

清酒製造用酵母の分離のための新規集積培地開発

2024 年

野 地 秀 和

目次

緒言

第1章 清酒酵母のビタミン非要求性と Yeastcidin 耐性を利用した清酒製造用酵母の分離と分離株の醸造特性解明

1-1 緒言

1-2 実験方法

1-2-1 Yeastcidin の調製

a. Yeastcidin の生産

b. Yeastcidin 溶液の最小生育阻害濃度 (MIC) の測定

1-2-2 集積培地を用いた各種酵母の増殖試験

a. 集積培地の調製

a-1. Yeastcidin 添加麴汁培地 (KY 培地)

a-2. Yeastcidin 添加 Buffer 欠如ビタミン欠如培地 (BY 培地)

b. 増殖確認試験

1-2-3 集積培養

1-2-4 発酵性、産膜性および増殖、細胞形態

1-2-5 ビタミン要求性

1-2-6 小規模発酵試験

1-2-7 清酒小仕込み試験

1-2-8 分離株の塩基配列解析および分子系統解析

1-2-9 実地醸造

1-3 結果および考察

1-3-1 集積培地を用いた各種酵母の増殖試験

1-3-2 集積培養

1-3-3 発酵性、産膜性および増殖、細胞形態

1-3-4 分離株の小規模発酵試験

1-3-5 分離株の清酒小仕込み試験

1-3-6 分離株の塩基配列解析および分子系統解析

1-3-7 実地醸造

1-4 小括

第2章 清酒酵母のビタミン非要求性を利用した抗菌物質非添加集積培地の開発と新規清酒製造用酵母の分離

2-1 緒言

2-2 実験方法

- 2-2-1 集積培地を用いた各種酵母の増殖試験
 - a. 集積培地の調製
 - b. 増殖確認試験
- 2-2-2 集積培養
- 2-2-3 産膜性および TTC 染色試験
- 2-2-4 小規模発酵試験
- 2-2-5 分離株の清酒小仕込み試験
- 2-2-6 分離酵母のキラー性確認試験
- 2-2-7 分離株の塩基配列解析および分子系統解析
- 2-3 結果および考察
 - 2-3-1 集積培地を用いた各種酵母の増殖試験
 - 2-3-2 集積培養
 - 2-3-3 分離株の小規模発酵試験
 - 2-3-4 分離株の清酒小仕込み試験
 - 2-3-5 分離株の特徴
- 2-4 小括

第3章 生理学的諸性質を用いた清酒製造用酵母の識別試験

- 3-1 緒言
- 3-2 実験方法
 - 3-2-1 使用菌株
 - 3-2-2 使用培地
 - a. セルレニン、シクロヘキシミドあるいはコハク酸ジメチルを用いた増殖試験
 - b. β -アラニンを用いた増殖試験
 - c. ロイシンあるいはアラニンを用いた増殖試験
 - d. マルトース、ガラクトースあるいは α -メチル-D-グルコシド(α -MG)を用いた増殖試験
 - f. TTC 上層培地
 - 3-2-3 増殖試験および生育、染色性の確認
- 3-3 結果および考察
 - 3-3-1 各種培地での識別試験
 - 3-3-2 各識別試験から考えられるきょうかい酵母の識別
- 3-4 小括

第4章 生理学的諸性質を用いた分離株の識別試験

- 4-1 緒言
- 4-2 実験方法
 - 4-2-1 使用菌株
 - 4-2-2 使用培地

4-2-3 増殖試験および生育、染色性の確認

4-3 結果および考察

4-3-1 BY1-1株およびBY1-3株の識別

- a. セルレニンによる識別試験
- b. シクロヘキシミドによる識別試験
- c. マルトース、ガラクトース、アラニンを用いた増殖試験

4-3-2 BV-2株およびBV-3株を用いた識別試験

- a. セルレニンによる識別試験
- b. シクロヘキシミドによる識別試験

4-3-3 各識別試験から考えられるきょうかい酵母の識別

4-4 小括

総括

謝辞

参考文献

Summary

第1章 清酒酵母のビタミン非要求性と Yeastcidin 耐性を利用した清酒

製造用酵母の分離と分離株の醸造特性解明

1-1 緒言

日本には、かつて多くの酒蔵が存在していた。1883年(明治16年)には16,546場の酒蔵が存在し、すべての酒蔵で製麹中に混入する酵母や、容器、器具に付着している酵母、建屋から舞い降りる酵母が増殖して湧付いてくる蔵付き酵母による清酒製造が行なわれていたと考えられる。この製造法では、清酒醪で高いアルコール発酵性を示しオフフレーバーも生成しない清酒製造に適した酵母が蔵付き酵母であれば健全な醪の発酵を期待できる。しかし、アルコール発酵能が低い酵母や野生酵母が蔵付き酵母であれば健全な酒母や醪が育成されず、製造や製品に影響を及ぼす微生物が増殖する可能性がある。この微生物は、腐造乳酸菌や火落菌などが存在し、腐造乳酸菌は麹や湧付き遅れの酒母や醪で増殖し、多酸性でアルコールが低く甘い醪・製成酒となる原因となり、火落菌は上槽後の清酒に繁殖して清酒自体が白濁し、さらに酸が増加し香りも落ちていく原因となる。野生酵母には、醪に膜をつくり酢酸エチルなどのオフフレーバーを生成する酵母、アルコール生成能が低い酵母などが存在する。これらの菌が醪の中で優勢になると清酒にとって良くない影響が出るため、優れた酒質の清酒を安定して醸すことができる純粋培養された清酒酵母(きょうかい酵母)を添加して清酒製造を行うようになっていった^{1,2)}。

1904年(明治37年)に醸造試験所(現独立行政法人酒類総合研究所)が設立され、その二年後に日本醸造協会がつくられた。その事業の一つとして清酒醸造試験で優秀な成績を納めた酵母を純粋培養して酒蔵に頒布するようになったのがきょうかい酵母の始まりである。1906年(明治39年)に頒布され始めた当時は培養酵母を使用することが一般的ではなく、蔵付き酵母による酒造りがほとんどの地域で行なわれていたため、各地で腐造が絶えなかった。当時の日本は、日清戦争後の国の財政需要に伴って1896年(明治29年)に酒税を導入し、1904~1905年(明治37~38年)の日露戦争を契機に酒税が国税に占める割合が税収第1位となり、1935年代(昭和10年代)に所得税や法人税の税収が急速に伸びるまでは国を支えていた^{3,4)}。そのため、腐造をおこすことのない安定した酒造り、かつ高品質の清酒を醸す酒造りが重要であった。このような時代背景もあり普及していったきょうかい酵母は、安定して高品質の清酒を造ることができるため、安定した税収に貢献した。近年では、酒税が国の税収に占める割合は令和4年度で1.6%⁵⁾と低いが、安定して高品質の清酒を造ることができるため多くの酒蔵できょうかい酵母が使用されており、酒蔵は、日本醸造協会から頒布されている複数のきょうかい酵母から各々の目指す清酒の風味に合わせて酵母を選択できる状況にある(Table 1)。現在、きょうかい酵母として25株が頒布されている。しかし、泡あり酵母であるきょうかい酵母6、7、9、10、14号(K6株、K7株、K9株、K10株、K14株)から泡なし化育種された601、701、901、1001、1401号(K601株、K701株、K901株、K1001株、K1401株)、K7株から耐性化育種が行われた11号(K11株)、K7株と1001号の交配株である1601号(K1601株)、1001株を親株として高エステル化育種された1701号(K1701株)、9号と1601号の交配株である1801号(K1801株)、そして各酵母のカルバミン

酸エチル低生成を目的として育種された尿素非生成酵母 KArg701 号、KArg901 号、Karg1401 号、Karg1901 号 (K1901 株) など、多くが既存のきょうかい酵母をベースとして育種された酵母であり、もろみから分離された酵母は K6 株、K7 株、K9 株、K10 株、K14 株、K1501 株の 6 株である⁵⁾。

Table 1 現在頒布されているきょうかい酵母⁶⁾

きょうかい酵母	実用年	分離源	醸造特性
6号	(K6株) 1935	新政酒造場 (酒造環境分離株)	発酵力が強く、香りはやや低くまろやか、淡麗な酒質に最適
7号	(K7株) 1946	真澄醸 (酒造環境分離株)	華やかな香りで広く吟醸用及び普通醸造用に適す
9号	(K9株) 1953	熊本県酒造研 (酒造環境分離株)	短期醸で華やかな香りと吟醸香が高い
10号	(K10株) 1952	東北地方醸 (酒造環境分離株)	低温長期もろみで酸が少なく吟醸香が高い
11号	(K11株) 1975	変異株 (7号エタノール耐性株)	醸が長期になっても切れが良く、アミノ酸が少ない
14号	(K14株) 1991	北陸地方醸 (金沢酵母) (9号自然変異株)	酸が少なく低温中期型醸の経過をとり特定名称清酒に適す
601号	(K601株) 1973	泡なし変異株 (6号自然変異株)	もろみで高泡を形成しない6号
701号	(K701株) 1969	泡なし変異株 (7号自然変異株)	もろみで高泡を形成しない7号
901号	(K901株) 1975	泡なし変異株 (9号自然変異株)	もろみで高泡を形成しない9号
1001号	(K1001株) 1984	泡なし変異株 (10号自然変異株)	もろみで高泡を形成しない10号
1101号	(K1101株) 2014	泡なし変異株 (11号自然変異株)	もろみで高泡を形成しない11号
1401号	(K1401株) 1998	泡なし変異株 (14号自然変異株)	もろみで高泡を形成しない14号
1501号	(K1501株) 1990	秋田県内酒造場 (秋田流・花酵母AK-1)	低温長期型もろみ経過をとり、酸が少なく、吟醸香の高い特定名称清酒に適す。
1601号	(K1601株) 1992	7号と1001号の交配株・変異処理あり	酸度が少なく、カブロン酸エチル高生産性
1701号	(K1701株) 2001	1001号の変異株	酢酸イソアミル及び、カブロン酸エチル高生産性、7号並の強い酸度
1801号	(K1801株) 2006	K1601とK9の交配株・変異処理あり	まろやかな味わいと華やかな香りが特徴
KArg701号	1994	変異株	尿素低生産の701号酵母
KArg901号	1994	変異株	尿素低生産の901号酵母
KArg1001号	2004	変異株	尿素低生産の1001号酵母
KArg1401号	2017	変異株	尿素低生産の1401号酵母
KArg1901号	(K1901株) 2014	変異株	カブロン酸エチル高生成、尿素低生産性
No.28	1993	変異株	酸度が高い、リンゴ酸が主成分であることを特徴とする多産酒
No.77	1993	変異株	酸度が高い、カブロン酸エチル高生産性、リンゴ酸が多い芳香の高い多産酒
KT901号	2008	901号の変異株	901号の酸生成の多い清酒酵母、もろみの酸度が高く、リンゴ酸とコハク酸が多くなる
赤色酵母	2002	アデニン要求株	低濃度、甘口ソフトタイプの桃色濁り酒用

清酒製造において清酒酵母は清酒の主成分となるアルコールの生成だけではなく、香味に関わる多くの成分の生成に関与しており、清酒の酒質の形成に大きく影響を与える。そのため清酒製造にどの酵母株を選択するかによって大きく風味が異なってくる。それを前提に、きょうかい酵母が広く使用されるようになる以前は、1万を超える酒蔵でそれぞれの酒蔵の蔵付き酵母が清酒製造に使用されていたため、腐造など不安定な清酒製造が行われていましたが、酵母が作り出す清酒の風味の多様性については豊かであったと予想される。一方で、きょうかい酵母が使用されるようになって以降は、安定して高品質な清酒が造られるようになったが、酵母がつくり出す風味の多様性は減少していると予想される。

近年、他社製品との差別化、酒質のさらなる向上や多様化を目的に、薬剤耐性を利用した既存酵母からの育種⁷⁻⁹⁾ や、清酒醪からの新たな特性を持った酵母の分離¹⁰⁻¹²⁾ が試みられているがそれらの多くは親株がきょうかい酵母である。一方で、東京農業大学の微生物工学研究室をはじめ、県の試験センターの研究者によって自然界からの新規清酒製造用酵母の分離が試みられている (Table 2)。自然界からの新たな清酒製造用酵母の分離の試みにおいては、多くの場合、自然界中の酵母の存在数が少ないために酵母の集積が行われる。酵母の集積で用いられる集積培地は、酵母を増殖させることを目的とした基礎培地に、酵母以外の微生物を増殖させないことを目的とした抗菌物質を添加して作成される。基礎培地としては、麴汁培地や YM 培地がよく選択され、抗

菌物質としてはアルコールやアンピシリン、クロラムフェニコールなどがよく用いられている。さまざまな集積培地と抗菌物質の組み合わせで調製された集積培地での集積とその後の選抜によって、数多くの清酒製造用酵母の分離が試みられ報告されている (Table 2)。例えば、麴汁培地にエタノールを添加した集積培地による分離を試みた松田ら¹⁸⁾は、アルコール発酵能が強く、香りについてもきょうかい酵母と同等の生成量を示す酵母の分離に成功している。一方で、麴汁培地にエタノールを添加した松田らと同様の集積培地による分離を試みた殿内²²⁾は、きょうかい酵母よりアルコール発酵能の低い酵母が分離され、YPD 培地 (Glu.10%) にアンピシリンを添加した集積培地による分離を試みた蟻川ら²⁴⁾は、*Saccharomyces ludwigii* が分離されている。このように、清酒製造に使用することができる酵母を分離できた例もあるが、目的の酵母を取得できずアルコール発酵能が低い酵母や *Saccharomyces cerevisiae* 以外の酵母が分離されている報告もあり、効率的な集積培養法や選抜法の開発が期待されている。

東京農業大学微生物工学研究室では、酵母がつくりだす清酒の風味を多様化させること、特徴ある性質を示す研究題材としての清酒製造用酵母を取得することを目的に、自然界からの新規酵母の分離を長年実施している。その分離では、まず麴汁培地あるいは酵母の最少培地をベースとした集積培地で集積培養を行い、培養液から単離した微生物の TTC 染色性や皮膜形成などを確認した後、小規模発酵試験と 3 段仕込み試験でアルコール発酵性とオフフレーバーの有無の確認を行うとともに、26S D1/D2 領域および ITS 領域の塩基配列を用いて同定を行っている。すでに実用化されている清酒製造用酵母は 20 株以上あり、ほとんどの株が花を分離源として用いて分離した酵母である。本研究室では数多くの清酒製造用酵母の分離に成功しているが、集積培地から単離される微生物のすべてが清酒製造用酵母というわけではなく、様々な酵母が分離されてくる。また、*S. cerevisiae* が分離されたとしてもアルコール発酵能が低い株も多いため、単離後の試験で清酒製造用酵母を選抜しており、より効率的に清酒製造用酵母を分離することができる方法が求められている。

S. cerevisiae である各種実用酵母はビタミン要求性を示すことが知られている。1954 年に高橋が酵母増殖におけるアミノ酸、硫酸アンモニウム、ビタミンの要求性が実用酵母によって異なる事を明らかにしており³⁹⁾、きょうかい酵母については、同じく 1954 年に中西らが K6 株、K7 株に対するアスパラギンを用いた際のビタミンの生育の影響を報告している⁴⁰⁾。また 1963 年には菅間らは清酒酵母の麴、酏、醪中での酵母のビタミン要求性について報告している⁴¹⁾。さらに 1962 年に谷は清酒酵母の増殖と B 群ビタミンの要求性の関係を調査し、ビタミン B1、B5、イノシトール、ビオチン、ニコチン酸の要求性に差があり、その中でも酵母によって必須とするビタミンと、生育を促進するビタミンがあることを報告している⁴²⁾。きょうかい酵母を含む実用酵母のビタミン要求性については、1985 年に中田らによって詳細に報告されており、清酒酵母 15 株、焼酎酵母 168 株、泡盛酵母 155 株、蒸留酒酵母 8 株、パン酵母 12 株、ワイン酵母 7 株、ビール酵母 8 株、樹液酵母 5 株の 5 種のビタミン (パントテン酸、ビオチン、チアミン、イノシトール、ピリドキシン) に対する要求性が調べられ、K6 株、K9 株を含む 13 株の清酒酵母と 20 株の焼酎酵母、7 株の泡盛酵母、1 株の樹液酵母のみがビタミン要求性を示さず、その他の 337 株はパントテン酸、ビオチンあるいはチアミンの要求性を示していた (Table 3)⁴³⁾。これまで報告されている清酒製造用酵母の分離を目的としたすべての試みにおいて、集積培地には麴菌や酵母エキスに

Table 2 清酒製造用酵母の分離報告

研究者	基質株	培養物質						選別方法				参考文献	備考			
		クロマトフェニコール	エタノール	プロピオン酸	ソルベリン	肌糖	その他基質	TTCC遺伝子試験による判定	生理学的特性に基づき判定	キナーゼ遺伝子試験	アミノ酸親性試験			アミノ酸生成 26S-28S DNA 制限	TTCC試験による判定	清酒醸造試験
大橋ら	麹汁増殖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	13	アミノ酸濃度や日本産産地は低いが、 実用化できる酵母が分離された
藤原ら	麹汁増殖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	14	アミノ酸濃度が若干高いが、 清酒醸造に適える酵母の分離
三井ら	麹汁増殖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	15	アミノ酸濃度が低い 実用化できる酵母が分離された
伊藤ら	麹汁増殖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	16	アミノ酸濃度が低い 実用化できる酵母が分離された
中川	麹汁増殖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	17	アミノ酸濃度は低い 実用化できる酵母が分離された
松田ら	麹汁増殖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	18	清酒醸造に利用できる可能性のある 酵母の分離に成功
三井ら	YPD増殖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	19	アミノ酸濃度や日本産産地は低いが 実用化できる酵母が分離された
久田ら	GYP増殖 (Glu,5%)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	20	アミノ酸生成は高い 実用化されている酵母を分離
尾仲ら	YMA増殖 (Glu,10%)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	21	アミノ酸濃度は高い 実用化されている酵母を分離
原田ら	YMA増殖改良 (炭素源マッシュ ホース)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	22	アミノ酸濃度は低い、酵母を分離 清酒を旨味の異なる食品の醸造に利用
荻野目ら	酵母分選用液体増殖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	23	アミノ酸濃度が濃く 実用化されている酵母を分離
堀川ら	YPD増殖 (Glu,10%)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	24	産地アミノ酸濃度の異なる <i>Saccharomyces hirogiri</i> を分離
堀川ら	YPD増殖 (Glu,10%)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	25	日本産産地やアミノ酸濃度は低い 清酒醸造に利用できる酵母を分離
小玉ら	人工海水を用いた液体増殖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	26	アミノ酸濃度や日本産産地は低いが 実用化できる酵母が分離された
菅原ら	YPD増殖、麹汁増殖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	27	実用化されている酵母の分離 分離できていない
嶋田	YPD増殖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	28	実用化されている酵母の分離 分離できていない
柏木	麹汁増殖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	29	実用化されている酵母の分離
山本	麹汁増殖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	30	ヒール酵母と同等あるいはそれ以下の発酵力を持 つ酵母を分離
工藤	麹汁増殖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	31	アミノ酸濃度は高い 実用化されている酵母を分離
西尾	麹汁増殖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	32	アミノ酸濃度や日本産産地は低く 日本産産地に適さない、酵母を分離
藤山	YPD増殖 (炭素)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	33,34	アミノ酸や日本産産地は低く 醸造が早い酵母を分離
池本	麹汁増殖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	35,36	アミノ酸濃度が少し低く 醸造が早い酵母を分離
奥田	麹汁増殖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	37	アミノ酸濃度は高い アミノ酸生成能力がある
加藤	麹汁増殖、Hydrate増殖、混合 炭増殖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	38	アミノ酸生成能力がある 実用化されている酵母を分離

Table 3 各種酵母のビタミン要求性⁴³⁾

Strain	Number of same groups	Requirement for				
		Pantothenate	Biotin	Thiamine	Inositol	Pyridoxine
<i>Awamori yeasts</i>	145 (Awamori no.1 and isolated in 1980~1981)	+	-	+	-	-
	3 (S7, S8, NI 7214)	+	-	-	-	-
	7 (S1 and 6 strains isolated in 1980)	-	-	-	-	-
<i>Shochu yeasts</i>	148 (A11, A12, S24 and 145 isolated in 1981)	+	-	-	-	-
	20 (S47 and 19 strains isolated in 1981)	-	-	-	-	-
<i>Sacch. sake</i>	13 (Kyokai no 6, 8, 9 and 10 strains of wild yeast)	-	-	-	-	-
	2 (Kyokai no. 7 and AS 701)	+	-	-	-	-
<i>Other Sacch. cerevisiae</i>						
Other distiller's yeasts	5	+	+	-	-	-
	3 (A30, IFO2094 and IFO2114)	+	-	-	-	-
Baker's yeasts	12	+	+	-	-	-
Wine yeasts	7	+	+	-	-	-
Brewer's yeasts	6	+	+	-	-	-
	2 (B4 and B5)	-	+	-	-	-
Tree exudate yeasts	1 (KSC 72)	+	+	-	-	-
	3	-	+	-	-	-
	1 (KSC 49)	-	-	-	-	-

+ : 要求性あり、- : 要求性なし

由来するビタミンや人工的に添加したビタミンが含まれており、集積培地の基礎培地をビタミン欠如培地とした、清酒酵母を効率よく集積できる新規集積培地を着想得て、本研究に取り組んだ。

抗菌物質については、東京農業大学微生物工学研究室では長年にわたり、Yeastcidin と呼ばれる麹菌 *Aspergillus oryzae* No.G 株が生産する抗菌物質を添加してきた。Yeastcidin の抗菌スペクトルは、穂坂らによって明らかにされており、実用酵母（清酒酵母、焼酎酵母、ワイン酵母、パン酵母など）54 株、*S. cerevisiae* 22 株、*Saccharomyces* 属、*Hansenula* 属、*Candida* 属、*Pichia* 属など 13 属 46 株、総計 122 株の酵母のうち、清酒酵母（K6 株、K7 株、きょうかい酵母 8 号、K9 株、K10 株、K11 株、K14 株、K15 株、K1601 株、K1701 株、AS701）と *Phicha chamberdii*、*P. farinosa* のみが Yeastcidin に耐性を示す⁴⁴⁾。Yeastcidin の抗菌スペクトルは、様々な微生物が存在する自然界から清酒製造用酵母を集積するためにとっても有利な性質であることから、本研究においても抗菌物質として Yeastcidin を用いることにした。

本章では集積培地の基礎培地としてビタミン欠如培地を、抗菌物質として Yeastcidin を用いた新規集積培地での各種酵母の増殖性を調べ、実際に清酒製造用酵母の分離を試みて、取得された酵母の醸造特性を明らかにしたので報告する。

1-2 実験方法

1-2-1 Yeastcidin の調製

a. Yeastcidin の生産

精米歩合 60%の美山錦を用いて麴蓋法により製麴した麴 1 kg に対し水を 4 L、酵素剤（グルク 100G）0.5 g を加え、55°Cで 15 時間糖化を行った。その濾液の糖度を蒸留水で希釈することで Brix 8%に調整し、麴汁培地を調製した。*A. oryzae* No.G 株を 1 白金耳とり、滅菌水 10 mL に懸濁した。その懸濁液 100 μ L を麴汁培地 10 ml に植菌し、30°Cで 7 日間培養したものを前培養液とした。2L 容器に麴汁培地 1 L を分注し、オートクレーブ（121°C、15 min.）で滅菌後、前培養液を植菌した。その後、25°Cで 25 日間培養した。培養後、濾過を行い、濾液量に対して 20~30 倍量の水道水で 7 回透析（富士フィルム和光純薬株式会社、Dialysis Membrane Size36）した。水道水での透析によって生じた沈殿物を遠心分離（8000 rpm、10 min.）して除去し、減圧蒸留で約 10 倍に濃縮した。この濃縮液を 10 倍量の蒸留水で再度透析し、生じた沈殿物を遠心分離によって除去したものを Yeastcidin 溶液とした。Yeastcidin 溶液は、オートクレーブ 滅菌（121°C、15 min.）した後、-10°Cで保存した。

b. Yeastcidin溶液の最小生育阻害濃度（MIC）の測定

供試菌株（Yeastcidin 耐性株である K7 株と Yeastcidin 非耐性株である *S. cerevisiae* IFO2011(IFO2011株)）を1白金耳とり、麴汁培地（Brix 8%）10 mLに植菌した。その後、25°Cで72~96時間静置培養したもの、または24~48時間振盪培養したものを前培養液とした。その前培養液の菌体密度をトーマ血球計算盤（エルマ株式会社）で測定した。

試験培地の調製は以下の通りに行った。所定のYeastcidin溶液濃度になるように、麴汁培地(Brix 8%)、蒸留水、Yeastcidin溶液を混合した。この時、麴汁培地添加量は抗菌試験用培地全体の容積の50%とした。オートクレーブ（121°C、15 min.）で滅菌後、供試菌株を 1.0×10^4 cells/mLとなるように植菌した。25°Cで3日間静置培養し、生育の有無を確認した。3連で抗菌試験を実施し、IFO2011株の生育が3回中0回あるいは1回となる最も低いYeastcidin溶液濃度をMIC(%)とした。

1-2-2 集積培地を用いた各種酵母の増殖試験

a. 集積培地の調製

a-1. Yeastcidin 添加麴汁培地（KY 培地）

麴汁培地（Brix 18%）80 mL に Yeastcidin 溶液（MIC：0.55%）を 0.44 mL 添加し、オートクレーブ（121°C、15 min.）で滅菌後、乳酸 0.32 mL、カゼイン 4 g を加え、KY 培地とした。

a-2. Yeastcidin 添加 Buffer 欠如ビタミン欠如培地（BY 培地）

Table 4 に示す組成の培地を調製した。本培地 80 mL に Yeastcidin 溶液（MIC：0.55%）を 0.44 mL 添加し、mi で滅菌後、乳酸 0.32 mL とカゼイン 4 g を加えて BY 培地とした。

Table 4 ビタミン欠如培地組成 (BY 培地用)

D-Glucose	130 g
L-Asparagine	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.23 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.125 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.125 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.028 mg
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.024 mg
D.W.	1000 mL

b. 増殖確認試験

供試菌株を麴汁培地 (Brix 10%) で 25°C、7 日間培養し、1 mL の培養液を採取した。遠心分離 (3000 rpm、3 min.) で集菌後、滅菌水で 2 回洗菌し、1 mL の滅菌水で菌体を懸濁した。トーマ氏血球計を用い、菌体懸濁液の菌体密度を計測し、増殖試験培地 80 mL に供試菌株を 1.0×10^3 cells/mL になるように植菌した。25°C で 7 日間培養を行い、増殖は経時的に波長 600 nm の吸光度を測定することで確認した。供試菌株として、清酒酵母 (K6 株、K7 株、K9 株)、焼酎酵母 (きょうかい酵母焼酎用 4 号 (SH4 株)、A11 株、A12 株)、泡盛酵母 (Aw1 株)、ワイン酵母 (OC2 株、きょうかい酵母ブドウ酒用 1 号 (Kw1 株)、*S. cerevisiae* IFO2215 (IFO2215 株)、*S. cerevisiae* IFO2300 (IFO2300 株))、ビール酵母 (*S. cerevisiae* IFO2000 (IFO2000 株)、IFO2011 株)、実験室酵母 *S. cerevisiae* S288c (S288c 株) を使用した。

1-2-3 集積培養

増殖試験で使用した BY 培地と KY 培地を集積培地として使用した。0.1 M リン酸緩衝液 100 mL に分離源の花 (花軸、花柄、花托およびがく片を除去したもの) をそれぞれ約 10 g 添加し、25°C で 1 日浸漬した。調製した集積培地に浸漬液を 1 mL 添加し、25°C で培養した。一日に一回攪拌し、Brix 糖度を 7 日毎に測定した。BY 培地では初期 Brix 12% から Brix 8% 以下になった時点で、KY 培地では初期 Brix 18% から Brix 14% 以下になった時点で集積培養液のサンプリングを行った。また、分離源を添加しない集積培地も調製し、糖度の低下を測定した。サンプリングした培養液を滅菌水で適宜希釈後、エタノール 6% 含有 2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chlorid (TTC) 下層培地 (Ethanol 6.0%, Agar 3.0%, Glucose 1.0%, Polypeptone 0.2%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.04%, Yeast extract 0.015%) にシャーレ 1 枚あたり 50 個程度のコロニーが生育するように塗抹した。30°C で 3 日間培養し、生じたコロニーから集積培地毎に 5 株を目安に釣菌し、分離株を取得した。

1-2-4 発酵性、産膜性および増殖、細胞形態

分離株を YM 液体培地 (Glucose 1%, Polypeptone 0.5%, Malt extract 0.3%, Yeast extract 0.3%) に植菌して 30°C で培養し、3 日後に産膜性を確認した。TTC 還元性試験は国税庁所定分析法注解に従って行った。詳細には、分離株を 10 ml の TTC 下層培地へ植菌し、コロニーの直径が 0.5~1.0 mm 程度になるまで 25°C で 2~3 日間培養した。そこに TTC 上層培地 (Agar 1.5%, Glucose 0.5%, TTC 0.05%) を重層し、3 時間後にコロニーの呈色を観察した。増殖、形態に関しては、分離株を YM 液体培地に植菌し 3 日間培養後、顕微鏡観察を行った。

1-2-5 ビタミン要求性

ビタミン要求性試験は、中田ら⁴³⁾の方法に従って行った。硫酸アンモニウムを窒素源とし、クエン酸、クエン酸カリウムを除去したビタミン欠如培地（1 Lあたりグルコース 20 g、硫酸アンモニウム 2.0 g、リン酸 2 水素カリウム 0.55 g、塩化カリウム 0.425 g、硫酸マグネシウム・7 水和物 0.125 g、塩化カルシウム・2 水和物 0.125 g、塩化鉄・6 水和物 2.5 mg、硫酸マンガン・4 水和物 2.5 mg）に、YM 液体培地で前培養した分離株を 1 mL 採取し、遠心分離（3000 rpm、3 min.）で集菌した。これを滅菌生理食塩水で 2 回洗浄後、 8.0×10^3 cells/mL となるように接種し、25°C での増殖の有無を観察した。

1-2-6 小規模発酵試験

精米歩合 60%の五百万石 115g を洗米・浸漬（4°C、2 時間）し、水切りを行い、121°Cで 10 分間蒸しを行った。蒸し後、放冷した蒸米に米麴 38g、水 200 mL、乳酸 0.8 mL を加え、10 mL YM 培地で 25°Cで 3 日間前培養した供試菌株を全量添加し、攪拌した。醪を 15°Cで 20 日間育成し、発酵期間中は 1 日おきに攪拌を行った。対照株として K9 株を使用した。発酵終了後、遠心分離（8000 rpm、10 min.）を行い、上清を回収し、濾過した。その濾液を分析試料として用いた。一般成分分析は国税庁所定分析法注解に従って行った。日本酒度は酒類用振動式密度計（京都電子工業、DA-155）を用いて測定し、総酸度・アミノ酸度は電位差自動滴定装置（京都電子工業、AT-710）を用いて測定した。アルコール濃度はアルコメイト AL-3（理研計器株式会社）を用いて測定した。

1-2-7 清酒小仕込み試験

清酒の小仕込み試験は、総米 500 g の三段仕込み（麴歩合 23%、汲水歩合 145%）で実施した。酒母については使用する米の量が少ないため、別途、総米 200 g の高温糖化醪（汲水歩合 200%、麴歩合 30%）をたてた（Table 5, 6）。詳細には、洗米し、4°Cで一晩浸漬後、水切りを行った白米 140 g を 30 分間蒸した。蒸し後、蒸米と熱湯 275 ml を混ぜ、品温が 60°C前後になった時点で米麴 66 g（白米換算 60 g）を添加し、55°Cで一晩糖化した。翌日、糖化液に氷 125g を添加して 25°Cにまで温度を下げ、乳酸 2.8 ml と YM 培地で前培養した供試菌株 1.6 ml を添加し、攪拌した。25°Cで 2 日間培養後、15°Cで培養した。酒母の濾液の一般成分分析を行い、ボーメ 7 以下、酸度 7 ml 以上を酒母完成の目安とした。

