

多酸性酵母の育種(第3報)

—細胞融合のための菌株調整—

郡司 章・ 遠城 聡
長谷川裕正・

1. 緒 言

果実酒製造において、それぞれの原料果実に適合した酵母の育種を目的とした。前報1)では多酸性酵母と優良ワイン酵母との細胞融合の一環として半数体化及び融合マーカ-の付与について報告したが、そこで半数体株の一部に栄養要求性株取得の困難なものがあり、その取得方法の改良に関係する若干の補足と融合操作に必要なプロトプラストの調整および再生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* 71B, 71B 株の半数体株 71B-h21 及び 71B 株のウラシル要求性株 71B(ura), 多酸性野生酵母 No.473 のリジン要求性株 No.473(lys)を用いた。

2.2 使用培地

半数体株のリジン及びウラシル要求性変異株の取得に使用した培地は前報と同様の組成で行った1)。その他は YPD 培地(酵母エキス 1%, ポリペプトン 2%, グルコース 2%)(完全培地), 改良 Wicker-ham 培地 [Yeast Nitrogen Base(Difco Lab.) 0.335%, グルコース 0.5%, ウラシル 50ppm, リジン 30ppm]を用いた。それぞれの培地を固形で用いる場合には寒天 2%加えて使用した。混釈法2)で用いる場合には低融点アガロースを 1.5%加え 40℃にてシャーレに流し込んだ。浸透圧調整用には塩化カルシウムをそれぞれの濃度にて培地に加えて使用した。

2.3 酵母の耐浸透圧性試験

浸透圧安定剤として塩化カルシウムを用い、71B 株及び 71B-h21 株を各濃度の塩化カルシウムにて希釈し 30 分間静置後、完全培地に塗布し生じたコロニー数の差を酵母の耐浸透性として求めた。

2.4 半数体株のウラシル及びリジン要求性変異株の分離³⁾⁴⁾

前報と同様の操作方法で行った。すなわち YPD 培地で 1 日培養した菌体をエチルメタルスルフォネート(EMS)により変異処理を行い 5-フルオロオロチン酸(FOA)または L-アミノアジピン酸(AA)を添加した選択培地上に塗布しウラシル及びリジン要求性株のみが生育できるポジティブセレクション法を行った。この時各工程は 0.5M 塩化カルシウム溶液の高張圧下で行った。

*食品発酵部 **梅肉酒製造(株)千代田工場

2.5 プロトプラストの調整及び再生5)

調整法は図1に示した。プロトプラスト化は検鏡にて水で希釈し溶菌で確認した。プロトプラストからの再生は調整したプロトプラストを各濃度の浸透圧安定剤にて希釈処理し30分間静置後、同濃度の浸透圧安定剤を加えた改良 Wickerham 培地に混釈培養し、生じたコロニ-数の差より算出した。

培養菌体 (YPD 培地, 25℃, 20hr, 振墨培養)

集菌・洗浄

0.2% Mercaptoethanol, 0.06M EDTA 溶液に 30℃, 30分保持

0.2% Mercaptoethanol, Zymolyase (4Units/ml) 35℃ 穏やかに振盪

集菌・洗浄

希 釈

低融点アガロースに溶かした培地で混釈, 固化

25℃ 培養

*希釈までの操作は全てプロトプラスト化液 [塩化カルシウム 0.33g/l, 硫酸マグネシウム 0.5g/l, 硫酸アンモニウム 2g/l, 0.6M マンニトール, 10mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH7.5)] を用いた。

図1 プロトプラスト調整法

3.1 酵母の耐浸透圧性

前報においてワイン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 71B 株より数種の半数体株を取得した。そのうち 71B-h32 株からは栄養要求性変異株が得られたが 71B-h21 株では全く得られなかった。また変異選択処理を施していない対象群の出現コロニ-数も極めて少なく処理操作以前の細胞環境に原因があると考え、その中の一つとして浸透圧について検討した。希釈時に各濃度の塩化カルシウム溶液に一定時間保持した後のコロニ-形成率は親株では 0.2M 以下で若干の減少傾向を見せたが、半数体株 71B-h21 は 0.5M 以下から急激に減少し滅菌水では 5% 以下の形成率であった。(図2)他の半数体株についても同様の傾向を示し 71B 株より分離した半数体株は浸透圧的に不安定な細胞であることが確認された。

