

チーズ由来酵母の分離と性質について(その2)

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科 微生物部 唐沢 夏騎

はじめに 酵母は、最も古くから発酵食品に利用されてきた微生物の一つで、微生物の存在が知られる以前から酒類やパン製造等に用いられてきた。酵母の生息場所は多様性に富み、酵母は自然界では花・果実・植物の葉の表面などに広く生息している。本研究部ではザクロなど多くの果実から天然酵母を分離し、その性質を調べる研究をおこなってきた。分離源対象を拡大し、動物由来として、乳製品(ナチュラルチーズ)を4種類(その1)から6種類に追加して酵母を分離した。特に動物由来酵母と植物由来酵母(既知)の性質について注目しながら、今後の活用方法を検討するため、分離した酵母のアルコール発酵性、耐塩性、耐糖性、糖類資化性、アルコール耐性について調べた。

乳製品(チーズ)由来酵母の分離と同定

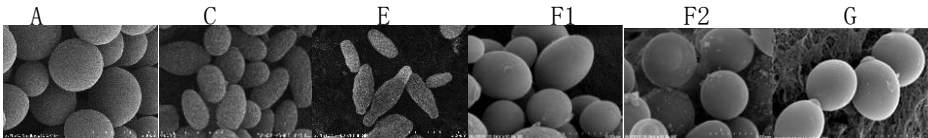
分離源：チーズ7種(A ゴルゴンゾーラドルチェ・イタリア製、B 熟成ブリー・フランス製、C スティルトン・イギリス製、D ダナブルー・デンマーク製、E カマンベール・国内産、F ゴルゴンゾーラピカンテ・イタリア製、G キャステロホイップクリームチーズ・デンマーク製)

方法：培養試験管にPBS(リン酸緩衝生理食塩水)を9mlに分離源を各1g量り培養試験管のPBSに加え混濁した。シャーレに抗生物質希釈液(0.1g/10ml)100μlを入れ、60℃以下のYM寒天培地をシャーレに流し込みよく混ぜた。寒天表面に試料100μlを滴下しコンラージ棒で液滴を広げ塗抹した。30℃で3日間培養した(アネロバック嫌気システム)。

結果：培養後、形成されたコロニーを生物顕微鏡900倍で観察した。細胞の形状と大きさから微生物を同定し、A、C、E、F、G由来の酵母(Fからは2種類)を分離することができた。Bは細菌スケールでカタラーゼ試験を試み乳酸菌と特定した。Eは乳酸菌以外の細菌と考えた。

チーズから分離した酵母の走査電子顕微鏡観察

チーズから分離した6種類(A、C、E、F1、F2、G)の酵母と製パン用酵母(P日清7-ズ製-植物)のSU1510走査電子顕微鏡画像(×10K)を取得した(下図)。



細胞の形状やスケールを調べ、長径と短径から形状比を求めた。尚、長径と短径の計測は、各酵母細胞5個を選び、顕微鏡座標設定ツールから二点間の距離を計測し、平均値を表1にまとめた。

表1 チーズ由来酵母細胞の形状と形状比

酵母No.	形状	長径 μm	短径 μm	形状比
A	楕円	5.12	4.39	1.17
C	円筒	5.09	2.94	1.73
E	紡錘	4.36	1.78	2.45
F1	楕円	4.87	4.19	1.16
F2	球	4.16	4.13	1.01
G	楕円	5.14	4.14	1.24
P	楕円	5.09	4.35	1.17

分離した酵母の細胞は楕円、球、円筒、紡錘の形状がみられた。形状比から酵母A、F1、Gは製パン用酵母Pに類似していた。

アルコール発酵性試験

方法：あらかじめ継代培養により作成した6種類の分離酵母と市販酵母(製パン用)を種菌として10%YM寒天培地(高層)に白金線を使用し、窃刺接種した。培地上部に素寒天を1ml加え、30℃のインキュベーターで培養した。24時間後の素寒天上昇距離(ガス発生量を反映)を測定した。3回測定した平均値を接種酵母のアルコール発酵力と判定して比較した(図1表2)。

結果と考察：酵母F2のアルコール発酵性は皆無で、C、Eは極めて弱いことが分かった。酵母A、F1は製パン用酵母Pに比べ、ガス発生量においてやや劣るものの発酵力が強く、酵母Gも一定の発酵力を有すると考えられ、製パンや酒造利用の可能性が期待される。なお、酵母A、F1、G、Pの細胞形状は楕円形で共通していた。



図1 分離酵母のアルコール発酵試験(左から酵母A、C、E、F1、F2、G、P)

