

自然界からの新たな香味を有する清酒醸造用酵母の開発（第3報）

— 河津桜から分離した酵母の清酒醸造特性 —

バイオ科 勝山 聡 天野祥吾 岩原健二
 静岡県酒造組合 高嶋一孝

Development of the *sake* yeast which produces new flavors from natural environment (3rd Report)— *Sake* brewing characteristics of yeast isolated from *Kawazu-zakura* —

Satoshi KATSUYAMA, Shogo AMANO, Kazutaka TAKASHIMA and Kenji IWAHARA

In recent years, the *sake* yeasts, which play an important role for *sake* brewing, has been isolated from natural environment like flowers. In previous report, the candidate strains for *sake* yeast have been isolated from shizuoka prefectural natural environment by enrichment culture screening and small-scale *sake* brewing test. In this report, about eleven hundred samples had been screened. As result, five samples were same level of fermentation ability compared with shizuoka prefectural original *sake* yeast HD-1. The forty strains were isolated from five samples and were predicted *Saccharomyces cerevisiae*. However, the fermentation ability of five strains selected randomly from forty strains were lower than HD-1 at early stage of small-scale *sake* brewing. The fermentation ability at early stage is important for making *shubo* (yeast mash). Then, seventy strains from culture of 3rd and 4th selection were applied to further selection and adaptation using *amazake* culture which is similar to a kind of *shubo*, twenty four strains which were reinforced its fermentation ability were isolated. The three strains which were selected from the twenty four strains had same level fermentation ability of HD-1 at early stage of small-scale *sake* brewing. The plant-scale *sake* brewing was tested using a strain derived from cherry blossom (*Kawazu-zakura*). The product showed sweet-sour taste with low alcohol content, that was different from *sake* brewing by conventional shizuoka prefectural *sake* yeast.

Keywords : *sake*, *Saccharomyces cerevisiae*, isolation, *Kawazu-zakura*.

キーワード：清酒、サッカロマイセス セレビスエ、分離、河津桜。

1 はじめに

近年、清酒業界は厳しい状況が続き、平成24年における全国の清酒製造数量は、平成元年の半分以下である¹⁾。本県においてもその減少量は、全国と比較すると緩やかではあるが、同様の状況となっている²⁾。消費者の嗜好の多様化や若年層の酒離れ等が原因として考えられており、このような状況を打破すべく本県酒造業界から地酒のさらなる差別化及び商品幅の拡大を図りたいとの要望がある。

近年、清酒の香味形成に重要な役割を果たす清酒醸造用酵母（以下、清酒酵母）の開発が地方公設試験等において広く行われ、各地域に咲く花等の自然界試料から清酒酵母の分離が行われている³⁻⁴⁾。これら酵母は、分離源の持つイメージから地域性や話題性のあ

る商品開発に使用され、地酒の差別化とブランド化にも貢献している。本県は、富士山をはじめとする豊かな自然やお茶やみかん等の多くの特産品を有している。そこで本研究では、静岡県地酒の更なる差別化及び商品幅の拡大を図るため、本県の豊かな自然を活用し、本県独自の清酒酵母の開発を目指した。これまでに、県内各地より採取した県特産品の花等の自然界試料から集積培養による酵母選抜及びベンチスケールによる清酒小仕込み試験を行い、いくつかの清酒酵母候補株を得ている⁵⁾。本報では、新たな自然界試料からの酵母選抜試験及び分離株による清酒小仕込み試験、馴化による高発酵性株の取得、河津桜由来の馴化株を用いたプラント規模による清酒製造実証試験を行ったので報告する。

2 方法

2.1 試験試料

分離源として、平成26年度に採取した自然界試料を表1に示す。採取方法等は既報⁶⁾に従った。また、各試料を適量ずつ採取した試験用チューブ1本を1試験区とし、試験に供した試験区数及び各選抜試験を通過した試験区数等を集計した。また、表1に示す試料の他に前報⁵⁾にて未試験の試料も用いた。

