

カツオブシ菌とその働き

4年C組 中西 夏輝

4年C組 谷口 亜紳

指導教諭 矢野 幸洋

1. 要約

サイエンス研究会生物班4年生は主に微生物を研究対象に据えて活動をしている。私たちはその中でも発酵食品に携わる菌・バクテリアなどに注目しており、身近な食品に潜む微生物の働きについて研究している。このレポートは、その中でも我々に昔からなじみのある発酵食品「カツオブシ」に関わる菌類についてまとめたものである。

キーワード カツオブシ菌、ペプトン培地、抗生物質

2. 研究の背景と目的

菌類は私たちの生活に大きくかかわっている。身近な生活品や食材から、社会の最先端科学技術まで、もはや人間は菌類の助けなくしては現在のような生活を送ることはできない。さらにいうならば、そもそもこの社会が成り立っているのは菌類たちのおかげである。私たちはそのような目立たずとも世界を縁の下で支えている菌類に興味を持ち、その中でも日本の伝統的な発酵食品である「鰹節」に携わる「カツオブシ菌」を研究対象とした。

鰹節とはその製作過程に「カツオブシ菌 (*Aspergillus repens* / *Aspergillus glaucus*)」というカビの一種が使われた世界でもっと堅い発酵食品である。その食品を作る際に使われる菌がどのような性質を持っているのか、鰹節以外にその性質を応用できないのかについて興味を持ち、調べることにした。

今回扱う「カツオブシ菌」は菌界、子囊菌門、ユーロチウム目、マユハキタケ科、アスペルギルス属に分類される真菌である。

この菌の特徴は、低水分・高塩分でも増殖できる点にある。これはこの菌の吸水力が極めて強いことに由来する。また、脂質分解酵素とタンパク質分解酵素により余分な脂肪・タンパク質をアミノ酸、イノシン酸という旨味成分へと分解している。鰹節から取ったダシに旨味があるのはこのためである。加えて、酸化防止酵素を生成しているため、一般の食品に比べて保存が効くようになっている。「カツオブシ菌」はまさに鰹節を作る上で極めて適した菌だといえる。

この菌を研究するために培地を作りたいが、カツオブシ菌に関する資料が著しく少ないため単離培養の方法を確立するところから始めた。

菌を育てるための培地には寒天培地や液体培地など多様にあるが、今回は「麹菌 (*Aspergillus oryzae*)」と同じアスペルギルス属ということで寒天培地を用いて単離培養することにした。



図1 使用した鰹節



図2 黄色のコロニー

3. 研究内容

培地は、カビの育成に適したペプトン培地を使用した。培地の作成方法を次に示す。

- ①200mlの蒸留水に、3.2gの寒天と10gのブドウ糖ペプトンを加えて攪拌し完全に溶かす。
- ②この溶液を300mlビーカーに入れ、オートクレーブを用いて20分120℃で滅菌する。
- ③6つのシャーレに均等に分け、寒天が固まったら冷蔵保存する。

作成したペプトン培地に、削り取った鰹節の表面の粉末をかけて、30℃で数日間培養した。結果、数種類の菌のコロニーが確認できた。それらの菌の一部を採取し、それぞれを800μlの滅菌水に溶かし、ループで培地にまんべんなく塗りつけた。前回と同じ環境で数日間培養した後、灰色と黄色の2種類のコロニーが成長した。



図3 灰色のコロニー

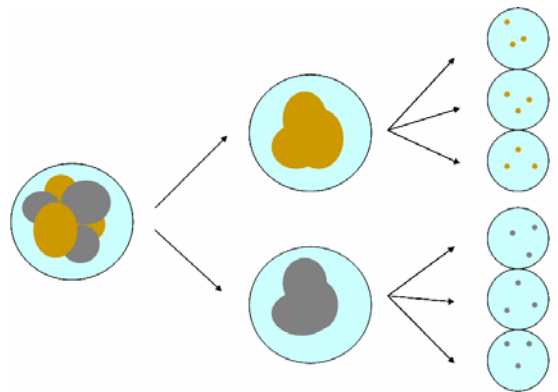


図4 単離培養

資料などを調べた結果、*Aspergillus repens*は黄色、*Aspergillus glaucus*は灰色のコロニーを作ることが分かった。その他、成長するときに大量の水分を必要とするなどの特徴が、今回できたコロニーと一致した。よってこの2つのコロニーはカツオブ

