

県産酵母を使用した清酒の品質向上

長沼 孝多・小嶋 匡人・木村 英生

Improve the Quality of *Sake* Maked by the Yeast Isolated in Yamanashi Prefecture

Kota NAGANUMA, Masato KOJIMA and Hideo KIMURA

要 約

県オリジナル清酒酵母（県産酵母）である富士桜酵母および桃の実酵母の泡なし化を実施した。シュガーエステル凝集法により泡なし変異株の取得を行い、富士桜酵母から 221 株、桃の実酵母から 217 株の変異株候補を得た。各変異株候補に対し、泡なし性、高糖濃度培地での生育性、麴汁培地での生育性を指標に比較的良好な株の選抜を行ったところ、富士桜酵母から 73 株、桃の実酵母から 58 株を選抜した。

1. 緒 言

清酒は、酒税法において「アルコール度が 22 度未満で、米、米こうじ及び水を原料として発酵させて、こしたものを」を基本として定義されている¹⁾。発酵を担うのは清酒酵母であるが、清酒酵母はアルコールを生成すると同時に種々の香気成分²⁾や呈味成分³⁾を生成し、清酒の香味に大きく影響を与えることが知られている。

ところで清酒酵母は、かつては各清酒製造企業が所有する、いわゆる家つき酵母⁴⁾が使われていたが、1906 年に発足した醸造協会（現：公益財団法人日本醸造協会）により、全国の清酒製造企業のもろみから分離された優良な清酒酵母⁵⁾が「きょうかい酵母」として頒布されるようになった。そのため、近年使用されている清酒酵母は多くがきょうかい酵母と言われている。

一方で、かねてより、清酒の差別化を目的として、各県、各研究グループあるいは各清酒製造企業において独自の清酒酵母を取得し活用する動きが存在した。本県においても、既報^{6,7)}により清酒醸造に使用できる野生酵母が取得され、「富士桜酵母」および「桃の実酵母」

（以下、県産酵母と称す）と命名された後、県酒造組合を中心に活用が図られた。

しかしながら、県産酵母は野生酵母の特徴を強く残し、特にもろみにおいては高泡を形成する、いわゆる泡ありタイプであった。泡ありタイプの清酒酵母は、泡消装置の設置やもろみのオーバーフローを考慮した製造量の調整などが必要であり、作業性に難がある。一方で近年では、きょうかい酵母を中心に高泡を形成しない泡なしタイプの清酒酵母が実用化⁸⁾されており、各清酒製造企

業の醸造計画は、泡なしタイプを前提としている場合も多い。

そこで本研究では、県産酵母を泡なし化し、またその醸造条件を最適化することを目的とした。本報では、県産酵母の泡なし化と、泡なし変異株候補の選抜方法において有機酸生成能を指標とするための検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

2-1 供試試料

富士桜酵母および桃の実酵母は、凍結保存されたものを復帰後、YM 液体培地で 25℃、3 日間静置を 3 回繰り返したものを使用した。

2-2 泡なし変異株の取得法

県産酵母の泡なし化は、自然発生する泡なし変異株を取得する方法で行った。変異株は、酵母の増殖過程において自然発生するとされているが、泡なしのような特定の変異が発生する確率は 100 万分の 1 程度⁹⁾とも言われている。そのため、性質の違いを利用し、自然発生した泡なし変異株を効率よく取得する方法が数種報告されている。性質の違いとは、気泡への吸着性や、担体への凝集性などである。

本報では、手法の簡便さから、凝集法の一手法であるシュガーエステル凝集法¹⁰⁾を使用した。すなわち、5ml の YM 液体培地で県産酵母を 25℃、7 日間静置した後、0.5ml のシュガーエステル溶液（三菱化学フーズ㈱、0.25% リョートーシュガーエステル P1570）を加え、1 分間強く混合した。次に、遠心機（㈱コクサン、H-

60R) で 4℃, 90×g, 5 分間遠心分離後, 遠心上清 0.5ml を別の YM 液体培地に接種し, 同様に 25℃, 7 日間静置した. 本操作を, 遠心後の上清に十分濁りが認められるようになるまで繰り返し行った.

