

色素含有平板培地による岩手県清酒酵母の識別*

菊池 祥**、佐藤 稔英**、玉川 英幸**

色素混合平板培地（カラープレート）を使用し、岩手県清酒酵母「ジョバンニの調べ」、「ゆうこの想い」、「FoxIw201」の識別を検討した。色素濃度検討の結果、BTBは80 mg/L、フロキシシン B及びローズベンガルは20 mg/Lでコロニーの着色が最も明瞭となった。また、培養温度35°C、炭素源にグルコース及びグリセロールを用いた結果、炭素源により着色が変化し、これらの酵母を識別できた。

キーワード：カラープレート、清酒酵母、識別、グルコース、グリセロール

Distinction of iwate sake yeasts by using dye-containing plate

Shou Kikuchi, Naruhide Sato and Hideyuki Tamakawa

Key words : Color plate, Sake yeast, Distinction, Glucose, Glycerol

1 緒 言

食品に使用される酵母の大部分は *Saccharomyces cerevisiae* である。*S. cerevisiae* は、糖分からアルコールと炭酸ガスを生成する働きを持つ。この働きからパン、ワイン、清酒など多くの発酵食品に使われている。清酒酵母は、公益財団法人日本醸造協会が頒布するきょうかい酵母や、各県が独自に育種した県酵母などがある。岩手県にも、県で育種した清酒酵母がある。吟醸香と言われる香気成分の一種であるカプロン酸エチル生成量が多く大吟醸酒等に使用される「ジョバンニの調べ」、カプロン酸エチル生成量がやや多く純米吟醸酒や純米酒等に使用される「ゆうこの想い」、吟醸香の一種である酢酸イソアミルと酸の生成量が多く純米酒等に使用される「FoxIw201」である。

清酒の製造時には培養した優良な清酒酵母を十分量添加して、その添加酵母を優勢な状態とすることで、雑菌汚染のリスクを低くする。しかし、容器を密閉せずに開放状態で発酵するため、稀に野生酵母や別の醗の酵母が混入して添加酵母よりも優勢になる場合がある。添加酵母以外が優勢になって発酵が進むと、香りや味が商品コンセプトと異なる清酒ができてしまう。醗が添加酵母の特徴と異なり添加酵母以外の優勢が疑われる場合には、酵母の識別が必要になる。添加酵母以外が優勢の場合には、酵母の再添加などの対策が必要となる。

清酒酵母の識別は、呼吸欠損菌の判別をする TTC 染色法^{1,2)} やパントテン酸資化性の判別をするβ-アラニン法³⁾ など各種識別培地の組み合わせによる識別⁴⁾ に加え、PCR 法を用いた遺伝子解析も行われている⁵⁾。識別に要する日数は、各種識別培地は5～7日間、PCR 法は3～4日間であるが、いずれの識別法も操作が煩雑であるため、より簡易な方法が求められる。

簡易な識別方法として、色素混合平板培地（カラープレート）を用いて清酒酵母であるきょうかい9号酵母とこまち酵母を着色差によって2～3日間の短期間で識別した渡辺らの報告がある⁶⁾。

本試験は、渡辺らの方法を参考に、岩手県で育種した清酒酵母をカラープレートで識別できるか検討した。渡辺らの方法に加え、培養温度の検討と、炭素源をグルコースからグリセロールに変えた培養試験、酵母混合による識別試験も実施したので報告する。

2 実験方法

2-1 使用酵母と培養方法

酵母は、岩手県で育種した清酒酵母「ジョバンニの調べ」、「ゆうこの想い」、「FoxIw201」の3株を使用した。

酵母は YPD 液体培地（20 g/L グルコース、10 g/L 酵母エキス、20 g/L ペプトン）3 mL にスラントから一白金耳接種し、30°C で3日間静置培養して供試した。

2-2 使用色素

色素は、pH 指示薬であり中性で緑色を呈するプロモチモールブルー（BTB）、菌垢の染め出しなどで用いられる桃色を呈するフロキシシン B、食紅で赤色を呈するローズベンガルの3種類を使用した。

2-3 色素濃度の検討

カラープレートに用いる最適な色素濃度を検討するため、次の方法で試験を行った。

グルコースカラープレートは YPD 培地（20 g/L グルコース、10 g/L 酵母エキス、20 g/L ペプトン、20 g/L 寒天）に色素を濃度20、40、60、80 mg/L となるように混合して作成した。

YPD 液体培地で増殖した酵母の光学密度(OD₆₀₀)を測定し、OD₆₀₀=1 となるように滅菌水で希釈して、濁度をそ

* 令和4年度技術シーズ創生・発展研究事業（可能性調査研究）

** 醸造技術部

えた。

OD₆₀₀=1 の酵母希釈液をグルコースカラープレートへプロットし、30℃で3日間培養後に各酵母の着色状態を観察した。

2-4 培養温度の検討

カラープレートの最適な培養温度を検討するため、次の方法で試験を行った。

BTBは濃度 80 mg/L、フロキシシン B とローズベンガルは 20 mg/L のグルコースカラープレートへ OD₆₀₀=1 の酵母希釈液をプロットし、25、30 または 35℃で3日間培養後に各酵母の着色状態を観察した。

