

(530)

(宮浦, 辰巳) 放線菌の生産する抗生物質に関する研究 (第3報)

Table 12. Industrial effect of inoculum size on the riboflavin yield

Inoculum	Mycerial suspension	Germinated spore		
		Inoculum size %	0.02	0.06
pH	7.4	7.2	7.4	7.3
Yield of B ₂ mg %	40.2	54.0	48.0	49.2
	40.2	36.6	54.0	48.0
	40.8	53.4	48.0	54.0
	39.6	37.2	48.0	51.0
	40.2	48.6	49.2	44.4
	44.4	51.0	54.0	49.8
Mean	40.9	46.8	50.2	49.4
Ratio	100	114	123	121

〔V〕 実験結果の批判

H₂O₂ による胞子の発芽促進条件に関しては培養日数を異にする胞子を用いて、それぞれの最高の発芽率を示すに必要なH₂O₂ 処理濃度を決定しようと多くの実験をくり返したが、培養の古いものほど低濃度のH₂O₂ で発芽する(ただし発芽率は劣る)傾向を認めた程度で培養日数とH₂O₂ 処理濃度との関係を明確に規定することはできなかった。また発芽率はH₂O₂ で処理する時の温度にかなり影響され、夏季室温が30°C以上に上昇した場合H₂O₂ 処理によつてかえつて発芽率が低下したことからなお検討の余地を認めるが、實際上25°C以下では1.5~2%が適当であつた。

H₂O₂ 処理による発芽促進の理由は明らかでないが第4表の結果から考えられるように単に酸化

剤としての作用には帰し難く思う。

また胞子形成培養液として稀胚芽エキスやこれにブドウ糖を加えたものを、発芽培養液として稀胚芽エキスかPGCSL 培養液を用いたがその理由はべつに報告³⁾する。

さらにH₂O₂ 処理後基質添加が発芽後の菌糸の伸長に有効なことは当然であるが発芽率まで上昇することについては、発芽には成長素物質が影響すること³⁾から考えて基質に伴つて補強される該物質の効果であると考えらる。

〔VI〕 総括

ビタミンB₂生産を目的とする*E. ashbyii*の培養に発芽胞子を応用する目的で、大量に処理し得る発芽促進条件ならびに大量培養への基礎実験を行いつぎの結果を得た。

(1) 胞子の発芽促進には胞子形成培養液に10日前後振盪培養した胞子懸液に35% H₂O₂を加えて1.5~2%とし、ただちに稀胚芽エキスまたはコーン・ステープ0.5%を加えたペプトーン・ブドウ糖培養液に移植して約10倍程度に稀釈して振盪すればよい。

(2) 工業的に応用する場合H₂O₂ 処理後20時間程度振盪して発芽を確めたものを5000倍の本培養液に接種培養しても、本培養液に対して1%の若い菌体浮游液を用いた場合に比し劣らない。

終りに臨みご批判ならびにご激励をいただいた齋藤賢道先生に深謝致しますとともに、ご指導ならびにご校閲を賜つた京大高田教授に厚くお礼申し上げます。本報の概要は大阪醸造学会第6回講演会(昭和29年10月15日)に発表した。

文 献

- 1) 齋藤, 箕浦: 本誌, 27, 338 (1949) 23, 1 (1950). 2) 箕浦: ビタミン, 7, 1026 (1954). 3) 箕浦: 本誌 (投稿中). (昭和30, 8, 27 受理)

放線菌の生産する抗生物質に関する研究

(第3報) 新抗生物質「A—6物質」の生産に就て

宮浦 昵 郎・辰 巳 忠 次 (大阪府立大学農学部農芸化学教室)

著者は前報^{1) 2)}に於て、新しく土壌より分離した*Streptomyces fradiae* 類似の放線菌の培養により、植物病原菌特に、軟腐病菌、青枯病菌、根頭癌腫病菌に対し有効な抗生物質「A—6物質」を分離抽出し、該物質は植物体に於てもその効果を充分に発揮することが出来る事を報告した。其後著者はこの物質の植物細菌病防除への実用化に関する研究、及びA—6物質の化学的研究を行うために多量生産方法を検討した。

A-6物質生産の最適培地は、前報¹⁾で述べた如く澱粉を炭素源とし Peptone を窒素源とした培地であるが、この培地は多量生産培地としては経済的に不適當である。そこで著者は安価な培地原料として農産廃物を考え澱粉粕、酒精蒸溜廃液、大豆粕等の利用を研究した。

