

新規焼酎酵母の開発に関する研究（第3報）

山本 英樹*¹・水谷 政美*¹・越智 洋*¹・高山 清子*¹・工藤 哲三*¹

Screening of New Yeasts for *Shochu* Production (III)

Hideki YAMAMOTO, Masami MIZUTANI, Hiroshi OCHI, Kiyoko TAKAYAMA and Tetsuzo KUDO

焼酎もろみから分離収集し当センターに保存している200株余りの野生酵母より選抜した新規酵母7株および既存酵母（実用酵母）8株について、20、28および38°Cにおける酵母の増殖性および麦麴発酵性を調査した。

培養温度が20および28°Cにおける酵母の増殖性について比増殖速度を求めて比較したところ、新規酵母と既存酵母について差はなく良好であった。38°Cでは新規酵母No.62が最も高い比増殖速度および酵母生菌率を示したことから、高温に対する耐性が高いと考えられた。

発酵性について、20°Cでは新規酵母は既存酵母と同等以上に立ち上がり早く、熟成もろみのアルコール分が高かった。また38°Cにおいて新規酵母No.62の熟成もろみアルコール分は他の酵母よりも高く、広い温度域において醸造適性が高いと考えられた。なお、熟成もろみの香气成分量は、28°Cと比較して20°Cでは低く、38°Cではさらに低くなった。官能的には20および28°Cのもろみはすっきりとした甘い香りであったが、38°Cでは香りが重く、焦げ臭の感じられるものが多かった。しかし新規酵母No.62, 182, 224はいずれの温度においても比較的良好な香りであった。

キーワード：焼酎、新規酵母、スクリーニング、比増殖速度、麦麴発酵試験

1 はじめに

焼酎製造ではもろみの良好な発酵によりアルコール収得量が高めることが重要で、使用する焼酎用酵母はアルコール発酵力が強く、適度なクエン酸耐性、高温耐性を持つことが望まれる。さらに品質の高い焼酎を製造するためには、良好な香味を生成する酵母が求められる。現在使用されている焼酎用酵母は、宮崎酵母、鹿児島酵母、熊本酵母、泡盛酵母、協会酵母等数種類があり、公設試、酒造組合、日本醸造協会等から酒造業者に分譲されている。これまで当センターでは、優良焼酎酵母である宮崎酵母（MK021）をはじめ芳香性酵母、高温発酵酵母等を分離^{1,2)}・分譲し、酒造業者に広く使用されてきた。

近年、焼酎の出荷量が増加し、消費者の嗜好性が高まっています。このような中、焼酎製

造における酵母の選択幅を広げ、消費者の嗜好の多様性に応え、原料の特徴を生かした焼酎の製造に寄与するために新規焼酎酵母を分離することが求められている。

前報^{3,4)}では、焼酎もろみから分離収集した野生酵母200株余りの中から7株を選抜し、これらの酵母を使用した甘藷焼酎の小仕込試験の結果について報告した。

本報では、20、28および38°Cにおける酵母の増殖性および麦麴発酵性について調査したので報告する。

2 実験方法

2-1 供試菌株

焼酎もろみから分離収集し当センターに保存している200株余りの野生酵母より、フラスコスケールの全麴発酵試験においてアルコール生産性が高く、もろみの香气成分が良好なものを7株選抜

* 1 応用微生物部

した。これらを新規酵母として使用した。また対照として、MK021を含む実用酵母8株を既存酵母として使用した。

2-2 酵母の増殖試験

2-1の酵母を5mLのMYGP培地(pH4.0)で28°C, 48hr静置により前培養した。これらの前培養酵母100 μ LをL字試験管のMYGP培地(pH4.0)10mLに植菌した。温度勾配振とう培養機(ADVANTEC製バイオフォトレコーダTN-2612)を用いて20, 28および38°Cで120hr振とう培養し, 経時的に光学密度(OD⁶⁶⁰)を測定して比増殖速度を算出した。さらに120hr培養液の酵母密度及び酵母生菌率を, メチレンブルー染色法により測定した⁵⁾。本法では, 0.02%メチレンブルー溶液と0.2Mリン酸緩衝液を等量混合し, pH4.6の1:10,000の色素液を作った。酵母液の乾物濃度が0.1~0.5%になるように懸濁液を調製し, この1mlと色素液1mlとを混合してヘマトメーターを使用して5分間以内に計数し, 青色に染まらない細胞数と全細胞数との比率を酵母の生菌率とした。さらに全細胞数から酵母密度を算出した。

