

地域資源を活用した食品加工技術に関する研究

—泡なし G 酵母の安定供給に関する研究 (第 1 報) —

澤井美伯、吉村明浩

Study on stable supply of Gifu original sake yeast stain G (I)

Yoshinori SAWAI and Akihiro YOSHIMURA

昨年度当センターで開発した泡なしタイプの G 酵母(NF-G)の普及を図るために、取扱いが簡便な乾燥酵母の調製を小規模培養で試みた。乾燥耐性を酵母に与えるトレハロースを菌体内に高濃度で蓄積させるための培養条件について検討を行い、酵母乾燥重量の約 9%まで高めることができた。

1. はじめに

岐阜県独自酵母である G 酵母は、平成 22 年度に作業効率に優れる泡なしタイプが開発され¹⁾、県内の酒造場で広く利用されている。当センターではこの G 酵母を液体培養して分譲を行っているが、培養液での分譲は酵母の保存性が悪いため、使用期限が 1 週間程度と短く、取扱いには細心の注意が必要である。そのため製造規模が極めて小さい酒造場や、構造改革特別地域いわゆる「どぶろく特区」の製造業者等に供給することが難しい。これらの製造業者に G 酵母の普及を図るためには、保存性が良く取扱いの簡便な乾燥酵母で供給する必要がある。乾燥酵母の利用についてはパンの製造やワイン醸造で一般的であり、清酒用酵母についても(財)日本醸造協会から 701 号、901 号の乾燥酵母が市販されている。酵母は乾燥に対する耐性が弱く、これら市販の乾燥酵母は、菌体内のトレハロース濃度を高めることにより、乾燥耐性を与えている。県内酒造場の規模に合わせた小規模培養で菌体内トレハロースの濃度を高めることができれば、小ロットで乾燥酵母を提供できる。そこで G 酵母の利便性の向上と普及を目的として、小規模培養で簡便な乾燥酵母の調製方法の確立を目指した。本研究では G 酵母の乾燥耐性を向上させるため、トレハロースを酵母菌体内に高濃度で蓄積させるための培養条件等について検討したので報告する。

2. 実験

2. 1 酵母の培養

酵母の培養は YM 培地を基本に、適宜グルコース濃度を調整した。前培養は、グルコース濃度 8%の YM 培地(以下 YM(8%)培地)を用いた。静置培養は 23°Cで行い、好氣的培養は 500ml 容量の振とうフラスコに調製した 100ml の培地を用い、高崎科学器械(株)製 TA-9R-3F で振とう培養を行った。酵母数は(株)キーエンス製デジタルマイクロスコープ VHX-900 と血球板を使い、直接顕鏡観察で計数した。生菌数は YM(1%)寒天培地を用いた混釈法にて出現したコロニー数を測定した。酵母の

菌体内トレハロースの生成は浅野ら^{2) 3)}の方法を参考に、好氣的な条件下で 30°C、7 時間培養後、36°Cに温度を上げて、さらに 5 時間程度培養することで生成した。

2. 2 酵母菌体内トレハロースの分析

酵母菌体内からトレハロースの抽出は KIDA ら⁴⁾の方法を参考にして行った。遠心分離器を用いて回収、洗浄した酵母菌体を熱風乾燥または凍結乾燥したものを試料とした。バイブレーションミルで粉碎後、200~700mg を秤量し、蒸留水(5°C)3ml を加えて懸濁後、1M トリクロロ酢酸溶液(5°C)3ml を加えてから 5°Cで 4 時間振とう抽出を行った。抽出後、遠心分離器で回収した上澄み 4ml に 2M 水酸化ナトリウム溶液 2ml、エタノール 11.6ml を加えて-20°Cで冷却した後、遠心分離器で沈殿を除去した。この抽出液をエバポレーターで乾固し、10ml の蒸留水に溶かしたものを分析に用いた。トレハロースの分析は SHODEX KS-802、KS-801 を用いた HPLC で行い、酵母乾燥重量当たりの比率を求めた。

3. 結果及び考察

3. 1 トレハロース生成の確認

浅野ら^{2) 3)}による清酒用乾燥酵母の調製方法では糖源を連続的に供給しながら 30°Cで好氣的に培養し 7 時間目から温度を上げるとともに糖源の添加量を減少させ、酵母にトレハロースを生成させている。振とうフラスコを用いた小規模培養では流加的な糖源の供給は難しい。そこで単回の培地グルコース量あるいは培養温度変化でトレハロースを生成させられないか調べた。

