

# 地域性と機能性の強化による県産酒類の高付加価値化

－世界に選ばれる青森の酒造り－

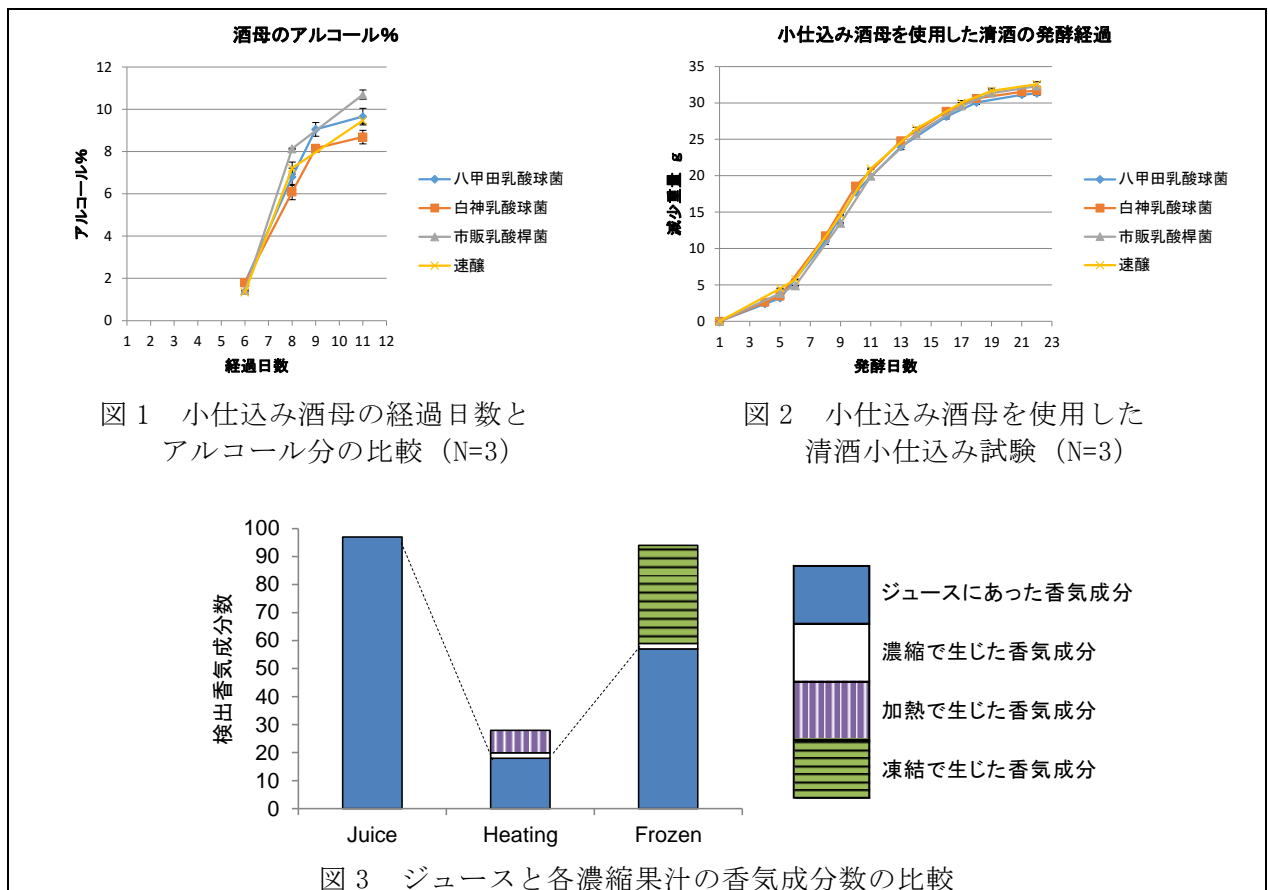
Add higher value to alcoholic beverages by strengthening regionality and functionality

- For liquor of Aomori chosen from the world -

小倉 亮、依田 毅、宮木 博、齋藤 知明

地域性および機能性を強化し、県産酒類の高付加価値化を目指すため、清酒については、県独自の種麴の普及や、自然界から分離した地域有用微生物を用いた新しい生酏造り（仮称：青森生酏）を開発する。また、果実酒については、新規で簡便な原料りんご果汁の冷凍濃縮技術や、健康機能成分を多く含有するりんご酒製造法を開発する。

R1年度は、清酒については、県産種麴「G-4（青森県酒造組合により「ゴールドG」と命名）」の普及のため県内4社で実地試験し、高い糖化力を示すことを確認した。また、県産酒米とゴールドGを用いた試験醸造で高品質なオール県産酒を製造できた。青森生酏開発に向け、白神山および八甲田山由来の乳酸菌から、それぞれ1株ずつを選抜し、それらを用いて酒母製造の小仕込み試験および2kgの中仕込み試験を行い、問題なく酒母が製造できること（図1, 2）を明らかにした（詳細は本文参照）。果実酒については、冷凍濃縮技術の開発に向け、凍結／融解法で濃縮りんご果汁を調製したところ、加熱濃縮よりも香気成分が保持され（図3）、官能的に優れることを明らかにした。



## 1. はじめに

地域性および機能性を強化することで県産酒類を高付加価値化することを目的として、清酒については、県独自の種麴の普及や、自然から分離した地域有用微生物を用いた新しい生酏造り（仮称：青森生酏）の開発、リンゴ酒については、新規で簡便な原料果汁の冷凍濃縮技術や、健康機能成分を多く含有する製造法の開発を行った。ここでは、新しい生酏造りに関する乳酸菌選抜と乳酸球菌添加による酒母小仕込み試験について報告する。

清酒を製造する際、清酒もろみの仕込みに先立ち、通常は「酒母」と呼ばれる優良な清酒酵母のみを純粋培養したスターターを製造する。現在、酒母の製造法は、優良酵母以外の微生物の生育を抑制するため乳酸を添加する『速醸酒母』が一般的である。一方で、伝統的な製法として、乳酸を添加せず、乳酸菌の働きにより酒母中に乳酸を蓄積させる製法の『生酏・山麴酒母』がある。これは、製造に時間と手間がかかるが特有の香味があり、数量は少ないものの「こだわり」を謳った商品としての価値が高く、青森県内でも複数社で製造されている。なお、仕込み初期に蒸米・米麴をすり潰す製法が「生酏」、すり潰さずそのまま製造する方法が「山麴」である。

