

## 清酒醸造用酵母の開発(1)

誌名	研究報告 = Reports of the Industrial Research Center of Shiga Prefecture
ISSN	13439391
著者	岡田, 俊樹 白井, 伸明 松本, 正
巻/号	16号
掲載ページ	p. 41-44
発行年月	2002年9月

# 清酒醸造用酵母の開発（第1報）

## 醸造用酵母の分離と酵母の特性試験

岡田 俊樹\*、 白井 伸明\*、 松本 正\*  
Toshiki Okada, Nobuaki Shirai, Tadashi Matsumoto

### 要旨

県内酒造業界の活性化策の一環で、香りや味に特徴を持たせた清酒造りが可能な酵母の取得を目的に、清酒醸造用酵母の開発を実施した。まずは、醪や酒母から酵母菌株の分離を行い、収集した各株の特性について調べた。その結果、醪から 372 株、酒母から 34 株の特徴的な異なる酵母菌株を得た。それぞれ分離菌を麹汁培地を用いて培養をおこない、発酵力、各種香気成分、総酸量を調べたところ、既存の醸造用酵母より高い発酵力や香気生成能を示すものが存在した。

### 1. はじめに

清酒は、古来から日本人にとって親しまれてきたアルコール飲料の一つで、現在も日本全土にわたり製造され販売、消費されている。中でも地酒と言われているものは、その地方地方で特徴づけられ、話題にのぼることも多い。しかしながら、近年清酒の消費量は、減少傾向にあることから地方の地酒メーカーでは少量生産で高品質な清酒製造が望まれる。

清酒は、特に品質を決める要因が多く、原料米の品種や産地、その精米歩合を含む処理法、麹菌や酵母等の微生物の種類、発酵経過とその管理方法、熟成方法とその条件等多岐にわたる。その中でも、アルコール生産を担う酵母の役割は大きく、香りの特徴付ける各種香気成分の生成や味に關与する有機酸の生成等大きく係わっている。<sup>1)</sup>

現在の清酒醸造における酵母は、大手酒造会社では自社で育種・開発されたものが用いられているが、中小企業においては、主に日本醸造協会等が分譲している協会酵母や各地方自治体で開発されたものが使用されている。<sup>2)</sup>

清酒酵母の開発法としては、アミノ酸等のアナログ耐性菌<sup>3),4)</sup>や薬剤耐性菌等<sup>2),5,6)</sup>の取得、また、これらを得るための薬剤や紫外線を使用した変異処理、既存菌株の優良性質を交雑により育種する手法<sup>7)</sup>等が報告されている。

滋賀県においては、約 60 社の清酒製造会社がある。現在、差別化、個性化が求められている時代にあって独自の酵母の開発に期待が寄せられているところである。

県内酒造業者に期待する酵母開発について調査したところ、①「高い吟醸香があつて味切れするもの」が最も多く、次に②「アルコール生産は高くなくても味がしっかりとした、また酸のきれいなもの」、次いで③「アルコール耐性があり、高生産なもの」と続いた。

そこで本研究は、県産酒の活性化を図ることを目的に香りや味に特徴を持つ清酒造りを可能とする酵母開発を実施するため、まずは、醪や酒母から酵母菌株の分離を行い、次に、第1次スクリーニングとして収集した各株の特性について調べたので報告する。

### 2. 実験材料および方法

#### 2.1 酵母の分離

##### 2.1.1 供試試料

平成 12 年 11 月から平成 13 年 4 月までの間に滋賀県内の 13 社の清酒製造会社の醪および山廃酒母 35 本を用いた。

##### 2.1.2 分離培地の調製

通常の培養や保存は、YPD 培地を用いた。醪および酒母からの酵母の分離は、同じ供試醪等から、コロニーの色調や外観が各々異なるものとして判断が可能な神田ら<sup>8)</sup>の報告を参考にして中富<sup>9)</sup>の色素培地(AP 培地)を用いた。また、醪を供試した場合の釣菌は、醸造に用いた既存の酵母とは様相の異なるものとした。なお、培地組成は、Table 1 に示した。

