

Penicillium M-73代謝産物の抗菌活性

土 居 修 一 森 満 範

Antifungal Effect of Metabolites Produced by a
Penicillium Isolate, M-73

Shuichi DOI Mitsunori MORI

A *Penicillium* isolate M-73, found as a contaminant on an agar plate culturing *Tyromyces palustris*, was examined in terms of its antifungal activities against wood decay fungi. The isolate did not have any volatile antifungal effect in a malt extract-peptone (MP) agar medium. The hyphal growth of *T. palustris* or *Serpula lacrymans* was arrested in an agar when a filtrate from the MP liquid, after being heated, was added to the medium. The filtrate also acted against *Coriolus versicolor* and *Pycnoporus coccineus*. Sapwood blocks of Yezospruce, treated with the filtrate, did not decay when exposed to *T. palustris*. An antifungal fraction was easily extracted from the filtrate with diethyl ether or ethyl acetate.

Keywords : biological control, antifungal activity, *Penicillium* sp, filtrate, wood decay fungi
生物的制御, 抗菌活性, ペニシリウム, ろ液, 木材腐朽菌

寒天培地でオオウズラタケを培養中に雑菌として見いだされたペニシリウム分離株, M-73の木材腐朽菌に対する抗菌作用を検討した。この分離株は, 麦芽エキス・ペプトン寒天培地上では揮発性の抗菌作用を示さなかった。この菌をMP液体培地で培養して得た培養ろ液を加熱後に加えた寒天培地上では, オオウズラタケおよびナミダタケの生長を阻止した。この培養ろ液は, カワラタケおよびヒイロタケにも抗菌活性を示した。培養ろ液で処理したエゾマツ辺材は, オオウズラタケに暴露しても腐朽しなかった。抗菌性画分は, エーテル, 酢酸エチルによって容易に抽出された。

1. 緒 言

従来の木材保存剤による環境への負荷を軽減するために, 木材保存のための一つ的手段として生物的防除が注目されている。その代表的な試みは, *Trichoderma* を生菌のまま木材中に組み入れ, 菌糸干渉能力や二次代謝産物(以下代謝産物)による抗菌作用などを利用

した腐朽の阻止である¹⁻³⁾。また, これ以外のカビや細菌による防腐・防黴・変色防止といった生物的防除も盛んに試みられている⁴⁾。しかしながら, いずれの場合も抗菌スペクトルや再現性などに問題があり, 木材劣化微生物に対して抗菌作用を持つ微生物をより多く検索する必要がある。

我々は既にキノコの栽培培地から分離した *Trichoderma* の木材腐朽菌に対する抗菌作用について、生菌・代謝産物の両面から検討した結果を報告⁵⁾、⁶⁾したが、その作用は限定的であった。その後多くの分離菌株や発酵研究所保存株などの検索を行ったにもかかわらず、それらの中からは抗菌作用の優れたものはいまだ見つけられていない。

たまたま、寒天培地でオオウズラタケ培養中に雑菌として混入した青色カビが、この菌の菌糸生長を阻止することを見いだした。そこで、このカビの木材腐朽菌に対する抗菌作用を代謝産物の面から検討したので、その結果について報告する。

2. 実験

2.1 供試菌

本実験に用いた *Penicillium M-73* (以下M-73)は、実験室の恒温培養器中の寒天培地でオオウズラタケを培養中に、雑菌として混入したコロニーから分離した菌株である。また、木材腐朽菌としては、オオウズラタケFFPRI 0507、カワラタケFFPRI 1030、ナミダタケFFPRI 0739およびヒイロタケFFPRI Ps1hを供試した。

2.2 対峙培養および揮発性抗菌物質の検定

オオウズラタケおよびカワラタケを用いてM-73との対峙培養を行った。培地には馬鈴薯^{ばしよ}ブドウ糖寒天培地(以下PDA)と麦芽エキス・ペプトン寒天培地(以下MPA、各濃度：2%、1%)とを用いた。ペトリ皿に注加したそれぞれの寒天平板培地の両端に上記の腐朽菌を接種し、これをあらかじめ培養した後、さらにM-73を平板中央に接種して7日間培養し肉眼的にそれぞれの生長の様子を観察した。

