

# 酵母の研究

自然界からのアルコール発酵酵母(サッカロマイセス属)の分離



米沢市立第七中学校

1年 新藤 匠杜

## ■実験目的

日本はその立地や環境条件により、日本酒・焼酎・醤油・味噌・なれ寿司など、世界の中でも類を見ないほど多く独自の発酵食品が存在し、まさに発酵食品王国と言うに相応しい食文化を有する国である。一例として他国では使用しないコウジカビ（アスペルギルス・オリゼー）や納豆菌（枯草菌の一種のバチルス・ナットー）など例を挙げればきりが無い。私は小学生の時に、発酵食品の研究の一環として四年、六年の時に納豆の研究を、五年の時に味噌の研究を行った。特に六年生の時に行った納豆の研究は、自然界から納豆有用微生物を分離してみようと言う発想から行った研究であった。そして今年も小学生の時に行ってきた発酵食品の研究を、続けたいと思い、私の家の家業（酒造り）で使われる酵母をテーマに自然界から分離することを目的として「酵母の研究」を行うこととした。

## ■実験方法

### 1. 製麴（麴造りは専門用語で製麴=せいきくと言う）

#### 製麴に必要な物

原料 白米 1kg ・ 麴種（カビの孢子）

器具 洗米浸漬用 バケツ・排水口ネット

蒸し米用 蒸し器・ナイロン網・キッチンタイマー

製麴作業用 温度計・ガーゼ程度の荒さの網布・ビニール袋・バスタオル

大型のバット・バットに入る程度の平角ザル・布（木綿）・こたつ一式

※全ての器具は予め殺菌しておく。今回は逆性石けん(DAC)・エタノールスプレーを使用。



※器具は全て事前に殺菌する。

※逆性石けんのDAC

※エタノールスプレー

清酒用の種麴と味噌用の種麴は同じアスペルギルス・オリゼーであるが清酒にはより多くの、米のデンプンを分解するためにアミラーゼ（デンプン分解酵素）力価（酵素の力）が必要で味噌には豆由来のタンパク質をよく分解するために、より多くのプロテアーゼ力価が必要である。今回は最高品温 43C で生産するところをプロテアーゼを失活させる事無くより多くの酵素を生産させるために最高品温 39~41C の範囲内で約 50 時間かけて製麴する。（注 弟の研究「味噌の研究」と一緒に製麴した。）

最初に原料を計測し目的の吸水歩合に合わせて洗米・浸漬する。この時、原料の漏れがあると正確な重量を測定出来なくなる為に原料は予め排水口ネットに入れて準備をする。目安としては吸水歩合 31~32% に仕上げる事が好ましい。又、33% を超え水分過多になると納豆菌の増殖が心配される。

家庭用の蒸し器でナイロン網を敷き原料を入れ、蒸気が上がってから約 1 時間蒸す。

原料は蒸した後にナイロン網に広げ、40°C まで蒸し米の温度を下げ、種麴を振る。

この時の種麴の使用量は安全を考え（通常は米 1kg に対して 1g の種麴）多目に倍量を使うことにする。なので今回は原料米 1kg に対して 2g の種麴を使用する。

種麴を均一に付着させる様に良くほぐしながらナイロン網に軽く貼り付ける程度に蒸し米をもみ菌糸の食い込みをよくさせる。



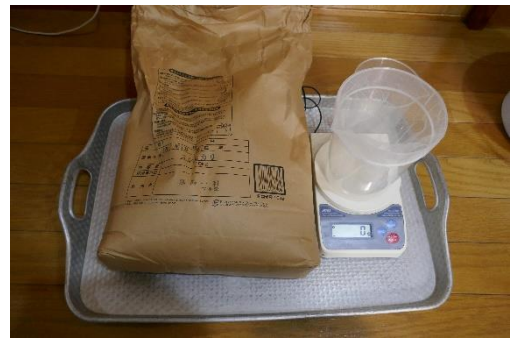
32℃以上で包み上がるように注意深く作業を行い、完了したら布ごとビニールにいれ 10ヶ所穴をあけ殺菌された大型バットに入れて少し口をあけてタオルでくるみ、保温し 24 時間品温を下がらないようにする。38C まで上がるのがよい。

