清酒麴から分離した *Pichia angusta* Y-11393 の亜硝酸消失能

島岡芳和¹・金内 誠^{2*}・笠原 紳²・吉澤 淑³

(¹醸造技術者・無所属・²宮城大学 食産業学部・³元東京農業大学)

平成 23 年 9 月 13 日受理

The Elimination of Nitrite by *Pichia angusta* Y-11393 Isolated from *Sake Koji*

Yoshikazu SHIMAOKA¹, Makoto KANAUCHI², Shin KASAHARA² and Kiyoshi YOSHIZAWA³

(¹*Sake Brewer, Unaffiliated with any Company,*

²*Department of Food Management, Miyagi University, 2-2-1 Hatatae Taihaku-ku Sendai-City, 982-0215 Japan,*

³*Department of Fermentation Science, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan)*

KIMOTO SHUBO is a traditional seed mash producing method in sake brewing. Yeast is cultivated vigorously in open systems without contamination by bacteria or wild yeast. In the process, contaminated microorganisms are inhibited from growing by a nitrite/nitrate system in the mother water and lactic acid produced by lactic acid bacteria. Finally, under the low pH condition, the sake yeast is grown predominantly in the mash. However, in the brewer's house, there is a phenomenon in which the nitrite is not eliminated in the mash. This factor was researched using model mash by sake *koji* obtained from sake brewer's houses. The microorganisms in the *koji* eliminated the nitrite in mash. Y-11393 strain was identified as *Pichia angusta*. The strain oxidized nitrite to eliminate it from the mash. It is believed that the yeast assimilated nitrate, which is a low toxic substance for yeast. The strain had tolerance against nitrite and could grow under 1-5mM nitrite conditions. It also eliminated nitrite up to 6-16% for 4 days. Moreover, the strain had acid tolerance and ethanol tolerance up to 5% ethanol and 1.1% lactic acid. The yeast eliminated nitrite in the model moto-mash. Also, the yeast cells between the mid-log phase and late-log phase thoroughly eliminated nitrite. It is obvious that the yeast has the ability to remove nitrite in the *KIMOTO* method.

Key words : 生酛酒母, 亜硝酸, 麴, *Pichia angusta*

諸言

清酒醸造における生酛酒母や山麴酒母は、伝統的な微生物遷移を利用して、開放下で酵母を純粋培養する方法である。その操作の特徴として繁雑で、期間が1カ月と長いことが挙げられる。

これらの生酛酒母や山麴酒母は初期に 10℃ 以下と

極低温下で、水や空气中に由来する硝酸還元菌、おもに *Pseudomonas* 属が仕込み水中に含まれる硝酸を亜硝酸へと変換する。芹沢¹⁻⁵⁾はこの亜硝酸と乳酸との相乗効果により、おもに麴に由来する野生酵母の生育を阻害していると報告している。しかし、原ら⁶⁾は生酛酒母に存在する亜硝酸濃度は 15ppm 程度で野生酵母の生育阻害は及ぼさず、その生育阻害は高糖濃度や

* コレスポンディングオーサー

高酸度などの要因が関係すると報告している。このように、生醗系酒母中の微生物相は複合的な要因により調節されていると考えられる。

しかし、これら伝統的酒母仕込みにおいて、その調製法や条件などにより仕込水中の硝酸から亜硝酸を生産しないなどの問題が見られる。そこで、硝酸還元菌を分離し、酒母に添加することで、安定的に亜硝酸塩を生成させる方法を報告した⁷⁻¹¹⁾。

一方、吉賀¹²⁾は、亜硝酸が非微生物的な作用により消失すると報告している。しかし、現在でも、酒造場では生成された亜硝酸が消失されない現象が見られる。これにより、乳酸菌の生育が遅れるなどの問題も見られる¹³⁾。実際の酒造場では、少量の過酸化水素の添加や温度調節、大量の酵母添加などが試みられている。このように亜硝酸の消失する機作は非微生物的作用だけでなく、不明な点も多い。

そこで、本研究では生醗系酒母を製造している酒造場などから恵与された麴を用いて消失試験を行い、亜硝酸の消失に関わる微生物を分離した。さらに、その微生物を同定し、亜硝酸の消失機作やその微生物の特性などについて明らかにした。この分離した亜硝酸消失に関わる微生物を用いて、生醗をモデル化し、亜硝酸消失能と微生物の増殖について検討した。

