ペプトン-グルコース培地に培養した場合の菌糸群の状態を, その懸垂液の粘度によって示した。

この結果から“非凝集型”の場合にも培養液の粘度が増加すると, 菌糸群の状態は, pellet 状から次第に pulp 状になってゆくが, 粘度の影響は, “凝集型”の場合程著しくないことが知られる。すなわち“非凝集型”の場合には, 孢子乃至菌糸には凝集性はなく, 個々の孢子はそれぞれ独立して発芽し, 菌糸が分岐伸長を重ねる間に, 培養液の適当な往復又は回転運動 (最も pellet を形成しやすい運動状態は如何なるものであるかはまだ不明である) によって, 次第に密な球状にまとめられることによって pellet が形成されるのであるが, 培養液の粘度の増加は, この pellet 形成作用を弱めるように働くものであると考えられる。

IV 結 論

以上の結果に基づき, 次のことが結論される。

(1) 糸状菌の液内培養に際し, 培養系内における菌糸群の状態は培養液の粘度によって著しく影響される。すなわち, 低粘度の場合には所謂 pellet 状となる菌糸群も, 増粘剤を添加して培地の粘度を高めると所謂 pulp 状を呈する。

(2) このような粘度の影響は, “凝集型”の菌株において特に著しくみとめられる。すなわち, “凝集型”の pellet 形成の主因である孢子乃至菌糸の凝集が, 培養液の粘度の増加によって妨げられるためであると考えられる。

(1) 高橋穰二, 山田浩一: 本誌, 33, 707(1959).

501 (1959).

(2) 高橋穰二, 山田浩一, 朝井勇宣: 本誌, 32,

(3) 高橋穰二, 山田浩一: 本誌, 34, 100(1960).

糸状菌の液内培養における物理的諸因子の影響について (第 5 報)*

Asp. niger NRRL-337 の生育及びアミラーゼ

生産に及ぼす培地粘度の影響について

高橋穰二, 町田晴夫, 山田浩一 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 35 年 1 月 19 日 受 理

I 緒 言

我々は前報⁽¹⁾において *Asp. niger* NRRL-337 の液内培養に際し, 培養液の粘度を高めることにより, 孢子乃至は菌糸の凝集性が弱まり, 凝集性に基づく pellet の形成が妨げられて, いわゆる pulp 状の菌糸群が得られることを明らかにした。このような菌体の状態の変化は, 菌の生育及び生産物にかなりの影響を及ぼすことが予想されるので, 本報では培地粘度を種々に変化させ, 菌の生育及び液化アミラーゼ生産に及ぼす影響を検討した。

II 実 験 方 法

使用菌株: *Asp. niger* NRRL-337.

使用培地: 基礎培地としてペプトン培地⁽²⁾を使用した (但し, 炭素源として可溶性澱粉 2% を用い, pH 調節

第 1 表 増粘剤の添加量と粘度との関係

増 粘 剤	添加量 (%)	粘度 (c. p.)
無 添 加	0	1.0
デキストラン	0.8	4.1
"	2.0	20.2
"	3.0	50.3
C. M. C.	1.0	28.4
メチルセルロース	0.7	3.3
"	1.8	13.0

の為 CaCO_3 0.8 g を添加した). これに増粘剤として, 主としてデキストランを添加し, 時にメチルセルロース (marpolose), C. M. C. 等も用いた。増粘剤の添加量と培地粘度との関係は第 1 表に示す通りである。

培養条件: 500 ml 肩つきフラスコに液量 100 ml を入れ, 30°にて 130 oscills/min の reciprocal shaker を用いて培養した。

孢子懸濁液の調製及び接種法: 第 1 報⁽²⁾と同様に行い, 接種量は全実験を通じて 1.5×10^5 conidia/ml of medium とした。

液化アミラーゼ測定法: Sandstadt 改良法による富金原法⁽³⁾を用

* Studies on the Effects of Some Physical Conditions on the Submerged Mold Culture. Part V. Effects of the Culture Fluid Viscosity on the Growth and the Amylase Production of *Asp. niger* NRRL-337.

