

【研究論文】

【令和4～6年度 県単独試験研究】

吟醸用宮城酵母泡無し株の取得 ー 県産清酒多様化のための酵母開発 ー

池田 匠、今野 知佐子、小山 誠司
食品バイオ技術部

吟醸用宮城酵母(通称“A酵母”)は、宮城県酒造組合が県内の酒蔵から分離した酵母菌株であり、県内でもよく利用されている酵母の一つである。宮城県では、培養微生物配布規程により当該株を有償配布しているが、従来型の高泡形成する「泡あり酵母」であり、その泡無し化が求められてきた。本研究において本株の泡無し化を目指し手法の検討を進めていたところ、目的とする泡無し株を取得する手法を確立したので報告する。

キーワード：吟醸用宮城酵母、泡無し化、酸性 SE 法

1 緒言

従来、清酒製造に使用されている酵母はもろみや酒母中でかさ高い泡(高泡)を形成することが知られていたが、1970 年代に大内らの整理したいわゆる「泡無し」変異株の分離手法¹⁾²⁾により、国税庁醸造研究所(現・独立行政法人酒類総合研究所)や日本醸造協会、公設試等で盛んに「泡無し株」の取得・実用化が行われ、現在ではほとんどの清酒醸造が「泡無し株」によって行われるようになってきた。

もろみの泡については、かつては正常な発酵が行われていることの指標とされ、「筋泡」「水泡」「岩泡」「高泡」「落泡」「玉泡」「地」などといった発酵段階を泡の形状で判断できた他、泡無しのもろみは腐造など異常発酵の前兆現象を示すものとして恐れられていた³⁾⁴⁾。一方で高泡のもろみは発酵槽の使用効率を低下させ、泡消しなどの余分な操作や、槽の縁をかさ上げする「泡笠」等の取り付け、あるいは泡消しのための装置を必要とするものであった。今日では微生物学的、醸造学的な知見も蓄積され、製造技術者の経験、勘に頼るだけでなくもろみの成分分析等を行って科学的にもろみの状態を判断するのが一般的となっており、発酵管理上、泡の必要性は薄れてきていた。

吟醸用宮城酵母は宮城県酒造組合が県内の酒造場から分離し、当センターで保存・管理している実用菌株である。県内各酒造場へ広く普及しているが、従来型の高泡形成する「泡あり酵母」であったため、高泡を形成しない「泡なし酵母」の開発が求められてきた。2000年前後に取得は試みられたが達成できず、その開発は中

断を余儀なくされていた。そこで本研究では、吟醸用宮城酵母からの泡なし変異株の分離方法を検討した。

2 酵母菌株、試薬及び方法

2.1 試験材料、調製等

酵母菌株は当センターが保存している株を用いた。ポテトデキストロース寒天培地(以下、PDA 培地)、酵母エキス、ペプトンは日本ベクトン・ディッキンソン株式会社のものを、その他の試薬については富士フィルム和光純薬株式会社から試薬特級またはそれに準ずるものを使用した。ショ糖脂肪酸エステル(以下、SE)については三菱ケミカル株式会社のリョートー®シュガーエステル P-1570 を使用した。麹エキス培地については既報に準じて調製したものを使用した。水、調製した培地及び水溶液は、121℃、20 分間加熱蒸気滅菌し使用した。SE 水溶液についてはアドバンテック東洋株式会社の孔径 0.2 μm 滅菌済み DISMIC-25CS にてろ過滅菌し使用した。珪藻土については Celite Corporation のセライト®No.545(以下、セライト)を用い、180℃、3 時間乾熱滅菌して使用した。

2.2 泡無し酵母の取得

吟醸用宮城酵母 MY95 株を親株とし、以下の手法を用いて「泡無し」形質となる自然変異株の判別及び取得を試みた。

2.2.1 有機溶媒による簡易判別

布川らの方法⁵⁾及び渡部らの方法⁶⁾に準拠した。菌株を YPD 培地(1% 酵母エキス / 2% ペプトン / 2% グルコース) 3 mL に植菌し 20℃、2 日間培養後、3,200 rpm、5 分間遠心し集菌した。直ちに上清を捨て水で 2 回洗浄し、その洗浄菌体に水を加えて懸濁した。この懸濁液を分取し任意の有機溶媒を同量加えてよく攪拌後、約 20 分間放置し水層と有機溶媒層を十分に分離させ、各菌株が水層に残存するか確認した。

