

高温醗酵性酵母の育種

河村大造

Breeding of Fusion Yeasts Having High-Temperature Tolerant, Higher-Fermenting Ability and Isolation of Ethanol-Tolerant Strains from *Kluyveromyces marxianus*

Daizo KAWAMURA

For breeding of fusion yeast strains having marked ability to ferment glucose at high temperatures, protoplast fusion between *Kluyveromyces marxianus* HUT 7182, a yeast strain capable of growing at high temperatures, and *Saccharomyces cerevisiae* HUT 7107, a yeast strain being used in ethanol fermentation, was performed. No fusion strains, which had fermenting ability superior to that of the parent strains at high temperatures, were obtained. Therefore, ethanol-tolerant strains were isolated from *K. marxianus* HUT 7182. The fermenting ability of the isolates at 45°C was superior to that of the mother yeast strain.

通常の温度よりも高温下でエタノール醗酵を行うことができれば、冷却費用を節減でき、省エネルギーの点で大きなメリットがあると考えられる。これまでに、この高温性酵母の検索・育種に関して各方面で種々の研究がなされている^{1)~6)}。本研究では、高温醗酵性酵母の育種を目的として高温増殖性があるとされている *Kluyveromyces marxianus*⁷⁾ と工業的なエタノール醗酵に用いられている *Saccharomyces cerevisiae* との細胞融合株と、*K. marxianus* 株からのエタノール耐性酵母の検索を試みた。

実験方法

1. 菌株

高温下での増殖能があり、ラクトースの資化能がある *Kluyveromyces marxianus* HUT 7182株と醗酵力が強く "*Saccharomyces formosensis*" という名前でエタノール醗酵に用いられている *Saccharomyces cerevisiae* HUT 7107株を用いた。エタノール耐性試験の対照として清酒酵母である日本醸造協会9号(K9)酵母と広島2号(H2)酵母を用いた。

2. 細胞融合

Beggs⁸⁾の方法によって行った。すなわち、YPD[酵母エキス(オリエンタル酵母)1%, ペプトン(日本製薬)2%, グルコース2%]液体培地で一晚振とう培養した菌体を集菌・洗浄してZymolyase 100 T(生化学工業)

で処理してスフェロプラストにし、塩化カルシウムとポリエチレングリコールで融合処理を行い、再生選択培地に重層した。再生選択培地はマルトースを炭素源とし、ピロガロールで嫌気性を保ち⁹⁾、45°Cで培養した。

3. エタノール耐性試験

2種類の方法で行った。一つはエタノール存在下での増殖抑制を調べる方法である。所定の濃度のエタノールを加えたYPD寒天培地に酵母を塗布して30°Cでの増殖の有無を肉眼で観察した。他の一つはエタノール存在下での生存率を調べる方法である。これは、原らの方法¹⁰⁾に準じて行った。すなわち、麴汁(Bllg. 6°)に酵母を接種し、30°Cで2日間培養した。培養酵母を滅菌水で2回洗浄後、0.05M酢酸緩衝液(pH4.2)3.5mlに懸濁し(酵母数約 1.8×10^8 /ml)、これに10%エタノール、2%グルコースを加えた0.2M酢酸緩衝液(pH4.2)3.5mlを添加し、40°Cに静置した。この懸濁液から経時的にサンプリングしてそれを適宜希釈し、YPD寒天培地に塗布した。30°Cで培養し、出現したコロニー数を測定して生存酵母数を計算した。

4. エタノール耐性株の分離

原らの方法¹⁰⁾に準じて行った。すなわち、YPD液体培地に酵母を接種し、28°Cで2日間静置培養する。培養酵母を滅菌水で2回洗浄後、0.05M酢酸緩衝液(pH4.2)3.5mlに懸濁し(酵母数約 1.8×10^8 /ml)、これに10%エタノール、2%グルコースを加えた0.2M酢酸緩

