

福山バラの酵母プロジェクト -製パンへの適用-

杉原千紗^{*1}, 花岡拓哉¹, 池田達哉², 久富泰資¹

本研究は、2016年7月1日の福山市市制施行100周年に向けた「チャレンジ100周年」事業に参加し、「ぬまくま夢工房」「福山市」「福山大学」の産官学が連携して地域社会の形成及び発展に寄与することを目的として行った。具体的には福山市園芸センター及びこだま食品株式会社試験農場で栽培されている43品種のバラを用いて、福山市・福山大学包括協定の下で産業に有用な野生出芽酵母の分離と実用化を目指した。その結果、398株の野生酵母を取得し、解析した222株中9株がワイン酵母OC2とほぼ同等の発酵性を示した。その中でも4株の高発酵性の野生出芽酵母は製パンにも適用出来ることがわかり、それぞれの酵母がもつ個性がパンの個性に表れるという驚きの事実が判明し、地域の特産としてブランド化できる道が示された。今後は、高発酵性の野生出芽酵母が得られたバラとその花に飛来する昆虫類についての詳細な研究を進めることが課題となる。

キーワード : 福山市、バラ、野生酵母、発酵性、製パン

酵母とは核をもつ真核単細胞微生物を指し、工業面のみならず医学分野や、家畜分野、真核細胞のモデル実験材料などとして用いられている。分類学上ではおおよそ149属1500種が存在しているとされ¹⁾、中には病原性を示すものもいる。その生息場所は自然界に広く分布し²⁻⁴⁾、果実、果汁、花、腐葉、樹液などの植物体、昆虫、人、雨、土壌、海水、淡水など多岐にわたる。酵母の産業用途として発酵食品、食品添加物、飼料、化粧品、医薬品、香水等がある。花に棲息している酵母に関しては多くの研究があり、酵母菌は昆虫類によって花に持ち込まれ、花から花へと伝播されることが知られている。また、花酵母は季節により変動し、夏から秋にかけて最も多く、植物の実のなる時期にも影響を受けることが知られている⁵⁾。しかしながら多くの研究では、花酵母は見つかっても菌数は僅かで、比較的限られたグループに属し、大多数は偏性好気性(酸素呼吸のみ)であって、発酵性をもつものはめずらしいとされる⁶⁾。事実、著者らは、サクランボ、ブルーベリー、ブドウなど果実からの高発酵性野生酵母の取得に成功しているが、ツツジ、ソメイヨシノ、柑橘類の花などからの野生酵母の分離実験では、高発酵性酵母は得られていない。本研究は、福山市の協力の下、福山市園芸センターよりのバラ41品種、こだま食品株式会社試験農場よりのバラ3品種を用いて、それらのバラの花またはバラの実に棲息している野生酵母の分離を試みた。その結果、製パンに適した4種の酵母を取得でき、分離源はそれぞれアロマテ

¹〒729-0292 福山市学園町1番地三蔵 福山大学生命工学部生物工学科

²〒721-8514 福山市西深津町6-12-1 近畿中国四国農業研究センター

*Tel: +81-84-936-2111, Fax: +81-84-936-2023, E-mail: csugihar@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp

表1 実験に使用したバラ品種(43品種)

整理番号	品種名
1	パローレ
2	桃香
3	エル
4	アロマテラピー
5	ステファニー ドゥ モナコ
6	フラグラント レディ
7	恋心
8	魅惑
9	つる ヘルツ アス
10	結愛
11	ペレニアル ブラッシュ
12	プレステージ ドゥ リヨン
13	ホワイトクリスマス
14	月光
15	シークレットパフューム
16	ストロベリー ダイキリ
17	楽園
18	オクラホマ
19	スウィート メリナ
20	ドフト ゴールド
21	プリンセスふくやま
22	ローズふくやま
23	ビューティフル ふくやま
24	福山城
25	チャーミーふくやま
26	スマイルふくやま
27	ラブリーふくやま
28	香貴
29	芳純
30	正雪
31	春芳
32	ハーモニイ
33	ミスターリンカーン
34	夢香
35	ジャスミーナ
36	フレンチ パフューム
37	ほのか
38	レモン アンド ジンジャー
39	フレグラント アプリコット
40	アンネ フランク
41	ゴールド マリー
42	ダマスクローズ
43	ドッグローズ

福山市園芸センターより#1-41の41品種を、こだま食品(株)試験農場より#33,42,43の3品種を採取し実験に使用した。

ラピー、シークレットパフューム、ダマスクローズ、ビューティフルふくやまの4品種のバラであった。またこれらの酵母を用いた製パン試験の結果、それぞれの酵母がもつ個性がパンの個性に直に表れることが明らかとなり、市販の酵母を使用したパンと比べてその味わいや香りが異なる地域特性のパンを作り出すことが可能となることがわかった。

材料と方法

バラの花を採取後、集積培養し、5種類の寒天培地上へシングルコロニーの作製を行った。得られた酵母様コロニーを顕微鏡観察し、出芽酵母のみを選別し、これらを凍結保存した。得られた野生出芽酵母株においてダーラム試験を24時間で行う1次スクリーニングを実施し、発酵性が見られたもののみ7時間で行う2次スクリーニングを実施した。これにより得られた高発酵性野生酵母株をパルスフィールドゲル電気泳動法により電気泳動核型を決定すると共に、18S rDNA 領域におけるコロニーPCR産物を用いてシーケンスを行い、得られた塩基配列情報を基にインターネット上のBlastn検索より菌の同定を行った。またパン生地による膨張試験を行い、パン生地の膨張性が比較的良い株をさらに選別した。これらにおける顕微鏡写真のデータをとった後、候補株を培養し、生イーストの状態ホームベーカリーによる製パン試験を実施した。このホームベーカリー試験での7倍量にて実際にベーカリーにて製パン試験を実施して、パンにおける特徴について調べた。尚、各々の方法の詳細を以下に示す。

試料採取の手順 福山市園芸センターから41品種、こだま食品株式会社試験農場から3品種のバラを採取した(表1)。具体的には、ナビロールプラスチック手袋を着用し、70%エタノールで手袋と剪定はさみを消毒後、剪定はさみを火炎滅菌してバラの5枚葉の下を切断し、なるべく雑菌が混入しないよう注意しながらポリ袋に1品種ずつバラの花または実を採取した(図1)。採取したものはデジ



図1 バラ採取の様子

福山バラの酵母プロジェクト -製パンへの適用-

タルカメラ (Panasonic LUMIX DMC-FZ2)で撮影した。

集積培養 採取したバラの花又はバラの実を火炎滅菌したピンセット及びハサミを用いて、葉、茎、花軸、花柄、花托、がく片を出来る限り取り除き、オートクレーブ(121℃、20分)済みの綿栓付きの250 mlのYM液体培地(表2)が入っている500 ml容三角フラスコに、雑菌が混入しないようにアルコールランプの火の傍でバラの花又は実を入れ、室温にて2日間から35日間静置培養した。

表2 各培地の組成(寒天培地ではLで1.5%,それ以外で2%の寒天を使用)

YM(自然界からの酵母分離用)	Bacto Peptone	0.5%
	Bacto Yeast Extract	0.3%
	Bacto Malt Extract	0.3%
	Glucose	1.0%
YPD(酵母、カビ用)	Bacto Yeast Extract	1.0%
	Bacto Peptone	2.0%
	Glucose	2.0%
L(乳酸菌用)	Bacto Yeast Extract	1.0%
	Bacto Peptone	1.0%
	Glucose	1.0%
	CH ₃ COONa・3H ₂ O	0.3%
MY(保存用)	Bacto Yeast Extract	0.5%
	Bacto Malt Extract	20.0%
YPM(自然界からの酵母分離用)	Bacto Yeast Extract	1.0%
	Bacto Peptone	2.0%
	Bacto Malt Extract	2.0%

花が大きい場合は火炎滅菌したハサミで、ある程度刻んでフラスコ内に入れて集積培養を開始した。

シングルコロニー単離による分離培養 基本的には集積培養液に発泡が見られたものにおいて、5種の寒天培地(表2)上に集積培養液を一白金耳分ずつ無菌的に塗り広げ、室温にて3日間から11日間培養した。尚集積培養を1ヶ月以上行っても発泡が見られなかったサンプルにおいてもYM, YPD, Lの寒天培地上に集積培養液を一白金耳分ずつ無菌的に塗り広げ、室温にて3日間程培養した。得られたシングルコロニーは白色、橙色、クリーム色、ピンク色などを呈したが、比較的丸い形を示す酵母様のコロニーで、より大きなサイズのものを10コロニー程度同じ組成の寒天培地上へ滅菌済み爪楊枝で無菌的に線引きし、室温にて3日間培養してマスタープレートを作製した。尚、プレートがカビなどに覆われそうになった場合は新たに同じ組成の寒天培地上へシングルコロニーを作製し、分離を試みた。

