

清酒酵母からの低温増殖性変異株の分離

河 村 大 造

Isolation of Low-Temperature Tolerant, Faster-Growing
Mutants from Sake Yeasts

Daizo KAWAMURA

Five sake yeast strains Hiroshima nos. 2 (H 2), 5 (H 5), 6 (H 6), Kyokai nos. 7 (K 7), and 9 (K 9) mutagenized by ultraviolet light irradiation were screened for mutants having the ability to grow faster at 5°C. Of the mutants isolated, 2 mutants derived from the H 6 had a briefer lag phase of growth at low temperatures; they showed a notable aptitude for fermenting glucose at 10°C, but did not show at 15 to 20°C, as compared with the H 6. In the sake mash at 10 to 15°C, the fermenting ability of the 2 mutants was almost the same as that of the mother strain H 6.

清酒は18°C以下の醸造が必要であり、中でも、吟醸酒の醸造には10°C前後のより低温下での醸酵が必須である。その理由として、近年、次のようなことが明らかになってきた。もろみが低温に保たれることによって、酵母中の香気成分生成に関与する酵素の活性が安定に保たれ^{1) 2)}、もろみ中に生成した香気成分の分解酵素の活性が低く抑えられる²⁾。また、もろみ温度が低いと、酵母による酸生成・アミノ酸生成も抑えられる^{3) 4)}。こうしたことから、低温下で増殖力・醸酵力が強いという性質は吟醸酒用酵母にとって重要な性質の一つであると考えられる。

これまでに、遺伝研究用の一倍体株と実用清酒酵母由来の一倍体株からそれぞれ低温増殖性変異株を分離し、低温増殖性は核性の優性変異遺伝子によることを明らかにした⁵⁾。この変異は優性であるので、二倍体株から、直接、低温増殖性変異株が取得できると考えられる。そこで、吟醸酒醸造に適したより低温増殖力の強い酵母を育種することを目的として、実用清酒酵母から低温増殖性変異株の取得を試みた。

実験方法

1. 菌株

清酒酵母広島2号(H 2)、広島5号(H 5)、広島6号(H 6)、日本醸造協会7号酵母(K 7)、9号酵母(K 9)を用いた。

2. 変異処理

既報⁶⁾と同様にして行った。すなわち、対数増殖期の細胞を滅菌水に懸濁し、シャーレに入れて攪拌しながら、紫外線(15Wの殺菌灯)を30cmの距離から30~120秒間照射した。そのときの生存率は80~35%であった。

3. 低温増殖性の測定

固体培地での場合はYPAD〔酵母エキス(オリエンタル酵母)1%、ペプトン(日本製薬)2%、硫酸アデニン0.04%、グルコース2%〕寒天培地に15°Cで前培養した菌濃度約10⁶/ml酵母培養液(YPAD液体培地)を塗布して5°Cのふ卵器中に静置した。肉眼で観察を続け、低温増殖性を測定した。

液体培地での場合は、YPAD(グルコース濃度2%あるいは20%)液体培地に15°Cで培養した酵母前培養液を本培養液中の接種時菌濃度が1.2×10⁶/ml程度になるように植菌して5°C、10°Cおよび15°Cで静置培養した。培養液を経時に採取して適当に希釀してヘマチトメーターで酵母数を測定した。

4. 酸酵力の測定

酸酵栓を付けた11容エルレンマイヤーフラスコに480mlのYPAD(グルコース濃度20%)液体培地を入れた。この培地に15°Cで静置培養した酵母前培養液を本培養液中の接種時菌濃度が1.2×10⁶/ml程度になるように植菌した。これを10°C、15°Cおよび20°Cに静置して炭酸ガス発生による減少重量を測定してアルコール生成量を推定した⁷⁾。また、酸酵力に及ぼすグルコース濃度の影響

