

清酒酵母の増殖における選択的アミノ酸取込みに及ぼす醸造要因

岩野君夫・伊藤俊彦・幡宮顕仁・中村拓郎・渡辺誠衛・中沢伸重

日本醸造協会誌（醸協）第99巻第11号801～808頁別刷（2004）

日 本 醸 造 学 会

清酒酵母の増殖における選択的アミノ酸取込みに及ぼす醸造要因

岩野君夫・伊藤俊彦・幡宮顕仁・中村拓郎・渡辺誠衛*・中沢伸重

(秋田県立大学, *秋田県総合食品研究所)

平成 15 年 12 月 24 日受理

Influence of Brewing Factor on the Selective Uptake of Amino acid in the Growth of Japanese Sake Yeast

Kimio IWANO, Toshihiko ITO, Akihito HATAMIYA, Takuro NAKAMURA,
Seiei WATANABE and Nobushige NAKAZAWA

(Akita Prefectural University, Nakano Shimo-Shinryo, Akita 010-0195, *Akita Research Institute of
Food & Brewing, Araya machi, Akita 010-1623)

Parallel and low-temperature fermentation, which are characteristic in Japanese sake brewing, were found to be involved in the selective uptake of amino acid in the growth of yeast. A supply of continuous glucose by parallel fermentation plays a role in maintaining low concentrations of glucose and increasing the uptake of amino acid during the growth of yeast. Low-temperature fermentation increases the uptake of amino acid. A shaking cultivation makes the amounts of yeast cells increase more than with standing cultivation, and also causes about a 1.6-fold increase in the uptake of amino acid. Especially, the uptake of arginine increases 4 fold.

Key words : 清酒酵母, アミノ酸資化, 醸造要因

緒 言

筆者らは、既に市販酒のアミノ酸含有量で呈味に係るアミノ酸を官能評価法で探索し、アラニン、アルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸の4つのアミノ酸が関わっていることを明らかにし¹⁾、更に麴抽出液を培地として清酒酵母を培養しアミノ酸取込みを調べた結果、アラニンは酵母が生成すること、アルギニンとアスパラギン酸は酵母が好んで多量に消費するアミノ酸であり、グルタミン酸の取込み量は少ないこと、アルギニンとグルタミン酸は麴からの持込み量が多い場合は酵母の消費量を上回ることなど²⁾を報告した。今回は清酒の呈味性に関係するアミノ酸について酵母増殖による取込み量に及ぼす幾つかの醸造要因について調べたところ、清酒醸造の特徴である低温発酵や並行複醸酵がアミノ酸取り込みに大きく関わって

ることを知ったので報告する。

実験方法

1. アミノ酸補填麴抽出液培地

前報²⁾と同じ。

2. 酵母の培養

酵母は協会酵母 K-7, K-901, 秋田流花酵母 AK-1, 当講座保存の清酒酵母 5 菌株の計 8 菌株を使用した。酵母の前培養は前報²⁾と同様に麴エキス培地を用いて 30°C, 2 日間の培養を行った。静置培養は前報と同じであるが、振盪培養は往復振盪培養機(ヤマト科学 BW 200)を使用し 120 rpm の振盪で培養した。

3. 培養温度の影響

培養温度の影響は 15°C または 30°C の 2 段階で調べた。

4. グルコース濃度の影響

初期グルコース濃度の影響は3.8, 10, 15, 20%の4段階で調べた。

5. 初発酵母数の影響

初発酵母数の影響は 2×10^5 /ml と 2×10^7 /ml の2段階で調べた。

6. 培養 pH の影響

麴からのアミノ酸の抽出は麴に4倍量の蒸留水を加えて5°C以下で2時間抽出し、グルコースとアミノ酸をアミノ酸補填麴抽出液培地と同様に補填して80°Cまで加温して酵素を失活させた。pH区分はpH 3, 4, 5, 6, 7の5段階とし、アミノ酸補填麴抽出液培地10mlに各pHの0.1M McIlvaine氏緩衝液をそれぞれ1ml加え1N NaOH又は1N HClでpHの微調整を行った。次に0.45 μ のミリポアで無菌ろ過して培地とした。

