

清酒醪と固液共存培地における 酵母菌体内の S-アデノシルメチオニンの動向

進藤 育*・高橋康次郎*・佐藤和夫*

(平成 23 年 5 月 19 日受付/平成 23 年 9 月 13 日受理)

要約：清酒醪中の酵母の存在部位別の菌体内成分について調べるために、従来の固液共存培地の寒天部形状を改変した。酵母は、従来通り固体部を斜面状に成形した培地において固体部の端のフラスコ器底ガラスが露出している部分に直接沈殿していることが観察された。これに対し、平板状に成形した改変培地では、器底部に形成した固体培地の上へ直接沈殿し、差別化が可能であった。培養中の液部のメチオニン濃度は、10℃の平板状固体培地でも低濃度一定で推移した。さらに 15℃でも同様に一定濃度で推移する傾向を示した。菌体内 S-アデノシルメチオニン (SAM) は、低温でかつ酵母菌体が固体部上へ直接沈殿する発酵条件で特に高蓄積が認められた。

次に醪中の酵母菌体を米粒に付着して存在する酵母と液部に浮遊する酵母に分画して回収した。その菌体内 SAM 濃度は、固体部に付着している菌体で高蓄積され、モデルの結果と合致した。一般に低温醪では米粒の溶けが悪く、粕歩合も高くなり、固形物が多くなることとの関連が考えられた。

以上のように、低温醪で認められる酵母菌体内への SAM 高蓄積については、これまで明らかにしてきた醪中のメチオニンの低濃度推移から示唆される選択的な取込に加え、固液界面に存在する酵母が増加することが、更なる一要因として明らかとなった。SAM は、醪中で酵母菌体から漏出して製成酒の酒質に影響を与えることから、今後この改変培地を活用し、SAM の漏出と酒質について詳細な検討をすることが可能と思われる。

キーワード：清酒醸造, yeast, 含硫化合物, S-adenosylmethionine

緒 言

清酒醪は、その最大の特徴である並行複発酵条件下で、米粒の溶解と酵母によるアルコール発酵によってその生育環境は常に変化しており¹⁾、種々の要因の解析には、複雑系ゆえの困難さを伴う。

著者らは、これまでに低温醪での含硫物動向について遊離メチオニンの構成比が低く²⁾、酵母菌体内の S-アデノシルメチオニン (SAM) の蓄積量が多いことを報告した³⁾。また、これらの特徴的な動向は単発酵では認められず²⁾、低温かつ並行複発酵でのメチオニンの低濃度推移が関与することを明らかにし^{3,4)}、特に吟醸酒などの低精米歩合の醪ではこれが顕著であることを明らかにした⁵⁾。また、これらを手掛かりに清酒醪における含硫物の特徴的な動向を検討するために、新たに固液共存培地を開発した。これにより SAM 生成酵素であるメチオニンアデノシルトランスフェラーゼなどの活性から、低温醪でのみ認められる含硫物の特徴的な動向をモデル化した。

一方、吉井らは、走査電子顕微鏡観察により、清酒醪中で酵母は米粒の空隙や亀裂などに侵入しやすく⁶⁾、醪中の酵母のうち 6~7 割が米粒表層部または米粒内部に存在している⁷⁾ ことを報告している。これ以外は、液部に浮遊し

て存在するが、これらの菌体内内容物について個別に検討された例はない。

そこで本研究では、清酒醪中で米粒に付着した状態の酵母について検討するために従来のシンプルなモデルを改良し、固体部形状を工夫した。すなわち寒天部をフラスコ内へ平板高層状に成型し、酵母菌体が濃厚な固体部直上へ沈殿しつつ発酵が進行する条件とフラスコ器底のガラス部位へ沈殿して発酵する条件とを設定し、これまでの並行複発酵条件に加え、物理的形狀の差異による SAM の動向を検討することを目的とした。

さらにこれを清酒醪と照合するために、固形物の存在が及ぼす発酵経過への影響と、発酵液中のメチオニン構成比及び醪中での固液の各画分に存在する酵母の菌体内 SAM について検討することとした。

