

II-535

白色腐朽菌 *P. chrysosporium* の増殖特性に関する研究

京都大学工学部 学生員 呉 楓 正 員 尾崎博明
 // 正 員 寺島 泰 学生員 大河内由美子
 (株) 鴻池組 正 員 前田かおり

1. はじめに

白色腐朽菌に属する *Phanerochaete chrysosporium* (以下 *P. chrysosporium*) は、リグニン分解能力を有する代表的な微生物である。リグニンの分解は、主要な栄養源 (C源、N源あるいはS源) が欠乏する頃に、白色腐朽菌が細胞外へ分泌するペルオキシダーゼ (LiPとMnP) に依存し、同じ酵素系の働きによってリグニンのみならず、多環芳香族化合物や有機塩素化合物等の種々の生物学的難分解性物質がCO₂に無機化されることが報告されている¹⁾。*P. chrysosporium*は難分解性汚染物質の微生物分解に大きな役割を果たしていくものと期待し、本研究では、実際の処理に用いるための基礎として、当菌の培養と増殖特性について検討を行った。

2. 白色腐朽菌 *P. chrysosporium* の形態特性 : *P. chrysosporium*は分類学的には担子菌亜門菌草綱に属している。担子菌類の生活環として、まず子実体に着生する担子胞子の発芽により一次菌糸が生育する。一次菌糸の接合・交配が起こり、二次菌糸が形成される。また一次菌糸、二次菌糸は一部が自発的に分節して分生胞子を形成し、無性的に生殖することができる²⁾。*P. chrysosporium*の形態特性を観察するために、スライド培養³⁾を行い、培養10日後に位相差顕微鏡により観察したところ、胞子、太さ約2~3μmの菌糸、菌糸構造内の隔壁が見られ、子実体を作らなくても容易に分生子を形成することが確認できた。顕微鏡写真の例は講演時に示す。

3. *P. chrysosporium* の増殖に及ぼす初期胞子濃度の影響 :

3-1. 実験方法 : 白金耳を用いて菌株から採取した胞子を滅菌水に入れて胞子懸濁液 (胞子濃度は 5×10^6 個/mL) を作成し、それを10倍、100倍に希釈した。次に、各胞子濃度につき3個ずつ、滅菌した100mL三角フラスコ中の液体培地に100μLずつ接種した。培養温度は30℃とし、3日間、6日間、12日間経過後に、菌体の乾重量を測定した。用いた液体培地の組成を表1に示す。胞子濃度は650nmにおける吸光度によって決定した。

3-2. 実験結果と考察 : 菌体重量の経時変化を図1に示す。増殖初期では、胞子数が多いほど増殖が速い傾向があったが、6日目以降初期胞子数と菌体量の間には有意な関係が見いだせない。したがって、菌糸が十分発達した後では増殖は植菌時の胞子数に依存しないと考えられる。

4. *P. chrysosporium* の増殖に及ぼす温度の影響 :

4-1. 実験方法 : 麦芽エキス20g/Lを含む液体培地を50mLずつ100mLの三角フラスコに分注し、オートクレーブで滅菌後、胞子懸濁液100μLを接種した。インキュベーター内において5、10、15、20、25、30、35、40、45℃の各温度で2個ずつ培養し、8日経過後にそれぞれの菌の乾重量を測定した。

4-2. 結果と考察 : 菌体増殖に及ぼす培養温度の影響を図2に示し、各温度における値は25℃の菌重量を1として重量比で比較している。この結果から、菌の増殖には30℃付近が最適であると考えられる。また15℃以下では菌の増殖が著しく抑制され、30℃以上でも増殖量は低下している。だが、胞子の生成は40℃前後において最も活発であるように見受けられた。

組成	濃度(1L中)
Glucose	10g
酒石酸アンモニウム	0.22g
0.1M Na-succinate buffer	100mL
Basal Medium	100mL
KH ₂ PO ₄	2.0g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5g
CaCl ₂	0.1g
Thiamine HCl	0.005g
Mineral solution	70mL

