

アルコール耐性清酒酵母の取得と醸造特性

小浜 恵子*、伊藤 良仁*、米倉 裕一**、
山本 忠*、櫻井 廣**、大澤 純也*

高濃度のアルコール存在下で増殖可能であり、耐性を示す清酒酵母の効率的な取得を実施し、醸造特性について検討した。協会701号酵母を変異処理した後、胞子形成培地で生育良好なものを選択し、15%エタノールを含むYPD培地にレプリカし、さらに20%エタノールを含むYPD培地で生育可能なものを釣菌した。取得した菌株の麹エキス培地でのエタノール生産性及び生育を調べたところ、2/3以上が親株より良好であり、2株は20%エタノール存在下での生存率が親株の100倍以上であった。取得した2株を用いて小仕込み試験を実施した結果、もろみ後半での酵母の生存率が親株より高く、ポーメの切れも良い傾向が見られた。

キーワード：清酒酵母、アルコール耐性、清酒醸造

Isolation of Ethanol-Tolerant Sake Yeasts and Characterization of Brewing

KOHAMA Keiko, ITO Yoshihito, YONEKURA Yuichi,
YAMAMOTO Tadashi, SAKURAI Hiroshi and OHSAWA Junya

We attempted to isolate of sake yeast that was able to grow in the medium containing 20% ethanol. *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No.701 was treated with ethyl methanesulfonate, and incubated on sporulation medium for nitrogen starvation. Colonies appeared on the medium were replicated onto YPD agar medium added with 20% ethanol. The mutants that could grow on the medium were selected, and 17 mutants had ability of ethanol producing more than parent strain. Among the isolated strains, 5-8 and 6-1 showed high cell viability in the 20% ethanol solution. In a small sake brewing test, the fermentation progressed similarly for 5-8, 6-1 and parent strain. Activities of cells in *moromi* measured by methylene blue staining showed 5% active for the both mutants and 15% active for parent strain. Amino acidity and total acidity had no difference between sake made with these strains.

keywords : sake yeast, ethanol tolerance

1 緒 言

清酒酵母はもろみ末期において自己生産したエタノールにより増殖が止まり、さらには死滅し自己消化することに従い、アミノ酸度、酸度、着色などが進んで製成酒の品質が劣化しやすくなる。このため高エタノール濃度でも増殖可能な酵母で、もろみ中でも高いエタノール耐性を示すものが望まれる。エタノール耐性酵母は原¹⁾によって協会7号酵母から分離され、協会11号酵母と

して実用化されている。秋田ら²⁾は、より長鎖アルコールであるイソアミルアルコール耐性株から効率的にエタノール耐性酵母が取得できるとしている。また、これらのエタノール耐性株がキラートキシン耐性を示すことを利用して、朝田らはエタノール耐性株を取得している³⁾。また、伊野本ら⁴⁾は窒素飢餓培地で耐久性の高い酵母を選択すると高濃度エタノール存在下でも増殖可能な株が取得できるとしている。エタノール耐性には、

* 応用生物部

** 醸造技術部

1) 高濃度エタノール下での生存性、2) 高濃度エタノール下での発酵性、3) 高濃度エタノール下での増殖性が考慮される。本研究においては前述したようなエタノール耐性酵母の取得法に加えて、エタノール耐性の3つの要素を備えるような選抜方法を設定し、エタノール耐性株を取得し醸造特性について検討した。

2 実験方法

2-1 供試菌株及び培地

協会酵母701号を親株として用いた。酵母の培養には、YPD培地(1%酵母エキス、2%ポリペプトン、2%グルコース)を用いた。窒素飢餓培地としては、孢子形成培地(Mclary medium, Sharmans medium)を用いた。高濃度エタノール存在下で増殖可能な突然変異株の分離にはエタノールを15%または20%含んだYPD培地(15%及び20%YPD培地)を用いた。また、エタノールの生産性及び生存率の測定には麹エキス培地を用いた。以上の培地は必要に応じて、2%寒天を加えた平板培地とした。

