

第6回 酵母の保存技術について (1) 酵母の保存法

鈴木基文

独立行政法人理化学研究所 バイオリソースセンター 微生物材料開発室 (理研 BRC-JCM)
〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

Preservation of yeasts

Motofumi Suzuki

Microbe Division/Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center (RIKEN BRC-JCM)
2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

1. はじめに

自然界から分離された酵母株あるいは人為的につくられた酵母突然変異株の種々の性質を保持したまま保存することは、学術的にも応用的にも非常に重要なことである。後者の突然変異株の保存法については、本講座の金子の解説があるので、ここでは酵母の一般的な保存法、特にJCMで行っている継代培養法、凍結乾燥法および凍結法について紹介する。酵母の種々の保存法に関しては、イギリスのNational Collection of Yeast Cultures (NCYC)での実際的な保存法について述べた、Kirsop (1984, 1988)の優れた総説があるので参照されたい。

2. 酵母の培養

酵母は通性嫌気性微生物であり、好气的条件および嫌气的条件で生育することができる。ほとんどの酵母種は単純な組成の合成培地、複雑な組成の合成培地あるいは麦芽エキストラクトを含んだ培地で生育することができる。これらの培地は液体培地として調製できるし、寒天を加えることによって固形培地を調製することができる。ほとんどの酵母種はそれらの培地で良好に増殖する。ただし、*Malassezia*属のような生育に脂質を要求する酵母がある。

酵母の生育に最適な pH の範囲は 4.5 と 6.5 の間であるが、pH 3.0 と 8.0 の間で生育可能である。

培地の構成成分は水分、炭素源、窒素源、無機物の

ほかビタミン、アミノ酸などの微量生育因子、その他未知の生育因子などである。物理化学的要因、すなわち pH、浸透圧なども培地の主要な因子である。天然培地は動物、植物、微生物から調製したエキスなど調製した培地である。例えば、麦芽汁や麹汁などが代表的である。酵母エキスやカザミノ酸などは濃縮液あるいは粉末状として組成のほぼ一定したものが製品化されており、培地の調製を容易にするとともに、合成培地と組み合わせて使用することもできる。一方、合成培地は化学的に純粋な既知物質のみからなる培地で、Wickerham の合成培地はその代表例であり、生理学的性状試験などに広く使用されている。

培地はその形状から液体培地および固体培地（斜面または平板培地）に分けられる。前者は水溶液体またはエマルジョンとして、後者は液体培地を寒天やゼラチンなどで固化させて使用する。

また、培地は使用目的によって分離用、培養用、保存用、各種の性状検査用、検定用の培地に区分することができる。一般的に酵母の分離、培養、保存に使用されている栄養豊富な培地の一つとして YM 培地があり、その液体培地組成を以下に示す。

YM 液体培地 (yeast extract-malt extract-peptone medium)

Yeast extract	3 g
Malt extract	3 g
Peptone	5 g
Glucose	10 g
Deionized water	1,000 ml

これに寒天 (20 g/1,000 ml) を加えて、固形培地 (YM agar と呼ばれる) としても使用される。YM の液体培地および寒天培地はともに粉末培地として製品化されていて、容易に調製することができる。

3. 酵母の保存法

1) 継代培養保存法 (subculturing, serial transfer)

古くから行われてきている保存法でコスト的に安く済む方法であるが、欠点として、この方法は手間がかかり、長期間の保存ができず、定期的な移植作業中に起こる汚染や誤植のような技術上の問題が起こる頻度が高い。しかし、いつでも何回でも移植できるし、培養性状を観察しやすいという利点がある。留意すべき点は培地組成と保存温度である。培地としては YM 液体培地および YM 寒天培地が一般的に用いられている。前者は特に発酵性酵母に適用できる。後者は好気性酵母に適用できる。担子菌系の酵母の保存にはポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地が推奨されている。実際例として伊藤ら (1990) の報告にあるように、担子菌系の射出分生子 (射出胞子) 形成酵母の長期間保存には、YM 寒天培地よりも PDA 培地の方が適している。

