

〔生物工学会誌 第73巻 第3号 207-211. 1995〕

ノ ー ト

清酒酵母協会 7 号の温度感受性自己消化変異株の分離

後藤 邦康^{1*}・星野 徹也²東京国税局課税第二部鑑定官室,¹ 千葉県工業試験場醸造課²¹〒100 東京都千代田区大手町1-3-2²〒264 千葉市若葉区加曽利町889

(平成 6 年 5 月 16 日 受付 平成 7 年 1 月 21 日 受理)

Isolation of a Temperature-Sensitive Autolysis Mutant from Sake Yeast
Kyokai No. 7 —Note—KUNIYASU GOTO^{1*} and TETSUYA HOSHINO² (*Office of Brewing Technology, Tokyo Regional Taxation Bureau, 1-3-2 Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100*¹; *Industrial Research Institute of Chiba Prefecture, 889 Kasori-cho, Wakaba-ku, Chiba 264*²) *Seibutsu-kogaku* 73: 207-211, 1995.

Temperature-sensitive autolysis mutants were isolated from a sake yeast, strain (Kyokai No. 7) of *Saccharomyces cerevisiae*, which is thought to be diploid. Isolation was performed by positive selection using a medium on which 2-deoxy-galactose-resistant mutants were able to grow. Yeast cells (1×10^8) were spread on a 2-deoxy-galactose plate, and about 100 colonies were isolated after incubation for 5 d at 25°C. About 1% of the mutants from the isolated colonies were deficient in assimilating galactose, and these included temperature-sensitive autolysis mutants at a high frequency (about 50%). In test brewing of sake, one isolate, strain gal-31, had the same fermentation activity as Kyokai No. 7, and the sake produced from gal-31 had a satisfactory quality when compared with that made from Kyokai No. 7. The resultant sake cake was stored at 37°C to determine the concentrations of alkaline phosphatase and *S*-adenosylmethionine, which were used to indicate the extent of yeast cell autolysis. The concentrations in the sake cake from strain gal-31 increased rapidly on storage at 37°C, supposedly because autolysis in the mutant cells in the cake was progressing. These results supported the probability that storing sake cake made from temperature-sensitive autolysis mutants at a higher non-permissive temperature has a positive effect on the ripeness.

[Key words: sake yeast, temperature-sensitive autolysis mutant, 2-deoxy-galactose resistant, sake cake]

清酒中の主要な副産物である清酒粕は、年により変動はあるものの3年間平均で生産量を見た場合、昭和59~61年で8.7万t(増醸酒以外のもの7.5万t,以下同じ)、昭和62~平成元年で10.1万t(9.2万t)、平成2~4年で9.7万t(9.2万t)製造されている。¹⁾近年その生産量は全体的にも、清酒の多様化・高品位化にともなう増醸酒以外の製品価値の高い酒粕についても増加傾向にある。その用途としては野菜や魚介類の塩蔵品の漬

物に広く利用されている。

これらの粕漬が独特の風味を醸すためには、使用する酒粕が十分に熟成(100日以上)しなければならない。熟成の初期に酵母は死滅するが、この工程が完全に終了するまで通常25日前後必要である。^{2,3)}酵母の死滅にともなう自己消化は、菌体内プロテアーゼによって細胞壁が部分的に破壊されることにより起こり、その結果、種々の加水分解酵素を含む内容物が漏出する。^{4,5)}このような酵母の死滅にともなう自己消化は、酒粕の熟成にもっとも重要な役割を果たしている。

* 連絡先, Corresponding author.

酒粕の熟成期間を短縮するために、北村ら⁶⁾は増殖に関する温度感受性株を分離し、その中から温度感受性自己消化変異株を取得した。この変異株を使用して清酒醸造を行い、製成した酒粕を非許容温度(37°C)に貯蔵したところ、熟成期間の短縮化が見られた。しかし、彼らが変異株取得に使用した親株は通常の清酒酵母と比較して、発酵速度が遅く、製成酒のアルコール濃度および香味などに従来の清酒に劣る欠点があった。そこで、清酒醸造でもっとも広範に使用されている清酒酵母協会7号(K-7株)から、自己消化変異株を直接分離することを計画した。しかし、K-7株は一般に二倍体と考えられており、⁷⁾直接変異株を取得できる確率は一倍体よりも低いため、通常の方法では目的の変異株を得ることは困難と考えられる。いままでにK-7株の変異株分離にはナイスタチン濃縮、⁸⁾種々のアミノ酸アナログ⁹⁻¹²⁾や核酸アナログ¹³⁾などの薬剤耐性によるポジティブ選択法などが適用されているが、現在まで、自己消化性に関する変異株は分離されていない。我々は、ガラクトースのアナログである2-デオキシガラクトース(2-DG)を用いたポジティブ選択法¹⁴⁾により分離したK-7株の2-DG耐性株中に、高温で自己消化を示す株が高頻度に含まれていることを見だし、その分離株の利用について検討を加えたので報告する。

