

# 新酵母の開発による高付加価値化清酒醸造試験（第3報）

—新酵母の特性を生かした醸造方法の開発—

飯野修一・乙黒親男・恩田 匠・後藤昭二\*

## Experimental Brewing of Valuable Sake using New Yeasts (3rd report)

—Development of Brewing Methods making Use of New Yeasts' Characteristics—

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

### 要 約

カプロン酸エチル高生産性の低発酵性酵母 3 菌株が、DLK14株のEMS処理により造成された。造成酵母を用いた低アルコール清酒は吟醸香が高く（カプロン酸エチル 4～5 mg/L）、モロミでの水 4 段の時期により、発酵経過及び生成清酒のアミノ酸度が異なった。

### SUMMARY

Three weak fermentative yeasts producing sufficient ethyl caproate were derived from the DLK14 mutant strains by EMS treatment. The low alcohol sakes brewed with these mutants were very rich in ginjo flavour, and contained 4~5mg/L of ethyl caproate. Furthermore, fermentation process and amino acidity of sakes brewed were different from the stages of 4th water addition to moromi.

### 1. 緒 言

これまでは我々はアルコールを10%程度生成して自然に発酵を停止する新規な低発酵性酵母のDL株を自然界から分離し<sup>1)</sup>、さらに、それにキラー性を付与<sup>2)</sup>したDLK14株を使用して低アルコール清酒の試験醸造を行った<sup>3)</sup>。醸成された低アルコール清酒は、モロミ初期の段階でピルビン酸が急減し、また、高級アルコールが多く、味に厚みを感じられたが、芳香性がやや弱いことが認められた。

本実験では、吟醸香の主成分であるカプロン酸エチルの生成能を高めるため、DLK14株の変異を行うとともに、併せて、モロミへの水 4 段の時期による酒質変化についての検討を行ったので報告する。

### 2. 実験方法

#### 2-1 供試酵母

親株にDLK-14株<sup>4)</sup>を、また、発酵試験や試験醸造の対照株に清酒用協会酵母901号（K901）を用いた。

#### 2-2 酵母の変異処理とセルレニン耐性株の分離

DLK-14株をASHIDAら<sup>5)</sup>の方法に準じて、エチルメタンсульフォート（EMS）で変異処理した後、セルレニン耐性酵母をICHIKAWAら<sup>6)</sup>の方法に準じて分離した。なお、

この時、酵母の前培養条件は25℃、2日間静置、EMS添加量はリン酸緩衝液量の1/50、及び変異の停止は、EMS処理後に、生理食塩水で酵母の洗浄を行い、さらに6%チオ硫酸ナトリウムを5 mL添加し<sup>7)</sup>、10分間放置して行った。また、セルレニン培地<sup>8)</sup>調製におけるセルレニンの添加方法は、60℃まで冷却した培地にあらかじめエタノールで溶解したセルレニン溶液を添加して行い、最終的なセルレニン濃度を25 μMとした。

#### 2-3 カプロン酸エチル高生産株の選抜

発酵試験は、前報<sup>10)</sup>と同様の方法で行った。ただし、発酵温度は15℃とした。そして、セルレニン耐性株の内から、生成酒中にカプロン酸エチルを多く生成した菌株を選抜した。

#### 2-4 造成株による低アルコール清酒の試験醸造

選抜したDLK14-C株及び対照としてK901株を用い、仕込みは前報<sup>5)</sup>と同様の方法で行った。ただし、仕込み量は総米1.9kg（市販のα米、乾燥麹使用）とした（Table 1）。

酒母製造は、前報<sup>10)</sup>と同様に改変高温糖化法により、20℃で行い、また、初添え後の発酵は10Lの試薬瓶を用い、12℃の恒温室中で行った。踊りは両株ともに2日間、仲はDLK14-C株使用では3日間、K901株使用では2日間とした。

なお、留め添え後のモロミについては水 4 段（汲み水歩合250%）の添加時期を変えた3種類の試験区（仕込み時：C-1、6日目：C-2、17日目：C-3）を設けた。

\* 客員研究員

Table 1 Proportion of raw materials for small scale in the low alcohol sake brewing.

