

## 地域名産の花・果実に生息する有用酵母の探索

眞山 滋志・村上 二郎・眞山 眞理

### Exploring of beneficial yeasts inhabiting well-known local flowers and fruits

Shigeyuki MAYAMA, Jiro MURAKAMI & Mari MAYAMA

#### Abstract

Isolation of natural yeasts inhabiting well-known local flowers and fruits was carried out for 6 years from Japanese daffodil and loquat of Minami-awaji and grapes PIONE and SHIEN of Okayama, Japan. The following yeasts, *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*, *Candida reilenensis*, *Pichia membranifacies*, *Schizosaccharomyces japonicus* and *Metschnikowia reukaufii* were isolated from Japanese daffodil, *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora vineae* and *Metschnikowia reukaufii* were isolated from Loquat, *Candida carpophila*, *Kloeckera apiculata*, *Hyphopichia burtonii*, *Hanseniaspora vineae* and *Pichia membranifacies* were isolated from PIOPE grapes, and *Hanseniaspora vineae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Wickerhamomyces anomalus* were isolated from SHIEN grapes. A brief review was carried out on the usefulness of individual isolates. The isolates of *S. cerevisiae* from SHIEN grapes were found to be alcohol resistant and beneficial in the production of KIU-brand brewed foods.

**Key words** : Exploring beneficial natural yeasts, yeast inhabiting flowers and fruits, natural yeast  
キーワード : 有用天然酵母の探索, 花・果実酵母, 天然酵母

### 1. はじめに

酵母は、真核生物である単細胞の菌類である。植物の花、葉面や樹液、食・住環境、土壌や海水など自然界に広く生息している。パスツールが19世紀中頃に果実酒、ビールやパンがアルコール発酵機能をもつ酵母による産物であることを初めて明らかにして以来、酵母は「発酵の母」と呼ばれる重要な産業微生物として

利用されている。酵母は全ゲノムが解析されており真核生物の遺伝子機能解明などバイオサイエンスのモデル生物として重要であるばかりでなく、遺伝子工学への応用においても最も重要な生物の一つである(原島, 2014)。一方、有用な天然酵母の探索利用も、地ビールやパン等発酵食品の新規の嗜好が求められており今なお盛んである。花酵母を利用したアルコール飲料の醸造は良く知られている(都築ら, 2015, 数岡&中田,

2013)。

本学では、2013年南あわじ志知キャンパスに地域創成農学部（現農学部）地域創成農学科が開設され、2018年に発酵食品分野の醸造学科が増設され、農・食を基盤とする未来社会の創成に実践的に役立つ人材の養成を目指している。教員それぞれの専門分野が関わる地域の課題解決に向けた研究会が立ち上げられ学部全体で地域貢献活動に取り組んできた。植物の病害防除に資する植物病理学を専門とする筆者らは、専門とする植物病原菌の分離のみならず植物表面に生息する有用な天然酵母を分離探索して大学ブランド発酵食品の作製を目指した。幸い2015～2019年度に文部科学省の「知の拠点整備事業」および2019～2021年に私立大学研究ブランディング事業に採択され、農学部で取り組んだ地域連携研究が全学的に支援された。本稿は、その内の一課題「天然酵母を利用した大学ブランドの発酵食品の開発」を目指して、約6年間本学が所在する地元の名産の花や果実等から分離収集した天然酵母とそれらの有用性に関する文献情報をまとめたものである。

## 2. 実験方法

### (1) 供試植物

本学南あわじ志知および高梁キャンパス地域名産の花及び果実として、南あわじ市の市花であるニホンスイセンおよび同灘地区名産のビワ、および岡山県特産ブドウのピオーネおよび紫苑を選定し酵母の分離に供した。ニホンスイセンは、日本3大水仙郷の名所として知られる南あわじ市黒岩水仙郷園において冬季に開花したものを分譲していただいた（図-1）。また農学部志知キャンパスとその周辺で開花したものを採取した。ビワ果実は灘地区名産「淡路島灘びわ」を初夏に入手した。高梁キャンパスにおいては、2015年に高梁市成羽の蔵元白菊酒造を訪問した時に伺った情報に基づき、生産量が最も多いといわれる高梁産の「ピオー

