

## 7 有用性微生物の育種、応用に関する研究 (有用耐塩性微生物の造成)

化学部 工藤 智子  
古江 国昭

### 要 旨

本研究では、香味良好な優良味噌から分離した耐塩性酵母について生理特性を試験し、それらの中から発酵力旺盛な5株を選んだ。さらに、5株それぞれを添加した小規模味噌仕込み試験を実施し、その結果スクリーニングしたO M-1と香り豊かな清酒酵母との細胞融合を試みた。

### 1. 緒 言

高塩分食品である味噌・醤油等の醸造技術の改善を図るうえで、醸造微生物の育種改良は今日的課題の一つと言える。特に、県産品の中でも麦味噌の生産高は、本県が全国第1位を誇っている。

麦味噌中の多種多様な耐塩性微生物の中でも、特に酵母の働きが新製品開発の鍵を握る。製品の味・香り・色等は、主発酵酵母である*Saccharomyces rouxii*や、後熟発酵に関与する*Candida versatilis*、*C. etchellsii*などの働きに微妙に影響を受けるため、これら耐塩性酵母の違いが製品の品質を大きく左右する。

そこで、優良耐塩性酵母をスクリーニングし、清酒酵母協会13号との細胞融合を試み、若干の知見を得たので報告する。

### 2. 実験方法

#### 1) 優良耐塩性酵母の分離

##### ① 供試菌株

香味良好な味噌7種から分離した優良耐塩性酵母140株を供試。

なお、*S. rouxii*、*C. versatilis*、*C. etchellsii*についても対照として供試した。

##### ② 形態観察、生理特性試験

##### a) 形態観察

コロニー生育状況、色、形の観察。顕微鏡下における酵母の形、大きさの観察。

##### b) 生理特性試験

- ・塩分耐性 (0~25%)
- ・TTC染色 (野生酵母の判別)
- ・オルソバニリン耐性 (*S. rouxii*属酵母のみ生

育) 15 ppm

・糖類発酵性 (Glu・Gal・Suc・Mal・Lac・Raf)

・糖類資化性 (Glu・Gal・Suc・Mal・Lac・Raf)

##### c) 官能試験

液体培養、個体培養 (味噌添加MY培地、塩分10%) により、官能試験を実施。

#### 2) 分離酵母による味噌小仕込試験

表1のとおり麦粒味噌を仕込み、その3kgずつに分離した耐塩性酵母5株を添加。併せて、無添加区と標準株添加区も仕込み、計8試験区を実施 (表3)。

表1 麦粒味噌仕込配合

原 料	重 量(kg)
原料麦 (裸麦)	10.0
原料大豆 (内地大豆)	4.8
出麴重量	11.7
食塩重量	3.2
蒸大豆重量	10.0
種水重量	3.0

① 熟成途中の成分分析 [a)~d)は基準みそ分析法による]

a) pH:

b) 滴定酸度:

c) 蛋白分解率:

d) 蛋白溶解率:

e) 糖類:

・装置; Jasco High Pressure Liquid

Chromatograph TRI ROTAR

Temperature Control Unit

UT-100

Shodex RI SE-11

- ・条件；カラム：Shodex S-801  
 プレカラム：Shodex S-801  
 溶媒：超純水  
 温度：35℃  
 流量：1.0ml/min

- ・前処理；各試料10gに20%スルホサリチル酸2滴を加え、水で計20gにする。十分に攪拌した後その浸出液をDISMIC-13cp(0.45μm ADVANTEC)でろ過したものをサンプルとした。

- ・項目；グルコース、マルトース、キシロース、アラビノース、グリセリン、エタノール

f)色度：

- ・装置；デジタル測色色差計 ND-504AA  
 (日本電色工業株式会社)

②最終製品の評価

a)有機酸：

- ・装置；Jasco High Pressure Liquid Chromatograph TRI ROTAR Temperature Control Unit UT-100 UV-Spectrometer UVIDEC-100-VI
- ・条件；カラム：Shodex C-811 2本  
 移動相：3mM過塩素酸(HClO<sub>4</sub>)水溶液  
 反応相：0.2mM ブロムチモールブルー(BTB)  
 15mM リン酸水素ナトリウム(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)水溶液

