

# 麴菌の変異に関する研究

## 紫外線照射による変異株の分離

### 及びその特性について

宇田川 清・蟹江 松雄

#### I 緒 言

微生物の変異に関しては変異現象の究明上からは勿論、原株保存の目的からも、新しい生化学的性質を持つた変異株の分離の目的からも近時多くの研究がなされている。麴菌についても井口氏<sup>1)</sup>は *Asp. sojae* の人工変異に関し、坂口氏等<sup>2)</sup>は *Asp. oryzae* の自然変異現象に関し、飯塚氏等<sup>3)</sup>は黒麴菌の変異に関し、また小田氏等<sup>4)</sup>も *Asp. oryzae* の変異について報告している。白麴菌に関しては、蟹江<sup>5)</sup>は先に麦芽汁寒天上の累代培養によつて得た自然変異株が原株に比較して形態的にも酸生成能にも、また *amylase* 生成能についても大きな変化を示すことを認めたが、松山氏<sup>6)</sup>も類似菌である赤麴菌の自然変異株について酵素力などに相違のおこる事を述べている。

われわれは *amylase* の生成の殆んど又は全く認められない突然変異株が得られれば、*amylase* の生成過程を研究する上に有力な武器になるだろうと考えて、白麴菌に紫外線を照射して 139 株の変異株を分離した。今迄の所、当初の目的にそのような菌株の存在は認められないが、形態的及び生理的な 2, 3 の観察を行つたので、これらをまとめて以下報告する。

#### II 実験材料及び実験方法

1. 使用菌株 *Asp. kawachii* KITAHARA が用いられた。これは本菌が  $\alpha$ -*amylase*,  $\beta$ -*amylase* 及び *maltase* 何れも強く *diastase* 生成用麴菌として適当な菌種であるからである。<sup>7)</sup>

2. 単孢子作成法 有馬氏<sup>8)</sup>の分散剤として  $\text{CaCO}_3$  を用いる方法は、この菌については孢子懸濁液を濾過する際、孢子が  $\text{CaCO}_3$  層に吸着せられ、高濃度の単孢子懸濁液を得る事が困難であつた。そこでわれわれは麦芽汁寒天斜面培地に  $26 \sim 28^\circ\text{C}$  で 7 ~ 10 日間培養した後、殺菌せる 0.05% の soapless soap (ミケソープ, pH 6.6) を 5 ml 加え、手で出来るだけ強く 5 分間振盪して孢子を浮遊せしめ、該液を 300 ml 容三角フラスコに移し、且つ殺菌せる glass dust (dia. 0.5 mm 以下) を約 0.2 g 添加して、毎分 180 回の振盪機で 20 分振盪した後、1% の蔗糖液 15 ml を添加して更に同一条件で 10 分間振盪を継続、glass filter No. 3 で静かに濾過し、濾液を単孢子懸濁液とした。この方法により ml 当り 20,000 ~ 80,000 個の懸濁液が得られ、分散率 80% 以上の結果を得た。

3. 紫外線照射 紫外線発生装置は“マツダ殺菌ランプ”(100 V, 0.3 A, 出力 20 W) を使用し、照射方法は前述の単孢子懸濁液を適度に稀釈し、該稀釈液 1 ~ 2 ml をペトリ皿中に納めた径

6 cm の時計皿に取り、ランプから 30 cm の距離で照射した。なお照射をできるだけ均一にするために、白金線で液を時々攪拌した。

4. Amylase 力価測定法 糖化力の測定法は Willstätter-Schudell 法に従って酵素液 5 ml を、2% 可溶性澱粉溶液 25 ml, N/10 醋酸緩衝液 (pH 4.5) 10 ml, 水 12.5 ml よりなる基質溶液に加え、40° C で作用せしめ、一定時間後反応液 5 ml を取り、N/10 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 ml にて反応を停止させた後、N/10 NaOH 5 ml で中和し、該液 5 ml を取り、N/10 沃度液 10 ml, N/10 NaOH 15 ml を順次加え、充分攪拌し、15 分後 N/10 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 ml を添加、澱粉溶液を指示薬として N/10 Na<sub>2</sub> S<sub>2</sub> O<sub>3</sub> で滴定した。糖量は沃度消費量で表した。α-amylase 力は Sandstedt 等<sup>9)</sup> の方法に従い、α-amylodextrin の標準溶液 20 ml に水 5 ml, 酵素液 5 ml を加え、40° C で反応させて unit を算出した。

5. 有機酸定性法 検液 20 ml に水 80 ml を加え、エーテル抽出を 30 時間行つた後、エーテル抽出区分はエーテルを除去し、水 2 ml 添加、非抽出区分は 60~70° C で真空濃縮し、濃縮液 3 ml を得、前者は 0.1 ml, 後者は 0.05 ml を使用し、paper chromatography によつて有機酸の検出を行つた。使用濾紙は東洋濾紙 No. 50 (40×40), 展開剤は butanol, 醋酸, 水 (4:1:1) で上昇法によつた。散布試薬は 0.1% mercurochrome alcohol 溶液を用い、麴酸に対しては別に 50% alcohol に FeCl<sub>3</sub> 1% を溶解した液を用いた。