24 時間後一度包みを広げてほぐす。このとき米粒の表面に白い粒が出来ているが、これは麹菌の胞子が発芽して出来た菌糸である。

次は麹菌が米内部の水分は毛細管現象により吸い上げ外にだすのでビニールを取り温度が下がらないように速やかに平らにならしおおよそ 5 時間ごとに手入れを行う。このとき最高温度を 40C よりも上にならないようにする。

約 50 時間後に完成になる。

ここまでは一昨年から弟と共同で行ってきた作業と同じである。



1. 洗米 (洗米)    2. 浸漬 (しんせき)    3. 張込み (蒸し器に米が付かないようにナイロン網使用)



4. 蒸強 (じょうきょう)    5. 蒸し上がり    6. 放冷 (ほうれい)



7. 種麹 (たねこうじ)    8. 種付け (たねつけ)    9. 種麹 左: 使用後 右: 使用前



10. 種付け後の蒸し米    11. 包み



## 2. 麴汁培地の製造

### 準備する物

原料 麴米 1 k g ・ 無水エタノール(99.5%) ・ 乳酸

機器 定温恒温器 ・ 乾熱滅菌器 ・ オートクレーブ ・ ガス台

器具 フタありステンレス寸胴 ・ 漏斗 ・ 濾紙 ・ 麴汁滅菌用耐熱容器 ・ 100ML メスシリンダー

綿栓またはシリコ栓 ・ 100ML 三角フラスコ ・ メスピペット等 ・ エタノールスプレー

こたつ

※全ての器具は予め殺菌しておく。



### a. 麴汁の作成

麴 1kg に水を 4L 加え時々攪拌しながら 55~62C に 8~10 時間保ち糖化する。

糖化完結をヨード反応で確かめたあと煮沸してから荒ごしし、冷えてからこれに麴汁 1L を加え、オートクレーブで 110C 10 分間加熱したあと濾過する。ボーリング 9~11° (浮標計) 程度の濃度に調整して使用する。

これがカビ、酵母などに使用する最も簡単な液体培地の作成方法であるが、今回は自然界から採取した果実や花などから選択的に分離・集積培養する為に以下の追加作業を行う。



1. ステンレス寸胴と米麴



2. 水麴を作る



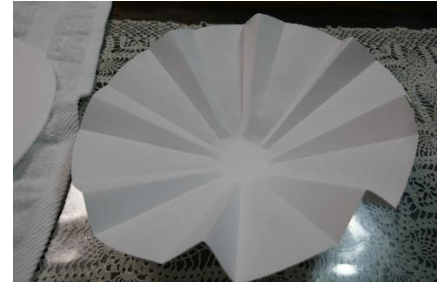
3. 55°Cで糖化



4. 糖化完了後



5. ろ紙を折る



6. 正しい折り方



7. 濾過をする



8. 浮標計で糖度を計測



10. 完成した麴汁

## b. 集積培養用液体培地の作成

あらかじめ準備しておいた麴汁を使用し感熱殺菌をした器具を使用し、集積培養用の麴汁液体培地を作成する。麴汁 95ml に対し無水エタノール 5ml に追加で乳酸 0.4mL として考える。(99.5≠100 とする)

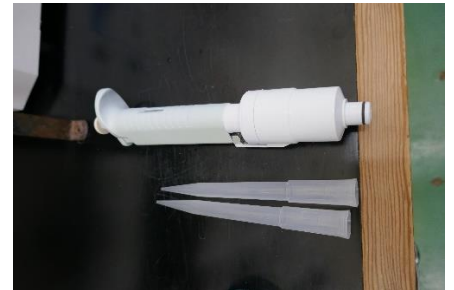
通常、単一の菌体培養は、殺菌した麴汁のみを使用するが、今回の実験では自然界から酵母を分離するため、サンプルの中に無数の異なる菌が混在しているため、単一の菌を培養するような何のストレスもなく増殖する培地では、様々な菌が発芽してしまうため、今回は麴汁液体培地の中に、アルコール発酵酵母を選択的に増殖させるため、今回はエタノールと乳酸を使用する。



