

# 阿波晩茶由来乳酸菌による清酒醸造技術の開発

## Sake Brewing Using Lactic Acid Bacteria Isolated from Awa-bancha

岡久 修己\*  
OKAHISA Naoki

### 抄 録

阿波晩茶から分離した乳酸菌から、山麴酒母や高温糖化乳酸菌添加酒母に利用可能な株の取得を試みた。アルコール感受性試験、高温糖化乳酸菌添加酒母および山麴酒母の小仕込み試験によって選抜を行った結果、低温で増殖し、酸生成能が高く、酵母の増殖に伴い生存数が減少する優良株を1株取得した。当該乳酸菌は山麴仕込み等の生酏系清酒醸造に実用可能である。

### 1 はじめに

これまでの研究で、徳島県の地域資源である阿波晩茶から乳酸菌を分離し<sup>1)</sup>、食品製造への利用を進めてきた。本研究では、阿波晩茶由来乳酸菌の清酒醸造への利用について検討を行った。清酒醸造における酒母製造では、醸造用乳酸を添加して雑菌の増殖を抑え、清酒酵母を純粋培養する速醸系酒母が一般的である。一方、伝統的な醸造手法である生酏系酒母では醸造用乳酸を使用せず、乳酸菌の生育を誘導し、乳酸菌が生産する乳酸によって雑菌の増殖を抑え、清酒酵母の純粋培養を行う。近年、徳島県内の清酒製造企業でも、製品の一部に生酏系酒母の一種である山麴酒母を用いる事例が増えている。さらに、山麴酒母よりも工程の短縮が期待できる高温糖化乳酸菌添加酒母<sup>2)</sup>の導入も検討されている。そこで、阿波晩茶由来乳酸菌の中から、山麴酒母や高温糖化乳酸菌添加酒母の製造に安定して利用できる優良株の選抜を試みた。

### 2 方法

#### 2・1 供試菌株および培地

平成30年度～令和4年度に阿波晩茶から分離した乳酸菌108株を供試した。山麴酒母小仕込み試験の対照として、生酏系酒母での使用が報告されている *Latilactobacillus sakei* NBRC 3541、*Leuconostoc mesenteroides* NBRC 102481を供試した。乳酸菌の培養はMRS培地を用いた。酵母はLED夢酵母4206株<sup>3)</sup>

を供試した。酵母の培養はYM培地を用いた。

#### 2・2 アルコール感受性試験

エタノール8および10%(v/v)を添加したMRS培地に各乳酸菌株の前培養液を接種し、30°Cで3日間培養後、生育の有無を確認した。

#### 2・3 簡易山麴酒母小仕込み試験

$\alpha$ 化米(徳島製麹 AA-60)14g、乾燥麹(徳島製麹 GK-60)6g、汲水30mLの配合で酒母小仕込み試験を行った。各乳酸菌の培養液を1mL接種後、酒母品温を15°Cに保ち、7日目に酸度を測定した。10日目に酵母培養液を1mL接種し、酒母品温を15°Cに保ち、30日目に乳酸菌数を測定した。

#### 2・4 高温糖化乳酸菌添加酒母試験

乾燥麹(徳島製麹GK-60)25gに水80mLを加え55°Cで6時間糖化し、Brixを20に調製した。これに乳酸菌培養液を0.5mL加え30°Cで48時間培養し、 $\alpha$ 化米(徳島製麹AA-60)50g、水100mL、酵母培養液0.5mLを加え、20°Cで12日間培養し、高温糖化乳酸菌添加酒母とした。

#### 2・5 1000g 規模山麴酒母小仕込み試験

$\alpha$ 化米(徳島製麹 AA-60)700g、乾燥麹(徳島製麹 GK-60)300g、汲水1400mL、硝酸カリウム120mgの配合で酒母小仕込み試験を行った。1日目に硝酸還元菌(秋田今野商店)2.4mLと乳酸菌培養液を6mL接種した(対照は1日目に前述の2種類の乳酸菌を6mLずつ接種した)。品温経過は図1に示した。15

\* 食品・応用生物担当

日目に酵母培養液を 6mL 接種し、25 日目に使用した。比較対照とする中温速醸酒母は乾燥麹（徳島製麹 GK-60）65 g， $\alpha$  化米（徳島製麹 AA-60）35 g，汲水 150mL，乳酸 700 $\mu$ L，酵母培養液 5mL の配合で仕込み、品温は 1 日目 20°C，2~7 日目 18°C，8 日目 6°C とし、8 日目に使用した。

