

焼酎酵母の安定供給に関する研究

高峯和則*, 安藤義則*, 亀澤浩幸*, 下野かおり*, 前野一朗*

Study on Stable Supply of Shochu Yeast

Kazunori TAKAMINE, Yoshinori ANDO, Hiroyuki KAMESAWA, Kaori SHIMONO and Ichiro MAENO

酵母の安定供給を目的とし、培養条件、大量培養法および酵母の長期保存法を確立するとともに、保存酵母の発酵能および香気成分生成能を評価した。その結果、酵母エキスおよびグルコースからなるY G培地を見出し、この培地を用いジャーファメンタによる大量培養を行ったところ、緩やかに通気することで総菌数 2.6×10^8 個/ml、生菌率85%であった。この酵母を集菌し冷蔵庫内に3ヶ月保存した結果、生菌率は約80%であった。更に、保存酵母を用い、いも焼酎の小仕込み試験を行った結果、培養直後の酵母と遜色ない発酵経過および酒質となった。

Keyword : Yeast, Shochu, Jarfarmentor, 培地, 長期保存

1. 緒言

鹿児島県内の酒造会社の大半は、鹿児島県酒造協同組合（以下、協同組合）が培養・販売している酵母を使用している。協同組合では、培地に麹汁を用いているため、培地調製には時間と手間を要している。また、培養した酵母は保存性がないため造り貯めができない。そのため、急な要望に対応できないなどの問題があり、製造計画の変更や装置トラブルに柔軟に対応できないのが現状である。また、最近焼酎製造量が増加し、それにともない酵母販売量も急増しているが対応に苦慮しているのが現状である。

そこで、安価で簡単に調製できる培地（簡易培地）の検討、大量培養法の検討を行い、得られた条件で培養した酵母について長期保存法を確立するとともに、保存酵母の発酵能および香気成分生成能の評価を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 培地

麹汁培地は以下の方法で調製した。すなわち、麹1に対して水道水4を加え55℃で1夜麹の成分を抽出した。No.2の濾紙で濾過して得られた濾液を沸騰させた。この溶液をNo.5C濾紙で濾過助剤（セライト）を用いて吸引濾過した。得られた濾液を $Bx10^\circ$ に水道水で調整した。

合成培地は、酵母エキス1%、ポリペプトン2%およびグルコース2%からなるYPD合成培地を用いた。なお、酵母エキス、ポリペプトンおよびグルコースは和光純薬工業製の最高純度の試薬を使用した。

蒸留粕培地は、いも焼酎蒸留粕を3,000rpmで15分間遠心分離して得られた上澄み液にグルコースを0, 0.5, 1.0お

よび2.0%になるように添加した。

寒天平板培地は、YPD合成培地に寒天を2%になるように添加したものをを用いた。

雑菌数測定用培地は、寒天平板培地にカビサイジンおよび炭酸カルシウムを添加した培地を用いた。

なお、全ての培地は調整後オートクレーブで121℃、15分間滅菌処理を行った。

2.2 培養

酵母は鹿児島2号酵母を使用した。前培養は麹汁培地5mlに酵母を植菌し、30℃で2日間静置培養した。3,000rpmで5分間遠心分離し、得られた沈殿物を滅菌蒸留水1mlに懸濁し、前培養酵母懸濁液とした。本培養は培地100mlに、前培養酵母懸濁液1mlを添加し、30℃で静置培養とロータリーシェーカー（150rpm）を用い振とう培養で行った。静置培養は3日間、振とう培養は2日間培養し、酵母培養液を得た。ジャーファメンタ培養は東京理科製のジャーファメンタMFBを用い、培地1Lに前培養液10mlを加え、30℃で培養した。なお、培地の溶存酸素濃度は、通気量および回転速度をコンピュータで自動制御することで調製した。また、培地には信越化学工業社製の消泡剤KM-72を0.1ml添加した。

2.3 総菌数および生菌率

総菌数の測定は、ヘマトメータを用いて行った。生菌数は寒天平板培地に塗抹し30℃で3日間培養後、生育したコロニー数から求めた。なお、生菌率は、以下の式で求めた。

$$\text{生菌率}(\%) = \frac{\text{生菌数}(\text{個/ml})}{\text{総菌数}(\text{個/ml})} \times 100$$