完成した酒母 73.5 g に氷水、米麴、十分に冷やした蒸米を添加して攪拌することで初添を行った（Table 7）。初添後の目標温度は 15°Cとした。仲添、留添は初添と同様に行い、目標温度はそれぞれ 10°C、8°Cとした。留添の日を醪 1 日目とし、醪 4 日目から醪最高濃度が 13.5°Cになるように毎日 1°Cずつ温度を上昇させた。その後 13.5°Cを 17 日目まで維持し、18 日目から 10°Cになるまで毎日 0.5°Cずつ温度を下降させた。発酵期間中は週一回分析を行い醪の発酵経過を確認した。発酵終了後、遠心分離（8000 rpm、10 min.）を行い、上清を回収・濾過した。濾液を 3 日間 4°Cで滓下げたものを製成酒とした。

醪育成中の醪濾液および製成酒の一般成分分析は 1-2-6 の方法と同様に行った。製成酒の有機酸（クエン酸、リンゴ酸、コハク酸、乳酸、ピルビン酸）の分析は、小室ら⁴⁵⁾の方法に従い有機酸分析システム（株式会社島津製作所）で測定した。香気成分分析は、Jms-Q1000 GC MKII（日本電子株式会社）を用いてヘッドスペース法にて測定した（Table 8）。香気成分分析では、カプロン酸エチル、酢酸イソアミル、酢酸エチルについては 0.5、1、5、10、50 ppm (v/v) の標準液を、イソアミルアルコール、イソブチルアルコールについては 5、10、50、100、500 ppm (v/v) の標準液を調製し、絶対検量線法により定量した。

Table 5 酒母仕込み配合表

総米(g)	200.0
蒸米(g)	140.0
麴米(g)	60.0
汲水(ml)	400.0
乳酸(ml)	2.8
酵母培養液(ml)	1.6

※表中の米は白米換算重量

Table 6 酒母仕込み汲み水内訳

糖化仕込み(ml)	275.0
冷却水(g)	125.0
合計(ml)	400.0

Table 7 醪仕込み配合表

	酒母	初添	仲添	留添	合計
総米 (g)	24.5	70.0	140.0	265.5	500.0
掛米 (g)	17.1	50.0	110.0	207.9	385.0
麴米 (g)	7.4	20.0	30.0	57.6	115.0
汲水 (mL)	49.0	60.0	170.0	446.0	725.0

※表中の米は白米換算重量

Table 8 GC/MS 分析条件

Analysis equipment	JOEL Jms-Q1000GC MkII
Column	InertCap Pure-WAX, 60 m×0.25 mm ID, 0.25 μm film
Carrier gas	He, 2 mL/min, constant flow
Oven	40°C (2 min) to 100°C at 5°C/min to 250°C at 10°C/min (hold 5 min)
Injection	Split 30 : 1, 200°C
Ion source temperature	200°C
Detection	Total ion monitor
Scan range	m/z 29-300

1-2-8 分離株の塩基配列解析および分子系統解析

分離酵母菌体をガラスビーズで破碎し、フェノールクロロホルム法で DNA を抽出した。これを鋳型に Taq ポリメラーゼと 26S rDNA-D1/D2 領域増幅用プライマー（5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'および 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'）あるいは ITS 領域増幅用プライマー（5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'および 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'）を用いてそれぞれの領域を PCR (1:1 サイクル, 94°C, 2 min., 2:35 サイクル, 94°C, 30 s, 50°C, 30 s, 72°C, 45 s, 3:1 サイクル, 72°C, 10 min.) で増幅した。得られた PCR 産物を High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) を用いて精製した。DNA 配列決定は、株式会社 Macrogen Japan に委託した。

系統樹は、The Yeast にならい *Saccharomyces* 属 9 種、*Kazachstania viticola* および *Zygosaccharomyces rouxii* の基準株と、K7 株、K9 株および分離株の 26S rDNA-D1/D2 領域と ITS 領域の塩基配列を連結し、ClustalX2.1 を用いて近隣結合法により作製した。

1-2-9 実地醸造

実地醸造は総米 696 kg の三段仕込み（麴歩合 21%、汲水歩合 155%）を行い、酒母については精米歩合 50%山田錦を用いた中温速醸法で育成した（Table 9）。

仕込み温度は、初添 13°C、仲添 8°C、留添 6°Cとし、醗 4 日目から醗最高濃度が 12.3°Cになるように徐々に温度を上昇させた。その後 12°Cを 17 日目まで維持し、18 日目から 10°Cになるまで毎日 0.5°Cずつ温度を下降させた。

Table 9 総米 696 kg 仕込み配合表

	酒母	初添	仲添	留添	合計
総米 (kg)	42.0	118.0	208.0	328.0	696.0
掛米 (kg)	28.0	88.0	167.0	267.0	550.0
麴米 (kg)	14.0	30.0	41.0	61.0	146.0
汲水 (L)	47.0	125.0	291.0	617.0	1080.0

※表中の米は白米換算重量

1-3 結果および考察

1-3-1 集積培地を用いた各種酵母の増殖試験

新たに設計した BY 培地での増殖を調べるために、清酒酵母、焼酎酵母、泡盛酵母、ワイン酵母、ビール酵母、実験室酵母を BY、KY 培地にそれぞれ植菌し、経時的に増殖を確認した。

清酒酵母については、K6 株、K7 株、K9 株のいずれも、KY 培地に植菌後 36 時間から顕著に増殖した。また、BY 培地では K7 株が 48 時間、K6 株が 60 時間、K9 株が 84 時間でそれぞれ増殖が確認されたが、KY 培地と比べて増殖量が少なかった (Fig. 1)。K7 株については、本来ビタミン要求性を示さない酵母であるが、昭和 36 酒造年度から 35°Cでパントテン酸の要求性を示すようになったことが報告されている。一方で、清酒醸造が行われる温度（10~20°C）ではパントテン酸の要求性は認められず、清酒醸造への影響がないことも報告されている⁴⁶⁾。本試験では 25°Cで増殖試験を実施し、K7 株の増殖が確認されたことから、K7 株は 25°Cでパントテン酸の要求性を示さないことが示唆された。仮に K7 株が 25°Cでパントテン酸を要求する性質を有していた場合には、K7 株が本試験で増殖した理由として、以下のものが考えられる。K7 株は、35°Cの培養温度で窒素源としてカゼイン分解物のような有機性窒素を用いた場合、パントテン酸要求性を示さなくなることが報告されている⁴²⁾。本試験の窒素源はアスパラギンを用いており、カゼイン分解物に含まれるアミノ酸の一つである。そのため、仮に 25°Cの培養温度で K7 株がパントテン酸を要求していたとしても、本試験では窒素源としてアスパラギン（有機性の窒素源）を用いたために増殖が確認されたと考えられる。BY 培地において増殖した酵母株の増殖量が KY 培地よりも少ないことについては、清酒酵母の生育を促進させることが知られているチアミンやイノシトールが BY 培地には含まれないためであると考えられる⁴³⁾。

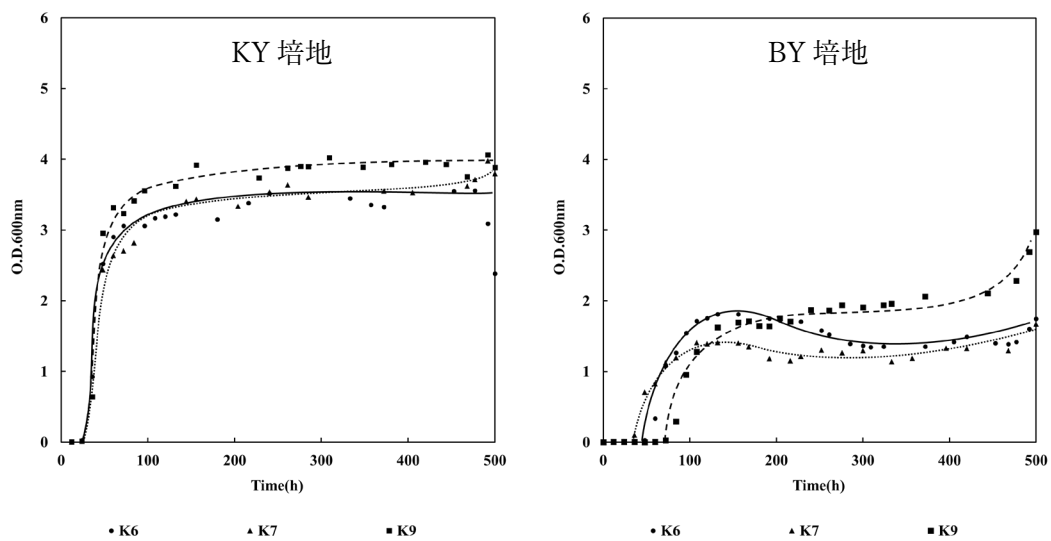


Fig. 1 清酒酵母 (K6 株、K7 株、K9 株) の増殖試験

焼酎・泡盛酵母については、SH4 株、Aw 株、A11 株、A12 株の KY 培地での増殖が、それぞれ 36 時間、36 時間、130 時間、210 時間で確認できた。その一方で、BY 培地での増殖は、SH4 株でのみであり、Aw 株、A11 株、A12 株は 500 時間の培養後でも増殖が確認されなかった (Fig. 2)。これは A11 株、A12 株についてはパントテン酸の要求性が、Aw1 株についてはパントテン酸とチアミンの要求性があることが報告されており⁴³⁾、BY 培地にはこれらのビタミンが含まれないため生育が抑制されたと考えられる。

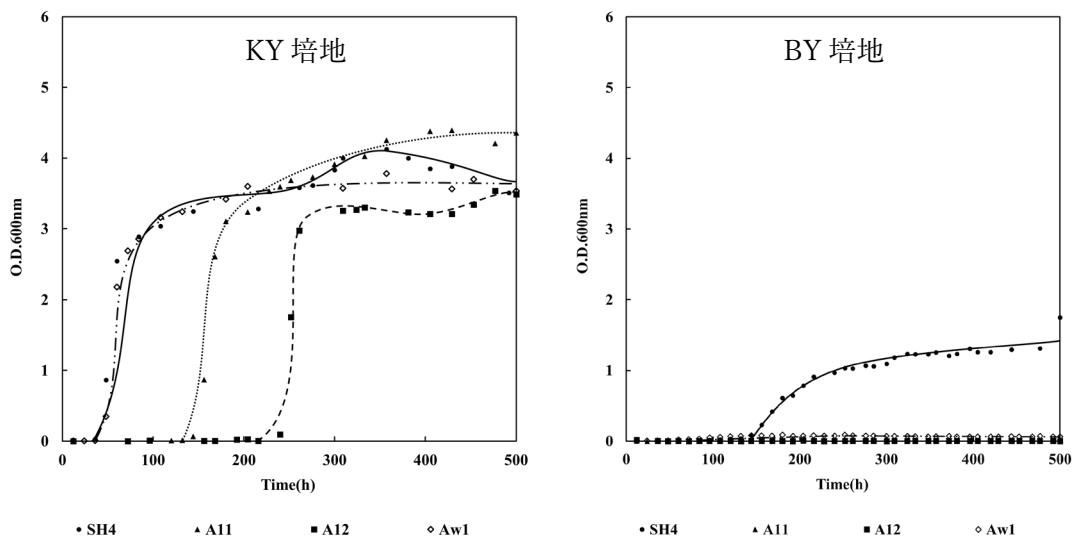


Fig. 2 焼酎・泡盛酵母 (SH4 株、A11 株、A12 株、Aw1 株) の増殖試験

ワイン酵母 (OC 2 株、Kw1 株、IFO2215 株、IFO2300 株)、ビール酵母 (IFO2000 株、IFO2011 株)、実験室酵母 (S288c 株) については、KY 培地において 7 株すべてで生育が確認されたが、BY 培地ではいずれの株も増殖しなかった (Fig. 3, 4)。OC2 株、IFO2215 株、IFO2300 株、IFO2000

株、IFO2011 株はパントテン酸およびビオチンの要求性があることから BY 培地での増殖見られなかったと考えられた^{43,47}。ワイン酵母 (Kw1 株) や実験室酵母 (S288c 株) については、ビタミン要求性が報告されていないが、各種 *S. cerevisiae* 株で報告例のあるパントテン酸、ビオチン、チアミン、イノシトール、ピリドキシンなどのビタミンに対する要求性があるため⁴³) に増殖できなかったと予想された。

KY 培地で Yeastcidin 耐性がない株 (ビール酵母、ワイン酵母、実験室酵母) が生育したことについては、Yeastcidin 耐性の判別手法と本実験の条件が異なることが要因であると考えられる。各菌株の Yeastcidin 耐性の有無は、*A. oryzae* No.G 株の培養液を濃縮後、アセトン抽出し、凍結乾燥した粉末を試験培地に 50~1000 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加した培地で 30°C、72 時間後の増殖の有無で判別している⁴⁴)。それに対し、本試験では、IFO2011 株の最小生育濃度となるように集積培地に Yeastcidin を添加しており、Yeastcidin の濃度が異なる。また、本試験では培養時間が 72 時間ではなく 500 時間まで増殖の有無を確認している。この条件の違いにより、Yeastcidin の作用による死滅をまぬがれた少数の供試菌株が時間をかけて増殖した (IFO2300 株 : 48 時間後から増殖、IFO2215 株 : 96 時間後から増殖、IFO2000 株、IFO2011 株 : 168 時間後から増殖) と考えられる。

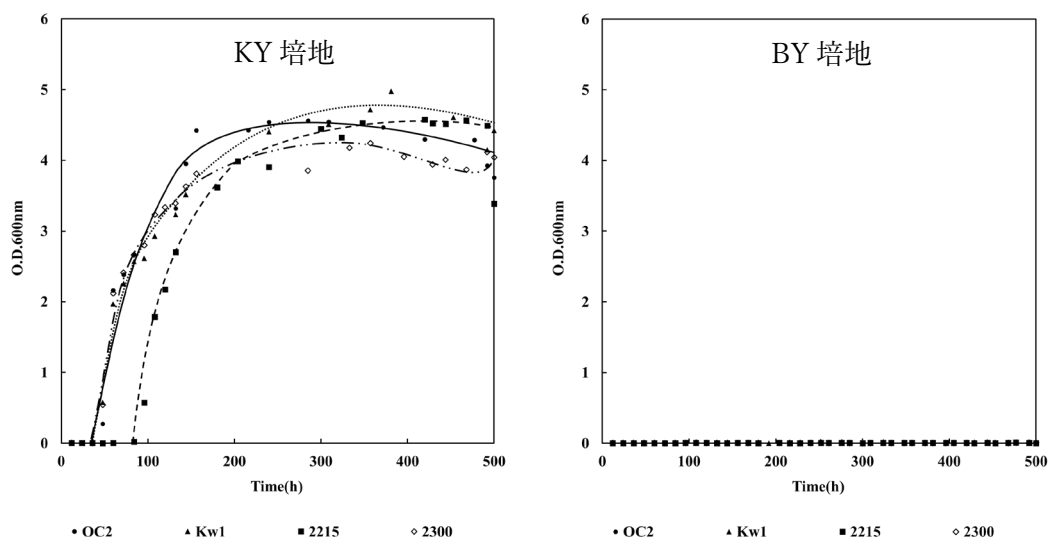


Fig. 3 ワイン酵母 (OS1 株、Kw1 株、IFO2215 株、IFO2300 株) の増殖試験

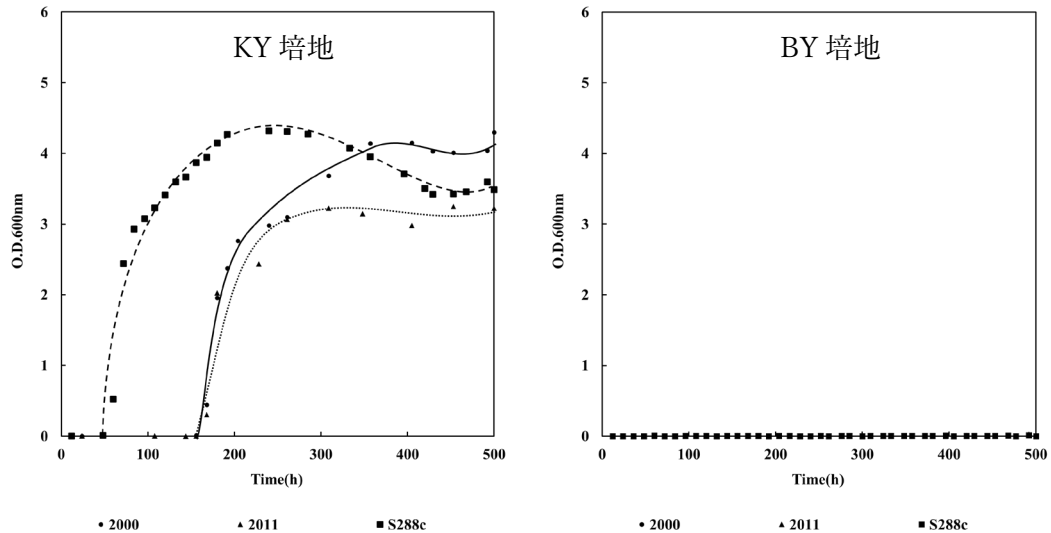


Fig. 4 ビール・実験室酵母（IFO2000 株、IFO2011 株、S288c 株）の増殖試験

1-3-2 集積培養

BY 培地あるいは KY 培地に分離源を添加し、酵母の集積を試みた。集積培養はそれぞれの培地で 3 本ずつ実施した。BY 培地については、BY1 と BY3 の集積培地で基準値までの Brix 糖度の低下と発泡がみられた。KY 培地については、KY1 の集積培地では糖度が低下しなかったが、KY2 で基準値までの糖度低下がみられた。KY3 については、7 日目の時点で Brix 糖度が 13.8%まで低下しており、旺盛な発泡もみられた。

Table 10 集積培養における Brix 糖度の推移

集積培地No.	Brix糖度 (%)			
	開始時	7日後	14日後	21日後
Yeastcin添加麹汁培地				
KY1	18	17	17.2	18
KY2	18	15	12	—
KY3	18	13.8	—	—
Yeastcin添加ビタミン欠如培地				
BY1	12	10	11	8
BY2	12	11	9	9
BY3	12	13	8	—

1-3-3 発酵性、産膜性および増殖、細胞形態

Brix 糖度の基準値までの低下あるいは旺盛な発泡が観察された集積培地の培養液を適宜希釈し、TTC 下層培地に塗抹して培養して釣菌することで、BY1、KY2、KY3 の集積培地から分離株 BY1-1~5 株、KY2-1~5 株、KY3-1~5 株をそれぞれ得た。集積培地 BY3 については、その培養液を塗布したシャーレに大量のカビが発生したことから釣菌を行わなかった。

BY1-1~5 株、KY2-1~5 株、KY3-1~5 株を YM 液体培地で培養したところ、いずれもガスが発生し、産膜を形成しなかった。また、顕微鏡観察を行った結果、いずれも増殖は出芽で卵形から球形であり、*S. cerevisiae* の特徴と一致していた。分離株の TTC 染色性は、BY1-1~5 株およ

び KY2-1~5 株が RED であり、KY3-1~5 株は WHITE であった (Table 11)。清酒醸造で広く使用されているきょうかい酵母は TTC 染色性 RED であるのに対し、野生酵母の多くは PINK または WHITE を示すため、TTC 染色性は酒母や醪中の酵母の純度確認のために利用されている。分離株 BY1-1~5、KY2-1~5 は、K9 株を含むきょうかい酵母と同様に TTC 染色性 RED であった。しかし、分離株 KY3-1~5 株については野生酵母と同じ TTC 染色性 WHITE を示しており、実用酵母としては適さないこと示していた。

TTC 染色性 RED を示した BY1-1~5 株および KY2-1~5 株と K9 株をビタミン要求性試験に供したところ、いずれの株もビタミン欠如培地での増殖性が観察された。本試験で用いた硫酸アンモニウムを窒素源とし、クエン酸塩無添加のビタミン欠如培地では、清酒酵母は増殖するが、泡盛酵母はパントテン酸とビタミン B1 を要求し、焼酎酵母はパントテン酸を要求することから⁴³⁾、BY1-1~5 株および KY2-1~5 株は清酒酵母 K6 株や K9 株と同じビタミン非要求性を示すことが明らかとなった。

Table 11 分離した菌株の各種性質

株	産膜性	増殖	細胞形態	TTC 染色性	ビタミン要求性	株	産膜性	増殖	細胞形態	TTC 染色性	ビタミン要求性
K9	-	出芽	卵形~球形	RED	-	KY3-3	-	出芽	卵形~球形	WHITE	
						KY3-4	-	出芽	卵形~球形	WHITE	
KY2-1	-	出芽	卵形~球形	RED	-	KY3-5	-	出芽	卵形~球形	WHITE	
KY2-2	-	出芽	卵形~球形	RED	-						
KY2-3	-	出芽	卵形~球形	RED	-	BY1-1	-	出芽	卵形~球形	RED	-
KY2-4	-	出芽	卵形~球形	RED	-	BY1-2	-	出芽	卵形~球形	RED	-
KY2-5	-	出芽	卵形~球形	RED	-	BY1-3	-	出芽	卵形~球形	RED	-
KY3-1	-	出芽	卵形~球形	WHITE		BY1-4	-	出芽	卵形~球形	RED	-
KY3-2	-	出芽	卵形~球形	WHITE		BY1-5	-	出芽	卵形~球形	RED	-

1-3-4 分離株の小規模発酵試験

TTC 染色性 RED およびビタミン非要求性を示した BY1-1~5 株および KY2-1~5 株の小規模発酵試験を行ったところ、対照として用いた K9 株が高泡を形成したのに対し、いずれの分離株も高泡を形成しなかった。また、小規模発酵試験の醪濾液の成分分析を行ったところ、BY1-1~5 株については、日本酒度+18~+19、アルコール濃度 16.3~19.8%であり、K9 株と比較しても同等以上のアルコール発酵力を示していたことから、清酒醪での高い発酵力が期待された。一方、KY2-1~5 株の日本酒度とアルコール濃度は、それぞれ-73~-50、6.8~10.7 であり、アルコール発酵力が低い株であると判断された。

Table 12 総米 150g 小規模発酵試験結果

分離株	日本酒度	アルコール度数 (%)	酸度 (ml)	アミノ酸度 (ml)	高泡形成能
K9	+18	15.7	3.8	1.8	+
KY2-1	-51	10.1	6.4	2.4	-
KY2-2	-66	9.8	6.3	2.5	-
KY2-3	-73	6.8	6.6	2.5	-
KY2-4	-50	10.7	6.2	2.5	-
KY2-5	-66	9.2	6.5	2.7	-
BY1-1	+18	17.9	3.9	1.3	-
BY1-2	+18	19.8	3.5	1.7	-
BY1-3	+19	17.4	3.6	1.3	-
BY1-4	+18	17.1	4.3	1.4	-
BY1-5	+19	16.3	3.9	1.6	-

1-3-5 分離株の清酒小仕込み試験

小規模発酵試験の結果から、清酒醪での高い発酵力が期待された BY1-1~5 株と K9 株を用いた総米 500 g の小仕込み試験に供し、その製成酒の一般成分分析を行った。各酵母を用いた小仕込みを行うにあたり、まずそれらの菌株を用いて、それぞれの高温糖化醗をたてた。酒母仕込み 7 日目に一般成分分析を行ったところ、対照株とした K9 株はボーメ 6.9、総酸度 9.4 mL であり、酒母として使用するボーメ 7 以下、総酸度 7.0 mL 以上という目標値に達していた。また、分離株においてもボーメ 4.8~6.2、総酸度が 8.0~8.7 mL となっており目標値に達していた (Table 13~19)。

育成した酒母を用いて三段仕込みを行い、21 日間の育成後、上槽した。発酵経過は K9 株と分離酵母全ての株で良好な経過を示した (Fig. 5~10)。製成酒の一般成分分析を行ったところ、K9 株の日本酒度 -7、アルコール濃度 17.1% に対し、BY1-1 株は ±0、18.3%、BY1-2 株は -4.7、18.7% であり、この 2 株は K9 株と同等以上のアルコール発酵能力を示した。BY1-3 株、BY1-4 株については、日本酒度は -7.6、-9.3 と K9 株と同等あるいはそれ以下であったが、アルコール濃度は 18.6%、17.7% と K9 株以上であり、同等のアルコール発酵能力であることが示唆された。BY1-5 株については、日本酒度は -3.7 と K9 株より高い値となったが、アルコール濃度は 16.6% と低かった。BY1~5 株の酸度をみると、BY1-1 株は 2.8 mL と K9 株よりも高い数値を示す一方、BY1-2~5 株は 2.0~2.4 mL と K9 株と同等あるいは低い数値であった。アミノ酸度は、いずれの株も K9 株よりも高い数値であった (Table 20)。また、官能的に BY1-1 の製成酒で蜜リング様の香気が強く感じられた。

今回小仕込み試験を行った BY1-1~5 株はいずれも発酵経過はよく、K9 株とは異なる製成酒の特徴を示した。特に BY1-1 株については K9 株よりも日本酒度がキレ、アルコール濃度も高いことからアルコール生成能が高く、また官能的にも K9 株とは異なる香気が確認されるなど特徴的な株であった。

Table 13 K9 株酒母経過表

日数	操作	庫内設定温度 (操作前)	庫内設定温度 (操作後)	品温	Be	総酸度 (ml)	アミノ酸度 (ml)	アルコール度数 (%)
1	仕込み	55.0	25.0					
2	權入れ	25.0	25.0	25.0				
3	權入れ	25.0	17.0	26.0				
4	權入れ	17.0	17.0	17.0				
5	權入れ	17.0	17.0	17.0				
6	權入れ	17.0	17.0	17.0				
7	分析	17.0	17.0	17.0	6.9	9.4	2.1	8.8
8	權入れ	17.0						

Table 14 BY1-1 株酒母経過表

日数	操作	庫内設定温度 (操作前)	庫内設定温度 (操作後)	品温	Be	総酸度 (ml)	アミノ酸度 (ml)	アルコール度数 (%)
1	仕込み	55.0	25.0					
2	權入れ	25.0	25.0	25.0				
3	權入れ	25.0	17.0	26.0				
4	權入れ	17.0	17.0	17.0				
5	權入れ	17.0	17.0	17.0				
6	權入れ	17.0	17.0	17.0				
7	分析	17.0	17.0	17.0	6.2	8.0	1.9	8.8
8	權入れ	17.0						

Table 15 BY1-2 株酒母経過表

日数	操作	庫内設定温度 (操作前)	庫内設定温度 (操作後)	品温	Be	総酸度 (ml)	アミノ酸度 (ml)	アルコール度数 (%)
1	仕込み	55.0	25.0					
2	權入れ	25.0	25.0	24.3				
3	權入れ	25.0	17.0	17.2				
4	權入れ	17.0	17.0	17.3				
5	權入れ	17.0	17.0	18.0				
6	權入れ	17.0	17.0	16.5				
7	分析	17.0	17.0	16.5	4.8	8.7	1.8	8.5
8	權入れ	17.0						

Table 16 BY1-3 株酒母経過表

日数	操作	庫内設定温度 (操作前)	庫内設定温度 (操作後)	品温	Be	総酸度 (ml)	アミノ酸度 (ml)	アルコール度数 (%)
1	仕込み	55.0	25.0					
2	權入れ	25.0	25.0	24.3				
3	權入れ	25.0	17.0	17.2				
4	權入れ	17.0	17.0	17.3				
5	權入れ	17.0	17.0	18.0				
6	權入れ	17.0	17.0	16.5				
7	分析	17.0	17.0	16.5	5.8	8.7	1.8	8.5
8	權入れ	17.0						

Table 17 BY1-4 株酒母経過表

日数	操作	庫内設定温度 (操作前)	庫内設定温度 (操作後)	品温	Be	総酸度 (ml)	アミノ酸度 (ml)	アルコール度数 (%)
1	仕込み	55.0	25.0					
2	權入れ	25.0	25.0	24.3				
3	權入れ	25.0	17.0	17.2				
4	權入れ	17.0	17.0	17.3				
5	權入れ	17.0	17.0	18.0				
6	權入れ	17.0	17.0	16.5				
7	分析	17.0	17.0	16.5	5.6	8.3	1.8	8.7
8	權入れ	17.0						

Table 18 BY1-5 株酒母経過表

日数	操作	庫内設定温度 (操作前)	庫内設定温度 (操作後)	品温	Be	総酸度 (ml)	アミノ酸度 (ml)	アルコール度数 (%)
1	仕込み	55.0	25.0					
2	權入れ	25.0	25.0	24.3				
3	權入れ	25.0	17.0	17.2				
4	權入れ	17.0	17.0	17.3				
5	權入れ	17.0	17.0	18.0				
6	權入れ	17.0	17.0	16.5				
7	分析	17.0	17.0	16.5	5.6	8.3	1.9	8.5
8	權入れ	17.0						

Table 19 酒母の一般成分分析

	日本酒度	総酸度(ml)	アミノ酸度 (ml)	アルコール度数 (%)	直接還元糖 (%)
K9	-7	2.6	1.5	17.1	2.4
BY1-1	±0	2.8	1.7	18.3	1.7
BY1-2	-4.7	2.4	2.0	18.7	2.0
BY1-3	-7.6	2.2	1.9	18.6	1.5
BY1-4	-9.3	2.0	1.9	17.7	3.1
BY1-5	-3.7	2.0	1.8	16.6	1.8

温度 (°C)、ポーム、総酸度 (ml) アミノ酸度 (ml)、
アルコール度数 (%)、直接還元糖 (%)

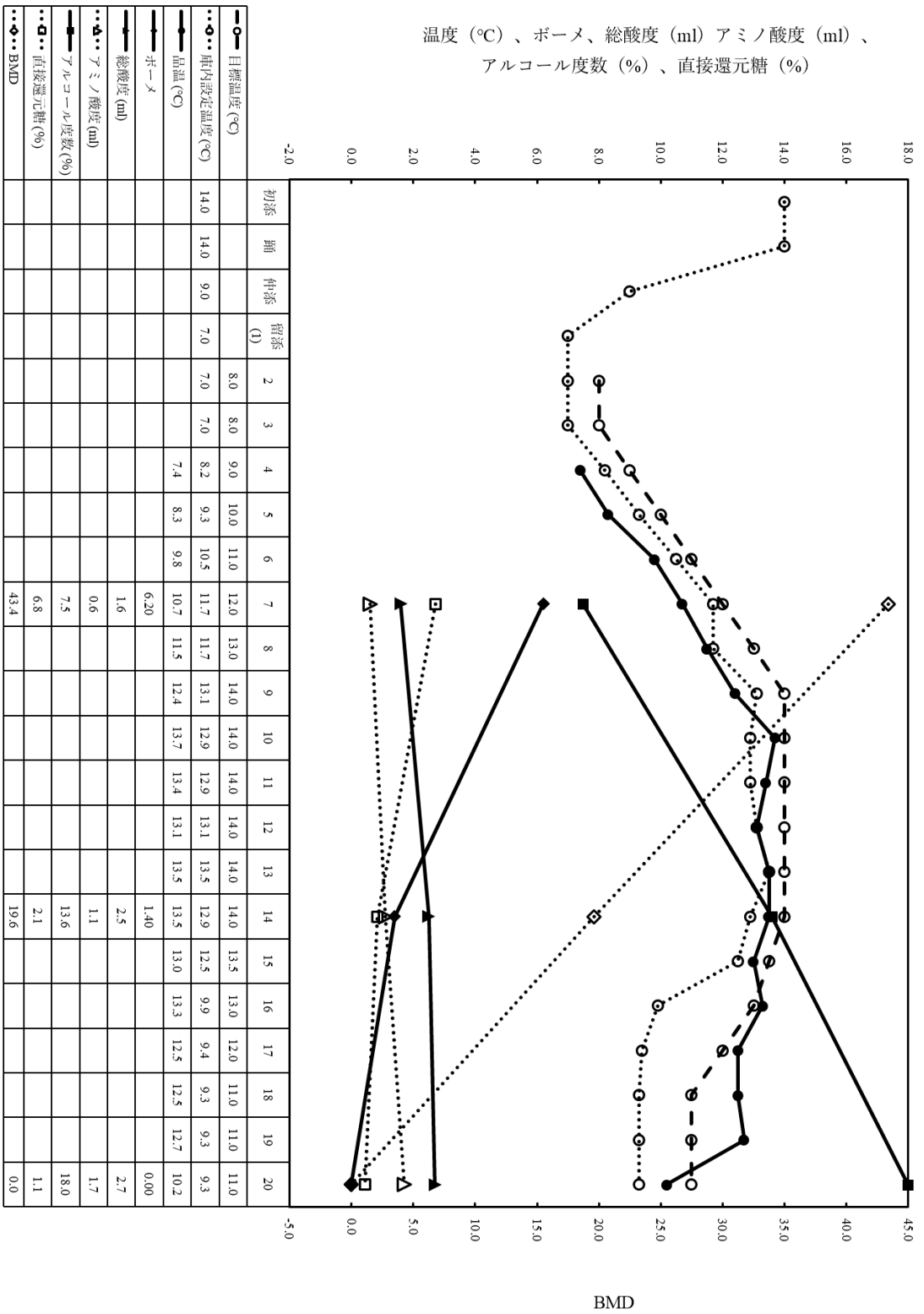


Fig. 5 K9 膠経過表

温度 (°C)、ポーム、総酸度 (ml) アミノ酸度 (ml)、
アルコール度数 (%)、直接還元糖 (%)

