高温耐性酵母の酒造適性に関する研究

食品工業部
江口良寿

これまでの研究で，前培養条件を変更すると酵母細胞のアルコール耐性等が変化して生産できるエタノール濃度が変化することを見い出した．この前培養条件での温度は，酵母の至適生育温度以下としているため，高温条件下でのエタノール生産のみならず，より低い温度条件下でもエタノール生産性に影響を与えていることが予測される．そこで，耐性を強化できる前培養条件を検討し，30℃及び 20℃におけるエタノール生産性について検討を行った．その結果，耐性を強化した酵母では，いずれの温度条件でもエタノール生産性が向上しており，前培養条件の変更は，広い温度条件下でエタノール生産性に影響することが分かった．

1. はじめに

工業技術センターでは，バイオエタノールの効率的な製造技術の開発を目的とし，これまでに流加培養システムを開発し，このシステムを用いることで短時間に高濃度エタノールが製造できることを明らかにした[1)]．また，その中でエタノール生産性に前培養条件が大きく影響することも見い出した[2)]．見い出した前培養条件は４℃の低温環境と30℃の環境を組み合わせたもので，酵母細胞にヒートショックを与えるような高温条件にはなっていないにもかかわらず，40℃でのエタノール生産性が大きく向上した．この結果から，前培養条件の違いが酵母のアルコール耐性に影響を与えることが示唆される．

前培養条件の違いが酵母のアルコール耐性に影響を与える研究はいくつかある[3)]が，前培養の温度条件の違いで耐性が変化するとの報告例は見られない．この前培養の温度条件の違いによるアルコール耐性の変化が明確になればバイオエタノール製造や酒類製造に応用できるものと考えられる．本研究では，前培養の温度条件の変化がアルコール生産性に及ぼす影響について検討を行った．

２．実験方法

2.1 供試菌株及び培地

酵母菌株は当センターに保存している協会 901 号酵母を用いた．これらの菌株は MY 培地（酵母エキス 0.3%，麦芽エキス 0.3%，ペプトン 0.5%，グルコース 1.0%）で，それぞれ培養して実験に用いた．また，前培養条件の検討の際には 2MY5，2MY10，2MY15，2MY20 培地（酵母エキス 0.6%，麦芽エキス 0.6%，ペプトン 1.0%，グルコースそれぞれ 5，10，15，20%）を用いた．流加培養システムを用いた発酵試験には，2MY15 培地を開始培地として， MY55 培地，MY60 培地（酵母エキス 0.3%，麦芽エキス 0.3%，ペプトン 0.5%，グルコースそれぞれ 55，60%）を流加培地としてそれぞれ用いた．

2.2 前培養

協会 901 号酵母をスラントより 1 白金耳 7.5ml の MY 培地に接種し，30℃で 24 時間振盪培養を行った．この培養液を 7.5ml の MY，2MY5，2MY10，2MY15，2MY20 にそれぞれ 0.1ml ずつ接種し，15℃で 72 時間静置培養，30℃で 18 時間振盪培養後，４℃で 72 時間静置して，前培養液を調製した．また，2MY20 での前培養液からそれぞれの新たな培地に接種した後，同様に前培養を行った．

2.3 試験管培養試験

調製したそれぞれの前培養液 0.1ml を新しい 2MY20 培地 7.5ml に接種し，40℃で振盪培養して，経時的にその全重量を測定することで，炭酸ガスの発生量とした．また，MY 培地を用いて 30℃で 24 時間培養した培養液をコントロールとした．

2.4 流加プログラム

開始培地への流加培地の流加は開始培地の糖濃度が低いことから Brix が 1.1 低下後，流加を開始し，流加培地量を 600 ml とした．

2.5 流加培養システムによる発酵試験

流加培養システムの概略図を図１に示す．開始培地 900ml をジャーファーメンタに入れ，これに MY 培地を用いて 30℃で 24 時間又は，2MY15 培地を用いて 30℃で６時間振盪培養後，４℃で 72 時間静置後，30℃で

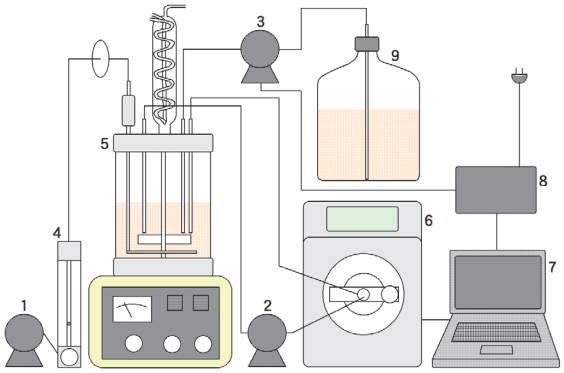

図１　流加培養システムの概略図

１：送気ポンプ，２，３：送液ポンプ（P-1），４：流量計，５：ジャーファーメンタ（M-100），６：Brix測定装置，７：制御コンピュータ，８：リレーユニット，９：リザーバータンク