2.2.2 有機溶媒分配法

2.2.1 に従って菌懸濁液に任意の有機溶媒を加えて攪拌後、約 20 分間放置し水層を分取、これに 3 mL の YPD 培地を加え 20℃、2 日間培養した。この操作を数回繰り返した後、約 1,000 cells/mL になるように水で希釈し、0.1 mL を PDA 培地に播種した。20℃、3 日間培養後、出現したコロニーを釣菌した。

2.2.3 セライト吸着法

大内らの方法²⁾に準拠した。菌株を麹エキス培地 5 mL に植菌し 20℃、2 日間培養後、3,000 rpm、10 分間遠心し集菌した。直ちに上清を捨て水で 2 回洗浄し、その洗浄菌体に pH3.0 クエン酸溶液(0.06 g/100 mL)を 5 mL 添加し攪拌した。これにセライト 50 mg を添加し 1 分間攪拌した後、約 30 分間放置した。その後 1,000 rpm、5 分間遠心して上清を分取し、分取した液をさらに 3,000 rpm、15 分間遠心して上清を捨て、水 0.5 mL を加えて菌体をよく懸濁させた。この懸濁液に 5 mL の麹エキス培地を加えて上記の操作を複数回繰り返した後、約 1,000 cells/mL になるように水で希釈し、0.1 mL を PDA 培地に播種した。20℃、3 日間培養後、出現したコロニーを釣菌した。

2.2.4 SE 凝集法

大内らの方法²⁾を参考に行った。YPD 培地 3 mL に植菌し、20℃で 2 日間培養した後、SE 溶液を添加して 1 分間攪拌した。1,000 rpm、5 分間遠心して上清を分取し、さらにその上清を 3,200 rpm、5 分間遠心し菌体を回収した。2 回水で洗浄して懸濁し、全量を YPD 培地 3 mL に加えた。この操作を複数回行い、得られた酵母が 1,000 cells/mL になるように希釈し、

PDA 培地に 0.1 mL 播種した。20℃、3 日間培養し、出現したコロニーを釣菌した。

2.2.5 酸性 SE 法

大内らの方法²⁾を参考に行った。YPD 培地 3 mL に植菌し、20℃で 2 日間培養した後、3,200 rpm、5 分間遠心し菌体を回収した。水で2回洗浄し、pH 3 クエン酸溶液 3 mL、0.25% SE 溶液 0.3 mLを加え 1 分間攪拌した。その後 1,000 rpm、5 分間遠心を行い生じた凝集を除き、さらに上清を 3,200 rpm、5 分間遠心し菌体を回収した。菌体は水で 2 回洗浄し水 0.5 mL に懸濁して YPD 培地 3 mL に加え、20℃、3 日間培養した。この操作を複数回繰り返した後、約 1,000 cells/mL になるように水で希釈し、0.1 mL を PDA 培地に播種した。20℃、3 日間培養後、出現したコロニーを釣菌した。

3. 結果と考察

「泡あり酵母」吟醸用宮城酵母は、もろみでの泡の体積は若干小さいといわれている。培養液中の当該株を顕微鏡下で観察し気泡吸着性を確認したところ、気泡への吸着は判然とせずあまり見られなかった。2000 年頃行われた予備的な研究で Froth Flotation 法⁷⁾を行い泡無し化を試みたが泡無し株は得られず(データ示さず)、気泡吸着性が弱い泡あり株から如何にして泡無し酵母を得るかが課題として残されていた。

3.1 有機溶媒を用いた泡無し化の簡易判別

各種有機溶媒を用い、既存の泡あり／泡無し酵母が分配可能か 2.2.1.に従い確認した。きょうかい酵母®(以下、K) 6 号、K601 号、K7 号、K701 号、K9 号、K901 号、宮城マイ酵母及びその泡無し株をそれぞれ培養し、2.2.1 に従い分配したところヘキサンは K6 号／K601 号の判別が、1-ブタノールは K9 号／K901 号の判別が困難であった。ベンゼンでは、使用した全ての泡あり株が有機溶媒層に移行し、泡無し株が水層に残存していたため(図1)、今後の簡易判別法としてベンゼンを用いることとした。