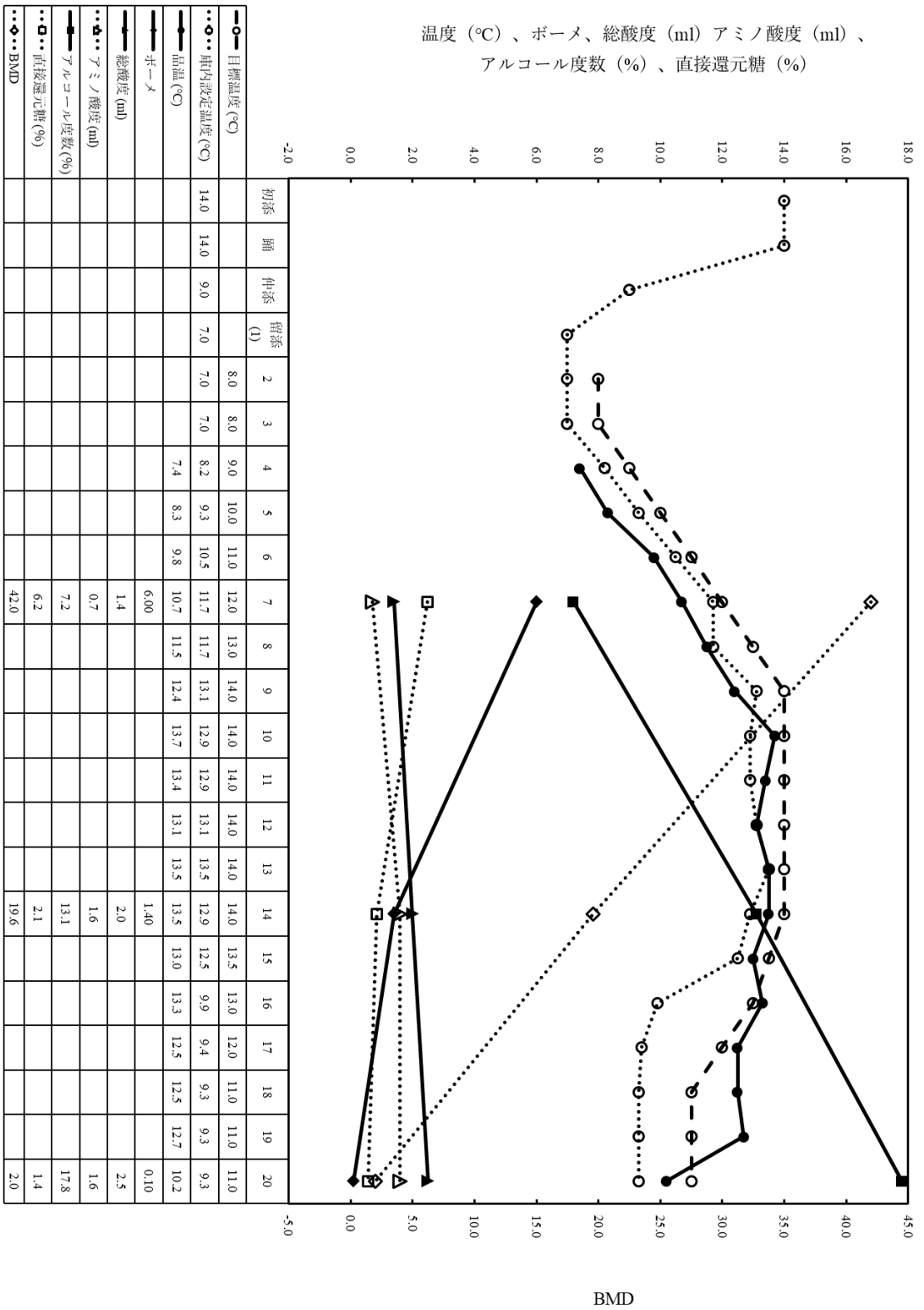


Fig. 6 BY1-1 醱経過経過表

温度 (°C)、ポーム、総酸度 (ml) アミノ酸度 (ml)、
アルコール度数 (%)、直接還元糖 (%)

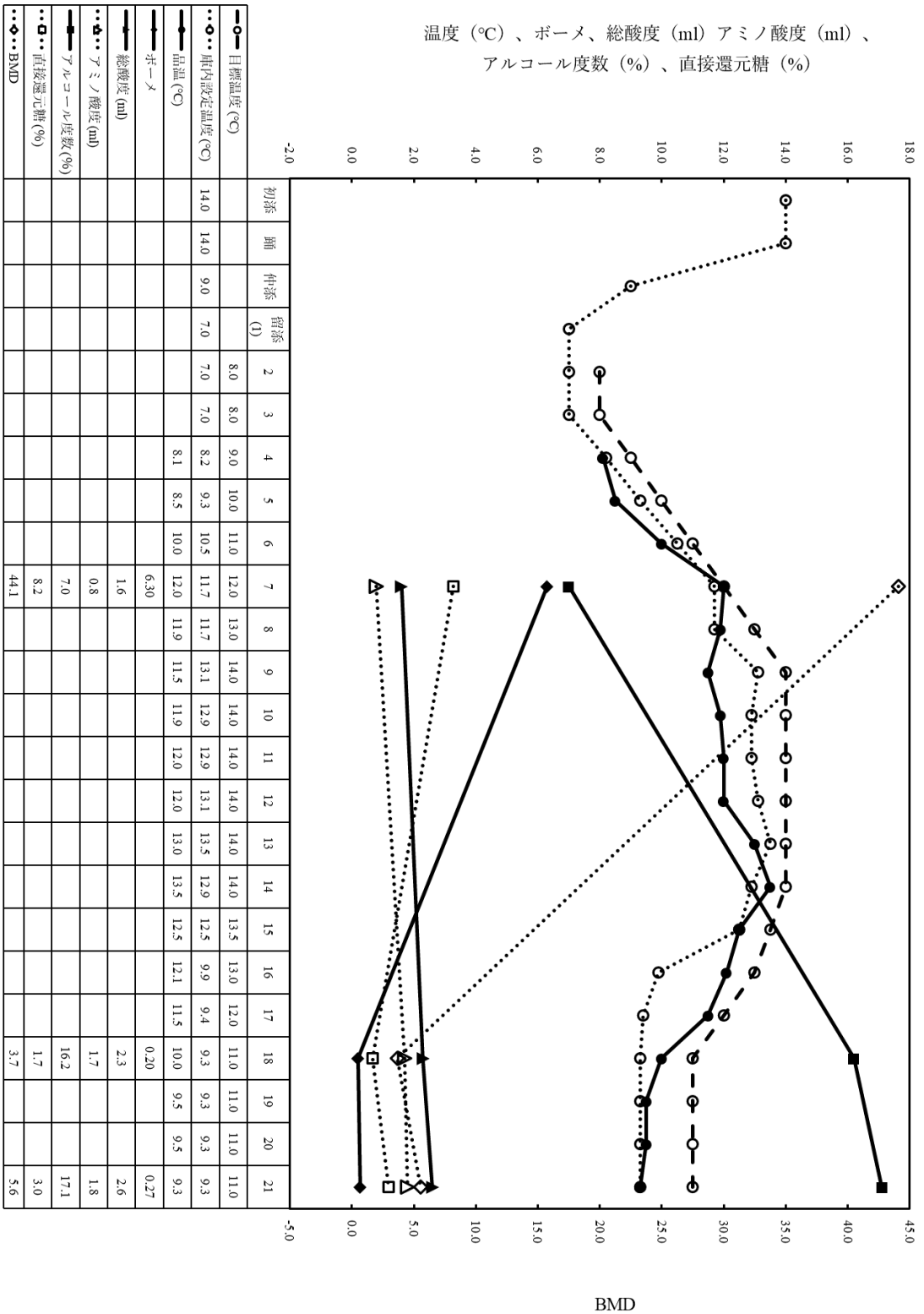


Fig. 7 BY1-2 醱経過経過表

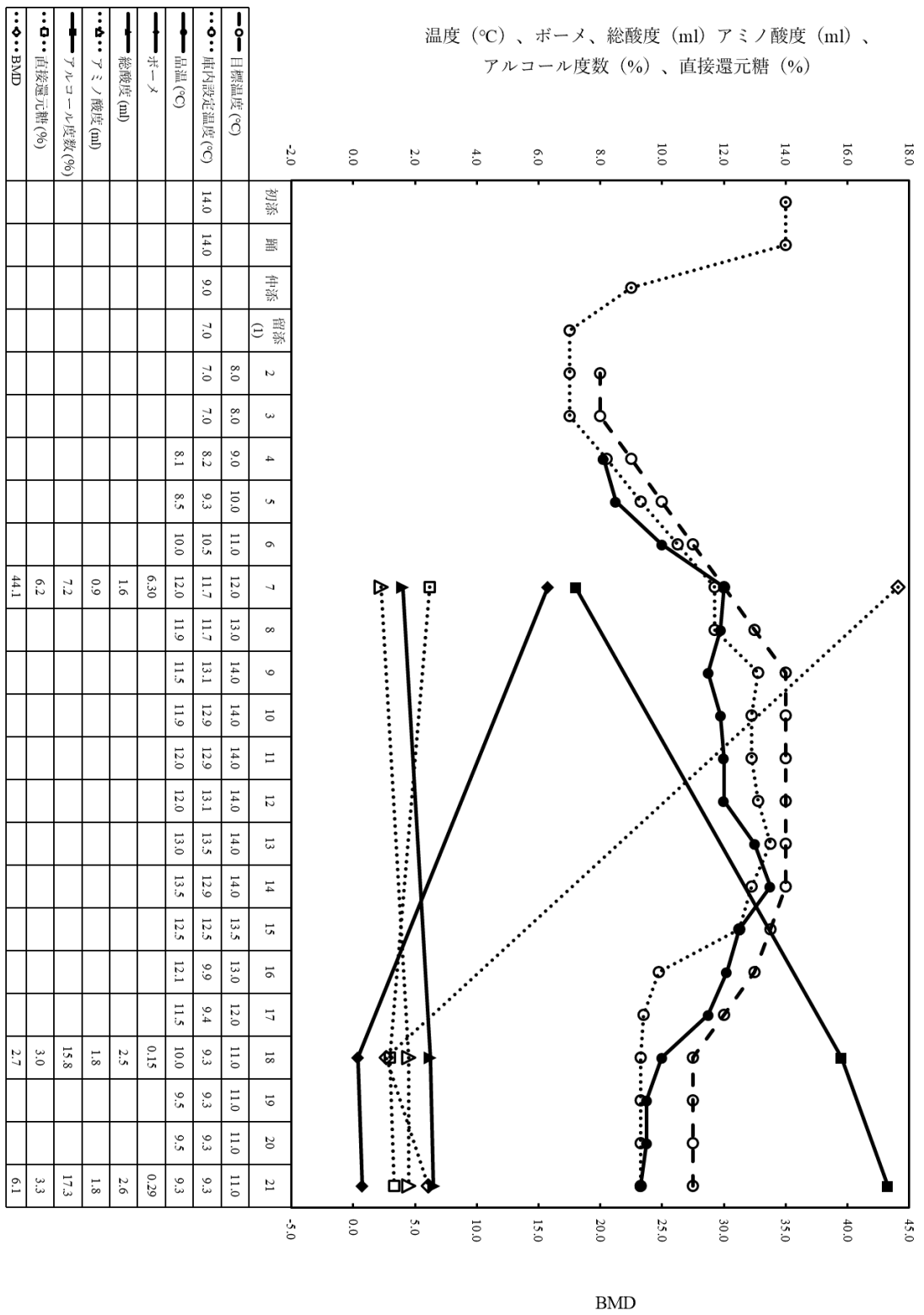


Fig. 8 BY1-3 経過経過表

温度 (°C)、ポーム、総酸度 (ml) アミノ酸度 (ml)、
アルコール度数 (%)、直接還元糖 (%)

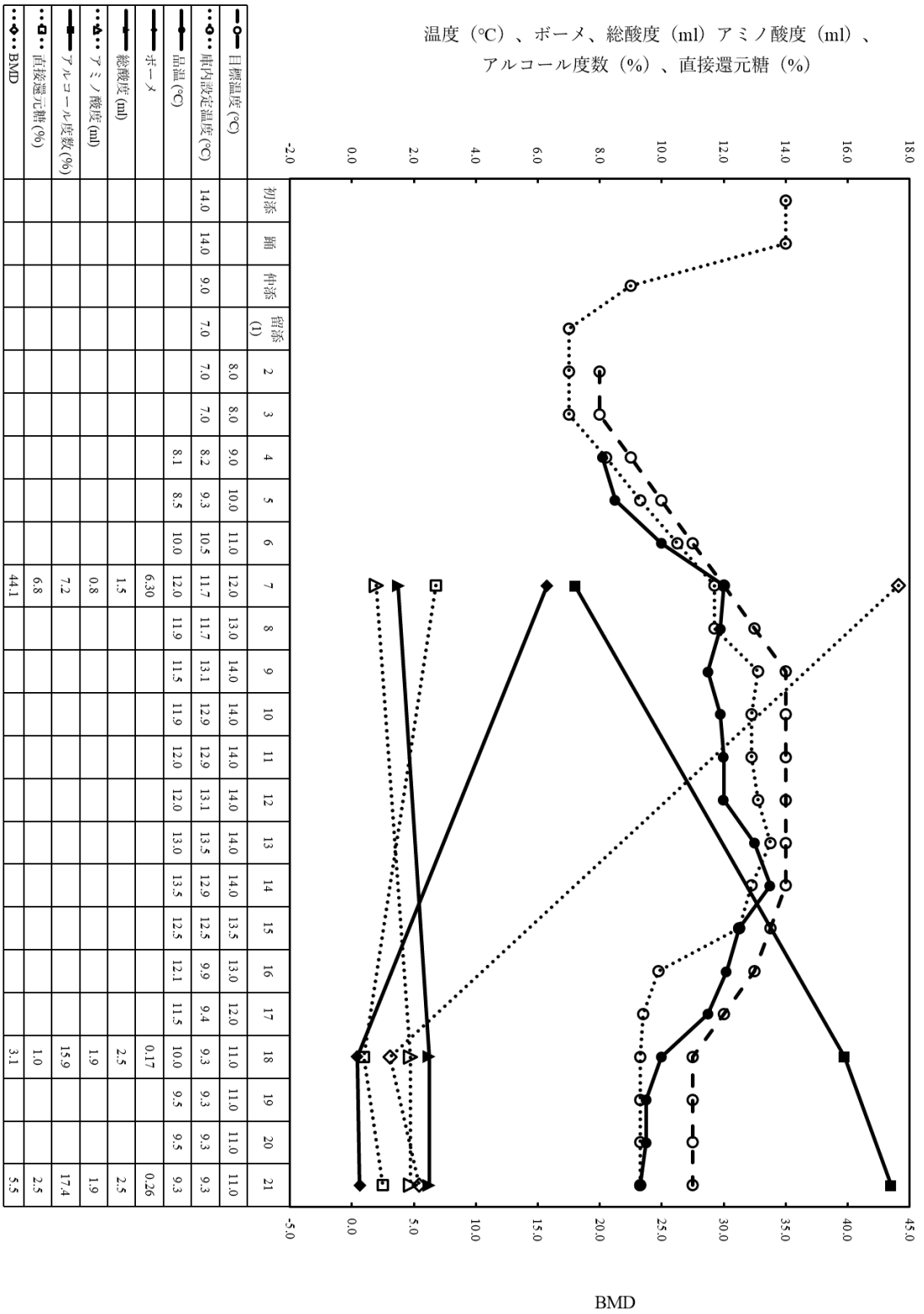


Fig. 9 BY1-4 醱経過経過表

温度 (°C)、ポーム、総酸度 (ml) アミノ酸度 (ml)、
アルコール度数 (%)、直接還元糖 (%)

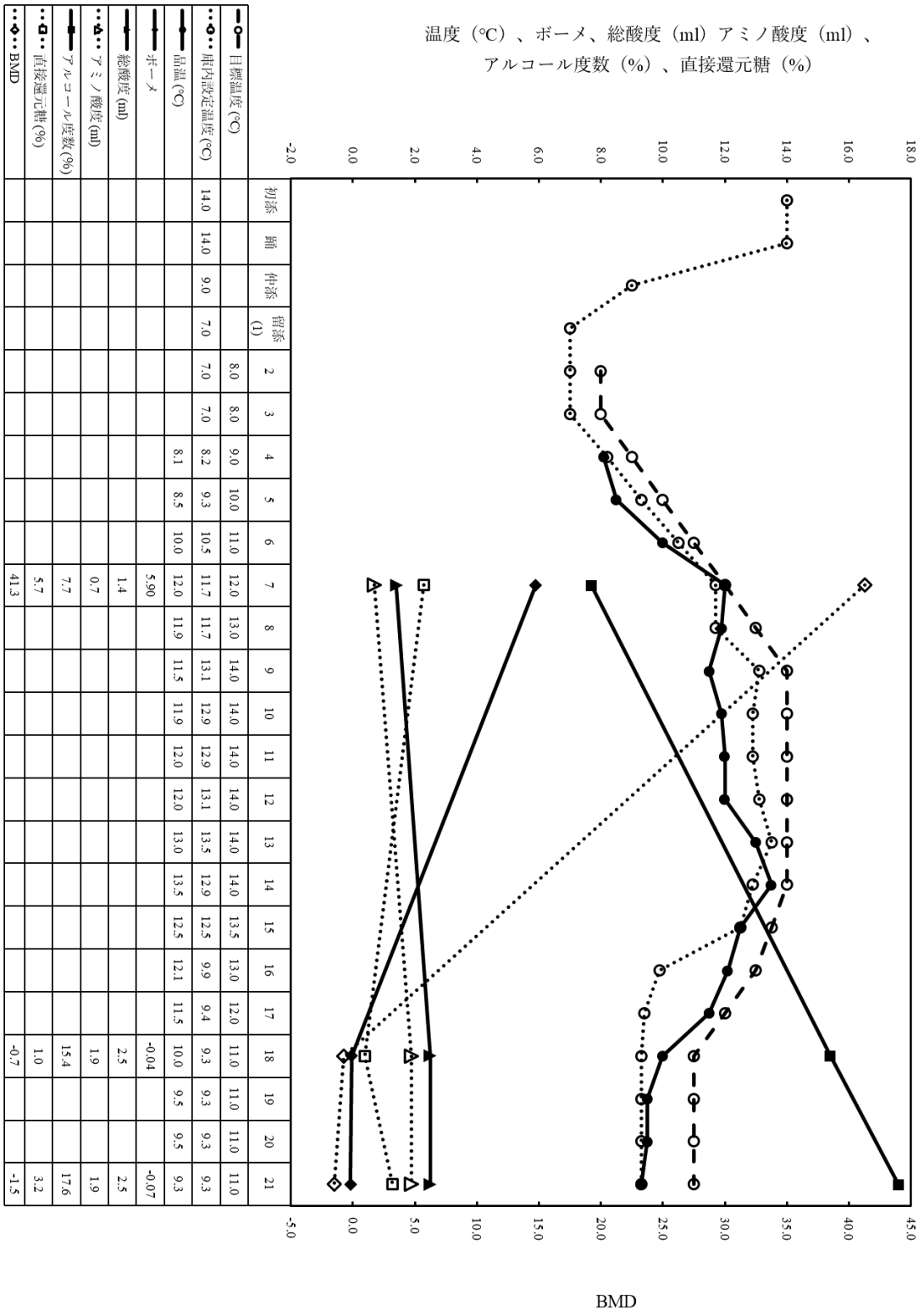


Fig. 10 BY1-5 醗経過経過表

Table 20 製成酒分析結果

	日本酒度	総酸度(ml)	アミノ酸度 (ml)	アルコール (%)	直接還元糖 (%)
K9	-7	2.6	1.5	17.1	2.4
BY1-1	±0	2.8	1.7	18.3	1.7
BY1-2	-4.7	2.4	2.0	18.7	2.0
BY1-3	-7.6	2.2	1.9	18.6	1.5
BY1-4	-9.3	2.0	1.9	17.7	3.1
BY1-5	-3.7	2.0	1.8	16.6	1.8

1-3-6 分離株の塩基配列解析および分子系統解析

アルコール発酵能力が強く、蜜リング様の吟醸香が強く感じられた BY1-1 株の 26S rDNA、ITS 領域の塩基配列を Table 21 に示した。K7 株、K9 株と BY1-1 株の D1/D2 領域および ITS 領域の相同性はどちらも 100%であった。それらの配列を連結し、*Saccharomyces* 属の酵母 9 種、K7 株、K9 株などの配列とアライメントし、系統樹を作成したところ、BY1-1 株は *S. cerevisiae* の基準株である NRRL Y-12632 株と清酒酵母である K7 株および K9 株からなる系統枝を形成し、ブートストラップ値は 100%であったことから、*S. cerevisiae* であると強く推定された (Fig. 11)。

川畑らはアルコール発酵産業で使用されている *S. cerevisiae* の ITS 領域の 6 カ所 A~F (ポジション A (*S. cerevisiae* S288C 株の ITS1 を基準に 28 番目の塩基)、B (ITS1 の 279 番目)、C (ITS1 の 301 番目)、D (ITS1 の 317 番目)、E (ITS2 の 78 番目)、F (ITS2 の 163 番目)) について、ポジション A、B、E、F でのチミンの繰り返し回数の違いを、そしてポジション C と D での塩基の違いを報告しており、また日本で分離された実用酵母 (比較検討されたすべての清酒酵母と焼酎酵母、1 種類のパン酵母) がグループを形成することも報告している⁴⁸⁾。ポジション C の塩基は S288c 株と *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 株がシトシンであるのに対して、BY1-1 株はチミンと異なる塩基であった。ポジション E、F の繰り返し回数は S288c 株がそれぞれ 8、7 回、NRRL Y-12632 株がそれぞれ 8、6 回であり、BY1-1 株はそれぞれ 9、6 回とどちらも違う繰り返し回数を示した。なお、BY1-1 株の繰り返し回数は清酒酵母である K7 株、K9 株と同じであったことから、BY1-1 株が清酒酵母 (K7 株、K9 株) と同じグループであることが示唆された。

Table 21 BY1-1 株の 26S D1/D2 領域および ITS 領域の塩基配列

領域	塩基配列
26S D1/D2	TACCTTCGGTGCCTGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGCTATGTTCCCTTGGAAC AGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTGC AGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGTAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG CGAACAAAGTACAGTGTGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAGAAATACGTGAAATTTGTTGAAA GGGAAGGGCATTGTATCAGACATGGTGTGTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTCA CTGGGCCAGCATCAGTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCT GTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTCAAGGATGTGGCATAATGGTTATATGCC
ITS	AAGAAATTAATAATTTTGAAGATGGATTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGCAAGAAGA CAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGCCCTGCGCTTAAGTGCAGCGTCTTGCTAGGCTTGTAAAGTTCTTTCTTG CTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACACACACTGT GGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAAC AATTTTATTTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAGTGGAAATTTTAAATATTAACAACTT TCAACAACGGATCTCTTGGTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATGCAGA ATTCGGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGATGCCTGTTTGGAGC GTCATTTCTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACCTTTGGAGTTAACTTGAATGCTGGCCCTT TTCATTGGATGTTTTTTTTTCAAAGAGAGGTTTCTGCGTGTCTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCTGTTTT AGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCT AGCGAACAATGTTCTTAAAGT

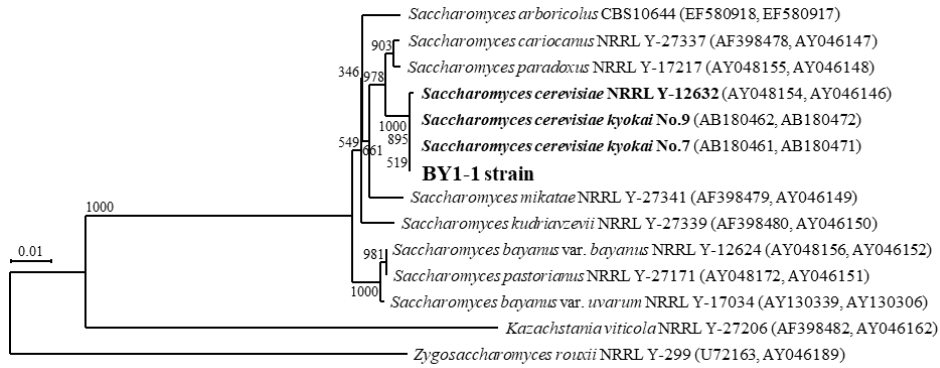


Fig. 11 各種酵母と BY1-1 株の系統樹

Table 22 ポジション A~F の塩基あるいはその繰り返し回数

	ポジションA Tの繰り返し数	ポジションB Tの繰り返し数	ポジションC 塩基の種類	ポジションD 塩基の種類	ポジションE Tの繰り返し回数	ポジションF Tの繰り返し回数
<i>S.cerevisiae</i> S288c	7	1	C	T	8	7
<i>S.cerevisiae</i> NRRL Y-12632	7	1	C	T	8	6
<i>S.cerevisiae</i> Kyokai No.7	7	1	T	T	9	6
<i>S.cerevisiae</i> Kyokai No.9	7	1	T	T	9	6
BY1-1	7	1	T	T	9	6

1-3-7 実地醸造

実用化試験として BY1-1 株を用いた総米 696 kg の清酒仕込みを行った(Fig. 11)。製成酒の一般成分、香気成分および有機酸成分を Table 23 に示した。製成酒のアルコール濃度、日本酒度、酸度、アミノ酸度は、それぞれ 17.0%、-3.57、1.60 mL、1.33 mL であった。

BY1-1 株の製成酒のカプロン酸エチルと酢酸イソアミルの濃度は、それぞれ 2.63, 0.37 mg/L であった。カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミルは、それぞれ蜜リンゴ様およびバナナ様の芳香を呈する化合物であり、その認識閾値はそれぞれ約 0.3~0.4 mg/L および約 0.9 mg/L であることから⁴⁹⁾、BY1-1 株の製成酒には、それらのうち蜜リンゴ様の吟醸香のみが感じられることがわかる。

微生物工学研究室では、様々な花を分離源として清酒製造用酵母の分離を試みており、分離酵母の中には BY1-1 株と同様に製成酒の酢酸イソアミル濃度が認識閾値未満となる酵母、ND4 株、AB2 株が存在する⁴⁵⁾。それらのカプロン酸エチル濃度は、ND4 株が 7.1 mg/L、AB2 株が 5.8 mg/L であるため、BY1-1 株は ND4 株や AB2 株と比較し、蜜リンゴ様の吟醸香の生成能が低い酵母であるといえる。BY1-1 株の製成酒のイソアミルアルコールとイソブチルアルコールの濃度は、それぞれ 86.2, 31.6 mg/L であり、イソアミルアルコール濃度/イソブチルアルコール濃度 (A/B) は 2.73 であった。イソアミルアルコールについて、他の花からの分離酵母の数値 115~237 mg/L⁴⁵⁾ と比較すると、低い値を示した。そのため A/B の値も、他の花からの分離酵母の数値 3.1~4.1 と比較し低い数値であった。香りの軽さは、イソブチルアルコール濃度とは負の相関が、一方で A/B とは正の相関があることが知られているため⁵⁰⁾、BY1-1 株の製成酒は、他の分離株と比較し落ち着いた香気であることを示している。また、BY1-1 株の製成酒の酢酸エチルは、17.1 mg/L であった。酢酸エチルは、清酒の香りにおいてシンナー様臭で例えられるオフフレーバーの原因物質である。その検知閾値は 24 mg/L であり、「酢酸エチル」、「セメダイン」などとして認知される濃度は約 80 mg/L⁴⁹⁾ であるため、BY1-1 株の製成酒は酢酸エチルに起因するオフフレーバーが検知されないことを示している。このように、BY1-1 株は、市販吟醸酒の平均程度のカプロン酸エチルを生成し、かつ酢酸イソアミルの生成能は低く、低い A/B を示す株であり、酢酸エチルが検知されない製成酒を製造可能な酵母であった。

BY1-1 株の製成酒のリンゴ酸とコハク酸の濃度は、それぞれ 432, 291 mg/L であり、リンゴ酸濃度/コハク酸濃度 (MA/SA) の値は 1.48 であった。著者らが分離した他の酵母のリンゴ酸含有量 : 340~497 mg/L、コハク酸含有量 : 328~524 mg/L、MA/SA : 0.88~1.26⁴⁵⁾ と比較すると、BY1-1 株は低コハク酸生成と高 MA/SA が特徴であった。リンゴ酸とコハク酸は、清酒に含有される有機酸の中でも乳酸に次いで量が多い有機酸であり、リンゴ酸は爽やかな酸味を、コハク酸は旨味やコクを付与することから、清酒の風味形成において重要な有機酸であるといえる⁵¹⁻⁵³⁾。また、リンゴ酸とコハク酸の存在比によりリンゴ酸の爽やかな酸味の感じやすさに変化し、特に MA/SA 比の値が高いとリンゴ酸の爽やかな酸味が感じられやすいことが示唆されている⁴⁹⁾。そのため、BY1-1 株の製成酒は、リンゴ酸の爽やかな酸味が感じられやすいといえる。BY1-1 株の製成酒の酢酸の濃度は 20.8 mg/L であった。酢酸は清酒のオフフレーバーの一つである酸臭の原因物質であり、37~39 mg/L で検知され、約 110 mg/L で「酢酸」「酸臭」と認知される^{49,54)} ことから、BY1-1 株の製成酒は酸臭が認識されないといえる。BY1-1 株の製成酒のピルビン酸の含有量

は 32.9 mg/L であった。ピルビン酸は、酵母によるアルコール発酵の中間体であり、醗育成初期にその濃度が最も高くなり、育成が進むとともに濃度が減少していく^{55,56)}。ピルビン酸濃度が高いもろみを上槽すると、アセトアルデヒドに変換されオフフレーバーの一つである木香様臭の原因となる⁵⁷⁾。また、ピルビン酸は α -アセト乳酸にも変換され、それがさらに非酵素的な酸化的脱炭酸反応によりジアセチルに変換されて、つわり香の原因にもなる⁵⁸⁾。これらのことから醗中のピルビン酸濃度は発酵管理および上槽のタイミングを計るうえで重要な指標であり、上槽は 100 mg/L 以下の濃度で行うことが目安となっている。BY1-1 株の製成酒のピルビン酸濃度は 32.9 mg/L であり、木香様臭やつわり香が生じにくい酒質であるといえる。このように、BY1-1 株は、低コハク酸生成と高 MA/SA が特徴であり、酸臭、木香様臭、つわり香などが認知されない、あるいは生じにくい製成酒を製造可能な酵母であった。

