

奈良県産シャクヤク花からの *Saccharomyces cerevisiae* の単離と醸造特性

立本 行江^{*1)}, 都築 正男^{*1)}, 栗原 智也^{*1)}

Sake brewing characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*

isolated from peonies produced in Nara Prefecture

TATSUMOTO Yukie^{*1)}, TSUDUKI Masao^{*1)}, KUWAHARA Tomoya^{*1)}

漢方関連素材から分離した奈良県独自の酵母で醸造製品をつくることを目指し、県内栽培のシャクヤク及びボタンの花から酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を5菌株分離した。いずれの酵母もきょうかい酵母と異なる菌株で、キラー性を示さず、酸を多く生成する甘口の低アルコール向け清酒醸造に使用可能と判断した。さらに、ワイン醸造にも使用できることを確認し、これらの菌株は、漢方関連の発酵食品に今後、貢献する素材として期待される。

1. 緒言

シャクヤク *Paeonia lactiflora* (ボタン科) の根を乾燥したものや、ボタン *Paeonia suffruticosa Andrews* (ボタン科) の根皮を乾燥したものは生薬として当帰芍薬散、八味地黄丸などの漢方処方に繁用される。奈良県は優良な産地で、シャクヤクにはヤマトシャクヤクとよばれる貴重な品種のものがある^{1,2)}。

奈良県では2012年より漢方のメッカ推進プロジェクト事業を部局横断で進めており、奈良時代にまで遡る文化的・歴史的厚みや、他府県にはない特徴を生かし、原料となる薬用作物の生産、漢方に関連する新たな商品・サービス等の創出を視野に入れ、県内の産業活性化を目指している。当センターではシャクヤク花の食を含めた有用な活用を目的に、花の成分評価や機能性評価を進めているところである³⁾。

一方、当センターでは清酒醸造用の酵母開発を行っており、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は酒類・パンなどの発酵食品の製造に使用されている大変重要な産業微生物である。現在利用されている *S.cerevisiae* の多くは優れた品質の発酵食品から分離された菌株で、これらの優良菌株の利用は製品の品質向上に大きく貢献している。近年、食生活の多様化に伴い様々な嗜好に対する発酵食品の製造や、地域特産品としての醸造製品の開発を目的として、地域の観光資源、例えば製品に好印象を付与できる花や土、水などを分離源とした新たな *S.cerevisiae* が求められ分離されている^{4~9)}。

奈良県においてもナラノヤエザクラやササユリの花から独自酵母が分離され、県内酒造会社で使用され地域性のある清酒の製品化がされている^{10,11)}。

これまでに、生薬採取を目的に栽培されるシャクヤクやボタンの花からの清酒醸造等に供される酵母分離の事例はないことから、新たな漢方関連醸造商品を目指し、奈良県内の栽培地で生薬用、観賞用として栽培されているシャクヤク及びボタン花試料を採取し、清酒等の醸造に適した酵母の分離と選抜を行い、分離した酵母の醸造特性を明らかにしたので報告する。

2. 実験方法

2.1 酵母の分離

2.1.1 分離源

2022年4月～5月に奈良県内のシャクヤク及びボタン栽培地11カ所から136の試料を採取し、酵母分離に供した。(表1) 「和シャクヤク (和)」は生薬採取用に栽培されているもの、「洋シャクヤク (洋)」は観賞用に栽培されているものとした。

2.1.2 使用培地

集積培地は麴汁培地 (Brix 10.5, pH 3.5) を使用した。1次選抜培地は100 ppm のクロラムフェニコールを加えた麴汁培地 (Brix 10.5, pH 3.5) を使用した。2次選抜培地は100 ppm のクロラムフェニコールを加えた高糖度の麴汁培地 (Brix 20.0, pH 3.5)、3次選抜培地は5%のエタノールを加えた麴汁培地 (Brix 10.5, pH 3.5)、4次選抜及び5次選抜培地は10%エタノールを加えた麴汁培地 (Brix 10.5, pH 3.5) を使用した。また、それぞれの試験管にはダーラム管を入れ、増殖に伴うガスの発生も観察した。

コロニーの分離にはTTC下層培地(日本醸造協会製)を使用した。酵母の増殖にはYPD培地(1%酵母エキス、

*1) バイオ・食品グループ

2%ペプトン，2%グルコース)を使用した。

2.1.3 集積培養および選抜

採取した試料を無菌的に 500 mL 袋に各々入れ，集積培地を加えて，30 °Cで培養した。白濁した集積培養液 100 μL を 1次選抜培地 10 mL に添加し，30 °Cで培養した。同様に 2次，3次，4次選抜は 30 °Cで培養し，5次選抜は 15 °Cで培養した。

5次選抜で白濁および発泡した培養液を TTC 下層培地に塗抹し，30 °Cで培養した単一コロニーを得た。

2.2 分離酵母の種の同定

2.2.1 同定キットによる種の推定

分離した酵母は酵母様真菌同定キット ID32C API (ピオメリユー・ジャパン (株) 製) を用いて推定を行った。酵母菌体をサスペンションメディウム 2 mL に懸濁し，ID32C API C メディウムに 250 μL 添加した。