### III 実験結果

1. 生存率及び変異率 われわれは照射後の操作を簡単にするために、照射時間に応じて照射液の孢子数を変えた。その結果得られた生存率及び変異率をあげると、Table 1 の通りである。

Table 1 Survival rates and mutation rates by ultraviolet irradiation

Irradiation time (min)	Conidia tested	Germinated conidia	Survival rate (%)	Mutants	Mutation rate (%)
1	285	69	24.2	4	5.8
2	2,303	155	6.68	34	21.9
3	16,230	61	0.38	15	24.6
5	24,700	35	0.14	12	34.3
10	84,700	24	0.03	7	29.2

即ち、生存率は時間が長くなるにつれて急速に減少し、3分ですでに 1% 以下となり、15分以上の照射では完全に死滅する。

変異率は 5 分前後が最高と思われ、従つて以下の実験においては主として 5 分を採用した。

2. 変異株の肉眼的観察 われわれは現在迄に肉眼的観察により、総計 139 株の変異株を分離し得た。これ等を麦芽汁寒天斜面培地上の観察によつて、9 の type に分類した。即ち、Dark brown type 57 株, Tan type 23 株, Restricted type 26 株, Yellow type 3 株, Yellow mycelium type 4 株, Albino type 10 株, Light type 9 株, Floccose type 5 株, Sterile type 2 株で

ある。しかし、同一の type に属する株が総て厳密に同じ肉眼的外観を有するというのではなく、或る株は type の性格を極端に表現しており、また或る株はそれ程明かに表現していないで移行途中と思われるものもあつたが、そういう株でも親株とははつきり区別されたので、その最も著しい特徴をつかんで上記の type の一つに分類した。しかし、本報においては明かに type の性格を持っている変異株で、しかも、麦芽汁寒天斜面上に 7~8 日間宛 5 代の累代培養によつて原形を保ち得た株のみを選んで、それをその type の代表株として、以下の観察を行い、他の変異株は一応省略した。5 代の累代培養によつて変化した株の数は約 2% であつた。代表株の菌株番号とその肉眼的特徴は次の如くである。

1. Dark brown type: conidia の色調が親株より濃厚で dark brown を呈し、生育は良好にして皺及び隆起の状態は親株と大差なく、conidia も密で気菌糸も認められない。この type に属する株の中には original color に復元するものが認められた。代表株は 24, 74, 230, 244, 267, 272 の 6 株である。

2. Tan type: conidia の色調は親株よりやや淡く、light yellowish brown を呈する。生育及び conidia の着生はやゝおそく、また僅かながら気菌糸を認める。代表株は 57, 65, 186, 245, 251, 257, 324 の 7 株である。

3. Restricted type: 麦芽汁寒天平面培養における発育は colony の直径が親株の 1/3 乃至それ以下である。色調は light yellowish brown 乃至 strong yellowish brown を呈する。conidia の着生は比較的疎で気菌糸は認められない。代表株は 49, 153, 218, 238, 249, 252, 253, 266, 318, 327, 330 の 11 株である。

4. Yellow type: 菌糸の色調は無色で、conidia は若い間は yellow であるが、老ねて来ると dusky yellow となる。僅かながら気菌糸が認められ、その他親株に近似する。代表株は 90 の 1 株である。

5. Yellow mycelium type: Yellow type と異り mycelium, conidia 共に yellow を呈する。conidia の着生は疎で生育はおそい。代表株は 95, 114 の 2 株である。

6. Albino type: conidia の色調は白色であるが着生は良好である。短小な気菌糸の認められるものもある (18)。代表株は 18, 322, の 2 株である。

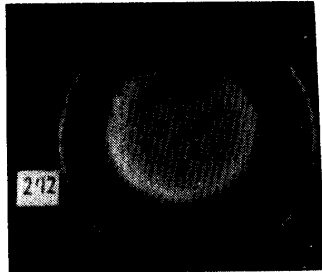
7. Light type: conidia の着生は非常に疎で、その色調は light yellowish brown である。皺は多く気菌糸は認められない。代表株は 305 の 1 株である。