7. 成分分析

前報²⁾と同じ。アミノ酸は20種類のアミノ酸に γ -アミノ酪酸を加えた21種類について調べた。

実験結果

1. アミノ酸取込みに及ぼす培養温度の影響

アミノ酸補填麴抽出液培地を用いて、協会酵母K-901とAK-1の2菌株について、15°C, 5日間と30°C, 3日間の静置培養を行い、酵母の増殖におけるアミノ酸取込みに及ぼす培養温度の影響を調べた。Table 1は培養後の酵母数、グルコース消費量、アルコール生成量を示した。酵母数はほぼ同一とみさせるが、30°C培養の方がグルコース消費量、アルコール生成量も多かった。Table-2は前報²⁾のA, B, Cのグループ分けの順にアミノ酸資化量をに示したものである。全体のアミノ酸資化量は菌株によって程度の差異があるが15°Cの方が資化量が多かった。特に協会酵

母K-901はその差が大きい。培養温度の違いによる資化量の差が大きかったアミノ酸は、グルタミン、スレオニン、アスパラギン、セリン、システインなどであり、特にグルタミンは15°Cの方が30°Cよりも約2倍も資化量が多かった。その他のアミノ酸は両菌株で違う傾向が認められ、今後多くの菌株を用いてアミノ酸資化量の違いを調べたいと考えている。清酒の呈味性に関係するアミノ酸についてみると、アスパラギン酸は差が認められず、グルタミン酸が若干低温の方が資化量が多いが、アルギニン、アラニンは菌株により異なった。

2. 静置培養と振盪培養のアミノ酸取込みの差異

アミノ酸補填麴抽出液培地を用いて、酵母増殖におけるアミノ酸取込みに対する静置培養と振盪培養の違いを調べた。酵母は8菌株を用い、15°C, 5日間培養を行った。Table-3は培養後の酵母数、グルコース消費量、アルコール生成量の平均値、最大値、最小値、標準偏差を示したものである。表から明らかなように酵母数は振盪培養が静置培養の2.1倍であった。グルコース消費量、アルコール生成量は両者の間に大きな差異は認められなかった。Table-4はアミノ酸の資化量を示したものであるが、全体のアミノ酸資化量は振盪培養の方が1.6倍も多かった。清酒の呈味性に関係するアミノ酸についてみると、アスパラギン酸、アルギニン、アラニンは振盪培養の方が資化量が多く、特にアルギニンは4倍も多かった。グルタミン酸は両者の間に違いは認められなかった。

3. 初期グルコース濃度の影響

アミノ酸取込みに及ぼす初期グルコース濃度の影響について協会酵母K-901とAK-1の2菌株を用いて調べた。アミノ酸補填麴抽出液培地のグルコースを無添加の3.8%, グルコースを補填した10%, 15%, 20%の4段階とし、15°Cで5日間静置培養を行った。

Table 1 Influence of temperature on the growth of yeast cells.

Yeast strain	Cultivation temperature	Number of yeast cells ($\times 10^8$ /ml)	Glucose consumption (%)	Ethanol production (%)
K-901	30°C	1.3	8.5	5.1
	15°C	0.9	6.4	3.8
AK-1	30°C	1.0	8.7	5.4
	15°C	1.0	5.9	3.7

Initial number of yeast cells ; 2×10^5 /ml

Table 4 Comparison between standing culture and shaking culture on the uptake of amino acid.