ネ」を使用した。2018年の晩秋には岡山特産冬ブドウとして人気の品種「紫苑」も用いた。

### (2) 分離培養法

酵母の分離増殖培地には、清酒、ビールおよびパン等の発酵に関わる*Saccharomyces* 属菌の選択増殖培地として知られているRE培地（ラヒノース1%、イーストニイトロゲンベース0.67%、クロラムフェニコール0.01%、エタノール0～8%添加）を用いた（安田&北本, 2011）。安田と北本はSniegowskiら（2002）およびSampaioら（2008）が広葉樹の樹皮や土壌から*Saccharomyces*属酵母の分離に用いた選択培地にクロラムフェニコールを加えたRE培地が花等からの*S. cerevisiae*の選択増殖培地として大変有効であることを示している。各供試植物はエタノール0～10%添加RE液体培地を入れた300ml培養瓶に浸漬後28℃で培養した。一定期間後、白濁した培養原液およびその希釈液少量をクロラムフェニコール含有PDAペトリ皿培地上に塗布、28℃で培養し、数日後に出現した単一コロニーを分離採取した。PDA培地は日本水産製を用いた。供試植物をエタノールフリーRE培地で浸漬培養した場合は、培養液約5mlを5～10%エタノール含有RE培地に移植培養して、増殖する菌株を分離保存した。

### (3) 酵母種の同定

分離酵母種の同定検査は、株式会社ファスマック遺伝子検査事業部（神奈川県厚木市）に委託して、酵母の遺伝子シーケンス解析を行い高精度データベースに基づく遺伝子診断法により行われた。

## 3. 結果および考察

2016～2020年に各試料植物から分離収集した酵母を表1に示した。スイセンから5種、ビワ3種、ピオーネ5種及び紫苑から5種が得られた。複数の試料植物に共通して分離される菌種のあることが注目された。

表1 地域名産の花・果実から分離した酵母

供試植物	酵母種名	採取年	採取地
ニホンスイセン	<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i>	2016	南あわじ市黒岩水仙郷
	<i>Candida railenensis</i>	2016	南あわじ市黒岩水仙郷
	<i>Pichia membranifaciens</i>	2017	南あわじ市志知
	<i>Schizosaccharomyces japonicas</i>	2018	南あわじ市志知
	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	2019	南あわじ市志知
ビワ (果実)	<i>Kloeckera apiculata</i>	2016	南あわじ市灘
	<i>Hanseniaspora vineae</i>	2016	南あわじ市灘
	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	2017	南あわじ市灘
ブドウピオーネ	<i>Candida carpophila</i>	2016	高梁市
	<i>Kloeckera apiculata</i>	2016	高梁市
	<i>Hyphopichia burtonii</i>	2017	高梁市
	<i>Hanseniaspora vineae</i>	2019	高梁市
	<i>Pichia membranifaciens</i>	2019	高梁市
ブドウ紫苑	<i>Hanseniaspora vineae</i>	2018	岡山市
	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	2018	岡山市
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2018	岡山市
	<i>Kloeckera apiculata</i>	2020	高梁市
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	2021	赤磐市

*Hanseniaspora vineae*および*Kloeckera apiculata*はそれぞれビワ、ピオーネおよび紫苑のいずれの果実からも分離された(図-1)。*H. vineae*、*K. apiculata*および紫苑から分離された*Hanseniaspora guilliermondii*はブドウ園において最もよく分離される菌種と言われており(Jollyら, 2006)、今回の分離探索においても同様の傾向が認められた。

*H. vineae*はブドウへの寄生性が高い酵母で、ワインの初期発酵に深くかかわっているといわれている。またワインへの芳香成分の加味による質向上に影響すると指摘されており芳香成分の分泌に関してワイン酵母*S. cerevisiae*との比較研究も多い(Jollyら, 2006, Beldaら, 2016, Del Fresno et al., 2021)。またワイン用ブドウから分離された*H. vineae*はパンの製造にも利用されている(Takaya et al., 2019)。