顕微鏡による出芽酵母の選別 集積培養を通して得られた酵母様コロニーを分離・培養したマスタープレートより少量の菌を用いてオートクレーブ済みミリQ水を用いてプレパラートを作製し、顕微鏡(NIKON BH-2)を用いて総合倍率400倍にて観察を行い、出芽酵母のみを選別した。

取得した野生出芽酵母の凍結保存 顕微鏡観察により出芽酵母と確認できた野生酵母において、YPD液体培地と50%グリセロールの体積比が1:1の比になるように調製した保存液各1mlに、マスタープレートから直接ローン状の菌体を滅菌済みの爪楊枝でかきとり懸濁、ボルテックスし、超低温フリーザー(MDF-V281ATR, 三洋)にて-80℃で凍結し保存した。

24時間でのダーラム試験による1次スクリーニング 総数398株中222株において実施した。グリセロール保存されている菌をYPD寒天培地上でインキュベーター(三洋, MIR-253)にて26℃で3日間復

帰培養後、新しい YPD 寒天培地上へ滅菌済み爪楊枝を用いて無菌的に線引きし、26°Cで一晩培養した。これにより増殖した酵母菌を用いて、オートクレーブ(121°C、20分)済み YPD 液体培地 5 ml へ滅菌済み爪楊枝で無菌的に植菌し、振とう培養器 (TAITEC, Bio-Shaker, BR-300LF) を用いて 26°Cで1晩振とう培養した。培養後、ボルテックスにより懸濁し、培養液 1 ml を YPD 液体培地 7 ml とダーラム管(φ7 mm×50 mm)の入ったオートクレーブ済みの

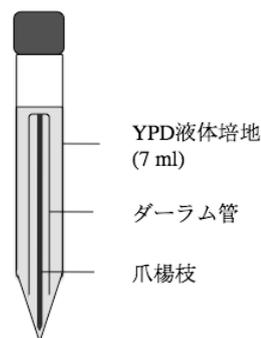


図2 ダーラム試験の模式図

10 ml 容ガラス製スピッツ管内(図 2)に無菌的にピペットマンで植菌し、左右にゆるやかに揺らしながら混合・懸濁後、インキュベーター (三洋, MIR-253) にて 26°Cで 24 時間静置培養を行った。このときコントロールとして高い発酵性を有するワイン酵母 OC2 を用いて、同様に試験を実施した。培養後、コントロールの OC2 株と同様に YPD 液体培地の液面上昇が見られたものを発酵性野生酵母株とした。

7 時間でのダーラム試験による 2 次スクリーニング 一次スクリーニングで発酵性を確認できた野生出芽酵母株において、YPD 液体培地 7 ml へ植菌後の培養時間を 24 時間から 7 時間へと短縮し、一次スクリーニングと同様にコントロール株の OC2 株と共に発酵性試験を行った。7 時間の発酵性試験後、コントロールの OC2 株と同等またはそれに近い発酵性を示したものを高発酵性野生酵母株として選別した。

パルスフィールドゲル電気泳動 (CHEF 型) による核型の決定 凍結保存した高発酵性野生酵母 9 株を滅菌済み黄色チップで少量かきとり、YPD 寒天培地上に無菌的にスポットし、インキュベーター (三洋, MIR-253) にて 26°C、3 日間復帰培養した。これを新しい YPD 寒天培地上に滅菌済み竹串を用いて各々塗り広げ、インキュベーター (三洋, MIR-253) にて 26°C、3 日間静置培養し、シングルコロニーを得た。これを滅菌済み爪楊枝で 10 ml YPD 液体培地に各々無菌的に植菌し、振とう培養器 (TAITEC, Bio-Shaker, BR-300LF) にて 26°Cで 1 晩振とう培養した。培養後、培養液全量を滅菌済み 14 ml 容ファルコンチューブにデカンテーションで移し、遠心機(KOKUSAN, H-60R)にて集菌 (3,000 rpm、4°C、1 分間) した。上清を捨てオートクレーブ済みミリ Q 水 1 ml をピペットマンで添加しボルテックスで懸濁後、滅菌済み 1.5 ml 容マイクロチューブに全量をデカンテーションで移して遠心機(KOKUSAN, H-60R)にて集菌 (3000 rpm、4°C、1 分間) し、上清を捨てて細胞の容量を調べ、細胞容量 : 0.05 M EDTA 溶液 = 2 : 3 の容積比になる様に 0.05 M EDTA 溶液 (pH 8.0) をピペットマンで加え、ピペッティングにより懸濁しこれを細胞懸濁液とした。各々の細胞懸濁液 150 μl、Zymolyase 20T (25 mg/ml) 溶液 50 μl を新しい滅菌済み 1.5 ml 容マイクロチューブに入れ、緩やかにタッピング後、ROTATOR (TAITEC, RT-5)にて速度 2 で緩やかに回転させながら BIO CHAMBER(TAITEC, BCP-120F)内にて 37°Cで 20 分間インキュベートした。低融点アガロースゲル (1 % LMTA, 0.125 M EDTA pH 7.5) を電子レンジで加熱し、あらかじめ熱をとった後、600 μl をピペットマンで加えて緩やかにピペッティングした後、モールドチャンバーに

福山バラの酵母プロジェクト -製パンへの適用-

流し込み、4°Cで20分間冷却して固化させた。上記のようにして作製したプラグを、LET buffer (0.5 M EDTA pH 8.0, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.075 % Mercaptoethanol) 1 ml ずつ分注しておいた滅菌済み 1.5 ml 容マイクロチューブ内へ火炎滅菌済みマイクロスパーテルを用いて移し、BIO CHAMBER(TAITEC, BCP-120F)内にて 37°Cで一晩インキュベートした。そして NDS buffer (0.5 M EDTA pH 8.0, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mg/ml Sodium N-dodecanoyl sarconate, 1 mg/ml proteinase K) 1 ml ずつ分注しておいた滅菌済み 1.5 ml 容マイクロチューブに、火炎滅菌済みマイクロスパーテルを用いてプラグを移し換え、インキュベーター STAC-1200 (Simadzu)にて 50°Cで一晩インキュベートした。処理済みのプラグを 0.05 M EDTA 溶液 (pH 8.0) が 3 ml 入った滅菌済み 35 mm 径シャーレに火炎滅菌したマイクロスパーテルで移して室温で5分間静置し洗浄後、新しい 0.05 M EDTA 溶液 (pH 8.0) 3 ml が入った同径のシャーレに、火炎滅菌したマイクロスパーテルでプラグを入れ換えて 4°Cで保存した。これを泳動用プラグとした。一方、500 ml 容三角フラスコに Ultra Pure Agarose (Invitrogen 社) を 1.2 g 入れ、0.5×TBE buffer 120 ml を加え、電子レンジで完全溶解してイオン交換水で重さ合わせした後、あら熱をとり、gel casting stand に溶解したゲルを流し込み、コームを差し込んで 4°Cで20分間固化させた。プラグを火炎滅菌したカバーグラスとピンセットを用いて泳動用プラグをウェルの深さの 20%程度になるように切り、ウェルに気泡が入らないよう注意しながらカットした泳動用プラグを滅菌済みマイクロスパーテルで入れ、穴埋め用ゲル (0.8 % Agarose LGT, 0.5×TBE buffer pH 8.0) で隙間を埋め、4°Cで15分間冷蔵固化させた。予め 14°C に冷却しておいた 0.5×TBE buffer pH 8.0 約 2.5 L を泳動槽に入れ、プラグを埋め込んだゲルをセットした。そして CHEF DR-II (Bio-RAD 社) を用いて [Initial A time:60 秒、Final A time:60 秒、Run time:15 時間、mode10、200 volts]、[Initial A time:90 秒、Final A time:90 秒、Run time:8 時間、mode11, 200 volts] の条件か、[Initial A time:60 秒、Final A time:60 秒、Run time:24 時間、Mode:10、Volts:180]、[Initial A time:120 秒、Final A time:120 秒、Run time:12 時間、Mode:11、Volts:180] の条件で buffer の温度が 14°C の条件下で泳動した。泳動後、ゲルを染色液 (0.5 µg/ml ethidium bromide, 0.5×TBE buffer pH 8.0) 中にて緩やかに振とう染色 (30 回/分、1 時間) した後、滅菌ミリ Q 水で軽くすすいだ後、UV Transilluminator (BioDoc-It system) の紫外線照射下で写真撮影した。

