

細胞融合法による麹菌の育種とその応用

(株)花屋三左衛門
和久豊

清酒醸造において麹は重要な位置をしめており麹のもつ内容性質が、製成酒の品質に大きな影響を与える事は昔からよく知られている。最近の清酒の多様化の動きの中で、多くの研究がなされており、麹菌についても今までにない新しい性質を持った菌株の造成開発が求められている。演者らは麹菌に積極的に新しい性質を導入できるという点でプロトプラスト融合法に注目し、それによる麹菌の育種を行っている。

今回、演者らは清酒のごく味に關与する重要な成分である事が知られている非醱酵性オリゴ糖に着目した。これらの成分は清酒醪中において transglucosidase(TGase)より、生成される事が明らかにされており¹⁾、また、岩野ら²⁾は TGase を利用し非醱酵性オリゴ糖含量の多い4段用糖化液を作成している。TGase 活性が強力な麹菌を造成する事ができれば、非醱酵性オリゴ糖含量の高い清酒醸造が可能と考え、TGase 活性の強力な *Aspergillus saitoi* と清酒用麹菌 *Aspergillus oryzae* の種間プロトプラスト融合を行い、TGase 活性の強力な清酒用麹菌の造成を行った。更に得られた融合株を用いて清酒製造試験を行ったのでそれらの結果について報告する。

1. 融合株の造成

方法

当社保存菌株である *Asp.oryzae* KBN202-2(清酒用麹菌)と、*Asp.saitoi*(焼酎用麹菌)の color mutant(白色変異株)P-11-54 株³⁾の2株に栄養要求のマーカをつけて供試菌株とした。Table 1 にこれら2株の性質を示した。

プロトプラスト作成及び融合の手順を、Fig.1 に示した。融合には、島津社製細胞融合装置 SSH-1 を使用した電気融合法によった。融合処理後、Czapek-Dox 最小培地上で生育してきた菌株を融合株とし、それらの諸性質の検討を行い、目的とする菌株を選択した。

結果及び考察

今回の融合率(融合株数/融合処理後の再生数)を Table 2 に示した。通常、電気融合法はポリエチレングリコールを使用する方法に比べ融合効率が高くなるとされているが、今回の融合効率は、高い数字とは言えなかった。これは、融合条件を変えても改善されなかったが、使用菌株を変更させることにより高い融合効率が得られた。これらより、高い融合効率を得る為には、それに適した菌株、あるいは菌株の組み合わせなどの選択が必要であると考えられた。得られた融合株44株は胞子の色より、(1)*Asp.oryzae*型、(2)*Asp.saitoi*型の2種類にわけられ、(1)(2)の混在型は存在しなかった。(1)(2)のタイプとも完全培地上で両親株へ分離しなかったことから、ヘテロリオンとは考えられず、また半数体化剤である p-フルオロフェニールアラニン、2-ベンズイミダゾールカルバミン酸エチルによる処理によっても胞子の色の分離、栄養要求株の出現は認められなかった。また、融合時に設

定した同数のプロトプラストを混合し融合処理しなかったもの、それぞれのプロトプラスト単独で融合処理したものの、のいずれにも最少培地上で生育する菌株は得られなかったことから、得られた菌株は融合初期に核融合組換えを起こした早期組換え体と推定しているが、この点に関してはさらに検討を加える必要がある。Table 3 に今回得られた融合株の中で孢子の色が緑色である6株(以下、特に断わらない限り緑色株を融合株と表示する。)を使用した米麹における酵素活性を示した。(Asp.saitoi 38株については出麹の酸度が1m1以上と生酸性が認められたため、今回の検討から除外した。)緑色株6株は片方の親株であるAsp.oryzaeに比べ6株ともTGase活性が上昇しており、その中でも、No.2株はAsp.oryzaeの約2.5倍のTGase活性を持っていた。これは、もう一方の親株でTGaseの強力なAsp.saitoiに比べても高い値であった。-amy1ase、glucoamy1ase(GAase)、acid carboxypeptidaseについても同様に両親株に比べ活性が強くなる傾向が認められ、acid proteaseのみ両親株の中間の値となった。Table 4 に得られた融合株6株の菌学的性質を示した。融合株6株において、両親株で認められない麹酸の生成があり、またNo.1 No.6の菌株では、褐変性がプラスとなっていた。アフラトキシンの生成は6株すべてで認められなかった。このような酵素活性及び菌学的性質の変化については、今後事例を積み上げていく中で、何らかの回答を得たいと考えている。以上の結果よりTGase活性が強くまた、米麹における褐変性の認められない融合株No.2を、今回目的の菌株として選択した。