*K. apiculata*も果実への寄生性が高くブドウを含むフルーツジュースの初期発酵で優占的となることが知られている。*H. guilliermondii*もまたワインの初期発酵過程における酵母の優占種となるが、ワインの香りを阻害するacetoinを産生するといわれている。

ブドウの初期発酵に関わるこれら野生酵母*H. vineae*、*K. apiculata*および*H. guilliermondii*は醸造工程初期に添加される亜硫酸やワイン酵母*Saccharomyces cerevisiae*が発酵生産するアルコールが5%程度になるとそれらの非*Saccharomyces*属酵母の増殖は抑制される(赤尾, 2017)。

ピオーネから分離された*Hyphopichia burtonii*は、糸状菌性の酵母でありデンプン分解酵素アミラーゼ活性が極めて強い酵母と言われている。本菌は手延べ技術により製造されている著名な秋田の伝統食品稲庭うどんの品質形成に関与している。稲庭うどんには肉眼でも判別できる位の空隙が存在しそれが菌ごたえ等の食味の原因になっているが、この空隙形成には製麺作業の繰り返し過程で集積される耐塩性酵母*H. burtonii*による発酵が深く関与することが明らかにされている(大久ら, 2012, 大久, 2013)。

冬ブドウ紫苑から*Saccharomyces cerevisiae*が分離できた。ピオーネからの酒酵母*S. cerevisiae*の分離が3年目も不調に終わった時期にピオーネの後のシーズンオフの前に出荷される人気の冬ブドウ品種「紫苑」

からも分離探索を試みたところ唯一酵母 *S. cerevisiae* が分離できた (図 1, 8 - 12)。同菌株は 4 ~ 10% エタノール含有 RE 培地で増殖することも確認され (図 2, 10), 本菌が清酒やワイン等の醸造発酵食品の作製に利用できる可能性が示唆された。現在これら分離株は PDA 試験管培地で冷蔵保存培養するとともに継体培養を行っている。また 10% グリセロール懸濁液の凍結保存法による数年以上の長期間の保存が可能である (金子, 2009)。

スイセンとピオーネから分離された *Pichia membranifaciens* はキラ酵母として良く知られている。酵母 *S. cerevisiae* が同種もしくは近縁の酵母を殺すいわゆるキラ現象は 1963 年にはじめて Makower と Bevan により報告されたといわれている (Goto, 1994)。清酒の醸造発酵工程における重要な品質管理の一つはキラ活性を持つ野生酵母の汚染防止である。近年キラ酵母のキラ因子遺伝子は細胞質に存在するプラスミッド上にコードされ、抗菌性毒素タンパク質を菌体外へ分泌して他酵母の増殖を抑制することが明らかにされており、優良な酒酵母の育種改良の指標にもなっている (Goto, 1994, Hatoum ら, 2012)。

*P. membranifaciens* は、また植物病原糸状菌を抑制する生物防除剤としての報告もある (Masih ら, 2001)。本菌のキラ活性について、村上ら (2017) が研究材料としているマイコトキシン産生植物病原菌に対する抗菌活性の有無について対峙培養試験を行ったところ、スイセン由来の *P. membranifaciens* は植物病原菌であるコムギ赤かび病菌 (*Fusarium graminearum*), トウモロコシ赤かび病菌 (*F. verticillioides*) およびトマトアルターナリア茎枯病菌 (*Alternaria alternata*) の成長に対する顕著な抗菌活性を示した (図 - 2, 13)。またピワ由来の *K. apiculata* にもキラ活性を認めた。近年、酵母は生物防除エージェントとして見直されており、地上部の病害のみならずポストハーベスト病害に対する生物的防除効果を示す報告もある。また、根圏においても他の微生物との競合能力の高いものがあ

