

## 細胞融合によるアルコール耐性酵母の造成

江藤 勸

食品工業部

### Breeding of Highly Alcohol-Tolerant Yeast by the Cell Fusion Method

Susumu ETO

Food Science and Technology Division

#### 要旨

麦焼酎の醸造に適した大分酵母の造成を目指して、大分酵母として期待される性質の一つであるアルコールに高い耐性を持つ酵母を、細胞融合法で育種することを試みた。親株としては、県内で最も多く使用されている鹿児島酵母とアルコール耐性の強いワイン酵母(OC-2)を選択した。両細胞をプロトプラスト化し、電気融合法で融合させたところ、鹿児島酵母よりアルコール耐性の強い3株の融合細胞を得た。

#### 1. 緒言

麦焼酎は大分県の特産品となっているにも関わらず、その醸造には甘藷焼酎用に開発された鹿児島酵母や米焼酎もろみより選抜された協会焼酎酵母が用いられているのが実状である。これに対し鹿児島県や熊本県ではそれぞれの特産焼酎である甘藷焼酎や米焼酎に適した酵母を開発しそれが全県的に使用されている。このような状況から県内の焼酎業界では大分麦焼酎のための大分酵母の開発が求められている。

一方、焼酎製造に伴い生じる蒸留粕は年間4~5万tに達し、その48%は飼肥料として、残りが海洋投棄等で処理されているが、ロンドン条約の批准によりこの海洋投棄が禁止される方向にある。このため蒸留粕の適正処理、有効利用は焼酎業界にとって取り組まなければならない緊急の課題である。この問題の解決方法の一つとして、高濃度のアルコール中でも生育できる酵母を用いて醸造を行うことにより蒸留粕自体を減量することが考えられている。このことから、大分酵母の特性としてアルコールに高い耐性を持つことも期待される。

本研究では、細胞融合法により麦焼酎の生産に適したアルコール耐性の強い酵母を造成する事を目的として、親細胞株の選定を行った後、電気融合を実施した。

#### 2. 実験方法

##### 2.1 使用菌株

(財)日本醸造協会および(財)発酵研究所より醸造用酵母を中心に購入した。

##### 2.2 染色試験

##### 2.2.1 TTC寒天重層法

常法<sup>1)</sup>に従いグルコースあるいは $\alpha$ -メチルグルコシドを含む栄養寒天培地上でコロニーを形成させ、トリフェニルテトラゾリウムクロライド(TTC)を含む軟寒天を重層して染色を行った。

##### 2.2.2 酸性ホスファターゼの検出

栄養寒天培地上に試験株のコロニーを形成させて $\alpha$ -ナフチルリン酸とFast blue salt Bを含む軟寒天を重層して染色を行い酸性ホスファターゼを検出した。

##### 2.3 パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)

165Vで90秒、105秒のパルス時間で各10時間、120秒のパルス時間で12時間電気泳動を行った。

##### 2.4 アルコール耐性試験

試験株をYPD液体培地中で前培養した後、各濃度のエタノールを含むYPD液体培地に接種して振盪培養装置(アドバンテック東洋, TN-2612)で増殖能を測定した。

##### 2.5 栄養要求変異株の作成

エチルメタンスルホン酸(EMS)により変異を引き起こした後、Nystatin処理を行って選択した。

##### 2.6 細胞融合

酵母細胞をZymolyase-100Tでプロトプラストとした後、2種類の細胞を混合し、1MHzの高周波電圧30Vを10秒印加し、2~3個のプロトプラスト鎖を形成させた後、直流パルス電圧400V、パルス幅60 $\mu$ 秒を印加して融合させた。緩衝液等は既報<sup>2)</sup>に準じて行った。

