北海道の植物からの *Saccharomyces* 属酵母の 単離と製パン適性

関口幸恵・田中みち子・高橋 淳*・浅野行蔵
(北海道大学大学院農学院・*日本製粉株式会社)

平成 19 年 7 月 2 日受理

Isolation of *Saccharomyces* spp. from plants in Hokkaido and
their characteristics for bread making

Sachie SEKIGUCHI, Michiko TANAKA, Atsushi TAKAHASHI*, Kozo ASANO

(Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Kita 9, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo,
Hokkaido, 060-8589, Japan
Nippon Flour Mills Co., Ltd., 5-27-5, Sendagaya, Shibuya, Tokyo, 151-8537, Japan)

This study aimed to add diversity to the food fermented by yeasts. For this purpose, we isolated only the strains of *Saccharomyces* spp. and examined their several characteristics essential for fermented food. Furthermore, we tried to make bread using the strains selected. Two hundred and sixty-two strains of budding yeasts were isolated from 138 plants in the Hokkaido area (Taisetsu, Hidaka, Shiretoko, Abashiri and Botanical Garden of Hokkaido University) on high osmotic agar plates. In order to select strains belonging to genus *Saccharomyces* from the budding yeasts, we constructed two primer pairs specific to *Saccharomyces* spp. within the D 1/D 2 domain of 26 S rRNA gene. Using colony PCR with these specific primers, we obtained 24 tentative strains of *Saccharomyces* spp. Homology search studies and phylogenetic analysis based on the gene sequences of 26 S rRNA gene D 1/D 2 domain of these tentative strains demonstrated that 23 strains could be identified as *Saccharomyces* spp. We examined their abilities for ethanol, aroma and CO₂ production, sugar assimilability, and their invertase activities. Distinctive isolates, *S. cerevisiae* AHU 4438, *S. paradoxus* AHU 4432, and *S. kluyveri* AHU 4436, were applied for bread making and the former two strains were evaluated as acceptable regarding bread volume and a distinctive aroma with full body when they were baked after a 40% longer final fermentation time.

Key words : *Saccharomyces* 属酵母, PCR プライマー, 製パン

緒 言

発酵食品では、その発酵過程において酵母が生産する有機酸やアルコール、香気成分が製品の風味や香りに大きな影響を与える。アルコール飲料や味噌・醤油、パン製造のため、耐アルコール性、耐糖性の付与、発酵力や保存性の向上などそれぞれの製品に適した酵母

の育種がこれまでも行われてきた。既知の酵母は、約 1500 種とされるが¹⁾、産業利用されているのはごく一部の属、種にすぎない。食生活の多様化に伴い、現代の消費者の様々な嗜好に対応する発酵食品を作り出すためには、異なった生理学的諸性質を持つ酵母の自然界からの選択や、従来から用いられている優良株の遺伝学的・細胞工学的手法による改良が考えられる^{2,3)}。

本報では、発酵食品に様々な特徴を付加できる酵母を北海道の自然環境に生息する植物から分離することを目的とした。これまでパンや清酒の製造でよく使用されてきた *Saccharomyces* 属酵母のみを、PCR 法を用いて効率的に分離同定し、これらについて発酵上重要と思われるいくつかの生理学的特徴を調べた。さらに発酵食品の一つであるパンの風味を良くする、異なる糖資化性をもつ酵母で発酵するなど特徴あるパン製造への利用を検討した。

実験方法

1. 出芽酵母の単離

大雪・日高山系、知床・網走や北海道大学植物園などで採取した木本樹液・樹皮・花・果実及び草本花を分離源とした。*Saccharomyces* 属酵母の特長である、

嫌気発酵能、高糖濃度耐性やアルコール耐性を選択の指標とし⁴⁾、植物試料は2つの方法で前処理を行った。植物試料約1g、メタルコーン1個と滅菌生理食塩水500 μ l を専用チューブにとり、MULTI-BEADS SHOCKER (安井器械) で30秒から60秒間破碎し、これを直接分離試料とした。集積分離試料として、2種の集積培養培地 (Table 1(I), (II)) 9ml にそれぞれ植物試料約1gを加え、3日間、27°Cで静置培養したものを用いた。

処理後の直接及び集積分離試料をそれぞれ滅菌生理食塩水で段階希釈後、ペニシリンGとストレプトマイシンをそれぞれ最終濃度1mg/l及び100mg/lとしたYPS平板培地 (Table 1(III)) に塗抹し、アネロパック・ケンキ (三菱ガス化学) を用いて、約3日間、27°Cで微好気培養を行った。出現したコロニーの

Table 1 Compositions of media.

