

高濃度エタノール存在下において清酒酵母の生育を促進する 温度ストレス処理条件

山岡千鶴*, 栗田 修*

Improvement of Yeast Growth by Heat Stress in the Presence of High Ethanol Concentrations

Chizuru YAMAOKA and Osamu KURITA

Key words: Sake yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, Heat stress, Ethanol tolerance

1. はじめに

清酒酵母は高い発酵能を持つ一方で、高濃度のエタノールに対する耐性が低い²⁾。このため、発酵後期のもろみでは高濃度のエタノールによって清酒酵母が死滅する。これは、酒質の劣化をもたらすことから、いくつかのエタノール耐性酵母が育種されてきた³⁾。

一方で、酵母には、さまざまなストレスに対して共通のストレス耐性獲得メカニズムが存在しており、例えば、温度ストレスを与えると、エタノール耐性を獲得することが報告されている⁴⁾。

既存の清酒酵母に温度ストレスを与えてエタノール耐性を付与することができれば、育種をせずとも酒質の向上が期待できる。そこで本研究では、温度ストレスを与えた場合のエタノール存在下での清酒酵母の生育を指標として、清酒酵母のエタノール耐性の向上に効果を示す温度ストレス処理条件を検討することとした。

2. 実験方法

2. 1 供試菌株

清酒酵母は協会 701 号 (K-701) を用いた。

2. 2 エタノール耐性試験

2. 2. 1 試験方法

液体培地を 15 mL 入れた L 字管に、YPD 液体培地 (酵母エキス 1%, ポリペプトン 2%, グルコース 2%) で 30°C, 2 日間静置培養した菌液を 150 μ L

* 食と医薬品研究課

植菌し、振とう温度勾配培養装置 (型名 TVS126MB, アドバンテック東洋) を用いて、振とう速度 30 rpm, 一定温度で培養した。酵母の生育度を 660 nm の濁度 (OD) で測定することにより判断した対数増殖期において、L 字管をウォーターバスに入れ、次項の処理条件にて静置することにより温度ストレスを与えた。その後、培養温度まで冷却し、培地にエタノールを添加し、再び振とう培養を行った。酵母のエタノール耐性に対する効果については生育度 (OD 値) で評価した。

2. 2. 2 試験条件

(1) ストレス処理温度の検討

YPD 液体培地を用い、培養温度は清酒製造において標準的な発酵温度である 15°C, ストレス温度は Watson らの報告⁴⁾を参考に 30°C または 37°C とし、1 時間処理した後、培地のエタノール濃度が 10, 12, 14 または 16% (v/v, 以下同様) となるようにエタノールを添加した。

(2) ストレス処理時間の検討

YPD 液体培地を用い、培養温度は 15°C, ストレス温度は 30°C とし、1 時間または 2 時間処理した後、培地のエタノール濃度が 10, 12 または 14% となるようにエタノールを添加した。

(3) 温度ストレス処理時の培地のエタノール濃度の検討

YPD 液体培地を用い、培養温度は 15°C とし、培地中にエタノールを 2, 4, 6 または 8% 含む状態でストレス温度 30°C, 2 時間の処理を行った後、最終

濃度が 12% となるようにエタノールを添加した。

(4) 培養温度の検討

YPD 液体培地を用い、培養温度は清酒製造の酵母工程の最高温度を参考に 22℃ とし、ストレス温度は 15℃ での培養時と同じ 15℃ の温度差を確保するため 37℃ で 2 時間処理した後、培地のエタノール濃度が 6, 8, 10, 12 または 14% となるようにエタノールを添加した。

(5) 培地の炭素源の検討

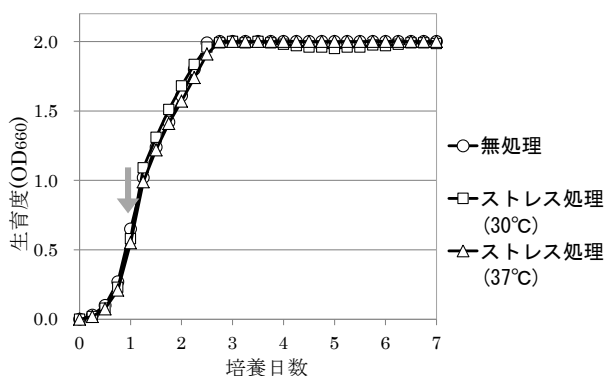
YPG 液体培地 (酵母エキス 1%, ポリペプトン 2%, グリセロール 3 v/v%) を用い、培養温度は 15℃, ストレス温度は 30℃ で 2 時間処理した後、培地のエタノール濃度が 6, 8, 10, 12 または 14% となるようにエタノールを添加した。

