

滋賀県オリジナル酵母に関する研究 —自然界からの清酒醸造用酵母の分離と製品への応用— (第2報)

松尾 啓史*
MATSUO Yoshifumi

岡田 俊樹*
OKADA Toshiki

川島 典子*
KAWASHIMA Noriko

要旨 センターの保有する酵母ライブラリーを豊かにすることを目的とし、前報では県内のシャクナゲやひまわりといった環境資源から145株の酵母候補株を分離した。麴汁培地を用いた簡易発酵試験では、既存の醸造酵母と同等のアルコール発酵を示す株を複数確認している。本報では、酒米を用いた醸造試験を実施し、清酒醸造への利用が期待できる23株を選抜した。また、これらの株の26SrRNAD1/D2領域の塩基配列解析の結果、23株中22株が酒類醸造に用いられている *Saccharomyces cerevisiae*であることを確認した。

1 緒言

近年、消費者の嗜好は多様化が進んでおり、香りの高い吟醸酒や米の味を活かした純米酒など高付加価値な特定名称酒の割合が増加してきている。加えて、微発泡性の清酒や低アルコール酒、生酏・山廃造りの復刻など多様化に合わせて幅広い商品展開が行われている。滋賀県では令和4年度に国税庁より、地理的表示保護制度であるGI「滋賀」(清酒)の認証を受け、より滋賀に特化した製品や海外輸出・インバウンドに向けた製品など、多様化する市場のニーズに対応し、なおかつ滋賀県の特色やオリジナル性を持つ清酒の開発が課題となっている。

清酒の品質には、原料米の品種や精米歩合、用いる麴菌や酵母の種類、発酵経過の管理条件等様々な要因が寄与している。なかでもアルコール発酵を担っている酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)は香気に影響するエステル類や味に影響する有機酸・アミノ酸の生成を行っており、どの菌株を用いるかは製品を特徴づける大きな要因である。

このような背景から、全国の自治体や大学などで特徴的な酵母菌株の分離・開発が行われている^{1,2)}。当センターでも、高品質な特定名称酒の醸造に向けた高香気生成酵母であるIRCS-SC9、IRCS-YS003F5の2株を開発し^{3,4)}、県内清酒醸造所に向けて菌株の分譲を行っている。

一方で当センターでは滋賀県の自然環境からの酵母の分離は行われてこなかった。滋賀県は豊かな自然を有しており酵母の分離源となる環境資源が潤沢であるとともに、中心には大きな琵琶湖が位置していることから多様な酵母が生息している可能性がある。

このような背景から、県内の環境資源から酵母分離を行い、145株の候補株を獲得することができた。麴汁培地を用いた発酵試験では、72株が既存の醸造用酵母と同程度のアルコール生成能を有していることが確認できており、清酒醸造への利用が期待できる⁵⁾。本報では、酒米を用いて総米50 g、200 gでの醸造試験を実施し、酵母の醸造特性を確認するとともに菌株の選抜を実施した。

* 食品・プロダクトデザイン係

2 実験方法

2.1 供試菌株

本研究では、前報⁵⁾にて既存酵母と比較して50%以上のアルコール発酵能を示した88株のうち、性質が類似する株を除外し40株を供試菌株とした。

2.2 小仕込醸造試験1(総米約50 g)

供試菌株をYPD液体培地(1%酵母エキス、2%ペプトン、2%デキストロス)で前培養を行い、1段の小仕込醸造試験を行った。仕込配合は、 α 化米(精米歩合60%白米、徳島製麴株式会社製)39 g、麴(精米歩合60%センター製)14 g、汲水(蒸留水)80 ml、乳酸0.3 ml、酵母培養液4 mlで行い、15°Cで、15日間培養を行った(表1)。発酵終了後、遠心分離(3000 rpm., 20 min.)にて製成酒を得た。製成酒の分析は、酒類総合研究所標準分析法注解⁶⁾に従い香気成分と一般成分分析を測定した。なお比較には清酒醸造に用いられている、きょうかい酵母K701、K901、K1401およびセンター分譲酵母KKK-S、IRCS-YS003の5株を使用した。比較に用いたこれらの酵母を以降、既存酵母と表記する。

