プロバイオティクスとしての天然酵母の利用に関する研究

玖　村　朗　人（北海道大学大学院農学研究科助教授）

1. はじめに

高齢化社会の到来や医療費負担額の増加に伴い，近年，健康の維持・増進への関心が著しく高まっている。とりわけ，食品や食品成分の特性を科学的に明らかにし，そこから期待される効能を理解・判断した上で消費者がそれらの食品を日常の食生活に取り入れていく傾向が強まっている。その流れを表すかのように平成3年度に厚生大臣が「食品中に含まれる特定の成分が健康の維持増進に役立つことが科学的に証明され，具体的な機能を表示することができる食品」を「特定保健用食品」として表示することを許可して以来，平成14年7月の時点で299品目がその認可を受けている。これらの品目のうち，実に75%以上が乳酸菌関連のもので，これはプロバイオティクスという概念に集約される。プロバイオティクスとは「宿主の健康維持に有益な働きをする微生物培養物」であり，乳酸菌の場合，腸内菌叢の改善や免疫賦活化作用，コレステロール低下作用等が認められている[1]。

ところで，酵母もまた我々の食生活において馴染み深い微生物で古くから醸造，製パン等に利用されてきた。特に近年はビール醸造の副産物利用としてビール酵母が注目されるようになり，単にビタミンや食物繊維の供給源としてではなく，糖尿病抑制や鉄分吸収の促進等の効果が見出されるようになった[2]。一方，市販の外国産チーズの中からしばしば分離される酵母は製造工程上意図的に添加されたものではなく，製造時の周辺環境や伝統的な製造手法に則って未殺菌乳を用いた結果見出されるものと考えられている。これらの酵母はチーズの製造工程，即ち，乳酸菌の発育に伴う乳酸発酵や加塩，低温熟成等の選択を受けながらチーズ中で生長したもので，長年に亘って食されてきたことからも人体へは無害であると考えられる[3]。しかし，これらの酵母の特性を明らかにして食品産業への応用を試みた例は極めて少ない。そこで本研究では，チーズから分離したこれらの天然酵母を特にプロバイオティクスとしての観点から利用可能であるかどうかを検討するためにいくつかの実験を行なったので報告する。

2. 材料と方法

2.1 供試菌の分離と培養

表1に示した各種チーズをそれぞれPBSに懸濁した後，PDA寒天上で27℃ 36時間培養し，出現した酵母様コロニーを採取した。これを再びPBSに懸濁した後，PDA寒天上で培養し，単一のクローンを得た。

2.2 供試菌の同定

得られた酵母をYPD液体培地で27℃ 2日間培養後，遠心分離によって酵母菌体を回収し，DNA抽出キット（ISOPLANT；ニッポンジーン）を用いてDNAの抽出を行なった。下記のプライマー（ITS-4, ITS-5）を用いてここで得られたDNAを鋳型としてInternal Transcribed Spacer（ITS）領域をPCRによって増幅し[4]，

増幅産物をTA-クローニング用ベクターであるpGEM-T Easyに連結した後，ヒートショック法による大腸菌JM109株への遺伝子導入を行なった[5]。遺伝子導入後，アンピシリン（50 mg/*l*）と0.1 mM IPTG，X-galを含むLB寒天上で培養を（37℃一晩）行ない，出現した白色を呈する株を採取してアンピシリンを含むLB溶液中で培養（37℃一晩）した[5]。大腸菌が保持するプラスミドをアルカリ-SDS法[5]で回収した後，それを鋳型としてThermoSequenase Cycle Sequencing Kit（Amersham Bioscience）を用いた標識反応を行ない，それをDNAシークエンサー（DSQ-2000L, Simadzu）に供した。決定されたDNA塩基配列をインターネット上でBLAST検索を行ない，酵母の菌種を決定した。

ITS-4：5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
ITS-5：5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'

2.3　胃腸内条件下での耐性実験

分離した酵母が胃内環境に近い低pH領域で耐性を示すかどうかを観察するために，YPD液体培地中で27℃ 48時間培養した供試酵母を1白金耳とって0.5% NaClを含む1 M HCl溶液pH 2.0（10 ml）に移し，37℃で3時間保持した。この後，この溶液から1白金耳とってYPD液体培地中で27℃ 72時間培養し，菌の発育に伴う濁りの有無から酵母の生存を判定した。

同様に胆汁酸に対する耐性を調べるために，YPD液体培地中で予備培養した供試酵母を0.1%コール酸添加または無添加のYPD液体培地に1白金耳移し，27℃ 24時間培養して発育状況を比較した。