を検討するために、グルコース濃度を変えて醸酵試験を行った。その際、培地中の総グルコース量が同一であつて濃度が10%, 20%, 30%になるようにYPAD培地を調製した。すなわち、グルコース10%培地600ml, 20%培地300ml, 30%培地200mlを醸酵栓を付けた1l容エルレンマイヤーフラスコに入れた。次に、15°Cで静置培養した菌濃度約 $5 \times 10^7 / ml$ の酵母前培養液を10mlずつ植菌して10°Cに静置した。そして、上記と同様にしてアルコール生成量を推定した。

5. 小仕込試験

仕込配合を表1に示した。仕込みは麹汁培地で28°C,

一晩振とう培養した酵母培養液を用いた二段仕込で行った。醸酵温度は水麹から試験終了までそれぞれ10°Cと15°C。

表1 小仕込試験の仕込配合

	初 添	留 添	総 量
総米 (g)	74	126	200
α 米 (g)	54	100	154
乾燥麹 (g)	20	26	46
水 (ml)	150	165	315
酵母* (ml)	2		2
乳酸** (g)	0.31		0.31

* 麹汁培地において28°Cで1晩、振とう培養(120rpm)した。

** 75%溶液

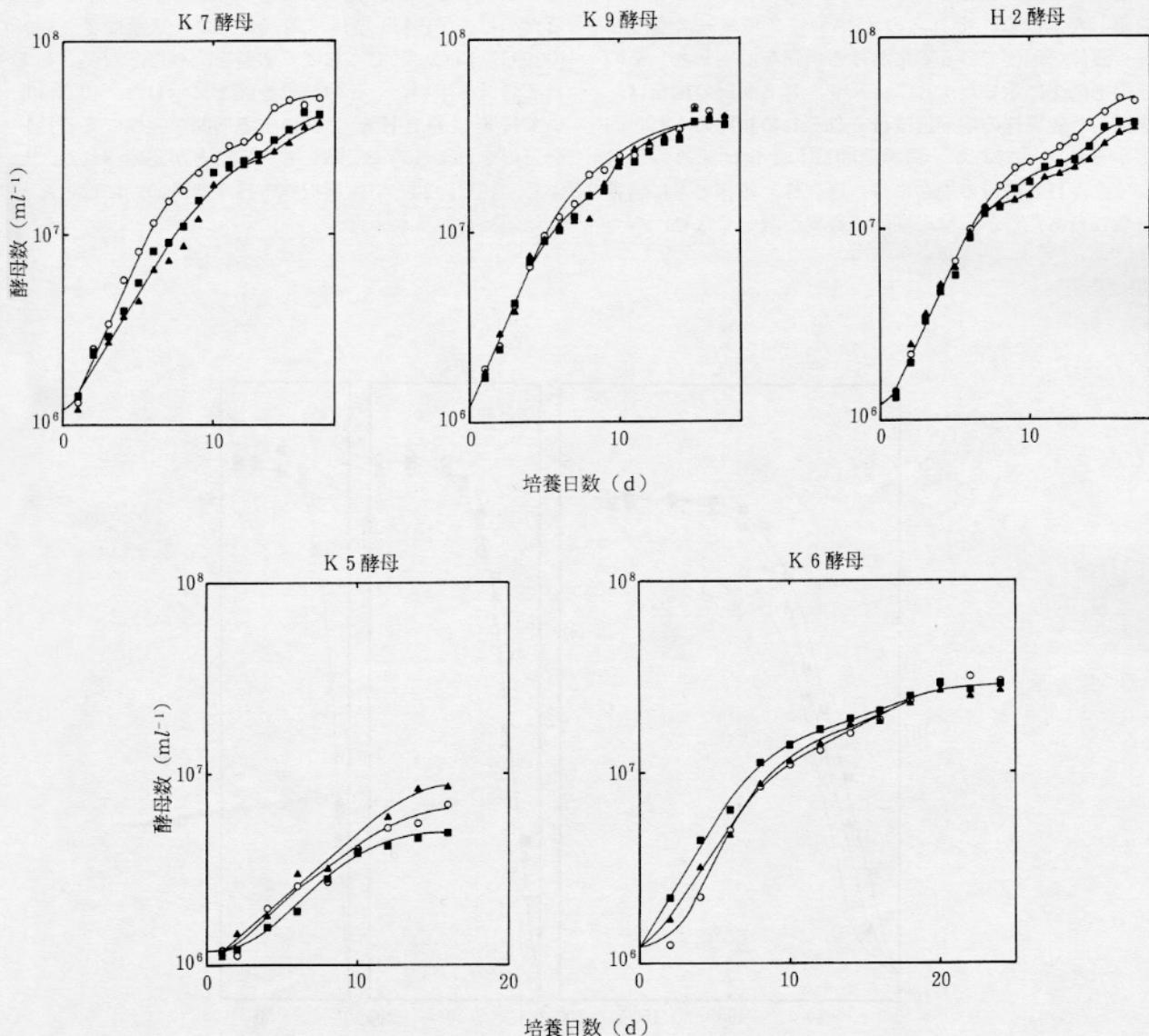


図1 低温増殖性変異株の5°Cにおける増殖
○、親株；▲、■、選択株

℃一定の二種類で行った。また、仕込容器に醸酵栓を取り付け、醸酵経過に伴うもろみ重量の減少を測定してアルコール生成量を推定した⁸⁾。

実験結果および考察

1. 低温増殖性の強い変異株の検索

