色素含有平板培地を用いた清酒酵母の識別と酵母混合発酵

渡辺誠衛・田口隆信・高橋 仁・大野 剛

(秋田県総合食品研究所)

平成 21 年 2 月 27 日受理

Identification of *sake* yeast strains using a color plate containing a pigment

Seiei WATANABE, Takanobu TAGUCHI, Hitoshi TAKAHASHI and Tsuyoshi OONO

(Akita Research Institute of Food and Brewing,

4-26 Aza Sanuki, Araya-machi, Akita City, Akita 010-1623)

In order to distinguish *sake* yeasts, color-plates containing 27 kinds of pigments were tested. We identified two groups of *sake* yeasts by using a color-plate containing 1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% glucose, 2% agar, and 4 mg/100 ml Phloxine-B. One group of yeasts with high ethyl caproate productivity stained red or dark pink, and another group of yeasts stained light pink or white.

As a result of examining a fermentation mixture of two kinds of yeasts, we were able to confirm the ratio of the yeast in *shubo* and *moromi* quickly and easily by using the color plates. The brewed *sake* contained a characteristic of both yeasts.

Key words : 清酒酵母, 識別, フロキシシン B, カラープレート

緒 言

近年, 清酒の多様化や個性化に伴い, 香気生成や酸生成に特徴のある様々な酵母が育種・選抜され, 実用化されている。高エステル生成酵母として, きょうかい 1601 号¹⁾, きょうかい 1701 号²⁾, きょうかい 1801 号³⁾ 等は吟醸酒の品質向上とバラエティー化に大きく貢献している。

一方, 清酒製造場や消費者は, より個性を持った清酒を求めている傾向があり, 宮尾ら⁴⁾の報告のように, 高エステル生成酵母と他の酵母を混合して清酒を醸造する混合発酵により, よりバラエティー豊かな清酒の製造が増えている。

清酒酵母の識別は, 従来法として細胞形態判別, コロニー形態判別, TTC 染色法⁵⁾, β -アラニン法⁵⁾, 糖類や窒素源の資化性・発酵性などがあるが, 近年, 分離方法から由来する薬剤耐性による判別法⁴⁾や, PCR 法による識別法⁶⁾⁷⁾, などが報告されている。

しかし, 酵母混合発酵において, 簡易で迅速に酒母や醪中の酵母を識別する技術が確立するには至っていない。清酒製造場では, 酵母混合清酒製造を経験に頼っている部分が多く, 酵母の個々の特性を生かしながら安定かつ再現性のある清酒を製造するのが難しいのが現状である。

清酒製造において酵母混合発酵中の酵母の識別が簡易に, かつ迅速に可能になることにより, 酒母および醪中の各酵母の酵母密度や生菌数や酵母割合が明らかになり, 製成酒の香気成分や酸度やその他の成分を含めた品質との関係が明らかになると考えられる。さらに, 酵母の種類と混合割合を変えることにより, 単一酵母の短所を補うことにより醪の管理が容易になり, 混合した酵母の能力範囲内で製成酒の一般成分や香気成分等を調整することができ, 単一酵母では得られない品質の清酒を安定製造することが可能になると思われる。

本研究では, 個々の酵母の特性を把握した上で, 色

素を含有した平板培養法により酵母混合発酵中の酵母の簡易識別法を確立し、酵母の特性を生かした酵母混合発酵安定醸造の可能性を見いだしたので報告する。

実験方法

1. 供試菌

供試菌株は、吟醸酒を想定して、比較的発酵力が旺盛で比較的香りが穏やかなタイプとして、きょうかい9号酵母（以下K-9）ときょうかい901号酵母（以下K-901）、秋田流・花酵母AK-1（きょうかい1501号として配付されている。以下AK-1）の3株。一方、比較的発酵力が弱く、香り（特にカブロン酸エチル）を多く製成するタイプとして、秋田県で開発されたこまち酵母⁹⁾、秋田純米酵母、華こまち酵母⁹⁾の3株の計6株を用いた。