また、吟醸用宮城酵母の菌体懸濁液を O.D.600nm = 0.64 となるよう水で希釈し、懸濁液と各有機溶媒を 1:1 で激しく攪拌して酵母が水層に残存するか、あるいは有機溶媒層に移行するか確認したところ、水層への

残存率はベンゼンが 4.1%、ジエチルエーテルが 14.1%、ヘキサンが 35.8% となっていた。そこで、2.2.2 に従いベンゼンまたはジエチルエーテルを用いて泡無し酵母の分離を試みたが、酵母に対する増殖阻害が顕著に表れ、分配－増殖のサイクルがベンゼンでは 2 回、ジエチルエーテルでは 9 回で増殖が確認できなくなった。水への残存率が比較的高かったヘキサンを使って 2.2.2 に従い水層を分取し、分配－増殖のサイクルを 10 回繰り返したところ、酵母に対する増殖阻害の程度は低かった。しかし PDA 培地上に出現したコロニー約 200 株のうち半数の約 100 株について簡易判別を行った結果、全ての株で有機溶媒層への移行がみられ、この方法では泡無し酵母は得られないことが分かった。

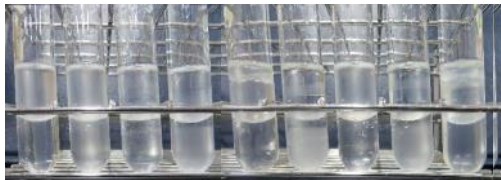


図1 水－ベンゼンの二相分離

左からK6、K601、K7、K701、K9、K901、宮城マイ酵母、宮城マイ酵母泡なし株、吟醸用宮城酵母

3.2 泡無し酵母候補株の分離

3.2.1 セライト吸着法の検討

2.2.3 に従いセライト吸着法を行い、吸着－増殖のサイクルを 10 回繰り返した後培養し、約 1,800 のコロニーを釣菌した。このうち 10 株をランダムに選び 3.1 に従って簡易判別を行ったところ全ての株が有機溶媒層に移行したため、吟醸用宮城酵母の自然変異株(泡無し変異株)の分離には不向きだったと判断した。

3.2.2 SE 凝集法の検討と酸性 SE 法の開発

2.2.4 に従い SE 凝集法で泡無し株の取得を試みた。前年までの研究では、終濃度 0.03% ～ 0.5% まで SE 濃度を変えたところ、0.5% で有望と思われる結果が得られたため(データ示さず)、SE の終濃度を 0.5% とし 10 回凝集－培養のサイクルを繰り返した。PDA 培地に出現した約 1,400 のコロニーを釣菌したが、ランダムに選んだ 10 株について簡易判別を行ったところ全て有機溶媒層に移行し、泡無し候補となる株はなかったため、条件を見直すこととなった。

条件検討のため、K7 号、K701 号及び吟醸用宮城酵母を 20℃、2 日間培養を行って集菌し、SE 濃度と酵母懸濁液の pH を変えて凝集させ、1,000 rpm、5 分間遠心して上清の濁度(O.D.600 nm)を比較した。懸濁液の pH が低下するにつれ、濁度は減少し SE の凝集効果が強く現れるようになってきたが、pH 3 以下では濁度が上昇することが分かった。SE 濃度については、0.02% ～ 0.03% で K7 号、吟醸用宮城酵母と K701 号との濁度の差が pH 3 付近で大きくなった(図2)。よって、pH 3 条件下で SE 凝集法を行うこととし、2.2.5 に従い培養－上清分取の操作を 11 回繰り返して、PDA

