

## 地域資源を活用した食品加工技術に関する研究

### —泡なしG酵母の安定供給に関する研究(第2報)—

澤井美伯、吉村明浩

#### Study on stable supply of Gifu original sake yeast stain G (II)

Yoshinori SAWAI and Akihiro YOSHIMURA

当センターで開発した泡なしG酵母(以下 NF-G)<sup>1)</sup>の普及を図るために、小規模培養による乾燥酵母の調製技術の開発を試みた。乾燥方法(凍結乾燥、減圧乾燥、送風乾燥)について検討し、NF-G乾燥酵母(以下 乾燥NF-G)を調製したが、乾燥後の生菌率は8.8~19.6%であった。次に、調製した乾燥NF-Gの保存試験及び試験醸造を行い、5ヶ月後の生菌率が2%以下に減少することが明らかとなった。

#### 1. はじめに

岐阜県独自酵母であるG酵母は、酢酸イソアミルなどの香気成分を豊富に産生する優れた酵母で、県内の酒造場で広く利用されてきた。当センターでは、G酵母の欠点であった泡立ち性の改善に着手し、平成22年度に泡なしタイプの開発に成功した。現在は、この泡なしタイプのG酵母(以下 NF-G)を液体培養して県内酒造場に分譲しているが、液体培養での分譲は酵母保存性が悪く、使用期限が1週間程度と短いという課題がある。

そこで、NF-Gの利便性の向上と普及を図るため、保存性が良く取扱いの簡便な乾燥酵母の調整方法について検討した。前報<sup>2)</sup>では、NF-Gの菌体内にトレハロースを高濃度で蓄積する培養条件について報告した。本年度は、酵母の乾燥方法について検討し、得られた乾燥NF-Gの保存試験と小規模試験醸造を実施したので、その結果について報告する。

#### 2. 実験

##### 2. 1 酵母の培養

酵母の培養に用いた培地は、YM培地を基本に適宜グルコース濃度を調整した。前培養は、グルコース濃度8%のYM培地(以下YM(8%)培地)を用いた。静置培養は23℃で行い、好氣的培養は、500ml容の振とうフラスコに調製した100mlのYM培地を用いて、振とう培養器(高崎科学器械(株)製TA-9R-3F)で振とう培養を行った。乾燥酵母調製のための培養は、1LのYM(10%)培地で行い、浅野ら<sup>3)4)</sup>の方法を参考にした前報<sup>2)</sup>と同様に、30℃、7時間振とう培養後、36℃に温度を上げて5時間培養することで行った。培養終了後に約100mlをトレハロース測定用として除き、残った900mlの培養液から乾燥酵母の調製を試みた。

##### 2. 2 酵母数及び生菌数の測定

酵母数はデジタルマイクロスコープ((株)キーエンス製VHX-900)と血球板を使い、直接顕微鏡観察し計数した。生菌数はYM(1%)寒天培地を用いた混釈法で行い、出現したコロニー数を測定した。

##### 2. 3 乾燥酵母の調製

トレハロースを蓄積させた酵母は、遠心分離機(ベックマン コールター(株)製HP-26 XP、3,000rpm、5分)を使って、酵母の回収と洗浄を行った。回収した酵母は、布に挟み圧力を加えて脱水を行った後、以下の乾燥方法で乾燥酵母にした。

- ・送風乾燥・・・脱水した酵母をクリーンベンチ内(室温22℃)に広げ、約5時間送風し乾燥した。
- ・凍結乾燥・・・脱水した酵母を-70℃で一晩冷凍後、凍結乾燥機(東京理化工業(株)製FDU-1200)を用いて乾燥した。
- ・減圧乾燥・・・脱水した酵母を、上記の凍結乾燥機を用いて真空乾燥した。

