

高温もろみ対応清酒酵母の開発 (第3報)

横堀正敏*¹ 鈴木康修*¹ 増田こずえ*¹ 南澤賢*²

Development of Sake Yeast Adaptable to High Temperature of Mash (Part 3)

YOKOBORI Masatoshi*¹, SUZUKI Yasunori*¹, MASUDA Kozue*¹, MINAMISAWA Ken*²

抄録

埼玉酵母から28℃でのアルコール処理で生存した株を得、これらと埼玉酵母を28℃の小仕込み試験で選抜した。また乳酸や糖化用酵素剤の使用量について検討した。高温もろみではカブロン酸エチル高生産性の埼玉F酵母および埼玉G酵母が適していた。これらを使用し、総米1t当り乳酸0.5Lと糖化用酵素剤30gを初添に添加した総米60kgの清酒製造試験では、最高品温15℃に設定した仕込の半分以下の期間で上槽に至り、同程度のアルコール分、日本酒度、アミノ酸度となり、粕歩合は小さくアルコール取得は同等以上で、酸度は1以上高く、香気成分ではエステルが少なく高級アルコールが多くなった。

キーワード：清酒酵母，高温もろみ，乳酸，酵素剤，酸度

1 はじめに

通年雇用の地元社員等による清酒製造では、温暖な時期にも冷却しながら行う会社が増えてきた。冷却しなければ省エネになるが、もろみは高温となって酵母の死滅を招きやすくなる。高温でのアルコール耐性を有する酵母であれば、その影響を抑えることが期待できる。

本研究では、前報までに得られた株^{1,2)}に加え、28℃でのアルコール処理後も生存した株を取得した。またスケールアップして仕込の条件や酒質等について検討した。

2 実験方法

2.1 供試株

埼玉酵母10種 (A01、BK2、C、D、E³⁾、F³⁾、G⁴⁾、H⁴⁾、YY⁵⁾、MR⁵⁾)、および既報において得られた3株^{1,2)}を用いた。

2.2 高温時アルコール処理後生存株の取得

麴エキス培地に酵母を接種して数日間28℃で培養後、培養液にアルコールを添加して28℃で1週間処理後、その一部を新たな麴エキス培地に接種し、増殖したものを生存株とした。アルコール濃度は10%から16%へと上げていった。

生存株から平板培地上でシングルコロニーを形成させ各12株を取得し、15%アルコール28℃1日処理後の死滅率¹⁾を測定し、少ないものを高温時アルコール耐性株として選抜した。

2.3 小仕込み試験

糖化用酵素剤にはグルコアミラーゼ「アマノ」(天野エンザイム)を使用した。

2.3.1 総米 55g

前報²⁾で得られた条件で実施した。すなわち、乾燥麴 10g、 α 米 45g、水 100mL、乳酸 0.1mL、酵素剤 0.2mg、酵母培養液 1mL を混合し、28℃1週間後に 3000rpm 10 分間の遠心分離で上槽とした。

2.3.2 総米 1kg

*¹ 北部研究所 食品・バイオ技術担当

*² 化学保安課

乾燥麴と α 米を使用した、通常の麴と蒸米での総米 1kg に相当するよう分量を調整し、酒母省略の 2 段仕込を行った。すなわち、初添に α 米 138g と乾燥麴 65g と水 425mL と酵母培養液 200mL の上澄みを捨てた沈殿、留添に α 米 525g と乾燥麴 133g と水 1195mL を混合し、その後は総米 55g の小仕込み試験と同様に行った。乳酸や酵素剤の使用量や使用時期を変化させ、踊りを取らないものもあった。

2.4 清酒製造試験

埼玉 F 酵母および埼玉 G 酵母を使用し、表 1 の仕込配合で 3 段のアンブル仕込みを行った。対照は踊りを 1 日取り、8~9℃で留め、最高品温を 15℃としたが、高温もろみでは踊りを省略した。

表 1 清酒製造試験仕込配合

	酒母	初添	仲添	留添	計
総米 (kg)	1.5	9.0	18.0	31.5	60
蒸米 (kg)	—	6.5	14.0	25.5	46
麴米 (kg)	1.5	2.5	4.0	6.0	14
汲水 (L)	6.0	11.0	18.0	46.0	81
乳酸 (mL)	高温	54	—	—	90
	対照	24	—	—	60
酵素剤 (g)	高温	1.8	—	—	1.8
	対照	—	—	—	—

