清酒酵母変異株における通気攪拌培養 によるエタノール発酵

河東田茂義¹・和田弥寿子²・小関敏彦³・三浦澄子¹

(¹ 山形大学農学部・² 和田酒造(資)・³ 山形県工業技術センター)

平成 17 年 9 月 8 日受理

Aerobic fermentation of ethanol by a mutant strain NF 1-1 of *sake* yeast *Kyokai* no. 7

Shigeyoshi KATOYODA¹, Yasuko WADA², Toshihiko KOSEKI³, Sumiko MIURA¹

(¹ Section of Bioresource Utilization, Faculty of Agriculture, Yamagata University, Tsuruoka 997-8555, Japan, ² Wada Brewing Limited Partnership, Yamagata 990-2473, Japan,

³ Yamagata Research Institute of Technology, Yamagata 990-2473, Japan)

To obtain higher productivity under aerobic fermentation, we screened for mutant strains of *Sake* yeast *Kyokai* no. 7 (K-7). A high concentration of ethanol producing mutant was isolated from 18 strains of non-foaming mutants. The NF 1-1 strain was placed in some media containing molasses and/or tomato extract, and the effect of culture conditions was studied. By shaking the culture at 30°C, a concentration of ethanol of 125.3 g/L with a productivity of 3.0 g/L · h, which was 1.1 times higher than that of the K-7 used, and a fermentation efficiency of 81.7% were obtained in a tomato extract medium that initially contained 30% (w/v) sugar. NF 1-1 showed lower ethanol tolerance, but higher heat tolerance and osmotic stress than its parent strain. The NF 1-1 strain was used in tomato wine brewing test on a fermentor for 20 h. As compared with the K-7 strain, the NF 1-1 strain produced a low concentration of succinic acid and malic acid, but the concentration of ethanol (7.6%) was higher than that of the K-7 used (6.7%) in a tomato juice that initially had 10% (w/v) sucrose added. The taste of the wine fermented by NF 1-1 was milder than its parent strain.

Key words : 清酒酵母変異株・エタノール発酵・通気攪拌培養

緒 言

酵母の発酵によるエタノールの製造技術においては、大別すると工業用エタノールの発酵における製造技術および酒類のような発酵アルコール飲料の製造技術^{1,2)}が進展してきた。工業用エタノールの発酵による製造の原料としては、主としてデンプン質原料および糖質原料が用いられているが、最近では、未利用バイオマス資源の活用が注目されている³⁾。これらの工業用エタノールの発酵による製造技術および酒類のような発酵アルコール飲料の製造技術は、通常いずれも

嫌気的条件下における酵母による発酵によって行われる。しかし、この嫌気的条件下でのエタノールの生産により、酵母の増殖は阻害され、酵母の活性は徐々に低下する。最近、担子菌を用いて好気的条件下でエタノール発酵を行う方法⁴⁾が示されているものの、酵母によるエタノール発酵の場合は嫌気的条件下で産生されているのみである¹⁾。清酒、ワインおよびビールなどの製造では酸素の供給によって酵母の増殖が促進されることが知られているが²⁾、通気攪拌培養によるエタノール発酵の報告はほとんどない。そこで、我々は、通気攪拌培養によるエタノール発酵について検討

を行った。通常のエタノール発酵に用いられている酵母は、嫌気条件での発酵を前提としているので通気攪拌条件では十分な発酵力を示さない可能性がある。そこで、清酒酵母を親株として通気攪拌条件で発酵力の強い変異株の作出を試みた。また、発酵の効率を改善する目的で泡なし酵母の清酒醸造への利用が提唱されて以来³⁾、多くの泡なし酵母変異株が幅広く用いられている。ここでは泡なし酵母の特性を生かし、通気攪拌による泡の形成が少ない状態でエタノールを生産する能力を有する新規の酵母を作出することとした。さらに、エタノール生産促進を有する廃棄バイオマス資源を活用することにより、生産効率のよいエタノール製造方法を検討した。得られたエタノールはバイオマスエネルギーの分野において未利用生物資源の利活用および二酸化炭素の削減に寄与すると考えられる。

一方、これまでの発酵アルコール飲料は長期間低温でのみ醸造されており、短期間で醸造された製品はなかった。そのため果物や野菜を新鮮なまま発酵アルコール飲料として開発する目的で食用完熟トマトを用いて通気攪拌発酵によるトマト酒を試作した。

