

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07661

研究課題名(和文) 蛍光分光法を用いたクラフトビールの酵母活性と品質安定性の数値化

研究課題名(英文) Monitoring of Beer Yeast Activity Using Fluorescence Spectroscopy

研究代表者

齋藤 高弘 (SAITO, Takahiro)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：50221990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ビール酵母の測定に適した検出波長と励起波長を選定し、ビール酵母の生細胞やATPとの関係を検討した。その結果、ビール酵母の測定には励起波長425 nm、検出波長635 nmが最適と判断された。検出波長635 nmのピークは、糖度、アルコール、酵母の種類の違いに影響を受けないため、適用範囲の広い指標であることが判明した。醗の検出波長635 nmの蛍光スペクトルの屈曲度は、生細胞数との間に正の相関が認められた。また、生細胞数はATPとの間に正の相関が認められたことから、蛍光分光法によって得られる屈曲度はビール酵母のATPを評価する指標になり、活性状態の評価に結びつくことが認められた。

研究成果の概要(英文)： We found that the best excitation and detection wavelengths for investigating beer yeast were 425 and 635 nm, respectively. The fluorescence may have been induced by beer yeast because no fluorescence peaks were detected from mash from which the beer yeast had been removed. Furthermore, this peak was not affected by differences in the concentrations of glucose and alcohol or by the different strains of beer yeast. Then we examined the relationship between the curvature degree of the fluorescence peak and the viability of the beer yeast. A positive correlation was observed between the degree of curvature of the peak and the number of live cells. In addition, a positive correlation was observed between the number of live cells and ATP production in beer yeast. Therefore, it was suggested the degree of curvature of the peak is also related closely with ATP production of beer yeast.

研究分野：食品科学

キーワード：蛍光分光 ビール酵母 抗酸化 ORAC ATP

1. 研究開始当初の背景

近年ビール市場全体は縮小気味であるのに対し、プレミアムビールが人気を博し、市場に占める割合は、2003年の4.0%から2013年には12.9%に拡大している¹⁾。また、食品・嗜好品一般にプレミアム市場は拡大しつつあり、高価格であっても質を求める顧客が増加している。そうした中、大手のビールに比べてやや高価格である地ビールが注目され、2014年1-9月累計の地ビールの出荷量は同期比7.0%増となり、4年連続前年を上回った²⁾。しかし、地ビール会社は商品の品質を安定化させることに苦慮しており、高品質を求める顧客を満足させ続けることは難しい。

ビールの品質の安定には、ビール酵母の状態を正確に把握することが重要である。ビール酵母は、製造過程で麦汁中の糖分を取り込み、アルコールや炭酸ガスを生成するだけでなく、アミノ酸を取り込み、香りや味を生成する重要な役割を果たす³⁾。そのためビール酵母の評価法として、染色法⁴⁻⁷⁾や培養法^{8,9)}、生理学的方法¹⁰⁾等が試みられてきた。しかし、それぞれ生死の判別、計測が煩雑で長時間、生理状態のみ判別という問題点がある。一方、ビール酵母の発酵・増殖に重要な役割を担う細胞膜プロトンポンプ活性を把握する細胞内pH法は、ビール酵母の代謝活性を反映した方法として注目されている¹¹⁾。しかしこの方法も、細胞を蛍光染色したり、pHや蛍光強度を計測する複数の工程があり、短期間での計測が難しく、小規模な醸造現場では定着していない。そのため多くの地ビール会社は、品質に関して、比重によるアルコールの生成具合以外ほとんど全てを官能に頼っている¹²⁾。