表1 自然界試料

試料名	採取場所	試験区数
河津桜	河津町、南伊豆町	400
ツツジ	沼津市	25
タチバナ(花)	沼津市戸田	397
サクラ樹液	沼津市	5
その他	-	125
合計		952

2.2 酵母選抜試験及び分離株の取得

酵母選抜試験は前報⁵⁾と同様に1～4次の4段階の集積培養により行った。4次選抜試験終了後、培地を滅菌水にて適宜希釈し、YPD寒天培地に塗布した。これを30℃にて2日間培養後、検出された単コロニーを取得して分離株とした。

2.3 清酒小仕込み試験

小仕込み試験は前報⁵⁾に従い、総米200gの三段仕込み(初添:12℃、仲添:8℃、留添:6℃)とした。なお、本報では、仕込み容量が少ない初添から踊までの期間において醪の乾燥や過度の品温低下等を防ぐため、仲添以降の本仕込み用容器よりも小容量の容器を枝桶として用いた。

2.4 甘酒様培地による分離株の選抜及び馴化

2.4.1 甘酒様培地の作製

甘酒様培地は、高温糖化酒母⁷⁾を参考とした。乾燥麹(G-50、徳島製麹(株)製)2.25gに汲水10.5ml及び乾燥麹補填水0.5mlを加え、40℃にて約2時間加温した。これにα化米(AA-50、徳島製麹(株)製)4.75g及びα化米補填水1.5mlを加え、55℃にて約24時間糖化した。これに汲水2.1ml及び乳酸65μlを加え、水浴中にて急冷し、甘酒様培地とした。

2.4.2 発酵能による分離株の選抜

分離株をYPD液体培地にて30℃、2日間培養した。この酵母培養液140μlを甘酒様培地に添加し、20℃に

て7日間培養した。経時的に培地の重量を測定し、その重量減少量をアルコール発酵に伴う二酸化炭素の放出量として発酵進度の指標とした。また、二酸化炭素の放出による培地中での気泡の発生を目視により観察した。

2.4.3 選抜株からの馴化株の取得

甘酒様培地において発酵を示した株の甘酒様培地培養液500μlをYPD液体培地10mlに添加し、30℃にて2日間培養した。この培養液140μlを新たな甘酒様培地に添加し、20℃にて7日間培養した。培養中は、2.4.2に示した方法と同様に、培地の重量測定及び観察を行った。培養終了後、培地を滅菌水にて適宜希釈し、YPD寒天培地に塗布した。これを30℃にて2日間培養後、検出された単コロニーを取得して馴化株とした。

2.5 清酒製造実証試験

実証試験は高嶋酒造(株)にて実施した。仕込み配合及び仕込み品温を表2に示す。米は、麴米及び掛米ともに静岡県産酒造好適米の誉富士(精米歩合60%)を使用した。留添後3日目に追水を添加し、26日目に自動醪圧搾機により上槽し製成酒を得た。

製成酒のアルコール度数及び日本酒度、酸度、アミノ酸度は国税庁所定分析法⁸⁾に従い分析した。

表2 清酒製造実証試験における仕込み配合

	酒母	初添	仲添	留添	追水	計
総米(kg)	21	42	84	153		300
麴米(kg)	6	12	18	24		60
掛米(kg)	15	30	66	129		240
汲水(l)	23	40	110	232	10	415

仕込み品温は、初添11.5℃、仲添8℃、留添6℃とした。
最高品温は、12℃とした。

3 結果および考察

3.1 自然界からの清酒醸造用酵母の分離

県内各地より季節の花や県特産品の花等を中心に、約950試験区採取した(表1)。これに前報⁵⁾にて未試験の約150試験区を合わせた約1,100試験区について酵母選抜試験を行った。この結果、41試験区が3次選抜を通過した。3次選抜において発泡性や増殖性が良好であった約30試験区について清酒醪様培地による4次選抜を行い、5試験区(試験区No.4及び2541、2987、3024、3216)が対照として用いた既存の静岡酵母HD-1とほぼ同等、またはそれ以上の発酵

