

1P-176

清酒酵母のプロリン蓄積変異株の分離と醸造特性の解析

○大橋 正孝¹, 橋田 恵介², 渡辺 大輔², 高木 博史²
 (奈良県振興・バイオ・食品グループ, ²奈良先端大・バイオ)
 ohashi-masataka@office.pref.nara.lg.jp

【背景と目的】我々は清酒の消費低迷を打破するために、エタノールを高生産する清酒酵母の開発を目指している。高木らはこれまでに、プロリンがエタノールなどのストレスから酵母を保護することを見出し、セルフクローニング法で作製したプロリン蓄積清酒酵母が、親株に比べて良好な醸造特性を示すことを報告している。(JBB, 103, 377, 2007)。そこで、本研究では遺伝子組換え体を用いずに、従来の清酒酵母よりもプロリンを細胞内に蓄積し、かつエタノール耐性の高い変異株を分離した。また、得られた変異株を用いて小仕込み試験を行い、エタノール生産性をはじめとする醸造特性を解析した。

【方法及び結果】協会酵母 901 号を EMS 変異処理後、プロリンアナログのアセチジン-2-カルボン酸 (AZC) を含有する SD 寒天培地で生育できる株を分離した。次に各株を SD 液体培地で 2 日間培養後、細胞内のプロリン含量をアミノ酸アナライザーで測定し、親株よりも 5 倍以上蓄積した株を選抜した。さらに、寒天培地でのスポット試験によって、親株よりもエタノール耐性の高い 4 株を選抜した (プロリン含量は親株の 6.2 ~ 10.4 倍)。得られた 4 株を用いて、総米 200g の小仕込み試験を 15°C、一段仕込みで行った。毎日もろみ 1g を採取し、アルコメイトでエタノール濃度を測定したところ、4 株中 3 株は常に親株よりもエタノール濃度が高く、特に一番高い株は親株よりも 0.7% 程度上回った。

Isolation of Japanese sake mutants that accumulate proline and analysis of their fermentation profiles

○Masataka Ohashi¹, Keisuke Hashida², Daisuke Watanabe², Hiroshi Takagi²
 (¹Nara Pref. Inst. Ind. Dev., ²Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words Japanese sake yeast, proline accumulation, ethanol production

1P-178

嫌気環境移行時の醸造酵母の残存ミトコンドリア活性と脂肪酸不飽和化活性の競争的相互作用

○泉 知輝¹, 澤田 和敬³, Jayakody Lahiru. N.^{1,2}, 徳永 直也¹,
 枝植 圭介³, 北垣 浩志^{1,2}
 (¹佐賀大学, ²鹿児島大学, ³佐賀工技セ)
 ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

【目的・背景】アルコール発酵環境下においても酵母ミトコンドリアが醸造特性に重要な役割を持つことを我々は多数報告してきた。そこで本報告においては、好気環境から嫌気環境に移行させた時の酵母ミトコンドリア活性の変化及びその活性変化の他の物質代謝への影響について調べた。

【方法・結果】嫌気環境移行時のミトコンドリアの形態を調べた結果、焼酎酵母、実験室酵母がフィラメント状から断片状の形態に移行したのに対し清酒酵母はフィラメント状の形態を長く維持し、高い活性を保っていると考えられた。この結果から嫌気環境移行時には複数の経路で少ない酸素を競争的に消費していると仮説を立てた。この仮説が正しければミトコンドリア活性が強い醸造酵母では酸素を使う他の代謝経路の活性が低下するはずである。酸素消費の代表的な経路として脂肪酸の不飽和化がある。そこで同条件で醸造酵母の不飽和脂肪酸含量を解析した結果、清酒酵母では他の醸造酵母と比べ不飽和脂肪酸の含量が統計的に有意に低下していた。以上の結果から、嫌気環境移行時に酸素がミトコンドリアと他の物質代謝経路で競争的に使われ、この経路間のバランスに醸造酵母間で多様性があると考えられた。

Competition between mitochondria and unsaturation of fatty acid during anaerobiosis in brewery yeasts

○Kazuki Izumi¹, Kazutaka Sawada³, Lahiru. N. Jayakody^{1,2}, Naoya Tokunaga¹,
 Keisuke Tuge³, Hiroshi Kitagaki^{1,2}
 (¹Saga Univ., ²Kagoshima Univ., ³Saga Ind. Technol. Center)

