



第10回 糸状菌胞子生産の応用 —種麴と微生物農薬—

今野 宏

株式会社秋田今野商店 〒019-2112 秋田県大仙市刈和野 248

The application of mass fungal spore production — Koji starter and biological control agent —

Hiroshi Konno

Akita Konno Co., Ltd., Kariwano 248, Daishen, Akita 019-2112, Japan

1. 醸造に用いられる麴菌

昨年「和食」がユネスコの無形文化遺産として登録されたが、「和食」の味わいをつくり出すには酒、味噌、醤油、味醂、鰹節のような素材が欠かせない。実はそれらは麴なくしてはありえず、麴は縁の下の力持ちとして日本の食文化を支えているといっても過言ではない。

麴菌は、1000年以上にわたる醸造の歴史の変遷を経て完成された我が国の食文化の原点に位置する微生物であり、桜が国花、雉が国鳥であるならば麴菌はまさに国を代表する微生物「国菌」と呼ぶにふさわしいものである（一鳥，2004）。

弊社は明治43年の創業以来、麴の種菌（種麴）を主軸に酵母菌、乳酸菌等、醸造に欠くことの出来ない微生物の種菌を全国の蔵元に供給している。このように多岐にわたる種菌を製造している会社は全国でも珍しく、弊社を含め数社しかない。

醸造界では胞子の色の相違から黄麴菌、黒麴菌、焼酎用白麴菌の3グループに分けられている（図1）。黄麴菌 *Aspergillus oryzae* は清酒、味噌の製造に使われており、種小名は最初の記載者がこの菌を清酒用米麴から分離したことから、イネの学名である「*Oryza sativa*」にちなんだものである。同じ種でも、用途によって麴菌の系統や麴の材料、培養法が微妙に異なっている。味噌醸造に適した菌株は、旨味の主体となる

アミノ酸やペプチドを蓄積させるために大豆タンパク分解力の強い菌が選択されているが、清酒醸造においては淡麗な酒質が好まれるため、逆にタンパク分解力が弱く糖化力の強い菌が選ばれている。同じく黄麴菌の醤油麴菌 *Aspergillus sojae* は醤油づくりに使われ、生育速度が早く、タンパク分解酵素群の働きが強い種小名も大豆（soya bean）に由来する。

黄麴菌の野生菌群には、強力な発がん物質であるアフラトキシンを生産するものが知られているが、日本の醸造に使用される黄麴菌からアフラトキシンを生産する菌株はまったく発見されておらず、明確に区別される（山田，2009）。

黒麴菌のアワモリコウジカビ *Aspergillus awamori* は沖縄の泡盛をつくるのに用いられ、黒麴菌の突然変異である焼酎白麴菌 *Aspergillus kawachii* (*A. luchuensis* mut. *kawachii*) は九州地方で本格焼酎製造に使われている。黒麴菌も焼酎用白麴菌も、酸味のもとであるクエン酸を黄麴菌に比べて数十倍も多くつくるうえ、耐酸性アミラーゼや生デンプン分解力も強く、酸っぱい麴で仕込んだ焼酎醪は、温暖地の醸造でも雑菌に汚染されず、香りも良くなるという利点がある。カビ付けをした鰹節の「枯節」には *Euretium herbarioume* が使われている。

