

温度的性質を標的とする焼酎こうぼの改良

I. 焼酎こうぼおよびタプイこうぼのプロトプラスト形成について

田邊幾之助・須田雅一・冨宿昭人・

プリシラ C. サンチェス*¹・ジャン ミシエル ルボー*²

(応用微生物学研究室)

昭和61年8月10日 受理

A Contribution to the Breeding of Shōchū-Yeasts of Thermotolerancy in Alcohol-Fermentation and Growth

I. On the Protoplast-Formation of Shōchū-Yeasts and Tapuy-Yeasts

Ikunosuke TANABE, Masakazu SUDA, Akito HUSYUKU,
Priscilla C. SANCHEZ*¹ and Jean Michel LEBEAULT*²

(Laboratory of Applied Microbiology)

緒 言

鹿児島島の焼酎醸造は通常、醪品温を冷却によって32°~33°Cに保ちながらアルコール発酵を行なっている。焼酎醪のトラブルの一つである乳酸菌による高酸度醪の研究³⁾からも、高品温がそれら乳酸菌の増殖に有利であるのは勿論であるが、高品温によって焼酎こうぼの増殖およびアルコール発酵が影響を受けることも問題であるとされている⁵⁾。ここで、鹿児島島の焼酎醸造をはじめ亜熱帯のフィリピンなどでのアルコール発酵には常に低品温維持に関する問題がコスト面から重くのしかかってくる。このため焼酎こうぼをはじめ、フィリピンの醸造物のこうぼについてアルコール発酵および生育の適温がいずれも0.1度だけでも高いこうぼの育種が望まれている。とくに、焼酎こうぼとフィリピンの清酒であるタプイの醪から分離したこうぼなど⁶⁾を素材とし、遺伝子源に適当なこうぼを選び、細胞融合によってアルコール発酵適温または生育適温のより高いこうぼを育種することを目的に研究を行なっているが、今回はこれら素材こうぼのプロトプラスト

形成を検討したので報告する。

材 料 と 方 法

1. 使用菌株

日本式に汲水を加えて試験醸造したフィリピンの清酒タプイの醪より分離したこうぼ *Saccharomyces cerevisiae* 9, 21, 22, 30および33, *Saccharomycopsis* sp. 2, 35, 42および43, *Candida* sp. 12, 24および56, *Torulopsis* sp. 7⁶⁾, フランスのアルコールこうぼ UTC (Université de Technologie de Compiègne) 株 *Saccharomyces cerevisiae* No. 36およびNo. 59, 猿酒こうぼ *Canaida* sp. 64, *Candida* sp. 66, *Candida* sp. 69, 我国の清酒こうぼ *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2193, 焼酎こうぼ (酒造組合こうぼ) *Saccharomyces cerevisiae* 61, および球摩焼酎こうぼ *Saccharomyces cerevisiae* SH-4-1 の計21株を実験に供した。

2. 培地

実験に使用した培地等は Table 1 に示した。こうぼ菌体の増殖・保存にはこうぼエキス・麦芽エキス培地 (Yeast extract-malt extract medium, Ym 培地) を用いた。たとえば、プロトプラスト形成用の菌体の調製は、Ym 培地 6 ml に1白金耳接種し、30°C 24時間振盪培養したものを前培養とし、これを300 ml 三角フラスコ中の Ym 培地200 ml に接種、24時間静置培養した培養を用いた。なお、保存などで培地に寒天を加える必要のある時はいずれも粉末寒天を2%となるよう加えた。

* 1 Dr. Priscilla C. SANCHEZ, Professor, Institute of Food Science and Technology, University of the Philippines at Los Baños, College, Laguna, 3720, Philippines

* 2 Dr. Jean Michel LEBEAULT, Professeur, Département de Génie Chimique, Université de Technologie de Compiègne, Centre de Royallieu-BP233, 60206 Compiègne Cedex, France

Table 1. Culture media, used in this investigation

1) Yeast extract malt extract medium (Ym-medium)	
Yeast extract	4 g
Malt extract	10 g
Glucose	10 g
Distilled water	1 ℓ
pH 6.8	
2) Sorbitol-EDTA-Tris solution (SET solution)	
Sorbitol	1.3 M
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	0.1 mM
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	10 mM
pH 7.4	
3) Culture media, used in the replica method	
3-1) Yeast extract polypepton glucose medium (Ypg medium)	
Yeast extract	4.0 g
Polypepton	3.5 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g
Glucose	20.0 g
Agar	20.0 g
Distilled water	1 ℓ
3-2) Glycerin medium	
Glycerin, 20.0g, is used in place of glucose in the Ypg medium.	
3-3) Color medium	
Ypg medium	400 ml
Eosin Y solution, 2g/ℓ	1.6 ml
Tripan Blue solution, 2g/ℓ	3.0 ml

3. プロトプラスト形成

Fig. 1 に示した山元と福井の方法で行なった⁷⁾. こうばの培養を遠沈・集菌後, β -mercaptoethanol と EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt) で処理し, SET 溶液高張下, Zymolyase 処理

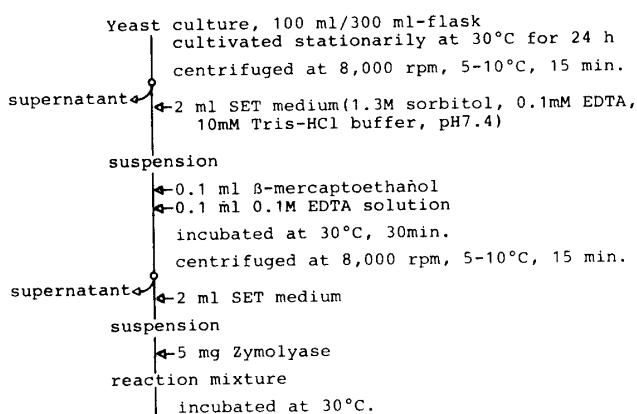


Fig. 1. The method for protoplast formation

するものである。なお, プロトプラスト形成の判定には反応液から経時的に0.1 ml ずつをとり, それぞれ SET 溶液4.9 ml および蒸溜水4.9 ml に加え, 蒸溜水中でプロトプラストの破裂崩壊によるクレット濁度の減少を観察した。また, Fig. 2 に点線で示したものは Zymolyase 作用開始時の同様に測定したクレット濁度を100%とし, 経時的に測定したクレット濁度の減少を相対値として示したものである。

