

自然環境からの *Saccharomyces cerevisiae* の分離と ビール醸造への利用*

玉川 英幸**、笹渡 繁巳***

本研究では岩手県内の自然環境中から *Saccharomyces cerevisiae* の分離およびビール醸造への利用を試みた。県内 2 カ所で採取した合計 293 の植物試料から 33 株の *S. cerevisiae* を分離することができた。*S. cerevisiae* が検出された植物試料としては樹皮が最も確率が高く、38 検体のうち 9 検体から検出された。取得したすべての *S. cerevisiae* 分離株はマルトース資化性がなく、単菌でビール製造することができないと考えられた。そこでマルトース資化性変異株の取得を試みた。分離株をマルトース培地に接種し、振とう培養したところ、培養 18 日目に 1 株の野生酵母親株からのみわずかにマルトース資化する変異株が得られた。さらに、得られたマルトース資化性変異株から 2-デオキシグルコース耐性株を取得したところ、マルトースを高効率で利用可能な変異株が取得できた。得られた野生酵母マルトース資化性変異株を用いて県内ブルワリーにおいてビールの試験醸造を実施した。その結果、取得した分離変異株は健全な発酵経過を示し、単菌でビール製造が可能であることが確認された。

キーワード：野生酵母、*Saccharomyces cerevisiae*、マルトース資化、ビール醸造

Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* from the Natural Environment and its Use for Beer Brewing.

TAMAKAWA Hideyuki, SASAWATARI Shigemi

Key words: wild yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, maltose assimilation, beer brewing

1 緒言

1994 年の規制緩和により、ビールの製造免許に必要な年間最低製造数量が 2000 kL から 60 kL に引き下げられた。このいわゆる「地ビール解禁」によりビール業界では新規参入が増加し、一時は小規模事業者が 300 社を超えた。10 年余りでブームは完全に沈静化し、メーカー数も 200 社ほどにまで減少したが、2010 年以降地ビールはクラフトビールと名前を変えて 2 次ブームと呼ばれる回復に転じている¹⁾。特に昨今では毎年 100 社単位で事業者が増加しており、きた産業の報告によれば 2023 年末でビールもしくは発泡酒の醸造所数は日本国内で 803 箇所となっている²⁾。クラフトビールのシェアは未だ増加傾向ではあるものの、ビール類の市場規模は 1994 年をピークに右肩下がり続けている。激化する競争の中で、クラフトビールも「大手がつかないスタイルのビール」というだけのセールスポイントでは差がつかなくなっている。

クラフトビールの差別化のために、各社ではビール製造に地域の特産物を利用することが少なくない³⁾。その特産物利用の観点のひとつとしていわゆる地域の「野生

酵母」が存在する。野生酵母とは枝や葉、花、果実、樹液など地域の自然環境中にもともと存在していた酵母のことであり、地元の植物試料から分離された野生酵母を用いた酒類の開発は度々報告されている⁴⁾⁵⁾⁶⁾。市販されている醸造用酵母とは異なり野生酵母は必ずしも醸造適性に優れたものばかりではないものの、野生酵母を利用した商品は、そのメーカーの会社としてのストーリー性や情緒性に与える価値が少なからずあり、継続してメーカーから一定のニーズが寄せられる。

こうした野生酵母を探索する場合、多くの場合は最も一般的な醸造用酵母と同種である *Saccharomyces cerevisiae* を分離することを目標として実施されるものの、最近では *Lachancea* 属酵母を利用した例も散見されるようになり⁷⁾⁸⁾、野生酵母のビール醸造への利用が拡大している。

本研究では、岩手県内の自然環境中から *S. cerevisiae* を単離し、ビール醸造適性の評価を行った。得られた分離株からマルトース資化性株の育種選抜を行い、20 L スケールでの試験醸造を実施したので報告する。

