

# 清酒酵母の発酵適性評価

## Evaluation of fermentation suitability of Sake yeast isolated from a manufacturing plant

会津若松技術支援センター 醸造・食品科 中島奈津子 齋藤嵩典

自社工場から単離した清酒酵母を用いて清酒以外の酒類を製造するため、麦汁の高温短期発酵が行えるか評価試験を行った。清酒酵母を単独で用いた場合、麦汁を用いた高温短期発酵条件では十分なアルコールが得られず、また香気も乏しかった。しかし、麦汁の高温発酵特性を有する市販酵母との混合発酵において、清酒酵母はこの酵母の発酵を妨げず、順調な発酵が行えることがわかった。清酒酵母との混合発酵により、市販の酵母単独では得られない有機酸など特有の香味の付与が期待される。

Key words: 麦汁発酵、清酒酵母

## 1. 緒言

栄川酒造株式会社は、耶麻郡磐梯町に工場を構える清酒・リキュール製造業者である。環境庁認定の日本名水百選に指定された良水を仕込み水に使用した製品は、各種鑑評会およびモンドセレクションにおいて多数の受賞歴を持ち、その品質の高さを示している。

栄川酒造(株)の清酒酵母は、会津若松駅前に所在した若松工場が閉鎖される際、工場内から独自に単離作業を行い取得していた酵母で、遺伝子解析により清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* であることが確認されている。平成29年、平成30年にそれぞれハイテクプラザ現場支援事業により発酵特性試験と高泡形成特性を持たない泡なし酵母への改良を行った。以降、様々な製品製造に用いられている。

酒類製造用の酵母は製造する酒類の製法や糖源等に適した菌株が育種選抜され、酒類ごとに適した酵母が使われている。清酒製造用には、米を原料とし、低温・長期発酵特性に優れた菌株が使用されている。そこで、本研究では、長らく清酒製造に用いてきた自社酵母を清酒以外の酒類製造に使用できるか明らかにするため、麦汁及び麦芽エキスを用い、高温・短期発酵条件における清酒酵母の発酵能力及び市販の麦汁発酵性酵母との混合発酵について評価し、清酒酵母を用いた清酒以外の酒類製造が可能か検証した。

## 2. 実験

### 2. 1. 清酒酵母と市販麦汁発酵酵母との比較

#### 2. 1. 1. 発酵試験

麦汁は以下の方法で調製した。栄川酒造(株)から提供された割砕麦芽と70[°C]の湯を1:4の比率で混和し、攪拌しながら65[°C]で糖化した。これをろ過して一番麦汁とし、ろ過残渣に2倍量の75[°C]の湯を加え75[°C]にて再糖化し、これをろ過して二番麦汁を得た。試験には、一番麦汁と二番麦汁を混和して使用した。なお、麦汁の糖化に用いる水は栄川酒造(株)の製造場内

で使用している原料水を用いた。

酵母は、栄川酒造(株)から提供された清酒酵母2種類(ES、EL)と市販酵母(M、MG+) (ピナクル社製)を用いた。清酒酵母は麹汁培地にて30[°C]、120[rpm]、一晚振盪培養した培養液を遠心分離にて集菌したもの、市販酵母は乾燥粉末酵母を用いた。

発酵は、25[°C]に設定した空冷式恒温器(CR-41C)内で行い、品温を23[°C]に維持し8日間実施した。

試験区は表1のとおり。①~④はいずれも $10^{10}$ 個、⑤~⑥は $10^8$ 個の酵母数となるように添加した。

表1 麦汁を用いた発酵試験の試験区

試験区	①	②	③	④	⑤	⑥
酵母	MG+	M	ES	EL	ES_1/100	EL_1/100
酵母由来	ピナクル社	ピナクル社	栄川酵母	栄川酵母	栄川酵母	栄川酵母
酵母状態	乾燥	乾燥	液体培養	液体培養	液体培養	液体培養
使用酵母量	1g	1g	200mL*	200mL*	2mL*	2mL*
麦汁	1L	1L	1L	1L	1L	1L

