

醤油酵母の細胞融合に関する研究

第一報 栄養要求株の取得とプロトプラスト再生条件の検討

山田 哲也・小瀬古茂樹*・小竹原 聡**・尾崎 安宣・久松 眞

三重大学生物資源学部 食品化学研究室

*サンジルシ醸造株式会社, **ヤマモリ食品工業株式会社

Studies on Cell Fusion of Soy-Sauce Yeast

Part 1 Production of Auxotrophic mutant and Regeneration Condition from Protoplast

Tetsuya YAMADA, Shigeki KOSEKO*, Yasunori OZAKI,
Satoshi KOTAKEBARA** and Makoto HISAMATSU.

Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Bioresources Mie University.
Sanjirushi Corporation*, Yamamori Corporation**

Summary

For improvement of Soy-sauce fermentation process, *Z. rouxii*, a Soy-sauce yeast, was tried to have more alcohol fermentation activity by cell fusion with *S. cerevisiae*. The result are following:

1 To check the success of cell fusion, auxotrophic mutants of the both yeast were obtained from both original strains by NTG treatment and they were four strains of *Z. rouxii* (*ade*⁻), one strain of *S. cerevisiae* (*lys*⁻) and four strains of *S. cerevisiae* (*his*⁻).

2 As the result of production of double marker mutant, Cycloheximide resistance strain was selected from *S. cerevisiae* (*lys*⁻).

3 Protoplast of yeast was prepared by Zymolyase treatment, and cell fusion of protoplast was attempted in 30% PEG solution contained 50 mM CaCl₂, and fused cell was regenerated on the synthetic medium agar.

4 Eight colonies were obtained by the above method. All of them have activity of galactose fermentation, but none of them has ability of sucrose assimilation. They have the same extent activity of alcohol fermentation and NaCl tolerance activity as *S. cerevisiae*. SDS electrophoretic patterns of them are resemble to *S. cerevisiae*.

5 Addition of cell wall components such as β -1, 3 glucan, mannan, cell wall from *S. cerevisiae*, to the regeneration medium agar was observed no favourable contribution to regeneration yield of protoplast.

Key words: Soy-sauce yeast, auxotrophic mutant, cell fusion, protoplast

緒 言

近年、微生物の育種改良が発酵工業において直接生産性の向上や、工程の簡素化をもたらし、工業的利益を挙げている。これまでの微生物育種の方法は、微生物に突然変異を誘起させるか、また、交配を重ねその中から優良な性質を有する微生物を選択していた。

一方、近年において、分子生物学、分子遺伝学の進歩にともない、従来になく育種法が開発されてきた。その一つが、遺伝子操作であり、そして他の一つはプロトプラスト融合法である。このプロトプラスト融合法は、1973年より報告が次々と出された。再現性のある最初の融合法は、Keller と Melchers の高 pH-高 Ca 法であり、続いて、見いだされたのは Kao と Michayluk と Walling らのポリエチレングコール (PEG) 法である。他には、Nagata らのポリビニルアルコール (PVA) 法、そして亀谷らのデキストラン法と四つの化学的方法が知られ、これについての総説¹⁾がある。又、物理的な方法は Zimmermann らの誘電電気泳動法による細胞融合法¹⁾であり、各々(1)栄養細胞のプロトプラスト化、(2)プロトプラスト融合、(3)融合したプロトプラストの細胞壁合成による通常栄養細胞への再生、とからなる三つの過程を経て行われる。又、ここで言うプロトプラストの語意は、植物や微生物の原形質は、細胞膜と、その外側にある多種の多糖類などからなる細胞壁に囲まれており、この細胞壁を取り除いた生命活動を維持するうえでの最小の単位である原形質を、プロトプラストと言う。尚、細胞壁の一部が残っているものをスフェロプラストと言うが、ここでは両者を総称してプロトプラストと呼ぶこととした。