り土壤病害に対しても生物的防除効果が期待されている (相野, 2020)。今後これらのキラ活性を持つ酵母が植物病害防除に利用できる可能性が示唆された。

酵母には分裂酵母と出芽酵母がある。前述の *S. cerevisiae* をはじめ全ての分離酵母は出芽酵母であるが (図 2, 12), スイセンから分離できた酵母 *Schizosaccharomyces japonicas* は分裂酵母である。*S. japonicas* 菌はアンズやイチゴから単離されており日本食品分析センターにて安全性試験を確認後、信州産アンズ由来酵母の食品への利用に関する研究が行われている (吉川 & 坂本, 2015)。分裂酵母では先端基礎研究および発酵産業で良く用いられている *Schizosaccharomyces bombe* が国際的に著名である。*S. bombe* は塩基配列が解読され分子データベースが確立されており真核細胞の分子細胞学研究のモデル生物として最先端の研究に貢献している。また、食品、化粧品、バイオエタノールなど発酵産業に役立っている。今回分離できた *S. japonicas* も近年国際レベルで分子生物データベース (MOD) の解析が急速に確立されてきており、*S. pombe* との比較研究に寄与するモデル生物として注目されている。

スイセンとピワから分離された *Metschnikowia reukaufii* は、昆虫により媒介される花酵母として良く知られており植物の花、媒介昆虫、酵母菌の生態系における相互関係において大変興味深い生命現象が解明されつつある (牧野 & 横山, 2014, Herrera, 2014, Tsuji & Fukami, 2018)。通常、単一の植物種からしか検出されない微生物種が大半を占めるなか、様々な植物種の蜜に共通して出現する微生物種として特に今回分離できた *M. reukaufii* は複数の論文にその名を連ねる花蜜界の「常連」と言われているものであった (牧野 & 横山, 2014)。2019 年冬の同日時に南あわじ志知キャンパス周辺の 50 ~ 200m 間隔の 3 か所のスイセン群の花から分離できた酵母がすべて *M. reukaufii* であったことに注目したが、これらの論文から本菌を近隣の群生地間につなぐものは媒介昆虫である可能性が

示唆される興味深い結果であった。

#### 4. おわりに

今回の酵母の分離探索を通じて、ブドウ紫苑から *S. cerevisiae* 菌株が得られたことから今後これを利用して大学ブランドの発酵食品の開発が可能になった。また *H. vineae*, *H. guilliermondii*, *K. apiculata*, *Hyphopichia burtonii* などの酵母もそれぞれ発酵食品の製造に関わるものであるため学科の醸造資源微生物の保存菌とした。今後も継続して有用天然酵母の探索収集を行う意義は大きいと考える。また、筆者は長年植物感染症における植物（品種）と病原菌（レース）

間の相互関係に起こる発病か抵抗性発現かの特異性現象の解明に携わってきたが（眞山&土佐, 2020）、今回の分離実験を通じて各種植物の花・果実や葉面にみられる天然酵母の生息性においても生物相互関係における特異的関係がみられることを知って、改めて自然生態系における多様な生物相互間にみられる「特異性」現象に興味をいだいた。最後に、本研究を遂行するにあたって文部科学省による地（知）の拠点整備事業（2015～19年度）および私立大学ブランディング事業「エコ農業ブランディングによる発展的地域創成モデルの形成」（2017～19年度）の支援を受けた。ここに厚く謝意を表す。

