

環境資源の新たな利用による水辺保全の啓発活動 ～養老孝子伝説再現プロジェクト～

岐阜県立大垣養老高等学校 食品化学班

活動の目的

大垣養老高校は、岐阜県西南部、養老山麓に位置する養老町にある。この養老町には滝の水が酒に変わったという孝子伝説で有名な「養老の滝」があり、この滝は幅4m、落差32mで日本の滝百選に選ばれている。その下流には養老神社があり、そこから湧き出る水が日本の名水百選に選ばれた「菊水泉」である。そしてこの一帯が自然環境を生かした公園となっており、年間を通して数多くの観光客が訪れる。私たちは、一年前よりこの地域固有の環境資源である滝と菊水泉の水質調査と清掃活動を町の観光協会の支援を受けながら行ってきた。

地元の高校生として、環境資源に恵まれたこの養老の地を今後どのように保全すべきか検討した結果、「環



図1 養老の滝 (左)と菊水泉 (右)

境資源の新たな利用」という考え方に行き着いた。養老町にしかない環境資源を私たちが学んできた学習や技術で世界に発信することはできないかという想いから、滝や湧水からアルコール生成菌を取り出し、お酒を造ることで孝子伝説を自分達の手で再現し、環境保全の啓発に繋げることを目的とした活動を開始した。

酵母の分離実験

実験1. 酵母の分離

滅菌処理したポリ容器に滝と菊水泉の水および水中の浮遊物を採取し、ショ糖液体培地に1ml加え30℃設定の恒温器で24時間培養した。CO₂の発生が確認された培地を1ml生理食塩水に懸濁し、PDA平板培地に塗抹した。30℃で48時間培養後、発生した白色のコロニーを1白金耳釣菌し、PDA斜面培地に塗抹した。分離した菌をダーラム管入りのショ糖液体培地に接種し、30℃で24時間培養後、ダーラム管内のCO₂発生を確認した。顕微鏡による形態観察を行い、出芽を確認して酵母菌の分離完了とした。

実験2. 発酵試験

(1) 糖類発酵性試験

0.1%酵母エキスを作成し、そこへ5%になるよう6種類の糖 (表1参照) を加え、アインホルン管に注入した。対照区として無糖液も用意した。30℃で24時間培養後、CO₂の発生を確認して発酵性の有無を判断した。

(2) アルコール発酵力試験

10%ショ糖液体培地200ml (酵母エキス0.5%、ポリペプトン0.5%、ショ糖10%) に分離酵母3種と市販



養老の滝での清掃活動



養老の滝での採水

パン酵母をそれぞれ3白金耳ずつ接種し、30℃で4日間培養した。培地の残糖量を屈折糖度計 (ATAGO) で測定し、培養開始前と終了後の差からアルコール生成量を推定し、アルコール発酵力を測定した。

実験3. 酵母の遺伝子同定

発酵試験で能力の高かった酵母の遺伝子同定を行った。PCRでITS領域を増幅し、アガロース電気泳動で断片サイズを確認した後、業者に委託してシーケンサーを行った。(協力:名城大学 加藤雅士教授)

実験4. 固定化酵母による果汁発酵試験

遠心分離した湿菌10gを3%アルギン酸Na500gに加え、ピペットから2% CaCl₂溶液に滴下し球状に固定化した。南濃みかん100%ジュースにショ糖を加え糖度19%に調整後、循環型バイオリアクターで35℃ 10時間連続発酵を行い、pH [pHメーター (HORIBA)]、アルコール濃度 (20ml蒸留後、エタノール濃度測定器 [ATAGO])、糖度 (ATAGO屈折糖度計) を測定した。

実験結果

実験1. 酵母の分離

菊水泉と滝の水から3種類の酵母を分離した。光学顕微鏡で撮影した写真を図2に示した。比較対象として市販パン酵母の写真も示した。

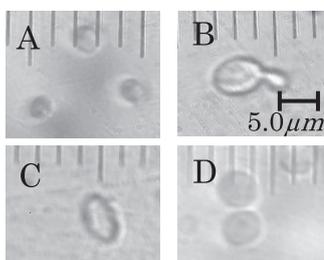


図2 分離酵母と市販パン酵母の光学顕微鏡写真
A: 菊水泉酵母 B: 滝酵母1 C: 滝酵母2 D: 市販パン酵母

実験2. 発酵試験

(1) 糖類発酵性試験

供試した6種の糖類について、各菌株の発酵性の有無を表1に示した。アルコール発酵に必要なスクロースの発酵性は分離した全ての菌株で確認された。菊水泉酵母はスクロースに加え、グルコース、フルクトース、マンノースを発酵しており、分離した菌株の中では最も多くの糖類に発酵性を示した。

(2) アルコール発酵力試験

発酵開始から30時間ごとに計測した培養液のアルコール濃度の推移を図3に示した。市販パン酵母は発

表1 糖類発酵性試験結果

	suc	glu	fru	lac	mal	man	cont.
パン	+	+	+	-	+	+	-
菊水	+	+	+	-	-	+	-
滝1	+	+	-	-	-	-	-
滝2	+	-	+	-	-	-	-

