

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-91  
(P2013-91A)

(43) 公開日 平成25年1月7日(2013.1.7)

(51) Int.Cl.

<b>C 12 N</b>	<b>1/16</b>	<b>(2006.01)</b>
<b>C 12 G</b>	<b>3/12</b>	<b>(2006.01)</b>
<b>C 12 G</b>	<b>3/02</b>	<b>(2006.01)</b>

F 1

C 12 N	1/16
C 12 G	3/12
C 12 G	3/02

テーマコード(参考)

G	4 B 0 1 5
	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 27 頁)

(21) 出願番号

特願2011-136913 (P2011-136913)

(22) 出願日

平成23年6月21日 (2011.6.21)

(出願人による申告) 平成21年度及び22年度経済産業省「地域イノベーション創出研究開発事業」ビート糖蜜を利用した十勝産スピリッツ及びリキュールの研究開発、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 598096991

学校法人東京農業大学  
東京都世田谷区桜丘1丁目1番1号

(71) 出願人 395008997

池田町  
北海道中川郡池田町西1条7丁目11番地

(74) 代理人 110000109

特許業務法人特許事務所サイクス

(72) 発明者 穂坂 賢

東京都世田谷区桜丘1丁目1番1号 東京農業大学内

(72) 発明者 内藤 彰彦

北海道中川郡池田町字清見83番地 池田町ブドウ・ブドウ酒研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵母及びこの酵母を用いたビート糖蜜からのアルコール発酵液の製造方法

## (57) 【要約】

【課題】ビート糖蜜を発酵原料として十分にアルコール発酵を進めることができ、アルコール飲料を製造することが可能な新規な酵母を提供することにある。さらに本発明は、上記新規な酵母を用いたアルコール飲料の製造方法を提供する。

【解決手段】エゾノヨロイグサの花またはポピーの花から分離されたサッカロミセス・セレビシエに属する酵母。ビート糖蜜濃度17%の培地での30、7日間におけるアルコール発酵能試験においてアルコール濃度7%以上の発酵液を生成する能力を有し、ビート糖蜜濃度13%の培地での30、7日間におけるA/B比 (i-アミルアルコール/ i-ブチルアルコール比) が2.95~3.2の範囲である。この酵母を用いて、ビート糖蜜を含有する発酵原料をアルコール発酵して、アルコール発酵液を得ることを含む、アルコール飲料の製造方法。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

エゾノヨロイグサの花から分離されたサッカロミセス・セレビシエに属する酵母であって、  
 ビート糖蜜濃度17%の培地での30、7日間におけるアルコール発酵能試験においてアルコール濃度7%以上の発酵液を生成する能力を有し、  
 ビート糖蜜濃度13%の培地での30、7日間におけるA/B比(i-アミルアルコール/i-ブチルアルコール比)が2.95~3.2の範囲である、  
 ことを特徴とする酵母。

## 【請求項 2】

受託番号がNITE P-1074である請求項1に記載の酵母。

10

## 【請求項 3】

ポピーの花から分離されたサッカロミセス・セレビシエに属する酵母であって、  
 ビート糖蜜濃度17%の培地での30、7日間におけるアルコール発酵能試験においてアルコール濃度7%以上の発酵液を生成する能力を有し、  
 ビート糖蜜濃度13%の培地での30、7日間におけるA/B比(i-アミルアルコール/i-ブチルアルコール比)が2.95~3.2の範囲である、  
 ことを特徴とする酵母。

## 【請求項 4】

受託番号がNITE P-1073である請求項3に記載の酵母。

20

## 【請求項 5】

請求項1~4のいずれかに記載の酵母を用いて、ビート糖蜜を含有する発酵原料をアルコール発酵して、アルコール発酵液を得ることを含む、アルコール飲料の製造方法。

## 【請求項 6】

前記アルコール発酵液を蒸留して蒸留酒を得ることを含む、請求項5に記載の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、新規酵母及びこの酵母を用いたビート糖蜜からのアルコール発酵液の製造方法に関する。より詳細には、ビート糖蜜のアルコール発酵に対して優れた性能を有する新規酵母、及びこの酵母を用いたビート糖蜜からのアルコール発酵液の製造方法に関する。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

ビート糖蜜は、ビート(甜菜)から製造された糖蜜であり、主に砂糖の原料として、わが国では北海道で生産されている。ビート糖蜜を砂糖以外の産物に導くことはこれまでほとんどなされていなかった。わずかに、甜菜糖工場廃液を炭素源として用いる酵母の製造方法が知られているに過ぎない(特許文献1)。

## 【0003】

本発明者らが属するグループでは、ビート糖蜜を発酵原料として用いたアルコール飲料の製造について研究開発を進めている。ビート糖蜜には、糖分以外にビート由来の種々の成分が含まれている。

40

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0004】

## 【特許文献1】特開平10-136975号公報

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

特許文献1では、主にパン酵母の培地として甜菜糖工場廃液を用いることが検討されるに過ぎず、ビート糖蜜を発酵原料としてアルコール飲料を製造する際に好適に用いること

50

ができる酵母については知られていない。上記のようにビート糖蜜には、糖分以外にビート由来の種々の成分が含まれており、従来のアルコール発酵用の酵母では、ビート糖蜜を発酵原料とした場合、原因は不明であるが、十分にアルコール発酵を進めることができなかつた。

【0006】

そこで、本発明の目的は、ビート糖蜜を発酵原料として十分にアルコール発酵を進めることができ、アルコール飲料を製造することが可能な新規な酵母を提供することにある。さらに本発明は、上記新規な酵母を用いたアルコール飲料の製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、  
エゾノヨロイグサの花から分離されたサッカロミセス・セレビシエに属する酵母であって、  
ビート糖蜜濃度17%の培地での30、7日間におけるアルコール発酵能試験においてアルコール濃度7%以上の発酵液を生成する能力を有し、  
ビート糖蜜濃度13%の培地での30、7日間におけるA/B比 (i-アミルアルコール/ i-ブチルアルコール比) が2.95~3.2の範囲である酵母に関する。

この酵母は、受託番号NITE P-1074として寄託されている。

【0008】

さらに本発明は、  
ポピーの花から分離されたサッカロミセス・セレビシエに属する酵母であって、  
ビート糖蜜濃度17%の培地での30、7日間におけるアルコール発酵能試験においてアルコール濃度7%以上の発酵液を生成する能力を有し、  
ビート糖蜜濃度13%の培地での30、7日間におけるA/B比 (i-アミルアルコール/ i-ブチルアルコール比) が2.95~3.2の範囲である酵母に関する。

この酵母は、受託番号NITE P-1073として寄託されている。

【0009】

さらに本発明は、上記の酵母を用いて、ビート糖蜜及びリン酸アンモニウムを含有する発酵原料をアルコール発酵して、アルコール発酵液を得ることを含む、アルコール飲料の製造方法に関する。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、ビート糖蜜溶液のアルコール発酵において優れたアルコール生成能を示すとともに、嗜好性に優れた発酵液を生成する酵母を提供することができる。さらに、本発明によれば、ビート糖蜜を原料として、優れた嗜好性を有するアルコール飲料の製造方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】リン酸アンモニウム2.0g/Lを含むビート糖蜜培地における各酵母のアルコール生成の経日変化を示す。

【図2】リン酸アンモニウム無添加ビート糖蜜培地における各酵母のアルコール生成の経日変化を示す。

【図3】30、1日間培養後発酵温度15 における生成アルコールの経日変化を示す。

【図4】30、2日間培養後発酵温度15 における生成アルコールの経日変化を示す。

【図5】30、3日間培養後発酵温度15 における生成アルコールの経日変化を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

<酵母>

本発明は、エゾノヨロイグサまたはポピーの花から分離されたサッカロミセス・セレビ

10

20

30

40

50

シエに属する酵母であって、ビート糖蜜濃度17%の培地での30、7日間におけるアルコール発酵能試験においてアルコール濃度7%以上の発酵液を生成する能力を有し、ビート糖蜜濃度13%の培地での30、7日間におけるA/B比(i-アミルアルコール/i-ブチルアルコール比)が2.95~3.2の範囲である酵母に関する。

## 【0013】

上記本発明の酵母は、711種の花のサンプルから発酵性酵母31株を分離し、この31株の中からさらに分離された、ビート糖蜜溶液のアルコール発酵において優れたアルコール生成能を示すとともに、嗜好性に優れた発酵液を生成する酵母である。分離の詳細については実施例において具体的に示す。

## 【0014】

上記本発明の酵母は、エゾノヨロイグサまたはポピーの花から分離されたサッカロミセス・セレビシエに属する酵母である。ポピーの花から分離されたサッカロミセス・セレビシエに属する酵母は、実施例においてはNo.137の酵母であり、エゾノヨロイグサの花から分離されたサッカロミセス・セレビシエに属する酵母は、実施例においてはNo.407の酵母である。さらに、これら本発明の酵母は、上記酵母分離の過程で、リン酸アンモニウム無添加であり、糖濃度が15%であるビート糖蜜溶液を、酵母数 $1 \times 10^5 / \text{mL}$ で、28で発酵させた場合に発酵開始6日目で生成アルコール濃度が4%以上となり、発酵開始7日目で生成アルコール濃度が6%以上となる酵母の中から分離された酵母である。標準的なアルコール発酵酵母であるA-28は、上記発酵条件では、発酵開始6日目で生成アルコール濃度が4%未満(3.2%)であり、かつ発酵開始7日目で生成アルコール濃度が6%未満(5.4%)であった。

