

応用微生物学実験 実験書

2004 年度版

	頁
1. 微生物の形態学実験	
1.1. 微生物の培養	1
1.2. 微生物の形態観察	4
1.3. かびのスライド培養法	6
1.4. 自然界からの放線菌の単離	7
1.5. 細菌のグラム染色	8
1.6. 菌数の計測	10
2. 微生物の探索と単離	
2.1. メタノール資化性菌の分離（集積培養） とその生育	11
2.2. 放線菌による抗生物質生産と バイオアッセイによる抗生物質の定量	13
3. 微生物の代謝・生理学	
3.1. Laccase の生産と精製	16
4. 微生物生産－酵素法	
4.1. L-チロシンの酵素合成	21
5. 微生物生産－発酵法	
5.1. 清酒醸造	23
5.2. ワイン醸造	26
5.3. アルコール濃度の定量	27

1 微生物の形態学実験

1.1. 微生物の培養

目的とする微生物を大量に得るためには微生物の生育に適した培養材料と条件のもとで微生物を培養しなければならない。

1.1.1. 培地の調製

培養基 (culture medium, 培地) は微生物を生育させるために用いる各種栄養物の混合物で、目的とする微生物に対する栄養素を完備していなければならない。微生物の種類や生理的条件によって、その栄養成分の組み合わせや pH は異なる。

通常、液体培養基と固体培養基に大別され、固体培養基は液体培養基に寒天などを加えて固めた培養基である。また、培養基は天然物質を材料とする天然培養基と化学的組成が明らかな合成培養基とに分けられ、主成分の一部が天然物質で、その他の成分を化学薬品とする半合成培養基も良く用いられる。

細菌用培地

Glucose	0.5	% (w/v)
Peptone	1	
Meat extract	1	
Yeast extract	0.2	
NaCl	0.5	
(Agar	2	%)
Tap water (水道水)		
pH 7.0 - 7.5	(BTB 試験紙で調整)	

酵母・かび用培地

Glucose	5	% (w/v)
Peptone	0.5	
Yeast extract	0.2	
K ₂ HPO ₄	0.4	
KH ₂ PO ₄	0.2	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.02	
(Agar	2	%)
Tap water (水道水)		
pH 5.6 - 5.8	(MR 試験紙で調整)	

放線菌用培地

Soluble starch	0.4	% (w/v)
Yeast extract	0.4	
Malt extract	1	
(Agar	2	%)
Tap water (水道水)		
pH 7.0 - 7.5	(BTB 試験紙で調整)	

乳酸菌用培地

Glucose	0.5	% (w/v)
Peptone	1	
Meat extract	1	
Yeast extract	0.2	
NaCl	0.5	
(Agar	2	%)
Tap water (水道水)		
pH 7.0	(BTB 試験紙で調整)	

穿刺培養用高層培地を調製する場合は、あらかじめ CaCO₃ を小スパテルに一杯程度の量を添加した試験管に上記培地を加える。

【調製操作】

1. 試薬を秤量し、培地を調製する。
2. 培地の pH を調整（1 N HCl または 1 N NaOH で）した後、試験管に分注する。寒天を入れた培地についてはオートクレーブ（5 分間程度）または湯煎によって寒天を溶解して、試験管に分注する（分注器使用）。
3. シリコセン（あるいは綿栓）をした後、オートクレーブによって加圧蒸気殺菌する（121℃、1.0 気圧、20 分）。
4. 固体斜面培地（スラント）を調製する場合は寒天が固まるまで斜面に静置しておく（図 1）。高層培地を調製する場合は直立させたまま放冷し、凝固させる（図 1）。斜面培地を凝固した後、直立させると斜面の下部に凝縮水ができるが、これは菌の十分な生育増殖に重要な役目を持つ。

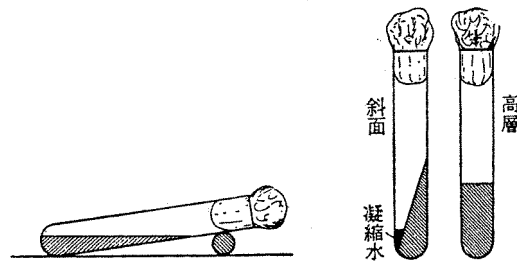


図 1 固体培地

1.1.2. 植菌

培養器に分注した固体または液体培地に目的の菌を純培養するために菌の移植（接種、inoculation）を行う。この際には、雑菌の混入を防ぐために細心の注意が必要である。

微生物を移植するためには白金耳を用いる。白金耳には白金線の先端部をループ状にしたものとカギ状にしたものがある。カギ状にした白金耳はカビの植菌に用いられ、その他の細菌や酵母などはループ状の白金耳で植菌する。また、嫌気性菌である乳酸菌などを穿刺培養する場合は白金線をそのまま用いる。

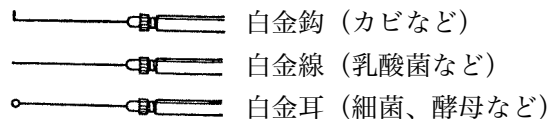


図 2 種々の白金耳

【植菌操作】

1. 菌が生えている培養基と新しい培養基との二本の試験管を、前者を内側にし、後者を外側にし、左手親指と人さし指の間にしっかりと持ち、中指を両方の試験管の間に軽くそえる。そして、シリコセン（あるいは綿栓）の頭部を火炎で軽く焼く。
2. 白金耳を右手に持って火炎殺菌する。
3. シリコセンを右手の自由な指の間にはさみ、試験管から静かに回しながら抜く。この時、両方の試験管の口は火炎から外さない。
4. 火炎殺菌した白金耳をまず新しい培養基に入れて冷却し、菌が生えている培養基から微生物を一白金耳量採って新しい培養基に移す。菌を移す時のみ、両試験管を火炎から外す。
5. 移植した後、試験管口を火炎中にて殺菌しながら、火炎で焼いたシリコセンを試験管に軽く挿入して、管外のシリコセン部分を焼いた後、十分に挿入する。
6. 白金耳を火炎で殺菌する。新しく植えた培養基の試験管をインキュベーターに入れて培養する。

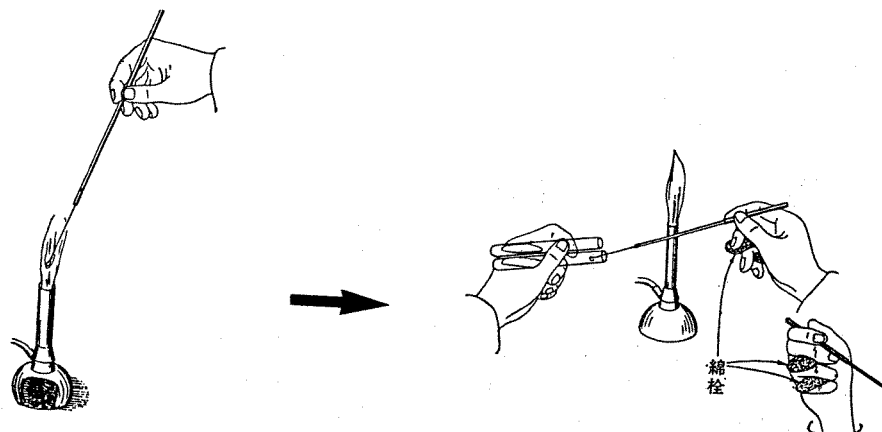


図3 植菌操作

【使用菌株】

細菌

グラム陰性菌

Escherichia coli (AKU 0008)

グラム陽性菌

Bacillus subtilis (AKU 0209)

酵母

子のう酵母

Saccharomyces cerevisiae (AKU 4111)

無孢子酵母

Candida maltosa (AKU 4624)

かび

接合菌類

Mucor javanicus (AKU 3010)

子のう菌類

Rhizopus oryzae (AKU 3119)

Aspergillus niger (AKU 3333)

Penicillium chrysogenum (AKU 3401)

放線菌

土壌より分離した菌株

乳酸菌

Lactobacillus plantarum (AKU 1130)

1.1.3. 培養

菌体の培養方法としては固体培養法と液体培養法がある。

1. 固体培養

菌の保存やかび・放線菌などの孢子を必要とする際には寒天を加えた固体培地を用いて菌を培養する。

固体培養は試験管の固体斜面培養基を用いた斜面培養や、滅菌したシャーレに寒天培地を流し込んで固めた培養基に菌液を注ぐ平板培養が行なわれる。平板培養は微生物の純粋分離法として広く用いられている。同じ原理に従って、微生物の細胞数を計測するのにも応用されている。すなわち、試料を希釈して平板の固体培養基で培養し、個々の細胞より独立した集落（コロニー）を作らせてその数を菌数とする（1.6. 菌数の計測参照）。

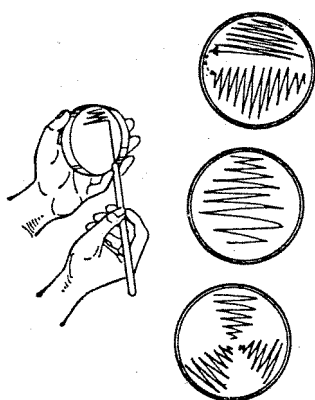


図4 平板培地への植菌操作

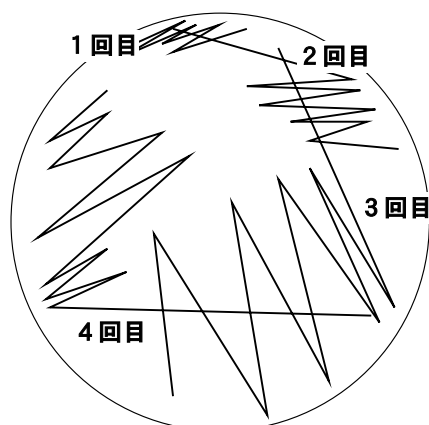


図5 微生物単離のための画線法（例）

2. 液体培養

多量の菌体を得ようとする場合は液体培養基を用いた液体培養を行う。静置培養法と振とう培養法が行われる。振とう培養は微生物を好氣的に培養する方法である。

1.2. 微生物の形態観察

微生物 microorganism という言葉は決して正確な学術用語ではない。しいて定義を与えれば、顕微鏡の助けを借りなければ肉眼では見ることができないような微小な生物、ということになるであろう。

通常、微生物と呼ばれるものには菌類（かび、酵母、きのこ）、細菌（放線菌を含む）、原生動物、ウイルス、及び一部の単細胞藻類が含まれる。これらの微生物は細胞内の核膜の有無によって原核生物 (prokaryote) と真核生物 (eukaryote) に大きく分けることができる。前者には細菌 (bacteria) と藍藻類 (cyanobacteria) が含まれ、後者には酵母 (yeast)、かび (mold)、藻類 (algae) などが含まれる。

1.2.1. 肉眼観察

微生物のおおよその大きさは、細菌が $0.5 \sim 1 \mu\text{m}$ 、酵母が $5 \sim 7 \mu\text{m}$ 、かびの菌糸の幅が $5 \sim 6 \mu\text{m}$ で、ウイルスは $0.01 \sim 0.3 \mu\text{m}$ である。このような微小な菌体でもそれが旺盛に増殖し、コロニーを形成すれば肉眼でも見ることができる。とりわけ、かびについては菌糸体の色や形を肉眼で観察することにより区別することが可能である。