実用の清酒酵母であるK7, K9, H2, H5, H6酵母（いずれも5℃で増殖できる）を親株として、低温増殖性の向上した変異株を取得することを試みた。紫外線による変異処理を行って、5℃で培養した寒天培地上でそれぞれの親株以上の低温増殖性を示す株を検索した。しかし、それぞれの親株よりコロニー形成日数が著しく短縮した株は見いだされなかった。そこで、同程度かそれより少し良いと思われるコロニーをそれぞれ2株ずつ釣菌した。次に、それらのYPAD（グルコース濃度2%）液体培地での5℃における増殖を測定した。その結果を図1に示した。K7, K9, H2酵母の場合は、選択した変異株の増殖速度はそれぞれの親株のそれと同等かそれ以下であり、誘導期間にも変化は認められなかった。H5酵母の場合には、選択株、親株とともに培養日数15日あたりから酵母細胞の凝集が激しくなり、ヘマ

チトメーターによる酵母数の測定が困難となった。H6酵母からの選択株2株は親株であるH6酵母と比べて増殖速度の差は認められなかったが、誘導期間の短縮が認められた。このように、低温下での増殖速度の向上が認められなかった理由として、次のことが考えられる。清酒酵母はいずれも、これまでの清酒醸造の長い歴史の中で、低温下での増殖・醸酵が優れた株が選抜されて用いられており、低温増殖に関する遺伝子も自然に集積されていると考えられる。そのため、低温増殖力の著しく向上した変異株を得るのは極めて難しいと考えられる。

2. 選択株の低温増殖性と醸酵性

5℃での増殖試験（図1）で誘導期間が短縮したH6酵母由来の選択株2株（H6-1, H6-2）についてその変化がどの低温域まで認められるかを明らかにするために、YPAD液体培地（グルコース濃度2%）での10℃, 15℃, 20℃における増殖を調べた。対照として、H6酵母を用いた。その結果を図2に示した。10℃においてH6-1株とH6-2株の誘導期間が親株であるH6酵母のそれより若干短縮していることが認められた。しかし、15℃, 20℃では選択株とH6酵母の間にはほとんど差は認められなかった。