現在はプロトプラスト融合法が活発化し同種、異種族間でも多く試みられるようになってきた。酵母では突然変異、性適交雑、プロトプラスト融合、異種遺伝子導入、発現も可能となっているが、一般に醸造用酵母ではプロトプラストによる無性適交雑を行うにしても適切な選択マーカーを使用し難い。と言うのは選択マーカーを突然変異により付与しようとしても多くの株が2倍体、高次倍数体のため突然変異株の分離が困難であり、得たとしても強い変異処理を行うと醸造用酵母の持つ有用形質を損傷させる可能性があることから適用は一般的には困難である。今回、醤油諸味中に生息する酵母のアルコール

生成能の向上、及び、香気の改善を目的として実用醤油酵母の改良に着手した。酵母の育種改良の手段として、PEG 法による細胞融合を行った。使用する酵母には、アミノ酸、核酸等の栄養要求性、薬剤耐性又呼吸欠損等のマーカーを付与することを試み、醤油用酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* と *Saccharomyces cerevisiae* の異属間細胞融合を行い、*Z. rouxii* の耐塩性を有し *S. cerevisiae* のアルコール高生成能を有する醤油酵母の育種、改良の研究を行なった。また、プロトプラストの通常栄養細胞への再生率が非常に低いことが、プロトプラスト融合株の分離再生率の低下を更に助長している。よって、プロトプラストの栄養細胞への再生、復帰を向上させるためにはプロトプラストの細胞壁合成が重要な鍵となることから、その細胞壁合成の前駆物質と考えられる細胞壁合成成分、マンナン、 β -グルカン、などの多糖を再生培地に加え、その再生率への影響についても検討した。

実験方法

1. 使用菌株

当研究室保存菌株 *Zygosaccharomyces rouxii*, *Saccharomyces cerevisiae* (協会9号)、の2種類の酵母を供試菌株として用いた。

2. 使用培地

前培養培地として GYP 培地、選択培地として最小培地、アミノ酸添加最小培地を使用した。各々の培地成分は Table. 1, 2 に示した。

Table. 1 GYP Medium.

Glucose	20 g
Polypepton	20 g
Yeast ext	10 g
Tap water	1000 ml

3. NTG (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine) 処理²⁾

酵母前培養液 0.5 ml を GYP 培地 4.5 ml に加え 30°C、6 時間培養した。この培養液を生理食塩水で遠心集菌 (3000 rpm, 5 min) を繰り返した。これに NTG 溶液を 5

Table. 2 Synthetic Medium.

Glucose	5.0 g	<u>Stocked vitamin solution (C)</u>	
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.5 g	Thiamine	100 μg
KH ₂ PO ₄	1.0 g	Pyridoxin	100 μg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g	Nicotinic Acid	100 μg
<u>Stocked salts solution (A)</u>		Pantothenic Acid	100 μg
NaCl	10 mg	Biotin	100 μg
CaCl ₂	10 mg	Inositol	10 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	10 mg		
FeCl ₃ ·6H ₂ O	10 mg		
<u>Stocked salts solution (B)</u>		Agar	30 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	700 μg	Deionized Water	1000 ml
CuSO ₄ ·5H ₂ O	500 μg	pH	6.0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	200 μg		
H ₃ BO ₄	100 μg		
KI	100 μg		

ml (100 μg/ml) 加え、30°C、60分間培養後、生理食塩水で3回遠心洗浄 (3000 rpm, 5 min) し、NTG を除去した。

4. ナイスタチン濃縮²⁾ (変異株の濃縮)

NTG 処理後の菌体懸濁液から一定量とり GYP 培地に加え変異株を安定化 (30°C, 24時間) させた。この培養液を遠心洗浄 (3000 rpm, 5 min) し、上澄みの大部分を捨て 0.5 ml とした。次に、95%エチルアルコールで 1 mg/ml となるよう調製したナイスタチン溶液を殺菌水で 100 μg/ml に希釈調製し、上記菌体懸濁液に加え、濃度が 10 μg/ml となるように全量を 5 ml とした後、30°C、一夜培養した。この培養液を適当に希釈し予め調製してあった GYP 寒天培地上に 0.1 ml ずつ加え、コンラージ棒で広げ 30°C、3日間培養した。