2.4 保存試験

酵母培養液を30mlずつに分け、3タイプの形態で保存した。図1に示すように、そのままの状態、酵母培養液を3,000rpmで20分間遠心分離し、沈殿物に滅菌蒸留水1ml

* 食品工業部

を加え懸濁した形態（アンプル状）および沈殿物を滅菌蒸留水で1回洗浄した形態（ケーキ状）である。保存は、5の冷蔵庫内で行った。

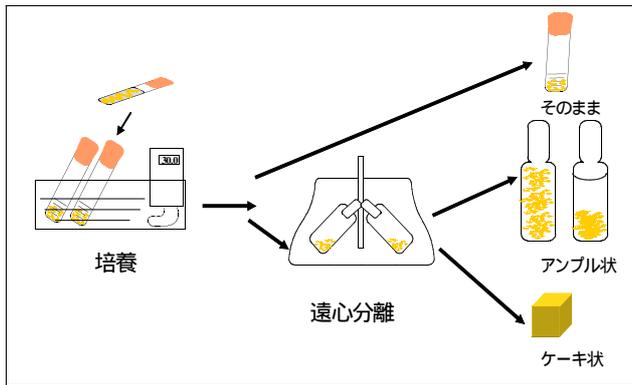


図1 酵母の保存形態

2.5 酵母菌体からのトレハロースの抽出及び測定

酵母菌体中のトレハロースはkida etc¹⁾の方法に従い抽出し、HPLCで分析した。HPLCは東亜ディーケーケー（株）製のイオンクロマトグラフを用いた。カラムは、PCI-510、検出器は複数作用極式電気化学検出器ICA-5212、溶媒は100mM水酸化ナトリウム溶液および10mM酢酸ナトリウム溶液の混合溶液を用い、流速は0.8ml/min、カラム温度は30で行った。

2.6 小仕込み試験

小仕込み試験は以下の方法で行った。すなわち、2L容ガラス製サンプル瓶に前培養液5gと米麹200gおよび水道水235gを添加し1次仕込みを行い、5日間発酵させた。これに、蒸煮・粉碎した甘藷1.0kgと水道水560gを加え2次仕込みを行った。発酵温度は恒温槽内で30一定とした。発酵経過は、発生する炭酸ガス重量をもろみの減少重量から算出することによって求めた。

蒸留は3L容のガラス製の蒸留器にもろみ1,500gを入れ、蒸気をもろみに直接吹き込みながら行った。蒸気吹き込み開始からアルコールが流出するまでの時間は約20分間を要した。その後1.5時間程度で蒸留が終了した。

2.7 もろみの分析

発酵終了後のもろみのアルコール濃度は、もろみをガーゼで濾過し、得られた濾液200mlを用いて国税庁所定分析法²⁾に従い行った。

2.8 焼酎の香気成分

香気成分の分析はHP5890型ガスクロマトグラフを使用しカラムはキャピラリーカラムDB-WAX（60m×0.25mm×0.25μm）を用いた。注入口温度240、カラム温度40で3分間保持後3/minで230まで昇温し、10分間保持した。スプリット比は1:30とし、キャリアガスはヘリウムガスで流速は2.0ml/min、検出器はFIDを使用した。

3. 結果と考察

3.1 培地及び培養方法の影響

酵母培養に及ぼす培地の種類及び培養方法の影響について検討した結果について表1に示す。協同組合では黄麹製の麹汁培地を用い静置培養で行っている。この方法で培養すると、総菌数 1.0×10^8 個/ml、生菌率68%であった。これに対して、YPD合成培地では静置培養において、総菌数 1.9×10^8 個/ml、生菌率80%であった。

一方、振とう培養においては、黄麹製の麹汁培地を用いた場合、静置培養と比べ、総菌数は 1.2×10^8 個/mlとわずかながら向上したが、生菌率が31%と半分程度に低下した。白麹および黒麹製の麹汁培地では生菌率が60%程度と低い値であった。これに対して、YPD合成培地では総菌数 4.9×10^8 個/ml、生菌率88%と高い値が得られた。

