

## 研究論文

## 「萬三の白モッコウバラ」から分離した酵母の清酒醸造特性評価

三井 俊\*<sup>1</sup>、小野奈津子\*<sup>1</sup>、安田（吉野）庄子\*<sup>1</sup>、伊藤彰敏\*<sup>1</sup>、山本晃司\*<sup>2</sup>*Sake Brewing Characteristics of Yeast Isolated from Flowers Called “Mansan-no-shiromokkoubara”*Shun MITSUI\*<sup>1</sup>, Natsuko ONO\*<sup>1</sup>, Shoko YOSHINO-YASUDA\*<sup>1</sup>,  
Akitoshi ITO\*<sup>1</sup> and Koji YAMAMOTO\*<sup>2</sup>Food Research Center\*<sup>1\*2</sup>

愛知県半田市指定天然記念物「萬三の白モッコウバラ」から清酒製造に適した有用酵母の分離を試みた。集積培養により分離された 3 株の酵母は 28S rDNA D1/D2 領域の塩基配列解析より、いずれも *Saccharomyces cerevisiae* と同定された。清酒小仕込試験における製成酒のアルコール分が協会酵母と比較してやや低いものの、協会酵母に対してキラ性を示さないことから、清酒製造に適用可能であることが確認された。また、製成酒の日本酒度の値より、本酵母を利用した清酒は甘口の酒質となることが推測された。

## 1. はじめに

近年、地域資源を活かした製品の開発によって、地域の活性化を図る取り組みが盛んに行われている。清酒業界においても、地域ブランド製品の開発が模索されている。こうした取り組みの一環として、各県公設試験研究機関や大学が中心となり、花や果実等から有用酵母を分離して清酒製造に利用する試みが行われてきた。我々はこれまでに愛知県内の各種植物から食品用酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を分離すると共に、清酒製造を含め、その利用技術の開発に取り組んできた<sup>1)~3)</sup>。

本研究では、地域ブランド清酒の開発を目的として、株式会社萬三商店敷地内の半田市指定天然記念物「萬三の白モッコウバラ」から酵母を分離した。遺伝子解析手法を用いて酵母の種の同定を行うと共に、キラ性、糖質化性等の生理学的性質を評価した。また、清酒小仕込試験を行い、分離酵母のアルコール、有機酸及び香気成分の生成能を評価し、清酒製造への適性を検討した。

## 2. 実験方法

## 2.1 酵母の分離

## 2.1.1 使用培地

1 次集積培地はエタノール 3%(v/v)を添加した麹汁培地(ボーメ 5.0、pH4.0)を使用した。2 次集積培地はエタノール 10%(v/v)を添加した麹汁培地を使用した。コロニー分離用の平板培地には TTC(トリフェニルテトラゾリウムクロライド)下層培地(日本醸造協会製)を使用した。

## 2.1.2 分離源

平成 25 年 4、5 月に株式会社萬三商店(愛知県半田市)敷地内の半田市指定天然記念物「萬三の白モッコウバラ」から採取した花を分離源とした。

## 2.1.3 集積培養

採取した花 50g を 1L 容三角フラスコ中の 1 次集積培地 500ml に浸漬し(計 30 本)、33°C で 7 日間静置培養を行った。白濁の認められた 1 次集積培養液 1mL を 200mL 容メディウム瓶中の 2 次集積培地 100ml に接種し、33°C で 7 日間静置培養を行った。2 次集積培養において白濁が認められた試験区に関して、培養液の一部を適宜希釈して TTC 下層培地に塗抹し、酵母のコロニーを得た。

## 2.2 遺伝子解析による分離酵母の種の同定

真菌の系統分類に用いられる 28S rDNA D1/D2 領域を解析対象とした<sup>4)</sup>。集積培養により分離された酵母のコロニーから鋳型となる DNA を抽出し、プライマー D1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') および D2 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') と、PCR 用酵素 QIAGEN Fast Cycling PCR Kit (QIAGEN 製)を用いて PCR を行った。PCR の温度条件は、95°C 5 分、40 サイクルの 96°C 5 秒; 55.5°C 5 秒; 68°C 27 秒、72°C 1 分とした。得られた DNA 断片の塩基配列を BLAST プログラム (National Center for Biotechnology Information、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) によりホモロジー検索を行い、酵母の種を同定した。

\*1 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 \*2 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 (現分析加工技術室)

