

分裂酵母を使用した高品質清酒製造法の開発

佐藤憲亮・小松正和・木村英生

Development of Making Procedure of Sake of Yamanashi

by *Schizosaccharomyces* sp.

Kensuke SATO, Masakazu KOMATSU and Hideo KIMURA

要 約

分裂酵母である *Schizosaccharomyces* 属酵母を新規清酒用酵母として用いる可能性を評価するため、国内の微生物保存機関由来の菌株を供試し、清酒もろみ中における増殖特性を調べた。今回供試した分裂酵母菌株のほとんどは、清酒もろみを培養基質としてアルコール発酵が可能であることがわかった。一方で、清酒酵母と比べ増殖速度が遅く、特に低温下でより増殖速度が遅延した。分裂酵母を用いた実験室スケールでの清酒小仕込み試験を実施し、もろみ発酵経過および生成酒の酒質について評価を行った。

1. 緒 言

近年、清酒の国内消費量は減少する傾向にあるが、各清酒メーカーでは低アルコール清酒や発泡性清酒の開発など、多様な製品の開発に取り組んでいる。また、近年では清酒の海外輸出も促進され¹⁾、今後さらに輸出が増加すると見込まれる。

清酒の醸造には、(財)日本醸造協会から頒布されているきょうかい酵母²⁾や、大学、各県の地方公設試験研究機関が開発した独自酵母³⁾⁻⁵⁾が使用されている。本県においても、自然界から酵母を取得、改良し^{3), 4), 6), 7)}、県内企業において製品化されている。一方で清酒に用いられるこれら酵母のほとんどは出芽酵母である *Saccharomyces cerevisiae* (以下 *S.cerevisiae*) が用いられており、製成される清酒の酒質の多様性に欠けるといった指摘がある。また清酒中にはその他の酒類と比較して、発がん性が疑われるカルバミン酸エチルの前駆体である尿素が含まれるといった、品質上の課題が問題視されることがある。

そこで本研究ではワインの醸造において、ウレアーゼ活性が高く⁸⁾、アミノ態窒素や尿素の低減に寄与し、様々な香气成分の生成を行うと報告されている^{9), 10)}分裂酵母 (*Schizosaccharomyces* 属酵母) を用いて清酒の醸造試験を行い、酵母の醸造特性を把握することで、実用的な清酒醸造への応用を目指す。本報告では国内研究機関保有の分裂酵母菌株について、培養温度が細胞増殖に与える影響やエタノール耐性などを検討した。また分裂酵母

を用いた清酒の小仕込み試験を実施し、もろみ中での発酵特性について調査した。

2. 実験方法

2-1 供試酵母

分裂酵母菌株は、(独)製品評価技術基盤機構保有菌株 *Schizosaccharomyces pombe* (以下 *Sz. pombe*) NBRC 344, 347, 349, 358, 365, 111645, および *Schizosaccharomyces japonicus* (以下 *Sz. japonicus*) NBRC 1609 を、理化学研究所バイオリサーチセンター保有菌株 *Sz. pombe* JCM8274, 8262 を用いた。比較対照の清酒酵母として本県で取得した *S. cerevisiae* FJA025 株⁷⁾ を用いた。菌株は平板培地で復元後、液体培地にて3回継代培養したものをを用いた。

2-2 使用培地

菌株の復元には YM 平板培地を、継代培養には YM 液体培地または麴汁培地を用いた。麴汁培地は乾燥麴(精米歩合 70%, 徳島製麴社製)に4倍量の滅菌蒸留水を加え、55°Cで12時間保温することで高温糖化处理した後、遠心分離(8000 rpm, 10分間)して得た上清にクロラムフェニコールを 100 ppm となるよう添加して調製した。この高温糖化处理による麴汁はグルコース濃度約 18 g/100 mL, ポーメ度 14~15 度であった。

2-3 分裂酵母の生育環境に対する耐性評価

各酵母の生育環境に対する耐性について評価を行った。5 mL の麴汁培地に対し、継代培養した各酵母菌株

を 10^4 個/mL 加え、 10°C 、 12°C 、 15°C 、 18°C 、 20°C の各温度で静置培養を行った。また 0.4% (w/v) 乳酸、8% (v/v)、10% (v/v) エタノールに対する耐性についても、同培地を用いて同様に評価した。それぞれ 2 日間の培養後、酵母菌体の沈殿が肉眼的に認められたものを増殖可能として判断した。

