

氏 名	野 地 秀 和
学位 (専攻分野の名称)	博 士 (醸造学)
学 位 記 番 号	甲 第 906 号
学位授与の日付	令和 6 年 3 月 20 日
学位論文題目	清酒製造用酵母の分離のための新規集積培地開発
論文審査委員	主査 教 授・博士 (農芸化学) 前 橋 健 二 教 授・博士 (工学) 數 岡 孝 幸 教 授・博士 (農学) 徳 岡 昌 文

論文内容の要旨

清酒製造において清酒酵母は清酒の主成分となるアルコールの生成だけではなく、香味に関わる多くの成分の生成に関与しており、清酒の酒質の形成に大きく影響を与えている。しかし現在は、多くの酒蔵がきょうかい酵母を使用することで酵母が形成する風味の多様性が減少していると考えられる。近年、他社製品との差別化、酒質のさらなる向上や多様化を目的に、薬剤耐性取得を利用した既存酵母からの育種や、清酒醪からの新たな特性を持った酵母の分離が試みられているが、それらの多くは親株がきょうかい酵母である。一方で、東京農業大学の微生物工学研究室をはじめ、県の試験センターの研究者によって自然界からの新規清酒製造用酵母の分離が試みられている。しかし、自然界からの分離の試みでは、清酒製造に使用することができる酵母を分離できた例もあるが、目的の酵母を取得できない例も多くあり、効率的な集積培養法や選抜法の開発が期待されている。そこで申請者は、清酒酵母のビタミン要求性という特徴に着目して、新規の清酒製造用酵母の分離方法の開発、特に新規集積培地の開発を行った。

実用酵母のビタミン要求性は酵母によって異なるが、清酒酵母については、ビタミンを要求しない性質を持つことが知られており、これを用いて集積培地の設計を行った。また抗菌物質として微生物工学研究室で以前より使用している清酒酵母を除く各種酵母の生育を阻害する Yeastcidin を添加した。新たに設計した集積培地を BY 培地として、各種実用酵母を用いた増殖試験を行ったところ、清酒酵母 (きょうかい酵母 6, 7, 9 号) および焼酎酵母 (SH4 株) の増殖は確認する事ができたが、SH4 株以外の焼酎酵母やビール酵母、ワイン酵母等の増殖は確認できなかった。この結果より、分離の目的とする清酒製造用酵母を選択的に集積できると考えられたため、実際に花を分離源に清酒製造用酵母の分離を試みることにした。結果として、清酒製造に用いることができる性質を持ち、かつカプロン酸エチル

高生成の新規の清酒製造酵母の分離に成功した。BY 培地を用いた分離の結果、清酒製造に利用できる酵母の分離に成功したことから、新たに設計した BY 培地は集積培地として利用できることが確認できた。

Yeastcidin は、清酒用種麹菌から分離された *Aspergillus oryzae* No.G 株によって生産される抗菌物質で、申請者が所属する研究室で長年、集積培地に添加して自然界から新規清酒製造用酵母の分離に利用されてきた。本抗菌物質は、清酒酵母以外の酵母の生育を広く阻害するため酵母分離に非常に有用であるが、市販されておらず、この抗菌物質を入手できない他機関の研究者による新規清酒製造用酵母の分離を難しくしている要因であった。そこで申請者は、抗菌物質を添加しない清酒酵母のビタミン非要求性のみを利用した新規集積培地 BV 培地を設計した。この培地についても各種実用酵母による増殖試験を行ったところ、清酒酵母（きょうかい酵母 6, 7, 9 号）と焼酎酵母 A12 株、泡盛酵母 Aw1 株が増殖した。このことから BY 培地同様に BV 培地でも清酒酵母を選択的に集積できると考えられたことから、BV 培地を用いて自然界からの酵母を行えるか、花を添加して分離の試験を行ったところ、高いアルコール発酵性を示す酵母の分離に成功した。このことから新たに設計した BV 培地は集積培地として利用できることが確認できた。

さらに、自然界から分離した酵母が自然界にエスケープしたきょうかい酵母と異なる酵母であることを判別するために、酵母の生理学的諸性質を用いた酵母識別の検討を行った。セルレニンやシクロヘキシミド等を用いた試験を複数組み合わせることで、試験したきょうかい酵母 18 株中 16 株について識別することができた。また、分離した 4 株の酵母についても試験を行ったところ、1 株を除き、きょうかい酵母と異なる酵母であると判別できる結果を得ることができた。

審査報告概要

本博士論文は、自然界からの清酒製造用酵母取得のための新規集積培地を開発し、さらに酵母の生理学的諸性質によって分離酵母と既存酵母とを識別する方法の確立を試みた研究である。申請者は、清酒製造用酵母を自然界から取得する試みにおいてアルコール発酵性が低い酵母や *Saccharomyces cerevisiae* 以外の酵母が分離されることが多い問題に対し、特にアルコール発酵性が低い酵母が取得されづらい集積培地の開発を目的に、清酒酵母のビタミン非要求性に着目してビタミンを含まない新規集積培地を設計した。また、それを用いて実際に清酒製造用酵母を分離することも実証した。分離酵母と既存清酒酵母の識別法については、先行研究では既存 18 株のうち 5 株しか識別できない不完全なものであったが、新規清酒製造酵母の探索・分離を試みる者であれば誰もが技術的に実施可能な酵母の生理学的

諸性質に関する複数の試験によって、既存 18 株のうち 16 株を識別できる方法を確立した。さらに実際に分離酵母と既存酵母の識別も可能であることを示した。本研究の結果は、研究題材となるアルコール高発酵性酵母を増やす手段として有効であり、学術的にも産業的にも意義があると考えられる。これらの研究成果等を詳細に検討した結果、審査委員一同は博士（醸造学）の学位を授与する価値があると判断した。