8. Floccose type: 菌叢は floccose で、conidia の着生は非常におそく周辺に僅かに認められるだけである。代表株は 45 の 1 株である。

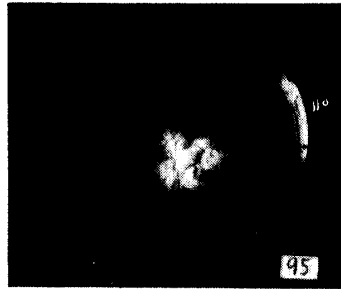
9. Sterile type: 菌叢は皮膜状を呈し、conidia の着生は認められないか、若しくは老ねて来ると僅かに着生する。麦芽汁寒天斜面培地上培養日数の経過と共に隆起が強くなり現われ、気菌糸は認められない。生育は比較のおそい。代表株は 37, 51, の二株である。

以上各 type に属する代表株の中 1 株宛の写真を Fig. 1 に掲載する。

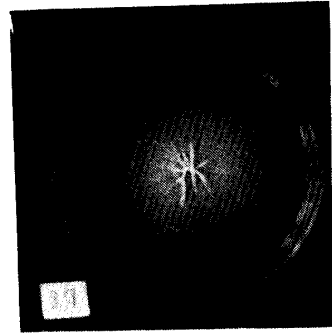
Fig. 1



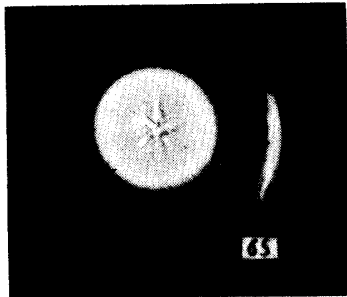
272: Dark brown type



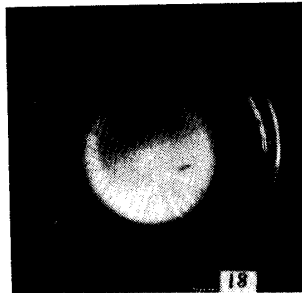
95: Yellow mycelium type



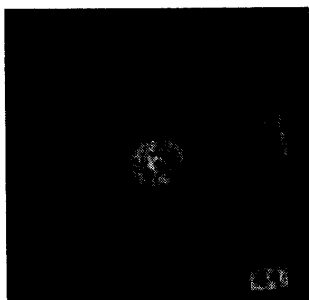
37: Sterile type



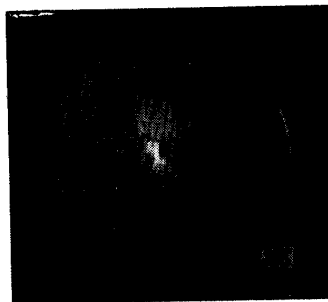
65: Tan type



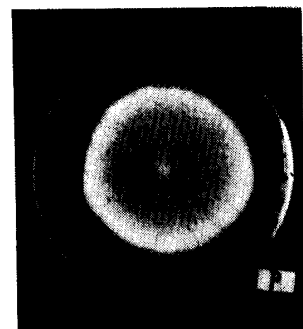
18: Albino type



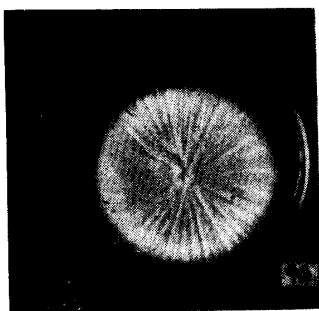
49: Restricted type



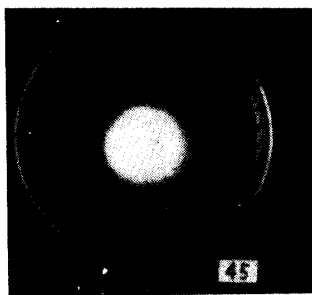
305: Light type



P: Parent



90: Yellow type



45: Floccose type

Table 2 Microscopical

Type	Strain No.	Vesicle	
		size ( $\mu$ )	shape
Dark brown	24	25~31	spherical
	74	26~32	"
	230	19~25	"
	244	15~20×20~25	oval
	267	16~23×18~25	"
	272	13~18×18~25	"
Tan	57	25~32	spherical
	65	20~30	"
	186	21~25	"
	245	12~16×15~20	oval
	251	12~16×18~22	"
	324	22~25×25~29	"
Restricted	49	12~30	spherical
	153	21~26	"
	218	25~30	"
	238	24~29	"
	249	12~17×14~20	oval
	252	18~25	spherical
	253	33~42	"
	266	13~18×22~28	oval
	318	18~25	spherical
	327	18~23×22~28	oval
	330	14~18×16~23	"
Yellow	90	35~50	spherical
Yellow mycelium	95	28~33	"
Albino	18	27~33	"
	322	12~20	"
Light	305	18~22×23~29	oval
Floccose	45	12~30	spherical
Sterile	37	12~25	"
	51		not
Parent		20~35	"