10

20

20

## 【0015】

ビート糖蜜は、本来、リン酸源及びアンモニウム(窒素源)に乏しい。本発明の酵母は、このようにリン酸源及びアンモニウム(窒素源)に乏しいビート糖蜜を発酵原料として用いるに適した新規な酵母である。

## 【0016】

さらに本発明の酵母は、既存の醸造酵母8種(清酒酵母、ワイン酵母、ビール酵母および蒸留酒酵母)とは、以下の点で発酵能が相違する新たなアルコール発酵能を有する酵母である。

30

- (1)ビート糖蜜濃度17%の培地での30、7日間におけるアルコール発酵能試験においてアルコール濃度7%以上の発酵液を生成する能力を有する。
- (2)ビート糖蜜濃度13%の培地での30、7日間におけるA/B比(i-アミルアルコール/i-ブチルアルコール比)が2.95~3.2の範囲である。

## 【0017】

これら本発明の酵母の詳細は実施例に示す。対比に用いた供試酵母は、既存の醸造酵母として清酒酵母の協会7号酵母(K-7酵母)、協会9号酵母(K-9酵母)、ワイン酵母としてOC-2酵母、IFO2220酵母、ビール酵母としてIFO2000酵母、IFO2011酵母および蒸留酒酵母としてIFO2091酵母、A-28酵母の計8株である。これら8株は、醸造酵母として代表的な酵母であるが、本発明の酵母は、上記(1)および(2)の点で、これら既存の醸造酵母とは明らかに相違するものである。さらに、本発明の酵母は、酵母を分離する条件として、ビート糖蜜溶液という通常の酵母の生育には必ずしも適していない条件を用い、かつそのような条件にも関わらず良好なアルコール発酵能を有するものとして選択されたものであることから、いずれも新規な酵母菌株である。

40

## 【0018】

本発明の酵母は、エゾノヨロイグサの花から分離されたサッカロミセス・セレビシエに属する酵母No.407は、受託番号NITE P-1074として、また、ポピーの花から分離されたサッカロミセス・セレビシエに属する酵母No.137の酵母は、受託番号NITE P-1073として、2011年3月3日に独立行政法人製品評価技術基盤機構NITE特許微生物寄託センター(NPMD)(千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)に寄託され、2011年3月28日に受託の通知を受けている。

50

## 【0019】

## &lt;アルコール飲料の製造方法&gt;

本発明は、アルコール飲料の製造方法を包含する。本発明のアルコール飲料の製造方法は、上記本発明の酵母を用いて、ビート糖蜜を含有する発酵原料をアルコール発酵して、アルコール発酵液を得ることを含む。

## 【0020】

発酵原料は、ビート糖蜜を糖濃度で例えば、10～20%の範囲で含むものである。但し、ビート糖蜜の糖濃度はこの範囲に限らず、発酵条件および目的とするアルコール発酵液の組成物等を考慮して適宜決定することができる。発酵原料は、発酵を促進する目的で、リン酸源及び窒素源としてリン酸アンモニウムを含有することもできる。リン酸アンモニウムの濃度は、例えば、発酵原料に対して1～3%の範囲とすることもできる。リン酸アンモニウム以外にも、リン酸源及び窒素源やビタミン類を添加することもできる。

10

## 【0021】

アルコール発酵は、例えば、25～30の範囲で実施することが、酵母の活性を良好に維持するという観点から好ましい。但し、発酵環境がより低温である場合には、発酵開始後12～48時間は、25～30の範囲とし、その後、25未満の温度（例えば、10～20）で発酵しても、所望のアルコール発酵液を得ることはできる。発酵期間は、発酵温度にもよるが、例えば、5～15日の範囲とすることもできる。

20

## 【0022】

発酵原料中の酵母数は、発酵原料の組成等を考慮して適宜決定できるが、例えば、酵母数 $1 \times 10^4 / \text{mL} \sim 1 \times 10^7 / \text{mL}$ の範囲とすることもできる。

20

## 【0023】

上記方法で得られるアルコール発酵液は、発酵条件にもよるが、アルコール濃度が例えば、6～8%程度である。また、アルコール発酵液は、アルコール発酵に伴って生成する種々の芳香成分を含有する。しかし、これら芳香成分に加えて、ビート糖蜜に由来する匂い成分も含有するため、通常は、そのままでの飲用には適さない。但し、原料として用いるビート糖蜜を精製することで、ビート糖蜜に由来する匂い成分を一部コントロールすることは可能である。

## 【0024】

## &lt;蒸留酒の製造方法&gt;

30

本発明のアルコール飲料の製造方法は、前記アルコール発酵液を蒸留して蒸留酒を得ることを含む。前記アルコール発酵液を蒸留して蒸留酒とすることで、上記をビート糖蜜に由来する匂い成分を少なくとも部分的に除去し、かつ芳香成分は残したアルコール飲料である蒸留酒を得ることができる。

## 【0025】

前記アルコール発酵液の蒸留は、常圧蒸留または減圧蒸留のいずれでも実施することができる。また、常圧蒸留及び減圧蒸留のいずれであっても、アルコール発酵に伴って生成する種々の芳香成分を含有する蒸留酒を製造することができる。常圧蒸留および減圧蒸留ともに、公知の方法を適宜利用できる。

40

## 【0026】

蒸留酒の製造は、例えば、前記アルコール発酵液を蒸留してアルコール濃度20～25%の蒸留液を得る工程（1）、および前記蒸留液を再度蒸留してアルコール濃度60～80%の蒸留液を得る工程（2）を含む方法であることができる。

## 【0027】

## 工程（1）

工程（1）では、前記アルコール発酵液を蒸留してアルコール濃度20～25%の蒸留液を得る。この工程での蒸留は、常圧蒸留であることができる。常圧蒸留は操作が容易であり、大量生産に適している。常圧蒸留では、特有の芳香が蒸留液に回収されるが、ビート糖蜜に由来する匂いも薄まってはいるが、残存する。一方、工程（1）では、減圧蒸留を用いることもでき、減圧蒸留によれば、ビート糖蜜に由来する匂いはより一層薄まるが

50

、減圧蒸留が必ずしも容易ではなく、大量生産には適していない。従って、本発明では、常圧蒸留を用いることが好ましい。

【0028】

常圧蒸留の条件は、ビート糖蜜を原料とし発酵を終了した発酵液（アルコール濃度約8%）を蒸留ボット内に入れ、ボットを加熱し蒸留を行う。加熱し続けると蒸留液が留出を始める。ただし、この留出液は香気成分的に品質が著しく低いことがあるので官能により分取し（取り除き）これを初留とする。初留は2度目の蒸留には利用しないことが望ましいので以後の液とは別にとておく。官能により初留をカットし、香気的に品質の良い部分から中留として分取する。中留は加熱を開始してから数時間程度（約8時間：加熱の能力による）まで分取する。ただし、加熱の状況により変化する。中留は留出液の品質の低下がみられるまで分取を継続する。その後は後留としてアルコールが1%未満になるまで蒸留を継続する。

10

【0029】

常圧蒸留の条件を変えることで、アルコール濃度20～25%の蒸留液を得ることができる。また、常圧蒸留の条件を変えることで、得られる蒸留液の香りもコントロールすることができる。

【0030】

工程（2）

工程（2）では、前記アルコール濃度20～25%の蒸留液を再度蒸留してアルコール濃度60～80%の蒸留液を得る。再度の蒸留は、工程（1）における蒸留と同様に常圧蒸留であることが、操作が容易であり、大量生産に適していることから好ましい。

20

【0031】

工程（1）で得られた蒸留液（中留）をボットに入れ加熱し蒸留を開始する。香気的に品質の低い部分を官能で分取し初留とする。品質の良い部分を中留とし、品質の低下が官能で見られたら中留の分取を終え、後留として留出液のアルコール度数が1%未満になるまで蒸留を継続する。

【0032】

常圧蒸留の条件を変えることで、アルコール濃度60～80%の蒸留液を得ることができる。また、常圧蒸留の条件を変えることで、得られる蒸留液の香りもコントロールすることができる。

30

【0033】

前記で得られた蒸留酒（スピリット）は、果汁や糖分を添加して、リキュールとすることもできる。例えば、前記アルコール濃度60～80%の蒸留液に、水、オリゴ糖及びエキス分を加えて、リキュールを得ることができる。オリゴ糖は、例えば、ビート糖由来のオリゴ糖ができることができ、エキス分は例えば、ハスカップのエキス分ができる。

40

【実施例】

【0034】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。本発明は実施例によって限定されるものではない。また、本発明において濃度を表わす「%」は、特にことわらない限り、重量%を意味する。なお、実施例に記載した分離酵母No.137株およびNo.407株は、それぞれ、受託番号NITE P-1073およびNITE P-1074として寄託したものである。