生酏・山麴酒母においては、仕込み初期に硝酸還元菌が繁殖し、続いて乳酸球菌、乳酸桿菌の順に微生物相が遷移する。この時点で乳酸菌の生成する乳酸により、乳酸菌以外の微生物は死滅している。そこに優良酵母の培養液を添加すると、酵母の増殖に従ってアルコールが生成され、乳酸菌は死滅し、優良酵母のみが生存しているスターターとなる。このような複雑な微生物遷移が行われるため、生酏・山麴酒母の製造期間は30日程度を要し、熟練した製造管理が必要となる。

乳酸菌による乳酸の生成が重要であることから、優良な乳酸菌を分離し、純粋培養した優良乳酸菌を添加して製造することが行われている。近年では、蔵の衛生環境が向上し、生酏・山麴酒母の製造量も少ないことから、製造環境中の乳酸菌数が少なく、伝統的な製法で生酏・山麴酒母を製造しようとしても微生物学的に非常に不安定であり、毎年安定した品質の酒母を製造することは難しくなっていると考えられるため、乳酸菌の添加による安定した酒母製造の重要性は増している。また、乳酸菌を添加することで製造日数を短縮でき、工程を簡略化できることから利用価値が大きい。さらに、自社蔵から分離したオリジナルの乳酸菌を使用することや、自然から分離した乳酸菌を使用することで、付加価値を高めた商品開発を行うことができる。これら乳酸菌添加による酒母製造においては、ほとんどが乳酸桿菌 (*Lactobacillus sakei*) を添加するものであり、乳酸球菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) を添加することはほとんど行われていない。

弘前工業研究所では、平成29年度に八甲田山や白神山地といった県内の自然から乳酸菌を分離しており、生酏・山麴酒母で見られる乳酸球菌 (*Leu. mesenteroides*) を多数所有している。そこで、自然由来の乳酸球菌の添加により、これまでにない生酏・山麴酒母製造を開発することを目的として、乳酸菌の選抜と山麴酒母の小仕込み試験を行った。

## 2. 材料と方法

### 2.1 使用菌株

平成29年度に県内自然から分離し、PCR-RFLP および16SrDNA塩基配列、MALDI-TOF-MSにより *Leu. mesenteroides* と同定された88株の乳酸菌を用いた。分離源は宇曽利湖周辺（2株）、八甲田山・蔦沼周辺（61株）、白神山地・大川林道および弘前大学白神自然環境研究センター自然観察園周辺（25株）である。

対照として、NBRC102480株、NBRC102481株（酒母もろみから分離された *Leu. mesenteroides*）、NBRC15893株 (*L. sakei* 基準株)、および秋田今野商店より市販されている酒母用乳酸菌 (*L. sakei*) を用いた。

## 2. 2 一次選抜

MRS 培地で前培養した乳酸菌 10ul を、Brix=20 に調整して滅菌したコウジエキス 1ml に植菌し、15℃、96 時間後の pH を測定した。

## 2. 3 二次選抜

コウジエキス 90ml に、MRS 培地で前培養した乳酸菌培養液を 1ml 加え、20℃で 4 日間培養後、99.5%エタノールを 1 日 1~2ml ずつ、累積エタノール添加量が 10ml (10%) になるまで加えて 20℃で培養した。各エタノール濃度において、10 $\mu$ l サンプルングし、滅菌した 0.85%NaCl 溶液で適宜希釈したものを白亜 MRS 寒天培地に塗布、30℃で 2 日間培養したものについて、生えてきた乳酸菌のコロニー数をカウントし、生存乳酸菌数を測定した。

## 2. 4 選抜乳酸菌による酒母小仕込み試験

コウジエキスにおいて選抜した乳酸菌が、実際の酒母もろみ中で優良な性質を示すかどうか検討するために、小スケールで酒母もろみを作成した。乳酸菌を添加する山麩酒母とともに、対照として乳酸を添加する速醸酒母を作成し、それぞれ実際の酒造における仕込み配合を参考に、表 1 の割合で原料を配合した。

表 1 酒母仕込み配合

	乳酸菌添加酒母	速醸酒母
総米	50g	50g
$\alpha$ 米	35g	35g
乾燥麴	15g	15g
水	70ml	70ml
乳酸菌培養液	150 $\mu$ l	-
乳酸	-	450mg

山麩酒母は、 $\alpha$  化米、米麴、水、乳酸菌を入れてよく混ぜ合わせ、インキュベータで静置し乳酸発酵を行った後、pH の低下を確認し、培養酵母を添加した。酵母添加前のインキュベータの庫内温度経過は、8℃で開始、1℃/日で上昇させ、12℃で一定とした。

速醸酒母については、 $\alpha$  化米、米麴、水、乳酸を混合し攪拌した後、すぐに培養酵母を添加した。添加した酵母は清酒用酵母の「まほろば華」をコウジエキス (Brix=12) で 3~5 日間培養したものを使用した。酵母添加後は、インキュベータに静置して発酵させながら、適宜、先を切ったチップで 800 $\mu$ l 程度サンプルングし、13,000rpm で 5 分間遠心した上清について、アルコメイト AL-2 (理研計器) によりエタノール濃度を測定した。酵母添加後のインキュベータの庫内温度経過は、2℃/日で上昇させ、22℃で一定とした。対照とした速醸酒母については、8℃で開始し、2℃/日で上昇させ、20℃で一定とした。

また、適宜サンプルングし、滅菌した 0.85%NaCl 溶液で適宜希釈したもろみを、シクロヘキシミドを 50ppm 含む MRS 寒天培地あるいは、クロラムフェニコールを 50ppm 含む YM 寒天培地に塗布、30℃で 2 日間培養し、生えてきた乳酸菌および酵母のコロニー数をカウントした。

酒母中で酵母が増殖し、清酒製造に使われるものと同程度の成分になったところで、インキュベータの庫内温度を 8℃に下げ、使用まで 2~3 日静置した。出来上がった酒母それぞれ 20g を使用して清酒の小仕込み試験 (下記) を行うとともに、残りを 9000rpm、15 分遠心分離し、上清について、ボーメ度、アルコール度数、酸度、アミノ酸度を測定した。測定は国税庁所定分析法に基づいて行った。

## 2. 5 小仕込み酒母を用いた清酒小仕込み試験

上記 2.4 で小仕込みした自然由来乳酸球菌 2 株 (Lm69, Lm111)、および市販乳酸桿菌 1 株 (Ls) を用いた山廃酒母、および速醸酒母 (soku) を用いて、表 2 の配合で清酒小仕込み試験を行った。2 段仕込みで、1 段目と 2 段目の間には、Ls および soku では踊を 15℃で 1 日、2 段目は 8℃で開始し、1℃/日で庫内温度を上昇し、15℃一定で行った。Lm69, Lm111 では踊を 15℃で 2 日とり、2 段目は 9℃で開始、1℃/日で庫内温度を上昇し、15℃一定とした。仕込み後は適宜重量を測定し、ガス発生量により発酵経過を観察するとともに、仕込み後 5 日目 (Ls と soku は 6 日目) および 13 日目 (Ls と soku は 14 日目) に上記 2.4 と同様に酵母生菌数を測定した。仕込み後 4 日目 (Ls と soku は 5 日目) には 20g の追水を行った。

