

報 文

微生物のカロチン生産に関する研究(第9報)

Neurospora sitophila Conidia 及びカロチンの生産に
及ぼす微量の金属鹽の影響について

石 井 隆 一 郎 (大阪市立衛生研究所)

〔I〕 緒 言

N. S 菌のカロチノイドは Conidia (Cn) の形成と同時に、その細胞のなかに生産される。従つてカロチンの生産を増強せしめるには、Cn の着生を多くする事とそのなかのカロチンを生成せしめる条件とを、追求する事が主眼となる。従來の孢子培地の研究では、黒野、藤田¹⁾は麹菌製造における木灰の効果は、主として無機成分の防腐劑的及び營養的效果並びに pH 調節能にあり、特に加里及び磷酸が有効であるとし、三輪²⁾は木灰の Cu, Zn, Al が麹菌の發育及び孢子の形成に有効であるとしている。その他 GILBERT³⁾は Ca⁺⁺, Fe⁺⁺ が、KOFFLER⁴⁾は NaCl 0.4%が、MOYER and COGHILL⁵⁾はグリセリン、酒石酸鐵アンモンが、SHU⁶⁾は Mn が何れも *Penicillium* の孢子形成に有効であると報じている。又有馬、田中、増田⁷⁾は *Penicillium* の孢子形成には Cu は著効があり Co, Ba, Ca, Mg, Zn, Fe⁺⁺, Al もやや有効であると述べている。

以上の報告で孢子形成とその色調について報じているのは三輪²⁾の報告であるが、麹菌孢子の色素は大部分カロチノイドではない。著者は孢子培地として有効な金属元素が *N. S* 菌の Cn 着生及びカロチノイド生産に及ぼす影響を検討するため以下の實驗を行つた。

〔II〕 實驗方法

基本培地としては次の組成のものを選び、これに添加する微量の金属鹽として CuSO₄·5H₂O, ZnCl₂, MnCl₂·4H₂O, Al(NO₃)₃·9H₂O, CO(NO₃)₂·6H₂O 等の各種濃度の液を用い又 NaCl については KOFFLER⁴⁾の報告もあり著者も前報⁸⁾において Cn の發芽促進効果を認めたので共に検討する事とした。

これに蒸留水を加えて 100 cc とする。培地組成及び添加金属鹽は特級又は一級製品を夫々再結晶を繰返して不純物を除去しておく。寒天は 4 日間流水中にさらし後、蒸留水でよく洗つておく。基本培地に各種濃度の微量の金属鹽を加えて pH 5.2 に調整した培地 15cc 宛、乾熱滅菌シャーレに流し入れ固化せしめた後、これに Cn を無菌水に懸濁分散、グラスウール濾過した分散 Cn 液をシャーレの中央に移植する。Cn の移植細胞数はヘマチトメーターにて 10 萬ヶ前後とした。培養は發育並びに繁殖速度を緩慢にして觀察に便ならしめるため低温度 18~20°C を用い 8 日間行つた。

〔III〕 菌糸及び Conidia の生産並びにその色調に及ぼす微量の金属鹽の影響

實驗結果は第 1 表に示すようである。

促進効果は一般に顯著ではないが、Cu, Zn, Mn 等は夫々効果的で Cu SO₄·5H₂O は 4×10^{-6} Mol%, ZnCl₂ は 5×10^{-4} mol% 及び MnCl₂·4H₂O は 10^{-8} Mol% が有効であつた。

Al(NO₃)₃·9H₂O はその効果は明らかでなく、NaCl も菌糸の形成には有効であつたが Cn の生産には判然たる効果がみられなかつた。

Composition of the Basal Medium

Ingredients	Concentration %
Soluble starch	5
KNO ₃	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25
KH ₂ PO ₄	0.5
FeCl ₃	10 ⁻⁸ mol
Agar-agar	2

(298)

(石井) 微生物のカロチン生産に関する研究(第9報)

Table 1. Effect of Metallic Salts on the Production of Carotenoids and Conidia by *Neurospora sitophila*. (I)

