

# 新酵母の開発による高付加価値化清酒醸造試験 (第2報)

—キラー性を有する低発酵性融合酵母“DLK株”を用いた低アルコール清酒の試験醸造—

飯野 修一・乙黒 親男・恩田 匠・後藤 昭二\*

## Experimental Brewing of Valuable Sake using New Yeasts (2nd Report)

—Brewing of a Low Alcohol Sake Using a Weak Fermentative Fusion Yeast (DLK) Possessing Killer Productivity—

Shuuichi IINO, Chikao OTOGURO, Takumi ONDA and Shoji GOTO\*

### 要 約

低発酵性DL株及びそのキラー性付与株5菌株(DLK株)を用いた発酵試験を行い、さらに後者1菌株(DLK-14)を用いた小仕込による低アルコール清酒試験醸造を行った。

1. DL株使用の温度別酒母製造試験において、7℃及び13℃では酵母純度は良好で、低発酵性が認められたが、20℃及び25℃では野生酵母による顕著な汚染が認められた。
2. DLK株の5菌株は発酵試験においていずれも低発酵性を示し、モロミの酵母純度も良好であった。
3. DLK-14株を使用した汲み水歩合250%の低アルコール清酒を醸成した。モロミにおけるボーメの切れは緩慢であったが、酒母及びモロミにおける酵母純度は良好であった。モロミではピルビン酸が早期に著しく減少し、その生成酒では清酒用協会酵母901号使用の生成酒に比べて、高級アルコールが多く、酸もやや多かった。官能的には苦みが少なかった。

従って、DL株及びDLK株は低アルコール清酒醸造用の有用な酵母になり得る可能性がある。

### SUMMARY

Fermentation tests using the strain DL with low fermentative character and five fusion strains(DLK) between the strain DL and killer yeast were done. Furthermore, Low alcohol Sake making using the strain DLK-14 carried out. In fermentation tests on seed mash using the strain DL, the purities of starter the strain DL were 100 % during fermentation at 7 °C and 13 °C, it was proved that the strain DL showed a weak fermentative character.

On the other hand, wild yeasts increased extremely at 20 °C and 25 °C. In fermentation test using five strains of DLK, the purities of starter DLK strains were 100 % during fermentation respectively. DLK strains also showed a weak fermentative character. Furthermore on low alcohol Sake making(Kumimizu buai 250 %) using the strain DLK-14, though the falling of *baumé* degree was apt to stop, the purity of starter yeasts during fermentation was 100 % on seed mash and Moromis, pyruvic acid content decreased rapidly. The Sake brewed contained large amount of higher alcohol and a little more total acid as compared with that of Sake yeast Kyokai No.901, and bitterness on sensory evaluation was not point out. As a result, it was suggested that the strain DL and DLK strains possessed possibility to be used as useful yeasts for making a low alcohol sake.

### 1. 緒 言

現在、清酒の香味に対する消費者の要求が多様化してきている。菅野ら<sup>1)</sup>、上東ら<sup>2)</sup>及び岩瀬ら<sup>3)</sup>は清酒酵母以外の酵母を使用して香味の異なる清酒の醸造を試みており、我々も前報<sup>4)</sup>でワイン酵母W3(ブドウ酒用協会酵母4号)を用いた低アルコール清酒醸造について報告した。また、

我々は低アルコール清酒醸造用酵母として、低発酵性と思われる既存のワイン酵母<sup>5)</sup>や新たに分離したDL株<sup>6-8)</sup>について麴エキスをを用いて発酵性を検討した結果、DL株は既存の低発酵性酵母よりも増殖は盛んであり、しかも、アルコール低生産性である点で注目された。しかし、製造現場では麴由来の野生酵母による汚染が懸念されたので、さらに、プロトプラスト融合によるキラー性DL株(DLK株)の造成を行った<sup>9)</sup>。

\* 客員研究員

表1 低アルコール清酒試験醸造の仕込み配合

		酒母	初添	仲添	留添	水4段	計
総米	(kg)	0.30	0.63	1.12	1.75		3.80
α米	(kg)	0.20	0.44	0.87	1.49		3.00
乾燥麴	(kg)	0.10	0.19	0.25	0.26		0.80
汲み水	(L)	0.69	1.45	2.60	3.64	4.84	13.22