* 研究開発型人材育成支援事業

** 醸造技術部

*** いわてまち発酵工房

2 実験方法

2-1 菌 株

対照としてマルトトリオース資化性のないエール酵母 ALE514 (AB Mauri Food Inc, St. Louis, MO, USA) を用いた。

2-2 植物試料からの *S. cerevisiae* の分離と同定

植物試料の採取は、事前に管理者から採取および研究の許可を得て、天台宗北上山新通法寺正覚院エリア（御堂観音）および石神の丘美術館花とアートの森エリアで実施した。植物試料はアルコール消毒したピンセットで採取し、滅菌された 50 ml コニカルチューブに移した。植物試料を採取したコニカルチューブは概ね 25°C 以下となるように保管し、採取から 5 時間以内に検体が完全に浸漬するように培地を添加した。培地は殿内らが報告した培地⁹⁾を用いた。3g 酵母エキス、3g 麦芽エキス、5g ペプトン、10g スクロースを溶解させた後、乳酸で pH 4.0 に調整し 920 ml にメスアップした。オートクレーブ後に 100 mg のクロラムフェニコールを溶解させたエタノール 80 ml を添加した。培地を添加した植物試料は 30°C で静置培養した。培養開始から 1、2、3 週間後に確認を行い、培地の混濁もしくは沈殿が生成したサンプルは上下反転によりよく懸濁した後、0.5 ml を 4.5 ml の同じ培地に接種して 30°C で 2 日間培養を行った。再度沈殿が生成したサンプルは YPD2 寒天培地（10g/L 酵母エキス、20g/L ペプトン、20g/L グルコース、20g/L 寒天）に塗布して 30°C で 2 日間培養し、シングルコロニー化を行った。コロニー形状を確認し、コロニーが小さすぎる（概ね 1 mm 以下）もの、糸状菌や細菌様のコロニー形状を示したものを除き、1 シャーレから 4 コロニーをピックアップした。同じ YPD2 寒天培地で培養を行い、マスタープレートとした。得られた酵母株はギ酸-アセトニトリル法でタンパク質抽出を行い、 α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸をマトリックスとして用いたマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析 (MALDI TOF-MS ultraflex, Bruker, Massachusetts, USA) で分析およびライブラリーリサーチを実施して微生物酵母菌種の同定を行った¹⁰⁾。

2-3 マルトース資化性変異株の選抜

マルトース資化性を獲得した変異株の選抜のために分離した *S. cerevisiae* を 2 ml 容 96 穴深底プレートに分注した 0.5 ml YPD2 培地に接種し、30°C で 2 日間静置培養した。得られた培養液 20 μ L を 50 ml コニカルチューブに分注した 20 ml YPM10 培地（10 g/L 酵母エキス、20 g/L ペプトン、100 g/L マルトース）に接種し、30°C で静置培養もしくは 100 rpm で振とう培養した。経時的にサンプリングして Brix を測定し、Brix が低下した培養液を YPD2 寒天培地に塗布して 30°C で 2 日間培養し、シングルコロニー化を行った。1 シャーレから 8 コロニーをピ

ックアップし、同じ YPD2 寒天培地でマスタープレートを作製した。得られた変異株はアンチマイシン-マルトース培地（6.7 g/L Yeast Nitrogen base w/o amino acid、20 g/L マルトース、0.6 mg/L アンチマイシン A、20 g/L 寒天）を用いて、寒天培地上でのマルトース資化性の評価を行った。

マルトース資化性を獲得した変異株からマルトース資化性がさらに向上した変異株を選抜するために YPD2 培地で振とう培養した菌体を滅菌水で 2 回洗浄して、1 シャーレあたり 10⁶ cells を 2-DG-マルトース寒天培地（20 g/L マルトース、0.4 g/L 2-デオキシグルコース (2-DG)、6.7 g/L Yeast nitrogen base、20 g/L）に塗布した。30°C で 1 週間培養を行い、形成されたコロニーを同じ培地にストリークして増殖が確認されたサンプルを YPD2 寒天培地にストリークしてマスタープレートとした。

2-4 発酵試験

分離した酵母、マルトース資化性を獲得した変異株、マルトース資化性が向上した変異株の最初の発酵能力評価のために以下のような簡易発酵試験を行った。2 ml 容 96 穴深底プレートに分注した 0.5 ml YPD2 培地に評価菌株を接種し、30°C、静置条件で 24 時間前培養した。1 ml の YPD20（200 g/L グルコース、10 g/L 酵母エキス、20 g/L ペプトン）もしくは YPM10 を分注した 2 ml 容 96 穴深底プレートに前培養液 50 μ L を接種して 30°C、静置条件で培養を行った。培養 48 時間後、培養液の Brix を測定して各酵母株の発酵能力を評価した。

分離酵母から選抜したマルトース資化性向上株の発酵能力の評価のためにドライモルト エクストラライト (Muntions Plc, Stowmarket, England) を用いて調製したドライモルト培地を用いた。Brix=12-13（初期比重約 1.05 (wt)）となるように溶解し、オートクレーブで 105°C、60 分間加熱処理した。加熱によって生成した凝集物を無菌的に遠心して除去し、発酵試験用の培地とした。評価する酵母は 30°C での静置培養で 5 ml YPD2 培地、100 ml YPD2 培地で段階的に拡大培養を行い、遠心によって菌体を回収後、800 ml のドライモルト培地で懸濁し、1 L 容メディウム瓶に分注した。23°C で発酵を行い、経時的にサンプリングして Brix を測定した。