Group	Amino acid	Standing culture				Shaking culture			
		Average	Maximum	Minimum	Standard deviation	Average	Maximum	Minimum	Standard deviation
A	Glutamine	78	85	68	5	89	108	57	20
	Lysine	82	89	65	8	128	158	112	14
	Threonine	68	71	65	2	87	89	86	1
	Methionine	90	107	78	9	140	141	136	2
	Aspartic acid	80	87	69	5	106	110	104	2
	Arginine	52	65	36	11	214	236	149	30
	Leucine	56	60	53	3	73	76	70	2
	Asparagine	66	71	60	3	86	89	84	2
B	Serine	26	28	22	2	32	35	30	2
	Tryptophan	30	38	21	5	81	93	69	8
	Phenylalanine	26	30	23	2	36	39	31	3
	Glutamic acid	39	51	25	8	41	61	19	15
	Isoleucine	20	24	17	2	28	29	25	1
	Histidine	29	39	21	7	57	63	53	4
	Cysteine	7	11	10	7	7	13	-14	9
	Valine	18	23	15	3	25	28	21	3
C	Tyrosine	24	33	19	5	38	42	34	3
	γ -Amino n-butyric acid	7	9	4	2	20	21	18	1
	Alanine	8	22	-5	8	13	25	-4	9
	Proline	-1	1	-3	1	-8	1	-18	6
	Glycine	-1	3	-4	3	2	5	-1	2
	Total (ppm)	805	938	679	83	1296	1382	1232	44

 Group division is the same as that of the previous report²⁾.

Table 5 Influence of initial glucose concentration on yeast growth.

Yeast strain	Initial glucose (%)	Number of yeast cells ($\times 10^7$ /ml)	Glucose consumption (%)	Alcohol production (%)
K-901	3.8	12.6	3.8	2.3
	10	9.4	4.1	2.6
	15	5.4	4.8	2.6
	20	5.6	4.3	2.2
AK-1	3.8	12.6	3.1	1.9
	10	9.6	4.4	2.4
	15	7.0	3.8	2.1
	20	3.2	4.0	2.2

 15°C, 5 days standing culture, Initial yeast cell number 1.7×10^5 /ml

Table 2 Influence of temperature on uptake of amino acid by yeast cells.

Group	Amino acid	K-901		AK-1	
		15°C	30°C	15°C	30°C
A	Glutamine	127	62	123	81
	Lysine	84	78	76	88
	Threonine	67	53	65	61
	Methionine	81	68	71	83
	Aspartic acid	66	63	64	64
	Arginine	57	41	43	47
	Leucine	43	34	42	39
	Asparagine	62	44	60	55
B	Serine	19	13	18	16
	Tryptophan	35	36	32	46
	Phenylalanine	20	14	19	18
	Glutamic acid	24	19	24	20
	Isoleucine	16	15	15	16
	Histidine	24	24	21	29
	Cysteine	12	23	11	21
	Valine	15	11	14	15
C	Tyrosine	20	13	18	19
	γ Amino n-butyric acid	1	-4	2	-1
	Alanine	4	-11	4	0
	Proline	1	1	0	-5
	Glycine	-2	-5	-1	-6
	Total (ppm)	775	589	719	707

 Group division is the same as that of the previous report²⁾.

Table 3 Comparison between standing culture and shaking culture on the growth of yeast cells.

	Standing culture				Shaking culture			
	Average	Maximum	Minimum	Standard deviation	Average	Maximum	Minimum	Standard deviation
Number of yeast cells ($\times 10^7$ /ml)	6.5	7.8	4.6	1.0	13.5	15.8	11.0	1.8
Glucose consumption (%)	4.3	5.8	3.5	0.7	4.2	5.3	3.4	0.7
Alcohol production (%)	2.7	3.7	2.2	0.5	2.8	3.5	2.3	0.4

Growth temperature 15°C, Growth period ; 5 days, Yeast 8 strain

 Initial number of yeast cells 2×10^5 /ml

Table 6 Influence of initial glucose concentration on the uptake of amino acid.

