

多酸性酵母の育種（第2報）

—細胞融合のための菌株調整—

郡司 章* 長谷川裕正*

市川 重和* 遠城 聡*

1. 緒言

果実酒製造において、各種の原料果実に適合した酵母の育種を目指し、前報1)では酸の少ない原料で仕込む果実酒の香味改善のために多酸性酵母の分離および性質について検討した。しかし、分離選択した酵母は発酵能や香りの点で醸造用としては不十分であった。そこで分離した多酸性酵母と優良ワイン酵母との融合を試みるため半数体化および栄養要求マーカーの付与について検討したので報告する。

2. 実験方法

2.1 使用菌株

ワイン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* No. 71B, 多酸性酵母 N0. 473, 接合型の標準株として *Saccharomyces cerevisiae* C4414 - 4A(5095)(a), *Saccharomyces cerevisiae* C5076 - 2D()を使用した。

2.2 使用培地

表1に示した培地を使用した。

2.3 胞子の形成法

供試菌株を胞子形成培地に塗布し、25℃, 10日間培養した。胞子は検鏡にて確認した。

2.4 加熱処理2)および色素培地併用による半数体株の分離法

胞子形成培地より一白金耳量の子実胞子を含む菌体を釣菌し、滅菌水2mlに懸濁する。これを55℃, 10分間湯浴中に浸した後、10分間の超音波処理により子実胞子を分散させ適当に希釈して色素培地上に塗布した。生じたコロニーから親株と色調の異なるものを採取した。純化後、胞子形成培地で胞子を形成しないで、しかもTTC培地上で染色されない株を単離した。

2.5 接合型の判定法

加熱処理で取得した菌株と接合型標準株を混合培養し、適当に希釈して色素培地上に塗布し、色調の異なるコロニーが出現することにより判定した。

2.6 アルコールおよび乳酸耐性試験法

完全培地にアルコールおよび乳酸を各々段階的に加え、全体容量を5mlとしたものに供試菌体を等量加え25℃, 14日間静置培養した。検体懸濁液の濁度(OD660nm)が0.100以下のときを生育限界とした。

* 食品発酵部 * 陶々酒製造(株)千代田工場

表 1 使用培地組成

AA plate	
α-Amino adipic acid	0.2 %
Yeast nitrogen base w/o amino acid and (NH ₄) ₂ SO ₄	0.16 %
Glucose	2 %
L-Lysine HCl	30 ppm
Agar	2 %
FOA plate	
5-Fluoroorotic acid	0.1 %
Yeast nitrogen base w/o amino acid	0.67 %
Glucose	2 %
Uracil	50 ppm
Agar	2 %
SD plate	
Yeast nitrogen base w/o amino acid	0.67 %
Glucose	2 %
Agar	2 %
SD+Lys plate	
Yeast nitrogen base w/o amino acid	0.67 %
Glucose	2 %
L-Lysine HCl	30 ppm
Agar	2 %
SD+Ura plate	
Yeast nitrogen base w/o amino acid	0.67 %
Glucose	2 %
Uracil	50 ppm
Agar	2 %
YPD plate	
Yeast extract	1 %
Glucose	2 %
Polypeptone	2 %
Agar	2 %
色素 plate	
Glucose	2 %
Arginine	0.1 %
Yeast extract	0.1 %
Methionine	0.2 %
KH ₂ PO ₄	0.5 %
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1 %
Agar	2 %
Aniline Blue	4 ppm
Eosine Y	4 ppm

2.7 変異処理法

YPD培地で培養した対数増殖期の細胞を3%エチルメタンスルフォネート(EMS)を含む0.1Mリン酸緩衝液(PH7)中で30分、設定処理時間静置し、5%チオ硫酸ナトリウムで1回、滅菌生理食塩水で2回洗浄後、希釈しSD平板培地に塗布し25℃で7日間培養した。

2.8 リジンおよびウラシル要求性変異株の分離法3), 4), 5)

変異処理した細胞をAAまたはFOA平板培地に塗布し、25℃で7日間培養し、コロニーを単離後、SD培地で生育せず、リジンまたはウラシル添加SD平板培地で生育可能な株をそれぞれリジンおよびウラシル要求性株として選択した。

2.9 小仕込み試験

凍結保存したナシ果汁にグルコースを加えBrix22にし、25℃に静置し発酵を行った。

2.10 成分分析法

一般成分は国税庁所定分析法6)、有機酸類は酵素法(ベーリンガー・マンハイム社製F-キット)にて行った。

3. 実験結果および考察

3.1 孢子形成および半数体株の分離

Saccharomyces cerevisiae No.71B株は4孢子の形成を確認したが、多酸性酵母No.473の孢子形成は認められなかった。そこで、半数体株の分離はNo.71B株について行った。加熱処理条件下で栄養細胞の生存率は0.3%になった。同条件下で孢子形成菌体の生存率は7.2%であった。色素培地上で供試菌体と色調が異なり、かつ小コロニーの35株を釣菌し、孢子形成培地およびTTC染色にて6株を選別した。

