

# 乾燥酵母の米焼酎製造への利用

林田安生\*・西村賢了\*

\* 熊本県工業技術センター 微生物応用部

## Rice Shochu Fermentation with Dry Yeast

Yasuo HAYASHIDA\* and Kenryo NISHIMURA\*

米焼酎の製造について乾燥酵母の利用を検討した。乾燥焼酎酵母 CAN1 の復水において、生菌率は水温に大きく影響され、35℃（復水時間 15 分）で最も高くなった。この復水した酵母を用い YPD 培地及び焼酎もろみでの発酵試験を行ったところ、乾燥酵母は生酵母と同様の発酵経過をとることが分かった。

### 1. はじめに

焼酎は九州地方の代表的な蒸留酒であり、蒸煮した穀類を麹カビの酵素によって糖化させながら酵母によって発酵させ、これを蒸留して製造される。熊本県の球磨地方は、米を原料とした米焼酎を製造する蒸留所が多く、その製造は地域経済にとって重要である。

焼酎の製造には、2 種類の微生物、麹菌と酵母、が必要である。麹菌は糖化酵素の生産を行い、酵母は糖のアルコールへの変換を行う。麹菌は保存性の高い胞子の形態で販売業者から供給されており、醸造所が業者に注文すると、冷蔵保存されている在庫商品が即座に蒸留所宛に配布される。また、その保存性は高く、蒸留所は製造年度を通して蒸留所で冷蔵保存している麹菌を随時使用している。これに対し、酵母は、公設研究機関や業界団体などで培養し、その後、蒸留所へ配布されている。よって、蒸留所からの酵母の注文、研究機関や業界団体での培養作業及び配布、蒸留所での受け取りを経て焼酎の製造に使用されるため、酵母をこれらの団体に注文してから製造を開始するまでに数日以上の上余裕をとる必要があり、製造スケジュールがこれによって影響を受ける。また、液体培養液の形態で供給されるため、輸送中や保存中の条件によって酵母活性の低下が生じたり雑菌に汚染される場合があるので、酵母を製造する機関や団体、そして、醸造所では注意深く酵母を取り扱わなければならない。これらのことは、酵母を培養する機関や団体と酵母を使用する蒸留所にとって、労務的精神的に負担となっている。

近年、乾燥酵母の利用が清酒製造業界に普及してきた。清酒製造においては酒母造りはその後の工程に大きな影響を与えるため、非常に重要で神経を使う工程であったが、保存性及び活性が高い乾燥酵母を利用することによって、その負担を軽減することに成功している<sup>1)</sup>。この技術は焼酎製造にも応用できると思われるが、これについて検討した例はあまりない。

そこで、本研究では焼酎酵母培養による酵母培養機

関及び蒸留所の労務的精神的負担を軽減するために、保存性に優れた乾燥酵母の焼酎製造への利用について検討した。

### 2. 方法

#### 2.1. 乾燥酵母

焼酎酵母 CAN1、及び、その乾燥菌体（日本甜菜製糖株式会社製造）をすべての試験に用いた。

#### 2.2 YPD 培地の作製

酵母エキス 10g、ポリペプトン 20g、ブドウ糖 20g を 1L の水に溶解し 121℃で 15 分滅菌した。YPD プレート培地については、寒天 20g を加えて同条件で殺菌して調製した。

#### 2.3 焼酎もろみの調製

常法にて行った。

#### 2.4 分析

##### 2.4.1 焼酎もろみの調整

乾燥酵母については、復水した菌液をそのまま、もろみ中の酵母については、もろみをガーゼで荒く濾過した液体を用い、アルカリメチレンブルー法、または、スライドカルチャー法により測定した<sup>2)</sup>。

アルカリメチレンブルー法では、0.1w/v%メチレンブルーエタノール溶液と 200mM グリシンバッファー (pH 10.2) を容量比 1:9 で混合し、これを菌液と等量混合して 15 分間放置した。そして、この混合液を顕微鏡で観察し、染色されていない菌数の全菌数に対する割合 (%) を生菌率とした。

スライドカルチャー法では、生理食塩水で希釈した菌液を YPD プレート培地に塗布し、殺菌したカバーグラス 2 枚で寒天培地の一部を覆って、30℃で培養した。培養開始時及び数時間毎に顕鏡し、開始時には菌細胞のばらつき状態を確認し、培養後においては視野に存在する発芽増殖している活性コロニー数と発芽していない菌細胞（不活性コロニー）を含んだ全コロニー数から生菌率を算出した。