Group	Amino acid	initial glucose (%)		K-901				AK-1			
		3.8%	10%	15%	20%	3.8%	10%	15%	20%		
A	Glutamine	122	113	103	91	122	117	100	89		
	Lysine	83	74	64	59	86	74	60	54		
	Threonine	65	60	56	52	64	61	55	51		
	Methionine	74	74	68	61	74	72	60	56		
	Aspartic acid	64	59	54	47	64	61	52	45		
	Arginine	58	52	40	40	60	47	34	31		
	Leucine	40	40	38	36	40	40	35	34		
	Asparagine	47	44	40	34	48	45	39	33		
B	Serine	20	19	17	15	21	19	16	14		
	Tryptophan	21	29	26	26	25	28	22	28		
	Phenylalanine	18	19	17	16	18	19	15	15		
	Glutamic acid	20	19	12	9	24	21	14	6		
	Isoleucine	15	15	14	12	15	15	13	12		
	Histidine	28	24	17	18	28	24	16	16		
	Cysteine	36	32	25	21	34	31	23	22		
	Valine	12	14	12	11	13	14	11	10		
C	Tyrosine	14	17	14	12	17	17	12	11		
	γ -Amino n-butyric acid	1	3	0	1	3	2	1	1		
	Alanine	1	5	2	-2	8	7	0	-3		
	Proline	-1	0	-1	-4	-1	-1	1	-1		
	Glycine	0	-1	-2	-1	1	1	-1	-1		
	Total (ppm)	739	710	610	554	764	711	575	523		

Group division is the same as that of the previous report²⁾. Other legends are the same as shown in Table 5.

Table 7 Influence of initial number of yeast cells on growth of sake yeast cells.

	Initial number of yeast	
	2×10^5 /ml	2×10^7 /ml
Number of yeast cells ($\times 10^7$ /ml)	6.5	9.5
Glucose consumption (%)	4.3	4.2
Alcohol production (%)	2.7	2.8

K-901, 15°C, 5 days culture

培養後のグルコース濃度のデータは省略したが、初期濃度が3.8%の区分も僅かに残存グルコースが認められた。Table-5は培養後の酵母数、グルコース消費量、アルコール生成量を示したものである。表から明らかなように、酵母数は初期グルコース濃度が低い区分は

ど酵母数が多く、濃度が高まるに従って酵母数が低くなった。アミノ酸資化量はTable-6に示したが、全体のアミノ酸資化量は酵母の増殖量と比例して初期グルコース濃度が低いほどアミノ酸資化量が多かった。清酒の呈味に関係するアミノ酸についてみると、アラ

Table 8 Influence of initial number of yeast cells on uptake of amino acid

Group	Amino acid	Initial number of yeast	
		2×10^5 /ml	2×10^7 /ml
A	Glutamine	102	124
	Lysine	89	76
	Threonine	68	50
	Methionine	94	110
	Aspartic acid	80	90
	Arginine	60	47
	Leucine	57	37
	Asparagine	67	63
B	Serine	26	10
	Tryptophan	33	23
	Phenylalanine	27	20
	Glutamic acid	39	19
	Isoleucine	21	13
	Histidine	32	22
	Cysteine	11	33
	Valine	19	10
C	Tyrosine	25	16
	γ -Amino n-butyric acid	8	1
	Alanine	10	-5
	Proline	0	2
	Glycine	1	-3
Total (ppm)		867	752

Group division is the same as that of the previous report²⁾. Other legends are the same as shown in Table 7.

ニン、アルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸の4つのアミノ酸は、初期グルコース濃度が15%以上になると急激に資化量が低下する傾向が認められた。

4. 初発酵母数の影響

酵母増殖におけるアミノ酸取込みに対する初発酵母数の影響を 2×10^5 /mlと 2×10^7 /mlの2区分で調べた。酵母は協会K-901を使用した。酵母の前培養は麴エキスで30°C 2日間培養し遠心分離(5,000 rpm, 15 min)で集菌して殺菌水で懸濁して所定の初発酵母数になるようにアミノ酸補填抽出液培地に添加した。15°C 5日間培養後の培養後の酵母数、グルコース消費量、アルコール生成量をTable-7に、アミノ酸資化量をTable-8に示した。培養後の酵母数は若干の違