【0035】

実施例1

<十勝地方内の花からの有用酵母の分離>

1. 実験方法

1) 分離源の採取

自然界には多種多様のものが存在し、それぞれの生育環境に適応した多種多様な微生物が生活している。そこで酵母の生育環境を考え、糖質を多くふくむ草花を分離源として採取した。野草は、十勝地方内より、6月から7月にかけ採取された711種の花（試料）を用

50

いた（帯広畜産大学より分譲）。

### 2) 集積培養法

乾熱殺菌した綿栓300mL容三角フラスコに、雑菌繁殖を抑制する物質である乳酸を3.0mL/L、窒素源として硫酸を2.0g/L、ビタミンとしてパントテン酸を200μg/Lを加えた22%ビート糖蜜液に、各分離源を入れて、30 でおよそ5~7日間培養した。集積培養期間に発酵が確認された時点で酵母が存在する可能性があると判断し、酵母の分離を行った。また7日間経過しても発酵が確認されないものについては酵母が存在しないものとした。

### 3) 集積培養液からの分離方法

表1に示すGYP液体培地を調整し、試験管に10mLずつ分注しオートクレーブで120 、15分間殺菌して保管した。平板培地や斜面培地用のGYP寒天培地は液体培地にさらに寒天1.5gを加えて加熱溶解し、試験管に10mLずつ分注しオートクレーブで120 、15分間殺菌して保管した。

あらかじめ180 、60分間乾熱殺菌したシャーレにエタノールを0.5mL添加した後、GYP寒天培地10mLにて平板培地とした。集積培養液を適宜希釈したものを1滴平板培地に落とし、コンラージ棒にて表面に均一に塗布して30 で3日間培養した。平板培地で形成させたコロニーから單一で大きいものを無造作に2~3株選択し、選択した順に番号を付けてGYP液体培地に火炎上接種し30 で培養した。発酵が旺盛なものをGYP斜面培地に接種し冷蔵保存した。

【0036】

【表1】

10

20

表 1 GYP 液体培地組成

Glucose	100g
Yeast Extract	5g
Peptone	5g
D. W	1 L

30

【0037】

### 2. 実験結果

発酵性のある分離酵母は、分離源711試料より、31株を分離した。分離した株の分離源番号と分離源を表2に示す。

【0038】

## 【表2】

表 2 711 試料から分離した発酵性酵母

分離源 711 試料から分離した発酵性酵母 [分離源番号、(分離源を示す)]

No. 31 (ムラサキツユクサ)、No. 91 (ツツジ)、No. 93 (ベコニア)、No. 96 (シロ)、No. 99 (スミレ)、No. 100 (パンジー)、No. 105 (ベコニア)、No. 116 (ルピナス)、No. 137 (ポピー)、No. 179 (ツツジ)、No. 201 (オオバミズホウズキ)、No. 276 (カーネーション)、No. 280 (キスゲ)、No. 295 (サンカヨウ)、No. 392 (タニギキョウ)、No. 406 (ドクゼリ)、No. 407 (エゾノヨロイグサ)、No. 414 (ヤエハマナス)、No. 428 (ドクダミ)、No. 433 (コマクサ)、No. 480 (マイクイーン)、No. 486 (カモミール)、No. 495 (イヌホウズキ)、No. 496 (イヌエンジュ)、No. 502 (ニラ)、No. 511 (ダリア)、No. 514 (マツバボタン)、No. 518 (ユリ)、No. 521 (キキョウ)、No. 583 (ペンステモンガーネット)、No. 596 (秋菊)

以上 31 株

10

20

## 【0039】

## &lt;分離酵母によるアルコール発酵試験&gt;

前項で発酵性があると推測された酵母について、300mL容三角フラスコを用いて発酵試験を行った。発酵能の比較対照としてA-28酵母(アルコール酵母)を用い、発酵能が同程度あるいはそれ以上のものを選択することを目的とした。

## 【0040】

## 1. 実験方法

## 1) 供試酵母

前項で分離した酵母計31株(表2)とアルコール発酵能の比較対照酵母として、A-28酵母(アルコール酵母)を供試酵母として使用した。

30

## 2) 酵母の前培養

前項で使用したGYP液体培地に分離酵母を1白金耳接種し、30、72時間培養し前培養とした。

## 3) ビート糖蜜発酵液の調製

糖濃度15%に調製したビート糖蜜液(原料に対し5倍容の水を加えたもの)に、リン酸アンモニウムを2.0g/L添加し、これを乾熱殺菌した500mL綿栓三角フラスコに150mL加え、オートクレーブにて120、15分間加圧滅菌した。

## 4) アルコール発酵

ビート糖蜜発酵液に前培養した供試酵母を1mL(全発酵液量が $1 \times 10^5$ /mLになるよう)添加し30、7日間発酵させた。

40

## 5) アルコールの測定

国税庁所定分析法注解に従って行った。

## 【0041】

## 2. 実験結果

分離した酵母の発酵後のアルコール生成量を表3に示した。

## 【0042】

## 【表3】

表 3 分離酵母の発酵後のアルコール生成量

酵母 (No.)	alc. (%)	酵母 (No.)	alc. (%)	酵母 (No.)	alc. (%)
A-28	7.0	No. 201	7.0	No. 486	6.2
No. 31	5.6	No. 276	6.5	No. 495	7.0
No. 91	6.8	No. 280	6.5	No. 496	6.8
No. 93	6.8	No. 295	6.4	No. 502	7.1
No. 96	7.1	No. 392	6.8	No. 511	6.6
No. 99	6.8	No. 406	6.9	No. 514	6.2
No. 100	7.0	No. 407	7.0	No. 518	7.0
No. 105	6.8	No. 414	5.5	No. 521	6.4
No. 116	6.9	No. 428	7.0	No. 583	6.8
No. 137	7.0	No. 433	6.7	No. 596	5.6
No. 179	6.7	No. 480	7.0		

10

20

30

40

50

## 【0043】

## 3. 考察

表3に示すとおり、A-28酵母と遜色ないアルコール生成 (alc. 6.9% ~ 7.1%) する酵母は、No. 96 (シロ)、No. 100 (パンジー)、No. 116 (ルピナス)、No. 137 (ポピー)、No. 201 (オオバミズホウズキ)、No. 406 (ドクゼリ)、No. 407 (エゾノヨロイグサ)、No. 428 (ドクゼリ)、No. 480 (カモミール)、No. 495 (イヌホオズキ)、No. 502 (ニラ) およびNo. 518 (ユリ) の12株であった。これらの12株を、アルコール発酵能を有する酵母とし、以後ビート糖蜜発酵優良酵母の選択試験をすることにした。

## 【0044】

## &lt;有用分離酵母の選択(1)&gt;

前項においてA-28酵母と遜色なくビート糖蜜培地にてアルコール発酵能を有する12株の分離酵母を得た。本項ではさらに付加価値を高めるためにもA-28酵母と同等あるいはそれ以上のアルコール発酵能が安定しており、官能的にも個性のある酵母を選択すること目的とした。

## 【0045】

## 1. 実験方法

## 1) 供試酵母

供試酵母は、前項により得た分離酵母12株(表4に示す)およびA-28(アルコール酵母)の計13株を試験に供した。

## 【0046】

## 【表4】

表 4 供試分離酵母と分離源

No. 96 (シロ)、No. 100 (パンジー)、No. 116 (ルピナス)、No. 137 (ポピー)、No. 201 (オオバミズホウズキ)、No. 406 (ドクゼリ)、No. 407 (エゾノヨロイグサ)、No. 428 (ドクゼリ)、No. 480 (カモミール)、No. 495 (イヌホオズキ)、No. 502 (ニラ)、No. 518 (ユリ) およびA-28 (アルコール酵母)
---

## 【0047】

## 2) ビート糖蜜発酵培地

前項と同様のビート糖蜜発酵培地を用いた。

## 3) 前培養および接種

GYP培地調整、菌接種、前培養は、前項と同様に行った。

## 4) 発酵条件

発酵条件は、28℃で7日間の発酵を行った。

## 5) アルコールの測定

前項と同様に行った。

## 【0048】

## 2. 実験結果

表5にリン酸アンモニウム2.0g/L添加、30℃、7日間発酵後の各酵母におけるアルコール生成量を示した。

## 【0049】

## 【表5】

表5 分離酵母の発酵後のアルコール生成量

酵母 (No.)	alc. (%)	酵母 (No.)	alc. (%)	酵母 (No.)	alc. (%)
A-28	7.0	No. 201	7.2	No. 480	6.6
No. 96	7.3	No. 406	7.0	No. 495	6.7
No. 100	7.2	No. 407	7.2	No. 502	6.7
No. 116	7.0	No. 428	6.9	No. 518	6.6
No. 137	7.1				

## 【0050】

## 3. 考察

表5に示すとおり、再度の確認試験においてA-28酵母と遜色ないアルコール生成かそれ以上のアルコール生成(7.0%~7.3%)を有する酵母は、No.96(シロ)、No.100(パンジー)、No.116(ルピナス)、No.137(ポピー)、No.201(オオバミズホウズキ)、No.406(ドクゼリ)およびNo.407(エゾノヨロイグサ)の7株であった。これらの7株を、ビート糖蜜における有用アルコール発酵酵母とし、さらに有用株選択、発酵特性および菌学的特性の検討をすることにした。

