

研究報文

麹菌孢子の発芽促進に関する研究
 - トレハロース含量の増加と発芽速度の回復 -

廣瀬真也, 眞岸範浩
 (ヒガシマル醤油株式会社 研究所)

(令和 4 年 4 月13日受理)

Study on promotion of *Aspergillus oryzae* spore germination
 - stimulating effect of trehalose content on the spore germination -

Shinya Hirose and Norihiro Magishi
 (Research Laboratory, Higashimaru shoyu Co., Ltd)

麹菌孢子の発芽促進を目的に、当社保有株である*Aspergillus oryzae* HL-15株を用いて、孢子のトレハロース含量と発芽速度の関係について解析した。はじめに、冷蔵保管による孢子のトレハロース含量と発芽速度の変化を確認するため、4℃で冷蔵保管した際の孢子内トレハロース含量と発芽速度を経時的に測定した。その結果、冷蔵期間が長くなるにつれて発芽速度が低下し、トレハロース含量も同様に低下した。さらに、この冷蔵保管による孢子内トレハロース含量および発芽速度の低下は、孢子を加温処理することにより、トレハロース含量が増加し、発芽速度は回復することを見出した。加温の温度と時間の違いによる回復効果比較を行ったところ、孢子の発芽速度回復のための加温最適条件は37℃で10~20時間であった。また、20時間以上の加温では発芽速度の回復効果が低下することから、この加温は単に孢子が生育（発芽）しているのではないことを確認した。さらに、加温により発芽速度およびトレハロース含量が回復した孢子は、その後再冷蔵しても発芽速度およびトレハロース含量の低下はみられず、加温処理により孢子の保存性も向上することが示唆された。

緒言

醤油は大豆と小麦を主原料とし、麹菌、乳酸菌、酵母の発酵によって特有の味わいや風味を醸し出す日本の伝統的な醸造調味料である。醤油醸造には「一麹、二糴、三火入れ」という言葉があり、これらの工程が醤油の品質に重要とされている。「一麹」にあたる製麹工程は、原料の分解に必要な諸酵素を麹菌に生産させることを主な目的として、蒸した大豆と炒った小麦に麹菌を植菌し、

醤油麹を作る工程である。醤油醸造で主に行われる3日麹では、通常約42~45時間かけて麹菌を増殖させ、増殖に合わせて麹をほぐす手入れを行う¹⁾。手入れは、一般的に盛り込みから約18時間後に1番手入れを、1番手入れの約8時間後に2番手入れを行い、発熱した麹の品温を下げ、麹菌の生育や酵素生産を促す効果がある¹⁾。醤油醸造用麹菌の持つべき望ましい性質は、①孢子の着生能が高い、②短毛菌である、③生育速度が速い、

④アミラーゼ活性が低く、生育中の炭水化物消費量が少ない、⑤醤油醸造に必要な酵素群、特にたんぱく加水分解系の酵素、グルタミナーゼ、植物組織分解系の酵素の生産能が十分高いことが挙げられる²⁾。麴菌が生産する各種酵素は非常に多様であり、同一作用の酵素でも基質特異性や最適作用条件が異なるものもあり、原料である大豆と小麦を可溶化、分解するのに有効である。さらに、製麴工程では雑菌の増殖を抑え、麴菌を優先的に増殖させることが重要であり、特に製麴初期の麴菌の増殖は、雑菌の抑制や麴菌の酵素生産に大きく影響を及ぼすため、孢子が早く発芽することが求められる。これまでの経験上、同一菌株であっても孢子の保管条件等の違いにより発芽速度が異なることが分かっている。孢子は乾燥させることで保存性が良くなり、孢子が死滅しない40℃以下の通風により水分15%以下にまで孢子を乾燥させ、乾燥状態で保管することにより、15℃で200日間保管してもほとんど発芽率は低下しない³⁾。しかしながら、乾燥しない場合又は乾燥させた場合でも高湿度下での保管では、保管期間が長くなるにつれて発芽率が低下することが報告されており³⁾、乾燥状態を保たなければ冷蔵保管においても発芽率は低下する。麴菌孢子の発芽に関してはこれまでに、最少培地で孢子を培養し、経時的に孢子内成分を測定すると、増殖するにつれて孢子内トレハロース量が減少すること⁴⁾や孢子のトレハロース含量が低下した遺伝子破壊株はストレス耐性が低下すること⁵⁾が報告されており、トレハロース含量が孢子の発芽や保存性に関与していることが考えられる。