実験方法

1. 供試試料

酒造場 A 社から恵与された麴を a、東北の酒造場 B および C 社から恵与された麴をそれぞれ b、c とした。

2. 殺菌仕込水および殺菌麴の調製

仕込水は各社から恵与されたものを用い、オートクレープで 121℃、15 分間滅菌した。また、麴 (1kg) は 1L の 70% エタノール水溶液に浸漬し、1 晩放置後、減圧下で乾燥させ、滅菌麴とした。

3. 麴を用いた亜硝酸消失試験

各麴 (10g) に 30ppm 亜硝酸ナトリウム (亜硝酸イオン濃度として 20ppm) を含むイオン交換水 (50mL) を添加し、15℃ で、7 日放置し、国税庁所定分析法¹⁴⁾に従い、亜硝酸を定性分析した。

4. 麴からの酵母および乳酸菌の分離

それぞれの麴 10g を 20mL の滅菌水に懸濁させた後、これに 20ppm 亜硝酸イオンを含むイオン交換水 (50mL) を加え、24 時間、30℃ で集積培養した。酵

母類の分離は、その培養液を GYP (1% glucose, 0.5 % yeast extract, 0.5 % polypeptone, 1.5 % agar, 30ppm 亜硝酸ナトリウム) 寒天平板培地に塗抹接種し、30℃、48 時間ほど静置培養した。生成したコロニーをタイプ別に鈎菌した。また、乳酸菌は成書¹⁵⁾に従い、培養を GYP 白亜寒天培地 (1% glucose, 1% yeast extract, 0.5% peptone, 0.2% sodium acetate, 0.5% CaCO₃, 1.5 % agar, 50mg/100mL Tween 80, 20mg/100mL MgSO₄·7H₂O, 1mg/100mL FeSO₄·7H₂O, 1mg/100mL NaCl) に塗抹接種し、アネロパック (三菱ガス化学製) を入れた嫌気ジャー中で 30℃、3～4 日ほど培養した。炭酸カルシウムが溶解し、ハローを形成したコロニーを鈎菌した。

5. 分離微生物を用いた亜硝酸の消失試験

麴汁を用い、酵母と乳酸菌の培養を行った。すなわち、麴 1kg に 4L のイオン交換水を加え、55℃ で一晚糖化させた。糖化後、5000rpm で、10 分間遠心分離した。この上澄みに卵白を加え、清澄後、麴汁培地とした。これをボーリング 5.0° に調整後に 121℃、15 分間滅菌処理した。これに、0.45μ シリンジフィルター (Minisart, Sartorius stedim biotec GmbH, Goettingen, Germany) で滅菌した亜硝酸ナトリウム溶液を 1mM となる様に添加し、あらかじめ 10⁸ (cells/mL) オーダーまで培養した菌体を 10⁵ (cells/mL) オーダーとなるように接種し、15℃、7 日間静置培養した。

6. 酵母の同定

酵母の同定は The Yeasts, A Taxonomic Study 4th edition¹⁶⁾ によった。分子生物学的特性は Kurtzman¹⁷⁾ と Coccolin¹⁸⁻¹⁹⁾ に従った。すなわち、26S RNA に相同する DNA をプライマー F (5'-GCCATA TCAATAAGCG-GAGGAAAA-3') およびプライマー R (5'-ATTC-CCAAACAACCTCGACTC-3') を用い、PCR によって増幅した。さらにこのプライマーの産物を鋳型として ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) とシークエンサー (3310; Applied Biosystems) を用いて塩基配列を検討し、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用いて、相同性を検討した。

7. 分離酵母の増殖の測定

前述した麴汁 (ボーリング 5.0°) に、フィルターで滅菌した亜硝酸ナトリウムを添加し、1～50mM の

濃度とした。あらかじめ培養しておいた分離酵母を 10^5 (cells/mL) オーダーとなるように接種し、15℃で4日間静置培養した。菌体の増殖は、660nmにおける濁度によって測定した。

8. 亜硝酸の測定

亜硝酸の測定は Snell&Snell²⁰⁾ に従った。すなわち、適宜希釈した試料 1mL に 1.51M 塩酸に溶解した 1% スルファニルアミン溶液 1mL を加え、さらに、0.02% ナフチルエチレンジアミン塩酸塩水溶液を加え、20分間反応させ、540nm の吸光度を分光光度計 (V630, 日本分光社製) にて測定した。

9. 亜硝酸から生じる硝酸の測定

1mM の亜硝酸ナトリウムを含む麹汁培地 (ボーリング 5.0°) に亜硝酸消失能が最も高かった分離酵母 Y-11393 株 (後述) を接種し、静置培養した。この培養液 1.0mL に、鉛粉 (ナカライテック Cat#20202-95) 0.1g を添加し、撹拌した。その後、4800 × g, 10分間遠心し、その上清の亜硝酸塩濃度を測定した。