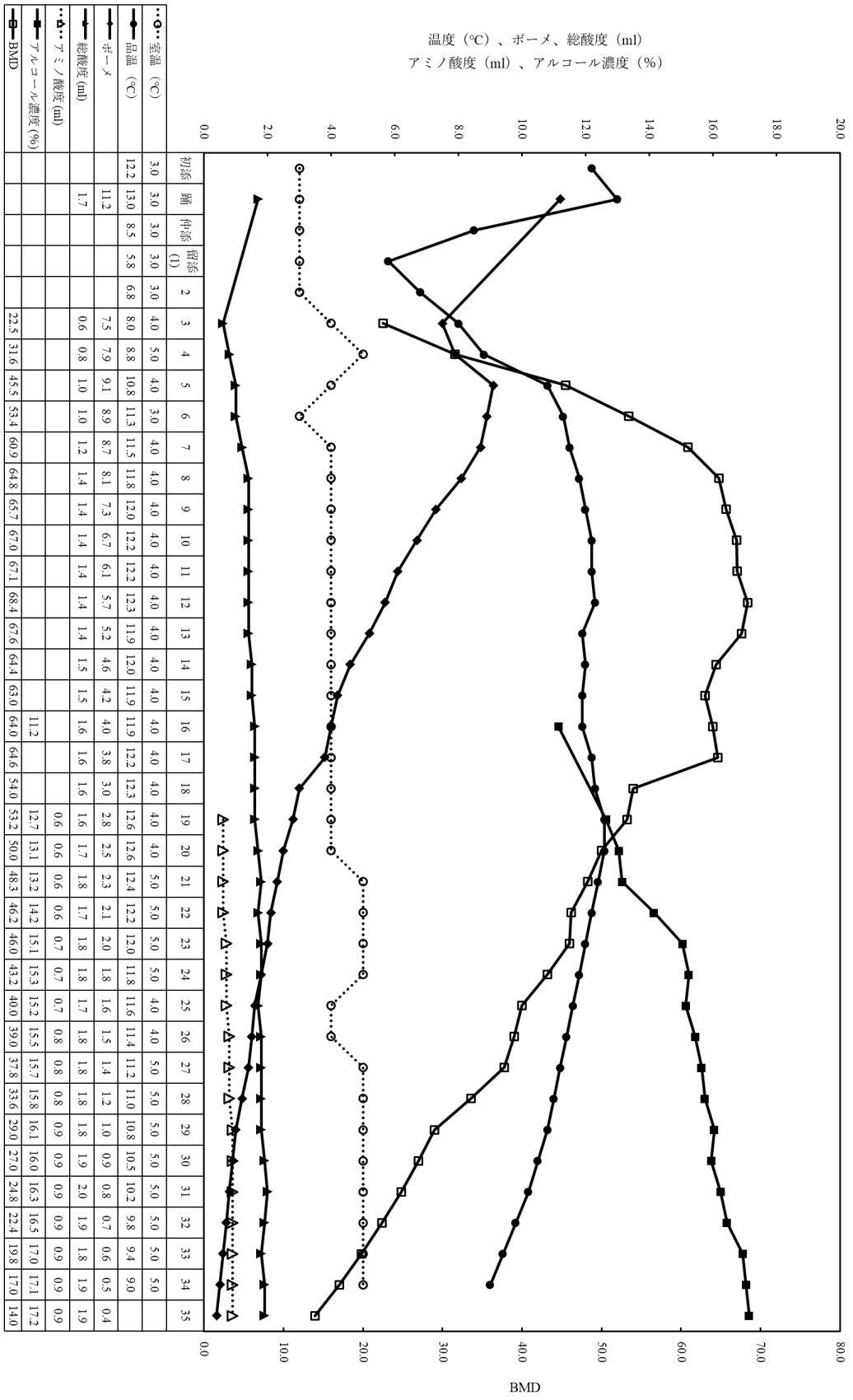


Fig. 12 BY1-1株を用いた総米 696 kg 実地験

Table 23 実地醸造の各種成分分析

一般成分	香気成分(mg/L)		有機酸成分(mg/L)		
日本酒度	-3.57	カプロン酸エチル	2.63	乳酸	645
アルコール (%)	17.0	酢酸イソアミル	0.37	リンゴ酸	432
酸度(ml)	1.60	イソアミルアルコール	86.2	コハク酸	291
アミノ酸度(ml)	1.33	イソブチルアルコール	31.6	クエン酸	86
		酢酸エチル	17.1	ピルビン酸	32.9
				酢酸	20.8

1-4 小括

既存の集積培地よりも清酒製造用酵母を効率的に集積できる培地を目的に、各種実用酵母はビタミンの要求性が異なり、それに加えて清酒酵母がビタミン非要求であることを利用して新規集積培地の基礎培地の設計を行った。また、抗菌物質としては様々な酵母のなかでも清酒酵母は例外なく耐性を有する Yeastcidin を添加することにし、新規集積培地 BY 培地を設計した。

この培地を用いて実用酵母を用いた増殖試験を行った結果、清酒酵母 K6 株、K7 株、K9 株と焼酎酵母 SH4 株のみの増殖が確認され、他の酵母（焼酎酵母 A11 株、A12 株、泡盛酵母、ワイン酵母、ビール酵母、実験室酵母）の生育を抑制することが確認された。この結果から BY 培地は、新規集積培地として有望であると判断し、実際に分離源を添加した実験を行った。

清酒製造用酵母の分離において、これまで微生物工学研究室で利用され続けている KY 培地と BY 培地の 2 つを利用して酵母の分離を試みたところ、BY 培地からのみアルコール発酵能力が高い酵母 BY1-1~4 株を分離することができた。BY1-1~4 株の中で、小仕込み試験において官能的に吟醸香を強く感じた BY1-1 株の分子系統解析を行ったところ、*S. cerevisiae* であることが強く示唆された。本株の実地醸造（総米 696 kg）で得られた製成酒は、その成分値から落ち着いたカプロン酸エチルの香気が感じられ、リンゴ酸の爽やかな酸味が感じられやすい酒質であることが示された。本研究で取得することができた BY1-1 株は、カプロン酸エチル生成能があり、低コハク酸生成、高 MA/SA などの特徴を示す酵母であり、実用化に耐えうる酵母であった。今後、特徴的な風味を形成できる実用酵母として BY1-1 株の清酒製造における利用が期待される。

本章における研究によって、ビタミンを含まない集積培地というこれまでに報告されている清酒製造用酵母の分離を目的とした様々な集積培地とは異なる新規集積培地の開発に成功した。

第2章 清酒酵母のビタミン非要求性を利用した抗菌物質非添加集積培地の開発と新規清酒製造用酵母の分離

2-1 緒言

前章において、清酒酵母のビタミン非要求性と Yeastcidin の抗菌効果を利用した新規集積培地である BY 培地を設計し、BY 培地で集積培養することで清酒製造への実用可能性が高い酵母の分離に成功した。同じ分離源から分離を試みたにも関わらず、微生物工学研究室で従来使用してきた KY 培地では清酒製造用酵母の分離が出来なかったことから、BY 培地は従来の培地よりも酒造適性のある *S. cerevisiae* を効率的に分離可能な培地であると考えられる。

しかし、BY 培地では Yeastcidin を使用していることから、Yeastcidin の高生産株を所有している研究者しか作製することができない集積培地だった。そのため、近年多くの大学や県の技術センターなどで清酒製造用酵母の分離が試みされているが、それらの実施者には調製することができない。清酒の風味の多様性を増やすためには、多くの研究者が利用することでき、酒造適性のある *S. cerevisiae* を、効率的に分離することのできる集積培地の開発が求められている。

そこで、本章では酵母の分離を試みる研究者が幅広く利用できる、Yeastcidin や薬剤を使用せず、新規清酒製造用酵母の分離に適性がある新規集積培地の開発を目的とし、1章で開発した BY 培地の改良を行った。

2-2 実験方法

2-2-1 集積培地を用いた各種酵母の増殖試験

a. 集積培地の調製

KY 培地と BY 培地は、1-2-2 a-1 および a-2 と同様に調製した。Buffer 欠如ビタミン欠如培地 (BV 培地) は、Table 24 に示す組成の溶液を調製し、オートクレーブ (121°C、15 min.) で滅菌後、乳酸 0.32 mL とカゼイン 4 g を添加して調製した。

Table 24 BY 培地および BV 培地組成

	BY培地	BV培地
Glucose	130 g	130 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	2 g
L-Asparagine	0.5 g	—
KH ₂ PO ₄	0.23 g	0.55 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.125 g	0.125 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.125 g	0.125 g
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.028 mg	2.5 mg
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.024 mg	2.5 mg
D.W.	1000 mL	1000 mL

b. 増殖確認試験

増殖確認試験は、1-2-2 b と同様に実施し、増殖試験培地として BY 培地および BV 培地を用いた。

2-2-2 集積培養

集積培養は、1-2-3と同様に実施し、増殖試験培地としてBY培地およびBV培地を用いた。

2-2-3 産膜性およびTTC染色試験

産膜性およびTTC染色試験は1-2-4と同様に実施した。

2-2-4 小規模発酵試験

容器に乾燥麴4g、 α 化米14.5g、水34mL、乳酸0.11mLを入れ、2mLYM培地で25°Cで3日間前培養した供試菌株を1.3mLを添加し、攪拌した。醪を15°Cで20日間育成し、育成期間中は週に3回攪拌を行った。対照株としてK901株を使用した。20日間の育成後、醪を遠心分離(8000rpm、4°C、10min.)して上清を回収・濾過し、濾液を用いて一般成分分析を行った。

2-2-5 分離株の清酒小仕込み試験

清酒の小仕込み試験は、総米400gの三段仕込み(麴歩合20%、汲水歩合150%)で実施した(Table 25~27)。三段仕込みは、Table 27に示す仕込み配合に従い実施したが、 α 化米と乾燥麴を使用したため、実際に添加した重量はTable 28~30に示す量とした。

酒母については、使用する米の量が少ないため、別に総米200gの高温糖化醪(汲水歩合200%、麴歩合30%)をたてた(Table 28)。 α 化米133gと熱湯331.8mlを混ぜ、品温が60°C前後になった時点で乾燥麴51.6gを添加し、55°Cで一晩糖化した。翌日、糖化液に氷125gを添加して25°Cにまで温度を下げ、乳酸2.8mlとYM培地で前培養した供試菌株1.6mlを添加し、攪拌した。25°Cで2日間培養後、15°Cで培養した。酒母の濾液の一般成分分析を行い、ボーメ7以下、酸度7ml以上を酒母完成の目安とした。対照株K9株と分離株それぞれについて酒母をたて、醪については完成した各酵母の酒母から3本の醪をたてた。

完成した酒母58.8gに氷水、米麴、十分に冷やした蒸米を添加して攪拌することで初添を行った。初添後の目標温度は15°Cとした。仲添、留添は初添と同様に行い、目標温度はそれぞれ10°C、8°Cとした。留添の日を醪1日目とし、醪4日目から醪最高濃度が13.5°Cになるまで毎日1°Cずつ温度を上昇させた。その後13.5°Cを17日目まで維持し、18日目から10°Cになるまで毎日0.5°Cずつ温度を下降させた。発酵期間中は週一回分析を行い醪の発酵経過を確認した。発酵終了後、遠心分離(8000rpm、4°C、10min.)を行い、上清を回収・濾過した。濾液を3日間4°Cで滓下げたものを製成酒とした。醪育成中の醪濾液および製成酒の一般成分分析および有機酸分析、香気成分分析は1-2-7に記す方法で実施した。

Table 25 酒母仕込み配合表

総米(g)	200.0
蒸米(g)	140.0
麴米(g)	60.0
汲水(ml)	400.0
乳酸(ml)	2.8
酵母培養液(ml)	1.6

※表中の米は白米換算重量

Table 26 酒母仕込み汲水配分表

糖化仕込み(ml)	275.0
冷却水(g)	125.0
合計(ml)	400.0

Table 27 総米 400 g 醪仕込み配合表

	酒母	初添	仲添	留添	合計
総米 (g)	28.0	64.0	120.0	188.0	400.0
掛米 (g)	19.6	46.1	93.6	160.7	320.0
麴米 (g)	8.4	17.9	26.4	27.3	80.0
汲水 (mL)	56.0	70.4	150.0	323.6	600.0

※表中の米は白米換算重量

Table 28 酒母仕込み添加量

α化米(g)	133.0
乾燥麴(g)	51.6
汲水(ml)	456.8
乳酸(ml)	2.8
酵母培養液(ml)	1.6

Table 29 酒母仕込み汲水配分表(α化米使用時)

糖化仕込み(ml)	331.8
冷却水(g)	125.0
合計(ml)	456.8

Table 30 醪仕込みにおけるα化米および乾燥麴を用いた際の添加量

	酒母	初添	仲添	留添	合計
α化米 (g)	13.0	43.8	88.9	158.3	304.0
乾燥麴 (g)	5.1	15.4	22.7	25.6	68.8
汲水 (mL)	44.8	88.7	185.0	399.0	717.5

2-2-6 分離酵母のキラー性確認試験

YEPD 培地 (Glucose 2%, Polypeptone 2%, Yeast extract 1%, Agar 2.5%, pH 4.7) にメチレンブルー0.003%添加した寒天培地に K6 株、K7 株、K9 株 (1×10^8 cells/mL) をそれぞれ 50 μ L 塗抹し、分離酵母をその上に植菌した後、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クリアゾーンを観察した。

2-2-7 分離株の 26S rDNA D1/D2 領域および ITS 領域による塩基配列解析および分子系統解析

塩基配列解析および分子系統解析は、1-2-7 と同様に実施した。

2-3 結果および考察

2-3-1 集積培地を用いた各種酵母の増殖試験

前章で BY 培地の有用性について各種供試菌株を用いて確認した際、対照として KY 培地を使用した。その結果、Yeastcidin 耐性がないとされるいくつかの供試菌株が、培養時間が長くなると

ともに増殖する現象が KY 培地でみられ、一方で BY 培地ではその現象が見られなかった (Fig. 1~4)。この結果から、Yeastcidin 耐性よりもビタミン非添加の方が、選択圧が高いと考えられた。そこで、清酒製造用酵母の集積を目的とした培地としてビタミン欠如培地を用いれば Yeastcidin を添加しなくても酵母を分離できるのではないかと考え、Table 24 に示す組成の Yeastcidin 非添加かつビタミン欠如の培地 (BV 培地) を設計した。各種酵母を BY 培地、BV 培地に植菌し、増殖確認試験を行った。

清酒酵母については、BY 培地では K7 株が 48 時間、K6 株が 60 時間、K9 株が 84 時間でそれぞれ増殖が確認され、BV 培地では K7 株が 60 時間、K6 株と K9 株 72 時間で増殖が確認された (Fig. 13)。増殖量については BY 培地、BV 培地の間で大きな差は確認できなかった。また、前章と同様に、35°C の培養温度でパントテン酸の要求性を示す K7 株の増殖が BY 培地、BV 培地どちらでも確認されたことから、25°C の培養ではパントテン酸の要求性を示さないことが示唆された。

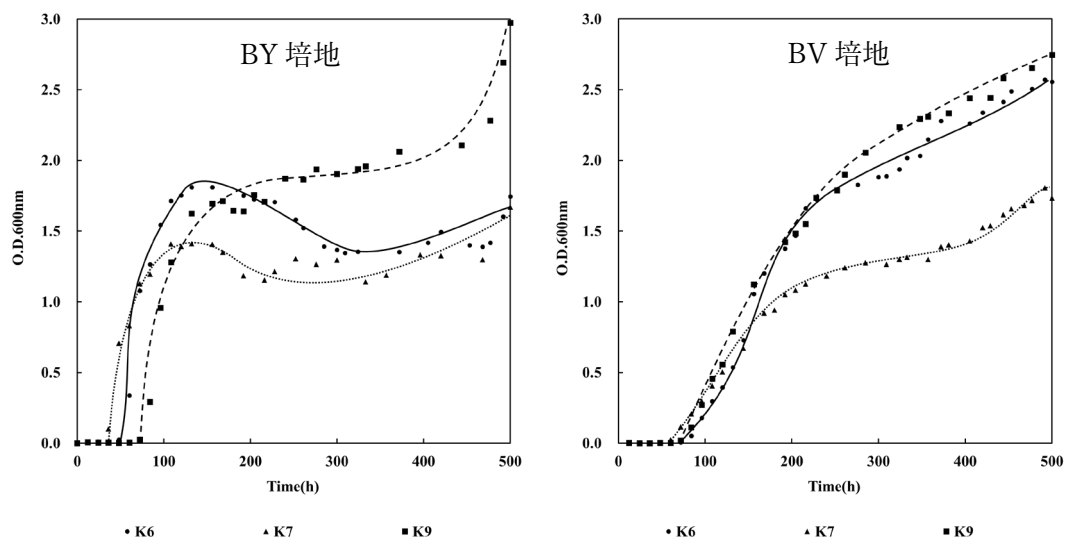


Fig. 13 清酒酵母 (K6 株、K7 株、K9 株) の増殖試験

焼酎・泡盛酵母については、BY 培地で SH4 株の増殖が 132 時間で確認された一方で、A11 株、A12 株、Aw 株は 500 時間の培養後でも増殖が確認されなかった。BV 培地での増殖は、A12 株で 156 時間、SH4 株では 264 時間で確認できたが、A11 株、Aw 株は 500 時間の培養後でも増殖は確認されなかった (Fig. 14)。これは A11 株についてはパントテン酸の要求性が、Aw1 株はパントテン酸とチアミンの要求性があり⁴³⁾、BY、BV 培地にはこれらのビタミンが含まれない為生育が抑制されたと考えられる。A12 株についてはパントテン酸の要求性を示すが、BV 培地でのみ生育が確認されたことから、BY 培地では Yeastcidin によって生育が抑制されていたと考えられる。

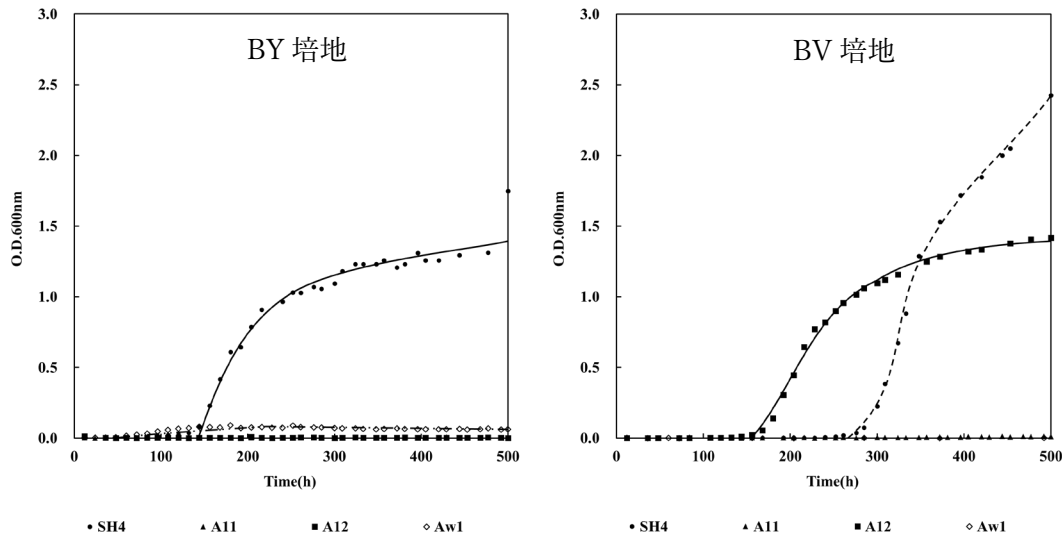


Fig. 14 焼酎・泡盛酵母（SH4 株、A11 株、A12 株、Aw1 株）の増殖試験

ビール酵母、ワイン酵母、実験室酵母についてはBY 培地、BV 培地ともに試験した8 株すべての生育が確認できなかった。OC2 株、IFO2215 株、IFO2300 株、IFO2000 株、IFO2011 株はパントテン酸およびビオチンの要求性があることから BY 培地での増殖見られなかったと考えられた^{43, 47}。ワイン酵母（Kw1 株）や実験室酵母（S288c 株）については、ビタミン要求性が報告されていないが、各種 *S. cerevisiae* 株で報告例のあるパントテン酸、ビオチン、チアミン、イノシトール、ピリドキシンなどのビタミンに対する要求性があるために増殖できなると予想された（Fig. 15）。

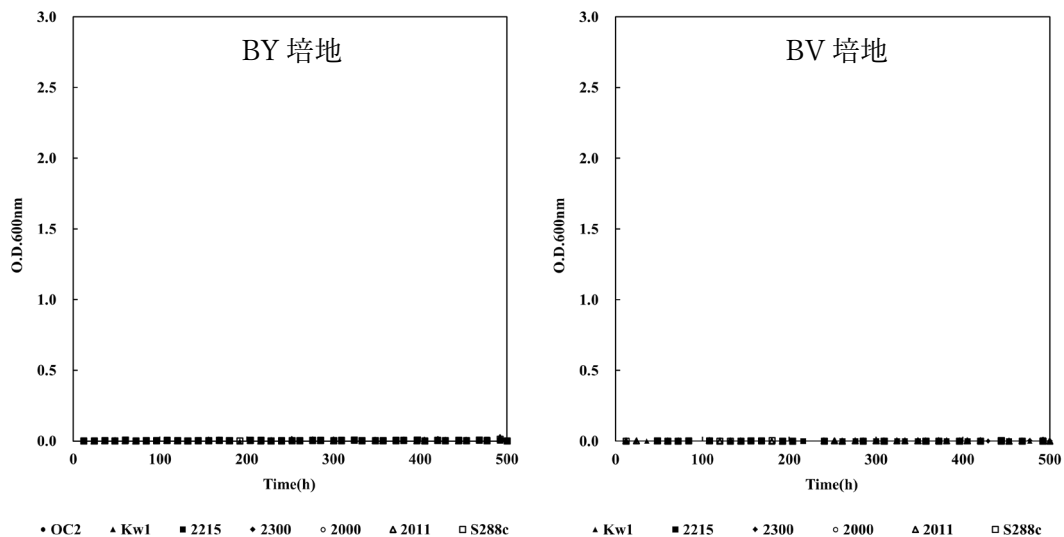


Fig. 15 ワイン・ビール・実験室酵母（OS2 株、Kw1 株、IFO2215 株、IFO2300 株、IFO2000 株、IFO2011 株、S288c 株）の増殖試験

2-3-2 集積培養

BV 培地と著者らがこれまで自然界からの酵母の分離で利用してきた Yeastcidin を含有してい

る2種類の集積培地 (KY 培地および BY 培地) に八重桜の花を添加して酵母の集積を試みた。花を添加し、7日間集積培養を行ったところ、BV 培地で Brix 糖度 12%から 3%に、BY 培地では 12%から 4%に、KY 培地では 18%から 6.4%に Brix 糖度が低下しており、それぞれの集積培地で強い発泡性も確認された。一方で、分離源を添加しなかった培地では糖度の低下は認められなかった。糖度の低下と強い発泡性が見られた集積培養液を 6%エタノール含有 TTC 下層培地に塗抹して培養し、生じたコロニーをそれぞれの集積培地毎に 5つ釣菌して培養した。BV 培地由来の2株については培養中にカビが生育したため廃棄した。その結果、BV 培地から 3株、BY 培地から 5株、KY 培地から 5株の分離株を取得することができた。それらの産膜性および TTC 還元性を試験したところ、すべての分離株は産膜性を示さず、TTC 還元性は RED であった。

3-3-3 分離株の小規模発酵試験

分離株を用いて総米 20 g 相当の小規模発酵試験を実施したところ、対照株とした K901 株の醪濾液の日本酒度は+8、アルコール濃度は 17.1%であった。それに対し、BV-2 株、BV-3 株、BY-4 株は日本酒度がプラスの数値となり、アルコール濃度が対照株と同等の値となった 3株が存在した。一方で、他の 10株については、BV-1 株 (日本酒度-17、アルコール濃度 14.6%) のように日本酒度がマイナスで止まり、アルコール濃度も 13~15%と低い値であった。

Table 31 小規模発行試験結果

Strain	Sake meter	Alcohol (%)
K901	+8	17.1
BV-1	-17	14.6
BV-2	+11	17.3
BV-3	+2	17.2
BY-1	-21	14.3
BY-2	-28	14.2
BY-3	-23	14.2
BY-4	+6	16.8
BY-5	-20	14.1
KY-1	-8	15.3
KY-2	-19	14.4
KY-3	-20	14.3
KY-4	-27	13.4
KY-5	-21	13.7

2-3-4 分離株の清酒小仕込み試験

小規模発酵試験で日本酒度がプラスの値となった BV-2、BV-3、BY-4 株を用いて清酒小仕込み試験を行った。小規模発酵試験において 3株ともに高泡形成を示したことから、清酒小仕込みの対照株として K901 株ではなく K9 株を用いた。

酒母は高温糖化醗をたて、6日目の分析で酸度が目安となる 7 ml を超え、ポーメについても BV-2、3 株が Be 7 を下回ったことから 7日目に三段仕込みの酒母として利用した (Table 32~36)。

醪については、1つの酒母から 3本の醪をたて、仕込みを行った。醪は順調に経過し、醪 25日目で K9 株および BV-2 株でポーメが 0 を下回ったため、上槽した。BV-3、BY-4 株についてはポーメ 0 より高いものの他の株との比較のために 25日目に同時に上槽を行った (Fig. 15~26)。

K9株の製成酒の日本酒度とアルコール濃度は、それぞれ+5、19.5%であった。BV-2株は日本酒度とアルコール濃度が+9、20.2%であり、K9株よりも有意に高い数値であった。BV-3株は、それぞれ-3、18.9%であり、K9株よりも発酵力がわずかに劣るが、醪日数を延ばすことで日本酒度がプラスの数値にまで上昇し、アルコール度数も上昇すると期待される。一方で、BY-4株は日本酒度-18、アルコール濃度が16.8%であり、対照株よりもアルコール発酵能力が低い株であった。

BV-2株の製成酒の総酸度とアミノ酸度はそれぞれ3.3 mLと1.6 mLであり、K9株の3.7 mLと1.4 mLと比較すると総酸度が低くアミノ酸度は高かった。BV-2株とK9株の製成酒の香気成分および有機酸成分を比較するとクエン酸と乳酸を除く成分すべてで有意に含有量が異なっていた。リンゴ酸（K9株の約0.36倍）、コハク酸（約0.84倍）、酢酸エチル（約0.69倍）、酢酸イソアミル（約0.55倍）、カプロン酸エチル（約0.69倍）の低生成、酢酸（約2.1倍）、イソブチルアルコール（約1.1倍）の高生成がBV-2株の特徴であった。製成酒の利き酒を行ったところK9株およびBV-2株の製成酒の酢酸の含量が高かったが（K9：229 mg/L、BV-2：470 mg/L）、顕著な酸臭は感じられなかった。また、その他のオフフレーバーについても感じられなかったことから、K9株よりもアルコール発酵能力が高い酵母として実用化が期待される分離株であった。

BV-3株の製成酒の総酸度とアミノ酸度はそれぞれ3.7 mLと1.6 mLでありK9株と比較すると総酸度は同程度でアミノ酸度は高かった。BV-3株とK9株の製成酒の香気成分および有機酸成分を比較するとクエン酸、乳酸、酢酸とイソアミルアルコールを除く成分すべてで有意に含有量が異なっていた。リンゴ酸（K9株の約0.64倍）、コハク酸（約0.84倍）、酢酸エチル（約0.83倍）、酢酸イソアミル（約0.69倍）、カプロン酸エチル（約0.81倍）の低生成がBV-3株の特徴であった。また、BV-3株の製成酒の利き酒を行ったところ、オフフレーバーは感じられなかった。そのため、BV-3株はK9株よりもアルコール発酵能力が劣るが18.9%のアルコールを生成することから実用化が期待される分離株であった。

BV-2株とBV-3株は、同じ集積培地から分離された株でありK9株と比較してリンゴ酸、コハク酸、酢酸エチル、酢酸イソアミル、カプロン酸エチルの低生成という共通した特徴を有していたが、その含有量は有意な差が見られ、また製成酒のアルコール濃度や酸度にも有意な差が見られた。つまり、この2株は発酵能力や製成酒中の有機酸、香気成分の組成が異なる別の株であると考えられる。

BY-4株の製成酒の総酸度とアミノ酸度はそれぞれ4.8 mLと1.7 mLでありK9株と比較すると共に高かった。クエン酸（K9株の約0.9倍）、リンゴ酸（約0.69倍）、酢酸エチル（約0.87倍）、イソブチルアルコール（約0.80倍）、酢酸イソアミル（約0.52倍）、カプロン酸エチル（約0.72倍）の低生成とコハク酸（約1.1倍）、酢酸（約4.4倍）の高生成がBY-4株の特徴であったが、BY-4株の製成酒の利き酒を行ったところ、顕著な酸臭が感じられた。そのため、実用化に適さない分離株であった(Table 37)。

Table 32 K9 株酒母経過表

日数	操作	庫内設定温度 (操作前)	庫内設定温度 (操作後)	品温 (操作前)	品温 (操作後)	Be	総酸度 (ml)	アミノ酸度	アルコール度数 (%)	Brix (%)
	仕込み		55.0		51.2					
1	醗建て	55.0	25.0	53.5	25.8					25.4
2	權入れ	25.0	25.0	25.0	25.0					26.2
3	權入れ	25.0	15.0	25.8	25.8					23.5
4	權入れ	15.0	15.0	15.0	15.0					21.6
5	權入れ	15.0	15.0	15.5	15.5					20.1
6	分析	15.0	15.0	15.0	15.5	7.59	8.69	1.23	6.97	18.9
7	使用	15.0		15.5						

Table 33 BV-2 株酒母経過表

日数	操作	庫内設定温度 (操作前)	庫内設定温度 (操作後)	品温 (操作前)	品温 (操作後)	Be	総酸度 (ml)	アミノ酸度	アルコール度数 (%)	Brix (%)
	仕込み		55.0		49.8					
1	醗建て	55.0	25.0	53.0	24.5					25.4
2	權入れ	25.0	25.0	24.8	24.8					26.1
3	權入れ	25.0	15.0	25.0	25.0					23.0
4	權入れ	15.0	15.0	15.0	15.0					20.9
5	權入れ	15.0	15.0	15.8	15.8					19.2
6	分析	15.0	15.0	15.0	15.2	6.73	9.03	0.90	7.89	17.8
7	使用	15.0		15.5						

Table 34 BV-3 株酒母経過表

日数	操作	庫内設定温度 (操作前)	庫内設定温度 (操作後)	品温 (操作前)	品温 (操作後)	Be	総酸度 (ml)	アミノ酸度	アルコール度数 (%)	Brix (%)
	仕込み		55.0		48.0					
1	醗建て	55.0	25.0	52.0	23.5					24.0
2	權入れ	25.0	25.0	24.0	24.0					26.0
3	權入れ	25.0	15.0	24.5	24.5					21.9
4	權入れ	15.0	15.0	14.5	14.5					20.8
5	權入れ	15.0	15.0	15.0	15.0					18.4
6	分析	15.0	15.0	14.8	15.0	6.24	8.62	1.29	8.45	17.4
7	使用	15.0		15.0						

Table 35 BY-4 株酒母経過表

日数	操作	庫内設定温度 (操作前)	庫内設定温度 (操作後)	品温 (操作前)	品温 (操作後)	Be	総酸度 (ml)	アミノ酸度	アルコール度数 (%)	Brix (%)
	仕込み		55.0		50.0					
1	醗建て	55.0	25.0	53.5	24.0					24.8
2	權入れ	25.0	25.0	24.8	24.8					26.0
3	權入れ	25.0	15.0	25.0	25.0					22.3
4	權入れ	15.0	15.0	15.0	15.0					20.8
5	權入れ	15.0	15.0	15.0	15.0					19.8
6	分析	15.0	15.0	15.0	15.5	7.58	8.67	1.38	6.87	19.0
7	使用	15.0		15.0						