2-5 試験醸造

ビールの試験醸造は株式会社遠野醸造 (Iwate, Japan) で実施した。糖化にはインフュージョン法を用いた。65°C で 75 分保持後、麦汁ろ過、スパージング、麦汁煮沸 60 分を行い、最終的に Brix 13.8（初期比重 1.054）の麦汁 14 L を得た。なお、ホップはチヌーク、カスケード、シトラの品種のホップをケトルホップ、レイトホップ、ドライホップでそれぞれ 15 g 使用した。酵母は 2 L YPD2 静置培養で調製し、滅菌水で 2 回洗浄した後、60 ml の滅菌水に懸濁して全量添加した。20°C で 1 週間発酵を行

い、酵母を除去した若ビールに 0.6% (w/v) となるように プライムシュガーを添加した。500 ml の耐圧性ペットボトルに分注し、15°C で 1 週間発酵を行った。

2-6 分析方法

発酵液の Brix 測定はポケット糖度計 PAL-J (Atago, Tokyo, Japan) を用いた。グルコース、マルトース、エタノール分析は Shi らの高速液体クロマトグラフィーによ

る方法¹¹⁾を一部改変して行った。60°C で保持した ICSeP-ION-300 カラム (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) を用い、溶媒として 0.01 N 硫酸 (流速 0.4 mL/min) を使用した。検出には示差屈折率検出器を用いた。比重は密度比重計 DA-505 (Kyoto Electronics Manufacturing Co. Ltd., Kyoto, Japan) を用いて測定した。香気成分はエタノール 5% (v/v) を含む標準物質を用いて清酒用の国税庁所定分析法を用いて行った。

Table 1 Number of sampling and isolate yeasts.

Date	Location where collected	Number of samples;				Identification	
		Sampling	1 st culture	2 nd culture	Single colony isolation		
2023/6/1	Mido Kannon	130	94	86	35	2	<i>Lachancea fermentati</i>
						1	<i>Pichia manshurica</i>
						17	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
						9	<i>Saccharomyces paradoxus</i>
						3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
						3	Not applicable to database
2023/6/22	Ishigami Museum of Art	163	57	48	29	6	<i>Lachancea fermentati</i>
						16	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
						5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
						2	Not applicable to database

Table 2 Ecological origins and isolate yeasts.

Ecological origins	Number of samples	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	<i>Lachancea fermentati</i>	<i>Pichia manshurica</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
leaf (litter)	83	5	3			1
branch (litter)	54	9	2	3	1	2
bark (litter)	38	9	2	1		1
flower (litter)	11	1		1		1
seed, fruit	80	6	1	2		2
sap	4					
flower (raw)	4					
leaf (raw)	5					
soil	2	1	1			
moss	3	1				1
the others	9	1		1		
Sum	293	33	9	8	1	8

3 結果

3-1 植物試料の採取、集積培養と酵母菌種の同定

採取数および選抜状況は Table1 に示した。植物試料は 2023 年 6 月 1 日に天台宗北上山新通法寺正覚院エリア（御堂観音）で 130 検体、2023 年 6 月 22 日に石神の丘美術館花とアートの森エリアで 163 検体採取した。1-3 週間の培養を行ったところ、それぞれ 94 検体、57 検体の混濁が認められた。再度同じ培地で増殖した検体を YPD 寒天培地でシングルコロニー化を行い、それぞれ 35 検体、29 検体の分離元から酵母様のコロニーを得た。得られたコロニーについて、質量分析法で酵母菌種の同定を行ったところ、それぞれ 17 検体、16 検体の採取源から *S. cerevisiae* を得ることができた。集積培養の工程で単一の酵母菌種が濃縮されているようで、1つの採取源から分離した 4 コロニーはほとんどの検体において単一の酵母菌種だった。

本研究においては、採取した植物試料に培地を添加して 1 週間おきに培養物の確認を行い *S. cerevisiae* の分離を実施した。*S. cerevisiae* は最終的に合計 33 個の植物試料から分離されたが、このうち、31 検体は培地添加から 1 週間で混濁が認められた検体であった。また、*Saccharomyces paradoxus* は合計 9 個の植物試料から分離されたが、このうち 8 検体は培養液の混濁に 2 週間もしくは 3 週間を要したものであった。このように、集積培養での培地の混濁状況は増殖した酵母菌種の特徴がある程度反映されたものとなった。

採取した植物試料数とそこから分離された酵母菌種を Table 2 に示した。*S. cerevisiae* が検出された植物試料としては樹皮が最も確率が高く、38 検体のうち 9 検体から検出され、自然に落ちた枝（9 検体/54 検体）がそれに次いだ。

