

## 研究論文

## 生醗系酒母から分離した乳酸菌による清酒の酒質に及ぼす影響

伊藤彰敏\*1、石川桃子\*2、小野奈津子\*1、西田淑男\*2

## Effect of Sake Quality by Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimoto-style Starter Culture

Akitoshi ITO\*1, Momoko ISHIKAWA\*2, Natsuko ONO\*1 and Yoshio NISHIDA\*2

Food Research Center\*1 Tokai Gakuen University\*2

独特な酒質を呈する酒造場の生醗系酒母から分離した乳酸菌について、MALDI TOF-MS を使用して菌種同定を行った結果、*Leuconostoc mesenteroides* 及び *Pediococcus pentosaceus* が同定された。乳酸菌添加酒母を利用した清酒小仕込試験を行った結果、*Ped. pentosaceus* を使用した酒母の製成酒は、酸度及び糖含量の低い淡麗型の酒質を呈した。

## 1. はじめに

清酒製造工程において本仕込を行う前段で、微生物汚染や発酵不良を防ぎ、健全なアルコール発酵を導くために、酵母を大量・純粋培養したスターターを調製する。このスターターは酒母とよばれ、清酒の重要な製造工程に位置づけられている。

酒母は大きく分けて生醗系酒母と速醸系酒母の2つに大別される。速醸系酒母では、雑菌淘汰の目的で仕込時に乳酸を添加し、約15日間で製造される。一方、生醗系酒母では、自然由来の乳酸菌により乳酸の生成を導き、30日間かけて製造される。

生醗系酒母は、硝酸還元菌や乳酸菌の増殖により雑菌を淘汰し、酵母の純粋培養とアルコール発酵を導く製造法であるが、仕込水や麹の菌叢が大きく影響するため、安定性に乏しい酒母である。なお、人為的に硝酸還元菌や乳酸菌を添加し、生醗系酒母製造の安定化を図る試みもなされている<sup>1)~7)</sup>。

愛知県の生醗系酒母を製造するA酒造場は、製成酒の酸味や味幅が他の酒造場とは異なり、酒質が淡麗であることから、微生物菌叢に違いがあるものと推察された。そこで、本研究ではA酒造場の生醗系酒母の乳酸菌叢を調査するため、Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI TOF-MS) を使用して菌種同定を行った。また、乳酸添加の代替として、分離乳酸菌を添加して熟成させた酒母の醸造特性について検討した。

## 2. 実験方法

## 2.1 試料

愛知県で生醗系酒母製造を行っているA酒造場の酒母

からサンプリングしたもろみを微生物分離試料とした。

## 2.2 乳酸菌の分離

MRS 寒天培地(Difco(株),+0.5%CaCO<sub>3</sub>)にもろみ希釈液を混積培養(30℃)し、ハローを形成したコロニーを1次選抜した。次に1次選抜コロニーをMRS broth 培地(Difco(株))で培養し、増殖の認められたものを分離乳酸菌として選抜した。

## 2.3 乳酸菌の同定

普通寒天培地(Difco(株))に乳酸菌培養液をスポットし、30℃、48時間培養後出現したコロニーを使用した。コロニーを70%(v/v)エタノール内で懸濁し遠心分離(13,000rpm、2min)後、沈殿に70%(v/v)ギ酸溶液、アセトニトリルを添加した懸濁液を調製した。懸濁液をプレート上に塗布し乾燥後、マトリックス(10mg/mL CHCA、2.5%(v/v) TFA、50%(v/v) アセトニトリル)を添加し分析に供した。MALDI TOF-MS(AXIMA 微生物同定システム:(株)島津製作所)を使用して微生物スペクトルを取得した。SARAMIS ソフトウェア(バイオメリュー(株))により微生物の同定を行った。

