プロダクト イノベーション

新規清酒製造用酵母の取得 プリンセスミチコの花酵母を用いた清酒開発

東京農業大学
数岡孝幸

はじめに

日本で古くから造られている清酒は、冠婚葬祭などに欠かせないほど日本での生活に密着している。しかし、その消費量は1975年頃を境に現在に至るまで減少し続けている。その要因として、消費者が選択することできる酒類の増加、若者の酒離れ、主な清酒消費者の高齢化、さらには景気の低迷、娯楽の多様化にともなう酒類購入に企てられる費用の減少などさまざまな要因が考えられるが、消費者の嗜好の多様化もその一因であると考えられる。

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、乳酸酸性およびもろみ中での固形物の溶解といった、ほか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、そのような条件下の酵母およびもろみでよく生育し良質の清酒を造る適性をもつ一群の酵母である⁽¹⁾。清酒製造における酵母製造工程は、清酒酵母がほかの酵母に比較し少なく多様な微生物が存在する状態から^(2,3)、最終的には純粋培養に近い状態で清酒酵母を大量に培養する工程である。そして、近代的な清酒醸造では良質な製品を安定して生産することを目的に、酵母製造工程において純粋培養した清酒酵母が添加されている。

清酒の酒質は原料や製造工程におけるさまざまな要因によって変化するが、清酒製造に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、清酒酵母として日本醸造協会で純粋培養して配布される種々のきょうかい酵母が主に使用されているが、酒質のさらなる多様化を目的に、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)が試みられている。また既存の酵母からの育種や変異株分離ではな

く、新たな清酒製造用酵母を自然界から分離することも試みられている。ところが、清酒もろみにおいて高いアルコール発酵性を示す酵母の取得は容易ではなく、その分離には集積培養法の工夫が必要である。

私は、東京農業大学で職を得て以来、10年以上にわたり清酒醪で清酒製造に十分なアルコール発酵能を示し、個性的な清酒を製造できる酵母の分離を、スクリーニング源として糖源（蜜）が存在する花に着目して試みている。そして、現在までその分離法の改良を試み続け、取得された酵母を世に送り出してきた。本稿では、クラウドファンディングで資金を取得して実施した、分離酵母を用いた清酒開発「プリンセスミチコプロジェクト」ならびに本プロジェクトでの清酒製造用酵母の分離方法について紹介させていただく。

プリンセスミチコプロジェクトの目的

東京農業大学に日本で唯一醸造を冠にした学科が開設されてから65年を経て、現在では全国酒造メーカーの半数を卒業生が占めるようになっている。大学は、日本酒をはじめ焼酎、泡盛、ワインなど酒造業界を支援すべくさまざまな活動をする時期にきていると考えていた。その第一歩としてプリンセスミチコプロジェクトが企画された。その内容は、平成から令和に元号がかわるタイミングにあわせ、バラの一品種であるプリンセス・ミチコの花から清酒製造用酵母を分離し、それを利用した清酒を製造・販売すると共に、本プロジェクトで得られた収益を自然災害で大きな被害を受けた地域への義援金とするものである（図1）。

図1 ■ プリンセスミチコプロジェクトのスキーム

クラウドファウンディングでの資金調達

近年、新しいテクノロジーを使った商品開発、映画・CDの製作や本の出版、アーティストへのメッセージ広告、スポーツ選手・団体の応援、地域の町おこし、小児医療やがん患者への支援など、クラウドファンディングはさまざまな分野で活用されている。資金調達法として、プラットフォームとなっているサイトの審査さえ通過すれば、個人・団体・企業の大小を問わず、誰でもプロジェクトを立ち上げられることが特徴である⁽¹⁰⁾。本プロジェクトを実施するにあたり、酵母の分離や酒蔵での清酒製造にかかる費用などに必要な資金を、(株)農大サポートを通して朝日新聞社のクラウドファウンディングサイトであるA-portで集めることにした。

クラウドファウンディングには、4つの資金調達型、①リターンがなく全額寄付の寄付型、②モノ・サービス・権利などのリターンがある購入型、③利子のリターンがある融資型、④利益からの配当がある投資型、がある。また、2つの実行型、①目標金額が集まらなければ企画が中止となる達成時実行型と、②目標金額が集まらなくても企画を実施できるが、支援者にリターンを渡す必要がある実行確約型、がある。本プロジェクトでは、1口2万円あるいは20万円で支援を募り、リターンとして7社によって製造される清酒7本あるいは7本10セットと試飲会への招待が得られる購入型・実行確約型のクラウドファウンディングを選択した。その結果、専用サイトからの申し込みに加え、現金書留による支援もあり、1,076人の支援者から25,473,705円のプロジェクト資金を調達することができた。

