

研究論文

愛知県大府市の桜から分離した酵母の清酒製造特性評価

三井俊*1、伊藤彰敏*1、近藤徹弥*2、伊東寛明*1、亀井佑香*1、
原本直幸*3、船井秀哉*3、榊原康彰*3

Sake Brewing Characteristics of Yeast Isolated from Cherry Blossoms
in Obu City, Aichi

Shun MITSUI*1, Akitoshi ITO*1, Tetsuya KONDO*2, Hiroaki ITO*1, Yuka KAMEI*1,
Naoyuki HARAMOTO*3, Hideya FUNAI*3 and Yasuaki SAKAKIBARA*3

Food Research Center *1*2 Nakano Shuzo Co., Ltd*3

愛知県大府市の桜の花から清酒製造に適した有用酵母の分離を試みた。集積培養により分離された酵母は 26S rDNA D1/D2 領域の塩基配列解析より、*Saccharomyces cerevisiae* と同定された。発酵試験の結果、分離酵母は酒造現場において一般的に使用される協会酵母と比較してアルコール生成能が低く、有機酸生成能も異なっていた。しかし、清酒小仕込試験の結果、最終的なアルコール分は 14% 台に到達したため、我々がこれまでに分離した天然酵母の醸造特性、実用化事例も考慮して、清酒製造に適用可能と判断した。なお、分離酵母(「おおぶ酵母」)を用いた純米酒が「桜舞(おおぶ)」として製品化された。

1. はじめに

近年、地域資源を活かした製品の開発によって、地域の活性化を図る取り組みが盛んに行われている。清酒業界においても、花や果実等の地域資源より新たな酵母を分離・育種して清酒製造に活用し、地域ブランド製品の開発や清酒品質の個性化・差別化を図る取り組みが積極的に試みられている。あいち産業科学技術総合センター食品工業技術センターでは、これまでに愛知県内の各種植物から食品用酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を分離すると共に、清酒やパンの製造を含め、その利用技術の開発に取り組んできた^{1)~5)}。

本研究では、新たな地域ブランド清酒の開発を目的として、愛知県大府市の桜の花から清酒製造に適用可能な酵母の分離を試みた。遺伝子解析手法を用いて酵母の種の同定を行うと共に、酒造現場において一般的に使用される協会酵母に対するキラ性⁶⁾を評価した。また、発酵試験(総米 100 g)を行い、分離酵母のアルコール、有機酸及び香气成分の生成能を評価した。さらに、分離酵母の実用化に向けてスケールアップした清酒小仕込試験(総米 1 kg)を実施し、清酒製造への適用を検討した。

2. 実験方法

2.1 酵母の分離、選別

2.1.1 使用培地

1 次集積培地はエタノール 2.4%(v/v)を添加した麴汁

培地(ボーム 5.0、pH4.5)、2 次集積培地はエタノール 5.7%(v/v)を添加した麴汁培地、3 次集積培地はエタノール 9.1%(v/v)を添加した麴汁培地を使用した。コロニーの分離には YPD 平板培地(1%酵母エキス、2%ポリペプトン、2%グルコース、2%寒天)を使用した。発酵試験及び清酒小仕込試験に用いる酵母の培養には麴汁培地を使用した。

2.1.2 分離源

令和 2 年 4 月に愛知県大府市内の桜から採取した花卉を分離源とした。

2.1.3 集積培養

1L 容ガラス瓶に採取した花卉 40 g、1 次集積培地 400 mL を入れ、30°C で 7 日間浸漬させた(計 24 試験区)。1 次集積培養液 0.2 mL を 2 次集積培地 50 mL に接種し、30°C で 7 日間静置培養を行った。さらに白濁した 2 次集積培養液 0.05 mL を 3 次集積培地 5 mL に接種し、30°C で 4 日間静置培養を行った。3 次集積培養液を希釈して、YPD 平板培地に塗抹、30°C で 2 日間培養し、コロニーを取得した。取得したコロニーを麴汁培地 5 mL に一白金耳植菌して、30°C で 48 時間静置培養した際の白濁や気泡の発生状況を観察し、清酒製造に適用可能な酵母と期待されるコロニーを選別した。

2.2 遺伝子解析による分離酵母の種の同定

食品衛生検査指針微生物編 2015(公益社団法人日本食品衛生協会)に準じて行った。選別した清酒製造に適用

*1 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 *2 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室(現保蔵包装技術室)

