

[J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 28, 1~12 1993]

## 放線菌 *Streptomyces* sp. FA-No.4 の生産する抗 *Botrytis cinerea* 活性物質の抗菌作用

篠原 隆、内藤憲二、柳田藤寿、後藤昭二

山梨大学工学部発酵化学研究施設  
〒400 甲府市北新 1-13-1

### Antifungal Substance Produced by *Streptomyces* sp. FA-No. 4 and its Antifungal Action against *Botrytis cinerea*

TAKASHI SHINOHARA, KENJI NAITO, FUJITOSHI YANAGIDA and SHOJI GOTO

*Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu 400, Japan*

#### Abstract

A strain of Actinomycetes, *Streptomyces* sp. FA-No.4, was incubated at 25 °C in Waksman medium for 72 hrs at initial pH 7.0 by rotary shaker to produce an antifungal substance against a pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. The major activity was founded in culture liquid and culture mycelia exhibited weak activity. Antifungal activity was thermotolerant at 20 to 40 °C and gradually lost the activity at above 50 °C. Antifungal substance was extracted by ethyl acetate from Waksman culture with the pH adjusted to 4.0. The crude extract was soluble in alkaline solution, alcohols, ethyl acetate and ether, slightly soluble in chloroform, and insoluble in water, acidic solution and hexane; from the results, it was estimated an acidic and lipophilic compound. The antifungal substance inhibited the growth of various fungi, but it had no inhibitory activity against bacteria tested. It showed a good preventive effect to *Botrytis cinerea* BC-045 in *in vitro* test on grape berries. However it was difficult to examine an effect on Riesling grapes in vineyard for damage of grapes caused by other plant diseases at the maturity.

#### 緒 言

*Botrytis cinerea* は糸状菌体と分生子を形成して増殖するカビの一種であり、不完全菌亜門線菌目に属する。本菌は植物に発生する灰色かび病 (Gray mold) の病原菌であり、多数の野菜類、果実類、花類に病害を発生させる。ブドウ栽培においては、その新梢、花、果実に着生して被害を及ぼ

す。一方、欧州系醸造ブドウに感染して、そのブドウ果が乾燥濃縮されて貴腐果となる有用な場合がある。わが国のブドウ畑における *Botrytis cinerea* 菌の分布および生理的性質と病原性について、後藤ら (1, 2) の研究があり、さらに篠原ら (5) は本菌の生成するラッカーゼについて検討した。また、その防除に関して各種農薬が試験された (3, 4)。し

かし一般に農業の使用は耐性菌の出現および残留農薬の問題がある。最近、微生物の生産する農薬が注目されているが、*Botrytis* 菌に関しては、放線菌の生産する次の抗生物質の報告がある。それはマクロライド系(Irumamycin, Cytovaricin) (6, 7)、ラクトン系(SN408, Tautomycetin, Tautomycin) (8-10)、およびペプチド系(Albopeptins) (11)の抗生物質である。しかし農薬として利用されるまでに至っていない。

本研究では放線菌*Streptomyces* sp. FA-No.4の生産する抗菌物質の生成条件、抽出方法 および抗菌力について試験して、その有効性を検討したので報告する。

### 実験方法

#### 1. 供試菌株

- (1) 放線菌*Streptomyces* sp. FA-No.4 (FA4と略記)を使用した。本菌は抗生物質生産菌として和歌山県の土壌から分離された(12)。
- (2) *Botrytis cinerea* BC-045, BC-093, BC-126 (菌株番号を略記)を使用した。本菌は山梨県下のブドウ園で分離されたものである(1)。供試菌のブドウ果への感染力はBC-093 > BC-045 > BC-126の順であった(13, 14)。(3)抗菌スペクトラム検定の試験菌として、*Botrytis bysoidea* IFO 9431, *Aureobasidium mansonii* IFO 8195, *A. pillurans* IFO 6353, *Saccharomyces cerevisiae* IAM 4274を使用した。

#### 2. 培地

- (1) 放線菌培養用 ①Waksman培地：グルコース1.0%、ポリペプトン0.5%、肉エキス0.5%、NaCl 0.5%、pH7.0 ②改変Bennet's培地：グルコース1.0%、ポリペプトン0.2%、肉エキス0.1%、酵母エキス0.1%、pH7.0 ③Nutrient培地：ポリペプトン1.5%、肉エキス0.5%、NaCl 0.5%、 $K_2HPO_4$  0.5%、pH7.0 ④Malt培地：グルコース2.0%、麦芽エキス2.0%、ポリペプトン0.1%、pH7.0 ⑤PD培地：ジャガイモ100gから1Lの培地を調製した(グルコース2%) (16)。
- (2) 抗菌活性試験用PDA培地：上記のPD培地に寒天1.5%を加えた。

#### 3. 抗菌物質

- (1) FA4の培養液、その凍結乾燥物、培養濾液と菌体のそれぞれの凍結乾燥物、および培養液の溶媒抽出物を供試した
- (2) 抗カビ剤2-(チアゾリル)-1H-ベンズイミダゾール(和光純薬工業製、TBZと略記)および市販農薬のロブラール水和剤(成分：イプロ