本報告では、DL株及びDLK株5菌株の発酵試験を行うと共に、その内から選抜した1菌株(DLK-14)を用いた低アルコール清酒の試験醸造について報告する。

## 2. 実験方法

### 2-1 供試酵母

DL株, キラー性DL株5菌株(DLK-7,11,14,22,24)及び対照株として清酒用協会酵母901号(K901)を用いた。

### 2-2 DL株の酒母製造試験

前報<sup>4)</sup>の酒母製造試験に示した。

### 2-3 DLK株の発酵試験

DLK株とK901の比較発酵試験は、前報<sup>4)</sup>と同様に、斉藤ら<sup>10)</sup>に準じた方法で行った。ただし、仕込量を10倍(麴エキス330ml及び乾燥麴120g使用)にして、発酵は15℃の恒温器中で行った。

### 2-4 DLK-14株による低アルコール清酒の試験醸造

DLK-14株及び対照としてK901を用い、総米3.8kg(市販のα米, 乾燥麴使用)の3段仕込み(表1)を行った。酒母の育成期間はボームが7に低下するまで、また、留添後モロミにおける汲み水4段添加時期はボーム4に低下するのを目標にした。酒母は前述の改変高温糖化法により、20℃で行い、初添え後の発酵は12℃の恒温器中で20Lの試薬瓶中で行った。汲み水歩合は250%とし、モロミのボームが1(日本酒度-10)になるまで発酵させた。

### 2-5 分析

1) ボーム, 日本酒度, アルコール, 酸度, アミノ酸度及びエタノール, pH, 屈折計示度(Brix), ビルビン酸, 高級アルコール及びエステルの分析は前報<sup>4)</sup>によった。

2) モロミの酵母純度試験: DLモロミ少量をYNB培地に画線培養し, TTC染色によりRedを呈した5菌株についてはパルスフィールド電気泳動法で染色体泳動パターンを調べ, DL株であるか否かを確認した。この時のサンプル調製及び泳動条件は前報<sup>4)</sup>と同様に行った。

DLK使用モロミについてはモロミの少量をYM寒天培地に平板培養し, 出現したコロニー50~100個程度について常法<sup>9)</sup>により, キラー性の有無を調べた。即ち, K901株を塗抹した平板培地(メチレンブルー培地, pH4.8)に各コロニーを接種して, 20℃, 3日間培養後に生育阻止帯を生じた

ものをDLK株とした。

## 3. 結果及び考察

### 3-1 DL株の酒母製造試験

DL株を使用した温度別酒母モロミにおいて20℃区及び25℃区は野生酵母に顕著に汚染されたが, 13℃区及び7℃区の酵母純度は良好であったことは前報<sup>4)</sup>で指摘した。なお, この汚染酵母から採取した5菌株は染色体電気泳動による染色バンドの位置がDL株のそれと異なり, 野生酵母であることが推察された(図1)。

この時の発酵経過はCO<sub>2</sub>揮散によるモロミ重量の減少量(以下, CO<sub>2</sub>減少量とする)で調べ, 図2に示した。K901株使用の13℃及び20℃区では18日目においてはCO<sub>2</sub>減少量は62g前後に達したが, 酵母純度が良好であったDL株使用の13℃区においては早期に(14日目)CO<sub>2</sub>減少量が少なくなり, 18日目におけるCO<sub>2</sub>減少量は39gで, これは前述したK901株使用の場合の63%であった。

また, 野生酵母による汚染が顕著に認められたDL株使用の20℃区及び25℃区ではCO<sub>2</sub>減少量はいずれも13℃区よりも多くなった。なお, DL株使用の13℃区及び7℃区における発酵経過はK901株に比べて発酵最盛期で3日程度の遅れとなった。

以上の結果, DL株を使用した場合, 20℃及び25℃の発酵温度では野生酵母による汚染が顕著であり, 製造現場では麴中に野生酵母が多いことを考慮すれば, 発酵経過はやや遅れるが, 本試験で野生酵母の汚染が認められなかった

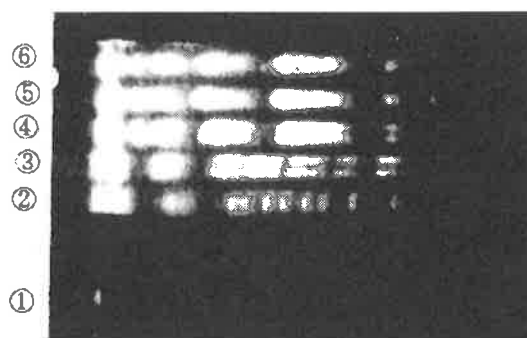


図1 DL株使用モロミ分離5菌株の染色体バンド

- 1) レーン: ①(DL株), ②~⑥(分離株1~5)
- 2) パルスフィールド電気泳動(11℃, 130V, 70秒で24時間)