Components\Media	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)
Yeast extract	5 g/l	5 g/l	5 g/l	5 g/l	10 g/l
Polypepton	5 g/l	5 g/l	5 g/l	5 g/l	20 g/l
Sucrose	200 or 400 g/l ^{a)}	20 g/l	40 g/l	—	—
Ethanol	—	30 ml/l ^{a)}	—	—	—
Glucose	—	—	—	40 g/l	20 g/l
Agar	—	—	15 g/l	15 g/l	—
pH	5.0-6.0	5.5	5.0-6.0	5.0-6.0	5.5

Components\Media	(VI)	(VII)
<i>Rice koji</i> ^{b)}	500 g/l	—
KH ₂ PO ₄	1.3 g/l	0.75 g/l
NaCl	0.25 g/l	—
Lactic acid ^{b)}	6 ml/l	—
Cane molasses ^{c)}	—	37.5 ml/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	3 g/l
Urea	—	1.9 g/l
Corn steep liquor	—	1.9 ml/l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	—	0.75 g/l
pH	not adjusted	5.2

Each medium was sterilized at 121°C for 15 min after adjusting the pH, respectively, except for 20 min to the medium (VII).

a) Sucrose solution sterilized separately and 99.5% ethanol were mixed with the other sterilized components of the medium (I) or (II), respectively.

b) *Rice koji* and lactic acid were mixed with the other sterilized components of the medium (VI) before inoculation.

c) Fermentable sugar content of cane molasses was about 33%.

うち、光学顕微鏡下（×150）で細胞が大きい酵母様コロニーを選択分離した。これをさらに YPD 平板培地（Table 1(IV)）に塗抹して約3日間、27°Cで培養した。単一コロニーで、かつ顕微鏡下で出芽が確認できたものを YPD 斜面培地に移植し、27°Cで5日間培養後、出芽酵母分離株として7°Cで保存した。

2. 26 S rRNA 遺伝子配列による出芽酵母の同定

NL 1-NL 4⁵⁾ プライマーペアを使ったコロニー PCR（Table 2）法で出芽酵母コロニーから 26 S

Table 2 Colony PCR conditions.

(a) Composition of reaction mixture 1.

Zymolyase 100 T 10 mg/ml	1 μ l
Sterilized distilled water (S. D. W)	9 μ l
	10 μ l

(b) Composition of reaction mixture 2.

Forward primer 10 pmol/ml	2.5 μ l
Reverse primer 10 pmol/ml	2.5 μ l
10×PCR buffer	5 μ l
25 mM MgCl ₂ sol.	3 μ l
2 mM dNTP	5 μ l
0.1% BSA sol.	5 μ l
Taq polymerase	0.5 μ l
S. D. W	2.5 μ l
	49 μ l

(c) PCR condition.

94°C for 4 minutes	} 35 cycles
94°C for 1 minute	
55°C for 1 minute	
72°C for 1 minute	
72°C for 10 minutes	
<hr/> → 4°C	

(d) Sequences of PCR primers.

Names of primers	Sequences
SCF 1	5'-GGCAACTTTGGGGCCGT-3'
SCR 1	5'-CGAGGCAAGCTACATTCCTATG-3'
SCR 2	5'-CCAGCTGGCAGTATTCCCA-3'
NL 1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'
NL 4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'

A toothpick with yeast cells from a small colony was suspended in Mixture 1 and 1 μ l of the suspension thus obtained was added to Mixture 2 as a template.