この懸濁液を IP32C API プレートに 135 μL ずつ接種し，30 °C，48 時間培養後，プレート上の 31 種類の炭素源の資化性パターンから apiweb™ (<https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>) により菌種を推定した。

表 1 分離源

No	採取日	場所	形状 花色	栽培年数	No	採取日	場所	形状 花色	栽培年数	
1	2022-04-25	橿原市S畑1	和 一重 ピンク	3年目	71	2022-05-06	吉野郡下市町M畑	和 一重 赤	3年目	
2			橿原市S畑2		和 一重 赤紫					72
3					和 一重 ピンク					73
4					74					
5					75					
6					76					
7	2022-04-28	磯城郡田原本町S ビニールハウス	和 梵天 白	77						
8				78						
9				79						
10				80						
11				81	2022-05-06	御所市U畑	和 八重 華燭の典 赤紫	2年目		
12	2022-04-29	桜井市M薬草園	洋 八重 コーラルチャーム ピンク	82			和 八重 滝の粧白			
13				83						
14				84						
15			85							
16			86							
17			和 一重 赤紫	87						
18	和 一重 赤紫	88								
19	2022-04-30	橿原市S畑2	和 一重 ピンク	89			和 八重 華燭の典 赤紫			
20				90						
21				91						
22				92						
23				93						
24				94						
25				95						
26				96						
27				97						
28				98						
29				99						
30				100						
31				101	2022-05-06	生駒市T畑	和 梵天 白	10年目		
32				102						
33				103						
34				104						
35				105						
36				106	2022-05-06	桜井市F畑	和 梵天 白	10年目		
37				107						
38				108						
39				109						
40				110						
41	2022-05-02	吉野郡下市町M畑	洋 一重 赤	111	2022-05-11	御所市T薬草園	和 梵天 白	2年目		
42				112						
43				113						
44				114						
45				115						
46				116						
47				117						
48				118						
49				119						
50				120						
51				121						
52				122						
53				123						
54				124						
55				125						
56	126									
57	127									
58	128									
59	129									
60	130									
61	131									
62	132									
63	133									
64	134									
65	135									
				136			洋 八重 赤紫	4年目		

2.2.2 遺伝子解析による種の同定

真菌の種の同定に用いられる 26S rDNA の D1/D2 領域の塩基配列を用いて、分離した酵母の種の同定を行った。PCR の鋳型は、YPD 培地で培養した菌体から Gen とるくん™ (酵母用) High Recovery (タカラバイオ (株) 製) で調製した染色体 DNA を用いた。

プライマーは NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGG AGGAAAAG-3') および NL4 (5'-GGTCCGTGTTCAA GACGG-3')¹²⁾を用いた。PCR の反応液は、2×Ex Premier DNA Polymerase (タカラバイオ (株) 製) を 10 μL, プライマー (10 μM) を 0.6 μL に鋳型 DNA を <0.5 μg を加え、滅菌水で 20 μL に調製した。Veriti Thermal Cycler (サーモフィッシャーサイエンティフィック (株) 製) を用いて、94 °C, 3 分間で DNA の変性を行った後、94 °C で 30 秒 (変性), 52 °C で 30 秒 (アニーリング), 72 °C で 1 分 (伸長) を 25 サイクル行った。

PCR 産物は、ExoSAP-IT (サーモフィッシャーサイエンティフィック (株) 製) で精製し、シークエンス用試料とした。DNA シークエンスはユーロフィンジェノミクス (株) に委託し塩基配列を決定した。決定した塩基配列は Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) により相同性検索を行い、酵母の種を同定した。

2.3 分離酵母の性質

2.2.3 菌株の識別¹³⁾

YPD 培地で培養した菌体から Gen とるくん™ (酵母用) High Recovery (タカラバイオ (株) 製) で調製した染色体 DNA を鋳型として PCR を行い、菌株の識別を行った。PCR 反応液は、2×Ex Premier DNA Polymerase (タカラバイオ (株) 製) を 10 μL, プライマー (10 μM) を 0.3 μL に鋳型 DNA を <0.5 μg を加え、滅菌水で 20 μL に調製した。No.111 及ときょうかい酵母 K701 の *AWA1* 遺伝子¹⁴⁾のみ Ex Taq™ (タカラバイオ (株) 製) を <0.5 μg, 10×Ex Taq buffer を 2.0 μL, dNTP Mixture (2.5 mM each) を 1.6 μL, プライマー (10 μM) を 2.0 μL, 鋳型 DNA を <0.5 μg 加え、滅菌水で 20 μL に調製した。増幅した領域は長鎖末端反復配列 (LTR) の一つ YLRW delta20¹⁵⁾ および *AWA1* 遺伝子である。

YLRW delta20 のプライマーは 5'-TCACGTCAGA ATAG TTTTTGCATCTATG-3' 及び 5'-AAATGGATGGATAATTT GATAATTGCTGGG3' を用いた。