表 2 清酒仕込み配合

	1 段目	2 段目	追水	合計	歩合
総米	28.3g	80g		108.3g	
α 米	-	80g		85.8g	
乾燥麴	20g	-		22.5g	20.8%
水	30g	120g	20g	181.7g	168%
酒母	20g				7.7%

※酒母中の α 米量は 5.8g、乾燥麴量は 2.5g、水量は 11.7g とした。

ガス発生量が 32g 程度の時点で、9000rpm、15 分遠心分離して上槽し、ボーメ度、アルコール度数、酸度、アミノ酸度を測定した。測定は国税庁所定分析法に基づいて行った。

上槽した清酒について、アルコールを 10%に調整し、3-Octanol を内部標準として、SBSE 法により GC/MS 分析を行った。サンプル 10ml に対し内部標準を 50ul、NaCl を 2g 添加し、Twister により 800rpm で 60~90 分の吸着処理を行った後、以下の条件で GC/MS 分析した。

加熱脱着部 (TDU2) : 25℃ 1min →60℃/min 昇温 →230℃ 4min

クライオフォーカス部 (CIS4) : 10℃ 0.5min →12℃/sec 昇温 →260℃ 10min

GC/MS (Agilent 7890A / 5973)

カラム : HP-INNOWAX 60m×0.25mm×0.25um

キャリアガス : ヘリウム 1.0ml/min コンスタントフロー

注入 : TDU2 splitless

オープン温度 : 40℃ 5min →3℃/min 昇温 →240℃ 15min

質量分析 : Scan (m/z 30-350)

得られたクロマトグラムに対し、AMDIS32 (NIST) を用いてデコンボリューションによるピーク解析を行い、Mass Profiler Professional (Agilent) により主成分分析を行った。

## 3. 結果と考察

### 3. 1 一次選抜

88 株について、比較的 pH がよく低下した 25 株について、再度同様の試験を行い、2 回の平均が pH ≤ 4.4 となる 10 株を、優良株として選抜した。(図 1)

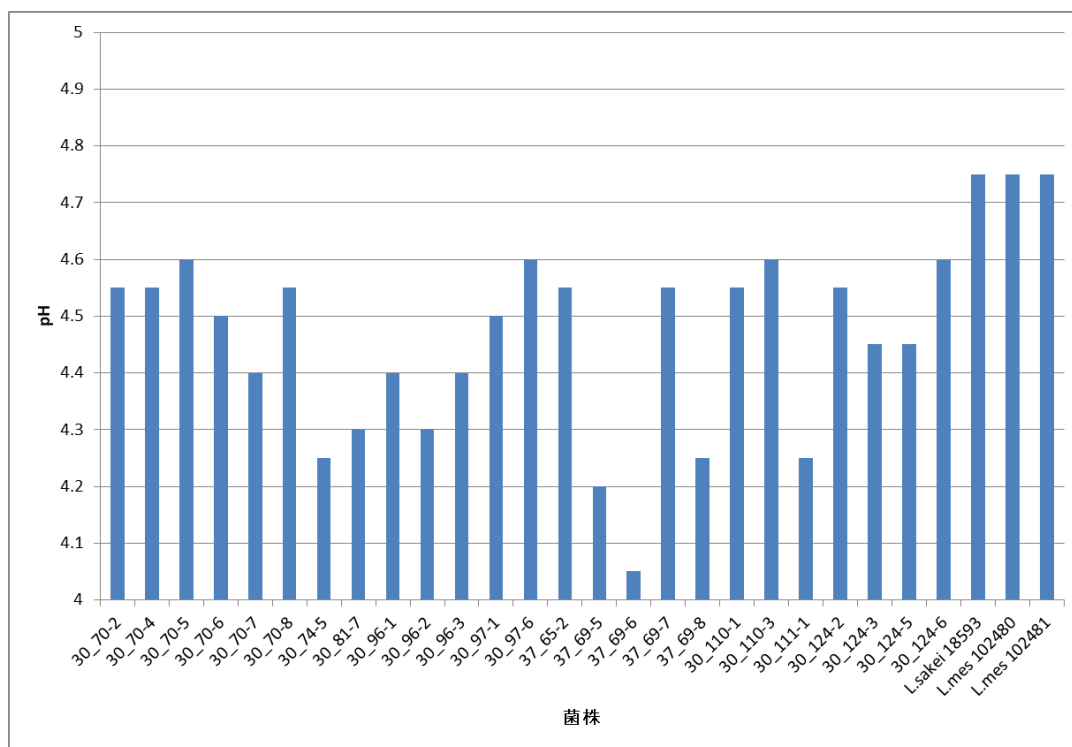


図1 コウジエキスにおける自然から分離した乳酸球菌の発酵能。2回の平均値

### 3. 2 二次選抜

いずれの株においても、アルコール6%程度から生菌数は減少し、10%ではアルコール添加前に比べて1%以下まで減少した。また対照としたNBRC102480株に比べ、自然分離株10株すべてのアルコール感受性が高かった。最も感受性が高く、アルコール8%で0.1%程度まで死滅する37-69-5株および30-111-1株を優良株として選抜した。(図2)