2-3 麦麴発酵試験

2-1の酵母を5mLのMYGP培地(pH4.0)で28°C, 24hr振とうし, 前培養酵母を得た。製麴は丸麦および河内白麴菌の種麴を使用して, 常法により行った。麦麴50gに汲み水60mLを加え, 前培養酵母100 μ Lを合わせてもろみとし, 20, 28, 38°Cで9日間発酵させた。

発酵状況を把握するために, 定期的に二酸化炭素減量を測定した。また発酵試験終了後の10日目のもろみについて, pH, 酸度, アルコール分および香気成分を測定した。もろみのpH⁶⁾および酸度⁷⁾は, 国税庁所定分析法に基づいて測定した。アルコール分については, もろみをNo.2ろ紙でろ過した試料をガスクロマトグラフ(DB-WAX; I.D. 0.53mm \times 30m, Film1 μ m, 50 \rightarrow 170°C (4°C/min), FID検出器, HEWLETT PACARD 6890 SERIES)を用いて測定した。香気成分濃度については, もろみ10mLにヘキサン1mLおよび塩化ナトリウム1gを加えて抽出したヘキサン画分を試料として, ガスクロマトグラフ(DB-

WAX; I.D. 0.53mm \times 30m, Film1 μ m, 50 \rightarrow 225°C (4°C/min), FID検出器, HEWLETT PACARD 6890 SERIES)で測定した。

3 結果および考察

3-1 酵母の増殖試験

20, 28, 38°Cにおける酵母の比増殖速度を表1に示した。比増殖速度は, 概ね28, 38, 20°Cの順に大きいことが分かった。新規酵母No.62および既存酵母Cでは, 38°Cでの値が28°Cよりもやや高かった。28°Cにおける比増殖速度は, 新規酵母が0.292~0.340, 既存酵母が0.303~0.352の値を示した。また20°Cでは, 新規酵母が0.159~0.200, 既存酵母が0.164~0.203の値を示した。これらより, 28°Cおよび20°Cにおいて, 既存酵母と新規酵母では差はないことが分かった。38°Cにおいては, 新規酵母No.197の比増殖速度が0.034と極端に低い値を示し, 高温域での増殖は困難であると考えられた。38°Cにおけるその他の比増殖速度は, 新規酵母が0.241~0.329, 既存酵母が0.205~0.328であり, 20および28°Cの場合と比較して菌株の違いによる比増殖速度の差が顕著であった。38°Cでは新規酵母No.62が0.329で最も

表1 20, 28, 38°Cにおける酵母の比増殖速度

供試酵母	比増殖速度 (1/hr)			
	20°C	28°C	38°C	
新規酵母	No.59	0.185	0.313	0.284
	No.62	0.180	0.312	0.329
	No.68	0.159	0.292	0.241
	No.165	0.198	0.314	0.269
	No.182	0.178	0.312	0.241
	No.197	0.192	0.334	0.034
	No.224	0.200	0.340	0.298
既存酵母	A	0.190	0.315	0.205
	B	0.164	0.314	0.223
	C	0.200	0.322	0.328
	D	0.166	0.352	0.261
	E	0.188	0.317	0.267
	F	0.185	0.331	0.298
	G	0.158	0.303	0.268
MK021	0.203	0.335	0.291	

表2 20, 28, 38°Cで120hr培養後の酵母密度および生菌率

培養温度	20°C		28°C		38°C		
	供試酵母	酵母密度 (cells/mL)	酵母生菌率 (%)	酵母密度 (cells/mL)	酵母生菌率 (%)	酵母密度 (cells/mL)	酵母生菌率 (%)
新規酵母	No.59	2.63×10^8	97.3	1.82×10^8	99.6	1.14×10^8	85.9
	No.62	2.24×10^8	99.3	2.12×10^8	98.9	1.06×10^8	93.2
	No.68	3.70×10^8	99.4	4.33×10^8	98.2	0.99×10^8	91.1
	No.165	2.99×10^8	97.9	2.31×10^8	98.6	1.14×10^8	83.2
	No.182	2.53×10^8	96.5	1.86×10^8	96.1	0.82×10^8	90.3
	No.197	2.36×10^8	98.3	1.82×10^8	98.7	0.78×10^8	74.5
	No.224	2.58×10^8	99.4	2.38×10^8	98.3	1.46×10^8	92.9
既存酵母	A	5.87×10^8	99.7	3.61×10^8	99.6	0.52×10^8	87.7
	B	3.02×10^8	98.1	2.04×10^8	98.8	0.70×10^8	84.1
	C	3.68×10^8	95.2	1.62×10^8	96.0	1.84×10^8	83.0
	D	2.25×10^8	97.9	2.31×10^8	99.0	1.18×10^8	79.6
	E	2.43×10^8	98.4	1.97×10^8	96.3	0.86×10^8	83.3
	F	1.98×10^8	98.8	2.16×10^8	98.1	1.24×10^8	76.1
	G	2.54×10^8	96.8	2.37×10^8	93.9	1.04×10^8	83.1
	MK021	3.22×10^8	98.8	2.25×10^8	98.9	0.72×10^8	86.7

