醸造用酵母の培養条件と TTC 染色性

稲橋正明・吉田 清・蓼沼 誠

<(財)日本醸造協会>

平成 11 年 7 月 14 日受理

Yeast Culture Conditions and the Appearance of TTC White Strains

Masaaki INAHASHI, Kiyoshi YOSHIDA and Makoto TADENUMA

(*Nippon Jozo Kyokai, Brewing Society of Japan,*
2-6 Takinogawa Kita-ku, Tokyo 114 Japan)

When serine, tyrosine, asparagine and aspartic acid were used as the nitrogen sources and yeast was cultured at or above 35°C, TTC white colonies were induced at a high frequency.

The frequency of induction of TTC white colonies was very high when aspartic acid and asparagine were used as the nitrogen source.

The TTC white strains were respiratory deficient as shown by the absence of growth on glycerol and the disappearance of the characteristic absorption spectrum of cytochromes $a+a_3$.

Using such respiratory deficient yeast, a smallscale fermentation was performed, and the components of the sake produced were compared with that produced by the parent strain (TTC Red). It was observed that fermentation was delayed acidity was elevated (increase in malic acid and acetic acid) and flavor had decreased.

Key words : TTC 染色性, 呼吸欠損菌

緒 言

清酒醸造において、酒母や醪中の酵母の純度確認のために用いられている TTC 染色法^{1,2)}は、元来酵母における正常菌と呼吸能力の欠損した菌(呼吸欠損菌)との判別に利用されていたものであり多くの報告がある^{3~5)}。最近、味噌醸造における新しい試みの一つとして呼吸欠損菌を用いた試醸が行われ、呼吸欠損菌か否かの判別の一つの手段としてこの TTC 染色法が用いられている^{6,7)}。

筆者ら^{8~11)}は醸造用酵母を 30°C 以下で平板培養した場合、培地に用いる炭素源及び窒素源の種類により、TTC 染色性の異なるコロニーが出現すること、及びそれぞれの菌株の性質及び醸造特性について既に報告した。

また、培養条件、特に培養温度と呼吸欠損菌の出現

(TTC 染色性で判別)については既に三宅³⁾、永井ら⁴⁾の報告があり、変異に及ぼす培養温度の影響も検討されている¹²⁾。今回、筆者らは窒素源の種類によっては高頻度に TTC 染色性のないコロニー(呼吸欠損菌)が現れることを見出した。そこで、それら TTC 染色性のない酵母の性質及び醸造特性について調べたので報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株

以下に示す各種醸造用酵母を供試菌として用いた。

(1) きょうかい清酒用酵母

K-6, 7, 9, 10, 11 及び 14 (いずれも泡あり酵母)。

K-15, 601, 701, 901 及び 1001 (いずれも泡なし酵母)。

(2) きょうかいぶどう酒用酵母

K-W-1 及び W-4。

(3) きょうかい焼酎用酵母

K-S-2。

2. 培地組成

増殖の基本培地として、

1) YPD 培地 (酵母エキス 1.0 %, ポリペプトン 2.0 %, グルコース 2.0 %, pH 5.2~5.5)。

2) 麴汁培地 (ボーム 4)。

3) YM 培地 (グルコース 1.0 %, 酵母エキス 0.3 %, ポリペプトン 0.5 %, 麦芽エキス 0.3 %)。

4) DIFCO の Yeast Carbon Base (1.17%)。

この 1~4) の培地を必要に応じて用い、また固体培養においては寒天を 2.3 % 加えたものを用いた。

3. 培養条件と TTC 染色性 White 株出現率の関係

(1) 培養温度と TTC 染色性

4) の基本培地に 20 種類のアミノ酸 0.5 % をそれぞれ単独で加えて、各固体培地に各種醸造用酵母を塗抹し、28, 32, 35 及び 38°C の培養条件にて 3 日間培養後、出現したコロニーの上に TTC 上層培地 (グルコース 0.5 %, TTC 0.05 %, 寒天 1.0 %) を重層した。

