

Eremothecium ashbyii の孢子の発芽について

(第4報) 工業的応用を目的とする孢子の発芽促進条件とその応用の基礎研究

箕浦久兵衛 (わかもと製薬株式会社)

〔I〕 緒 言

E. ashbyii の孢子の発芽促進条件についてはすでに報告^{1) 2)}したが、これらはすべて胚芽寒天斜面上の孢子について行つた研究であつて、単孢子分離などの菌学的基礎研究には充分であるが大量処理には不適當である。しかるに B_2 の工業生産を目的とする該菌のタンク培養において振盪培養によつて得た孢子を容易かつ確実に発芽させる条件が分れば、実際上前培養行程を省略できて大いに有利になるものと考えられる。

本報にはこの目的を達する見透を得るに到るまでの基礎実験結果の概要を述べる。

〔II〕 実験方法

(1) 菌株: 該菌による B_2 生産量は菌株によつてかなり異り、胚芽寒天上同程度に橙黄色を示す菌株間にあつても液体培養液(例えばペプトン・ブドウ糖液)に振盪培養した場合3~4日で菌体の大部が孢子にかわるもの(S株と仮称)と7日以上培養してもほとんど孢子をつくることなく菌体はそのまま自己消化に陥るもの(M株)とがあつて B_2 生産には後者が好適である。しかし今回の試験の初期においては適当な孢子形成培養液が知られていなかったのもつばらS株について試験した。その後M株も胚芽エキス系培養液でよく孢子をつくることを知つたのでこの株に切りかえたが発芽状況にはほとんど差を認めなかつた。

(2) 培 養 液

PGCSL培養液: ペプトン1.5, 粗製ブドウ糖3 およびコーン・スチープ0.5%より成る。

胚芽エキス: 前報²⁾参照。

稀胚芽エキス: 胚芽エキスを水道水で2倍にうすめたもの。

(3) H_2O_2 : 純正化学製35% H_2O_2 を使用した。

(4) 振盪培養条件: 振巾7~8 cm, 振動数115~130rpmの4台のシェーカーを使用したがこの範囲内では発芽率に影響はみなかつた。培養温度は25~28°Cとしたが夏季昼間は33°Cにまで上昇した。

〔III〕 振盪培養孢子の H_2O_2 による発芽促進条件(1) 発芽促進に要する H_2O_2 濃度 (S株について)

前報²⁾において胚芽寒天斜面上の比較的若い孢子が0.1%程度の H_2O_2 でよく発芽したことから、まずPGCSL培養液に3日間振盪して得た孢子懸液を8日間静置後その2ccに H_2O_2 を加えて0.05~0.2%とし28°Cに静置培養したが2日後にいたつても発芽するものはなかつた。

上記孢子懸液をさらに7日間放置した後 H_2O_2 を加えて0~0.5%とした胚芽エキス2ccに0.1ccづつ接種して2日間静置培養した結果 H_2O_2 0.5%含有のものにのみ約5%の孢子が発芽しているのを認めた。この結果より振盪培養の孢子も寒天斜面上のものと同様に発芽には適当な熟成期間を必要とするものかも知れないこと、ならびに寒天斜面上の孢子と異り0.5%の H_2O_2 でもなお不足することが推定されたのでつぎの実験を行つた。

すなわち胚芽エキス2ccに H_2O_2 を加えて所定の濃度としたものにPGCSL培養液に4日培養した孢子懸液を0.1ccづつ接種して3日間静置培養して得た発芽率を第1表に示す。

すなわち振盪培養によつて得た孢子の発芽にはべつに熟成期間を要しないことならびに発芽促進には1.5~2%が適當であることを知つた。

(2) H_2O_2 処理後振盪することの効果(S株)

H_2O_2 が酸化剤であることから考えて H_2O_2 処理後振盪することの影響について試験した。すなわちPGCSL培養液に5日間振盪培養して得た孢子懸液に35% H_2O_2 を加えて2%とし静置したものと振盪したものと