シ菌であると断定した。

つまり、図2は*Aspergillus repens*、図3は*Aspergillus glaucus*であると思われる。

図2, 3の段階では一種類ではあるが複数のコロニーが混在している状況で、一つの細胞からできた一つのコロニーがほかのコロニーとは接していない状態でないと単離培養とは言えない。この実験を繰り返していくうち、単離培養に成功した培地もあったが、多くの培地でコンタミネーションが起こり、実験を次の段階まで進めるまでには至らなかった。

そこで、単離培養の成功確率を上げるために、抗生物質を用いた培地を使用することにした。前述のペプトン培地にカナマイシンを混ぜるという方法をとった。カナマイシンは、カビなどの菌を培養するときにコンタミネーションを防ぐために使われる抗生物質である。

今回は保存濃度が20mg/mlであるカナマイシンを、溶媒として滅菌SP水を用い、使用濃度を10~50µg/mlに設定した。

まず、カナマイシンは、常温では活性が失われるので、冷凍するために濃度20mg/mlの保存ストックを作成した。作業はすべてクリーンベンチ内で行った。

- ①マイクロピペットで10mlの滅菌水を量る。
- ②電子天秤を用いてカナマイシンを200mg量り取る。
- ③先ほど量った滅菌水にカナマイシンを加えボルテックスで溶かしこむ。
- ④この水溶液を1mlずつ分けて冷凍保存する。

このストックを10本作成した。

オートクレーブにかけた固まる前の培地に濃度が20µg/mlとなるようにカナマイシンを加え、シャーレに移して冷蔵した。このカナマイシン入の培地は合計11個作成した。



図5 完成した培地

4. 考察

今回の実験は、コンタミネーションを防ぐために行ったのもので、作成段階で菌の混入を防ぐ必要がある。使う機材や手を消毒し、クリーンベンチやオートクレーブを使用するなどの細心の注意を払った。作成した培地を使用してデータを取っていないが、培地に菌を移した場合、以下のような結果が予想できる。

- ①カツオブシ菌のみが成長し、他のバクテリアなどは全く成長しない、つまり、単離培養に成功する。
- ②カツオブシ菌と他のバクテリア等が混在し、抗生物質を使う前とあまり変化が無い。
- ③カツオブシ菌が成長せずに、バクテリアのみが成長する。
- ④全くなにも成長しない。

①の場合なら問題無いが、②~④の場合

にはそれぞれ以下のような改善点が挙げられる。

- ②バクテリアがカナマイシンに対して耐性を持っていることが考えられるので抗生物質の種類を変える、もしくはカツオブシ菌のみが成長できるぎりぎりの濃度を調べる。
- ③カナマイシンが、カツオブシ菌の成長を妨げており、さらにバクテリアに対しては効果を上げていないので、この場合、カナマイシン以外の、カツオブシ菌には効かない抗生物質を利用する。
- ④カナマイシンが、シャーレ内の全ての菌の成長を抑制しているので、濃度を下げて実験をやり直す。

5. 今後の課題

現段階ではカツオブシ菌の培養というごく初歩的な実験だが、将来的にはカツオブシ菌が持っていると言われるリパーゼやプロテアーゼと言った酵素の検出や、それらの酵素が分解した結果できたアミノ酸などの検出を行っていくつもりである。そのためには、カツオブシ菌の単離培養する方法を確立する必要がある。今回はカナマイシンを使用するが、カナマイシンがアスペルギルス属に適さなければ、ほかの抗生物質の使用も検討する。他にも、カツオブシ菌は高塩分の状態にも耐性があるので、培地に塩を混ぜることも考えている。

6. 参考文献

- [1] 「バイオ実験イラストレイテッド」
4巻～7巻, 真壁和裕, 秀潤社
(1996, 1997, 2003)

7. 謝辞

サイエンス生物班の活動において、顧問の矢野先生、櫻井先生に、多大なご指導を賜りました。そのほか、本校や仙台でのポスター発表において、的確なアドバイスを下さった他校の先生方、大学の先生方に感謝申し上げます。