2. 種麴の製法

種麴製造の基本工程（図2）は麴の製造法と類似した点が多いが、目的が酵素生産でなく胞子生産にある

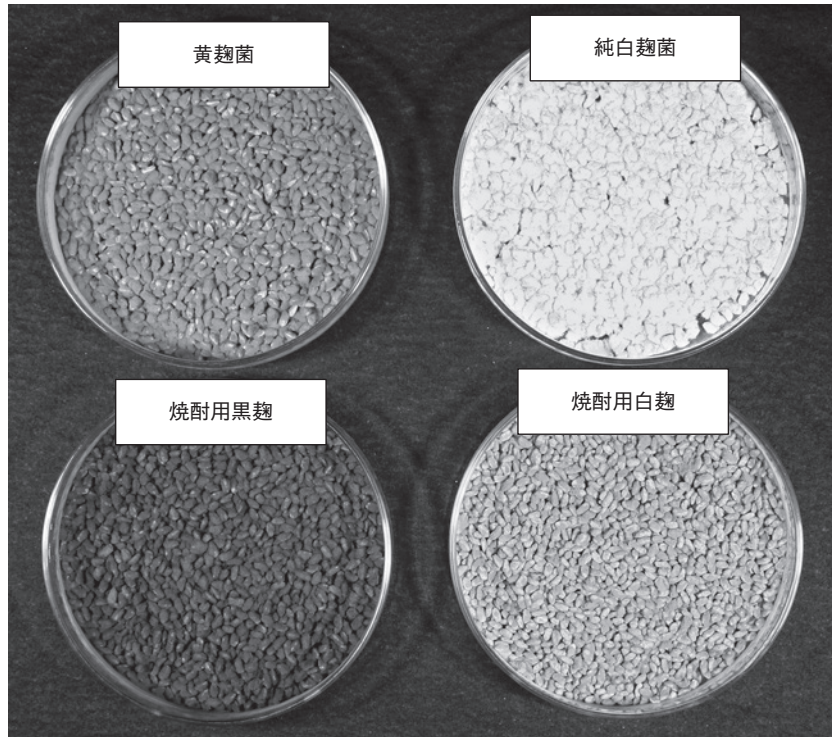


図1 麹菌の種類

醸造用麹菌には4種類あり、それぞれ胞子の色が異なる。胞子を無数に付けた種麹（写真）をふるって胞子を米や麦、大豆に付けて麹にする。麹菌は用途によって使い分けられる。

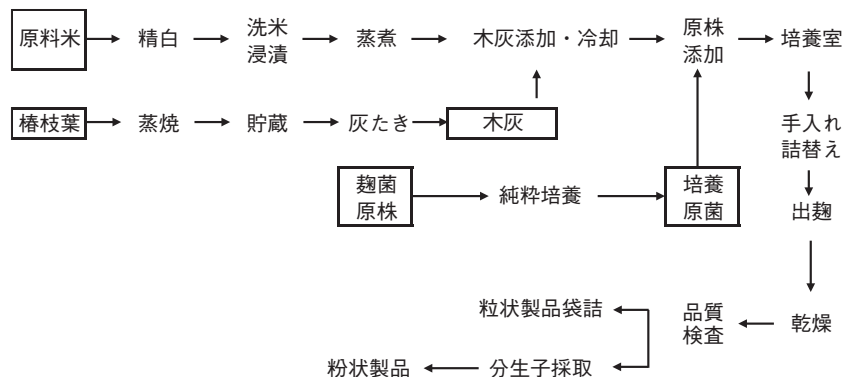


図2 種麹の製造工程

こと、原料の精白歩合が高いこと、蒸上り後に木灰を添加すること、培養期間が5～6日と長く、その間高湿度の環境下に置くこと、出麹を乾燥することなど麹と異なった工程上の特徴がある。また種麹は玄米に近い米（97%前後の精白）を使用するため麹菌の増殖が旺盛で製麹中の発熱量は清酒麹の3倍を超え、通風による温度制御方式の機械製麹が出来ないため、在来式の麹蓋による製麹を行っているのが普通である。

以下に一般的な麹菌の製造方法を述べる。種麹の製造では蒸米の放冷後に原料の1%相当の木灰を添加するのが大きな特徴である。近年では木灰の代わりにリン酸カリを中心にした人工灰を用いることも行われている。灰の効用については麹菌の「生育促進効果」や「防腐効果」「米粒相互の隔離」「胞子形成の促進」「胞子の耐久性の増加」「胞子色相を良くする」などが知られている。

灰は樺のものを最良とするが、広葉樹雑木灰も使われる。樺灰は雑木の5倍以上の水溶性成分があり、この水溶性成分の差が樺灰を良しとする理由と考えられている(奈良原, 1986)。

灰を塗した後、30℃位に冷却した蒸米に麴菌を接種する。接種用の原菌は予めフラスコ中で純粋培養されたものを用いる。接種量は原料の1/3000位で、麴の標準接種量(1/1000)より少ない。接種量が少ないのは原料が玄米で白米と比べて栄養豊富で麴菌の増殖が早いこと、接種量の少ない方が孢子着生が早く始まることによる。

原菌は種麴業者の命である。保存方法においても木灰は活躍している。木灰を加えてつくった種麴は、木灰を加えないでつくった孢子に比較して耐久性が増大され、種麴を悪い環境に保存した場合でも孢子の発芽率が低下しない。木灰の使用は、孢子の貯蔵性の本質にふれ、菌株保存問題にも大きく関与している(真鍋, 1987)。今から500年も前に、未だ微生物の存在すら知られていない昔に、世界中のどんな民族にも先駆けてこのような「長期保存法」を木灰で行っていた日本人の知恵には感服させられる。

実際弊社でも木灰を入れた乾燥孢子を密閉容器に封印し、80年以上保存しているが変異は見られない。その他に培地(麴エキス, PDA等)を時々変えての継代培養法を行うとともに凍結乾燥保存、冷凍保存法なども併用して保存している。