10. アルコール耐性および酸度耐性

あらかじめ滅菌した麹汁培地 (ボーリング 5.0°) に、エタノールを 1.5 ~ 9% の濃度となるよう添加した。また、同培地に乳酸を 0.27 ~ 1.26%, つまり、酸度換算で 3 ~ 14 となるように添加した。これに、あらかじめ培養しておいた分離酵母 Y-11393 を 10^5 (cells/mL) オーダーとなるように接種し、15℃で4日間静置培養した。生育の観測は肉眼で行った。

11. モデル生酏の小仕込み試験

定法通り洗米、吸水、水切りした飯米を 60 分間蒸きょうし、無菌下で放冷した。また、恵与された麹 b は 110℃, 10 分間滅菌した。さらに、仕込水は 121℃, 15 分間で滅菌した。これらをすべて無菌下で品温が 10℃以下になる様に冷却した。これら蒸米 140g, 麹 60g, 仕込み水 200mL を、あらかじめ滅菌した 500mL 容三角フラスコに入れた。さらに、仕込み水の一部にスミチーム S (新日本化学工業製) を α -アミラーゼ力価換算で、60,000U となる様に溶解させた後、ミニザルト (Minisart, Sartorius stedim biotec GmbH, Goettingen, Germany) にて滅菌し、三角フラスコ内に添加した。また、フィルター滅菌した亜硝酸ナトリウムを亜硝酸イオンが約 10ppm となる様に添加した。これらをモデル生酏とし、これにあらかじめ培養した *Lactobacillus sakei* NRIC1071 及び分離酵母 Y-11393 を 10^4 (cells/

mL) オーダーとなる様に接種し、品温が 12℃となるよう培養し、24 時間おきに撹拌した。

12. 菌体数の測定

乳酸菌 *L.sakei* の測定は成書¹⁵⁾に従い、平板培地法で行った。また、分離酵母 Y-11393 は顕微鏡下で、トーマ氏の血球計を用いた¹⁴⁾。Y-11393 の死細胞の菌体数はメチレンブルー染色法²¹⁾にて行った。

13. 菌体密度を異にした条件下での亜硝酸消失試験

麹汁 (ボーリング 5.0°, 1mM 亜硝酸ナトリウムを含む) 10mL に、あらかじめ培養していた分離酵母 Y-11393 を 10^3 (cells/mL) オーダーとなるように接種し、それぞれ 30℃で、 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 (cells/mL) オーダーとなるまで培養した。この菌体を $4800 \times g$, 10 分間遠心分離し、菌体を回収した。それぞれにフィルター滅菌した 1mM 亜硝酸ナトリウム溶液を 10mL 加え、15℃で、2 日および 4 日間放置し、残存した亜硝酸を測定した。

実験結果および考察

1. 亜硝酸消失微生物の検討

生酏系酒母は、細菌や乳酸菌などの作用により汚染微生物の生育を抑制し、清酒酵母を生育させていく酒母製法の一つである²¹⁻²³⁾。この酒母期間中、仕込水中の硝酸は微生物により、毒性の強い亜硝酸へと変換される²³⁾。これまで、金井²²⁾は、亜硝酸の消失の機作について、乳酸菌の生成する乳酸と亜硝酸塩が反応し、亜硝酸と乳酸塩となると報告した。さらに、この亜硝酸はアミノ酸と反応して窒素が生成し、揮発する^{12,24,25)}。しかし、実際には、亜硝酸が消失しないなどの問題が見られ、乳酸菌や清酒酵母の生育が悪くなるなどの問題もあり、製品の品質に影響を及ぼす。

そこで、その要因を検討するために、まず、麹 a, b, c を用い、亜硝酸反応の消失について検討した。その結果は、Fig.1 に示した。4 日間放置した後の亜硝酸残存率は麹 a が 7.4%, 麹 b が 73%, 麹 c は 39%であった。次に、麹 a と酒造場 A から採取した仕込水に亜硝酸イオンを 20ppm 添加し、仕込水と麹 a を殺菌 / 未殺菌の系で亜硝酸の消失を検討した。結果を Fig.1 に併せて示した。非殺菌水 / 非殺菌麹では、亜硝酸残存率が 1% と、ほぼ亜硝酸が消失した。また、非殺菌水 / 殺菌麹を用いた系では亜硝酸残存率は 91%であった。殺菌水 / 非殺菌麹では亜硝酸残存率は

Fig. 1 Eliminating Nitrite by Koji and Water.