かびの肉眼観察におけるポイント

Rhizopus 属： 綿毛状あるいはクモの巣状に菌糸体を形成する。クモノスカビと呼ばれる。

Mucor 属： 菌糸は白色ないしは灰色で短い毛のように繁殖する。ケカビと呼ばれる。

Penicillium 属： 分生孢子が緑色ないしは褐色で、アオカビと呼ばれる。

Aspergillus 属： 分生孢子の色は黄色、緑色、褐色あるいは黒色とさまざまである。コウジカビと呼ばれる。

細菌や酵母でも色素を生じる菌についてはコロニーや周辺の培地を肉眼観察することによって区別することができる。

1.2.2. 顕微鏡の扱い方

顕微鏡は微生物の研究において最も重要な道具の一つである。一つ一つの部分の構造と機能を十分に理解して、その取り扱い方を習熟しなければならない。

1. 顕微鏡の構造

顕微鏡は光学的な部分と器械的な部分とに分かれている。

2. 器械的な部分

器械系部分は光学系部分を支え、光学系に適正な光軸を与え、試料に対する焦準を行う。試料台 (stage) は検鏡試料を載せる装置で、中央に穴があり、試料台の下にある光源から光を試料にあてる。試料台に載せられた試料に対する焦準合わせは試料台を粗動ネジ及び微動ネジで上下することによって行う。

3. 光学的な部分

光学系部分は接眼レンズと対物レンズ、及び照明装置からなる。

接眼レンズは対物レンズによって拡大された実像をさらに拡大するレンズである。観察に際して、レンズにごみがあるように見えるのは接眼レンズにごみが付いている場合が多い。これは顕微鏡をのぞきながら接眼レンズをまわして、それに従ってごみも移動するようであれば接眼レンズのごみと考えることができる。

対物レンズは顕微鏡の分解能に決定的に影響する。倍率の高い対物レンズは高価であるので、取り扱いに注意を要する。対物レンズには乾燥系のレンズと油浸系のレンズがあり、油浸系のレンズは試料との間にガラスと同じ屈折率を持つツエーデル油を入れて高倍率にして使用する。

4. 操作法

i. 検鏡に際して高い解像力を得るために適切な照明を考える必要がある。像の明るさを調節するためには絞りの開閉よりも光源の強さを調節するべきである。

ii. 次に試料を試料台にのせて、まず粗動ネジを動かし、側面から見ながら対物レンズを試料に近づける。

- iii. 次いで接眼レンズをのぞきながら像が見える位置まで試料台を下げる（あるいは鏡筒を上げる）。
- iv. 大体のピントが合ったら微動ネジにより焦準を合わせる。

レンズを交換した場合でも焦準合わせを始めからやりなおす必要はなく、微動ネジの操作だけで焦点を合わせることができる。高倍率で検鏡する場合はまず低倍率で検鏡して焦点を合わせてから順次高倍率に移す。顕微鏡の総合倍率は対物レンズ及び接眼レンズのそれぞれの単独倍率の積で表される。

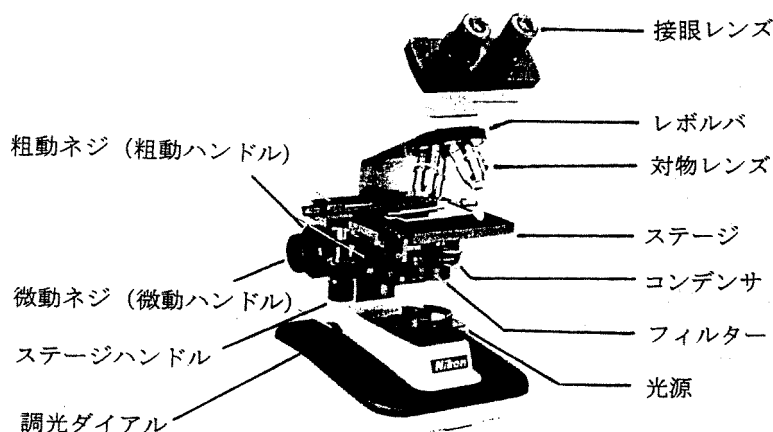


図6 光学顕微鏡

1.2.3. 顕微鏡観察

顕微鏡によって主に次のような観察を行う。

1. かびの顕微鏡観察のポイント
 - i. 菌糸の隔壁の有無
 - ii. 分生子の着生の状態
 - iii. 有性胞子の形成の有無
 - iv. 胞子のう

表1 かびの形態的特徴

Aspergillus 属： 菌糸に隔壁がある。分生芽胞（conidia）は連鎖状。

Penicillium 属： 菌糸に隔壁がある。分生芽胞は分断されて連鎖状。
梗子（sterigmata）は房状。

Rhizopus 属： 菌糸には隔壁が見られない。胞子のうの中に分生子がある。

Mucor 属： 菌糸には隔壁が見られない。胞子のうが観察される。

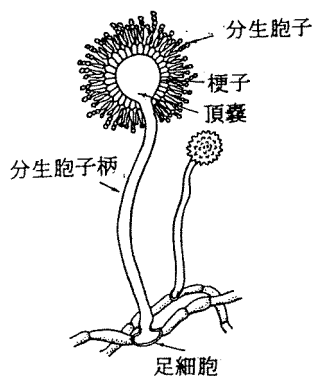


図7 *Aspergillus* 属

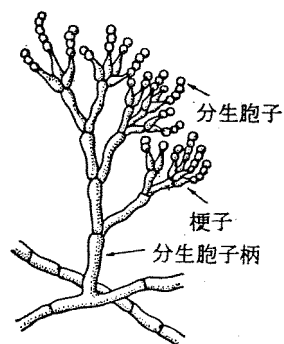


図8 *Penicillium* 属

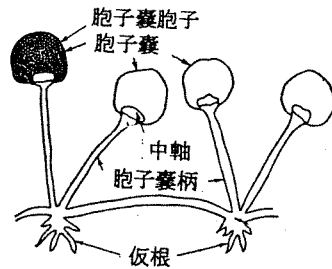


図9 *Rhizopus* 属

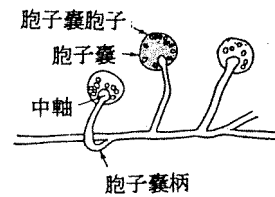


図10 *Mucor* 属

2. 酵母の顕微鏡観察のポイント

- 増殖法（出芽形式、分裂形式、射出胞子の形成など）
- 栄養細胞の形
- 仮性菌糸の形成の有無
- 子のう胞子の形態

表2 酵母の形態的特徴

Saccharomyces cerevisiae： 卵形で出芽分裂する。多極出芽。

Candida 属： 偽菌糸を作る。

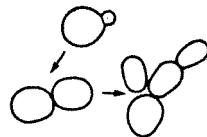


図11 *Saccharomyces cerevisiae* の出芽分裂

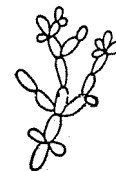


図12 *Candiada* 属の偽菌糸

3. 細菌の顕微鏡観察のポイント

- 細胞の形態
- グラム染色性

表3 細菌の形態的特徴

Escherichia 属： 短桿菌、グラム陰性菌。

Bacillus 属： 長桿菌、グラム陽性菌。

1.3. かびのスライド培養法

かびをホールグラス上で培養し、直接、顕微鏡で観察する方法で、菌糸の成長や胞子の形成などの形態観察ができる。放線菌についてもこの方法が用いられる。

【準備】

- シャーレに濾紙（直径 9 cm の円形）、ホールグラス、カバーガラス、つまようじ（4本）を入れて新聞紙に包んで乾熱殺菌する。
- パスツールピペット、ピンセットを新聞紙に包んで乾熱殺菌する。

【操作法】

- オートクレーブしたかび培養用培地（2%寒天を含む）を、乾熱殺菌済みのパスツールピペットを用いて、乾熱殺菌したカバーガラス上に一滴落とす。
- カバーガラス上で固まった平板培地に白金耳を使ってカビを植菌し、ピンセットでカバーガラスをつまんで逆さまにして、シャーレ中に図13のように組み立てたホールグラスの上に乗せる。
- シャーレ中の濾紙に滅菌水を注いで、ふたをする。
- 静置培養、28℃で培養。

5. 時々、ホールグラスごと取り出して顕微鏡のステージに置き、培地の端からカバーグラス上に伸びた菌糸を検鏡する。

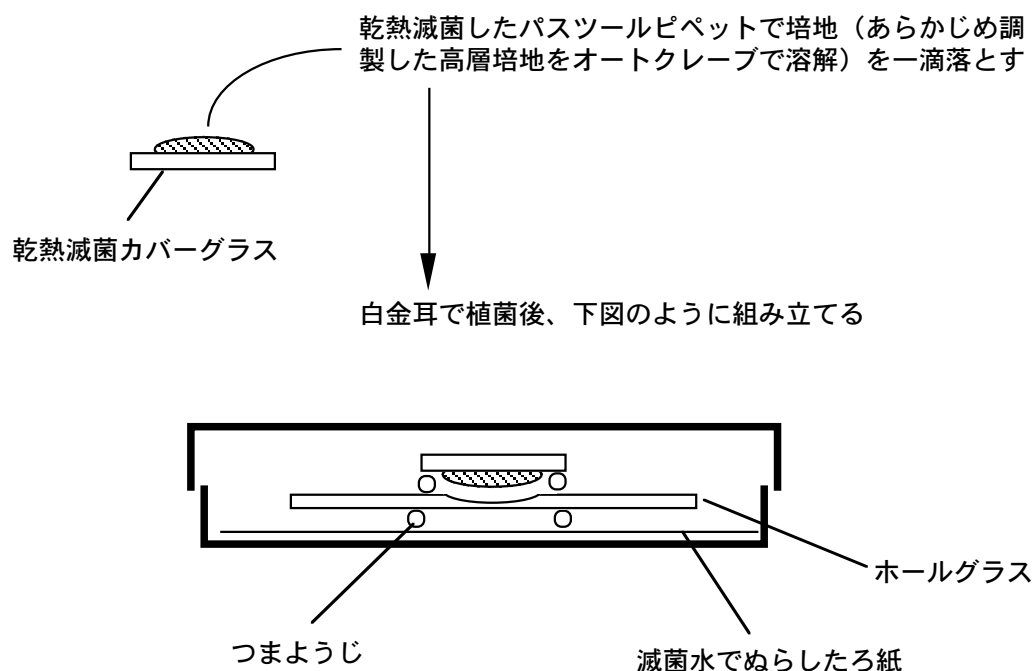


図13 かびのスライド培養

1.4. 自然界からの放線菌の単離

平地の土壌 1g 中には微生物が 1 千万から 1 億存在すると言われている。特に土壌中には放線菌と呼ばれる一群の微生物が多く生息している。放線菌はかびと細菌の中間的な性質を示す。すなわち、糸状の菌糸を放射状に作り、分生胞子を作る点ではかびに類似しているが、菌糸の幅は $1\mu\text{m}$ 以下であり、原核細胞であるところから、分類的には細菌に属する。抗生物質などの生産菌として応用微生物工業と密接に関係している。

ここでは、土壌中より放線菌を単離することを試みる。

【準備】

1. シャーレをアルミホイルに包んで乾熱殺菌する。
2. 土壌試料を採取する（畑の土等、5 サンプル）。

【操作】

1. オートクレーブした放線菌用の培地を乾熱殺菌したシャーレに注いで平板培地を作る。
2. 土壌等採取したサンプル約 1g を試験管にとる。
3. 蒸留水 5ml を加えて良く振る。
4. 上清液を火炎滅菌した白金耳で平板培地上に塗布する。
5. 図5に示したように、平板培地上で希釈画線する。
6. 画線した平板培地のシャーレを 28℃で培養する。
8. 放線菌のコロニーを白金耳で釣り菌して斜面培地に植える。
9. 28℃で培養する。
10. コロニーを検鏡する。

