

蔵付き酵母分離へのLoop-mediated Isothermal Amplification Method (LAMP)法の利用と分離株の醸造特性

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	畠山,明 渡邊,陽介 有本,圭吾 栗林,喬 原,崇 城,斗志夫
発行元	日本醸造協会
巻/号	115巻9号
巻号補足	
掲載ページ	p. 537-544
発行年月	2020年9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



蔵付き酵母分離への Loop-mediated Isothermal Amplification Method (LAMP) 法の利用と分離株の醸造特性

畠山 明^{1,2*}・渡邊陽介¹・有本圭吾¹・
栗林 喬^{3,4*}・原 崇⁵・城斗志夫^{5*}

(¹ 吉乃川株式会社, ² 新潟大学自然科学研究科, ³ 新潟県醸造試験場, ⁴ 現 新潟食料農業大学, ⁵ 新潟大学農学部)

令和元年 12 月 13 日受理

Screening and Characterization of a House Yeast Strain for Sake Brewing Using the Loop-Mediated Isothermal Amplification Method

Akira HATAKEYAMA^{1,2*}, Yosuke WATANABE¹,
Keigo ARIMOTO¹, Takashi KURIBAYASHI^{3,4*},
Takashi HARA⁵, Toshio JOH^{5*}

(¹Yoshinogawa Co., Ltd., 4-8-12, Settaya, Nagaoka-shi, Niigata, 940-1105, Japan, ²Graduate School of Science and Technology, Niigata University, 2-8050 Ikarashi, Nishi-ku, Niigata-shi, Niigata, 950-2181, Japan, ³Niigata Prefectural Sake Research Institute, 2-5932-133, Suido-cho, Chuoh-ku, Niigata-shi, Niigata, 951-8121, Japan, ⁴Present address, Niigata Agro-Food University, 2416, Hiranedai, Tainai-shi, Niigata, 959-2702, Japan, ⁵Faculty of Agriculture, Niigata University, 2-8050 Ikarashi, Nishi-ku, Niigata-shi, Niigata, 950-2181, Japan.)

*Corresponding authors:

A. Hatakeyama; Tel: +81-258-35-3000; Fax: +81-258-36-1107
E-mail: a-hatakeyama@yoshi1548.jp

T. Kuribayashi; Tel: +81-245-28-9851; Fax: +81-245-28-9851
E-mail: takashi-kuribayashi@nafu.ac.jp

T. Joh; Tel: +81-25-262-6640; Fax: +81-25-262-6640
E-mail: joh@agr.niigata-u.ac.jp

We isolated a house yeast strain from *shubo* and *moromi* mash in the Yoshinogawa Brewery (founded in 1548), using triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining and loop-mediated iso-

thermal amplification targeting the *K7_02212* and *PPT1* genes. The isolated yeast, YS4, was identified as a *Saccharomyces cerevisiae* strain by analysis of the 26S rDNA. The physiological characteristics (TTC stainability, acid phosphatase activity, cell surface hydrophobicity, and ratio of spore formation) of YS4 differed from those of common Kyokai sake brewing yeast strains. When YS4 was used to make sake, it produced a unique taste.

Key words: Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法・醸造用酵母・識別・蔵付き酵母・清酒酵母

緒言

清酒製造において、清酒酵母は、原料米と麴菌とともに清酒の品質を決定する大きな要因である。現在、一般的な清酒製造に用いられる清酒酵母は、公益財団法人日本醸造協会から配布されているきょうかい酵母である場合が多い。きょうかい酵母は優れた醸造特性を有し、清酒の安全な醸造や高品質化に大きく貢献している。近年、きょうかい7号のゲノムの解析が行われ、現在日本醸造協会より頒布の行われているきょうかい7号、701号、9号、901号、10号、1001号などのきょうかい7号系清酒酵母 (K7 グループ)、現在頒布が行われていないきょうかい1号～5号及び8号などのK7 グループ以外の清酒酵母、清酒酵母以外の酵母において特徴的に存在する遺伝子が明らかとなっている¹⁾。これまでに我々は全てのきょうかい清酒酵母に共通して存在する *K7_02212* 遺伝子 (機能未知) と、K7 グループで欠損しているプロテインホスファターゼ遺伝子 (*PPT1*) を検出の標的とした Loop-mediated Isothermal Amplification Method (LAMP) 法を用いた醸造用酵母の識別法を開発した²⁾。この識別法を用いることにより、*K7_02212* 遺伝子を持つが *PPT1* 遺伝子を持たない K7 グループ系清酒酵母、*K7_02212* 遺伝子と *PPT1* 遺伝子を両方持つ K7 グループ以外の清酒酵母、*K7_02212* 遺伝子を持たないが *PPT1* 遺伝子を持つその他の酵母を識別することが可能である。また、LAMP 法は、標的遺伝子の6つの領域に対して4種類のプライマーを設定し、鎖置

