

## 研究論文

## カーネーションから分離した酵母を利用した純米酒の開発

三井 俊\*<sup>1</sup>、伊藤彰敏\*<sup>1</sup>、山本晃司\*<sup>1</sup>、秋山和範\*<sup>2</sup>、加藤雅士\*<sup>2</sup>

## Development of Junmai-shu Using Yeast Isolated from Carnation

Shun MITSUI\*<sup>1</sup>, Akitoshi ITO\*<sup>1</sup>, Koji YAMAMOTO\*<sup>1</sup>, Kazunori AKIYAMA\*<sup>1</sup>  
and Masashi KATO\*<sup>2</sup>Food Research Center\*<sup>1</sup> Faculty of Agriculture, Meijo University\*<sup>2</sup>

従来の酒質とは異なった特徴ある香味を有する清酒の開発を目的として、花から分離した酵母を利用した純米酒の開発を行った。名城大学農学部附属農場のカーネーションから分離し、セルレニン耐性を付与した酵母 (MC9 株) のアルコール耐性株 (MC9-3 株) を取得した。清酒醸造適性を評価した後、実用規模試験 (総米 400kg 規模) を実施した。その結果、製成酒は低アルコール分で、酸味と甘みを併せ持つ特徴的な酒質となった。本清酒は名城大学ブランド清酒として特別純米酒「華名城 (はなのしろ)」の銘柄で製品化された。

## 1. はじめに

近年の消費者の嗜好多様化に伴い、清酒消費量が減少している。とりわけ若年層の清酒離れは深刻であり、アルコール飲料のニーズの多様化に従来の清酒が十分対応しきれていないと考えられる。この状況を打開するためには、清酒に新たな特徴を付与する必要がある、その手段の一つとして、各県公設試験研究機関や大学が中心となり、花や果実等から有用酵母を分離して清酒醸造に利用する試みが盛んに行われている<sup>1)2)</sup>。

我々はこれまでに愛知県及び岐阜県内の各種植物から食品用酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の探索を行ってきた。さらに、名城大学農学部附属農場内のカーネーションから分離した *Saccharomyces cerevisiae* を清酒製造に最適化するために香气成分生成能を改良 (セルレニン耐性の付与) した酵母 MC9 株を取得した<sup>3)</sup>。

本研究ではもろみ末期の発酵停滞を改善することを目的として、MC9 株のアルコール耐性能の改良を行った。清酒醸造適性を評価した後、総米 400 kg 規模の実規模試験を実施した。

## 2. 実験方法

## 2.1 アルコール耐性株の取得

名城大学農学部附属農場 (愛知県春日井市) のカーネーションから分離し、セルレニン耐性を付与した酵母 (MC9 株) を親株として使用した。

原らの手法<sup>4)</sup>の一部を改変して以下のように行った。MC9 株を YM 培地 (1% グルコース、0.5% ポリペプト

ン、0.3% 酵母エキス、0.3% 麦芽エキス) にて 30℃で 24 時間培養し、集菌洗浄後、18% エタノール含有酢酸緩衝液 (pH 4.2) に懸濁した。30℃で 4 時間放置した後、この懸濁液を YM 寒天培地に塗布し、30℃で 48 時間培養した。出現したコロニーに関して、18%エタノール含有酢酸緩衝液中への懸濁・放置時間を段階的に増やす操作 (4~48 時間) を繰り返した。18%エタノール含有酢酸緩衝液で 48 時間生存した菌株に関して、20% エタノール含有酢酸緩衝液 (pH 4.2) でも同様の操作を繰り返した。最終的に 20% エタノール含有酢酸緩衝液に 15℃で 7 日間放置した後に生存していた菌株をアルコール耐性株とした。

## 2.2 製成酒の成分分析

日本酒度、アルコール分、酸度、アミノ酸度及び香气成分組成の分析は国税庁所定分析法<sup>5)</sup>に従った。グルコース濃度はグルコース測定キット (和光純薬工業 (株)) を用いて測定した。有機酸組成の分析は、試料をイオン交換水で 5 倍希釈後、孔径 0.45 μm のセルロースアセテートフィルターでろ過したものを分析試料として、有機酸分析システム ((株) 島津製作所) を用いて測定した。分析条件は以下の通りである。