そこで、本研究では麴菌孢子の発芽促進を目的に、孢子のトレハロース含量と発芽速度に着目し、冷蔵保管中のトレハロース含量と発芽速度の低下とその回復方法について検討した。

実験方法

1. 麴菌孢子の調製

パン粉(関西食品工業株)12gと小麦フスマ(日清製粉株)15gを混合し、蒸留水15mlを加え、1

L容三角フラスコに入れた。ウレタン栓で蓋をし、オートクレーブ(121℃, 45分)処理後、当社保有株 *Aspergillus oryzae* HL 15株の孢子を約 7.0×10^7 /gとなるように植菌し、30℃で4日間培養して麴菌固体培養物に孢子を着生させた。培養開始より20, 26, 44時間後に手入れを行い、培養終了後は三角フラスコを4℃の冷蔵庫で保管した。

2. 麴菌孢子の発芽率の算出

約 3.0×10^8 /mlとなるように蒸留水で調製した孢子懸濁液100 μ Lを麴汁寒天培地⁶⁾に塗布し、30℃で培養した。培養開始から1時間毎に孢子を検鏡し、孢子200個あたりに発芽している孢子の割合(発芽率)を算出した。

3. 麴菌孢子のトレハロース含量の測定

分析試料の調製は、堀越らの方法⁷⁾に準じて行った。適量の麴菌固体培養物を50ml容遠心管に入れ、蒸留水を適量加えて激しく懸濁した。懸濁液を茶漉しでろ過し、大きな固形物を除いた。ろ液を分析用ろ紙No.7(ADVANTEC社)でろ過し、ろ紙上に残った孢子をエアージャケット方式のインキュベーターにて70℃で2時間乾燥させた。分析試料の測定は、Pongsuwanらの方法⁸⁾を参考に行った。具体的には、乾燥した孢子0.05~0.10gをマイクロチューブ(Eppendorf社)に取り、0.10g/mlとなるように蒸留水を加えて懸濁後、15分間の沸騰浴を3度繰り返し、孢子内成分を抽出した。加熱処理した懸濁液を遠心(9,500g, 10分)し、上清を0.45 μ mフィルター(ADVANTEC社)でろ過後、蒸留水で10倍希釈した。希釈液30 μ Lと内部標準液として蒸留水で調製した0.1mg/mlスクロース溶液30 μ Lをマイクロチューブに取り、ドライブロックバス(ASONE社)にて95℃で乾固した。メトキシアミン塩酸塩(和光純薬, 一級)を2%(w/v)となるようピリジン(関東化学株, 特級)に溶解させ、乾固したマイクロチューブに100 μ L加え、30℃で90分インキュベートした。50 μ Lの

N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (ジーエルサイエンス社) を加え, 37℃で30分インキュベートした後, GCMS-QP 2020 (株島津製作所) にてトレハロース含量を測定した。Gas Chromatography-Mass spectrometry (GC/MS) 分析条件は以下の通りである。

カラム: SH-Rxi-5 sil MS (株島津製作所), 内径 0.25 mm, 長さ 30 mm, 膜厚 0.25 μm
 昇温条件: 80℃ (2分保持) → 330℃ (15℃/分) → 330℃ (13分保持)

注入方法: スプリット スプリット比 1:3 注入量: 1 μL

検出された成分の同定は, 各ピークのフラグメントパターンについてNISTライブラリ (株島津製作所) による定性解析を行った後, 標準品とのマススペクトル, Retention Indexまたは Retention Timeの一致により行った。トレハロースの定量は, 標品としてTrehalose (和光純薬工業株, 特級) を使用し, 内部標準 (IS) 物質に対する濃度比とマスクロマトグラムのピーク面積 (Area/IS) 比を基に検量線を作成し, トレハロース含量を算出して行った。

