

麴菌の生産する抗菌性物質・Yeastcidin を用いた 「さくらひめ」からの清酒酵母の分離

宮岡俊輔 穂坂 賢*

Isolation of *Sake* Yeast by the Enrichment culture method using the antibiotic yeastcidin
from flowers of 'SAKURAHIME'

MIYAOKA Shunsuke and HOSAKA Masaru

地域の独自色の強い清酒開発をするため、愛媛県特産の花きである「さくらひめ」から清酒酵母の分離を行った。麴菌の生産する抗菌性物質・Yeastcidin を用いた集積培養により分離を行ったところ、24本の集積培養のうち10本から、30株の候補株を分離することができた。この30株について清酒小仕込み試験等を行い、その清酒醸造適性を検討し4株の優良酵母を選抜することができた。

キーワード：清酒、集積培養、抗菌性物質・Yeastcidin、酵母、麴菌

はじめに

コロナウイルス禍により酒類製造業は大きなダメージを受けており、アフターコロナに向け需要回復対策が必要である。輸出等を通じて世界に情報発信することは、需要回復対策として有効と考えられるが、輸出の際はテロワールが重視されるため「地域性」の高い商品開発が求められる。

「さくらひめ」は、愛媛県農林水産研究所が開発した愛媛県のオリジナル品種で、青色系が一般的なデルフィニウムをピンク色に品種改良したもので、桜を連想させる姿と愛媛の「ひめ」から「さくらひめ」と命名され¹⁾、日本フラワー&ガーデンショウグランプリなど様々な賞を受賞した地域を代表する花である。

一方、多くの可能性を秘めた自然界から個性豊かな酵母を分離利用することは、製品の個性化やテロワールの構築に寄与すると考えられ、様々な取り組みが行われているが^{2)~6)}、清酒醪において高いアルコール生成を示す酵母の取得は容易ではない。東京農業大学のグループは、麴菌が産生する抗菌性物質・Yeastcidin について研究を行い、この物質は多くの酵母の生育を抑制するが、清酒酵母の成育を抑制しないことを発見した^{7)~8)}。さらに、これを利用して、各種の花から「花酵母」の分離に成功している^{9)~13)}。

そこで、本研究では、Yeastcidin を用いた集積培養により、愛媛県特産の「さくらひめ」から清酒酵母の分離を行ったので報告する。

実験方法

1. Yeastcidin 粗物質の調整

Yeastcidin 粗物質の調整は穂坂ら⁹⁾の方法に準じた。すなわち、3L フェルンバッハフラスコ (CORNING 431252) に入れた 600mL の麴汁培地 (pH 5.4, Brix.10) に *A.oryzae* No.G 株⁷⁾ のスラントからその胞子を3白金耳植菌し、27°C、20日間静地培養した。培養ろ液をエバポレーターで約10倍まで濃縮し、濃縮液と同量の冷アセトンを加え、ガラス棒でよく攪拌、冷凍庫で一晩保存した。析出した物質を遠心分離等で回収し、得られた溶液から残存したアセトンを除去し、粗物質が含まれた水溶液を得た。

調整した粗物質の抗菌性を確認するため、10 mL の麴汁培地 (Brix.10, pH 5.4) に 200 ppm 程度になるよう粗物質を添加し、各酵母培養液を 10 μ L 植菌し、30°C で静置培養、濁度の変化を調べた。清酒酵母として熊本酵母 KA-1、

* 東京農業大学応用生物科学部

この研究は、「令和3年度産学官連携共同研究開発事業」の予算で実施した。

ワイン酵母としてきょうかいワイン酵母3号、ビール酵母として県内企業のビール醪から分離したものをを用いた。

2. 供試する花の採取

さくらひめの花は、切り花と鉢植えについて、愛媛県農林水産研究所花き指導室から提供を受けた。県内蔵元4社および愛媛県産業技術研究所実験室で2週間保管・生育させた後花を採取した。採取した花は、写真1に示す通り、ポリ袋に密閉して冷蔵保存と10%グリセリン溶液中で-80℃で冷凍保存し、これらを集積培養に用いた。



