高濃度エタノール存在下で増殖する清酒酵母の取得

伊野本 真彦・山田 修・五味 勝也・飯村 稔

(国税庁醸造研究所)

平成 9 年 8 月 14 日受理

Isolation of Sake Yeast Able to Grow in the Medium Containing More Than Ten Percent Ethanol.

Masahiko INOMOTO, Osamu YAMADA, Katsuya GOMI and Yuzuru IMURA
(National Research Institute of Brewing, National Tax Administration
Agency, 3-7-1, Kagamiyama, Higashihiroshima 739 Japan)

In mid to completion of *moromi* mashing, due to high ethanol concentration yeast cells cease growing, become inactive, and eventually lysed, resulting in unfavorable increase of amino acids and color. To solve the problem we attempted to isolate sake yeast strains which could grow in the medium containing more than 10% ethanol. Cell of *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No.7 were treated with ethyl methanesulfonate. Colonies appeared on the yeast extract-polypepton-dextrose agar medium (YEPD) were replicated onto 0.6% sodium acetate agar medium for nitrogen starvation. Through the primary screening on the YEPD agar medium added with 12% ethanol as a final concentration and the secondary screening in the same medium, 6 mutants showed abundant growth comparing with poor growth by the parental strain. In a small-scale sake brewing test with the 6 mutants, mutant strain 7-68 was selected. A pilot-scale sake brewing experiment with strain 7-68 and the parental strain was carried out. *Moromi* fermentation progressed similarly for the both strains. Activities of yeast cells measured by the methylene blue staining method showed 20% active for strain 7-68 and 32% active for strain Kyokai No.7 at the completion of the *moromi* mashing. It was also observed that amino acidity was 1.4 mℓ in the resulted sake made with strain 7-68 and 1.7 mℓ with the parental strain. The result suggests that the mutant obtained by the above procedures would be helpful in solving the problem.

Key words : 清酒酵母・高濃度エタノール耐性

一般に清酒酵母は、清酒醪において、エタノール濃度が10%程度まで増殖するがそれ以上のエタノール濃度になると増殖が停止する。そこで、協会7号酵母から通常のエタノール濃度よりも高いエタノール濃度において増殖可能な清酒酵母を取得することを目的とした。

協会7号酵母にEMS処理による突然変異を施し、出現コロニーを0.6%酢酸ナトリウム平板培地に移し、

30°C、4週間の窒素飢餓培養を行った。次に、この培地を12%エタノールを含むYEPD平板培地(12%YPDE培地)にレプリカし、出現コロニーを釣菌した。この培養によって140株のコロニーを取得し、諸性質の比較を行い、それらの中から親株に比べ12%YPDE培地での増殖能を有し、かつ清酒醸造に適していると見られた数株を取得した。最終的に最も優れた1株、7-68株を実用試験に供し、その生成酒の評価を行った。

緒 言

一般に清酒酵母は清酒醪において、エタノール濃度が10%程度まで増殖するがそれ以上のエタノール濃度になると増殖が停止する。それ以降は発酵を持続するが死滅するものが増加する。それに伴い、アミノ酸度、着色等の増加により酒質が変化することが知られている^{1,2)}。したがってエタノールの清酒酵母に対する効果は酒質に大きく影響すると考えられる。ところで清酒酵母のエタノール耐性としては次の3点が考えられる。即ち、1) 高濃度エタノールでの生存性、2) 高濃度エタノールでの発酵性、3) 高濃度エタノールでの増殖性である。1) については、原ら³⁾によってエタノール濃度20%溶液中で生存可能な耐性株が分離され協会11号酵母として実用化されている。

2), 3)も清酒醪の管理にとって重要な性質であるが、これらの性質については現在まで詳しい検討はなされていない。

Kennedy らによると窒素飢餓培地において耐久性のある酵母は比較的高濃度のエタノールを含む培地において良好な増殖性を示すと報告されている⁴⁾

そこで著者らは、その方法に注目し、協会7号酵母から通常のエタノール濃度よりも高いエタノール濃度において増殖可能な突然変異株を取得することを検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 供試菌株および使用培地

