

## 山幸酵母による発酵食品の開発 (R3)

公益財団法人 とかち財団 ものづくり支援部  
食品技術グループ 高谷 政宏

### 1 研究の背景と目的

池田町のワイン用独自品種「山幸」は国際ブドウ・ワイン機構に国内3例目となる品種登録がされた十勝地域の貴重な資源である。著者らはこの「山幸」から酵母 *Hanseniaspora vineae* TW15 (山幸酵母) を分離し、この酵母を使用することにより風味の差別化されたパンが得られることを明らかにした<sup>1)</sup>。また、山幸酵母はスクロースを利用することができないため、スクロースを分解する酵素インベルターゼを備えた *Saccharomyces cerevisiae* と混合培養することによって、スクロースを糖源とした培地もしくはパン生地でも山幸酵母を培養、発酵することを可能にする技術を開発した<sup>2)</sup>。

酵母を利用する発酵食品はパンのほかにもワイン、清酒、ビールといった酒類などがある。なかでもワイン醸造に *H. vineae* を使用すると華やかな香りなどが増強された好ましい風味のワインが得られるという報告があり<sup>3)</sup>、同種である山幸酵母もワイン醸造に使用すると好ましい風味のワインが得られる可能性が考えられた。また、製パン用酵母は生イーストもしくはドライイーストの形態で販売されている。生イーストは使用期限が一般に製造後1カ月程度と短く、まとまった販売量が確保できていない新規の酵母を売り出すには難しい形態である。そのため山幸酵母を製パン用酵母として商品化するためには、ドライイーストの形態で製パン用酵母としての機能を発揮する必要がある。

本研究では、山幸酵母を使用したワインの商品開発に向けて、池田町ブドウ・ブドウ酒研究所のご協力のもと、実規模スケールのワイン醸造試験を実施した。さらに、開発した混合培養技術により培養した山幸酵母を製パン用ドライイーストとして商品化するため、試作した山幸酵母ドライイーストを使用した製パン試験を実施した。

### 2 試験研究の方法

#### 2-1. 山幸酵母を使用したワイン醸造試験

本報告では令和4年1月発行の日本醸造協会誌に掲載された内容の一部を編集して記載する<sup>4)</sup>。池田町ブドウ・ブドウ酒研究所にて、前日に収穫した山幸ブドウを破碎して得られた果醪444Lに50ppmになるように亜硫酸カリウムを添加し、Brix23になるよう補糖し、山幸酵母の乾燥菌体(16g)を添加した。対照区は、Lallemand社の市販乾燥ワイン酵母DV10 (*S. bayanus*) を使用し、同様に処理した果醪410Lに乾燥菌体80gを添加した。発酵開始12日後に圧搾して、さらに9日間発酵した後、5日間オリ下げをして瓶詰めした。ワイン醸造中にサンプリングを実施して発酵経過を解析した。還元糖(グルコースとフルクトースの合計)を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分析した<sup>5)</sup>。pHはガラス電極により測定した。酵母数の計測はクロラムフェニコール添加PDA培地により計測し、最少セロビオース-リジン培地(0.17% YNB without Amino Acids and Ammonium Sulfate、0.5% セロビオ

ース、0.1% リジン、2.0%寒天) を用いたレプリカ法により山幸酵母の菌数を計測した<sup>3)</sup>。

瓶詰めしたワインは10℃で保管し、10日以内に各種分析に供した。比重、エキス分、アルコール分、総酸、還元糖、着色度は酒類総合研究所標準分析法注解に従った<sup>6)</sup>。なお、着色度は光路長5mmのセルを用いてOD420nmとOD530nmにおける吸光度を測定した。官能評価は池田町ブドウ・ブドウ酒研究所に所属する特に習熟したパネル4名を含む合計10名により実施し、外観を3点満点、香りを5点満点、味を8点満点、調和を4点満点とした合計20点満点の評点法で評価すると同時に任意でプロフィールについて自由記述した。統計処理はExcelの統計ソフトを用いて有意水準5%、両側検定によるstudentのt検定を実施した。

