

五島の微生物を活用した加工食品の開発

食品・環境科 主任研究員 横山 智 栄
食品・環境科 研究員 井内 智 美
長崎県立大学 看護栄養学部 准教授 松澤 哲 宏

麴菌はデンプンやタンパク質を分解する酵素を分泌することから、甘酒、日本酒、味噌、醤油など日本人の食生活に欠かせない発酵食品の製造に利用されてきた。本研究では、酵母や乳酸菌同様、麴菌についても地域独自の麴菌の開発を行い、発酵食品の差別化を図る目的で、長崎県五島市の自然環境から麴菌となり得る株を分離し、発酵食品の製造に有用な地域独自の麴菌の開発を試みた。自然界より胞子が緑色を呈する麴菌を分離し、同定およびアフラトキシン生合成遺伝子解析を行った。米麴を作製し酵素力価を測定したところ糖化力の高い株も存在した。

1. 緒言

麴菌はデンプンやタンパク質を分解する酵素を分泌することから、甘酒、日本酒、味噌、醤油などの発酵食品の製造に利用されてきた。麴は主に蒸した米や麦、大豆などの穀類に麴菌を加えて繁殖させたものである。麴菌によって酵素が分泌された麴は、発酵食品における酵素の供給源として重要であり、各発酵食品の品質に大きな影響を及ぼす。

麴菌は市販の種麴を使用して発酵食品を製造しているところが多い。一方、多くの地域では自然環境から分離された酵母や乳酸菌が地域独自の有用微生物として、地域の活性化に用いられている。そこで、麴菌についても自然環境から分離することで、地域の活性化に資することができると考え、本研究では、長崎県五島市の自然環境から麴菌候補株を分離し、発酵食品の製造に有用な地域独自の麴菌の開発を試みた。

2. 実験方法

2.1 野生麴菌の分離方法

(1) 培地調製法

分離用培地には α 米培地(α 米：徳島製麴株式会社製 AA-60) およびポテトデキストロース寒天培地(日水製薬株式会社製)を用いた。 α 米の殺菌方法については、50 mL PP 製遠沈管に α 米 15 g を入れ、オートクレーブ(121°C、15分)した。

(2) 分離用試料と添加方法

分離用試料として、長崎県五島市の福江島野外から採取した試料を用いた。採取試料は分離時まで6°Cで保存した。培地への試料の添加方法としては、滅菌済

α 米を ϕ 90 mm PS 製シャーレに全量移し滅菌水 5 mL 添加後、分離用試料と混ぜ合わせた。培地に添加後の試料は分生子が目視で観察されるまで6日から10日間25°Cで培養した。

(3) 菌株の分離方法

実体顕微鏡(株式会社島津理化製 VCT-VBIT)で観察し、分生子の色調や形態から麴菌と推定される菌株をさらにポテトデキストロース寒天培地で培養した。

2.2 分離株の同定およびアフラトキシン生合成遺伝子解析

分離株について、 β -tubulin 遺伝子の塩基配列を決定し分子系統解析を用いて菌種同定を行った。分子系統形跡の結果、麴菌として有用と考えられる菌種についてカビ毒であるアフラトキシンの生合成に関する遺伝子のうち、*affT*, *nor-1*, *afIR* の3遺伝子の有無をPCR法によって確認し、これらの遺伝子を有していないアフラトキシン非産生株の選出を行った。