## observation

Conidiophore length×width(μ)	Sterigmata		Diameter of conidia (μ)	Width of hyphae (μ)
	size (μ)	shape		
400~500× 8~12	10~12×3 ~4	clavate	4.5~6	4~7
600~700× 8~12	10~12×3 ~4	"	4.5~6	4~6
420~480× 5~ 7	6~ 9×2 ~3	"	3~5	4~6
300~400× 4~ 5	7~10×3 ~5	cylindrical clavate	3~5	5~7
400~500× 5~ 7	7~10×2 ~4	"	4~6	5~7
410~560× 5~ 7	6~ 9×1.5~2.5	"	4~6	6~8
400~500× 6~ 9	10~12×3 ~4	clavate	4.5~6	6~8
360~450× 6~ 8	5~ 8×3 ~4	cylindrical clavate	4.5~6	4~8
400~500× 5~ 7	6~ 9×2.5~3.5	"	4~5	4~5
430~560× 5~ 7	9~11×3 ~5	"	3~5	4~6
300~550× 4~ 6	8~11×4 ~6	"	3.5~4.5	4~5
450~650× 5~ 7	8~12×4 ~6	"	4~6.5	3~6
330~650×10~13	9~15×4 ~5	cylindrical clavate	4~6	3~5
550~800×10~14	9~15×4 ~6	clavate	4~6	4~6
530~700× 7~ 9	5~ 8×3 ~4	"	4~5	4~6.5
540~700× 8~10	7~11×4 ~6	"	4~5	5~6
400~610× 5~ 8	5~ 8×2.5~3.5	"	4~5.5	4~6
320~550× 4~ 6	5~ 8×3 ~4	cylindrical clavate	4~5	6~7
500~720× 6~ 9	10~15×3 ~5	"	5~7	6~7
250~480× 3~ 6	8~12×3 ~5	"	4~5	4~6
350~580× 5~ 7	7~11×5 ~6	"	5~7	4~6
500~730× 7~ 9	7~11×4 ~5	"	5~6	6~8
320~560× 5~ 7	7~10×2.5~3.5	"	3~5	5~7
320~450× 7~ 9	6~11×2.5~3.5	"	4~5	4~6
200~380× 6~ 9	7~12×3 ~4	"	3~5	4~5
390~480× 6~ 8	—	—	4~7	3~6
460~650× 4~ 7	5~ 8×3 ~4	"	3~4	3~4
450~720× 6~ 8	7~10×4 ~6	"	4~6	5~7
120~600× 4~ 6	6~10×3 ~4	"	2~5	3~5
120~150× 5~ 7	6~15×3 ~4	"	2~3	4~6
observed				2~3
400~600× 6~12	7~12×3 ~4	clavate	3~5	4~8

3. 変異株の顕微鏡的観察 各 type の菌株を麦芽汁寒天斜面培地上に、7~10 日間培養し顕微鏡的観察を行つた結果は、Table 2 の如くである。

以上、顕微鏡的な観察を概観すると、変異株では頂囊が oval なものが相当認められ、大きさも多少小さくなつていものがある。梗子も cylindrical clavate に変形しているものが多く認められる。

Dark brown type は色調の変化以外は特記する事がない。Tan type には梗子の着生が少い株 (186, 245) が認められた。Restricted type は頂囊は多少小型で、畸型的な梗子も認められた

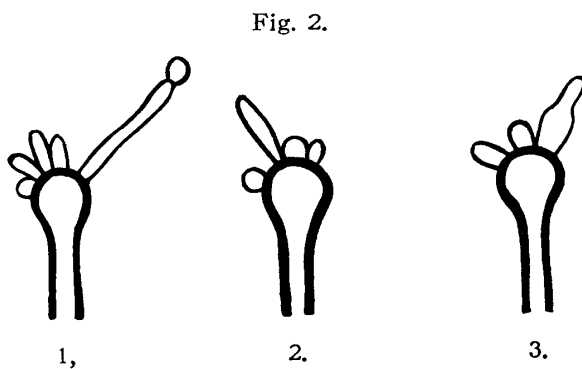


Fig. 2.

た (Fig. 2 ; 1, 2). Yellow type, Yellow mycelium type 及び Albino type では特記する事がない。Light type, Floccose type 及び Sterile type は一般に頂囊が小さく、Floccose type では分生芽胞柄が不揃で短少なものも多く混じており、Sterile type は分生芽胞柄が短小であり、また、conidia が小型である。Light type は梗

子の着生が少く、畸型も認められた (Fig. 2 ; 3).

Table 3. Nitrogen assimilation of the mutants.