次に培養法としては、小型の通気培養タンクを使用し通気培養法について検討した。

実験の部

I. 生産培地の決定

培養条件、検定に就いては前報¹⁾に準じた、尚力価の表現は比較を容易にするために、対照に対する百分比で示した。又対照は培養毎に2~3個行つて力価の変動を出来るだけ防いだ。更に力価は何れも培養期間中の最高力価を比較した。

a. 酒精蒸溜廃液の窒素源としての利用試験 Amylo 法に於ける酒精蒸溜廃液を麻布で濾過し、濾液を使用した。その成分は全窒素35.7mg/100cc, 全糖512.3mg/100cc (Glucose として)であつた。尚対照の WAKSMAN 澱粉培地の全窒素は約0.04%であつた。結果は Table 1 に示す。

Table 1. Utilization of still-residues of alcohol fermentation for A-6 substance producing medium

Composition of medium		Potency
Control (WAKSMAN starch medium)		100
Still-residues 100cc		3.6
" "	100cc, Starch 2g	2.7
" "	100cc,	4.3
" "	100cc, Dry yeast (Ebios) 0.5g	92.6
" "	100cc, Soy bean meal 0.5g	72.4
" "	100cc, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5g	0
" "	100cc, Urea 0.5g	0
HCl transaction Still residues 100cc		8.3
" "	" " 100cc, Dry yeast (Ebios) 0.5g	72.3
" "	" " 100cc, Soy bean meal 0.5g	90.8

尚培地の pH はすべて7.0~7.2に調節した。又添加した酵母は薬用乾燥酵母を、大豆粕は脱脂大豆粕粉を使用した。更に酸処理酒精蒸溜廃液は試料酒精蒸溜廃液を稀 HCl と共に1時間加熱処理した後、中和して調製した。

b. 酵母及び大豆粕の窒素源としての利用試験 酵母及び大豆粕は放線菌の培地にはよく利用され、著者等も前報¹⁾に於て少量の添加は良好である事を述べたが、今回は経済的培地として単独利用につき検討した。酵母には薬用酵母(表中I)と乾燥ビール酵母(表中II)の外、製パン用圧搾酵母を使用した。又大豆粕には前記脱脂大豆粕粉を使用した。培地の pH は7.0~7.2である。結果は Table 2 に示す。

Table 2. Utilization of yeast and soybean meal for A-6 substance producing medium

Composition of medium		Potency
Dry yeast I (Ebios) 1g	} Starch 2g NaCl 0.5g (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.25g CaCO ₃ 0.35g Water 1000c.c.	126
" " II (Beer yeast) 1g		104
Pressed yeast 1g		462
Soy bean meal 1g		246
Dry yeast (Ebios) 0.5g Soy bean meal 0.5g		154
Control (WAKSMANN Starch medium)		100

c. 甘藷澱粉粕の炭素源としての利用試験 A-6物質生産株は澱粉が最良の炭素源である¹⁾事から、我々は澱粉含量の多い農産廃物として澱粉粕の利用を検討した。一般に澱粉粕中の澱粉量は文献²⁾によると60%前後である、又我々の測定でも同様であつた。而しながら正確な値は試料を十分に粉碎し混合して測定しても、大きく変

(532)

(宮浦, 辰己) 放線菌の生産する抗生物質に関する研究 (第3報)

動し同一試料でも一定の値を得難いので、一様に60%とみなし実験に供した。澱粉粕中には土壌等が相当量混入しているので殺菌には特に注意し、又熱水浸出により混入物を除いた。この場合浸出率の上昇と濾過を容易にするために酵素処理を行った所、表に示す如く興味ある結果となつた。尚 Dextrin, Maltose は澱粉より低い力価を示している。使用した酵素は3種とも糊抜剤として市販されているものである。結果は Table 3 に示す。

Table 3. Utilization of waste pulp from starch manufacture for A-6 substance producing medium