力を示した（図1）。これより、この5試験区の4次選抜培地中には清酒醸造に必要な諸性質を有する酵母が存在すると考えられ、これら培地から1試験区につき8株ずつ合計40株（4(4)-1～8及び2541(4)-1～8、2987(4)-1～8、3024(4)-1～8、3216(4)-1～8）を分離した。分離株はいずれも白色からクリーム色で、平滑かつ湿性の *Saccharomyces cerevisiae* 様のコロニー形態であった。

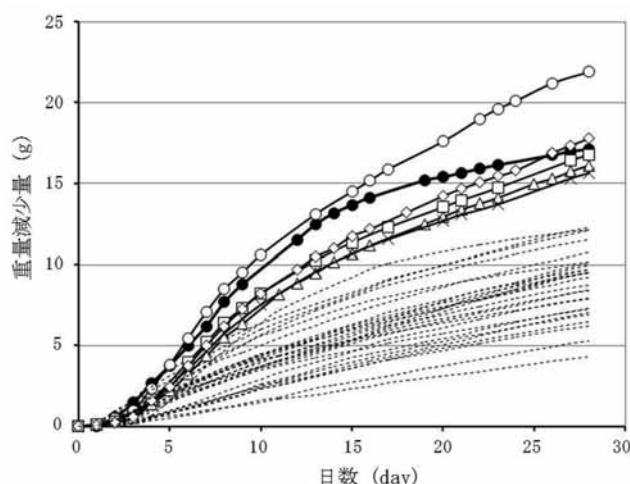


図1 4次選抜試験における培地の重量減少

●：HD-1
—：発酵が良好な試験区
○：No.4、△：No.2541、◇：No.2987、
□：No.3024、×：No.3216
…：発酵が緩慢な試験区

3.2 分離株を用いた清酒小仕込み試験

取得した分離株のうち各試験区由来の任意の5株（4(4)-1及び2541(4)-1、2987(4)-1、3024(4)-1、3216(4)-1）について清酒小仕込み試験を行った。対照としてHD-1及び前報⁵⁾にて取得した分離株で発酵が良好な540(4)-8株を用いた。この結果、5株はいずれも540(4)-8株と同様の発酵経過を示し、最終重量減少量はHD-1と比較しやや少なかった（図2）。製成酒成分についても5株はいずれも540(4)-8株と同等で、アルコール度数が約13%で酸度が約4.0であった（表3）。このことから、今回新たに取得した分離株は、前報⁵⁾にて取得した分離株と同様に、既存の静岡酵母とは異なる、「低アルコールかつ甘酸っぱい」酒質を示す酵母であった。なお、前報⁵⁾と比較し、HD-1の最終重量減少量及びアルコール度数は増加した（図2、表3）。これは枝桶の使用により醪の乾燥及び過度の品温低下等を防ぐことができ、順調に発酵が進んだためと考えられた。

