

タイトル：酵母の二酸化炭素産生（発酵性試験）

◇対象

高校生

◇実験の概要

酵母菌には、グルコースなどの糖から、エタノールと二酸化炭素を生成することにより生活に必要なエネルギーを獲得するものがある。酵母菌が行うエタノール発酵は、お酒やパンの製造など人々の生活に利用されている。

この実験は、酵母菌が行うエタノール発酵によって発生する二酸化炭素ガスを、液体培地内でダーラム管というドーム型のガラス管内に溜めて気泡として観察するというものである。また、培地に BTB (Bromothymol Blue)^{*}を加えることで、BTB を含む培地が緑色から黄色に変化することから、培地中のダーラム管内に溜められた気体が二酸化炭素によるものであることが推測できる。

試験では、4 つの発酵試験培地にそれぞれ酵母菌 1 種類ずつと、比較試験（酵母菌の代わりに生理食塩水を入れる）を行い、発酵能があるパン酵母の他、発酵能が無い酵母菌を使用してこれらを比較する。

	試験 1	試験 2	試験 3	試験 4
試験する酵母菌	パン酵母	赤色酵母	油脂酵母	生理食塩水 (酵母菌無し)

※BTB 溶液：pH の指示薬として使われる。酸性では黄色、中性では緑色、アルカリ性では青色になる。

二酸化炭素は水に溶解すると酸性になるため、BTB 溶液は黄色に変色する。

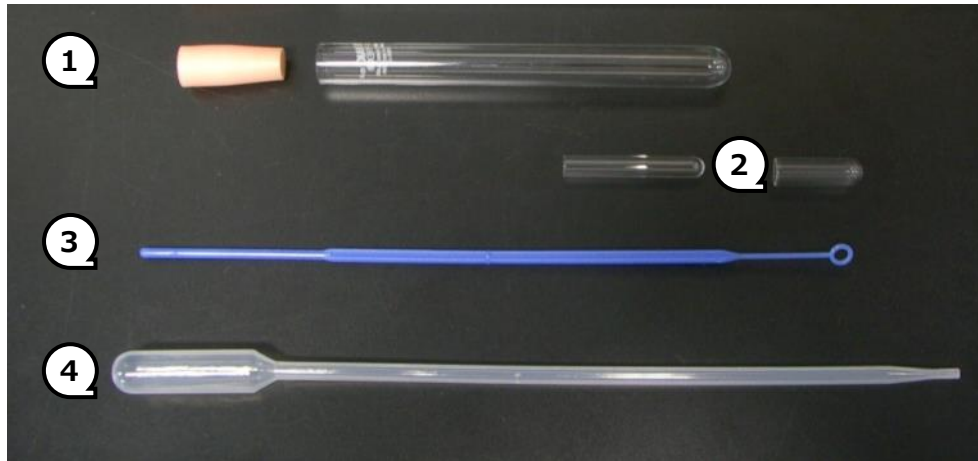
◇所要時間

1 日～3 日（細胞数や培養温度により調節可）。

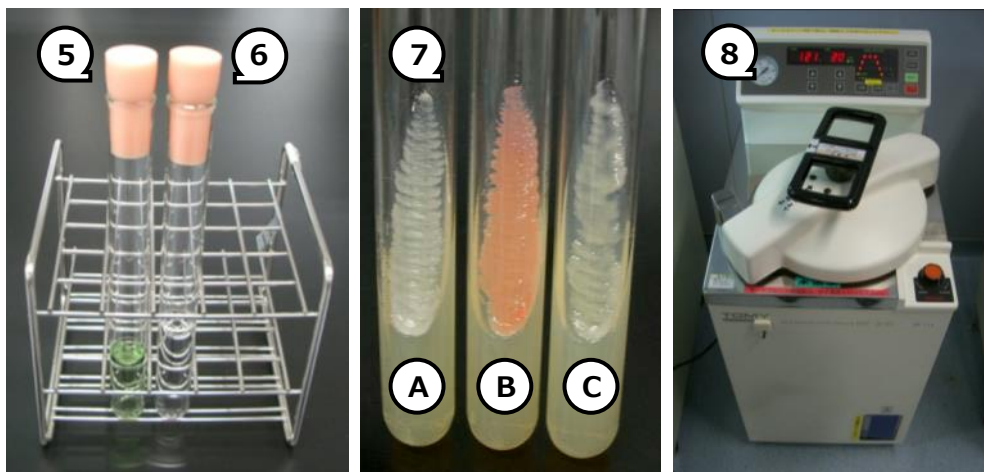
前日までに細胞や発酵試験培地の準備が整っていれば、8 時間～9 時間で酵母菌の二酸化炭素ガスの産生が確認可能。