実 験 方 法

(1) 培地の調製及び培養法

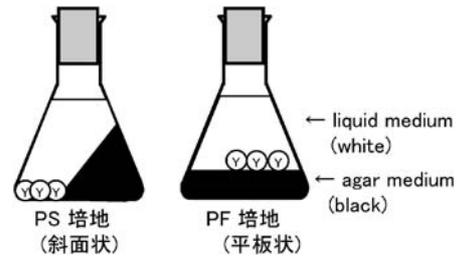
1) 固液共存培地の組成と固体部調製

濃厚な寒天部と相対的に希薄な糖液がフラスコ内に共存するように種々の予備実験を繰り返し設定した。培地組成を表 1 に示した。本論文ではこれ以降、この固液共存培地を並行複発酵モデルとして Parallel の頭文字 P を採って、

* 東京農業大学応用生物科学部醸造科学科

表 1 P 培地の固体部及び液体部組成

	Glucose (g)	Yeast ex (g)	Poly peptone (g)	Agar (g)	Water (ml)
固体部	61	3.6	3.6	1.8	90
液体部	18	-	-	-	180
合計	79	3.6	3.6	1.8	270

図 1 固液共存培地の固体部の形状別外観図
Y; 発酵中の酵母沈殿の存在部位

P 系培地とし、下記に説明する固体部の形状表記と組み合わせで PS または PF 培地と呼称する。

固体部調製は、固体部用の各試薬を 90 ml の水に溶解した。この時、加熱による着色を回避するため、グルコースと寒天、酵母エキスとポリペプトンは適宜分割してオートクレーブ滅菌した後に混合した。これをクリンベンチ内で混合して下記の形状に成型固化後、一晚室温で放置し、内壁面及び寒天表面の結露水を自然蒸発させた。

a) PS 培地 (Parallel- Slant) の調製

前報³⁾と同様に寒天部を斜面状とした。すなわち培養中に寒天との直接接触を避け、ガラス器底へ酵母を沈殿させるために器底を一部露出し、後に液体部を注入した時に固体部の斜面上端が液面上へ突き出ないようにするため、300 ml 容三角フラスコ内の 250 ml の目盛が上端となるように斜めに固化させた。

b) PF 培地 (Parallel- Flat) の調製

寒天部を流入後、そのまま静置し、300 ml 容三角フラスコ内底部全面に平板高層状に固化させた。

2) 固液共存培地の液体部調製

滴定酸度が 1 ml となるように乳酸を添加した 10% グルコース溶液 180 ml を調製し、滅菌した。これを先に固体部を調製した三角フラスコ中の各固体培地上に注入した。換算上の固液界面の接触面積は、PS 培地、PF 培地、共に約 45 cm² である。

フラスコの各培地の外観模式図を図 1 に示した。

3) 供試酵母及び前培養、本培養

清酒酵母きょうかい 7 号 (K-7) を使用した。前培養は、GYP 培地 (グルコース 2%, 酵母エキス 0.5%, ポリペプトン 0.5%) を用いて、30°C で 48 hr 培養して用いた。本培養時では、前培養培地を懸濁後、そのまま用いた。接種量は本培養培地液体部に対し 5% 量、初発菌数 10⁶ cells/ml とした。発酵温度は、10°C 及び 15°C の 2 条件とした。

4) 小仕込み方法

精米歩合 70% の一般米を用い、総米 1 kg、酒母省略の 3 段仕込みを行った。製麹は市販種麹を混用し、麹室内で常法により製麹し、最高品温を 42°C とした。仕込み配合は、麹歩合を 22%、汲水歩合を 130% とした。仕込み温度は、添を 12°C、踊を 11°C、仲を 8°C、留品温 6°C とし、仕込庫の温度操作にならって徐々に昇温させ、8 日目に最高品温 15°C と設定した。最高品温到達後は、品温を維持し、3000 rpm, 15 min の遠心分離にて上槽した。また、醪中の酵母の仕込み糧以外は全く糧入れを行わないこととした。これは下記のように醪中の酵母をその存在部位別に回収する上で、過度な糧入れによる物理的の攪拌がもたらす米粒溶解効