3. 結果と考察

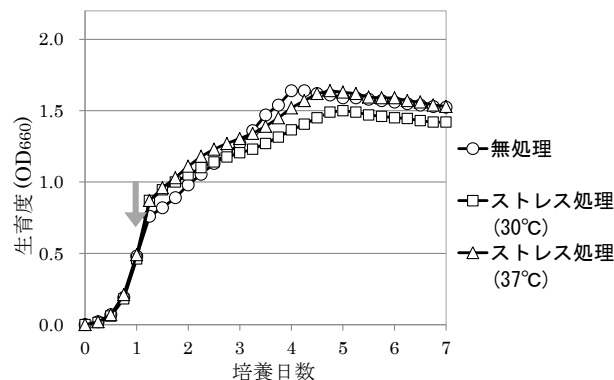
3. 1 ストレス処理温度および処理時間が酵母の生育に及ぼす影響

30℃ または 37℃ でストレス処理を行ったところ、図 1 に示すように、培地のエタノール濃度が 10% および 12% の場合、温度ストレス処理区での酵母の生育は無処理区と同程度もしくはわずかに下回った。30℃ 処理区は、エタノールが 14% および 16% の場合、無処理区より酵母の生育がよかった。37℃ 処理区は、エタノール 14% では無処理区より生育がよかったが、エタノール 16% では無処理区より悪かった。

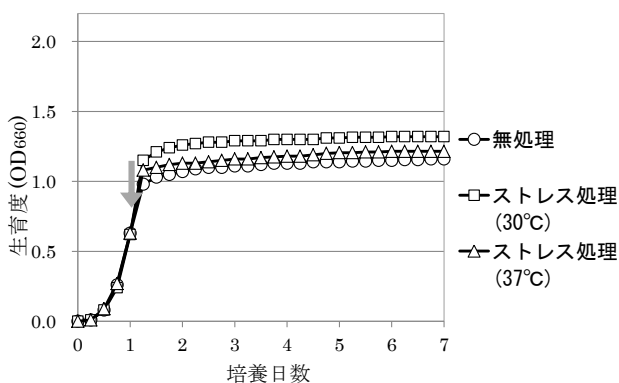
次に、ストレス処理温度 30℃ において、処理時間の影響を調べたところ、培地のエタノール濃度が 14% では 2 時間処理区の方が 1 時間処理区より酵母の生育がよかった (図 2)。なお、エタノール 10%