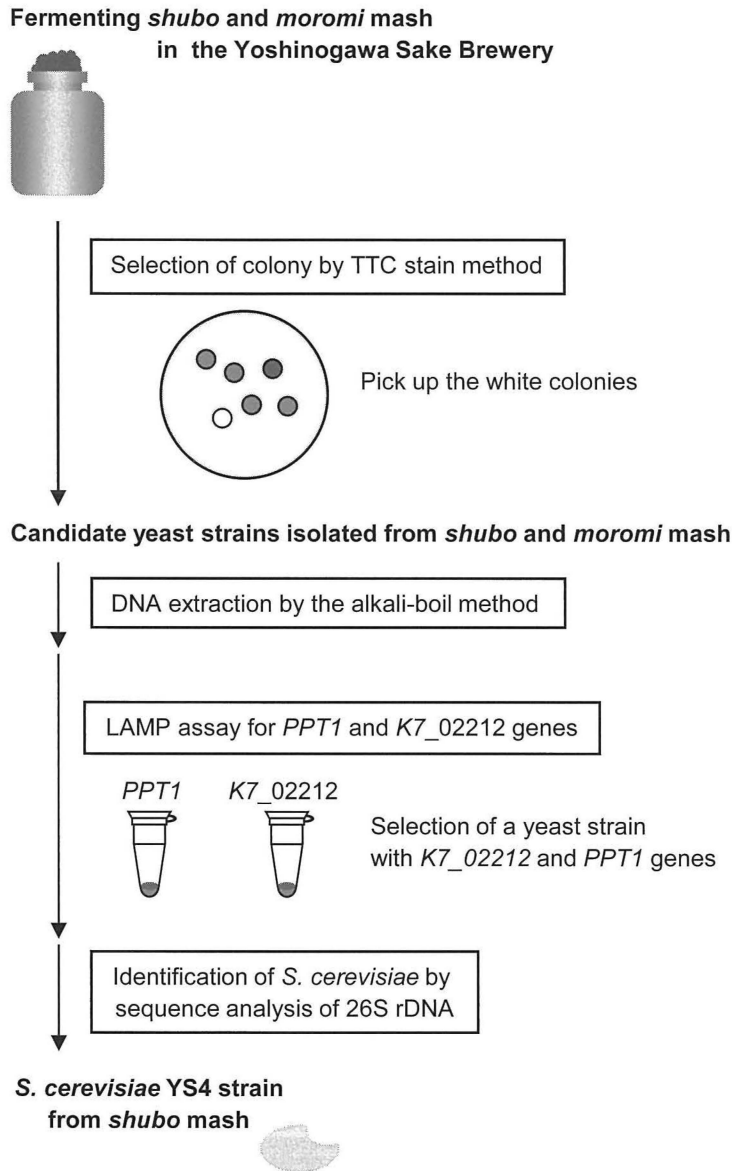


Fig. 1 Screening and identification scheme of a house yeast strain.

換 DNA ポリメラーゼ反応を利用して反応液を一定温度で短時間保温するだけで効率よく遺伝子を増幅できるため、増幅産物を目視で確認可能な正確、簡便、迅速な手法である。このため、現在使用されている清酒酵母以外の酵母を自然界や蔵元の醸造環境中から分離する場合、簡便なスクリーニング法として応用が期待できる。

酒類の多様化に伴い、より個性的でブランド力ある

清酒製品が重要になるなか、酒造場の酒造道具や作業場内に存在する蔵付き酵母を利用することによって、製造者間における差別化を図る試みがなされている³⁾。きょうかい酵母の頒布事業の開始以前は、固有の蔵付き酵母で清酒醸造を行っていたことから、現代において、これら蔵付き酵母を簡便に分離し、清酒製造に用いることができれば、清酒製品の高付加価値の創造を可能とし、清酒の需要拡大に寄与できるものと期待で