JCM での保存の手順としては以下の通りである。調製した YM 寒天斜面培地および PDA 斜面培地は 25°C で 2~4 日間静置した後、無菌であることを確認しておく。菌株を画線接種し、生育に適切な温度 (通常は 25°C、低温菌であれば 10~17°C) で培養する。十分に生育したら、8°C の低温保存室 (除湿装置付き) で保管する。除湿装置によって湿度は低く保っているが、寒天培地の乾燥が早くなるので注意が必要である。径 16.5 mm の中試験管で栓はシリコ栓を用いている。綿栓を用いる場合は、高湿になると綿栓を通してカビの侵入によって汚染されやすくなるので、定期的に保存菌株の状態を検査する必要がある。

酵母の種類によるが一般的に約 2~6 ヶ月ごとに新しい培地に植え継ぎを行う。以下の酵母属の菌株は継代期間が短いので、注意されたい。 *Dekkera*, *Brettanomyces* (この 2 属酵母は多酸性が原因), *Bullera*, *Sporobolomyces* などの射出胞子形成酵母, *Hanseniaspora* および *Kloeckera*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Schizosaccharomyces* など。

2) 凍結乾燥保存法

この保存法は水を凍結して減圧下で氷の状態から水蒸気の状態へ昇華することによって、乾燥させる方法

で、長期間保存ができる。

JCM での保存の手順としては以下の通りである。通常、YM 斜面培地または平板培地で 3~5 日間培養して十分に生育した後期定常期の酵母菌体を分散媒 (10% スキムミルク + 1% グルタミン酸ナトリウム水溶液) に濃厚な菌体懸濁液をつくる。滅菌済み 2.5 ml 容プラスチック製シリンジ (ディスプレイザブル) に分注針 (ステンレス製) を無菌的に装着して、懸濁液を全量吸い上げる。菌体懸濁液を吸い上げた分注針付きシリンジをステッパーに装着して 0.1 ml ずつ、滅菌した凍結乾燥用綿栓付きアンプル 15 本 (1 株につき 15 本) に無菌的に分注する。凍結乾燥前の生育確認を行うために YM 寒天平板培地に 0.1 ml 滴下して、画線して生育至適温度で培養する。分注したアンプルを真空装置に脱着可能な多岐管 (マニホールド) の肉厚ゴム管に差し込み、-80°C のフリーザーの中に入れて、菌体懸濁液を凍結する。約 2 時間後、分注したアンプル付きマニホールドを真空装置に連結して減圧下で乾燥する。この段階は市販の真空装置の仕様に合わせて手順となる (例えば、脱着できない多岐管の場合は、分注したアンプルを 1 本ずつ凍結しながら、多岐管に連結することを繰り返し行うなど)。

一夜、乾燥後、アンプルを真空下で熔封する。熔封後、真空度チェックをする。凍結乾燥アンプルは低温室 (4°C) で保存する。保存後、1 本のアンプルの生存試験を行う。

分散媒について：凍結乾燥は凍結と乾燥の 2 段階からなっているので、酵母細胞にとっては凍結障害および乾燥障害を受けるため、それらの障害から最大限に保護できる分散媒を用いることが重要である。種々の分散媒が知られているが、スキムミルクまたは血清を基礎にした分散媒が用いられている。JCM では、10% スキムミルク + 1% グルタミン酸ナトリウム水溶液を用いている。血清を用いた例としては、7.5% グルコース-馬血清溶液がある (Kirsop, 1984)。

3) 凍結保存法

凍結保存によって、凍結乾燥と同様に長期間の酵母の保存が可能であり、特に液体窒素を用いれば半永久的な保存ができる。-80°C のフリーザーを用いた保存法と液体窒素を用いた保存法がある。JCM の酵母株は両方の保存法を用いているが、液体窒素による保存は気相中で行っている。保護剤 (分散媒に相当) としては 10% グリセロール水溶液を用いている。