続いて遠心上清を適宜希釈し, YM 平板培地に塗抹後, 25℃, 3 日間培養してコロニーを得た. 生育したコロニーから良好な生育を示したものを釣菌し, 別の YM 平板培地で継代して純化したものを泡なし変異株候補とした.

2-3 試験管培養による選抜

泡なし変異株候補について, 試験管培養による選抜を行った. なお, 各変異株候補は, 選抜前に 1ml の YM 液体培地で 25℃, 2 日間前培養した.

泡なし変異株候補のうち, 特に優れる株については光学顕微鏡 (オリンパス株, BX-51) により気泡への吸着性を確認した.

2-3-1 泡なし性

2-2 に準じ, 各泡なし変異株候補を 5ml の YM 培地で 25℃, 3 日間静置後, 0.5ml のシュガーエステル溶液を加え, 1 分間強く混合した. 4℃, 90×g, 5 分間遠心分離し, 上清の濁りや沈殿量を目視で確認し, 4 段階で評価した.

2-3-2 高糖濃度での生育性

各泡なし変異株候補を, 5ml の YPD 培地 (グルコース 5.0 あるいは 10.0%, 酵母エキス 1.0%, ポリペプトン 2.0%) に接種し, 25℃, 3 日間静置した. 酵母の増殖量および発泡性を目視で確認し, 生育や発泡性を 4 段階で評価した.

2-3-3 麴汁培地での生育性

各泡なし変異株候補を, 麴汁 (9° Bé, クロラムフェニコール 100ppm 含有) に接種し, 25℃, 2 日間静置した. 酵母の増殖量および発泡性を目視で確認し, 生育や発泡性を 4 段階で評価した.

2-4 有機酸生成能を指標とした選抜法の検討

各泡なし変異株候補について, 有機酸生成能を指標とした選抜法を検討した. 微生物培養用プレート (アズワン株, 24 穴平底) を使用し, 変異株候補を 1ml の麴汁培地 (9° Bé, クロラムフェニコール 100ppm 含有) で 25℃, 2 日間静置後, その懸濁液を遠心機 (日立工機株, CT15RE) で 4℃, 15,000rpm, 15 分間遠心した. 上清を 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し, ろ液の有機酸含有量を高速液体クロマトグラフで定量した. 測定条件を表 1 に示した.

また, 同条件で雰囲気を嫌気 (三菱ガス化学株, 嫌気ジャーおよびアネロパック・ケンキ使用) としたものについても同様に試験した. 前者を通常培養, 後者を嫌気培養とした.

表 1 有機酸測定条件

方式	ポストカラムpH緩衝法
ポンプ	LC-10AD (島津製作所社製) × 2
検出器	CCD-6A電気伝導度検出器 (島津製作所社製)
カラム	Shim-pack SCR-102H φ8.0×300mm
溶離液	5mM p-トルエンスルホン酸
反応液	5mM p-トルエンスルホン酸 20mM Bis-Tris 100mM EDTA
カラム温度	40℃
流速	0.6ml/min

3. 結果

3-1 泡なし変異株候補の取得

富士桜酵母および桃の実酵母ともに, 泡なし変異株の取得は 2 系列で行った. 便宜上, 富士桜酵母を親株とする 2 系列を FJA, FJB, 桃の実酵母を親株とする 2 系列を MMA, MMB とした.

シュガーエステル凝集法の操作を 9 回繰り返し, ところ, いずれの系列においても遠心後の上清に濁りが認められるようになった. 操作をさらに 3 回加え合計 12 回とし, 釣菌と純化を行い, 泡なし変異株候補を得た.

泡なし変異株候補の取得結果を表 2 に示した. 富士桜酵母から合計 221 株, 桃の実酵母から合計 217 株を得た. なお, 泡なし変異株は, 本法での培養期間の長さから, 泡なし以外の変異も生じている可能性を考慮し, 選抜の幅を広げるため各系列で 100 株以上を取得した.

得られた各変異株候補は, YM 平板培地にスポット培養し, 適宜継代した.