2-5 炭素源の検討

各酵母の炭素源による着色を確認するため、次の方法で試験を行った。

グルコースカラープレートに加え、炭素源をグルコースからグリセロールに変更した培地 (20 g/L グリセロール、10 g/L 酵母エキス、20 g/L ペプトン、20 g/L 寒天) に、BTBは濃度 80 mg/L、フロキシシン B 及びローズベンガルは 20 mg/L になるように混合してグリセロールカラープレートも作成した。

OD₆₀₀=1 の酵母希釈液を1万倍希釈して、作成したカラープレートに 100 μL 塗抹し、35℃で、グルコースカラープレートは3日間、グリセロールカラープレートは6日間培養後に各酵母の着色状態を観察した。

2-6 混合酵母の識別

酵母を混合した場合に識別可能か確認するため、次の方法で試験を行った。

OD₆₀₀=1 の酵母希釈液を1万倍希釈して、「ジョバンニの調べ×ゆうこの想い」、「ジョバンニの調べ×FoxIw201」、「ゆうこの想い×FoxIw201」の組み合わせで、1対1で混合し、酵母混合液とした。

カラープレートに酵母混合液を 100 μL 塗抹し、35℃で、グルコースカラープレートは3日間、グリセロールカラープレートは6日間培養後に各酵母の着色状態を観察した。

3 結果及び考察

3-1 色素濃度の検討

結果を図1に示す。BTBは濃度が高くなるにつれて、酵母の着色が濃くなり80 mg/Lが最も酵母間の差が明瞭であった。同様に、フロキシシン B とローズベンガルは濃度が高くなるにつれて、酵母が濃く着色した。しかし、濃度が高くなると酵母間の着色差が小さくなるとともに、培地の色が濃く不明瞭となるため、20 mg/L が最も識別し易かった。すべての色素で「ジョバンニの調べ」と「FoxIw201」の着色は似通っており、識別は難しいと考えられた。そのため、より識別を容易にするため培養温度の検討を行った。















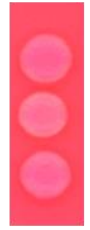





















色素	酵母	色素濃度			
		20 mg/L	40 mg/L	60 mg/L	80 mg/L
BTB	ジョバンニの調べ				
	ゆうこの想い				
	FoxIw201				
フロキシシンB	ジョバンニの調べ				
	ゆうこの想い				
	FoxIw201				
ローズベンガル	ジョバンニの調べ				
	ゆうこの想い				
	FoxIw201				

図1 酵母を培養したカラープレート (色素濃度の検討)

3-2 培養温度の検討

結果を図2に示す。酵母の着色は、培養温度が25℃から30℃、35℃と高くなるにつれ、濃くなり、35℃で最も酵母間の差が明瞭となった。このことから培養温度は35℃が最適と考えられた。

酵母別の着色は「FoxIw201」が最も濃く、次に「ジョバンニの調べ」となり、「ゆうこの想い」は最も薄くなった。BTB とフロキシシン B 又はローズベンガルを組み合わせることで、単コロニーの酵母の識別が可能であった。

酵母の最適培養温度は30℃程であり、この最適温度から大きく離れるとストレスが負荷される⁷⁾。高温などの環境ストレスに酵母が曝されると、ストレス応答が誘導され、酵素の不活性化やタンパク質の保護及び除去などが行われる。このことから培養温度による酵母の着色の違いは、ストレス応答による酵母の酵素活性やタンパク質の変化が影響していると考えられた。

3-3 炭素源の検討

これまでの検討で単コロニーの酵母の識別はできた。そこで、実際の作業では単コロニーではなく、複数コロニーで識別するため、以下の試験は複数コロニーで実施した。

炭素源をグルコースとした場合は色素によらず、「ジョバンニの調べ」と「ゆうこの想い」は同程度に薄く、「FoxIw201」は濃く着色した (図3)。そこで、「ジョバン

ニの調べ」と「ゆうこの想い」の識別を容易にするために炭素源の違いによる検討を行った。

グルコースは解糖系で代謝される。グリセロールはジヒドロキシアセトンリン酸を経て、グリセルアルデヒド3リン酸に変換され解糖系に合流する⁸⁾。この反応で発生した NADH は呼吸鎖で再酸化される必要がある。こうしたことから、グリセロールの代謝には酸素が必要になる。このような代謝の違いが色素の取り込みや着色に関与すると推測し、炭素源をグリセロールに変更して試験を行った。

その結果、グリセロールの場合は「ゆうこの想い」と「FoxIw201」は薄く、「ジョバンニの調べ」は濃く着色した(図4)。

色素	酵母	培養温度		
		25℃	30℃	35℃
BTB	ジョバンニの調べ			
	ゆうこの想い			
	FoxIw201			
フロキシシンB	ジョバンニの調べ			
	ゆうこの想い			
	FoxIw201			
ローズベンガル	ジョバンニの調べ			
	ゆうこの想い			
	FoxIw201			