◇必要な実験器具

- ① 試験管、シリコン栓（綿栓）
- ② ダーラム管（発生した二酸化炭素をこの管の中に集める）
- ③ ループ（酵母菌を培地から採取するために使用）（市販）
- ④ スポイト



- ⑤ 発酵試験培地（ダーラム管 液体培地・グルコース水・BTB 溶液の混合液）
- ⑥ 生理食塩水（0.85% NaCl 水）
- ⑦ 酵母菌（試験管の中の斜面培地上で培養しているもの）
A：パン酵母， B：赤色酵母， C：油脂酵母
- ⑧ オートクレーブ（圧力釜。121℃で 15 分間、圧力をかけた高熱の蒸気で微生物を完全に死滅させる）

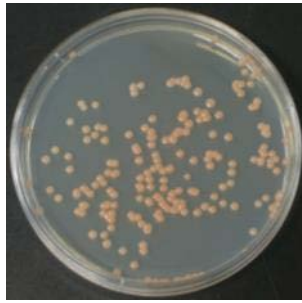


実験室にあると望ましいもの：インキュベータ（25～30℃）

◇使用する微生物（NBRC 提供）



パン酵母



赤色酵母



油脂酵母

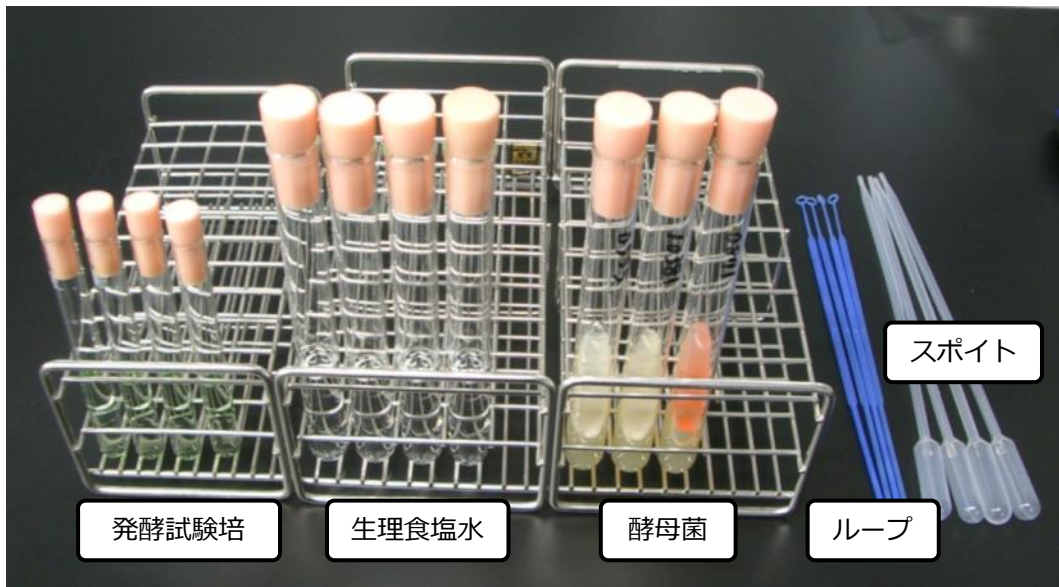
- (1) パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae*
- (2) 赤色酵母 *Rhodospidium toruloides*
- (3) 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi*

