

〔醸酵工学 第61巻 第5号 349-352, 1983〕

ノート

醸造酵母からの栄養要求性変異株の分離

大内 弘造・下田 雅彦*・中村 行善**
 小嶋弥之祐***・西谷 尚道

国税庁醸造試験所

Isolation of auxotrophic mutants from industrial yeasts. Kozo OUCHI, MASAHIKO SHIMODA, YUKIYOSHI NAKAMURA, YANOSUKE KOJIMA, and TAKAMICHI NISHIYA
(National Research Institute of Brewing, 2-6 Takinogawa, Kita-ku, Tokyo 114, Japan)
Hakkokogaku 61: 349-352. 1983.

Auxotrophic mutants from a *saké* yeast having diploid or higher ploidy were isolated by the nystatin enrichment method. To facilitate the isolation, canavanine resistant auxotrophic cells were mixed with the *saké* yeast before addition of nystatin to estimate the enrichment ratio in the nystatin treatment. Auxotrophic mutants of strain Kyokai no. 7 were found to need much higher enrichment for isolation than strain 7H3 (a haploid of Kyokai no. 7) as estimated from the enrichment indexes. Auxotrophic mutants were also isolated from strains Kyokai no. 9 and Kyokai no. 10 at enrichment indexes of more than 20,000. Of the mutants isolated, an adenine auxotroph of strain Kyokai K10 whose cells were colored red in the fermentation of *saké* mash was applied to produce of a new type of *saké*.

酵母の突然変異株は、通常一倍体株を用いて分離されるが、本報では醸造酵母から直接、栄養要求性株を分離することを検討した。

清酒酵母、ビール酵母、ワイン酵母等の醸造酵母は二倍体以上の倍数体であり、¹⁻³⁾これらの酵母から栄養要求性株を分離するためには、一倍体から分離する場合に比べて低頻度で生じる栄養要求性株を一段と効率よく濃縮する必要がある。そこで、その濃縮効率がわかるように、内部標識株法を検討した。すなわち、Snow⁴⁾の nystatin 濃縮法において、変異誘発処理を施した供試菌細胞と共に、既知栄養要求性とカナバニン耐性を持つ標識株を低比率で混合しておき、その比率が nystatin 処理によって上昇する度合を測定し、濃縮指數とするものである。

Table 1 には供試菌株を示した。栄養要求性株を分離するための親株としては、協会7号(K7)、協会7号の一倍体株(7H3)⁵⁾、協会9号(K9)および協会10号

現在 *菊正宗酒造株、**太洋酒造株、***株小嶋総本店

(K10) の4種の清酒酵母を用いた。また、nystatin 処理の際に混合する標識株としては、ヒスチジン要求性(his 5)とカナバニン耐性(can 1)を持つ5050株およびアデニン(ade 1)、ヒスチジン要求性とカナバニン耐性を持つ5087株を用いた。清酒酵母のうち、K7, K9, K10 は胞子形成能を持っている。したがって、二倍体以上の倍数体と考えられるが、協会7号が二倍体と推定される以外、倍数性については不明である。

増殖用完全培地として YPAD⁶⁾ 呼吸欠損株の増殖を抑えるための培地としてグリセロールを炭素源とする YPG⁶⁾ を用いた。栄養要求株の検出には、アンモニアを窒素源とする合成最少培地 SD⁶⁾ 要求性の識別には SD 培地に必要なアミノ酸、核酸塩基を補添した CMM⁶⁾ (complete minimal medium), CMM 培地からアミノ酸、核酸塩基を一種類ずつ除いた OM⁶⁾ (omission medium) を用いた。カナバニン耐性の識別には CAN (アルギニン欠 OM 培地に L-カナバニン 60μg/ml 添加)を用いた。また、窒素飢餓培養には YCB(グ

Table 1. Strains of yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Strain	Genotype ^a	Spore formation	Origin
7H3	$\alpha \beta\alpha l$	—	Haploid of strain K7 ^b
K7	$\alpha/\alpha \beta\alpha l/\beta\alpha l$	+	Saké yeast Kyokai no. 7
K9		+	Saké yeast Kyokai no. 9
K10		+	Saké yeast Kyokai no. 10
5050	$\alpha his5 can1$	—	This work
5078	$\alpha ade1 his5 can1$	—	This work

^a α/α : mating type, $\beta\alpha l$: temperature sensitive growth on the β -alanine medium^b) in which pantothenate was replaced with β -alanine, *his5*: requirement for histidine, *ade1*: requirement for adenine, *can1*: canavanine resistance.