(2) pH の違いによる TTC 染色性

4) の基本培地にアスパラギン酸 0.5 % を加え pH 3.2, 4.2, 5.3, 6.5 及び 8.0 に調整した各固体培地に K-7 号酵母を塗抹し、28 及び 35°C にて 3 日間培養後、出現したコロニー上に TTC 上層培地を重層した。

(3) 培養方法の違いによる TTC 染色性

4) の基本培地にアスパラギン酸 0.5 % を加え、pH 5.3 に調整した培地 (アスパラギン酸培地) に K-7 号酵母を接種し、28 及び 35°C にて静置又は通気培養を 3 日間行った。その培養酵母を上記固体培地に塗抹し、28°C, 3 日間培養後、出現したコロニー上に前記 TTC 上層培地を重層した。

また嫌気培養においては上記固体培地に同酵母を塗抹し、接種後日本製薬製アネロメイト P を使用し、嫌気状態にしたものについては 28 及び 35°C にて 3 日間培養後、出現したコロニー上に TTC 上層培地を重層した。

(4) 培地の違いによる TTC 染色性

前記麴汁及び YM 固体培地に K-7 号酵母を塗抹し、28, 32, 35 及び 38°C にて 3 日間培養後、出現した

コロニー上に TTC 上層培地を重層し、アスパラギン酸培地における TTC 染色性と比較した。

4. アミノ酸添加と TTC 染色性 White 株の出現率

4) の基本培地にアスパラギン酸 0.25 % 添加し、20 種類のアミノ酸 0.25 % 添加した固体培地 (pH はすべて 5.3 に調整) に K-7 号酵母を塗抹し、28 及び 35°C にて 3 日間培養後、出現したコロニー上に TTC 上層培地を重層し、コロニーの色を観察し、アミノ酸の添加効果を調べた。

5. ケト酸添加と TTC 染色性 White 株の出現率

4) の基本培地にアスパラギン酸 0.5 %, 各種ケト酸を 1 % 添加した固体培地 (pH はすべて 5.3 に調整) に K-7 号酵母を塗抹し、28 及び 35°C にて 3 日間培養後、出現したコロニー上に TTC 上層培地を重層し、コロニーの色を観察し、ケト酸の添加効果を調べた。

6. ビタミンと TTC 染色性の関係

前記アスパラギン酸培地中に含まれている 9 種類のビタミンを一つずつ除いた固体培地に K-7 号酵母を塗抹し、28, 32 及び 35°C にて 3 日間培養後、出現したコロニーの上に TTC 上層培地を重層し、コロニーの色を観察し、ビタミンの影響を見た。

7. 呼吸欠損変異株の取得方法⁵⁾

TTC 下層培地 (グルコース 1.0 %, 酵母エキス 0.15 %, ポリペプトン 0.20 %, KH_2PO_4 0.10 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04 %, 寒天 2.3 %) にアクリフラビンを 0.4~4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加した培地に K-7 号酵母を塗抹し、28°C, 3~4 日間培養してコロニーを形成させ、培養後、上層培地をコロニー上に重層して TTC 染色性のないコロニー (White 株) を分離した。また分離したコロニーを YPG 培地 (グリセリン 3.0 %, 酵母エキス 0.15 %, ポリペプトン 0.2 %, KH_2PO_4 0.1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04 %, 寒天 2.3 %) に塗抹し、28°C, 4~5 日間培養後、生育しない株を変異株とした。

8. 呼吸欠損株の判別法

(1) TTC 寒天重層法

秋山ら²⁾の方法によった。

(2) カラープレート法^{5,13,14)}

完全培地 (グルコース 2.0 %, 酵母エキス 0.4 %, ポリペプトン 0.35 %, KH_2PO_4 0.2 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.35 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 %, 寒天 2.3 %, pH 5.0) 滅菌後、55°C に冷し、エオシン Y (最終濃度

8 $\mu\text{g}/\text{ml}$), トリパンブルー (最終濃度 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加えてプレートを作製した。菌液を塗抹し, 28°C, 4~7 日間培養後コロニーの色によって判別した。

