

# 分裂酵母を使用した高品質清酒製造法の開発（第3報）

長沼孝多・小嶋匡人・木村英生・佐藤憲亮

## Development of Making Procedure of Sake of Yamanashi by *Schizosaccharomyces* sp.(3rd Report)

Kota NAGANUMA, Masato KOJIMA, Hideo KIMURA and Kensuke SATO

### 要 約

既報で分離された *Schizosaccharomyces pombe* KY02-6-6 を使用した清酒製造法を検討した。同菌株は、発酵温度 13℃で発酵せず、15℃あるいは18℃でのアルコール生成は、きょうかい 901号と比較して倍程度の期間を要した。もろみ中の尿素量低減は、アルコール生成と同時期に認められ、発酵温度 15℃では12日目から、18℃では9日目からであった。901号のもろみにおいて、もろみ日数10日目にKY02-6-6を混合することで、製成後の尿素分解活性が認められた。

### 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<sup>1)</sup>、今後さらに輸出が増加すると見込まれる。

清酒の醸造に用いられる酵母のほとんどは出芽酵母である *Saccharomyces 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、ウレアーゼ活性や<sup>2)</sup>、香氣成分の生成を行うと報告されている<sup>3,4)</sup> 分裂酵母 (*Schizosaccharomyces* 属酵母) を用いて、実用的な清酒醸造への応用を目指す。

既報<sup>5)</sup> 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。また既報<sup>6)</sup> では山梨県内の自然環境中から、新規な分裂酵母菌株を取得した。本報では、KY02-6-6株を使用して、清酒製造を試みた結果を報告する。

### 2. 実験方法

#### 2-1 供試菌株

分裂酵母として、前報で取得した *Schizosaccharomyces pombe* (以下 *Sz. pombe*) KY02-6-6 および (独)

製品評価技術基盤機構から購入した *Sz. pombe* NBRC 0347株を使用した。清酒酵母として、(公財)日本醸造協会から購入した、きょうかい 901号 (以下 901号) を使用した。

#### 2-2 使用培地

菌株の継代および拡大培養には、YM液体培地 (Difco社製) を使用した。

#### 2-3 小仕込試験

尿素量を低減するための小仕込試験を2手法実施した。まず、酵母を酒母に添加する際にKY02-6-6と901号を混合する方法 (以下、酵母混合法) を、次に901号で育成したもろみにKY02-6-6を添加する方法 (以下、添加法) を実施した。

##### 2-3-1 酵母混合法

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 $\alpha$ 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 10 mg/L および尿素を 140 mg/L とするよう添加した。

仕込配合は、既報<sup>7)</sup> にしたがって、一段仕込により総米 95.8 g のスケールで実施した (表1)。

酵母は、KY02-6-6 および 901号をそれぞれ YM液体培地で培養し、遠心分離機で集菌後、KY02-6-6の菌数:901号の菌数=10:0, 7:3, 5:5, 3:7, 0:10の割合となるように混合後、最終接種菌量が  $10^7$  オーダーとなるように接種した。品温は、インキュベーターを使用し

て 13, 15 あるいは 18°C に制御した。

発酵の経過は、もろみの重量減少で示した。もろみの分析は、適宜サンプリングしたもろみを 12,000 rpm, 10 分, 15°C で遠心分離し、上清のアルコール度を高速液体クロマトグラフで測定した。尿素量は、アミノ酸分析装置 (JLC-500/V2, 日本電子社製) あるいは F-キット 尿素/アンモニア (JK インターナショナル社製) を使用して定量した

表 1 仕込配合 (一段仕込)

総米 (g)	95.8
蒸米 (g)	74.8
麴米 (g)	21.0
汲水 (mL)	114.2

### 2-3-2 添加法

仕込配合は、既報<sup>8)</sup>にしたがい、初添、仲添および留添の 3 回に分けて仕込を行う三段仕込により、総米 200g のスケールで実施した。なお、初添と仲添の間に一日、踊り (休み) を取った (表 2)。麴米、掛米、仕込水は 2-3-1 と同様に実施した。

