

# 低温耐性酵母のアルコール発酵について

## 大阪府立園芸高校 バイオサイエンス科 バイオ研究部3年 藤井智弥

### <序論>

近年、アルコール発酵を利用したパンや日本酒といった食品の製造がより活発になっている。この食品製造の工程に食品添加物として一般的に使用される。この化学物質には毒性が指摘され、他の添加物が用いられるなど使用削減が課題となっている。これを実現するため、低温で活発にアルコール発酵を行う酵母の探索を、長期低温保存されており低温耐性を期待した天然酵母を対象に行った。また低温耐性の強い酵母の探索及び低温での発酵能力をパン・酒酵母と比較し、正体不明の天然酵母をDNA分析おこない酵母の種類の特定制について試みた。

### <実験1>

#### 天然酵母の低温増殖能力の試験

2020年2学期に分離され一年間 5°Cで保存されていた天然酵母25株、2021年11月に分離室温保存の天然酵母14株を使用し1%滅菌生理食塩水に溶かしたのちYM平板培地に塗抹し生存確認を行った。生存が確認できた2020年産酵母5系統、2021年産酵母10系統、市販のパン酵母と酒粕から分離した酒酵母を使用し上記と同手順を行い、5°C、15°C、30°Cの条件で培養し、コロニーの直径を比較した。

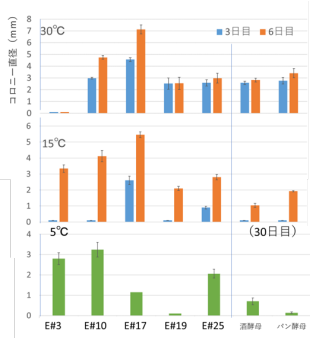


図1. 温度条件による天然酵母5系統と酒・パン酵母のコロニー直径の比較

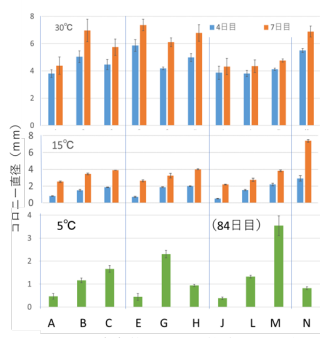


図2. 温度条件による天然酵母10系統のコロニー直径の比較

### <結果>

30°CではE#3に雑菌が混入してしまったためコロニーの計測はできなかった。15°CではE#17が一番生育に適していた。5°CではE#3が一番適していた。パン酵母と酒酵母は15°Cと5°Cではコロニーが天然酵母より小さく温度による生育の違いが見られた。2021年産酵母ではG, Mが低温での生育能力が高かった。この結果より実験2で使用する酵母を#3, #10, #17, #25, G, M に決定し実験を行った。

### <実験2>

#### 天然酵母のアルコール発酵能力試験

先行研究の方法を参考に、10°C、20°C、30°Cの温度区分で発酵能力の比較を行なった。酵母液の培地にはYM液体培地を用いた。1白金耳酵母を取り液体培地に入れた。これを振盪培養器にて30°Cで一晩培養した。次に酵母の発酵能力を調査した。試験管に5mlのブドウ糖を10%に変更したYM高層寒天培地を作成した。そこに、酵母液を白金耳の先端に付け、培地にそれぞれ突き刺した(穿刺)。その高層寒天培地の上に溶かした1.5%の寒天液1.5mlを流し込み培養した。穿刺した酵母が発酵によってガスが発生し、寒天を押し上げた高さを測定し、相対的な発酵力とした。

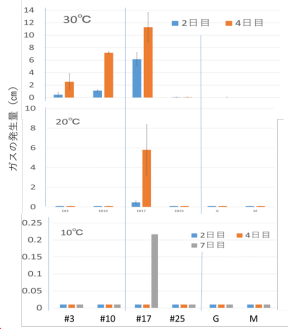


図3. 温度条件による天然酵母のガス発生量の比較

### <結果>

#25, G, Mは蓋が持ち上がりガスの発生がなかった。#3, #10, #17は30°Cでガスの発生があったが、20°Cでは#17のみガスの発生が見られた。7日目にして#17にガスの発生が見られた。この実験より実験3と比較する酵母を#17の酵母とした。

### <参考文献>

- 東京家政学院大学 第54号 2014年 天然酵母発酵におけるパンおよびワインづくりの適性 錦貫 仁美 林 一也
- 2012年度課題研究論文 レモンの「天然酵母のパン」の製造に向けて大阪府立園芸高等学校 バイオ研究 第3学年 酒井一樹
- Hanseniaspora uvarum | Viticulture and Enology (ucdavis.edu), 2018 <https://wineserver.ucdavis.edu/.../hanseniaspora-uvarum>

