

# 花から分離した酵母を用いたオリジナル清酒の開発

井上智実\* 松田章\*

日本各地で地域性のある酵母を用いたオリジナル清酒の開発が盛んに行われている。そこで、本研究では、石川県独自のオリジナル清酒を開発するために、石川県内の名所旧跡の花からアルコール生産性の高い野生酵母を分離することを試みるとともに、酵母の特性を評価した。その結果、兼六園の桜の花、金沢城址公園の桜の花、白山高山植物園のハクサンフウロから分離した酵母は、小仕込み試験で良好な発酵力を示した。これらの酵母は、28S rDNAを用いた遺伝子解析により*Saccharomyces cerevisiae*と同定された。また、アピCオクサノグラムを用いた糖資化性試験により、それぞれは異なったタイプであることが示された。兼六園の桜から分離した株を用いた酒母の発酵条件の検討では、少量の米糖化液で培養した酵母をスターターとして添加することで発酵初期の活性を高めることが明らかとなった。本方法を用いた総米600kgの清酒醸造では、良好な発酵過程を示し、酢酸イソアミルの香りを主体としたアルコール17.6%の清酒が製造できた。

キーワード：オリジナル清酒，野生酵母，名所旧跡，米糖化液

## Development of Original Sake Using Yeasts Isolated from Flowers

Tomomi INOUE and Akira MATSUDA

Development of the original sake using the yeast with the regionality is carried out flourishingly in the various parts of Japan. In this study, to create original sake of the various places in Ishikawa Prefecture, we tried isolating wild yeast that is capable of producing alcohol efficiently, from flowers at the places of scenic beauty and historic interest in Ishikawa, and evaluated some properties of the yeasts. As a result, it was shown that the yeasts isolated from cherry blossoms in Kenrokuen Garden and Kanazawa Castle Park, and “Hakusanfuuro” (*Geranium yesoemse* var. *nipponicum*) in the Hakusan Alpine Plant Garden indicated good fermentation activity in sake brewing tests on a small scale. These yeasts were identified as *Saccharomyces cerevisiae* via genetic analysis using 28S rDNA, and each strain was found to be a different type via a saccharides assimilation test using API 20 C AUX. Examination of the fermentation condition of “syubo” using the strain from cherry blossoms in Kenrokuen Garden was revealed that the activity in the early period of fermentation was improved by the addition of yeast incubated in a small amount of rice saccharification liquid as a starter. The brewing of sake from 600kg of rice using this method showed a good fermentation process. The sake had manufactured an alcohol content of 17.6% and a fragrance consisting mainly of isoamyl acetate.

Keywords : original sake, wild yeast, place of scenic beauty and historic interest, rice saccharification liquid

### 1. 緒 言

食の多様化，健康志向からワインや焼酎などの消費量が增大する一方で，日本を代表する醸造酒である清酒の消費量は年々減少している。全国の清酒消費量の推移をみると，ピーク時の昭和50年度には1,675千L消費されたが，平成28年度は537kLと約1/3まで減少している<sup>1)</sup>。

このような状況の中，清酒醸造業界では，新しいタイプの清酒の開発が全国で精力的に取り組まれ，アルコール濃度の低い清酒や発泡性を有する清酒，リンゴ酸を高めたワイン風の清酒などが開発されている。また，地域の特色を出した清酒の開発も各地で行われており，その一例として，大学や公設試と連携し，名所旧跡や花，特産品などから野生酵母を分離して清酒に利用する取り組みが行われている<sup>2-5)</sup>。

本研究では，石川県内の名所旧跡の花を中心にアル

\*化学食品部

コール発酵力が強い酵母を分離し、分離酵母の特性を評価するとともに醸造条件を検討し、県産酵母による清酒製造への応用を図った。

## 2. 実験方法

### 2. 1 試料の採取および培地調製

試料は、石川県内の名所旧跡を主な採取場所として、花を中心に採取した。また、採取後は速やかに分離試験に供した。

酵母の分離培地は、5%グルコース-YPD培地(酵母エキス1%、ペプトン2%、グルコース5%)をオートクレーブ後、クロラムフェニコールを100mg/L(エタノールに0.1g/mL溶解して添加)、プロピオン酸ナトリウムを2g/Lとなるよう加えて調製した。また、平板寒天培地は2%グルコース-YPD培地に寒天を2%となるよう加えて調製した。