もろみは、901 号を YM 液体培地で培養し、集菌後、最終接種菌量が 10<sup>7</sup> オーダーとなるように酒母に接種した。

KY02-6-6 は、YM 液体培地で培養し、集菌後、最終接種菌量が 10<sup>7</sup> オーダーとなるようにもろみに接種した。もろみに接種する時期は、(1) 酒母育成後 あるいは (2) もろみ日数留後 3 日 あるいは (3) もろみ日数留後 10 日 の 3 時期とした (図 1)。

もろみの管理および分析は、2-3-1 と同様に行った。

表 2 仕込配合 (三段仕込)

	水麴	初添	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
品温 (°C)	15	8	9	7	

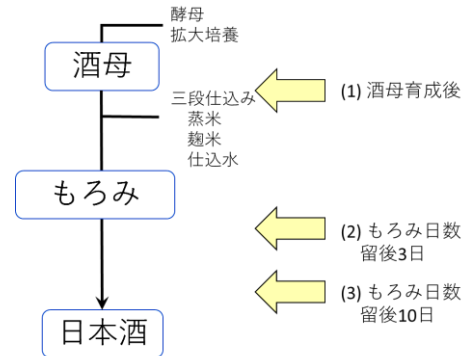


図 1 901 号もろみへの KY02-6-6 添加時期

## 2-4 KY02-6-6 菌体のエタノール処理による上清の尿素分解活性

KY02-6-6 の尿素分解酵素を菌体外に抽出する方法として、菌体のエタノール処理を検討した。KY02-6-6 を YM 液体培地で培養し、集菌後 10<sup>7</sup> オーダーとなるように調製した。この調製液に、濃度が 10, 15 および 20% (v/v) となるようにエタノールを添加し、20°C で 2, 10, 24 および 48 時間静置した。遠心処理後の上澄液に、尿素を 70 mg/L となるように添加し、20°C, 20 分静置後に 0.4M TCA を添加して酵素反応を終了し、上澄液の尿素量を、アミノ酸分析装置で定量した。

## 3. 結果

### 3-1 分裂酵母のアルコール生成と尿素分解活性の経時変化

一段仕込み、発酵温度 15°C において、KY02-6-6 および NBRC 0347 による小仕込試験を実施した結果を図 2 に示した。その結果、KY02-6-6 および NBRC 0347 は同様の傾向を示し、上清に含まれるエタノールは発酵開始後にしばらく認められなかったが、12 日から認められ、同時期から尿素量の減少が認められた。発酵温度 18°C においては、エタノールは 9 日目から認められた。

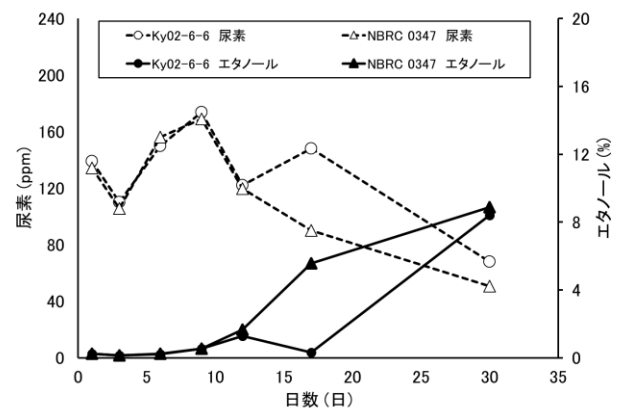


図 2 一段仕込みにおける分裂酵母のアルコール製成と

## 尿素分解活性の経時変化

### 3-2 酵母混合法

KY02-6-6 および 901 号を混合して小仕込試験を行った際の、KY02-6-6 単独、KY02-6-6 : 901 号 = 5 : 5、901 号単独の場合について図 3 および図 4 に示した。もろみの重量減少は、15°C (図 3) および 18°C (図 4) でも、901 号の混合割合にかかわらず同様の傾向となった。このとき、もろみに尿素分解活性は認められなかった (図省略)。一方、KY02-6-6 単独の発酵では、901 号を混合したもろみと比較して重量減少が遅れ、およそ 2 倍の時間を要した。なお、図は示さなかったが、発酵温度 13°C では KY02-6-6 もろみの重量減少は認められなかった。

