

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和2年度～令和4年度 総合分担研究報告書

試験法及び分析法の開発

－真菌基原の添加物の分析法の開発及び真菌数試験法の比較検討－

研究分担者 渡辺麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 室長

研究要旨 既存添加物の品質向上に資する試験法及び分析法の開発を行う目的で、食品添加物のうち微生物を基原とする酵素について、MALDI-ToF MSによる予測アミノ酸配列を指標とした基原同定法としてペプチドマスフィンガープリンティング法（PMF法）の有用性を検討した。さらに、食品添加物公定書（公定書）の微生物限度試験における真菌数試験で規定されたジクロラン・グリセリン（DG-18）寒天培地による混釈培養法に対して、その他の試験条件と比較しての集落の生育性評価を行った。PMF法の基原同定については、添加物酵素を電気泳動後得られたバンドをトリプシンで消化し、ペプチドをMALDI-ToF MSを用いて解析して、その質量データを用いてデータベース検索によるタンパク質の同定を行った。その結果、供試した36製品中30製品について基原の情報が得られ、そのうち27製品において、製品に付帯する基原情報と解析から得られた結果が一致した。したがって、電気泳動法とMALDI-ToF MSを組み合わせた解析法は、酵素の基原の特定に有効であり、製品の安全性の確保に貢献できると考えられた。真菌数試験法の比較検討については、DG-18寒天の他2種類の寒天培地を用い、混釈培養法または塗抹培養法にて培養を行った。規定された2菌種を含む計5菌種を20または100 cfu/mLの濃度に調整して接種し、培養後、集落数を計測した。検討の結果、小さな集落が生育する性質の既定の*Candida albicans*を含む3菌種では、いずれの試験条件でも集落数計測は可能であった。一方で集落が早くかつ大きく生育する性質の既定の*Aspergillus brasiliensis*を含む2菌種では、100 cfu/mLの接種菌液では培養5日後でいずれの試験条件でも集落は密集し数の計測は困難であったが、20 cfu/mLの接種菌液を使用する、または培養期間を短くすることで、集落数計測が可能となった。したがって、場合によっては、代替法として寒天培地の種類の変更や、接種試験液の希釈、培養日数の短縮も検討する必要があることが示された。

研究協力者

吉成知也 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部 室長

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 部長

多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 室長

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 主任研究官

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 主任研究官

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 主任研究官

中西早苗 国立医薬品食品衛生研究所

衛生微生物部 短時間非常勤職員
船江元子 国立医薬品食品衛生研究所

衛生微生物部 短時間非常勤職員

A. 研究目的

既存添加物酵素は、細菌、放線菌、真菌などの微生物を基原とするものが多い。既存添加物酵素の基原は一つの微生物種に規定されておらず、異なる種に由来する製品であっても、酵素活性が同じであれば同一の品目とみなされる。微生物の中には二次代謝産物としてヒトへ危害性を有する物質を産生するものがあるこ

とから、基原菌種の同定は重要である。その一方で、既存添加物の流通製品を分析すると、基原菌種の同定が難しい品目は多いことが知られている。微生物由来基原の品目の同定法として、タンパク質アミノ配列を指標とした分子生物学的手法を応用した試験法を開発する必要がある。添加物酵素は、分子量の大きいタンパク質であることから、HPLC や質量分析器による解析に適していない。また、微生物の分泌物から製造されていることから、核酸情報を基にしたアプローチも難しい。この問題を解決できる手法として、MALDI-ToF MS による予測アミノ酸配列を指標とした基原同定法が有用であると考え、ペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 法に着目した。本手法はタンパク質の構造解析法の一つとして頻繁に用いられている¹⁾。PMF 法は、まずアクリルアミドゲルを用いた電気泳動法によってタンパク質を分離した後、バンドを切り出してトリプシンなどのタンパク質分解酵素による消化を行う。得られたペプチドを飛行時間型質量分析器 (ToF MS) により網羅的に分析する。複数のペプチドの質量情報からデータベース検索 (Mascot サーチ) により、元のタンパク質を同定する。PMF 法が酵素添加物の基原の特定に有用かどうかを検証する必要がある。

また、第9版食品添加物公定書 (以下、公定書) では、微生物限度試験法のもと、真菌 (酵母及びカビ) 数試験の方法が規定されている。

「培地の性能及び試験法の適合性試験」として、試験菌として酵母である *Candida albicans* NBRC 1594 およびカビである *Aspergillus brasiliensis* NBRC 9544 の計2菌種各1菌株を用いること、1 mL あたりの出現集落数が100以下となるように調整した試験菌液を使用すること、ジクロラン・グリセリン (DG-18) 寒天培地 15~20 mL と試験菌液 1 mL を使用しての混釈培養を行うこと、25±1°C で5日間以内で培養するとき十分な増殖及び接種菌液の回収があること、といった試験法の規定がされている。混釈培養法には、塗抹培養法と比較して大量の試験液を1枚の平板で試験できる、カビ集落が大きく発育しないため正確な計測がしやすい、

などといった実験上のメリットがある。一方で、試料中の菌が熱の影響を受ける可能性があること、完全な好气的条件での培養にはならないため特に好气的な真菌の発育性に影響することなどのデメリットもある。またこの影響の程度は、菌種によって様々であるとされる。これに対して、食品等の一般的な試験法として汎用される菌数測定法として、塗抹培養法²⁾がある。本培養法のメリットとしては、試料中の菌は熱の影響を受けないことがある。デメリットとしては、1枚の平板で試験できる試験液が混釈培養法より少ないため試験での実験量が多くなること、平板上でカビ集落が大きく発育しやすいため集落が密集し正確な計測が不可能となりやすいことがあるとされる。以上の試験法の特徴をふまえると、公定書で規定された試験法の DG-18 寒天培地による混釈培養法では、真菌種によっては生育効率が低い可能性がある。しかし現在のところ、これらの培養法による真菌集落の生育性や集落数の計測効率の違いについて、十分に評価されていない。

本研究では、既存添加物の品質向上に資する試験法及び分析法の開発を行う目的で、PMF 法の酵素に対する基原同定における有用性の検討、および公定書の微生物限度試験における真菌数試験法とその他の試験条件との比較評価を行った。

B. 研究方法

B-1) MALDI-ToF MS による予測アミノ酸配列を指標とした基原同定

B-1-1) 分析機器

質量分析には、MALDI-ToF MS (Spiral TOF-plus JMS-S3000; 日本電子株式会社) を使用した。

B-1-2) 試料

既存添加物試料は、日本食品添加物協会から分与されたアミラーゼ 10 種、ガラクトシダーゼ 3 種、セルラーゼ 5 種、ヘミセルラーゼ 5 種及びプロテアーゼ 13 種の計 36 製品を用いた。これらについて PMF 解析を行い、製造者から提供される付帯情報に記載の基原情報と解析から得られた結果が一致するかどうかを検討

した。その結果から、PMH法が酵素添加物の基原の特定に有用かどうかの検証を行った。

B-1-3) 質量分析用検体の調製

各試料は、検体のタンパク質含有量に応じて5~100 mg/mLの濃度となるよう精製水に溶解した。それぞれ等量の2×laemmli sample buffer (Bio-Rad社)と混合後、SDS-PAGEに供した。ゲルからバンドを切り出し、約1 mm立方に細かく切り刻み、1.5 mL容のマイクロチューブに入れた。チューブに脱色液(50%アセトニトリルを含む25 mM重炭酸アンモニウム水溶液)150 µLを加え、10分間振盪(1,000 rpm)後、溶液を除去した。同じ操作をもう1回繰り返した。アセトニトリル100 µLを加え、10分間インキュベートした。アセトニトリルを除去後、減圧容器を用いて乾燥させた。還元用バッファー(10 mM DTTを含む25 mM重炭酸アンモニウム水溶液)100 µLを加え、56°Cで45分振盪(1000 rpm)した。溶液を除去後、アルキル化用バッファー(55 mMヨードアセトアミドを含む25 mM重炭酸アンモニウム水溶液)100 µLを加え、暗所下で30分間振盪(1000 rpm)した。溶液を除去後、チューブに脱色液(50%アセトニトリルを含む25 mM重炭酸アンモニウム水溶液)150 µLを加え、10分間振盪(1000 rpm)後、溶液を除去した。同じ操作をもう1回繰り返した。アセトニトリル100 µLを加え、10分間インキュベートした。アセトニトリルを除去後、減圧容器を用いて乾燥させた。トリプシン(Trypsin Sequencing Grade, modified; Roche Diagnostics社)10 µg/mLを含む25 mM重炭酸アンモニウム水溶液)20 µLを加え、37°C一晩インキュベートした。0.1% TFAを100 µL加え、15分間インキュベート後に上清を回収した。同様の操作を合計3回行い、全ての上清をまとめて、窒素気流で20 µL程度まで濃縮した。0.1%トリフロオロ酢酸を含む50%アセトニトリル水溶液、続いて0.1%トリフロオロ酢酸水溶液で平衡化したZipTip 0.2 µL-C18(ミリポア社製)にトリプシン消化産物を吸着させ、0.1%トリフロオロ酢酸水溶液で洗浄後、0.1%トリフロオロ酢酸と10 mg/mLのマトリクス(4-クロロ- α -シ

アノケイ皮酸;シグマアルドリッチ社)を含む50%アセトニトリル水溶液でMALDI-ToF MSのサンプルプレート上に直接溶出した。完全に乾燥させた後、MALDI-ToF MS(SpiralToF-plus;日本電社)を用いてスパイラルモードでマスペクトルを測定した。キャリブレーションには、トリプシン由来の2種の自己消化ペプチド(m/z 805.4163及び2163.0564)を用いた。