揮発性抗菌物質の生産の有無に関しては既報⁶⁾の方法で検定した。

2.3 滅菌培養ろ液の抗菌作用の検定

麦芽エキス・ペプトン(以下MP)培養液でM-73を5~20日間、5~30℃で培養した後、これらのろ液をろ過滅菌し、10ml/100mlの割合でPDAに混釈して平板を調製した(以下に述べる「滅菌」とはすべてろ

過滅菌を意味する)。この平板に供試木材腐朽菌を接種して培養し、生長量を測定した。同様の試験をオートクレーブにかけたろ液についても行った。

2.4 滅菌培養ろ液を注入した木材の耐朽性試験

エゾマツ材に2.3項と同様にして得た滅菌培養ろ液を減圧注入し、それをオオウズラタケとカワラタケに暴露して重量減少率を測定した。

2.5 滅菌培養ろ液の溶媒抽出

M-73培養ろ液を、エーテルおよび酢酸エチルを用いて抽出した。抽出済のろ液は再びろ過滅菌してから2.3項と同様に抗菌活性を測定した。なお、溶媒層は無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧乾固して抽出物を回収した。

3. 結果

3.1 対峙培養の結果と揮発性抗菌活性

M-73の成長適温は約25℃であり、培地上での孢子形成がきわめて早くしかも飛散しやすいため、対峙培養による菌糸干渉についての詳しい観察はできなかった。しかしながら、PDA培地とMPA培地とを比較すると、両腐朽菌に対する抗菌作用は後者の培地上で比較的強く発現することが明らかとなった。

一方、揮発性物質の活性は認められなかった。

3.2 PDA培地中での滅菌培養ろ液の抗菌活性

M-73の培養温度および期間とオオウズラタケに対する抗菌活性の関係を、あらかじめMP培養液を用いた静置培養ろ液で調べた結果、本実験の範囲では25℃で20日間培養のものが活性が最も強いことがわかった。また、培養液のpHがいったん酸性側に移行してから再びアルカリ側に移行して8になった時に活性が高くなることが明らかとなった。

そこで、次にMP培養液を用いて、25℃で振とう培養を行い、pHが8になった時に得た滅菌培養ろ液で、抗菌活性を測定した結果を第1表に示す。この表ではろ液をオートクレーブで加熱した時の抗菌活性についても示した。菌糸生長阻害率から明らかのように、供試したいずれの菌に対しても高い生長阻害活性を示し、しかもその活性は加熱処理によって失われないこ

第1表 M-73代謝産物をふくむPDA培地上での木材腐朽菌の菌糸生長 (オートクレーブの影響についても示した)
Table 1. Influence of autoclaving on inhibition ratio of hyphal extension of four wood decay fungi on PDA plates containing the filtrate from M-73 isolate

木材腐朽菌 wood decay fungus	オートクレーブの有無 ^{a)} Autoclaving ^{a)}	菌糸生長(mm) (標準偏差) Hyphal extension (SD) (mm)	菌糸生長阻止率(%) ^{b)} Inhibition ratio(%) ^{b)}
オオウズラタケ <i>T. palustris</i>	無 No	34.7(1.5)	100
	有 Yes	34.8(1.7)	100
ナミダタケ <i>S. lacrymans</i>	無 No	31.0(2.4)	100
	有 Yes	30.9(1.6)	97.8
カラワタケ <i>C. versicolor</i>	無 No	32.6(4.6)	72.4
	有 Yes	35.1(1.0)	81.0
ヒイロタケ <i>P. coccineus</i>	無 No	35.8(1.0)	80.9
	有 Yes	36.5(1.8)	89.5

ろ液は、M-73を25℃で7日間液体振盪培養して得た。菌糸生長量は、26℃あるいは20℃で5、6日間培養して測定した。

a) 「無」はろ液をそのまま、 「有」は120℃、20分間、オートクレーブにかけてから供試したことを示す。

b) 菌糸生長阻止率 = $\frac{\text{コントロール培地での菌糸生長量} - \text{試験培地での菌糸生長量}}{\text{コントロール培地での菌糸生長量}} \times 100(\%)$