表 2 泡なし変異株候補の分離数

親株	系列	略号	変異株候補 分離数(株)
富士桜酵母	1	FJA	112
	2	FJB	109
桃の実酵母	1	MMA	111
	2	MMB	106

3-2 試験管培養による選抜

泡なし変異株候補の選抜を行った結果を表 3 に示した. 選抜の結果, 泡なし性, 高糖濃度での生育性, 麴汁培地での生育性のいずれも良好な株数は, FJA で 29 株, FJB で 44 株, MMA で 34 株, MMB で 24 株認められ, また各選抜のいずれにおいても特に優れていると推察された株数はそれぞれ 14 株, 13 株, 8 株, 11 株であった. したがって, 親株である富士桜酵母からは 73 株 (うち, 特に優れると推察された株 27 株), 桃の実酵母からは 58 株

(うち、特に優れると推察された株 19 株) を選抜し、次の選抜候補として扱うこととした。

得られた変異株候補のうち、特に優れると推察された合計 46 株について気泡吸着性を確認したところ、いずれの株も気泡吸着性は認められなかった。例として、親株である富士桜酵母の気泡吸着を図 1 に、泡なし変異株候補の 1 株である FJA025 株の気泡吸着を図 2 に示した。

なお、泡なし性がほとんど認められなかった株は、FJA で 12 株、FJB で 8 株、MMA で 7 株、MMB で 4 株あった (表には示さない)。

表 3 泡なし変異株候補の選抜結果

変異株 候補 分離数	A	B	C	A, B, C いずれも 優れる株数 (株)	特に優れる 株数
FJA	112	54	82	29	14
FJB	109	58	86	44	13
MMA	111	55	76	34	8
MMB	106	46	58	24	11

A: 泡なし性に優れる株数 B: 高糖濃度での生育に優れる株数 C: 麹汁培地での生育に優れる株数

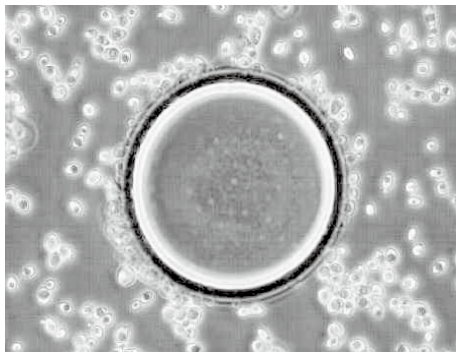


図 1 富士桜酵母 (親株) の気泡吸着性 (気泡への吸着が認められる)

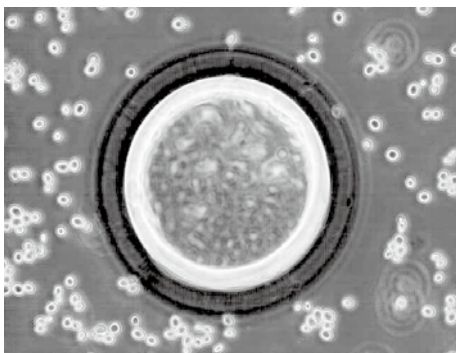


図 2 泡なし変異株候補 (FJA025 株) の気泡吸着性 (気泡への吸着が認められない)

3-3 有機酸生成能を指標とした選抜法

泡なし変異株候補のうち、FJA の 12 株を使用し、通常の培養あるいは嫌気培養した際の有機酸生成量を図 3 に示した。

有機酸は、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸および酢酸が認められた。クエン酸は、通常培養あるいは嫌気培養のいずれでもほぼ同程度の含有量であったが、リンゴ酸、コハク酸および酢酸は、通常培養と比較し嫌気培養での含有量が減少した。酢酸は、通常培養と比較し嫌気培養での含有量の変動が少なくなる傾向が認められた。

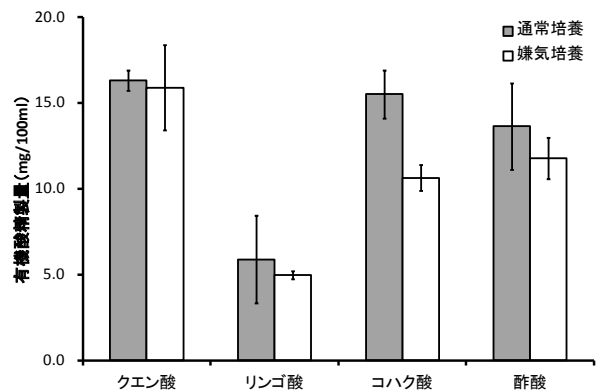


図 3 泡なし変異株候補の有機酸生成量

4. 考 察

県産酵母 (富士桜酵母, 桃の実酵母) は、どちらも自然界から分離された野性酵母である。本研究に先立ち聞き取り調査を行ったところ、県産酵母に共通する欠点として、①高泡を形成すること ②発酵能力がやや低く・特にもろみの後半で鈍ること ③清酒に独特の香気を有すること、などが主に指摘された。

