

鹿児島工試酵母の分類学的研究

食品工業部 高峯和則, 瀬戸口真治, 亀沢浩幸, 美坂幸子, 浜崎幸男

Taxonomic Study on "Kagoshimakoshi Yeast"

Kazunori TAKAMINE, Shinji SETOGUCHI, Hiroyuki KAMESAWA,
Koko MISAKA and Yukio HAMASAKI

焼酎酵母の鹿児島工試酵母, 泡盛1号, 宮崎酵母および醸造協会SH 4号, ワイン酵母のOC 1, OC 2およびOC 3, 清酒酵母の協会7号および協会9号, 新たに焼酎もろみから分離したNo.21株, 凝集性酵母IR 2およびアルコール製造用酵母の発研1号について形態学的, 生理学的諸性質を調べた。その結果, 鹿児島工試酵母は皮膜形成がHeavyである, Melezitose発酵性が強い, Galactose資化性が強い, 培養温度33℃におけるMelezitose資化性が強い, ビタミン欠除培地上でも十分に生育が出来る, 37℃で生育するコロニーが最も大きいおよび α -Methyl-glucosideを炭素源とするTTC染色で3種類の色に染色されることが特徴であった。

1. はじめに

現在, 南九州の焼酎工場でもっとも広く使用されている鹿児島工試酵母(以後, Koとする)は1952年に, 鹿児島県工業試験場の勝田ら¹⁾が沖縄の泡盛焼酎工場のもろみから分離した酵母である。

清酒酵母, 泡盛酵母および宮崎酵母の分類学的研究については報告されている^{2,3)}が, Koについては西谷^{4,5)}の“焼酎酵母研究のあゆみ”により断片的に紹介されているにすぎない。

焼酎製造は開放系で発酵が行われており, また, 差しもとを繰り返すため家付き酵母により汚染される可能性がある。工藤ら¹⁾は宮崎酵母が高リン酸培地上において酸性ホスファターゼ活性がないことと, α -Methyl-glucosideを炭素源とするTTC染色法により赤色に染まらないことを見だし家付き酵母との分離に成功している。

そこで家付き酵母の分離および細胞融合法による焼酎酵母の育種に関する研究の基礎資料とする目的で, Koとワイン酵母, 清酒酵母および他の焼酎酵母の形態学的, 生理学的諸性質について比較検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

2. 1 使用菌株

焼酎酵母としてKo, 泡盛1号, 醸造協会SH 4号(以後, SH 4号とする)および宮崎酵母(以後, MKとする), ワイン酵母としてOC 1, OC 2およびOC 3, 清酒酵母として協会7号および協会9号, 新たに焼酎もろみから分離したNo.21株, 凝集性酵母としてIR 2およびアルコール製造用酵母として発研1号を使用した。なお, 泡盛1号, SH 4号, MKおよび発研1号は宮崎県食品加工研究開発センターから分与されたものである。

2. 2 分類法

2. 2. 1 “The Yeasts”¹²⁾による分類法

“The Yeasts”の*Saccharomyces cerevisiae*の記載中で行われている試験項目について, これらの方法を一部改変して以下の方法で行った。

2. 2. 1. 1 細胞の大きさ

Glucose 1%, Polypeptone 0.5%, Yeast extract 0.3%およびMalt extract 0.3%からなるYM培地に25℃, 3日間培養を2回繰り返して, 菌株を400倍の顕微鏡写真にとり, 細胞の長・

短径を測定した。そして同倍率のマイクロメーターの写真を用いて換算し、細胞の大きさを求めた。

2. 2. 1. 2 皮膜形成

YM培地で30℃、2日間静置培養したもの(別に記載しない限り前培養はこの方法で行った)をGlucose 15%からなるYM培地5mlに0.5ml植菌し、25℃で14~20日間培養後皮膜の形態を飯塚ら¹³⁾の方法で観察した。

2. 2. 1. 3 凝集性

Glucose 15%のYM培地5mlに前培養液0.5ml植菌し30℃、7日間静置培養後ボルテックスミキサーで30秒間振とうした。その後2~3分間静置し凝集の有無を観察した。