Key words mitochondria, yeast, unsaturated fatty acid

1P-177

酢酸ナトリウム資化性を指標とした寡酸性酵母の新規育種方法の開発

○中瀬 舞, 西本 遼, 浅井 拓也, 山下 伸雄, 明石 貴裕
 (白鶴酒造)
 akashi@hakutsuru.co.jp

【目的】清酒中に存在する有機酸の大半は酵母により生産され、有機酸の量や組成は味に大きな影響を及ぼす。それらを変化させることで、バリエーションに富んだ清酒を醸造することが可能となる。しかし、発酵性を維持させつつ、有機酸の量を減少させる株を取得するのは容易ではなかった。そこで我々は、寡酸性酵母の新規育種技術の開発を試みた。

【方法・結果】清酒中の主な有機酸であり、過剰に存在するとエグ味につながるコハク酸の低減に着目した。コハク酸は TCA サイクル内の α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ $Kgd1$ によって大半が合成される。 $kgd1\Delta$ 株は酢酸ナトリウムを単一炭素源とした栄養豊富な培地 (YPA 培地) においては生育できることが報告されている。そこで酢酸ナトリウムを単一炭素源とした培地 (YPA 培地) で生育できない株をネガティブスクリーニングにより取得した。また、 $kgd1\Delta$ 株は酢酸ナトリウムを単一炭素源とした最小培地 (YNBA 培地) では生育可能であることから、二次スクリーニングとして YNBA 培地で生育可能な株を取得した。その結果、約半数の株において発酵性に影響は出ず、酸度およびコハク酸が低下した。さらに、YPA 培地・YNBA 培地における生育の違いにより異なる有機酸組成の株を取得できることも示唆された。これらのことから、本育種法を用いることにより、効率よく寡酸性酵母を取得できるだけでなく、異なる有機酸組成の株を選抜することが可能であることが明らかとなつた。

Development of the new screening method to identify yeasts with low acid productivity based on a sodium acetate-utilizing.

○Mai Nakase, Haruka Nishimoto, Takuya Asai, Nobuo Yamashita, Takahiro Akashi
 (Hakutsuru Sake Brewing Co. Ltd.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, sake

1P-179

清酒酵母ガラクトース代謝制御系の解析

○池永 裕¹, 富澤 佑貴¹, 彦久保 和也¹, 林 秀謙¹, 増渕 隆²,
 上山 修², 佐藤 勝也³, 鳴海 一成⁴
 (¹前橋工大・工・生工, ²群馬産技セ, ³原子力機構, ⁴東洋大・生命科)
 ikenaga@maebashi-it.ac.jp

【背景】清酒酵母にはガラクトースを代謝できない酵母のあることが知られており、その原因としてきょうかい 7 号のゲノム解析結果から、転写制御因子に存在する変異が原因ではないかと推定されている。酵母のガラクトース代謝は転写因子 $GAL4$ 、リブレサー $GAL80$ 、調節因子 $GAL3$ の 3 つの遺伝子で制御されているが、清酒酵母では、実験室酵母との比較から $GAL4$, $GAL3$ の両方に変異が入って翻訳が中断されており、そのどちらが原因かわからていなかった。¹ 我々は、清酒酵母きょうかい 901 号を親株に取得した変異株群 KAZE 酵母の網羅的発現解析を行ったが、ガラクトース代謝に重要な 3 つの遺伝子 ($GAL1$, $GAL2$, $GAL3$) の発現が大幅に上昇していることを見出した。

【目的と結果】原因解明のため群馬 KAZE 酵母の 3 つの代謝制御遺伝子の配列解析を行ったところ、 $GAL4$ の遺伝子にのみ変異が入って実験室酵母の $GAL4$ 遺伝子配列に戻っていることが確認された。YPD 培地のグルコースをガラクトースに変えて培養した結果、この変異により群馬 KAZE 酵母は、ガラクトース代謝能を回復していた。このような変異が現在清酒業界で利用されている各種きょうかい酵母にどの程度存在するかを調べたところ、いくつかの酵母に変異が存在し、変異とガラクトース代謝能は相関していた。本変異は発現形質と直接関連しており清酒酵母の分類・判別同定に資すると考えられる。

1) T. Akao et al., DNA R. 18, 423-434 (2011)

Analysis of sake yeast transcription system of galactose assimilating genes

○Hiroshi Ikenaga¹, Yuki Tomizawa¹, Kazuya Hikokubo¹, Hidenori Hayashi¹,
 Takashi Masubuchi², Osamu Kamiyama², Katsuya Satoh³, Issay Narumi⁴
 (¹Dept. Eng. Maebashi Inst. Technol., ²Gunma Ind. Technol. Center, ³JAEA, ⁴Fac. Life Sci., Toyo Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, sake yeast, GAL , mutation