5. 変異株の分離

GYP 寒天培地に生育したナイスタチン濃縮コロニーを選択培地にレプリカした。各々の選択培地は、最小培地 (SF)、アミノ酸添加最小培地 (SA)、GYP 培地 (GYP) を使用し SF, SA, GYP の順番に植え継ぎ、三日間、30°C で培養した。SF (-) SA (+) GYP (+) をアミノ酸要求株、SF (-) SA (-) GYP (+) を核酸要求株と考えた。この二つの要求株について、アミノ酸16種、

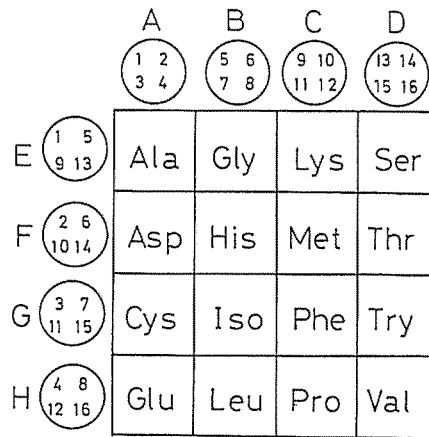


Fig. 1 Combination test of amino acid.
1~16: Code number of amino acid (cf: Table 3).

Table. 3 Amino Acid and Nucleic Acid.

Amino Acid		Nucleic Acid
1. Alanine	9. Lysine	1. Adenine
2. Aspartic Acid	10. Methionine	2. Cytosine
3. Cysteine	11. Phenylalanine	3. Guanine
4. Glutamic Acid	12. Proline	4. Thymine
5. Glycine	13. Serine	5. Uracil
6. Histidine	14. Threonine	
7. Isoleucine	15. Tryptophan	
8. Leucine	16. Valine	

核酸5種を用いてそれら変異株の栄養要求性を調べた。アミノ酸要求性を調べる方法として各々のアミノ酸を含んだ最小培地を Fig. 1 の A~H の組合せになるように調製した。これに菌を接種し生育してきたシャーレの組合せにより栄養要求性を決定した。尚、アミノ酸は各々 10 mg/ml の濃度の溶液を最小培地 1 L 当りに 1 ml 加えた。核酸も同様に行った。又、使用したアミノ酸、核酸は Table. 3 に記した。これにより得られた変異株は、各々の殺菌済み液体最小培地 (SF, SA) 5 ml に植え継ぎ 30°C, 4 日間振とう培養し SA 培地のみ生育したものを栄養要求性変異株とした。

6. 各種生理試験³⁾

1) 糖発酵性試験は Glucose, Galactose の 2 種について行いダーラム管を入れた最小培地中のガス発生の有無を調べた。

2) 糖資化試験は Glucose, Galactose, Sucrose, Raffinose の 4 種について行いそれらの糖を含む最小培地中の生育の有無を調べた。

3) 食塩耐性試験は GYP 培地中に食塩を 0~30% となるように加え一週間培養したときの生育度合を検討した。

4) Anilin blue 染色性⁴⁾ は Glucose 3.0%, Yeast ext 0.5%, Anilin blue 0.005%, Agar 2.0%, pH 7.2 の寒天培地に接種し 30°C, 4 日間培養後のコロニー染色性を観察した。

7. 酵母の核観察⁵⁾

1) DNA 結合蛍光試薬 DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) による方法。

2) Giemsa 染色法。CARNOY 固定液 (Alcohol 6 ml, chloroform 3 ml, Acetic acid 1 ml) で処理後 Giemsa 染色液で染色する方法。

8. Cycloheximido 耐性株の造成²⁾

Cycloheximido を含む GYP 培地に前培養しておき、菌が生育したら次に前よりも濃い Cycloheximido 濃度の GYP 培地に接種する。これを繰り返すことにより Cycloheximido 耐性株を造成した。

9. 菌体内蛋白質の比較⁶⁾

1) 試料の酵母菌体を集菌後、トリス塩酸緩衝液に懸濁し超音波細胞破碎機で菌体を破壊した。未破碎酵母は遠心除去 (4000 rpm, 15 min) 後、上澄み液に 20% TCA を加えて沈澱物を遠心回収 (12000 rpm, 5 min) し、5% TCA で洗浄した後、沈澱物を 0.01 N NaOH で溶解し試料とした。