Table 36 酒母 6 日目一般成分分析結果

	ボーメ	総酸度 (ml)	アミノ酸度 (ml)	アルコール度数 (%)	Brix(%)
K9	7.59	8.69	1.23	6.97	18.9
BV-2	6.73	9.03	0.90	7.89	17.8
BV-3	6.24	8.62	1.29	8.45	17.4
BY-4	7.58	8.67	1.38	6.87	19.0

温度 (°C)、ボーム、総酸度 (ml) アミノ酸度 (ml)、
アルコール度数 (%)、Brix (%)

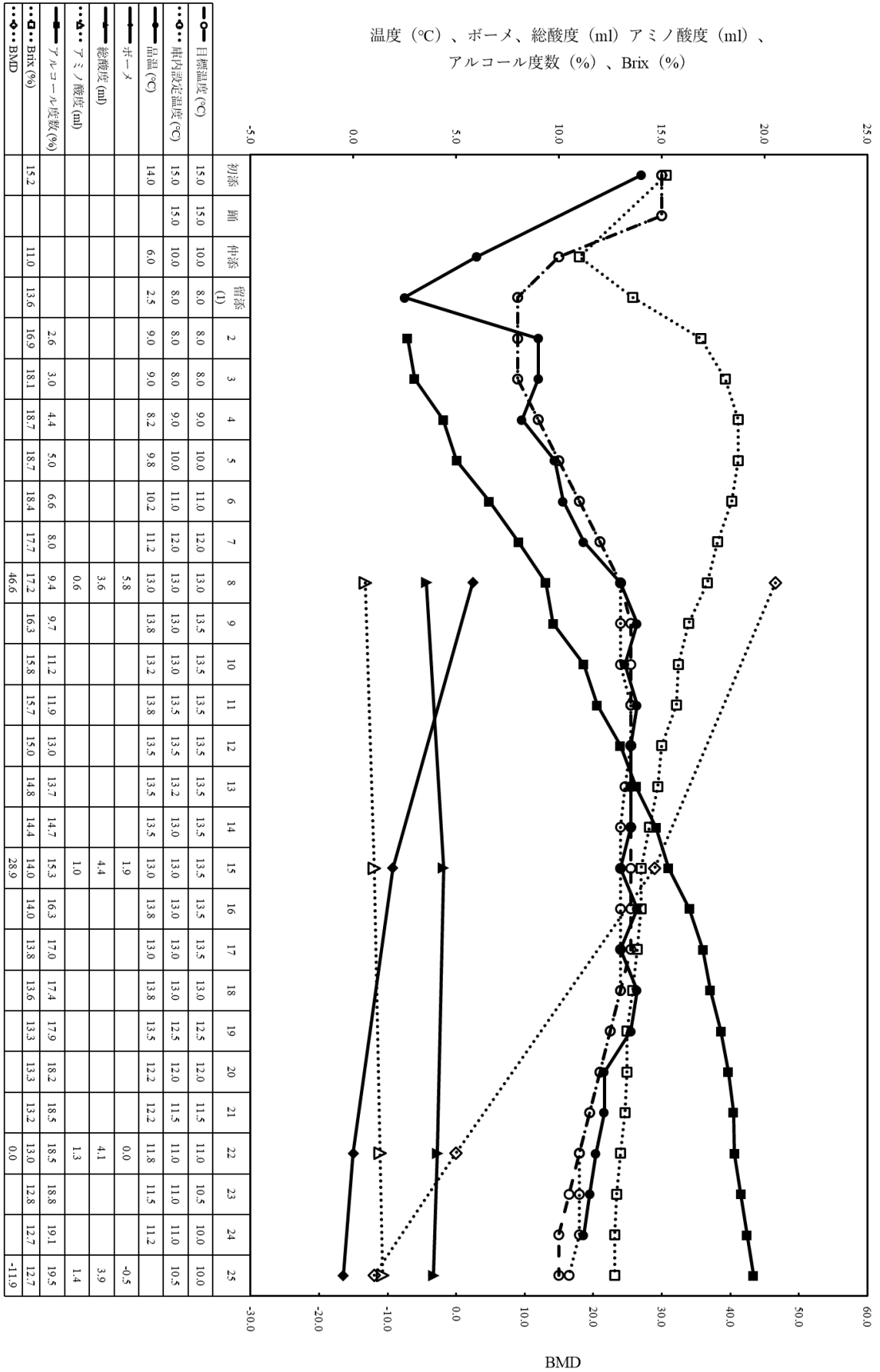


Fig. 16 K9株①醱酵経過表

温度 (°C)、ポーム、総酸度 (ml) アミノ酸度 (ml)、
アルコール度数 (%)、Brix (%)

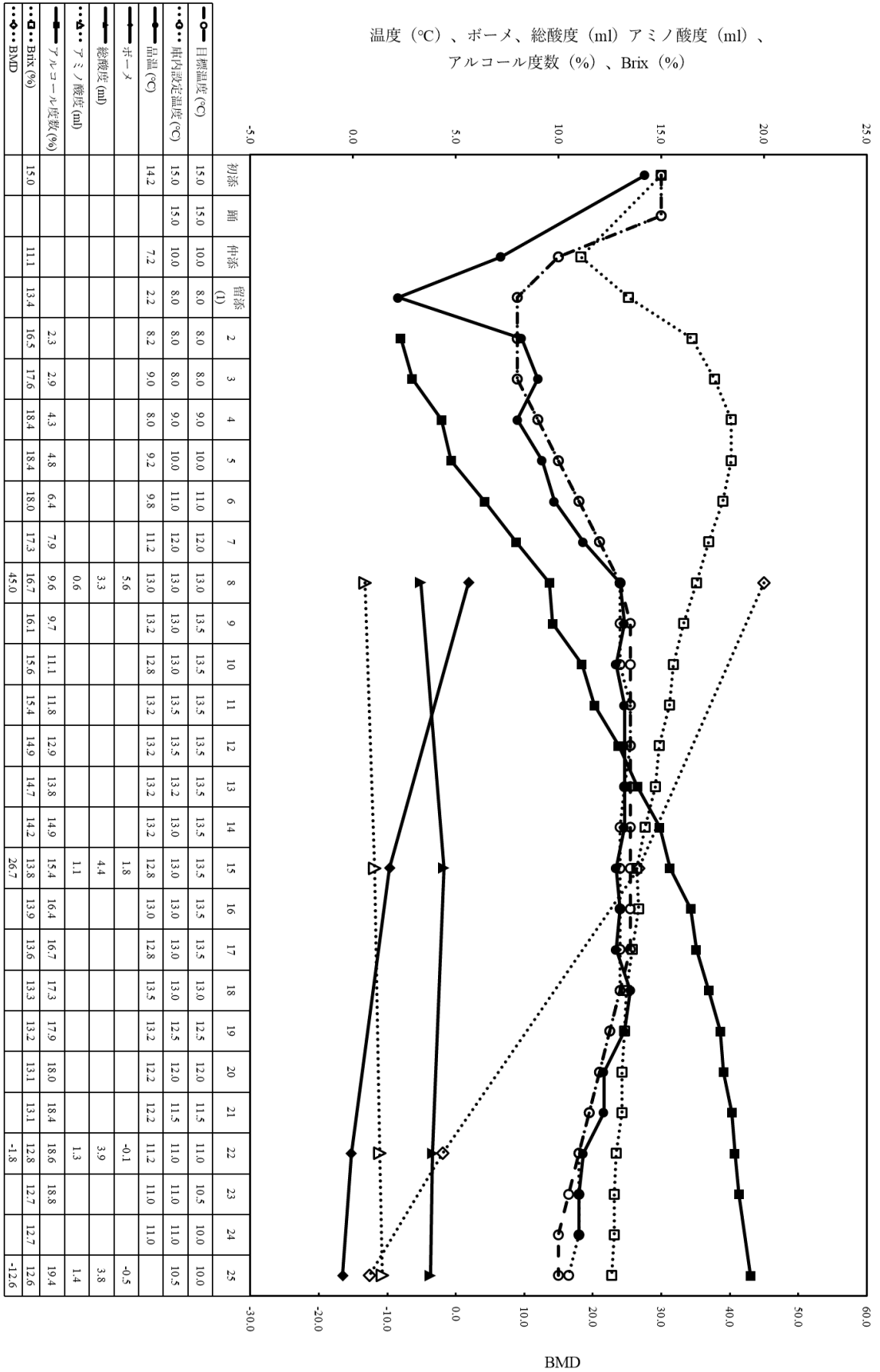


Fig. 17 K9 株の醸造経過表

温度 (°C)、ポーム、総酸度 (ml) アミノ酸度 (ml)、
アルコール度数 (%)、Brix (%)

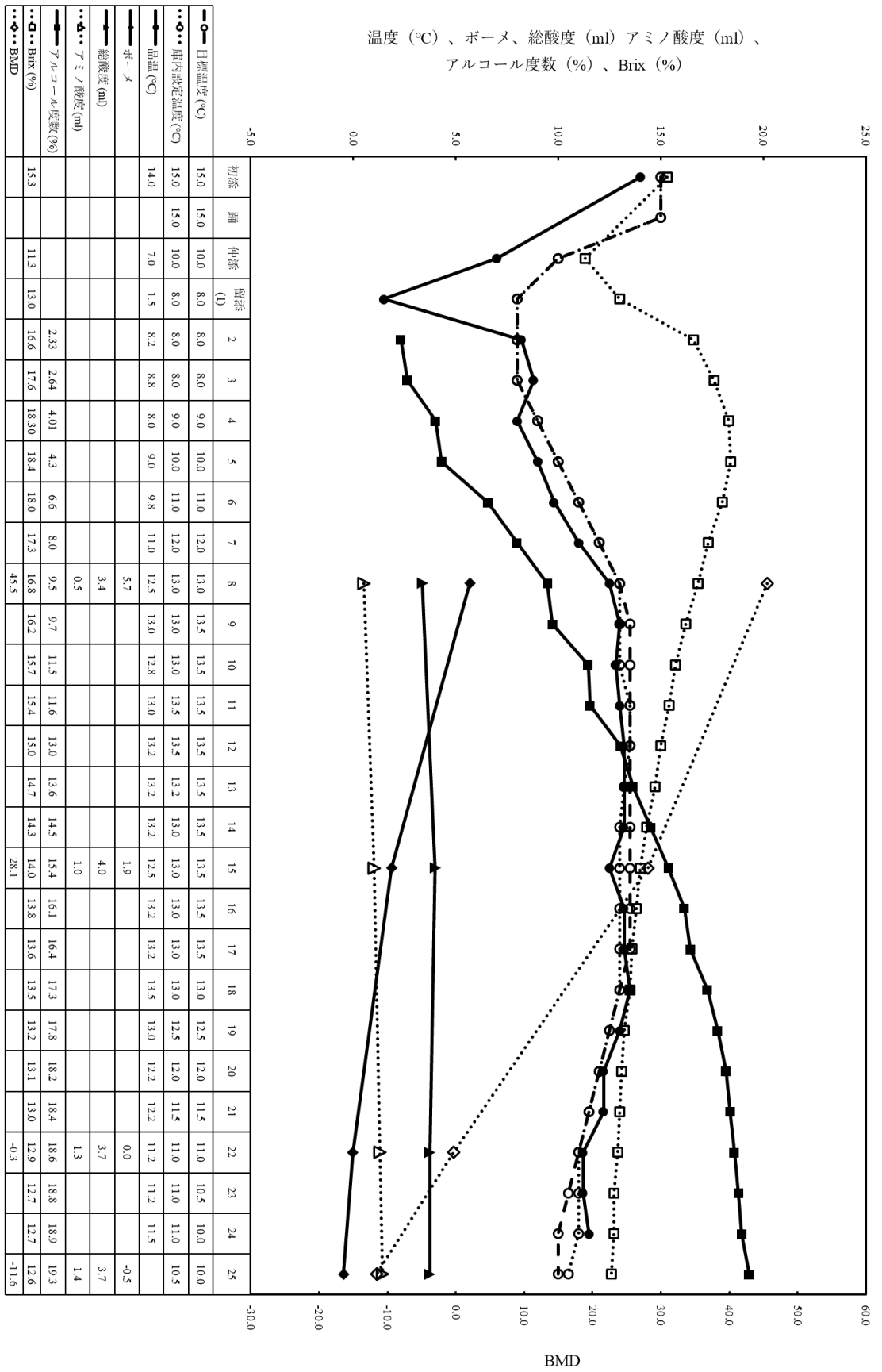


Fig. 18 K9株③醱経過表

温度 (°C)、ボーム、総酸度 (ml) アミノ酸度 (ml)、
アルコール度数 (%)、Brix (%)

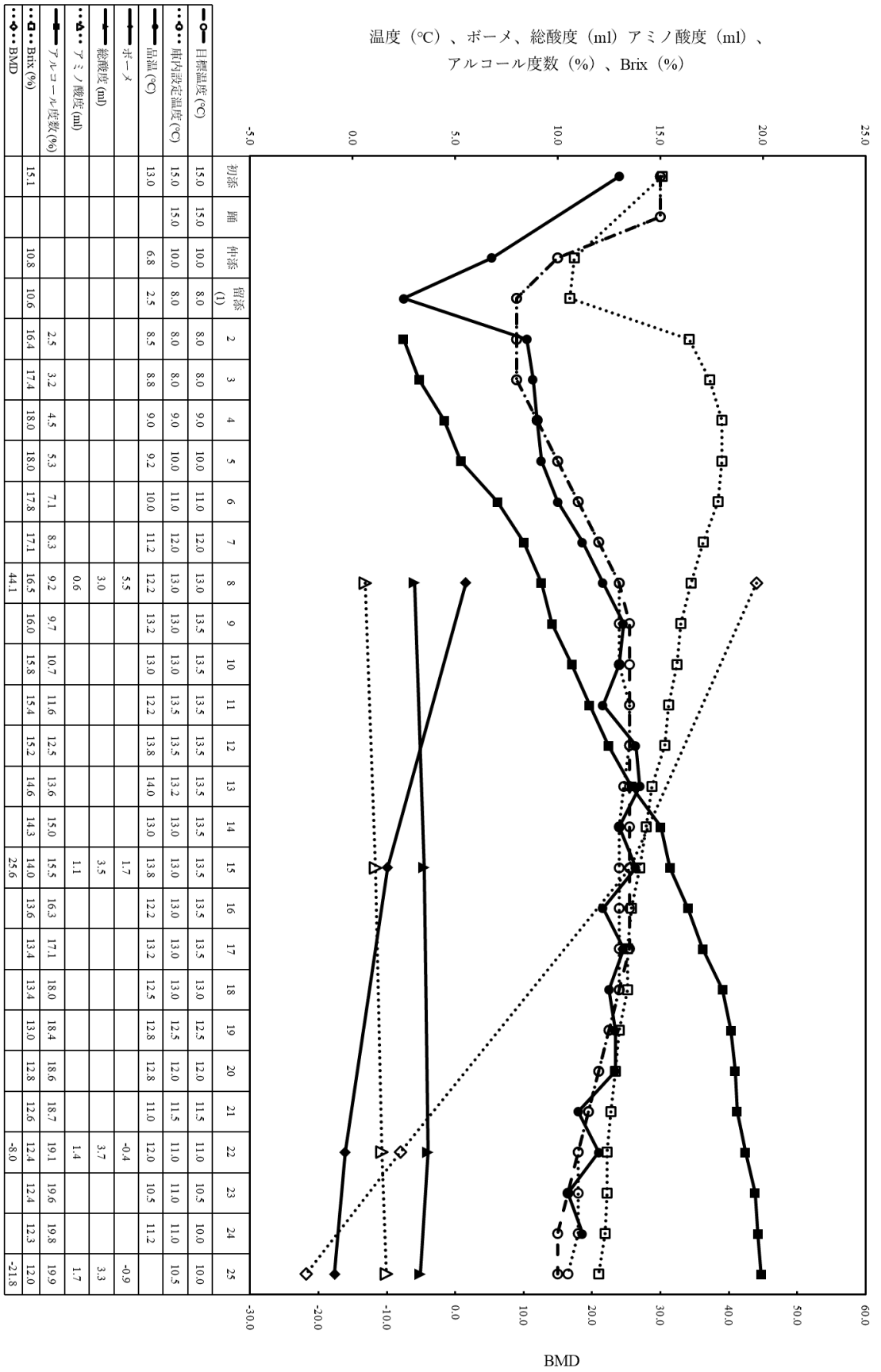


Fig. 19 BY-2株①醱経過表

温度 (°C)、ボーム、総酸度 (ml) アミノ酸度 (ml)、
アルコール度数 (%)、Brix (%)

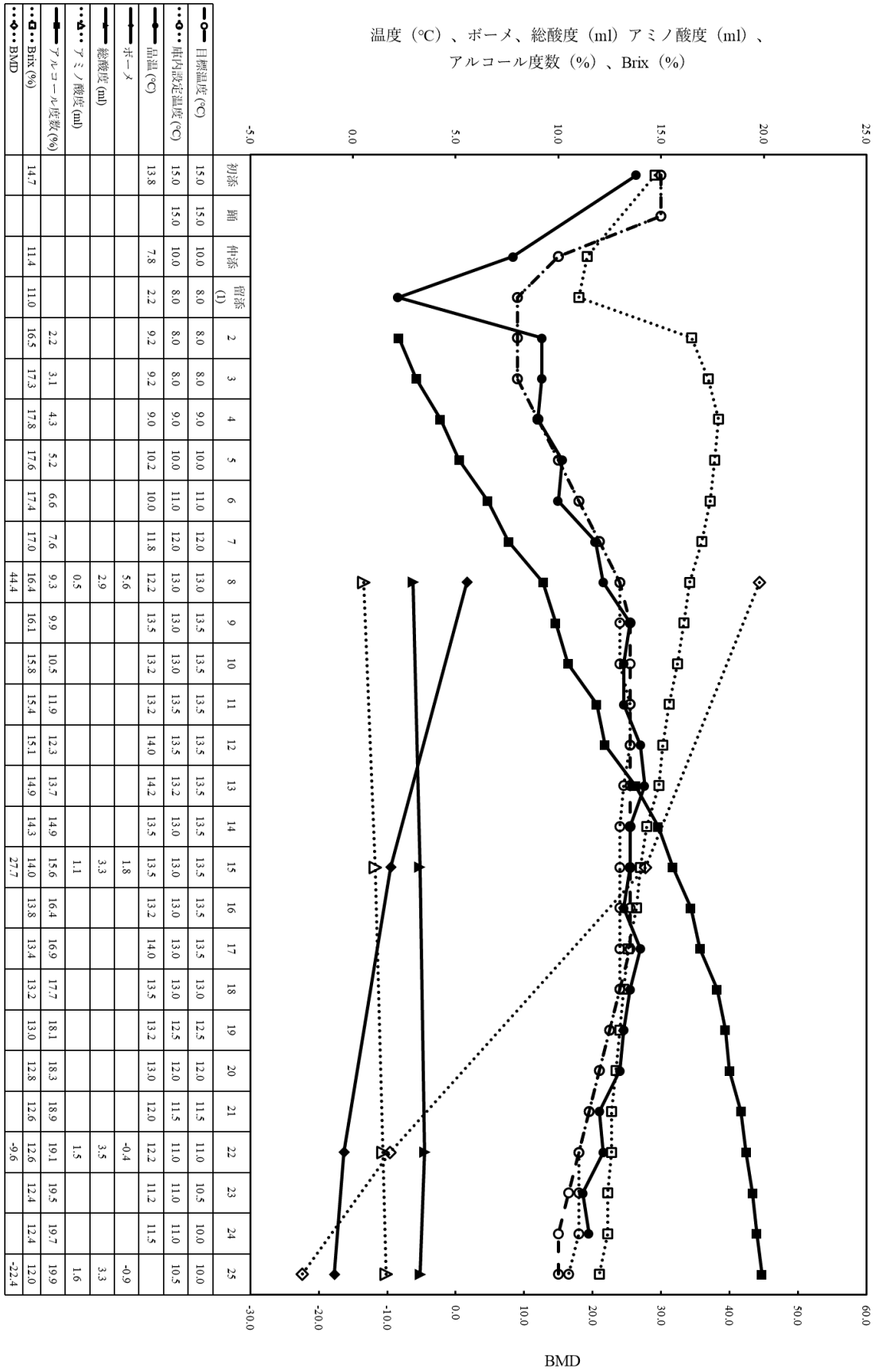


Fig. 20 BV-2株の醸経過表

温度 (°C)、ポーム、総酸度 (ml) アミノ酸度 (ml)、
アルコール度数 (%)、Brix (%)

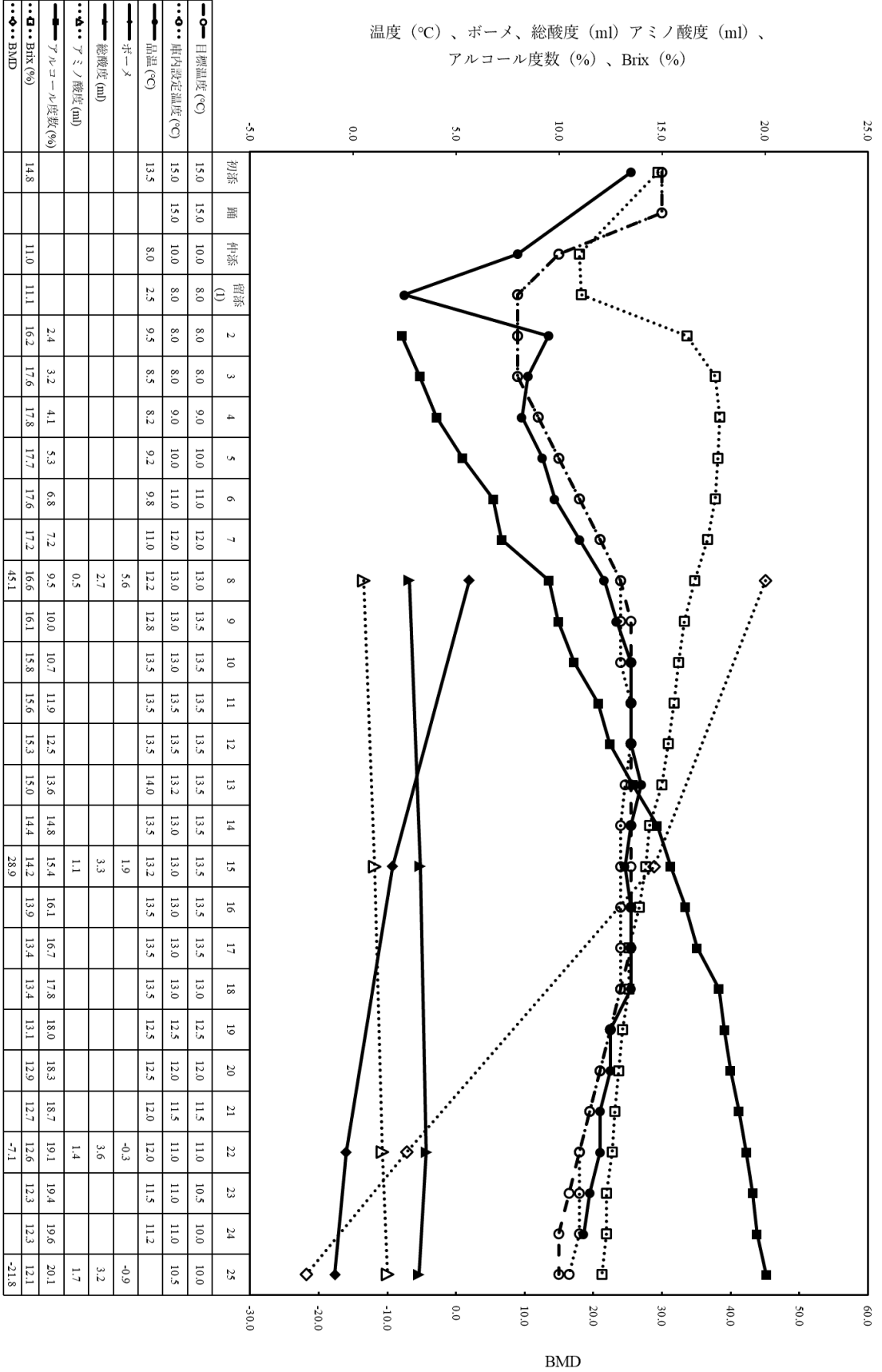


Fig. 21 BV-2株③膠経過表

温度 (°C)、ポーム、総酸度 (ml) アミノ酸度 (ml)、
アルコール度数 (%)、Brix (%)

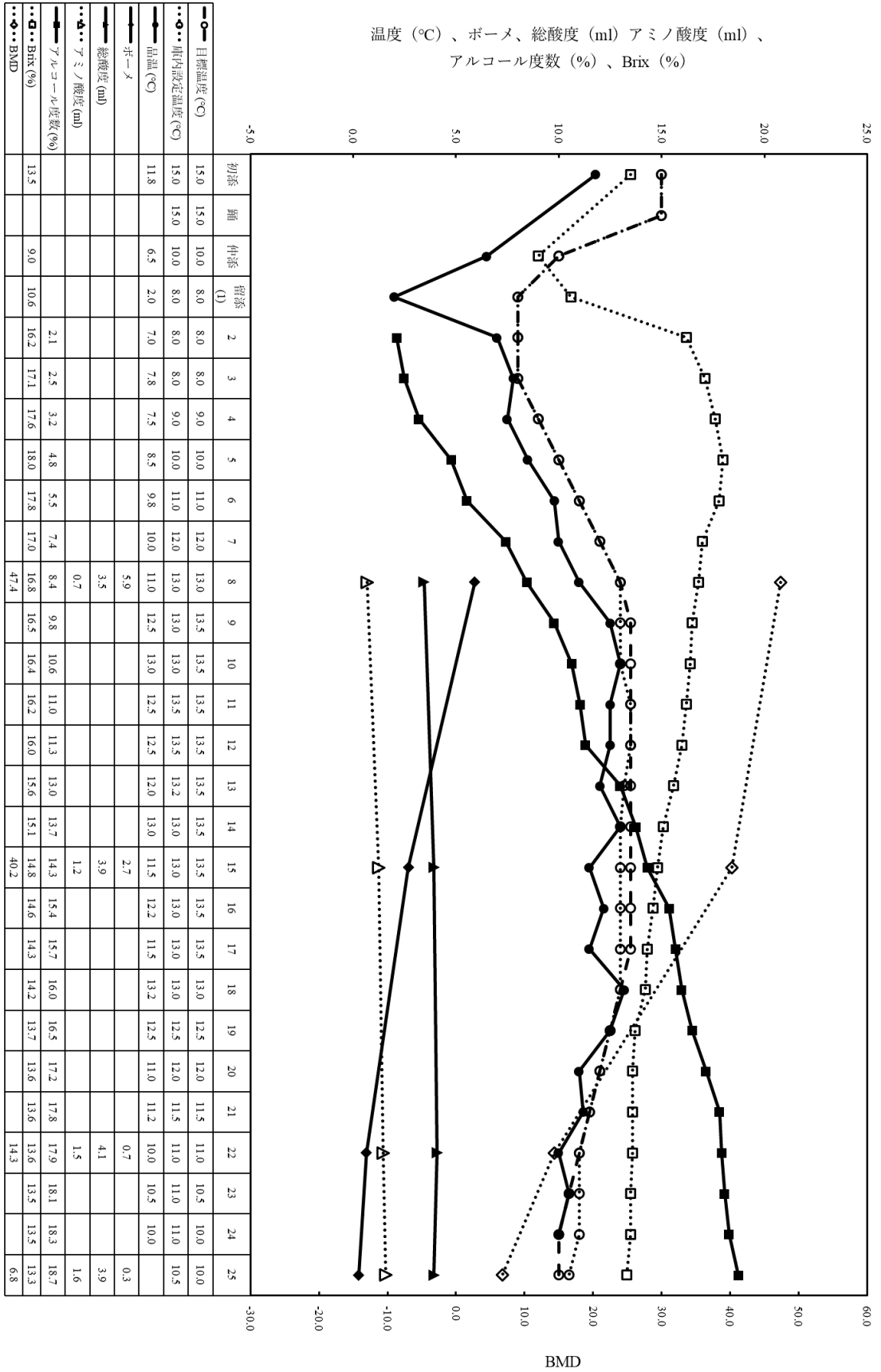


Fig. 22 BV-3株①醱経過表

温度 (°C)、ポーム、総酸度 (ml) アミノ酸度 (ml)、
アルコール度数 (%)、Brix (%)

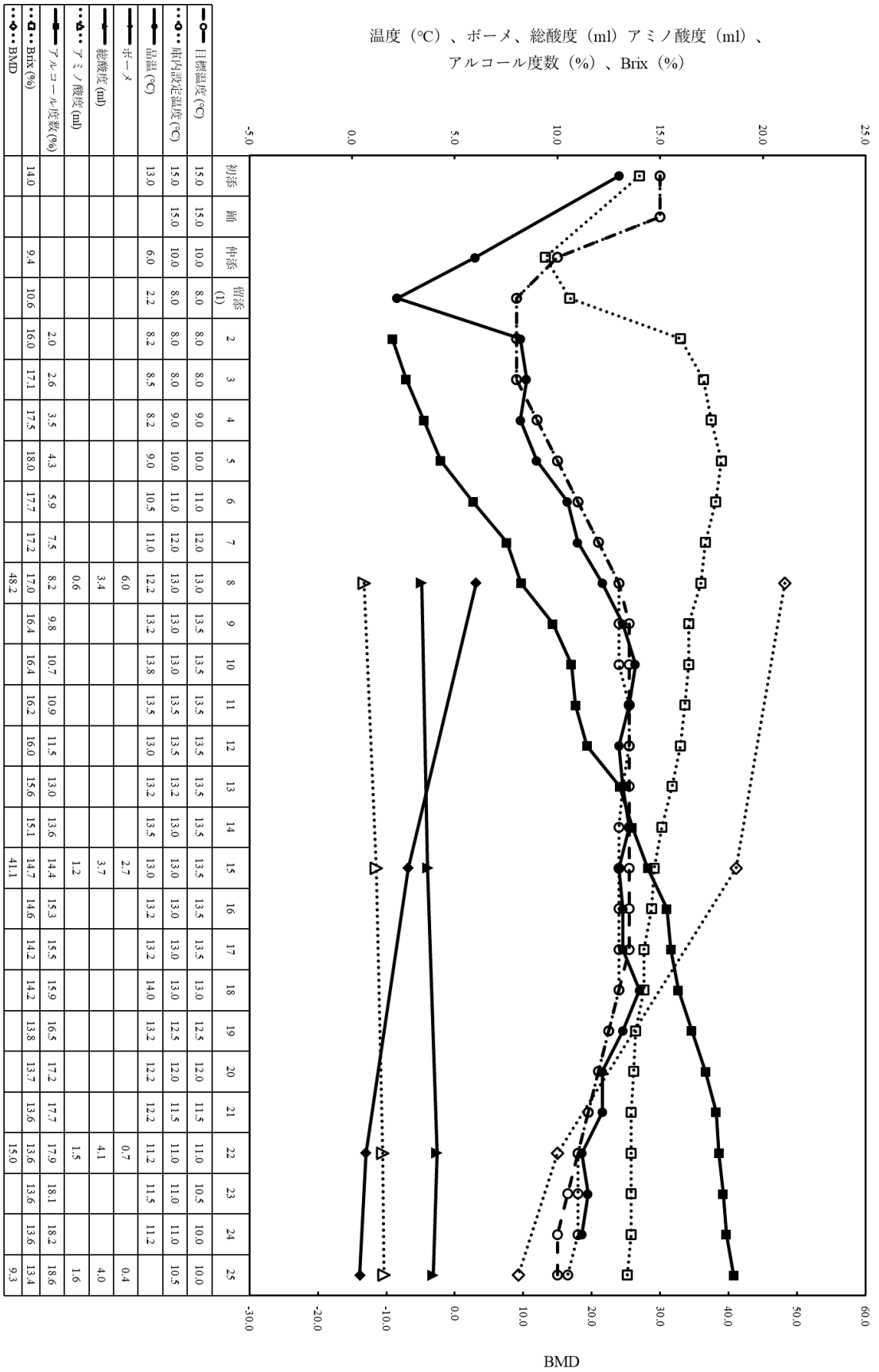


Fig. 23 BV-3株②醱経過表

温度 (°C)、ポーマ、総酸度 (ml) アミノ酸度 (ml)、
アルコール度数 (%)、Brix (%)