以上の結果から、振とう培養することで総菌数が増加することが分かった。また、YPD合成培地が麹汁培地と比べて酵母の培養には優れていることが分かった。

表1 培地及び培養方法の影響

培地の種類	培養方法	総菌数 ($\times 10^8$ 個/ml)	生菌率 (%)
黄麹汁	静置	1.0	68
YPD	"	1.9	80
黄麹汁	振とう	1.2	31
白麹汁	"	1.6	58
黒麹汁	"	1.8	57
YPD	"	4.9	88

3.2 簡易培地の検討

麹汁培地の調製は2.1に記載したとおり、手間と時間を要する。そこで、安価でかつ、効率よく調製できる培地（簡易培地）の検討を行った。

3.2.1 蒸留粕培地

松久保ら³⁾は、Mayerの合成培地の塩類と糖を蒸留粕の上澄み液に溶解した培地を用い、30で振とう培養すると 7.4×10^8 個/mlまで増殖し、蒸留粕が微生物にとって増殖促進効果があることを報告した。

そこで、蒸留粕培地について検討した結果、静置培養（図2-A）では、グルコースを添加することで総菌数は増加するが、最大でも 0.8×10^8 個/mlであった。また、生菌率もグルコース無添加で最大の60%程度であった。

一方、振とう培養（図2-B）では、グルコース無添加において総菌数 4.5×10^8 個/ml、生菌率93%であり、グルコースを添加することで総菌数は無添加と比べ約1.2倍（ 5.8×10^8 個/ml）に増加した。

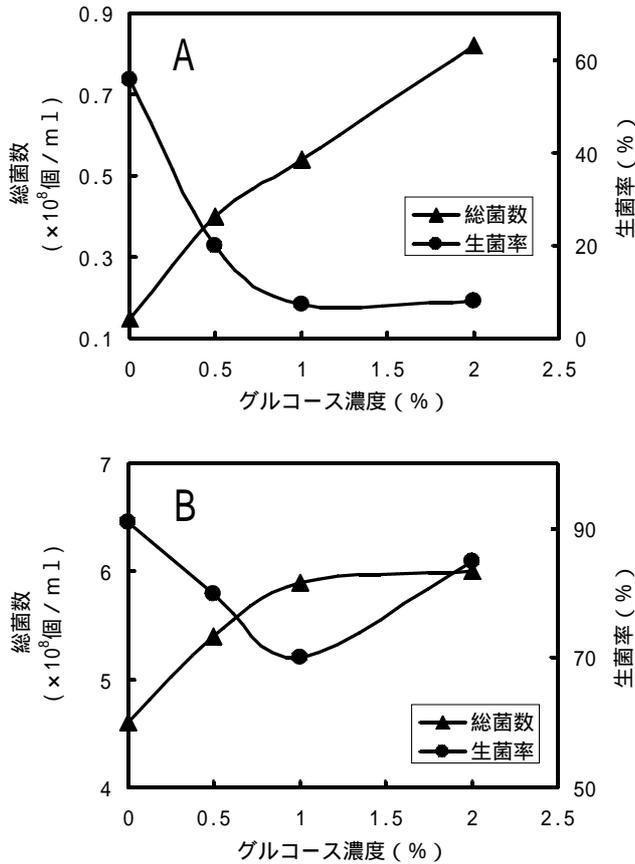


図2 蒸留粕培地におけるグルコース添加の影響
A: 静置培養, B: 振とう培養

3.2.2 YG培地

表1に示すように、YPD合成培地は酵母の培養に優れていることが分かった。ポリペプトンは牛乳カゼインや脱脂大豆が原料である。一方、酵母エキスはビール酵母を原料としている。最近の食の安全・安心への関心が高まり、遺伝子組み換え体を用いた食品は敬遠されている。この動きは焼酎製造においても同様である。

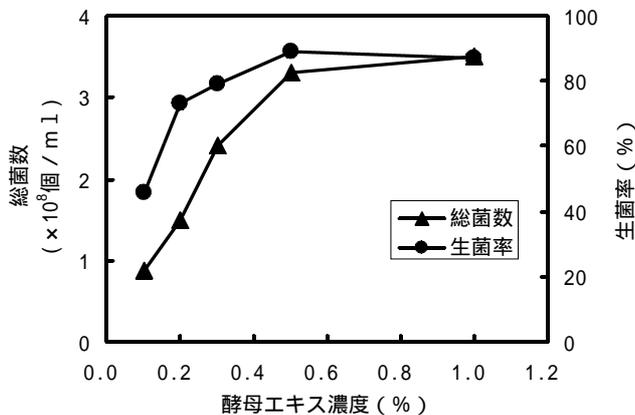


図3 酵母エキス濃度の影響

そこで、遺伝子組換え体ではないことが明確な酵母エキスとグルコース2%からなるYG培地の検討を行った。その結果を図3に示す。酵母エキスの添加量が増加するに従い、総菌数および生菌率ともに増加し、0.5%添加において総菌数 3.3×10^8 個/mlおよび生菌率89%であった。

