

アルコール発酵をしない酵母の検索①
～スクリーニング方法の開発

山口仁孝・小松千紜

美作大学・美作大学短期大学部紀要（通巻第67号抜刷）

アルコール発酵をしない酵母の検索① ～スクリーニング方法の開発

Investigation of an Yeast Species That Does Not Undergo Alcoholic Fermentation ①-Development of a Screening Method

山口 仁孝¹⁾†・小松 千紘²⁾

キーワード：アルコール発酵、天然酵母

はじめに

近年では、自然志向の高まりから、天然酵母に高い関心が示されており、天然酵母を利用した発酵食品の販売数も増加傾向にある。様々な地域で自然界から発酵能力が高い有用な天然酵母が採取・分離され、新規に分離した天然酵母を利用したパンや日本酒、ワインなどの食品・飲料は、独特の風味や深い味わいがあり、各地域によって特産品として開発に力が入れている^{1), 2), 3), 4)}。

特にアルコール飲料については、近年の低アルコール・ノンアルコール飲料の需要の高まりに伴い、各メーカーで様々な製法を駆使して製造されている。すなわち、酵母そのものが嫌気性アルコール発酵をする特性と相反する性質が求められることから、風味や味わいを損なわずアルコールを産生しない酵母の育種・分離が精力的に試みられている。

発酵能力が高く独特の風味や味わいを呈し、しかもアルコール発酵を行わない新規有用酵母の探索には、多くの手間と時間がかかり、効率よく有用酵母を分離するスクリーニング法は確立されていない。

そこで、今回我々は植物、特に糖分を多く含む花き類を主な対象とし、高い発酵能力を有する酵母を採取するとともに、アルコール発酵をしない酵母のスク

リーニング法の開発について若干の考察を行ったので報告する。

材料と方法

1. 酵母対照株

2種類の市販ドライイースト（Quick-Rize、Traditional：Fleischmann's®）および（独）製品評価技術基盤機構（nite）より、酵母標準株（*Saccharomyces cerevisiae* NBRC No.0555）を購入し、使用した。

2. 酵母サンプリング

滅菌綿棒（ γ 滅菌木軸綿棒：栄研化学）を用いて、花き類を中心に、植物・土壌などを採取し、15ml滅菌チューブ（188261：greiner BIO-ONE）に入れ培地塗抹まで冷蔵保管（4℃）した。

3. 酵母菌の分離・培養

滅菌綿棒からの酵母菌分離はポテトデキストロース寒天培地（05709：日水製薬）、液体培地としてYPD Broth（242820：Difco）を用いた。

4. スクリーニング方法の検討

1) 炭酸ガス産生性試験（フェノールフタレイン法）

酵母の発酵に伴い産生される炭酸ガスに着目し（図1）、産生される炭酸ガスにCa(OH)₂を反応させることで検出する方法を模索し、フェノールフタレイン法を改良した方法を検討した。

Ca(OH)₂水溶液は強アルカリ性であることから、

†責任著者

¹⁾ 美作大学生生活科学部食物学科

²⁾ 学生

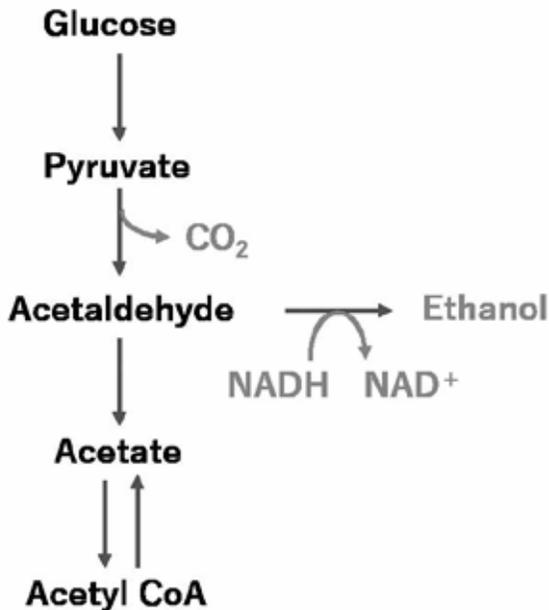


図1 アルコール発酵の概略図

Ca(OH)₂水溶液は炭酸ガスと反応し、水酸イオンが減少するとpHが急激に下がる。そこで、pH指示色素（フェノールフタレイン）を添加したCa(OH)₂溶液を染み込ませたろ紙を作成し、YPD液体培地で2種類のドライイーストを培養後、試験管口にろ紙を接触させ、炭酸ガスの発生を色の変化として観察した。