高い値を示し、ついで既存酵母Cが0.328であった。これらの酵母は高温域での増殖性が高いと考えられた。

20, 28, 38°Cで120hr培養したときの酵母密度および生菌率を表2に示した。酵母密度は、概ね20, 28, 38°Cの順に高いことが分かった。新規酵母No.68, 既存酵母DおよびFでは、28°Cでの値が20°Cよりもやや高かった。また既存酵母Cは

38°Cの値が28°Cよりも高かった。酵母生菌率は、20および28°Cでは概ね95%以上であった。38°Cでは、既存酵母の生菌率がすべて90%を下回っていたが、新規酵母No.62は93.2%, 新規酵母No.224は92.9%と高い値を示し、高温耐性が高いと考えられた。また新規酵母No.197は74.5%と低く、高温下に弱いと考えられた。

表3 麦麴発酵試験 (20°C) の結果

経過時間 (h)	二酸化炭素減量 (g)									アルコール分 (% (V/V))	酸度	pH	
	24	48	72	96	120	144	168	192	216				
新規酵母	No.59	0.11	4.32	8.42	10.13	11.31	12.02	12.44	12.77	12.92	16.4	12.7	3.77
	No.62	0.05	3.94	8.33	10.10	11.33	12.07	12.52	12.86	13.01	16.5	12.4	3.83
	No.68	0.08	3.02	8.24	10.20	11.50	12.25	12.70	13.04	13.18	16.7	12.4	3.88
	No.165	0.06	3.03	8.12	10.03	11.29	12.06	12.57	12.95	13.11	16.9	12.6	3.85
	No.182	0.09	3.92	8.21	10.02	11.26	12.03	12.50	12.86	13.02	16.9	12.9	3.82
	No.197	0.12	3.47	8.15	9.99	11.22	11.95	12.41	12.76	12.91	16.4	13.6	3.77
	No.224	0.08	3.23	8.10	9.99	11.29	12.02	12.43	12.76	12.92	15.6	13.0	3.85
既存酵母	A	0.07	2.88	8.06	9.97	11.25	11.96	12.41	12.76	12.89	16.4	13.1	3.82
	B	0.09	3.20	7.76	9.48	10.67	11.42	11.97	12.40	12.57	16.1	13.8	3.73
	C	0.07	1.53	6.46	9.02	10.58	11.48	12.05	12.47	12.65	15.6	14.3	3.79
	D	0.05	0.07	0.13	0.19	0.40	2.54	7.86	10.56	11.56	15.0	14.7	3.61
	E	0.08	3.93	8.05	9.77	11.04	11.77	12.29	12.67	12.83	16.4	13.5	3.77
	F	0.08	0.91	6.97	9.37	10.74	11.50	12.02	12.40	12.57	16.1	14.6	3.68
	G	0.10	2.85	8.03	9.90	11.16	11.90	12.39	12.74	12.91	16.1	13.0	3.82
MK021	0.10	1.44	7.32	9.81	11.33	12.13	12.61	12.97	13.15	16.3	12.5	3.87	