2. 酵母の増殖特性

Y. P. D 液体培地（1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose）3ml にスラントから酵母を白金耳接種し、30°C、2日間前培養を行い、初発の酵母密度を調整後、麴エキス（Be'6.5）10ml で、アドバンティック東洋（株）製バイオフォトレコーダー（TN-112 D）を用いて酵母の最適温度の30°Cで増殖特性を検討した。得られた増殖曲線から、 $-\log T = 0.025$ に達する時間を酵母の休眠時間と設定し、傾きと吸光度から増殖速度係数 b と二倍増殖世代時間 τ (hr) を求めた。

吸光度 (OD_{660}) が最大で、かつ平行になった72時間をめどに培養を終了し、培養液についてトーマ氏の血球計により酵母密度を⁵⁾、Y. P. D 平板培養法⁵⁾により生菌数を求めた。

(1) 各酵母の増殖特性

供試菌株6種類の酵母を初発酵母密度を 1×10^6 cells/ml になるように調整し、増殖特性を検討した。

(2) 初発菌数を変えた増殖特性

初発酵母密度 1×10^6 cells/ml のAK-1酵母を対照として、こまち酵母の初発酵母密度を $1.0 \sim 3.0 \times 10^6$ cells/ml の5段階に変えて増殖特性を検討した。

3. 色素培地による酵母の識別

アクリジンオレンジ、アリザリンレッドS、アニリンブルー水溶液、アルカシンG、ビーブリッヒスカー

レッドWS、ボルドーS、プロモクレゾールグリーン、プロモフェノールブルー、プロムチモールブルー、クリスタルバイオレット、エオシンY、エリトロシンB、エバンスブルー、酸性フクシン、塩基性フクシン、エチレンブルー3水塩、メチルオレンジ、メチルレッド、ニュートラルレッド、フェノールレッド、フロキシシンB、ローズベンガル、サフランT、ズダンVI、トリパンプルー、ボンソアール2R、ボンソアール3Rの27種類の色素を最終濃度2mg/100mlになるようにY. P. D 平板培地を作成した。（以下カラープレートと示す）

6種類の酵母をY. P. D 液体培地で30°C、3日間培養し、前記27種類のカラープレートに酵母集団として釵山でレプリカし、30°C、3日間培養後、各酵母の染色を観察した。

4. カラープレート最適濃度の検討

レプリカ法の結果から、識別可能性の高い5種類のカラープレートについて色素を最終濃度2mg/100ml, 4mg/100ml, 6mg/100ml, 8mg/100ml, 10mg/100mlの5段階のプレートを作成し、前記同様、酵母集団として釵山でレプリカし、30°C、3日間培養後、最も識別がクリアな濃度を検討した。また、酵母培養液を約100個のコロニーが出現するように希釈後、カラープレートを用いてコロニーの識別についても検討した。

5. 色素培地による混合酵母の識別

K-901, AK-1と、こまち酵母、華こまち酵母の4種類の酵母を単独でY. P. D 液体培地で30°C、2日間培養し、酵母密度をそれぞれ 5×10^7 cells/ml に調整した。その後、K-901×こまち酵母、K-901×華こまち酵母、AK-1×こまち酵母、AK-1×華こまち酵母の4種類の組み合わせで混合し、約100個のコロニーが出現するように直ちに希釈後、カラープレートで30°C、2日間培養し、酵母の識別別の可能性を検討した。

6. 吟醸酒母における酵母混合発酵

精米歩合40%の白米を使用し、総米450g（蒸米300g、麴米150g、汲み水500ml、乳酸500ml/100L）の速醸酒母における酵母混合発酵を検討した。酵

母はAK-1酵母とこまち酵母を最終的に仕込時の初発生菌数が 5×10^5 cells/mlになるように混合比率を100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100の6区分とし、酒母育成試験を行った。品温経過は、一般的な吟醸速醸酒母の育成法に従い、13日目で使用とした。酵母の判別はカラプレートを用いて前記同様に行った。