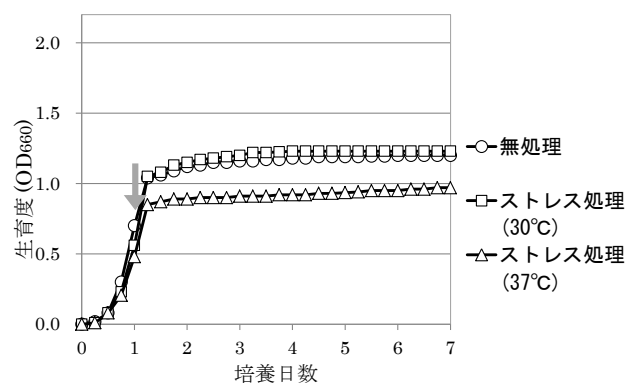
a) 培地中のエタノール濃度が 10% の場合



b) 培地中のエタノール濃度が 12% の場合



c) 培地中のエタノール濃度が 14% の場合



d) 培地中のエタノール濃度が 16% の場合

図 1 ストレス処理温度の違いが酵母の生育に及ぼす影響

培地, YPD 培地; 培養温度, 15℃; ストレス処理時間, 1 時間。

図中の矢印はストレス処理を行った時点を示す。

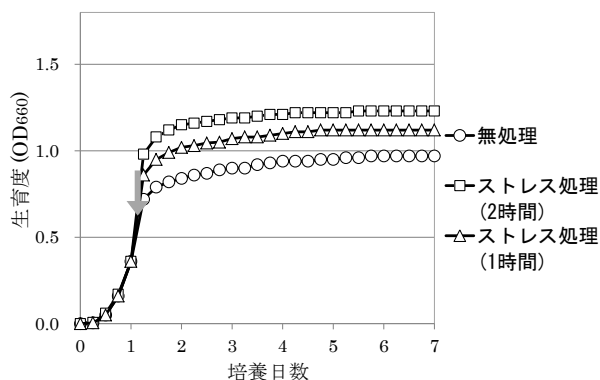


図 2 温度ストレス処理時間の違いが酵母の生育に及ぼす影響
 培地, YPD 培地; 培養温度, 15°C; ストレス温度, 30°C; 培地中のエタノール濃度, 14%.
 図中の矢印はストレス処理を行った時点を示す.

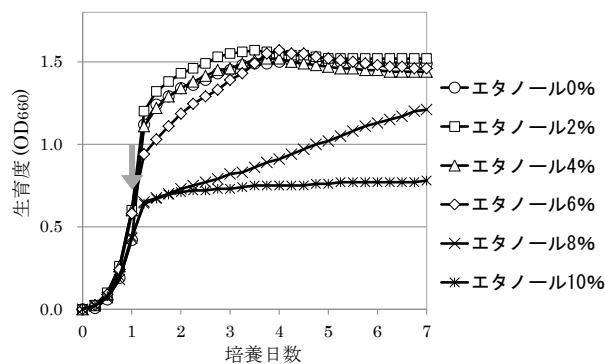


図 3 温度ストレス処理時における培地へのエタノール添加が酵母の生育に及ぼす影響
 培地, YPD 培地; 培養温度, 15°C; ストレス温度, 30°C; ストレス処理時間, 2 時間.
 ストレス処理後に最終濃度が 12%となるようにエタノールを添加.
 図中の矢印はストレス処理を行った時点を示す.

および 12%では温度ストレス処理の有無および処理時間に関わらず酵母の生育に差はみられなかった。これより、温度ストレスは清酒酵母のエタノール耐性の向上に寄与することが確認でき、14%付近の濃度のエタノール存在下において、30°C, 2 時間処理という条件でその効果が高いことがわかった。

3. 2 温度ストレス処理時の培地のエタノール濃度がストレス処理効果に及ぼす影響

図 3 に示すように、エタノールを添加した培地で温度ストレス処理を行った場合、エタノール 6%までは、酵母の生育はエタノールを含まない培地で温度ストレス処理を行った場合と同程度であったが、エタノール 8%および 10%では、酵母の生育は悪くなった。酵母は温度ストレスとエタノールストレスに対してよく似たストレス応答をするという報告⁹⁾があるが、温度ストレス時の培地へのエタノール添加は、酵母の生育に効果を示さなかった。

3. 3 培養温度がストレス処理効果に及ぼす影響

培養温度を 22°Cとした場合、培地のエタノール濃度が 14%では、培養温度が 15°Cの場合よりも、温度ストレスの効果が小さかった(図 4)。なお、エタノール濃度が 6~12%においては温度ストレス処理の有無で酵母の生育に差はみられなかった。Gao⁹⁾は、培養温度が高いほど酵母はエタノールに対

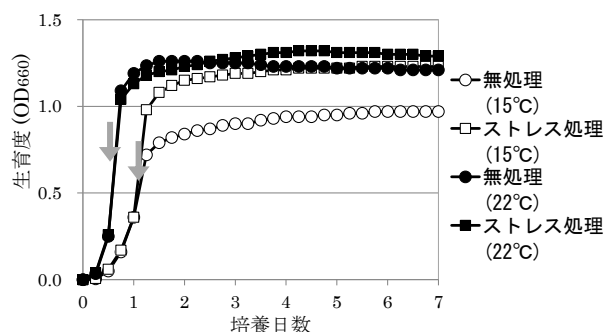


図 4 培養温度およびストレス温度の違いが酵母の生育に及ぼす影響
 培地, YPD 培地; ストレス温度, 30°C (□) または 37°C (■); ストレス処理時間, 2 時間; 培地中のエタノール濃度, 14%.
 図中の矢印はストレス処理を行った時点を示す.

