

Aspergillus glaucus 群種の培養に関する基礎的研究

培地の糖濃度とアミノ酸類が生育に及ぼす影響について

高野 一郎, 矢吹 稔

(応用微生物学研究室)

Ichiro TAKANO and Minoru YABUKI : Studies on the Cultural Media
for the Growth of *Aspergillus glaucus* Group

(The influence of sugar concentrations and kinds of amino
acids in the media on the growth of the fungi)

緒 言

Aspergillus glaucus 種については以前から水分の少ない農水産物の乾燥製品または糖濃度が比較的高い加工食品から分離されたものが多く、これらの製品の外観、風味を損なう有害菌とされているものが多い。

中沢ら^(1,2)は乾燥葉たばこ、かつおぶし、中根⁽³⁾はエンシレージ、大槻⁽⁴⁾は光学製品のガラス、飯塚⁽⁵⁾綾野ら⁽⁶⁾はマロングラッセ、今井ら⁽⁷⁾はねり羊かん、飯塚⁽⁸⁾はタイ国産米の古粳から *Asp. glaucus* 群種を分離報告しており、宇田川⁽⁹⁾によれば貯蔵穀類の変質にはこれらの菌類が関与することが多いという。

著者の1人^(10,11,12)は *Asp. glaucus* 群種である *Asp. amstelodami* の孢子形成、孢子発芽、孢子の β -fructofuranosidase について研究を行ってきたがその群種の培養上の特性を明らかにするために *Asp. glaucus* 群種9菌株について培地に含まれる糖濃度およびアミノ酸が生育に及ぼす影響について実験を行ったのでそれらの結果について報告する。

実験材料と方法

(1) 使用菌株及び保存

Aspergillus amstelodami (本学部保存菌)

Asp. amstelodami IAM 2025

Asp. amstelodami IAM 2035

Asp. chevalieri IAM 2001

Asp. glaucus IAM 2124

Asp. mangini IAM 2030

Asp. medius IAM 2915

Asp. repens IAM 2005

Asp. ruber IAM 2029

Asp. oryzae (本学部保存菌)

以上10菌株をシヨ糖濃度 200g/l に調節した Czapek 寒天斜面に接種し、30°の恒温器中に培養したものを種

菌として用いた。

(2) 培地の調製に用いた薬品類は試薬1級を用い、アミノ酸類は味の素株式会社、協和醸酵工業株式会社、メルク社のもの及び Difco の Casamino acids を使用した。シヨ糖は試薬と市販グラニュー糖の転化糖量を比較した百瀬ら⁽¹³⁾の実験によればその含有量は 0.021~0.042%とわけて低く、我々の追試の結果も 0.025%であつたので市販グラニュー糖をシヨ糖として使用した。寒天は日本栄養化学株式会社の細菌用寒天を用いた。

(3) 菌体生育量の測定

寒天培地を直径 9 cm のペトリ皿に流し固めたのち、寒天斜面培養から白金鈎で培養をかきとり平板の中央に接種する。これを 30°の恒温器中で5日間培養ののち生じた集落の直径を測定し、ペトリ皿3枚の培養の平均値を菌体生育量とした。なお操作はすべて常法通り無菌的におこなつた。

実 験 結 果

(1) 培地のシヨ糖濃度と菌の生育量との関係

Czapek 寒天培地のシヨ糖濃度を3% (w/v) から 90% (w/v) まで段階的に変化させて培養した場合の菌体生育量を Fig. 1 に示した。*Asp. glaucus* 群種の菌株はいずれもシヨ糖40~60%のときに最もよい生育を示すのに *Asp. oryzae* は20%シヨ糖のとき最高生育量を示しそれ以上の濃度のシヨ糖によつていちじるしく生育は抑えられた。

Asp. glaucus 群種のうち *Asp. amstelodami* の3菌株、*Asp. repens* はシヨ糖濃度40%で *Asp. glaucus*, *Asp. mangini*, *Asp. ruber*, *Asp. chevalieri* は50%で、*Asp. medius* は60%でそれぞれ最高の生育量を示した。

シヨ糖3%では *Asp. oryzae* は最高生育量の70%の生育量を示すのに対して、*Asp. glaucus* 群種の菌は10~20%の生育量を示すにとどまつた。

