

長崎県産清酒用微生物の創出と安全性について

研究年度 令和3年度

研究期間 平成31年度～令和3年度

研究代表者名 松澤哲宏

共同研究者名 横山智栄、井内智美

1. はじめに

長崎県ではこれまで県内で分離された新規有用発酵微生物を用いた発酵食品の開発が盛んに行っている。特に五島つばきから分離された酵母では、清酒・ワイン・焼酎が既に商品化され製造・販売が行われている。そこで次の段階として清酒の醸造に必要な天然麹菌を県内から分離し、県内で創出された有用微生物のみで清酒の醸造を行える態勢を作ることが計画されている。天然麹菌が創出された場合、清酒のみではなく県産麹を用いた甘酒や醤油、味噌などの開発も予定されている。本研究では長崎県工業技術センターで分離した天然麹菌の候補となる株について①菌種同定、②安全性の評価、③既存の麹菌との比較の3つを行い、食品への利用が可能な長崎県産麹の確立を目指すことを目的とした。また、酒造会社の蔵から分離された酵母の菌種同定、エタノール産生能試験および香り成分の分析を新たに実施し、県産の有用酵母も新たに創出を試みることで県内の酒造業界の支援も行うことも目的とした。

2. 実験方法

長崎県工業技術センターで分離された県内の土壌および酒蔵から分離された天然麹菌候補株 60 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、天然麹菌として有用と考えられる菌種についてアフラトキシンの生合成に関する遺伝子のうち、*afIT*, *nor-1*, *afIR*, *norA*, *avnA*, *vbs* の 6 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シン非産生株の選出を行った。

3. 結果および考察

天然麹菌候補株 60 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。分子系統解析の結果、これまで天然麹菌候補株として分離された株は、*Aspergillus flavus* 54 株、*A. nomius* 4 株、*A. tamarisii* 1 株、*A. thomii* 1 株と同定された。これら 60 株についてアフラトキシシンの生合成遺伝子である、*afIT*, *nor-1*, *afIR*, *norA*, *avnA*, *vbs* の 6 遺伝子の有無を PCR 法によって確認した。その結果、60 株中 18 株でこれら 6 遺伝子全てを有していることが明らかとなった。一般的に *A. flavus* の 3 割がアフラトキシシンを産生すると言われており、本研究の結果は妥当なものであった。これら 18 株はアフラトキシシンを産生する可能性が高いため、天然麹菌の候補として適していないことが明らかとなった。

本研究で確認を行ったアフラトキシシン生合成に関する 6 遺伝子の中で 1 遺伝子でも欠損していればアフラトキシシンを産生する可能性は低いが、天然麹菌としてより高い安全性が必要であるため、6 遺伝子中 3 遺伝子以上の欠損が認められる株を天然麹菌候補株とする基準を設けた。その

基準に基づくと 60 株中、*A. flavus* 12 株、*A. nomius* 1 株、*A. tamarii* 1 株、*A. thomii* 1 株の合計 15 株で 3 遺伝子以上の欠損が認められ、より安全性の高い天然麹菌候補株である可能性が示唆された。

アフラトキシン生合成に関与する遺伝子のほとんどが、ゲノム上、75 kb に及ぶ大きな遺伝子クラスターを成しており、遺伝子クラスター中のすべての酵素遺伝子の発現は、制御遺伝子である *afIR* によって制御されている。*afIR* 遺伝子は遺伝子クラスターの中心付近に存在、AflR 蛋白が発現すると、それが各酵素遺伝子のプロモーター部分に結合して酵素遺伝子の発現を活性化すると報告がある¹⁾。天然麹菌候補株 15 株中、14 株で *afIR* 遺伝子の欠損が認められており、他の遺伝子の欠損と相まってこれらの 15 株は安全性が高い株である可能性が高いため天然麹菌の候補になり得ると考えられる（表 1）。

これらの天然麹菌候補株のうち、*A. falvus* 5 株（No. 9, 10, 12, 14, 17）、*A. tamarii* 1 株（No. 23）のグルコアミラーゼおよび α -アミラーゼ活性を測定し、既存の麹菌との比較を昨年度実施した。その結果、*A. falvus* 5 株はグルコアミラーゼ活性および α -アミラーゼ活性は既存の麹菌と比較して低かった。その一方で、*A. tamarii* No. 23 株は既存の麹菌である白麹雪こまちおよび白長菌よりも高いグルコアミラーゼ活性を示したが、 α -アミラーゼ活性は明らかに低い結果となった。麹菌は酵素バランスも重要で、 α -アミラーゼ活性に対してグルコアミラーゼ活性の割合（GA/ α A）が高い麹が求められている²⁾。*A. tamarii* No. 23 株は既存の麹菌である白麹雪こまちおよび白長菌よりも GA/ α A が明らかに高く、長崎県産天然麹菌の候補株として非常に有力であることが、これまでの研究結果から示唆された。しかし、*A. falvus* で既存の麹菌と同等のグルコアミラーゼ活性および α -アミラーゼ活性を有する株は見つかっていない。そのため、今後、酵素活性の測定を行っていない候補株 9 株（No. 3, 27, 30, 38, 39, 43, 44, 51, 56）について測定を行い、酵素活性の強い天然麹菌の探索を行い、複数の有用県産麹菌の創出が必要であると考えられる。