衝液 (pH4.2) 3.5ml を添加し、40℃に10時間静置して自己消化させた。次に、この懸濁液を適宜希釈し、YPD 寒天培地に塗布して、30℃で培養し、出現したコロニーを釣菌した。この操作を数回繰り返して、生存率の高い菌をエタノール耐性変異株として分離した。

5. 全核酸量の測定

Schneider 法¹¹⁾に従って行った。すなわち、核酸を過塩素酸で抽出し、その抽出液の260nmの吸光度を測定した。

6. 糖の資化性

ラクトースまたはトレハロースを加えたWickerham 合成培地¹²⁾上での増殖の有無によって判定した。

7. 増殖力

30℃で静置培養した前培養液(酵母数約 1.0×10^8 /ml) 2 ml をYPD 液体培地100ml に加え、30℃で静置培養して経時的に620nm で濁度を測定して、比増殖速度を求めた。

8. 醗酵力

醗酵栓を取り付けた1 l 容エルレンマイヤーフラスコに480ml のYPD (グルコース濃度20%) 液体培地を入れた。この培地に35℃で静置培養した前培養液を本培養液中の接種時菌濃度が約 1.0×10^8 /ml になるように植菌して、融合候補株の場合は30℃と40℃、エタノール耐性株の場合は40℃と45℃の水槽中に静置した。炭酸ガス発生による減少重量がエタノール生成量に比例することから減少重量を測定してエタノール生成量を推定した。融合候補株の場合は減少重量の変化がほぼなくなる7日後までの総減少重量でその醗酵力を表した。エタノール耐性株の場合は経時的に減少重量を測定して醗酵力を調べた。

実験結果および考察

1. 細胞融合株の選択指標

高温下で醗酵力の強い酵母を育種することを目的として、高温下で増殖可能な株として知られている *K. marxianus*⁷⁾ (HUT 7182株) とエタノール醗酵酵母として実際に使用されている *S. cerevisiae* (HUT 7107株) を用いて、細胞融合株の取得を試みた。この2株の融合株が得られれば、両者の特徴を合わせ持った酵母が育種できる可能性がある。融合確認のために選択標識が必要であるが、変異処理によってそれを付与すると他の有用な性質にまで悪影響を及ぼす恐れがあるので、野生型のままで選択標識となり得る性質を探した。YPD 寒天培地上45℃で HUT 7182株は増殖するが、HUT 7107株は増殖しない。また、ピロガロールによる30℃嫌気条件下でHUT 7182株はマルトースを資化しない(kluyver effect¹³⁾) が、HUT 7107株は資化するという性質が明らかとなったので、これを選択標識として用いることにした。

2. 細胞融合候補株の性質

HUT 7182株と HUT 7107株を細胞融合処理した結果、45℃でのピロガロール嫌気条件下でマルトースを資化する8株の融合株の候補が得られた。その8株と親株2株について全核酸量、糖の資化性、増殖力、醗酵力を検討した。その結果を表1に示した。全核酸量については融合候補株の値がすべて両親株の中間の値を示し、核が完全に融合したと考えられる株は存在しなかった。しかし、両親株がそれぞれ一方の資化性しか有していないラクトースとトレハロースの資化性に関しては、2つの糖の資化性を有する株が、融合候補株8株中4株認められた。30℃での比増殖速度は両親株の中間の値を示した株が1株あったが、それ以外は両親株より低い比増殖速度を示した。30℃での醗酵力については、両親株の中間の値を示す株が1株認められた。それ以外は両親株より低い値を示した。40℃については、8株とも親株のうちの醗酵

