

# 五島つばき酵母を活用した加工食品の開発

食品・環境科	主任研究員	松本周三
食品・環境科	主任研究員	横山智栄
食品・環境科	研究員	晦日房和
応用技術部	部長	河村俊哉

五島市商工会

樺の島として有名な五島列島でヤブツバキの花等から *Saccharomyces cerevisiae* が分離され、「五島つばき酵母」と名付けられた。これらの酵母を利用した酒類を開発するため、吟醸香の主要な香気成分である、カプロン酸エチルを高生産する酵母の育種を行った。紫外線照射により変異処理を行った五島つばき酵母を、セルレニン5  $\mu\text{g/mL}$  を含む YPD 寒天培地で培養し、コロニーを形成したセルレニン耐性株、15 株をカプロン酸エチル高生産候補株として分離した。これらの候補株で麹エキス培地を発酵させ、カプロン酸エチル濃度を GC/MS で分析した。その結果、親株よりカプロン酸エチルを高生産する酵母 4 株を分離した。

## 1. 緒言

日本有数の樺の島として有名な五島列島は、約 900 万本のヤブツバキが自生しており、樺を活用した地域振興の機運が高まっている。長崎県では、これまでに新規搾油法によるツバキ油やツバキの葉を活かしたツバキ茶の開発を行ってきたが、引き続き、新たな需要を生み出す商品の開発が望まれている。五島市商工会においては、そのような期待を受け、樺に関連する新たな地域資源として、ヤブツバキの花等から複数の酵母、*Saccharomyces cerevisiae* を分離した。これらを「五島つばき酵母」と命名し、酵母を活用した加工食品を開発するため、平成 26 年度から工業技術センターと五島市商工会で共同研究を開始した。

酵母を利用した食品としては、パン、醤油、味噌、酒類等が挙げられる。そのうちの酒類については、近年、販売数量が減少を続けており、消費をいかに取り込むかが課題の 1 つとなっている。幅広い嗜好に対応するために製品を多様化し、さらに市場で販売されている製品との差別化を図る必要がある。その方法の一つとして、新たな酵母の開発が数多く行われている。各県では、地域性を活かした独自酵母の開発が進められており、長崎県においても香気や呈味に特徴を有した酵母の開発が望まれている。そこで、本研究では地域特性を活かしたこの五島つばき酵母を親株にして、吟醸香の主要な香気成分であるカプロン酸エチル高生産酵母の育種を行った。カプロン酸エチルを生産するにはその前駆体であるカプロン酸が必要となるが、セルレニンに耐性を有する株が、カプロン酸をはじめと

した脂肪酸を高生産することが知られている<sup>[1]</sup>。よって、セルレニン耐性株の分離及びそれらの菌株からのカプロン酸エチル高生産酵母の選抜を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 セルレニン耐性株の分離

親株には五島つばき酵母の中からアルコール耐性が高い菌株を使用した。変異処理は紫外線照射により行った。YPD 液体培地で 30℃、24 時間静置培養した五島つばき酵母を 10<sup>6</sup> cell/mL になるよう希釈し、直径 45 mm のシャーレに 10 mL 広げてから紫外線を照射した。ピーク波長 256 nm、電力 15W の紫外線ランプを用い、生菌率が 1% 以下になるように、光源からシャーレまでの距離は 18 cm、照射時間は 180 秒間とした。紫外線照射した懸濁液を適宜濃縮して、セルレニン 2  $\mu\text{g/mL}$  を含む YPD 寒天培地に接種し、30℃、48 時間培養した。径の大きいコロニーを形成した菌株を釣菌し、YPD 液体培地で 30℃、24 時間静置培養した。それらを再度、セルレニン 1、3、5  $\mu\text{g/mL}$  を含む YPD 寒天培地に接種し、30℃、48 時間培養した。セルレニン 5  $\mu\text{g/mL}$  以上でコロニーを形成した菌株をセルレニン耐性株として、-80℃で保存した。

### 2.2 カプロン酸エチル高生産酵母の選抜

各セルレニン耐性を有する 15 株、親株、きょうかい酵母 901 号を YPD 液体培地 0.5 mL に接種した。30℃、48 時間、静置培養後、遠心分離 (2,000 × g、5 分間) し、上清を除去した。生理食塩水 1 mL を加えて菌体を洗

