

河内白麹菌と泡盛黒麹菌の細胞融合

食品工業部 瀬戸口真治, 白川賢一*, 浜崎幸男

Interspecific Hybridization of *Aspergillus kawachii* and *Aspergillus awamori* var *kawachi* by Protoplast Fusion.

Shinji SETOGUCHI, Ken'ichi SHIRAKAWA and Yukio HAMASAKI

新しい焼酎用麹菌の開発を目的として、河内白麹菌 (*Aspergillus kawachii*) と泡盛黒麹菌 (*Aspergillus awamori* var *kawachi*) のプロトプラスト融合を行った。融合処理には35%ポリエチレングリコールを用い、3.14%の融合頻度で融合株 (ヘテロカリオン) を取得した。さらに、分離したヘテロカリオンのうち最小寒天培地上で生育の良い株から0.1% d-campher 処理により2倍体株を造成した。2倍体の分離株のうち、蒸し米上で生育の良い株について、麹を作成し、酵素組成、酸度及びクエン酸生成量を原株および親株と比較した。2倍体株は、原株、親株に比べいづれも同等もしくはそれ以上の値を示した。

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、麹菌の種類によって味、香りが異なってくる。従来、白麹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、県内企業では、白麹菌による焼酎造りの他に黄麹菌併用や黒麹菌によるつくりが増えてきている。

一方、バイオ技術による焼酎麹菌の育成についても研究が行われ、白麹菌と黄麹菌の細胞融合の研究例¹⁾がある。これは、主として黄麹菌の持つ芳香成分、うま味成分の強い生成力と白麹菌の酸生成力を併せもつ麹菌の育成を目的とするものである。黒麹菌については、昭和25年頃までは、南九州4県で使われていた種麹のうちで74%と大部分を占めていた²⁾製品には癖があるものの、濃醇で甘口タイプが好まれていたが、作業上の困難性のため、昭和45年以降殆ど使用されていなかった。

白麹菌と黒麹菌による細胞融合による造成例の

*サツマ化工機

報告は未だない。

そこで、筆者らは、白麹菌と黒麹菌を使って細胞融合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博士より分譲された *Aspergillus kawachii*(k), *Aspergillus awamori* var *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 細胞壁分解酵素

プロトプラスト調製用の細胞壁分解酵素剤は Usukizyme(協和化成), Novnzyme(Novo Biolabs), Funculase(Yakuruto Honsha Co), Zymolyase(生化学工業), Chitinase(SIGMA)を使用した。

2.3 培地

最小培地(MM)は2%のグルコースを含む Czapek-Dox 培地を用い、完全培地 (CM) は最小培地に0.5%酵母エキス(Difco Lab.) および0.5%カ

ザミノ酸(Difco Lab.)を添加し使用した。また、それぞれの固形培地は Czapek Dox Agar "Nissui" (日本製薬) を使用した。

2.4 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Novozyme, 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Anne³⁾らの方法に準じ、図1の示すとおり行った。融合率は融合処理前、MM寒天培地及びCM寒天培地に生育したコロニーの比率により求めた。

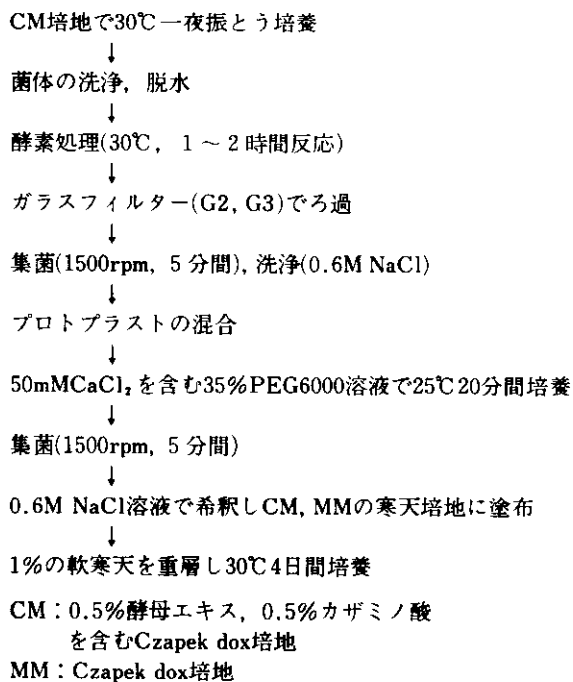


図1 細胞融合の操作手順

2.5 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、得られた分生子をさらにMM寒天培地上で培養し2倍体株を選択した。