##### 2.1.3 分離操作および培養

供試試料を滅菌水に適宜希釈して、滅菌シャーレ(90 × 15mm, IWAKI)に固化した培地に塗抹し、20℃で 2 ~ 4 日間培養した。

\*機能材料担当

Table 1 各種培地組成

YPD 培地		A P 培地	
Glucose	20 g	Bacto-Yeast Carbon Base	11.7 g
Yeast-Extract	10 g	Yeast Extract	1.0 g
Poly Pepton	20 g	L-Methionine	5.0 g
Distilled Water	1000 ml	Sucrose	40.0 g
		Aniline Blue	25 mg
		Ponceau 2R	50 mg
		Distilled Water	1000 ml

\*固体培地の場合は、寒天を20g添加した。

## 2.2 麹汁培地での発酵試験

### 2.2.1 供試試料

先に各醪や酒母から純粋分離を繰り返しおこない純化した分離菌株を用いた。

### 2.2.2 麹汁培地の調製

常報のとおり、麹1に対して予め60℃に加温した3～4倍量の蒸留水を加え、55℃で8時間糖化をおこなった。<sup>10)</sup> 糖化終了後、遠心分離(3000rpm, 15min.)、次いで、ろ過(東洋濾紙 No.2)をおこない、ボーム(Be) 10.0に調製して、100 ml 容量の三角フラスコに、50 ml ずつ分注した。その後、通気性シリコン栓を取り付けオートクレーブ(121℃, 15min.)で滅菌した。

### 2.2.3 本培養(発酵試験)

予め、供試菌株を麹汁培地で培養しておいた前培養液を、発酵試験培地に $10^4$  order cells/mlになるように接種した。なお、培養は15℃で7日間おこなった。

Table 2 ヘッドスペースガスクロマトグラフの分析条件

Column	: DB-WAX 30m×0.25mm Film: 0.25um
Carrier Gas	: He
Inject temp	: 260℃
DetectTemp.	: 280℃
Oven Temp.	: 50℃, 5min. →5℃/min. →150℃, 5min.
Sample Volume	: 1ml
Sample Heat Condition	: 80℃, 20min.
Needle Temp.	: 110℃
Sample Loop temp.	: 140℃
Press Time	: 0.1min.
Inj. Time	: 0.08min.
Detector	: Mass
Internal Standard	: n-amyl alcohol (200ppm)

### 2.2.4 成分分析

発酵の度合いは、炭酸ガス発生量を重量減少で測定して目安とした。また、総酸の測定は、国税庁所定分析法注解<sup>11)</sup>にしたがった。

また、香気成分の測定は、吉沢<sup>12)</sup>の方法を参考にし、パーキンエルマー社製 AutoSystem ガスクロマトグラフィ質量分析装置(GC-MS)にヘッドスペースサンプラー(HS40XL)を付属して用い、酢酸イソアミル、カプロン酸エチル、イソアミルアルコール、イソブチルアルコール、n-プロピルアルコール等を分析した。なお、分析条件は、Table 2に示した。

## 3. 実験結果

### 3.1 酵母の分離

清酒醪および酒母から、清酒醸造用の酵母と考えられる菌株を分離し、純粋分離を繰り返した結果、醪からは372株、酒母からは34株を得た。

### 3.2 分離菌株の特性

それぞれ分離した菌株の特性を知るため、麹汁培地を用いて培養をおこない、発酵力、各種香気成分、総酸量を調べた。なお、試験は、分離菌株の中から206株を選出し供試した。

発酵力の目安とするCO<sub>2</sub>減少量の結果をTable 3に示した。206株中2/3の菌株は、2.5g以上だった。中でも3.0gを越えるものが31株ほどあり、最も高かったのは、AP-046、APC-006の3.23gだった。3.10gを越えた6株を発酵力が高い菌株とした。今後、これらの

Table 3 CO<sub>2</sub>の減少量

CO <sub>2</sub> 減少量	菌株数
> 3.10 g	6 (Maximum:3.23g)
3.00 - 3.09 g	25
2.50 - 2.99 g	89
< 2.49 g	86
総菌株数	206

菌株は、アルコール耐性等も検討する予定である。

次に、培養液の香気成分を分析し香気生成が高い菌株を調べた。特に吟醸香である酢酸イソアミルとカプロン酸エチルに注目し、その結果を Table4 に示した。供試した大方の菌株は、既存の株と同程度もしくはそれ以下であったが、一部の菌株で高いと考えられる菌株があった。中でも、酢酸イソアミルでは、SYA-008 が既存の菌株よりも2倍程度、また、カプロン酸エチルでは、SY-051 が1.5倍程度高かった。数倍程度高生産な菌株は確認できなかったが、今後小仕込み試験等

