

研究論文

愛知県内の花から分離した酵母の遺伝的多様性と清酒醸造特性

小野奈津子*¹、安田(吉野)庄子*²、船越吾郎*³、加藤雅士*⁴、鈴木 徹*⁵、北本則行*⁶Genetic Diversity and Sake Brewing Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Flowers in Aichi PrefectureNatsuko Ono*¹, Shoko Yoshino-Yasuda*², Goro Funakoshi*³, Masashi Kato*⁴,
Tohru Suzuki*⁵ and Noriyuki Kitamoto*⁶Food Research Center*^{1-3,6}, Faculty of Agriculture, Meijo University*⁴, Faculty of Applied Biological
Sciences, Gifu University*⁵

愛知県内の様々な花から 25 株の酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を分離した。これら花から分離した酵母 *S. cerevisiae* (以下「花酵母」)及び産業用酵母(清酒、パン、ワイン)についてマイクロサテライト解析による遺伝的多様性解析を行ったところ、花酵母の大部分は、産業用酵母とは異なる独自のクラスターを形成した。独自のクラスターを形成した花酵母は、清酒酵母に比べてアルコール生産能が低く、酸の生産能が高いという清酒醸造特性を示した。

1. はじめに

食生活の多様化に伴い、従来にない嗜好的特徴や地域ブランド性など新たな付加価値のある発酵食品の製造が求められている。このような発酵食品開発の取組みの一つとして、我々は自然界から酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を分離し、分離株を用いた発酵食品の開発を目指し研究を行った。我々はこれまでに樹皮からの *Saccharomyces* 属酵母の分離に用いられた培地¹⁾を花からの *S. cerevisiae* の優先的な増殖を可能とする選択的集積培地として応用する²⁾とともに、*S. cerevisiae* 特異的検出プライマー³⁾を活用したスクリーニング方法を組み合わせて、迅速に *S. cerevisiae* を分離する手法を確立した。今回は、確立した *S. cerevisiae* 分離法を用いて花から分離した *S. cerevisiae* (以下「花酵母」)の遺伝的多様性について、産業用酵母と併せて染色体 DNA 上に存在するマイクロサテライトを解析することによって検討した。また、花酵母と産業用酵母の清酒醸造特性について比較解析を行った。

2. 実験方法

2.1 供試菌株

愛知県下の花から分離した花酵母 25 株、産業用(清酒、パン、ワイン)酵母 28 株、実験室酵母 1 株を使用した(表 1)。ワイン酵母 9 株と清酒酵母の一部は独立行政法人酒類総合研究所(NRIB)から分譲された株を、実験室酵母は独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)から

分譲された株を、パン酵母 10 株は市販ドライイーストから分離した株を使用した。

2.2 原材料

原材料として、乾燥 α 化米(70%白米、徳島製麹(株)製)、乾燥麹(70%白米、徳島製麹(株)製)を用いた。

2.3 遺伝的多様性解析

2.3.1 マイクロサテライト解析

YPD 培地で培養した酵母菌体から、ザイモリエイス処理とフェノール・クロロホルム抽出による方法で全 DNA を抽出し鋳型 DNA とした。マイクロサテライト解析は、Legras らの方法⁴⁾に準じて以下のように行った。12 遺伝子座のマイクロサテライトを含む領域を、領域に特異的なプライマーと PCR 用酵素 QIAGEN Multiplex PCR Kit(QIAGEN 製)を用いてマルチプレックス PCR を行い増幅させた(表 2)。PCR の温度条件は、95°C 15 分、34 サイクルの 94°C 30 秒; 57°C 2 分; 72°C 1 分、60°C 30 分とした。PCR 産物を用いて遺伝子解析システム GenomeLab GeXP (Beckman Coulter 製)で電気泳動を行い、フラグメントのサイズを測定した。得られたフラグメントサイズデータに基づき、竹崎らの解析ソフトウェア POPTREE2⁵⁾を用いて齋藤らの近隣結合法⁶⁾により、分子系統樹を作製した。

2.3.2 Interdelta PCR 解析

酵母試験菌株の TE 懸濁液を鋳型 DNA とした。delta エレメント特異的プライマーは、既報²⁾の delta1 及び delta2 に加え、Legras ら⁷⁾の delta12(5'-TCAA

