

## 研究論文

## 芙蓉の花から分離した酵母の清酒醸造特性評価

三井 俊\*<sup>1</sup>、伊藤彰敏\*<sup>1</sup>、山本晃司\*<sup>1</sup>、金政 真\*<sup>2</sup>*Sake Brewing Characteristics of Yeast Isolated from Cotton Rosemallow*Shun MITSUI\*<sup>1</sup>, Akitoshi ITO\*<sup>1</sup>, Koji YAMAMOTO\*<sup>1</sup> and Shin KANAMASA\*<sup>2</sup>Food Research Center\*<sup>1</sup>, Chubu University\*<sup>2</sup>

芙蓉(フヨウ)の花から酵母を分離した。ITS 領域の塩基配列解析より、分離酵母(芙蓉酵母)は *Saccharomyces cerevisiae* と同定された。清酒小仕込試験の結果、芙蓉酵母は製成酒のアルコール分が協会酵母と比較して低いものの、我々がこれまでに分離し、既に実用化に至っている天然酵母とほぼ同等の醸造特性を示した。また、酒造現場において一般的に使用される協会酵母に対してキラー性を有さないことが確認された。なお、芙蓉酵母を用いた純米酒が「中部大学のお酒」として製品化された。

## 1. はじめに

近年、清酒業界では新たな酵母を分離・開発することにより、清酒品質の個性化・差別化を図る取り組みが盛んに行われている。こうした取り組みの一環として、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。食品工業技術センターで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)~4)</sup>。

本研究では、芙蓉の花から分離された天然酵母の清酒製造への活用を目的とした。遺伝子解析手法を用いて酵母の種の同定を行うと共に、既存の協会酵母に対するキラー性、TTC(トリフェニルテトラゾリウムクロライド)染色性を評価した。また、清酒小仕込試験を行い、分離酵母のアルコール、有機酸及び香氣成分の生成能を評価し、酒造適性を検討した。

## 2. 実験方法

## 2.1 芙蓉酵母の分離

## 2.1.1 使用培地

集積培地は YPD 液体培地(酵母エキス 1%、ポリペプトン 2%、グルコース 2%、pH5.5)を使用した。酵母コロニーの分離にはクロラムフェニコール(100  $\mu$ g/mL)及びプロピオン酸ナトリウム(100mg/mL)を添加した YPD 平板培地を用いた。酵母の培養には麴汁培地(ボーメ 5.0、pH4.0)を用いた。

## 2.1.2 分離源

平成 25 年 7、8 月に愛知県尾張旭市内で栽培されて

いた芙蓉の花を分離源とした。

## 2.1.3 酵母の分離

採取した花を 50mL 容チューブ中の集積培地 25 mL に浸漬し、30°C で 3 日間静置培養を行った。集積培養液 50  $\mu$ L を酵母コロニー分離用平板培地に塗抹し、30°C で 24 時間培養してコロニーを得た。試験管にガストラップチップ(栄研化学(株))と YPD 液体培地を入れ、酵母コロニーを一白金耳植菌した後、30°C で静置培養し、培養開始から 24 時間、48 時間、72 時間における炭酸ガス生成を評価した。

## 2.2 遺伝子解析による分離酵母の同定

PCR 用酵素(東洋紡(株))を用いて 18S rDNA と 26S rDNA の間に存在する ITS (internal transcribed spacer)領域を増幅し、塩基配列を決定後、BLAST プログラムによりホモロジー検索し、分離酵母を同定した。

## 2.3 分離酵母の TTC 染色性、キラー性

分離酵母を麴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°C 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°C で保温して、呈色を観察した。対照として協会酵母 K901 株、K1801 株を使用してコロニーの呈色を比較した。

キラー性に関しては、分離酵母の麴汁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 K901 株、K1801 株の培養液をそれぞれ植菌線画し、30°C で 2 日間培養した。