(3) YPG 培地における生育の有無

前記方法によった。

9. 呼吸欠損の証明方法

チトクローム系酵素の比較法

オパールグラス法¹⁵⁾を改変して用いた田中他⁶⁾の方法によった。YPD 培地にて 30°C, 40 時間浸漬培養した菌体 100~140 mg (湿重量) を洗浄, 集菌し, ろ紙できている付着液を除き, 2% (V/V) のエタノールを含むグリセリン 8 ml を加えて流動化させた後, さらに 30 mg の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を加えて還元状態にした後, 日立製分光光度計 (U-2001) で 450~650 nm の吸収スペクトルを室温にて測定した。測定の際レファレンス側にはろ紙又は硫酸紙を当て, 基線を下げ吸収ピークの検出を容易にした。

10. 小仕込み試験方法

K-7 号酵母を対照として, 取得 4 株の小仕込み試験を行い, アスパラギン酸 35°C 処理 2 株が, 他の呼吸欠損株と比較して発酵状態に差が認められるか調べた。

(1) 仕込み配合

A 麴 (アルコール脱水麴) 35 g, α 米 115 g, 仕込み水 270 ml の乳酸無添加一段仕込みで発酵温度 15°C 一定で行い, CO_2 減量が 48 g に達した時点 (アルコール約 18% 前後) で上槽した。

11. 分析法

一般分析は国税庁所定分析法¹⁶⁾, 有機酸組成は HPLC (島津製 LC-10 A)¹⁷⁾ により分析した。

実験結果及び考察

1. 培養条件と TTC 染色性 White 株出現率の関係

(1) 培養温度と TTC 染色性

セリン, チロシン, アスパラギン及びアスパラギン酸をそれぞれ単独で加えて 35°C で培養した場合に TTC 染色性が White のコロニーが多数出現した。特にアスパラギン及びアスパラギン酸を用いた時に顕著に TTC 染色性に違いが見られた (データ省略)。そこで顕著に TTC 染色性に違いが見られたアスパラギン酸寒天培地を用いて, 各種醸造用酵母を塗抹し, 各温度で 3 日間培養後, TTC 染色を行い, 培養温度と

Fig. 1 Relation between the incubation temperature and the induction of TTC white colonies.

(1) Aspartic acid medium.

○—○: K-6, 10, 601, 1001.

●—●: K-7, 9, 14, 701, 901.

△—△: K-11.

▲—▲: K-15.

Fig. 2 Relation between the incubation temperature and the induction of TTC white colonies.

(2) Aspartic acid medium.

□—□: K-W-1 (38°C no growth).

▽—▽: K-W-4.

▼—▼: K-S-2.

White 株出現率の関係について調べた結果を Fig. 1 及び 2 に示した。

K-6, 10, 601 及び 1001 については, 35°C 以下で培養した場合には White 株が出現しなかったが, 38°C で培養を行った場合には, 出現したコロニーはすべて White 株であった。K-7, 9, 14, 701 及び 901 については 32°C 以下で培養した場合には White 株は出現しなかったが, 35°C で培養した場合には 50% ほど White 株が出現し, 38°C で培養を行った場合には出

現したコロニーはすべて White 株であった。K-11 酵母についてはいずれの培養温度でも White 株は出現しなかった。K 11 は K-7 号のアルコール耐性株であるが、K 7 酵母と比較すると White 株出現に関して温度耐性も高い酵母であることが示された。K-15 号酵母については 32°C の培養温度でも White 株が 50 % ほど出現し、35°C 以上で培養を行った場合には出現したコロニーはすべて White 株であった。K-W-1 号酵母は 28、32 及び 35°C の培養において White 株が 10 % 程度出現し、38°C で培養した場合には、生育せず、温度耐性の低い酵母である。K-W-4 号酵母は 35°C 以下で培養した場合には White 株は出現しなかったが、38°C で培養を行った場合には出現したコロニーはすべて White 株であった。K-S-2 号酵母はいかなる培養温度でも White 株は出現しなかった。また出現した TTC 染色性 White コロニーを釣菌し、28°C で培養し、TTC 染色性を調べた所、すべて TTC 染色性 White であった。また 5 回の繰り返し培養を行っても、すべての株が TTC 染色性 White で