Three kojies ('a', 'b' and 'c') were obtained from sake breweries. The sterilization water was prepared by autoclave and the sterilization koji was prepared by 70% ethanol and dried with a low pressure dryer. The control used sterilized water and sterilized koji.

10%, 殺菌水／殺菌麹の系では、亜硝酸残存率が100%であった。なお、対照の20ppmの亜硝酸イオンを含む仕込水の残存率も100%であった。

以上の結果から、亜硝酸消失に関する微生物は、仕込水由来の微生物ではなく、麹由来の微生物であると推察した。

そこで、麹aより、酵母類と生酸性のある細菌類を乳酸菌として分離した。酵母類はコロニーの形態から4株分離し、それぞれType1, 2, 3, 4とした。また、乳酸菌類は48株分離した。分離株による亜硝酸の残存率をTable 1及び2に示した。Type 1, Type 2の

酵母は亜硝酸を消失し、亜硝酸残存率は1.3%と2.6%と低く、一方、Type 3とType 4の亜硝酸残存率は49.0%と62.2%であり、Type 1, 2と比べ、高かった。対照として、清酒酵母であるK7及びK9の亜硝酸残存率はそれぞれ74.5%及び86.1%と亜硝酸消失能は低かった。野生酵母として報告のある*Pichia anomala*を培養したものの亜硝酸残存率は72.2%であった。酒母中より分離した*Lactobacillus sakei*と同定されている宮城大学食産業学部 発酵化学研究室保存株の亜硝酸残存率は68.1%であった。麹aより分離した乳酸菌のうち、1株は残存率が31.1%と低く、次いで、残存率が40.0～50.0%の株は8株、50.1～60.0%のものは17株、60.1%以上のものは22株であった。よって、乳酸菌にも亜硝酸分解能を有するものが存在すること

Table 1 Eliminating Nitrite by Microorganisms

Yeast	Nitrite Residue (%)
Yeast Type 1	1.3
Yeast Type 2	2.6
Yeast Type 3	49.0
Yeast Type 4	62.2
K-7	86.1
K-9	74.5
<i>Pichia anomala</i> NRIC1311	72.2
<i>Lactobacillus sakei</i>	68.1
Control	100

The yeasts were cultivated in a koji extract medium containing 1mM nitrite for 7 days. The residue nitrite was measured.

Table 2 Eliminating Nitrite by Lactic acid Bacteria

Nitrite residue	Strains
Less than 40%	1
40.0-50.0%	8
50.1-60.0	17
60.1% over	22
Total	48

The isolated lactic acids were cultivated in a koji extract medium containing 1mM nitrite for 7 days. The residue nitrite was measured.

が明らかとなった。

分離した微生物のうち亜硝酸消失能が高かった酵母 Type 1 の亜硝酸消失について検討を進めることとした。なお、乳酸菌の亜硝酸消失機作についても今後検討が必要であると考えられた。

2. 亜硝酸消失能酵母の同定およびその特徴

亜硝酸消失能を有する株として分離した Type 1 の酵母を Y-11393 とした。

形態学的特徴を Table 3 に示した。細胞の形は卵型で、大きさは長径 $6.5\mu\text{m}$ 、短径 $1.5\mu\text{m}$ であった。また、増殖形態は多極出芽で、偽菌糸形成はなく、胞子形成能を有し、弱い産膜能を有した。また、形成した胞子はレモン型であった。生理学的試験の結果を Table 4 に示した。この株は Glucose と Trehalose に資化性および発酵性があり、また、窒素源として、硝酸塩を資化した。さらに、分子生物学的特徴を調べるために 26S rRNA をコードする DNA の塩基配列の相同性を検索した結果、99% と高い相同性で *Pichia angusta*

(Accession No. AM397861.1) と同定された。

一般的に、麹には *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Torulopsis* 属の酵母が多く検出されると報告される²⁶⁻²⁸⁾。本株も *Pichia* 属であることより、麹に付着している微生物であると推察された。

次に Y-11393 の増殖における亜硝酸ナトリウム濃度の影響及びそのときの亜硝酸消失を検討し、増殖の結果を Fig.2 に示した。1 ~ 5mM 亜硝酸を含む培地において本株は、亜硝酸イオンを含まないコントロールの培地と同様に増殖した。また、本株は亜硝酸ナトリウム濃度 10mM 以上では、増殖阻害がみられ、コントロールの約 1/3 の増殖であった。なお 25mM 以上ではほとんど増殖しなかった。