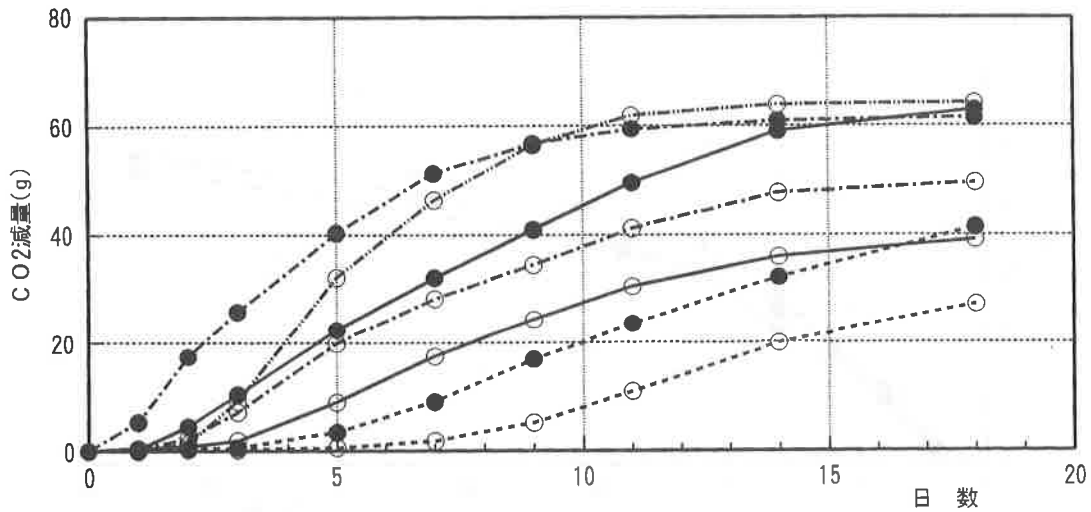


図2 DL株使用の酒母製造試験における発酵経過

- 1) 使用酵母： DL,7°C DL,13°C DL,20°C DL,25°C K901,7°C K901,13°C K901,20°C  
 2) 仕込量：総米178g, 汲み水133%

表2 DL株使用の酒母製造試験における生成酒成分

発酵温度	使用酵母	日本酒度	エタノール % (v/v)	ピルビン酸 mg/L	高級アルコール <sup>1)</sup>			エステル <sup>1)</sup>		
					n-PrOH	i-BuOH	i-AmOH	EtOAc	AmOAc	EtOCap
					mg/L			mg/L		
7°C	K901	-28	13.6	197	76	57	144	73	8.0	0
	DL	-70	9.0	260	27	55	210	35	1.4	0
13°C	K901	+8	18.3	182	151	75	186	74	6.3	0
	DL	-60	11.0	233	31	103	286	99	3.5	0
20°C	K901	+15	17.8	87	138	126	232	56	2.3	0

\*仕込条件は図2の注を参照。モロミ日数：20日。

1) n-PrOH (ノルマルプロパノール), i-BuOH (イソブタノール), i-AmOH (イソアミルアルコール), EtOAc (酢酸エチル), AmOAc (酢酸イソアミル), EtOCap (カプロン酸エチル)

13°C程度の低温で発酵を行う必要があると思われた。

次に、18日目の生成酒成分を表2に示した。DL株使用の13°C区ではエタノール含量11%(v/v)であり、K901株使用の13°C区及び20°C区における18%に比べて顕著に低かった。

このモロミは前述の様に、酵母純度が良好であり、しかも早期に発酵が緩慢になったので、DL株の低発酵性が確認された。ただし、その生成酒は日本酒度-60の甘口であった。また、7°C区及び13°C区は発酵の程度は少ないにも関わらず、K901株使用に比べてi-AmOHが多く、n-PrOHが少なかった。このことは前報<sup>4)</sup>の酵母別発酵試験でも認められた。なお、ピルビン酸はK901株使用の20°C区を除いていずれも200mg/L程度で多かった。

### 3-2 DLK株の発酵試験

キラー酵母DLKの5菌株を用いて、15°Cで発酵試験を行った。CO<sub>2</sub>揮散によるモロミ重量の減少による発酵経過を

図3に示した。K901株使用のモロミに比べてDLK5菌株及びDL株使用のモロミはいずれも10日目頃の早期に発酵が緩慢となった。この中でDLK-14株は初期の発酵において、また、DL株は後半においてもやや速やかな経過を示した。