糖の発酵試験には10%グルコース-YPD培地およびBrix(糖度)を10%に調製した麴エキスをを用いた。

酒米を用いた発酵試験は、50mLの滅菌遠心ポリチューブに乾燥米麴2.0g、 $\alpha$ 化米4.0g、滅菌水(90%乳酸0.1%含有)14mLを加えて攪拌し、 $\alpha$ 化米が十分膨潤したのち使用した。

米糖化液は、乾燥米麴と $\alpha$ 化米と水を3:7:21の割合で混合し、1時間静置した後、56°Cで8時間以上糖化して作製した。

### 2. 2 菌体の分離

採取した試料は、50mLの滅菌遠心ポリチューブに1/3程度入れ、分離培地を30mL加えて、30°Cで最大5日間静置培養を行った。産膜が生成した試料を除外した後、濁りや発泡が認められた試料は、試験管に100 $\mu$ Lサンプリングし、速やかに冷蔵庫に保管した。サンプリング液は、10%グルコース-YPD培地を10mL加えた後、30°C、48時間静置培養してBrix値を測定した。Brix値が7.0%未満を示した培養液は、平板寒天培地に画線塗抹し、30°Cで24時間培養した。培養後に出現したコロニーは、平板寒天培地へ16株を画線的に植菌して単一の菌株を得るための純化作業を行った。

### 2. 3 発酵試験

糖発酵試験は、1次選抜として10%グルコース-YPD培地を用い、2%グルコース-YPD培地で培養した分離菌体を加え、30°Cで48時間静置培養した。Brix値が7.0

未満を示した菌体の試験区は、アルコール濃度を測定し、4.0%以上を示した菌株を保存した。次に、2次選抜としてこれら菌体をBrix10%に調製した麴エキスに接種し、30°Cで48時間静置培養した後、アルコール濃度を測定し、4.0%以上を示した菌株を保存した。3次選抜は、2次選抜した菌株について、協会酵母K-901を対照株として酒米の発酵試験を行い、同程度のアルコール生成能を示した株を保存した。3次選抜した株はBrix10%の麴エキスで培養し、小仕込み試験に供した。

### 2. 4 キラー性試験

3次選抜で得られた菌株は、2%-グルコースYPD平板寒天培地上でK-901と交差するように画線接種し、25°Cで48時間培養し、生育状態を観察した<sup>6)</sup>。

### 2. 5 TTC染色

菌体を2%-グルコースYPD培地で培養し、1プレート100~200コロニーとなるよう希釈した後、TTC(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride)下層培地で30°C、2日間培養した。次にTTC上層培地を加熱溶解後、45°C程度に放冷してコロニー上へ静かに重層し、固まった後30°Cで2~3時間放置してコロニーの染色性を観察した<sup>7)</sup>。

### 2. 6 同定試験および糖資化性試験

DNAシーケンサー法で28S rDNA D1/D2の塩基配列解析を行い、DNA Data Bank of Japan(DDBJ)のDNAデータベースでの相同性検索を行った。

また、糖資化性の評価は、単一炭素源の利用能についてアピCオクサノグラム(シスメックス・ビオメリュー)を用いて行った。試験は、乾燥炭水化物を含むそれぞれのカップに所定の方法で調製した菌体の懸濁液を接種し、30°Cで2日間培養後、それぞれのカップをコントロールのカップと比較し、分離株および協会酵母との比較を行った。

### 2. 7 小仕込み試験

清酒の製造では、一般的に麴エキスで培養した酵母を酒母の仕込みに使用する。ここでは兼六園の桜から分離したKEN24株を用い、小仕込み試験を行い、発酵特性を調べた。なお、対照株は、K-901を用いた。

KEN24株の麴エキス培養液は、仕込み水の1%,2%,5%(v/v)(菌数:1.0 $\times$ 10<sup>8</sup>cells, 1.9 $\times$ 10<sup>8</sup>cells, 4.7 $\times$ 10<sup>8</sup>cells), 一方、K-901は1%(v/v)(菌数:1.6 $\times$

10<sup>8</sup>cells)添加した。小仕込み試験は、50mLの滅菌遠心ポリチューブに乾燥米麴3.0g、 $\alpha$ 化米7.0g、滅菌水(90%乳酸0.5%含有)15mLを加えて攪拌し、 $\alpha$ 化米が十分膨潤した後、菌体の培養液を添加して25℃で10日間発酵を行った。発酵経過は試料の重量を測定し、もろみの炭酸ガス減量で評価した。