B-1-4) ペプチド質量を指標としたタンパク質の同定

マスペクトルから得られたペプチド質量を指標としたタンパク質の同定は、Matrix Scienceのウェブ上のプログラム Mascot Search Peptide Mass Fingerprintを用いて行った。主要なペプチドの質量を入力し、検索条件は以下のように設定した; Database: SwissProt, Enzyme: Trypsin, Allow up to: 1, Fixed modification: Carbamidomethyl(C), Peptide tolerance: 15ppm, Mass values: MH⁺。これによって確からしい菌種とタンパク質が同定できなかった場合、UniProt(<https://www.uniprot.org/>)データベースの検索により該当する菌種のタンパク質のアミノ酸配列がSwissProtに登録されているかを調べた。

B-2) 真菌数試験法の比較検討

B-2-1) 供試菌

比較した供試菌としては、添加物公定法で規定された *Ca. albicans* NBRC 1594 および *A. brasiliensis* の2種に加えて、規定の試験菌種には含まれないが環境中に分布頻度や濃度が高いことがしばしばある *Cladosporium sphaerospermum* NIHS 0378, *Penicillium citrinum* NIHS 0222 および *Mucor hiemalis* NIHS 0886 の3種、計5種各1菌株を供試した。

B-2-2) 比較した培養条件

比較した培養条件としては、培養法については、規定法である混釈培養法およびその比較対象として塗抹培養法の2種類、寒天培地種類については、規定法であるDG-18寒天培地、およびその比較対象として食品等の一般的な試験法として汎用されるポテト・デキストロース寒

天 (PDA) 培地¹⁾と日本薬局方の一般試験法微生物限度試験法〈4.05〉で規定されるサブロー・ブドウ糖カンテン (サブロー寒天) 培地²⁾の3種類を検討に加えた。また、菌濃度が濃かった場合の集落数計測の難易度についても評価するため、接種する菌液の濃度として、1 mLあたり40または100 cfuの濃度で作製した。平板1枚あたりの接種菌液体積は、混釈培養法では1 mL、塗抹平板法では0.5 mLとした。B-1)の菌株およびこれらの培養法・寒天培地の種類・接種菌濃度をそれぞれ1種類ずつ組み合わせて1試験条件を設定して、培養3から6日目(培養2晩から5晩)で毎日集落数を計測し、測定集落数や実験効率を比較した。1試験条件では平板3枚で実験を行い、得られた測定集落数の平均値を算出した。以上の培養のセットを最大3回繰り返し、結果を比較評価した。

C. 結果及び考察

C-1) MALDI-ToF MSによる予測アミノ酸配列を指標とした基原同定

Figure 1-6に各試料のSDS-PAGE像、Table 1-5に各試料の由来、SDS-PAGE像から推定した分子量、およびMALDI-ToF MSによる同定結果(酵素名、生物種、質量、Coverage)を示した。

C-1-1) β -ガラクトシダーゼ (試料1~3)

試料1と2は、いずれも*Aspergillus oryzae*の培養物から製造された製品であるが、PMF解析の結果、*A. oryzae*に加えて*A. flavus*の β -ガラクトシダーゼも候補タンパク質としてヒットした。*A. oryzae*と*A. flavus*は非常に近縁であり、 β -ガラクトシダーゼのアミノ酸配列は完全に一致している。そのため、PMFでは判別出来なかったと考えられた。また、試料2のSDS-PAGE解析で認められたタンパク質のバンドは、 β -ガラクトシダーゼの理論分子量よりも小さく、分解が起きていると推定された。

試料3は、*Niallia circulans*の培養物から製造された製品であるが、同定出来なかった。UniProtデータベースの検索を行った結果、*N. circulans*の β -ガラクトシダーゼはSwissProtに登録されていなかったことから、同定出来なかつ

たと考えられた。

C-1-2) アミラーゼ (試料4~13)

*Aspergillus niger*由来の試料5、*Bacillus amyloliquefaciens*由来の試料7、*Bacillus licheniformis*由来の試料8及び*Rhizopus oryzae*由来の試料13については、付帯情報と同一の基原種由来の酵素が同定された。

試料4は、*Aspergillus foetidus*の培養物から製造された製品であるが、*A. usamii*と*A. oryzae*の α -アミラーゼが同定された。近年、*A. foetidus*と*A. usamii*は共に*A. niger*に再分類されたことから²⁾、付帯情報と一致した結果が得られたと考えられた。*A. oryzae*と*A. usamii*の α -アミラーゼは、アミノ酸配列の相同性が99%と非常に高いことからPMFでは判別出来なかったと考えられた。

試料6は、*A. oryzae*の培養物から製造された製品であるが、*A. oryzae*に加えて*A. usamii*の α -アミラーゼも候補タンパク質としてヒットした。試料4と同様、この2菌種の α -アミラーゼはアミノ酸配列の相同性が非常に高いことからPMFでは判別出来なかったと考えられた。

試料9は、*Bacillus subtilis*の培養物から製造された製品であるが、*B. amyloliquefaciens*の α -アミラーゼのみが候補タンパク質としてヒットした。SwissProtから*B. subtilis*の α -アミラーゼのアミノ酸配列を入手し、トリプシン消化して得られるペプチドの質量を算出した結果、試料9の52 kDaのバンド由来のペプチドのシグナルと全く一致しなかった。このことより、試料9の由来は*B. subtilis*ではなく、*B. amyloliquefaciens*と考えられた。近年、これまで*B. subtilis*と分類されていた菌の一部が、*B. amyloliquefaciens*に再分類された³⁾。この試料の製造に使われている*B. subtilis*は、*B. amyloliquefaciens*に再分類された菌であり、製造者の情報がアップデートされていない可能性が考えられた。

試料10は、*Glycine max* (大豆) から製造された製品であるが、50 kDa付近のバンドは*G. max*の β -アミラーゼと同定されたが、28 kDa付近の主要なバンドは*G. max*由来のレクチンと同定

された。レクチンは、製造過程で混入したものと考えられた。

試料 11 と 12 は、共に *A. niger* の培養物から製造された製品であるが、*A. niger* に加えて *A. awamori* のグルコアミラーゼも候補タンパク質としてヒットした。*A. niger* と *A. awamorii* は近縁種であり、このグルコアミラーゼのアミノ酸配列が完全に一致していることから PMF では判別出来なかったと考えられた。試料 11 の 118 kDa のバンドは、同定されたグルコアミラーゼの分子量よりも大きくずれていた。何らかの翻訳後修飾による影響を推察された。

C-1-3) セルラーゼ (試料 14~18)

試料 14 は、*A. niger* の培養物から製造された製品であるが、付帯情報と同一の基原種由来の酵素が同定された。

試料 15 は、*Pycnoporus coccineus* の培養物から製造された製品であるが、同定出来なかった。UniProt データベースの検索を行った結果、*P. coccineus* のセルラーゼは SwissProt に登録されていなかったことから、同定出来なかったと考えられた。

試料 16 は、*Trichoderma longibrachiatum* の培養物から製造された製品であるが、*Trichoderma viride* と *Trichoderma harzianum* のセルラーゼが候補タンパク質としてヒットした。UniProt データベースの検索を行った結果、*T. longibrachiatum* のセルラーゼは 1 種のみ SwissProt に登録されていたが、それはヒットした酵素と異なるものであった。SwissProt における *T. longibrachiatum* のセルラーゼの登録情報が十分でなかったことから、近縁種のセルラーゼが候補タンパク質としてヒットした可能性が考えられた。

試料 17 は、*Trichoderma reesei* の培養物から製造された製品であるが、*T. reesei* に加えて *Trichoderma koningii* のセルラーゼも候補タンパク質としてヒットした。*T. reesei* と *T. koningii* は近縁種であり、このセルラーゼのアミノ酸配列が完全に一致していることから PMF では判別出来なかったと考えられた。

試料 18 は、*T. viride* の培養物から製造された

製品であるが、55 kDa のバンドについては *T. viride* に加えて *T. koningii* と *T. reesei* のセルラーゼも候補タンパク質としてヒットした。これら 3 種の真菌は近縁種であり、このセルラーゼのアミノ酸配列の相同性が互いに 96% であることから PMF では判別出来なかったと考えられた。31 kDa 及び 19 kDa のバンドについては、*T. viride* 以外の真菌のキシラナーゼ (ヘミセルラーゼの 1 種) が候補化合物としてヒットした。UniProt データベースの検索を行った結果、*T. viride* のキシラナーゼは SwissProt に登録されていなかった。そのため、近縁種のキシラナーゼが候補タンパク質としてヒットした可能性が考えられた。

C-1-4) ヘミセルラーゼ (試料 19~23)

試料 19 は、*A. niger* の培養物から製造された製品であるが、付帯情報と同一の基原種由来の酵素が同定された。

試料 20 は、*A. niger* の培養物から製造された製品であるが、58 kDa のバンドは、*A. niger* とその近縁の 2 種の真菌のグルコアミラーゼが候補化合物としてヒットした。このグルコアミラーゼは製造過程で混入した不純物と考えられた。33 kDa 及び 20 kDa のバンドについては、*A. niger* に加えて、*A. kawachii* のキシラナーゼも候補化合物としてヒットした。*A. niger* と *A. awamorii* は近縁種であり、これらキシラナーゼのアミノ酸配列の相同性が非常に高いことから PMF では判別出来なかったと考えられた。

試料 21 は、*P. coccineus* の培養物から製造された製品であるが、同定出来なかった。UniProt データベースの検索を行った結果、*P. coccineus* のヘミセルラーゼは SwissProt に登録されていなかったことから、同定出来なかったと考えられた。

試料 22 と 23 は、*T. longibrachiatum* の培養物から製造された製品であるが、他の *Trichoderma* 属真菌のヘミセルラーゼが候補タンパク質としてヒットした。試料 16 と同様、SwissProt における *T. longibrachiatum* のヘミセルラーゼの登録情報が十分でなかったことから、近縁種のヘミセルラーゼが候補タンパク質としてヒットし