Table 1. Percentage of germinated spores in stationary culture

Days	H_2O_2 %					
	0	0.3	0.5	1.0	1.5	2.0
2	0	0	0	0	11	3
3	0	0	<1	2	17	17

芽率を比較した結果は第2表のとおりである。

すなわち振盪の効果は顕著に認められたが、前回の結果と比較して発芽率は不十分でとくに発芽後の菌糸の伸長は極めて悪かつた。その原因として基質の不足が考えられたのでその添加の効果を試験した。

(3) H_2O_2 処理後基質添加の効果 (S株)

PGCSL培養液50ccに5日間振盪して得た胞子懸液に35% H_2O_2 を加えて2%ならしめ、ただちにブドウ糖10%、ペプトーン5%より成る基質液10ccを加えたものと加えないものを振盪し2日後における発芽率を比較した結果は第3表のとおりであつて、基質液の添加は発芽に有効であるだけでなく発芽後の菌糸の伸長もかなり良好であつた。

Table 3. Effect of the addition of substrate.

Substrate	Germinated spore %
No addition	7
Added	20

Table 4. Effect of the manner of the addition of H_2O_2 and substrate

Manner of treating	Germinated spore (%)
Spores + (H_2O_2) + (substrate)	18
Spores + (H_2O_2 + substrate,	<1

すなわち H_2O_2 による処理時間はなるべく短い方がよいことおよび H_2O_2 処理後発芽培養液でうすめることは極めて有効であることを知つた。

(5) H_2O_2 処理濃度

第1表に示したようにS株の発芽促進には1.5~2%の H_2O_2 処理が適当であることを知つたが念のためM株についても実験した。すなわち7~11日振盪培養した胞子懸液を所定量の35% H_2O_2 で処理した後、その一定量をPGCSL培養液に接種して1~2日間振盪した結果を第6表に示す。

Table 6. Effect of the H_2O_2 concentration on the germination ratio

No. of sample	1		2		3
	1	2	1	2	1
0	0	0	0	<1	2
1	0	15			35
1.5			13	45	47
2	23		18		41
2.5			0	10	18
3	0	0			

では H_2O_2 濃度が0.1%程度のものではよく発芽伸長したことから考えて10~20倍に希釈すればその害作用は除き得るものと想像されたので、発芽後の菌糸の伸長が阻害されなくなるに要する希釈倍数を知るために実験を行つた。

Table 2. Effect of shaking

Condition	Days		
	1	2	3
Stationary	0	<1	<1
Shaking	<1	12	15

しかし所要量の H_2O_2 添加によつて酸素ガスの発生著しく、大量処理の場合操作上の困難が予想されたので、添加すべき基質液に H_2O_2 の所要量を混合した後、胞子懸液に添加する方法を検討した2日目の発芽率は第4表のとおりであつて、基質液で予め希釈された H_2O_2 では刺戟が不十分となることが考えられ、 H_2O_2 による刺戟は瞬間的のもののように推定されたのでさらにつぎの実験を行つた。

(4) H_2O_2 による処理時間 (以下M株について)

稀胚芽エキスに7日培養の胞子懸液を2% H_2O_2 で処理し、酸素ガスの発生が止んだ後一定時間ごとにPGCSL培養液50ccに1ccづつ接種して振盪した場合1日後の発芽率を第5表に示す。

Table 5. Effect of time treated by H_2O_2

Treating time (hr)	0	0.5	1.0	1.5	8
Germinated spore (%)	43	39	28	30	22

すなわちM株においても発芽促進に適当な H_2O_2 濃度は胞子の状態によつて一定し難いが大体1.5~2%でよいものと考えられる。

刺戟に用いた H_2O_2 が発芽後の菌糸の伸長を著しく阻害することは(4)の実験において想像された。 H_2O_2 処理胞子をタンク培養に用いる場合処理後ただちに本培養液に接種すればその目的は達せられるが、処理後胞子が発芽し始めるまでに約10時間、発芽可能な胞子が発芽し了るまでには1日以上を要するものであり、この時間中タンクの保温、通気、攪拌をつづけることは不経済である。しかしさきに報告したように H_2O_2 添加培養液での発芽試験におい

(528)

(箕浦) *Eremothecium ashbyii* の孢子の発芽について(第4報)