## 2. 8 分離酵母を用いた清酒醸造

清酒の醸造は、精米歩合60%の石川門を用い、速醸酒母による総米600kgの三段仕込みを石川県内の酒蔵で行った。なお、各歩合は、麴歩合120%、汲み水歩合150%、酒母歩合6.7%とした。酒母は、総米40kg、汲み水48Lとし、酒米の発酵物を用いて酤立てを行った。

## 2. 9 成分分析

Brix値はデジタル糖度計PR-100((株)アタゴ)を用いて測定した。アルコール濃度はアルコメイト(理研計器(株))を用いて測定した。ただし、総米600kgの醸造製成酒のアルコール濃度は国税庁所定分析法注解に基づき、浮ひょう法で測定した<sup>8)</sup>。また、日本酒度、酸度、アミノ酸度も同分析法注解にもとづき測定した。香气成分の分析は、GC/MS 7890A/5975C(アジレント・テクノロジー(株))、オートサンプラーMPS2/TDU(ゲステル(株))を用いて分析した。なお、分析法は、ヘッドスペース法を用いた。内部標準物質は試料5 mLにカプロン酸メチルと3-ペンタノールを100  $\mu$  L加え、50℃で30分温置した。カラム温度は、40℃で10分保持後、230℃まで5℃/minで昇温させ、230℃で12分保持した。カラムはJ&W Scientific DB-WAX, 0.25 mm I.D.×60 m, df=0.25  $\mu$  mを使用した。有機酸分析は、ICS-1500 (DIONEX(株))を用い、カラムはIonPac ICE-AS6(日本ダイオネクス(株))、溶離液は0.4mmol/Lヘプタフルオロ酪酸を用い、流速は1.0mL/minで分析した。

## 3. 結果と考察

### 3. 1 菌体の分離

試料は、兼六園(金沢市)、金沢城址公園(金沢市)、能登鹿島駅(穴水町)、白山高山植物園(白山市)など19地点から桜、梅、のとキリシマツツジ、高山植物などの花を中心に採取し、スクリーニング試料として933点作製した。分離培地を試料に加えて培養した結果、

177点に懸濁・発泡が認められた。これら試料から懸濁液を分取し、10%YPD培地で3日間培養した結果、Brix値が7.0%未満、アルコール濃度が4.0%以上を示した試料は、90試料存在し、1440株を分離した。

### 3. 2 発酵試験

分離した1440株を10%YPD培地で培養し、Brix値、アルコール濃度を測定した結果、Brix7.0%未満、Alc.4.0%以上を示した株は295株存在した。さらに麴エキスをを用いた発酵試験でAlc.4.0%以上を示した株は76株存在した。

これら76株について酒米を用いた発酵試験を行った結果、K-901と同程度のアルコール生成能力を示した株は、兼六園の桜KEN24(12株)、金沢城址公園の桜KAN23(14株)、白山高山植物園のハクサンフウロHAK2,4,5,8,18(14株)から分離された40株であった。

### 3. 3 分離酵母の性質および同定試験

TTC染色は、呼吸能欠損細胞の検査に用いられる試験法であり、清酒もろみ中の清酒酵母の純度の判定に利用される。清酒酵母は赤色に、呼吸能欠損酵母は白色に、野生酵母のほとんどは桃色ないし白色に染色される。分離した野生酵母40株についてTTC染色試験を行った結果、すべて赤色であったため、分離株は清酒酵母と同じ特徴を有していることが判明した。

また、協会酵母に対しキラー性を有する場合、清酒もろみに混入すると協会酵母を死滅させるため、協会酵母を用いた酒造りに支障をきたすことになる。したがって、キラー性を持たないことは、清酒醸造において非常に重要な要素である。そこで、分離した40株についてK-701、K-901に対するキラー性の有無を調べた。その結果、すべての分離株はキラー性を示さなかった。

アピCオクサノグラム(シスメックス・バイオメリュウ)を用いた資化性の試験では、KEN24から分離した12株は、同じタイプの資化性を示した。また、KAN23から分離した14株も同じタイプの資化性を示した。HAK2,4,5,8,18から分離した14株は、2タイプの資化性を示した。なお、これら4タイプの資化性を比較したところすべて異なっており、さらに、28S rDNAの塩基配列解析を行った結果、すべて*Saccharomyces cerevisiae*であると同定された。なお、これら4タイプについてK-701とK-901の資化性を比較した結果、すべて異なっていたため、分離株と協会酵母は異なり、ま