1. 必要な物



2. 乾熱殺菌された三角フラスコ



3. ピペットは機械式を使用



4. 培地の準備



5. 培地の分注



6. 薬品を入れる

### ○エタノール

自然界の大多数の菌はある一定濃度のアルコール存在下では、増殖出来ない。

サッカロマイセス属(*Saccharomyces*)やシズサッカロマイセス属(*Schizosaccharomyces*)は発酵によりアルコールを生じ、食品の加工に古くから利用されておりアルコール耐性がある。しかし自然界の中のアルコール発酵酵母は、おおむね 8%までのアルコール濃度までしか発酵出来ない。ところが清酒酵母と言われるサッカロマイセス・セレビスエ(*Saccharomyces Cerevisiae*)の中の高アルコール生産性酵母は 16%までのアルコールを生産すると言われている。

なので、今回は、液体培地中の初発のアルコール濃度を 5%として培養を開始する。

### ○乳酸

自然界の菌の中で、数少ないアルコールに耐性のある菌の 1 つとして知られているのは、乳酸菌の仲間だ。

穀物が自然発酵するときに最初に関与する微生物は野生酵母と硝酸還元菌だが、その硝酸還元菌が生産した亜硝酸を利用し、乳酸菌が増殖し生成し、その乳酸の殺菌作用により他の菌が増殖できずに死滅し、清酒酵母サッカロマイセス・セレビスエ(*Saccharomyces Cerevisiae*)だけが増殖することが知られている。今回はその理屈を生かし予め乳酸を添加して培地に応用するものとする。



### 3. サンプルの採取

酵母の付着している可能性のあるサンプルを採取する

納豆菌は、土壌微生物としてどこにでもいると考えられ、同じく種類を限定しなければ酵母も何処からでも採取出来ると考えられる。ところがアルコール発酵をする酵母は、数多くの酵母の中でも数えられるくらいの属しか存在しない。しかし昔から天然発酵の葡萄酒等があることから、アルコール発酵酵母はアルコールに必要なブドウ糖の多い所に生息しやすいと考えられる。

なので、今回は、ブドウ糖がたくさんありそうな果実や花から採取し、4種類の検体から液体培地にて各種3サンプルを用意して試験することとする。なお、比較の対象には清酒酵母を使用する。



これを集積培養液体培地に入れる。



※果実はそのまま4粒ずつ、花は一つずつはさみで切ってから培地に投入した。

## ■実験結果

### 1. 麴米の製造

原料米は親戚の田んぼで栽培されたコシヒカリを食べる程度に精米した物を使用した。洗米・浸漬した結果、昨年の天候のせいか米が異常なほどに固いので24時間程度に水に付ける事とした。

白米の重量を100%とすると、この時の浸漬後の吸水歩合は+25%と目標の吸水歩合まで5%足りない。

しかし、これ以上は吸水しないので、以降の行程で対策を取る事とした。

#### ①蒸し

原料米は水が沸騰してから1時間の蒸し時間の所、1時間15分と鍋の水が蒸発して無くなる限界まで蒸すこととした。

#### ②種付け

その後速やかに蒸し米を広げてあら熱を取り通常は35°C以下で種麴を振るところ、50°Cを切った時点で種麴を振り、蒸し米を良く揉みまんべんなく胞子を広げた。

#### ③包み

包み温度は通常32°Cで保温するが個原料米が硬く吸水が少ない為に早く菌糸に成長して貫う必要が有る為35°Cで包み保温した。また保温する際も木綿の布で包みビニール袋に入れるところ、ビニール袋のみを使用して水分が逃げないようにして、早めの発芽を促した。

発芽してから実験結果ビニール袋に入れない理由は、菌糸が発芽しぞうしょくを始めると空気中の酸素を使い、呼吸を始めるので、ビニール袋をはずさないと呼吸ができないからである。

この時点での重量は蒸気による重量変化で+10%程度増えるので135%程度だ。

#### ④盛り・切り返し

通常は24時間後に白くなり始めるが、あまりぞうしょくしていなかったため、通常より温度を上げ、30時間目で最初の作業（きりかえしもり）をした。

#### ⑤仲仕事

盛りより8時間後に手入れを行った。通常より菌種の増殖が遅いので2時間遅らせた。(38°C)