## 2.4.2 グルコース

焼酎もろみを濾過によって清澄化し、この清澄液中のグルコースを酵素キット（バーリンガー・マンハイム社製）を用いて測定した。

## 2.4.3 アルコール

焼酎もろみをNo.2ろ紙でろ過して得られた清澄液に等容量の1%アセトン溶液を加えてよく混合した。この混合液をガスクロマトグラフにより分析し、内部標準法にてエタノール濃度を定量した。

ガスクロマトグラフの分析条件は以下のとおり。

カラム：1.1m×3.2mm ガラスカラム

充填剤：Porapak Type QS (50-80mesh)

カラム温度：140℃

キャリアガス：窒素ガス 40mL/min

検出器：FID

## 2.4.4 香気成分

焼酎もろみをNo.2ろ紙でろ過して得られた清澄液、または、25度に割水した焼酎2mLを塩化ナトリウムで飽和させ、これに3mLの酢酸メチルを加えて10分間激しく振とうし、3000rpmで10分間遠心分離した。得られた有機溶媒相1mLを別の試験管に取り、酢酸メチル1mLを加えて同様の操作を更に5回行った。そして、有機溶媒相を減圧下で1mLまで濃縮し、ガスクロマトグラフで分析した。分析条件は次のとおり。

カラム：DB-WAX 30m(J&W)

カラム温度：50℃ (5℃/min)200℃

キャリアガス：ヘリウムガス 1kg/cm<sup>2</sup>

気化室温度：220℃

検出器温度：230℃

検出器：FID

## 3. 結果及び考察

### 3.1 復水試験

#### 3.1.1 メチレンブルー法による測定

焼酎酵母CAN1の乾燥酵母菌体1gを2~50℃に温度を調節した水100mLに加え、5~50分間放置して復水した。この復水した酵母菌液を試料として生菌数を測定した。

結果を図1及び図2に示す。2℃~10℃の温度範囲で復水した酵母は生菌率50%を越えなかった。15℃で復水した酵母の生菌率は復水時間が25分まで高くなった。20~50℃で復水した酵母の生菌率は70%以上の値を示したが、30~40℃で85%以上の値となった。45℃及び50℃での復水では復水時間が長くなると生菌数が減少する傾向があった。低温では、菌体の復水

が遅く、高い温度では酵母の失活が生じたためと思われる。

最も生菌数が高かったのは、35℃15分で91%だった(約 $1 \times 10^{10}$ cells/g乾燥酵母)。そこで、以後の試験において乾燥酵母の復水条件は35℃で15分間とした。

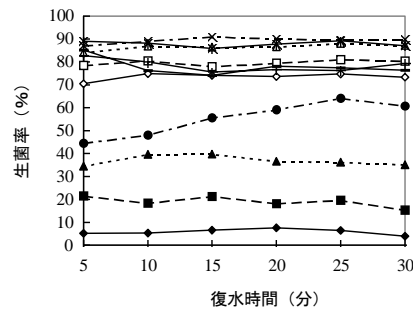


図1 乾燥酵母復水試験

水100mlに対して乾燥酵母1gを加えて復水させた。生菌率はアルカリメチレンブルー染色法で測定した。

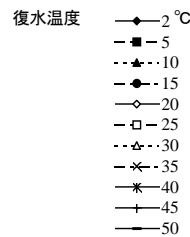


図2 乾燥酵母復水試験

水100mlに対して乾燥酵母1gを加えて15分間放置して復水させた。生菌率はアルカリメチレンブルー染色法で測定した。

#### 3.1.2 スライドカルチャー法による測定

乾燥酵母1gを35℃に調温した水100mLに加え15分間覆水させた。そして、酵母の生菌数をスライドカルチャー法で測定した。酵母を塗布したプレートは、すぐに顕微鏡で観察し、酵母がよく分散していることを確認した。そして、30℃で8時間培養し4個以上に出芽増殖した酵母細胞のかたまりの数と増殖していない酵母細胞の数を顕微鏡観察によって測定した。測定

は、1カバーグラスにつき任意に2カ所の視野について行った。その結果は、生菌数36%とメチレンブルー法で得られた値よりかなり低くなった。

メチレンブルー法では、生菌細胞内でメチレンブルーの分子が還元され無色になることを利用して、細胞の生死を判別しているが、スライドカルチャー法はある時間内の酵母の出芽状態を観察している。酵母細胞内に浸透したアルカリメチレンブルー液の還元が全ての生細胞内で短期間に生じるのに対し、プレート上に塗布された生菌の全てがある時間内に出芽すると限らないことから、メチレンブルーを還元した細胞数に比べて出芽した細胞の割合が少なくなると考えられる。