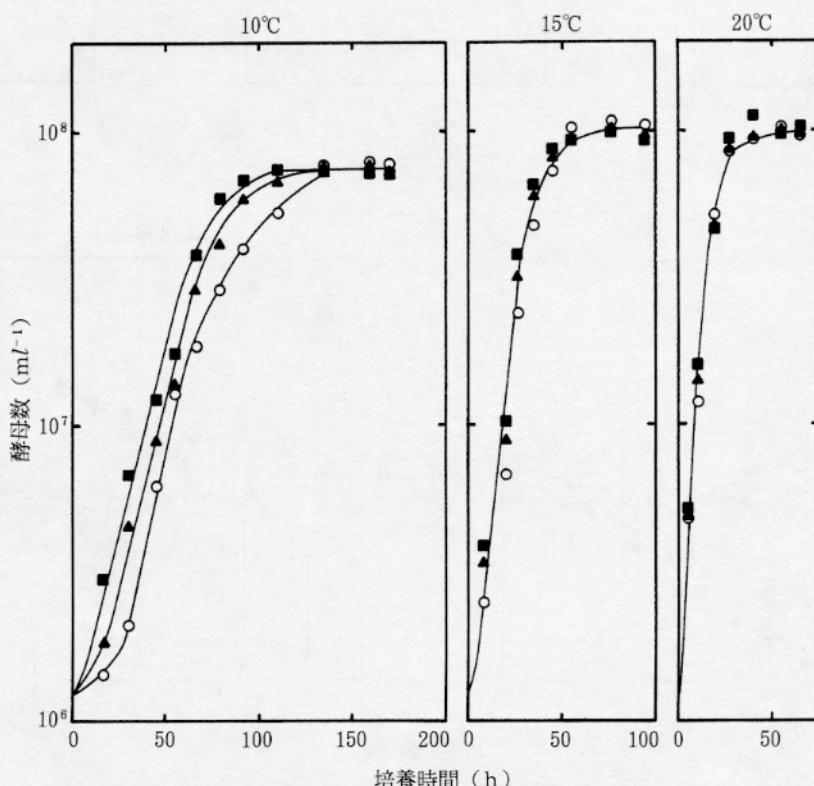


図2 H6酵母とその選択株の低温度下での増殖
グルコース濃度、2%
○, H6酵母; ▲, H6-1酵母; ■, H6-2酵母

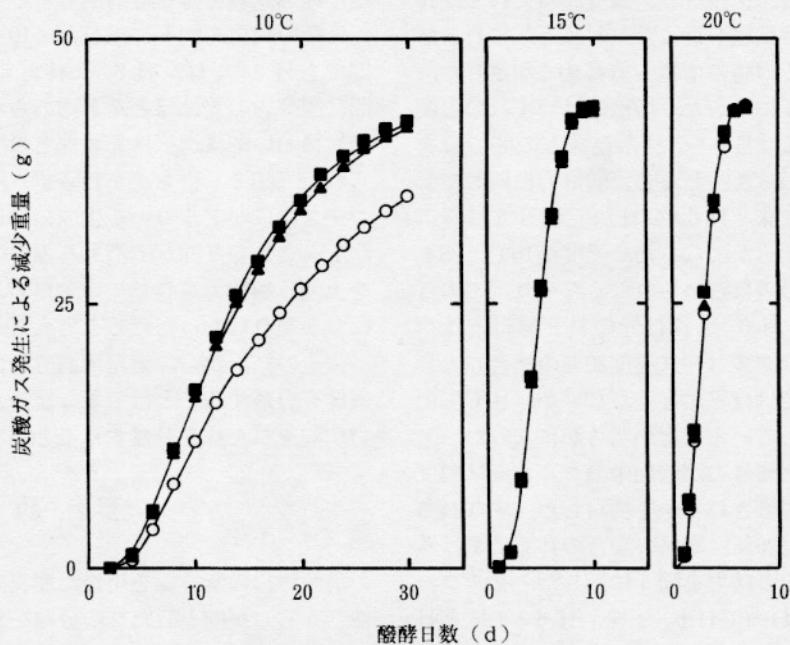


図3 H 6 酵母とその選択株の低温度下での醸酵
グルコース濃度、20%
○, H 6 酵母; ▲, H 6-1 酵母; ■, H 6-2 酵母

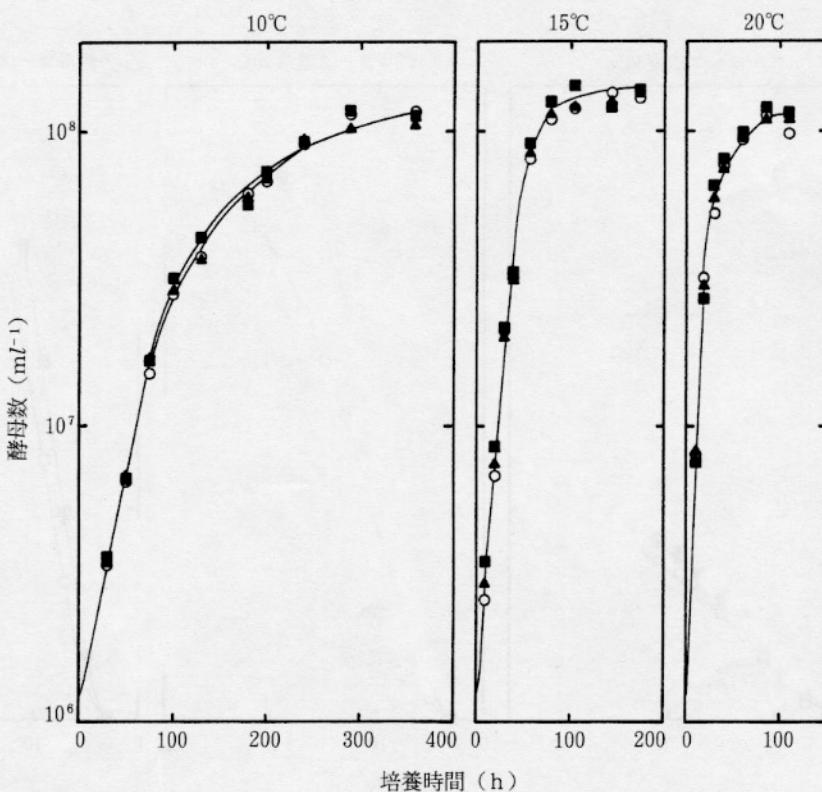


図4 H 6 酵母とその選択株の低温度下での増殖
グルコース濃度、20%
○, H 6 酵母; ▲, H 6-1 酵母; ■, H 6-2 酵母

次に、この選択したH 6-1株とH 6-2株の醸酵力を検討した。すなわち、グルコース濃度20%で10°C, 15°C, 20°Cにおいて醸酵試験を行った。対照としてH 6酵母を用いた。また、その時の増殖もあわせて測定した。その結果を図3と図4に示した。増殖力はいずれの温度においてもH 6-1株, H 6-2株と親株との間でほとんど差は認められなかった。しかし、醸酵力に関しては10°CにおいてH 6-1株, H 6-2株が元のH 6酵母より優れていることが明らかになった。温度が15°C, 20°Cになるとその醸酵力の差は認められなくなった。このことから、H 6-1株, H 6-2株は元のH 6酵母と比べて低温下での増殖力（グルコース濃度20%の場合）と15°C, 20°Cでの醸酵力ではほとんど差がないが、10°Cでの醸酵力が著しく向上していることが明らかになった。

次に、この向上した醸酵力が培地中のグルコース濃度によってどのように影響されるかを検討した。すなわち、グルコース濃度10%, 20%, 30%の場合の10°Cにおける醸酵力を測定した。その結果を図5に示した。グルコース濃度10%と20%においてH 6-1株, H 6-2株とH 6酵母の間の差が著しく、グルコース濃度が30%ではその差が小さくなかった。以上のことから、H 6-1株とH 6-2株はグルコース濃度10%, 20%においてその醸酵力の向上を顕著に示すことが明らかになった。

