出羽三山植物体からのアルコール発酵能を有する 野生酵母の単離

藤野舜一¹・川邊久之²・小室真保¹

(¹ 東京バイオテクノロジー専門学校, ² 高島ワイン株式会社)

平成 27 年 11 月 27 日受理

Isolation of wild yeasts having alcohol fermentation ability from plants
in “Dewasanzan (Mt. Yudono, Mt. Haguro, Mt. Gassan)”

¹Shunichi FUJINO, ²Hisayuki KAWABE, ¹Maho KOMURO

(¹Tokyo College of Biotechnology, ²Takahata Wine Co.Ltd.)

The isolation of wild yeasts having alcohol fermentation ability was carried out using plants from “Dewasanzan” in Yamagata Prefecture for the purpose of making a wine with a distinguishing new bouquet. Only one strain having alcohol fermentation ability was found among a total of 484 strains of isolated yeasts from flower samples of 12 species. Successively, we revealed that the bark of trees around the Tokyo College of Biotechnology, whether from needle or broadleaf trees, is a good source of yeast with alcohol fermentation ability. Based on the above results, we isolated a total of 261 yeast strains from the bark of 6 species of trees in “Dewasanzan”, and 61 strains, or 23%, showed alcohol fermentation ability. Nineteen typical fermentative strains were identified as follows; *Lachancea thermotolerans*, *Lachancea meyerii*, *Saccharomyces paradoxus*, *Hanseniaspora vineae*, and *Torulaspora delbrueckii*.

Key words : 樹皮, 野生酵母, アルコール発酵

緒 言

果実や花, 樹液, 葉には野生酵母が存在する¹⁾が, この野生酵母を利用して香味等に特色のある発酵飲料を開発する試みが行われている。例えば, 田畑ら²⁾は清酒醸造用酵母の探策を目的として, キンモクセイの花から *Torulaspora* 属や, *Metschnikowia* 属と推定される酵母の単離を報告している。また, 山本³⁾も清酒醸造用酵母の探策を行い桜花から 2 種類の酵母の単離を報告している。

ワイン酵母の場合には, ブドウ果実⁴⁾や海洋酵母⁵⁾からの単離, あるいは選抜が報告されている。

著者らも山形県産のブドウと山形県内の植物体から

単離される野生酵母により地産ワインを開発することを最終目的として, 先ずは山形県の出羽三山(湯殿山, 羽黒山, 月山)の植物体からアルコール発酵能を有する野生酵母の単離を試みた。

実験方法

1. 野生酵母単離源としての供試植物体

出羽三山の植物体として, 12 種の花および樹木 6 種の樹皮を単離源とした。

また, 当校周辺(東京都大田区)の植物体として, 2 種の花, 樹木 1 種の葉, および樹木 6 種の樹皮を単離源とした。

2. 集積培養用培地（以下、集積用培地と略）の調製法

レーズンを含有した2種類の組成の培地（基礎培地、および亜硫酸塩添加培地）を使用し、それぞれから1次および2次集積用培地を調製した。

基礎培地は乾燥レーズン（「サンメイドレーズン」、池伝株式会社扱い）にBrix22～23になるように約2.2倍量の蒸留水を加えた後、全重量の0.2%量の酒石酸を加えてpH3.3～3.4に調整し、オートクレーブ殺菌した。この殺菌済の基礎培地から、上清部分20 mlおよびレーズン5粒の割合になるように50 mlファルコンチューブに分注したものを1次集積用培地として使用した。また、上清部分10 mlおよびレーズン1粒の割合で試験管に分注したものを2次集積用培地として使用した。

亜硫酸塩添加培地は、上記オートクレーブ殺菌後の基礎培地に、ピロ亜硫酸カリウムを80 ppm添加（亜硫酸としては40 ppm）し、基礎培地の場合と同様にして1次および2次集積用培地を調製した。

3. 植物サンプルの採取方法および集積培養法

火炎滅菌したピンセットを使用して植物体から花、葉、樹皮（約3cm×2cm大）を採取し、直ちに1次集積用培地に浸漬した。

この培地を20℃で、特に記載がない限り1週間の培養を行った。なお、出羽三山で植物サンプルを採取した場合には、サンプルの入った1次集積用培地を当校に冷蔵便で送付後、同様に培養した。