## 2.4 乳酸発酵酒母仕込試験

表1に仕込配合を、図1に乳酸発酵酒母の概略図を示す。乳酸菌は、MRS broth 培地を用いて、30℃で2日間培養した後、集積菌体を滅菌水で3回洗浄したものを使用した。分離乳酸菌を使用して乳酸発酵を5日間行った後、協会701号酵母(培養液7mL)を添加して20日間、酒母の熟成を行った。発酵温度は15℃一定とした。なお、α化米及び乾燥麹は徳島製麹(株)製のものをを使用した。なお、対照乳酸菌として、当センターにおいて山廃酒母から分離した *Lactobacillus sakei* FK4 を使用した。

\*1 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 \*2 東海学園大学 健康栄養学部

また、乳酸 2mL を添加した速醸酒母(熟成期間 15 日)を対照とした。

表 1 仕込配合

		酒母	留	合計
総米	(g)	7	93	100
α化米	(g)	5	75	80
乾燥麴	(g)	2	18	20
汲水	(mL)	10	170	180



図 1 乳酸菌添加酒母の概略図

## 2.5 乳酸発酵酒母を用いた清酒小仕込試験

表 1 に仕込配合を示す。総米 100g、麴歩合 20%、汲水歩合 180%の条件で、留添 1 段で仕込を行った。なお、酒母歩合は 7%に設定した。15°C一定で、20 日間アルコール発酵を行った。

## 2.6 酒母及び製成酒の成分分析

15 日目の酒母もろみ及び 20 日目の清酒もろみについて、5000rpm、30 分(5°C)で遠心分離し、得られた上清液の分析を行った。

酒類総合研究所標準分析法<sup>8)</sup>に準じて、日本酒度、酸度、アミノ酸度及び着色度を測定した。アルコール分は簡易アルコール分析計:アルコメイト AL-2 型((株)ウッドソン)により測定した。有機酸は、試料をポアサイズ 0.45µm のフィルターでろ過し、ろ液を高速液体クロマトグラフ Shimadzu SCL-10Asp((株)島津製作所)で分析した。グルコースはグルコースアナライザー GA06((株)エイアンドティー)により測定した。全糖はフェノール硫酸法により測定した。

## 3. 実験結果及び考察

### 3.1 乳酸菌の分離及び同定

図 2 に A 酒造場の酒母もろみ中の乳酸菌数の推移を示す。もろみ初期より  $10^3$ CFU/g のオーダーで検出された。7 日目には  $10^7$ CFU/g まで増殖し、19 日目まで菌数を維持していた。その後、減少に転じ、使用時には乳酸菌が認められなかった。酵母のアルコールの生成により、乳酸菌が死滅したものと推察された。

もろみ日数毎に 10 株の分離乳酸菌コロニーを無作為に抽出し、MALDI TOF-MS により分離乳酸菌を同定した。その結果、*Leuconostoc mesenteroides* 及び *Pediococcus pentosaceus* の 2 菌種が同定された。図 3 に分離乳酸菌の SEM 観察画像を示す。一般的な生醗系

酒母では、乳酸球菌 *Leu. mesenteroides* の増殖が認められた後、乳酸桿菌 *Lactobacillus sakei* が優勢菌になることが知られている。本もろみからは、乳酸桿菌は検出されず、このことが他の酒造場との酒質差が生じている要因として推察された。