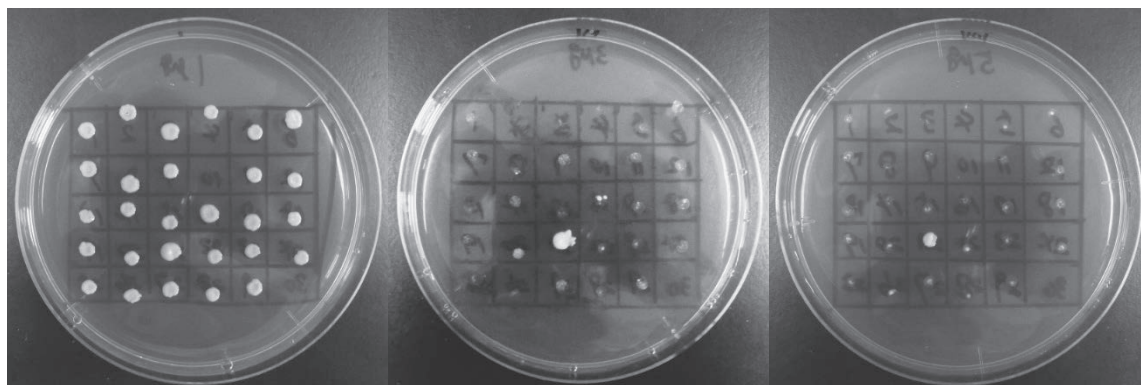


図1 セルレニン耐性株のYPD寒天培地上のコロニー  
左からセルレニン濃度1、3、5 µg/mL

浄後、再度、遠心分離 (2,000×g、5分間) し、上清を除去した。洗浄は2回行った。沈殿した菌体を最小容量の滅菌水で懸濁し、Brix 20% に調製した麴エキス培地 5 mL に添加した。30℃、14日間、静置培養後、上清をGC/MSで分析した。装置は450GC-240MS system (バリアン)、カラムはInertCap Pure-WAX (内径0.25 mm、長さ60 m、膜厚0.25 µm) (GLサイエンス株) を用いた。カラムオープン温度は50℃で10分間保持し、180℃まで10℃/分、220℃まで20℃/分で昇温し、5分間保持した。注入口温度は220℃、注入方法はスプリット、スプリット比10:1、キャリアガスはHe、流速は1.2 mL/分で分析した。試料は20 mLバイアルに上清0.9 mL、カプロン酸メチルを10% エタノール溶液で0.1 mg/L に調製した内部標準液0.1 mL を添加した。50℃、20分間保温し、上部気相を900 µL 注入した。

### 3. 結果及び考察

図1に各濃度になるようにセルレニンを添加したYPD寒天培地上における、変異処理株のコロニー形成の様子を示す。セルレニン1 µg/mL では、候補株の多くが径の大きいコロニーを形成した。濃度が上昇するにつれて増殖が阻害され、セルレニン5 µg/mL でも増殖できる耐性株をピックアップした。この操作を繰り返し、五島つばき酵母から、カプロン酸エチルを高生産する候補株として15株のセルレニン耐性株を分離した。

これらの候補株を用いて、麴エキス培地での発酵試験を行い、カプロン酸エチル濃度を分析した。その結果を図2に示す。親株である五島つばき酵母を対照としたとき、カプロン酸エチル濃度比が高い4株が得られた。さらに、そのうち3株はきょうかい901号より

明らかに当該生産量が高いことがわかった。

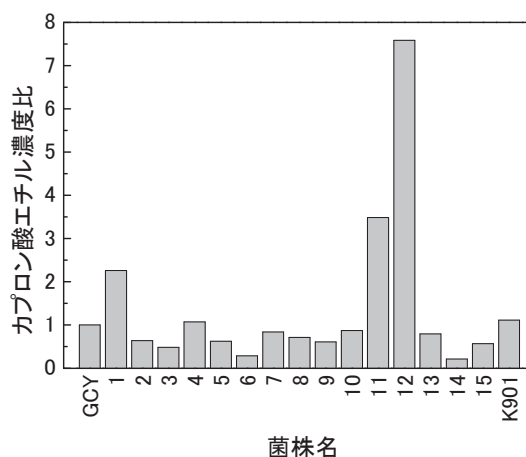


図2 麴エキス発酵液のカプロン酸エチル濃度比  
GCY: 五島つばき酵母、K901: きょうかい酵母9号

### 4. 結言

五島つばき酵母を親株としたセルレニン耐性株から、4株のカプロン酸エチル高生産株を分離することができた。今後はこれらの菌株で小仕込み試験を行い、酒造適性を調べる。また、五島つばき酵母の特徴を調べ、パンや醤油、味噌等、他の発酵食品への適性についても検討する。

### 参考文献

- [1] E. Ishikawa, N. Hosokawa, Y. Hata, Y. Abe, K. Suginami, S. Imayasu, Agric. Biol. Chem., 55 (8), pp. 2153-2154 (1991).