

温州ミカンの花から分離した酵母の 同定と清酒醸造特性

数岡孝幸*・水田健太郎**・上原莉奈**・中田久保*

(平成 23 年 11 月 17 日受付/平成 24 年 4 月 20 日受理)

要約: 集積培養法によって温州ミカンの花から分離株 MK1~3 株を得た。その中で MK3 株は、生理学的試験と 16S rDNA-D1/D2 領域および ITS 領域の塩基配列に基づいた分子系統解析の結果から *Saccharomyces cerevisiae* と同定された。また Yeastcidin 耐性を有する事から、MK3 株が清酒酵母であることが示唆された。MK3 株は、清酒もろみにおけるアルコール生産量が 17.6% であり、清酒酵母協会 9 号株と同等の発酵力を示した。MK3 株を用いた製成酒は香气成分と有機酸に特徴的な組成を示した。特に MK3 株を用いた製成酒は、低いコハク酸濃度、高いリンゴ酸/コハク酸比、高いカプロン酸エチル濃度、高いイソアミルアルコール/イソブチルアルコール比を示した。また、MK3 株は高泡を形成せず、TTC 還元性が Red であることから、清酒製造に実用可能な株であった。MK3 株は、特徴的な風味を形成できる実用酵母として清酒製造での利用が期待される。

キーワード: 清酒, 酵母, カプロン酸エチル, A/B 比, MA/SA 比

1. はじめに

米, 米麴, 水を原料とし, 総米に対する汲水量 135% 前後で仕込む清酒もろみは, 並行複発酵, 高濃度仕込み, 低温発酵, 低カリウム濃度, 乳酸酸性および固形物の溶解といった, 他の酒類とは異なる清酒製造特有の発酵環境を形成している。清酒酵母は, そのような清酒製造条件下の酵母およびもろみで良く生育し良質の清酒を造る適性を持つ一群の酵母である¹⁾。近代的な清酒製造では, 清酒の原料である水や麴に存在する清酒酵母が他の酵母に比較し少ないため^{2,3)}, 良質な製品を安定して生産することを目的に, 純粋培養した酵母を酒母製造工程において添加する。清酒の酒質は原料や製造工程における様々な要因によって変化するが, 使用する清酒酵母の種類は酒質形成の重要な要素の一つである。

現在, 主に日本醸造協会が純粋培養された種々のきょうかい酵母が清酒製造に用いられているが¹⁾, 近年の消費者の嗜好の変化に伴い酒質の多様化が求められ, それを目的に薬剤耐性株取得による酵母の育種⁴⁻⁷⁾ や清酒もろみからの変異株の分離^{8,9)}, 自然界からの清酒酵母の分離¹⁰⁾ が試みられている。

一方, 清酒製造業者は旧来その地域の地主であり, 地域で生産された余剰米を利用して, 地域との結びつきの中で清酒製造を行ってきた。近年地酒メーカーが苦戦するようになった一要因は, 地域との結びつきが弱くなったからと

も考えられる。そこで著者らは, 地域との結びつきをより強くするためには, 県花や市花など地域の花から分離された清酒酵母を用いた清酒製造が有効であると考えた。また, 花言葉はやさしく可憐な言葉が多く, 贈り物にされても喜ばれると予想される。そのような考えのもと, 清酒もろみで十分な発酵力を示し, 新たな香味特性を有する酵母の分離を消費者がイメージしやすい著名な花から試み, 清酒酵母を取得してきた¹⁰⁻¹⁴⁾。しかし地域との結びつきを考えると, 特産物である果物の花も有用であるにもかかわらず, その例はイチゴの花から分離した酵母¹⁴⁾を除きなかった。

本報では, 日本国内において最も生産量が多く, また特産地も多く有する温州ミカンの花から, 特徴ある有機酸組成および香气成分組成を形成する酵母が取得されたので報告する。

2. 方 法

(1) 集積培養用培地の調製

精米歩合 65% の一般精白米を用い蓋麴法により調製した麴 1 kg に対し水 4 l を加え, 55°C, 15 時間糖化を行った。濾過して得られた濾液に水を加え brix 18% に調整した麴汁培地を得た。100 ml の麴汁培地に, 中田ら¹⁵⁾の方法で調製した Yeastcidin 粗物質を 25 mg 添加し, 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌後, 乳酸を 0.4 ml, エタノール滅菌したカゼインを 5 g 加え集積培養用培地とした。