【放線菌の簡易スライド培養法】

放線菌培地で作製した平板培地に、図14のように、放線菌を画線してからカバーグラスをつきさして、培養後、カバーグラスに付着した放線菌を顕微鏡で観察する。

*放線菌を生育させた平板培地は、後日、バイオアッセイに使用する（2.2.2. 参照）。

実験終了後、各自単離した放線菌は、名前を明記して提出する。

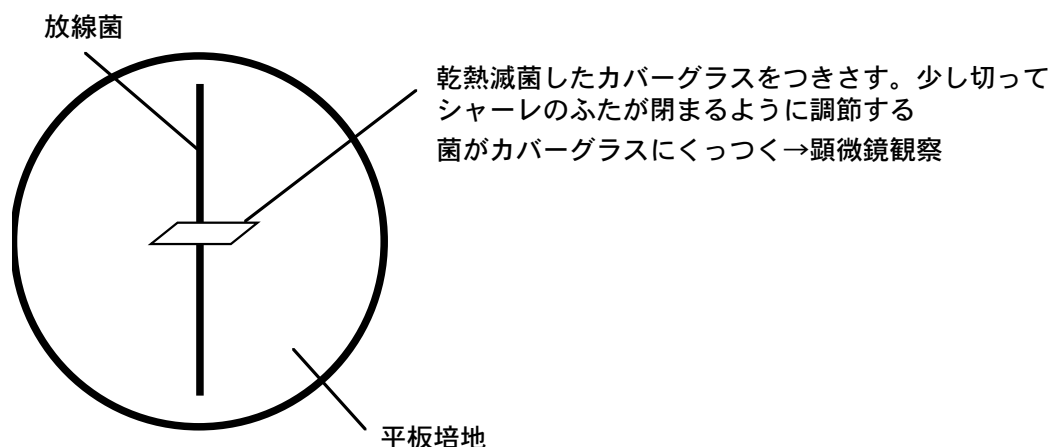


図14 放線菌の簡易スライド培養法

【放線菌の観察のポイント】

1. 集落の色（集落の裏側から見た基生菌糸の色）
2. 可溶性色素の色
3. におい
4. 菌糸の直径
5. 孢子



図15 放線菌 *Streptomyces* 属

1.5. 細菌のグラム染色

グラム染色は Gram が 1884 年に見出した染色法で、細菌を二種類に大別する方法として重要である。その原理は、塩基性色素が細菌の細胞表層で保持される能力の差を見ることにより細菌を区別するものであり、細菌の細胞表層構造の違いに起因するものである。すなわち、アルコールで脱水した（細菌細胞表層にある）ペプチドグリカン層に色素・ヨウ素複合体が捕捉されるか否かによる。

【試薬】（当番調製）

1. Gentian violet 溶液： Gentian violet 0.5 g、蒸留水 100 ml
2. Gram のヨード液： ヨード 0.5 g、ヨードカリ 1 g、蒸留水 150 ml
3. Carbol fuchsin 溶液： 塩基性 fuchsin 5 mg、エタノール 0.5 ml、フェノール 250 mg、蒸留水 80 ml

【操作】

1. 18～24 時間培養した細菌を白金耳採り、これをスライドガラスに塗り付けてしばらく風乾した後、スライドガラスの下から弱い火炎であぶり、菌をガラスに固定する。
2. Gentian violet 溶液を固定した菌の上に一滴落とし、1～2 分間染色する。
3. 水洗せずにヨード液に1 分間浸す。
4. ヨード液をよく切り、濾紙でよく吸い取った後、95% エタノールで色素が流れ出なくなるまで洗う。エタノールを何度も変えて洗い、洗浄には時間をかけないようにして1 回洗う操作につき5～15 秒の操作で行う。
5. 水洗して、濾紙で水分を吸い取る。
6. 次に対比染色する。Carbolic fuchsin 溶液で10 秒間染色する。
7. 水洗して乾燥し、検鏡する。

【解説】

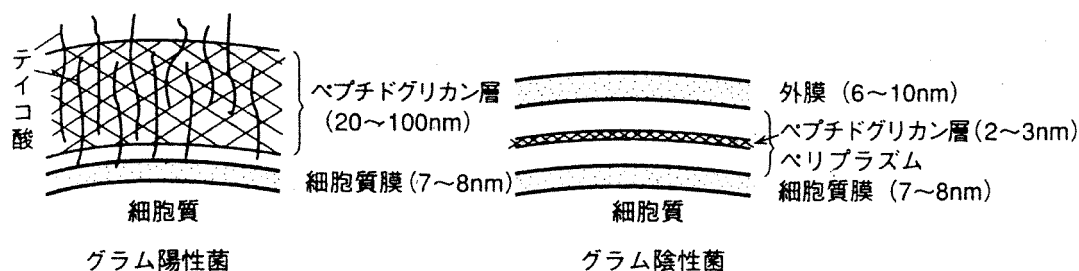


図16 グラム陽性細菌とグラム陰性細菌の細胞表層構造の違い

グラム陽性菌は細胞表層にあるペプチドグリカン層が厚く、外側に厚い夾膜を有しており、テイコ酸と呼ばれる陰イオン性のポリマーを10～50%ぐらい含む場合が多い（図16）。テイコ酸はペプチドグリカンと結合したり、細胞質膜の脂質とも結合する場合がある。グラム陽性に染まるものは球菌（*Staphylococcus* 属など）、有孢子細菌（*Bacillus* 属、*Clostridium* 属）、コリネ型細菌（*Corynebacterium* 属、*Arthrobacter* 属など）、酵母・かびの菌糸、植物組織、放線菌（*Streptomyces* 属）、乳酸菌（*Lactobacillus* 属など）がある。

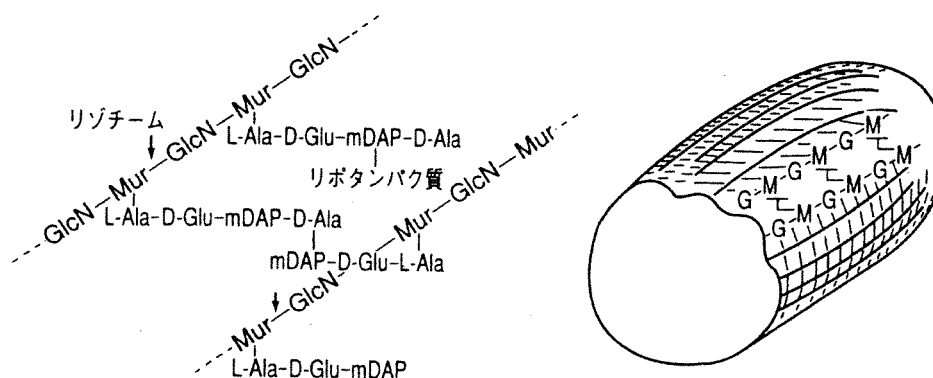


図17 ペプチドグリカンの化学構造（大腸菌）

略号：GlcN または G: *N*-アセチルグルコサミン, Mur または M: *N*-アセチルムラミン酸, L-Ala: *L*-アラニン, D-Glu: *D*-グルタミン酸, mDAP: メソジアミノピメリン酸, 矢印はリゾチームによる分解の作用点を示す。

グラム陰性菌はペプチドグリカン層が極めて薄く、外側に外膜が存在している（図16）。グラム陰性菌には外膜と細胞質膜の間にペリプラズムと呼ばれる“すきま”があり、そこには加水分解酵素および糖、アミノ酸などの栄養物質を細胞内へ取り込む場合に必要なたんぱく質が局在している。ペプチドグリカンは、強固な編み目構造を持つ巨大分子である（図17）。*N*-アセチルグルコサミンと *N*-アセチルムラミン酸（*N*-アセチルグルコサミンに乳酸の結合した化合物）が結合したものが繰り返し長くつながった分子を縦糸とすれば、横糸を *L*-アラニン、*D*-グルタミン酸などからなるペプチドで橋渡ししたものがペプチドグリカンである。これらの糖やアミノ酸はすべて共有結合で結ばれ、袋状の分子を形成している。グラム陰性に染まるものは極鞭毛を持つ細菌（*Pseudomonas*

属、*Gluconobacter* 属など)、腸内細菌群 (*Escherichia* 属、*Enterobacter* 属など)、動物組織、血球などがある。

グラム染色が培養条件によって陽性になったり陰性になったりする菌もあり、これをグラム不定と言う。染色性は培養条件によっても異なることがあり、*Bacillus* 属細菌でも培養時間が短い場合は陰性になることがある。しかし、陰性が陽性になることは無い。

1.6. 菌数の計測

酵母やカビの胞子のように細胞が比較的大きく、液体中で分散するようなものは血球計算盤 (ヘマトメーター hematometer) でその数を計算することができる。血球計算盤は肉厚のやや大きいスライドガラスで、その中央部に2本の溝が彫ってある。溝と溝との間の平面はスライドガラスの平面より下がっていて、カバーガラスでおおうと、平面とカバーガラスとの空間の厚さが 0.1 mm になるようになっている。また、平面の中央部に縦横 0.05 mm の間隔で正方形が描かれている。従って、一分画は $0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm} = 0.0025 \text{ mm}^2$ の面となり、その容積は空間の 0.1 mm をかけあわせた 0.00025 mm^3 となる。細胞の懸濁液を一分画あたり細胞数が5個程度となるように希釈し、ピペットを用いてスライドガラスの2本の溝の間の平面とカバーガラスの間に流し込む。しばらく静置して、細胞の動きが止まったら検鏡する。分画を5区画以上数え、その平均を取り、これを5~10回程繰り返す。希釈倍率をかけて1 ml あたりの細胞数を算出する。

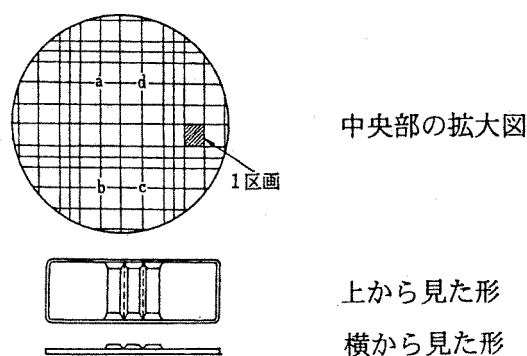


図18 ヘマトメーター

参考文献

- (1) 京都大学農学部食品工学工学教室編：食品工学実験書 下巻、養賢堂、1970
- (2) 微生物研究法懇談会：微生物学実験法、講談社サイエンティフィック、1975
- (3) 日本生化学会編：新生化学実験講座 第17巻 微生物実験法、東京化学同人、1992
- (4) 木村 光編：食品微生物学、培風館、1988
- (5) 京都大学農学部農芸化学学科編：農芸化学実験書 第2巻、産業図書、1957

2 微生物の探索と単離

2.1. メタノール資化性菌の分離（集積培養）とその生育

微生物の中には、C-C 結合を持たない化合物（炭素数が1の化合物）を炭素源として利用するものがあり、これらを総称して C_1 化合物資化性菌（メチロトロフ、methylotroph）と呼んでいる。この場合の代謝開始物質としての C_1 化合物とは、methane、methanol、methyl amine 類などである。地球上では、 CO_2 とメタンの間での酸化還元代謝による循環がメチロトロフを介して行われており、その規模は CO_2 量にして 15~20 億 t / year にも及ぶと言われている。メチロトロフには、 C_1 化合物のみしか炭素源に利用できない偏性メチロトロフ（細菌）と、 C_1 化合物以外の炭素源も利用できる通性メチロトロフ（細菌、酵母）に分類することができる。今回の実験では、methanol を炭素源とする微生物を対象とする。

メタノール資化性菌の代謝はまず、methanol の酸化によって始まる。methanol は細菌では methanol dehydrogenase、酵母では alcohol oxidase により formaldehyde に酸化され、formaldehyde から CO_2 への酸化によりエネルギーの生産、formaldehyde の固定反応により細胞構成物質の生合成がそれぞれ開始する。すなわち、formaldehyde の完全酸化によって NADH が生成し、電子伝達系に渡されることで、ATP が生産される。また、formaldehyde は pentose phosphate や glycine によって固定され、それぞれは glyceraldehyde-3-phosphate へと導かれ、一般の生体と同様の生合成を行う^{6,7)}。