12 時間振盪培養した前培養液 30ml を添加した後，30℃又は 20℃で培養を開始した．10 秒毎に培養液の Brix 糖度を測定し，設定した Brix 濃度以下になった時点で流加培地を添加して培養液の Brix 濃度を一定に保ちながら培養を行った．規定量の流加培地の添加後，さらに培養を行い， Brix 濃度の低下が認められなくなってから 12 時間経過したときを発酵終了とした．

2.6 発酵もろみの分析

発酵もろみのアルコール濃度は株式会社島津製作所製ガスクロマトグラフィーGC-9A によるアセトンを内標とした１点検量線法で測定し，菌体量は培養液 1.0ml 中の菌体の湿重量とした．

３．結果および考察

3.1 高温発酵における前培養条件の影響

図２に 40℃における試験管培養試験の経過を示す．MY で前培養した培養液では，全ての前培養条件で，炭酸ガス発生量に差はほとんど認められなかった．また，この実験に用いた前培養液(2MY20)を４℃，３日間静置した後，新たな培地 7.5ml に 0.1ml 接種して前培養した場合の試験管培養試験の経過を図３に示す．MY 培地から前培養したときと異なり，コントロール以外の前培養液では，炭酸ガス発生量が向上しており，その向上度合いはグルコース濃度に影響されている傾向が見られる．そのため，グルコース濃度を含めた前培養条件の違いが，酵母のアルコール耐性に影響を与えることが示唆された．

3.2 30℃発酵における前培養条件の影響

前培養の温度条件は酵母の至適生育温度の30℃までしか上げていないことから，40℃といった高温条件だけでなく，より低い温度条件下でも影響を与えている可能性がある．そのため，30℃発酵における前培養条件の影響について，流加培養システムを用いて検討した．その発酵経過を図４に示す．

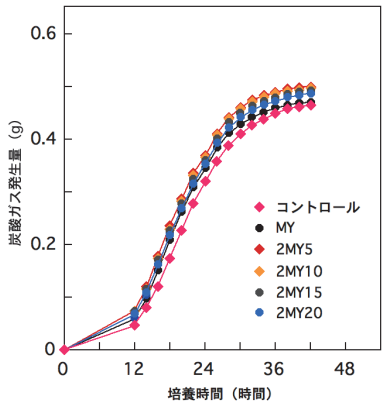

図２　試験管培養試験経過（MY培地から）

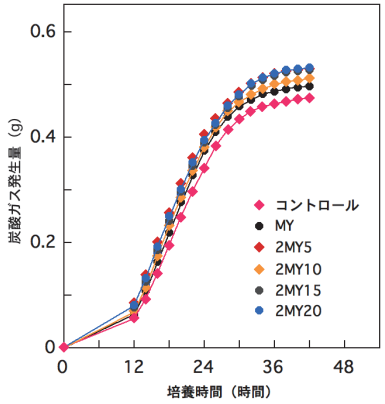

図３　試験管培養試験経過（2MY20から）

前培養条件でMY培地を用い，30℃で24時間振盪培養したとき（図４-a）は，流加終了までに60時間以上を要した．一方，検討した前培養条件では，50時間程度で流加が終了した（図４-b）．また，到達ア

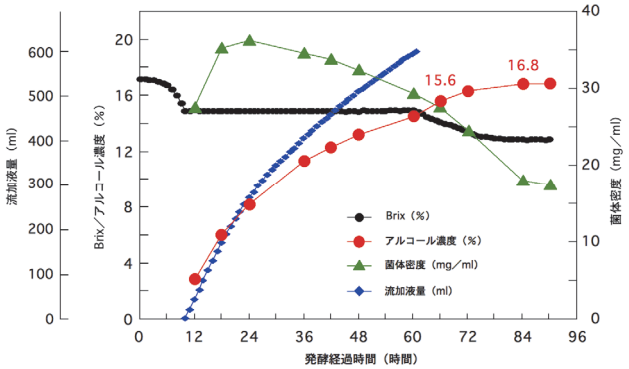

図４-a　30℃における発酵経過

開始培地：15%グルコース2MY培地900ml，流加培地：55%グルコースMY培地600ml，前培養：30℃，24時間振とう培養，発酵温度：30.0℃，通気量：50ml/分，攪拌速度：250rpm

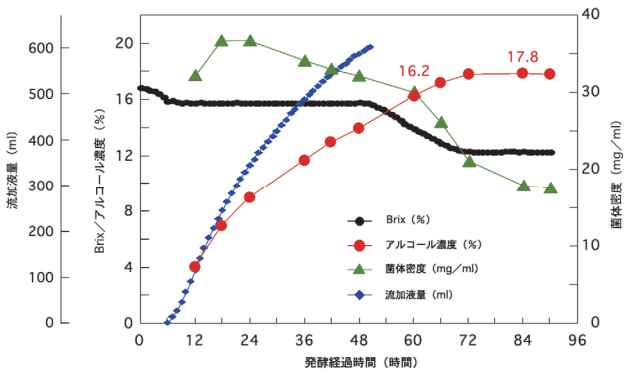

図４-b　30℃における発酵経過

開始培地：15%グルコース2MY培地900ml，流加培地：55%グルコースMY培地600ml，前培養：30℃，６時間振とう培養後，４℃，72時間静置後，30℃，12時間振とう培養，発酵温度：30.0℃，通気量：50ml/分，撹拌速度：250rpm

