

寒天重層発酵法による低温発酵性ワイン酵母の選択

後藤昭二・岸本宗和*・篠原 隆

山梨大学工学部発酵化学研究施設
〒400 甲府市北新1-13-1

Double Layer Agar Fermentation Method for Selection of Cryophilic Wine Yeasts

Shoji Goto, Munekazu Kishimoto*, and Takashi Shinohara

Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu 400

Abstract

A double layer agar fermentation method was developed for the selection of cryophilic wine yeasts. An underlying medium, PYG-F (Peptone-Yeast Extract-Glucose) containing 0.25% agar is poured into a medium-sized test-tube to give a lower layer 60 mm in height. After yeast is inoculated into this lower layer medium, it is covered with 2% agar with a thickness of 10 mm. The fermentation velocity is evaluated by measuring the distance the upper layer of agar rises as a result of fermentation gas.

酵母による糖、糖質原料の発酵時における全発酵度や発酵力に関する試験は、一般にMeissel発酵装置とかHayduck発酵装置など¹⁾、あるいはそれらの改良装置を使用して行われてきた。ワイン酵母の基礎的な発酵に関する試験にも、従来、Meissel法の改良装置を用い、ブドウ果汁を最小単位の場合でも200mlないし500mlを使用し、経時的に炭酸ガスの発生量、糖消費量、アルコール生成量を観察する方法によってきた。しかし、この方法により低温発酵試験を行うときには発酵終了までに長時間を要する。

筆者らは、白ワイン用酵母の選択基準のなかでも重要な特性の一つである低温発酵性試験を短時間内に観察しうる実験系、寒天重層発酵試験法を開発したので報告する。

実験方法

1. 供試ワイン酵母

Saccharomyces cerevisiae W 3, OC 2, KW 3 (協会3号), NZ681, YB378.

2. 寒天重層発酵試験

下層 PYG-F : peptone 0.75%, yeast extract 0.45%, glucose 5%, agar 0.25%, pH 6.2.

上層 : 2%寒天.

方法 : PYG-F 培地10mlを綿栓、殺菌ずみの中型試験管 (d = 16.5mm, h = 165mm) に注入し、培地層高を60mmとし、オートクレーブ殺菌する。別にYM液体培地 (peptone 0.5%, yeast extract

*現在、サッポロワイン(株) 山梨県東山梨郡勝沼町綿塚字大正577

0.3%, malt extract 0.3%)に3日間、前培養した培養液から1白金耳を、先に用意したPYG-F下層培地中に穿刺状に接種する。この上に2%寒天を層高10mmになるように注入、重層する。これを所定の温度で培養し、発酵ガスによって上層寒天が上昇する高さ(距離)を経時的に測定する。

下層培地中の菌数測定:前項同様の中型試験管に生理食塩水10ml(h=60mm)を用意する。別にYM液体培地に3日間培養した培養液から1白金耳を、先の生理食塩水中に懸濁する。この懸濁液を適宜に希釈し、その一定量を取り、別に用意したYM寒天平板上に拡げて培養後、出現コロニー数を計測し、1ml当たりの酵母数として表示する。

3. 改良Meissel装置による果汁の発酵試験

甲州種ブドウ果汁(Brix 14.5, T.acid 0.56%, pH3.3)200mlを250ml容三角フラスコにとり殺菌後、各試験温度に保持しておく。別に同一果汁5mlに供試酵母を3日間培養したものを、先の果汁培地に接種する。これを所定の温度で培養しながら経時的に重量測定を行う。

結果及び考察

1. 下層PYG-F培地の寒天濃度と層高

PYG-F培地の寒天濃度を0.1%, 0.25%, 0.5%としたときの状態を観察した。寒天濃度0.1%の場合、2%寒天を重層すると、下層培地中に重層寒天層が沈んで不安定になり、発酵ガスによる重層寒天の上昇にバラツキが見られた。下層の寒天濃度0.5%の場合、酵母を接種後、白金耳による割れ目ができること、また下層と重層寒天との間に空隙ができることなどから、発酵ガスによる重層寒天の上昇がスムーズにゆかないといった欠点が見られた。下層の寒天濃度0.25%のときには、接種後、寒天は直ちに元状に復し、下層と上層寒天とは良く密着して発酵ガスによる上層寒天の上昇がスムーズに進み、ばらつきはみられなかった。