※L-乾燥標品にて提供。L-乾燥標品の復元方法等のご案内は微生物株と一緒に同封しております。

◇準備するもの

実験に必要な試薬・器具の数

発酵試験培地（ダーラム管入り試験管）	4 本
10 ml 生理食塩水（試験管）	4 本
3 種類の酵母菌（斜面培地入り試験管）	各 1 本（3 本）
ループ	4 本
スポイト	4 本



◇使用する培地

【発酵試験培地】

液体基本培地

グルコース	20 g
酵母抽出物 (Yeast Extract)	4.5 g
ペプトン (Peptone)	7.5 g
水 (D.W.)	1 L

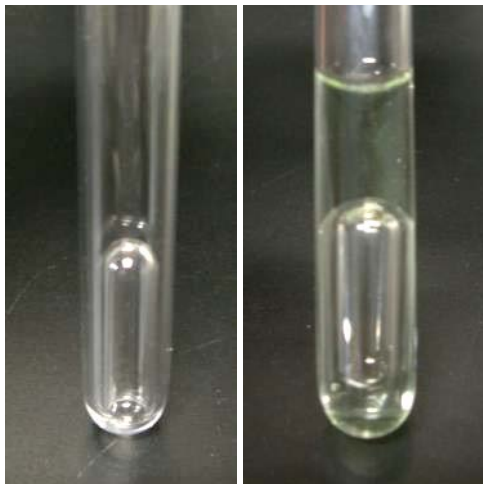
BTB 溶液

BTB (Bromothymol Blue)	50 mg
水	75 ml

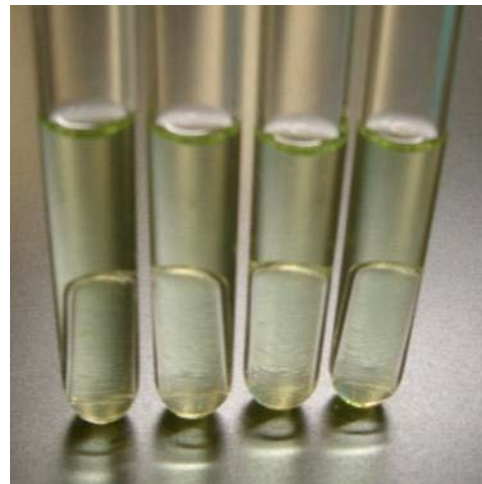
液体基本培地 100 ml に対して、4 ml の BTB 溶液を加える。

試験管にダーラム管を底が上になるようにいれ、液体基本培地を 2 ml 加える。

このとき、ダーラム管内に気泡がある。シリコン栓を着け、オートクレーブをかける。(オートクレーブをかけることで、気泡が無くなる)



試験管の中にダーラム管を入れ、その中に液体基本培地を加え、オートクレーブをかける (121 °C, 15 分)。



オートクレーブをかけた後の発酵試験培地。ダーラム管の中に気泡が無くなったことを確認する。

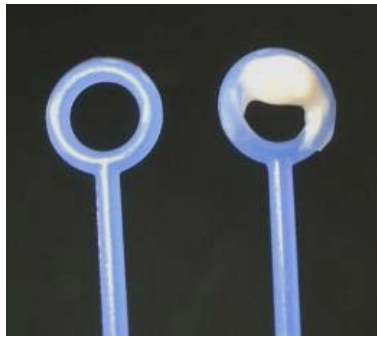
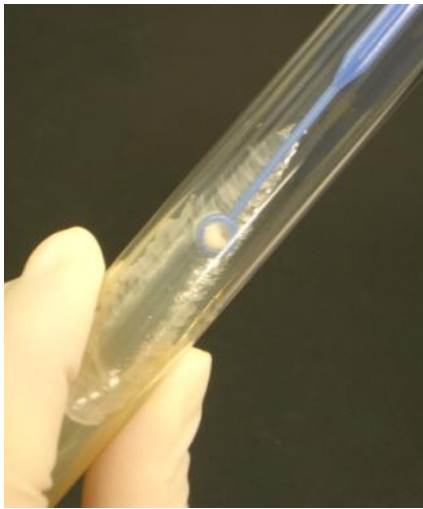
生理食塩水

