

# 思川桜からの酵母の分離と 地域オリジナルな日本酒の開発

荻野目 あづさ<sup>\*1</sup>, 川久保 利麗叶<sup>\*2</sup>, 上田 誠<sup>\*3</sup>

Isolation and characterization of fermentative yeasts  
from omoigawa-zakura

Azusa OGINOME, Ririka KAWAKUBO, Makoto UEDA

Many Japanese wine, sake are fermented by Kyokai sake yeasts. However, in recent years, screening of fermentative original yeasts from flowers and fruits have been attempted because the needs of unique sake requirements of non-traditional sake tastes are increased. Thus, we tried to screen the fermentative yeasts from Omoigawa cherry that is the City Flower of Oyama-city and to develop of fermented foods such as sake. A selected strain, *Saccharomyces cerevisiae* OPJ-1, showed high ethanol productivity almost as much as the Sake yeast kyokai No.7. The sake by *Saccharomyces cerevisiae* OPJ-1 brewed at a local brewery this commercial fermentation was released in April 2014.

KEYWORDS: Sake yeast, omoigawa-zakura, sake brewing

## 1. はじめに

思川桜とは、春に薄紅色の花を咲かせる小山市原産の桜である。十月桜の突然変異種とされており、十月桜より色が濃く、花が小ぶりであること

が特徴である。発見は、久保田秀夫氏であり、思川を望む丘陵地で発見されたことからこの名がつけられた。昭和 53 年 7 月 10 日には小山市により市花に認定されており、現在も開花時期には思川桜を題材にした数多くの祭りが開催されている。また、平成 13 年度には里親制度が導入されており、

---

\*1 持田製薬工場株式会社 (Mochida Pharmaceutical Plant Co., Ltd., 2014 年度小山高専専攻科卒業)

\*2 専攻科(Advanced Course of Material Chemistry and Bioengineering)

\*3 物質工学科(Dept. of Material Chemistry and Bioengineering), E-mail: mueda@oyama-ct.ac.jp

多くの市民に愛されていることがうかがえる。本研究室は、この思川桜を利用した日本酒等の商品を開発することによる地域貢献を目指し、思川桜からの酵母の分離を行った。

自然界には多くの野生酵母が生息し、多種多様な特性を持つ。野生酵母は、土壌、水、樹木、樹液、花、花の蜜腺、果実など自然界のあらゆるものや地域に生息しており、生息する生態環境に関連して、上述の醸造用酵母とは異なる芳香性や資化性などをもつことが報告されている<sup>1-3)</sup>。

清酒の醸造においては、関与する酵母がアルコール生産の他にも香りの特徴付ける各種芳香成分の生成や、味に関与する有機酸やアミノ酸の生産などに深く関わっているため、清酒の品質に対する酵母の役割は大きい。したがって、性質の異なる酵母を用いることにより、清酒の風味を変化させることが可能だと考えられる<sup>4)</sup>。そのような性質の違いを利用して、清酒への新たな特色を付加するために、独自に自然界から野生酵母を分離し醸造に使用する試みが行われている<sup>5)</sup>。

## 2. 方法

### 2. 1 思川桜からの酵母の分離

酵母分離用液体培地（糖類 20%、酵母エキス 0.3%、ポリペプトン 0.3%、プロピオン酸カリウム 0.64%、クロラムフェニコール 0.01% (pH5.6)）30mL の入ったプラスチックコップに、各々思川桜の花弁を 3~5 輪入れ 25°C にて数日から十日間静置培養を行った。培養中、菌の生育、発泡の見られた培地を YM 寒天培地（グルコース 1.0%、酵母エキス 0.3%、麦芽エキス 0.3%、ポリペプトン 0.5%、寒天 2.0%）に塗布し、単コロニー分離法にて 1 サンプルにつき 3 から 6 のコロニーの単離を行った。単離した菌をクロムアガーカンジダ寒天培地（クロモペプトン 1.0%、グルコース 2.0%、クロラムフェニコール 0.05%、発色基質混合物 0.2%、寒天 1.5%）に塗布し、25°C にて生育後コロニーの色を観察した。