2. 2. 1. 4 擬菌糸

Potato Dextrose Agar (Difco社)上にslide cultureを行い、25℃、14日間培養後顕微鏡で擬菌糸の形成を観察した。

2. 2. 1. 5 胞子形成

酢酸ナトリウム0.5%およびAgar 2%からなる胞子形成用培地に予め2% Agarを含んだYM斜面培地で30℃、2日間前培養した菌株を塗抹し30℃、7日間培養後顕微鏡で観察した。なお、形成していない菌株は更に7日間培養を行い観察した。

2. 2. 1. 6 糖の発酵性

Yeast extract 0.45%, Polypeptone 0.5%からなる培地にプロモチモールブルー指示薬を少量添加し試験管に2ml分注しDurham管を内挿した。これを115℃、15分間殺菌後、6%の糖類を1ml分注し(Raffinoseは12%)100℃、15分間殺菌した。これに10⁴倍に無菌水で希釈した前培養液30μlを植菌し、25℃で30日間培養し炭酸ガスの発生を観察した。

2. 2. 1. 7 炭素源の資化性

Yeast Nitrogen Base (Difco社) 0.67%, Bacto-agar (Difco社) 2%からなるYNB培地を121℃、10分間殺菌後、炭素源が0.5%になるように滅菌フィルターでろ過したものを添加し平板

培地とした。これに10⁴倍に無菌水で希釈した前培養液30μlをスポットし(別に記載しない限りこの方法で行った)、25℃で14日間培養し生育の有無を観察した。なお、Melezitoseは33℃においても培養を行った。

2. 2. 1. 8 アルブチン分解能

常法に従いYeast-autolysate溶液を調製後、これにアルブチン0.5%, Agar 2%を加え溶解し115℃、10分間殺菌後1%クエン酸鉄(Ⅲ)アンモニウム溶液を数滴加え平板培地とした。これにスポットし、25℃で14日間培養したコロニー周辺の変色を観察した。

2. 2. 1. 9 窒素源の資化性

Yeast Carbon Base (Difco社) 1.17%およびBacto-agar 2%からなるYCB培地に硫酸アンモニウム、硝酸カリウムおよびエチルアミンを窒素原子として0.01%になるようにそれぞれ添加し121℃、10分間殺菌後平板培地とした。これにスポットし、25℃で14日間培養し生育の有無を観察した。

2. 2. 1. 10 ビタミンの要求性

伊藤ら¹⁵⁾の設定した基本培地にBacto-agar 2%および窒素源として硫酸アンモニウム0.05%またはL-アスパラギン0.2%添加し121℃、10分間殺菌後7種類のビタミンを省略法で添加し平板培地とした。これにスポットし、25℃で14日間培養し生育の有無を観察した。なお、ビタミン類は滅菌フィルターでろ過したものを添加した。

2. 2. 1. 11 濃糖環境における生育

塚原¹⁴⁾の方法に従って行った。

2. 2. 1. 12 37℃における生育

Glucose 15%からなるYM平板培地にスポットし、37℃で14日間培養し生育の有無を観察した。

2. 2. 1. 13 シクロヘキシミド耐性

YNB培地にGlucose 0.5%およびシクロヘキシミド10mg/lを添加した平板培地にスポットし、25℃で14日間培養し生育の有無を観察した。

2. 2. 2 その他の分類法

2. 2. 2. 1 β-アラニン培地における生育
菅間ら¹⁶⁾の方法に従い、25℃および35℃の培養温度で行った。すなわち、伊藤ら¹⁵⁾の設定した硫酸アンモニウムを窒素源とした基本培地にパントテン酸の代わりにβ-アラニンを添加したβ-アラニン平板培地を用いこれにスポットし、5日間培養し生育の有無を観察した。

2. 2. 2. 2 TTC染色法

村上ら¹⁷⁾の方法に従い培地を作製し、これにスポットし、30℃、2日間培養後染色を行った。染色条件は30℃、24時間とした。

2. 2. 2. 3 アミノ酸要求性

Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acid 0.67%, Glucose 2%およびBacto-agar 2%からなる培地にスポットし、25℃で14日間培養し生育の有無を観察した。

