

## 微生物利用技術に関する研究

### －新規酵母の分離と食品への応用 (3)－

横堀正敏\*<sup>1</sup> 鶴藺大\*<sup>2</sup> 高橋友哉\*<sup>1</sup> 増田こずえ\*<sup>1</sup>

## Study on Utilizations of Microorganisms

### － Isolation of Yeasts from Natural Resources and Use for Foods (3)－

YOKOBORI Masatoshi\*<sup>1</sup>, TSURUZONO Masaru\*<sup>2</sup>, TAKAHASHI Tomoya\*<sup>1</sup>, MASUDA Kozue\*<sup>1</sup>

#### 抄録

パン用に選抜した酵母株は、孢子形成能により *Saccaromyces cerevisiae* の特徴が確認された。高糖条件での発酵性も再確認された。香りの特徴物質は特定できなかった。

清酒用に選抜した高泡を形成する酵母株からは、泡なし変異株を取得した。既に得られている株とともに、清酒製造試験において、香味に特徴のある良好な結果が得られた。自然界からの2つの株は独特の酒質になったが、安定的な製造には更に検討の必要がある。

キーワード：酵母，発酵，パン，清酒

## 1 はじめに

酒類やパン類など、酵母を利用した発酵食品は、大きく成熟した市場を形成している。しかし成熟産業ゆえに、消費者の嗜好の多様化に対応しにくい面がある。製品の香味成分を生産する酵母は、安定的な製造のため、安全に発酵できるよう改良され、現在では限られた種類のもが多く使われ、結果、商品の特徴を打ち出しにくくなる一因となっている。一方、自然志向の高まりから、天然酵母には高い関心が示されるようになってきた。

本研究では、新たな発酵食品製造のため、これまで県内の自然界や食品工場等から酵母を取得し、発酵性等により選抜してきた<sup>1,2)</sup>。

本報では、得られた酵母の特徴を更に詳しく調べるとともに、改良を行った。

## 2 実験方法

### 2.1 パン・菓子類

#### 2.1.1 ショ糖溶液での炭酸ガス発生量評価

既報<sup>1,2)</sup>において、市販の天然酵母と比較して発酵力や香りが良好であった B 株について、更に市販のイースト（市販 a, b）と発酵力を比較した。また、食パンなどを想定した低糖条件（ショ糖 10%）に加えて、菓子パンを想定した高糖条件（ショ糖 40%）での発酵力を測定した。その他は既報<sup>1)</sup>のとおり。

#### 2.1.2 パンの香気成分の測定

2.1.1 と同じ酵母を用い、強力粉 250 g に対して水 70%、生イースト 3%、ショ糖 7%、食塩 2%、脱脂粉乳 2.5%、ショートニング 4%を使用し、家庭用製パン機（National 製 SD-BT113）で食パンを製作した。そのパンは室温で1時間冷却した後、1cm 厚の外相を切り落とし残りの内相を粉碎し、その 1g を 20mL バイアルに入れ、内部標準として 0.1% (v/v) n-ブタノール溶液 10ml を加えて密封した。これを 58℃水浴中に 15 分間保持した

\*<sup>1</sup> 北部研究所 生物工学部

\*<sup>2</sup> 西部環境管理事務所

後、固相マイクロ抽出<sup>3)~5)</sup>用の針(膜厚 85 μ m、材質 StableFlex Carboxen/PDMS、SUPELCO 製)をバイアルの気相に 15 分間挿入して香氣成分を吸着させ、ガスクロマトグラフィー (HP5890)で測定した。240 °Cの注入口からスプリットレスで 5 分間注入後、DB-WAX カラム(内径 0.25mm、膜厚 0.25 μ m、長さ 30m)を 40 °C 5 分間保持→100 °C (3 °C/分) → 230 °C (10 °C/分)で昇温させ、240 °C FIDにて検出した。

### 2.1.3 孢子形成能の評価<sup>6)</sup>

YPD 培地 (1%酵母エキス、2%ペプトン、2%グルコース)にて 2 日間 30 °Cで培養した B 株の培養液を、酢酸ナトリウム培地 (0.82%酢酸ナトリウム三水和物、0.1%グルコース、0.18%塩化カリウム、0.25%酵母エキス、1.5%寒天)に白金耳で塗布し、1 週間 20 °Cで培養した。生じたコロニー中の菌体を微分干渉顕微鏡 (Nikon 製 ECLIPSE 80i)で観察した。

## 2.2 清酒

### 2.2.1 泡なし変異株の取得

既報<sup>1)</sup>において、発酵性や香味は良好だが高泡を形成した c 株について、以下の方法で泡なし変異株を分離した。培地は Brix 6 の麴エキス培地を使用し、各操作を 10 回繰り返した後、コロニーを得た。各株は総米 50g の小仕込み試験<sup>1)</sup>により、高泡の有無などを確認した。