メチレンブルー染色は、その原理が明快で簡便であることから、生菌数の測定に広く使用されてきた。この方法では細胞の色で生死を判断するが、色は顕微鏡の光量や絞りなどによって微妙に変わるため、測定者は光量などの条件が一定になるように努め、色の判断に慣れる必要がある。スライドカルチャー法では、酵母の形態を見るので、確実に生細胞と判断でき測定者の負担は低減できる。しかし、その測定方法により、メチレンブルー法に比べて生菌率は低い値となる。また、微生物のプレートへの塗布や培養時間が必要で多くの試料を一度に処理することが難しく、本報ではスライドカルチャー法による生菌数の詳細な検討は行わなかった。

### 3.2 焼酎仕込み試験

焼酎もろみに1gの乾燥酵母(5mLの水で復水し全量を加えた)の水5mLの培養酵母(生酵母、 $2 \times 10^8$ cells/ml)を加えて25°Cで放置して発酵させた。そして、もろみ重量の減少量の変化を測定した。

結果を図3に示す。両試験区ともよく発酵し、重量減少はほとんど同じであったが、発酵前半で乾燥酵母

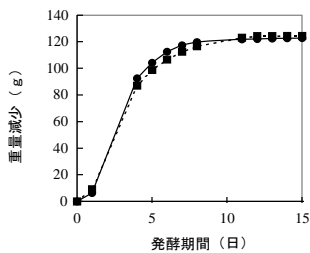


図3 乾燥酵母による焼酎発酵試験

焼酎麹120g、蒸米330gに仕込み水550mlを加えて焼酎もろみとした。焼酎もろみに復水した乾燥酵母(1g、復水に5mlの水を使用)または、生酵母5ml( $2 \times 10^8$ cells/ml)を加えて、25度で15日間放置した。

—●— 乾燥酵母  
-■- 生酵母

の方が重量が早く減少した。酵母の初期菌数は $1 \times 10^8$ cells/g もろみ(乾燥酵母)及び $1 \times 10^6$ cells/g もろみ(生酵母)であり、この菌数の違いがもろみの減少量に影響したためと思われる。

### 3.3 乾燥酵母添加量の影響

#### 3.3.1 YPD 培地での発酵試験

YPD 培地 100mL に乾燥酵母を 500mg/L、100mg/L、10mg/L、5mg/L になるように加えた。また、酵母培養液を 0.5mL 加えた。そして、25°C で 6 日間放置し、培地重量の減少を測定した。

結果を図4に示す。乾燥酵母を 500mg/L の濃度で添加した試験区は生酵母より早く重量が減少したが、10及び5mg/Lで添加した試験区では、減少量が初期に少なかった。添加量 100mg/L が最も生酵母の試験区と相似であった。初期の酵母菌数を算出すると、100mg/L の試験区では $1 \times 10^6$ cells/ml 培地で生酵母のそれとほぼ一致する。

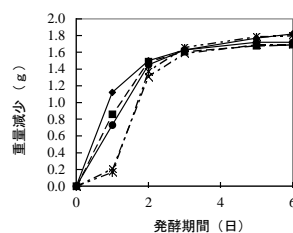


図4 YPD培地での乾燥酵母発酵試験

YPD培地に乾燥酵母または生酵母を添加し25度で放置した。

乾燥酵母 —●— 500 mg/l 標記mgの乾燥酵母を5mlの水で復水し0.5mlを培地に添加  
-■- 100  
-▲- 10  
-※- 5  
生酵母 —●— 培養液0.5ml ( $2 \times 10^8$ cells/ml)を培地に添加

#### 3.3.2 焼酎もろみでの発酵試験

焼酎もろみ1kgに乾燥酵母500mg、100mg、50mg、10mg、5mgを加えた。また、酵母培養液を5mL加えた。そして、25°Cで12日間放置し、もろみ重量の減少を測定した。

結果を図5に示す。乾燥酵母を500mg添加した試験区は生酵母より早く重量が減少したが、10及び5mg添加した試験区では、減少量が初期に少なかった。添加量100mg及び50mgが生酵母の試験区と相似でありYPD培地での結果と一致した。

