

## 山麩仕込用優良清酒酵母の分離

有富和生\*・田村伊美子\*<sup>2</sup>・田中淳也\*・半明桂子\*・有馬秀幸\*Isolation of Useful Sake Yeast for *Yamahai* Making from Seed and Main Mashes in Sake Brewing  
Kazuo Aritomi, Imiko Tamura, Junya Tanaka, Keiko Hammyo and Hideyuki Arima

優良な清酒酵母を用いて安定した山麩仕込による清酒の開発を目的として、県内酒造会社の酏および醪から酵母を分離し、それらを用いてアルコール生成試験および小仕込試験を実施した。分離酵母のアルコール生成能、製成酒の分析結果および官能評価から、優れた醸造特性を有する酵母を取得することができた。

## 1. 緒言

全国的に清酒の消費が低迷する中、消費者にとって差別化可能な清酒の開発が求められている。各酒造会社は、従来の淡麗な酒質とは異なる濃醇な香味を有し甘味と酸味の調和した個性豊かな山麩仕込の清酒に注目している。しかし、山麩仕込の清酒製造には、雑菌の汚染に因る腐造等の危険性を伴うこと、特有の香味を醸し出す酵母を必要とすることから、各酒造会社からその対応が求められている。

本研究では、優良な山麩仕込用清酒酵母を取得するため、酵母の分離、それを用いたアルコール生成試験そして小仕込試験を行ったので報告をする。

## 2. 実験方法および結果

## 2・1 酵母の分離

山麩仕込の清酒製造を実施している県内酒造会社4社から、平成20および21酒造年度の酏3点および醪6点を収集して試料とした。各試料を生理食塩水で適宜希釈した後、YEPD寒天培地(2%グルコース、2%ポリペプトン、1%酵母エキス、2%寒天)にその希釈液を塗布し、約28℃、3日間培養をした。生育した酵母の大きさや表面の状態を考慮しながら、合計60株を取得し分離酵母とした。

## 2・2 アルコール生成試験

## 2・2・1 第1次スクリーニング

通常、清酒酵母は優れたアルコール生成能を有する。そこで、

分離酵母のアルコール生成能を把握するために、次のようなアルコール生成試験を行った。

分離酵母60株およびきょうかい酵母7号(以下、K7と略す)を滅菌した麴汁液体培地(ポーメ6)3mlに各々植菌後、28℃、3日間培養して前培養液とした。次に、アルコール生成試験用培地I(麴汁液体培地30ml、粉末乾燥麴5g)に最終菌体濃度が一定となるように前培養液を各々添加し、20℃、10日間静置培養を行った。培養液中のアルコール濃度(v/v%)については、高速液体クロマトグラフ((株)島津製作所製)を用いて測定した。

培養初期においてK7の生成アルコール濃度(6~7v/v%)に対する各分離酵母の生成アルコール濃度の割合をX軸にとり、培養後期においてK7の最大生成アルコール濃度(11~12v/v%)に対して各分離酵母の最大生成アルコール濃度の割合をY軸にとった関係を図1Aに示す。K7(●)を基準(100)にして、培養初期および後期において高濃度のアルコール生成能を有する29株(第1象限)、培養初期のアルコール生成能は低いものの高濃度のアルコール生成能を有する5株(第2象限)そして高濃度のアルコール生成能は低いものの培養初期に高いアルコール生成能を有する2株(第4象限)合計36株(○)を選抜し、以下の第2次スクリーニングに供した。