写真1 さくらひめ花の保存 左：冷蔵保存、右：冷凍保存

3. Yeastcidin を使用した集積培養

100 mL の三角フラスコに 50 mL の麴汁培地 (Brix.15) を入れ、250 ppm となるように Yeastcidin 粗物質を添加後 121℃、15 分間滅菌した。粗物質濃度はビール酵母 IFO 2011 株の生育を 72 時間阻止できる濃度を 100 ppm とした。エタノール滅菌した乳性カゼイン (WAKO、特級) を 2.5% になるように添加、さらに 0.15 mL の乳酸を加え pH を約 3.3 に調整後、保存していたさくらひめを 5 から 6 花加え、27℃ で保持、1 回/日 攪拌した。混濁・発泡が見られたものについて糖度を測定し、Brix.12 以下になったものを適宜希釈し、TTC 下層培地に塗抹した。発生したコロニーに、TTC 上層培地を重層し、27℃、3 時間保持後、ピンクからレッドに着色したコロニー (写真2) を釣菌した。

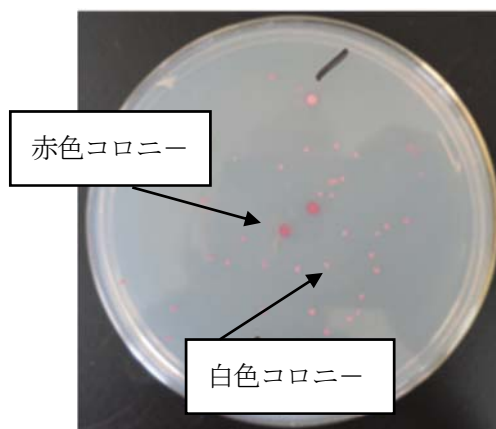


写真2 TTC 上層培地重層の様子

4. 総米 150 g の小仕込み試験

分離した酵母の醸造適性を把握するため、表1の配合で2段仕込みによる小仕込み試験を実施した。YPD 液体培地を用いて、28℃で振とう培養、濁度 2.0 で終了し前培養液とした。仕込み水 100 mL と凍結麴 30 g を混合し、15℃、2 時間保持した。凍結麴は、精米歩合 35% の山田錦を用いた大吟醸麴 (県内企業で製造) を凍結保存したものをを用いた。前培養液 5 mL 添加後 15℃、44 時間保持した後、水 110 mL を加え 7℃ に冷却、2 時間保持した。α 米 (AA60、徳島製麴株式会社) 120 g と水 90 mL を混合し、110℃、60 分間加熱処理、冷却したものを加え仕込み完了とした。重量減少が 45g に達したら遠心分離により上槽した。

表1 総米 150g 小仕込み試験仕込み配合

	添	留	合計
α米 (g)		120	120
麴 (g)	30		30
汲み水 (mL)	100 ^{※1}	200	300

※1 1Lの水に、NaCl(0.2g)、KH₂PO₄ (0.04g)、90%乳酸 (1.67 mL) 添加した。

5. 製成酒の分析

一般成分は、国税庁所定分析法注解（第4回改正）¹⁴⁾ に準じて測定した。また、香气成分はヘッドスペースガスクロマトグラフを用いて、グルコースの定量はグルコース CII テストワコー（和光純薬工業株式会社）により分析した。酵母数は、上槽前もろみをメチレンブルー染色液で希釈、トーマの血球盤で計測した。

6. キラー性試験

久保らの方法¹⁵⁾ により測定した。すなわち、0.003%メチレンブルーを添加した TTC 下層培地にきょうかい9号酵母を 10⁶ 個塗抹し、さらに分離酵母を植菌した後、28℃で培養した。24 時間後に微小なコロニーが培地一面に生じた際に現れる分離酵母周辺のクリアゾーンを観察した。