温度：60℃

流量：1.0ml/min(移動相)

0.5ml/min(反応相)

検出：UV-445nm

- ・前処理；① e) 糖類に同じ
- ・項目；クエン酸、リンゴ酸、コハク酸、乳酸、ギ酸、酢酸、ピログルタミン酸

b)官能試験：

全試験区における最終製品の味・香り・色について官能試験を実施(表3)。

3)味噌酵母と清酒酵母との細胞融合

①選択培地(生理的相補性マーカー)の確認

融合成功株を抽出する際決め手となる、親株の生理的相補性マーカーを決定するために、各種培地でK-13、OM-1の生育試験を実施。

YEPD培地でK-13を、味噌添加MY培地でOM-1を前培養し、各酵母の菌数を測定して、ほぼ同量の菌体をそれぞれ約15mlの選択培地(組成は表4参照)に混釈し、TTC下層培地(1%グルコース、1.2%ポリペプトン、0.15%酵母エキス、0.04%MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、3%寒天、pH5.5)約10mlを重層する。35℃で培養し、成育状況を観察。

②プロトプラスト融合

a)プロトプラスト化条件の検討

最適なプロトプラスト化の条件を把握するため、表2のような溶菌試薬によりプロトプラスト化率を測定。

YEPD培地で1晩前培養済みのK-13及びOM-1それぞれを、0.6MKClで洗浄後、K-13を試薬III、OM-1を試薬I、IIで溶菌し、1時間ごとに検鏡して菌数計測を行う。

プロトプラスト化率を算出するために、溶菌途中の酵素液100mlにH<sub>2</sub>O1mlを加え、5分放置した後、菌数計測を行う。

$$\text{プロトプラスト化率(\%)} = \frac{\text{最初の菌数} - \chi \text{時間後の菌数}}{\text{最初の菌数}}$$

表2 プロトプラスト化用溶菌試薬組成

試薬No.	組	成
I	0.1%メルカプトエタノール(SET)	:1ml
	0.6M KCl+60mg/ml Funclaseを含む 0.1M 酢酸バッファー	:1ml
II	0.1%メルカプトエタノール(SET)	:1ml
	0.6M KCl+60mg/ml Funclaseを含む 0.1M 酢酸バッファー	:1ml
	0.5mg/ml Zymolyase 2000	:1ml
II	0.6M KCl+30mg/ml Funclaseを含む 0.1M 酢酸バッファー	:2ml

