

研究論文

マロラクチック発酵を利用した赤ワイン様酒類の開発

伊藤彰敏*1、松田紬衣*2、伊藤里恵*2、三田有紀子*2

Development of Red Wine-Style Liquor Using Malolactic Fermentation

Akitoshi ITO*1, Tsumugi MATSUDA*2, Rie ITO*2 and Yukiko MITA*2

Food Research Center*1 Sugiyama Jogakuen University*2

シクロヘキシミド耐性酵母 FIA1-MAL、紫黒糯米「峰のむらさき」及び焼酎麹を利用した1段仕込により、リンゴ酸濃度の高い赤色高酸度清酒を製成した。*Oenococcus oeni*を用いたマロラクチック発酵を行った結果、官能評価の優れた赤ワイン様酒類を開発することができた。

1. はじめに

酒類の消費動向は、社会情勢や食生活の多様化・洋風化などライフスタイルの変化に対応し、変遷する。果実酒であるワインは酸味を特徴とする酒類で、その酸味により肉や魚料理等の油分を口中ですすぐ効果があるため、一般家庭においても食中酒として広く定着するようになった。国税庁統計年報書(令和元年度)による酒類の消費数量の平成変遷において、果実酒の消費数量は確実に増加傾向であることが示されている。

本研究では、洋食スタイルに合致する高酸度でライト感のある食中酒の開発を念頭におき、紫黒米と焼酎麹を用いる他、マロラクチック発酵(以下 MLF)を導入し、色調と風味に特徴のある赤ワイン風酒類の開発を試みた。

2. 実験方法

2.1 リンゴ酸高生産酵母の育種^{1)~3)}

愛知県純米酒酵母 FIA1 を YM 培地(酵母エキス 0.5%、ポリペプトン 0.5%、麦芽エキス 0.3%、グルコース 1%)5mL で 30℃、2 日間静置培養した後、遠心集菌した。0.2M リン酸緩衝液(pH8.0)4.6mL に懸濁し、40% グルコース 0.25mL、エチルメタンスルホン酸(EMS) 0.3mL を加え、30℃で 60 分間変異処理した。変異処理後、遠心集菌し、チオ硫酸ナトリウム 5ml で EMS を中和後、シクロヘキシミドを 1µg/mL 含有 YM 寒天平板培地に塗布し、30℃で 7 日間培養したコロニーをシクロヘキシミド耐性株として釣菌した。シクロヘキシミド耐性株を YNB15 培地(酵母ニトロゲンベース 0.67%、グルコース 15%)で培養し、リンゴ酸の生成量の多い株を選抜した。

2.2 赤色高酸度清酒仕込

愛知県産紫黒糯米品種「峰のむらさき」(令和 2 年産)

を掛米とし、焼酎麹(徳島製麹(株)70-S)を使用した 1 段仕込を実施した。赤色高酸度清酒仕込配合を表 1 に示す。リンゴ酸高生産酵母を麹エキス培地で 48 時間培養した培養液を酒母とし、20℃で仕込みを行い、20℃で 5 日間アルコール発酵させた後、遠心分離機により固液分離した。

表 1 赤色高酸度清酒仕込配合

		麹歩合50%
総米	(g)	1000
紫黒米	(g)	500
焼酎麹	(g)	500
汲水	(mL)	1500

2.3 MLF 試験

製成酒 100mL に、凍結乾燥菌体として MLF 乳酸菌 *Oenococcus oeni*(商品名: Viniflora®CiNe™ シンワフードケミカル(株)製)を 10mg(10⁸CFU)添加し、20℃で 10 日間 MLF を行った⁵⁾。発酵終了後、0.9µm のフィルターろ過により精製した。経時的にサンプリングし、リンゴ酸及び乳酸の濃度変化を測定した。

2.4 製成酒の成分分析

アルコール分、酸度及びアミノ酸度を測定した⁶⁾。また、pH、Brix、グルコース、全糖(フェノール硫酸法)、全窒素、色調(L*、a*、b*)及び有機酸(クエン酸、リンゴ酸、コハク酸及び乳酸)を測定した⁴⁾。フェノール化合物指数としてアントシアニン指標値、エタノール指数、HCl 指数、高分子色素指数及び総ポリフェノール量を測定した⁷⁾。なお、対照としてカベルネソーヴィニオンを用いた市販赤ワイン(n=7)を分析に供した。