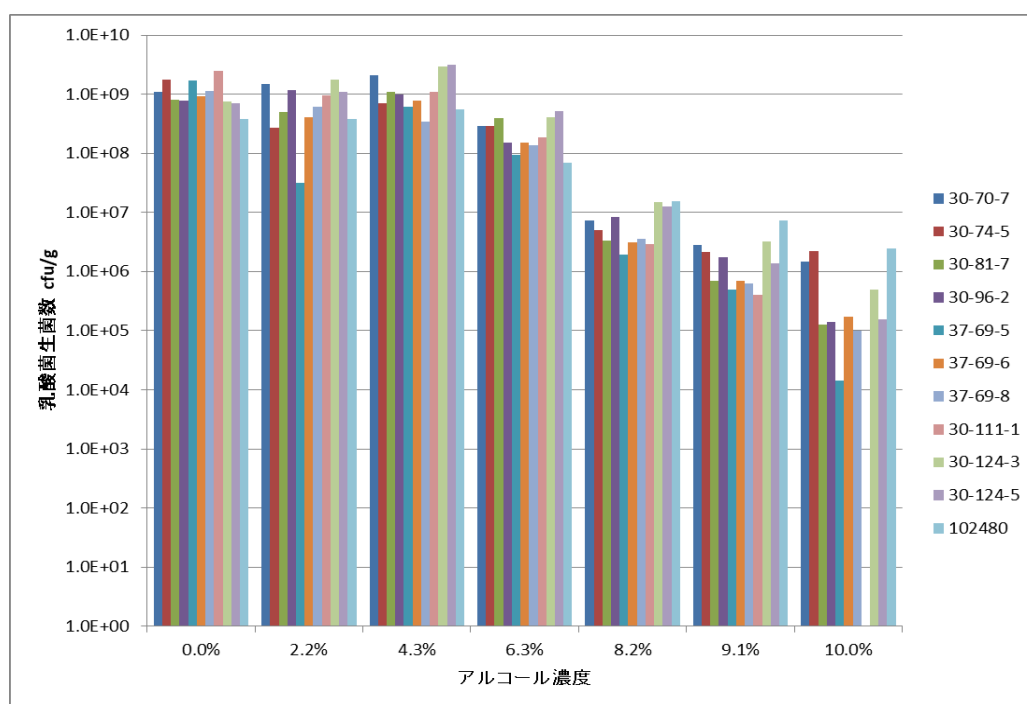


図2 アルコール濃度と乳酸菌生菌数

### 3. 3 酒母小仕込み試験

山麩酒母における、温度経過と pH の変化を図 3 に、乳酸菌の増殖を図 4 に示す。仕込み後、温度上昇に従って乳酸菌が増殖し、球菌では 6 日目、桿菌では 8 日目に最大となった。増殖に伴い pH も低下し、球菌、桿菌とも 10 日目には pH=3.5 程度となった。これは通常の上麩酒母と同様の推移であると考えられ、米・米麩中에서도選抜乳酸菌が実用できることが明らかとなった。乳酸球菌は桿菌よりも栄養要求性が低く、増殖が速いため、山麩酒母中では球菌が増殖してから桿菌が増殖することが分かっている。今回の試験においても、球菌の増殖は桿菌より早く、pH が低下するのも早かった。

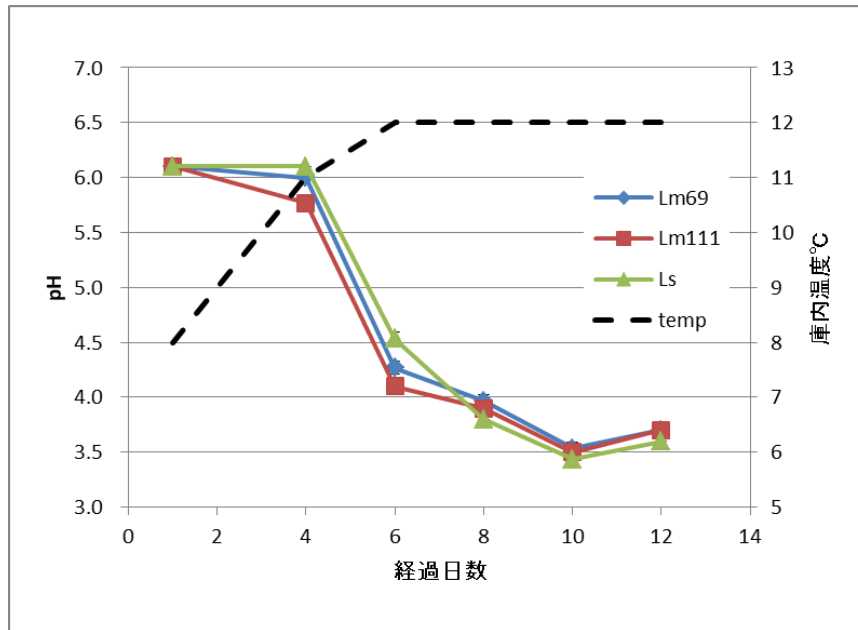


図 3 乳酸菌添加酒母の温度経過と pH

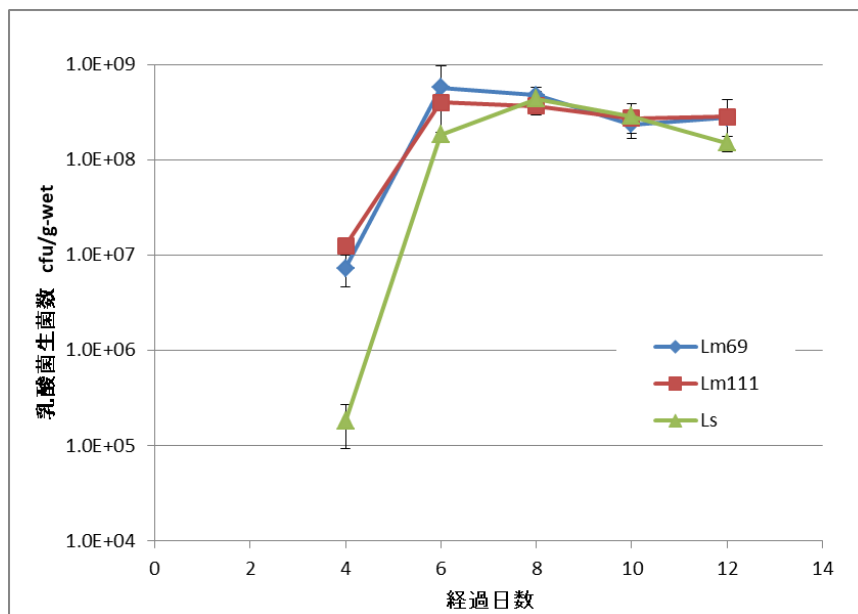


図 4 酒母 1g あたりの乳酸菌生菌数

酵母添加後の温度経過を図5に、アルコール濃度を図6に、酵母生菌数を図7に示す。乳酸球菌添加の山麩（Lm69, Lm111）では酵母が比較的増殖せず、使用前で速醸に比べ1/5～1/6程度しか存在していなかった。一般に、生酏・山麩酒母では、酒母中のリノール酸を乳酸菌が消費するため、速醸に比べ酵母の増殖が悪いが、その影響により生酏・山麩の特徴が生まれるとされている。今回の試験においても、乳酸菌添加のものは速醸に比べて酵母の増殖が悪く、同様の現象が起きていると思われるが、乳酸球菌添加の物は桿菌添加に比べ、より増殖が悪いことが明らかとなった。酒母中の酵母生菌数は清酒製造上重要であるため、この原因については今後より詳細に調査する必要がある。

