

清酒醸造に利用可能な乳酸菌の選抜*

佐藤 稔英**、米倉 裕一**

仕込時に市販の乳酸を添加する速醸系酒母の代わりに、酒造現場で製造される米麴から選抜分離し培養した乳酸菌を用いる酸基醴（あまざけ）醴を酒母とすることを試み、清酒の小仕込み試験を行った。その結果、選抜した乳酸菌を添加する酸基醴醴を用いても速醸系と同等の日数で酒母の製造が可能であることが確かめられた。
キーワード: 醸造用乳酸菌、速醸、酸基醴醴

Suitability of lactic acid bacteria isolated from koji (rice malt) for producing sake starter

NARUHIDE Sato and YUICHI Yonekura

In Sokujo brewing of sake, commercial lactic acid is added to the starter (shubo). In this study, we show that lactic acid bacteria screened from factory-derived malted rice (kome-koji) can be added to the starter of Sanki-amazake sake brewing. We perform a pilot-scale brewing using this method. Furthermore, it is confirmed that the number of production days for brewing the starter is the same as that by using the Sokujo method.

key words: Lactic acid bacteria, Shubo, Sokujo, Sanki-amazake

1 緒言

清酒醸造の現場では、モロミ初期の雑菌や野生酵母の汚染を防止する目的で酒母が製造される。一般的に酒母の条件として ①優良な清酒酵母を高密度に含むこと、②多量の乳酸を含むことが挙げられる。酒母の製造法は乳酸の取得方法により大きく二つに区分される。蒸米と米麴を水に仕込み、乳酸菌により乳酸を生成させる伝統的製法である生醴系酒母と、仕込み時に市販の乳酸と酵母を同時に添加する現在主流の速醸系酒母である。

近年、個性的な純米酒造りを目指して昔ながらの生醴系酒母の取り組みへの要望が酒造メーカーから挙がっている。そのため、微生物の遷移を不確定な自然の増殖の制御によらず、人為的に乳酸菌を添加することにより、生醴系酒母製造を安定化させようとする試みがなされてきた¹⁻⁴⁾。しかし、伝統的な生醴系酒母の製造方法は時間と手間がかかり、安定した製造には多くの経験を要することには変わりがない。

筆者らは実際の酒造現場で製造された米麴から乳酸菌を探索、分離し、それらを培養して添加する「酸基醴醴」⁵⁾に着目した。すなわち、生醴系酒母製造における、低温仕込みや硝酸還元菌の増殖を省略し、乳酸菌の増殖により酒母製造を行うものである。添加する乳酸菌に求められる特性としては、以下のことが挙げられる。

(1) 乳酸発酵が旺盛で速醸酒母で添加される乳酸量

を超える乳酸生産能を有すること

- (2) 火落ち性が無いこと
- (3) 濃糖環境で生育可能なこと
- (4) アルコール感受性があること

以上の条件を満たす乳酸菌株を分離・選抜し、酒母作製試験および清酒小仕込み試験を行った。

2 実験方法

2-1 乳酸菌の分離

2-1-1 分離試料

岩手県内10製造場で製造された米麴76点を用いた。

2-1-2 使用培地と分離

細菌酸度測定培地 (YAS培地) 10mLに米麴1gを添加し、30°Cで48時間培養した。培養後、培養液のpHを測定し、対照 (米麴無添加) よりもpHが2.0以上酸性側にシフトした試料を生酸菌が存在しているものとして選抜した。

それらをMRS寒天培地に塗布し、30°Cで48時間嫌気培養を行い、発育良好なコロニーを各シャーレから10株ずつ選抜した。

選抜した株を再度YAS培地で生酸性を確認し、キャピラリー電気泳動により乳酸量を測定して、生産量が4000ppm以上のものを候補株として選抜した。候補株を火落ち菌検出培地 (SI培地) を用いた培養試験、およびグルコース濃度を25%としたBrix20%麴汁培地を用いた濃糖