2.4　Caco-2細胞への付着実験

ヒト結腸ガン由来株化細胞Caco-2を10^6cell/cm^2ずつ予めカバースリップを入れた24穴プレートに播種し，37℃，5% CO_2存在下で培養（4～5日間）して細胞を付着させた後，さらに8日間培養して分化誘導した。培養液には10%ウシ胎児血清とペニシリン（100 U/ml），ストレプトマイシン（100 ng/ml）を含むDMEM培地を用いた。この後，細胞をPBSで3回洗浄し，予めDMEMで洗浄しておいた供試酵母を10^6細胞に添加して37℃，90分間，5% CO_2の条件で保持した。この後，細胞をPBSで4回洗浄して付着しない酵母を除去した後，カバースリップを取り除いて風乾させ，メタノールで3分間固定した。細胞および酵母の染色はギムザ溶液を用いて10分間行ない，水洗後，風乾させた。以上作成した標本をマウントクイック（大道産業）にてスライドグラスに包埋し，倒立型顕微鏡を用いてCaco-2に付着した酵母の数を計測した。なお，同一の実験区についてそれぞれ4ウェルずつ行ない，Caco-2細胞数とそれに付着した酵母数の計測は各ウェル当り20視野（総計80視野）にわたって行なった。

3.　結果と考察

本実験において得られた計95株の酵母は何れも青かびタイプのチーズから分離され（**表1**），その他のタイプのチーズから酵母を検出すること

表1　各種チーズより分離された酵母の菌種同定

分離源	分離株数	菌種名[1]
青かびタイプ		
ロックフォール（フランス）	28	*D. hansenii* (28/28)
ブルー・ド・シャッス（フランス）	6	*D. hansenii* (6/6)
ゴルゴンゾラ（イタリア）	10	*S. cereviciae* (10/10)
スチルトン（イギリス）	51	*K. lactis* (30/51)
		D. hansenii (17/51)
		Y. lipolytica (4/51)
白かびタイプ		
シャルスネイ（フランス）	0	
ル・サン・オーバン（フランス）	0	
パラカ（フランス）	0	
その他		
ニュイ・サン・ジョルジュ（フランス，表面熟成タイプ）	0	
フロレット（フランス，山羊乳）	0	

[1] カッコ内はその分離株中の内訳を示す

は出来なかった。分離した全ての酵母についてITS領域のDNA塩基配列を調べたところ，ロックフォール，ブルー・ド・シャッス，ゴルゴンゾラから分離された酵母は同一菌種であったのに対し，スチルトンからは複数の菌種が得られていることが明らかとなった。最も多かったのが*Debaryomyces hansenii*（54%）で，これは耐塩性の産膜酵母として知られ，好ましくない酵母と捉えられてきた。次いで多かった*Kluveromyces lactis*（32%）はケフィア[6]やクーミス[7]等の伝統的な発酵乳に含まれている。*Saccharomyces cerevisiae*（11%）はビール醸造や製パン産業に利用される代表的な菌種で，*Yarrowia lipolytica*（4%）は2-ケトグルタール酸やエリスリトール，マンニトールといった代謝産物を生産し，工業的な利用がなされている[8]。

各菌種から任意に2株ずつ選び出し，Caco-2細胞に対する付着実験を行なった結果を**表2**に示した。この結果，付着性を示す*K. lactis*（**図1-A**）と*D. hansenii*（**図1-B**），付着性を殆ど示さない*S. cerevisiae*（**図1-C**）と*Y. lipolytica*（**図1-D**）に2分され，酵母間に差があることが明らかとなった。これまで報告された単位Caco-2細胞数（100 cell）に対する乳酸菌の付着細胞数を見ると，*L. rhamnosus* GG株の場合，1,500前後で同じ*L. rhamnosus*でもMA27/6B株では100に満たないという[9]。また，Caco-2に対する各種*Lactobacillus*属乳酸菌25株の付着性を観察した

表2　各分離酵母株のCaco-2に対する付着性

供試酵母	付着細胞数[1]
K. lactis S-1	51
K. lactis S-2	62
D. hansenii R-7	35
D. hansenii 212	31
S. cereviciae G-3	1
S. cereviciae G-9	3
Y. lipolytica S-8	7
Y. lipolytica S-12	7

[1] Caco-2（100cell）に対して付着した酵母の細胞数

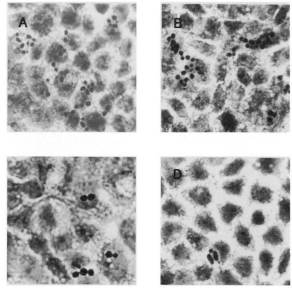

図1　Caco-2細胞に対する各種酵母の付着実験
A：*K. lactis* S2株，B：*D. hansenii* 212株，
C：*S. cereviciae* G3株，D：*Y. lipolytica* 12株