2) SDS-PAGE は、スラブ泳動装置を使い分離ゲルに 12% ゲル濃度を用いた。試料蛋白質は 1 mg/ml 程度になるように希釈し 2 分間煮沸し 60 μ l をゲルに注入した。泳動条件は 1 mm 厚のゲルで 10 mA 定電流で泳動させた。泳動後は第一化学の銀染色キットを用いて銀染色を行った。

10. 酵母のプロトプラストの調製方法⁷⁾

4°C で保存してある菌株のスラント培地から、菌を一白金耳とり、5 ml の GYP 液体培地に植菌し 30°C, 24 時間静置培養した。この前培養液から 1 ml とり 50 ml の GYP 培地の入っている 100 ml 容マイヤーフラスコに接種し 30°C, 20 時間振とう培養した。この培養細胞懸濁液から 5 ml を取り遠心集菌 (3000 rpm, 5 min) し、殺菌水で 2 回洗浄し 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で 1 回遠心洗浄した。0.2% 2-メルカプトエタノール、細胞壁溶解酵素として 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した Zymolyase-20 T (1 mg/ml) (キリンビール(株)製) そして、浸透圧安定剤として 1 M 塩化カリウムを含んだ 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5), 5 ml に懸濁させ、L 字型試験管に移し、ゆっくりと振とうさせながら、1 時間反応させてプロトプラスト化させた。

11. 酵母のプロトプラストの融合再生方法

得られた 2 種のプロトプラストに 1 M 塩化カリウム 3 ml 加え混合後、遠心洗浄 (1500 rpm, 10 min) を繰り返して、これに 50 mM CaCl₂ を含む 30% (w/v) PEG 6000 溶液 5 ml を加え 20°C, 20 分間でゆっくり振とうさせた。これを 1 M 塩化カリウムで遠心洗浄を 2 回繰り返して、室温で 1 時間放置後 1 M 塩化カリウムを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で希釈し、その 0.1 ml ずつを 1 M 塩化カリウムを含んだ GYP 寒天培地上に塗布し同組成の培地を重層した。30°C, 4 日間培養して生じたコロニーをプロトプラストからの再生株と非プロトプラスト

株の合計の総菌数とした。一方、生理食塩水で連続希釈し、その0.1 mlを1 M 塩化カリウムを含まないGYP寒天培地上に塗布した後、同組成の培地を重層した。これを30°C、4日間培養して生じたコロニーを非プロトプラスト株数とした。この両者の培地に生育したコロニーの差をプロトプラスト数とした。

12. プロトプラスト再生促進物質

1) 酵母の細胞壁と細胞質の調製

酵母 (*S. cerevisiae*) 細胞集菌体を殺菌水で十倍に希釈した溶液 15~20 ml を-30°C に冷却した細胞破砕機エクスプレス (BIOX 製) に挿入し凍結させた。このエクスプレスを圧縮機を用いて交互に10回ほど圧縮溶融操作を繰り返した。破砕処理した酵母菌体は遠心分離 (10000 rpm, 10 min) し、沈澱部を細胞壁区分、上澄液と細胞質区分として用いた。

2) 添加物質

エクスプレスにより破砕し分別した細胞壁区分 0.1 ml, 細胞質区分 0.1 ml, 細胞壁構成多糖としてマンナン0.1%, β -1,3 グルカン0.1%, カードラン0.1%, 塩化カルシウム 10 mM, イノシトール 10 mM を寒天培地 20 ml 当り添加試料とした。

結 果

1. 栄養要求性株の分離

Table. 4 に取得した栄養要求性変異株の分離経過及び要求型を示した。*Z. rouxii* からはアデニン栄養要求株を4株, *S. cerevisiae* からはヒスチジン栄養要求株を4株, リジン栄養要求株を1株取得した。更に栄養要求性マーカー以外に酵母のプロトプラスト融合株の選択マーカーとして糖の資化性, 発酵性, 耐塩性, 核染色, 抗生物質耐性試験を行った。Table. 5 に栄養要求マーカーを付与した変異株の生理的性質を示した。*Z. rouxii* はアデニン要求性を示し, グルコースを資化, 発酵し, 18%までの

Table. 5 Physiological Characteristics of Mutants.