ディオソ50%、界面活性剤50%；日産化学工業製)を使用した。

#### 4. 抗菌活性試験

- (1) MIC(Minimum inhibitory concentration) 値の測定を寒天平板希釈法によって行った。FA4の培養液の凍結乾燥物、抽出物あるいは薬剤などの抗菌物質を16000  $\mu$ g/mlから100  $\mu$ g/mlまで2倍希釈法でPDA板培地に含有させた。試験用菌体は、予め供試菌を径6mmの円形濾紙を置いたPDA平板培地に20℃、3-7日間前培養して用意した。供試菌体の着生した濾紙を先に調製した抗菌物質含有PDA培地に置いて接種し20℃、7日間培養して生育の有無をみた。
- (2) 円筒寒天平板法(カップ法とする)で行った。PDA平板培地の表面に供試菌を接種したのち、そこにペニシリンカップ(ステンレススチール製、内径6mm、外径8mm、高さ10mm)を3-4個置いた。そのカップの中に抗菌物質溶液0.2mlずつ入れて20℃、7日間培養し、カップ周辺に生ずる生育阻止帯を測定した。なお、生育阻止帯の形成が不定形るとき、その抗菌活性は+/-で表示した。

#### 5. FA4菌株の培養と培養条件の検討

FA4はWaksman 寒天斜面培地に培養し、保存した。それからWaksman培地5mlに接種して25℃、2日間、回転振盪(回転数200rpm、振幅8cm)して前培養した。この前培養液を坂口フラスコ中の250mlのWaksman培地に接種し、25℃、3日間、回転振盪して培養した。本培養液は遠心分離(15,000rpm、10分)ののち、その上清液を孔径0.45  $\mu$ mニトロセルロースフィルターで濾過した。この濾過液をカップ法による抗菌活性試験に供した。培養条件は①各種培地、②培地のpH、③培養時間、を検討した。

#### 6. FA4の生産する抗菌物質の性状

- (1) FA4培養液の菌体破碎の効果をみた。Waksman培地の培養液を超音波破碎機(Tomy社製UR-200P、周波数20kHz、出力100W)によって30分間、破碎処理して、その抗菌活性をみた。
- (2) FA4の培養菌体中の抗菌物質活性をみた。Waksman培地での培養液100mlから遠心分離により菌体を集菌し、これを3回脱イオン水で洗浄したのち、超音波処理して菌体を破碎した。各画分をpH4に調整して酢酸エチルで抽出し、抽出液を濃縮、乾固した。この析出物を70%エタノールに溶解して、カップ法による抗菌活性試験に供した。
- (3) 抗菌物質の耐熱性を調べた。Waksman培地での培養液(濾過液)と培養液の凍結乾燥物を0.4%溶液としたものについて、20-70℃温度範囲で

30分間処理したのち、抗菌活性をみた。

#### 7. 抗菌物質の抽出法の検討

培養濾液100mlをpH4に調整し、これに50mlの溶媒を加えて分液ロートで振盪抽出した。抽出は2回繰返して行い、2回の抽出溶媒層を合わせた(約100mlとなる)のち、ロータリエバポレータで減圧下に濃縮、乾固した。得られる析出物を10mlの70%エタノールに溶解して、カップ法による抗菌試験に供した。抽出溶媒の種類および抽出時のpHについて検討し、さらに粗抽出物の溶解性をみた。

#### 8. ブドウ果粒を用いた抗菌試験

健全なブドウ果粒を一粒ずつ水道水、次いで殺菌水で洗浄し風乾した。そのブドウ果粒を抗菌物質(FA4の培養液の抽出物)あるいは薬剤の溶液に浸漬して、各物質を塗布した。抗菌物質はエタノールに溶解し、さらに400ppm展着剤(キング化学製)を加えて使用した。塗布処理したブドウ果粒は深皿シャーレの中の金網上に並べた。対照として無処理のブドウ果粒を3-5個入れた。これらの果粒上に検定用*Botrytis cinerea*の胞子を散布して接種した。シャーレ内には殺菌水を浸した濾紙を置いて湿室とした。のち蓋をして20°C、14日間培養し、感染状況を観察した。リースリングブドウの果粒はそのまま使用したが、甲州ブドウの場合、果粒はクロロホルムによってワックス除去処理して使用した。

#### 9. 屋外の栽培ブドウにおける抗菌試験

(1) 1989年秋期試験: 本施設のブドウ育種試験地で栽培されているリースリングブドウ樹の結果枝を取り木し、鉢植えとしたものを熟期(9月9日)に母樹より分離した。試験区は対照を含めて4区設定し、一区当たり一ないし二木を使用した。一木(一鉢)当たり3-8房の果実を有し、枝に付いた状態で試験に供した。ブドウ果実は1%酢酸、次いで殺菌水で洗浄し、その後抗菌物質の溶液に浸漬して処理した。供試したのはFA4培養液の凍結濃縮物の1%水溶液であった。その1日後に、約半数の果実に先に培養した*Botrytis cinerea*の胞子を接種した。これらの試験区は本施設内のブドウ園の中に置いて、その病害の発生状況を21日間にわたり観察した。のち、試験ブドウを収穫して(10月4日)、分析した。

(2) 1990年秋期試験: ブドウ育種試験地のリースリング樹について試験した。試験区は対照を含めて4区とし、一区当たり2-5枝に付いたブドウ果実を試験した。供試したのはFA4培養菌体の酢酸エチル抽出物をアルミナに吸着させたもの(S-1:2g/L、粗抽出物として20mg/L)、酢酸エチル抽出物に培養菌体を混合したもの(S-2:

