

県産アルコール低産生酵母を用いた麴甘酒の 香りの多様化に関する研究

辻篤史* 井上智実** 道島俊英*

近年、麴甘酒や乳酸発酵甘酒などの米を主原料としたノンアルコール発酵食品の開発が活発化する一方で、香りや食感において画一的な製品が多い現状から、個性的な製品の開発が求められている。本研究では、麴甘酒関連製品の香りの多様化を目的とし、石川県産の花や果実由来の酵母の中から、アルコール産生能が低く、かつ特徴的な香り成分を産生する酵母を選抜し、それらの酵母を用いてノンアルコールで麴甘酒に特徴的な香りの付与を試みた。その結果、兼六園梅由来KEU1-5株、ルビーロマン由来RBR31-5株などの*Hanseniaspora*属酵母で発酵することで、*Saccharomyces*属の清酒酵母とは異なり、バナナ様の香りや花様の香りが強い特徴を有するノンアルコール麴甘酒が製造可能であることを明らかにした。

キーワード：発酵食品，甘酒，野生酵母，香り

Research on Aroma Diversification of Amazake Using Yeasts Isolated from Plants in Ishikawa Prefecture

Atsushi TSUJI, Tomomi INOUE and Toshihide MICHIHATA

Recently, the development of non-alcoholic fermented foods using rice as the main ingredient, such as koji amazake and lactic acid fermented amazake, has become more active. However, many of these fermented foods are uniform in terms of aroma and texture, and there is a need to develop unique products. In this study, with the aim of diversifying the aroma of koji amazake-related products, we selected yeasts from among those derived from flowers and fruits in Ishikawa Prefecture that have low alcohol production capacity and produce characteristic aroma components, and attempted to impart characteristic aromas to koji amazake without alcohol using these yeasts. As a result, we found that non-alcoholic koji amazake with a strong banana-like or flower-like aroma can be produced by fermentation with *Hanseniaspora* genus yeasts such as the KEU1-5 strain from Kenrokuen plum and the RBR31-5 strain from Ruby Roman grapes, unlike *Saccharomyces* genus sake yeasts.

Keywords : fermented food, amazake, yeast, aroma

1. 緒 言

近年、発酵食品メーカーでは伝統発酵食品の枠に捉われない新製品の開発が活発化しており、その例として麴甘酒や乳酸発酵甘酒が挙げられる。一方、これらの麴甘酒関連製品は香りや食感において画一的な製品が多いのが現状であり、より個性的な製品を開発して展開することができれば、製品の差別化や市場規模の拡大が期待できる。

石川県工業試験場ではこれまでに、麴甘酒や乳酸発酵甘酒の特徴成分や製造方法に関する研究開発に取り組んできた^{1),2)}。また、兼六園などの県内名所旧跡の花

や県産果実から酵母(県産酵母)を分離し、これらの酵母を利用した地元企業による清酒、パンなどの開発を支援してきた^{3),4)}。

本研究では、麴甘酒関連製品の香りの多様化を目的とし、県産酵母の中からアルコール産生能が低く、かつ特徴的な香り成分を産生する酵母を選抜し、それらの酵母を用いて特徴的な香りを付与したノンアルコール麴甘酒(アルコール1%未満)の開発を試みた。

2. 実験方法

2.1 使用県産酵母

石川県工業試験場が保有する酵母ライブラリより、表1に示す県内の名所・旧跡の花や県内産果実を由来

*化学食品部 **企画指導部

表1 使用した酵母

strain	species	由来
K-701	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	きょうかい酵母
K-1801	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	きょうかい酵母
HAK6-10	<i>Pichia</i> sp.	ハクサンフウロ
KEU1-5	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	兼六園ウメ
KEU136-1	<i>Hanseniaspora vineae</i>	兼六園ウメ
RBR31-5	<i>Hanseniaspora vineae</i>	ルビーロマン
NKS8-14	<i>Kazachstania</i> sp.	能登鉄道ソメイヨシノ
KMY2-1	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	小丸山公園ソメイヨシノ
KMY8-9	<i>Candida</i> sp.	小丸山公園ソメイヨシノ
BSK-1	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	能登産ブルーベリー

とする8株の県産酵母を使用した。選抜にあたり、清酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*(K-701株, K-1801株)を比較対照とし、同属以外の属種の酵母を評価した。各酵母の前培養には、ポテトデキストロース培地(0.4 %ポテトエキス, 2 %グルコース)を使用し、30 °Cで一晩静置培養したものを前培養液として用いた。

