

天然酵母の分離同定と醗酵能評価

Identification of natural yeast and its fermentative ability

藤原 永年 *

FUJIWARA Nagatoshi

Yeast is well isolated from fruits and foods in nature, and the bread baking with natural yeast is popular. In this report, two strains of wild yeast (NF539, NF540) were isolated from dried grapes (raisins). These wild strains were identified as *Saccharomyces cerevisiae* by the analyses of 26S rDNA D1/D2 genetic homology, morphology and biochemical features. We named this strain as 'Tezuka Yeast'. The bread baked with NF540 yeast is equivalent to that with commercial dry yeast.

1. 緒言

現代におけるパン製造には酵母が必須である。パン生地を膨化させるためには適切なガスの発生力と保持力が必要であり、その役割を酵母が担っている。酵母は糖類を炭素源として醗酵することで、アルコールと炭酸ガスを発生する。パン酵母の歴史において、自然界から分離してパン生地中で高いガス発生力を持つ酵母をスクリーニングすることで、製パン用酵母を確立した。我が国では、1930 年代に凍結乾燥したドライイーストが製パン用酵母として市販された¹⁾。

一方、自然界に存在する酵母を独自に種起こししてパン製造に使用する製法もある。手間暇がかかり、安定性や膨化が弱くなる欠点もあるが、ドライイーストによるパンとは異なる味や香りを醸し出した美味しいパンの製造も可能となり、差別化したパンを製造販売するベーカリーも現れている。パン市場ではこれを俗に天然酵母によるパンと呼んで区別している。種起こしする醗酵物としてフルーツが多く使用され、酵母以外に乳酸菌等の多種多様な微生物が増殖しており、パンの特徴に多彩な影響を与えられられる。

本研究では、実際にフルーツからアルコール醗酵を指標にして天然酵母を分離し、その同定試験を行った。また、分離同定した天然酵母の醗酵能は、食パン製造を行い、市販ドライイーストと比較して評価した。

2. 材料と方法

(1) 材料

市販の果物レーズン、リンゴ、オレンジ (2022 年 4 月、近商ストア学園前店で購入) を醗酵物として使用した。

(2) アルコール醗酵による天然酵母のスクリーニング

1) 果物のアルコール醗酵

無菌 1L 容メディウム瓶に滅菌蒸留水で洗浄した果物を小刻みに切って入れ、滅菌リン酸緩衝液 0.5 L に懸濁した。30℃で 1 週間静置培養した。毎日、瓶の上下を入れかえるように懸濁し、瓶の蓋を開けることで、菌の増殖や醗酵度合いをアルコール臭とガスの発生で確認した。

2) 酵母様コニーの分離と純化

醗酵液を Yeast Peptone Dextrose (YPD agar, Becton Dickinson, USA) 寒天平板培地に塗抹した。

* 食物栄養学科 教授

30℃で培養して、酵母様コロニーの出現を確認した。候補コロニーを複数個継代し、最終的に純化して、酵母様の形態を示した候補株を2株スクリーニングした。

(3) 酵母の同定

1) 形態観察

各菌株を Yeast Mold Broth (YM, Becton Dickinson) 培地に 1.5%寒天を追加した YM 寒天平板培地で 30℃、3 週間好気培養した。出現コロニーを滅菌蒸留水でマウントし、光学顕微鏡 BX51（オリンパス株式会社）および実体顕微鏡 SMZ800（株式会社ニコン）で観察した。

2) 糖同化性試験

酵母様真菌同定用キット ID 32 C アピ（バイオメリュー・ジャパン株式会社）を用いて 32 種類の炭水化物基質の同化試験を実施した。単離されたコロニーを釣菌して滅菌蒸留水で McFarland 濁度 2 の菌液を調製した。各乾燥炭水化物基質の入ったカップに菌液を 135 μ l ずつ分注して 30℃、24-48 時間培養した。コントロールのカップと比較してより不透明なカップを陽性と判定した。