2.5 官能審査

愛知県酒造技術研究会に所属する杜氏 18 名をパネラーとし、MLF 前酒及び MLF 酒の香り、味、色調及び総

*1 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 *2 椋山女学園大学生生活科学部

合評価について、2点嗜好法により官能審査した。優れているほうを選択し、優劣がつけがたい場合「どちらでもない」項目を回答してもらい、酒質の良悪を判定した。

3. 実験結果及び考察

3.1 リンゴ酸高生産酵母の育種

EMS で変異処理をした後、形成されたコロニーのサイズが大きいものをシクロヘキシミド耐性株として 16 株を選抜し、YNB15 培地で培養、各種分析を行った。親株と育種株の性質の比較を表 2 に示す。A3、A6、B2、C1 及び F3 の 5 株は、親株(Control : 1.0mL)より酸度が高かった。リンゴ酸について、すべての耐性株で、親株(0.22mg/100ml)よりリンゴ酸濃度が高かった。なお、A1 株及び A4 株は、親株の約 8 倍高い値を示した。リンゴ酸とコハク酸の濃度比(M/S)を検討した結果、リンゴ酸濃度の高かった A1 及び A4 株は、親株より M/S 比が高く、有望株として評価された。酵母のリンゴ酸生産能を評価するため、リンゴ酸濃度と濁度の比(M/OD)を比較した結果、リンゴ酸濃度の高かった A1 株(2.84)及び A4 株(2.83)は、親株(0.31)より M/OD 比が高く、酵母のリンゴ酸生産能が優れていることが確認できた。なお、育種によるアルコール生産能の減退は認められなかった。以下の試験では、リンゴ酸高生産酵母として、A1 株(FIA1-MAL)を使用した。

表 2 親株と育種株の性質の比較

FIA1	濁度 OD660	酸度 mL	リンゴ酸 mg/100mL	コハク酸 mg/100mL	M/S	M/OD
Control	0.70	1.00	0.22	1.11	0.20	0.31
A1	0.57	0.80	1.62	0.92	1.76	2.84
A2	0.63	0.80	0.66	0.86	0.77	1.05
A3	0.62	1.90	0.75	1.21	0.61	1.20
A4	0.61	0.70	1.73	1.14	1.51	2.83
A5	0.66	1.00	0.90	1.11	0.81	1.37
A6	0.62	1.40	0.66	0.98	0.59	1.06
B1	0.70	0.60	0.89	0.97	0.92	1.27
B2	0.67	1.10	0.66	1.08	0.69	0.99
C1	0.68	1.10	0.75	1.18	0.70	1.11
C2	0.68	0.90	0.71	1.22	0.60	1.40
D1	0.70	0.70	0.50	0.88	0.57	0.72
E1	0.69	0.90	0.92	1.32	1.04	1.33
F3	0.73	1.10	0.95	1.74	0.54	1.30
F4	0.87	1.00	1.02	1.99	0.59	1.18
F5	0.68	0.90	0.61	1.06	0.31	0.90
F6	0.72	0.90	1.17	1.64	1.11	1.63

M/S:リンゴ酸/コハク酸 M/OD:リンゴ酸/濁度

3.2 赤色高酸度清酒仕込

赤ワイン様酒類の開発にあたり、赤い色調と酸味の付与について検討する必要がある。そこで、原料として紫黒糯米及び焼酎麹を選択した。紫黒糯米は、糠層にアントシアニン色素であるシアニジン-3-グルコシドを有する。紫黒糯米の色素は水溶性で、溶出液は赤ワイン様の

色調を呈する。また、クエン酸を含有する焼酎麹を使用することにより、赤ワインが呈する高酸度の酒質を実現できる。

発酵経過については、仕込 2 日目からろみ表面に泡が観察された。仕込 3 日目には発酵がさかんに行われ、炭酸ガスでもろみの一部(麹)が押し上げられ、2 層を呈した。仕込 4 日目で、上部に浮いていた麹も沈み、発酵が終了した。