The filtrate was obtained from the shake culture fluid of M-73 incubated for 7 days at 25 °C. The hyphal extension was determined after 5 ~ 6 days incubation at 26 °C or 20 °C.

a) "No," represents to use the filtrate without autoclaving; "Yes," represents to use the filtrate autoclaved at 120 °C for 20 min.

b) Inhibition ratio = (mean hyphal extension of control - mean hyphal extension of test) / mean hyphal extension of control × 100 (%)

第2表 M-73の振とう培養液から得た滅菌ろ液で処理したエゾマツ辺材の耐朽性
Table 2. Decay resistance of Yezo spruce sapwood blocks treated with the filtrate from the shake culture fluid of M-73 isolate

処理 Treatment	木材試験片の平均重量減少率(%) (標準偏差) ^{a)} Mean % weight loss(SD) ^{a)} of wood blocks by	
	オオウズラタケ <i>T. palustris</i>	カラワタケ <i>C. versicolor</i>
コントロール Control	29.0(4.9)	21.7(2.0)
補正 (培養液で処理した試験片) Correct (treated with the medium)	31.2(7.0)	22.8(2.6)
試験 (ろ液 ^{b)} で処理した試験片) Test (treated with the filtrate ^{b)})	0.6(2.8)	23.4(1.5)

a) 値は9個の試験片の平均値で、括弧内は標準偏差である。腐朽期間は7週間である。

b) ろ液の注入量は木材試験片の170w/w%である。

a) Values represent means of 9 replicates. Numbers in parentheses represent standard deviations. Duration of experiment was 7 weeks.

b) Retention of the filtrate was about 170w/w% of each wood blocks.

とが明らかとなった。

ただし、この表で示したのはコントロール培地上で供試菌がほぼ培地全面に広がるまでの結果である。この培養期間をさらに延長した結果では、カラワタケとヒイロタケに対しては長くても2週間程度しか抗菌活性を持続しないことが明らかとなった。オオウズラタケとナミダタケに対しては、1か月かそれ以上の期間

抗菌活性を示した。なお、ろ液を混釈したPDA培地の初発pH値はいずれも6~7の範囲にあり、コントロール培地での予備試験の結果からpHの影響はないと判断できた。

3.3 滅菌培養ろ液を注入した材の耐朽性

第2表にM-73滅菌培養ろ液で処理したエゾマツ辺材の腐朽試験結果を示す。この表の結果は、寒天培地

第3表 M-73培養ろ液から得たエーテルあるいは酢酸エチル画分の寒天培地における抗菌活性
Table 3. Hyphal extension of 2 Basidiomycetes after 5 days incubation on PDA plate containing each fraction of diethyl ether or ethyl acetate from the original MP medium and the shake culture fluid of M-73 isolate

寒天培地に添 加した画分 Fraction added into PDA plate	菌糸生長 (標準偏差) (mm) Hyphal extension (SD) (mm) of			
	オオウズラタケ <i>T. palustris</i>		カワラタケ <i>C. versicolor</i>	
	補正 ^{a)} Correct ^{a)}	試験 Test	補正 ^{a)} Correct ^{a)}	試験 Test
エーテル Diethyl ether	35.3(0.5)	0.0	35.4(0.8)	0.0
酢酸エチル Ethyl acetate	35.5(0.6)	0.0	36.0(0.0)	0.0
抽出残液 Residue	35.8(1.5)	34.3(2.9)	36.0(0.0)	36.0(0.0)

a) M-73を培養しない培地から得たそれぞれの溶媒の画分を添加した。
b) Each fraction from the original malt extract-peptone medium was added.