4. こうばの呼吸欠損変異株

永井の方法¹⁾で呼吸欠損変異株を得た。まず, 100 ml 三角フラスコの Ypg 液体培地 (Table 1) 40 ml に acriflavin を3.8 μ g/ml となるよう加えた。全菌数が10⁴ cells/ml となるようこうばを接種し, 30°C 5日間静置培養した。培養を4倍稀釈リンゲル液で10³ cells/ml となるよう稀釈し, これを Ypg 培地平板に0.1 ml 接種, ガラススティックで塗抹し, 30°Cで培養した。1週間後, 生じたコロニーをレプリカ法で Ypg 培地平板, Glycerin 培地平板 (Table 1) および Color 培地平板 (Table 1) 上に複写した。30°Cで培養すると, 呼吸欠損変異株は Ypg 培地上では生育はするが小コロニーしか形成せず, Color 培地平板でも小コロニーだが濃紫色を呈する。一方, 呼吸基質培地である Glycerin 培地平板上では呼吸欠損変異株は増殖しないので原株のつくるコロニーとは容易に区別がつく (Photo 2)。

呼吸欠損変異株の呼吸活性, 発酵力, 温度的性質およびプロトプラスト形成についてはそれぞれ, YSI 53型生物用酸素モニターによる酸素消費度測定⁴⁾, マイセル栓を使用する方法⁵⁾, 温度勾配培養装置 (東洋科学工業, TN-12) による増殖量および生育速度定数から求める方法, および前述のプロトプラスト形成方法によって検討した。呼吸活性については次のようにこうば懸濁液を調製し実験に供した。まず300 ml 三角フラスコに Ym 液体培地50 ml を入れ, 使用菌株を1白金耳接種, 30°C48時間振盪培養した。培養を8,500 rpm (11,000 \times g), 5°C, 10分間遠沈し, 4倍稀釈リンゲル液で2度洗浄・遠沈をくり返した後, 菌体を再び4倍稀釈リンゲル液に懸濁し, 50 ml とする。懸濁液50 ml 中30 ml は菌体乾物重測定に用い, 残り20 ml を30°C, 約2時間振盪培養した後, 酸素消費量を測定した。反応混液は Table 2 に示したが, 基質として glucose, maltose および glycerin を用い 300 mg/l の濃度とした。なお, 結果は1時間, 乾物重あたりの酸素消費量 μ l を酸素消費度として示した。