2.3 小仕込醸造試験2(総米200 g)

総米50 gスケール試験で選抜した菌株を用いて、総米200 gスケールの酒母省略3段小仕込醸造試験を行った。50 gスケールと同様に菌株の培養を行い、表2に示す仕込み配合で試験を実施した。掛米は α 化米(精米歩合70%白米、徳島製麴株式会社製)、麴は(山田錦 精米歩合60%センター製)を使用した。仕込温度は、初添 15°C、仲添 12°C、留添 10°Cとし、留添の翌日から1日1°Cずつ昇温して、15°Cに達してから発酵終了まで保持した。発酵期間中は、重量減少を測定した。発酵の終了は、重量減少が少なくなった21日目(重量減少の遅い株は23日)とし、遠心分離(3000 rpm., 20 min.)にて製成酒を得た。製成酒の分析は、酒類総合研究所標準分析法注解⁶⁾に従い香気成分と一般成分分析を測定した。

表1 総米約50 gスケール試験仕込み配合

総米(g)	53.0
α化米(g)	39.0
麴米(g)	14.0
汲水(ml)	100.0
乳酸(ml)	0.3
培養酵母(ml)	4.0

表2 総米200 gスケール試験仕込み配合

	初添	仲添	留添	合計
総米(g)	35.0	70.0	95.0	200.0
α化米(g)	23.0	57.0	75.0	155.0
麴米(g)	12.0	13.0	20.0	45.0
汲水(ml)	55.0	85.0	130.0	270.0
乳酸(ml)	0.2			0.2
酵母(ml)	2.0			2.0

2.4 遺伝子配列に基づく選抜株の同定

200gスケール試験に供した23株について、26S rRNAD1/D2 領域の遺伝子配列を確認し、種の同定を行った。

3 結果と考察

3.1 小仕込醸造試験1(総米約50g)

総米50 gスケール試験のアルコール濃度の結果を図1に示す。既存酵母はアルコール16%程度のアルコール発酵を示した。分離株は40株中19株がと同等(15%以上)、9株が既存酵母よりやや低い値を示した(8~15%)。残りの7株はアルコール8%未満であった。清酒醸造に用いるうえで、アルコール濃度8%未満の株は発酵力が乏しいと判断し、以降の選抜からは除外した。

また、製成酒のアミノ酸度を横軸、酸度を縦軸にプロットしたものを図2に示す。選抜株は①既存酵母に近いグループ(図2 オレンジ円)、②既存酵母より酸度がやや高いグループ(図2 緑円)、③上記に属さず酸度またはアミノ酸度が高い株(図2 紫点)の3つに分類された。アルコール濃度に着目すると③に属する株にはアルコールが8%以下の株が集中していた。

香気成分の分析値を用いて主成分分析を行ったところ、図2における①グループは吟醸香であるカプロン酸エチルや酢酸イソアミルが高い傾向がみられた。②、③グループでは全体的に香気成分は低い傾向にあり、③グループの一部の株では酢酸エチルが高い値を示した。