して感受性が高いことを報告しているため、培養温度 22°Cでは、高温が温度ストレスの効果を低下させたものと推察される。なお、22°Cの培養では 15°Cの時より酵母の生育度が高かったが、これは酵母の生育至適温度(30°C前後)に近いためと考えられる。この結果から、温度ストレスは、培養温度が比較的低い場合にエタノール耐性の向上に寄与することが示唆された。

3. 4 培地の炭素源がストレス処理効果に及ぼす影響

エタノール非存在下では、YPD 液体培地及び YPG 液体培地における酵母の生育度に差はないことを確認した。YPG 液体培地において、培地のエタノール濃度が 6%および 8%では温度ストレス処理の有無で酵母の生育に差はみられなかった。エタノール濃度 10%の YPG 液体培地では酵母の生育が悪くなり、無処理区よりも温度ストレス処理区の方が酵母の生育度が低かった(図 5)。エタノール濃度 12%および 14%の同液体培地では、温度ストレス処理の有無に関わらず酵母の生育が著しく悪かった。グリセロールはストレスに対する保護物質として働くことが知られているが⁷⁾、今回の実験条件ではグリセロールを含む YPG 液体培地のストレスに対する保護効果は確認できなかった。

4. まとめ

清酒酵母のエタノール耐性の向上に効果を示す温度ストレス処理条件を検討した。YPD 培地を用い、培養温度を 15°Cとした場合、対数増殖期における酵母への 30°C、2 時間の温度ストレス処理によって、培地のエタノール濃度 14%での酵母の生育が促進された。培養温度を 22°Cとした場合は、培養温度を 15°Cとした場合と比べて温度ストレスの効果が小さかったことから、温度ストレスは、培養温度が 15°Cという比較的低い場合に酵母のエタノール耐性の向上に寄与することが示唆された。一方、温度ストレス処理時に、培地へエタノールを添加した場合および YPG 培地を用いた場合は、酵母の生育促進効果がみられなかった。以上のように、高濃度のエタノール存在下において、清酒酵母の生育を促進する温度ストレス処理条件を見出すことができた。

参考文献

1) H. Wu et al. : "Disruption of Ubiquitin-Related Genes in Laboratory Yeast Strains Enhances Ethanol Production during Sake Brewing". J.

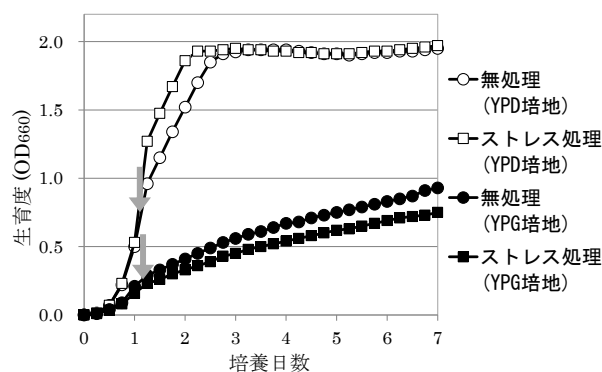


図 5 異なる培地における温度ストレス処理が酵母の生育に及ぼす影響

培養温度, 15°C; ストレス温度, 30°C; ストレス処理時間, 2 時間; 培地中のエタノール濃度, 10%.

図中の矢印はストレス処理を行った時点を示す.

Biosci. Bioeng., 107(6), p636-640 (2009)

- 2) Y. Ogawa et al. : "Tolerance Mechanism of the Ethanol-Tolerant Mutant of Sake Yeast". J. Biosci. Bioeng., 90(3), p313-320 (2000)
- 3) 新田朝子ほか : "K1 キラー耐性を利用した清酒酵母からのアルコール耐性酵母の取得". 生物工学会誌, 78(3), p77-81 (2000)
- 4) K. Watson et al. : "Acquisition of Ethanol Tolerance in Yeast Cells by Heat Shock". Biotechnol. Lett., 5(10), p683-688 (1983)
- 5) P. W. Piper : "The Heat Shock and Ethanol Stress Responses of Yeast Exhibit Extensive Similarity and Functional Overlap". FEMS. Microbiol. Lett., 134(2-3), p121-127 (1995)
- 6) C. Gao. et al. : "The Effects of Temperature and pH on the Ethanol Tolerance of the Wine Yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*". J. Appl. Bacteriol., 65(5), p405-409 (1988)
- 7) S. Hohmann : "Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts". Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66(2), p300-372 (2002)