+: 発酵性あり - : 発酵性なし

※酵母名と糖は略称表示

パン: 市販パン酵母 菊水: 菊水泉酵母

滝1: 滝酵母1 滝2: 滝酵母2

suc: スクロース, glu: グルコース

Fru: フルクトース, lac: ラクトース, mal: マルトース, man: マンノース, cont.: 対照区 (無糖)

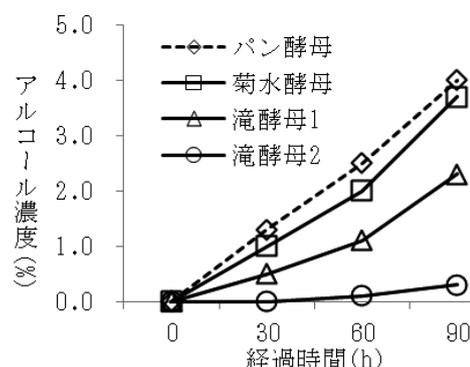


図3 各菌株のアルコール濃度推移
※データは全て平均値 (n=10)

酵開始後90時間で4.0%のアルコールを生成した。分離した菌株では、菊水酵母が最も発酵力が強く、90時間で3.7%のアルコールを生成した。

実験3. 酵母の遺伝子同定

シーケンサーにて菊水泉酵母の塩基配列を解析した結果、99%の確率で*S. cerevisiae*の近縁種である*Lachancea fermentati*であることが判明した。

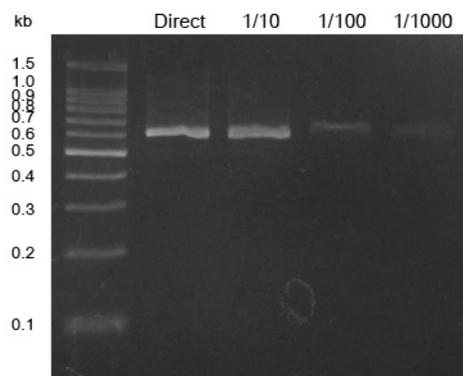


図4 ITS領域の電気泳動写真

実験4. 固定化酵母による果汁発酵試験

発酵開始時と10時間後の各測定値を図5に示した。pH3.8、糖度9%、アルコール濃度2.8%の果実酒とな

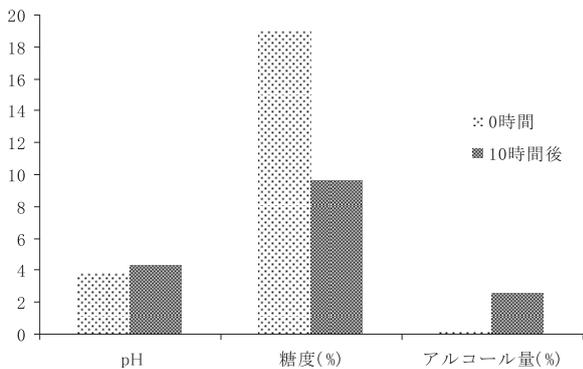


図5 発酵開始時と10時間後の各測定項目の比較

り、色は濃い橙色、風味はみかんとアルコールの混ざった爽やかなものとなった。

考察

パンや清酒、ワインといった発酵食品に利用される *S. cerevisiae* は、用途に適した能力を持つようスクリーニングされ純粋培養された酵母である。それに対して野生酵母は土壌、大気、海、河川、花卉、果実など自然界のあらゆる場所、地域に生息しており、近年このような野生酵母を利用した発酵食品の開発が盛んに行われている^{1~5)}。

清酒醸造業界においても、新たな酵母を単離・利用することで清酒製品の個性化・差別化が試みられ、大学や公設試験研究機関でも研究が行われている。最近の例として、奈良工業技術センターが奈良八重桜から分離した酵母で清酒醸造⁶⁾、名城大学が附属農場の花から新規酵母を探索し日本酒「華の城」を開発している。このように、自然界には清酒醸造に適した酵母が広く分布しており、これらの中にはより良好な風味を示すものが存在すると考えられ、本研究でもその可能性を探るべく滝からの酵母分離を試みた。

野生酵母のエネルギー源となるグルコースが存在する花卉や果実と比較して、流れのある水圏環境では酵母の絶対数が少なかった。その条件の中で3種類の野生酵母を分離できた要因としては、養老の滝と菊水泉は養老山の中腹にあり、広葉樹が周囲を取り囲んでいるため水中に落葉や花卉が散在しており、そういった水中の浮遊物由来の酵母を分離したのではないかと考えられる。特に菊水泉から分離した *Lachancea fermentati* は昆虫から分離されることがあり⁷⁾、今回分離した菌も水中に落下した昆虫由来の可能性もある。また、試料採取日が4月ということも滝や菊水泉の周囲には桜が咲き始めていた。京都の鴨川から酵

母を分離した例¹⁾では、水と共に水面に浮かんだ桜花卉も採取している。花卉が水面に落下することで水中の菌体数も増加すると考えられ、本実験でも桜花卉由来の酵母を分離した可能性が指摘される。