清酒酵母協会7号を親株として用いた。

酵母の培養にはYEPD培地(1%酵母エキス, 2%ポリペプトン, 2%グルコース)を用いた。窒素飢餓培養の培地としては、酵母の胞子形成培地、すなわち0.6%酢酸ナトリウム平板培地を用いた。高濃度エタノール存在下で増殖する突然変異株の分離および増殖試験には、エタノールを12%含んだYEPD培地(12%YPDE培地)を用いた。以上の培地は必要に応じて、2%寒天を加えた平板培地とした。

pHについては0.6%酢酸ナトリウム平板培地を除きいずれの培地もNaOHまたはHClを用いて清酒醪に準じて4.2に調整した。

2. 高濃度エタノール存在下増殖する突然変異株の分離法

5 mlのYEPD液体培地に協会7号酵母を接種し、30°C, 24時間培養後、滅菌水で2回洗浄した菌体に突然変異処理を施した。突然変異処理法としては3%エチルメタンスルホン酸(以下EMSと省略す)で40分処理を行った。なお、本条件での生残率は約50%である。6%チオ硫酸ナトリウム溶液でEMSを中和後、処理菌体をYEPD平板培地に塗布し30°C, 24~48時間培養した。

次に、出現コロニーをKennedy ら⁴⁾の方法に従い、0.6%酢酸ナトリウム平板培地にレプリカを行い30°C, 約4週間培養後、出現コロニーを12%YPDE平板培地にレプリカし30°C, 72~96時間培養後、出現コロニーを釣菌した。

3. 高濃度エタノール培地での培養

釣菌した突然変異株をYEPD液体培地で前培養後、滅菌水で2回洗浄した。この洗浄菌体を1次スクリーニングのため12%YPDE平板培地に塗布し30°Cで培養した。24時間毎に増殖の確認を行い96時間まで培養して増殖の有無を確認した。同様の操作を繰り返し行いエタノール存在下で増殖する突然変異株を選択した。また、この対照としてエタノールを含まない培地を用いた。

1次スクリーニングした株は2次スクリーニングのためYEPD液体培地で培養後、12%YPDE液体培地10 mlに菌体を約 10^8 個/mlになるように接種し30°Cで静置培養後、1次スクリーニングの時と同様に96時間まで培養し増殖の有無を確認した。同様の操作を繰り返し行い増殖の良い変異株の選択を行った。この時対照としてエタノールを含まない培地を用いた。

4. 清酒小仕込試験

難波ら⁵⁾の方法に従った。

選択した変異株を使用し、掛米(精米歩合70%)、および乾燥麴を用いて総米200 gの3段仕込で行った。

仕込温度は水麴, 初添, 踊りを15°Cとして、仲添は9°C, 留添は7°Cとなるように仕込を行い、留添後2日目より1日当り水温を1°Cづつ上げ最高品温を15°Cとして、CO₂発生にともなう醪重量の減少が約60 gになった時点で遠心分離によって上槽した。

生成酒の一般分析およびメチレンブルー染色率の測定は国税庁所定分析法注解⁶⁾に従った。

5. 総米 100 kg の清酒醸造試験

小仕込試験により選択した突然変異株を用いて、総米 100 kg の中間規模の清酒醸造試験を行った。原料米は広島県産日本晴で、精米歩合 70% 白米を使用した。仕込配合は酒母 7 kg、初添 15 kg、仲添 28 kg、留添 50 kg、吸水歩合 130% で仕込、品温は循環式冷却により制御し、最高温度を 15℃ になるように設定した。対照として親株の協会 7 号酵母を用いた。酒母、醪および生成酒の一般分析は国税庁所定分析法注解⁶⁾に従った。

6. 菌学的諸性質の検討方法

主に大内ら⁷⁾の方法に従った。

酵母生菌体溶解酵素による溶解性試験の方法は、供試菌株を YEPD 液体培地で 30℃、48 時間静地培養後、滅菌水で洗浄し OD₆₆₀ = 1 になるように 0.1 M Na-リン酸 buffer (pH 7.5) に懸濁した。分光光度計セル内に酵母懸濁液 1 ml、Zymolyase 20 T 溶液 (Zymolyase 20 T 200 mg/10 ml) 0.1 ml を入れて、パラフィルムで被い、混合後 30℃ でゆるやかに振とうしながら一定時間ごとに菌体の溶解にともなう吸光度 (OD₆₆₀) の減少を測定した。対照には親株の協会 7 号酵母およびエタノール耐性株として協会 11 号酵母を用いた。