きる。

そこで本研究では、1548 年創業の新潟県で最古の歴史を有する吉乃川株式会社の酒母及び醪から、この LAMP 法を利用して、蔵付き酵母の分離を試み、K7 グループ系清酒酵母とは異なる *K7_02212* 遺伝子と *PPT1* 遺伝子の両方を持つ酵母を選抜することに成功した。さらに、得られた酵母の TTC (2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride) 染色性、酸性ホスファターゼ活性の有無、細胞膜表面の疎水性、孢子形成率といった生理学的特徴が、K7 グループ以外のきょうかい酵母とも異なることを明らかにするとともに、単離した酵母を用いて実用規模の清酒製造が可能であったので報告する。

実験方法

1. 使用酵母、培地および試薬

独立行政法人酒類総合研究所より分譲されたワイン酵母 KW-1、清酒酵母きょうかい 1 号、2 号、3 号、4 号、5 号、8 号、公益財団法人日本醸造協会より購入した清酒酵母きょうかい 7 号、901 号を使用した。酵母の培養には YPD 液体培地 (1% 酵母エキス、2% ポリペプトン、2% グルコース) を使用した。試薬は、特に記載のない限り富士フィルム和光純薬製の特級グレードの試薬を使用した。

2. 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の分離と同定

酵母のスクリーニング方法を Fig. 1 に示す。吉乃川株式会社において、平成 30BY に製造された酒母及び醪を蔵付き酵母の分離源とし、それぞれ仕込後 10 日目にサンプリングを行った。サンプリングを行った酒母及び醪は、きょうかい 701 号や 901 号、1001 号など、K7 グループ系清酒酵母を使用したものであった。

採取した酒母および醪を 1 プレートあたり 1×10^2 cells となるように滅菌水で希釈した後、1 サンプルあたり 3 プレートの TTC 下層培地 (1% グルコース、0.2% ポリペプトン、0.15% 酵母エキス、0.1% KH_2PO_4 、0.04% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2% agar, pH 5.5) に植菌し、30℃で 2 日間培養した。培養後、TTC 上層培地 (0.5% グルコース、0.05% TTC、2% agar) を重層してコロニーの染色性を確認し⁴⁾、白色を呈したコロニーを単離した。つづいて、これら分離株における、きょうかい清酒酵母で特徴的に確認される *K7_02212* 遺伝子と、K7 グループ系清酒酵母で欠失しているが、他の醸造用

酵母には存在する *PPT1* 遺伝子の有無を、畠山らの報告に従い LAMP 法により検出した²⁾。標的遺伝子の有無が K7 グループ系清酒酵母とは異なる菌株を選抜し、さらに 26S rDNA 遺伝子の D1/D2 領域の部分塩基配列に基づく同定解析を行った。PCR による 26S rDNA 遺伝子の D1/D2 領域の増幅には、NL-1 プライマー (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') と、NL-4 プライマー (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') を用いた⁵⁾。得られた塩基配列について *Saccharomyces cerevisiae* との相同性を確認し、99% 以上の相同性を示す株を取得した。

3. K7 グループ以外の清酒酵母との識別

分離株と K7 グループ以外の清酒酵母の識別を行うため、孢子形成率⁶⁾、リン酸存在下での構成的酸性ホスファターゼ活性の有無⁷⁾、高泡形成性に関する細胞膜表面の疎水性を調査し、比較を行った。孢子形成率は各菌株を孢子形成培地 (0.5% 酢酸ナトリウム、2% 寒天) で 7 日間培養後、300 個の細胞を観察して算出した。細胞膜表面の疎水性は布川らの方法⁸⁾を参考に、各酵母菌体の懸濁液に等量のヘキサンを加え、激しく攪拌後、水層とヘキサン層のどちらに菌体に移行するかで判別した。

5. キラー性試験

YS4 株を YPD 平板培地に、きょうかい 901 号と交差するように接種し、30℃で 48 時間培養し、交錯点のクリアゾーンの有無により、キラー性⁹⁾を判定した。

6. フェルラ酸脱炭酸能の発現に関わる *FDC1* 遺伝子変異の解析

清酒酵母におけるフェルラ酸からの 4-ビニルゲアイアコール非生産性の要因である *FDC1* (ferulic acid decarboxylase gene) 遺伝子変異 (c.160A>T) の有無を、畠山らの PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法により確認した¹⁰⁾。

