

でん粉高分解性焼酎用麹菌株の構築と選択

南九州大学健康栄養学部食品健康学科発酵利用学研究室

外山英男、関森 梓、石井 朝裕、外山 信男

要約

焼酎製造では芋やそばなど種々の原料が使用されているが、麹に関しては米麹を使用するのがこれまでのやり方であった。しかしながら、我々は麹に関してもやはり原料に即したものを使用するのが本筋であると考え、我々が開発した糸状菌の倍数化法と重層選択培地を使用して甘藷マッシュ上で良好に増殖する麹菌の構築と選択を試みた。モデル株である *Aspergillus kawachii* (IFO4308) 株の非同調成熟分生子を倍数化後、処理した分生子を甘藷マッシュを加えた重層選択培地の下層培地に加え、その上に同組成の上層培地を重層し培養した。培養後、培地表面に出現したコロニーの中から、最も大型のコロニーを **K2** 株として分離し、甘藷マッシュ培地上での増殖性を元株と比較した。その結果、**K2** 株は元株よりも明らかに良好な増殖性を示した。また、**K2** 株の液体培養物のでん粉分解力を元株と比較した結果、**K2** 株は元株の3倍以上のでん粉分解力を保持することが判明した。これらの結果から、倍数化の手法と重層選択培地による選択手法を利用すれば、焼酎用麹菌から容易にでん粉高分解性株を構築・選択できると結論した。

緒言

焼酎の原料にはいろいろな種類があるが、麹は米麹を使用しているものが多い。芋焼酎の場合にも、米麹を使用しているものが大半を占めているが、芋焼酎の場合なら、麹はやはり芋麹を使用すべきではないかと考えた。泡盛の場合には、原料が米であり、米麹を使用して米100%の全量仕込を行なっている。芋焼酎でこれを実現するには、芋麹を調製できればよいが、麹菌自体の能力や技術的な問題があるためにこれまであまり行なわれていなかった。そこで、我々は麹菌のでん粉糖化力を高めることにより、芋麹を調製できるのではないかと考え、麹菌のでん粉糖化力を向上させることを試みた。我々はこれまでに糸状菌分生子をコルヒチンで処理して同質倍数体を形成する技術を開発し、ヤクルト薬品工業株式会社から特許を出願している¹⁾。この実験では、この方法を利用して麹菌のでん粉高分解性株を構築することを試みた。また、我々は、重層選択培地を用いて結晶性セルロース高分解性トリコデルマ株の獲得に成功し、月島機械株式会社から特許を出願している²⁾。この実験では、この重層選択培地をでん粉高分解性株の選択に応用して、でん粉高分解性株を選択することを試みた。

1) 倍数化処理

モデル株として *Aspergillus kawachii* (IFO4308) 株を使用し PDA 寒天培地上で 28°C で培養し、4°C で保管した。この菌体 2 ミリ四方を PDA 寒天培地上に置いて 28°C で 10 日間培養して成熟分生子を着生させた。着生した分生子は滅菌水中に懸濁後、ガラスフィルター (3G-2) で菌体断片を除去し、ろ液を分生子懸濁液として使用した。分生子懸濁液中の分生子は遠心分離で収集

し、これを倍数化用液体培地に加えて、28℃、1週間静置培養を行なった。倍数化用液体培地として、コルヒチン 0.1% (w/v)、グルコース 1.0% (w/v)、ペプトン 0.5% (w/v) を含むツアペック培地を使用した。ツアペック培地の組成はNaNO₃: 2.0 g/l、K₂HPO₄: 1.0 g/l、MgSO₄·7H₂O: 0.5 g/l、KCl: 0.5 g/l、FeSO₄·7H₂O: 0.01 g/lであった。培養中に分生子の一部が発芽して、膜状の菌体を培地表面に形成したが、培地中には未発芽の分生子が多数存在していた。培養後、生じた菌体をガラスフィルターで除去し、ろ液中に未発芽分生子がなおも多数存在していることを確認した。ろ液中の分生子は遠心分離で収集し、滅菌した生理食塩水に懸濁させ 4℃で保管した。

