

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)

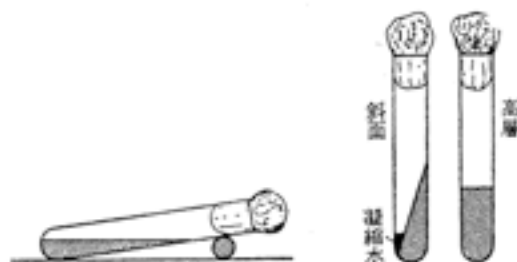
乳酸菌用培地

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。



（出所：京都大学農学部食品工教室編：食品工学実験書・下巻 p.9、第IV.8図，養賢堂，1970）

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。

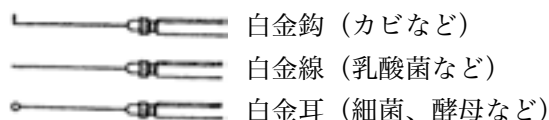


図2 種々の白金耳

（出所：微生物研究法懇談会編：微生物学実験 p.52、図2-1，講談社，1975）

【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中に入れて冷却し、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中に移す。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。

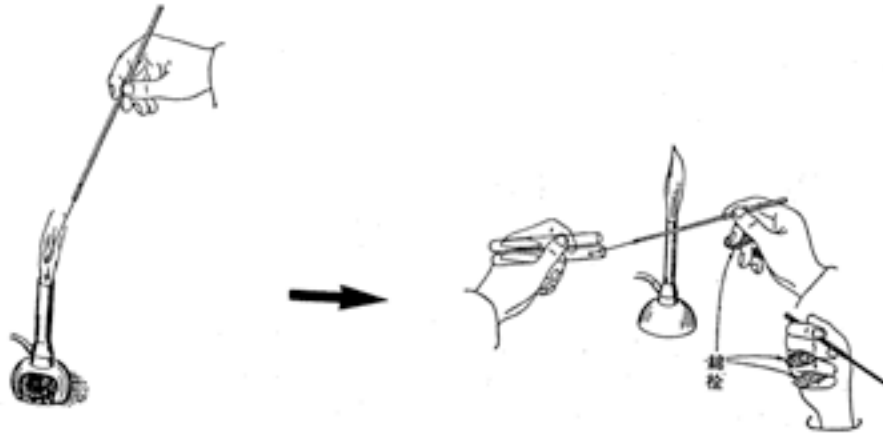


図3 植菌操作

(出所：京都大学農学部食品工教室編：食品工学実験書・下巻 p.14、第IV.10図,11図，養賢堂，1970)

【使用菌株】

細菌

- グラム陰性菌
- グラム陽性菌

Escherichia coli (AKU 0008)
Bacillus subtilis (AKU 0209)

酵母

- 子のう酵母
- 無孢子酵母

Saccharomyces cerevisiae (AKU 4111)
Candida maltosa (AKU 4624)

かび

- 接合菌類

Mucor javanicus (AKU 3010)
Rhizopus oryzae (AKU 3119)

- 子のう菌類

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）。

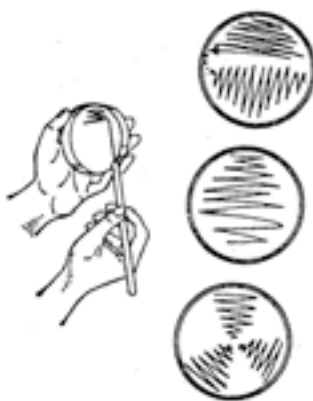


図4 平板培地への植菌操作

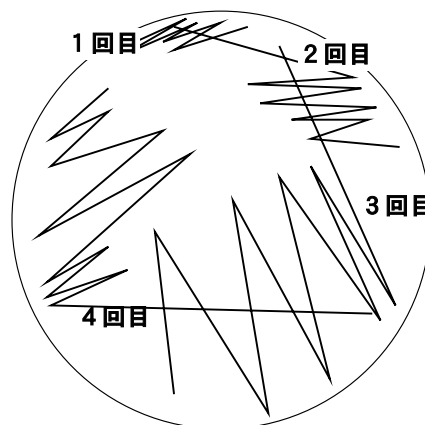


図5 微生物単離のための画線法（例）

(出所：微生物研究法懇談会編：

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。