YM(8%)培地で前培養した G 酵母を YM(2%)培地が入った振とうフラスコ 4 本(Pre-1~4)に植菌し、30°Cで 7 時間振とう培養を行った。Pre-1、2 は遠心分離器で菌体を回収後、滅菌蒸留水で洗浄し Pre-1 は YM(0%)培地、Pre-2 は YM(2%)培地を加えて 36°Cで 5 時間培養した。Pre-3 は培地交換を行わずに 36°Cで 5 時間培養を継続、Pre-4 は 30°Cのまま 5 時間培養を継続した。培養後、菌体中のトレハロース量を分析した。これらの結果を表 1 に示した。その結果、Pre-2 が 2.5%と最も多くトレハロ

表1 トレハロース生成試験

	Pre-1	Pre-2	Pre-3	Pre-4
初期培地	YM(2%)			
培養 0~7 時間	30℃			
洗浄後の培地交換	YM (0%)	YM (2%)	無	
培養 7~12 時間	36℃	36℃	36℃	30℃
酵母数(/ml)	1.1×10 ⁸	2.1×10 ⁸	1.4×10 ⁸	1.6×10 ⁸
菌体乾燥重(g)	0.2807	0.4859	0.3066	0.3141
Trehalose(%)	0.3	2.5	2.2	0.5

ースが生成され、次に Pre-3 の 2.2%、Pre-1 と Pre-4 がそれぞれ 0.3%、0.5%と低い値となった。これらのことから、振とうフラスコを用いた培養でも培養温度を変化させることでトレハロースを生成することが可能であることがわかった。また Pre-1、Pre-4 のトレハロース量が低いことから、トレハロースの生成には、温度操作と共に、温度上昇後の培地にグルコースが必要であることが示された。Pre-3 の生成量が Pre-2 より低いのは、30℃、7 時間の培養中にグルコースが消費され、温度上昇時のグルコース濃度が Pre-2 より低くなっていたからと考えられ、温度上昇時のグルコース濃度がトレハロース生成量に影響することが示唆された。

3. 2 グルコース濃度の検討

トレハロースを高濃度で生成させるには、温度上昇時における培養液中のグルコース濃度が重要であると考えられたので、最適なグルコース濃度に検討を行った。事前に行った試験（データ無）で最も酵母の増殖が良かった YM(8%)培地を初期培地として、8 本（GC-1~8）の振とうフラスコで NF-G を 30℃で 7 時間、振とう培養した。培養液から遠心分離器で回収した菌体を滅菌蒸留水

表2 培養液中のグルコース濃度とトレハロース生成

試験方法				
初期培地	YM(8%)			
培養 0~7 時間	30℃			
培地交換	洗浄後 YM(0.5~11%)			
培養 7~12 時間	36℃			
分析結果				
	YM (%)	酵母数 (/ml)	酵母乾燥重(g)	Trehalose (%)
GC-1	0.5	1.4×10 ⁸	0.3135	1.3
GC-2	1.0	1.5×10 ⁸	0.3518	1.9
GC-3	2.0	1.9×10 ⁸	0.4585	2.3
GC-4	3.0	2.1×10 ⁸	0.5336	3.4
GC-5	4.0	2.1×10 ⁸	0.6195	5.2
GC-6	6.0	2.7×10 ⁸	0.7242	8.0
GC-7	8.0	2.6×10 ⁸	0.7565	9.1
GC-8	10.0	2.5×10 ⁸	0.6947	7.3

で洗浄後、グルコース濃度 0.5~10%の YM 培地に交換して 36℃で 5 時間振とう培養した。培養終了後に培養液中の酵母数を測定し、回収した酵母菌体の乾燥重量と菌体内トレハロース量の分析を行った（表 2）。その結果、グルコース濃度が 8%の GC-7 がトレハロース濃度、酵母乾燥重が最も大きい値となり、酵母数についても最も多かった GC-6 と同程度であった。このことから温度上昇時のグルコース濃度は 8%程度が最適であると考えられた。また培養終了後の GC-7 は、温度上昇前の酵母と比べて、トレハロースの蓄積によると推察される酵母菌体の肥大化が観察された（図 1）。

