

高校で出来る！  
農芸化学実験プロトコール  
～ひと味違う生物・化学実験～

詳細説明書

- 【1】 土壌からの酵素生産微生物の分離
- 【2】 麹菌のアミラーゼ検出実験
- 【3】 簡易 DNA 検出実験

## 【1】 土壌からの酵素生産微生物の分離

「アミラーゼ・プロテアーゼ生産微生物の分離と検出」

### 1. 概要

光合成を行わない微生物は、生育に有機物を必要とする。微生物は加水分解酵素を分泌して、周囲の環境中のデンプンやタンパク質などの高分子化合物を糖やアミノ酸などの低分子化合物に分解し、吸収する。

微生物の培養には、目的によりさまざまな組成の培地が工夫され、使用されている。ここでは、デンプンを加水分解するアミラーゼまたは、タンパク質を加水分解するプロテアーゼを生産する微生物を、スーパーマーケットなどで入手できる簡易な材料を用いて分離検出する実験を紹介する。

微生物のうち、核を持たない原核生物を細菌（バクテリア）という。原虫・ミジンコ・藻類などは真核生物である。真核生物の中で、カビ・酵母などは特に真菌という。本実験では、細菌の分離について記述している。

### 2. 材料

- ・三角フラスコ（500 mL）
- ・オートクレーブ（電子レンジで代用可）
- ・滅菌済みプラスチックプレート（ガラスシャーレで代用可）
- ・ガスバーナー、試験管、スポイト、コンラージ棒（竹串で代用可）
- ・コンソメの素、片栗粉、スキムミルク、棒寒天
- ・ルゴール液（イソジンで代用可）

### 3. 実験（下線部は大学で実施）

（1）デンプン培地の作製法（10 枚分）

- ◆ 500 mL の三角フラスコに水道水を 200 mL 入れる。コンソメの素（1/2 個）・片栗粉（2 g）・棒寒天（3 g）を入れて、アルムホイルでフタをし、オートクレーブ滅菌（121℃、20 分間）する。フラスコの容量の 50%以上の水を入れてはいけない。
- ◆ オートクレーブがない場合は、電子レンジに入れて加熱する。細かい泡が発生するので、吹きこぼれないうちに電子レンジを止める。片手に軍手を二重にはめて、フラスコをそっと振り混ぜる。再び電子レンジに入れて加熱し、吹きこぼれる直前に止めて振り混ぜる。3,4 回繰り返して、大きな泡が連続的に発生するようになれば完了。
- ◆ 滅菌済みのプラスチックプレートを用意する。ガラスシャーレを用いる場合は、キレイに水洗し、70%エタノールをしみこませたペーパータオルで良く拭き取る。シャーレにエタノールを数滴入れて着火し、火が消えれば滅菌完了（この操作は教員が行って下さい）。
- ◆ ガスバーナーで大きめに火をたいて、炎から 20 cm 以内のところで素早くプレートのフタを空けて、溶けている寒天培地を流し込む。寒天培地がプレート全体に広がる位で約 20 mL である。プレートのフタが空いている時間を極力短くすること。
- ◆ 流し込んだ寒天培地が固まって、表面が乾燥したら使用可能。室温で 1 日程度。

（2）スキムミルク培地の作製法（10 枚分）

- ◆ 500 mL の三角フラスコに水道水を 200 mL 入れる。スキムミルク (1 g) ・ 棒寒天 (3 g) 入れる。デンプン培地と同様の手順で培地を作製する。

注：加熱によりスキムミルク中のタンパク質が固まるため、培地は均一にならない。

### (3) 植菌

- ◆ 土壌を採取する。落ち葉の下などの黒い土がよい。
- ◆ 試験管に水 (水道水でも可) を約 10 mL とり、採取した土壌を耳かき一杯入れる。耳かきに山盛りに入れてはいけない。土はごくわずか、ほとんど濁って見えなくらいで良い。
- ◆ もう 1 本試験管を使って 10 倍に希釈する。
- ◆ 培地に土壌の希釈液をスポイトで 2,3 滴たらす。
- ◆ コンラージ棒で培地全体に引き延ばす。竹串を使用するときは、太い方を黒こげになるまでバーナーで焼いて滅菌してから使用する。
- ◆ 30°C の孵卵器で 1~2 日間培養する。室温で放置する場合は、3 日間~1 週間。