By Jōji TAKAHASHI, Haruo MACHIDA and Kōichi YAMADA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

い、次の如く行った。2% 可溶性澱粉溶液 (100 ml 中 pH 4.8 の 2N-酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 5 ml を含む) 20 ml を大型試験管にとり、これに供試酵素液と水を加え 30 ml とし、30° にて作用させ、0.5~1 分毎に作用混液の 0.5 ml をピペットでとり、5 ml のヨード溶液 (溶液 1 l 中, I 0.088 g, KI 40 g を含む) 中に速かに注入し、その呈色を検べ、標準色 (0.01 N-HCl 100 ml 中 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 25 g, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 3.84 g を含む) に達するに要する時間を測定する。この時間を分で表わしその逆数を 100 倍したもので単位を表わした。すなわち 100 分を要して標準色に達したものを 1 単位とする。培養液中の液化アミラーゼは培養濾液をそのまま供試酵素液として用いたが、菌体内アミラーゼは洗滌菌体を硫酸デシケーターで乾燥後粉碎して、水で一定量に fill up し、その上澄を供試酵素液とした。

粘度測定法：Ostwald 粘度計を用い、30° にて測定。

菌体量測定法：菌体は生理的食塩水で 2 回洗滌後、蒸留水で 1 回洗滌し、濾紙上に集め、硫酸デシケーター中にて減圧乾燥する。この際菌体と共に CaCO_3 が残存するので、乾燥後一定量の 1 N-HCl で溶出し、NaOH で滴定して CaCO_3 量を求め、それを減じたものを菌体量とする。

III. 実験結果

1. 菌体の生育に及ぼす培地粘度の影響 第 1 表に示した培地のうち、増粘剤無添加のもの、及びデキストランの添加によって粘度を高めた 3 種の培地 (即ち、それぞれの粘度は 1 c. p., 4.1 c. p., 20.2 c. p. 及び 50.3 c. p. である) を用いて培養を行った。培養系内における菌糸群の形態は前報⁽¹⁾で述べた如く、培地粘度が高まるにつれて次第に, pellet 状から pulp 状となるが、その状態は第 1 図の写真に示す通りである。

これらの形態及び培地粘度の相違に基づく菌体の生育の相違を比較するには、各々の場合における growth

rate 或は糖消費速度を比較するのが普通であるが、本実験に於ては、それらの数値の経時的変化が激しく、培養の全期間を通じて一義的な値を得ることが出来ないで、ここでは単位消費糖あたりの菌体生成量 ($\Delta W/\Delta S$) の経時的変化によって菌体の生育状況を比較することとした。その結果は第 2 図に示す通りである。この図から知られるように、培養初期では培地粘度の低い程 $\Delta W/\Delta S$ は大きい、培養後期に至る

(1)

(2)

(3)

(4)

第 1 図 培養液の粘度と菌糸群の形態との関係 (デキストラン添加の場合)

(1) 増粘剤無添加 粘度 1 c. p. (2) デキストラン 0.8% 添加 粘度 4.1 c. p.
(3) デキストラン 2% 添加 粘度 20.2 c. p. (4) デキストラン 3% 添加 粘度 50.3 c. p.

第2図 ΔW/ΔS 単位消費糖に対する菌体生成量の経時的变化

●—● 1 c.p. x---x 4 c.p. △---△ 20 c.p. ○---○ 50 c.p.

第3図 最大菌体収量に及ぼす粘度の影響

と、先ず 1 c.p. の場合に急激な減少がみとめられ、それよりやや後れて 4 c.p. の場合に同様な傾向が現われるが、20 c.p. 及び 50 c.p. の場合にはかような減少傾向はみとめられない。このことは、培養系内における菌糸群の形態と密接な関係があるものと考えられ、第 1 図に示した如く、1 c.p. の場合には大きく密な pellet が形成され、4 c.p. の場合にも小さいがやはり pellet が形成されているのに対し、20 c.p. 及び

50 c.p. の場合には、菌糸は pulp 状に分散しているので、pellet を形成する場合はその成長に伴い、糖の利用率が急速に低下することを示すものと考えられる。

又、 ΔW の総計である菌体の総収量を比較すれば、第 3 図の如き曲線が得られ、粘度 4 c.p. の場合に菌体量が最大となることが知られる。即ち、本実験の如く股粉 2% という条件の下では（炭素源の濃度が変われば、この曲線の形もまた変わることは、上述の $\Delta W/\Delta S$ の経時的变化から考えても明らかである）菌体収量という観点だけからすれば、培地の粘度は 4 c.p. が最適であることとなる。