2. 2 麴甘酒の調整および分析方法

2. 2. 1 麴甘酒の調整

麴甘酒の調整は、炊飯米(コシヒカリ), 乾燥米麴(T-90・徳島製麴(株)), 蒸留水を3:1:4の重量比で混合し、57 °C温浴中にて6時間糖化することで調整した。

2. 2. 2 酵母選抜用試料の調整

前記で調整した糖化液に蒸留水を添加してグルコース濃度の指標であるBrix 15.0に調整し、ボイル浴中で20分間保持し、殺菌と酵素失活を行った。これに、前培養した各酵母を0.1 (v/w)%添加し、15 °Cで72時間保持した後、ボイル浴中で20分間保持して加熱殺菌したものを酵母の選抜用試料として使用した。

2. 2. 3 アルコール濃度測定

アルコール濃度は、試料の遠心上清をアルコール分析計(アルコメイトAL-2・理研計器(株))にて測定した。

2. 2. 4 香気成分分析

香気成分分析は、固相マイクロ抽出法⁵⁾により実施し、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS, 7890A/5975C・アジレント・テクノロジー(株))により分析した。試料をガラスバイアルに3.0 g秤量し、オートサンプラー(MPS2・ゲステル(株))にて40 °Cに保持したバイアル内ヘッドスペースの香気成分をSPMEファイバー(DVB/Car/PDMS・Supelco)に30分間捕集した。ファイバーに抽出した香気成分をGC-MSにより、カラム

(DB-WAX ; 60 m×0.25 mm×0.25 μm), 注入口温度230 °C, オープン温度40 °C(10 min)→5 °C/min→230 °C(12 min), スプリット比1:10の条件で分析した。質量検出器はイオン化電圧70 eV(EI), イオン源温度150 °C, 質量電荷比(m/z) 33-300の範囲で分析した。なお、検出した香気成分の濃度は、得られたトータルイオンクロマトグラムのピーク強度(ピーク面積)にて比較した。

2. 3 選抜県産酵母の発酵条件の検討

2. 2. 1で調整した麴甘酒に、蒸留水を適宜添加しながらBrix 28.5, 20.0, 10.0に調整し、その後ボイル浴中で20分間殺菌と酵素失活を行ったものを発酵条件検討用の麴甘酒とした。

これらの麴甘酒に、選抜したKEU1-5株とRBR31-5株、対照としてK-701株を各々約 1×10^4 cells/gとなるように添加し、30 °Cで48時間まで静置発酵した。発酵中に経時的に試料を採取し、ボイル浴中で20分間加熱した後、アルコール濃度測定および香気成分分析を行い、発酵条件の検討を行った。

2. 4 官能評価

選抜したKEU1-5株とRBR31-5株、対照としてK-701株にて麴甘酒を30 °Cで24時間発酵した試料を官能評価に供した。官能評価は、工業試験場職員8名をパネルとし、各試料について果実様(バナナ様), 花様のうわだち香の強度(5段階)を評点法にて評価した。

3. 結果および考察

3. 1 アルコール低産生かつ特徴的な香りを産生する酵母の選抜

麴甘酒は、炊飯米または蒸し米と米麴に適量の水を加え、55-60 °Cにてデンプンを糖化して製造されるアルコールを含まない発酵食品である。原料・製法ともに日本酒に類似している一方で、清酒酵母による発酵工程がないために、酵母によって産生されるアルコールと香り成分が含まれていない。そのため、麴甘酒関連製品は、米や米麴に由来する比較的弱くて画一的な匂いの製品となりがちである。そこで、匂いのバリエーションを増やす一つの手法として、アルコール低産生酵母を使用し、ノンアルコール飲料の範囲(アルコール1 %未満)で華やかな香りを有する麴甘酒が製造可能かを検討することにした。