た、分離株もそれぞれ異なるタイプの *S. cerevisiae* であると考えられた。

### 3. 4 小仕込み試験

分離した4タイプの株はほぼ同じ傾向の発酵経過を示したため、ここでは全国的に知名度が高い兼六園を分離源とするKEN24の12株の中から最も華やかな香りが感じられたKEN24-15株(図中KEN24)を用いて小仕込み試験を行った。

まずは、麴エキスでKEN24-15株を培養した小仕込み試験結果を図1に示す。KEN24-15株は、発酵初期の立ち上がりがK-901と比べ緩やかで、K-901の約3倍の菌体(KEN24-15(5%))を加えた場合においても、発酵初期の炭酸ガス減量は、1/2以下であった。清酒の製造では、発酵初期の立ち上がりが緩やかであると、もろみ中のアルコール濃度が高まるまでに時間を要し、もろみが雑菌汚染するリスクが高くなる。そのため、発酵初期の立ち上がりを向上させることが必要である。図1では、KEN24-15株は発酵開始48時間後から、発酵が進んだことから、酒米の発酵に馴化させた酵母を用いることで、発酵の立ち上がりが向上するものと考えられた。

そこで、グルコース濃度が高く、酵母の培養に適していると考えられる米糖化液で酵母を培養し、小仕込み試験を行った。小仕込み試験は、KEN24-15株を米糖化液で培養し、仕込み水の1%,2%,5%,10%(w/v)(菌数： $0.9 \times 10^7$  cells,  $1.8 \times 10^7$  cells,  $4.6 \times 10^7$  cells,  $9.2 \times 10^7$  cells)となるように添加して、25℃で10日間発酵を行った。その結果を図2に示す。米糖化液で培養した培養液は、仕込み水の5%以上加えた場合において発酵初期の立ち上がりが向上し、K-901と同程度の炭酸ガス減量を示すことが判明した。

次に、米糖化液培養液を用いた場合、発酵初期の立ち上がりが向上した要因を検証するため、仕込み水の5%(w/v)相当量の米糖化液に、麴エキスで培養した菌体 $0.46 \times 10^8$  cellsを添加して比較試験を行った。その結果を図3に示す。炭酸ガス減量は、K-901の1/10以下となり、発酵初期の立ち上がりは穏やかなままであったため、米糖化液で培養した酵母が寄与していたものと考えられた。したがって、米糖化液で培養した酵母を酒母の仕込みに使用することで、酒母の発酵初期の立ち上がりが良好に推移するものと考えられた。