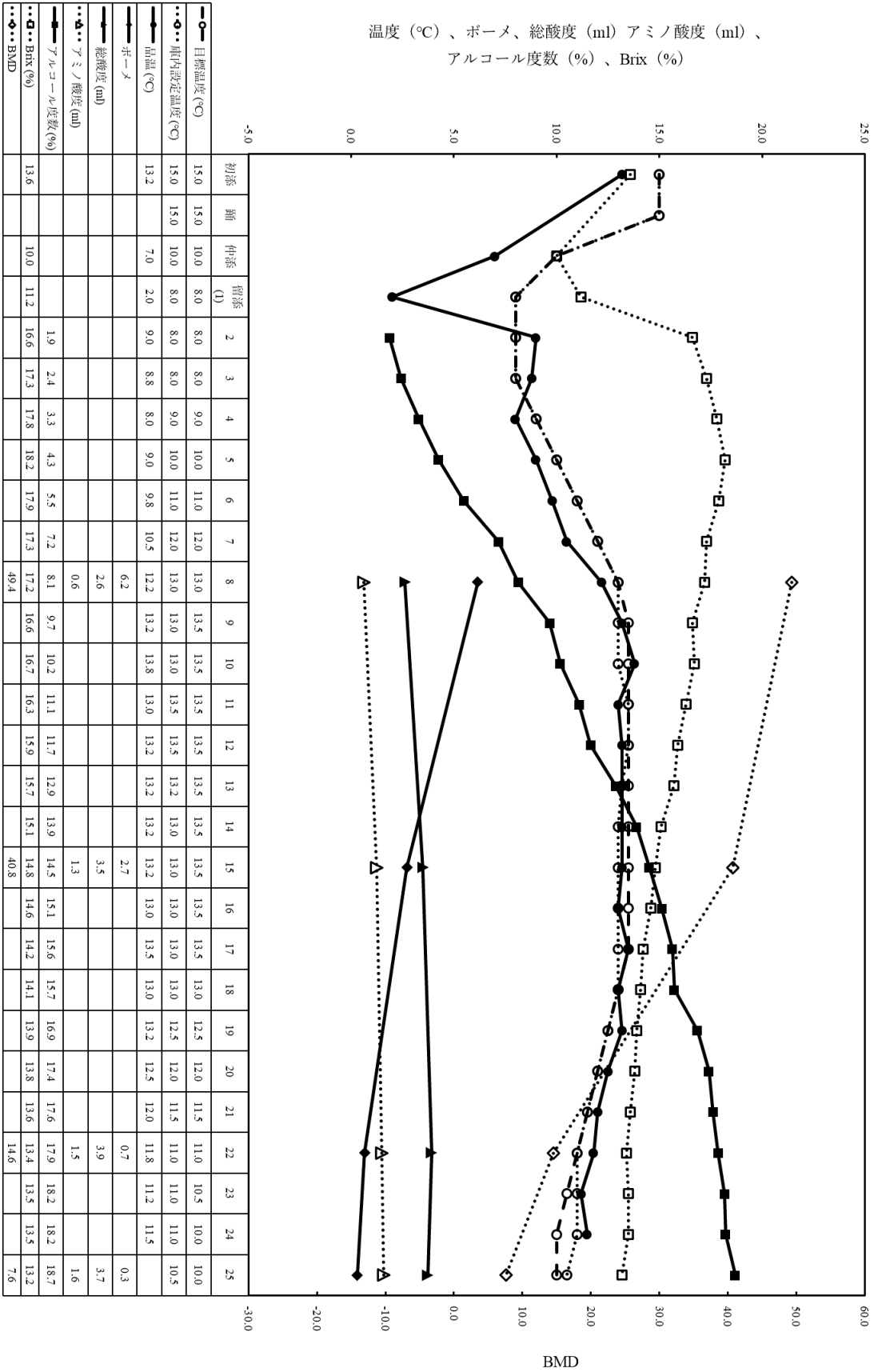


Fig. 24 BV-3株③醗経過表

温度 (°C)、ボーム、総酸度 (ml) アミノ酸度 (ml)、
アルコール度数 (%)、Brix (%)

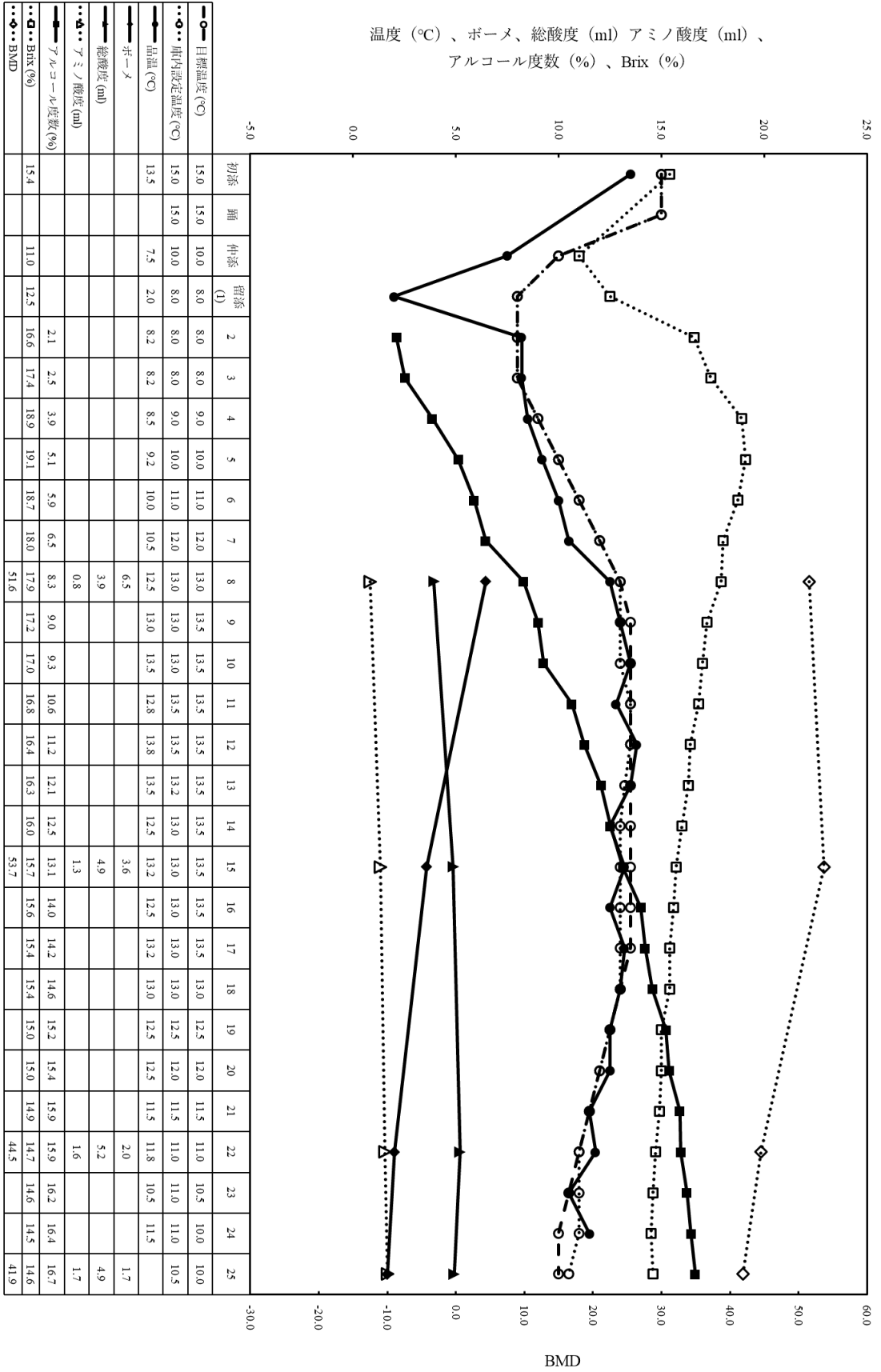


Fig. 25 BY-4株①醗経過表

温度 (°C)、ボーム、総酸度 (ml) アミノ酸度 (ml)、
アルコール度数 (%)、Brix (%)

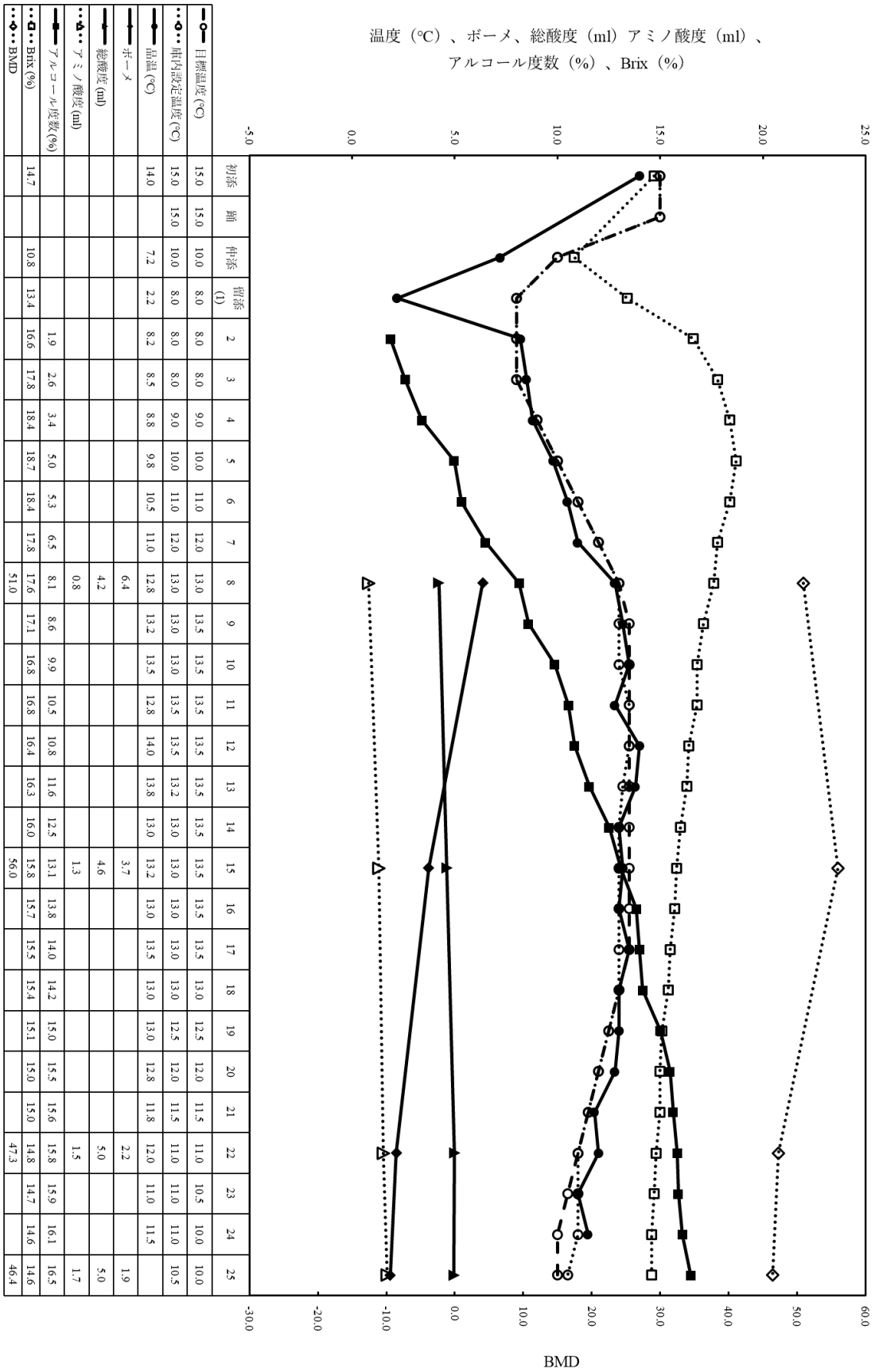


Fig. 26 BY-4 株 ② 醸造経過表

温度 (°C)、ポーム、総酸度 (ml) アミノ酸度 (ml)、
アルコール度数 (%)、Brix (%)

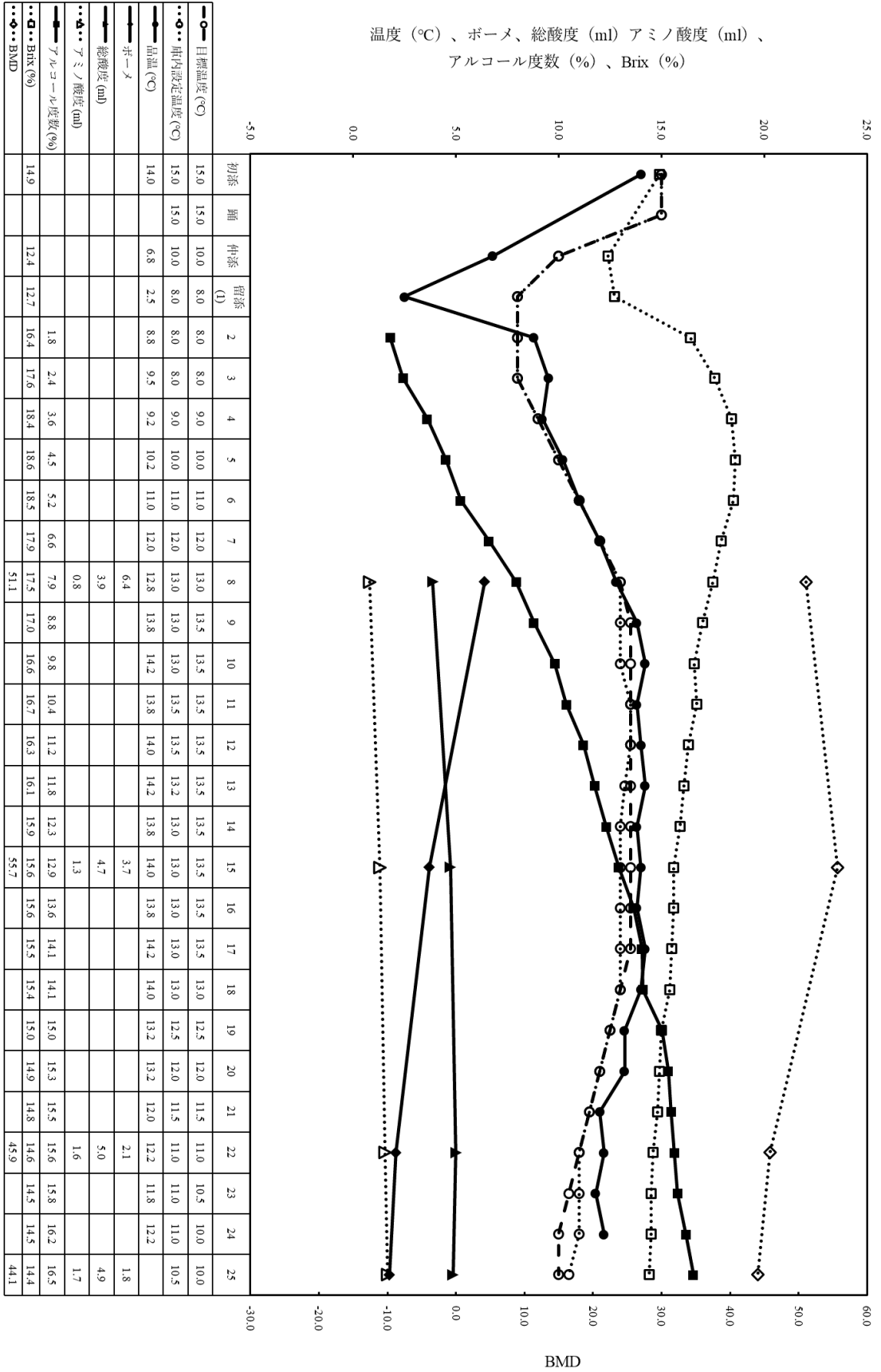


Fig. 27 BY-4株③醸経過表

Table 37 製成酒の一般成分分析および有機酸、香気成分分析結果

	K9	BV-2	BV-3	BY-4
日本酒度	+5 ± 0.14 ^a	+9 ± 0.12 ^b	-3 ± 0.39 ^c	-18 ± 0.79 ^d
アルコール度数(%)	19.5 ± 0.06 ^a	20.2 ± 0.04 ^b	18.9 ± 0.09 ^c	16.8 ± 0.04 ^d
酸度(mL)	3.7 ± 0.08 ^a	3.3 ± 0.06 ^b	3.7 ± 0.12 ^a	4.8 ± 0.09 ^c
アミノ酸度(mL)	1.4 ± 0.01 ^a	1.6 ± 0.02 ^b	1.6 ± 0.01 ^b	1.7 ± 0.02 ^c
クエン酸(mg/L)	81 ± 2.66 ^a	83 ± 1.57 ^a	76 ± 0.87 ^a	73 ± 1.02 ^b
ピルビン酸(mg/L)	147 ± 3.01 ^a	76 ± 13.5 ^b	407 ± 9.78 ^c	514 ± 21.0 ^d
リンゴ酸(mg/L)	334 ± 8.34 ^a	120 ± 3.26 ^b	213 ± 1.71 ^c	229 ± 4.05 ^d
コハク酸(mg/L)	754 ± 7.84 ^a	635 ± 8.86 ^b	632 ± 11.8 ^b	814 ± 8.75 ^c
乳酸(mg/L)	677 ± 3.80 ^a	657 ± 8.19 ^{ab}	763 ± 36.1 ^a	654 ± 4.87 ^b
酢酸(mg/L)	229 ± 39.5 ^a	470 ± 41.4 ^b	287 ± 29.9 ^a	1012 ± 86.8 ^c
酢酸エチル(mg/L)	74.2 ± 1.27 ^a	51.1 ± 0.19 ^b	61.5 ± 1.63 ^c	64.6 ± 0.50 ^d
イソブチルアルコール(mg/L)	63.7 ± 0.54 ^a	72.6 ± 0.06 ^b	61.7 ± 0.35 ^c	50.9 ± 0.73 ^d
酢酸イソアミル(mg/L)	2.35 ± 0.03 ^a	1.30 ± 0.02 ^b	1.62 ± 0.04 ^c	1.22 ± 0.03 ^d
イソアミルアルコール(mg/L)	123 ± 2.47 ^a	128 ± 0.72 ^b	129 ± 1.96 ^a	123 ± 0.37 ^c
カブロン酸エチル(mg/L)	0.88 ± 0.01 ^a	0.61 ± 0.01 ^b	0.71 ± 0.02 ^c	0.63 ± 0.00 ^b

※T 検定による ※同じアルファベット同士は有意差がない (p<0.05) N=3

2-3-5 分離株の特徴

清酒小仕込み試験を実施した BV-2、BV-3 株のキラー性確認試験を行ったところ、2 株ともに K6、K7、K9 株に対してクリアゾーンを形成しなかったことから、清酒酵母に対してキラー性を有していなかった。



Fig. 28 K9 株に対するキラー性試験結果(左から BV-2 株、BV-3 株)

また、BV-2、BV-3 株の 26S rDNA、ITS 領域の塩基配列を Table 38、39 に示した。K7 株、K9 株と BV-2 株、BV-3 株の D1/D2 領域および ITS 領域の相同性はどちらも 100%であった。それらの配列を連結し、*Saccharomyces* 属の酵母 9 種、K7 株、K9 株などの配列とアライメントし、系統樹を作成したところ、分離株は *S. cerevisiae* の基準株 NRRL Y-12632 株と清酒酵母 K7 株および K9 株からなる系統枝に位置し、ブートストラップ値 100%であったことから、2 株とも *S. cerevisiae* であると強く推定された(Fig. 28)。また、ITS 領域のポジション A~F について清酒酵母である K7 株、K9 株と BV-2、BV-3 株は同じ塩基であった。

Table 38 BV-2 株の 26S rDNA および ITS 領域の塩基配列

領域	塩基配列
26S D1/D2	TACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGCTATGTTCCCTTGGAAAC AGGACGTCATAGAGGGTGAAGATCCCCTGTGGCGAGGAGTGCCTTTGTAAGTGCCTTCGAAGAGTCG AGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGTAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCAGATAG CGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTTGTGAAA GGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTTGTCTCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCA CTGGCCAGCATCAGTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCT GTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATAGCC
ITS	AAGAAATTAATAATTTGAAAATGGATTTTTTGTGTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGA CAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGCCTGCGCTTAAGTGCCTGCTTGTAGGCTTGTAAAGTTCTTTCTTTG CTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACAAACACACTGT GGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAAC AATTTTATTTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACGGAAATTTAAATATTAATAAATTT TCAACAACGGATCTCTTGGTTCGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTCGAGA ATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCGCTGTTGAGC GTCATTTCTTCTCAAACTTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTTGAATTTGCTGGCCTT TTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTCTTGAAGTATAATGCAAGTACCGGTGTTTT AGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCT AGCGGAACAATGTTCTTAAAGT

Table 39 BV-3 株の 26S rDNA および ITS 領域の塩基配列

領域	塩基配列
26S D1/D2	TACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGCTATGTTCCCTTGGAAAC AGGACGTCATAGAGGGTGAAGATCCCCTGTGGCGAGGAGTGCCTTTGTAAGTGCCTTCGAAGAGTCG AGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGTAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCAGATAG CGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTTGTGAAA GGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTTGTCTCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCA CTGGCCAGCATCAGTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCT GTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATAGCC
ITS	AAGAAATTAATAATTTGAAAATGGATTTTTTGTGTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGA CAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGCCTGCGCTTAAGTGCCTGCTTGTAGGCTTGTAAAGTTCTTTCTTTG CTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACAAACACACTGT GGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAAC AATTTTATTTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACGGAAATTTAAATATTAATAAATTT TCAACAACGGATCTCTTGGTTCGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTCGAGA ATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCGCTGTTGAGC GTCATTTCTTCTCAAACTTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTTGAATTTGCTGGCCTT TTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTCTTGAAGTATAATGCAAGTACCGGTGTTTT AGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCT AGCGGAACAATGTTCTTAAAGT

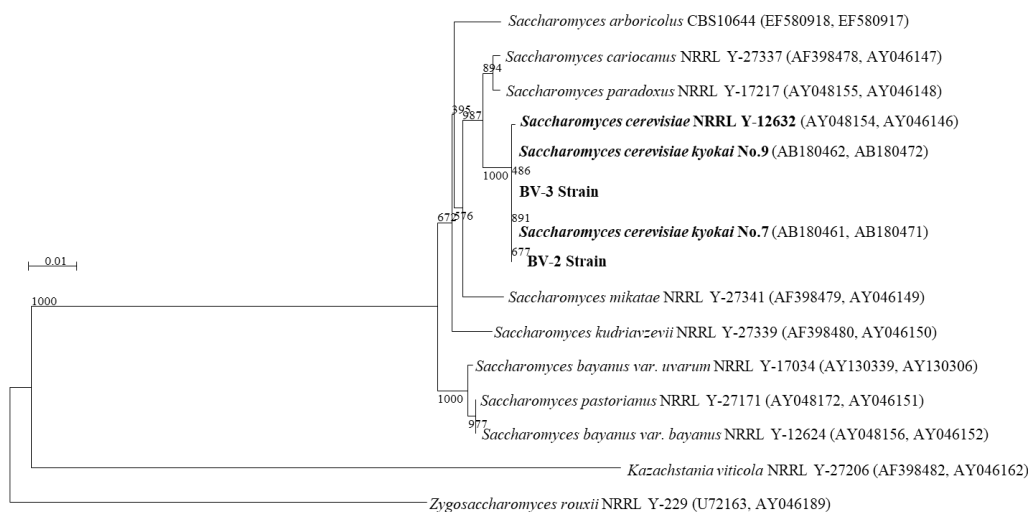


Fig. 29 BV-2、BV-3 株の系統樹

Table 40 分離した株のポジション比較

	ポジションA Tの繰り返し数	ポジションB Tの繰り返し数	ポジションC 塩基の種類	ポジションD 塩基の種類	ポジションE Tの繰り返し回数	ポジションF Tの繰り返し回数
<i>S.cerevisiae</i> S288c	7	1	C	T	8	7
<i>S.cerevisiae</i> NRRL Y-12632	7	1	C	T	8	6
<i>S.cerevisiae</i> Kyokai No.7	7	1	T	T	9	6
<i>S.cerevisiae</i> Kyokai No.9	7	1	T	T	9	6
BV-2	7	1	T	T	9	6
BV-3	7	1	T	T	9	6

2-4 小括

清酒酵母のビタミン非要求性を利用し、抗菌物質を使用しない集積培地である BV 培地を設計し、増殖試験を行った。BV 培地において試験した清酒酵母および焼酎酵母の生育が確認され、その他の酵母については生育が確認されなかった。このことから清酒酵母をより選択的に集積する事ができる培地であると期待された。そこで実際に分離源を添加して酵母の集積を試みた。

八重桜の花を 3 種類の集積培地に添加して集積培養を行った結果、すでに清酒製造で実用化されている酵母の分離実績がある KY 培地や BY 培地からは、アルコール発酵能が優れた分離株を取得できず、新たに設計した BV 培地からのみ取得することができた。これらの結果は、抗菌物質を使用しない新規集積培地の設計に成功したことと、清酒製造を目的とした酵母の分離を試みる際には、複数種類の集積培地を用いることで目的とする酵母の取得確率を向上できることを示している。一方で、これら 3 種類の集積培地のどれが清酒製造用酵母の取得効率がよいかについては、同じ八重桜の花を分離源として用いているが、厳密には異なる花卉が集積培地に添加されているため取得効率は判断できない。集積培地組成の違いによる清酒製造用酵母の取得効率の検討については今後の課題である。

また、分離された酵母 BV-2 株と BV-3 株は、リンゴ酸、コハク酸、酢酸エチル、酢酸イソアミル、カプロン酸エチルの低生成という共通した特徴を有していたが、その含有量は有意な差が見られ、また製成酒のアルコール濃度や酸度にも有意な差が見られたため異なる株であると考えられた。

第3章 生理学的諸性質を用いた清酒製造用酵母の識別試験

3-1 緒言

自然界からの清酒製造用酵母を分離においては、新たに取得した酵母の醸造特性を明らかにすることや、同定をするだけでなく、既存の清酒製造で使用されている酵母、特にきょうかい酵母ではないことを示す必要がある。なぜならば、エスケープと呼ばれる酒蔵で使用されているきょうかい酵母が何らかの原因で自然界に定着し、その株を分離してしまう可能性や、きょうかい酵母や既存分離酵母を多く扱っている研究室では、それら酵母がコンタミネーションする可能性があるためである。既存の清酒製造用酵母を分離していないことを示すことが重要となる。

清酒酵母株の判別については、酵母の全ゲノムを読み既存株のゲノムと比較解析する方法や、種々のきょうかい酵母の生理学的諸性質（薬剤耐性や炭素源、窒素源の資化性など）を調べる方法で行われてきた。生理学的諸性質を利用したきょうかい酵母の判別方法は、近年育種開発された1801号酵母に関する論文で報告されている（Fig. 29）⁵⁹⁾。この判別法を見てみると、セルレニン耐性を調査することで耐性株と非耐性株に分け、それぞれを炭素源やアミノ酸の資化性で判別していることがわかる。しかし、詳細にみてみると、K10株の38°Cでのアラニン識別培地の結果が記されておらず、K1501株については2か所に識別結果が存在している。また、株の判別ができているのがK6、K601、K1601、K1701、K1801株のみであり、K1801株の識別はできているが、きょうかい酵母株全体の識別法としては不完全なものであることがわかる。そこで本章では、各種きょうかい酵母の識別方法の開発を目的に生理学的諸性質を再検討した。

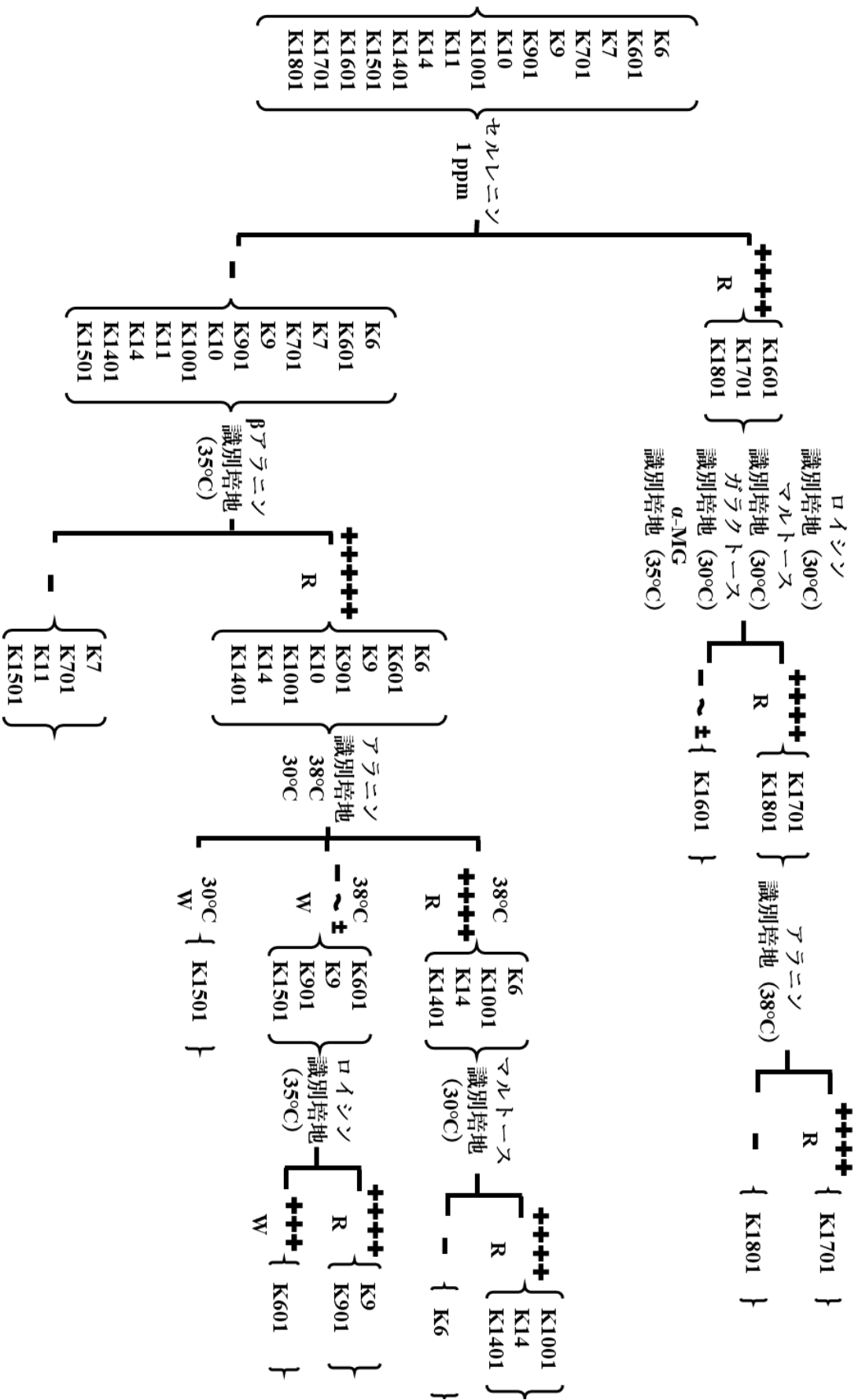


Fig. 30 きょうかい酵母における酵母の識別試験方法 (引用) 59)

3-2 実験方法

3-2-1 使用菌株

使用菌株は吉田らの報告⁵⁹⁾で使用されていたきょうかい酵母 15 株および K1901 株、きょうかい酵母 No.28、きょうかい酵母 No.77 の計 18 株を用いた (Table 41)。