AWA1 遺伝子のプライマーは 5'-ATGTTCAATCGCTTT AATAAACTTACCGCC-3' 及び 5'-TTAGTTAAAGAAAGC AA GAACGAAAATACC-3' を用いた。

Veriti Thermal Cycler (サーモフィッシャーサイエンティフィック (株) 製) を用いて、94 °C, 1 分間で DNA の変性を行った後、反応は 94 °C で 1 分 (変性), 60 °C で 1 分

(アニーリング), 72 °C で 5 分 (伸長) を 30 サイクル行った。K701 の *AWA1* 遺伝子のみ、反応は 94 °C で 1 分 (変性), 60 °C で 1 分 (アニーリング), 72 °C で 7 分 (伸長) を 30 サイクル行った。これらを 1% アガロースゲル電気泳動で増幅した DNA 断片の大きさを確認した。

2.3.2 TTC 染色

分離した酵母を生理食塩水に懸濁し、適宜希釈したものを TTC 下層培地に塗抹して、30 °C で 2 日間培養した。コロニーが生じた TTC 下層培地に TTC 上層培地を重層し、30 °C で約 2 時間静置してコロニーの呈色の有無を観察した。

2.3.3 キラー性¹⁶⁾

メチレンブルー 0.003% 添加した YEPD 培地 (酵母エキス 1%, ポリペプトン 2%, グルコース 2%, 寒天 1.5%, pH 4.7) にきょうかい酵母 (K701, K901) を 10⁶ CFU/g 塗抹し、分離酵母を植菌した後、25 °C で培養した。24 時間後に微小コロニーが培地一面に生じた時に現れる透明なハローの有無を観察した。ハローがある場合をキラー性酵母と判断した。

2.3.4 パントテン酸要求性 (β-アラニン試験)

酵母のパントテン酸要求性は、清酒酵母ではきょうかい 7 号系の酵母で見られ、要求性株は低温では β-アラニン培地で生育できないが、35 °C 以上の高温で生育できる。非要求性株は低温でも生育ができる。

分離した酵母を生理食塩水に懸濁し、適宜希釈したものを β-アラニン培地 (日水製薬 (株) 製) に塗抹して、35 °C で 2 日間培養し、コロニーを計数し、次いで 20 °C で 2 日間培養し、20 °C の培養で生じたコロニーを計数した。

2.3.5 アルコール耐性

エタノールを 0~30% 含むダーラム管入り麴汁培地 (Brix 10 pH 3.5) を用いて、予め前培養した酵母の培養液を 100 μL 加え、30 °C で培養し、培養液の白濁およびガスの発生を確認し、アルコール耐性を調査した。

2.4 清酒の試験醸造

2.4.1 総米 100 g での仕込み試験

表 2 に示す仕込み配合により、一段仕込みで総米 100 g の小仕込み試験を行った。品温は、仕込み開始から醸造終了まで 20 °C とし、10 日間醸造を行った。できた醪は遠心分離で上槽した。

表 2 総米 100 g 仕込み配合

総米	(g)	100.0
α化米 (歩留 97%)	(g)	74.7
乾燥麹米 (歩留 86%)	(g)	19.8
汲水	(mL)	160.0
酵母培養液	(mL)	10.0
乳酸 (85~92%)	(mL)	0.1

2.4.2 総米 1 kg での仕込み試験

表 3 に示す仕込み配合により, 三段仕込みで総米 1 kg の仕込み試験を行った. 品温は仕込み開始から留添まで 15 °C で管理し, 20 日間醸造を行った. できた醪は袋釣りにて上槽した.

表 3 総米 1 kg 仕込み配合

	酒母	初添	仲添	留添	計
総米	(kg)	0.18	0.35	0.47	1.00
α化米 (歩留 97%)	(kg)	0.12	0.26	0.36	0.74
乾燥麹米 (歩留 86%)	(kg)	0.04	0.07	0.09	0.20
汲水	(mL)	0.25	0.58	0.88	1.71
麹エキス (酵母培養液)	(mL)	4.30			
乳酸 (85~92%)	(mL)	0.57			

2.4.3 成分分析

上槽した試醸酒は, 酸度, アミノ酸度, アルコール, 日本酒度, 有機酸, 香気成分の分析を行った.

酸度及び, アミノ酸度は国税庁所定分析法¹⁷⁾に準じて分析した. アルコール及び日本酒度はアルコライザー酒 ME システム ((株) アントンパール・ジャパン製) を用いて測定した.

有機酸は アセトンで 10 倍希釈し除タンパク質処理したものを, 孔径 0.45 μm フィルターろ過後, 5 倍希釈し固相抽出カートリッジ (Sep-Pak Accell QMA: 日本 Waters (株) 製) で有機酸を抽出した. この試料を表 4 の分析条件で測定を行った. また, 香気成分は表 5 の分析条件で測定を行った.