赤色高酸度清酒の成分を表 3 に示す。赤色高酸度清酒は市販赤ワイン(平均値)より酸度が高かった。これはクエン酸を含有する焼酎麹を原料に使用したためである。リンゴ酸高生産酵母を使用した結果、リンゴ酸濃度は市販赤ワインより高い値を示した。MLF はリンゴ酸から乳酸への変換であることから、MLF を導入できることが確認された。アルコール濃度は約 17%で市販赤ワインより高かった。グルコースは酵母によりほとんど消費された。グルコースが残存すると、MLF 時に乳酸菌によりジアセチルなどのオフフレーバーが生成されることが知られている。製成酒中のグルコース濃度が低いことから、健全な MLF が期待できる。なお、全糖濃度は高い値を示した。アミノ酸度及び全窒素ともに市販赤ワインより高い値を示した。官能的には酸味が強いので、旨味、苦味等は感じられなかったが、熟成時の呈味変化が予想される。

対照酒として、7 ブランドの赤ワインを市販赤ワインの試料とし、平均値で評価した。市販赤ワインと比較して明るさを表す L*値が高かった。a*/b*の値は、赤の強さの指標となる。製成酒の a*/b*は 2.09 で、市販赤ワインの 1.72 より高い値を示した。明るさ、色のバランスを考慮すると、「赤」をより感じる製成酒であった。

表 3 赤色高酸度清酒の成分

	赤色高酸度清酒	市販赤ワイン
pH	3.61	3.46
酸度	mL	8.9
クエン酸	mg/100mL	343
リンゴ酸	mg/100mL	120
コハク酸	mg/100mL	29
乳酸	mg/100mL	14
アルコール	%v/v	17.1
Brix	%w/v	10.6
グルコース	mg/mL	0.79
アミノ酸度	mL	1.00
全窒素	%w/v	0.14
L*	63.9	23.5
a*	51.1	48.6
b*	24.4	28.3
a*/b*	2.09	1.72

市販赤ワインの数値は、平均値(n=7)で示した。

3.3 MLF 試験

赤色高酸度清酒について MLF を行った。MLF による pH 及び酸度の経時変化を図 1 に示す。pH は上昇する

傾向(MLF 発酵前 3.61、発酵後 3.72)にあった。酸度は発酵前が 8.9mL であったのに対し、MLF 後に 7.40mL となり、1.5mL 低下した。

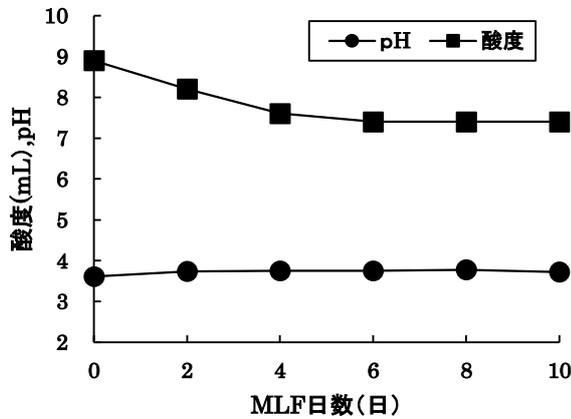


図 1 MLF による pH 及び酸度の経時変化

MLF によるリンゴ酸及び乳酸の経時変化を 図 2 に、MLF 前後の有機酸濃度の比較を 図 3 示す。リンゴ酸濃度は MLF とともに減少し、4 日目から濃度の変化がなくなった。一方、乳酸濃度は MLF とともに増加し、4 日目から濃度の変化がなくなった。以上より、MLF は速やかに行われ、発酵 4 日目で終了したものと推察された。なお、クエン酸及びコハク酸は MLF の前後で濃度の変化は認められなかった。

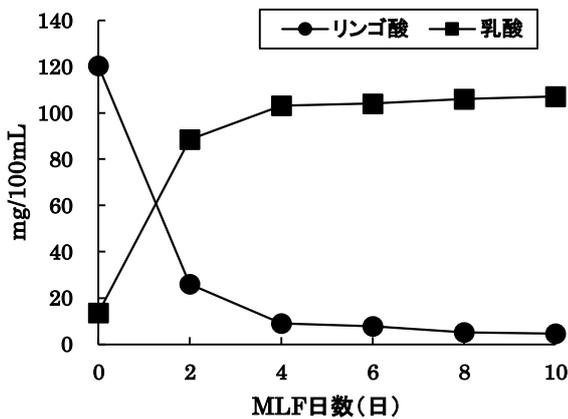


図 2 MLF によるリンゴ酸及び乳酸の経時変化

MLF による色調の経時変化を 図 4 に示す。MLF とともに a*値(赤色み)が低下する傾向が認められた。視覚的には赤い色調に変化があるようには見えなかった。L*値は増加、b*値は低下する傾向が認められた。なお、市販赤ワインは L*値が低く、濃赤色を呈する結果となった。