	<i>Z. rouxii</i>	<i>S. cerevisiae</i>
1. Genotype	ade ⁻	lys ⁻
2. Assimilation of Sucrose	-	+
Glucose	+	+
Galactose	-	+
Raffinose	-	+
3. Fermentation of Glucose	+	+
Galactose	-	+
4. Salt tolerance	18%	6%
5. Color of Colonies on Anilin Blue plate	Blue	White
6. Cycloheximide resistance	-	+

食塩耐性を示した。*S. cerevisiae* はリジン要求性を示し, ガラクトース発酵性を有し, 食塩耐性 6%, シクロヘキシミド耐性を示した。又, ヒスチジン要求株よりもリジン要求株の方がシクロヘキシミド耐性が強化された。

2. プロトプラストの再生率と復帰の有無

Z. rouxii (ade⁻) 株と *S. cerevisiae* (lys⁻. cyh^r) 株のプロトプラストの再生率と復帰の有無について調べたところ Table. 6 に示すように *Z. rouxii* (ade⁻) 株では再生率 6.7%, 復帰頻度は 4.5×10^{-6} であることより殆ど無視できる。*S. cerevisiae* (lys⁻. cyh^r) 株では再生率 1.0%, 復帰は確認されなかった。

3. *Z. rouxii* (ade⁻) 株と *S. cerevisiae* (lys⁻. cyh^r) 株との細胞融合

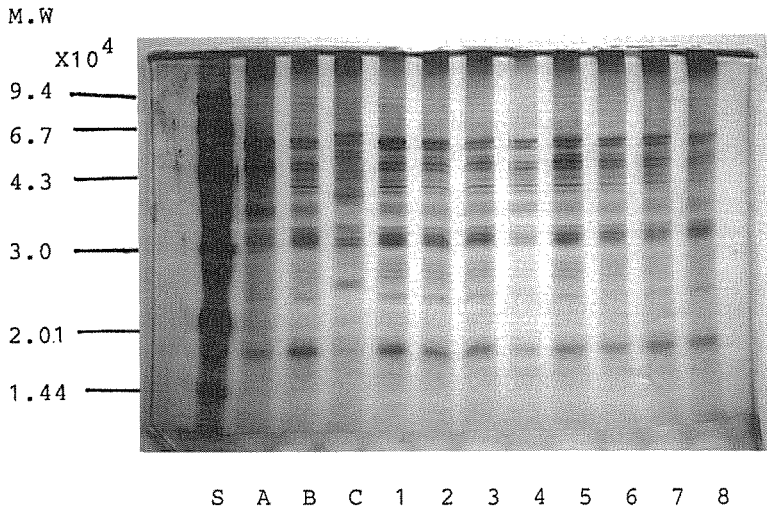
プロトプラスト融合の結果, 最小培地に生育が良好なものについてシクロヘキシミド耐性を調べたところ8株に耐性があった。これらの菌株について生理的性質を調べたところ8株とも全てガラクトース発酵性を有し, またシュクロース資化性がなかった。そして耐塩性は *S. cerevisiae* (lys⁻. cyh^r) 株と変わりなく発酵能も変わらなかった。酵母菌体の大きさに差は無く, 核染色による核

Table. 4 Selectivity of Auxotrophic Mutant.

Strain	Wild type	Auxotrophic mutant	Total	Auxotrophy
<i>Z. rouxii</i>	1045	4	1049	ade ⁻ (4)
<i>S. cerevisiae</i>	315	5	320	his ⁻ (4), lys ⁻ (1)

Table. 6 The ratio of Protoplast Formation and its Regeneration of *Z. rouxii* (*ade*⁻) and *S. cerevisiae* (*lys*⁻, *cyh*^r).