実験結果および考察

1. 高濃度エタノール存在下増殖する突然変異株の分離

実験方法で述べたように窒素飢餓状態にするため、0.6% 酢酸ナトリウム平板培地で 30℃、約 4 週間培養した菌体を 12% YPDE 平板培地へレブリカシ 30℃、96 時間培養を行った。その結果コロニーの出現はわずかであり、約 140 株のコロニーを釣菌することができた。

本方法は生残った株を釣菌することによるポジティブな選択方法であり 0.6% 酢酸ナトリウム平板培地での培養時間を長くすることにより異なる種類の突然変異株の取得が容易に可能であると思われる。

2. 高濃度エタノール培地での増殖

釣菌株約 140 株を 1 次スクリーニングのため 12% YPDE 平板培地に塗布し増殖の有無の確認を行った結果、親株よりも増殖の良い 14 株を選

択した。この 14 株を用いて 2 次スクリーニングとして 12% YPDE 液体培地で増殖試験を行い親株に比べ増殖の良い 7-1, 7-39, 7-68, 7-72, 7-89 及び 7-98 の 6 株を選択した。増殖試験を 2 回繰返しその結果を Table 1 に示した。

最も増殖の良かった 7-68 株について 11% YPDE 平板培地における 30℃、5 日間の増殖性を Fig. 1 に示した。対照の親株協会 7 号酵母および協会 11 号酵母には増殖が見られないが、変異株は親株および協会 11 号酵母よりも高いエタノール濃度で増殖することが確認できた。

なお、データには示さないが YPDE 平板培地における増殖については、協会 7 号酵母はエタノール濃度 10% 程度まで増殖するがそれ以上の濃度では増殖しないのに対し、7-68 株および 7-89 株はエタノール濃度 12% 程度まで増殖が認められた。

Table 1 Growth of *S. cerevisiae* Kyokai No.7 and its mutants strain 7-68 on the solid or the liquid medium

Strain	Solid culture		Liquid culture	
	YPDE (12% EtOH) agar medium		YPDE (12% EtOH) medium	
	1st	2nd	1st	2nd
7-1	++	++	+++	++
7-17	++	++	-	-
7-38	++	++	+	+
7-39	++	++	+++	++
7-52	++	++	-	-
7-68	++	++	+++	+++
7-72	++	++	++	++
7-86	++	++	-	-
7-87	++	++	-	-
7-88	++	++	-	-
7-89	++	++	+++	+++
7-95	++	++	-	-
7-98	++	++	+++	++
7-114	++	++	-	-
Kyokai No.7	+	+	+	+

YPDE (12% EtOH): 1% yeast extract, 2% polypepton, 2% dextrose, 12% ethanol as a final concentration, pH 4.2.

For the solid medium, 2% agar was added

Yeast cells were inoculated into each medium and incubated at 30℃ for 96 hrs. Degree of growth was expressed as +++ abundant, ++ fair, + standard, - poor

3. 清酒小仕込試験

高濃度エタノール培地から選択した6株および親株の協会7号酵母, 計7株を用いて清酒小仕込試験を行った。

CO₂の発生にともなう醪重量の減少による発酵経過をFig.2に示した。発酵経過には大差は無いが, 突然変異株7-68, 7-72については親株に比べ発酵力

が強いことが確認された。

醪日数20日の生成酒の一般成分をTable2に示した。一般成分に大差は見られなかったが, 総酸度については, 突然変異株の方が親株に比べ低くなる傾向がみられた。また上槽の醪における酵母のメチレンブルー

Fig.1 Growth of different yeasts

Abbreviations: K-7, *S. cerevisiae* Kyokai No.7; *S. cerevisiae* Kyokai No. 11; 7-68, mutant strain 7-68. Yeast cells were inoculated onto YPDE (11% EtOH) agar medium and incubated at 30°C for 5 days. Photograph shows that many colonies appeared on the plate inoculated on the plate inoculated with mutant strain 7-68.

