

# ナラノヤエザクラの花からの有用な酵母の分離及びそれを使った清酒の開発

大橋正孝<sup>\*1)</sup>, 都築正男<sup>\*1)</sup>, 清水浩美<sup>\*1)</sup>, 松澤一幸<sup>\*1)</sup>  
藤野千代<sup>\*2)</sup>, 鈴木孝仁<sup>\*3)</sup>, 岩口伸一<sup>\*3)</sup>

## Isolation of useful yeasts from flowers called Naranoyaezakura (*Prunus verecunda* 'Antiqua') and development of Japanese sake brewing with the isolated yeast

OHASHI Masataka<sup>\*1)</sup>, TSUDUKI Masao<sup>\*1)</sup>, SHIMIZU Hiromi<sup>\*1)</sup> and MATSUZAWA Kazuyuki<sup>\*1)</sup>  
FUJINO Chiyo<sup>\*2)</sup>, SUZUKI Takahito<sup>\*3)</sup>, and IWAGUCHI Shinichi<sup>\*3)</sup>

ナラノヤエザクラの花から有用な酵母の分離を試み、その中の1株が *Saccharomyces cerevisiae* であり、染色体電気泳動核型（パルスフィールド電気泳動法）により、清酒の製造に一般的に使われている協会酵母とは異なる株であることが判明した。また、キラー性試験により、協会酵母に対してキラー性がないことが分かった。その酵母をナラノヤエザクラ酵母と名付けて、その酵母を使って清酒の仕込み試験を行い、成分分析を行ったところ、この酵母は、低アルコールで甘味があるが、酸味のしっかりあるフルーティーな味わいのある清酒をつくることのできる酵母であった。

### 1. 緒言

全国の清酒の消費量の推移を見ると、最も消費された昭和50年には1,675千kL消費されたのが、平成18年には688千kLと約41%程度にまで減少している<sup>1)</sup>。これは、清酒の仕込み配合等が旧態依然であり、清酒のほとんどのものが、既存の醸造協会系酵母を使用して製造され、その個性がなくなっていること、さらに果汁を使用した低アルコール飲料を飲まれているため、清酒に抵抗感のある若年層の清酒離れが進んでいる<sup>2)</sup>ことに代表されるように、消費者の嗜好の変化に十分対応しきれていないことも要因の一つとして考えられる。その状況を打破するために、様々なところで、新しい酵母を分離して消費者の嗜好に合った清酒の開発が取り組まれている。

平成18年5月、奈良女子大学創立100周年にむけて、ナラノヤエザクラから有用酵母を分離し、それらを使用した発酵食品（酒類）の開発に向けた「奈良八重桜PJ（プロジェクト）」が奈良女子大学で発足した。ナラノヤエザクラは、天然記念物及び奈良県の県花であり、その花の姿から、優雅、可憐、清楚というイメージを連想させる。平成19年より当センターも上記プロジェクトに参加していたが、平成20年度に、そういったイメージを持つナラノヤエザクラの花から清酒醸造に適した酵母の分離を検討した。

### 2. 実験方法

#### 2.1 試薬

乳酸、エタノール、クロラムフェニコール、グルコース、寒天、グリセリン、L-アラビノース、D-キシロース、アドニット、D-ガラクトース、イノシトール、D-ソルビトール、 $\alpha$ -メチル-D-グルコシド、セロビオース、ラクトース、マルトース、D-トレハロース、D-ラフィノース、メリビオース、流動パラフィン、ホルムアルデヒド液、フェノールフタレイン、0.1M水酸化ナトリウム溶液（容量分析用）、プロモチモールブルー、リンゴ酸、クエン酸、コハク酸は、和光純薬工業(株)製を用いた。TTC寒天下層培養地、TTC寒天上层培養地は、ニッスイ製を用いた。D-メレチトースはシグマ社製を用いた。酵母エキスは、DIFCO社製を用いた。ペプトンは、BD社製を用いた。麴汁液体培地は、米麴1kgに水3,000mLを加えて55℃で一晩加温後ろ過搾汁して得られた麴汁を目標とするBrixとなるように水で希釈した後、乳酸でpHを調整してからオートクレーブで滅菌し、必要に応じてエタノールを無菌的に添加して作製した。GYP培地は、D-(+)グルコース2%、酵母エキス0.5%、ペプトン0.5%を水に加え、オートクレーブで滅菌して調整した。YEPD培地は、酵母エキス1%、ペプトン2%、グルコース2%、寒天1.5%を水に加え、1Mクエン酸水溶液でpH4.7に調整したものをオートクレーブで滅菌して調整した。

<sup>\*1)</sup> 食品・毛皮革技術チーム、<sup>\*2)</sup> 国立大学法人奈良女子大学社会連携センター、<sup>\*3)</sup> 国立大学法人奈良女子大学理学部生物科学科分子生物学分野