あり、TTC 染色性に違いの認められた株は出現しなかった。

(2) pH の違いによる TTC 染色性

アスパラギン酸培地において pH を変えて培養した場合に TTC 染色性に違いが見られた。その結果を Table 1 に示した。28°C で培養した場合にはいずれの pH に調整しても White 株が出現しなかったが、35°C で培養を行った場合にはどの pH に調整しても White 株が出現した。White 株の出現率は pH は 5.3 及び 6.5 で高く、逆に pH が酸性側又はアルカリ側では低くなった。

(3) 培養方法の違いによる TTC 染色性

アスパラギン酸液体培地における静置及び通気培養、アスパラギン酸固体培地における嫌気培養後の TTC 染色性の結果を Table 2 に示した。

28°C で培養を行った場合には、培養方法にかかわらず White 株は出現しなかった。35°C で培養した場合にはいずれの培養方法によっても White 株が出現したことから、White 株の出現率への培養方法の影響

Table 1 Relationship between pH and the induction of the TTC white colonies.

pH Temperature Strain	pH 3.2		pH 4.2		pH 5.3		pH 6.5		pH 8.0	
	28°C	35°C	28°C	35°C	28°C	35°C	28°C	35°C	28°C	35°C
K 7	0	30	0	50	0	85	0	95	0	25

Aspartic acid (0.5 %) was added to the yeast carbon base at 0.5 % and this was sterilized for 15 minutes at 115°C after adjustment of the pH.

Adjustment of pH by hydrochloric acid and sodium hydroxide.

Value : Rate of induction of TTC white colonies (%).

$B/A \times 100$ (%)

A : Total of all colonies (TTC red + white).

B : Total of TTC white colonies.

Table 2 Induction of the TTC white colonies by different cultivation methods.

Cultivation methods		Stationary (liquid)	Aeration (liquid)	Anaerobic (solid)
Strain	Medium	Aspartic acid	Aspartic acid	Aspartic acid
	Incubation temp.			
K 7	28°C	0	0	0
	35°C	40	40	40

Anaerobic incubation : K 7 was incubated in the aspartic acid medium under anaerobic conditions using ANAEROMATE P at 28°C and 35°C, respectively.

Value : Rate of induction of TTC white colonies (%).

$B/A \times 100$ (%)

A : Total of all colonies (TTC red + white).

B : Total of TTC white colonies.

Fig. 3 Relation between the incubation temperature and the induction of TTC white colonies.

Strain : K-7.

○—○ : Aspartic acid medium

●—● : Koji extract and YM medium.

は認められなかった。従ってアスパラギン酸培地 35°Cにおける培養がTTC染色性Whiteの変異株の出現を高める原因であり、また、大量に培養した酵母(増殖を伴わない)をアスパラギン酸培地に添加し、35°Cにて2日間放置し、TTC染色性を行った所、White株が出現しなかった(データ省略)。以上の結果から、変異は添加した酵母がアスパラギン酸培地 35°Cにおいて増殖を伴うことで起こるものではないかと推測された。

(4) 培地の違いによるTTC染色性

K-7号酵母におけるアスパラギン酸、麴汁及び

YM寒天培地における培養温度とWhite株出現率の関係をFig. 3に示した。

28及び32°Cで培養を行った場合には、いずれの培地においてもWhite株は出現しなかった。また、35及び38°Cで培養を行うと、White株が出現したが、麴汁及びYM寒天培地の方がアスパラギン酸寒天培地よりもWhite株の出現率は低い値を示した。

2. アミノ酸添加とTTC染色性White株の出現率

麴汁及びYM寒天培地におけるWhite株の出現率がアスパラギン酸寒天培地を用いた時に比べて低い値を示したので、その原因を調べるためにアスパラギン酸培地にアミノ酸を添加してその効果について調べTable 3に示した。