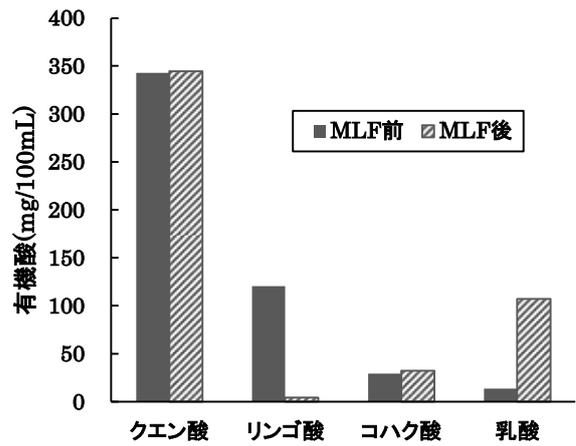


図 3 MLF 前後の有機酸濃度の比較

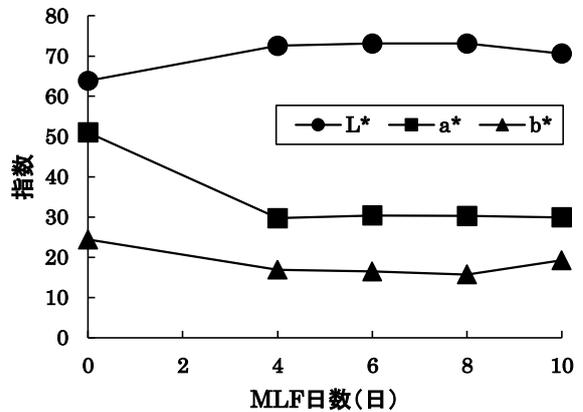


図 4 MLF による色調の経時変化

MLF 前後酒の成分の比較を 表 4 に示す。MLF によりアルコール、Brix 及びグルコースが低下し、アミノ酸度は増加した。

図 5 に MLF 酒のフェノール化合物指数を示す。アントシアニン指標値は MLF により、やや低下する傾向が認められた。MLF 酒は市販赤ワインと匹敵する数値を示した。エタノール指数はワインの滑らかさの指標に用いられている。MLF により約 10 倍高く、市販赤ワインに匹敵する数値を示した。高分子色素指数は MLF による変化は少なかった。市販赤ワインは MLF 酒より高い値を示した。これは、赤ワイン中にはタンニン系の色素が多く含まれていることを示唆するもので、MLF 酒より苦味の強度が強いことが推察された。

総ポリフェノール量は MLF によりやや低下する傾向が認められた。通常の清酒はポリフェノール含量が極めて低い。MLF 酒は紫黒米に由来するポリフェノール色素を含有するため、総ポリフェノール 1000ppm を超える赤ワインレベルの数値を示した。

表4 MLF前後酒の成分の比較

		MLF前	MLF後	市販赤ワイン
発酵温度	°C	20	20	-
発酵期間	日	6	10	-
pH		3.61	3.82	3.46
酸度	mL	8.9	7.2	7.3
クエン	mg/100mL	343	331	n.d.
リンゴ酸	mg/100mL	120	4	2
コハク酸	mg/100mL	29	30	81
乳酸	mg/100mL	14	103	149
アルコール	%v/v	17.1	16.5	13.0
Brix	%w/v	10.6	10.2	8.5
グルコース	mg/mL	0.79	0.42	0.29
アミノ酸度	mL	1.00	1.50	0.53
全窒素	%w/v	0.14	0.14	0.05
L*		63.9	65.5	23.5
a*		51.1	42.9	48.6
b*		24.4	25.8	28.3
a*/b*		2.09	1.66	1.72