## 2.3 分離酵母の生理学的性質

### 2.3.1 TTC 染色性

分離酵母を麹汁培地にて培養した後、培養液を TTC 下層培地にスポットして 30℃で 2 日間培養を行った。コロニー出現後、TTC 上層培地を重層し、30℃で保温して、呈色を観察した。対照として協会酵母 K701、K901、K1801 株を使用してコロニーの呈色を比較した。

### 2.3.2 キラー性

分離酵母を麹汁培地にて培養した後、培養液から白金耳を使用して TTC 下層培地に一本植菌線を描き、それと交差するように協会酵母 K701、K901、K1801 株の培養液をそれぞれ植菌線画し、30℃で 2 日間培養した。

### 2.3.3 糖資化性

酵母様真菌同定キット ID32C アピ（シスメックス・バイオメリュー（株）製）を用いた。TTC 下層培地に生育させた酵母菌体を滅菌水 2mL に懸濁させ、ID32C アピ C メディウムに 250  $\mu$ L 添加した。これを ID32C アピプレートに接種した。30℃で 48 時間培養後、プレート上の 31 種類の炭素源（ガラクトース、シクロヘキシミド、白糖、N-アセチル-グルコサミン、乳酸、L-アラビノース、D-セロビオース、ラフィノース、D-マルトース、トレハロース、2-ケト-グルコン酸カルシウム、 $\alpha$ -メチル-D-グルコシド、D-マンニトール、乳糖、イノシット、D-ソルビトール、D-キシロース、D-リボース、グリセロール、L-ラムノース、パラチノース、エリスリトール、D-メリビオース、グルクロン酸ナトリウム、D-メレチトース、グルコン酸カリウム、レブリン酸、ブドウ糖、L-ソルボース、D-グルコサミン塩酸塩、エスクリン）の資化性パターンを調べた。

## 2.4 分離酵母を用いた清酒小仕込試験

### 2.4.1 発酵経過の比較

乾燥麹（60%精白、徳島製麹（株）製）20g、乾燥  $\alpha$  化米（60%精白、徳島製麹（株）製）80g、蒸留水 180ml、分離酵母の前培養液 10ml を混合して、15℃で発酵させた。対照酵母として協会酵母 K701 株を使用した。小仕込試験容器の蓋にピンホールを空けてガス放出口を設け、容器重量を測定した。重量減少をモニタリングして発酵経過の比較を行った。

### 2.4.2 製成酒の成分分析

もろみ日数 20 日目に上槽を行った。7000rpm、20 分の条件で遠心分離し、得られた上清液を製成酒として成分分析に供した。アルコール分はアルコメイト AL-2 型（理研計器（株）製）を用いて測定した。日本酒度、酸度、アミノ酸度及び香気成分組成に関しては国税庁所定分析法<sup>5)</sup>に準拠して分析を行った。有機酸組成は前報<sup>3)</sup>に従い、高速液体クロマトグラフで分析した。

## 3. 実験結果及び考察

### 3.1 酵母の分離

採取した花を浸漬して行った 30 本の 1 次集積培養のうち、4 本で白濁とガスの発生が認められた。その 4 本の 1 次集積培養液を 2 次集積培地に接種して培養を行ったところ、3 本の培養で白濁が認められた。白濁が認められた 3 本の培養液をそれぞれ適宜希釈して TTC 下層培地に塗抹し、30℃で 2 日間培養を行った。生じたコロニーから、3 種類の酵母（以降モッコウバラ酵母 M1、M2、M3 株と記載）を取得した。

### 3.2 遺伝子解析による分離酵母の種の同定

モッコウバラ酵母 M1、M2、M3 株について、28S rDNA D1/D2 領域の約 600bp の DNA 断片を PCR により増幅し、それぞれの塩基配列を決定した。これらの配列について公開データベースに登録されている配列との相同性を比較したところ、いずれも *S. cerevisiae* の 28S rDNA D1/D2 領域の塩基配列と 100%一致した。これらの結果より、モッコウバラ酵母 M1、M2、M3 株は *S. cerevisiae* と同定された。

### 3.3 分離酵母の生理学的性質

#### 3.3.1 TTC 染色性

TTC 染色性はアルコール発酵能の指標となる。酵母のアルコール発酵能が高ければ TTC が還元され、強い赤色を示す。一般的な酒造現場で使用される協会酵母は TTC を還元して強い赤色を示す。

対照として用いた協会酵母 K701、K901、K1801 株のコロニーは強い赤色を示した。一方、モッコウバラ酵母 M1、M2、M3 株のコロニーはいずれもピンク色に染色された。モッコウバラ酵母は一般的な酒造現場で使用されている協会酵母とは TTC 染色性が異なることが示された。