た可能性が考えられた。

C-1-5) 真菌由来のプロテアーゼ (試料 24~31)

A. niger 由来の試料 25, *Aspergillus phenicis* 由来の試料 27 及び *Penicillium citrinum* 由来の試料 29 については、付帯情報と同一の基原種由来の酵素が同定された。

試料 24 は, *Aspergillus melleus* の培養物から製造された製品であるが、同定出来なかった。UniProt データベースの検索を行った結果, *A. melleus* のプロテアーゼは SwissProt に登録されていなかったことから、同定出来なかったと考えられた。

試料 26 は, *A. oryzae* の培養物から製造された製品であるが、47 kDa のバンドは *A. oryzae* とその近縁種の *A. usamii* の α -アミラーゼが候補タンパク質としてヒットした。この α -アミラーゼは製造過程で混入した不純物と考えられた。34 kDa 及び 23 kDa のバンドについては、試料 1 及び 2 の結果と同様に、*A. oryzae* に加えて近縁種の *A. flavus* のプロテアーゼも候補タンパク質としてヒットした。

試料 28 は, *Aspergillus* sp. の培養物から製造された製品であるが、種名は付帯情報に記載されていなかった。25 kDa のバンドの解析結果において、*A. oryzae* と *A. flavus* のプロテアーゼが候補タンパク質としてヒットした。アフラトキシンを産生する可能性のある真菌の *A. flavus* を酵素の製造に用いることはないため、この製品の由来は *A. oryzae* と考えられた。

試料 30 は, *P. coccineus* の培養物から製造された製品であるが、同定出来なかった。UniProt データベースの検索を行った結果, *P. coccineus* のプロテアーゼは SwissProt に登録されていなかったことから、同定出来なかったと考えられた。

C-1-6) バクテリア由来のプロテアーゼ (試料 32~36)

試料 31 は, *R. niveus* の培養物から製造された製品であるが、67 kDa のバンドは *R. oryzae* のグルコアミラーゼと同定された。SwissProt に *R. niveus* のグルコアミラーゼが登録されていない

ため、近縁種の酵素がヒットしたと考えられた。34 kDa のバンドは, *R. niveus* のプロテアーゼと同定された。

試料 32 は, *Sphingomonas paucimobilis* の培養物から製造された製品であるが、同定出来なかった。UniProt データベースの検索を行った結果, *S. paucimobilis* のプロテアーゼは SwissProt に登録されていなかったことから、同定出来なかったと考えられた。

試料 33 は, *Geobacillus stearothermophilus* の培養物から製造された製品であるが, *G. stearothermophilus* に加えて *Bacillus thermoproteolyticus* のプロテアーゼも候補タンパク質としてヒットした。このプロテアーゼの 2 菌種間におけるアミノ酸配列の相同性は非常に高い (99.3%) ことから PMF では判別出来なかったと考えられた。

試料 34 は, *B. subtilis* の培養物から製造された製品であるが、53 kDa と 29 kDa のバンドはそれぞれ *B. amyloliquefaciens* の α -アミラーゼ及びプロテアーゼと同定された。試料 9 と同様の解析を行った結果、この製品の由来は *B. amyloliquefaciens* の可能性が高く、製造者の付帯情報がアップデートされていないと考えられた。

試料 35 は, *Bacillus* sp. の培養物から製造された製品であるが、種名は付帯情報に記載されていなかった。30 kDa のバンドの解析結果において、*Bacillus licheniformis* のプロテアーゼが候補タンパク質としてヒットしたことから、この製品の由来は *B. licheniformis* と考えられた。

試料 36 は, *B. amyloliquefaciens* の培養物から製造された製品であるが、58 kDa と 29 kDa のバンドはそれぞれ付帯情報と同一の *B. amyloliquefaciens* の α -アミラーゼ及びプロテアーゼと同定された。

計 36 種の酵素製品について、電気泳動と MALDI-ToF MS による測定を組み合わせた PMF 解析を行った結果, 30 製品について基原種の情報が得られた。それらのうち 25 製品については、製造者による付帯情報と一致した結果が得られた。ただ、その 25 製品のうち 14 製品については、付帯情報と一致する基原種に加え、

近縁種の酵素も候補タンパク質としてヒットした。PMF解析においては、トリプシン消化によって得られたペプチドをTOFMSで解析するため、イオン化効率が高い一部のペプチドの質量情報しか得られない。そのため、高い相同性を有するタンパク質を区別することが出来ない。そこで、解析するタンパク質に特異的なペプチドを検出することが重要となる。今回の解析においては、消化酵素としてトリプシンを用いたが、Arg-C, Asp-N, Lys-Cなど認識サイトが異なる消化酵素が他にも存在する。これらの酵素を用いた解析結果も用いることで、同定の精度を高められる可能性がある。

基原種の情報が得られた30製品のうち、5製品については製造者による付帯情報と同定されたタンパク質の基原種が異なっていた。この理由としては、製造に用いられた微生物のタンパク質情報がSwissProtに登録されていないため、近縁種のタンパク質がヒットしたこと、又は微生物の最新の分類法に合わせて製造者の情報がアップデートされていない可能性が考えられた。また、*A. melleus*, *B. circulans*, *P. coccineus* や *S. paucimobilis* 由来の製品については、基原種を同定出来なかった。現状ではこれらの生物種のタンパク質の情報がSwissProtに登録されていないが、今後データベースのアップデートにより、これら生物由来の酵素の同定も可能になることが期待される。

C-2) 真菌数試験法の比較検討

C-2-1) 添加物公定書での培養条件における各種真菌の培養結果の比較

公定書に既定の最大濃度である100 cfu/mLの接種菌液を接種し、最大培養期間である5日間(4晩目)培養を行った後での、供試5菌種(Figure 7)の培養結果を比較した。Figure 8に、培養像の代表として、公定法であるDG-18寒天を用いた混積培養法での集落像を示した。本表では、集落の発育性について、5菌種のうち、「培養5日後で小さな集落を形成する3菌種」をAとし、「集落生育が早く大きな集落を形成する2菌種」をBと分類し表記した。集落の発育性がタイプAの*Ca. albicans*, *Cl.*

shaerospermum および *P. citrinum* の3菌種では、比較した結果、今回試験したいずれの培地種類および培養法の組み合わせでも、集落は目視で観察可能な大きさとなり、いずれの培養法・寒天培地の組み合わせで集落数計測が可能であった。集落の発育性がタイプBの*A. brasiliensis* と *M. hiemalis* では、集落は密集し数の計測は困難となった。したがって、早く大きな集落を形成する菌種では、公定法に既定の培養条件の組み合わせで集落数計測が困難となったため、これらの菌種では、培養法、培地種類、接種菌液濃度、培養日数の組み合わせを変え、集落数計測が可能となる方法の検討が必要ということが確認された。

C-2-2) 小さな集落を形成する菌種における真菌数計測結果の比較

集落の発育性がタイプA菌種(小さな集落を形成;*Ca. albicans*, *Cl. shaerospermum* および *P. citrinum*)で100 cfu/mLの接種菌液を用いての真菌数計測結果を、各培養条件間で比較した(Figure 9)。3菌種それぞれの結果から、*Ca. albicans* ではDG-18寒天培地を用いた混積培養法では4晩目で、その時接種した最大の菌数が出現していない状態であったものの、微生物限度試験法における真菌数試験法「培地の性能及び試験法の適合性試験」に既定の培養4晩目でも接種した菌数の80%以上は回収できていた(Figure 9)。日本薬局方の一般試験法微生物限度試験法(4.05)²⁾では、出現集落数は接種菌液から予想される菌数の1/2から2倍以内が適当と判断できると規定されていることから、今回の結果では十分な菌数が得られたものと判断した。しかし日本薬局方で使用される寒天培地の種類はサブロー寒天であり、培養法も平板塗抹法であることから、今後、DG-18寒天培地による混積培養法での検討回数を増やし、評価を確実なものとする必要がある。

C-2-3) 大きな集落を形成する菌種における真菌数計測結果の比較

集落の発育性がタイプA(大きな集落を形成;*A. brasiliensis* および *M. hiemalis*)で40

cfu/mL の接種菌液を用いての真菌数計測結果を、各培養条件間で比較した (Figure 10). また、その際の集落培養像を比較した (Figure 11). 今回の比較検討の結果から、混釈・塗抹の両培養法で共通して DG-18 寒天培地では集落形成が遅く、最大の集落数が形成されるまでに最短でも 4 晩の培養が必要であることが確認された (Figure 10). 同時に、Figure 1 の培養像で示したとおり、DG-18 寒天培地では集落発育が他の 2 種類の培地と比較して小さく、集落数が計測しやすい結果となった. サブロー寒天培地では、菌量が平板 1 枚あたり 20 cfu と少ない塗抹培養でも、集落数測定期間最短の 2 晩の培養でもすでに集落の発育は過剰となって集落が密集しており、数の計測が不可能となった (Figure 11). 以上のことから、*A. brasiliensis* や *M. hiemalis* では、DG-18 寒天または PDA 寒天培地を用いて、3~4 晩以上の培養期間をみるといった注意が必要であると考えられた.

D. 結論

D-1) MALDI-ToF MS による予測アミノ酸配列を指標とした基原同定

SDS-PAGE によって添加物酵素に含まれる個々のタンパク質を分離した後に、それぞれのタンパク質について MALDI-ToF MS による分析を行う PMF 解析を用いて微生物を基原とした酵素添加物の基原菌種の特定を行った. その結果、36 製品中 30 製品の基原を明らかにした. この結果より、PMF 解析は酵素添加物の生物基原を調べるために有効な手段であることが明らかになった. しかし、近縁種のタンパク質も候補として提示してしまうことや、SwissProt に登録の無い生物種由来の製品については対応できないという問題点が認められた. 今後は、複数種の消化酵素を用い、ペプチドのパターンを増やすことで同定の精度を高めるといった改良を行い、より精度の高い基原種同定法の構築を試みる.

