

耐性を持つ酵母のスクリーニング

Screening for resistant yeast

石川 瑚子 菊池 桃子 中島 愛菜

Ishikawa Koko Kikuchi Momoko Nakajima Ena

1. 要旨

空気中の酵母を果物や野菜を用いて集め、増殖時の環境を変化させることで耐塩性や耐酸性を持つ酵母のスクリーニングを試みた。耐塩性酵母については酵母が増殖するときの塩の濃度を調節することでスクリーニングできることがわかった。

2. 酵母について

酵母は、生物学的分類では真核生物の子囊菌類に含まれる。無性生殖によって増殖し、増殖の方法には、親の体とほぼ同じ大きさで丸い形に分裂するもの、親の体から芽のように膨らみ楕円形の酵母が出芽するものなどがある。また、酸素がある場合には呼吸によってATPを取り出すが、酸素がない場合にはアルコール発酵を行う。

自然界では花の蜜、果実、樹液、植物の葉の表面、土壌などあらゆる場所に生息している。空気中にもたくさんの種類の酵母が存在しており、その中には耐性を持つ酵母を持たない酵母が混在している。

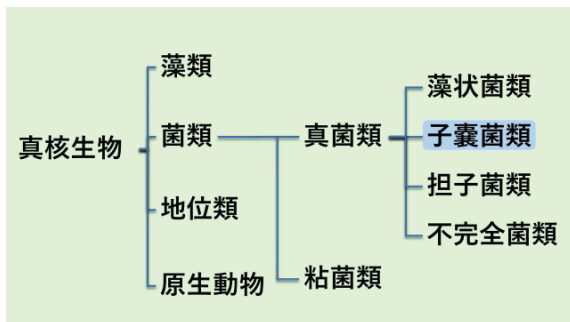


図1) 酵母の生物学的分類

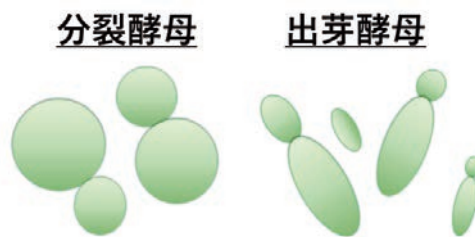


図2) 分裂酵母と出芽酵母

3. 研究目的

酵母は、味噌やパン、ビールを作るときに大きな役割を担っている。酵母が様々な環境で育つことを知り、酵母の耐性について興味を持った。そこで私たちは、酵母が増殖するときの環境を変化させることで空気中の酵母から耐性を持つ酵母を取り出すことを目的とする。

4. 酵母のスクリーニングについて

今回の実験で行う酵母のスクリーニングとはたくさんの種類の酵母の中から自分たちの欲しい酵母を取り出すことである。スクリーニングの方法は、まず空気中に存在する酵母を果物や野菜を用いて集める。そして集めた酵母を、食塩を加えた環境で育て、耐塩性を持つ酵母のみを残し増殖させる。

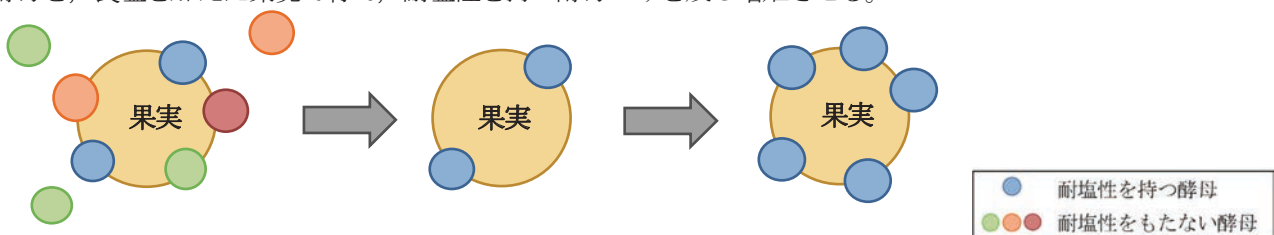


図3) 酵母のスクリーニング

5. 先行研究

大高ら (2020) の「酵母の分離とその性質」1) の実験結果より、塩分の多い培地で分離した酵母は耐塩性を持ち、塩分を含む培地で増殖できる。戸井田らの「自然界から分離した酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の特性」2) の実験結果より、自然界から分離した酵母は塩の濃度が 10% から 16% の時、増殖可能であり、塩の濃度が 19% から 22% の時、増殖できない。岸本らの「梅酢から分離した酵母の耐酸、耐塩性」3) の実験結果より、梅酢から分離した酵母は pH2~3 の時、増殖可能であるが、その他の梅酢から分離していない酵母は pH3 以下の時、増殖できない。耐酸性を有する酵母は中程度の耐塩性を有する。