3. 結果および考察

3. 1 諸性質

諸性質の比較について表1に示した。
細胞の大きさは、Koは他の酵母の中間の大きさ

であった。

皮膜形成はOC1以外は認められ、Koが最も明確でheavyであった。皮膜の形態の一般例を図1¹³⁾に示した。

凝集能はNa21株およびIR2で認められた。

擬菌糸はいずれの菌株も形成した。

胞子形成能はOC3、協会7号および協会9号で認められなかった。これは、協会7号酵母において大内ら⁸⁾や玉城ら⁹⁾の報告と一致しなかった。

アルブチン分解能は全ての菌株において認められなかった。

窒素源の資化性は硫酸アンモニウムを用いた場合、全ての菌株で資化性が認められた。硝酸カリウムおよびエチルアミンは全ての菌株で資化性が認められなかった。

濃糖環境における生育は50% (w/w) Glucoseにおいては全ての菌株で生育した。60% (w/w) Glucoseにおいては全ての菌株で生育しなかった。

37℃における生育はKoのコロニーが最も大きくOC3は生育しなかった。

シクロヘキシミド耐性およびアミノ酸要求性は全ての菌株で認められなかった。

表1 諸性質の比較一覧表

	Ko	OC1	OC2	OC3	7号	9号	Na21	IR2	Aw1*	MK	SH4	発研1号
細胞の大きさ												
長径 (μm)	5.95	6.10	6.25	6.89	5.99	5.84	6.57	5.93	5.84	5.94	5.81	6.55
短径 (μm)	4.83	5.02	5.11	5.37	4.94	4.40	5.54	4.55	4.29	4.46	3.99	4.27
皮膜形成 ¹²⁾	heavy	smooth	islets	islets	ring	ring	heavy	ring	islets	ring	islets	ring
凝集能	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
擬菌糸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
胞子形成	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
アルブチン分解能	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
窒素源の資化性												
(NH ₄) ₂ SO ₄	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KNO ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
エチルアミン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
濃糖環境における生育												
50% (w/w)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60% (w/w)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37℃における生育 ¹³⁾	+ _{3.3}	+ _{2.0}	+ _{3.0}	-	+ _{1.5}	+ _{2.0}	+ _{3.0}	+ _{2.5}	+ _{2.0}	+ _{2.0}	+ _{2.0}	+ _{1.0}
シクロヘキシミド耐性	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7%酢酸培地における生育	+	+	+	+ _s	+	+	+	+	+	+	+	+

* 1 ; 泡盛1号, * 2 ; 図1参照, * 3 ; コロニーの直径 (mm), + s ; + slow

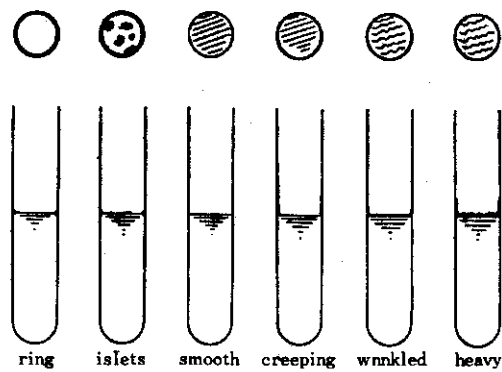


図1 液体培養における皮膜の形態¹³⁾

3.2 ビタミン要求性

ビタミン要求性の比較について表2に示した。無機窒素として硫酸アンモニウムを添加した場合、泡盛1号はチアミンを要求した。協会7号はビタミンの要求性を示さなかった。これは、培養温度が25℃であるためであり、表には示さなかったが、培養温度35℃においてパントテン酸の要求性を示した。これは昔間ら¹⁶⁾の報告と一致した。有機窒素としてL-アスパラギンを添加した場合、IR2およびSH4号は全ビタミン欠除培地に生育できなかった。泡盛1号はパントテン酸およびチアミンを要求し、発研1号はパントテン酸を要求した。他の菌株はビタミンの要求性を示さず、Koがいずれの培地においても最も大きなコロニーを形成した。