調製した乾燥酵母は、ラミジップAL-Dに0.1~0.3gずつ小分けし、窒素充填包装後に冷蔵保存(5℃)した。

##### 2. 4 酵母菌体内トレハロースの分析

2. 1の方法で培養した酵母菌体内のトレハロースの抽出は、KIDAら<sup>5)</sup>の方法で行った。試料は、約100mlの培養液から遠心分離機を用いて回収・洗浄後、熱風乾燥した酵母菌体を使用した。バイブレーションミルで試料を粉砕後、全量(400~500mg程度)を秤量し、蒸留水(5℃)3mlを加えて懸濁後、1Mトリクロロ酢酸溶液(5℃)3mlを加え、5℃で4時間、振とう抽出を行った。抽出後、遠心分離機で回収した上澄み4mlに、2M水酸化ナトリウム溶液2ml、エタノール11.6mlを添加してから-20℃で冷却後、生じた沈殿を遠心分離機で除去した。この上澄みをエバポレーターで乾固し、10mlの蒸留水に溶解して分析に用いた。トレハロースの分析は、HPLC(カラム:SHODEX KS-802及びKS-801、移動相:H<sub>2</sub>O、流量:1.0ml/min)で行い、酵母乾燥重量当たりの含有率を求めた。

##### 2. 4 乾燥酵母の保存試験

保存試験は、送風乾燥、凍結乾燥及び減圧乾燥を用いて調製した乾燥NF-Gを5℃で冷蔵保存した。それぞれ乾燥直後、1ヶ月後及び5ヶ月後に乾燥酵母1g当たりの生菌数を測定し、経時的な推移を観察した。

## 2. 5 小規模試験醸造

表1に示した仕込配合で、総米200gの試験醸造を行った。米は60%精米のひだほまれを使用し、米麴は全量一括して製造し冷蔵保存したものを使用した。

酵母は、2. 3で調製した乾燥酵母を使用し、比較対照として市販乾燥酵母(きょうかい901号(以下 乾燥901)と701号(以下 乾燥701))と従来法で液体培養したNF-G培養液(以下 培養NF-G)を使用した。なお、乾燥酵母の復水は、乾燥酵母0.15gを40℃の温水5mlに加え、40℃で30分間保温することで調製した。仕込みは初添14℃、仲添11℃、留添9℃とし、留添翌日から1日に1℃ずつ昇温し、環境温度14℃に達してから発酵終了まで保持した。アルコール発酵に伴い発生する炭酸ガス量を、醪重量の変化から算出し、発酵経過を観察した。試験開始後14日目で発酵を終了し、上槽して製成酒を得た。上槽は遠心分離機を用いて行い、製成酒の分析は国税庁所定分析法<sup>6)</sup>に従って行った。

表1 総米200g試験醸造 仕込配合

	初添	仲添	留添	合計
総米 (g)	35	65	100	200
蒸米 (g)	20	55	80	155
麴米 (g)	15	10	20	45
汲水 (ml)	55	75	146	276
乳酸 (ml)	0.2	-	-	0.2
酵母 (液)	2ml	-	-	2ml
酵母 (乾)	0.06g	-	-	0.06g

## 3. 結果及び考察

### 3. 1 乾燥酵母の調製

乾燥NF-Gの調製結果を表2に示した。900mlの培養液から4.5~4.9g(5.0~5.5g/1L)の乾燥酵母が得られた。保存性を高めるため、乾燥NF-Gの水分は10%以下にすることを目標としたが、凍結乾燥後の水分は、11.2%と高い値となった。これは凍結乾燥後の作業中に吸湿したのが原因と考えられる。

乾燥重量当たりのトレハロース量は、9.4~10.8%となり、目標としていた10%に近い値が得られた。この結果から、乾燥耐性の付与に必要なトレハロースは十分に蓄積していると考えられた。

乾燥工程は、いずれも約 $2.3 \times 10^{11}$ の酵母数から行った。乾燥後の生菌数は、凍結乾燥が $2.1 \times 10^9$ と他の乾燥方法より少なく、生菌率も8.8%と他の乾燥方法19.6%に比べて低い値となった。このことから凍結乾燥では、その工程で酵母に損傷が起きていると考えられた。市販の乾燥酵母の酵母数 $3.0 \sim 3.5 \times 10^{10}$ /g(生菌率80%以上)と比較すると、いずれの方法も低い値であり、生菌数を高めるように、乾燥方法の改善を行う必要がある。