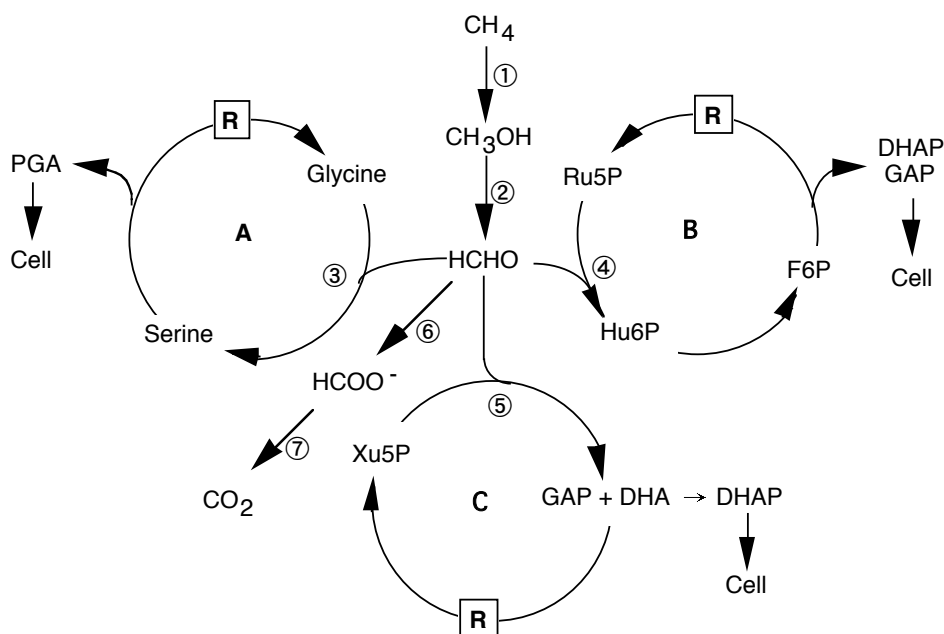


図19 メチロトロフの代謝

A: セリン経路（細菌）

B: リブローズモノリン酸経路（細菌）

C: キシルローズモノリン酸経路（酵母）

【酵素】① methane monooxygenase

② methanol dehydrogenase（細菌）
alcohol oxidase（酵母）

③ serine hydroxymethyl transferase

【略語】DHA: dihydroxyacetone

DHAP: dihydroxyacetone phosphate

F6P: fructose 6-phosphate

GAP: glyceraldehyde 3-phosphate

R: formaldehyde 受容体の再生経路

④ hexulosephosphate synthase

⑤ dihydroxyacetone synthase

⑥ formaldehyde dehydrogenase

⑦ formate dehydrogenase

PGA: 3-phosphoglycerate

Ru5P: ribulose 5-phosphate

Xu5P: xylulose 5-phosphate

Hu6P: hexulose 6-phosphate

2.1.1. メタノール資化性菌の自然界からの分離と集積培養

メタノール資化性菌の分離を土壌から集積培養により分離する。特定の基質を栄養源として利用する微生物をスクリーニングするには、集積培養という方法がとられる⁸⁾。今回の実験のように、methanol を炭素源として生体の維持を行う微生物を探し出す際に、培地の炭素源に methanol のみを使用することで、目的に適った微生物のみをスクリーニングする方法である。幾度か methanol のみを炭素源として含む培地での培養を繰り返して、すなわち methanol 利用性の選択圧をかけることで、純度の高いメタノール資化性菌を集め、methanol の濃度による増殖の度合を測定する。

2.1.1 (1) メタノール資化性菌の分離

【実験方法】

1. 任意の材料約 0.5 g (土壌サンプルなど×2種類)
2. 各々別々の液体培地 (培地*4 ml、含 1% (v/v) methanol) に添加する。
3. 28℃で2～4日間振とう培養する。
4. この1次培養液 0.1 ml を新しい液体培地 (4 ml、含 methanol) に植菌する (これ迄、振とう培養してきた1次培養液は、2次培養へ植菌した後は処分してよい。)
5. 28℃で2日間振とう培養する。
6. この2次培養液を1白金耳だけ平板培地 (15 ml、含 methanol) に画線する。
7. 28℃で2～5日間静置培養する。
8. 比較的大きく成長したコロニー1個を白金耳で斜面培地 (5 ml、含 methanol) に移植する。
9. 28℃で2日間静置培養する。
10. 肉眼的・顕微鏡的観察を **6.1. 微生物の形態学実験** に記載の方法と同様に行う。
11. このうちの生育の良好な菌を、2.1.1 (2)の生育度実験に用いる。

*メタノール資化性菌用培地

methanol (植菌時に添加)	1% (v/v)
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.3% (w/v)
KCl	0.1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.01
Yeast extract	0.05
(Agar	2)
Tap water (水道水)	
pH 7 (BTB 試験紙によって調整)	

2.1.1 (2) 生育に対するメタノール濃度の影響の調査

【実験方法】

1. 生育の良好な1菌株について以下の実験を行う。
2. 斜面培地から3白金耳の菌体を5 ml の滅菌生理食塩水 (0.85% NaCl) に懸濁する。
3. この懸濁液 0.1 ml ずつを液体培地 (4 ml : 含 methanol) 合計3種類*に加える。
4. 28℃で振とう培養する。
5. 培養開始後2 (～3) 日後及び4 (～5) 日後に各培養液から1.5 ml ずつサンプリングして、pH を測定する (pH 試験紙または pH メーター使用)。次いで、pH 測定後の培養液 (1.5 ml) に1.5 ml の 0.1 N HCl を加え生育を停止させ、生育度 (OD₆₁₀) を測定して、図20のようなグラフを作成する (参照溶液は未植菌の液体培地を用いる。OD₆₁₀ 測定まで希釈サンプルは冷蔵庫に入れておいてもよい)。

*3種類の培地の methanol 濃度は、0, 1.5, 5% (それぞれの methanol 添加量は 0, 0.06, 0.20 ml) のものを準備する。

《注意：methanol は口で吸わないように!! ピペットマンあるいは安全ピペッターで扱うこと》

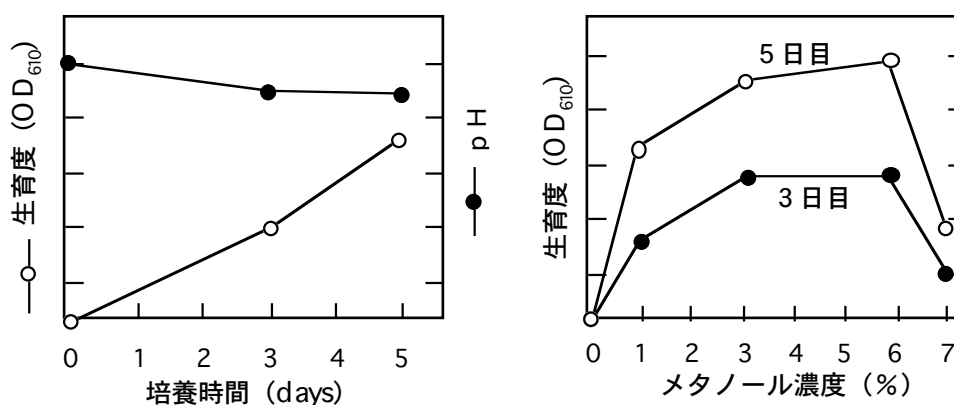


図20 メタノール資化性微生物の生育

2.2. 放線菌による抗生物質生産とバイオアッセイによる抗生物質の定量

抗生物質 (antibiotics) とは、「微生物が生産する物質で、他の細胞の生存・活動を阻害するもの」と定義されているが、その範囲は非常に広大で、抗腫瘍性物質といったものも含まれる。最初に発見されたものは、今回のバイオアッセイの実験でも用いるペニシリン (penicillin) である。この抗生物質は、細菌が増殖する際にその細胞壁の合成を阻害するものである。発見当初は万能薬としてもはやされたが、グラム陰性菌には効果が低いとされている。現在では非常に多くの抗生物質が発見され、また、天然の抗生物質を出発基質として新たな性質を有するものを合成してより役に立つものが造られ、医薬・農業・食品等で用いられている⁹⁾。

ここでは、1. 微生物の形態学実験で自然界より分離してきた放線菌が抗生物質を生産するか否かを、バイオアッセイという分析法で確認する。

2.2.1. バイオアッセイ 1：ペーパーディスクとアッセイプレートを用いた方法

抗菌性を調べるための試験に供する細菌を含んだ寒天培地をガラスプレートに蒔き、放線菌の培養ろ液を染み込ませたペーパーディスクを載せて培養する。通常、細菌は一面に生育し寒天平板培地表面は不透明になるが、その細菌に対して抗菌性を持つ抗生物質が生産されているならば、そのディスクの周辺では細菌の生育が抑制され寒天平板は透明なままとなる（これを生育阻止環という）。こうして、抗生物質の有無を確かめる。また、既知の各種抗生物質 (penicillin 系、cephalosporin 系各2種類。いずれも細胞壁合成阻害の抗生物質¹⁰⁾) の溶液を同様に処理して、その抗菌性について確認してみる¹¹⁾。

2.2.1 (1) 分離放線菌の再培養

1. 各自が分離した放線菌2株について、それぞれ斜面培地より1白金耳とり、予め準備した液体培地 (1.1.1. 培地の調製の放線菌用培地、オートクレーブ済、4 ml/16.5×165 mm、シリコセン) に植菌する。
2. 28℃で4～7日間振とう培養する。
3. 円形ろ紙およびロートを用いて、培養液を濾過する。
4. 得られた培養ろ液を 2.2.1 (3) バイオアッセイに供する。

2.2.1 (2) 被検細菌の培養・アッセイプレートの作成

4人1組で2枚のガラスプレートを使用する。1. 微生物の形態学実験で培養したグラム陽性菌及び陰性菌各1株を被検菌として使用する。

【実験方法】

1. 各被検菌の斜面培地より1白金耳とり、予め準備した液体培地 (1.1.1. 培地の調製の細菌用培地、オートクレーブ済、4 ml/16.5×165 mm、シリコセン) に植菌する。
2. 28℃で1日振とう培養する。

- 得られた被検菌培養液から、乾熱滅菌したピペットで 0.2 ml をとり、1.8 ml の滅菌生理食塩水 (0.85% NaCl、オートクレーブ済、1.8 ml/16.5×105 mm、アルミホイル) 中に加えて、約 10 倍に希釈する。
- 予め用意した寒天培地 (1.1.1. 培地の調製の細菌用培地、300 ml/500 ml 容三角フラスコ、アルミホイル) を 5 分間オートクレーブして、寒天を溶かした後、50℃ ぐらいまで冷却する (このとき、アルコールで拭いた温度計をアルミホイルに穴をあけて培地に差し込み、温度を監視する)。
- 50℃ 付近まで冷却した寒天培地に 3. の希釈培養液 1 ml を無菌的に加えて、手早く泡立たないよう静かに攪拌する。
- 攪拌後すぐに、バイオアッセイ用ガラスプレート (オートクレーブ済) に、平らに流し込み固化させる (このとき、ふたを少しだけずらして、蒸気を逃がす。固化するまで絶対に動かさないこと)。

2.2.1 (3) バイオアッセイ

【実験方法】

- 放線菌培養ろ液 2 種類 (4 人分 8 種類) および標準抗生物質溶液 20 種類* (4 種類×5 濃度)、合計 28 種類を準備する。
- アルミホイル上に並べたペーパーディスク 28 個に各サンプルをピペットマンで 0.05 ml ずつ染み込ませる。これを 2 セット (2 プレート分) 用意する。
- ピンセットを用いて、適当な間隔でアッセイプレートの上のにのせる (どの濃度の抗生物質が染み込んだペーパーディスクかを把握しておくこと)。
- 28℃ で 1 日静置培養する。
- ペーパーディスクの周りにできた生育阻止環の直径 (mm) を測定する。