## 【0051】

## &lt;有用分離酵母の選択(2)&gt;

前項においてA-28酵母と遜色なくビート糖蜜培地にてアルコール発酵能を有する7株の分離酵母を選択した。本項ではさらに付加価値を高めるためにもA-28酵母と同等あるいはそれ以上のアルコール発酵能が安定してあり、官能的にも個性のある有用分離酵母を選択することを目的とした。

## 【0052】

## 1. 実験方法

## 1) 供試酵母

供試酵母は、前項により得た分離酵母7株(表4に示す)およびA-28酵母(アルコール酵母)の計8株(表6)を試験に供した。

## 【0053】

10

20

30

40

## 【表6】

表 6 供試分離酵母と分離源

No. 96 (シロ)、No. 100 (パンジー)、No. 116 (ルピナス)、No. 137 (ボビー)、  
No. 201 (オオバミズホウズキ)、No. 406 (ドクゼリ)、No. 407 (エゾノヨロイグサ)、および A-28 (アルコール酵母)

## 【0054】

## 2) ビート糖蜜発酵培地

10

前項と同様の17%糖濃度(全糖)に調整したビート糖蜜発酵培地を用いた。

## 3) 前培養および接種

GYP培地調整、菌接種、前培養は、前項と同様に行った。

## 4) 発酵条件

発酵条件は、28℃で7日間の発酵を行った。

## 5) アルコールの測定

前項と同様に行った。

## 6) 香気成分分析

発酵終了後のろ液100mLに内部標準物質としてn-アミルアルコールを50ppmになるよう加え、ジエチルエーテル・n-ペンタン(2:1)混合溶媒で振盪抽出し、抽出区分に1%塩酸を加え塩基性区分を除去後、さらに2%炭酸ナトリウムを加え酸性区分を除去し、中性区分を得、ワイドマーカラムにて上端温度34℃で濃縮した。濃縮して得た試料をガスクロマトグラフィーの試料として用い、低沸点の香気成分の定量を行った。

20

## 7) ガスクロマトグラムの分析条件

ガスクロマトグラムはG-3000(日立製)を用い、カラムサイズは0.25mm×60mを用いた。充填剤はTC-WAXで、カラム温度は70℃、検出器はFIDで行った。キャリアガスはN<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>流速35mL/min.で行った。

## 【0055】

## 2. 実験結果

表7にリン酸アンモニウム2.0g/L添加、28℃、7日間発酵後の各酵母におけるアルコール生成量を示した。また表8に28℃、7日間発酵後の各酵母の香気成分を示した。

30

## 【0056】

## 【表7】

表 7 分離酵母の発酵後のアルコール生成量

酵母 (No.)	alc. (%)	酵母 (No.)	alc. (%)	酵母 (No.)	alc. (%)
A-28	8.4	No. 116	8.4	No. 406	8.4
No. 96	8.9	No. 137	8.5	No. 407	8.6
No. 100	8.6	No. 201	8.6		

40

## 【0057】

## 【表8】

表8 分離酵母のアルコール発酵後の香気成分分析値

	A-28	No.96	No.100	No.116	No.137	No.201	No.406	No.407
n-POH	10.7	8.1	8.3	15.5	10.2	11.3	12.0	10.0
i-BOH	43.3	30.4	32.8	50.0	38.7	46.0	47.5	36.3
i-AOH	83.4	80.2	78.7	85.0	81.0	77.3	79.3	75.2
酢酸エチル	6.0	6.2	4.9	6.6	8.4	9.2	5.9	7.5
酢酸イソアミル	0.7	—	0.6	0.8	0.6	0.7	0.7	0.6
A/B 比	1.93	2.64	2.40	1.70	2.09	1.68	1.67	2.07

単位: ppm

n-POH; n-ブロピルアルコール、i-BOH; イソブチルアルコール、i-AOH; イソアミルアルコール

A/B 比; イソアミルアルコール/イソブチルアルコール比

## 【0058】

## 3. 考察

表7に示すとおり、No.96株8.9%、No.100株8.6%、No.137株8.5%、No.201株8.6%およびNo.407株8.6%と対照酵母A-28株の8.4%に対し、同等以上のアルコール生成であった。またNo.116株とNo.406株は、他の分離株よりアルコール生成はやや劣るが、共に8.4%のアルコールを生成し、対照酵母A-28株と変わらない生成量であった。

表8の香気成分分析の結果をみると、香気特性の一つであるA/B比は、アルコール生成の高かったNo.96株(2.64)、No.100株(2.40)、No.137株(2.09)およびNo.407株(2.07)と対照のA-28酵母の1.93よりも高く、A/B比が2以上であったことから、官能的には測れないが華やかさの特徴を示す香気特性を有していると思われる。一方、No.116株(1.70)、No.201株(1.68)およびNo.406株(1.67)と、A/B比は2以下であることから、ウイスキーの香気特性に代表される様に、重厚な香気特性を有していると思われる。しかし、微量な数値の差であることから、ほとんど官能的には変わらないと考えられる。

本実験結果から、アルコール生成能を基本とし、No.96株、No.100株、No.137株、No.201株およびNo.407株を有用分離酵母とした。

## 【0059】

## &lt;有用分離酵母に小仕込み試験&gt;

前項において有用分離酵母5株を見出すことができた。本項においては実地醸造を考慮し、有用分離酵母5株による小仕込み試験を行い、蒸留後の留液の成分分析ならびに官能評価において選択するとともに、成分分析、香気成分分析を行い、実用性について検討を行い、最終的な実用酵母を選択することを目的とした。

## 【0060】

## 1. 実験方法

## 1) 供試酵母

前項により選択したNo.96株、No.100株、No.137株、No.201株、No.407株および対照酵母A-28株の6株を供試酵母として用いた。

## 2) 発酵培地の調製

発酵培地の調整は、糖濃度15% (ビート糖蜜363gを水1.5Lに調製したもの) に調製したビート糖蜜液 (リン酸アンモニウム2.0g/Lを含む) を乾熱殺菌した2L綿栓三角フラスコに1.5L加え、オートクレーブ内で120℃、15分間加圧殺菌した。

## 3) 前培養および接種

前項と同様のGYP培地を用い行った。菌接種量は、発酵培地の液量に対して酵母数で $1 \times 10^5/mL$ になるよう、前培養液を添加した。

10

20

30

40

50

## 4) 発酵条件

発酵条件は、28℃、7日間行った。

## 5) 蒸留

マントルヒーターによる直接加熱蒸留方法を用いた。直接加熱蒸留は、直接もろみを加熱し、流出するアルコール蒸気を冷却捕集し、留液のアルコール濃度が全留で、40%程度になるまで行った。得た蒸留液のアルコール分を蒸留水にて濃度25% (alc.25°) に調整し、香気成分分析および官能検査に供した。

## 6) 香気成分分析

試料の処理およびガスクロマトグラムの条件は、前項と同様に行った。

## 7) 官能検査

10

パネリストは、専門的知識を有する10名で、官能検査は、評価法と嗜好による順位付け法で行った。評価法は、対照酵母A-28酵母にて製造したスピリットを基準（評価3点）に、それぞれの酵母にて製造したスピリットを5段階（1：とても良い 2：良い 3：同等程度 4：やや劣る 5：劣る）にて評価した。嗜好による順位付け法は、それぞれの酵母にて製造したスピリットをパネリストの嗜好にて評価し、順位付けをした。

20

【0061】

## 2. 実験結果

直接加熱蒸留し、アルコール濃度25%に調整した蒸留液の香気成分結果を表9に、評価法による官能検査結果を表10に、嗜好による順位付け法の官能検査結果を表11に各々示した。

【0062】

【表9】

表 9 蒸留後の留液の香気成分分析値

	A-28	No. 96	No. 100	No. 137	No. 201	No. 407
n-POH	25.0	29.3	51.9	39.6	30.1	30.2
i-BOH	84.0	121.7	103.2	180.6	110.4	112.6
n-BOH	0.7	1.6	—	3.1	1.3	3.6
i-AOH	288.4	274.2	300.0	306.5	304.2	241.6
酢酸エチル	16.1	19.5	45.3	49.3	24.1	57.9
酢酸イソアミル	1.4	2.1	1.6	2.6	1.9	2.3
A/B 比	3.43	2.25	2.91	1.70	2.76	2.15

単位；ppm

n-POH ; n-ブチルアルコール、i-BOH ; イソブチルアルコール、n-BOH ; n-ブチルアルコール

i-AOH ; イソアミルアルコール A/B 比 ; イソアミルアルコール/イソブチルアルコール比

アルコール分 25%に調整した留液の分析値

30

40

【0063】

## 【表10】

表 10 各酵母により得た蒸留液 (alc. 25°) の評価法による官能検査結果

パネリスト	サンプル (酵母番号)				
	No. 96	No. 100	No. 137	No. 201	No. 407
1	5	3	4	3	3
2	2	3	2	3	2
3	2	2	4	4	3
4	2	2	2	1	1
5	3	2.5	3	3	2
6	2	2	2	2	2
7	2	4	3	4	3
8	2	2	2	2	2
9	2	3	1	1	3
10	2	2	2	1	1
評価点合計	24	25.5	25	24	22
評価点平均	2.4	2.55	2.5	2.4	2.2