### (4) コロニーの観察

- ◆ 培地上に生じた微生物の集落 (コロニー) をスケッチする。特定のコロニーを選んで、大きさ、形、隆起、縁の形態、表面の性状、色、臭いなどを記録する。
- ※ 細かい毛がふさふさしているコロニーはカビの可能性が高い (放線菌の可能性もある)。

### (5) アミラーゼ生産菌の検出

- ◆ 培地にルゴール液を約 10 mL かける。デンプンが残っている部分は濃青色に染色される。アミラーゼを生産する微生物のコロニーの周辺は、デンプンが消費されるため透明に抜けて見える。

### (6) プロテアーゼ生産菌の検出

- ◆ スキムミルク培地はミルクのタンパク質であるカゼインが凝固しているため、濁って見える。プロテアーゼを生産する微生物のコロニーの周辺は、カゼインが分解されるため濁りが消えて見える。光にかざして観察するとよく見える。

### (7) 顕微鏡観察

細菌は微小 (0.7~3  $\mu\text{m}$ ) なので、400 倍程度の光学顕微鏡で形態を観察するのは難しい。観察する場合は、インクを 1 滴スライドグラスに滴下し、竹串の先端で微生物のコロニーを微量掻き取って懸濁する。カバーグラスを乗せて強く押しつけ、余分な懸濁液を除いてから顕微鏡観察する。

100 倍の油浸対物レンズを用いて、1,000~1,500 倍で観察すると桿菌・球菌などの細菌の姿をとらえることができる。

微生物には内生孢子を形成するものがある。キラキラ光って見えるので、400 倍程度の顕微鏡でも容易に確認することができる。内生孢子を形成する好気性の桿菌であれば、*Bacillus* 属である可能性が高い。*Bacillus* 属細菌には加水分解酵素を大量に生産するもの

が多いので、デンプン培地やスキムミルク培地でしばしば分離される。

#### (8) 微生物の同定

微生物の形態・グラム染色・酸素の要求性・運動性などの情報を集めることにより、微生物の分類学上の位置について推定することができる。

##### ◆ グラム染色

グラム氏が考案した細菌の染色法。細菌は、1枚の細胞膜の上に厚い細胞壁が存在するグラム陽性菌と、2枚の細胞膜の間に薄い細胞壁が存在するグラム陰性菌に大きく分けることができる。

##### ◆ 微生物の形態

顕微鏡観察により、球菌、桿菌、らせん菌などに分けることができる。球菌もその集合状態により、単球菌、双球菌、連鎖球菌、ブドウ球菌などに分けられる。桿菌も球菌に近い短桿菌から長桿菌とさまざまである。桿菌が少しだけ曲がったコンマ菌から、文字通りらせん状のらせん菌もある。

##### ◆ 酸素の要求性

生育に酸素を必要とする好気性菌と、酸素を必要としない嫌気性菌に大きく分けることができる。好気性菌の中にも、大気圧よりも低い酸素分圧を好む微好気性菌（多くの乳酸菌）がある。嫌気性菌には、酸素があってもなくても生育できる通性嫌気性菌と酸素に触れると死滅する絶対嫌気性菌がある。

##### ◆ 運動性

細菌は鞭毛を回転することにより遊泳する。鞭毛が細菌の全周に着生する周鞭毛と、端にだけ着生する極鞭毛がある。鞭毛を持たず、運動性のない細菌も多い。なお、運動性は液体培地で新鮮な培養液中で観察する必要がある。コロニーを形成した細菌は運動性を失っている場合が多い。

##### ◆ 内生孢子の形成

細胞内に内生孢子を形成する細菌もある（*Bacillus* 属と *Clostridium* 属）。内生孢子は耐熱性・耐乾燥性などに優れ、沸騰水中でも死滅しないものも多い。