* 東京農業大学短期大学部醸造学科

** 東京農業大学応用生物科学部醸造科学科

(2) 酵母の分離

集積培養用培地を 100 ml 三角フラスコに調製し、酵母の分離源として熊本県球磨郡で採取された温州ミカンの花を適量添加した。25°C で集積培養し、集積培養中は一日に一回攪拌した。混濁し気泡を有する培養液の brix 値を定期的に測定し、brix 10% 以下となった時点で集積培養液をサンプリングした。集積培養液を滅菌水で適宜希釈後、TTC 下層培地に 50 個程度のコロニーが生育するように塗抹して、30°C で 3 日間培養し、生じたコロニーから釣菌することで分離酵母を得た。

(3) 発酵性、産膜性および増殖、細胞形態、孢子形成

得られた分離株を糖 10% YM 液体培地に植菌し、30°C、5 日間培養し発酵性と産膜性を観察した。増殖、形態に関しては、分離株を YM 液体培地に植菌し培養後、顕微鏡観察を行った。孢子形成は木澤らの方法に従った¹⁶⁾。酵母の栄養細胞と孢子をサフラニンとマラカイトグリーンで対比染色させ孢子の形成を確認した。

(4) 分離酵母の生理学的性質

(a) 糖類の発酵性、資化性および硝酸塩の資化性試験

“The Yeasts”¹⁷⁾ に準じて行った。Yeast Nitrogen Base (Difco) を基本培地とし、糖類発酵性はガラハム管を入れた試験管に各種糖が終濃度 2% (ラフィノースは 4%) となるように添加した培地を用いた。糖類資化性は、Yeast Nitrogen Base に各炭素源が 0.5%、寒天 2% となるように添加した培地を用いた。生育の判定は炭素源無添加培地を対照とし、培養温度は 25°C とした。硝酸カリウムの資化性試験は、Yeast Carbon Base (Difco) に硝酸カリウムと寒天をそれぞれ 0.078%、2% となるように添加した培地を用いた。対照として Yeast Carbon Base に 0.5% 硫酸アンモニウムを添加した培地と窒素源無添加培地を用いた。YM 液体培地で前培養した分離菌株を滅菌生理食塩水で 2 回洗浄後に接種し、25°C での増殖の有無を観察した。

(b) ビタミン欠培地での増殖能試験

中田ら¹⁸⁾ の方法に従って行った。

(c) TTC 還元性試験

TTC 還元性試験は、国税庁所定分析法注解¹⁹⁾ に従って行った。

(d) Yeastcidin 耐性試験

Yeastcidin 粗物質を麴汁培地 (brix 10%) に 200 µg/ml となるように添加し、オートクレーブで 121°C、15 分間加熱殺菌し試験培地とした。試験培地に分離酵母を 8×10^3 cfu/ml となるように植菌し、30°C で 72 時間培養し、増殖の有無によって耐性を判定した。耐性株として清酒酵母協会 7 号を、非耐性株としてビール酵母 *S. cerevisiae* IFO2011 を対照株として用いた。

(5) 高泡形成能

500 ml 容三角フラスコに米麴 35 g、蒸米 115 g、水 200 ml、乳酸 0.8 ml を入れ、10 ml 麴汁培地 (brix 10%) で前培養した分離酵母を全量添加し、13°C で発酵を行い、経時的に高

泡形成を観察した。対象として協会 9 号株 (K-9 株) を用い比較することで高泡形成能を判定した。また 13°C で 25 日間発酵後のもろみの濾液を用い、日本酒度、アルコール濃度、酸度およびアミノ酸度の測定を国税庁所定分析法注解¹⁹⁾ に従って行った。

(6) 26S rDNA-D1/D2 および ITS 領域の塩基配列解析

前培養した分離酵母菌体からガラスビーズを用いて細胞を破碎し、DNA を抽出後、フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール (25:24:1) 処理およびエタノール沈殿を行い、DNA を精製した。精製した DNA を鋳型に、KOD plus-Neo と 26S rDNA-D1/D2 領域増幅用プライマー (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' および 5'-GGT-CCGTGTTTCAAGACGG-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 により増幅した。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)MacroGen Japan に委託した。

(7) 清酒の小仕込み試験

原料米として精米歩合 60% の一般精白米を用い、総米 4 kg の三段仕込み (麴歩合 22%、汲水歩合 145%) を行った。酒母には汲水 1 l あたり 7 ml の乳酸を添加し、YM 液体培地にて前培養した MK3 株あるいは K-9 株を 2×10^5 cfu/ml となるように接種した。仕込み温度は、初添 15°C、仲添 10°C、留添 8°C とし、醪最高温度 13°C で醪日数 19 日目に 3,000 rpm、15 分間遠心分離を行い上清を回収し、濾過後、分析試料として用いた。