#### ⑥仕舞仕事

仕舞仕事は更に2時間遅らせ仲仕事から8時間後に40°Cに達して行った。

#### ⑦最高品温・出麴

以降最高品温を39~41°C程度に保ちながら合計60時間製作作業を行った。

アルコールのような匂いがした。アルコール臭が有ると言うことは状態が若いと言うことだ。

見た目は小さくなっているような気がした。

味はかむと甘味が出る。

あまり乾燥させずに麴を仕上げたので出麴歩合は130%と概ね予定の範囲内だった。



1. 種付け後。菌糸は回っていない。2. 盛り。ようやく菌糸が出始める 3. 仲仕事。菌糸の回りが悪い。



4. 仕舞仕事。状態が若い。



5. 最高品温。アルコール臭が有る



6. 出麹。全体に菌糸が薄い。

## 2. 麹汁培地作成

完成した麹に 4L の水をいれ 55°C で煮て 20 時間糖化した。

本来であれば、10 時間程度で糖化できるが、麹の酵素力化が低いため、糖化が遅れた。

20 時間かけて、仕上がった麹汁の酵素活性を止めるため、約 10 分間煮沸し酵素活性を止めた。(タンパク質は、60°C 以上で熱変性するため、酵素 60°C 以上で失活する。)

麹汁の濾過を以下の手順で行った。

- 濾紙を折る。(濾紙には裏表があるのでよく確認する)
- 濾紙の折り方に注意する。(抜けるので、真ん中は折らない。)
- 濾過したあと糖度をはかる。浮標計を用いボーリング 9° で薄めに調整した。
- 殺菌する。(110°C で 1 時間熱する)





### 3. 培養試験

以下の採取物からサンプルを 100ML 三角フラスコ入り集積培養用液体培地に各 3 本ずつ添加し酵母を分離してみようと試みた。

- ①ブドウ（デラウエア）×3 個
  - ②ブルーベリー（新藤家庭）×3 個
  - ③コウメ（しおれている）×3 個
  - ④花（ノウゼンカズラ）×3 個
  - ⑤かすから採取した清酒酵母（実験結果の比較の対象として）×1 個
- なお、培養温度はこたつで概ね 30~40°Cとした。



1. ブドウ（デラウエア）



2. ブルーベリー



3. 小梅（時期が過ぎしおれている）

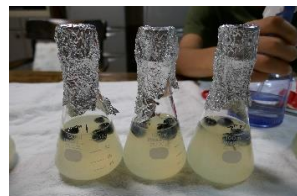
これを集積培養液体培地に入れた。



4. ノウゼンカズラ



1. ブドウ（デラウエア）



2. ブルーベリー



3. 小梅



4. ノウゼンカズラ



5. 酒粕から清酒酵母を採取した比較対象としての培地。

## 培養開始 2 日目

### ①ブドウ

培地のにごりが少し澄み少量の沈殿物が発生した。

3つのサンプルのうち2番目のサンプルがより澄んでいる。

### ②ブルーベリー

3つのサンプルとも目立った変化はない。

### ③コウメ

3つのサンプルのどれもがブドウと同じくらい澄み始めている。

### ④花

どれも沈殿物が少なく目立った変化はない。

### ⑤清酒酵母

澄んできた液体の中に、細かい粉のような物が発生してきた。

※沈殿は、培地の中のタンパク質等が沈殿していると考えられるが、細かい粉状の沈殿や浮遊物の発生は、酵母の増殖と考えられる。清酒酵母のサンプル培地の清澄は、採取したサンプル中の酵素などの影響が考えられる。