親株であるK-7株をYNBD培地(0.67% Yeast Nitrogen Base, 2% グルコース)で30°C, 2日間振とう培養した洗浄菌体を1シャーレあたり 10^8 cells程度になるように2-DG寒天培地(0.67% Yeast Nitrogen Base, 3% グリセロール, 0.02% 2-DG, 2% 寒天)に塗布し、25°C, 5日間培養すると、 10^{-6} の頻度でコロニーが出現した。これらのコロニーの一部を2枚のYNBD寒天培地(YNBD培地に2%寒天を添加)およびYNBGal寒天培地(YNBD寒天培地のグルコースをガラクトースに変更)に移植した。YNBD寒天培地の1枚は37°C, 他は25°Cで3日間培養し、ガラクトース資化能および増殖に与える温度の影響を試験した。その結果、2-DG耐性株の約1%はガラクトースを資化できなかった。分離したガラクトース非資化株8株のうち、4株は37°Cで増殖できない温度感受性変異株であった。この4株について、2-DG寒天培地での培養を8回繰り返して形質の安定化を行った。

アルカリフォスファターゼ活性を指標として自己消化検出試験⁶⁾を行ったところ、37°C条件下で4株すべてが自己消化性を示した。この温度感受性自己消化

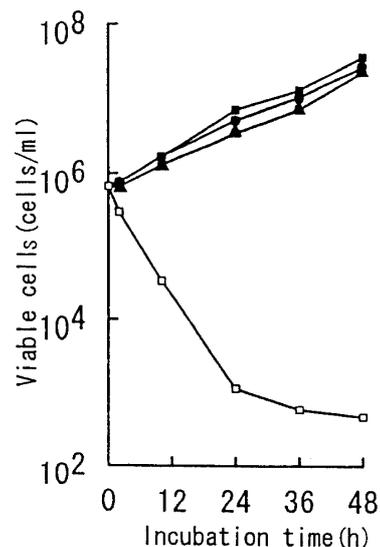


Fig. 1. Number of the viable cells of mutant (gal-31) and parent (K-7) strains in YNBD-medium at 25°C and 37°C. Both strains were precultivated at 25°C for 3 d. Cultures were inoculated at 6×10^6 cells/ml. Viable cell counts were made by the plate-counting technique. Symbols: ■, gal-31 at 25°C; ●, K-7 at 25°C; □, gal-31 at 37°C; ▲, K-7 at 37°C.

変異株の出現頻度は、北村らの増殖に関する温度感受性株48株から自己消化性のものが4株見いだされた頻度に比べ、有為に高かった。これらの取得した4株の糖資化能およびTTC染色性¹⁵⁾などは、親株と同じであったので、そのうち1株(gal-31株)を、以下のようない実験に供した。

まず最初に、25°Cと37°Cで培養したときの生菌数の変化を測定した(Fig. 1)。25°Cにおいて、gal-31株とK-7株は同程度の生菌数を示した。一方、非許容温度である37°Cにおいて、gal-31株の培養48時間後の生菌数は接種時の0.08%以下に低下していることから、増殖の停止だけでなく、菌体の死滅も同時に起こっていた。

そこで、菌体の死滅ともなう自己消化が起こっているかどうかを確認するために、非許容温度におけるアルカリフォスファターゼ¹⁶⁾とプロテアーゼ¹⁷⁾の両活性の変化について調べた(Table 1)。YPD培地(1%酵母エキス, 2%ポリペプトン, 2%グルコース)で25°C, 3日間培養した定常期の菌体を25°Cもしくは37°Cに移した。12, 48時間後に、懸濁培養液の一部を遠心分離(775×g, 10分間)し、上清を分析試料とした。遠心分離後の菌体は約 2×10^8 cells/mlになるように0.1 M 酢酸緩衝液(pH 6.7)で懸濁した。この菌体懸濁液0.5 mlに0.5 mm径ガラスビーズ1 gを添

Table 1. Time courses of enzyme activities after heat treatment of strains gal-31 and K-7.