3. 選択株による清酒小仕込試験

小仕込試験を行って清酒もろみ中の醸酵力を検討した。その結果を図6に示した。10°C, 15°Cのいずれの温度でもH 6-1株, H 6-2株と親株であるH 6酵母の間に醸酵力の差はほとんど認められなかった。これは、10°Cにおいては選択株と親株との間に醸酵力の差が認められた（図3）にもかかわらず、清酒もろみ中ではグルコース生成がアルコール生成の律速になっており⁸⁾、しかも、これら3株が清酒もろみ中のグルコース生成速度を上回る醸酵力を有しているため、アルコール生成速度に差が現れなかったためと考えられる。

以上の結果から、実用清酒酵母において低温増殖性変異株を分離することはできなかったが、低温下での醸酵力が向上した株を分離することができた。

要 約

清酒酵母の紫外線を用いた変異処理により、低温増殖性（5°C）が向上した株の分離を試みた。その結果、広島6号酵母由来の選択株の低温下での誘導期間が親株より短縮していることが認められた。しかし、増殖速度の向上した株は得られなかった。その選択株は、10°Cでも誘導期間が若干短縮していたが、15°C, 20°Cでは、親株

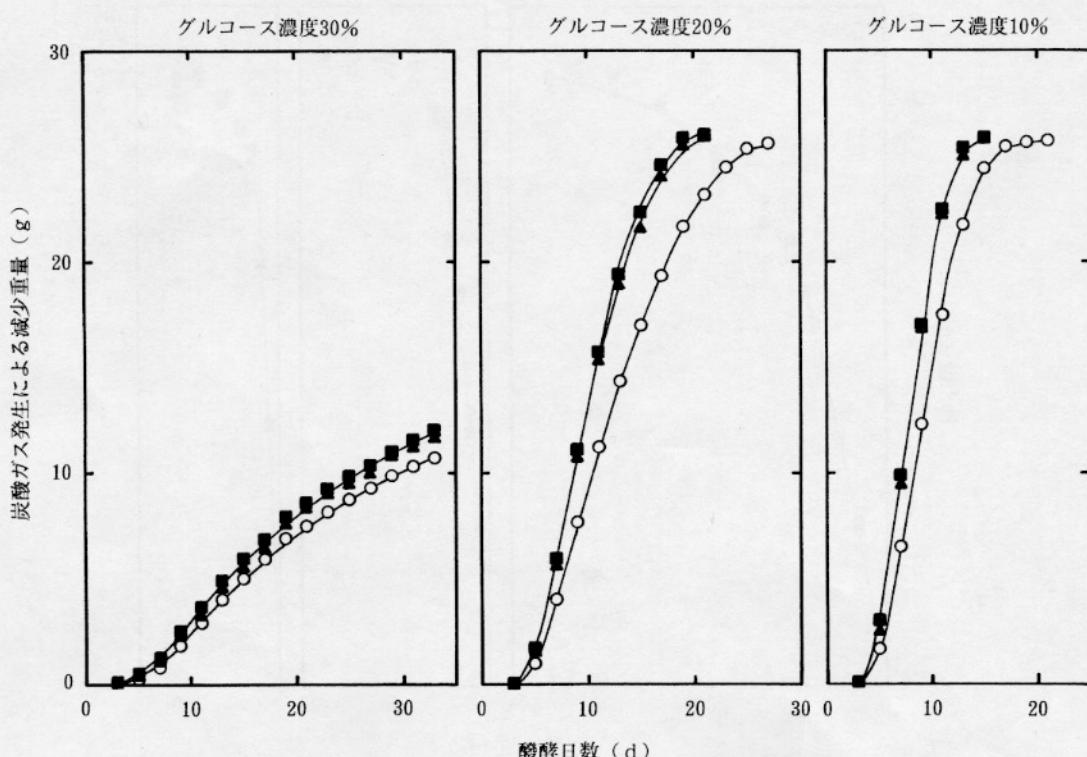


図5 H 6酵母とその選択株の各グルコース濃度での醸酵
醸酵濃度, 10%
○, H 6酵母; ▲, H 6-1酵母; ■, H 6-2酵母