Fig.2 Time course of carbon dioxide evolution from moromi during small-scale sake brewing.

Six mutants and their parental strain were tested. Quantity of total rice was 200g.

Table 2 Analysis of sake brewed in small-scale brewing with mutants and their parental strain

Strain	Sake meter	Total acidity(ml)	Amino acidity(ml)	Alcohol (%)	CO ₂ evolved(g)
7-1	+9	3.0	1.8	19.0	55.0
7-39	+9	2.7	1.8	18.5	55.1
7-68	+9	2.8	1.8	18.6	57.3
7-72	+9	3.1	1.8	19.5	56.0
7-89	+9	3.0	1.8	19.0	54.8
7-98	+9	3.0	1.8	19.1	54.8
Kyokai No. 7	+8	3.3	1.8	19.0	55.0

The parental strain: *S. cerevisiae* Kyokai No.7

Sake made in Fig 2 was analyzed by the standard method established by the National Tax Administration Agency.

一染色率を測定したところ親株，協会7号酵母が19.4%であったのに対し突然変異株，7-39，7-68及び7-72はそれぞれ16.9%，12.1%及び16.2%であり，突然変異株は親株に比べ死滅しにくい傾向がみられた。繰り返し小仕込試験を行った結果，これらの傾向には再現性が見られた。

得られた突然変異株の中で最も発酵力が強く，死滅率が低く，生成酒の総酸度が少ない7-68株を最終的に選択して，以下の試験に用いた。

4. 総米 100 kg の清酒醸造試験

7-68株を用いて総米 100 kg 清酒醸造試験を行った。仕込配合を Table 3 に示した。

醪のボーメおよびアルコール濃度を Fig. 3, に示した。醪経過は親株，7-68株ともに，ほぼ同じ経過を示したが，親株に比べ醪前半の高泡時において7-68株のボーメの切れが早い傾向にあり，この結果は高濃度エタノール存在下での増殖性と関連するものと推測される。アルコール濃度に関しては，親株，7-68株ともにほぼ同様の経過を示した。

アミノ酸度および総酸度の経過をそれぞれ Fig. 4

Fig. 3 Time course of ethanol formation and Baumé reduction in *moromi* during *moromi* mashing.

Pilot-scale sake brewing with 100 kg rice.

および Fig. 5 に示した。アミノ酸度，総酸度ともに親株に比べ7-68株の方がモロミ期間全体を通し低くなった。

醪中における酵母のメチレンブルー染色率を Fig. 6 に示した。醪後半13日目以降，アルコール度数12%以上の期間において親株に比べ低くなり，上槽時のメ

Fig. 4 Time course of amino acidity in *moromi* during *moromi* mashing.

Pilot-scale sake brewing with 100 kg rice.

Fig. 5 Time course of total acidity in *moromi* during *moromi* mashing.

Pilot-scale sake brewing with 100 kg rice.

Table 3 Proportion of raw materials for pilot-scale sake brewing.

		1st	2nd	3rd	
	Seed mash	addition	addition	addition	Total
Total rice	(Kg)	7	15	28	50
Rice for steaming	(Kg)	4	10	21	42
Rice for koji	(Kg)	3	5	7	8
Water	(l)	10	16	32	72

Nipponbare rice cultivar was polished to 70% and used for the experiment. Quantity of total rice was 100kg. Temperature of the *moromi* mash was raised 1°C per day until it reached 15°C.

チレンブルー染色率は7-68株の方が30%程度低くなることが示された。この結果から7-68株は親株に比べ高濃度エタノール存在下において増殖性ととも、増殖後の細胞についてもエタノールに対する耐性が上昇しているのと推測された。

生成酒の一般成分をTable 4に示した。

日本酒度、アルコール度数はほぼ同じ数値を示したが、小仕込試験の時と同様に親株に比べ7-68株の方が総酸度が低くなった。このように醪及び生成酒の総酸度について7-68株は親株に比べ低い傾向が見られたこととエタノール耐性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。また、7-68株ではアミノ酸度が低くなり、着色度が低くなることが認められた。

5. 菌学的諸性質の測定

TTCの染色性、 β -アラニン培地における増殖性、糖類の発酵性、炭素源の資化性、硝酸塩、亜硝酸塩の資化性、セルロース凝集性、濃糖環境における生育、killer factorに対する抵抗性試験は親株と同じであっ

Fig.6 Change in yeast cell viability in moromi during moromi mashing.