Composition of medium		Potency
Control (WAKSMAN Starch medium)		100
Starch 2g, Water 100cc	} Peptone 0.5g (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.25g K ₂ HPO ₄ 0.1g NaCl 0.5g MgSO ₄ 0.025g CaCO ₃ 0.35g	125
Starch manufacture 3g, Water 100cc		128
100cc of 3% Water exudate solu. of starch manufacture		113
100cc of 3% Water solu. of enzymatic transacted		159
Starch manufacture by bacterial enzyme		277
" by enzyme "Spitase"		213
" by enzyme "Neomaltz"		

d. 考察 先ず酒精蒸溜廃液は表にも示される様にそのまま使用する事は不可能である。又良好と思われる窒素源を添加しても対照以上に力価を上昇がないのは酒精蒸溜廃液中に生産阻害物が存在するのかも知れない。これについては今後研究する予定である。

次に酵母、大豆粕は予想通り非常に良好であつた。特にパン酵母は良好で価格の点より考えても経済的窒素源となり得る様である。

又澱粉粕も表に示す如く良い結果を得た。特に酵素処理を行った場合には2~3倍にも力価の上昇することは興味がある。以上の結果を総合して経済的生産培地として次の組成を決定した。

酵素処理澱粉粕3% 液100cc, 压榨酵母又は大豆粕粉 1g, (NH₄)₂ SO₄ 0.3g, NaCl 0.5g, CaCO₃ 0.3~0.5g, pH 7.0

II. 通気培養に就て

我々は数種の試料⁴⁾を参考として Fig. 1 に示す様な通気培養タンクを設計、製作し、この装置により培養法を検討した。

a. 構造及び使用法 構造は Fig. 1 に示す、材質は、タンクは鉄製ホーロー張りである。攪拌機及びその軸受は鉄製ニッケルメッキ、他の部分はすべてゴム及びガラスを使用した。使用にあたっては Fig. 2 の如く接続した。

Fig. 1. Fermenter

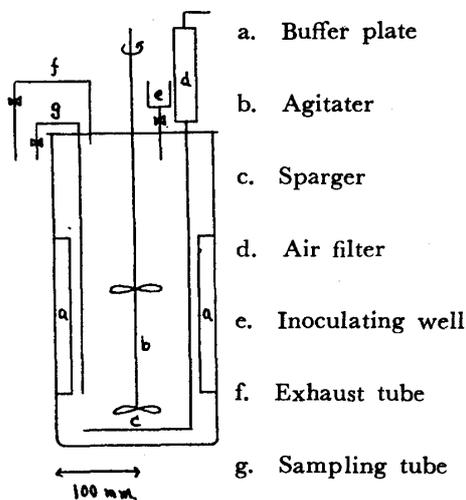
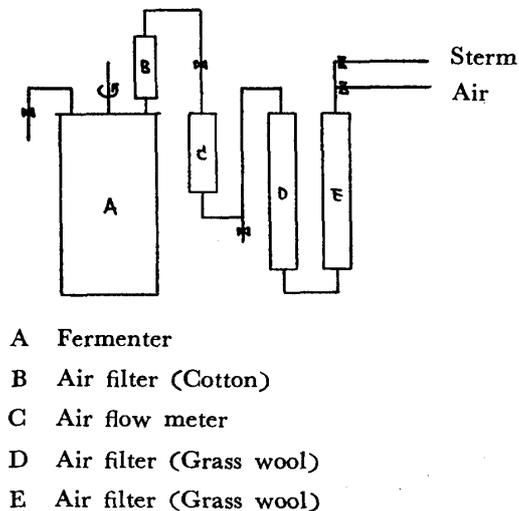


Fig. 2. Fermentation apparatus



この装置の殺菌はすべて加圧蒸気 (1kg/cm² 12°C) で20~30分間行い、培地の殺菌は一度軽く殺菌したもの

をタンクに入れ再び蒸気により120°C, 30分殺菌する。尚この装置は現在迄数回使用したが一度も汚染したことはなかつた。培養にはタンクを30°Cの水槽に入れ, 毎分培地と内容の空気を送り200~500 r. p. m. で攪拌した。この装置は種々の欠点を有するので更に改良研究中である。

c. 結果 培養経過の一例を振盪培養の夫と比較してみると Fig. 3, Fig. 4 の如くである。即ち両者共に類似した経過をたどっているが, タンクの方が少し劣る様である。これは装置の欠点によるものと考えられるが, 而しながら経過時間は振盪の場合より約半に短縮されるので, 量産培養としては好都合である。