また、下層PYG-F寒天培地の高さを40mm, 60mmとしたとき、結果に差はみられなかった。

2. 接種菌数の影響

前培養を3日間行ったYM液体培地からの1白金耳量の酵母数は $10^3 \sim 10^4$ cells/mlの範囲にあった。そこで、この菌数内での発酵速度に及ぼす影響を検討した。Fig. 1にW3(低温性)及びOC2(中温性)を用い、接種菌数を 6.4×10^3 cells/mlないし、 4.8×10^4 cells/mlのときの発酵速度(重層寒天の上昇速度)を示した。両菌株とも接種量が 10^4 cells/mlのときは、 10^3 cells/mlの場合に比較して発酵ガス発生は速いが、低温性酵母と中温性とでの

差は明瞭に識別することができた。

3. 下層PYG-F培地のglucose濃度の影響

下層培地のglucose 5-20%としたときの影響の結果を、W3, OC2を用いて検討した。結果はFig. 2に示した。W3の場合、5, 10, 15% glucoseでは殆ど発酵ガスの発生速度に影響がなく、20% glucoseの場合のみ発酵ガス発生が1日遅れた。OC2では5, 10% glucoseのときには差がみられなかったが、15, 20% glucoseでの発酵は1-2日遅れた。

以上のことから下層PYG-F培地の寒天濃度を0.25%で層高60mm、3日間前培養のYM液体培地から1白金耳の接種量、重層する2%寒天の層高10mmとすることとした。

4. 寒天重層法による温度別発酵試験

低温性のW3, KW3, 中温性のOC2及び保存菌株NZ681, YB378の5菌株について10, 13, 22, 30°Cでの寒天重層発酵試験を行った。結果は、Fig. 3-1及びFig. 3-2に示した。13°Cにおいて、W3およびKW3は1ないし2日目にガスの発生があり、3日目に重層寒天は最高値6.5cmに達した。OC2は4日目にガスの発生がみられ、5日目に6.5cmに達した。10°Cの場合、W3は2日間、KW3は3日目にガスの発生がみられ、両菌株とも4日目に6.5cmに達した。OC2のガス発生は5日目にみられ、6日目に6.5cmに達した。22°Cの場合には3菌株とも1ないし2日目で最高値6.5cmに達し、菌株間の差はみられなかった。

保存ワイン酵母127菌株について実験した中の代表的な例としてNZ681及びYB378の2菌株の結果をFig. 3-2に示した。NZ681株は、13°Cにおいて2日目にガスの発生があり、3日目に最高値6.5cmに達し、10°Cでは3日目にガスの発生があり、5日目に6.5cmに達した。YB378株は、13°Cにおいて3日目にガスの発生がみられたが、最高値6.5cmに達したのは6日目であった。両菌株とも22°C, 30°Cでは1ないし2日目に6.5cmに達した。NZ681株はW3, KW3と同一の発酵パターンを示したことから低温発酵性酵母、YB378株はOC2類似のパターンであることから中温性酵母と判定された。

保存127菌株中、本寒天重層発酵試験法によって選択された代表的な低温発酵性酵母としてYM84, YM112, YM126及びYB320があった。

5. 改良Meissel法による果汁の発酵試験

ブドウ果汁(甲州種、Brix 14.5, 総酸0.56%, pH3.3)200mlを発酵栓付250ml容三角フラスコを用いて13°Cで発酵させ、CO₂の発生を重量減少から測定して発酵速度を観察した。その結果はFig. 4に

ました。寒天重層による発酵試験の結果、低温性と判定されたW3, NZ681の発酵速度は速く、約20日間で発酵が終了したが、中温性と判定されたOC2, YB378の2菌株の発酵は極めて緩慢であり、寒天重層法による結果と一致した。

このことから寒天重層発酵法は低温発酵性酵母の選択法として有用な方法ということができよう。ただし、本方法によるデータは、発酵初期に関するものであることに留意する必要がある。

要 旨

低温発酵性ワイン酵母の選択に簡便、有用な寒天重層発酵試験法を開発した。中型試験管に下層培地として寒天0.25%のPYG-F培地を注入し、層高を60mmとする。これに酵母を接種後、2%寒天を厚さ10mmに重層した。発酵ガスによる重層2%寒天層の経時的な上昇距離から発酵状態を判定した。