* 平成29年度 技術シーズ創生研究事業 (プロジェクトステージ)

** 醸造技術部

表1 小仕込み試験仕込配合

| 酸基醴酏 | 酒母 | 酒母2段 | 添 | 仲 | 留 | 計 |
|---------|----|------|-----|-----|-----|------|
| 総米(g) | 20 | 40 | 150 | 300 | 490 | 1000 |
| 麴(g) | 20 | | 40 | 60 | 80 | 200 |
| 蒸米(g) | | 40 | 110 | 240 | 410 | 800 |
| 水(mL) | 80 | | 200 | 400 | 670 | 1350 |
| 乳酸菌(mL) | 10 | | | | | |

中温速醸

| | 酒母 | | 添 | 仲 | 留 | 計 |
|--------|------|--|-----|-----|-----|------|
| 総米(g) | 60 | | 150 | 300 | 490 | 1000 |
| 麴(g) | 20 | | 40 | 60 | 80 | 200 |
| 蒸米(g) | 40 | | 110 | 240 | 410 | 800 |
| 水(mL) | 80 | | 200 | 400 | 670 | 1350 |
| 乳酸(mL) | 0.48 | | | | | |

耐性試験に供し、火落ち性が無く、濃糖耐性を持つ株をさらに選抜した。その後、アルコール感受性の試験を行った。エタノール8%を含むBrix5%麴汁培地10mLに供試菌のMRS培養液を10 μ L添加して30°Cで48時間培養し、増殖の見られない菌株を優良株として選抜した。

2-2 小仕込み試験

分離した乳酸菌を用い、麴40g、汲水80mLで乳酸醱酵試験を行った。米麴に汲水を添加して55°Cで6時間糖化

して30°Cまで品温を下げた。ここに、麴汁培地(Brix5.0%、pH5.0)で48時間培養した乳酸菌を10mL添加して、30°Cで48時間、培養した。培養後、遠心分離(5000rpm、50分)し、上清を官能評価した。

官能評価で優良と判断された乳酸菌を用い、表1の仕込み配合で小仕込み試験を行った。乳酸菌はMRS培地5mLで培養した後、100mL麴汁培地(Brix5.0%、pH5.0)に添加して30°Cで48時間培養したものを10mL添加した。対照として速醸系酒母である中温速醸酏の小仕込み試験を行った。酵母は、岩手県酵母FOX-Iw201号を使用した。成分分析は、遠心分離(5000rpm、50分)後の上清を試料とし、国税庁所定分析法注解⁶⁾に従って分析した。

3 実験結果

3-1 乳酸菌の分離

YAS培地で培養を行った結果、供試した76点の米麴のうち36点で、対照(米麴無添加)よりもpHが2.0以上酸性側にシフトし、それらには生酸菌が生息するものとして選抜した。それらの培養液をMRS寒天培地に塗布し、発育良好なコロニーを各シャーレから10株ずつ選抜した。得られた選抜株360株を、再度YAS培地で培養し、生酸性を検討した結果、288株が生酸菌として選抜され、そのうち

表2 酸基醴酏(使用菌株*Lactobacillus*)の経過

| 日数 | 操作 | 品温(°C) | ポーメ | Brix(%) | 酸度(ml) | アルコール(%) |
|----|----------|--------|------|---------|--------|----------|
| 1 | 糖化開始 | 57.8 | | | | |
| | 糖化停止 | 53.2 | | | | |
| | 乳酸菌添加 | 34.1 | | | | |
| 2 | | 31.2 | 15.7 | 29.2 | 0.8 | |
| 3 | 酵母添加・2段掛 | 25.5 | 15.7 | 29.4 | 4.6 | |
| 4 | | 18.9 | 13.6 | 27.1 | 6.8 | |
| 5 | | 18.9 | 12.2 | 26.1 | 8.2 | 4.75 |
| 6 | | 19.1 | 10.6 | 24.0 | 8.6 | 7.15 |
| 7 | | 19.2 | 9.3 | 22.6 | 8.9 | 8.35 |
| 8 | | 18.9 | 8.4 | 21.6 | 8.9 | 8.80 |
| 9 | 分け | 19.2 | 7.1 | 20.5 | 9.8 | 10.05 |