2. 液化アミラーゼの生産に及ぼす培地粘度の影響 次に培地粘度の変化による菌糸群の状態の相違が、液化アミラーゼの生産にどのように影響するかについて検討した（使用した培地の種類及び各種の実験条件は前述の場合と全く同様である）。4 種の培地粘度のそれぞれの場合における菌

体の増殖状態及び菌体内、菌体外アミラーゼの経時的变化は第 2 表に示す通りである。第 1 図(1)及び第 1 図(4)から明らかなように、培地粘度が 1 c.p. の場合と 50 c.p. の場合とでは菌糸群の状態は全く対照的である。この相違に基づくアミラーゼ生産の相違を比較するために第 2 表の結果によって菌体外、菌体内及び全アミラーゼの変化を経時的に plot すれば第 4 図(1 c.p., pellet 状の場合)及び第 5 図(50 c.p., pulp 状の場合)の如き曲線が得られ、両者の最も著しい相違は菌体内アミラーゼの曲線に見出される。即ち、1 c.p. の pellet 状菌糸の場合には残糖が殆んど零となる培養 46 時間目位まで菌体内アミラーゼは急速に蓄積され、それ以後かなり急速に減少する。それに対し、50 c.p. の pulp 状菌糸の場合には培養 30 時間目位から 70 時間目位まで菌体内アミラーゼは殆んど増減せず一定しており、しかもその量は前者の場合の最高値の約半量にすぎない。又菌体外アミラーゼについては培養の初期から pulp 状の場合の方が pellet 状の場合に比して多く、その増加も急速である。

第 2 表 培養経過に及ぼす粘度の影響

粘度	時 間		26	30	40	50	60	70	90	120
1 c. p.	菌 体 外 ア ミ ラ ー ゼ	A_0	1.4	1.8	4.0	6.2	—	12.5	15.4	18.2
	菌 体 内 ア ミ ラ ー ゼ	A_i	1.3	1.1	3.9	5.4	—	3.3	—	0
	全 ア ミ ラ ー ゼ	$A_0 + A_i = A$	2.7	2.9	7.9	11.6	—	15.8	—	18.2
	菌 体 量 (g)	W	0.23	0.35	1.03	1.15	1.15	—	—	—
	単位菌体量当り菌体外アミラーゼ	A_0/W	6.1	6.2	3.9	5.4	—	9.8	13.4	15.8
	単位菌体量当り菌体内アミラーゼ	A_i/W	5.6	3.1	3.8	4.7	—	2.9	—	0
	単位菌体量当り全アミラーゼ	A/W	11.7	9.3	7.7	10.1	—	12.7	—	15.8
4 c. p.	菌 体 外 ア ミ ラ ー ゼ	A_0	2.1	3.8	7.0	9.8	13.2	16.6	20.0	22.2
	菌 体 内 ア ミ ラ ー ゼ	A_i	1.8	2.4	3.7	5.0	4.3	2.5	—	0
	全 ア ミ ラ ー ゼ	$A_0 + A_i = A$	3.9	6.2	10.7	14.8	17.5	19.1	—	22.2
	菌 体 量 (g)	W	0.55	0.89	1.40	1.40	—	—	—	—
	単位菌体量当り菌体外アミラーゼ	A_0/W	4.2	4.3	5.0	7.0	9.4	11.8	14.3	15.9
	単位菌体量当り菌体内アミラーゼ	A_i/W	3.6	2.7	2.6	3.6	3.1	1.8	—	0
	単位菌体量当り全アミラーゼ	A/W	7.8	7.0	7.6	10.6	12.5	13.6	—	15.9
20 c. p.	菌 体 外 ア ミ ラ ー ゼ	A_0	2.8	4.4	7.2	10.8	14.3	17.0	20.0	22.2
	菌 体 内 ア ミ ラ ー ゼ	A_i	2.3	2.7	3.3	3.5	3.5	3.3	—	0
	全 ア ミ ラ ー ゼ	$A_0 + A_i = A$	5.1	7.1	10.5	14.3	17.8	20.3	—	22.2
	菌 体 量 (g)	W	0.63	0.96	1.20	1.20	—	—	—	—
	単位菌体量当り菌体外アミラーゼ	A_0/W	4.5	4.6	6.0	8.9	11.8	14.0	16.5	18.5
	単位菌体量当り菌体内アミラーゼ	A_i/W	3.5	2.8	2.8	2.9	2.9	2.7	—	0
	単位菌体量当り全アミラーゼ	A/W	8.0	7.4	8.8	11.8	14.7	16.7	—	18.5
50 c. p.	菌 体 外 ア ミ ラ ー ゼ	A_0	2.8	3.9	7.0	10.6	—	16.6	20.0	22.2
	菌 体 内 ア ミ ラ ー ゼ	A_i	2.1	2.5	3.1	3.3	3.4	2.6	—	0
	全 ア ミ ラ ー ゼ	$A_0 + A_i = A$	4.9	6.4	10.1	13.9	—	19.2	—	22.2
	菌 体 量 (g)	W	0.52	0.81	0.93	0.93	—	—	—	—
	単位菌体量当り菌体外アミラーゼ	A_0/W	5.4	4.8	7.5	11.4	—	17.8	—	24.1
	単位菌体量当り菌体内アミラーゼ	A_i/W	4.0	3.1	3.3	3.6	3.7	2.8	—	0
	単位菌体量当り全アミラーゼ	A/W	9.4	7.9	10.8	15.0	—	20.6	—	24.1

