

Killer factor をもつ 優良清酒酵母の造成

(醸試) ○大内弘造, 秋山裕一

1. 目的 清酒醸造では、永年の間に選抜された協会7号のような優良酵母が用いられているが、開放発酵であるために野生酵母の汚染をうけることがある。野生酵母によって汚染されたもろみは、発酵もにぶく、多酸性で、香気の乏しい形となり、生成酒の品質も低下するのが普通である。

1971年に今村ら¹⁾によって清酒酵母にも killer の存在が認められ、野生酵母の汚染に関して新たな問題が提起された。即ち、killer 酵母は sensitive 酵母を殺してしまうので、普通の野生酵母なら問題にならないような少数の侵入によっても、もろみが占領されるからである。現在使用されている優良酵母はみな、sensitive であり、killer の汚染に対して全く無防備であるので、何らかの対策が要求されるが、その1つは今村ら²⁾が協会7号から分離したように、killer に対する resistant mutant を利用することである。さらにより防御策としては killer 酵母を積極的に利用することである。即ち、killer は killer factor に対して免疫性があり³⁾、他の killer によって原則的に殺されることがないので、もしも killer で、しかもよい酒を造りうるような酵母があれば、野生 killer が侵入しても駆逐されることがないばかりか、普通の sensitive 野生酵母の汚染を防止できるので、野生酵母の汚染対策は飛躍的に楽になる。

そこで優良 killer 清酒酵母の開発を企てた。今回は反復戻し交配法を適用し、野生 killer 清酒酵母の killer factor 産生に与る遺伝子と協会7号の遺伝子とを組み込むことによって、定方向の改良が可能であり、実用的な killer 清酒酵母の育種ができるとの見通しをえたので話題の提供とする。

2. 方法 (1)育種プログラム: Somers と Bevan³⁾によれば、killer factor を生産する遺伝子 k は細胞質遺伝子であるが、 k が細胞内に保持されるためには核遺伝子 M が必要である。そして $M(k)$ は killer となるが、 $M(o)$, $m(o)$ は sensitive となり、また $m(k)$ は数世代後に $m(o)$ の sensitive となる。そこで、 k および M の給源にするため、野生 killer 清酒酵母を1回親とし、協会7号を反復親として戻し交配をくりかえす次のような育種プログラムを設定した。即ち、野生 killer より haploid を分離し、それと協会7号の haploid を交配して1代目雑種をつくる。この1代目雑種の胞子を分離し、その中から killer で、かつ β -alanine 培地上の増殖が温度感受性(協会7号の genetic marker)の haploid を選抜し、それと協会7号の haploid を交配して2代目雑種をつくる。2代目雑種の胞子を分離し、その中から killer の haploid を選抜し、それと協会7号の haploid を交配して3代目雑種をつくる。以下同様に選抜と交配とをくりかえして野生 killer の k , M 以外の遺伝子を稀釈して行き、得られた各代の雑種について醸造適性を調べ、協会7号と同等の優良 killer 清酒酵母になるまで戻し交配を行なう。

シンポジウム (醸造における有用菌株の開発)

(2) 供試菌: 1 回親として野生 killer 清酒酵母 KL88 を用い, 反復親としては協会 7 号の haploid 7H2 (α 型), 7NB6-3 (α 型), および 7NB32-5 (α 型) を用いた。

(3) 胞子の分離および交配: 酢酸ソーダ寒天培地で胞子を形成させ, micromanipulator で胞子を分離した。または cell-wall lytic enzyme で処理した後, random spore plating 法⁴⁾によって haploid を分離した。交配は micromanipulator で cell-to-cell copulation を行なわせるか, mass mating を行なって胞子形成のある diploid を分離した。

(4) その他: killing の検査には Somers³⁾の Buffered Methylene blue 培地上で sensitive 酵母と試験菌とを交叉接種し, 25°C に 2 日間培養した。醸造特性の試験には小型 (総米 200g), または中間規模 (総米 100kg, 400kg) の清酒もろみを仕込んだ。香気成分の分析は Head space 法により, もろみ成分の一般分析は国税庁所定分析法に従った。もろみにおける酵母の分別計数には β -alanine 培地を使用した。

3. 結果 上記の育種プログラムに従って交配した雑種の 2 代目以降は, β -alanine 培地における増殖挙動や TTC 染色性において協会 7 号と全く同じであったが, 清酒もろみにおける発酵性, 生酸性, 香気生成能などの醸造特性には, KL88 型, 協会 7 号型, および中間型が認められた。もろみ小仕込試験によって 3 代目雑種の中に発酵性や香気生成能の点で協会 7 号と同等のものが見出されたので, この菌株を Killer 7 と命名し, 中間規模のもろみを試験した。その結果, もろみの発酵経過は協会 7 号の対照もろみに近似したが, 最終酸度は対照の 2.3 に対して 2.6 とやや高く, 逆にアミノ酸度は対照の 2.3 に対して 2.0 と低い値がえられた。その生成酒の品質を時期を異にして 2 回, 官能審査した結果, どちらの場合にも対照酒に優るとも劣らない成績がえられた。また Killer 7 の汚染酵母に対する挙動を調べるため, 清酒もろみにおける他酵母との競合現象を追跡した結果, Killer 7 は大量の野生 killer 酵母の混入によっても殺されることはなく, sensitive な酵母が混入した場合には容易に殺して排除することが確認された。以上のように Killer 7 は野生酵母対策上, 有利な実用的酵母といえるが, さらに優良な killer 清酒酵母をえるために戻し交配を続けた。それら各造成株の諸性質について述べると共に, 本法によって育種する際の障害となる点や killer 清酒酵母を使用する際の問題点等についても考察する。

- 1) 今村, 高岡: 清酒酵母研究会会報, No. 16 (1971)
- 2) 今村, 川本, 高岡: 醸工, 52, 300 (1974)
- 3) J. M. Somers, E. A. Bevan: Genet. Res. Camb., 13, 71 (1969)
- 4) G. R. Fink: Methods in Enzymology, XVII A, 59 (1970)