#### (1) Froth Flotation 法<sup>7)</sup>

50mL の培養液をメスシリンダーに入れ、10 分間程度の通気でオーバーフローさせ、残った液部を新たな培地 50mL に接種し、培養した。

#### (2) シュガーエステル凝集法<sup>8)</sup>

培養液 10mL にリョートーエステル CA-H1 (三菱化学フーズ)の 0.25%溶液 1mL を添加し、1 分間攪拌後、5 分間 1000rpm で遠心し、上澄液 1mL を新たな培地 10mL に接種し、培養した。

#### (3) セライト凝集法<sup>9)</sup>

10mL の培地で培養した酵母を 2 回洗浄後、クエン酸水溶液 (pH3) 10mL とセライト 100mg を加え、1 分間攪拌した。生じたフロックを 30 分

間の静置で沈降させ、上澄液 1mL を新たな培地 10mL に接種し、培養した。

### 2.2.2 小仕込み試験 (総米1kg)

既に得られている a<sup>1)</sup>, B, c, 及び 2.2.1 で得られた c の泡なし変異株シ 3, シ 6, シ 8 株を用い、表 1 の仕込配合で、二段のアンフル仕込みを行った。対照には、県で頒布している吟醸用酵母、埼玉 C を使用した。自然界から得られた酵母 a, B 株は清酒もろみでの発酵が弱いため、栄養源であるパントテン酸カルシウムを 10ppm、硫酸マグネシウムを 100ppm、汲水あたりで添加した。もろみは恒温培養器で温度制御した。温度経過は、留添を 10 °C とし、1 日 1 °C 温度を上げ、最高温度を 15 °C とし、3 週間ほどで上槽した。

表 1 仕込配合

	酒母	初添	留添	計
蒸米 (g)		160	610	770
乾燥麴 (g)	21.5	55.9	120.4	197.8
汲水 (mL)	103.5	432.1	936.6	1382.2
乳酸 (mL)	0.6	0.4		1

### 2.2.3 清酒製造試験

a, b<sup>1)</sup>, シ 8, B 株を使用し、総米 60kg の清酒試験製造を行った。b 株は既報<sup>1)</sup>で良好な結果が得られているので、対照として用いた。2.2.2 と同様にパントテン酸カルシウムと硫酸マグネシウムを添加した。三段仕込みで、その他は既報<sup>9)</sup>のとおり。

## 3 結果及び考察

### 3.1 パン・菓子類

#### 3.1.1 ショ糖溶液中での炭酸ガス発生量評価

B 株の発酵力は、ショ糖の発酵において、市販のイーストに比べ遜色無かった (図 1)。

#### 3.1.2 パン香氣成分の評価

パンの香氣成分としてしばしば検出される β-フェネチルアルコールは、発酵過程において生じる、バラの花の香りに類似した香氣成分である。B 株においても β-フェネチルアルコール生成は確認できたが、市販の生イーストと比較して特に多くはなかった (図 2)。この他にも香氣成分と

思われるピークが検出されているので、それらについてさらに検討の必要があると思われる。

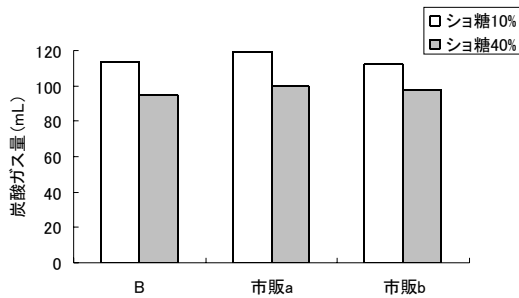


図1 3時間後までに生成する炭酸ガス量

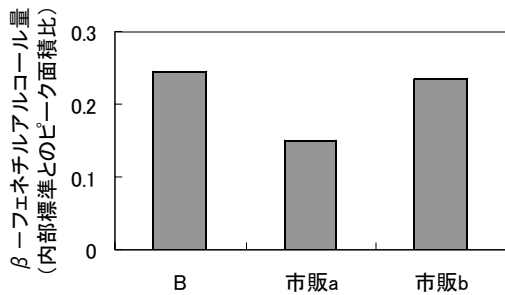


図2 パンのβ-フェネチルアルコール量

### 3.1.3 胞子形成能の評価

実用パン酵母は高次倍数体が多く、胞子形成が困難である場合がある。酵母を育種する手法の一つである交雑を行うには胞子形成能が必要であり、胞子を形成することで育種の可能性が広がる。今回のB株では、*S.cerevisiae*の特徴どおり、1細