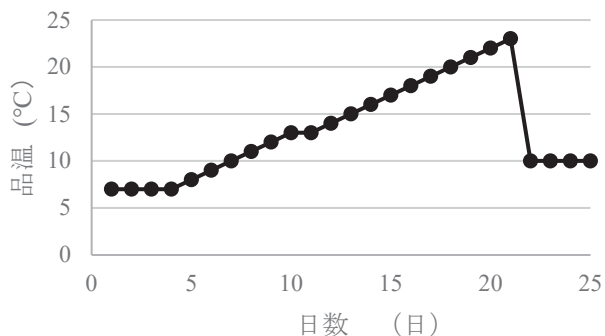


図 1 山麴酒母の品温経過

## 2・6 清酒小仕込み試験

表1に示した仕込み配合で総米200gの清酒小仕込み試験を行った。酒母は、前述の1000g規模山麴酒母小仕込み試験で作製した山麴酒母と中温速醸酒母 33.6g（酒母歩合7%）を使用した。麹は徳島製麹社製乾燥麹GK-60，掛米は徳島製麹社製 $\alpha$ 化米AA-60を用いた。品温は、初添15°C，仲添10°C，留添6.5°Cとし、その後9日目に最高品温が10.5°Cとなるように約0.5°C/日ずつ品温を上昇させ、以後上槽までこの温度を維持した。留添以降の炭酸ガス減少量が58g以上となった時点で、遠心分離により上槽した。

表 1 総米 200g 清酒小仕込み試験仕込み配合

	酒母	初添	仲添	留添	計
総米(g)	14	24	67	95	200
蒸し米 (g)	9.8	15.2	55	80	160
麹米(g)	4.2	8.8	12	15	40
汲水(L)	19.6	60.4	100	180	360

## 2・7 成分分析

酒母および製成酒の日本酒度とアルコールは、アントンパール製アルコライザー酒システム DMA 4100M を用いて、酸度、アミノ酸度および亜硝酸は国税庁所定分析法に従い分析した。有機酸は、高速液体クロマトグラフ（EXTREMA，日本分光製）を使用した。カラムは Shodex RSpak KC-811（6  $\mu$ m，

8 mm×300 mm，レゾナック製）を直列に 2 本用いた。移動相は 4mM 過塩素酸を流速 1.5 mL/min で用いた。反応相は 0.2 mM ブロモチモールブルーを含む 15 mM リン酸水素二ナトリウム溶液を流速 1.5 mL/min でポストカラム添加し、検出波長は 445 nm とした。香気成分の測定は、アジレント・テクノロジー社製ガスクロマトグラフ GC8890（使用カラム：アジレント・テクノロジー社製 DB-Wax）を用いたヘッドスペース法にて行い、成分の定量は内部標準法に従った。内部標準として、カプロン酸メチルを用いた。

## 3 結果および考察

### 3・1 アルコール感受性試験

阿波晩茶から分離した乳酸菌 108 株について、エタノールを添加した MRS 培地における生育性を評価した。エタノール 8% の条件では、生育が抑制される株は 1 株であり、大多数の株が耐性を示した。一方で、10% では 18 株の生育が抑制された。10% エタノールで生育が抑制された株を表 2 に示す。山麴酒母は、アルコール濃度が 10% 前後に達することから、山麴酒母への利用を考えると、10% のエタノールに感受性を示す必要がある。このことから、エタノール 10% で生育が抑制された 18 株を候補株として選

表 2 アルコール感受性試験結果

菌株No.	属種	エタノール		選抜
		8%	10%	
AWA18105	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	+	-	※
AWA1853	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	+	-	
AWA19106	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	+	-	※
AWA1925	<i>Secundilactobacillus collinoides</i>	-	-	
AWA1986	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	-	※
AWA2002	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	+	-	※
AWA2018	<i>Secundilactobacillus collinoides</i>	+	-	
AWA2053	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	+	-	
AWA2207	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	+	-	※
AWA2212	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	+	-	※
AWA2215	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	+	-	※
AWA2227	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	+	-	※
AWA2230	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	+	-	※
AWA2249	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	+	-	※
AWA2260	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	+	-	※
AWA2277	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	+	-	※
AWA2285	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	+	-	※
AWA2293	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	+	-	※