Type	Strain No.	Nitrogen source			Type	Strain No.	Nitrogen source			
		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>			NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	
Dark brown	24	+	+	+	Yellow	1*	+	+	+	
	74	+	+	+		90	+	+	+	
	230	+	+	+	Yellow mycelium	95	±	±	+	
	244	+	+	+		114	+	+	+	
	267	+	+	+		117*	+	+	+	
	272	+	+	+		Albino	18	+	±	+
Tan	57	+	+	+	96*		+	+	+	
	65	+	+	+	322		+	+	+	
	186	+	+	+	Light		36*	+	-	+
	247	+	+	+			39*	+	±	+
	251	+	+	+		52*	+	-	+	
	257	+	±	+		305	+	+	+	
324	+	+	+	Floccose	14*	±	±	+		
Restricted	49	+	+		+	38*	-	±	+	
	153	-	+		+	45	+	±	+	
	218	+	+		+	55*	-	-	+	
	231	+	+		+	Sterile	37	-	-	-
	249	+	+	+	51		-	-	-	
	252	+	±	+	Parent		+	+	+	
	253	+	+	+						
	266	+	+	+						
	318	+	+	+						
	327	+	+	+						
330	-	-	-							

Note    + good growth                    + fairly growth  
          ± little growth                    - no growth  
          \* Strains not marked as the representatives

4. 窒素同化能力試験 代表株及び他の数株の窒素同化能力を Czapek 溶液及び Czapek 溶液の  $\text{NaNO}_3$  の代りに、窒素濃度の等しい  $\text{NaNO}_2$  及び  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を含む培地に、7 日間培養して繁殖状態を観察した結果は、Table 3 の通りである。

Table 3 から、無機窒素の同化能力に関する変異株は割合多く (42 株中 15 株)、しかも、各種の異なった変異の様相を示すものであることがわかる。即ち無機窒素の同化能力を分類すれば、Table 4 の如くである。

Table 4 Utilization of inorganic nitrogen

$\text{NO}_3^-$	$\text{NO}_2^-$	$\text{NH}_4^+$	
-	+	+	Nitrate non-assimilative.....A
+	-	+	Nitrite non-assimilative ..... B
-	-	+	Nitrate and nitrite non-assimilative .....C
-	-	-	Inorganic nitrogen non-assimilative .....D

試験した菌株の内、A に属するものは 153 (Restricted type) の 1 株、B に属するものは 257 (Tan type), 252 (Restricted type), 18 (Albino type), 36, 39, 52 (Light type), 45 (Floccose type) の 7 株、C に属するものは 95 (Yellow mycelium type), 14, 38, 55 (Floccose type) の 4 株、D に属するものは 330 (Restricted type), 37, 51 (Sterile type) の 3 株である。

概して、肉眼的にも顕微鏡的にも親株と著しい相違の認められる変異株に、無機窒素同化能力の強く欠けている変異株が認められることは興味のあることである。

5. Amylase 力比較試験 代表株の amylase 力を比較するために、ペトリ皿に麩 5g を採り、水 4.5 ml を加え、攪拌殺菌後接種、 $30^\circ\text{C}$  で 3 日間培養した後、1% 食塩水 50 ml を加え、乳鉢で磨砕し  $37^\circ\text{C}$  で 2 時間静置した後濾過し、濾液についてその pH,  $\alpha$ -amylase 力及び糖化力を測定した。その結果は Table 5 に示す如くである。

Table 5. Amylase activities of the mutants

Type	Strain No.	Growth on bran	pH of extract	$\alpha$ -Amylase (unit)	Saccharifying activity		
					0.5hrs	1.5hrs	3hrs
Dark brown	24	卍	6.4	9.96	1.23	2.19	2.94
	74	卍	6.4	7.13	1.47	2.22	3.06
	230	卍	4.4	4.09	2.02	2.08	3.34
	244	卍	5.4	5.26	0.98	2.16	3.01
	267	卍	6.0	8.86	2.21	2.52	3.25
	272	卍	6.0	5.29	1.64	2.05	2.86
Tan	57	卍	6.2	3.64	1.53	2.43	3.21
	65	卍	5.6	7.37	1.68	2.31	3.02
	186	卍	5.8	5.63	1.65	2.42	3.12
	245	卍	6.5	7.63	1.42	1.86	2.66
	251	卍	6.4	16.95	1.08	1.55	2.11
	257	卍	6.4	16.16	1.52	1.82	2.77
	324	卍	4.9	4.97	1.11	2.46	3.12

(Cont'd on next page.)



Table 5. (Cont'd)

