

# ハナバチから分離した酵母の性質と清酒醸造への利用

石川雄章・花牟礼研一・藤野舜一・寺澤善実・杉田佑輔

## ハナバチから分離した酵母の性質と清酒醸造への利用

石川雄章<sup>1\*、3</sup>・花牟礼研一<sup>1</sup>・藤野舜一<sup>1</sup>・寺澤善実<sup>2</sup>・杉田佑輔<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東京バイオテクノロジー専門学校, <sup>2</sup>㈱若松 東京港醸造, <sup>3</sup>(公財)日本醸造協会)

令和4年8月15日受付/令和4年12月5日受理

Characterization of yeasts isolated from a bumblebee and their application in saké-brewing

Takeaki ISHIKAWA<sup>1\*、3</sup>, Ken-ichi HANAMURE<sup>1</sup>, Shun-ichi FUJINO<sup>1</sup>, Yoshimi TERASAWA<sup>2</sup>, and Yusuke SUGITA<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Tokyo College of Biotechnology, 1-3-14 Kitakojiya, Ohta-ku, Tokyo 144-0032, Japan,

<sup>2</sup> Wakamatsu Co., Tokyo Port Brewery, 4-7-10, Shiba, Minato-ku, Tokyo 108-0014, Japan,

<sup>3</sup> Brewing Society of Japan, 2-6-30, Takinogawa, Kita-ku, Tokyo, 114-0023, Japan)

Received 15 August 2022 ; accepted 5 December 2022

Three wild yeasts were isolated from the bumblebee (*Bombus ardens*) caught at Hibiya Park in Tokyo in May 2018. One of those strains, Ha-1 was identified as *S. cerevisiae* by DNA sequence of the ITS region in the rRNA gene and another, Ha-3, was *Wickerhamomyces anomalus*. Although Ha-2 shows close affinity to *S. cerevisiae* in a 95% identity of its DNA sequence of the ITS, the species of Ha-2 remains unclear.

The results obtained in the investigations and of saké brewed by laboratory scale showed that : (1) all of strains Ha-1, Ha-2 and Ha-3 were able to produce ethanol at more than 150 mL per liter ; (2) the fermentation speed at 30 °C of Ha-1 was almost equal to that of K-901, and that of Ha-2 was 77% of K-901 and that of Ha-3 was 44 % ; (3) the TTC staining of Ha-1 and Ha-2 colonies were respectively red and that of Ha-3 was white (stainless) ; (4) killer activities of Ha-1 and Ha-2 against K-901 and K-701 were not observed.

According to the results stated above, we decided to use the Ha-1 yeast for practical saké-brewing and found it possible to produce a saké to be marketed as *Junmaiginjo-genshu*.

**Key words** : コマルハナバチ (bumblebee), 野生酵母 (wild yeast), 清酒醸造 (saké-brewing)

### 緒言

近年, 自然界から酵母を分離して酒類製造に利用することが多く報告されており, 花酵母<sup>1)</sup>はその一例である。また, Hisatomi ら<sup>2)</sup>はバラの花から *Lachancea fermentati* や *Saccharomyces cerevisiae* (以下, *S. cerevisiae* と略記する。)を分離し, パンやワインを製造している。また, 中川ら<sup>3)</sup>は知床に自生するマタタ

ビとコクワから分離した *Saccharomyces paradoxus* でワインの製造を試みている。一方, 殿内ら<sup>4)</sup>によると, 花は開花日数が短いので, 花からの酵母の分離は難しいことを報告しており, 著者のひとり藤野ら<sup>5)</sup>は羽根三山の植物体から野生酵母の分離を試みて, 花からの分離は難しく, ミズナラやブナの樹皮から分離している。かかる事実は, 我々が東京都内の草花や樹皮, 土壌などから酵母の分離を試みた際にも実感したことで

\*責任著者連絡先: takeiskw@ybb.ne.jp

ある。そこで、酵母が共棲している花に効率よく遭遇する方法として、花から花を訪れて蜜や花粉を集め廻っているハナバチに着目した。この度、訪花している1匹のハナバチを捕獲し、このハナバチから3株の酵母を分離することができた。これらの酵母の中の1株は *S. cerevisiae* と同定されたので、他の2株とともに酒造適性を中心にこれらの酵母の性質を検討し、*S. cerevisiae* と同定された1菌株を用いて純米吟醸原酒を製品化することができたので報告する。

## 実験材料と方法

### 1. 供試材料

酵母の分離源であるハナバチは2018年5月東京都千代田区の日比谷公園内の花壇に飛来したコマルハナバチの雌であり、それを補虫してただちに殺菌済みのZiploc（ファスナー付きプラスチック・バック）に保管した後、その日のうちに集積培養に供した。

### 2. 酵母分離のための集積培養

ペニシリンとストレプトマイシン各100 U/mL含有YM培地（1% glucose, 0.5% peptone, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, pH 6.8）10 mLに試料を入れて25℃で7日間培養して生育する微生物を取得した。なお、カビが多くて酵母のみを釣菌できない場合は、同上培地にさらに2 g/Lのn-プロピオン酸ナトリウム<sup>6)</sup>を加えた培養、もしくはアルカリ・ピロガロール法による嫌気培養<sup>7)</sup>を行った。

