ミニレビュー [Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol.63, No.12, pp.1885~1887, 1989]

=シリーズテーマ=

ワイン酵母の特性と優良菌株の選択育種

ワイン酵母の特性と優良菌株の選択育種	後藤 昭二	1885
キラーワイン酵母の育種と利用	原 昌 道	1888
キラーワイン酵母の形質の遺伝	北野 一好	1893
細胞融合による優良ワイン酵母の育種	清水 健一	1896
ワイン酵母による芳香成分の生成	篠 原 隆	1900

ワイン酵母の特性と優良菌株の選択育種†

後 藤 昭 二

(山梨大学工学部発酵化学研究施設)

はじめに

ワインの酒質は原料ブドウの品種、品質によるところが大きいといわれてきた。しかし、安全、安定な果醪発酵のために添加されるワイン酵母は、菌株ごとに増殖能や発酵力、低温発酵性、亜硫酸耐性、揮発酸や高級アルコール等の生産性に差があり、生成ワイン酒質に影響することが報告されてきた。従来、これらの性質を目安に自然界（ブドウや果醪）から優良菌株の分離、選択が行われてきた。近年、上記のほか、キラー活性、凝集性、低泡性その他が安定な発酵と製造工程の合理化上、望ましい性質として取り上げられ、また直接酒質に影響する酵母によるエステルや高級アルコール類の生成、フェノール類の合成、分解、果汁中の微量成分の代謝産物、等等ワインの香味形成に関する知見が蓄積されつつあり、あらためてワイン酵母の重要性が見直されている。

以下、ワイン酵母の特性と優良菌株の選択、育種の概要を紹介する。

1. 野生酵母の分布とワイン酵母の種類

原料ブドウおよび果醪には多種類の酵母が $10^3 \sim 10^6$ cells/ml 存在している⁽¹⁾。表1に示したように、一般に *Kloeckera apiculata* が優勢で *Saccharomyces cerevisiae* 群は少ない。*Torulaspora delbrueckii* (rosei), *Candida stellata*, 産膜酵母 F 群は常在酵母として、また *Zygosaccharomyces bailii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Schizosaccharomyces pombe* 等が分離される。F 群や *Z. bailii* は生成ワインの汚染原因酵母でもある。

果醪は、これら野生酵母が優勢であること、野生酵母の静菌ないし殺菌および果汁の酸化防止のため約 100 ppm の亜硫酸が添加されること、低 pH (3.0~3.4) で高糖度 (約 20~24%) であることなどの特徴を持っている。このような条件下で果醪を安全に発酵させ、良質のワインを得るためにワイン酵母の添加が行われる。

果醪の主発酵を担う酵母は *S. cerevisiae* とその関連酵母である。主として糖類の資化、発酵能に基づく The Yeasts, 2nd ed., 1970⁽²⁾ によれば、ワイン酵母は表2のように多種類である。しかし、*S. cerevisiae* が圧倒的に多く、次いで *S. bayanus* である。*Saccharomyces sensu stricto* の分類上の標徴として使用されてきた糖類の利用能は不安定であること、また各種間の交雑が可能であることなどから、The Yeasts, 3rd ed., 1984⁽³⁾ では、表

† Characterization and Improvement of Wine Yeasts.

Shoji GOTO (The Institute of Enology and Viti-culture, Yamanashi University, Kitashin, 1-13-1, Kofu 400)

表 1 ブドウおよび果醪発酵中の酵母群の消長⁽¹⁾

酵母群	主要菌種	酵母群構成比(%)		
		果汁	発中	発終
KA	<i>K. apiculata</i>	40~70	0~1	0
S 1	<i>S. cerevisiae</i>	2~10	95~100	98~100
	<i>S. bayanus</i>			
S 2	<i>T. delbrueckii</i>	1~5	0~1	0~1
	<i>Z. bailii</i>			
T	<i>C. stellata</i>	10~15	0~1	0
F	<i>P. membranae-faciens</i>	10~20	1~5	1~2
	<i>C. krusei</i>			
O	<i>M. pulcherrima</i>	2~5	0~2	0~1
	<i>S'des ludwigii</i>			
	<i>Schizos. pombe</i>			

表 2 ワイン酵母の種類

I <i>Cerevisiae</i> 群	II <i>Bayanus</i> 群	III <i>S. exiguus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. bayanus</i>	
<i>S. capensis</i>	<i>S. heterogenicus</i>	
<i>S. chevalieri</i>	<i>S. uvarum</i>	
<i>S. italicus</i>		