表1 融合候補株の性質

	1	2	3	4	5	6	7	8	HUT 7182	HUT 7107
全核酸量 ×10 ⁻⁹ (mg/cell)	0.66	0.82	0.79	0.82	0.68	0.95	0.79	1.04	0.66	1.20
資化性										
ラクトース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
トレハロース	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
醗酵力【CO ₂ 発生量 (g)】										
30℃ (7日後)	32.1	26.3	28.9	24.0	27.3	30.0	37.2	34.7	35.0	47.6
40℃ (7日後)	24.0	19.7	21.6	20.1	20.6	22.8	27.8	26.5	21.8	34.1
比増殖速度 (h ⁻¹)										
30℃	0.08	0.17	0.18	0.17	0.23	0.20	0.04	0.16	0.21	0.28

力の弱いHUT 7182株と同程度以上で両親株の中間値以下の醗酵力を示した。

以上の結果、完全に核が融合した株は得られなかったが、核の一部同士が融合したと思われる株は得られた。しかし、親株以上の高温醗酵力を示す株は得られなかった。

3. *K. marxianus* HUT 7182 株からのエタノール耐性株の分離

これらの結果から、細胞融合の親株として用いた *K. marxianus* HUT 7182株は醗酵力が弱いことが明らかとなった。その醗酵力の弱いのはエタノール耐性が弱いことも一因ではないかと考え、HUT 7182株のエタノール耐性（エタノール存在下での増殖抑制）を調べた。対照としてHUT 7107株、K 9 酵母、H 2 酵母についても調べた。その結果を表2に示した。HUT 7182株はエタノール10%添加培地で増殖が認められず、他の酵母よりエタノール耐性が弱いことが明らかになった。そこで、HUT 7182株のエタノール耐性株を分離した。得られたエタノール耐性株4株についてエタノール耐性試験を行った。エタノール存在下での増殖抑制をみる方法では増殖の有無を肉眼で判断すると全く差が認められなかった。そこで、エタノール存在下での生存率をみる方法でエタノール耐性を調べた。その結果を表3に示した。接種量（0 hの菌数）に多少の差はあるが、241株と311株が他の2株よりエタノール耐性が強いと認められた。そこで、この2株について40℃と45℃で醗酵試験を行った。対照として、HUT 7182株とHUT 7107株についても調べた。その結果を図1に示した。40℃では241株が親株

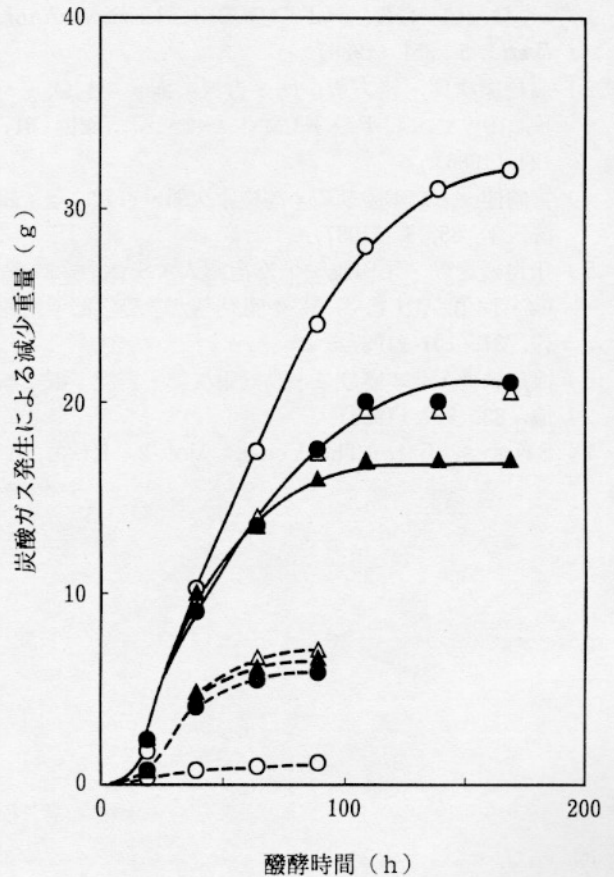


図1 エタノール耐性株の醗酵

—, 40℃, ---, 45℃
○, HUT 7107株; ●, HUT 7182株
△, 241株; ▲, 311株

とはほぼ同等、311株は親株より低い醗酵力を示した。しかし、45℃では241株、311株ともに親株より強い醗酵力を示した。この結果、エタノール耐性株を分離することによって、*K. marxianus* HUT 7182株の高温下での醗酵力が改善されることが明らかになった。