4. 麹菌胞子の加温処理

冷蔵保管した麹菌固体培養物が入った三角フラスコをエアージャケット方式のインキュベーターにて所定の温度, 時間で処理した。

結果及び考察

1. 冷蔵保管による麹菌胞子の培養時間毎の発芽率の変化

培養終了直後の胞子と30日間冷蔵 (4℃) 保管した胞子の各培養時間の発芽率を測定した。培養終了直後と比べ, 冷蔵30日間保管することで培養2~5時間での発芽率は低下したが, 培養6時間では同程度であった (図1)。本研究では, 胞子の発芽の速度を解析するために, 胞子の発芽が旺盛な状態であった培養4時間後の発芽率を「発芽速度」として解析を行った (図1)。

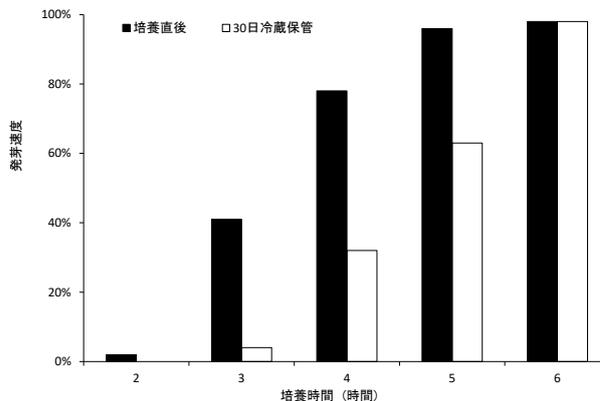


図1 冷蔵保管麹菌胞子の培養時間毎の発芽率の変化

4℃で30日間冷蔵保管した麹菌胞子を30℃で培養した時の発芽率を経時的に測定した。平均値 (n=2)

2. 冷蔵保管による麹菌胞子のトレハロース含量と発芽速度の変化

胞子を90日間冷蔵保管し, 保管中のトレハロース含量と発芽率を経時的に測定した。その結果, 冷蔵30日間でトレハロース含量は培養終了直後を100%として約43%に, 発芽速度は約90%から約39%にまで低下した。冷蔵60日間, 90日間と冷蔵期間が長くなるにつれてトレハロース含量は低下する傾向がみられ, 発芽速度は約18%, 約4%に低下した (図2)。

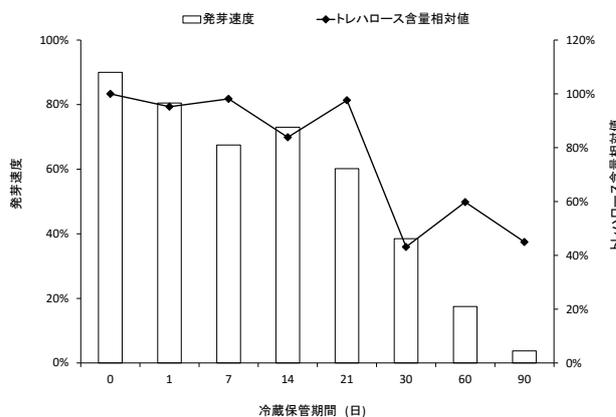


図2 冷蔵保管による麹菌胞子のトレハロース含量と発芽速度の変化

麹菌胞子を4℃で90日間冷蔵保管した時のトレハロース含量と発芽速度を経時的に測定した。平均値 (n=2)

