

徳島県産の花および果実からの有用酵母の分離

梶原瑞季、西堀尚良*
(平成 29 年 1 月 16 日受理)

Isolation of useful yeast from flowers and citrus fruits in Tokushima prefecture

Mizuki Kajihara and Naoyoshi Nishibori

Summary

New isolates of useful yeast are needed to give new characteristics to beer and sake. As the distribution of *Saccharomyces cerevisiae* is limited in nature and the report of successful isolations were only a few, though numbers of the attempts have been made.

Using enrichment culture technique using RE medium, isolation of useful yeast are made from three flowers (Strawberry, Sudachi, Lotus) and two citrus fruits (Yuzu, Yuzo). These are famous and local farm products in Tokushima prefecture. Two strains isolated from citrus yuzu peel revealed the almost same length of rDNA 5.8S-ITS region in PCR amplification to *Saccharomyces cerevisiae*. By a DNA sequence analysis, these two yeast are identified as *Tbrulaspora pretoriensis* which is used as baker's and wine yeast.

Key words: Tokushima prefecture, *Tbrulaspora pretoriensis*, 5.8S-ITS rDNA, Yuzu

地域の特産品としてビールや酒な醸造が行われるようになり、商品に特徴を与えることができる酵母の分離が求められるようになった。このため、花などを分離源とした多くの分離の試みが行われてきた。しかしながら、*Saccharomyces cerevisiae* の自然界での分布は極めて少なく、分離の成功例は極めて少ない。

RE 培地による集積培養を行う方法を用いて、徳島県の特産品であるイチゴ、すだち、レンコンの花、およびゆず、ゆこうの果実と葉から有用酵母の分離を試みた。その結果、rDNA 5.8S-ITS 領域の長さが *Saccharomyces cerevisiae* と類似した 2 株の酵母をゆず果皮から分離し、これらの株の rDNA 5.8S-ITS 領域の塩基配列を決定した。これら 2 株は、パンやワインの製造に使用される酵母である *Tbrulaspora pretoriensis* と塩基配列が 99% 一致したことから、ゆずからあらたに分離したこれら 2 株を *Tbrulaspora pretoriensis* と同定した。

キーワード 徳島県産酵母 *Tbrulaspora pretoriensis* 5.8S-ITS rDNA ゆず

*連絡責任者・別冊請求先

四国大学短期大学部 (771-1192 徳島市応神町古川 123-1)

Shikoku university junior college, Ojin Tokushima city, Tokushima 771-1192, Japan

緒言

酵母は様々な発酵食品の製造に不可欠な微生物であるが、生物学的な分類をあらわすものではなく、*Saccharomyces* 属の他 *Candida* 属、*Zygosaccharomyces* 属など多様な属にわたる生物種が含まれる。*Saccharomyces* 属には食品製造における重要な種が多く含まれており、*Saccharomyces cerevisiae* は代表的な種である。この種は、パン、日本酒、ビール、ワインなどの製造に用いられる産業微生物であり、目的に応じた性質を保有する株が選抜されてきた。例えば、日本酒酵母は発酵力や芳香などの優れた醸造特性を持つ *S. cerevisiae* であり、協会酵母として日本酒の醸造に使用されている。また、ビール酵母は、優れた発酵力、適度な凝集性を有する株が選抜されてきた結果、清酒もろみの発酵試験ではほとんどアルコールを産生しないが、マルトースおよびマルトリオースなどの資化性が高いことが知られている¹⁾。このような優良酵母は、製品の品質向上に大きく寄与してきたと言える。しかし近年、消費者の嗜好が多様化するに伴い、地域特産品としての日本酒や、地ビールの醸造を行うマイクロブルワリーが登場するようになった。このように、酒類の多様化を目指した取り組みが盛んになってきたことから、製品に好印象を付与できる花や果実を分離源とした新たな *S. cerevisiae* が求められている。しかしながら、自然環境中での *Saccharomyces* の存在は極めてわずかであり、多くの時間と労力が費やされているにもかかわらず、その分離は極めて困難であり分離成功例は極めて少ない。近年、RE 培地を用いた集積培養の後に酵母を分離することにより、比較的高効率に *Saccharomyces* 属酵母株を分離できることが報告された²⁻⁴⁾。そこで、RE 培地を用いて徳島県の特産品でもあるイチゴ、スダチの花、ハスの花、およびユズ、ユコウの果実と葉を分離源とした *Saccharomyces* 属酵母をはじめとする有用酵母の分離を試みた。