また、8、15、22及び54日目モロミについてはモロミの少量をYNB培地を下層培地に画線培養し、出現した100程度のコロニーにTTC染色を行い、各モロミにおける酵母純度を調べた。各DLKモロミのコロニーはDLK-22株だけWhiteで他はPinkを呈し、これはそれぞれ使用酵母と同様であり、酵母純度は良好と思われた。さらに各15日目モロミからの釣菌株(23~49個)はすべてキラー性を示したので、DLK使用モロミにおいてはそれぞれに使用した酵母によって発酵が進行したものと思われた。一方、DLモロミの8日目ではPinkのものも散見され、15日目以降ではすべてRedであり、野生酵母に顕著に汚染されたと思われた。

なお、前述の温度別の酒母製造試験においてDL株使用

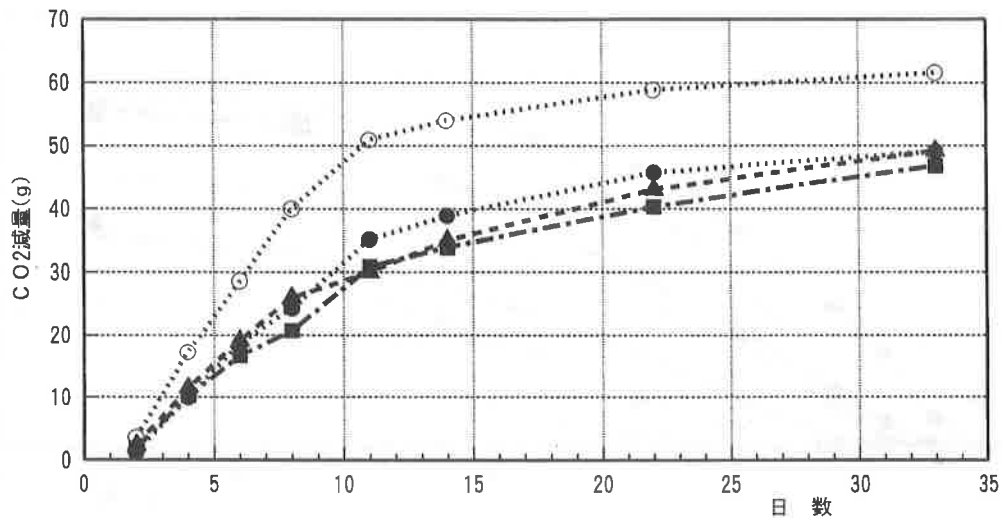


図3 DLK株の発酵試験における発酵経過

- 1) 使用酵母: K901 (○), DL (●), DLK14 (▲), DL7,11,22,24 (■)  
 2) エキス (ボーメ5) 300ml, 乾燥麹113g, 乳酸2.1ml, 酵母前培養液30ml, 15℃発酵.

表3 DLK株使用の発酵試験における成分変化

使用酵母	8日目		15日目		55日目	
	エタノール % (v/v)	エタノール % (v/v)	ピルビン酸 mg/L	日本酒度	エタノール % (v/v)	ピルビン酸 mg/L
K901	14.1	16.9	118	+ 3	18.3	55
DL	9.4	12.3	168	-30	15.2	61
DLK-7	8.3	10.5	170	-24	15.4	59
11	8.3	10.6	174	-20	15.8	55
14	8.9	10.8	169	-24	15.5	60
22	8.9	10.7	166	-27	15.7	67
24	8.8	11.2	176	-24	16.0	65

\* 仕込条件は図3の注を参照.

の13℃で野生酵母の汚染が認められなかったのに対して、この試験 (15℃発酵) で汚染が認められたのは、この試験では麹歩合が通常の麹歩合 (20%) の5倍の全麹仕込であり、仕込時に麹に由来する野生酵母の数が多かったことに起因したと思われる。

各モロミにおける発酵中のエタノール生成及び発酵終了時 (55日目) の香気成分量をそれぞれ表3と表4に示した。DL株及びDLK株の5菌株を使用したモロミのエタノールは8日目及び15日目のいずれもK901株使用に比べて6% (v/v) 程度少なく、最終的には (55日目) DL株及びDLK株使用が16%前後で、対照のK901株が18.3%に比べて少なかった。前述のようにDLK株5菌株はモロミの酵母純度が良好であったことから、アルコール低生産性が確認された。

我々は既報で<sup>7)</sup>、麹汁培地の場合、エタノール10% (v/v) 含有でもK901株は速やかな発酵を示したのに対してDL株はエタノール8%含有培地で発酵を示さなかったこと