※ 比較的簡便な調査により属名まで推定することは可能であるが、確実な同定には詳細な解析が必要である。さらに種名まで同定するためには、16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列解析を始めとした遺伝生化学的な解析を行う必要がある。

## 4. 考察

◆ デンプンを分解するアミラーゼとタンパク質を分解するプロテアーゼは基本的な加水分解酵素であり、多くの微生物が産生するので、多人数の生徒が同時に実験を行ってもほぼ全員の実験でどちらかの酵素生産微生物が分離できる。同様に、基質としてオリーブ油などを用いることにより、中性脂肪を分解するリパーゼを生産する微生物も容易に分離できると考えられる。

一方、セルロースを分解するセルラーゼの生産菌を分離するためには、培地と試料の採取場所に工夫が必要である。カルボキシセルロースなどの可溶性セルロースを炭素源

に用い、落ち葉や朽ち木などセルロース分解微生物が存在しそうな場所から試料を採取しても、分離できるとは限らない。

◆ 微生物探索の過程で、緑膿菌や黄色ブドウ球菌など病原性有りと分類されている微生物が単離されることがある。しかし、多くの大腸菌の菌株の中で病原性を有するものが極めて珍しいのと同様に、このような微生物種の中でも実際に病原性を有する菌株は極めて限られているため、実質的に安全と見なして差し支えない。動物の死体や病院など、病原菌の存在が疑われる場所から採取しない限り、病原菌が単離される心配はない。

実際に、環境中から採取した微生物の DNA を用いて組換え DNA 実験を行う場合も、病原性微生物の存在の可能性が低いと推定される環境（通常の庭の土壌などはこれに該当する）から採取したサンプルによる組換え DNA 実験は、初等中等教育機関の理科実験室と同レベルの実験室で実験を行って良いという文部科学省の通達が出されている。

参照：「宿主認定ベクター系を用い、環境中から抽出した核酸を供与核酸とする遺伝子組換え生物の使用等における拡散防止措置について」（メタゲノム研究）

[http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/data/anzen/position\\_10.pdf](http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/data/anzen/position_10.pdf)

## 【2】麹菌のアミラーゼ検出実験

「麹菌の蒸し米培養からアミラーゼを抽出・検出する」

### 1. 概要

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、日本では古くから清酒、しょう油、味噌の醸造に用いられてきたカビである。室町時代にはほぼ現在と同じ製法が確立しており、長年の利用実績から安全性が保証されている。非常に生産性が高く、大量のアミラーゼを培地の中に分泌生産する。

ここでは、炊飯器で炊いた白米に麹菌を培養し、生産されたアミラーゼを簡便に検出する方法について紹介する。

- ◆ デンプンはグルコースが  $\alpha$ -1,4 結合により連結したものであり、らせん状の構造を取る。ヨードを含む溶液に浸けると、 $I_2$  分子と  $I_3$  分子がらせんの中で一列に並ぶ。ヨウ素分子の間を電子が往来し、赤色光を吸収するので濃青色に染まって見える。アミラーゼによりデンプン分子が分解されると、ヨウ素分子が放出されるため色が消える。
- ◆ 麹菌とは実際に食品の醸造に用いられているカビをさすので、黄麹菌・黒麹菌・紅麹菌・しょう油麹菌などがあり、必ずしも *Aspergillus* 属のカビではない。一方、コウジカビとは *Aspergillus* 属のカビをさすので、中には病原性を有するカビもある。

### 2. 材料

- ・麹菌（研究者から分譲してもらおう。手造り味噌のキットから分離するのも可）
- ・炊いた白米（無洗米を炊飯器で炊いても可）
- ・棒寒天、片栗粉
- ・滅菌済みプラスチックプレート（ガラスシャーレで代用可）
- ・ガスバーナー、乳鉢、ロート、ガーゼ（コーヒーのフィルターでも可）
- ・フラスコ（または試験管）、スポイト、綿棒
- ・ルゴール液（イソジンで代用可）