\*: 培養液の液量

### 2. 1. 2. 成分分析

アルコール分はSD式迅速アルコール測定システム(京都電子工業(株))、酸度とアミノ酸度は総酸アミノ酸滴定装置AT-710(京都電子工業(株))、pHはHM-50G(東亜DKK社)を用いて測定した。Brixと比重はビールWort屈折計(Timvasion社)、香気成分は、ガスクロマトグラフ7890B(Agilent社)を用い、内部標準法にて測定した。また、発酵3日目の酵母の様子を光学顕微鏡BX51(オリンパス(株))で観察した。

### 2. 2. 清酒酵母と市販麦汁発酵酵母の混合発酵

#### 2. 2. 1. 発酵試験

麦汁は市販の麦芽エキス(SPRAY MALT light、Muntons社)を用いて比重1.06になるように調製した。酵母は、清酒酵母、市販酵母ともに麹汁培地を用いて30[°C]、120[rpm]、一晚振盪培養した培養液を遠心分離にて集菌し、上記のとおり調製した麦汁に再懸濁した後、単一酵母試験区および複数酵母試験区のいづ

れにおいても総酵母数が  $1 \times 10^7$  [個/ml] の濃度となるように添加した。試験区は表2のとおり。

発酵は 30[°C] に設定した空冷式恒温器 (CR-41C) 内で行い、品温を 28[°C] に維持し 3 日間実施した。

表2 酵母混合発酵試験の試験区

試験区		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
市販麦汁発酵酵母	M	○				○	○			○	
	MG+		○					○	○		○
清酒酵母	ES			○		○		○		○	○
	EL				○		○		○	○	○

### 2. 2. 2. 成分分析

アルコール分は SD 式迅速アルコール測定システム (京都電子工業株) を用いて測定した。香気成分は、ガスクロマトグラフ 7890B (Agilent 社) を用い、内部標準法にて測定した。

## 3. 結果

### 3. 1. 清酒酵母と市販麦汁発酵酵母との比較

麦汁の組成は表3のとおり。麦汁調製は複数回実施した。糖化経過中に試料をサンプリングして Brix と比重を測定し、各々の値をプロットしたところ、高い相関係数を示す近似式が得られた (図1)。