しかし、実用規模における仕込みを想定した場合、

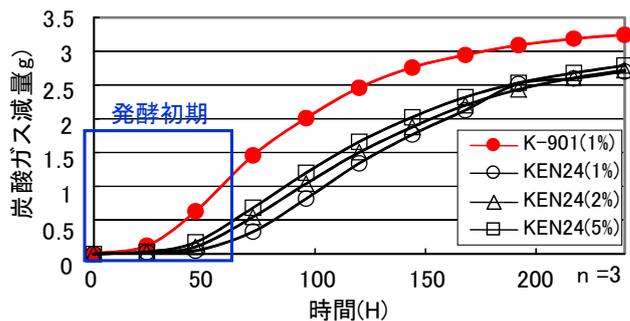


図1 麴エキス培養液における発酵曲線

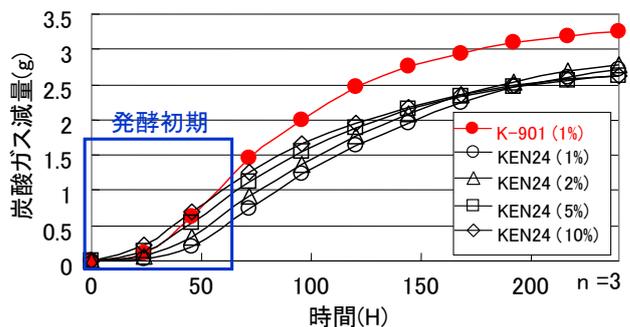


図2 米糖化液培養液における発酵曲線

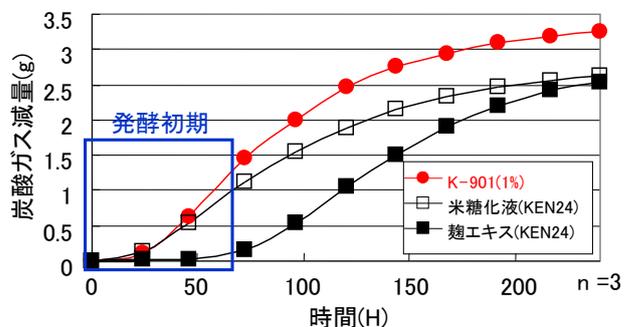


図3 米糖化液培養液と麴エキス培養液の比較試験

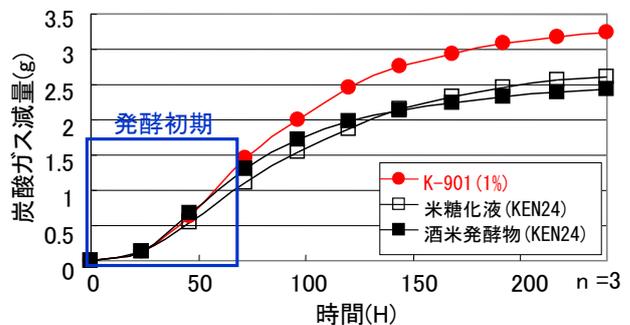


図4 米糖化液培養液と酒米発酵物の比較試験

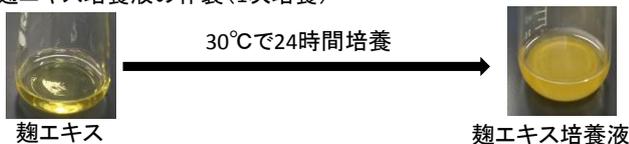
総米1t程度の清酒の仕込みでは、酒母の作製(酒母歩合10%、汲み水歩合120%の場合)に汲み水を120L程度使用する。したがって、先の方法では、6kg(汲み水の5%)もの米糖化液を作る必要があり、大きな労力を要する。そこで、少量の米糖化液で酒米を発酵させた発酵物が仕込みに利用できないか検討した。小仕込み試験は、KEN24-15株を米糖化液で培養し、添加する水の量の5%(v/v)(菌数： $5.0 \times 10^6$  cells)となるように加え、25℃で10日間発酵を行った。その結果を図4に示す。米糖化液の培養液5%添加時と同等の効果が認められ、酒米の発酵物が利用可能であることが明らかとなった。

### 3. 5 KEN24-15株を用いた清酒醸造

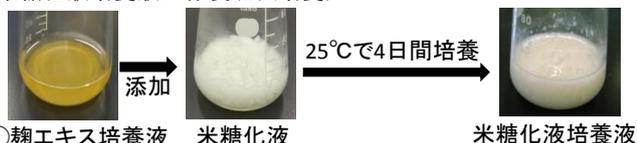
小仕込み試験の結果、酒米の発酵物を用いた場合においても発酵の立ち上がりが向上したため、本手法を用いて酒母を作製し、総米600kgスケールでの清酒の仕込みを行った。

酒母の仕込みに用いる酒米発酵物の作製方法を図5に示す。1次培養として麴エキス6mLにスラントで培養した菌体を接種し、30℃、24時間培養を行った。2次培養は、この培養液を、高温糖化物(配合割合：乾燥米麴36g、 $\alpha$ 化米72g、水250mL)に加え、25℃で4日間培養した。3次培養は、この培養物を酒母の汲み水5%相当量の酒米培地(乾燥米麴340g、掛米760g、水1.5L(90%乳酸0.5%含有))に加えて25℃で7日間培養した。酒母のもろみ最高温度は、22℃、もろみ日数は13日で行い、清酒のもろみ最高温度は、17℃、もろみ日数は22日で上槽した。

#### ① 麴エキス培養液の作製(1次培養)



#### ② 米糖化液培養液の作製(2次培養)



#### ③ 酒米発酵物の作製(3次培養)

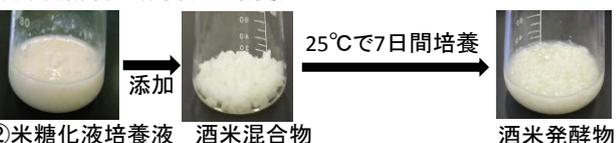


図5 酒母の仕込みに用いる酒米発酵物の作製方法

なお、酒母の仕込みは、発酵経過を把握するため、2次培養後、3次培養後、酒母8日後、13日後の生菌数およびアルコール濃度を測定した。また、清酒のもろみは、5日、7日、10日、13日、22日後にアルコール濃度と日本酒度を測定し、発酵経過を把握した。