#### 引用文献

- 原島俊 (2015) 酵母を用いた真核生物遺伝子機能の解明とバイオテクノロジーへの応用. 生物工学会誌 第93巻 第1号, 2-22.
- 都築正男, 大橋正孝, 清水浩美 (2015) ササユリからの酒造用酵母の分離とその醸造特性. 奈良県産業振興総合センター 研究報告 41, 1-11.
- 数岡孝幸, 中田久保 (2013). 花から分離したTPI株の同定とその清酒醸造特性. 日本醸造協会誌 108 (1), 52-58.
- 安田(吉野)庄子, 北本則行(2011). *Sacharomyces cerevisiae* の選択的分離と遺伝的多様性, 日本食品科学工学会誌58巻9号, 433-439.
- Sniegowski, P.D., Dombrowski, P.G. & Fingerman, E. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Res.* 1, 299-306.
- Sampaio, J.R. & Goncalves, P. (2008) Natural populations of *S. kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and sympatric with *S. cerevisiae* & *S. paradoxus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2144-2152.
- Jolly, N.P., Augustin, O.P.H. & Pretorius, I.S. (2006) The role and use of Non-Saccharomyces yeasts in wine production. *S.A.J of Enology & Viticulture* 27 (1), 15-39.
- Belda, I., Ruiz, J., Alastruey-Izquierdo, A., Navascues, E., Marquina, D. & Santos, A. (2016) Unraveling the enzymatic basis of wine "flavorome": a phylo-functional study of wine related yeast species. *Frontiers in Microbiology*, 7, 12.
- Del Fresno, J.M., et al. (2021) The impact of *Hanseniaspora vineae* Fermentation and Ageing on Lees on the Terpenic Aromatic Profile of White Wines of the Albillo Variety, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (4), 2195.
- 大久長範, 鈴木直樹, 三浦みどり, 遠藤耕介, 藤田康弘 (2012) 手延べ乾麺の空隙形成に関与する耐塩性酵母. 日本食品科学工学会誌 59巻9号, 442-446.
- 大久長範 (2013) 手延べ乾麺「稲庭うどん」の空隙形成に関与する耐塩性酵母 *Hyphopichia burtonii*. *J. Brewing Society of Japan*, 1087, 472-477.
- 金子嘉信 (2009) 酵母の保存技術について (2) 出芽酵母突然変異体の凍結保存. *Microbiol. Cult. Coll.* 25 (2), 93-95.
- Takaya, M., Ohwada, T., Oda, Y. (2019) Characterization of the yeast *Hanseniaspora vineae* isolated from the wine grape 'Yamasachi' and its use for bread, *Food science and technology Research* 25 (6), 835-842.

- 赤尾健 (2017) 醸造用酵母のあれこれ (2) ビール酵母, ワイン酵母, *Sake Utsuwa Research* V, 8-11.
- Goto, K. (1994). Two killers on the chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Brew.Soc.Japan*, 89 (1), 18-25.
- Hatoum, R., Labrie, S. and Fliss, I. (2012) Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: From fundamental to novel applications, *Front Microbiol.* 3, 421.
- Masih, E. I., Slezack-Deschaumes, S., Marmaras, I., Barka, E.A., Vernet,G., Charpentier, C., Adholeya, A., Paul, B. (2001) Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine, *FEMS Microbiol Lett*, 202 (2), 227-32.
- Murakami, J, Miyashita, K, Masaïke, A, Mayama, S. (2017) Detection of Fusarium species from rice seeds in the southern part of Awaji Island, Japan. In *Translation from Genomes to Disease Management* (Proc. of Asian Conf. on Plant Path.), 203.
- 相野公孝 (2020) 生物的防除法 2) 細菌を用いた生物的防除. 植物病理学 (第2版) (眞山・土佐編) 文永堂, p183-4.
- 吉川茂利, 坂本乃里子 (2015) アンズ由来ジャポニカス分裂酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* の食品への利用に関する研究. 長野県工業技術総合センター研究報 10, 178-181.
- 牧野崇司, 横山潤 (2014) 共生関係にひそむ第三者: 花蜜を利用する酵母・細菌が変える植物-送粉者相互作用. 日本生態学会誌 64, 101-115.
- Herrera, C.M. (2014) Population growth of the floricolous yeast *Metschnikowia reukaufii*: effects of nectar host, yeast genotype, and host x genotype interaction. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88 (2), 250-7.
- Tsuji, K. & Fukami, T. (2018) Community-wide consequences of sexual dimorphism:evidence from nectar microbes in dioecious plants, *Ecology* 99 (11), 2476-2484.
- 眞山滋志・土佐幸雄 (編) (2020) 植物病理学 (第2版) 文永堂 pp. 347.