表 4 有機酸分析条件

装置	Waters社製 (LC) ACQUITY UPLC™
カラム	日本Waters(株)製 HSS T3, 粒子径 1.8 μm×内径 2.1 mm×長さ50 mm
検出器	UV 210 nm
移動相	20 mM リン酸二水素ナトリウム溶液 (pH 2.8)
カラム温度	35 °C
注入量	6 μL
流速	0.5 mL/min

表 5 香気成分分析条件

装置	(株) 島津製作所製 GCMS-QP 2010 Ultra
カラム	アジレントテクノロジー(株)製 HP-INNOWAX, 60 m×0.25 mmID, 0.25 μm
カラム流量	ヘリウム0.61 mL/min
注入口温度	250 °C
注入モード	スプリット (スプリット比 1/5)
注入量	2 mL
昇温条件	40 °C (0-5min) → 40-60 °C(5-10min) → 60-70 °C (10-20min) → 70-120 °C (20-33min) → 120 °C (33-38min)
スプリット比	5.0
イオン化法	EI
イオン源温	200 °C
イオン化電圧	70 eV
スキャン質量範囲	50-500 m/z
スキャン速度	1666

2.5 ワインの試験醸造

奈良県果樹・薬草研究センターで 2022 年に栽培されたモンドブリエとカベルネ・ソーヴィニオンを用い, 白ワインと赤ワインの試験醸造を行った.

ピロ亜硫酸カリウム(富士フィルム和光純薬工業(株))を果実重量の 0.04 w/w % 添加後, ハンドブレンダーで潰し, モンドブリエ (白ワイン用) は固液分離し, カベルネ・ソーヴィニオン (赤ワイン用) は皮を含んだ果汁にした. 白糖添加により Brix を 21.0 に調整し, 白ワインは, 果汁 200 mL に YDP 培地で培養した酵母液 300 μL を添加し, 15 °C で Brix 10.0 未満になるまで発酵を行った.

赤ワインは果汁 200 mL を低温醸し (5 °C, 5 日間) 後, 酵母培養液 300 μL 添加し, 30 °C, 2 日間→25 °C, 1 日間→15 °C で Brix が低下しなくなるまで発酵を行った. できたワインは遠心分離で上槽した.

上槽したワインは, アルコール, 酸度, pH, Brix, の分析を行った. pH はガラス電極 pH メータ HS-30S (東亜電波工業(株)製), Brix はデジタル糖度計 PR-101α ((株) アタゴ) を用いて測定した. アルコールはアルコメイト AL-2 (理研計器 (株)) を用いて測定した. 酸度は国税庁所定分析法¹⁷⁾に準じて分析した.

3. 結果及び考察

3.1 酵母の分離と同定

採取した 136 の試料から 5 次選抜終了までに, 23 試料で選抜培地の白濁と発泡が認められた. 23 の試料の内訳は, シャクヤク花 22 試料 (No.18, 19, 32, 36, 40, 41, 42, 54, 57, 58, 59, 60, 63, 72, 73, 77, 78, 87, 88, 92, 111, 125), ボタン花 1 試料 (No.105) になる.

この 23 試料から得られた酵母について ID32C API を用いて種の同定を試みた.

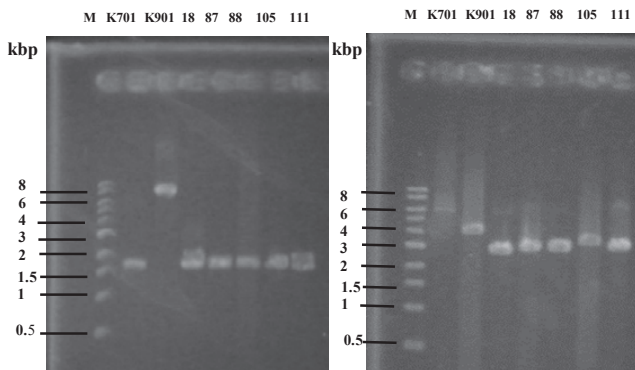
その結果, *Saccharomyces cerevisiae* が 5 菌株 (No.18, 87, 88, 105, 111), *Candida pelliculosa* が 18 菌株 (No.19, 32, 36, 40, 41, 42, 54, 57, 58, 59, 60, 63, 72, 73, 77, 78, 92, 125) であることが推定された。

そこで 酒類などの発酵食品に使用される *S.cerevisiae* と推定された 5 菌株について 26S rDNA D1/D2 領域の塩基配列を決定し, その塩基配列から公開されている既知の配列との相同性を比較したところ, 相動性は 100%であり, 5 菌株はすべて *S.cerevisiae* と同定された。

3.2 分離酵母の性質

3.2.1 菌株の識別

S.cerevisiae である 5 菌株が既存のきょうかい酵母とは異なることを調べるために, PCR で *AWA1* 遺伝子及び YLRW delta20 を増幅して, 2 種の清酒用きょうかい酵母 (K701 と K901) のものと断片長を比較した。その結果, YLRW delta20 では 5 菌株全てが約 1.6 kbp であったのに対し, K701 は約 1.6 kbp, K901 は約 8 kbp の大きさであった (図 1)。*AWA1* 遺伝子では No.18, 87, 88, 111 が約 2.7 kbp, No.105 が約 3.0 kbp の大きさであったのに対し, K701 は約 6 kbp, K901 は約 4 kbp の大きさであった (図 2)。以上から, 分離した 5 菌株の酵母は, 既存のきょうかい酵母ではなく, 独自の酵母であると考えられた。



