

## 香川県産オリーブからの醸造用酵母の探索

誌名	研究報告 / 香川県産業技術センター
ISSN	13465236
著者名	大西, 茂彦
発行元	香川県産業技術センター
巻/号	17号
掲載ページ	p. 63-64
発行年月	2017年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



# 香川県産オリーブからの醸造用酵母の探索

大西 茂彦

香川県らしい特徴を持つ清酒を開発するために、香川県の特産農産物であるオリーブの果実表面から清酒醸造に利用可能な酵母を探索した。多数のオリーブ果実の表面を綿棒でふき取り集積培養し、トリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC) 染色法および二酸化炭素産生能による選抜を行った結果、*Saccharomyces cerevisiae* 2株 (OY-04, 05株) が得られた。これらの株を Brix 18 の麴汁培地、15°C で培養したところ 7% 前後のエタノールを生産することが確認された。

## 1 緒言

清酒の消費量が漸減を続ける中、他県メーカーでは従来製品と差別化した新製品開発が盛んに行われている。特に、地域に生育する花等から酵母を分離して清酒醸造を行う試みが多数報告されており<sup>1-4)</sup>、本県でも香川県らしい特徴を持つ清酒の開発が急務となっている。香川県の県花・県木であるオリーブは、約 100 年前に本県小豆島で初めて栽培が成功したことが知られている。このオリーブから酵母を分離して清酒を醸造することにより、香川県の特徴を前面に押し出した消費者イメージの良い新製品の開発が可能となる。そこで、本研究ではオリーブの実から醸造用酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の分離を試みたので報告する。

## 2 実験の方法

### 2. 1 培地の調製

#### 2. 1. 1 集積培養用培地

米麴(ヤマク食品) 200 g に蒸留水 800 mL を加え、55°C で 1 夜糖化させた。糖化液を No. 2 ろ紙でろ過後、1 分間煮沸し、セライトろ過して清澄な糖化液を得た。糖化液はグルコースで Brix 18 に調整した後、100 mL 容三角フラスコに分注してシリコ栓をし、115°C、10 分間オートクレーブした。滅菌した糖化液 100 mL に乳酸 400  $\mu$ L、アルコール滅菌したカゼイン 5 g を加え集積培養用培地とした。

#### 2. 1. 2 トリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC) 染色法用 TTC 下層培地

グルコース 10 g、ペプトン 2 g、酵母エキス 1.5 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 g を蒸留水 1 L に溶解後、塩酸で pH 5.5 に調整後、寒天 30 g を加え 115°C、10 分間オートクレーブした。殺菌した培地約 15 mL を直径 9 cm ペトリディッシュに分注し、固化させた。

#### 2. 1. 3 TTC 上層培地

蒸留水 100 mL にグルコース 5 g、トリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC) 0.5 g、寒天 15 g を加え、沸とう湯せん中で加熱、溶解させた。TTC 染色試験の際には、湯浴中で培地温度を 50°C に冷却した後、画線培養した TTC 下層培地に重層した。

#### 2. 1. 4 二酸化炭素産生能確認用培地

YPD 培地 (グルコース 2%、酵母エキス 0.45%、ペプトン 0.75%) とダーラム管を試験管に入れアルミキャップを

し、121°C、15 分間オートクレーブした。

### 2. 2 オリーブからの酵母分離および集積培養

オリーブ果実の表面をふき取り検査用綿棒 (ワイプチェック TE-302, 佐藤化成工業所) でふき取り、綿棒の附着物をリン酸緩衝生理食塩水 9 mL に懸濁したものを 100 mL 容三角フラスコ中の集積培養用培地に加え、30°C で静置培養した。三角フラスコは 1 日 1 回培養液を攪拌し、培養液の状態を観察した。

### 2. 3 TTC 染色法による酵母の選別

寒天培地上に形成された清酒酵母のコロニーはトリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC) を還元して赤色に着色する<sup>5)</sup>。これを利用して、集積培養で得られた酵母用真菌の選別を行った。集積培養した培養液を、白金線を用いて TTC 下層培地に画線した。画線した TTC 下層培地は 30°C、3 日間静置培養して真菌のコロニーを得た。培養後の TTC 下層培地に TTC 上層培地を重層し、30°C、2 時間放置し、コロニーの着色を評価した。

### 2. 4 二酸化炭素産生能による酵母の選別

酵母がエタノール発酵する際には二酸化炭素が生成することから、液体培養時の二酸化炭素の発生の有無を指標に酵母の選別を行った。二酸化炭素産生能確認用培地に TTC 染色法で濃い赤に着色したコロニーを 1 白金線植菌した。30°C、2 日間静置培養し、二酸化炭素の発生量を評価した。

### 2. 5 リボゾーム RNA 遺伝子 (rDNA) 領域の増幅による種の同定

分離した酵母の ITS1 領域のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は Fungal rDNA (ITS1) PCR Kit Fast (タカラバイオ) を用い、同キットのマニュアル<sup>6)</sup> に従って行った。ポジティブコントロールとして、上記キット付属の *S. cerevisiae* DNA も PCR 増幅した。PCR 増幅産物は、2% アガロースゲル電気泳動法 (x1 TBE 緩衝液、エチジウムブロマイド染色) に供し、泳動距離の比較を行った。

