

地域特性を有する県産清酒の開発

—新規清酒酵母の検索—

恩田 匠・長沼孝多・乙黒親男・渡辺正平*・飯村 稷**

Development of Yamanashi Original Sake

— Screening of new Sake yeast —

Takumi ONDA, Kota NAGANUMA, Chikao OTOGURO, Masahira WATANABE* and Yuzuru IIMURA**

要 約

山梨県内で採取された花・果実などを分離源として、清酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の検索と分離を行った。合計328点の試料について、麴エキスを培地による集積培養を行った結果、51点について発泡性が認められた。この発泡性の認められた試料から、純粋分離操作を繰り返し、49株の酵母を得た。これら酵母菌株のアルコール生成能を調べたところ、16株の分離株が比較的強いアルコール発酵性を示した。これらの酵母について、同定試験を行った結果、その全てが *Saccharomyces cerevisiae* であると推定された。

1. 緒 言

清酒醸造には、アルコール発酵を行うための清酒酵母¹⁾が必要不可欠である。現在、清酒醸造の現場では、通常に(財)日本醸造協会から頒布されている酵母(いわゆる協会酵母)を利用して製造が行われている場合が多い。これらの酵母は、ほとんどが各地の清酒もろみから分離された優良酵母である。近年、新たな清酒酵母を分離・開発することで、清酒製品の個性化・差別化が試みられ、各県の地方公設試験研究機関でも行われてきた。最も最近の例として、山口県工業技術センターが桜の花からの清酒酵母²⁾(「桜酵母」と呼称されている)の分離に成功し、新たな製品の開発に至っている。この「桜酵母」のように、自然界には清酒醸造に適した酵母が広く分布していると考えられ、これらの中にはより良好な風味や呈味を示すものが存在する可能性が示唆された。

そこで、山梨県特産の果実や花などから新規な清酒酵母を検索し、分離した清酒酵母を用いて本県オリジナルの清酒を開発することを目的として研究に着手した。平成15年度は、酵母の検索と分離酵母の諸性状の解析を行った。

2. 実験方法

2-1 供試試料

酵母の分離源として、山梨県内の花・果実類を中心とした試料を収集した。収集のための容器には、主に拭き

取り検査用キット(フキフキチェック、栄研社製)を用いた。

山梨県工業技術センターが収集した227点、山梨県酒造組合の共同研究参画企業10社が収集した101点の合計328点を用いた(Table 1)。

2-2 麴エキスの作製

酵母の分離ならびにエタノール生成(発酵)試験には、麴エキスを主体とした培養基を用いた。この麴エキスは、市販乾燥麴(精米歩合70%、徳島精工社製)を用いて調製した。すなわち、乾燥麴に対し4倍容の蒸留水を加え、65℃で6~7時間保温することで高温糖化处理した後、遠心分離(5,000rpm, 20分間)を行って、その上清を麴エキスとして得た。この高温糖化处理による糖化液は、グルコース濃度約18 g/100ml、ボーメ度14~15度であった。この麴エキスは、使用まで冷蔵保存した。

2-3 清酒酵母の分離

収集された試料を麴エキス培地に入れ、25℃で保温した。この麴エキス培地には、酵母の分離時には乳酸(2ml/100ml)を添加し、好気性細菌の生育抑制のためにシクロヘキシミド(10mg/100ml)とアジ化ナトリウム(10mg/100ml)、カビの生育抑制のためにプロピオン酸ナトリウム(100mg/100ml)を添加した。集積培養時には、さらに場合によりエタノール(2~5ml/100ml)を添加した。この培地は、110℃10分間の殺菌処理を行った。

酵母分離用の試料を麴エキスに添加し、20~25℃で数日間保温後、発泡（ガスの生成）が認められた試料について、さらに同培地を用いて集積培養を繰り返した。最終的に5%エタノールを含む麴エキス培地を用いた集積培養においても強い発泡が認められた培地について、YM寒天培地（Difco社製）を用いて streak 培養（ストリークカルチャー）を繰り返し、酵母様の単コロニーの分離を行った。平板培地の培養は25℃で行った。ストリークカルチャーにおいて、カビなどの好気性菌の生育を抑制する必要があるときには、シャーレを嫌気ジャー（角形ジャー、三菱ガス社製）に入れ、嫌気（炭酸）ガス発生剤（ガスバック「アネロ」、三菱ガス社製）を用いて嫌気培養を行った。