発酵力の測定は次のように全麴培地を調製して行

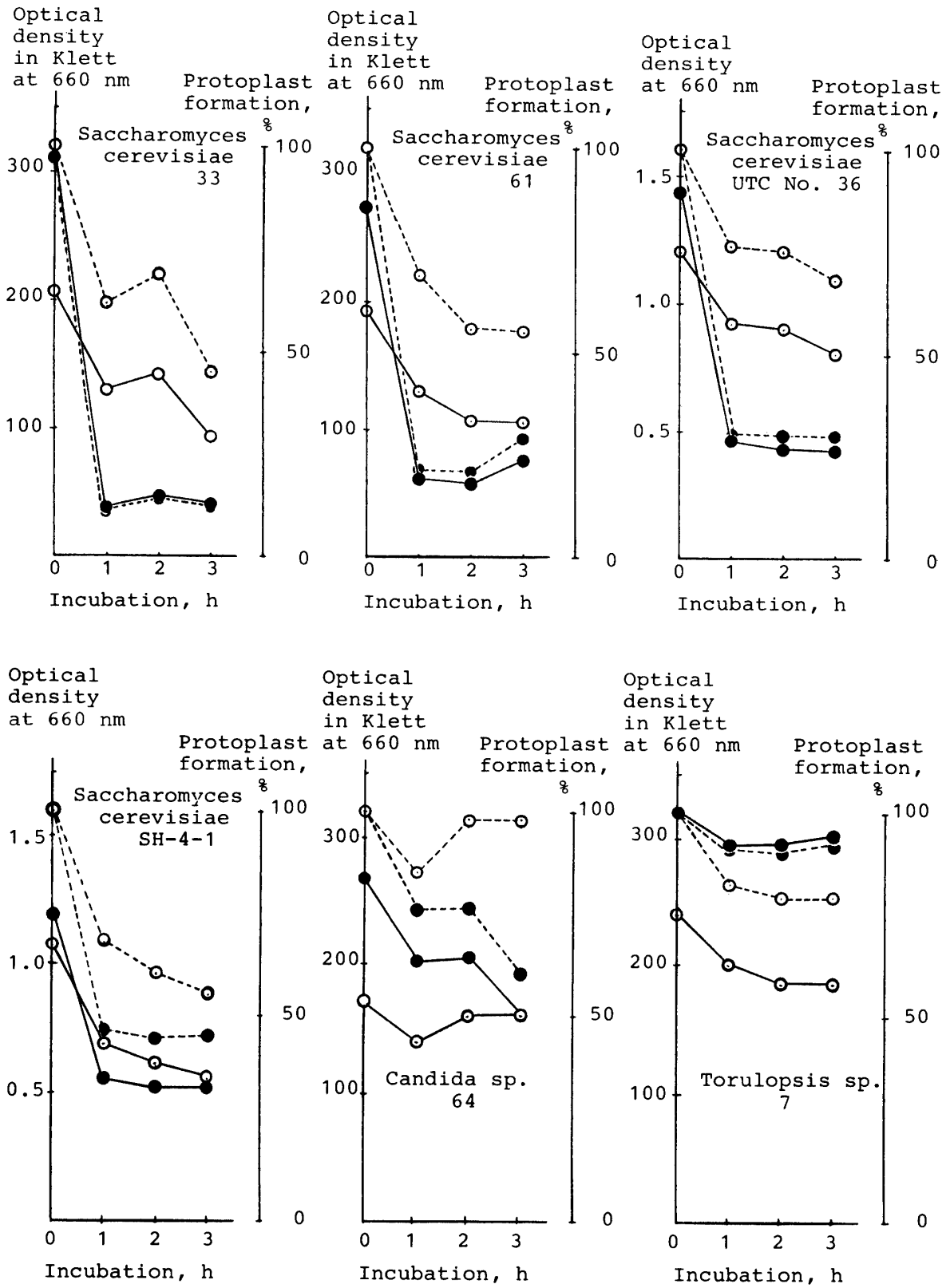


Fig. 2. Formation of yeast-protoplasts

○—○—○: Optical density of the suspension of yeast, treated with Zymolyase, in the SET medium.
 ●—●—●: Optical density of the suspension of yeast, treated with Zymolyase, in the distilled water.
: Percentage of the optical density of diluted suspension at a certain incubation-time for one at start. The diluted suspension is prepared as shown in Fig. 1.

Table 2. Reaction mixture, used for the determination of respiration activity (oxygen consumption)

	Endogenous respiration	Substrate respiration
Yeast-cell suspension	2 ml	2 ml
Substrate solution, substrate, 300mg/l -1/4-strength Ringer solution	—	1 ml
1/4-strength Ringer solution	2 ml	1 ml

なった。まず、米を1晩水に浸漬し、水切り1時間後、吸水量から計算して元石50g相当の浸漬米を300 ml 三角フラスコにとる。121℃15分蒸煮・滅菌の後、白麴菌 *Aspergillus awamori* var. *kawachii* Wk-7 の三角フラスコで製麴したものを種麴として1粒接種しよく混合した。まず37℃で24時間培養し、次に30℃で24時間培養する製麴法⁵⁾を採用した。つぎに、Ym 培地に3日培養したこうぼを滅菌水道水80 ml に 10^6 cells/ml となるように懸濁したものを前記元石50 g の麴に仕込み、綿栓をマイセル栓にかえた。培養は24℃および37℃で2週間行ない、炭酸ガスの減少量を秤量し、これからアルコール生成量を計算した。計算式は アルコール生成量 (g) = 炭酸ガス減少量 (g) × 0.511 / 0.489である。

結果と考察

1. プロトプラスト形成

タイプこうぼ、UTC こうぼおよび焼酎こうぼなどについて、山元・福井の方法に沿ってプロトプラスト形成を検討した。結果は Fig. 2 に示すとおりである。図中点線で示したクレット濁度変化は Zymolyase 処理開始時のクレット濁度を100%として示したものである。この方法のプロトプラスト形成の数量化は Zymolyase 処理反応液を水に投入することによって生成したプロトプラストが破裂しクレット濁度が低下することにもとづくが、この低下率が30%くらいでも検鏡によってはプロトプラストが形成が明確ではなかった。プロトプラスト形成が明確であった菌株は、Zymolyase 処理反応液を SET 溶液と水にそれぞれ投入し、経時的にクレット濁度変化を示した実線のグラフで両曲線が明らかに交叉する場合であった。この判定方法でプロトプラストの形成が Zymolyase 20 T (麒麟麦酒, Lot. no. 284021) 2.5mg/ml で良好であったこうぼはタイプこうぼ *Saccharomyces cerevisiae* 9, 21, 22, 30および33, UTC 株 *Sacch. cerevisiae* No. 36およびNo. 59, 清酒こうぼ *Sacch. cerevisiae* IFO 2193, 焼酎こうぼ *Sacch. cerevisiae* 61 (Photo 1), およびタイプこうぼ *Candida* sp. 56 で、これは例外として他は全て *Sacch. cerevisiae* であった。また、*Sacch. cerevisiae*

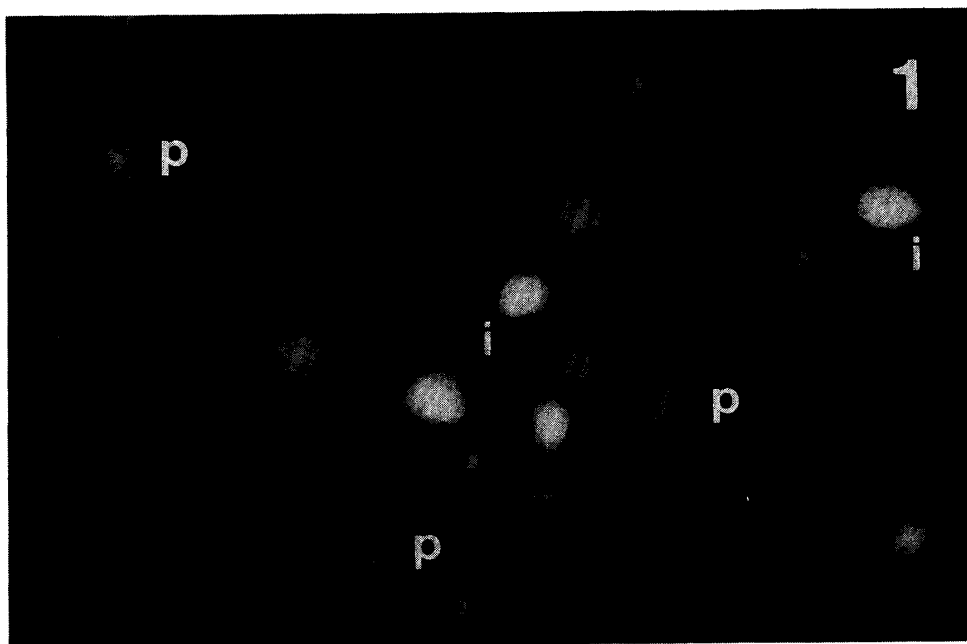


Photo 1. Protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* 61 (Shôchû-yeast) under a fluorescent microscopy, stained with acridine orange. i: Intact cells, stained yellowish orange. p: Protoplasts, stained pale yellowish green, and a golden-yellow organelle in protoplast seems to be the nucleus.