果を回避し、条件を統一するためである。

5) 清酒醪中の米粒付着酵母と液部浮遊酵母の分画
発酵終了後の上槽のタイミングで液部浮遊酵母と米粒付着酵母を分画採取した。

醪からの酵母分画は、まず醪の一部をひしゃくで静かに汲み出し、これを格子角 1 mm のステンレス金網 (市販の茶漉し) による濾過にて固液分離した。その混濁液部であるメッシュ通過画分から 3000 rpm, 15 min 処理により液部に浮遊して存在する酵母を得た。同様に金網上の残渣固体部からは、常法に準じ、原醪量まで加水し充分懸濁後、500~1,000 rpm の低速の遠心分離を繰り返す⁸⁾ ことにより米粒表層に存在する固体部由来の酵母を得た。

(2) 分析方法

1) 分析試料調製

醪を 5000 rpm, 20 min, 遠心分離後、No. 2 濾紙 (ADVANTEC 社製) 濾過しその濾液を分析試料とした (以下、分析濾液)。

2) 一般分析

ボーメ、酸度、アミノ酸度、直糖、アルコール、酵母数は、国税庁所定分析法⁹⁾ に従い行った。酵母数測定時には同時にメチレンブルー染色を行い、染色率を算出した。合わせて発酵中の重量減少量測定をフラスコごとに行い、その累積重量減少量を算出し炭酸ガス減量とみなして、アルコール発酵の目安とした。分析試料採取による欠減は、適宜計算補正した。

3) アミノ酸組成分析

分析試料を適宜アミノ酸分析用塩酸で希釈し、ディスクフィルターで再度濾過して用い、アミノ酸自動分析計 (日立 L-8500 型) により行った。分析条件はカラム温度 57°C、反応槽 130°C とした。

4) SAM 量の測定

後藤ら¹⁰⁾ の方法に従った。HPLC (SC8010, TOSOH 社製) にて GL-Pack Nucleosil 100SA カラムを用い、SAM iodide salt を標準試料として OD260 を測定した。

実験結果及び考察

1) 培地形状及び発酵温度と発酵経過

培養中の一般分析経過のうち、10°C 及び 15°C における重量減少による発酵過程を図 2 に示した。本培地では表 1 に示した通り、1 フラスコ当たり 79 g のグルコースを含む

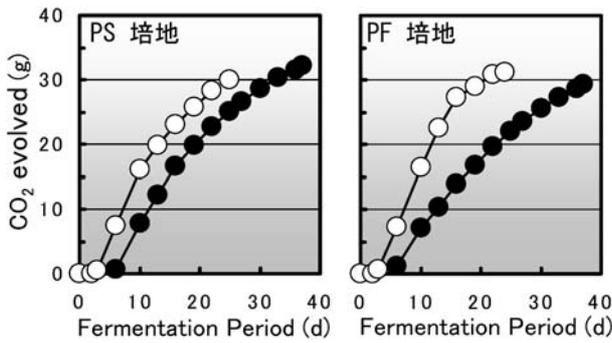


図 2 各培養における発酵過程
Symbols ; ● ; 10°C, ○ ; 15°C

ことから、炭酸ガス発生による重量減少は最大でもその半量以下と推測される。本設定でも 30 g 台到達を目標として培養終了の目安としたが、経過は順調であった。培養初期の糖濃度が両培地、両温度とも 10% 台後半と醪に比べてやや高く推移したが、その後、順調にグルコースが消費された。酒母中の糖濃度が 20% を超えることや、酒母由来の糖と段仕込中の高糖濃度環境を本培地は特に考慮していない。アルコールは糖の減少に従って生成され、培養終了時でいずれも 15% 程度であった。この時の固体部のアルコール濃度は液部とほぼ同じ濃度であった。このように前報⁴⁾同様、醪と同様の傾向を示し、PS 及び PF の培地形状による差異は、数日程度であり大差なかった。また、アミノ酸度も徐々に増加し、最大 4 ml 台と本モデル設定として適切な経時変化であった。