3.2 接合型の判定

選別菌株と接合標準株の交雑でa型株と接合コロニーを認めたもの5株、α型株とは1株であった。

以上の結果より Saccharomyces cerevisiae No.71B株は heterothallic 株と判定した7)。

得られた6株の生理的性質を調べているなかで、トリプトファンを要求するものが3株あり、これらはいずれもα型であった。a型を示した1株はYPD培地では生育するがwickerham合成培地ではコロニー形成がみられず要求物質は判明していない(表2)。

表2 Saccharomyces cerevisiae 71B株からの分離半数体株の性質

菌 株	凝集能	TTC染色	接合型	Tryptophane要求性
71B	-	red	-	-
71B-h-5	+	pink	α	要 求
71B-h-11	+	pink	α	要 求
71B-h-13	-	white	α	-
71B-h-21	+	white	α	要 求
71B-h-28	+	white	a	Wickerhamで生育せず
71B-h-32	-	white	α	-

色素培地による倍数体の確認は *Saccharomyces ludwigii* およびパン酵母で調べられている 8)。今回醸造用酵母でも有効であることが確認できた (図 1)。また、接合能の確認にも活用でき、従来の検鏡による方法より確実性や処理能に優れていた。ただし、色素培地によるクローンの識別効果は供試菌により大きな差異があり、有効な培地組成や色素の組み合わせとその含量はそのつど検討する必要がある。