実験方法

1. 供試菌株

供試菌株は、清酒酵母きょうかい7号株 (K-7 株) および K-7 株を変異原処理して作出して得た変異株を用いた。変異株の作出は次のように行った。10⁷ cells/ml の菌懸濁液 5 ml にメタンスルホン酸エチル 0.15 ml を加え、30°C で 45 分間処理した後、Elorzasa⁴⁾ が示したように、酵母細胞表層タンパク質の変異株を濃縮することを目的として、シクロヘキシミド 10 ppm を含む YEPD 寒天培地 (酵母エキス 1%, バクトペプトン 1%, グルコース 2%, 寒天 2%, pH 6.0) により、シクロヘキシミド耐性株を純粋分離した。さらに、清酒酵母を通気攪拌培養する場合、泡形成が培養容量を減少させるため、シクロヘキシミド耐性株から泡なし酵母変異株の取得を試みた。分離したシクロヘキシミド耐性株から、気泡吸着法⁵⁾ を用いて、泡なし酵母を集積し、平板培養により泡なし酵母を単離した。これらの変異株を合成培地 (蒸留水 1 L 中に以下の成分を含む: スクロース 200 g, (NH₄)₂SO₄ 5 g, Na₂HPO₄ 5 g, KH₂PO₄ 2 g, MgSO₄・7 H₂O 0.5 g, 酵母エキス 2 g, pH 6.0) を用い振とう培養

し、二酸化炭素発生量が優れている変異株を選別した。それらの株の中からさらにエタノール生成能が優れていた NF 1-1 株を選別した。これらの菌株は YEPD 寒天培地に植え、5°C で保存した。

2. エタノール発酵試験

NF 1-1 株および対照として親株の K-7 株を用い、糖蜜培地、廃棄されるトマトやカキから果汁を調製した果汁培地⁷⁾、あるいはトマト・糖蜜混合培地および合成培地を用いてエタノール発酵試験を行った。いずれの場合も前培養培地は本培養培地組成と同じものを用いた。本培養が振とう培養の場合の前培養は、試験管に 5 ml の培地をいれ、オートクレーブ滅菌を行った後、斜面培地から 1 白金耳植菌し、30°C で 24 時間、静置培養した。本培養は無滅菌の培地を 500 ml の三角フラスコに 100 ml の培地をいれ、前培養を 5% 加えて 30°C で振とう (160 rpm) 培養した。糖蜜培地の組成は、蒸留水 1 L 中に以下の成分を含む: 糖蜜 250 g, スクロース 100 g, (NH₄)₂SO₄ 5 g, Na₂HPO₄ 5 g, KH₂PO₄ 2 g, pH 6.0。トマト果汁培地は、トマト果汁 1 L に以下の成分を含む: スクロース 145 g, (NH₄)₂SO₄ 5 g, pH 6.0。トマト果汁は、以下のように調製した。完熟トマト果実をつぶした後、還流冷却管を装着した 5 L 三角フラスコに入れ、約 1 時間煮沸した。冷却後、5000×g、15 分間遠心し、その上清をトマト果汁とした。ニンジン抽出液は、以下のように調製した。ニンジンをミキサーにかけた後、同量の蒸留水を加え 90°C で約 1 時間加熱した。冷却後、10,000×g、15 分間遠心し、その上清をニンジン抽出液とした。ニンジン抽出液培地の組成は、ニンジン抽出液 1 L 中に以下の成分を含む: スクロース 150 g, (NH₄)₂SO₄ 5 g, Na₂HPO₄ 5 g, KH₂PO₄ 2 g, pH 6.0。カキ果汁培地は、庄内柿果汁 1 L に以下の成分を含む: スクロース 63 g, (NH₄)₂SO₄ 5 g, pH 6.0。カキ果汁は、以下のように調製した。完熟カキ果実をつぶした後、20 L ポリタンクに入れ、2 倍希釈した過熟カキ果実を用いて、K-7 株を 24 時間、30°C で前培養した菌液を 5% 添加して、カキ果汁が最もよく調製される条件⁷⁾である 12 時間、30°C で静置した。果肉は上部に浮いてくるので、下部の清澄液を採取後、5000×g、15 分間遠心し、その上清をカキ果汁とした。トマト・糖蜜混合培地の発酵においては、2 倍希釈した糖蜜とトマト果汁の混合割合を 9 対 1 か

