清酒酵母のピルビン酸生成能に及ぼす エタノールの効果

飯村 稔・松丸克己・水野昭博
上田護国・斎藤泰夫・伊藤 康

(名古屋国税局鑑定官室)

平成2年7月3日受理

The Effect of Ethanol on Pyruvic Acid Productivity of Sake Yeast

Yuzuru IIMURA, Katsumi MATSUMARU, Akihiro MIZUNO,
Morikuni UEDA, Yasuo SAITO and Koh ITO

(The Office of Technical Officers, The Taxing Bureau of Nagoya,
3-3-2, Sannomaru, Naka-ku, Nagoya 460)

The effect of ethanol on the pyruvic acid productivity of sake yeasts in synthetic media was studied, to elucidate the mechanism of pyruvic acid in sake mash (*moromi*). A sake yeast, Kyokai No.9, was precultured in media composed of 2% glucose, 0.67% Yeast Niteogen Base w/o amino acid (pH 4.5) and ethanol of various concentrations. Resulted yeast cells were washed with water, replaced in the fresh basal medium containing glucose as the sole carbon source at the density 1.6×10^8 cells/ml, and incubated at 15°C. The pyruvic acid productlvtvity in this culture was determined. Yeast cells grown in the preincubation with 8~10% ethanol had pyruvic acid productivity 1.8 times as high as those grown in the preincubation without ethanol. The increment in the productivity was also enhanced by the supplementation of L-lactic acid. The pyruvic acid productivity of the yeast cell depended on the ethanol concentration of the medium used for the preculture, while the productivity of the resting cells harvested from the preculture were not influenced by the concentration of ethanol in the replacement culture. The increment in the pyruvic acid productivity of the yeast cell grown in the presence of ethanol was seemed to be due to the reduction in the pyruvic acid assimilating ability.

Key words : 清酒酵母・ピルビン酸・エタノール

緒 言

清酒醪において、酵母はエタノール濃度が10~12%に達するまで増殖することが報告されている¹⁾。すなわち、酵母は清酒醪において、種々の異なる濃度のエタノール存在下で増殖する。特に、醪初期に比べエタノール濃度が10%前後に達してから増殖した酵母は、醪後半の成分変化に対してより大きく関与することが考えられる。したがって、種々の濃度のエタノール存在下で増殖した酵母について生理学的諸性質の違いを検討することにより醪管理にとって重要な知見が得られるものと思われるが、それに関する報告は見当たらない。

一方、ピルビン酸はアルコール発酵における中間体と

して不可欠な成分であるが、他方で、清酒醪中のピルビン酸は、木香様臭と呼ばれる異臭の本体であるアセトアルデヒドの前駆体でもある²⁾。したがって清酒醪においてピルビン酸生成を制御することが醪管理の上で求められる。

そこで、酵母増殖時のエタノールの存在が生理学的諸性質にどのように影響するかを検討する一環として、清酒酵母のピルビン酸生成に対するエタノールの影響を調べた。本報では清酒醪を想定した合成培地を用いて清酒酵母を種々の濃度のエタノール存在下で培養し、得られた菌体についてピルビン酸生成能を比較した。その結果、8~10%のエタノール存在下で培養して得られた休止菌体は、それより低いエタノール存在下で培養した休

止菌体に比べピルビン酸生成能の高いことを見出し、さらにその原因についても考察した。

実験方法

1. 供試菌株

清酒酵母協会 9 号を使用した。

2. 培地

基本培地としては Wicherham 培地に準じた 0.67% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acid (DIFCO 社製) と 2% グルコースを含むものを用い、この基本培地に 0~12% の範囲で種々の濃度のエタノールを添加した培地 (GE 培地) を使用した。また、必要に応じて GE 培地に 0.4% L-乳酸を添加した GEL 培地も用いた。

後述の置換培養にあたっては、前培養に GE 培地を用い、本培養には 0.67% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acid (DIFCO 社製) に唯一の炭素源として 2%, 6% グルコース, 300 ppm ピルビン酸あるいは 0.4% L-乳酸のいずれかを添加した培地 (本培養培地) を用いた。

pH についてはいずれの培地も NaOH または HCl を用いて清酒醪に準じて 4.5 に調整した。

3. 置換培養

供試菌体を GE 培地 200 ml に 10^6 個/ml の密度で植菌し、15°C, 5 日間静置することにより前培養して得られた菌体を集菌し、冷水約 100 ml で 2 回洗浄後、本培養培地 (pH 4.5) 20 ml に菌体密度が 1.6×10^8 個/ml となるよう置き換えた。この際、菌体密度は最終的に吸光度 (600 nm) を測定することにより調整した。本培養は 15°C において一定期間行った。