3-2 グルコースおよびマルトース培地での発酵力評価

分離した *S. cerevisiae* のビールの醸造適性を評価することを目的としてグルコースおよびマルトースを炭素源とした合成培地（YPD20 培地、YPM10 培地）で簡易発酵試験を実施した。培養終了後の培養液 Brix を測定した結果を Figure 1 に示した。陽性対照として用いたエール酵母 ALE514 はグルコースとマルトースの資化性が高く、YPD20 培地、YPM10 培地での培養によって Brix が 7.2、5.5 まで低下した。一方、今回自然環境から分離した *S. cerevisiae* は YPD20 培地での Brix は大きく低下したものの YPM10 培地の Brix を大きく低下させる株はなかった。こうした糖資化による Brix の低下傾向は菌種によってある程度近い傾向があり、*S. paradoxus* も同様にグルコース資化性は高いものの、マルトース資化性のある株は

なかった。それぞれ 8 株分離された *Lachancea fermentati*、*Wickerhamomyces anomalus* はいずれもマルトース資化性があるものの弱く、グルコース資化性も *S. cerevisiae* に大きく劣るものが多かった。このように YPD20 培地での発酵力は他の酵母と比べて *Saccharomyces* 属酵母は明らかに高く、高濃度グルコース培地での発酵力を評価することで *Saccharomyces* 属かどうかの選抜はある程度可能と考えられた。

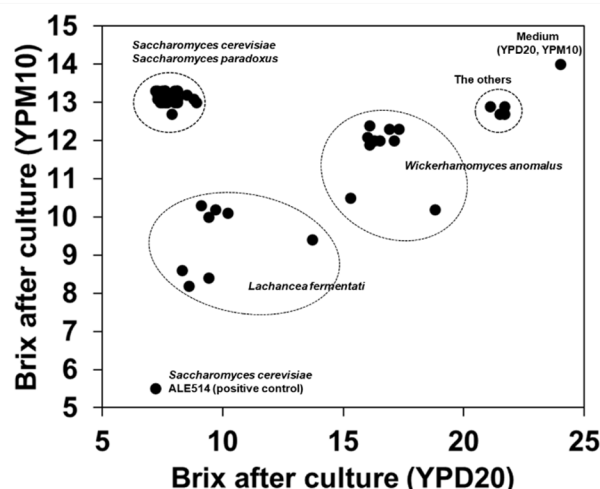


Figure 1 Brix value after micro-scale fermentation test by yeast isolates in YPM10 and YPD20 medium.

3-3 マルトース資化性変異株の選抜

今回自然環境下より分離した *S. cerevisiae* はいずれもマルトース資化性に乏しく、単菌でビール製造することが難しいと考えられた。そこで分離した *S. cerevisiae* から高効率でマルトースを利用する変異株を取得することを試みた。

マルトース資化性が向上した変異株を取得する方法として 2-DG 耐性株を取得する方法¹²⁾、アンチマイシン耐性株を取得する方法¹³⁾が報告されている。最初にこれら定法にしたがって分離した *S. cerevisiae* 33 株について各種薬剤耐性となった自然変異株の取得を試みたが、多くの株からはいずれの薬剤耐性株も取得することができず、またわずかに取得できた株も発酵試験を実施したところマルトース資化性を獲得していなかった。そこで今回、マルトース培地を用いた集積培養法を用いてマルトース資化性を獲得した変異株を濃縮することを試みた。

分離した *S. cerevisiae* 33 株をそれぞれ YPM10 培地に接種し、30°C で静置培養もしくは振とう培養を行った。接種した 33 株はいずれもマルトース資化性がないため、酵母の増殖に伴う培地の混濁や Brix の低下は起こらないはずであるが、マルトース資化性を獲得した変異株が発生し、増殖してくれば培地の混濁が認められる可能性がある。酵母種菌を接種後、長期間に渡って培養を継続し、培養液の外観を経時的