[Alkaline phosphatase] (units/mg of wet yeast cells)

(h)	25°C				37°C			
	Intracellular		Extracellular		Intracellular		Extracellular	
	gal-31	K-7	gal-31	K-7	gal-31	K-7	gal-31	K-7
0	42.8	55.2	12.8	2.5	42.8	55.2	12.8	2.5
12	58.2	58.0	5.0	6.0	20.9	56.8	31.1	10.7
48	54.6	58.2	3.1	1.6	2.8	39.5	43.7	6.3

[Protease] (units/g of wet yeast cells)

(h)	25°C				37°C			
	Intracellular		Extracellular		Intracellular		Extracellular	
	gal-31	K-7	gal-31	K-7	gal-31	K-7	gal-31	K-7
0	7.4	10.6	1.0	3.7	10.6	7.4	1.0	3.7
12	42.0	10.4	5.0	2.7	19.2	59.2	4.3	6.6
48	33.5	21.8	17.5	1.0	30.3	84.1	29.6	20.2

加し, Mini Bead Beater (Biospec Products Co. Ltd.) で細胞破碎(1分間, 3回繰り返し)後, 遠心分離(20,000×g, 10分間)した上清を試料とした. 両試料ともに0.45 μmのフィルターでろ過後, 酵素活性を測定した.

アルカリフォスファターゼ活性は, gal-31株における活性の菌体内外の分布が48時間後に逆転したが, K-7株ではほとんど変化しなかった. プロテアーゼ活性は両株ともに菌体内活性が上昇したが, gal-31株に

おいて特に著しく, 48時間後には25°C保存時の2.5倍に達した. 37°C処理によりアルカリフォスファターゼ活性は菌体外に溶出し, プロテアーゼ活性は上昇することから, gal-31株の死滅にともなう自己消化が非許容温度への移行により速やかに進行すると考えられた.

gal-31株とK-7株の増殖速度に及ぼす培養温度の影響について調べた(Fig. 2). gal-31株の増殖速度は27°C付近で最大になり, 30°C以上ではやや低下し始め, 37°Cでは増殖しなかった. なお, K-7株では32°Cが最適増殖温度であった. 両株とも22°Cから27°Cまではほぼ同等の増殖速度を示したが, gal-31株では17°C以下で低下し, 低温下における発酵が遅れるものと予想された.

次に, 発酵試験培地(1%酵母エキス, 1%ポリペプトン, 10%グルコース, 以下YP10D培地)100 mlに 1×10^6 もしくは 1×10^8 cells/mlになるように菌体を植菌し, 種々の温度における発酵経過(炭酸ガス減量で測定)について調べた(Table 2). 初発菌体数が少ない場合, 予想どおりgal-31株は低温下での発酵の遅延が認められたが, 25°C以上ではK-7株と変わらなかった. しかし, 菌体が増殖した状態に相当する 1×10^8 cells/ml添加区では22°C以下の低温域においても, 両株の差異はほとんど認められなかった. 以上の結果から, gal-31株を使用した発酵の場合, 酵母菌

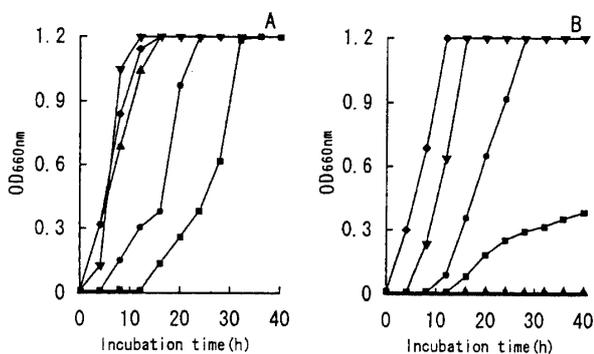


Fig. 2. Effect of temperature on growth of strains gal-31 (B) and K-7 (A). Both strains were precultivated at 25°C until they entered the log phase. Cultures were inoculated at 1×10^6 cells/ml. Cell densities were measured by the turbidity at 660 nm. Symbols: ■, Incubated at 17°C; ●, 22°C; ◆, 27°C; ▼, 32°C; ▲, 37°C.

Table 2. Effects of temperature and inoculum size on fermentation ratio with strains K-7 and gal-31.