県産酵母について、シュガーエステル凝集法により泡なし変異株候補を取得したところ、富士桜酵母から 221 株、桃の実酵母から 217 株を分離し、比較的性質が良好と推察される株はそれぞれ 27 株、19 株であった。泡なしタイプの酵母は、泡ありタイプの酵母と比較し、もろみ中に多数の酵母が存在するようになるため、もろみの発酵が旺盛に行われる⁹⁾とされている。したがって、県産酵母に共通する欠点である高泡の形成と発酵力の弱さは、泡なし化により改善が望めるものと考えられた。引き続き、泡なし変異株候補から優良な株を選抜する予定である。

一方、泡なし変異株候補のうち、泡なし性がほとんど認められない株も存在し、富士桜酵母では 20 株、桃の実酵母では 11 株が該当した。したがって、本研究においてシュガーエステル凝集法により泡なし変異株が取得

できる確率は、富士桜酵母では約 91%、桃の実酵母では約 95%であった。既報¹⁰⁾では、同法で取得した 15 株の変異株のうち、泡なし性を示した株は 14 株 (約 93%) であったため、本研究でも同程度の効率で泡なし変異株が取得できたこととなった。

また、県産酵母に指摘された清酒の独特の香気は、原因として酢酸が推察され、県産酵母に限らず野性酵母で醸造した清酒においてよく指摘される¹¹⁾。しかしながら、清酒における有機酸の生成、特に揮発酸である酢酸の生成量は、もろみの酸素濃度に左右されることが知られており、酢酸の生成能により変異株を選抜する方法については確かな手法がなかった。今回、嫌気雰囲気において酵母を培養することにより、通常の雰囲気と比較して酢酸生成量の変動が少なくなる傾向が認められたため、酢酸を指標とした変異株の選抜において、嫌気雰囲気で培養を行うことが有効である可能性が示唆された。しかしながら、実際のもろみにおける酢酸生成との相関は不明であり、今後の検討課題である。

5. 結 言

県産清酒酵母の泡なし化を目的として、シュガーエステル凝集法により泡なし化を行った。泡なし変異株候補は富士桜酵母から 221 株、桃の実酵母から 217 株が得られ、各選抜により富士桜酵母からは 73 株 (うち、特に優れる株 27 株)、桃の実酵母からは 58 株 (うち、特に優れる株 19 株) が得られた。

謝 辞

本研究を行うにあたりまして、多大な御助言をいただきました 飯村 穰 元山梨大学教授に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 酒税法 (昭和 28 年 2 月 28 日法律第 6 号) : 第 1 章 第 3 条 7
- 2) 堤 浩子 : バイオインダストリー, NOV., 2012, p. 4-8 (2012)
- 3) 橋爪 克己 : バイオインダストリー, NOV., 2012, p. 16-21 (2012)
- 4) 改訂清酒入門 : 財団法人日本醸造協会, p. 62 (2007)
- 5) 改訂清酒酵母の研究 : 清酒酵母研究会, p. 27 (1980)
- 6) 恩田 匠, 長沼 孝多, 乙黒 親男, 渡辺 正平, 飯村 穰 : 山梨県工業技術センター研究報告, No.18, p. 30-33 (2004)

- 7) 恩田 匠, 長沼 孝多, 辻 政雄, 渡辺 正平, 飯村 穰 : 山梨県工業技術センター研究報告, No. 19, p. 45-47 (2005)
- 8) 増補改訂清酒製造技術 : 財団法人日本醸造協会, p. 180 (2009)
- 9) 大内 弘造 : 酒と酵母のはなし : 技報堂出版, p. 132 (1997)
- 10) 大内 弘造 : 清酒酵母の泡なし変異株に関する研究, 博士論文 (東京大学), p. 10-29 (1974)
- 11) 菅野 信男・馬宮 功・秋山 裕一 : 醸協, Vol. 65, No.10, p. 902-907 (1970)