18S rDNA 領域における塩基配列の決定 YPD 寒天培地上に高発酵性野生酵母株を滅菌済みの竹串で塗布し、インキュベーター(三洋, MIR-253)にて 26°Cで2日間静置培養して、シングルコロニーを無菌的に単離した。滅菌済み 0.2 ml 容マイクロチューブに、アイスバス中でピペットマンを用いて滅菌済みミリ Q 水を 29.75 µl、Zymolyase-20T 溶液 (5 mg/ml, 滅菌済みミリ Q 水で調製) を 3 µl 加え、シングルコロニーを滅菌済み黄チップでごく僅かに採取しこれに懸濁後、BIO CHAMBER BCP-120F(TAITEC)にて 37°Cで40分間反応させた。尚、ネガティブコントロールとして菌無しのサンプルも同様に調製した。一方、滅菌済み 1.5 ml 容マイクロチ

表3 使用オリゴヌクレオチドのリスト

オリゴヌクレオチド	塩基配列(5' to 3')
18-Fw	ATCTGGTTGATCCTGCCAGT
18-Rv	GATCCTTCCGCAGGTTCCACC

ューブに、アイスバス中でピペットマンを用いて 10× Ex Taq Buffer 20 μ l、dNTPs Mixture 溶液(each 2.5 mM)16 μ l、18-Fw 側及び 18-Rv 側プライマー(表 3)溶液(各 2.5 μ M, 最終濃度 0.2 μ M)を各 16 μ l、EX-Taq HS 1 μ l をピペットマンで加え、タッピングし、pre-Mixture を調製した。この pre-Mixture を 17.25 μ l ずつ上記の細胞溶解液に添加し、PCR Thermal Cycler Dice(TaKaRa)を用いて 94°C で 3 分間熱処理した。そして 94°C で 30 秒間、プライマーのアニーリングを 62°C で 30 秒間、相補鎖 DNA の伸長・合成を 72°C で 1 分間の反応を 1 サイクルとして 30 サイクル繰り返して行った後、72°C で 1 分間反応させた。PCR 後、PCR 産物を -20°C にて保存した。

1%アガロースゲル電気泳動 TaKaRa LO3 アガロース 0.75 g と 1×TBE buffer 75 ml を 300 ml 容三角フラスコに入れ、LABOTOP-ACE 3000 で重さを量り、電子レンジでアガロースを完全に溶かした。イオン交換水で重さ合わせをし、あらかじめ熱をとった後、ethidium bromide 溶液 (10 mg / ml) 3.75 μ l を加えてゆるやかに混合した。これをゲルメーカーに流し込み、コームを挿し、ゲルの周りに保冷剤を置いてゲルを室温で 20 分間固化した後、4°C で 10 分間完全固化させた。次に、BIO CRAFT 社製 MODEL BE-560 に ethidium bromide (最終濃度 0.5 μ g / ml) の入った 0.5×TBE buffer 約 250 ml と作製したゲルを入れ、上記の PCR 産物を 10 μ l と 6×LS(BPB) 2 μ l を混ぜ、12 μ l ずつ 2 レーンに分けて分子量マーカー λ / HindIII 6 μ l と共に 100 V で 40 分間泳動した。

Nucleospin Gel and PCR Clean-up によるゲルからの DNA 抽出 泳動後、CROSS LINKER XL-200 (TAITEC)を用いて、360 nm の紫外線を照射しながら、特級エタノールで火炎滅菌したカッターの刃で目的のバンドを切り出し、滅菌済み 1.5 ml 容マイクロチューブに回収した (1 サンプルにつき 2 レーン分)。これに Buffer NT1(Binding Buffer)を 200 μ l ずつ加え、THERMO CIRCULATOR ZL-100(TAITEC)を使用して 50°C で 10 分間インキュベートした。尚、2~3 分ごとにサンプルを軽くタッピングし溶解させた。その後、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column を 2 ml 容 Collection Tube にセットし、溶液を全量カラムに添加後、遠心機(TOMY, MX-100)を用いて遠心 (11,000 rpm、23°C、30 秒)し、溶液をカラムに吸着させた。遠心後、ろ液を捨て、カラムを同じ Collection Tube にセットし、Buffer NT3(Wash Buffer) 700 μ l を添加し、遠心機(TOMY, MX-100)を用いて遠心 (11,000 rpm、23°C、30 秒)し、ろ液を捨て、カラムを同じ Collection Tube にセットした。この操作をもう一度行い、メンブレンを洗浄した。洗浄後、MX-100 遠心機(TOMY)にて遠心 (11,000 rpm、23°C、1 分間)し、メンブレンを乾燥させた。乾燥後、カラムを新しい滅菌済み 1.5 ml 容エッペンドルフチューブに移し、そこに Drying Oven Dx31(Yamato)により予め 85°C に加熱しておいたオートクレーブ済みミリ Q 水 15 μ l ずつ加え、室温で 5 分間静置し、遠心機(TOMY, MX-100)にて遠心 (11,000 rpm、23°C、3 分間)した。この操作で得られた溶出液を DNA 試料とし、4°C で保存した。このうち 2 μ l を用いて Nano Drop DN-1000 により DNA 濃度と純度の測定を行った。

Applied Biosystems 3130/3130xl ジェネティックアナライザによる塩基配列の解析 オートクレーブ

福山バラの酵母プロジェクト -製パンへの適用-

滅菌済み 0.2 ml 容マイクロチューブに、ピペットマンを用いて滅菌済みミリ Q 水を 5.0 μ l、ゲルから切り出した DNA 溶液 1 μ l、BigDye Sequencing Buffer 1 μ l、Primer 溶液(18-Fw 又は 18-Rv、共に 1.6 pmol)1 μ l、Premix(BigDye Terminator v3.1)2 μ l をピペットマンで加え、タッピング後、PCR Thermal Cycler Dice(TaKaRa, TP600)を用いて鋳型の二本鎖 DNA の熱変性を 96°C で 1 分間行った。その後、98°C で 10 秒間、プライマーのアニーリングを 55°C で 3 秒間、相補鎖 DNA の伸長・合成を 72°C で 2 分間の反応を 1 サイクルとして 25 サイクル繰り返して行った。次に PCR 反応させたサンプルを滅菌済み 1.5 ml 容マイクロチューブに全量移し、0.125 M EDTA 溶液 1 μ l、3 M 酢酸ナトリウム溶液 1 μ l、100 % エタノール 25 μ l を加え、軽くタッピングし、遮光しながら静置した(室温、15 分)。インキュベート後、遠心機(TOMY, MX-100)により遠心 (15,000 rpm、4°C、15 分間)し、上澄み液を捨て、70 % エタノール 125 μ l を加え、遠心機(TOMY, MX-100)を用いて遠心 (15,000 rpm、4°C、15 分間)した。遠心後、上澄み液を捨て、デシケーター(TOMY, MV-100)を用いて乾燥(5 分)させた。次に Hi-Di Formamide 18 μ l を加え、BLOCK INCUBATOR BI-525A(ASTEC)を用いて 95°C で 2 分間熱変性し、遮光しながら 2 分間氷冷した。その後、全量を専用の 0.2 ml 容 Sample Tube に移し、蓋をした。この Sample Tube を DNA Sequencer(Applied Biosystems 3130/3130xl ジェネティックアナライザ)にセットし、その塩基配列を解読した。得られた塩基配列情報を、変換ソフト(Conversion Programs)により Windows から Mac に変換した後、AutoAssembler 2.1 による信頼性の低い配列の除去及びデータ配列とチャートとの一致を確認した。最後に、GENETYX-MAC ver.11.2.1 を用いて得られた配列を保存した。