SH-4-1 はプロトプラストの形成は悪くはないが対照の SET 溶液中でも生成したプロトプラストの安定度が低いために良好なグループには入れることができなかった。一方、温度的により高い生育温度を示すタイプこうぼの 1 つ *Torulopsis* sp. 7 はこの方法の範囲内ではほとんどプロトプラストを生成していないと判断した。また、良好なグループの 1 つ、*Candida* sp. 56 は β -mercaptoethanol 処理を省略しても、それを使用した場合のプロトプラスト形成とほぼ同じ程度の形成率であったが、他のタイプこうぼ *Sacch. cerevisiae* 33 などは β -mercaptoethanol 処理を省略した場合、ほとんどプロトプラストは形成されなかったものと判

断できた。

2. 呼吸欠損変異株の誘導とそのプロトプラスト形成

当初は、プロトプラスト融合に際し温度的性質に関係のないと思われる余分の遺伝子、とくにミトコンドリア-DNA を焼酎こうぼに導入したくないこととプロトプラスト形成が多少ともこうぼの培養条件に影響を受けることなどから、遺伝子源として用いる、より高温性のこうぼ *Torulopsis* sp. 7 および *Candida* sp. 24 と 64 について呼吸欠損変異株を得ることを目的に実験を行なった (Photo 2)。しかし、*Candida* sp. 24 と 64 については Color 培地平板上での着色がいずれも

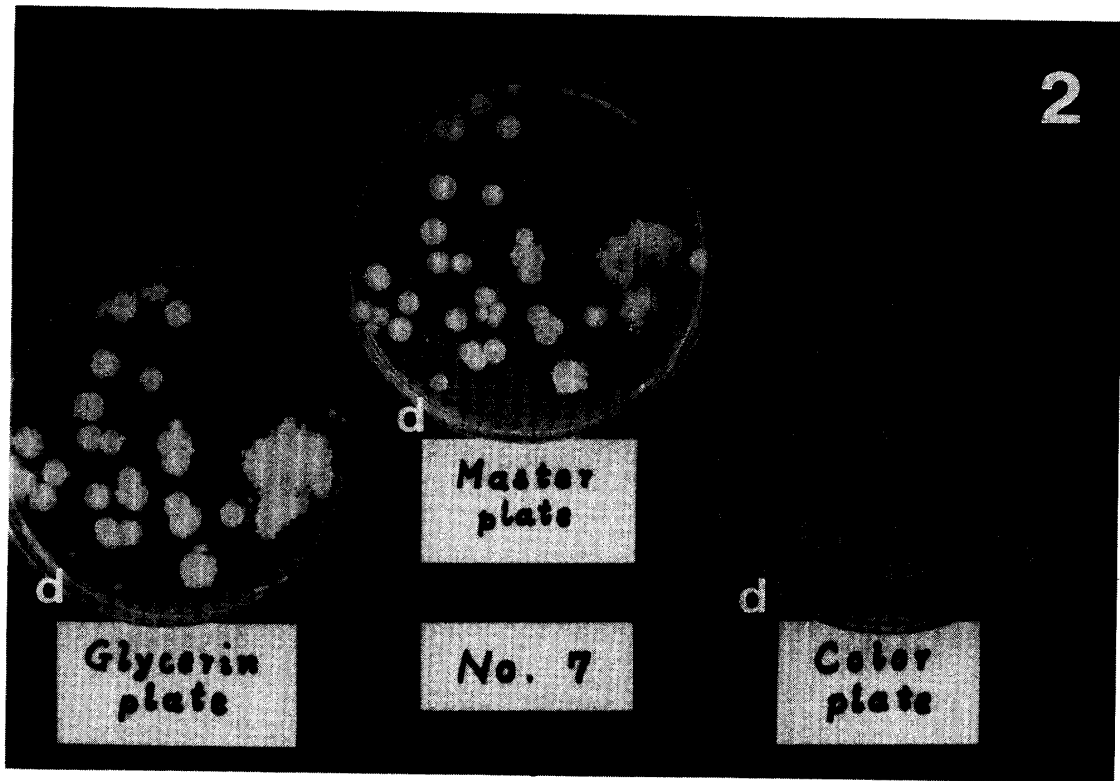


Photo 2. Colonies of acriflavin-treated cells were replicated on the master plate (Ypg-medium), the Color plate, and the glycerin plate, respectively. Respiration-deficient-mutant colony (d) turns violet on the color plate and does not grow on the glycerin plate.

薄く、コロニーも petite ではない。また、それらの呼吸活性の検討でも原株とほとんど差がなかったことから、呼吸欠損変異株ではないものと判断した。一方、*Torulopsis* sp. 7 では約 3% の割合で Color 培地平板上に petite colonie が現われた。そしてその呼吸をはじめ、温度的性質、発酵力およびプロトプラスト形成について比較検討したので以下それを述べる。

Fig. 5 に示すように *Tor.* sp. 7 の呼吸欠損変異株と認められるものは 7-p-1 株のみで、7-p-3 株や

7-p-4 株はわずかに酸素吸収が認められるので部分的呼吸欠損変異株と考えられる。一方、7-p-1 株の温度的性質について Fig. 3 に示すように増殖量を示すクレット濁度は原株 *Tor.* sp. 7 と比較してほぼ半分の量であるが、これは呼吸欠損のための ATP 生成率の低下によるものと思われる。これは同時に同じ培地ならばより小コロニーの形成、すなわち “petite” であることを示している。また、部分的呼吸欠損変異株である 7-p-3 株は原株と 7-p-1 株の中間の生育量を示