分離した菌株について、光学顕微鏡観察により、純粋分離されているか否か確認した。

2.4 酵母の培養法および保存

酵母菌株は、グリセロールストック（25%グリセロール、0.85%食塩）として、超低温（-80℃）下で凍結保存を行った。短期的な保存には斜面培養菌体を作製して利用した。それら保存菌体から、YM液体培地（または麴エキス培地）に植菌し、20~25℃18時間静置培養した。3回以上継代培養を繰り返し、菌体の活性を高めてから同定試験やアルコール生成試験に供した。

2.5 アルコール生成試験

麴エキス培地200ml（乳酸などその他の成分は無添加）に、同培地で前培養した酵母菌株を約 10^6 CFU/mlになるように接種し、21℃で静置培養を行った。任意の期間培養後、培地中のエタノールと残糖（グルコース、マルトース）濃度の定量を、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて行った。すなわち、培養後の培地について、遠心分離（3,500rpm、20分間）により菌体を除去後、メンブランフィルターでろ過して、試験液を調製した。HPLC分析には、陽イオン交換樹脂（Na型#2618、日立社製）を充填したステンレス製のカラム（カラム温度40℃）を用いた。溶離液には0.4%リン酸を用いて流速0.6ml/minに設定し、示差屈折計を検出器（検出器温度40℃）により測定した。また、炭酸ガス生成による重量減少を経時的に測定し、発酵経過を観察した。

エタノール生成試験には、対照菌株として、協会酵母きょうかい701、901ならびにワイン酵母W-3およびOC-2を用いた。

2.6 酵母の同定試験

分離酵母のうち、アルコール生成が認められた菌株について、形態観察と糖類の資化性試験による簡易同定を

実施した。形態観察は、細胞形態とコロニーの形態・色調を観察し、PDA培地およびYM培地上での偽菌糸の形成を調べた。糖類の資化性は、酵母同定キットアピCオクサノグラム（API 20C AUX、日本ビオメリュー社製）を用いた。同定キットのマニュアルに従い、YM寒天培地に生育させた酵母菌株を生理的食塩水2mlに懸濁させた後、アピCオクサノグラム液体培地に0.1ml添加したものをオクサノグラムプレートに接種した。3日間培養後に、プレート上の19種の炭素源（グルコース、グリセリン、2-ケト-D-グルコン酸カルシウム、L-アラビノース、D-キシロース、アドニット、キシリトール、ガラクトース、イノシット、D-ソルビトール、 α -メチル-D-グルコシド、N-アセチル-D-グルコサミン、D-セロビオース、ラクトース、マルトース、D-トレハロース、D-メレチトース、D-ラフィノース）の資化性パターンを調べ、Ycast第2版³⁾の記載を基に菌種の推定を行った。

3. 実験結果および考察

3.1 酵母の検索と分離

麴エキスを用いた1次スクリーニングの結果、51点の試料において発泡が認められた（Table 1）。この発泡性は、酵母が増殖したときに発生した炭酸ガスによるものであると推定し、同試料を用いて酵母の集積培養を繰り返した。集積培養は、最終的に5%エタノールを含む麴エキス培地を用いた。集積培養後の試料から、ストリークカルチャーによる純粋分離操作を繰り返すことによって、49株の酵母菌株を得た。

3.2 分離酵母のアルコール生成試験結果

分離酵母を麴エキスで21℃14日間培養した後のアルコール生成試験の結果をFig. 1に示した。今回の麴エキス培地において、対照とした清酒酵母（きょうかい701、901）およびワイン酵母（OC-2、W-3）は、12~13%のエタノール生成を生成した。