表2 分離酵母のアルコール発酵性試験

酵母種類	上昇距離 mm
A	95
C	18
E	15
F1	101
F2	0
G	86
P	104

チーズ由来酵母の性質(その2) 耐塩性試験

味噌醬油の製造の「発酵」という過程で使用される酵母は、高い濃度の食塩を含む中で生育できる必要がある。分離した酵母と製パン用酵母の耐塩性を調べた。

方法と結果：事前に作成した酵母A、C、E、F1、F2、G、Pのコロニー(種菌)を使用した。4区分(濃度0、2、5、10%)の食塩を含有するYM寒天培地に種菌を白金耳で接種した。30℃で72時間培養し、培養後の観察(図2-酵母A、Cの例)から耐塩性を判定し表3にまとめた。さらに酵母Cを食塩濃度の15~20%まで耐塩性試験を行った結果、15%まで生育可能であった。考察：酵母Cは耐塩性が高く、他のA、E、F1、F2、G、Pは耐塩性が低いといえる。市販醬油や味噌の塩分濃度(%)は16~19(醬油)、12~15(味噌)であることから、酵母Cは味噌製造に適応する可能性がある。



図2 チーズ由来酵母の耐塩性試験例(食塩濃度(%)は左から0、2、5、10の順)

表3 チーズ由来酵母の耐塩性

酵母種類 \ 塩分濃度(%)	0	2	5	10
A	++	++	+	-
C	++	++	++	++
E	++	++	+	-
F1	++	++	+	-
F2	++	++	+	-
G	++	++	+	-
P	++	++	+	-

(++ 生育良好、+ 弱く生育、- 生育不良)

チーズ由来酵母の性質(その3) 耐糖性試験

酵母はパン製造において糖濃度の影響を受ける。パン生地は、その糖濃度に応じて①無糖生地(例：フランスパン生地(糖分量0%))②低糖生地(例：食パン生地(糖分量1%))③高糖生地(例：菓子パン生地(糖分量20~30%))に分けられる。チーズ由来酵母の各種製パン用適性を知るために耐糖性試験を試みた。方法：上白糖を含有するYM寒天培地(7区分：濃度0、10、20、30、40、50、60%)を使用し、酵母A、C、E、F1、F2、G、Pの耐糖性を先の実験と同様に塗抹法で試験した。30℃で72時間培養した。

結果と考察：各酵母コロニーの生育状況(図3-酵母Aの例)から耐糖性を判定し、表4にまとめた。



(糖濃度(%)は左から0、10、20、30、40、50、60の順)

図3 チーズ由来酵母Aの耐糖性試験例

表4 チーズ由来酵母の耐糖性試験

酵母種類 \ 糖濃度(%)	0	10	20	30	40	50	60
A	+	++	++	++	++	+	-
C	+	++	++	+	+	-	-
E	+	++	++	+	-	-	-
F1	+	++	++	++	++	+	-
F2	+	++	++	++	+	-	-
G	+	++	++	+	+	-	-
P	+	++	++	++	++	+	-

チーズ由来酵母の性質(その4) 糖類資化性試験

糖類資化性とは、微生物が栄養源の糖類を利用する性質で、試験結果から酵母の類似性を調べることができる。試験は単糖類のブドウ糖(g)、果糖(f)、二糖類のショ糖(su)、麦芽糖(m)、乳糖(L)、5炭糖のキシロース(x)、多糖類のデンプン(st)、計7種類の糖類を使用した。

方法：窒素基本培地(ニトロゲンベース10%、酵母エキスを0.1%、カザミノ酸0.1%)1mlと各種糖類(0.5%)を含む寒天培地19mlを混合し素寒天で重層化した。分離酵母コロニーを決められたゾーンに白金線で接種し、シュガーフリー(sf)を対照として比較した。

結果と考察：30℃、5日間培養後、酵母コロニーの生育状況からコロニーのスケールを測定した(図4-試験例)。測定方法はコロニーの両端を計測した(表5、図5)。チーズ由来酵母A、E、F1、G、Pに類似性がみられた。チーズ酵母AとF1、製パン用酵母Pは細胞像、アルコール発酵性に、耐塩性、耐糖性のみならず糖資化性においても共通性がみられた。又、すべての酵母にはブドウ糖、果糖、ショ糖、麦芽糖などの甘味性糖類を資化する特徴がみられた。