3) 26S rDNA の D1/D2 領域塩基配列解析

コロニーから菌体を 1 白金耳とり、無菌蒸留水に懸濁した。ガラスビーズ衝撃式ホモジナイザー（株式会社セントラル科学貿易）で物理的に菌体を破砕して DNA を抽出した。D1/D2 領域の PCR 増幅は、プライマーとして ITS5, NL4²⁻³)を用い、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara Bio) で実施した。シーケンサーは ABI PRISM 3500xl Genetic Analyzer System (Applied Biosystems, USA) を使用し、塩基配列は ChromasPro 2.1 (Technelysium, AUS) で決定した。

4) BLAST

BLAST 相同性検索⁴⁾は、解析ソフトウェア ENKI v3.2 (TechnoSuruga Laboratory) を用いて、データベース DB-FU15.0 (TechnoSuruga Laboratory) および国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/GenBank) で検索した。ブートストラップ法⁵⁾ (1,000 反復) を用いた簡易分子系統解析による系統樹を作成した。

(4) 醗酵能評価

分離した天然酵母と市販ドライイースト（日清フーズ ドライイーストカメリヤ ホームベーカリー用）を使用して食パンを焼いた。ホームベーカリーパンくらぶ（BB-HE10 型、ZOJIRUSHI）で、レシピ天然酵母・食パン（表 1）に従って実施した。それぞれの食パンを 9 名にアンケート調査することで比較評価した。

表 1 食パンレシピ

食パン材料		調理工程	
水	210 mL	ねかし	0.5 時間
生種	26 g	コネ	1.0 時間
強力粉	300 g	醗酵	4.5 時間
砂糖	16 g	焼き	1.0 時間
塩	5 g		

3. 結果

(1) 果物からの酵母様コロニーの分離と純化

市販のレーズン、リンゴ、オレンジを 1 L 容メディウム瓶に入れ、30℃で静置培養したところ、レーズンを入れたメディウム瓶が 3 日目より蓋を開けるとアルコール臭が漂い、液体表面に気泡が浮かび上がった。培養期間が増す毎に、アルコール臭と気泡の発生が激しくなった。リンゴ、オレンジを入れた瓶からは、微かなアルコール臭がしたが、気泡の発生も弱く、日ごとに激しさを増すことはなかった。そこで、培養 7 日目にレーズンの培養液を 1 白金耳、YPD 寒天平板培地に塗布し、30℃で 2 日間培養した。発現したクリーム色の大きなコロニーを釣菌し、継代することで純化した。

同様の酵母様コロニーのスクリーニング工程を 2 回行い、それぞれ純化した菌株（菌株番号 NF539, NF540）を凍結保存し、親株とした。

(2) 糖同化性試験

ID 32C アピによる糖同化性試験結果を表 2 にまとめた。NF539 と NF540 の糖同化性は全く同じであった。 α -メチル- α -D-グルコシド、パラチノース, D-メレチトース, エスクリンの糖同化性が陰性であったが、市販のドライイーストは陽性を示した。この点が異なっていた。

(3) 形態観察

各菌株（NF539, NF540）の YM 寒天平板培地上の形成コロニーについて、培養性状を表 3 にまとめ、巨視的なコロニーの形態観察を図 1 に示した。培養性状、巨視的観察像は、NF539, NF540 共に同様の性状、観察像であった。

