

地域特産品開発を目的とした酵母の分離

Isolation of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* from Plants for Use in the Development of Special Regional Foods

(2018年3月31日受理)

河野 勇人

Isato Kono

Key words : 酵母, 分離

地域特産品開発への応用を目的に、特徴を有する酵母の分離を検討した。犬養木堂生家の植物から、時季、種類を変えて採取をし、酵母の集積培養を行った。グルコース、シュクロース、マルトースなどを基質とした培地ならびにアルコールを含む培地での発酵性の強い酵母を選別した。さらに、0～16%エタノール溶液中での生育性、発酵性を検討し、2-1-5株を実用性が期待できる酵母として分離した。この株について、形態観察、コロニーの性状、胞子形成の有無、糖源別の生育性、26S rDNA-D1/D2塩基配列の分子系統解析により、2-1-5株を*Saccharomyces cerevisiae*と同定した。

I. 緒 言

自然界には様々な種類の微生物が存在し、古来よりそれら微生物の働きを食品製造加工に利用してきた。その中でも酵母は、日本酒、ワイン、ビール、パン、醤油、味噌、漬物などの発酵食品の製造に関わり、生活に密着した微生物である。酵母は分類上数百種類あるといわれているが、発酵食品の製造に多く使われている酵母は、清酒酵母、ワイン酵母、ビール酵母、パン酵母等と呼ばれ、いずれも*Saccharomyces cerevisiae*の種に属している。しかし同じ*S. cerevisiae*でも、アルコールの生成、耐性、香気成分の生成能等に違いがあり、各々の製造環境に適した特性を有し、DNA解析でも違いが生じてくる^{1,2)}。このような菌株レベルでの相違を利用して、地域特産品開発への応用を目的に、特徴のある酵母、特に*S. cerevisiae*が自然界から分離されている³⁻⁶⁾。

地域の活性化に寄与する食品開発には、開発食品の競争優位性が求められる。他との差別化を図るためには、独自の製造技術、知財などの法的保護、ブランド等が必要となるが、独自の微生物を食品開発へ用いることもその手段となり得る。

本研究では、地域特産品開発を目的に、特徴を有する酵母の分離を検討した。本学と同じ地区内には、岡山県を代表する文化的資産である犬養毅の生家並びに犬養木堂記念館があり、この生家、記念館周辺の花、葉、果実、樹皮などの植物試料を採取し酵母の分離を試みた。その結果、食品開発への応用が期待される酵母が取得できたので報告する。

II. 実 験 方 法

1. 使用培地および菌株

集積培養には、YPD培地（酵母エキス1%、ポリペプトン2%、グルコース2%、クロラムフェニコール100 μg/ml）を用い、流動パラフィンを重ねて培養した。糖の発酵性試験は、基本培地（(NH₄)₂SO₄ 0.5%、KH₂PO₄ 0.1%、MgSO₄·7H₂O 0.05%、CaCl₂·2H₂O 0.01%、NaCl 0.01%）に糖（グルコース、シュクロース、マルトース）を0.5%添加した培地を用い、ダーラム管によりガス生成の有無を観察した。胞子形成にはMaClaryらの培地（酢酸ナトリウム 0.82%、酵母エキス 0.25%、グルコース 0.1%、塩化カリウム 0.05%、硫酸マグネシ

ウム 0.0029M) を用いた。アルコール耐性は、エタノールを 5%, 8%, 12%, 16%濃度に調製しダーラム管を入れたYPD培地でのガス生成で判定した。平板培地には寒天を 2%添加した。

2. 試料のサンプリング

犬養木堂生家(岡山市北区庭瀬)において、植物の採取を異なる4通りの季節(1回目 春・4月(気温15°C), 2回目初夏・5月(気温21°C), 3回目 夏・7月(気温30°C), 4回目 秋・11月(気温16°C))に実施した。

採取植物として、ハナノキ、ヤハズエンドウ、キュウリグサ、ツバキ、セイヨウタンポポ、トキワハゼ、ソメイヨシノ、ドクダミ、ツルニチニチソウ、シダレモミジ、イロハモミジ、アメリカフウロ、アカバナユウゲショウ、クスノキ、柿の木の花、葉果実、樹皮など計88試料^{7, 8)}を採取した。