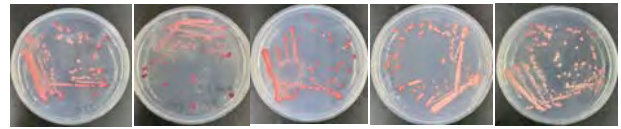
(左) 図 1 YLRW delta20 の PCR 産物の電気泳動

(右) 図 2 *AWA1* 遺伝子の PCR 産物の電気泳動

LaneM ; Quick-Load Purple 1kb DNA Ladder

3.2.2 TTC 染色性

TTC 染色はアルコール発酵能を確認するための指標のひとつであり, きょうかい酵母のようにアルコール発酵能が高いと, TTC が還元されてコロニーが赤色に染まる。分離した 5 菌株の *S. cerevisiae* の TTC 染色性はいずれもきょうかい酵母よりも薄い赤色もしくは濃桃色赤色を示した。この結果よりアルコール発酵能を持つが, きょうかい酵母より能力は劣ることが考えられた。(図 3)



No.18 No.87 No.88 No.105 No.111

図 3 TTC 染色

3.2.3 キラー性

S. cerevisiae には他の酵母を死滅させるキラー因子と呼ばれるタンパク質を分泌するものがあり, キラー酵母と呼ばれる。清酒の製造現場でキラー酵母が持ち込まれると, 従来から使用されているきょうかい酵母などの酒造用酵母に悪影響を与えるため, 分離した酵母のキラー性の有無を確認した。

きょうかい酵母 (K701, K901) に対する分離酵母のキラー性の確認結果を図 4 に示す。K701, K901 を塗抹した上に画線した分離酵母との境界にハローが認められなかったことから, きょうかい酵母に対するキラー性がなく, 酒造現場で他の酵母に影響を与える可能性はなく使用できると考えられる。

K701



K901



No.18 No.87 No.88 No.105 No.111

図 4 分離酵母のキラー性試験 (上段 K701 下段 K901)

3.2.4 パントテン酸要求性

分離酵母の β -アラニン培地での生育は 5 菌株全て K701 とは異なり, 35 °C でコロニーを形成し, 20 °C でコロニーを形成しなかった。(表 6)。一方, K701 などの協会 7 号系酵母は 20 °C でコロニーを形成し, 35 °C ではコロニーを形成しない。この結果より, 分離した 5 菌株の酵母はきょうかい 7 号系統とは異なる系統であることが判明した。

表 6 β -アラニン培地の生育

試料No.	18	87	88	105	111
35°C	○	○	○	○	○
20°C	×	×	×	×	×

※○生育あり ×生育なし

3.2.5 アルコール耐性

K701, K901 を対照としてエタノールを含む培地での生育状況を観察した。

すべての分離酵母でエタノール濃度が 0%, 5%, 10%, 15% の培地では培養開始 2 日目以降で増殖が確認された。一方, K701, K901 はエタノール濃度が 0%, 5% の培地では培養開始 1 日目以降で増殖が確認され, 10% の培地では 4 日目以降で増殖が確認された。またエタノールを 20% 含む培地では, いずれも増殖が確認できなかった。

K701 と比較してアルコールに対する耐性はほぼ同等であるが, 増殖速度は劣るものと考えられる。

3.3 清酒の試験醸造

3.3.1 総米 100 g の仕込み試験

分離した 5 菌株の酵母を用い, 総米 100 g で小仕込みを行い, 遠心分離で粕と分離した清酒試料を分析した。

対照は K701, K901 を用いて仕込んだ。結果を表 7 に示す。

発酵の経過は炭酸ガスの発生量により把握した (図 5)。発酵経過は, No.111 が最も早く発酵が進み, No.18 が最も遅かった。

生成したアルコール濃度は No.111 が 17.3% で最も高く, No.18 の 7% が最も低かった。その他の酵母のアルコール濃度は 11.2~13.1% の間にとどまり, きょうかい酵母 (K701 20.4%, K901 19.6%) より, アルコール生成能が低い傾向が見られた。

日本酒度は全てマイナスの値で甘口の酒であり, 酸度は K701 が 4.8, K901 が 5.5 に対して, No.18 は 9.0, No.111 は 6.9, その他の酵母は 4.3~5.0 を示し, 酸が多く生成される傾向が見られた。

上槽した清酒の有機酸は, 表 8, 図 6 に示した。

特徴的な成分として, No.87 と No.111 は他酵母と比較して酢酸の生成量が少なく, No.87 と No.88 はリンゴ酸の生成量が多い傾向が見られた。

試験した 5 種類の清酒を奈良県産業振興総合センター職員により官能評価を行い, 酸味と香りの調和が良い, No.87, No.111 を候補として, 1 kg 規模で試験醸造を行った。