清酒製造用酵母の分離

清酒製造を目的とした自然界からの酵母の分離では、最初に分離源からの酵母の集積を目的とした集積培養が行われる。その培地としては、米麴の糖化液（麴汁培地）^(11~14)、YPD培地やGYE培地など酵母エキスとペプトンを含む培地^(15~18)、Yeast Nitrogen base (Difco) に糖を加えた培地⁽¹⁹⁾などに、目的の酵母以外の微生物の増殖を抑える化合物（クロラムフェニコールやアンピシリン、エタノール、Yeastcidinなど）を添加したものが用いられる。これらの培地で種々の酵母が分離されているが、アルコール発酵能力が低いものや *Saccharomyces cerevisiae* ではない酵母の分離例も報告されている。本プロジェクトにおける酵母分離では、私が従来用いていた集積培地（麴汁培地にYeastcidinを添加した培地）に加え、新たな集積培地（ビタミン欠如培地にYeastcidinを添加した培地）を設計し、清酒製造用酵母の分離を試みた（図2）。

- ①分離源の入手 プリンセス・ミチコの花は、東京農業大学OBが経営している千葉県八千代市にある京成バラ園の協力を得て入手した。
- ②麴菌が生産する抗菌物質Yeastcidin Yeastcidinは、清酒用種麴から分離した *Aspergillus oryzae* No.G株を麴汁培地で25°C、25日間程度培養した際に培地中に生産され、*S. cerevisiae* を含む多くの酵母の生育を抑止するが、清酒酵母の生育は抑止しないという興味深い特性をもつ抗菌物質である⁽²⁰⁾。清酒製造用酵母の分離においては、ビール酵母 (*S. cerevisiae* IFO2011株) に対する最少生育阻止濃度となるように集積培地に添加している。
- ③集積培地 本プロジェクトでは、2種類の集積培地を用いた。一つは、米麴糖化後の濾液にYeastcidinを

図2 ■ 新規清酒製造用酵母の分離

添加した培地，もう一つは，ビタミンを含まない合成培地に糖源としてグルコースを添加し，さらに Yeastcidin も添加した培地である．これらの培地を 100mL 容のプラスチック容器に調製後，オートクレーブ滅菌する．そして，集積培養開始直前に乳酸と清酒もろみ中の米粒を模したエタノール滅菌カゼインを添加する．

④集積培養と単離株の取得 集積培養では，糖（グルコース）を資化し，ガスを発生する株の集積およびアルコール耐性を有する株の取得を目的としている．詳細には，分離源から枝葉，花軸，花柄，花托およびがく片などを除去し，10g 程度の花を集積培地に添加する．25℃で培養を行い，搅拌は一日に1回，混濁し気泡を有する培養液の brix 糖度を7日毎に測定し，糖度6%以上の低下が確認された時点で，培養液を適宜希釈後，エタノールを6%含有するYM寒天培地に塗布しコロニーを生成させる．本プロジェクトでは，糖度が低下した集積培養液毎に5株のコロニーを単離し，合計15株を得た．

⑤清酒製造用酵母候補株の選抜 各種選抜試験では，*Saccharomyces* 属の可能性がない単離株の除去を目的とした発酵性試験（10%グルコースを含むYM培地での培養でガスを発生する株を選抜），産膜性試験（液体培地で産膜性を示さない株を選抜），顕微鏡観察（5～10μm 程度の細胞の大きさであり，形が卵～球形，出芽で増殖している株を選抜）を実施後，TTC 染色性試験（きょうかい酵母と同じ TTC 染色性 RED を示す株を選抜）を実施する．次に，選抜された株を用いて，清酒もろみを模した配合での小規模発酵試験（1段仕込み）を実施し，日本酒度のキレおよびアルコール生成能を確認する．本プロジェクトでは，単離株15株のうち，10株を小規模発酵試験に供することができ，そのうち5株がきょうかい9号酵母と同等のアルコール発酵能を有する可能性が示された（表1）．

⑥清酒小仕込み試験 本試験は，小スケールでの清酒仕込みを行い，清酒製造酵母としての適正を判断することを目的としている．分離株5株と精米歩合60%の一般精白米を用い，麴歩合23%，汲み水歩合145%，仕込み温度は，初添15℃，仲添10℃，留添8℃，醗最高温度は13.5℃で醗日数20日の清酒小仕込み（総米500gの3段仕込み）を行う．本プロジェクトでは，対照株として用いたK9株と比較しても高いアルコール発酵能力があると言え，また，官能評価でも密リソ様の香気が強く感じられ，かつ顕著なオフフレーバーが感じられなかったBY1-1株を選抜することができた（表1）．