Cultivation periods days Metallic salts mol %	3			4			5			6			8		
	M	Cn	C	M	Cn	C	M	Cn	C	M	Cn	C	M	Cn	C
10^{-4}	+	-		1	+	LO	3	1	LO	5	2	LO	6	5	Or
10^{-5}	+	-		1	+	LO	3	1	LO	5	2	LO	6	6	Or
2×10^{-5}	+	-		2	+	LO	4	2	LO	5	3	LO	6	6	Or
5×10^{-5}	+	-		2	+	LO	4	1	LO	5	3	LO	6	5	Or
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \ 10^{-6}$	+	-		2	+	LO	3	2	LO	5	3	LO	6	5	Or
2×10^{-6}	+	-		2	+	LO	3	2	LO	5	3	LO	6	5	Or
4×10^{-6}	+	-		3	+	LO	4	3	LO	6	4	Or	7	7	Or
6×10^{-6}	+	-		2	+	LO	4	3	LO	5	3	LO	6	6	Or
8×10^{-6}	+	-		2	+	LO	3	2	LO	5	3	LO	6	6	Or
10^{-7}	+	-		2	+	LO	3	2	LO	5	3	LO	6	5	Or
5×10^{-7}	+	-		1	+	LO	2	1	LO	4	2	LO	5	4	Or
10^{-8}	+	-		1	+	LO	2	1	LO	4	2	LO	5	4	Or
10^{-8}	-	-		-	-		2	1	LO	4	2	LO	6	6	Or
$\text{ZnCl}_2 \ 10^{-4}$	+	-		2	-		3	1	LO	5	3	LO	6	6	Or
3×10^{-4}	+	-		2	-		4	2	LO	6	3	LO	7	6	Or
5×10^{-4}	+	-		5	-		7	3	LO	8	5	LO	8	7	Or
7×10^{-4}	+	-		4	-		6	2	LO	7	3	LO	7	6	Or
10^{-5}	+	-		2	-		3	2	LO	5	3	LO	7	6	Or
10^{-8}	+	-		3	+	LO	5	2	LO	8	5	Or	9	7	Or
$\text{MnCl}_2 \ 10^{-4}$	+	-		2	+	LO	4	1	LO	6	4	Or	6	6	Or
$4\text{H}_2\text{O} \ 10^{-5}$	+	-		2	+	LO	4	1	LO	5	2	LO	6	5	Or
10^{-6}	+	-		1	-		3	1	LO	5	2	LO	6	4	Or
10^{-4}	+	-		1	-		3	1	LO	6	2	LO	6	5	Or
$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \ 10^{-5}$	+	-		1	-		3	1	LO	6	2	LO	6	6	Or
$9\text{H}_2\text{O} \ 10^{-6}$	+	-		4	+	LO	5	1	LO	6	2	LO	7	6	Or
2	+	-		2	-		3	1	LO	3	3	Or	5	4	Or
1	+	-		3	-		3	1	LO	4	3	Or	5	4	Or
$\text{NaCl}\%$ 0.5	+	-		3	+	LO	5	2	LO	6	4	Or	7	6	Or
0.1	+	-		3	+	LO	6	2	LO	7	4	Or	7	6	Or
0.05	+	-		1	-		5	2	LO	6	4	Or	7	6	Or
Control	+	-		3	-		4	1	LO	6	3	Or	6	5	Or

M: Mycelia, Cn: Conidia, LO: Light Orange, Or: Orange.

〔IV〕 微量の金属鹽の栽培地への添加効果

以上で有効と認められた Cu, Zn, Mn の鹽類と Co 及び食鹽、木灰等の栽培地への添加効果を β -カロチン、總カロチノイド、Conidia 生産の面より検討した。小麦麩 5g をシャーレにとり、これに前記の金属鹽を加えた緩衝液を 5 cc とり滅菌後培地の乾燥を防ぎつゝ、 27°C 前後で 10 日間培養、その後 37°C で 1~2 日乾燥し Cn を乾燥毛筆ではきとつて分析に供した。本菌 Cn の主要色素は β -カロチン 及び リコピン であるから吸着用 アルミナ (KK I 又は KK II) による分別に際して β -カロチン に随伴する色素は β -カロチン 部とし、リコピン に随伴する色素を リコピン部 として計算したが リコピン より上部に吸着される強吸着性の色素は分別しなかつた。

