

クリベロミセス ラクティス酵母を用いた清酒小仕込試験

栗田 修*, 中林 徹*, 山崎栄次*

Small Scale-Sake Brewing with Yeast *Kluyveromyces lactis*

Osamu KURITA*, Toru NAKABAYASHI*, and Eiji YAMAZAKI*

Keywords: Sake, Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, Mixed culture

1. はじめに

清酒の消費者ニーズの多様化に伴い、数多くの清酒酵母が育種されてきた。特に、吟醸酒の品質向上を目的に育種された高エステル生産性酵母^{1), 2)}は吟醸酒の消費拡大に貢献した。また、従来の清酒とは酸味の異なる清酒製造用に、リンゴ酸を多く生産する酵母なども育種されている³⁾。

一方、清酒酵母単一では得られにくい品質、例えば特定名称酒としての吟醸酒において、タイプの異なる複数の清酒酵母による混合培養法を利用することで、もろみ後半でのメーターの切れが改善され、淡麗な味の滑らかな吟醸酒が製造されている⁴⁾。著者らは、異なる清酒酵母同士の混合培養法とは異なる清酒酵母と非清酒酵母による混合培養法により、清酒の品質多様化の可能性を検討している。前報の中で、清酒酵母との混合培養にクリベロミセス ラクティス酵母を利用することで、清酒中の香気成分の改善効果が認められたことを報告した⁵⁾。本研究では、清酒酵母とクリベロミセス属酵母の混合培養法において、清酒製造条件が清酒の品質に及ぼす影響を検討した。

2. 実験方法

2.1 使用菌株

清酒酵母は協会 701 号 (K-701) を使用した。非

清酒酵母にクリベロミセス ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) NBRC1903-P2 を使用した。

表 1 仕込配合

	添	仲	留	計
総米(g)	75	155	270	500
蒸米(g)	55	120	215	390
麴米(g)	20	35	55	110
活性酵母(mL)	20			
乳酸(mL)	0.5			
水(mL)	195	250	330	775
非清酒酵母は清酒酵母の菌数に対して1, 5, 40倍と変えて酵母菌体として添加				
活性酵母=清酒酵母協会701号20mL				

2.2 清酒小仕込試験

小仕込試験は総米 500 g の仕込を行い、原酒を製造した。麴米には 60% 精米の乾燥麴 (徳島精工 (株) 製) を使用し、掛米には 60% 精米の α 化米を使用した。酒母はポーメ 5 の麴汁で 30 °C 2 日間培養したものをを用いた。発酵温度は 15 °C とし、留添後 21 日後に上槽した。仕込 1~5 号に用いた仕込配合を表 1 に示した。清酒酵母と非清酒酵母の混合比率を 1:1, 1:5, 及び 1:40 とした時の仕込をそれぞれ仕込 2 号, 3 号及び 4 号とした。なお、非清酒酵母は清酒酵母培養液 20 mL に対して 20 mL (1:1), 100 mL (1:5), 800 mL (1:40) の培養液で培養した菌体を遠心分離 (3,000 rpm, 15 分) により回収した後、仕込に使用した。また、対照には協会 701 号の単一酵母を使用した (仕込 1 号)。仕込 6, 7 号の仕込配合をそれぞれ表 2, 3 に示す。また、仕

*食と医薬品研究課

込 8 号は仕込 6 号と同様の仕込配合を用い、仕込 9、10 号の仕込配合は表 4、5 に示した。

表 2 仕込配合 (仕込 6 号)

	添	仲	留	計
総米 (g)	75	155	270	500
α 化米 (g)	55	120	215	390
麴米 (g)	20	35	55	110
活性酵母 (mL)	20			
乳酸 (mL)	0.5			
水 (mL)	205	260	340	805

表 3 仕込配合 (仕込 7 号)

	添	仲	留	計
総米 (g)	75	155	270	500
α 化米 (g)	55	120	215	390
麴米 (g)	20	35	55	110
活性酵母 (mL)	20			
乳酸 (mL)	0.5			
水 (mL)	215	270	350	835

2. 3 分析

製成酒の一般成分は国税庁所定分析法に基づいて測定した⁶⁾。香気成分の分析は、ヘッドスペースガスクロマトグラフィーにより行った⁷⁾。アミノ酸は、高速液体クロマトグラフ法によりポストカラム誘導体化—蛍光検出法にて測定した⁸⁾。

表 4 仕込配合 (仕込 9 号 (湧き進め型))

	添	仲	留	計
総米 (g)	80	175	245	500
α 化米 (g)	60	130	195	385
麴米 (g)	20	45	50	115
活性酵母 (mL)	20			
乳酸 (mL)	0.5			
水 (mL)	210	280	310	800

表 5 仕込配合 (仕込 10 号 (湧き抑え型))

	添	仲	留	計
総米 (g)	70	135	295	500
α 化米 (g)	55	100	230	385
麴米 (g)	15	35	65	115
活性酵母 (mL)	15			
乳酸 (mL)	0.5			
水 (mL)	200	250	360	810