2-4 実験室レベルの試験醸造

2-4-1 供試酵母

2-1 の *Sz. pombe* 8 株、*Sz. japonicus* 1 株、*S. cerevisiae* 1 株の計 10 株を用いた。酵母は YM 培地で 3 回以上継代培養した後に実験に供した。分裂酵母を試験醸造に用いる場合には、清酒酵母の培養液と混合して用いた。すなわち、各分裂酵母と *S. cerevisiae* をそれぞれ 1.5×10^6 個/mL となるように調整し、すべての試験区で、初添における総菌体数が 3.0×10^6 個/mL となるように添加した。

2-4-2 原材料および小仕込み配合

発酵容器として、900 mL 容のハチミツ瓶を殺菌して用いた。麴米として乾燥麴 (1-70、精米歩合 70%、徳島製麴社製) を、掛米として α 化米 (AA-70、精米歩合 70%、徳島製麴社製) を使用した。仕込水は、蒸留水に硫酸マグネシウムを 10 mg/L 添加し水加工した。

仕込み配合は恩田ら³⁾の方法にしたがい、初添、仲添および留添の 3 回に分けて仕込みを行う、三段仕込により、総米 200 g のスケールで実施した。この仕込配合では、麴歩合 20%、汲水歩合 130%、酒母歩合 5% となる。なお、初添と仲添の間に 2 日、踊り (休み) を取った。仕込配合を表 1 に示した。

表 1 実験室スケールの小仕込み配合

	水麴	初添	踊り	仲添	留添	計
総米 (g)	10	25		65	100	200
蒸米 (g)		25		55	80	160
麴米 (g)	10			10	20	40
汲水 (ml)	55			75	130	260
温度 ($^\circ\text{C}$)	15	15	15	9	7	

2-4-3 もろみ管理

インキュベーターを使用してもろみの品温を制御した。留添から温度を一日あたり 1°C ずつ升温し、もろみの最高温度を 13°C とした。継時的に発酵容器の重量を測定し、もろみの重量減少量が 60 g に達したときに発酵終了とした。

発酵終了後、遠心分離 (4°C 、8,000 rpm、15 分間) を用いて上槽し、得られた上清を生成酒とした。生成

酒は、 4°C で保管後、滓 (おり) 引きした。

2-4-5 生成酒の諸成分分析

遠心分離で得られた生成酒は、 $0.45 \mu\text{m}$ フィルターでろ過し、生成酒の測定用試料とした。アルコール含有量、日本酒度は酒類用振動式密度計 (DA-155、京都電子工業社製) により測定した。なお、アルコール含有量と日本酒度は、浮ひょう法¹¹⁾ により確認を行った。総酸度、アミノ酸度の測定は常法¹¹⁾ によった。

3. 結果と考察

3-1 分裂酵母の耐性評価

分裂酵母菌株 9 株および、*S. cerevisiae* 1 株に関して各発酵温度における増殖及び、0.4% 乳酸、8% エタノール、10% エタノール含有培地における増殖を表 2 に示した。

供試したすべての分裂酵母菌株は 15°C での発酵が可能であったが、 12°C 以下では発酵が遅延することが分かった。また分裂酵母菌株の多くは、1 週間培養を続けると 10°C の培養においても沈殿を生じたため、低温でも生育が可能であることが分かった。分裂酵母の細胞分裂速度は出芽酵母と比べて遅いことはこれまでも報告されている^{9),10)}。

表 2 分裂酵母菌株の耐性

菌株名	10°C	12°C	15°C	18°C	20°C	0.4% 乳酸	8% EtOH	10% EtOH
344	-	-	+	+	+	+	+	+
347	-	-	-	+	+	+	+	+
349	-	-	+	+	+	+	+	-
358	-	-	+	+	+	+	+	+
365	-	-	-	+	+	+	+	+
111645	-	-	-	+	+	+	+	+
1609	-	-	+	+	+	-	+	+
8274	-	-	+	+	+	+	+	-
8262	-	-	-	+	+	+	+	+
FJA025	+	+	+	+	+	+	+	+