### 3. 実験結果及び考察

#### 1) 優良耐塩性酵母の分離

形態観察、生理特性試験、官能試験の結果、優良耐塩性酵母（OM-1～OM-5）5株をスクリーニングし、その5株を味噌小仕込試験に供試した。

#### 2) 分離酵母による味噌小仕込試験

##### ① 仕込味噌の熟成経過

分析結果を図1～6に示す。

試験区No.5～8については、図1、2より仕込み初期の急激なpH低下、酸度上昇が認められた。

また、図5によると試験区No.1、8の酵母では発酵力がやや劣っていることが推察される。

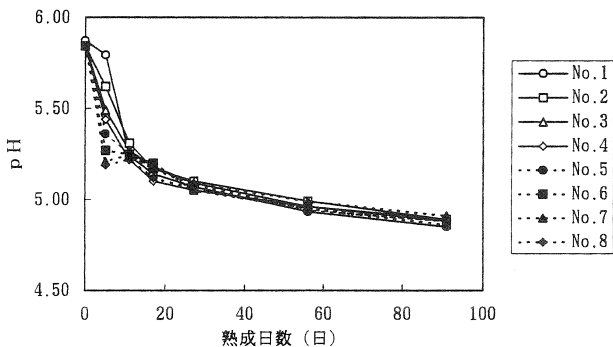


図1 pH

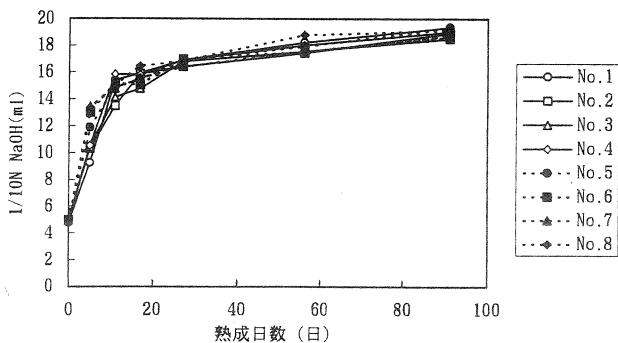


図2 滴定酸度

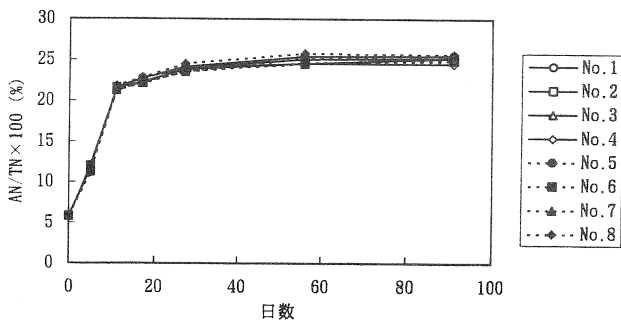


図3 蛋白分解率

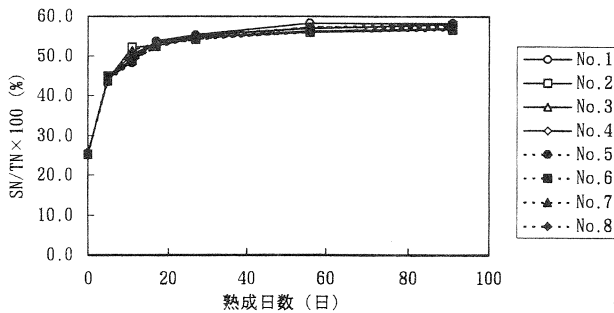


図4 蛋白溶解率

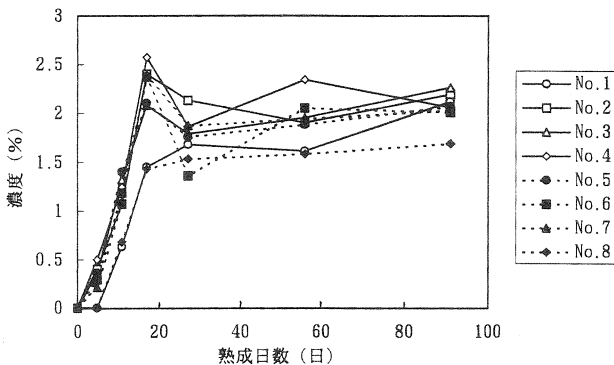


図5 アルコール生成能

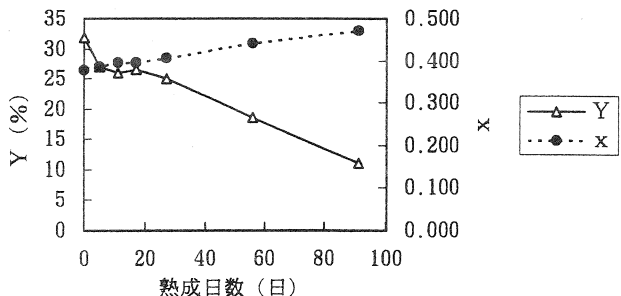


図6 味噌熟成中の測色値の変化(試験区No.2)

##### ② 最終製品の評価

分析結果を図7に示す。

試験区No.3、6では、味噌ではあまり好ましくないギ酸が、若干多めに生成している。

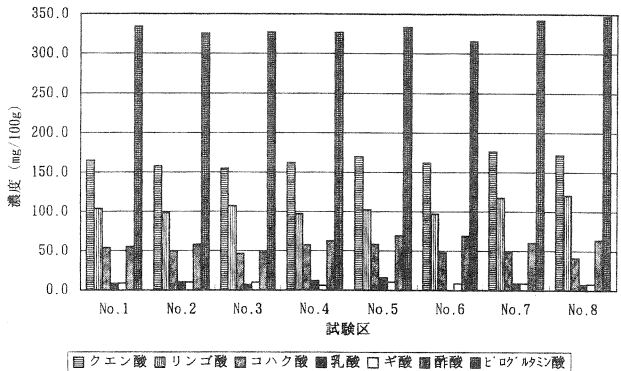


図7 有機酸組成

以上の結果と、表3に示す官能試験の結果を総合的に判断すると、試験区No.2で用いたOM-1が味噌酵母としてもっとも良好な性質を有しているということが判明した。

したがって、清酒酵母との細胞融合にはOM-1を供試した。

表3 味噌仕込試験 (官能試験結果)