2. 研究の目的

蛍光分光法は、励起光と検出光を分光することで物質の情報を得る手法であり、試薬の添加や前処理を必要とせず、簡便、迅速、非破壊での計測が可能である。片岡ら¹³⁾は、清酒の製造に用いられる麹の菌体量や酵素活性の評価に本手法が適用できることを明らかにした。そのため本手法は、麹菌だけでなくビール酵母の状態の評価にも適用が期待された。そこで本研究は、ビール酵母の状態を把握するために、蛍光分光法が適用可能か明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ビール酵母の測定に最適な検出波長と励起波長を選定した。次に、醪を用い、ビール酵母の有無、糖やアルコール、ビール酵母の種類の違いが蛍光スペクトルに与える影響について把握した。最後に、醪の蛍光スペクトルとビール酵母の生死やATPとの関係を解明した。

蛍光スペクトルの検出には、試料を96well黒色マイクロプレートに100μL分注し、蛍光プレートリーダー(infinite M200 PRO, TECAN)を用い、各検出波長における蛍光強

度を5nm間隔で計測した。蛍光スペクトルのピークは、ピークの最大蛍光強度およびピークの屈曲度を指標として評価した。なお、屈曲度は次式(1)で算出した。

$$\text{ピークの屈曲度} = \frac{\text{検出波長 } 635 \text{ nm の 蛍光強度}}{\text{検出波長 } 615 \text{ nm の 蛍光強度}} \cdots \cdots (1)$$

なお、屈曲度が1.000以上である場合をピークの検出が可能であると判断した。供試体は、地ビールの製造に用いられる醪(上面発酵ビール酵母 WY1056 や麦汁等の混合液)を用いた。

(1) ビール酵母の測定に最適な検出波長と励起波長の選定

励起波長380, 400, 420, 440 nmにおける醪の蛍光スペクトルを計測した。また、励起波長380, 390, 400, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440 nmにおける、醪の検出波長635 nmの蛍光強度を測定した。

(2) 醪の蛍光スペクトルに影響を与える因子の解明

醪を遠心分離した後の上清液、濾過後の醪、Brixが0, 5, 10, 15, 20のグルコースと超純水の混合液(以下、糖溶液)、濃度が0, 5, 10, 20, 40, 80 v/v%のエタノール溶液、Brixが12の糖溶液で24時間培養した上面発酵酵母 Saflale S-04(以下、S-04)と下面発酵酵母 Saflager W-34/70(以下、W-34/70)を供試体に用い、励起波長425 nmにおける蛍光スペクトルを求めた。

(3) 醪の蛍光スペクトルとビール酵母の生死、ATPとの関係の解明

UVスポット光源(LC6, 浜松ホトニクス)の照射時間を適宜変化させビール酵母の生細胞数を変化させた醪、Brixが12の糖溶液、2.5, 5, 10, 100倍に希釈した醪、同じ内容物が混入した醪2種(醪①、醪②)を供試体に用い、励起波長425 nmにおける蛍光スペクトルを求めた。また、トーマ氏血球計算盤(サンリード硝子)上に試料を20μLと20μLのメチレンブルー染色液を滴下し、生細胞数と死細胞数を生物顕微鏡 BX-2700TL(レイマー)で求めた。ATPはルシフェール250プラス、ルシフェールATP消去試薬(共にキッコーマンバイオケミファ)を用い測定した。

4. 研究成果

1) ビール酵母の測定に最適な検出波長と励起波長の選定

Fig. 2に、励起波長380, 400, 420, 440 nmの醪の蛍光スペクトルを示す。励起波長が長くなるにつれ、最大蛍光強度は大きくなった。また、励起波長が420 nmの蛍光スペクトルには検出波長515, 585, 635, 690 nmにおいて4つのピークが検出できた(①~④)。検出波長635 nm付近に見られるピークは、他のピークが励起波長毎に検出波長が異なるのに対し、400, 420, 440 nmの励起波長全てに共通に出現した。片岡ら¹³⁾は、検出波長630 nmのピークが麹菌からの情報を得るために最適だと判断しており、今回の結果も検出