### 3. 実験（下線部は大学で実施）

#### （1）麹菌の培養

- ◆ 炊飯器で白米を炊き、滅菌済みのプレートに約 10 g とる。バーナーで大きめに火をたき、約 20 cm 以内の距離でフタを開けておいて乾燥させる。
- ◆ 表面の湿り気が飛んだところで、麹菌の胞子を植菌する。筆で胞子を直接塗りつけても良い。
- ◆ ビニールテープでプレートのフタを止める。麹菌は生育に酸素を必要とするので、密封してはいけない。
- ◆ 30℃で5～7日間培養する。室温では1週間以上おく。先に白い菌糸が伸長し、4日目くらいから緑色の胞子が形成される（白い胞子が形成される菌株もある）。

#### （2）デンプンプレートの調製（10枚分）

- ◆ 水道水 150 mL に片栗粉（1.5 g）に棒寒天（1.5 g）を計り取る。
- ◆ オートクレーブまたは電子レンジを用いて寒天と片栗粉を溶解し、プラスチックプ

プレートまたはガラスシャーレに流し込む。プレートに薄く拡がるくらいで約 15 mL。冷えて固まり、表面が乾燥するのを待つ。

### (3) アミラーゼ溶液の調製

- ◆ 麹菌が繁茂した米粒を約 5 g 乳鉢に取る。乳棒を用いて良くすりつぶす。水を約 10 mL 入れて、さらに良くすりつぶす。
- ◆ ロートに四つ折りにしたガーゼ、またはコーヒーフィルターなどの目の粗い紙をセットしてろ過する。溶液の粘性が高いため、通常のろ紙では非常に時間がかかる。

### (4) アミラーゼによるあぶり出し (指導：神奈川総合高校 石橋篤教諭)

- ◆ アミラーゼ溶液を綿棒に付けて、デンプンのプレートに絵を描く。下絵を描いておくこと。
- ◆ 30~37°C で 15~20 分間保温する。人肌でプレートを温めても良い。アミラーゼ溶液を付けたところのデンプンが分解されるため、ルゴール液を約 10 mL 流し込むと透明に抜けて絵が浮き上がる。

### (5) アミラーゼ活性染色

- ※ タンパク質は、ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離することができる。分子量に従ってタンパク質を分離する通常の電気泳動では、あらかじめタンパク質の試料に界面活性剤(SDS)を加えて煮沸処理するため、タンパク質は変性し、活性を失っている。電気泳動が終了すると、CBB などによりタンパク質を染色して検出する。
- ※ 酵素のタンパク質試料を、活性を保ったまま電気泳動し、酵素活性により検出することを活性染色という。
- ◆ デンプンを含んだアクリルアミドゲルを作製し、界面活性剤を用いずに電気泳動すると、アミラーゼは分子量と電荷によりゲル内を移動する。アミラーゼを検出することができる。
- ◆ デンプン入りアクリルアミドゲルにアミラーゼ溶液をチャージし、電気泳動を行った(約 40 分間)。電気泳動終了後に、ゲルを pH 7 の緩衝液に浸けて 15 分間静置して、アミラーゼが働くのを待つ。
- ◆ ゲルをルゴール液に浸けると、ヨードデンプン反応によりゲルが青紫色に染まるが、アミラーゼが存在する場所が透明に抜けて観察される。
- ※ 活性染色ゲルでは、ほぼ分子量に従って酵素タンパク質が移動する。タンパク質分子が複数結合し、二量体や多量体の形で電気泳動する場合も多い。
- ※ 唾液を 20~50 倍程度に薄めたものを対照として電気泳動すると興味深い結果が得られる。

### (6) アミラーゼ活性の定量的測定

「 $\alpha$ -アミラーゼ測定キット (Kikkoman 社)」を用いて、アミラーゼ溶液に含まれるアミラーゼ活性の定量的測定を行った。キットに含まれる N3-G5- $\beta$ -CNP 基質は、 $\alpha$ -アミラーゼの活性により加水分解され、黄色に発色する CNP を単離する。比色計により呈色を測定し、試料に含まれる  $\alpha$ -アミラーゼ活性を計算する。