Strain	Cell number (Cells/ml)				
	Native	Non-protoplast	Protoplast	Regenerating cell	Reversion frequency
<i>Z. rouxii</i> (<i>ade</i> ⁻)	7.5×10^6	0	7.5×10^6	5.0×10^5	4.5×10^{-6}
<i>S. cerevisiae</i> (<i>lys</i> ⁻ , <i>cyh</i> ^r)	7.6×10^6	9.0×10^2	7.6×10^6	8.0×10^4	—

**Fig. 2** SDS-Electrophoretic pattern of cell protein from fusion cell.

Cell protein was subjected to SDS PAGE (SDS PAGE was achieved on a slab of 12% polyacrylamide gel under 10 mA current at room temperature). 60 μ g of cell protein was used and the protein was stained with Ag^+ staining reagent (DAIICHI CO LTD).

S: Standard. A: *S. cerevisiae*. B: *S. cerevisiae* (*lys*⁻, *cyh*^r). C: *Z. rouxii* (*ade*⁻).
1~8: Fusion cell.

数も1個であることがわかった。更に、得られた融合株の8株の菌体内蛋白質のパターンを比較した。Fig. 2に示されるように全て *S. cerevisiae* (*lys*⁻, *cyh*^r) 株のパターンに類似していることが明らかであった。

4. プロトプラスト再生促進への影響

完全培地である GYP 培地と細胞壁構成成分である β -1,3 グルカン、マンナンのほか酵母の細胞壁区分、細胞質区分等を単独に添加した最小培地に於ける再生率への影響を Fig. 3 に示した。7 種類の物質とも単独添加した場合、各々再生率の向上は特に見られなかった。

考 察

今回、取得した栄養要求性変異株 *S. cerevisiae* の親株の耐塩性が12%であったが NTG 処理後得られた栄養要求性株の耐塩性は6%まで低下し、NTG 処理により耐塩性に関与する遺伝子の何等かの部分に損傷を受けたと考えられ酵母本来の性質が損なわれないマーカー付き菌株のスクリーニングを検討する必要がある。

造成した変異株 *Z. rouxii* (*ade*⁻) 株と *S. cerevisiae* (*lys*⁻, *cyh*^r) 株から得られた融合株について糖資化性、糖発酵性、耐塩性、菌体内蛋白質のパターンから推測すると今回分離した菌株は、*S. cerevisiae* に近い融合株か、

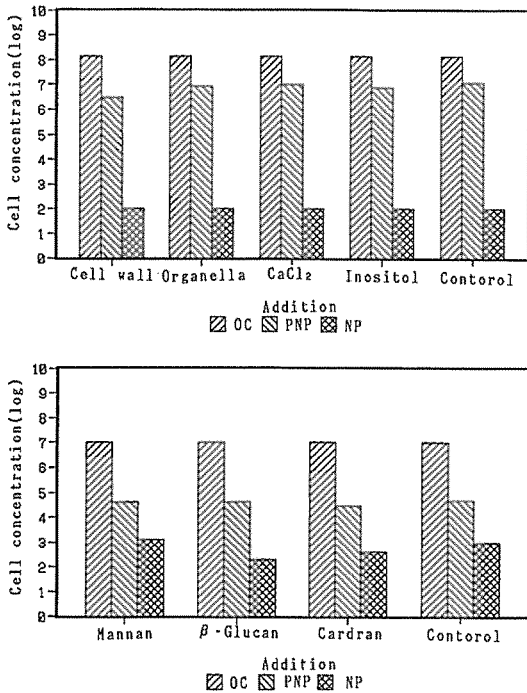


Fig. 3 Addition effect of cell wall components on protoplast regeneration of *S. cerevisiae*.

Each of Mannan 5 mg, β-Glucan 5 mg, Cardran 5 mg Cell wall 0.1 ml, Organella 0.1 ml, CaCl₂ 10 mM, Inositol 10 mM was added to 20 ml of the medium agar for protoplast regeneration.

OC: Colony number of original cell (non Zymolyase treatment.)

PNP: Colony number of protoplast and non protoplast (Zymolyase treatment with sorbitol.)

Np: Colony number of non protoplast (Zymolyase treatment without sorbitol.)

