清酒泡なしキラー酵母の育種

河野勇人・東江昭夫*・産本弘之・姫野国夫

(岡山県工業技術センター・*広島大学工学部)

昭和 62 年 5 月 1 日受理

Breeding of Non-Foaming Killer Sake Yeast

Isato KONO, Akio TOH-E*, Hiroyuki SANMOTO and Kunio HIMENO

(Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, 4-3-18,
Ifuku-cho, Okayama-shi, Okayama, 700

*Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering,
Hiroshima University, Saijo-cho, Higashihiroshima-shi,
Hiroshima, 724)

The K_1 killer character was introduced into the non-foaming sake yeasts by either protoplast fusion or cytoduction. We confirmed that seven killer strains thus obtained maintained the ploidy of the nuclear donor strain by tetrad analysis and by quantitative fluorometric analysis of the nuclear DNA content. The following characters of these non-foaming killer strains were observed; (1) The killer activity was maintained stably up to tenth passage, (2) these strains killed killer sensitive strain and had immunity to the K_1 killer toxin in the respective mixed culture, (3) they did not form a high froth during fermentation of sake mash, (4) the fermentation process was the same as those shown by their parental strains except one which showed a slower fermentation, and (5) quality of sake produced by using these strains was as good as that produced by the parental strains.

Key words: 清酒泡なし酵母・キラー酵母・プロトプラスト融合

緒 言

清酒醸造用酵母の泡なし変異株の細胞表層は、高泡を形成する一般の清酒酵母の細胞表層が疎水性であるのに対し、その疎水基がマンナンによってマスクされた構造をとるため親水性になると報告されている¹⁾。このため泡なし酵母は気泡に付着しないため清酒醪の発酵中に高泡を形成しない。よって清酒仕込みにおいてその分だけ仕込量を増加させることができ、また泡消しの作業も不要となるなど、醸造工程の効率化・経済化が図れ、メリットの大きい酵母である。

しかし、この清酒泡なし酵母を用いた醪が麹等からの野生酵母の侵入によって汚染されると、醪の発酵経過の変調、特に多くの野生酵母が高泡形成酵母であるため高泡の発生による泡のふきこぼれ等の問題が生じたりし、泡なし酵母を用いる利点もなくなってしまう。また、野生酵母のうちでもキラー酵母に汚染されると、普通の清酒酵母同様この酵母はキラー感受性であるため淘汰され

てしまう²⁾。だがこのような問題は、この泡なし酵母をキラー化することで解決できる。

醸造用キラー酵母の育種法についてはこれまでに種々報告されているが^{3~6)}、特にプロトプラスト融合の場合、醸造用酵母とキラー供与菌の核の融合を避けるために、核融合欠損や紫外線感受性の特殊な変異株が用いられている。しかし、*Saccharomyces cerevisiae* のプロトプラスト融合において、これらの変異株を用いなくても核の融合する頻度は非常に低いことが報告されている^{7~8)}。

本報では、*kar1*⁹⁾ 変異株及びその野生型のキラー酵母を用いて清酒泡なし酵母とプロトプラスト融合を試みたところ、清酒泡なし酵母の核を持ち細胞質のみ融合した清酒泡なしキラー酵母が得られたので、その醸造特性等と合わせて報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株

使用菌株を第1表に示した。なお、清酒泡なし酵母は

第1表 使用菌株 (*Saccharomyces cerevisiae*)

菌 株	キラー表 現型*	遺 伝 子 型**	由 来
K-7	K ⁻ R ⁻	<i>a/α FRO/FRO βal/βal</i>	協会7号 (日本醸造協会)
K-9	K ⁻ R ⁻	<i>a/α FRO/FRO</i>	協会9号 (日本醸造協会)
K-701	K ⁻ R ⁻	<i>a/α fro/fro βal/βal</i>	協会701号 (日本醸造協会)
K-901	K ⁻ R ⁻	<i>a/α fro/fro</i>	協会901号 (日本醸造協会)
N	K ⁻ R ⁻	<i>a/α fro/fro</i>	保存株
YAT 679	K ⁺ R ⁺	<i>a arg6</i> [KIL-k ₁]	広島大学・東江
YAT 357	K ⁻ R ⁻	<i>a/α ura3/+ ilv3/+ can1/+ mak10/+ +/thr1 +/ski3</i>	広島大学・東江
YAT 408	K ⁻ R ⁻	<i>α leu2 lys10 kar1</i>	広島大学・東江
C-5	K ⁺ R ⁺	<i>α leu2 lys10 kar1</i> [KIL-k ₁]	Cytoduction (YAT 679→YAT 408)***