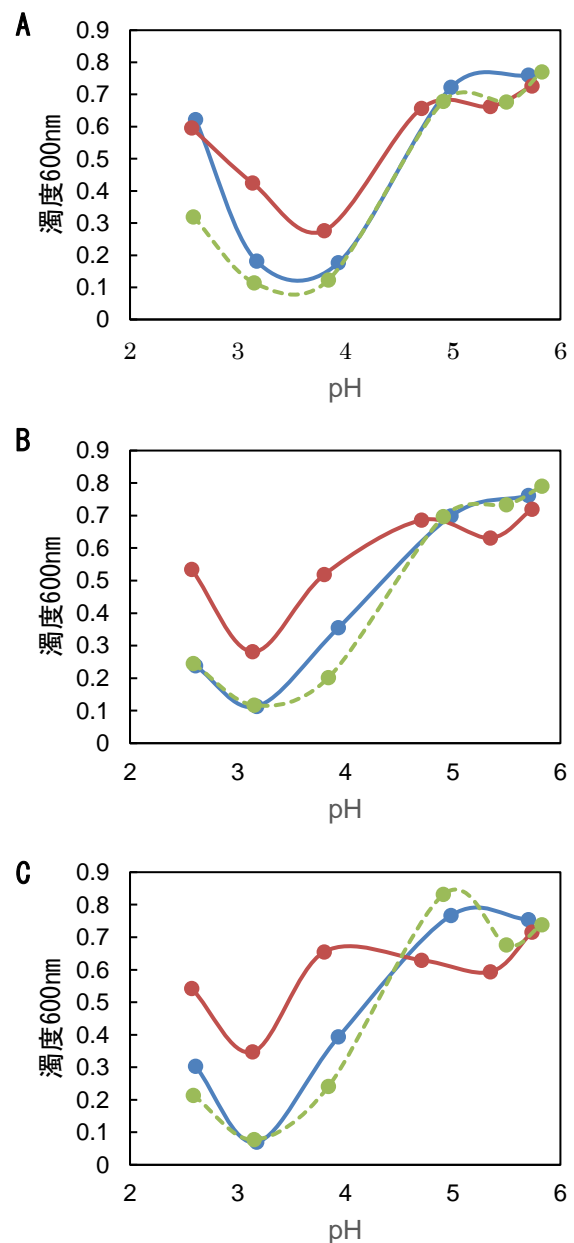


図2 各 pH における SE 処理後の上清の濁度

A: SE 0.01%、B: SE 0.02%、C: SE 0.03%

赤: K701、緑: K7、青: 吟醸用宮城酵母

培地に播種した。生じたコロニー 250 個を釣菌し、そのうち約 20 個をランダムに選んで簡易判別を実施したところ、全ての株が水層に残存し、対照とした宮城マイ酵母泡無し株と同様の挙動を示した。SE 凝集法による判別でも同様の傾向を示しており、本方法により高い確率で泡無し候補株が得られる可能性が示唆された。

4 結言

吟醸用宮城酵母泡無し株取得方法の検討を行った。

- 1) 吟醸用宮城酵母は気泡吸着性が低く、既報により報告されていた Froth flotation 法、セライト吸着法、SE 凝集法、有機溶媒分配法のいずれでも、泡無し株は取得できないことが確認された。
- 2) 新たに開発した酸性 SE 法を実施し、生じたコロニー250個のうちランダムに選んだ20個について、有機溶媒と SE 凝集法による簡易判別を行った。その結果、判別を行ったすべての株が泡無し酵母と判定され、高い確率で泡無し候補株が得られることが示唆された。

参考文献、引用URL

- 1) Kozo Ouchi ,Hiroichi Akiyama.Non-Foaming Mutants of Sake Yeasts Selection by Froth Flotation Method,Agr.Biol.Chem.1971,Vol.35,No.7,p.1024-1032
- 2) 大内弘造,布川弥太郎.清酒酵母泡なし変異株の選択法.日本醸造学会誌.1972,Vol.67,1 号, p.54-57.
- 3) 梅田紀彦,増補改訂酒造講本,財団法人日本醸造協会,新日本印刷株式会社,2011,p.159-161
- 4) 大内弘造.泡なし酵母の歴史.日本醸造協会誌.2010,Vol.105,No.4,p.184-187
- 5) 布川弥太郎,大内弘造.清酒泡なし酵母.化学と生物.1973,Vol.11,No.4,p.216-224
- 6) 渡部貴志,近藤雄一郎,吉野功.発酵力の強い群馬 G1 酵母の泡無し化と高品質清酒の製造.群馬県立産業技術総合センター研究報告.2022,p.56-61