rRNA 遺伝子の D 1/D 2 全領域を増幅した。SU-PRECTM PCR（タカラバイオ）により精製したこれらの増幅産物を鋳型とし、Big Dye Terminator v 1.1 cycle Sequencing Kit（PerkinElmer Japan）と NL 1 及び NL 4 プライマーを用いてシーケンス反応を行わせた。反応終了後、3100 Genetic Analyzer（Applied Biosystems JAPAN）でそれらの塩基配列を決定し、BLAST⁶⁾ 検索を行った。

3. *Saccharomyces* 属に特異的なプライマーの構築

DNA データバンクで入手した *Saccharomyces cerevisiae* 4 株及び *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus* 各 1 株ずつ⁷⁾、計 10 株と試験的に同定した出芽酵母分離株のうち 12 株の 26 S rRNA 遺伝子 D 1/D 2 領域の塩基配列を多重整列化した。これを基に *Saccharomyces* 属に特異的なプライマーペア SCF 1-SCR 1, SCF 1-SCR 2 を同領域内に設計した。

4. *Saccharomyces* 属酵母の選択と確認

保存した出芽酵母分離株のコロニー PCR を、上述した 2 種の新規に構築したプライマーペアと NL 1-NL 4（Table 2）を用いて行った。3 種のプライマーペアによる断片がすべて増幅したものを *Saccharomyces* 属仮同定株とした。

Saccharomyces 属仮同定株の相同性検索を D 1/D 2 領域の塩基配列決定により行った。さらに、仮同定株とその相同株及び DNA データバンクより得た *Saccharomyces sensu stricto* species⁷⁾ に属する標準株の D 1/D 2 領域約 547 塩基の多重整列化は、CLUSTAL X プログラムパッケージ⁸⁾ を用いて行った。得られたデータから PHYLIP プログラムパッケージ version 3. 65 (<http://evolution.genetics.washington.software/phyliip.html>) を用い、近隣結合法で系統樹を作成した。系統樹上の各分岐の信頼性はブーツストラップ法で計算した。

5. 発酵食品製造上重要な酵母の諸性質の評価法

(1) エタノール生成能 供試株 1 白金耳を麴培地（Table 1(VI)）10 ml に接種し、15°Cで7日間静置培養した⁹⁾。培養液上清中のエタノール濃度を F-kit Ethanol（Roche Diagnostics）を用いて測定した。対照として市販乾燥パン酵母ニッシンドライイースト（日清製粉グループ）と協会 7 号酵母を用い、同様に

培養して得た培養上清のエタノール濃度を測定した。

(2)香気成分生成能 YPD 10 培地 (Table 1(V)) のグルコース量を 100 g/l としたものの 5 ml に各供試株 1 白金耳を接種し 20°C, 5 日間静置培養後, 遠心分離 (4°C, 1500×g, 5 min) して得た培養上清の香気成分を分析・比較した。各培養上清 1 ml に同量の酢酸エチルを加え, 30 秒間振とう抽出後, 酢酸エチル画分を分離し, さらに硫酸マグネシウムで脱水後これを試料とした。分析は GC-MS (GC-MS QP-2010, 島津製作所; DB-WAX column, 30 m×0.25 mm, 0.25 μm in split-less) で行い, 対照として前記市販パン酵母ニッシンドライイーストを同様に培養・調製したものを用いた。以下の糖質化性, インペルターゼ活性及び小麦粉生地における炭酸ガス発生試験でもこのニッシンドライイースト酵母株を対照株として同様に培養・調製し比較した。

(3)糖質化性 培養同定・真菌キット ID 32 C api (BIOMÉRIEUX) を用いて, 31 種の糖類について各供試株の質化能をプロトコールに従って判定した。

(4)インペルターゼ活性 各供試株を YPD 培地 (Table 1(V)) 7 ml を含む試験管にて, 27°C, 120 rpm で 13 時間振とう培養した後, 4°C, 5000×g, 5 min で遠心分離し集菌した。菌体を滅菌生理食塩水に懸濁し OD₆₀₀=1.0 とした菌液 1 ml に 5% ショ糖溶液 (0.1 M クエン酸緩衝液; pH 5.5) 1 ml を加え, 30°C で 3 時間反応させた。1 N NaOH 2 ml を加えて反応停止後, ジニトロサリチル酸法でグルコース濃度を測定した。一方, DC protein assay kit (BIO-RAD Laboratories) を用いて, 集菌した菌体 1 mg 当たりのタンパク質量を測定した。各供試株菌体タンパク質 1 mg あたり, 1 時間に生成したグルコース量を 1 U のインペルターゼ活性とした。