中試験管にYPD液体培地10mlを作成し、2種類のドライイースト（Quick-Rize、Traditional：Fleischmann's®）から分離したコロニー1白金耳をそれぞれ25°C24時間培養した。培養後フェノールフタレイン添加Ca(OH)₂水溶液を染み込ませたろ紙を試験管口につけ、5分間静置し、色の変化を観察した。pH指示色素はフェノールフタレイン溶液（フェノールフタレイン0.1gにエタノール90mlを入れ溶かした後、純水を加えて100mlとしたもの）5mlと純水10mlを混合したものを使用した。また、中試験管にダーラム管を入れたYPD液体培地10mlを作成し、2種類のドライイースト（Quick-Rize、Traditional：Fleischmann's®）から分離したコロニー1白金耳をそれぞれ25°Cで培養し、3、6、9、12、18、24時間後にダーラム管に溜まったガスの産生量を確認すると

同時に、フェノールフタレイン添加Ca(OH)₂水溶液を染み込ませたろ紙を試験管口につけ、5分間静置し、色の変化を観察した。

なお、2種類のドライイースト（Quick-Rize、Traditional：Fleischmann's®）から分離したコロニー1白金耳は、純水9mlにドライイースト1gを加え混合後、ポテトデキストロース寒天培地に塗抹して25°C48hrs培養後、コロニーをピックアップして純培養を行ったものを使用した。

2) アルコール生成試験

市販キット（Ethanol Assay Kit, QuantiChrom（DIET-500）、Saccharide Removal Kit（DSRK-500）：funakoshi）を用いた方法を検討した。

結果

1. 酵母サンプル

花きや果物、土壌などから228サンプルを採取し、一部から酵母の分離を行った。

2. スクリーニング方法の検討

1) 炭酸ガス産生性試験（フェノールフタレイン法）

YPD液体培地にて2種類のドライイースト（Quick-Rize、Traditional：Fleischmann's®）を25°C24hrs培養した結果、両培地内のダーラム管に気泡が確認された。そして、フェノールフタレイン添加Ca(OH)₂水溶液を染み込ませたろ紙を試験管口につけ、5分間静置し、色の変化を観察したところ、ドライイーストを培養した培地で明瞭な色の変化を確認する事ができた。（図3）

中試験管にダーラム管を入れたYPD液体培地にて2種類のドライイーストを培養し確認した結果、3、6、9時間後では気泡が確認されなかったが、12時間後から両培地のダーラム管に少量の気泡が確認され、24時間後ではダーラム管全体で気泡が確認された（図4）。一方、フェノールフタレイン添加Ca(OH)₂水溶液を染み込ませたろ紙の色の変化も3、6、9時間培養後のサンプルでは確認されず、12時間後から明瞭に観察された。（図5）

多検体のスクリーニングのため24 well plate での

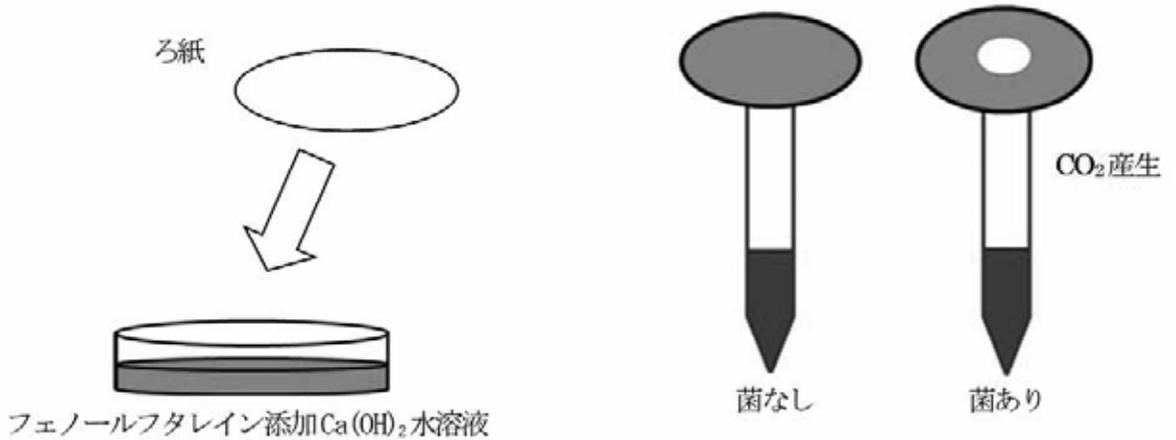


図2 フェノールフタレイン法

応用を試み、標準株1株、市販株2株、サンプル5株を試験的にスクリーニングした結果、中試験管での実験と同様に、12時間後で明瞭に判定することができ、キバナコスモス、腐敗した浅漬け汁より、有用酵母候補を分離することができた(図6)。