表3 発酵試験に用いた麦汁の成分値

比重	酸度	アミノ酸度	pH	Brix	Alc(%)
1.060	1.2	2.4	5.34	15.7	0

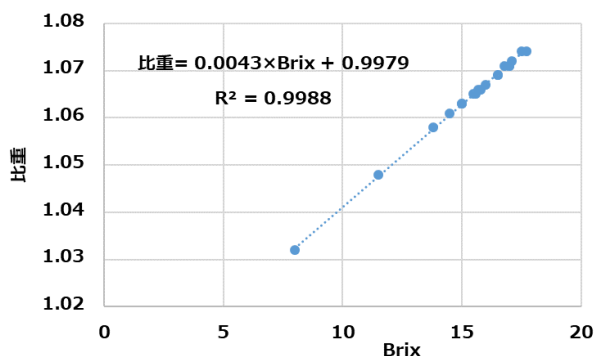


図1 糖化麦汁の比重と Brix の関係

各試験区におけるアルコール濃度を図2に示す。市販酵母は MG+, M のいずれも高い発酵能力を示し、発酵3日目でアルコール濃度 8 [%] を達成した。一方、清

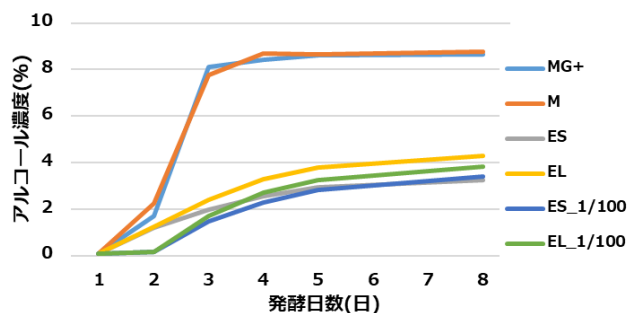


図2 アルコール濃度の変化

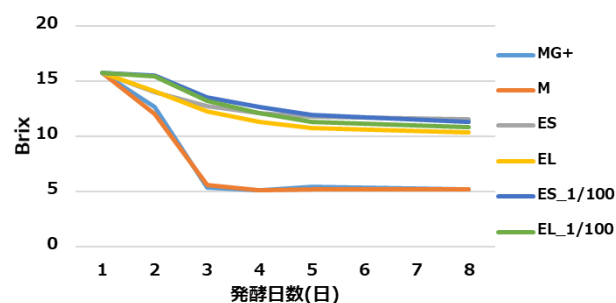


図3 Brix の変化

酒酵母は EL で発酵6日目に 4 [%] に至ったが、ES および添加量を 1/100 にした試験区では8日間の発酵終了時点で 4 [%] まで至らなかった。発酵終了時のアルコール濃度は、MG+が 8.6 [%]、Mが 8.7 [%]、ELが 4.3 [%]、EL1/100 が 3.8 [%]、ES1/100 が 3.4 [%]、ES が 3.2 [%] であった。

各試験区の Brix の変化を図3に示す。市販酵母は MG+、M のいずれも発酵3日目までに順調に減少し、アルコール生成が最大値となった3日目に Brix も下げ止まりとなった。一方、清酒酵母は Brix の減少が鈍く、緩やかに減少するものの、発酵終了とした8日目にも Brix が残っていた。さらに、酵母添加量が 1/100 の試験区の Brix は、発酵開始後2日目までほぼ横ばいで減少しなかった。発酵前の Brix は 15.7 で、8日後の Brix は ES が 11.3、ES1/100 が 11.3、EL1/100 が 10.8、EL が 10.3、M および MG+ が 5.2 まで減少した。

また、発酵3日目の試験区①~④を採取し、酵母を観察したところ、市販酵母は清酒酵母に比べて大きく、やや細長い形態を示した (図4)。特に、市販酵母 M では全体が膨潤し、巨大化した細胞が複数観察された。また、発酵もろみ 1 [ml] あたりの酵母細胞数は  $ES < EL \approx M < MG+$  であった (データ未掲載)。

香気成分については、発酵が旺盛な市販酵母の試験区において生成量が多かった (図5)。特にノルマルプロピルアルコールやイソアミルアルコール、イソブチルアルコールといった高級アルコールの生成量が多かった。また、酢酸エチル、酢酸イソアミル、カプロン酸エチルといったエステルについてもウィスキー酵母の生成量が多く、特にカプロン酸エチルについては、

市販酵母で発酵3日目まで認められる一方、清酒酵母では発酵期間中を通じて生成が確認されなかった。

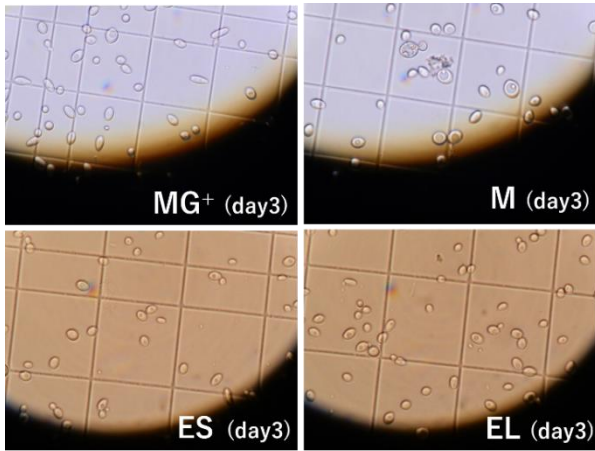
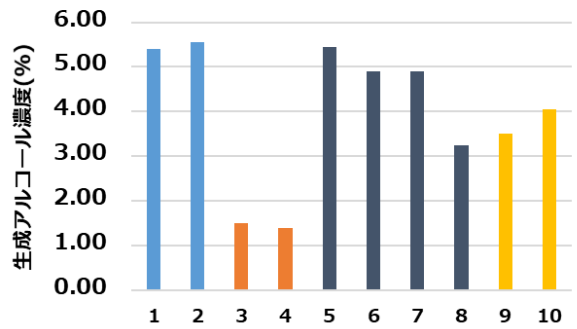