7. 吟醸醪における酒母混合発酵

精米歩合40%の白米を使用し、総米600g(蒸米476g, 麴米124g, 汲み水846ml)の3段仕込みを行った。酒母は、前記AK-1酵母とこまち酵母を最終的に初添時の初発生菌数が 2.0×10^7 cells/mlになるように混合比率を100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100の6区分とした。品温は、初添12°C, 踊り13°C, 仲添9°C, 留添6°Cで仕込み、以後、7日目に最高品温11°Cになるように温度管理し、最高品温を10日間維持した後、目標醪日数25日、目標日本

酒度-1~+1の上槽まで品温を下げた。

酵母の判別はカラプレートを用いて前記同様に行った。

実験結果及び考察

1. 酵母の増殖特性

(1) 各酵母の増殖特性

K-9, K-901, AK-1, こまち酵母, 秋田純米酵母, 華こまち酵母の6株について増殖特性を調べた結果をTable 1に示した。休眠時間が短く、増殖速度係数が大きく、二倍体増殖世代時間が短いK-9, K-901, AK-1グループと、休眠時間が長く、増殖速度係数が小さく、二倍体増殖世代時間が長いこまち酵母, 秋田純米酵母, 華こまち酵母グループの2グループに分かれることが分かった。さらに、72時間の培養終了後において、同じ初発菌数でも酵母の種類によって最大酵母密度や最大生菌数が異なることが明らかになった。

(2) 初発菌数を変えた増殖特性

Table 1 Growth characteristics of yeasts

Strains	Dormant stage -LogT=0.025 (hr)	Growth rate b	Generation times t (hr)	After 72 hr of incubation	
				Number of cells ($\times 10^8$ cells/ml)	Number of viable cells ($\times 10^8$ colonies/ml)
K-9	7.5	0.31	2.21	1.60	0.95
K-901	8.2	0.30	2.31	1.76	0.99
AK-1	7.5	0.33	2.12	1.94	1.15
<i>komachi-kobo</i>	9.3	0.24	2.86	0.80	0.35
<i>Akita-junmai-kobo</i>	8.8	0.26	2.68	0.71	0.32
<i>hanakomachi-kobo</i>	9.0	0.25	2.77	0.77	0.31

Initial number of cells was 1×10^6 cells/ml.

Yeast cells were cultured in a *koji* extract medium for 72 hr at 30°C by BIO-PHOTORECORDER.

Table 2 Growth characteristics of yeasts by different initial number of yeast cells

Strains	Initial number of cells ($\times 10^6$ cells/ml)	Dormant stage -LogT=0.025 (hr)	Growth rate b	Generation times t (hr)	After 72 hr of incubation
					Number of cells ($\times 10^8$ cells/ml)
AK-1	1.0	4.3	0.40	1.75	1.81
<i>komachi-kobo</i>	1.0	4.7	0.30	2.31	0.77
<i>komachi-kobo</i>	1.5	4.0	0.33	2.08	0.91
<i>komachi-kobo</i>	2.0	3.8	0.32	2.17	0.82
<i>komachi-kobo</i>	2.5	3.4	0.34	2.03	0.90
<i>komachi-kobo</i>	3.0	3.2	0.35	1.98	0.77

Yeast cells were cultured in a *koji* extract medium for 72 hr at 30°C by BIO-PHOTORECORDER.