トレハロース含量は, 冷蔵前の値を100%とした時の相対値
 発芽速度は麹菌胞子を30℃で4時間培養した時の発芽率

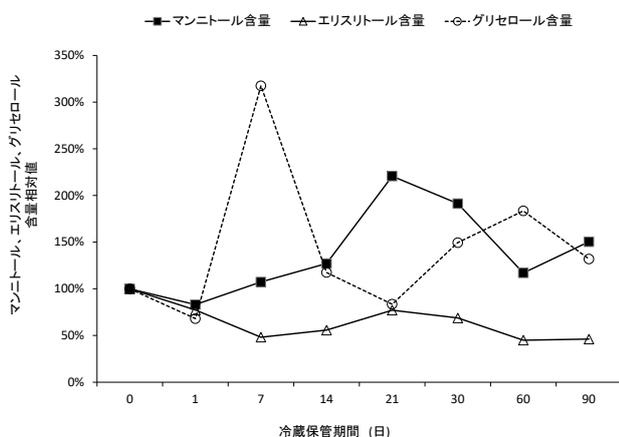


図3 冷蔵保管による麹菌胞子の糖アルコール含量の変化

麹菌胞子を4℃で90日間冷蔵保管した時の各糖アルコール含量を経時的に測定した。

平均値 (n=2) 冷蔵前の値を100%とした時の相対値

トレハロース以外の胞子内成分では、同じく糖アルコールであるマンニトール、エリスリトール、グリセロールが検出され、アミノ酸や有機酸は検出されなかった (data not shown)。これらトレハロース以外の糖アルコールの含量は、冷蔵により変化するものの、冷蔵期間の長さや含量の変化に相関はみられなかった (図3)。そのため、トレハロース含量と発芽速度の解析をさらに進めることとした。

3. 冷蔵保管麹菌胞子の加温処理によるトレハロース含量と発芽速度の変化

3-1. 加温温度別の発芽速度の変化

30日間冷蔵保管した胞子を用い、30、37、45、55℃の各温度で1時間加温した時の発芽速度を測定した。その結果、加温前は約52%であった発芽速度が、30℃加温では約79%、37℃加温では約85%、45℃加温では約72%まで回復した (図4)。一方、55℃加温では発芽速度の回復がみられなかった。発芽自体もみられなかったため、加温により胞子が死滅したと考えられた (図4)。このことから、冷蔵保管による胞子の発芽速度低下は、30~45℃で加温することで回復し、最適な加温温度は37℃付近であることが示唆された。

一般的な麹菌胞子の発芽最適温度は15~44℃

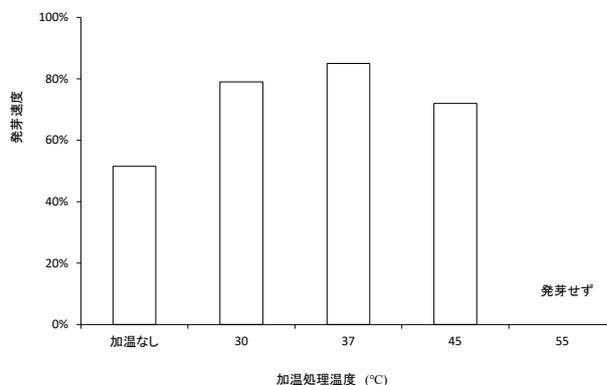


図4 冷蔵保管麹菌胞子の加温温度別の発芽速度の変化

4℃で30日間冷蔵保管した麹菌胞子を30、37、45、55℃の各温度で1時間加温した時の発芽速度を測定した。

平均値 (n=2)

と言われており⁹⁾、本研究での加温条件も含まれる。加温による発芽速度回復は、加温することで胞子が生育 (発芽) しているだけではないかと考えられたため、加温時間とトレハロース含量、発芽速度回復の関係をさらに解析した。

3-2. 加温処理によるトレハロース含量の増加と発芽速度の回復

30、60、90日間冷蔵保管した胞子をそれぞれ37℃で加温し、加温48時間まで経時的にサンプリングを行い、トレハロース含量と発芽速度を測定した。その結果、全ての胞子においてトレハロース含量は加温時間が長くなるにつれて増加し、30日間冷蔵保管した麹菌胞子では、加温前を100%として10時間加温で約272% (培養終了直後の約138%)、48時間加温で約335% (培養終了直後の約170%)と顕著に増加した (図5)。一方、発芽速度の向上が一定時間認められ、24時間以上の加温で低下した (図6)。よって、単に加温で胞子が生育 (発芽) しているだけではないことを確認した。また、30日間冷蔵保管した胞子では約39%、60日間冷蔵保管した胞子では約18%であった加温前の発芽速度が、37℃で3~24時間加温することで、70%以上にまで回復したのに対して、90日間冷蔵保管した胞子では約