また、2倍体のDNA含量の測定はHerbertら⁴⁾の方法により核酸を抽出し、Burtonの方法でDNAを測定した。なお、標準曲線作成のためのDNA標品としては、Salmon testes DNA-Na(Sigma社)を用いた。

2.6 酵素活性及び酸度

100ml容三角フラスコに米20gを秤取りし浸漬、水切り後オートクレーブで120℃20分間蒸きょうし、放冷後分生子(ヘテロカリオンは菌体)を1白金耳植菌し35℃ 6日間培養した麹を分析に用いた。酵素活性、酸度の測定は国税庁所定分析法⁶⁾に従い分析した。また、クエン酸は有機酸分析計Shodex LCDG-1(昭和電工製)で測定した。

3. 結果および考察

3.1 プロトプラスト融合

小川ら⁷⁾は、プロトプラストの調整に用いたUsukizymeは、Trichoderma由来の酵素製剤でありβ-1,3-グルカナーゼおよびキチナーゼをバランスよく含み、真菌類の細胞壁を顕著に分解することを報告している。そこで、Usukizymeおよびその他市販されている酵素剤のFuncelase, Zymolyase, NovozymeをK1(his), A1(arg)に単独酵素製剤としての使用を試みた。K1については0.6M NaClを含む2% Usukizymeの酵素溶液を1~2時間作用させることで最も多数のプロトプラスト(1.4×10^7)が形成された。しかしながら、

表1 再生率および融合頻度

菌株	復帰突然変異率	再生率(%)	CM	MM	融合頻度(%)
K1(his)	1.4×10^{-7}	10.0	4.40×10^5	1.05×10^5	0.24
A1(arg)	6.0×10^{-6}	8.4			

A1については、いずれの酵素剤も単独使用では、菌糸体はくずれるもののプロトプラストの形成は見られなかった。そこで、これら市販酵素剤を混合し、さらにChytinaseを加えて検討した結果、0.6M NaClを含む0.5%Novozyme, 0.2%Zymolyaze, 0.2%Chytinase(pH6.3)の条件下で多少のプロトプラスト(3×10^6)が得られたのでA1との融合を試みた。両株の融合処理はANNEら³⁾の方法に準じて行った。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2,000倍以上を示していることからMM寒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。なお融合処理後の再生率は3.14%であった。得られた融合株は、再度MM寒天培地に菌糸を移植し、その中で特に生育の良い1株をH-K1-A1と命名し実験に供した。H-K1-A1の形成する分生子は完全に両親株のアミノ酸要求株に分離し、MM寒天培地には生育しなかった。この結果からH-K1-A1はヘテロカリオン株であることが確認された。

3.2 2倍体造成

糸状菌のヘテロカリオン株から2倍体株を得る方法として、紫外線処理^{8),9)}およびd-cammphor処理¹⁰⁾が有効な処理法として行われている。本研究では小川らの行った麹菌の2倍体造成に準じd-camphor処理法を用いた。0.1%のd-camphorを含むCM寒天培地(図2)およびMM寒天培地にH-K1-A1の菌糸を生育させるとセクターを形成した。セクターに生じた分生子を回収し、MM寒天培地で培養すると12.2%の分生子が生育しコロニーを形成し、30株を分離した。得られた株の分生子はすべて黒色であった。これらの分生子の中で蒸し米上で生育のよい1株をD-K1-A1-13と命名しその分生子を分析した。