微視的観察では、NF539 は YM 寒天平板培地上の培養開始 1 週間目で、栄養細胞が亜球形から楕円形、卵形となっており、出芽によって増殖す

表 2 NF539, NF540 の糖同化性試験

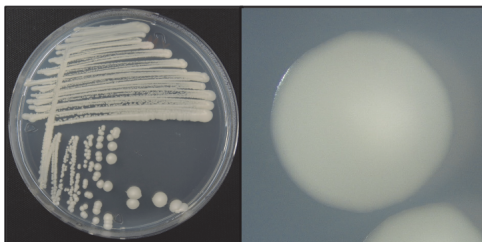
カップ	基質	テスト項目	NF539	NF540	市販ドライイースト
1.0	ガラクトース	GAL	+	+	+
1.1	シクロヘキシミド	ACT	-	-	-
1.2	白糖	SAC	+	+	+
1.3	N-アセチル-グルコサミン	NAG	+	+	+
1.4	乳酸	LAT	+	+	+
1.5	L-アラビノース	ARA	+	+	+
1.6	D-セロビオース	CEL	-	-	-
1.7	ラフィノース	RAF	+	+	+
1.8	D-マルトース	MAL	+	+	+
1.9	トレハロース	TRE	+	+	+
1.A	2-ケト-グルコン酸カルシウム	2KG	-	-	-
1.B	α -メチル- α -D-グルコシド	MDG	-	-	+
1.C	D-マンニトール	MAN	+	+	+
1.D	乳糖	LAC	+	+	+
1.E	イノシット	INO	-	-	+
(1. F)	(コントロール)	0			
0.0	D-ソルビトール	SOR	+	+	+
0.1	D-キシロース	XYL	-	-	-
0.2	D-リボース	RIB	+	+	+
0.3	グリセロール	GLY	+	+	+
0.4	L-ラムノース	RHA	+	+	+
0.5	パラチノース	PLE	-	-	+
0.6	エリスリトール	ERY	-	-	-
0.7	D-メリビオース	MEL	+	+	+
0.8	グルクロン酸ナトリウム	GRT	+	+	+
0.9	D-メレチトース	MLZ	-	-	+
0.A	グルコン酸カリウム	GNT	+	+	+
0.B	レブリン酸	LVT	-	-	-
0.C	ブドウ糖	GLU	+	+	+
0.D	L-ソルボース	SBE	+	+	+
0.E	D-グルコサミン塩酸塩	GLN	+	+	+
0.F	エスクリン	ESC	-	-	+

表 3 天然酵母の培養性状および形態観察*

	周縁の形状	隆起状態	表面の形状	光沢および性状	色調
NF539	全縁	クッション形	平滑	バター様、湿性	白色～クリーム色
NF540	全縁	クッション形	平滑	バター様、湿性	白色～クリーム色

*YM 寒天平板培地, 30℃, 3 週間

NF539



NF540

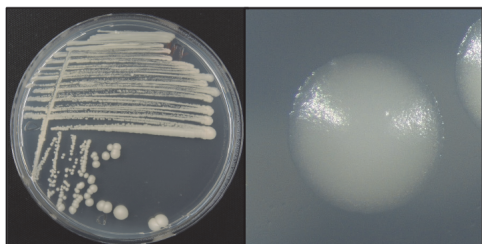


図 1 コロニーの巨視的観察像

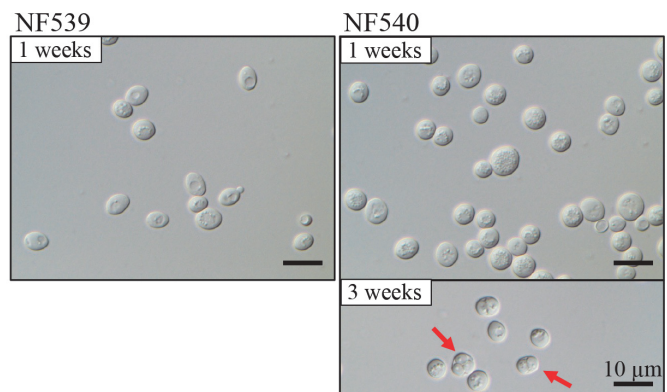


図 2 微視的観察像

ることを確認した（図 2）。培養開始から 3 週間を経過した YM 平板培地で有性生殖器官の形成は認められなかった。NF540 の培養開始 1 週間目の観察は、NF539 と同様であったが、培養開始から 3 週間を経過した YM 寒天平板培地で有性生殖器官である球形-楕円形の子のうの中に 2-3 個の子嚢胞子形成を認めた（図 2 矢印）。