一方全アミラーゼについては、糖が消費しつくされる迄は pellet, pulp 共にほぼ同量の生成がみとめられるのに対し、糖消費後は pellet 状の場合の増加量は pulp 状の場合に比し著しく少ない。これらのことは 50 c. p. の pulp 状のものでは菌体内で生産されたアミラーゼの培養液中に移行する速度が 1 c. p. の pellet 状の場合に比して速く、しかもそれにはほぼ見合うアミラーゼが菌体内でかなり後期に至る迄生産されていることを示すものと考えられる。しかるに 1 c. p. の pellet 状の菌糸群では菌体内で生成されたアミラーゼの菌体外への移行はやや遅く、最初の間はアミラーゼは菌体内に蓄積されるが、糖が消費しつくされると蓄積された菌体内アミラーゼは次第に減少する。即ち、蓄積された菌体内アミラーゼの培養液中への移行を補うだけのアミラーゼが生産されないことを示すと考えられる。

以上 pellet 状菌糸と pulp 状菌糸との間にみとめられたアミラーゼ生成状況の相違は、4 c. p. の場合と 20 c. p. の場合との比較に於いてもみとめられる。即ち、4 c. p. では第 1 図 (2) にみられる如く、菌糸群は pellet 的傾向がつよいので、そのアミラーゼ生成状況も 1 c. p. の場合と類似しており、20 c. p. では第 1 図 (3) の如く pulp 的性状がつよいので、アミラーゼの生産は 50 c. p. のものに近似した傾向をたどっている。

次に単位菌体量あたりの

第 4 図 培養時間とアミラーゼ生成量との関係 (1 c. p. の場合)

×——× 全アミラーゼ ○——○ 菌体外アミラーゼ △——△ 菌体内アミラーゼ

第5図 培養時間とアミラーゼ生成量との関係 (50 c. p. の場合)

x---x 全アミラーゼ o---o 菌体外アミラーゼ Δ---Δ 菌体内アミラーゼ

第6図 菌体内アミラーゼの減少及び全アミラーゼの増加に及ぼす菌糸の形態の影響

Δ---Δ 全アミラーゼ o---o 菌体内アミラーゼ Δ---Δ 菌体外アミラーゼ

ーゼの生産が高まることを表わしている。

3. 増粘剤の種類の影響 これ迄の実験は増粘剤としてすべてデキストランを用いてきたので、以上の結果がデキストランの添加による化学的な影響である恐れがあるので、その点を明らかにするため増粘剤を変えて実験を行った。増粘剤としては第3表に示す如くメチルセルロース (添加量 0.7% 及び 1.8%) 及び C. M. C. (添加量 1%) を使用した。菌糸群の状態は第8図に示す通りで、第1図に示したデキストラン添加の場合と、それぞれの対応する粘度においてはほぼ一致している。又最大アミラーゼ量及び最大菌体量をデキストラン添加の場合と、それぞれ対応する粘度において比較すると (第3表), デキストラン添加の場合と比べ殆んど同様であるか、或はわずかにそれを上廻る程度であり、増粘剤無添加のものと比較して粘度の影響としては全く同一の傾向にあることが知られる。従ってアミラーゼ生産に及ぼす前述の如き影響はデキストランの化学的な影響ではなく、粘度の増加に伴う菌糸の状態の変化に基づくものであることが知られる。