### 2. 6 アルコール生産性試験

分離した酵母を麴汁培地 (Brix 18) 7 mL に植菌して 15°C で 2 週間インキュベート後、培養液上清のアルコール濃度を分析した。アルコール分析は、水素炎イオン化検出器 (FID) 付きガスクロマトグラフを用い、内部標準法で定量した。

## 3 結果と考察

### 3. 1 オリーブ果実表面からの酵母分離

一般的に蜜のある花や糖質の多い果実から酵母を探索する場合には、花や果実を直接培地に投入して集積培養する。しかし、オリーブの果実には酵母の栄養源となる糖質がほとんど含まれていない。よって、オリーブの果実の表面に存在している酵母はそれほど多くないことが予想された。そこで、リン酸緩衝生理食塩水で湿らせたふき取り検査用綿棒「ワイブチェック」で多数のオリーブ果実の表面をふき取り(写真1)、綿棒の付着物を集積培養用培地に植菌することにより酵母の捕捉率向上を試みた。その結果、旺盛に発泡して懸濁した培養液が得られたのでTTC染色法に供した。



写真1 ワイブチェックによる酵母表面の拭取り

### 3. 2 分離酵母の選抜

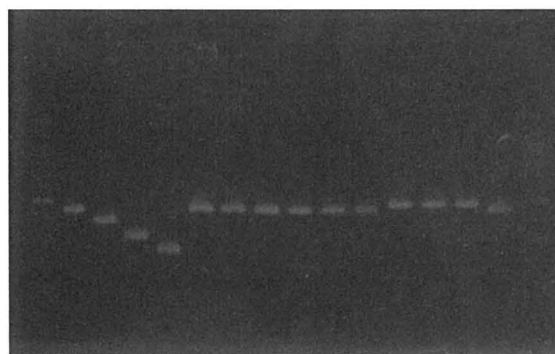
TTC染色法により、呼吸活性旺盛なきょうかい6号、7号、9号酵母は赤く染まり、野生酵母の大部分はピンク色に染まることが知られている<sup>9)</sup>。そこで、集積培養で得られた酵母をTTC染色法に供し、呼吸活性の旺盛な酵母を選別した。同試験で濃い赤に染まった酵母を二酸化炭素産性能確認試験に供した。30℃、2日間インキュベート後、発生した二酸化炭素によりダーラム管が浮上した株を高発酵性酵母として選抜した。

### 3. 3 分離された酵母の同定

二酸化炭素産性能確認試験により二酸化炭素の発生が確認された6株(OY-01~6)について、PCRによるrDNA ITS領域の増幅を行い、増幅産物を2%アガロースゲル電気泳動に供した(図1)。

電気泳動の結果、ポジティブコントロールである *S. cerevisiae* DNAのPCR増幅産物と同じ約450 kbのバンドを示す2株(レーン6~8(OY-04株)および9~11(OY-05株))が得られた。レーン3~5(OY-01~03株)およびレーン12~14(OY-06株)についてはPCR増幅産物の泳動距離から *S. cerevisiae* とは属の異なる酵母様真菌と推測された。

OY-04株およびOY-05株のPCR増幅産物のシークエンス情報(外部委託)から、これらの株が *S. cerevisiae* であることが確認された。



レーン 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

図1 rDNA ITS領域 PCR増幅産物の電気泳動

1:ラダーマーカー(100 bp), 2:*S. cerevisiae*(ポジティブコントロール), 3:OY-01, 4:OY-02, 5:OY-03, 6-8:OY-4, 9-11:OY-5, 12-14:OY-06, 15:*S. cerevisiae*(ポジティブコントロール), 16:ラダーマーカー(100 bp)

### 3. 4 分離酵母のアルコール生産能

OY-04株およびOY-05株をBrix 18の麹汁培地に植菌して15℃で培養を行った結果、OY-04株のアルコール生産能は7.4 g/100 mL、OY-05株は6.5 g/100 mLと低温でのアルコール生産性が確認された。

## 4 結言

香川県の特産農産物であるオリーブの果実表面から酵母を探索した結果、低温でアルコールを生産する *S. cerevisiae* 2株を得た。今後は、分離した酵母のキラ性を確認するとともに、小仕込み試験を行い製品レベルの味と香りを有する清酒の醸造が可能か確認する。

本研究は、香川県酒造組合からの受託研究として実施した。

## 参考文献

- 1) 数岡幸幸: 清酒製造用酵母の分離および実用化, 日本醸造協会誌, **110**, 298-305(2015).
- 2) 安田(吉野)庄子, 北本則行: 花からの *Saccharomyces cerevisiae* の選択的分離と遺伝的多様性, 日本食品科学工学会誌, **58**, 9, 433-439(2011).
- 3) 三井 俊, 伊藤彰敏, 山本晃司, 秋山和範, 加藤雅士: カーネーションから分離した酵母を利用した純米酒の開発, あいち産業科学技術総合センター研究報告, 84-87(2013).
- 4) 大橋正孝, 都築正男, 清水浩美, 松澤一幸, 藤野千代, 鈴木孝仁, 岩国伸一: ナラノヤエザクラの花からの有用な酵母の分離及びそれを使った清酒の開発, 奈良県工業技術センター研究報告, **35**, 35-38(2009).
- 5) 注解編集委員会: 第三回改正国税庁所定分析法注解, 305-306(1974).
- 6) TaKaRa Fungal rDNA (ITS1) PCR Kit Fast 説明書