### 3. 単コロニーの分離

集積培養によって得られた微生物の中で、培養中に気泡の発生が認められたものを検鏡して細胞の形態を観察し、さらにはYM寒天平板にて30℃で培養し、生成するコロニーの形状から酵母であることを確認した。必要に応じて培養を反復して単一の酵母から成ると推定されるものを釣菌した。

### 4. 発酵性

飯塚・後藤の成書<sup>8)</sup>に準じて以下の実験を行った。なお、必要に応じて比較対照としてきょうかい酵母901号、及びきょうかい701号（以下、それぞれK-901, K-701と略記する。）を用いた。

1) 定性的な確認 試験管に10~15 mLの前記YM培

地とダーラム管を入れ、25℃で数日間培養し、CO<sub>2</sub>発生の有無を確認した。

2) 発酵速度 50 mLのYM培地で30℃一昼夜（約18時間）振とう培養した菌体を3,500 rpm, 10分間の遠心分離によって集菌し、さらに蒸留水で洗浄・遠沈して得た供試菌体をそれぞれ初発濃度が約 $1 \times 10^8$  cell/mLになるよう10%グルコース水溶液に懸濁して25 mL容のキューネ発酵管（Einhorn 発酵管）に入れ、同液で管内を満たし、30℃で経時的にCO<sub>2</sub>発生量を計測した。計測後に再度菌数を計測し、菌数 $1 \times 10^8$ 当たりのCO<sub>2</sub>発生量（積算量）に補正し、CO<sub>2</sub>発生量と発酵時間との関係から培養初期の平均発酵速度（CO<sub>2</sub>  $\mu$ L/min）を求めた。なお、酵母菌数は、検鏡下でトーマの血球計で計測した菌数とOD<sub>600</sub>との関係式を予め算出しておき、OD<sub>600</sub>を測定して求めた。

### 5. 炭素源及び硝酸塩の資化性と発酵性の確認

飯塚・後藤の成書<sup>8)</sup>に準じた。すなわち、炭素源の発酵性と資化性の試験は、1.7% Yeast Nitrogen Base without Amino Acids & Ammonium Sulfate (Difco-233510, 以下YNBと略称する。)と窒素源として0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 及びそれぞれ2%の供試炭素源を含む培地を用い、25℃, 48時間培養後の生育を確認し、発酵性については、予め挿入したダーラム管中のガス発生の有無を観察した。また硝酸塩資化性については、1.7% YNBに2%グルコースと0.5% KNO<sub>3</sub>を含む培地により、25℃, 48時間培養後の生育の有無を確認した。

### 6. TTC 染色性

（公財）日本醸造協会が頒布するTTC培地を用い、古川らの方法<sup>9)</sup>に従ってTTC染色性を調べた。

### 7. キラー性の確認

取得した酵母は実用化を前提としているため、供試酵母がキラー因子を産生するか否かを大内ら<sup>10)</sup>の方法に準じて確認した。本研究では酒造現場を重視することから、既存の主な清酒酵母であるK-701及びK-901に対するキラー性を検討した。

### 8. 菌株の同定

(1) 分離した3菌株について、凍結した酵母を乳鉢に

**Table 1** Formula of raw materials for pilot scale saké-brewing

		<i>Shubo</i>	<i>Soe</i>	<i>Naka</i>	<i>Tome</i>	Total
Polished rice	g	38	75	150	237	500
Steamed	g	25	52	115	192	384
<i>Koji</i>	g	15	26	40	52	133
Water	mL	71	113	228	418	830
Lactic acid	mL	0.4*				

\*The quantity is equivalent to that of 563 mL lactic acid added to 100L water for *Shudo*.

取り、0℃以下で乳棒を用いてよく磨砕した後、常法<sup>11)</sup>に準じて全DNAを抽出した。抽出したDNAを用いて、リボゾーマルRNA遺伝子のITS1、5.8S、及びITS2領域約800塩基の配列分析を(株)Macrogen Japanに依頼して行い、データバンクに登録されている既知のDNA配列との一致率(Identity)から菌株を同定した<sup>12)</sup>。(2)前項と同様に抽出した全DNA区分を1%アガロースゲルによる電気泳動に供し、泳動パターンをK-901、及びK-701と比較した。

## 9. 有機酸の定量

HPLC法<sup>13,14)</sup>により、以下の条件により分析した。装置：Hitachi L235、カラム：ODS-SP、カラム温度50及び65℃。移動相：0.85%リン酸：水(7：3v/v)、流速1.0 mL/min、試料の注入量20 µL、検出器：UV 210 nm、peak height法により定量した。

## 10. 香気成分の定量

ヘッドスペース-GLC法<sup>15)</sup>によった。Shimadzu GC-2014AFとヘッドスペースサンプラー Turbo Matrix HS40を用い、以下の条件で分析した。カラム：DB-WAX (0.25 mmφ×30 cm×0.25 µm)、カラム温度：40℃(3 min)、10℃(1 min)、150℃(5 min)、注入口：250℃、キャリアガス：He(スプリット比：1：40)、検出器にはFIDを用いて定量した。