ルコース 20 g, Difco-Yeast Carbon Base 11.7 g/l, pH 6.0) を用いた。固型培地には 2% 寒天を添加した。

栄養要求性株の濃縮、分離は次のように行った。栄養要求性株を分離すべき供試菌を YPAD 培地 5ml に 2 日間培養してから集菌し、蒸留水で 2 回洗浄した。その洗浄菌体を蒸留水 12 ml に懸濁し、直径 9 cm のガラスペトリ皿に移して、30 cm の距離から 1~2 分間、15 W 殺菌灯の紫外線を照射した。この菌体を回収し、YPAD 培地に一晩培養した。この培養液に、別に培養した標識株細胞を 10^{-7} ~ 10^{-5} の比率で混合し、洗浄後全体を YCB 培地 5ml に接種して一晩、窒素飢餓培養を行った。この菌体を SD 培地 10 ml に移植し、L 字管で 4 時間振とうした後、nystatin (Serva 社) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 液を 0.5ml 加え、さらに 30~60 分間振とうした。これを適宜希釈し、YPAD プレートまたは YPG プレート上にコロニーをつくらせてマスター プレートとした。このマスター プレート上のコロニーを YPG プレート (YPG 培地でマスター プレートをつくった時は省略)、SD プレートおよび CAN プレートにレプリカし、SD 培地と CAN 培地の両者で増殖できないものを栄養要求性株としてマスター プレートから一次選択を行った。この一次選択株については、CMM プレートおよび OM プレートにレプリカして、その要求性の種類を確認した。培養はすべて 30°C で行った。また、紫外線照射前後、nystatin 处理前後に生菌数を測定し、各生存率を求めた。また、nystatin 处理前後に CAN プレートに塗布し、生じたカナバニン耐性コロニー (さらに OM プレートにレプリカして要求性を確認) の数から標識株の混合比率と生存率を求めた。そして、nystatin 处理前の混合比率と処理後の混合比率との比を以って栄養要求性株の濃縮指數

とした。この濃縮指數が低い時には、1 回目の nystatin 处理後 YPAD 培地に培養しておいた菌体に対して、窒素飢餓培養から前述の濃縮操作を繰りかえした。この場合の濃縮指數としては、最初の混合比率と 2 回処理後の混合比率との比を当てた。

Fig. 1 には、協会 7 号と標識株 5087 に対する nystatin の作用を示した。対照、すなわち、nystatin 無添加の条件では、野生型株である協会 7 号は最少培地中

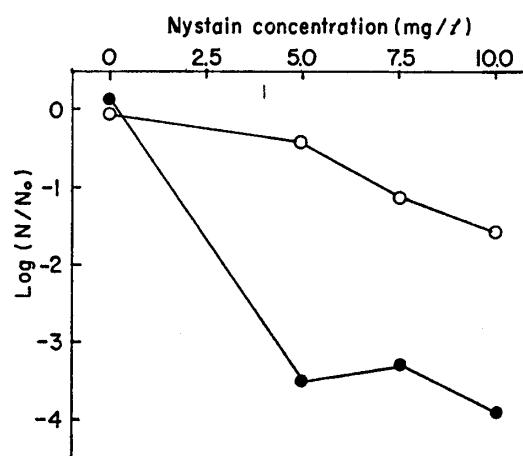


Fig. 1. Effect of nystatin concentration on the survival rate of wild type cells and auxotrophic cells of a marker strain.

Yeast cells grown in YPAD complete medium were inoculated into YCB (yeast carbon base) medium and incubated overnight at 30°C for nitrogen starvation. These cells were then transferred to SD minimal medium and incubated for 4 h at 30°C. Then, nystatin was added to the medium at the indicated concentration, and the incubation was continued for another one hour. The survival rate is the ratio of the numbers of viable cells after (N) to before (N_0) nystatin treatment.

(●) wild type strain K7, (○) marker strain 5087.

Table 2. Isolation of auxotroph mutants of *sake* yeasts.

