

422 プロトプラスト融合による醤油麹菌 *Aspergillus sojae* の育種

(キッコーマン 醸科研) ○牛島重臣, 中台忠信

1. 目的 *Aspergillus sojae* は, *Aspergillus oryzae* とともに醤油醸造用麹菌として広く用いられている。我々は, *A. oryzae* とは醸造特性が異なり<sup>1)</sup>、まだプロトプラスト融合の成功例のない *A. sojae* について, 系統を異にする株間のプロトプラスト融合を検討している。醤油麹菌の生産するプロテアーゼは製品の歩留りに, グルタミナーゼは醤油中のグルタミン酸量に大きく寄与することが知られている。今回, 系統を異にする高プロテアーゼ生産株と高グルタミナーゼ生産株とを融合させることにより, 両酵素のバランスのよい株の育種を試み, 若干の融合株を得たので, 麹菌のプロトプラスト化, 融合の条件および得られた融合株の性質について報告する。

2. 方法 使用した菌株は, 当社研究所保存株で, 高プロテアーゼ生産株 *A. sojae* No. 2048 (*A. sojae* KS の変異株) と, 高グルタミナーゼ生産株 *A. sojae* No. 2165 である。各々, 分生胞子の色と栄養要求のダブルマーカ―を付与して使用した。新鮮な分生胞子を液体培地に接種後, 振盪培養して若い菌糸を得た。洗浄後の菌糸にスタビライザーを含む細胞壁溶解酵素液を作用させ, 融合・再生に充分量のプロトプラストを得た。両株のダブルマーカ―株のプロトプラストを Anné らの方法<sup>2)</sup> にほぼ準じて融合・再生させて, 最少培地に生育する融合株を選択した。

3. 結果 ①市販酵素の効果: セルラーゼオノズカが低頻度プロトプラストを与えた。

② *Trichoderma*, *Bacillus*, *Streptomyces* 起源酵素の効果: 自ら調製したこれら酵素のうち, *Trichoderma* 起源の酵素ではプロトプラストは形成されず, *B. circulans* 起源酵素, *Streptomyces* 起源酵素 (両者とも市販キチナーゼ併用) で供試細胞の 30% 以上のプロトプラストが形成された。

③プロトプラストは 6~12 hr 培養の菌糸から効率よく得られ, 6 hr 以内の培養菌糸からは形成されなかった。

④ *B. circulans* 起源酵素の最適濃度は 30 mg/ml, 反応最適 pH は 6.5 であった。

⑤スタビライザーとしては Sorbitol と KCl がよく, Sorbitol の最適濃度は 0.8 M であった。

⑥ 20~33% PEG/Ca<sup>++</sup>, Glycine (pH 7.5) 下で融合後, 再生用最少培地に生育した株は不安定なヘテロカリオンであった。

⑦ヘテロカリオン株の分生胞子に小田らの方法<sup>3)</sup> に従って UV 照射し, 安定な緑色融合株を分離した。

⑧安定な緑色融合株は, UV 感受性や核染色の結果から 2 倍体であると判断された。

⑨安定な緑色融合株の酵素生産性は, その両親株の中間型を示すものが多かった。

1) 林 和也: 醸協, 75(10), 850 (1980).

2) J. Anné and J. F. Peberdy: *J. Gen. Microbiol.*, 92, 413 (1976).

3) K. Oda and N. Iguchi: *Agric. Biol. Chem.*, 27, 758 (1963).