2) アルコール生成試験

今回は、市販キット(Ethanol Assay Kit, QuantiChrom(DIET-500)、Saccharide Removal Kit(DSRK-500):funakoshi)を用いた、アルコール産生性スクリーニング試験については実施に至らなかった。

考察

1. スクリーニング法の検討

○フェノールフタレイン法

YPD液体培地にて2種類のドライイースト(Quick-Rize、Traditional:Fleischmann's®)を24時間25°C培養し、フェノールフタレイン添加Ca(OH)₂水溶液を浸み込ませたろ紙を試験管口につけ、5分間静置した結果、ドライイースト培養した培地で明瞭な色の変化を確認する事ができた。このことから酵母が発酵によって炭酸ガスを生成し、その炭酸ガスとCa(OH)₂が反応し、CaCO₃を生成したため、pHが下がり色が変わったと考えられる。

また、中試験管にダーラム管を入れたYPD液体培地にて培養後、12時間後から両培地のダーラム管にご

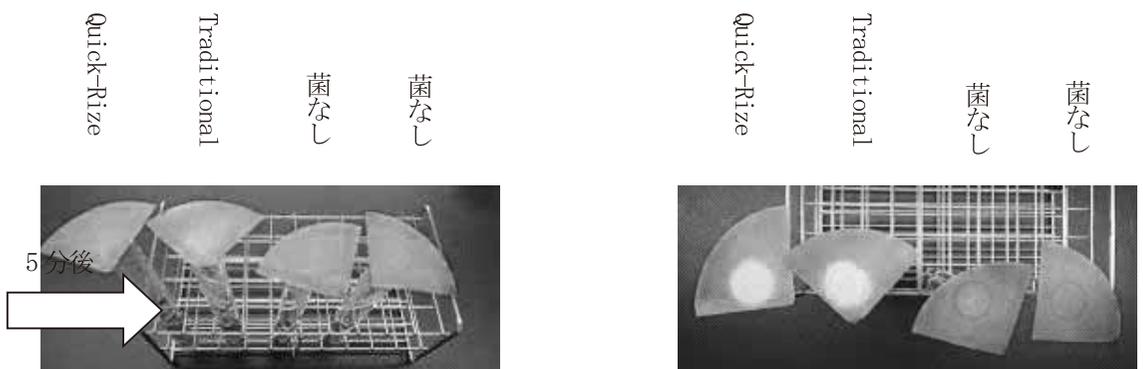


図3 24時間25°C培養後の色の变化

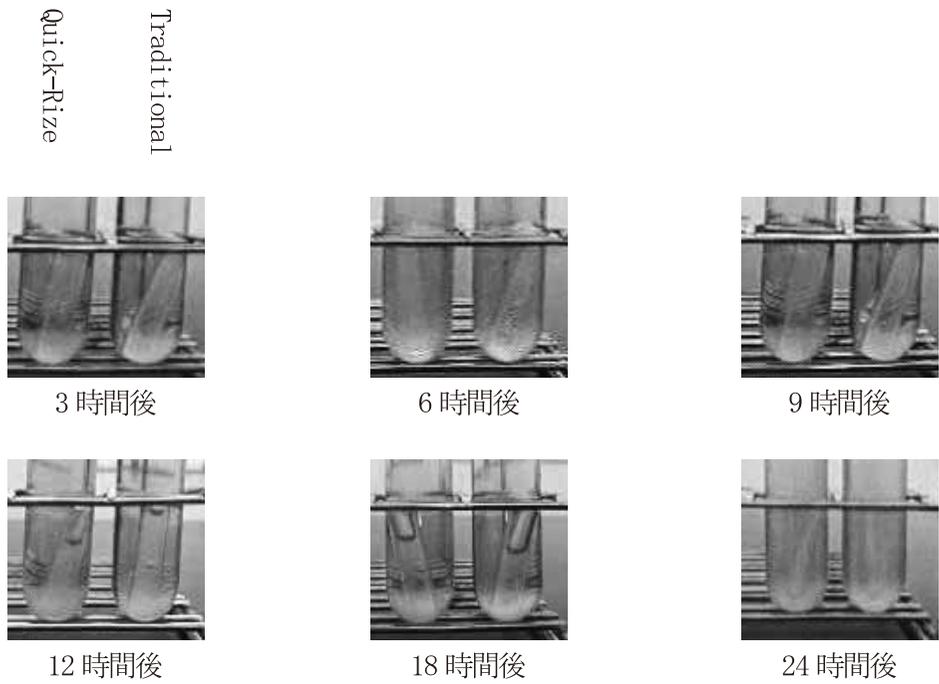


図4 ダーラム管入りYPD液体培地培養後の気泡の違い

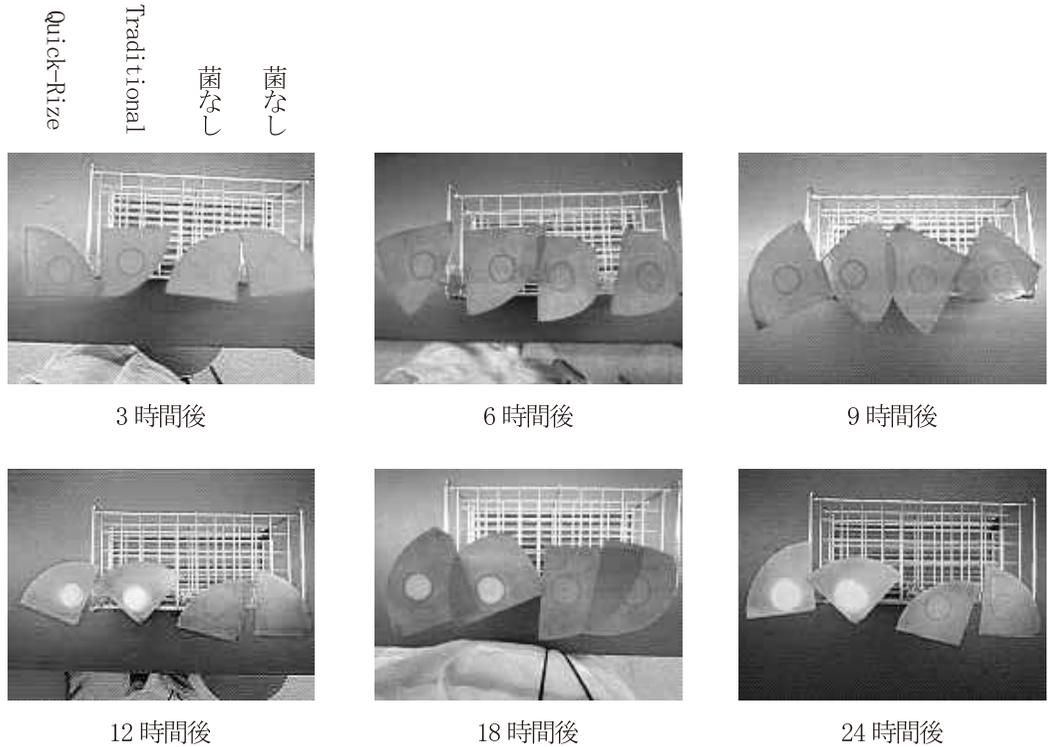


図5 フェノールフタレイン添加Ca(OH)₂水溶液を浸み込ませたろ紙の色の变化

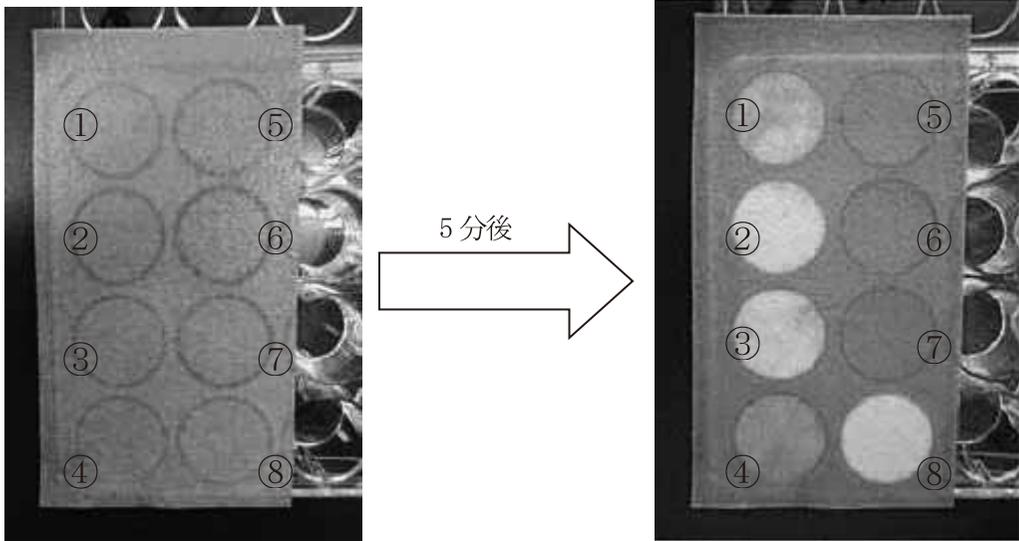


図6 24 well plateでのスクリーニング結果

NO.	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
由来	標準株	Tradi- tional	Quick -RIze	キバナ コスモス	ヨウシュ ヤマゴボウ	オオムラサキ シキブ	マルバル コウ	腐敗した 浅漬け汁