4. ピルビン酸生成能の測定

培養液を濾過し酵母菌体を除去した試料について、ピルビン酸濃度を測定した。この値を増殖後の菌体数で補正するため、同一培養液について菌体密度を吸光度 (600 nm) で測定し、最終的にピルビン酸生成能は次のように表わした。

ピルビン酸生成能

= 測定ピルビン酸濃度 (ppm) / 菌体密度 (OD_{600})

なお、ピルビン酸の定量は F-キットピルビン酸 (ペーリンガー・マンハイム社製) を用いる酵素法によった。

5. ピルビン酸資化能の測定

培地中に添加したピルビン酸濃度の減少を経時的に測定した。定量は前項と同様の方法によった。

6. エタノールの定量

培養液を濾過し酵母菌体を除いた試料について F-キ

ットエタノール (ペーリンガー・マンハイム社製) を用いる酵素法で行った。

実験結果

1. エタノールを含む培地におけるピルビン酸生成能

GE 培地あるいは GEL 培地に供試菌株を 10^6 /ml の密度で植菌し 15°C で 6 日間、静置培養した。培養後の菌体密度は GE 培地および GEL 培地のいずれにおいてもエタノール濃度が 0~8% においてほぼ一定 ($7.0 \sim 7.5 \times 10^7$ 個/ml) であったが、10% 以上含む培地では菌体密度が $5.0 \sim 5.2 \times 10^7$ 個/ml となり約 70% まで低下した。その時のピルビン酸生成能を測定し、その結果を Fig. 1 に示した。GE 培地及び GEL 培地のいずれにおいても、より高い濃度のエタノール存在下で培養することによりピルビン酸生成能も高くなる傾向が見られた。また、GEL 培地では GE 培地の場合に比べ全般的に 1.5~1.8 倍の高いピルビン酸生成能を示した。

2. 各種濃度のエタノール存在下で培養した菌体のグルコースからのピルビン酸生成能

増殖を伴わない休止菌体によるピルビン酸生成能を調べるため、まず、各種濃度のエタノールを含む GE 培地で前培養した菌体を一旦集菌した後、得られた菌体を新たに調製した本培養培地に増殖が伴わないように高い菌体密度で置き換えた後、置換培養を行った。前培養時のエタノールと、置換培養 (初発グルコース濃度 6% または 2%) におけるピルビン酸生成との関係を経時的に調べその結果を Fig. 2 に示した。

Fig. 1 The effect of ethanol on the pyruvic acid productivity of the sake yeast in Glucose-Ethanol (GE) and Glucose-Ethanol-Lactate (GEL) media.

The GE media were composed of 2% glucose, 0.67% Yeast Nitrogen Base (DIFCO) and ethanol of various concentrations. The GEL media were the GE media supplemented with 0.4% lactate. A sake yeast, Kyokai No. 9, was incubated in the each medium at 15°C for 6 days. Symbols, (○) and (●), showed GE and GEL media respectively.

Fig. 2 The effect of ethanol concentration in preculture on the pyruvic acid and the ethanol productivities of the yeast resting cell in the replacement culture in the basal medium containing glucose.

A sake yeast, Kyokai No.9, was precultured in the GE media, which contained ethanol of the various concentrations described in the legend of Fig. 1. After washed, resulting cells were replaced in the basal medium, which contained 2 or 6% glucose as sole carbon source. Then, incubations were carried out at 15°C.

Symbols showed the ethanol concentrations in the preculture; 0% (x), 4% (Δ), 8% (○) and 10% (●).

Dotted lines showed the ethanol production.

初発グルコース濃度が6%の実験では、前培養時に高い濃度のエタノール存在下で培養した菌体ほどピルビン酸生成能の高い傾向が見られた。生成ピルビン酸濃度についてはエタノール非存在下で培養した菌体では培養1日目、またエタノール存在下で培養した菌体ではいずれも培養2日目で最大値となって、以後減少が見られた。なお、このピルビン酸の減少は、佐藤ら³⁾の報告に符合するものであった。エタノールの生成については10%エタノール存在下で前培養した菌体はエタノール非存在下で前培養した菌体に比べ遅れが見られたが最終的にはほぼ同じ濃度となった。

一方、初発グルコース濃度が2%の実験においても6%の実験と同じように高い濃度のエタノール存在下で培養した菌体ほどピルビン酸生成も高い傾向が見られたが、そのレベルは6%の場合の約3分の1に留まり、エタノール生成の傾向もそれに呼応していた。

なお、この一連の置換培養においては菌体密度に変動がなく新たな増殖が認められないことから、ピルビン酸およびエタノールの生成は休止菌体によるものであることが確かめられた。

Fig. 3 The effect of ethanol concentration in preculture on the pyruvic acid assimilating ability of the resting yeast cell in the replacement culture in the basal medium containing pyruvic acid as the sole carbon source.