* 以下の 4 種類の抗生物質 (penicillin [グラム陽性], ampicillin [グラム陽性、グラム陰性、広域ペニシリン], cephalosporin [グラム陽性、グラム陰性], cephalixin [グラム陽性、グラム陰性]) について行う (各 1 mg/ml の標準液 100 ml ずつを当番が準備)。各班にて希釈を行い、10, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ の計 5 種類を準備する。

【実験結果】

測定した結果を片対数グラフ用紙にプロットする (図 2 1)。

阻止環の直径：普通目盛 (横軸)

抗生物質濃度：対数目盛 (縦軸)

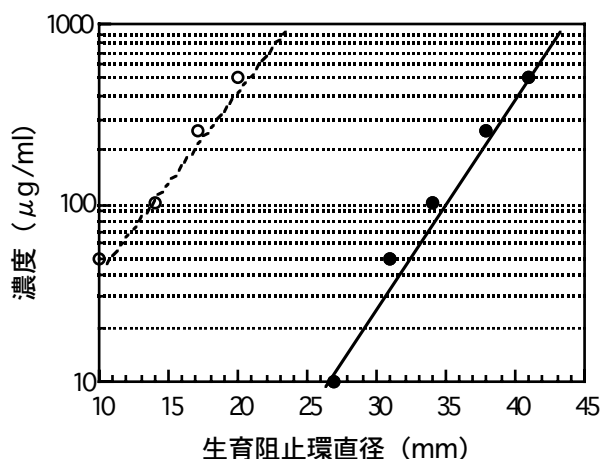


図 2 1 抗生物質による生育阻止

2.2.2. バイオアッセイ 2：交叉培養法

抗生物質の生産性を試験するもう一つの方法として、交叉培養法 (cross streak method) を試みる。本法では、生産される抗生物質がどのような細菌に効力を示すかを調べる事ができる^{12,13)}。

【実験方法】

1. 放線菌の簡易スライド培養法で使用した放線菌の平板培養を使用する*。
2. 被検菌 2 株（グラム陽性菌およびグラム陰性菌）を図 2 2 のごとく画線する（コンタミしている場合は、できるだけその箇所を避けて画線する。スペースが狭い場合は、画線可能な範囲だけでよい）。
3. 28℃で被検菌を生育させ、それぞれの被検菌の生育阻止帯の長さ（mm）を測定する。

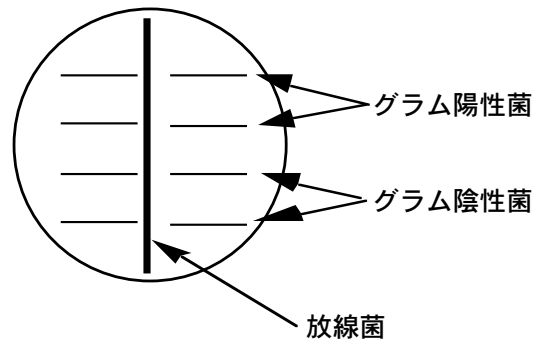


図 2 2 交叉培養法

*放線菌のスライド培養法を失敗した人は、もう一度培養を行う。

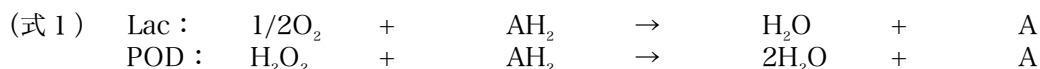
参考文献

- (6) 谷 吉樹：“応用微生物学” コロナ社、1992、pp. 84-85
- (7) 谷 吉樹、児玉 徹、倉根隆一郎：“バイオコンバージョン” 医学出版センター、1993、pp. 79-86
- (8) 緒方浩一：“応用微生物学概論” 同文書院、1972、pp. 32
- (9) 谷 吉樹：“応用微生物学” コロナ社、1992、pp. 147-155
- (10) 緒方浩一：“応用微生物学概論” 同文書院、1972、pp. 114
- (11) 緒方浩一：“応用微生物学概論” 同文書院、1972、pp. 108-109
- (12) 緒方浩一：“応用微生物学概論” 同文書院、1972、pp. 107-108, 178-179
- (13) 京都大学農学部農芸化学学科編：“農芸化学実験書” 第 2 巻、産業図書、1957、pp. 880-881

3 微生物の代謝・生理学

3.1. Laccase の生産と精製

Laccase (Lac) および Peroxidase (POD) は、それぞれ酸素もしくは過酸化水素を酸化剤として種々の水素供与体 (AH₂) の酸化反応 (式 1) を触媒する酵素であり、動物、植物、微生物界に広く分布し、それぞれ性質が異なっている。微生物においては糸状菌、担子菌において効率良く生産され、Lac は *Coriolus versicolor*、*Pleurotus ostreatus* により、POD は *Arthromyces ramosus*、*Coprinus cinereus* により培養液中に著量に分泌生産されることが知られている。



Lac、POD はともに木材の主要構成成分であるリグニンの合成・分解に関与しており、木材がキノコ類により腐敗分解するプロセスにおいて重要な働きを担っている。Lac としてはウルシ由来のものが有名であり、漆器の塗装剤である漆の合成に関与している。POD は生体にとって有害な過酸化物の分解除去に機能しているとも言われている。

Lac、POD はともに実用的にも価値ある酵素である。Lac はジーンズなどの染料であるインディゴを効率よく分解することから自然な着古し感を出す酵素漂白に用いられている。POD は、高感度色原体を水素供与体として用いることにより臨床分析に広く利用されている。また近年、溶液中に遊離した色素を脱色する作用を利用して、洗濯時の色移り防止を目的とした洗剤用酵素として期待されている。さらに Lac、POD は、工場廃液に含まれるフェノール、塩素化芳香族化合物、発癌性芳香族アミンなどの除去、種々の複合建材の生産におけるリグニンの重合、フェノール樹脂の合成、パルプ廃液の脱色など、様々な用途への応用が期待されている。微生物酵素は、菌体内酵素と菌体外酵素に大別できるが、本実験では、担子菌 *Coriolus versicolor* の菌体外 Lac を取り上げる。

3.1.1. *Coriolus versicolor* による Laccase の生産 (4 人 1 組)

C. versicolor を用い Laccase (Lac) の分泌生産を試み、培養にともなう Lac の生産量を Lac 活性を測定することによりモニターする。本 Lac は分子量約 63,000 の単体の糖タンパク質であり、酵素 1 分子あたり 4 原子の銅を有する。

【実験方法】

1. 前培養培地* (オートクレーブ済、5 ml/16×165 mm 試験管、シリコ栓) を調製する。
2. *C. versicolor* IFO 30388 を前培養培地に植菌する。
3. 28℃で4日間振とう培養する。
4. 本培養培地* (オートクレーブ済、50 ml/500 ml 容坂口フラスコ、シリコ栓) に前培養液を移植する。
5. 28℃で3日間振とう培養する。また、培養期間中、オートクレーブ済の 5 ml メスピペットで培養 1,2 日目の培養液 3 ml を採取し、4℃にて保存する。
6. 培養液 (約 4 4 ml) を円形濾紙とブフナーロートを用いて吸引しながら濾過し、培養液上清を得る。
7. 培養液上清を 3 ml 取り培養 3 日目のサンプルとし、培養 1,2 日目のサンプルとともにタンパク質濃度と活性の測定を行い (3.1.3. Laccase の活性測定参照) Lac 生産の経時変化を解析する。残りは、Lac の精製に用いる。

* 1% glucose, 0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 0.1% KH₂PO₄, 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O, pH 6.0 (前培養・本培養培地いずれもシリコ栓で)

【実験結果】

培養 1,2,3 日目のサンプルについて 3.1.3.の方法に従い測定した活性値 (unit/ml) とタンパク質濃度 (mg/ml) を培養日数に対してプロットし、Lac の分泌生産の経時変化を解析する。

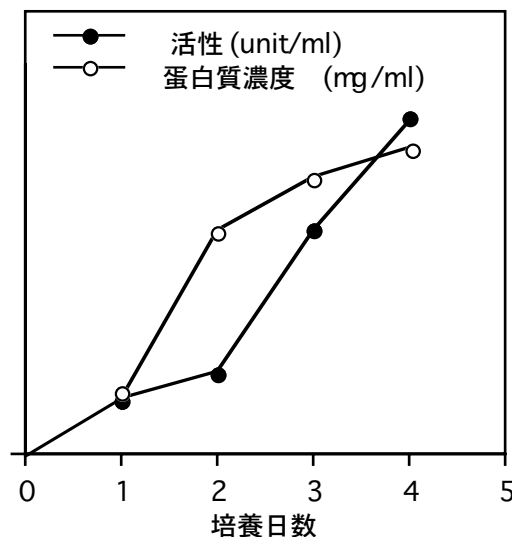


図2-3 Lac生産の経時変化(一例)

3.1.2. Laccaseの精製(2人1組)

精製に際しては、イオン交換クロマトグラフィーを行う。蛋白質はそれぞれ固有の等電点を持ち、等電点より高いpHでは負に、低いpHでは正に帯電している。帯電している蛋白質はイオン交換樹脂に吸着され、吸着の強度により溶出される条件が異なる。溶出は通常、塩濃度勾配下で行い、吸着分子は最も吸着の弱い分子から吸着の強さの順に溶出されることにより分離精製される。本実験は、2人1組で実験を行う。

3.1.2 (1) 透析

イオン交換樹脂への良好な吸着を得るために、サンプルをあらかじめ低イオン強度に調整しておく必要がある。このために、透析を行う。

【実験方法】

1. 培養液上清 20 ml を透析チューブに入れる
(空気を残して両端を糸でしっかり閉じる。
透析は、低分子塩類を除き、イオン強度を下げるために行う。高分子のタンパク質はチューブ内に残る)。
2. 1ℓの0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中に浸けて一晩4℃で安置し、透析処理液を得る。
3. 不溶性沈殿物が生じている場合は 10,000 rpm、20 分間遠心分離し、上清を粗酵素溶液として回収する。生じていない場合は、そのまま次の操作に供する。
4. 粗酵素溶液の体積を測定した後、3 ml サンプルングし 4℃にて保存する。残りは、次のイオン交換クロマトグラフィーにかける。

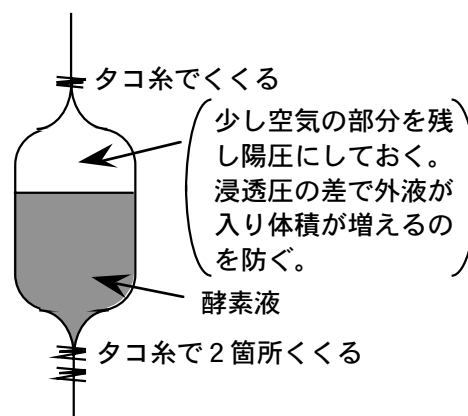


図2-4 透析の方法

3.1.2 (2) イオン交換クロマトグラフィーによる酵素の精製

吸着剤として DEAE (diethylaminoethyl)-Sephacel というアニオン交換樹脂を用いる。これは、中性領域では全体的に正にチャージしている。精製する Lac は負に荷電しているので、アニオン交換樹脂に吸着される。吸着された Lac は塩類を含んだ高イオン強度溶液により溶出される。

【実験方法】

1. クロマトグラフィー用カラム(φ1.5×20~30 cm)に水を少量入れ、予め水に浸した脱脂綿をカラムの底に詰める。(あまりきつく詰めないこと、脱脂綿を詰めた後にコックの流路がつまっていないか確認しておくこと。空気が脱脂綿内にあると溶出が遅くなる。)
2. DEAE-Sephacel を一様に懸濁したものを 15 ml 充填する。