色の 変化	+	++	++	+	-	-	-	++

く少量の気泡が確認され、フェノールフタレイン添加 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 水溶液を浸み込ませたろ紙の色の变化も12時間後から明瞭に観察されたことから、試験管内にごく微量でも炭酸ガスの発生があれば、色の变化として明瞭に判断できると推察された。

さらに、今回酵母の培養温度は25℃に設定したため、25℃での培養温度では12時間後から明瞭にスクリーニング結果を判断できることが判明した。

また、多検体処理を考慮した24 well plateでの応用を試みた結果、中試験管での実験と同様に、12時間後に明瞭に判定することができるようになったことから、本スクリーニング法では、25℃12時間培養で酵母の発酵による炭酸ガスの発生の有無について判定することができると判断した。

○アルコール生成試験

今回はキットを使ったアルコールの検出については実施できなかった。今後確認をする予定である。

2. 天然酵母のスクリーニング

花きを中心に228サンプルを採取し、一部についてスクリーニング試験用に分離を試みた結果、腐敗した浅漬け汁及びキバナコスモスより有用酵母候補を分離することができた。

アルコール非発酵性とアセトアルデヒド耐性、醤油香気成分であるHEMF産生性との関連が報告されており、高塩濃度下など浸透圧負荷がかかる状況でアセトアルデヒドをアルコール発酵せずに効率よく酢酸、アセチルCoAへと変換する系が発達するとの報告がある^{5), 6), 7), 8)}ことから、そのような環境下でのサンプリング、選択培養方法の検討も必要であると考えられた。

また、今回はアルコール発酵に係る酵素遺伝子の発現等については検討していないが、組み換え体を用いた文献も多く報告されていることから、遺伝子の発現解析等についても鋭意検討していきたい。