(4) 26S rDNA の D1/D2 領域塩基配列解析

抽出した DNA より、D1/D2 領域を設計したプライマーを用いて PCR 法で増幅し、シークエンサーで 572 塩基を解析した。NF539 と NF540 は相同性 100% で全く同じ塩基配列であった。微生物同定システム ENKI を用いて D1/D2 領域塩基配列の BLAST 相同性検索を実施した結果、DB-FU データベースでの相同性スコア、国際塩基配列データベースでの相同性スコアが、子囊菌系酵母の一種である *Saccharomyces cerevisiae* の複数株と相同率 100.0% の相同性が確認された（表 4、5）。DB-FU に対する相同性検索で得られた D1/D2 領域塩基配列に基づく簡易分子系統樹を基準種について作成した（図 3）。NF539, NF540 は、*Saccharomyces* 属で構成される系統群に含まれ、*S. cerevisiae* NRRL Y-12632NT (Accession No. AY048154) と同一の分子系統学的位置を示した。

以上より、NF539, NF540 は *S. cerevisiae* と同定した。

表 4 DB-FU に対する BLAST 検索結果

登録名	株名	Accession No.	相同率
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NRRLY-12632	AY048154	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cariocanus</i>	NRRLY-27337	AF398478	567/572 (99.1%)
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	NRRLY-17217	U68555	566/572 (99.0%)
<i>Saccharomyces jurei</i>	NCYC-D5088	HG764813	565/572 (98.8%)
<i>Saccharomyces arboricolus</i>	CBS10644	EF580918	562/572 (98.3%)
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	IFO1802	AB040995	563/573 (98.3%)
<i>Saccharomyces bayanus var. uvarum</i>	NRRLY-17034	AY130339	561/572 (98.1%)
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	NRRLY-27171	U68547	560/572 (97.9%)
<i>Saccharomyces bayanus var. bayanus</i>	NRRLY-12624	U94931	560/572 (97.9%)
<i>Saccharomyces mikatae</i>	IFO1815	AB040996	559/574 (97.4%)
<i>Kazachstania unispora</i>	NRRLY-1556	U68554	549/572 (96.0%)
<i>Torulaspora microellipsoides</i>	NRRLY-1549	U72160	549/573 (95.8%)
<i>Kazachstania aquatica</i>	CBS10102	AY881651	549/573 (95.8%)
<i>Kazachstania africana</i>	NRRLY-8276	U68550	549/572 (96.0%)
<i>Kazachstania martiniae</i>	NRRLY-409	AF398481	548/572 (95.8%)
<i>Kazachstania solicola</i>	CBS6904	AY007895	547/572 (95.6%)
<i>Kazachstania servazzii</i>	NRRLY-12661	U68558	547/572 (95.6%)
<i>Kazachstania aerobia</i>	CBS9918	AY582127	547/572 (95.6%)
<i>Torulaspora francisciae</i>	NRRLY-17532	U73604	548/573 (95.6%)
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	NRRLY-866	U72156	548/573 (95.6%)
<i>Kazachstania yasuniensis</i>	CLQCA20-132	HG934855	546/572 (95.5%)
<i>Torulaspora pretoriensis</i>	NRRLY-17251	U72157	547/573 (95.5%)
<i>Kazachstania lodderae</i>	NRRLY-8280	U68551	544/572 (95.1%)
<i>Kazachstania bromeliacearum</i>	CBS7996	HQ412595	541/566 (95.6%)
<i>Torulaspora maleeae</i>	IFO11061	AB087395	545/573 (95.1%)
<i>Naumovozyma dairenensis</i>	NRRLY-12639	U68556	543/571 (95.1%)
<i>Kazachstania siamensis</i>	NBRC101968	AB258462	546/574 (95.1%)
<i>Kazachstania zonata</i>	NBRC100504	AB198187	545/573 (95.1%)
<i>Kazachstania piceae</i>	NRRLY-17977	U84346	542/572 (94.8%)
<i>Torulaspora globosa</i>	NRRLY-12650	U72166	543/573 (94.8%)

