

# 「さくらひめ」の花から分離した酵母による 清酒の実施醸造試験

宮岡俊輔 中村 仁\*

Plant-scale Sake brewing with Sake type yeasts isolated from flowers of 'SAKURAHIME'

MIYAOKA Shunsuke and NAKAMURA Hitoshi

筆者らは前報<sup>1)</sup>において、地域独自性の強い清酒開発のため、Yeastcidin 添加麴汁培地を用いて愛媛県特産「さくらひめ」の花から清酒タイプ酵母の分離を行い、4株の優良酵母を得た。同様に Yeastcidin 添加麴汁培地を用いて東京農業大学で分離した4株を加え、計8株について愛媛県内企業5社で実地醸造試験を行い、その醸造適性を検討し、実用的にも優れた特性を有する4株の清酒タイプ酵母を選抜することができた。

キーワード：清酒、集積培養、抗菌性物質・Yeastcidin、酵母、麴菌、実地醸造、さくらひめ、花

## はじめに

自然界から個性豊かな酵母を分離利用することは、製品の個性化やテロワールの構築に寄与すると考えられ、様々な取り組みが行われているが<sup>2)~7)</sup>、清酒醪において高いアルコール生成を示す酵母の取得は容易ではない。東京農業大学のグループは、麴菌が産生する抗菌性物質・Yeastcidin について研究を行い、この物質は多くの酵母の生育を抑制するが、清酒酵母の未成育を抑制しないことを発見した<sup>8)~9)</sup>。筆者らも前報において、Yeastcidin が清酒酵母の生育は阻害しないが、ワイン酵母およびビール酵母の生育は阻害することを改めて確認した。さらに穂坂らは<sup>9)~11)</sup> これを利用して清酒用酵母の分離に成功している。

また、さくらひめは開花時期が限られているため、さくらひめの切り花および鉢植えについて開花後2週間程度県内蔵元等で保管後、花を採取し、冷蔵保存および10%グリセリン溶液中で-80℃凍結保存を行い、酵母の採取源として凍結保存が有効であることを見いだした。

これら保存した花を用いて、Yeastcidin 添加麴汁培地で集積培養したところ、13本で泡立ちと糖度低下がみられ、これら培養液から TTC 着色性により選抜し、30株の微生物を得た。この30株について総米150gの清酒小仕込み試験を実施したところ、6株は発酵性が低かったが、24株で協会9号酵母(日本醸造協会)と同程度の発酵性を示した。Yeastcidin を集積培養に使用することで清酒タイプ酵母が効率的に分離できたものと考えられる。香気成分生産能や酵母増殖能、製成酒の成分等を比較検討し、優良酵母4株を選抜した。

そこで、これら酵母の実用化を目的として、同様に Yeastcidin 添加麴汁培地を用いて東京農業大学で分離した4株を加え、計8株について愛媛県内企業5社で実地醸造試験を行い、その醸造適性を検討したので、その結果について報告する。

## 実験方法

### 1. 供試酵母

前報<sup>1)</sup>で分離したさくらひめ酵母、Sa-16、-17、-24および-27の4株、東京農業大学で分離した、ESH519-22、-23、-24および-53の4株のあわせて8株を用いた。

※ (現)愛媛県庁経済労働部産業創出課  
この研究は、「えひめ香る地酒商品化・プロモーション促進事業」の予算で実施した。

## 2. キラー性試験

久保らの方法<sup>12)</sup>により測定した。すなわち、0.003%メチレンブルーを添加した TTC 下層培地にきょうかい9号酵母を $10^6$ 個塗抹し、さらに分離酵母を植菌した後、28℃で培養した。24時間後に微小なコロニーが培地一面に生じた際に現れる分離酵母周辺のクリアゾーンを観察した。