〔IV〕工業的応用への基礎実験

(1) H_2O_2 処理孢子懸液の所要稀釈度

稀胚芽エキスに9日間振盪培養した孢子懸液に35% H_2O_2 を加えて液中濃度を1.5%ならしめ、発泡の止んだ後その所定量を稀胚芽エキス100ccに接種して20時間振盪した後、それぞれの培養から所定量を100ccの PGCSL 培養液に接種し4日間振盪し菌体ならびに B_2 収量を測定した。なお対照としては PGCSL 培養液に3日間振盪培養した菌体浮遊液を用いた。実験要領を第7表に、培養結果を第8表に示す。

Table 7. Magnification of inoculum

No.	Inoculum size of H_2O_2 -treated spore suspension		Inoculum size of germinated spores	
	cc/100cc	Magnification	cc/100cc	Magnification
1	4	26	1.25	80
2	10	11	0.5	200
3	20	6	0.25	400
4	30	4.3	0.16	625

すなわち H_2O_2 処理後5~10倍に稀釈すれば接種菌量が対照の $\frac{1}{45} \sim \frac{1}{170}$ の少量でも48時間目の菌体収量は対照を上廻り、96時間後の B_2 収量も対照と同程度であった。また孢子懸液の稀釈度の小さいものは培養初期の増殖はおくられるが B_2 収量は増加する傾向が

Table 8. Dry weight of mycelium and riboflavin yields (unit: mg%)

No.	Inoculum size of H_2O_2 -treated spores	Dry wt. after 28 hr on shaking	Inoculum size of germinated spores to PGCSL medium	Dry wt. of fungus		Yield of B_2	
				24hr	48hr	48hr	96hr
1	4.1	15	0.187	1157	1215	8.4	19.6
2	10.3	19	0.095	1053	1330	8.8	30.6
3	20.6	25	0.063	287	1345	12.2	32.4
4	30.9	32	0.051	60	1355	12.5	34.7
Control	Inoculated with 1% of mycelial suspension cultured for 3 days		8.7	1223	1152	11.6	34.0

認められた。

(2) H_2O_2 処理濃度が B_2 生産に及ぼす影響

孢子の発芽促進条件に関する上述の実験はおもに発芽率のみを対象に考えてきたが本来の目的は B_2 生産にあるので H_2O_2 処理濃度についてもべつに考慮する必要が認められる。そこで工業的応用を併せ考えてつぎのように実験を行った。

すなわち所定量の H_2O_2 で処理した孢子懸液(稀胚芽エキスに8日培養)5ccを45ccの稀胚芽エキスに接種して18時間振盪後その0.1ccを50ccの PGCSL 培養液に接種して5日間振盪培養を行った。この方法により孢子懸液300ccを H_2O_2 で処理後発芽培養液に接種して3Lとし、振盪発芽させた後液量1.5トンのタンクに移植するのと同じ割合となる。なお本実験の対照は PGCSL 培養液に2日間振盪した菌体を1%接種したものである。培養結果は第9表のとおりである。

Table 9. Effect of H_2O_2 concentration on the growth and riboflavin yield

No.	H_2O_2 %	Germinated spore, after 18hr		Dry wt. of fungus mg%		Yield of B_2 mg%		
		Ratio %	Dry wt. mg%	24hr	48hr	24hr	48hr	120hr
1	1	43	415	1385	1125	5.2	16.6	32.2
2	1.5	73	582	1241	1141	6.1	18.6	45.8
3	2	32	141	976	1146	3.1	23.6	62.1
Control	Inoculated with 1% of mycelial suspension cultured for 2 days			1288	1206	7.3	18.2	42.7

すなわち発芽率と B_2 生産量は必ずしも並行せず初期の発育の抑えられたものの方が最後の B_2 収量は大きくなる傾向が認められ、前回の試験における H_2O_2 処理後の稀釈度の小さいものと同様であった。いずれにしても

この実験によつて2トントラックに3Lの発芽孢子を接種すれば1%の菌体浮游液を接種するのと同等以上の B₂ が生産されること知つた。しかし實際上 3L の培養液を振盪することは操作上困難と考えられるので、この接種量をさらに小さくできないかと考えつぎの実験を行つた。