実験方法

1. 酵母分離に用いた培地と酵母の分離源

酵母の選択培養には RE 培地 (0.67% イーストニトロゲンベース、1% ラフィノース、0.05% クロラムフェニコール、8% エタノール) 2) を試験管に 3ml 分注して用い、純粋分離と

保存培養にはそれぞれ平板と斜面に調整した PDA 培地 (0.4% 馬鈴薯デンプン、2% グルコース、1.5% 寒天) を用いた。

酵母の分離源には、何れも徳島県内産のイチゴの花、スダチの花、ハスの花、およびユズ、ユコウの果実、葉を用いた。花と葉は直接、果実は予め滅菌した濾紙で表面をふき取り、ふき取った濾紙を RE 培地に加えた。試験管数の内訳は、イチゴの花 2 本、スダチの花 2 本、ハスの花 120 本、ユズ 30 本、ユコウ 30 本の計 184 本であった。30°C で 7 から 14 日間静置培養し、白濁または白色沈殿を生じた培養を酵母生育陽性と判断した。なお、ハスの花は全 120 本のうち 70 本は 30°C で、50 本は 22°C で培養した。RE 培地の陽性試験管から、PDA 寒天平板培地に一部を画線し 30°C で培養後、生じた酵母コロニーから 3 度繰り返して画線培養を行い酵母細胞の純粋分離を行った。

2. *Saccharomyces* 属酵母を基準とした分離酵母の選択

純粋分離分離した酵母の rDNA 5.8S-ITS 領域を PCR により増幅し、880bp の増幅長を示す株を *Saccharomyces* 属酵母の候補株として選択した。なお、対照として協会酵母 7 号株を用いた。酵母試験菌株を 10 μL の滅菌水に懸濁し 95°C で 10 分間加熱して得た菌液を鋳型 DNA とし、ITS-1 プライマー (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') および ITS-4 プライマー (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')⁵⁾ と Mighty Amp ポリメラーゼを混合し、PCR を行った。PCR の温度条件は、98°C 2 分の反応の後、40 サイクルの 98°C 10 秒、56°C 15 秒、68°C 1 分、最終伸長反応を 98°C 2 分とした。PCR 反応物は全量を 1.5% アガロースゲル電気泳動により分離して、100bp ラダーマーカーと比較して増幅塩基長を調べた。

3. 選択酵母の同定

rDNA 5.8S-ITS 領域が、協会酵母と同様およそ 880bp であった酵母株のリボゾーム領域を、ITS-1 および ITS-4 プライマーで増幅後、塩基配列を決定した。得られた DNA 断片の遺伝子配列と NCBI の塩基配列データをもとにホモロジー検索を行い、酵母株を同定した。

実験結果および考察

1. RE 培地を用いた集積培養

スダチの花を加えた RE 培地 2 本は何れも酵母陽性であり、これら 2 本の試験管から計 38 株の純粋分離株を得た。これら分離株の rDNA5.8S-ITS 領域を PCR で増幅し、電気泳動により増幅産物長を解析したところ、全ての株からほぼ 500bp の増幅産物が得られた (図 1)。rDNA5.8S-ITS 領域長は酵母の属あるいは種により異なることが報告されている。スダチから分離した酵母株が全て同様の増幅塩基長を示したことは、分離した酵母株が何れも同じ属あるいは種であることを示しており、RE 培地中で多様な酵母種が優占するのではなく、ほぼ単一の酵母のみが優占することを示している。したがって、*Saccharomyces* 属酵母の分離には、同一試験管から多くの株を分離するのではなく、多くの試験管からそれぞれ 1 株程度分離することが有効な方法であると考えられた。なお、イチゴの花を加えた 2 本の RE 培地からは酵母増殖陽性の試験管は得られなかった。