(8) 分析

高泡形成能試験時におけるアルコール濃度の測定は ALCOHOL CHECKER YSA-200 (YAZAKI) を用いて行った。製成酒の一般成分分析は国税庁所定分析法注解¹⁹⁾ に従って行った。有機酸 (クエン酸、リンゴ酸、コハク酸、乳酸、フマル酸、酢酸) の分析は、小室ら¹³⁾ の方法に従って、電気伝導度検出器を備えた高速液体クロマトグラフィーを用いて行った。香気成分分析は、小室ら¹²⁾ の方法に従って試料を調製し、ガスクロマトグラフィーで低沸点香気成分の定量を行った。分析条件は、キャピラリーカラム (0.25 mm × 60 m)、充填剤 TC-WAX を用い、窒素ガス流速 30 ml/分、カラム温度 70°C、検出器 FID で行った。

3. 結果および考察

(1) 酵母の分離

25°C での集積培養では、12 日目から brix が低下し、気泡も見られるようになった。15 日目には brix が 10% に下降し、菌数も 1.6×10^8 cfu/ml に達した。培養液を TTC 下層培地に塗抹して生じたコロニーを 3 つ無作為に釣菌し分離株を得た。

(2) 発酵性, 産膜性および増殖, 細胞形態

分離株を糖 10%YM 液体培地で培養した結果, いずれもガスを多量に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, いずれも卵形から球形であり, 増殖は出芽であった。この3株を MK1~3 株とし, 高泡形成試験に供した。

(3) 分離株の生理学的性質と胞子形成

MK1~3 株はいずれも清酒もろみで高泡を形成しなかった。また, 高泡形成試験のもろみの濾液の日本酒度, アルコール濃度, 酸度およびアミノ酸度は, 対照とした清酒酵母 K-9 株がそれぞれ -24, 18.0%, 3.8, 2.9 であった。それに対し, MK1~3 株は日本酒度が +1~-1, アルコール濃度が 18.1~18.7%, 酸度が 3.5~3.9, アミノ酸が 1.8~2.5 となった (Table 1)。アルコール, 酸度, アミノ酸度に大きな差がないにも関わらず, 日本酒度に大きな差があったが, 少なくとも MK1~3 株が K-9 株と同等の 18% 程度のアルコールを生産することができる株であることが確認された。また, MK1~3 株の中でも特に MK3 株を用いた濾液には, 官能的に良好な香気が感じられたため, 以降の生理学的性質の試験と胞子形成試験に供する事とした。

MK3 株の胞子形成を試みたところ, マラカイトグリーンで緑色に染色される胞子が観察され, MK3 株が胞子形成能を有することを確認した。また, MK3 株の糖類発酵性と資化性および硝酸カリウムの資化性試験の結果を対照として用いた K-9 株と比較すると, マルトースの発酵性を除く糖の発酵性および資化性, 硝酸カリウムの資化性において MK3 株は K-9 株と同様の性質を示した (Table 2)。さらに MK3 株は, ビタミン欠培地での増殖性があり, Yeastcidin 耐性があり, TTC 還元性においても Red の還元能を有しており, K-9 株と同様の性質を示した (Table 3)。

(4) 分子系統解析

MK3 株の属の推定を行うために, 26S rDNA-D1/D2 領

域の塩基配列を用いた分子系統解析を試みた。決定できた MK3 株の 26S rDNA-D1/D2 領域の塩基配列 (547 塩基, Accession number : AB683054) を用いて国際塩基配列データベースに対する BLAST 検索を行い, 上位 20 種それぞれの基準株および MK3 株, K-9 株の塩基配列から ClustalX 2.1 を用いて系統樹を作成した (Fig. 1)。得られた系統樹において, MK3 株は *Saccharomyces* 属からなる系統群に含まれ, そのブートストラップ値は 99.1% であったことから, MK3 株は *Saccharomyces* 属の酵母であると推定された。さらに MK3 株は, *S. cerevisiae* の基準株である NRRL Y-12632 株および清酒酵母 K-9 株と同じ系統枝を形成しており (ブートストラップ値 99.6%), MK3 株が *S. cerevisiae* であることが示唆されたが, 26S rDNA-D1/D2 領域の塩基配列を用いた分子系統解析では種の推定に限界があるため, 次に ITS 領域の塩基配列を用いた分子系統解析を行い MK3 株の種の推定を試みた。MK3 株の ITS 領域の塩基配列決定を行った結果, 730 塩基の配列を決定できた (Accession number, AB683055)。MK3 株と *Saccharomyces* 属酵母 8 種および協会 7 号株 (K-7 株) と K-9 株の ITS 領域の塩基配列を用いて系統樹を作成したところ, MK3 株は基準株 NRRL Y-12632 株および K-7 株, K-9 株を含む *S. cerevisiae* からなる系統枝を形成し, ブートストラップ値は 98.6% であったことから, MK3 株は *S. cerevisiae* であると推定された (Fig. 2)。