*1 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 *2 発酵バイオ技術室(現保蔵包装技術室) *3 分析加工技術室(現共同研究支援部) *4 名城大学農学部 *5 岐阜大学応用生物科学部 *6 発酵バイオ技術室(現至学館大学健康科学部)

表 1 供試菌株

| 菌株 | 分離源 |
|----------------|---------------------------------|
| 花酵母 | |
| F1 | オシロイバナ(名古屋市西区) |
| F2 | サクラ(名古屋市千種区) |
| F3 | サクラ(名古屋市千種区) |
| F4 | フジ(江南市) |
| F5 | パンジー(一宮市) |
| F6 | アジサイ(長久手市) |
| F7 | アジサイ(蒲郡市) |
| F8 | アジサイ(蒲郡市) |
| F9 | アジサイ(蒲郡市) |
| F10 | アジサイ(蒲郡市) |
| F11 | ジニア(長久手市) |
| F12 | ウメ(名古屋市天白区) |
| F13 | ウメ(名古屋市天白区) |
| F14 | カキツバタ(春日井市) |
| F15 | カキツバタ(春日井市) |
| F16 | カキツバタ(名古屋市西区) |
| F17 | カキツバタ(名古屋市西区) |
| F18 | ショウブ(名古屋市西区) |
| F19 | ショウブ(名古屋市西区) |
| F20 | カーネーション(春日井市) |
| F21 | カキツバタ(春日井市) |
| F22 | カキツバタ(春日井市) |
| F23 | カキツバタ(春日井市) |
| F24 | カキツバタ(春日井市) |
| F25 | ガクアジサイ(名古屋市天白区) |
| 実験室酵母 | |
| S288C | S288C(=NBRC1136) (NITE) |
| 清酒酵母 | |
| K1 | 協会1号(=RIB6001) (NRIB) |
| K2 | 協会2号(=RIB6002) (NRIB) |
| K3 | 協会3号(=RIB6003) (NRIB) |
| K4 | 協会4号(=RIB6004) (NRIB) |
| K6 | 協会6号(=RIB1001) (NRIB) |
| K7 | 協会7号 |
| K701 | 協会701号 |
| K9 | 協会9号 |
| K901 | 協会901号 |
| パン酵母 | |
| B1 | 市販パン酵母1 |
| B2 | 市販パン酵母2 |
| B3 | 市販パン酵母3 |
| B4 | 市販パン酵母4 |
| B5 | 市販パン酵母5 |
| B6 | 市販パン酵母6 |
| B7 | 市販パン酵母7 |
| B8 | 市販パン酵母8 |
| B9 | 市販パン酵母9 |
| B10 | 市販パン酵母10 |
| ワイン酵母 | |
| 71B-1122 | 71B-1122(=RIB1048) (NRIB) |
| K1-V1116 | K1-V1116(=RIB1049) (NRIB) |
| EC-1118 | EC-1118(=RIB1050) (NRIB) |
| W-3 | W-3(=RIB1027) (NRIB) |
| UCD 13 | UCD 13(=RIB1036) (NRIB) |
| WE 14 | WE 14(=RIB1042) (NRIB) |
| WE 372 | WE 372(=RIB1043) (NRIB) |
| OC-2 | OC-2(=RIB1057) (NRIB) |
| K1 marquee ICV | K1 marquee ICV(=RIB1063) (NRIB) |

AATGGAATCCCAAC-3')及び delta21(5'-CATCTTAA CACCGTATATGA-3')を用い、PCR 用酵素 QIAGEN Fast Cycling PCR Kit (QIAGEN 製) を用いて 2 種類の PCR を行った。PCR の温度条件は、95°C 5 分、35 サイクルの 96°C 5 秒; 45°C 5 秒; 68°C 45 秒、72°C 1 分とした。反応物を 2.5%(w/v)アガロースゲル電気泳動で解析した。