また、多くの分裂酵母菌株が 0.4% 乳酸、および 10% エタノールに耐性を示したことから、清酒もろみ中での増殖が可能であることが示唆された。一方で、NBRC 349、JCM8262 株は 10% エタノール存在下では増殖ができなかった。加えてすべての分裂酵母菌株は、*S. cerevisiae* と比べ低温での生育が遅いことが分かった。

3-2 分裂酵母と清酒酵母を混合した実験室スケールの小仕込み試験

3-1 の結果から分裂酵母単独では清酒醸造環境における増殖が難しいと考えられたため、分裂酵母と清酒酵

母の混合培養による清酒醸造を試みた。留添え後のもろみの重量減少を図1に示した。

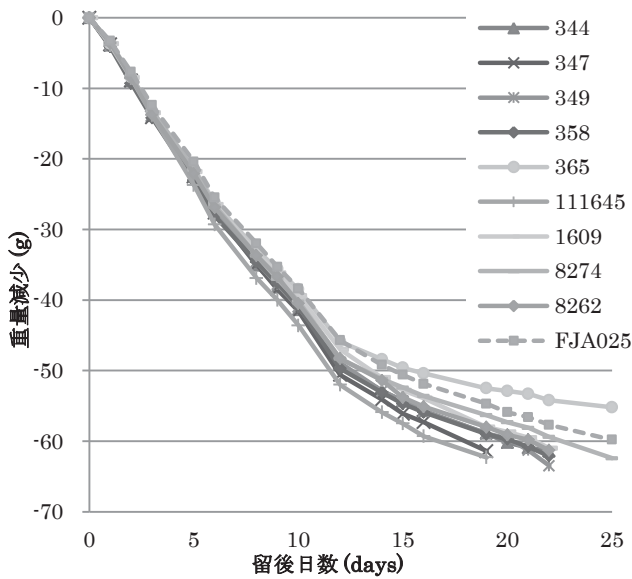


図1 もろみの重量減少

もろみの重量減少からは、分裂酵母と混合した試験区のひとつで、清酒酵母のみの試験区に比べ発酵速度が速くなる傾向が見られた。この混合培養により、発酵速度が速くなったことについては、分裂酵母の代謝産物によるものと推察されるが、今後、より詳細に検討するものとした。

また、小仕込み試験における生成酒の諸成分を表3に示す。

表3 生成酒の諸成分値

菌株名	生成酒の一般成分値			醸日数 (日)	
	酒精度	日本酒度	酸度		
344	18.2	+7.8	2.0	4.9	22
347	17.7	+5.8	2.3	4.6	19
349	18.4	+7.9	2.2	4.9	20
358	18.5	+4.5	2.1	5.5	21
365	18.5	+0.4	2.1	5.7	25
111645	18.0	+7.2	1.8	4.6	19
1609	18.4	+7.5	2.2	4.9	22
8274	18.4	+7.9	2.1	4.9	25
8262	18.5	+7.5	2.0	5.3	22
FAJ025	18.6	+5.9	1.9	5.4	25

分裂酵母を混合した試験区では、諸成分の値は清酒酵母のみで発酵させた清酒に比べて大きな変化はなく、ほぼすべての試験区で酒精度が18度を上回った。この結果から、分裂酵母を添加した清酒醸造において、従来の清酒酵母と混合培養を行うことで、清酒酵母の発酵を阻害せず、安定した醸造が可能であることが示唆された。

また上槽後の酒粕を顕微鏡観察した画像を図2に示す。

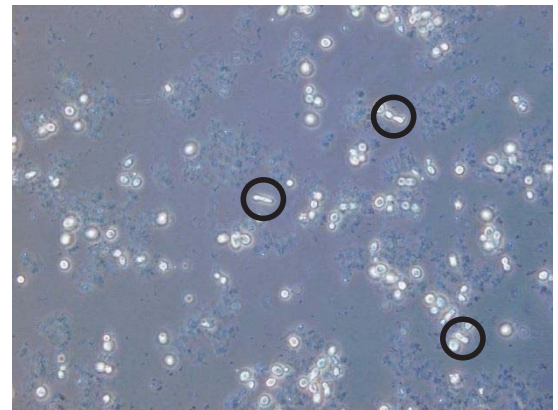


図2 分裂酵母混合培養試験区における酒粕の顕微鏡画像
(○で囲んだ部分が分裂酵母と推察される細胞)