3. 結果と考察

3. 1 酵母混合比率の影響

製成された清酒の一般成分分析と製成歩合の結果を表 6 に示す。また、製成酒の香気成分を表 7 に示す。製成酒の一般成分分析結果から、清酒酵母単独と混合培養とは大きな差は認められなかった。しかしながら、表 7 の結果に示すように混合培養の混合比率 1:1 の時に、バナナ様の香りを呈する酢酸イソアミルが高いことがわかる。また、非清酒酵母を清酒酵母の 40 倍使用した場合、オフフレーバー

となる酢酸エチルが製成酒中に多く蓄積した。このことは、非清酒酵母由来の酢酸エチルの生成が増加したことによるものと考えられる。事実、クリベロミセス属酵母は酢酸エチルを生成することが知られている⁹⁾。さらに、非清酒酵母 40 倍使用では、フーゼル油臭としてのイソアミルアルコールが多く蓄積することからも官能的に好ましくない。混合比率の 1:1 と 1:5 を比較した場合、アルコール取得量の点で 1:1 の方がその値が高いこと、さらに香気成分の分析結果から好ましい香気成分である酢酸イソアミルが高いことから、以後の実験については酵母の混合比率を 1:1 とすることとした。

表 6 製成酒の一般成分分析及び製成歩合

	日本酒度	アルコール分	酸度	アミノ酸度	アルコール取得量
仕込1号	-16	19.8	3.01	1.65	278
仕込2号	-14	20.0	3.00	1.62	286
仕込3号	-17	19.4	3.03	1.69	277
仕込4号	-12	20.3	3.02	1.53	288

仕込1号 協会701号単独、仕込2-4号混合培養(クリベロミセス属酵母を清酒酵母に対してそれぞれ1、5、40倍使用)

表 7 製成酒の香気成分

	酢酸イソアミル	イソアミルアルコール	カブロン酸エチル	酢酸エチル
仕込1号	4.99	166.9	1.28	54.2
仕込2号	6.02	176.4	1.27	63.9
仕込3号	5.21	170.6	1.35	58.4
仕込4号	7.07	216.5	1.30	190.3

単位: ppm

3. 2 汲水歩合の影響

清酒の酒質に影響を与える因子の一つに汲水歩合がある。汲水歩合の大小は、品温の高低と同様に発酵速度に大きな影響を与える。このことから、本研究では異種酵母間の混合培養(清酒酵母:非清酒酵母=1:1)における汲水歩合を 155%から 167%まで変化させたときの酒質及び発酵特性について検討を行った。汲水歩合 155%、161%、167%の仕込はそれぞれ仕込 5、6、7 号に相当する。図 1 に示すように、炭酸ガスの放出量は汲水歩合の上昇に伴い増加し、発酵速度が増加することが明らかとなった。このことは、表 8 の製成された清酒におけるアルコール取得量と一致した。日本酒度に注目した場合、汲水歩合が 155%では酒が甘くなる傾向にあり、現在辛口・濃醇な酒質を求めている消費者の嗜好性とはかけ離れている。官能評価の結果を考慮し、汲水歩合 161%が酒質・酒造適性として最も良好であると判断した。

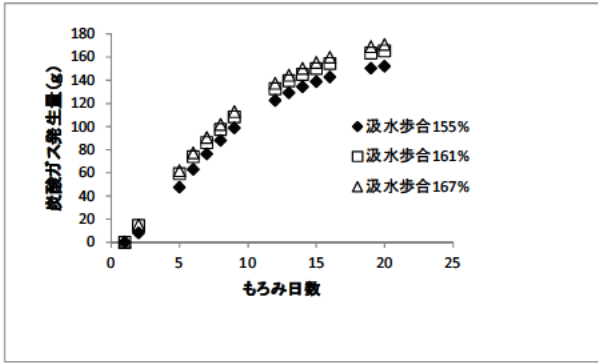


図 1 汲水歩合の発酵速度への影響

表 8 製成酒の一般成分分析及び製成歩合

	日本酒度	アルコール分 (%)	酸度	アミノ酸度	アルコール取得量	官能評価	汲水歩合 (%)
仕込5号	-18	19.1	4.96	1.61	266	x	155
仕込6号	0	20.8	3.13	1.51	340	○	161
仕込7号	3	20.6	3.19	1.46	362	△	167

3. 3 発酵形式の影響

仕込配合は酒質に大きな影響を与えると共に酵母の発酵形式を決定する。三段仕込みの場合、添の総米に対する割合を大きくした場合には酵母の増殖が速くなり、また留の割合を多くした場合にはもろみ前半での発酵は遅れる。今回の実験では、仕込6号の仕込配合を基準とし（仕込8号）、酵母の湧き進め型（仕込9号）と湧き抑え型（仕込10号）の仕込配合の変化による酒質の影響を検討した。製成酒の分析（表9）から、湧き進め型ではややアルコールの生成が低くアルコール取得量も低かった。その原因として、湧き進め型（仕込9号）はもろみ前半での酵母の増殖が良いためにアルコールの生成量は初期の段階で高いことが考えられ、もろみ後半では自ら生成したアルコールにより生育阻害を受けたものと考えられる。また、今回の仕込試験では15℃の一定温度で発酵を行っており、この温度ではアルコールに対する酵母の生育阻害を受けやすい環境条件となっている。湧き抑え型（仕込10号）では、他の仕込と比べて酸度が高くなった。これは、もろみ前半での酵母の増殖が抑えられ、最高酵母密度になるまでの酵母の出芽増殖に伴う酸生成が高かったものと推定される。なお、日本酒度、アミノ酸度は発酵形式の違いによる大きな差は認められなかった。官能評価では仕込9号が最もよく、旨味がありなお且つ味が滑らかであった。その原因を調べるために、製成酒のアミノ酸分析及び有機酸分析を行った。