- 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) でカラム中の樹脂を洗浄する (20 ml、カラム容量の約 3 ～ 4 倍量で洗浄する)。
- 緩衝液の液面が樹脂の上端ぎりぎりにまで達した時点でコックを閉じる (カラムを枯らさないようにすること)。
- 粗酵素溶液を (ガラスピペットなどで) 静かに流し込む。
- コックを開き、溶出を開始し、酵素タンパク質を樹脂に吸着させ、溶出液を三角フラスコに回収する (溶出速度のおおよその目安は、1 ～ 5 秒間に 1 滴落下するくらい)。
- 粗酵素液の液面が樹脂の上端ぎりぎりにまで達した所でコックを閉じる。次に 0.01 M リン酸緩衝液 (20 ml、カラム容量の約 3 ～ 4 倍量) で非吸着タンパク質を洗い出す。溶出液は上記 6 の溶出液とまとめて三角フラスコに回収し、非吸着画分とする。
- 0.3 M の NaCl を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 30 ml で、樹脂に吸着した Lac を溶出する。溶出される液をあらかじめ約 3 ml の所に印をした試験管で 3 ml ずつ 10 本分受け取る (試験管には必ずナンバーリングしておくこと)。
- 溶出液フラクション 10 本を 4℃ で保存する。

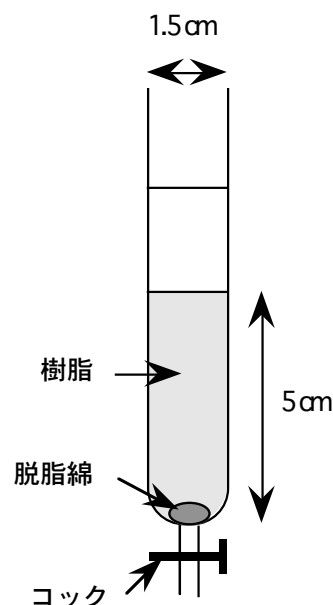


図 2 5 イオン交換クロマトグラフィーカラム

【実験結果】

溶出液フラクション 10 本について 3.1.3.の方法に基づいて測定した活性値 (unit/ml) とタンパク質濃度の尺度である 280 nm の吸光度をフラクション No.に対してプロットし、イオン交換クロマトグラフィーにおける Lac の溶出挙動を解析する。

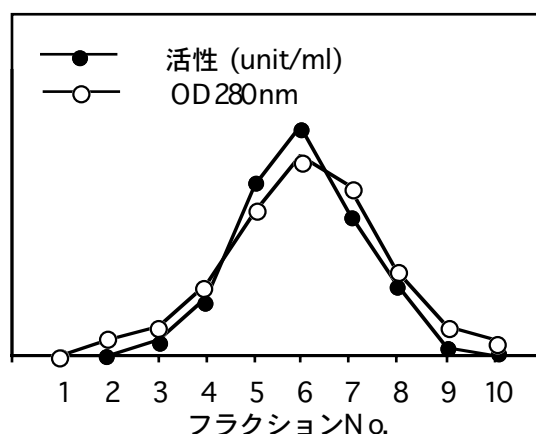


図 2 6 イオン交換クロマトグラフィーの結果 (一例)

粗酵素液、溶出液フラクションで最も活性が高かったフラクションについて 3.1.3.の方法に基づいて測定した活性値 (unit/ml)、タンパク質濃度 (mg/ml) とサンプルの体積から総タンパク質量、総活性、比活性などを算出し、下に示す精製表を作成し、精製の効率を評価する。

表4 酵素精製表の例

Step	体積 (ml)	総タンパク質 (mg)	総活性 (unit)	比活性 (unit/mg)	精製率 (fold)	収率 (%)
1. 粗酵素液	-	-	-	-	1	100
2. DEAE-Sephacel	-	-	-	-	-	-

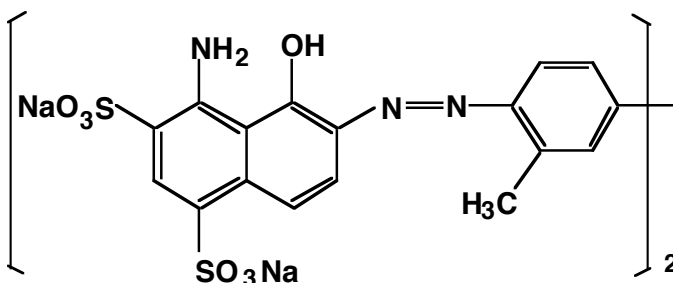
3.1.3. Laccase の活性測定

各段階のサンプルおよび精製した Lac について、酵素活性、タンパク質濃度を測定し、比活性、総活性を算出する。これらの数値を基に Lac 生産のタイムコース、精製の効率を評価する。

3.1.3(1) 活性測定

Lac はジーンズなどに用いられる染料色素を脱色する活性を有している。この性質を利用して、ジーンズのストーンウォッシュならぬ、エンザイムウォッシュ（酵素脱色）技術が実用化されている。今回の活性測定では、青色色素 Direct Blue 53 に対する脱色活性を評価する。

(Direct Blue 53 の構造)



【実験方法】

- 表5に示す酵素反応液に 1.2 ml の酵素液*を加え、反応を開始する。
- 室温で2～60 分間反応させ、目視で脱色が確認できた時点で吸光度測定を行う。この際、反応は停止させず、反応開始時点から吸光度測定までに要した時間を反応時間とする（60 分以上反応させても脱色が確認できない場合は、一晩放置し翌日吸光度の測定を行う）。
- 600 nm での吸光度を測定し酵素活性を算出する**。

表5 酵素反応液の組成

0.05 M マロン酸緩衝液 (pH 4.5)	1.5 ml
0.25 mM Direct Blue 53 水溶液	0.3 ml

- * 次の酵素液について処理する。
- ・ブランクとして酵素溶液の代わりに H₂O
 - ・培養 1,2,3 日目の培養液上清
 - ・粗酵素溶液、非吸着画分、溶出液フラクション 10 本

** 上記の反応条件で、1 分間に 600 nm の吸光度を 1 減少させる酵素活性を 1 unit とする。

酵素活性の計算方法

Activity (unit/ml) =
(OD ブランク - OD サンプル) × (1/反応時間(min)) × (1/酵素量(ml)) × 希釈率

3.1.3 (2) タンパク質濃度の測定 (a) 280 nm の吸収による測定

タンパク質は 280 nm 付近に紫外部の吸収極大を示す。これは主としてチロシンとトリプトファンによる吸収である。この性質を利用して、280 nm での紫外吸光を測定し、タンパク質濃度の尺度とする。

溶出液フラクション 10 本についてそれぞれ 300 μ l を 3 ml へと 10 倍希釈したものについて、280 nm での紫外吸光を測定する。

(b) 色素結合法による測定

繊維用の triphenylmethane 色素である Coomassie Brilliant Blue G-250 が酸性 pH 条件下で、タンパク質と結合すると、色調が赤紫色から青色に変化することを利用して、タンパク質濃度を測定する。

【実験方法】

1. 酵素液* 0.05 ml に Bio-Rad protein assay の 5 倍希釈を 2.5 ml 加える（泡立てると正確な値が出ないので、泡立でないこと）。
2. 5～60 分以内に 595 nm での吸光度を測定する**。

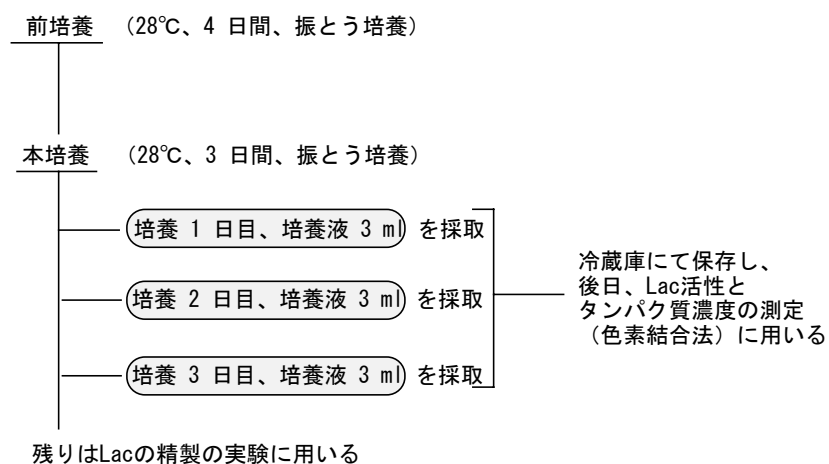
* 次の酵素液について処理する（希釈せず、そのまま処理する）

- ・培養 1, 2, 3 日目の培養液上清
- ・粗酵素溶液
- ・溶出液フラクションで最も活性が高かったフラクション

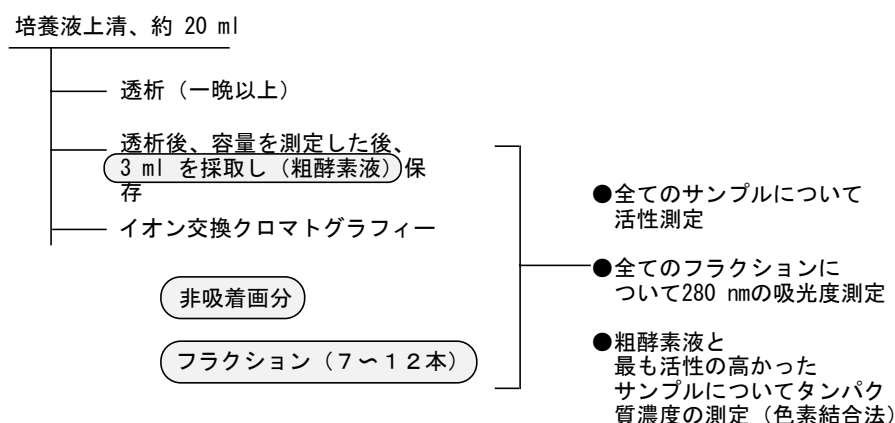
** 標準卵白アルブミン溶液を準備し、検量線を測定する。標準液の濃度は、0, 100, 200, 300, 400, 500 μ g/ml のものを作成する。

Laccaseの生産と精製実験のフローチャート

Lacの生産実験（4人1組）



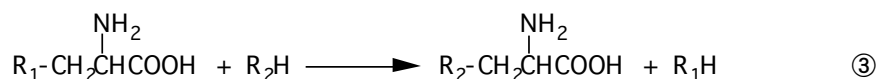
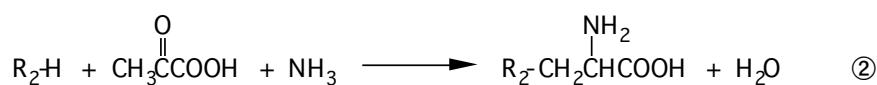
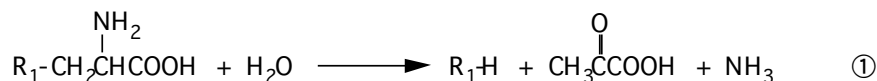
Lacの精製実験（2人1組）



4 微生物生産—酵素法

4.1. L-チロシンの酵素合成

β -チロシナーゼ (β -tyrosinase, tyrosine phenol-lyase) は、L-tyrosine を phenol, ammonia, pyruvate に分解する反応 (反応①) を触媒する酵素であるが、この逆反応である L-tyrosine 合成 (反応②) 及び L-tyrosine の phenol を他の基質 (例えば pyrocatechol) に置換 (反応③) する機能を持っている。このように分解反応、合成反応、置換反応と多彩な反応を触媒し、ビタミン B₆ を補酵素とすることから、多機能 B₆ 酵素と呼ばれる。また、これらの分解・合成・置換のいずれの場合も、L-tyrosine の側鎖にあたる部分がある程度異なっている、反応を触媒する能力を持っている。すなわち、基質特異性がかなり低い酵素である。従って、②、③の反応で R₂H に pyro-catechol を用いるとパーキンソン病の治療薬として用いられる L-DOPA も効率よく合成することができる。