その結果は第2表に示す如くで Co, Cu, Mn, Zn はカロチンの生産に有効で Mn は總カロチノイドの生産増加にも効果的であつた。食鹽及び木灰は効果を認めるに至らなかつた。殊に食鹽は β -カロチン 部は少々減少しているに反して リコピン 部は増加し總カロチノイドは對照と變らない結果を示した。これは培養が長期にわたると食鹽及び木灰共に培地の水分が不足し、従つてその滲透壓を高め生体内におけるカロチン合成反應を阻

Table 2. Effect of Metallic Salts on the Production of Carotenoids and Conidia by *Neurospora sitophila*. (II)

Metallic salts mg%		β -Carotene fraction mg%	Lycopene fraction mg%	Total carotenoids mg%	Conidia %
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ $6\text{H}_2\text{O}$	1	63.5	34.8	98.3	8.3
		59.8	23.0	82.8	7.6
		55.0	30.8	85.8	7.8
		*59.4	29.5	88.9	7.9
	10	55.9	39.1	95.0	8.4
		52.4	24.3	76.9	6.6
		58.0	20.0	78.0	8.0
		*55.5	27.8	83.3	7.7
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1	62.6	32.8	95.4	6.1
		63.1	25.3	88.4	6.8
		55.7	32.3	88.0	7.2
		*60.5	30.1	90.6	6.7
	10	40.5	43.8	84.3	6.8
		43.8	19.6	63.4	7.4
		42.0	29.7	71.7	7.1
		*42.1	31.0	73.1	7.1
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	20	44.2	61.8	106.0	7.0
		67.0	36.9	103.9	6.6
		*55.6	49.4	105.0	6.8
	200	46.9	59.9	106.8	7.0
		65.9	45.7	111.6	6.4
		59.8	23.0	82.8	7.0
		*57.5	42.9	100.4	6.8
NaCl	500	42.5	53.5	96.0	7.2
		44.2	54.1	98.3	6.0
		49.7	26.0	75.7	6.8
		*45.5	44.5	90.0	6.7
ZnCl_2	6.8	62.5	25.4	87.9	7.0
		58.8	26.5	85.4	6.6
		61.8	22.8	84.6	7.6
		*61.1	24.9	86.0	7.1
	68	59.4	42.5	101.9	10.0
		69.4	24.0	93.4	8.0
		64.1	29.0	93.1	8.0
		*64.3	31.8	96.1	8.7

害せしめた事に起因するものと考えられる。第2表において $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の 1mg%添加區が β -カロチン 生産に有効である事が明らかになつたが Co は V, B₁₂ の分子構成元素として B₁₂ 生産に必須の元素であり本菌は糸状菌類中では最も B₁₂ 生産力の強い菌株の一であり且 B₁₂ とカロチンの併用が動物の生長並びにカロチンの体内利用率を高めるとの報告⁹⁾ にかんがみ $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ のカロチン及び B₁₂ 生産に及ぼす影響を検討したが下記の如く β -カロチンの生産には 0.08 mg % (麩に對して) で充分であり B₁₂ 生産には麩培地への Co 添加効果は認められなかつた。

	B ₁₂ 7%
<i>Neurospora sitophila</i> Conidia	9.6
麩培養物	6.8

Table 3. Effect of $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ mg%	β carotene fraction mg%
0	50.2
0.04	54.1
0.08	63.0
0.4	63.0
2.0	61.8

〔V〕 總 括

Neurospora sitophila の β -カロチン、總カロチノイド及び Conidia の生産に及ぼす微量金属鹽の影響を検討し次の結果をえた。

供試金属鹽のうち $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 はカロチンの生産に有効であつたが $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, NaCl, 木灰は効果を認める

(300)

(外山) *Trichoderma koningi* に依る纖維素分解 (第3報)