さて、接種の終わった蒸米だが、1日目はドラム式製麴機に入れて、28~30℃で高層培養を行う。2日目に品温が38℃位まで上昇し、麴菌の増殖が肉眼で認められる頃に麴蓋や金属製トレイに盛り分ける。盛る量は孢子を蒸米全体の表面に生成させるようにするには、少量を薄く広く広げることが望ましい。しかし、薄層ほど乾燥が早いので一般には1.8lのトレイに0.9lの麴の盛りが標準とされている。2日目から7日目までの培養期間は前半が麴菌の栄養体細胞の増殖に適した35℃に、後半が孢子形成に適した30℃に設定し、温湿度を調整した操作が行われる。湿度は98%位が最適である。製麴中には蒸米の水分の減少と還元糖の消費によって水分活性が低下し麴菌の増殖と孢子形成に適さなくなる。そこで、水分の散逸を防ぐため麴室の湿度を飽和温度近くまで高める加湿や麴蓋やトレイに湿った布を被せ、布の水分散逸により代謝熱の放出を行ったり、空の麴蓋に培養中の麴蓋を逆さに被せることによって培養環境を密閉状態にして、器壁より熱の放出で水分の散逸を防ぐ工夫などがされている。

孢子が十分に着生した種麴は水分が28%近くあり、その孢子には約36%の水分を含んでいる。孢子の生存率を長期間高く保つには乾燥して水分を孢子で15%以下に、粒状種麴(培養物をそのまま乾燥したもので)10%以下に保つ必要がある。乾燥は孢子の死滅を防ぐため40℃以下での除菌温風乾燥が一般的である。粉状の種麴にするためには、乾燥された粒状種麴をふるいに掛けて菌糸や玄米粒を除き孢子のみを回収する。ふるい分けの方法としては、80メッシュと150メッシュ位の2段階とうふるいにより先ず玄米粒を除き次に菌糸を除いて孢子のみを回収する。

乾燥後の種麴はロット毎に孢子数、発芽率、細菌数の検査を行う。分生子には一定量の滅菌済増量剤(α 澱粉)を混合して種麴として検査に合格したものが包装される。製品としては乾燥したままの粒状種麴(孢子数 8×10^8 /g程度)と篩別により分離した孢子に α 澱粉を混合し、孢子数 2×10^9 /g程度に調整した粉末種麴がある。

3. 生物防除剤とは

農業は高い農業生産性を維持するために不可欠であり、世界的な食糧不足を解消するためにも、今後その役割はますます増大すると考えられている。しかし一方で環境などに及ぼす悪影響への懸念も広がっている。さらに単一の農業を多用することによって農業に抵抗性の土壌病害菌が発生して、大きな問題となっている。いわゆる連鎖障害である。せっかく形成された産地も崩壊、移動を余儀なくされている。その解決策として、より安全な農業の開発と、その施用技術の改善の努力がなされ、大きな成果を上げた一方、農業を使わず、あるいは農業の施用量を減らして土壌病害菌を防除しようとする取り組みも行われてきている。

その一つが自然環境に存在するものを防除に使用するという試みである。自然に存在するものならば、ヒトが合成して作り出した難分解物質(農薬)と異なり、安全であると考えられるからである。その中で生まれたものが微生物農薬である。生物防除は自然の生態系の機能を利用するものといわれる。自然には多くの生物が互いに干渉しあっている。微生物には寄生、抗生、競合、抵抗性誘導などの機能があり、微生物相互、あるいはそれに動植物が加わった三者の関係の中で展開される。

とりわけ欧米では、化学合成農薬一辺倒に対する反省を踏まえ、微生物農薬を積極的に開発し利用する機運が強まり、様々なタイプの微生物農薬が実用化され

つつある。我が国においても、近年の環境保全指向の高まりの中で微生物農薬に対する期待は大きいものがあり、市場性も高まりつつある。現在その開発に取り組んでいこうとする企業は確実に増えてきている。

4. 種麹づくりの技術が生んだ微生物農薬

微生物農薬は「生きている」ということが従来の農薬と異なる点である。当然のことながら製剤化過程、貯蔵期間、施用作業などを通して「生きていること」が必須になる。実はこのような種々の環境下で生きながらえる手法として、微生物は自らの細胞を環境の激変に耐えられるように耐久細胞というものをつくる。カビの場合それが胞子である。微生物農薬のほとんどが胞子でつくられているのは、このような理由による。種麹づくりの手法は微生物農薬生産の手法としても注目をあびている。