アルコール分は簡易アルコール分析器アルコメイト AL-2 型 (理研計器) により、あるいは常法⁶⁾により測定した。日本酒度、酸度、アミノ酸度は常法⁶⁾により測定した。香気成分は、ヘッドスペースサンプラー用 10mL 容バイアルに試料 0.9mL と内部標準液 0.1mL を封入し、ヘッドスペースガスクロマトグラフィー⁷⁾により測定した。有機酸成分は有機酸分析セット ShodexOA (昭和電工) により分析した。

3 結果及び考察

3.1 高温時アルコール処理後生存株の取得

16%アルコール処理生存株が BK2、C、F、YY、MR から得られ、各々を B6、C6、F6、Y6、M6 とした。このうち高温時アルコール耐性を示した B6、C6、F6 からシングルコロニーを形

成させ、各 12 株、計 36 株を取得した。これらから更に高温時アルコール耐性株として、B6 から 2 株 (B604、B612)、C6 から 4 株 (C605、C608、C611、C612)、F6 から 3 株 (F606、F610、F611) を選抜し、この 9 株を次の試験に使用することとした。

3.2 小仕込み試験

3.2.1 総米 55g

上の 9 株および各親株 (BK2、C、F) を使用して試験を行った (表 2)。それほど大きな差はなく、官能的にまとまりのあるものなどで各親株から 1 株ずつ (B604、C612、F610)、そして親株の中ではアルコール生成など良好だった F の計 4 株を次の試験で使用することとした。

表 2 総米 55g の小仕込み試験 (1)

株	減少重量 (g)	粕歩合 (%)	アルコール分	日本酒度	酸度	アミノ酸度
B604	19.0328	116.6	17.25	+1.5	3.95	2.8
B612	19.3464	114.6	17.15	+1.5	3.95	2.85
C605	19.4943	114.7	17.1	+1.5	3.95	2.85
C608	19.4429	113.6	17.05	+0.5	4.1	2.85
C611	19.7299	114.5	17.2	+2	3.95	2.85
C612	19.6613	113.9	17.1	+1.5	3.95	2.95
F606	19.6950	114.8	16.95	+0.5	3.95	2.9
F610	19.3032	116.9	17.0	+0.5	3.95	2.85
F611	19.0230	116.6	17.05	+0.5	3.95	2.8
BK2	18.2405	125.7	16.15	-6.5	4.5	2.9
C	18.9617	123.2	16.7	±0	4.0	2.8
F	19.8651	114.3	17.55	+3.5	4.3	2.6

上の 4 株、前報までに得られた 3 株 (DA05、DA10、YA12) とその親株で良好だった D^{1,2)}、そしてこれまで小仕込みに使用しなかった埼玉酵母 (A01、G、H、MR) の計 12 株を使用した試験では、DA05、DA10、YA12、D、H、MR はアルコール生成や発酵が弱かった (表 3)。次の試験では B604、C612、F610、A01、F、G を使用することとした。

3.2.2 総米 1kg

通常のアンブル仕込みに相当する乳酸 1mL (総米 1t 当り 1L) と、総米 55g の試験と同程度の割合の酵素剤 4mg (総米 1t 当り 4g) を初添に加え、試験を行った (表 4)。雑菌汚染が疑われるクセが

現れた。また日本酒度は+14前後となり、発酵が進みすぎたと考えられる。

表3 総米 55gの小仕込み試験 (2)

株	減少重量 (g)	粕歩合 (%)	アルコール分	日本酒度	酸度	アミノ酸度
B604	19.2572	114.8	17.15	+3.5	3.4	2.8
C612	19.2834	117.2	17.05	+4	3.6	2.7
F610	19.4617	115.3	17.1	+4.5	3.5	2.7
DA05	18.3775	131.1	16.4	+1	4.35	3.1
DA10	18.8743	143.1	16.5	+1.5	4.3	3.1
YA12	19.1872	133.0	16.6	+5	4.6	2.75
A01	19.6135	131.1	16.95	+7	3.1	3.1
D	17.9041	152.1	15.6	-4	4.3	3.0
F	19.6535	128.5	17.5	+3.5	3.65	2.6
G	19.9541	132.4	17.0	+4	3.6	2.9
H	19.3586	142.2	16.65	+3	3.0	3.15
MR	14.4892	135.4	12.45	-46.5	5.8	3.05