* K⁺/K⁻: キラー活性の有/無R⁺/R⁻: キラー毒素に対する抵抗性/感受性** *FRO/fro*: 泡あり/泡なし*βal*: 35°C で β-アラニン培地に生育不可*kar1*: 核融合欠損変異

*** YAT 679 の細胞質を YAT 408 に導入することを示す

協会 701 号・協会 901 号及び当センター保存のN株の3種類の菌株を用いた。キラー酵母の YAT 679 株及び C-5 株のキラー特異性は K₁ に属する。C-5 株は、エチジウムブロマイド処理して呼吸欠損 (ρ⁰) にした YAT 408 株と YAT 679 株 (ρ⁺) とを集団交配し、そのうちから K⁺, ρ⁺, *leu2* の性質を持つものとして分離した菌株である。

2. 使用培地

YEPD 培地 (酵母エキス 1%, ポリペプトン 2%, グルコース 2%), YPG 培地 (酵母エキス 1%, ポリペプトン 2%, グリセロール 3%), MB 培地 (pH 4.7 に調整した YEPD 培地へメチレンブルー 0.003% 添加), 孢子形成培地及び omission medium は SHERMAN ら¹⁰⁾ のものを用いた。また、協会 701 株の選別用として β-アラニン培地¹¹⁾ (日本醸造協会製) を用いた。なお、固形培地には寒天を 2% 添加した。

3. キラー活性の定性及び定量試験

キラー感受性菌 (YAT 357) を MB 培地に塗布して試験菌をその上から植菌後、25°C で 2 日間培養し、試験菌の周囲における感受性菌の生育阻止帯の有無でキラー活性を判定した。定量は Well test^{12,13)} により行った。すなわち、YAT 357 株を塗布 (10⁵ cells) した MB 培地上に直径 12 mm の穴を作り、そこへ試験菌の無菌培養液を 0.2 ml 注入して 20°C で 3 日間培養後、形成される阻止帯の直径を測定し、これをキラー活性とした。

4. 四分分子分析

孢子形成培地で形成させた孢子を、Zymolyase 100 T (生化学工業) 含有の子の壁溶解酵素溶液 (1.2 M ソルビトール, 50 mM リン酸, 0.11% 2-β-メルカプトエタノール, Zymolyase 100 T 0.2 mg/ml) で処理し、ミクロマニピュレーター (NARISHIGE 製, MO-103) で子の解剖を行った。

5. プロトプラスト融合

プロトプラストの調整、融合、再生は、Beggs の方法¹⁴⁾ に準じて行った。すなわち、対数期後期の細胞を細胞壁溶解酵素溶液 (1.2 M ソルビトール, 0.01 M EDTA, Zymolyase 100 T 0.2 mg/ml, 0.1 M クエン酸, pH 5.8) で 30°C, 1 時間処理し、プロトプラストを調整した。遠沈集菌 (久保田卓上遠心機 KN-70, 2,000 rpm, 5 min) 後、0.01 M CaCl₂ を含む 1.2 M ソルビトール溶液に懸濁し、泡なし株とキラー株のプロトプラストを各々約 10⁸ 個 (0.8 ml) ずつ混合し、この 10 倍容量のポリエチレングリコール溶液 (20% PEG 4,000, 10 mM CaCl₂, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5) を加えた。室温で 20 分間放置後、遠沈集菌し、0.2 ml の 1.2 M ソルビトール溶液に懸濁した。そのうち 0.1 ml を選択培地 (キラー株が YAT 679 の場合: グルコース 0.1%, Difco Yeast Nitrogen Base 0.67%, ソルビトール 1.2 M, 乳酸ナトリウム 4%, 寒天 2.5%, pH 5.3, C-5 の場合: ロイシン欠平板培地) 上に 50°C, 10 ml の再生培地 (Difco Yeast Nitrogen Base 0.67%, ソルビトール 1.2 M, 寒天 3%) とともに重層し、26°C で 5 日間培養した。