2-2 高濃度エタノール下増殖可能な変異株の分離

10mlのYPD液体培地に協会701号酵母を植菌し、30、一昼夜培養後、滅菌水で2回洗浄した菌体に突然変異処理を施した。突然変異処理は、5%エチルメタンサルホン酸(EMS)を含むリン酸緩衝液(pH 7)で30、45分間処理を行った。6%チオ硫酸ナトリウムでEMSを中和後、処理菌体を2回洗浄してYPD液体培地にて30、一昼夜培養した。次に、培養液を孢子形成培地に塗抹し、22、3週間培養後、生育したコロニーを15%YPD平板培地にレプリカし、30、2日培養後、さらに20%YPD平板培地にレプリカして生育良好な株を釣菌した。

2-3 増殖とアルコール生成能及び高濃度アルコール下での生存率

取得した変異株を麹エキス培地(Brix 10)で30、20時間前培養後、麹エキス培地(Brix 20)に植菌し、15での増殖をクレット計を用いて測定した。11日後のエタノール生産量をガスクロマトグラフィー(HP5890 ヒューレットパッカード社製)を用いて、国税庁所定分析法注解⁵⁾に従い測定した。

高濃度エタノール中での生存率は、20%エタノールを含む麹エキス培地(Brix 16)に 2.0×10^6 /mlとなるように植菌し、15、1週間静置培養後の生菌数を測定した。

2-4 小仕込み試験

難波ら⁶⁾の方法に従った。選抜した変異株を使用し、総米1kg(精米歩合70%)の3段仕込みで行った。仕込温度は水麴、初添、踊りを15として仲添12、留添は10となるように仕込みを行い、留後2日目より品温を一日に1づつ上げ、最高品温を15となるようにした。CO₂発生に伴うもろみ重量の減少が300gになった時点で

遠心分離により上槽した。

製成酒の一般分析及びメチレンブルー(MB)染色率の測定は、国税庁所定分析法注解⁵⁾に従った。エタノールは2-3に準じ、有機酸はカルボン酸分析計(S-3000、東京理化学)で測定した。

3 結果

3-1 変異株の分離と生育及びエタノール生成能

実験方法で述べたように孢子形成培地で3週間培養し、15%YPD培地にレプリカし、さらに20%YPD培地にレプリカして200株を得た。生育良好な70株を用いて増殖及びエタノール生成を測定した。培養11日目の結果を図1に示した。

クレット単位

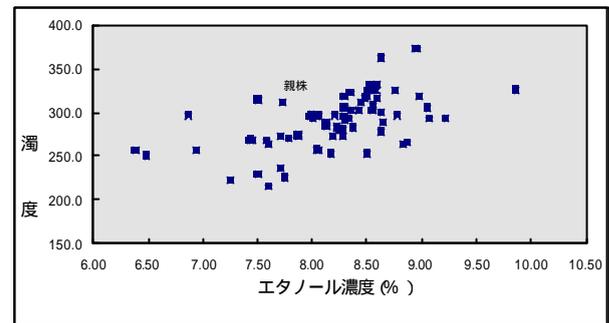


図1 変異株の増殖とエタノール生成

約50株についてはエタノール生成能が親株よりもすぐれ、うち17株については生育も良好であった。

3-2 高濃度エタノール下での生存率

分離した50株から特に生育とアルコール生成能の高かった17株を実験方法に従って1週間20%エタノール存在下においた時の生存率を表1に示した。

親株を含めたほとんどの変異株が死滅していたが、5-8及び6-1株の生存率が非常に高かった。

3-3 清酒小仕込み試験

取得したアルコール耐性酵母5-8及び6-1株を用い、親株である協会701号を対照として清酒小仕込み試験を行った。CO₂発生にともなうもろみの重量減少による発酵経過を図2に示した。

