

# 新規アミラーゼ発酵カビを発見

大阪府立園芸高等学校

バイオ研究部

為本

紫央

【はじめに】

日本では、有用微生物としてアミラーゼ発酵を行い、高い糖化能力を持つキコウジカビ (*Aspergillus oryzae*) を食品製造に利用してきた。キコウジカビの特徴として以下のようなものが挙げられる。

- 麹菌として最も多く利用されている種類である。
- 麹菌は主に和食に欠かせない醤油、味噌、日本酒、みりん、酢などの製造に利用される。
- 同じアスペルギルス属の中には発ガン性のカビ毒を産生するアスペルギルス・フラバス (*Aspergillus flavus*) など、約 150 菌種がこの属に含まれる。

新しい麹菌の品種(系統)の作出を目的として本実験を行った。新しい品種を作り出す手法として、コウジカビにとって高ストレス環境であるUV照射と低温殺菌に用いられる温度条件の2種類の負荷で突然変異の誘発実験を試みた。実験したシャーレ上から得られた特異的な株について形態、生理的形質の調査を行い、アミラーゼ発酵カビとして有望視できる系統であるかの評価を行った。

【材料】

園芸高校バイオサイエンス科の生命科学系の専門科目の実験実習で使用している市販の麹から分離したキコウジカビを実験材料として使用した。

【方法】

UV照射による突然変異誘発実験として、クリーンベンチ内に設置されている殺菌灯を使用し、コウジカビ孢子懸濁液をコンラージ棒で塗抹した平板培地に紫外線(UV)照射を行った。照射時間は20、40、60、180分間とした。

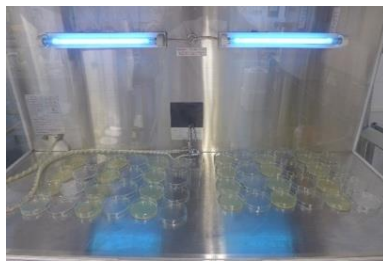


写真1 UVランプでの照射の様子

温度処理による突然変異誘発実験として、60℃に設定した電気オーブを用い、UV照射実験と同様に作成した平板培地を15、30、60、120分間温度処理を行った。



写真2 温度処理の様子

各実験の処理後、25℃で培養を行い、培養3日後、培地上に発生したコロニーから紫外線処理から24株、温度処理からは10株を試験管に分離した。また、無処理のシャーレから1株をControlとして分離した。

得られた株について、培養適温、コロニー形成速度、増殖スピード、アミノ酸要求性、アミラーゼ活性について比較する実験を行った。また特異株についてシーケンス分析によるカビ種の分類確認を行った。

なお、形態観察、コロニー形成速度、増殖スピードに関する実験には、酵母・カビ用平板培地(京都大学応用微生物実験書)またはPDA培地を使用した。アミノ酸要求性に関する実験には、アミノ酸を含まない窒素源(イーストナイトロジェンベース)とグルコースのみの培地とこれに20種類のアミノ酸を加えた培地を使用した。

【結果】

《突然変異誘発実験》

UV照射実験のシャーレから分離した株の中から孢子形成をしない特異的な株(UV40#1-4株)を見出した。



写真4. UV40分照射したシャーレから分離された孢子形成しない株と無処理株の様子  
左: 変異株培養6日目平板培地 中: 実体顕微鏡検鏡下のUV40#1-4株菌糸 右: 無処理株の培養6日目

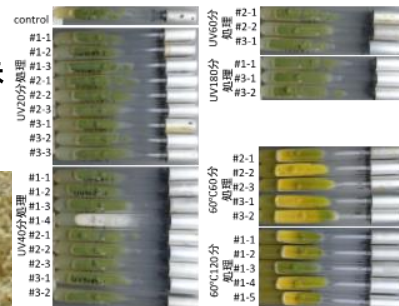


写真3 突然変異誘発処理後シャーレ上に発生し、分離した34株と無処理株の分離後9日目の様子

《生育適温に関する実験》

平板培地上での菌糸の伸長を測定することで培養適温を調査した。無処理株では35℃が一番成長しているのに対し、孢子形成しないUV40#1-4株は、25℃が生育適温であった。

(図1、図2)