まとめ

本研究により、アルコール非発酵性天然酵母の探索に有用なスクリーニング方法として、YPD液体培地を用いてのCa(OH)₂量の変化を検出する方法（フェノールフタレイン法）を確立した。確立したスクリーニング法を用いて、自然界から採取した花き類より酵母のスクリーニングを行った結果、高発酵能を有する新規有用酵母のスクリーニング法としての有用性を確認した。今後は採取したサンプルのスクリーニングを行い、アルコール発酵性について更なる調査を行いたい。

参考文献

- 1) 富永達也、奥澤洋平：分子生物学的手法を用いた新規酵母の開発. 埼玉県産業技術総合センター報告第1巻（2003）
- 2) 鶴藪大、富永達也、仲島日出男、横堀正敏：有用機能性酵母の探索と利用. 埼玉県産業技術総合センター報告第3巻（2005）
- 3) 横堀正敏、鶴藪大、渡辺泰成、増田こずえ、橋本麻里：微生物利用技術に関する研究（2）－新規酵母の分離と食品への応用－. 埼玉県産業技術総合センター研究報告第4巻（2006）
- 4) 柏木亨：桜の花から分離した酵母による清酒の商品化. 日本醸造協会誌. 97巻1号（2002）
- 5) 上原健二ほか：酵母のHEMF生産におけるアセトアルデヒドの役割. 日本醸造協会誌110巻12号.p. 840-848（2015）
- 6) 中川智行：出芽酵母のアセトアルデヒドに対する細胞応答と耐性機構. 日本醸造協会誌. 107巻9号.p. 632-637（2012）
- 7) 河村大造ほか：アルコール発酵酵母の育種. J. Brew. Soc. Japan.Vol.91, No.10, p.753-756（1996）
- 8) 後藤（山本）奈美ほか：酵母の酢酸代謝酵素遺伝子の破壊及び高発現がアルコール発酵中の酢酸生成に及ぼす影響. J. Brew. Soc. Japan. Vol.101, No.12, p.949-956（2006）