要 約

高温増殖性の *K. marxianus* (HUT 7182株) と実際のエタノール醗酵に用いられている *S. cerevisiae* (HUT 7107株) の細胞融合を行った。融合株は得られたが、親株以上の高温醗酵力を示す株は得られなかった。

HUT 7182株からエタノール耐性の強い株を分離することによって、45℃で親株を上回る醗酵力を持つ高温醗酵性酵母を取得できた。

文 献

- 1) MATSUOKA, H., KOBAYASHI, Y., and UEDA, S.: *J. Ferment. Technol.* 60, 599 (1982).

表2 供試菌株のエタノール耐性の比較

菌 株	エタノール耐性*		
	エタノール5%	エタノール10%	エタノール15%
HUT7182	+	—	—
HUT7107	+	+	—
K 7	+	+	—
H 2	+	+	—

培養温度 30℃

* YPD+所定濃度エタノール添加寒天培地上で増殖する(+) 増殖しない(—)を示す。

表3 取得したエタノール耐性株のエタノール耐性*

菌 株	生存酵母数 (ml ⁻¹)				
	0 h	2 h	5 h	8 h	10 h
231	4.9×10^7	2.6×10^3	N. D.**		
241	3.3×10^7	4.0×10^3	1.2×10^2	2.0×10	N. D.
311	2.3×10^7	2.6×10^3	5.0×10	1.0×10	N. D.
411	4.2×10^7	4.3×10^3	N. D.		
HUT 7182	4.9×10^7	1.1×10^3	N. D.		

* エタノール濃度5%, 40℃で静置した時の生存酵母数の経時変化を示す。

** N. D.: 不検出

- 2) SEKI, T., MYOGA, S., SAVITREE, L., UEDONO, S., GAROON, K., and TAGUCHI, H.: *Biotechnol. Lett.* **5**, 351 (1983).
- 3) 高橋康次郎・緒方新一郎・吉沢 淑・中村欽一・KARUWANNA, P.・KUMNUANTA, J.: *醸協*, **81**, 124 (1986).
- 4) 宮崎伸一・北本勝ひこ・高橋康次郎・吉沢 淑: *醸酵工学*, **65**, 1 (1987).
- 5) 田邊幾之助・須田雅一・富宿昭人・SANCHEZ, P. C.・LEBEAULT, J. M.: 鹿児島大学農学部学術報告, **37**, 197 (1987).
- 6) 渡辺誠衛・北本勝ひこ・高橋康次郎・吉沢 淑: *醸協*, **83**, 757 (1988).
- 7) STOKES, J. L.: *The Yeasts*, Vol. 2, ROSE, A. H., and HARRISON, J. S. ed. (Academic Press, London and New York), p.122 (1971).
- 8) BEGGS, J. D.: *Nature*, **275**, 104 (1978).
- 9) 注解編集委員会: 第3回改正 国税庁所定分析法注解, 3版, 注解編集委員会編 (日本醸造協会, 東京), p.305 (1974).
- 10) 原 昌道・佐々木雅春・小幡孝之・野白喜久雄: *醸協*, **71**, 301 (1976).
- 11) SCHNEIDER, W. C.: *J. Biol. Chem.*, **161**, 293 (1945).
- 12) 飯塚 廣・後藤昭二: *酵母の分類同定法*, 第2版 (東京大学出版会, 東京), p.136 (1973).
- 13) SIMS, A. P., and BARNETT, J. A.: *J. General. Microbiol.* **106**, 277 (1978).