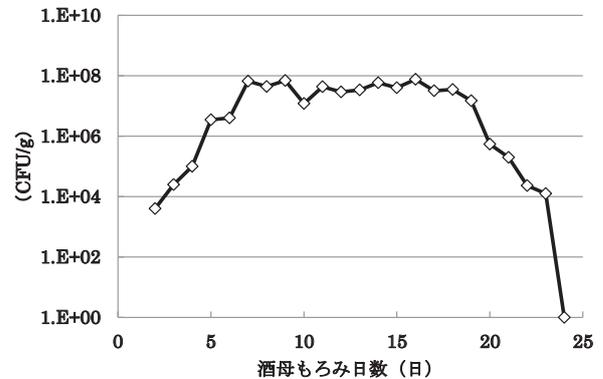


図 2 A 酒造場の生醗系酒母の乳酸菌数の推移

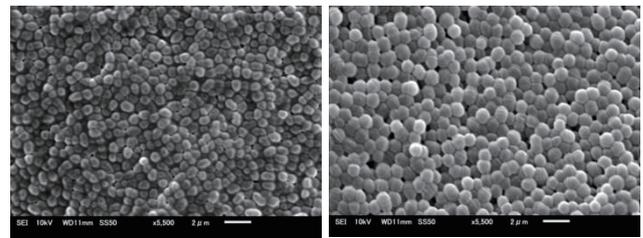


Figure 3: SEM observation images of isolated lactic acid bacteria. The left image shows *Leuconostoc mesenteroides* and the right image shows *Pediococcus pentosaceus*.

図 3 分離乳酸菌の SEM 観察画像

2 日目から 22 日目までに検出されたコロニーから、各日数 2 コロニーを無作為に選抜し、デンドログラムを作成した結果を図 4 に示す。その結果、菌叢の異なるクラスターを得ることができた。2-10 日目のもろみは、ほぼ単一種の *Leu. mesenteroides* が主要菌叢であった。11-22 日目のもろみは、70%以上の一致率で 2 つのクラスターが認められ、*Ped. pentosaceus* が主要菌叢であった。

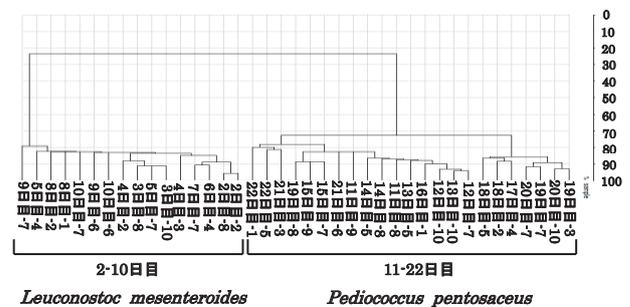


図 4 MALDI TOF-MS により同定された乳酸菌株のデンドログラム

### 3.2 乳酸発酵酒母の製造

乳酸を添加する速醸酒母を対照として、*Lb. sakei* F4(LS)、*Leu. mesenteroides*(LM; A 酒造場分離菌)、*Ped. pentosaceus*(PP; A 酒造場分離菌、LS+PP、及び LM+PP で仕込を行った。

乳酸菌添加酒母の成分値比較を表 2 に示す。

表 2 乳酸菌添加酒母の成分比較

	速醸	LS	LM	PP	LS+LM	LM+PP
アルコール分(%v/v)	14.0	12.1	13.0	14.7	13.0	14.8
ポーメ	4.0	6.4	5.8	4.4	5.5	3.2
グルコース(%w/v)	5.0	8.4	8.0	5.2	7.0	4.0
酸度(mL)	6.50	9.70	8.30	8.70	10.20	9.80
アミノ酸度(mL)	2.20	2.50	2.50	3.00	3.20	3.00

LS:*Lb. sakei* FK4, LM:*Leu. mesenteroides*, PP:*Ped. pentosaceus*

A 酒造場から分離した乳酸菌である PP を用いた仕込は、LS 及び LM 仕込と比較し、ポーメが低く、アルコール分が高い値を示し、並行複発酵が順調に行われたものと推察された。

乳酸菌添加酒母は速醸酒母と比較し、酸度が高い傾向を示した。乳酸菌添加酒母のうち、LS 仕込の酸度が最も高かった。一般的な生酏系酒母のモデルである LS+LM 仕込が最も高い酸度であった。

乳酸菌添加酒母は速醸酒母と比較し、アミノ酸度が高い傾向であった。PP 仕込は LS 及び LM 仕込と比較し、最も高い値であった。

乳酸菌添加酒母は速醸酒母と比較し、グルコースの値が高い傾向であった。PP 仕込は LS 及び LM 仕込と比較し、最も低い値であった。また、A 酒造場の生酏系酒母のモデルである LM+PP 仕込では、ポーメ及びグルコースともに最も低い値であった。