表4 麦麴発酵試験（28℃）の結果

経過時間（h）	二酸化炭素減量（g）									アルコール分 （%（V/V））	酸度	pH	
	24	48	72	96	120	144	168	192	216				
新規酵母	No.59	3.16	9.51	11.57	12.63	13.17	13.43	13.61	13.81	13.92	16.1	13.0	3.90
	No.62	2.53	9.12	11.28	12.41	12.97	13.23	13.41	13.61	13.71	16.4	12.4	3.96
	No.68	2.08	9.34	11.56	12.58	13.08	13.32	13.47	13.64	13.75	16.1	13.2	3.93
	No.165	2.28	9.15	11.23	12.35	12.95	13.24	13.44	13.64	13.76	16.2	12.6	3.97
	No.182	2.86	9.39	11.52	12.62	13.18	13.46	13.65	13.86	13.97	16.3	12.4	3.99
	No.197	2.72	9.30	11.42	12.52	13.10	13.38	13.58	13.78	13.90	16.3	13.0	3.95
	No.224	1.96	9.28	11.54	12.59	13.10	13.34	13.49	13.65	13.75	17.2	12.3	4.01
既存酵母	A	1.61	9.19	11.46	12.56	13.14	13.40	13.58	13.77	13.88	15.9	13.4	3.94
	B	2.56	8.79	10.73	11.92	12.78	13.17	13.41	13.61	13.72	16.3	13.7	3.91
	C	1.95	9.00	11.10	12.26	12.89	13.19	13.40	13.61	13.74	16.2	13.5	3.95
	D	1.53	8.75	10.86	12.02	12.69	12.98	13.15	13.32	13.43	16.0	13.9	3.88
	E	2.86	9.27	11.32	12.40	13.00	13.31	13.52	13.75	13.87	16.4	13.3	3.92
	F	2.40	9.08	11.01	12.12	12.75	13.07	13.25	13.47	13.59	16.0	13.6	3.90
	G	1.96	9.23	11.41	12.52	13.10	13.33	13.50	13.67	13.77	16.2	12.6	3.95
MK021	2.14	9.42	11.58	12.59	13.10	13.35	13.52	13.71	13.83	16.0	12.4	3.99	

表5 麦麴発酵試験（38℃）の結果

経過時間（h）	二酸化炭素減量（g）									アルコール分 （%（V/V））	酸度	pH	
	24	48	72	96	120	144	168	192	216				
新規酵母	No.59	5.16	8.79	9.54	9.80	10.09	10.31	10.51	10.73	10.93	9.7	12.9	3.99
	No.62	4.67	9.18	10.38	10.62	10.86	11.03	11.19	11.36	11.52	11.6	12.9	4.00
	No.68	3.87	7.15	7.66	7.87	8.06	8.20	8.31	8.41	8.53	8.4	12.6	3.96
	No.165	3.82	8.00	9.00	9.23	9.44	9.60	9.74	9.90	10.04	10.3	12.5	3.98
	No.182	4.40	7.47	7.83	8.00	8.18	8.33	8.44	8.55	8.68	8.5	12.2	3.97
	No.197	3.95	7.34	7.96	8.17	8.36	8.51	8.66	8.82	8.97	8.5	12.9	3.95
	No.224	3.91	7.39	7.79	7.99	8.20	8.37	8.52	8.68	8.85	8.1	12.2	3.99
既存酵母	A	1.50	6.46	8.58	9.02	9.27	9.47	9.65	9.82	10.00	9.1	13.2	3.92
	B	2.51	6.19	7.70	8.53	9.10	9.39	9.61	9.80	9.98	9.4	13.0	3.96
	C	3.43	7.46	8.78	9.27	9.58	9.76	9.93	10.06	10.21	10.1	13.4	3.96
	D	3.63	7.01	8.77	9.68	10.17	10.42	10.60	10.80	10.99	10.6	13.3	3.94
	E	3.98	8.16	10.00	10.49	10.76	10.94	11.11	11.27	11.44	11.2	13.0	3.99
	F	4.16	7.67	9.22	10.06	10.56	10.88	11.15	11.40	11.64	10.3	13.4	3.97
	G	3.36	7.48	8.83	9.14	9.35	9.53	9.69	9.85	10.00	9.5	13.4	3.96
MK021	3.58	7.90	8.94	9.18	9.42	9.62	9.77	9.96	10.14	9.4	12.7	3.98	

3-2 麦麴発酵試験

表3, 4および5に, 20, 28および38℃での麦麴発酵試験の結果を示した。二酸化炭素減量は, 24hrにおいて, 38, 28, 20℃の順に大きかった。28℃では216hrまで順調に二酸化炭素減量の値が伸びた。38℃では72hrまでは順調な伸びを示すものの, それ以後の伸びはほとんど見られなかった。38℃では28℃の場合よりも24hrにおいて急激な伸びが見られるが, 既存酵母AおよびBでは認められなかった。20℃では, 28℃の場合に比べて立ち上がりが緩慢ではあるものの後半は順調に伸びた。既存酵母D, F, CおよびMK021は立ち