3.3 糖の発酵性および炭素源の資化性

糖の発酵性および炭素源の資化性の比較について表3に示した。

表2 ビタミン要求性の比較一覧表

	Ko	OC1	OC2	OC3	7号	9号	Na21	IR2	Aw1 ¹⁾	MK	SH4	発研1号
N源: (NH ₄) ₂ SO ₄												
全ビタミン添加	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
パントテン酸欠除	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
チアミン欠除	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
ピリドキシン欠除	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ニコチン酸欠除	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
イノシトール欠除	+	+	+	+w	+	+	+	+w	+w	+	+w	+
ピオチン欠除	+	+	+	+w	+	+	+	+w	+	+	+w	+
アミノ安息香酸欠除	+	+	+	+w	+	+	+	+	+	+	+	+
全ビタミン欠除	+	+	+	+w	+	+	+	+w	-	+	+w	+
N源: L-アスパラギン												
全ビタミン添加	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
パントテン酸欠除	+	+	+	+	+w	+w	+	+w	-	+	+w	-
チアミン欠除	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
ピリドキシン欠除	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ニコチン酸欠除	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
イノシトール欠除	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ピオチン欠除	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
アミノ安息香酸欠除	+	+	+	+	+	+	+	+w	+	+	+	+
全ビタミン欠除	+	+	+	+	+w	+w	+	-	-	+	-	-

*1; 泡盛1号, +w; +weak

表3 糖の発酵性および炭素源の資化性の比較一覧表

	Ko	OC1	OC2	OC3	7号	9号	No 21	IR2	Aw1''	MK	SH4	発研1号
糖の発酵性												
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+s	+s	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	+	+	+s	+s	+	+s	+	+	+s	+	+	+s
Melezitose	+s	+s	+s	-	-	+s	-	+s	-	-	-	+s
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Soluble starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -MG*	+s	+	+s	+	+	+	+	+s	+s	+	+s	+
炭素源の資化性												
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+s	+s	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+s	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+s	+	+	+
Melezitose 25°C	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33°C	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Soluble starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -MG*	+s	+	+s	+s	+	+	+	+s	-	±	±	+
Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+s	+s	+s	+s	±	+s	+s	+s	±	+s	+s	+s
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Succinic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citric acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* 1 ; 泡盛1号, * 2 ; α -Methyl-glucoside, +s ; + slow, ± ; わずかに生育が認められる

糖の発酵性においてGlucose, SucroseおよびMaltoseは全ての菌株で2日目に発酵を開始した。Galactoseは協会7号および協会9号で発酵が遅れ5日目に開始した。RaffinoseはOC2, OC3, 協会9号および泡盛1号において発酵が遅れた。濱川ら⁴⁾はMKはRaffinoseの発酵性がないと報告しているが、今回の実験の結果発酵性が認められた。MelezitoseはKoが最も速く6日目に、OC1およびOC2が10日目に、協会9号および発研1号が12日目に、IR2が14日目に発酵を開始した。

炭素源の資化性においてGlucoseおよびSucroseは全ての菌株で3日目に生育した。Galactoseは協会7号および協会9号で生育が遅れた。これは糖の発酵性と同様の結果となった。Maltoseは協会9号で生育が遅れた。KoはMelezitoseを33℃において資化できない⁴⁾とされているが、今回の実験で資化できることが認められた。

3.4 β-アラニン培地における生育

β-アラニン培地における生育の比較について表4に示した。培養温度25℃では全ての菌株が生育

を有したが、35℃ではOC3および協会7号において生育が認められなかった。酵母のパントテン酸要求性はパントテン酸の構成成分であるβ-アラニンによって代替されることが知られている¹⁸⁾。協会7号は25℃においてβ-アラニンをパントテン酸の代替とするが、35℃において代替できないと菅間ら¹⁶⁾の報告があるが、これと一致した。一方、OC3ではYM平板培地においても生育が認められないことより、温度感受性を有しているためと考えられる。