AK-1 の初発酵母密度 1×10^6 cells/ml を対照に、こまち酵母の初発酵母密度を 1 倍～3 倍にして増殖特性を調べた結果を Table 2 に示した。こまち酵母の初発菌数が増えることによって休眠時間は短くなったが、増殖速度係数や二倍体増殖世代時間には差異はなく、培養終了後の最大酵母密度にも影響しないことが分かった。即ち、培養終了時の最大酵母密度が AK-1 の

1.81×10^8 cells/ml に対し、こまち酵母は初発菌数を多くしても $0.77 \sim 0.91 \times 10^8$ cells/ml となったことから、最大酵母密度は初発菌数に影響されず各酵母の増殖特性によることが明らかとなった。

宮尾ら⁴⁾¹⁰⁾、稲橋ら¹¹⁾の報告の通り、酒母に酵母を混合使用する場合や、醪に酒母を混合使用する場合、混合する酵母の増殖速度や最大酵母数を考慮した増殖

Table 3 Staining of yeasts on color-plates by replica method

No	Pigment	K-9	K-901	AK-1	<i>komachi-kobo</i>	<i>akita-junmai-kobo</i>	<i>hanakomachi-kobo</i>
1	Acridine Orange	—	—	—	—	—	—
2	Alizarin Red S	—	—	—	—	—	—
3	Aniline Blue	+	+	+	+	+	+
4	Azocarmine G	—	—	—	—	—	—
5	Biebrich Scarlet WS	—	—	—	—	—	—
6	Bordeaux S	—	—	—	—	—	—
7	Bromocresol Green	—	—	—	—	—	—
8	Bromophenol Blue	—	—	—	—	—	—
9	Bromothymol Blue	—	—	—	+	+	+
10	Crystal Violet	—	—	—	—	—	—
11	Eosin Yellowish	—	—	—	++	++	++
12	Erythrosine B	+	—	—	++	++	++
13	Evans Blue	+	+	+	+	+	+
14	Fuchsin Acid	—	—	—	—	—	—
15	Fuchsin Basic	—	—	—	—	—	—
16	Methylene Blue	—	—	—	—	—	—
17	Methyl Orange	—	—	—	—	—	—
18	Methyl Red	—	—	—	—	—	—
19	Neutral Red	+	+	+	+	+	+
20	Phenol Red	—	—	—	—	—	—
21	Phloxine B	+	—	+	++	++	++
22	Rose Bengal	+	—	+	++	++	++
23	Safrain T	—	—	—	—	—	—
24	Sudan VI	—	—	—	—	—	—
25	Trypan Blue	++	++	++	++	++	++
26	Ponceau 2 R	—	—	—	—	—	—
27	Ponceau 3 R	—	—	—	—	—	—

Color plates contained 1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% glucose, 2% agar and 4 mg/100 ml Phloxine-B.

Yeast cells were cultured on color plates by a replica method for 3 days at 30°C.

Symbols: —: no staining, +: weak staining, ++: good staining

特性を十分に把握しておくことが重要であることが再認識された。

2. 色素培地による混合酵母の識別

K-9, K-901, AK-1 と、こまち酵母, 秋田純米酵母, 華こまち酵母の6株について, 27種類の色素を最終濃度 2mg/100ml 一定になるように調整したカラープレートに培養液をレプリカし, 各酵母の染色を観察した結果, プロムチモールブルー, エオシン Y, エリトロシン B, フロキシシン B, ローズベンガル の5種類のカラープレートで K-9, K-901, AK-1 グループと, こまち酵母, 秋田純米酵母, 華こまち酵母グループの2つのグループに分かれることが分かった。(Table 3)

特に, フロキシシン B 含有カラープレートでは, 酵母集団の色が K-9, K-901, AK-1 が白または薄いピンク色に染色されるのに対して, こまち酵母, 秋田純米酵母, 華こまち酵母は濃いピンク色または赤色に染色され, 2グループの明確な判別が可能だった。参考までにきょうかい 1601 号, きょうかい 1701 号, きょ

うかい 1801 号は濃いピンク色または赤色, きょうかい 1401 号は白または薄いピンク色に染色され, 高カブロン酸エチル生産酵母の K-1601, K-1701, K-1801, こまち酵母, 秋田純米酵母, 華こまち酵母とそれ以外の酵母との識別が可能であった。(Fig. 1)