⑦分離酵母の同定 自然界から分離した微生物を食品製造に使用するには，さまざまな培養条件下で同種のほかの株から得られた毒素の産生能について評価しなければならないが，分離株が毒素非生産株であることを絶対的に確証するのは不可能である．一方で，微生物由来の食品成分の安全性のためのガイドラインにおいて，「使用微生物がよく知られ，広く分布した非病原性の酵母，たとえばある種の *Saccharomyces* 属である場合，またはよく性質の知られた食品に通常に存在し食品成分製造に安全な使用歴のあるものについては安全性が高いと認識される」とある⁽²¹⁾．*S. cerevisiae* の安全性については，古くから発酵・醸造食品の製造などに利用されており，菌体もしくはその代謝産物に重大な危険性は潜在していないと判断できる．また，きわめて安全性の高い GRAS (generally recognized as safe) 微生物としても知られ，米国 EPA (Environmental Protection Agency) においても *S. cerevisiae* は病原性・トキシン生産などは認められないとされている．これらのことから，自然界から分離した酵母が，*S. cerevisiae* であることをしっかりと同定すること，また製造試験で造った産物の成分分析結果が既存の産物の分析結果と同等であることを確認することが大切である．

表1 ■ 清酒製造用酵母の選抜

生理学的諸性質						小規模発酵試験				清酒小仕込み試験			
分離株	発酵性	産膜性	増殖	細胞形態	TTC還元性	日本酒度	アルコール濃度 (%)	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)	日本酒度	アルコール濃度 (%)	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)
K9	+	-	出芽	卵形～球形	RED	+18	15.7	3.8	1.8	-7	17.1	2.6	1.5
Yeastcidin 添加ビタミン欠如培地													
BY1-1	+	-	出芽	卵形～球形	RED	+18	17.9	3.9	1.3	±0	18.3	2.8	1.7
BY1-2	+	-	出芽	卵形～球形	RED	+18	19.8	3.5	1.7	-4.7	18.7	2.4	2
BY1-3	+	-	出芽	卵形～球形	RED	+19	17.4	3.6	1.3	-7.6	18.6	2.2	1.9
BY1-4	+	-	出芽	卵形～球形	RED	+18	17.1	4.3	1.4	-9.3	17.7	2.0	1.9
BY1-5	+	-	出芽	卵形～球形	RED	+19	16.3	3.9	1.6	-3.7	16.6	2.6	1.8
Yeastcidin 添加麹汁培地													
KY2-1	+	-	出芽	卵形～球形	RED	-51	10.1	6.4	2.4				
KY2-2	+	-	出芽	卵形～球形	RED	-66	9.8	6.3	2.5				
KY2-3	+	-	出芽	卵形～球形	RED	-73	6.8	6.6	2.5				
KY2-4	+	-	出芽	卵形～球形	RED	-50	10.7	6.2	2.5				
KY2-5	+	-	出芽	卵形～球形	RED	-66	9.2	6.5	2.7				
KY3-1	+	-	出芽	卵形～球形	WHITE								
KY3-2	+	-	出芽	卵形～球形	WHITE								
KY3-3	+	-	出芽	卵形～球形	WHITE								
KY3-4	+	-	出芽	卵形～球形	WHITE								
KY3-5	+	-	出芽	卵形～球形	WHITE

図3 ■ プリンセス・ミチコの花からの分離酵母で作られた清酒

製造した酒蔵（左から）：南部美人，出羽桜酒造，一ノ蔵，浅間酒造，関谷醸造，石鮎酒造，澄川酒造場

筆者らは、清酒などの製造を目的とした製造者に花など自然界から分離した酵母を提供する際には、同定試験（生理学的試験および塩基配列の解析）を自ら行うとともに、それを受託する企業にも同定試験を委託し、分離株が *S. cerevisiae* であることを確認している。本プロジェクトで分離した BY1-1 株も *S. cerevisiae* と同定された。

醸造方法については、各社の判断に委ね、各社が目指す酒質に仕上げるよう努めていただいた。各社で造られた清酒は、酵母の特徴に由来するカプロン酸エチルの香気を有する共通点をもちつつ、それぞれ異なる酒質であった（図3）。

おわりに

普段は、清酒醪で高いアルコール発酵能力を示し、研究対象となり得る興味深い性質を示す酵母の取得、およびその分離方法の改良を目的に、花からのスクリーニングを行っている。数多くの種類の花を分離源として用いて一定の確率で目的酵母を取得しており、特定の花からの酵母の分離を目的としていない。プリンセス・ミチコの花から清酒製造用酵母に関する企画を提案いただいた際、私は尻込みした。なぜなら、酵母の取得なしにプロ