乳酸菌添加酒母の有機酸組成を図 5 に示す。乳酸は LS 仕込において最も低い値であった。PP 仕込の乳酸は、LS と LM 仕込の中間の値であった。酢酸は LS 仕込で高く、LM 仕込で低い傾向が認められた。PP 仕込は相対的に乳酸及び酢酸ともに高い値であった。しかし、LM+PP 仕込では、乳酸及び酢酸ともに低い値であった。

### 3.3 乳酸発酵酒母を使用した清酒小仕込試験

これまでに評価した酒母を用いて、総米 100g の留添一段仕込の清酒小仕込試験を行った。15℃で 20 日間発酵を行い、遠心分離による上清液の分析を行った。

図 6 に発酵性を評価する炭酸ガス減量の比較を示す。速醸酒母と乳酸菌添加酒母の間の違いや、乳酸菌の違いによる顕著な相違は認められず、すべての試験区において、順調に並行複発酵が行われた。

表 3 に乳酸菌添加酒母清酒の成分値の比較を示す。

製成酒成分について、速醸仕込酒と乳酸菌添加酒母

仕込酒の間に顕著な相違は認められなかったが、乳酸菌添加酒母仕込酒においてアミノ酸度が低く、着色度が高くなる傾向が認められた。

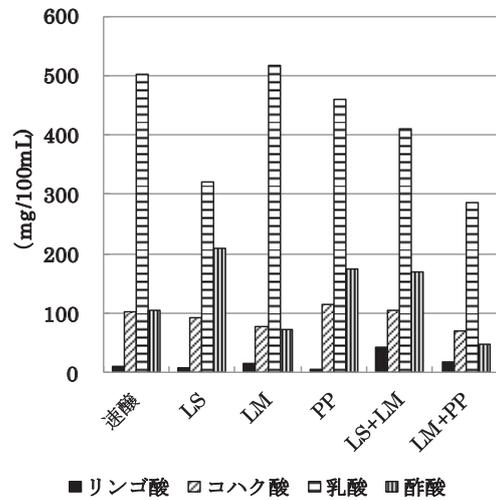


図 5 乳酸菌添加酒母の有機酸組成

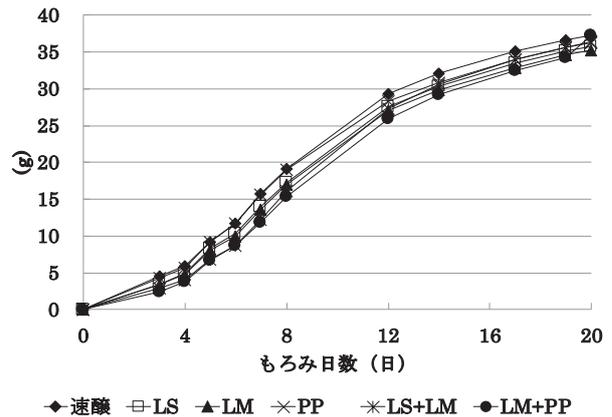


図 6 炭酸ガス減量（発酵性）の比較

表 3 乳酸菌添加酒母清酒の成分値の比較

	速醸	LS	LM	PP	LS+LM	LM+PP
アルコール分(%v/v)	18.5	18.3	18.2	18.6	18.2	18.4
日本酒度	+1.5	+1.0	-0.8	+2.0	+0.1	+1.4
全糖(%w/v)	4.0	4.2	4.3	3.5	4.7	3.6
グルコース(%w/v)	0.6	0.5	0.6	0.4	0.7	0.4
酸度(mL)	3.20	3.50	3.25	3.15	3.40	3.15
アミノ酸度(mL)	1.75	1.50	1.35	1.55	1.30	1.45
着色度(OD430)	0.080	0.080	0.082	0.090	0.086	0.087

LS:*Lb. sakei* FK4, LM:*Leu. mesenteroides*, PP:*Ped. pentosaceus*

PP 仕込酒は乳酸菌添加酒母清酒のなかで最もアルコール分が高く、日本酒度がプラスにシフトした。糖成分を比較したところ、PP 仕込酒は全糖及びグルコースが最も低い値であった。また、酸度の値も PP 仕込酒が最も低い値であった。