実用化にあたっては培養・胞子化・回収などの製造プロセス開発技術を高めることが重要なポイントとなるが、実はこの工程、種麹の製造方法に酷似しているのである。もちろん原菌は *Aspergillus* ではないが、高い生物活性を持った胞子生産性の優れた保存性の高い糸状菌が選定される。製造方法は基本的に前述した種麹製造方法に準拠して胞子を回収していく。培地にあたる穀物は原菌によって使い分けられ、主に小麦ふすま、圧偏大麦、玄米が用いられる。微生物農薬の場合も、いかに生物活性の高い胞子を多量に穀物に形成させるかが採算性に大きく影響するため、種麹にはないそれぞれの菌株にあった胞子形成環境を整えていかなければならない。一般的に胞子形成を促進させる方法として栄養体細胞に何らかのストレスを与えてやることによって胞子が着生することがある。温度、湿度、酸素分圧、pH、浸透圧などの要因である。弊社で現在製造している微生物農薬原体は *Trichoderma atroviride*、*Talaromyces flavus*、*Metarhizium anisopliae* がある。それぞれに最適培養条件があり、それぞれに異なった胞子形成要因があるが基本的には種麹製造のノウハウが活かされている。糸状菌（固体培養）の場合は 10^9 /g 以上の有効胞子数が実用化のための一つの目安になると思われる。保存安定性が悪い微生物についてはさらに目標値のかさ上げが必要になるが、いずれにしても有効菌株のスクリーニングに際しては生産性・保存安定性を考慮に入れたものでなければ実用化は難しい。弊社では大手農薬会社からの委託を受けて、指定生物農薬登録製造場としてすでに多くのカビを使った微生物農薬原体の製造をスタートしている。

そして今後さらに、この部門の需要は増加していくものと思う。そのいくつかを紹介する（図3）。

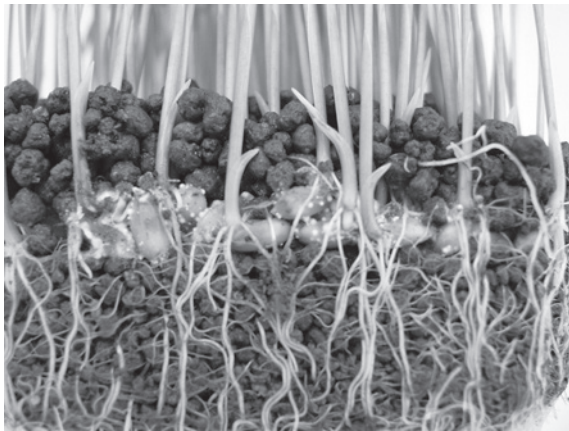
「エコホープ」（熊倉，2006）はクミアイ化学工業が静岡県内で分離した糸状菌 *Trichoderma atroviride* SKT-1 を有効成分とする水稲用種子消毒剤で、糸状菌、細菌の両方に起因する病害に既存の科学農薬と同等以上の防除効果を発揮する。環境負担が少ないのが特徴で、トータルコストも既存化学農薬と同等である。本菌が病原菌と競合して増殖することで病原菌の繁殖を抑制する。適用病害はいもち病、ばか苗病、もみ枯細菌病、苗立枯細菌病、ごま葉枯病で、200 倍に希釈して種子を 24～48 時間浸漬して処理する。薬剤耐性はなく、各種化学農薬の耐性菌に対しても高い防除効果を示す。土壌中では速やかに自然界に存在する菌量まで減衰し、水系では死滅するなど水棲生物や他の生物への影響はほとんどない。エコホープドライは、胞子製剤で、室温 6 ヶ月間の保存を可能にして取り扱いと輸送性を改善した製品であり、2004 年に登録を取得し、販売を進めている。適用、効果ともにエコホープ同等で、化学農薬と同等以上の生物効果を有する。

Talaromyces flavus SAY-Y-94-01 は栃木県農業試験場で発見された子囊菌である。不完全世代は *Penicillium vermiculatum* で、環境条件によって有性生殖と無性生殖を行う生活環を持つ。*Talaromyces flavus* 剤は固体培養法により製造された分生子 (1×10^8 cfu/g) を有効成分とする製剤で、出光興産により 2001 年にイチゴたんそ病、うどんこ病用の微生物殺菌剤として「バイオトラスト水和剤」の商品名で農薬登録された。さらに、水稲種子消毒剤として効果を示すことが分かり、2007 年には「タフブロック」（石川，2007）として農薬登録された。本剤は水稲の育苗場面において防除が不可欠な種子伝染病害（ばか苗病、いもち病、もみ枯細菌病、苗立枯細菌病、褐条病など）および土壌伝染性病害（苗立枯病など）を同時防除する。