《増殖スピードの比較、実験》

液体培地を用い150rpm、25℃48時間で振とう培養した結果、生体重はあまり差はなかった。しかし、乾物重ではUV40#1-4株が明らかに重いことが確認できた。(図3、図4)

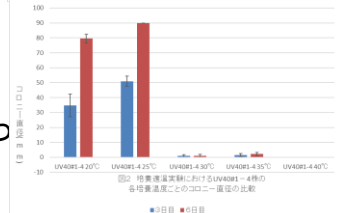
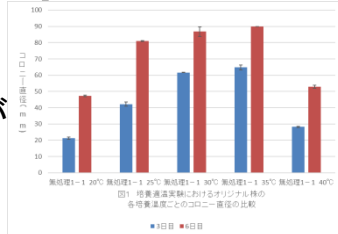
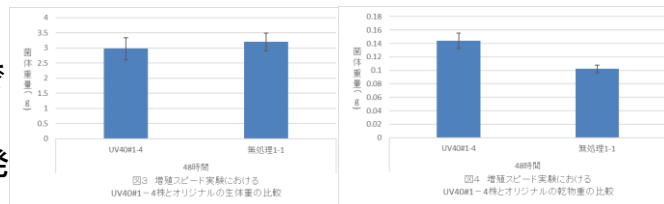
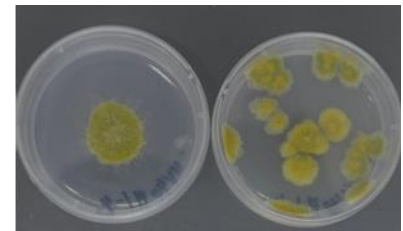


写真5 振とう培養48時間後の液体培地中のUV40#1-4株

《アミノ酸要求性実験》

アミノ酸完全欠損培地と全添加培地で培養し、伸長を比較したところ、全ての株で培地間で生育の差異は認められなかった。しかし、孢子形成をしないUV40#1-4株は、いずれの培地でも菌糸の成長が抑制されるとともに、孢子形成が行われた。(写真6)



アミノ酸なし アミノ酸あり

写真6 アミノ酸要求性検出実験の培養6日目におけるUV40#1-4株の孢子形成現象

《アミラーゼ活性実験》

アミラーゼ活性を調査したところオリジナルのものとUV#1-4株は同程度の力価があることが確認できた。

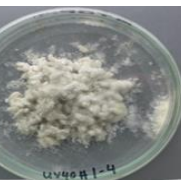
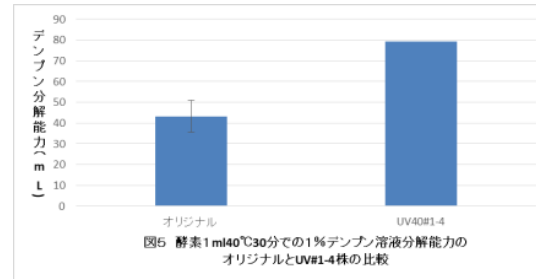


写真7 蒸し米に接種後30℃で1ヶ月間培養したUV40#1-4株の様子

《米麹生成実験》

UV40#1-4株は、蒸し米に植菌し1ヶ月間培養しても孢子形成せず白色の状態であった。

《分類確認》

UV40#1-4株の核rDNAのITS領域のシーケンスを分析し、BLAST検索したところアースリニウム属菌の1種と配列が100%一致した。



写真8 DNAシーケンス分析のデータ

《考察》

今までのコウジカビの製麹では、工程の中で空気中に多量の孢子が飛散することがあった。その影響で作業環境を悪化させ、職員のアレルギーを引き起こす原因にもなっていた。またそれを防止するために様々な機械を導入するなどして余分な費用が必要だがそれでも完全に防止することは不可能であった。

今回得たアースリニウム菌はコウジカビ以上のアミラーゼ活性を持ち、その上孢子を形成しないためこれらの問題を解決できる有用な菌であると考えられる。また文献調査より、属内にカビ毒を生産する種がないためとても安全な菌であるといえる。この菌は、産業的に有用であり、実用化にむけての研究を実現したい。

《文献》

伊藤彰敏ら、2015、糖化酵素高生産麹菌の育種選抜、あいち産業科学技術総合センター 研究報告、p100-p103