## 2-2. 山幸酵母ドライイーストを使用した製パン試験

使用菌株は山幸酵母ととから野酵母である。とから野酵母は山幸酵母の分離源と同一地域である十勝地域に生育していたエゾヤマザクラの果実から分離された酵母であるため選択した<sup>7)</sup>。これらの菌株を混合培養し、ドライイーストを試作した。ドライイーストの製法は機密情報が含まれるため割愛する。ドライイーストは顕微鏡観察により山幸酵母ととから野酵母の比率を算出した。ドライイーストを用いて、既存の報告と同様の方法で製パン試験を実施した<sup>1,2)</sup>。焼きあがったパンは菜種置換法による比容積の測定、糖、遊離アミノ酸、揮発性成分を分析した。いずれの分析も既存の報告と同一の方法で実施した<sup>1,2)</sup>。実験は独立して4回実施し、統計処理はExcelの統計ソフトによりstudentのt検定を実施した。

## 3 結果と考察

### 3-1. 山幸酵母を使用したワインの発酵経過と品質

培養した山幸酵母菌体を使用して、実規模スケールのワイン試験醸造を実施して還元糖濃度の推移ならびに野生酵母を含む全酵母数、山幸酵母単独の菌数の推移を分析した(図1)。山幸酵母はDV10よりも還元糖の減少が2,3日遅れていた。これは山幸ブドウ果醪の低いpH(3.2)、高い糖濃度、低い発酵温度(15℃)などの複合的な要因により生じたものと考えられた。山幸酵母単独の菌数は発酵開始から8日目までは野生酵母を含む全酵母数とほぼ同じ菌数を維持したが、山幸酵母は糖をほぼ消費する9日目以降、全酵母に占める割合が減少した。これは山幸酵母のアルコール耐性がおおよそ10%であり、発酵開始8日目にはアルコール濃度が10.1%(分析値)を超えたため、山幸酵母の生育が著しく弱まり、原料ブドウ等に由来するアルコール耐性の高い野生酵母が優勢になったものと考えられた。

出来上がったワインは官能評価に熟練したパネル10名によって評価され、山幸酵母は香り、味、調和の評価が高い傾向であり、総合得点が有意に高い結果であった(表1)。特に評価された味は酸味が穏やかであることが評価されており、これは総酸とpHが影響したと考えられる(表2)。総酸は0.02~0.05%、pHは0.05の違いで識別が可能であり<sup>8)</sup>、特に総酸は山幸酵母が1.18g/Lも低い値であった。ワインの香りに関連する揮発性成分は、適量の高級アルコールとエステルの存在が重要であることが分かっている<sup>9)</sup>。DV10の菌種である

*S. bayanus* は *S. cerevisiae* よりも高級アルコールやエステルを多く生成すると報告されていたが<sup>10)</sup>、SPME を用いた GC-MS による揮発性成分の分析を分析したところ、DV10 よりも山幸酵母のほうが高級アルコールやエステルを多く生成していた。これは山幸酵母の菌種である *H. vineae* の遺伝学的特性によるものと考えられた<sup>11)</sup>。

表 1. 試作ワインの官能評価結果

	色	香り	味	調和	総合評価
山幸酵母	2.8 ± 0.6	2.7 ± 0.7	4.3 ± 1.4	2.6 ± 0.5	12.4 ± 2.2 <sup>a</sup>
DV10	2.7 ± 0.7	2.3 ± 0.7	3.6 ± 1.6	2.1 ± 0.6	10.7 ± 2.3 <sup>b</sup>

異なるアルファベットは 5%水準で有意な差があったことを表す。

表 2. 試作ワインの品質

	アルコール (%)	エキス (%)	pH	総酸 (g/L)	還元糖 (g/L)	色	
						420 nm	530 nm
山幸酵母	12.33	3.5	3.62	9.79	3.2	2.142	2.705
DV10	11.52	3.4	3.55	10.97	2.8	2.074	2.568