1. ブドウ (デラウエア) 2. ブルーベリー 3. 小梅 4. ノウゼンカズラ

## ○3 日目

### ①ブドウ

サンプル 1, 3 は、目立った変化はないが 2, には気泡がついているものがある。

### ②ブルーベリー

サンプル 1 は沈殿が少し見えた。サンプル 2, 3 は、変化は少ない。

### ③コウメ

全体的に澄んできて果実の表面に、気泡が出ているサンプルがあった。

### ④花

特に目立った変化はない。

### ⑤清酒酵母

酵素の作用により清澄したが、発酵が進んだようには、円滑に進んでいる様には見えない。



1. ブドウ (デラウエア) 2. ブルーベリー 3. 小梅 4. ノウゼンカズラ



5. 清酒酵母



## ○4日目

通常の麹汁液体培地と比べ、アルコールと乳酸が入っているため、培養の状態が遅い。

### ①ブドウ

サンプル 2, 3 は、気泡が見える。但し少ない。

### ②ブルーベリー

特に目立った変化はない。サンプル 1 の変化もなくなった。

### ③コウメ

すべてのサンプルに微量の気泡が見える。

### ④花

サンプル 1, 3 に気泡が見える。但し少ない。但しこの気泡は花から出た物で酵母活動由来では無い。

### ⑤清酒酵母

気泡が見られるが少ない。ようやく発酵してきたようだ。

この気泡は酵母が増殖し、その酵母が呼吸して放出した二酸化炭素である。



1. ブドウ (デラウエア) 2. ブルーベリー 3. 小梅 4. ノウゼンカズラ 5. 清酒酵母

## ○5日目

### ①ブドウ

ブドウは、すべてのサンプルに微量の気泡が見られたが少ない。

### ②ブルーベリー

ブルーベリーは、すべてのサンプルに気泡が見られなかった。発酵が起こっていない。

### ③コウメ

コウメは、サンプル 1, 3 に微量の気泡が見られた。

### ④花

花は、すべてに気泡が見られなかった。発酵はしていないようだ。

### ⑤清酒酵母

この中で一番気泡が見られた。気泡が筋状に立って見えるほど旺盛だ。



1. ブドウ (デラウエア) 2. ブルーベリー 3. 小梅 4. ノウゼンカズラ 5. 清酒酵母

○6日目

①ブドウ

ブドウは、すべてのサンプルに気泡が残っているが少ない。発酵は停止すると見られる。

②ブルーベリー

ブルーベリーは、すべてのサンプルに気泡が見られなかった。発酵が起こっていない。

③コウメ

コウメは、サンプル 1, 3 も気泡が立たなくなった。

④花

花は、すべてに気泡が見られなかった。発酵は完全に停止したと考えられる。

⑤清酒酵母

気泡が見られたが大分鈍くなった。



1. ブドウ (デラウエア) 2. ブルーベリー 3. 小梅 4. ノウゼンカズラ 5. 清酒酵母

○7日目

①ブドウ

全てのサンプルから気泡が出なくなった。発酵が停止したようだ。菌体らしい沈殿はあった。アルコールとブドウの香りがした。

②ブルーベリー

あまり変化が無く、一部のサンプルに沈殿が見られた。

③コウメ

サンプル 2 は培地中でサンプルが破裂して果肉が出ている。その為果汁による着色があった。

菌体らしき沈殿が見られた。気泡が出なくなり発酵が停止したようだ。発酵したアズメの様な香りがした。

④花

3つのサンプルとも変化が見られなかった。甘い香りがした。

⑤清酒酵母

一番激しかった気泡が立たなくなり発酵が停止した。アルコール臭がした。

		1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目	
ブドウ	1	—	沈+-	+ -	+ -	気+-	気+-	-	
	2	—	沈+	気+	気+	気+-	気+-	-	
	3	—	沈+-	+	気+	気+-	気+-	-	
ブルーベリー	1	—	—	沈+	—	—	—	—	
	2	—	—	—	—	—	—	—	
	3	—	—	—	—	—	—	—	
小梅	1	—	沈+-	気+	気+	気+	-	-	
	2	—	沈+-	気+	気+	-	-	-	
	3	—	沈+-	気+	気+	気+	-	-	
ノウゼンカズラ	1	—	—	—	—	—	—	—	
	2	—	—	—	—	—	—	—	
	3	—	—	—	—	—	—	—	
清酒酵母		—	沈+	+	気+	気++	気+-	-	