	Shubo	1st 2nd 3rd 4th				Total
		Feed	Feed	Feed	Feed	
Total rice (g)	150	315	560	875		1900
$\alpha$ -rice (g)	100	220	435	745		1500
Dried koji (g)	50	95	125	130		400
Water (g)	345	725	1300	1820	2420	6610

ただし、C-1の水4段は仕込み時に所定量の1/5、残り4/5を5日目に加えた。

### 2-5 分析

1) ボーメ、日本酒度、エタノール、酸度、アミノ酸度、pH、ピルビン酸、高級アルコール及びエステルの分析は前報<sup>10)</sup>と同様な方法による。

2) モロミの酵母純度試験：DLK14-C株使用の各モロミの酵母純度は各モロミから釣菌した酵母20菌株ずつのキラ性<sup>9)</sup>の有無<sup>9)</sup>を調べて求めた。

## 3. 結果及び考察

### 3-1 セルレニン耐性株の分離

Table 2 に、変異処理後の酵母懸濁液をセルレニン培地プレート3枚に平板塗抹し、6日目までに出現したコロニーの大きさと数を示した。出現したコロニー数は、1プレート10~40個程度であり、その内、大中コロニーの割合は比較的少なかった。これまでセルレニン耐性株からカプロン酸エチル高生産株が分離されており<sup>7, 8, 11)</sup>、セルレニン

Table 2 Screening of mutants resistant to cerulenin

	Colonies counts		
	Large (2mm)	Middle (1.5mm)	Small (1mm)
Plate 1	2	7	20
Plate 2	0	3	10
Plate 3	1	4	30

1) We spread the suspensions of cells mutagenized on the YEPD agar plates (1% glucose, 0.5% peptone, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 2% agar, 25 $\mu$ M cerulenin), and incubated for 6 days at 30 $^{\circ}$ C.

耐性株中のカプロン酸エチル高生産株の割合について ICHIKAWAら<sup>7)</sup>は5%、榊原ら<sup>8)</sup>は21%と比較的高い値を示している。このことから、本試験で分離したセルレニン耐性株中には、多くのカプロン酸エチル高生産株が存在しているものと考えられた。そこで、前述のコロニーの中から大コロニー2個、中コロニー3個及び小コロニー3個の合計8コロニーを無作為に選び、次の発酵試験に用いた。

### 3-2 セルレニン耐性分離株による発酵試験

3-1で選抜した8菌株、対照のK901株及びDLK14株の合計10菌株を用いて、15 $^{\circ}$ Cで発酵試験を行った。発酵速度はCO<sub>2</sub>揮散に伴うモロミ重量の減少を測定して判断した。

セルレニン耐性分離株8菌株使用の各モロミ及び親株のDLK14株使用のモロミは、K901株使用の対照モロミに比べていずれも緩慢な発酵を示した。

各菌株使用の生成酒(25日目)における香氣成分量を

Table 3 Selection of mutants producing sufficient ethyl caproate.

Strains	Esters <sup>1)</sup>			Higher alcohols <sup>1)</sup>			Killer activity
	EtOCap	AmOAc mg/L	EtOAc	n-PrOH	i-BuOH mg/L	i-AmOH	
K-901	traces	7.2	138	138	85	158	-
DLK14	0	4.1	91	55	118	255	+
DLK14-C	3.9	4.0	68	47	75	199	+
D	0	6.4	86	68	138	298	+
E	traces	1.6	65	46	141	233	+
F	3.6	4.3	77	53	81	228	+
G	0	6.7	72	61	93	208	+
H	0	1.1	45	57	83	235	+
I	0	5.7	84	76	121	339	+
J	2.6	1.0	64	49	98	237	+

Sake mashes were composed of Koji extract (33ml, boome 5), dried koji (12 g), and fermented 25 days at 15 $^{\circ}$ C.