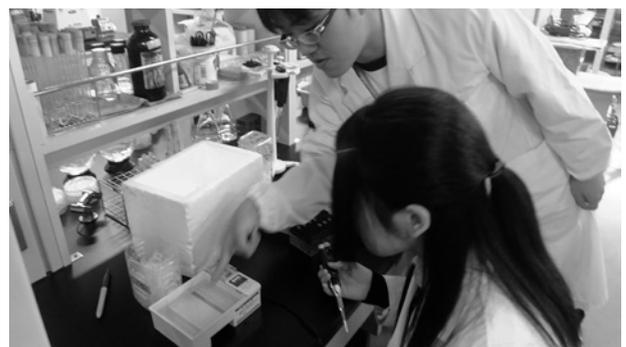
また、アルコール生成力試験の結果、*L. fermentati* がパン酵母に匹敵する発酵力を持っていることが分かった。これは、中硬水のミネラルバランスが酵母の増殖に適しているとの報告もあり⁸⁾、全硬度が90ppmである菊水泉の水質が増殖力の高い酵母のスクリーニングの役割を果たしたのではないかと推察される。

糖類発酵性試験の結果、分離した *L. fermentati* はフルクトースに発酵性を示した。果実を発酵する場合、酵母はアルコール発酵の過程でグルコースとフルクトースを同時に消費する。しかし、代謝に必要なエネルギーが異なるため、フルクトースよりもグルコースを消費する速度が速くなり、発酵が進むにつれてフルクトースの割合が高くなる。よって、フルクトースに発酵性を示す酵母を果実の発酵に用いることで発酵終盤でも衰えることなくアルコール発酵を続けることができるため、*L. fermentati* は果実酒醸造に適した酵母であると考えられる。本研究で試作したみかん果汁の発酵液も、柑橘類の爽やかさと甘さが香るものとなり、伝説再現の可能性を高く感じる結果となった。

本実験で分離した *L. fermentati* は、2003年に



滝と湧き水から酵母菌を分離する実験の様子



分離した酵母を大学で遺伝子同定する様子

Kurtzmanによって名称が付けられた発見されて間もない菌である。よって基礎的な研究しかなされておらず、発酵食品への応用研究はまだなされていない。今回の研究で*L. fermentati*の発酵力の強さが判明したため、今後も継続して発酵特性を研究し、滝の水が酒になったという孝子伝説を自分たちで再現することで、地元養老町の活性化につなげていきたい。

参考文献

- 1) 浅野純子、左子芳彦 (京大院農)、鴨川から分離した *Saccharomyces cerevisiae* の性状解析と製パンの試み、H22年度水産学会近畿支部後期例会
- 2) 鎌倉未貴、眞山真理、スタチ花卉から分離した野生酵母 *Hanseniaspora meyeri* の製パンへの応用、四国大学紀要、34:37-46 (2012) .
- 3) 木下 (小室) 友香理、門倉利守、数岡孝幸、穂坂賢、中田久保、花から分離した酵母の性質と清酒醸造における特長、東京農大農学集報、53 (2)、100-106 (2008)
- 4) 木下富雄、田中麻有、パン用野生酵母の花・果実からの分離、兵庫大学論集第12号、p71-82
- 5) 永田信、黒潮圏に生息する有用酵母の探索と新たな発酵食品の開発PLATFORM No.232 2007年1月号
- 6) 大橋正孝、都築正男、清水浩美、松澤一幸、藤野千代、鈴木孝二、岩口伸一、ナラヤエザクラの花からの有用な酵母の分離及びそれを使った清酒の開発 奈良県工業技術センター 研究報告 No.35 2009
- 7) Nhu H. Nguyen, Sung-Oui Suh and Meredith Blackwell, Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from Neuroptera and other insects, *Mycologia* November/December 2007 vol. 99 no. 6 842-858

- 8) 佐々木 健、森川博代、竹野健次 西条地区龍王山における森林整備と10年経過後の水質、水量の変化および西条酒造用水の特徴、西条・山と水の研究機構10周年記念誌 p67~89

研究の啓発活動

この研究の認知度を地域に広めるため、養老町が主催する親孝行ふるさとフェスタでポスター発表を行い、地元の方に私たちの研究を知ってもらう活動を行った。ポスターは多くの方に見ていただくことができ、「養老の滝にこんなすごい酵母がいるなんて驚いた」「養老の滝名物が増えると嬉しい」といったお言葉をいただいた。この活動が滝と菊水泉という身近な環境資源の新たな価値について考えていただくきっかけとなったと感じている。

この取り組みの認知度を上げるため、本研究を通して作成した論文が鳥取環境大学主催第10回TUESカップで最優秀の環境大賞を受賞した。それがきっかけとなり新聞でも本研究内容が大きく取り上げられ、その反響はとても大きなものであった。また、日本水産学会の高校生研究発表でポスター発表も行い、水産学の先生方から研究に対する的確なアドバイスを頂くことができた。今後も様々な場所でこの研究内容を発信し、発展させていきたい。



図6 水産学会ポスター発表(左)とTUESカップ環境大賞受賞(右)

岐阜県立大垣養老高等学校 食品化学班