また、発酵中、酵母は PS 培地においては、そのほとんどが、寒天部の端のフラスコ器底ガラスが露出している部分に直接沈殿していることが観察されるのに対し、PF 培地では、ガラス器底部に形成した寒天培地の上へ直接沈殿していた。このように寒天固体部の形状が異なることにより、酵母沈殿の形成は大きく異なった。

2) 各培養におけるアミノ酸の動向

培養終了時の培地液部の遊離アミノ酸組成構成比と総量を表 2 に示した。これは、秋田らの報告¹¹⁾を参考に米タンパクを構成するアミノ酸組成条件で培養した際に、清酒酵母が取り込みやすいとされているアミノ酸¹²⁾が表中の上位に来るように並べ替えて示したものである。

メチオニン構成比は一般に清酒醪中では 1~数% とされており¹³⁾、既報の通り PS 培地では 10°C のメチオニン構成比が 2.5% で、15°C の 3.0% に比べて低かった⁴⁾。これと比較し PF 培地では、10°C と 15°C のいずれでも 2% 台と構成比が共に低い傾向であった。この結果については、後述のメチオニン濃度の経時変化とともに詳説するが、培地の固体部形状が異なることにより、これまで認められた温度差による特徴的な動向がさらに 15°C でも現れることが示された。

そこで、PF 培地における経時変化として総アミノ酸の変化を図 3 に、メチオニンの変化を図 4 に示した。いずれの図中においても比較のために、既報⁴⁾の PS 培地の結果を同時に示した。培地液部のアミノ酸総量は、全条件で発

表 2 各培養における発酵終了時の培地液部のアミノ酸組成

培地形状 培養温度	PS 10°C	PF 10°C	PS 15°C	PF 15°C
Lys	15.2	14.9	15.0	15.3
Ser	2.6	2.9	2.6	2.2
Thr	3.2	3.6	3.5	3.5
Met	2.5	2.8	3.0	2.1
His	1.6	1.5	1.6	1.6
Leu	16.9	16.6	16.0	16.2
Cys	0.0	0.0	0.0	0.0
Asp	2.9	2.9	2.8	2.6
Ile	6.0	5.9	5.9	6.0
Glu	7.2	7.1	7.0	7.2
Phe	10.6	11.2	11.3	11.7
Arg	8.0	8.0	7.7	7.5
Val	8.1	7.9	8.2	8.1
Tyr	4.0	3.8	3.9	4.3
Ala	7.4	7.1	7.3	7.4
Gly	1.7	1.7	1.8	1.9
Pro	2.2	2.1	2.4	2.6
TOTAL (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
TOTAL (mg/l)	4489	4549	4326	4056

酵期間中、徐々に増加した。組成別でも大半は同様に上昇したが、低温醪で特徴的な動向を示したメチオニンは、10°C では既報の通り低濃度で一定推移であったが、さらに 15°C でも同様に特徴的な一定推移の傾向を示した。このように固体培地表面へ沈殿している酵母では、最高品温 10°C の低温醪のみで認められた特徴的な動向⁴⁾が 15°C でも再現されることが明らかとなった。両培地では、アミノ酸は、酵母エキスとポリペプトン由来である。このためアミノ酸組成は、米由来と異なりメチオニン構成比がやや高いため、PF 培地で発酵温度による差が出にくかった要因の一つとも考えられたが、これについては、次項の SAM 蓄積と固形物付着と合わせて結論づけることとする。

3) 各培養における SAM 動向

次に菌体内 SAM 量の経時変化を図 5 に示した。SAM は 10°C では既報同様、経時的に増加した。特に PF 培地の 10°C 条件では、定常期到達後の発酵末期に顕著な蓄積が見られ、PS 培地 10°C 条件との比較でも終了時で 2 倍近い差であった。15°C では培養末期でやや菌体内濃度が低下したが、これは菌体からの溶出または漏出が要因と考えられた。

