焼酎醪より分離したキラー酵母

工藤哲三・下中野健*・三浦道雄*・西山和夫*・日高照利

(宮崎県工業試験場・* 宮崎大学農業化学科)

昭和 60 年 5 月 31 日受理

Isolation of Killer Yeast from Shochū Mash

Tetsuo KUDO, Ken SHIMONAKANO, Michio MIURA,

Kazuo NISHIYAMA and Terutoshi HIDAHA

(Miyazaki Prefectural Industrial Research Institute,
1-7-14 Tsunehisa, Miyazaki-shi, Miyazaki-ken, 880)

A wild killer yeast (B-86) was isolated from shochu mash.

1. According to morphological and physiological property, it was suggested that B-86 belongs to *Saccharomyces*.2. By the result of killing-sensitive experiments, it was supposed that B-86 is k_1 -type killer yeast. But the molecular weight of M-dsRNA was slightly smaller than that of k_1 and larger than that of k_2 .

3. B-86 was cured killer activity at 40°C.

4. It was supposed that B-86 can kill killer-sensitive yeasts at 31°C and below pH 4.0.

Key words: 焼酎・キラー酵母

緒 言

近年、国内においてもキラー酵母が発見され、清酒醸造において野生酵母による醪の汚染も、キラー酵母の観点から再検討されてきた^{2,3)}。

焼酎醪においては、これまでキラー酵母の存在が確認されていなかった⁴⁾が、今回調査した一工場よりキラー酵母を見出したので報告する。

実 験 方 法

1. 供試菌株

第1表に示す。

2. キラー酵母の分離

焼酎工場の一次、二次醪より前報⁵⁾と同様にサンプリングを行い、YEPD 培地 (グリコース 2%, ペプトン 2%, 酵母エキス 1%, 寒天 2%) に 30°C 48 時間培養

第1表 使用菌株

K ₀	鹿児島焼酎酵母
MK	宮崎焼酎酵母
KL 88	清酒キラー酵母 (K ₁)
5038	K ₁ キラー酵母
5170	K ₂ キラー酵母
5226	K ₉ キラー (<i>Hansenula mrakii</i>)

後、100~200 のコロニーを形成させ、YEPD-MB 培地⁶⁾ (0.1 M citrate-phosphate buffer で pH 4.5 に調整した 0.003% × メチレンブルーを含む YEPD 培地) に、焼酎酵母 MK あるいは K₀ を塗抹したものにレプリカし、25°C 48 時間培養後、コロニー周辺に、阻止円を形成したものをキラー酵母として分離した。

3. 分離したキラー酵母の諸性質

細胞の大きさ YEPD 液体培地に 28°C 48 時間振とう培養後、マイクロメーターを用いて測定した。

胞子形成 YEPD 培地で前培養後、菌懸濁液を胞子形成培地 (1% 酢酸カリウム, 0.05% グルコース, 0.1% 酵母エキス, 寒天 2%) に塗抹後、30°C 48 時間培養後、顕微鏡観察を行った。

擬菌糸形成 バレイショ、グルコース培地を用いてスライド培養法⁷⁾により 25°C 7 日間培養後、検鏡した。

糖の発酵性 各供試糖を 2%, 酵母エキス 0.5%, ペプトン 1.0% を含む培地に Durham 管を内挿し、前培養液より、菌体を一白金耳接種し、30°C 5 日間ガス発生を観察した⁷⁾。

炭素源の資化性 各炭素源 0.5%, Yeast Nitrogen Base (Difco) 0.67%, 寒天 2% の平板培地を作り、それに供試菌懸濁液を画線接種し、30°C で培養し生育の

有無を観察した。

窒素源の資化性 Yeast Carbon Base (Difco) を用いてオキサノグラフ法⁸⁾によった。

37°C における生育 YEPD 培地のプレート上に画線接種し、37°C で培養した。

シクロヘキシミド耐性 シクロヘキシミドを 10 µg/ml の割合で添加した酵母エキスを、ペプトン培地に 10⁶/ml の仕試験を接種し、30°C で培養した。

酸性ホスファターゼ活性 前報⁵⁾に準じた。

ビタミン要求性 Vitamin Free Yeast Base (Difco) を用いて行った⁹⁾。

タリズム Zymolyase 100 T (生化学工業) を用いて、胞子のう壁を溶解し、Leitz 式ミクロマニプレーターを用いて 2 世代にわたり四分子分析を行い、胞子形成能を調べた¹⁰⁾。