(5) 酵母の同定

細胞形態が卵形から球形であること, 発酵が旺盛であること, 産膜性が無く出芽で増殖すること, 子嚢胞子を形成すること, 硝酸塩を資化しないこと, そして 26S rDNA-D1/D2 領域の塩基配列を用いた分子系統解析の結果から, MK3 株は *Saccharomyces* 属の酵母だと判断された。種に関して The Yeast の Key to species に従うと, MK3 株はビタミン欠培地での増殖性があり, マルトースの発酵性がないことから, ITS 領域の塩基配列を用いた分子系統解析からの推定とは異なる *S. arboricolus* となる。しかし *S. arbo-*

Table 1 Froth forming ability of the strains in sake mash and the components of the filtrate.

Strain	Froth forming	Sake meter	Alcohol (%)	Acidity (ml)	Amino acidity (ml)
MK1	-	±0	18.7	3.9	2.5
MK2	-	-1	18.1	3.6	2.5
MK3	-	+1	18.5	3.5	1.8
K-9	+	-24	18.0	3.8	2.9

Table 3 Physiological characteristics of the strains.

Strain	Growth in vitamin free medium	Resistance against Yeastcidin	TTC staining
MK3	+	+	Red
K-9	+	+	Red

Table 2 Fermentation and assimilation tests of the strains.

Strain	Fermentation						Assimilation								
	Glu	Gal	Suc	Mal	Lac	Raf	Glu	Gal	Suc	Mal	Lac	Raf	Mel	α-MG	KNO ₃
MK3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
K-9	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-

Glu: glucose, Gal: galactose, Suc: sucrose, Mal: maltose, Lac: lactose, Raf: raffinose, Mel: melezitose, α-MG: α-methyl-D-glucoside

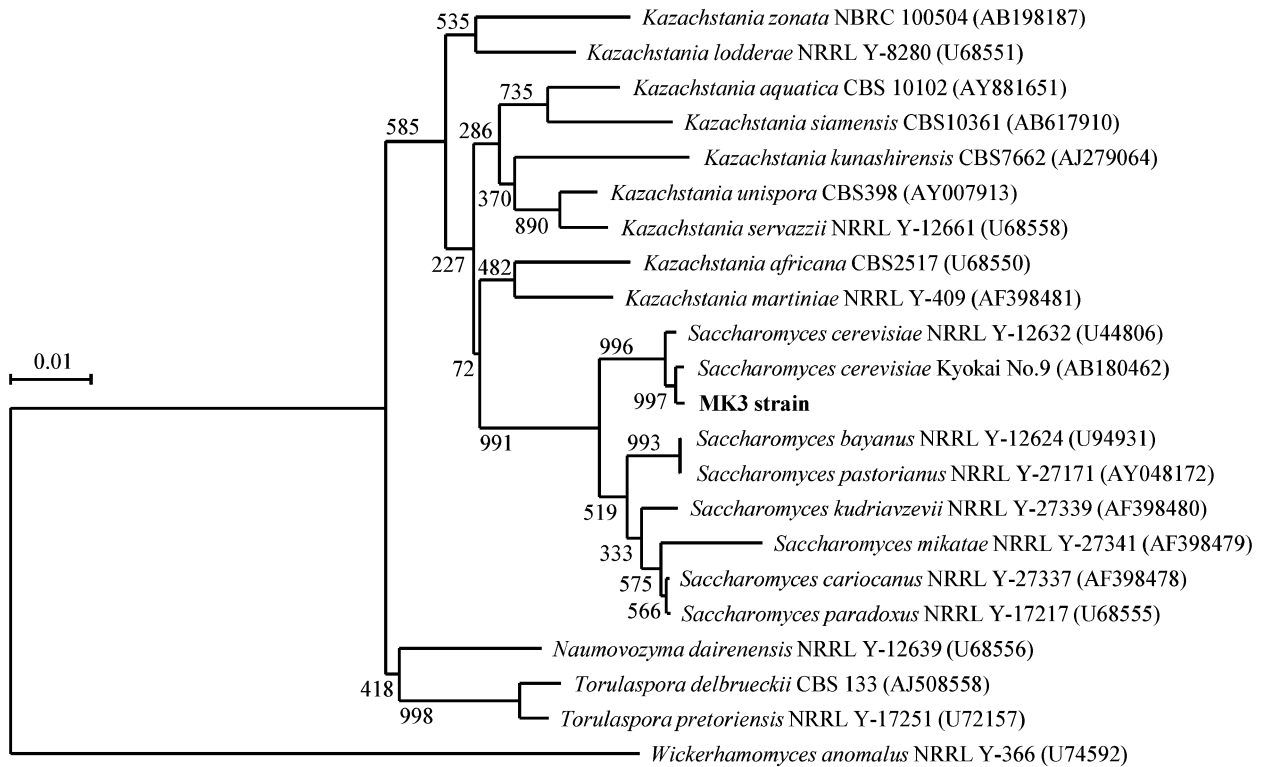


Fig. 1 Neighbor-joining tree based on the comparison of the 547 bps in the D1/D2 region of 26S rDNA. The number in parentheses is the accession number of the DNA Data Bank.