カラム : Shimadzu SCR101H

検出器 : 電気伝導度検出器

移動相 : 4 mM *p*-トルエンスルホン酸

緩衝相 : 4 mM *p*-トルエンスルホン酸

(100 mM EDTA, 20 mM Bis-Tris)

流速 : 0.8 mL/min

\*1 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 \*2 名城大学 農学部

## 2.3 酵母の醸造適性評価

乾燥麹(60%精白、徳島製麹社製) 30 g、乾燥 $\alpha$ 化米(60%精白、徳島製麹社製) 120 g、蒸留水 240 ml、酵母前培養液(OD<sub>600</sub>=1.2) 3 ml を混合して、13°Cで一定時間発酵させた。遠心分離により固液分離し、得られた上清液を製成酒として成分分析に供した。また、発酵に伴って生成する炭酸ガスの揮散による重量減少を測定することで発酵経過をモニタリングした。対照として、一般の清酒用酵母である協会酵母(K701号)を同様に試験に供した。

## 2.4 清酒小仕込試験

乾燥麹(60%精白、徳島精工社製)、一般精白米(60%精白)を用い、総米 5 kg の三段仕込で行った。仕込配合を表 1 に示す。酵母は麹エキス培地による前培養液(OD<sub>600</sub>=2.2) 300 ml を利用した。仕込温度は、初添 17°C、仲添 14°C、留添 14°C とした。上槽は遠心分離にて行った。

表 1 仕込配合

|         | 酒母  | 初添  | 仲添  | 留添  | 計   |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 総米 (kg) | 0.0 | 1.0 | 1.5 | 2.5 | 5.0 |
| 掛米 (kg) | 0.0 | 0.8 | 1.2 | 2.0 | 4.0 |
| 麴米 (kg) | 0.0 | 0.2 | 0.3 | 0.5 | 1.0 |
| 汲水 (L)  | 0.3 | 1.5 | 2.4 | 4.0 | 8.2 |

## 2.5 実用規模試験

原田酒造合資会社にて実施した。愛知県産酒造好適米若水の 60%精白米を用い、総米 400kg の三段仕込で行った。仕込配合を表 2 に示した。仕込温度は、初添 11°C、仲添 11.5°C、留添 15°C とした。上槽は自動もろみ搾機にて行った。

表 2 仕込配合

|           | 酒母 | 初添 | 仲添  | 留添  | 追水 | 計   |
|-----------|----|----|-----|-----|----|-----|
| 総米 (kg)   | 16 | 60 | 132 | 192 |    | 400 |
| 掛米 (kg)   | 0  | 46 | 100 | 160 |    | 306 |
| 麴米 (kg)   | 16 | 14 | 32  | 32  |    | 94  |
| 酵母前培養液(L) | 4  |    |     |     |    |     |
| 汲水 (L)    | 48 | 66 | 160 | 260 | 20 | 554 |

## 3. 実験結果及び考察

### 3.1 アルコール耐性株の取得

酵母を 20%エタノール含有酢酸緩衝液に懸濁して、15°Cで 7 日間放置した後、その懸濁液を YM 寒天培地に塗布したところ、35 株のアルコール耐性株を取得することができた。そのうち、増殖が速く、コロニー径の大きいものを MC9 株のアルコール耐性株 (MC9-3) として以後の試験に供した。

### 3.2 酵母の醸造適性評価

#### 3.2.1 発酵の経時変化

アルコール耐性株 (MC9-3) とその親株 (MC9) 及び協会酵母 (K701 号) について、発酵に伴う炭酸ガス減量を比較した (図 1)。MC9-3 と MC9 はほぼ同様の経

過を示した。K701 号と比較すると、発酵初期の炭酸ガス減量速度が小さく、その後は K701 号とほぼ同程度の速度で推移した。このことから、MC9-3 及びその親株 MC9 は、一般の清酒用酵母と比較して、もろみ初期における菌体増殖が遅いと推測される。

