

# 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

栗田 修\* , 中林 徹\*

## Fermentation Tests with the Mixed Cultures of Sake Yeast and *Kluyveromyces* sp. Yeast

Osama KURITA and Toru NAKABAYASHI

### 1. はじめに

近年,特定名称酒としての吟醸酒の製造において,タイプの異なる複数の清酒酵母による混合培養法が利用されている<sup>1)</sup>. その一つのメリットは, 一種の清酒酵母により香気成分の強化を行い, もう一種の清酒酵母により清酒の日本酒度を調整できることにある. しかしながら, 清酒酵母と非清酒酵母の混合培養による清酒製造についてはほとんど報告がない. 著者らは, 清酒酵母と非清酒酵母 (*Pichia anomala*) の混合培養法, いわゆる異種酵母間の混合培養法により, 従来よりも香気成分, 特にバナナ様の香りを呈する酢酸イソアミル含量の高い清酒製造ができることを報告した<sup>2)</sup>. 本研究では, 非清酒酵母としてクリベロミセス属酵母を清酒製造に利用した場合の清酒の品質への影響を検討した.

クリベロミセス属酵母は, 乳糖を資化できる酵母で, モンゴルにおいてチゴと呼ばれる馬乳酒の製造に利用されている<sup>3)</sup>. また, クリベロミセス属酵母と乳酸菌とが共生した場合, 乳酸菌の生育増殖効果が認められ乳酸生成が増加することが報告されている<sup>4)</sup>. Mora らは, ワイン酵母とクリベロミセス属酵母 (*Kluyveromyces thermotolerans*) の混合培養により, ワイン中の乳酸含量が高くなるとの報告をしている<sup>5)</sup>. 本研究では, クリベロミセス属酵母の3種を用いて, 清酒の小仕込試験を行った.

### 2. 実験方法

#### 2. 1 使用菌株

清酒酵母は協会 701 号を使用した. クリベロミセス属酵母は, *K. fragilis* NBRC1777, *K. lactis* NBRC1903, *K. marxianus* NBRC10005 の3種を使用した.

#### 2. 2 高糖濃度最少培地による発酵試験

使用菌株を YNB 培地 (酵母ニトロゲンベース 0.67%, グルコース 2%) にて 30 , 2 日間静置培養した前培養液を YNB20 液体培地 (酵母ニトロゲンベース 0.67%, グルコース 20%) に 1 / 100 容量添加し, 30 , 10 日間静置培養した. 生菌数は, YPD 培地 (ポリペプトン 2%, 酵母エキス 1%, グルコース 2%, 寒天 2%) 及び YNBL 培地 (酵母ニトロゲンベース 0.67%, ラクトース 2%, 寒天 2%) にて測定した. 清酒酵母の生菌数は, YPD 培地の生育コロニーのカウント数から YNBL 培地の生育カウント数を差し引いたものとし, クリベロミセス属酵母の生菌数は, YNBL 培地上で生育したコロニーのカウント数とした.

#### 2. 3 清酒小仕込試験

小仕込試験は表1に示す仕込配合により 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 化米を使用した. 発酵温度は 15 一定

\* 食と医薬品研究課

とした。留添後、21 日後に上槽した。

## 2. 4 分析

製造酒の一般成分は国税庁所定分析法に基づいて測定した<sup>6)</sup>。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<sup>2)</sup>。

表 1 仕込配合

	添	仲	留	計
総米(g)	75	155	270	500
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)	195	250	330	775

## 3. 結果と考察

### 3. 1 高糖濃度最少培地中の酵母生菌数

清酒酵母と混合培養に使用する非清酒酵母は、清酒製造上、野生酵母として考えられるため、蔵内の家付き酵母として清酒のもろみを汚染することが危惧される。そこで、クリベロミセス属酵母の種の選抜に当たって、清酒酵母との共存下で死滅しやすいことがその条件となる。そこで、清酒酵母及びクリベロミセス属酵母の高糖濃度培地中での、それら酵母の生育菌数を測定した。その結果を図 1 に示す。NBRC1903 株が最も死滅しやすいことが明らかとなった(図 1)。また、清酒酵母の死滅率はクリベロミセス属の種に限らず、清酒酵母単独培養よりも混合培養において、清酒酵母は長く生存することが明らかとなった(図 2)。最終的に、NBRC1903 株を清酒酵母との混合培養による清酒小仕込試験に使用する酵母に選定した。

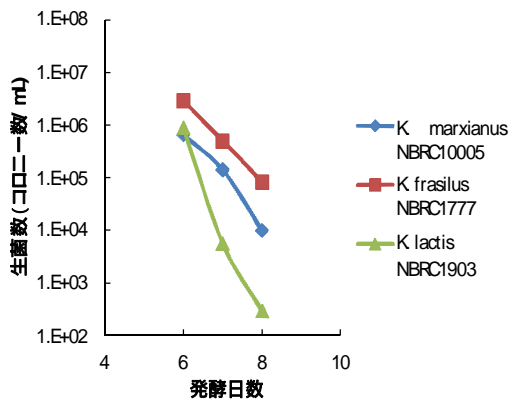


図 1 YNB20 培地上でのクリベロミセス属酵母の生育

3 種のクリベロミセス属において、清酒酵母との共存下でのその生育数に差が生じた原因を解明するために、これら酵母のエタノール耐性について検討した(図 3)。NBRC1903 株は、4% (v/v) のエタノール含む YNB 液体培地上では生育が認められるものの、6%では生育しなかった。それに対して、NBRC1777 株及び NBRC10005 株は共に 6%のエタノール存在下でも生育した。このことから、混合培養中での NBRC1903 株が最も早く死滅した理由としては、エタノール耐性が深くかかっていることが推定される。