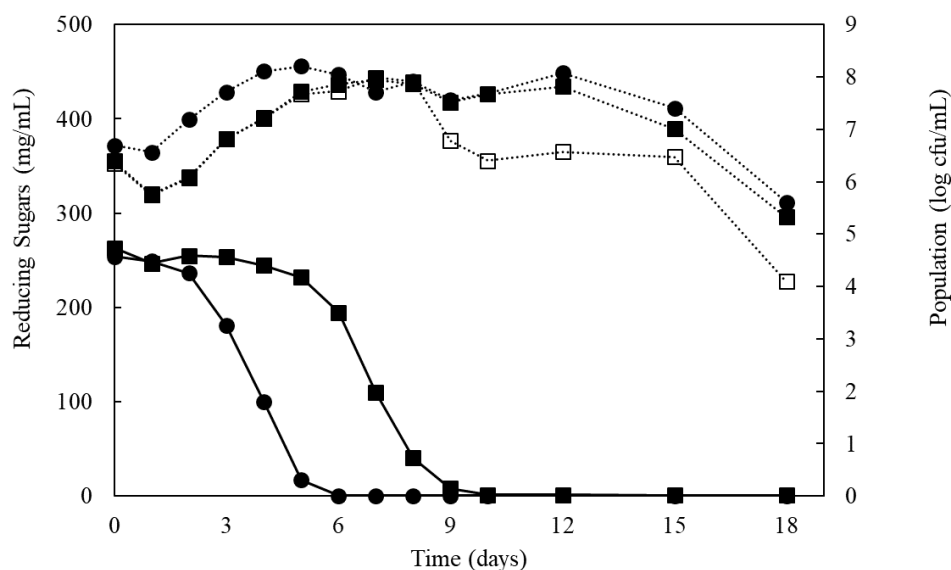


図 1. 山幸酵母を使用したワインの発酵経過

—■— : 山幸酵母(還元糖)、—●— : DV10 (還元糖)、…■… : 山幸酵母 (総酵母菌数)  
 …●… : DV10 (総酵母菌数) ; …□… : 山幸酵母 (山幸酵母単独菌数)  
 総酵母菌数には原料ブドウなどに由来する野生酵母の菌数も含まれる。

### 3-2. 山幸酵母ドライイーストを使用したパンの品質

山幸酵母ととち野酵母を混合培養したドライイーストを使用して製パン試験を実施し

た（図 2）。比較対象は日本甜菜製糖株式会社のとちち野酵母ドライイーストを使用した。試作した山幸酵母ドライイーストはとちち野酵母と混合培養したため、山幸酵母ととちち野酵母が共存した状態になっており、そのドライイースト中の山幸酵母の存在比率はおよそ 90%であった。得られたパンの比容積は山幸酵母ドライイーストが  $4.42 \pm 0.14$ 、とちち野酵母ドライイーストが  $4.44 \pm 0.06$  であり、両者の間に差はなかった。パンの糖含量も両者の間に差はなかった（データ非掲載）。混合培養技術の開発に使用した菌株である *S. cerevisiae* NBRC2044 のスクロースを分解する酵素インベルターゼ活性は  $2460 \pm 340$  nmol/min/細胞固形重量 (mg) であるのに対して、今回混合培養に使用したとちち野酵母のインベルターゼ活性は  $246 \pm 21$  nmol/min/細胞固形重量 (mg) と非常に低い値が報告されていたため<sup>12)</sup>、ドライイースト中の 90%を占める山幸酵母に発酵可能なグルコース、フルクトースを十分に供給できず、膨らみの小さいパンになってしまうことが懸念されたが、今回の試験結果からとちち野酵母の低いインベルターゼ活性でも山幸酵母によるパン生地膨張に十分な糖を供給していたことが示唆された。山幸酵母を使用したパンに特徴的な揮発成分に酢酸と酢酸 2-フェニルエチルがあった<sup>1,2)</sup>。これらの成分を分析した結果、山幸酵母ドライイーストを使用したパンに多く含まれていることが分かった（表 3）。揮発成分の分析結果も比容積の結果と同様に、パン生地発酵中にとちち野酵母が山幸酵母に十分量の糖を供給したことを示唆した。また、3名のパネルによって簡易的な官能評価を実施した結果、山幸酵母ドライイーストを使用したパンはとちち野酵母ドライイーストを使用したパンよりも酸味や華やかな香りが強いことも確認された。

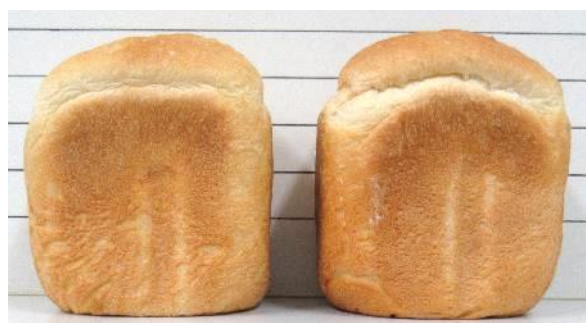


図 2. パンの外観

左：山幸酵母ドライイースト、右：とちち野酵母ドライイースト

表 3. 山幸酵母に特徴的なパンの揮発成分

	面積 (×10 <sup>3</sup> )		相対面積 (%)	
	山幸酵母	とちち野酵母	山幸酵母	とちち野酵母
Acetic acid	$598 \pm 10^a$	$143 \pm 21^b$	$3.9 \pm 0.1^a$	$1.0 \pm 0.1^b$
2-Phenylethyl acetate	$105 \pm 8^a$	$21 \pm 2^b$	$0.7 \pm 0.0^a$	$0.0 \pm 0.0^b$