### 2. 2 日本酒製造用酵母の選択

分離酵母の中から日本酒製造に適した酵母を選択するため TTC 染色試験、エタノール耐性試験を

行った。さらに分離株の遺伝子解析を行うことにより菌株の同定を行った。

#### 2. 2. 1 TTC 染色試験

分離酵母を TTC 下層培地（グルコース 1.0%、ペプトン 0.2%、酵母エキス 0.15%、酸性リン酸カルシウム 0.1%、硫酸マグネシウム 0.04%、クエン酸 0.03%、寒天 3.0% (pH4.5±0.1)）に植菌し、25°C にて 2 日間培養した。2 日後、TTC 上層培地（TTC 0.005%、グルコース 0.05%、寒天 0.15%）を重層し、2~3 時間後にコロニーの色を確認した。

#### 2. 2. 2 エタノール耐性試験

YPD 液体培地（グルコース 2.0%、酵母エキス 1.0%、ポリペプトン 2.0%）3mL の入った試験管にエタノールを添加し、5、10、15% (v/w) のエタノールを含んだ培地を作成した。分離酵母を各々植菌し 25°C にて 2 日間培養を行い、濁度 (600nm) の測定によりエタノールの耐性を調べた。対照株として協会 7 号を用いた。

#### 2. 2. 3 DNA 塩基配列解析による同定

思川桜より分離した優良酵母 22 株の同定は、ITS 領域および 26S rDNA D1/D2 領域 (OPJ-1, OPJ-8 のみ) の塩基配列解析により行った (株式会社マクロジェン・ジャパンに解析に外注)。

### 2. 3 小仕込み試験

アルコール生産能を評価するため実際に酒造場で行われている三段仕込みを用いた小仕込み試験を行った。日本酒の醸造は通常、低温下で時間をかけて発酵させるため温度は 10°C とした。原料の  $\alpha$  米 (徳島製麹 (株), AA-60)、乾燥麹 (徳島製麹 (株), 1-60) には精米歩合 60% のものを用いた。仕込配合は表 1 のとおりである。

種酵母はグルコース 10% の YPD 培地を試験管に 5ml 分注し 30°C にて約 2 日間培養した。水麹は乾燥麹、仕込水を容量約 900mL のマヨネーズ瓶にいれ、25% 乳酸水 0.4mL と酵母培養液 0.2mL を添加した。添仕込は乾燥麹からの酵素抽出時間を確保するため、水麹の数時間後に行った。 $\alpha$  米を添加後、

直ちに瓶をゆっくり振って攪拌し、内部の麴、 $\alpha$ 米、仕込水を均一に分散させ添仕込とした。踊り（酵母増殖期間）をとる必要があるため、仲仕込は添仕込から2、3日後に行った。また、仲仕込、留仕込みは連続した二日間で実施した。最初に乾燥麴を添加、続いて仕込水を添加し攪拌、最後に $\alpha$ 米を添加し再度攪拌し内容物を均一にした。

表 1 三段仕込の仕込配合

	水麴	添仕込 (一段目)	仲仕込 (二段目)	留仕込 (三段目)	計
乾燥麴(g)	10	0	10	10	30
$\alpha$ 米(g)	0	20	30	50	100
仕込水 (mL)	50	0	70	140	260
総米(g)	10	20	40	60	130

糖類の炭酸ガスへの変換による重量の変化をエタノール生成の目安とした。留仕込終了の段階から重量が40g以上の減量、あるいは減量速度の低下や炭酸ガス発生が停止から発酵の終了を判断した。対照株として協会7号を用い、遠心分離により得られた上清（清酒）を比較分析した。

## 2. 4 分析

小仕込み試験で得られた清酒の評価はエタノール濃度、有機酸濃度の測定により行った。エタノールの濃度測定はガスクロマトグラフィー

(Agilent J&W GC カラム - DB-5 30m, 0.32mm, 1 $\mu$ m)を用いた。有機酸濃度の測定は高速液体クロマトグラフィー (Shim-pack SCR-102H) のpH緩衝化ポストカラム電気伝導度検出法により行った。