清酒製造

清酒製造は、東京農業大学の経営者大賞を受賞している酒蔵のうち協力いただけた7社、北から南部美人（岩手県）、出羽桜酒造（山形県）、一ノ蔵（宮城県）、浅間酒造（群馬県）、関谷醸造（愛知県）、石鮎酒造（愛媛県）、澄川酒造場（山口県）によって行われた。仕込みは、総米約1,000kgで実施していただき、使用する米や

プロジェクトが始まらない。それにもかかわらず、元号が変わるタイミングにあわせて清酒を「平成最後の祝い酒」として世に出すというコンセプトがある。加えて、アルコール発酵能が清酒製造に耐えうる酵母の分離成功確率が、約10年前（約3%程度）に比べ上昇しているとはいえ低く（約7%程度）、さらに官能評価で実用化できると判断できる酵母の取得確率はさらに低いからである。とはいっても、始めなければ始まらない。もし、プリンセス・ミチコの花に目的の酵母がいたら、それを逃さないという気持ちで実験に取り組み、幸運にも恵まれ、清酒製造用酵母を取得することができた。プリンセスミチコプロジェクトに携わった皆様：実験に取り組んだ学生達、東京農業大学戦略室および(株)農大サポートの教職員、取得酵母を用いて清酒を製造して下さった酒蔵の方々、そしてクラウドファンディングでプロジェクトをサポートして下さいました方々に、この場を借りまして感謝申し上げます。

文献

- 財団法人日本醸造協会：“増補改訂清酒製造技術”，1998.
- 津川光昭，菅間誠之助，山村紘司，粉谷亘慶，野白喜久雄：醸協，**61**, 71 (1966).
- 竹田正久，塚原寅次：醸工，**43**, 447 (1965).
- 市川英治：醸協，**88**, 101 (1993).
- 福田和郎：醸協，**88**, 22 (1993).
- 相川元庸，水津哲義，市川英治，川戸章嗣，安部康久，今安 聡：醸工，**70**, 473 (1992).
- 吉田 清，稲橋正明，中村欽一，野白喜久雄：醸協，**88**, 645 (1993).
- 宮岡俊輔，新谷智吉，森本 聡：醸協，**96**, 115 (2001).
- 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**, 949 (2008).
- A-port HP, <https://a-port.asahi.com/guide/>
- 松田義弘，工藤晋平，小関敏彦，上木厚子，上木勝司：醸協，**100**, 199 (2005).
- 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，5 (5).
- 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，臼井瑠美，續 順子：あいち産業科学技術総合センター研究報告，96 (2015).
- 岩口伸一，鈴木孝仁，松澤一幸，清水浩美，大橋正孝，都築正男，藤野千代：生物工学会誌，**87**, 356 (9).
- 久田 孝，矢野俊博，松田 章：醸協，**107**, 205 (2012).
- 蟻川幸彦：長野県食品工業試験場研究報告，53 (2002).
- 蟻川幸彦，小松良寿，戸井田仁一，近藤君夫：長野県工業技術総合センター食品技術部門研究報告，47 (2005).
- 三井 俊，伊藤彰敏，山本晃司，金政 真：あいち産業科学技術総合センター研究報告，58 (2017).
- 殿内曉夫，森山裕理子：生物工学会誌，**93**, 632 (2015).
- 穂坂 賢，新宅信彦，矢作直子，中田久保，坂井 劭，塚原寅次：発酵工学，**65**, 191 (1987).
- 栗飯原景昭，矢野圭司：“バイオテクノロジーと食品—バイオ食品の安全性確保に向けて”，建帛社，1991, p. 170.

プロフィール

数岡 孝幸 (Takayuki KAZUOKA)

＜略歴＞1998年関西大学工学部生物工学科卒業／2003年同大学大学院工学研究科博士課程修了／同年京都大学化学研究所講師（研究機関研究員）／2004年同研究所教務職員／2006年東京農業大学短期大学部助手（嘱託）／2007年同学部助教／2013年同学部准教授／2018年東京農業大学応用生物科学部准教授，現在に至る＜研究テーマと抱負＞新規清酒製造用酵母の取得とその醸造特性，麹菌が生産する抗菌物質 Yeastcidin に関する研究＜趣味＞家族と過ごす時間を楽しむこと＜所属研究室ホームページ＞https://www.nodai.ac.jp/academics/app/fer/news/fer_topics/lab_706/

Copyright © 2020 公益社団法人日本農芸化学会
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.58.188