しかし、この実験で使用した酵母エキスは試薬ベースであり高価である。そこで、食品加工に利用されている酵母エキスについて検討し、その結果を表2に示す。なお、酵母エキス濃度は0.5%とし、振とう培養で行った。また、対照は和光純薬社製の酵母エキスを用いた。培養終了後の生菌率はA社-2が87%と最も高い値であったが、総菌数は 1.2×10^8 個/mlであった。A社-3は総菌数は 4.2×10^8 個/mlと最も高い濃度であったが、生菌率が38%であった。一方、B社-1は総菌数および生菌率の値が対照と比べて最も遜色なかった。

表2 市販酵母エキスの選抜

	総菌数 ($\times 10^8$ 個/ml)	生菌率 (%)
A社-1	3.5	66
A社-2	1.2	87
A社-3	4.2	38
B社-1	3.5	74
B社-2	2.1	21
C社-1	3.0	57
C社-2	1.0	30
D社-1	3.4	62
D社-2	2.7	37
D社-3	3.4	44
D社-4	2.8	49
対照	3.7	80

3.3 保存形態の検討

麹汁培地で静置培養して得られた酵母およびYPD合成培地で振とう培養して得られた酵母について、表3に示す3タイプの形態で30日間冷蔵庫内に保存した。その結果、麹汁培地で得られた酵母は保存することで生菌率はそのまま7.9%、アンブル状が2.0%、ケーキ状が6.2%に低下し、いずれも雑菌による汚染が観察された。一方、YPD合成培地で培養した酵母はいずれの形態においても保存直後と遜色なく約80%であり、雑菌汚染は観察されなかった。

表3 保存試験結果

	生菌率 (%)	
保存形態	麹汁培地	YPD合成培地
そのまま	7.9	77
アンブル	2.0	80
ケーキ状	6.2	80

3.4 保存試験による酵母エキスを選抜

表2に示す結果から、総菌数、生菌率に優れたA社-1と3、B社-1、C社-1、D社-1および対照について培養終了後の酵母菌体をケーキ状に処理し、冷蔵庫内に保存した。その結果を表4に示す。保存3ヶ月後では、D社-1以外は生菌率がわずかに低下し、保存6ヶ月後にはBおよびC社製の酵母菌体は全滅した。いずれの酵母菌体とも保存期間が長くなるほど生菌率は低下した。しかし、中でもD社-1は生菌率の低下が抑えられ、6ヶ月後においても45%の生菌率であった。

表4 市販酵母エキスを用いた培地で得られた酵母の保存試験

	総菌数 ($\times 10^8$ 個/ml)	生菌率(%)		
		培養直後	3ヶ月後	6ヶ月後
A社-1	3.5	66	57	18
A社-3	4.2	38	36	17
B社-1	3.5	74	52	1
C社-1	3.0	57	40	0
D社-1	3.4	62	62	45
対照	3.7	80	85	38

3.5 ジャーフアメンタ培養

D社-1の酵母エキスを用いたY G培地によるジャーフアメンタ培養試験を行った。通気条件は 通気量0.1vvm (1分間に1Lの培地に供給する通気量)、攪拌速度100rpmの条件 (RUN1)、溶存酸素を十分に供給するように通気および攪拌を行う条件 (RUN2) および 通気を行わずに攪拌速度100rpmの条件 (RUN3) で行った。培養における経時変化を図4に示す。酵母の増殖は酸素供給量が多いほど速やかに行われ、RUN1では培養32時間後に総菌数が 2.6×10^8 個/mlと最大となった。RUN2では24時間後に 2.8×10^8 個/mlと最大となり、その後ほぼ一定であった。一方、RUN3では酵母増殖に伴い急激に溶存酸素濃度が減少し、培養開始から6時間後には溶存酸素が含まれない状態で培養したため、増殖は緩やかであった。48時間後における総菌数は 1.3×10^8 個/mlとRUN1、2と比べて約50%の菌体濃度であった。