D-2) 真菌数試験法の比較検討

公定書で規定の試験条件をその他試験条件と比較し、集落の生育性をもって真菌数計測の

正確性と効率を評価した. その結果、公定書で規定の DG-18 寒天培地を用いて、規定の菌濃度を接種し 4 晩の培養後、集落の発育が過剰となり集落数の計測が不可能となる真菌群があった. ここには公定法に記載された *A. brasiliensis* も含まれた. また同条件の培養条件で、発育速度が遅く小さな集落が発育するため最低 5 晩の培養が必要となる真菌群もあった. ここには公定法に記載された *Ca. albicans* も含まれた. これらの群は両方とも環境中に高い頻度で分布するため、食品添加物に混入することは十分に考えられた. 添加物公定書では、規定法と同等以上の検出感度および精度を有する場合には、代替法の適用も可能であるとされているため、検出が予測される菌種によっては、代替法として寒天培地の種類の変更や、接種試験液の一層の希釈、培養日数の短縮も検討する必要がある.

E. 参考文献

- 1) Thiede B, Höhenwarter W, Krah A, et al. 2005. Peptide mass fingerprinting. *Methods*. 35(3):237-247.
- 2) 公益社団法人日本食品衛生協会. 食品衛生検査指針 微生物編 改定第二版. 2018, p. 519-524.
- 3) Hong SB, Lee M, Kim DH, et al. 2013. *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia. *PLoS One*. 8(5): e63769.
- 4) De Vos P, Garrity GM, Jones D, et al. 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., vol.3: the Firmicutes. New York: Springer Press; p.181-184.
- 5) 厚生労働省. 第十八改正日本薬局方. 2021, p.122-130.

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 渡辺麻衣子, 吉成知也, 西崎雄三, 増本直子, 多田敦子, 工藤由起子, 杉本直樹. 食品添加物の微生物限度試験における真菌数試験法の比較検討. 日本農芸化学会 2023 年度大会, 2023 年 3 月 (オンライン開催)

2) 吉成知也, 関根葵, 小林直樹, 西崎雄三, 杉本直樹, 工藤由起子, 渡辺麻衣子. MALDI-ToF MS を用いた既存添加物酵素の基原生物の同定手法に関する研究. 日本農芸化学会 2023 年度大会, 2023 年 3 月 (オンライン開催)

2. 論文発表等

2-1. 論文

1) Shouhei Hirose, Maiko Watanabe, Atsuko Tada, Naoki Sugimoto, Kyoko Sato, Yukiko Hara-Kudo. Evaluation on suitability of culture broth and conditions for Escherichia coli growth and gas production test of food additives. Food Hygiene and Safety Science. Accepted.

2) Tomoya Yoshinari, Aoi Sekine, Naoki Kobayashi, Yuzo Nishizaki, Naoki Sugimoto, Yukiko Hara-Kudo, Maiko Watanabe. Determination of the biological origin of enzyme preparation by SDS-PAGE and peptide mass fingerprinting. Food Additives & Contaminants: Part A. Submitted.

2-2. 総説

なし

2-3. 単行本

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

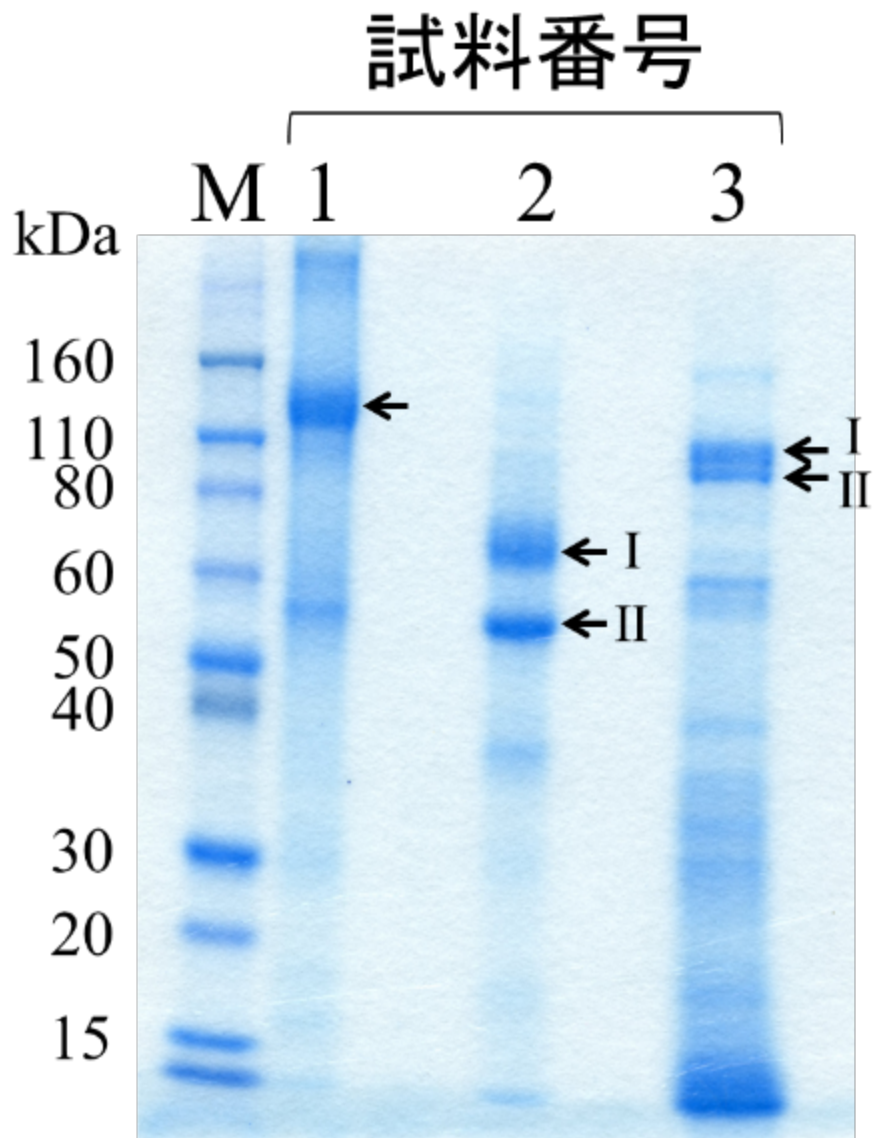


Figure 1. β -ガラクトシダーゼ 3 製品の SDS-PAGE 像

M: タンパク質マーカー. 泳動した試料量は, 試料 1: 100 μ g, 試料 2: 50 μ g, 試料 3: 100 μ g とした. 解析を行ったバンドを矢印で示した.

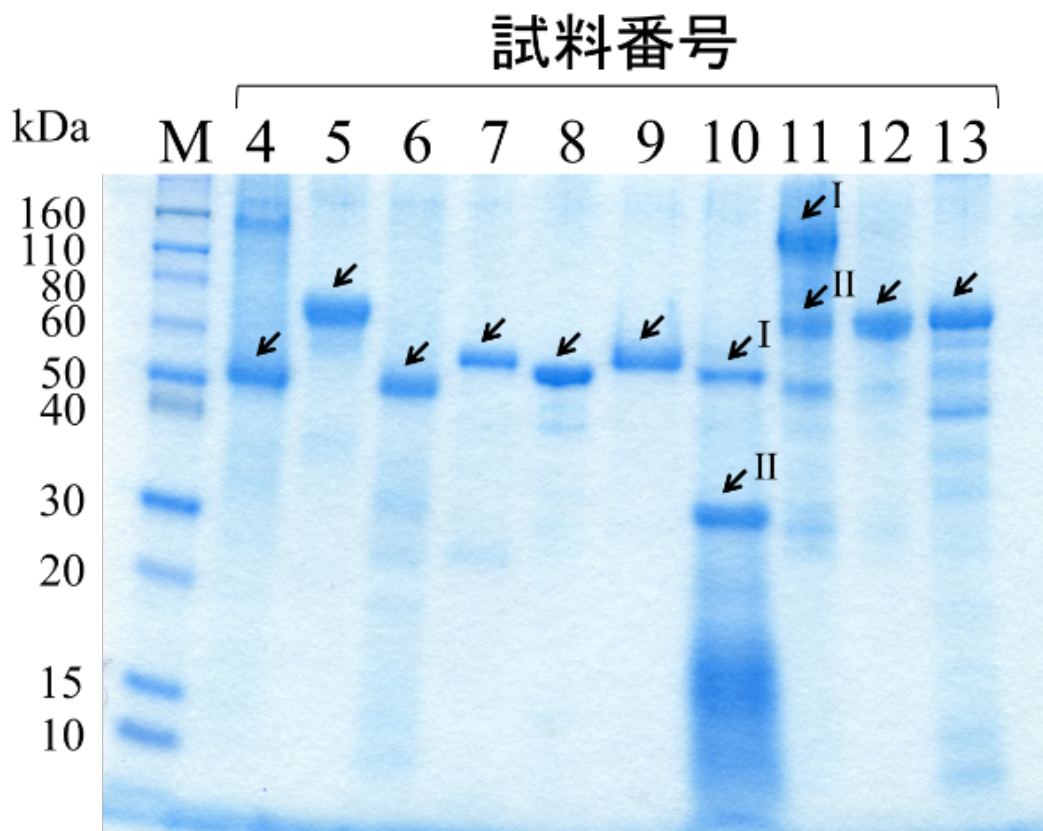


Figure 2. アミラーゼ 10 製品の SDS-PAGE 像

M: タンパク質マーカー. 泳動した試料量は, 試料 4: 150 μ g, 試料 5: 20 μ g, 試料 6: 15 μ g, 試料 7: 20 μ g, 試料 8: 5 μ g, 試料 9: 75 μ g, 試料 10: 75 μ g, 試料 11: 15 μ g, 試料 12: 5 μ g, 試料 13: 20 μ g とした. 解析を行ったバンドを矢印で示した.