*3 中埜酒造株式会社

可能な酵母と期待されるコロニーについて、26S rDNA D1/D2 領域をコロニーダイレクト PCR によって増幅し、部分塩基配列を決定した。PCR 用酵素として KOD FX Neo(東洋紡(株))、プライマーとして D1(5'GCATATCA ATAAGCGGAGGAAAAG-3')および D2(5'-GGTCCGTG TTTCAAGACGG-3')を用いて PCR を行った。PCR の温度条件は、94°C2 分、40 サイクルの 98°C10 秒；55°C30 秒；68°C90 秒、72°C1 分とした。得られた塩基配列と NCBI(National Center for Biotechnology Information、ホームページアドレス <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)に登録されている配列との同一性を比較した。

2.3 分離酵母のキラ一性の評価

分離酵母の麹汁培養液から白金耳を使用して YPD 平板培地に一本植菌線を描き、それと交差するように協会酵母 K901 株、K1801 株の培養液をそれぞれ植菌線画し、30°C で 3 日間培養した。

2.4 分離酵母を用いた発酵試験

乾燥麹(60%精白、徳島製麹(株))20g、乾燥 α 化米(60%精白、徳島製麹(株))80g、蒸留水 180 mL、分離酵母の培養液 5mL を混合して、15°C 一定で発酵させた(n=3)。対照酵母として、協会酵母 K901 株と、これまでに分離され、既に実用化に至っている既存の天然酵母 MC9-3¹⁾株を用いた。発酵 18 日目で遠心分離(9000 rpm、20 分)にて上槽し、得られた上清液を製成酒として成分分析を行った。清酒醪(もろみ)では発酵に伴って炭酸ガスが生成し、それが揮散することで醪重量が減少する。発酵中、醪の炭酸ガス減少量を測定することで、発酵経過の比較も行った。

2.5 清酒小仕込試験

乾燥麹(60%精白、徳島製麹(株))及び乾燥 α 化米(60%精白、徳島製麹(株))を用い、総米 1 kg の三段仕込で行った。仕込配合を表 1 に示す。麹汁培地による酵母培養液 120mL を酒母とした。対照酵母として、協会酵母 K901 株を使用した。仕込温度は、初添 12°C、仲添 8°C、留添 7°C とした。醪品温は留時から 1 日 1°C ずつ上昇させ、醪 9 日目に最高品温 15°C となるようにし、それ以降は 15°C 一定とした。発酵 19 日目で遠心分離(9000 rpm、20 分)にて上槽し、得られた上清液を製成酒として成分分析を行った。また、発酵中、醪の炭酸ガス減少量を測定することで、発酵経過を比較した。

表 1 仕込配合

	酒母	初添	仲添	留添	計
総米 (kg)	0.000	0.172	0.314	0.514	1.000
掛米 (kg)	0.000	0.112	0.246	0.442	0.800
麹米 (kg)	0.000	0.060	0.068	0.072	0.200
汲水 (L)	0.120	0.322	0.650	0.828	1.920

2.6 成分分析

アルコール分はアルコメイト AL-2 型(理研計器(株))を用いて測定した。日本酒度、酸度、アミノ酸度及び香気成分組成は酒類総合研究所標準分析法⁶⁾に準拠して分析した。有機酸組成は既報²⁾に従って分析した。

3. 実験結果及び考察

3.1 酵母の分離

測定採取した桜の花弁を浸漬して行った 1 次集積培養液(計 24 試験区)を 2 次集積培地に接種して培養したところ、17 試験区で白濁が認められた。さらに白濁が認められた 17 試験区の 2 次集積培養液を 3 次集積培地に接種したところ、5 試験区で白濁が認められた。

白濁が認められた 5 試験区の 3 次集積培養液を適宜希釈して YPD 平板培地に塗抹し、30°C で 2 日間培養することで、コロニーを取得した。これらのコロニーを麹汁培地 5 mL に一白金耳植菌して、30°C で 48 時間静置培養を行った際の白濁や気泡の発生状況から、清酒製造に適用可能な酵母と期待される 1 試験区のコロニーを選別した。

3.2 遺伝子解析による分離酵母の種の同定

選別した清酒製造に適用可能な酵母と期待されるコロニーについて、26S rDNA D1/D2 領域の約 600bp の DNA 断片を PCR により増幅し、塩基配列を決定した。これらの配列について公開データベースに登録されている配列との同一性を比較したところ、*Saccharomyces cerevisiae* の 26S rDNA D1/D2 領域の塩基配列と 100% 一致した。この結果より、選別したコロニーは *Saccharomyces cerevisiae* と同定された。なお、この同定されたコロニーを「おおぶ酵母」とした。