Blastn による菌の同定 NCBI Homepage(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中の「BLAST」を選択し、「Basic BLAST」の項目の「nucleotide blast」を選択し、「Enter Query Sequence」の欄に得られた塩基配列をペーストした。そして、「Choose Search Set」の項目で「Others(nr etc.):」、「Program selection」の項目で「Highly similar sequences (megablast)」を選択した後、BLAST ボタンをクリックし、検索をかけ、相同性の高い遺伝子配列を持つ菌を特定した。尚 Show results in a new window にチェックを入れて新しいウィンドウを開き、検索条件を結果と共に表示させた。

パン生地での膨張試験 パン生地膨張試験における基本配合¹⁰⁾を表 4 に示す。YPD 寒天培地上に菌株を滅菌済み爪楊枝で植菌し、26°C で 72 時間前培養後、YPD 液体培地 10 ml に植菌して 26°C で 18 時間振とう培養したもの各 1 ml を、パン生地の材料(表 4)が入った湯のみ茶碗に入れ、オートクレーブ滅菌済み 10 ml 容試験管の管底を用いて 1 分間混合させた。混ぜ合わせた生地を 70%エタノールで消毒した手袋にて丸め、これを 100 ml 容メスシリンダーの底に入れ、70%エタノールで消毒したプラスチック製の棒を用いて空気を抜いた後、体積を記録して BIO CHAMBER BCP-120F(TAITEC)を用いて 37°C で 5 時間発酵させ、発酵前後の体積を調べ、市販酵母 3 種とそ

日清フーズ 日清カメリア強力粉	10.0 g
パールエース印 上白糖	0.5 g
財団法人塩事業センター 食塩	0.2 g
酵母(培養懸濁液)	1.0 ml
オートクレーブ済みミリ Q 水	5.0 ml

の膨張性を比較した。

ホームベーカリーでの製パン試験 コントロールとして市販酵母1株も同様に実施した。高発酵性野生酵母株をYPD寒天培地上にオートクレーブ済み青チップを用いて幅3mm×長さ5cm程にて線引きし、インキュベーター(三洋, MIR-253)にて26°Cで1日間培養した。これを、オートクレーブ滅菌済みYPD液体培地10mlに全量加えボルテックスし、これをYPD液体培地400mlの入った500ml容坂口フラスコに全量デカンテーションで無菌的に加え、振とう培養器(TAITEC, Bio-Shaker, BR-300LF)にて26°Cで一晩振とう培養した。培養後、重量を予め測定しておいた4本の滅菌済み50ml容ファルコンチューブに培養液を集菌(3,000rpm、室温、30秒)し、デカンテーションにて上清を捨て、菌体重量を測定した。これに約31°Cに温めたアルカリイオン水を50ml容ファルコンチューブ1本当たり、菌体と合わせて45mlになるように入れ、十分に菌を混合させた後、一斤分のパンの材料(表5)が入ったホームベーカリー

表5 ホームベーカリーによる製パン試験の材料の配合

日清フーズ 日清カメラア強力粉	280 g
パールエース印 上白糖	20 g
財団法人塩事業センター 食塩	4 g
明治 ケーキマーガリン 食塩不使用	20 g
キリン アルカリイオン水(31°C)	180 ml (45 ml×4本)
生イースト(各YPD培地400mlで26°C1晩振とう培養し、集菌したもの)	
アロマセラピー由来EY4-2株	5.47 g
シークレットパフューム由来EM15-1株	6.81 g
ダマスクローズ由来④YPD-3株	6.21 g
ビューティフルふくやま由来27L-1株	6.07 g

表6 ホームベーカリーによる作業工程(4時間50分)

各工程	用時間(分)
ねり	18
予備発酵	62
練り	5
ミックスコール	1
練り	4
一次発酵	65
ガス抜き	1
二次発酵	28
ガス抜き*	1
成形発酵***	60
焼き上げ	45

*この後、中のハネを取り出した

***アロマセラピー由来EY4-2株のみ70分で実施した。

(MK, HB-100)に加え、天然酵母パン早焼きモードにて製パンを開始した(表6)。尚、開始から3時間15分後、二次発酵が終了しガス抜きが終わった後に、ハネを取り出して形成発酵、焼きに入った。焼き上がり後、すぐに重量を測定し、デジタルカメラ(Panasonic LUMIX DMC-FZ2)で写真撮影を行い、室温で約1時間あら熱をとった後、パンが完全に冷めてからパンナイフで半分にカットし断面をデジタルカメラで同様に撮影し、比較した。

パン工房での製パン試験 パン工房で製パン試験に使用した材料の配合を表7に示す。ホームベーカリーでの製パン試験の7倍量にてパン工房ROCCA(広島県福山市曙町1丁目20-14)にて製パン試験を実施した。温度を37°Cに調節したアルカリイオン水に酵母を入れ、マーガリン以外の材料が入ったボウルに加え、ミキシングを開始した。生地がまとまってきたらマーガリンを加えさらにミキシングを行った。

福山バラの酵母プロジェクト -製パンへの適用-

ミキシング終了後、生地をバットに寝かせ生地温度を測定し、予備発酵を行った。予備発酵後、ガス抜きをして一次発酵に持ち込み、生地分割後に二次発酵を行った。その後生地を成形し成形発酵に持ち込み、成形発酵後に 190℃から 230℃の間で焼きに入った。尚、パン工房での製パン試験行程を表 8 に示した。

表7 パン工房で製パン試験に使用した材料の配合

材料	アロマセラピー	シークレット パフューム	ダマスクローズ	ビューティフル ふくやま
カメラア強力粉	1960 g	1960 g	1960 g	1633 g
砂糖	140 g	140 g	140 g	116 g
塩	28 g	28 g	28 g	23 g
マーガリン	140 g	140 g	140 g	116 g
水(37℃)	1260 g	1260 g	1260 g	1050 g
生イースト	38.22 g	38.77 g	43.43 g	42.43 g

表8 パン工房での作業工程の詳細

工程	アロマセラピー	シークレット パフューム	ダマスクローズ	ビューティフル ふくやま
ミキシング	16 分 30 秒	16 分 30 秒	16 分 30 秒	16 分 30 秒
予備発酵	70分	85分	60分	60分
一次発酵	30分	30分	30分	40分
二次発酵	40分	30分	30分	35分
成形発酵	60分	75分	60分	73分
焼成	35分	40分	33分	35分

パン生地の内相内部における電子顕微鏡観察 市販酵母 KANEKA、アロマセラピー、シークレットパフューム、ダマスクローズ由来の酵母と小麦粉は日清フーズ、日清カメラア強力粉を使用し、ホームベーカリーで製パンしたパンの内相内部の電子顕微鏡写真を、近畿中国四国農業研究センターの走査型電子顕微鏡(日立ハイテクノロジー社, S-3400)を用いて行った。具体的にはホームベーカリーで製パンしたパン生地を焼き上げた後、あら熱をとってパンナイフでカットし、1 cm 程度の幅に切ったパン片を試料としてホームベーカリーで焼き上げた当日に解析を行った。

結果および考察

福山市から採取した 43 品種のバラの花または実から野生酵母を 398 株取得した。福山市園芸センターバラ 41 品種から得られた野生酵母株数を各固形培地の種類ごとに示したグラフを図 3 に、こだま食品株式会社試験農場食用バラ 3 品種から得られた野生酵母株数を各固形培地の種類ごとに示したグラフを図 4 に示す。図 3, 4 の結果から、酵母が全く分離されないバラ品種が存在することがわかるが、これらは今後継続して同様に分離を実施し、本当に酵母菌が取得されにくいバラ品種であることを検証する必