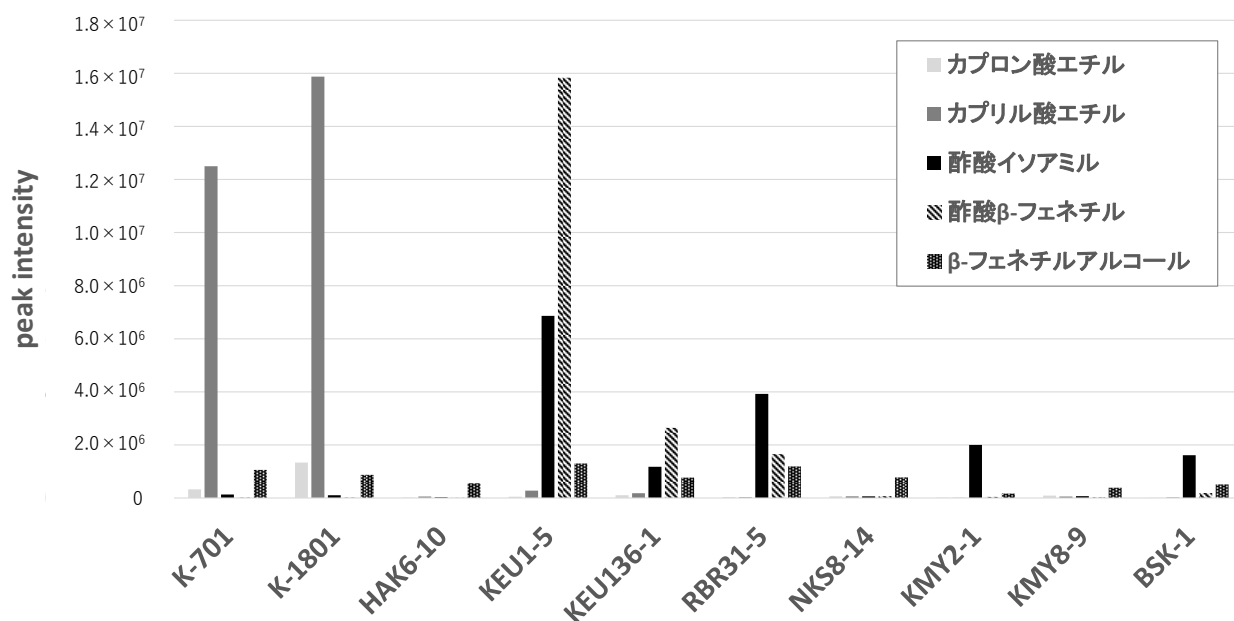


図1 各種県産酵母で発酵した麴甘酒の香り成分

まず、麴甘酒を由来や属種の異なるさまざまな県産酵母にて発酵し、アルコール生成の有無と匂い成分の特性を調査した。なおこの際、一般的にアルコール飲料の生産に使用され、アルコール産生能が高い *S. cerevisiae* 以外の属種の酵母を意図的に選んで使用した。各種県産酵母で麴甘酒(Brix 15.0)を15 °Cで72時間発酵した結果、対照である清酒酵母K-701株、K-1801株はそれぞれ、0.45、0.25 vol%のアルコールを生成したのに対し、県産酵母発酵物のアルコール濃度はいずれも検出限界(0.20 vol%)以下であった。

次に、発酵物について特徴的な香り成分量を比較した結果を図1に示す。清酒酵母(K-701株、K-1801株)は、県産酵母と比較してカブロン酸エチル(リンゴ様)、カプリル酸エチル(パイナップル様)などの脂肪酸エチルエステルが多く含まれていた。一方で県産酵母は、清酒酵母よりも酢酸イソアミル(バナナ様)や酢酸β-フェネチル(甘い花様)などの酢酸エステルを多く生成する株が認められ、特に *Hanseniaspora* 属種の株(KEU1-5株、KEU136-1株、RBR31-5株、BSK-1株)がこれらの成分を多く生成していた。また、KEU1-5株、KEU136-1株、RBR31-5株では、β-フェネチルアルコール(バラ様)も比較的多く含まれていた。*Hanseniaspora* 属は、ブドウの成熟期やワインの発酵初期段階で最も頻繁に存在する非 *Saccharomyces* 属酵母であり、近年ワインの差別化を目的にワイン醸造への利用が試みられている⁶⁾。特に、

Hanseniaspora vineae を使用することで、*Saccharomyces* 属のみで醸造したワインよりもフルーティで花様の香りとなることが報告されており、多量の酢酸β-フェネチルが生成することが報告されている^{7),8)}。本研究においても、*Hanseniaspora* 属の発酵物で酢酸β-フェネチルが多い点が一致しており、ブドウと同様に、米を原料とした際にも、*Saccharomyces* 属よりもフルーティで花様の香りが強い発酵物を得られる可能性が示された。渡辺らは、清酒用の *S. cerevisiae* を基に酢酸β-フェネチル高産生株を育種しており、最大で3倍以上の酢酸β-フェネチル生成量を実現している⁹⁾。本研究の *Hanseniaspora* 属では、清酒酵母K-701株の10-900倍の酢酸β-フェネチルを産生しており、*Saccharomyces* 属よりも明らかに高い生成能を示している。中でも、KEU1-5株は、酢酸β-フェネチルと酢酸イソアミルとともに顕著に多く生成する傾向を示した。また、RBR31-5株は、KEU1-5株とは異なる比率で酢酸イソアミル、酢酸β-フェネチル、β-フェネチルアルコールを生成していた。これらの点を考慮し、アルコール産生能が低く、清酒酵母とは香り特性の異なる県産酵母として、*Hanseniaspora* 属のKEU1-5株とRBR31-5株を選抜し、以後の試験に使用した。