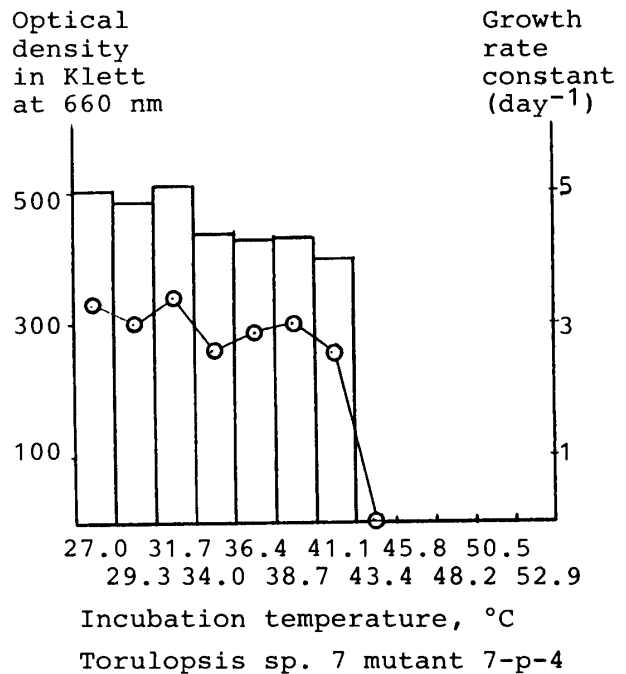
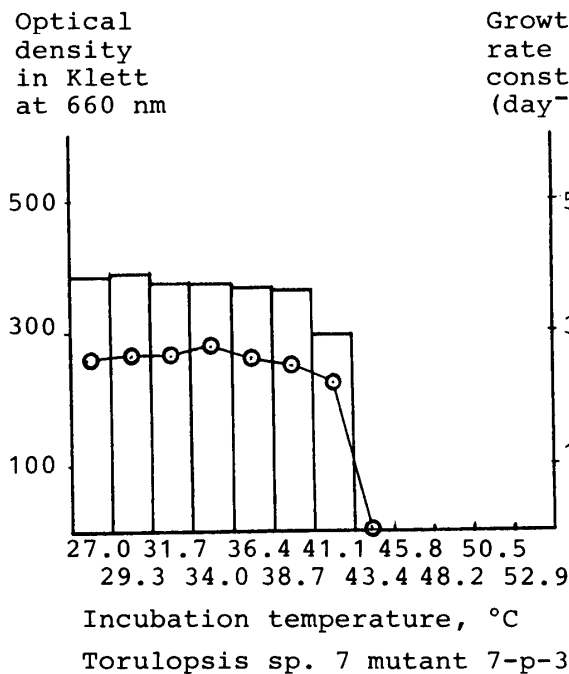
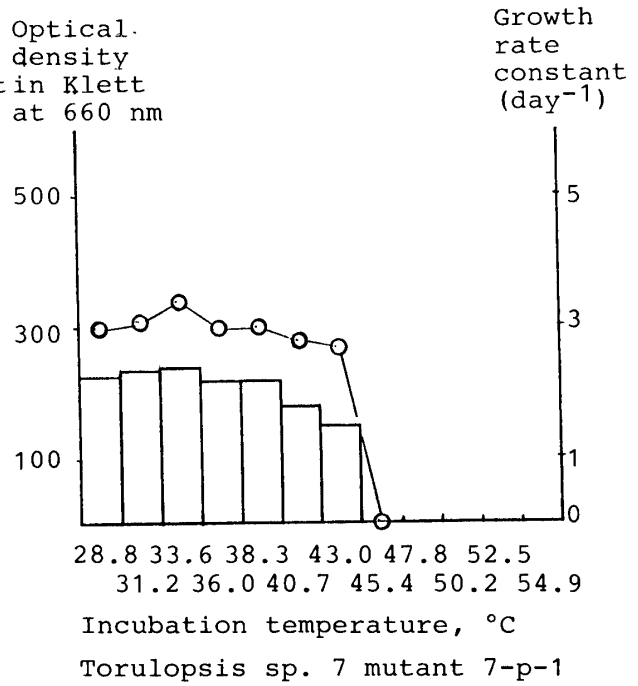
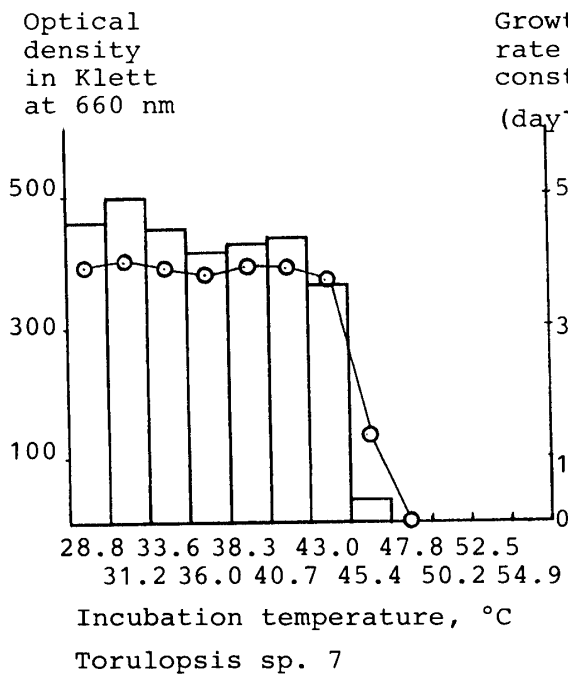


Fig. 3. Growth-temperature-range and growth-rate-constant of the respiration-deficient mutants of *Torulopsis* sp. 7.
 —○—○— : Growth rate constant.

