

## どうやって培養するの、カビ？

山下 秀行

微生物はそれぞれ異なった生活環を持っており、それに応じて菌種や菌株に適した培養方法があるものと考えられる。カビは糸状菌 (filamentous fungi) とも呼ばれ、一般には、真菌類の中で形態学的にみて菌糸状に増殖する一群を指す。清酒・味噌・醤油・本格焼酎などの醗酵食品の製造に欠かすことのできない麹菌 (*Aspergillus* 属) は、その中の代表的なカビである。一口にカビといってもその種類は多く、すべてのカビに関する培養法を述べるなど、筆者にはとても出来ないが、入社以来30年にわたり係わってきた麹菌の培養についてお話することで、カビを培養しようとする方々のお役に立つことができれば幸いである。筆者が学生時代に行っていた微生物の培養の際には、培地成分や培養方法についての違いなど考えたこともなかった。しかし、種麹の製造会社に勤務して、初めて培養に穀物を培地として利用することや、分生子取量を上げるためになされている培養方法について知った。また、麹菌の最終目的産物である麹の製造において、培地の種類や培養条件によって麹が造る酵素の種類や量が大きく異なることを学んだ。一方、その培養には、酵母や大腸菌などとは異なり分生子を接種することが多く、いまだにその取り扱いには悩まされている。分生子の飛散性が高いことは、麹菌にとっては自然界において広く伝播し、子孫を増やすための合理的な手段であり、産業に利用しようとする我々にとっても有利な点が多い半面、複数の菌株を扱う際には汚染の原因となる。麹菌の培養といっても、菌株の保存、菌体増殖、酵素生産、分生子採取とその目的はさまざまである。本稿では、種麹 (カビの分生子) から麹の製造までの過程を通して、各段階で行われる培養方法について重要なポイントだと思われる点に注目してみたい。

### 単菌分離培養

筆者らは、1940年に味噌用麹菌の単菌分離に初めて成功後、種々の菌株の分離・育種に取り組み、実用麹菌を得てきた。麹菌の利用は、試料を懸濁し希釈法により寒天培地で培養し、生育してきた単一コロニーを分離することから始まる。カビの培養培地は多種あるが、麹菌の培養には Czapek-Dox (CD) 培地を用いるのが一般的である。しかし、試薬の純度の向上により、それまで夾雑物として含まれていた金属により適量に保たれていた

表1. CDM-agar培地組成

NaNO <sub>3</sub>	3.0 (3.0) g	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.001 (-) g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 (1.0) g	MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.001 (-) g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5 (0.5) g	AlCl <sub>3</sub>	0.001 (-) g
KCl	2.0 (0.5) g	Sucrose	30 (30) g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.02 (-) g	Distilled water	1,000 ml
FeSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.01 (0.01) g	Agar	20–25 (15) g

※カッコ内は、CD-agar培地。

本培地中の微量金属量が不足し、麹菌の分生子の色が変化することが報告されている<sup>1)</sup>。この報告は、金属イオンが微生物の生育などにも大きな影響を及ぼすことから、培養の際にはその種類や濃度は検討すべき要点であることを示唆している。そこで、筆者らは、保有株の分類に用いる巨大集落培養や短期保存には、KClを増やし、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Mn<sup>2+</sup>を新しく加えたCDM-agar培地 (表1) 用いているが、それ以外の分生子数や純度の測定には、麹汁培地 (麹糖化エキス：シヨ糖度10) を使用している。麹菌の分生子は連鎖状のものが多く、菌糸の伸長が早くコロニー同士が重なり単菌分離し難いので、分生子の均一分散と菌糸の伸長抑制のために、懸濁液や培地にノイゲンEA-160やトリトンX-100などの界面活性剤をそれぞれ0.1–0.5%加えておくと良い。この方法では、9 cm径のシャーレに100個程度コロニーが出現しても計測が可能である。麹菌の培養温度は通常は28–35°Cとするが、麹菌の中には20数時間で分生子を着生し始める株があるので、植え替えのタイミングも菌株によって異なる。また、分生子は脱落しやすく、シャーレ内でコロニー間の混合が起きるので、単菌分離の際はシャーレに1個出現するよう希釈液の採取量などを工夫する。しかし、ここで注意しなくてはならないことがある。この1個が汚染による目的以外の株であった場合である。以前、原菌を再分離した際に親株とはまったく性質の異なる株を選択したことがあったが、この時は異なる数株のコロニーを選択しておいたことで失敗を免れた。菌株の特長である、菌糸の長さ・分生子の色や着生の様子・裏面のしわの形状などを観察し、こういったミスをなくすようにする。また、分生子を扱った後は、常にそれが周りに飛散している状態であるとの認識が重要で、短時間に連続して異なる菌株を使用することは汚染

