

加工食品への活用を目的とした麹菌の開発

長沼 孝多・橋本 卓也・木村 英生

Isolation of *Aspergillus oryzae* from Nature Field in Yamanashi Prefecture and Its Application in Food Processing

Kota NAGANUMA, Takuya HASHIMOTO and Hideo KIMURA

要 約

新規な有用麹菌を検索するため、本県の実環境から麹菌の分離を試みた。α米蒸米培地およびAFPA培地により糸状菌の分離を行い、得られた分離株の形態観察、生理学的試験および遺伝子レベルの解析を行った。県内から土壌等59試料を採取し分離を実施したところ、*Aspergillus*属分離株を2株得ることができた。この2株は、その形態的特徴、ITS1遺伝子の解析結果およびアフラトキシン非産生性であったことから*Aspergillus oryzae*と推察された。

1. 緒 言

麹は、米や大豆などの穀類に糸状菌を生育¹⁾させたもので、東アジアにおいて広く認められる。麹には、糸状菌が産生するデンプン分解酵素やタンパク質分解酵素が蓄積され、その作用を利用して酒類等の製造が行われてきた。多くの国の麹は餅麹（もちこうじ）で、穀物粉を餅状としたものに*Rhizopus*属（クモノスカビ）や*Mucor*属（ケカビ）等を生育させたものである。

一方、我が国においても、麹は味噌、醤油、清酒等の発酵食品の製造に利用されてきた。我が国の麹は餅麹とは異なり、蒸米等の加熱した穀類に糸状菌を生育させた撒麹（ばらこうじ）であるという点で独特と言える。また、本糸状菌は「麹菌」と総称され、酒類産業等で長年使用されてきた有用な菌の胞子が種麹として専門業者から販売されてきた。なお、日本醸造学会による「麹菌を我が国の国菌と認定する」宣言²⁾では、麹菌は*Aspergillus*属の糸状菌*A. oryzae*（黄麹菌）、*A. sojae*、*A. luchuensis*（黒麹菌）および*A. luchuensis* mut. *kawachii*（白麹菌）を指すとされる。

近年、麹に含まれる機能性成分^{3,4)}に着目した化粧品開発等のほか、本県では塩麹を活用した調味料⁵⁾や、麹と酒粕を組み合わせた甘酒⁶⁾等が商品開発されており、伝統的な食品としての見直しも進んでいる。

そこで、本研究では、自然界から麹菌を検索するとともに、麹を利用する食品加工法について検討することを目的とした。本年度は、本県の実環境から*A. oryzae*の分離を試みた。

2. 実験方法

2-1 供試菌株

標準菌株として、（独）製品評価技術基盤機構から購入した*A. oryzae* NBRC6215、NBRC30113、*A. flavus* NBRC5324 および*A. niger* NBRC33023を供試した。

2-2 使用培地

培地は、AFPA培地（関東化学社製）、ツァペックドックス寒天培地（CZ培地、関東化学社製）、ポテトデキストロース培地（PDA培地、日本製薬社製）、α米蒸米培地⁷⁾（乾燥α米AA-60、60%精米、徳島製麹社製を使用）を用いた。α米蒸米培地は、9cm径ガラスシャーレに15gの乾燥α米を敷き、121℃10分加熱処理したものに、滅菌水を無菌的かつ均一に2ml、3ml、あるいは4ml添加して調製した。

2-3 試料

*A. oryzae*分離のための試料は、山梨県内の土壌^{8,9)}、葉、稲穂⁷⁾、米ぬかなどを収集した。試料は、分離操作までポリエチレン製袋に密閉して冷暗所に保存した。試料の概要を表1に示した。

表1 *A. oryzae*分離源とした試料

種 類	試料数
土壌	32
葉	8
稲穂・稲わら	7
米ぬか	12
計	59

2-4 糸状菌の分離

糸状菌の分離操作の流れを図1に示した。すなわち、試料をα米蒸米培地に塗抹し、25℃ 3日間の培養で生育し緑色あるいは白色を呈すコロニーを釣菌した。続いてAFPA培地に接種し、30℃ 48時間の培養でコロニー裏面が橙～黄色になるものを *Aspergillus* 属と推定される糸状菌として分離した。コロニーの色調等を確認し、単一の糸状菌となるようにPDA培地で純培養した。