#### 3. 実験結果及び考察

##### 3.1 染色試験

入手した試験株すべてについてグルコースあるいは $\alpha$

Table 1 試験酵母株の染色性

分類	酵母名称	記号	酵母染色試験		
			TTC-glucose	TTC- α MG	acp
焼酎酵母	鹿児島酵母	Ko	R	R	+
	協会焼酎酵母	SH-4	R	WP	+
	宮崎酵母	MK	R	P	-
	泡盛酵母	Aw	R	R	+
ウイスキー酵母	American whisky yeast.	AmW	P	PR	-
	Suntory No.3. Distillery yeast.	SuW	P	PR	-
ワイン酵母	ワイン酵母	OC-2	PR	WP	+
	協会3号	W3	R	PR	+
ビール酵母	S.cerevisiae; Ale.	Ale	PR	P	+
	S.postorians; Lager.	Lager	PR	P	-
清酒酵母	協会7号	K-7	R	R	-
	協会9号	K-9	PR	PR	-
	協会13号	K-13	R	R	-
アルコール酵母	発研1号	H-1	P	PR	-

R : 赤, P : ピンク, WP : 白っぽいピンク, PR : 赤っぽいピンク

ーメチルグルコシドを炭素源とした TTC 染色及び酸性ホスファターゼの検出を行った。TTC 染色の結果は、ほぼ既報<sup>1)</sup>に準じたものとなったが、分類による判別が出来るとは明確な傾向は認められなかった。これに対して酸性ホスファターゼ (acp) の検出結果は宮崎以外の焼酎、ワイン酵母で陽性、ウイスキー、清酒、アルコール酵母で陰性という酵母の分類ではっきりとした差が出た。(Table 1)

### 3.2 パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

試験株の遺伝子レベルでの分類、解析を行う目的で PFGE による染色体の分離を試みた。今回検討したほとんどの株が *Saccharomyces cerevisiae* であるため顕著な差は認められなかったが、いくつかの株で第 II, IX 染色体等に若干のシフトが見られた (Fig.1).

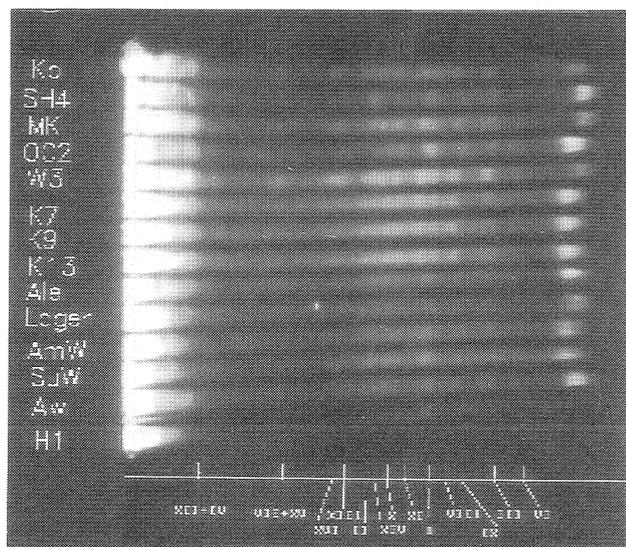


Fig.1 パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による酵母試験株の染色体の解析

### 3.3 アルコール耐性試験

細胞融合のための親株を選定する目的で試験株の増殖に対するエタノールの影響を検討し、アルコール耐性の指標とした。YPD 培地中で前培養した試験株を各濃度のエタノールを含む YPD 培地に接種し振盪培養槽で培養して吸光度を測定することで酵母の増殖を測定した。