2次集積培養を行う場合には、1次集積培養液1 mlを2次集積用培地に接種し、同じく20℃、1週間培養した。

4. 集積培養時のガス発生有無の確認方法

1次および2次集積培養時のガス発生有無の確認は、ガス発生とともに培地中でレーズンが浮上する現象を目視観察で行った。

5. 集積培養液からの酵母の単離

1次または2次集積培養液を滅菌水で適宜希釈後、希釈液0.1 mlをクロラムフェニコールを0.01%添加したYM寒天培地に塗抹し、20℃で1週間培養した。培養後、出現したコロニーをYM寒天培地で画線培

養し、シングルコロニーとして単離した。

6. 単離酵母のアルコール発酵能評価試験法

市販の無添加白ブドウ果汁に対し、Brix23、総酸8g/Lになるように、上白糖で補糖、酒石酸で補酸した果汁10 mlに単離酵母を1白金耳接種した。20℃で2～3週間培養し、経時的に理研計器（株）簡易アルコール分析器（「アルコメイト」AL-2型）でアルコール濃度を測定した。20℃、3週間以内にアルコールを8%以上生成した場合にアルコール発酵能を有するものとした。

7. 酵母の同定方法

酵母DNAのITS1、5.8SおよびITS2の領域（400～800bp）をユニバーサルプライマーを用いてPCR法で増幅した⁶⁾。得られたPCR産物の塩基配列分析はシグマアルドリッチジャパン合同会社または（株）マクロジェン・ジャパンに依頼した。塩基配列データをDDBJデータベース（www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html, BLAST法）で検索し酵母の同定を行った。

実験結果

1. 出羽三山の花からのアルコール発酵酵母の単離

湯殿山（フキノトウ、モクレン、ツツジ、タンポポ、ノニガナ）、羽黒山（フキノトウ、タチツボスミレ、アジサイ、ユウガギク、ハルジオン）、月山（ナギナタコウジュ、名称不詳2種）の植物の花（計12品種、13検体）を採取し、基礎培地を使用して調製した1次集積用培地で培養を行った。各検体の1次集積培養液から計484株の野生酵母を単離し、それぞれのアルコール発酵能を調べた。その結果、月山のナギナタコウジュ由来の1株のみが20℃、2週間培養で8%のアルコール生成を示し、同酵母は*Torulaspora delbrueckii*と同定された。その他の株は、いずれも発酵能を示さなかった。

2. 酵母単離源としての植物体の見直し・検討

(1) 当校周辺の各種植物体からの単離の検討

上記の結果から、アルコール発酵能を有する酵母の単離源として花は不向きであると考えられたので、単離源としての植物体の見直し・検討を行った。すなわち、当校周辺でツツジ（*Rhododendron indicum*）お

よびタンポポ (*Taraxacum officinale*) の花を比較対照としサクラ (*Prunus x yedoensis* 'Somei-Yoshino') の葉やヒマラヤスギ (*Cedrus deodara*) の樹皮を採取し、基礎培地および亜硫酸塩添加培地からそれぞれ調製した集積用培地を使用して、1次および2次の集積培養を行った。この際、アルコール発酵酵母の存在有無の簡易指標として、集積培養時の培養液中でのガス発生の有無を観察した。その結果、Table 1に示すようにツツジ・タンポポの花およびヒマラヤスギ樹皮試料で集積培養液にガス発生が観察された。ガス発生の認められた集積培養液から酵母を単離し、得られた酵母のアルコール発酵能を調べた。同 Table に示すように、アルコール発酵能を示した菌株はタンポポ花由来が187株中1株に対して、ヒマラヤスギ樹皮由来では29株中13株存在した。ツツジ由来の24株はいずれも発酵能を示さなかった。