これらの分離株に共通する特徴として、醪初期にお

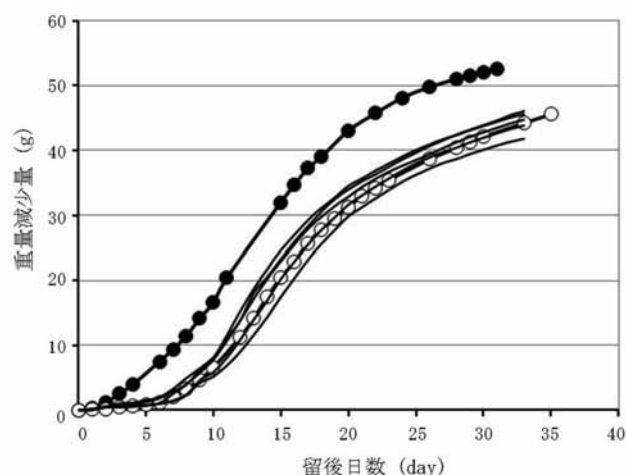


図2 分離株を用いた清酒小仕込み試験における醪の重量減少

●：HD-1、○：540(4)-8
—：分離株（4(4)-1、2541(4)-1、2987(4)-1、
3024(4)-1、3216(4)-1）

表3 分離株による清酒小仕込み試験の製成酒成分

酵母	アルコール分(%)	日本酒度	酸度
HD-1	15.65	-17	2.1
540(4)-8	13.05	-50	4.0
4(4)-1	12.75	-48	3.8
2541(4)-1	13.50	-46	3.8
2987(4)-1	12.80	-48	4.1
3024(4)-1	13.30	-45	4.2
3216(4)-1	12.20	-50	4.0

ける発酵力がHD-1と比較してやや緩慢であった（図2）。しかし、その後の最も発酵が活発な期間における1日当たりの重量減少量は、HD-1と分離株ではほぼ同等であった（図2）。そこで、この醪初期における発酵力の弱さは醪初期における増殖力に原因があると考え、分離株のうち任意の1株（540(4)-8株）について初添時の酵母添加量を3倍に増量して清酒小仕込み試験を行った。この結果、540(4)-8株（初発3倍量）はHD-1と同等の醪初期の発酵力を示した（図3）。このことから、540(4)-8株の醪初期の発酵力の弱さは、HD-1と比較して醪初期における増殖力が弱く、活発な発酵を示すために必要な酵母数となるまでに期間を要したためと考えられた。また、必要な酵母数に達した後は分離株もHD-1と同等の発酵力を示すことが可能と考えられた。しかし、540(4)-8株（初発3倍量）の最終重量減少量は、通常の初発酵母量で試験した540(4)-8株（初発1倍量）とはほぼ同等であった（図3）。また、

【報告】

製成酒成分においても両者はほぼ同じであった(表4)。このことから、HD-1に比べて540(4)-8株のアルコール生成が少なく酸生成が多いのは、醗初期における増殖力の弱さよりも株自体の性質によると考えられた。また、540(4)-8株以外の分離株についても、清酒小仕込み試験において540(4)-8株と同様の発酵経過及び同等の酒質を示すことから、540(4)-8株と同様の性質を有すると推察された。

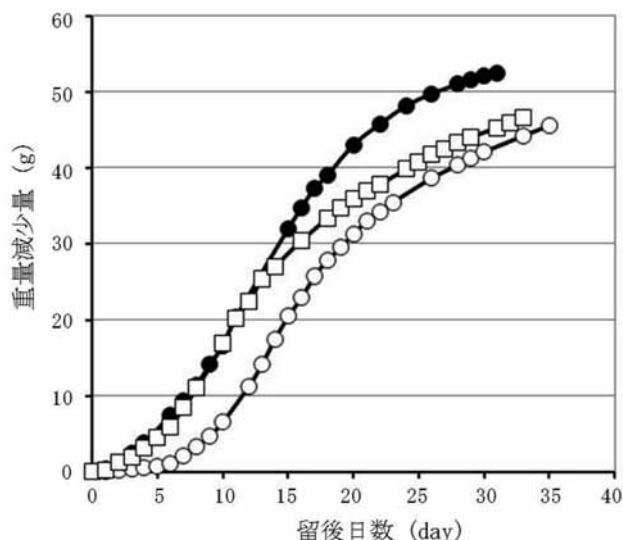


図3 初発酵母量の増量による清酒小仕込み試験の醗の重量減少

● : HD-1、○ : 540(4)-8 (初発1倍量)、
□ : 540(4)-8 (初発3倍量)

表4 初発酵母量の増量による清酒小仕込み試験の製成酒成分

酵母	アルコール分(%)	日本酒度	酸度
HD-1	15.65	-17	2.1
540(4)-8 (初発1倍量)	13.05	-50	4.0
540(4)-8 (初発3倍量)	13.20	-44	4.3