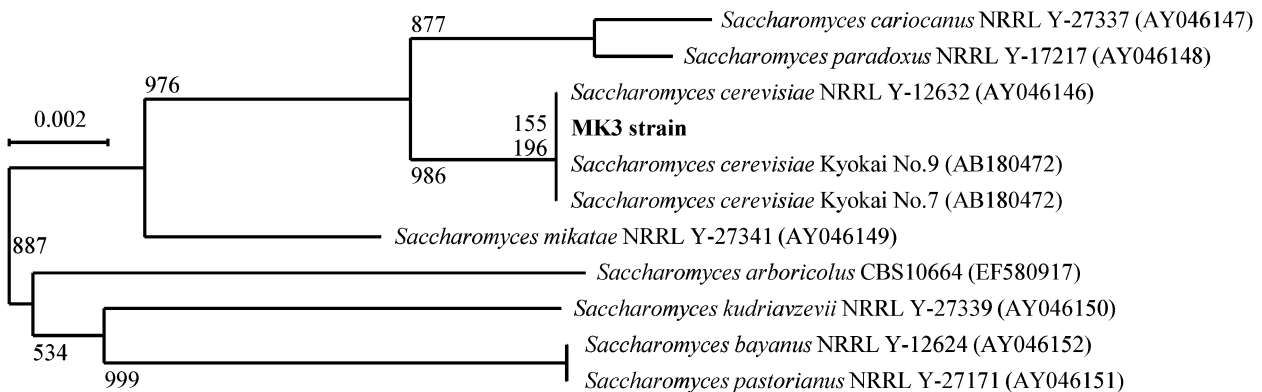


Fig. 2 Neighbor-joining tree based on the comparison of the 730 bps in the ITS region. The number in parentheses is the accession number of the DNA Data Bank.

arboricolus はメレジトースを資化し、マルトースを資化しないが、MK3株はメレジトースを資化せず、マルトースを資化するという異なる性質も示す。一方、清酒酵母 K-9株も The Yeast の Key to species に従うと、ビタミン欠培地で増殖性があり、マルトースの発酵性があることから *S. bayanus* となり、*S. cerevisiae* と同定されない。清酒酵母 K-7株も K-9株同様に *S. bayanus* となるが、K-7株は以前から *S. cerevisiae* の範疇に入り、DNA の類似度からも *S. cerevisiae* であると言われている。そこで分子系統解析の結果から MK3株は K-9株同様に K-7株と同じ *S. cerevisiae* の系統枝に位置し、高いブートストラップ値でそれが支持されていること、また *S. arboricolus* とは異なる系統枝に

位置していること、さらに MK3株が *S. arboricolus* とは糖の資化性において異なる性質を示すことから総合的に判断し、MK3株は *S. cerevisiae* であると同定した。

清酒酵母、ビール酵母、ワイン酵母など醸造で用いられる酵母は、Yeastcidin に対する耐性で異なる性質を示す。つまり清酒酵母が Yeastcidin に耐性を有するのに対し、その他のほとんどの醸造用酵母は耐性を有さない。Yeastcidin 耐性試験の結果、MK3株は清酒酵母同様に Yeastcidin に対して耐性を示したことから、MK3株が清酒酵母であることが示唆された。

(6) 清酒の小仕込み試験

MK3株と対照としたK-9株を用いた製成酒の一般成分分析をTable 4に示した。高泡形成能試験のもろみ濾液の分析では、日本酒度に大きな違いが見られたが、小仕込み試験ではMK3株とK-9株は同等の日本酒度とアルコール濃度を示した。このことからMK3株はK-9株と同等の発酵力を有することが明らかとなった。またMK3株は、酸度、アミノ酸度ともにK-9株よりも低い値を示した。

