

有用微生物の開発

—酒類用低発酵性酵母の改良—

飯野修一・荻野 敏・小宮山美弘

Development of Useful Microorganisms

—Breeding of Low Alcohol Productivity Yeast Isolated for Brewing—

Shuichi IINO, Satoshi OGINO and Yoshihiro KOMIYAMA

要 約

核融合欠損キラー酵母No.5048株 (a, leu 1, kar 1, KIL-K₁) を使用して、プロトプラスト融合法によるアルコール低生産性酵母DL株へのキラー性の導入を試みた。

- 1) No. 5048株のプロトプラスト形成のための酵素処理はDL株に比べて長時間(1晩)を要した。
- 2) 30%PEG4,000使用時のプロトプラスト保持のために、0.6Mのソルビトール含有が必要であった。
- 3) Difco Nitrogen Base 再生培地でのプロトプラストの再生時間は短かった(3日間)。
- 4) キラー活性を保持する無菌培養ろ液使用によるキラー濃縮で、再生した菌株の中から、融合株と思われる8菌株が分離された。

1. 緒 言

我々は低アルコール清酒醸造用の酵母として、DL株^{1,2)} (*Saccharomyces cerevisiae*³⁾) を既に分離した。しかしながら、少量試験において、この酵母の増殖力は協会清酒酵母に比べて、やや劣っており⁴⁾、製造現場で安定した醸造を行うには趣に混在する野生酵母の増殖抑制やこの酵母の増殖を促進するように発酵温度や酒母歩合を高くするなどの醸造方法を行うことが望まれた。

一方、酵母の中に仲間の酵母を殺すキラー酵母がBEVAN

ら⁵⁾により発見されて以来、応用面から、醸造用酵母にキラー性を付与し、醸造工程での野生酵母の汚染を防止しようとする試み⁶⁾がなされてきた。プロトプラスト融合法は胞子形成の困難な菌株にも適用が可能で、また、減数分裂の際の形質分離の心配がないことから、一般的な育種方法となり、最近では細胞中の核は融合しなくて、キラー物質などの細胞質だけを導入させる方法もいくつか報告⁶⁾されている。

今回、我々はDL株のアルコール低生産性の形質を失いたくない観点から、キラー供与株としてKar 1株を利用し

表1 使用菌株

菌 株	遺伝子型	YNB培地での増殖能 ¹⁾	キラー活性 ²⁾	胞子形成能 ³⁾
DL ⁴⁾		+	-	+++
No. 5048 ⁴⁾	a, leu 1, kar 1, KIL-K ₁	-	+	-

1) YNB培地 (Difco Yeast Nitrogen Base 0.67%, グルコース1%, 寒天2.5%, pH 5.3)