市販赤ワインの数値は、平均値(n=7)で示した。

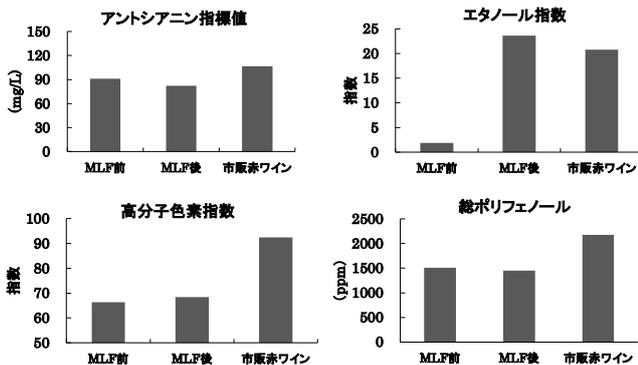


図5 MLF酒のフェノール化合物指数

3.4 官能審査

図6にMLF酒の官能評価を示す。MLF酒はMLF前酒と比較し、香味ともに評価が高く、総合評価も優れていた。本試験酒は、原料に焼酎麹を使用しているため、クエン酸濃度が高い。一般的に、乳酸菌はクエン酸を代謝し、酢酸、ジアセチル及び2,3-ブタンジオールなどのオフフレーバー物質を生成することが知られている。本試験に使用したMLF乳酸菌 *Oenococcus oeni* は、ヘテロ発酵型のクエン酸非代謝乳酸菌であるため、ジアセチルを生成しない。よって、官能評価の香りの項目において、オフフレーバーは反映せず、良好な結果が得られた。また、MLFにより、紫黒米特有の糠様臭が低減化した。

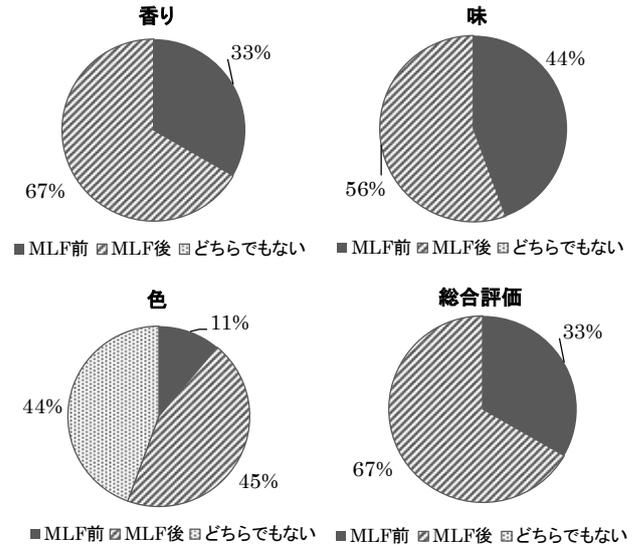


図6 MLF酒の官能評価

4. 結び

本研究の結果は、以下のとおりである。

- (1) EMS 変異処理後のシクロヘキシミド耐性株から、リンゴ酸高生産酵母 FIA1-MAL の取得に成功した。
- (2) FIA1-MAL、紫黒糯米及び焼酎麹を利用した1段清酒仕込みにより、赤ワイン様の赤色高酸度清酒を製成することができた。
- (3) *Oenococcus oeni* を使用したMLFにより、官能評価値の向上が認められた。

文献

- 1) 吉田清, 稲橋正明, 中村欽一, 野白喜久雄: 日本醸造協会誌, **88**(8), 645(1993)
- 2) 小金丸和義, 大浦有実, 神田康三, 村田晃, 加藤富民雄: 日本醸造協会誌, **96**(4), 275(2001)
- 3) 小金丸和義, 神田康三, 安田正昭, 加藤富民雄, 田代康介, 久原哲: 日本醸造協会誌, **98**(4), 303(2003)
- 4) 伊藤彰敏, 石川桃子, 西田淑男: あいち産業科学技術総合センター研究報告, **8**, 42(2019)
- 5) 柳田藤寿, 鎌田勉, 篠原隆, 後藤昭二: 日本醸造協会誌, **88**(3), 238(1993)
- 6) 独立行政法人酒類総合研究所編: 酒類総合研究所標準分析法, <https://www.nrib.go.jp/bun/pdf/bun/nb03.pdf>(2022/9/26)
- 7) 後藤(山本) 奈美, 安井孝, 戸塚昭: 日本醸造協会誌, **89**(12), 989(1994)