文 献

- 1) 後藤、飯塚：酵母の分類同定法、P.40、学会出版センター（1980）。

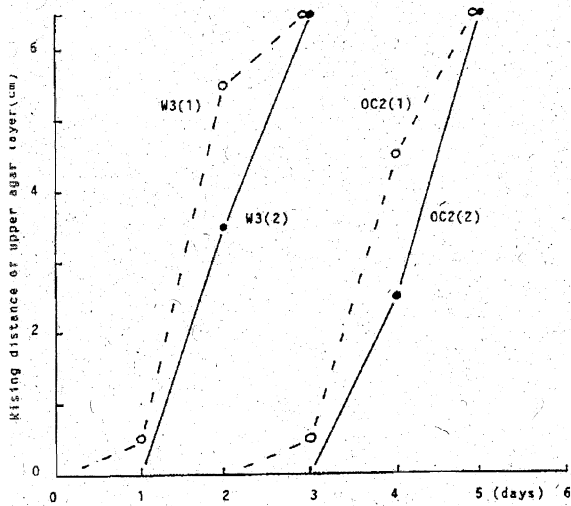


Fig. 1 Effects of inoculum size on evolution of fermentation gas (13°C).
inoculum size(cells/ml): W3(1), 3.4×10^4 ; W3(2), 7.2×10^3 ; OC2(1), 4.8×10^4 ; OC2(2), 6.4×10^3 .

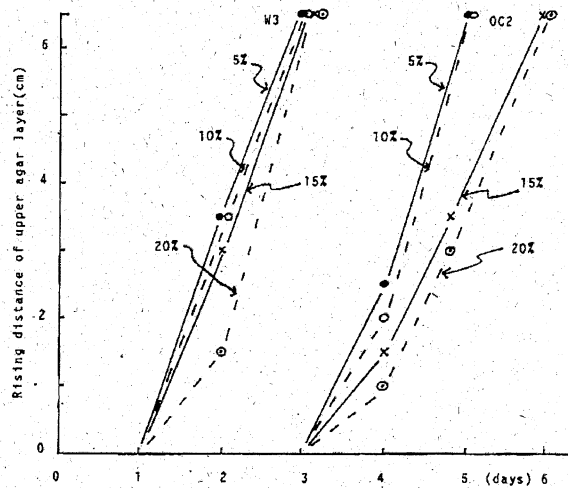


Fig. 2 Effects of glucose concentration on evolution of fermentation gas (13°C).

glucose: 5% ●, 10% ○, 15% ×, 20% ⊙

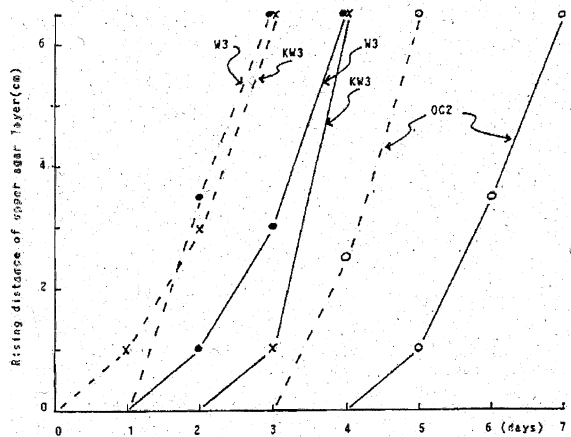


Fig. 3-1 Evolution of fermentation gas in 10 and 13°C.
--- 10°C, — 13°C.

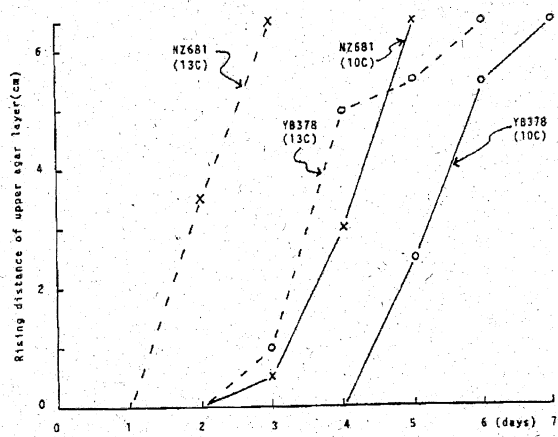


Fig. 3-2 Evolution of fermentation gas in 10 and 13°C.

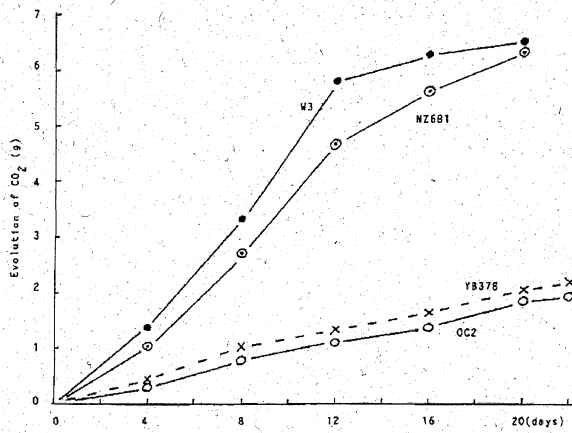


Fig. 4 Fermentation of grape must by cryophilic and mesophilic wine yeasts (13°C).