における増殖

2) 平板培養での供試菌株周囲におけるキラー感受性菌株の生育阻止帯の有無

3) 胞子形成培地 (酢酸ナトリウム0.4%, ラフィノース0.04%及び寒天2%) での胞子形成能

4) *Saccharomyces cerevisiae*

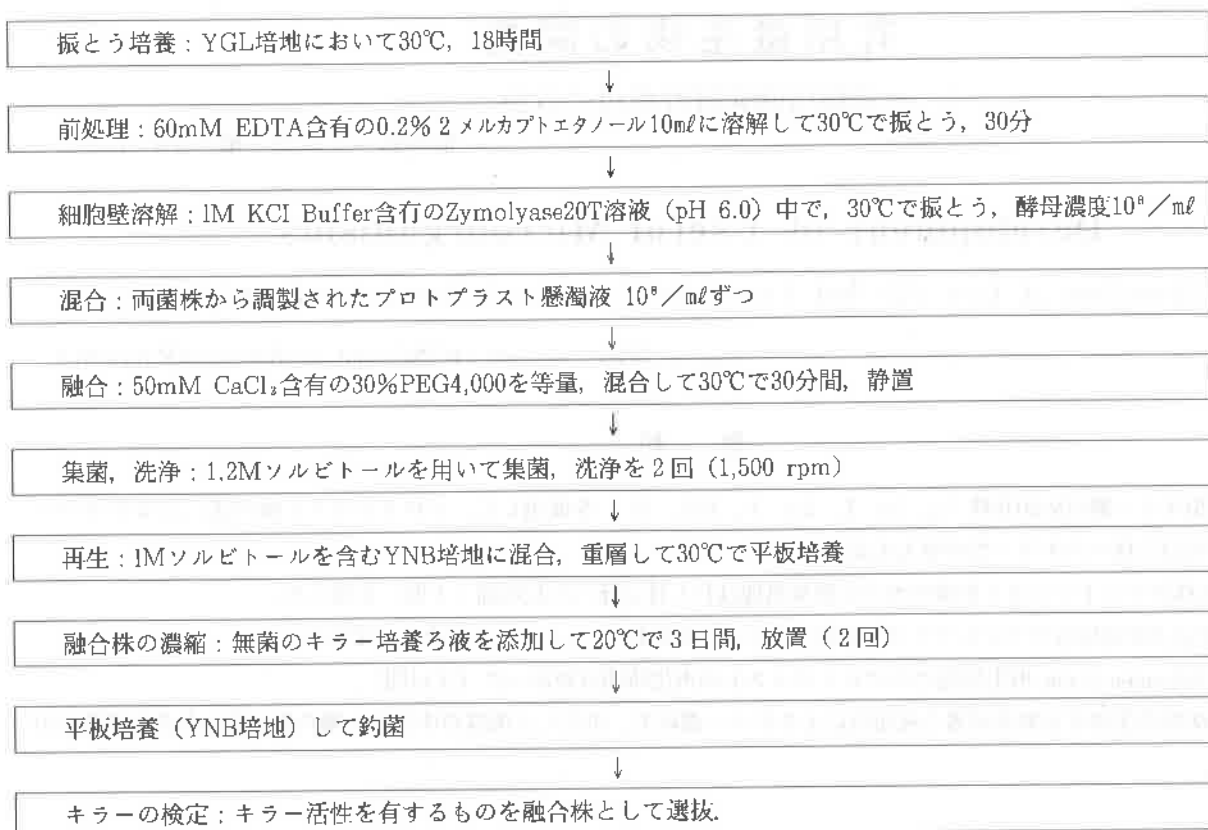


図1 細胞融合

たプロトプラスト融合法によるDL株へのキラー物質の導入を試みたので報告する。

2. 実験方法

2-1 使用菌株

融合には当センターで分離したアルコール低生産性酵母DL株及びキラー供与酵母として国税庁醸造試験所から譲渡されたNo.5048株 (a, Ieu1, Kar1-1, [KIL-KI]) の両 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた。また、キラー活性の検定及び定量試験にはキラー感受性酵母として協会清酒酵母901号 (以下K901) を用いた。

親株であるDL株及びNo.5048株について本試験に必要なと思われる遺伝形質を表1に示した。

YNB培地 (Yeast Nitrogen Base (Difco) 0.67%, グルコース1%, 寒天2.5%, pH 5.3) に前者は増殖し、また、キラー活性は後者に認められた。

従って、この両形質を合わせて持つものを融合株として選抜した。なお、前者は旺盛な孢子形成能を示したが、後者は孢子を形成しなかった。

2-2 使用培地

1) 使用酵母の増殖には山崎ら⁷⁾のYGL培地 (グルコース4%, ポリペプトン1%, 酵母エキス0.5%, KH_2PO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, pH 5.8) を用いた。

2) 融合後のプロトプラストの再生には1Mソルビトールを含む上述のYNB培地を用いた。

3) 融合株の濃縮には0.1Mクエン酸-リン酸二ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) で調製したYL培地 (グルコース2%, ポリペプトン1%, 酵母エキス1%)⁸⁾ 及び市販の乾燥麹を糖化して調製した麹エキス培地 (ポーメ10) を用いた。

4) 酵母の孢子形成には大内ら⁹⁾の孢子形成培地 (酢酸ナトリウム0.4%, ラフィノース0.04%及び寒天2%), またキラーの検定はメチレンブルー-0.003%を含む前項のクエン酸緩衝液でpH 4.8に調製したYL培地 (以下MB培地とする)⁸⁾を用いた。

2-3 キラー活性の定性及び定量試験

キラー活性は河野らの方法¹⁰⁾により、MB培地 (pH 4.8) 上の試験菌の周囲における感受性菌 (K901を使用) の生育阻止帯の有無で判定した。

また、定量はWOODS and BEVAN¹¹⁾や今村ら¹²⁾に準じた河野ら¹⁰⁾のWell testにより行った。但し、穴の直径は9mmとした。

2-4 プロトプラストの調製

受容株は呼吸能欠損変異株にしてから用いるのが一般的であるが、受容株のアルコール低生産性の形質が失われることが心配されたので、変異させずに、そのまま用いた。プロトプラストの調製及び融合は基本的にはGUNGEら¹³⁾