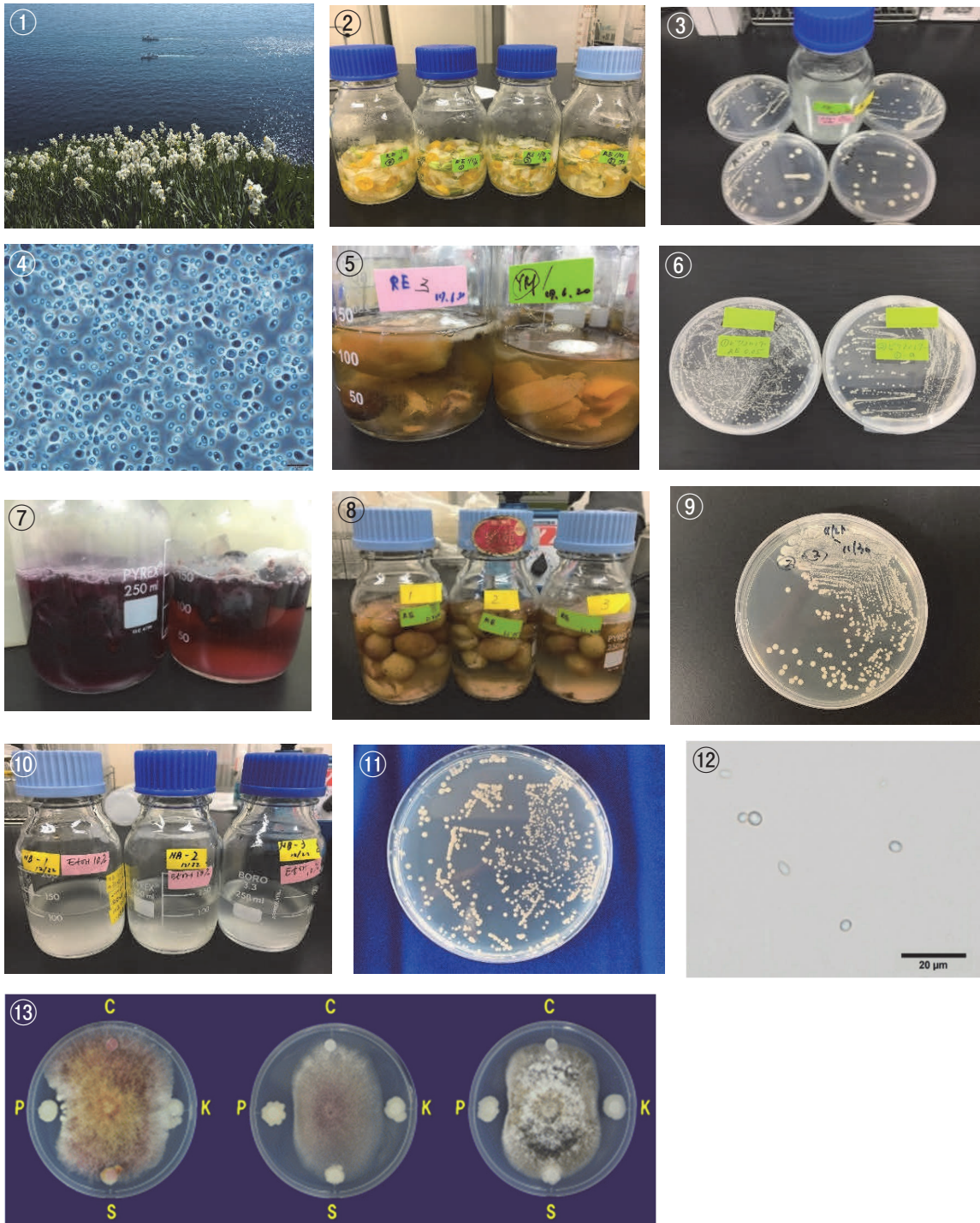


図1 各種植物からの酵母の分離（上段左①から下段右⑬へ）  
 ①南あわじ市灘の黒岩水仙郷 ②スイセンのRE培地浸漬培養 ③スイセン培養液の画線培養  
 ④スイセンの分離酵母 ⑤ビワのRE培地浸漬培養 ⑥ビワ培養液の画線培養  
 ⑦ピオーネのRE培地浸漬培養 ⑧紫苑のRE培地浸漬培養 ⑨紫苑培養液の画線培養  
 ⑩紫苑分離酵母のアルコール10%含培養液での培養 ⑪分離酵母*S. cerevisiae*のコロニー  
 ⑫分離酵母*S. cerevisiae*の単細胞と出芽する酵母の顕微鏡写真  
 ⑬植物病原糸状菌に対するキラ性酵母検出の対峙培養  
 C：濾紙（対照区） P：*P. membranifaciens* K：*K. apiculata* S：*S. cerevisiae*