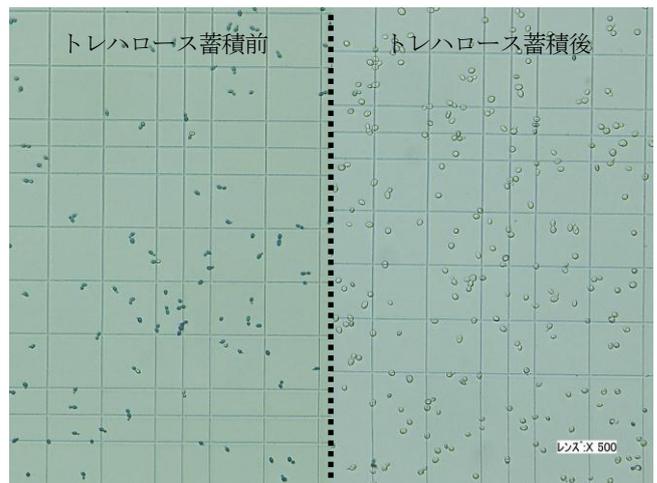


図1 トレハロース生成前後の酵母（NF-G）

3. 3 培地交換をしない培養条件の検討

温度上昇開始時に培地中のグルコース濃度を 8%にすればトレハロースを効率的に生成させることができたが、培養途中での培地交換の作業は、乾燥酵母の調製方法としては煩雑である。そこで培地交換を行わない手法を検討した。初期培地を YM(10%)培地とし、30℃7 時間培養後、36℃に温度を上昇させてから 5 時間培養を継続した。酵母数、菌体内トレハロース量、培地中のグルコース濃度の経時変化を追跡し、その結果を図 2 に示した。グルコース濃度を 10%で培養を開始すると、培養後 7 時間後に約 8%に減少し、温度上昇させるのに最適なグルコ

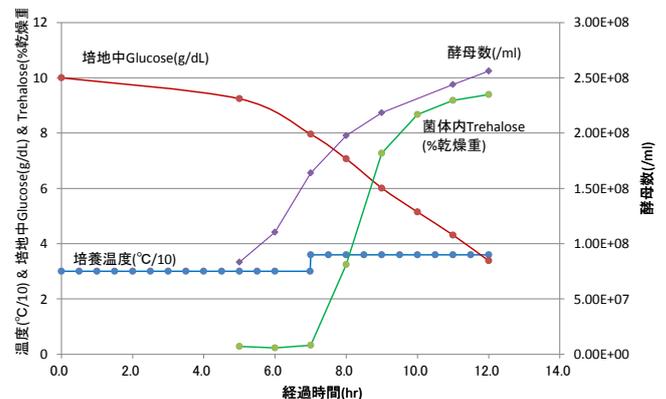


図2 培養の経時変化

ース濃度となった。グルコース濃度は酵母数の増加に反して減少し、培養 12 時間後に約 3.4% となった。菌体内トレハロース量は 36°C に温度上昇後から急激に増加し最終的に 9.4% まで増加した。酵母数についても培養 12 時間後で 2.6×10^8 /ml と、培地交換をした GC-7 の酵母数と同程度であり、培地交換をしない培養でもトレハロースを高濃度で生成させられることが明らかになった。

4. まとめ

振とうフラスコによる小規模培養において、酵母に乾燥耐性を与えるトレハロースを菌体内に生成させる培養条件を検討した。その結果、温度上昇時の培地中のグルコース濃度が 8% のとき、最もトレハロースを生成した。温度上昇時に培地交換をしない培養では、初期培地のグルコース濃度を 10% にすることにより、トレハロースを乾燥重量の 9% 程度まで高めることができた。今後、このトレハロースを蓄積した酵母の乾燥方法について検討を行う予定である。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、財団法人越山科学技術振興財団から研究助成金を頂きました。ここに感謝の意を表します。

【参考文献】

- 1) 岐阜県産業技術センター研究報. No5, pp.46-48, 2011.
- 2) 浅野ら, 北海道立食品加工研究センター報告. No.3, pp77-82, 1998.
- 3) 浅野, 清酒酵母の研究 -90 年代の研究-, 清酒酵母・麴研究会, pp135-138, 2003.
- 4) KIDA *et al.*, *J. Ferment. Bioeng.*, 76(4), pp284-288, 1993.

Abstract

Sake yeast strain G is used widely at the brewery in Gifu prefecture. The dried form of sake yeast G is required, because the dried yeast is useful for the small scale fermentation such as the doburoku brewing. The sugar, trehalose, is essential for the viability of the dried yeast cell, due to preserving membrane structure. In this study, we attempted to elevate the cellular trehalose level by the shift of the culture condition. The shift of the culture temperature from 30 degrees C to 36 degrees C resulted in the increase of the trehalose from 0.5% to 9.4% of the dried yeast cells. The glucose content of culture medium also had the influence of the cellular trehalose level.