## 3. 糖の資化性試験

酵母様真菌同定キット ID32CAPI (シスメックス・ビオメリュー (株)) に接種した菌体が資化する 31 種類の炭素源 (ガラクトース、シクロヘキシミド、スクロース、N-アセチルグルコサミン、乳酸、L-アラビノース、D-セロビオース、ラフィノース、D-マルトース、トレハロース、2-ケトグルコン酸カルシウム、 $\alpha$ -メチル-D-グルコシド、マンニトール、ラクトース、イノシトール、D-ソルビトール、D-キシロース、D-リボース、グリセリン、L-ラムノース、パラチノース、エリスリトール、D-メルピオース、グルクロン酸ナトリウム、D-メレチトース、グルコン酸カリウム、レブリン酸、グルコース、L-ソルボース、D-グルコサミン塩酸塩、エスクリン) について調べた。

## 4. 実地試験醸造

仕込みは県内企業5社で実施した。それぞれの仕込みの内容を表1に示した。

表1 実地試験醸造の内容

企業名	使用酵母	原料米	精米歩合	製法品質	総米
A	ESH519-24	山田錦	50%	純米吟醸	750kg
A	Sa-16	松山三井	55%	純米吟醸	750kg
B	ESH519-23	しずく媛	50%	純米	150kg
C	ESH519-53	しずく媛	50%	純米	190kg
C	Sa-17	松山三井	60%	純米	190kg
D	Sa-27	媛育71号	65%	純米	750kg
E	ESH519-22	松山三井	50%	純米吟醸	900kg
E	Sa-24	松山三井	60%	吟醸	750kg

## 5. 製成酒の分析

一般成分および香気成分は、上槽、アルコール添加前のもろみを凍結保存後、解凍遠心分離して上清を分析した。一般成分は、国税庁所定分析法注解 (第4回改正)<sup>13)</sup> に準じて測定した。また、香気成分はヘッドスペースガスクロマトグラフを用いて、グルコースの定量はグルコース CII テストワコー (和光純薬工業株式会社) により分析した。酵母数は、上槽前もろみをメチレンブルー染色液で希釈、トーマの血球盤で計測した。

## 6. 官能評価

8種類の試験醸造酒について、愛媛県酒造組合製造技術委員会委員10名により5点法で評価した。その際、できるだけ特徴のあるものを評価し、コメントを記載するよう依頼した。

## 結果と考察

### 1. キラー性試験

キラー性を有した酵母は様々な酵母を使用する清酒製造現場では利用できないため、東京農大で選抜した4株のキ

ラー性試験を行った。結果は表2に示す通りすべての株でキラー性は見られなかった。なお、当所分離したさくらひめ酵母 Sa-16、-17、-24、-27 については、前報に示す通り、キラー性を有していないことを確認している。

これらのことから、分離した8株については清酒酒造現場で使用可能と判断し、実地醸造試験を行うこととした。

表2 東京農業大学で分離した4株のキラー性

酵母名	キラー性
ESH519-22	—
ESH519-23	—
ESH519-24	—
ESH519-53	—

## 2. 糖の資化性試験

前項と同様、東京農大で選抜した4株の糖の資化性について、K9株と比較して表3に示した。4株の糖の資化性は、対象のK9株と異なるタイプであった。また、前報に示す通り当所で分離した酵母 Sa-16、-17、-24、-27 では糖の資化性に異なるパターンがみられたが、東京農大分離株では4株とも同じパターンを示した。

表3 東京農業大学で分離した4株の糖の資化性

酵母名	ESH519-22	ESH519-23	ESH519-24	ESH519-53	K-9
ガラクトース	+	+	+	+	+
スクロース	+	+	+	+	+
ラフィノース	+	+	+	+	+
D-マルトース	-	-	-	-	-
$\alpha$ -メチル- $\alpha$ -D-グルコシド	-	-	-	-	+
パラチノース	-	-	-	-	+
グルコース	+	+	+	+	+