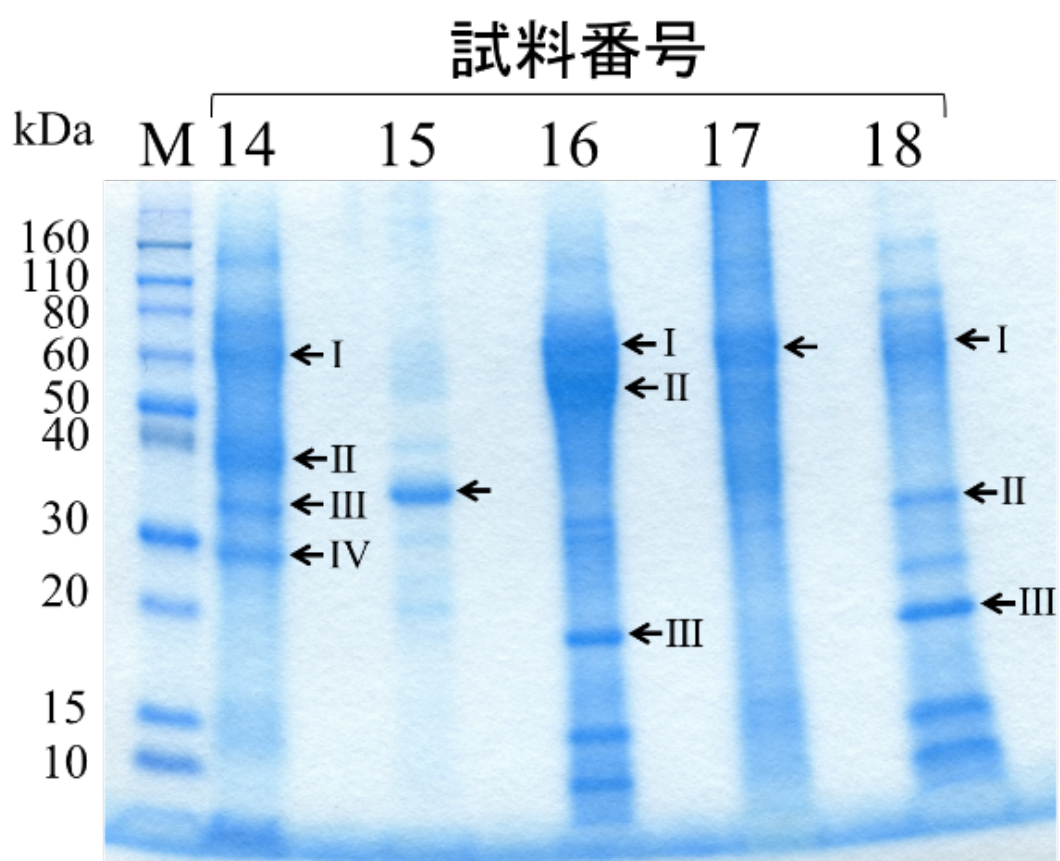


Figure 3. セルラーゼ 5 製品の SDS-PAGE 像

M: タンパク質マーカー. 泳動した試料量は, 試料 14: 150 μ g, 試料 15: 25 μ g, 試料 16: 120 μ g, 試料 17: 150 μ g, 試料 18: 300 μ g とした. 解析を行ったバンドを矢印で示した.

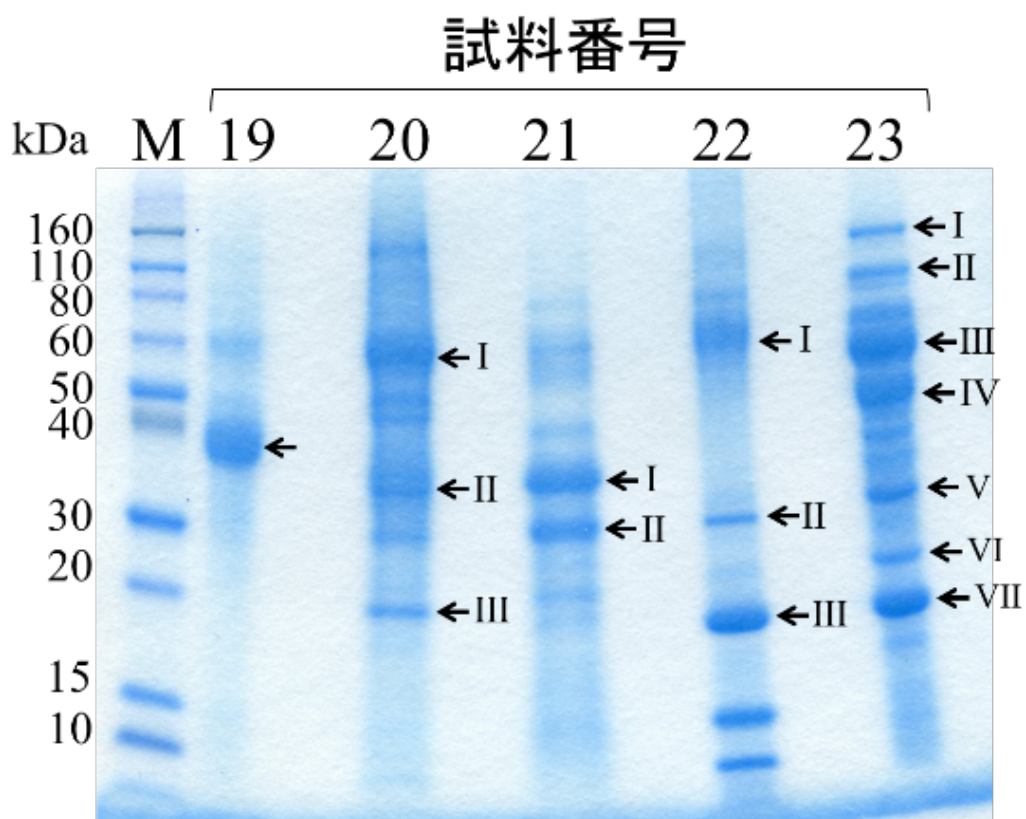


Figure 4. ヘミセルラーゼ 5 製品の SDS-PAGE 像

M: タンパク質マーカー. 泳動した試料量は, 試料 19: 30 μg , 試料 20: 120 μg , 試料 21: 120 μg , 試料 22: 60 μg , 試料 23: 40 μg とした. 解析を行ったバンドを矢印で示した.

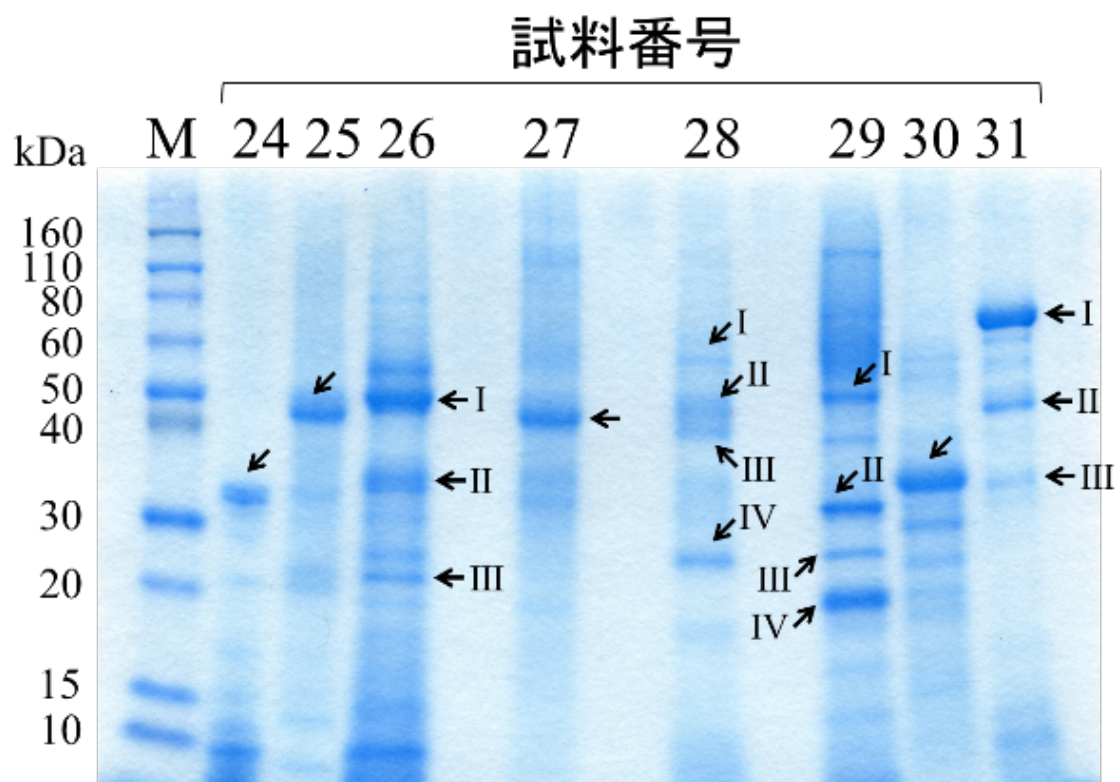


Figure 5. 真菌由来のプロテアーゼ 8 製品の SDS-PAGE 像

M : タンパク質マーカー. 泳動した試料量は, 試料 24 : 2 ug, 試料 25 : 25 μ g, 試料 26 : 150 μ g, 試料 27 : 100 μ g, 試料 28 : 400 μ g, 試料 29 : 150 μ g, 試料 30 : 100 μ g, 試料 31 : 20 μ g とした. 解析を行ったバンドを矢印で示した.