1) n-PrOH (n-propyl alcohol), i-BuOH (isobutyl alcohol), i-AmOH (isoamyl alcohol), EtOCap (ethyl caproate), AmOAc (isoamyl acetate) and EtOAc (ethyl acetate)

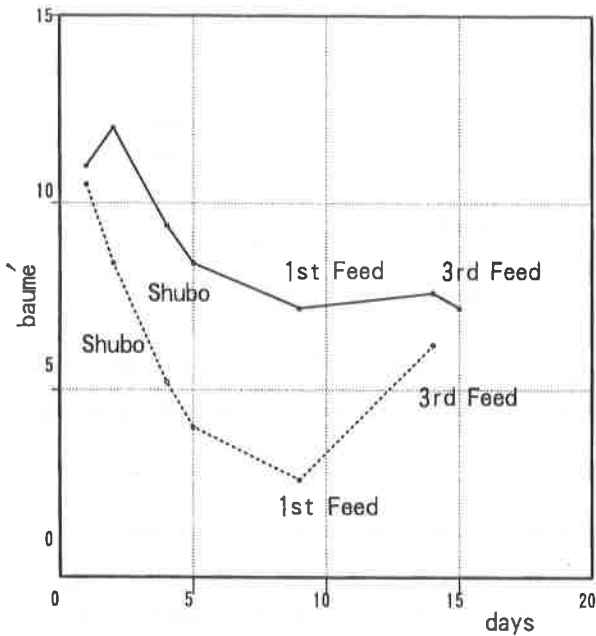


FIG. 1 Fermentation process on Shubo and the first stage of Moromis.

- 1) Section : K901 C-2  
 ..○... —●—  
 2) Shubo (total rice 358g, water 171%, 20°C),  
 Moromi (12°C)

Table 3 に示した。親株及びK901株使用では、カプロン酸エチルがほとんどなかったのに対して、セルレニン耐性分離株 8 菌株の内、DLK14-C株、DLK14-F株及びDLK14-J株の 3 菌株使用では、それぞれカプロン酸エチル含量が3.9mg/L、3.6mg/L及び2.6mg/Lで、顕著に多く認められた。従って、この 3 菌株の内、カプロン酸エチルを最も多く生産したDLK14-C株を次の低アルコール清酒醸造用酵母として用いた。なお、3-1のセルレニン耐性株の分離においてDLK14-C株は大コロニー、DLK14-F株及びDLK14-J株は中コロニーとして分離されたものであった。

### 3-3 DLK14-C株による低アルコール清酒の試験醸造

3-2の発酵試験において、カプロン酸エチル高生産性を示したDLK14-C株及び対照の901株を使用して、低アルコール清酒の試験醸造を行った。酒母及び留め添えまでの発酵経過をFIG. 1 に示した。酒母においてDLK14-C株(C-2モロミ)使用の場合、ボーメの切れが緩慢であり、ボーメ7にまで下がるのにK901株使用に比べて3日遅いことから、酒母育成期間を9日間とした。

踊り2日目の酸度は、K901株使用で2.1mL、DLK14-C株で2.4mLであったので補酸は行わなかった。

次に、水4段の添加時期を変えたモロミの発酵経過をFIG. 2 に示した。DLK14-C株使用モロミは、対照のK901株使用モロミに比べて留め添え後におけるボーメの下がり