[Inoculated to 10 ⁸ /ml]								
Incubation time	gal-31				K-7			
	15°C	20°C	25°C	30°C	15°C	20°C	25°C	30°C
2 d	2.30	3.32	4.15	3.87	2.57	3.55	4.02	4.23
5 d	3.95	3.95	4.23	4.10	3.85	3.85	4.23	4.15

[Inoculated to 10 ⁶ /ml]								
Incubation time	gal-31				K-7			
	15°C	20°C	25°C	30°C	15°C	20°C	25°C	30°C
2 d	0.41	0.91	3.59	3.11	1.59	2.32	3.23	3.43
5 d	2.51	3.90	4.13	4.06	3.77	3.90	4.15	4.10

The fermentation ratio is indicated as CO₂ evolution (g) from 100 ml YP10D-medium.

体の増殖期に 20°C 以上の高温条件を設定することにより、従来と同様な発酵工程を設定できるものと考えられた。

そこで、難波らの方法¹⁸⁾に基づき、総米 150 g の清酒小仕込試験を行った。初添時に酵母を 10⁷ cells/ml になるよう添加し、留め後 5 日目まで品温を 20°C においた後、15°C 一定のいわゆる前急型仕込を行った。gal-31 株および K-7 株使用醪ともに、発酵経過に差はなく、留め後 15 日目に炭酸ガス減量から見てほぼ発酵を終了し、上槽を行った。製成酒の成分を Table 3 に示したが、両製成酒成分には大きな差はなかった。なお、留め後から 15°C 一定にした試験区分では、gal-31 株使用醪は発酵経過が緩慢になる傾向を示し、発酵試験から予測された酵母増殖遅延による影響が認められた。この醪に関しては末期の菌体密度も他の試験区の半分程度 (0.9 × 10⁸/g-醪) であり、製成酒成分もアルコール濃度の低下と日本酒度の切れの悪さが認め

られた。

さらに、高温貯蔵中の酒粕で酵母の自己消化を確認するため、25°C もしくは 37°C に貯蔵した酒粕中の、アルカリフォスファターゼ活性および酵母が清酒醪後半に液胞内に蓄積する S-adenosylmethionine (SAM)^{19,20)} の溶出量を経時的に測定した。5.0 g の製成粕を 10 ml 蒸留水に懸濁し、4°C で 12 時間抽出後、蒸留水で 25 ml にメスアップし、12,000 × g、20 分の遠心により固液分離を行った。上清を 0.45 μm フィルターによりろ過後、分析試料とした。なお、SAM 量の測定は後藤らの方法²⁰⁾に基づき分析した。

酒粕中に溶出するアルカリフォスファターゼ活性は 25°C および K-7 株使用の 37°C 区分では貯蔵後 48 時間まで、20~30 u/g-粕のレベルであった。一方、gal-31 株使用、37°C 貯蔵粕の場合、12 時間後に約 50 u/g-粕で最大となり、以後 40 u/g-粕前後まで低下したものの、他の試験区に比べ高いレベルで推移した。

Table 3. Composition of sake made from *moromi* mashes of strains K-7 and gal-31.

	Acidity (ml)	Amino acidity (ml)	Sake-meter	Alcohol (% v/v)	Viable cells (/g of <i>moromi</i> mash)
[20→15°C]					
gal-31	3.0	2.6	+ 6.4	17.5	1.7 × 10 ⁸
K-7	3.2	2.5	+ 14.4	18.2	2.2 × 10 ⁸
[15°C (constant)]					
gal-31	4.3	2.9	- 10.4	15.0	0.9 × 10 ⁸
K-7	3.2	2.5	+ 12.4	18.2	2.0 × 10 ⁸

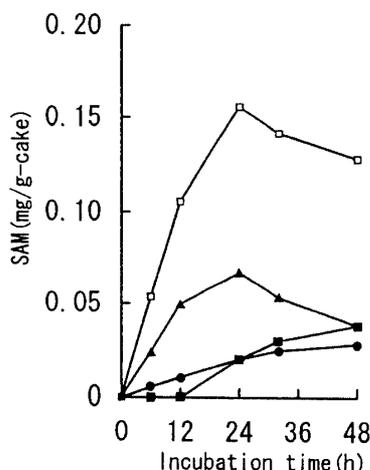


Fig. 3. Effect of storage temperature on elution of *S*-adenosylmethionine (SAM) from sake cake made from *moromi* mashes of strains gal-31 and K-7. Symbols are the same as in Fig. 1.