Chauviereらの実験によれば[10]，特に付着性の高かった株は*L. acidophilus* LB，*L. helveticus* CNRZ32とCNRZ240，*L. delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ239株の計4株であったが，それでもCaco-2（100 cell）に対する比率は200程度であったという。本実験で最も付着性の高かった*K. lactis*の場合，50～60程度となるが，酵母の場合，細胞自体の大きさが乳酸菌の8～10倍程度大きいことも考慮する必要がある。*K. lactis*に次いで付着性の高かった*D. hansenii*は，*K. lactis*のおおよそ半分の30前後の値となった。殆ど付着性を示さなかった*Y. lipolytica*と*S. cerevisiae*を含め，これらの付着性の差は各種酵母の細胞壁成分やその発現量の違いによるものと考えられる。

なお，胃腸内条件下での耐性実験の結果，全ての酵母において生存性と良好な発育が確認された。このことから，今回分離した酵母を経口摂取した場合，生きたまま小腸に到達する可能性が示唆された。

4. おわりに

我々の食生活の中で生きた酵母を口にすること

は稀であり，成人の糞便から分離される微生物の中で酵母が占める割合は非常に少ない[11]。仮に我々に最も馴染み深い *S. cerevisiae* を生菌の状態で摂取したとしても，本実験結果から考えるに腸内には定着せず，腸内細菌叢に及ぼす影響は殆ど無いものと考えられる。一方，一部の発酵乳製品に含まれ，その安全性や嗜好性の点でも肯定的に捉えられ得る *K. lactis* に明らかな付着性が認められたことは本実験で得られた大きな成果といえよう。今後，この酵母が腸管におけるカルシウムの吸収や免疫細胞の適度な活性化，あるいは腸内菌叢の改善等に何らかの寄与が確認されれば，新たな食品素材としての提案が可能となるものと考えられる。

本研究を遂行するにあたり，研究助成を賜りました浦上食品・食文化振興財団ならびに関係者各位の皆様に心から御礼申し上げます。また，今後の貴財団の益々のご発展をお祈り致します。

引用文献

1)　竹友直生，木村勝紀，佐々木隆，福井宗徳，武田邦弘　乳業技術 55, 42-54（2002）

2)　グュエン・ヴァン・チュエン，タ・チ・トエット・マイ，高崎智子，安江正明 New Food Industry, 44, 7-15（2002）

3)　Kumura H., Takagaki K., Sone T., Tsukahara M., Tanaka T., and Shimazaki K. Biosci Biotechnol Biochem. 66, 1370-1373（2002）

4)　White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. PCR protocols: Guide to Methods and Applications.（Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. eds）Academic Press, Inc., San Diego, California, USA, 315-322（1990）

5)　Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E. F. Molecular cloning, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York（1989）

6)　ケフィアとは何か　よつ葉乳業（株）技術情報ニュース 7（2）（2002）

7)　足立達，伊藤敞敏　乳とその加工　建帛社（1987）

8)　Heslot, H. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 43, 43-73（1990）

9)　Bernardeau, M., Vernoux, J. P. and Gueguen, M. Milchwissenschaft 56, 663-666（2001）

10)　Chauvière, G., Coconnier, M. H., Kerneis, S., Fourniat, J. and Servin, A. L. J. Gen. Microbiol. 138, 1689-1696（1992）

11)　森下芳行　腸内フローラの構造と機能　朝倉書店（1990）

Assessment of wild type yeasts isolated from dairy origin as probiotic use

Haruto Kumura (Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

In recent years, beneficial effects of *Bifidobacterium* strains and some species of lactic acid bacteria have been emphasized for human health. These strains are considered as probiotic bacteria, which exhibit potential for improvement of intestinal circumstances including microbial balance and immunological response to various antigens. In contrast, little attention has been paid to apply yeast strains as this concept in spite of their importance in the food and brewing industry. Among the yeast species, *Saccharomyces cerevisiae* has been used frequently and other type of strains could be found in fermented dairy products. Although yeasts isolated from some traditional cheeses were not adopted for specific uses, these could be understood as non-pathogenic source because of long-term history of consumption.

In this study, 95 strains of yeast were isolated from commercial blue-veined cheese. Identification by a nucleotide sequence analysis resulted in *Debaryomyces hansenii* (51 strains), *Kluveromyces lactis* (30 strains), *Saccharomyces cerevisiae* (10 strains) and *Yarrowia lipolytica* (4 strains).

These strains were resistant to gastrointestinal conditions such as acid stress (pH 2) and the presence of cholic acid. Two strains from each species were randomly selected to perform *in vitro* adhesion study using intestinal cell lines of Caco-2 from human origin. Adhesive potential was found in *K. lactis* and *D. hansenii*, in contrast, that of *S. cerevisiae* and *Y. lipolytica* was negligible. Since *K. lactis* have been used as deliberate culture of certain dairy products, this study demonstrated the possibility to propose the novel probiotic yeast strain. It remains to be elucidated specific biological influences of *K. lactis* such as improvement of intestinal circumstances and/or adsorption of Ca^{2+}.