表2 乾燥NF-Gの調製結果

	送風乾燥	凍結乾燥	減圧乾燥
乾燥酵母量(g)	4.5	4.9	4.6
水分含量(%)	9.3	11.2	6.7
Trehalose含量(%)	9.4	10.8	9.4
乾燥工程前酵母数	$2.3 \times 10^{11}$	$2.4 \times 10^{11}$	$2.3 \times 10^{11}$
乾燥後生菌数	$4.5 \times 10^{10}$ ( $1.0 \times 10^{10}$ /g)	$2.1 \times 10^{10}$ ( $4.3 \times 10^9$ /g)	$4.5 \times 10^{10}$ ( $9.8 \times 10^9$ /g)
乾燥後生菌率(%)	19.6	8.8	19.6

### 3. 2 乾燥酵母の保存試験

調製した乾燥NF-Gが、市販の乾燥酵母と同様に長期保存可能であるかを確認するため、冷蔵(5℃)での保存試験をおこなった(図1)。その結果、送風乾燥、凍結乾燥、減圧乾燥のいずれの乾燥方法においても乾燥NF-Gの生菌数は乾燥直後から経時的に減少し、乾燥直後と比較した5ヶ月後の生菌率はそれぞれ、0.6%、1.8%、0.5%であった。このことから調製した乾燥NF-Gは、長期保存が難しいことが明らかとなった。

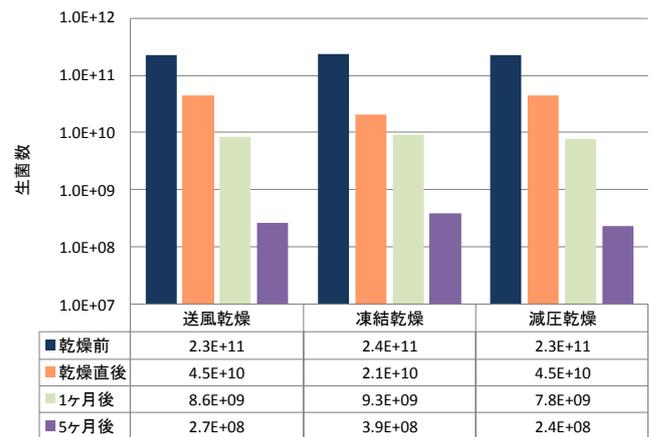


図1 乾燥酵母の保存試験結果

### 3. 3 小規模試験醸造

市販乾燥酵母である乾燥901と乾燥701、培養液NF-Gを対照として、総米200gの試験醸造を行い、乾燥NF-Gの醸造特性を調べた。乾燥NF-Gは、最も生菌数が高い、送風乾燥直後( $1.0 \times 10^{10}$ /g)のものを使用した。

炭酸ガス減量を指標にした発酵経過を図2に、上槽後の製成酒の分析結果を表3に示した。

乾燥酵母で比較した場合、乾燥NF-Gは発酵開始後6日目までは、乾燥901と同様な発酵経過を示した。7日目頃から乾燥901に比べて炭酸ガス発生量が増加し、上槽日の14日目で乾燥901より約3.7g、乾燥701より約3.0g多くなった。これは培養液で行う従来の試験醸造と同様の傾向であり、乾燥酵母にしてもNF-G酵母が901号や701号より強い発酵力を持つことが示された。

製成酒については、乾燥NF-Gはアルコール18.7%、日本酒度が-1.4と最も高い値となった。これは発酵経過の炭酸ガス減量の差に見られる発酵力の強さによると考えられた。酸度は他より若干低く、アミノ酸度は若干高い値となった。また、培養液NF-Gと乾燥NF-Gを比較すると、炭酸ガス減量は同様の経過をとり、製成酒についてはアルコール、日本酒度とも培養液NF-Gがわずかに高い値となった。