Ca. 300 ppm pyruvic acid was used instead of glucose and L-lactate as the sole carbon source in the replacement cultures described in the legend of Fig. 2.

Symbols showed the ethanol concentrations in the preculture; 0% (x), 4% (Δ), 8% (○) and 10% (●).

3. 各種濃度のエタノール存在下で培養した菌体のピルビン酸資化能

前項と同様、各種濃度のエタノール存在下で培養した菌体をピルビン酸 300 ppm を唯一の炭素源とする培地で置換培養し、ピルビン酸資化を経時的に調べ、その結果を Fig. 3 に示した。エタノール無添加で前培養した菌体については、資化されたピルビン酸量は 48 時間でほぼ上限値に達したが、エタノール存在下で前培養した菌体については資化に遅れがみられ、特に 8% 以上のエタノール存在下で前培養した菌体のピルビン酸資化能は著しく低下した。

4. 各種濃度のエタノール存在下で培養した菌体のピルビン酸資化能に対するエタノールの効果

前項同様の各種濃度のエタノール存在下で一旦前培養して得られた休止菌体をピルビン酸 300 ppm 及び各種濃度のエタノールが共存する培地に置換し、ピルビン酸資化能を調べ、その結果を Fig. 4 に示した。いずれのエタノール濃度で前培養して得られた休止菌体についても、置換培養におけるピルビン酸資化に対して共存するエタノールの影響は認められなかった。

5. 各種濃度のエタノール存在下で培養した菌体による L-乳酸からピルビン酸の生成

前項と同様に各種濃度のエタノール存在下で前培養して得られた休止菌体を 0.4% L-乳酸を唯一炭素源とす

Fig. 4 The effect of ethanol on the pyruvic acid assimilating ability of the sake yeast in the replacement culture using resting cells.

A sake yeast, Kyokai No. 9, was precultured as described in the legend of Fig. 2. After washed, resulting cells were replaced in the basal media containing ca. 300 ppm pyruvic acid and ethanol of various concentrations. Then, incubations were carried out at 15°C for 24 hr.

Symbols showed the ethanol concentrations in the preculture; 0% (x), 4% (Δ), 8% (○) and 10% (●).

る培地に置き換えることにより置換培養を行ってピルビン酸の生成を経時的に調べ、その結果を Fig. 5 に示した。いずれの場合も培養時間に応じて L-乳酸から生成するピルビン酸濃度の上昇がみられ、前項のグルコースを唯一炭素源とした場合とほぼ同様に前培養時のエタノール濃度が高くなるにしたがってピルビン酸生成能の上昇が認められた。ただし、10% エタノール存在下で培養した菌体は、より低いエタノール存在下で培養した菌体に比べ 4 日間の培養で、ピルビン酸生成能に低下が見られた。

考 察

エタノールの清酒酵母に及ぼす影響については、清酒醪の末期にエタノールが 18~20% 生成すると酵母の死滅率が急激に上昇して、発酵が著しく緩慢になる。一方、清酒酵母はエタノールが 10~12% 生成するまで増殖することが知られているが²⁾、エタノール存在下で増殖した清酒酵母が非存在下で増殖した場合に比べ、生理学的性質にどのような違いがあるかはほとんど研究されていない。本報では、この違いを調べる一端として、合成培地における清酒酵母のピルビン酸生成能へのエタノールの影響を検討した。その結果、グルコースを含む培地あるいはグルコースと L-乳酸を含む培地ではエタノール濃度が高いほど単位菌体当たりのピルビン酸の培地へ

Fig. 5 The effect of ethanol concentration in preculture on the pyruvic acid productivity of the resting yeast cell in the replacement culture in the basal medium containing L-lactate as sole carbon source.

A sake yeast, Kyokai No. 9, was precultured in the GE media described in the legend of Fig. 2. After washed, resulting cells were replaced in the basal medium, which contained 0.4% L-lactate as the sole carbon source. Then, incubations were carried out at 15°C.

Symbols showed the ethanol concentrations in the preculture; 0% (x), 4% (Δ), 8% (○) and 10% (●).