## 2・2・2 第2次スクリーニング

選抜酵母36株のアルコール生成能を把握するため、2・2・1第1次スクリーニングにおけるアルコール生成試験を改変して、

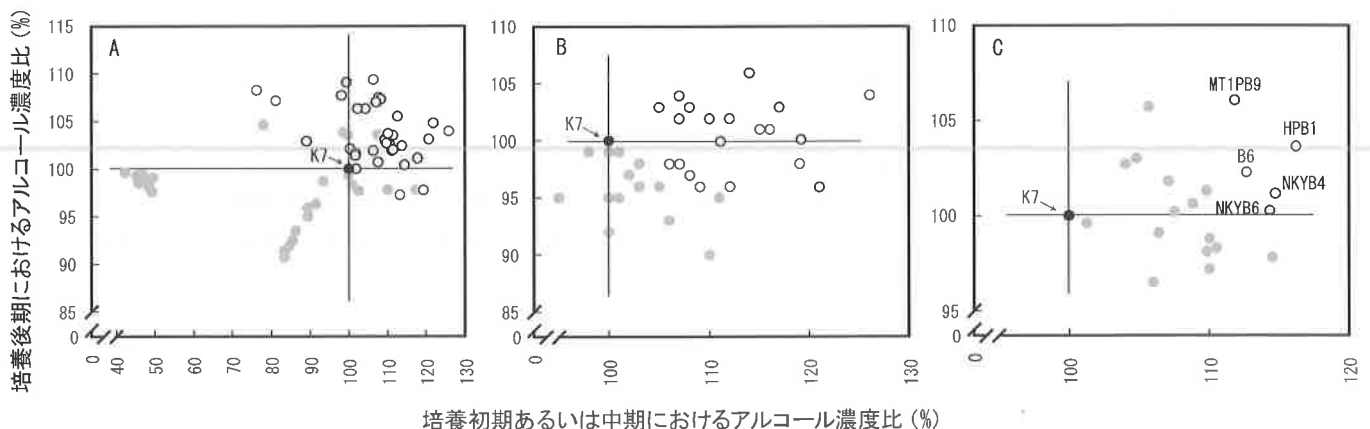


図1 分離酵母を用いたアルコール生成試験

A; 第1次スクリーニング, B; 第2次スクリーニング, C; 第3次スクリーニング

次のように行った。

選抜酵母 36 株および K7 の前培養液を同様に作成し、アルコール生成試験用培地Ⅱ (α米 40g, 乾燥麹 10g および水 80ml) に最終菌体濃度が一定となるように前培養液を各々添加して 17℃, 25 日間静置培養を行った。その後、経時的に培養液中のアルコール濃度を測定した。

培養中期において K7 の生成アルコール濃度 (約 9v/v%) に対する各選抜酵母の生成アルコール濃度の割合を X 軸にとり、培養後期において K7 の最大生成アルコール濃度 (約 16.5v/v%) に対して各選抜酵母の最大生成アルコール濃度の割合を Y 軸にとった関係を図 1B に示す。K7 (●) を基準 (100) にして、培養中期および後期において高濃度のアルコール生成能を有する 13 株 (第 1 象限) そして高濃度のアルコール生成能は低いものの培養中期に高いアルコール生成能を有する 7 株 (第 4 象限) 合計 20 株 (○) を選抜し、次の第 3 次スクリーニングに供した。

### 2・2・3 第 3 次スクリーニング

2・2・2 第 2 次スクリーニングにおけるアルコール生成試験を改変して、次のように行った。

選抜酵母 20 株および K7 の前培養液を同様に作成し、アルコール生成試験用培地Ⅲ (α米 80g, 乾燥麹 20g および水 150ml) に前培養液を各々添加後、静置培養を行った。培養温度は最初 10℃に制御した後、1日に 1℃醗温度を上昇させ最高温度 15℃としてそれ以降温度を維持し、経時的に培養液中のアルコール濃度を測定した。

選抜酵母 20 株のアルコール生成能について、2・2・2 第 2 次スクリーニングと同様に K7 (●) と比較した結果を図 1C に示す。B6, HPB1, MT1PB9, NKYB4 および NKYB6 の 5 株 (○, 第 1 象限) は、3 種類のスクリーニングのどの培養条件であっても培養中期および培養後期において優れたアルコール生成能を有する酵母であった。

### 2・3 小仕込試験

#### 2・3・1 使用酵母および仕込方法

2・2・2 第 3 次スクリーニングにおいて優れたアルコール生成能を有した酵母 5 株 (B6, HPB1, MT1PB9, NKYB4, NKYB6) および K7 の合計 6 株を使用した。仕込配合は表 1 に示すとおり、総米 1kg の三段仕込 (初添, 仲添, 留添) とした。酵母は麹汁液体培地にて前培養 (28℃, 3 日間) した後、同一濃度になるように調整した各酵母の培養液を初添に汲み水と共に添加した。仕込温度は、初添 14℃, 仲添 10℃そして留添 6℃に制御して、留添後、1日に 0.5℃醗温度を上昇させ最高温度 13℃としてその温度を維持した。酵母のアルコール生成能については、生成する炭酸ガスの放出による減量を経時的に測定し、

表 1 仕込み配合

	初添	仲添	留添	計
総米 (g)	190	300	510	1,000
蒸米 (g)	120	230	430	780
麹 (g)	70	70	80	220
汲み水 (ml)	200	400	650	1,250