## 11. 日本酒度などの一般成分

- (1) **日本酒度** 京都電子工業(株)製 振動密度計(清酒メーター) DA-105型により測定した。
- (2) **アルコール分** 理研計器(株)製 アルコメイト AL-2型により測定した。
- (3) **酸度及びアミノ酸度** 酒類総合研究所標準分析法(国税庁所定分析法)<sup>16)</sup>により、総酸を測定して酸度を、

またホルモール滴定法により、アミノ酸度を求めた。

## 12. 小仕込み試験

使用酵母の選定と実用化醸造に関する基礎情報を得るために、Table 1に示す仕込配合により、総米500gの試験醸造を行った。小規模の三段仕込みを行うにあたって、得られる結果の精度を高めるために、米麴は徳島製麴(株)製の乾燥麴IDK1-60(黄麴、精米歩合60%)、蒸米には同社製の酒造用α化米AA-60(精米歩合60%)の同一ロットのものを用い、秤量にはd=0.01 g、max=2,200 gのSartorius CP2202Sを用いて0.1 g単位まで精秤した。また、乾燥麴に対しては20%、α化米については30%相当の水分補正(加水)を行った。酒母は速醸酒母、醪の温度は循環式恒温水槽を用いて最高温度を10℃とした。発酵終了後の上槽は、3,500 rpm、15分の遠心分離によって行い、製成酒を得た。

## 13. 実用化に向けた醸造試験

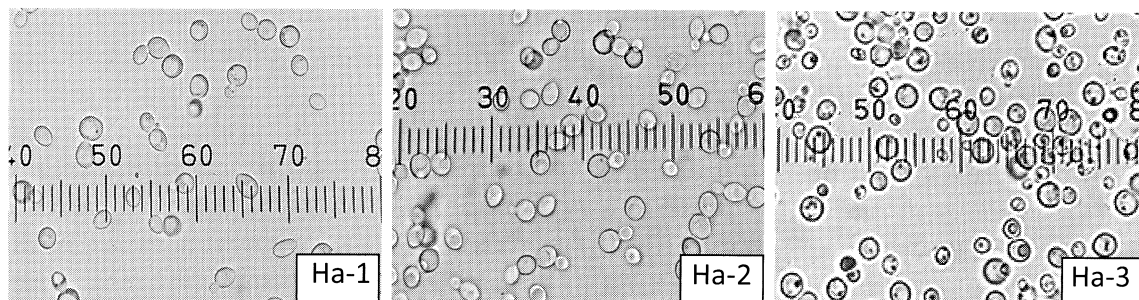
精米歩合60%の東京産原料米(山田錦)を用い、Table 2に示す仕込配合により総米200 kgの吟醸仕込みを行った。

酒母麴と添麴の計15 kgと仲麴、留麴の計31 kgはそれぞれ合併して製麴した。種麴とその使用量は、酒母・添麴ではα-アミラーゼの強い黒判「大吟醸」を7.5 g(50 g/100 kg原料米)、仲・留麴ではグルコアミラーゼの強い黒判「古流吟醸」(いずれも(株)ピオック製)を18.6 g(60 g/100 kg原料米)とし、最高品温は酒母・添麴では43℃、仲・留麴では40℃、製麴時間はいずれも50時間を目標に製麴した。酒母は速醸で、醸造乳酸73 mL(560 mL/汲水100 L)、酵母は麴汁培地1 Lで25℃、48時間前培養して、いずれも水麴時に添加し、1週間後の分けを目標に育成し

**Table 2** Formula of raw materials for brewer's scale saké brewing

		<i>Shubo</i>	<i>Soe</i>	<i>Naka</i>	<i>Tome</i>	Total
Polished rice	kg	11	35	59	95	200
Steamed	kg	7	24	45	78	154
<i>Koji</i>	kg	4	11	14	17	46
Water	L	13	40	84	143	280
Lactic acid*	mL	563~760				

\*90% Lactic acid mL/100L water for *Shudo*.

**Fig. 1** Appearance of isolated yeast strain, Ha-1, Ha-2, and Ha-3

た。醪は、添仕込み 15.8℃、伸 9.8℃、留 7.5℃、最高温度は 10℃とし、上槽時の日本酒度-2.0を目標に醪を管理した。上槽にはヤブタ式自動搾機を用いて製成酒を得た。

## 実験結果と考察

### 1. 採取源と酵母の取得

酵母の分離源となったハナバチは、コマルハナバチ (*Bombus ardens*) の雌で、当該個体から多数の酵母が分離されたが、YM 寒天平板での培養を 2 回反復して得られたコロニーから再度、ダーラム管を入れた YM 液体培地で 25℃、2 日間培養して CO<sub>2</sub> の発生、すなわち発酵性を再度確認した後、Fig. 1 に示すように、検鏡による観察とコロニーの形状によって区別される 3 株を得て、それぞれを Ha-1, Ha-2, 及び Ha-3 と呼称することとして、以下の実験に供した。

昆虫から酵母が分離されることは珍しいことではなく、Sung-Oui ら<sup>17,18)</sup>は甲虫類から *Candida* 属や *Pichia* 属の酵母を分離している。ハチからは Gangl ら<sup>19)</sup>がミツバチの巣箱中のハチミツなどから *Zygosaccharomyces rouxii* と *Candida apicola* を分離し、Barry ら<sup>20)</sup>はミツバチから *Torulasporea delbrueckii* を分離している。しかし、ハチなどの昆虫から *S. cerevisiae*