の蓄積量（ピルビン酸生成能）が上昇し明らかにエタノールの効果が認められた (Fig. 1)。このことからエタノール存在下で培養した菌体はピルビン酸生成能が上昇していることが示唆された。それを確かめるため各種濃度のエタノール存在下で培養して得られた休止菌体のピルビン酸生成能を調べた。すなわち、各種エタノール濃度下で前培養して得られた菌体を一旦集菌後、増殖が伴わない程度の高密度で新たな培地に置き換えることにより置換培養し、ピルビン酸生成能を調べた結果、より高い濃度のエタノール存在下で前培養した菌体ほど、より高いピルビン酸生成能を有することが示された (Fig. 2)。これらの結果はエタノールのピルビン酸生成能に対する効果が菌体の増殖段階で働いていることを示すものであり、エタノール存在下で増殖した休止菌体には既により高いピルビン酸生成能が備わっているものと思われる。

これらの結果から、エタノールがピルビン酸生成能を上昇させた要因として、エタノール存在下で培養した菌体は細胞表面の透過系に変化を来し、ピルビン酸分泌能が上昇したこと、あるいは一旦菌体外に分泌されたピルビン酸の資化能が低下したため、菌体外の蓄積濃度が上昇した可能性が考えられた。前者のピルビン酸分泌能が上昇する可能性については、それを直接確認することは適切な方法がなく困難なため、今回は後者の休止菌体

におけるビルビン酸の資化能を調べたところ、より高い濃度のエタノール存在下で培養した菌体ほどビルビン酸資化能の低い結果が得られた (Fig. 3)。このことからビルビン酸生成能が上昇する要因の一つとして、分泌と資化のバランスにおいて、エタノール存在下で培養した菌体はビルビン酸資化能が低下した結果、ビルビン酸を多く蓄積することが考えられた。

また、Fig. 4 は一旦増殖した休止菌体においてビルビン酸資化能は、増殖後のエタノール濃度には影響されないことを示している。このことは、実際の清酒醪における酵母のビルビン酸生成能も醪前半の増殖段階のエタノール濃度に依存しており、定常期以後のエタノール濃度には直接影響されないことを示唆している。

休止菌体による L-乳酸からのビルビン酸の生成を検討したところ、Fig. 5 に見られるように、エタノール存在下で培養した休止菌体によって、より高いビルビン酸生成が見られグルコースを基質とした場合とほぼ同様の結果が得られた。このことは、エタノールの効果がグルコースあるいは L-乳酸からビルビン酸への細胞内代謝系に直接及んでいるのではなく、透過系の変化に原因することを示唆しており前述の推察と符合する。また、Fig. 2 の結果でエタノール存在下で培養した菌体は発酵力も低下したことからグルコースやビルビン酸にかぎらず取り込み能が非特異的に低下していることも考えられたが、Fig. 5 の L-乳酸の結果については高い濃度のエタノール存在下で培養した菌体においても資化能が高いことから、L-乳酸については取り込みが良好であると思われた。なお、Fig. 5 の結果は Fig. 1 のグルコースと L-乳酸のビルビン酸生成能の上昇に対する相乗効果を裏付けているものと思われる。

なお、今回の実験では whole cell を用いたが、さらにエタノールの効果が透過系の変化に因ることを確かめるためには、無細胞系を用いた実験が必要であり、今後

に残された課題である。

今回は協会 9 号を用いたが、それ以外の清酒酵母も用いて、実際の清酒醪におけるビルビン酸生成に対するエタノールの効果を検討する予定である。

要 約

清酒酵母を合成培地を用いて種々の異なる濃度のエタノール存在下で培養し、得られた休止菌体についてビルビン酸生成能を比較した結果、以下の知見を得た。

1. 0~10% の範囲で各種濃度のエタノール存在下で前培養した菌体について、集菌後グルコースを唯一の炭素源として含む培地で置換培養し、ビルビン酸生成能を比較したところ、高いエタノールで前培養した菌体ほど、より高いビルビン酸生成能を持つ傾向が見られた。また、これと同様の傾向は L-乳酸を唯一の炭素源とする培地での置換培養においても認められた。
2. 前記のエタノール存在下で培養した菌体のビルビン酸生成能の差異は増殖段階に依存し、増殖後の休止菌体のビルビン酸生成能はエタノール濃度に影響されなかった。
3. エタノール存在下で培養した菌体のビルビン酸生成能が上昇する要因の一つとして、ビルビン酸資化能が低下したため、ビルビン酸の分泌能と一旦分泌されたビルビン酸の資化能とのバランスの変動することが推察された。

文 献

- 1) 清酒酵母研究会 編：改訂 清酒酵母の研究，p. 35，清酒酵母研究会（1980）
- 2) 土肥和夫，宮内俊一，川本 雅之：醸工，52，416（1974）
- 3) 佐藤俊一，水野昭博，岩野君夫，高原康生，木崎康造，佐野英二，辻 邦司，梅田紀彦，戸塚 昭，川島 宏：醸協，76，（11）764（1981）