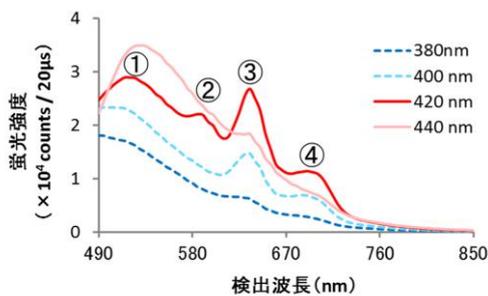


Fig. 2 励起波長380, 400, 420, 440 nmにおける醪の蛍光スペクトル
波長が近く、醪中のビール酵母からの情報検出には 635 nm が適切と考えられた。Fig. 3 に、励起波長 380~440 nm (10 段階) における検出波長 635 nm の蛍光強度を示す。励起波長 425 nm において、蛍光強度は最も大きくなった。このことから、醪の検出波長 635 nm のピークを捉えるには、425 nm の励起波長が最適と考えられた。

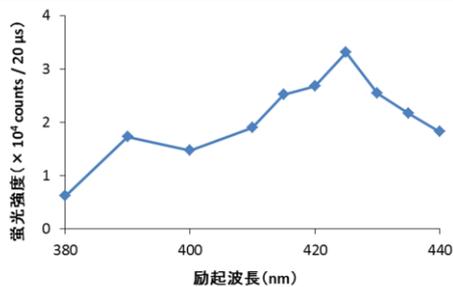


Fig. 3 励起波長380~440 nmにおける検出波長635 nmの蛍光強度

(2) 醪の蛍光スペクトルに影響を与える因子の解明

Fig. 4 に示すように、遠心分離後および濾過後のスペクトルは、醪の蛍光スペクトルに見られた検出波長 590, 635, 700 nm のピークが消失した。遠心分離および濾過は、醪中

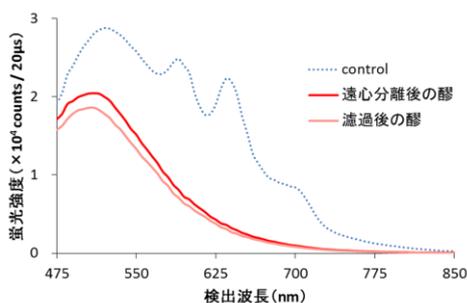


Fig. 4 励起波長425 nmにおける遠心分離後および濾過後の醪の蛍光スペクトル

のビール酵母のみを取り除けないため、ビール酵母以外に醪に含まれる糖やアルコールが醪の蛍光スペクトルに与える影響も調べた。その結果、検出波長 635 nm のピークは全て検出されなかった。また糖溶液およびエタノール溶液の蛍光強度は、最大で約 700 counts / 20 μs であり、醪の最大蛍光強度の 1/500 と低く、糖やアルコールは醪の蛍光スペクトルにほとんど影響しないことが明らかとなった。また、異なる種類のビール酵母

(S-04, W-34/70) の蛍光スペクトルは、Fig. 5 に示すように、どちらも検出波長 635 nm にピークが検出され、ビール酵母の種類の違いによってピークの検出波長は変化しないことが明らかとなった。以上の結果から、検出波長 635 nm のピークはビール酵母に由来していると考えられた。

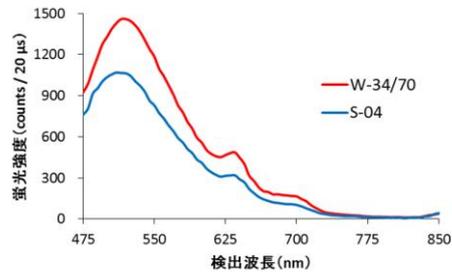
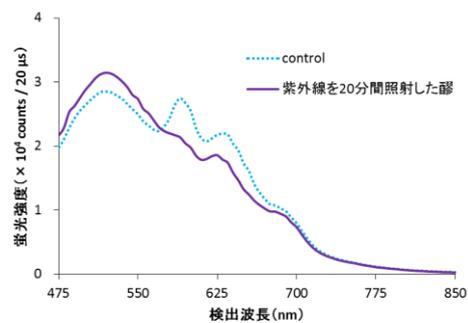