福山バラの酵母プロジェクト -製パンへの適用-

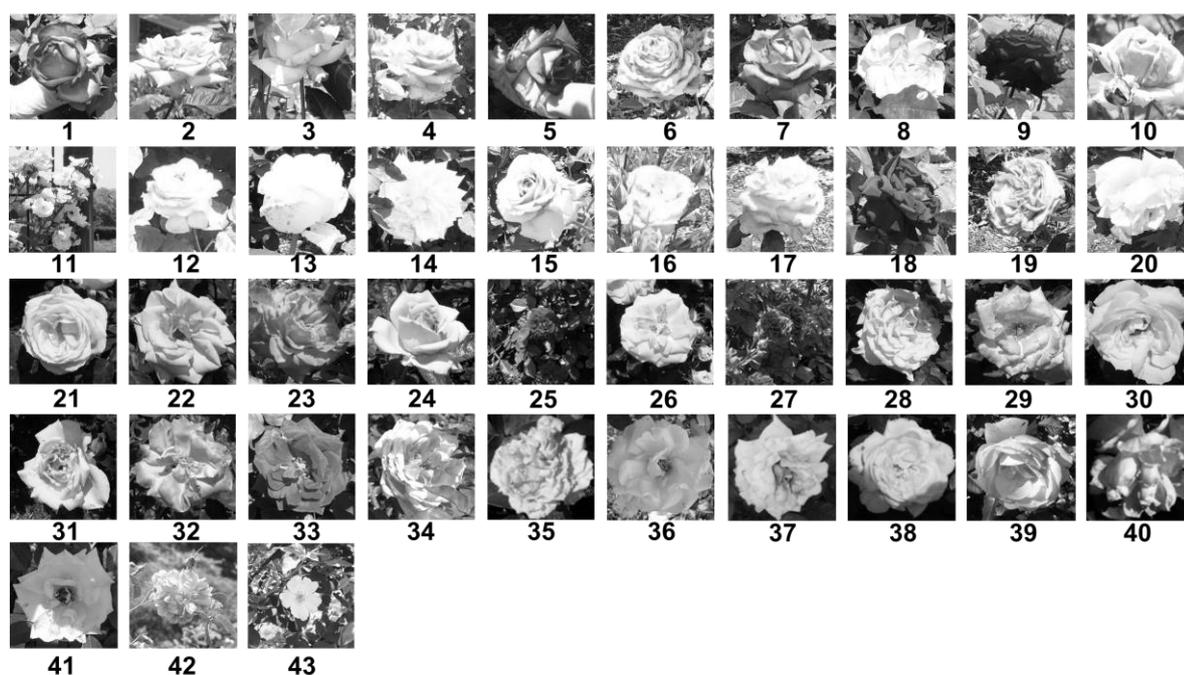


図5 野生酵母の分離に用いた福山市のバラ(43品種)
 図中の番号は、表1の番号と対応している。

場では無農薬で栽培されたバラであった。このことから、農薬の有り無しに関わらず、野生酵母をバラの花およびその実から取得できることが分かった。但し、殺虫剤や殺菌剤の散布はバラの花が開花する前であり、開花後の散布は行っていない。バラ43品種の花の写真を図5に示す。バラの花の色は、ピンク、赤、白、黄色、紫、朱色とさまざまで、発酵性試験の24時間による1次スクリーニングにおいて発酵性株を分離出来たバラ品種は20品種で、(2)桃香、(3)エル、(4)アロマテラピー、(8)魅惑、(9)つるヘルツアス、(10)結愛、(12)プレステージドゥリヨン、(13)ホワイトクリスマス、(14)月光、(15)シークレットパフューム、(16)ストロベリーダイキリ、(17)楽園、(20)ドフトゴールド、(22)ローズふくやま、(23)ビューティフルふくやま、(27)ラブリーふくやま、(29)芳純、(30)正雪、(42)ダマスクローズ、(43)ドッグローズであった。これらの20品種のバラの花色は、ピンク、赤、白、黄色、紫、朱色とさまざまであったが、14品種がピンク系であったことから、酵母を運んで来ると考えられる昆虫は比較的ピンク色のバラを好んで飛んできているのではないかと考えられた。また、これらのバラを採取する際、蝶や蜂、ハナムグリなど数多くの昆虫類を観察した。中でも全長7~9mmのハナムグリがバラの品種によっては一輪から6匹も見出され、花の蜜だけでなくバラの花びらも食していることが覗かれた。また福山市園芸センター近くの福山市沼隈町では葡萄が特産物として育てられているが、これらの昆虫類がどのような酵母株を伝播しているかは不明であり、今後フィールド調査を実施し、昆虫類の種を特定すると共にこのバラ園付近に棲息する昆虫類に関連した調査・研究が必要だと考えられる。特にブドウ園とバラ園とに共通して出現する昆虫類がいるのかどうか、また、実際に高発酵性野生酵母をそれらの昆虫類

表 9 高発酵性野生酵母 9 株における特徴

菌株	分離源となったバラ品種	集積培養(日間)	分離用寒天培地
EY4-1	アロマテラピー	9	YPM
EY4-2	アロマテラピー	9	YPM
EM4-1	アロマテラピー	14	MY
EM15-1	シークレットパフューム	15	MY
4YM-1	アロマテラピー	3	YM
15YPD-1	シークレットパフューム	14	YPD
4YPD-3	ダマスクローズ	3	YPD
4L-5	アロマテラピー	35	L
27L-1	ビューティフルふくやま	34	L

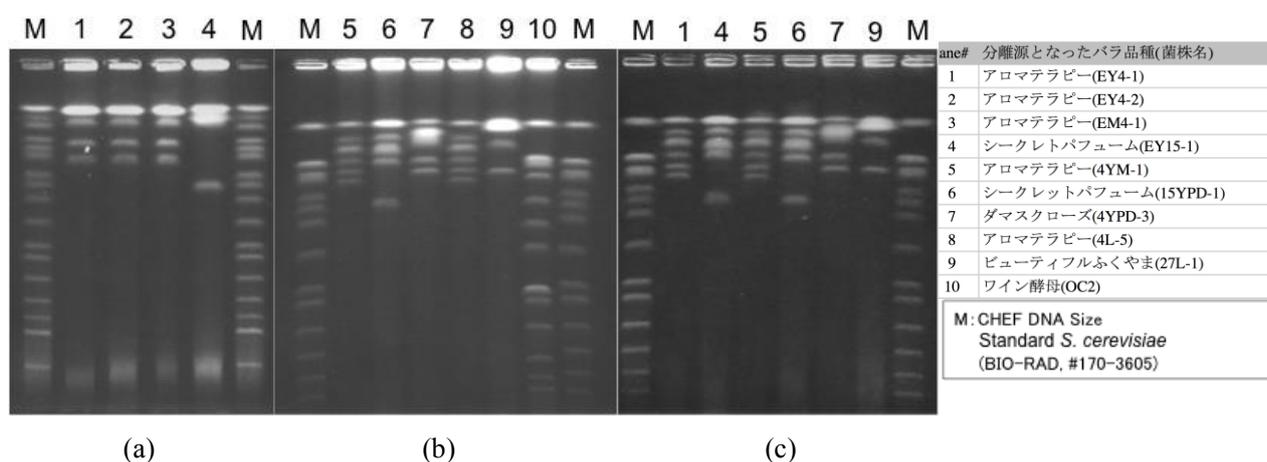


図 6 高発酵性酵母 9 株におけるパルスフィールド電気泳動による核型解析

(a) では I.A.60 秒、F.A.60 秒、R.T.15 時間、mode10、I.A.90 秒、F.A.90 秒、R.T.8 時間、mode11、200 volts、(b), (c)では I.A.60 秒、F.A.60 秒、R.T.24 時間、mode10、I.A.120 秒、F.A.120 秒、R.T.12 時間、mode11、180 volts にて泳動した。

が運んでいるのかどうかを調べる必要がある。

一方、発酵性試験の 24 時間による 1 次スクリーニングにおいて選別された発酵性株は、95 株であった。さらにこの 95 株に関してより短時間である 7 時間の発酵性試験による 2 次スクリーニングを行った結果、9 株の高発酵性株を取得することが出来た。9 株の分離源となったバラの品種、集積培養日数、分離用に用いた固形培地の種類を表 9 に示す。これら高発酵性酵母 9 株の分離源となったバラは、アロマテラピー、シークレットパフューム、ダマスクローズ、ビューティフルふくやまの 4 品種であった。これらの特徴として、花の香りの強い点が挙げられた。このことは、昆虫がバラの香りに誘われて酵母を運んでくることを示唆している。

これら高発酵性の 9 株の電気泳動核型をパルスフィールドゲル電気泳動で調べた結果を図 6 に示す。Lane#1, 2, 3, 5, 8 は同一の核型を示し、アロマテラピーに由来する。lane#4, 6 も同一の核型を示し、シークレットパフュームに由来する。lane#7 はダマスクローズに由来する。lane#9 はビューティフルふくやまに由来する。このように各バラの品種に特徴的な核型をもつ酵母が存在し、そのような酵母が複数株