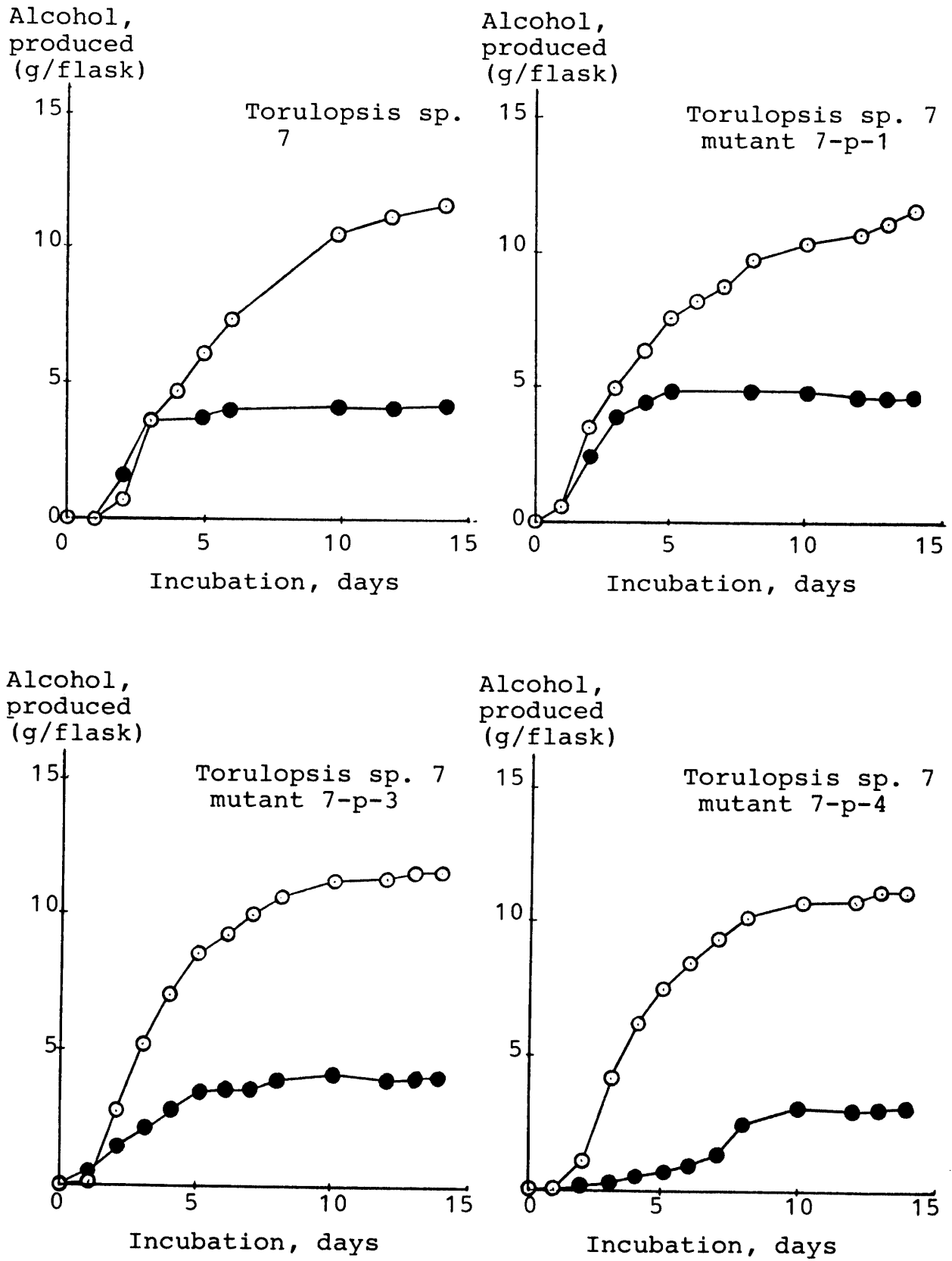


Fig. 4. Alcohol fermentation of the respiration-deficient mutants of *Torulopsis* sp. 7
 Incubation temperature : —○—○—, 24°C ; —●—●—, 37°C.