粗抽出物20mg/L+菌体5g/L)、および培養菌体(S-3:5g/L)であり、各水溶液をスプレーによってブドウ果実に噴霧して処理した(9月12日)。なお各溶液には展着剤200ppm添加して使用した。噴霧処理の6日後に先に培養した*Botrytis cinerea*の胞子をS-2区とS-3区の一部のブドウ果実に接種した。試験区は15日間にわたり病害の発生を観察し、のちブドウを収穫して分析した(9月27日)。分析法は既報(5,17)に従った。

#### 実験結果および考察

##### 1. FA4の培養条件と抗菌活性

(1) 培地の種類: Waksman培地などの5種類の培地ならびにWaksman培地に大豆粉と澱粉を添加した場合の結果をTable 1に示した。

FA4培養後の抗菌活性は、高い順にWaksman, Nutrient, PDA, Bennet's, Malt培地の順であった。また、抗菌活性の高い培地は菌体生成量が多かった。Bennet'sおよびMalt培地ではほとんど抗菌活性がみられなかった。Waksman培地に大豆粉を添加した場合に抗菌活性が僅かながら高められた。しかし、澱粉添加の効果はみられなかった(5)。以上の結果からFA4の培養にはWaksman培地あるいはWaksman培地に大豆粉を添加した培地を使用した。

Table 1. Antifungal Activity in the Culture of *Streptomyces* sp. FA4 with Various Media

Medium	Growth OD <sub>680</sub>	Inhibitory activity <sup>a)</sup>
Waksman	3.3	++
Nutrient	2.0	+
PDA	1.0	+
Bennet's	0.9	+/-
Malt	0.5	-

Medium	tester strain	Inhibitory activity
Waksman	BC-045	17mm <sup>b)</sup>
(Control)	BC-093	+
	BC-126	17
Waksman	BC-045	19
+soybean	BC-093	18
powde	BC-126	18
Waksman	BC-045	16
+starch <sup>c)</sup>	BC-093	+/-
	BC-126	+

a) Growth inhibitory activity by cup method; tester strain: BC-126.

b) Diameter of inhibitory zone by cup method.

c) Additive content, 1%.

(2) 培地のpH: Waksman培地のpH3.0-9.0およびpH7.0-12.0に調整してFA4を培養し、その抗菌活性をみた (Table 2, 3)。抗菌活性はpH6からアルカリ側において高い結果であり、pH10で最も高い抗菌活性が示された。また、生成菌体量もアルカリ側で高い値であった。

なお、検定菌として*Sacch. cerevisiae* IAM 4274を使用した場合においても、pH10-11において高い活性が示された(15)。以後、培地のpHは7.0あるいはよりアルカリ側に調整した。

(3) 培養時間の影響: Waksman培地における経時

的抗菌活性の変化をみた (Table 4)。抗菌活性は培養72時間で最も高くなり、また、菌体生成量は培養60時間で最大であった。これらの結果は先の報告(13)にほぼ一致した。

2. 培養液の菌体破碎効果および培養菌体中の抗菌活性

培養液の超音波処理の結果をTable 5に示した。抗菌活性は菌体破碎によって約20%ほど高められた。この効果はFig. 1に示した結果から、培養菌体に付着した抗菌物質が培養液中に分散したためと考えられた。

Table 2. Influence of pH Correction of Waksman Medium on Antifungal Activity-(1)

Initial pH	pH						
	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
Growth (OD <sub>660</sub> )	0.05	0.06	5.80	2.90	3.70	4.10	4.80
Final pH <sup>a)</sup>	3.15	4.15	6.75	8.00	8.08	8.00	8.15
Inhibitory activity <sup>b)</sup>	-	+/-	+/-	+	+	+	+

a) After cultivation.

b) Cup method, tester strain: BC-126

Table 3. Influence of pH Correction of Waksman Medium on Antifungal Activity-(2)

Initial pH	pH					
	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0
Growth (OD <sub>660</sub> )	2.20	2.51	2.30	2.55	2.60	1.95
Final pH <sup>a)</sup>	8.21	8.50	8.55	8.60	8.60	8.90
Inhibitory activity (mm) <sup>b)</sup>	14.5	14.9	16.1	17.6	16.1	+/-

a) After cultivation.

b) Cup method, tester strain: BC-126.

Table 4. Evolution of Antifungal Activity during the Cultivation

Culture	Culture time (hr)									
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108
Growth <sup>a)</sup>	1.55	1.71	2.10	2.78	3.48	4.15	3.62	3.12	2.65	2.60
Final pH	6.8	6.8	7.2	7.2	7.1	7.2	7.6	7.9	8.2	8.5
Inhibit. act. (mm) <sup>b)</sup>	-	+/-	9.0	14.0	15.0	15.7	16.9	15.1	13.4	12.0

a) Waksman medium, OD<sub>660</sub>.

b) Growth inhibitory activity by cup method, tester strain: BC-126.

Table 5. Effect of Ultrasonic Treatment of the Culture on Antifungal Activity

	Growth inhibitory activity (mm) <sup>a)</sup>
Ultrasonic treatment	17.3
Control	14.0

a) Cup method, tester strain BC-045.