アルカリフォスファターゼ活性の変化は酵母からの溶出だけでなく、粕中のアルコールやタンパク質分解酵素の影響による活性の変動が起きているものと考えられた。SAM 溶出量は gal-31 株使用の 37°C 貯蔵後、6 時間程度から急速な増加が認められ、24 時間貯蔵において K-7 株使用酒粕の 3 倍程度の SAM の溶出があった (Fig. 3)。gal-31 株使用酒粕の 37°C 貯蔵により酵母の自己消化が速やかに起こることが確認でき、北村ら⁶⁾と同様な酵母内容物の溶出による酒粕熟成促進効果があるものと考えられた。以上の結果から、K-7 株の温度感受性自己消化株、gal-31 株を使用し K-7 株と同様な優良清酒醸造ができ、さらにその製成粕を高温貯蔵することにより早期熟成が可能であることが示唆された。

要 約

一般に二倍体と考えられている清酒酵母協会7号から、2-デオキシガラクトースとグリセロールを含む Yeast Nitrogen Base 培地に生育した耐性株より温度感受性自己消化株を分離した。酵母細胞を1プレートあたり 1×10^8 個になるよう2-デオキシガラクトース寒天培地に塗布し、25°C、5日培養で約100コロニーが出現した。出現コロニーのうち1%がガラクトース非資化株であり、その約半数が37°Cで自己消化を起こす株であることを見いだした。これらの変異株のうち1株、gal-31株を用い清酒醸造試験を行ったところ、発酵経過および製成酒の酒質について協会7号と同等

の結果が得られた。さらに、gal-31株を用いた製成酒粕を37°Cに貯蔵し、酵母の自己消化の進行を示す指標としてアルカリフォスファターゼ活性と *S*-adenosylmethionine 濃度経時的変化を測定した。変異株の自己消化の進行に伴うと考えられる酒粕中の両指標物質の活性および濃度の変化が急激に起こっていることが認められた。これらの結果より、温度感受性自己消化株を用いた清酒粕を高温貯蔵することで、その熟成期間を短縮できる可能性が示唆された。

本研究の遂行にあたり、ご指導とご高配を賜りました前国税庁醸造試験所所長西谷尚道博士および種々ご支援をいただきました安河内重人、川澤亨両氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 国税庁課税部酒税課：酒税通信第16号 (1993)。
- 2) 松本憲次，荒木次夫：醸協，57，426-434 (1962)。
- 3) 小嶋 操，中野芳明，山城敬一：醸酵工学，59，37-42 (1981)。
- 4) 永井 進編：酵母研究における方法論，p. 205，学会出版センター (1982)。
- 5) 新本洋士，新本美智枝，玉井洋一，高桑正義：農化，57，427-430 (1983)。
- 6) 北村秀文，佐藤俊一，下飯 仁，家藤治幸，佐伯宏，蓼沼 誠：醸協，86，605-609 (1991)。
- 7) Ouchi, K., Wickner, R. B., Toh-e, A. and Akiyama, H.: *J. Ferment. Technol.*, 57, 483-487 (1979)。
- 8) 大内弘造，下田雅彦，中村行善，小嶋弥之祐，西谷尚道：醸酵工学，61，349-352 (1983)。
- 9) 小田佳緒子，北本勝ひこ，高橋康次郎，吉沢 淑：醸協，83，614-617 (1988)。
- 10) Akita, O., Ida, T., Obata, T. and Hara, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, 69, 125-128 (1990)。
- 11) Ichikawa, E., Hosokawa, N., Hata, Y., Abe, Y., Suginami, K. and Imayasu, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2153-2154 (1991)。
- 12) Fukuda, K., Watanabe, M., Asano, K. and Ohta, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2445-2446 (1990)。
- 13) 小田佳緒子，北本勝ひこ，五味勝也，高橋康次郎：醸酵工学，68，399-403 (1990)。
- 14) Platt, T.: *Mol. Cell. Biol.*, 4, 994-996 (1984)。
- 15) 吉川敏郎，秋山裕一：農化，36，354-358 (1962)。
- 16) Schurr, A. and Yagil, E.: *J. Gen. Microbiol.*, 65, 291-303 (1971)。
- 17) Scott, J. H. and Schekman, R.: *J. Bacteriology*, 142, 414-423 (1980)。
- 18) 難波康之祐，小幡孝之，萱島 進，山崎与四郎，村上光彦，下田高久：醸協，73，295-300 (1978)。
- 19) Shizaki, S., Shimizu, S. and Yamada, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2293-2300 (1984)。
- 20) 後藤邦康，土肥和夫：醸協，87，230-234 (1992)。