49株の分離酵母は、エタノール生成量から3つのグルー

Table 1 供試試料と分離酵母数

会社記号	試料数	酵母分離 試料数 ¹⁾	その他	酵母分離試料の分離源
工技セ	227	16		桜、富士桜、芝桜、桜餅用、桃、ブドウ、リンゴなどの花・果実
A社	4	2		札、樹液
B社	4	2		菌物の花
C社	0	0		
D社	5	2		麹
E社	37	14		駒いちご、桑の葉、桜の葉、桜餅用、バラ、豆柿など
F社	6	2		環境
G社	0	0		
H社	0	0		
I社	32	7	32*	保など
J社	13	6		麹・自宅の花類（キンモクセイ、富士アザミ、富士桜など）
総計	291	35		

1) 発泡が認められた試料数、*E社内で培養（発泡）済みの試料も含む。

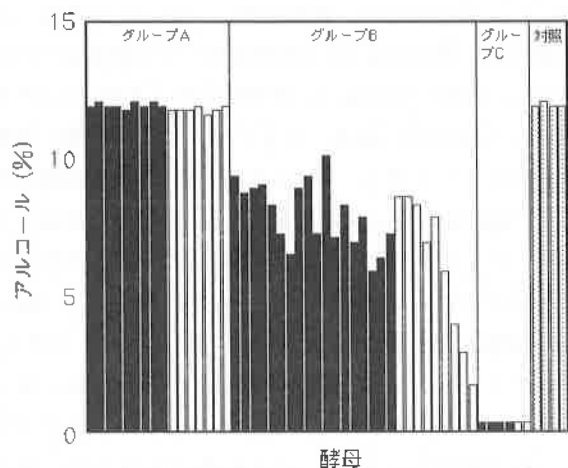


Fig. 1 分解酵母のアルコール生成量の比較

黒棒は工業技術センターの試料から、白棒は共同研究企業からの分離酵母、対照は、左からきょうかい701, 901, OC-2, W-3.

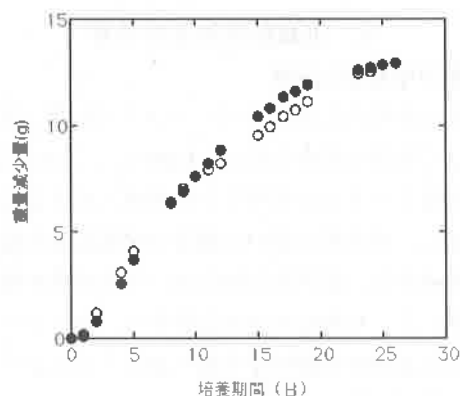


Fig. 2 分離酵母の増殖性

黒●：きょうかい701，白○：分離酵母（No. 2株）

ブ (A, B, C) に分類できた (Fig. 1)。対照とした清酒酵母とほぼ同等のエタノール生成を示したグループAは、16菌株であった。このグループAの16菌株は全て麴エキス培地中のグルコースをほとんど完全に消費したことを確認した。しかしながら、後述するように16菌株全てがマルトース資化性を有するにも関わらず、麴エキス中のマルトースはほとんど消費されず、麴エキス中ではグルコースが優先的に消費されることが分かった。なお、グループAの菌株は、麴エキス培地で旺盛な増殖を示し、その増殖性は、既存の清酒酵母と比較して遜色無かった (分離酵母No.2の結果のみをFig. 2に示す)。

5%前後のエタノールを生成したグループBは27株であり、ほとんどエタノール生成の無かったグループCは6株であった。グループBとCの酵母は、麴エキス中のグルコースを完全には消費しなかった。これらの酵母は、清酒モロミ中で18%以上のエタノール生成が必要とされる清酒醸造には適さないことが推察された。

Table 2 分解酵母の生化学的性状

性 質	グループ	
	A-I	A-II
形態的特徴		
栄養細胞の形態	卵型	卵形
コロニー	スムーズ	スムーズ
皮膜	なし	なし
偽菌糸	なし	なし
糖類資化性		
グルコース	+	+
グリセロール	-	-
2-ケト-D-グルコン酸	-	-
L-アラビノース	-	-
D-キシロース	-	-
アドニット	-	-
キシリトール	-	-
ガラクトース	-	+
イノシトール	-	-
D-ソルビトール	-	-
α-メチル-D-グリコシド	-	-
N-アセチル-D-グルコサミン	-	-
D-セロビオース	-	-
ラクトース	-	-
マルトース	+	+
スクロース	+	+
D-トレハロース	+	+
D-メレジトース	-	+
D-ラフィノース	-	+

+ : 陽性, - : 陰性.

