

優れた発酵特性を有する酵母の探索

安藤 聡・中村 敏英

農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

[〒305-8642 つくば市観音台 2-1-12]

Isolation of yeasts having superior fermentation characteristics

Akira ANDO and Toshihide NAKAMURA

National Food Research Institute,

National Agriculture and Food Research Organization

1. 目的

酵母は古くから発酵食品の製造に利用され、酒やパンなどを中心に高い発酵能を有する酵母が選抜されてきた。我々の研究室では、パン生地発酵に必須なパン酵母を対象として研究を行ってきた。パン酵母製品の生産や製パンの過程において、パン酵母は乾燥や冷凍、高濃度ショ糖等といった様々なストレスに曝されることから、パン酵母には優れたストレス耐性が必要とされる。そこで、本研究では優れたストレス耐性を有するパン酵母株の取得を目的として、酵母菌株の収集および育種を行い、得られた株の発酵特性を評価した。

また、酵母によるアルコール発酵を利用して、工業的に糖蜜等からのエタノール生産も行われている。近年、環境保護の観点からバイオエタノールのような化石燃料の代換燃料が注目されている。バイオエタノールは農作物の未利用部分や廃木材などのバイオマスから製造されるエタノールで、環境負荷の少ないエネルギーとして重要である。稲わらのようなリグノセルロース系バイオマスにはグルコースのような六炭糖の他にキシロースのような五炭糖も含まれている。リグノセルロース系バイオマスからのエタノール生産においては、すべての糖からエタノールを生産することが高効率化、低コスト化に重要である。しかしながら、五炭糖からエタノールを生産できる酵母はごく僅かな種のみが知られている現状である。そこで既存株よりも五炭糖発酵性の高い酵母の分離を目的として本研究を行った。

2. 材料および方法

1) パン酵母の分離と特性解析

(1) パン酵母株の分離

発酵食品等の分離源を生理食塩水に懸濁後、100 µg/ml クロラムフェニコールを含む YPD 寒天培

地（1%イーストエキス，2%ペプトン，2%グルコース，2%寒天）上に接種した。30℃で2日間培養した後，酵母様のコロニーをYPD寒天培地に植継ぎ保存菌株とした。コロニーの生育が観察されない場合には，分離源試料を100 µg/ml クロラムフェニコールを含むYPD液体培地に懸濁し，30℃で2～7日間培養した後，100 µg/ml クロラムフェニコールを含むYPD寒天培地に接種した。

(2) 種の同定

Nardiらの報告（2006）に基づき，PCRを用いて *Saccharomyces sensu stricto* か否かの判別を行った。PCRには，*Saccharomyces sensu stricto* を特異的に認識するオリゴヌクレオチドプライマー SAC26F（5'-GAGAGGGCAACTTTGGGRCCGT-3'）および SAC26R（5'-ACCATTATGCCAGCATCCTTGACTTAC-3'）に加え，広範な酵母を認識するオリゴヌクレオチドプライマーSAC18F（5'-CTGCGAATGGCTCATTAAATCAG-3'）および SAC18R（5'-CCCTAACTTTCGTTCTTGATTAATG-3'）を用いた。酵母コロニーよりDNAを抽出し，これを鋳型として上記プライマーを用いた多重PCRを行った。両方のプライマー対に由来する増幅が認められた株を *Saccharomyces sensu stricto* と同定した。

さらに，Martorellら（2005）の報告に基づく *Saccharomyces cerevisiae* 特異的プライマー SC1d（5'-ACATATGAAGTATGTTTCTATATAACGGGTG-3'）および SC1r（5'-TGGTGCTGGTGCGGATCTA-3'）を用いてPCR増幅を行った。*Saccharomyces sensu stricto* と同定された株の内，これらプライマー対での増幅が見られる株を *S. cerevisiae* と同定した。

(3) 発酵特性解析

実用パン酵母由来株MAFF 113347を対照菌株として，等量のYPD培地を用いて培養した菌体を用い，製パン関連の各種発酵能を比較した。発酵開始180分後における対照菌株の総ガス発生量に対する供試菌株の総ガス発生量の比を発酵力とした。低糖，高糖生地として，各々5%，50%のショ糖を含有する液発酵培地（Tanaka et al., 2006）を用い，ファーモグラフSS（アトー社）を用いて発酵過程におけるガス発生量を測定した。冷凍耐性の比較には低糖生地を用いた。120分間の前発酵の後，-25℃で3日間冷凍保存後，30℃で15分間解凍してガス発生量を測定した。発酵開始180分後における対照菌株の総ガス発生量に対する供試菌株の総ガス発生量の比を冷凍耐性とした。