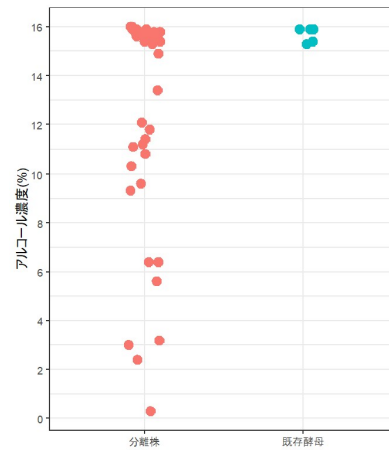


図1 50 gスケール試験 アルコール濃度

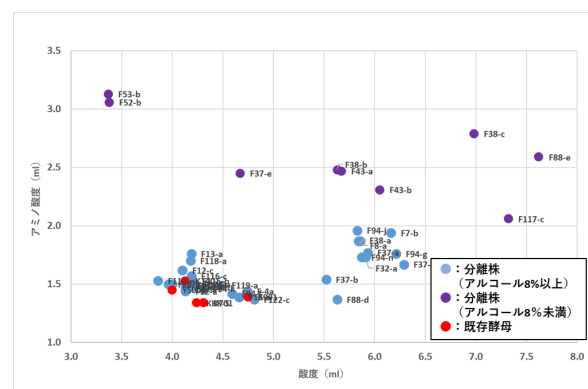


図2 50 gスケール試験 アミノ酸度・酸度分布

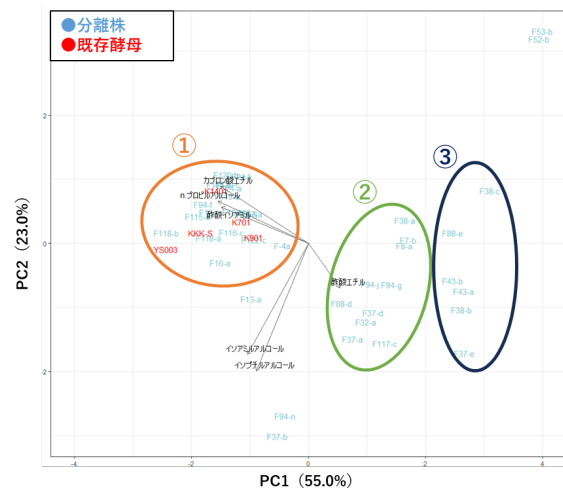


図3 50 gスケール試験 香気成分

3.2 小仕込醸造試験2(総米200g)

総米50 gスケール試験にて選抜した株を用いて、総米200 gスケールの小仕込み醸造試験を行った。アルコール濃度の結果を図4に示す。

既存酵母はアルコール濃度18%を示し、50 gスケール試験の16%よりも高い値となった。選抜酵母も同様に50 gスケール

ール試験よりもアルコール濃度が高い傾向を示し、23株中15株がアルコール濃度18%以上と既存酵母と同等のアルコール発酵能を示した。また、既存酵母よりアルコール濃度が低い傾向にあった株は、50 gスケール試験においても同様にアルコールが低い株であり、醪でのCO₂の減少が緩慢な株(23日目上槽)に集中していた。

また、酸度・アミノ酸度に注目すると、50 gスケール試験と同様に既存酵母の近くに分布する株とやや酸度が高い傾向にある株の2つに大別された。これらのグループに属する株は50 gスケール試験の図2の①、②の構成株とほとんど一致しており、菌株の性質が安定していることが示唆された。

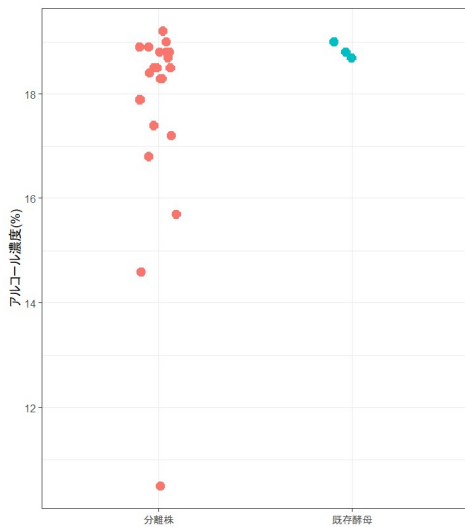


図4 総米200 gスケール アルコール濃度

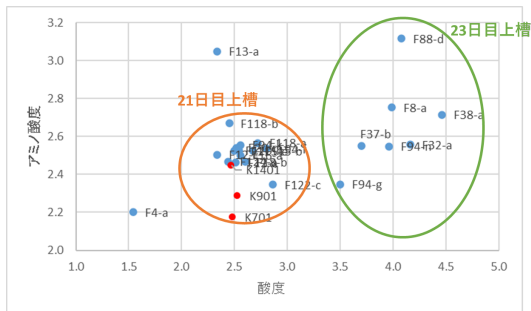


図5 総米200 gスケール 酸度アミノ酸度

香気成分の分析値を用いて主成分分析を行ったところ、既存酵母の付近に分布しカブロン酸エチルや酢酸イソアミルが比較的高い株と、全体的に香気成分値が低い株に大別された(図6)。この分類は醪の重量減少、酸度アミノ酸度の分布においても同じようにグルーピングされていることから、2系統の酵母を獲得していることが示唆された。