アスパラギン酸培地にグルタミン酸ナトリウム及びL-アラニンを追加するとWhite株が出現せず添加効果が認められるが、他のアミノ酸を追加した場合には添加効果は認められなかった。前項の麴汁及びYM培地におけるTTC White株の出現率の低い原因はこれらの培地がWhite株の出現を押さえるようなアミノ酸を含んでいる(アスパラギン酸培地より栄養豊富)ことが一つの原因であると判断した。

3. ケト酸添加とTTC染色性White株の出現率

グルタミン酸ナトリウム及びL-アラニンの添加によりWhite株の出現が抑制されることにより、両アミノ酸に関連のあると思われるケト酸の添加効果について調べた結果をTable 4に示した。

Table 3 Induction of the TTC white colonies by the addition of amino acids

Medium		Aspartic acid (Control)	Sodium-glutamate (Control)	L Alanine (Control)	Aspartic acid + Sodium glutamate	Aspartic acid + L Alanine
Strain	Tem- pera- ture					
K-7	28°C	0	0	0	0	0
	35°C	50	0	0	0	0

The same result was obtained when using K-15.

Control medium : Aspartic acid, sodium-glutamate or L-alanine was added to the yeast carbon base at 0.5 % and this was then sterilized for 15 minutes at 115°C.

Test medium : Each amino acid was added to the aspartic acid medium (aspartic acid 0.25 %) and this was then sterilized for 15 minutes at 115°C after adjustment of 5.3.

Value : Rate of induction of TTC white colonies (%).

$B/A \times 100$ (%)

A : Total of all colonies (TTC red+white).

B : Total of TTC white colonies.

Table 4 Induction of the TTC white colonies by the addition of keto acids.

Strain	Medium Temperature	Aspartic acid (Control)	Aspartic acid + α -Ketoglutaric acid	Aspartic acid + Pyruvic acid	Aspartic acid + Oxalacetic acid
K 7	28°C	0	0	0	—
	35°C	50	0	10	—

The same result was obtained when using K-15.

Control medium : Aspartic acid was added to the yeast carbon base at 0.5 % and this was then sterilized for 15 minutes at 115°C.

Test medium : Each keto acid was added to the control medium (aspartic acid 0.5 %) after sterilization for 15 minutes at 115°C and the adjusted pH to 5.3.

: No growth.

Value : Rate of induction of TTC white colonies (%).

$B/A \times 100$ (%)

A : Total of all colonies (TTC red+white).

B : Total of TTC white colonies.

Table 5 Induction of the TTC white colonies in the presence of vitamin B₆.

Strain	Medium Temperature	Vitamin B ₆ -deficient			Vitamin B ₆ (400 μ g/l)		
		28°C	32°C	35°C	28°C	32°C	35°C
K 7		0	0	0	0	0	50

Vitamin B₆ : Pyridoxine-HCl

Value : Rate of induction of TTC white colonies.

$B/A \times 100$ (%)

A : Total of all colonies (TTC red+white).

B : Total of TTC white colonies.

α -ケトグルタル酸を添加し 35°Cで培養を行っても White 株が出現せず添加効果が認められた。またピルビン酸ナトリウムを添加した場合には White 株が出現したが、アスパラギン酸のみの培地と比較すると White の出現率は非常に低いものであった。オキサロ酢酸を添加した場合には生育しなかったが、オキサロ酢酸はアスパラギン酸に対応するケト酸であり、White 株出現と不生育とが何らかの関係があるとも考えられる。

4. ビタミンと TTC 染色性の関係

Yeast Carbon Base より一種類ずつビタミンを除いて比較した結果を Table 5 に示した。通常含まれている塩酸ピリドキシン量 (400 μ g/l) においては、35°Cで培養すると White 株が出現したが、塩酸ピリ