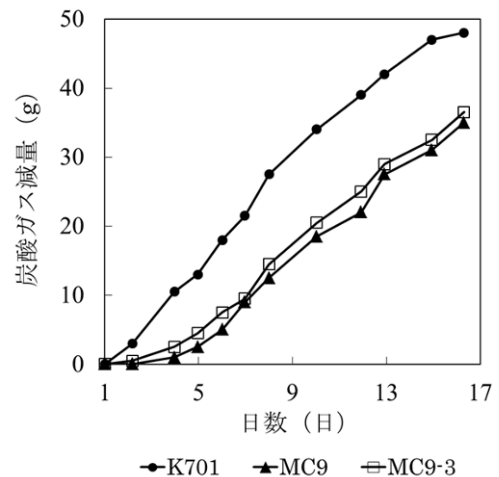


図 1 酵母の炭酸ガス減量経過

#### 3.2.2 製成酒成分値の比較

16 日間発酵させ、アルコール耐性株 (MC9-3) とその親株 (MC9) 及び協会酵母 (K701 号) を比較した。製成酒の成分値を表 3 (アルコール分、日本酒度、酸度、アミノ酸度、グルコース)、表 4 (有機酸、香気成分組成) に示す。MC9-3 の生成アルコール分 (13.8%) は MC9 の生成アルコール分 (12.8%) と比較すると約 1 割高くなり、アルコール生成能が改善された。しかし、K701 号と比較すると、アルコール分が低く、日本酒度は大きくマイナス側にシフトしており、MC9-3 は低アルコール清酒向けの酵母であることがわかった。酸度に関しては MC9 と同程度であり、K701 号の約 1.4 倍高い値を示した。アミノ酸度に関しては MC9 及び K701 号と同程度であった。

有機酸組成は、MC9 とほぼ同様であり、K701 号と比較すると、乳酸及び酢酸濃度は約 3 倍高く、コハク酸は約 2/3 倍であり、リンゴ酸は同程度であった。以上の結果から、MC9-3 及びその親株 MC9 は一般の清酒用酵母とは異なった特徴的な有機酸生成能を有する酵母であることが明らかとなった。香気成分組成についても MC9 とほぼ同様であり、K701 号と比較すると、酢酸イソアミル濃度は約 1/3 倍であり、カプロン酸エチルはやや低かった。また、発酵もろみの泡生成状況から、MC9-3 及びその親株 MC9 は、K701 号と同様に泡なし酵母と推測された。

表3 製成酒の成分値

| 菌株            | K701  | MC9   | MC9-3 |
|---------------|-------|-------|-------|
| 泡形成能          | 泡無し   | 泡無し   | 泡無し   |
| アルコール分 (%v/v) | 18.6  | 12.8  | 13.8  |
| 日本酒度          | -17.2 | -58.6 | -52.6 |
| 酸度 (ml)       | 2.6   | 3.6   | 3.7   |
| アミノ酸度 (ml)    | 1.8   | 1.7   | 1.7   |
| グルコース (%)     | 1.8   | 5.9   | 5.1   |

表4 製成酒の有機酸、香り成分組成

| 菌株               | K701 | MC9 | MC9-3 |
|------------------|------|-----|-------|
| リンゴ酸 (mg/100ml)  | 29   | 28  | 26    |
| コハク酸 (mg/100ml)  | 67   | 42  | 42    |
| 乳酸 (mg/100ml)    | 10   | 28  | 33    |
| 酢酸 (mg/100ml)    | 17   | 52  | 53    |
| 酢酸イソアミル (ppm)    | 3.5  | 0.8 | 0.9   |
| カブロン酸エチル (ppm)   | 0.8  | 0.7 | 0.5   |
| イソアミルアルコール (ppm) | 172  | 179 | 180   |