また、それぞれの株は50 gスケール試験と同様の傾向を示しており、形質的に安定していることが示唆された。

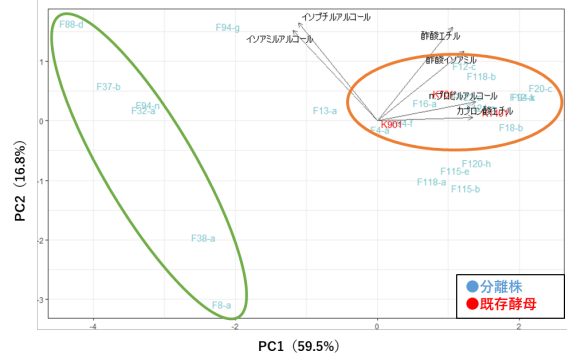


図6 総米200 gスケール 香気成分

3.3 遺伝子配列に基づく選抜株の同定

200 g醸造試験に供した菌株について26S rRNA/D2領域の遺伝子配列を確認したところ23株中22株が既知の*S.cerevisiae*の配列と非常に高い相同性を示したため、これらの株は*S.cerevisiae*であることが示唆された(表3)。

表3 総米200 gスケール 供試菌株同定結果

株名	分離源	同定結果
F4-a	ゴールドコイン	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F8-a	モチツツジ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F12-a	キンシバイ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F12-c	キンシバイ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F13-a	キンシバイ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F16-a	ヒメジオン	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F18-b	バエテリア・フォエタイダ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F20-c	ユリ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F32-a	ツバキ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F37-b	クチナシ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F38-a	ツバキ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F88-d	ツキミソウ	<i>Lachancea thermotolerans</i>
F94-f	シャクナゲ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F94-g	シャクナゲ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F94-k	シャクナゲ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F94-n	シャクナゲ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F115-b	ヒマワリ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F115-e	ヒマワリ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F118-a	ウツギ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F118-b	ウツギ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F120-h	ウツギ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F122-c	ミニバラ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F124-a	サルスベリ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

4 まとめ

滋賀県内の環境資源をから獲得した酵母候補株から選抜した40株について、酒米を用いた醸造試験を実施した。選抜株の中には清酒醸造に十分なアルコール発酵能を有するものが複数存在しており、既存酵母に近いグループとやや酸度が高く香り成分が低いグループの2系統の酵母を獲得していることが確認できた。これらの株は50 gスケール、200 gスケールともに同様の傾向がみられたことから、菌株の性質は安定していることが期待される。さらに200 gスケールに供した菌株は23株中22株が*S.cerevisiae*と高い相同性を示し、清酒醸造に利用できる菌株であることが示唆された。今後、スケールアップした醸造試験を実施し、現状と同じ性質を発揮できることを確認する。

参考文献

- 1.) 都築正男、大橋正孝、清水浩美：奈良県産業振興総合センター研究報告. No. 41, 5-11, (2015)
- 2.) 小野奈津子、安田庄子 他：あいち産業科学技術総合センター 研究報告 6, 70-73, (2017)
- 3.) 岡田俊樹 川島典子：滋賀県工業技術総合センター研究報告, p94-100, (2021)
- 4.) 岡田俊樹：滋賀県工業技術総合センター研究報告, p116-118, (2018)
- 5.) 松尾啓史 岡田俊樹：滋賀県工業技術総合センター研究報告, (2023)
- 6.) 公益財団法人日本醸造協会：酒類総合研究所標準分析法注解, (2017)