Fig. 5 励起波長425 nmにおける培養24時間後のS-04およびW-34/70の蛍光スペクトル

(3) 醪の蛍光スペクトルとビール酵母の生死、ATP との関係の解明

Fig. 6 に、紫外線を 20 分間照射した醪の蛍光スペクトルを示す。検出波長 635 nm のピ



ークは大きく減少した。Table 1 に示すように、紫外線照射した醪中のビール酵母の死細胞率は 98.1% となり、ほとんど全てのビール

Table 1 紫外線照射した醪中のビール酵母の死細胞率

試料名	死細胞率(%)
control	56.4
紫外線を20分間照射した醪	98.1

酵母が死滅していた。そのため、ピークはビール酵母の生死と関係していることが示唆された。そこで、ビール酵母の生死とピークの屈曲度との関係を明らかにするため、死細胞率の異なる醪 20 種のピークの屈曲度を調べた。その結果、Fig. 7 および Fig. 8 に示すように、ピークの屈曲度は死細胞数との間に負の相関、生細胞数との間に正の相関がそれぞれ認められ、屈曲度はビール酵母の生細胞数を推測する手段となり得ると考えられた。そこで、発酵初期におけるビール酵母の代謝活性と関係していると言われる ATP14) をビール酵母の状態を評価する指標とし、屈曲度との関係を調べた。Fig. 9 に、醪中のビール酵母の生細胞数と ATP 発光量との関係を示す。生細胞数は、ATP 発光量との間に正の相関が認められた。このように、屈曲度は生細胞数と相関が認められることから、ATP と

も密接に関係していることが明らかとなった。なおATPは、Fig. 10に例を示すように、同じ種類のビール酵母であっても生細胞1個あたりで7倍も異なる。そのため蛍光分光法を用いた本手法で得られる屈曲度は、ビール酵母の数やその生死だけでなく、ビール酵母の代謝活性を評価する指標になり得ると考えられた。

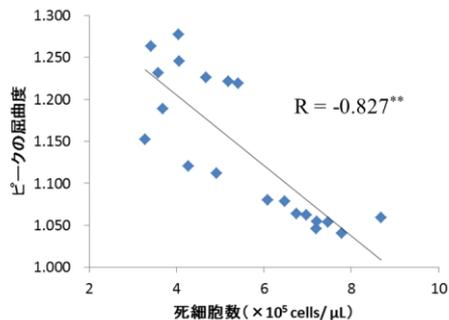


Fig. 7 醗中のビール酵母の死細胞数と励起波長425 nmにおける醗の蛍光スペクトルの検出波長635 nmのピークの屈曲度との関係
**：相関係数は1%水準で有意(両側)

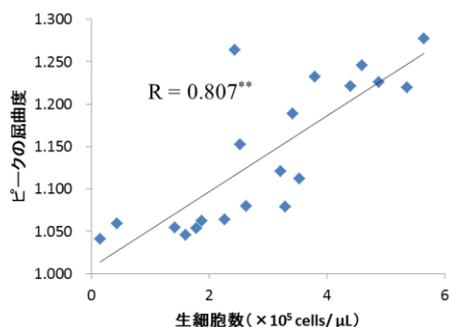


Fig. 8 醗中のビール酵母の生細胞数と励起波長425 nmにおける醗の蛍光スペクトルの検出波長635 nmのピークの屈曲度との関係
**：相関係数は1%水準で有意(両側)