3. 2 選抜酵母による発酵条件の検討

発酵条件が各酵母による酢酸イソアミル、酢酸β-フ

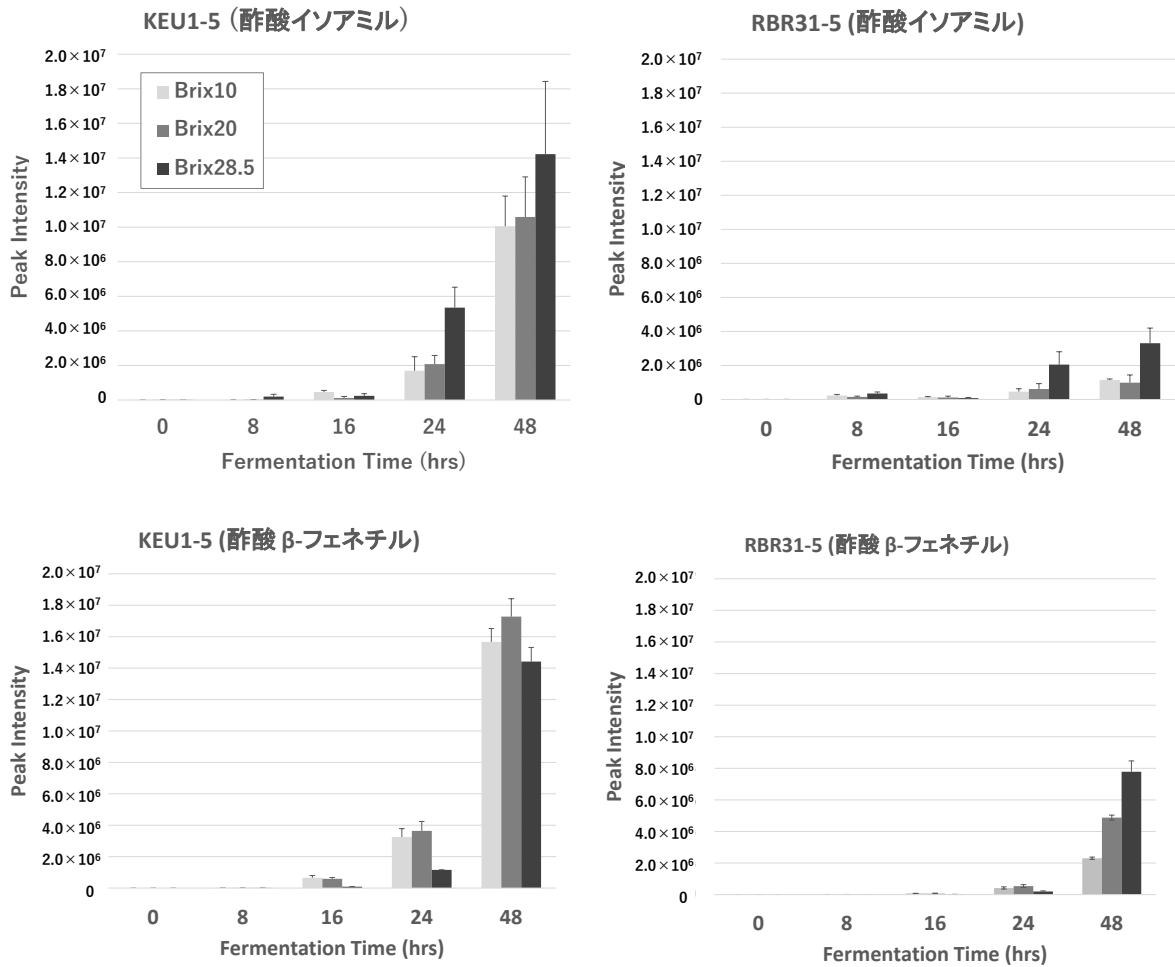


図2 県産酵母による麴甘酒発酵時の香气成分量の経時変化(n=3)