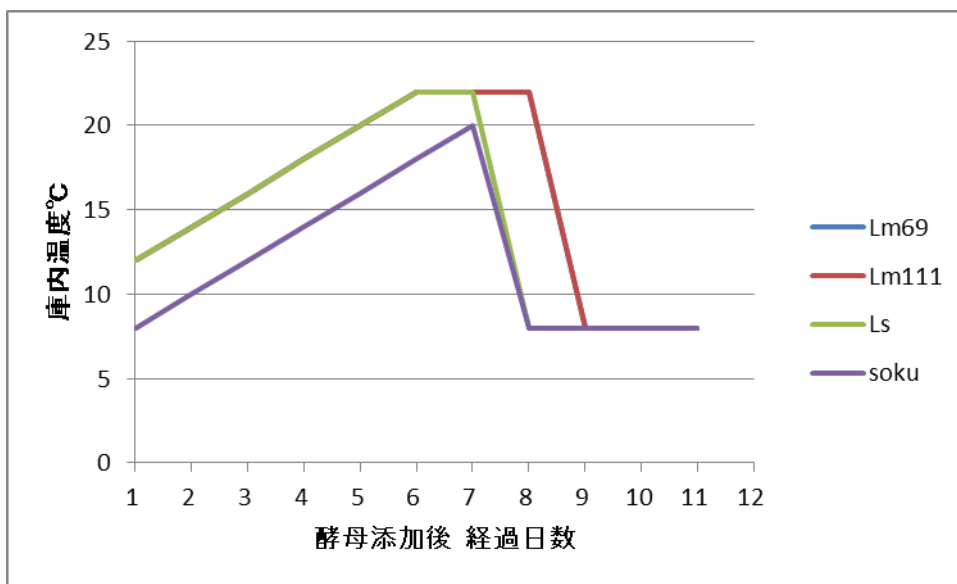


図5 酵母添加後の温度経過

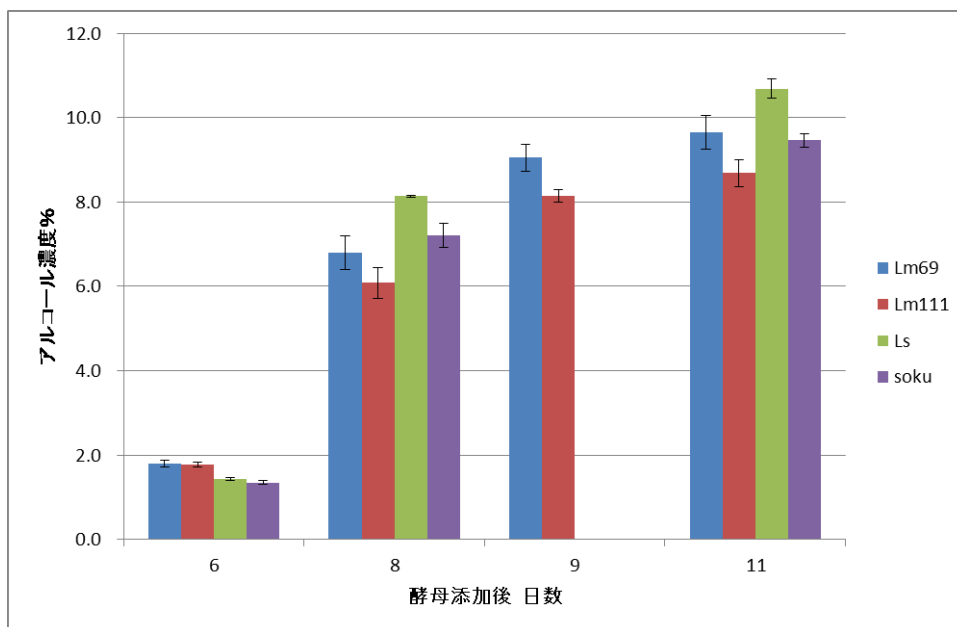


図6 酒母中のアルコール濃度

Ls と soku は 8 日目には下げたため、9 日目は測定していない。

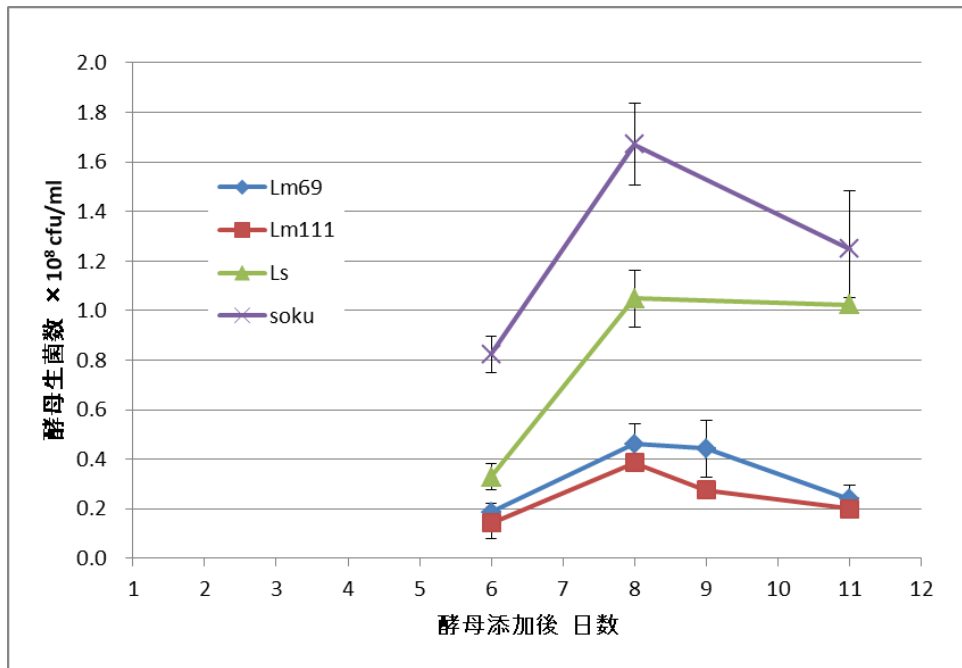


図7 酒母 1ml 中の酵母生菌数

酒母中の乳酸菌の生菌数を図8に示す。酵母添加後8日目では、桿菌添加の酒母ではアルコールが8%程度であり、乳酸菌は死滅していた。一方、球菌添加の酒母では8日目でアルコールが6%程度で、乳酸菌は $10^2 \sim 10^5$  cfu/ml程度生存していたが、9日目にはアルコールが8%程度になり、死滅した。このことから、乳酸桿菌でも球菌でも、酒母のアルコールが8%を超えていれば乳酸菌は死滅し、添加した乳酸菌に由来する腐造の心配はないと考えられる。