## 2.2 装置

Brix は、(株)アタゴ製デジタル糖度計 PR-100 を用いて測定した。培養は、(株)サンキ精機製振とう培養器 SCS-20R を用いた。アルコールは理研計器(株)製アルコメイト AL-2 を用いて測定した。日本酒度は水道機工(株)製日本酒度測定器 DA120 を用いて測定した。有機酸は、Agilent 社製キャピラリー電気泳動を用いて測定した。酵母の資化性試験は、ピオメリュー社製細菌同定検査キット API 20C AUX 及び API ID32C を用いて行った。

## 2.3 酵母の分離

主として奈良公園内に植栽されているナラノヤエザクラのうち、延べ 50 本のナラノヤエザクラから約 560 個の花を採取した。この花を無菌的に 1 本の 50mL のチューブに 3 つずつ入れ、調製した麴汁液体培地 (Brix10, pH3.5) を注ぎ、30°C で培養した (第 1 次選択)。

さらに、2 次選択として、クロラムフェニコールを添加した麴汁液体培地 (Brix26, pH3.5) を用いて 30°C で培養した。

さらに、3 次選択の 1 として、2 次選択で発泡あるいは白濁したサンプルを麴汁液体培地 (Brix14.7, pH3.6, エタノールが 5%(v/v)) を用いて 15°C で培養した。

さらに、3 次選択の 2 として、3 次選択の 1 で発泡したサンプルを麴汁液体培地 (Brix14.7, pH3.6, エタノールが 5%(v/v)) を用いて 10°C で培養した。

3 次選択の 2 で発泡した懸濁培養液を、無菌的に TTC 寒天下層培養地に塗抹し 30°C で培養した単一コロニーを分離株(8 株)とした。

## 2.4 酵母の発酵性試験

下記の方法で行った。

- (1)ペプトン 0.5%、酵母エキス 0.5%を水 100mL に溶解し、試験管に 10mL ずつ分注する。
- (2)上記試験管の溶液に糖をそれぞれ 6% (ラフィノースは 12%) 加え、ダーラム管を入れる。
- (3)試験管と流動パラフィン、蒸留水をオートクレーブで滅菌する。
- (4)酵母をスラントから滅菌水に植菌し、しばらく放置する。
- (5)上記の酵母を含む滅菌水 100 $\mu$ L それぞれの糖の入った試験管に入れる。
- (6)滅菌した流動パラフィン 3mL を重層後 30°C で培養し、48h 後にダーラム管にガスがたまっているかどうかを確認する。たまっていたら、+とする。

## 2.5 酵母の資化性試験

酵母の資化性試験は、API 20C AUX 及び API ID32C に付属の操作法に基づいて行った。

## 2.6 キラー性試験<sup>3)</sup>

YEPD 培地にメチレンブルーを 0.003% 添加した寒天平板に協会酵母 (K701 あるいは K901) を 10<sup>6</sup> cfu/g となるよう塗布した後、測定する酵母を植菌し、25°C で 24 時間培養し、微小コロニーが培地一面に発生したときに現れるクリアゾーンを観察した。

## 2.7 TTC 染色

TTC 染色試験は、古川、秋山の方法<sup>4)</sup>に従って行った。すなわち菌体を適当に希釈し (1 プレートに約 200 程度となるよう)、TTC 下層培地に 30°C で 2 日間プレート培養したコロニー上へ、TTC 上層寒天培地を溶解後 45°C 程度にしてから静かに重層し、固まった後 30°C で 2~3 時間放置し、コロニーの染色性を観察した。

## 2.8 清酒の仕込み試験

三段仕込みで醸造を行った。仕込み配合を表 1 に示す。

表 1 仕込み配合

(単位: kg)

	初添	仲添	留添	計
総米	1.75	3.50	4.75	10.00
$\alpha$ 化米 <sup>a)</sup>	1.22	2.62	3.64	7.47
乾燥麴米 <sup>b)</sup>	0.43	0.69	0.86	1.98
汲水	2.29	5.29	8.04	15.61

<sup>a)</sup>歩留97%

<sup>b)</sup>歩留86%

まず、汲水 2.29kg に乳酸 5.7mL、乾燥麴米 0.43kg、酵母数が 10<sup>8</sup>cfu/mL となるように培養した麴汁液体培地 (ポーム度 10) 40mL を加え、水温 10°C で 1~3 時間浸漬した。次に、その浸漬した液に、 $\alpha$  化米 1.22kg を加え初添とした。1 日後、汲水 5.29kg と乾燥麴米 0.69kg を加えて、1~3 時間経過後、 $\alpha$  化米 2.32kg を加えて仲添とした。さらに 1 日後、汲水 8.04kg と乾燥麴米 0.86kg を加えて、1~3 時間経過後、 $\alpha$  化米 3.64kg を加えて留添とした。初添は 15°C、仲添は 12°C、留添は 10°C を目標として仕込みを行った。対照酵母として、K701 と K901 を用いた。留添以降、品温が 11~14°C になるように温度管理を行い、ナラノヤエザクラ酵母では 18 日間、K701 では 15 日間、K901 では 15 日間醸造を行った。その後、念入りに洗浄した酒袋を用いて袋吊りで上槽を行った。