6. 先行研究との違い

先行研究では、耐性を持つ酵母を集めるために、塩分や酸の多い食材を用いることで耐性を持つ酵母をスクリーニングしている。それに対して今回の実験では、空気中に存在するたくさんの種類の酵母を、食材を用いて集め、酵母が増殖するときの環境を変えて、耐性を持つ酵母をスクリーニングする。

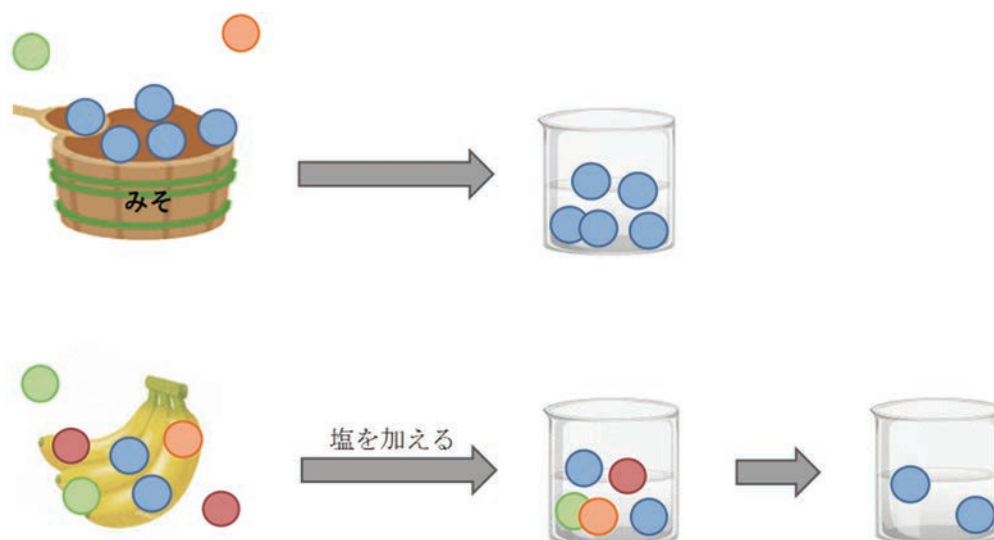


図 4) 先行研究(上)と本研究(下)の違い

7. 予備実験

キウイ、リンゴ、メロン、パイナップルを用いて酵母液を作り、二週間恒温槽で保存する。顕微鏡で観察したところ、パイナップルの酵母液で最も多く酵母が増殖していた。したがって実験 1 ではパイナップルを用いて酵母液を作る。

8. 実験 1

<実験方法>

1. 水 10.0 g, 砂糖 0.67 g, パイナップル 3.3 g を用いて酵母液を作る。耐塩性を調べる実験では水の代わりに濃度を調整した食塩水を用いる。食塩水の質量パーセント濃度は①0.0%②3.8%③7.4%④10.7%⑤13.8%⑥16.7%⑦19.4%⑧21.9%⑨24.2%⑩26.5%⑪28.6%に設定し、各 3 つずつ作る。耐酸性を調べる実験では水の代わりに pH を調整した溶液を用いる。クエン酸とクエン酸ナトリウムを用いて、①pH2②pH3③pH4④pH5⑤pH6⑥pH7 に調整し、各 3 つずつ作る。ただし①はクエン酸のみ、⑥は蒸留水である。
2. 酵母液を 30°C の恒温槽で一週間保存し、酵母を増殖させる。
3. 顕微鏡で観察する。耐塩性を調べる実験では塩の濃度が何%まで、酵母が増殖可能なのかを調べる。耐酸性を調べる実験では pH の値がいくつまで、酵母が増殖可能なのかを調べる。



写真1) 手順1 用いたパイン



写真2) 手順2 恒温槽で保存される酵母液



写真3) 手順3 酵母液の観察

<実験結果(耐塩性)>

食塩の濃度が0.0%~16.7%の時、酵母は増殖し、19.4%~28.6%の時、酵母は増殖していなかった。また食塩の濃度が大きくなるにつれて酵母の数が減少していた。