30°C 3 日間の培養で生育がみられた株を+、生育がみられなかった株を-で示した。選抜株を※で示した。

抜した。さらに、これらの中から菌種として食品への利用実績が確認できなかった4株を除外し、14株を、山麩酒母に利用可能な優良株として選抜した。

### 3・2 簡易山麩酒母小仕込み試験

選抜株14株を用いて酒母環境中での酸の生産性と酒母完成時の生存性を確認するため、総米20g規模で簡易山麩酒母小仕込み試験を行った。仕込み7日目の酸度が7.0mL以上であること、および仕込み30日目における乳酸菌数が4.0log CFU/g以下であることを選抜基準とし、これらの条件を満たした6株を山麩酒母製造に適した優良株として選抜した(表3※印で示す)。

表3 簡易山麩酒母小仕込み試験結果

菌株No.	7日目酸度 (mL)	30日目乳酸菌数 (logCFU/g)	選抜
AWA18105	10.9	2.8	※
AWA19106	11.4	6.5	
AWA1986	6.0	2.7	
AWA2002	6.9	5.2	
AWA2207	7.6	3.3	※
AWA2212	8.2	6.2	
AWA2215	7.6	3.0	※
AWA2227	6.1	N.D.	※
AWA2230	12.3	5.6	
AWA2249	8.3	3.8	※
AWA2260	9.8	5.6	
AWA2277	8.7	6.2	
AWA2285	8.8	N.D.	※
AWA2293	9.0	5.5	

### 3・3 高温糖化乳酸菌添加酒母試験

高温糖化乳酸菌添加酒母は、乳酸を添加しない酒母製法の一つである。麴および蒸米に水を加えて高温糖化を行った後、乳酸菌を添加し、酒母中で酸を生成させることで雑菌の増殖を抑制し、酵母の健全な増殖を促す。山麩酒母に比べて酸生成が速く、工程の短縮が可能であることから、徳島県内の清酒製造企業でも導入が検討されている。そこで、濃糖環境における酸生成能および高アルコール環境下での生存性を確認するため、高温糖化乳酸菌添加酒母小仕込み試験による選抜を行った結果を表4に示す。全ての試験区でアルコール濃度は13%以上に達した。

このうち、酒母完成時に酸度が7.0 mLを超え、かつ生菌数が検出限界以下(N.D.)まで減少した株を優良乳酸菌として選抜し、AWA2227株およびAWA2285株を取得した。

表4 高温糖化乳酸菌添加酒母試験結果

菌株No.	酸度 (mL)	アルコール (%)	乳酸菌数 (logCFU/g)	選抜
AWA18105	6.9	13.7	5.2	
AWA2207	7.6	13.5	3.3	
AWA2215	7.6	13.4	3.0	
AWA2249	8.3	13.8	3.8	
AWA2227	7.7	13.3	N.D.	※
AWA2285	8.8	13.3	N.D.	※

### 3・4 1000g 規模山麩酒母小仕込み試験

選抜株AWA2227株およびAWA2285株を使用して1000g規模の山麩酒母小仕込み試験を実施した。対照として生醗系酒母での使用実績が報告されている *Latilactobacillus sakei* NBRC 3541, *Leuconostoc mesenteroides* NBRC 102481を混合接種し、同条件で山麩酒母を仕込んだ。

亜硝酸の推移を図2に示す。対照株は6日目、AWA2227株は7日目をピークに亜硝酸が減少に転じたが、AWA2285は減少が遅れた。AWA2227株は13日目に亜硝酸が消失したのに対し、対照とAWA2285株は15日目の酵母添加時まで残存していた。

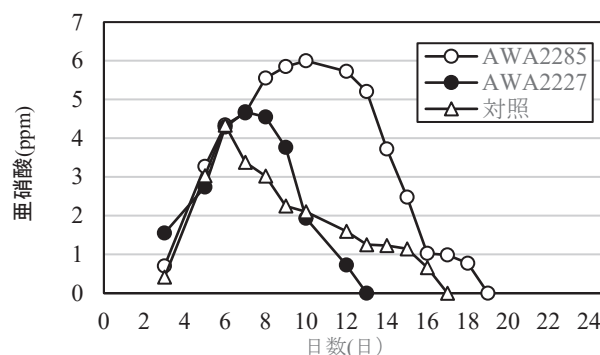


図2 亜硝酸の推移

乳酸菌数の推移を図3に示す(対照は混合仕込み2株の合計菌数)。AWA2227は菌数の立ち上がり早く10日目には8.0logCFU/gを超えた。一方、AWA2285株は菌数の立ち上がり遅れ、8.0log CFU/gに達したのは16日目であった。対照株は、接種時から菌数があまり増えず、7.0logCFU/g前後で推移した。酵母添