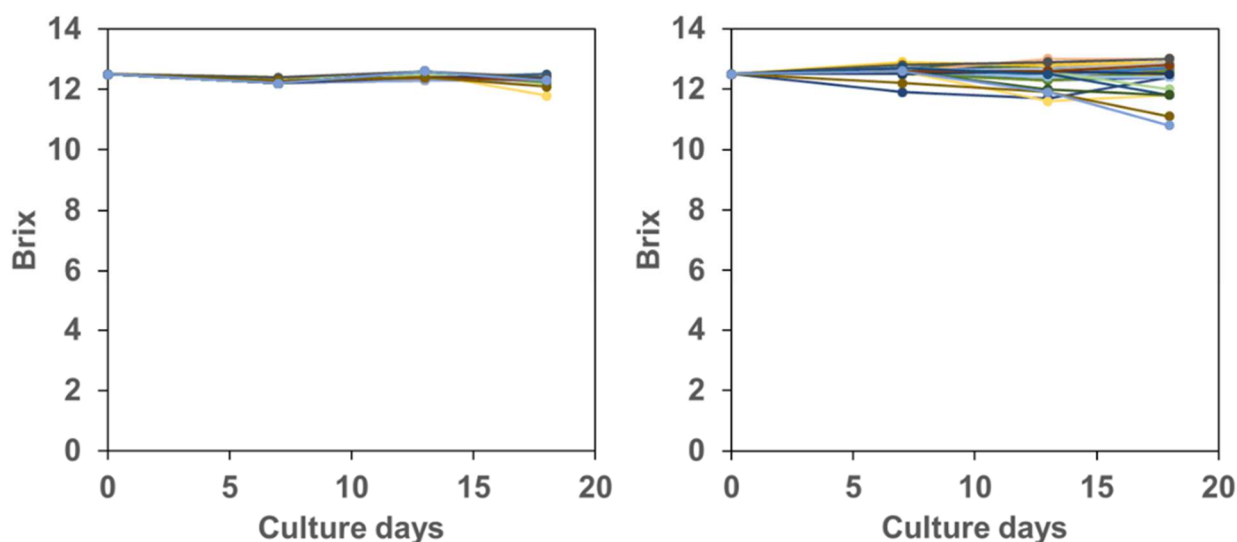


Figure 2 Change in Brix value during enrichment culture with 33 *S. cerevisiae* isolates in YPM10 medium. Panels A and B show the results for static condition and aerobic condition, respectively. See the main text for sample information.

に確認するとともにサンプリング液の Brix を測定した。その結果、培養 18 日目に振とう培養していたサンプルの中からでわずかに Brix が低下し、培地が混濁したサンプルが 5 つ現れた (Figure 2, IGAM072、IGAM076、IGAM117、IGAM121、IGAM128)。振とう培養を実施していた多くのサンプルで培地の Brix は 12.5-13.0 だったが、Brix が低下したと判断した 5 つのサンプルでは培地の 10.8-11.8 だった。一方、静置培養していたサンプルでは沈殿が形成されたサンプルは認められなかった。Brix 低下が確認された培養液からシングルコロニーを単離して、各シングルクロンのマルトース資化性をシャーレ上で評価した。シャーレ上でのマルトース資化性の評価に YPM2 培地 (10 g/L 酵母エキス、20 g/L ペプトン、20 g/L マルトース) を使用すると、マルトース資化性がない株でもペプトンや酵母エキス由来のわずかな炭水化物を好氣的に利用して増殖する擬陽性が生じるため、培地条件を最小培地とし、更に呼吸増殖を抑制するアンチマイシン A を添加することでシャーレ上でのアンチマイシン資化性を正確に評価できると報告されている¹⁴⁾。そこで、アンチマイシン-マルトース培地で増殖を確認したところ、5 株の分離株親株はいずれも増殖が認められなかった。また、IGAM072、IGAM076、IGAM117 から得られた 8 クロンのも同様に増殖が認められなかったのに対して、IGAM121、IGAM128 から得られた 8 クロンはすべてで増殖が確認された。そこで IGAM121、IGAM128 から得られた各 8 株について YPM10 培地を用いて簡易発酵試験を実施した。その結果、IGAM121 の集積培養から得られた変異株はその親株と Brix 低下の程度が変わらなかったのに

対して、IGAM128 の集積培養から得られた変異株では親株よりやや Brix が低下する株が幾つか得られた (Figure 3)。しかし、最も Brix が低下した株でも 12.9 であり、陽性対照として用いた ALE514 の Brix5.5 と比べると大きくマルトース資化性は劣っていると考えられた。なお、IGAM128 およびその変異株について PCR で *AWA1* の遺伝型を確認したところ¹⁵⁾¹⁶⁾、集積培養の前後 *AWA1* の遺伝型に変化がなかった。したがって、取得された変異株は他酵母株のコンタミネーション等ではなく、変異によって取得されたものと考えられる (data not shown)。

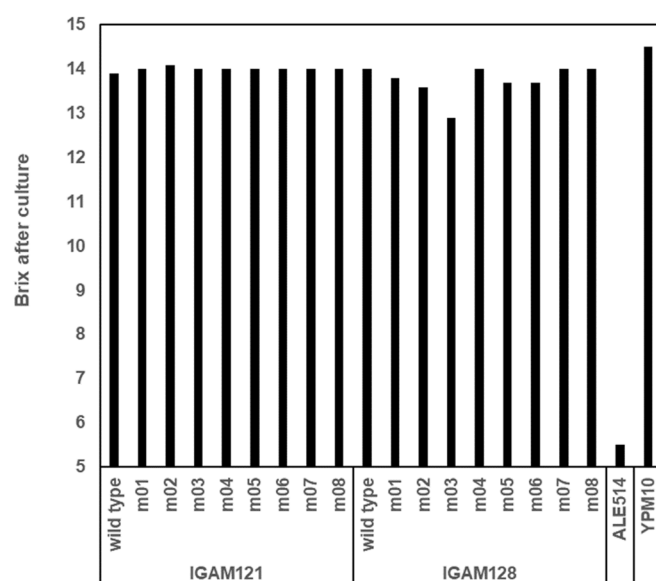


Figure 3 Brix value after micro-scale fermentation test by maltose adapted-*S. cerevisiae* isolates in YPM10 medium.