7. 清酒小仕込試験および実規模醸造試験

分離株による清酒の小仕込試験は、難波らの方法をもとに総米 200 g の仕込を 4 回行った。対照としてきょうかい 901 号を用いて、15℃一定で発酵を行った¹¹⁾。発酵経過は炭酸ガス減少量を測定することにより観察した。炭酸ガス減少量が 60 g に達した時点で、醪を遠心分離 (3000×g, 15 min) し、上清を製成酒として取得した。

さらに、分離株の実規模醸造試験は総米 100 kg の

Table 1 Feed program of sub-industrial scale sake brewing

Materials	Seed mash (Mizu-koji)	Sake mash			Total
		1st (Soe)	2nd (Naka)	3rd (Tome)	
Rice for steaming (kg)	0	15	25	40	80
Rice for koji (kg)	5	0	5	10	20
Water (L)	30	0	50	60	140
90% (v/v) Lactic acid (mL)	90	0	0	0	90
Yeast (cells)	6×10^{11}	-	-	-	6×10^{11}

仕込で行った。精米歩合 65% の一般米を使用し、Table 1 の仕込配合により三段仕込とした。留仕込時の温度を 9℃ とし、留仕込以降は醪の発酵温度を 1℃ / 日で上昇させ、最高温度 15℃ で 2 日間保持した後、醪温度を 1℃ / 日で下降させ 9℃ 一定とし、アルコール度数が 17% に達するまで発酵を行った。発酵経過は醪から定期的にサンプリングを行い、アルコール度数および日本酒度を測定した。醪を遠心分離 (3000 × g, 15 min) で上槽し、上清を製成酒として取得した。

醸造した清酒の一般成分は国税庁所定分析法に従い¹²⁾、香気成分は酒類総合研究所標準分析法注解に従って¹³⁾、それぞれ分析した。有機酸については、Shim pack SCR102H (300 mm × 8 mm i.d.) を用いた HPLC 有機酸分析システム (島津製作所) で分析を行った。0.45 μm メンブレンフィルター (Cellulose Acetate, 孔径 0.45 μm, ADVANTEC) で、ろ過した各試料 10 μL を HPLC に供した。移動相には 5 mM *p*-トルエンスルホン酸水溶液を用い、カラム温度 40℃、流速 0.8 mL/min で溶出し、5 mM *p*-トルエンスルホン酸および 100 μM EDTA を含む 20 mM Bis-tris 緩衝液によるポストカラム pH 緩衝化電気伝導度検出法により分析した。各有機酸濃度は、標準品 (富士フィルム和光純薬) のピーク面積との比較により算出した。

5. 官能評価

5 人の熟練したパネラーにより製成酒の評価を行い、5 点法による酒質の評価と、香りと味に関するコメントを得た。

結果及び考察

1. 酒母及び醪からの蔵付き酵母分離

吉乃川株式会社の酒母及び醪から、Fig. 1 に示した K7 グループ系清酒酵母以外の酵母の分離方法と、得られた酵母の生理学的性質の解析によって、蔵付き酵

母の単離を試みた。

一次スクリーニングとして、酒母及び醪に使用した K7 グループ系清酒酵母とは異なる酵母を分離するため TTC 染色試験を行った。K7 グループ系清酒酵母は TTC 還元能を有し TTC 染色でコロニーが赤色を呈するが、その他の酵母では TTC を還元できずコロニーが白色を呈する⁴⁾ため、TTC 染色試験で白色を呈したコロニーの酵母を分離した。酒母 5 本、醪 15 本からサンプル採取を行い、最終的に 6×10^3 個のコロニーから 6 個の白色コロニーが得られた。酒母より取得した菌株を YS4 株、醪より取得した菌株を YM29 株・YM34 株・YM36 株・YM55 株・YM57 株とした。

次に、得られた酵母が、K7 グループ系清酒酵母とは異なる酵母であるか識別するため、K7_02212 遺伝子と PPT1 遺伝子を標的とした LAMP 法による 2 次スクリーニングを行った。その結果を Fig. 2 に示す。得られた 6 株の中で、唯一 YS4 株が、酒母及び醪に使用した K7 グループ系清酒酵母とは異なり、K7_02212 遺伝子と PPT1 遺伝子の両方を持っていた。また、YS4 株の 26S rDNA 遺伝子の D1/D2 領域の塩基配列を解析した結果、*S. cerevisiae* の配列と完全に一致したため、YS4 株は *S. cerevisiae* と同定された。

