

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
食品・環境科	科長	河村	俊哉

椿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、吟醸香の香り成分である、酢酸イソアミ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 500 µg/mL 5,5,5-トリフルオロイソイシンを含む最小寒天培地で培養し、コロニーを形成した株を酢酸イソアミル高生産候補株として分離した。これらの候補株で麴エキス培地を発酵させ、酢酸イソアミル濃度を GC/MS で分析した。親株と比較して、高い数値を示した菌株を、酢酸イソアミル高生産酵母とした。

1. 緒言

日本有数の椿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、椿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、椿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 *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。これと併せて、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りや呈味に特徴を有した酵母の開発が望まれている。これまで、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、吟醸香の主要な香り成分であるカプロン酸エチルの高生産酵母の育種を行った。今年度は吟醸香のもう一つの主要な香り成分である酢酸イソアミルを高生産する酵母の育種を行った。

清酒もろみにおいて酢酸イソアミルが生成するには、

その前駆体であるイソアミルアルコールが必要となる。5,5,5-トリフルオロイソイシンに耐性を有する株は、ロイシンからイソアミルアルコールが生合成される経路において、フィードバック阻害を受けにくいため、イソアミルアルコール濃度が上昇することが明らかになっている¹⁾。よって、トリフルオロイソイシン耐性株の分離及びそれらの菌株からの酢酸イソアミル高生産酵母の選抜を行った。

2. 実験方法

2.1 トリフルオロイソイシン耐性株の分離

親株には五島つばき酵母の中からアルコール発酵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。トリフルオロイソイシン耐性株の分離は Ashida らの方法²⁾を参考に行った。YPD 液体培地で 30℃、48 時間静置培養した五島つばき酵母を生理食塩水で 1 回洗浄後、10⁶ cell/mL になるよう生理食塩水で希釈し、直径 45 mm のシャーレ上に広げた。生菌数が 1% 程度になるように、光源から約 20 cm の位置にシャーレを置いて、15 W の紫外線ランプを 120 秒間照射した後、2,000 × g、3 分間、遠心分離した。上清を除去した後、菌体を再度少量の生理食塩水に懸濁し、500 µg/mL 5,5,5-トリフルオロイソイシンを含む最小寒天培地に接種し、30℃、4 日間培養した。コロニーを形成した菌株をトリフルオロイソイシン耐性株とし、その中からコロニーの径が大きい菌株を選抜した。

2.2 酢酸イソアミル高生産酵母の選抜

YPD 液体培地 3 mL にトリフルオロイソイシン耐性を

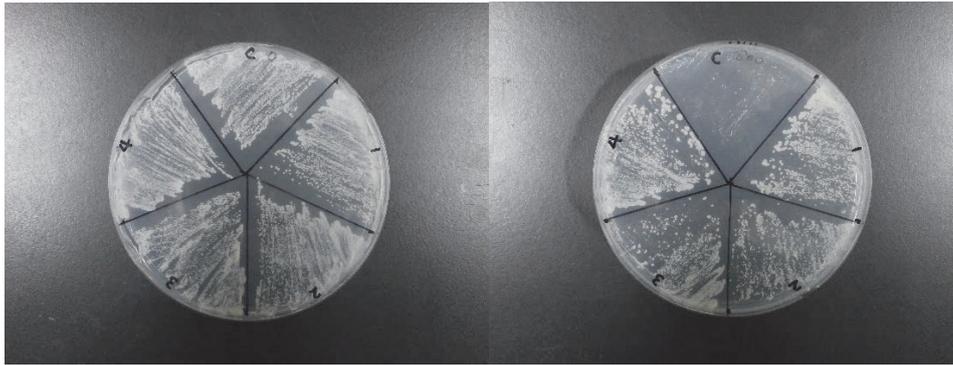


図1 トリフルオロロイシン耐性株の最小寒天培地上のコロニー
左; コントロール (5, 5, 5-トリフルオロロイシンなし)、右; 500µg/mL 含有
C; コントロール (親株)、1、2、3、4; 各酢酸イソアミル高生産候補株

有する14株、親株、きょうかい酵母901号を接種した。30℃、48時間、静置培養後、2,000 × g、5分間、遠心分離し、上清を除去した。生理食塩水1 mLを加えて菌体を洗浄後、再度2,000 × g、5分間、遠心分離し、上清を除去した。洗浄は2回行った。沈殿した菌体を少量の滅菌水で懸濁し、Brix 20に調製した麴エキス培地10 mLに添加した。30℃、7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注入、スプリット比は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、気相900 µLを注入した。

3. 結果及び考察

紫外線による変異処理を行った五島つばき酵母から、酢酸イソアミルを高生産する候補株として14菌株のトリフルオロロイシン耐性株を分離した。図1は5,5,5-トリフルオロロイシンを添加していない最小寒天培地と500 µg/mL添加した培地上における、候補株のコロニー形成の様子である。500 µg/mL添加した培地上では親株が増殖できないことが確認できる。

これらの候補株を用いて発酵試験を行い、香気成分を分析した濃度の比を図2に示した。酢酸イソアミルの含有量は候補の全株が親株及びきょうかい酵母901号より多かった。しかし、残存するイソアミルアルコ

ール濃度比も全株で高かった。酢酸イソアミル/イソアミルアルコール比についてはきょうかい酵母901号より全株低く、多量のイソアミルアルコールは劣化臭の原因となるため、さらなる改善が必要である。

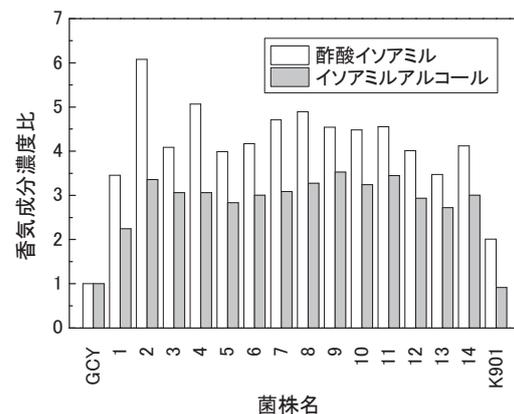


図2 麴エキス発酵液の香気成分濃度比
GCY; 五島つばき酵母、K901; きょうかい酵母901号

4. 結言

本年度の分離した *Saccharomyces cerevisiae* のトリフルオロロイシン耐性株から酢酸イソアミ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のさらなる育種を行うとともに、小仕込み試験を行い、酒造適性を調べる。

謝辞

本研究を行うにあたり、酵母をご提供いただいている五島市商工会に謝意を表します。

参考文献

[1] S. Ashida, E. Ichikawa, K. Suginami, S. Imayasu, *Agric. Biol. Chem.*, 51 (8), pp. 2061-2154 (1991).