Table 41 使用した供試菌株

供試菌株(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)		
きょうかい6号酵母 (K6株)	きょうかい10号酵母 (K10株)	きょうかい1601号酵母 (K1601株)
きょうかい601号酵母 (K601株)	きょうかい1001号酵母 (K1001株)	きょうかい1701号酵母 (K1701株)
きょうかい7号酵母 (K7株)	きょうかい11号酵母 (K11株)	きょうかい1801号酵母 (K1801株)
きょうかい701号酵母 (K701株)	きょうかい14号酵母 (K14株)	きょうかい1901号酵母 (K1901株)
きょうかい9号酵母 (K9株)	きょうかい1401号酵母 (K1401株)	きょうかい酵母No.28 (No.28株)
きょうかい901号酵母 (K901株)	きょうかい1501号酵母 (K1501株)	きょうかい酵母No.77 (No.77株)

3-2-2 使用培地

a. セルレニン、シクロヘキシミドあるいはコハク酸ジメチルを用いた増殖試験

蒸留水に寒天を 2.8% になるように溶解させ、試験管に 9 mL ずつ分注しオートクレーブ滅菌 (121°C、15 min.) を行い、滅菌寒天を作成した。Difco Yeast Nitrogen Base 6.9 g、グルコース 20 g を蒸留水 100 mL に溶解させてフィルター滅菌を行った。この液体 1 mL と溶解滅菌寒天を混合し、40°C 程度まで冷却させた。セルレニンを用いた増殖試験の際には、そこにセルレニンを 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 ppm となるように添加し、増殖試験培地を調製した。シクロヘキシミドを用いた増殖試験の際には、そこにシクロヘキシミドを 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 ppm となるように添加し、増殖試験培地を調製した。コハク酸ジメチル (DMS) を用いた増殖試験の際には、そこに DMS を 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1, 2.4, 3.0% となるように添加し、増殖試験培地を調製した。

b. β -アラニンを用いた増殖試験

蒸留水 100 mL にビオチン 2.0 mg を溶かしたビオチン溶液を調製した。蒸留水 1 L に β -アラニン 4 mg、チアミン 20 mg、ピリドキシン 20 mg、ニコチン酸 20 mg、イノシトール 100 mg、パラアミノ安息香酸 20 mg とビオチン溶液 1 mL を溶解させて β -アラニン水溶液を調製した。蒸留水 100 mL の一部にグルコース 2 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05 g、 KH_2PO_4 0.15 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g、 β -アラニン水溶液 1 mL を溶解させて pH 5 に調整し、残りの蒸留水と寒天 2.5% を添加して、オートクレーブ滅菌 (121°C、15 min.) を行い、 β -アラニン培地を調製した。

c. ロイシンあるいはアラニンを用いた増殖試験

Difco Yeast Nitrogen Base w/o Amino acid Ammonium Sulfate を 1.7 g、グルコース 20 g、ロイシンあるいはアラニン 5 g を蒸留水 100 mL に溶解させてフィルター滅菌を行った。この液体 1 mL と溶解させた 2.8% 滅菌寒天を混合し、増殖試験培地を調製した。

d. マルトース、ガラクトースあるいは α -メチル-D-グルコシド(α -MG)を用いた増殖試験

蒸留水に酵母エキス 0.15%、ポリペプトン 0.2%、 KH_2PO_4 0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04%、寒天 2.5%、マルトース、ガラクトースあるいは α -MG を 2%添加し、オートクレーブ滅菌(121°C、15min.)を行い、増殖試験培地を調製した。

f. TTC 上層培地

蒸留水にTTC 0.05%、寒天1.5%を添加した。炭素源については、TTC上層培地を重層するコロニーが生育している培地に含まれるものを添加した。具体的には、マルトース、ガラクトースあるいは α -MG増殖試験培地はそれぞれの糖を0.5%添加、ロイシンあるいはアラニン増殖試験培地および β -アラニン増殖試験培地にはグルコースを0.5%添加してTTC上層培地とした。

3-2-3 増殖試験および生育、染色性の確認

供試菌株をYM培地で25°C、3日間培養し、1 mLの培養液を採取した。遠心分離(3000 rpm、3 min.)で集菌後、滅菌水で2回洗菌し、1 mLの滅菌水で菌体を懸濁した。この懸濁液を作製した培地の1区画に1白金耳植菌を行った。植菌後は温度の指定がない培地は30°C、指定があるものは指定温度で3日間培養後、TTC上層培地を重層し、生育具合および染色性の確認を行った。

3-3 結果および考察

3-3-1 各種培地での識別試験

酵母の識別を行うために各種試験を行い、酵母の生育を確認した。セルレニン耐性試験については、0~5.0 ppmのセルレニン濃度で各きょうかい酵母の耐性を評価した。その結果、セルレニンを利用して育種された酵母株の耐性が高く、それ以外の酵母株は耐性が低い結果が得られたが、耐性が高い酵母株、低い酵母株の中でもその度合いが異なっていた。詳細には、0.3 ppmで抑制された耐性+のK6株グループ(K6、K701、K901、K10、K1001、K11、K1501株)、0.4 ppmで抑制された耐性++のK601株グループ(K601、K7、K9、K14、K1401株)、0.5 ppmで抑制される耐性+++のNo.28株グループ(No.28株)、3.0 ppmで生育が抑制される耐性++++のK1901株グループ(K1901株)、5.0ppmで生育が抑制される耐性+++++のK1601株グループ(K1601、K1701株)、5.0ppmでも生育が確認された耐性++++++のK1801株グループ(K1801、No.77株)の計6グループに分類された。セルレニンでの識別試験については、後述の実験と比較してよりきょうかい酵母を再現性高く6グループに分類できることから、酵母株の識別試験を実施する際には、最初に実施する試験として適していると判断された。また上記の結果から、K6株、K601株、K1601株、K1801株、K1901株、No.28株をきょうかい酵母以外の酵母株を識別する際の基準株とすることとした。

Table 42 セルレニンを用いた識別試験の結果

	セルレニン (ppm)											生育具合での 総合評価	
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0		
K6	R	R	±P	—	—	—	—	—	—	—	—	K6	+
K601	R	R	R	±R	—	—	—	—	—	—	—	K601	++
K7	P	P	P	±W	—	—	—	—	—	—	—	K7	++
K701	R	R	±W	—	—	—	—	—	—	—	—	K701	+
K9	P	P	R	±R	—	—	—	—	—	—	—	K9	++
K901	P	P	P	—	—	—	—	—	—	—	—	K901	+
K10	R	R	P	—	—	—	—	—	—	—	—	K10	+
K1001	R	R	P	—	—	—	—	—	—	—	—	K1001	+
K11	P	P	±W	—	—	—	—	—	—	—	—	K11	+
K14	P	P	R	±R	—	—	—	—	—	—	—	K14	++
K1401	P	P	R	±R	—	—	—	—	—	—	—	K1401	++
K1501	R	R	±W	—	—	—	—	—	—	—	—	K1501	+
K1601	P	P	R	R	R	R	R	R	R	R	R	K1601	++++
K1701	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	K1701	++++
K1801	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	K1801	++++
K1901	R	R	P	P	P	P	P	P	P	P	P	K1901	++++
No.28	R	R	R	R	±P	—	—	—	—	—	—	No.28	+++
No.77	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	No.77	+++++

	セルレニン (ppm)						生育具合での 総合評価	
	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0		
K6	R	—	—	—	—	—	K6	+
K601	R	—	—	—	—	—	K601	++
K7	P	—	—	—	—	—	K7	++
K701	R	—	—	—	—	—	K701	+
K9	P	—	—	—	—	—	K9	++
K901	P	—	—	—	—	—	K901	+
K10	R	—	—	—	—	—	K10	+
K1001	R	—	—	—	—	—	K1001	+
K11	R	—	—	—	—	—	K11	+
K14	P	—	—	—	—	—	K14	++
K1401	P	—	—	—	—	—	K1401	++
K1501	R	—	—	—	—	—	K1501	+
K1601	P	R	R	R	R	—	K1601	++++
K1701	P	R	R	R	R	—	K1701	++++
K1801	P	R	R	R	R	R	K1801	++++
K1901	P	P	P	—	—	—	K1901	++++
No.28	P	—	—	—	—	—	No.28	+++
No.77	W	P	P	P	P	P	No.77	+++++

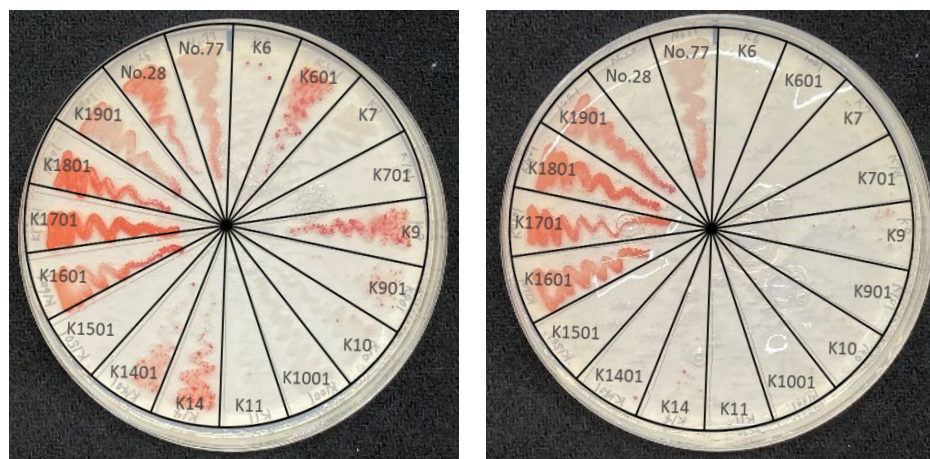


Fig. 31 セルレニンにおける増殖試験 (左図 : 0.3 ppm 右図 : 0.6 ppm)

シクロヘキシミドを用いた識別試験では、0~1.0 ppm のシクロヘキシミド濃度で各きょうかい酵母の耐性を評価した。その結果、シクロヘキシミドによる生育が抑制された順に、0.1 ppm で抑制された耐性+1 の K7 株グループ (K7、K10、K1001、No.28 株)、0.2 ppm で抑制された耐性++ の K6 株グループ (K6、K601、K701、K9、K901、K11、K14、K1401、K1501、K1601、K1701、K1801、K1901 株)、1.0 ppm でも生育が確認された耐性+++ の No.77 株グループ (No.77 株) の計 3 グループに分類された。

上記の結果から、K6 株、K7 株、No.77 株をきょうかい酵母以外の酵母株の識別する際の基準株とすることとした。

Table 43 シクロヘキシミドを用いた増殖試験結果

	シクロヘキシミド (ppm)											生育具合での 総合評価	
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0		
K6	R	±W	—	—	—	—	—	—	—	—	—	K6	++
K601	R	±W	—	—	—	—	—	—	—	—	—	K601	++
K7	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	K7	+
K701	R	±W	—	—	—	—	—	—	—	—	—	K701	++
K9	P	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—	K9	++
K901	P	±P	—	—	—	—	—	—	—	—	—	K901	++
K10	R	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	K10	+
K1001	R	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	K1001	+
K11	P	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—	K11	++
K14	P	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—	K14	++
K1401	P	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—	K1401	++
K1501	R	±P	—	—	—	—	—	—	—	—	—	K1501	++
K1601	P	±P	—	—	—	—	—	—	—	—	—	K1601	++
K1701	P	±P	—	—	—	—	—	—	—	—	—	K1701	++
K1801	W	±P	—	—	—	—	—	—	—	—	—	K1801	++
K1901	W	±P	—	—	—	—	—	—	—	—	—	K1901	++
No.28	R	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	No.28	+
No.77	P	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	No.77	+++

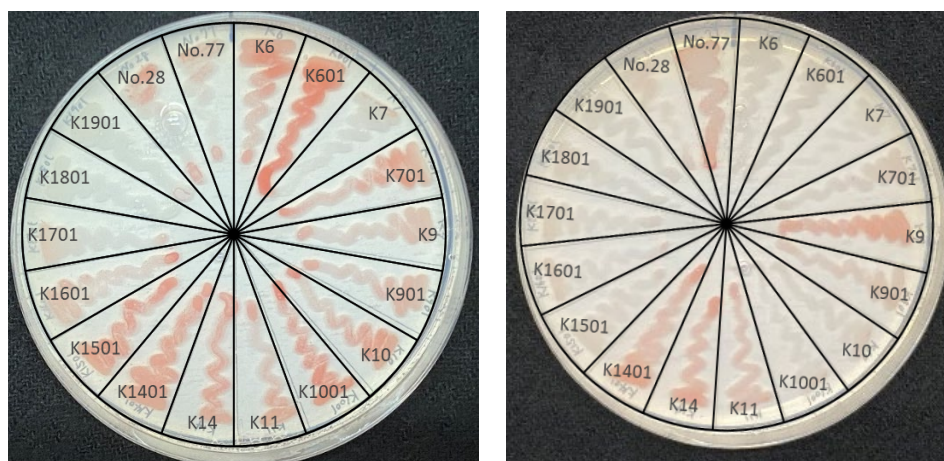


Fig. 32 シクロヘキシミドにおける増殖試験 (左図 : 0.0 ppm 右図 : 0.1 ppm)

DMS を用いた識別試験では、0~3.0 ppm の DMS 濃度で各きょうかい酵母の耐性を評価した。その結果、DMS による生育が抑制された順に、1.2%で抑制された耐性+の K1601 株グループ (K1601、No.77 株)、1.5%で抑制された耐性++の No.28 グループ (No.28 株)、2.4%で抑制された耐性+++の K7 グループ (K7、K9、K10、K1001、K14、K1401、K1701、K1801、K1901 株)、2.7%で生育が抑制された耐性++++の K6 グループ (K6、K601、K701、K901、K11、K1501 株) の計 4 グループに分類された。しかし、耐性++++の DMS 濃度 2.4%以上での酵母の生育は非常に弱い (±) ため、DMS に対する酵母の耐性評価は、耐性+~++++の 3 段階で評価することとした。

Table 44 DMS を用いた増殖試験

	コハク酸ジメチル (DMS) (%)											生育具合での 総合評価	
	0.0	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7	3.0		
K6	R	R	R	R	R	R	R	R	±P	—	—	K6	+++
K601	R	R	R	R	R	R	R	P	±P	—	—	K601	+++
K7	R	P	P	P	P	±W	±P	±P	—	—	—	K7	+++
K701	R	R	R	R	R	R	R	R	—	—	—	K701	+++
K9	P	P	P	P	P	P	P	P	—	—	—	K9	+++
K901	P	P	P	P	P	P	P	P	±P	—	—	K901	+++
K10	R	R	R	R	R	R	P	P	—	—	—	K10	+++
K1001	R	R	R	R	R	P	P	P	—	—	—	K1001	+++
K11	R	R	R	R	R	P	P	P	±P	—	—	K11	+++
K14	R	R	P	R	R	P	P	P	—	—	—	K14	+++
K1401	R	R	P	R	R	P	P	P	—	—	—	K1401	+++
K1501	R	P	R	R	R	R	P	R	±P	—	—	K1501	+++
K1601	R	P	P	±P	—	—	—	—	—	—	—	K1601	+
K1701	R	P	P	±P	P	P	P	±P	—	—	—	K1701	+++
K1801	R	P	W	±W	±W	±W	±W	±P	—	—	—	K1801	+++
K1901	R	P	W	±W	±W	±W	±W	±P	—	—	—	K1901	+++
No.28	R	R	R	R	R	±P	—	—	—	—	—	No.28	++
No.77	±P	±P	±W	±W	—	—	—	—	—	—	—	No.77	+

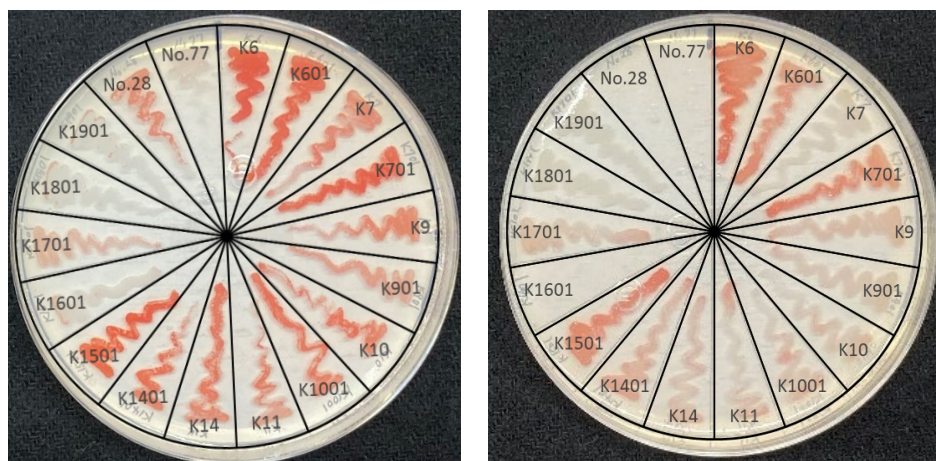


Fig. 33 DMS における増殖試験 (左図 : DMS 0.9% 右図 : DMS 1.5%)

マルトース、ガラクトース、 α -MG を炭素源として用いた増殖試験を、マルトースとガラクトースについては異なる培養温度 (30, 33, 36, 39°C) で、 α -MG については 30°C で実施し、酵母の炭素原資化性を評価した。その結果、K1701、K1801、K1901、No.77 株は 36°C でマルトースを資化せず、全ての株が 39°C で資化しなかった。次に、K6、K14、K1401、K1601、K1801、K1901、No.77 株は 36°C でガラクトースを資化せず、全ての株が 39°C で資化しなかった。

Table 45 マルトース、ガラクトース、 α -MG を用いた増殖試験

	マルトース				ガラクトース				α -MG	
	30°C	33°C	36°C	39°C	30°C	33°C	36°C	39°C	30°C	
K6	R	R	R	—	R	R	—	—	P	K6
K601	R	R	R	—	R	R	R	—	\pm W	K601
K7	R	R	R	—	R	R	R	—	\pm W	K7
K701	R	R	R	—	R	R	R	—	P	K701
K9	R	R	R	—	R	R	R	—	P	K9
K901	R	R	R	—	R	R	R	—	P	K901
K10	R	R	R	—	R	R	R	—	—	K10
K1001	R	R	R	—	R	R	R	—	—	K1001
K11	R	R	R	—	R	P	P	—	—	K11
K14	R	R	R	—	P	P	—	—	P	K14
K1401	R	R	R	—	P	P	—	—	P	K1401
K1501	R	R	R	—	R	R	R	—	—	K1501
K1601	R	R	R	—	R	R	—	—	—	K1601
K1701	R	R	—	—	R	R	R	—	—	K1701
K1801	R	R	—	—	R	P	—	—	\pm P	K1801
K1901	R	R	—	—	R	P	—	—	\pm P	K1901
No.28	P	P	P	—	R	P	P	—	\pm W	No.28
No.77	P	P	—	—	\pm P	\pm P	—	—	—	No.77

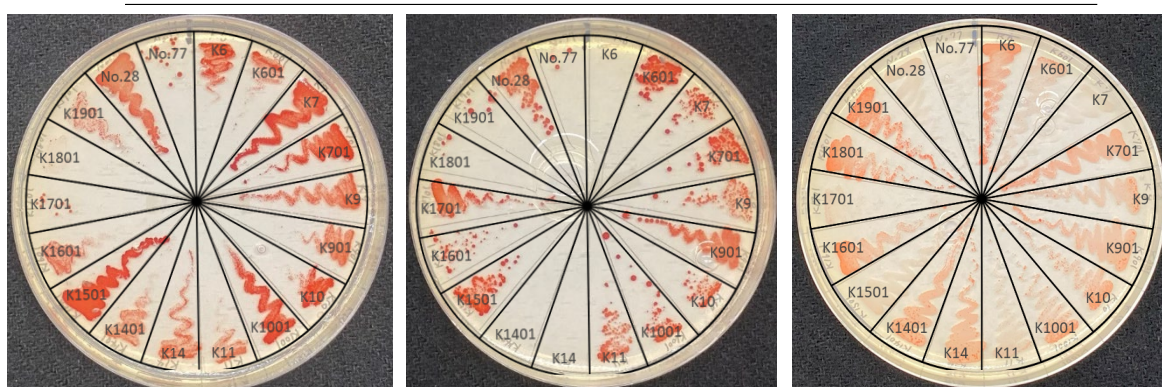


Fig. 34 マルトース、ガラクトース、 α -MG を用いた増殖試験
(左からマルトース 35°C、ガラクトース 35°C、 α -MG 30°C)

β アラニンを炭素源として用いた増殖試験は、30°Cと35°Cで実施し、各きょうかい酵母の資化性を評価した。その結果、すべての株が30°Cで β -アラニンを資化したのに対し、35°CではK7、K701、K1001、K11、K1501株による資化が確認されなかった。

Table 46 β アラニンを用いた増殖試験

	β アラニン	
	30°C	35°C
K6	R	R
K601	R	R
K7	\pm R	—
K701	\pm R	—
K9	R	R
K901	R	R
K10	R	R
K1001	\pm RorP	—
K11	\pm R	—
K14	R	R
K1401	R	R
K1501	\pm W	—
K1601	R	R
K1701	R	R
K1801	R	R
K1901	R	R
No.28	R	R
No.77	\pm P	\pm P

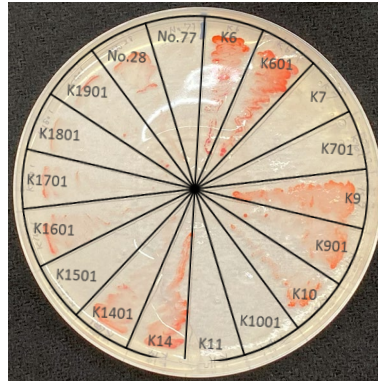


Fig. 35 β アラニン培地 35°Cでの増殖試験

各きょうかい酵母のロイシン、アラニン、アルギニンの資化性を、ロイシンとアラニンについては 35、38、41°Cで、アルギニンについては 30、35、38、41°Cで評価した。ロイシンの資化性についてみてみると、35°Cでは K7、K1601、K1701、K1801、K1901、No.28、No.77 株が資化できず、41°Cではすべての株が資化できなかった。アラニンについては、35°Cで K7、K1701、K1801、K1901 株が資化できず、41°Cでは全ての株で資化できなかった。アルギニンについては、35°Cで K7、K9、K901、K14、K1401、K1601、K1701、K1801、K1901、No.77 株が資化できず、41°Cでは全ての株資化できなかった。

Table 47 アミノ酸を用いた増殖試験

	ロイシン			アラニン			アルギニン				
	35°C	38°C	41°C	35°C	38°C	41°C	30°C	35°C	38°C	41°C	
K6	R	±P	—	R	R	—	R	R	±P	—	K6
K601	R	±P	—	R	R	—	R	R	±P	—	K601
K7	±P	—	—	R	—	—	R	P	—	—	K7
K701	R	±P	—	P	R	—	R	P	±P	—	K701
K9	R	±P	—	R	±P	—	R	R	—	—	K9
K901	R	±P	—	R	±P	—	P	P	—	—	K901
K10	R	±P	—	R	R	—	R	R	±P	—	K10
K1001	R	±P	—	R	±P	—	R	R	±P	—	K1001
K11	P	±P	—	P	±P	—	P	P	—	—	K11
K14	R	±P	—	R	±P	—	P	P	—	—	K14
K1401	R	±P	—	R	±P	—	P	P	—	—	K1401
K1501	R	±P	—	P	R	—	R	R	±P	—	K1501
K1601	±P	—	—	R	R	—	R	R	—	—	K1601
K1701	±P	—	—	P	—	—	R	R	—	—	K1701
K1801	±P	—	—	R	—	—	R	R	—	—	K1801
K1901	±P	—	—	R	—	—	R	R	—	—	K1901
No.28	R	—	—	R	±P	—	P	P	±P	—	No.28
No.77	±W	—	—	R	±W	—	P	P	—	—	No.77

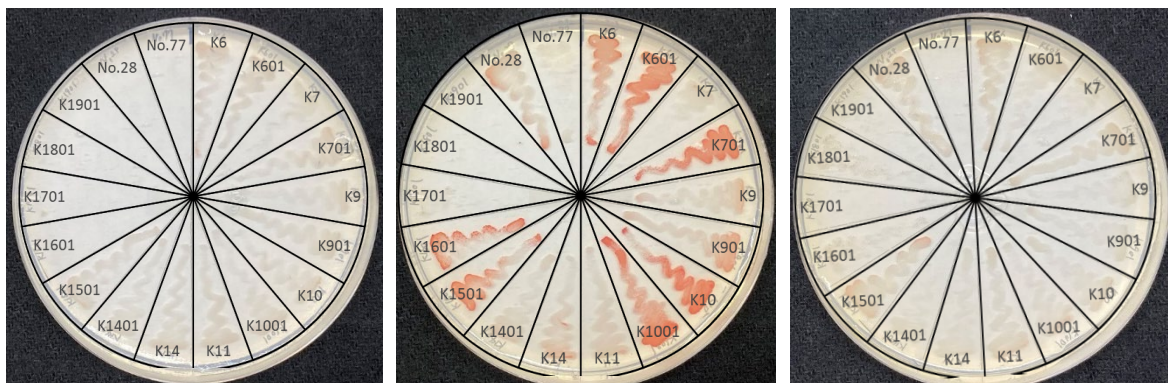


Fig. 36 アミノ酸を用いた 38°Cでの増殖試験 (左からロイシン、アラニン、アルギニン)

3-3-2 各識別試験から考えられるきょうかい酵母の識別

薬剤耐性試験および炭素源、窒素源の資化性について評価を行い、これを基にきょうかい酵母 18 株の識別を行った。初めにセルレニンを用いた識別試験を行いきょうかい酵母を 6 グループに分類した。セルレニン耐性++++++の K1801 株と No.77 株はシクロヘキシミドに対する耐性が異なるため識別することができた。セルレニン耐性+++++の K1601 と K1701 は、DMS に対する耐性が異なるため識別することができた。K1901 株と No.28 株については、セルレニン耐性のみで識別することができた。セルレニン耐性++の K601、K7、K9、K14、K1401 株については、35°Cにおける β -アラニンの資化性が無い K7 を識別し、 β -アラニンの資化性を示す K601、K9、K14、K1401 株については、38°Cにおけるアラニンの資化性によって、資化性がある K601 株を識別することができた。資化性を示さない K9、K14、K1401 株については、高泡形成試験で高泡を形成しない K1401 を識別できたが、K9 と K14 については、本研究において識別する方法を見出すことができなかった。セルレニン耐性+の K6、K701、K901、K10、K1001、K11、K1501 株については 35°Cにおける β -アラニンの資化性で 2 グループに分類した。 β -アラニンの資化性を示す K6、K901、K10 株のグループについては、シクロヘキシミドの耐性によって耐性+の K10 株を識別し、耐性++の K6、K901 株については 36°Cのガラクトースで資化性を示す K901 株と、資化性を示さない K6 株に分類した。 β -アラニンの資化性を示さない K701、K1001、K11、K1501 株のグループはシクロヘキシミドの耐性+の K1001 株を分類し、 α -MG の資化性を示す K701 株を分類した。 α -MG の資化性を示さない K11、K1501 株は高泡形成試験で高泡形成する K11 と、高泡を形成しない K1501 に分類した。

この結果より、きょうかい酵母 18 株中 16 株について分類することができ、K9 株と K14 株については分類することができなかった。既報の論文では 15 株中 5 株のみ分類ができており残りの株については大きなグループまでしか分類できていなかったことから、生理学的諸性質を用いたきょうかい酵母の分類において大きな進展であった (Fig. 37)。

3-4 小括

酵母の生理学的諸性質および薬剤耐性を用いた新たな清酒酵母の識別試験について検討を行った。きょうかい酵母 18 株について、薬剤耐性試験や生理学的諸性質を用いて評価を行った。それぞれの評価をもとにきょうかい酵母の識別方法を検討した。この結果より、きょうかい酵母 18 株中 16 株について分類することができ、K9 株と K14 株についてはお互いを識別することができなかった。既報の論文では 15 株中 5 株のみ分類ができており残りの株については大きなグループまでしか分類できていなかったことから、生理学的諸性質を用いたきょうかい酵母の分類において大きな進展であった。

また、各種試験において耐性に違いがある事が確認できるが、この結果が清酒の仕込み試験を行った際、グループごとに似たような性質を持つのか、今後試験を行い確認することが、今後の課題である。

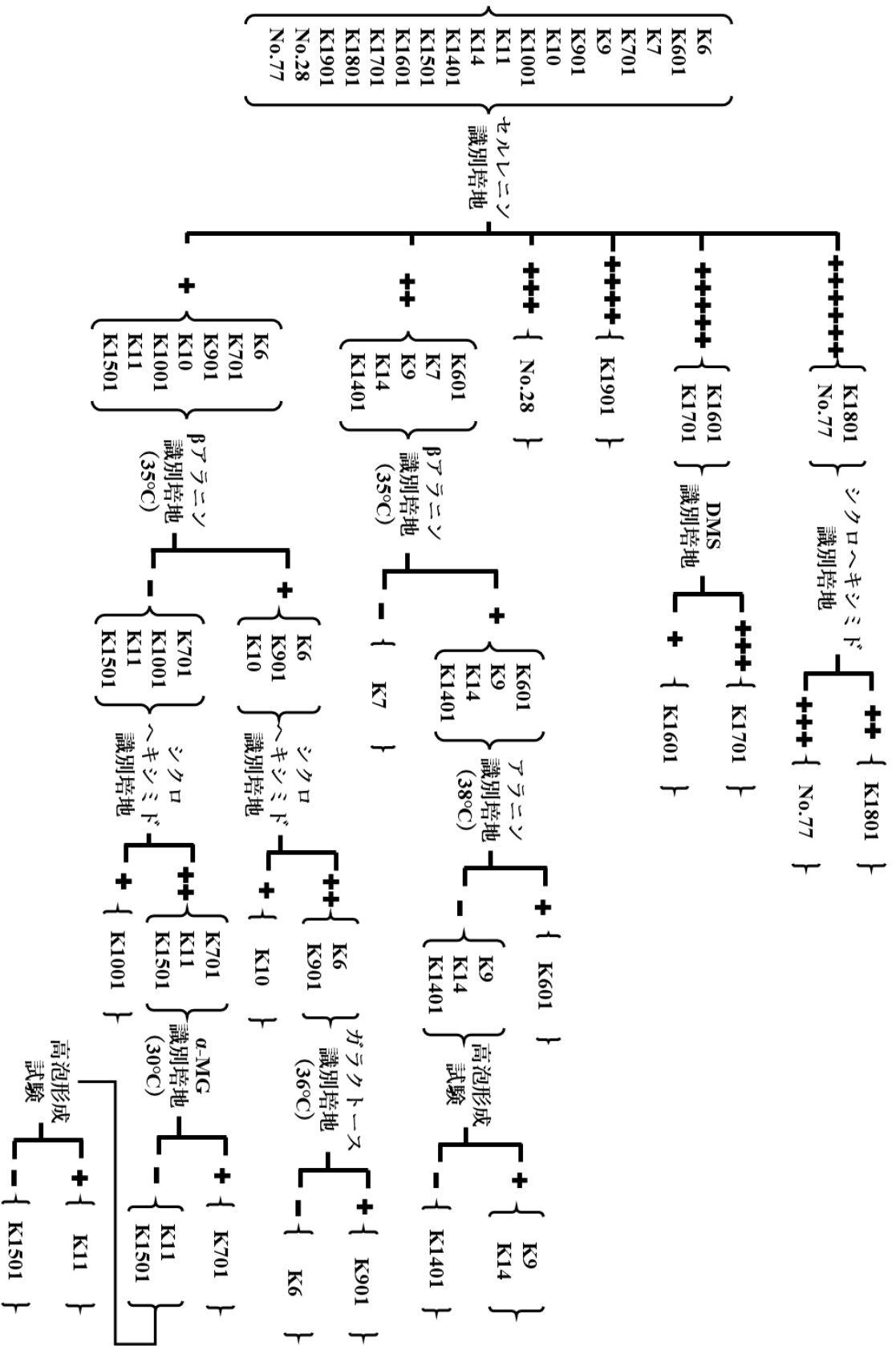


Fig. 37 きょうかい酵母 18 株を用いた識別法

第4章 生理学的諸性質を用いた分離株の識別試験

4-1 緒言

1章、2章では、新規に開発・改良した集積培地を用いて自然界からの清酒製造用酵母の分離を試み、それぞれの集積培地で実用可能性が高い酵母（1章：BY1-1株、BY1-3株、2章：BV-2株、BV-3株）を分離することができた。また、3章では各種きょうかい酵母の新たな判別方法を模索しK9株とK14株を除く全てのきょうかい酵母を識別する方法を開発することができた。本章では、3章で開発した識別法を利用し、1章・2章で取得した分離酵母がどのきょうかい酵母と類似するのか、あるいは全く別の株であるのかを検討した。