塩化ナトリウム (NaCl)	8.5 g
水	1 L

試験管に 10ml ずつ分注し、オートクレーブをかける。

◇実験の手順

1. 少量の酵母菌をループで掻き取る。(7~8 mm 径のループ半分程度)



2. ループに掻き取った酵母菌を、10 ml の生理食塩水にいれ、攪拌（懸濁）する。



生理食塩水と酵母菌懸濁液

左 : 生理食塩水

右 : 酵母菌懸濁液

3. 懸濁した懸濁液を発酵試験培地に 2~3 滴程度加える。



加える細胞の数により実験結果の出る時期を調節可能。結果を見るのが数日後であれば、懸濁液を 10 ml の生理食塩水に 2~3 滴程度加えて希釈した酵母菌液を、発酵試験培地に 1~2 滴加える。

4. 室温～30℃程度の場所に置き、培養する。

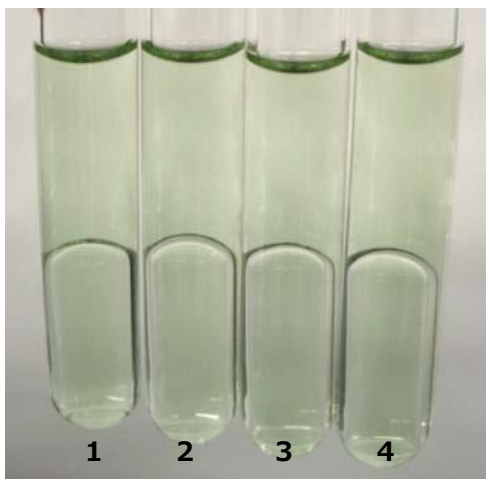
1 日で結果を出したい場合、インキュベータや孵卵器など、気温が 25～30℃程度になる場所に置く。(室温でも可)



◇実験結果

培養 2 日後の試験管の様子（右写真）を見ると、パン酵母が入った試験管内のダーラム管には気泡が集まり、ダーラム管ごと液体培地の上部に浮き上がっている。パン酵母以外の酵母菌や酵母菌が入っていない試験管では、ダーラム管内に気泡はない。また、パン酵母が入った試験管の培地の色が黄色くなったのは、パン酵母が放出した二酸化炭素により、培地内の pH が酸性になり、pH の変化を BTB 反応により黄色く変色したためである。

パン酵母のみがエタノール発酵により二酸化炭素を放出しており、他の酵母菌株は、ダーラム管内に気泡は存在しておらず、二酸化炭素を発生するエタノール発酵はしていないということが分かる。



発酵試験培地に添加した直後

1. パン酵母、2. 赤色酵母、3. 油脂酵母
4. 生理食塩水



25℃で培養 2 日後

1. パン酵母、2. 赤色酵母、3. 油脂酵母
4. 生理食塩水

◇まとめ

液体培地の中にダーラム管をいれて酵母菌を培養すると、ダーラム管の中に二酸化炭素が集まり、発酵という酵母菌の働きを気泡として観察することができる。酵母菌の一つであるパン酵母は、発酵により二酸化炭素を放出するが、他の酵母菌（赤色酵母や油脂酵母）は、発酵能を持たないため、二酸化炭素を生産しない。酵母菌の種類によって発酵を行うものとそうでないものがあることが今回の試験によって分かる。