表4 総米 1kgの小仕込み試験 (1)

株	減少重量 (g)	粕歩合 (%)	アルコール分	日本酒度	酸度	アミノ酸度
B604	210.8	70.0	15.8	+14.5	3.1	2.5
C612	212.4	72.0	15.85	+14.5	3.4	2.65
F610	211.6	74.3	15.85	+14	3.25	2.55
A01	201.6	80.5	15.45	+14	3.5	2.7
F	225.1	60.2	16.15	+13	4.0	2.5
G	222.9	61.4	16.15	+14.5	3.65	2.65

乳酸 1mL、酵素剤 4mg 使用

乳酸を1.5倍、酵素剤を5倍にした (表5)。ひどいクセは抑えられたが、日本酒度は概ね+10を超え、やはり発酵の進みすぎと思われる。アルコール分や日本酒度が小さめなB604、C612、A01を除き、F610、F、Gを次の試験では使用することとした。

表5 総米 1kgの小仕込み試験 (2)

株	減少重量 (g)	粕歩合 (%)	アルコール分	日本酒度	酸度	アミノ酸度
B604	245.9	56.5	16.3	+12	3.9	2.75
C612	249.2	53.9	16.45	+13	3.75	2.8
F610	250.3	56.1	16.75	+14.5	3.75	2.8
A01	231.1	58.6	15.25	+3	3.4	3.2
F	261.0	49.2	16.55	+14.5	4.2	2.7
G	263.3	48.4	16.6	+15	3.95	2.85

乳酸 1.5mL、酵素剤 20mg 使用

乳酸と酵素剤の使用時期による効果を確認する

ため、乳酸は初添に1mLと留添に0.5mL、酵素剤は50mgを初添か留添のどちらかに使用した (表6)。前の試験と比較して乳酸の分割による利点は特に感じられなかったため、乳酸は初添時に添加することとした。酵素剤も時期による差ははっきりしないので、初添で使用することとした。F610は発酵が弱めで、この株には50mgでは酵素剤が過剰だった可能性があると思われる。

表6 総米 1kgの小仕込み試験 (3)

株	減少重量 (g)	粕歩合 (%)	アルコール分	日本酒度	酸度	アミノ酸度
初添に酵素剤						
F610	246.2	64.0	16.3	-8.5	3.3	2.85
F	275.5	52.5	17.6	+1.5	4.05	3.15
G	280.6	52.1	17.45	+1.5	4.05	3.45
留添に酵素剤						
F610	253.6	60.8	16.6	-4	3.6	2.8
F	277.2	52.0	17.65	+3	4.3	3.15
G	273.2	51.4	17.35	±0	4.0	3.4

乳酸初添に1mL留添に0.5mL、酵素剤50mg使用

F610で乳酸と酵素剤の使用量を変えた (表7)。乳酸が多い方がやや良さそうだったが、全体にアミノ酸度が大きくなり、この株は高温もろみに適していないように思われた。以後の試験にはFとGを使用することとした。

表7 総米 1kgの小仕込み試験 (4)

酵素剤 (mg)	減少重量 (g)	粕歩合 (%)	アルコール分	日本酒度	酸度	アミノ酸度
乳酸 1.5mL						
20	276.1	66.3	17.35	+8.5	3.85	3.75
30	261.9	63.7	17.0	+2.5	3.8	3.8
40	259	59.1	16.8	-2.5	3.65	3.8
乳酸 2mL						
30	259.7	65.7	16.9	+2.5	3.95	3.7
40	266.2	59.5	17.25	+3.5	4.05	3.65
50	268.2	55.3	17.2	+1.5	3.9	3.7

F610使用

FとGを使い、乳酸を1.5mLとし、酵素剤の使用量を変えた (表8、9)。バラツキは大きいですが、Fは酵素剤20~50mg、Gは20~60mgでアルコールの生成が良好で、日本酒度はFは30~70mg、Gは30~60mgでややプラス程度だった。酵素剤が多すぎると溶けすぎて発酵が不順になるおそれ

があるので、以下の試験では酵素剤使用量を総米1t当り30gとした。

表8 総米1kgの小仕込み試験(5)

酵素剤 (mg)	減少重量 (g)	粕歩合 (%)	アルコール分	日本酒度	酸度	アミノ酸度
20	310.9	66.3	17.75	+8.5	3.95	3.5
30	295.5	63.7	17.2	+2.5	3.8	3.45
40	289.5	59.1	17.05	-2.5	3.95	3.5
50	293	65.7	17.4	+2.5	3.9	3.55
60	293.1	59.5	16.8	+3.5	4	3.55
70	298.1	55.3	16.85	+1.5	3.95	3.6