1 : とても良い 2 : 良い 3 : 同等程度 4 : やや劣る 5 : 劣る

## 【0064】

## 【表11】

パネリスト	サンプル (酵母番号)				
	No. 96	No. 100	No. 137	No. 201	No. 407
1	5	4	3	1	2
2	2	4	1	3	5
3	5	2	3	4	1
4	1	5	2	4	3
5	3	5	1	4	2
6	4	2	3	4	1
7	5	4	2	3	1
8	2	1	4	5	3
9	3	5	1	4	2
10	5	1	4	3	2
評価点合計	31	33	24	35	22
評価点平均	3.1	3.3	2.4	3.5	2.2

数字は5種類のサンプルの順位を示す

## 【0065】

## 3. 考察

香気成分分析の結果より、高級アルコールのうちn-プロピルアルコールでは分離酵母全

10

20

30

40

50

てが29.1ppm～51.9ppmと対照のA-28酵母(25.0ppm)に比べ高い値を示した。イソブチルアルコールにおいても分離酵母全てが103.2ppm～180.6ppmと対照酵母のA-28株(84.0ppm)に比べ高い値を示した。一方イソプロピルアルコールにおいては、No.96株が274.2ppm、No.407株が241.6ppmと対照のA-28酵母(288.4ppm)に比べ低い値を示したが、他の分離酵母は300ppm～306.5ppmと高い値を示した。この結果から、A/B比は、対照のA-28酵母(3.43)に比べ、1.70～2.91と総じて低い値となり、重厚な好気特性を示す香気特性となつた。また酢酸イソアミルが対照のA-28酵母が1.4ppmであったのに対し、分離酵母では1.6ppm(No.100株)～2.6ppm(No.137株)と僅かではあるが高い値を示した。この酢酸イソアミルの成分値から、分離酵母は、対照酵母に比べにエステルの面からも香気に特性があるといえる。

10

さらに官能評価の結果より、全ての分離酵母で発酵により得た蒸留液(アルコール分25°調整)は、対照のA-28酵母より得た蒸留液(アルコール分25°調整)より良い評価が得られた。嗜好法による結果では、No.137株とNo.407株が嗜好法による順位付けで他のものより高い順位を示した。特にNo.407株はエゾノヨロイグサより分離した酵母であることから、商品価値の向上の観点からも楽しみな酵母といえる。

## 【0066】

## 実施例2

## &lt;有用分離酵母の同定&gt;

十勝支庁管内の花より分離した、ビート糖蜜発酵能に優れた有用分離酵母(5株)の属種の同定を行い、菌学的特性を明らかにすることを目的に、糖の発酵性や資化性および硝酸塩の資化性について検討を行った。

20

## 【0067】

## 1. 実験方法

## 1) 供試酵母

供試酵母は、前項で用いた有用分離酵母5株(No.96株、No.100株、No.137株、No.201株およびNo.407株)を試験に供した。表12に供試菌株と分離源を示した。

## 【0068】

## 【表12】

表 12 供試酵母と分離源

30

分離酵母 No.	分離源 (花名)	分離酵母 No.	分離源 (花名)
No. 96	シロ	No. 201	オオバミズホウズキ
No. 100	パンジー	No. 407	エゾノヨロイグサ
No. 137	ポピー		

## 【0069】

## 2) 糖の発酵性試験

糖の発酵性は、Yeast Nitrogen Base(Difco社)を基本培地とし、これに各炭素源(グルコース、ガラクトース、シュークロース、マルトース、ラクトースおよびラフィノース)を6%(ラフィノースのみ12%)になるよう添加し、乾熱殺菌した綿栓ダラハム管入り小型試験管に分注後、オートクレーブにて120°、10分間加圧殺菌した。酵母の接種は、あらかじめYM液体培地で前培養した分離酵母を、殺菌水にて2度洗浄後、洗浄菌体の希釈懸濁液より、殺菌ピペットにて $8 \times 10^3$ /mLとなるよう接種し、25°、5日間培養し、ガス発生の有無より発酵性を判定した。

40

## 3) 糖の資化性試験

糖の資化性は、Yeast Nitrogen Base(Difco社)を基本培地とし、これに各炭素源(グルコース、ガラクトース、シュークロース、マルトース、ラクトース、ラフィノース、メレジトース、および-メチル-d-グルコシド)を0.5%、寒天2%を添加した平板培地上に

50

、あらかじめYM液体培地で前培養した分離酵母を、殺菌水にて2度洗浄後、洗浄菌体の希釈懸濁液より、白金耳にて画線接種し、25 、5日間培養し、生育の有無より資化性を判定した。

#### 4 ) 硝酸塩 (KNO<sub>3</sub>) の資化性試験

硝酸塩資化性は、表13に示す組成を基本培地とし、これにN源としてKNO<sub>3</sub>を0.078%、または比較対照として(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を0.1%加えた培地を用い、これにあらかじめYM液体培地で前培養した分離酵母を、殺菌水にて2度洗浄後、洗浄菌体の希釈懸濁液より、殺菌ピペットにて8×10<sup>3</sup>/mLとなるよう接種し、25 、3日間培養し、生育の有無より判定した。

【0070】

【表13】

10

表 13 硝酸塩資化性培地細成

glucose	10	g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0	g	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5	g	
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.01	g	
NaCl	0.01	g	
biotin	200	μg	20
Ca · pantothenate	40	mg	
inositol	200	mg	
thiamine - HCl	40	mg	
pyridoxine - HCl	40	mg	
nicotinic acid	40	mg	
ρ - aminobenzoic acid	20	mg	
riboflavine	20	mg	30
dis. water	1,000	mL	

【0071】

#### 2 . 実験結果

有用分離酵母の糖の発酵性試験結果を表14に、有用分離酵母の糖の資化性試験結果を表15に示した。また、有用分離酵母の硝酸塩の資化性試験結果は、全株( - )を示した。

【0072】

## 【表14】

表 14 有用分離酵母の糖の発酵性試験結果

	分離酵母 (酵母番号)				
	No. 96	No. 100	No. 137	No. 201	No. 407
Glu.	+	+	+	+	+
Gal.	+	+	+	+	+
Suc.	+	+	+	+	+
Mal.	+	+	+	+	+
Raf.	+	+	+	+	+
Lac.	—	—	—	—	—

Glu. ; グルコース、Gal. ; ガラクトース、Suc. ; シューカロース、  
Mal. ; マルトース、Raf. ; ラフィノース、Lac. ; ラクトース

## 【0073】

## 【表15】

表 15 有用分離酵母の糖の資化性試験結果

	分離酵母 (酵母番号)				
	No. 96	No. 100	No. 137	No. 201	No. 407
Glu.	+	+	+	+	+
Gal.	+	+	+	+	+
Suc.	+	+	+	+	+
Mal.	+	+	+	+	+
Raf.	+	+	+	+	+
Lac.	—	—	—	—	—
Mel.	+w	+w	+w	+w	+w
$\alpha$ -GG	—	—	—	—	—

Glu. ; グルコース、Gal. ; ガラクトース、Suc. ; シューカロース、  
Mal. ; マルトース、Raf. ; ラフィノース、Lac. ; ラクトース、  
Mel. ; メレジトース、 $\alpha$ -GG ;  $\alpha$ -メチル-d-グルコシド

## 【0074】

## 3. 考察

有用分離酵母の同定は、糖の発酵性、糖の資化性および硝酸塩の資化性試験結果より、有用分離酵母全株を *Saccharomyces cerevisiae* と同定した。

有用分離酵母全株が *Saccharomyces cerevisiae* であったことから、利用は十分可能であると同時に、安全面でも既に実証されていることから、安心して酒類への利用できるものといえる。

## 【0075】

## 実施例 3

< 分離酵母 (No. 137 株, No. 407 株) と既存の醸造酵母との発酵能の差異の検討 >

十勝の野草から分離した No. 137 株および No. 407 株は、分類学的には *Saccharomyces cere*

visiaeになる。しかし、菌株特許を取得するにあたり、本菌株が他の菌株（醸造酵母；*Saccharomyces cerevisiae*）と菌株的な差異（形質的）、例えば発酵特性などにおいて、明確的にあるいは簡便的に分けられることが重要である。

本分離酵母No.137株およびNo.407株は、分離するに際しビート糖蜜を集積培養液として、集積培養法にて分離を行った。したがって分離菌株の形質的な性質としては、ビート糖蜜培地において増殖やアルコール発酵が極めて良好であると考えられる。

そこで本試験においては、集積培養液に用いた培地の糖度を10%～20%（全糖換算による）に変え、分離酵母No.137株、No.407株と既存の醸造酵母8種（清酒酵母、ワイン酵母、ビール酵母および蒸留酒酵母）との発酵能の差異の検討を試みた。

【0076】

10

### 1. 実験方法

#### 1) 供試酵母

供試酵母は、分離酵母のNo.137株、No.407株の2酵母、既存の醸造酵母として清酒酵母の協会7号酵母（K-7酵母）、協会9号酵母（K-9酵母）、ワイン酵母としてOC-2酵母、IFO2220酵母、ビール酵母としてIFO2000酵母、IFO2011酵母および蒸留酒酵母としてIFO2091酵母、A-28酵母の計10株を用いた。