(5)小麦粉生地における酵母の炭酸ガス発生能 200 ml 容三角フラスコ中の YPD 培地 100 ml に供試株 1 白金耳を接種し前項同様に 13 時間振とう培養した。500 ml 容坂口フラスコ中の廃糖蜜培地 (Table 1(VII)) 120 ml にこの培養液を 5 ml 接種し, 同条件で 40 時間振とう培養後, 遠心分離して菌体を集めた。酵母の発酵能試験用パン生地は無糖生地と 5% 加糖生地の 2 種を用いた (Table 3)。ミキサー (National MFG) に入れた生地材料は, 30°C, 550 rpm で約 5 分間捏ね, ドウグラフ (横河北辰電機) 上で捏ね具合

Table 3 Compositions of dough.

Components/Dough ^{a)}	k ₀	k ₅	BM
Yeast cells ^{b)}	1.7 g	1.7 g	4 g
Hard wheat flour	35 g	35 g	200 g
Sugar	1.75 g	0 g	10 g
Salt	0.7 g	0.7 g	4 g
Water	20 ml	21 ml	133 ml
Shortening	—	—	10 g
Ascorbic acid aq (100 ppm)	—	—	1 ml

a) k₀: Test dough without the addition of sugar.

k₅: Test dough with the addition of 5% sugar.

BM: Test dough for bread making. b) Wet weight.

が一定となったら, 20 g のドウを分取しファーモグラフ II (アトー) に供した。30°C, 5 分間放置後, 5 分毎のガス発生量を 2 時間にわたり測定した。

(6)パン焼成試験 YPD 培地 10 ml に各供試株 1 白金耳を接種し, 前項同様に 13 時間試験管で振とう培養した培養液 5 ml を, 500 ml 容坂口フラスコ入り YPD 培地 120 ml に接種し, さらに 24 時間振とう培養した。この培養液を遠心分離し, 得られた菌体を適量の滅菌生理食塩水に懸濁した。この懸濁液をブフナー漏斗と CELLULOSE ACETATE フィルター (0.20 μm, 47 mm; ADVANTEC 東洋) を用いて吸引濾過して得た, 水分含量約 70% の菌体ケーキをパン焼成試験に用いた。パン生地は, ノータム法による山型食パンの製造法に従い調製した。各成分 (Table 3) の捏ね混ぜ・分割を含め 30°C で 20 分間置き, ガス抜きと成形を行った後, 湿度 85% で最終発酵を 38°C, 70 分間, または 100 分間行った。これらを 200°C, 25 分間焼き上げた。対照としてニッテンレギュラー生イースト (ニッテン) を用いて同様に生地を調製しパン焼成を行った。品質評価は, 焼成 1 時間後に重量と容積を測定し, 1 日後に日本イースト工業会が定める評価法¹⁰⁾に従って 5 人のパネラーによる食味試験を行った。物理的評価と官能評価をあわせ, 同工業会が定める品質評価法¹⁰⁾に従って総合評価を行った。