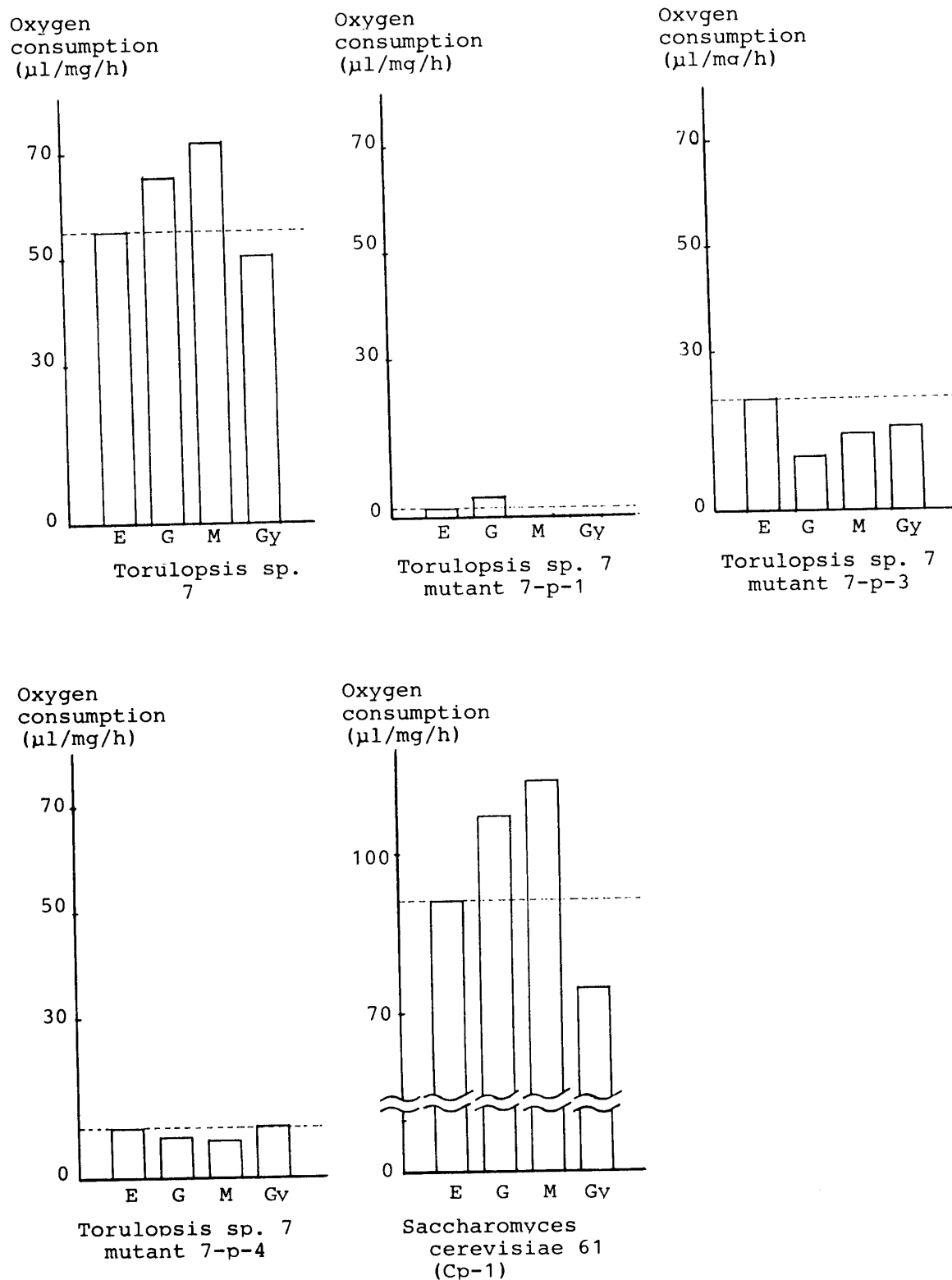


Fig. 5. Oxygen consumption of the respiration-deficient mutants of *Torulopsis sp. 7*.
 E : Endogenous respiration.
 G : Substrate respiration for glucose.
 M : Substrate respiration for maltose.
 Gy : Substrate respiration for glycerin.

し、呼吸能の結果とともに部分的呼吸欠損であることをさらに裏づけている。なお、生育温度範囲については 7-p-1 株は原株と同じで、この変異が温度的性質には特別な影響を与えていないことを示している。

次に、発酵力については Fig. 4 に示した。原株は元来、発酵力の高い株ではないが、呼吸欠損変異株の 7-p-1 株もほぼ同じ程度であったので、呼吸欠損変異は発酵力にも影響がなかったものと考えられる。

プロトプラスト形成については原株 *Tor. sp. 7* はそのままでは Fig. 2 に示すように Zymolyase で細胞壁は溶解しない。また、M. SŁPICKI と L. FERENCZY らの方法²⁾を参考に Zymolyase の作用を受けやすくするため、さらに 2-D-deoxyglucose を含む培地で 30℃ 1 時間培養したものを実験に使ったが、

ほとんど変化なく、プロトプラストの形成は認められなかった。しかし、結果として、呼吸欠損変異株は部分的呼吸欠損変異株 7-p-3 および 7-p-4 を含め、Fig. 6 に示すように非常に良好なプロトプラスト形成を示した。したがって、今回の呼吸欠損変異にともない、現象的には Zymolyase の作用を受けやすくなることが明らかである。通常、acriflavin 存在下培養したこうばはミトコンドリア-DNA を欠損すると報告されているが、この実験では、呼吸欠損変異株にミトコンドリアが存在するかどうかを確かめていない。この点、今後の検討課題となるが、acriflavin 処理で、Zymolyase の作用を受けやすくなる変異がおりやすい変異であることは確かめられたものと思う。