【0077】

20

#### 2) 酵母の前培養

GYP液体培地に各酵母を1白金耳接種し30、72時間培養し前培養とした。GYPの培地組成は表16に示すとおりである。

【表16】

表 16 GYP 液体培地組成

グルコース	100g
酵母エキス	5g
ペプトン	5g
水	1L

30

【0078】

#### 3) ビート糖蜜培地の調製

全糖換算で糖濃度10%～20%になるよう調製したビート糖蜜液を、あらかじめ殺菌した500mL錐栓三角フラスコに150mL分注し、オートクレーブにて120、15分間加圧滅菌した。この殺菌したビート糖蜜液をビート糖蜜培地とし、各酵母のアルコール発酵試験に用いた。

#### 4) アルコール発酵

ビート糖蜜培地に前培養した供試酵母を1mL（ $1 \times 10^4$ /mLなるよう）添加し30、5～10日間発酵させた。

40

#### 5) アルコールの測定

国税庁所定分析法注解に従って行った。

#### 6) 香気成分分析

発酵終了後のろ液100mLに内部標準物質としてn-アミルアルコールを50ppmになるよう加え、ジエチルエーテル・n-ペンタン（2:1）混合溶媒で振盪抽出し、抽出区分に1%塩酸を加え塩基性区分を除去後、さらに2%炭酸ナトリウムを加え酸性区分を除去し、中性区分を得、ワイドマーカラムにて上端温度34で濃縮した。濃縮して得た試料をガスクロマトグラムの試料として用い、低沸点の香気成分の定量を行った。

#### 7) ガスクロマトグラムの分析条件

ガスクロマトグラムはGC-2014（島津製）を用い、カラムサイズは0.25mm×60mを用い

50

た。充填剤はInertCap Pure WAXで、カラム温度は50 ~ 80 昇温法 (50 27分保持-2 /分で80まで昇温、10分保持)、検出器はFIDで行った。キャリアガスはN<sub>2</sub>ガス、N<sub>2</sub>ガスの流速は35mL/min. で行った。

【0079】

2. 実験結果および考察

1) 分離酵母No.137株、No.407株および各醸造酵母の各ビート糖蜜培地におけるアルコール発酵能の差異の検討：

表17に分離酵母No.137株、No.407株および各醸造酵母の各ビート糖蜜培地におけるアルコール生成値を示した。

【0080】

10

【表17】

表17 分離酵母 No.137株、No.407株および各醸造酵母の各ビート糖蜜培地におけるアルコール生成値

供試酵母	糖濃度(%)と発酵日数			
	10%	13%	17%	20%
	5日間	7日間	7日間	10日間
No.137株	3.7	6.0	7.8	8.5
No.407株	3.6	5.9	7.8	8.5
K-7酵母	3.8	5.0	6.0	7.0
K-9酵母	3.6	4.9	5.6	6.0
OC-2酵母	3.8	4.6	1.9	4.4
IF02220酵母	3.6	4.0	0	0
IF02000酵母	3.6	4.8	4.3	0
IF02011酵母	3.6	3.8	3.6	3.6
IF02091酵母	3.6	5.1	0	0
A-28酵母	4.0	5.4	6.8	7.6

数値は生成アルコール濃度(%)を示す。

【0081】

アルコール生成の結果(表17)より、分離酵母のNo.137株とNo.407株は、ビート糖蜜の糖濃度が10%、5日間の発酵では3.7%(No.137株)、3.6%(No.407株)、13%、7日間の発酵では6.0%(No.137株)、5.9%(No.407株)、17%、7日間の発酵では7.8%(No.137株)、7.8%(No.407株)、20%、10日間の発酵では8.5%(No.137株)、8.5%(No.407株)とビート糖蜜の糖濃度に関係なく、アルコール発酵は良好であった。

【0082】

一方供試した既存の醸造酵母では、ビート糖蜜の糖濃度が10%、5日間の発酵では4.0%(A-28酵母)~3.6%の範囲であり、13%、7日間の発酵では5.4%(A-28酵母)~3.8%(ビール酵母IF02011酵母)、17%、7日間の発酵では6.8%(A-28酵母)~0%(蒸留酒酵母IF02091酵母、ワイン酵母IF02220酵母)、20%、10日間の発酵では7.6%(A-28酵母)~0%(蒸留酒酵母IF02091酵母、ワイン酵母IF02220酵母、ビール酵母IF02000酵母)とある程度はアルコール発酵する酵母(A-28酵母)もあるものの、その他の醸造酵母は糖濃度が上がるに従い、発酵が緩慢となった。酵母によってはアルコール生成が0%と全くできない酵母もあった。

【0083】

20

30

40

50

以上の結果より、分離酵母と代表的な既存の醸造酵母にてビート糖蜜の糖濃度と発酵温度によるアルコール発酵能の差異は明確にあり、分離酵母137酵母と407酵母はビート糖蜜の糖濃度に関係なくアルコール発酵能を有する酵母であった。一方、供試した醸造酵母は、ビート糖蜜の糖濃度が高くなるに従い発酵が緩慢となり、酵母によってはアルコール発酵能が全くない酵母もあったことから、発酵能において明確に差異が生じた。

従って、分離酵母(No.137株、No.407株)は、ビート糖蜜濃度17%のビート糖蜜培地での30、7日間における発酵において、7%以上のアルコール発酵能を有することから、この発酵条件とした発酵能の差異で酵母の識別判定を行うことができると思われる。

#### 【0084】

2) 分離酵母No.137株、No.407株および各醸造酵母の糖濃度13%ビート糖蜜培地における低沸点香気成分の差異の検討：

酵母は、培養基、発酵温度などの発酵条件により、生成する香気成分に特徴を示す。特にA/B比(i-アミルアルコール/i-ブチルアルコール比)は、香気バランスとして扱われ、酵母をはじめ種々の酒類に特徴がある。この香気バランスの特徴を、酵母の差異のキーと考え、13%ビート糖蜜培地での7日間発酵における低沸点香気成分とその特性について、分離酵母No.137株、No.407株および比較対照として各醸造酵母の代表酵母(K-7酵母、OC-2酵母、IFO2011酵母、A-28酵母およびIFO2091酵母)5酵母を用い、そのアルコール生成比較を行った。

その結果を表18に分離酵母No.137株、No.407株および各醸造酵母の糖濃度13%ビート糖蜜培地における低沸点香気成分分析値として示した。

#### 【0085】

#### 【表18】

表18 分離酵母No.137株、No.407株および各醸造酵母の糖濃度13%ビート糖蜜培地における低沸点香気成分分析値

(単位: ppm)

供試酵母	n-ブチル	i-ブチル	n-ブチル	i-アミル	A/B比
	アルコール	アルコール	アルコール	アルコール	
No.137株	5.8	13.6	1.8	40.5	2.98
No.407株	5.2	19.8	1.3	62.3	3.15
K-7酵母	9.0	19.0	4.2	37.4	1.97
OC-2酵母	14.4	17.5	7.2	49.3	2.82
IFO2011酵母	5.3	30.4	2.3	52.3	1.72
IFO2091酵母	20.9	53.8	0.0	44.6	0.83
A-28酵母	10.9	17.1	2.6	70.7	4.13

A/B比:i-アミルアルコール/i-ブチルアルコール比を示す。

#### 【0086】

低沸点香気成分分析の結果(表18)より、分離酵母No.137株のi-ブチルアルコールの生成値は13.6ppm、i-アミルアルコールの生成値は40.5ppmとなり、従ってA/B比は2.98であった。No.407株のi-ブチルアルコールの生成値は19.8ppm、i-アミルアルコールの生成値は62.3ppmとなり、従ってA/B比は3.15であった。

一方比較対照酵母の内、糖蜜発酵酵母の代表酵母A-28のi-ブチルアルコールの生成値は17.1ppm、i-アミルアルコールの生成値は70.7ppmとなり、従ってA/B比は4.13と、分離酵母のNo.137株やNo.407株よりも高い値を示した。しかしその他の醸造酵母にあっては、A/B比は、清酒酵母のK-7酵母が1.97、ワイン酵母のOC-2酵母が2.82、ビール酵母のIFO20

10

20

30

40

50

11酵母が1.72、蒸留酒酵母のIFO2091酵母が0.83と2.90以下の値であった。

以上供試酵母の比較数は少ないが、13%糖蜜培地で30、7日間発酵後の香気成分に顕著に差異が認められ、特に香気バランスを示すA/B比 (i-アミルアルコール/ i-ブチルアルコール比) では、分離酵母は2.95から3.2程度にあり、その他の酵母はこの範囲ではなかったことから、A/B比を酵母判定のキーとして活用できると思われる。

### 【0087】

#### 3.まとめ

分離酵母No.137株とNo.407株と既存酵母との発酵能の差異について検討した。

その結果、以下の試験において、分離酵母No.137株、No.407株は既存酵母と異なる酵母であると判定できた。

1) ビート糖蜜濃度17%のビート糖蜜培地での30、7日間における7%以上のアルコール発酵能試験

分離酵母No.137株、No.407株；(+)、既存酵母；(+)～(-)