## 2.9 キャピラリー電気泳動条件

カラム: Agilent 社製 fused-silica(75 $\mu$ mID, 75cm 有効長)

泳動液: Agilent 社製 Organic Acid Buffer for CE pH 5.6

印加電圧: -25kv, 温度: 20°C

波長: 350nm ref 200nm, 注入量: 2sec/50mmBar

キャピラリー温度: 20°C

試料の注入毎に泳動液で4分間洗浄を行った。

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 酵母の属種の決定及びキラ性試験

1次選択から3次選択の2で得られた8株の酵母の属種の決定及びキラ性試験は, 国立大学法人奈良女子大学理学部生物科学科分子生物分野 岩口准教授らによって行われた。DNAシーケンサー法で28s rRNA D1/D2領域塩基配列を決定し, DNA Data Bank of Japan (DDBJ)のDNAデータベースでの相同性の検索を行った結果, 8株中1株が *Saccharomyces cerevisiae* と特定された。さらに, 染色体電気泳動核型(パルスフィールド電気泳動法)により, この酵母は, 清酒の製造に一般的に使われている協会酵母(K7, K701, K901号)とは異なる株であることが判明した。また, キラ性試験により, 協会酵母に対してキラ性がないことが分かった。

#### 3.2 酵母の特性

得られた *S.cerevisiae* をナラノヤエザクラ酵母と名付けて, 酵母の特性を調査したところ下記のような結果となった。

- (1)菌の形態 (GYP培地を用いて30°Cで2日間培養)  
 栄養細胞の大きさ: 4~8µm  
 栄養細胞の形状: 卵型  
 増殖の形態: 出芽
- (2)コロニーの形態(GYP寒天培地を用いて30°Cで2日間培養)  
 形態: 円  
 隆起: 凸円状  
 周縁: 全縁  
 大きさ(直径): 2~3mm  
 色調: 白色で不透明  
 表面: 円滑で光沢あり
- (3)キラ性試験  
 協会酵母に対するキラ性の有無は非常に重要であるため, 当センターでもキラ性試験を行ったところ, K701, K901に対してキラ性がないことを確認した。二つの機関でキラ性のないことが判明したことから, 安心して醸造会社で使用していただけたと考えられる。
- (4)TTC染色試験  
 TTC染色試験では, K701及びK901では赤色を示したが, ナラノヤエザクラ酵母ではピンク色を示した。
- (5)発酵性試験  
 発酵性試験の結果を下記に示す。括弧内は *S.cerevisiae* 文献値<sup>9)</sup>であり, 比較しても矛盾は生じなかった。

グルコース + (+)  
 グリセリン -

L-アラビノース -  
 D-キシロース -  
 アドニット -  
 D-ガラクトース + (+, -)  
 イノシトール -  
 D-ソルビトール -  
 α-メチル-D-グルコシド + (+, -)  
 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-メレチトース - (+, -)  
 D-ラフィノース + (+, -)  
 メリビオース - (+, -)

表2 資化性試験

carbon source	Naranoya ezakura <sup>a)</sup>	K701	K901
Glucose	+	+	+
Glycerin	-	-	-
2-Keto-D-gluconate	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-
D-Xylose	-	-	-
Adonitol	-	-	-
Xlytol	-	-	-
Galactose	+	+	+
Inositol	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-
α-Methyl-D-glucoside	+	+	+
N-Acetyl-D-glucosamine	-	-	-
D-Cellobiose	-	-	-
Lactose	-	-	-
D-Maltose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
D-Trehalose	-	-	-
D-Melezitose	-	-	-
Raffinose	+	+	+
Melibiose	-	-	-
Cycloheximide	-	-	-
Mannitol	-	-	-
D-Ribose	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-
Palatinose	-	+	+
Erythritol	-	-	-
Glucuronate	-	-	-
Gluconate	-	-	-
Levulinic acid	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-
D-Glucosamine hydrochloride	-	-	-
Esculin	-	-	-

<sup>a)</sup> The isolated yeast in this study

#### (6)資化性試験

資化性試験の結果を表2に示す。バイオメリューのデータベースで同定したところ, ナラノヤエザクラ酵母は, *S.cerevisiae* であることを確認した。また, ナラノヤエザク