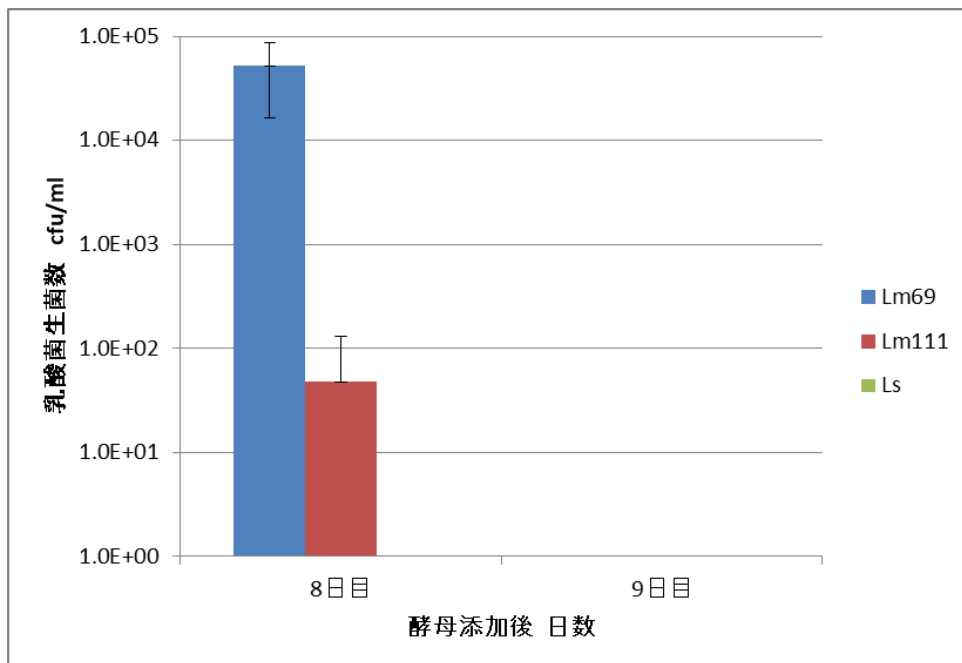


図8 酒母 1ml 中の乳酸菌生菌数

使用前の酒母成分を図9～12に示す。球菌添加の酒母においてはボーメがやや高く、アルコールがやや低い。通常の酒母製造では、温度を上昇させ、酵母が増殖し、アルコールが8%程度になれば温度を下げ、数日後に使用する際にはアルコールが10%程度であるが、球菌添加の酒母では酵母が



少なかったため、8%程度で温度を下げた後、発酵が鈍ってしまい、使用前でも10%以下となったためだと考えられる。酸度、アミノ酸度に関しては、乳酸桿菌、球菌ともに山廃酒母の特徴を示しており、問題ない酒母に仕上がったと考えられた。

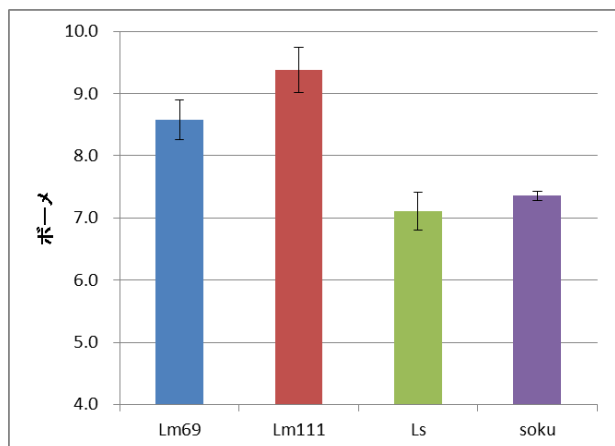


図9 使用前酒母成分 (P)

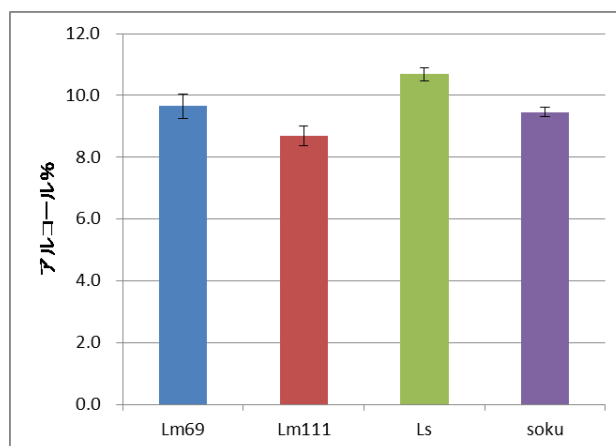


図10 使用前酒母成分 (アルコール)

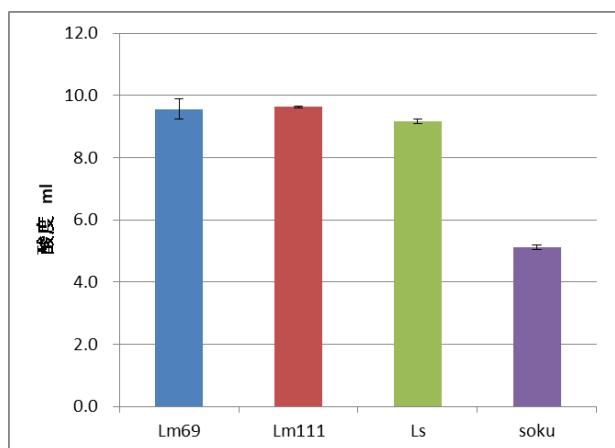


図11 使用前酒母成分 (酸度)

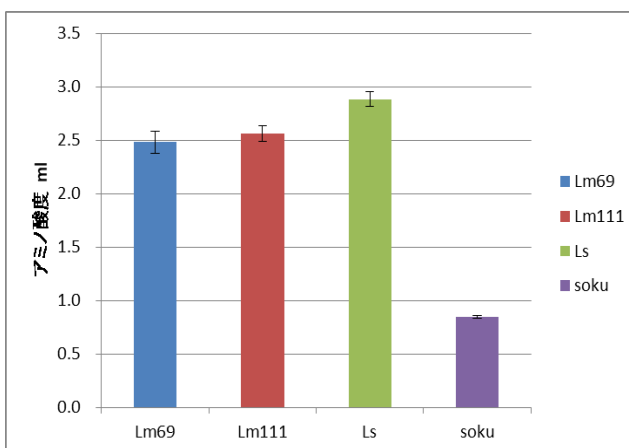


図12 使用前酒母成分 (アミノ酸度)