4-2 実験方法

4-2-1 使用菌株

1章および2章で分離したBY1-1株、BY1-3株、BV-2株、BV-3株を供試菌株とし、また各試験において耐性度や資化性の有無の指標となるきょうかい酵母を選択し、それらを対照株とした（Table 48）。

Table 48 各増殖試験における基準株

基準株	
セルレニン	K6, K601, K1601, K1801, K1901, No.28
シクロヘキシミド	K6, K7, No.77
DSM	K6, K1601, No.28
マルトース	K6, K1701
ガラクトース	K6, K601
α -MG	K6, K7, K10
β -アラニン	K6, K7
ロイシン	K6, K7
アラニン	K6, K7, K9

4-2-2 使用培地

使用培地の調製は3-2-2と同様に実施した。

4-2-3 増殖試験および生育、染色性の確認

供試菌株をYM培地で25°C、3日間培養し、1 mLの培養液を採取した。遠心分離（3000 rpm、3 min.）で集菌後、滅菌水で2回洗菌し、1 mLの滅菌水で菌体を懸濁した。この懸濁液を作製した培地の1区画に1白金耳植菌を行った。植菌後は温度の指定がない培地は30°C、指定があるものは指定温度で3日間培養後、TTC上層培地を重層し、生育具合および染色性の確認を行った。

4-3 結果および考察

4-3-1 BY1-1株およびBY1-3株の識別

a. セルレニンによる識別試験

3章で完成させた識別試験方法を用いて、1章で分離したBY1-1株およびBY1-3株を識別試験に供した。作成した識別手順を基に初めにセルレニンの試験を行った。Fig. 38で示す結果となり5 ppmのセルレニン培地で、K1801株の生育が確認されなかったが、BY1-1株とBY1-3株は共に生育が確認された。このことからK1801株よりも強いセルレニン耐性があると考えられたが、K1801株が今回生育が弱っていた可能性を考慮して、BY1-1、BY1-3株は耐性++++++のグループに分類することとした。

Table 49 セルレニンによるBY株の増殖試験

	セルレニン (ppm)											生育具合での 総合評価	
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0		
K6	R	R	R	R	—	—	—	—	—	—	—	K6	+
K601	R	R	R	R	—	—	—	—	—	—	—	K601	++
K1601	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	K1601	++++
K1801	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	K1801	+++++
K1901	W	W	W	W	W	W	W	P	P	P	P	K1901	++++
No.28	R	R	R	R	R	P	P	±	—	—	—	No.28	+++
BY1-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	BY1-1	+++++
BY1-3	P	P	P	P	R	R	R	R	R	R	R	BY1-3	+++++

	セルレニン (ppm)						生育具合での 総合評価	
	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0		
K6	R	—	—	—	—	—	K6	+
K601	R	—	—	—	—	—	K601	++
K1601	P	P	R	R	±R	—	K1601	++++
K1801	P	P	R	R	±R	—	K1801	+++++
K1901	W	P	±	±	—	—	K1901	++++
No.28	R	—	—	—	—	—	No.28	+++
BY1-1	R	R	R	R	R	R	BY1-1	+++++
BY1-3	P	R	R	R	R	R	BY1-3	+++++

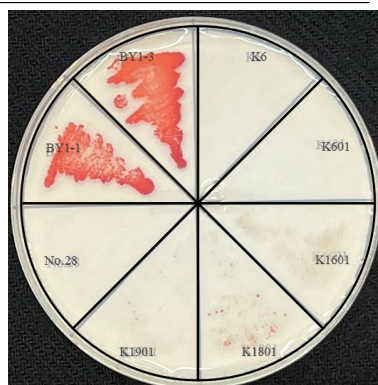


Fig. 38 セルレニン 5 ppm における基準株および分離株 BY1-1 株、BY1-3 株の増殖試験

b. シクロヘキシミドによる識別試験

セルレニンの結果より、分離株が K1801 株と No.77 株どちらに近縁であるか調べるためシクロヘキシミドによる試験を行った。BY1-1 株についてはシクロヘキシミドによる生育抑制が K6 株と同じことから耐性++グループであると判断し、BY1-3 株については K6 よりも抑制される濃度が低いことから耐性+グループであると判断された。この結果より、BY1-3 株はどのきょうかい酵母とも異なる分離酵母であると判断した。

Table 50 シクロヘキシミドによる BY 株の増殖試験

	シクロヘキシミド (ppm)											生育具合での 総合評価	
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0		
K6	P	P	P	P	±P	—	—	—	—	—	—	K6	++
K7	R	±W	—	—	—	—	—	—	—	—	—	K7	+
No.77	W	W	P	P	P	P	P	P	P	P	P	No.77	+++
BY1-1	R	R	R	P	±P	—	—	—	—	—	—	BY1-1	++
BY1-3	R	±W	—	—	—	—	—	—	—	—	—	BY1-3	+

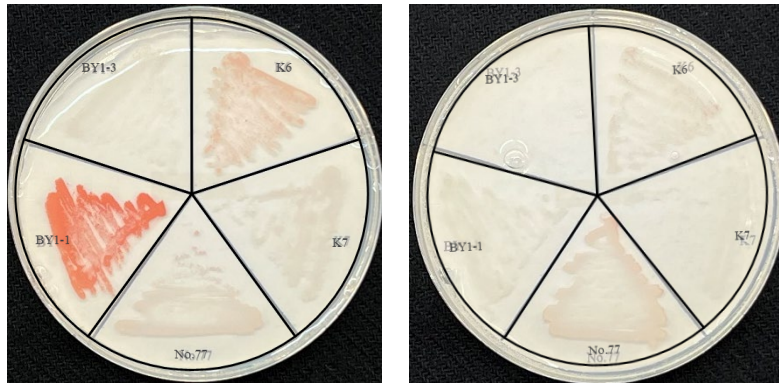


Fig. 39 シクロヘキシミドにおける基準株および分離株 BY1-1 株、BY1-3 株の増殖試験
(左図:0.1 ppm 右図:0.4 ppm)

c. マルトース、ガラクトース、アラニンを用いた増殖試験

シクロヘキシミド試験の結果より、K1801 株と BY1-1 株は新たに設計した識別方法では同一の結果を示す株であることが確認された。そこで、新たな試験を追加する事で識別することができるか検討を行った。その結果、マルトース、ガラクトース、アラニンを用いた識別試験の結果、各試験において、BY1-1 株は生育する事 (+) が確認され、前章の結果より K1801 株はいずれの試験でも生育しない株であることから BY1-1 株はきょうかい酵母と異なる分離株であると判断した。

Table 51 マルトース、ガラクトース、アラニンによる BY 株の増殖試験

	マルトース		ガラクトース		アラニン			
	30°C	36°C	30°C	36°C	35°C	38°C		
K6	P	W	K6	P	±	K6	R	R
K1701	P	±	K601	P	P	K7	—	—
BY1-1	R	P	BY1-1	R	P	K9	R	±
BY1-3	P	±	BY1-3	R	±	BY1-1	R	R
						BY1-3	—	—

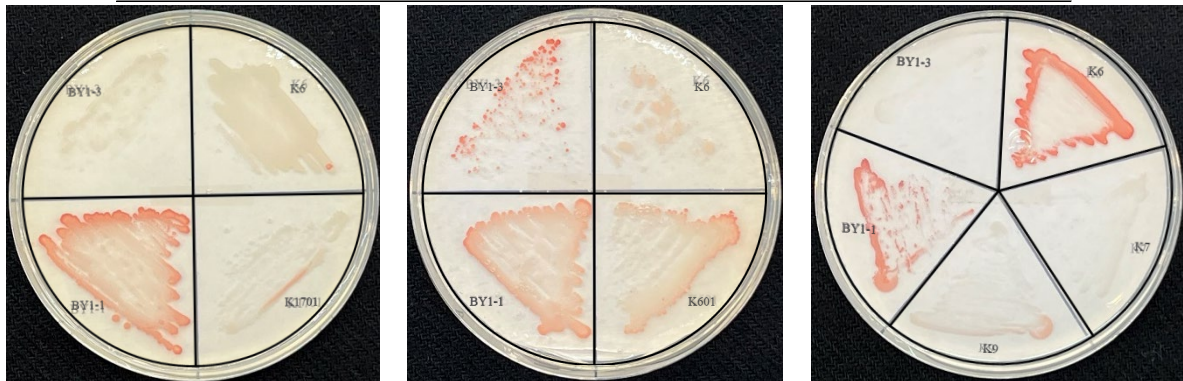


Fig. 40 マルトース、ガラクトース、アラニンにおける基準株および分離株 BY1-1 株、BY1-3 株の増殖具合 (左からマルトース 36°C、ガラクトース 36°C、アラニン 38°C)

4-3-2 BV-2 株および BV-3 株を用いた識別試験

a. セルレニンによる識別試験

4-3-1 と同様の方法、2 章で分離した BV-2 株および BV-3 株を識別試験に供した。作成した識別手順を基に初めにセルレニンの試験を行った。Fig. 40 のような結果となり BV-2 株と BV-3 株は共に耐性菌の生育も見られるが No.28 と同じ耐性+++グループと判断した。

Table 52 セルレニンによる BV 株の増殖試験

	セルレニン (ppm)												生育具合での 総合評価	
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0			
K6	R	R	R	R	—	—	—	—	—	—	—	—	K6	+
K601	R	R	R	R	—	—	—	—	—	—	—	—	K601	++
K1601	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	K1601	++++
K1801	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	K1801	+++++
K1901	W	W	W	W	W	W	W	P	P	P	P	P	K1901	++++
No.28	R	R	R	R	±P	±P	±P	±W	±W	±W	—	—	No.28	+++
BV-2	P	P	P	P	±P	±P	±P	±P	±P	±P	—	—	BV-2	+++
BV-3	W	W	W	W	±W	±W	±W	±W	±W	±W	—	—	BV-3	+++

	セルレニン (ppm)					生育具合での 総合評価		
	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0		5.0	
K6	R	—	—	—	—	K6	+	
K601	R	—	—	—	—	K601	++	
K1601	P	P	R	R	±R	—	K1601	++++
K1801	P	P	R	R	±R	—	K1801	+++++
K1901	W	P	±	±	—	—	K1901	++++
No.28	R	—	—	—	—	—	No.28	+++
BV-2	P	—	—	—	—	—	BV-2	+++
BV-3	W	—	—	—	—	—	BV-3	+++

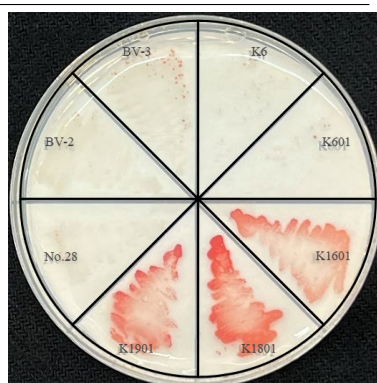


Fig. 41 セルレニン 0.9 ppm における基準株および分離株 BV-2、BV-3 株の増殖試験

b. シクロヘキシミドによる識別試験

セルレニンの結果から作成した識別手順では No.28 株と近縁である判断することしかできないが、新たにシクロヘキシミドの増殖試験を行うことで分類することができる可能性があったため、試しに試験を行った。その結果、シクロヘキシミドを用いた試験では BV-2 株は K6 と同じ耐性++グループと判断できた。BV-3 株については耐性++の K6 株と耐性+++の No.77 株の間で生育が抑制されており、新たな耐性度である可能性が示されが、今回については耐性+++と判断した。このことから BV-2 株、BV-3 株はそれぞれ異なる性質をもつ酵母であると判断した。

Table 53 シクロヘキシミドにおける BV 株の増殖試験

	シクロヘキシミド (ppm)											生育具合での 総合評価	
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0		
K6	R	P	P	P	±P	—	—	—	—	—	—	K6	++
K7	R	±W	±W	—	—	—	—	—	—	—	—	K7	+
No.77	W	W	W	P	P	P	P	P	P	P	P	No.77	+++
BV-2	W	P	P	P	±P	—	—	—	—	—	—	BV-2	++
BV-3	P	P	P	P	P	P	P	P	±P	—	—	BV-3	+++

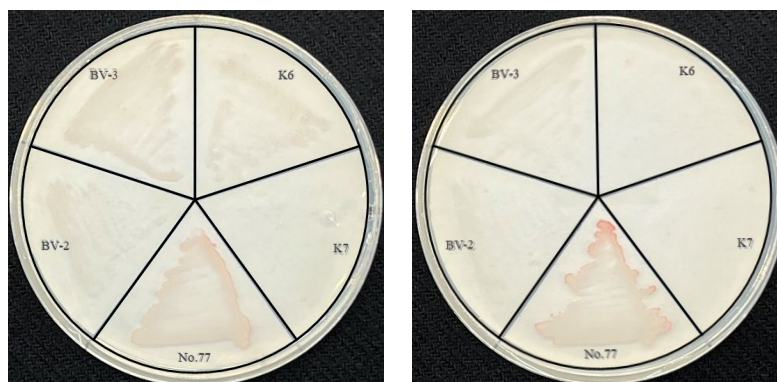


Fig. 42 シクロヘキシミドでの BV-2、BV-3 株の増殖試験 (左図:0.4 ppm 右図:0.8 ppm)

4-3-3 新たに分離した清酒製造用酵母の識別試験

新たに分離した清酒製造用酵母の識別試験の結果を、きょうかい酵母の識別法に当てはめて Fig. 43 にまとめた。

4-4 小括

前章で確立された識別法と基準株を用いて分離した新規清酒製造用酵母 (BY1-1、BY1-3、BV-2、BV-3 株) の識別試験を行った。

BY1-1、BY1-3 株についてはセルレニン耐性試験の結果 K1801 株と同じ耐性を示し、その後のシクロヘキシミドの試験で BY1-3 株が一番耐性低く、他の酵母と識別できた。BY1-1 株は K1801 株と同じ耐性を示し、新たに追加したガラクトースでの試験によって K1801 株と識別できたことから、きょうかい酵母とは違う性質を示す可能性が示された。

BV-2、BV-3 株についてはセルレニンの試験で No.28 と同じ耐性が確認できた。さらにシクロヘキシミドによる試験を行ったところ BV-3、BV-2、No.28 株とそれぞれ違う耐性を示したことから 3 種が全く違う特徴を持つ清酒製造用酵母であると識別することができた。No.28、BV-2、BV-3 については同時に小仕込み試験を行い、識別試験との関係性を確認することで薬剤耐性を用いた識別と分析値の関係性についても調べたいと考えている。

また、シクロヘキシミド識別試験における BV-3 株のように明らかにきょうかい酵母と異なる耐性度を持つ酵母が出た際の、判定をどうするか検討も必要であると考えられる。

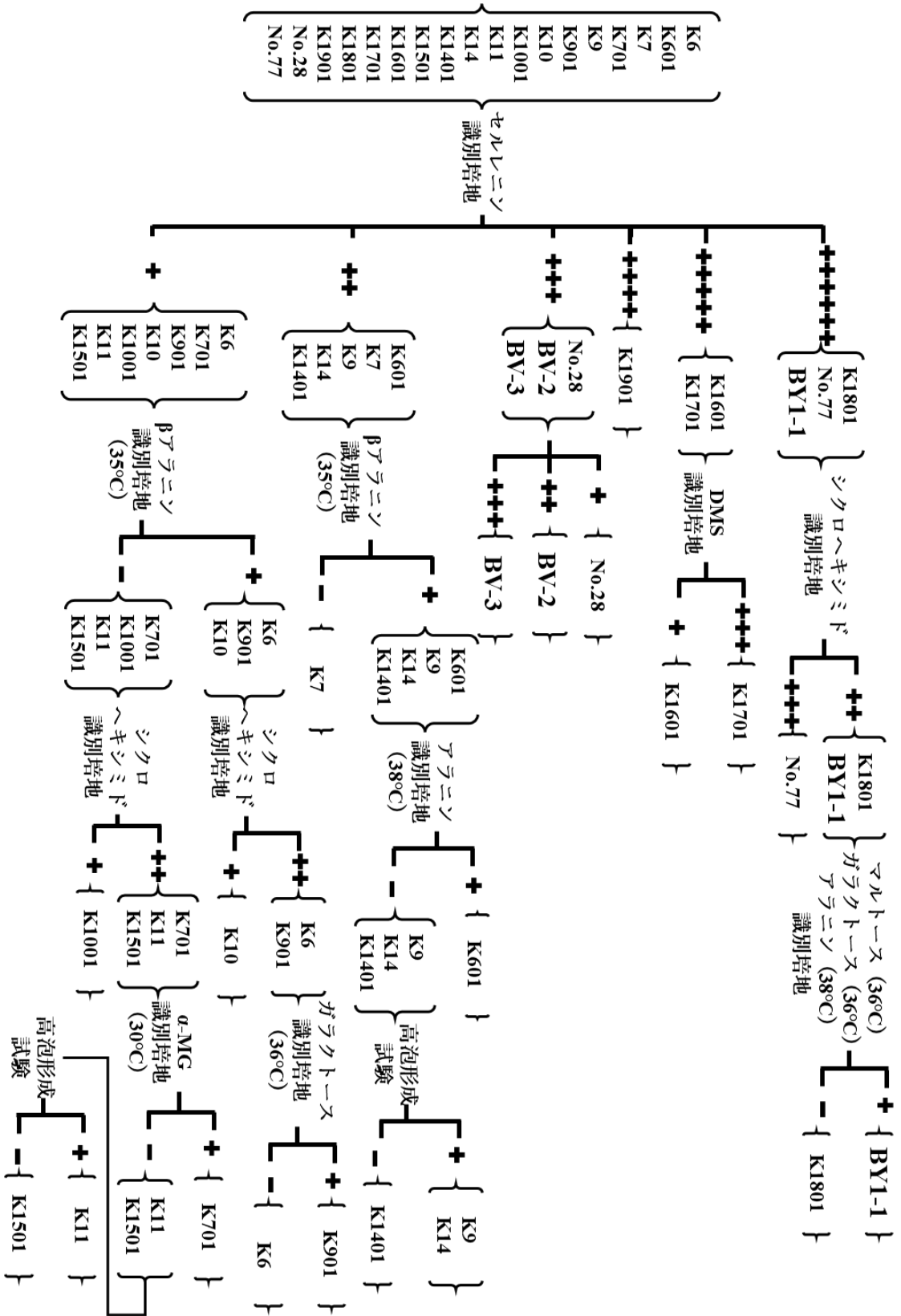


Fig. 43 新規識別法を用いた分離株の識別

総括

1章では新規の清酒製造用酵母を分離するために、既存の集積培地よりも *S.cerevisiae* であり、清酒製造に用いる酵母を効率的に集積できる培地を目的に設計を行った。各種実用酵母はビタミンの要求性が異なり、さらに多くの清酒酵母がビタミン非要求であることを用いて培地の設計を行った。また、抗菌物質として微生物工学研究室で使用されていた Yeastcidin についても着目し、清酒酵母のビタミン非要求性と Yeastcidin を利用した新規の集積培地 BY 培地を設計した。この培地を用いて実用酵母を用いた増殖試験を行った結果、清酒酵母 K6 株、K7 株、K9 株と焼酎酵母 SH4 株のみ増殖が確認され、他の酵母の生育を抑制する培地であることが確認された。この結果から集積培地として用いることができる判断し、実際に分離源を添加した実験を行った。KY 培地と BY 培地の2つを利用して酵母の分離を試みたところ、BY 培地からのみアルコール発酵能力が高い酵母 BY1-1~4 株を分離することができた。また、小仕込み試験において官能的に吟醸香を強く感じた BY1-1 株の分子系統解析を行ったところ、*S. cerevisiae* であることが強く推定された。これらの結果から、ビタミンを含まない集積培地という、これまでに微生物工学研究室や他の研究者らが酵母分離で用いて来た様々な集積培地とは異なる新規集積培地の開発に成功した。

2章では BY 培地と異なり、抗菌物質を使用せず、清酒酵母のビタミン非要求性のみを用いた集積培地である BV 培地を設計し、増殖試験を行った。BV 培地において試験した清酒酵母および焼酎酵母の生育が確認され、その他の酵母については生育が確認されなかった。このことから清酒酵母をより選択的に集積する事ができる培地であると期待された。そこで実際に分離源を添加して酵母の集積を試みた。八重桜の花を3種類の集積培地に添加して集積培養を行った結果、すでに清酒製造で実用化されている酵母の分離実績がある KY 培地や BY 培地からは、アルコール発酵能が優れた分離株を取得できず、新たに設計した BV 培地からのみ取得することができた。これらの結果は、抗菌物質を使用しない新規集積培地の設計に成功したことと、清酒製造を目的とした酵母の分離を試みる際には、複数種類の集積培地を用いることで目的とする酵母の取得確率を向上させる可能性を示している。

3・4章では、酵母の生理学的諸性質および薬剤耐性を用いた新たな清酒酵母の識別試験について検討を行った。はじめにきょうかい酵母 18 株について試験を行った結果、きょうかい酵母 18 株中 16 株について分類することができ、K9 株と K14 株については分類することができなかった。この結果を用いて、作成した分類図と基準株を用いて新規に分離した清酒製造用酵母の識別試験を行ったところ、分離した酵母 4 株はきょうかい酵母と全く異なる特徴を持つ酵母であると判断できた。

本研究では、既存の集積培地よりも効率よく清酒製造用酵母を集積することのできる培地の作成を目的として各種試験を行った。清酒酵母のビタミン非要求性という特性を用いた新規の集積培地として、BY 培地と BV 培地を設計し、この2種の培地とも清酒酵母と一部の焼酎酵母が選択的に増殖することが確認された。実際に BY 培地と BV 培地に分離源を添加し、新規清酒製造用酵母の分離に成功したことから、清酒製造用酵母を分離することに適している培地であると考えられた。きょうかい酵母の識別試験についても既存の方法を改変し、生育濃度を用いた新規の識別方法を検討し、きょうかい酵母の識別および分離した酵母の識別を行えることを確認した。

どちらの試験についても今回の結果では成功しているが、試行数が少ないため今後も継続的に試験を行い母数を増やすことで、新規培地が清酒酵母に適しているかの検討を、識別試験についても再現性があるのかを確認する必要がある。集積培地については、1章で設計したBY培地について、1章では新規清酒製造用酵母を分離することができたが、2章の分離では分離することができなかった。これについては、添加した分離源に酵母が付着していなかった可能性もあるが、分離源の状態や採取時の気候によって、KY培地、BY培地、BV培地それぞれで適して条件がある可能性もあるため、今後統計などを用いつつ検討を重ねつつ、改良できる部分を検討する必要があると考える。

識別試験については、今回分離した酵母以外についても試験を行い、同様に識別可能であるか検討を行う必要がある。また、きょうかい酵母と似た識別結果になった分離された酵母について、似た識別結果となっている酵母同士で小仕込み試験を行い、仕込み結果の分析値が似ているのか、異なる部分がどのように現れるかを確認することも検討課題である。今後、検討を行う必要がある部分は多いが識別試験を酵母の分離に組み込むことで新たな分離方法に繋げることと、小仕込み試験での基準株の選定などに用いることができると考えている。

参考文献

- 1) 小穴富司雄：醸協、65 (4)、307-311 (1970)
- 2) 野白喜久雄：醸協、79 (4)、229-235 (1984)
- 3) 塚原寅次：醸協、50 (11)、623-625 (1955)
- 4) 国税庁 租税史料 (2023年12月)
(<https://www.nta.go.jp/about/organization/ntc/sozei/tokubetsu/h22shiryokan/01.htm>)
- 5) 総務省 国税・地方税の税収内訳 (令和4年度決算額) (2024年2月)
(https://www.soumu.go.jp/main_sosiki/jichi_zeisei/czaisei/czaisei_seido/ichiran02.html)
- 6) 公益財団法人日本醸造協会 きょうかい酵母 (2023年12月) (<https://www.jozo.or.jp/yeast/>)
- 7) 相川元庸、水津哲義、市川英治、川戸章嗣、安部康久、今安聰：醸工、70 (6)、443-477 (1992)
- 8) 福田和郎：醸協、88 (1)、22-28 (1993)
- 9) 市川英治：醸協、88 (2)、101-105 (1993)
- 10) 有富和生、田村伊美子、田中淳也、半明桂子、有馬秀幸：山口県産業技術センター研究報告、24、21-23 (2012)
- 11) 宮岡俊輔、新谷智吉、森本聡：醸協、96 (2)、115-120 (2001)
- 12) 大場孝宏、末永光、一松時生、羽田野雄大、満生慎二、鈴木正柯：醸協、103 (12)、949-953 (2008)
- 13) 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)
- 14) 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、41、5-11(2015)
- 15) 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、4、68-71 (2014)
- 16) 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、白井瑠美、續順子：あいち産業科学技術総合センター、4、96-99 (2014)
- 17) 中川秀幸：富山食研研報、1、23-30 (2010)
- 18) 松田義弘、工藤晋平、小関敏彦、上木厚子、上木勝司：醸協、100 (3)、199-208 (2005)
- 19) 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、7、58-61 (2017)
- 20) 久田孝、矢野俊博、松田章：醸協、107 (4)、205-209 (2012)
- 21) 尾仲宏康、丸山潤一、浅水俊平、黒岩真弓、北本勝ひこ、山田雅人、五島徹也、赤尾健：醸協、114 (10)、645-653 (2019)
- 22) 殿内暁夫、森山裕理子、青山嘉宏、土岐春歌：醸協、111(7)、437-444 (2016)
- 23) 荻野目あづさ、川久保利麗叶、上田誠：小山工業高等専門学校研究紀要、48、91-95 (2015)
- 24) 蟻川幸彦、小松良寿、戸井田 仁一、近藤君夫：長野食工試研報、33、47-48 (2005)
- 25) 蟻川幸彦、下坂誠、岡崎光雄、小原忠彦：長野食工試研報、30、53-54 (2002)
- 26) 小玉健太郎：醸協、94 (11)、879-883 (1999)
- 27) 吉浦 貴紀、田畑 恵、中川 力夫、長谷川 裕正、西岡 勇一郎：茨城県工業技術センター研究報告、39 (2011)

- 28) 鶴藺 大、富永 達矢、仲島日出男、横堀正敏：埼玉県産業技術センター研究報告、3 (2005)
- 29) 柏木享：醸協、97 (1)、2-6 (2002)
- 30) 山本渉：八戸工業高等専門学校紀要、45、45-48 (2010)
- 31) 工藤泰良、関淑楓、Teemu Koivisto、柏崎萌子、大久保里穂、山本歩：八戸工業高等専門学校紀要、51、117-121、(2017)
- 32) 西尾昭：鳥取県産業技術センター研究報告、13、31-33 (2010)
- 33) 勝山聡、天野祥吾、岩原健二：静岡県工業技術研究所、6、61-62 (2014)
- 34) 勝山聡、天野祥吾、岩原健二：静岡県工業技術研究所、7、49-53 (2015) "
- 35) 池本重明、阪井幸宏、中内道世：和歌山県工業技術センター平成 17 年度研究報告、19 (2006)
- 36) 池本重明、阪井幸宏、山本芳也、中内道世：和歌山県工業技術センター平成 18 年度研究報告、15 (2007)
- 37) 恩田匠、長沼幸多、乙黒親男、渡辺正平、飯村穰：山梨県工業技術センター研究報告、18、30-33(2004)
- 38) 加藤美都子、山岡邦雄、柏木享：NewFoodIndustry、52(8)、11-17(2010)
- 39) 高橋雅弘：農化、28 (5)、398-404
- 40) 中西志郎、塚原寅次：醸協、49 (10)、48-52 (1954)
- 41) 菅間誠之助、佐伯宏、野白喜久雄：醸協、60(4)、362-366 (1963)
- 42) 谷善雄：醸協、57 (1)、30-39
- 43) 中田久保、穂坂賢、坂井劭：醗工、63 (6)、509-515 (1985)
- 44) 穂坂賢、新宅信彦、矢作直子、中田久保、坂井劭、塚原寅次：醗工、65 (3)、191-197 (1987)
- 45) 小室友香理、清水大介、加藤陽子、穂坂賢、中田久保：醸協、100 (6)、454-460 (2005)
- 46) 下飯 仁：生物工学、80 (2)、64-69 (2002)
- 47) 篠原隆、押田明成、柳田藤寿：山梨大学醗酵研究所研究報告、31、1-8 (1996)
- 48) Miho KAWAHATA, Tsutomu FUJII, and Haruyuki IEFUJI : Biosci. Biotechnol. Biochem.、71 (7)、1616-1620 (2007)
- 49) 宇都宮仁、磯谷敦子、岩田博：醸協、99 (10)、729-734 (2004)
- 50) 吉沢淑、高橋康次郎：醸協、81 (10)、680-684 (1986)
- 51) 林田正典、上田隆蔵、寺本四郎：醗工、46 (2)、85-91 (1968)
- 52) 大場孝宏：醸協、106 (5)、262-270 (2011)
- 53) 佐藤信、大場俊輝、高橋康次郎、国分伸二、小林幹男、小林宏治：醸協、72 (11)、801-805 (1977)
- 54) 山根善治、武宮重人、川瀬直樹、佐伯宏：醸協、92 (3)、224-227 (1997)
- 55) 佐藤信、中村欽一、蓼沼誠、飯村穰、安岡正博、高橋康次郎：醸協、66 (5)、523-526 (1971)
- 56) 吉沢淑、高橋康次郎、平田勤、曾我浩：醸協、80 (8)、569-570 (1985)
- 57) 土肥和夫、宮内俊一、川本雅之：醗工、52、416-422 (1974)
- 58) 伊藤和樹、佐藤時習、兜森忠道、渡辺誠衛、田口隆信：醸協、102 (4)、309-313 (2007)
- 59) 吉田清：醸協、101 (12)、910-922 (2006)

謝辞

本論文の執筆にあたり多くの方々にご協力いただきました。指導教授である数岡孝幸教授には、いつも丁寧な指導と適切な助言をいただきました。深く感謝いたします。

また、醸造学専攻の先生方には貴重なアドバイスをいただき、感謝しております。最後に、本論文を執筆するにあたり協力してくださった全ての方に厚く御礼申し上げます。

Summary

I attempted to develop accumulation media those would make it difficult to isolate yeasts unsuitable for sake production, and designed two accumulation media, vitamin-deficient medium with Yeastcidin (BY medium) and vitamin-deficient medium (BV medium). Of the various practical yeasts, only sake yeast and a part of shochu yeasts were able to grow on BY and BV media. Furthermore, I attempted to isolate sake-producing yeasts from flower with BY, BV medium and koji extract medium containing Yeastcidin. As a result, we were unable to isolate yeasts with high alcohol fermentability from the KY medium, but were able to isolate one strain from the BY medium and two strains from the BV medium from the same source of isolation. In attempts to isolate new sake-producing yeasts from nature, it is important to distinguish the acquired strain from existing strains. Therefore, we attempted to improve the previously reported identification method that could identify 5 of the 18 strains of *kyokai* yeasts, and established a method that could identify 15 of the 18 strains. Using the established identification method to identify the new sake-producing yeast isolated from the flowers and the *kyokai* yeast, it was shown that the two strains isolated from the BV medium were different from the association yeast.