ら5対5まで変え、スクロースを加えずに、30°Cで振とう(160 rpm)培養した。通気攪拌培養は、糖蜜培地およびトマト果汁培地を用いて行った。前培養は、培地を500 mlの三角フラスコに100 mlの培地をいれ、滅菌し、予め培養した種培地を5%加えて30°Cで振とう(160 rpm)し、24時間培養した。本培養は、糖蜜培地の場合は10 L容のファーマンターに7 Lの培地を入れ、0.5 vvm, 200 rpmの条件で、トマト果汁培地の場合は10 L容のファーマンターに4 Lの培地を入れ、0.2 vvm, 200 rpmの条件で、前培養を5%加えて30°Cで行った。合成培地は1 L中に以下の成分を含む：スクロース 200 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g, Na_2HPO_4 5 g, KH_2PO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 酵母エキス 2.0 g, pH 6.0。

3. NF 1-1 株の諸性質の検討

NF 1-1 株および対照として K-7 のエタノール耐性、温度耐性、浸透圧耐性および酸化ストレス耐性を Ogawa ら⁸⁾の方法に準じて行った。

(1) エタノール耐性試験

YEPD 培地で2日間、30°Cで静置培養し、冷却水で洗浄後、1%グルコースと20%エタノールを含む0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.2) に 1×10^8 cells/ml の細胞を懸濁した。30°Cに保持し、4時間毎に一部を採取し、適宜希釈し YEPA 寒天培地で30°C、2日間培養後、形成したコロニー数を計測し生存率を求めた。

(2) 温度耐性試験

温度耐性試験は対数増殖期細胞 (1×10^8 cells/ml) を試験管に入れ、50°Cで保温し、3分毎に取り出して冷却後の生存細胞数を YEPA 寒天平板培地で形成したコロニー数を計測し生存率を求めた。

(3) 浸透圧耐性試験

浸透圧耐性試験は糖濃度20%に調整したトマト抽出液で培養した対数増殖期細胞 (1×10^8 cells/ml) を0.1 M リン酸緩衝液 (pH 5.9) で洗浄後、3 M NaCl を含む YNB 培地⁹⁾ (グルコース 2%, yeast nitrogen base 0.67%, pH 5.5) に懸濁し、30°Cで培養した。6時間毎に一部を採取し適宜小試験管で連続的な希釈を行い、YEPA 寒天培地で30°C、2日間培養後、形成したコロニー数を計測し生存率を求めた。さらに、耐糖性を調べるために、トマト抽出液培地にスクロースを添加し、糖濃度が60から80%の間で培養し、増殖量とエタノール生成能を測定した。

(4) 酸化ストレス耐性試験

酸化ストレス耐性試験は対数増殖期細胞 (1×10^8 cells/ml) を連続的に10倍希釈した後、3 mM の過酸化水素を含む YEPA 寒天平板培地にそれぞれをスポットし、30°C、2日間培養後、形成したコロニーを写真撮影した。

4. トマト果汁による発酵アルコール飲料の製造試験

完熟トマト果実をジューサーにかけ、さらに晒布で濾過したトマト果汁を15 mlの試験管に5 ml分注し、121°Cで15分間オートクレーブ滅菌し前培養培地とした。この前培養培地に、NF 1-1 株の斜面培養物を1白金耳接種して30°Cで24時間静置培養し、前培養物とした。酒母培地としては前培養培地と同様に調製したトマト果汁を500 mlの三角フラスコに100 ml分注し、上記の前培養物を5%濃度で加え、回転振とう(160 rpm)し、30°Cで24時間培養し、酒母とした。一方、主培地としては前培養培地と同様に調製したトマト果汁に10%のスクロースを添加した。その主培地4リットル分を10リットルのジャーファーマンターに無滅菌で仕込んだ。上記の酒母を5%濃度となるよう主培地に移植し、攪拌数200 rpm, 通気0.1 vvm, 30°Cの条件下で培養した。一定時間毎に試料を採取し、遠心分離 (10,000×g, 15分) により、菌体を除去した。得られた上澄液は種々の成分分析および官能試験に用いた。エタノール生成量の増加が認められなくなった時点で発酵を終了した。比較のために K-7 株も同様な条件で同時に培養した。