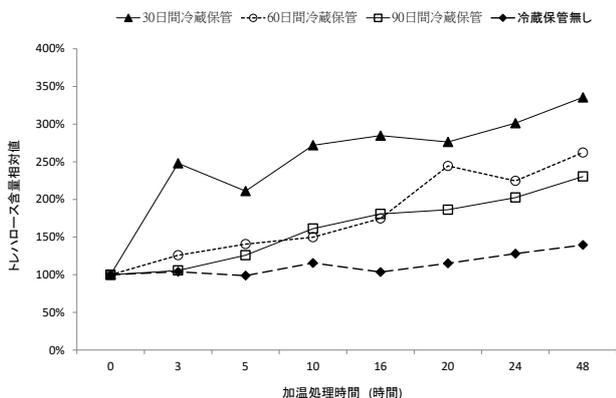


図5 冷蔵保管麹菌胞子の加温処理時間とトレハロース含量の関係

4℃で30, 60, 90日間冷蔵保管した各麹菌胞子を37℃で48時間加温した時のトレハロース含量を経時的に測定した。平均値 (n=2) (30日間冷蔵保管のみn=1) 加温処理前の値を100%とした時の相対値

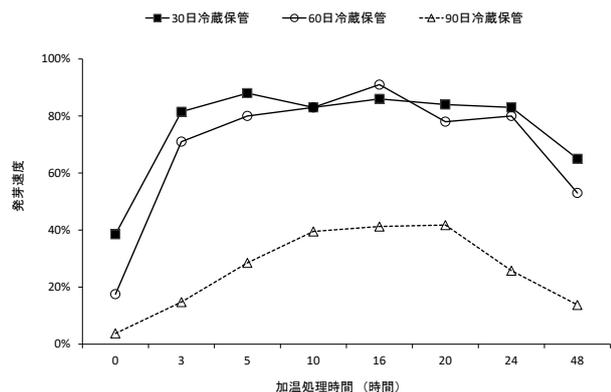


図6 冷蔵保管麹菌胞子の加温処理時間と発芽速度の関係

4℃で30, 60, 90日間冷蔵保管した各麹菌胞子を37℃で48時間加温した時の発芽速度を経時的に測定した。

4%であった加温前の発芽速度が、37℃で10~20時間加温することで最大約40%までしか回復しなかった(図6)。発芽速度回復の最適な加温時間帯も冷蔵期間が長くなるにつれて短くなり、30, 60日間の冷蔵保管では3~24時間の加温時間よりも短くあるいは長くなると回復量が減るのに対して、90日間の冷蔵保管では10~20時間の加温時間よりも短くあるいは長くなると回復量が減った(図6)。この結果から、37℃で24~48時間の加温処理は胞子へ加温によるストレスがかかり発芽速度が低下すること、60日間を超える冷蔵保管による発芽速度の低下は、37℃の加温

処理では回復効果が小さいことが示唆された。

3-3. 加温処理による麹菌胞子の保存性向上

30日間冷蔵保管した胞子を37℃で16時間加温し、再度冷蔵保管した。再冷蔵保管30日まで経時的にサンプリングを行い、トレハロース含量と発芽速度を測定した。その結果、加温により増加したトレハロース含量と回復した発芽速度は、ともに再冷蔵保管しても低下しなかった(図7)。トレハロース含量は、加温前を100%として加温直後は約267%(培養終了直後の約173%)、30日間の冷蔵保管後においても約219%(培養終了直後の約142%)であった(図7)。発芽速度は、加温前は約53%であったが、加温することで約90%に回復し、その後30日間冷蔵保管しても約85%に維持された(図7)。このことから、加温処理胞子の再冷蔵保管におけるトレハロース含量と発芽速度の低下抑制効果が確認でき、加温によるトレハロース含量の増加と発芽速度の回復は、胞子の保存性の向上につながる事が示唆された。なお、本研究は「冷蔵処理黄麹菌胞子の活性化方法」として特許を取得している(特許第6968465号)。