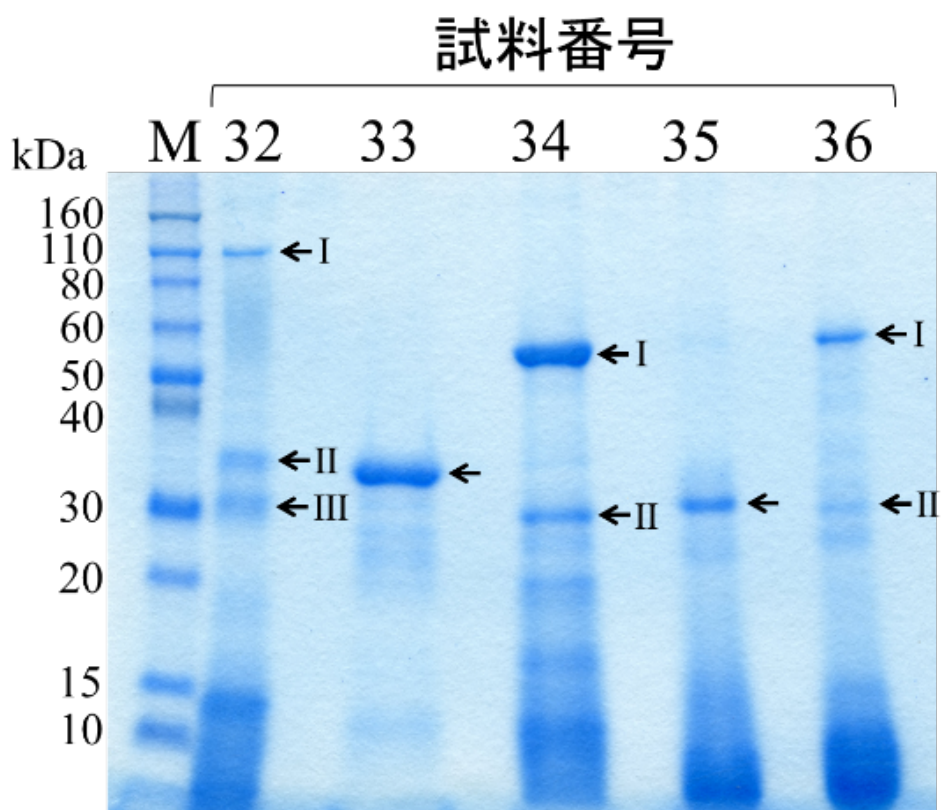


Figure 6. バクテリア由来のプロテアーゼ 8 製品の SDS-PAGE 像

M: タンパク質マーカー. 泳動した試料量は, 試料 32: 750 ug, 試料 33: 500 μ g, 試料 34: 500 μ g, 試料 35: 600 μ g, 試料 36: 500 μ g とした. 解析を行ったバンドを矢印で示した.

Table 1 ガラク トシダーゼとアミラーゼ試料の解析結果

| 試料No. | 付帯情報 | | SwissProtデータベースを用いた Mascotサーチによる解析結果 | | | | | |
|-------|------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------------|-----------|--------------|
| | 酵素名 | 基原種 | バンド No. | SDS-PAGE上の推定分子量 (kDa) | 酵素名 | 基原種 | 分子量 (kDa) | Coverage (%) |
| 1 | β -galactosidase | <i>Aspergillus oryzae</i> | NA | 123 | β -galactosidase A | <i>Aspergillus flavus</i> | 110.1 | 19 |
| 2 | β -galactosidase | <i>Aspergillus oryzae</i> | I | 71 | β -galactosidase A | <i>Aspergillus oryzae</i> | 110.1 | 19 |
| | | | II | 53 | β -galactosidase A | <i>Aspergillus flavus</i> | 110.1 | 19 |
| 3 | β -galactosidase | <i>Niallia circulans</i> | I | 105 | unidentified ^b | <i>Aspergillus oryzae</i> | 110.1 | 19 |
| | | | II | 98 | unidentified ^b | | | |
| 4 | α -amylase | <i>Aspergillus foetidus</i> | NA | 50 | α -amylase A type-1/2 | <i>Aspergillus oryzae</i> | 55.3 | 28 |
| 5 | α -amylase | <i>Aspergillus niger</i> | NA | 65 | α -amylase | <i>Aspergillus usamii</i> | 55.3 | 28 |
| 6 | α -amylase | <i>Aspergillus oryzae</i> | NA | 47 | acid alpha-amylase | <i>Aspergillus niger</i> | 53.4 | 21 |
| | | | | | α -amylase A type-1/2 | <i>Aspergillus oryzae</i> | 55.3 | 32 |
| | | | | | α -amylase | <i>Aspergillus usamii</i> | 55.3 | 32 |
| 7 | α -amylase | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | NA | 53 | α -amylase | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 58.4 | 55 |
| 8 | α -amylase | <i>Bacillus licheniformis</i> | NA | 49 | α -amylase | <i>Bacillus licheniformis</i> | 58.5 | 28 |
| 9 | α -amylase | <i>Bacillus subtilis</i> | NA | 52 | α -amylase | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 58.4 | 58 |
| 10 | β -amylase | <i>Glycine max</i> | I | 50 | β -amylase | <i>Glycine max</i> | 56.4 | 45 |
| | | | II | 28 | lectin | <i>Glycine max</i> | 30.9 | 35 |
| 11 | glucoamylase | <i>Aspergillus niger</i> | I | 118 | glucoamylase | <i>Aspergillus niger</i> | 68.8 | 30 |
| | | | II | 61 | glucoamylase | <i>Aspergillus awamori</i> | 68.8 | 30 |
| | | | | | glucoamylase | <i>Aspergillus niger</i> | 68.8 | 19 |
| | | | | | glucoamylase | <i>Aspergillus awamori</i> | 68.8 | 19 |
| 12 | glucoamylase | <i>Aspergillus niger</i> | NA | 62 | glucoamylase | <i>Aspergillus niger</i> | 68.8 | 21 |
| | | | | | glucoamylase | <i>Aspergillus awamori</i> | 68.8 | 21 |
| 13 | glucoamylase | <i>Rhizopus oryzae</i> | NA | 62 | glucoamylase 1 | <i>Rhizopus oryzae</i> | 65.3 | 45 |

Table 2 セルラーゼ試料の解析結果

| 試料No. | 付帯情報 | | SDS-PAGE上の | | SwissProtデータベースを用いたMascotサーチによる解析結果 | | | |
|-------|-----------|------------------------------------|------------|-------------|-------------------------------------|------------------------------|-----------|--------------|
| | 酵素名 | 基原種 | バンド No. | 推定分子量 (kDa) | 酵素名 | 基原種 | 分子量 (kDa) | Coverage (%) |
| 14 | cellulase | <i>Aspergillus niger</i> | I | 61 | cellulose 1,4-β-cellobiosidase | <i>Aspergillus niger</i> | 49.2 | 23 |
| | | | II | 40 | maman endo-1,4-β-mannosidase A | <i>Aspergillus niger</i> | 41.6 | 34 |
| | | | III | 33 | endo-1,4-β-xylanase C | <i>Aspergillus niger</i> | 35.6 | 51 |
| | | | IV | 27 | unidentified | | | |
| 15 | cellulase | <i>Pycnoporus coccineus</i> | NA | 33 | unidentified | | | |
| 16 | cellulase | <i>Trichoderma longibrachiatum</i> | I | 58 | cellulose 1,4-β-cellobiosidase | <i>Trichoderma viride</i> | 55.3 | 21 |
| | | | II | 50 | cellulose 1,4-β-cellobiosidase | <i>Trichoderma viride</i> | 55.3 | 19 |
| | | | III | 18 | endo-1,4-β-xylanase | <i>Trichoderma harzianum</i> | 20.7 | 35 |
| 17 | cellulase | <i>Trichoderma reesei</i> | NA | 57 | cellulose 1,4-β-cellobiosidase | <i>Trichoderma reesei</i> | 55.4 | 21 |
| | | | | | cellulose 1,4-beta-cellobiosidase | <i>Trichoderma koningii</i> | 55.4 | 21 |
| 18 | cellulase | <i>Trichoderma viride</i> | I | 55 | cellulose 1,4-β-cellobiosidase | <i>Trichoderma viride</i> | 55.3 | 15 |
| | | | | | cellulose 1,4-β-cellobiosidase | <i>Trichoderma koningii</i> | 55.4 | 15 |
| | | | | | cellulose 1,4-β-cellobiosidase | <i>Trichoderma reesei</i> | 55.4 | 15 |
| | | | II | 31 | endo-1,4-β-xylanase 3 | <i>Trichoderma reesei</i> | 38.2 | 25 |
| | | | | | endo-1,4-β-xylanase | <i>Trichoderma harzianum</i> | 20.7 | 35 |