注 1) 相同性スコアで上位 30 に検索された 26S rDNA の D1/D2 領域塩基配列データ

注 2) 網掛けは、簡易分子系統解析に供した配列データ

表 5 国際塩基配列データベースに対する BLAST 検索結果

登録名	株名	Accession No.	相同率
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YPH499	AP026843	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	W303	7ZW0_LA	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72323	OP358989	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72322	OP358988	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72321	OP358987	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72320	OP358986	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72319	OP358985	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72318	OP358984	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72317	OP358983	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72316	OP358982	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72315	OP358981	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72313	OP358979	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72297	OP358964	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L261col5 max	CP072086	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L261	CP072102	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PY0001	CP097143	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72225	OP108255	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72223	OP108253	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72216	OP108246	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72215	OP108245	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72212	OP108242	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72209	OP108239	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72208	OP108238	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72206	OP108236	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72205	OP108235	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72203	OP108233	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72202	OP108232	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72200	OP108230	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72199	OP108229	572/572 (100.0%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS72197	OP108227	572/572 (100.0%)

注 1) 相同性スコアで上位 30 に検索された 26S rDNA の D1/D2 領域塩基配列データ

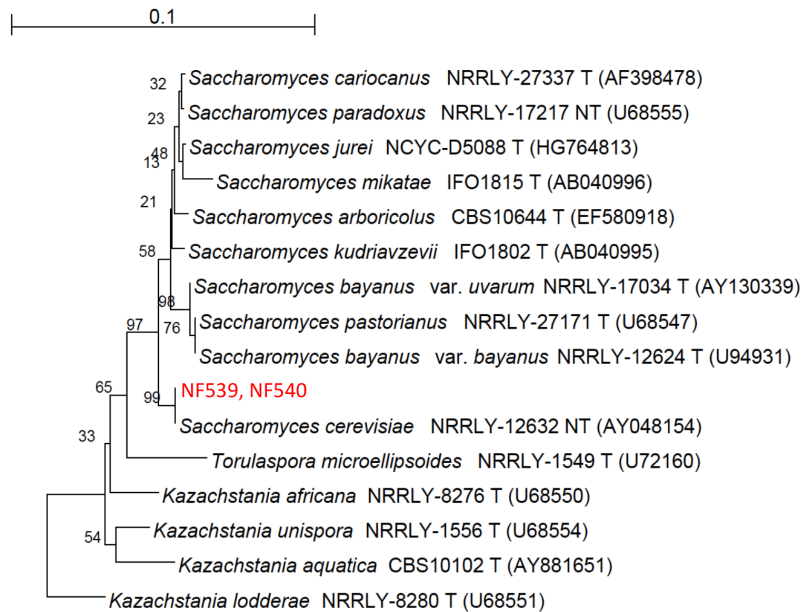


図 3 NF539, NF540 の 26S rDNA の D1/D2 領域塩基配列に基づく簡易分子系統樹

左上の線: スケールバー, 系統枝の分岐に位置する数字: ブートストラップ値, 株名の末尾の T: その種の基準株 (Type strain), NT: その種の新基準株 (Neotype strain)

(5) 食パン製造における醗酵能評価

今回の分離酵母と市販ドライイーストを使用して焼いたパンは、見た目や味の相違はなかったが、天然酵母で焼いたパンのほうが少し硬く感じた(図4)。

4. 考察

3種類の果物から酵母の分離を試み、30℃で醗酵させたレーズンのみから酵母様株が分離できた。他の果物では雑菌の繁殖と酵母の醗酵程度が弱く、天然酵母の単離には至らなかった。レーズンから単離した酵母様株を同定試験した結果、形態、糖同化性試験、26S rDNAの相同性から、*Saccharomyces cerevisiae*と同定できた。NF539については、培養3週間後の微視的観察で有性生殖器官である子嚢胞子が観察できなかったが、それ