実験結果および考察

1. *Saccharomyces* 属酵母の単離と同定

採取した樹液や木片・花・果実など 138 の植物試料

から YPS 選択平板培地上で 262 株の出芽酵母を単離した。このうち任意に選択した 29 株の rRNA 遺伝子 D1/D2 領域の塩基配列を調べたところ、これらは *Torulaspora* 属, *Candida* 属, *Zygosaccharomyces* 属, *Lachancea* 属, *Hanseniaspora* 属の酵母であって、*Saccharomyces* 属酵母が含まれていないことを認めた。生理的特性からの選択では *Saccharomyces* 属酵母を得る確率が低いと考えられた。新たに構築した *Saccharomyces* 属特異的プライマー (Table 2) を用いて、当研究室保存の *Saccharomyces* 属 AHU 株 3 株と先に同定した分離株コロニーについて PCR 産物を比較した結果、選択プライマーとして使用できると判定した。これら 2 セットの特異的プライマーと NL1-NL4 を用いたコロニー PCR により 3 種の特異的断片が増幅した出芽酵母 24 株が *Saccharomyces* 属と考えられた (Fig. 1)。さらにこれらの D1/D2 領域塩基配列から BLAST 検索した結果、*Torulaspora delbrueckii* に 99% 相同であった 1 株を除き、残り 23 株が *S. cerevisiae*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. kluyveri* のいずれかに 99% 以上相同で、系統解析により、*Saccharomyces* 属に属する上記 4 種のいずれかのクラスターに含まれると判定した (Fig. 2)。植物試料から耐浸透圧性、発酵能や出芽を指標として酵母

を分離したが、*Saccharomyces* 属は分離出芽酵母の 1 割にも満たず、自然界における分離可能なこの属は予想以上に少ないことが明らかとなった。この 23 株は菌株保存機関 AHU に寄託し、以後 AHU 番号で表記した。なお、*S. kluyveri* は、現在、7 種で構成される *Saccharomyces sensu stricto* species に系統的に入らないとする説もある⁷⁾。本研究で得られた系統樹においても *S. kluyveri* の 2 株並びに近縁の 4 株は *Saccharomyces sensu stricto* species とは異なるクラスターを形成していた。またここでは、構築したプライマーペアが、多くの様々な出芽酵母からコロニー PCR という簡便な方法で *Saccharomyces* 属酵母を選択するプローブとして使用できる有用なものであることが示唆された。

2. 分離 *Saccharomyces* 属酵母の諸性質

分離した *S. cerevisiae* の AHU 4425, AHU 4426, AHU 4438 株, *S. mikatae* の AHU 4418 株, *S. kluyveri* の AHU 4419, AHU 4435, AHU 4437 株が、比較的高いエタノール生成能を示したが、市販パン酵母ニッシンドライイーストや協会 7 号酵母菌株の生成量には及ばなかった (Table 4)。YPD 10 培地で生成された主な香気成分は、イソアミルアルコール、フェニルエチルアルコール、アセトイン、乳酸、2,3-

Fig. 1 Electrophoretic profile of PCR products with specific primers from *Saccharomyces* spp. from budding yeast strains isolated.

Lane M : 100 bp DNA Ladder (TaKaRa). Lane N : Negative control. Lanes 1, 4, 7, 10, 13, 16 and 19 : amplified with the primer pair of NL 1 and NL 4. Lanes 2, 5, 8, 11, 14, 17 and 20 : amplified with the primer pair of SCF 1 and SCR 1. Lanes 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 21 : amplified with the primer pair of SCF 1 and SCR 2. Budding yeast strains B, C, and F were selected as candidates for *Saccharomyces* spp.

Fig. 2 Neighbour-joining tree based on the comparison of the 547 bps in D1/D2 region of 26S rRNA. Bootstrap values more than 50% based on 1000 replications are given on the branches. Strain numbers of the isolates are shown in bold. A number in parentheses is an accession number of DNA Data Bank.

Table 4 Ethanol production in the *rice koji* medium by yeast strains selected and used in this study.

Strain No.	Ethanol production (% ; v/v)		
	<0.5	0.5-4.0%	>4.0%
AHU 4420		AHU 4424	AHU 4418
4421		4428	4419
4422		4432	4425
4423		4439	4426
4427		4440	4435
4429			4437
4430			4438
4431			Baker's yeast (7.57%)
4433			K 7 (7.97%)
4434			
4436			

Baker's yeast : Nisshin dry yeast, K 7 : the sake yeast Kyokai No. 7

ブタンジオール、メチオナルであった。それぞれの香気成分の割合や全体の生成量は、株によって異なり種特異的ではなかった。すべての株においてイソamilアルコールが最も多く検出され全体の1/2以上を占めていた。また、対照に比べフェニルエチルアルコールの割合が大きく、アセトインの割合が小さかった。