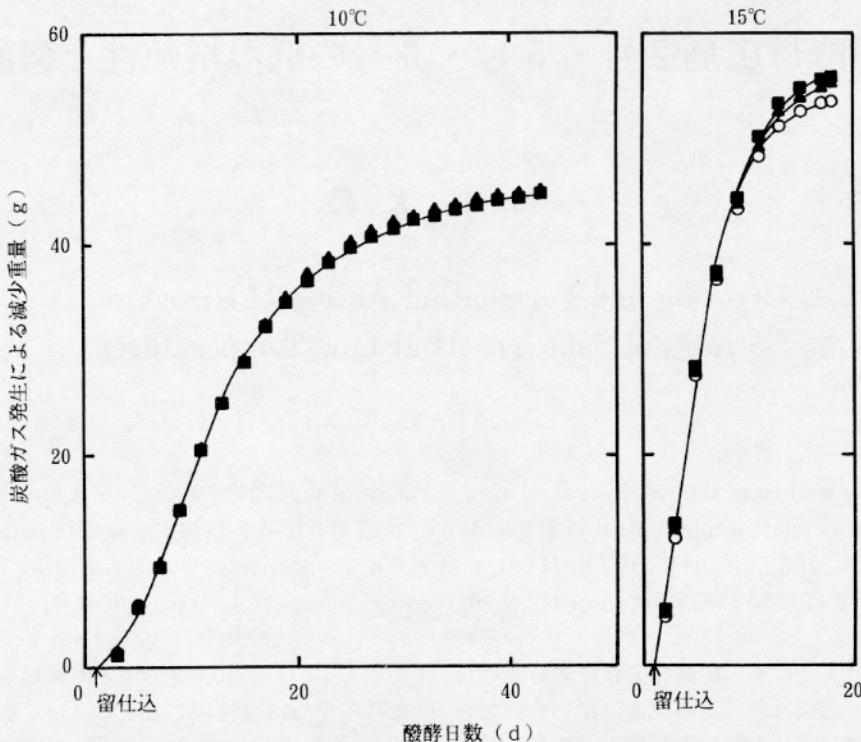


図6 H6酵母とその選択株による清酒小仕込試験

総米, 200 g

○, H6酵母; ▲, H6-1酵母; ■, H6-2酵母

とほとんど差は認められなかった。醸酵力に関してはその選択株が10°Cで親株より向上していたが、15°C, 20°Cではほとんど差が認められなかった。その醸酵力の向上はグルコース濃度10%, 20%で著しかった。清酒もろみ中では醸酵力の向上は現象としては認められなかった。

文 献

- 1) 栗山一秀・芦田晋三・斎藤義幸・杉並孝二・今安聰: 酿酵工学, 64, 169 (1989).
- 2) 柳内敏靖・清川良文・若井好則: 酿酵工学, 67, 419

(1989).

- 3) 伊藤 康: 酿協, 60, 908 (1965).
- 4) 土肥和夫: 改訂 清酒酵母の研究, 清酒酵母研究会編 (清酒酵母研究会, 東京), p. 294 (1980).
- 5) 河村大造・東江昭夫: 生物工学, 71, 225 (1993).
- 6) 河村大造・門 隆興・東江昭夫: 酿酵工学, 64, 25 (1986).
- 7) 飯塚 廣・後藤昭二: 酵母の分類同定法, 第2版 (東京大学出版会, 東京), p. 40 (1973).
- 8) 布川弥太郎・佐藤 勝・合瀬健一: 酿協, 71, 982 (1976).