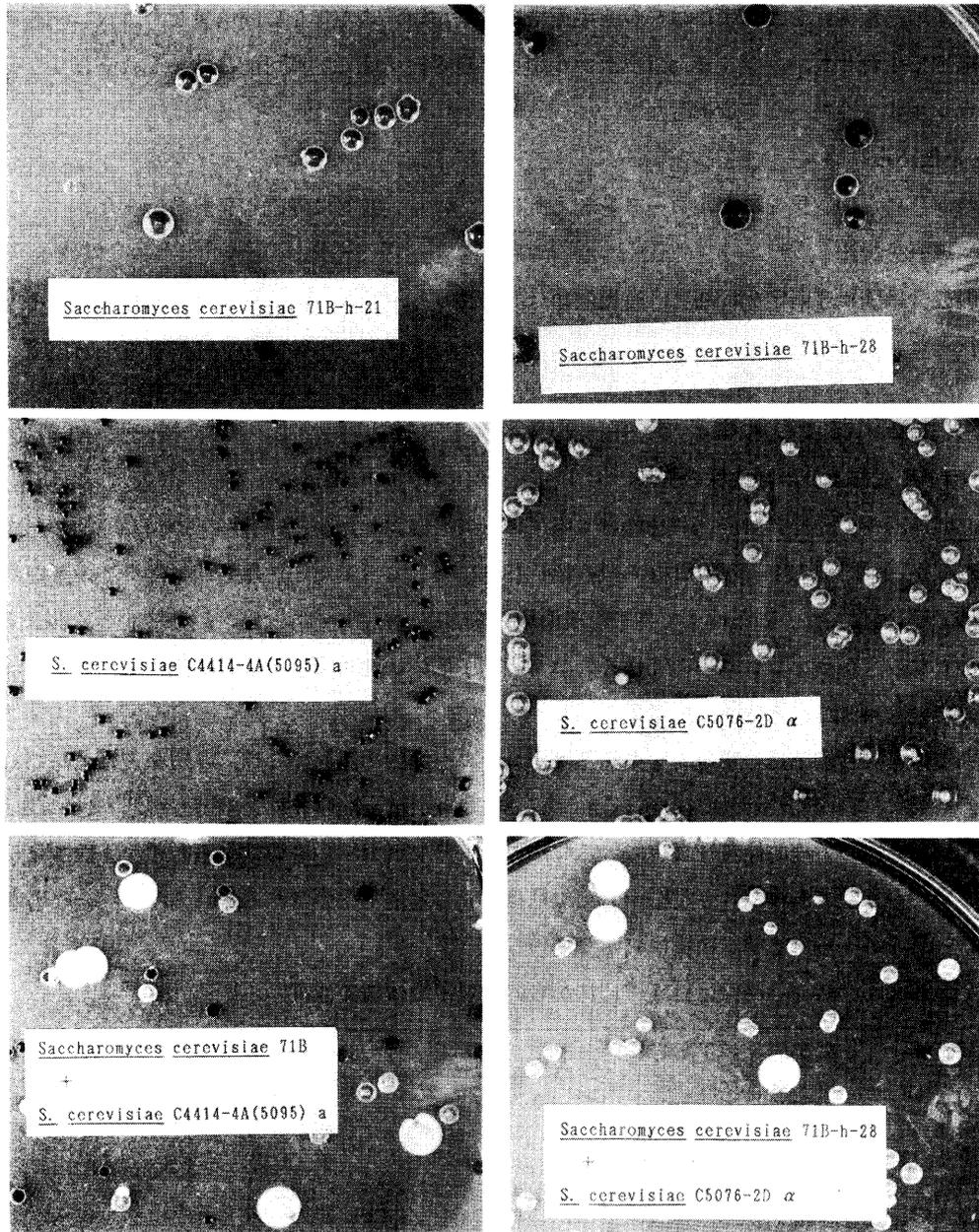


図 1 *Saccharomyces cerevisiae* 71B分離株と標準菌株の色素添加培地上における混合接合試験写真

3.3 アルコール・乳酸耐性

ナシ果汁の発酵試験において、No.473 株は No.71B 株に比べ酸度で倍以上の値を示し、その内の大部分は乳酸であった。No.71B 株は乳酸を産生しなかった(表3)。清酒酵母についてのアルコールと乳酸の耐性についての解説⁹⁾を参考にして試験したところ、アルコール耐性は No.71B 株で 13%、No.71B-h-32 株と No.473 株は 10% であった。乳酸耐性は No.71B 株と No.473 株は 1.6% 以上を示し、No.71B-h-32 株は 1.3% であった。次に乳酸とアルコール共存化での耐性を試験した。No.71B 株は乳酸濃度 0.2~0.5% の範囲ではアルコール濃度 10% で増殖を制限され、乳酸 0.6~1.0%、アルコール 3~9% の範囲では、ほぼ比例して制限されていた。No.473 株は乳酸 0.2~1.2%、アルコール 1~8% の範囲でほぼ比例して制限されているが、ただアルコール 5~6% の範囲ではアルコールの方が乳酸よりも強く制限していた。

表3 ナシ果汁発酵試験

菌 株	S. cerevisiae 71B	Wild yeast No.473	(ナシ果汁)
アルコール (%)	12.5	5.5	(-)
糖 度 (%)	8.5	15.30	(23.0)
pH	3.9	3.3	(4.8)
酸 度 (ml)	4.0	8.6	(1.8)
クエン酸 (g/l)	-	0.35	(0.47)
L-リンゴ酸 (g/l)	1.42	1.00	(1.19)
コハク酸 (g/l)	0.91	0.82	(-)
L-乳酸 (g/l)	-	4.53	(-)
酢 酸 (g/l)	0.07	0.16	(-)

この事は No.473 株を使用して発酵試験を行ったときに、アルコール 5.5%、乳酸 0.4% を生産した時点で発酵が終了し、また、アルコールの生成速度が乳酸のそれよりも速くなったこととも合う。

No.71B-h-32 株はアルコール単独耐性に比べて乳酸が共存すると大幅に増殖が抑制される。No.71B-h-32 株のアルコール生成は親株の No.71B-h-32 株と同等であるが乳酸に対する耐性は著しく低くなっていると考えられこれは半数体化することにより膜構造が変化し物質の透過能が変わった⁸⁾ためと思われる(図2)。

3.4 変異処理およびリジン、ウラシル要求性変異株の分離

実験室株についての栄養要求性株の取得は変

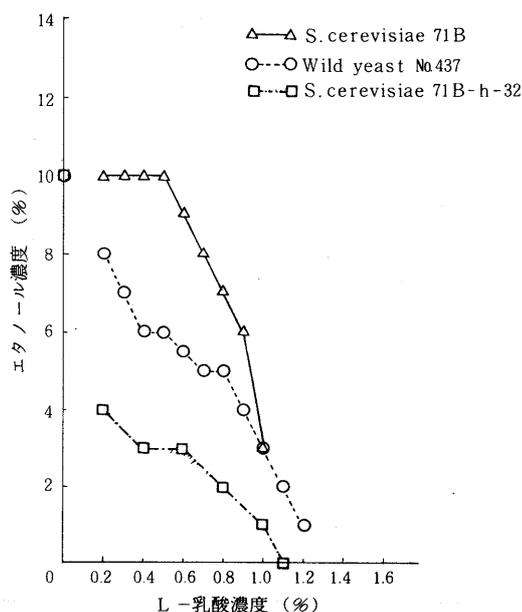


図2 エタノール・乳酸共存培地における酵母の増殖限界

異処理 nystatin 濃縮, レプリカという一連の操作で得られるが, 醸造用酵母については醸造用としての特性を損なうことのないように変異処理も穏やかにする必要がある。そのため変異株出現頻度は低く, 取得には多大の労力を要する。近年清酒酵母についてポジティブセレクション法を用いて栄養要求性株を効率よく取得した報告^{3), 10)}があり, この方法を用いてワイン酵母および多酸性酵母に応用した。

