

耐塩性酵母の生理的性質

畑山 誠**、中山 繁喜**、桜井 廣**

培養酵母を添加していない味噌、醤油諸味から分離した蔵付き耐塩性酵母の生理的性質を調べた。この中から醸造に利用できそうな菌株として、主発酵酵母4株、後熟酵母1株を取得した。これらの酵母は、生育pH、生育温度、エタノール耐性の適性域が異なるため、様々な発酵環境で使い分けが出来る可能性を持つことが分かった。

キーワード：耐塩性酵母、生理的性質

Physiological properties of Salt Tolerant Yeasts

HATAKEYAMA Makoto, NAKAYAMA Shigeki and SAKURAI Hiroshi

The physiological properties of warehouse salt tolerant yeasts was examined, which were isolated from Miso and Shoyu mash with no addition of cultivated yeasts. Four strains of *Zygosaccharomyces rouxii* and 1 strain of *Candida* genus seemed to be available for brewing Miso and Shoyu. Because of their variety in optimum pH, temperature and ethanol concentration for growth, they supposed to be used in Miso and Shoyu making in the various fermentation environment.

key words : salt tolerant yeast , physiological properties

1 緒 言

味噌、醤油の製造において、発酵をコントロールし高品質な製品を製造することを目的として培養酵母を添加することが広く行われている。また、これに関する報告や解説も多い^{1)~7)}。

味噌、醤油の発酵を行う耐塩性酵母には主発酵酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) と後熟酵母 (*Candida versatilis*、*Candida etchellsii*) がある。センター保有耐塩性酵母の生理的性質の研究については前報⁸⁾で報告した。本研究では、培養酵母の添加を行っていない味噌、醤油諸味から分離した耐塩性酵母の生理的性質 (生育pH、生育温度、耐エタノール性、香気) について調べた。

2 実験方法

2-1 酵母の分離、分別

県内外から収集した味噌、醤油諸味から耐塩性酵母分離用グルコース平板培地 (表1の基本培地に2%寒天を加えたもの) を用いて酵母の分離を行った。

主発酵酵母 (以降、Z酵母) と後熟酵母 (以降、C酵母) の分別は、分別用培地 (表2) でKNO₃の資化性を調べることで行った⁹⁾。分離分別を行ったZ酵母28菌株、C酵母2菌株を試験に供試した。対照としてセンター保有のZ酵母RS-1とC酵母KT-3を用いた。

2-2 基本となる培地組成

本実験には、表1の培地を高食塩 (18%≒3M) 含有基本培地として使用した。pH調整はマッキルベン緩衝液で行い、基本pHを5.0とした。

表1 基本培地組成

組成物	含量 (%)
かびミノ酸	1
酵母エキス	0.2
KH ₂ PO ₄	0.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
グルコース	5
NaCl	18

* 地域に適合する耐塩性酵母の開発に関する研究 (第2報) (基盤的・先導的技術研究推進事業)

** 醸造技術部

表2 分別培地組成

組成物	含量(%)
Yeast Carbon Base (DIFCO)	1.17
KNO ₃	0.078
NaCl	18.0
寒天	2.0

2-3 酵母の前培養

表1の培地を5mlづつL字試験管に分注し、殺菌した。これに酵母を1白金耳植菌し、よく攪拌した後、30℃で2日間振とう培養したものを前培養物とした。

2-4 生育pH試験

培地として、マッキルベン緩衝液で基本培地のpHを3.5~6.5に0.5刻みで調整したものを用意した。

各培地を10mlづつ試験管に分注し、殺菌した。これに、よく攪拌した前培養物0.1mlを注入植菌し、よく攪拌した後、28℃で1週間静置培養した。

この培養物をよく攪拌した後、(株)島津製作所製分光光度計UV-1200を用いて、波長660nmで吸光度を測定し、酵母の生育度とした。

2-5 生育温度試験

培地は基本培地を使用した。酵母の培養温度を15~35℃に5℃刻みで設定した。酵母の培養と生育度測定は、生育pH試験と同様に行った。最も生育度の高かった温度を生育最適温度とした。

2-6 耐エタノール性試験

培地として、滅菌後の基本培地にエタノールを加え、エタノール含量を0、1、2、3、4%に調整したものを用意した。酵母の培養と生育度測定は、生育pH試験と同様に行った。

2-7 発酵香気試験

培地として、仕込み約1ヶ月後の醤油諸味ろ液を使用し、表3の諸味ろ液培地を調製した。

この培地を50mlづつ三角フラスコに分注し、殺菌した。これに、よく攪拌した前培養物1.5mlを注入植菌し、30℃、100rpmで18日間緩やかに振とう培養を行った。

この培養物の香りの好ましさについて5人のパネラーで官能評価を行った。点数は、好ましいもの1点、やや好ましいもの2点、普通のもの3点、やや嫌いなもの4点、嫌いなもの5点とした。

表3 諸味ろ液培地の組成

諸味ろ液	50%
グルコース	5%
食塩	10%

(pH5.0に調整)

3 実験結果

3-1 生育pH試験

今井¹⁰⁾によるとNaCl 3M存在下でのZ酵母の生育pHは、pH3.5~6.5の広いpH範囲に生育するAグループ、pH3.5~5.5までに生育するBグループ、pH4.0~5.0という狭いpH範囲にしか生育できないCグループの3グループに分類されると言う。

本試験の結果は表4の通りであり、収集酵母はAグループとBグループに分けられ、Cグループに該当する菌株はなかった。ただし生育pHの上限が6.0の菌株、5.5の菌株と5.0の菌株の3つに分かれた。

表4 耐塩性酵母の生育pH

グループ	A	B			C
		pH6.0	pH5.5	pH5.0	
Z酵母	O-4	O-7	O-1	M009	なし
	O-5	O-9	O-2	M010	
	O-6	O-10	O-3	RS-1	
	O-11	M-4	O-8		
	O-12	M-5	M-6		
	F-1		M004		
	F-2		M008		
	F-3				
	M-2				
	M001				
	M003				
	M005				
	M006				
	M007				
C酵母	M-1				
	M-3				
	KT-1				

3-2 生育温度試験

収集酵母の生育最適温度は表5の通りである。通常、酵母の生育適温は25~30℃位と考えられているが、20~35℃位まで同程度の生育を示した酵母もあった。しかし、すべての酵母で15℃以下の温度帯では生育が鈍かった。また後熟酵母は25~35℃と高めの生育適温を示した。

表5 耐塩性酵母の生育最適温度(℃)

最適温度	20-35	20-30	25-30	25-35	
Z酵母	O-1	O-2	O-4	O-11	
	O-9	O-3	O-5	O-12	
	O-10	O-7	O-6	M-2	
	M-4	O-8	F-1	M006	
	M-5	M003	F-2	M007	
	M-6	M004	F-3		
	M001		M010		
	M005				
	M008				
	M009				
	RS-1				
	C酵母				M-1
					M-3
					KT-3

3-3 エタノール耐性

それぞれの酵母の生育できる上限のエタノール濃度を表6に示す。収集酵母は、エタノール濃度3%あるいは4%まで生育できる酵母が多かった。

表6 耐塩性酵母のエタノール耐性

アルコール	1%	2%	3%	4%
Z酵母	O-4 O-5 O-6	M-2 M010 RS-1	O-2 O-3 O-7 O-8 O-9 M003 M006 M007 M008 M009	O-1, O-10 O-11, O-12 F-1, F-2 F-3 M-4 M-5 M-6 M001 M004 M005
C酵母			M-1 M-3 KT-3	

3-4 発酵香

収集耐塩性酵母の発酵香の好ましさの平均点を表7にまとめた。この中で一番評価の高かった株は、主発酵酵母では対照株RS-1であった。これにやや並ぶ菌株として、M-5、M005、M008、M010が挙げられた。後熟酵母では、M-1が対照株KT-3より香りが良く、対照株より穏やかな香りと評価された。

表7 耐塩性酵母の発酵香の好ましさ(平均点)

	Na	点数	Na	点数
Z酵母	O-1	3.8	M-2	3.0
	O-2	3.2	M-4	3.6
	O-3	3.4	M-5	2.2
	O-4	3.6	M-6	3.8
	O-5	4.2	M001	2.8
	O-6	3.8	M003	3.6
	O-7	3.2	M004	4.0
	O-8	3.0	M005	2.4
	O-9	3.4	M006	2.6
	O-10	2.8	M007	2.8
	O-11	3.0	M008	2.4
	O-12	3.4	M009	4.0
		F-1	2.8	M010
	F-2	3.0	RS-1	2.0
	F-3	2.6		
C酵母	M-1	2.4	KT-3	2.6
	M-3	3.6		

4 考察

収集酵母の生育 pH 範囲が、pH3.5 ~ 6.5 の広い株 (Aグループ) と生育 pH 上限が少し低い株 (Bグループ) が半々あった。味噌醤油醸造への利用という点から考えると、耐塩性乳酸菌の増殖が旺盛で製品酸度が高くなる傾向のある製造場にはAグループの株が適する。また乳酸発酵が低調な場合はBグループの株の方が適当と

考えられる。

生育温度範囲は、大きく4グループに分かれた。生育温度範囲が広い (20-35 °C) 株を使用すれば発酵熟成は早いと思われる。しかし麹の酵素による原料成分の分解とバランスが取れなければ製品での香味のバランスが崩れる可能性もあるので、発酵熟成と酵母の生育温度範囲の関係については更に検討が必要と考える。

エタノール耐性では、4%のエタノールが存在しても生育できる酵母が13株あった。これら収集酵母は、前報⁹⁾のセンター保有酵母と比較すると総じて生育適応範囲が広い傾向にある。

発酵香は、主発酵酵母では対照より良いと判断された株はなかった。これにやや並ぶ菌株として、M-5、M005、M008、M010が挙げられた。これらの酵母は、生育pH、生育温度、エタノール耐性の適性域が様々であるため、製造場の環境条件によって使い分けができると思われる。後熟酵母ではM-1が対照株よりやや良い香りだと判断された。香りの強さが対照株より弱いので、おだやかな後熟の発酵香が欲しい場合には有用な株と考える。

5 結 語

本研究では、県内外から収集した耐塩性酵母について生理的性質の比較を行った。収集酵母の生育pH、生育温度、エタノール耐性の適応範囲は様々であるが、センター保有酵母と比較すると総じて生育適応範囲が広い傾向にある。発酵香は、主発酵酵母では対照とやや並ぶ菌株として、4株 (M-5、M005、M008、M010) が挙げられた。これらの菌株は様々な生育適性を持つので、醸造環境の違いにより使い分けができる可能性がある。また後熟酵母ではM-1が対照株よりやや良い香りで、おだやかな後熟の発酵香が欲しい場合には有用な株である。しかし大半の酵母は好ましくない香気をもつため、培養酵母無添加での味噌、醤油の醸造は、製品の品質上問題がある場合が多い。

文 献

- 1) 相羽富夫: 醬研, 1, 157 (1975)
- 2) 清水 毅, 木村延二郎: 醬研, 4, 171 (1978)
- 3) 奥沢洋平, 板倉 徹, 江口卯三夫: 醬研, 8, 21 (1982)
- 4) 野田義治, 井上 等, 楠田秀喜, 大場和徳, 中野正路: 醬研, 8, 108 (1982)
- 5) 小泉幸道, 羽島久志, 柳田藤治, 伊藤明徳, 山口元之: 醸協, 76, 206 (1981)
- 6) 今井誠一: 味噌の科学と技術, 32, 206 (1984)
- 7) 今井誠一: 味噌の科学と技術, 35, 334 (1987)
- 8) 畑山 誠, 中山繁喜, 櫻井 廣: 岩手県工業技術センター研究報告, 4, 109 (1997)
- 9) 山里一英ら編著: 微生物の分離方法 p.294 R & D プランニング (1986)
- 10) 今井誠一: 新潟県食品研究所報告・特別号 (1984)