また、本年度は工業技術センターの共同研究者に技術指導を行いながら酵母の同定を行うことを計画していたが、新型コロナウイルス感染症の拡大の影響により実施することができなかった。また、工業技術センターで実施する予定であった天然麹菌の酵素活性についても、新型コロナウイルス感染症の拡大の影響により、他の業務を優先しなければならなかったため昨年度からの進展が見られなかった。

4. おわりに

これまでの研究結果から、遺伝子検査により天然麹菌候補株となり得るものが 15 株認められた。今後、グルコアミラーゼおよび α -アミラーゼ活性の測定を行っていない 9 株について測定を行い、麹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、遺伝子レベルではアフラトキシンが生産される可能性は極めて低いが、実際にこれらの株を米飯に接種しアフラトキシンが生産されないことを外部機関に依頼して確認する必要がある。本研究の成果により、県産天然麹菌の候補株の選定基準が確立し、県産天然麹菌の創出に向けて大幅な進展がみられた。

表 1. アフラトキシンの生合成に関する遺伝子の PCR 結果

No.	species	<i>afT</i>	<i>nor-1</i>	<i>afR</i>	<i>norA</i>	<i>avnA</i>	<i>vbs</i>
1	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
2	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
3	<i>A. flavus</i>	+	+	+	-	-	-
4	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
5	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
6	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
7	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
8	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
9	<i>A. flavus</i>	-	-	-	+	+	+
10	<i>A. flavus</i>	-	-	-	+	-	+
11	<i>A. flavus</i>	-	+	+	+	+	+
12	<i>A. flavus</i>	-	-	-	+	+	+
13	<i>A. flavus</i>	-	+	+	+	+	+
14	<i>A. flavus</i>	-	-	-	+	+	+
15	<i>A. flavus</i>	-	+	+	+	+	+
16	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
17	<i>A. flavus</i>	-	-	-	+	+	+
18	<i>A. flavus</i>	-	+	+	+	+	+
19	<i>A. flavus</i>	-	+	+	+	+	+
20	<i>A. flavus</i>	-	-	+	+	+	+
21	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
22	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
23	<i>A. tamarii</i>	-	-	-	-	-	-
24	<i>A. flavus</i>	-	+	+	+	+	+
25	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
26	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
27	<i>A. thomii</i>	-	-	-	+	+	+
28	<i>A. nomius</i>	+	-	-	+	+	+
29	<i>A. nomius</i>	-	+	-	+	+	+
30	<i>A. nomius</i>	-	-	-	+	+	+
31	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
32	<i>A. flavus</i>	+	+	+	-	-	+
33	<i>A. flavus</i>	+	+	+	-	-	+
34	<i>A. flavus</i>	+	+	+	-	-	+
35	<i>A. flavus</i>	+	+	-	+	-	+
36	<i>A. flavus</i>	+	+	+	-	-	+
37	<i>A. flavus</i>	+	+	+	-	-	+
38	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-	-	+
39	<i>A. flavus</i>	-	+	-	-	-	+
40	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-	+	+
41	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
42	<i>A. flavus</i>	+	+	+	-	-	+
43	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	+
44	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	+
45	<i>A. flavus</i>	+	+	+	-	-	+
46	<i>A. flavus</i>	+	+	+	-	-	+
47	<i>A. flavus</i>	-	+	+	+	+	+
48	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
49	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
50	<i>A. flavus</i>	+	+	+	-	-	+
51	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-	-	+
52	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
53	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
54	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
55	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
56	<i>A. flavus</i>	-	+	-	-	-	+
57	<i>A. nomius</i>	+	-	-	+	+	+
58	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	+	+
59	<i>A. flavus</i>	-	+	+	+	+	+
60	<i>A. flavus</i>	-	-	+	+	+	+

参考文献

1. 矢部希見子（2002）アフラトキシン生合成機構. *Mycotoxins* 52: 143-152.
2. 山本晃司（2010）麴と麴菌. 愛産研食品工業技術センターニュース 2010年12月号 pp. 1-2.