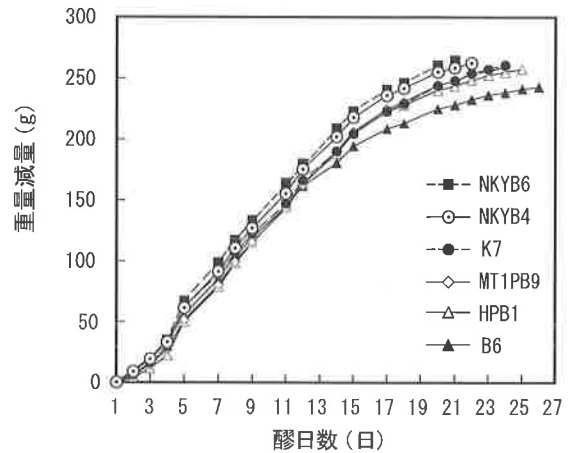


図 2 発酵経過

K7 を基準として各酵母の発酵経過により判断を行った。アルコール分が約 17 度を超えた時点を上槽時期として、遠心分離により上槽を行った。

#### 2・3・2 一般分析および官能評価方法

製成酒の一般分析のうちアルコール分、日本酒度、酸度およびアミノ酸度については、国税庁所定分析法注解<sup>1)</sup>により分析を行った。グルコースについては、液体クロマトグラフ (株) 島津製作所製) により測定した。甘辛度および濃度については、日本酒度および酸度から佐藤ら<sup>2)</sup>の回帰式により算出した。香り成分については、ヘッドスペース法<sup>3)</sup>を用いたガスクロマトグラフ (バリアンテクノロジーズジャパンリミテッド製) により測定した。有機酸については、キャピラリー電気泳動 ((株) ベックマンコールター製) により測定した。芳香族アルコールについては、伊藤らの<sup>4)</sup>方法に準じて、液体クロマトグラフ (日本分光 (株) 製) により測定した。

官能評価については、平成 23 年度山口県講話会において酒造関係者 11 名 (20 代; 5 名, 30 代; 3 名, 40 代; 2 名, 60 代 1 名) および当所職員 4 名により、味、香りを考慮して 3 点法 (1; 良, 2; 普通, 3; 不可) で行った。

#### 2・3・3 酵母の醸造特性の検討

小仕込試験の発酵経過を図 2 に、製成酒の分析および官能評価結果を表 2 に示す。

発酵経過については、醗初期において各酵母の発酵経過にはほとんど差が見られなかったが、留後 5 日目以降次第に差が生じた。K7 (●) の発酵経過と比較すると、NKYB6 (■) および NKYB4 (◎) の経過は共に良好であり、K7 の醗日数 24 日に対して NKYB6 および NKYB4 の醗日数は 21 日および 22 日であった。MT1PB9 (◇) および HPB1 (△) は K7 と同様の経過を示したが、B6 (▲) は醗中期から後期にかけて緩やかな発酵経過を示したことから 26 日目に上槽を行った。

製成酒の分析結果については、K7 と良好な発酵経過を示した NKYB4 および NKYB6 の関係を中心に考察する。

K7 と比較して NKYB4 および NKYB6 の日本酒度は高く、グルコース濃度は低い値を示した。これは、醗後期において K7 がやや緩やかな発酵経過を示したことによりアルコール生成より糖化が優勢になり、その結果、グルコース濃度が上昇し日本酒度が高くなったものと推察される。一方、NKYB4 および NKYB6 は

表2 製成酒の分析結果および官能評価

	K7	NKYB4	NKYB6	MT1PB9	HPB1	B6
醸日数 (日)	24	22	21	24	25	26
アルコール分 (度)	17.0	17.0	17.1	17.1	16.9	16.1
日本酒度	-11.1	-5.4	-4.7	-0.1	-7.0	-12.2
酸度 (ml)	2.9	2.5	2.5	2.2	2.0	2.3
アミノ酸度 (ml)	2.4	2.2	1.9	2.4	2.7	2.9
グルコース (g/100ml)	2.1	1.7	1.5	1.7	1.8	2.9
甘辛度	-0.8	-0.8	-0.9	-1.0	-0.1	0
濃淡度	+3.0	+2.0	+2.0	+1.2	+1.2	+2.0
香氣成分 (ppm)						
カプロン酸エチル	1.4	1.5	1.5	0.6	0.4	0.4
酢酸イソアミル	4.0	5.1	4.5	3.6	2.6	2.5
イソアミルアルコール	203	171	156	206	133	225
酢酸エチル	88	97	104	77	66	69
有機酸 (ppm)						
リンゴ酸	470	434	500	198	573	161
クエン酸	84	83	65	72	70	73
コハク酸	685	700	621	545	395	527
酢酸	147	123	49	313	31	571
乳酸	477	566	494	478	346	571
芳香族アルコール (ppm)						
チロソール	68	75	67	58	57	49
βフェニルアルコール	80	82	80	76	55	70
トリプトフォール	77	97	83	131	96	127
官能評価						
酒造関係者	2.2	2.0	2.0	2.3	-	2.0
職員	1.5	1.1	2.0	2.1	2.3	1.5