今回の実験では、最初に β -tyrosinase の生産菌である *Citrobacter intermedius* を L-tyrosine を含む培地で培養することで β -tyrosinase の誘導生成を行い、この酵素を含む菌体を直接触媒的に用いて phenol、pyruvate 及び ammonia から L-tyrosine の合成を行う。また、 β -tyrosinase の誘導生成の際に、この酵素をコードする遺伝子の発現が、基質である L-tyrosine によって誘導されることを確認する。すなわち、L-tyrosine が存在しない状態で菌を培養した時と比較することにより、酵素の誘導生成とその機構を理解する。

4.1.1. 菌体の培養

4人1組で2つの培養 (誘導培養と非誘導培養) を行う。

【実験方法】

1. 前培養培地* (オートクレーブ済、L-tyrosine 非含有、5 ml/16.5×165 mm 試験管、シリコ栓) 2本に、*Citrobacter intermedius* (別途配布) 1白金耳を植菌する。
2. 28℃で1日振とう培養を行う。
3. 本培養培地* (オートクレーブ済、L-tyrosine 含有・非含有・各1本、60 ml/500 ml 容坂口フラスコ、シリコ栓) に前培養液をそれぞれ移植する。
4. 28℃で15～18 時間振とう培養 (可能な限りこの培養時間が望ましい) を行う。
5. 培養液を各々2等分し、10,000 rpm、15 分間遠心分離した後、上清を捨てる。
6. 沈澱 (菌体) に2.5 ml の生理食塩水を加えて懸濁する (すぐに以下のチロシン合成実験を行えない時は、この食塩水を入れただけの状態で氷中に保存しておき、チロシン合成実験を行う直前に懸濁する方がよい。但し、何時間も放置したままはよくない)。
7. 誘導・非誘導菌体懸濁液が各々2本ずつ得られるので、以下2人1組で誘導・非誘導各1本ずつを用いて4.1.2 L-チロシンの酵素合成に供する。

* 培地の組成

L-Tyrosine	0.2 % (w/v) … 前培養培地には添加しない。本培養培地のうち
Meat extract	0.5 酵素誘導させる場合のみ加える。
Peptone	0.5
NaCl	0.2
Yeast extract	0.05
Tap water	pH 7.0 (BTBなどを指示薬として0.1 N KOHで調整)
オートクレーブした後、L-Tyrosine が析出するが、そのまま使用してよい。	

4.1.2. L-チロシンの酵素合成

【実験方法】

1. 反応基質溶液*15 ml (100 ml 容三角フラスコ、ゴム栓) 2本に、4.1.1. で調製した菌体懸濁液 (全量 2.5 ml、誘導・非誘導 2 種) をそれぞれ加える。
2. 30℃水浴中で反応開始させる。
3. 反応開始直後 (0 時間) および 0.5 時間後に、両反応液から (反応液を振とうし均一に混ぜてから) 1 ml ずつ採取する (但し、採取する際は、未反応の phenol が有毒なので絶対に口で吸わず、安全ピペッターで吸うこと。析出したチロシン結晶のため採取しにくい場合は、ブルーチップ (1 ml 用チップ) の先端をハサミで少し切りとり、そのチップを付けたピペットマンで採取するとよい)。採取した反応溶液 1 ml に 0.1 N HCl 1 ml を添加し、反応を停止させる。
4. 反応 1 時間後、3.と同様に 1 ml ずつ採取し、0.1 N HCl 1 ml を添加して反応停止する。採取後、phenol 0.2 g を各反応液に追加する。
5. 反応 2 時間後、3.と同様に 1 ml ずつ採取し、0.1 N HCl 1 ml を添加して反応停止する。採取後、phenol 0.2 g および potassium pyruvate 0.63 g を各反応液に追加する。
6. 反応 3 時間後、phenol 0.2 g を各反応液に追加する。
7. 反応 4 時間後、3.と同様に 1 ml ずつ採取し、0.1 N HCl 1 ml を添加して反応停止する。
8. 反応停止した生成物溶液は、4.1.3. の定量操作を行うまで、実験台上に室温放置する。

* Potassium pyruvate 0.63 g, phenol 0.2 g, ammonium acetate 1 g を 15 ml の H₂O に溶解し、1 N KOH で pH 8.0 に調整する (実験当日調製。phenol は皮膚などにつけないこと。つけた時は直ちによく洗う。phenol を天秤や実験台の周りに撒き散らさないように !!)。

4.1.3. L-チロシンの定量

L-tyrosine が nitroso-2-naphtol・硝酸と反応すると、赤色物質 (不安定) が生成する。これを加熱することによって、安定な黄赤色物質に変えて定量する。この際、phenol が定量に大きな影響を及ぼすので、サンプル中に残存する phenol を isoamyl acetate で抽出除去してから定量を行う。

【実験方法】

1. Tyrosine 標準溶液* (50 μ g/ml) を各自 0.1 N HCl で希釈して 6 種の希釈標準液 (0, 10, 20, 30, 40, 50 μ g/ml 各 10 ml) を調製する。また、各反応時間 (0, 0.5, 1, 2, 4 時間) に対する反応生成物溶液 (誘導) の 50, 25, 10 倍希釈 (反応停止用 HCl が等量添加されているので、実質、100, 50, 20 倍希釈) と、反応生成物溶液 (非誘導) の 10 倍希釈 (実質 20 倍希釈) を、0.1N HCl を用いて調製する。標準液および反応液、計 26 種について以下の定量操作を行う。
2. 各測定サンプル 5 ml (16.5×165 mm 試験管) に isoamyl acetate 5 ml を安全ピペッターで添加し、ゴム栓をして十分に攪拌する。この操作により、未反応の phenol を有機溶媒で抽出除去することができる。
3. 上層を安全ピペッターで除去した後、下層 (水相) に対して 2.の操作をもう一度行う。
4. 上層を取り除いた下層 (水層) から、2 ml を 16.5 mm×100 mm 短試験管に採取する。
5. 0.1% nitroso-2-naphtol 溶液* 1 ml および 0.5 mg/ml sodium nitrite 溶液* 1 ml を加え、攪拌する。
6. 試験管にアルミキャップをかぶせて、55℃で 30 分間加熱する。
7. 未反応の nitroso-2-naphtol を除去するために、1,2-dichloroethane 3 ml を安全ピペッターで加え、ゴム栓をして激しく攪拌する。
8. ゴム栓をはずして、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した後、上層を採取する (試験管を遠心ローターにセットする際、試験管が割れないようにローターの底にキムワイプを少しだけ詰める。但し、キムワイプを多く詰めすぎないこと。下層はクロル含有有機廃液溜めへ捨てる)。
9. 採取した上層について、450 nm での吸光度を測定する。

* 50 μ g/ml L-tyrosine 標準溶液 (0.1 N HCl に溶解)、0.1% nitroso-2-naphtol (95% ethanol に溶解)、0.5 mg/ml sodium nitrite (5 倍希釈の nitric acid に溶解)・各 1000 ml を当番が調製する。

参考文献

- (14) 日本農芸化学会誌, 52 巻 (8 号), R111 - R118 (1978)
- (15) Advances in Applied Microbiology, 19 巻, 249 - 288 (1975)

5 微生物生産一発酵法

5.1. 清酒醸造

酒類はその製造法によって三種類に大別される。すなわち、醸造酒、蒸留酒、それに混成酒である。醸造酒は発酵した液をそのまま濾過した酒で、清酒やビール、ワインなどがこれに属する。蒸留酒は発酵した液を蒸留して得られた酒で、ウイスキーや焼酎、泡盛などがこれに属する。混成酒は醸造酒に蒸留酒を添加したり、あるいは蒸留酒に着色料や香料、甘味料などを混合した酒で、みりんやリキュールなどがこれに属する。また、醸造酒はその発酵の形式により並行複発酵、単行発酵（単行複発酵）、単発酵の三種類に分けられる。並行複発酵はモロミ中でデンプンを糖化しながら発酵を行うもので、清酒がその代表である。単行発酵はビールがその代表に挙げられ、最初に麦芽を糖化した後、その糖化液を発酵するのである。単発酵は糖化を必要とせずに発酵だけを行うもので、ワインなどがその代表として挙げられる。

清酒は米のデンプンを米麴で糖化しながら、同時に酵母でアルコール発酵を行う並行複発酵で醸造されるものである。

5.1.1. 清酒の醸造法

5.1.1. (1) 製麴

デンプン質原料に麴菌の孢子を接種して培養し、糖化酵素を生産する。麴を糖化剤として用いる（本実験では、市販の麴を用いる）。

1. 原料白米
2. 洗米・浸漬
3. 水切り
4. 蒸（む）しきょう 30～60 分
5. 放冷 30～35 °C
6. 種麴（もやし）を散布・混合 *Aspergillus oryzae* を孢子が着生するまで繁殖させる
7. 切り返し 蒸し米の堆積を広げて混合する、製麴中に発生する熱と二酸化炭素を外に出す
8. 出麴

5.1.1. (2) もと作り（酒母）

使用酵母菌株 *Saccharomyces sake*（清酒酵母、協会 7 号または協会 9 号）

酵母の培地

Glucose	1.0 % (w/v)
Peptone	0.5
Yeast extract	0.3
Malt extract	0.3
Tap water（水道水）	
pH 5 - 6	（MR 試験紙で調整）

1. 種培養用培地 5 ml／試験管および本培養用培地 100 ml／坂口フラスコを各 2 本ずつ調製し、オートクレーブ滅菌する。
2. 種培養用培地 5 ml／試験管 2 本に酵母を 1 白金耳ずつ植菌し、28°C で一晩振とう培養する。
3. 各試験管の全量を本培養用培地 100 ml／坂口フラスコに移植し、28°C で一晩振とう培養する。
4. 培養液を遠沈管に移し、5000 rpm、約 15 分遠心分離し、集菌する。
5. 適当量の水に懸濁して菌を洗浄後、遠心分離する。
6. 水（約 5 ml）に懸濁して菌を 10^{10} cells/ml 前後の濃度に調整する（ヘマトメーターで計測、**1.6 菌数の計測参照**）。
7. 菌を 10^8 cells/ml 濃度になるように仕込みへ添加する。

5.1.1. (3) 蒸米の調製

1. 所定量の酒米（五百万石または山田錦）を洗米（フィルターを通した水道水で 4～5 回デカンテーションにて洗う、強く洗ってはいけない）し、浸漬（フィルターを通した水道水に入れて室温で一夜放置）する（当番）。
2. 水切り（ザルに麻布をかぶせて、その上に洗米をのせて水を切る）する。
3. 蒸しきょう（蒸し器で蒸して蒸気が抜け出してから 40 分位待つ）する。
4. 放冷（30°C ぐらいまで）し、仕込みに必要な量に分ける。

5.1.1. (4) モロミ仕込み

一度に大量の原料を酒母に添加すると、その酸度が極端に低下するので、3回4日間にわたって順次添加する。これを“三段仕込み”と言う。仕込みビンに次の様な割合で添加し、配合する。

仕込み配合（速醸）

	添	仲	留	計
掛米	109 g	173 g	300 g	582 g
麴米	56 g	45 g	68 g	169 g
汲み水	158 ml	263 ml	503 ml	924 ml
酵母（ 10^{10} cells/ml）	1.6 ml			
乳酸（原液を10倍希釈）	5.3 ml			

上記の米の添加量は白米相当の仕込量
従って実際の仕込み量は次の様になる。

蒸米の場合	掛米 ×1.3 (g)
麴米の場合	麴米 ×1.2 (g)