表1 Kirkらによる培地の組成

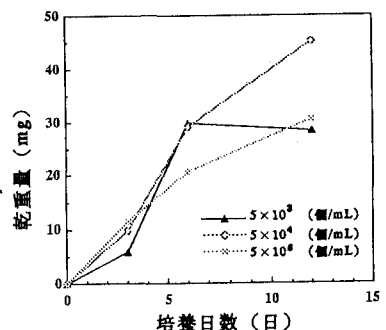


図1 *P. chrysosporium* の増殖に及ぼす植菌時の胞子濃度の影響

5. *P. chrysosporium*の増殖に及ぼすpHの影響：

5-1. 実験方法：糸状菌の培養によく用いられるCzapek液体培地³⁾を1NのHClと1NのNaOHを用いてpHを3.0、3.5、4.0、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0に調整し、それぞれ20mLずつを100mLの三角フラスコに分注し、滅菌後に植菌して、30℃で培養した。13日間の培養後pHによっては菌体増殖量が少ないためローリー法により測定した蛋白量を菌体量に代用した。

5-2. 結果と考察：実験結果を図3に示す。この図より、培地のpHは菌の増殖に大きく影響し、*P. chrysosporium*の最適pHは4付近であると考えられる。また、pH5.5以上では菌の成長は著しく抑制される。

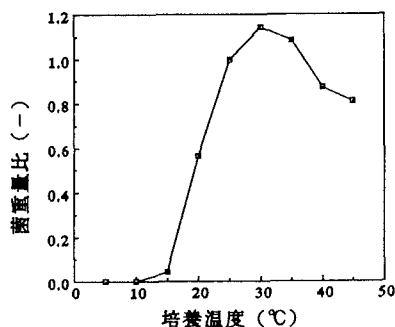


図2 *P. chrysosporium*の増殖に及ぼす温度の影響

6. *P. chrysosporium*の増殖に及ぼす微量物質の影響：

6-1. 実験方法：本研究では、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、チアミン塩化物の影響について調べた。表1に示す培地中のミネラル溶液より塩化カルシウム、塩化コバルト、チアミン塩化物のいずれか、また、これを全て除いた培地を用い、8日間培養後に菌の乾重量を測定した。

6-2. 実験結果と考察：実験結果を表2に示す。これら微量物質がある場合は、無添加の場合に比べて著しく、菌の生育が良かった。特に、*P. chrysosporium*の増殖にはチアミン(VB1)の影響が最も大きいことがわかった。これは真菌類では一種類または数種類のビタミンを添加しないと成長しないという報告と一致している。チアミンは補酵素チアミンニリン酸の構成成分であり、この補酵素は主に糖代謝に重要な役割を果たしている⁴⁾。

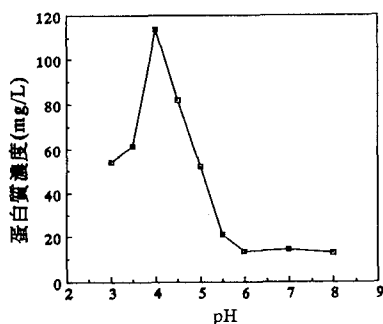


図3 *P. chrysosporium*の増殖に及ぼすpHの影響

7. おわりに

本研究で得られた結論は次の通りである。

1. 植菌時の孢子数が多いほど発芽速度が速くなる傾向があったが、その後の菌体増殖量には大きな影響を与えない。
3. *P. chrysosporium*の最適増殖温度は30℃付近であり、15℃以下では菌の増殖は著しく抑制される。
4. *P. chrysosporium*の最適増殖pHは4付近であり、pHが5.5以上になると菌の増殖が抑制される。
5. *P. chrysosporium*の増殖にはビタミンB1は必須因子である。

なお本研究を遂行するに当たり、京都大学木質科学研究所の島田幹夫教授、梅澤助教授より、*P. chrysosporium*の分譲及びご助言をいただいたことを付記し、深謝いたします。

培地条件		菌体乾重量 (mg)
Ca^{2+}	無添加	38.1
Co^{2+}	無添加	43.3
Thiamine·HCl	無添加	4.8
$\text{Ca}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Thiamine·HCl}$	無添加	4.2
$\text{Ca}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Thiamine·HCl}$	添加	42.7

表2 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、Thiamine·HClの有無による増殖の違い

- 〔参考文献〕 1) 志水一允他；木質バイオマスの利用技術，文永堂出版，1991
 2) 石川辰夫他；図解微生物学ハンドブック，丸善株式会社，1990
 3) 京都大学農学部食品工学教室；食品工学実験書，養賢堂，1987
 4) 水野卓他；きのこの化学・生化学，学会出版センター，1992