分離 *Saccharomyces* 属酵母株と対照酵母株の糖資化性を比較したところ、ガラクトース、スクロース、グルコース、ラフィノースを資化する点は共通していた。市販パン酵母がトレハロース、メレチトースを資化するのに対し、供試株はいずれも資化できなかった。無糖パン生地製造で重要であるマルトースの資化能を持つ株は、*S. kluyveri* AHU 4435 のみであった。このことから、分離 *Saccharomyces* 属酵母は加糖パン生地での発酵は期待できるが、無糖パン生地での発酵は期待できない。逆に分離株が資化でき対照酵母が資化し得ない炭素源は、乳酸、マンニトール、メリビオース、D-ソルビトール、グルコン酸カリウム、L-ソルボースであった。メリビオースなどの機能性糖を資化する分離 *Saccharomyces* 属酵母を利用した特徴ある製パンへの応用も期待できると思われる。

インペルターゼはスクロースを分解し、単糖生成による浸透圧上昇を引き起こすため、菓子パンのような高糖パン生地中の酵母による発酵を阻害する可能性がある。従って、菓子パン製造に際しては活性が適度に低い事が重要である。分離 *Saccharomyces* 属酵母株のインペルターゼ活性は、ほとんどが対照の市販パン酵母菌株と同程度、またはそれ以下であり (Table 5)、これらの酵母は菓子パン製造に利用できると考え

た。一方、*S. cerevisiae* AHU 4423 株は比較的、*S. kluyveri* AHU 4439 株は著しく対照酵母よりインペルターゼ活性が高いので、これらの株は高糖生地中で利用が難しいと思われた。

加糖条件下においてパン生地におけるガス発生量 (120 分間) を調べたところ、AHU 4419, AHU 4432, AHU 4436, AHU 4438 株は対照である市販パン酵母ニッシンドライイースト菌株に近い発酵力を持っていた (Fig. 3)。無糖条件下では、対照よりも初期 (50 分間) ガス発生速度の高い株が数株得られた。これらの結果から、生地中での発酵力にすぐれ、アルコール及び香気成分生成能に大きな違いのあった *S. paradoxus* AHU 4432, *S. kluyveri* AHU 4436, *S. cerevisiae* AHU 4438 の3株を次の焼成試験に用いた。

3. パン焼成試験

焼成した各パンの断面図に明らかのように、最終発酵時間が70分では、どの株においても、対照の市販パン酵母ニッテンレギュラー生イーストを用いたパンと比べ膨らみが足りなかった。最終発酵を100分に延長すると、AHU 4432, AHU 4438 株を用いたパンは対照の70分最終発酵の膨らみと同程度になった (Fig. 4)。パンの色・形は対照に匹敵し、対照の香気とは異なりふくよかで味にこくがあった。これら分離酵母 AHU 4432, AHU 4438 株を使ったパンの総合評価点数は対照を81とした時77.1及び73.4と比較的高く、パンとして市場に受け入れられうると評価した (Table 6)。焼成試験に用いたこれらの分離酵母2株はYPD培地で調製し、対糖収率約36%であったが、パン酵母最適培養法である、十分な通気の下で廃糖蜜

Table 5 Invertase activities of yeast strains selected and used in this study.

Invertase activity	<100 U		100-200 U	>200 U
	AHU 4419	AHU 4428	AHU 4418	AHU 4439 (450 U)
	4420	4429	4423 (188 U)	
	4421	4431	4430	
	4422	4433	4432	
Stain No.	4424	4434	4436	
	4425	4435	Baker's yeast (105 U)	
	4426	4437		
	4427	4438		
		4440		

1 unit is defined as the amount of glucose production for 1 min per 1 mg protein.

Fig. 3 Total CO₂ production in the test dough.
Measurement was done at 30°C for 120 min.

Fig. 4 Cross sectional views of bread fermented by each of three *Saccharomyces* strains isolated and a commercial baker's yeast strain (Nitten regular raw yeast).

Table 6 Quality evaluation of breads fermented by various *Saccharomyces* yeasts.