YS4 株以外の取得菌株は、TTC 染色性がきょうかい酵母とは異なるものの、K7_02212 遺伝子を持つが、PPT1 遺伝子は持たないという特徴は K7 グループ系清酒酵母と同様であった。稲橋らは、生育条件の影響によっては、きょうかい酵母から TTC 染色で白色を呈する呼吸欠損株変異株が生じることを報告している¹⁴⁾。よって、YS4 株以外の菌株は、清酒製造のために、現在頒布されている清酒酵母が変異した菌株であると推察された。

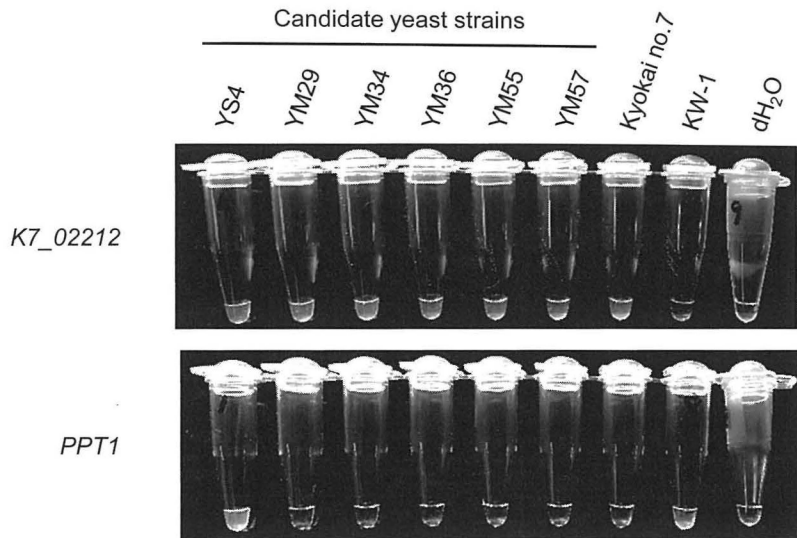


Fig. 2 LAMP analysis of *K7_02212* and *PPT1* genes for candidate house yeast strains from sake mash in the Yoshinogawa Sake Brewery. Kyokai no.7 and KW-1 were used as the positive controls for *K7_02212* and *PPT1*, respectively.

Table 2 Characteristic of Kyokai sake yeasts and YS4

Yeast strain	Acid phosphatase activity	Cell surface hydrophobicity test*	Ratio of spore formation(%)
YS4	+	W	<1.0
Kyokai no.1	+	H	<1.0
Kyokai no.2	-	W	16.2
Kyokai no.3	+	H	<1.0
Kyokai no.4	+	H	6.2
Kyokai no.5	+	H	<1.0
Kyokai no.7	-	H	3.2
Kyokai no.8	+	W	20.3

*Cell surface hydrophobicity test depends on the distribution of yeast cells in a water-hexane two phase system⁹⁾. H, hydrophobicity; W, hydrophilicity.

YS4と同様に、*K7_02212* 遺伝子と *PPT1* 遺伝子の両方を持つ、きょうかい1～5号及び8号との識別を行うため、各菌株のリン酸存在下での構成的酸性ホスファターゼ活性の有無、清酒醪の高泡形成に関与する細胞膜表面の疎水度及び胞子形成率を調べた。YS4株は、高リン酸培地における構成的酸性ホスファターゼ活性を有しており、細胞膜表面の疎水度は低く、胞子形成率は低い値を示した (Table 2)。きょうかい1～5号及び8号のなかで、全ての特徴がYS4株と合致する菌株は存在しなかった (Table 2)。これらの結果より、YS4株は、現在までに頒布されたきょうか

い清酒酵母とは異なる菌株であることが強く示唆されることから、YS4株を蔵付き酵母と判断した。本酵母が分離された酒造場は、創業から470年余りに渡って清酒製造を続けており、長期に渡る清酒醸造の環境の中で、YS4株は独自の進化を遂げてきた可能性もある。この点に関しては、酵母の系統解析を含め、次世代シーケンス解析などを用いて、今後更なる検討が必要である。

