Aspergillus niger による Aflatoxin B₁ の分解について (1)

坪内 春夫・山本 勝彦・久田 和夫・坂部 美雄・土平 一義*

H. TSUBOUCHI, K. YAMAMOTO, K. HISADA, Y. SAKABE, K. TSUCHIHARA*:

Degradation of aflatoxin B₁ by *Aspergillus niger* (1)

微生物を用いて Aflatoxin B₁ (AF B₁) を分解する実験報告は多く発表^{1,2,3)} されている。著者らも *Aspergillus flavus* 培養白米培地 (AF B₁ 約1.2 ppm 含有) で採集した真菌を用いて AF B₁ 添加 Czapek-Dox broth (Cz broth) で培養したところ、それらの菌のうち *A. niger* による AF B₁ 減毒が強く現われたので、*A. niger* による減毒作用について、さらに検討した。

実験材料および方法

実験-1: Cz broth (Difco 製, pH 6.8に調整して使用) を滅菌後、40 ml ずつ 100 ml 容滅菌三角フラスコに分注し、アセトン溶解 AF B₁ を添加して 1,000 ppb として使用した。そして、0.05% Tween 80水溶液に浮遊させた *A. niger* の胞子液 (6×10⁴/ml) を 0.5 ml ずつ加えて 25°C で静置培養した。培養物については5日目ごとに No. 5C 濾紙 (東洋濾紙製) を用いて、濾液と菌体に分け、pH、糖分 (アンスロン法による)、菌体重量、濾液および菌体吸着 AF 量 (TLC⁴⁾ および HPLC⁵⁾ による) を測定した。濾液からの AF の抽出法は、濾液 10 ml に MeOH 12.2 ml を混合し、さらに、CHCl₃ 20 ml を用いて3回抽出して脱水乾固した。また、菌体吸着 AF の抽出は、菌体の水分を濾紙で十分に吸い取り、海砂を加えて乳パチでよくすりつぶし、これに CHCl₃: MeOH (1:1) を加えてさらにすりこみ抽出し、脱水乾固して AF 分析に用いた。

実験-2: pH の低下を抑制するために、Cz broth 40 ml に炭酸カルシウム 0.5 g を加えて実験-1と同様に行った。

結果および考察

(1) 実験-1について

Fig. 1' に中国産のトウガラシより分離した *A. niger* S-42-4-3で行った実験結果を示した。図のように pH は経時的に低下し、5日目には4.0、10日目には1.9、15日目には1.7となり20日以後は1.6となり一定となった。AF B₁ 残存量は pH の低下とともに減少し、5日目で70%、10日目に25%、15日目には0%となった。しかし、pH 低下とともに AF B_{2a} が生成され、10日目には最高値となり添加した AF B₁ 相当量に換算すると50%に達した。しかし、その後減少傾向を示し、20日目には25%、25日目には7.5%となった。一方、菌体吸着 AF 量を調べたところ、AF B₁ が5日目と10日目にそれぞれ1.3% および2%吸着されていたにすぎず、15日目以後は検出出来なかった。また、pH 6.8に調整した Cz broth に AF B₁ を1,000 ppb 添加した対照を25°C に置き AF B₁ の安定性を調べたところ、25日目でも90%以上回収出来た。また別に、クエン酸で pH 2.0 に調整した Cz broth に AF B_{2a} を 500 ppb 添加し、15日間の安定性を調べたところ5日目と10日目には100%、15日目には86%の回収率であった。それゆえ、この実験では *A. niger* が産生した有機酸 (ペーパークロマトグラフィーにより濾液中にはクエン酸およびグルコン酸の存在が推定された) による pH 低下にともない AF B_{2a} が生成されるとともに、AF B_{2a} も *A. niger* により分解されたと考えられる。また、この時の培地中の糖分と菌体重量をみみると、菌体重量の増加とともに培地中の糖分の減少がみられる。しかし、25日目の糖分はまだ70%以上も残存していることが分かった。これは、この株だけでなく他の3株の *A. niger* についても同じような結果を得たので、エネルギー源がまだ十分残っているうちに AF B₁ の分解が生じていると考えられる。

* 名古屋市衛生研究所 (〒467 名古屋市瑞穂区萩山町 1-11)

Nagoya City Health Research Institute (1-11 Hagi-yama-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467)

(2) 実験-2について

実験-1で使用した菌を用いて炭酸カルシウムを添加した Cz broth で行った実験結果が Fig. 2. である. pH は25日目でも5.5であった. AF B_{2a} は培養期間中一度も検出しなかった (検出限度2 ppb). AF B₁ は経時的に減少し, 15日目では30%, 20日目には10%, 25日目には5%にまで減少した. 菌体吸着の AF を調べたところ, AF B₁ が10日目に5%, 15日目に7.5%となり25日目まで一定であった. また, 炭酸カルシウム 0.5 g を加えた AF B₁ 1,000 ppb 添加 Cz broth 中の AF B₁ の安定性を調べたところ, 25日目でも90%以上回収出来た. すなわち, この場合は, AF B_{2a} を経由しないで *A. niger* により AF B₁ が分解していることが考えられる.