表3 酸基醴酏(使用菌株*Leuconostoc*)の経過

| 日数 | 操作 | 品温(°C) | ポーメ | Brix(%) | 酸度(ml) | アルコール(%) |
|----|----------|--------|------|---------|--------|----------|
| 1 | 糖化開始 | 56.9 | | | | |
| | 糖化停止 | 52.2 | | | | |
| | 乳酸菌添加 | 35.1 | | | | |
| 2 | | 31.8 | 15.3 | 28.4 | 3.3 | |
| 3 | 酵母添加・2段掛 | 25.3 | 15.8 | 29.4 | 8.4 | |
| 4 | | 21.0 | 14.0 | 28.4 | 9.8 | |
| 5 | | 20.4 | 12.6 | 27.0 | 10.5 | 5.10 |
| 6 | | 19.6 | 10.2 | 23.7 | 10.5 | 6.40 |
| 7 | | 19.2 | 9.0 | 22.7 | 10.5 | 8.35 |
| 8 | | 19.1 | 8.0 | 21.4 | 10.5 | 9.80 |
| 9 | 分け | 19.2 | 7.4 | 20.6 | 10.4 | 10.10 |

表4 中温速醸酏の経過

| 日数 | 操作 | 品温(°C) | ポーメ | Brix(%) | 酸度(ml) | アルコール(%) |
|----|-------|--------|------|---------|--------|----------|
| 1 | 水麴・仕込 | 25.2 | | | | |
| 2 | | 21.2 | | | | |
| 3 | | 18.9 | 16.7 | 27.3 | | |
| 4 | | 18.9 | | | | |
| 5 | | 19.1 | 10.1 | | 5.6 | 8.2 |
| 6 | | 19.2 | | | | |
| 7 | 下げ | 18.9 | 7.2 | | 6.1 | 11.5 |
| 8 | | 4.6 | | | | |
| 9 | 分け | 4.6 | 6.0 | | 6.6 | 12.2 |

表5 製成酒成分

| | 菌株 | 属 | モロミ日数 | アルコール | 日本酒度 | 酸度 |
|------|-------|-----|-------|-------|-------|-----|
| 酸基醴酐 | A123 | LB | 18 | 16.8 | + 3.3 | 3.1 |
| | H125 | LB | 20 | 16.5 | + 4.0 | 2.8 |
| | I155 | LB | 18 | 17.9 | + 6.0 | 2.9 |
| | I161 | LB | 18 | 18.6 | + 2.6 | 2.8 |
| | LB122 | LB | 18 | 18.4 | + 2.4 | 2.6 |
| | LB146 | LB | 19 | 18.3 | - 2.0 | 3.0 |
| | LB61 | LB | 19 | 18.5 | + 1.2 | 2.7 |
| | LB68 | LB | 21 | 19.6 | + 5.0 | 2.8 |
| | Leu58 | Leu | 18 | 17.8 | + 1.4 | 3.4 |
| | W133 | LB | 18 | 16.8 | + 7.7 | 2.9 |
| 中温速醸 | — | — | 18 | 18.2 | + 1.3 | 2.6 |

*属のLBはLactobacillus属、LeuはLeuconostoc属

155株で乳酸生産量が4000ppmを超えた。速醸酒母での乳酸添加量は汲水100L当たり400mL～600mLであることから、これらの株は酒母で必要とされる乳酸量を超える生産能をもつと言える。しかし、155株のうち、12株で酢酸の生産量が700ppm以上になることが確認されたため、これらを除く143株を候補株として選抜した。