3.2 半数体株のリジン及びウラシル要求性変異株の分離

0.5M 塩化カルシウム溶液中で操作することにより選択培地上にコロニーの形成がみられ栄養要求

性変異株の取得も親株同様高効率であった(表 1)。

表 1 栄養要求性株の分離

菌 株	EMS 処理 生存率 (%)	コロニー形成株数		栄養要求性株	
		FOA 選択培地	AA 選択培地	ura ⁻ 変異株	lys ⁻ 変異株
S. cerevisiae 71B	65	22		21	
		26		20	
S. cerevisiae 71B-h21	96	16		15	
		20		19	
Wild Yeast 473	42	532		2	
		125		6	

3.3 プロトプラストの調整

プロトプラスト調整は蟻川ら⁶⁾の方法を基本操作とした。細胞壁溶解酵素 Zymolyase (4 Units/ml) 処理によるコロニー形成の経時変化を追跡した。浸透圧安定剤として 0.3M 塩化カルシウムを加えた 10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5) で希釈し、同様に安定剤を加えた完全培地に混釈し培養した。

71B (ura) 株は酵素処理 30 分後に初発コロニー数より 8%前後のコロニー数増加がみられた。これは対数増殖期の菌体群中に結合した状態の母細胞と娘細胞が存在し、酵素未処理の場合これがコロニー形成単位となるが酵素の作用により分離し一音 K が夫夫コロニーを形成してコロニー数の増加を招いたと考えられる⁷⁾。また酵素処理時間を 2 時間に延長してもコロニー形成数の低下は起こらず安定していた。

No.473 (lys) 株は、酵素処理時間と共にコロニー形成数は減少し 60 分後には 50%の形成率に減少した (図 3)。

両株とも酵素未処理細胞を水で希釈し検鏡しても溶菌は確認されず、処理 20 分後より溶菌現象が認められた。処理 60 分後には 71B (ura) 株はほとんどの菌体が溶菌したが No.473 (lys) 株については一部に溶菌しない菌体が認められた。