## 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

乾燥麴(60%精白、徳島製麴(株)) 20g、乾燥  $\alpha$  化米(60%精白、徳島製麴(株)) 80g、蒸留水 180mL、酵母培

\*1 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 \*2 中部大学 応用生物学部

養液 10mL を混合した。醗温度は 15°C 一定で経過させた後、醗日数 14 日目から 1 日に 0.5°C ずつ降温し、醗日数 17 日目で発酵を終了した。対照酵母として、協会酵母 K901 株とこれまでに分離され既に実用化に至っている既存の天然酵母を用い、炭酸ガス減量による発酵経過の比較を行った。

#### 2.4.2 製成酒の成分分析

醗を遠心分離(10,000rpm、20分)にて上槽し、得られた上清液を製成酒として成分分析した。アルコール分はアルコメイト AL-2 型 (理研計器(株))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>に準拠して分析した。有機酸組成は既報<sup>2)</sup>に従って分析した。アミノ酸組成は Nexera X2 自動プレカラム誘導体化アミノ酸分析装置((株)島津製作所)を用いて分析した。

### 3. 実験結果及び考察

#### 3.1 酵母の分離

採取した芙蓉の花を集積培地に浸漬して培養したところ、白濁と気泡の発生が認められた。集積培養液を酵母コロニー分離用平板培地に塗抹して培養を行い、コロニーを得た。これらコロニーをガス生成試験に供したところ、培養 48 時間において明確にガストラップチップを浮上させ、アルコール発酵能を有する酵母と期待される株が得られた。

#### 3.2 遺伝子解析による分離酵母の同定

アルコール発酵能を有することが期待される株の ITS 領域の塩基配列相同性解析より、*Saccharomyces cerevisiae* と同定された。この株を「芙蓉酵母」とした。

#### 3.3 分離酵母の TTC 染色性、キラー性

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、強い赤色を呈する。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呈する。対照として用いた協会酵母 K901 株、K1801 株のコロニーは強い赤色を呈した。一方、芙蓉酵母のコロニーはピンク色を呈し、協会酵母とは TTC 染色性が異なっていた。

清酒製造において、新規に分離した酵母を利用する場合、酒造現場において一般的に使用され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が重要である。TTC 下層培地上、縦に線画した芙蓉酵母の植菌線と横に線画した協会酵母 K901、K1801 株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。よって、芙蓉酵母は協会酵母に対しキラー性を有さないことが確認された。

#### 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

清酒醗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醗重量が減少する。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 1 に示す。芙蓉酵母の醗は、K901 株の醗と比較すると、醗初期は同程度の炭酸ガス減量速度であるが、醗後期の炭酸ガス減量速度が小さく、最終的な炭酸ガス減量も少なかった。一方、既存の天然酵母の醗と比較すると、同程度の炭酸ガス減量速度で推移した。このことから、芙蓉酵母は実規模レベルの仕込みにおいては、醗後期で発酵が緩慢になり、最終的な生成アルコール分も低くなることが推測される。また、発酵醗の泡生成状況を観察したところ、芙蓉酵母の醗は K901 株の醗と同様に泡の低い状態を呈したため、芙蓉酵母は泡無し酵母と考えられる。

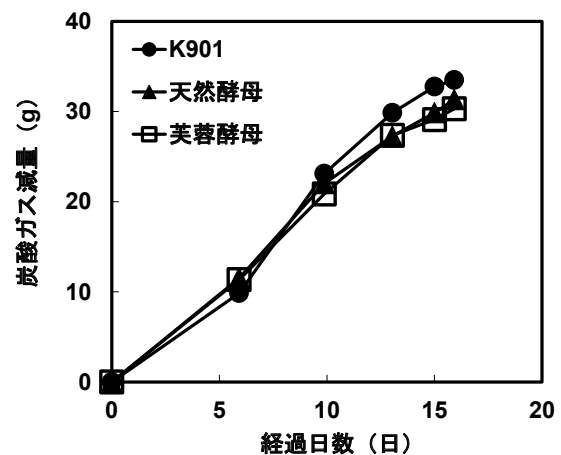


図 1 炭酸ガスの減量経過

#### 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 1 に示す。芙蓉酵母の製成酒(以降芙蓉酵母区と記載)のアルコール分は、K901 株の製成酒(以降 K901 株区と記載)の約 85%と低くなったものの、既存の天然酵母の製成酒(以降天然酵母区と記載)に近い値を示した。また、生成アルコール分が低いことに対応して、日本酒度はよりマイナスの値となった。