ラ酵母の Palatinose の資化性が K701 及び K901 と異なっていることから K701 と K901 と異なる株であることが分かった。

### 3.3 清酒の仕込み試験

ナラノヤエザクラ酵母のモロミは、K701 及び K901 と同じく高泡が生じなかった。醸造中、アルコール、日本酒度、酸度、アミノ酸度、Brix の経時変化をモニターした。アルコール及び日本酒度の経時変化を図 1, 2 に示す。

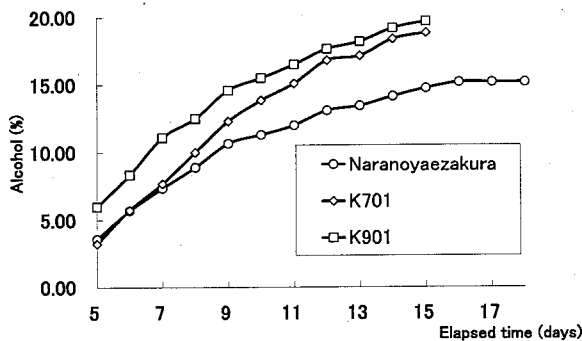


Fig. 1 Concentration of alcohol in fermented sake

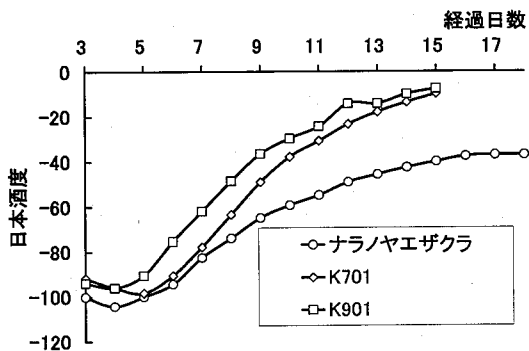


図2 日本酒度の経時変化

ナラノヤエザクラ酵母を使った醸造では、アルコール濃度及び日本酒度は、5日から16日まで緩やかに上昇したが、16日以降は、ほとんど変わらず、アルコール濃度は、15.2%まで、日本酒度は-37.1までしか高くならなかった。

### 3.4 清酒の分析値

醸造した清酒の分析値を表3, 4に示す。

ナラノヤエザクラ酵母で醸造した清酒は、K701及びK901よりも、アルコール濃度が低く、日本酒度も小さかった。日本酒度が小さく、酸度が高いため、官能検査でも、甘めで酸味がしっかりある清酒であった。また、リンゴ酸及びコハク酸が多く含まれており、ワインに似たフルーティーな酸味をもった清酒であった。

表3 醸造酒の成分値

	ナラノヤエザクラ	K701	K901
アルコール(%)	15.2	18.85	19.7
日本酒度	-37.1	-9.9	-7.6
酸度	4.1	3.5	3.3
アミノ酸度	1.4	1.7	1.8
Brix	17.1	14.4	14.7

表4 有機酸濃度

Yeasts	(mg/100mL)		
	リンゴ酸	クエン酸	コハク酸
ナラノヤエザクラ	76.8	18.6	88.0
K701	41.9	8.6	46.3
K901	58.7	14.0	69.5

### 3.5 今後の課題と問題点

清酒の仕込み試験では、18日で醸造を終了したが、もう少し醸造を続けた場合、清酒の成分値がどのように変化するかを調べる必要がある。また、香り成分の経時変化を分析についても今後の課題である。

## 4. 結言

ナラノヤエザクラの花から、清酒の製造に一般的に使われている協会酵母とは異なる株である *S. cerevisiae* を分離した。その酵母を使って清酒の仕込み試験を行った結果、低アルコールで甘味があるが、リンゴ酸やコハク酸を多く含み、酸味のしっかりあるフルーティーな味わいのある清酒をつくることのできる酵母であった。

本研究は、奈良八重桜PJの一環として行った。

### 参考文献

- 1) 国税庁ホームページ  
<http://www.nta.go.jp/shiraberu/senmonjoho/sake/shiori-gai-kyo/shiori/2008/pdf/06.pdf#search=%E9%86%92%E7%B1%B3%E5%85%B6> (消費)数量の推移
- 2) 財団法人 秋田経済研究所「あきた経済」平成19年8月号(No.339):若年層の清酒アンケート調査  
[http://www.akita-bank.co.jp/houjin/keiei/keizai/tyousa\\_topic/190803.html](http://www.akita-bank.co.jp/houjin/keiei/keizai/tyousa_topic/190803.html)
- 3) 河野勇人他, 醸造協会誌, 83, 5, 344 (1988)
- 4) 古川敏郎, 秋山裕一: 農化, 37, 398 (1963)
- 5) Yeasts: Characteristics and identification p468