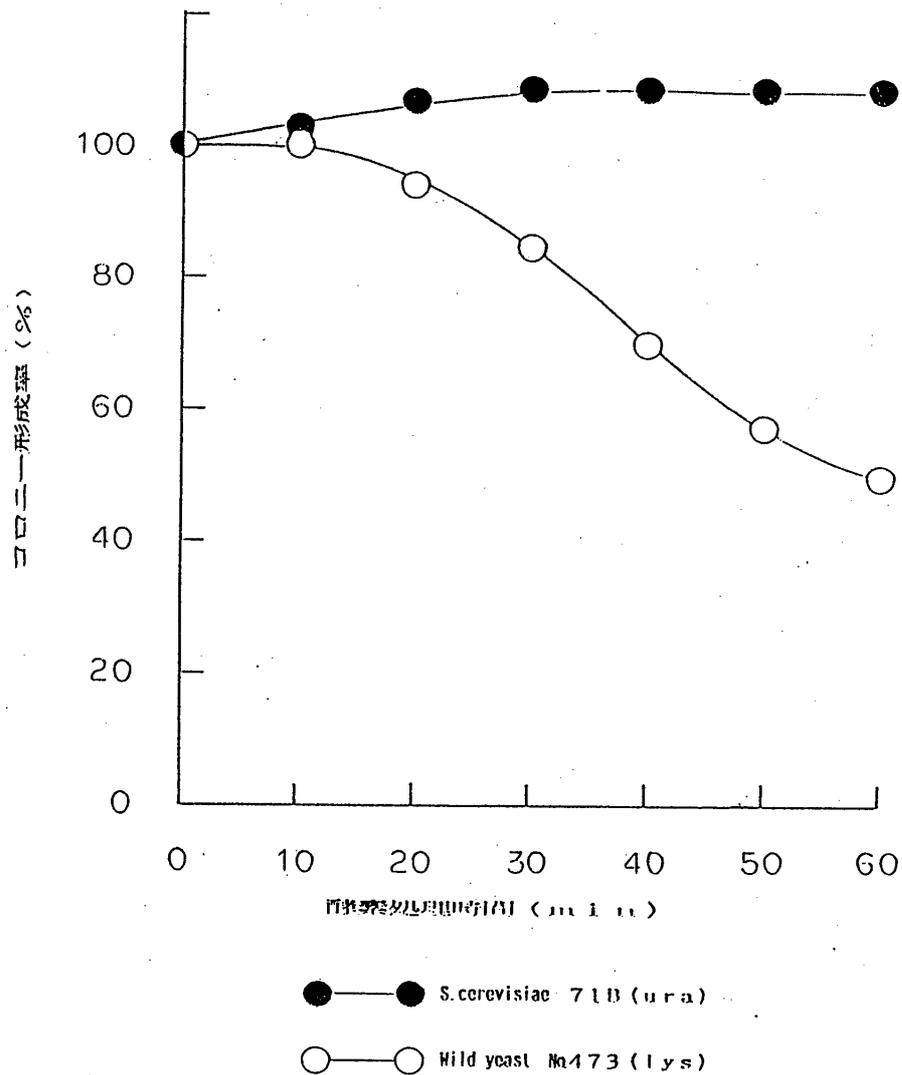


図3 酵母のコロニー形成に及ぼす酵素処理時間の影響

3.4 プロトプラストの再生

酵素処理(4units/ml) 60分後の菌体と未処理の菌体を各濃度の浸透圧安定剤にて希釈処理し,同濃度浸透圧安定剤を加えた培地で培養した。71B (ura)株は 0.21 以下の条件下で処理と未処理菌体のコロニー形成数に急激な差が生じ,酵素処理 60 分の時点の滅菌水中では 65%の再生菌体数の差があった。この事と酵素処理時間による菌体の減少がない事から再生可能なプロトプラストの存在が推定され,その数は処理菌体の 65%に達し,更に処理時間の延長と共にプロトプラストの高効率取得が可能であろう(図4)。

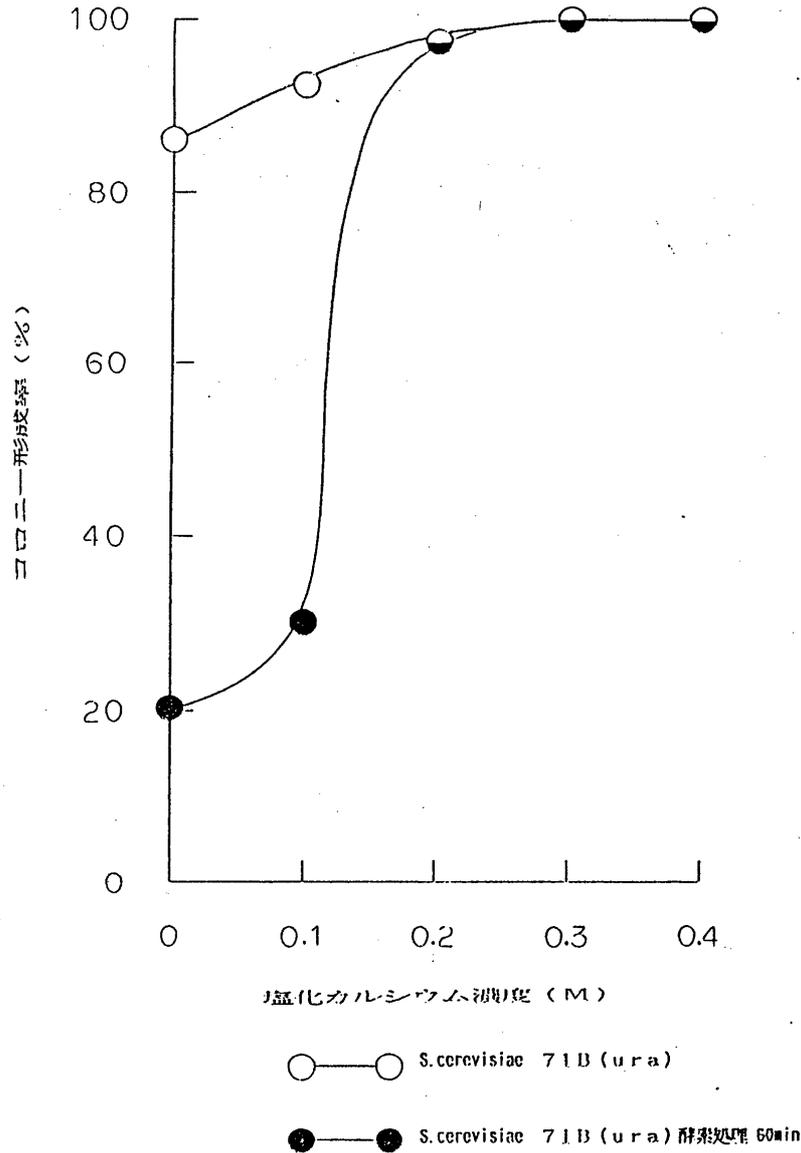


図4 酵母のコロニー形成に及ぼす塩化カルシウム濃度の影響(1)

また,再生培地に0.4M以上の塩化カルシウムが存在すると出現コロニーの形状が小さくなり高張溶液による生育障害が考えられ71B (ura)株のプロトプラスト再生に適する塩化カルシウム濃度は0.2~0.3Mにあると考えられる。

No.473 (lys)株は;酵素未処理の菌体において0.2M以下の条件でコロニー-形成数の減少がみられ滅菌水中では40%の再生コロニー-数であった。これから71Bの半数体と同様にNo.473 (lys)株も浸透圧的に不安定な細胞(osmotically sensitive cell.OSC)が一部含まれている事が示唆される。酵素未処理細