7. 糖の資化性試験

酵母様真菌同定キット ID32CAPI（シスメックス・バイオメリュー（株））に接種した菌体が資化する 31 種類の炭素源（ガラクトース、シクロヘキシミド、スクロース、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、α-メチル-D-グルコシド、マンニトール、ラクトース、イノシトール、D-ソルビトール、D-キシロース、D-リボース、グリセリン、L-ラムノース、パラチノース、エリスリトール、D-メルビオース、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、グルコース、L-ソルボース、D-グルコサミン塩酸塩、エスクリン）について調べた。

結果と考察

1. Yeastcidin 粗物質の調整

調整した粗物質の抗菌性を表2に示したとおり、清酒酵母の生育は阻害しないが、ワイン酵母およびビール酵母の生育は阻害することを確認した。

表2 Yeastcidin 粗物質の抗菌性

	Yeastcidin 添加 の有無	濁度 ^{※1}	
		23 hr	44 hr
清酒酵母	無	0.7	1.5
	有	0.5	1.8
ビール酵母	無	0.7	1.5
	有	0.1	0.0
ワイン酵母	無	0.4	1.4
	有	0.1	0.1

※1 30℃で静置培養後、濁度を測定した。

2. Yeastcidin を使用した集積培養

24本の集積培養を行った結果、13本で泡立ちと、糖度低下(Brix.12以下)がみられた。これらの培養液を適宜希釈し、TTC下層培地に塗抹、さらにTTC上層培地を重層したところ、10本でピンクからレッドに着色したコロニーが得られた。表3に示す通り、各3株ずつ釣菌し合計30株を分離した。

表3 泡立ち、糖度減少がみられた集積培養

No	分離した酵母	培養日数	最終Brix.値	泡立ち	TTC染色	花の保存方法
1	Sa 1, 2, 3	7	11.1	○	P~R	冷蔵保存
2	Sa 4, 5, 6	7	10	○	R	冷凍保存
3	Sa 7, 8, 9	7	8.4	○	R	冷蔵保存
4	Sa10, 11, 12	11	6.2	○	P~R	冷凍保存
5	Sa13, 14, 15	8	6.6	○	P~R	冷凍保存
6	Sa16, 17, 18	8	5.9	○	R	冷凍保存
7	Sa19, 20, 21	8	5.6	○	P~R	冷凍保存
8	Sa22, 23, 24	8	5.9	○	R	冷凍保存
9	Sa25, 26, 27	8	5.8	○	R	冷凍保存
10	Sa28, 29, 30	14	11.6	○(わずか)	P	冷凍保存

3. 総米150gの小仕込み試験

分離した30株の総米150gの清酒小仕込み試験を実施した。その結果、24株はきょうかい9号(K9)と同等の発酵経過を示した。全く発酵が進行しないものが3株、明らかに発酵が遅い経過を示すものが3株存在した。Yeastcidinを集積培養に使用することで、清酒酵母様の酵母を効率よく分離できたものと考えられる。製成酒の香り成分と一般成分を分析し、分析結果をもとに4株の優良酵母を選抜した。選抜した4株の発酵経過を図1に、一般成分を表4、香り成分を表5に示した。