つぎに、亜硝酸消失の結果を Fig.3 に示した。亜硝酸イオン 25 及び 50mM では、亜硝酸の消失はほとんど見られなかったが、10mM 以下では消失が見られた。実際の生配中の亜硝酸イオンは 15ppm 程度であり、本株で十分消失できると考えられた。さらに、本株は 10mM 亜硝酸ナトリウム、つまり、亜硝酸イオン換算で 460ppm までは増殖可能で、今後は土壌の亜硝酸イオンの処理や、水処理などへの応用についても検討出来ると推察された。

この Y-11393 の硝酸イオン消失が酸化反応かあるいは還元反応によるものかを検討した。その結果を Fig.4 に示した。鉛粉の添加により、消失した亜硝酸イオンが再び検出された。Y-11393 の亜硝酸消失機作

Table 3 Morphological Characteristics of Y-11393 Strains.

	Y-11393
Cell shape	Short-oval
Cell size	1.5 ~ 6.5 μm
Vegetative reproduction	Multi budding
Pseudomycelium	Unformed
Ascospore	Formed
Film-formation	Formed

Table 4 Physiological Characteristics of Y-11393 Strains.

	Fermentation of Sugars	Assimilation of Sugars																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
	Lactose Trehalose Raffinose Maltose Sucrose Galactose Glucose																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								

+, Growth; -, non-growth

Molecular biological characteristics,

26S rRNA - DNA ; Accession No. AM397861.1 as *Pichia* sp. We identified as *Pichia angusta*

Fig. 2 Growth of *Pichia angusta* Y-11393 Containing each Nitrite Concentration. The strain was cultivated in koji extract (Balling 5.0°) containing 1-50mM of Nitrite.
 ● 0mM, ○ 1mM, ■ 5mM, □ 10mM, ▲ 25mM, △ 50mM

Fig. 3 Eliminating Nitrite by *P. angusta* Y-11393. Initial nitrite concentrations were (1-50mM) prepared in koji extract (Balling 5.0°), and the strain was cultivated in them.
 ○ 1mM, ■ 5mM, □ 10mM, ▲ 25mM, △ 50mM

は亜硝酸を酸化し、硝酸へと酸化する反応によるものと考えられた。なお、培養2日目及び3日目で亜硝酸と硝酸の総量が大きく減少したのは、変換された硝酸がY-11393に取り込まれたものと考えられた。

次に、Y-11393の増殖のアルコールと酸度に対する耐性をTable 5に示した。その結果、本株はエタノール5%までは増殖でき、亜硝酸消失能を失わないことがわかった。なお、酸度12 (1.1%乳酸) まで増殖可能であり、同様に亜硝酸消失能を失わないことがわか

った。

3. モデル生醗での亜硝酸消失と乳酸菌及び亜硝酸消失能酵母の増殖

一般的な生醗製造において、初暖気入れとなる7～10日後には、*Pseudomonas* 属により亜硝酸が生成され、最大濃度となる²³⁾。そこで、微生物群の消長を解析しやすくするために単純なモデル系を構築した。芹沢¹⁻²⁾は、山廃醗中の野生酵母数について検討し、仕込み直後は $10^4 \sim 10^6$ (cells/g) オーダーであることを

Fig. 4 The Amount of Remaining Nitrite and Converting Nitrate by *Pichia angusta* Y-11393. The strain was cultivated in koji extract (Balling 5.0°) containing 1mM of Nitrite. Nitrate was reduced by lead powder.
□ Nitrite, ■ Nitrate

Table 5 Ethanol and Acid Tolerance of Growing Y-11393 Strain

Alcohol concentrations (%)	Growth of Y-11393 strains	Acidity as Lactic acid	Growth of Y-11393 strains
1.5	+	3	+
3	+	5	+
5	+	9	+
6	-	12	+
9	-	14	-

+ , Growth; -, non-growth

報告した。そこで、本検討でも Y-11393 の初発菌数は 10^4 (cells/g) オーダーとし、乳酸菌数も同数とした。また、温度は昇温せず 12°C 均一で行った。原ら⁶⁾は生醗をモデル化し、麹中の汚染酵母の生育を 12°C で行っていること²⁹⁾や *L.sakei* が生育し、亜硝酸濃度が最大となる 7～8 日目における品温は 12°C 付近であることに準じた。さらに、酵母添加の目安となる 14 日の温度の目安が、 $13 \sim 15^\circ\text{C}$ と $12^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ であることに従った²⁹⁾。その結果を Fig.5 に示した。

混合培養した系では、初発 12ppm の亜硝酸イオンが、5 日目で 2.1ppm まで減少し、それ以降、緩やかに減少し、最終的には 1.3ppm となった。Y-11393 単独で培養したものでも同様に、5 日目までは直線的に