### 3.3 清酒小仕込試験

酵母の醸造適性評価より、MC9-3は菌体増殖が遅いことが推測され、もろみ初期において他の雑菌が増殖することが懸念された。速やかにMC9-3の増殖を導くために、もろみ温度を留添直後から15℃となるように管理した。もろみ日数は16日間であった。製成酒成分値は、アルコール分12.1%、日本酒度-14.1、酸度3.8 ml、アミノ酸度1.4 ml、グルコース濃度2.7%であった。有機酸組成に関しては、リンゴ酸16 mg/100ml、コハク酸35 mg/100ml、乳酸31 mg/100ml、酢酸40 mg/100mlであった。他の雑菌の影響で酸度及び乳酸濃度が著しく高くなるといった傾向は認められなかった。香り成分組成に関しては、酢酸イソアミル0.4 ppm、カブロン酸エチル0.2 ppm、イソアミルアルコール200 ppmであった。酵母の醸造適性評価の結果と比較すると、酢酸イソアミルとカブロン酸エチル濃度がやや低くなっているが、これはもろみ温度をやや高めに設定したためと考えられる。製成酒は一般的な清酒と比較して、アルコール分がやや

低く、乳酸等の有機酸とグルコース濃度が高いために甘酸っぱい酒質となった。成分値の経時変化を図2（アルコール分、日本酒度）、図3（酸度、アミノ酸度）に示す。もろみ期間を通してアルコール分は順調に増加し、それに伴い日本酒度もプラス側にシフトしていった。酸度はもろみ3日目から8日目にかけて急激に増加したが、その後は緩やかに増加し、14日目以降はほぼ一定となった。アミノ酸度はもろみ初期から緩やかに増加し、14日目以降はほぼ一定となった。

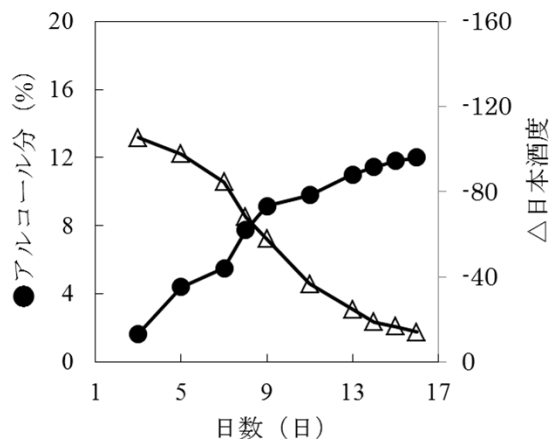


図2 アルコール分、日本酒度の経時変化  
(清酒小仕込試験)

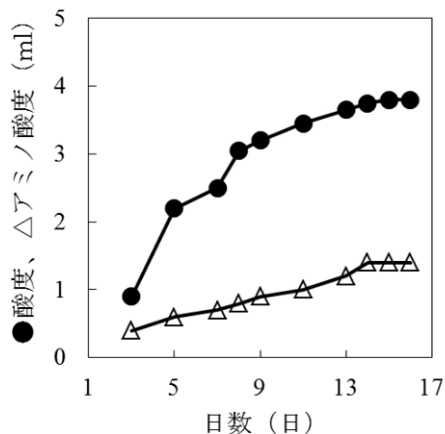


図3 酸度、アミノ酸度の経時変化  
(清酒小仕込試験)

### 3.4 実用規模試験

初添温度が11℃と低くなったために、もろみタンク下に電熱器を置いて加温し、MC9-3株の増殖を図った。さらに留添直後からもろみ温度を15℃となるように管理した。もろみ日数は23日間であった。製成酒成分値は、アルコール分11.4%、日本酒度-54、酸度3.7 ml、アミノ酸度2.1 ml、グルコース濃度5.8%であった。清酒小仕込試験の結果と比較すると、アルコール分がやや低く、