そこで培養終了時の培地液部の SAM 及びフラスコ当たりの生産量を表 3 に示した。10°C の PS 培地では既報⁴⁾の通り 19.6 mg/10¹⁰ cells であったのに対し、PF 培地条件では 36.9 mg/10¹⁰ cells と高かった。また、15°C の PS 培地では 7.0 mg であったのに対し、PF 培地では、11.0 mg であり、同温度で比較しても固体部へ直接接触する PF 培地条件では、PS 培地に比べ SAM が菌体内に高蓄積された。さらに先のメチオニンの低濃度推移とも考え合わせると、低温かつ固体部に直接接触する両条件を同時に満たした PF 培地 10°C 発酵の条件では、さらに SAM が高蓄積された。一般に低温醪では溶けが悪いことが知られ、粕歩合も高く、醪末期でも固形物が相対的に多くなる。また、酵母は

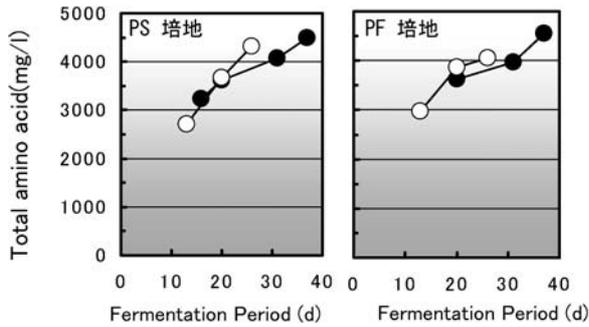


図3 各培養における培地液部の総アミノ酸の経時変化
Symbols ; ● ; 10°C, ○ ; 15°C

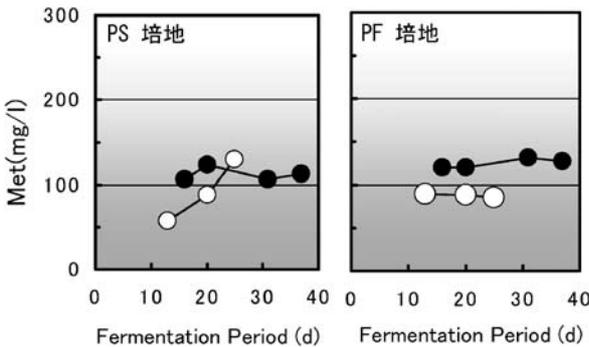


図4 各培養における培地液部のメチオニンの経時変化
Symbols ; ● ; 10°C, ○ ; 15°C

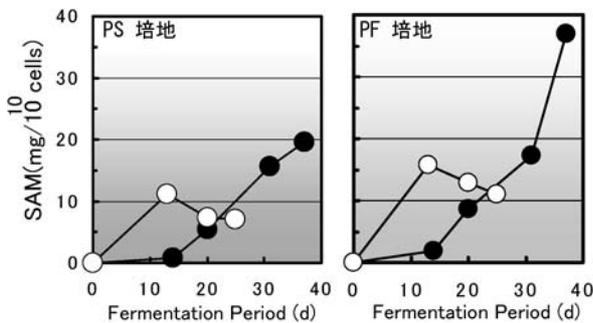


図5 各培養における酵母菌体内SAM濃度の経時変化
Symbols ; ● ; 10°C, ○ ; 15°C

固体部（米粒）表層にも存在し^{6,7)}、この酵母が結果として相対的に増えることが示されている。PF培地では培地形状による酵母の存在部位の差異が菌体内成分に影響を及ぼしていることが明らかとなった。

4) 米粒附着酵母及び液部浮遊酵母の菌体内SAM
米粒存在酵母及び金属メッシュを通過した液部浮遊酵母の各菌体内のSAM濃度を表4に示した。

米粒画分中の菌体内SAM量は約12 mg/10¹⁰ cellsと最高品温が15°Cの醪であるため全体的にやや低いものの、液部浮遊酵母であるメッシュ通過画分中の菌体に対し約1.3倍であった。また、メッシュ濾過により得られた醪濾液のSAM濃度は27.2 mg/lであり、同様に15°Cでの発酵で

