

高粱の地酵母の探索について

岡山県立高粱高校 普通科2年 井上侑己 黒川美琴 葉廣煌 藤本典子

序論

地域特有の地酵母の単離を目的として高粱高校で3種類の植物を採取し、その中で最も多く培養できた酵母に着目し、DNA分析により菌種同定を行った。その結果、未知種の酵母を発見したため性質についてドライイーストと比較する実験を行った。

実験1

酵母の培養・選定

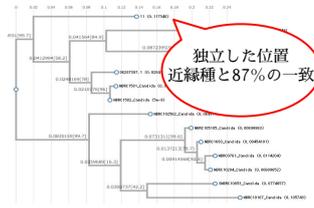
目的: 校内で採取した3種類の植物のうち、研究に使用する酵母の選定。
方法: 滅菌した各瓶にキシウブ(子房を含む)・紫蘭・ツツジの花弁各67g 砂糖13.4g(各植物の質量の20%)、蒸留水200mlをいれ密封した。その瓶を1日に1回蓋を開け空気を入れた後、瓶を振る。7日後、14日後に中の液を顕微鏡で観察した。



結果: キシウブ: 多くの菌体が観察された。細胞が大きく丸い形状。
紫蘭: 菌体が観察されなかった。
ツツジ: 微量の菌体が観察された。細胞が大きい。
⇒結果より酵母の特徴である形が丸く、大きな細胞が数多く観察されたキシウブに着目し実験した。

野生酵母の同定

目的: キシウブから取れた酵母の同定を行い酵母の種類を決定する。
方法: 酵母を培養、単離した後DNA抽出し目的遺伝子部分をPCR増幅し、抽出を行った部分の塩基配列を決定しオンラインデータベース※1で同定を行い、分子系統樹を作成した。(岡山理科大学の講習会)
結果: 分子系統樹より未知種酵母が見出された。未知種酵母は分子系統樹より一番近い種と87%の一致、他、近縁種にCandidaが多数見出された。
⇒新種・新属の可能性を得た。



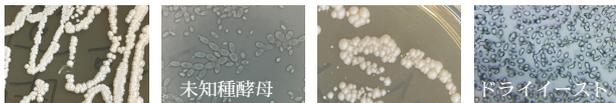
実験2

未知種酵母の性質をドライイーストとの比較から調べる

見た目の比較

目的: 未知種酵母の性質を見た目から確認する。
方法: ジャーレに未知種酵母とドライイーストをそれぞれ培養し、3日後にそれぞれの表面と顕微鏡写真から比較を行った。

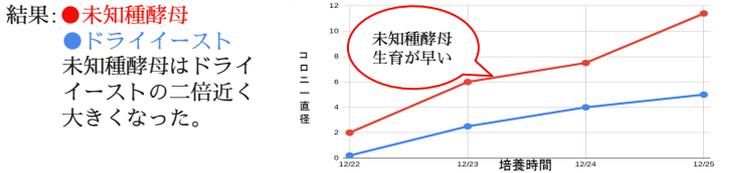
種類	コロニーの形状	表面の様子	菌体の大きさ
未知種酵母	平たく広がるよう	ざらざら	ばらつきがある
ドライイースト	丸く盛りあがるよう	つるつる	小さく一定



考察: 未知種酵母が平たく広がるように形成していたのはドライイーストよりも好気性があるからなのではないかと推測する。

コロニー直径の推移の比較

目的: 未知種酵母の性質をコロニー直径の推移より確認する。
方法: 蒸留水に各酵母のコロニーを入れ懸濁し、YPD培地に塗り広げた。コロニーの直径を4日間にわたって測定し平均を元にグラフを作成した。グラフの傾きから生育速度の比較を行った。(28℃)



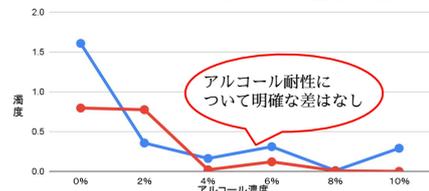
考察: 未知種酵母は呼吸をするために周りの空気に触れようと、横に広がるようにコロニーを形成したと考えられる。

参考文献

- https://www.nite.go.jp/nbric/dbrp/top
- https://www.biomerieux-industry.com/ja/products/api
- 身近な食材に存在する天然酵母の研究(神尾真由 久保田莉央 花田沙奈)
- 酵母の二酸化炭素産生(発酵性試験)(製品評価技術基盤機構)
- 低温耐性酵母のアルコール発酵について(藤井智弥大阪府立園芸高等学校バイオサイエンス科)
- 酵母の簡便な培養法と教材化の検討(岩井章介弘前大学教育学部紀要)
- 天然酵母の化粧化利用に関する研究(大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科)

