

## 短期間でオーダーメイド可能な酵母拡大培養方法の検討

渡部貴志・柳澤昌臣

The yeast extended cultivation method which can quickly response to the order  
WATANABE Takashi, YANAGISAWA Masaomi

酒質が多様化している消費者ニーズに対応するため、酒造業界から酵母拡大培養の受注期間をより短期間にするよう要望が出ている。そこで本研究では、長期間保存しても酵母が死滅しない前培養液の調製方法を検討することにした。その結果、6ヶ月間冷蔵保存していても生菌率が90%以上の前培養液を作ることになった。また、この前培養液を用いた拡大培養酵母でも清酒の小仕込み試験に影響がほとんど無いことが確認できた。

キーワード：清酒、拡大培養、生菌率、試験醸造

Because the sake quality of required by consumer is diversified, sake brewers of Gunma prefecture requested us to cultivate yeast more short time of delivery. The purpose of this study is to investigate the pre-cultivation condition which yeasts do not death with the long storage period. We succeeded to obtain the yeast pre-culture with 90% or more viable cell ratio for 6 months cold storage. Furthermore, we confirmed that almost no effect for small scale sake brewing test by the yeast extended culture using this long storage pre-culture.

KEY WORD: Japanese sake, yeast extended cultivation, viable cell ratio, small scale yeast mash brewing test

### 1 はじめに

清酒、焼酎、ビール、ワインなどの酒類は、ブドウ糖が酵母によってアルコールへと変換されることで醸されている。古来では果皮や蔵付きの酵母により酒類は造られてきたが、近代に入って醸造用の酵母が単離され、大量に純粋培養された酵母を酒類醸造に用いられるようになった。このことにより、雑菌汚染による腐造の危険性は大きく下がり、酒質は飛躍的に向上した。

酵母を純粋培養するためには、無菌操作設備が必要であるため、中小零細の酒類製造会社は、(公財)日本醸造協会などの外部機関が培養した酵母を購入している。また、各都道府県の公設試では、独自の酵母を管理しており、県内酒類製造会社への拡大培養酵母の提供は、非常に重要な業務で

ある。当センターでは、群馬県独自の清酒用酵母である群馬KAZE酵母<sup>1)</sup>や群馬G2酵母<sup>2)</sup>、群馬227酵母<sup>3)</sup>だけでなく、清酒製造会社が取得した自社酵母の管理を行っている。近年では、群馬県独自いちご「やよいひめ」から単離した酵母<sup>4)</sup>も地ビール会社に提供している。

これまで当センターでは、12月までに翌年4月までの酵母培養スケジュールをとりまとめていた。しかしながら近年は、様々な清酒酵母が開発され、地酒ブームにより消費者から求められている酒質も多様化している。このことから、清酒製造会社からは、発注期限を2週間前までに短縮して欲しいという要望が出てきた。

酵母拡大培養は、①休眠化させている酵母細胞を寒天培地から液体培地へ接種、菌体量を増やす前培養を行い、②そのリフレッシュした酵母細胞を一定の菌体量となる

ように培養する本培養という流れで行う。現在は、培地の作成に要する時間を除いても約10日間かかる。もし、6ヶ月間以上の長期間で、前培養液中の酵母細胞の生菌率が90%以上と高く維持できる保存方法を見つければ、受託から本培養をするだけで良くなり、約4日間まで短縮させることが可能となる。

そこで本研究では、企業ニーズへの対応を迅速化し、同時に拡大培養に要する業務の効率化を目的に、短期間でオーダーメイド可能な酵母拡大培養方法を検討したので、その結果を報告する。

## 2 実験材料と方法

### 2.1 供試酵母および使用培地

群馬県独自酵母である群馬G1酵母(G1)、群馬G2酵母泡無し株(G201)、群馬KAZE酵母2号(KAZE2)は、県内清酒製造会社に頒布しているスラントのものを使用した。また、県内清酒製造会社の自社酵母の中で、増殖性が悪く拡大培養に時間がかかるA株を使用した。

酵母の前培養および拡大培養には、秋田今野の冷凍濃縮麴エキス(Brix 20°)を12倍に希釈し、グルコース83 g/L、グルタミン酸ナトリウム 1.7 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g/L、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g/Lを加えた希釈麴エキス培地を用いた。酵母菌体を増殖させる培養には、2×YD培地(ミーストP1G(アサヒフードアンドヘルスケア) 20 g/L、グルコース 40 g/L)を用いた。それぞれの培地は、調製後に121℃、15分間の加温加圧滅菌を行った。