Table 4 香気成分分析結果 (1)

菌株 No.	i-AmOAc	CaOEt	i-AmOH
SY-023	1.8	0.9	64.3 (ppm)
SY-045	2.2	0.9	62.9
SY-051	1.1	1.7	66.2
SY-057	1.7	1.2	60.3
SY-060	1.8	0.9	56.4
SYA-008	2.5	1.1	77.1
SYA-015	1.8	1.2	87.2
SYA-037	1.4	1.5	51.6
SYC-008	2.7	1.2	88.8
SYC-032	2.6	1.3	103.5
SYC-038-2	2.6	1.3	102.4
SYAC-006	1.5	1.4	80.6
K-7	1.1	1.0	59.2
K-9	1.3	1.2	65.4
K-14	1.5	1.2	72.4
Average	1.07	0.71	58.09
Maximum	2.70	1.70	103.50
Minimum	0.30	0.10	10.40

i-AmOAc: isoamyl acetate, CaOEt: ethyl n-caproate,  
i-AmOH: isoamyl alcohol

を実施して検討していく予定である。

また、n-プロピルアルコール、イソブチルアルコールの結果を Table 5 に示した。

次に、培養液の酸度が高かった菌株を Table 6 に示した。大半の菌株は、既存の菌株程度またはそれ以下だったが、SYZ-007やSYA-045は、それぞれ3.30mlと3.10mlと高かった。これらの菌株については、有機酸組成を調べ味に特徴がある清酒醸造の酵母として期待したい。

今回は、清酒醪や酒母から清酒醸造用の酵母と考えられる菌株を分離し、これらの発酵性、香気成分、酸に特質があると考えられる菌株を得ることができた。今後の展開としては、県内酒造会社の要望等をふまえて酵母開発を実施していく予定にしている。

Table 5 香気成分分析結果 (2)

菌株 No.	n-PrOH	i-BuOH
SY-052	38.9	16.2 (ppm)
SY-054	32.7	11.7
SY-056	33.7	15.4
SYA-039	34.9	9.0
SYA-053	21.5	22.5
SYC-001	32.9	20.9
SYC-008	31.0	26.2
SYC-032	31.5	34.3
SYC-038	29.3	38.5
SYC-038-2	30.3	26.1
K-7	28.3	13.7
K-9	19.0	13.0
K-14	28.2	6.4
Average	22.04	12.14
Maximum	38.90	38.50
Minimum	14.70	4.80

n-PrOH: n-propyl alcohol, i-BuOH: iso-Butyle alcohol

Table 6 総酸の分析結果

菌株 No.	滴定量
SYA-020	2.80 (ml)
SYA-045	3.10
SYC-019	3.00
SYC-035	2.90
SYAC-024	2.90
SYZ-007	3.30
K-7	1.80
K-9	1.90
K-14	1.80
Average	1.90
Maximum	3.30
Minimum	1.35

## 謝 辞

本研究を実施するにあたり、試料の採取にご協力をいただきました県内清酒製造会社およびご助言をいただきました近府県の関連機関の方々に深く感謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) 財団法人日本醸造協会編：醸造物の成分 (1999)
- 2) 清酒酵母研究会編：清酒酵母の研究, p79-138 (1992)
- 3) S.Ashida, E.Ichkawa, K.Suginami and S.Imayasu  
: *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2061 (1987)
- 4) 秋田修：醸協, 84,(2),96-99 (1989)
- 5) 吉田 清、稲橋 正明、中村 欽一、野白 喜久雄  
: 醸協, 88,(8),645-647 (1993)
- 6) 吉田 清：醸協, 90,(10),751-758 (1995)
- 7) 原昌道、若井芳則、嶋崎孝行、北野一好：醸協,  
78,(6),449-452 (1983)
- 8) 神田晃敬、三森智子、松井菊恵、浜池正昭、本場  
健光：醸協, 85,(6),417-421 (1990)
- 9) 永井進編：酵母研究における方法論, 学会出版セ  
ンター(1982)
- 10) 山里一英ら編：微生物の分離法, R & D プラン  
ニング, (1986)
- 11) 注解編集委員会編：第四回改正国税庁所定分析  
法注解、(1993)
- 12) 吉沢淑：醸協, 68,(1),59-61 (1973)