(2) 当校周辺樹木の樹皮からの単離の検討

以上の結果から、アルコール発酵能を有する酵母の単離源として樹皮の有用性が示唆されたので、当校周辺の3箇所の公園で採取したヒマラヤスギ、ケヤキ (*Zelkova serrata*)、ニレ (*Ulmus davidiana* var. *japonica*)、イチョウ (*Ginkgo biloba*)、クスノキ (*Cinnamomum camphora*)、マツ (*Pinus thunbergii*) の各樹皮を用いて、(1)の実験と同様に1次および2次の集積培養を行い、ガス発生状況を調べた。Table 2に示すように、針葉樹および広葉樹に属する調べた6種7検体の全ての樹皮試料において集積培養液にガス発生が認められた。ガス発生の認められた集積培養液

から酵母を単離し、単離酵母のアルコール発酵能を調べた。同 Table に示すように単離酵母50株の内、50%の25株がアルコール発酵能を示した。

ヒマラヤスギ、ケヤキ、およびイチョウの各樹皮から単離され、最もアルコール発酵能の高かった各代表株1株ずつを同定した結果、いずれも *Torulaspora delbrueckii* と同定された。

続いて、これらの酵母が樹皮由来である事の確認試験を行った。すなわち、ヒマラヤスギならびにケヤキの各樹皮を使用して、基礎培地を使用して調製した1次集積用培地にオートクレープ処理した樹皮、および未処理樹皮をそれぞれ添加し、樹皮無添加培地とともに20℃で2週間培養した。その結果、両樹皮ともに未処理樹皮添加培地のみにガス発生が認められ、単離酵母は樹皮由来である事が確認された。

3. 出羽三山の樹木樹皮からのアルコール発酵酵母の単離および同定

上記試験において、樹皮がアルコール発酵酵母の単離源として極めて有用であることを見出したので、引き続き出羽三山の樹木樹皮を対象として単離試験を進めた。湯殿山ではミネザクラ (*Prunus nipponica*)、イタヤカエデ (*Acer mono*)、羽黒山ではヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*)、ヤマナシ (*Pyrus pyrifolia*)、月山ではミズナラ (*Quercus mongolica* var. *grosseserrata*)、ブナ (*Fagus crenata*) の計6種の樹木の樹皮を採取した。これらの各樹皮を両組成の培地を使用して、それぞれ1次集積培養したところ、全ての培養液

Table 1 CO₂ evolution test at the enrichment culture of various plant materials and numbers of yeast strains isolated from the culture medium CO₂ evolved

Plant material	Sequential time of enrichment culture	CO ₂ evolution		Numbers of yeast strains isolated	
		Basal medium	Basal medium containing 80ppm metabisulfite	Total strains	Strains having alcohol fermentation ability*
The flower of <i>Rhododendron indicum</i>	1st	—	—	24	0
	2nd	+	—		
The flower of <i>Taraxacum officinale</i>	1st	+	+	187	1
	2nd	+	+		
The leaf of <i>Prunus x yedoensis</i> 'Somei-Yoshino'	1st	—	—	—	—
	2nd	—	—		
The bark of <i>Cedrus deodara</i>	1st	—	—	29	13
	2nd	—	+		

+ : evolution of CO₂ — : no evolution of CO₂

* : These strains formed alcohol concentrations of more than 8% as to the fermentation test with grape juice (20℃, 3 weeks).

All plant materials were sampled around the authors' school on Apr. 24, 2014.

Both 1st and 2nd enrichment cultures were carried out at 20℃ for 1 week.

Table 2 CO₂ evolution test at the enrichment culture of tree bark samples and numbers of yeast strains isolated from the culture medium CO₂ evolved

Sampling place	Name of tree		Sequential time of enrichment culture	CO ₂ evolution		Numbers of yeast strains isolated	
	Species	Family		Basal medium	Basal medium containing 80ppm metabisulfite	Total strains	Strains having alcohol fermentation ability*
the park "Kyunomikawaryokuti"	<i>Cedrus deodara</i>	<i>Pinaceae</i>	1st	+	—	4	3
			2nd	+	+		
	<i>Zelkova serrata</i>	<i>Ulmaceae</i>	1st	+	+	19	14
			2nd	+	+		
the park "Oomoriminami-ichhoumekouen"	<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i>	"	1st	+	+	not isolated because of the growth of mold	—
			2nd	+	+		
	<i>Ginkgo biloba</i>	<i>Ginkgoaceae</i>	1st	—	—	13	8
			2nd	+	+		
the park "Kitamaehori-ryokuti"	<i>Cinnamomum camphora</i>	<i>Lauraceae</i>	1st	—	—	6	0
			2nd	—	+		
	<i>Pinus thunbergii</i> (A)	<i>Pinaceae</i>	1st	+	—	1	0
			2nd	—	—		
the park "Kitamaehori-ryokuti"	<i>Pinus thunbergii</i> (B)	"	1st	+	+	7	0
			2nd	+	—		
	The sum total					50	25