MK3株とK-9株の有機酸組成をTable 5に示した。MK3株を用いた製成酒のクエン酸、リンゴ酸の含有量は同等であったが、コハク酸、乳酸およびフマル酸の含有量がK-9株の製成酒より低かった。特にコハク酸含有量については、清酒(純米酒)の一般的な数値が390~487 ppm²⁰⁾であり、また著者らが分離した他の花からの酵母による製成酒350~520 ppm¹⁴⁾であることと比較しても、MK3株は低い数値(272 ppm)を示しており、低コハク酸生成がMK3株の特徴であることを示している。清酒中の有機酸は、リンゴ酸、コハク酸、乳酸で約80%が占められる²¹⁾。その中でリンゴ酸は清酒に爽やかな酸味を付与し、コハク酸はコクを付与する^{22,23)}。さらに、リンゴ酸とコハク酸の含量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、特にコハク酸含量に対するリンゴ酸含量比(MA/SA比)の値が0.8以上の場合にリンゴ酸の特徴が感じられやすいことが示唆されており、リンゴ酸およびコハク酸の含量が重要なだけでなくMA/SA比も重要である¹³⁾。MK3株のMA/SA比は1.5であり、K-9株の0.6に比べて高い値を示した。これはMK3株のリンゴ酸含有量についてはK-9株と比較し大きな差がないが、MK3株のコハク含有量がK-9株の約43%と低いからである。他の花から分離された酵母の数値0.8~1.0¹⁴⁾と比較しても、MK3株のMA/SA比は高かった。これらの結果からMK3株の製成酒は、リンゴ酸の爽やかな酸味が感じられる酒質であることが示唆された。

製成酒の香気成分分析において、K-9株のカブロン酸エチル生成量が検出限界下(0.2 ppm未満)であるのに対し、MK3株は3.8 ppmであったことから、MK3株はK-9株よ

りも高いカブロン酸エチル生成能を有していた(Table 6)。また、その他のきょうかい酵母の小仕込み試験でのカブロン酸エチル生成量(K-7株:1.6 ppm²⁴⁾, K-701株:1.7 ppm²⁴⁾, K-1001株:1.5 ppm²⁴⁾, K-14株:1.74 ppm²⁵⁾)と比較しても、MK3株のカブロン酸エチル生成能は高かった。一方で、きょうかい酵母には、育種過程でセルレニン耐性が付与されカブロン酸エチル生成能を高められた高エステル生成酵母K-1601株, K1701株, K1801株も存在する。これらの株のカブロン酸エチル生成量は、それぞれ5.5 ppm²⁴⁾, 3.27 ppm²⁶⁾, 6.7 ppm²⁷⁾と報告されており、MK3株のカブロン酸エチル生成能は、K1701株に匹敵するが、K-1601株, K1801株よりも低かった。MK3株が育種過程を経ることなくセルレニン耐性を有しているのかについて、MK3株のカブロン酸エチル生成要因を知る上で今後検討する必要がある。酢酸イソアミルについては、K-9株とMK3株の製成酒でそれぞれ2.0 ppm, 1.3 ppmであり、MK3株の生成能はK-9株よりも低かった。MK3株は、吟醸香生産株の中でもカブロン酸エチル生成タイプの株であった。H20~22年度の吟醸酒のカブロン酸エチルと酢酸イソアミル含有量の平均値はそれぞれ2.0 ppm, 1.6 ppmである²⁸⁾。MK3株は市販酒用酵母として、平均的な吟醸酒よりもカブロン酸エチルの吟醸香を有する清酒を製造できる酵母であった。一方、近年の全国新酒鑑評会の金賞受賞酒のカブロン酸エチルの平均濃度は7 ppm前後であり、MK3株の小仕込み試験酒の濃度はそれより低い。しかし、総米量が大きな仕込みを行う事で、K-14株では総米80gの仕込みで1.74 ppmであった生成量が総米640kgで4.42 ppm²⁵⁾に、K-1801株では総米200gで6.7 ppmであった生成量が総米3トンで7.2 ppm²⁷⁾に高まる例も報告されており、より総米量を多くしたMK3株を用いた仕込み試験について今後検討の余地がある。

MK3株はカブロン酸エチルだけではなく、イソアミルアルコールとイソブチルアルコールの生成能においても特徴を示した。イソブチルアルコールの含有量と香りの軽さには負の相関があり、イソアミルアルコールとイソブチルアルコールの含量比(A/B比)と香りの軽さには正の相関

Table 4 Comparison of the components of the produced sake.

Strain	Sake meter	Alcohol (%)	Acidity (ml)	Amino acidity (ml)
MK3	+4	17.6	1.5	1.2
K-9	-2	18.0	2.2	1.8

Table 6 Aroma components of the produced sake.

Strain	Ethyl caproate (ppm)	Isoamyl acetate (ppm)	Isoamyl alcohol (ppm)	Isobutyl alcohol (ppm)	A/B ratio
MK3	3.8	1.3	355.8	25.4	14.0
K-9	trace	2.0	228.6	50.5	4.5

A/B represent isoamyl alcohol/isobutyl alcohol.