を分離した報告は見あたらない。

Madden ら<sup>21)</sup>は、昆虫と酵母が相利共生の関係にあり、酵母の代謝副産物 (香気成分や揮発酸など) によって昆虫に花の蜜など糖の所在情報を提供し、その代償に運動機能の無い酵母は糖の存在場所に運んでもらい拡散できるという仮説、拡散遭遇モデル (dispersal-encounter model) を提唱している。さらに、同氏らはスズメバチから分離した酵母を使ってワインやビールを製品化している<sup>22)</sup>が、分離した酵母については、「商業的な醸造に使用されたことのない野生種の酵母」とし、属や種名は記していない。また、Tauber ら<sup>23)</sup>は、西洋ミツバチ (*Apis mellifera*) では、中腸から分離される酵母 *Wickerhamomyces anomalus* (以下、*W. anomalus* と略記する。) すなわち、本報でいう Ha-3 と同種の酵母がミツバチの免疫調節とホルモン関連の遺伝子発現、及びミツバチのノゼマ病の原虫 *Nosema ceranae* との関係に影響することを明らかにしている。

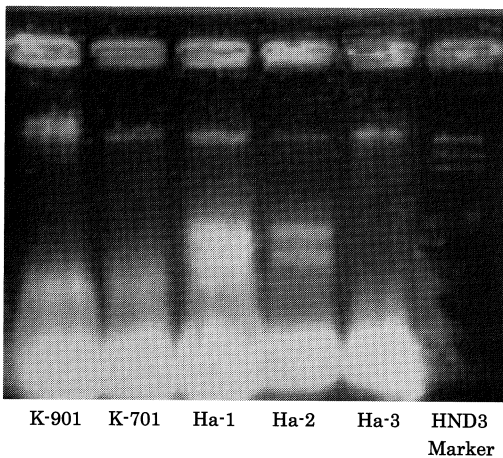
### 2. 菌株の同定

Ha-1, Ha-2, 及び Ha-3 におけるリボゾーマル RNA 遺伝子の ITS 領域約 800 塩基 (Ha-3 においては 600 塩基) の塩基配列を比較解析し、結果を Table

**Table 3** Identification of the strain by ITS region of the rRNA gene

Strain	DNA Accession number	Identity	Gaps	Closest related strain*	
Ha-1	ITS 1	LC722225	747/752 (99%)	4/752 (0%)	<i>S. cerevisiae</i> CBS 1171
	ITS Region				
	ITS 2	LC722226			
Ha-2	ITS 1	LC722227	741/781 (95%)	30/781 (3%)	<i>S. cerevisiae</i> CBS 1171
	ITS Region				
	ITS 2	LC722228			
Ha-3	ITS 1		568/571 (99%)	2/571 (0%)	<i>W. anomalus</i> CBS 5759
	ITS Region	LC722229			
	ITS 2				

\*Each sequence is aligned to the closest related strain in the NCBI nucleotide database.



**Fig. 2** Electrophoretic DNA patterns of Ha-1, Ha-2, and Ha-3. K-901 and K-701 are used as references.

3にまとめた。ITS 1, ITS 2, 及び5.8S rRNAを含むいわゆるITS領域をデータベース (GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/) によって検索した結果, Ha-1とHa-3の一致率はいずれも99%で, Ha-1が*S. cerevisiae*, Ha-3は*W. anomalus*と同定された。一方, Ha-2は*S. cerevisiae*との一致率が95%であり, データベースの中では最も一致率が高いものの, 高島<sup>12)</sup>が属種同定における一致率の限界値99%より低いことと, 次項に述べるRaffinoseの資化性が(-)であることと考え合わせて属種は不明であるとした。

それぞれの酵母の全DNA抽出区分の電気泳動パターンをFig. 2に示す。各バンドの詳細については検討していないが, Ha-1やHa-2はK-901, K-701とは異なる泳動パターンを示した。

### 3. 炭素源及び硝酸塩の発酵性と資化性

結果をTable 4にまとめて示すが, 飯塚らの成書<sup>8)</sup>とTHE YEAST<sup>24)</sup>に掲げられている関係する酵母のものを抜粋して同表に掲げて比較して考察する。Ha-1は文献による発酵性, 資化性ともに*S. cerevisiae*, 及び*S. paradoxus*と同じパターンであった。Ha-2はRaffinoseの発酵性を欠いており, *S. cerevisiae*の(+), *S. paradoxus*の(v)と比較すれば, 糖類の発酵性からは*S. cerevisiae*よりも*S. paradoxus*に近いようにも見えるが, 前述のとおり属種を決定するには至らなかった。Ha-3は糖類の発酵性, 資化性ともに文献による*W. anomalus*によく一致しているが, 硝酸塩資化性は(-)であり, 文献の(+とは異なる。この差異は今後の検討課題としたい。