### 3.4 清酒小仕込み試験

小仕込み酒母を用いた清酒の発酵経過を図13に示す。乳酸球菌添加の酒母中の酵母数が少なかったため、甕を2日として仕込んだところ、桿菌および速醸とほぼ同様の発酵経過となった。発酵中の酵母生菌数(図14)は発酵5日、13日のいずれにおいても速醸に比べて乳酸球菌添加酒母使用のものは少なかったが、上述の酒母中での差(1/5~1/6)より小さく、速醸の1/2程度だった。

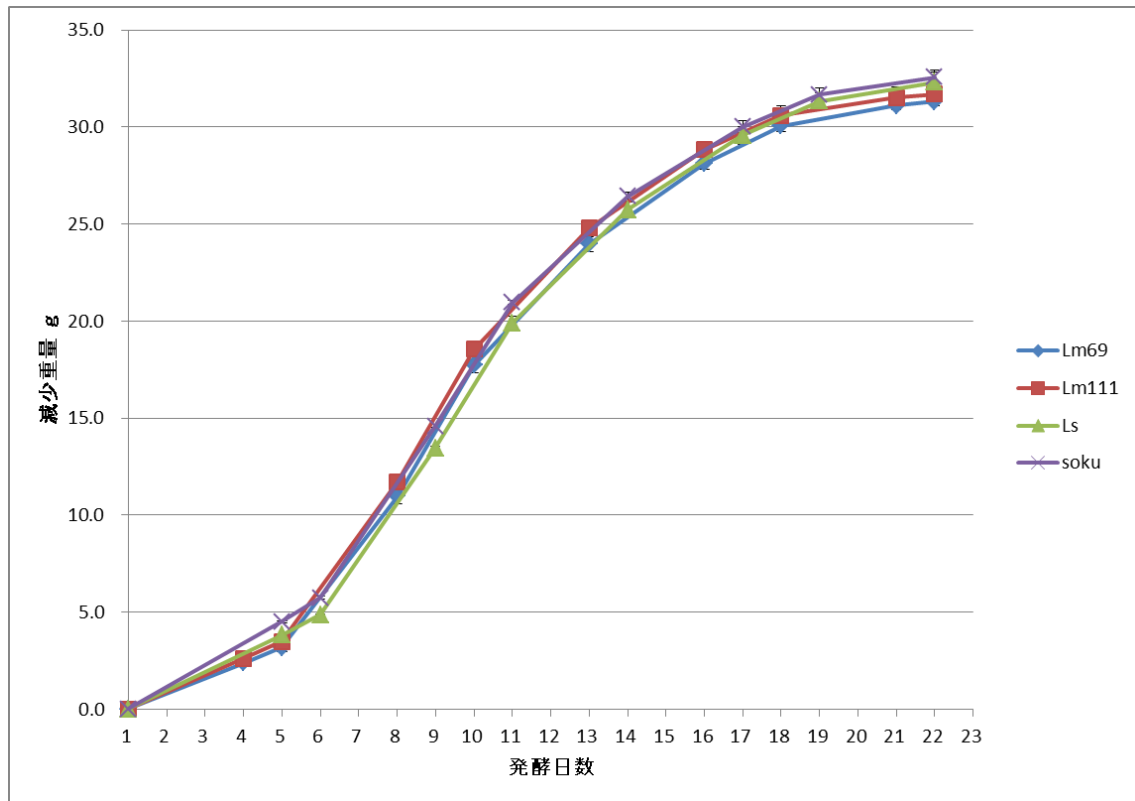


図 13 清酒小仕込み試験の発酵経過

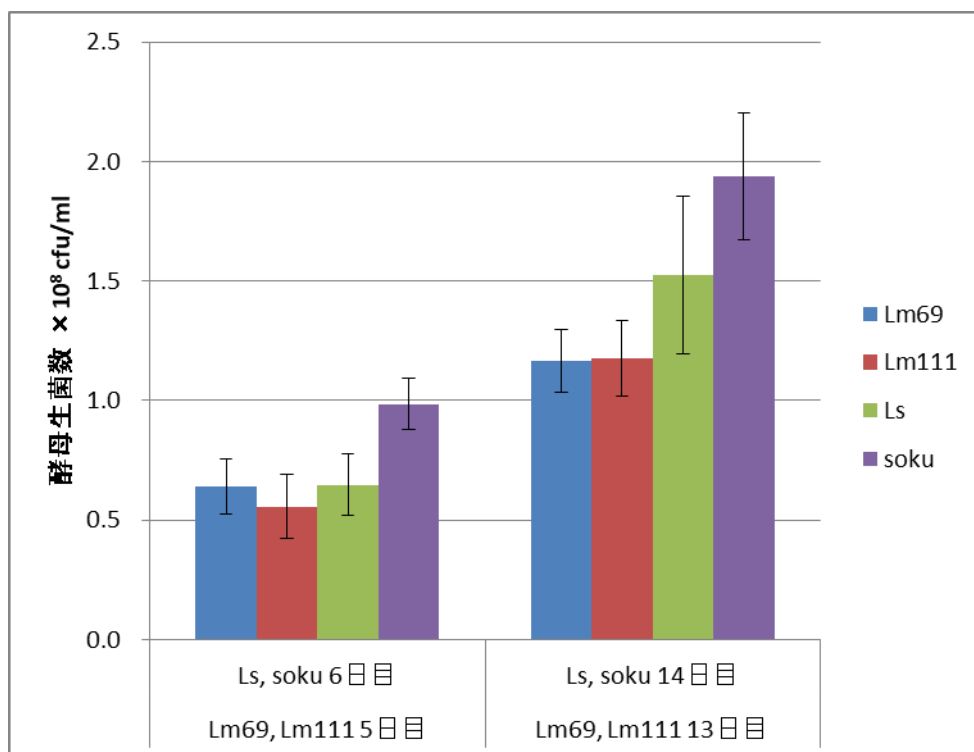


図 14 清酒もろみ発酵中の酵母生菌数

上槽した清酒成分を図 15~18 に示す。球菌添加の物は、桿菌添加や速醸に比べて日本酒度がやや低く、アルコール製成はやや少ないが、アルコール度数 18%以上まで発酵できていることから、実用上大きな問題はないと考えられる。酸度は速醸に比べ乳酸菌（桿菌、球菌とも）添加でやや高