2) 重層選択培地上のコロニー出現状況

でん粉高分解性株選択のための重層選択培地としては、選択基質である甘藷マッシュ 10 g と寒天 3.0 g、ペプトン 0.5 g、Triton X-100 (polyoxyethyleneoctylphenylether) 0.1 ml を加えたツアペック培地 100ml を深型ガラスシャーレ (150 mm x 60 mm) に加え、これに分生子懸濁液を加えた後、4℃で放置して寒天を固化させた。寒天固化後、同組成の培地 100 ml を重層し、4℃で寒天を固化させた後、28℃で培養した。甘藷マッシュは 5 mm 角に細断した甘藷断片をミキサー (SCM-40A 石崎電気製作所) で粉碎して調製した。培養 5 日目には培地表面に大小のコロニーが出現した。その中で最も大型のコロニーを選択株、K2 株として実験に使用した。

3) 甘藷マッシュ培地上での増殖性とアミラーゼ生産性の比較

元株ないし K2 株の菌体 2 ミリ四方を甘藷マッシュ培地上に置き、28℃で4日間培養した。甘藷マッシュ培地としては、寒天 3.0% (w/v)、ペプトン 0.5% (w/v)、甘藷マッシュ 10% (w/v) を加えたツアペック培地を使用した。1株につき甘藷マッシュ培地を 3 枚使用して実験を行った。培養後のコロニーの直径をデジタルノギス (ミットヨ) で計測して平均値を求めた。その結果、K2 株のコロニーの直径は図 1 と表 1 に示すように、明らかに元株の直径よりも大であった。よって、K2 株の甘藷マッシュ培地上での増殖性は元株よりも良好であると考えた。

次に、これらのコロニーが着生している甘藷マッシュ培地上にヨードヨウ化カリウム溶液を加えると、コロニーの周囲にでん粉が分解されたために生ずる透明域が形成された。この透明域の直径もデジタルノギスで計測し、コロニー直径との比率から菌体あたりのアミラーゼ生産性を比較した。その結果、表 1 に示すように、K2 株の菌体あたりのアミラーゼ生産性は元株と同様であることが判明した。しかしながら、透明域の面積を考慮すると、K2 株のアミラーゼ生産量は元株よりも大であると考えられた。

図1 元株と K2 株のコロニー



28°Cで培養4日目

表1 元株と K2 株の透明域とコロニーの平均直径

菌株	透明域直径	菌株コロニー直径 (mm)	比率 (透明域/コロニー)
元株	48.47 ± 0.4	44.37 ± 0.4	1.09
K2	59.66 ± 1.8	53.06 ± 1.8	1.12

28°Cで培養4日目にヨード液を滴下後デジタルノギスで透明域とコロニーの直径を計測した。1株につきプレートを3枚使用した。

表2 元株と K2 株のでん粉糖化活性と酵素生産時の菌体生成量、酸度と酸生産時の菌体生成量

菌株	でん粉糖化活性 (IU/ml)	酵素生産時の平均菌体生成量 (mg)	酸度	酸生産時の平均菌体生成量 (mg)
元株	22.5	186.0	13.1	307.0
K2	68.5	270.0	12.8	278.9

でん粉分解力は、28°Cで5日間回転振盪培養して培地をろ紙でろ過後、ろ液を酵素液として使用し、1% (w/v) 可溶性でん粉溶液を基質として求めた。酸度は28°Cで10日間静置培養後、培地10 mlを中和するのに必要な0.1 N NaOHのml数から求めた。

4) でん粉糖化力測定試験

元株ないしK2株の菌体2ミリ四方を酵素生産用液体培地に加え、28℃で回転振盪培養(NR-30 TAITEC) (160rpm)を行ない、培養6日目に培地をろ紙(No. 2 ワットマン)でろ過して菌体を除去し、ろ液を酵素液として使用した。酵素生産用液体培地としては、100ml三角フラスコにツアペック培地50ml(可溶性でん粉0.5g、ペプトン0.25g)を加えて使用した。でん粉糖化力測定のために、酵素液2.0mlに基質である可溶性でん粉溶液を4.0ml加え、50℃で60分間往復振盪(125 stroke/min)を行なった。基質である可溶性でん粉溶液は0.1M酢酸緩衝液(pH 5.0)に可溶性でん粉を1.0% (w/v)加えて使用した。その後、反応液をろ紙でろ過し、反応液中の還元糖量をDNS法で定量した³⁾。その結果、表2に示すように、K2株のでん粉糖化力は元株の3倍以上であることが判明した。この結果から、K2株はでん粉高分解能を保持する株であると考えた。