表 1 製成酒の成分値

項目	使用菌株	K901	天然酵母	芙蓉酵母
	アルコール分 (%、v/v)		16.7	14.6
日本酒度		3.4	-16.2	-21.2
酸度 (mL)		3.2	4.3	4.2
アミノ酸度 (mL)		1.7	1.7	1.9

酸度は、K901 株区より 1mL 高い値となり、天然酵母区と比較すると同程度の値となった。アミノ酸度は、K901 株区及び天然酵母区より若干高い値となった。アルコール分、日本酒度の値及び前項の炭酸ガス減量経過から、芙蓉酵母は既存の天然酵母と同様に K901 株と比較するとアルコール生成能が低いことが推測される。

製成酒の有機酸組成を 図 2 に示す。芙蓉酵母区は K901 株区と比較すると、コハク酸、乳酸濃度がやや高かった。天然酵母区と比較すると、リンゴ酸及びコハク酸濃度がやや高く、乳酸濃度がやや低かった。酢酸濃度が K901 株区の約 1.5 倍と高く、既存の天然酵母同様に酒造現場で一般的に使用される協会酵母と比較して酢酸生成能が高い酵母であることがわかった。

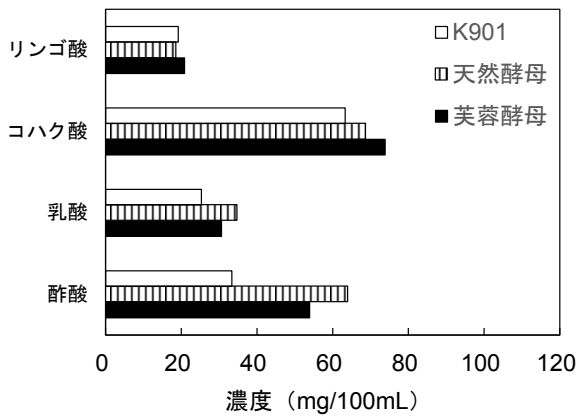


図 2 製成酒の有機酸組成

製成酒の香気成分組成を 図 3 に示す。芙蓉酵母区は K901 株区同様にカプロン酸エチル濃度が 1ppm 以下と低かった。また、酢酸イソアミル濃度は K901 株区の 1/3 程度であった。天然酵母区と比較するとほぼ同様の香気成分組成であった。

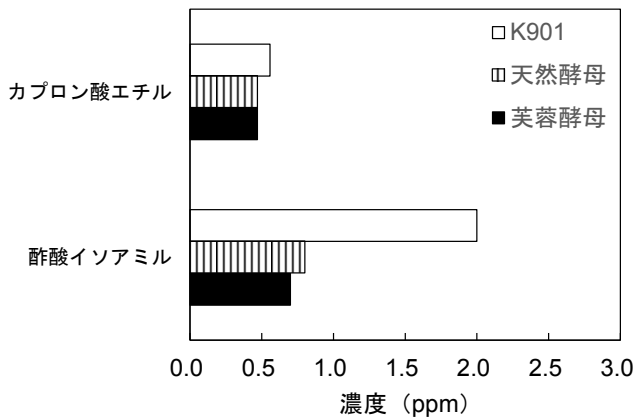


図 3 製成酒の香気成分組成

原料米から麹菌のプロテアーゼ及びペプチダーゼにより醪中に供給されたアミノ酸は、その一部が酵母の栄養源として取り込まれることで消費される。岩野ら<sup>6)</sup>は清酒中のアミノ酸について、酵母によって取り込まれる量の多いアミノ酸グループ、取り込まれる量が中程度のアミノ酸グループ及び取りこまれ難く逆に酵母が生成するアミノ酸グループに大別している。製成酒のアミノ酸のうち、酵母に取り込まれる量の多いアミノ酸グループの組成を 図 4 に示す。芙蓉酵母区は K901 株区と比較すると、アスパラギン酸、ロイシン、グルタミン濃度が高く、逆にアルギニン濃度が低い傾向にあり、協会酵母とは異なったアミノ酸取り込み能を有することがわかった。製成酒のアミノ酸のうち、酵母が放出するアミノ酸グループの組成を 図 5 に示す。K901 株区と比較すると、プロリン濃度が高く、アラニン及びグリシン濃度は低かった。天然酵母区と比較すると、アラニン及びプロリン濃度が高かった。