#### 3.3.2 キラー性

*S. cerevisiae* の中には、キラー因子と呼ばれるタンパク質を分泌して他の酵母を死滅させるキラー酵母の存在が知られている。清酒製造において、新規に分離した酵母を利用する場合、酒造現場で使用されている協会酵母に悪影響を及ぼすことのないように、酵母のキラー性の有無を確認することは重要である。

協会酵母 K701、K901、K1801 株に対するモッコウバラ酵母のキラー性評価の結果を図 1 に示す。TTC 下層培地上、縦に線画したモッコウバラ酵母の植菌線と横に線画した協会酵母の植菌線との交差部位にハロー（抗菌活性）は認められなかった。モッコウバラ酵母 M1、M2、M3 株はいずれも協会酵母に対しキラー性を示さないことが判明し、酒造現場で使用することに対する安全性が確認された。

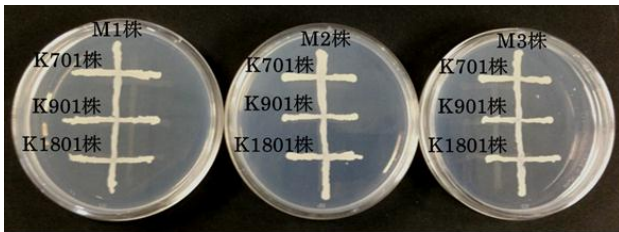


図1 モッコウバラ酵母のキラー性評価

### 3.3.3 糖資化性

モッコウバラ酵母の糖資化性評価の結果を表1に示す。M1、M2、M3株は同様の糖資化性を示し、ガラクトース、白糖、乳酸、ラフィノース、 $\alpha$ -メチル-D-グルコシド、ブドウ糖を資化した。また、いずれの株に関しても、K701株で資化性の認められなかったD-マルトースについては資化性が認められた。一方、K701株で資化性の認められたパラチノースについては資化性が認められなかった。

表1 モッコウバラ酵母の糖資化性評価

菌株	K701	M1	M2	M3
ガラクトース	+	+	+	+
白糖	+	+	+	+
乳酸	+	+	+	+
ラフィノース	+	+	+	+
D-マルトース	-	+	+	+
$\alpha$ -メチル-D-グルコシド	+	+	+	+
パラチノース	+	-	-	-
ブドウ糖	+	+	+	+

+: 資化性あり、-: 資化性なし

注: 1株も陽性を示さなかった23種類の炭素源に関しては表示を省略

## 3.4 分離酵母を用いた清酒小仕込試験

### 3.4.1 発酵経過の比較

清酒もろみでは発酵に伴って炭酸ガスが生成し、それが揮散することでもろみ重量が減少する。したがって、重量減少分を炭酸ガス減量として測定することにより、発酵経過の指標とすることができる。炭酸ガス減量経過を図2に示す。モッコウバラ酵母M1株を利用した清酒もろみ（以降M1株区と記載）は他の酵母を利用した区と比較すると、発酵初期の炭酸ガス減量速度が小さく、その後はK701株区とほぼ同程度の速度で推移した。このことから、M1株はK701株と比較して、もろみ初期におけるアルコール発酵が遅いと考えられた。一方、M2、M3株区はK701株区と比較すると、発酵中期以降の炭酸ガス減量速度が小さく、実規模レベルの仕込みにおいて、もろみ後期で発酵が停滞する可能性がある。最終的

な炭酸ガス減量はM1、M2、M3株区間では、ほぼ同程度となった。また、発酵もろみの泡生成状況から、M1、M2、M3株はいずれも泡なし酵母であるK701株と同様に泡の低い状態を呈し、泡なし酵母と考えられた。