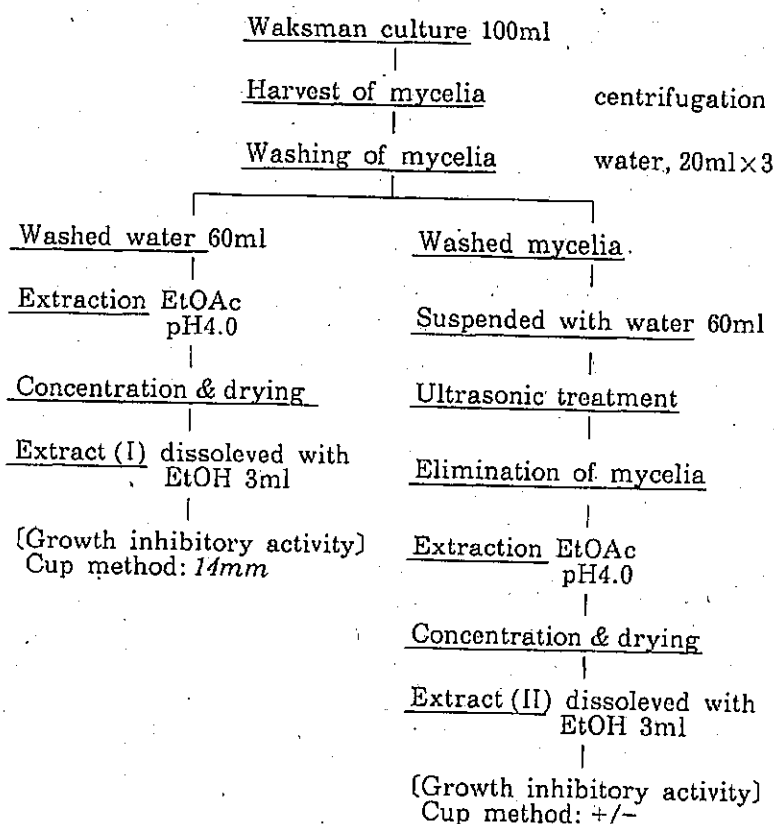


Fig. 1. Distribution of Antifungal Substance in the Culture of *Streptomyces* sp. FA4. Tester strain: BC-045

培養菌体を洗浄して菌体に付着した抗菌活性物質を集めた区分 (Extract-I) には、はっきりと抗菌活性が認められたが、菌体区分 (Extract-II) には、ほとんど活性がみられなかった (Fig. 1)。

3. 抗菌物質の熱耐性

熱耐性試験の結果を Table 6 に示した。培養濾液

の抗菌活性は40℃まではほぼ一定であったが、50℃より低下が示された。しかし、70℃においても約50%の活性が残存した。また、培養液濃縮物の抗菌活性は20-70℃の範囲でほぼ一定であって、高温における活性の低下はわずかであった。以上の結果から、本抗菌物質は熱安定性の高いことが認められた。

Table 6. Thermostability of Antifungal Substance

Lot	Growth inhibitory activity (mm) <sup>a)</sup>					
	Temperature(°C)					
	20	30	40	50	60	70
Culture medium <sup>a)</sup>	22.3	21.3	20.5	17.8	15.3	11.5
Broth concentrate <sup>b)</sup>	22.0	23.0	22.0	21.5	21.3	21.4

a) Filtrate of Waksman culture.

b) Freeze-dried culture broth, 0.4% solution.

c) Cup method, tester strain: BC-045.

4. 抗菌物質の抽出条件および粗抽出物の溶解性
- (1) pHの影響: FA4の培養濾液のpHを1-9調整してn-ブタノールあるいは酢酸エチルで抽出し、その抗菌活性をみた(Table 7)。その結果、pH3-4が高い抗菌活性を示した。また、pHを中性としても、抗菌活性が大きく低下することはない。以後、pH4.0に調整して抗菌物質を抽出することとした。
- (2) 抽出溶媒の種類: 5種類の溶媒について抽出効果をもみた(Table 8)。  
n-ブタノールおよび酢酸エチルが高い抽出効

果を示した。酢酸エチルは抽出操作が容易であり、以後、抽出は本溶媒を使用した。酢酸エチルによる抽出によって、培養液1リットルから51mgの粗抽出物を得た。

- (3) 粗抽出物(抗菌物質)の溶解性: 各溶液の溶解性についてTable 9に示した。

粗抽出物はアルカリ溶液に可溶であったが、酸性溶液に不溶であった。また、アルコール系の溶媒に溶解性を示した。以上から、抗菌物質は脂質系の酸性物質であることが推定された。

Table 7. Influence of pH Adjustment on the Extraction of Antifungal Substance from the Culture

Lot	Growth inhibitory activity (mm) <sup>c)</sup>								
	pH								
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
n-BuOH <sup>a)</sup>	-	-	+/-	++	+	+	+/-	+/-	+/-
EtOAc <sup>b)</sup>	NT <sup>d)</sup>	NT	26	24	23	21	22	24	23
EtOAc <sup>b)</sup>	19	19	21	20	NT	NT	17	NT	NT

a) Waksman medium; extraction by n-Butanol.

b) Medium: Waksman + soybean powder; extraction by ethyl acetate (Data from A. Sasano: 15).

c) Cup method, tester strain: BC-045.

d) Not tested.

Table 8. Extraction of Antifungal Substance by Various Solvents

Solvent	Growth inhibitory activity (mm) <sup>a)</sup>
n-Butanol	19.0
Ethyl acetate	19.0
Butyl acetate	15.0
Isopropyl ether	12.0
Chloroform	16.5

a) Waksman culture of *Streptomyces* sp. FA 4 was tested; the culture was adjusted its pH to 4.0 for extraction.

a) Cup method, tester strain: BC-045.