### 4. 発酵速度の比較

実験方法4, 2)に示す方法で, 培養初期の発酵速度を求めて比較したが, 実験を3回繰り返して得た個々のデータの平均値から最小二乗法により求めた近似直線の勾配を平均発酵速度とした。培養初期の発酵速度が大きいことは, 酒母や醪における雑菌汚染を防止する観点から重要な性質であると考えている。結果はFig. 3に示すとおりで, 発酵が検出可能になった30分以降の30℃におけるそれぞれの平均発酵速度( $\text{CO}_2$   $\mu\text{L}/\text{min}/1 \times 10^8$  yeast cell)は, Ha-1が7.6, Ha-2, 5.6, Ha-3は3.2であり, 対照のK-901と比較すると, Ha-1はK-901の7.3にほぼ等しく, Ha-2ではその約77%, Ha-3では44%であった。Ha-1は発酵開始時から発酵初期における発酵速度の点で, K-901とほぼ等しいことから清酒醸造への実用が可能な菌株であると考えた。

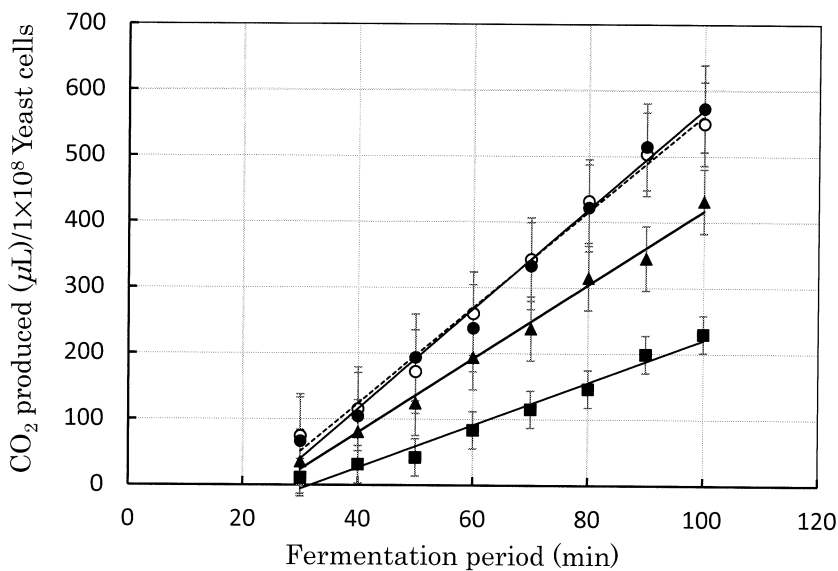
**Table 4** Fermentation and growth reactions to various carbon sources and nitrate

	Fermentation					
	Gl	Ga	S	M	L	R
Ha-1	+	+	+	+	-	+
Ha-2	+	+	+	+	-	-
Ha-3	+	+	+	+	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	+	v	+	+	-	+
<i>S. paradoxus</i>	+	+	+	v	-	v
<i>W. anomalus</i>	+	v	+	v	-	v

	Growth reactions						
	Gl	Ga	S	M	L	A	KNO <sub>3</sub>
Ha-1	+	+	+	+	-	+	-
Ha-2	+	+	+	+	-	+	-
Ha-3	+	+	+	+	-	+	-
<i>S. cerevisiae</i>	+	v	+	+	-	+	-
<i>S. paradoxus</i>	+	+	+	v	-	+	-
<i>W. anomalus</i>	+	v	+	+	-	+	+

Abbreviations : Gl, glucose ; Ga, galactose ; S, sucrose ; M, maltose ; L, lactose ; R, raffinose ; and A, ethanol. Symbols : +, positive ; -, negative ; and v, variable. *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, and *W. anomalus* are showed as a reference<sup>24)</sup>.



**Fig. 3** Comparison of fermentation rate of the yeasts

Abbreviations : ●, Ha-1 ; ▲, Ha-2, ■, Ha-3, and ○, K-901 (control strain).

The fermentation rate at 30 °C was 7.6 of Ha-1, 5.6 of Ha-2, 3.2 of Ha-3 and 7.3 of K-901 (control strain), respectively. They were calculated by the slope of CO<sub>2</sub> (µL) produced/ min. by 1 × 10<sup>8</sup> yeast cell.

The error bar indicates the standard error (n = 3).

5. 小仕込み試験醸造による実用化株の選定

分離した酵母，特に Ha-1 株の酒造適性を明らかに

し，実用化の可否を決定することを目的に，K-901 を対照に Ha-2 株をも加えて総米 500 g の小仕込みを行

**Table 5-A** Composition of resulting saké

	NS	Alcohol(%)	Acidity(mL)	F-N(mL)
Ha-1	+5.7 ±0.08	15.1 ±0.08	3.6 ±0.08	2.2 ±0.12
Ha-2	+5.5 ±0.08	15.0 ±0.16	3.9 ±0.05	2.2 ±0.00
K-901	+5.8 ±0.16	14.9 ±0.16	3.4 ±0.08	2.4 ±0.05

Abbreviations : NS, *Nihonshudo*, saké meter value ; FN, Formol nitrogen (Amino acidity). Numerical values are averages of three replicates and ± standard deviation.