## 3. 実地醸造試験

仕込みは、5社で8種類の酵母をそれぞれ使用した8仕込みを実施した。小仕込み試験の結果を参考として、各社で様々な酒質設計が行われたため、原料米は「山田錦」「しずく媛」「松山三井」「媛育71号」の4種類、総米も190kgの小規模から900kgと実醸造規模まで多様な醸造が行われた。精米歩合は、50%から65%と通常の市販を考慮した規格のものとなった。もろみのBMD曲線を図1に示した。多様な仕込みであったが、もろみ日数24日から29日ですべての醸造試験は終了し、順調な発酵経過を示した。

一般成分の分析結果を表4に、香気成分を表5に示した。

すべての仕込みでアルコール分が16%程度生成され十分な発酵力を示した。また、酸度は少ないもので1.3、多いもので1.7、アミノ酸度はすべて1.2以内となった。上槽前の酵母数もすべての仕込みで $10^8$ 個/g以上が確認でき、実用的な性質を有していることが示された。製成酒の日本酒度は、-6.2~7.8と酒質にバラエティがあった。尿素について測定したところ、ESH519-23株とESH519-53株で10mg/L以下となり、これらの株では製成酒のカルバミン酸エ

チル精製量の低減が期待できる。香気成分生成量は、酵母により特性が異なり幅広い分布を示した。中でも重要な成分であるイソアミルアルコールは96.7~147.2 ppm、酢酸イソアミル1.2~3.6 ppm と酵母による違いが大きかった。カプロン酸エチルについては、8種類の酵母のうち6種類で2.5 ppm 以下となり、前述と併せイソアミル系の香気成分を有したものが多かった。Sa-17株とSa-24株はカプロン酸エチルを5 ppm 以上生成し、他の6種類と香気の特徴が大きく異なっていた。

#### 4. 官能評価

官能評価の結果を表6に示した。5点法の評価(良1→欠点5)で10人の平均点が3点以上となる評価の低かったものは1種類(ESH519-23株で3.1点)のみであり、ほとんどが良好な酒質と評価された。製品の個性化やテロワールの構築を目的として、地域の食材や料理とのペアリングを意識して、香りと味の特徴が異なる酵母を4株選抜し、それぞれES1(Sa24株)、ES2(Sa27株)、ES3(ESH519-53株)、ES4(ESH519-24株)とした。