+ : evolution of CO₂ — : no evolution of CO₂

* : These strains formed alcohol concentrations of more than 8% as to the fermentation test with grape juice (20°C, 3 weeks).

All barks were sampled at the park around the authors' school on June 24, 2014.

Both 1st and 2nd enrichment cultures were carried out at 20°C for 1 week.

にガス発生が確認された。これらの集積培養液から酵母を単離し、単離酵母のアルコール発酵能を調べた。

Table 3 に示すように、全単離株 261 株の内、23% に相当する 61 株がアルコール発酵能を示し、全ての樹皮試料からアルコール発酵酵母を単離することが出来た。以上の結果から、樹皮の単離源としての有用性が確認された。

これら 61 株の内、それぞれの樹木別に発酵パターンの異なる代表 19 株の同定を行った。代表株の発酵パターンを Fig. 1, 同定結果を Table 4 に示した。

湯殿山のミネザクラ (Fig. 1, A) およびイタヤカエデ (Fig. 1, B) の樹皮由来酵母の計 5 株は、いずれも *Lachancea thermotolerans* と同定された。羽黒山のヒノキ (Fig. 1, C) およびヤマナシ (Fig. 1,

Table 3 Numbers of yeast strains isolated from the bark of trees in "Dewasanzan"

Name of mountain	Name of tree		Medium for 1st enrichment culture	Numbers of yeast strains isolated	
	Species	Family		Total strains	Strains having alcohol fermentation ability*
Mt. Yudono	<i>Prunus nipponica</i>	<i>Rosaceae</i>	Basal medium	32	14
			Basal medium	4	2
	<i>Acer mono</i>	<i>Aceraceae</i>	Basal medium containing 80ppm metabisulfite	4	1
			Basal medium	116	12
Mt. Haguro	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	<i>Cupressaceae</i>	Basal medium containing 80ppm metabisulfite	4	0
			Basal medium	25	6
	<i>Pyrus pyrifolia</i>	<i>Rosaceae</i>	Basal medium containing 80ppm metabisulfite	31	4
Mt. Gassan	<i>Quercus mongolica</i> var. <i>grosseserrata</i>	<i>Fagaceae</i>	Basal medium	25	4
			Basal medium	4	3
	<i>Fagus crenata</i>	"	Basal medium containing 80ppm metabisulfite	16	15
The sum total				261	61

* : These strains formed alcohol concentrations of more than 8% as to the fermentation test with grape juice (20°C, 3 weeks).

All barks were sampled on September 1, 2014.

A. *Prunus nipponica* from Mt. Yudono

B. *Acer mono* from Mt. Yudono

C. *Chamaecyparis obtusa* from Mt. Haguro

D. *Pyrus pyrifolia* from Mt. Haguro

E. *Quercus mongolica* var. *grosseserrata* from Mt. Gassan

F. *Fagus crenata* from Mt. Gassan

Fig. 1 Lapses of alcohol fermentation by yeasts isolated from the bark of trees in “Dewasanzan”. Each strain no. in the figure corresponds to that of Table 4 (Y15 and Y16 are not identified).