トマト酒の官能評価は点数が小さいほど優れているとした3点法で、山形県工業技術センター研究員により行い、その平均値で示した。

5. 分析方法

エタノールは日立ガスクロマトグラフィー G-3900 (FID, 充填剤 Porapak Type Q (Waters Co.)) により、175°Cで測定した⁷⁾。菌体の糖組成の分析は Lee ら⁹⁾に準じて HPLC により行った。すなわち、それぞれ約2 mgの試料を2 M TFA に懸濁し、121°Cで90分間加熱した。その後減圧乾固して、その残渣を1 mlの蒸留水に溶かした。その溶液10 μ l を Shodex SUGAR SP 0810 カラム (8.0 ϕ × 300 mm, 昭和電工(株)) により分析した。カラムは蒸留水で溶出させ、糖の検出は RI 検出器により行った。有機酸

Fig. 1 Micrographs of K-7 (A) and NF1-1 (B) cells grown in a synthetic medium incubated for 5 days.

の分析はHPLCにより行った。すなわち、発酵上清と内部標準液（レプリン酸溶液）を1対1で混合後、その溶液10 μ lをShim-pack-102カラム（8.0 ϕ $\times$ 300 mm, 2直接続, 島津製作所）により分析した。還元糖量はジニトロフタル酸法によった¹⁰⁾。

実験結果および考察

1. 変異株による発酵試験

変異処理して得られた泡なし変異株18株について合成培地を用いた振とう培養による発酵試験をした結果、きょうかい7号株（K-7株）より二酸化炭素発生量が多かったNF1-1株とNF1-18株を選別した。培養5日目に生成したエタノールを測定した結果、K-7株、NF1-1株およびNF1-18株はそれぞれ6.6, 9.6および8.8%であった。NF1-1株が高かったことから、今後、この株を用いることとした。この菌株の形態は培養期間中をとおして著しく球状であり、形態変異株であることを認めた。合成培地を用い5日間培養したK-7株およびNF1-1株の顕微鏡像をFig. 1に示した。NF1-1株が親株由来であることを確認するために、菅間らが示した方法¹¹⁾に従い、35°Cで培養した場合、NF1-1株も親株同様にパントテン酸要求性を示したために、親株由来と判断した。さらに、NF1-1株は呼吸欠損変異株の可能性があるために、NF1-1株をYNB-グリセロール寒天培地（グリセロール1%, yeast nitrogen base 0.67%, 寒天2%, pH 5.5）およびYEP-グリセロール寒天培地（グリセロール1%, 酵母エキス2%, ペプトン1%, 寒天2%, pH 5.5）で生育の有無を確認した。いずれの培地においても生育が認められ、呼吸欠損変異株ではないことが確認された。

Fig. 2 Time course of changes in the production of ethanol by NF1-1 strain (●) and Kyokai No. 7 strain (○) incubated in a molasses medium with the fermentor at 30°C.

2. 糖蜜培地におけるエタノール生産性におよぼす培養方法の影響

合成培地による振とう培養において、NF1-1株はエタノールを効率よく生産することを認めたため、さらにファーマンターによる通気攪拌培養を、エタノール発酵生産によく用いられる糖度20%に調整した糖蜜を糖源として試みた。その結果をFig. 2に示した。いずれの菌株においても培養32時間目でエタノール生成は最高値となり、NF1-1株は11.9%, K-7株では10.1%であった。通気量や攪拌回数をこれ以上増やしても、いずれの菌株もエタノール生成量は増加せず、むしろ減少し、特にK-7株でその傾向は著しかった（データは省略）。さらに、同じ糖蜜培地を用い、静置培養と振とう培養を行い、エタノール生産性を比較した。その結果をTable 1に示した。糖蜜を用いた通気攪拌培養の場合、そのエタノール生成量と生産性は、32時間で最高値を示し、NF1-1株においては93.9 g/L, 生産性約2.9 g/(L $\cdot$ h)で、K-7株では79.8 g/L, 生産性約2.5 g/(L $\cdot$ h)であった。NF1-1株の場合、これまで報告されている糖蜜を発酵原料とした回分法の培養容積当たりの生産性が1.3-1.5 g/(L $\cdot$ h)¹¹⁾であるのに比べ、2倍ほど高かった。併せて、泡なし酵母であるNF1-1株では培養開始時にわずかの消泡剤の添加でよかった。振とう培養においてもNF1-1株はK-7株より生産性は高く、培養48時間

Table 1 Productivity of ethanol on a molasses medium that initially contained 20% sugar by culture condition.