3. 酵母の分離

採取した試料をYPD培地へ加え、さらに流動パラフィンを重層し、25°Cで2週間静置培養した。この培養液0.1mlをYPD平板培地に塗抹し、アネロパック・ケンキ(三菱ガス化学製)を使用した嫌気的条件下で再び培養した後、コロニーの形態より酵母と推察される菌株を釣菌した。

さらに、グルコース、シュクロース、マルトースを糖源とした発酵性、ならびにアルコールを含む培地での糖の発酵性を有する菌株を分離した。

4. 酵母の同定試験

分離した酵母の同定は、シスメックス・ビオメリユー(株)製培養同定・真菌キット(API20C AUX)ならびに26S rDNA-D1/D2塩基配列の解析により行った。なお塩基配列解析は(株)テクノスルガ・ラボに委託した。

III. 実 験 結 果

1. 酵母の分離

採取試料を集積培養し、1回目の15試料のうち、1つの試料(椿)から酵母を2株分離した。しかし2株とも発酵性は無かった。

2回目の18試料のうち、8試料(アメリカフウロ、アカバナユウゲショウ、タンポポ等)から酵母と推定される株を41株分離した。このうち発酵性を有するものは4株あったが、いずれも糸状性であった。

3回目の17試料のうち、11試料(クスノキ樹皮、柿木樹皮、コケ等)から酵母と推定される株を33株分離した。このうち発酵性を有するものは10株で、いずれも酵母状の形態であった(表1)。

4回目の38試料のうち、20試料(竹の皮、コケ、ハナノキ、柿の実、コブシ、サザンカ、アジサイ、アサギリ、アオキ、シャシヤンボ、ナンテン、イチョウ、ヒメジョオン、アラカシ、シダレモミジ、マンリョウ等)から酵母と推定される株を50株分離した。このうち発酵性を有するものは3株で、いずれも酵母状の形態であった(表2)。

表1 3回目のサンプリング結果

分離源	分離株	発酵性株	形態	株名
クスノキ1樹皮	1	1	酵母	3-2
コケ	3	3	酵母	9-1, 9-2, 9-3
柿木樹皮	1	1	酵母	12-3
クスノキ2樹皮	3	3	酵母	13-1, 13-2, 13-3
地衣類	2	2	酵母	15-1, 15-2
その他	23	0		
合計	33	10		

表2 4回目のサンプリング結果

分離源	分離株	発酵性株	形態	株名
竹の皮	1	1	酵母	2-1-5
コケ	2	2	酵母	19-3-1, 19-3-2
合計	3	3		

2. 分離株の発酵性

スクリーニングの結果分離された計13株について、0~16%エタノール溶液中での、生育性、発酵性を検討した。その結果、2-1-5株のみ16%の高濃度エタノール環境下で発酵性を示し、また生育も可能であった。他の分離株については、いずれも12%以上のエタノール濃度環境下では、発酵も生育も認められなかった(表3)。以上の結果より、食品開発への応用等、実用性が期待できる酵母として、2-1-5株を分離した。

表3 分離株のアルコール溶液中での発酵性

分離株	エタノール濃度				
	0%	5%	8%	12%	16%
3-2	+	+	-	-	-
9-1	+	+	+	-	-
9-2	+	+	+	-	-
9-3	+	+	-	-	-
12-3	+	+	-	-	-
13-1	+	+	+	-	-
13-2	+	+	+	-	-
13-3	+	+	+	-	-
15-1	+	+	+	-	-
15-2	+	+	+	-	-
2-1-5	+	+	+	+	+
19-3-1	+	-	-	-	-
19-3-2	+	-	-	-	-

(発酵性有/無 : +/-)

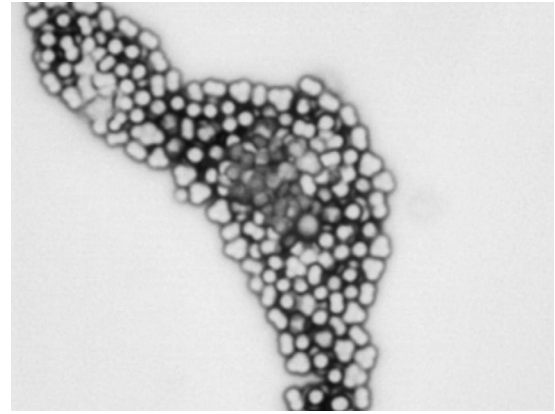


写真2 2-1-5株の胞子形成

3. 分離株の性状

分離した2-1-5株の形態観察を行った。顕微鏡観察の結果、2-1-5株は円形～楕円形（長径×短径：7.1×5.7 μm）の形態で、出芽増殖が認められた（写真1）。またYPD平板培地上でのコロニーはクリーム色で、表面が平滑でバター様の光沢があった。また、胞子形成培地で培養した結果、酵母細胞内に最大4個の子嚢胞子が形成された（写真2）。