によりDL株が比較的高いエタノール濃度に感受性であることを報告している。なお、ここでDLK株使用の生成酒のエタノール含量が15~16%と比較的高かった点については、麹の使用割合が非常に高く、麹由来のアミノ酸や酵素などが多かったためと思われるので、DL株及びDLK株を用いて低アルコール清酒を醸造する場合、麹歩合を高くしすぎないことが必要と思われる。

また、DLK株使用の生成酒においてはPrOH含量が少なく、i-AmOHが多い特徴が前述の酒母製造試験のDL株使用の13℃発酵と同様に認められたので、DLK株はDL株と同様のアルコール低生産性と高級アルコール生産能の両形質を受け継いでいると思われる。

なお、DLK株使用のいずれも55日目の日本酒度は-20~-30で甘口であったにも関わらず、ピルビン酸は50mg/L前後で少なかった (表3)。また、生成酒のAmOAcはK901株使用に比べて少なかった。酸度及びアミノ酸度はいずれ

表4 DLK株使用の発酵試験における生成酒の香気成分

酵母	高級アルコール			エステル			酸度	アミノ酸度
	n-PrOH	i-BuOH mg/L	i-AmOH	EtOAc	AmOAc mg/L	EtOCap	ml	ml
K-901	102	64	149	71	5.3	0	9.0	5.2
DL	39	104	280	89	1.0	0	9.8	5.2
DLK-7	50	78	254	50	0.6	0	10.5	5.0
11	50	83	260	57	0.7	0	10.5	5.1
14	51	80	245	53	0.8	0	10.5	5.1
22	54	79	219	58	0.4	0	10.5	5.4
24	55	92	257	57	0.6	0	10.5	5.3

\* 仕込条件は図3の注を参照。モロミ日数は55日。

も通常の清酒に比べてかなり多く、これは仕込時の乳酸添加や麹歩合が高いことによる影響と思われるが、DLK株使用で酸度がK901株よりもやや多い傾向は認められた。

### 3-3 DLK-14株による低アルコール清酒の醸造

前述の様にDLKの5菌株はいずれも低発酵性を示し、酵母純度は良好と思われたので、初期の発酵が速やかなDLK-14株を選択し、K901株を対照株にして低アルコール清酒の試験醸造を行った。

酒母及び初添え後のボーメの経過を図4に示した。酒母製造は通常、行われている20℃で行った。この時、DLK-14株ではボーメの切れが緩慢であったので、ボーメ7まで下るのがK901株使用よりも2日遅く、7日間の酒母育成期間を要した。また、この7日目の酒母モロミから分離し100菌株はすべてキラー性を示し、酵母純度は100%であったことから、DLK-14株使用の場合、通常の酒母製造条件

で育成が可能であると思われた。

さらに、初添えの3日後に仲添え、5日後に留添えを行ない、初添え1日後の踊りにおける酸度は2.1mlであった。

従って、一般的に野生乳酸菌の増殖抑制に必要な酸度は2ml以上とされているので補酸は行わなかった。K901株使用モロミでは最高ボーメ7を示した後、留添え4日後にはボーメが下がり始めた。ボーメ4の時点で汲み水を添加して、汲み水歩合250%とした。一方、DLK-14株使用モロミでは最高ボーメは同様に7程度であったが、その後のボーメの切れは非常に緩慢であり、留添え後11日目にはボーメの切れが止まったので、この時点で汲み水を同様に添加した。図5に発酵中のエタノール生成の経過を示したが、DLK-14株使用モロミでは11日目までエタノールが漸増しており、9.6%の時点で汲み水添加を行った。その後、ボーメは切れ始めたが、ボーメ1で再び止まり、この時の