図4 発酵途中の酵母細胞の光学顕微鏡観察



市販麦汁発酵酵母	M	MG+	清酒酵母	ES	EL
M	○				
MG+		○			
清酒酵母			○		
ES				○	
EL					○

図6 酵母混合発酵時の生成アルコールの比較

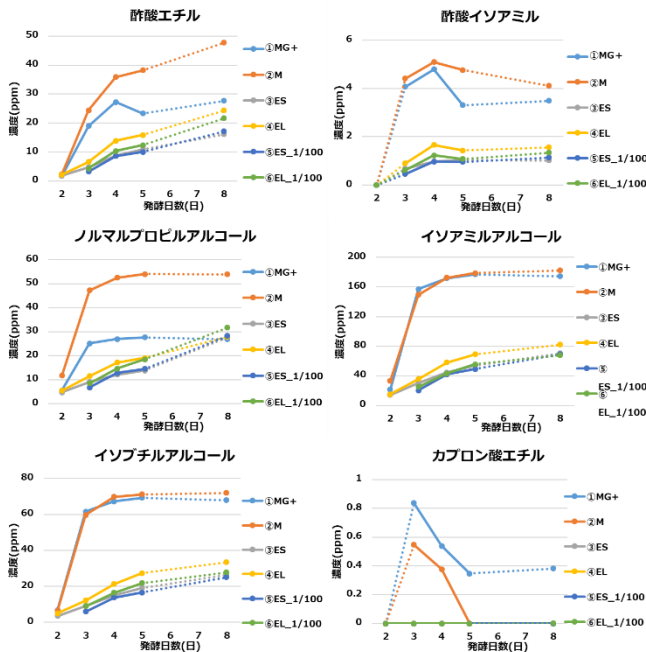


図5 香気成分の比較

### 3. 2. 清酒酵母と市販麦汁発酵酵母の混合発酵

酵母混合発酵終了後の生成アルコール濃度を比較すると、試験区5、6、7において市販酵母単独発酵時の生成アルコールと同程度のアルコール生成が確認された。一方、試験区8、9、10においては単独発酵よりもアルコール生成が鈍くなった(図6)。

香気成分については、試験区5、6、10で0.5~1.0[ppm]程度の酢酸イソアミルの生成が認められた。その他については3. 1. で得られた結果ほど大きな差は認められなかった(データ未掲載)。

## 4. 考察

### 4. 1. 清酒酵母と市販麦汁発酵酵母との比較

麦汁調製は、複数回実施したが、総量によって糖化速度が異なった(データ未掲載)。しかし、Brix16を達成するまでにかかった時間はいずれも30~90分程度、その後糖化時間の経過とともに上昇し、200分までの間でBrixが横ばいとなることはなかった。プラント規模で製造する場合、一番麦汁の糖度は20程度、二番麦汁の糖度は5~6程度で、これらを混和して糖度15程度とする。今回は、一番麦汁の糖度が17~18、二番麦汁の糖度は4程度とプラント規模よりも低くなった。これは試験規模が小さく、十分な糖化効率が得られなかったものと推測する。

麦汁の糖化は、麦芽中に含まれる酵素、ジアスターゼ(アミラーゼ)により行われ、デンプンからマルトースが生成する。今回、清酒酵母はアルコール生成が市販酵母の約半分、麦汁発酵性に乏しいことが示唆された。この理由の一つとして清酒酵母がマルトースからアルコールを生成しにくい特性を持っていることが考えられる。酵母を単離した工場に主に使用されていたのはきょうかい7号系が中心だったことから、今回試験に供した清酒酵母も7号系の特徴を有する可能性が高い。清酒酵母は、その種類や発酵温度によってアルコール生成に利用できる糖の種類が異なる。平成30年に行った研究<sup>1)</sup>において、20[°C]、5日間の試験区においてきょうかい7号系をはじめ、試験に供したすべての清酒酵母でマルトースの発酵性が乏しいことを確認した。このことから、清酒酵母は長期発酵に適しており、短期発酵では環境に順応するだけで発酵まで至らない可能性がある。高温短期発酵でアルコール生成する能力がなく、発酵完了時のアルコール濃度が低いと、その後の蒸留工程においてアルコール濃度を