表 9 製成酒の一般成分分析及び製成歩合

	日本酒度	アルコール分 (%)	酸度	アミノ酸度	アルコール取得量	官能評価
仕込8号	-3	20.6	2.84	1.54	326	△
仕込9号	-4	19.6	2.91	1.60	306	○
仕込10号	-3	20.5	3.27	1.58	326	x

表 10 製成酒のアミノ酸分析

	仕込8号	仕込9号	仕込10号
Asp	0.72	0.75	0.74
Thr	1.16	1.18	1.18
Ser	0.82	0.86	0.86
Glu	1.80	1.79	1.75
Pro	4.95	5.12	4.84
Gly	1.84	1.89	1.91
Ala	4.67	4.89	4.78
Val	0.95	0.97	0.98
Met	0.50	0.56	0.52
Ile	0.53	0.54	0.54
Leu	1.26	1.30	1.31
Tyr	0.73	0.76	0.77
Phe	0.72	0.74	0.75
His	1.07	1.11	1.11
Lys	0.82	0.89	0.86
Arg	1.67	1.71	1.71
SUM	24.2	25.1	24.6

単位: $\mu\text{mol/mL}$

表 11 製成酒の有機酸分析

	仕込8号	仕込9号	仕込10号
Citrate	7.6	8.5	11.0
Malate	211.7	192.3	193.1
Succinate	681.7	623.9	629.9
Lactate	766.5	820.9	773.9
Acetate	197.3	220.8	247.2
SUM	1864.8	1866.4	1855.1

単位: mg/L

アミノ酸分析において、仕込9号の製成酒はプロリン (Pro) とアラニン (Ala) がやや多く検出された（表10）。プロリンは甘酸味、アラニンは強甘味を呈する¹⁰⁾ことから、アミノ酸組成が仕込9号の製成酒の良い官能評価に影響したと推定される。表11に示すように、仕込配合の違いにより有機酸組成がかなり変化しており、その組成が製成酒の官能評価に大きく影響していると推定された。仕込9号では乳酸 (Lactate) が高く、仕込10号では酢酸 (Acetate) が高くなった。このことは、仕込9号

では嫌氣的なピルビン酸 (Pyruvate) から乳酸への還元反応が進み, 一方仕込 10 号ではアセトアルデヒドから酢酸への酸化反応が進んだことを示唆する.

4. まとめ

クリベロミセス ラクティス酵母と清酒酵母の混合培養法により清酒小仕込試験を行った. 清酒酵母と非清酒酵母の混合比は 1:1 が香気成分の観点から好ましく, 汲水歩合は標準型よりもやや高めの方がアルコール収得量も高くなり, 官能的にも良好であった. また, 発酵形式は湧き進め型が官能的に良好で, その原因としては, 清酒中のアミノ酸としてアラニン, プロリンの含量が高いことが推察された.

5. 参考文献

- 1) 稲橋正明: “きょうかい酵母清酒用 1701 号”. 日本醸造協会誌, 96, 679-687 (2001)
- 2) 吉田清: “きょうかい酵母清酒用 1801 号”. 日本醸造協会誌, 101, 910-922 (2006)
- 3) 栗田修他: “非乳酸資化性リンゴ酸デヒドロゲナーゼ低生産性酵母の育種”. 日本醸造協会誌, 93, 555-561 (1998)
- 4) 宮尾俊輔: “きょうかい 1801 号を用いた混合仕込”. 日本醸造協会誌, 103, 742-749 (2008)
- 5) 栗田修他: “清酒酵母とクリベロミセス属酵母と

の混合培養による発酵試験”. 三重県工業研究所研究報告, 36, 81-84 (2012)

6) 第四回改正国税庁所定分析法注解, 注解編集委員会編, 日本醸造協会 (1993)

7) O. Kurita: “Increase of acetate ester-hydrolysing esterase activity in mixed cultures of *Saccheomyces cerevisiae* and *Pichia anomala*”. *J. Appl. Microbiol.*, 104, 1051-1058 (2008)

8) M. H. Joseph and P. Davies: “Electrochemical activity of o-phthalaldehyde-mercaptoethanol derivatives of amino acids: Application to high-performance liquid chromatographic determination of amino acids in plasma and other biological materials”. *J. Chr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 125-136 (1983)

9) Jiang, J. “Volatile metabolites produced by *Kluyveromyces lactis* and their changes during fermentation. ” *Process Biochem.*, 30, 635-640 (1995)

10) 醸造物の成分, 日本醸造協会編集, 日本醸造協会 (1999)