YS4株について、清酒醸造に影響を及ぼす性質である清酒酵母に対するキラー性、及び清酒中における煙臭生成の原因となる *FDCI* 遺伝子の欠失変異

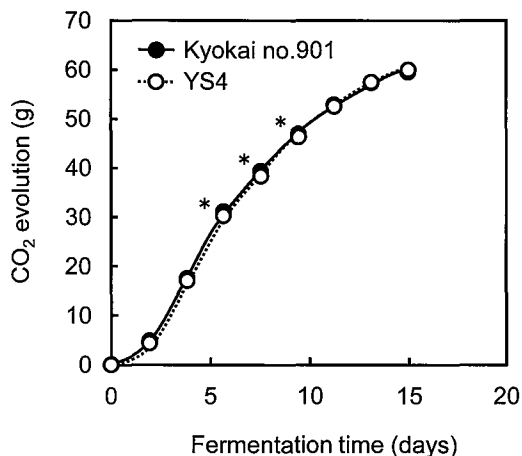


Fig. 3 CO₂ evolution of sake made with Kyokai no.901 and YS4 in small-scale brewing. Values of small scale brewing are averages from four independent brewing experiments. Asterisks (*) indicate a 5% level of significance (Student's t-test).

(c.160A>T) についても調べた。清酒製造場内にキラ一性酵母を持ち込むことは、既存の清酒酵母の生育を阻害する可能性があるが、YS4 株はキラ一性を示さず、酒造場内での使用に特別な配慮を必要としない菌株であった。

さらに YS4 株には、きょうかい 7 号や 9 号といっ

た清酒酵母と同様に、*FDCI* 遺伝子のナンセンス変異 (c.160A>T) が存在することから、フェルラ酸脱炭酸能を有さず、清酒製造において煙臭等の原因となる 4-ビニルグアイアコールを生成する可能性が低い酵母であることもわかった。しかし、この点に関しては、本酵母のフェルラ酸脱炭酸酵素の活性や実際の 4-ビニルグアイアコールの生産性など、今後詳細に検討する必要がある。

近年では、草花等を分離源とする自然界由来酵母の開発が広く行われているが、その目的の一つに、既存清酒酵母とは異なる醸造特性を有する酵母の開発という側面がある。本研究において、TTC 染色性を指標に酵母の分離を行ったが、検出された酵母の多くは酒造場で一般に用いられている K7 グループ系清酒酵母であったことから、既存清酒酵母以外の酵母の分離を目的とする場合には、遺伝子レベルによる酵母の識別・同定が重要である。今回、我々が用いた LAMP 法は、サーマルサイクラーを必要としない等温反応 (60 ~ 65℃ 一定) による遺伝子増幅法であり、遺伝子増幅の有無も目視で確認できる (Fig. 2)。自然界や蔵付き酵母の分離の際、分離株と既存清酒酵母との簡易的な識別法として *AWAI*・*SSUI*・*BIO6*・*FLOI* 遺伝子を利用した PCR 法が使用されているが¹⁵⁾、本 LAMP 法は、既存清酒酵母以外の酵母をより簡便に識別することができた。したがって、高価な分析機器の導入が難しい酒造場においても、TTC 染色法によ

Table 3 Analysis of sake made using YS4 and Kyokai no.901 in sake brewing tests

Yeast strain	CO ₂ evolution (g)	General properties				Flavor components (mg/L)				Sensory score ^a
		<i>Sake</i> meter	Alcohol (%)	Acidity (mL)	Amino acidity (mL)	Isobutyl alcohol	Isoamyl alcohol	Isoamyl acetate	Ethyl caproate	
Small scale brewing (200 g of total rice)										
YS4	60.6 ± 0.2	-9.5* ± 0.4	17.1 ± 0.1	3.5* ± 0.0	1.5* ± 0.1	146.1* ± 5.2	278.4* ± 5.6	6.3* ± 0.3	0.7 ± 0.0	2.2* ± 0.4
Kyokai No.901	60.4 ± 0.3	-14.0 ± 0.5	16.9 ± 0.1	3.2 ± 0.0	2.0 ± 0.0	90.6 ± 2.6	206.0 ± 5.4	8.7 ± 0.3	0.8 ± 0.0	1.4 ± 0.5
Sub-industrial scale brewing (100 kg of total rice)										
YS4	N.D.	+6.4	17.0	2.6	1.0	116.9	237.8	3.8	0.5	2.4 ± 0.40

Values of small scale brewing are averages from 4 independent brewing experiments.