#### 4. 考察

- ◆ 黄麹菌(*A. oryzae*)は安全な微生物であり、非常に大量のアミラーゼを生産するため、比較的簡便な方法でアミラーゼ活性を検出することができる。焼酎の製造に用いられる黒麹菌(*A. awamori* または *A. niger*)や白麹菌(*A. kawachii*)は黄麹菌ほどアミラーゼの生産量が多くないため、あぶり出し実験や活性染色実験はうまくいかない。
- ◆ フラスコを用いた液体培養で麹菌を培養することも可能であるが、麹菌の菌体は附着性が強いので培地中に均一に分散せず、塊をつくる。
- ◆ 麹菌は窒素源の不足を環境シグナルとして孢子を形成する。肉汁を用いた寒天培地に麹菌を接種すると、白色の菌糸が盛んに伸長するが、緑黄色の孢子はあまり形成しない。炊飯器で炊いた白米は、麹菌にアミラーゼを生産させるためには非常に優れた培地である。



### 【3】簡易 DNA 抽出実験

「身近な材料からの DNA 抽出実験比較」

#### 1. 概要

すべての生物には DNA が含まれている。DNA は微細だが長大な分子なので、比較的簡便な手順により抽出し、観察することができる。細胞中の DNA は細胞壁と細胞膜や核膜に包まれ、タンパク質が巻き付いている。DNA の抽出は、こうした細胞膜やタンパク質を除去する過程である。

一般に、細胞壁は機械的にすりつぶすことにより細胞の内容物を放出させる。細胞膜は界面活性剤を加えることにより、構成成分のリン脂質を分散させる。タンパク質は主として食塩により塩析させることにより除去する。DNA 分子は 65%以上のエタノール溶液中では不溶化して析出するので、最後にエタノールを用いて DNA を分離する。

DNA を抽出する実験はさまざまな方法が考案されているが、ここでは簡便な方法により大腸菌、鶏のレバー、ブロッコリー、バナナから DNA を抽出比較した実験について紹介する。この方法は、基本的にバナナから DNA を抽出するために工夫された実験であるため、バナナを材料とした時に最も良い結果が得られていることを、あらかじめお断りしておく。

さらに、得られた DNA 成分の純度・濃度、および混入している RNA について検討した結果も紹介する。

#### 2. 材料

- ・ 鶏レバー、ブロッコリー、バナナ、大腸菌（肉エキス培地で生育させたもの）
- ・ 乳鉢、ビニール袋、目の粗いろ紙（コーヒーフィルターが良い）
- ・ ロート、試験管（または三角フラスコ）、ビーカー、
- ・ 食塩、液体洗剤、エタノール

#### 3. 実験（下線部は大学で実施）

##### （1）材料の破砕

材料を約 10 g 計り取ってすりつぶし、10%塩化ナトリウム溶液を 10 mL 加えて混和する。

- ◆ 鶏レバーは乳鉢を用いてすりつぶす。塩化ナトリウム溶液を加えると粘りけが出てくる。また、生臭い匂いがするので嫌う人もいる。
- ◆ ブロッコリーは乳鉢を用いてすりつぶす。
- ◆ バナナはビニール袋に入れて指でつぶすことができる（乳鉢不要）。空気を抜いて、徹底的につぶすこと。
- ◆ 大腸菌は簡易な方法で破砕することはできない。

##### （2）ろ過と界面活性剤添加

コーヒーフィルターを用いてろ過し、ろ液の 1/5 量の台所用液体洗剤（P&G 社 ジョイ等）を添加して混和する。

- ◆ 鶏レバーは粘性が高く、ろ紙ではほとんどろ過できなかった。ガーゼを用いて絞り出した。

- ◆ 大腸菌の懸濁液はコーヒーフィルターを通過し、ろ過の効果が得られなかった。
- ◆ バナナとブロッコリーの試料からは、順調にろ液が得られた。

### (3) DNA の析出 (指導：都立新宿高校 佐藤由紀夫教諭)

ろ液をビーカーに移し、エタノール (約 20 mL) をビーカーの縁からゆっくり注いでいく。エタノールの濃度が高くなると DNA を含む成分が明瞭な糸状に析出し、泡をまとして自然に浮上してくる。かき回しても収量は増えないので、静かに待つこと。DNA 成分はピンセットやガラス棒などを用いて回収できる。