Culture condition	NF 1-1		K-7	
	Ethanol (g/L)	Productivity (g/L·h)	Ethanol (g/L)	Productivity (g/L·h)
Static	75.0	0.45	71.0	0.42
Shaking	91.2	1.90	85.4	1.78
Fermentor	93.9	2.90	79.8	2.49

Table 2 Ethanol productivity on vegetable juice medium that initially contained 20% sugar by shaking culture.

	NF 1-1		K-7	
	Ethanol (g/L)	Productivity (g/L·h)	Ethanol (g/L)	Productivity (g/L·h)
Tomato	82.4	3.43	80.1	3.34
Carrot	80.9	2.89	74.2	2.65
Persimmon	75.5	1.72	72.9	1.52

目で最高値を示し、生産性は1.9g/(L・h)であったが、静置培養ではいずれの菌株においても大きな差は認められなかった。したがって、NF 1-1株は好気的な条件において高いエタノール生産性を発揮する能力を有すると思われた。振とうあるいは通気攪拌が培地に酸素を供給することにより、酵母の増殖およびエタノール発酵に影響を及ぼす可能性も考えられるが、今後検討したい。

3. 野菜果汁および果物果汁におけるエタノール発酵

未利用のまま廃棄されている野菜や果実を用いてエタノールを生産することができれば、農産物廃棄資源の活用と二酸化炭素の削減に結びつけることが可能となる。そのため、市場に出荷されないトマト果実（山形大学農学部附属農場より提供）および庄内特産の庄内柿（農事組合法人松ヶ岡農場，山形県鶴岡市羽黒より提供）を用いて発酵試験を行った。併せて、酵母のよい培地であるニンジン抽出液も用いた。それぞれの培地にはスクロースを加え糖度を20%に調整した。これらの果汁を用いた振とうエタノール発酵の結果をTable 2に示した。トマト果汁を用いた培養において

は、何れの菌株においてもエタノール生産は培養24時間で最高値を示し、NF 1-1株は82.4g/L、生産性約3.4g/(L・h)で、K-7株では80.1g/L、生産性約3.3g/(L・h)であった。ニンジン抽出液を用いた培養においては、何れの菌株においてもエタノール生産は培養28時間で最高値を示し、トマト果汁よりエタノール生産性が劣っており、NF 1-1株は約2.9g/(L・h)で、K-7株では約2.7g/(L・h)であった。カキ果汁を用いた培養においては、何れの菌株においてもエタノール生産はさらに遅れ、培養48時間で最高値を示し、エタノール生産性は、NF 1-1株が約1.7g/(L・h)で、K-7株では約1.5g/(L・h)であった。ここで用いた何れの培地においてもNF 1-1株がK-7株よりエタノール発酵能が優れていた。トマト果汁を用いた場合、発酵時間が短縮され、生産性も向上した。トマトやニンジンはエタノール発酵のための糖源としてよりも、発酵促進効果剤としての利用が考えられる。そこで、糖源として糖蜜を用い、発酵促進効果剤としてトマト果汁を用いることにより、エタノール発酵に及ぼす効果を検討した。トマト果汁と糖蜜の混合比を

Table 3 Influence of the mixture of molasses and tomato upon the ethanol productivity.

Molasses ^a : Tomato	NF 1-1			K-7		
	Etha- nol (g/L)	Time ^b (h)	Produc- tivity (g/L·h)	Etha- nol (g/L)	Time ^b (h)	Produc- tivity (g/L·h)
10 : 0 (20.0) ^c	53.3	56	0.95	88.6	56	1.58
9 : 1 (18.6)	82.1	48	1.71	88.5	44	2.01
7 : 3 (15.7)	71.6	32	2.24	71.3	28	2.54
5 : 5 (12.8)	61.5	24	2.56	61.0	24	2.54

a : Molasses was diluted at 2 times with distilled water.

b : The time of maximum fermentation of ethanol.

c : Values in parentheses are the percent of reducing sugar in the mixture of molasses and tomato.