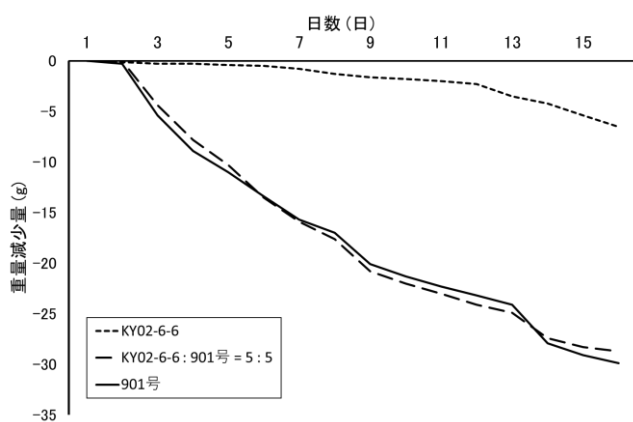


図 3 KY02-6-6 および 901 号酵母を混合した場合のもろみ重量減少 (15°C)

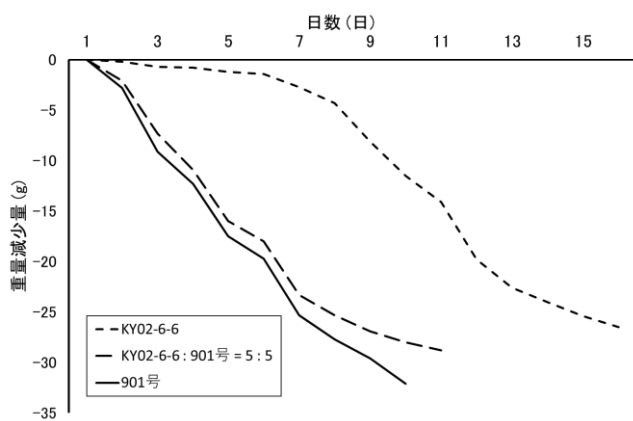


図 4 KY02-6-6 および 901 号酵母を混合した場合のもろみ重量減少 (18°C)

### 3-3 添加法

901 号により育成したもろみにおいて、(1) 酒母育成後あるいは(2) もろみ日数留後 3 日あるいは(3) もろみ日数留後 10 日に KY02-6-6 を混合した際の、製成後の尿素量を測定した結果を表 3 に示した。もろみ日数 10 日に混合した場合、製成後の尿素量は、添加な

し区と比較して低下が認められた。

また、もろみの総米を 1000g とした場合の尿素量を表 4 に示した。スケールアップの場合も、製成後の尿素量の低減が認められた。

表 3 KY02-6-6 の添加による 901 号もろみの製成後の尿素量 (n=2)

901 号もろみへの KY02-6-6 添加日	製成後の尿素量 (ppm)
添加なし	26
(1) 酒母育成後	17
(2) もろみ日数 3 日目	28
(3) もろみ日数 10 日目	2

表 4 総米 1000g とした場合の KY02-6-6 もろみの添加による 901 号もろみの製成後の尿素量

総米 (g)	もろみ 温度	酒精度	日本 酒度	酸度	尿素量 (ppm)
1000	15°C	17.5	+4.4	2.3	5

### 3-4 KY02-6-6 菌体のエタノール処理による上清の尿素分解活性

KY02-6-6 のエタノール処理後の上清の尿素分解活性を図 5 に示した。エタノール濃度を 20% とすることで、上清に尿素の分解活性が認められた。エタノール濃度 10%、あるいは 15% の場合、48 時間のエタノール処理で上清に尿素分解活性が認められた。このことから、KY02-6-6 菌体を比較的エタノール含有量の高いもろみに混合することで、もろみに尿素の分解活性を付与できることが確認できた。