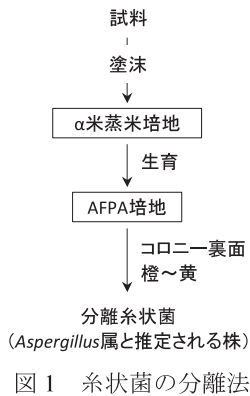


図1 糸状菌の分離法

2-5 分離糸状菌の同定

分離糸状菌の同定法の流れを図2に示した。分離された糸状菌を、PDA培地およびCZ培地に接種し、村上¹⁾およびKlich¹⁰⁾の方法にしたがい、特に *A. oryzae* に特徴的な形態について観察した。すなわち、PDA培地およびCZ培地における分生子色調が緑色あるいは白色であること、コロニー径が45mm以上であること、アスペルジラが確認できること、分生子形成構造が複列であること、分生子柄が粗面であることの確認を行った。

アフラトキシンの非産生性については、PDA培地で5日培養したコロニーについて、シャーレのふたに25%アンモニア水を滴下し、コロニー裏面が赤変しないものをアフラトキシシン非産生性¹¹⁾とした。

遺伝子レベルの同定試験(ITS1遺伝子の解析)は外部機関に委託した。

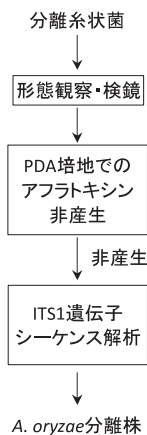


図2 *A. oryzae* の同定法

3. 結果

3-1 使用培地の検討

本研究では、阿部ら⁷⁾の方法であるα米蒸米培地の水分量(α米15gあたり6mlの滅菌水を添加)を3mlに改変した。これは、今回の試料では、阿部らの培地で *Mucor* 属と推察される糸状菌が生育し、分離の妨げとなったためである。そのため、滅菌水の添加量を2ml、3mlあるいは4mlとして標準菌の生育を確認したところ、添加量3mlで25℃ 3日間の培養が適当であることが分かった。このとき、α米蒸米培地の水分含有量は23.7g/100g、水分活性は0.93であり、標準菌の生育に支障は認められないことを確認した(図3)。

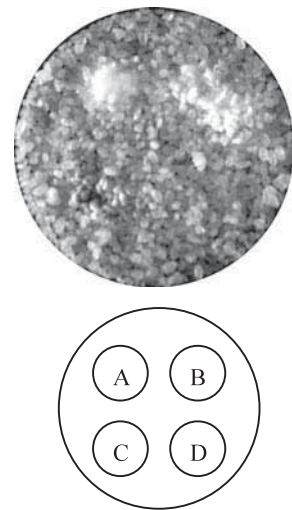


図3 α米蒸米培地(滅菌水添加量3ml)における標準菌の生育(25℃ 3日間)。A : *A. oryzae* NBRC6215, B : *A. oryzae* NBRC30113, C : *A. flavus* NBRC5324, D : *A. niger* NBRC33023 AおよびBの生育は良好、Dの生育は不良であった。

3-2 糸状菌の分離および同定

α米蒸米培地上の糸状菌コロニーの一例を図4に示した。例のように、白色でα米を覆うように生育したコロニーを *Aspergillus* 属と推定し、11株を単離した。

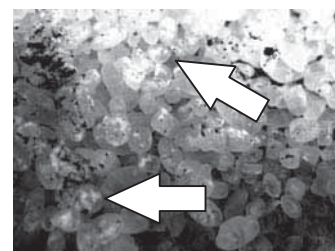


図4 α米蒸米培地上の糸状菌(矢印で示した箇所)

本11株について、分離源、コロニー色調(α米蒸米培地上、AFPA培地上およびPDA培地上)および検鏡

によるアスペルジラの有無を調べた結果を表2に示した。分離株番号1, 2, 4, 7, 8, 10, 11の7株にはアスペルジラが認められず(表2), 形態から *Penicillium* 属の糸状菌と推察された。

表2 分離糸状菌の分離源, コロニー色調および形態

分離株番号	1	2	3	4	5	6
分離源	土壌	土壌	土壌	葉	土壌	土壌
α米蒸米培地 コロニー色調	白	白	白	白	白	白
AFPA培地 コロニー裏面色調	濃い橙	橙	橙	橙	橙	黄色
PDA培地 コロニー色調	灰緑	白	白~緑	灰緑	緑	白
アスペルジラ	-	-	+	-	+	+