減少した。一方、乳酸菌単独のものは、亜硝酸イオンの減少量は低く、初発濃度の 87% 程度であった。

混合培養したときの菌体数及び酸度を Fig.6 に示した。*L.sakei* は 10 日目では、 10^8 (cells/mL) オーダーまで増殖し、Y-11393 は 5 日以降、増殖は見られなかった。このときの Y-11393 の菌体数は、 10^6 (cells/mL) オーダーであった。また、酸度は、乳酸菌の増殖と同様に、培養期間中上昇し、10 日目で酸度 6.0 であった。

モデル生醗中で、乳酸菌および Y-11393 を単独で培養させたときの菌体数及び酸度を Fig.7 に示した。

亜硝酸イオンを含んだモデル生醗中での *L.sakei* のみを培養した系では、*L.sakei* の増殖は 10^6 (cells/

mL) オーダーで停滞した。また、Y-11393 を単独で 10^8 (cells/mL) オーダーであった。 *L.sakei* のみを増培養した系では 5 ~ 7 日目で定常期に達し、菌体数は、殖させたモデル生酛の酸度は 10 日目で 4.6 であり、

Fig. 5 Nitrite Concentration in Model Moto-Mash during Co-cultivating with *L.sakei* and *P. angusta* Y-11393. ●, co-cultivating *L. sakei* and Y-11393; ○, cultivating *L. sakei*; ■, cultivating Y-11393.

Fig. 6 The Cell Numbers of *L.sakei* and *P. angusta* Y-11393 Co-cultivating in Model Moto-Mash and Acidity. *L.sakei* or Y-11393 was co-cultivated at 12°C in model Moto-Mash containing satirized koji, steamed rice, and water.

●, Cell numbers of *L. sakei*; ○, Cell numbers of Y-11393; ■, Acidity of model moto-mash.

亜硝酸イオンにより *L.sakei* の増殖の阻害を受けたことを裏付ける結果となった。亜硝酸イオンを含まない

モデル生酛において、*L.sakei* の増殖は Fig.6 に示した混合培養させた系と同様に 10^8 (cells/mL) オーダ

Fig. 7 The Cell Numbers of *L.sakei* or *P. angusta* Y-11393 Strain in Model Moto-Mash Containing Nitrite or without Nitrite and Acidity. *L.sakei* or Y-11393 was cultivated individually at 12°C in model Moto-Mash containing satirized koji, steamed rice, and water with or without nitrite.
●, Cell numbers of *L. sakei*; ○, Cell numbers of Y-11393; ■, Acidity of model moto-mash cultivating *L. sakei*; □, Acidity of model moto-mash cultivating Y-11393.

Fig. 8 The Ratio of Dead Yeast Cells(*P. angusta* Y-11393)in Model Moto-Mash Containing Nitrite.
●, The Ratio of dead yeast cells cultivating together *L.sakai*; ○, The Ratio of dead yeast cells in model moto-mash without cultivation of *L.sakai*

一まで増殖した。このときのモデル生配の酸度は 6.6 であった。

このように乳酸菌・酵母添加したモデル系において、乳酸菌数が 5～7 日で最大となり、さらにこの時期に亜硝酸も消失した。生配系酒母で 7～14 日における乳酸菌数及び亜硝酸消失すること²⁹⁾から、この 7～14 日前後をモデル化できたと考えられた。

さらに、Y-11393 の死滅率を Fig.8 に示した。混合培養した系では、Y-11393 の死滅率が高く、3 日目で 40%、5 日目で 53%、7 日目で 80% 以上となった。一方、Y-11393 のみを亜硝酸イオンを含むモデル生配で培養させた時の死滅率は、3 日目で 18%、5 日目で 43%、10 日目で 37% であった。よって本株は乳酸による死滅が示唆された。

以上のことより、亜硝酸イオン濃度約 10ppm を含む条件下では、乳酸菌 (*L.sakei*) の増殖は遅れた。一方、Y-11393 は、乳酸の増殖の初期、つまり 5 日目ぐらいまでに、亜硝酸を消失させた。しかし、本株は乳酸菌の増殖と酸度上昇により死滅率が高まった。本株のような酵母は、乳酸菌の増殖の前期、つまり「初暖気入れ」から増殖し、酵母添加時期までに亜硝酸イオンを消失すると考えられた。

谷田³⁰⁾は野生酵母 *Hansenula* 属 (syn. *Pichia* 属) が酒母初期に硝酸/亜硝酸へ強く作用すると報告しており、本結果と一致すると考えられた。しかし、Y-11393