48時間後におけるRUN1、2およびRUN3の酵母の生菌率はそれぞれ85、92%および72%であった。

図5にRUN1、2および3の条件で培養し経時的に酵母をサンプリングし、酵母に含まれるトレハロース濃度を測定した結果を示す。RUN1、2は経時的に増加したが、RUN3は24時間で $78 \mu\text{g}/10^8$ 個と最大となり、その後急激に減少した。RUN1、RUN2およびRUN3の48時間後におけるそれぞれのトレハロース濃度は、40、56および $24 \mu\text{g}/10^8$ 個と、酸素供給量の多い順に高い濃度であった。

ケーキ状の形態で保存試験を行った結果を図6に示す。RUN1および2の条件で培養した酵母は、保存期間50日間までは生菌率はほぼ一定であったが、RUN3の酵母は保存30日目には生菌率が15%程度に急激に減少した。

RUN1およびRUN2は90日間保存後でも生菌率は70%以上であった。保存140日後においてもRUN2は60%の生菌率が維持されていた。以上の結果から、培養および保存ともRUN1およびRUN2の条件が良好であった。

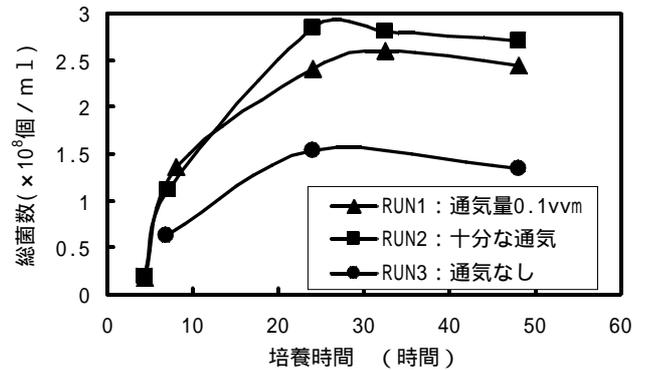


図4 ジャーフアメンタ培養における経時変化

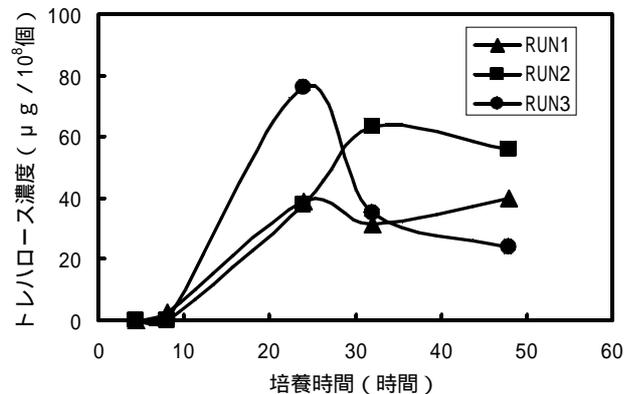


図5 トレハロース濃度の経時変化

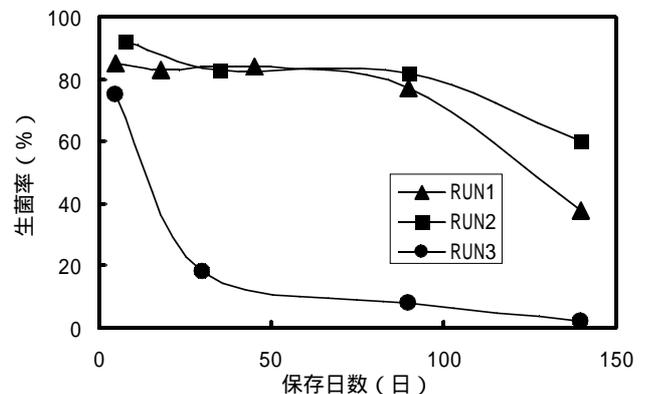


図6 ケーキ状態における保存試験

3.6 保存酵母による小仕込み試験

RUN 2 は培養および保存試験において最適な条件であったが、この条件は溶存酸素濃度を維持するために通気と攪拌を激しく行う必要があり、培養コストが高くなる。

そこで、RUN 2 と遜色ない結果が得られたRUN 1 の90日間保存した酵母を用いて小仕込み試験を行った。なお、対照として、YPD合成培地で振とう培養して得られた酵母を用いた。