**Table 5-B** Composition of organic acids and flavor substances of resulting saké

	Lac	Mal	Succ	EtOAc	i-BuOH	i-AmOH	i-AmOAc	Et-Cap
Ha-1	591 ±62	616 ±48	724 ±38	15.41 ±0.00	58.27 ±0.03	170.75 ±1.18	0.71 ±0.04	nd
Ha-2	532 ±49	636 ±56	777 ±29	13.55 ±0.16	55.16 ±1.61	166.30 ±1.97	0.03 ±0.02	nd
K-901	619 ±57	572 ±76	654 ±32	36.83 ±2.55	47.41 ±2.76	130.55 ±1.04	3.74 ±0.64	1.80 ±0.00

The numerical values(mg/L) are averages of three replicates for organic acid, duplicate for flavor substances and ± standard deviation.

Abbreviations : Lac, Lactic acid ; Mal, Malic acid ; Succ, Succinic acid. They are the main components of organic acid in saké.

EtOAc, ethyl acetate ; i-AmOH, isoamyl alcohol. (3-methyl-1-butanol) ; i-AmOAc, isoamyl acetate (3-methyl-butyl acetate) ;

EtOCap, ethylcaproate(ethyl hexanoate) ; nd, not detected(undetectable). They are the main flavor components in saké.

った。*W. anomalus*であるHa-3は、試験醸造から省いた。Ha-1, Ha-2ともに三段仕込みの醪を順調に発酵させ、香りも特に異常はなかった。ただ、留温度を8℃以下にするとHa-2は発酵が遅くなる傾向にあった。しかし、留温度が10℃ではその後の醪最高温度が10℃でも順調に発酵を続けることができ、Ha-1及びHa-2はアルコール分を15%以上生成させることができた。また、Ha-1, Ha-2ともに醪で高泡を形成することはなかった。以下に、総米500gで速醸酒母(酒母総米38g, 最高温度18℃で8日間の育成)を用いた三段仕込みの醪で、最高温度10℃、22~28日目に上槽した製成酒の一般成分をTable 5-Aに、主な有機酸と香气成分の分析結果をTable 5-Bに示す。

アルコール分15.0%を目標に上槽したため、醪日数がそれぞれHa-1で26日、Ha-2、28日、K-901は22日となった。ちなみに、原料米の溶けの指標であるそれぞれの原エキスはHa-1が27.9、Ha-2が28.0、K-901は27.8であり、一般成分も比較的良好に揃えることができたものと考えた。この小仕込試験で得られた主な有機酸と香气成分の分析結果はTable 5-Bに示すとおりであるが、K-901と比較して、Ha-1, Ha-2

ともにリンゴ酸、コハク酸が多く生成され、乳酸はHa-1ではほぼ同じ、Ha-2では2割ほど少なかった。また、香气成分は、K-901に比べてHa-1, Ha-2ともに香气エステル類の生成は少なく、特にカプロン酸エチルは検出されなかったが、イソアミルアルコールは2~3割ほど多いという特徴が見られた。一方、酢酸エチルの生成はHa-1, Ha-2とK-901とで大きな差がみられた。総酸度(有機酸組成)や香气成分の量は醸造条件によって大きく変わることは周知の事実である。吉田<sup>25)</sup>は、高香气生成酵母K-1801の育種・開発の経緯を解説している中で、カプロン酸エチルや酢酸エチル含量、主な有機酸量が仕込みによって大きく変わることを示している。また、K-1801を使っても、カプロン酸エチルが10mg/L以上生成される醪がある一方、2, 3mg/Lしか生成しない場合もあることもよく知られている事実であり、醪の品温管理などの条件によって、酸度や香气成分の量は変動することから、Ha-1やHa-2についての有機酸や香气成分の組成や生成量については、発酵条件との関連において、今後詳細に検討されるべき課題であると考えられる。

官能評価のデータをTable 6にまとめたが、これま



**Table 6** Sensory evaluation of resulting saké

Class	Panel number	Ha-1			Ha-2			K-901		
		Taste	Aroma	Quality	Taste	Aroma	Quality	Taste	Aroma	Quality
Whole	17	2.29	2.29	2.35	2.88	2.94	3.41	2.65	1.94	2.53
		0.772	0.849	0.931	0.857	0.827	0.712	1.057	0.966	1.007
Men	11	2.27	2.45	2.45	2.64	2.64	3.18	2.45	1.73	2.18
		0.905	0.934	1.128	0.809	0.809	0.751	1.214	1.009	0.982
Wemen	6	2.33	2.00	2.17	3.33	3.50	3.83	3.00	2.33	3.17
		0.516	0.632	0.408	0.816	0.548	0.408	0.632	0.816	0.753
Student (Young)	10	2.60	2.40	2.70	3.10	3.10	3.40	2.90	2.10	2.90
		0.843	0.966	1.059	0.876	0.876	0.843	1.197	1.101	0.994
Staff (Aged)	7	1.86	2.14	1.86	2.57	2.71	3.43	2.29	1.86	2.00
		0.378	0.690	0.378	0.787	0.756	0.535	0.756	0.900	0.816

The sensory evaluation was performed by 17 panels.

Evaluation score means 1, excellent ; 2, good ; 3, satisfactory ; 4, conditionally passed ; and 5, failed.