この、焼酎もろみ発酵試験中のもろみ清澄液のグルコース濃度を測定したところ、発酵1日目に全ての試験区で最大となり、その後減少した(図6)。

生酵母の発酵1日目の濃度は9w/v%であった。酵母添

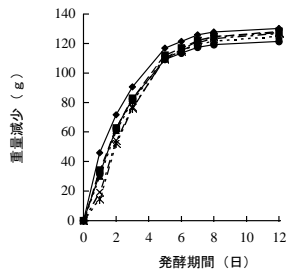


図5 乾燥酵母による焼酎発酵試験

焼酎麹120g、蒸米330gに仕込み水550mlを加えて焼酎もろみとした。  
焼酎もろみに復水した乾燥酵母または、生酵母を加えて、25度で12日間放置した。

乾燥酵母 ●—500 mg/kg 標記mgの乾燥酵母を5mlの水で復水し全量をもろみに添加  
■—100  
●—50  
▲—10  
※—5

生酵母 ●— 培養液5mL (2×10<sup>8</sup>cells/ml)をもろみに添加

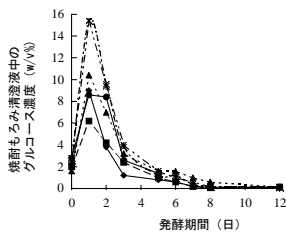


図6 焼酎もろみ清澄液中のグルコース

焼酎麹120g、蒸米330gに仕込み水550mlを加えて焼酎もろみとした。  
焼酎もろみに復水した乾燥酵母または、生酵母を加えて、25度で12日間放置した。  
もろみは濾過によって清澄化し、グルコース濃度は酵素キットで測定した。

乾燥酵母 ●—500 mg/kg 標記mgの乾燥酵母を5mlの水で復水し全量をもろみに添加  
■—100  
●—50  
▲—10  
※—5

生酵母 ●— 培養液5mL (2×10<sup>8</sup>cells/ml)をもろみに添加

添加量が10及び5mgの試験では15w/v%であり生酵母の試験区よりも高い値だった。添加量500mg及び100mgでは6w/v%と低かった。

表1 焼酎もろみ中の酵母生菌率とエタノール濃度

添加量	焼酎もろみ中の酵母生菌率 (%)		発酵12日もろみ清澄液のエタノール濃度 (w/v%)
	発酵5日	発酵12日	
乾燥酵母 500 mg/kgもろみ	73.7	8.0	16.1
100	75.9	4.8	16.0
50	75.7	6.9	15.9
10	70.3	4.4	15.9
5	74.2	0.8	16.1
生酵母 5 ml/kgもろみ	55.2	2.8	15.9

焼酎麹120g、蒸米330gに仕込み水550mlを加えて焼酎もろみとした。  
焼酎もろみに復水した乾燥酵母または、生酵母を加えて、25度で12日間放置した。  
生酵母培養液の酵母数は2×10<sup>8</sup>cells/mlであった。  
生菌率は、もろみを煮く濾過し、アルカリメチレンブルー法で測定した。  
エタノールは、もろみを濾過で清澄化し、ガスクロマトグラフで測定した。

もろみのグルコース濃度が高すぎたり低くすぎたりすると、酵母が浸透圧ショックをうけたり栄養源がなくなったりし、その活性が低くなる場合がある。そこ

で、発酵5日目及び12日目の生菌数及び発酵12日目のアルコール濃度を測定した。結果を表1に示す。乾燥酵母を添加した試験区の生菌数は生酵母を添加した試験区よりもほとんどの場合高く、アルコール濃度に差は見られなかった。本試験区の範囲では、添加量の酵母への影響は少ないと思われた。

#### 4 おわりに

乾燥酵母の復水条件を検討したところ、35℃で15分間復水すると最も高い生菌率(91%、メチレンブルー法)の菌液が得られた。また、乾燥酵母を用いて焼酎もろみを発酵させたところ、生酵母と同様の濃度で乾燥酵母を使用すると、ほぼ同じ発酵経過をとることがわかり、乾燥焼酎酵母が焼酎製造に使用できることが分かった。

#### 文献

- 1) 浅野行蔵, 富永一哉, 吉川修司, 田村吉史, 柿本雅史, 北村秀文, 森本良久, 津村弥: 日本醸造協会誌, “乾燥酵母協会701号及び協会901号による清酒製造”, vol. 94, pp.338-345 (1999).
- 2) Manabu Sami, Mitsuo Ikeda and Seizo Yabuuchi: Journal of Fermentation and Bioengineering, “Evaluation of the alkaline methylene blue staining method for yeast activity determination”, vol. 78, pp.212-216 (1994).

コメント: