

耐塩性酵母の簡易培養法

畑山 誠*、中山 繁喜*、桜井 廣*

酵母の培養装置を持たない中小の味噌醤油工場で行える2種類の耐塩性酵母の簡易な大量培養法を確立した。生醤油10%、グルコース5%、食塩10%という同一組成の培地と簡単な装置で通気培養することにより、これらの耐塩性酵母の培養が可能となった。

キーワード：耐塩性酵母、大量培養

Easy Culture Method of Salt Tolerant Yeast

HATAKEYAMA Makoto、NAKAYAMA Shigeki、SAKURAI Hiroshi

An easy mass culture method of two salt tolerant yeasts was established for the minor Miso and Shoyu factories where special fermentor for yeast was not equipped. Two salt tolerant yeasts could be cultured by aeration using easy equipments and the same medium that contains Raw Shoyu (without heating) 10%(v/v), Glucose 5%(w/v) and Salt 10%(w/v).

key words : salt tolerant yeast , mass culture method

1 緒言

近年、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行われており、これに関する報告や解説も多い^{1)~7)}。すなわち家付き酵母による蔵癖を修正し諸味の発酵を健全にすること、さらに積極的に熟成期間を短くする試み⁸⁾などが行われている。

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。一般にこれらの酵母を工場で使用するには専用設備で培養するか専門業者から購入する必要があるが、高価である。主発酵酵母の大量培養法については比較的簡易な装置として甘酒製造用タンクの改良したものを流用した報告⁹⁾があるが、この設備は県内企業にはなく、どこでも行える方法ではない。また今井は耐塩性酵母の大量培養のための最適培地は生醤油、グルコース、食塩からなり、主発酵酵母と後熟酵母では生醤油の濃度が異なると報告している¹⁰⁾。

本研究では簡単に入手できるもので培養装置を組み、作業の煩雑さを避けるために2種の耐塩性酵母とも同一組成の培地を使用して、県内中小企業の工場現場ででき

る簡易な培養法を確立した。

2 実験方法

2-1 供試菌株

当センター保有の *Z.rouxii* RS-1 (以後、Z酵母と略す)、*C.versatilis* KT-2 (以後、C酵母と略す) を供試した。

2-2 培地組成の検討

生醤油、グルコース、食塩から成る培地を選択し、耐塩性酵母の増殖に最適な培地組成について検討した。

表1の組成の培地を調製し、各5mlずつL字試験管に分注し、滅菌した。これに 1×10^5 個/mlとなるようにZ酵母またはC酵母を植菌した。これを30℃、120rpmで振盪培養し、経時的に酵母の増殖を調べた。酵母の計数はトーマ氏血球計を用いて行った。

2-3 培地の殺菌条件

大量培養培地の殺菌は二重釜を使い、煮沸で行った。沸騰開始から30分後まで経時的に培地をサンプリングし、煮沸時間と残存細菌数の関係について検討した。

* 醸造技術部

表1 培地組成 (%)

No	生醤油 (v/v)	グルコース (w/v)	食塩 (w/v)
1	5	2.5	1.0
2	5	5	1.0
3	5	1.0	1.0
4	1.0	2.5	1.0
5	1.0	5	1.0
6	1.0	1.0	1.0
7	2.0	2.5	1.0
8	2.0	5	1.0

pHはすべて5.0 ± 0.1に調製した。

生醤油 TN(全窒素)=1.79% NaCl=17.4% pH=4.9

2-4 大量培養

培養装置を図1に示した。散気管とシリコンチューブ(内径6mm)は5分間煮沸殺菌した。培養器としてポリエチレン製(20ℓ)あるいはステンレス製タンク(100ℓ)を使用した。これらは殺菌しなかった。また通気配管中に細菌等を捕集するエアフィルターは設けなかった。通気には吐出空気に油の混じらないコンプレッサー(岩城製エアポンプ AP-415A、最大吐出量15ℓ/min、50Hz)を使用し、恒温室中で培地温度を25℃あるいは30℃に保ち培養を行った。また培地には消泡剤としてシリコーン(信越化学工業製信越シリコーンKS66)0.005%を加えた。

酵母の計数はトーマ氏血球計を用いて行った。

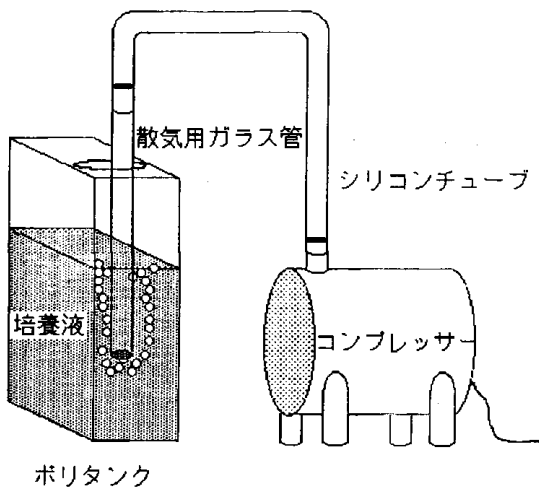


図1. 耐塩性酵母の簡易大量培養装置

2-5 培養酵母の保存性と細菌汚染

培養終了後、本培養液を10℃環境下で保存し、酵母生菌数および耐塩性細菌数の経時変化について検討した。

2-6 酵母、細菌数の測定

酵母の生菌数は平板塗抹法で調べた。あらかじめ調製した生醤油培地(表2)をシャーレに分注し凝固させた。これに適宜希釈した試料を塗抹し、30℃で静置培養し生育したコロニー数を計数した。

細菌の生菌数は混釈培養法で調べた。適宜希釈した試料と寒天培地を混和凝固し、これを30℃で静置培養して生育コロニー数を計数した。寒天培地は一般細菌については標準寒天培地を使用し、耐塩性細菌については食塩を10%加えた標準寒天培地を使用した。また培養液の耐塩性細菌の経時変化の検討では、酵母の生育を阻止するカビサイジン(0.02%)を加えた生醤油培地を使用した。

表2 生醤油培地の組成

生醤油	20%
グルコース	5%
食塩	10%
寒天	2%

(pH5.0に調製)

3 実験結果

3-1 培地組成

組成の異なる培地(表1、No1~8)による酵母増殖の差を図2および図3に示した。Z酵母では生醤油、グルコースともに10%の培地(No6)で一番酵母の増殖が早かった。C酵母では生醤油10%、グルコース5%(No5)以上の培地で酵母が10⁶個/mlのオーダーまで増殖した。

3-2 培地殺菌条件

培地の煮沸時間と細菌数の関係を図4に示した。培地が沸騰し始めてから5分で培地中の細菌はすべて死滅した。この時の培地の温度は沸点上昇により103℃であった。

3-3 大量培養

図1の培養装置を使用し、No5の組成の培地50ℓを調製して、Z酵母およびC酵母の培養を2日間行った。結果を表3に示す。この装置を使った培養では、培養温度25℃および30℃で、Z酵母、C酵母ともに10⁶個/mlのオーダーまで増殖した。

この実験では培地を適温に保つために恒温室を使用した。が、冬季に室温7℃前後の部屋で市販の電気毛布をボ

耐塩性酵母の簡易培養法

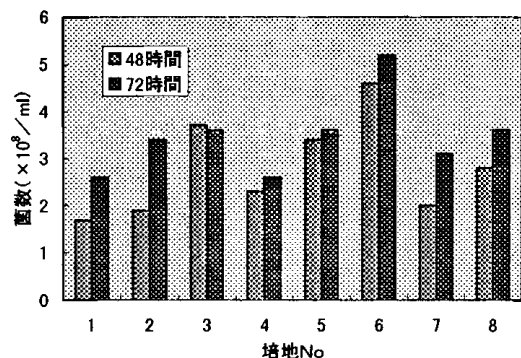


図2. 培地と主発酵酵母(Z酵母)の生育

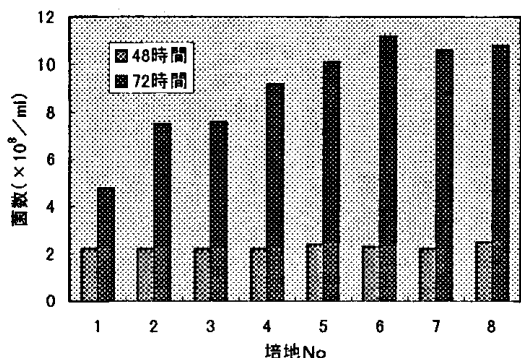


図3. 培地と後熟酵母(C酵母)の生育

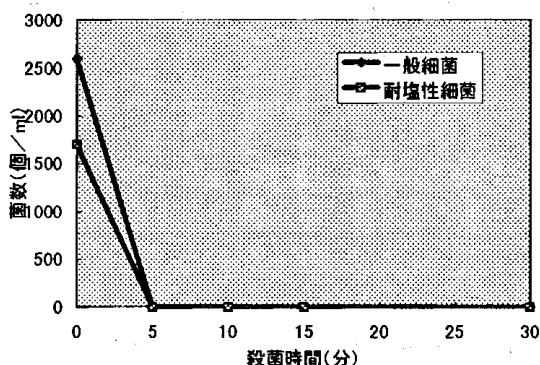


図4. 殺菌時間と細菌数

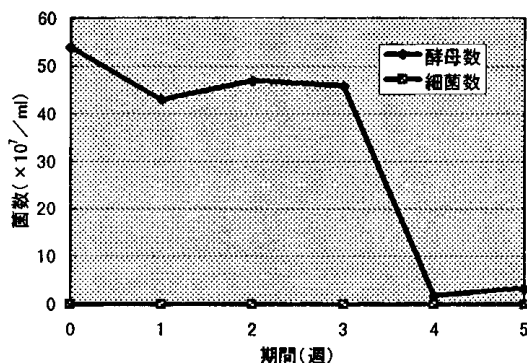


図5. 後熟酵母の保存性と汚染細菌の増殖

リエチレン製タンクの周りに巻いて培地温度を 25℃ に保ち、培養を試みた。この結果、Z酵母、C酵母ともに酵母数は 3.5×10^8 / ml まで増殖した。

表3 大量培養における酵母の生育

酵母	培養温度 (°C)	菌数 ($\times 10^8$ / ml)
Z酵母	25	3.0
〃	30	4.3
C酵母	25	4.0
〃	30	6.4

初発酵母数 1×10^6 個 / ml

50 l 培地に対し通気量 15 l / 分、2日間培養

3-4 培養酵母の保存性と細菌汚染

C酵母の培養終了後、培養液を 10℃ で保存した時の経時的な生菌数の減少と耐塩性細菌の増殖の結果を図5に示す。3週間目までは酵母生菌数が 10^8 個 / ml 台であったが、4週間目には約 10 分の 1 まで減少した。耐塩性細菌の増殖は5週間目まで全く見られなかった。

4 考察

4-1 培地組成の選択

味噌醤油の発酵を行う場合、一般的に初発菌数が 10^5 個 / g 以上であれば良いとされている。これから計算すると酵母濃度が 10^8 個 / g の培養液を 10 ~ 100 l 調製すれば、10 ~ 100 t の味噌醤油の製造が可能であり、県下業者の生産規模に対応できると考えられる。そこで培地組成の選択基準の最低ラインを両酵母ともに 1 ml あたり 10^8 個以上に増殖するものとした。これに照らすと図2および3から全ての組成が基準をクリアしている。

またZ酵母はグルコース量が多い培地で早く増殖したが、生醤油 10% 培地の方が 20% 培地よりも増殖が早かった(図2)。C酵母は生醤油、グルコースともに多い培地の方がよく増殖した(図3)。これらの結果は今井の報告¹⁰⁾と一致する。さらにグルコース 10% の培地では培養終了後、培養物を室温で静置しておいたところ継続的な泡の発生が観察され、これは培地に残存する糖の発酵に起因するものと推測された。培養終了後はすぐに製造工程で使用されることから、これでは残糖量が多い。酵母培養の最適培地はそれぞれの酵母で異なるが(生醤油濃度 Z酵母用 10%、C酵母用 20%)、工場現場での調製という点から培地組成は同じものとした方が簡便と

思われる。

そこで以上のことから2種類の酵母培養に共通の培地組成としてNo 5 (生醤油10%、グルコース5%、食塩10%)を選択した。

4-2 培地の殺菌条件

培地の殺菌には通常、高圧蒸気滅菌器を用いるが、その設備のない工場もあるので本研究では簡単な煮沸殺菌の条件について検討した。

その結果、培地殺菌のための煮沸時間は5分で十分であった。実際はさらに短い時間で殺菌が完了している可能性もあるが、沸騰開始の見極めが難しいことと現場での作業を考え、煮沸時間は5分に設定した。

4-3 培養酵母の保存と細菌汚染

酵母は10℃環境下では3週間から4週間目にかけて生菌数が減少した。耐塩性細菌の増殖は5週間目まで全く見られなかった。従って酵母の培養中に耐塩性細菌の混入はなかったと言える。

4-4 培養法の適否

No 5の培地を使用し、培養温度25℃および30℃、2日間の通気培養でZ酵母、C酵母ともに $3\sim 6 \times 10^6$ 個/mlまで増殖した。試験管を使用した振盪培養ではC酵母は 10^9 個/ml台まで増殖したが、攪拌を伴わない本装置の培養では 10^8 個/ml台が限界であった。しかし1mlあたり 10^8 個以上に酵母が増殖すれば工場生産規模に対応可能という基準は満たしている。また細菌の増殖も見られない。

これらのことより本研究の培養法は工場における簡易的な酵母の培養法として適当であると判断した。

5 結 語

本研究では生醤油10%、グルコース5%、食塩10%という組成の培地を使用し、簡易な装置で2種の耐塩性酵母を通気培養する方法を確立した。県内の味噌、醤油工場で恒温室を設置しているところはないと思われるので、培地の保温には火災の危険の少ない電気毛布を培養器に巻く方法がよいと思われる。

またこの培養法は無菌環境下で行うものではないため、いろいろな細菌の汚染が起こりうる。しかしこの培地には食塩が10%含まれており、一般の微生物が増殖しにくい培地である。本試験では耐塩性細菌による汚染は見られなかった。しかし味噌、醤油工場には耐塩性細菌が多く存在するので培養液が汚染される可能性は高い。そこで細菌汚染また酵母の活性の点から酵母の培養液を長期保存するのは避け、培養後すぐに使用することが望ましい。

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) 小澤一広、赤池嘉彦、佐々木勝史、村松恵津子：醬研,21,197(1995)
- 9) 安藤 武、山下 恵、竹田良作：香川県発酵食品試報,76,1(1983)
- 10) 今井誠一：新潟県食品研究所報告・特別号 (1984)