3.3 甘酒様培地による高発酵性株の取得

自然界から取得した分離株は、醗初期における増殖力が弱いことで発酵の立ち上がりに遅延が生じることがわかった。実験室規模による清酒小仕込み試験では仕込み規模が小さいために、多くの場合、YPD液体培地等の人工合成培地等にて前培養した酵母を、直接、初添時に醗へ添加する^{4, 9)}。しかし、実際の製造現場においては、1仕込みの規模が大きいため、三段仕込みにより醗を仕込む前に、まず酒母により酵母の拡大培養を行い、これをスターターとして初添時に醗へ添加する⁷⁾。よって、酒母においては、目的とす

る清酒酵母を製造工程の初期から速やかに、かつ支配的に拡大培養させ、野生酵母等による汚染を防ぐことが醸造安全性の面からも求められる。そのため、清酒小仕込み試験において醗初期の増殖力が弱かった分離株は、実際の酒母工程においても初期の増殖力が弱く、野生酵母等による汚染を受けやすくなることが懸念された。そこで、数種類ある酒母の中で比較的製造が容易な高温糖化酒母⁷⁾を参考に、乾燥麹で α 化米を糖化させた甘酒様培地を作製した。この培地にて、取得した分離株の一部及びこれらと分離源を同じとし、同様の方法にて3次培養液から取得した分離株の合計70株の発酵能を、HD-1を対照として評価した。この結果、HD-1は培養2日目から順調に培地の重量減少を示した(図4)が、分離株はほとんどが重量減少を示さなかった。しかし、培養6~7日目に3株(540(3)-9、2541(3)-8、2541(4)-10)が極僅かに培地の重量減少またはアルコール発酵に伴う気泡の発生を示した(図4)。酵母は、様々なストレス培地にて培養することによりストレス耐性を獲得することが知られており、この性質を利用した酵母の育種等も行われている¹⁰⁾。甘酒様培地も高糖度及び乳酸酸性等のストレス培地であり、これら3株は培養中に何らかのストレス耐性等の新たな形質を獲得し発酵が強化されたと推察された。

そこで、この3株について甘酒様培地にて再度培養を行った。この結果、3株とも最終的な重量減少量は

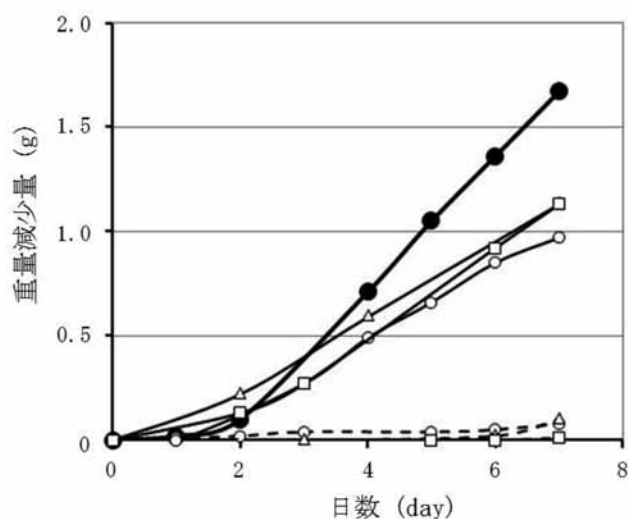


図4 甘酒様培地における重量減少

● : HD-1
 … : 発酵能評価にて僅かな発酵を示した3株
 (○ : 540(3)-9、△ : 2541(3)-8、
 □ : 2541(4)-10)
 - : 再度培養した3株
 (○ : 540(3)-9、△ : 2541(3)-8、
 □ : 2541(4)-10)

【報告】

HD-1より少なかったが、培養初期から順調に重量減少を示した（図4）。そこで、この培地から馴化株（540(3)-9S'-1～8、2541(3)-8S'-1～8、2541(4)-10S'-1～8）を分離した。これら馴化株について甘酒様培地における発酵能を評価したところ、いずれも分離前の培養液と同等の発酵を示した（図不掲載）。また、馴化株はYPD寒天培地上にて10回継代した後も同等の発酵を示し、この形質は安定的であることがわかった（図不掲載）。よって、これら馴化株は、実際の製造現場における酒母工程において安定的に健全な酒母製造が可能な株であると考えられた。なお、馴化株が獲得したと考えられるストレス耐性等の形質については、今後詳しく解析していく予定である。