表3 各培養における培地液部及び酵母菌体内のSAM濃度

	Intracellular (mg/10 ¹⁰ cells)	Medium (mg/l)	Total in flask (mg)
PS 10°C	19.6	16.9	91.9
PS 15°C	7.0	28.2	55.3
PF 10°C	36.9	15.1	94.7
PF 15°C	11.0	29.1	55.9

表4 清酒醪中の米粒附着酵母と液部存在酵母の菌体内及び醪濾液のSAM濃度

各画分	Intracellular (mg/10 ¹⁰ cells)	Filtrate (mg/l)
米粒画分	11.9	—
メッシュ通過画分	9.1	27.2

あったことを考えると、醪期間中での極端な漏出があったとは考えられずこれも妥当であった。

この菌体内SAMの結果と、前述のPF培地中の酵母菌体内SAM量がPS培地に比べて高かったこと、かつPF培地では15°Cでも同傾向が見られることから、低温醪中の菌体内SAM高蓄積現象には、既報^{3,4)}の低温醪製成酒のメチオニンの構成比低下と、醪中のメチオニン低濃度推移から示唆される選択的な取込に加え、固体部に附着する酵母が相対的に増加することが、更なる一要因として明らかとなった。SAMは、醪中で酵母菌体から漏出して製成酒の酒質に影響を与える^{14,15)}とされている。その蓄積が、固体部附着酵母と液部浮遊酵母とで異なり、その上でこれらの各酵母菌体からのSAM漏出についても、本培地形状を工夫して用いることで、個別に検討することができた。今後、SAMの漏出と酒質について詳細な検討が可能と思われる。

総 括

低温醪における含硫物の特徴的な動向を指標として、既に確立したモデル培地に各条件を個別に検討するための改良を施し、醪中で酵母が存在する各画分における菌体内SAMの蓄積について、要因解析を行った。

濃厚な寒天部と相対的に希薄な糖液からなる固液共存培地を用い、その濃度差を利用した拡散的供給による非酵素依存的な固液共存培地の固体部形状を斜面状から平板状に改良することによって、酵母が固液界面上に存在する条件を設定した。その結果、低温かつ菌体が濃厚寒天部直上へ沈殿しつつ発酵する条件では、フラスコ器底ガラス部位へ沈殿する条件よりも菌体内SAM蓄積が著量であった。

一方、1パッチ培養当たりSAM生成総量は同温度条件では大差ないこともあり、培地形状即ち酵母の存在環境と菌体内保持との関連が考えられた。従来、単発酵で培地へガラスビーズや活性炭やシリカゲル、沸騰石などの無機体を添加し酵母の分散状態を物理的接触として検討した例は幾つかある¹⁶⁾が、糖等の供給源である有機固形物の存在下で培養した酵母の菌体内成分に関して、温度差を関連づけ

て言及することができた。

固体部付着酵母では高蓄積かつ菌体内保持率も高いことから、低温清酒醪での米粒溶解低下に起因する付着酵母の相対的増加が、SAM 高蓄積の更なる一要因であることが考えられた。

謝辞：本研究を行うにあたり、実験に尽力頂いた本学発酵生産科学研究室（旧酒類生産学研究室）卒業生、中村菜通子、磯崎邦宏の両氏に感謝致します。合わせて終始御懇篤なる御指導を受け賜りました角田潔和、小泉武夫両先生に心より深謝致します。

参考文献

- 1) 清酒製造技術 日本醸造協会, 198-201 (1987)
- 2) 進藤 斉, 角田潔和, 吉沢 淑, 小泉武夫, (1994), 清酒醪の発酵温度とアミノ酸動向, 日本醸造学会誌, 第 89 巻, 1 号, p. 65-71
- 3) 進藤 斉, 土井弥市, 麻布暁史, 坂野和章, 角田潔和, 吉沢 淑, 小泉武夫, (1998), 清酒醪の発酵温度と酵母菌体への含硫物蓄積, 日本醸造学会誌, 第 93 巻, 5 号, p. 389-395
- 4) 進藤 斉, 矢部修平, 角田潔和, 小泉武夫, (2006), 低温醪の及び並行複発酵培地における清酒酵母の含硫物蓄積とメチオニンアデノシルトランスフェラーゼ活性, 日本醸造学会誌, 第 101 巻, 1 号, p. 61-68
- 5) 進藤 斉, 角田潔和, 小泉武夫, (2006), 清酒醪における発酵温度と精米歩合が各種酵母の含硫物動向に与える影響, 日本醸造学会誌, 第 101 巻, 10 号, p. 776-778
- 6) 吉井美華, 神田涼子, 岩田 博, 荒巻 功, (2000), 醪中に