Table 3 ヘミセルラーゼ試料の解析結果

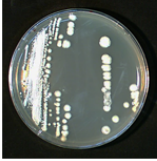
| 試料No. | 付帯情報 | | SDS-PAGE上の | | SwissProtデータベースを用いたMascotサーチによる解析結果 | | | |
|-----------------------------|---------------------------|------------------------------------|------------|-------------|---|------------------------------|-----------|--------------|
| | 酵素名 | 基原種 | バンド No. | 推定分子量 (kDa) | 酵素名 | 基原種 | 分子量 (kDa) | Coverage (%) |
| 19 | hemicellulase | <i>Aspergillus niger</i> | NA | 39 | mannan endo-1,4- β -mannosidase A | <i>Aspergillus niger</i> | 41.6 | 34 |
| 20 | hemicellulase | <i>Aspergillus niger</i> | I | 58 | glucoamylase | <i>Aspergillus niger</i> | 68.8 | 11 |
| | | | | | glucoamylase I | <i>Aspergillus kawachii</i> | 68.7 | 11 |
| | | | | | glucoamylase | <i>Aspergillus awamori</i> | 68.8 | 11 |
| | | | | | endo-1,4- β -xylanase C | <i>Aspergillus kawachii</i> | 35.6 | 51 |
| | | | | | endo-1,4- β -xylanase A | <i>Aspergillus niger</i> | 35.6 | 45 |
| 21 | hemicellulase | <i>Pyrenopeziza coccineus</i> | I | 34 | endo-1,4- β -xylanase B | <i>Aspergillus kawachii</i> | 24.2 | 27 |
| | | | | | endo-1,4- β -xylanase B | <i>Aspergillus niger</i> | 24.1 | 15 |
| | | | | | unidentified | | | |
| 22 | hemicellulase | <i>Trichoderma longibrachiatum</i> | I | 63 | unidentified | | | |
| | | | | | unidentified | | | |
| | | | | | exoglucanase 1 | <i>Trichoderma viride</i> | 55.3 | 21 |
| 23 | hemicellulase | <i>Trichoderma longibrachiatum</i> | II | 29 | endo-1,4- β -xylanase 2 | <i>Trichoderma harzianum</i> | 23.8 | 30 |
| | | | | | endo-1,4- β -xylanase 2 | <i>Trichoderma harzianum</i> | 23.8 | 20 |
| | | | | | unidentified | | | |
| | | | | | xyloglucanase | <i>Trichoderma reesei</i> | 87.3 | 31 |
| | | | | | exoglucanase | <i>Trichoderma koningii</i> | 55.4 | 17 |
| | | | | | exoglucanase | <i>Trichoderma reesei</i> | 55.4 | 17 |
| | | | | | exoglucanase | <i>Trichoderma reesei</i> | 50.3 | 18 |
| endo-1,4- β -xylanase | <i>Trichoderma reesei</i> | 38.2 | 33 | | | | | |
| 24 | hemicellulase | <i>Trichoderma longibrachiatum</i> | III | 18 | unidentified | | | |
| | | | | | unidentified | | | |
| | | | | | endo-1,4- β -xylanase | <i>Trichoderma reesei</i> | 24.1 | 39 |

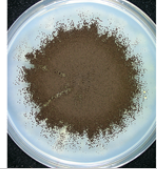
Table 4 真菌由来のプロテアーゼ試料の解析結果

| 試料No. | 付帯情報 | | バンド No. | SDS-PAGE上の 推定分子量 (kDa) | | SwissProtデータベースを用いた Mascotサーチによる解析結果 | | |
|-------|----------|------------------------------|------------|------------------------------|---|--------------------------------------|-----------------|----|
| | 酵素名 | 基原種 | | 酵素名 | 基原種 | 分子量 (kDa) | Coverage (%) | |
| 24 | protease | <i>Aspergillus melleus</i> | NA | 32 | unidentified | | | |
| 25 | protease | <i>Aspergillus niger</i> | NA | 45 | aspergillopepsin | <i>Aspergillus niger</i> | 41.3 | 37 |
| 26 | protease | <i>Aspergillus oryzae</i> | I | 47 | α -amylase A type-1/2 | <i>Aspergillus oryzae</i> | 55.3 | 25 |
| | | | II | 34 | α -amylase | <i>Aspergillus usamii</i> | 55.3 | 25 |
| | | | III | 23 | alkaline protease 1 | <i>Aspergillus oryzae</i> | 42.5 | 26 |
| | | | | | alkaline protease 1 | <i>Aspergillus flavus</i> | 42.5 | 26 |
| | | | | | alkaline protease 1 | <i>Aspergillus oryzae</i> | 42.5 | 21 |
| | | | | | alkaline protease 1 | <i>Aspergillus flavus</i> | 42.5 | 21 |
| 27 | protease | <i>Aspergillus phoenicis</i> | NA | 44 | aspergillopepsin-1 | <i>Aspergillus phoenicis</i> | 41.4 | 34 |
| 28 | protease | <i>Aspergillus sp.</i> | I | 56 | unidentified | | | |
| | | | II | 46 | unidentified | | | |
| | | | III | 42 | unidentified | | | |
| | | | IV | 25 | neutral protease 2 | <i>Aspergillus oryzae</i> | 37.8 | 18 |
| | | | | | neutral protease 2 homolog | <i>Aspergillus flavus</i> | 30.6 | 22 |
| 29 | protease | <i>Penicillium citrinum</i> | I | 48 | unidentified | | | |
| | | | II | 31 | subtilisin-like serine protease Pen c 1 | <i>Penicillium citrinum</i> | 40.5 | 23 |
| | | | III | 25 | subtilisin-like serine protease Pen c 1 | <i>Penicillium citrinum</i> | 40.5 | 16 |
| | | | IV | 21 | penicillolysin | <i>Penicillium citrinum</i> | 37.7 | 9 |
| 30 | protease | <i>Pycnoporus coccineus</i> | NA | 34 | unidentified | | | |
| 31 | protease | <i>Rhizopus niveus</i> | I | 67 | glucoamylase 1 | <i>Rhizopus oryzae</i> | 65.3 | 42 |
| | | | II | 47 | unidentified | | | |
| | | | III | 34 | rhizopuspepsin-2 | <i>Rhizopus niveus</i> | 41.5 | 38 |


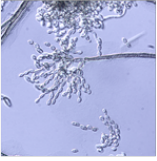
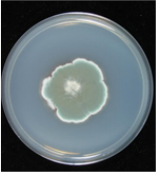

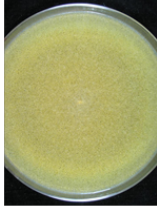
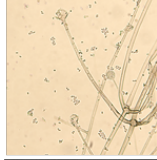
Table 5 バクテリア由来のプロテアーゼ試料の解析結果

| 試料No. | 付帯情報 | | バンド No. | SDS-PAGE上の 推定分子量 (kDa) | SwissProtデータベースを用いたMascotサーチによる解析結果 | | | |
|-------|----------|---------------------------------------|------------|------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------|-----------------|
| | 酵素名 | 基原種 | | | 酵素名 | 基原種 | 分子量 (kDa) | Coverage (%) |
| 32 | protease | <i>Sphingomonas paucimobilis</i> | I | 110 | unidentified | | | |
| | | | II | 36 | unidentified | | | |
| | | | III | 30 | unidentified | | | |
| 33 | protease | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | NA | 33 | thermolysin | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | 60.6 | 27 |
| | | | | | | <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> | 60.1 | 27 |
| 34 | protease | <i>Bacillus subtilis</i> | I | 53 | α -amylase | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 58.4 | 22 |
| | | | II | 29 | subtilisin BPN' | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 39.2 | 24 |
| 35 | protease | <i>Bacillus sp.</i> | NA | 30 | subtilisin Carlsberg | <i>Bacillus licheniformis</i> | 38.8 | 20 |
| 36 | protease | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | I | 58 | α -amylase | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 58.4 | 42 |
| | | | II | 29 | subtilisin BPN' | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 39.2 | 27 |






Candida albicans NBRC 1594 *Aspergillus brasiliensis* NBRC 9544
 食品添加物公定法で規定

Cladosporium sphaerospermum *Penicillium citrinum* *Mucor hiemalis*
 NIHS 0378 NIHS 0222 NIHS 0886
 添加物公定法で規定無し、環境中に分布頻度・濃度高い

Figure 7. 供試菌株

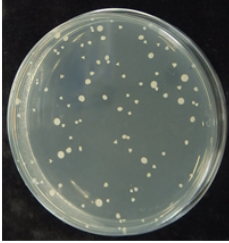
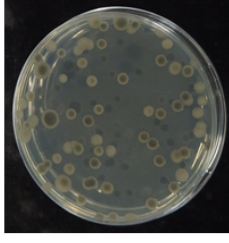

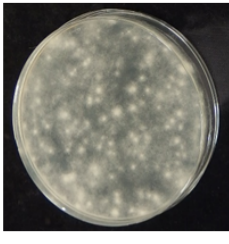

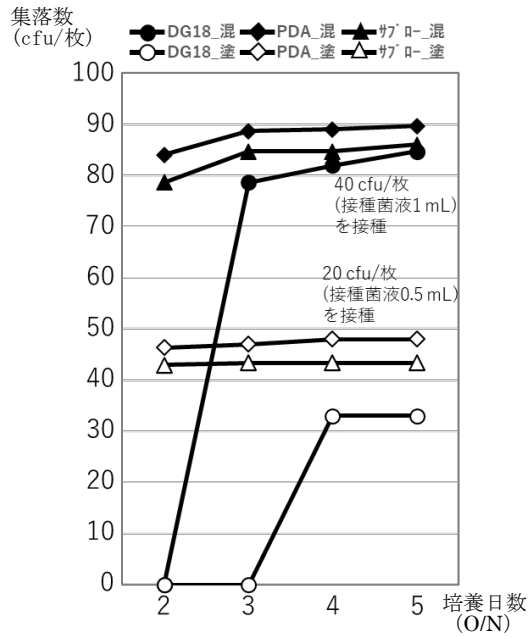
| Species | <i>Ca. albicans</i> | <i>Cl. sphaerospermum</i> | <i>P. citrinum</i> | <i>A. brasiliensis</i> | <i>M. hiemalis</i> |
|--|---|---|--|---|---|
| 公定法規定種 | ○ | × | × | ○ | × |
| 集落の発育性* | A | A | A | B | B |
| 公定法 (混釈培養・ ジクローラン グリセリン 寒天)での 集落像 |  |  |  |  |  |
| 集落数計測の 可・不可 | いずれの培地種類・培養法でも集落数も計測可能 | | いずれの培地種類・培養法でも集落は 密集し数の計測は困難 | | |