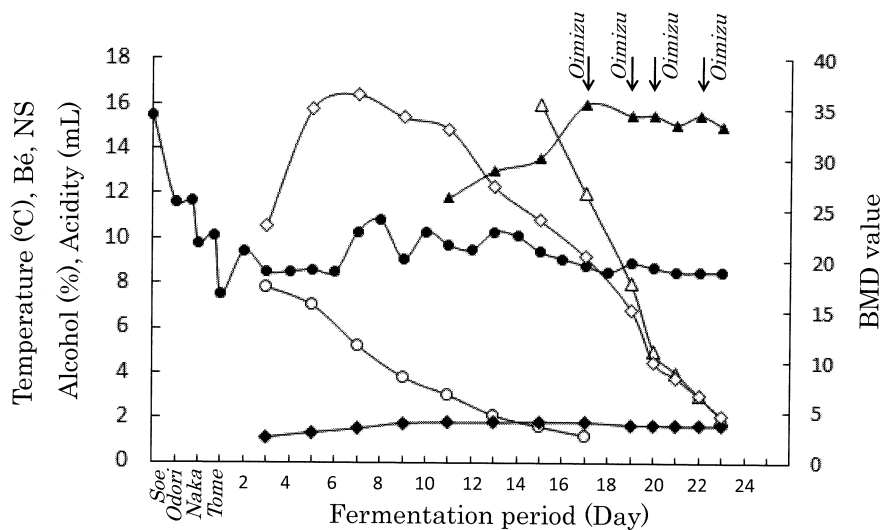
The student panels were composed of 6 men and 4 women in their 20s.

Staff panels were 40 to 70 years old. Five of them were the authors, who were expert panelists and the remaining two were women.

The numerical values are averages of evaluation scores at the upper line and standard deviation at the lower line.

で述べてきた製成酒それ自体の官能評価データであり、有機酸組成や香気成分の特徴が反映されていることが認められた。すなわち、全パネル 17 名による評価では、香りは香気エステル類の生成が多い K-901 の評

点が高かった。一方、味の評価は、K-901 も高いものの、Ha-1 では、コメントから推察するに、リンゴ酸が多いことによると思われる「爽やかさ」が評価されたと思われる。K-901 には「味重い」のコメントがあ



**Fig. 4** Progress of main mash fermentation

*Oimizu* : water addition to control fermentation.

Symbols are ●, temperature ; ○, baume degree ; ▲, alcohol content ; △, *nihonshudo* value ; ◇, BMD value ; and ◆, acidity.

**Table 7** Components of commercial saké  
(*Junmai Ginjo genshu*)

NS	Alcohol(%)	Acidity(mL)	F-N(mL)
-2.0	15.1	1.64	1.0
Lac	Mal	Succ	
333	325	351	
EtOAc	i-AmOH	i-AmOAc	EtOCap
21.4	158.8	0.7	nd

Abbreviations are the same as those in Table 5.

った。興味深いことは、男女別や若者（学生）と年配者（職員：Staff）間で評価に差が見られたことである。男性は味、香り、総合評価（Quality）ともに Ha-1 より K-901 を高く評価しており、一方で女性はいずれの項目も Ha-1 の方を良いと評価しているが、その差は小さく、バラツキ（標準偏差）も大きい。年輩者（Staff）にも同様の傾向が見られ、K-901 の香り、Ha-1 の味に対してより明確に高い評価を与えている。これらに対して、Ha-2 に対する評価は全般に低かった。以上の諸結果に加えて、データは示さなかったが、TTC の染色性は Ha-1 及び Ha-2 が赤、Ha-3 は白であったこと、Ha-1、Ha-2 ともに K-901、K-701 いずれに対してもキラー性を示さないことが確認されたことから、Ha-1 を清酒の製品化に用いることができる菌株であると結論づけた。

## 6. 実用化醸造

実験方法 10 に示す方法で、Ha-1 を用いた総米 200 kg の吟醸仕込みを行った。製麴は、出麴までの時間が酒母・添麴では 55 時間、仲・留麴では 52 時間であり、出麴歩合はそれぞれ 21.6 %、24.3 % であった。速醸酒母は、3～5 日目まで暖気入れを行い、4 日目の最高ポーメは 15.2、7 日目の最高温度は 22 °C、酵母数は約  $2 \times 10^8$  /mL で、8 日目に分けて、4 日の枯らし期間を取って添卸をした。

醪の品温経過と主な成分変化を Fig. 4 にまとめて示す。BMD 曲線から発酵は順調に推移したと考えているが、成分の調整を図るため、17 日目に 30 L、19 と 20 日目にそれぞれ 16 L、22 日目に 17 L の追水を行った。なお、小仕込み試験の項でもふれたが、総米 200 kg の仕込みにおいても、Ha-1 は醪で高泡を形成

することはなかった。23 日目に上槽を行い、Table 7 に示す製成酒を得て、純米吟醸原酒として製品化した。製成酒は、酢酸イソアミル系の香りをほのかに感じるものの、吟醸酒としては香りがきわめて控えめ、もしくは低いが、爽快で淡麗な味の清酒として製品化することができた。