胞を水で希釈し検鏡したとき細胞膨潤は起こるが溶菌は確認されず、低浸透圧下における何等の細胞増殖障害によるコロニー形成阻害が考えられる。このことから酵素処理時間と共にコロニー形成数が減少するのは大部分 OSC 菌体がプロトプラスト化する事による再生不良によるものであろう。また、再生培地に 0.4M 以上の塩化カルシウムが存在しても出現コロニーの形状は変わらず No.473 (lys) 株は 71B (ura) 株より高張圧下に適していると考えられる

No.473 (lys) 株は、大きく 2 つに分けられ全菌体の 60% を占める低浸透圧下で不安定であり現条件下ではプロトプラスト状態になると再生困難な OSC とそれ以外の部分である。残り 40% の菌体中に酵素処理 60 分の時点で全菌体に対して 25% の再生可能なプロトプラストの存在が推定される(図 5)。より以上の効率を得るためには、菌体条件または再生条件の最適化が必要であろう。

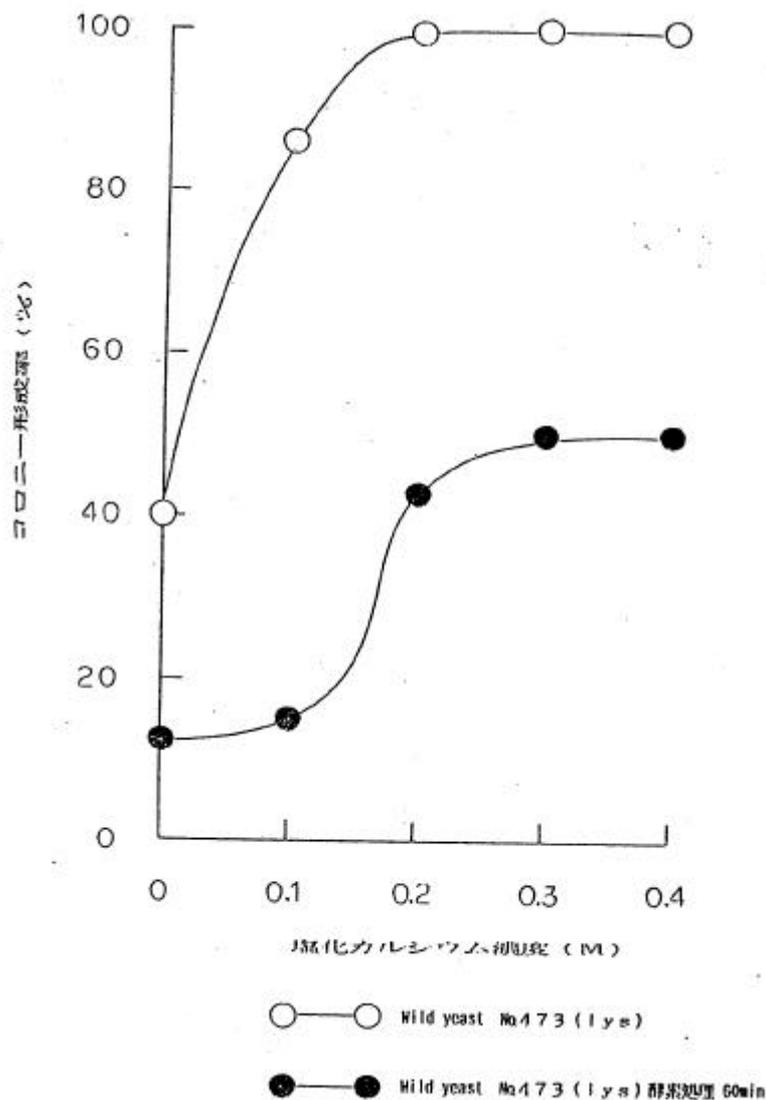


図 5 酵母のコロニー形成に及ぼす塩化カルシウム濃度の影響(2)

参考文献

- 1) 郡司 章,長谷川裕正,市川 重和,遠戚 聰:茨城県工業技術センター研究報告 第1g号,(1991)
- 2) 岡田憲幸,秋本隆司,新国佐幸,真鍋 勝:日本食品工業学会 37, (4),270(1990)
- 3) 北本勝ひこ:日本醸造協会誌 84, (1),34 (1989)
- 4) 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)
- 5) 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- p250(1983)
- 6) 蟻川幸彦,馬場 茂,近藤君夫,桑原秀明,宮崎忠雄:発酵工学会誌 83, (9),605(1988)
- 7) 兎束保之:生物と化学 30, (7),431(1992)