2) キシロース発酵性酵母の分離と特性解析

(1) キシロース発酵性酵母の分離

茨城県内で採取した土壌サンプルをキシロース培地（クロラムフェニコール含有）に懸濁し，25℃で2日間培養した。培養後，適宜希釈を行いキシロース寒天培地（2%キシロース，0.67%イーストニトログンベースを含有）に塗布した。キシロース発酵性は2%キシロースを含む培地で培養し，24時間後にエタノール濃度を測定することで判定した。

(2) キシロースからのエタノール生産性

7%キシロースを含む培地45 mlに前培養液5 mlを添加して30℃で培養し，24時間後および48時間後にエタノール濃度および残存するキシロース濃度を測定した。

(3) 同定

2 ml の YPD で一晩培養し、Gen とるくん（酵母用）（TaKaRa）を用いてゲノム DNA の抽出を行った。得られた DNA について、NL1 および NL4 プライマー（Kurtzman & Robnett, 1998）を用いて PCR 法により 26S rDNA の部分配列（D1/D2 領域）を増幅し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。得られた塩基配列を基に種の同定を行った。

3. 結果

1) パン酵母の分離と特性解析

(1) パン酵母株の分離および同定

約 30 種類の発酵食品等を分離源として、60 以上の酵母様菌株を取得した。これらの内、YPD 寒天培地上および YPD 液体培地中での生育が旺盛で、優れた発酵能を有することが予想される株について、PCR に基づく種の同定を試みた。その結果、表 1 に記した 5 株が *S. cerevisiae* であることが明らかとなった。優れた発酵特性を有するパン酵母は *S. cerevisiae* に分類されることが知られていることから、*S. cerevisiae* と同定された 5 株を解析対象として、以降の詳細な解析を行った。

(2) 発酵特性解析

実用パン酵母由来株 MAFF 113347 を対照菌株として、上記 5 株の分離株における製パン関連の各種発酵特性を解析した。表 1 に MAFF 113347 に対する相対的な発酵力および冷凍耐性を示した。大根の糠漬けおよび乾燥ナシより分離された 2 株は、無糖生地の発酵力を有しなかったが、優れた高糖生地発酵力および冷凍耐性を示していた。

一方、パン生地の発酵種であるサワー種から分離された 3 株は、いずれも同一のサワー種から分離されたものである。いずれも、実用パン酵母由来株と比べて優れた発酵特性を示さなかった。特に無糖生地発酵力については、著しく低い値を示した。MAFF 113868 および 113869 の 2 株については、全ての発酵特性が極めて類似していたことから、同一の株に由来するものである可能性がある。

表 1. 分離株の発酵特性

MAFF 番号	無糖生地 発酵力	低糖生地 発酵力	高糖生地 発酵力	冷凍耐性	分離源
113866	0.00	0.33	1.32	2.33	大根糠漬け
113867	0.24	0.62	0.78	0.96	サワー種
113868	0.02	0.59	0.75	0.71	サワー種
113869	0.01	0.35	0.61	0.67	サワー種
113870	0.00	0.60	2.18	1.97	乾燥食品（ナシ）

2) キシロース発酵性酵母の分離と特性解析

(1) キシロース発酵性酵母の分離

茨城県内で採取した土壌サンプル 20 点からキシロース資化株を 40 株分離した。分離した株を

用いてキシロース発酵試験を行った結果、16 株がキシロースからエタノールを生産することが明らかとなった。キシロース発酵性酵母のうち、エタノール生産性が比較的高い 3 株 (JXF7 (MAFF 113879), JXF8 (MAFF 113880), JXF11 (MAFF 113881)) について、詳細に解析を行った。

(2) キシロースからのエタノール生産性

比較的高いキシロース発酵性を有する 3 株および比較対象としての *Pichia stipitis* NBRC 1687 株を用いてキシロースからのエタノール生産を経時的に調べた (図 1)。分離した 3 株はいずれも NBRC 1687 株よりもキシロースの利用やエタノール生産に優れていることが明らかとなった。