Type	Strain No.	Growth on bran	pH of extract	$\alpha$ -Amylase (unit)	Saccharifying activity		
					0.5 hrs	1.5 hrs	3 hrs
Restricted	49	卍	4.4	2.32	1.68	2.16	2.97
	153	卍	6.1	4.74	1.87	2.46	3.20
	218	卍	4.6	3.10	0.81	1.84	2.77
	238	卍	6.2	5.91	1.71	2.22	3.17
	249	卍	6.0	8.00	1.29	2.16	3.03
	252	+	4.1	1.77	1.06	1.86	2.50
	253	卍	5.9	5.21	1.21	2.16	2.90
	266	卍	4.8	5.21	1.64	2.00	2.78
	318	卍	4.7	6.78	1.59	2.51	3.34
	327	卍	5.9	7.20	1.19	2.22	3.08
	330	±	5.6	0.29	0.19	0.40	0.47
Yellow	90	卍	6.9	7.11	1.32	2.25	2.55
Yellow mycelium	95	卍	3.0	2.09	1.26	2.04	2.91
	114	卍	5.6	6.31	1.53	2.28	2.94
Albino	18	卍	5.6	4.46	1.44	2.19	2.91
	322	卍	5.6	7.82	1.62	2.36	3.20
Light	305	卍	4.5	2.93	0.97	2.03	2.94
Floccose	45	卍	4.8	2.48	0.54	0.90	1.62
Sterile	37	+	3.6	0.90	0.75	1.48	2.25
	51	±	6.0	0.02	0.05	0.06	0.09
Parent		卍	6.2	6.86	1.86	2.31	3.27

Note 卍 very good growth    卍 good growth  
 + fairly growth            ± a little growth

Table 5 からわかるように、麴抽出液の pH には相当の変動が認められ、 $\alpha$ -amylase および  $\beta$ -amylase の酸に対する安定性を考慮に入れば、抽出液を用いて夫々の力価を測定しても、各株の酵素の生成能を示さないことになる。しかし、pH が極端に低い数株 (37, 95, 252) の内 95 について  $\text{CaCO}_3$  を添加し pH を補正した麴を作り、試験した結果は Table 6 の如くである。

Table 6.  $\alpha$ -Amylase formation on bran added  $\text{CaCO}_3$ 

Strain No.	$\text{CaCO}_3$ g/5g of bran	Growth	pH of extract	$\alpha$ -Amylase (unit)
95	none	卍	3.4	2.09
	0.4	卍	4.4	2.02
	0.5	卍	6.4	2.80
Parent	none	卍	5.8	7.00
	0.4	卍	5.8	6.62
	0.5	卍	6.0	7.70

即ち、pH を高める操作を施しても  $\alpha$ -amylase の著しい増加が認められないので、Table 5 の  $\alpha$ -amylase 力は酸による破壊は考慮に入れなくて差つかえないと考えられる。この想定の上に立つて、Table 5 を見れば、251, 257, 24, 267 は明らかに親株より  $\alpha$ -amylase 力が強く、殊に前

2株は2倍以上の力価を示した。前2株が何れも外観的に Tan type に属し、後2株は何れも Dark brown type に属することは、実用的な菌株分離の見地から、興味あることである。これに反し、形態的にも、窒素同化能力にも変異の著しい株は一般に  $\alpha$ -amylase は弱化する傾向が認められるが、窒素同化能に変異を来たしたものの中には、繁殖が良好でないものが多く、良好な繁殖の下においても、なお、 $\alpha$ -amylase 力が弱いかどうか不明である。257 が Nitrite non-assimilative であるにもかかわらず、前記の如く、 $\alpha$ -amylase 力の極めて強いことは特記すべきことである。一般的には  $\alpha$ -amylase 力の弱まっている変異株の方が多い。糖化力は親株と比較して特別強いものは見当たらないが、230, 267 は親株よりも可成り強い。糖化力の多少弱まっている株は広く見られる。しかし、極端に弱い 330, 51 は繁殖も非常に悪いので比較の対照になし得ない。

6. 有機酸生産能力試験  $\alpha$ -amylase 力比較試験を行つた際、麩麴抽出液の pH に可成りの変動が認められたので、酸の組成とその生産能力を調べた。即ち glucose 10%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%,  $\text{MgSO}_4$  0.01%,  $\text{CaCl}_2$  0.01% からなる培養液 80 ml を 300 ml 容三角フラスコに採り、30°C で静置培養し、5日及び13日の培養液につき、酸度、糖消費率、菌体重量を測定し、且つ paper chromatography 法によつて citric(C), oxalic(O), malic(M), gluconic(G), 及び kojic (K) acid を検出した結果は、Table 7 の如くである。

Table 7 から、272, 186, 245, 49, 249, 322 等は初期の生酸能力が増加したと認められ、他は生酸速度が親株に比較して遅く、かつ一般に弱いといひ得る。そしてこの後者に属するものは一般に citric acid の生産が弱められているとみることが出来る。gluconic acid の生産は一般に弱められるものが多く、kojic acid の生産は強められているもの、余り変らないもの、弱められているもの等見られる。親株では malic acid の生産は paper 上に認められなかつたが、変異株の中には明らかに認められるもの (49, 45) が存在した。しかし、変異によつて起される各種有機酸の相関々係、並びに窒素同化能や、 $\alpha$ -amylase 生産能との関聯性については何等認むべき事実をつかみ得なかつた。