(3) 本培養液への接種量

稀胚芽エキスは10日間振盪した孢子懸液を1.5%の H₂O₂ で処理しその5ccを45ccの稀胚芽エキスに接種して18時間振盪後殺菌水で10倍にうすめ、50ccの PGCSL 培養液に0.1, 0.3および1.0ccづつ接種して5日間振盪培養を行つた。この条件で1.5トンの本培養液に対しそれぞれ0.3, 0.9および1.5Lの接種量に相当する。H₂O₂ 処理後18時間における発芽率は約30%であつた。対照には PGCSL 培養液に2日培養の菌体浮游液1%を接種した。培養結果は第10表のとおりである。

すなわちいずれの場合においても初期の発育はかなりおくれたが5日目の B₂ 収量は0.06%の種菌を用いた場合対照の2倍余となつた。これより2トントラックへの接種菌液は900ccで充分であることが分つた。

(4) 工業的培養液での実験

上述の PGCSL 培養液は B₂ 生産用には採算上とりあげることができないので魚粉および糖蜜より成る主醱酵培養液を用いた場合における H₂O₂ 処理濃度ならびに発芽孢子の接種量について試験した。

まず H₂O₂ 濃度については5%ブドウ糖加稀胚芽エキス³⁾に6日間振盪培養した孢子懸液を3分し、それぞれ1, 1.5および2%の H₂O₂ で処理し、ただちにその5ccを稀胚芽エキス45ccに接種して18時間振盪したものを魚粉5%, 糖蜜3% (転化糖として) の培養液100ccに0.02ccづつ接種して6日間培養した結果は第11表のとおりである。なお対照は PGCSL 培養液に3日間培養した菌体浮游液1%を接種した。

Table 11. Industrial effect of H₂O₂ concentration on the riboflavin yield

Inoculum	Myccerial suspension	Germinated spore		
Inoculum size %	1.0	0.02		
H ₂ O ₂ %		1.0	1.5	2.0
pH	7.7	7.2	7.3	7.4
Yield of B ₂ mg %	40.8	54.6	74.4	57.6
	45.0	60.0	57.0	62.4
	42.0	39.0	74.0	56.4
	42.0	59.4	72.0	57.6
	36.0	62.4	54.6	—
Mean	41.2	55.1	66.4	58.5
Ratio	100	134	166	142

すなわち B₂ 生産量の平均値を比較すれば発芽孢子を接種したもののほうが明らかに多く、有意差検定の結果も極めて有意と出た。しかもそのうち1.5% H₂O₂ 処理のものが最も良好な結果を与え、平均値の推定値を計算したところ95%の信頼限界において対照では 41.2±3.75 mg であるのに対し、1.5% H₂O₂ 処理孢子の場合は 66.4±7.71 mg %であつた。いずれにしても1.5% H₂O₂ で処理した孢子を10倍に希釈して振盪し、本培養液で5000倍に希釈しても充分培養できることを知つた。

さらに念のため発芽孢子の接種量と B₂ 生産量との関係を上と同じ培養液について試験した。

すなわち稀胚芽エキスに12日間振盪した孢子懸液を1.5% H₂O₂ で処理し PGCSL 培養液に20時間振盪発芽させたものの所定量を前回と同じ本培養液100ccに接種して5日間振盪培養を行つた。対照には前回と同条件のものを使用した。培養結果を第12表に示す。

すなわち B₂ 収量は発芽孢子を用いた場合、接種量が少いほど測定値のちらばりは大きくなるが、それらの平均値はいずれも対照より上廻り有意差検定の結果もその差は極めて有意と出た。

Table 10. Effect of inoculum size

No.	Inoculum size %	Dry wt. of fungus mg %		Yield of B ₂ mg %	
		24hrs	48hrs	48hrs	120hrs
1	0.02	128	1108	29.2	67.5
2	0.06	213	870	32.2	86.0
3	0.2	666	1050	30.8	79.1
Control	1.0	1320	1157	28.4	42.8

(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 による孢子の発芽促進条件に関しては培養日数を異にする孢子を用いて、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、実際上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。

また孢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*の培養に発芽孢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) 孢子の発芽促進には孢子形成培養液に10日前後振盪培養した孢子懸液に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。