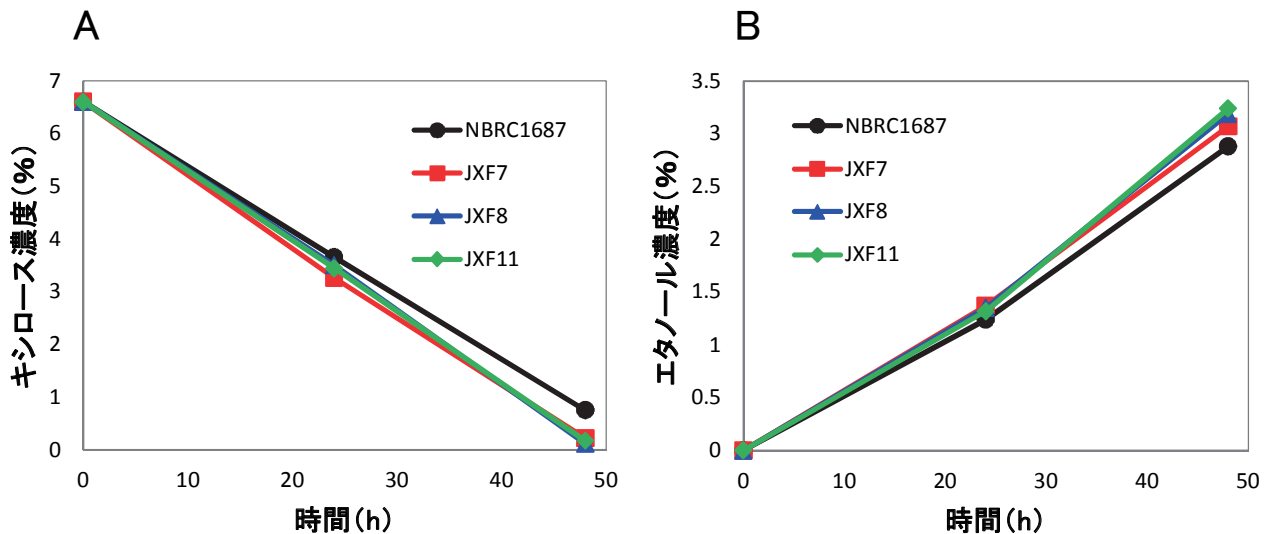


図 1. 新規分離株のキシロース消費とエタノール生産

A : 培地中に残存するキシロース濃度,

B : 培地中のエタノール濃度.

(3) 同定

キシロース発酵性株 3 株の種を同定するためにゲノム DNA を抽出し、得られた DNA を鋳型として PCR を行い、26S rDNA の D1/D2 領域を増幅・塩基配列の決定を行った。ホモロジー検索の結果、3 株とも *P. stipitis* に属することが明らかとなった。

4. 考察

1) パン酵母の分離と特性解析

大根の糠漬けおよび乾燥ナシより分離された 2 株は、無糖生地の発酵力を有しなかったことから、マルトース発酵能を欠いていると考えられる。しかしながら、両株は優れた高糖生地発酵力を示したことから、ショ糖による高浸透圧ストレスに対する高い耐性を有していると考えられる。分離源である糠漬けおよび乾燥果実には、それぞれ、高濃度の食塩および糖質が含まれることから、このような高浸透圧耐性酵母が分布していたものと思われる。また、両株は実用パン酵母由来株の約 2 倍の冷凍耐性を示していたが、これと高浸透圧耐性との関連性についてさらに解析を進めたい。

2) キシロース発酵性酵母の分離と特性解析

キシロースからのエタノール生産に優れた新規酵母株の分離を試みた結果、新種の酵母株を分離することはできなかったものの、同種である *P. stipitis* NBRC 1687 株よりもエタノール生産に優れた株を分離することができた。しかし、発酵能は産業利用には十分とは言えず、さらに発酵能の高い酵母株が必要である。既存の株や新たに分離した株を用いて変異育種等により発酵能やストレス耐性を強化することも視野に入れ、今後の課題としたい。

5. 謝辞

本研究を行うに当たり多大なご協力ご支援を賜った青森県産業技術センターの清野貴将氏，ならびに食品総合研究所・酵母ユニット特別研究員，渡邊樹氏および渡部貴志氏に厚く御礼申し上げます。

6. 参考文献

- Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:331-371.
- Martorell, P., Querol, A. and Fernandez-Espinar, M. T. (2005). Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 71:6823-6830.
- Nardi, T., Carlot, M., De Bortoli, E., Corich, V. and Giacomini, A. (2006). A rapid method for differentiating *Saccharomyces sensu stricto* strains from other yeast species in an enological environment. *FEMS Microbiol Lett.* 264:168-173.
- Tanaka, F., Ando, A., Nakamura, T., Takagi, H. and Shima, J. (2006). Functional genomic analysis of commercial baker's yeast during initial stages of model dough-fermentation. *Food Microbiol.* 23:717-728.

Summary

Yeasts were isolated from fermented foods and soils, and screened for ability to bread-dough fermentation and to xylose fermentation. Yeasts for dough fermentation, which were identified to be *Saccharomyces cerevisiae* by PCR using species-specific primers, were evaluated for fermentation ability in non-sugared dough, high-sugared dough, and after freeze-thaw. Yeasts for xylose fermentation were identified to be *Pichia stipitis* by 26S rDNA sequencing, and were evaluated for ethanol productivity using xylose as sole carbon source.