共に順調な発酵経過を示しており、K7と比較して優れた発酵能を有していることが分かった。濃淡度について、K7は3.0で濃淡の尺度として「非常に濃い」となった。一方、良好な発酵経過を示したNKYB6およびNKYB4では共に2.0で「かなり濃い」となった。

香氣成分のうち官能評価に最も影響を及ぼすカプロン酸エチルについて、K7の1.4ppmと比較してNKYB4およびNKYB6では共に1.5ppmであり差はなかった。酢酸イソアミルについて、K7の4.0ppmと比較するとNKYB4では5.1ppmで約1.3倍、NKYB6では4.5ppmで約1.1倍多く生成していた。一方、異臭成分の一つであるイソアミルアルコールについて、NKYB4では171ppm、NKYB6では156ppmでありK7の203ppmと比較して低濃度となった。酢酸エチル(セメダイン臭)は評価者の好みに影響される成分であり、K7の88ppmと比較するとNKYB4では97ppm、NKYB6では104ppmでありやや差は認められるが、K7と同様に評価されるものと思われる。

有機酸は酸味として評価される重要な成分であり、約70%以上が酵母により生成されている<sup>5)</sup>。爽やかな酸味と評価されるリンゴ酸について、K7の470ppmと比較するとNKYB4では434ppm、NKYB6では500ppmであり大差ではなかった。同様に評価されるクエン酸についても、K7の84ppmと比較するとNKYB4では83ppm、NKYB6では65ppmであり大差はなかった。

異臭成分の一つである酢酸について、K7の147ppmと比較するとNKYB4では123ppm、NKYB6では49ppmと低濃度となった。

芳香族アルコールのうち苦味および渋味と評価されるチロソールおよびβフェニルアルコールについて、K7と比較してNKYB4およびNKYB6では若干差はみられるものの大差ではなかった。雑味と評価されるトリプトフォールについて、K7の77ppmと比較してNKYB4では97ppm、NKYB6では83ppmであり、少し高い濃度となった。これらについては、山麩仕込の清酒製造には特有の香味を醸し出す酵母を必要とすることから好ましい結果だと考えられる。

官能評価について、酒造関係者の評価では各酵母間で大きな差はみられずK7と比較してNKYB4およびNKYB6の製成酒が相対的に良い評価を得た。また、当所職員の評価では、NKYB4の製成酒が香味のバランスも良く最も良い評価であった。

以上の結果から、NKYB4は良好な発酵能を有し製成酒の酒質についても良い評価を得ていたことから優れた醸造特性を有する酵母であることが分かった。

### 3. 結 言

優良な清酒酵母を用いた山麩仕込による清酒を開発するために、県内酒造会社の醗および醪から酵母の分離を実施した。次に、それらのアルコール生成能および製成酒の酒質を把握するため、アルコール生成試験および小仕込試験を行った。その結果、K7と比較して優れた醸造特性を示したNKYB4を選抜することができた。今後、県独自の酵母「やまぐち山麩酵母」としてブランド化を図るとともに、差別可能な商品として山麩仕込の清酒の開発に寄与したい。

試料として醗および醪を提供して頂いた酒造会社および製成酒の官能評価にご協力頂いた酒造関係者に感謝致します。

### 参考文献

- 1) 第四回改正国税庁所定分析法注解, 注解編集委員会編, 財団法人日本醸造協会, p.7-33 (1993).
- 2) 佐藤 信, 川島 宏, 丸山良光: 清酒の味覚に関する研究, 日本醸造協会雑誌, 69(11), p.774-777 (1974).
- 3) 吉沢 叔: Head space 法による清酒香氣成分の迅速定量法, 日本醸造協会雑誌, 68, p.59-61 (1973).
- 4) 伊藤俊彦, 小松幸恵, 高堂 斐, 高橋 仁, 田母神繁, 小泉武夫, 中沢伸重, 岩野君夫: 吟醸酒に含まれる芳香族アルコールの呈味性について, 日本醸造協会誌, 103(7), p.562-569 (2008).
- 5) 醸造物の成分, 日本醸造協会編, 財団法人日本醸造協会, p.50-62 (1999).