3.4 馴化株による清酒小仕込み試験

甘酒様培地における発酵能が元株と比較して強化した馴化株は、清酒小仕込み試験においても元株と異なる発酵経過及び酒質を示すことが考えられた。そこで、馴化株のうち任意の3株（540(3)-9S'-1及び2541(3)-8S'-1、2541(4)-10S'-3）を用いて清酒小仕込み試験を行った。対照として、HD-1及びそれぞれの馴化株の元株を使用した。この結果、いずれの馴化株も醪初期においてHD-1と同等の発酵を示し、540(3)-9S'-1及び2541(3)-8S'-1は最終重量減少量が元株より増加した（図5）。また、この2株による製成酒は、元株よりアルコール度数が増加し、酸度は低下した（表5）。

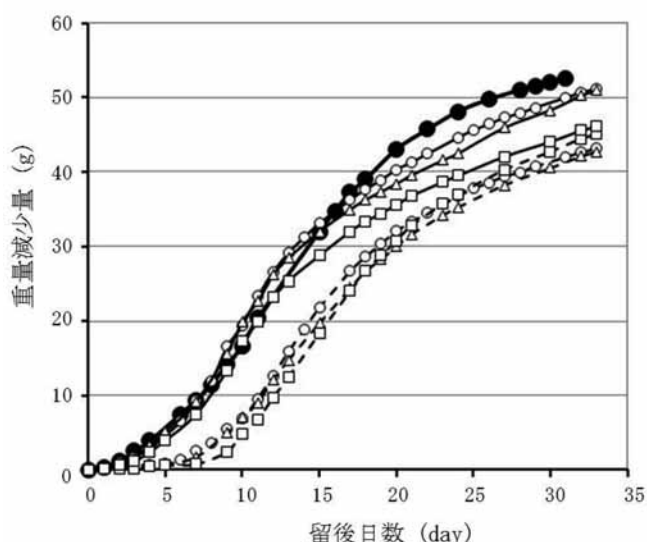


図5 馴化株を用いた清酒小仕込み試験における醪の重量減少

- : HD-1
- : 元株 (○ : 540(3)-9、△ : 2541(3)-8、□ : 2541(4)-10)
- : 馴化株 (○ : 540(3)-9S'-1、△ : 2541(3)-8S'-1、□ : 2541(4)-10S'-3)

以上より、馴化株は甘酒様培地だけでなく清酒小仕込み試験における醪においても発酵初期または全体の発酵力が強化されていた。よって、馴化株は、実際の製造現場における一連の清酒製造において十分使用可能であると判断された。また、540(3)-9S'-1及び2541(3)-8S'-1は、540-8株による初発酵母量を増量した試験とは異なり、醪の最終重量減少量及び製成酒成分に変化があったことから、醪初期における増殖力の強化だけでなく、アルコール生成能等も強化されたと考えられた。また、アルコール生成能の強化により、アルコールと同じくピルビン酸をもとに合成される有機酸¹¹⁾の生成量が減少し、製成酒の酸度の低下に影響したと考えられた。

表5 馴化株による清酒小仕込み試験の製成酒成分

酵母	アルコール分(%)	日本酒度	酸度
HD-1	15.65	-17	2.1
540(3)-9	12.75	-47	4.0
2541(3)-8	12.15	-51	3.4
2541(4)-10	13.20	-43	3.9
540(3)-9S'-1	14.85	-32	3.7
2541(3)-8S'-1	14.70	-36	2.9
2541(4)-10S'-3	13.40	-45	3.6