表 2 使用したプライマー

| 遺伝子座名 | 配列(5'→3') | 蛍光色素 | S288Cの増幅断片長(bp) |
|-------------|--|--------------|-----------------|
| Mix1 | | | |
| C5 | FW: tgacacaatagcaatggcctca RV: gcaagcgactagaacaacaatcaca | Beckman Dye3 | 165 |
| C3 | FW: cttttatttacgagcggccat RV: aaatctcatgctgtgaggggtat | Beckman Dye2 | 120 |
| C8 | FW: caggctgttctaactgtgtaaaatg RV: gctgttctgttggtagcattactgt | Beckman Dye4 | 128 |
| C9 | FW: aagggttcgtaaacatataactggca RV: tataagggaaagagcacgatggc | Beckman Dye4 | 92 |
| C11 | FW: ttccatcataaccgtctggatt RV: tgcccttttcttagatggccttc | Beckman Dye4 | 203 |
| YOR267c | FW: tactaacgtcaactgctgccc RV: ggatctacttgcagtatacggg | Beckman Dye3 | 297 |
| Mix2 | | | |
| C4 | FW: aggagaaaaatgctgtttattctgacc RV: tttctccgggacgtgaata | Beckman Dye4 | 235 |
| C6 | FW: gtggcatcatatctgcaatttatcac RV: caatcaagcaaaagatcgccct | Beckman Dye3 | 99 |
| SCAAT1 | FW: aaagcgtgaagcaatggttagatatt RV: caagcctctcaagcatgacctt | Beckman Dye3 | 240 |
| SCAAT5 | FW: agcataattggaggcagtaaaagca RV: tctccgtctttttgtactgcgtg | Beckman Dye4 | 168 |
| YKL172w | FW: caggacgctaccgaagctcaaaag RV: acttttgccaatttctcaagat | Beckman Dye2 | 129 |
| YPL009c | FW: aaccattgacctcttactatcgt RV: ttcgatggctctgataactccattc | Beckman Dye2 | 296 |

2.4 清酒醸造特性解析

乾燥 α 化米 24 g、乾燥麹 6 g、蒸留水 50mL、酵母前培養液 1mL を混合して、15°Cで 17 日間発酵させた。遠心分離(11,000rpm、20 分)にて上槽し得られた上清液を製成酒とした。製成酒についてアルコール分をアルコメイト(理研計器(株)製)を使用し測定した。日本酒度、酸度及びアミノ酸度は、国税庁所定分析法⁸⁾に従って分析を行った。

3. 実験結果及び考察

3.1 花からの *S. cerevisiae* の分離

既報²⁾では、*S. cerevisiae* の優先的な増殖を可能とする選択的集積培地を用いて 130 本の培養から 6 株の *S. cerevisiae* の分離に成功している(表 1 の F1~F6)。更なる分離を試みた結果、選択的集積培地に 59 種類の様々な愛知県内の花を採取した 410 本の培養から、55 株の

表3 マイクロサテライト解析で得られたフラグメントサイズデータ

| 菌株 | F1 | F17 | F20 | F21 | K2 | K6 | K7 | B1 | B3 | UCD 13 | WE 14 |
|---------|-----------|-----|-----|-----|-----------------|-----|-----|-----------------------|-----------|--------|-----------|
| 遺伝子座 | | | | | | | | | | | |
| C5 | 116 | 116 | 114 | 114 | 116 | 116 | 116 | 116 / 124 | 116 | 114 | 154 / 190 |
| C8 | 92 | 92 | 104 | 104 | 92, 116 | 92 | 92 | 107 / 113 / 119 / 122 | 92 | 104 | 116 |
| C8 | 126 | 126 | 126 | 126 | 120, 126 | 126 | 126 | 111 / 117 / 126 | 126 | 129 | 141 |
| C9 | 103 | 97 | 91 | 91 | 91, 103 | 97 | 97 | 88 / 97 | 94 / 103 | 91 | 94 |
| C11 | 1 | 197 | 205 | 205 | 191, 201 | 197 | 197 | 191 / 203 / 217 | 195 | 185 | 191 |
| YOR267c | 441 | 402 | 288 | 288 | 282 / 345 / 375 | 402 | 402 | 267 / 276 / 363 | 366 / 411 | 276 | 360 |
| C4 | 332 / 356 | 341 | 242 | 242 | 275 | 341 | 341 | 305 / 347 | 329 | 275 | 257 |
| C6 | 93 | 91 | 101 | 101 | 95 / 107 | 91 | 91 | 91 / 107 | 91 | 101 | 105 |
| SCAAT1 | 185 / 191 | 185 | 173 | 173 | 194 / 215 | 185 | 185 | 164 / 179 / 191 / 212 | 194 | 185 | 188 / 212 |
| SCAAT5 | 159 | 159 | 150 | 150 | 150 / 168 | 159 | 159 | 147 / 159 | 165 | 150 | 156 / 162 |
| YKL172w | 133 | 133 | 121 | 121 | 130 | 133 | 133 | 133 / 145 | 133 | 127 | 124 |
| YPL009c | 264 | 264 | 267 | 267 | 237 / 255 | 264 | 264 | 270 / 285 / 303 | 264 | 261 | 291 |