6. 核 DNA 含量の測定

SUZUKI らの方法¹⁵⁾ により行った。すなわち、ヨウ化プロビジウムで蛍光染色した G1 期にある酵母細胞の核の励起光 (波長 546 nm) により生じる蛍光強度を、Zeiss MPM 01 KFL/03 FL epifluorescent microscope-photometer により測定し、核 DNA 含量を求めた。

7. 小仕込醸造試験

小仕込醸造試験は難波らの方法¹⁶⁾ に準じて行った。

8. 製成酒の分析

製成酒の一般成分は国税庁所定分析法¹⁷⁾ により、香気成分はヘッドスペース法により、また有機酸は有機酸分

析計（盛進製薬 S-700）により分析した。製成酒の官能試験はパネラー 5 名による 3 点法で行った。

実験結果及び考察

1. プロトプラスト融合法による泡なし株へのキラプラスミドの移入

キラ酵母 (ρ^+) から清酒泡なし酵母への細胞質導入を検出するため、各泡なし株をエチジウムブロマイド処理により呼吸欠損 (ρ^0) にした。 ρ^0 泡なし株のプロトプラストと ρ^+ キラ株のプロトプラストをポリエチレングリコールで融合させ、選択培地及び再生培地により融合株を分離再生した。再生株の内から、YPG 培地で生育しかつキラ活性のあるものを、YAT 679 と K-701 の組合わせから 15 株 (701 FK 株), YAT 679 と K-901 の組合わせから 36 株 (901 FK 株), YAT 679 と N の組合わせから 16 株 (NFK 株), C-5 と K-901 の組合わせから 28 株 (901 CK 株), それぞれ 1 次分離菌として得た。

2. 倍数性の決定

1 次分離菌には、細胞質融合株と核融合株の二種類の存在が考えられる。そこで、これらの四分子分析を試

第 2 表 DNA 含量の測定結果

親 株	比 DNA 量	倍 数 性
YAT 679	1.00	n
K-701	2.08±0.13	2 n
K-901	1.78±0.12	2 n
N	1.90±0.13	2 n

融 合 株	比 DNA 量	倍 数 性
701 FK-16	1.97±0.13	2 n
901 FK-3	2.13±0.14	2 n
NFK-7	1.87±0.11	2 n
NFK-12	1.73±0.10	2 n
NFK-25	2.23±0.15	2 n
901 CK-17	1.70±0.09	2 n
901 CK-31	1.71±0.10	2 n
701 FK-1	2.86±0.18	3 n

第 3 表 キラ活性の変化 (mm)

菌 株	世 代				
	2	4	6	8	10
YAT 679	20	19.5	19.5	20	20
701 FK-16	21	20	20.5	21	21
901 FK-3	21	20.5	20	20.5	20.5
901 CK-17	21	21.5	21	22	22
901 CK-31	21.5	22.5	22	22	22
NFK-7	18.5	19.5	18	18.5	19
NFK-12	20.5	21.5	20.5	21	21.5
NFK-25	21	20	20.5	20.5	20

各菌株を YEPD 寒天培地で 10 代まで継代培養し、それぞれについてさらに YEPD 液体培地 (pH 4.7) に 10^5 cells/ml 接種後 20℃ 3 日間静置培養し、この無菌培養液を Well test に供し、キラ活性を測定した。

み、1～2 組の四分子 (いずれも Arg : arg=4 : 0) がとれた株 (701 FK : 2 株, 901 FK : 1 株, NFK : 3 株, 901 CK : 2 株) についてその核 DNA 含量を測定し、その倍数性を調べた (第 2 表)。その結果、701 FK-16, 901 FK-3, NFK-7, NFK-12, NFK-25, 901 CK-17, 901 CK-31 の各株は YAT 679 株の 2 倍の核 DNA 含量を持ち、YAT 679 株が 1 倍体であることから、それぞれ親株の清酒泡なし酵母と同じ 2 倍体、すなわち細胞質融合株であることが判った。一方、701 FK-1 株は 3 倍体であったので、これは核融合の結果生じたものであることが判った。