3.5 清酒製造実証試験

取得した馴化株は、実際の製造現場における清酒製造に使用可能であると判断できたため、プラント規模における清酒製造実証試験を行った。馴化株のうち、540(3)-8S'-1～8は沼津市内より採取したムクゲの花を、2541(3)-8S'-1～8及び2541(4)-10S'-1～8は南伊豆町より採取した河津桜を分離源としている。そこで、発酵が良好で地域性のある河津桜由来の2541(3)-8S'-1株を実証試験株として選定した。得られた製成酒は、アルコール度数が約13%で酸度は約3.0であった（表6）。このことから、実証試験株2541(3)-8S'-1は、プラント規模における清酒製造においても既存の静岡酵母にはない「低アルコールかつ甘酸っぱい」酒質を示すことがわかった。なお、今回の実証試験は一般的な吟醸酒と同様の製造方法にて行ったが、清酒小仕込み試験よりも製成酒のアルコール度数は低かった。この原因として、仕込み配合や品温管理の違い等が考えられたため、今後は、より酵母に適した製造方法について検討していく予定である。

表6 清酒製造実証試験における製成酒成分

酵母	アルコール分(%)	日本酒度	酸度	アミノ酸度
2541(3)-8S' -1	12.85	-41	3.1	2.3

4 まとめ

静岡県の豊かな自然から清酒醸造に適した性質を有する分離株を取得した。これら分離株は、清酒小仕込み試験において、既存の静岡酵母とは異なる特徴的な酒質を示したが、醪初期における発酵力が緩慢であった。醪初期の発酵力の弱さは、製造現場での酒母工程にて野生酵母等による汚染を招くことが懸念されたため、高温糖化酒母を模した甘酒様培地による分離株の選抜及び馴化により、醪初期の発酵力が強化された馴化株を取得した。このうち、発酵が良好で地域性のある河津桜由来の株を用いて清酒製造実証試験を行ったところ、「低アルコールかつ甘酸っぱい」酒質を示した。

謝辞

本研究を行うにあたり、実験方法等について御指導いただきました東京農業大学応用生物科学部醸造科学科 進藤斉准教授に深く感謝いたします。また、試料採取に御協力いただいた河津町役場及び戸田森林組合、静岡県農林技術研究所の関係各位に深く感謝いたします。

参考文献

1) 国税庁課税部酒税課：酒のしおり。(2014.3公表)。

- 2) 国税庁：清酒製造業の概況（平成25年度調査分）。(2014.11公表)。
- 3) 柏木亨：桜から分離した酵母による清酒の商品化。日本醸造協会誌，97，2-6（2002）。
- 4) 大橋正孝 他：ナラノヤエザクラの花から有用な酵母の分離とそれを使った清酒の開発。奈良県工業技術センター研究報告，35，35-38（2009）。
- 5) 勝山聡 他：自然界からの新たな香味を有する清酒醸造用酵母の開発（第2報）。静岡県工業技術研究所研究報告，第7号，49-53（2015）。
- 6) 勝山聡 他：自然界からの新たな香味を有する清酒醸造用酵母の開発（第1報）。静岡県工業技術研究所研究報告，第6号，61-62（2014）。
- 7) (財)日本醸造協会：酒母，「増補改訂清酒製造技術」，増補改訂新版（(財)日本醸造協会，東京），石川雄章 他 編集，pp.167-210（2009）。
- 8) (財)日本醸造協会：清酒、合成清酒，「第四回改正国税庁所定分析法注解」，第四回改正版（(財)日本醸造協会，東京），注解編集委員会 編集，pp.7-33（1993）。
- 9) 難波康之祐 他：小仕込試験法の設定。日本醸造協会雑誌，73（4），295-300（1978）。
- 10) 山岡千鶴 他：高濃度エタノール存在下において清酒酵母の生育を促進する温度ストレス処理条件。三重県工業研究所研究報告，38，74-77（2014）。
- 11) 浅野忠男：清酒酵母の有機酸生成に関する研究。生物工学会誌，85（2），63-68（2007）。