ドキシンのみを除いた培地を用いると White 株が出現せず、アミノ基転移反応に関係があるピリドキシンが White 株の出現に何等かの影響を与えていることが示唆された。前記のオキサロ酢酸の結果と考え合わせて興味深い。

5. 呼吸欠損株の判別

TTC 染色性が White の性質を示す株として、呼吸欠損菌があり、呼吸欠損をおこさせる変異剤の一つであるアクリフラビンを用いて K-7号酵母より呼吸欠損菌を誘発させ、今回アスパラギン酸培地を用いて 35°Cで培養し取得した TTC 染色性 White 株との比較を行った結果を Table 6 に示した。

(1) TTC 寒天重層法による判別

アスパラギン酸培地における TTC White 株は従来

Table 6 TTC stain of the respiratory deficient strain and other characteristics.

Parent strain	Strain	Treatment	TTC	Aspartic acid TTC	Growth on glycerol medium	Color plate
K-7	A-4	Acridlavine (0.4 ppm)	WP	WP (small)		blue violet (no luster)
	A-6	Acridlavine (4 ppm)	WP	WP (small)		blue violet (no luster)
	B-19	Asp. acid medium at 35°C	W	W (small)		red violet (no luster)
	B-26	Asp. acid medium at 35°C	W	WP (small)		red violet (luster)
K-7 (Control)			R	R (large)	# R	light violet (luster)

Incubation temperature : 28°C.

Color plate : glucose (2.0 %), peptone (0.35 %), yeast extract (0.4 %), ammonium sulfate (0.3 %), potassium phosphate (0.2 %), magnesium sulfate (0.1 %), trypan blue (15 µg/ml), eosin Y (8 µg/ml).

The color of the colonies was observed after incubation for five days.

— : No growth.

R : Red, WP : whitish pink, W : White.

Aspartic acid TTC : TTC-staining on aspartic acid medium.

Table 7 Comparison of cytochrome enzymes by the opal-glass method.

Parent strain	Strain	Treatment	Cytochrome enzymes		
			a + a ₃	b	c
K-7	A-4	Acridlavine (0.4 ppm)	disappeared	slightly detectable	slightly detectable
	A-6	Acridlavine (4 ppm)	disappeared	slightly detectable	slightly detectable
	B-19	Asp. acid medium at 35°C	disappeared	slightly detectable	slightly detectable
	B-26	Asp. acid medium at 35°C	disappeared	slightly detectable	slightly detectable
K-7 (Control)			present	present	present

のTTC培地においてもWhiteであり、アクリフラビン処理により取得した株と同様のTTC染色性を示した。

(2) カラープレート法による判別

エオシンYとトリパンブルーを用いたコロニーの染色判別では呼吸欠損菌は赤紫色¹³⁾乃至青紫色⁶⁾に呈色する。本試験においては対照株が明るい紫色を呈したのに対し、アスパラギン酸培地におけるTTC White株は赤紫色を呈し対照株との差異が認められた。またアクリフラビン処理株は青紫色を呈した。

(3) YPG培地における生育の有無

アスパラギン酸培地におけるTTC White株はYPG培地において生育せず、アクリフラビン処理により取得した株と同様な結果を示した。

6. 呼吸欠損の証明

オパールグラス法によるチトクローム酵素の比較結果をTable 7に示した。

対照株に比べいずれのTTC White株は600 nm付近の吸収スペクトルに差異を認め、チトクロームa + a₃の吸収ピークが消失していた。又、チトクロームb, cを含め吸収スペクトル全般に対照株の方が鋭敏なピークを示した。この結果よりアスパラギン酸培地におけるTTC White株は呼吸欠損菌であることが判明した。

この結果は30°C以下での炭素源、窒素源によるTTC染色性の変化(用いた培地におけるTTC染色性の違い)とは異なり、アスパラギン酸培地における35°C以上の培養において実際に変異が起きていることが示唆された。

Fig. 4 Time course of fermentation for respiratory deficient yeast and its parent strain (K-7).

Proportion of materials in moromi.