酒母の製造経過を表1に示す。その結果、菌数はそれぞれ1g中 $10^8$  cellsオーダー存在し、十分な酵母の増

表1 酒母の製造経過

経過日数	Alc. (%)	菌数 (cells/g)
2次培養 (3日目)	13.5	$1.8 \times 10^8$
3次培養 (7日目)	13.5	$1.0 \times 10^8$
酒母もろみ8日目	8.1	$1.3 \times 10^8$
酒母もろみ13日目	12.7	$1.0 \times 10^8$

表2 清酒もろみの発酵経過

もろみ日数	Alc. (%)	日本酒度
5日目	12.1	3.0*
7日目	13.3	-15.7
10日目	15.0	-1.4
13日目	16.0	+5.2
22日目	17.6	+14.2

\*:ボーメ

表3 有機酸分析結果

有機酸成分	濃度 (mg/100ml)
ピルビン酸	13.6
クエン酸	8.1
リンゴ酸	27.5
乳酸	42.6
酢酸	5.6
コハク酸	49.3

表4 香気成分分析結果

香気成分	濃度 (ppm)
酢酸エチル	137
酢酸イソアミル	5.6
カブロン酸エチル	0.5
フェネチルアルコール	103
イソブチルアルコール	159
イソアミルアルコール	256
1-プロパノール	133

殖が認められた。また、アルコール生成も8日目で8.1%、13日目で12.7%と良好な結果が得られた。

清酒もろみの発酵経過を表2に示す。清酒もろみ中のアルコール度数は、5日目で12.1%、10日目で15.0%を示し、順調にアルコールが生成された。また、ボーメは、5日目で3.0、日本酒度は10日目で-1.4を示し、22日の上槽した。上槽前の清酒もろみの成分分析を行った結果、アルコール度数は17.6%、日本酒度は+14.5、酸度は2.2、アミノ酸度は1.5を示した。

有機酸の分析結果を表3に示す。酢酸濃度が高いと酸臭として感じられるが、ここでは5.6mg/100mLと低い値が示された。香気成分の分析結果を表4に示す。吟醸香の成分では酢酸イソアミルが5.6ppm、カブロン酸エチルは0.5ppmを示し、酢酸イソアミルを主体とした香りを持つ清酒となった。なお、官能評価を行った結果、スッキリとしたキレのある清酒であった。

#### 4. 結 言

兼六園の桜、金沢城址公園の桜、白山高山植物園のハクサンフウロから協会酵母K-901と同程度のアルコール生成能力を有する株を40株分離した。分離した40株は清酒酵母にキラー性を示さず、アピCオクサノグラムを用いた糖資化性の試験では、4タイプに分類された。また、それぞれのタイプについてDNAシーケンスを行った結果、すべて*S. cerevisiae*であると同定された。

KEN24-15株を用いた小仕込み試験の結果、米糖化液や酒米発酵物を仕込みに用いることで、発酵の立ち

上がりが増進した。

KEN24-15株を用いた清酒醸造において、酒米発酵物を用いて酒母を作製し、清酒を製造した結果、発酵は良好に進み、酢酸イソアミルを主体としたアルコール度数が17.6%の清酒ができた。また、酒質はスッキリとしたキレのある清酒であった。

#### 参考文献

- 1) “酒のしおり（平成30年3月）”。国税庁。  
<http://www.nta.go.jp/taxes/sake/shiori-gaikyo/shiori/2018/pdf/036.pdf>, (参照 2018-08-01).
- 2) 穂坂賢, 中田久保. 花から分離した酵母による清酒の試験醸造. 日本醸造協会誌. 2000, vol. 95, no. 11, p. 837-842.
- 3) 小室友香里, 穂坂賢, 中田久保. 桜の花から分離した酵母の醸造特性. 日本醸造協会誌. 2004, vol. 99, no. 10, p. 743-749.
- 4) 小室友香里, 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. 日本醸造協会誌. 2005, vol. 100, no. 6, p. 454-460.
- 5) 柏木亨. 桜の花から分離した酵母による清酒の商品化. 日本醸造協会誌. 2002, vol. 97, no. 1, p. 2-6.
- 6) 大内弘造, 川島宏. 清酒酵母保存株における Killer および neutral strain の分布. 日本醸造協会誌. 1974, vol. 69, no. 9, p. 629-630.
- 7) 古川敏郎, 秋山裕一. TTC重層法による酵母の分別について. 日本農芸化学会誌. 1963, vol. 37, no. 7, p. 398-402.
- 8) 注解編集委員会編. 第4回改正国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会, 1993, p.7-24,273.