2) ビート糖蜜濃度13%培地での30、7日間におけるA/B比

分離酵母No.137株、No.407株；2.95～3.2、既存酵母；2.9以下～3.2以上

### 【0088】

#### 実施例4

##### <実用酵母による発酵特性>

表12、表14～15に示す有用分離酵母5株より、アルコール発酵能、蒸留液の官能評価等を踏まえ、実用酵母としてNo.137株およびNo.407株を選択した。

これら2株を用い、実地醸造を踏まえアルコール発酵条件の検討を進め、よりよい条件の検討を行った。

### 【0089】

##### <栄養源添加無添加による発酵>

###### 1. 実験方法

1) 供試酵母

実施例2で選択したNo.137株、No.407株および対照としてA-28酵母の3株を供試酵母として用いた。

2) 発酵培地の調製

発酵培地の調整は、糖濃度15%（全糖濃度）に調製したビート糖蜜培地（リン酸アンモニウム2.0g/L培地およびリン酸アンモニウム無添加培地）を乾熱殺菌した300mL錐栓三角フラスコに150mL加え、オートクレーブ内で120、15分間加圧殺菌した。

3) 前培養および接種

実施例1と同様に行った。

4) 発酵条件

発酵温度は30、発酵日数は10日間とした。

5) 酵母の増殖度

酵母の増殖状態を、生成アルコール濃度をもって示した。

6) アルコール濃度の測定

実施例1と同様に行った。

### 【0090】

###### 2. 実験結果

実用酵母2株（No.137株およびNo.407株）および対照のA-28酵母について、リン酸アンモニウム2.0g/Lを含むビート糖蜜培地における生成アルコールの経日変化を図1に、リン酸アンモニウム無添加ビート糖蜜培地における生成アルコールの経日変化を図2に各々示した。

リン酸アンモニウム2.0g/Lを含むビート糖蜜培地における各酵母のアルコール生成は、7日目にほぼピークの7%を生成し、その後7%台を維持し、10日目にはやや減少したものの、ほぼ横ばい傾向を示した。リン酸アンモニウム2.0g/Lを含むビート糖蜜培地における各酵母のアルコール生成は、No.137株、No.407株ともにリン酸アンモニウム添加培地同

10

20

30

40

50

様7日目でほぼピークの7%を生成し、その後7%台を維持し、10日目にはやや減少したものの、ほぼ横ばい傾向を示したが、対照酵母のA-28株は、前半より緩やかに推移し、10日目で7%台のアルコール生成となった。

#### 【0091】

##### 3. 考察

実用酵母のNo.137株およびNo.407株は、本ビート糖蜜培地においては、リン酸アンモニウム添加無添加に係わらず、最終的に7%台のアルコール生成をすることより、栄養源の添加がアルコール発酵に大きな影響を与えないと考えられる。しかし誘導期を含め前半4日間のアルコール発酵において、リン酸アンモニウム添加では、早い段階（2日目）よりアルコール生成が順調に進むのに対して、リン酸アンモニウム無添加においては、ややアルコール生成が遅れ、4日目以降にアルコール生成が盛んになってくる。

この結果を考慮すれば、アルコール発酵4日目までの発酵前半期に、雑菌の汚染あるいは野生酵母の汚染を防ぎ、実用酵母を優先して増殖発酵させるためには、リン酸アンモニウムを添加する必要があるといえる。

#### 【0092】

##### <初発培養温度と発酵温度によるアルコール生成>

実用酵母を用い、現場の温度環境を考慮した環境下でのアルコール発酵を行い、最低限のアルコール発酵条件の見出すことを目的に、初発温度30℃で培養後、低温下でのアルコール発酵条件を検討した。

#### 【0093】

##### 1. 実験方法

###### 1) 供試酵母

前項と同様、No.137株、No.407株および対照としてA-28酵母の3株を供試酵母として用いた。

###### 2) 発酵培地の調製

前項と同様、糖濃度15%（全糖濃度）に調製したビート糖蜜培地（リン酸アンモニウム2.0g/Lを含む）を乾熱殺菌した300mL錐栓三角フラスコに150mL加え、オートクレーブ内で120℃、15分間加圧殺菌した。

###### 3) 前培養および接種

実施例1と同様に行った。

###### 4) 初発培養温度条件と発酵条件

初発培養温度30℃で、1日～3日間培養を行った後、発酵温度を10℃、13℃および15℃にしアルコール発酵を行った。なお日数については培養日数と発酵日数を合算したトータル日数とし、発酵温度10℃と13℃では12日間、15℃では10日間行った。

###### 5) 酵母の増殖度

前項と同様、生成アルコール濃度をもって示した。

###### 6) アルコール濃度の測定

実施例1と同様に行った。

#### 【0094】

##### 2. 実験結果

実用酵母2株（No.137株およびNo.407株）および対照のA-28酵母について、30℃で培養後発酵温度15℃における生成アルコールの経日変化を図3～5に各々示した。

#### 【0095】

30℃で培養後発酵温度15℃における生成アルコールの経日変化（図3～5）では、1日培養後3日目のアルコール濃度は2%～3%となり、その後7日間（10日目）で7%まで増加し、2日培養では3日目のアルコール濃度は3%～4%となり、その後7日間（10日目）で7%まで増加し、3日培養では3日目のアルコール濃度は4%台となり、その後7日間（10日目）で6%台後半まで増加した。30℃で培養後発酵温度13℃における生成アルコールの経日変化（図示せず）では、1日培養後3日目のアルコール濃度は1.5%～2.5%となり、その後7日間（10日目）で6%後半まで増加し、2日培養では3日目のアルコール濃度は2%後半～3.5%

10

20

30

40

50

%ほどとなり、その後7日間(10日目)で6.5%まで増加し、3日培養では3日目のアルコール濃度は4%台～6.5%となり、その後7日間(10日目)で6.%台後半までほぼ横ばい状態であった。30 で培養後発酵温度10 における生成アルコールの経日変化(図示せず)では、1日培養後3日目のアルコール濃度は2%となり、その後9日間(12日目)で6.5%ほどまで増加し、2日培養では3日目のアルコール濃度は3%台となり、その後9日間(12日目)5%台まで増加し、3日培養では3日目のアルコール濃度は3.5%ほどとなり、その後9日間(12日目)で65%台後半まで増加した。

これらの結果より、30 での培養期間が長いほどその間での生成アルコールが高くなり、これに伴い発酵期間(低温期)に入つてからのアルコール生成が緩慢になる傾向が示された。特に発酵温度が下がるほど顕著になり、それに伴つて発酵日数も12日と長くなる。また同時に生成するアルコール濃度も低下している。

#### 【0096】

##### 3. 考察

30 で培養後発酵温度15 における生成アルコールの経日変化(図3～5)、30 で培養後発酵温度13 における生成アルコールの経日変化(図示せず)および30 で培養後発酵温度10 における生成アルコールの経日変化(図示せず)より、30 での培養期間が長いほどその間での生成アルコールが高くなり、これに伴い発酵期間(低温期)に入つてからのアルコール生成が緩慢になる傾向が示された。特に発酵温度が下がるほど顕著になり、それに伴つて発酵日数も12日と長くなる。また同時に生成するアルコール濃度も低下している。

低温下でも発酵は進が、その速度は緩やかであり、かつ生成アルコール濃度が低いと推測されることから、低温期間での発酵は避けるのが望ましい。また低温期間を使うのであれば、少なくとも1日は培養温度30 とし、酵母の増殖を促進させた後、15 での発酵が適当であると思われる。

#### 【0097】

##### 実施例5

###### <前記実用酵母によるアルコール生産量の予測>

実地醸造においてアルコールの生産量がどの程度になるかは、製造上重要となる。そこで本項においては、実用酵母がビート糖蜜1tより純アルコールとしてどの程度の生産量があるかを検討し、実地醸造においての生産量予測を行つた。

#### 【0098】

##### 1. 実験方法

###### 1) 供試酵母

実施例2にて選択したNo.137株、No.407株および対照としてA-28酵母の3株を供試酵母として用いた。

###### 2) 発酵培地の調製

発酵培地の調整は、糖濃度15%(全糖濃度)に調製したビート糖蜜培地(リン酸アンモニウム2.0g/Lを含む)を乾熱殺菌した3L綿栓三角フラスコに1.5L加え、オートクレーブ内で120 、15分間加圧殺菌した。

###### 3) 前培養および接種

実施例1と同様に行つた。

###### 4) 発酵条件

発酵温度は、28 で行った。発酵日数は、10日間行った。

###### 5) 蒸留

ガラス製の単式蒸留器を用い、マントルヒーターによる直接加熱法で行った。蒸留液の回収は、留液のアルコール濃度が全留で38%程度になるまで行った。

###### 6) アルコール濃度の測定

実施例1と同様に行つた。

#### 【0099】

##### 2. 実験結果

10

20

30

40

50

表19にアルコール回収量およびビート糖蜜トン当たりの収量を示した。

No.137 株は、発酵もろみ5360mL (糖蜜使用量1232.8g) から397%アルコールを677mL (純アルコールで268.8mL) 回収した。ビート糖蜜トン当たりの収量は、純アルコール換算で331.4L/tであった。No.407 株は、発酵もろみ5320mL (糖蜜使用量1223.6g) から38.7%アルコールを707mL (純アルコールで273.6 mL) 回収した。ビート糖蜜トン当たりの収量は、純アルコール換算で334.8L/tであった。比較対照のA-28株は、発酵もろみ5360mL (糖蜜使用量1232.8g) から38.7%アルコールを693mL (純アルコールで268.2mL) 回収した。ビート糖蜜トン当たりの収量は、純アルコール換算で330.6L/tであった。