分生子の直径およびDNA含量を表2に示す。D-K1-13の直径はK1, A1に比べわずかに大きくなっており、DNA含量はK1, A1の和に近い値を



図2 d-campher処理(CM)

表2 分生子の大きさおよびDNA含量

菌株	大きさ (直径, μm)	DNA含量 (10-8 μg /個)
K1(his)	5.6	2.3
A1(arg)	4.6	1.5
D-K1-A1-13	5.8	4.4

示した。また、D-K1-A1-13をMM培地で一夜振とう培養したところ分生子が発芽していた。これらの結果からD-K1-A1-13は2倍体株であることを確認した。

3.3 酵素活性および酸度

原株(K, A), 親株(A1, K1), ヘテロカリオン(H-K1-A1)および2倍体株(D-K1-A1-13)の麹を作成し、その酵素組成、酸度およびクエン酸の生成量を測定した。その結果を表3, 4に示した。酵素組成は2倍体株が、活性の高い原株(K)と同等もしくはそれ以上の値を示し、特に α -アミラーゼと酸性カルボキシペプチダーゼは高い値を示した。酸度は、通常の製麹法とは培養法が異なるためかなり低い値になっており、十分な比較はできなかったが、クエン酸の生成量は原株、親株を上回っていた。これらの結果は、焼耐用麹菌としての有用性を示している。

蒸し米上での生育速度は、速い方からA, A1, D-K1-A1-13, K, H-K1-A1, K1であった。K1は

特に遅く十分にハゼるまでに5~6日を要した。

D-K1-A1-13は生育速度は速いが、分生子の着生はかなり遅く、着生する前に麹が自己消化してしまい種麹の作成に困難を要した。今後は、着生を速めるための検討を行い、種麹を作成し、小仕込試験による焼酎用麹菌として評価をする必要がある。

また、2倍体は自然分離株を生ずる¹¹⁾可能性もあり安定化のための半数体化処理についても今後検討したい。

表3 酵素組成(U/g-drykoji)

菌株	AA	GA	AP	ACP
元株				
K	272	118	4068	4338
A	75	45	2443	2522
親株				
K-1	180	114	1793	3325
A-1	133	67	3110	4064
ヘテロカリオン				
K-1-A-1-4	262	89	2343	3388
2倍体				
D-K1-A1-13	368	114	4457	6173

AA: α -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

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

4. おわりに

河内白麹菌と泡盛黒麹菌のプロトプラスト融合を行った結果、3.14%の融合頻度で融合株を取得した。分離した融合株(ヘテロカリオン)を0.1% d-campher処理により2倍体株を造成し、D-K1-A1-13を分離した。

本株の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が、麹の分生子の着生はかなり遅かった。

終わりに臨み貴重な菌株を譲与され、また、終始指導を賜りました宮崎大学農学部小川博士に深く感謝致します。

参考文献

- 1) 外山英男, 外山信男: 醸酵工学, **68**, 85 (1990)
- 2) 日本醸造協会編: しょうちゅう醸造技術, 26 (1976), p. 26
- 3) J. Anne, J. F. Ppederdy: J. Gen. Microbiol. **92**, 413(1976)
- 4) W. C. Schneider: J. Biol. Chem., **164**, 747 (1946)
- 5) K. Burton: Biochem. J., **62**, 315(1956)
- 6) 日本醸造協会: 国税庁所定分析法注解(1974)
- 7) 小川喜八郎, 外山信男, 杉田浩一: 醸酵工学, **66**, 385(1988)
- 8) C. Ishitani, Y. Ikeda, K. Sakaguchi: J. Gen. Appl. Microbiol, **2**, 401(1956)
- 9) K. Oda, N. Iguchi: Agric. Biol. Chem., **27**, 758(1963)
- 10) G. Pontecorvo, J. A. Roper, E. Forbes: J. Gen. Microbiol., **8**, 198(1953)
- 11) K. Ogawa, H. Ohara, N. Toyama: J. Ferment- Bioeng., **52**, 1985(1988)