フェネチル生成に与える影響について検討した。発酵に大きく影響を与える麴甘酒の特性として、重要な炭素源であり、なおかつ浸透圧に影響を及ぼすグルコース濃度が考えられた。そこで、グルコース濃度の指標であるBrixの異なる3パターンの麴甘酒中に各酵母を添加して発酵した際のアルコール濃度および各香气成分量を測定した。なお、発酵時の温度条件は製造コストを鑑み、発酵時間の短縮を期待できる30℃に設定した。

測定の結果、アルコール濃度は、発酵24時間では両菌株ともに全てのBrixで0.2 vol%未満であったが、48時間では、RBR31-5株のBrix 10 (0.60-0.65 vol%)を除き、両菌株とも1%以上(1.45-10.3 vol%)となった。

次に、各香气成分のピーク強度の経時変化を図2に示す。酢酸イソアミル量は、KEU1-5株、RBR31-5株ともに、24時間以後はBrix 28.5でBrix 10と20より高かった。また、KEU1-5株はRBR31-5株よりも顕著に多くの酢酸イソアミルを生成した(Brix 28.5, 24時間で11

倍)。秋田らは清酒の製造法の研究にて、事前糖化した麴甘酒に清酒酵母を添加した際、初発糖濃度が高い場合に酢酸イソアミル濃度が高くなることを報告している¹⁰⁾。本研究では非*Saccharomyces*属酵母を用いているが、同様の現象が生じており、異種酵母においても共通の機構が働くことが示唆される。酢酸β-フェネチル量は、KEU1-5株では、発酵24時間後まではBrix 10と20がBrix 28.5よりも高い傾向が認められたが、発酵48時間ではBrix間の量差はほとんどなくなった。RBR31-5株では、24時間後まではKEU1-5株同様にBrix 10と20がBrix 28.5よりも高い傾向が認められたが、48時間後にはBrixが高いほど酢酸β-フェネチル量も高くなる傾向が認められた。酢酸β-フェネチル量についても、KEU1-5株はRBR31-5株よりも多く生成したが、酢酸イソアミルほど両菌株間の差は大きくなかった(Brix 28.5, 24時間で3.5倍)。

これらの結果より、発酵を進めるほど酢酸イソアミ

ルと酢酸β-フェネチルは増加する一方で、アルコール濃度も急激に上昇するため、アルコール濃度1%未満で香りを付与するには、24時間程度の適度な時間で加熱処理などにより発酵を停止する必要があることが明らかとなった。また、酢酸イソアミル(バナナ様)を増加させるにはBrixを30近くまで高めること、酢酸β-フェネチル(甘い花様)を増加させるにはBrixを20以下に設定すべきと考えられた。

3. 3 県産酵母-麴甘酒発酵物の官能評価

KEU1-5株とRBR31-5株により発酵した麴甘酒の果実様・花様の香りの感じ方を把握するため、30℃で24時間発酵した麴甘酒の官能評価を実施した(図3)。

その結果、KEU1-5株、RBR31-5株ともに、清酒酵母K-701株よりもバナナ様、花様の香りが強く感じられる傾向が認められた。また、KEU1-5株はRBR31-5株よりもバナナ様の香りが、RBR31-5株はKEU1-5株よりも花様の香りが強く感じられる傾向があった。食品の香気は数十～数千の多種多様な成分が混ぜ合わさっており、また各成分は香気の種類や質や閾値が大きく異なり、濃度によって感じ方が変化する成分も含まれる。そのため、微妙な香気成分の組成バランスの変化が食品全体の風味の変化に影響を与える¹¹⁾。前述の通り、今回官能評価に用いた試料は、KEU1-5株とRBR31-5株の酢酸β-フェネチル量の差は酢酸イソアミルよりは少なかった(図2)。本研究では各成分を定量しておらず、正確な議論は難しいものの、酢酸イソアミルや酢酸β-フェネチルを含む複数成分の量とバランスの違いが、バナナ様の香りと花様の香りのどちらを強く感じるかに影響を及ぼしたものと推察される。

本研究により、食品製造にほとんど使用されてこなかった非*Saccharomyces*属酵母を用いて、発酵条件を調整することで、*Saccharomyces*属とは異なる特徴的な香りを有する麴甘酒(ノンアルコール)を製造可能であることが示された。一方で、ワインにおいて非*Saccharomyces*属酵母の使用により、発酵が不完全になることや、不快な特性を持つワインになるリスクも指摘されている¹²⁾。今後は、これらのマイナス面も考慮しながら、さらなる研究の進展を図る必要がある。