Fig. 3 Time course of changes in the production of ethanol by NF1-1 strain (●) and Kyokai No. 7 strain (○) incubated in a tomato medium with the rotary shaker (A) and fermentor (B) at 30°C.

変えた結果を Table 3 に示した。どちらの菌株においても発酵時間はトマト果汁を添加する割合の増加に従い短時間で終了し、特に 5 : 5 の場合はトマト果汁培地の発酵終了時間と同じ 24 時間で最高値に達した。そのときのエタノール生成量と生産性の結果は、NF 1-1 株においては 61.5 g/L (生産性約 2.6 g/L·h) で、K-7 株で 61.0 g/L (生産性約 2.5 g/L·h) であった。糖蜜にトマト果汁を混合した場合は、NF 1-1 株と K-7 株ではトマト単独でエタノール発酵を行った時と比べると、NF 1-1 株のエタノール生産性は

劣っていた。NF 1-1 株は糖蜜に含まれる何らかの成分によって生長やエタノール発酵が阻害されることが考えられる。これらの原因については今後の検討課題である。

トマト果汁がエタノールの生成を促進する可能性が示されたため、トマト果汁に糖量を 30% になるようにスクロースを加えて振とう培養と通気培養を行った。その結果を Fig. 3 に示した。振とう培養の場合 (Fig. 3 A)、いずれの菌株の場合も 42 時間で最高値を示したが、培養 36 時間以降 NF 1-1 株のエタノール生成

Table 4 Sugar composition of yeast cells by culture condition.

	Shaking culture			Static culture		
	Biomass (g/L)	Glc. (%)	Man. (%)	Biomass (g/L)	Glc. (%)	Man. (%)
NF 1-1	2.85	9.7	14.1	1.60	14.5	10.3
K-7	2.20	14.5	14.1	1.55	18.2	11.0

量は、K-7 株を逆転していた。NF 1-1 株のエタノール生成量は 15.9% (125.3 g/L)、生産性約 3.0 g/(L・h) で、K-7 株で生成量は 14.5% (114.2 g/L)、生産性約 2.7 g/(L・h) であった。NF 1-1 株の場合、これまで報告されている糖蜜を発酵原料とした回分法の培養容積当たりの生産性が 1.3-1.5 g/(L・h)¹⁾であるのに比べ、2 倍ほど高かった。通気培養の場合 (Fig. 3 B)、いずれの菌株の場合も 36 時間で最高値を示し、NF 1-1 株のエタノール生成量と生産性は、生成量は 14.3% (113.0 g/L)、生産性約 3.1 g/(L・h) で、K-7 株では生成量は 14.1% (111.4 g/L)、生産性約 3.1 g/(L・h) でその差はほとんど認められなかった。しかし、この場合、発酵を 36 時間で終了させており、NF 1-1 株ではその後もエタノール生成を継続する可能性が考えられ、今後検討する必要があると思われる。併せて、泡なし酵母である NF 1-1 株では培養開始時にわずかの消泡剤の添加でよく、K-7 株で見られたタンクからのふきこぼれもなかった。現在、トマト果汁に含まれるエタノール発酵促進物質を検索中である。

4. NF 1-1 株の性質

エタノール耐性の清酒変異株は種々のストレス耐性があることが示されている⁸⁾。NF 1-1 株についてもそのような耐性の有無を調べた。対数増殖期細胞を用いた場合、30°C で過酸化水素を含む培地による酸化的ストレス耐性の試験において、K-7 株と生存細胞の量的な差は認められなかった (結果は省略)。一方、50°C、12 分間の熱耐性試験における生存率は NF 1-1 株が 0.42% と K-7 株の 0.08% に比べて高く、3 M NaCl を含む YNB 培地⁷⁾に 30°C、24 時間培養した浸透圧ストレス条件においた場合においても、NF 1-1 株は増殖傾向を示し 1.87 倍の細胞数であったが、K-7 株の増殖は抑制され 0.84 倍に減少していた。この浸透圧ストレス条件における NF 1-1 株細胞の形態は