Fig. 3. Shake culture

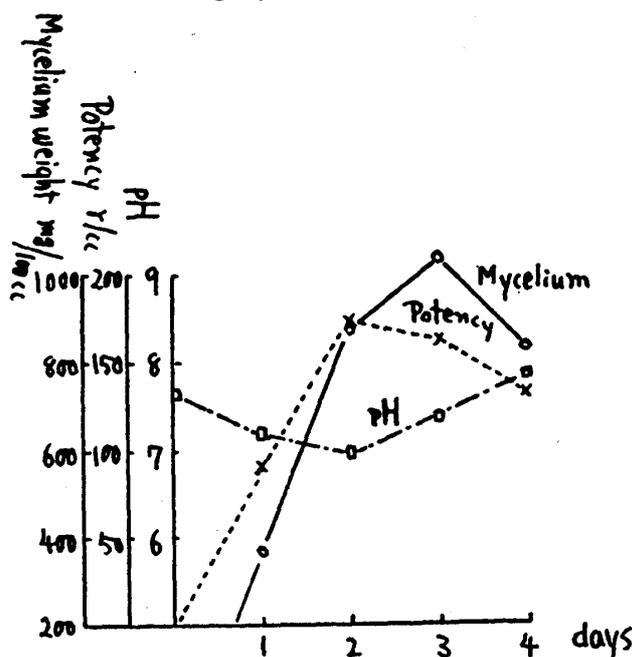
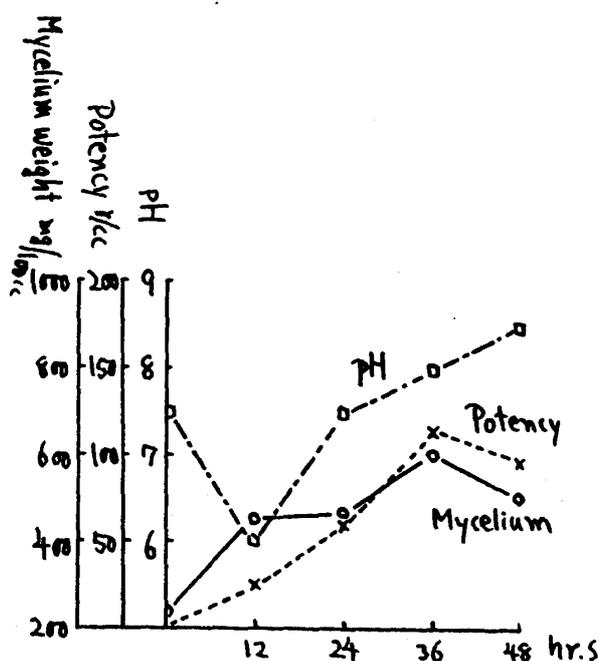


Fig. 4. Jar culture



Ⅱ. 要 約

A-6物質につき経済的生産を検討した結果は次の如く要約される。

1. 酒精蒸溜廃液は殆んど利用されない。
2. 酵母, 大豆粕によく利用され, 特にパン酵母は良好である。
3. 甘藷澱粉粕は充分利用され, 酵素処理によつて澱粉より良好な炭素源となる。
4. 小型培養タンクを使用し, 通気培養を行つた。

(本報告は昭和30年4月日本農芸化学会大会に於て発表した。)

文 献

- 1) 辰己, 宮浦: 本誌, 32, 1 (1954). 2) 辰己, 宮浦: 本誌, 32, 364 (1954). 3) 木原: 食糧副産物の利用, 119 (1950). 4) BROWN, W. E. et al.: Ind. & Eng. Chem., 42, 1769 (1950), BARTHOLOMEW, W. H., et al; Ind. & Eng. Chem., 42, 1827 (1950). (昭和30, 8, 30受理)

放線菌の生産する抗生物質に関する研究

(第4報) 新抗生物質「A-6物質」の抽出, 精製法及び性状の新知見に就いて

宮浦 昵郎・辰己 忠次 (大阪府立大学農学部農芸化学教室)

著者¹⁻³⁾が既に報じた新抗生物質A-6物質につき, 多量生産のための抽出法を検討し, 更に2, 3の精製法により得られた精製物質の新知見について報告する。即ち抽出法には Ion 交換樹脂法を使用, 精製には Chromatography を行い, 粗抽出物が2種の混合物である事を認めた, そしてこの混合物中の一部を得たのでその性状