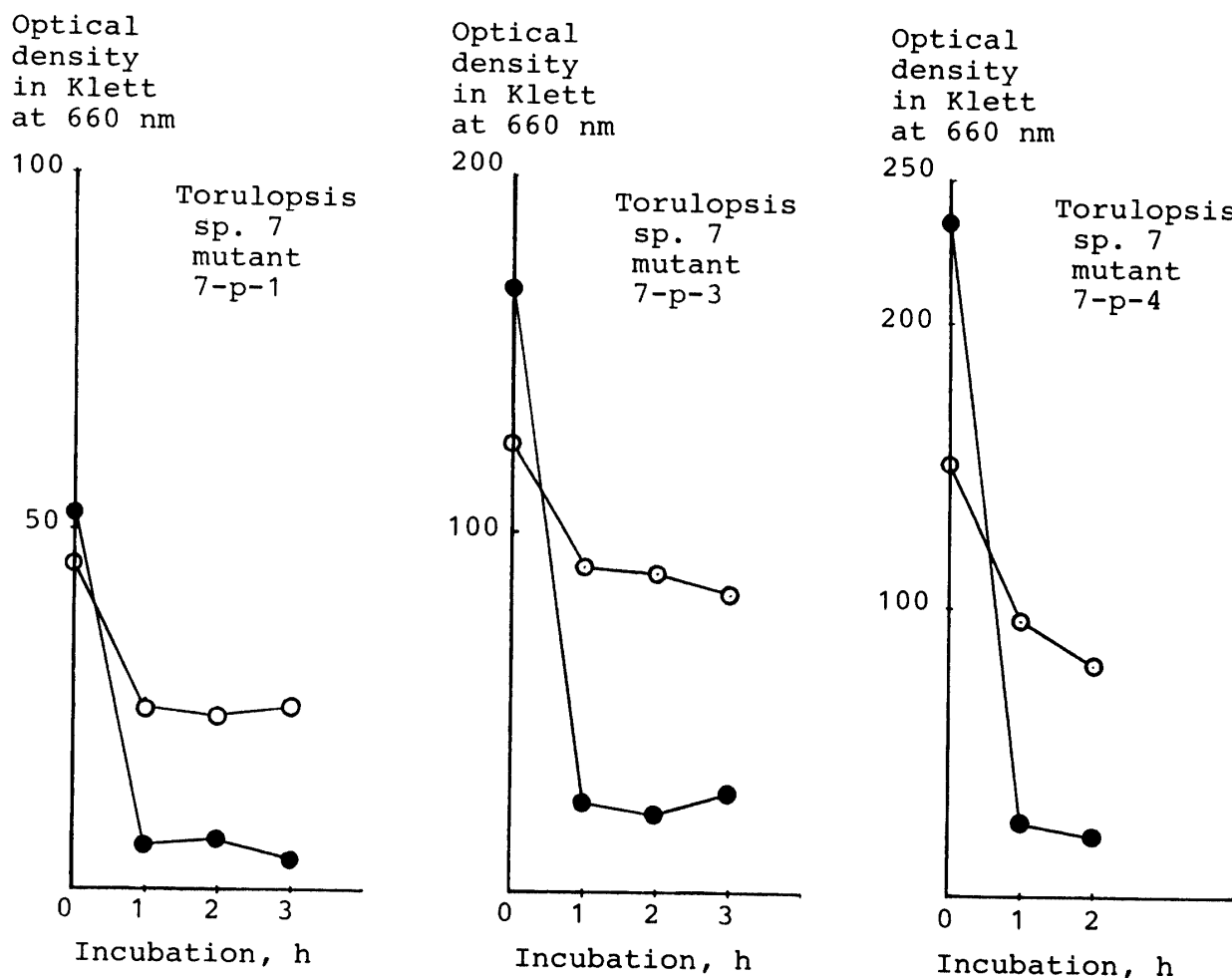


Fig. 6. Protoplast formation of the respiration-deficient mutants of *Torulopsis sp. 7*.
 ○—○—: Optical density of the suspension of yeast, treated with Zymolyase, in the SET medium.
 ●—●—: Optical density of the suspension of yeast, treated with Zymolyase, in the distilled water.

要 約

細胞融合によって、アルコール発酵適温が、または生育温度上限がより高いこうぼを育種するため、その素材として、焼酎こうぼ、フィリピンのタプイこうぼなどのプロトプラスト形成を検討した。プロトプラストの形成には β -mercaptoethanol で処理したのち、Zymolyase 20T を作用させる方法で検討した。焼酎こうぼ、清酒こうぼ、コンピエーニュ工科大学こうぼはすべて *Saccharomyces cerevisiae*, また、タプイこうぼは12株中5株が *Sacch. cerevisiae* で、これらはいずれもこの方法でプロトプラストをよく形成した。一方、タプイこうぼで生育温度上限がより高い *Torulopsis* sp. 7 はこの方法ではプロトプラストの形成はまったく認められなかった。

この *Torulopsis* sp. 7 を細胞融合の際の遺伝子源として用いるために、呼吸欠損変異株を acriflavin 処理で得た。呼吸欠損変異株はそれぞれ呼吸欠損の程度に差があったが、発酵力、温度的性質については原株と差がなく、acriflavin 処理では変異を受けなかった。*Torulopsis* sp. 7 の呼吸欠損変異株は、呼吸欠損の程度とは関係なく、前記のプロトプラスト調製法でいずれもプロトプラストの形成が容易であった。

謝辞 本研究において使用した Zymolyase 20T は麒麟麦酒株式会社麦酒科学研究所長 井上 喬氏より御提供いただいたこと、ここに記し、深く謝意を表す。

文 献

- 1) 永井 進：呼吸欠損酵母菌—作り方と検出法—。蛋白質・核酸・酵母, **12** (6), 506—513 (1967)
- 2) Sipiczki, M. and Ferenczy, L. : Protoplast Fusion of *Schizosaccharomyces pombe* Auxotrophic Mutants of Identical Mating-Type. *Molec. gen. Genet.*, **151**, 77—81 (1977)
- 3) 田邊幾之助・二石真智子・迫間敬子・有川順子：旧式焼酎(米麴生白糠仕込)醸造における酒母・醪中の乳酸菌について。鹿大農学術報告, No. **33**, 47—52 (1983)
- 4) 田邊幾之助・今村光宏・当 直樹：微細藻バイオマスから凝集沈殿法によって活性汚泥をつくる試み。I. 微細藻バイオマスの培養と凝集沈殿による活性フロック形成について。II. 活性フロックによる連続処理実験。用水と廃水, **28** (7), 691—699 (I); **28** (9), 903—908 (II) (1986)
- 5) 田邊幾之助・金丸 芳：旧式焼酎の高酸度醪のモダル実験について。鹿大農学術報告, No. **36**, 99—109 (1986)
- 6) Tanabe, I. and Tago, Y. : Alcohol Fermentation for the Securing of Energy Resources and Single Cell Protein Production. *Report of Overseas Visits*, NODAI Research Institute, TUA, April 1982—March 1983, 40—64 (1983)
- 7) Yamamoto, M. and Fukui, S. : Fusion of Yeast Protoplasts. *Agr. Biol. Chem.*, **41** (9), 1829—1830 (1977)

Summary

Protoplast-formations of Shôchû-yeasts, Philippine-tapuy-yeasts and other alcohol yeasts were investigated in order to breed a yeast of higher optimum-temperature of alcohol-fermentation, or of higher growth-temperature by making use of the cell-fusion technique. Protoplast-formation was carried out, following the general method : yeast-cells, treated with β -mercaptoethanol, were reacted with Zymolyase 20T (Kirin Beer Co., Ltd.) in a certain hypoosmotic solution. Shôchû-yeasts, Sake-yeast, UTC (Université de Technologie de Compiègne)-yeasts and 5 of 12 tapuy-yeast-strains all belong to *Saccharomyces cerevisiae*, and their facile production of protoplasts by this method observed. *Torulopsis* sp. 7, tapuy-yeast of higher growth-temperature would not become protoplast by this method.

In order to use *Torulopsis* sp. 7 as gene source in the cell fusion, its respiration-deficient mutants were obtained by the treatment with acriflavin. They vary in degree of respiration-deficiency, but they are in possession of the same fermentation-ability and growth-temperature-range as *Torulopsis* sp. 7 is. These properties did not seem mutated by the treatment with acriflavin. The respiration-deficient mutants of *Torulopsis* sp. 7 produced protoplasts easily by the general method, independent of the degree of their respiration-deficiency.