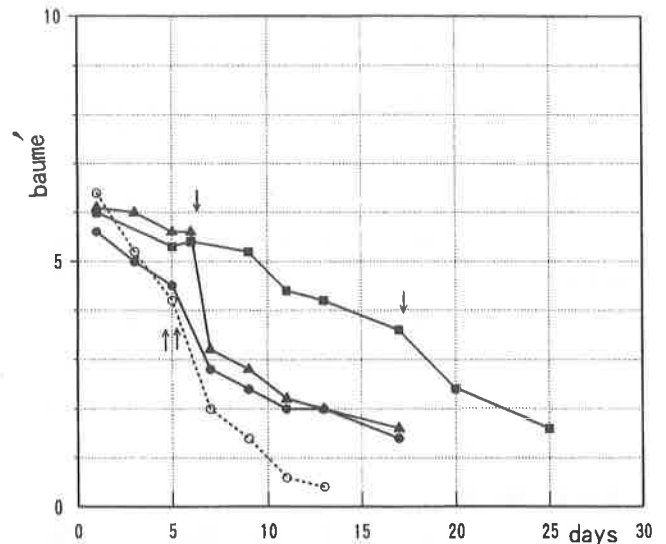


FIG. 2 Fermentation process on Moromis different from stages of 4th water addition

- 1) Section : K901 C-1 C-2 C-3  
 ..○... —●— —▲— —■—  
 2) Total rice 1.9kg, water 250%, 12°C

が非常に緩慢であった。しかし、水4段を行うことによりそのボーメの下がりはややかになり、また、水4段の添加時期が早い程、発酵経過は速やかになった。即ち、各モロミについて、ボーメ1.5に達するまでのモロミ日数を比較すると、DLK14-C株使用で水4段を6日目までに行ったC-1及びC-2のモロミ日数は17日間、また、17日目に水4段を行ったC-3のモロミ日数は25日間であった。なお、対照のK901株使用ではモロミ日数は9日間であった。

生成酒の一般成分をTable 4 に示した。いずれもエタノール量は、10% (V/V) 前後、酸度は2 mL以下であったが、DLK14-C株使用は、K901株使用に比べて、いずれもpHが0.3程度高く、アミノ酸度が1 mL以上多いのが特徴であった。なお、アミノ酸度は、水4段の添加時期が遅いほど増加が認められ、アミノ酸度が3.4mLで多かったC-3は、官能的に雑味が感じられた。従って、水4段の時期は早期に行い、モロミ日数を長くしすぎないことが大事であると思われる。また、ピルビン酸量は、K901株使用が262 mg/Lと多かったが、DLK14-C株使用の場合は、水4段添加時期の遅速にも関わらず、いずれも4~5 mg/Lと非常に少なかった。ピルビン酸がモロミ初期に急減するのは、低アルコール清酒醸造において大きな長所と思われるが、このことは、前報<sup>5)</sup>で既に述べた。

さらに、生成酒の香気成分の含量をTable 5 に示した。

吟醸香成分として重要なカプロン酸エチルの生成は、DLK14-C株使用では3.8~5.1mg/LとK901株使用(痕跡)に比べて著しく多く、官能的にも、明らかに芳香が感じられた。なお、カプロン酸エチルの過剰は、味がくどくなる<sup>12)</sup>

Table 4 Components of Low alcohol sakes different from the stages of water addition to Moromis

Section <sup>1)</sup>	Boome	Ethanol	pH	Acidity	A.A. <sup>2)</sup>	P.A. <sup>2)</sup>
		(% (v/v))		(mL)	(mL)	(mg/L)
K901	1.4	9.8	1.8	3.97	1.3	262
C-1	1.4	9.8	1.9	4.29	2.3	4
C-2	1.6	9.9	1.6	4.30	2.7	5
C-3	1.6	10.2	2.0	4.31	3.4	5

1) The stages of water addition (as 4th addition) to Moromi: K901 (after 5 days), C-1 (0 and 5 days), C-2 (after 6 days) and C-3 (after 17 days).