D) の樹皮由来酵母 9 株は発酵パターンはかなり異なっていたが、いずれも *Lachancea meyersii* と同定された。月山のミズナラ (Fig. 1, E) 樹皮由来酵母 2 株については、それぞれ *Saccharomyces paradoxus* および *Hanseniaspora vineae* と同定された。月山のブ

ナ (Fig. 1, F) 樹皮由来酵母 3 株については、*Hanseniaspora vineae*, *Lachancea thermotolerans* および *Torulaspora delbrueckii* と同定された。

Table 4 The identification results of yeasts from the bark of trees in “Dewasanzan”

Name of mountain	Name of tree	Strain No.	Yeast identified	Identities (%)
Mt. Yudono	<i>Prunus nipponica</i>	Y4	<i>Lachancea thermotolerans</i>	99
		Y5	"	"
		Y6	"	"
		Y9	"	"
	<i>Acer mono</i>	Y17	<i>Lachancea thermotolerans</i>	99
Mt. Haguro	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	H1	<i>Lachancea meyersii</i>	100
		H2	"	99
		H7	"	100
		H10	"	"
		H12	"	"
	<i>Pyrus pyrifolia</i>	H13	<i>Lachancea meyersii</i>	99
		H15	"	100
		H18	"	"
		H22	"	"
	Mt. Gassan	<i>Quercus mongolica</i> var. <i>grosseserrata</i>	G2	<i>Saccharomyces paradoxus</i>
G3			<i>Hanseniaspora vineae</i>	97
<i>Fagus crenata</i>		G7	<i>Hanseniaspora vineae</i>	99
		G8	<i>Lachancea thermotolerans</i>	100
		G9	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	99

考 察

樹液には酵母が存在することはよく知られており、総称として樹液酵母と呼ばれている。代表的な樹液酵母として *Pichia* 属, *Hansenula* 属, *Kluyveromyces* 属, *Shizosaccharomyces* 属, *Arthroascus* 属, *Candida* 属の酵母があり、これら樹液酵母は好気性の酸化型酵母であり、糖の発酵性を欠くか、微弱であると小玉⁷⁾は報告している。

一方で、樹皮からの野生酵母の単離に関する報告は多くはなく、これまでの報告例としては、ブナ科ナラ属 (*Quercus* 属)⁸⁻¹²⁾、日本の樹木 (54 検体, 名称不明)¹³⁾、ブドウ樹¹⁴⁾、ハワイ諸島の *Charpentiera*¹⁵⁾、インド森林地帯の 7 属の広葉樹^{16, 17)}、リンゴ¹⁸⁾等の樹皮からの報告に限られている。この内、単離酵母のグルコースやシュクロースからのアルコール発酵能を調べた報告は前記のブドウ樹の樹皮由来酵母の 1 報のみであり、樹皮由来酵母について広範にアルコール発酵能を調べたのは本研究が初めてである。その結果、針葉樹および広葉樹にわたる 8 科 12 種に属する 13 検体の全ての樹木の樹皮に酵母が存在し、かつアルコール発酵能を示す酵母が都心の公園樹木の場合で全単離株数の 50%、出羽三山樹木の場合で 23% と、極めて高頻度で樹皮中に存在することが本研究により初めて明らかとなった。樹皮が、アルコール発酵酵母の新規単離源として、今後、学術的、産業的に注目されるこ

とが期待される。

樹皮に存在する酵母は前記したようにアルコール発酵能を示す酵母の存在割合が著しく高く、また検出される酵母の属種も樹液酵母とは異なっていた。樹液酵母や花酵母と比較して、樹皮にアルコール発酵性酵母の存在割合が高い理由については全く不明であり、今後の検討課題としたい。

また、樹液酵母は樹液に酵母が風雨や鳥、昆虫などにより運ばれ繁殖したものとされているが、樹皮由来酵母についてもどのような経緯で死細胞で栄養分の少ないと思われる樹皮中に存在するのか興味ある課題である。

なお、今回出羽三山の花や樹皮から単離された酵母のワイン醸造への適性については、現在検討を進めている。

要 約

1. 出羽三山の 12 種の花から野生酵母 484 株を単離し、単離酵母のアルコール発酵能を調べた。しかしながら、ナギナタコウジュの花由来の *Torulaspora delbrueckii* と同定された 1 株しか見出せず、花はアルコール発酵酵母の単離源としては不向きであった。

2. アルコール発酵能を有する野生酵母の植物体での単離源を検討する目的で、当校周辺の植物の花、葉、樹皮から野生酵母を単離し、アルコール発酵能を調べた。その結果、針葉樹、広葉樹を問わず、樹皮がアル