高めるための蒸留回数が増え、製造期間の長期化およびコスト高につながる。そのため、現時点では清酒酵母単独での麦汁発酵は難しいと考えられる。

また、香気の生成についても、清酒酵母は低温長期発酵で良好な香気を生成する特性を持つ傾向があり、麦汁を用いた高温短期条件では清酒酵母の特性を十分に生かしきれず、十分な香気の生成に至っていない可能性が考えられる。

なお、清酒酵母を単独で麦汁発酵に用いる方法として、清酒酵母をマルトース発酵性株へ改良する方法<sup>2)</sup>、<sup>3)</sup>、そして、酵母は改良せず、麦汁のマルトースを酵素にてグルコースに変換し、清酒酵母が発酵可能な糖にして発酵させるという方法が考えられる。これらについては、今後検討していく予定である。

#### 4. 2. 清酒酵母と市販麦汁発酵酵母の混合発酵

清酒酵母は単独での高温短期間の麦汁発酵が困難と判断した。しかし、市販酵母との混合発酵において、市販酵母単独発酵と同程度のアルコールが生成できることが確認されたことから、清酒酵母は市販酵母に対するキラー性がなく、市販酵母の発酵を妨げないことがわかる。そのため、清酒酵母を単独で使用した高温短期麦汁発酵は困難であるが、酵母を混合すれば、清酒酵母を用いることが可能である。

また、清酒酵母はコハク酸や乳酸といった有機酸を高生産する特性がある。麦汁を原料として製造するウイスキーでは、発酵が完了した後、蒸留に供する前に乳酸菌による再発酵を伴う製法がある。乳酸菌により酵母が残した糖や有機酸が発酵され、より複雑な香味を呈し、これを蒸留することで、奥行きのある蒸留酒が得られる。すなわち、清酒酵母との混和発酵では、従来の市販酵母とは発酵もろみの有機酸組成が異なる可能性があり、乳酸菌発酵に伴い特有の香味を持つ酒類が製造できると考えられる。これについては追って実験、実証が必要であるが、清酒製造で用いられている生醗乳酸菌など蔵特有の乳酸菌を単離し、これを利用することで個性的な香味を有する酒類製造の実現も期待できる。

なお、ウイスキー製造についてはビール酵母を用いた報告がある<sup>4)</sup>が、清酒酵母を用いた報告はない。清酒酵母を用いたウイスキーはすでに県外の酒造メーカーによって製品化されているが、本研究により清酒酵母を用いた高温短期の麦汁発酵適性について評価することができた。これにより、酵母の特性を知り、その汎用性を高めるとともに、県産酒類全体の技術力および製品開発力の向上に寄与できるものと考えられる。

## 5. 結言

- ・清酒酵母を用いた麦汁発酵が可能か検証するため、麦汁での発酵試験を行った。
- ・麦汁の高温短期発酵条件では、十分なアルコール生成が得られないことがわかった。
- ・清酒酵母は市販の麦汁発酵酵母の発酵を妨げないことがわかった。
- ・清酒酵母と市販酵母の混合発酵により、高温短期の麦汁発酵が可能であることがわかった。

### 参考文献

- 1) 中島奈津子ほか,福島県オリジナル清酒製造技術の開発(第2報)-清酒酵母の糖発酵性に関する試験-,福島県ハイテクプラザ試験研究報告,67-68(2017)
- 2) Srdkan Novak. *et al.*, Sugar uptake in a 2'-deoxy-D-glucose resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. of Industrial Microbiology*,735-39(1991)
- 3) 関口昭博,製パン用酵母「美の和酵母」の改良研究,群馬県産業技術センター研究報告,9-12(2008)
- 4) 四方秀子,酵母特性がウイスキー原酒特性に及ぼす影響,日本醸造協会誌, 315-323(2006)