また、酵素生産時に形成された菌体の重量を元株とK2株で比較した。ろ紙上の菌体を、予め秤量しておいたアルミカップに置き、80℃で19時間乾燥させた後秤量し、この重量からアルミカップ重量を差し引いて形成された菌体重量を求めた。その結果、表2に示すように、K2株の菌体重量は元株の約1.5倍であることが判明した。この結果も、K2株の増殖性が元株よりも良好であることを示した。

5) 酸生産試験

元株ないしK2株の菌体2ミリ四方を酸生産用液体培地に加え、28℃で10日間静置培養を行なった。酸生産用液体培地としては、100ml三角フラスコにツアペック培地50ml(グルコース2.5g、ペプトン0.25g)を加えて使用した。培養後、培地をろ紙でろ過して菌体を除去し、ろ液10mlを小型のビーカーに移し、これにBTB-NR混合指示薬を3滴加え、これを0.1Nカセイソーダで滴定し、ろ液10mlを中和するのに要した0.1Nカセイソーダのml数を求めた。酸度は溶液10mlを中和するのに必要な0.1Nカセイソーダ溶液のml数と定義した。その結果、表2に示すように、K2株の酸度は元株とあまり変わりなく、K2株では酵素生産性は向上したが、酸生産性はあまり変化しなかったと考えられた。

また、酸生産時に形成された菌体の重量を元株とK2株で比較した。ろ紙上の菌体を、予め秤量しておいたアルミカップに置き、80℃で19時間乾燥させた後秤量し、この重量からアルミカップ重量を差し引いて形成された菌体重量を求めた。その結果、表2に示すように、K2株の菌体重量は元株のそれよりも下回ることがわかり、その理由としては使用した酸生産用液体培地がK2株の菌体形成に不適であった可能性や培養途中で溶菌した可能性が考えられた。

6) 分生子内核状況

元株とK2株の分生子をスライドグラス上に火炎固定し、5N塩酸で50℃、40分間処理後、ギームザ液で核染色を行なったところ、図2と図3に示すように、K2株の分生子は元株と同様に単核性であったが、核直径は元株よりも増大していることが判明した。この結果から、K2株は倍数体か異数体の状態にあると推測された。しかしながら、K2株をPDA培地上で培養してもセクターの形成はみられず、遺伝的に安定であると考えられた。

図2 元株分生子の核染色結果



図3 K2株分生子の核染色結果



7) まとめ

この実験では麹菌の非同調分生子を使用した。この場合、倍数化処理で異数体や核酸含量がさまざまな倍数体が形成され、この中から従来のレプリカ法などで、でん粉高分解性株を選択するのは非常に困難であると思われたが、考案した重層選択培地により、非同調分生子からも目的と

する株を容易に選択できることが上記の結果から判明した。

また、選択培地上の種々のコロニーの中で大型のコロニーを形成した **K2** 株がでん粉高分解性株であった。選択培地上で大型のコロニーを形成しているということは早期に選択培地表面に出現したことを意味し、早期に出現できるということは、でん粉分解力が元株よりも良好であったためと考えられた。そのために甘藷マッシュ培地上でも良好に増殖できたと考えられた。

また、**K2** 株のでん粉高分解力は倍数化による遺伝子増幅効果によるものではないかと考えた。

次に、なぜ重層選択培地で、でん粉高分解性株である **K2** 株が選択できたのかについて検討したが、でん粉を分解するための酵素の生産性が良好であるほど選択層を容易に突破可能であると思われ、選択層を通過する間に良好な酵素生産性を保持する **K2** 株が自然に選択されたためと推測された。

さらに、得られた **K2** 株は遺伝的には安定なのかどうか問題となるが、**K2** 株は P D A 培地上で長期間培養してもセクターの形成は見られないので遺伝的には安定であると考えられた。

引用文献

- 1) 特許第 3685518 号「糸状菌類の超高次同質倍数体の製造方法」
- 2) 特許公開番号 006-166848 「トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)、その製造方法及び結晶性セルロースの高加水分解活性セルラーゼの製造方法」
- 3) Miller, G. L.
Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426-428 (1959).

謝辞

ヤクルト薬品工業株式会社と月島機械株式会社のご協力に感謝いたします。

また、同選択法の特許出願をしていただきました株式会社みやざき **TLO** に感謝いたします。