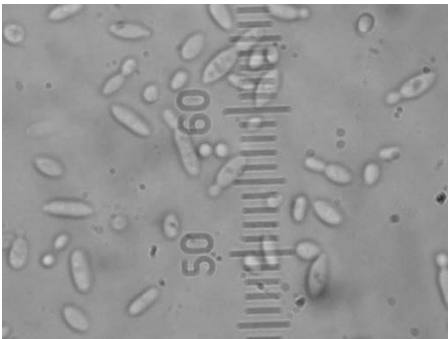


写真4) 顕微鏡でみた3.8%の酵母液

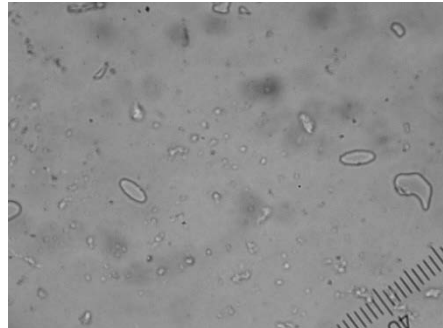


写真5) 顕微鏡でみた26.5%の酵母液

<実験結果(耐酸性)>

すべてのpHで酵母は増殖していた。しかしpH5とpH6の時、ほかのpHに比べて酵母の数が少なかった。

pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7
◎	◎	◎	△	△	○

表1) 実験1 耐酸性実験の結果

<結果の表について>

表1及びこれ以降の表には以下の基準を用いる。

- ◎…どこをみてもたくさんの酵母が観察できる。
- …◎よりも酵母の数が少ない。観察するところによって酵母の数にばらつきがある。
- △…酵母の観察はできるが数は少ない。数個しか観察できない。
- ×…酵母を全く観察できない。一個もない。

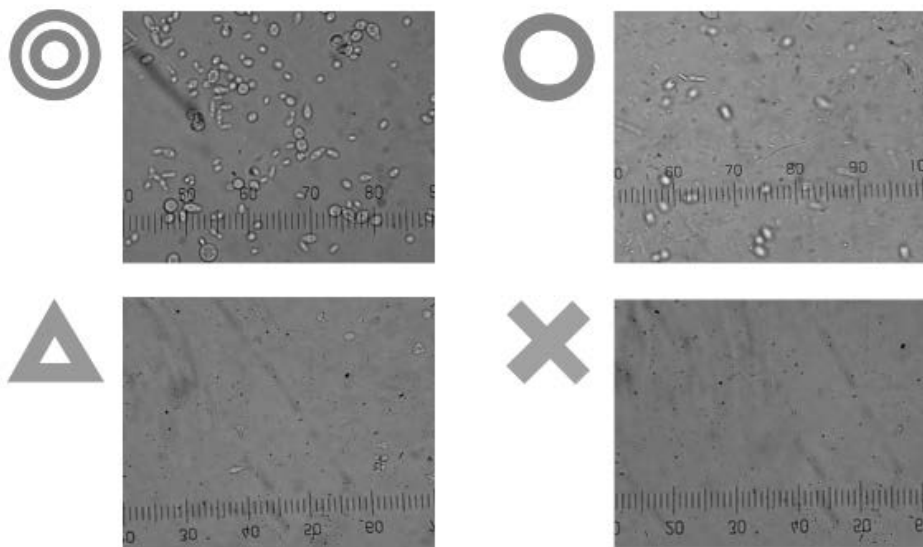


写真6) 結果に用いる記号の基準

<考察>

耐塩性を調べる実験では、16%付近まで増殖することが分かる。このことから、食塩の質量パーセント濃度約16%付近の環境で増殖させることで耐塩性を持つ酵母を取り出すことができる。

耐酸性を調べる実験では調整した酵母液の濃度が、パインの pH (pH3~4) によって大きく変化した。

パインを入れる前	pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7
一週間後	pH2.3	pH2.7	pH3.6	pH4.1	pH4.6	pH3.1

表2) pH の変化

pH2, pH3, pH4, pH7 で酵母が多く観察できた原因として、パインによって、調整した pH がパインの pH に近づいたことで、パインから分離した酵母が増殖しやすい環境になったのではないかと考える。pH5, pH6 で酵母の数が少なかった原因として、緩衝作用により pH の変化が小さく、酵母液の pH の値とパインの pH の値が離れているため、パインから分離した酵母が増殖しにくい環境になったのではないかと考える。

酵母を集めるために用いたパインが酸性であるため、集めた酵母は耐酸性を持っているもののみであることに気が付いた。したがってパインから分離した酵母の耐塩性を調べる実験では、耐酸性酵母の耐塩性の有無を調べたことになる。これは本来の目的である、空気中の酵母から耐塩性を持つ酵母をスクリーニングすることとずれが生じる。これらの課題を解決するために実験2を行った。