Viability of yeast cells was measured by the methylene blue staining method (6).

た。

エタノールに対する感受性の差は細胞壁構造の差に起因していることが予想されたので次に酵母細胞壁の溶解性試験を行い、その結果Fig.7に示した。

7-68株はZymolyaseによる酵母細胞壁の溶解速度が速かった。その結果から7-68株は細胞壁に変化が起こっていることが推察された。なお、データには示さないが透過型電子顕微鏡により細胞の形態を比較したところ7-68株は親株に比べ細胞壁が薄いことが認められた。

原ら⁸⁾によると協会11号酵母はZymolyase非感受性株と報告されており今回もFig.7に示すように同様の結果が得られた。今回分離した7-68株はZymolyase感受性が親株よりも高く、かつメチレンブルー染色性が低いことから協会11号酵母とはエタノールに対する耐性機構が異なると推察された。

要 約

協会7号酵母は10%程度のエタノールを含むYEPD平板培地で増殖するが、それ以上のエタノール濃度になると増殖が停止する。今回高濃度エタノール

Fig.7 Lysis of yeast cells with Zymolyase.

Lysis of yeast cells with Zymolyase 20 T was tested by Ouchi's method⁸⁾

Table 4 Analysis of sake brewed by strain 7-68 and strain Kyokai No.7.

Strain	Sake meter	Total acidity(ml)	Amino acidity(ml)	Reducing sugar (%)	Alcohol (%)
7-68	+2	2.2	1.4	1.6	17.6
Kyokai No.7	+4	2.4	1.7	0.2	17.8

General components were analyzed by the standard methods established by the National Tax Administration Agency.

ルを含む培地で増殖する突然変異株の取得を試み以下の結果を得た。

1. 協会7号酵母をEMS変異処理し得られた突然変異株を窒素飢餓状態で30°C、約4週間、培養後、生残ったものの中から通常より高いエタノール濃度で増殖する清酒酵母を取得することが出来た。
2. 変異株のうち最も増殖の良かった7-68株を用いて清酒醸造試験を行った結果、モロミ後半において親株に比べメチレンブルー染色率が低くなった。
3. 7-68株を用いた醪においては醪期間全体を通して総酸度、アミノ酸度が親株に比べ低くなった。
4. 今回行ったように窒素飢餓条件下で耐久性の高い酵母を選択することによって協会系酵母等の優良酵母から、さらにすぐれた性質を持つ実用酵母を取得する可能性が示された。

なお、本研究の一部は平成9年度日本農芸化学会大会において発表した。

文 献

- 1) 土肥和夫：醸造論文集，**27**，129（1972）
- 2) 赤井 隆，高橋正男，山田康朗：醸協，**56**，(10) 1035（1961）
- 3) 原 昌道，佐々木雅晴，小幡孝之，野白喜久雄：醸協，**71**，(4) 297（1976）
- 4) BRIAN K. KENNEDY, NICANOR R. AUSTRIACO, JR., JISI ZHANG, and LEONARD GUARENTE *Cell*, **80**, 485-496（1995）
- 5) 難波康之祐，小幡孝之，萱島 進，山崎与四良，村上光彦，下田高久：醸協，**73**，(4) 295（1978）
- 6) 注解編集委員会編：第四回改正国税庁所定分析法注解：（財）日本醸造協会（1993）
- 7) 大内弘造，田中良彦，布川弥太郎，秋山裕一：醸協，**67**，(2) 167（1972）
- 8) 原 昌道，溝口晴彦，小幡孝之，飯村 稔，戸塚 昭，野白喜久雄：醸協，**73**，(5) 408（1978）