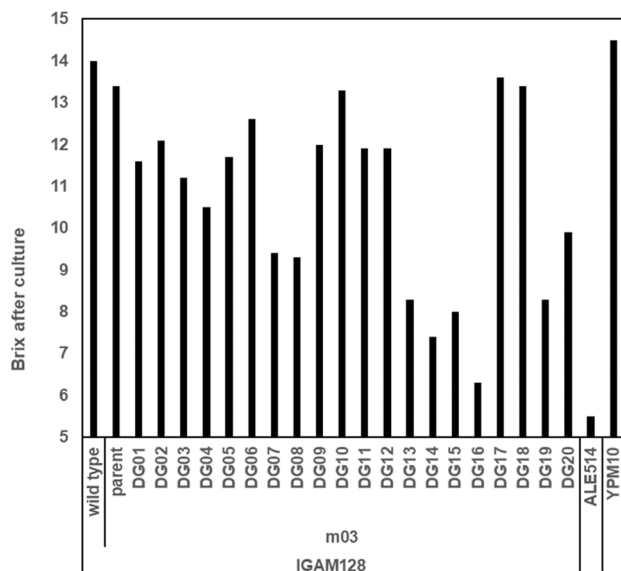


Figure 4 Brix value after micro-scale fermentation test by 2DG resistant-isolate *S. cerevisiae* strains in YPM10 medium.

3-4 マルトース資化性が向上した変異株の選抜

分離した *S. cerevisiae* の一つである IGAM128 株からマルトース培地を用いた集積培養で資化性変異株を獲得できたものの、そのマルトース資化性は高くなかった。そこで、さらにマルトース資化性が向上した変異株を取得するために、これまで得られた変異株の中から比較的 Brix 低下の度合いが大きかった IGAM128m03 株を親株として 2DG 耐性株を取得することとした。

変異株選抜のために 2DG-マルトース培地に 10^6 cells/plate もしくは 10^7 cells/plate で各 4 枚のシャーレに菌体を塗布して培養を行い、合計 20 個の 2DG 耐性クローンを得た。得られた変異株について YPM10 培地を用いて簡易発酵試験を実施したところ、評価を行った 20 株のうち 8 株で Brix が 10 以下まで低下していた (Figure 4)。特に IGAM128m03DG14 株、IGAM128m03DG15 株、IGAM128m03DG16 株の 3 株は Brix が 7.4、8.0、6.3 まで低下しており、ビール酵母である ALE514 と比べると劣ってはいるものの比較的高いマルトース資化性を示すことが明らかとなった。これらの発酵試験を複数回実施し、マルトースを最も安定的に資化した株として IGAM128m03DG15 株を選抜した。

3-5 マルトース資化性変異株の麦汁を模した培地での発酵力の評価

IGAM128m03DG15 株のマルトース資化性を麦汁に近い条件で評価することを目的としてドライモルト培地での発酵試験を実施した (Figure 5)。

ALE514 では発酵が速く、2 日後に Brix が 7.6 で停止した。IGAM128m03DG15 株では発酵開始とともに

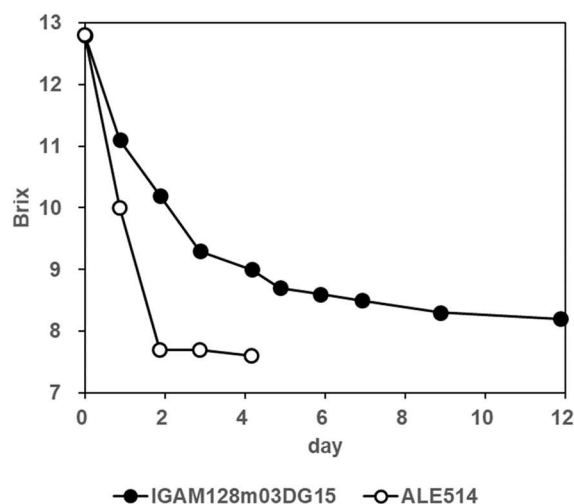


Figure 5 Time-dependent fermentation profiles of IGAM128m03DG15 and ALE514 in dry malt medium adjusted to an initial specific gravity of 1.05.