Strain	UV-survival rate (%)	Enrichment index ^a	Number of colonies isolated				Nutrients required by the mutants ^c
			Wild type	Marker ^b	Mutant	Total	
7H3	0.77	2,600	47	2	45	94	Adenine (20) Methionine (461) Leucine (1), Histidine (5)
7H3	0.77	4,100	254	69	442	765	
K7	2.3	1,000	942	6	0	948	Histidine (12) Adenine (2)
K7	2.6	30,000	750	155	14	919	
K9	0.058	28,000	6,477	113	326	6,916	Methionine (137) Adenine (184) Not identified (3)
K10	0.063	22,000	824	5	7	836	Arginine (5) Adenine (1) Lysine (1)

^a The value A/B in which A and B represent the ratios of numbers of marker cells to test cells after and before nystatin treatment, respectively.

^b A strain having known auxotrophic and canavanine resistant markers. It was added as a marker strain to the wild type in the proportion of 10⁻⁵–10⁻⁷ in order to estimate the enrichment index.

^c Figures in parentheses are the numbers of colonies which required the indicated nutrient.

1時間の培養によって若干増殖し、見掛けの生存率は1.0を超えたが、栄養要求性を持つ標識株は増殖ができず、むしろ生菌数はわずかに減少した。しかし、nystatinを5 µg/ml 添加した場合には、協会7号の生存率が1/3,000に激減したのに対して、標識株の生存率は1/3に減少したに過ぎなかった。nystatin濃度をさらに増加した場合には、協会7号の減少よりも標識株の減少の方が上回ったので、両菌株の生存率の比、すなわち濃縮指数は5 µg/ml 添加の時よりも低下した。そこで、以下の実験では、nystatin 5 µg/ml の濃度で栄養要求性株の濃縮を行った。

Table 2には、各種清酒酵母からの栄養要求株の分離成績を示した。協会7号一倍体株7H3を供試菌とした場合には、濃縮指数2,600の時に分離したコロニー94個の中に栄養要求性を示すものが47個あり、その中の2個は標識株であった。また、濃縮指数4,100の時に分離した765個のコロニー中には442個の栄養要求性株と69個の標識株が含まれていた。一方、協会7号を供試菌とした場合には、濃縮指数1,000の時に分離した948個のコロニーには、6個の標識株が含まれるのみで、栄養要求性株はなかったが、nystatin処理を2回くりかえし、濃縮指数30,000の状態で分離した919個のコロニーには155個の標識株の外に14株の栄養要求性株が含まれていた。協会9号および協会10号を供試菌とした場合にも、濃縮指数20,000以上において、

それぞれ326/6916および7/836の頻度で栄養要求性株が分離された。それら栄養要求性株の種類は、アデニン、メチオニン、ロイシン、ヒスチジン、アルギニン、リジン各要求性の6種であったが、その中でメチオニン、次いでアデニン要求性株の占める割合が高かった。

以上のように、協会7号、協会9号および協会10号の倍数体酵母から一倍体化することなしに栄養要求性株を分離することができた。ただし、協会7号と協会7号一倍体株とを比較すれば明らかのように、前者からの分離の効率は低かった。したがって、栄養要求性株の濃縮効率を十分に高める必要があったが、そのためには、標識株の濃縮指数を目安とする方法は有効であった。

今回分離された栄養要求性株の各代表株を用いて研究室規模の清酒醸造試験を行った。それらの中で協会10号のアデニン要求性株は菌体内に赤色色素を蓄積し、そのために桃色のもろみとなった¹⁾ことは、清酒の多様化の観点から興味深い。

文 献

- 1) 小田、若林：醸工, 33, 441 (1955).
- 2) 高野、吉柄、寺島：醸工, 44, 150 (1966).
- 3) Kusewicz, D., Johnston, J.: J. Inst. Brew., 86, 25 (1980).
- 4) Snow, R.: Nature, 211, 206 (1966).
- 5) Ouchi, K., Wickner, R. B., Toh-e, A., Akiyama,

- H.: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 483 (1979).
6) Wickner, R. B., Leibowitz, M. J.: *Genetics*, **82**, 429 (1976).
7) 大内, 下田, 中村, 小嶋, 飯村, 西谷, 秋山: 日本醸酵工学会大会要旨集, p. 151 (1981).
8) 菅間, 山川, 濑岡, 山村, 野白: 醸協, **60**, 453 (1965).

(昭58. 4. 15受付)