分離株の同定およびアフラトキシン生合成遺伝子解析は長崎県立大学に依頼した。

2.3 米麴の製造方法および酵素活性の測定方法

(1) 使用菌株

野外からの分離株6株と対照株として市販の種麴2株(株式会社秋田今野商店製白麴雪こまち、株式会社菱六製長白菌)を使用した。

(2) 製麴方法

① 培地調製法

製麴に使用する胞子懸濁液作製のための麴菌株候補

の培養には蒸米培地(米:市販の食用米(長崎県産))を用いた。製麴には α 米培地(α 米は2.1(1)と同じもの)を使用した。

②孢子懸濁液作製法

孢子懸濁液作製のための麴菌株候補の培養は以下の方法で行った。すなわち、50 mL PP 製遠沈管に食用米 10 g と純水 2 mL を入れオートクレーブ(121°C、15分)したものに、麴菌株候補を植菌し、25°Cで13日間培養した。培養後、生理食塩水を15 mL 加え攪拌し脱脂綿を詰めた滅菌済5 mL PP 製シリンジに入れろ過した。適宜希釈したろ液をトーマの血球計算盤により検鏡して孢子密度を測定後、生理食塩水で適宜希釈し孢子密度が 2×10^6 孢子/mL 孢子懸濁液を得た。市販の種麴は0.5 gを15 mL PP 製遠沈管に入れ、生理食塩水8 mLを加えた。以降は前述と同様に孢子密度が 2×10^6 孢子/mL となるように希釈した。

③製麴方法

製麴はシャーレ製麴法^[1]に準じて行った。 ϕ 90 mm PS 製シャーレに α 米15 gを入れオートクレーブ(121°C、15分)した。次いで、孢子懸濁液(2×10^6 孢子/mL) 7.5 mL を α 米に加え、培養温度35°C、相対湿度95%で63時間培養した。米麴は40°Cで3時間、60°Cで21時間乾燥させ、酵素力価測定時まで-20°Cで冷凍保存した。

④酵素活性の測定

前項で得られた米麴について酵素力価測定を行った。 α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼの酵素活性はキッコーマンバイオケミファ株式会社製の糖化力分別定量キットを用いた。

3. 実験結果

3.1 分離菌株の同定

福江島の自然環境から採取した28の分離源から52株分離した。このうち30株について β -tubulin 遺伝子の塩基配列を決定し分子系統解析を用いて菌種同定を行った。その結果、29株で遺伝子の塩基配列を決定することが可能であった。分子系統解析の結果、*Aspergillus flavus* (25株)、*Aspergillus nomius* (2株)、*Aspergillus thomii* (1株)、*Aspergillus tamarii* (1株)と同定された。

3.2 アフラトキシン生合成遺伝子解析

同定された29株についてアフラトキシンの生合成遺伝子 *affT*, *nor-1*, *afIR* の3遺伝子の有無をPCR法

によって確認した。その結果、3遺伝子とも検出されなかった株は*Aspergillus flavus* (5株)、*Aspergillus nomius* (1株)、*Aspergillus thomii* (1株)、*Aspergillus tamarii* (1株)であり、29株中8株認められた。これらの株はアフラトキシン産生遺伝子が欠損しており、高い安全性を有する株である可能性が大きいことから、麴菌株候補になり得ると考えられた。

3.3 分離株の酵素活性

安全性が高いと考えられる株のうち、これまで麴菌としての育種された報告のない*A. thomii*と今回の解析ではアフラトキシン産生3遺伝子が欠損していたが、アフラトキシン産生菌として報告されている^[2]*A. nomius*は今回の麴菌株候補から除外し、6株の酵素活性を測定した(表1)。その結果、分離菌株6の糖化力は対照株より約2倍以上高かった。

表1 酵素力価測定結果

	グルコアミラーゼ (U/g dry-koji)	α -アミラーゼ (U/g dry-koji)	水分 (%)
分離菌株1	24.1	29.6	32.7
分離菌株2	36.8	29.5	32.5
分離菌株3	11.4	25.6	34.5
分離菌株4	13.8	18.9	35.0
分離菌株5	8.9	23.0	36.4
分離菌株6	156.5	34.3	35.4
白麴雪こまち	83.0	236.6	31.8
長白菌	42.0	100.9	34.6

4. 結言

自然界より分離した株についてプロテアーゼ活性についても測定し、麴菌としてより有用な株の選定を行っていく必要がある。また、麴におけるアフラトキシン非生産性についても確認する必要がある。

参考文献

- [1] 岡崎直人:日本醸造協会誌、74(11)、738-739(1979)。
 [2] Kurtzman CP, Horn BW, Hesseltine CW *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 53(3):147-158(1987)。