徐々に Brix 低下速度が鈍化し、4 日後に Brix 9.0 まで低下したものの発酵を 12 日目まで継続しても Brix は 8.2 までしか低下せず、ややマルトースが残存したと考えられた。

3-6 ビールの試験醸造

最後にビール製造の可能性を評価することを目的として岩手県内ブルワリーで試験醸造を実施した。ペールエールスタイルのレシピで調製した Brix 13.8 (初期比重 1.054) の麦汁に酵母を添加し、発酵を 1 週間行った。Brix 7.9 まで低下した若ビールに、プライムシュガーを用いたガス付けおよびラガリングを経て、アルコール 5.5%、最終 Brix 7.7 (比重 1.013)、官能評価においても特段目立ったオフフレーバーのないまずまずの発酵度のビールとなった (Table 3)。ドライモルト培地での結果を反映するように、マルトースは約 4 g/L 残存しており、今回得られた IGAM128m03DG15 株では麦汁中のマルトース濃度が低濃度となったときマルトース資化性が大きく低下する可能性が示唆された。マルトリオースの資化性はなく、麦汁と同量のマルトリオースがビールに残存していた。ビール中に含まれる一般的なアルコール類、エステル類を測定したところ、酢酸イソアミルが 2.13 ppm 検出された。今回の試験醸造には対照を準備していないため、厳密に評価はできないが、一般的なビールと比較するとこの数値は低くない¹⁷⁾。自然環境下から分離した *S. cerevisiae* を育種して得られた酵母 IGAM128m03DG15 株は今回、単菌である程度の品質のビールを製造することが可能であった。

Table 3 Analytical results of components in the beers.

Alcohol (v/v %)	5.52
Final specific gravity (t/t)	1.01374
Brix	7.7
pH	4.34
Sugar (g/L)	
Glucose	0.11
Maltose	3.99
Maltotriose	14.31
Flavor component (ppm)	
Ethyl acetate	27.63
n-Propyl alcohol	18.02
Isobutyl alcohol	17.13
Isoamyl acetate	2.13
Isoamyl alcohol	91.00
Ethyl caproate	0.80

4 考 察

一般的に *S. cerevisiae* は糖類の利用速度が高く、自然環境中でも糖濃度が高い環境に存在しているという報告もされている¹⁸⁾。実際、糖濃度の高い樹液から分離されている例もあり⁴⁾、今回樹皮や木の枝からの *S. cerevisiae* 分離確率が高かったのも樹液との関連性が考えられる (Table 2)。花は蜜に糖類を含むため花からは *S. cerevisiae* がよく分離できるという報告¹⁸⁾がある一方で、殿内らは花からは *S. cerevisiae* があまり分離できないと報告している⁹⁾。本研究では殿内らの方法を採用して酵母の分離を行ったせいか、採取した4検体の生花からは *S. cerevisiae* を分離することができず、枯れて落ちた花11検体から1検体分離できたのみだった。花からはあまり *S. cerevisiae* を分離できないと記載した殿内らの報告を再現した。花に *S. cerevisiae* が本当に存在しないのかどうかは更なる研究が必要であるが、実作業として *S. cerevisiae* が分離されてくるかどうかは培地条件など選抜の方法によって大きな影響を受けるものと思われる。

全ゲノムの包括的な解析により、中国で分離された *S. cerevisiae* が *S. paradoxus* と最も系統的に近く、*S. cerevisiae* のルーツは中国にあると考察されている¹⁹⁾。中国に分布する *S. cerevisiae* 野生酵母は独立した9系統に分かれることが報告されており、そのうちわずかな系統のみがマルトース資化性を獲得し、現在使用されているすべての産業用酵母に分岐したと考えられている²⁰⁾。したがって野生酵母においてマルトース資化性はマイナーな形質であると言える。今

回、分離した33株の *S. cerevisiae* はいずれもマルトース資化性がなかった。また、マルトース資化性株の変異育種においても、今回分離した株では、一般的によく使用される2DG耐性株を取得する方法¹²⁾、アンチマイシン耐性株を取得する方法¹³⁾では取得することができなかった。*S. cerevisiae* がマルトース資化性変異が取得しやすいかどうかは、野生酵母の系統的距離が影響しているものと考えられる。一方、マルトース培地で集積培養して取得した変異株を親として取得した2DG耐性株から、マルトースを高効率で利用する株を取得することができた。段階的に取得した2つの変異株の変異箇所を解析すれば、マルトース資化性のレベルに寄与する染色体上のアレルが明らかとなり、進化的あるいは育種上の観点から非常に有用な知見となるとと思われる。