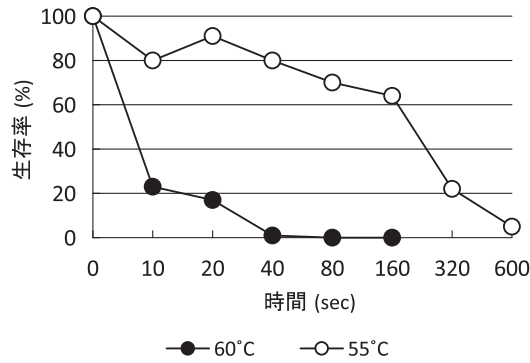


図1. *A. oryzae*分生子の耐熱性  
(生存率の測定)

孢子懸濁液 (1.3 × 10<sup>8</sup> cfu/ml) 1 ml を、各温度に保持した生理食塩水 100 ml に入れ、攪拌後、経時的にサンプリングし急冷後、こうじ汁寒天培地に散布。30°C、72時間培養後に出現したコロニー数から算出。

の原因となり絶対にしてはならない。しかし、麹菌の分生子は耐熱性が低く(図1)、短時間の紫外線照射により死滅するという弱点もあるので、使用する器具は乾熱殺菌が有効であり、菌株使用後の部屋やクリーンベンチなどは殺菌灯を点けておくことで、汚染の予防が可能となる。

### 保存培養

分離した麹菌は麹や種麹の培養試験を行い、酵素産生能や味・かおりなど醸造特性を調べ、種麹としての有用性が認められた株は保存する。微生物の保存方法は種々あるが、生命の長期間維持と、優れた形質の安定保持を命題とする。他の微生物と同様に、寒天スラント培地を用いて保存しても良いが、そのままでは発芽率の低下が激しく長期保存には適さない。そのため筆者らは、原菌の保存は、綿栓付き試験管に入れた米を培地として用い30°Cで120時間培養後、真空乾燥によって水分を10%以下まで除去する方法で行っている(図2)。なお、使用する米には分生子の耐久性や、孢子柄の部分が短縮され分生子数が増すと報告されている、リン酸やカリウム含量の高い木灰<sup>2)</sup>を0.1–0.5%添加して培養しているが、食品添加用のリン酸二カリウムなどで代用してもよい。途中、寒天スラントと同様にななめにうすく広げる。培養容器の栓は重要であり、寒天培地の場合はシリコセン(信越ポリマー(株)製)・綿栓どちらを用いてもよいが、オートクレーブ殺菌時に綿栓が濡れないように紙やアルミホイルで包んでおくことで、濡れた部分にカビが生えるのを防ぐ。穀物を培地とする場合、菌株によっては増殖時に発生した二酸化炭素の容器内滞留により増殖が停止し、自己消化によって分生子の着生が極端に抑制される株もある(表2)ので、通気性の高い綿栓の方がシリ



図2. 原菌の保存

表2. 培養方法による分生子量の違い

	綿栓法 (%)	シリコセン法 (%)
<i>A. oryzae</i> H20	4.4	2.3
<i>A. oryzae</i> H52	8.8	6.9

コセンより適している。使用する綿栓は、素早く作業が終えられるように、繰り返し使用しても型崩れのない成形したものを用いる。接種はマイクロスパーテル片匙タイプの乾熱殺菌したもので行い、落下した分生子は匙面を、寒天に生育した菌糸や分生子は反対側の板面や白金鉤を用いて、寒天ごと切り取る。

### 継代培養

市販種麹の製造は、拡大培養法で行われるため、原菌から製品世代まで数代の植え継ぎが必要となることから、その間の形質の安定性が重要となる。まず、CDM-Agar培地において巨大集落培養を行い、セクターの発生などを観察し外観上の変化を観察する。また、種麹製造用の米や麦培地を用いた植え継ぎ培養を行い、各世代のものを用いて同時に製麹試験を行い、安定性を確認する。保存原菌は繰り返し使用による汚染や保存性の低下を避けるために、植え継ぎしたものを原菌として用いる。また、菌株によっては培地の種類で形質が変化するものもあり、色々な培地で継代培養試験を行い、安定性の高い培地を選択する。

### 種麹培養

分生子を効率良く大量に得ることを目標とし、培養容器は金属トレイや麹蓋を用い、米や大麦を培地として空調したクリーンルームや加湿した麹室などで120時間培養し、除湿した温風で乾燥する。蒸煮原料を30–32°C

まで冷却後、散布器で均一に接種後、約20時間後に、手入れを行い薄く広げる。この時、原料の層厚は1 cm程度と薄くしないと、菌糸の長い菌株の場合は収量が低下する。培養期間が長いので、その間原料が乾燥しないように環境湿度を保持し、温度は後半28°C付近まで下げ分生子着生を促す。種麴の製造を商業規模で行う場合には、細菌汚染のリスクが高い液体培養法は採用されておらず、米や麦、穀などの穀物を用いた固体培養が一般的である。玄米の表面は麴菌の増殖に有利なミネラルやN含量が豊富であるが、そのままでは硬く麴菌が生育し難いので、表面を3%程度磨いたものを用いる。磨き過ぎると澱粉が露出し蒸し米が塊となり表面積が少なくなるため、収量も減る。増殖が遅い、菌糸が長い、酸素要求量が多い菌株などについては、初発水分・培養温度・手入れ回数・酸素濃度・盛厚・製麴などの培養条件を変える。