Table 5 Organic acids of the produced sake.

Strain	Citric acid (ppm)	Malic acid (ppm)	Succinic acid (ppm)	Lactic acid (ppm)	Fumalic acid (ppm)	Acetic acid (ppm)	Total (ppm)	MA/SA ratio
MK3	125.6	395.2	272.1	336.0	4.4	36.7	1170	1.5
K-9	134.4	367.7	631.2	447.4	8.7	18.6	1608	0.6

MA/SA represent malic acid/succinic acid.

がある²⁹⁾。MK3株のイソアミルアルコールはK-9株よりも約50%多く、イソブチルアルコールは約35%少なかった。そのためA/B比はMK3株の14.5に対しK-9株は4.5となり、他の花から分離された酵母の数値3.1~4.1¹⁴⁾と比較してもMK3株のA/B比が非常に高い値となった。このようにMK3株は香気成分において、高いカブロン酸エチル生成能を有し、高A/B比を示す株であることが明らかとなった。

熟練したパネリストによる官能検査を行った結果でも、いずれもカブロン酸エチルの吟醸香が軽く華やかに香り、リンゴ酸の爽やかな酸味が感じられる調和のとれた酒質であると評価を得た。

(7) まとめ

日本国内において最も生産量が多く、また特産地も多く存在する温州ミカンの花から、清酒酵母K-9株と同等の発酵力を示し、高泡を形成せず、TTC還元性Redである清酒製造に実用可能なMK3株を取得した。MK3株は、低酸性で、しかも低いコハク酸生成を示す酵母であった。MK3株を用いた製成酒は高MA/SA比を示し、リンゴ酸の爽やかな酸味が感じられる酒質であった。また香気については、高A/B比を示し、カブロン酸エチルの吟醸香が軽く華やかに香った。MK3株は、市販酒用酵母として酸、香気の調和のとれた有用な酵母であった。日本には、温州みかんの他にもリンゴ、なし、ブドウ、桃、柿など生産量が多く、各地に特産地を有する果物があり、それらの花から特徴ある酵母の取得が今後期待される。