は一般的な野生酵母とは異なり、好氣的条件下で生育するための強い産膜能はなかった (データ未提示)。

L.sakei と Y-11393 との共存培養させたときの酸度は 6.0 程度であった。また、これまでの検討では Y-11393 は、酸度 12 まで増殖可能であった。しかし、モデル生配では、死滅率が 80% 以上となった。野生酵母の死滅は、濃糖、低温、乳酸、酸性の相乗効果といわれている²¹⁾。本検討でも、複合的な要因で死滅率が高くなったと推察した。

一般に小仕込では、溶存酸素が多く、野生酵母などの好気性酵母が生育する。しかし、本モデルでは、培養容器の特性上、表面積に対する底面積が小さく、酒母全体が好氣的条件下ではないと考えられた。また、全体的に、嫌気ゾーンや好気ゾーンの発生を抑えるための攪拌を行った。その結果、本来は嫌気性の乳酸菌と Y-11393 との混合培養において、乳酸菌の生育が遅延することなく、7 日目で酸度 4.0 と、一般的な「酵母添加」時の酸度 4.8 よりやや低いものの²⁹⁾、乳酸菌の生育や乳酸発酵は健全であると考えられた。これらのことより、このモデル系では溶存酸素の影響により Y-11393 の増殖速度の加速や乳酸菌の増殖の阻害などがなく、モデルとして遜色なく、本株が酒母中에서도亜硝酸消失能を持っていることが明らかとなった。さらに、これらのことより本株は生配酒母において、亜硝酸消失に何らかの関係があることが示唆された。

Fig. 9 Elimination of Nitrite by each Cell Number of *P. angusta* Y-11393.

Y-11393 was cativated until 10⁴-10⁸ cells/mL, and they were added to Nitrite solutions. Nitrite was eliminated by Y-11393 of each cell number.

■, eliminated in 2 days; □, eliminated in 4 days

菌体密度 / 菌体数と亜硝酸消去能を検討した。その結果を Fig.9 に示した。1mM 亜硝酸ナトリウム溶液に菌体を加えないものを対照とし、この亜硝酸量を 100% とした。

まず、 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 (cells/ml) となるよう Y-11393 を培養・調製し、亜硝酸ナトリウム溶液を添加した。

10^8 (cells/mL) オーダーとなるよう培養した本株に亜硝酸ナトリウム溶液を添加したものの残存亜硝酸量は、2 日目には対照の 64.0 %, 4 日目には対照の 52.8% であった。また、 10^7 (cells/mL) オーダーとなるよう培養した本株に亜硝酸ナトリウム溶液を添加したものの残存亜硝酸量は、2 日目には対照の 38.8 %, 4 日目には対照の 21.1% であった。 10^6 (cells/mL) オーダーとなるよう培養した本株に亜硝酸ナトリウム溶液を添加したものの残存亜硝酸量は 2 日目には 43.9 %, 4 日目には 24.4% であった。同様に 10^5 (cells/mL) オーダーでは、2 日目には残存亜硝酸量は 68.7 %, 4 日目には 42.5% であった。

このことより、菌体数 (菌体密度) が生育途中の $10^5 \sim 10^7$ (cells/mL) オーダーで、つまり対数増殖期中～後期の菌体において、亜硝酸イオンの消去能が高いことがわかった。これは、モデル生配で *P.angusta* の定常期より前に亜硝酸イオン消去能が高く、菌体数が少ないにもかかわらず、5 日目までに、急激に消去したことと一致した。

このように本株は強い亜硝酸消去能を持ち、モデル生配でも亜硝酸イオンの消失することが明らかとなった。今後は本株の亜硝酸消失酵素、亜硝酸酸化酵素の酵素科学的特性を検討する予定である。

要約

- 1) 亜硝酸消失に関わる微生物の探索を行うため、酒造場 3 場より恵与された麴を用いての亜硝酸消失試験を行った。
- 2) サンプル麴 2 種は、亜硝酸の消失が見られた。さらに亜硝酸消失は、麴に付着している微生物が関与していた。
- 3) 麴から 4 タイプの酵母と 48 株の乳酸菌を分離した。Type 1 の酵母は 1mM の亜硝酸イオンを 98% 消失させた。
- 4) Type 1 の酵母は細胞の形は卵型で、増殖形態は多

極出芽で、偽菌糸形成はなく、レモン型の内性胞子を形成した。資化性および発酵性と 26S rRNA をコードする DNA の塩基配列から *Pichia angusta* と同定し、今後 *Pichia angusta* Y-11393 株とし、実験に供した。