表 7 試験醸酒 (総米 100 g) の成分

No	K701	K901	18 (シャクヤク)	87 (シャクヤク)	88 (シャクヤク)	105 (ボタン)	111 (シャクヤク)
製成量 (mL)	148	148	134	142	138	140	144
アルコール (%)	20.37	19.56	6.99	12.23	11.16	13.09	17.31
日本酒度	-5.08	-15.36	-117.88	-70.21	-82.17	-61.71	-31.86
比重 (g/cm ³)	1.0035	1.0107	1.0889	1.0511	1.0604	1.0446	1.0225
酸度	4.8	5.5	9.0	4.3	5.0	4.3	6.9
アミノ酸度	1.9	3	3.2	2.8	3.1	3.0	2.1

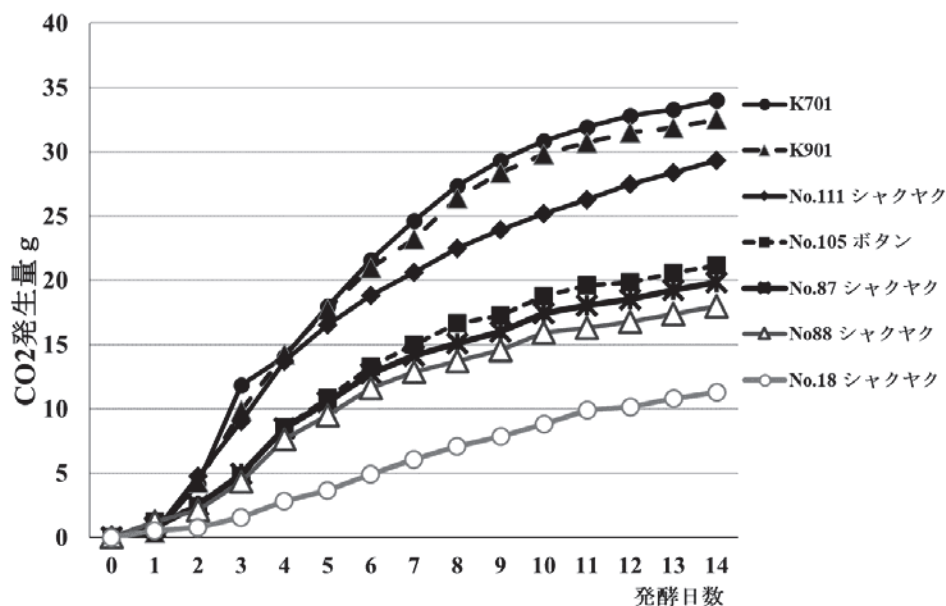


図 5 総米 100 g 仕込み試験の炭酸ガス発生量 (発酵経過)

表 8 有機酸（総米 100 g 試醸酒）

No.	単位：mg/L							
	K701	K901	18	87	88	105	111	
酒石酸	71.5	50.4	0.0	219.5	0.0	0.0	120.0	
ピルビン酸	10.1	12.4	6.0	51.2	24.6	5.5	116.9	
リンゴ酸	124.4	161.6	919.3	2732.5	3594.3	1878.6	139.0	
乳酸	463.5	536.4	3488.4	938.5	1725.5	684.6	797.2	
酢酸	798.0	842.1	1517.9	553.6	865.9	761.0	589.3	
クエン酸	194.1	267.5	0.0	45.7	25.8	15.3	240.4	
ピログルタミン酸	243.9	329.4	22.2	48.0	34.6	57.0	189.6	
コハク酸	1234.6	1274.1	273.6	602.8	476.9	475.4	1159.5	

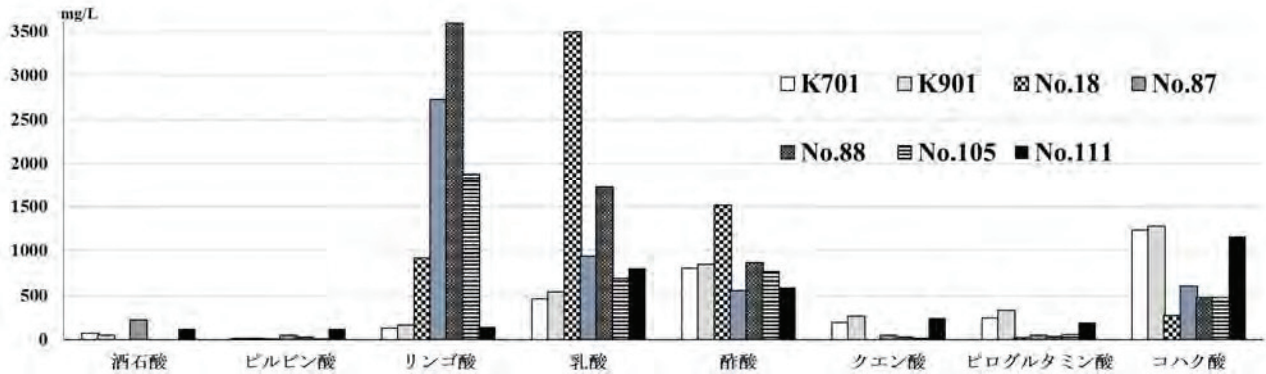


図 6 有機酸比較（総米 100 g 試醸酒）

3.3.2 総米 1 kg の仕込み試験

総米 100 g の仕込み試験で選抜した No.87 及び No. 111 を用いて醸造規模を拡大し、総米 1 kg の試験醸造を行った。発酵経過は醸造期間中に一部サンプリングを行い、アルコールを分析して管理した（図 7）。発酵経過は 2 菌株で大きな差はなく進んだ。