以上の実験から, *A. niger* による AF 減少は, AF 非産生性の *A. flavus* にみられるような単なる菌体吸着による⁶⁾減少でないことが分った.

(3) 汙液および菌体吸着

AF を TLC で分析中 AF B₁ を含めて青色の螢光スポットが7個みられた. (Table 1.) このスポットに Rf 値の高いものより番号をつけると, No. 1 は AF B₁, No. 6 は AF B_{2a} である. No. 3 と No. 4 のスポットは AF R₀ に相当するものではないかと Rf 値などより考えられる. これらのうち, No. 6 の AF B_{2a} と No. 7 のスポットは菌体中には一度も検出しなかった. また, No. 3 と No. 4 のスポットは5日目以降の汙液

および菌体中に現われたが, それらの汙液および菌体への分布性は一定せず, 培養時期により異なっていた. また, No. 3 または No. 4 のスポットは培養中最高濃度を HPLC⁹⁾ で測定したところ, 10日目または15日目の汙液中に螢光強度 (HPLC 検出部における) を AF B_{2a} と同じと仮定した場合, AF B₁ に換算して約7%生成されていたにすぎず, その後は他のスポットと同様にかすかに TLC 上に検出される程度であった. Mann, R. らは *A. niger* による AF B₁ 分解について, YES 培地を使用して30°C で行った実験では, 11日目までに pH は1近くまで低下し, やがて4.0~4.5までもどったが AF B_{2a} については検出しなかったと述べている²⁾. また, 別の報告では AF R₀ の生成に関して放射活性で調べたところ, 培養物全体で添加した AF B₁ の放射活性の12.8%が AFR₀ 生成に関係したと述べている⁷⁾.

著者らの実験では *A. niger* による AF B₁ 分解作用は, 有機酸による pH 低下により, AF B_{2a} が形成され, 形成された AF B_{2a} が *A. niger* により直接的かあるいは間接的に分解されるものと, AF B_{2a} を形成しないで, 直接または間接的に分解される二つの経路の有ることが分った.

謝 辞

本実験に当り真菌の同定に関し色々御指導いただきました国立衛生試験所衛生微生物部長倉田浩先生はじめ真菌室の諸先生方に感謝いたします.

Fig. 1. Degradation of aflatoxin B₁ by *Aspergillus niger* in Czapek-Dox broth

- △—△ Sucrose
- AF B₁
- AF B₁ in mycerium
- AF B_{2a}
- pH
- ▲—▲ Weight of mycerium
- ×—× AF B₁ (control)

Fig. 2. Degradation of aflatoxin B₁ by *Aspergillus niger* in Czapek-Dox broth with CaCO₃

- AF B₁
- pH
- AF B_{2a}
- AF B₁ in mycerium
- △—△ AF B₁ (control)

Table 1. Rf values of blue fluorescent spots of aflatoxin B₁ and related compounds by TLC on silica gel

Spot No.	Compounds	Rf
1	Aflatoxin B ₁	0.53
2		0.47
3		0.40
4		0.35
5		0.23
6	Aflatoxin B _{2a}	0.07
7		0

TLC plate: Biosil A + 5% Gypsum, 0.25 mm thickness

Developing solvents: CHCl₃ - Acetone (9+1)

引用文献

- 1) Ciegler, A., Lillehoj, E. B., Peterson, R. E., Hall, H. H.: Appl. Microbiol., **14**(6), 934 (1966).
- 2) Mann, R., Rehm, H. J.: Z. Lebensm.-Unters.-Forsch., **163**, 39(1977).
- 3) 伊藤嘉典, 森下芳行, 栗飯原景昭: 農化, **52**(5), 195(1978).
- 4) 山本勝彦, 田村征男, 森山繁隆, 坂部美雄: 名市衛研報, **18**, 43(1971).
- 5) 久田和夫, 山本勝彦, 寺田久屋, 坪内春夫, 坂部美雄: 日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集, p.55(1979).
- 6) Masimango, N., Remacle, J., Ramaut, J. L.: Ann. Nutr. Alim., **33**, 149(1979).
- 7) Mann, R., Rehm, H. J.: European J. Appl. Microbiol., **2**, 297(1976).