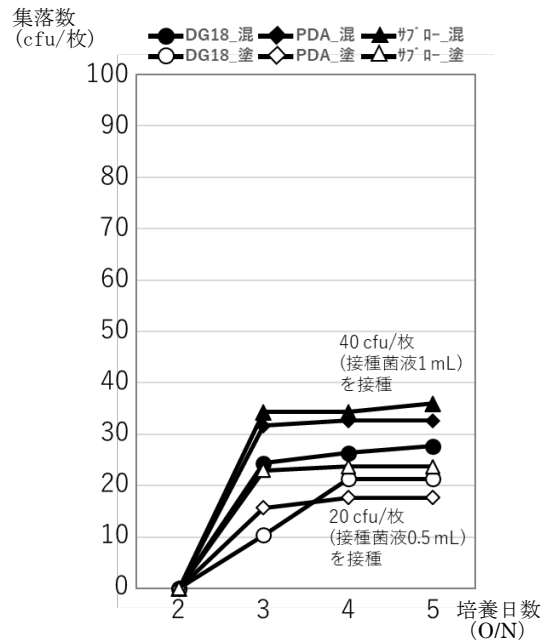
Figure 8. 公定法である DG-18 寒天を用いた混釈培養法での集落像および集落の発育状況

試験菌液の濃度は 100 cfu/mL に設定し接種した。培養 4 晩後の集落像を示した。集落の発育性 A：培養 4 晩後で小さな集落（直径 1.5 cm 以下）を形成する菌種、集落の発育性 B：A より生育が早く大きな集落を形成する菌種。

A. *Ca. albicans*



B. *Cl. sphaerospermum*



C. *P. citrinum*

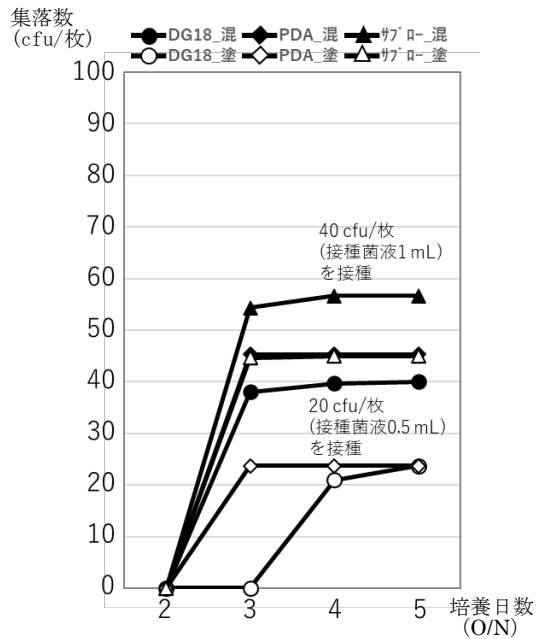


Figure 9. 小さな集落を形成する3菌種を用いた各培養条件間での真菌数計測結果の比較

混釈培養または塗抹培養と、DG-18培地・PDA培地・サブロー寒天培地の3種類の寒天培地の、それぞれ1種類ずつを組み合わせて培養条件を設定した。接種菌液は1 mLあたり100 cfuの濃度で作製し、これを平板1枚あたり、混釈培養法では1 mL、塗抹平板法では0.5 mL接種した。3平板×3回繰り返し実験の集落数測定結果の平均値をプロットした。

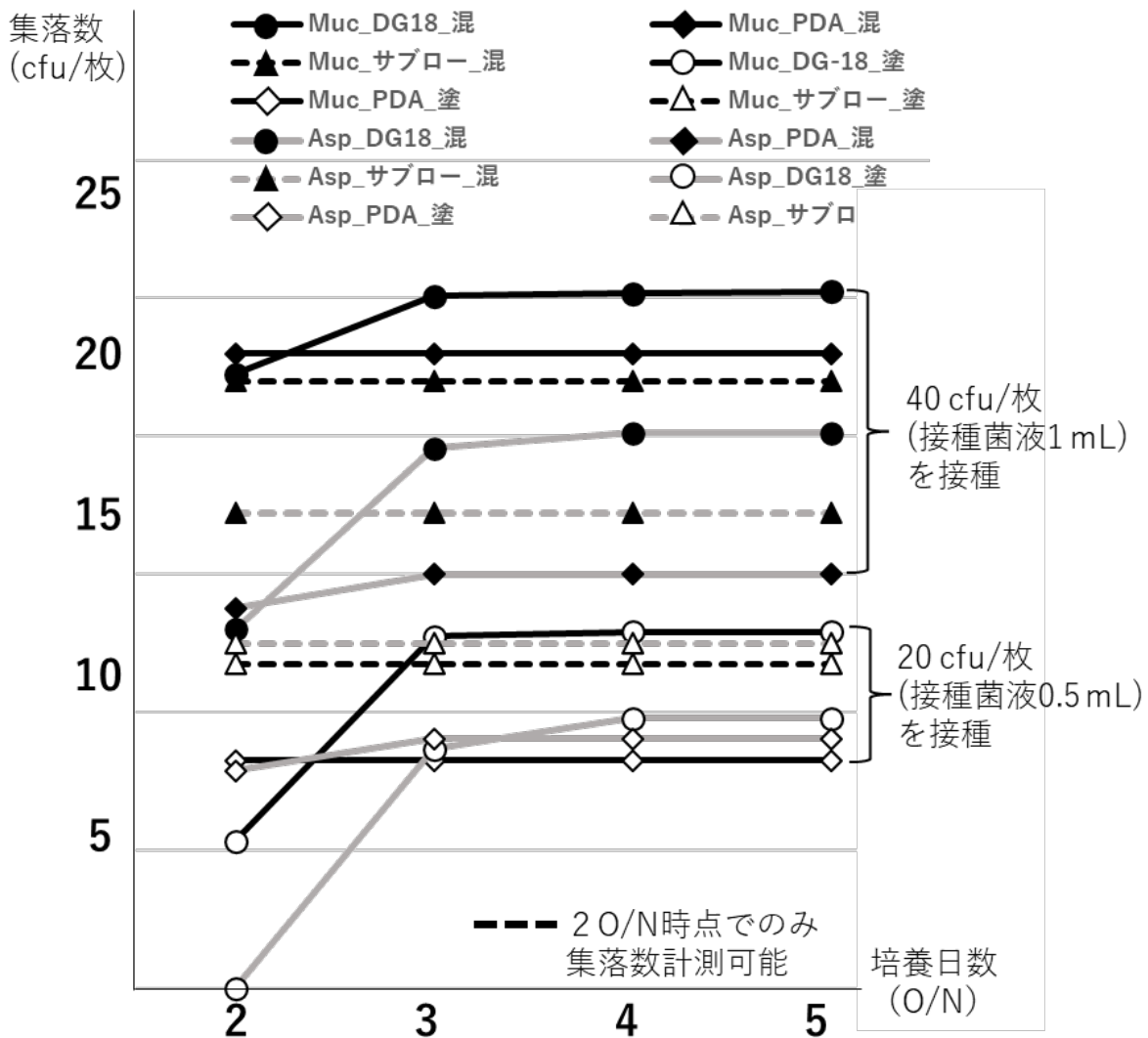


Figure 10. 大きな集落を形成する3菌種を用いた各培養条件間での真菌数計測結果の比較

混積培養または塗抹培養と、DG-18 培地・PDA 培地・サブロー寒天培地の3種類の寒天培地の、それぞれ1種類ずつを組み合わせる培養条件を設定した。接種菌液は1 mLあたり40 cfuの濃度で作製し、これを平板1枚あたり、混積培養法では1 mL、塗抹平板法では0.5 mL接種した。3平板×3回繰り返し実験の集落数測定結果の平均値をプロットした。破線の折れ線グラフは、培養2晩目の時点では集落数の計測が可能であったが、翌日以降は集落が大きくなりすぎて、数の計測が不可能となったためデータが取得できなかったことを表す。

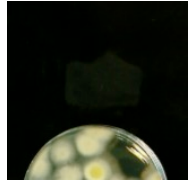
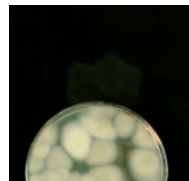
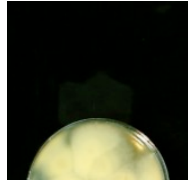
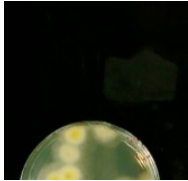
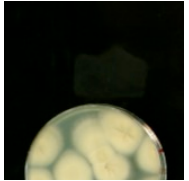


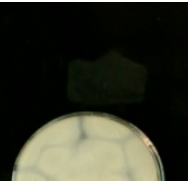


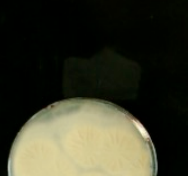
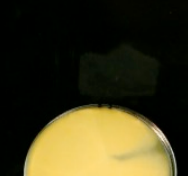
| | | | |
|-----------|---|---|---|
| 接種菌種 | <i>A. brasiliensis</i> (5O/Nでの培養像) | | |
| 培地種類 | DG-18 | PDA | サブロー寒天 |
| 混積培養 |  |  |  |
| 塗抹培養 |  |  |  |
| | <i>M. hiemalis</i> (5O/Nでの培養像) | | |
| 混積培養 |  |  |  |
| 塗抹培養 |  |  |  |
| 集落計測の可・不可 | 集落数計測しやすい | 集落は密集し数の計測は培養期間が5O/Nに近づくほど困難 | |

Figure 11. 大きな集落を形成する2菌種を用いた各培養条件間での集落発育状況の比較

混積培養または塗抹培養と、DG-18培地・PDA培地・サブロー寒天培地の3種類の寒天培地の、それぞれ1種類ずつを組み合わせる培養条件を設定した。接種菌液は1 mLあたり40 cfuの濃度で作製し、これを平板1枚あたり、混積培養法では1 mL、塗抹平板法では0.5 mL接種し、5晩培養後の培養像を示す。