5) *Pichia angusta* Y-11393 株は亜硝酸を酸化させ、硝酸へと変換することで、亜硝酸を除去していた。

6) 本株は 1 ～ 5mM 亜硝酸までは良好に増殖した。しかし、亜硝酸濃度 10mM 以上では、増殖阻害がみられた。このとき、1 ～ 5mM 亜硝酸は 2 日目以降、良好に分解され、4 日目の亜硝酸残存率が 6 ～ 16% であった。実際の生配系の亜硝酸含有率は 0.3mM で、本株で十分分解できると考えられた。

7) 本株は、エタノール含有と酸性条件では、生育できなかった。ゆえに酒母中の亜硝酸消失に関係し、その後の醸造工程に影響するものではないと推察された。

8) モデル生配系での *L.sakei* と本株を混合培養した結果、亜硝酸耐性のない乳酸菌は、本株の酵母によって亜硝酸が除去され、酸菌が生育できた。その後、乳酸菌が生産する乳酸等により、本株の死滅率は増加した。

9) 本株は $10^5 \sim 10^7$ (cells/mL) オーダーの対数増殖期中期～後期の少ない菌体でも亜硝酸消去能を有することが明らかとなった。

参考文献

- 1) 芦沢長：醸協, **56**, (11), 1139-1135 (1961)
- 2) 芦沢長：醸協, **57**, (5), 422-426 (1962)
- 3) 芦沢長：醸協, **58**, (6), 543-548 (1963)
- 4) 芦沢長：醸協, **58**, (7), 653-659 (1963)
- 5) 芦沢長, 斉藤 孔男：醸協, **60**, (5), 69-72 (1965)
- 6) 原昌道, 高橋米治, 大塚謙一：醸工, **45**, (5), 410-417 (1967)
- 7) 小西康夫, 杉倉恒栄, 緒方浩一：醸工, **45**, (9), 795-802 (1967)
- 8) 芦沢 長, 斉藤 孔男, 林 光二：醸協, **61**, (3), 271-281 (1965)
- 9) 芦沢 長, 斉藤 孔男, 林 光二：醸協, **61**, (7), 638-642 (1966)
- 10) 山本奈美：醸協, **84**, (2), 118-120 (1989)
- 11) 若井芳則, 白石真奈美, 前中幹興, 小西康夫：醸工, **68**, (3), 187-195 (1990)
- 12) 吉賀晋：醸造学雑誌, **13** (7), 679-690 (1935)
- 13) 蔭山公雄：醸造学雑誌, **14**, (9), 751-759

- (1936)
- 14) 注解編集委員会編：第四回改正国税庁所定分析法注解（財団法人日本醸造協会，東京）（1996）
- 15) 内村泰，岡田早苗，小崎道雄監修：乳酸菌実験マニュアル－分離から同定まで－（朝倉書店，東京）（1992）
- 16) Kurtzman, C. P., and Fell, J. W. In: The yeast, a taxonomic study 4th ed., Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 1998
- 17) Kurtzman C.P., Robnett C.J.: *Antonie Van Leeuwenhoek*, **73**, (4), 331-371 (1998)
- 18) Cocolin L., Bisson L.F., Mills D.A.: *FEMS Microbiol Lett.* **189**, (1), 81-87 (2000)
- 19) Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Zironi R. and Comi G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, (3), 1347-1355, (2004)
- 20) Snell, F. D. & Snell, C. T. Colorimetric Methods of Analysis, 3rd ed., pp. 282-284. New York: Van Nostrand. (1944).
- 21) (財) 日本醸造協会；清酒製造技術，（財団法人日本醸造協会，東京）（1987）
- 22) 金井春吉，湯本應利：醸造試験所報告，114, 236-302 (1932)
- 23) Konishi Y.: *J. Ferment. Technol.* **47**, 759-771 (1969)
- 24) VAN SLYKE, D. D. : *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, **7**, 46 (1909)
- 25) Lamson R. W. : *J. Bacteriol.*, **9**, (3), 307-313 (1924)
- 26) 小玉健吉，京野忠司：醗工，**42**, (12) 739-745 (1964)
- 27) 竹田 正久，塚原 寅次 醗工，**43**, (7), 447-456 (1965)
- 28) 竹田 正久，塚原 寅次 醗工m **44**, (3), 61-70 (1966)
- 29) 野白喜久雄，鎌田耕造，蓼沼誠，吉澤淑，水沼武二：醸造の辞典，（朝倉書店，東京）（1988）
- 30) 谷田清光：醸造學雜誌，**13**, (10), 981-988, (1935)