3.5 TTC染色性

TTC染色性による比較について表5に示した。糖源がα-Methyl-glucosideの場合Koは赤、ピンクおよびピンクっぽい白の3種類の色に、OC2および発研1号はピンクおよび赤の2種類の色に染色された。焼酎もろみより分離されたNo.21株はKoと比較するとα-Methyl-glucoside以外は同色であった。凝集性酵母IR2は染色されにくい性質でピンク系であった。

表4 β-アラニン培地における生育の比較一覧表

培養温度	Ko	OC1	OC2	OC3	7号	9号	No.21	IR2	Aw1 ¹⁾	MK	SH4	発研1号
25℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35℃	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
35℃ YM培地	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

* 1 ; 泡盛1号

表5 TTC染色性による比較一覧表

糖源	Ko	OC1	OC2	OC3	7号	9号	No.21	IR2	Aw1 ¹⁾	MK	SH4	発研1号
Glucose	R	R	R	R	R	R	R	RP	R	R	R	R
Galactose	R	R	R	R	R	R	R	RP	R	R	R	R
Maltose	R	R	R	R	R	R	R	RP	R	R	R	R
Sucrose	R	R	R	R	R	R	R	RP	R	R	R	R
α-MG ²⁾	R,P & Pw	R	R & P	R	RP	R	R	P	RP	RP	RP	R & P

* 1 ; 泡盛1号, * 2 ; α-Methyl-glucoside

R ; 赤, P ; ピンク, RP ; 赤っぽいピンク, Pw ; ピンクっぽい白

4. おわりに

鹿兒島工試酵母の分類学的な性質を中心に形態学的、生理学的諸性質をワイン酵母のOC 1, OC 2 およびOC 3, 清酒酵母の協会7号および協会9号, 新たに焼酎もろみより分離したNo.21株, 凝集性酵母IR 2, 焼酎酵母の泡盛1号, 宮崎酵母, 醸造協会SH 4号およびアルコール製造用酵母の発研1号と比較検討した。その結果, 鹿兒島工試酵母は皮膜形成がHeavyであること, Melezitoseの発酵性および資化性が強いこと, Galactoseの資化性が強いこと, ビタミン欠除培地上でも十分に生育できること, 37℃で生育するコロニーが最も大きいことおよび α -Methyl-glucosideを糖源とするTTC染色で3種類の色に染色されることが特徴であった。

参 考 文 献

- 1) 勝田常芳, 西野勇実, 山口力, 前原喜義: 鹿工試発酵工業部研究速報, 1 (1952)
- 2) 大内弘造, 田中良彦, 布川弥太郎, 秋山裕一: 醸協, 67, 2, 167 (1972)
- 3) 玉城武, 忍頂寺晃嗣, 高江洲朝清, 下地博, 玉那覇勉: 醸協, 76, 3, 198 (1981)
- 4) 濱川悟, 日高照利, 工藤哲三, 山田和史: 宮崎工業試験場研報 30, 59 (1985)
- 5) 西谷尚道: 醸協, 77, 9, 599 (1982)
- 6) 西谷尚道: 醸協, 77, 10, 648 (1982)
- 7) 西谷尚道: 醸協, 77, 12, 872 (1982)
- 8) 西谷尚道: 醸協, 78, 1, 38 (1983)
- 9) 西谷尚道: 醸協, 78, 2, 121 (1983)
- 10) 西谷尚道: 醸協, 78, 3, 193 (1983)
- 11) 工藤哲三, 日高照利, 山田和史, 濱川悟: 醸協: 81, 7, 477 (1986)
- 12) Lodder (Editor): The Yeasts, second revised and enlarged edition (1970)
- 13) 飯塚廣, 後藤昭二: 酵母の分類同定法, 東大出版会 (1973) p.31
- 14) 塚原寅二, 竹田正久: 清酒酵母の分類学, 建帛社 (1985) p.39, p.138
- 15) 伊藤雄太郎, 中村雄次, 植村定治郎: 発酵工学, 33, 421 (1955)
- 16) 菅間誠之助, 山川浩一郎, 湯岡巖一, 山村紘司, 野白喜久雄: 醸協, 60, 5, 453 (1965)
- 17) 村上英也, 吉田清, 野呂二三, 稲橋正明, 服部裕子: 77, 3, 181 (1982)