参考文献

- 増補改訂 清酒製造技術 (財団法人日本醸造協会, 東京) (1998)
- 津川光昭, 菅間誠之助, 山村紘司, 初谷亘慶, 野白喜久雄 (1966) 酒造場酵母について (5) 酒造期直前の床土酵母の検索, 日本醸造協会誌, 第61巻, 1号, pp.71-74.
- 竹田正久, 塚原寅次 (1965) 米麹中の酵母について: (第1報) 特に清酒酵母の分離について, 醱酵工学雑誌, 第43巻, 7号, pp.447-456.
- 市川英治 (1993) カブロン酸エチル高生産酵母, 日本醸造協会誌, 第88巻, 2号, pp.101-105.
- 福田和郎 (1993) β -フェネチルアルコール高生産酵母の分子育種, 日本醸造協会誌, 第88巻, 1号, pp.22-28.
- 相川元庸, 水津哲義, 市川英治, 川戸章嗣, 安部康久, 今安 聰 (1992) リンゴ酸生成能の高い清酒酵母の育種, 醱酵工学雑誌, 第70巻, 6号, pp.473-477.
- 吉田 清, 稲橋正明, 中村欽一, 野白喜久雄 (1993) Cycloheximid 耐性株から得られたリンゴ酸高生産性酵母, 日本醸造協会誌, 第88巻, 8号, pp.645-647.
- 宮岡俊輔, 新谷智吉, 森本 聡 (2001) 愛媛県内清酒醪からの多酸性酵母の分離とそれを用いた貴醸酒醸造試験, 日本醸造協会誌, 第96巻, 2号, pp.115-120.
- 大場孝宏, 末永 光, 一松時生, 羽田野雄大, 満生慎二, 鈴木正柯 (2008) 清酒もろみからの多酸性清酒酵母の分離とその特性, 日本醸造協会誌, 第103巻, 12号, pp.949-953.
- 穂坂 賢, 中田久保, 坂井 劭 (2000) 花から分離した酵母の醸造特性, 日本醸造協会誌, 第95巻, 11号, pp.837-842.
- 穂坂 賢, 小室友香理, 中田久保 (2004) 花から分離したND酵母による焼酎醸造, 日本醸造協会誌, 第99巻, 5号, pp.381-387.
- 小室友香理, 穂坂 賢, 中田久保 (2004) 花から分離した酵母の醸造特性, 日本醸造協会誌, 第99巻10号, pp.743-749.
- 小室友香理, 清水大介, 加藤陽子, 穂坂 賢, 中田久保 (2005) 麹汁培地を用いて花から分離した酵母の清酒醸造試験, 日本醸造協会誌, 第100巻, 6号, pp.454-460.
- 木下 (小室) 友香理, 門倉利守, 数岡孝幸, 穂坂 賢, 中田久保 (2008) 花から分離した酵母の性質と清酒醸造における特長, 東京農大農学集報, 第53巻, 2号, pp.100-106.
- 中田久保, 坂井 劭, 竹田正久, 塚原寅次 (1980) こうじ菌の生産する抗菌性物質に関する研究, 日本醸造協会誌, 第75巻, 9号, pp.761-764.
- 木澤祥恵 (2009) 学生実験における酵母の胞子形成条件の検討, 筑波大学技術報告, 29号, pp.17-19.
- KURTZMAN, C.P., FELL, J.W. and BOEKHOUT T. (2011) The Yeasts, a Taxonomic Study, 5th edition, pp.87-110.
- 中田久保, 穂坂 賢, 坂井 劭 (1985) 泡盛, 焼酎, 清酒酵母および他の *Saccharomyces cerevisiae* 間の差異, 醱酵工学会誌, 第63巻, 6号, pp.509-515.
- 注解編集委員会編 (1993) 第四回改正国税庁所定分析法注解, 財団法人日本醸造協会, 東京.
- 醸造物の成分 (財団法人日本醸造協会, 東京) (1999)
- 林田正典, 上田隆蔵, 寺本四郎 (1968) 清酒醸造における有機酸の研究: (第7報) 清酒中の有機酸組成の多様性について, 醱酵工学雑誌, 第46巻, 2号, pp.85-91.
- 大場孝宏 (2011) 酸味を活かした清酒の製造, 日本醸造協会誌, 第106巻, 5号, pp.262-270.
- 佐藤 信, 大場俊輝, 高橋康次郎, 国分伸二, 小林幹男, 小林宏治 (1977) 清酒の味覚に関する研究 (7) 清酒の多様化について, 日本醸造協会誌, 第72巻, 11号, pp.801-805.
- 吉田 清 (1995) 少酸性および多酸性清酒酵母の育種, 日本醸造協会誌, 第90巻, 10号, pp.751-758.
- 北陸酒造技術研究会 (1995) きょうかい酵母清酒用第14号 (金沢酵母), 日本醸造協会誌, 第90巻, 9号, pp.682-684.
- 稲橋正明 (2001) きょうかい酵母清酒用1701号, 第96巻, 10号, pp.679-687.
- 吉田 清 (2006) きょうかい酵母清酒用1801号, 日本醸造協会誌, 第101巻, 12号, pp.910-922.
- 国税庁鑑定企画官 (2012) 全国市販酒類調査の結果について (平成22年度調査分), 国税庁ホームページ (<http://www.nta.go.jp/shiraberu/senmonjoho/sake/shiori-gaikyo/seibun/2011/pdf/01.pdf>), pp.25.
- 吉沢 淑, 高橋康次郎 (1986) プロファイル法によるウイスキーの官能評価, 日本醸造協会誌, 第81巻, 10号, pp.680-684.

Identification and *Sake* Brewing Characteristics of Yeast Isolated from Satsuma Mandarin Blossom

By

Takayuki KAZUOKA*, Kentaro MIZUTA**, Rina UEHARA** and Hisayasu NAKATA*

(Received November 17, 2011/Accepted April 20, 2012)

Summary : The MK3 strain was isolated from Satsuma Mandarin blossom by enriched culture method. On the basis of physiological tests and molecular analyses based on DNA sequences of 26SrDNA-D1/D2 region and ITS region, MK3 was identified as *Saccharomyces cerevisiae*. Furthermore, it was suggested that MK3 was *sake* yeast, since MK3 had a tolerance against Yeastcidin. The alcohol productivity of MK3 in *sake mash* was 17.6%. The MK3 possessed an equipollent fermentative ability in *sake mash* with sake yeast, kyokai No. 9. The *sake* produced by MK3 revealed distinguishing composition of aroma compounds and organic acids. In particular, the *sake* brewed by MK3 showed low succinic acid concentration, high malic acid/succinic acid ratio, high ethyl caproate concentration and high isoamyl alcohol/isobutyl alcohol ratio. The MK3 was a useful yeast for *sake* production, because it did not form *taka-awa* in *sake mash* and it was stained red with TTC. It is expected that the MK3 will be used for *sake* production as a useful yeast which is able to form characteristic flavor.

Key words : *sake*, Yeast, Ethyl caproate, isoamyl alcohol/isobutyl alcohol ratio, malic acid/succinic acid ratio

* Department of Brewing and Fermentation, Junior College of Tokyo University of Agriculture

** Department of Fermentation Science, Faculty of Applied Biosciences, Tokyo University of Agriculture