福山バラの酵母プロジェクト -製パンへの適用-

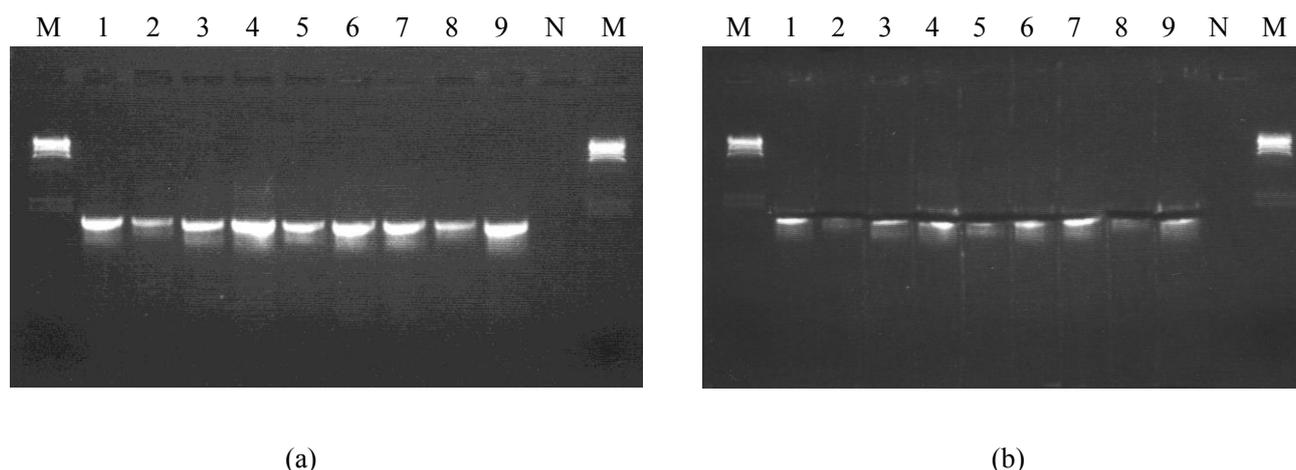
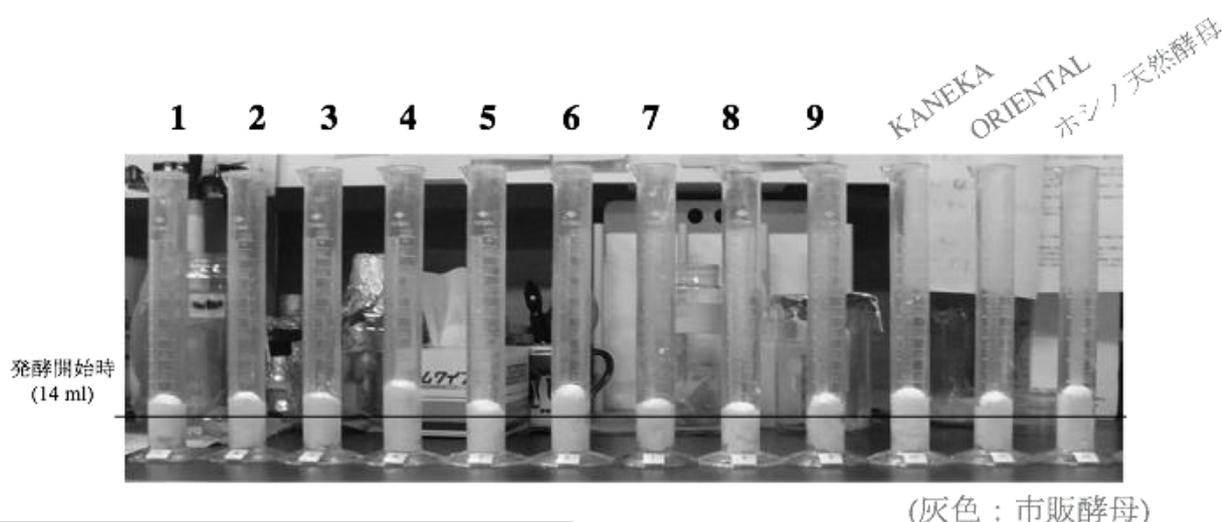


図7 高発酵性株9株における18S rDNA領域のコロニーPCR産物の泳動結果
 図中の番号は図6のlane#と同じ。(a)はPCR産物10µlずつを使用。(b)は切り出し後のサンプル。
 M: λ /HindIII Marker (12 µl), N: negative control

分離されることもあった。言い換えれば、同じ核型の高発酵性野生酵母はある品種のバラに局在し、別のバラ品種には存在していないことが示された。また、高発酵性野生酵母が分離できた条件は、集積培養日数に着目すると、最短で3日、最長で34日であり、分離培養に用いた固形培地に着目すると5種類全てから分離された。このことはある特定の培養期間や培地の種類でのみ増殖するとは限らないことを表している。

一方、18S rDNA領域におけるコロニーPCRを行った結果を図7に示す。Lane#1~#9では目的と思われる1.8 kbpのPCR産物が得られ、これらのPCR産物を切り出し、精製後、塩基配列を解読した。得られた塩基配列の情報をBlastn検索した結果、アロマテラピー由来のEY4-1 (#1), EY4-2 (#2), EM4-1 (#3), 4YM-1 (#5), 4L-5 (#8)は*Torulasporea franciscae*、シークレットパフューム由来のEM15-1 (#4), 15YPD-1 (#6)は*Lachancea fermentati*、ダマスクローズ由来の4YPD-3 (#7)は*Lachancea kluyveri*、ビューティフルふくやま由来の27L-1 (#9)は*Candida tropicalis*であると推定された。これらのデータは図6の電気泳動核型と一致しており、同一のバラ品種内で核型構成に相同性が見られたことから、バラ品種ごとに特定の酵母が生育していると考えられた。しかしながら、なぜバラ品種毎に異なる酵母が得られたのかについては不明であり、バラの花びらの成分またはバラ品種毎の糖組成の違い、酵母を伝播する昆虫の特異性などによるのではないかと考えられた。今後同様に同じ品種のバラから継続して野生酵母を分離し、解析を進める必要がある。また、花酵母に見られる多くの野生酵母は限られた属の酵母であり、*Aureobasidium*属に属する黒色酵母、*Cryptococcus*属、*Rhodotorula*属、*Sporobolomyces*属、*Candida*属、*Torulopsis*属などが分離されることが知られている⁶⁾。しかしながら、今回得られた高発酵性野生酵母は、*Torulasporea*属、*Lachancea*属、*Candida*属であり、特に*Torulasporea*属の基準種はスペインの土壌から、*Lachancea*属酵母の基準種は食品やショウジョウバエから分離されることが多いが、今回なぜ福山市内のバラから



(灰色：市販酵母)

#	分離源となったバラ(菌株名)
1	アロマセラピー(EY4-1)
2	アロマセラピー(EY4-2)
3	アロマセラピー(EM4-1)
4	シークレットパフューム(EY15-1)
5	アロマセラピー(4YM-1)
6	シークレットパフューム(15YPD-1)
7	ダマスクローズ(4YPD-3)
8	アロマセラピー(4L-5)
9	ビューティフルふくやま(27L-1)

図8 高発酵性野生酵母9株を用いたパン生地の膨張性試験

Torulaspota 属酵母や *Lachancea* 属酵母が分離されたのかは興味深い。今後分離されてくる酵母の再現性を調べると同時に分離源となったバラ品種に飛んでくる昆虫類の生態も含めて、さらに詳しく解析する必要がある。また、花から発酵性をもつ野生酵母が取得しにくいことが報告されている¹⁰⁾が、なぜ本研究で高発酵性の野生酵母を多数取得することができたのかも興味が深い。バラ園付近における特産物などとの関連性にも着目し、今後さらに詳しく調べていく必要がある。

次にこれらの高発酵性野生酵母が製パンへ適用できるかどうかを調べた。まず、これら高発酵性野生酵母9株を用いたパン生地での膨張性試験を行った。その結果を図8に示す。この結果から、市販酵母3株よりもパン生地の膨張率が高かったのは、#4及び#6のシークレットパフューム由来の酵母であり、それらを除く7株では、市販酵母よりも膨張率はやや劣ることが分かった。尚、この結果はダーラム発酵性試験とは多少異なっており、必ずしも一致していなかった。その原因として各酵母が小麦粉のグルテンに対する分解酵素を分泌している可能性や糖の資化性の違いによると考えられた。興味深いことにダーラム発酵性試験で最も発酵性が高かったのは#2のアロマセラピー由来のEY4-2株であったが、パン生地膨張性試験では#4のシークレットパフューム由来のEM15-1株が最も良い結果が得られた。この原因として先程の分解酵素や糖の資化性の影響に加えて、菌の増殖速度も関与している可能性が考えられた。