親株である協会701号酵母と変異株では発酵経過には差がないことが示された。もろみ後半では変異株の方が発酵力が強い傾向が見られた。もろみ日数21日目の製成酒の一般成分を表2に、有機酸組成を表3に示す。

変異株5-8及び6-1は親株にくらべてポーメの切れがよい傾向にあった。酸度、アミノ酸度ともに変異株と親株にはほとんど差がみられない一方で、上槽時のメチレンブルー染色率は変異株が約5%、親株が15%であり生存率は明らかに変異株の方が高かった。有機酸組成は6-1に関してはリンゴ酸が若干高い値を示した。

表1 変異酵母の高濃度エタノール下生存率

| 菌株 | 生存菌数 (cells/ml) |
|--------|--------------------|
| 1 - 1 | 57 |
| 1 - 8 | 0 |
| 1 - 10 | 0 |
| 2 - 8 | 0 |
| 2 - 9 | 0 |
| 4 - 4 | 32 |
| 4 - 5 | 3 |
| 4 - 6 | 70 |
| 4 - 8 | 17 |
| 4 - 10 | 10 |
| 5 - 8 | 2.4×10^2 |
| 6 - 1 | 1.0×10^4 |
| 6 - 3 | 8 |
| 7 - 2 | 5 |
| 7 - 4 | 1 |
| 7 - 5 | 0 |
| 7 - 8 | 6 |
| K701 | 4 |

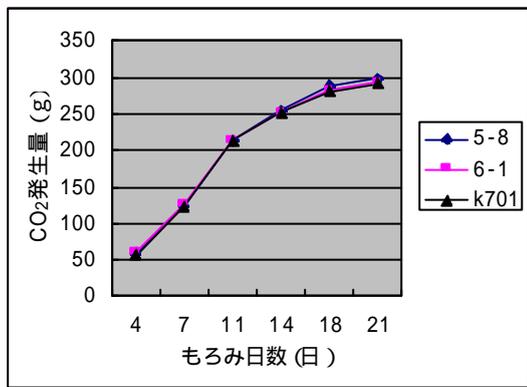


図2 小仕込み試験でのCO₂発生量

4 考 察

エタノール耐性に関しては、前述したようにいくつかの変異株が取得され、性質が検討されている。しかしながら、メカニズムについては未だ不明な部分も多い。今回、孢子形成培地による窒素飢餓状態での選択と20%アルコールを含む培地による選抜で図1に示したように効率的なアルコール耐性変異株の取得が可能であった。小仕込み試験の結果は実際のもろみ中でのエタノール耐性を示唆するものであり、分離した耐性株は長期発酵を要する製造や、あるいは発酵経過が急速で酵母の死滅が生じたもろみの救済にも使用できるものと思われる。

従来のエタノール耐性酵母についてはいくつかの特徴が報告されている。1つには細胞壁溶解酵素 Zymolyase に対する感受性の変化である。協会11号酵母に関して⁷⁾あるいは朝田らの報告³⁾でも Zymolyase に耐性を示し難溶になると報告されている。今回取得した変異株については、まだ実験を行っていないので同様であるかはわからない。しかし、既知の変異株の特徴としては、アルコール耐性による菌体の死滅が少ないのでアミノ酸度は低くなるものの、酸度が高くなる傾向が報告されている。

表2 小仕込み試験の醸成酒一般分析

| 菌株 | 日本酒度 | 酸度 (ml) | アミノ酸度 (ml) | アルコール (%) | CO ₂ 発生 (g) | MB染色率 (%) |
|-----|------|------------|---------------|--------------|---------------------------|--------------|
| 5-8 | -5 | 2.9 | 2.5 | 18.0 | 300 | 5.6 |
| 6-1 | -8 | 3.0 | 2.7 | 19.3 | 293 | 5.1 |
| 701 | -10 | 2.7 | 2.5 | 19.0 | 292 | 15.6 |