アルコール耐性の比較

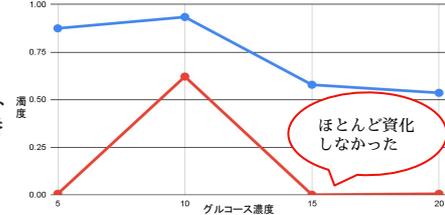
目的: 未知種酵母の性質をアルコール耐性から確認する。
方法: 濁度マクファーランド2に合わせた各酵母液中に度数100%のアルコールを0,2,4,6,8,10%入れ、栓をして2日間培養する。その後、菌体量を濁度により測定し比較する。
結果: アルコール濃度が高くなるほど濁度は低くなり、増殖が抑制された。
● 未知種酵母
● ドライイースト



考察: 両者においてアルコール耐性については明確な差はないと思われる。

生育におけるグルコース濃度の比較

目的: 未知種酵母の性質を各グルコース濃度での増殖から確認する。
方法: 濁度マクファーランド2に合わせた各酵母液を濃度5,10,15,20%のグルコース液に入れ懸濁し培養する。3~4日後にそれぞれの濁度を分光光度計で測り比較を行う。
結果: 未知種酵母はグルコース濃度10%以外では濁度は限りなく0に近い値が出た。未知種酵母、ドライイーストのどちらも10%で濁度が一番高くなった。
● 未知種酵母
● ドライイースト



考察: 未知種酵母では10%以外では菌体の増殖はほとんど見られなかったがこれは未知種酵母がグルコースをほとんど資化することができなかったためと考えられる。また、グルコースを資化するにはなにが別の栄養素が必要であると考えられる。

資化性の比較

目的: 未知種酵母の性質を資化性から確認する。
方法: ビオメリュー社のAPI 20 C AUX(微生物同定キット)を使用。培養時間が24時間のコロニーを使用し、菌体をプレートへ分注した。プレート上で19種類の同化試験を行い単一炭素源としての各基質の利用能を48~72時間後に酵母の発育で確認する。(反応は陰性コントロールと比較して判定する)

未知種酵母	ドライイースト
● MLZ(メレイトース) ● GAL(ガラクトース) 72時間後	● RAF(ラフィノース) ● XLT(キシリトール) ● MDG(メチル化グルコース) ● MAL(マルトース) ● MLZ(メレイトース) ● ADO(アドニトール) ● SOR(ソルビトール) ● GAL(ガラクトース) ● TRE(トレハロース) ● XYL(キシロース) ● INO(イノシトール) ● GLU(グルコース) ● SAC(スクロース) 砂糖 ● ARA(アラビノース) 24~48時間後

未知種酵母は2種類の糖のみ資化した。
考察: 未知種酵母にはドライイーストのように多くの炭水化物(糖)に対する資化性が見受けられないことから炭水化物ではなく他のものをエネルギー源にしているのではないかと考える。未知種酵母とドライイーストともに資化性が見られた糖を使用し実験を行うとグルコースとは異なる結果が得られる可能性があると考えられる。また、キットの基質は単一炭素源であるため、資化するために必要な栄養源が足りないことで十分糖を資化できなかった可能性も考えられる。

発酵能力の比較

目的: 未知種酵母の性質を発酵能力から確認する。
方法: 同じコロニー数を懸濁した5,10,15,20%のグルコース溶液をキューネ発酵管に入れ、空気を抜きグルコース溶液で満たし28℃で培養する。発生した二酸化炭素の量を6日間同時刻に測定し、発生量の比較を行う。
結果: 未知種酵母はドライイーストに比べ、発酵能力が極めて低い。
● 未知種酵母5%
● 未知種酵母10%
● ドライイースト5%



※未知種酵母15%20%はほぼ発酵しなかったためグラフに表記なし。
考察: 未知種酵母はアルコール発酵能力が低いと考えられる。また、グルコース液のみであるため、資化する際に必要な栄養素が足りず発酵が進まなかった可能性も考えられる。しかしYPD培地でも両者には二酸化炭素の発生に大きな差が見られた。

総合考察

未知種酵母には発酵能力はさほどなく、好気性ではないかと考えられる。また炭水化物に対する資化性も芳しくないためパンや酒造に使用することは難しいと考えられる。グルコース濃度の比較、資化性の比較から未知種酵母は炭水化物に対する資化性は低いことがわかったが、YPD培地ではかなりの増殖が見られる。これは、YPD培地に含まれるタンパク質の分解物であるペプトンを資化している可能性が高いと考えられる。また、近縁のCandida種の中には油脂酵母として知られるものもあり、未知種酵母も油脂酵母であれば利用の可能性が出てくる。