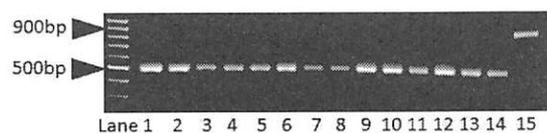


図1. スダチから分離した酵母の rDNA5.8S-ITS 領域長 (Lane 1-14: 分離酵母, Lane 15: *S. cerevisiae*)

以上のように RE 培地での培養試験管数を多くすることが *Saccharomyces* の分離に有効であると考えられた。そこで、ハスの花を加えた RE 培地 120 本、ユズおよびユコウの果実、葉をもとに、それぞれ 30 本の RE 培地で集積培養を行い、それぞれ 21 本、18 本、22 本、計 63 本の陽性試験管を得た。なお、ハスの花を加えた培地の陽性試験管は全て 30°C の培養で得られたもので、22°C の培養から酵母陽性試験管は得られなかった。*Saccharomyces* の分離を目的とした集積培養は一般的に 25~30°C で行われる。Sampaio らは、10°C で集積培養を行うことにより、*S. cerevisiae* の他、低温で増殖する *S. kudriavzeii* と *S. uvarum* を分離している⁴⁾。このように、集積培養の温度に依存した *Saccharomyces* が分離される例があるものの、本実験では 22°C で培養した 50 本の試験管から

陽性試験管は得られなかった。このことは、気温が高い自然環境から採取したハスの花への低温性酵母の付着が少なかった可能性を示している。

ハスの花を加えた RE 培地の陽性試験管のうち 10 本からそれぞれ 1 株の計 10 株を、また、ユズおよびユコウ由来の陽性試験管 1 本から 2 株を分離し、ユズ由来の 30 株とユコウ由来の 12 株を得た。純粋分離した酵母株は合計 52 株である。

2. rDNA の増幅

分離株の rDNA5.8S-ITS 領域を PCR で増幅したところ、ハスの花由来の酵母株では 400bp あるいは 600bp のバンドを示したが 880bp の株は得られなかった (図 2)。また、ユズ、ユコウ由来の酵母株の多くは同様に 400bp あるいは 600bp の増幅産物を示したが、ユズ果皮由来酵母の Z31, Z32 株 2 株から協会酵母 7 号とほぼ同様の長さの増幅産物が得られ、この 2 株を *Saccharomyces* 候補株とした (図 3)。

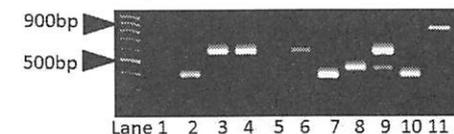


図2. はすの花から分離した酵母の rDNA5.8S-ITS 領域長 (Lane 1-10: 分離酵母, Lane 11: *S. cerevisiae*)

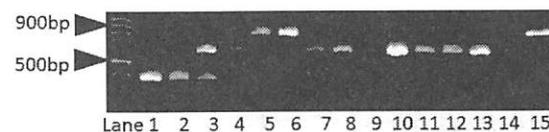


図1. ゆずから分離した酵母の rDNA5.8S-ITS 領域長 (Lane 1-14: 分離酵母, Lane 15: *S. cerevisiae*)

Sampaio らは、広葉樹の樹皮 147 試料から *S. cerevisiae* 15 株を含む *Saccharomyces* 属酵母を計 53 株分離している⁴⁾。また、Seingowski らは樹皮や土壌などの 84 試料から計 18 株の *S. cerevisiae* および *S. paradoxus* の分離を報告している³⁾。これらの報告での *Saccharomyces* 属酵母分離の確率はそれぞれ、36 および 21% である。また、安田らは、花を採集して培養した 130 本の RE 培地から 16 株、12% の *Saccharomyces* 属酵母株を分離している²⁾。今回我々は種々の花や果実などを加えて