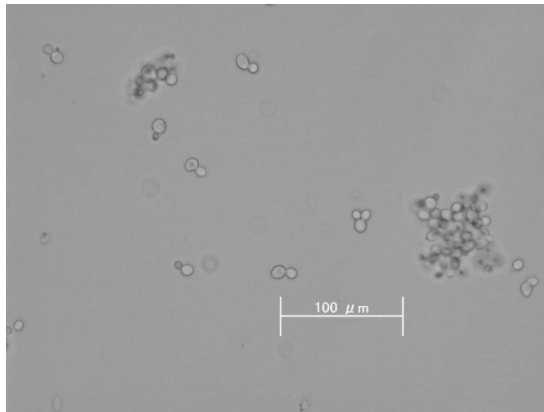


写真1 2-1-5株の顕微鏡写真

4. 酵母の同定結果

最終的に分離した2-1-5株について、糖源別の生育性の検討を行った（表4）。また、この酵母のマンニトール培地での生育を検討した結果、2-1-5株は生育しなかった。なお生育の有無は、目視により判別した。

さらに、2-1-5株の26S rDNA-D1/D2塩基配列の国際塩基配列データベース（DDBJ/ENA/EMBL）/GenBank）に対するBLAST相同性検索の結果、*S. cerevisiae*の塩基配列と相同率100%の相同性を示した。

以上の結果から、分離した2-1-5株を*S. cerevisiae*と同定した。

表4 2-1-5株の糖別の生育性

2-1-5株	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR
	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
2-1-5株	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	
	+	-	-	-	+	+	+	-	+	

(29°C・72時間培養後の生育の有/無 : +/-)

GLU	ブドウ糖	GLY	グリセリン	2KG	2-ケト-D-グルコン酸カルシウム
ARA	L-アラビノース	XYL	D-キシロース	ADO	アドニット
XLT	キシリトール	GAL	ガラクトース(無水)	INO	イノシット
SOR	D-ソルビトール	MDG	メチル-D-グルコシド	NAG	N-アセチル-D-グルコサミン
CEL	D-セロビオース	LAC	乳糖	MAL	マルトース
SAC	白糖	TRE	D-トレハロース	MLZ	D-メレチトース
RAF	D-ラフィノース				

IV. 考 察

自然界には多種多様な微生物が存在し、生態系が形成されている。そのうち有用な性状を有する微生物は、食品、医薬品、農薬、アルコール、プラスチック等へ利用されている。その内酵母は、単細胞の真核微生物でありアルコール発酵をすることから、多くの種類の酵母が実用的に利用されている。特に、*S. cerevisiae*はその強い発酵力、アルコール耐性、生育能から、アルコール飲料や製パンなど多種多様な食品に活用され、それらに用いられる酵母は、清酒酵母、パン酵母などの名称で利用されている。近年は自然界から*S. cerevisiae*を始めとする有益な酵母を分離し³⁻⁶⁾、それを用いた食品開発も試みられている。

本研究では、岡山県を代表する文化的資産である犬養木堂生家から、地域特産品の開発へ応用できる有用な酵母の分離を検討した。試料の採取は4回試みたが、特に気温が高い時季に分離できる確率が高いと思われた。また採取試料としては、花や果実よりも水分を含んだ樹皮から、食品開発への応用が期待される酵母が分離された^{2, 6)}。

分離した2-1-5株は、YPD平板培地上でクリーム色の平滑なコロニーを形成し、細胞は卵型で出芽増殖し、孢子形成培地や培地が3週間経過した平板培地上で、細胞内に丸型で平滑な孢子が最大4個形成されていることを確認した。液体培地での皮膜形成は認められなかった。これらの特徴から、*Saccharomyces*属の酵母であると推測された。

さらに糖の資化性の結果より、グルコース、グリセロール、メチル-D-グルコシド、マルトース、ショ糖、トレハロース、ラフィノースを基質とする生育が認められたが、その他の糖については生育が認められず、特にセロビオースについては生育が認められなかった。この結果より、2-1-5株は*S. cerevisiae*や*Candida tropicalis*等の可能性が推測された。さらに、マンニトールを基質とする培地での生育が認められなかったことから、2-1-5株を*S. cerevisiae*と推定した^{9, 10)}。