この結果、この測定に用いた株のほとんどが細胞質融合株で 2 倍体のままであった。これは、3 倍体は 2 倍体に比べて胞子の発芽率が悪い (10% 以下)⁸⁾ ことから、四分子分析を試みた過程で核融合株の 3 倍体はほとんど発芽せず、その結果細胞質融合株が選別されたためではないかと推測される。

3. キラ活性保持安定性

得られた 7 株の細胞質融合株を YEPD 固形培地に 10 代まで継代培養し、それぞれについて Well test によりキラ活性を測定した (第 3 表)。その結果、いずれもキラ活性を安定に保持することを確認した。なお、NFK-7 株のキラ活性が他に比べて弱いことの原因については不明である。

4. 混合培養試験

得られた細胞質融合株が実際の清酒醪の環境においてキラ活性を示すかどうかを調べるため、小規模醪 (蒸米 70 g, 麴 30 g, くみ水 120 ml, pH 3) へ 701 FK-16 株と野生酵母として YAT 679 株及び YAT 357 株を同数 (10^5 cells/ml) 接種後 15℃ で培養し、 β -アラニン培地を用いた部分嫌気培養法¹⁸⁾ により継時的に菌数変化を測定した。

第 1 図 (a) に示したように、YAT 357 株は培養 1 日後までは生育が認められたがそれ以後は認められず、701 FK-16 株のみ増殖生育した。なお、YAT 357 株単独では、小規模醪中で良好に増殖生育した。逆に第 1 図 (b) に示したように、701 FK-16 株はキラ耐性を持つために野生の清酒キラ酵母¹⁹⁾ と同じ K₁ タイプの YAT 679 株に殺されず、両者は共存して増殖生育した。

このように、実際の清酒醪において融合株はキラ活性・キラ耐性を有し、醪中の野生酵母を殺しかつ野生キラ酵母には殺されないため、醪の野生酵母による汚染防止に有効である。

5. 融合株の醸造特性

小仕込醸造試験において、留後仕込容器 (1 l 容平底フラスコ) に発酵管をつけ、上槽まで炭酸ガス発生に伴う

第1図 混合培養による菌数変化

醪の重量減少量を測定して融合株とその親株との発酵能を比較した(第4表)。また、この製成酒の一般成分・香气成分・ピルビン酸及び官能評価についても検討した(第5表)。これらの結果より、NFK-25株を除いていずれの融合株とも親株と同等の醸造特性を有することが判った。

NFK-25株は親株のN株に比べて発酵経過が緩やかであり、そのため同じ発酵期間のN株の製成酒と比べてアルコール分が低く、ピルビン酸も多くなっていた。一般に、清酒泡なし酵母は高泡を形成しないためにその醪の発酵が進みすぎることがあるが、このNFK-25株は緩やかな発酵経過をとることから、この点を改善するのにも有効な酵母であると考えられる。

また小仕込醸造試験において、いずれの融合株ともその親株の清酒泡なし酵母同様、高泡は形成しなかった。これは、酵母の泡なしの性質が核支配のもの²⁰⁾であることから、融合株が清酒泡なし酵母の核を持つことを裏づけるものである。

要 約

清酒泡なし酵母(協会701号:協会901号,N株)とキラー酵母(YAT679株:KAR,C-5株:kar1,いずれもK₁タイプ)とのプロトプラスト融合法による細胞質混合実験を行い、清酒泡なしキラー酵母を計7株得

第4表 醪の炭酸ガス発生に伴う重量減少量(g)

菌 株	留 後				
	5日	10日	15日	20日	25日
K-701	9.5	26.2	37.9	44.6	49.3
K-901	12.6	26.1	36.7	43.7	48.7
N	10.6	26.6	38.1	44.9	49.5
701FK-16	8.7	26.6	38.5	45.4	50.1
901FK-3	11.7	26.1	37.2	43.5	47.8
901CK-17	10.0	27.4	39.3	45.4	49.4
901CK-31	8.6	25.9	37.2	42.9	46.9
NFK-7	7.4	26.3	38.9	45.0	49.0
NFK-12	7.9	25.2	37.3	43.2	47.0
NFK-25	6.5	22.5	35.6	42.4	45.9