F使用

表9 総米1kgの小仕込み試験(6)

酵素剤 (mg)	減少重量 (g)	粕歩合 (%)	アルコール分	日本酒度	酸度	アミノ酸度
20	336.3	56.5	17.9	+10.5	4.2	3.45
30	339.4	53.9	17.6	+5	4.2	3.6
40	377.3	56.1	17.65	+5	4.2	3.45
50	348.2	58.6	17.8	+4.5	4.2	3.5
60	372.0	49.2	17.4	-1	4.2	3.5
70	375.8	48.4	17.1	-3.5	4.2	3.6

G使用

3.3 清酒製造試験

冷やさないような仕込と管理を行い、高温もろみは品温 25℃前後となった(図1)。

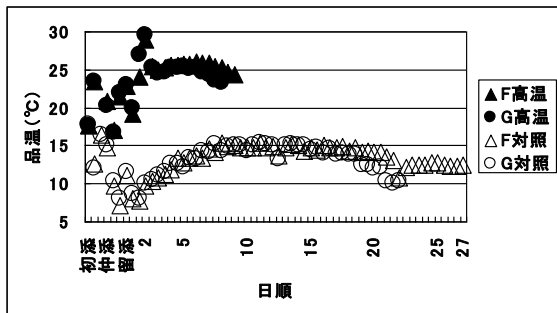


図1 もろみ経過(1) 品温

もろみ経過を見ると、高温もろみでは対照に比べ非常に進行が早く、半分以下の日数で日本酒度は±0に近づき(図2)、アルコール分は16%程度になった(図3)。酸度は高温もろみで常に高く(図4)、アミノ酸度は増加速度は早い但最终的には対照と同程度だった(図5)。

製成酒成分等を表10に示す。アルコール分と

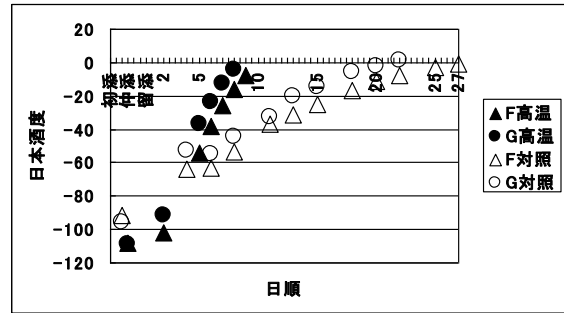


図2 もろみ経過(2) 日本酒度

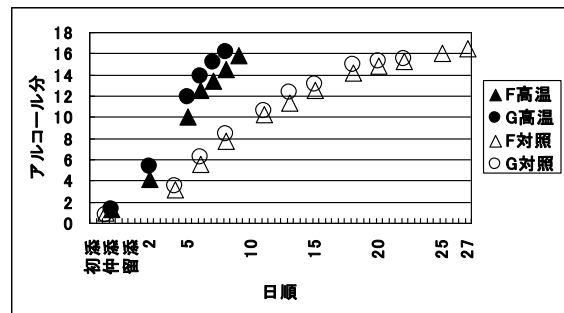


図3 もろみ経過(3) アルコール分

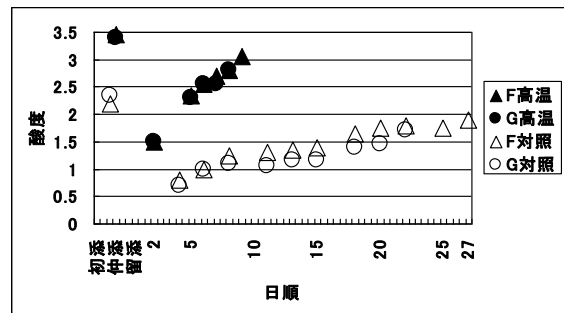


図4 もろみ経過(4) 酸度

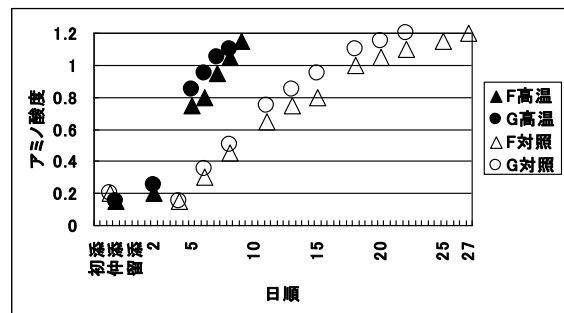


図5 もろみ経過(5) アミノ酸度

アミノ酸度は対照と同程度だった。日本酒度は低かったが、休日の作業を避け上槽を早めたため、もろみ日数を1~2日伸ばせば同等になると思われる。酸度は1以上高くなった。粕歩合は小