Items/Strain No.	<i>S. cerevisiae</i> Control	<i>S. kluyveri</i> AHU 4436		<i>S. paradoxus</i> AHU 4432		<i>S. cerevisiae</i> AHU 4438	
Final fermentation time(min)	70	70	100	70	100	70	100
Color	8	4.5	6	7.3	8.3	7	8
Figure	4	2	2.3	3.1	3.8	3.1	3.9
Crust	4	1.8	2.3	3.1	4	2.9	3.7
Foam	8	4.4	4.6	5.8	7.2	5.8	6.8
Hue	4	2.3	2.3	3.1	3.6	3.2	3.7
Texture	4	1.7	1.7	2.7	3.8	2.7	3.5
Aroma	12	10.2	10.2	10	10.4	10.6	10.8
Taste	12	9.2	9.4	10.8	11	11	11
Volume	25	10	10	14	25	11	22
Total	81	46.1	48.8	59.9	77.1	57.3	73.4
Rank	B	E	E	E	C	E	C

Rank	A	B	C	D	E
Total	≥91	81-90	71-80	61-70	≤60

Rank A, B, C : Acceptable. Rank D, E : Unacceptable.

を用いた連続流加法で生産することにより、耐久力のある十分量の菌体を得、さらに種々の試験を行うことにより、特徴あるパン酵母としての能力を発揮することが期待される。

要 約

酵母を用いた発酵食品に様々な特徴を付加することを目的に、自然界から *Saccharomyces* 属酵母のみを選択的に単離し、それらの発酵食品への利用上重要な諸性質を調べ、パン製造に応用することを試みた。大雪、日高、網走、知床や北海道大学植物園で採取した138の植物サンプルから、262株の出芽酵母を高浸透圧寒天培地上で単離した。26 S rRNA 遺伝子の D1/D2 領域中に新しく構築した *Saccharomyces* 属酵母に特異的なプライマーペアを用いて、コロニー PCR により24株の *Saccharomyces* 属仮同定株を選択した。D1/D2 全領域の塩基配列を読み、その相同性検索及び系統解析を行った結果、このうち23株を *Saccharomyces* 属と同定した。これら酵母菌株のエタノール・香気成分生成能、糖資化性、インペルターゼ活性、小麦粉生地における炭酸ガス発生能を調べたところ、炭酸ガス発生能を持ち、エタノール・香気成分生成能において市販パン酵母とは大きく異なる3株 *S. cer-*

evisiae AHU 4438 株, *S. paradoxus* AHU 4432 株, *S. kluyveri* AHU 4436 株を得、これらを用いてパン焼成試験を行った。AHU 4432, AHU 4438 株で最終発酵時間を100分とした時、市販パン酵母で最終発酵時間70分後焼成した対照と同程度のパンの体積が得られた。パンの色・形は対照に匹敵し、対照の香気とは異なり味にこくがあった。総合的に AHU 4432, AHU 4438 株を用いたこれらのパンは市場に受け入れられうるものとして評価された。

謝 辞

ファーマグラフ及びパン焼成試験にご協力いただいた農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター芽室研究拠点の山内宏昭博士、斉藤勝一博士及び小麦研究チームの皆様へ深く感謝致します。

文 献

- 1) C. P. Kurtzman and J. W. Fell : The Yeast Handbook, Springer, Berlin (2006)
- 2) 柏木 亨：醸協, **97**, 2-6 (2002)
- 3) 松田義弘, 工藤晋平, 小関敏彦, 上木勝司, 上木厚子：醸協, **100**, 199-208 (2005)
- 4) 菅浦敏夫：New Food Industry, **35**, 1-6 (1993)

- 5) C. P. Kurtzman and C. J. Robnett : *Antonie van Leewenhoek*, **73**, 331-371 (1998)
 - 6) S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman : *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410 (1990)
 - 7) C. P. Kurtzman and C. J. Robnett : *FEMS Yeasts Res.*, **3**, 417-432 (2003)
 - 8) J. D. Thompson, T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins : *Nucleic Acid Res*, **24**, 4876-4882 (1997)
 - 9) K. Fukuda, A. Muromachi, M. Watanabe, K. Asano, and S. Takasawa : *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 288-292 (1993)
 - 10) 日本イースト工業会：イースト技法, **60**, 85-102 (1990)
-