製成酒の官能検査を実施したところ、乾燥NF-Gは他の酵母と比べて香りや味が不調和で、品質の低下が観察された。

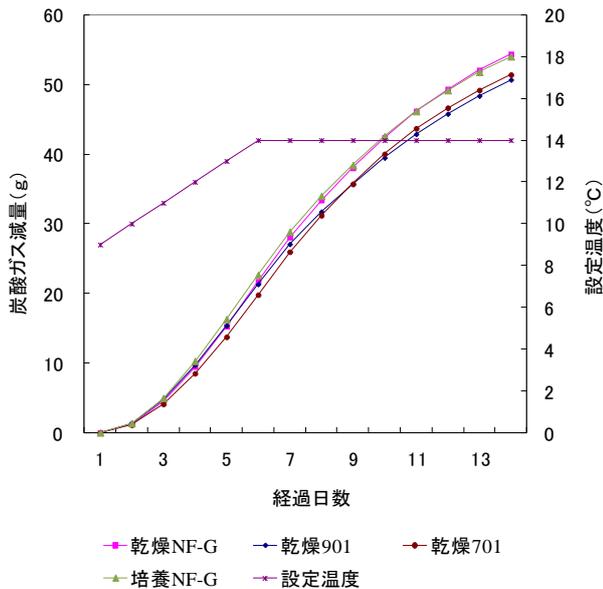


図2 小規模試験醸造の発酵経過

表3 小規模試験醸造 製成酒の分析結果

	乾燥NF-G	乾燥901	乾燥701	培養NF-G
製成酒量(ml)	253	255	253	260
粕重量(g)	177	179	180	172
アルコール(%)	18.7	18.2	18.0	18.9
日本酒度	-1.4	-2.0	-6.1	-0.1
酸度	2.2	2.3	2.4	2.3
アミノ酸度	1.1	0.9	1.0	1.1

#### 4. まとめ

トレハロースを蓄積させたNF-Gを、送風乾燥、凍結乾燥、減圧乾燥によって、それぞれ生菌数 $1.0 \times 10^{10}/g$ 、 $4.3 \times 10^9/g$ 、 $9.7 \times 10^9/g$ の乾燥NF-Gを調製したが、これは市販の

乾燥酵母に比べて低い値となった。また保存試験及び小規模試験醸造の結果から、乾燥NF-Gには長期保存性が付与されていないことや、製成酒の品質が低下することが明らかとなった。

#### 【謝 辞】

本研究を遂行するにあたり、財団法人越山科学技術振興財団から研究助成金を頂きましたことに、感謝の意を表します。

#### 【参考文献】

- 1) 岐阜県産業技術センター研究報告. No5, pp.46-48, 2011.
- 2) 岐阜県産業技術センター研究報告. No6, pp.29-31, 2012.
- 3) 浅野ら, 北海道立食品加工研究センター報告. No.3, pp77-82, 1998.
- 4) 浅野, 清酒酵母の研究 - 90年代の研究 -, 清酒酵母・麴研究会, pp135-138, 2003.
- 5) KIDA *et al.*, *J. Ferment. Bioeng.*, 76(4), pp284-288, 1993.
- 6) 日本醸造協会, 国税庁所定分析法注解.

#### Abstract

The dried yeast is used as starter for the rapid sake brewing. In the general sake brewing, the seed culture, called "Shubo", is prepared to increase the yeast without bacterial contamination. The dried yeast is useful for the rapid and small scale brewing, such as the doburoku brewing, because brewers can skip the preparation of Shubo. In this study, we attempted to prepare the dried yeast strain G from small batch culture. Three types of the dried yeast, air-dried (dried at room temperature and atmospheric pressure), vacuum-dried, and freeze-dried yeast, were prepared. The viability of the cells was tested. Each dried yeast showed the lower cell viability (8.8-19.6%) compared with two commercial dried yeasts, K-901 and K-701 (more than 80%). To evaluate the fermentation ability of the three dried yeasts, the 200-g scale brewing tests were examined. The ability of the three dried yeasts decreased compared with that of the fresh yeast. In the tasting test, the examiners indicated the imbalance between the flavor and the taste-components.