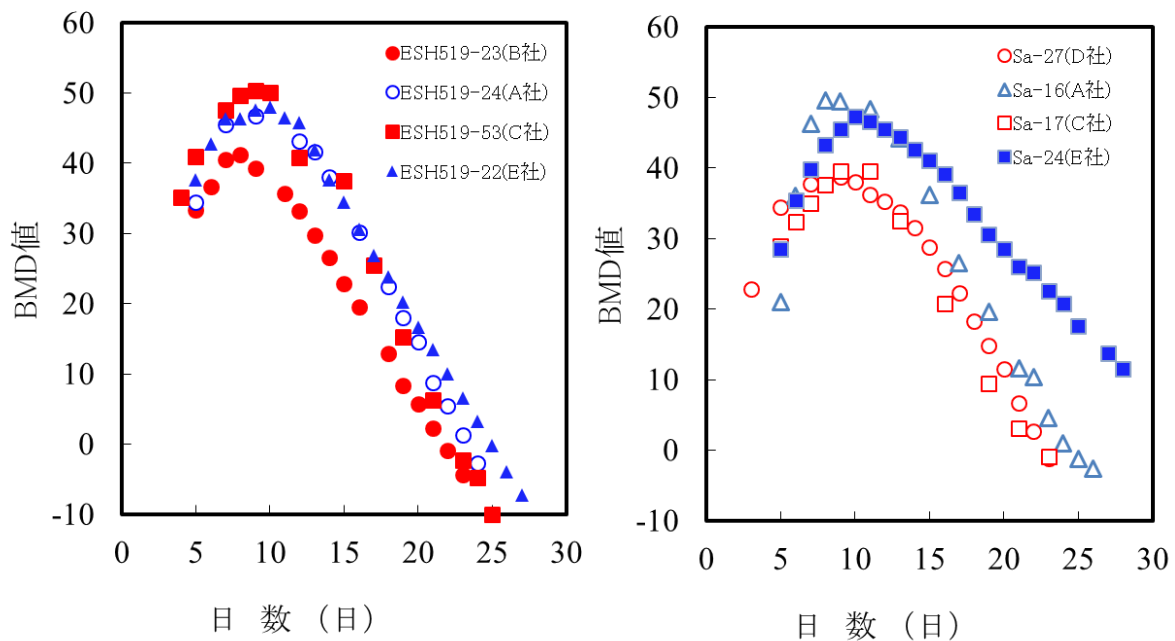


図1 実地醸造試験のBMD曲線

表4 実地醸造試験製成酒の一般成分

酵母名	企業名	アルコール分(% , v/v)	日本酒度	エキス分	酸度	アミノ酸度	尿素(mg/L)	グルコース(% , w/v)	日数	酵母数(個/g)
ESH519-22	E	16.3	2.1	5.1	1.5	0.9	10.2	1.5	28	$1.94 \times 10^8$
ESH519-23	B	16.1	2.2	5.0	1.5		2.5	1.8	25	$1.81 \times 10^8$
ESH519-24	A	16.4	-0.1	5.5	1.4	1.0	27.9	1.3	24	$1.78 \times 10^8$
ESH519-53	C	16.7	7.8	4.2	1.7	0.9	9.7	1.0	29	
Sa-16	A	16.5	1.5	5.2	1.3	0.9	45.4	0.9	26	$1.93 \times 10^8$
Sa-17	C	17.7	5.6	4.8	1.6	1.1	32.7	0.8	25	$2.24 \times 10^8$
Sa-24	E	15.8	-6.2	6.4	1.7	1.2	20.3	2.9	28	$1.57 \times 10^8$
Sa-27	D	16.6	0.6	5.7	1.3	1.2	24.5	0.9	23	$2.61 \times 10^8$

表5 実地醸造試験製成酒の香気成分

酵母名	企業名	香気成分 (ppm)						
		アセトアルデヒド	酢酸エチル	n-プロピルアルコール	イソブチルアルコール	酢酸イソアミル	イソアミルアルコール	カプロン酸エチル
ESH519-22	E	61.6	66.5	29.5	33.8	1.8	106.3	1.2
ESH519-23	B	75.0	65.4	32.2	35.6	1.9	104.6	1.2
ESH519-24	A	77.9	59.2	30.0	36.4	2.1	112.8	2.1
ESH519-53	C	14.4	65.7	32.1	43.9	2.3	116.3	0.8
Sa-16	A	46.2	57.4	85.3	45.4	3.6	146.1	2.4
Sa-17	C	26.5	49.4	51.0	57.5	2.1	147.2	5.0
Sa-24	E	56.7	34.4	50.9	27.8	1.2	96.7	6.1
Sa-27	D	107.4	64.6	36.4	44.0	2.0	109.9	1.5

表6 官能評価結果

酵母名	企業名	評点 (平均)	コメント
ESH519-22	E	1.8	味幅あり。酢イソ、酸味さわやか。きれいで純吟らしいふくらみ。やや発泡感、うま味ありバランス良。香りクセ、やや刺激味、シブ。
ESH519-23	B	3.1	ややうすく、香り重い。味わい軽い、やや香りクセ。やや酸臭、ミルク臭。
ESH519-24	A	2.0	さわやかな酸味。ふくよかな香り。酸味に特徴。バランスよくガス感あり。
ESH519-53	C	2.7	メロンやパイン様香気。酸味しっかり。酸と甘みの調和。味わいきれい。
Sa-16	A	2.5	ふくよかだが、やや青臭。松山三井らしい酒質。ややアルデヒド臭。あらい。
Sa-17	C	2.9	生老香。香りくずれ。ややうすい。ダレ、酸化。脂肪酸臭。
Sa-24	E	1.5	果実を感じさせる華やかな香り。吟醸香高い。含み香。酸味良好。ふくらみあり。適度な甘さと酸味の調和。
Sa-27	D	2.3	すっきりと柔らか。酢イソ系。バランスよく香味がよく調和している。きれい。穏やかで清涼感のある香り

## ま と め

地域独自性の強い清酒開発のため、愛媛県特産「さくらひめ」の花から清酒タイプの8株の優良酵母を得たり。この8株について清酒醸造適性を検討し、以下の結果を得た。

1. キラー性を有した酵母は清酒製造現場で利用できないため、さくらひめの花から分離した8株のキラー性試験を行い、すべての株でキラー性を有していないことを確認した。
2. 東京農業大学で分離した4株について糖の資化性を検討した結果、これら4株は K9 株とは異なるパターンを示した。
3. さくらひめの花から分離した8株について、5社で8仕込みの実地醸造試験を行い、「仕込み経過」「製成酒の一般成分、香気成分」「官能評価」の結果から、香りと味の特徴が異なる4株を選抜した。

## 文 献

- 1) 宮岡俊輔, 穂坂 賢: 麹菌の生産する抗菌性物質・Yeastcidin を用いた「さくらひめ」からの清酒酵母の分離, 愛媛県産業技術研究所研究報告, 60, 24-30 (2022).
- 2) 宮岡俊輔, 新谷智吉, 安井正良: 柑橘の花からの酒類醸造用酵母の分離とその性質, 愛媛県工業系研究報告, 41, 25-28 (2003).
- 3) 宮岡俊輔, 新谷智吉, 佐野和男, 二宮順一郎: 柑橘の果皮からの酒類醸造用酵母の分離とその性質, 愛媛県工業系研究報告, 42, 26-30 (2004).
- 4) 柏木 亨: 桜の花から分離した酵母による清酒の商品化, 醸協, 97 (1), 2-6 (2002).
- 5) 都築正夫, 大橋正孝, 清水浩美: ササユリからの酒造用酵母の分離とその醸造特性, 奈良県産業振興総合センター研究報告, 41, 5-11 (2015).
- 6) 三井 俊, 伊藤彰敏, 山本晃司, 金政 真: 芙蓉の花から分離した酵母の清酒醸造特性評価, あいち産業科学技術総合センター研究報告, 6, 58-61 (2017).
- 7) 井田祐子, 佐藤悦人, 丸田航大, 田崎裕二: 花から分離した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の清酒醸造特性, 日菌報, 62, 65-75 (2021).
- 8) 中田久保, 酒井 劭, 竹田正久, 塚原寅次: こうじ菌の生産する抗菌性物質に関する研究, 醸協, 75, 761-764 (1980).
- 9) 穂坂 賢, 新宅信彦, 矢作直子, 中田久保, 酒井 劭, 塚原寅次: 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の生産する抗菌性物質 (Yeastcidin) の精製と性質, 醗酵工学, 65, 191-197 (1987).
- 10) 穂坂 賢, 角本琢磨, 大竹 聡, 中田久保, 酒井 劭: 麹菌の生産する抗菌性物質・Yeastcidin を用いた集積培養液からの清酒酵母の分離, 醸協, 94, 998-1005 (1999).
- 11) 穂坂 賢, 中田久保, 酒井 劭: 花から分離した酵母による清酒の試験醸造, 醸協, 95, 837-842 (2000).
- 12) 久保友佳子, 清水浩美: 橘の機能性成分の調査研究 (第3報), 奈良県産業振興総合センター研究報告, 46, 11-20 (2020).
- 13) 西谷尚道監修: 第4回改正国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会, 231 (1993).