

桜酵母の分離

吉浦 貴紀* 田畑 恵** 中川 力夫* 長谷川 裕正** 西岡 勇一郎***

1. はじめに

研究委託元の(株)西岡本店は銘柄「花の井」で創業220年余を経るが「花の井」の「花」は桜の花から命名されている。また企業の所在地である桜川市は、国の天然記念物である山桜の景観で有名であり、多くの観光客が訪れる。そこで今回、地元の花の井より分離した酵母で桜の花見シーズンに桜川市を訪れてくれる観光客に季節限定清酒の製造販売を計画するために、桜酵母の分離を目的として研究を当センターに委託した。

2. 方法

1) 供試材料

磯部桜山公園(桜川市)採集の山桜2種
(株)西岡本店敷地内のソメイヨシノ2種

2) 検証事項

桜の花びらから酵母を分離し、性質を確認する。清酒製造には一般的に、*Saccharomyces cerevisiae* (以下 *S. cerevisiae* という。)に分類される酵母が用いられている。そこで、特に *S. cerevisiae* に分類される酵母の分離を目指し、以下の①～③を検証した。

①桜の花からの酵母の分離

4種の花を、表1に示した培地で集積培養した。自然界からの酵母の分離は各地で盛んに行われており、さまざまな培地が工夫されている^{1), 2)}。また、当センターでも過去にさまざまな培地からの分離を試みているが、そのなかから有効だと予想される培地を用いることとした。

培養液を顕微鏡で観察し、円～楕円形の酵母の存在が確認できたものについては、培養液の一部をYPD平板培地に塗抹し、酵母のコロニーを分離した。その後、ガストラップチップ入りYPD液体培地で純粋培養し、膜およびガスの生産性を確認し、一次スクリーニングとした。

②候補株のアルコール耐性選抜

分離酵母について、顕微鏡による形態観察を行い、二次スクリーニングとした。さらにアルコールを含む培地で培養し、短時間(24hr程度)で成長して来る物を順次アルコール濃度を上げた培地で培養することにより、高濃度のアルコールに耐性のある菌株を純化させていくことにより三次スクリーニングとした。

表1 酵母の分離に用いた培地

培地名	培地組成	特徴
YPD 培地*1	Yeast extract 1%	<ul style="list-style-type: none"> 一般的な酵母用培地 乳酸, クロラムフェニコールで細菌を抑制 プロピオン酸ナトリウムでカビを抑制
	polypepton 2%	
	glucose 2%	
	クロラムフェニコール 100 μg/ml	
	プロピオン酸ナトリウム 100mg/ml	
麴汁 培地	乳酸 20ml/L	<ul style="list-style-type: none"> 一般的な清酒酵母用天然培地 清酒酵母の発育に最も優れていると言われている
	麴を糖化させたもの	
	麴 2kg	
	水 7 L	
	上記を1昼夜55°Cで糖化	
	クロラムフェニコール 100 μg/ml	
	プロピオン酸ナトリウム 100mg/ml	
	乳酸 20ml/L	

*1 必要に応じて寒天1.5%を添加し、平板培地とした。

③酵母の分類同定試験

培養同定真菌キット(API 20 C AUX, 日本ビオメリュー株式会社製)による簡易同定を行い、最後に26S rRNA 遺伝子(D1/D2領域)の塩基配列³⁾により、菌種の分類同定を行った。

3. 結果の概容

①桜の花からの酵母の分離

表1に示した麴汁培地で集積培養を行ったところ、最終的に4本の集積培養カップより酵母様微生物の生育が確認された(写真1)。



写真1 麴汁培地で集積培養

表1のYPD平板培地に4カップの集積培養酵母を塗布、純化して形態的に大きいコロニーをそれぞれ1株ずつ、計4株採取した。さらにガストラップチップを入れたYPD液体培地で培養し、膜を作らずガスを生成するという *S. cerevisiae* の特徴を持った物が1株得られたのでこれを候補株とした(一次スクリーニング)(写真2)。

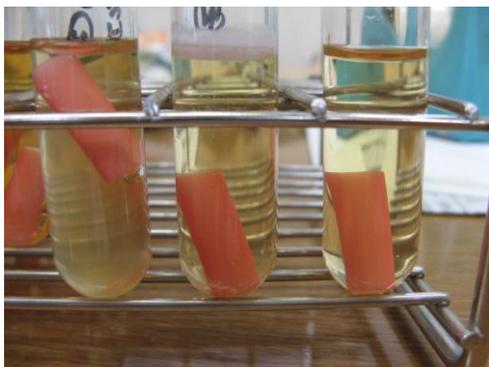


写真2 一次スクリーニング

(ガス生産性があると、ガストラップチップが浮き上がる)

- 左 : 膜生産性なし, ガス生産性あり → 候補株
中央 : 膜生産性あり → 除外
右 : ガス生産性なし → 除外

②候補株のアルコール耐性選抜

①で得られた候補株を顕微鏡により観察したところ、栄養細胞の形からも *S. cerevisiae* である可能性が高いと推察された(二次スクリーニング)(写真3)。

この候補株を最終アルコール濃度が 5%になるように調整した麴汁培地に植菌し、24 時間培養後にアルコール濃度を 6%に調整した麴汁培地に植菌した。さらに 24 時間後にまたアルコール濃度を 1%ずつ増加させた麴汁培地に植菌して最終的にアルコール濃度が 13%でも生育した菌株を最終候補株とした(三次スクリーニング)。

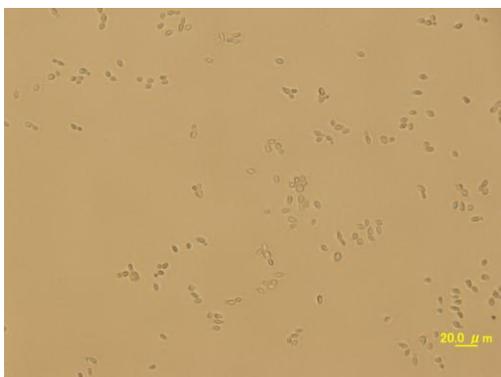


写真3 候補株の顕微鏡観察

③酵母の分類同定試験

②で選抜した候補株を培養同定真菌キットを用いて酵母の同定を行ったところ、糖類資化性から *S. cerevisiae* であると推定された(写真4)。そこでさらに 26S rRNA 遺伝子(D1/D2 領域)の塩基配列を調べてデータベースと比較したところ、98%の高い確率で *S. cerevisiae* であると推定された。



写真4 培養同定真菌キットによる判定

4. まとめ

桜の花から酵母の分離を行ったところ、磯部桜山公園採集の山桜から清酒酵母として1株を採取することができた。

この酵母を用いて企業では平成 22 年酒造期に純米酒の醸造を行い製品化とすることが出来た。この純米酒は地元の有志により「桜酵母仕込み 花の井桜川」と命名され販売されることになった(写真5)。

株式会社西岡本店野村の HP

<http://www.hananoi.jp/>



写真5 製品化された桜酵母仕込み「花の井桜川」

5. 参考文献

- 1) 鶴菌大, 富永達矢, 仲島日出男, 横堀正敏, 埼玉県産業技術総合センター研究報告第3巻, (2005)
- 2) 「地域特性を有する県産清酒の開発—新規清酒酵母の検索—」, 恩田匠, 長沼孝多, 乙黒親男, 渡辺正平, 飯村穰, 山梨県工業技術センター
- 3) 日本薬学会第 122 年会 公衆衛生協議会資料 (2002)