また、国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/EMBL)/GenBank) に対するBLAST検索の結果、26S rDNA-D1/D2塩基配列は、*S. cerevisiae* (KG518189)や*S. cerevisiae*

NRRLY-12632 (U44806)を始めとする*S. cerevisiae*の基準株と100%の相同率 (572/572) であった。また、塩基配列を基に解析した分子系統樹において、2-1-5株は*Saccharomyces*属で構成されるクラスター内に含まれ、*S. cerevisiae* NRRL Y-12632 (U44806)とのブートストラップ値は100であり、同一の系統枝を示した。以上の結果から、竹の皮から分離した2-1-5株を、*S. cerevisiae*と同定した。

*S. cerevisiae*はその発酵性から、日本酒、ワイン、ビールなどのアルコール飲料、パン製造、エタノール生産など多くの分野で工業的に利用されている。近年この*S. cerevisiae*を自然界から分離し、この酵母を用いて地域特産品の開発へ応用している例が見られる²⁾。

今回分離した2-1-5株も地域的なブランドとなり得る酵母であり、今後さらにその特性を検討し、地域特産品開発への応用を試みてゆきたい。

V. 要 約

岡山県を代表する文化的資産である犬養木堂生家の周辺の自然界から、発酵性を有する酵母の分離を試みた。その結果、88試料のうち7試料から、形態が酵母状ならびに糖の発酵性を有する酵母が13株分離された。

選別された13株について、0~16%エタノール溶液中での生育性、発酵性を検討した結果、2-1-5株を実用性が期待できる酵母として分離した。

最終的に分離した2-1-5株について、形態の顕微鏡観察、コロニーの性状、孢子形成の有無、糖源別の生育性、26S rDNA-D1/D2塩基配列の解析により、2-1-5株を*S. cerevisiae*と同定した。

VI. 謝 辞

本研究を行うにあたり、ご協力頂いた犬養木堂記念館、財団法人岡山県郷土文化財団の皆様へ感謝致します。

付 記

本研究は、以下の学生諸氏による卒業研究の一環として実施された内容を纏めたものである。氏名を記載し、

感謝に代えます。

平成28年度 小林愛, 新舎怜奈, 武井秀弥, 森菜穂

平成29年度 奥田千尋, 谷口佳奈, 鳥取美鈴, 檜崎青奈,
野澤尚平, 林綾夏, 福岡彩香, 和田昌世

参 考 文 献

- 1) 数岡孝幸, 水田健太郎, 上原莉奈, 他: 温州ミカンの花から分離した酵母の同定と清酒醸造特性, 東京農大農学集報57 (2), 79-85 (2012)
- 2) 殿内暁夫, 森山裕理子, 青山嘉宏, 土岐春歌: 白神山地从り分離した酵母*Saccharomyces cerevisiae*の利用, 醸協 111(7), 437-444 (2016)
- 3) 山本歩: 清酒醸造用野生酵母の桜花からの単離, 八戸工業高等専門学校紀要 第45号, 45-47 (2010, 12)
- 4) 西尾昭: スイカの花から分離した発酵性酵母の性質, 鳥取県産業技術センター研究報告 No. 13, 31-33 (2010)
- 5) 鎌倉未貴ら: スダチ花卉から分離した野生酵母*Hanseniaspora meyeri*の製パンへの応用, 四国大学紀要 (B), 34, 37-46 (2012)
- 6) 藤野舜一, 川邊久之, 小室真保: 出羽三山植物体からのアルコール発酵能を有する野生酵母の単離, 醸協 111(11), 743-749 (2016)
- 7) 奥田重俊, 武田良平: フィールド図鑑 人里の植物, p. 14, 120 (1985), 東海大学出版会, 東京
- 8) 奥田重俊, 武田良平: フィールド図鑑 低地の森林植物, p. 160 (1985), 東海大学出版会, 東京
- 9) C. H. コリンズ, パトリシアM. ライン, J. M. グランジ, J. O. ファルキンハムⅢ: コリンズとラインの微生物学実験法[第8版], pp. 747-750 (2013), 緑風出版, 東京
- 10) Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. : The Yeast, a taxonomic study, 5th edition (2011), Elsevier, Amsterdam