9. 実験2

<実験方法>

1.実験1と同様に酵母液をつくる。酵母液が酵母を集める食材のpHから影響を受けないようにするために、パインの代わりに pH の値が中性に近いバナナ、ニンジン、ジャガイモ、ナスを用いる。食材の pH は pH 試験紙で調べたところ、すべて pH6~7 を示した。耐塩性を調べる実験では食塩水の質量パーセント濃度を①10%②13%③16%④19%に設定する。濃度の設定は、実験1の結果より育つことが分かっている濃度の低い値については改めて調べる必要はないと考えたため、10%からとしている。

耐酸性を調べる実験では、クエン酸とクエン酸ナトリウムを用いて、実験1と同様に①pH2②pH3③pH4④pH5⑤pH6 に調整し酵母液を作る。①はクエン酸のみである。

2.酵母液を 30℃の恒温槽で一週間保存する。

3.顕微鏡で観察する。

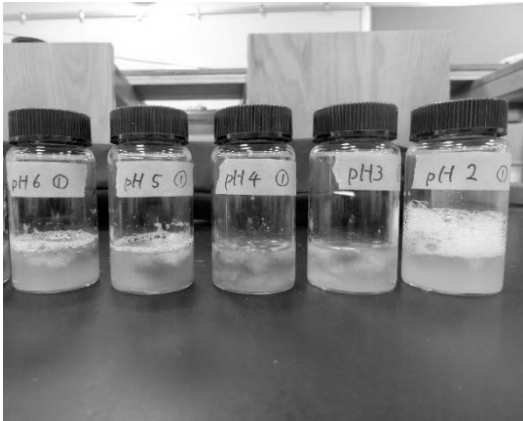


写真7) バナナを用いた酵母液

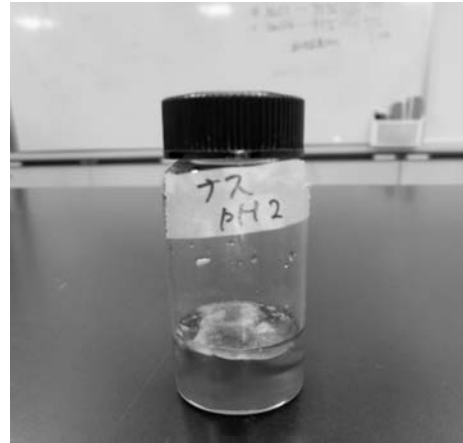


写真8) ナスを用いた酵母液 (pH2)

<実験結果>

耐塩性の実験ではジャガイモ以外で、食塩の濃度が10~13%の時、酵母が増殖していた。濃度が16%以上の時、酵母は増殖していなかった。また食塩の濃度が大きくなるにつれて酵母の数が減少していた。カビが生えている酵母液をいくつか確認した。

	10%		13%		16%		19%	
バナナ	△	※	△		×		×	
ニンジン	○	※	○	※	×		×	
ジャガイモ	×	※	×	※	△	※	×	※
ナス	△		△	※	×		×	

表3) 実験2 耐塩性実験の結果 (※はカビあり)

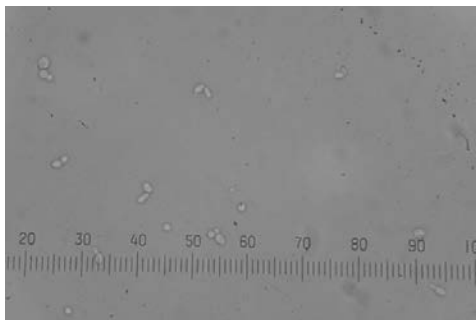


写真9) 13%のニンジンの酵母液

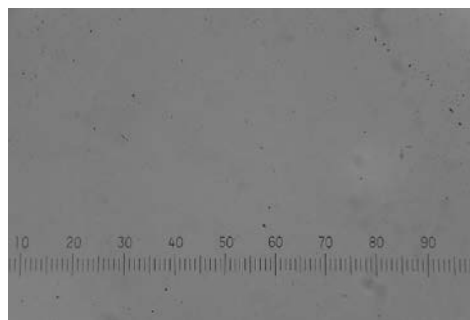


写真10) 16%のニンジンの酵母液

耐酸性の実験では、バナナは pH の値が小さくなるにつれて酵母の数が少なくなっていた。ニンジン、ジャガイモ、ナスは pH の値が小さくなるにつれて酵母の数が多くなった。カビが生えている酵母液をいくつか確認した。

	pH2	pH3	pH4	pH5	pH6
バナナ	△	△	△	△	○
ニンジン	◎	◎	○	△	△
ジャガイモ	○	◎	△	◎	×
ナス	◎	◎	◎	◎	△

表4) 実験2 耐酸性実験の結果 (※はカビあり)