図2 酵母を培養したカラープレート (培養温度の検討)

3-4 混合酵母の識別

次に、実際の識別作業を想定して、2種類の酵母を混合した混合酵母の培養を試みた。

その結果、炭素源をグルコースとした場合(図5)とグリセロールとした場合(図6)のいずれの着色パターンも、図3及び図4と同様であった。そのため、グルコースでは「ジョバンニの調べ×ゆうこの想い」、グリセロールでは「ゆうこの想い×FoxIw201」の識別は難しいと考えられた。しかし、表1に示すように、これら2種類の炭素源を用いることで、試験した3つの酵母の組み合

わせを識別可能であった。

全ての色素で、酵母及び炭素源での着色パターンが一致していたため、色素はいずれかの1種類で十分であると考えられる。3種類の色素の中では、BTBが最も識別が容易であったが、BTBは酵母の生成する酸により培地が変色する。このように酵母や色素により識別が難しい場合があるため、念のためBTBとフロキシシンB又はローズベンガルというように、2種類の色素を用いることでより確実に識別できると考えられる。

酵母	色素		
	BTB	フロキシシンB	ローズベンガル
ジョバンニの調べ			
ゆうこの想い			
FoxIw201			

図3 酵母を培養したカラープレート (炭素源グルコース)

酵母	色素		
	BTB	フロキシシンB	ローズベンガル
ジョバンニの調べ			
ゆうこの想い			
FoxIw201			

図4 酵母を培養したカラープレート (炭素源グリセロール)

酵母	色素		
	BTB	フロキシシン B	ローズベンガル
「ジョパンニの調べ」 × 「FoxIw201」			
「ゆうこの想い」 × 「FoxIw201」			
「ジョパンニの調べ」 × 「ゆうこの想い」			

図5 混合酵母を培養したカラープレート (炭素源グルコース)

酵母	色素		
	BTB	フロキシシン B	ローズベンガル
「ジョパンニの調べ」 × 「FoxIw201」			
「ゆうこの想い」 × 「FoxIw201」			
「ジョパンニの調べ」 × 「ゆうこの想い」			

図6 混合酵母を培養したカラープレート (炭素源グリセロール)

表1 カラープレートでの酵母の着色結果

色素		BTB フロキシシンB ローズベンガル	
		グルコース	グリセロール
酵母	ジョパンニの調べ	+	++
	ゆうこの想い	+	+
	FoxIw201	++	+

+: 薄い着色、++: 濃い着色

4 結 言

本研究では、カラープレートを用いて岩手県で育種した清酒酵母の識別を試みた。

(1) 色素濃度を検討した結果、酵母に依存せず、BTB では 80 mg/L、フロキシシン B 及びローズベンガルは 20 mg/L が、全体的にコロニーの着色が最も明瞭であった。

(2) 最適な培養温度を検討した結果、35℃でコロニーの着色が最も明瞭となった。

(3) グルコースとグリセロールの2種類の炭素源を用いることで、同一株でもコロニーの着色に違いが生じ、どの酵母の組み合わせでも、それぞれの酵母を識別可能であった。

(4) 色素は1種類ではなく、2種類を用いることでより確実に識別できると考えられる。著者らはBTBとフロキシシンBを推奨する。

(5) PCR法と比較すると、識別に同等の期間を要したが、カラープレートは煩雑な作業がなく簡易に行うことができた。

(6) 各種識別培地と比較すると、同等の操作になるものの、グリセロールカラープレートでは少し早く(3日間)、グリセロールカラープレートでは同等の期間(6日間)で、複数回の培養工程がなく、識別することができた。

(7) カラープレートによる識別は必要とする設備が少なく、また、高価な機器を必要としないため、酒造企業でも実施できる。

本研究で開発したカラープレートでの酵母識別技術を、醗中の酵母の優勢確認で活用し、県内清酒の品質向上に繋げるとともに、今後、きょうかい酵母など県酵母以外の識別も検討し、県内酒造企業への技術支援に活かしたい。

文 献

- 古川敏郎, 秋山裕一: 日本農芸化学会誌, 37, p398-402 (1963)
- 稲橋正明, 吉田清, 蓼沼誠: 日本醸造協会誌, 94, p1006-1015 (1999)
- 池見元宏, 和田多聞, 秋山裕一: 日本醸造協会誌, 67, p678-681 (1972)
- 吉田清: 日本醸造協会誌, 101, p910-922 (2006)
- 福田央: 日本醸造協会誌, 109, p202-211 (2014)
- 渡辺誠衛, 田口隆信, 高橋仁, 大野剛: 日本醸造協会誌, 104, p712-721 (2009)
- 島純, 安藤聡, 中村敏英: 日本食品科学工学会誌, 57, p225-231 (2010)
- E. E. CONN, P. K. STUMPF, G. BRUENING, R. H. DOI: コーン・スタンプ生化学, 株式会社東京化学同人, 1988