4. 結 言

麴甘酒関連製品の香りの多様化を目的に、県産酵母を使用した特徴的な香りを有する麴甘酒(ノンアルコー

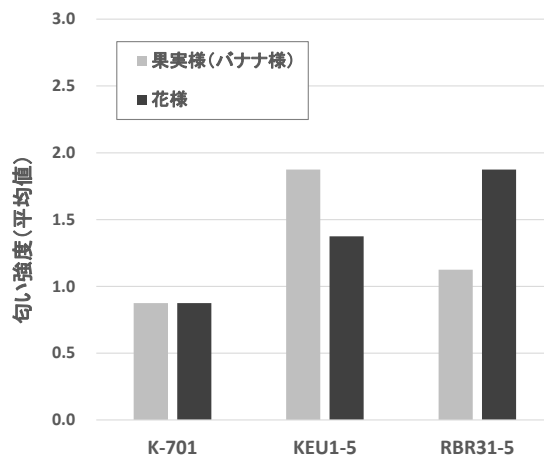


図3 県産酵母で発酵した麴甘酒の官能評価結果

ル)の開発を行った。

その結果、兼六園梅由来KEU1-5株、ルビーロマン由来RBR31-5株などの*Hanseniaspora*属酵母で発酵することで、*Saccharomyces*属の清酒酵母とは異なる香りを有する麴甘酒を製造可能であることが示された。

これらの知見・技術を生かすことで、近年需要が高まっているノンアルコールの麴甘酒関連製品や低アルコール清酒の新製品開発が期待できる。

参考文献

- 1) 辻篤史, 勝山陽子, 中村静夫. 石川県の伝統発酵食品から分離した乳酸菌を用いた新規機能性食品開発. 石川県工業試験場研究報告. 2011, no. 61, p. 39-44.
- 2) 辻篤史, 道島俊英, 小柳喬. 石川県の伝統発酵食品および麴甘酒の機能性探索. 石川県工業試験場研究報告. 2017, no. 67, p. 21-26.
- 3) 井上智実, 松田章. 花から分離した酵母を用いたオリジナル清酒の開発. 石川県工業試験場研究報告. 2017, no. 67, p. 27-32.
- 4) 井上智実, 山崎裕也. 石川県産酵母を用いたパンの開発. 石川県工業試験場研究報告. 2016, no. 66, p. 43-46.
- 5) Robert P. Belardi and Janusz B. Pawliszyn. The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. *Water Quality Research Journal*. 1989, vol.24(1), p.179-191.
- 6) Valentina Martin, Maria Jose Valera, Karina Medina, Eduardo Dellacassa, Remi Schneider, Eduardo Boido, Francisco Carrau. Application of *Hanseniaspora vineae* to improve white wine

- quality. *White Wine Technology*. 2022, p. 99-115.
- 7) Valentina Martín, Facundo Giorello, Laura Fariña, Manuel Minteguiaga, Valentina Salzman, Eduardo Boido, Pablo S. Aguilar, Carina Gaggero, Eduardo Dellacassa, Albert Mas, Francisco Carrau. De novo synthesis of benzenoid compounds by the yeast *Hanseniaspora vineae* increases the flavor diversity of wines. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2016, vol. 64, no. 22, p. 4574-4583.
- 8) Jessica Lleixàl, Valentina Martín, María del C. Portillo, Francisco Carrau, Gemma Beltran, Albert Mas. Comparison of fermentation and wines produced by inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in microbiology*. 2016, vol. 7, p. 338-349.
- 9) 渡辺誠衛, 大野剛, 田口隆信. アルコール感受性酵母を用いた新しいタイプの清酒の開発. *秋田県総合食品研究所報告*. 2007, no.9, p. 20-26.
- 10) 秋田修, 大場俊輝, 中村欽一. 糖化後発酵法による醸造酒の製造に関する研究 II 糖化後発酵法における発酵条件の検討 1. *日本醸造協会雑誌*. 1986, vol. 81, no.6, p. 402-408.
- 11) 飯島陽子. 食品の香気分析技術についての最近の話題. *日本調理科学会誌*, 2018, vol. 51, no.4, p. 197-204.
- 12) Neil P. Jolly, Cristian Varela, Isak S. Pretorius. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*. 2014, vol. 14(2), p. 215-237.