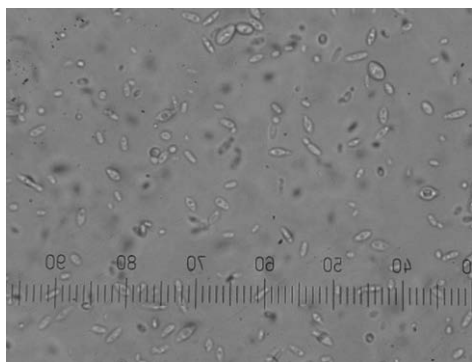


写真 11) pH3 のニンジンの酵母液

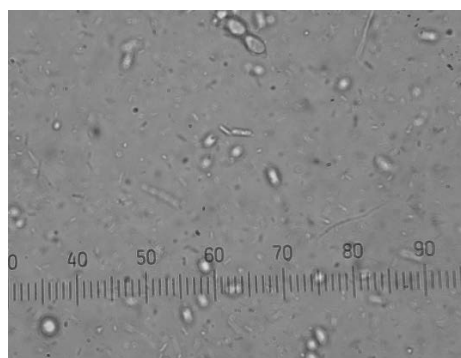


写真 12) pH4 のニンジンの酵母液

<考察>

耐塩性を調べる実験では、バナナ、ニンジン、ナスが食塩の濃度 10%~13%で酵母が増殖することから、中性の食材であれば酵母を集める食材の種類に関係なく、食塩の濃度約 13%で育てることで空気中の酵母の中から耐塩性を持つ酵母を取り出せると考える。また実験 1 でパインを用いて集めた酵母が食塩の濃度 0.0%~16.7%の時に増殖したことから、パインを用いて集めた酵母のような耐酸性を持つ酵母は塩の濃度約 16%で育てることにより高い耐塩性を持つ酵母が取り出せると考える。

ジャガイモの結果がバナナ、ニンジン、ナスの結果と異なっている原因として、カビの有無が酵母の増殖に影響したのではないかと考え、この仮説を検証するために次の実験を行った。まず、食塩の濃度が 13%のジャガイモの酵母液に生えた白いカビを、希釈したニンジンの酵母液 (pH2) に移し、30 度の恒温槽で一週間保存する。ニンジンの酵母液を用いた理由は、今回の実験で最も多く酵母が増殖した酵母液であったためである。その後、顕微鏡で観察すると、酵母が増殖していることを確認した。同様の実験を食塩の濃度 10%のニンジンの酵母液に生えた緑のカビと pH2 のジャガイモの酵母液に生えた黒いカビでも行ったが、いずれも酵母が増殖していることを確認した。このことからカビの有無は酵母の増殖に影響を及ぼさないと考える。これらの実験から、食塩の濃度が 10%と 13%のジャガイモの酵母液の実験は失敗している可能性があるのではないかと考える。

耐酸性を調べる実験では、すべての果物や野菜において、どの pH でも酵母が増殖したため、pH の値がいくつまで増殖可能なかを調べることができなかった。また、pH3 以下では酵母が増殖しないという先行研究の内容と大きく異なる結果となった。考えられる原因は 2 つ挙げられる。1 つは実験の回数が少なく、データに信頼性がないという点である。もう 1 つは、参考文献では塩酸を用いて培地の pH を調整し、酵母の生育を行ったのに対し、私たちの実験ではクエン酸とクエン酸ナトリウムを用いて緩衝液を作り、酵母を増殖させた点である。

10. 今後の課題

データの信頼性を得るために実験 2 の耐酸性の実験を再度行う。再度同じ結果を得た場合は、酸の違いによって結果が異なるのかを調べるために、クエン酸以外の酸を用いて pH の調整を行い実験する。

11. 参考文献

- 1) 大高八重子、森美羽. “酵母の分離とその性質”. スーパーサイエンスハイスクール課題研究論文集 vol.9. 高松第一高校, 2020, p.71 - 75
- 2) 戸井田仁一、蟻川幸彦. “[PDF] 自然界から分離した酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の特性”. 長野県工技センター研報. https://www.gitc.pref.nagano.lg.jp/reports/pdf/H19/04Shokuhin/H19F03_10-13.pdf
- 3) 岸本憲明、森下日出旗. “[PDF] 梅酢から分離した酵母の耐酸、耐塩性”. 美作女子大学短期大学部, 大阪市立環境科学研究所. https://www.jstage.jst.go.jp/article/seikatsueisei1957/38/2/38_2_65/_pdf