分離株番号	7	8	9	10	11
分離源	土壌	土壌	葉	米ぬか	もみ
α米蒸米培地 コロニー色調	白	白	白	白	白
AFPA培地 コロニー裏面色調	橙	黄色	橙	橙	黄色
PDA培地 コロニー色調	灰緑	灰緑	黄色	灰緑	灰緑
アスペルジラ	-	-	+	-	-

一方, 分離株番号3, 5, 6, 9の4株はアスペルジラが認められ, *Aspergillus* 属と推定された。この4株のうち, 分離株番号5, 9はPDA培地においてアフラトキシン生産性が認められ, *A. oryzae* 以外の *Aspergillus* 属と推察された。

一方, アフラトキシン生産性が認められなかった分離株番号3, 6の諸性状およびITS1遺伝子の解析結果を表3に示した。本2株は, 検鏡による形態観察において *A. oryzae* の特徴を有し, アフラトキシン産生が認められず, ITS1遺伝子解析により *A. oryzae* と推察された。以上のことから, 本県の自然環境から *A. oryzae* が2株得られたことになる。

表3 *A. oryzae* 分離株の諸性状

	分離株3	分離株6
集落の色調	緑~白	白
分生子柄	粗面	粗面
アフラトキシン	非産生	非産生
ITS1遺伝子解析結果*	<i>A. oryzae</i>	<i>A. oryzae</i>
(候補)	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
		<i>A. kambarensis</i>
		他4株

* ITS1解析結果は, 菌株の候補および一致率で示される。表に示した菌株は, いずれも一致率が100%であった。

4. 考察

有用麹菌の検索を目的として, 本県自然環境から2株の *A. oryzae* を分離した。 *Aspergillus* 属は自然環境に普遍に存在⁹⁾し, 特に土壌や稲穂等からの高頻度検出^{7,9)}が報告されているが, 本研究においては, 検出頻度は比較的良かったことが考えられた。

本研究で用いたα米蒸米培地は, *Aspergillus* 属が他の糸状菌と比較して蒸米に生育しやすい¹⁾性質を利用したものである。今回, 本培地の水分量の調整により, さらに分離の妨げとなる糸状菌の生育を抑えることができ, スクリーニングに有用であると考えられた。

なお, *Aspergillus* 属の推定実験に用いたAFPA培地は, *Aspergillus* 属の産生するアスペルギル酸と培地中の鉄イオンによるコロニー裏面の着色¹²⁾を指標にしているが, 同色と判断された11株中7株が *Penicillium* 属であった。本培地には *Aspergillus* 属以外の糸状菌も生育できることから, 色調の判断には慎重を要すると考えられた。また, 同培地をスクリーニングに用いた報告¹³⁾もあるが, 本研究の試料のように多数の糸状菌が含まれる場合, 本培地でのスクリーニングは困難であった。

以後の研究では, 得られた *A. oryzae* 2株の酵素活性等を確認するとともに, 既存の麹菌を含め, 漬物製造等の食品加工に使いやすい形態での活用を検討する。

5. 結言

1. 本県の自然環境から, α米蒸米培地およびAFPA培地による *A. oryzae* の分離を行った。
2. *A. oryzae* と推定される糸状菌を2株分離した。

参考文献

- 1) 村上英也: 麹学, 日本醸造協会 (1986)
- 2) 日本醸造学会 麹菌をわが国の「国菌」に認定する (<http://www.jozo.or.jp/koujikinnituite2.pdf> (2015/3/31アクセス))
- 3) 小林禮次郎: 膜, **20**, 47-54 (1995)
- 4) 皆見紀久男: 皮膚, **36**, 707-714 (1994)
- 5) 酒蔵の塩麹商品いかが, 山梨日日新聞, 2012.6.26, 朝刊経済面
- 6) 低アルコール酒やデザート開発, 山梨日日新聞, 2015.2.18, 朝刊経済面
- 7) 阿部真紀, 小針清子, 秋田修: 実践女子大学生活科学部紀要第49号, 7-14 (2012)
- 8) 正古良夫, 玉村富: 真菌と真菌症, **4**, 59-66 (1963)
- 9) 矢口貴志, 日本医真菌学会雑誌, **52**, 193-197 (2011)
- 10) Maren A. Klich: Identification of common *Aspergillus* species (2002)
- 11) 齊藤道彦: 微生物遺伝資源利用マニュアル(22), (2007)
- 12) 鈴木明子, 成田紀子, 菊池裕, 一戸正勝: 食品衛生学雑誌, **35**, 319-322 (1994)
- 13) 茂一孝, 西尾昭: 鳥取県産業技術センター研究報告, **13**, 21-23 (2010)