3-3 分離酵母の同定

分離した49株の酵母の同定試験を実施した。分離酵母のうち、高いアルコール生成を示したグループAの酵母菌株は、糖類の資化性パターンからグループA-IとグループA-IIの2群に大別できた (Table 2)。

グループA-Iの酵母は、乳白色のコロニーを形成し、偽菌糸 (または菌糸) を形成せず、卵形の細胞形態を示した。これらの菌株は、グルコースの他に、ガラクトース、マルトース、スクロース、トレハロース、メレジトース、ラフィノースを資化して生育したことから、*Saccharomyces cerevisiae*¹⁾ であると推定した。

グループA-IIの酵母は、乳白色のコロニーを形成し、偽菌糸 (または菌糸) を形成せず、卵形の細胞形態を示した。これらの菌株は、グルコースの他に、ガラクトース、マルトース、スクロースを資化して生育したことから、*Saccharomyces cerevisiae* であると推定した。グループA-Iの酵母とは異なり、トレハロース、メレジトース、ラフィノースを資化した。

一般的に清酒酵母*S. cerevisiae*は、ガラクトースを資化する²⁾ことからされていることから、A-IIの菌株は、A-Iの菌株に比べ、より清酒酵母に近い性質を有する菌株である可能性が示唆された。A-Iは、ワイン酵母に多い、*Saccharomyces bayanus*であることも推察された。

アルコール生成の低かったグループBとCの酵母菌株は、糖類資化性パターンから、*Candida*属などの酵母であると推定され、*Saccharomyces cerevisiae*ではないことが分かった(データは示していない)。

現在、食品製造に用いる微生物の安全性については、厳密な確認が必要になっていることから、分離した酵母についても、今後遺伝子レベルでの情報に基づき同定試験が必要である。

前述したように、新たな清酒酵母を自然界から検索する試みは、各県で実施されるようになってきている。新潟県醸造試験場¹⁾では、平成15年度までに、新潟県内の花や果実などの試料200点からの酵母の分離を行い、3株の酵母を得たが、それらはアルコール生成能が低く、清酒酵母*S. cerevisiae*ではなかったことを報告している。本研究においても、得られた*S. cerevisiae*は16株と非常に少なかった。以上のことから、自然界では発酵性の*S. cerevisiae*は少なく、非発酵性の野性酵母が有意であるとする知見²⁾が指示された。

本研究で得られた清酒酵母については、今後その醸造特性等を調べていく。

5. 結言

山梨県内の花や果実などから16株の清酒酵母を分離した。今後は、清酒酵母の検索とともに、得られた清酒酵母を用いた実験室レベルでの小仕込試験を実施し、その生成酒の評価を行っていく予定である。

酵母検索のための試料の収集にご協力いただいた方々に御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 清酒酵母研究会：清酒酵母の研究(改訂)、清酒酵母研究会(日本醸造協会内)、東京(1970)
- 2) 柏木享:桜の花から分離した酵母による清酒の商品化、日本醸造協会、97、2-6(2002)
- 3) Barnett, J. A., Patne, R. W. and Yarrow, D. The Yeasts: Characterization and Identification (2nd ed.), Cambridge University Press, Cambridge (1983)
- 4) Barnett, J. A., Patne, R. W. and Yarrow, D., 497 *Saccharomyces cerevisiae*, The Yeasts: Characterization and Identification (2nd ed.), Cambridge University Press, Cambridge, p. (1983)
- 5) 飯塚廣, 後藤昭二, 主な種の検索, 酵母の分類同定法

(第3版), 東京大学出版会, 東京, p. 107-121 (1980)

- 6) 栗林喬:野性酵母の醸造特性, 食品の試験と研究, 38, (2004).
- 7) Lund, A., The chemistry and biology of yeasts, Ecology of yeasts, Academic Press, New York, p. 63-80 (1958)