いがあるがグルコース消費量、アルコール生成量は両者に違いは認められなかった。全アミノ酸資化量は初発酵母数が大幅に違うにも関わらず僅かに約10%の差異であった。清酒の早味性に関係するアミノ酸についてみると、初発酵母数が少ない方がアルギニン、グルタミン酸、アラニンの取込みが多くアスパラギン酸の取込み量は若干少なかった。

5. 初発 pH の影響

協会酵母K-901を用いて清酒酵母の増殖におけるアミノ酸の取込み量に対する培地の初発PHの影響を調べた。アミノ酸補填抽出液培地を用いて15°C、5日間の培養を行った。Table-9に培養後の酵母数、グルコース消費量、アルコール生成量を示したが、酵

Table 9 Influence of initial pH on growth of sake yeast

	Initial pH of medium				
	3	4	5	6	7
Number of yeast cells ($\times 10^7$ /ml)	2.9	3.3	3.6	3.7	2.3
Glucose consumption (%)	2.8	4.1	3.7	3.2	2.9
Alcohol production (%)	1.8	2.1	2.3	2.3	1.8

K-901, 15°C, 5 days standing culture, Initial number of yeast cells 2×10^5 /ml

Table 10 Influence of initial pH on the uptake of amino acid during growth of sake yeast.

Group	Amino acid	Initial pH of medium				
		pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
A	Glutamine	65	74	87	76	71
	Lysine	46	54	71	59	56
	Threonine	52	48	56	51	52
	Methionine	80	76	87	78	80
	Aspartic acid	41	39	45	56	55
	Arginine	49	89	120	90	77
	Leucine	9	10	12	9	11
	Asparagine	37	35	38	13	1
B	Serine	5	5	7	6	5
	Tryptophan	32	35	43	33	24
	Phenylalanine	9	8	9	9	9
	Glutamic acid	10	12	22	26	30
	Isoleucine	8	8	9	8	9
	Histidine	14	9	23	18	19
	Cysteine	13	8	12	3	-13
	Valine	6	8	9	7	7
C	Tyrosine	14	17	21	17	15
	γ -Amino n-butyric acid	11	18	21	14	12
	Alanine	10	14	16	14	12
	Proline	0	-11	-8	-4	-3
	Glycine	0	2	3	2	1
	Total (ppm)	510	557	702	585	529

Group division is the same as that of the previous report²⁾. Other legends are the same as shown in Table 9.

母の増殖は初発 pH が pH 5.0, 6.0 の時に最大で、pH 4.0, 3.0 で若干低下し、pH 7.0 では大きく低下した。アミノ酸の資化量は Table-10 に示した。清酒の呈味性に関係するアミノ酸についてみると、アルギニン初発 pH 5.0 の区分が際立って取込み量が多く、

アスパラギン酸とグルタミン酸は初発 pH が高くなるに従って取込み量が多くなった。アラニンは今回は取込みを示したが初発 pH の違いの影響は認められなかった。

考 察

培養温度の影響は、30°Cと15°Cの比較をした結果であるが、低温の方がアミノ酸資化量が多いという結果が得られ、清酒醸造の特徴の一つである低温発酵がアミノ酸を低減する意味で意義が大きいことを示すものと考えられ興味深い。グルタミンは麴中に最も多く含まれるアミノ酸であるが、酵母にとって低温で利用し易いアミノ酸であることは興味深い。清酒の呈味に関係するアミノ酸の取込みに対しては培養温度の違いは大きな影響を示さなかったが、低温の方がアミノ酸全体の取込み量が多いことから、実際の酒母・醗では間接的にアスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニンの濃度の低減に関係していると推論される。