【0100】

【表19】

10

表 19 アルコール回収量およびビート糖蜜トン当たりの収量

供試酵母	発酵もろみ量 (mL) (ビート糖蜜量、g)	回収 Alc. (%)	回収量 (mL) (純 Alc. 量、mL)	収量 (L/t)
A-28 酵母	5,360 (1,232.8)	38.7	693 (268.2)	330.6
No.137 株	5,360 (1,232.8)	39.7	677 (268.8)	331.4
No.407 株	5,320 (1,223.6)	38.7	707 (273.6)	334.8

ビート糖蜜量は、全糖 66%換算による。230g/L より算出した。

20

Alc. はアルコールを示す。

収量は、ビート糖蜜 1t 当たりの純アルコール (100%) で示した。

【0101】

### 3. 考察

No.137 株は、ビート糖蜜トン当たりの収量が純アルコール換算で331.4L/t、No.407 株は、ビート糖蜜トン当たりの収量が純アルコール換算で334.8L/tであったのに対して、比較対照のA-28酵母は、ビート糖蜜トン当たりの収量が純アルコール換算で330.6L/tであった。このこと実用酵母として選択した2株は、比較対照株よりも生産量がビート糖蜜1t当たり0.8Lから4.2L多いことから十分なアルコール生産量を有しており、実地醸造に十分利用できると思われる。

30

【0102】

### 実施例 6

#### <リキュールの嗜好性の検討>

実用酵母 (No.137およびNo.407) によるビート糖蜜 (糖濃度15%) から得たスピリッツを用い、アルコール分15%に調整した後、ハスカップ果汁やビート糖蜜添加によるリキュールの試作を試みた。

【0103】

### 1. 実験方法

#### 1) 供試スピリッツおよびアルコール分の調整

前項によって得た蒸留液を蒸留水にてアルコール分を15%に調整したものを試験に供した

40

#### 2) リキュール材料

糖は、日本食品化工製のオリゴ糖 (L-95) と、日本甜菜製糖製のビート糖蜜 (芽室工場製) を用いた。酸味料は乳酸 (90%) を用いた。果実材料としてはハスカップジュースを用いた。

#### 3) リキュールの配合

リキュールは、酒税法上エキス分が2度以上なければならない<sup>2)</sup>ため、酒税法を考慮し表20に示す配合で行った。

【0104】

50

## 【表 20】

表 20 リキュールの配合表

サンプル1	： 糖 2% (w/v%)、乳酸 1% (v/v%)
サンプル2	： ハスカップ 5% (v/v%)、糖 2% (w/v%)、乳酸 1% (v/v%)
サンプル3	： ビート糖蜜 1% (w/v%)、乳酸 1% (v/v%)

## 4) 成分分析

10

エキス分、アルコール濃度および酸度の測定は、国税庁所定分析法注解<sup>2)</sup>に従って行った。

## 【0105】

## 2. 実験結果

試作したリキュールの成分分析値を表21に示した。

全てのサンプルでエキス分2度以上となった。また酸度が9以上の値となった。

## 【0106】

## 【表 21】

表 21 リキュールの成分分析値

20

スピリッツ	サンプル No.	エキス分 (度)	アルコール分 (%)	酸度 (mL)
A-28 酵母使用	1	2.76	14.0	9.2
	2	3.51	13.0	9.5
	3	2.23	14.0	9.4
No. 137 株使用	1	2.76	14.0	9.3
	2	3.51	13.0	9.3
	3	2.23	14.0	9.3
No. 407 株使用	1	2.76	14.0	9.2
	2	3.51	13.0	9.3
	3	2.23	14.0	9.3

酸度：試料 10mL を N/10NaOH にて中和するのに要する滴定値 (mL) で示した。

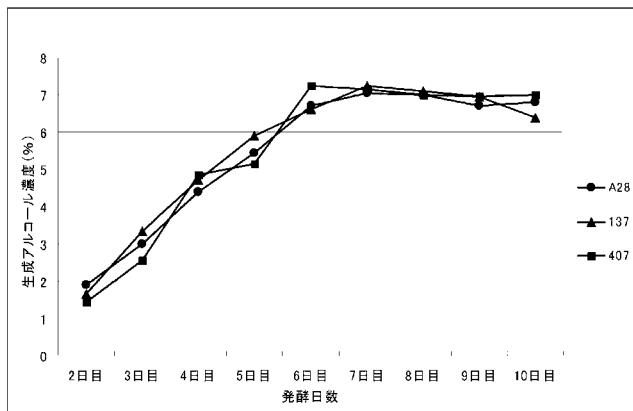
30

## 【産業上の利用可能性】

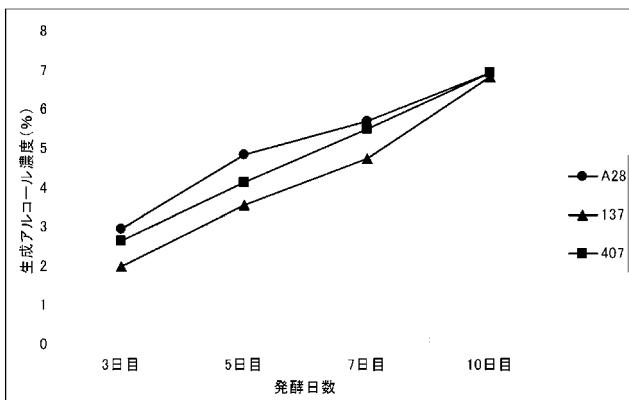
## 【0107】

本発明はアルコール発酵分野に有用である。

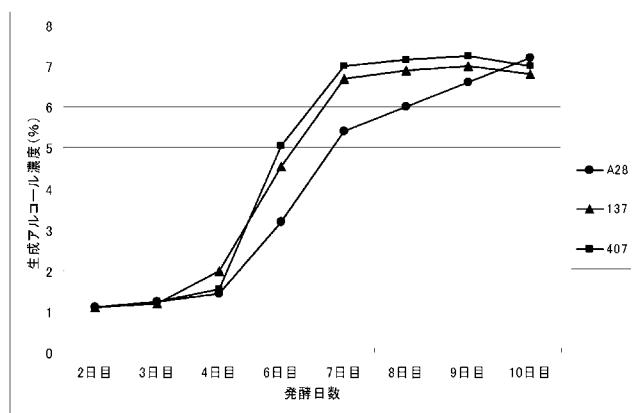
【図1】



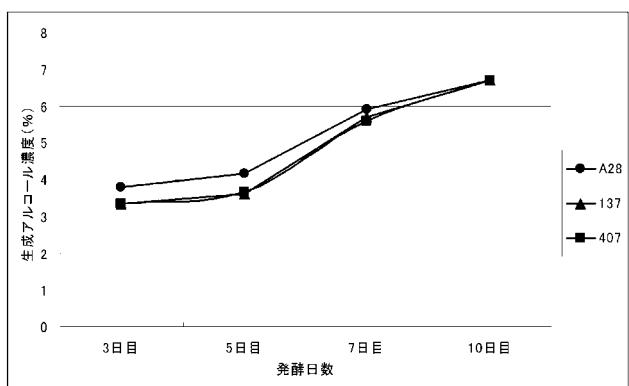
【図3】



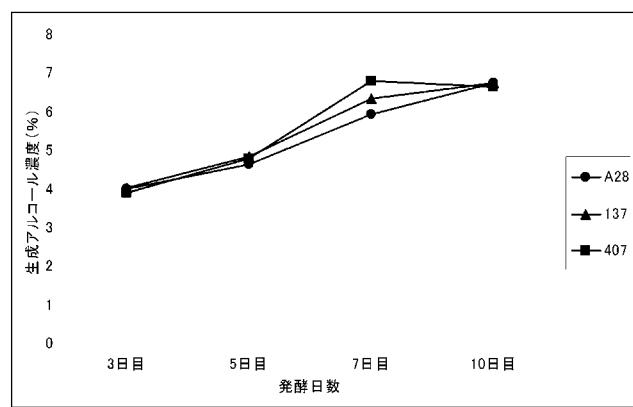
【図2】



【図4】



【図5】



---

フロントページの続き

(72)発明者 山岸 賢三  
北海道中川郡池田町字清見 8 3 番地 池田町ブドウ・ブドウ酒研究所内

(72)発明者 大渕 秀樹  
北海道中川郡池田町字清見 8 3 番地 池田町ブドウ・ブドウ酒研究所内

F ターム(参考) 4B015 AG05 NB02 NG04 NP02  
4B065 AA80X AC14 BA22 BB26 BC01 CA06 CA42