### 2.2 前培養酵母の保存試験

県内清酒製造会社に拡大培養酵母を提供するのと同様に、希釈麴エキス培地5 mLを含む試験管に酵母を一白金耳接種し、30℃にて24時間、150 rpmの往復振とう培養を行ったものを通常の前培養液とした。

長期保存に向けた前培養液の調製では、2×YD培地100 mLを含む300 mL容三角フラスコに酵母を一白菌耳接種し、30℃にて24時間、150 rpmの往復振とう培養を行った。得られた培養液を5 mLずつ15 mL容チューブに分注し、8000 rpm×10分間

表1 小仕込み試験条件

	酒母	一段	二段	追水	計
総米(g)		40	160		200
掛米(g)			160		160
麴米(g)		40			40
汲水(mL)	12	68	200	30	310

の遠心分離を行った。沈殿した菌体を希釈麴エキス培地5 mLに再懸濁し、30℃で24時間の静置培養を行い、これを長期保存用の前培養液とした。

それぞれの培養液を4℃の冷蔵庫で保存し、培養直後、1、2、4、8、12、24週間後にメチレンブルー染色法<sup>5)</sup>により、酵母の生菌率を分析した。

### 2.3 小仕込み試験

令和2年度兵庫県産山田錦(40%精米)を用い、表1に示す条件で総米200gの小仕込み試験を行った。酵母の拡大培養は、通常の前培養液5 mL、または24週間(6ヶ月間)冷蔵保存した長期保存用の前培養液1 mLを希釈麴エキス培地500 mLに接種し、30℃で3日間静置培養した。また、KAZE2については拡大培養液を6ヶ月間冷蔵保存したものも用いた。これらの拡大培養液1 mLを酒母の代わりに用いた。

麴米は、ハイG(樋口松之助商店)を種麴として製麴したものを用いた。なお、汲水は水道水を用い、酒母用加工水として水道水に $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.2 g/L、NaCl 0.15g/L、乳酸 5 mL/L加えたものを10 mLと99.5%エタノール1 mLを用いた。もろみ温度は、15℃一定で行った。掛米は洗米後、35%吸水率となるように浸漬し、蒸籠で蒸したのものを用いた。追水は、6、12、15日目に10 mLずつ計30 mL行った。上槽は、18日目に遠心分離により行った。

### 2.4 分析方法

酸度、アミノ酸度、日本酒度は、国税庁所定分析法に従い、分析を行った。アルコール分(エタノール)は、アルコメイト(理研計器(株))により簡易分析を行った。糖類(グルコース、マルトース)は、高速液体クロマトグラフ、示差屈折率検出器を用い、分析を行った。香気成分(酢酸エチル、イソアミルアルコール、酢酸イソ

アミル、カブロン酸エチル) は、ヘッドスペースガスクロマトグラフで分析した。

## 2. 5 実地試験醸造

県内酒造会社3社にそれぞれ使用する酵母を変えて実地試験醸造を委託した。当センターで通常の前培養液と長期保存用の前培養液を用いて拡大培養を行い、同規格の清酒造りに用いて頂いた。

## 3 結果と考察

### 3. 1 前培養液の長期保存化

(公財)日本醸造協会では、用事調製の拡大培養酵母だけでなく、1年間保存できる粉末酵母やアンブル酵母も提供している。粉末酵母は、大量培養した菌体を回収し、酵母が死滅しない条件で乾燥化させる必要がある、大型設備投資が必要である。一方、アンブル酵母は、ガラスのアンブルに酵母が液体の状態です封入されているため、当センターでも同様のものが作れると考えた。しかしながら、その調製方法は企業秘密で報告例がないため、培養条件を検討することにした。

微生物研究において、酵母の培養に用いられる培地は、その目的によって組成が大きく異なる<sup>6)</sup>。YPD培地は、窒素源やビタミン成分が多く、酵母は早く増殖することができる。しかしながら、エネルギー源である炭素源が相対的に低く、増殖した酵母の死滅は早い。一方、PDA培地は、窒素源やビタミン成分は少ないが、相対的に炭素源が多いため、酵母の寒天培地上での長期保存に向いている。これらの情報から、まず富栄養の2×YD培地で酵母菌体を増殖させて回収し、炭素源が豊富な希釈麹エキス培地で培養すれば、長期保存可能な前培養液が得られると推測した。