試験管にエタノールを入れ、ろ液を少しずつ滴下しても良い。

### (4) DNA 成分の分析(1)

簡易な方法で抽出した DNA 成分にはさまざまな夾雑物が混入している。吸光分析および電気泳動により DNA 成分の分析を行った。

- ◆ DNA および RNA の核酸は TE 緩衝液(10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)に溶解する。回収した DNA 成分を 70%エタノールにより洗浄して塩分を除き、0.5 mL の TE 緩衝液を加えて攪拌した。超音波を用いて攪拌し、70°Cの湯煎にかけたが約半分しか溶解しなかった。

※ 不溶成分は主として変性したタンパク質および多糖と考えられる。

### (5) DNA 成分の分析(2)

核酸は 260 nm と 280 nm の紫外線を吸収するが、タンパク質は 280 nm の紫外線のみ吸収する。純粋な DNA は 260 nm/280 nm の吸光度比は約 2.0 であり、タンパク質が混入するほど 260/280 吸光度比が低下する。また、吸光度(A)=1 の時、2 本鎖 DNA の濃度は約 50 µg/mL であることから核酸の濃度を推定することができる。

- ◆ DNA 成分溶液の 260 nm および 280 nm の吸光度比は約 1.7 で、10~20%のタンパク質が混入していると推定された。また、吸光度から 1 mg 程度の核酸が含まれていると推定された。

### (6) DNA 成分の分析(3)

真核生物の細胞に含まれる核酸はほとんどが RNA である (DNA の割合は 1%程度)。電気泳動および RNA を特異的に分解する RNase 処理により、抽出した DNA 成分に含まれる核酸の分析を行った。

- ◆ DNA 成分溶液の電気泳動を行ったところ、DNA マーカーで約 1,000 塩基対の位置に明瞭なバンドが現れた。

※ DNA 成分溶液に含まれる核酸の大部分は、細胞内に最も多く含まれる核酸成分であるリボソーム RNA と考えられる。

- ◆ DNA 成分溶液に対して RNase 処理を行なって RNA を分解除去した後に電気泳動を行ったところ、リボソーム RNA のバンドが消失し、分子量が大きな核酸成分が検出された。この核酸成分は大部分が DNA と考えられる。

#### 4. 考察

ここで紹介した方法では、材料としてバナナとブロッコリーを用いた場合に繊維状の核酸成分が明瞭に観察できた。

※ 鶏レバーを用いた場合は試料の粘性が問題になったので、もっと材料を少なくして試料の溶液を薄くした方がうまくいくと考えられる。

※ 大腸菌の細胞壁は、リゾチームなどの酵素により分解する必要がある。リゾチームは卵白に大量に含まれているので、大腸菌の懸濁液に卵白を少量入れるとうまくいく可能性がある。

◆ DNA の抽出操作は多糖成分の抽出と類似している。細胞壁の主成分は多糖であるため、細胞壁の破砕が大きなポイントとなる。細胞壁の破砕が不十分だと核酸の回収効率が低下する。また、生物によっては細胞壁の破片に DNA が吸着して回収効率が非常に低くなることがある（真菌類にはこのような生物が多い）。このような場合は、試料細胞を乾燥し、液体窒素により凍結して乳鉢を用いて破砕することが多い。

動物細胞には細胞壁がないので、材料によっては非常に高効率で核酸を回収することができる。DNA 成分の多い白子などは材料として好適と考えられるが、高価な上に入手できる時期が限られるので実用性が乏しい。

※ バナナは乳鉢を用いずに破砕することができるので、大勢の生徒に対して実験を実施する材料として適していると考えられる。

◆ DNA は非常に長大な分子であるが機械的剪断力に弱いので、長い分子の状態を保って抽出するのは難しい。細胞壁溶解酵素やタンパク質分解酵素を用いて穏やかな方法で抽出すると、大部分が 50 kb (50,000 塩基対)以上の長さで回収することが可能である。ここで紹介した方法では、大部分の DNA が 10 kb 以下に分断されてしまう。