静置培養と振盪培養の違いは、酵母の増殖量に大きな違いが生じ振盪培養の方が2倍も酵母数が多かった。振盪培養は溶存酸素の供給という面で通気培養と静置培養の中間的な条件と考えられるが、グルコース消費量は静置培養と振盪培養でほぼ同一であることから、振盪培養では好気的な増殖のためATP獲得のエネルギー効率が高くグルコース消費量に対して酵母数が多かったものと推察される。アミノ酸資化量も振盪培養の方が約1.6倍も多かったが、特にアルギニンの資化量が静置培養の約4倍も多いという特徴が認められた。これはアミノ酸代謝⁹⁾が静置培養と振盪培養で異なるためアミノ酸資化量に差異が生じたものと考えられる。

初発グルコース濃度は、酵母の増殖に大きく影響し、初発グルコース濃度が低いほうが酵母数が多かった。これは酵母の増殖に対するグルコースの濃糖圧迫が原因と考えられる。アミノ酸資化量は酵母の増殖量と比例して初発グルコース濃度が低い方が資化量が多かった。この事実は、連続的にグルコースを低濃度に供給する並行複発酵は酵母の増殖量やアミノ酸資化量を増大させる効果を有していることを示すもので興味深い。

初発酵母数がアミノ酸取込みに及ぼす影響は、酒母での初発酵母数は 2×10^5 /gと初添での初発酵母数は 2×10^7 /gと推定されるのでこの2区分で調べたが、アミノ酸資化量は僅か約10%の違いであった。この理由は酵母が出芽増殖で指数的に増えるため最大酵母密度に達するまでの全アミノ酸資化量の約90%は 2×10^7 が 2×10^8 に増殖する段階で使われることを示すものと考えられる。しかし個々のアミノ酸について

みると大きな差異が認められ、初発酵母数が少ない方がアルギニン、グルタミン酸の取込み量が多く、これらのアミノ酸を低減する意味で初発酵母数が少ない方が効果的であると考えられる。

初発pHの影響は、pHを3, 4, 5, 6, 7の5区分で調べたが、清酒酵母は $6 > 5 > 4 > 3 > 7$ の順に酵母数が多かったが、アミノ酸資化量は $5 > 6 > 4 > 7 > 3$ の順であった。生もと系酒母の初発pHは約6前後、速醸系酒母の初発pHは約3前後であるので、両pHのアミノ酸の取込みを比べてみるとpH6の方が全体のアミノ酸取込み量が多く、グルタミン、リジン、アスパラギン酸、アルギニン、グルタミン酸の取込み量が多い。アスパラギン酸、アルギニン、グルタミン酸は清酒の呈味に関係しているアミノ酸であるがpH6の方が取込み量が多いことは興味深い。今後は実際の酒母でアミノ酸組成の違いを調べたいと考えている。

要 約

清酒醸造の特徴である並行複発酵及び低温発酵が清酒酵母の増殖における選択的なアミノ酸資化に大きく関わっていることが明らかとなった。並行複発酵による連続的なグルコースの供給はグルコース濃度を低濃度に維持し酵母増殖におけるアミノ酸資化量を増大させる役割を担っている。低温発酵もアミノ酸資化量を増大させる役割を担っている。振盪培養は静置培養より酵母の増殖量が多く、アミノ酸資化量も約1.6倍と多く、特にアルギニンの資化量は約4倍も多かった。培地の初発pHの違いも清酒酵母の増殖とアミノ酸取込みに大きく影響することが分かった。

最後に本研究に当たり奨学寄附金を頂戴した秋田県酒造組合様、貴重なアドバイスを頂きました山梨大学飯村稔教授、日本醸造協会吉田清上席技師に厚くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) 岩野君夫, 高橋和弘, 伊藤俊彦, 中沢伸重; 醸協, **99**(9), 659-664 (2004)
- 2) 岩野君夫, 伊藤俊彦, 旗宮顕仁, 中村拓郎, 渡辺誠衛, 中沢伸重; 醸協, **99**(10), 735-742 (2004)
- 3) 岩野君夫, 飯塚尚彦, 斉藤和夫, 布川弥太郎; 醸協, **76**(4), 272-275 (1981)