

# 薬剤耐性を利用した特徴ある清酒酵母変異株の選抜手法の検討

Investigation on Selection Techniques for Characteristic Sake Yeast Mutants utilizing Drug Resistance

西尾 昭

Akira Nishio

電子・有機素材研究所

変異処理後の薬剤耐性を利用した酢酸イソアミル高生産酵母の取得を目的に条件検討を行った。その結果、有効な薬剤と変異処理時間の組合せを見出すことができた。薬剤としては、カナバニン、オーレオバシジンAを用いた時に目的とする高生産株を取得することができた。

## 1. はじめに

県内酒造会社から特徴ある酵母開発の要望は高く、現在も継続して取り組んでいるところであるが、新たに、バナナ様の香りである酢酸イソアミル高生産酵母開発の要望が寄せられ育種を検討することとした。酵母の育種方法として、優良な性質を掛け合わせる交雑法と突然変異を起こさせる変異法があるが、今回は特徴ある親株がないため変異法で行うこととした。

変異処理を利用した酢酸イソアミル高生産酵母の育種法では、薬剤耐性を利用した方法がいくつか報告されているが<sup>1)~4)</sup>、今回用いる親株にどの方法が適しているか不明であった。また、変異条件も、目的とする性質が得られると同時に発酵能が劣るなど本来有する優良な性質が損なわれないような最適条件を見つける必要があった。

そこで本研究は、薬剤耐性を利用して最適な酢酸イソアミル高生産酵母の選抜手法を見出すことを目的に行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 使用菌株

酵母は、清酒酵母協会 901 号（以下、K901）を使用した。

### 2.2 使用薬剤

変異処理には、エチルメタンスルホン酸（以下、EMS、Sigma 社製）を使用した。耐性薬剤には、カナバニン（Sigma 社製）、オーレオバシジンA（TaKaRa 社製）、プレグネノロン（Sigma 社製）、ハイグロマイシンB（和光純薬製）を使用した。

### 2.3 変異処理

変異処理は常法どおり行った。すなわち、K901をYPD 液体培地 5ml（1%酵母エキス、2%ポリペプトン、2%グルコース）中、30℃で一晩振とう培養後、菌体を集菌し、滅菌水 5ml で洗浄した。その後、0.1M リン酸バッファー（pH7.0）に懸濁させ、EMS 0.15ml（濃度 3%）を加え、30℃で穏やかに振とうさせ変異処理を行った。処理時間は、0 分（無処理）、30 分、40 分、60 分で行った。処理後、菌体を集菌し、5%チオ硫酸ナトリウム 5ml で洗浄し、さらに滅菌水 5ml で 2 回洗浄した。

### 2.4 変異株の選択

#### 2.4.1 カナバニン耐性変異株

秋田の方法<sup>1)</sup>に従って行った。すなわち、滅菌水で洗浄した酵母菌体に 5ml の滅菌水を加えて懸濁し、10ppm カナバニンプレート（0.67%イーストナイトロジェンベース w/o アミノ酸、2%グルコース、10ppm L-カナバニン、2%寒天）に 100  $\mu$ L 塗布した。25℃で 5~7 日培養し、生育したコロニーを耐性株と

して選抜した。

#### 2.4.2 オーレオバシジンA耐性変異株

大原らの方法<sup>2)</sup>に従って行った。すなわち、変異処理後、滅菌水で洗浄した酵母菌体に YPD 液体培地 5ml を加えて懸濁し、オーレオバシジンAプレート (1%酵母エキス、2%ポリペプトン、2%グルコース、1ppm オーレオバシジンA、2%寒天) に 100 $\mu$ L 塗布した。30°Cで5~7日培養し、生育したコロニーを耐性株として選抜した。

#### 2.4.3 プレグネノロン耐性変異株

堤らの方法<sup>3)</sup>に従って行った。すなわち、変異処理後、滅菌水で洗浄した酵母菌体に YPD 液体培地 5ml を加えて懸濁し、プレグネノロンプレート (0.67%イーストナイトロジェンベース、2%グリセロール、15ppm プレグネノロン、2%寒天) に 100 $\mu$ L 塗布した。30°Cで5~7日培養し、生育したコロニーを耐性株として選抜した。

#### 2.4.4 ハイグロマイシンB耐性変異株

井上らの方法<sup>4)</sup>に従って行った。すなわち、変異処理後、滅菌水で洗浄した酵母菌体に YPD 液体培地 5ml を加えて懸濁し、ハイグロマイシンBプレート (1%酵母エキス、2%ポリペプトン、2%グリセロール、500ppm ハイグロマイシンB、2%寒天) に 100 $\mu$ L 塗布した。30°Cで5~7日培養し、生育したコロニーを耐性株として選抜した。

### 2.5 発酵試験

麴汁培地 (pH5、Brix10) 30ml を 50ml 遠心チューブに分注し、オートクレーブ後、乾燥麴 (1-60) 10g と酵母 2ml (麴汁培地で2日間前培養) を添加し、15°Cで2週間発酵させた。発酵終了後、遠心分離 (4,000rpm、10分) を行いアルコール分および香り成分を分析した。