まず、KAZE2を用いて予備試験を開始し、6ヵ月後に生菌率を調べたところ、90%以上の高い値を維持していた。そこで、KAZE2に加え、G1、G201、A株を用いて、通常の前培養液と長期保存用の前培養液を冷蔵保存し、生菌率の経日変化を調べた。通常の前培養液では、生菌率が冷蔵保存と共に急激に下がり、8週間後には全ての株で20%以下となった(図1A)。また、G1、

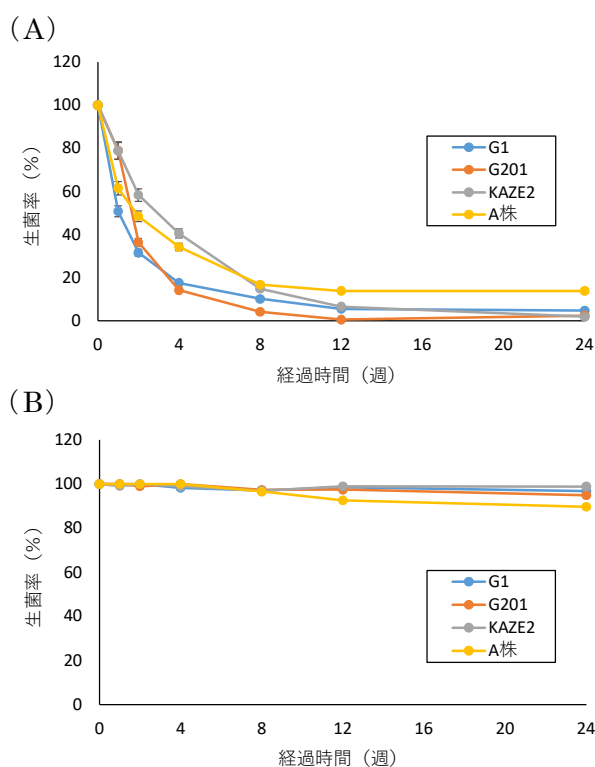


図1 各酵母の生菌率の経時変化

(A) 通常の前培養液を4℃で冷蔵保存した生菌率の変化。(B) 長期保存用の前培養液を4℃で冷蔵保存した生菌率の変化。独立した3回の試験の平均値と偏差値。

G201、KAZE2については、8週間後以降も生菌率は低下していったが、A株は24週間後(6ヶ月間)で13.9%の生菌率であった。一方、長期保存用の前培養液の生菌率は、ほとんど低下せず、G1、G201、KAZE2は6ヶ月間後で94%以上の生菌率であった(図1B)。A株も同様の傾向ではあるが、6ヶ月間後に89.7%の生菌率であった。

### 3. 2 醸造特性に与える影響評価

先の検討により、少なくともG1、G201、KAZE2、A株の前培養液の生菌率が6ヶ月間高い値を維持できる方法が分かった。この前培養液を用いて拡大培養した場合、通常の前培養液を用いたものと比較して、酵母の醸造特性に影響が出ないことが実用化に不可欠である。そこで、新たにG1、G201、KAZE2、A株の通常の前培養液を作成し、6ヶ月間保存した長期保存用の前培養液と同時に拡大培養を行い、小仕込み試験を行うことにした。重量減少量や醸造特性は、前培養液間ではあまり変化がない

表2 小仕込み試験での醸造特性

平均	重量減少量 (g)	日本酒度	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)	アルコール分 (%(v/v))	Glucose (%)	Maltose (%)	イソアミルアルコール (ppm)	酢酸イソアミル (ppm)	カブロン酸エチル (ppm)	酢酸エチル (ppm)	イソブチルアルコール (ppm)	E/A
G1通前	70.63	-0.7	2.9	1.7	18.7	1.4	1.0	204.2	8.3	0.7	119.7	82.1	4.1
G201通前	66.69	-9.1	3.2	1.8	17.2	2.0	1.3	232.9	7.6	0.6	81.0	126.6	3.3
KAZE2通前	67.76	-7.5	2.8	1.8	16.9	2.0	1.2	199.5	6.8	3.8	74.7	101.9	3.4
A株通前	57.24	-22.5	2.6	1.7	15.0	3.8	1.8	185.7	2.3	4.8	40.0	61.9	1.3
G1長前	70.61	-0.8	2.7	1.8	18.5	1.4	0.9	201.1	8.3	1.0	118.6	77.8	4.1
G201長前	66.72	-9.7	3.1	1.8	17.0	2.1	1.3	230.8	7.6	0.7	78.7	122.2	3.3
KAZE2長前	68.07	-3.0	2.5	1.8	18.1	1.7	1.1	198.2	8.0	4.7	94.0	92.8	4.1
A株長前	56.63	-24.0	2.6	1.7	14.7	3.8	1.8	184.7	2.1	4.7	40.3	60.3	1.2
KAZE2長拵	65.87	-12.1	2.8	1.6	16.3	2.5	1.5	189.0	3.8	3.0	42.9	84.6	2.0