日本酒度もマイナス側にシフトしているが、これは原料米の溶解性の違いが影響していると考えられる。アミノ酸度に関しては、原料米の特性及びアルコール分を出すためにもろみ日数を長くしたことで、その値が高くなったと考えられる。有機酸組成に関しては、リンゴ酸 37 mg/100ml、コハク酸 63 mg/100ml、乳酸 32 mg/100ml、酢酸 153 mg/100ml で、酢酸濃度が著しく高くなった。MC9-3 は有機酸の中でも特に酢酸生成能に特徴を有する酵母であることがわかった。香気成分組成に関しては、酢酸イソアミル 1.3 ppm、カプロン酸エチル 0.2 ppm、イソアミルアルコール 192 ppm であり、清酒小仕込試験同様にカプロン酸エチル濃度は低かった。MC9-3 はセルレニン耐性を有しているものの、カプロン酸エチル生成能は低いことがわかった。成分値の経時変化を図 4 (アルコール分、日本酒度)、図 5 (酸度、アミノ酸度) に示す。アルコール分は 3 日目から 14 日目にかけて順調に増加し、19 日目以降はほぼ一定となった。日本酒度の推移は清酒小仕込試験の結果と比較すると緩慢であるが、これは汲水歩合や原料米の溶解性の違いが影響していると考えられる。酸度は 3 日目から増加して 14 日目以降はほぼ一定となり、雑菌汚染に起因して著しく増加するといった現象は認められなかった。アミノ酸度はもろみ初期から緩やかに増加していった。発酵もろみの状態に関しては、もろみ 9 日目からその表面は粘り気のある膜に覆われた。

醸造した清酒は低アルコールで酸味と甘みを併せ持つ特徴的な酒質となった。名城大学学生による官能評価からは、「口当たりが良い」、「ワインのような味でおいしい」等の評価が得られた。

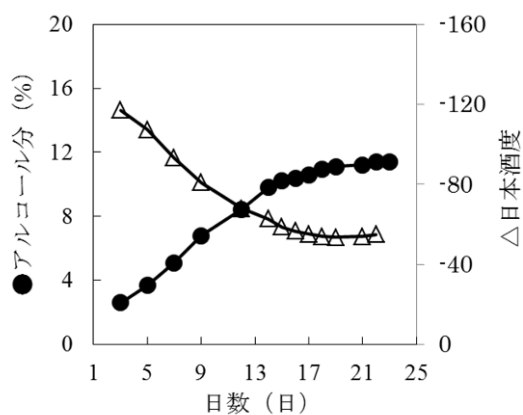


図 4 アルコール分、日本酒度の経時変化 (実用規模試験)

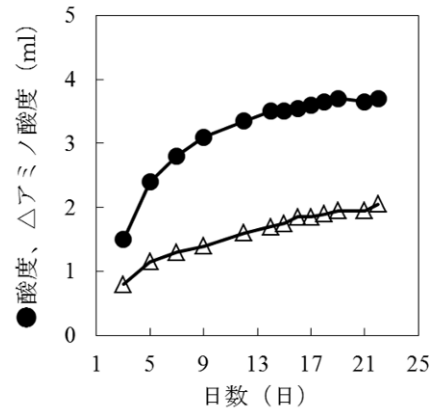


図 5 酸度、アミノ酸度の経時変化 (実用規模試験)

#### 4. 結び

従来の伝統的な酒質とは異なった特徴ある香味を有する清酒の開発を目的として、カーネーションから分離した酵母を利用した純米酒の開発を行った。酵母の香気成分生成能及びアルコール耐性能の改良を行った後、実用規模試験を実施した結果、低アルコール分で、酸味と甘みを併せ持つ、特徴的な酒質の醸成酒が得られた。なお、本清酒は名城大学ブランド清酒として特別純米酒「華名城 (はなのしろ)」の銘柄で製品化された。

#### 謝辞

本研究にあたり、実用規模試験にご協力頂いた原田酒造合資会社原田晃宏氏と桜井誠氏に感謝申し上げます。

#### 文献

- 1) 穂坂賢, 中田久保, 坂井劬: 日本醸造協会誌, **95**, 837 (2000)
- 2) 大橋正孝, 都築正男, 清水浩美, 松澤一幸, 藤野千代, 鈴木孝仁, 岩口伸一: 奈良県工業技術センター報告, **35**, 35 (2009)
- 3) 吉田幸代, 中村恵子, 三井俊, 伊藤彰敏, 安田 (吉野) 庄子, 林真梨菜, 清崎みなみ, 土屋照二, 北本則行, 加藤雅士: 日本農芸化学会関西支部講演会講演要旨集, **471**, 62 (2011)
- 4) 原昌道, 佐々木雅晴, 小橋孝之, 野白喜久雄: 日本醸造協会誌, **71**, 301 (1976)
- 5) 日本醸造協会: 第 4 回改正国税庁所定分析法注解, (1990)