く、アミノ酸度は球菌添加の物でやや高かった。官能的には香味に異常はなく良好であったが、球菌添加の物に明確な特徴があるわけではなかった。

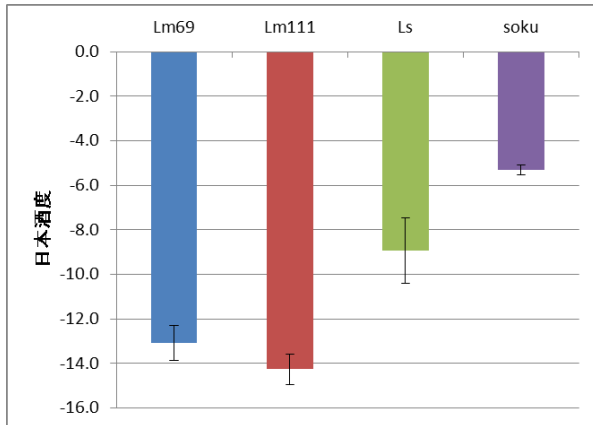


図 15 清酒成分 (日本酒度)

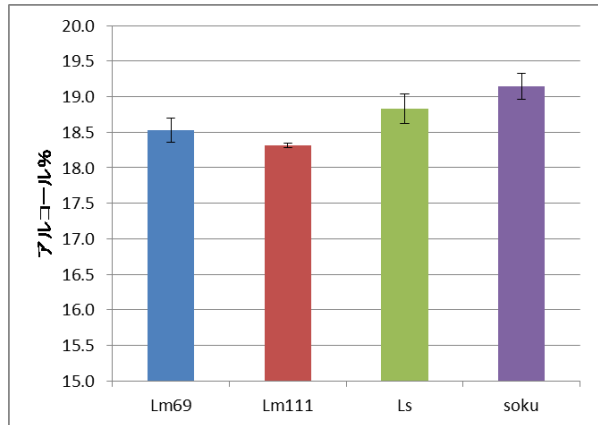


図 16 清酒成分 (アルコール度数)

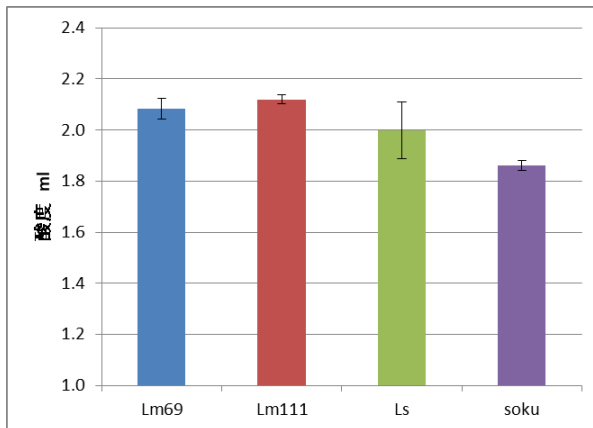


図 17 清酒成分 (酸度)

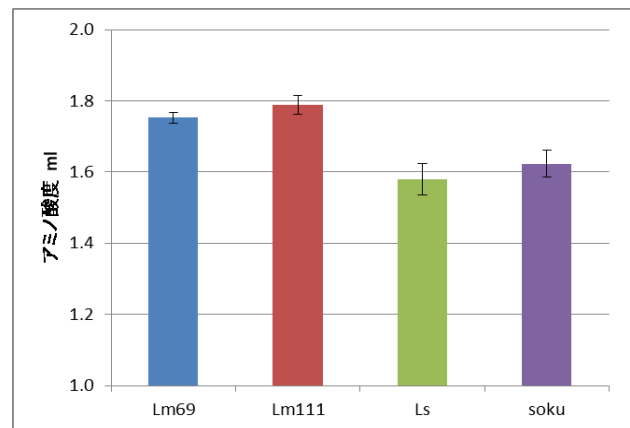


図 18 清酒成分 (アミノ酸度)

清酒成分を GC/MS 分析し、検出されたピークについて主成分分析を行ったところ、主成分 1 (寄与率 13.4%) により、球菌添加のものと、桿菌添加および速醸がおおむね識別できた (図 19)。官能的には大きな違いは認識できなかったが、球菌添加の酒母により製造した清酒が、通常の酒母を用いた清酒とは異なる特徴を持つ可能性が示唆された。この差異が球菌による成分由来であるのか、酵母が少なかったことに起因するものなのかについては、さらなる研究が必要である。

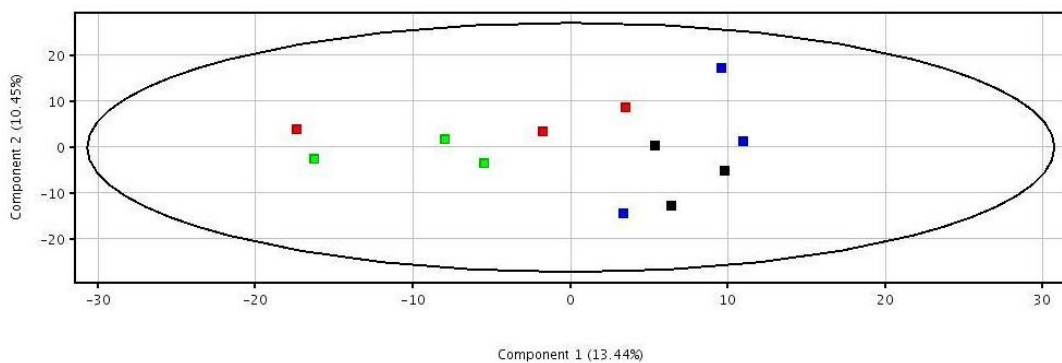


図 19 清酒の主成分分析結果 赤 : Lm69、緑 : Lm111、青 : Ls、黒 : soku

#### 4. まとめ

自然由来の乳酸球菌 (*Leu. mesenteroides*) 88 株から、コウジエキスでの低温発酵性とアルコール感受性により、生酏・山麩に有用であると考えられる 2 株を選抜した。選抜株を用いて、 $\alpha$  米、乾燥米麴を用いた山麩酒母小仕込み試験を行ったところ、選抜株を添加した酒母では 8~12°C、10 日間で pH が 3.5 まで低下し、市販の乳酸桿菌を添加したものと遜色ない性能であることが明らかとなった。一方で、酵母添加後は、球菌を添加した酒母で酵母の増殖が悪く、速醸の 1/5~1/6 程度の酵母数に留まった。小仕込みした酒母を用いた清酒の小仕込み試験では、乳酸球菌添加のものより踊り日数を 2 日としたことで、速醸、乳酸桿菌添加の酒母を用いたものと同様の発酵経過を示し、すべてアルコール度数が 18% 以上であったことから、乳酸球菌添加の酒母は実用可能であると考えられた。乳酸球菌添加酒母を用いて製造した清酒は、官能的に異味異臭は無く、GC/MS による成分分析では、速醸や乳酸桿菌添加酒母を使用した清酒とは異なる特徴を持つことが示唆された。