候補株をSI培地にて培養した結果、火落ち性は確認されなかったものの、濃糖耐性試験において31株が生育遅延を示した。酒母は濃糖環境であり、グルコース濃度が高いときには20%程度になるとされている。そのため、グルコース25%で生育可能な供試株は全て酒母製造中に生育可能と考えられる。上記31株を除いた112株のアルコール感受性を評価した結果、84株で生育が見られなかった。エタノール8%で生育しない乳酸菌株は、清酒醸造の火落菌、腐造性乳酸菌となり得ないと期待されるため、これらを優良株として選抜した。

以上の結果、酒母の製造に利用可能性のある乳酸菌として84株を選抜した。

3-2 小仕込み試験結果

前項で選抜された乳酸菌84株のうち、実製造での利用を希望した6社の全48株を用いて小仕込み試験を実施した。乳酸発酵試験では全ての優良株で滴定酸度3.0～4.8mLとなり乳酸発酵は良好に進んだ。官能評価により、ヨーグルト臭やチーズ様といった乳酸醴酐特有の指摘があった株を排除し、全10株を選抜した。選抜された菌株をブルカー・ダルトニクス社製MALDI-TOF MS（同定解析ソフトウェアMALDI バイオタイパーVer4.1.80）で微生物同定を行ったところ、9株がLactobacillus属、1株がLeuconostoc属と推定された。

酸基醴酐および中温速醸醴酐の小仕込み試験の温度経過と成分値の代表例を表2～4に示す。使用したすべての乳酸菌株と同様の経過をたどり、酸基醴酐の分け時のpHが5.7～7.6、アルコール10.0～11.4%、滴定酸度は8.9～10.4mLとなった。中温速醸醴酐に比べ酸度が4.0mL程度高かった。また、今回選抜したLeuconostoc属を使用した場合、同様に選抜されたLactobacillus属を使用した場合に比べて酸度が0.6～1.8mL程度、高くなった。酒母製造日数は酸基醴酐で9日であり、一般的に30日程度かかる

生醴系酒母の日数と比較してもかなり短く、速醸系酒母並の日数で製造可能な方法であるといえる。

小仕込み試験を行った結果を表5に示す。モロミ日数は酸基醴酐・中温速醸醴酐ともに18～19日で差はなかった。製成酒の成分は酸基醴酐の方が、酸度が高めの傾向が見られた。日本酒度およびアルコールについては使用菌株によりバラツキが確認された。また、今回選抜したLeuconostoc属を使用した場合、同様に選抜されたLactobacillus属を使用した場合に比べて酸度がやや高くなった。

4 結 言

速醸系酒母製造における乳酸添加の代わりに利用可能な乳酸菌を、製造場由来の米麹から分離・選抜と、それらを用いて小仕込み試験を行った。酒母製造の要件として、①速醸酒母で添加される乳酸量を超える乳酸生産能、②火落ち性が無い、③濃糖環境で生育可能、④アルコール感受性、以上の特性を有する乳酸菌を選抜した。

選抜した乳酸菌を増殖させた後に酵母を添加する酸基醴酐に利用した結果、速醸系酒母製造方法と同等の日数で酒母の製造が可能であった。

文 献

- 1) 芦沢長；山廃酒母における微生物学的研究（第3報）乳酸菌添加の影響について、醸協、58(6)、pp543-548（1963）
- 2) 芦沢長；山廃酒母における微生物学的研究（第6報）育成日数の短縮について、醸協、59(3)、pp265-267（1964）
- 3) 鈴木賢二、高橋幹雄、根本彩、佐藤寿昭、根本秀夫、佐藤正；福島県産ブランド清酒の開発—山廃酒母用微生物の検索と山廃醴酐および純米大吟醸酒の試験醸造、福島県ハイテクプラザ試験研究報告、平成15年度、pp63-66（2003）
- 4) 西尾昭、茂一孝；乳酸菌と硝酸還元菌の添加による生もと系酒母製造の安定化、鳥取県産業技術センター研究報告(11)、pp55-58（2009）
- 5) 江田鎌治郎；乳酸訓養 最新清酒連醸法（1912）
- 6) 第四回改正国税庁所定分析法注解(1993)