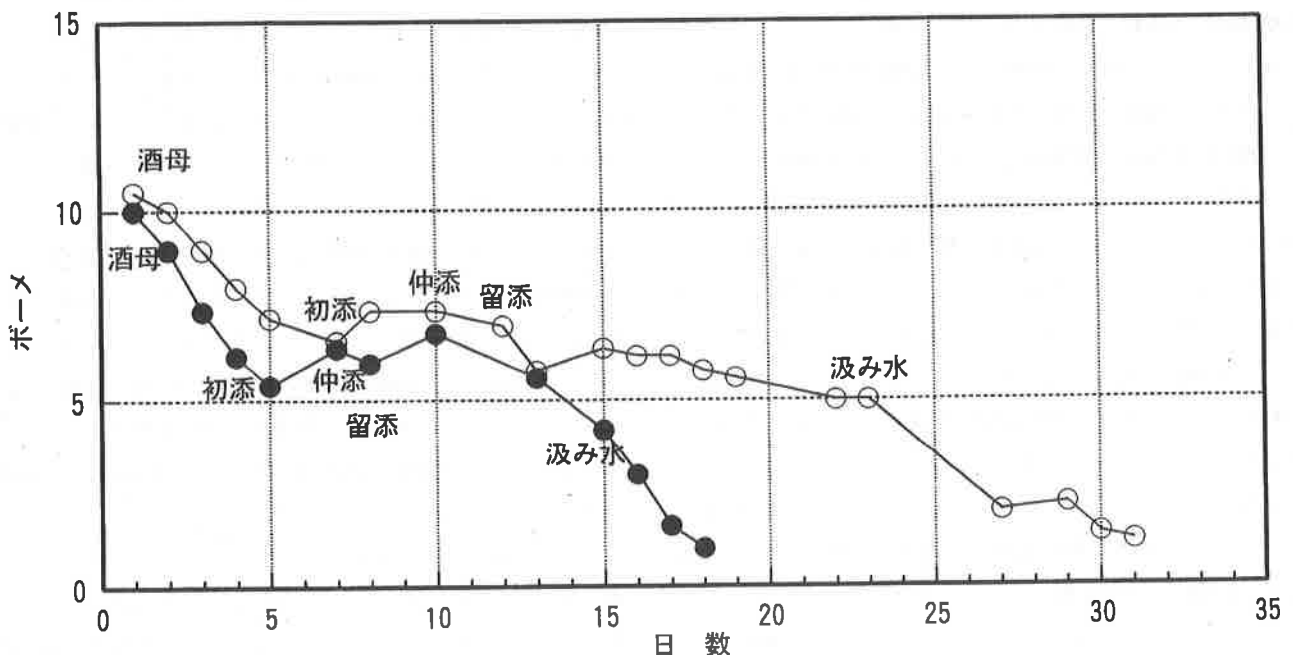


図4 DLK-14株使用モロミの発酵経過 (低アルコール清酒)

- 1) 使用酵母: K901 (●) DLK-14 (○)  
 2) 総米3.8kgの3段仕込, 汲み水250% (4段), 酒母20℃, 初添え後12℃一定。

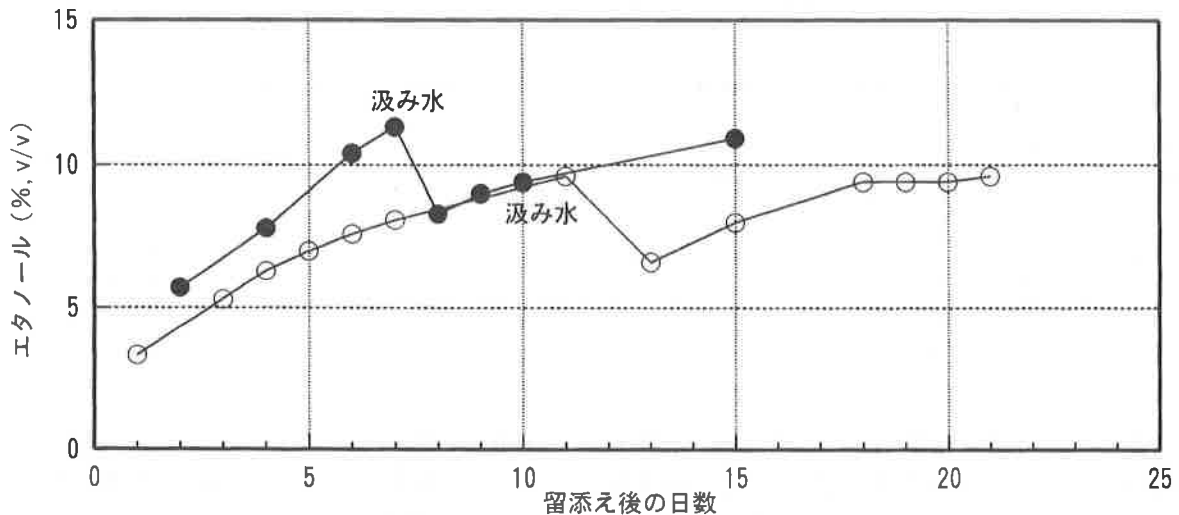


図5 DLK-14株使用モロミのエタノール生成 (低アルコール清酒)

- 1) 使用酵母: K901 (●) DLK-14 (○)  
 2) 仕込及び発酵経過は図4を参照.