Asp. glaucus 群種のうち *Asp. mangini*, *Asp.*

medius および *Asp. ruber* はショ糖 3% の培地での生育はきわめてわるく、その最高生育量も他の菌にくらべて劣っていた。

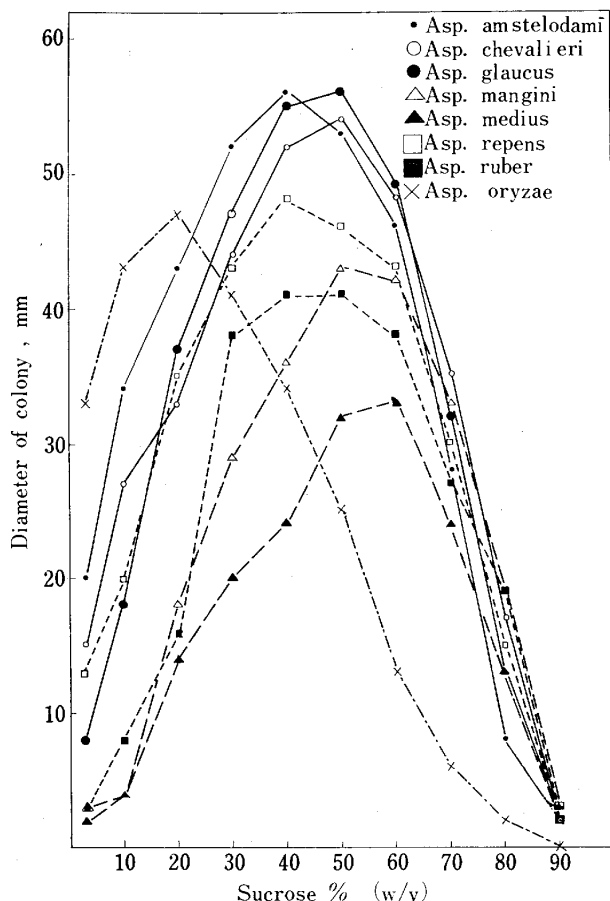


Fig.1. Influence of concentration of sucrose of the medium on the growth rate of *Asp. glaucus* group. Growth rate was estimated after 5 days incubation at 30°C on Czapek agar medium containing varying concentration of sugar.

Table 1. Several nitrogen sources of the medium and growth of fungi*.

Fungi	Growth Rate			
	NaNO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄	Urea	Casamino acids
Asp.mangini IAM2030	36	31	14	41
Asp.medius IAM 2915	24	20	15	42
Asp.ruber IAM 2029	41	37	26	64

* Growth rate was represented as diameter of colony of fungi. Basal composition of the medium was that of Czapek agar. Incubation time was 5 days at 30 °C.

(2) 培地の窒素原の種類をかえた場合の *Asp. mangini*, *Asp. medius*, および *Asp. ruber* の生育の状態

これら 3 菌種の生育は Czapek 寒天培地での生育量が他の菌種よりも劣っていたので窒素原を硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、尿素をそれぞれ 2g/l の濃度で、カザミノ酸 (Difco) 20g/l の濃度で含み、ショ糖は Fig.1 の結果から各菌種の最高生育量を示す濃度で含み、他の成分は Czapek 寒天培地と同じ濃度で含む培地を調製しこれに前記の菌を接種し、それらの生育量を測定した。Table 1 に示されるように Czapek 寒天培地に含まれる硝酸ナトリウムは硫酸アンモニウム、尿素よりもすぐれた窒素原であつたがアミノ酸混合物であるカザミノ酸がよりすぐれていた。しかしカザミノ酸を窒素原とした場合も *Asp. mangini*, と *Asp. medius* の生育は他の菌種にくらべて劣っていた。

(3) 単一アミノ酸を培地の窒素原とした場合の菌の生育量

カザミノ酸はすぐれた窒素原であることがわかつたのでその構成成分である単一アミノ酸を窒素原とした場合の菌の生育量について実験をおこなつた。

Table 2. Basal composition of the medium used in the experiment on the influence of amino acids on the growth rate of fungi.