ルコール濃度はそれぞれ16.8，17.8%と検討した前培養条件の方が高くなった．このため，前培養条件は40℃といった高温条件下だけでなく，酵母の生育至適温度の30℃でもアルコール生産性に影響を与えることが分かった．

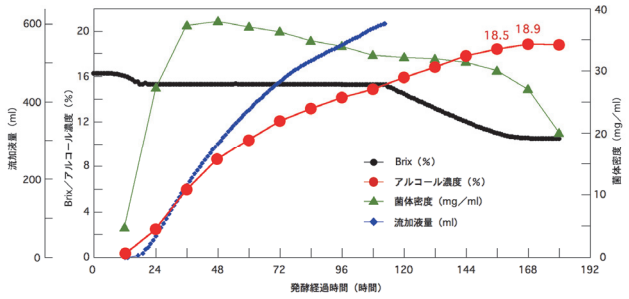

図５-a　20℃における発酵経過

開始培地：15%グルコース2MY培地900ml，流加培地：60%グルコースMY培地600ml，前培養：30℃，24時間振とう培養，発酵温度：20.0℃，通気量：50ml/分，撹拌速度：250rpm

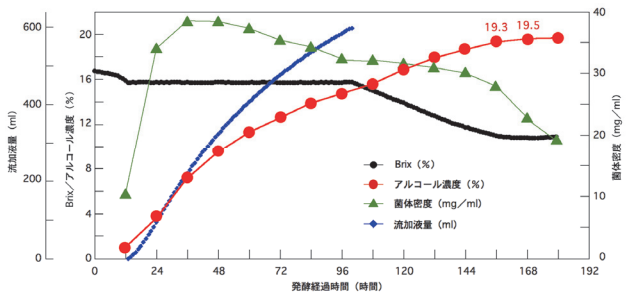

図５-b　20℃における発酵経過

開始培地：15%グルコース2MY培地900ml，流加培地：60%グルコースMY培地600ml，前培養：30℃，６時間振とう培養後，４℃，72時間静置後，30℃，12時間振とう培養，発酵温度：20.0℃，通気量：50ml/分，撹拌速度：250rpm

3.3 20℃発酵における前培養条件の影響

前培養条件の違いが30℃での発酵においてもアルコール生産性に影響を与えていたことから，さらに低温条件の20℃における発酵経過を示したのが図５である．

30℃発酵のときと同様に20℃でも前培養条件をMY培地，30℃で24時間振盪培養としたとき（図５-a）は流加終了時間が約112時間だったのに対して，検討した前培養条件では約100時間となり（図５-b），発酵中期でも発酵速度の低下が少ないことが分かった．また，菌体密度が急速に低下するときのアルコール濃度はそれぞれ18.9%，19.3%となっており，検討した前培養条件の方が若干向上していた．最終的なアルコール到達濃度はそれぞれ18.7，19.6%となっており，検討した前培養条件で培養するとアルコール耐性が向上すると考えられる．その結果として，アルコール生産性が向上することが示唆された．

４．おわりに

前培養の温度条件の違いでアルコール生産性が影響を受けることが分かった．また，前培養に用いるグルコース濃度及び前々培養の条件でも影響を受けることもわかった．検討した前培養条件は酵母の生育至適温度の 30℃以上には上げていないことから，ヒートショックによる影響とは考えにくく，広範囲の発酵温度条件でアルコール耐性に影響を与えていると考えられる．そのため，10℃程度で発酵させる清酒醸造などでも前培養（酒母製造）条件の違いが酒質にも影響することが考えられる．清酒醸造での酒母は製麹に次ぐ重要な製造工程であるとされてきたが，微生物学，醸造学が進展して純粋培養，速醸系酒母ができるようになった現在では，酒母製造に関する研究はあまり実施されていない．それでも菊正宗酒造株式会社の溝口は生もと系酒母と速醸もと系酒母とを比較し，酒母の製造方法の違いで酵母細胞の膜脂質組成が変化し，これがアルコール耐性に影響を与えることを明らかにした[3)]．今回の結果は前培養温度を変化させるだけで，酵母のアルコール耐性を変化させることができることを示唆するものである．今回の実験では，MY 培地を用いているために，実際の酒母についても同様の現象が起きるのかは今後の検討課題であるが，簡単な操作で酵母のアルコール耐性が強化されるのであれば，現在主流となっている速醸系酒母に応用することで酒質の安定化につながると考えられることから，更なる検討を

加えていきたい.

参考文献

１）江口良寿，福元豊，矢野昌之，円城寺隆志：アルコールの高濃度連続生産システムの開発に関する研究，平成19年度佐賀県工業技術センター研究報告書（2007）

２）江口良寿: アルコールの高効率生産微生物の育種に関する研究，平成23年度佐賀県工業技術センター研究報告書（2011）

３）溝口晴彦：清酒醸造に見られる酵母のエタノール耐性獲得機作，生物工学会誌，第76巻，122-130（1998）