

バイオテクノロジーの応用による製造合理化に関する研究(その3)

- 清酒酵母の育種 -

吉浦 貴紀* 長谷川裕正* 郡司 章*

1. 緒 言

前報で明利小川酵母に変異処理を行い新酵母を取得した。本報告ではその変異株について明利小川酵母由来であることを確認するために協会7号, 9号, 10号と染色体DNAの電気泳動パターンの比較を行った。その結果変異株は明利小川酵母由来であることを確認したので報告する。

また, 3酒造場で新酵母を用いた謬から分離した酵母についても同様の比較を行い1社において9号系酵母に置き換わっていることを確認した。

2. 実験方法

2.1 使用菌株

サイズスタンダードとしてYNN295株(Bio-Rad社)を用い, 協会701号, 901号, 10号, 1001号と明利小川新酵母(以後, 新酵母)と新酵母を使用した酪より分離した3株, および当センタ-保存株より2株を用いた。

2.2 電気泳動用試料(アガロースブラグ)の調製¹⁾²⁾

試料の調製は以下の手順で行った。

斜面培養した酵母を50mlのYPG液体培地に接種し, 30 で一晩培養する。

50mlの遠心管で10分間遠心し集菌する。

上清を捨て, 10mlの滅菌水で洗浄し, 再度遠心で集菌後10mlの0.05M EDTA pH8.0で懸濁, 洗浄した後10mlのスクリーキャップ付き試験管に移す。

遠心にかけ上清を捨てた後に再度500u1の0.05MEDTA pH8.0を加え懸濁する。

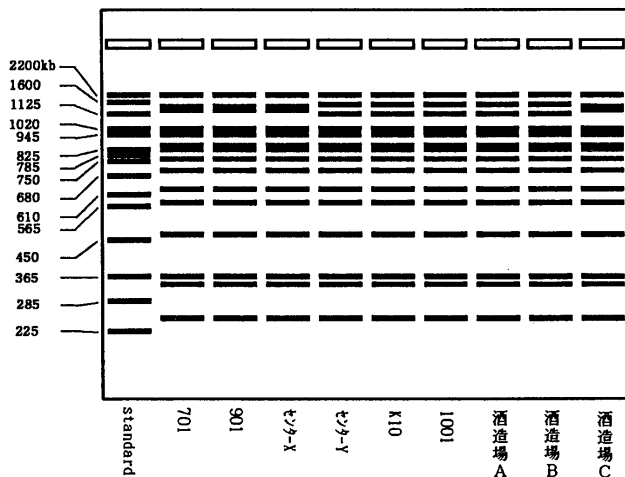


図1 各種酵母の染色体DNA泳動パターン

200u1の5 mg/ml zymolyase-20T (1ml中グリセリン5 ml, 1/100Mリン酸buffer 1ml, zymolyase-20T10mg)を加えて50 で20分保温する。

1.5mlの1.5%低融点アガロース(0.125M EDTA pH7.5 中)を加えBio-Rad社製CHEF用モールドチャンバーに流し込む。

小さめのプラスチックケースにゲルを押し出し, 15mlのLET buffer(100ml中0.5M EDTA pH8.0 50ml, 0.01M Tris-HCl pH7.5 50ml, 2-メルカプトエタノール7.5ml)を添加し37で一晩保温する。

15mlのNDS buffer(100ml中0.5M EDTA pH8.0 50ml, 0.01M Tris-HCl pH7.5 50ml, ラウロイルサルコシン1g)に置き換えて3mg/mlプロテナーゼK 600u1を加え50で一晩保温。

約20mlの50mM EDTA pH8.0で2~3回洗浄し室温で一晩放置する。

新しい約10mlの50mM EDTA pH8.0で保存しておく。

2.3 泳動装置及び泳動条件

泳動ゲルは1.5%アガロース(Bio-Rad社)を用い, 泳動緩衝液は0.5×TBEで行った。

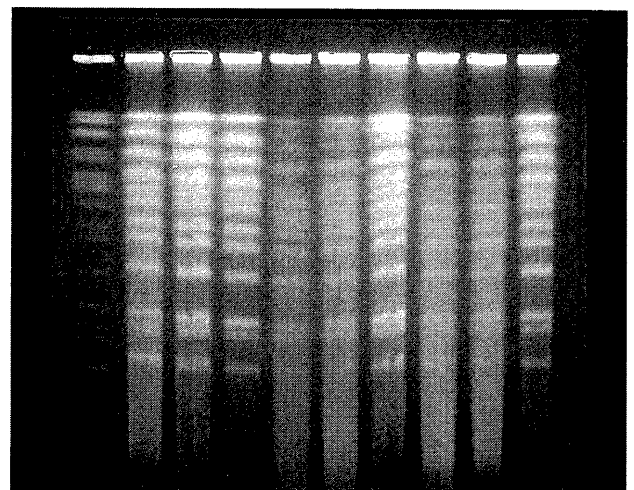
CHEF電気泳動にはDRM System(Bio-Rad社)を使用し電圧200V, パルス時間90秒で24時間泳動を行った。

2.4 染色体DNAの検出

泳動後ゲルを0.5µg/ml EtBr溶液中で1時間染色し, 蒸留水で1昼夜脱色を行い, トランスイルミネーターにより写真撮影した。

3. 実験結果及び考察

各種酵母の染色体DNAパターンを図1に示した。8~10レーンが新酵母のバンドである。新酵母の泳動パターンを7号, 9号, 10号のものと比較すると8, 9レーンの酵母は, 1125~1600kb付近のバンドが明らかに7号, 9号とは異なり10号のバンドパターンに近い。このことより新小川明利酵母は10号酵母を親株とした変異株であることが確認できた。10レーンの酵母については, 1125~1600kb付近のバンドより9号系の酵母であると考えられる。この醸造元では新酵母を用いた酒母生成の段階で何らかの原因で9号系酵母が混入し, 増殖力でよさる9号系酵母に置き換わってしまったものと思われる。



*食品発酵部

4. まとめ

CHEFによる染色体D N Aの分離を試み,新酵母が染色体分離パターンから10号系であることを確認した。

CHEFによって得られる染色体D N A分離パターンは酒母,もろみ育成時における酵母の判別に有効であると思われる。しかし,結果が出るまで3~4日必要であり,また, D NAに関する知識,設備も必要であるため個々の酒造場が独自に実施するのは困難である。酒造用酵母の判別を容易にするためにはあらかじめ栄養要求性,薬剤耐性等の性質を持たせておくことが有効であると思われる。

今後,新酵母を実用化するにあたっては, 9号系とは異なる落ちついた,上品な香りを生成するがアルコール耐性や増殖力が弱いという欠点を改良していく必要がある。

参考文献

- 1) 日本アイソトープ協会: 「遺伝子工学実験」,pp199,丸善(1991)
- 2) 後藤邦康,蓮尾徹夫,小幡孝之,原 昌道:酸協, 85, (3) 185 (1990)