トマト果汁で発酵したときの形態とほぼ同じであり、肥大した球形細胞が連結していたが、K-7 株に形態の変化は認められなかった。NF 1-1 株がより浸透圧耐性を示したことから形態の変化と関連があると思われる。また、発酵限界であった糖濃度 70% のトマト果汁培地で 30°C、4 日間の培養におけるエタノール生成量も NF 1-1 株が 4.1% で K-7 株の 1.9% より高かったことから浸透圧耐性がより優れていると思われた。20% エタノール耐性試験における 30°C、8 時間処理後の生存率は NF 1-1 株が 1.0% と K-7 株の 38.0% に比べ著しく低かった。このエタノール耐性の弱さが、30% 以上の高い糖濃度におけるエタノールの生産性の向上を阻害している要因の 1 つと思われる。この菌株の形態は著しく球状であり、形態変異株であることを認めた。酵母細胞形態が細胞糖組成に影響を及ぼすことが知られている¹²⁾ ことから、合成培地で培養した菌体の細胞糖組成を親株の K-7 株と比較した (Table 4)。その結果、NF 1-1 株は K-7 株に比べ、振とう培養と静置培養のいずれにおいても、グルコース含量の低下が認められた。泡なし酵母変異株が Ouchi と Akiyama⁵⁾ により報告され、さらに Ouchi と Nunokawa¹³⁾ によりその変異株の物理化学的特性も明らかにされている。さらに、泡なし変異株で AWA 1 遺伝子に由来する細胞壁タンパク質が欠損していることが報告されている¹⁴⁾。NF 1-1 株においても細胞壁多糖や細胞壁タンパク質の構造や生合成に何らかの変異が生じている可能性があるが、変異の詳細とエタノール発酵との関連については不明であり、今後の検討が必要である。

5. トマト果汁による発酵アルコール飲料の製造

完熟トマト果汁を方法に示したようにジャーファーマンターに無滅菌で仕込んだ場合のエタノール生成量、還元糖量および官能評価の結果を Table 5 に示した。NF 1-1 株も K-7 株も 20 時間以降は、これ以上のエ

Table 5 Analysis of components and sensory evaluation in tomato mash during fermentation.

	Time (h)	Ethanol (%)	Reducing sugar (%)	pH	Sensory evaluation
NF 1-1	12	4.0	6.8	3.47	1.75
	16	5.0	3.9	3.46	2.30
	20	7.6	0.8	3.45	2.80
K 7	12	3.8	6.2	3.93	2.80
	16	5.6	3.5	3.37	2.00
	20	6.7	0.9	3.36	2.85
Tomato juice		0.0	7.8	4.25	N. D.

Number of panelists : 10.

N. D. : Not determined.

Table 6 Analysis of organic acid in tomato mash during fermentation

	Time (h)	Citric acid (ppm)	Succinic acid (ppm)	Malic acid (ppm)	Pyruvic acid (ppm)	Acetic acid (ppm)
NF 1-1	12	2370	434	158	104	12
	16	2377	438	175	116	27
	20	2411	457	198	127	34
K 7	12	2393	506	175	115	24
	16	2251	543	198	109	19
	20	2323	612	242	109	33
Tomato juice		2379	0	133	0	0

タノール生成はなかった。NF 1-1 株においては培養 20 時間で最高値 7.6%, K-7 株では培養 20 時間で最高値 6.7% であった。この場合も、NF 1-1 株のエタノール生成量がすぐれていた。これらの発酵酒の品質を比較するために、10 人のパネラーによって 3 点評価法により官能試験をおこなった。その結果、最も評価が高かったのは NF 1-1 株による培養 12 時間目が 1.75 で、最も低かったのは K 7 株の培養 20 時間目が 2.85 であった。16 時間目以降では還元糖が減少し、酸味が引き立ったため、酸味の好き嫌いで評価が分かれる結果となっていた。有機酸の分析結果を Table 6 に示した。有機酸は、いずれの菌株においてもクエン酸含量が最も高かったが、原料のトマト果汁に含まれていて、発酵によって生成も消費もされていないこ

とを示していた。それ以外の有機酸もいずれの菌株においてもコハク酸、リンゴ酸、ピルビン酸、酢酸の順に多かった。コハク酸、ピルビン酸および酢酸はトマト果汁には含まれておらず、発酵過程で生成されていた。リンゴ酸はトマト果汁にも含まれていたが、発酵過程でも生成されていた。NF 1-1 株は、これらの有機酸の中でよりコハク酸の生成量が少ない傾向を示していた。最も官能評価の高かった NF 1-1 株の発酵 12 時間の酒は、強い刺激的な酸味を示すピルビン酸と酢酸含量が低く、還元糖量が高かった。そのため甘いトマトの風味が生き、丸味ある飲みやすい酸味の生きたすっきりした味が保たれていたと思われる。最も評価の低かった K-7 株による発酵 20 時間の酒は酢酸含量が最も高く、還元糖は 1% 以下であった。そのた