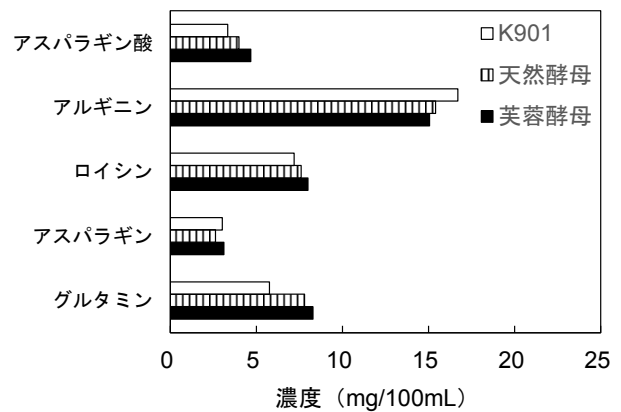


図 4 製成酒のアミノ酸組成 (酵母取り込み量の多いアミノ酸)

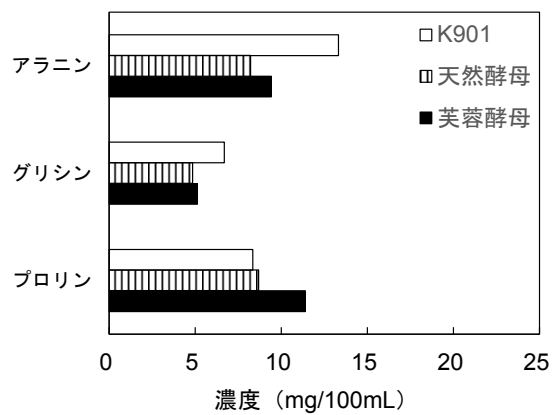


図 5 製成酒のアミノ酸組成 (酵母が放出するアミノ酸)

#### 4. 結び

芙蓉の花から酵母を分離した。ITS 領域の塩基配列解析より、分離酵母は *S. cerevisiae* と同定された。また、酒造現場において一般的に使用される協会酵母に対してキラー性を有さないことが確認された。清酒小仕込試験の結果より、芙蓉酵母は協会酵母 K901 株と比較するとアルコール生成能が低いことがわかった。また、有機酸生成能、香气成分生成能、アミノ酸取り込み能も異なっていた。しかし、我々がこれまでに分離し、既に実用化に至っている天然酵母と比較すると、アルコール生成能を含めてほぼ同等の醸造特性を有しており、清酒製造に適用可能であると考えられた。

本研究結果を参考にして、平成 27 年 2 月に東春酒造株式会社において、芙蓉酵母を用いた純米酒が醸造され、「中部大学のお酒」として製品化された。今後も酒質安定化のために、実醸造における並行複発酵経過等の評価を行う予定である。

#### 文献

- 1) 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)
- 2) 三井俊, 小野奈津子, 安田(吉野)庄子, 伊藤彰敏, 山本晃司: あいち産業科学技術総合センター研究報告, **3**, 68(2014)
- 3) 伊藤彰敏, 小野奈津子, 安達真人, 内藤俊, 沖塚翔太, 三井俊, 倉田久美, 臼井瑠美, 續順子: あいち産業科学技術総合センター研究報告, **4**, 96(2015)
- 4) 伊藤彰敏, 小野尚之, 小野奈津子, 三井俊, 山本晃司: あいち産業科学技術総合センター研究報告, **5**, 104(2016)
- 5) 国税庁編: 国税庁所定分析法(昭和 36 年 1 月 11 日 国税庁訓令第 1 号, 最終改正平 19 国税庁訓令第 6 号)
- 6) 岩野君夫, 幡宮顕仁, 中村拓郎, 渡辺誠衛, 伊藤俊彦, 中沢仲重: 日本醸造協会誌, **99**, 735-742 (2004)