

稲穂から分離した不完全菌類を用いた米の糖化

大阪府立園芸高校学校バイオサイエンス科 バイオ研究部
3年 椎林 航希

【背景と目的】 現在、酵母とともに日本の発酵食品を支えているニホンコウジカビ (*Aspergillus oryzae*) について天然の株と米麹として市販され味噌や甘酒などアマラーゼ発酵に用いられている株を比較したいと考え、稲穂に発生したカビ病菌と *Aspergillus oryzae* の米の糖化能力の比較をおこなった。

【材料と方法】 ○1、稲の採取：園芸高校フラワーファクトリ科の実習圃場内の水田に栽培されている稲から8月17日に、カビ病を発病している穂を採取した。採取した穂にはそれぞれの稲穂に通し番号を付けた「穂番号」を付与した。採取した稲は図1に示した。

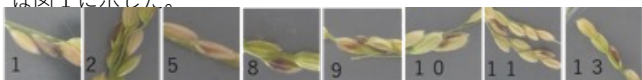


図1、カビ病を発症した稲の様子

○2、培地の調整：酵母カビ用培地 (glucose 25 g, pepton 2.5g, yeast extract 1.0 g, K₂HPO₄ 2.0 g, KH₂PO₄ 1.0 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.10g, Ager 10.0 g、水 500ml、pH 5.6) を調整し 20枚の平板培地を作成した。

○3、培養：2で作った平板培地の中央に採取してきた穂から籾を1粒置き、25℃で3日間培養した。籾には1粒ごとに「籾番号」を付与した。

○4、分離：3で培養し発生した菌のコロニーを実体顕微鏡で観察し、糸状菌を別の平板培地に釣菌し、純粋分離を試みた。釣菌したコロニーはそれぞれ「コロニー記号」を付与した。

○5、新たに植菌した培地は25℃で3日間培養した。培養したコロニーは図2に示した

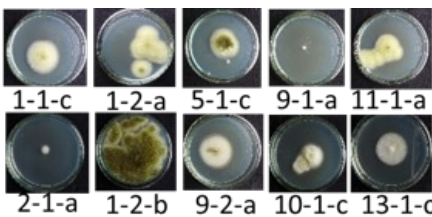


図2、純粋分離を試み得られた糸状菌コロニーの様子の各写真下のCODEは、採取した穂番号-籾番号-平板培地上のコロニー記号である。

○6、スライド培養：4、5で分離し、得られた糸状菌を酵母カビ用培地を作り殺菌したスパーテルで1cm四方の方眼に切った。切った培地をスライドガラスの上に置き糸状菌を塗抹して、25℃で3日間スライド培養を行った。

○7、形態観察：6で作成したスライド培養を生物顕微鏡で観察した。観察した子実体の様子を図3に示した



図3、稲穂に発病したカビ病から純粋分離して得られた糸状菌をスライド培養し、形成された子実体の様子

○8、米麹作り：1日水につけておいた米をシャーレ1枚に10g入れ、120℃15分高圧蒸気滅菌した。放冷した米に分離したカビと *Aspergillus oryzae* を接種し、25℃で3日間培養した。培養した米麹は図4に示した

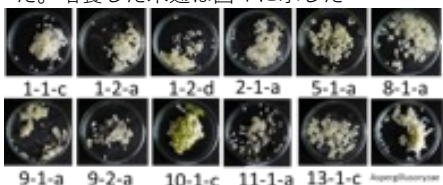


図4、1日水につけた米に分離したカビと *Aspergillus oryzae* を接種した米麹の様子

○9、8で作った米麹をビーカーに移し、1%食塩水30mmを加えた。それをひだ折りろ紙でろ過し、酵素液を作った。

○10、アマラーゼ希釈：試験管8本を用意して1~8まで番号を入れた。2~8まで試験管に蒸留水1mmずつ入れ、1、2に9で作った酵素液を入れた。2の試験管から酵素液を1mmとり、3の試験管にいれた。この操作を8まで繰り返し、8の試験管から1mm捨てた。

○11、力価計測：1~8の試験管に可溶性デンプン5mm入れた。このとき試験管は氷水で冷やした。60℃のお湯に30分入れた。30分反応後、1~8まで1分ごとに10%塩酸、ヨウ素液を1滴ずつ入れた。

○米の糖化実験：ビーカーに米20gと150mm程度の水を加え、お粥を作った。お粥を冷却したのち、クリーンベンチ内で○8で作成したアマラーゼ活性が認められた米麹30gを加えて60℃で24時間保温したのち糖度を記録した。

【結果】 アマラーゼ活性実験をおこなった12株のうち6株アマラーゼ活性が認められた試験管写真を図5に示した。1-2-b、10-1-cは、*Aspergillus oryzae* と同等の活性力があり、11-1-aは、*Aspergillus oryzae* 以上の活性力があることが分かった。

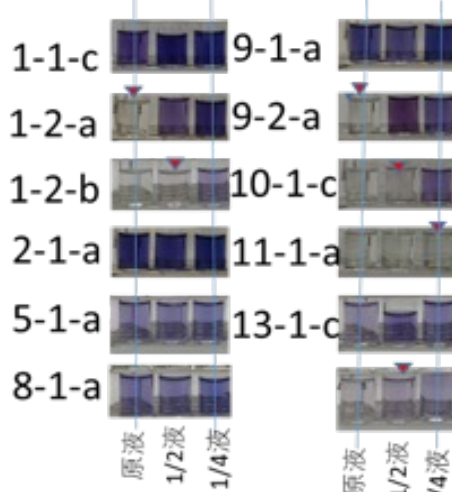


図5、アマラーゼ活性実験のヨウ素デンプン反応の様子

粥の糖度の変化の様子を表1にまとめた。全ての株において *Aspergillus oryzae* と同等程度の糖化力があることが分かった

表1. 米麹を投入し糖化した後の粥の糖度

株コード	糖度 (° Bx)	
	糖化前	糖化後
1-2-b	1.5	22.7
10-1-C	1.2	18.3
11-1-a	1.3	18.8
<i>A. oryzae</i>	1.5	19.5

【考察】 焼酎の醸造に利用される子実体が黒っぽいクロコウジカビ (*Aspergillus niger*) がある。1-2-b、11-1-aは、*Aspergillus oryzae* よりも高い糖化力がみられ、形態的にも、これに近縁であると考えられる。○10-1-cは子実体が黄色であり、(*Aspergillus oryzae*) に近縁であると考えられる。

○本実験で天然のコウジカビを分離することに成功したといえる。○今後、DNA分析による種同定に挑戦したい

【参考文献】 ・中西載慶、微生物利用、実教出版、2014
・北本勝彦、2012、生物学基礎講座バイオよもやま話、麹菌物語、生物学、第90巻、p424-427。