に準じた山崎らの方法⁷⁾により行った。その概要を図1に示した。

使用酵母をYGI培地7mlに1白金耳量接種して、2日間、30℃で振とう(130rec/min, 振幅30mm, 以下、同様)培養し、前培養とした。次にその前培養液0.5mlを採取、同培地100mlに接種し、30℃で18時間、振とう培養した。菌体は殺菌水、次に10mM EDTAのそれぞれ20mlずつを用いて、遠沈洗浄(4,000rpm, 5分間)した。洗浄菌体は60mM EDTAを含んだ0.2%2-メルカプトエタノール溶液10ml中で、30℃、30分間の振とう処理を行い、集菌後、1M KClを含むM/15リン酸緩衝液(以下KB, pH 6.5)に懸濁した。10⁸/ml濃度にした酵母懸濁液1mlに、2.5mg/ml濃度のZymolyase-20T¹⁰⁾ 1ml及びKB (pH 6.0) 8mlを添加し、30℃で、振とうしながら、プロトプラスト化した。

2-5 プロトプラストの融合

得られたプロトプラストは0.4M CaCl₂で3回、遠心分離しながら洗浄(1,500rpm, 5分間)した。

プロトプラスト濃度10⁸/ml程度にした両酵母懸濁液1mlずつを混合して、1,500rpm, 5分間の遠沈で集めた菌体に、50mM CaCl₂を含む30%ポリエチレングリコール4,000(以下PEG 4,000)溶液2mlを添加して、30℃で30分間、静置した。またこの時にソルビトール添加の是非について検討した。次いで1.2Mソルビトールを用いて遠沈集菌しながら2回洗浄した。

2-6 プロトプラスト融合体の検出

1) 細胞壁の再生

融合処理した菌体を1.2Mソルビトール0.2mlに懸濁し、

表2 無菌の培養ろ液におけるキラー活性の比較

培養日数	培地別キラー活性 ¹⁾	
	YL	麴エキス
2日	1mm	2mm
3日	1mm	3mm
4日	0	2mm

* Na5048株を使用して20℃培養した時の培養ろ液について比較した。感受性菌K901を塗布したMB培地上の穴に無菌ろ過した培養ろ液を注入して20℃、5日間培養した時に、形成される増殖阻止円の幅を測定した。

その0.1mlを1Mソルビトールを含むYNB再生培地20mlに混合して、シャーレに流し、固化後、さらに同組成の培地を重層して、30℃で培養した。

2) 融合株の濃縮

本試験の再生培地にはアミノ酸要求性(leu1)のあるNa5048株は再生できない。再生培地に出現するコロニーは親株のDL株も含まれているので、これをキラー酵母が生産するキラー物質により、死滅させ、融合株を濃縮した。即ち、Na5048株を前述の麴エキス培地、またはクエン酸緩衝液でpH 4.8に調製したYL培地のそれぞれ80mlに3白金耳、接種して20℃で培養した。その培養液は18,000rpm, 15分間の遠心分離を行い、上澄液を0.45mμで無菌ろ過し、これを無菌培養ろ液とした。

一方、再生コロニーは寒天培地ごと破碎して上述のYL培地(pH4.8)50mlに溶解した。この酵母溶解液10mlに無菌培養ろ液60mlを添加し、20℃で3日間、静置培養した。次いで、この培養液10mlを採取して、再度、同様に無菌培養ろ液を添加して培養した。培養液の少量をYNB平板培地で30℃、3日間、画線培養し、出現するコロニーを釣菌した。

3) 融合株の選抜

釣菌した菌株について、キラー活性を有するものを融合株として選抜した。

3. 実験結果及び考察

3-1 プロトプラストの調製

酵母細胞壁溶解酵素(Zymolyase 20T)での処理時間を

表3 本試験において分離された菌株

YNB培地で、 の増殖能 ¹⁾	キラー活性 ¹⁾	胞子形成能 ¹⁾	菌株数
+	+	+++	5
+	+	+	3
+	-	+++	18

1) 表1の注を参照。

検討した。酵素濃度250mg/L, 30°Cの処理条件においては30分の処理時間でDL株はプロトプラストをよく形成したが, No.5048株はプロトプラストの形成が認められなかった。後者のプロトプラスト形成は3時間後でも明確でなく, 長時間(1晩)を要した。処理時間の短縮のためには今後, 使用する酵素の種類や酵素濃度など¹²⁾の検討が必要と思われる。なお, プロトプラスト形成は顕微鏡下での細胞壁溶解による完全な球状への形態変化及び水滴を添加した時の浸透圧低下による破裂した細胞の凝集塊の形成¹³⁾により判断した。