#### IV 考 察

われわれが紫外線照射した *Asp. kawachii* KITAHARA は、河内氏が中酸性黒麴菌からの突然変異であると述べているものであり、このことは北原氏等<sup>10)</sup>によつて証明されているので、紫外線照射変異株の中には back mutation によつて黒色の株が得られはしないかと期待したが、実験結果に記載した如く、親株より褐色度の高い Dark brown type のものは得られたが、brownish black の変異株は得られなかつた。これは飯塚氏等<sup>3)</sup>が黒麴菌の紫外線照射によつて得た Tan type 変異株に再照射しても、色調が親株に復帰するものの得られなかつた事実と一致する。

次に、供試親株は自然変異を起し易い菌株であるといわれているが、自然変異を起し易い菌は当然紫外線照射によつても変異し易いと考えられるが、この推論は変異率が非常に高かつた実験結果とよく一致する。

形態的な変異・窒素同化能・amylase 生成能・有機酸生産能相互の間には、勿論はつきりした  
 関聯性は認められなかつたが、一般に形態的な変異の著しいもの (Light type, Floccose type,  
 Sterile type 等)の中には無機窒素同化能に欠け、或は、amylase 力が弱く、若しくは生酸速度  
 の遅いものが多いといえる。

変異株の窒素同化能力については、特定の無機態窒素源を同化し得ないものが可成り多く存在し  
 ていることを認めた。このことから、窒素同化能は変異株の生理的な分類には有効な方法である  
 といえる。飯塚氏等<sup>3)</sup>の黒麴菌の変異についての実験では、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>態窒素のみを同化し得ない type は  
 認めなかつたが、われわれの実験では、こういう変異株の存在も認め得た。これは Neurospora につ  
 いて de la Haba<sup>11)</sup>も認めているところである。又われわれは Nitrate and Nitrite non-assimi-  
 lative の変異株の中でも NH<sub>4</sub><sup>+</sup>態窒素を同化し得るものと同化し得ないものとあることを指摘し、  
 後者を Inorganic nitrogen non-assimilative と名付けたが、これら無機窒素同化能に対する 4  
 つの group は inorganic nitrogen assimilation の過程を研究する上に有効に使うものと  
 考えられ、今後追求したいと考えている。

当初の目的であつた amylase を欠くか、又はその非常に小さい変異株は見当らなかつた。こ  
 のことは、amylase が構成酵素として菌の metabolism に不可欠の役割を果すものであると考え  
 れば当然のことであるが、数少いわれわれの実験結果から断定するのは尙早である。amylase 力  
 を生命とする種麴製造業者が菌株の保存を形態だけに頼ることは、非常に危険であることは、以上

Table 7. Organic acids

Type	Strain No.	pH		Acidity		Consumed sugar (%)		Weight of mycelium (g) (dry matter)
		5	13	5	13	5	13	
Incubation time (days)		5	13	5	13	5	13	13
Dark brown	272	1.4	1.6	6.9	4.5	42.4	71.4	1.24
Tan	65	1.6	1.6	2.4	2.4	49.9	93.1	1.37
	186	1.4	1.8	5.8	2.6	50.0	93.4	1.43
	245	1.4	1.8	7.1	4.0	49.9	92.1	1.41
Restricted	49	1.4	1.6	5.2	13.2	33.6	88.4	1.39
	249	1.4	1.8	5.9	2.1	64.3	96.9	1.73
	253	1.6	1.8	2.3	2.4	47.2	93.9	1.37
	318	1.6	1.8	2.8	3.8	47.5	93.9	1.38
Yellow	90	1.8	1.6	2.0	2.7	53.4	95.1	1.35
Albino	18	1.6	1.8	2.9	2.8	35.0	94.5	1.36
	322	1.6	1.8	8.2	2.4	49.9	92.1	1.22
Yellow mycelium	95	1.4	1.6	3.3	5.0	17.9	92.4	1.21
	114	1.6	1.8	3.6	3.2	55.1	94.0	1.38
Light	305	1.4	1.7	2.0	3.1	46.6	93.9	1.41
Floccose	45	1.6	1.8	2.3	3.2	19.8	40.3	0.72
Parent		1.6	1.8	4.6	2.1	48.1	79.6	1.26

Note Acidity : ml of N/10 NaOH to neutralize 10ml of the culture medium.