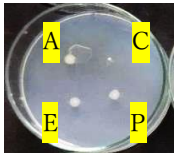


図4 チーズ酵母のブドウ糖類資化性試験例

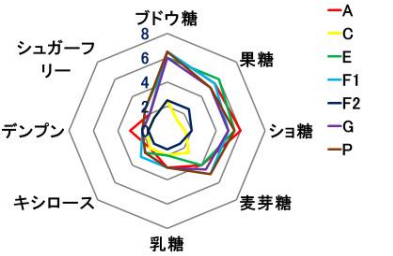


図5 チーズ由来酵母の糖類資化試験 コロニーのスケール(mm)

表5 チーズ由来酵母の糖類資化試験(コロニーのスケールmm)

糖類 \ 酵母	A	C	E	F1	F2	G	P
g	6.5	2.5	6.0	6.5	2.5	6.0	6.5
f	5.5	1.2	6.0	5.5	2.5	5.0	5.0
su	6.0	1.5	5.5	5.0	2.0	5.0	5.5
m	4.0	2.5	4.0	5.0	1.5	4.5	5.0
L	3.0	2.0	2.0	3.0	1.5	3.0	3.0
X	2.0	2.0	2.5	3.0	1.5	2.5	2.5
st	3.0	1.5	2.0	2.0	1.5	2.0	2.0
sf	2.0	1.5	2.5	2.0	1.5	2.0	2.5

チーズ由来酵母の性質(その5) アルコール耐性試験

アルコール耐性の高い酵母は醸造特性を持つと考えられる。チーズ由来の高アルコール発酵性酵母A、F1、Gの醸造特性を念頭に耐性試験を試みた。酵母試験株は従来の6株(A、C、E、F1、F2、G)とPに生ビールから分離した酵母(Br)も追加した(図6)。

方法はYM液体培地5mlを8本の試験管に採り酵母8株(A、C、E、F1、F2、G、P、Br)コロニーの1白金耳を接種し、30℃で4日間静置培養した。培養後の酵母生菌数(アルコール耐性試験前)を測定した後、酵母培養液を遠心分離(3000rpm)後、上清を捨て、酵母菌体を得た。酵母菌体に20%エタノールを5ml加えてボルテックスで均一化した。30℃で培養24時間後、酵母生菌数を測定し、反応前後の酵母コロニー数から生存率を求め、アルコール耐性を判定した。一般には、酵母はアルコールによりストレスを受け生菌数は低下すると思われる。反応後の生菌数測定では、検体(試料)として、酵母希釈液(10²、10³倍、10⁴倍)を培地に塗抹した。結果と考察：酵母アルコール耐性試験の反応前後の生菌数測定にあたっては、形成されたコロニー数をカウントしアルコール耐性率は反応後生菌数を反応前生菌数で除し100を乗じ表6に纏めた。アルコール発酵力の強い酵母A、F1、Gの高いアルコール耐性を期待したが、生存率は低く醸造特性はなかった。他の酵母についても生存率が低く適性はみられなかった。

表6 アルコール耐性試験 -反応前後の生菌数(CFU/ml)と耐性率(%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	120	15	1.2×10 ²	TNTC	TNTC	265	2.7×10 ⁶	2.3	
C	320	48	3.2×10 ²	TNTC	TNTC	850	8.5×10 ⁶	26.6	
E	85	13	8.5×10 ²	TNTC	TNTC	360	3.6×10 ⁶	4.2	
F1	93	18	9.3×10 ⁶	TNTC	93	18	9.3×10 ⁴	1.0	
F2	54	5	5.4×10 ⁶	TNTC	175	65	2.2×10 ⁵	4.1	
G	95	12	9.5×10 ⁶	TNTC	TNTC	107	1.1×10 ⁶	12.0	
P	37	6	3.7×10 ⁶	TNTC	TNTC	50	5.0×10 ⁵	14.0	
Br	45	10	4.5×10 ⁶	TNTC	107	38	1.3×10 ⁵	2.9	

おわりに：耐糖性と発酵性の高いA、Fと発酵性が高く耐糖性の低いGについて、製パンや菓子類製造の利用の可能性を探りたい。酵母Cは、耐塩性が強く味噌製造に利用できる可能性がある。動物(乳)由来の酵母であっても植物由来酵母と似ている点については、動物体表面に生息する常在菌が搾乳などの過程で混入した可能性が考えられる。

赤字で示した表の項目

1. 酵母種類、2. 反応前コロニー数(10⁵倍希釈)、3. 反応前コロニー数(10⁶倍希釈)、4. 反応前生菌数CFU/ml)、5. 反応後コロニー数(10²倍希釈)、6. 反応後コロニー数(10³倍希釈)、7. 反応後コロニー数(10⁴倍希釈)、8. 反応後生菌数CFU/ml)、9. アルコール耐性率(%)