上がり特に遅かった。一方, 新規酵母は比較的立ち上がりが早かった。図1, 2および3に, 20, 28および38℃での麦麴発酵試験熟成もろみのア

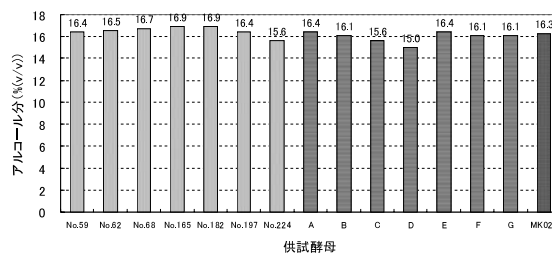


図1 麦麴発酵試験（20℃）熟成もろみのアルコール分

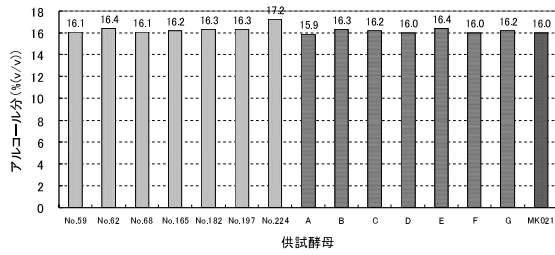


図2 麦麴発酵試験 (28°C) 熟成もろみのアルコール分

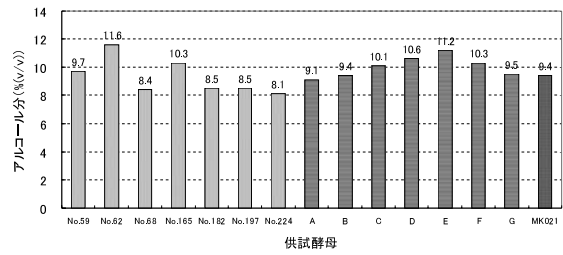


図3 麦麴発酵試験 (38°C) 熟成もろみのアルコール分

表6 麦麴発酵試験熟成もろみの香気成分濃度

香気成分	雰囲気	香気成分濃度 (mg/L)														
		新規酵母							既存酵母							
		No.59	No.62	No.68	No.165	No.182	No.197	No.224	A	B	C	D	E	F	G	MK021
酢酸エチル	20°C	58	68	69	63	63	65	56	69	67	59	58	70	66	59	49
n-プロピルアルコール		118	115	96	112	118	113	116	158	127	157	113	105	121	100	81
i-ブチルアルコール		137	138	154	111	99	110	121	98	104	110	195	133	113	170	175
i-アミルアルコール		383	349	390	274	290	341	333	256	402	256	325	332	305	424	363
β-フェネチルアルコール		247	220	201	182	196	209	172	210	202	134	187	206	201	257	201
酢酸エチル	28°C	32	43	36	38	36	43	35	32	51	51	50	46	50	38	43
n-プロピルアルコール		106	113	81	108	113	106	84	136	117	111	136	112	124	96	76
i-ブチルアルコール		177	163	194	154	140	158	160	147	134	164	150	169	145	214	187
i-アミルアルコール		422	357	372	315	340	380	361	324	405	407	386	347	353	440	392
β-フェネチルアルコール		269	228	212	200	225	239	228	237	210	261	237	221	229	281	239
酢酸エチル	38°C	9	12	9	10	8	8	9	7	13	16	16	16	11	9	10
n-プロピルアルコール		38	37	39	40	37	27	28	67	37	33	45	35	34	43	26
i-ブチルアルコール		80	109	75	95	86	80	58	81	69	65	93	96	73	98	72
i-アミルアルコール		294	281	237	256	291	278	267	190	214	212	251	248	221	318	226
β-フェネチルアルコール		194	180	146	138	159	178	207	94	130	145	147	163	148	240	133