め酸味と渋みが引き立ち、くどさを感じられる結果となっていた。以上の結果から、NF 1-1 株を用いることで、発酵時間が12時間以内の短時間で、新鮮で飲みやすい低アルコールの発酵トマト酒の醸造が可能であると思われる。他の果汁や野菜ジュースを単独であるいは混合しても同様に低アルコールの発酵酒の醸造の可能性が示唆された。しかし、発酵コストの点では、通気攪拌時間の短縮を検討する必要があると思われる。なお、比較のために、K-7 株および NF 1-1 株によりトマト果汁を通気攪拌しないで発酵させた場合、7 日間で発酵は終了したが、いずれもエステル臭と酢酸臭が強く、飲料には適さないと判断し、これ以上の分析や官能試験は行わなかった。

要 約

振とうや通気攪拌の条件下で高いエタノール生産性を得る目的で、清酒酵母きょうかい7号 (K-7) から泡なし変異株 NF 1-1 を得た。この菌株を用い、各種培地のもとで振とう培養およびファーマンター培養を行った。糖濃度30%に調整したトマト抽出液を用いて振とう培養した場合、エタノール濃度は125.3g/L、生産性はK-7 株より1.1 倍高い3.0g/L・hであった。トマト果汁にエタノール発酵促進物質の存在が示唆された。NF 1-1 株はK-7 株に比べエタノール耐性が低く、耐塩性、耐糖性及び温度耐性は高かった。トマトジュースによる低濃度エタノール飲料を試作した結果、初発糖濃度10%の場合、ジャーファーマンターにより20 時間で発酵が終了し、新たなアルコール飲料の可能性が示唆された。

謝 辞

本研究は、山形県地域結集型共同研究事業「遺伝子工学と生命センシングの複合技術による食材と生物材料の創世」(1998.9~2003.9) の1 課題から派生した成果である。関係各位に心から謝意を表します。

文 献

- 1) 栃倉辰六郎, 山田秀明, 別府輝彦, 左右田健次監: 発酵ハンドブック, pp. 43-48, 共立出版 (2001)
- 2) 吉沢淑, 石川雄章, 蓼沼誠, 長澤道太郎, 永見憲三編集: 醸造・発酵食品の事典, pp. 210-399, 朝倉書店 (2002)
- 3) S. KIM, B. E. DALE, *Biom. Bioe.*, **26**, 361-375 (2004)
- 4) T. OKAMURA, T. OGATA, N. MINAMIMOTO, T. TAKENO, H. NODA, S. FUKUDA, and M. OH-SUGI, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1596-1600 (2001)
- 5) K. OUCHI and H. AKIYAMA, *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1024-1032 (1971)
- 6) M. V. ELORZA, C. M. LOSTAU, J. R. VILLANUEVA, and R. SENTANDREU, *Biochim. Biophys. Acta*, **454**, 273-284 (1976)
- 7) 河東田茂義, 末永秀清: 山形農林学会報, **44**, 25-27 (1987)
- 8) Y. OGAWA, A. NITTA, H. UCHIYAMA, T. IMAMURA, H. SHIMOI, and K. ITO, *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 313-320 (2000)
- 9) J.-N. LEE, D.-Y. LEE, I.-H. JI, G.-E. KIM, H. N. KIM, J. SOHN, S. KIM, and C.-W. KIM, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 837-841 (2001)
- 10) 百瀬勉, 矢野良子: 化学の領域, **17**, 891-895 (1963)
- 11) 菅間誠之助, 山川浩一郎, 瀧岡厳一, 山村紘司, 野白喜久雄: 醸協, **60**, 453-456 (1965)
- 12) M. HAYASHIBE, N. SANDO, and N. ABE, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **16**, 287-303 (1973)
- 13) K. OUCHI and Y. NUNOKAWA, *J. Ferment. Technol.*, **51**, 85-95 (1973)
- 14) K. MIYASHITA, K. SAKAMOTO, H. KITAGAKI, K. IWASHITA, K. ITO, and H. SHIMOI, *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 14-18 (2004)