コール発酵酵母の有用な単離源であることを初めて見出した。即ち、6種の樹木樹皮7検体を採取し、単離酵母50株のアルコール発酵能を調べたところ、50%に相当する25株がアルコール発酵能を有していた。

3. 出羽三山の樹木6種の樹皮から261株の酵母を単離し、アルコール発酵能を調べた。その結果、23%に相当する61株がアルコール発酵能を示し、樹皮はアルコール発酵酵母の単離源として極めて有用であることが確認された。それぞれの樹木樹皮由来の代表19株を同定した結果、*Lachancea thermotolerans*, *Lachancea meyersii*, *Saccharomyces paradoxus*, *Hanseniaspora vineae*, *Torulaspora delbrueckii*の5菌種であった。

付 記

本論文は当校醸造発酵コースの3年生が卒業研究として、2012年度より高畠ワイン(株)との共同研究として実施した結果の一部を研究担当講師である著者がまとめたものである。

ここに担当学生の名を記し、その努力に敬意を表する次第である。

2012年度：藤崎昌之，高橋克則，兵頭雅俊

2013年度：吉沢拓巳，久保寺祐己，廣瀬美咲，
進藤功紀

2014年度：戸村優，田崎杏花，近藤倭，但木博祐

2015年度：村田恵利佳，山本慎一郎，伊藤加奈恵，
内堀友祐，岡野怜

謝 辞

出羽三山での植物(花，樹皮)採取を行っていたいた、高畠ワイン(株)松田旬一氏および四釜伸一氏に深謝いたします。

又、植物(花，樹木)の同定をお願い致しました中川康代様(元，科学博物館勤務)および酵母の同定をご指導いただきました当校非常勤講師 渡辺佳世博士に謝意を表します。

参考文献

- 1) 大隅良典・下田 親編：酵母のすべて(丸善)，18-21 (2012)
- 2) 田畑恵，武田文宣，萩原康成，加藤悟朗：茨城県工業技術センター研究報告，第36号(2005)
- 3) 山本歩：八戸工業高等専門学校紀要，**45**，45-48 (2010)
- 4) 篠原隆：*J. ASEV JPN.*，**8**，119-126 (1997)
- 5) 柳田藤寿，小玉健太郎，篠原隆：醸協，**97**，150-161 (2002)
- 6) M. Tamura, K. Watanabe, Y. Mikami, K. Yaza-wa, K. Nishimura : *J. Clin. Microbiol.*，**39**，4309-4315 (2001)
- 7) 田村學造，野白喜久雄，秋山祐一，小泉武夫編：酵母からのチャレンジ(技報堂出版)，1-23 (1997)
- 8) M. Yoneyama : *J. Science of Hiroshima University Series B, Div. 2*，**8**，19-38 (1957)
- 9) M. J. Butler, G. Lazarovits, V. J. Higgins, M. A. Lachance : *Can. J. Microbiol.*，**35**，728-734 (1989)
- 10) P. D. Sniegowski, P. G. Dombrowski, E. Finger-man : *FEMS Yeast Research*，**1**，299-306 (2002)
- 11) C. Belloch, M. Villa-Carvajal, M. L. Alvarez-Rodriguez, J. J. R. Coque : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*，**57**，1668-1671 (2007)
- 12) J. P. Sampaio, P. Goncalves : *Appl. Environ. Microbiol.*，**74**，2144-2152 (2008)
- 13) I. Banno, K. Mikata : *IFO Res. Comm.*，**10**，10-19 (1981)
- 14) 中里厚実，棚橋勝道，前原博幸，竹田正久，塚原寅次：東京農業大学集報，**28**，245-255 (1984)
- 15) H. J. Phaff, W. T. Starmer, C. P. Kurtzman : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*，**50**，1683-1686 (2000)
- 16) B. Bhadra, R. S. Rao, P. K. Singh, S. Shivaji, P. K. Sarkar : *Curr. Microbiol.*，**56**，489-494 (2008)
- 17) R. S. Rao, B. Bhadra, S. Shivaji : *Lett. Appl. Microbiol.*，**47**，19-24 (2008)
- 18) R. Chen, Y. M. Jiang, S. C. Wei, Q. M. Wang : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*，**62**，2774-2777 (2012)