(単位:bp)

酵母が分離された。26S rDNA D1/D2 領域の塩基配列決定による同定を行った結果、19 株の酵母が *S. cerevisiae* と同定された (表 1 の F7~F25)。新たに、ジニア、ウメ、ショウブ、カーネーション、ガクアジサイ及びカキツバタの花から分離することができた。

3.2 花から分離した *S. cerevisiae* の遺伝的多様性

マイクロサテライトは染色体上に散在する数塩基対の繰り返し単位からなる反復配列であり反復数が多様性に富んでいるため、品種や個体レベルの高感度な識別及び分類の遺伝マーカーとして利用されている。12 遺伝子座のマイクロサテライトマーカーを用いて、花酵母と産業用酵母併せて 54 株についてマイクロサテライト解析を行った。得られたフラグメントサイズデータの一部を抜粋して表 3 に示す。得られたデータに基づき分子系統樹を作製した結果を図 1 に示す。

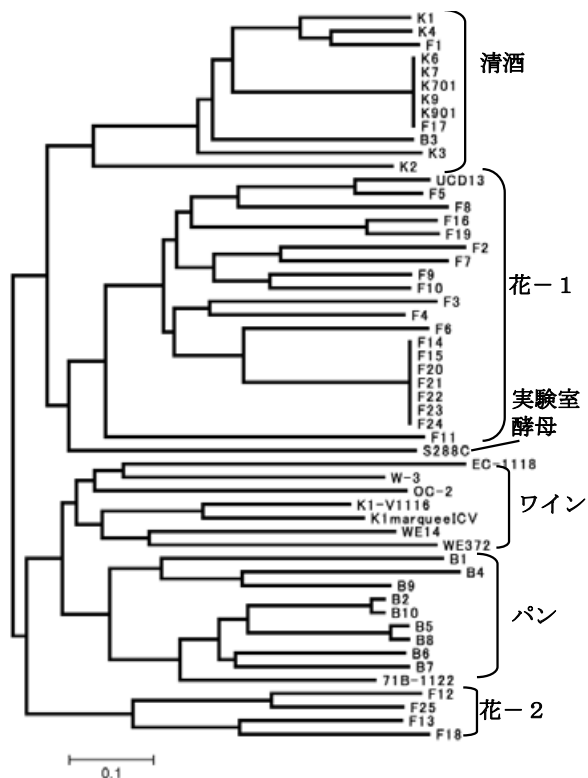
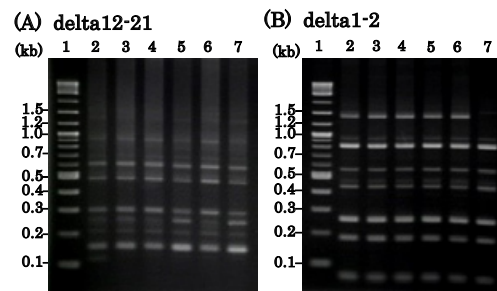


図1 マイクロサテライト解析による分子系統樹

花酵母 25 株について、18 株は他の花酵母とは異なる固有のパターンを有したが、7 株は同一の遺伝子型を示し識別できなかった。そこで、Interdelta PCR 解析による識別を試みた。delta エLEMENTは *S. cerevisiae* 染色体上に存在するトランスポゾン Ty1 と Ty2 の末端繰り返し配列であり、遺伝的多様性解析に用いられる。マイクロサテライト解析で同一のパターンを示した 7 株 (F14、F15、F20、F21、F22、F23 及び F24) は、delta エLEMENTの PCR 解析においてもすべての株が同一のパターンを示し識別できなかった(データ省略)。

