

## UV-LEDを利用した微生物育種用機器の開発に関する調査研究

岡久 修己\*<sup>1</sup>, 中村 怜\*<sup>2</sup>

### 抄 録

UV-LED を利用した微生物育種用機器開発の可能性を探るため、試作した微生物育種用機器を改良し、280nmに加え、270nm, 330nm, 255nmの紫外線を照射可能なUV-LED光源を作製した。照射距離を50mmとし、清酒酵母にそれぞれの波長の紫外線を照射し、酵母生菌数の経時変化を調べ、各波長における最適照射時間の検討を行った。最適条件で清酒酵母に各波長の紫外線を照射し、得られたセルレニン耐性酵母について、麴エキス培地発酵試験により酵母の性質を調べた結果、全ての波長で、カプロン酸エチルを高生産する酵母が取得できた。

### 1 はじめに

香味良好な清酒を醸造する目的で、新規清酒酵母の育種は、全国各地で盛んに取り組まれている。育種の手法としては、エチルメタンサルフォネート等の薬剤処理、水銀ランプを用いた紫外線照射等による変異株の取得や、酵母の接合による交雑株の取得等が挙げられる。

これまでの研究によりUV-LEDを光源とする紫外線を照射可能な微生物育種用機器を試作し、UV-LEDを光源とする280nmの紫外線を照射することで、優良な性質を持つ清酒酵母が育種できることを見出している<sup>1)</sup>。このことからUV-LEDが新たな育種的手段として用いられる可能性が示された。

そこで、本研究では、UV-LEDを利用した微生物育種用機器開発の可能性を探るため、試作した微生物育種用機器に改良を加え、複数の波長の紫外線を照射可能にし、それぞれの波長について、最適育種条件を検討するとともに、育種酵母の性質を調べた。

### 2 実験方法

#### 2・1 供試菌株および培地

親株としてきょうかい901号酵母を使用した。培地としてYPD培地（1%酵母エキス，2%ポリペプトン，2%ブドウ糖），麴汁培地（乾燥麴に4倍量の水を加えて糖化し，濾過後にBrix10%，pH4に調整した培地。乾燥麴には徳島製麴社製のG-50（精米歩合50%「山田錦」）を用いた。）およびアルコール脱水麴添加培地<sup>2)</sup>を用いた。

#### 2・2 微生物育種用UV-LED照射装置

微生物育種用UV-LED照射装置は、前報<sup>1)</sup>で試作した装置を改良し、主波長330nm, 280nm, 270nm, 255nmのLEDを光源とする紫外線を照射可能とした。またLEDパッケージについては、前報で使用したローパワー用の一般的なキャンタイプからSMDパッケージとし、定格電流0.35(A)のパワーUV-LEDへ変更した。

#### 2・3 UV-LEDを光源とする紫外線照射試験

きょうかい901号酵母を、YPD液体培地で28℃2日間振盪培養後、集菌洗浄し、生理食塩水にて、約 $1 \times 10^7$  cells/mlの菌懸濁液を調製した。この菌懸濁液6mlを直径60mmのシャーレに入れ、菌懸濁液に対して、微生物育種用UV-LED照射装置を用いてUV-LEDを光源とする紫外線を、シャーレの液体表面から50mmの距離で、0.5～20分間照射した。照射後の菌懸濁液を回収し、生理食塩水で適宜希釈後、YPD寒天平板培地に塗布し、28℃で4日間培養後、生育した酵母コロニー数をカウントした。

#### 2・4 セルレニン耐性変異株の分離

同様に調製した菌懸濁液に対して、UV-LEDを光源とする紫外線をシャーレの液体表面から50mmの距離で255nmは1分、270nmは2分、280nmは5分、330nmは30分それぞれ照射し、Ichikawaら<sup>3)</sup>の方法を参考にセルレニン耐性株の分離を行った。すなわち、紫外線照射後の菌懸濁液を12.5μMセルレニン含有YPD寒天平板培地に塗布し、28℃で4日間培養後、生育した酵母コロニーを単離した。

\*1 食品・応用生物担当，\*2 電子技術担当

## 2・5 アルコール脱水麴添加培地による発酵試験

アルコール脱水麴添加培地による発酵試験は、斎藤らの方法<sup>2)</sup>を参考に行った。YPD液体培地で25°C3日間培養した酵母培養液を、アルコール脱水麴培地に添加し、15°Cで20日間培養した。培養後に、炭酸ガス減少量を測定し、培地上清について、香気成分の測定を行った。

## 2・6 香気成分分析

培地上清の香気成分の測定は、パーキンエルマー社製ガスクロマトグラフClarus500（使用カラム：Agilent社製DB-Wax）を用いたヘッドスペース法にて行い、成分の定量は内部標準法に従った。内部標準液として、カプロン酸メチルを用いた。

# 3 結果および考察

## 3・1 微生物育種用機器の改良

新たなUV-LED光源として、主波長330nm, 280nm, 270nm, 255nmのLEDを用いた。主波長255nmのLEDの光放射強度(W)を基準(1.0)とした場合の他のLEDの光放射強度比を表1に示す。

表1 各LEDの光放射強度比(定格電流入力)

主波長 (nm)	光放射強度 強度比
255	基準(1.0)
270	4.3
280	4.1
330	5.6

定格電流を流した場合、各々のUV-LEDの光放射強度が異なっているため、後述する高放熱基板の電子回路の改良を行い、各々のUV-LEDへ流れる電流値(A)を調節することで、全ての波長で光放射強度比が一定になるように制御した。