Table 9. Solubility of Crude Extract from the Culture<sup>a)</sup>

Solubility	Solvent
Soluble	0.5N-NaOH, 0.5% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ,
	Methanol, Ethanol, n-Butanol,
	Ether, Acetone, Ethyl acetate
Slightly soluble	: Chloroform
Insoluble	: Water, 0.5n-HCl, Hexane, Benzene

a) Ethyl acetate was used for the extraction.

## 5. 抗菌物質の抗菌活性

(1) 培養液および粗抽出物の抗菌活性：抗菌活性は MIC およびカップ法で測定した。培養液 (Broth)、培養濾液 (Filtrate) および菌体 (Mycelia) の凍結乾燥物について、MIC 法で抗菌活性をみた (Table 10)。抗菌活性が 4000 microgram/ml 以上で認められた。元の培養液と培養濾液の固形物濃度は、それぞれ 5.5g/l (5.5mg/ml) および 3.3g/l (3.3mg/ml) であったので、供試濃度 4000 microgram/ml はほぼ原液の濃度に一致する。すなわち元の培養液濃度、あるいはその 4 倍濃度以上の試料において、はっきりと抗菌活性が示された。

しかし菌体について、元の濃度は 0.84g/l (0.84mg/ml) であって、その約 5 倍濃度 (供試濃度 4000 microgram/ml) で弱い抗菌活性がみられた。

カップ法によって明確で、再現性の良い抗菌活性の結果を得た。そこで抗菌活性物質の溶媒抽出における抽出効率をみた (Table 11) (15)。

溶媒 (酢酸エチル) 抽出による抗菌活性物質の回収率は、40-50% にとどまった。

(2) 抗菌スペクトラム：抗菌物質の各種微生物に対する抗菌活性をみた (Table 12)。抗菌活性はカビや酵母などの真核微生物に対して示されたが、細菌類には示されなかった。

Table 10. Antifungal Activity in the Culture of *Streptomyces* sp. FA4

Concentration (microgram/ml)	Growth inhibitory activity <sup>a)</sup>		
	Culture concentrate <sup>b)</sup> :		
	Broth	Filtrate	Mycelia
1 0 0 0	-	-	-
4 0 0 0	+/-	+	+/-
1 6 0 0 0	+	+	NT
6 4 0 0 0	+	+	NT

a) MIC method, tester strain: BC-045; -: no activity, +/-: weak activity, +: positive activity; NT: not tested.

b) Freeze-dried substances of the Waksman culture.

Table 11. Antifungal Activity of Crude Extract from Waksman Culture

	Experimental data :	Theoretical data
Culture filtrate		
Inhibitory act. (A) <sup>a)</sup>	10-22mm	16mm
Inhibitory unit (B)	0.75-1.38	1.0
Lot volume	100ml(x1)	100ml(x1)
Crude extract		
Inhibitory act. (C)	[20-26mm]x2	16mm x5
Inhibitory act. (D)	2.0-2.5	5.0
Lot volume	20ml(x1/5)	20ml(x1/5)
Recovery of antifungal substance:		
(i) [D/Bx5] x100(%) or (ii) [C/AX5] x100(%)		

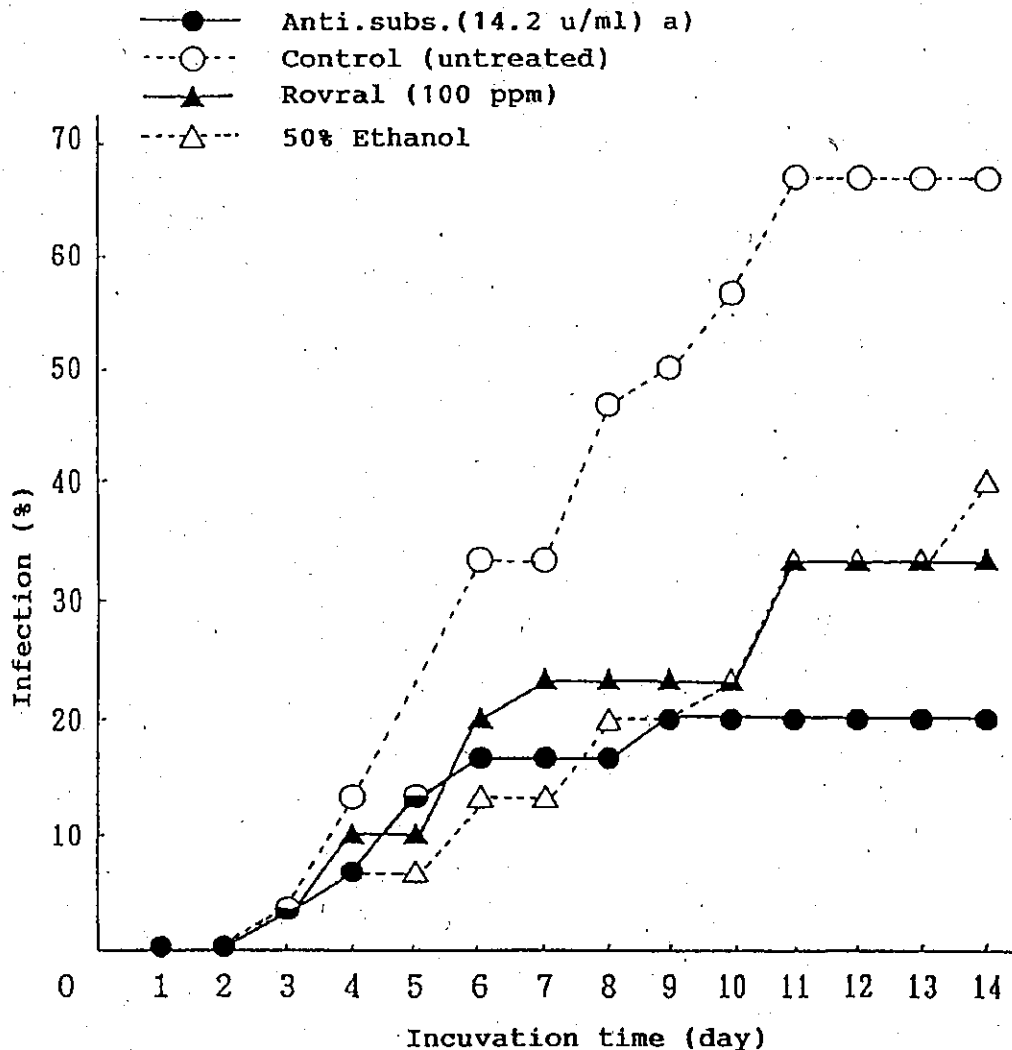
a) Growth inhibitory activity by cup method; tester strain: BC-045.