^a Sensory scores were awarded based on a 5-point scale, with a score of 1 point indicating the highest quality. Scores are the averages of the points awarded by the 5 testers.

*Significant difference compared to kyokai no. 901 (Student's t-test, $p < 0.05$).

N.D., no data.

Table 4 Concentrations of organic acids in sake made using YS4 and Kyokai no.901

Yeast strain	Citric acid	Pyruvic acid	Malic acid	Succinic acid	Lactic acid
Small scale brewing (200 g of total rice)					
YS4	94.3* ± 5.2	423.5* ± 8.5	266.4* ± 11.2	426.4* ± 12.5	1372.2* ± 47.8
Kyokai, No.901	67.4 ± 1.2	258.1 ± 7.4	405.6 ± 8.0	498.6 ± 26.8	1137.3 ± 67.7
Sub-industrial scale brewing (100 kg of total rice)					
YS4	134.2	382.8	208.0	418.4	1229.0

Values of small scale brewing are averages from 4 independent brewing experiments.

* Significant difference compared to kyokai no. 901 (Student's t-test, $p < 0.05$).

る酵母のスクリーニングと本 LAMP 法を用いることによって、自然界由来酵母や蔵付き酵母の分離を行うことが可能となる。

2. 蔵付き酵母 YS4 株の清酒醸造特性

YS4 株の清酒醸造特性を確認するため、対照として K7 グループ系清酒酵母であるきょうかい 901 号を用いて総米 200 g の小仕込試験を行った。小仕込試験における発酵経過を Fig. 3 に示した。きょうかい 901 号と比較して、YS4 株の発酵経過（炭酸ガス減量）は、6, 8, 10 日目に僅か 1.1 g 以内であるものの有意に低かったが、12 日目以降には有意差は認められなくなり、結果的にきょうかい 901 号と同様の発酵経過となった。得られた製成酒の一般成分を比較したところ、アルコール分は両菌株で大きな変化はなかったが、YS4 株はきょうかい 901 号と比較すると、日本酒度と酸度が有意に高く、アミノ酸度が有意に低かった (Table 3)。また、香氣成分に関しては、きょうかい 901 号に比べ YS4 株のイソブタノールとイソアミルアルコールといった高級アルコールの値が有意に高く、酢酸イソアミルが有意に低い値であった (Table 3)。この香氣成分の傾向は、既存の清酒酵母とは異なり、自然界より分離された酵母の醸造特性に類似しており¹⁶⁾、個性的な酒質につながるものと期待できる。

さらに、総米 100 kg の実地醸造試験を行った。YS4 株の発酵の立ち上がりには問題なく、また発酵期間中に遅れはみられず、上槽まで順調に発酵した（データ示さず）。製成酒の一般成分および香氣成分に関しても、酸度がやや高いもののその他成分に関しては一般的な清酒の範囲内の値であった¹⁷⁾。5 名のパネラーによる官能評価試験を行ったところ、小仕込試験の製成酒において、YS4 株の製成酒はきょうかい 901

号の製成酒と比較すると、5 点法での評価は有意に低かったものの、その評点は 2.2 点であり、酒質として大きな欠点はなかった (Table 3)。また、小仕込試験と実地醸造試験の両方において、YS4 株の製成酒では「酸味があり軽快」や「爽快な酸味」といった酸味に関する指摘がなされた。小仕込試験の製成酒の有機酸分析の結果、YS4 株はきょうかい 901 号と比較して、クエン酸、ピルビン酸、乳酸の生成量が有意に多く、リンゴ酸、コハク酸の生成量が有意に少なかった。また、YS4 株の実地醸造試験の製成酒においても有機酸組成に同様の傾向がみられた (Table 4)。YS4 株ときょうかい 901 号では、TCA 回路において、有機酸生成に関わる酵素の活性に差があるものと推察されるが、今後詳細な検討が必要である。試験醸造におけるこれらの結果から、蔵付き酵母 YS4 株は、実用可能な醸造特性を有し、酸味に特徴をもった清酒を生成することが示唆された。