2. 清酒製造試験

方法

種麹は、試験区として融合株No.2株を、対照区には、Asp.oryzae KBN202-2を用いた。原料米は、あいちのかおり(愛知県産一般米)精米歩合70%を使用した。製麹は麹蓋法により行った。酒母は協会7号酵母を用いたアンプル酒母を調整した。仕込みは総米54kgの4段仕込みとし、酒母は協会7号酵母を用いたアンプル酒母を調整使用した。仕込み配合をTable 5に示した。麹、製成酒の分析は常法により行った。糖組成の分析はベ-パクロマトグラフィ-により行った。

結果

使用した麹の一般分析の結果をTable 6に、有機酸分析の結果をTable 7に示した。試験区は対照区と同様に麹菌の生育は良好であったが菌糸のからみが少なく、しまりがほとんど認められなかった。これは融合に使用したAsp.saitoi P-11-54株に近い性質であり、今回選択したNo.2株がこの性質を持っていることは機械製麹に有利であると考えられた。今回の製麹は標準的な経過で行ったが、試験区は対照区に比べトランスグルコシダーゼは約1.7倍の値となり、今回の目的に合致するものと判断された。その他の酵素についても小試験の時と同様に酵素活性は高くなり、特にグルコアミラーゼは2倍の活性値を示した。有機酸分析の結果では、試験区の麹は対照区に比べクエン酸コハク酸が増加しており、これは、Asp.oryzaeにAsp.saitoiの形質が導入されたためと考えられた。醪の経過をFig.2に示した。試験区では初期pHが高くアルコール生成が早く酸度アミノ酸度がやや高い傾向にあったが、これは、使用した麹の酵素活性が試験区の方が高いことが原因であろう

と考えられた。製成酒の一般分析の結果を Table 8 に、有機酸分析の結果を Table 9 に示した。一般成分は両者とも大きな差は認められず、有機酸組成はやや試験区の方が、多い傾向を示した。しかし、官能試験の結果では、融合株を使用した製成酒は対照に比較して、やや濃い感じとなったが、両者の間に格段な利き酒上の差は認められなかった。Table 10 に糖組成の測定結果を示した。試験区は対照区に比較し、グルコース濃度が高く非醗酵性糖の中でイソマルトースがやや高く、イソマルトリオースが対照区と同等かやや低い結果となった。パノース、イソマルトテトラオースは対照区に比べ低い結果となった。これは、TGase 活性とともに GAase 活性も上昇したため TGase の作用が十分に発揮されなかったと推定された。これは、TGase の糖転移作用の最適基質であるマルトースの不足によるものか、TGase, GAase の作用によりオリゴ糖が分解された結果であるかは不明であるが、少なくとも GAase の存在により TGase からの非醗酵性オリゴ糖の生成率が極端に低下するという岩野ら⁴⁾の結果と一致するものと考えられた。

今回、麹菌の TGase 活性を上げること及び、それを利用することにより製成酒中の非醗酵性オリゴ糖含量の増加の目的とした検討を行ったが、麹菌の TGase 活性の上昇と共に GAase 活性が上昇してしまい、目的を達成することができなかった。現在、変異法により TGase 活性を減少させずに GAase 活性を低下させることを検討中である。

3 . 要約

TGase 活性の強力な菌株の造成を目的として *Asp.oryzae* と *Asp.saitoi* の種間プロトプラスト融合を行った。

得られた菌株は胞子の色より *Asp.oryzase* 型 *Asp.saitoi* 型に分けられ、ヘテロカリオンまたは、2 倍体と思われるものは得られなかった。今回得られた菌株は早期組換え体ではないかと推定した。

胞子の色が緑色で TGase 活性の強く褐変性のない No.2 株を、今回目的の菌株として選択した。

融合株 No.2 株を使用し、総米 54Kg の清酒製造試験を実施した。

本実験を行うにあたり終始御指導いただいた名城大学教授山下勝博士、また、多大な御協力をいただいた愛知県食品工業技術センター深谷伊和男先生に厚く御礼申し上げます。

- 1) 澱粉科学ハンドブック：P113、朝倉書店
- 2) 岩野ら：醸協、74、(1)53(1979)
- 3) 伊藤ら：昭和 62 年度日本醗酵工学大会講演要旨集 p69(1987)
- 4) 岩野ら：醸協、75、(12)997(1979)