Table 12. Antimicrobial Spectrum of the Antifungal Substance Produced by *Streptomyces* sp. FA4

Tester strain	Antimicrobial activity <sup>a)</sup>
<i>Botrytis cinerea</i> BC-045	++
<i>B. bysoidea</i> IFO-9431	++
<i>Aureobasidium mansonii</i> IFO-8195	++
<i>A. pullulans</i> IFO-6353	++
<i>Cladosporium</i> sp. <sup>b)</sup>	++
<i>Rosellinia necatrix</i> IFO-9420 <sup>b)</sup>	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IAM-4274	++
<i>Echerichia coli</i> K-12 IFO-3301 <sup>b)</sup>	-
<i>Bacillus subtilis</i> IFO-12210 <sup>b)</sup>	-
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO-3060 <sup>b)</sup>	-

a) 1% Culture concentrate was used.

b) Data from F. Sato (12).

Fig. 2. *Botrytis* Infection on Riesling Berries *in vitro* after Treatment with the Antifungal Substance from *Streptomyces* sp. FA4, Rovral, 50% Ethanol, and Control.

a) Antifungal substance; 1u=16mm, inhibitory activity (see Table 11.). Tester strain: BC-045.



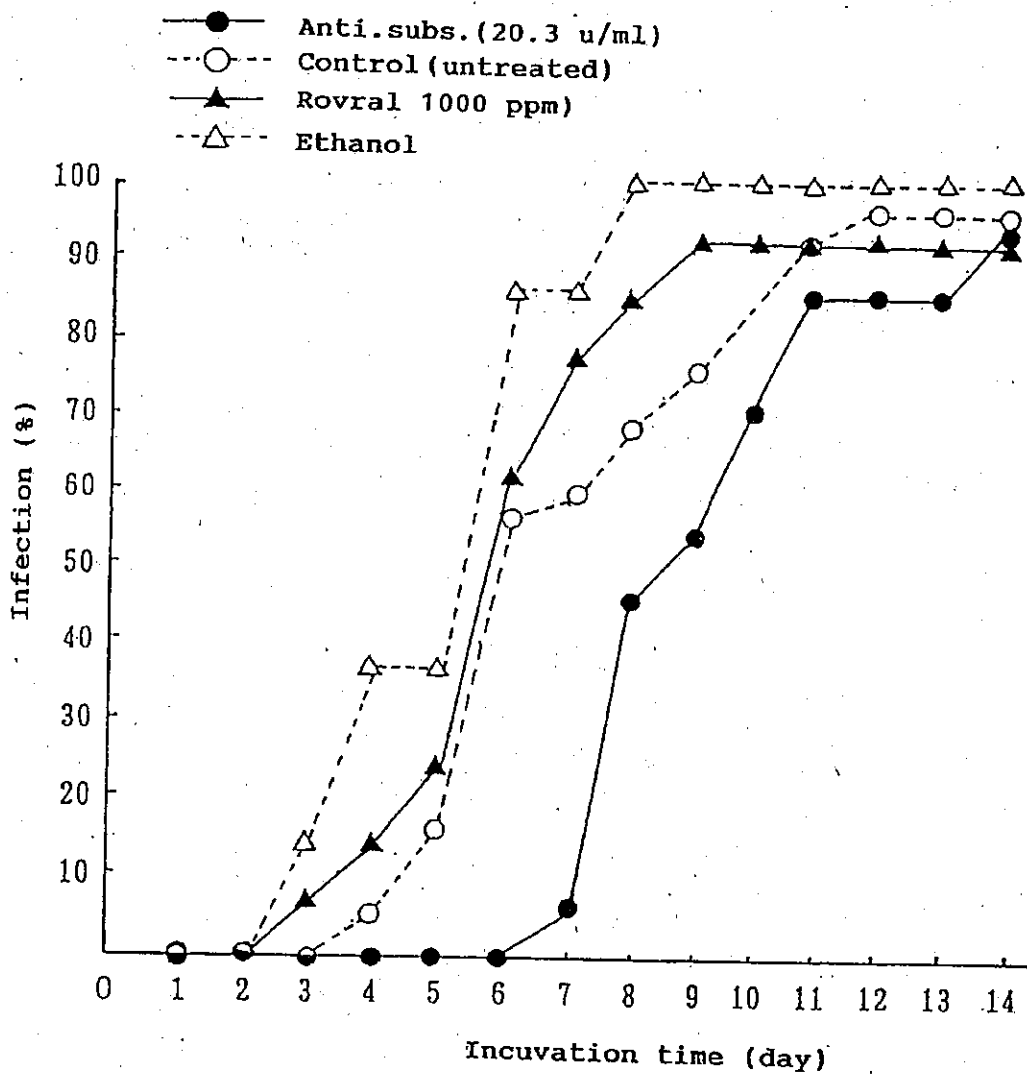


Fig. 3. *Botrytis* Infection on Koshu Berries *in vitro* after Treatment with the Antifungal Substance from *Streptomyces* sp. FA4, Rovial, 50% Ethanol, and Control. Skin wax of Koshu berries was reduced by washing with chloroform to facilitate the infection of *Botrytis cinerea* BC-045.