(A)	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
	Sucrose	400g
	M/15 phosphate buffer (pH 6.0)	500ml
	Distilled water	120ml
	Agar	20g
(B)	Amino acid (Nitrogen content was adjusted to equivalent weight of that of (1g of L-arginine-HCl) Distilled water 100 ml.	

(A) and (B) were separately sterilized and mixed prior to use.

著者の 1 人(11)がすでに報告したように *Asp. glaucus* 群種に属する *Asp.amstelodami* の ascospore の発芽と菌体の生育が 1g/l の L-アルギニン塩酸塩によつてよく行なわれることが知られているので培地に加える各アミノ酸の濃度は 1g/l の L-アルギニン塩酸塩を含む窒素の量と同一量の窒素を含むように調節した。実験に用いたアミノ酸の種類は Fig.2 に、培地組成は Table 2 に示した。

なおアミノ酸を含む培地の殺菌に当つては糖とアミノ酸の反応による着色物質の生成を防ぐためにアミノ酸溶液と他の成分の溶液を別の容器中で殺菌し、ペトリ皿に流し固める直前に混和して使用した。

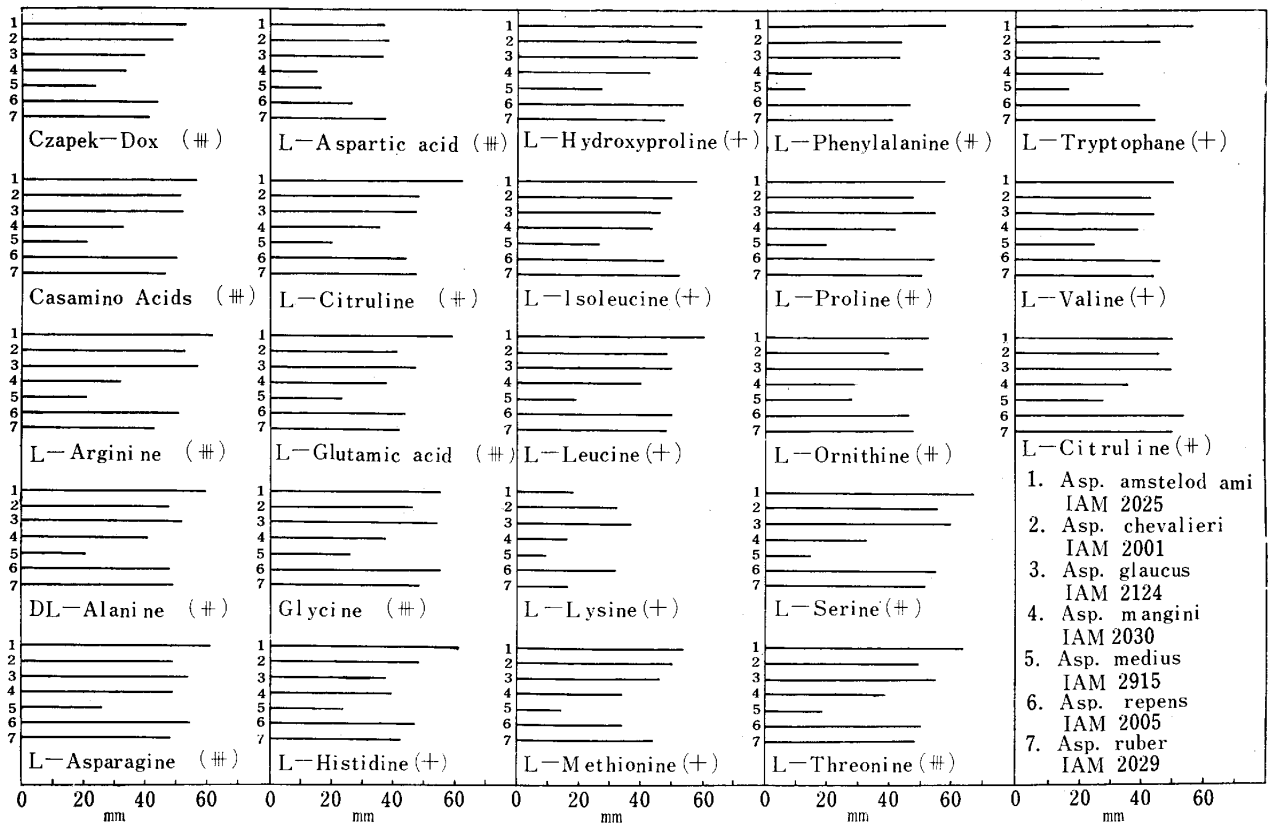


Fig. 2. Influence of various kinds of amino acids on the growth rate of *Asp. glaucus* group. Sodium nitrate was replaced by individual amino acid and growth rate was estimated after 5 days incubation at 30°C