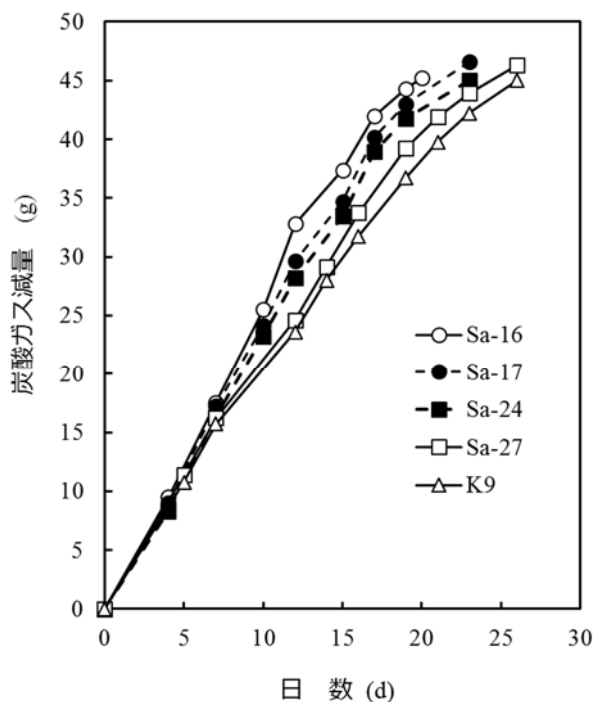


図1 選抜した4株の小仕込み試験経過図

表4 小仕込み試験製成酒の一般成分

	アルコール (%, v/v)	日本酒度	エキス分	酸度	アミノ酸度	グルコース (%, w/v)	もろみ日数 (日)	炭酸ガス減 量 (g)	酵母数(個/g) ×10 ⁸	死滅率(%)	形状
Sa-16	15.5	11.5	3.2	2.1	0.6	0.2	20	45.2	1.45	7.3	卵型、酵母様
Sa-17	16.4	15.4	2.7	2.3	0.6	0.2	23	46.6	1.94	4.1	卵型、酵母様
Sa-24	16.2	15.5	2.7	2.2	0.6	0.2	23	45.0	1.93	0.9	卵型、酵母様
Sa-27	16.4	15.7	2.7	2.7	0.7	0.2	26	46.3	2.30	9.2	やや小さい卵型、 酵母様
K9	15.8	13.6	2.9	2.8	0.6	0.2	26	45.0	1.76	12.3	卵型、酵母様

表5 小仕込み試験製成酒の香気成分

試料名	香気成分 (ppm)						
	アセトアル デヒド	酢酸エチル	n-プロピル アルコール	イソブチル アルコール	酢酸イソアミ ル	イソアミルア ルコール	カブロン酸 エチル
Sa-16	28.4	78.9	58.5	59.3	7.1	191.2	1.7
Sa-17	24.4	69.0	51.7	47.0	5.4	167.6	8.7
Sa-24	20.0	77.4	49.5	46.8	5.9	170.6	8.9
Sa-27	33.5	75.0	39.1	57.3	4.2	160.5	1.3
K9	39.1	68.5	49.9	67.6	4.1	175.1	1.3

4. キラー性試験

キラー性を有した酵母は様々な酵母を使用する清酒製造現場では利用できないため、選抜した4株のキラー性試験を行った。結果は表6に示す通りすべての株でキラー性は見られなかった。

表6 選抜した4株のキラー性

酵母名	キラー性
Sa-16	—
Sa-17	—
Sa-24	—
Sa-27	—

5. 糖の資化性試験

選抜した4株の糖の資化性について、K9株と比較して表7に示した。選抜した4株の糖の資化性は、対象のK9株と異なるタイプであった。また、Sa-17株とSa-24株は同様のパターンを示し、両者ともマルトース資化性を有していた。Sa-16株、Sa-27株とSa-17・24株はそれぞれ異なる糖の資化性を示した。

表7 選抜した4株の糖の資化性

酵母名	Sa-16	Sa-17	Sa-24	Sa-27	K-9
ガラクトース	+	+	+	+	+
スクロース	+	+	+	+	+
ラフィノース	+	+	+	+	+
D-マルトース	-	+	+	-	-
α -メチル- α -D-グルコシド	-	-	-	-	+
パラチノース	+	-	-	-	+
グルコース	+	+	+	+	+