現在では、優良清酒酵母を用いて酵母純度を高めた清酒製造が一般的であり、清酒品質の向上のための重要な技術となっている。一方で、泡なし酵母の開発など、醸造技術発達の過渡期であった 1970～1980 年代にかけては、日本各地の酒造場より清酒酵母が多数分離され、様々な醸造特性を示すことが報告されていた^{18,19)}。したがって、自然界の分離源と同様に、清酒製造場も個性的な酵母の分離源として期待できる。さらに、本手法を用いることにより、「蔵付き酵母」という消費者にとってわかりやすいストーリー性も清酒製品に付与できることから、魅力的な商品の開発にも役立つものと考えられる。今後は YS4 株の醸造特性をさらに詳細に調査するとともに、本酵母株を用いた清酒製品の開発を行う予定である。

要 約

1548年に創業した吉乃川株式会社の酒母及び醪から、TTC染色法と*K7_02212*遺伝子および*PPT1*遺伝子を標的とするLAMP法をスクリーニング法として利用し、 6×10^3 株の酵母より、*K7_02212*遺伝子と*PPT1*遺伝子の両方を有するK7グループ系清酒酵母とは異なるYS4株を分離した。YS4株の生理学的特徴（TTC染色性、酸性ホスファターゼ活性、細胞膜表面の疎水度、孢子形成率）が、K7グループ以外のきょうかい清酒酵母とも異なることが強く示唆されたため、蔵付き酵母と判断した。また、YS4株は*Saccharomyces cerevisiae*として同定された。実規模醸造試験の結果、YS4株からは酸味に特徴をもった酒質の清酒が得られることがわかった。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、有益なご助言を賜りました新潟県醸造試験場 場長 金桶光起先生をはじめ職員の皆様に心より感謝申し上げます。また、本稿の投稿を許可いただいた吉乃川株式会社 峰政祐己社長、並びに、吉乃川株式会社の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1) 赤尾健：醸協，**107**，366-380（2012）
- 2) 畠山明，遣水潤，今井裕貴，栗林喬，高橋方夫：醸協，**112**，707-713（2017）
- 3) 大野剛，渡邊誠衛，上原智美，高橋仁：秋田県総合食品研究センター報告，**18**，1-8（2016）
- 4) 古川敏郎，秋山裕一：農化，**37**，398-402（1963）
- 5) Sugita, T. and Takashima, M. : *Med. Mycol. J.* **52**, 107-115（2011）

- 6) 田仁祥信，友弘幸男，宮田章，太田一良，林田晋策：醸協，**84**，407-412（1989）
- 7) Toh-e A. and Ohshima, Y. : *J. Bacteriol.*, **120**, 608-617（1974）
- 8) 布川弥太郎，大内弘造：化学と生物，**11**，216-224（1973）
- 9) 三井俊，小野奈津子，安田庄子，伊藤彰敏，山本晃司：あいち産業科学技術総合センター研究報告，68-71（2014）
- 10) 畠山明，渡邊陽介，有本圭吾，原崇，城斗志夫：醸協，**115**，印刷中（2020）
- 11) 難波康之祐，小幡孝之，萱島進，山崎与四郎，村上光彦，下田高久：醸協，**73**，295-300（1978）
- 12) 注解編集委員会編：第四回 改正国税庁所定分析法注解（財団法人日本醸造協会，東京）（1993）
- 13) 標準分析法注解編集委員会編：酒類総合研究所標準分析法注解（公益財団法人日本醸造協会，東京）（2017）
- 14) 稲橋正明，吉田清，蓼沼誠：醸協，**94**，1006-1015（1999）
- 15) Fujihara, H., Hino, M., Takashita, H., Kajwara, Y., Okamoto, K., and Furukawa, K. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**, 1086-1089（2014）
- 16) 中川智行，内田みなみ，平井菜未，奥村真衣，吉村明浩，澤井美伯，正木和夫，二神泰基，玉置尚徳，向田潤，三井亮司，稲垣瑞穂，島田昌也，鈴木徹，杉山誠，早川享志：醸協，**114**，43-52（2019）
- 17) 公益財団法人 日本醸造協会編：醸造物の成分（1999）
- 18) 秋山裕一，熊谷知栄子，田中良彦，大内弘造：醸協，**66**，516-522（1971）
- 19) 後藤邦康，上田護国，中村武司，原昌道，吉沢淑：醸協，**81**，189-193（1986）