さく、アルコールの取得は同等以上となった（酵素剤でよく溶けたためと思われる）。

香気成分ではエステルが少なく高級アルコールが多くなった。今回使用した酵母はカブロン酸エチル高生産性で吟醸タイプの製造に適しているが、高温もろみではその特徴が現れなかった。

有機酸は酸度と同様に多くなったが、リンゴ酸のみ酵母により差が現れ、Fでは増えたがGでは対照より少なくなった。

- ・アルコール分、日本酒度、アミノ酸度は同程度
- ・酸度は1以上高い
- ・粕歩合は小さくアルコール取得は同等以上
- ・エステルは少なく高級アルコールが多い

酸度が大きくなるが、乳酸量を増し糖化用酵素剤を使用することで、25℃程度のもろみで短期間での清酒が製造できた。4段掛けなどで甘さを調節して酸味とのバランスを取ることは可能と思われる。

表10 製成酒一般成分等

区分	高温		対照		
	F	G	F	G	
酵母					
アルコール分	15.7	15.9	16.6	15.2	
日本酒度	-8	-4.5	-0.5	+1.5	
酸度	2.9	2.55	1.9	1.45	
アミノ酸度	1.3	1.3	1.35	1.2	
粕歩合 (%)	37.8	39.7	45.0	50.8	
純アル取得(L/白米 t)	301	307	303	274	
もろみ日数 (日)	9	8	27	22	
香気成分 (ppm)	酢酸エチル	38.2	45.0	68.2	51.2
	イソブタノール	80.6	70.9	59.2	64.5
	酢酸イソアミル	0.9	0.9	1.4	1.2
	イソアミルアルコール	199	178	169	166
	カブロン酸エチル	1.5	2.1	5.1	8.7
有機酸 (ppm)	クエン酸	106	94.0	73.8	50.0
	リンゴ酸	285	99.0	122	131
	コハク酸	532	550	479	351
	乳酸	916	722	443	416
	酢酸	40.4	63.6	9.4	10.7

4 まとめ

(1) 埼玉酵母から高温時アルコール耐性株を取得し、28℃の小仕込み試験に適した株を選抜したが、高温もろみでの清酒製造にはカブロン酸エチル高生産性の埼玉F酵母および埼玉G酵母が適していた。

(2) 28℃の小仕込み試験では、総米 1t 当り乳酸 0.5L と糖化用酵素剤 30g の初添への添加が適当だった。

(3) (2)の条件で総米 60kg の清酒製造試験を実施した。25℃前後の高温もろみでは、最高品温 15℃の通常の仕込みに比べて以下の特徴が見られた。

- ・もろみ期間は半分以下

参考文献

- 1) 横堀正敏, 南澤賢, 鈴木康修, 増田こずえ: 高温もろみ対応清酒酵母の開発, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **10**, (2012)44
- 2) 横堀正敏, 南澤賢, 鈴木康修: 高温もろみ対応清酒酵母の開発(第2報), 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **11**, (2013)56
- 3) 横堀正敏, 鶴菌大, 高橋友哉, 増田こずえ: 微生物利用技術に関する研究-新規酵母の分離と食品への応用(3)-, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **6**, (2008)55
- 4) 横堀正敏, 南澤賢, 増田こずえ, 阿部知子: 清酒酵母の開発, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **9**, (2011)21
- 5) 横堀正敏, 高橋友哉, 増田こずえ: 新規清酒酵母の実用化, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **7**, (2009)51
- 6) 国税庁所定分析法(訓令), <http://www.nta.go.jp/shiraberu/zeiho-kaishaku/tsutatsu/kobetsu/sonota/070622/01.htm>, 2014.3.6
- 7) 横堀正敏, 高橋友哉, 増田こずえ, 阿部知子: 清酒酵母の開発, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **8**, (2010)45