ま と め

清酒用酵母を「さくらひめ」から分離し、製造に利用する技術について検討したところ、以下の結果が得られた。

1. 麹菌の抗菌性物質 Yeastcidin について、東京農業大学からのノウハウの提供を受け、粗物質を調整することができた。本物質は、清酒酵母の生育は阻害しないが、ワイン酵母およびビール酵母の生育は阻害することを確認した。
2. 愛媛県農林水産研究所花き指導室からさくらひめの切り花および鉢植えの提供を受け、2週間程度県内蔵元および当所実験室に保管後、花を採取し、冷蔵保存および10%グリセリン溶液中での-80℃凍結保存を行った。酵母の採取源として凍結保存の方が有効であった。
3. Yeastcidin を使用して集積培養を行った結果、13本で泡立ちと糖度低下がみられた。これら培養液から TTC 着色性により選抜し、30株の微生物を得た。
4. 30株について総米150gの清酒小仕込み試験を実施したところ、6株は発酵性が低かったが、24株で協会9号酵母（日本醸造協会）と同程度の発酵性を示した。Yeastcidin を集積培養に使用することで清酒酵母に類似した性質のものが効率的に分離できることが分かった。
5. 24株について、香気成分生産能や酵母増殖能、製成酒の成分等を比較検討し、優良酵母4株を選抜した。

文 献

- 1) 岡本充智, 廣瀬由紀夫, 中村嘉宏: デルフィニウム新品種「さくらひめ」の育成, 愛媛県農林水産研究報告, 6, 1-4 (2014).
- 2) 宮岡俊輔, 新谷智吉, 安井正良: 柑橘の花からの酒類醸造用酵母の分離とその性質, 愛媛県工業系研究報告, 41, 25-28 (2003).
- 3) 宮岡俊輔, 新谷智吉, 佐野和男, 二宮順一郎: 柑橘の果皮からの酒類醸造用酵母の分離とその性質, 愛媛県工業系研究報告, 42, 26-30 (2004).
- 4) 吉浦貴紀, 田畑 恵, 中川力夫, 長谷川裕正, 西岡勇一郎: 桜酵母の分離, 茨城県工業技術センター研究報告, 39, オンラインワン技術開発事業受託研究 (2010).
- 5) 都築正夫, 大橋正孝, 清水浩美: ササユリからの酒造用酵母の分離とその醸造特性, 奈良県産業振興総合センター研究報告, 41, 5-11 (2015).
- 6) 三井 俊, 伊藤彰敏, 山本晃司, 金政 真: 芙蓉の花から分離した酵母の清酒醸造特性評価, あいち産業科学技術総合センター研究報告, 6, 58-61 (2017).
- 7) 中田久保, 酒井 劭, 竹田正久, 塚原寅次: こうじ菌の生産する抗菌性物質に関する研究, 醸協, 75, 761-764 (1980).
- 8) 穂坂 賢, 新宅信彦, 矢作直子, 中田久保, 酒井 劭, 塚原寅次: 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の生産する抗菌性物質 (Yeastcidin) の精製と性質, 醗酵工学, 65, 191-197 (1987).

- 9) 穂坂 賢, 角本琢磨, 大竹 聡, 中田久保, 酒井 劭: 麹菌の生産する抗菌性物質・Yeastcidin を用いた集積培養液からの清酒酵母の分離, 醸協, 94, 998-1005 (1999).
- 10) 穂坂 賢, 中田久保, 酒井 劭: 花から分離した酵母による清酒の試験醸造, 醸協, 95, 837-842 (2000).
- 11) 小室友香理, 穂坂 賢, 中田久保: 花から分離した酵母の醸造特性, 醸協, 99, 743-749 (2004).
- 12) 小室友香理, 清水大介, 加藤陽子, 穂坂 賢, 中田久保: 麹汁培地を用いて花から分離した酵母の清酒醸造試験, 醸協, 100, 454-460 (2005).
- 13) 数岡孝幸: 清酒製造用酵母の分離及び実用化, 醸協, 110, 298-305 (2015).
- 14) 西谷尚道監修: 第4回改正国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会, 231 (1993).
- 15) 久保友佳子, 清水浩美: 橘の機能性成分の調査研究 (第3報), 奈良県産業振興総合センター研究報告, 46, 11-20 (2020).