4. キラー酵母の相互作用による分類

YEPD-MB 平板培地上で、大内³⁾らの方法に従い、2 種類の菌株を交又するように、画線接種し、25°C 28 時間培養後青く染まった方を死滅したものとした。

5. キュアリング試験

YEPD 寒天培地上 40°C で培養し、生育コロニーを釣菌し 25°C 3 日間培養後、キラー検出用培地に感受性酵母 (K₀) を塗抹したものにレプリカし、キラーの判定を行った。又、シクロヘキシミドを 0.1~0.2 ppm 含む YEPD 平板培地で 25°C 5 日間培養後、生育コロニーについて同様にキラーの判定を行った。

6. 発酵試験

グルコース 15%，酵母エキス 0.3%，ペプトン 0.7% の培地をクエン酸で pH 3.8 に調整し、前培養菌体を培地 100 ml に対し 500 µl 加え、Meissel 管をつけて発酵させた。

又、焼酎麴 70 g、水 120 ml の培地でも同様に行った。

7. 混合培養試験

焼酎麴 70 g、水 120 ml の培地にキラー酵母と感受性酵母をそれぞれ一定量ずつ添加し、両者の菌数の変化を見た。

8. 増殖速度

酵母エキス 0.2%，ペプトン 0.5%，グルコース 6.0%，クエン酸 0.2% (pH 3.8) の培地を用い、28°C で静置培養を行い、一定時間ごとに、ヘマトメーターで、酵母数を計測し、増殖速度を算出した。

9. ds RNA のアガロース電気泳動

ds RNA の抽出は FRIED, FINK¹¹⁾ の方法に準じて行ったが、塩化リチウム処理は省略した。抽出後 DNase I (SIGMA) 400 µg/ml で処理後、0.9% アガロー

スで電気泳動を行った。泳動は 35 V 90 mA で 7 時間行った。

実験結果及び考察

1. キラー酵母の分離

宮崎県内の焼酎工場 25 工場 130 試料中、C 工場よりキラー酵母が検出された。第 2 表に、その工場の一次、二次醪における、キラー酵母の占有率を示す。酒母として添加した K₀ 酵母にかなりの比率でとってかわっていた。又この C 工場中には、キラー酵母でなく、かつキラーにより殺されもしない、キラー中性株は、ほとんど検出できず、その他の工場より分離した酵母も、キラー感受性酵母が大部分であった¹²⁾。

この C 工場より分離したキラー酵母 (B-86) を以下の試験に供した。

2. キラー酵母 B-86 の諸性質

第 3 表に、B-86 の諸性質を示す。細胞の大きさは、K₀ 酵母、MK 酵母、協会 7 号などとほぼ同じで、mycotorula 型の擬菌糸を形成した¹³⁾。Lactose, Melibiose の資化性、発酵性がなく、α-Methylglucoside を資化し、硝酸塩を資化せず、ビタミンを要求した。これらの

第 2 表 キラー酵母の醪中での分布状況 (C 工場)

試料採取年月	
昭和 58 年 12 月	二次醪 (麦製) 88.5%
昭和 59 年 9 月	一次醪 (米製) 36.3%
"	二次醪 (麦製) 58.3%

第 3 表 キラー酵母 (B-86) の諸性質

	B86	協会 7 号
細胞の大きさ (µ)	6.7×4.9	6.0×4.3
胞子形成率	90%	35%
擬菌糸	+	+
炭素源の資化性 () は発酵性		
Glucose	+(+)	+(+)
Galactose	+(+)	+(+)
Maltose	+(+)	+(+)
Sucrose	+(+)	+(+)
Lactose	-(-)	-(-)
Melibiose	-(-)	-(-)
Raffinose	+(+)	+(+)
Soluble Starch	-	-
α-Methyl glucoside	+	+
Cellobiose	-	-
Arabinose	-	-
Trehalose	-	-
Xylose	-	-
硝酸塩資化性	-	-
ビタミン要求性	+	+
シクロヘキシミド耐性	-	-
37°C における生育	+	+
高リン酸培地の酸性ホスファターゼ活性	-	-
タリズム	完全ホモタリズム	ヘテロ