Koji 35 g

α -rice 115 g

Water 270 ml

Addition of yeast 10^6

Fermentation temperature 15°C

○—○ Control

△—△ Respiratory deficient strain induced by treating with asp. acid medium at 35°C.

□—□ Respiration deficient strain induced by treating with acriflavine.

用いた TTC White 株はそれを構成する細胞すべてが呼吸欠損菌であり、呼吸株は存在しなかった。また 10 回の繰り返し培養を行っても TTC 染色性に違いのある株は出現せず、すべて呼吸欠損菌であった。

7. 小仕込み試験

K-7 号酵母を対照として、取得呼吸欠損菌 4 株の小仕込み試験を行った。醪経過を Fig. 4 に、小仕込み酒の成分結果を Table 8 及び 9 に示した。

アスパラギン酸 35°C 処理、アクリフラビン処理呼吸欠損菌 4 株は対照株と比較すると発酵が遅れる傾向にあった。小仕込み酒の成分を対照株と比較すると、4 株とも日本酒度及びアルコールに差は認められなかった。

酸度はアクリフラビン処理呼吸欠損菌と対照株との差は認められなかったが、アスパラギン酸 35°C 処理呼吸欠損菌は酸度が高くなる傾向が認められた。アミノ酸度は呼吸欠損菌 4 株ともに高い値を示した。官能評価については対照株に比べて低い評価を得るものが見られた。また醪中の純度を調べた結果、4 株ともに TTC 染色性 White 系であり、YPG 培地に生育しなかったことから醪は添加酵母により純粋に発酵していることが示された。

対照株に比べてアスパラギン酸 35°C 処理呼吸欠損菌は酸度が高い傾向にあったので、有機酸組成を見るところリンゴ酸含量は対照株が 208 ppm に対して 632 ~ 863 ppm と約 3~4 倍高い値を示し、また酢酸含量

Table 8 Components of the small-scale fermented sake produced by the respiratory deficient strain. (K-7)

Strain	Sake meter	Alcohol (%)	Total acidity (ml)	Amino acidity (ml)	pH	* Color	Fermentation period (days)	Sensory test	Characteristics of the yeast in moromi	
									TTC (28°C)	Growth on glycerol medium (28°C)
A 4	+1.5	18.4	3.65	1.70	3.85	0.078	17	1	WP	—
A 6	+2.0	18.7	3.60	2.20	3.87	0.104	20	3	WP	—
B 19	+6.5	18.5	4.15	2.10	3.67	0.092	18	2	W	—
B 26	+5.0	18.7	3.95	1.90	3.83	0.087	18	1	W	—
K 7 (Control)	+5.0	18.7	3.60	1.55	3.88	0.078	17	1	R	≡

R : Red, WP : Whitish pink, W : White

* Color : Absorbance with 30 mm cells at 430 nm.

Sensory test (evaluation) : 1 (good) - 5 (bad).

— : No growth.

Table 9 Organic acid composition of small-scale fermented sake produced by the respiratory deficient strain (K-7)

Strain	Citric acid (ppm)	Pyruvic acid (ppm)	Malic acid (ppm)	Succinic acid (ppm)	Lactic acid (ppm)	Fumaric acid (ppm)	Acetic acid (ppm)	Pyroglutamic acid (ppm)	Total (ppm)
A-4	113	239	328	321	277	2	306	34	1620
A-6	131	201	444	264	308	5	297	35	1685
B-19	106	288	863	453	285	3	330	33	2361
B-26	124	408	632	340	327	2	330	26	2189
K-7 (Control)	110	265	208	378	277	2	233	21	1494

においても対照株 233 ppm であるのに対して 330 ppm と約 1.5 倍程度高い値を示した。この酢酸含量の増加は官能評価の低かった原因の一つであると思われる。佐藤ら¹⁸⁾は K-701 の呼吸欠損菌で清酒の仕込みを行い、発酵が遅れること、リンゴ酸が多くなることを報告しているが、アスパラギン酸 35°C 処理呼吸欠損菌も同様な結果を示した。また呼吸欠損菌では 2-Methylmalic acid (シトラマル酸) が生成されることが T.Sai ら¹⁹⁾によって報告されているが、今回取得した呼吸欠損菌においても生成されているかどうか検討したいと考えている。