異なるアルファベットは 1%水準で有意な差があったことを表している

#### 4. まとめ

従来の山幸ブドウによるワインは、アロマが華やかで若々しいといった風味が報告である<sup>13)</sup>。ワイン醸造に関与する *Non-Saccharomyces* 属酵母は主にブドウに由来するが、ブドウに生息している酵母は地域的に異なることが分かっており、これがテロワール概念の一因とも考えられている<sup>14)</sup>。本研究では、山幸ブドウから分離した山幸酵母を山幸ワインの醸造に使用すると、華やかな香りなどを形成する高級アルコールやエステルが増加して香りの官能特性が向上する傾向であり、総合的な官能特性が優れたワインが得られた。したがって、山幸酵母は官能的に優れたワインの製造に有望な菌株であり、従来備えていた山幸ワインの品質とオリジナル性をさらに向上する可能性が示唆された。

本研究は、製パン用酵母として山幸酵母を商品化するため、山幸酵母と同様に十勝地域由来というストーリー性を持ったとかち野酵母を混合培養相手に使用し、従来試験してきた生イーストの形態ではなく商品化の可能性が考えられるドライイーストの形態で製パン試験を実施した。その結果、混合培養相手であるとかち野酵母単体のドライイーストを使用したパンと同様の膨らみのパンが得られ、山幸酵母特有の風味も再現できることも分かった。今後、山幸酵母ドライイーストが商品化され、十勝由来というストーリー性と高い品質のパンやワインが商品化されていくことが期待される。

#### 5. 参考文献

- 1) M. Takaya, T. Ohwada and Y. Oda : *Food Sci. Technol. Res.*, **25** (6) , 835-842 (2019)
- 2) M. Takaya, T. Ohwada and Y. Oda : *Food Sci. Technol. Res.*, **27** (3), 483-489 (2021)
- 3) J. Lleixà, V. Martín, M. Portillo, C. del, F. Carrau, G. Beltran and A. Mas : *Front. Microbiol.*, **7**, 338 (2016)
- 4) 高谷政宏, 大淵秀樹, 大和田琢二 : *日本醸造協会誌*, 117(1), 37-44 (2022)
- 5) Y. Oda, Y. Yajima, M. Kinoshita and M. Ohnishi : *Food Microbiol.*, **20** (3) , 371-375 (2003)
- 6) 独立行政法人酒類総合研究所, 酒類総合研究所標準分析法注解, <https://www.nrib.go.jp/bun/nribanalysis.html> (2017)
- 7) 小田有二, 山内宏昭, 田村雅彦 : *日本食品科学工学会誌*, 59(1),1-5 (2012)
- 8) 横塚弘毅 : *調理科学*, **22** (2) , 94-101 (1989)
- 9) 横塚弘毅 : *調理科学*, **22** (1) , 29-36 (1989)
- 10) 岸本宗和, 相馬英一, 篠原隆, 後藤昭二 : *日本醸造協会誌*, **93** (3) , 231-237 (1998)
- 11) F. Giorello, M. J. Valera, V. Martin, A. Parada, V. Salzman, L. Camesasca, L. Fariña, E. Boido, K. Medina, E. Dellacassa, L. Berna, P. S. Aguilar, A. Mas, C. Gaggero and F. Carrau : *Appl. Environ. Microbiol.*, **85** (1) , e01959-18 (2019)
- 12) Y. Oda, D. Mikumo, K. Tajima and H. Yamauchi : *Food Sci. Technol. Res.*, **16** (1), 45-50 (2010)
- 13) 山根善治, 武宮重人, 井原信二 : *日本醸造協会誌*, **112** (8) , 578-585 (2017)
- 14) E. Borren and B. Tian : *Foods*, **10** (1) , 13 (2021)