LM+PP 仕込酒は LS+LM 仕込酒と比較して、並行複

発酵が順調に進み、アルコール分が高く、日本酒度がプラス側にシフトした。LM+PP 仕込酒は LS+LM 仕込酒と比較して酸度が低く、アミノ酸度の高い製成酒であった。

なお、官能評価において、すべての製成酒でオフフレーバーであるジアセチル臭は認められなかった。

乳酸菌添加酒母仕込酒の有機酸組成を図 7 に示す。

速醸仕込酒と乳酸菌添加酒母仕込酒の有機酸組成比や定量値に顕著な相違は認められなかった。また、すべての製成酒について、オフフレーバーであるジアセチル臭は認められなかった。

LS 仕込酒及び LS+LM 仕込酒は、他の仕込酒と比較してコハク酸の値が高かった。一方、PP 仕込酒及び LM+PP 仕込酒は、他の仕込酒と比較してコハク酸の値が低かった。

A 酒造場の生醗系酒母のモデルである LM+PP 仕込酒は、一般的な生醗系酒母のモデルである LS+LM 仕込酒と比較し、酸度が低く、糖成分の少ない製成酒であった。*Ped. pentosaceus* が分離された A 酒造場の生醗系酒母清酒の酒質は、酸味や味幅が他の酒造場とは異なり、酒質が淡麗である。本結果はこの現状と一致するものであった。

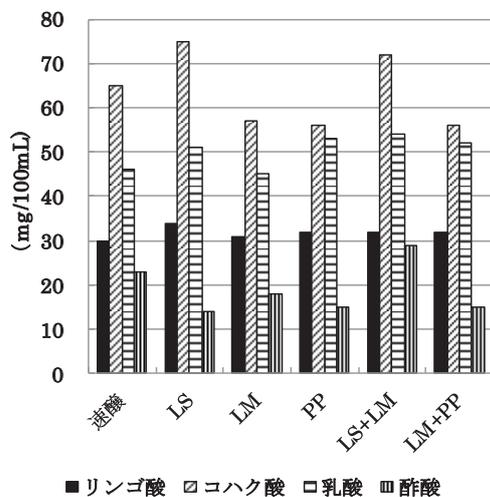


図 7 乳酸菌添加酒母仕込酒の有機酸組成

## 4. 結び

- (1) 独特な酒質を呈する A 酒造場の生醗系酒母は、乳酸桿菌の存在しない酒母であった。
- (2) 乳酸菌添加酒母は速醸酒母と比較し、酸度及びアミノ酸度が高い値であった。
- (3) *Ped. pentosaceus* を利用した乳酸菌添加酒母の製成酒は、一般的な生醗系酒母の製成酒と比較し、酸度が低く、糖成分が少ない淡麗型の酒質であった。

## 文献

- 1) 西尾昭, 茂一孝: 鳥取県産業技術センター研究報告, **11**, 55(2009)
- 2) 和田潤, 泊直宏, 高阪千尋, 清野珠美, 廣岡青央, 山本佳宏: 京都市産業技術研究所研究報告, **6**, 17(2016)
- 3) 樋口智子, 大場孝宏: 福岡工業技術センター研究報告, **19**, 51(2009)
- 4) 芹沢長, 斎藤孔男: 日本醸造協会誌, **61**(11), 1033 (1966)
- 5) 山路悦子, 古川恵司, 溝口晴彦, 原昌道: 日本醸造協会誌, **100**(4), 281 (2005)
- 6) 百瀬洋夫, 鎌尾敦子: 日本醸造協会誌, **88**(1), 76 (1993)
- 7) 藤原明子, 藤井一嘉, 外菌寛郎: 広島県立総合技術研究所食品工業技術センター研究報告, **26**, 7 (2011)
- 8) 独立行政法人酒類総合研究所編: 酒類総合研究所標準分析法(平成 29 年 4 月 6 日)