第4表 各種酵母に対するキラー酵母のキラー作用

抵抗性試験株	MK	K ₀	5038 (K ₁)	KL88 (K ₁)	5170 (K ₂)	B-86	H. mrakii (K ₉)
キラー試験株							
B-86	+	+	-	-	+	-	-
5038 (K ₁)	+	+	-	-	+	-	-
5170 (K ₂)	+	+	+	+	-	+	-
H. mrakii (K ₉)	+	+	+	+	+	+	-

+: キラー活性あり, -: キラー活性なし

諸性質は、協会7号、K₀酵母等と同じで、B-86は*Saccharomyces*に属するキラー酵母と考えられる。

又、高リン酸培地における酸性ホスファターゼ活性がなく、生活環は完全ホモリズムであり、協会7号や清酒キラー酵母KL88⁽⁴⁾と異なっていた。

3. B-86のキラータイプ

第4表に各種の酵母のキラー作用を示す。B-86はK₀酵母、MK酵母を殺し、又K₂タイプの5170とは互いに殺し合い、K₁タイプの5038、KL88に対しては互いに殺すことも殺されることもなかった。又キラー活性が強く作用スペクトルの広い*Hansenula mrakii* (K₉)は供試した酵母を全て殺した。

又、アガロース電気泳動の結果(第1図)からキラーファクター生産を支配する遺伝子であるM-ds RNAの分子量はK₁タイプの5038やKL88より小さく、5038とK₂タイプの5170の中間の分子量であった。

KITANO⁽⁵⁾らは、山梨県のワイン工場より分離したキラー酵母Y-2が*Saccharomyces cerevisiae*でM-ds RNAはK₂とK₁の間に位置するが、K₂、K₃を殺しK₁に抵抗性を示すことより、このY-2はK₁タイプのキラー酵母であろうと報告している。焼酎醪より分離したB-86もK₂を殺し、K₁に対し抵抗性を示すことよりこのY-2と類似のK₁タイプのキラー酵母と考えられる。又、B-86のキラー活性の至適pHはK₁をほぼ同じくpH4.5~5.0であった⁽⁶⁾。

第1図 キラープラスミドのアガロース電気泳動図

1. λ DNA-NIND III 分子量マーカー
2. KL 88
3. 5038 (K₁)
4. B-86
5. 5170 (K₂)
6. B-86 のキュアリング処理
7. 鹿児島酵母 (K₀)

4. キュアリング試験

キラー活性を失わせる 高温培養及びシクロヘキシミド処理を行ったところ、第5表のように40℃培養でB-86は100%キラー活性を失い、M-ds RNAが脱落した。(第1図)シクロヘキシミド0.1ppmでは、大部分キラー活性を保持していたが、0.2ppmで処理するとほぼ100%キラー活性を失った。

5. 発酵試験

第2図にYEPD培地、焼酎醪培地でB-86及びK₀の30℃での発酵試験の結果を示す。焼酎醪培地ではK₀に比較して発酵速度は大差ないが、YEPD培地ではK₀に劣った。増殖速度はB-86が $\mu=0.259$ 、K₀は $\mu=0.247$ であった。

第5表 キラープラスミドの脱落(Curing)

	40℃ 培養	シクロヘキシミド処理 0.1ppm	シクロヘキシミド処理 0.2ppm
B-86	100%	9%	100%
KL-88	94%	41%	100%

第2図 B-86、K₀の発酵試験

- : B-86 YEPD 培地: グルコース 15%, 酵母エキス 0.3%, ペプトン 0.7%, pH 3.8
- : K₀ 焼酎醪 培地: 焼酎醪 70g, 水 120mL, 発酵温度 30℃

6. 混合培養試験

焼酎酸においては32℃前後に品温が上昇することもあり、キラーファクターは失活してしまう可能性もある。そこで25℃、28℃、31℃において、B-86とK₀をほぼ1:1の割合で添加して、発酵試験を行い、両者の菌数変化をみた結果を第3図に示すが、両者の検出は、酸性ホスファターゼ活性の有無を利用して、 α -ナフチルリン酸ナトリウム、ファーストブルーサルトBを用いたジアゾカップリング法によった⁽⁵⁾。25℃、28℃では、K₀は酵母数10⁶/mlオーダーに抑えられ特に25℃では1×10⁶/ml以下であった。31℃では、発酵開始より、16時間程度までは両者とも共存し、菌数が増加す