### <実験3>

#### パン酵母、酒酵母アルコール発酵能力比較試験

実験2より最も発酵能力のあった酵母を使用して同様の方法で30°C、20°C、10°Cの温度区分でパン酵母、酒酵母とのアルコール発酵能力を比較した。記録可能限界値を試験管の一番上15.5cmとしている。

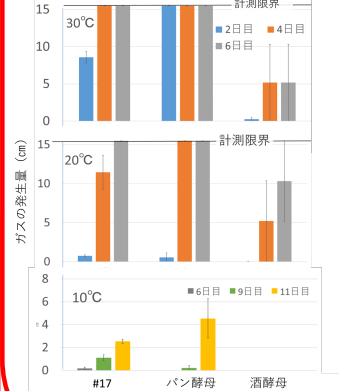


図4. 温度条件の#17とパン・酒酵母とのガス発生量の比較

### <結果>

3つともすべての酵母からガスの発生があった。また#17は酒酵母よりも20°Cでの発酵力があり、パン酵母とほぼ同等のアルコール発酵力が見られた。10°Cにおいてはパン酵母1反復が異常なガスの発生量だったため、誤差範囲が広くなりガスの発生量も多かった。

### <実験4>

#### DNA分析からの酵母の特定

DNA抽出にはDNA Extraction Solutionを使用しエタノール沈殿法で#10, #17, パン・酒酵母のDNA抽出溶液を作成した。次にプライマーとしてフォワード側にITS-FtとITS-Fc (GTAAC AAGGT (T/C)TCCG T)、リバース側にITS-R (CGTTC TTCAT CGATG)を用い、PCRによるDNA増幅の比較を、電気泳動で行った。次に良好なDNA増幅が認められたプライマーを用いITS領域のダイレクトシーケンシングを行い天然酵母の種類の特定制を試みた。蛍光標識には、アプライドバイオシステムズ社のBigDye™ Terminator v3.1を使用した。

Score	Expect	Identities	Gap	Strand	Frame
Query 1	1e-100	100.00(100)		Plus	41
Query 42	1e-100	100.00(100)		Plus	60
Query 41	1e-100	100.00(100)		Plus	129
Query 102	1e-100	100.00(100)		Plus	181
Query 101	1e-100	100.00(100)		Plus	241
Query 121	1e-100	100.00(100)		Plus	241
Query 120	1e-100	100.00(100)		Plus	279
Query 101	1e-100	100.00(100)		Plus	340
Query 280	1e-100	100.00(100)		Plus	339
Query 281	1e-100	100.00(100)		Plus	279
Query 280	1e-100	100.00(100)		Plus	279

図5. ダイレクトシーケンシングによる得られた#17のITS領域塩基配列(Query2/324bp)とNCBI相同検索サービスで検出されたHanseniaspora uvarumの塩基配列(Sbjct/1-323)のアライメントと同様に酒酵母のITS領域塩基配列(Query1/279bp)と検出されたSaccharomyces cerevisiaeの塩基配列(Sbjct/100-378)のアライメント

### <結果>

図5はシーケンシングによって得る事ができた#17と酒酵母の塩基配列をブラスト検索にかけたものを示したものである。図6は2つのITSの一致率を調べた結果を示したものである。これにより#17(F2)は酒酵母(F4)とのITSが一致していないところが多いためサッカロミセスルビシエではない酵母だと分かった。

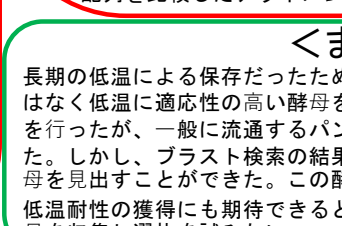


図6. 得られたITS領域塩基配列を比較したアライメント

### <まとめ>

長期の低温による保存だったため、2020年産天然酵母は低温増殖だけではなく低温に適應性の高い酵母を期待してアルコール発酵能力比較試験を行ったが、一般に流通するパン酵母と同程度の低温適應性にとどまった。しかし、ブラスト検索の結果サッカロミセスルビシエではない酵母を見出すことができた。この酵母と生態学的特徴と似た酵母であれば低温耐性の獲得にも期待できると考えらる。今後は、より多くの天然酵母を収集し選抜を試みたい。

### <受賞歴>

- 第5回 IBLユースカンファレンス 銀賞
- 第66回 日本菌学会大会 優秀賞
- 第66回 大阪府学生科学賞 優秀賞