2) Amino acidity. 3) Pyruvate acid

が、DLK14-C株使用の生成酒の場合、アルコールが少ないためか、味のくどさは感じられなかった。また、清酒香気成分のイソアミルアルコール (i-AmOH) は、DLK14-C株使用ではK901株使用に比べて2倍程度多かった。

なお、図表には示さなかったが、K901株使用とDLK14-C株使用の酒母(9日目)及びモロミ(留め添え後5日目)からそれぞれ酵母を分離し、その分離酵母のキラー性の有無を調べて、DLK14-C株使用における酒母及びモロミの酵母純度を求めた。K901株使用の酒母及びモロミから分離した20菌株はすべてキラー性を示さなかったことから、本試験醸造では野生キラー酵母の混入がなかったと考えた。また、DLK14-C株使用酒母及びモロミから分離した各20菌株はすべてキラー性を示したことにより、これらの分離菌株はDLK14-C株であり、DLK14-C株使用酒母及びモロミの酵母純度は100%であるとした。

以上、述べた様に、DLK14-C株使用モロミは、水4段を早期に行えばモロミ日数が短縮でき、かつ、アミノ酸度が低減することが明らかにされた。また、DLK14-C株使用の場合は、水4段の添加時期に関わらず、モロミ初期のポーメの低下が緩慢であること、モロミ早期にピルビン酸が急減すること、生成酒においてi-AmOHとアミノ酸度が多く、pHが高いことなどが認められた。これらのことは前報<sup>9)</sup>の親株DLK-14株の醸造特性と同様であった。従って、本試験で変異処理により造成されたDLK14-C株は、カプロン酸エチル高生産性を保持すると共に、その他の性質では親株DLK14株の形質を引き継いでいると思われた。

#### 4. 結 言

造成したカプロン酸エチル高生産低発酵性酵母(DLK14-C株)を用いた低アルコール清酒の試験醸造において、その生成酒は吟醸香が高く(カプロン酸エチル4~5 mg/L)、残存ピルビン酸は少なかった。また、本酵母使用の醸造では、初期モロミへの水4段を行うことにより、発酵

Table 5 Aroma components of Low alcohol sakes different from the stages of water addition to Moromis.

Section <sup>2)</sup>	Esters <sup>1)</sup>			Higher alcohols <sup>1)</sup>		
	EtOCap	AmOAc	EtOAc	n-PrOH	i-BuOH	i-AmOH
	(mg/L)			(mg/L)		
K901	traces	2.0	39	53	50	113
C-1	4.0	1.6	40	39	71	208
C-2	3.8	1.0	37	36	70	196
C-3	5.1	1.3	47	38	73	209

1) See footnote of table 3, 2) See footnote of table 4.

が速やかになり、モロミ日数が短縮された。

以上より、本酵母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。

最後に、酵母の変異処理を行う際に、EMS処理やセルレニン耐性株の分離法についてご助言いただきました千葉県工業試験場醸造課の宮崎浩子氏、星野哲也氏及び加藤茂宏氏に厚くお礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) 篠原 隆・飯野修一・渡辺正平・後藤昭二：醸協，**85(8)**，580 (1990)
- 2) 清酒酵母研究会編：清酒酵母の研究—80年代の研究—(1992) P110
- 3) 飯野修一・渡辺正平・春日徳彦・後藤昭二：醸協，**89(7)**，557 (1994)
- 4) 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)
- 5) 飯野修一・乙黒親男・恩田 匠・後藤昭二：山梨県工業技術センター研究報告，**9**，87 (1995)
- 6) Shinzo ASHIDA, Eiji ICHIKAWA, Koji SUGINAMI and Satoshi IMAYASU: Agric. Biol. Chem., **51(8)**, 2061 (1987)
- 7) Eiji ICHIKAWA, Naomi HOSOKAWA, Yoji HATA, Yasuhisa ABE, Koji SUGINAMI and Satoshi IMAYASU: Agric. Biol. Chem., **55(8)**, 2153-2154 (1991)
- 8) 榎原伸一・岡本竹巳・田代道夫：栃木県食品工業指導所研究報告，**4**，17 (1990)
- 9) 北本勝ひこ：醸協，**84(1)**，34 (1989)
- 10) 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，**9**，80 (1995)
- 11) 蟻川幸彦・近藤君夫・桑原秀明・吉川茂利・馬場 茂・小栗 勇：長野食工試研報，**17**，52 (1989)
- 12) 飯野修一・渡辺正平：山梨県工業技術センター研究報告，**1**，97 (1987)