表5 DLK-14株使用による低アルコール清酒の一般成分

	日本酒度	アルコール (%, v/v)	酸度 (ml)	pH	アミノ酸度 (ml)	ピルビン酸 mg/L
K901	-10	9.4	1.6	3.97	0.9	194
DLK-14	-10	9.4	2.2	4.23	1.5	29

1) 総米 3.8 kg, 汲み水250%の3段仕込, モロミ日数: K901 (10日), DL (18日)

エタノールは9.4%であった。以上、ボーマ1に達するまでの留添後のモロミ日数はK901使用で13日、DLK-14使用で18日を要した。

この時の生成酒の成分を表5に示した。エタノール量はK901株及びDLK-14株使用で共に9.4%であった。その他の成分についてDLK-14株使用とK901株使用を比較すると、それぞれpHが4.23と3.97、酸度が2.2mlと1.6ml及びアミノ酸度が1.5mlと0.90mlであり、いずれもDLK-14の方がやや多かった。また、ピルビン酸量はK901株使用が194mg/Lであるのに対してDLK-14株使用で29mg/Lと大きな違いが認められた。佐藤ら<sup>15)</sup>はピルビン酸は酵母の増殖が盛んな時期にモロミ中に著しく蓄積され、一般的にはアルコールが11~12%生成されたところでピルビン酸が減少し始めること、また、発酵最盛期を過ぎてから品温を下げ、ある程度高いアルコール濃度でなるべくモロミ日数を延ばすことによりピルビン酸が低減する傾向にあることを報告している。ピルビン酸の発酵中の動向を図6に示した。本試験のDLK-14株使用モロミでは4日目のエタノールが6% (w/w) 程度生成した時点でピルビン酸は34mg/Lに急減しており、エタノール生成及びボーマの切れが非常に緩慢な状態であった。アルコール生成が11~12%の低い濃度で醸成される低アルコール清酒の「純米やわくち酒」に

おいては残存ピルビン酸が多く<sup>13~18)</sup>、清酒の品質を損なう香気成分であるダイアセチルが発生し易いので、上槽後の酵母添加によりダイアセチルを除去することが必要である<sup>18)</sup>ことも報告されている。前報<sup>4)</sup>のワイン酵母W3 (ブドウ酒酵母協会4号) を用いた低アルコール清酒においても残存したピルビン酸は150mg/L前後で多かった。また、生成酒に苦みが少ないので、汲み水を添加してさらに発酵を継続することにより辛口の低アルコール清酒を醸造することも可能と思われた。さらに、生成酒の香気成分の含量を表6に示したが、DLK-14株使用ではK901株使用に比べて*i*-AmOHが3倍、そして*i*-BuOHが2倍多いので、香味の幅を増しているものと思われた<sup>12)</sup>。また、苦みの程度も少なかった。EtOAc及びAmOAc含量もK901株使用と同様であった。また、モロミ18日目に鈎菌した100菌株はいずれもキラ性を示し、DLK-14株使用モロミの酵母純度は100%であった。

以上、DLK-14株使用モロミでは不要成分のピルビン酸が早期に著しく減少し、その生成酒では高級アルコール量が多く、苦みが少なかった。従って、DL株及びDLK株は低アルコール清酒醸造用の有用な酵母になり得る可能性がある。