まず EMS 処理による各菌の生存率を調査した。N0.473 株は No.71B 株より生存率が低かった。また, No.71B-h-32 株は 2 時間の処理でシコロニーの発育速度は遅れるが, 生存数は変わらなかった。N0.71B-h-21 株では処理時間とともに生存率は低下していた(図3)。

つぎに, それぞれ菌株の生存率 40~90% 範囲で変異処理を施した菌体を F A O および A A 培地で選別した。No.71B 株においては比較的容易に栄養要求性株を得ることが出来たが No.473 株はポジティブセレクション法を用いても株の出現頻度は低かった(表4)。

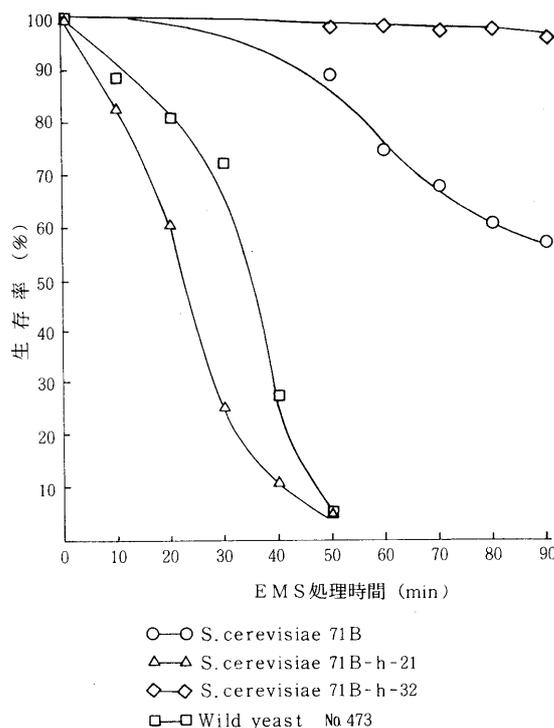


図3 EMS 処理後の生存率

表4 栄養要求性株の分離

菌 株	EMS 処理 生 存 率 (%)	コロニー形成株		栄養要求性株
		F O A 選択培地	A A 選択培地	ura-変異株 lys-変異株
S. cerevisiae 71B	65	22		21
		26		20
S. cerevisiae 71B-h-32	96	25		15
		10		1
Wild Yeast No.473	42	532		2
		125		6

得られた変異株を用いてリジンおよびウラシルを添加した小仕込試験を行ったところ、製成酒の一般分析値は親株と比較して差はなかった(表5)。

表5 栄養要求性株による小仕込試験

菌 株	アルコール(%)	糖度(%)	酸 度	L-乳酸(g/l)
S. cerevisiae 71B	10.6	7.4	5.2	0.10
71B-lys-9	10.1	7.8	5.9	0.10
71B-ura-9	10.2	7.5	5.8	0.10
S. cerevisiae 71B-h32	10.9	7.7	5.7	0.10
71B-h32-lys-14	10.6	7.9	6.1	0.11
71B-h32-ura-1	10.6	7.9	6.0	0.10
Wild Yeast No.473	4.7	13.5	9.6	4.78
No.473-lys-4	4.6	14.0	9.5	4.76
No.473-ura-4	4.8	13.7	9.5	4.78

リンゴ果汁にグルコースを加えBrix20にしリジン30ppm、ウラシル50ppmを添加し、25℃で静置した。

参考文献

- 1) 郡司章, 長谷川裕正, 市川重和, 石神靖裕: 当所報告第17号(1989)
- 2) 飯塚廣, 後藤昭二: 酵母の分類同定法第二版東京大学出版会(1973)
- 3) 小田佳緒子, 北本勝ひこ, 高橋康次郎, 吉沢淑: 日本醸造協会誌, 83, (9), 614(1988)
- 4) 北本勝ひこ: 日本醸造協会誌, 84, (1), 34(1989)
- 5) 小田佳緒子, 北本勝ひこ, 五味勝也, 高橋康次郎: 日本醸造学会講演要旨集(平成元年度)6(1989)
- 6) 注解編集委員会編: 第3回改正国税庁所定分析法注解日本醸造協会(1974)
- 7) 秋山裕一編: 酵母の利用と開発第二版学会出版センター(1983)
- 8) 永井進編: 酵母研究における方法論第一版学会出版センター(1982)
- 9) 橋谷義孝編: 酵母学第一版岩波書店(1967)
- 10) 小田佳緒子, 北本勝ひこ, 五味勝也, 高橋康次郎: 発酵工学会誌, 68, (5), 339~403(1990)