中のワイン酵母は、*S. exiguus* を除き、すべて *S. cerevisiae* に包含されることになった。しかし最近、DNA-DNA 相同性実験の結果、*S. cerevisiae* 群と *S. bayanus* 群間の DNA 相補性は 5~32% と低いことから両者を別種にするとの提案が行われた⁽⁴⁾。また、Banno ら⁽⁵⁾ は、*S. cerevisiae* と低い DNA 相同性の *S. bayanus* 株について、*S. cerevisiae* の Gal⁻ 突然変異株との相補試験により、これが gal 4 突然変異体であることおよび制限酵素地図も両種間で異なることから、両者を別種にすることを提案している。なお、ワイン醸造上の観点から、*S. bayanus* は一般に低温性といわれ、高アルコール耐性菌株や仮性産膜能を持つ菌株が多いという特徴がある。

2. タリズムと倍数性

Snow⁽⁶⁾ は *Saccharomyces* 属ワイン酵母 71 菌株のうち、子のう胞子形成能を欠落した等の 24 菌株を除いた 44 菌株がホモタリク、2 倍体で、ヘテロタリクは 1 菌株のみであることを、また Thornton⁽⁷⁾ は供試ワイン酵母 25 菌株中 21 菌株がホモタリク、2 倍体で、3 倍体と思われたものは 1 菌株であることを報告した。後藤ら⁽⁸⁾ は 48 菌株中、胞子形成能や胞子発芽能の欠落した菌株を除き、38 菌株がホモタリクで、1 菌株のみが

ヘテロタリクと思われ、大多数の菌株は 2 倍体であることを明らかにした。その他、供試菌株数は少ないが同様の報告があることから明らかにワイン酵母のほとんどの菌株はホモタリク、2 倍体で、ヘテロタリク株はまれで、また 3 倍体以上の高次倍数菌株も少ない。

醸造酵母のうち清酒酵母 (*S. cerevisiae*) はヘテロタリクのものが多く、パン酵母や下面発酵型ビール酵母は高次倍数体が多いことと比較すると、ワイン酵母の多くがホモタリク、2 倍体であることは一つの特徴であろう。なお、高次倍数体は遺伝的に安定であり、他方ホモタリク株は長期保存中の形質の保持に有利であるとの解釈もある。

3. 優良菌株の選択、育種

ワイン酵母の選択、育種改良には、他の醸造用酵母の場合と同様 1) 自然界からの分離、検索、2) 突然変異、3) 接合による交雑、4) プロトプラスト融合、および 5) 形質転換が考えられる。

以下、ワイン酵母として望ましい特性を持つ菌株の選択、育種改良について近年行われたなかの数例を紹介する。

(1) 低温発酵性 低温性酵母として広く使用されている *S. cerevisiae* W 3 は果醪から分離されたものである⁽⁹⁾。なお、本菌株は 1 個の核遺伝子 KHR に支配される weak killer 活性を有するという特徴を持つ。この特性は果醪発酵中における添加酵母の純度検定を行うときのマーカーとして有用である⁽¹⁰⁾。他方、Kusiewicz⁽¹¹⁾ は変異処理から低温性変異株を得ている。低温発酵性に関する遺伝的背景は未だ明らかでない。

(2) 亜硫酸耐性 前記の W 3 は亜硫酸 150~200 ppm でよく発酵するが、OC 2 の耐性は 100~125 ppm である。亜硫酸耐性は 2 個以上の優性遺伝子によって支配されることが示されている⁽¹²⁾。

(3) H₂S 非生産性およびオフ・フレーバー非生成能 自然界から分離されている。Romano ら⁽¹³⁾ は H₂S 非生成菌株と凝集性菌株との交雑から両性質を備えた交雑株を得た。

(4) グリセロール高生産性 Eustae ら⁽¹⁴⁾ はグリセロール生産能が 3~6 g/l の数種の親株の胞子間接合から生産能 10~11 g/l の交雑株を得た。また、四胞子解析の結果、グリセロール高生産性は 2:2 に分離することを報告している。

(5) 高級アルコール生産性 Rous ら⁽¹⁵⁾はブランデー原料ワイン用酵母として、イソアミルアルコール 50% 減、総フーゼル油 20% 減の高級アルコール低生産能突然変異株を得た。フーゼル油低含量のブランデー用ワインを使用したときの蒸留管理は容易である。

(6) 凝集性 自然界からも低頻度ながら分離されているが⁽¹⁶⁾、胞子間接合交雑によりワイン酵母への凝集能の導入が行われた⁽¹⁷⁾。凝集性は 1 個の優性な遺伝子が関与する安定な菌株のほか、不安定な菌株のあることが報告されている⁽¹⁸⁾。