第5表 製成酒の各種分析値

菌 株	項 目						
	酸度	日本酒度	アルコール分(%)	酢酸イソブチル(ppm)	イソアミールアル(ppm)	ピルビン酸(mg/100ml)	官能評価* X (n=5)
K-701	3.95	+11	17.0	6.0	280.9	18.4	2.2
K-901	3.78	+10	17.0	6.0	260.7	18.7	1.3
N	3.71	+10	17.1	5.1	297.5	14.3	1.7
701FK-16	3.72	+13	17.1	6.3	325.3	17.7	2.1
901FK-3	3.89	+3	16.6	8.8	295.8	12.6	1.6
901CK-17	3.49	+13	16.8	12.2	366.8	12.3	2.0
901CK-31	4.10	+13	16.4	7.4	359.6	17.0	1.8
NFK-7	3.71	+11	16.7	7.9	326.3	15.7	2.2
NFK-12	3.81	+8	16.3	5.5	348.9	22.4	2.0
NFK-25	4.11	-1	15.9	6.7	296.6	36.6	2.6

* 1:良い 2:普通 3:悪い

た。これらの菌株はキラー活性を安定に保持し、また清酒醪においてキラー活性及びキラー耐性を示した。また親株の清酒泡なし酵母と同じ泡なしの性質を持ち、その醸造特性も親株のものと変わりがなかった。なお、このプロトプラスト融合によってキラー活性の強さの違う株や発酵経過の緩やかな株が得られた。

核 DNA 含量の測定に際し御指導頂きました 岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所(現東京大学)教授 黒岩常祥先生に深謝致します。

なお、本研究は通商産業省の地域フロンティア技術開発事業補助金により行われた。

文 献

- 1) 布川弥太郎, 大内弘造: 化学と生物, 11, 216 (1973)
- 2) 秋山裕一: 醸酵工学, 56, 618 (1978)
- 3) 大内弘造, 秋山裕一: 醸工, 54, 615 (1976)
- 4) K. OUCHI, R. B. WICKNER, A. TOH-E and H. AKIYAMA: *J. Ferment. Technol.*, 57, 438 (1979)
- 5) 山本哲郎, 柳生淳二, 太田香矢乃, 浜野充博, 大内弘造, 西谷尚道: 農化, 58, 559 (1984)
- 6) K. OUCHI, T. NISHIYA and H. AKIYAMA: *J. Ferment. Technol.*, 61, 631 (1983)
- 7) H. J. HALFMANN, W. RÖCKEN, C. G. EMFIS and

- U. ZIMMERMANN : *Curr Genet.*, **6**, 25 (1982)
- 8) M. D. ROSE, B. R. PRICE and G. R. FINK : *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3490 (1986)
- 9) J. CONDE and G. R. FINK : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 3651 (1976)
- 10) F. SHERMAN, G. R. FINK and C. W. LAWRENCE : *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, (1974)
- 11) 菅間誠之助, 山川浩一郎, 瀧岡巖一, 山村紘司, 野白喜久雄 : 醸協, **60**, (5) 83 (1965)
- 12) D. R. WOODS and E. A. BEVAN : *J. Gen. Microbiol.*, **51**, 115 (1968)
- 13) 今村武司, 川本雅之, 高岡祥夫 : 醸工, **52**, 293 (1974)
- 14) J. D. BEGGS : *Nature*, **275**, 104 (1978)
- 15) T. SUZUKI, S. NISHIBAYASHI, T. KUROIWA, T. KANBE and K. TANAKA : *J. Bacteriol.*, **152**, 893 (1982)
- 16) 難波康之祐, 岩野君夫, 磯見昭夫 : 醸協, **71**, (1) 61 (1976)
- 17) 国税庁所定分析法注解 p. 6, 日本醸造協会 (1981)
- 18) 菅間誠之助, 大内弘造, 忍頂寺晃嗣, 野白喜久雄 : 醸協, **61**, (2) 164 (1966)
- 19) 大内弘造, 秋山裕一 : 醸試報, **152**, 20 (1981)
- 20) 笠原秀夫, 大内弘造, 倉田京子, 石戸輝雄, 布川弥太郎 : 醸工, **52**, 348 (1974)