### 2.6 小仕込み試験

総米 130g の小仕込み試験を、次の仕込配合 ( $\alpha$ 米 (AA60) 100g、乾燥麴 (1-60) 30g、90%乳酸 0.2ml、水 225ml、酵母 10ml) により 15°Cで行った。発酵終了後、遠心分離 (5,000rpm、20分) を行い、成分分析に供した。

### 2.7 分析方法

酸度、アミノ酸度は国税庁所定分析法注解<sup>5)</sup>に従い、還元糖はフェーリング法により分析した。

アルコール分、日本酒度は振動式密度計 (DA-105、京都電子工業製) を使用して測定した。

香り成分はガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS-QP2010plus、島津製作所製) を使用し、ヘッドスペース法により分析した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 変異処理条件の検討

耐性薬剤には、カナバニン、オーレオバシジンA、プレグネノロン及びハイグロマイシンBを使用した。これらはオフフレーバーであるイソアミルアルコールの生成が少なく、酢酸イソアミル/イソアミルアルコールの濃度比率 (E/A比) が高い酵母の選抜が期待されるものである。

各薬剤プレートでの各処理時間における大きなコロニーの出現数を示す (表1)。

表1 各薬剤プレートにおける出現コロニー数 (個/4プレート)

薬剤	濃度	変異処理時間(分)			
		0(無処理)	30	45	60
カナバニン	10 ppm	32	-	-	-
オーレオバシジンA	1 ppm	0	10	6	0
プレグネノロン	15 ppm	0	0	0	0
ハイグロマイシンB	500 ppm	0	0	0	0

カナバニンは、EMS処理無し (0分) で耐性株が出現したことから、その後のEMS処理は行わなかった。その他の薬剤についてはEMS処理を行い、オーレオバシジンAは、30分および45分処理した時にコロニーが出現した。プレグネノロン、ハイグロマイシンBは条件を変えて数回実験を行ったが、今回の条件では耐性株の取得はできなかった。

### 3.2 カナバニン耐性変異株

出現した32コロニーを70ppmカナバニンプレートに接種し、25°Cで1週間培養し、生育してきた15株を選抜した。その15株を再度70ppmカナバニンプレートに接種、培養し、生育が良好な4株 (No.3、20、26、30) を選抜した。

選抜した4株を発酵試験に供した結果、アルコール発酵が盛んで、酢酸イソアミル生成が良好な2株（No.3、20）が得られ（データ非掲載）、小仕込み試験に供した。

小仕込み試験の結果、アルコール生成能は親株と同等で、酢酸イソアミル、E/A比が親株の1.7倍高い1株（No.20）を選抜した（表2）。

表2 カナバニン耐性株による小仕込製成酒の分析結果

	901(親株)	No.3	No.20
エタノール(%)	18.7	18.7	18.3
日本酒度	-7.7	-7.3	-10.1
酸度(ml)	2.80	2.80	3.00
アミノ酸度(ml)	1.55	1.60	1.45
イソアミルアルコール	1	1.04	1.06
酢酸イソアミル	1	1.06	1.77
E/A比	1	1.02	1.67

※イソアミルアルコール、酢酸イソアミル、E/A比は、901(親株)を1として表示

### 3.3 オーレオバシジンA耐性変異株

出現した16コロニー（変異処理時間30分10コロニー、45分6コロニー）を再度オーレオバシジンAプレートに接種し、生育してきた9株（30分6株、45分3株）を選抜した。

選抜した9株を発酵試験に供した結果、アルコール生成の良好な5株が得られ、香気分析を行った。それらのうち酢酸イソアミル生成が良好な2株（No.30-2、30-8）を選抜し（データ非掲載）、小仕込み試験に供した。

小仕込み試験の結果、アルコール生成能は親株とほぼ同等で、酢酸イソアミル、E/A比が親株の1.3~1.4倍高い1株（No.30-2）を選抜した（表3）。

表3 オーレオバシジンA耐性株による小仕込製成酒の分析結果

	901(親株)	No.30-2	No.30-8
エタノール(%)	18.9	17.9	18.6
日本酒度	-0.5	-10.2	-3.0
酸度(ml)	2.90	3.15	3.30
アミノ酸度(ml)	1.65	1.65	1.75
イソアミルアルコール	1	0.91	0.82
酢酸イソアミル	1	1.28	1.07
E/A比	1	1.41	1.31

※イソアミルアルコール、酢酸イソアミル、E/A比は、901(親株)を1として表示

## 4. おわりに

変異処理後の薬剤耐性を利用した酢酸イソアミル高生産酵母の取得を目的に条件検討を行った。その結果、有効な薬剤と変異処理時間の組合せを見出すことができた。薬剤としては、カナバニン、オーレオバシジンAを用いた時に目的とする高生産株を取得することができた。

今後、スケールアップした試験醸造を行い、選抜した酵母の酢酸イソアミル高生産能を確認する予定である。

## 文献

- 1) 秋田修；カナバニン耐性を利用した優良酵母取得法，醸協，84，p.96-99（1989）
- 2) Toshinari Takahashi, Yusuke Ohara, Michiyo Sawatari, and Kazuo Sueno.; Journal of Bioscience and Bioengineering, 123, p.71-77（2017）
- 3) 堤浩子；特開2002-191355
- 4) 井上豊久；特開2007-89455
- 5) 第四回改正国税庁所定分析法注解（1993）