#### 6. ブドウ果粒を用いた抗菌活性試験

抗菌活性物質（粗抽出物）を塗布したブドウ果粒に *Botrytis cinerea* を接種して、その感染状態を観察した (Fig. 2, 3) (15)。リースリングブドウ果粒を用いた場合、抗菌力が明白に示された。その抗菌力は農薬であるロブラール100ppmとほぼ同程度であった。甲州ブドウ果粒を用いた場合、抗菌力は一次的に示されたが、培養7日目より感染し、11日目ではほぼ90%の感染率となっており、抗菌力に持続性がみられなかった。この場合、甲州ブドウ果粒は果皮ワックスの除去処理をして供試した。そのために果粒表面の状態が変化しており、本抗菌物質および

ロブラールに強い抗菌力がみられなかったと考えられた。

#### 7. 屋外の栽培ブドウにおける抗菌活性試験

(1) 1989年秋期試験の結果：本試験においては、*Botrytis cinerea* の生育に加えて晩腐病などの病害が急速に発生して、抗菌物質処理区と対照区に差違がみられなかった (Table 13)。

試験区のブドウを収穫して分析した (Table 14)。分析値から抗菌物質処理の効果はみられなかった。また、ラッカーゼ活性が試験区の一部に微弱にしか認められなかったことから、*Botrytis cinerea* の感染は僅かであったと考えられた。

Table 13. Fungal Infection of Riesling Grapes after Treatment with the Culture Concentrates of *Streptomyces* sp. FA4

Day (Date)	Treatment for grapes <sup>a)</sup>							
	Cont./Bc		Broth/Bc		Filtrate/Bc		Mycelia/Bc	
0 (9/11)	- <sup>b)</sup>	-	-	-	-	-	-	-
5 (9/16)	+	+	+	+	+	+	+	+
14 (9/25)	+	+	++	++	++	++	++	+
21 (10/2)	++	+	+++	++	++	+++	++	++

a) Cont./Bc: Control (untreated) and inoculation of *Botrytis cinerea* BC-045. 1% Culture concentrate solutions of broth, filtrate and mycelia, and inoculations of *Botrytis cinerea* BC-045.

Inhibitory activity of the culture concentrates was show in Table 10.

b) -: no infection, +: 5-20%, ++: 21-50%, +++: >51% (percent for infected grapes).

Table 14. Analysis of Riesling Grapes Treated with the Culture Concentrates of *Streptomyces* sp. FA4

Component	Treatment <sup>a)</sup>							
	Cont./Bc		Broth/Bc		Filtrate/Bc		Mycelia/Bc	
Sugar content (%)	16.4	17.0	19.0	14.8	15.5	14.5	15.5	16.0
pH	3.35	3.40	3.32	3.25	3.30	34.5	3.40	34.5
Total acid (g/L)	9.26	8.66	10.91	12.19	8.50	10.24	9.03	11.52
Laccase (u/ml) <sup>b)</sup>	0	0	0	0	0.2	0.3	0	0.1

a) See Table 13. Grapes were harvested in October 4th, 1989.

b) Polyphenol oxydase activity derived from fungal infection.

(2) 1990年秋期試験の結果：本試験においても、降水や高温の気象条件の影響を受けて、ブドウ果実の玉割れと一般病害が急速に進行した。このために抗菌物質処理区と対照区に差違がみられなかった。また、*Botrytis cinerea*の感染はほとんど見られず、その果実中にはラッカーゼ活性が認められなかった(Table 15)。

試験対象ブドウとしてリースリング種を使用した。本品種は*Botrytis cinerea*に感染し易いことから選んだものである。しかし、今回の試験において、その収穫時期の秋雨あるいは台風など

の降水によって、ブドウ果実が急速に玉割れや一般病害で腐敗したために、抗菌活性物質の効果をみる事ができなかった。今後、リースリングブドウを試験する場合は、一定面積をビニールハウス様にカバーして降水を制限して試験するか、より冷涼な気候のところ、例えば長野県下のブドウ園での試験が適当と考える。また、より晩熟型のブドウ品種による試験が考えられる。本抗菌物質は明確な抗*Botrytis cinerea*活性を有しており、さらにその施用方法の検討が必要と考えられた。

Table 15. Analysis of Riesling Grapes Treated with the Antifungal Substance Produced by *Streptomyces* sp. FA4