第3図 B-86 と焼酎酵母 (K₀) の混合培養試験

●: 野生キラー酵母 B-86 初発菌数 3.8×10^6 /ml
○: 焼酎酵母 K₀ 初発菌数 3.6×10^6 /ml 培地 { 焼酎醪 70g
水 120ml

るが、K₀ は以後急速に菌数が減少し 10^7 /ml オーダー以下となった。一方 B-86 は 10^8 /ml オーダーを保ち発酵を続けており、全菌数の 90% を B-86 が占めていた。キラー感受性酵母が、キラーファクターによって殺されるのは対数増殖期において大きいといわれており、32°C という高温においても、キラー酵母の生産するキラーファクターによりすみやかに殺されてゆくのではないかと考えられる。又、混合培養に用いた焼酎醪培地の pH は 3.4~3.6 で、B-86 のキラー活性の至適 4.5~5.0¹⁷⁾ と比較するとかなり低く、キラーファクターの作用条件としてはあまり良い条件下ではないと思われる。焼酎の一次醪では一般に pH は 3.2~3.5、二次醪で 3.8~4.3¹⁷⁾ であり pH の高い二次醪の方がキラーファクターにとって好都合であろうと思われる。今後、このキラー酵母の利用等について検討してゆきたい。

要 約

焼酎醪よりキラー酵母を一株 (B-86) 分離した。

1. B-86 は、K-7, K₀, MK 等の酵母と形態的にも生理試験においてもほとんど差がなく、*Saccharomyces*

と考えられる。

2. B-86 は、その相互作用により K₁ タイプのキラー酵母と考えられるが、M-dSRNA の分子量は KL-88, 5038 より小さかった。

3. 40°C によるキュアリングで B-86 は 100% キラー活性を失った。

4. B-86 は pH 4 以下でかつ 31°C においてもキラー感受性酵母を死滅させられると考えられる。

貴重な菌株の分譲を受け、又御指導いただいた国税庁醸造試験所第六研究室長西谷尚道博士に深謝致します。

文 献

- 1) 今村 武司・川本 雅之・高岡 祥夫：醸工 52, 293 (1974)
- 2) 秋山裕一・大内弘造・植物浩行：醸試報 148, 1 (1976)
- 3) 大内弘造・川島宏：醸協 69, (9) 629 (1974)
- 4) 岩田博・新里修一・高宮義治・志恒邦雄・中尾俊幸・田中康：醸協 76, (2) 123 (1981)
- 5) 工藤哲三・日高照利・山田和史・濱川悟：醸協投稿中
- 6) 飯塚廣・後藤昭二著：酵母の分類同定法 p.7, 東京大学出版会 (1980)
- 7) 飯塚廣・後藤昭二著：酵母の分類同定法 p.37, 東京大学出版会 (1980)
- 8) 飯塚廣・後藤昭二著：酵母の分類同定法, p.49, 東京大学出版会 (1980)
- 9) 石川辰夫編集：微生物遺伝学実験法 p.186, 共立出版 (1982)
- 10) 山崎豊彦・石川 貴・野々村英夫：山梨大発研究報告 16, 35 (1981)
- 11) H. M. FRIED, G. R. FINK: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4224 (1978)
- 12) 工藤哲三・濱川悟・日高照利・松尾千鶴子：宮崎工試報告 28, 59 (1983)
- 13) 飯塚廣・後藤昭二著：酵母の分類同定法 p.8, 東京大学出版会 (1980)
- 14) 大内弘造・秋山裕一：醸試報 152, 20 (1981)
- 15) K. KITANO, M. SATO, T. SHIMAZAKI, S. HARA: *J. Ferment. Technol.* 62, 1 (1984)
- 16) 工藤哲三・下中野 健：宮崎工試報告 29, 45 (1985)
- 17) 日本醸造協会編：醸造技術 (しょうちゅう乙類) p.38, 日本醸造協会 (1976)