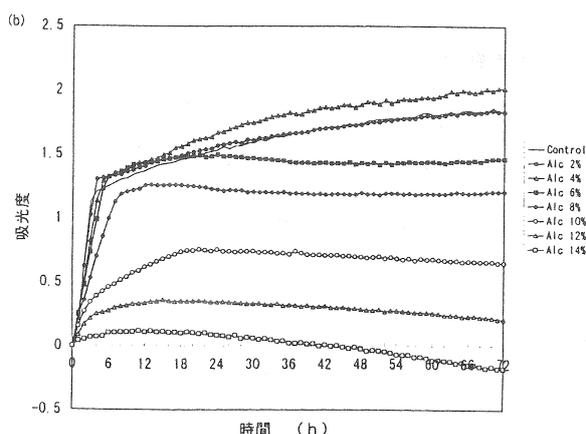
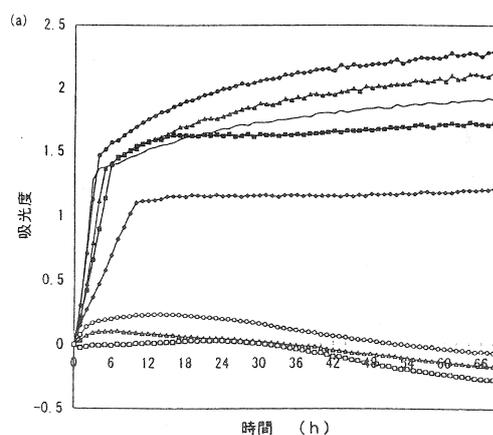


Fig.2 酵母試験株の増殖に対するエタノールの影響 (a) 鹿児島酵母, (b) ワイン酵母 OC-2

鹿児島酵母をはじめほとんどの試験株が10%以上のエタノールにより増殖が抑制されたが、ワイン酵母 OC-2 では抑制の割合が低かった (Fig.2 a,b). そこで10%エタノール存在時の増殖抑制率をグラフにすると Fig.3 のようになった。これより OC-2 以外の酵母が10%エタノールにより80%以上の抑制を受けているのに対し、OC-2 では60%程度しか抑制されず、アルコール耐性が比較的強いと考えられた。

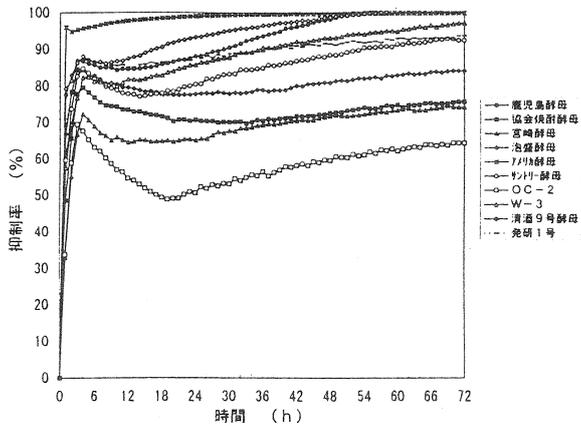


Fig.3 10% エタノールによる酵母試験株の増殖抑制

### 3.4 栄養要求性変異株の作成

細胞融合のための親株として、県内で最も多く使用されている鹿児島酵母とアルコール耐性試験の結果有望であったワイン酵母 OC-2 を選定し、それぞれ変異株の作成を試みた。

当初、紫外線照射による変異誘発を行っていたが目的とする株が得られなかったため、EMS を変異源として用いたところ OC-2 のロイシン要求性変異株 OCE1(Leu<sup>-</sup>) を得た。鹿児島酵母については良好な変異株は得られなかったが、TTC 染色の結果、OCE1(Leu<sup>-</sup>) と鹿児島酵母の区別は可能であったため、正常な株を使用することとした。

### 3.5 細胞融合

OCE1(Leu<sup>-</sup>) と鹿児島酵母を Zymolyase-100T で処理してプロトプラストとした後、2種類の細胞を混合し、電気融合法にて融合を行った。最小培地上で生育する株の内、TTC 染色で正常の鹿児島酵母とは異なる染色を示した F2, F3, F5 の3株を融合細胞として分離した。この内 F2, F5 については acp は検出されたが、F3 については検出されなかった (Table 2)。これは、融合したプロトプラストから細胞壁を再生する過程で何らかの変異を起こしたものと思われる。