発酵経過は図7に示すように、1次および2次もろみとも保存酵母と対照酵母による違いは認められなかった。また、発酵終了後のもろみの分析結果は表5に示すように、全ての分析項目において大差がなかった。更に、蒸留して得られた焼酎の香気成分をガスクロで分析した結果、表6に示すように、保存酵母では -フェネチルアルコールが51mg/L、酢酸 -フェネチルが2.0mg/Lと対照と比べて僅かであるが少なかった。しかし、両酵母による香気成分の生成には大差はなく、また、官能試験の結果、保存酵母と対照酵母による香味の違いは認められなかった。

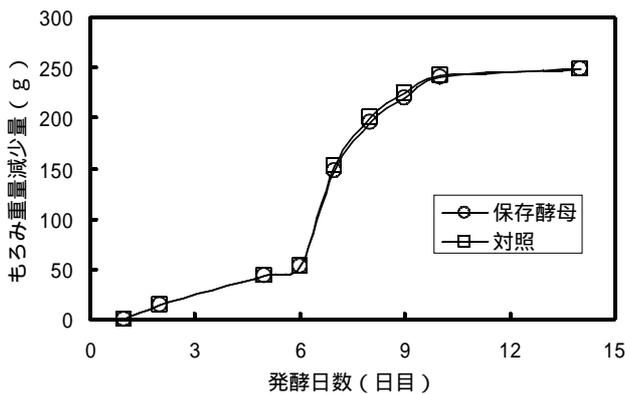


図7 発酵経過

表5 発酵終了後のもろみ分析

	保存酵母	対照
もろみ酸度 (ml)	9.1	8.8
アルコール (%)	16.1	16.0
試留酸度 (ml)	3.8	3.6
全糖 (%)	2.4	2.4
直糖 (%)	0.4	0.4
総菌数 (個/g)	2.5×10^8	2.4×10^8
生菌数 (個/g)	1.5×10^8	1.4×10^8
雑菌 (個/g)	N.D.	N.D.

表6 ガスクロ分析結果

香気成分 (mg/L)	保存酵母	対照
n-プロピルアルコール	88	90
iso-ブチルアルコール	118	118
アミルアルコール類	285	285
-フェネチルアルコール	46	51
酢酸イソアミル	3.6	3.3
酢酸エチル	77	62
乳酸エチル	3.6	3.9
酢酸 -フェネチル	2.0	2.5

4. 結 言

焼酎用酵母を安価で簡単に調製できる培地（簡易培地）と、大量培養法の検討、培養した酵母について長期保存法を確立するとともに、保存酵母の発酵能および香気成分生成能の評価を行った。

その結果、麹汁培地に変わる新たな培地を見出した。まず、いも焼酎粕を遠心分離して得られた上澄み液にグルコースを1%になるように添加すると、総菌数は 5.8×10^8 個/ml、生菌率70%と良好な培地であった。しかし、焼酎粕はロットによる成分変化や腐敗しやすいなどの欠点がある。そこで、更に安価で簡便な調製ができる培地を検討した結果、0.5%酵母エキスおよび2%グルコースからなるYG培地を見出した。

また、この培地を用いジャーファメンタによる大量培養を行った結果、通気を緩やかに行うことで酵母は速やかに増殖し、かつ、保存性も向上した。培養48時間後の酵母の総菌数は 2.6×10^8 個/ml、生菌率は85%であった。得られた酵母を集菌し冷蔵庫内に保存したところ3ヶ月の生菌率は約80%であった。

さらに、この酵母を用い小仕込み試験を実施した結果、培養直後の酵母と遜色ない発酵経過および酒質となった。

参 考 文 献

- 1) K. Kida etc: J. Ferm. Bioeng., 76, 284 (1993)
- 2) "第四回改正国税庁所定分析法注解", (財)日本醸造協会 (1993) p.229
- 3) 松久保好太朗ら: 食品工業生産・リサイクル高度化システム技術開発 研究成果報告書 (平成3年) p.108