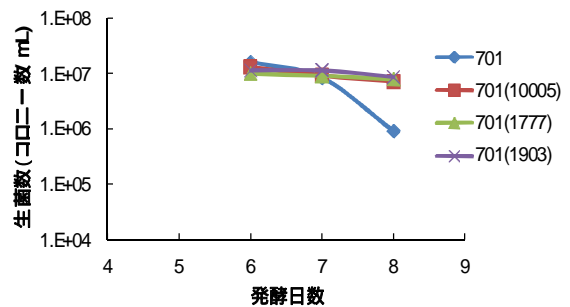


図 2 YNB20 培地上での純粋及び混合培養における清酒酵母の生育

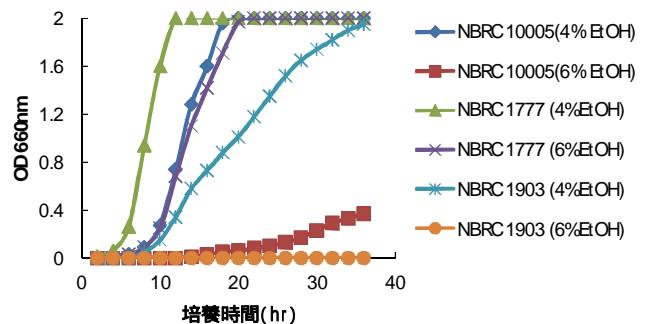


図 3 クリベロミセス属酵母のエタノール耐性

### 3. 2 清酒小仕込試験

清酒酵母協会 701 号, K. lactis NBRC1903 の単独発酵, 及び清酒酵母協会 701 号と K. lactis NBRC1903 の混合発酵による小仕込試験を行い, 得られた清酒の一般成分結果を表 2 に示した。K. lactis NBRC1903 単独発酵では、アルコール分が 3.6%と極めて低い一方、酸度は清酒酵母協会 701 号で製造

された清酒に比べて約 1.9 倍の高い値を示した。しかしながら、混合培養で造られた清酒は、清酒酵母単独で製造されたものと一般成分の大きな差は認められなかった。図 1 で示したように、*K. lactis* NBRC1903 は清酒のもろみ中で死滅していることが推定されるが、今回の一般成分分析にアミノ酸度の増加が認められなかったことは、*K. lactis* NBRC1903 の清酒もろみ中への菌体老廃物の流出が極めて少ないと推定される。

表 2 清酒の一般成分分析

	日本酒度	アルコール分(%)	酸度	アミノ酸度
K701	-8	19.7	2.94	1.99
NBRC1903	Be13.0	3.6	5.54	2.76
K701+NBR C1903	-6	20.0	2.73	2.07

また、製造された清酒の香気成分を分析したところ、NBRC 株単独発酵ではオフフレーバー(異臭)としての酢酸エチルを大量に生成することが明らかとなった(表 3)。

表 3 清酒の香気成分

	酢酸イソアミル (ppm)	イソアミルアルコール (ppm)	E/A比	カブロン酸エチル (ppm)	酢酸エチル (ppm)
K701	8.43	215.7	3.91	1.37	93.4
NBRC1903	0.50	71.5	0.70	0.13	526.0
K701+NBR C1903	8.57	203.8	4.21	1.49	101.0

酵母 *Pichia anomala* は酢酸エチルを大量に生成することが知られており<sup>7)</sup>、著者は以前、清酒酵母と *Pichia anomala* の混合培養によりバナナ様の酢酸イソアミルの生成が増加することを報告した<sup>2)</sup>。この結果と同様に、清酒酵母と NBRC1903 株の混合培養で製造された清酒は酢酸イソアミル含量が高い傾向にあった。また、カブロン酸エチルも混合培養で高い傾向にあり、ワイン酵母と非ワイン酵母である *Hanseniaspora uvarum*<sup>8)</sup> や *Debaryomyces vanriji*<sup>9)</sup> との混合培養でカブロン酸エチルの含量が高くなる結果と同じ傾向を示した。

#### 4. まとめ

クリベロミセス属酵母の 3 種 (*K. marxianus*, *K. fragilis*, *K. lactis*) の内、*K. lactis* が清酒酵母との混合培養下で最も早く死滅する。その原因は、*K. lactis* のエタノール耐性と深くかかわっていることが推定された。清酒酵母協会 701 号と *K. lactis* NBRC1903 の混合培養による清酒小仕込試験の結果、清酒酵母単独で製造された清酒よりも果実様の香気成分の高い清酒が製造できた。

#### 5. 参考文献

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) F. Kosikowsski: “Fermented milk. In: Cheese and Fermented Milk Food”. 37-46. Elsevier Applied Science Publishers. New York. (1975)
- 4) S. Ishii et al.: “Identification of compounds causing symbiotic growth of *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* and *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* in Chigo, Inner Mongolia, China”. *Anim. Sci. J.*, 70, 81-89 (1999)
- 5) J. Mora et al.: “Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerance* and *Saccharomyces cerevisiae*”. *Am. J. Enol. Vitic.*, 41, 156-159(1990)
- 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) J. Tabachnick and M. A. Joslyn: “Formation of esters of yeast. I. The production of ethyl acetate by standing surface of *Hansenula anomala*”. *J. Bacteriol.*, 65, 1-9(1953)
- 8) J. V. Gil et al.: “Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts”. *J. food sci.*, 61, 1247-1249(1996)
- 9) A. Garcia et al.: “Influence of a mixed culture

with *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles in a Muscat wine". *J. Food Sci.*, 67, 1138-1143(2002)

(本研究は、平成 23 年度科学技術振興機構研究成果展開事業(フーズピリティスターディ)の支援を受けて実施されました。)