Ash of woods	1000	52.6	16.1	68.7	6.4
		51.0	20.5	71.5	6.8
		*51.8	18.3	70.0	6.6
	5000	54.0	17.0	71.0	6.0
		50.0	19.5	69.5	6.2
		*52.0	18.3	70.3	6.1
Control	0	47.8	33.2	81.0	7.4
		59.7	32.3	92.0	7.0
		49.6	35.9	85.5	6.6
		*52.4	33.8	86.2	7.0

*: Mean value

にいたらなかった。その促進効果の最適濃度 (mg/100g培地) は $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.08, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 20, ZnCl_2 6.8 であつた。又 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 及び ZnCl_2 は *Conidia* の収量増加にも効果的であつた。

終始御指導と御鞭撻を賜りました所長茶珍博士、恩師京大教授高田博士並びに阪大教授照井博士に深謝致します。尙本研究は昭和28年10月16日本會講演會において

發表した。

(Neurospora sitophila に關する研究第19報)

文 献

- 1) 黒野, 藤田: 醸造試報, **95**, 31 (昭2). 2) 三輪: 本誌, **11**, 181, 304 (昭8), 3) GILBERT, W. J.: J. Bact., **51**, 731 (1946). 4) KOFFLER, H., KNIGHT S. G. and FRAZIER W. C.: J. Bact., **53**, 115 (1947). 5) MOYER A. T. and COGHILL R. D.: J. Bact., **54**, 161 (1947). 6) SHU, P.: J. Bact., **54**, 161 (1947). 7) 有馬, 田中, 増田: J. Antibiotics, **3**, 493 (昭25). 8) 石井, 宮本: 本誌, **32**, 276 (昭和29). 9) EDWARD G. HIGH and SHERMANN S. WILSON: J. Nutri, **50**, 203 (1953).

(昭和29, 4, 16受理)

Trichoderma koningi に依る纖維素分解 (第3報)

外 山 信 男 (宮崎大學農學部農業化學科)

緒 言

Trichoderma 屬は世界的に分布し土壤特に酸性土壤中に極めて豊富に生存する糸狀菌である。該菌は有機物分解力が強く枯死直後の又は衰弱せる植物に繁殖し植物の根部、木材表面、貯藏中の甘藷等に屢々認められる¹⁾。且該菌は *Penicillium* 屬等と並んで典型的な纖維素分解菌^{2) 3)} で土壤の腐植形成の要因ともなつて居る。更に *Trichoderma* 屬糸狀菌が諸種植物病原菌に優性な拮抗作用を示し⁴⁾ 病菌を襲いその菌糸に自己の菌糸を密着せしめ病菌の細胞内容物を吸収したり⁵⁾ 一種の有毒物質を分泌して病菌を致死せしめる場合が知られて居る⁶⁾。

該菌の培養液から他の糸狀菌に有毒なる物質が分離されて居る⁷⁾ が高等植物にも影響を及ぼす物質も認められて居る⁴⁾。現在 *Trichoderma* 屬は上記の性質の爲種々な植物病原菌に對する生物學的防除に應用されるのみであるが著者は自然界に於ける該菌の生活狀態より相當強力なる Cellulase を有すること並びに甘藷表面での生育狀況から Amylase をも有することを豫想し既に Cellulase に就ては應用上必要な基礎的事項を報告した⁸⁻¹⁰⁾。

土壤中に最も普通の糸狀菌は *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Fusarium*, 並びに *Trichoderma* 各屬であるが現在迄農産製造特に醸造方面には獨り *Trichoderma* 屬が應用の例を見ない。後記の如く Cuprammonium Rayon 或は無蒸煮澱粉粕より短期間に相當量の Glucose を生ずる該菌の麴抽出濾液の作用を示し該菌の新たな應用の一端と爲し度い。

實 験 の 部

Trichoderma koningi の Cellulase は既報¹⁰⁾ の如くその測定法に於ける濾紙の崩壊度と BERTRAND 氏試薬の還元性(Glucose 生成)に於て甚だ強力なものであるが該酵素の應用上如何なる條件下で最も強力な Cellulase 作用が得られるかを先決問題である。從來の著者の研究に於ては液内培養法を採用したがこれは該法では基質として用いた木綿纖維が該菌に依り微細な纖維屑とされる現象に注目した爲に他ならぬ。しかし從來の経験に依れ