3. カラープレート最適濃度の検討

6種類の酵母について識別可能性の高い5種類の色素の濃度を5段階に変えたカラープレートを用いてレプリカ法で酵母集団の識別を検討した結果, エオシン Y とエリトロシン B は 2mg/100ml, フロキシシン B は 4mg/100ml が最もクリアに識別することができた。(Table 4)

また, 培養後の酵母混合液でコロニー識別を検討した結果, フロキシシン B の 4mg/100ml 濃度のカラープレートでは, シングルコロニーでも K-9, K-901, AK-1 の白または薄いピンク色に対して, こまち酵母, 秋田純米酵母, 華こまち酵母は濃いピンク色または赤色に染色され, 2グループの識別が可能であった。(Fig. 2)

フロキシシン B は, 合成着色料で通称赤色 104 号と呼ばれ¹²⁾, 食品, 医薬品, 化粧品など幅広く利用されているだけでなく, 植物細胞 (特に硬質菌) や動物細胞組織の染色にも使われている。濃赤色に染色された酵母細胞を顕微鏡で観察すると細胞内に色素が浸透していることから, 比較的発酵力が旺盛で比較的香りが穏やかなタイプの K-9, K-901, AK-1, K-1401 グループと比較的発酵力が弱く, 香り (特にカブロン酸エチル) を多く製成するタイプの K-1601, K-1701, K-1801, こまち酵母, 秋田純米酵母, 華こまち酵母グループのコロニーの染色の違いは, 両グループの酵母の細胞壁あるいは細胞膜の違いによるフロキシシン B 色素の細胞内への浸透性の強弱によるものと推察された。

4. 色素培地による酵母の識別の有効性

培養後の AK-1 酵母とこまち酵母を適当に混合し, 約 100 個のコロニーが出現するように希釈した試料を最終濃度 4mg/100ml のフロキシシン B 含有カラープレートに 100 μ l 塗末し, 30°C, 2 日間培養したものを試料とした。パネラーは, 当研究所の酵母実験の未熟練者 11 名により, 問 1: 「2 種類の酵母を識別する場合

Fig. 1 Identification of replica-colonies using color plates

Colonies were replica-plated on color plates for 3 days at 30°C

A, B, C, J: Colors of yeasts were white or light-pink.

D, E, F, G, H, I: Colors of yeasts were dark-pink or red.

A: K-9, B: K-901, C: AK-1, D: *komachi-kobo*, E: *akita-junnmai-kobo*, F: *hanakomachi-kobo*, G: K-1601, H: K-1701, I: K-1801, J: K-1401

Table 4 Effect of pigment concentrations on staining of yeast

pigment	concentration of pigment (mg/100 ml)	AK-1	<i>komachi-kobo</i>
Aniline Blue	2	yW	W
	4	ltB	ltB
	6	B	B
	8	B	B
	10	B	B
Eosin Yellowish	2	ltyW	dkyW
	4	ltyW	dkyW
	6	ltP	dkP
	8	ltP	dkP
	10	ltP	dkP
Erythrosine B	2	ltP	P
	4	dkP	dkP
	6	dkP	dkP
	8	dkP	dkP
	10	dkP	dkP
Phloxine B	2	ltP	dkP
	4	ltP	dkP
	6	dkP	dkP
	8	dkP	dkP
	10	dkP	dkP
Rose Bengal	2	RP	RP
	4	RP	RP
	6	RP	RP
	8	RP	RP
	10	RP	RP

Yeasts were cultured onto color plates by a replica method for 3 days at 30°C
 Color : W : white, lty W : light yellowish white, yW : yellowish white, dky
 W : dark yellowish white, ltB : light blue, B : blue, ltP : light pink, P : pink,
 dkP : dark pink, RP : red purple

The colors of K-9 and K-901 are the same as AK-1 (A grupe).