S. cerevisiae の back mutant ではないかと思われた。又、実用醤油酵母の育種と言うことで耐塩性があるものでなくてはならず、その点分離した菌株は耐塩性が殆ど無く実用性に乏しい。しかし、異種酵母間の細胞融合では仮に融合したとしても一般に不安定で両親の何れか一方の形質に偏って行くと考えられている。又一般に酵母のプロトプラストの融合頻度は再生プロトプラスト当り、同種間の融合でおよそ $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 、異種酵母間の融合では $10^{-5} \sim 10^{-7}$ 程度である。今回行った融合操作では更に低頻度であったと考えられる。

プロトプラストの再生には細胞壁の合成と栄養細胞への再生復帰という意味がある。又、細胞壁再生は液体培

地中では極めて困難なことが知られている。これは、細胞壁再生が全く行われぬだけでなくプロトプラスト表面に微繊維が合成されこれらが集合して繊維状の網状構造は造られるが完全な細胞壁を造るに至れない。又、この完全な細胞壁としてはインペルターゼ、酸性フォスフォターゼなど酵素作用のあるいくつかのマンナンタンパク質や脂質等が上記の網状構造の中に蓄積されたものでなければならない。細胞壁の基層成分は β-1,3 結合と β-1,6 結合を持つ分岐グルカンであることが知られている。現在、酵母のプロトプラスト再生に高濃度の塩化カルシウムが使われ効果のあったことが報告⁸⁾されている。おそらく細胞壁再生活性を保持する機構に関与していると考えられている。しかしながら、今回細胞壁の構成成分をなすマンナン、グルカン、細胞質成分、塩化カルシウム等を単独で加え酵母プロトプラストの再生率を調べたが期待に反して無添加の再生率と比べほとんど変わりなかった。しかし細胞壁の再生に必要な資材である糖類を多糖の形でなくオリゴ糖の形で供給することにより利用が高まることは十分に期待されるので多糖分解物について検討する必要がある。今後復帰頻度が低く、再生率の高い栄養要求性株の取得とプロトプラスト再生融合条件の検討、更には融合方法の検討により融合頻度を高めると共に実用的な見地からは、欠損により生ずるマーカーでないマーカーを見いだす必要がある。

要 約

1. 変異処理の結果、*Z. rouxii* (ade⁻) 4 株と *S. cerevisiae* (lys⁻) 1 株、*S. cerevisiae* (his⁻) 4 株が得られた。
2. *Z. rouxii* (ade⁻) 株と *S. cerevisiae* (lys⁻. cyh^r) 株との細胞融合から得られた融合株 8 株にシクロヘキシミド耐性があり、全てガラクトース発酵性を有し、シュクロース資化性がなく、耐塩性、アルコール発酵能共に *S. cerevisiae* と同程度であり、菌体の大きさに差は無く、核染色による核数も 1 個であり、菌体内蛋白質の電気泳動的パターンを比較したが親株のパターンに類似していた。従って *S. cerevisiae* に近い融合株か、*S. cerevisiae* の back mutant と考えられた。
3. 細胞壁構成成分である β-1,3 グルカン、マンナンのほか酵母の細胞壁区分、細胞質区分等を単独に添加したが再生率の向上に対する寄与は見られなかった。

文 献

- 1) 長田敏行. プロトプラストの遺伝工学. 講談社サイエンティフィック, p. 24-42 (1987).
- 2) 柳田友道. 微生物学実験法. 講談社サイエンティフィック, p. 288-306 (1975).
- 3) 長谷川武治. 微生物の分類と同定 (上). 学会出版センター, p. 154-257 (1984).
- 4) K. OSUMI, A. AMEMORI, and T. HARADA. Selection Cell Surface Mutants of *Hansenula miso* IFO 0146 with Anilin Blue, *J. Ferment. Technol.*, **55**: 544- 547 (1977).
- 5) 小林一成, 久能 均. 三重大学農学部学術報告 **70**号, p. 1-5 (1985).
- 6) 永井 進. 酵母研究における方法論. 学会出版センター, p. 3-6 (1982).
- 7) 有馬賢治, 高野 勇. 微生物のプロトプラスト融合日本発酵工学会誌. **57**: p. 380-395 (1979).
- 8) 井口昌一郎, 平野 正. 酵母プロトプラストの表層構造と再生. 細胞, **12**: p. 24-31 (1980).