2014 年にはアリスライフサイエンス社から昆虫病原性糸状菌 *Metarhizium anisopliae* の農薬登録が行われた。商品名「パイレーツ粒剤」（宮田ら，2012；紫尾ら，2013）の有効成分の *Metarhizium anisopliae* は、一般的な土壌に常在している昆虫の天敵糸状菌である。本剤は破碎米の表面にメタリジウム菌をコーティングした粒剤タイプの製剤で、作物の株元に散布する。アザミウマ類の幼虫は蛹になるために作物の茎葉部から土壌に落下する性質がある。製剤を散布すると、落下してくるアザミウマ類幼虫をメタリジウム菌



Trichoderma atroviride の「ばか苗病」に対する発病抑制効果 (クミアイ化学工業提供)



Talaromyces flavus のもみ殻表面への定着 (出光興産提供)



Metarhizium ansopliae が付着したアザミウマ成虫 (アリストライフサイエンス提供)

図3 各種微生物農薬の効果
岩瀬亮三郎氏撮影 (現埼玉農総研)。

が土壌表面で待ち伏せして感染し、短期間で死亡させる。

5. 孢子製造業の未来

本来カビにとっては、固体基質上で生育する方がより自然な培養法である。そしてこの固体上での培養条件で、カビの機能を最大限に発揮させているのが「麹づくり」のような固体培養ではないだろうか？

最近、この日本特有の製麹手法 (固体培養) で培養された麹菌以外の様々な環境から分離された麹菌の仲間のカビ達が、抗ウイルス物質 (Kanai *et al.*, 2000) や新規抗菌物質 (Ishiyama *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2000) を沢山つくってくれる事実を目のあたりにしている。

米粒に麹菌をそだてることにより、このような環境下での培養でなければつくりえない生産物が沢山ある。この麹づくりの手法をもってすれば多くのユニークな生理活性物質を探し出せるに違いない。

今後、醸造から生まれた製麹技術は世界的に醸造以外の分野で大いにもてはやされることになることは間違いない。まさに「温故知新」である。

文 献

- 一島英治 2004. 日本の国菌コウジキン. 日本醸造協会誌 **99**: 83.
- 石川成寿 2007. タラロマイセス フラバスを用いた新戦略. 生物農薬の新戦略とバイオコントロール研究の最前線, p. 28-35, 日本植物病理学会バイオコントロール研究会, 東京.
- Ishiyama, D., Satou, T., Senda, H., Fujimaki, T., Honda, R. & Kanazawa, S. 2000. Heptaibin, a novel antifungal peptaibol antibiotic from *Emericellopsis* sp. BAUA8289. J. Antibiot. **53**: 728-732.
- Kanai, Y., Ishiyama, D., Senda, H., Iwatani, W., Takahashi, H., Konno, H., Tokumasu, S. & Kanazawa, S. 2000. Novel human topoisomerase I inhibitors, topopyrones A, B, C and D. I. Producing strain, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activity. J. Antibiot. **53**: 863-872.
- 熊倉和夫 2006. *Trichoderma* 菌によるイネ種子伝染性病害の生物除去. 温古知新 **43**: 48-54.
- 真鍋 勝 1987. 種麹と木灰とアフラトキシン. 温古知新 **24**: 33-43.
- 宮田将秀, 宮本武彰, 山中 聡 2012. ナスのミカン

- キイロアザミウマに対する昆虫病原糸状菌 *Metarhizium anisopliae* 製材を利用した防除. 北日本病害虫研究会報 **63** : 181-183.
- 奈良原英樹 1986. II. 種麴(もやし). 村上英也(編), 麴学, p. 32-47, 日本醸造協会, 東京.
- Sato, T., Ishiyama, D., Honda, R., Senda, H., Konno, H., Tokumasu, S. & Kanazawa, S. 2000. Glomosporin, a novel antifungal cyclic depsipeptide from *Glomospora* sp. I. Production, isolation, physico-chemical properties and biological activities. J. Antibiot. **53**: 597-602.
- 紫尾 学, 山中 聡, 田中 寛 2013. メタリジウム粒剤処理による施設キュウリのミナミキイロアザミウマ, タバココナジラミおよびトマトハモグリバエの防除. 関西病害虫研究会報 **55** : 13-16.
- 山田 修 2009. 黄麴菌 *Aspergillus oryzae* がアフラトキシンを作らないのには理由(わけ)がある. 温古知新 **46** : 29-34.