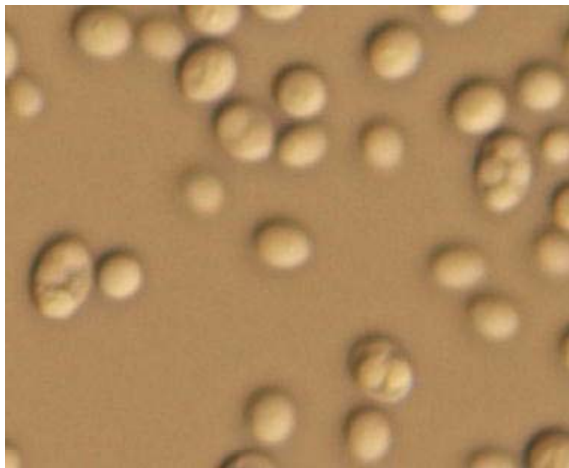


図3 胞子形成したB株の顕微鏡写真

胞につき4つの胞子を形成した(図3)。

このB株を使用し、共同研究先において、食パン、あんパン、ハード系パン、酒饅頭を試作している。

## 3.2 清酒

### 3.2.1 泡なし変異株の取得

Froth Flotation法では泡なし変異株は取得できなかった。セライト法でも取得数は少なかったが、シュガーエステル法では10株取得した。総米50gの小仕込み試験により、高泡を形成しないことや、アルコール分やカプロン酸エチル生成量などから、シュガーエステル法で得られたシ3, シ6, シ8の3株を選抜した。

### 3.2.2 小仕込み試験(総米1kg)

試験結果を表2に示す。a, B株は他の酵母と比べるとアルコール分が少なく、日本酒度も非常に小さく、酸度が高くなった。B株の酵母密度はもろみ20日目、埼玉Cと同程度の $2.5 \times 10^8$ /mLに増えていたので、栄養源添加の効果はあったものと考えられる。シ3, シ6, シ8株はどれも高泡を形成しなかったが、アルコール分やカプロン酸エチル濃度等より、シ8株を選抜した。

表2 小仕込み試験結果(総米1kg)

	埼玉C	a	B	c	シ3	シ6	シ8
アルコール分	19.3	16.9	15.7	20.0	19.1	19.6	19.6
日本酒度	+13	-12	-21	+14	+11	+10	+10
酸度	2.25	3.05	3.15	2.4	2.15	2.1	2.15
アミノ酸度	1.85	1.95	2.25	1.85	2.0	2.05	2.05
香気成分 (ppm)	iBuOH	112	145	117	95	63	65
	iAmAc	4.5	2.3	1.0	4.7	2.5	2.7
	iAmOH	256	371	270	265	208	210
	EtCap	2.0	1.7	1.6	2.8	3.5	3.6