## 3. 結果および考察

### 3. 1 思川桜からの菌の分離

思川桜 1,300 輪を用い、265 サンプルの酵母分離用液体培養液を作成した。数日から10日程度で92サンプルに高い発泡性を確認できたため、これらの培養液をクロムアガーカンジダ寒天培地に塗布した。クロムアガーカンジダ寒天培地は、微生物が生産する酵素によって分解されると発色する人工発色源が含まれているため、微生物の属を呈

色で大まかに判別することができる。代表的な *Saccharomyces* 属はクロムアガーカンジダ寒天培地で白色から紫色を呈する。92 サンプルの培養液をクロムアガーカンジダ寒天培地に塗布した結果、43 株の白色あるいは紫色のコロニーを取得することが出来た。さらに、単離株の発泡性や糖類での増殖性を調べることにより22株を以後の試験に候補株とした。

### 3. 2 酒造能力評価

#### 3. 2. 1 TTC 染色試験

TTC(2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド)は、水素によりTPF(トリフェニルホルマゼン)へ還元される。また、酵母のミトコンドリア内にはコハク酸脱水素酵素が存在する。よって、TTCを酵母上に重層すると、コハク酸脱水素酵素により遊離した水素がTTCを還元するため、脱水素酵素の働きの大い酵母上はTPFの呈する赤色へ変化する。協会酵母はこの試験により赤を呈することが知られているため、TTC染色試験は実際に酒造場等で発酵に使われている清酒酵母の純度確認に用いられている。本実験にて、思川桜より分離した酵母のうちOPJ-1株は、協会7号と同様の赤色を呈した。この結果からOPJ-1株は発酵力の高い酵母であり、日本酒製造に利用可能な性質を持つことが示唆された。また、OPJ-74-1株も赤色を呈したがOPJ-1株および協会7号と比べるとやや薄い赤色であった。

#### 3. 2. 2 エタノール耐性試験

酵母は嫌気的な培養条件下でエタノールを生産するが、アルコール生産用酵母には自ら生産したエタノールへの耐性が求められ、アルコール耐性は醸造用酵母には必須の性質である。従って、エタノール耐性の高い菌体の方が、生製品のアルコール度数を高めることができるため酒造能力が高いと評価できる。本実験において、エタノール濃度0%、5%条件では、22株全てが問題なく増殖した。しかし、10%条件においては、高い増殖がみられた株は、OPJ-1、OPJ-22-1、OPJ-74-1の3株についてのみであった。中でもOPJ-1、OPJ-74-1の2株は協会7号と同等のアルコール耐性を示した。

### 3. 3 遺伝子解析

遺伝子解析の結果を表2にまとめた。酒造能力評価にて高い性能を示した OPJ-1、OPJ-74-1 は *Saccharomyces cerevisiae* と同定された。*S. cerevisiae* は現在酒やパン等多くの場で用いられ、人類が歴史的につき合っている有用微生物の代表格であり、以後の小仕込み試験では、*S. cerevisiae* OPJ-1、OPJ-74-1 を用いることにした。また、多数分離された *Torulaspota delbrueckii* はワイン醸造での分離株として知られる。これら *Torulaspota delbrueckii* の中から優良酵母を選択すれば、将来ワイン製造を実施できる可能性もある。

表2 分離酵母の同定結果

分離株の分類	取得菌株数
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	11
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
<i>Starmerella bombicola</i>	2
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	2
<i>Wickerhamomyces sp.</i>	1
<i>Pichia anomala</i>	1
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1
<i>Candida zeylanoides</i>	1
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1

### 3. 4 小仕込み試験

思川桜から分離した *S. cerevisiae* OPJ-1、OPJ-74-1 の日本酒製造能力を低温下の三段仕込みにより評価した。アルコール発酵では、糖が消費されエタノールと二酸化炭素を生成する。発酵容器の重量の減少を観察することにより、発酵速度を判定することができる。Fig. 1 に協会7号と *S. cerevisiae* OPJ-1、OPJ-74-1 の発酵の様子を重量の推移により示した。これら2株は協会酵母と同等の発酵能力および低温耐性能力があることが明らかとなった。発酵終了後のエタノール濃度は、協会7号 16.1%、*S. cerevisiae* OPJ-1 17.7%、*S. cerevisiae* OPJ-74-1 17.0%であった。