上槽した清酒成分を表 9、有機酸を表 10、図 8、香気成分を表 11 に示す。

No.87, No.111 と最終的なアルコール濃度が 10%前後になった。しかし、仕込み 3 日目で、K701 は 10%以上のアルコールを生成するのに対し、No.87, No.111 は 3%前後に留まり、初期の増殖が遅れる傾向が示された（図 7）。

酸度は No.87 は 6.2, No.111 は 5.9 と高めで、日本酒度は No.87 は -69.65, No.111 は -58.35 で甘口であった。

有機酸は、No.87 は乳酸、酢酸、No.111 は、クエン酸、コハク酸、乳酸が多く含まれており、K701 を用いて醸造した清酒と比較すると、No.111 はクエン酸が 6 倍多く含まれていることが分かった（図 8）。

香気成分は、K701 で醸造した清酒と比較すると、No.111 はイソブタノールが約 1.6 倍、イソアミルアルコールは約 1.5 倍生成することがわかった。

奈良県産業振興総合センター職員により官能評価を行い 2 種とも酸味と甘みの調和が良いことも踏まえ、これらの結果から No.111 が清酒用酵母に適していると判断した。

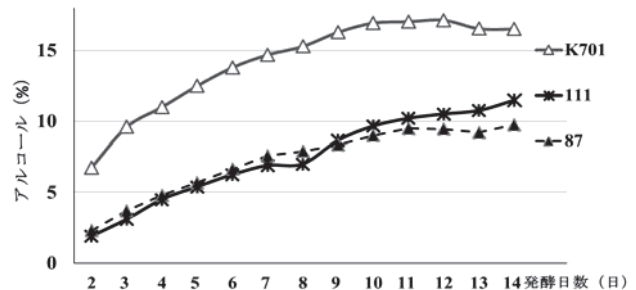


図 7 総米 1 kg 仕込み試験のアルコール量推移

表 9 試醸酒（総米 1 kg）の成分

No.	K701	87	111
製成量 (mL)	1215	990	1098
酒粕 (g)	642.6	918.5	937.5
アルコール (%)	16.53	9.75	11.48
日本酒度	-7.79	-69.65	-58.35
比重 (g/cm ³)	1.0054	1.0507	1.0431
酸度	4.8	6.2	5.9
アミノ酸度	1.8	2.0	2.0

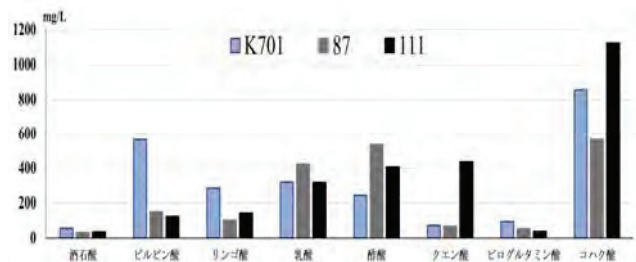


図 8 有機酸組成（総米 1 kg 試醸酒）

表 10 有機酸組成 (総米 1 k g 試醸酒)

No.	単位: mg/L		
	K701	87	111
酒石酸	56.1	32.7	36.2
ピルビン酸	565.4	150.3	123.4
リンゴ酸	283.7	103.4	143.8
乳酸	319.4	422.9	316.4
酢酸	242.6	536.1	406.1
クエン酸	73.4	67.0	436.2
ピログルタミン酸	93.7	52.9	37.2
コハク酸	854.6	565.4	1121.9

表 11 香気成分組成 (総米 1 k g 試醸酒)

No.	単位: ppm		
	K701	87	111
酢酸エチル	42.18	28.41	31.59
酢酸イソブチル	0.14	0.11	0.11
酪酸エチル	0.61	0.28	0.26
プロパノール	101.72	23.75	27.48
イソブタノール	45.01	52.00	72.13
酢酸イソアミル	1.57	0.54	0.64
イソアミルアルコール	113.21	106.20	165.92
カブロン酸エチル	1.03	0.69	0.71
カブリン酸エチル	2.41	1.14	1.17

表 12 ワインの成分結果

ブドウ品種 No.	モンドブリエ (白ワイン)			
	87	88	105	111
製成量ml	175	170	172	110
粕 (遠沈残渣) g	11.28	10.85	12.54	8.83
アルコール%	12.60	10.80	13.00	-
pH	3.7	3.6	3.7	-
酸度	6.4	8.2	5.6	-
発酵前Brix	21.1	21.1	21.1	21.1
発酵後Brix	7.5	9.7	7.3	22.2
発酵日数	17	14	13	-
ブドウ品種 No.	カベルネ・ソーヴィニヨン (赤ワイン)			
	87	88	105	111
製成量ml	170	170	110	150
粕 (遠沈残渣) g	48.57	48.05	52.44	50.37
アルコール%	12.5	12.5	13.0	12.2
pH	4.0	4.0	4.0	4.0
酸度	9.2	8.7	8.5	8.4
発酵前Brix	21.0	21.0	21.0	21.0
発酵後Brix	7.6	7.4	7.6	7.7
発酵日数	19	19	18	19