培養した 184 本の RE 培地から分離できた *Saccharomyces* 属酵母は RE 培地を含む同一の試験管から分離した 2 株のみであり、分離の確率は 1% と極めて低かった。Sampaio らは、櫛や櫛の樹種の違いにより分離酵母株数が異なることを報告しており⁴⁾、今回実験で分離率が低かったことは、はすの花、ユズやユコウ果実および葉への酵母の付着が少ないことに起因する可能性が考えられた。

3. 分離酵母の塩基配列解析

分離酵母 Z31 および Z32 の 2 株の塩基配列解析を行い、Z31 株の 784 塩基、Z32 株の 741 塩基を決定した。この結果をもとにホモロジー検索を行ったところ、これら 2 株の塩基配列は何れも *Tbrulasporea pretoriensis* 5.8SrDNA gene and ITS1 and ITS2 と塩基配列の 99% が一致した。同一種の菌株間では、ITS 領域の塩基配列の相同性が 99% 以上であることが示されており、この数値が同定の目安とされている⁶⁾。このことから、今回分離した 2 株は *Tbrulasporea pretoriensis* であることが明らかになった。両株の塩基配列を比較すると、その塩基配列は 100% 一致し両株は同一試験管から分離した同一株であることがわかった。このことは RE 培地中では異なる起源を持つ細胞が優占するのではなく、単一の細胞が優占することを示していると考えられた。*Tbrulasporea* 属は現在 *T. pretoriensis* の他 *T. delbrueckii*, *T. globosa* の 3 種が知られている。*T. pretoriensis*, *T. delbrueckii* は、冷凍耐性や高い糖濃度への耐性などの特徴からパン酵母として利用されるだけでなく、ワインの発酵に関与することが知られている酵母である⁷⁻⁹⁾。

以上のように、計 184 本の試験管から酵母増殖陽性試験管 65 本を得、このうち 1 本から有用酵母が分離できた。これまでに報告された RE 培地を用いた集積培養による分離例と比較して、分離確率はきわめて低かったものの、徳島県産ゆずから *Tbrulasporea pretoriensis* を分離した。今後これらの株の詳細な生理学的特性を明らかにすることが、新しい酵母の利用につながると考えられる。また、RE 培地による集積培養過程における種の遷移についてはほとんど知られていないことから、効率的な有用

酵母の分離には、温度条件の変更や培養期間を調節することなど、集積培養条件の変更で、増殖の速い酵母株や低温に適した酵母株が効率よく分離できる可能性があると考えられる。

謝辞

ハスの花は徳島市川内町藤原俊茂氏のレンコン田より採取していただいた。また、ユズおよびユコウの果実と葉は、徳島県勝浦郡上勝町より採取されたものを分与いただいた。記して感謝の意を表します。

文献

1. 向井伸彦, 岡田明彦, 鈴木昭記, 高橋利朗 ビール酵母とその他の醸造用酵母のビール醸造特性 J. Brew. Soc. Japan. 93, 967-975 (1998)
2. 安田庄子, 北本則行 花からの *Saccharomyces cerevisiae* の選択的分離と遺伝的多様性 日本食品科学工学会誌 58, 433-439 (2011)
3. Sniegowski, P.D., Dombrowski, P.G. and Fingerman, E. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. FEMS Yeast Res., 1, 299-306 (2002)
4. Sampaio, J. P. and Gonçalves, P. Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. Appl. Environ. Microbiol., 74, 2144-2152 (2008)
5. Guillamón J. M., Sabaté J., Barrio E., Cano J. and Querol A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. Arch. Microbiol. 169, 387-392 (1998)

6. 後藤慶一 DNA塩基配列を用いたカビ・酵母の同定 モダンメディア 55, 237-242 (2009)

7. Oda, Y. and Tonomura, K. Selection of a novel baking strain from the *Torulaspota* yeasts. Biosci. Biotech. Biochem., 57, 1320-1322 (1993)

8. Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C. and Zapparoli, G. Effects of *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. Eur. Food Res. Technol., 235, 303-313 (2012)