この顕微鏡画像からは清酒酵母が優位に増殖したことが確認できる。一方、分裂酵母を混合した全ての試験区における上槽後の酒粕においても、形態的に分裂酵母と推察される細胞が観察された。特に3-1の結果から清酒もろみ中では増殖が難しいと考えられた菌株も、酒粕中から細胞が観察された。このことは清酒もろみにおいては、低温環境下であっても、分裂酵母は増殖可能であることを示している。

一方で、今回検討した小仕込み試験の条件においては、分裂酵母の増殖速度が遅いため、清酒酵母が優位に増殖したものと考えられる。そのため生成酒の酒質に与える分裂酵母の影響は、小さいものと推察された。今後は清酒もろみ中での培養温度などについてさらなる検討を行うとともに、本県の自然界から新規な分裂酵母菌株を取得し、清酒醸造に応用する方法を検討する。

4. 結言

1. 国内研究機関より分譲を受けた分裂酵母菌9株について、清酒もろみと同様の栄養成分を含む麹汁培地で生育が可能であることが分かった。
2. 試験に用いた分裂酵母9株のうち7株で10%エタノール耐性、8株で0.4%乳酸耐性を示した。また分裂酵母は15℃以下で発酵が遅延することがわかった。
3. 実験室スケールの小仕込み試験において、分裂酵母と清酒酵母を混合することで、発酵速度が速くなる可能性が示唆された。
4. 分裂酵母を混合した試験区の生成酒の酒質は、清酒酵母のみで醸造したものと比較して大きな差異はなく、清酒酵母の特徴が優位に発現していた。

5. 酒粕の顕微鏡画像から、9株の分裂酵母は清酒もろみ中で増殖可能であることが示唆された。

参考文献

- 1) 国税庁：酒のしおり
<<http://www.nta.go.jp/shiraberu/senmonjoho/sake/shiori-gaikyo/shiori/01.htm>> (2017-3-30 参照)
- 2) 改訂清酒酵母の研究：清酒酵母研究会，p.27(1980)
- 3) 恩田 匠，長沼 孝多，乙黒 親男，渡辺 正平，飯村 穰：地域特性を有する県産清酒の開発－新規清酒酵母の探索－，山梨県工業技術センター研究報告 No.18， pp.30-33 (2004)
- 4) 恩田 匠，長沼 孝多，辻 政雄，渡辺 正平，飯村 穰：地域特性を有する県産清酒の開発－新規清酒酵母の探索－，山梨県工業技術センター研究報告 No.19， pp.45-47 (2005)
- 5) 数岡孝幸：清酒製造用酵母の分離及び実用化，日本醸造協会誌，日本醸造協会，Vol.110，No.5，pp.298-305 (2015)
- 6) 長沼 孝多，小嶋 匡人，木村 英生：県産酵母を使用した清酒の品質向上，山梨県工業技術センター研究報告 No.27， pp.33-36 (2013)
- 7) 長沼 孝多，橋本 卓也，木村 英生：県産酵母を使用した清酒の品質向上（第2報），山梨県工業技術センター研究報告 No.28， pp.29-35 (2014)
- 8) Lubbers MW et al. : Purification and characterization of urease from *Schizosaccharomyces pombe*, *RJ.Can J Microbiol.* 1996, Vol.42, No.2, pp.132-40 (1996)
- 9) S. BENITO et al. : Potensial of *Sc. Pombe* in Red Winemaking, *Food technol. Biotechnol.* Vol.52, No.3, pp.376-382 (2014)
- 10) Benito A et al. : Selected *Schizosaccharomyces pombe* Strains Have Characteristic That Are Beneficial for Winemaking, *PLOS ONE*.
<<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151102>> (オンライン論文, 2017-3-30 参照)
- 11) 国税庁所定分析法