### 麴の培養

麴の培養は、種麴製造とは培養方法が異なり、そこに関与する因子は、原料の種類・搗精歩合・初発水分・品温経過・環境湿度など、実に多岐にわたる。麴の場合は、原料の分解に必要な酵素を麴菌に造らせることを主目的とするが、産地や気候によって違う天然素材を培地としていること、食品の用途によって要求される酵素量やそのバランスが異なること、造り手の麴の品質に対する考え方も異なることなどから画一化された培養法はなく、“造り万流”と言われる所以である。麴の培養には、まず、麴菌を順調に生育させることが重要である。麴菌の場合は、細胞数を測定できないため、培養中の麴菌の増殖は、菌体中のN-アセチルグルコサミン含量や、単位当たりの麴菌のO<sub>2</sub>吸収量を測定する方法によって行われている。後者は、麴菌が吸収したO<sub>2</sub>量を測定する方法であり、増殖の初期は菌体量との間に相関があるが、その度合いは培地や菌株によって大きく異なる(図3)。醗酵食品の製造に用いられる麴造りは、米や麦・大豆などの穀物に適量吸水させ、蒸煮殺菌したものを培地とした麴菌の固体培養が行われている。その利点としては、培地は穀物と水のみから成り単純であること、好氣的微生物であるカビの生育に適した環境であること、解放系であるにもかかわらず、初発水分が30-45%程度と低いため、液体培養の場合と比較してバクテリア汚染を受け難いことなどが挙げられる。しかし、特筆すべきは、醸造食品の製造に必要な*A. oryzae*のグルコアミラーゼ遺伝子が、固体培養において特異的にしかも多量に発現する<sup>3)</sup>ことや、*A. kawachii*の耐酸性α-アミラーゼも同様に固体培養でのみ産生される<sup>4)</sup>といったことなどである。しかし一方、バラツキが多く品質が均一ではないこと、麴菌の発熱量が多く品温制御が困難であること、培養や物質生産に最

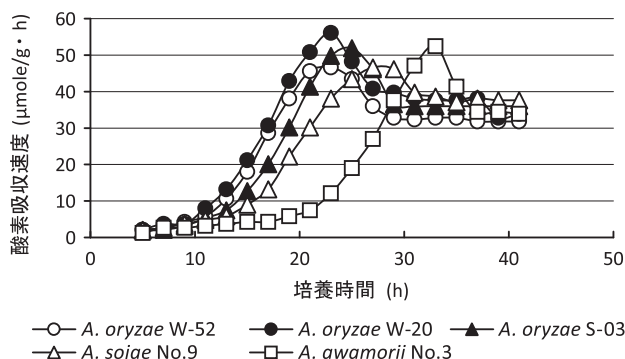


図3. 麴種や菌株間の増殖速度差。85%精米歩合の他用途米(蒸し米水分:35%)を用いて、コーンウェイの微量拡散容器を用い、30°Cの高温水槽内で培養した。

適な培地成分の調整がし難いこと、菌体外に産生した物質の精製が容易ではないことなどの欠点もある。近年、麴菌の糖質関連酵素の生産が環境中のグルコースにより抑制されることに着目し、98%精白大麦を基質とした液体培養法で白麴菌を培養することで、グルコースの培地中への放出速度が遅くなりグルコアミラーゼ、耐酸性・非耐酸性α-アミラーゼが同時にバランスよく高生産され、固体麴と同等の焼酎ができたとの報告<sup>5)</sup>がある。本研究を通じた両培養法の差異に関する解析が進むとともに、両者の特徴を生かした新規培養方法や、麴菌を宿主とした異種タンパク質や有用物質生産への応用が期待される。

### おわりに

麴の世界には、殺菌技術もさほど進歩していない頃より、解放系においても雑菌汚染を避け麴菌を優先的に培養する方法を見いだしてきた先人たちの長い歴史がある。微生物の培養は奥が深く、マニュアル通りに行かないことが多い。試行錯誤を繰り返すうちに改良すべき点はまだ多いことを教えられる。微生物の培養方法は実にさまざまであるが、どれがその微生物の特性を生かすのに最適であるのか不明な点も多い。彼らにとってその条件が快適なのか否か、さらには、我々が努力すればもっと違った顔を見せてくれるのだろうか。本稿で取り上げた筆者らの麴菌の培養方法は、その中のごく一部でしかないことをお断りしておく。

### 文 献

- 1) 根井外喜男：微生物の保存法，東京大学出版会(1977).
- 2) 松浦慎治：醸協，**59**, 938 (1964).
- 3) 秦 洋二，石田博樹：醸協，**93**, 922 (1998).
- 4) S. Sudo et al.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 483 (1994).
- 5) 小路博志ら：醸協，**102**, 109 (2007).