アミラーゼ生成 (アミラーゼ量を同時間に存在する菌体量で割ったもの) についても、上述の場合と同様の傾向がみとめられる。即ち 50 時間目及び 70 時間目 (アミラーゼ生成状況の相違は、この期間において最も顕著にみとめられる) の菌体内及びアミラーゼ量と培地粘度 (即ち菌糸群の状態と考えてよい) との関係を plot すれば第6図が得られる。本図において、先ず菌体内アミラーゼについては 1 及び 4 c. p. の pellet 状のものでは 50 時間目から

70 時間目の間に大巾な減少を示しているが、20, 50 c. p. の pulp 状のものでは、わずかの減少しかみられない。又全アミラーゼについても、粘度が高くなる程この期間における増加量が多いことが知られる。即ち前述の如く pellet 状菌体をなすものでは、この期間に菌体外へのアミラーゼ放出に見合う菌体内でのアミラーゼ生産が行われない事を示している。このことは菌体が pulp 状になる程アミラーゼ生産は長期間にわたって活潑に行われることを示し、従ってアミラーゼの単位菌体あたりの最大生産量は、培地粘度が高くなり、菌の形状が pulp 的になる程高い値を示すことが予想される。第2表の結果に基づいて単位菌体量あたりの最大アミラーゼ量と粘度との関係を plot すれば第7図の如き曲線が得られ、明らかに菌体が pulp 状になる程アミラ

第 7 図 単位菌体量当りのアミラーゼ生成量に及ぼす菌糸形態の影響

(1)

(2)

第 8 図 培養液の粘度と菌糸群の形態との関係 (メチルセルロース添加の場合)

(1) メチルセルロース 0.7% 添加, 粘度 3.3 c. p. (2) メチルセルロース 1.8% 添加, 粘度 13.0 c. p.

菌体にあつては残糖がほぼ零となるまでアミラーゼの急激な蓄積がみとめられ, その後急激に減少する。それに対し pulp 状の菌体では, 菌体内アミラーゼの蓄積は少ないが, 培養の 30 時間目から 70 時間目まで, かなり長期にわたりほぼ一定している。

(3) 単位菌体量あたりの最大アミラーゼ力価は, 低粘度に培養した pellet 状をなすものが低く, 高粘度の pulp 状のものほど高い値を示す。

(1) 高橋穰二, 小佐野吉泰, 山田浩一: 本誌, 34, 440 (1960)。

(2) 高橋穰二, 山田浩一: 本誌, 32, 501 (1958)。

(3) 富金原孝: 醸酵協会誌, 13, 50 (1955)。

第 3 表 アミラーゼ生成に及ぼす増粘剤の種類の影響

増粘剤	濃度 %	粘度 c. p.	最大アミラーゼ (A)	最大単位菌体量 (W)	最大アミラーゼ (A/W)
メチルセルロース	0.7	3.3	22.2	1.49	14.9
"	1.8	13.0	26.6	1.31	19.6
C. M. C.	1.0	28.4	22.2	—	—
無添加	0	1.0	18.2	1.15	15.8
デキストラン	0.8	4.1	22.2	1.40	15.9
"	2.0	20.2	22.2	1.20	18.5

IV 結 論

以上の結果を要約すれば, 次のことが結論される。

(1) 菌体の生育に及ぼす培地粘度の影響を, 単位消費糖あたりの菌体生成量 ($\Delta W/\Delta S$) によって比較すると,

a) $\Delta W/\Delta S$ は培地粘度が低く, 菌体が pellet 状となる時は培養初期においては大きい, pellet の生長につれて急激に減少する。

b) 培地粘度が高く, 菌糸群が pulp 状となる時は

$\Delta W/\Delta S$ は培養の全期間を通じて殆んど一定である。

(2) 液化アミラーゼの生成に及ぼす培地粘度及び菌糸群の状態の影響は, 菌体内のアミラーゼ量において最も顕著に現われ, pellet 状の