加後の乳酸菌数は、AWA 2227株が最も早く減少に転じ、20日目には検出限界以下となった。

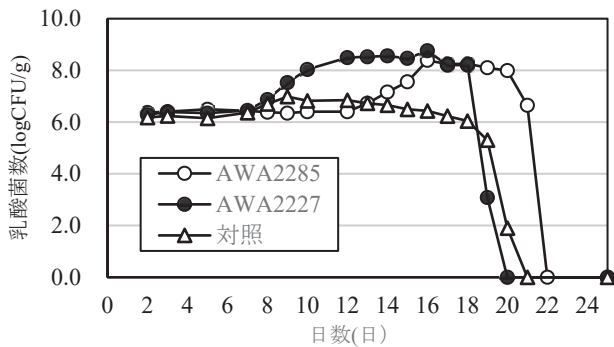


図3 乳酸菌数の推移

酸度の推移を図4に示す。酸度は、AWA2227株および対照で早期から上昇が認められたが、対照は12日目以降で酸度の上昇が鈍化した。一方で、AWA2227は順調に上昇し、15日目の酵母添加時に唯一7.0mLを超えた。一方でAWA2285株は、酸度の上昇が遅く、酵母添加時の酸度は4.0mL前後にとどまった。しかしながら、その後は上昇を続け、最終的にはAWA2227の酸度を上回った。

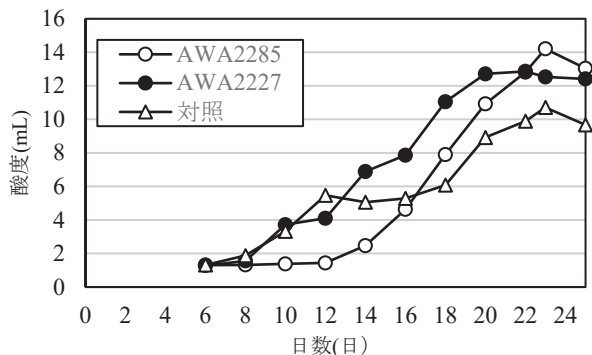


図4 酸度の推移

アルコールの推移を図5に示す。酵母添加時の環境が最も良好であったAWA2227株が最も早いアルコールの上昇を示した。

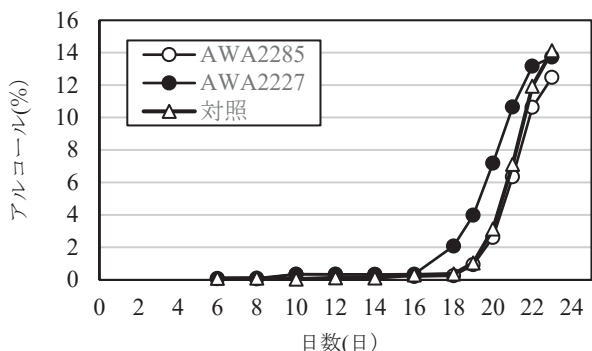


図5 アルコールの推移

以上の結果から、AWA2227株は山廃酒母環境中で増殖が早く、それに伴い酸度の上昇と亜硝酸の減少が最も早く進行した。これにより酵母の生育環境が早期に整い、アルコール生成の立ち上がりも早かった。さらに、アルコール上昇後の乳酸菌の死滅も早いことから、AWA2227株は山廃酒母の安定した製造に理想的な性質を有していると考えられる。

山廃酒母3種類と、比較のために仕込んだ乳酸菌無添加、乳酸添加の中温速醸酒母の一般成分分析結果を表5に示す。酵母数には大きな差は見られなかったが、アルコール、酸度、アミノ酸度は速醸酒母に比べて山廃酒母が高い傾向を示した。

表5 酒母の一般成分

使用乳酸菌	速醸酒母		山廃酒母	
	-	AWA2227	AWA2285	対照
アルコール(%)	11.6	13.7	12.5	14.1
酸度(mL)	7.3	12.4	13.0	9.7
アミノ酸度(mL)	1.1	2.9	3.8	4.5
酵母数 (log10CFU/g)	8.1	8.3	8.3	8.4

有機酸分析結果を表6に示す。リンゴ酸および乳酸はいずれも山廃酒母が高く、特に乳酸はAWA2227株およびAWA2285株を用いた山廃酒母で速醸酒母の2倍以上となった。コハク酸は山廃酒母が速醸酒母より低い傾向を示し、酢酸については明確な傾向は認められなかった。