Table 2 融合細胞の染色性

	TTC-glucose	TTC- α MG	acp
鹿児島酵母	R	R	+
OCE1(Leu <sup>-</sup> )	WP	P	+
融合細胞 F2	P	PR	+
融合細胞 F3	P	P	-
融合細胞 F5	P	PR	+

R : 赤, P : ピンク, WP : 白っぽいピンク, PR : 赤っぽいピンク

この3株について PFGE を行った結果、OCE1(Leu<sup>-</sup>) と鹿児島酵母の染色体パターンの中間的な性質を示し、融合細胞であることが確認された (Fig.4)。

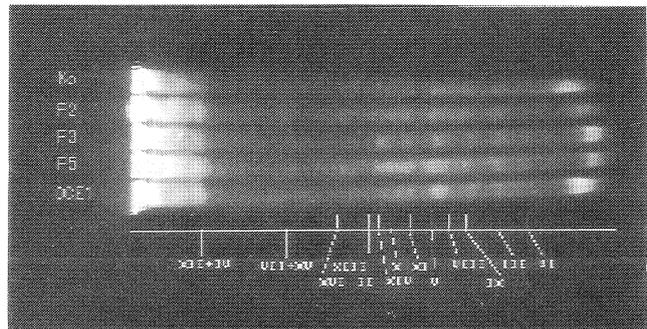


Fig.4 PFGE による融合細胞の染色体の解析

### 3.6 融合細胞のアルコール耐性試験

3株の融合細胞のアルコール耐性について検討した。エタノールが存在しない条件では3株とも親株と同等の増殖を示したが、10%のエタノール存在下では、F3 についてはほぼ OCE1(Leu<sup>-</sup>) と同等の、F2, F5 については OCE1(Leu<sup>-</sup>) 株と鹿児島酵母との中間的な性質を示した (Fig.5)。

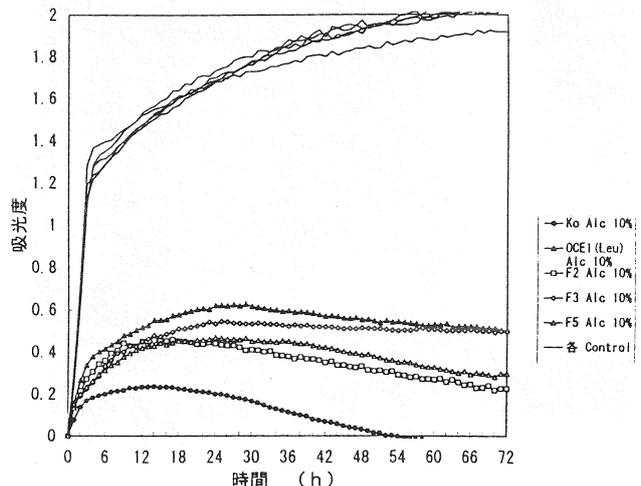


Fig.5 融合細胞の増殖に対する10%エタノールの影響

#### 4. まとめ

麦焼酎の醸造に適した大分酵母の造成を目的として、アルコール耐性を指標に親株の選定及び細胞融合を実施し次の結果を得た。

(1) 入手した酵母株について増殖に対するエタノールの影響を検討した結果、ワイン酵母 OC-2 が他の酵母に比べてアルコール耐性が高いことが明らかとなった。

(2) 鹿児島酵母と OC-2 の栄養要求性変異株を細胞融合させ、融合株 F2, F3, F5 を得た。

(3) 3 株の細胞は染色体を分析した結果、融合細胞であることが確認された。

(4) アルコールに対する耐性は 3 株とも鹿児島酵母よりも強く、特に F3 株は OC-2 に匹敵する耐性を持っていた。

今後は、得られた 3 株について小仕込み試験等を実施し、実際の麦もろみ中でのアルコール耐性や産生される香気成分の評価を行って大分酵母と成り得るかを判断する。

#### 参考文献

- 1) 西谷尚道：醸協,77(10)648(1982)
- 2) 野田幸太郎，十川好志：島津評論,44,167(1989)