以上の結果から、胞子のトレハロース含量は発芽速度と完全に相関を示すわけではないもの

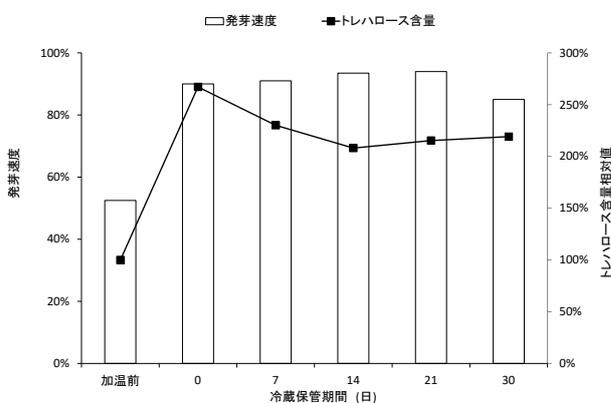


図7 加温処理した冷蔵保管麹菌胞子の再冷蔵保管によるトレハロース含量と発芽速度の変化

4℃で30日間冷蔵保管した麹菌胞子を37℃で16時間加温し、再度4℃で30日間冷蔵保管した時のトレハロース含量と発芽速度を経時的に測定した。

平均値 (n=2)

トレハロース含量は加温処理前の値を100%とした時の相対値

の、発芽速度と密接な関係があると考えられた。Christopheらの報告⁴⁾により、胞子の発芽時に胞子内のトレハロースやマンニトール含量が減少するとともにグリセロール含量が一時的に増加後、減少していくことが分かっている。本研究ではマンニトール、グリセロール含量については冷蔵保管期間との関係性はみられなかったが、加温によってトレハロース含量が増加することで発芽に関わる遺伝子が発現し、発芽速度が回復する、あるいは、加温により発芽に関わる遺伝子が発現することで、発芽速度が回復し、その結果、トレハロース含量が増加すると推測された。麹菌は菌糸先端のみを成長点とする極性成長である。現在、特定の場所が成長（発芽、伸長）するための発芽の極性確立に関する遺伝子である*swoC*, *D*, *F*や、確立した極性の維持に関する*swoA*, 分岐伸長に関する*swoB*, *E*, *G*, *H* 等が報告されている¹⁰⁾。今後はこれら遺伝子の発現を解析することで、加温による発芽速度回復のメカニズムについて解明を進めていく。

要 約

1. 4℃冷蔵保管による胞子のトレハロース含量及び発芽速度は、保管期間が長くなるにつれて低下し、冷蔵保管時のトレハロースの減少と発芽速度低下に相関がみられた。
2. 冷蔵保管による胞子内トレハロース含量および発芽速度の低下が、胞子を加温処理することで増加あるいは回復することを見出し、加温最適条件は37℃、10~20時間であった。
3. 加温により発芽速度が回復し、加温前と比べてトレハロース含量が増加した胞子は、その後再冷蔵しても発芽速度やトレハロース含量の低下はみられず、加温処理により胞子の保存性が向上することが示唆された。

謝 辞

本研究にあたり、終始ご指導とご助言をいただきました取締役研究所長、古林万木夫博士に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 芳賀宏：しょう油醸造における3日麴および冷却仕込みについて. 日本醸造協会雑誌, **63**, 931-936 (1968)
- 2) 林和也：麹学. 村上英也編著, p.407, 日本醸造協会 (1986)
- 3) 奈良原英樹：麹菌の増殖と胞子形成に対する水分活性の影響. 発酵工学, **55**, 254-261 (1977)
- 4) C. d'Enfert and T. Fontaine : Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans treA* gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose. *Mol. Microbiology.*, **24**, 203-216 (1997)
- 5) 坂本和俊：麹菌胞子の耐久性に関わる遺伝子の発現制御機構について. 日本醸造協会, **105**, 762-769 (2010)
- 6) 日本醤油研究所：しょうゆ試験法 (1985)
- 7) K. Horikoshi et al : Mannitol and Mannitol Dehydrogenases in *Conidia* of *Aspergillus oryzae*. *J. Bacteriol.*, **89**, 326-330 (1965)
- 8) W. Pongsuwan et al : Prediction of Japanese green tea ranking by gas chromatography/mass spectrometry-based hydrophilic metabolite fingerprinting. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 231-236 (2007)
- 9) 照井 堯造, 望月 務：カビ胞子の発芽における代謝生理. 醸酵工学雑誌, **35**, 157-163 (1957)
- 10) M. Momany et al : *Aspergillus nidulans swo* Mutants Show Defects in Polarity Establishment, Polarity Maintenance and Hyphal Morphogenesis. *Genetics Society of America.*, **151**, 557-567 (1999)
- 11) S. Fillinger et al : Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology.*, **147**, 1851-1862 (2001)