実験結果は Fig.2 に示されるようにカビの生育は集落直径でみる限り L-リジンを除き他のアミノ酸はいずれもよく生育を支えるが、Cochrane⁽¹⁴⁾ も指摘するようにカビの生育量は集落直径、菌体乾物量の何れにより測定しても絶対的尺度は存在せず、この実験の場合も菌糸の密度を考慮した場合は Table 3 に示すように判断した。

Table 3. Influence of amino acids on the growth rate of *Aspergillus glaucus* group.

Evaluation	Amino Acids
Much Suitable	arginine, asparagine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, threonine, (casamino acids, sodium nitrate)
Suitable	alanine, citruline, ornithine, serine, proline, phenylalanine
Not Suitable	cystine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, tryptophane

すなわち *Asp. glaucus* 群種の生育に好適と思われる窒素原はアルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシンおよびスレオニンであり、ついでアラニン、シトルリン、オルニチン、セリン、プロリン、フェニルアラニンがややよく、シスチン、ヒスチジ

ン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニンおよびトリプトファンはカビの生育に適するとは思われなかった。しかしいずれの単一アミノ酸も硝酸ナトリウム、カザミノ酸にくらべると窒素原としての効果は劣っていた。

考 察

Asp. glaucus 群種の培養、保存には Thom ら⁽¹⁵⁾によれば20%ショ糖またはブドウ糖を加えた Czapek 培地がよいとされているが、培地の糖濃度と菌の生育との関係についての詳細な報告はすくない。

飯塚⁽⁵⁾はマロングラッセから分離し、*Asp. mangini* と同定した菌がショ糖を60%になるように添加したこうじ汁に最もよく生育したとのべており、今井ら⁽⁷⁾はねり羊かんから分離した *Asp. medius* 類縁菌が食塩濃度1~2モルの培地に最もよく生育したと報告している。すでに緒論でのべたように *Asp. glaucus* 群種は浸透圧の高い培地によく生育することは以前から多くの観察があるが主として形態学的な観察に重点がおかれている。著者らは *Asp. glaucus* 群種7種について培地の糖濃度を段階的に変化させたものを用意し菌の生育量との関係を求めたがその結果はきわめて各菌ともよく類似した傾向が見ら

れた。すなわち Fig.1 にみられるようにシヨ糖濃度40～60%の部分に生育の最高点を持つ山型の曲線を示している。実験に供した菌株数が多くはないので断定はできないがシヨ糖40%, 50%および60%附近に最大生育量を示す3種のグループに細分できると思われる。

Asp. mangini と *Asp. medius* についての所見は飯塚(5), 今井ら(7)の前記の報告の結果ときわめてよく一致していた。さらに著者の一人(11)は *Asp. amstelodami* の ascospore の発芽率と培地の糖濃度との関係をしらべたところその発芽率曲線は生育曲線ともよく一致することを見出している。

Asp. glaucus 群種ではない *Asp. oryzae* は Fig.1 に示されるようにシヨ糖20%のときに最もよく生育し, *Asp. glaucus* 群種とは明らかに異つた生理的性質を示している。

Asp. mangini, *Asp. medius* および *Asp. ruber* は Czapek 培地の生育が他の菌にくらべて劣つていたので培地の窒素原として硝酸ナトリウム, 硫酸アンモニウム, 尿素およびカザミノ酸を用いて比較したがカザミノ酸が最もすぐれた窒素原であつた。飯塚(5)は *Asp. mangini* の生育には Czapek または Pfeffer 培地よりもこうじ汁がよかつたとのべ, 今井ら(7)は *Asp. medius* 類縁菌の生育には麦芽汁を用いているがこれらのことはこれらの菌が天然培地またはカザミノ酸に含まれる窒素成分, あるいは微量成分を要求するのではないかと考えられる。