JCM での保存の手順としては以下の通りである。

通常, YM 斜面培地または平板培地で 3~5 日間培養して十分に生育した後期定常期の酵母菌体を滅菌した 10% グリセロール水溶液 (3~4 ml) で濃厚な菌体懸濁液をつくる. 0.2~0.4 ml ずつ滅菌済み 5 ml 容プラスチック製メスピペット (ディスポーザブル) で凍結チューブ (Nunc 363401, 容量 1.8 ml, インナーキャップ式; Nunc A/S, Roskilde, Denmark) 10 本に無菌的に分注する. 凍結前の生育確認を行うために YM 寒天平板培地に 0.1 ml 滴下して, 画線して生育至適温度で培養する. 作製した 10 本の凍結チューブのうち, 6 本は -80°C のフリーザーに, 3 本は液体窒素タンク (気相部分を利用, 約 -170°C) にて, 保存する. 残り 1 本は凍結保存後の生育確認試験を行う.

4. おわりに

L-乾燥法は, 凍結乾燥法と異なり, 液体状態を乾燥する方法なので, 保存対象となる酵母細胞の凍結障害を受けずに済むところに利点があり, 長期保存法として, 凍結乾燥法と同様に優れた方法である (Mikata et al., 1983; Mikata, 1999). JCM でも一部の酵母株でこの方法を適用しているが, 保存方法は基本的に同じなので, その詳細については, 見方 (2002) の総説を参照されたい. その他の酵母の保存法として, 中瀬ら (1989) の流動パラフィン重層法による酵母の保存法, 奥野および金井 (1981) による酵母の蒸留水保存法は, 装置を使わないコストを軽減する保存法として良い方法であると考えられる.

以上, JCM で行っている保存法を中心に紹介させていただいた. 長期保存法としては, 設備や装置などのハード面でコストのかかる方法が今後とも必要とされていくと思われるが, 1~5 年程度の中期的保存法の開発も必要であると考えられる. また, 今回は触れなかったが, 凍結乾燥不能な酵母株に適した分散媒や

保護物質の探索も今後の重要な課題であると考えられる.

文 献

- 伊藤むつみ, 中瀬 崇, 鈴木基文 (1990). 寒天斜面培地による射出胞子形成酵母の保存: YM 寒天培地とジャガイモ-グルコース寒天培地の比較. *Bull. JFCC* **6**: 1-5.
- 奥野大路, 金井由美子 (1981). 酵母の蒸留水保存と凍結乾燥保存. *凍結及び乾燥研究会会誌* **27**: 100-106.
- Kirsop, B.E. (1984). Maintenance of yeasts. *In* Kirsop, B.E. & Snell, J.J.S. (eds.), *Maintenance of Microorganisms. A Manual of Laboratory Methods*, p. 109-130, Academic Press, London.
- Kirsop, B.E. (1988). 4. Culture and preservation. *In* Kirsop, B.E. & Kurtzman, C.P. (eds.), *Living Resources for Biotechnology, Yeasts*, p. 74-98, Cambridge University Press, Cambridge.
- Mikata, K., Yamaguchi, S. & Banno, I. (1983). Preservation of yeast cultures by L-drying: Viabilities of 1710 yeasts after drying and storage. *IFO Res. Comm.* **11**: 25-46.
- Mikata, K. (1999). Preservation of yeast cultures by L-drying: Viability after 15 years of storage at 5°C. *IFO Res. Commun.* **19**: 71-82.
- 見方洪三郎 (2002). 酵母の長期保存法に関する研究. *Microbiol. Cult. Coll.* **18**: 3-16.
- 中瀬 崇, 山田和彦, 小川絃司, 鈴木 勇, 駒形和男 (1989). 流動パラフィン重層法による酵母の保存: 20 年間の保存成績. *Bull. JFCC* **5**: 11-18.
- (担当編集委員: 岡根 泉)