清酒酵母、ワイン酵母及びパン酵母の大部分が、各々の用途を反映したクラスターを形成した。一方、花酵母は、F1 及び F17 の 2 株を除いた大部分が、産業用酵母と異なる 2 つの独自のクラスターを形成した。この結果から、花酵母は従来の産業用酵母とは異なる性質を有している可能性があると考えられた。19 株の花酵母から成るクラスター(花-1)に属したワイン酵母 UCD13 は、マイクロサテライト解析による系統樹においてカシの木から分離された酵母と位置が近かったとの報告がある⁴⁾。本研究で得られた分子系統樹においては F5 の位置に近く、自然界から分離した酵母と遺伝的に近いと考えられた。4 株の花酵母から成るクラスター(花-2)は、パン酵母クラスターに近かった。F1 及び F17 は清酒酵母クラスターに属した。特に F17 は 5 株の清酒酵母(K6、K7、K701、K9 及び K901)と同一のパターンを有し識別できなかった。そこで、Interdelta PCR 解析を行った (図 2)。F17 は 5 株の清酒酵母と似



1: 分子サイズマーカー(2-Log DNA Ladder), 2: K6, 3: K7, 4: K701, 5: K9, 6: K901, 7: F17

図2 Interdelta PCR 解析

たパターンを有したが同一ではないことから、これらの清酒酵母のコンタミネーションではないことが明らかになった。マイクロサテライト解析と Interdelta PCR 解析を組み合わせて詳細に花酵母の遺伝的多様性を解析することができた。

3.3 花から分離した *S. cerevisiae* の清酒醸造特性

供試菌株について、清酒小仕込み試験を行い得られた製成酒を成分分析した結果を表4に示す。

製成酒のアルコール分は清酒酵母では14.2~17.5%、パン酵母では12.4~16.1%、ワイン酵母では10.7~16.1%、実験室酵母では13.2%であったのに対し、花酵母では4.9~16.3%であり産業用酵母に比べて低い傾向を示した。花酵母での日本酒度も同様に産業用酵母に比べて低い傾向を示した。花酵母での酸度は、産業用酵母に比べて高い傾向を示した。アミノ酸度は、清酒酵母で

表4 清酒小仕込み試験の成分分析値

| 菌株 | アルコール分(%) | 日本酒度 | 酸度 | アミノ酸度 |
|----------------|-----------|--------|------|-------|
| F1 | 13.2 | -33.2 | 4.05 | 1.05 |
| F2 | 8.6 | -86.1 | 4.65 | 1.60 |
| F3 | 10.6 | -56.3 | 4.55 | 1.15 |
| F4 | 11.2 | -49.0 | 4.70 | 0.95 |
| F5 | 7.9 | -83.3 | 4.65 | 1.45 |
| F6 | 9.5 | -71.0 | 4.55 | 1.15 |
| F7 | 9.8 | -67.8 | 4.45 | 1.50 |
| F8 | 7.4 | -91.0 | 5.05 | 1.65 |
| F9 | 8.9 | -78.0 | 4.65 | 1.65 |
| F10 | 10.3 | -62.2 | 4.35 | 1.40 |
| F11 | 7.6 | -110.3 | 6.70 | 2.10 |
| F12 | 8.1 | -68.4 | 4.70 | 1.70 |
| F13 | 9.1 | -73.6 | 4.70 | 1.65 |
| F14 | 6.3 | -104.6 | 4.65 | 1.90 |
| F15 | 4.9 | -115.9 | 4.90 | 2.00 |
| F16 | 10.8 | -59.7 | 4.30 | 1.40 |
| F17 | 16.3 | -9.1 | 3.00 | 1.70 |
| F18 | 8.5 | -80.2 | 4.60 | 1.80 |
| F19 | 9.7 | -63.8 | 4.40 | 1.35 |
| F20 | 9.6 | -72.4 | 4.35 | 1.60 |
| F21 | 9.2 | -77.8 | 4.50 | 1.60 |
| F22 | 9.8 | -72.6 | 4.55 | 1.15 |
| F23 | 9.7 | -69.6 | 4.50 | 1.25 |
| F24 | 10.2 | -69.4 | 4.35 | 1.25 |
| F25 | 10.8 | -68.3 | 4.30 | 1.25 |
| S288C | 13.2 | -40.0 | 3.10 | 1.35 |
| K1 | 17.2 | -11.2 | 3.15 | 1.45 |
| K2 | 14.2 | -35.6 | 3.60 | 1.50 |
| K3 | 16.6 | -8.6 | 3.30 | 1.50 |
| K4 | 15.9 | -10.2 | 3.70 | 1.60 |
| K6 | 17.2 | -7.4 | 3.30 | 1.50 |
| K7 | 15.0 | -18.7 | 4.00 | 1.50 |
| K701 | 17.3 | -6.3 | 3.20 | 1.60 |
| K9 | 17.2 | -6.6 | 3.10 | 1.50 |
| K901 | 17.5 | -8.8 | 3.55 | 1.70 |
| B1 | 14.4 | -32.9 | 3.90 | 1.15 |
| B2 | 16.1 | -11.8 | 3.05 | 2.20 |
| B3 | 13.4 | -20.7 | 4.30 | 1.35 |
| B4 | 13.0 | -29.2 | 4.20 | 1.45 |
| B5 | 14.7 | -17.6 | 4.40 | 1.35 |
| B6 | 14.6 | -17.8 | 4.50 | 1.00 |
| B7 | 15.2 | -21.5 | 4.10 | 1.85 |
| B8 | 13.8 | -11.4 | 3.70 | 1.65 |
| B9 | 12.4 | -37.7 | 4.80 | 1.40 |
| B10 | 15.8 | -14.1 | 3.30 | 1.95 |
| 71B-1122 | 15.5 | -23.5 | 4.10 | 2.05 |
| K1-V1116 | 14.1 | -28.5 | 4.85 | 1.10 |
| EC-1118 | 16.1 | -19.6 | 3.20 | 2.05 |
| W-3 | 16.1 | -16.4 | 3.70 | 1.40 |
| UCD 13 | 10.7 | -65.8 | 4.10 | 1.50 |
| WE 14 | 13.3 | -38.4 | 3.85 | 2.40 |
| WE 372 | 10.7 | -59.2 | 4.95 | 1.40 |
| OC-2 | 14.2 | -29.3 | 4.70 | 1.90 |
| K1 marquee ICV | 14.7 | -25.3 | 4.70 | 1.50 |