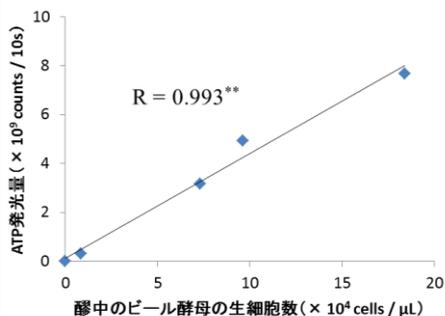


Fig. 9 醗中のビール酵母の生細胞数とATP発光量との関係
**：相関係数は1%水準で有意(両側)

蛍光分光法において、ビール酵母の測定に最適な励起波長は425 nm、検出波長は635 nmであることが判明した。また、蛍光スペクトルの検出波長635 nm付近のピークの屈曲度はATPと密接に関係していることが明らかとなった。そのため蛍光分光法は、地ビールの醸造現場で、簡便かつ迅速にビール酵母の代謝活性を評価する手法になり得ると考えられた。今後は、ビール酵母の代謝活性を評価する、細胞内pH法等のその他の既存の評価法との関係を検証する。また、実際の地ビー

ルの製造現場での利用適性を検討する。

<引用文献>

- 1) サントリー (2013) ; プレミアムビールに関する消費者飲用動向調査 サントリープレミアムビールレポート 2013, <http://www.suntory.co.jp/news/2014/12062-2.html>, (参照 2015-01-30) . 2) 東京商工リサーチ (2014) : 第5回地ビールメーカー動向調査, http://www.tsr-net.co.jp/news/analysis/20141027_01.html, (参照 2015-01-30) . 3) 宮地秀夫 (1999) : 酵母, ビール醸造技術, 初版, 食品産業新聞, 87-115. 4) 日本生化学会編 (1992) : 生菌数の測定, 新生化学実験講座 17 微生物実験法, 第1版 (別府輝彦), 東京化学同人, 137-139. 5) M. J. Chilver, J. Harrison, and T. J. B. Webb. (1978) : Use of Immunofluorescence and Viability Stains in Quality Control, J. Amer. Soc. Brew. Chem., 36, 13. 6) A. M. Paton and S. M. Jones (1975) : The Observation and Enumeration of Micro-organisms in Fluids using Membrane Filtration and Incident Fluorescence Microscopy, J. Appl. Bact., 38, 199-200. 7) B. Rotman and B.W. Papermaster (1966) : Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 55 (1), 134-141. 8) E. B. C. Report of Yeast Group (1961) : ESTIMATION OF YEAST VIABILITY, J. Inst. Brew., 68 (1), 14. 9) E. B. C. Analytica Microbiologica. (1977) : J. Inst. Brew., 83, 109-118. 10) 今井健夫 (2008) : 最近の酵母活性測定技術の進歩とその応用, 日本醸造協会, 103 (4), 230-237. 11) Imai, T., Ohno, T. (1995) : The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Environ. Microbiol., 61 (8), 3604-3608. 12) 井上喬 (2006) : 連載第12回『ビール醸造における酵母の取り扱い』(前編), Sake Utsuwa Research, 6-9. 13) 片岡皆人, 齋藤高弘, 岡本竹己, 佐々木隆浩, 星佳宏, 杉江正美, 萩原昌司, 志賀徹 (2011) : 蛍光分光法を用いた清酒製造工程における麹菌活性評価技術の開発, 日本醸造協会, 106 (9), 620-626. 14) 増田達也 (2010) : 菌体のエネルギー代謝 : 酒類製造への応用, 生物工学, 88 (10), 536. 1)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

東尾 恭詳、田村 匡嗣、松井 正実、齋藤 高弘、松本 健一、岡本 竹己、査読有、 蛍光分光法を用いたビール酵母活性

のモニタリング、Eco-Engineering、28(4)、
85-90, 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 高弘 (SAITO, Takahiro)
宇都宮大学・農学部・教授
研究者番号：50221990

(2) 研究分担者

田村 匡嗣 (TAMURA, Masatsugu)
宇都宮大学・農学部・助教
研究者番号：60750198