おける米粒の観察, 平成 12 年度日本醸造学会大会講演要旨集, p. 8, No. 15

- 7) 吉井美華, (2000), 電子顕微鏡で見えてくるもの「酒造工程のミクロな世界」, 第 24 回酒米懇談会講演要旨集, 酒米研究会, p. 1-7
- 8) 吉澤 淑, 高橋康次郎, 北本勝ひこ, 永井英雄, (1985), 清酒醸造における無機塩の影響 (2), 清酒のアミノ酸量に及ぼす酵母の前培養の影響, 日本醸造協会誌, 第 80 巻, 9 号, p. 649-653
- 9) 第四回改訂国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会 (1993)
- 10) 後藤邦康, 土肥和夫, (1992), 清酒醪中の S-アデノシルメチオニンの定量と変化, 日本醸造協会誌, 第 87 巻, 3 号, p. 230-234
- 11) 秋田 修, 大場俊輝, 中村欽一, (1986), 糖化後発酵法における発酵条件の検討 (1), 日本醸造協会誌, 第 81 巻, 6 号, p. 402-408
- 12) 岩野君夫, 飯塚尚彦, 斉藤和夫, 布川弥太郎, (1981), 清酒醸造におけるアミノ酸の生成 (2), 発酵によるアミノ酸の増減, 日本醸造協会誌, 第 76 巻, 4 号, p. 272-275
- 13) 醸造物の成分, 日本醸造協会 (1999)
- 14) 蓼沼 誠, 高橋康次郎, 佐藤 信, (1975), 清酒の熟成による香味の変化に関する研究 (3), S-アデノシルメチオニン, 日本醸造協会誌, 第 70 巻, 8 号, p. 581-584
- 15) 蓼沼 誠, 高橋康次郎, 林 積徳, 佐藤 信, (1975), 清酒の熟成による香味の変化に関する研究 (4), S-アデノシルメチオニンと 5-メチルチオアデノシン, 日本醸造協会誌, 第 70 巻, 8 号, p. 585-587
- 16) 竹崎道代, 松浦一雄, 広常正人, 浜地正昭, (1993), 酵母の増殖に与える固形剤の添加効果, 日本醸造協会誌, 第 88 巻, 4 号, p. 319-325

Effect of the Characteristics of Medium on the Content of Intracellular S-Adenosyl-Methionine of Yeast

By

Hitoshi SHINDO*, Kojiro TAKAHASHI* and Kazuo SATO*

(Received May 19, 2011/Accepted September 13, 2011)

Summary : The accumulation of SAM in yeast cells was examined. A modified model was developed to compare the yeast cells attached on the solid of the medium which was assumed cells in the rice fraction in *sake* mash. As reported previously, the yeast cells precipitated to the glass on the bottom of the flask in the medium. On the contrary, in this study the yeast precipitated on the surface of the flat solid medium in the bottom of the flask. The yeast cells on the flat solid medium accumulated high content of SAM at 10°C, whereas the methionine concentration in liquid medium was kept at low concentration. Furthermore, this characteristic tendency was also shown at 15°C.

Next, SAM was highly accumulated in the yeast cells at the solid rice fraction of *sake* mash : this tendency was the same as that of the model medium.

These results suggests that the high accumulation of intracellular SAM in the yeast cells was characterized as caused by the *sake* mash being at low temperature.

Key words : *sake* mash fermentation, yeast, sulfur compounds, S-Adenosyl- methionine

* Department of Fermentation Science, Faculty of Applied bioscience, Tokyo University of Agriculture