表6 酒母の有機酸

使用乳酸菌	速醸酒母		山廃酒母	
	-	AWA2227	AWA2285	対照
リンゴ酸 (mg/100mL)	19.0	25.7	26.3	31.9
コハク酸 (mg/100mL)	100.5	72.7	70.9	71.1
乳酸 (mg/100mL)	306.2	714.7	748.5	527.6
酢酸 (mg/100mL)	29.4	32.4	39.5	27.2

### 3・5 清酒小仕込み試験

1000g規模の山廃酒母小仕込み試験で得られた山廃酒母3種類と、比較対照の中温速醸酒母を用いて総米200gの清酒小仕込み試験を行った。製成酒の一般分析結果を表7に示す。もろみ日数や日本酒度には大きな差は見られず、酒母成分で差がみられたアミノ酸度も製成酒では明確な差が見られなかった。アルコール濃度は山廃酒母仕込み清酒でわずかに高い傾向があり、酸度は山廃酒母仕込み清酒で高かった。

表7 製成酒の一般成分

使用乳酸菌	速醸酒母		山麩酒母	
	-	AWA2227	AWA2285	対照
もろみ日数(日)	22	22	22	23
日本酒度	3.0	3.0	2.6	4.6
アルコール(%)	16.8	17.1	17.1	17.4
酸度(mL)	2.0	2.3	2.3	2.3
アミノ酸度(mL)	1.4	1.2	1.3	1.4

有機酸分析結果を表8に示す。リンゴ酸およびコハク酸に大きな差はなく、酢酸は山麩酒母仕込み清酒でやや高めであった。乳酸は酒母成分と同様に山麩酒母仕込み清酒で高く、特にAWA2227株およびAWA2285株を用いた山麩酒母仕込み清酒では速醸酒母仕込み清酒の2倍以上となった。

表8 製成酒の有機酸

使用乳酸菌	速醸酒母		山麩酒母	
	-	AWA2227	AWA2285	対照
リンゴ酸 (mg/100mL)	17.1	15.8	14.9	16.7
コハク酸 (mg/100mL)	44.0	49.8	49.4	48.9
乳酸 (mg/100mL)	24.0	49.0	50.7	41.8
酢酸 (mg/100mL)	8.3	10.4	10.5	9.5

香気成分分析結果を表9に示す。酢酸エチルが山麩酒母仕込み清酒でやや低くなったが、吟醸酒の主要な香気成分であるカプロン酸エチル等の成分は大きな差は見られなかった。

表9 製成酒の香気成分

使用乳酸菌	速醸酒母		山麩酒母	
	-	AWA2227	AWA2285	対照
酢酸エチル(ppm)	109	78.6	81.6	89.7
イソアミルアルコール(ppm)	174	179	176	173
酢酸イソアミル(ppm)	2.9	2.7	3.2	3.4
カプロン酸エチル(ppm)	4.3	4.7	4.9	5.2

官能評価では、すべての製成酒においてオフフレーバーであるジアセチル臭は認められなかったが、山麩酒母のAWA2285株仕込みおよび対照仕込みでは、乳酸菌特有の漬物臭が感じられた。AWA2227株を用いた山麩仕込み清酒は、酸度が高い特徴を有し、オフフレーバーがなく、良好な品質であった。このことから、AWA2227株は山麩仕込み清酒に用いる乳酸菌として有望な株であると考えられる。

#### 4 まとめ

本研究では、阿波晩茶から分離した乳酸菌から山麩酒母や高温糖化乳酸菌添加酒母に利用可能な株の取得を試みた。最終選抜された *L. plantarum* AWA2227 株は、山麩酒母環境中で、低温で増殖し、酸生成能が高く、酵母の増殖に伴い生存数が減少した。また、当該乳酸菌で仕込んだ山麩酒母で醸造した清酒は、山麩酒母仕込み清酒の特徴である高い酸度を有し、オフフレーバーがなく、良好な品質であった。このことから、AWA2227 株は山麩仕込み清酒に用いる乳酸菌として有望な株であると考えられる。

#### 参考文献

- 1) 西岡浩貴, 岩橋均, 堀江祐範. “阿波晩茶から分離された乳酸菌の特性”. 美味技術学会誌. 2022, 21(1), p. 12-19.
- 2) 佐藤稔英. “酸基醴(あまざけ)醪を用いた清酒製造”. 日本醸造協会誌. 2021, 116(11), p. 736-747
- 3) 岡久修己, 宮崎絵梨, 中村怜. “短波長UV-LEDを利用した清酒酵母の育種”. 徳島県立工業技術センター研究報告. 2017, 26, p. 41-44.