表7 麦麴発酵試験熟成もろみの主要アルコール比

比	雰囲気	新規酵母							既存酵母							
		No.59	No.62	No.68	No.165	No.182	No.197	No.224	A	B	C	D	E	F	G	MK021
A/P ※	20°C	3.2	3.0	4.0	2.4	2.5	3.0	2.9	1.6	3.2	1.6	2.9	3.2	2.5	4.2	4.5
A/B		2.8	2.5	2.5	2.5	2.9	3.1	2.7	2.6	3.9	2.3	1.7	2.5	2.7	2.5	2.1
B/P		1.2	1.2	1.6	1.0	0.8	1.0	1.0	0.6	0.8	0.7	1.7	1.3	0.9	1.7	2.2
A/P	28°C	4.0	3.2	4.6	2.9	3.0	3.6	4.3	2.4	3.5	3.7	2.9	3.1	2.9	4.6	5.1
A/B		2.4	2.2	1.9	2.1	2.4	2.4	2.2	2.2	3.0	2.5	2.6	2.0	2.4	2.1	2.1
B/P		1.7	1.4	2.4	1.4	1.2	1.5	1.9	1.1	1.1	1.5	1.1	1.5	1.2	2.2	2.5
A/P	38°C	7.8	7.7	6.1	6.3	7.9	10.2	9.6	2.8	5.8	6.4	5.6	7.2	6.5	7.4	8.7
A/B		3.7	2.6	3.1	2.7	3.4	3.5	4.6	2.3	3.1	3.3	2.7	2.6	3.0	3.2	3.2
B/P		2.1	3.0	1.9	2.3	2.4	2.9	2.1	1.2	1.9	2.0	2.1	2.8	2.1	2.3	2.8

※A：イソアミルアルコール B：イソブチルアルコール P：n-プロピルアルコール

ルアルコール分を示した。いずれの酵母についても、20および28°Cでは十分にアルコール分が高く、38°Cでは低くなった。ただし、新規酵母No.224、既存酵母C、Dは28°Cのもろみが20°Cのもろみよりアルコール分が高く、既存酵母Aは20°Cのもろみが28°Cのもろみより高かった。また新規酵母No.62および既存酵母Eは38°Cにおいて11.6およ

び11.2%で他の酵母よりアルコール分が高かった。これらは広い温度域において醸造適性が高いと考えられた。

表6に麦麴発酵試験熟成もろみの香気成分濃度を、表7に主要アルコール比を示した。28°Cと比較して、20°Cのもろみは香気成分濃度が全体的にやや低く、さらに38°Cで顕著であった。38°Cに

においてA/Pが特に大きくなっているのは、n-プロピルアルコールの大幅な減少に起因していた。

官能検査においては、20および28℃のもろみはすっきりとした甘い香りであり、いずれも良好であった。また38℃のもろみの香りは重く、焦げ臭の感じられるものが多かったが、既存酵母No.62, 182, 224は比較的良好な香りであった。

以上のとおり温度耐性や麦麴による発酵性から判断して、新規酵母の実用化の可能性は高いと考えられた。

4 まとめ

焼酎もろみから分離収集し当センターに保存している200株余りの野生酵母より選抜した新規酵母7株および既存酵母（実用酵母）8株について、酵母の増殖試験および麦麴発酵試験を行った。

20および28℃における酵母の比増殖速度は、既存酵母と新規酵母について差はなく、いずれも高い増殖性を示した。38℃では、新規酵母No.197の比増殖速度は極端に低く、酵母生菌率も低いことから、高温域での増殖は困難であると考えられた。一方、新規酵母No.62が最も高い比増殖速度を示し酵母生菌率も最も高いことから、高温域での増殖性が高いと考えられた。

20℃での麦麴発酵試験において、新規酵母は既存酵母と同等以上に立ち上がり早かった。また38℃において、新規酵母No.62は他の酵母より熟成もろみのアルコール分が高く、広い温度域における醸造適性があると考えられた。

熟成もろみの香気成分濃度については、28℃と比較して20℃では低く、38℃ではさらに低かった。官能検査においては、20および28℃の場合すっきりとした甘い香りであり、いずれも良好であったが、38℃のもろみの香りは重く、焦げ臭の感じられるものが多かった。しかし、新規酵母No.62, 182, 224はいずれの温度においても比較的良好な香りであった。

今後はスケールアップをした仕込試験を行うことにより、選抜酵母の醸造適性および実用化についてさらに詳細な検討を行う。

5 参考文献

- 1) 工藤哲三, 日高照利, 柏田雅徳, 中山法親: 宮崎県工業試験場研究報告, 34, p.79~83 (1989)
- 2) 工藤哲三, 日高照利, 柏田雅徳: 宮崎県工業試験場研究報告, 35, p.55~60 (1990)
- 3) 山本英樹, 工藤哲三, 水谷政美, 竹下淳子, 柏田雅徳: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 49, p.113~117 (2004)
- 4) 山本英樹, 工藤哲三, 水谷政美, 高山清子, 柏田雅徳: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 50, p.113~116 (2005)
- 5) 京都大学農学部食品工学教室編: 食品工学実験書下巻, p.38 (1979)
- 6) 注解編集委員会編: 第4回改正国税庁所定分析法注解, p.30 (2000)
- 7) 注解編集委員会編: 第4回改正国税庁所定分析法注解, p.20 (2000)