3.3 分離酵母のキラ一性の評価

新規に分離した天然酵母を清酒製造に使用する場合、酒造現場において使用される協会酵母に悪影響を及ぼすことのないように、酵母のキラ一性の有無を確認することが重要である。YPD 平板培地上、縦に線画したおおぶ酵母の植菌線と横に線画した協会酵母 K901 株、K1801 株の植菌線との交差部位にハロー(抗菌活性)は認められなかった。よって、おおぶ酵母は協会酵母に対しキラ一性を有さないことが確認された。

3.4 分離酵母を用いた発酵試験

3.4.1 発酵経過の比較

発酵試験(総米 100 g)における炭酸ガス減量経過を図 1 に示す。おおぶ酵母の醪は、協会酵母 K901 株の醪と比較すると、特に発酵中期以降の炭酸ガス減量速度が小さかった。既存の天然酵母 MC9-3 株と比較しても、発酵中期以降の炭酸ガス減量速度がやや小さかった。

また、発酵時の泡生成状況を観察したところ、おおぶ酵母の醪は K901 株の醪と同程度に泡の低い状貌を呈したため、泡無し酵母と考えられる。

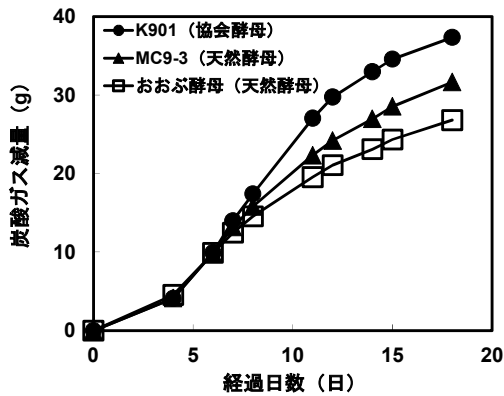


図 1 炭酸ガスの減量経過(発酵試験)

3.4.2 製成酒の成分分析

製成酒のアルコール分、日本酒度、酸度、アミノ酸度、有機酸、香気成分を表 2 に示す。アルコール分に関して、おおぶ酵母の製成酒(以降、おおぶ酵母区と記載)は、K901 株の製成酒(以降、K901 株区と記載)の約 70%、既存の天然酵母の製成酒(以降、天然酵母区と記載)の約 85%と低い値であった。また、生成アルコール分が低いことに対応して、日本酒度はよりマイナスの値となった。前項の炭酸ガス減量も合わせて考慮すると、おおぶ酵母は K901 株と比較するとアルコール生成能が低いことがわかった。また、既存の天然酵母 MC9-3 株と比較してもややアルコール生成能が低いことがわかった。酸度は、K901 株区より約 1 mL 高く、MC9-3 株と比較しても約 0.6 mL 高かった。アミノ酸度は、K901 株区より約 0.2 mL 高かった。

有機酸組成について、おおぶ酵母区は K901 株区と比較すると、リンゴ酸濃度が約 60%と低く、乳酸濃度がやや高かった。また、酢酸濃度については、K901 株区の約 2.5 倍と高く、既存の天然酵母 MC9-3 株同様に酒造現場で一般的に使用される協会酵母と比較して酢酸生成能が高い酵母であることがわかった。

香気成分組成について、おおぶ酵母区は K901 株区同様にカプロン酸エチル濃度が 1ppm 以下となり低かった。また、酢酸イソアミル濃度は K901 株区の 1/2 程度であり、吟醸香生成能は低かった。MC9-3 株と比較するとほぼ同様の香気成分組成であった。

3.5 清酒小仕込試験

3.5.1 発酵経過の比較

清酒小仕込試験(総米 1 kg)における炭酸ガス減量経過を図 2 に示す。おおぶ酵母の醪は、K901 の醪と比較すると、炭酸ガス減量速度が小さいことが再確認できた。このことから、おおぶ酵母は、実規模レベルの仕込みにおいて、一般的に使用される協会酵母と比較して、発酵が遅くなることが推測される。