福山バラの酵母プロジェクト -製パンへの適用-

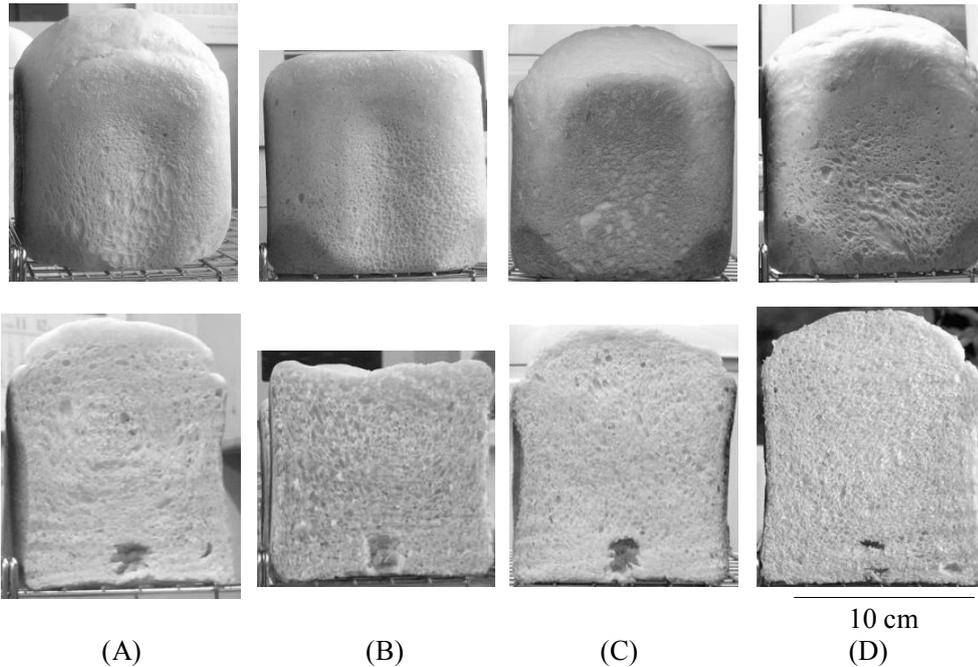


図9 4株におけるホームベーカリーでの製パン試験の結果
 (A)アロマテラピー由来の EY4-2 株を、(B)シークレットパフューム由来の EM15-1 株を、
 (C)ダマスクローズ由来の 4YPD-3 株を、(D)ビューティフルふくやま由来の 27L-1 株を使用した。

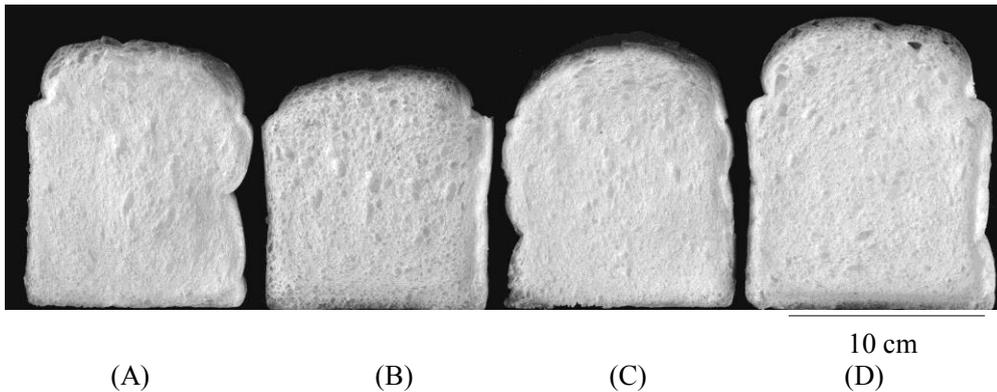


図10 パン工房での製パン試験の結果
 図中の説明は図9と同じ。

次に図8の結果から、バラ4品種から分離された高発酵性野生酵母に関して、それぞれのバラ品種から比較的パン生地膨張の良かった1株ずつ EY4-2 (#2), EM15-1 (#4), 4YPD-3 (#7), 27L-1 (#9)を選んで、ホームベーカリーで製パン試験を行った。その結果を図9に示す。また、ホームベーカリーの7倍量の菌体を使用してパン工房で製パン試験を行った結果を図10に示す。図9の結果から#9のビューティフルふくやま由来の27L-1株を使用したものが最もパン生地の焼き上がりが良かったが、図8のパン生地膨張試験で最も膨張性が良かった#4のシークレットパフューム由来のEM15-1株を使用したものは最も焼き上がりが悪かった。また、どちらの製パン試験においても、アロマテラピー由来の#2 (EY4-2 株)、シークレットパフューム由来の#4 (EM15-1 株)を使用して製パンした(A), (B)では、パン表面に焼き色が付

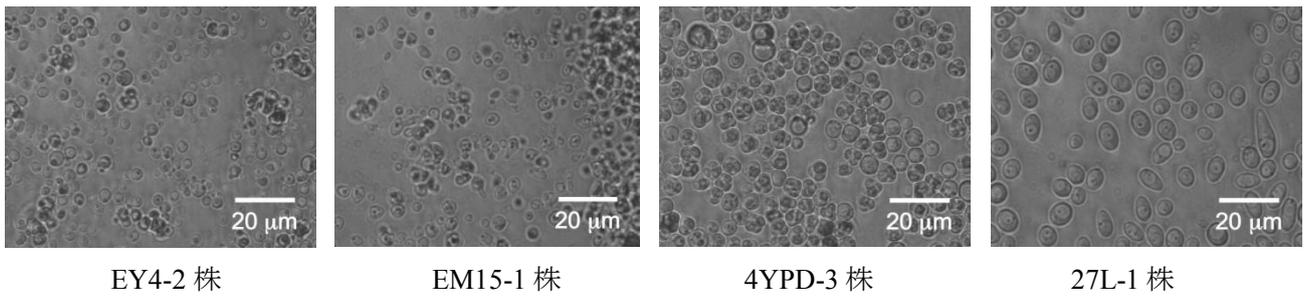
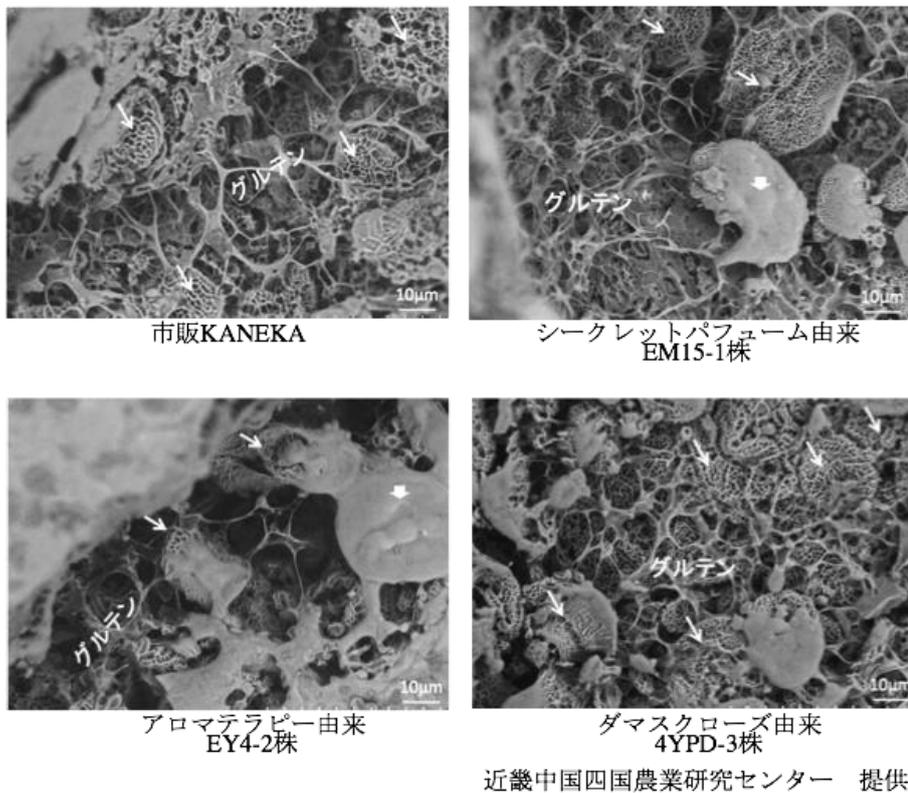