はほぼ同じ値を示したのに対し、花酵母ではパン酵母及びワイン酵母と同様に幅広い値を示した。これらから、産業用酵母とは異なる独自のクラスターを形成した23株の花酵母を用いて得られた製成酒は、清酒酵母に比べてアルコール分及び日本酒度が低く、酸度が高いという特徴があった。一方、マイクロサテライト解析において清酒酵母クラスターに属した2株の花酵母(F1及びF17)を用いて得られた製成酒の成分分析値は、清酒酵母の製成酒の成分分析値と類似していた。これらの結果から、マイクロサテライト解析の結果と清酒小仕込み試験の結果は相関関係があると考えられた。

4. 結び

本研究の成果をまとめると、以下のとおりである。

- (1) 愛知県内の花から *S. cerevisiae* を25株分離した。
- (2) 花酵母と産業用(清酒、パン、ワイン)酵母のマイクロサテライト解析による遺伝的多様性解析の結果、花酵母の大部分は、産業用酵母とは異なる独自のクラスターを形成した。
- (3) 花酵母の大部分は、清酒酵母に比べてアルコール生産能が低く、酸生産能が高いという特徴を示した。

付記

本研究の一部はエリザベス・アーノルド富士財団平成23年度学術研究助成により行った。

文献

- 1) JP. Sampaio and P. Goncalves : *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 2144(2008)
- 2) 安田(吉野)庄子, 北本則行 : 食品科学工学会誌, **58**(9), 433(2011)
- 3) P. Martorell, A. Querol and M.T. Fernández-Espinar : *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 6823(2005)
- 4) JL. Legras, D. Merdinoglu, JM. Cornuet and F. Karst : *Mol. Ecol.*, **16**, 2091(2007)
- 5) N. Takezaki, M. Nei and K. Tamura : *Mol. Biol. Evol.*, **27**, 747(2010)
- 6) N. Saitou and M. Nei : *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406(1987)
- 7) JL. Legras and F. Karst : *FEMS Microbiol. Lett.*, **221**, 249(2003)
- 8) 国税庁編 : 国税庁所定分析法, 3清酒, <https://www.nta.go.jp/shiraberu/zeiho-aishaku/tsutatsu/kobetsu/sonota/070622/pdf/03.pdf>, (2017/08/02)