## 要 約

東京都内の花壇に飛来した 1 匹のコマルハナバチから 3 株の酵母、Ha-1、Ha-2 及び Ha-3 を分離した。rRNA 遺伝子における ITS 領域の塩基配列から Ha-1 は *S. cerevisiae*、Ha-3 は *W. anomalus* と同定した。Ha-2 は *S. cerevisiae* と類縁の酵母と思われるが、現時点では同定できず、不明とした。いずれの菌株も 15% (v/v) 以上のアルコールを生成した。TTC 染色性は Ha-1 と Ha-2 が赤、Ha-3 は白であった。また、Ha-1 の 30 °C における発酵速度は K-901 とほぼ同等であった。Ha-2 ではその 77%、Ha-3 は Ha-1 や K-901 の 44 % と遅かった。Ha-1 と Ha-2 は K-901 と K-701 に対するキラー性も認められなかった。以上の結果から、Ha-1 株は清酒醸造への実用化が可能と考え、Ha-2 株をも加えて、K-901 を対照として小仕込み試験に供した。その製成酒の各成分と官能評価から、Ha-1 は実用株として使えると判断した。よって、Ha-1 を用いて総米 200kg の仕込みを行い、純米吟醸原酒として製品化することができた。

## 謝 辞

コマルハナバチの同定に関して貴重なご意見と丁寧なご指導を賜った国立科学博物館 井手竜也先生、酵母の rRNA 遺伝子の解析に関して貴重なご意見とご指導を戴いた岩手大学農学部 下飯 仁教授（現、(公財)日本醸造協会副会長）に深く感謝いたします。

また、2018 年～2021 年にわたり、卒業研究を通して実験に携わり貴重なデータを出してくれた 19 名の学生諸君に対しては、以下に氏名を記して謝意を表する次第である。

櫻井 億、畠山翔悟、関野文章、宮越 駿、武内与士拓（2018 年度）。清水青空、西山徳磨、野坂 尚、福島綾乃（2019 年度）。新井幸弥、加藤真生、金城 紬、鯨岡瑞希（2020 年度）。大口 岳、大谷昂正、坂下友紀乃、佐藤賢介、林 夏実、中屋玖美（2021 年度）。

## 参考文献

- 1) 東京農大花酵母研究会：  
<http://www.hanakoubou.jp/index.html>
- 2) Taisuke Hisamitsu, Kousuke Toyomura : *My-coscience*, **62**, 382-389 (2021)
- 3) 中川良二, 濱岡直裕：北海道立総合研究機構食品加工センター研究報告 No.10, 17-21 (2013)
- 4) 殿内暁夫, 森山裕理子, 青山嘉宏, 土岐春春歌：醸協, **111** (7) 437-444 (2016)
- 5) 藤野舜一, 川邊久之, 小室真保：醸協, **111** (11) 743-748 (2016)
- 6) 日本生物工学会編：生物工学実験書, 培風館(東京) p.120-121 (2010)
- 7) 菅間誠之助, 大内弘造, 忍頂寺晃嗣, 野白喜久雄：醸協, **61** (2) 164-169 (1966)
- 8) 飯塚 廣, 後藤昭二：酵母の分類同定法 (第三版), 東京大学出版会 (1980)
- 9) 古川敏郎, 秋山裕一：農化, **37** (7) 398-402 (1963)
- 10) 大内弘造, 川島 宏：醸協, **69** (9) 629-630 (1974)
- 11) 鈴木賢一朗, 平石 明, 横田 明編：微生物の分類同定実験法, 丸善出版(株) (東京) p. 22-27 (2012)
- 12) 高島昌子：醸協, **116** (10) 674-680 (2021)
- 13) 横塚弘毅, 松土俊秀, 櫛田忠衛：J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. **18**, 7-13 (1983)
- 14) 浅野沙也佳, 加藤真実, 立川 敦生, 竹内 孝幸, 松本 啓嗣：関税中央分析所報 第61号, 73-77 (2021)
- 15) 吉沢 叔：醸協, **68** (1) 59-61 (1973)
- 16) 独法) 酒類総合研究所：  
<https://www.nrib.go.jp/bun/nribanalysis.html>, 酒類総合研究所標準分析法, 3-5, 3-7
- 17) Sung-Oui Suh, Meredith Blackwell : *FEMS Yeast Research* **5**, 87-95 (2004)
- 18) Sung-Oui Suh, Nhu H. Nguyen and Meredith Blackwell : *ibid*, **8**, 88-102 (2008)
- 19) Helmut Gangl, Ksenija Lopandic, Gabriele Tschek, Stefan Mandl, Gerhard Leitner, Katharina Wechselberger, Maria Batusic, and Wolfgang Tiefenbrunner : bioRxiv preprint doi : <https://doi.org/10.1101/300780> ; April 13, 2018.
- 20) Joseph P. Barry, Mindy S. MetzJustin Hughey, Adam Quirk and Matthew L. Bochman : *Fermentation* **4**, 22-32 (2018)
- 21) Madden AA, Epps MJ, Fukami T, Irwin RE, Sheppard J, Sorger DM, and Dunn RR : *Proc. R. Soc. B* **285**, 20172733 (2018).  
<http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2017.2733>
- 22) <https://news.ncsu.edu/2019/04/beer-brewers-abuzz>
- 23) James P. Tauber, Vy Nguyen, Dawn Lopez, and Jay D. Evans : *Insects*, **10** (9) 296-312 (2019)
- 24) C. P. Kurtzman, J. W. Fell, and T. Boekhout ed., THE YEAST A TAXONOMIC STUDY Fifth Edition Volume 1, (Elsevier Amsterdam) p. 262-253, 274-275 (2011)
- 25) 吉田 清：醸協, **10** (12) 910-922 (2006)