また電源は安価で一般的なACアダプターを利用し、基板内の電子回路で定電流制御に変換し、UV-LEDを発光した。本研究で用いたUV-LEDは一般的なLEDに比べ大電力タイプであるため、光量も大きい。UV-LEDが放つ熱量も高く、UV-LED自体の熱量によって光量が低下する特性を持つ。そのため、専用の高放熱基板を作成し、UV光量の低下を防いだ。

## 3・2 最適照射条件の検討

清酒酵母にそれぞれの波長の紫外線を照射し、酵母生菌数の経時変化を調べることで、各波長における最適照射時間の検討を行った(図1)。280nm~255nmの範囲では短波長になるに従い殺菌効果は高くなった。330nmは20分間の連続照射では清酒酵母に対する殺菌効果は確認できなかった。なお、330nmについては、120分間の連続照射でも清酒酵母に対する殺菌効果は確認できなかった(データ示さず)。

照射距離50mmで、酵母の生存率が40~50%となる時間、すなわち280nmは5分、270nmは2分、255nmは1分を各波長の最適育種条件とした。殺菌効果が確認できなかった330nmは、30分間の照射で育種試験を行った。

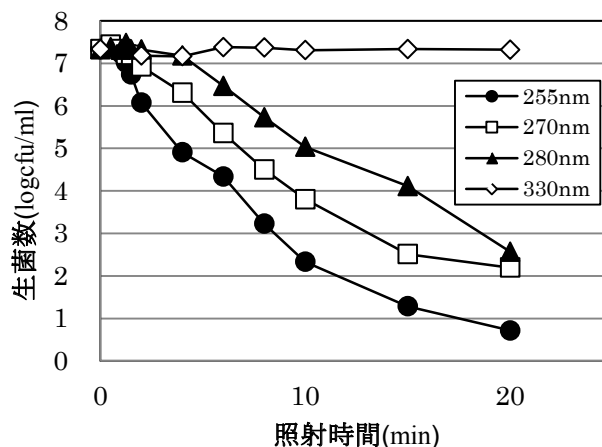


図1 UV-LEDによる紫外線照射後の酵母生菌数

## 3・3 清酒酵母育種試験

最適条件で清酒酵母に各波長の紫外線を照射し、255nmは78株、270nmは77株、280nmは57株、330nmは31株のセルレニン耐性株を取得した。得られた変異酵母について、アルコール脱水麴培地を用いた発酵試験を行い、炭酸ガス減少量、培地上清の香気成分を分析し、それぞれの波長での取得酵母の性質を調べた。

それぞれの波長の紫外線照射により取得した変異株の中で特に良好な結果が得られた株と親株(K-901)の発酵試験結果を表2に示す。それぞれの波長の紫外線照射で取得した変異株は4株ともアルコール脱水麴培地中で、カプロン酸エチルを親株の

4 倍以上生成し、酢酸イソアミル生成量は大きく低下した。炭酸ガス減少量は、330nm, 280nm, 270nm の紫外線照射で取得した変異株については、親株と同程度であったが、255nm の紫外線照射で取得した変異株は、親株と比較して低下していた。

表 2 アルコール脱水麴培地を用いた発酵試験結果

菌株	K-901	4487	4206	4538	4335
照射波長(nm)		255	270	280	330
炭酸ガス減少量(g)	4.8	4.5	4.7	4.8	4.8
香気成分(ppm)					
酢酸エチル	15.0	18.6	25.3	15.1	18.0
酢酸イソアミル	0.8	0.1	0.1	0.1	0.1
イソアミルアルコール	42.0	29.8	30.0	32.9	32.7
カプロン酸エチル	0.6	2.8	2.7	2.4	2.5

#### 4 まとめ

微生物育種用 UV-LED 照射装置を改良し、主波長 330nm, 280nm, 270nm, 255nm の LED を光源とする紫外線を照射可能とした。

清酒酵母にそれぞれの波長の紫外線を照射し、酵母生菌数の経時変化を調べたところ、330nm は 120 分間の連続照射でも清酒酵母に対する殺菌効果は確認できなかった。その他の波長については、殺菌効果が確認され、短波長になるに従い殺菌効果は高まった。育種のための最適育種条件を照射距離 50mm

の場合、280nm は 5 分、270nm は 2 分、255nm は 1 分とした。

最適条件で清酒酵母に各波長の紫外線を照射し、セルレニン耐性株を取得したところ、全ての波長でカプロン酸エチル高生産株が取得できた。

#### 謝辞

本研究は公益財団法人JKAの平成27年度公設工業試験研究所等における人材育成等補助事業において実施しました。

#### 参考文献

- 1) 岡久修己, 宮崎絵梨, 日開野輔, 中村怜. UV-LEDを用いた清酒酵母の育種. 徳島県立工業技術センター研究報告. 2015, 24, p. 23-25.
- 2) 斎藤久一, 渡邊誠衛, 田口隆信, 高橋仁, 中田健美, 岩野君夫, 石川雄章. アルコール脱水麴を用いる培地による優良酵母の分離とその性状. 醸協. 1992, 87, p. 915-921.
- 3) Ichikawa, E.; Hosokawa, N.; Hata, Y.; Abe, Y.; Suginami, K.; Imayasu, Y. Breeding of Sake Yeast with Improved Ethyl Caproate Productivity. Agric.Biol.Chem. 1991, 55, p. 2153-2154.