試験区	添加酵母	官能結果	概 評
1	無添加	△	香り過多
2	OM-1	◎	すっきり、発酵香有り
3	OM-2	△	重い
4	OM-3	○	
5	OM-4	△	発酵香なし
6	OM-5	△	
7	S.rouxii	○	
8	C.versatilis	×	

3)味噌酵母と清酒酵母との細胞融合

①選択培地 (生理的相補性マーカー) の確認

2. 3)①の生育試験の結果、選択培地には炭素源であるラフィノースと食塩を両親株の生理的相補性マーカーに決定し、表4の培地No.1を融合成功株確認用選択培地とした。

表4 K-13とOM-1の生育試験

培地NO.	培 地 成 分	K-13	OM-1
1	YNB	0.67%	
	ラフィノース	2.00%	×
	NaCl	10.00%	×
2	YNB	0.67%	
	ラフィノース	2.00%	○
3	YNB	0.67%	
	グルコース	2.00%	×
	NaCl	10.00%	○
TTC		R	W

{ YNB: イースト ナイトロゲン ベース w/o  
アミノ酸 pH 5.2  
TTC: R=red, W=white

②プロトプラスト融合

a)プロトプラスト化条件の検討

プロトプラスト化率測定結果を図8に示す。

表2の試薬No.Ⅲについては、K-13を1時間で半分以上に溶菌していることがわかる。したがって、K-13は、Ⅲで十分溶菌可能と

言える。

しかし、OM-1溶菌用試薬のⅠ、Ⅱについては、5時間経過後も顕著な現象が確認できず、さらに溶菌酵素の検討が必要と思われる。

以上の結果から、耐塩性酵母は細胞壁が他の酵母に比べ強固な構造をしているため、通常の溶菌酵素では効果が認められないことが考えられる。

一般に、耐塩性酵母は清酒酵母等に比べ、増殖速度が遅く増殖菌体量も少ないため、アルコール発酵能、増殖速度、芳香性に優れた清酒酵母を融合の相手として選択したが、本研究では、プロトプラスト調製が思うように進まず、この条件を確立することが今後の最優先課題と考えられる。

また、細胞壁の溶解が困難であることから、融合後の細胞壁の再生も容易には行えないことが想定されるため、融合法についてもPEG法や電気融合法等各種融合技術の検討が今後の課題である。

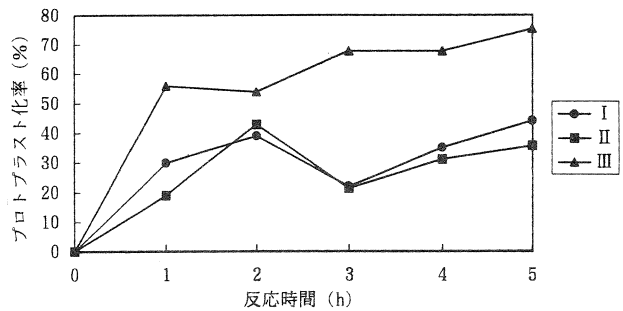


図8 プロトプラス化率

参考文献

- 1)中野政弘:味噌の醸造技術、(財)日本醸造協会
- 2)好井・金子・山口:食品微生物学、技報堂出版
- 3)石川辰夫:微生物遺伝学実験法、共立出版
- 4)永井進:酵母の細胞工学と育種、学会出版センター
- 5)木村・河合:食品微生物学、培風館
- 6)田口・永井:微生物培養工学、共立出版
- 7)今井・松本:醸協, 70, (12) (1975)
- 8)海老根英雄:醸協, 80, (3) (1985)
- 9)西田・加藤・村田:醸協, 86, (5) 372 (1991)
- 10)久寿米木・馬場・中原・小川:醸協, 87, (9) 645 (1992)