3-2 プロトプラストの融合

融合処理は30%PEG4000及び50mM CaCl₂を使用して行ったが, 破壊したプロトプラストによる凝集塊の形成が観察され, 浸透圧調整剤の使用を必要とした。ソルビトール1.2M濃度でも同様であり, ソルビトール濃度を0.6Mとすることによりプロトプラストは維持された。

3-3 プロトプラストの再生と融合株の選抜

1) 再生日数

再生培地における酵母コロニーの出現は3日であった。これは融合株のマーカースとして呼吸能の正常化やアミノ酸要求性の消失などをもちいるのが一般的であり, 再生培地はアミノ酸を含まないものやグリセリンの使用で再生時間が1週間と長くなるが, 本試験ではYNB培地を使用しており, 栄養条件が良好であるためか, 酵母の増殖が旺盛で, 再生時間は短くなったものと思われた。

2) 無菌培養ろ液のキラー活性

YL培地と麴エキス培地を用いた場合の培養ろ液のキラー活性を比較して, 表2に示した。後者の場合, 形成された増殖阻止円の幅は前者に比べて1~2mm程度大きく, キラー活性が強いことが認められた。従って, 融合株の濃縮に必要なキラー物質の生産には麴培地を採用した。

3) 得られた菌株のキラー活性及び胞子形成能

本試験で得られた26菌株のキラー活性と胞子形成能を表3に示した。キラー活性を有するものが8菌株であった。この内, 親株のDL株と同様に胞子形成が旺盛なものが5菌株, 及びわずかに認められたもの3菌株であった。ここで胞子形成能が認められた5菌株はDL株の旺盛な胞子形成能を受け継いでいると思われた。

キラー活性を示さなかったのは18菌株であり, これらは胞子形成が認められたので, 選抜時, キラー物質に殺されずに残ったDL株と思われる。

4. 結 言

我々は低アルコール清酒醸造用の酵母として開発中の

DL株について, 今回, プロトプラスト融合によるキラー性の付与試験を行い, 融合株と思われるものを分離した。

今後, 本試験で分離された菌株について試験醸造を行い, キラー性を有するアルコール低生産性酵母であるか確認し, 実用化を図る。

最後に本試験をまとめるにあたって助言をいただいた山梨大学助教授の山崎豊彦博士及び同大学名誉教授の後藤昭二博士に厚くお礼を申し上げますと共に, 本試験で使用したNo.5048株を譲渡していただいた国税庁醸造試験所に感謝します。

参考文献

- 1) 飯野修一, 渡辺正平, 後藤昭二:平成2年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 東京(1990) P6
- 2) 飯野修一:清酒酵母の研究-80年代の研究-, 清酒酵母研究会編及び発行,(1992) P110~111
- 3) 篠原 隆, 飯野修一, 渡辺正平, 後藤昭二:醸協, 85(8), 580-581 (1990)
- 4) 飯野修一, 渡辺正平:未発表
- 5) E.A.BEVAN and M.MAKOWER: *Proc. 11 Int. Conc. Genet.*, 1, 203 (1963)
- 6) 清水健一:醸協, 83(10), 667-673 (1988)
- 7) 山崎豊彦, 渡辺正平, 野々村英夫:醸協, 84(8), 568-570 (1989)
- 8) 大内弘造, 川島 宏:醸協, 69(9), 629-630 (1974)
- 9) 大内弘造, 秋山裕一:発酵工学, 54(9), 615-623 (1976)
- 10) 河野秀人, 東江昭夫, 座木弘之, 姫野国夫:醸協, 83(5), 343-347 (1988)
- 11) D.R.WOODS, E.A.BEVAN: *J.Gen.Microbiol.*, 51, 115 (1948)
- 12) 今村武司, 川本雅之, 高岡祥夫:発酵工学, 52, 293-299 (1974)
- 13) Norio GUNGE and Atsuko TAMARU: *Japan.J. Genetics*, 53(1), 41-49 (1978)
- 14) 小金丸和義, 江口良寿, 増田照雄, 坂田宗章:昭和61年度佐賀県工業試験場業務報告, 17-24 (1986)
- 15) 有馬賢治, 高野 勇:発酵工学, 57(5), 380-395 (1979)
- 16) 蟻川幸彦, 馬場 茂, 近藤君夫, 桑原秀明, 宮崎忠雄:長野県食品工業試験場報告, 14, 85 (1986)