以外はNF540と全て結果が一致した。通常のYPD平板寒天培地での増殖は、無性生殖環が主で子嚢胞子の検出が困難であったと考えられる。現在の新種同定は、26S rDNAの相同性結果を重視しており、2株は同一の*S. cerevisiae*であると結論づけた。

今回の分離酵母と市販ドライイーストを使用して焼いたパンは、見た目や味の相違はなかったが、天然酵母で焼いたパンのほうが少し硬く感じた。市販ドライイーストはパンの醗酵に適した酵母であり、醗酵度合いが高く、パン生地がより膨れることが理由と考えられ、パンのレシピ改変により最適化が可能である。一般的な食パンのレシピでは、ドライイーストをグラム単位で添加している。通常、強力粉300gに対してドライイーストは5g程度が標準的である。実際に菌数換算すると 10^{14} CFU (colony forming unit) 以上の酵母を加えていることになり、微生物学的な見知からは桁外れの菌数と言える。醗酵力が弱いことがパン酵母に適さないかどうかを考えた場合、必ずしもそうとは限らない。パン酵母の役割は二酸化炭素発生による膨化であるが、酵母は最終商品に死菌体として残存する成分でもあり、酵母に含まれるアミノ酸、食物繊維、ビタミン、ミネラル、核酸といった成分は、商品の価値に大いに影響するものである。醗酵力が弱ければ培養時間で膨化をコントロールできる。酵母成分が多くなれば商品の第三次機能への利用価値も高まる。本来、酵母死菌体はバランスの良い栄養源でもあり、食品や化粧品など多方面でYeast extractとして利用されている⁹⁾。生ビールの製造においても、本来は最終段階で酵母菌体を濾過分離することで澄明なビールとなるが、あえて酵母菌体を残存させた酵母入りビールもあり、栄養豊富で健康志向のビールとして差別化し、コクや、まろやかさ、うまみ成分をアピールした商品も出回っている⁷⁾。今回分離した酵母株を利用した新しいレシピ開発や酵母成分に視点を置いた商品開発が可能であると考え、引き続き検討していく。

今回分離したNF539, NF540の天然酵母株を「帝塚酵母」と命名した。

参考文献

- 1) 越後明：イースト，「製パンの科学（Ⅱ）製パン材料の科学」田中康夫，松本博編，光琳，東京，pp.57-90、199.



図4 食パンの焼き上がり比較

- 2) White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (editors). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press; pp.315–322. 1990.
- 3) O'Donnell K.: Fusarium and its near relatives. In: Reynolds DR and Taylor J (editors). The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. Wallingford: CAB International; pp. 225–233. 1993.
- 4) Altschul SF, Madden TF, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.: Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res;25:3389–3402. 1997.
- 5) Saitou N, Nei M.: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol;4:406–425. 1987.
- 6) Rahman M, Islam R, Hasan S, Zzaman W, Rana MR, Ahmed S, Roy M, Sayem A, Matin A, Raposo A, Zandonadi RP, Botelho RBA, Sunny AR.: A Comprehensive Review on Bio-Preservation of Bread: An Approach to Adopt Wholesome Strategies. Foods. 11(3):319. 2022.
- 7) Fukuda N.: Apparent diameter and cell density of yeast strains with different ploidy. Sci Rep. 27;13(1):1513. 2023.

謝辞

本研究は、研究協力者として帝塚山大学現代生活学部食物栄養学科の藤原ゼミ 2022 年度生・橋本和佳奈、東里香、関はるかが、卒業研究として実験操作を主に担当した。また、実験助手の藤田安奈氏に技術的なサポートを頂いた。研究成果をまとめるにあたり、心より深謝致します。