

河内白麴菌と泡盛黒麴菌の細胞融合

食品工業部

○瀬戸口 真 治, 白 川 賢 一, 浜 崎 幸 男

* サツマ化工 (株)

1. はじめに

焼酎製造において、酒質におよぼす因子はいろいろあるが、麴菌の種類によって味、香りが異なってくる。従来、白麴菌による焼酎造りが多かったが、最近の消費者ニーズの多様化に伴い、いろいろな菌株の造成がなされている。その中で、バイオ技術による焼酎麴菌の育成としては、白麴菌と黄麴菌の細胞融合の研究例がある。しかしながら、白麴菌と黒麴菌による造成例の報告はない。

そこで、当センターでは、白麴菌と黒麴菌を使って細胞融合法による造成を試みたのでその結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 使用菌株

宮崎大学農学部小川助教授より分譲された *Aspergillus kawachii*(k) *Aspergillus awamori* val *kawachi*(A) および栄養要求性を付与した K由来の K1 (his), A由来の A1 (arg) を使用した。

2.2 プロトプラスト融合

プロトプラストの調整に用いる酵素剤は K1に Usukizyme を A1に Novozyma, Zymolyase, Chitinase を混合したものを使用した。浸透圧の調整剤は 0.6M NaCl を用いた。融合処理は Anneらの方法に準じ、図1の示すとおり行った。

2.3 2倍体の形成

0.1% d-camphor を含む最小寒天培地 (MM) にヘテロカリオン (K1-A1-H) 菌体を植菌し 30℃ 7日間培養した。

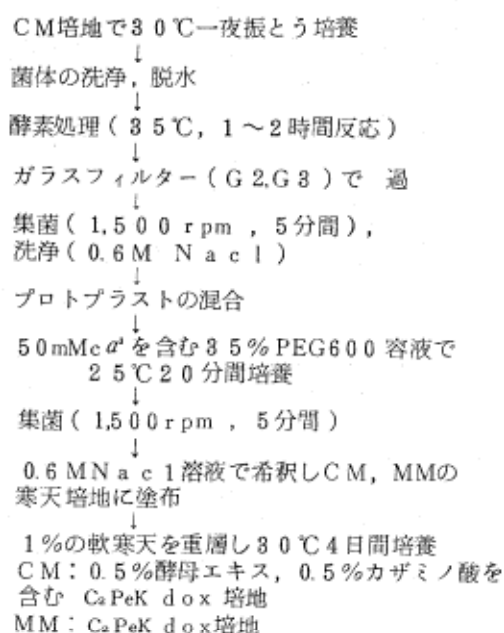


図1 細胞融合の操作手順

2.4 酵素活性及び酸度

100 ml容三角フラスコに20 g浸漬，水切り後オートクレーブで120℃20分間蒸きょうし，放冷後植菌し35℃6日間培養した麴を分析に用いた。酵素活性，酸度の測定は国税庁所定分析法に従い分析した。また，クエン酸は高速液体クロマトグラフィーで測定した。

3. 実験結果

3.1 プロトプラスト融合

K1(his)，A1(arg)のプロトプラスト再生率および融合率は表1に示した。融合頻度は0.24%を示しており，両親株の復帰突然変異率の400倍以上を示していることからMM寒天培地に生育したコロニーは融合株であることが確認された。

表1 再生率および融合頻度

菌 株	復帰突然変異率	再生率%	C	M	M M	融合頻度%
k1(his)	14×10^{-7}	10.0				
A1(arg)	6.0×10^{-5}	8.4	4.40×10^{-5}		1.05×10^{-3}	0.24

3.2 2倍体造成

d-cammphor 処理で得られた分生子をMM寒天培地で培養し，生育できる分生子由来のコロニーの1株をD-K1-A1-13と命名した。本株の分生子の直径とDNA含量を表2に示した。また，2倍体化の頻度は12.2%であった。

3.3 酵素活性および酸度

元株，親株，ヘテロカリオンおよび2倍体株の酵素組成を表3に酸度およびクエン酸の生成量を表4に示した。2倍体株はいずれも両元株と同等もしくは以上の値を示した。

4. まとめ

河内白麴菌と泡盛り黒麴菌の細胞融合を行い2倍体株と推定できるD-K1-A1-13を分離した。本株の

表2 分生子の大きさおよびDNA含量

菌 株	大きさ (直径, km)	DNA含量 (10^{-8} , kg)
K1(his)	43	23
A1(arg)	35	15
D-K1-A1-13	46	44

表3 酵素組成 (U/g-drykoji)

菌 株	AA	GA	AP	ACP
元 株				
K	272	118	4,068	4,388
A	75	45	2,443	2,522
親 株				
K-1	180	114	1,793	3,325
A-1	180	67	3,110	4,064
ヘテロカリオン				
K-1-A-1-4	262	89	2,343	3,388
2 倍 体				
D-K1-A1-13	363	114	4,457	6,173

AA: a-アミラーゼ GA: グルコアミラーゼ
AP: 酸性プロテアーゼ
ACP: 酸性カルボキシペプチダーゼ

酵素組成及びクエン酸生成能は両元株と同等もしくはそれ以上の値を示した。今後は、2倍体株の半数体化を行い遺伝的に安定な菌株を求めると共に焼酎製造試験を行い酒質への影響を調べるつもりである。終わりに臨み本研究に終始指導を賜りました宮崎大学農学部小川助教授に深く感謝致します。

表4 酸度およびクエン酸

菌 株	pH	酸 度	クエン酸(mg/l)
元 株			
K	4.40	1.07	347.8
A	4.22	1.23	456.0
親 株			
K-1	3.95	1.08	411.2
A-1	4.25	1.24	439.8
ヘテロカリオン			
K-1-A-1-4	4.14	1.29	578.5
2 倍 体			
D-K1-A1-13	4.39	1.20	544.1