iBuOH, iAmAc, iAmOH, EtCap はそれぞれイソブタノール、酢酸イソアミル、イソアミルアルコール、カプロン酸エチル。表3についても同様。

### 3.2.3 清酒製造試験

もろみの日本酒度、アルコール分、酵母密度の経過をそれぞれ図4, 5, 6に示す。ここでもシ8株は高泡を形成せず、発酵は順調に進み、華やかな香りとなった。

a, B株は酵母の増殖を促すため、仕込中からほぼ15℃に保ったが、やはり増殖や発酵が鈍く、

アルコール生成が少なく、ポーメが残りに、酸が多かった。

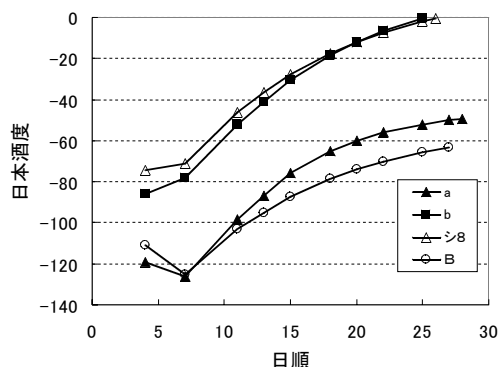


図4 もろみ経過 日本酒度

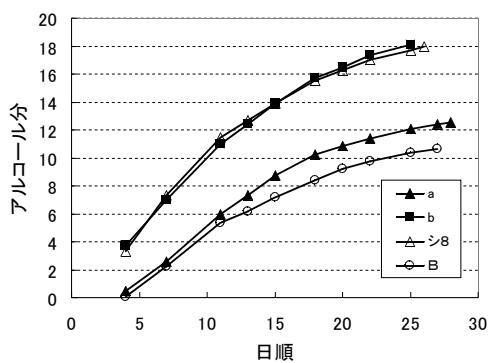


図5 もろみ経過 アルコール分

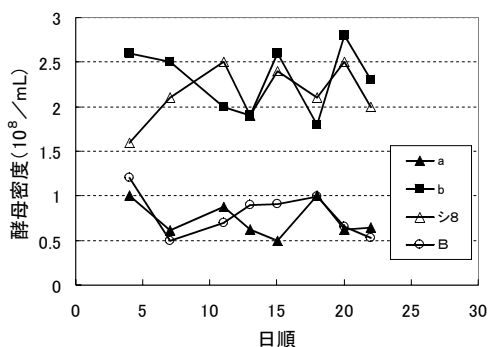


図6 もろみ経過 酵母密度

表3に製成酒の分析結果を示す。特に B 株で酸が多く、酸臭も感じられ、乳酸、酢酸が極端に多かった。酵母密度も小さいため、品温管理や栄養源添加などの条件を再度検討する必要がある。しかし一般消費者等のアンケートでは a, B 株の酒がおいしいという感想もあり、特に女性からの支持が高かった (図7)。

表3 清酒製造試験結果

	a	b	シ8	B	
アルコール分	12.35	17.3	17.3	10.55	
日本酒度	-45	-2	-1.5	-61	
酸度	3.15	1.95	2.0	6.0	
アミノ酸度	1.5	1.6	1.35	1.8	
香気成分 (ppm)	iBuOH	166	85	41	81
	iAmAc	0.8	3.0	1.0	0.2
	iAmOH	287	208	172	149
	EtCap	1.5	1.5	3.6	1.5
	有機酸 (ppm)	クエン酸	256	46	51
リンゴ酸		239	202	225	112
コハク酸		401	457	454	262
乳酸		1260	922	878	6280
酢酸		252	28	15	1240
粕歩合 (%)	31.8	26.8	28.4	33.8	
純アルコール収得量 (L/白米 t)	250	352	355	202	
もろみ日数	28	25	26	27	

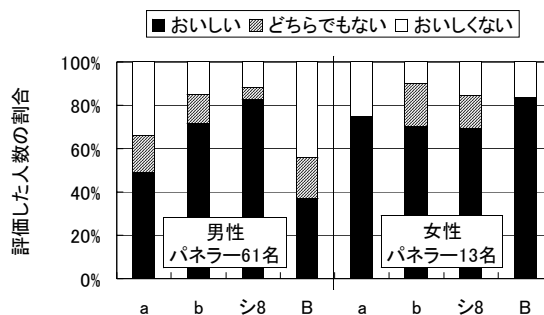


図7 官能審査結果

発酵性や酒質の良好であった b, シ8 株は、それぞれ埼玉 E, 埼玉 F 酵母として、共同研究先において実地での清酒製造試験を行っている。

#### 4 まとめ

パン用に選抜した B 株は、孢子形成能からも *S.cerevisiae* の特徴が確認された。高糖条件での発酵性も確認された。香りの特徴ははっきりしなかったため、今後検討の必要がある。

清酒用に選抜し、高泡を形成した c 株から取得した泡なし変異株シ8株は、親株の特徴を保持し、清酒製造試験においても良好な結果となった。自然界から得られた a, B 株は特徴的な酒質になったが、増殖や発酵が鈍く、安定的な製造のためには更なる検討が必要と思われる。

## 謝 辞

本研究を進めるに当たり、客員研究員として御指導いただきました独立行政法人理化学研究所の鈴木基文先任研究員に感謝の意を表します。

## 参考文献

- 1) 横堀正敏, 鶴菌大, 渡辺泰成, 増田こずえ : 微生物利用技術に関する研究—新規酵母の分離と食品への応用—, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **5**, (2007) 107
- 2) 横堀正敏, 鶴菌大, 渡辺泰成, 増田こずえ, 橋本麻里 : 微生物利用技術に関する研究 (2) —新規酵母の分離と食品への応用— 試料の採取と酵母の分離—, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **4**, (2006) 59
- 3) 小野昌志 : 食パンの風味成分について, イースト技報, **71**, (2001) 45
- 4) 井藤隆之, 末長新, 井村聡明 : 発酵種およびパンの風味成分分析について, イースト技報, **73**, (2003) 25
- 5) 長谷川秀樹, 櫻井博章, 森谷浩, 坪内秀明 : 北海道産素材を活用した製パンについて, イースト技報, **73**, (2003) 49
- 6) Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. : The Yeasts a Taxonomic Study Fourth Edition, Elsevier, (1998) 84
- 7) Ouchi, Kozo and Akiyama, Hiroichi : Non-foaming mutants of sake yeastsselection by cell agglutination method and froth flotation method, Agric. Biol. Chem., **35**, (1972), 54
- 8) 大内弘造, 布川弥太郎 : 清酒酵母泡なし変異株の新選択法, 醸協, **67**, (1972) 54
- 9) 横堀正敏, 増田こずえ, 山田和男 : 清酒仕込方法の合理化に関する研究—仕込配合の検討—, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **1**, (2003) 116