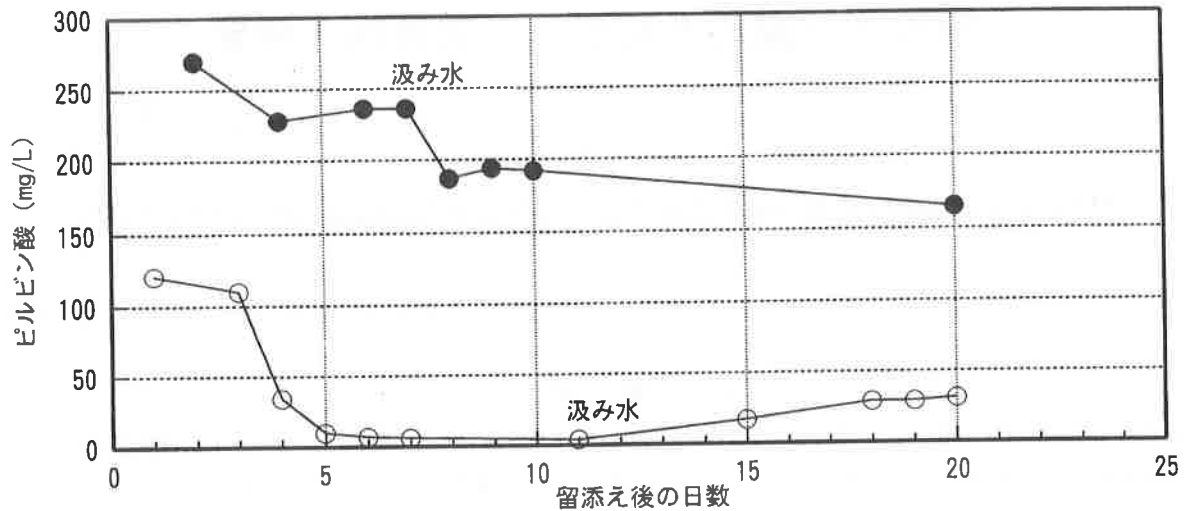


図6 DLK-14株使用モロミのピルビン酸の変動 (低アルコール清酒)

- 1) 使用酵母: K901 (●) DLK-14 (○)  
 2) 仕込及び発酵経過は図4, 図5を参照.

表6 DLK-14株使用による低アルコール清酒の香気成分

	高級アルコール <sup>1)</sup>			エステル <sup>1)</sup>		
	n-PrOH	i-BuOH mg/L	i-AmOH	EtOAc	AmOAc mg/L	EtOCap
K901 <sup>2)</sup>	35	39	81	32	2.3	痕跡
DLK-14 <sup>2)</sup>	45	79	222	46	2.2	痕跡

1) 表2の注を参照, 2) 表5の注を参照

#### 4. 結 言

我々は本試験においてDL株及びDLK株が低アルコール清酒醸造用の有用な酵母になり得る可能性があることを認めた。今後、他のDLK株7菌株についても醸造特性を調べる予定である。今後、これらの酵母を利用した新しいタイプの低アルコール清酒が実用化されることを期待する。

#### 参考文献

- 1) 菅野信男・永谷正治・佐藤 信・大塚謙一：醸協, 76, (1)45 (1981)
- 2) 上東治彦・樋口和彦：高知工試報告, 21, 118 (1990)
- 3) 岩瀬利徳・高田 明・渡邊妙子・福田秀雄・佐々木清祐・吉武正文：醸協, 90, (2)137 (1995)
- 4) 飯野修一・乙黒親男・恩田 匠・小宮山美弘・後藤昭二：山梨県工業技術センター研究報告 (平成6年度) に投稿中。
- 5) 飯野修一・渡辺正平：山梨県工業技術センター研究報告, 2, 89 (1988)
- 6) 篠原 隆・飯野修一・渡辺正平・後藤昭二：醸協, 85, (8)580 (1990)
- 7) 清酒酵母研究会編：清酒酵母の研究—80年代の研究— (1992) P110
- 8) 飯野修一・渡辺正平・春日徳彦・後藤昭二：醸協, 89, (7)557 (1994)
- 9) 飯野修一・荻野 敏・小宮山美弘：山梨県工業技術センター研究報告, 8, 83 (1994)
- 10) 齊藤久一・渡邊誠衛・田口隆信・高橋 仁・中田健美・岩野君夫・石川雄章：醸協, 87, (12) 915 (1992)
- 11) 注解編集委員会：第4回改正国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会 (1993)
- 12) 飯野修一・渡辺正平：醸協, 89, (12)996 (1994)
- 13) 日本酒造組合中央会東京支部銘酒研究委員会：醸協, 74, (1)61 (1979)
- 14) 荻野 敏・乙黒親男・渡辺正平・加々美 久：山梨食工指研報, 11, 48 (1979)
- 15) 大塚謙一・醸造試験所所員一同：醸協, 75, (11) 926 (1980)
- 16) 佐藤俊一・水野昭博・岩野君夫・高原康生・木崎康造・佐野英二・辻 邦司・梅田紀彦・戸塚 昭・川島 宏：醸協, 76, (1), 764 (1981)
- 17) 岩野君夫・佐藤俊一・水野昭博・高原康生・木崎康造・佐野英二・辻 邦司・梅田紀彦・戸塚 昭・川島 宏：醸協, 76, (11)768 (1981)
- 18) 岩野君夫・水野昭博・岩田 博・高原康生・木崎康造・佐野英二・辻 邦司・戸塚 昭・川島 宏：醸協, 76, (11)773 (1981)