図 11 製パン性の良かった酵母細胞 4 株の顕微鏡写真



近畿中国四国農業研究センター 提供

図 12 食パンの内相内部の構造比較

きにくく、ダマスクローズ由来の#7 (4YPD-3 株), ビューティフルふくやま由来の#9 (27L-1 株)を使用し
て製パンした(C), (D)ではパン表面に焼き色が付きやすい傾向が見られた。膨張性試験で最も膨張率の高
かったシークレットパフューム由来の酵母が実際の製パン試験では膨らみが悪かった要因として、小麦
粉のグルテンを分解するプロテアーゼの働きで小麦粉のグルテンのネットワークの維持が難しくなる
ことが考えられた。また使用酵母菌株によって焼き上がりの色や形だけでなく、味や香りなどにも違い
が見られ、どちらの製パン試験でも再現性が得られた。酵母種によってパンの特徴に違いが見られた原
因は、酵母種による小麦粉由来のグルテンやデンプンなどを分解する能力が異なることが関与してい
るのではないかと考えられた。パンの特徴では、アロマセラピー由来の EY4-2 株を使用し製パンした(A)
が最も生地が柔らかくかつ甘く感じ、シークレットパフューム由来の EM15-1 株を使用し製パンした(B)

福山バラの酵母プロジェクト -製パンへの適用-

ではもちもちとした生地で味に癖がなく、ダマスクローズ由来の 4YPD-3 株を使用し製パンした(C)では生地がやわらかく味が濃くてやや甘みがあり、ビューティフルふくやま由来の 27L-1 株を使用し製パンした(D)では市販の食パンに最も近い味・食感がした。また、これら 4 種で製パンしたものは市販の酵母を使用し製パンしたものと明確に異なる食味を呈した。

製パンに用いた 4 株の酵母の顕微鏡写真を図 11 に示す。4 株の酵母は細胞の大きさ、形に特徴があることがわかった。次に、市販酵母 KANEKA、アロマセラピー、シークレットパフューム、ダマスクローズ由来の酵母を使用し、ホームベーカリーで製パンしたパンの内相内部における電子顕微鏡写真を図 12 に示す。市販のカネカ酵母を使用した食パンでは殆どの澱粉(矢印)が酵素的に分解したと考えられる網目状になっており、グルテンの網目構造が良く発達しているのに対し、アロマセラピー由来の EY4-2 酵母を使用した食パンでは澱粉の一部(矢印)が部分的に酵素的に分解したと考えられる網状であるが、グルテンの網目構造が薄く少なく、シークレットパフューム由来の EM15-1 酵母を使用した食パンでは澱粉の一部(矢印)が酵素的に分解したと考えられる網状構造が薄く少なく、糊化して大きく変形 (太矢印)し、ダマスクローズ由来の 4YPD-3 酵母を使用した食パンでは、殆どの澱粉(矢印)が酵素的分解したと考えられる網状構造をもち、グルテンの網状構造が薄い。これらの結果から比較的製パンに適しているのは、アロマセラピー由来 EY4-2 株及びダマスクローズ由来 4YPD-3 株であると考えられた。製パンの結果である図 9, 10, 12 を通して分かったことは、製パンに適した酵母を選別する上で、パン生地膨張試験の結果はあまり反映されておらず、むしろダーラム試験で高発酵性を確認した株をそのまま製パン試験までもっていく方が良いことがわかった。また、生地があまり膨らまない株でも焼きに入ると膨らむ株もあったため、今後は製パン試験に重点をおき、分離した野生酵母に関して製パンに適した株の選別を行う必要があると考えられる。また、今回選別した野生酵母に関して生イーストでは日持ちが悪く、普及しにくいいため、今後はドライイースト化を目指すとともに、福山市内の学校給食にも普及させて地元愛を育てるような手助けもしたい。

謝辞

本研究を行うにあたり、大変お世話になりましたぬまくま夢工房代表取締役社長の中島基晴様、同製造部長の清水照久様、福山市経済環境局経済部長の小畑正和様、農林水産部長の石岡徹様、経済環境課長の武田栄貴様、地産地消課長の國近様、またバラ採取にご協力頂きました福山市園芸センターの皆様、酵母における知見及び実験等をご指導頂きました福山平成大学福祉健康学部福祉学科の壺井基夫教授、福山大学生命工学部生物工学科10期生の児玉拓也さん、福山市のばら採取にご協力頂きました25期生の山田翔平さん、大下拓也さん、沖田将悟さん、天田沙織さん、脇本佑貴さん、他分子生物学研究室卒業の皆様に深く感謝致します。

文献

- 1) Kurtzman, C.P., Fell, J.W., and Boekhout T. In *The Yeasts* Fifth edition: A taxonomic study, Elsevier Nederland BV, Amsterdam (2011).
- 2) Gadanho, M., and Sampaio, J. P. Occurrence and diversity of yeasts in the mid-Atlantic ridge hydrothermal fields near the Azores Archipelago. *Microb. Ecol.*, **50**, 408 – 417 (2005).
- 3) Gadanho, M., Libkind, D., and Sampaio, J. P. Yeast diversity in the extreme acidic environments of the Iberian Pyrite Belt. *Microb. Ecol.*, **52**, 552 – 563 (2006).
- 4) Connell, L., Redman, R., Craig, S., Scorzetti, G., Iszard, M., and Rodriguez, R.: Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microb. Ecol.*, **56**, 448 – 459 (2008).
- 5) Glushakova, A. M., Kachalkin, A. V., and Chernov, I. Y. Yeasts in the flowers of entomophilic plants of the Moscow region. *Microbiology*, **83**, 125-134 (2014).
- 6) Phaff, H. J., Miller, M. W., and Mark, E.M. 酵母菌の生活, 永井進訳, 140-141, 学会出版センター (1986).
- 7) James, S. A., Collins, M. D., and Roberts, I.N. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspota*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 189-194 (1996).
- 8) Oda, Y., Yabuki, M., Tonomura, K., and Fukunaga, M. A phylogenetic analysis of the *Saccharomyces* species by the sequence of 18S-28S rRNA spacer regions. *Yeast*, **13**, 1243-1250 (1997).
- 9) Van der Auwera, G., Chapelle, S., and De Wachter, R. Structure of the large ribosomal subunit RNA of *Phytophthora megasperma* and phylogeny of the Oomycetes. *FEBS Lett.*, **338**, 133-136 (1994).
- 10) パン技術, 社団法人日本パン技術研究所, **398**, 19 (1995).

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (13), 1-19 (2014)

" Project for Fukuyama Rose Yeasts " - application of rose yeasts to bakery -

Chisa Sugihara^{*1}, Takuya Hanaoka¹, Tatsuya Ikeda², and Taisuke Hisatomi¹

¹Department of Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Fukuyama University,
Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan

²Laboratory of Plant Biotechnology, Department of Plant Breeding, National Agricultural Research Center for Western
Region, 6-12-1 Nishifukatsu, Fukuyama 721-8514, Japan

In 2016, we will celebrate the 100th anniversary of the founding of Fukuyama city. Fukuyama is famous for rose flowers and is trying to make the city decorated with one million roses. In this situation, we have started to isolate wild yeasts breeding in the flowers of roses cultured at two gardens in Fukuyama city. Then, we have selected wild budding yeasts representing high fermentation abilities in order to apply these yeasts to development of products unique to Fukuyama city. It was named "Project for Fukuyama Rose Yeasts" and promoted in collaboration with the city office and a company of Fukuyama to advertise Fukuyama city to all over the world. In this study, we have isolated 398 strains of wild budding yeasts from 43 kinds of rose flowers cultivated in Fukuyama city. Nine strains of wild budding yeasts were selected to represent high fermentation abilities. The electrophoretic karyotyping and 18S rDNA sequencing of these yeasts were performed to identify yeast species. Finally, four species of nine yeast strains were found to produce delicious bread. The four kinds of bread produced from four different yeasts were found to represent personalities one another from the viewpoint of flavor, taste, and baking color. It was shown that the wild budding yeasts from roses of Fukuyama are able to make only one products specific to the city of Fukuyama.

Keywords: Fukuyama city, rose, wild yeast, fermentation, baking