3.3.3 ワインの試験醸造

酵母 No.87, 88, 105, 111 を用いた白及び赤ワインの試験醸造の結果を表 12 に示す。

白ワインでは、各酵母は 13 日～17 日で発酵が進んだが、No.111 は Brix が低下せず、発酵しなかった。

アルコール濃度は 10.9～13.0% を示し、酸度は No.88 が 8.2, その他 5.4～6.4 と高く、奈良県産業振興総合センター職員による官能評価で、No.87 は香りも良く色調が澄明で、酸味のあるすっきりとした白ワインと評価された。

赤ワインでは、4つの酵母の発酵日数は 18～19 日が進み、アルコール濃度は 12.2～13.0% を示した。酸度は No.87 が 9.2 と最も高く、その他は 8.4～9.2 と白ワインよりも酸が多く生成される傾向が見られた。

官能評価から、4酵母とも香りよく酸味と渋味をしっかりと感じられる赤ワインと評価された。

モンドブリエを使用した場合、No.111 は発酵には適さないが、白ワインは No.87, 赤ワインは No.87, 88, 105, 111 が醸造に使用可能であることが確認できた。

4. 結言

漢方関連素材から奈良県独自の酵母で醸造製品をつくることを目指して、県内栽培のシャクヤク及びボタンの花から酵母を 5 株分離し、*S. cerevisiae* と同定した。

選別した菌株は、きょうかい酵母 K701, K901 とは異なる菌株であり、キラー性を示さず清酒醸造に使用可能であると判断された。

生育の初期増殖が弱い傾向が見られ、酸を多く生成することから、酸味のある甘口の低アルコール向け清酒醸造に使用可能と判断した。さらに、ワイン醸造にも使用できることを確認し、これらの菌株は、漢方関連の発酵食品に今後、貢献する素材として期待される。

今回の清酒製造に最も適すると選抜したシャクヤク花酵母は、生薬を採取するために県内で栽培される優良品種「梵天」であった。今後、初期増殖の改善やパンなど他の醸造製品に使用しやすい形態への検証を行い、花酵母や漢方関連のイメージにつながる発酵食品の製品化へ更なる検討を進めていきたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、関係者の方々には、試料の採取において多大な配慮とご協力をいただき、深謝いたします。

参考文献

- 1) 柴田敏郎, シャクヤクの薬用品種育成について, 特産種苗, 公益財団法人日本特産農作物種苗協会, 16, 24-27, 2013
- 2) 福田真三, 芍薬の生産と資源, 現代東洋医学, 12(4), 77-85, 1991
- 3) 立本行江, 首藤明子, 西原正和; 奈良県産業振興総合センター研究報告, (48), 15-22, 2022,
- 4) 安田 (吉野) 庄子, 北本則行; 日本食品科学工学会誌; (58) 9, 31-37, 2011
- 5) 荻野目あづさ, 川久保利麗叶, 上田誠; 小山高専研究紀要; (48), 91-95, 2015

- 6) 三井俊, 伊藤彰敏, 山本晃司, 金政真, ; あいち産業科学技術総合センター研究報告, (6), 58-61, 2017
- 7) 関口幸恵, 田中みち子, 高橋淳, 浅野行蔵; 日本醸造協会誌(103), 125-134, 2008
- 8) 数岡孝幸; 日本醸造協会誌 (110), 298-305, 2015
- 9) 高橋和則, 大山修一, 吉崎由美子, 玉置尚徳, 鮫島吉廣; 日本醸造協会誌(105), 546-555, 2010
- 10) 大橋正孝, 都築正男, 清水浩美, 松澤一幸, 藤野千代, 鈴木孝仁, 岩口伸一; 奈良県工業技術センター研究報告, (35), 35-38, 2009
- 11) 都築正男, 大橋正孝, 清水浩美; 奈良県工業技術センター研究報告, (41), 5-11, 2015
- 12) Kurtzman, C. P., and Robnett, C. J. ; J. of Clin. Microbiol., (35), 1216-1223, 1997
- 13) 都築正男, 大橋正孝, 清水浩美; 奈良県産業振興総合センター研究報告, (40), 26-27, 2014
- 14) Shimizu, M., Miyashita, K., Kitagaki, H., Ito, K., and Shimoi, H. ; J.Biosci.Bioeng., (100), 687-680, 2005
- 15) 福田央, 周延, 三上重明; 日本醸造協会誌, (107), 57-67, 2014
- 16) 河野勇人, 東江昭夫, 産本弘之, 姫野国夫; 日本醸造協会誌, (83), 5, 343-347, 1988
- 17) 西谷尚道監修; 第四回訂正国税庁所定分析法注解, 20-24, 日本醸造協会, 2000