通前：通常の前培養液を用いた拡大培養液、長前：長期保存用の前培養液を用いた拡大培養液、長拵：6ヶ月間冷蔵保存した拡大培養液、2回の独立した試験の平均値。

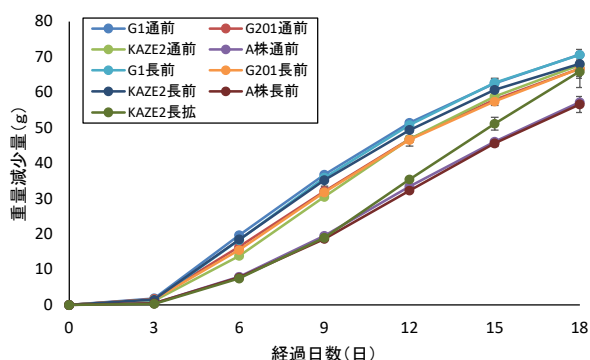


図2 重量減少量の変化

2回の独立した試験の平均値と偏差値。

ことが認められた（表2、図2）。このことから、前培養液を長期保存のものに変更しても、実際の酒造りには影響が少ないと予測された。一方で、拡大培養液を6ヶ月間冷蔵保存したKAZE2は、生菌率が41%まで下がっており、初期の重量減少量が少なかった。このことから、拡大培養液の作り置きは難しく、前培養液からオーダーメイドする必要が認められた。

### 3.3 実地醸造試験による評価

さらに実用化を検討するため、用いる酒米と精米歩合など同規格の清酒を複数造る酒造会社3社に実地醸造試験を委託することにした。酒造会社間において、用いる酵母と酒米は異なるようにした。

それぞれ、前培養液の違いによって、もろみ日数や、醸造成分に多少の差が認められた（表3）。これは、実地醸造では同時に複数の仕込みは行えないので、時期の連れによる気候の影響が大きいと考えられた。また、酒造会社からは、酒造りには大きな影響は無かったと感想を頂いている。これらのことから、長期保存化させた前培養液を用いても実用上問題ないと考えられた。

表3 実地醸造試験のまとめ

もろみ日数 (日)	日本酒度	アルコール分 (%(v/v))	グルコース (%)	酢酸イソアミル (ppm)	カブロン酸エチル (ppm)	
A 対照	23	+11.3	17.0	1.5	1.6	5.4
A 長期	25	+7.6	16.8	2.1	0.9	4.1
B 対照	26	-2.0	16.1	2.6	1.2	7.1
B 長期	28	-0.8	16.0	2.3	1.1	8.0
C 対照	22	-2.0	17.0	1.9	2.2	2.2
C 長期	23	-3.3	17.2	1.8	1.8	3.5

## 4 まとめ

本研究では、酒造会社の要望である短時間でオーダーメイド可能な酵母拡大培養方法を確立するため、前培養液を長期保存可能にする培養条件を検討した。その結果、6ヶ月間冷蔵保存しても生菌率がほとんど下がらない条件を見出した。また、実地醸造試験により、前培養条件を変えても酵母の醸造特性に問題ないことを確認した。

## 文献

- 1) 上山 修ら：平成13年度群馬県工業試験場研究報告、39-43
- 2) 増渕 隆ら：平成24年度群馬産業技術センター研究報告、38-41
- 3) 増渕 隆ら：平成21年度群馬産業技術センター研究報告、12-14
- 4) 渡部貴志ら：令和2年度群馬産業技術センター研究報告、29-33
- 5) 後藤邦康ら：日本醸造協会誌 81、189-193 (1986)
- 6) 渡部貴志：日本生物工学会誌 98、623 (2020)