The colors of *akita-junnmai-kobo* and *hanakomachi-kobo* are the same as
komachi-kobo (B grupe).

合、何を基準で分けますか?」, 問2: 「2種類の酵母の数を数えて下さい。なお、その識別理由を書いて下さい。」の質問で行った。

その結果、コロニーを色のみで識別した人が8名、色と形で識別した人が2名、形のみで識別した人は0

名だった。10名中10名(100%)がコロニーの色を識別理由とした結果となった。多くのパネラーは、AK-1酵母はピンク色または薄いピンク色、こまち酵母は赤または濃いピンク色と認識し、本カラープレートを用いた酵母の識別方法の有効性が証明された。

Fig. 2 Identification of colonies using color plates
Yeast cells were cultured on color plates for 2 days at 30°C

A : AK-1. Colors of colonies were white of light pink.

B : *komachi-kobo*. Colors of colonies were dark pink or red.

従来のセルレニン等の薬剤耐性含有プレートでの識別方法では、プレートのセルレニン濃度や酵母の耐性の強弱によりコロニーの大きさが異なり識別に熟練を要していたが、本方法ではコロニーの大きさには差が

なく、染色されたコロニーの色のみで1枚のプレートにより識別が可能であることから、簡易性・正確性・再現性の高い識別方法であると考えられた。

5. 速醸酵母における酵母混合発酵

AK-1 酵母とこまち酵母を最終的に仕込時の初発生菌数を 5×10^5 cells/ml になるように混合比率を 100 : 0, 80 : 20, 60 : 40, 40 : 60, 20 : 80, 0 : 100 の6区分で速醸酵母育成試験を行った。

カラープレートで両酵母を識別し、それぞれの酵母の生菌数と酵母の比率を Fig. 3 に示した。生菌数は、両酵母ともに4日目の初暖気頃から8日目の沸付にかけて急激に増加し、9日目の最高品温から使用までは緩やかな増殖となった。AK-1 酵母 100% の酒母は、こまち酵母 100% の酒母に比べ、増殖が旺盛で、使用時には AK-1 酵母の 13.5×10^7 cells/ml に比べ、こまち酵母は 11.2×10^7 cells/ml となり、最大生菌数が異なり、バイオフィトレコーダーで調べた両酵母の特性が反映される結果となった。また、AK-1 酵母とこまち酵母の合計した総生菌数も使用時点で AK-1 酵母の比率が高くなるにつれて多くなる傾向が見られた。

カラープレートを用いた両酵母の生菌数の比率は、AK-1 酵母とこまち酵母の初発生菌数の比率 100 : 0

Fig. 3 Viable cells and ratio of cells in *shubo* by using mixed-cultures of AK-1 and *komachi-kobo*
Yeast cells were cultured on color plates (1% yeast extract, polypeptone, 2% glucose, 2% agar and 4 mg/100 ml Phloxine-B) for 2 days at 30°C

Symbols : AK-1 : *komachi-kobo* = 100 : 0 (—●—), 80 : 20 (··○··), 60 : 40 (—▲—), 40 : 60 (··△··), 20 : 80 (—■—), 0 : 100 (··□··).

Table 5 Analysis of *Shubo* by using mixed-cultures of AK-1 and *komachi-kobo*

Initial ratio of cells AK-1 : <i>komachi-kobo</i>	General components				Flavor components(ppm)					
	Sake meter	Ethyl alcohol (%)	Total acidity (ml)	Amino acidity (ml)	EtOAc	n-PrOH	i-BuOH	i-AmOAc	i-AmOH	EtOCap
100 : 0	-23.1	12.3	4.4	1.1	74.2	55.0	56.7	8.2	165.8	1.0
80 : 20	-25.1	12.1	4.4	1.0	62.8	51.3	39.4	7.6	197.9	1.1
60 : 40	-27.8	11.8	4.3	1.1	59.7	47.8	34.6	6.6	230.3	1.6
40 : 60	-29.7	11.8	4.3	1.0	49.0	52.6	32.4	6.0	286.3	1.7
20 : 80	-34.8	11.2	4.3	1.1	44.0	49.2	23.0	5.5	316.9	2.2
0 : 100	-36.8	10.8	4.2	1.1	38.2	46.0	9.0	4.4	328.8	2.4