表3 醸成酒の有機酸組成

| 菌株 | 有機酸 (ppm) | | | |
|------|-----------|----|------|------|
| | 乳酸 | 酢酸 | リンゴ酸 | コハク酸 |
| 5-8 | 490 | 57 | 567 | 643 |
| 6-1 | 604 | 77 | 682 | 783 |
| K701 | 559 | 62 | 535 | 720 |

それは、主にリンゴ酸、コハク酸の増大によるものであるといわれており⁸⁾、ともに協会7号酵母の2倍程度まで増大する。リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH2) 活性の増大も報告されている⁹⁾。今回の取得株では酸度の増大も顕著ではなく、リンゴ酸、コハク酸が大幅には増加していない。これらのことから、既知のものとは異なるメカニズムによるものであることも推察される。協会11号酵母や秋田らの報告したアルコール耐性酵母はK1キレートキシン耐性が報告されており^{2,10)}、今回取得した変異酵母も耐性を示すかを検討する必要がある。また、一般にアルコール耐性酵母はヒートショックタンパク質などストレス耐性に関与する遺伝子群が恒常的に発現しているといわれており、中には菌体内にグリセロールを70%も蓄積しているものも報告されている⁹⁾。一方、伊野本らの報告⁴⁾によれば Zymolyase に耐性を示さないアルコール耐性酵母も取得可能であり、酸度はむしろ低くなるともいわれている。

今回、取得した2株の変異株がどのような変異により、エタノール耐性を獲得しているのかを検討し、既知の変異株とは異なることが証明できれば岩手県の遺伝子源として貴重であると考えられる。また、今回は1kgの小仕込み試験の結果であるので、今後スケールアップをした場合の醸造特性の追試も必要であると思われる。

5 結 語

協会701号酵母を親株とし、高濃度のエタノール存在下で増殖可能であり、耐性を示す清酒酵母の効率的な取得を実施し、醸造特性について検討した。

- 1) 孢子形成培地で生育良好なものを、高濃度エタノールを含む平板培地で選択することにより、効率的なエタノール耐性株の取得が可能であった。
- 2) 得られた耐性株のうち20%エタノール存在下での生存率が親株の100倍以上である変異株が2株(5-8、

6-1) 取得できた。

3) 5-8及び6-1を用いて小仕込み試験を実施した結果、発酵経過は特に差がないものの、もろみ後半での酵母の生存率が親株より高く、ポーメの切れも良い傾向が見られた。製成酒は一般分析値に大きな差異はみられなかった。

なお、本研究は中小企業庁地域活性化連携促進事業費補助金の一環として実施されたものである。

文 献

- 1) 原 昌道, 佐々木雅春, 小幡孝之, 野白喜久雄 : 醸協, 71, 301 (1976)
- 2) 秋田 修, 渡辺隆幸, 蓮尾徹夫, 小幡孝之, 原 昌道 : 発酵工学, 68, 95 (1990)
- 3) 朝田朝子, 内山博文, 今村武司 : 生物工学, 78, 77 (2000)
- 4) 伊野本真彦, 山田 修, 五味勝也, 飯村 穰 : 醸協, 93, 224 (1998)
- 5) 日本醸造協会 : 第4回改訂国税庁所定分析法注解
- 6) 難波幸之祐, 小幡孝之, 萱島 進, 山崎与四郎, 村上光彦, 下田高久 : 醸協, 73, 295 (1978)
- 7) 原 昌道, 溝口晴彦, 小幡孝之, 飯村 穰, 戸塚 昭, 野白喜久雄 : 醸協, 73, 408 (1978)
- 8) 原 昌道, 小幡孝之, 佐藤俊一, 壺阪興一郎, 下田高久, 野白喜久雄 : 醸協, 72, 610 (1977)
- 9) 下飯 仁 : 日本農芸化学会講演要旨集, 74, p.485 (2000)
- 10) 原 昌道, 山本徳雄, 深田雄一, 小幡孝之, 野白喜久雄 : 醸協, 71, 564 (1976)