White 株 (呼吸欠損菌) の出現は酸度、アミノ酸度の増加、香りの低下など清酒醸造においては好まない結果をもたらすと考える。このように仕込みの為に用いる前培養酵母の培養条件、特に 35°C 以上の温度による培養 (酵母の種類によっては 32°C 以上) は酵母の生育に大きな影響を与えるとともに、酵母の変異の原因となることから正確な温度管理が必要であると考えらる。

要 約

窒素源の種類によっては培養条件により、高頻度に TTC 染色性のないコロニーが現れることを見出した。それら TTC 染色性のない酵母の性質及び醸造特性について調べた。

セリン、チロシン、アスパラギン及びアスパラギン酸を単独添加した培地を用い 35°C 以上で培養した場合に、TTC White のコロニーが高頻度で出現した。

これら TTC White のコロニーの出現は特にアスパラギン酸及びアスパラギンを用いた場合に著しかっ

た。

TTC White 株はグリセリン培地に生育せず、チトクローム a+a₃ の吸収スペクトルが消失していることから呼吸欠損菌であった。

これら呼吸欠損菌を用いて小仕込みを行い、小仕込み酒の成分結果を親株 (TTC Red) と比較したところ、発酵の遅れ、酸度の上昇 (リンゴ酸、酢酸の増加)、香りの低下を招いた。

文 献

- 1) 古川敏郎, 秋山裕一: 農化, **37**, 398-402 (1963)
- 2) 秋山裕一: 醸協, **58** (12), 1155-1158 (1963)
- 3) 三宅節子: 蛋白質, 核酸, 酵素, **13** (12), 1053-1060 (1968)
- 4) 永井 進, 柳島直彦: 最新医学, **16** (11), 3055-3059 (1961)
- 5) 永井 進: 蛋白質, 核酸, 酵素, **12** (6), 506-513 (1967)
- 6) 田口武子, 佐藤 正, 関口順一, 安平仁美: 醸協, **84** (4), 264-269 (1989)
- 7) 久寿米木一裕, 馬場雅幸, 宮城盛安, 中原民也: 醸協, **91** (5), 355-361 (1996)
- 8) 吉田 清, 村上英也: 醸協, **73** (3), 218-220 (1978)
- 9) 清酒酵母研究会編: 清酒酵母の研究 (80 年代の研究) p 101, 清酒酵母研究会 (1980)
- 10) 村上英也, 吉田 清, 野呂二三, 稲橋正明, 服部裕子: 醸協, **77** (3), 181-184 (1982)
- 11) 村上英也, 吉田 清, 野呂二三, 稲橋正明, 服部裕子: 醸協, **77** (6), 413-418 (1982)
- 12) 上原悌二郎, 山村みどり: 醸協, **87** (11), 773-779 (1992)

- 13) 石川辰夫編：微生物遺伝学実験法, p 192, 共立出版 (1982)
  - 14) 清酒酵母研究会編：清酒酵母の研究 (80 年代の研究) p 462, 清酒酵母研究会 (1980)
  - 15) K. SHIBATA, A. A. BENSON, M. CALVIV : *Biochim. Biophys.*, **15**, 461-470 (1954)
  - 16) 注解編集委員会編：第 4 回改正国税庁所定分析法注解, p 7, 日本醸造協会 (1993)
  - 17) 吉田 清, 稲橋正明, 中村欽一, 秋山裕一, 野白喜久雄：醸協, **89** (8), 647-651 (1994)
  - 18) 佐藤和夫, 宇都宮仁, 近藤恭一, 三島秀夫, 竹村成三, 中村欽一, 吉澤 淑：醸工, **66** (2), 91-97 (1988)
  - 19) T. SAI, K. AIDA, T. UEMURA : *J. Gen. Appl. Microbiol* **15**, 345-363 (1969)
-