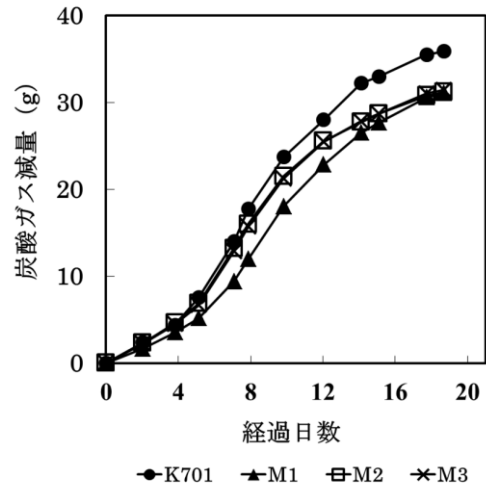


図2 炭酸ガスの減量経過

### 3.4.2 製成酒の成分分析

製成酒のアルコール分、日本酒度、酸度、アミノ酸度の値を表2に示す。M1、M2、M3株区のアルコール分は16%台であり、K701株より低い値となったものの、我々がこれまでに愛知県内の各種植物から分離してきた酵母と比較するとアルコール生成能がやや高いと考えられた<sup>3)</sup>。また、発酵基質である糖分が多く残存したために日本酒度はマイナスの値となった。このため、モッコウバラ酵母を利用した清酒は甘口の酒質となると考えられた。酸度に関しては、K701株区と比較すると、M1株区は同程度であったが、M2、M3株区は約1.2倍高い値を示した。M1、M2、M3株区のアミノ酸度はいずれもK701株区と同程度であった。

製成酒の有機酸組成を表3に、香り成分組成を表4に示す。M1株区はK701株区と比較すると、リンゴ酸及びコハク酸濃度がやや低く、乳酸及び酢酸濃度がやや高かった。M2、M3株区はK701株区と比較すると、リンゴ酸及びコハク酸濃度がやや低く、乳酸濃度がやや高かった。また、酢酸濃度が約2倍であり、M2、M3株は酢酸生成能が高いことがわかった。

表2 製成酒の成分値

項目	使用菌株	K701	M1	M2	M3
	アルコール分 (%v/v)		19.1	16.3	16.3
日本酒度		4.5	-15.8	-18.6	-17.6
酸度 (mL)		3.5	3.4	4.1	4.1
アミノ酸度 (mL)		1.4	1.4	1.3	1.3

香気成分組成に関しては、M1、M2、M3 株区はいずれも K701 株区と比較すると、カブロン酸エチル濃度がやや低く、酢酸イソアミル濃度は 1/3 程度であり、一般的に吟醸香とされている香気成分の生成能が低いことがわかった。オフフレーバーとされているイソアミルアルコール濃度は K701 株区の約 1.3 倍であった。花から分離した酵母を利用して、花のイメージを喚起させる清酒を製造するには香りは重要な因子である。今後、薬剤耐性を指標とした育種法等により、香気成分生成能を改良する必要がある。

**表 3** 製成酒の有機酸組成  
(単位：mg/100ml)

項目	使用菌株	K701	M1	M2	M3
リンゴ酸		25	18	14	15
コハク酸		87	60	67	67
乳酸		28	36	35	36
酢酸		34	40	67	64

**表 4** 製成酒の香気成分組成  
(単位：ppm)

項目	使用菌株	K701	M1	M2	M3
カブロン酸エチル		1.3	0.7	0.6	0.7
酢酸イソアミル		8.9	3.2	2.7	2.8
イソアミルアルコール		199.3	259.3	252.0	254.5

#### 4. 結び

地域ブランド清酒の開発を目的として、株式会社萬三商店敷地内の半田市指定天然記念物「萬三の白モッコウ

バラ」から酵母を分離した。28S rDNA D1/D2 領域の塩基配列解析より、分離された 3 株の酵母はいずれも *S. cerevisiae* と同定された。また、協会酵母に対してキラ一性を示さないことから清酒製造に適用可能であることが確認された。清酒小仕込試験の結果より、モッコウバラ酵母は協会酵母と比較するとアルコール生成能が低いものの、我々がこれまでに愛知県内の各種植物から分離した酵母と比較するとアルコール生成能がやや高いと考えられた。本酵母を利用した清酒は甘口の酒質となることが推測された。

現在、中埜酒造株式会社において本酵母を使用した仕込試験を実施しており、製品化を目指している。また、本酵母を活用した地域おこしを推進するために、当センターを含めて、株式会社萬三商店、中埜酒造株式会社、株式会社トラム、特定非営利活動法人半田市観光協会が協力して、清酒以外の地域商品の開発も進めている。

#### 文献

- 1) 安田(吉野)庄子, 北本則行: 日本食品科学工学会誌, **58**, 433(2011)
- 2) 伊藤彰敏, 山本晃司, 瀬見井純, 北本則行, 續順子: 愛知県産業技術研究所研究報告, **10**, 84(2011)
- 3) 三井俊, 伊藤彰敏, 山本晃司, 秋山和範, 加藤雅士: あいち産業科学技術総合センター研究報告, **2**, 84(2013)
- 4) Cletus P. Kurtzman, Christie J. Robnett: *Antonie Van Leeuwenhoek*, **73**, 331(1998)
- 5) 日本醸造協会: 第四回改正国税庁所定分析法注解, (1993)