5 結 言

本研究では岩手県内の自然環境中からの *S. cerevisiae* の分離およびビール醸造への利用を検討した。自然環境下より取得したすべての *S. cerevisiae* 分離株はマルトース資化性がなかったことから、マルトースを炭素源とした集積培養、2DG耐性化を経てマルトースを高効率で利用可能な変異株が取得した。得られた野生酵母マルトース資化性変異株を用いてビールの試験醸造を実施した。その結果、取得した分離変異株は健全な発酵経過を示し、単菌でビール製造が可能であることが確認された。実用に耐えうる性能かどうかは今後更なる評価が必要ではあるものの、自然環境下から分離されたマルトース資化性がない *S. cerevisiae* に、マルトース資化性を付与し、ビール製造を検討した本研究は近年進展する日本のクラフトビール業界に有用な知見を提供するものと思われる。

謝 辞

野生酵母育種株のビール試験醸造には株式会社遠野醸造にご協力いただきました。前醸造長の太田睦博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 一般社団法人日本ビール文化研究会：知って広がるビールの世界，翔泳社（2024）
- 2) きた産業株式会社：全国醸造所リスト，<https://kitasangyo.com/beer/MAP.html>（2024-7-17）
- 3) 丸山裕慎，小澤敦揮，山崎栄次，藤原孝之：地域特産果実を副原料として用いた新香気クラフトビールの開発，日本食品科学工学会誌，68，p.21-31（2021）
- 4) 鈴木成宗，坂宮章世，金澤春香，栗田修，矢野竹男，荻田修一：樹液から単離した香気生産野生酵母の

- ビール香気特性および実用性の評価, 日本食品工学会誌, 17, p.59-69 (2016)
- 5) 堀江祐範, 中川智行, 杉野紗貴子, 吉村明浩, 奈良一寛, 梅野彩, 田尾博明: 地産微生物の応用として四国遍路道から分離した野生酵母による清酒醸造の試み, 美味技術学会誌, 15, p.12-20 (2016)
 - 6) 松田義弘, 上木厚子, 上木勝司: 各種果実から分離された香気生産性野生酵母の同定と香気生産特性, 日本醸造協会誌, 104, p.57-74 (2009)
 - 7) 武内純子, 阪内淳逸, 山崎雅夫: 自然界からの酵母分離および分離された *Lachancea thermotolerans* の酒類製造上の性質と活用, 日本食品科学工学会誌, NSKKK-D-24-00043 (2024)
 - 8) 久富泰資: 福山バラの酵母プロジェクト, 生物工学会誌, 102, p.418-420 (2024)
 - 9) 殿内暁夫, 森山裕理子, 青山嘉宏, 土岐春歌: 白神山地から分離した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の利用, 日本醸造協会誌, 111, p.437-444 (2016)
 - 10) 川崎浩子: MALDI-TOF MS を用いた微生物迅速同定の食品微生物分野への展開, 日本食品微生物学会雑誌, 37, p.165-177 (2020)
 - 11) Shi NQ, Cruz J, Sherman F, Jeffries TW: SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipitis*, Yeast, 19, p.1203-1220 (2002)
 - 12) Orikasa Y, Mikumo D and Ohwada T: A 2-Deoxyglucose-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae* shows enhanced maltose fermentative ability by the activation of MAL genes. Foods, 7, p.52 (2018)
 - 13) Maruyama H, Yamamiya T, Ozawa A, Yamazaki E and Suzuki N: Beer Brewed with Sake Yeast Strain Has Unique Sake-like Flavors, J. Am. Soc. Brew Chem., 82, p.150-159 (2023)
 - 14) 畠中治代: ラガービール酵母の・-グルコシドトランスポートの機能解明と変異型トランスポーター高発現による発酵速度改善, 大阪大学博士論文 (2018)
 - 15) Shimizu M, Miyashita K, Kitagaki H, Ito K and Shimoi H: Journal of bioscience and bioengineering, 100, p.678-680 (2005)
 - 16) 玉川英幸: PCR 法による独自清酒酵母の判別, 岩手県工業技術センター研究報告, 24, p.66-69 (2022)
 - 17) Schneiderbanger H, Koob J, Poltinger S, Jacob F and Hutzler M: Gene expression in wheat beer yeast strains and the synthesis of acetate esters, J Inst Brew, 122, p.403-411 (2016)
 - 18) 数岡孝幸: 清酒製造用酵母の分離および実用化, 日本醸造協会誌, 110, p.298-355 (2015)
 - 19) Peter J, De Chiara M, Friedrich A, Yue J X, Pflieger D, Bergström A, Sigwalt A, Barre B, Freel K, Llored A, Cruaud C, Labadie K, Aury JM, Istace B, Lebrigand K, Barbry P, Engelen S, Lemainque A, Wincker P, Liti G, Schacherer J: Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates, Nature, 556, p.339-344 (2018)
 - 20) Duan SF, Han PJ, Wang QM, Liu WQ, Shi JY, Li K, Zhang XL, Bai FY: The origin and adaptive evolution of domesticated populations of yeast from Far East Asia, Nature communications, 9, p.2690 (2018)