窒素原としてのアミノ酸はアルギニン, アスパラギン, アスパラギン酸, グリシン, スレオニンがよく, アラニン, シトルリン, オルニチン, フェニルアラニン, プロリン, セリンがこれにつぎ, 他のアミノ酸は培養に適当な窒素原とは考えられなかつた。

カザミノ酸, アルギニンは *Asp. amstelodami* の ascospore の発芽に好結果を与え(11), アルギニンは *Asp. amstelodami* の conidia の呼吸を増大せしめる(10)と報告されているが *Asp. glaucus* 群種の生育に対しても好適であることが示された。

終りに菌株を御分与頂きました東京大学応用微生物研究所飯塚広教授に厚く感謝し, 実験に助力された鈴木敏夫氏に感謝します。

要 約

Aspergillus glaucus 群種である *Asp. amstelodami*, *Asp. chevalieri*, *Asp. glaucus*, *Asp. mangini*, *Asp. medius*, *Asp. repens*, 及び *Asp. ruber* の7菌種についての培地の糖濃度, 培地の窒素原と菌の生育との関係について実験をおこなつた。

Asp. glaucus 群種は培地のシヨ糖濃度40～60%附近

が生育に好適であつて, これより低いあるいは高い濃度では生育は劣る。

Asp. oryzae は培地のシヨ糖濃度20%で最高の生育を示し, 90%では全たく生育しないが, *Asp. glaucus* 群種はシヨ糖90%でもわずかではあるが生育を示しこの群種の耐滲透圧性を現わしている。

培地の窒素原にはカザミノ酸, アルギニン, アスパラギン, アスパラギン酸, グルタミン酸, グリシン, スレオニン及び硝酸ナトリウムが適当であつた。

アラニン, シトルリン, オルニチン, フェニルアラニン, プロリン, セリン, 硫酸アンモニウム, 尿素等も窒素原として利用された。

文 献

- (1) 中沢亮治, 武田義人, 岡田董勝, 霜三雄: 農化, 10, 135 (1934)
- (2) 中沢亮治, 武田義人, 末松勝利: 農化, 10, 1137 (1934)
- (3) 中根正行: 応用菌学, 1, 17 (1949)
- (4) 大槻虎男, 須田善子, 斉正子: 資源研彙, 17—18, 69 (1950)
- (5) 飯塚広: 農化, 26, 68 (1952)
- (6) 綾野雄幸, 牧田胖: 千葉大園芸学報., 5, 1 (1957)
- (7) 今井寛, 岡智: 農化, 29, 201 (1955)
- (8) 飯塚広: 農化, 31, 454 (1957)
- (9) 宇田川俊一: 醸酵協, 20, 1 (1962)
- (10) 矢吹稔: 農化, 37, 272 (1963)
- (11) 矢吹稔: 農化, 38, 407 (1964)
- (12) 矢吹稔: 農化, 39, 138 (1965)
- (13) 百瀬勉, 富田ジュン, 矢野良子: 分析化学, 13, 877 (1964)
- (14) V.W. Cochrane: "Physiology of Fungi", John Wiley & Sons, Inc., New York, p.5 (1958)
- (15) C. Thom, K. Raper: "A Manual of the Aspergilli", p.122 (1945)

Summary

Molds of *Aspergillus glaucus* group: *Asp. amstelodami*, *Asp. chevalieri*, *Asp. glaucus*, *Asp. mangini*, *Asp. medius*, *Asp. repens*, and *Asp. ruber*, were cultivated on agar media containing varying concentrations of sugar or many kinds of nitrogen sources including amino acids, and suitable constitution of cultural media for these group of fungi were studied.

Favorable concentration of sugar in the media is lying in 40 to 60% was found, and these molds tested

exhibited growth on the medium contained 90% of sucrose, however, *Asp.oryzae* could not show any growth on the same medium.

Nitrogen sources suitable for growth of these fungi

were arginine, asparagine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, threonine, and casamino acids. Sodium nitrate was also found to be favorable nitrogen source.