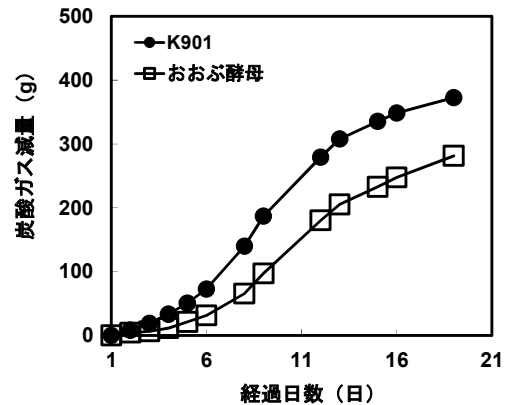


図 2 炭酸ガスの減量経過(清酒小仕込試験)

表 2 製成酒の成分値(発酵試験)

		K901	MC9-3	おおぶ酵母
アルコール分	(%)	18.62 ± 0.03	15.73 ± 0.15	13.07 ± 0.21
日本酒度		8.88 ± 0.91	-19.65 ± 1.73	-38.13 ± 2.25
酸度	(mL)	3.30 ± 0.13	3.66 ± 0.05	4.27 ± 0.24
アミノ酸度	(mL)	1.12 ± 0.03	1.34 ± 0.01	1.33 ± 0.03
リンゴ酸	(mg/L)	316 ± 4	182 ± 5	189 ± 15
コハク酸	(mg/L)	597 ± 17	529 ± 6	562 ± 30
乳酸	(mg/L)	329 ± 2	333 ± 2	366 ± 24
酢酸	(mg/L)	354 ± 17	582 ± 16	882 ± 61
カプロン酸エチル	(mg/L)	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1
酢酸イソアミル	(mg/L)	2.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.1
イソアミルアルコール	(mg/L)	154.2 ± 11.5	144.6 ± 13.8	144.2 ± 11.1

平均値 ± 標準偏差 (n=3)

3.5.2 製成酒の成分分析

製成酒の成分分析結果を表3に示す。おおぶ酵母区は、アルコール分がK901株区の約75%と低くなったものの、最終的なアルコール分は14%台に到達しており、我々がこれまでに分離した天然酵母のアルコール生成能等を含めた醸造特性、実用化事例^{1),2)}も考慮して、清酒製造に適用可能と判断した。日本酒度は-24.7と低く、酸度は4.00mLと高くなったことから、おおぶ酵母を利用した清酒は甘酸っぱい酒質になると考えられる。

表3 製成酒の成分値(清酒小仕込試験)

	K901	おおぶ酵母
アルコール分 (%)	18.8	14.3
日本酒度	10.9	-24.7
酸度 (mL)	2.55	4.00
アミノ酸度 (mL)	1.65	1.45

4. 結び

本研究では、地域ブランド清酒の開発を目的として、愛知県大府市の桜の花から酵母を分離し、清酒製造への適用を検討した。

結果は、以下のとおりである。

- (1) 26S rDNA D1/D2 領域の塩基配列解析より、分離酵母は *Saccharomyces cerevisiae* と同定された。
- (2) 分離酵母は協会酵母に対してキラ性性を有さないことが確認された。

- (3) 発酵試験(総米 100 g)の結果、分離酵母は協会酵母と比較してアルコール生成能が低く、有機酸生成能も異なっていたが、清酒小仕込試験(総米 1 kg)の結果、最終的なアルコール分が14%台に到達したため、清酒製造に適用可能と判断した。

なお、本研究結果を参考にして、令和3年7月に中埜酒造株式会社において、おおぶ酵母を用いた清酒が醸造され、「桜舞(おおぶ)」として製品化された。

文献

- 1) 三井俊, 伊藤彰敏, 山本晃司, 秋山和範, 加藤雅士: あいち産業科学技術総合センター研究報告, **2**, 84(2013)
- 2) 三井俊, 小野奈津子, 安田(吉野)庄子, 伊藤彰敏, 山本晃司: あいち産業科学技術総合センター研究報告, **3**, 68(2014)
- 3) 伊藤彰敏, 小野奈津子, 安達真人, 内藤俊, 沖塚翔太, 三井俊, 倉田久美, 臼井瑠美, 續順子: あいち産業科学技術総合センター研究報告, **4**, 96(2015)
- 4) 伊藤彰敏, 小野尚之, 小野奈津子, 三井俊, 山本晃司: あいち産業科学技術総合センター研究報告, **5**, 104(2016)
- 5) 三井俊, 伊藤彰敏, 山本晃司, 金政真: あいち産業科学技術総合センター研究報告, **6**, 58(2017)
- 6) 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, <https://www.nrib.go.jp/bun/pdf/bun/nb03.pdf>, (2022/4/15)