	添	仲	留
掛米	141.7 g	225 g	390 g
麴米	67 g	54 g	82 g

5.1.1. (5) 仕込み後の管理

1. 仕込みビンはアルミ箔でフタをする。
2. 仕込み後、4日間は“櫛入れ”を行う。すなわち、ガラス棒などを突っ込んでモロミ中のガスを抜いてやる。余り激しくかきまわさないようにすることが大切である。高泡後に仕込みビンのまわりに付着した泡をタオルできれいに拭き取る。これをこまめにやる。
3. 15℃で14～15日間で上槽する。その間、時々、ガラス棒を突っ込んでモロミ中のガスを抜いてやる。

5.1.1. (6) 上槽

モロミを“さらし（晒）”（臭いを抜くために予め酒で炊いておく）で絞って濾過した後、遠心分離（8,000回転、10分）して上澄み液を得る。

表6 仕込み計画表

		製 麹		
		酒米の洗米、浸漬		
		水切り、蒸きょう		
		種麹の散布		
		切り返し		
日		出 麹		
1		酏・種培養植菌		
2		添の掛米の 洗米、浸漬		
3	添	水切り、蒸きょう		
4	踊	仲の掛米の 洗米、浸漬		
5	仲	水切り、蒸きょう		
6	留	留の掛米の 洗米、浸漬		
7		水切り、蒸きょう		
		15℃ かい入れ（仕込み後4日間）		
		上槽、15℃の場合留から14～15日		

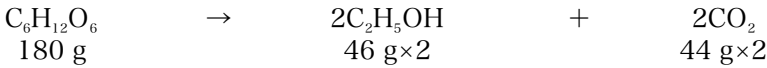
5.1.2. 発酵経過の分析

5.1.2 (1) 炭酸ガス減少量からのアルコール濃度の計算

清酒醸造中のモロミのアルコール濃度を、モロミより発生した炭酸ガス量より便宜的に計算する。先ず、仕込み後にモロミを含んだ仕込みビンの重量を“はかり”で測定する。その後、発酵経過に従って経時的に重量を測定することにより、減少した炭酸ガス量を計算し、次に示した式によってアルコール濃度を計算する。上槽する時まで計ってアルコール濃度の経時的な増加を調べる。

【計算の原理】

アルコール発酵の量的関係



従って、x (g) のCO₂がモロミから発生し、そのモロミの液量が y (ℓ) とすると、そのアルコール濃度 z (g/ℓ) は次の式で表わすことができる。

$$z\text{ (g/ℓ)} = \frac{(46/44) \times x\text{ (g)}}{y\text{ (ℓ)}}$$

エタノールの比重はd²⁰ = 0.789 (g/ml) であるから、体積濃度に換算するとアルコール濃度 a (v/v, %) は次のようになる。

$$a \text{ (v/v, \%)} = \frac{z \text{ (g/}\ell\text{)}}{0.789} \times \frac{1}{10}$$

これを整理すると

$$a \text{ (v/v, \%)} = \frac{0.1325 \times x \text{ (g)}}{y \text{ (}\ell\text{)}}$$

ただし、 x ：炭酸ガス減量 (g)

y ：モロミろ液量 (ℓ) = 蒸米重量 + 汲み水重量

a ：アルコール濃度 (v/v, %)

5.1.2 (2) 酵素法によるアルコール濃度の定量

上槽後の清酒については、5.3.2. 酵素法にアルコール濃度の精密測定法に従って、アルコール濃度を測定する。また、官能試験を行って評価を与える。

参考文献

(16) 山田 正一編：清酒工業、光琳書房

(17) 日本醸造協会：新醸造技術

(18) 野白 喜久雄他：醸造の事典、朝倉書店

5.2. ワイン醸造

ワイン醸造の発酵形式は単発酵式で、原料であるブドウに含まれる糖類がワイン酵母によりアルコールに変換される。ワインには、黒色ブドウの色素を溶出させた赤ワインと、赤色の果皮を除去したブドウまたは緑色ブドウを使った白ワインがある。

赤ワインの標準的醸造法は、黒色ブドウを破碎し果梗を除去した後、果皮・果肉・果汁・種子を一緒にタンクに入れ発酵させる。発酵とともにアルコールが生成し、果皮から色素、種子から渋味の主体を成すタンニンが抽出される。発酵終了後圧搾し、樽に入れて後発酵を行い、貯蔵熟成させる。一方、白ワインは果皮を除去した赤ブドウまたは緑色ブドウを破碎・除梗し、直ちに圧搾・搾汁する。得られた果汁を発酵させた後、樽に貯蔵し熟成させる¹⁹⁾。

5.2.1. 白ワインの醸造法

ワイン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* No.95) 及び甲州種ブドウを用いて、2人1組で白ワインの醸造を行う。発酵途中の様子を観察し、醸造した白ワインのアルコール濃度の測定や官能試験を行う。

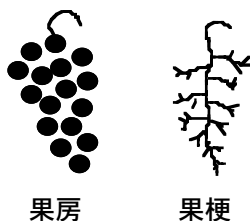
5.2.1 (1) 酒母づくり

【実験方法】

1. ブドウ果房を約 25 g 量り取り、果梗を取り除いた（除梗）後、果粒をよく水洗いする。
2. 果粒を乳鉢で潰砕し、果汁を搾る。果汁の糖度及び pH の測定を行う。
3. 得られた果汁のうち、5 ml を 16.5×165 mm 試験管に、20 ml を 100 ml 容 三角フラスコに移す。それぞれアルミホイルで蓋をした後、10 分間オートクレーブし滅菌する。
4. 5 ml の果汁培地にワイン酵母 1 白金耳を植菌し、28℃で約 3 日間静置培養する。
5. 培養液の全量を 20 ml の果汁培地に移植し、28℃で約 3 日間静置培養する。この培養液を酒母という。

【注意事項】

pH 測定は適当な試験紙を、糖度測定は検糖計²⁰⁾を使用して行う。



5.2.1 (2) 醸造

【実験方法】

1. ブドウ果房を約 400 g 量り取り、除梗した後、果粒をよく水洗いする。
2. さらし布中で潰砕し、果汁を搾る。果汁の体積を測定後、500 ml 容コニカルフラスコに移し、アルミホイルでふたをする。
3. メタ重亜硫酸カリウム ($K_2S_2O_5$) を果汁 100 ml あたり 15 mg (SO_2 として約 100 ppm) 添加し、攪拌・溶解後、糖度及び pH の測定を行う。
4. ショ糖を加えて糖度 24% に調整する (補糖)。
5. 5.2.1. (1) で調製した酒母を全量移植する。
6. 18°C で 5 ～ 10 日間静置培養を行う。発酵中の様子を毎日観察・記録し、糖度と pH も毎日測定する。
7. 糖度 (3 ～ 5 度) や酸味、官能試験などにより発酵を終了する。
8. メタ重亜硫酸カリウムを 100 ml あたり 15 mg 添加する (あるいは添加しなくてもよい)。
9. 8,000 rpm、20 分間遠心分離し、上清を得る。
10. 5.3.1. 酵素法によるアルコール濃度の簡略測定法に従い、アルコール濃度の測定を行う。
11. 4 ～ 10°C で 5 ～ 10 日間冷蔵保存する。
12. 5.3.2. 酵素法によるアルコール濃度の精密測定法に従い、アルコール濃度の正確な測定を行う。
13. 官能試験を行う。

参考文献

- (19) 緒方浩一 “応用微生物学概論” 同文書院、1972、pp. 154
(20) 京都大学農学部農芸化学科編 “農芸化学実験書” 第 2 巻、産業図書、1957、pp. 791

5.3. アルコール濃度の定量

5.3.1. 酵素法によるアルコール濃度の簡略測定法

alcohol dehydrogenase (ADH) と NAD^+ の存在下で、発酵液中の alcohol を aldehyde に酸化する。ここに、PMS (phenazine methosulfate) を加えると、これが酸化によって生成した $NADH$ により還元される。還元型 PMS を発色試薬 NTB (nitrotetrazorium blue) で酸化すると、液が青紫色に発色する。濃度既知の alcohol を幾種類か用いて同様の処理を施し、これらをスタンダードとして濃度未知の発酵液の液色と比較して濃度を予測する。

【測定原理】



【試薬】

以下の試薬を当番が調製する。

- | | |
|--|---------|
| (A) 1% (v/v) ethanol 水溶液 | 1,000ml |
| (B) 100 mM リン酸緩衝液 pH 7.5 (1% (w/v) Triton X-100 含有) | 1,000ml |
| (C) 0.4% (w/v) NAD^+ 水溶液 | 30ml |
| (D) 10 units/ml ADH 溶液 (in 100 mM リン酸緩衝液 pH7.5) | 30ml |
| (E) 0.01% (w/v) PMS + 0.1% (w/v) NTB 水溶液 (アルミホイルで遮光する) | 30ml |

【実験方法】

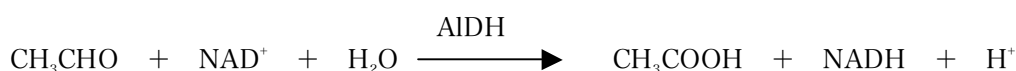
1. イノムアッセイ用マイクロプレート を 4 人に 1 枚用意する。
2. 試薬 (A) より調製した 0.1、0.05、0.02、0.01、0.005、0% (v/v) ethanol 標準液及び脱塩水で 100 倍と 1000 倍に希釈した発酵液 (ワイン・清酒) を 100 μ l ずつマイクロプレートの穴に入れる。
3. 標準液及び試料の入った各穴に、試薬 (B) 100 μ l、(C) 20 μ l、(D) 20 μ l を順に加え、軽く攪拌する。
4. 室温で約 5 分間放置する。
5. 試薬 (E) 20 μ l を加え、発色させる。
6. スタンダードの色の濃さと比較して、試料中のおおよその ethanol 濃度を推定する。

5.3.2. 酵素法によるアルコール濃度の精密測定法

清酒・ワイン中のアルコール濃度を、alcohol dehydrogenase (ADH) および aldehyde dehydrogenase (AIDH)を用いて酵素的に定量する。

【測定原理】

試料中に含まれる ethanol を ADH および AIDH による酸化反応により下式に示すように acetic acid に完全に変換する。このとき、ethanol の 2 倍量の NADH が生成するので、NADH の濃度を分光学的に測定して ethanol の濃度を計算する。NADH は 340 nm において吸収があるのに対して NAD⁺は吸収がないことから、この波長における吸光度を測定することで測定が可能となる。



【実験方法】

1. 試料を蒸留水で希釈し、エタノール濃度が 0.005～0.06 g/l の範囲になるように調整する（清酒・ワインの場合 10,000～30,000 倍が適当）。
2. 希釈試料 0.1 ml を吸光度測定用のセルに直接採取する。
3. F-キットエタノールの溶液 II（別途配布）を 3 ml 加え、混和する。
4. 室温にて約 3 分後、340 nm における吸光度 (E_1) を測定する。
5. 同じセルに F-キットエタノールの溶液 III（別途配布）を 0.05 ml を加え、混和する。
6. 反応終了後（約 5～10 分、吸光度の増加がなくなったとき）、340 nm における吸光度 (E_2) を測定する。
7. ブランクとして、2.～6.の操作を蒸留水 0.1 ml に対しても行い、 E_1 および E_2 を測定する。

【計算方法】

ethanol 濃度は、次式により求める。

$$\text{ethanol (g/l)} = \frac{V \times \text{MW}}{\epsilon \times d \times v \times 2 \times 10,000} \times \Delta E \times \text{希釈率}$$

$$\Delta E = (E_2 - E_1) \text{ 試料} - (E_2 - E_1) \text{ ブランク}$$

V (反応液量) : 3.15 ml

MW (分子量) : 46.07

d (光路長) : 1 cm

ϵ (吸光係数) : 6.3 ($1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

v (検体量) : 0.10 ml

従って、

$$\text{ethanol (g/l)} = \frac{3.15 \times 46.07}{6.3 \times 1 \times 0.1 \times 2 \times 10,000} \times \Delta E \times \text{希釈率} = 0.1152 \times \Delta E \times \text{希釈率}$$