の実験結果からも明かであるが、形態色調が親株に近似のものは、比較的 amylase 力の変動も少く、更に、親株にはるかに優る amylase 力をもつ変異株も、こういう type の中に見出されたことは注目に値する。

V 要 約

*Asp. Kawachii* KITAHARA に紫外線を照射して、139 株の変異株を分離し、主として代表株 33 株について形態及び 2, 3 の生理作用を観察して次の結果を得た。

1. 紫外線照射による conidia の生存率及び変異率を測定した。
2. 変異株は麦芽汁寒天培地上の肉眼的観察によつて、次の 9 の type に分類し得た。
 

1. Dark brown (57 株)	2. Tan (23 株)	3. Restricted (26 株)
4. Yellow (3 株)	5. Yellow mycelium (4 株)	6. Albino (10 株)
7. Light (9 株)	8. Floccose (5 株)	9. Sterile (2 株)
3. 顕微鏡的観察によつて変異株の中には頂囊の大きさ・形状、分生芽胞柄の長さ、梗子の大きさ・形状、胞子の大きさ等に或程度の変化が認められるものあることを知つた。
4. 特定な無機窒素同化能力に欠けているものが相当数存在することを知り、これらは Nitrate non-assimilative, Nitrite non-assimilative, Nitrate and nitrite non-assimilative 及び NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 態・NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 態・NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 態何れの窒素をも同化し得ない Inorganic nitrogen non-assimilative の 4 groups に分類されうることを知つた。

formation of the mutants

C	O	M	G	K	C	O	M	G	K
5					13				
+	±	-	-	+	±	+	-	±	±
±	-	-	-	+	-	±	-	+	±
-	±	-	-	±	±	-	-	-	±
±	±	±	-	±	+	-	+	+	+
-	±	-	-	±	±	-	±	+	±
-	-	-	-	-	-	-	-	±	+
-	-	-	-	+	-	±	-	+	±
-	-	-	±	+	-	±	-	+	±
-	-	-	-	±	±	±	±	±	±
-	-	-	-	±	±	-	-	+	±
-	-	-	-	±	±	-	+	+	±
±	-	-	±	±	+	±	-	±	+

Consumed sugar : sugar was determined by the Bertrand's method.

5. Amylase 力には極端に大きな変動は認められなかつたが、かなり増大したものもあり、減少したものも認められた。

6. 有機酸の生産はその速度の早められるもの、遅くなるものの両者が認められた。有機酸の組成についても、paper chromatographic に追跡して若干の変動のあることを知り得た。

(この報告の要旨は昭和 28 年 7 月日農化西日本支部例会において講演した。)

### 文 献

- 1) 井口 信義：日農化, **23**, 16 (1949) ; **23**, 357 (1950)
- 2) 坂口謹一郎・石谷千代子：日農化, **26**, 18 (1952)
- 3) 飯塚 広・山口辰良：日農化, **26**, 71 (1952)
- 4) 小田雅夫・加茂新重郎・滝口 一・布谷 昭・山泉 敬：醸工, **30**, 120 (1952)
- 5) Matsuo Kanie : Memoirs Fac. Agr. Kagoshima Univ., **1**, 87 (1952)
- 6) 松山 正宣：醸工, **30**, 114 (1952)
- 7) 北原覚雄・久留島通俊：醸工, **27**, 1 (1949)
- 8) 有馬 啓：J. Antibiotics, **III**, 347 (1950)
- 9) R. M. Sandstedt, E. Kneen and M. J. Blish : Cereal Chem., **16**, 712 (1939)
- 10) 北原覚雄・久留島通俊：醸工, **27**, 182 (1949)
- 11) G. de la Haba : Science, **112**, 203 (1950)

## R É S U M É

**Studies on the Mutation of *Aspergillus Kawachii* KITAHARA****Isolation and Characters of the Mutants  
by Ultraviolet Irradiation**

Kiyoshi UTAGAWA and Matsuo KANIE

In order to study the mutation of *Asp. kawachii* KITAHARA by the ultraviolet irradiation, at first, survival and mutation rate was measured.

139 mutants isolated were classified into nine types by macroscopical characters on the effective malt agar: dark brown, tan, restricted, yellow, yellow mycelium, albino, light, floccose, and sterile.

33 strains which most strongly revealed the character of each type as the representatives were selected, and their microscopical and physiological characters were observed.

Some changes in the size and the shape of vesicle and sterigmata, the size of conidia, and the length of conidiophore against the parent strain were found microscopically in some mutants, and these morphological changes occurred most strongly and frequently in restricted, light, floccose, and sterile types.

The existence of a large number of the specific mutants which were absent from the ability in the assimilation of inorganic nitrogen was observed, and it was found that these mutants might be able to arrange in nitrate non-assimilative type, nitrite non-assimilative type, nitrate and nitrite non-assimilative type, and inorganic nitrogen non-assimilative type being unable to assimilate  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ , and  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ .

The mutants without the ability in the assimilation of inorganic nitrogen were involved among those which mutated morphologically in stronger grade.

Extreme alteration in the amylase activity was not observed, and most of the mutants decreased the power of the amylase, but a few strains which surpassed the parent strain were obtained.

Concerning the velocity of the production of the organic acids, some of the mutants were quickened and the others were delayed, and these were assumed to be weakened in citric acid production.

Two strains of the mutants tested revealed the spot of malic acid paper chromatographically against the parent strain.