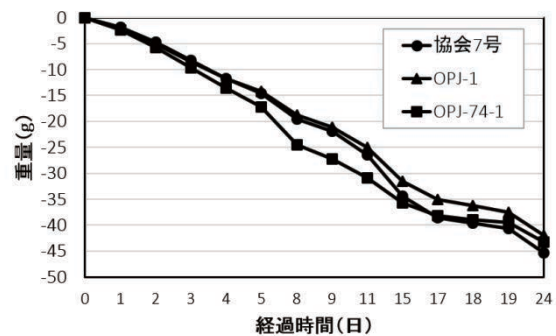


図1 小仕込み試験の重量変化

有機酸濃度の測定結果を図2に示す。OPJ-1 株はリン酸、クエン酸、リンゴ酸は、協会7号と同等かそれ以上の濃度を有しており、コハク酸（貝類に含まれる旨み成分）、乳酸（やわらかみのある温和な酸味）の濃度が比較的高い傾向にあることがわかった<sup>6)</sup>。OPJ-74-1 はクエン酸、乳酸は協会7号よりやや少ないがリン酸（洗みを伴う酸味）、コハク酸が多い結果となった。

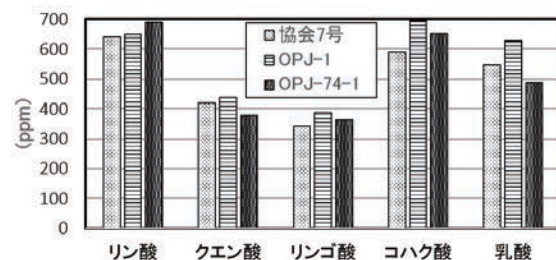


図2 小仕込み試験による日本酒の有機酸濃度

## 4. まとめ

本研究において、小山市花である思川桜花弁より優良な発酵性を示す酵母を分離することができた。中でも、*S. cerevisiae* OPJ-1 は協会7号と同等の高い日本酒製造能力を示した。この研究結果を基に(株)野崎本店および杉田酒造(株)と協力し、2014年1月から *S. cerevisiae* OPJ-1 を用い、地元小山市で栽培されたお米“ふゆみずたんぼ”を原料とした日本酒を製造し4月から販売した。さらに2015年は小山市で栽培された五百万石の酒米を用いた純米酒の製造に発展した。この産学官連携で開発されたお酒は2015年5月30日に行われた小山高専の50周年祝賀会での鏡開きに用いられた(図3)。





図3 *S. cerevisiae* OPJ-1 によるお酒  
 A: 小山高専 50 周年祝賀式での樽酒  
 B: 思川桜花酵母のお酒

左) 2014 年製造, 中央) 2015 年製造, 右) 祝賀式記念品

#### 参考文献

- 1) 鎌倉未貴, 眞山眞理: スダチ花卉から分離した野生酵母 *Hanseniaspora meyeri* の製パンへの応用, Bull. Shikoku Univ., 34, pp.37-46, (2012)
- 2) 木下富雄, 田中麻有: パン用野生酵母の花・果実からの分離, 兵庫大学論集, 12, pp.71-82, (2007)
- 3) 木下富雄, 井上裕子: パン用野生酵母の花・果実からの分離 (2), 兵庫大学論集, 13, pp.69-81, (2008)
- 4) 木下(小室)友香理, 門倉利守, 数岡孝幸, 穂坂賢, 中田久保: 花から分離した酵母の性質と清酒醸造における特徴, 東京農大農学集報, 53, pp.100-106, (2008)
- 5) 山下浩一, 田坂美奈: 新規酒造用酵母の開発, 奈良県工業技術センター研究報告, 30, pp.17-21, (2004)
- 6) 浅野忠男: 清酒酵母の有機酸生成に関する研究, 生物工学会誌, 85(2), pp.63-68, (2007)

【受理年月日 2015年 9月28日】