(7) 低泡性 Eschenbruck ら⁽¹⁸⁾はワイン酵母と泡なし酵母の胞子間交雑により泡立ち能の排除に成功している。泡立ち性は、少なくとも 2 個の優性な遺伝子 (FRO-A, FRO-B) の制御下にあり⁽¹⁹⁾、これは清酒酵母のそれに対応することも確認された。

(8) リンゴ酸分解能 乳酸菌のマロラクチック (ML) 酵素は、分子量約 70,000 のそれぞれ 2 個の同じサブユニットから成ることから、ML 発酵に必要な遺伝情報は単一遺伝子によるものと考えられた⁽²⁰⁾。このことから Williams ら⁽²¹⁾は *Lactobacillus delbrueckii* の ML 遺伝子を *Escherichia coli*-酵母シャトルベクターを用いてワイン酵母にクローン化した。この酵母は果醪発酵中、L-リンゴ酸の約 1.5% を L-乳酸に変換した。実用化には、酵母細胞中での ML 遺伝子発現に関する研究が必要である。

(9) キラー活性 キラーワイン酵母は、果醪発酵中、野生酵母群の排除に有効である。キラーワイン酵母は大部分が K₂ タイプであり、ワイン酵母の特徴の一つとみなされよう。キラーワイン酵母については原、北野両氏によって解説される。

おわりに

従来、優良酵母といわれる菌株を多数のブドウ品種の仕込みに画一的に使用してきたきらいがある。しかし、別々の品種のブドウ果醪の発酵に同一菌株を使用した場合、発酵速度、アルコールや芳香成分の生成量、さらには生成ワインの官能検査のランキングも異なることが指摘されている。酵母遺伝学やワイン酵母の醸造上の各特性等の研究は、前記のように望ましい性質の育種改良の展望を開いている。今後はブドウ品種ごとに最も適した菌株を選択し使い分けることが必要である。

他方、育種手法による菌株の改良のためには、それぞれに特徴的な形質を持った菌株を自然から分離、検索す

ることと、これら菌株の生物学的、遺伝学および醸造学的特性を調査研究し、ワイン酵母菌株のコレクションの確立が必要である。

おわりに本レビューの執筆を心よくお引き受け下された先生方にお礼申し上げます。

- (1) 後藤昭二：醸協，80，392 (1985)。
- (2) J. P. van der Walt: "The Yeasts, a Taxonomic Study," ed. by J. Lodder, 2nd revised and enlarged edition, North-Holland Publ., Amsterdam, 1970, p. 555.
- (3) D. Yarrow: "The Yeasts, a Taxonomic Study," ed. by N. J. W. Kreger-van Rij, 3rd completely revised edition, Elsevier, Amsterdam, 1984, p. 379.
- (4) V. Martini and C. P. Kurtzman: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35, 508 (1985).
- (5) I. Banno and Y. Kaneko: 7th Int. Symp. Yeasts-Abstracts, Perugia, 1988, p. 122.
- (6) R. Snow: *Am. J. Enol. Vitic.*, 30, 33 (1979).
- (7) R. J. Thornton: *Ant. van Leeuw.*, 52, 97 (1986).
- (8) 後藤昭二，前島善彦，樋口純子：1989 年度日本農芸化学会大会講演要旨集，1989, p. 117.
- (9) 横塚 勇，後藤昭二，阿角忍喜：山梨大発研報告，1, 63 (1954)；9, 89 (1962).
- (10) 北野一好，原 勝，牛島栄治，高橋利郎，戸塚 昭，後藤昭二：1987 年度日本醸造工学会大会講演要旨集，p. 186.
- (11) D. Kusewicz: *Acta Aliment. Pol.*, III 1~2, 61 (1976).
- (12) J. Thornton: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14, 159 (1982).
- (13) P. Romano, M. E. Soli, G. Suzzi, L. Grazia and C. Zambonelli: *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 1064 (1985).
- (14) R. Eustae and R. J. Thornton: *Can. J. Microbiol.*, 33, 112 (1987).
- (15) C. V. Rous and R. Snow: *J. Inst. Brew.*, 89, 274 (1983).
- (16) G. Suzzi, P. Romano and C. Zambonelli: *Can. J. Microbiol.*, 30, 36 (1984).
- (17) R. J. Thornton: *Am. J. Enol. Vitic.*, 36, 47 (1985).
- (18) R. Eschenbruck, K. J. Cresswell, B. M. Fisher and R. J. Thornton: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14, 155 (1982).
- (19) R. J. Thornton: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 5, 103 (1978).
- (20) G. Caspritz and F. Radler: *J. Biol. Chem.*, 258, 4907 (1983).
- (21) S. A. Williams, R. A. Hodges, T. L. Strike, R. Snow and R. Kunkee: *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 288 (1984).