Lot <sup>a)</sup>	Infection <sup>b)</sup>	Grape composition			
		Sugar (%)	pH	Total acid (g/L)	Laccase (u/ml)
S-1(1)	++	12.8	3.28	9.68	0
S-1(2)	++	13.8	3.50	7.95	0
S-2(1)	++	12.6	3.25	8.33	0
S-2(2)	++	13.2	3.30	9.98	0
S-2(3)	++	14.0	3.25	9.90	0
S-2/Bc(1)	+++	13.8	3.30	11.65	0
S-2/Bc(2)	++	12.8	3.30	14.40	0
S-3(1)	+	13.4	3.30	7.95	0
S-3(2)	+	12.8	3.30	7.73	0
S-3(3)	++	11.6	3.35	7.16	0
S-3/Bc	++	15.0	3.15	9.94	0
Control(1)	++	13.8	3.10	10.35	0
Control(2)	+++	16.6	3.30	7.35	0

- a) S-1: crude extract absorbed in alumina 2g/L.  
 S-2: crude extract 20mg/L + mycelia 5g/L. S-2/Bc: treatment with S-2 and inoculation of *Botrytis cinerea* BC-045.  
 S-3: mycelia 5g/L. S-3/Bc: treatment with S-3 and inoculation of *Botrytis cinerea* BC-045.  
 Control: untreated.
- b) Infection of grapes. +: 5-20%, ++: 21-50%, +++>51% (percent for infected grapes). Grapes were treated in September 12th and harvested in September 27th, 1990.

## 要 約

1. 抗菌物質生産のための放線菌 *Streptomyces* sp. FA4の培養条件は、Waksman培地を使用し、そのpHを7-10に調整して、25℃で72時間の回転振盪培養であった。培養菌体中の抗菌活性は僅かであり、その大部分は培養液に存在した。
2. 抗菌物質は20-70℃の範囲に耐熱性を有したが50℃以上で次第に活性が低下した。
3. 培養液から抗菌物質の抽出は、培養液のpHを4.0として酢酸エチルで行った。この場合の回収率は40-50%にとどまった。
4. 抽出された抗菌物質(粗抽出物)の溶解性は、アルカリ溶液、アルコール類、酢酸エチル、エーテルなどに可溶、クロロホルムに難溶、水、酸性溶液、ヘキササンなどに不溶であった。それより抗菌物質は脂質系の酸性物質と推定された。
5. 抗菌スペクトラムをみたところ、カビ類および

- 酵母に対して抗菌活性を有したが、細菌類に対して、抗菌活性を有しなかった。
6. ブドウ果粒を用いた抗 *Botrytis cinerea* 試験で抗菌活性が認められた。しかし、抗菌活性は供試ブドウによって異なった。
  7. 屋外の栽培ブドウについて抗菌物質の施用試験を実施した。試験したリースリングブドウは、熟期に達すると急速に玉割れと一般病害が進行したために、その活性については判定できなかった。

本研究の遂行に当たり、抗菌物質の調製、試験菌の分譲などにご協力下さいました多木化学株式会社 前川義雄氏に深謝いたします。また、抗生物質の実験法についてご教示下さいました北里研究所 大村智所長、岩井讓研究部長、増間博士および塩見博士に深謝いたします。

## 文 献

- (1) 後藤昭二, 寺林隆志, 横塚勇: 農化, 54, 117-121 (1980).
- (2) 後藤昭二, 青野力三: 山梨大学発研報告, 16, 1-4 (1981).
- (3) 後藤昭二, 寺林隆志, 横塚勇: 農化, 54, 123-124 (1980).
- (4) 上野雄靖, 里吉弘行, 戸川英夫, 井理正彦: 醸協, 74, 264-268 (1979).
- (5) 篠原隆, 後藤昭二: 醸協, 86, 453-455 (1991).
- (6) S.Omura, Y.Tanaka, A.Nakagawa, Y.Iwai, M.Inoue, and H.Tanaka: *J.Antibiotics*, 35, 256-257 (1982).
- (7) T.Kitahara, H.Kusakabe, G.Nakamura, T.Sakurai, and K.Isono: *J.Antibiotics*, 34, 1073-1074 (1981).
- (8) 児玉亭, 岩澤律夫, 橋本昌樹, 斎藤雅之, 深見治一, 田中隆治, 宗和弘, 大塚範夫: 1992年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1992, p. 210.
- (9) X.-C.Cheng, T.Kihara, X.Ying, M.Uramoto, H.Osada, H.Kusakabe, B.-N.Wang, Y.Kobayashi, K.Ko, I.Yamaguchi, Y.-C.Shen, and K.Isono: *J.Antibiotics*, 42, 141-144 (1989).
- (10) X.-C.Cheng, T.Kihara, H.Kusakabe, J.Magae, Y.Kobayashi, R.-P.Fang, Z.-F.Ni, Y.-C.Shen, K.Ko, I.Yamaguchi, and K.Isono: *J.Antibiotics*, 40, 907-909 (1987).
- (11) K.Isono, K.Kobinata, H.Oikawa, H.Kusakabe, M.Uramoto, K.Ko, T.Misato, S.-W.Tai, C.-T.Ni, and Y.-C.Shen: *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2163-2165 (1986).
- (12) 佐藤文彦: 多木化学(株)バイオ事業推進室レポート, 1989.
- (13) 新津源明: 山梨大学発酵生産学科卒業論文, 1991. 3. 6.
- (14) 内藤憲二: 山梨大学発酵生産学科卒業論文, 1992. 3. 9.
- (15) 笹野麻理: 山梨大学化学生物工学科卒業論文, 1993. 3. 8.
- (16) 飯塚廣, 後藤昭二: 酵母の分類同定法, 東京大学出版会, 東京, 1969, pp134-135.
- (17) 山梨大学発酵化学研究施設果実酒醸造研究部門編: 果実酒の分析法, 1990.