での結果と符号して、オオウズラタケによる腐朽に対して完全な抗菌性を付与できることを示している。

3.4 滅菌培養ろ液の溶媒抽出

第3表にエーテルおよび酢酸エチルで抽出後のろ液の抗菌活性を調べた結果を示す。両溶媒で抽出した後のろ液には全く抗菌活性がないことが明らかである。したがって、抗菌活性の本体はこれらの溶媒中に移動したことが明白なので、抽出物を減圧下で回収した。回収した抽出物は、^{ねんちゆう}粘稠な黄色液体であるが、5℃下で針状結晶様の物質を析出した。

4. 考 察

木材保存のための生物的制御には、*Trichoderma* 類がもっとも供試される⁵⁾。これらの木材腐朽菌に対する抗菌作用は、菌糸干渉だけでなく揮発性物質を含む代謝産物の抗菌活性に基づくものである⁷⁾。生菌を用いる方法は、電柱地際部の腐朽阻止^{2, 8)}などに応用されるべく検討されている。この方法では、材表面に*Trichoderma* などの胞子や菌糸を^{まんえん}蔓延させて腐朽菌の攻撃を阻止するのであるが、外観上の問題などから建築材には適用できない。本報告では、代謝産物を利用して腐朽を阻止することを前提として生物検定を行った。

供試したM-73代謝産物の抗菌作用は、既報⁶⁾で用いた*Trichoderma* のそれより強いことが明らかで

ある(第1表)。すなわち、本実験と同様の条件で*Trichoderma* を振とう培養して得た、最も抗菌活性が高いと思われる時期の滅菌ろ液でも、寒天培地上での木材腐朽菌生長阻止能は長くても12日間しか持続しない。これに対し、M-73の代謝産物は、特に褐色腐朽菌に対する抗菌活性が強く、その上120℃の熱処理でも活性を失わない。したがって、常温ではその抗菌活性を長期間持続する可能性を持つ。

木材中にこの代謝産物を注入して耐朽性付与効果を調べた結果は、オオウズラタケに対してきわめて強い抗菌活性を持つことを示した。寒天培地上では、カワラタケに対してもある程度の抗菌活性を示したが、木材上では全く発現しなかった。ナミダタケ、ヒイロタケなど他の木材腐朽菌に対する腐朽試験を実施していないので断定はできないが、この代謝産物は褐色腐朽菌が高頻度で認められる⁹⁾家屋で使える可能性があるろう。

抗菌活性を持つ成分には、キチナーゼやグルカナーゼなど木材腐朽菌の細胞壁成分を溶解する能力を持つ酵素が含まれている可能性もあるが、一般にこれらの酵素は高温には不安定である。したがって、M-73の抗菌作用は抗生物質によるものと思われる。*Penicillium* が、ペニシリン類をはじめとする抗生物質を生成することは周知のことである。しかしながら、木材腐朽菌に対する活性を目的とするスクリーニング

は行われていないので、本実験の結果はPenicillium 抗生物質の木材保存への適用の可能性を示したものと
いえる。

なお、この代謝産物の抗菌活性が単一成分によるものか、また培養過程によってどのような質的・量的変化を伴うのかなど不明の点も残されている。今後この物質が効率的に生産される条件を求めるとともに、化学的構造を明らかにする予定である。また、白色腐朽に対する抗生作用が弱いので、さらにほかの菌のスクリーニングを行い、いずれの腐朽型の菌に対しても防腐効果を持つ菌株を見いだすことが重要と考える。

文 献

- 1) Bruce, A. and King, B. : Material u. Organismen, 21, 165-179 (1986)
- 2) Bruce, A. and Highley, T. L. : Material u. Organismen, 21, 1-13 (1986)
- 3) Murmanis, L. L., Highley, T. L. and Ricard, J. : Material u. Organismen, 23, 271-279 (1988)
- 4) Freitag, M., Morrell, J. J. and Bruce, A. : Biodeterioration Abstracts, 5(1), 1-13 (1991)
- 5) Doi, S., Yamada, A. and Mori, M. : Material u. Organismen, 28, 131-141 (1993/1994)
- 6) Doi, S., and Mori, M. : Material u. Organismen, 28, 133-151 (1993/1994)
- 7) Bruce, A., Johnston, C. and Mevey, J. A. P. : Internal. Res. Group on Wood Preserv., Document No. IRG/WP/1316 (1987)
- 8) Ricard, J. : J. Inst. Wood Sci., 7, 6-9 (1976)
- 9) 青島清雄 : “微生物の生態”, 東京大学出版会, 第4巻 p.175 (1977)

—性能部 耐久性能科—
(原稿受理 H6. 11. 28)