※発酵の強さと状態を表に表した。無=— 弱=+- 中=+ 強=++ と表す。

※酵母と思われる沈殿が発生した場合は"沈"と、発酵で気泡が立つ場合は"気"と記載



## ■考察

こうして、4日間の洗米からの製麴作業と3日間の麴汁培地作成、7日間に渡る酵母の集積培養を終了した。

今回の実験は、「酵母の研究」と言うことで、自然界からのアルコール発酵性酵母（サッカロマイセス属(Saccharomyces)）の分離を行ったが、昨年行った納豆有用微生物の分離と比較して、非常に難しい実験になった。それは酵母が納豆菌等の芽胞形成菌とは違い、熱や薬品に弱いことが実験を難しくしている一つの要因だ。

しかし幸いなことに、今回分離するサッカロマイセス属(Saccharomyces)は好気性のアルコール生産性酵母だ。しかも知られているのは主にシゾサッカロマイセス属(Schizosaccharomyces)との2種類の属しかアルコール存在下で生育できない。なので今回は培地の中に予めこの菌が生育できる程度の濃度のエタノールを添加し、さらに乳酸存在下では通常の菌は生育できないところ生育できる、清酒酵母カロマイセス・セレビスエ(Saccharomyces Cerevisiae)だけが生育できる環境を作り培養を行った。培地も最も安価で簡単に作成できる麴汁培地を基として行ったわけだが、実験中も産膜酵母（目的とする菌では無い）なども認められず、結果良好な成績が得られた。

今回の実験に於いて採取したブドウ・ブルーベリー・小梅・ノウゼンカズラの4つのサンプルのうちブドウと小梅に酵母の増殖した形跡が確認出来た。表のようにブドウと小梅の角3サンプル共に強弱や早い遅いの違いはあるが酵母の活動が確認出来る。

但し、清酒酵母と比較して見ると、その発酵能力は弱くて短い。

自然界から採取した天然の酵母は、選抜され代々植継がれてきた清酒酵母と比較して、発酵力が弱いのは当然のことだ。しかし自然界の中にも代々選抜されてきた酵母よりも強い酵母が何万株の中に1つ位は存在するはずである。

また、通常の麴汁培地で清酒酵母を発酵させると、30~40℃の条件ではおよそ3日間で増殖を終了するようだ。今回の実験で、全ての酵母がそれよりも遅く増殖を始めたのは、麴汁液体培地中に酵母の活動にストレスが掛かるエタノールと乳酸の存在が有ったからだと思われる。

ブドウのサンプルは全てのサンプルで酵母の増殖が確認出来た。

ブルーベリーはサンプル1だけが途中で増殖したように見えたが、翌日には確認出来なくなり誤差の範囲だろう。ブルーベリーには目的とする酵母がいなかったのかも知れない。

小梅はフレッシュな状態では無く、時期も過ぎて木の上で熟していて一番酵母の存在に期待していた。1と3のサンプルはブドウ同様に良好な実験結果となった。またサンプル2であるが、果肉や果汁が飛び出すほど最初から果実の中で何かの菌が増殖していたのであろうか？興味を持てる培養試験だった。

ノウゼンカズラの花はサンプル中最も難しかった。木の上に蟻が上り花から蜜を運び出しているのが目に付いたのでサンプルとして採用したが、結果アルコール生産性酵母は見つけることが見られなかった

比較の対象として作成した清酒酵母のサンプルはさすがに発酵力が強かった。培地のアルコール臭も強かった。

今回の実験を通して、酵母を自然界から分離するのは想像以上に難しいことが分かった。現在発酵食品の分野で使われている酵母も元はと言えば自然界から分離して使われた物だ。なのに、何度も分離・選抜を繰り返して現在使われている優れた酵母があると言うことは、大変おどろくべき事だ。

私も今後とも微生物を利用する実験を続けて、微生物の世界を探っていきたいと思う。

■参考文献

- 納豆の研究（その1） 新藤匠杜・新藤有杜  
味噌の研究 新藤匠杜・新藤有杜  
醸造学 野白喜久雄・小崎道雄・好井久雄  
醸造・食品学実験書 柳田藤治

今回の実験について、実験の方法・文書の書き方・パソコンの入力方法や専門用語については父から教えて貰った。