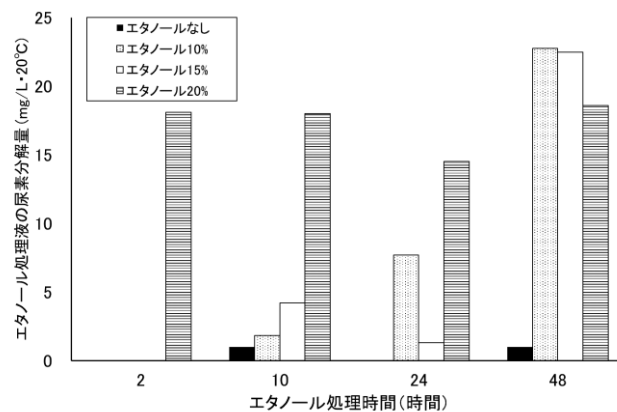


図 5 KY02-6-6 のエタノール処理後の上清の尿素分解活性

#### 4. 考 察

3-2の結果のとおり、KY02-6-6を単独で清酒製造に使用する場合、15℃以上のもろみ温度が必要と認められた。KY02-6-6と901号を混合して使用した場合、その混合割合にかかわらず同様な発酵経過が認められた。これは、901号が常に優勢となり、KY02-6-6が生育できない可能性が推測された。結果には示さなかったが、*Sz. pombe* NBRC 0347でも同様の結果となった。以上のことから、本報告における「酵母法」のように、酒母育成時に分裂酵母と清酒酵母を混合して使用し、尿素量の低減を図ることは困難であることがわかった。

一方、図2に示したとおり、分裂酵母は、もろみのエタノール生成と同時期に尿素の分解活性が高まることがわかった。続いて、901号により育成したもろみにおいてKY02-6-6を混合したところ、製成酒中の尿素量が低減が認められた。これは、図5からエタノールによる溶菌による菌体内の尿素分解酵素がもろみ中に放出される可能性が考えられた。

ただし、分裂酵母単独のもろみにおいては、発酵開始初期にエタノールが含まれない期間が比較的長期間あるため、乳酸による制菌など、衛生管理を確実に行うことに注意が必要である。

#### 5. 結 言

1. *Schizosaccharomyces pombe* KY02-6-6 を使用した清酒製造法を検討した。
2. 小仕込試験では、同菌株は、発酵温度 13℃で発酵せず、15℃あるいは 18℃でのアルコール生成は 901 号と比較して倍程度の期間を要した。
3. もろみ中の尿素量低減は、アルコール生成と同時期に認められ、発酵温度 15℃では 12 日目から、18℃では 9 日目からであった。
4. 901 号のもろみに、もろみ日数 10 日に KY02-6-6 を混合することで、製成後の尿素分解活性が認められた。

#### 参考文献

- 1) 国税庁：酒のしおり。  
<https://www.nta.go.jp/taxes/sake/shiori-gaikyo/shiori/2019/index.htm>, (2019-3-30 参照)
- 2) Lubbers MW *et al.* : Purification and characterization of urease from *Schizosaccharomyces pombe*, *RJ.Can J Microbiol.* 1996 Vol.42, No.2, pp132-40 (1996)
- 3) S. BENITO *et al.* : Potensial of *Sc. Pombe* in Red

Winemaking, *Food technol. Biotechnol.*, Vol.52, No.3, pp376-382 (2014)

- 4) 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, 2018-3-30 参照)
- 5) 佐藤憲亮, 小松正和, 木村英生 : 分裂酵母を使用した高品質清酒製造法の開発, 山梨県工業技術センター研究報告 No.31, pp29-35 (2014)
- 6) 佐藤憲亮, 小松正和, 木村英生 : 分裂酵母を使用した高品質清酒製造法の開発 (第 2 報), 山梨県産業技術センター研究報告 No.1, pp29-35 (2015)
- 7) 宮尾俊輔 : きょうかい 1801 号を用いた混合仕込, *日本醸造協会誌* No.103(10), pp742-749 (2008)
- 8) 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, pp29-35 (2014)