Total rice : 450 g, Polishing ratio : 40%. *Shubo* brewing by using mixed-cultures of AK-1 and *komachi-kobo*.

が13日の使用時には100:0, 80:20が83.2:16.8, 60:40が65.0:35.0, 40:60が41.5:58.5, 20:80が24.8:75.2, 0:100が0:100の比率となり, AK-1酵母の比率が増加傾向にあることが確認された。前記, 30°Cでの増殖特性 (Table 1, Table 2) では, 最大酵母密度や最大生菌数にかなりの差が認められたが, 実際の酒母または醪では30°Cより低い発酵温度の影響によるため酵母間の違いがそれほど現れない結果となった。

13日目の使用時の一般成分と香気成分を Table 5 に示した。こまち酵母の混合比率が高くなるにつれて, 日本酒度はマイナス側へ, アルコールと酸度は低くなる傾向が見られた。香気成分は, こまち酵母の混合比率が高くなるにつれて, 酢酸エチルとノルマルプロパノールとイソブタノールと酢酸イソアミルが低くなる傾向があり, イソアミルアルコールとカプロン酸エチルは増加する傾向が確認され, 我々の報告の通り⁸⁾ 一般成分と香気成分のいずれも両酵母の特性が反映された結果となった。

6. 醪における酒母混合発酵

AK-1酵母とこまち酵母のそれぞれの酒母の生菌数を 2×10^7 cells/ml に調整した後, 混合比率を 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100 の6区分で酒母混合醪仕込試験を行った。

醪の一部を35日目まで延ばし, カラープレートを用いて生菌数と酵母の比率を測定した結果, 醪を通して両酵母の生菌数と両酵母の比率が明らかになった。

(Fig. 4)

両酵母の生菌数は, 醪10日目から15日目に最大生菌数となり, AK-1酵母の比率が多くなるにつれ総生菌数は多くなった。また, 両酵母の生菌数の比率は, AK-1酵母とこまち酵母の初発生菌数の比率100:0が35日には100:0, 80:20が86.4:13.6, 60:40が67.2:32.8, 40:60が49.1:50.9, 20:80が22.0:78.0, 0:100が0:100となり, AK-1酵母の比率が増加する傾向になることが確認された。

上槽日を日本酒度で+1から-1を目標とし, 上槽後の成分を Table 6 に示した。一般成分では, こまち酵母の混合比率が高くなるにつれて, 醪日数が長く, 酸度が低くなる傾向が見られた。香気成分は, こまち酵母の混合比率が高くなるにつれて, 酢酸エチルとノルマルプロパノール及びイソブタノールと酢酸イソアミルが顕著に低くなる傾向があり, イソアミルアルコールとカプロン酸エチルは増加する傾向が見られた。

現在, 他の酵母の組み合わせによる清酒製造試験を検討しているが, いずれの場合も増殖特性や発酵力の異なる2種類の酒母を用いた混合発酵の場合, 製造面では単一酵母の短所を補うことにより醪の管理がしやすくなり, 混合した酵母の能力範囲内で製成酒の一般成分や香気成分等を調整することができ, 単一酵母では得られない品質の清酒を安定製造することが確認された。

要 約

1. 主な吟醸酒用酵母の増殖特性を調べた結果, 大き

Fig. 4 Viable cells and ratio of cells in *moromi* by using mixed-cultures of AK-1 and *komachi-kobo*
Yeast cells were cultured on color plates (1% yeast extract, polypeptone, 2% glucose, 2% agar and 4 mg/100 ml Phloxine-B) for 2 days at 30°C
Symbols: AK-1 : *komachi-kobo* = 100 : 0 (—●—), 80 : 20 (··○··), 60 : 40 (—▲—), 40 : 50 (··△··), 20 : 80 (—■—), 0 : 100 (··□··).

Table 6 Analysis of sake by using mixed-fermentation of AK-1 and *komachi-kobo*

Initial ratio of cells AK-1 : <i>komachi-kobo</i>	General components					Flavor components (ppm)					
	Fermentation time (days)	Sake meter	Ethyl alcohol (%)	Total acidity (ml)	Amino acidity (ml)	EtOAc	n-PrOH	i-BuOH	i-AmOAc	i-AmOH	EtOCap
100 : 0	21	0.6	16.0	1.5	0.8	145.9	82.7	54.2	8.6	180.2	2.9
80 : 20	22	1.0	16.1	1.4	0.9	110.1	82.3	32.2	6.6	182.0	4.4
60 : 40	22	0.7	16.0	1.4	0.8	89.6	72.7	25.9	5.3	208.7	4.7
40 : 60	25	0.3	16.2	1.3	0.8	87.3	61.2	18.2	4.9	215.9	5.7
20 : 80	25	1.0	16.3	1.3	0.9	75.4	51.9	8.7	4.8	217.0	7.1
0 : 100	30	0.3	16.2	1.2	0.8	72.5	50.5	5.6	4.5	230.6	7.8

Total rice 450 g, Polishing ratio : 40%. Sake brewing by using mixed-cultures of AK-1 and *komachi-kobo*.

- く 2 つのグループに分けることができ、同じ初発菌数でも最大酵母密度や最大生菌数が異なることが分かった。
- 高カブロン酸エチル生産性酵母とそれ以外の酵母の混合発酵を想定して、27 種類のカラープレートで主な酵母の識別を検討した結果、フロキシシン B 含有 Y. P. D プレートで、K-9、K-901、AK-1 グループと、こまち酵母、秋田純米酵母、華こまち酵母グループの 2 グループに識別することができた。
 - 酵母比率を変えた酒母育成試験、酒母比率を変えた醪製造試験を検討した結果、カラープレートを用いることにより、酵母混合発酵中の両酵母の挙動が明らかになった。
 - 製成酒の成分は、酵母の種類と混合割合を変えることにより両酵母の有している能力範囲内で調整可能であり、醪管理上のメリットも確認された。
 - 本識別法は、簡易性・再現性に優れており、熟練者以外でも識別の有効性が確認された。

文 献

- 1) 吉田清：醸協，90(10)，751-758 (1995)
- 2) 稲橋正明：醸協，96(10)，679-687 (2001)
- 3) 吉田清：醸協，101(12)，910-922 (2006)
- 4) 宮尾俊輔：醸協，99(10)，694-700 (2004)
- 5) 注解編集委員会編：第三回改正国税庁所定分析注解，日本醸造協会，230-232 (1973)
- 6) 福田央，周延，三上重明：醸協，101(8)，601-613 (2006)
- 7) 福田央，周延，三上重明：醸協，102(2)，139-145 (2007)
- 8) 渡辺誠衛，新野葉子，田口隆信，高橋仁，大野剛，中田健美，立花忠則：秋田県総合食品研究所報告，7，38-45 (2005)
- 9) 渡辺誠衛，田口隆信，高橋仁，大野剛，杉本勇人：秋田県総合食品研究所報告，10，1-8 (2008)
- 10) 宮尾俊輔：醸協，103(10)，742-749 (2008)
- 11) 稲橋正明：平成 20 年度清酒酵母・麴研究会講演要旨
- 12) 食品添加物実務要覧：厚生省生活衛生局食品化学課監修，551，(1993)