- (3) 山崎 : 農化, 5, 481 (1929). (7) 松山 : *ibid* 26, 638 (1952).
 (4) 松山 : 農化, 27, 7~11 (1953). (8) HINSHELWOOD *The Chemical kinetics of the Bacterial Cell*, 161~165 (1946).
 (5) FISHER : *Statistical Methods for Research Workers* (1950) (遠藤等邦訳, 47~49 頁). (9) HINSHELWOOD : *ibid.*, 121~126 (1946).
 (6) 松山 : 農化, 26, 513 (1952).

Summary

(1) For the viable counting of the Hiochi bacteria putrefying Sake the capillary tube method using the diluted Sake agar containing 1% peptone was available. By the addition of Na-thioglycolate to this medium, the development of the colonies was stimulated, but the colony number was not increased.

(2) Through this method of the viable counting, the growth curves of five strains were measured. As the results, it was established that they fitted to VERHURST's logistic curve by means of the finite difference diagram discussed in the previous report⁽⁶⁾ (Fig. 1). Two strains incubated for 6 months at 30° were shown the composite growth curves (Fig. 2).

酵母の Amino Acids 及び Vitamins 要求に就て (第 3 報)

高 橋 雅 弘 (東京大学農学部農芸化学科醸酵学教室)

昭和 29 年 1 月 9 日 受理

Studies on the Requirements of Amino Acids and Vitamins of Yeasts. Part 3.

By Masahiro TAKAHASHI (Department of Agricultural Chemistry,
Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

第 1, 2 報に於て著者は酵母特に *Saccharomyces* 属の繁殖時に於ける無機窒素源, 有機窒素源, 並びに vitamins の関係に就き報告した。即ち *Saccharomyces* 属に於ては窒素源として硫安を用いた場合 vitamins を必要とせず, amino acids を窒素源とする場合 vitamins を要求する。しかも要求する vitamins は実用上分類されている清酒酵母, アルコール酵母, ビール酵母の 3 群に特異性のある事を認めた。

著者は本報に於て 3 群の中より清酒酵母を取上げ, 無機窒素源として硫安, 有機窒素源として amino acids を与え, これらと vitamins の関係に就き実験を進めた結果を報告する。

実験 1. 清酒酵母は前報に於ても認めた如く, 硫安を窒素源とした場合は vitamins を必要とせず, amino acids を用いる場合に vitamins を要求する。この事実から amino acids に硫安を添加した場合又は硫安に amino acids を添加した場合は繁殖は如何なるか。更に amino acids の代りに酸アミドである asparagine と硫安を同時に窒素源として与えた場合は如何なる繁殖を示すか。この試験をする為に次の実験を行なった。

実験方法 : 前報に準じて行なつた。

培養液 : Table 1 に示す如く, 葡萄糖, 塩類に窒素源として amino acids (18 種混合), 硫安, asparagine

Table 1. Composition of the Culture Medium.

(1) Amino acids + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.	} + Glucose + Salts solution.
(2) Amino acids + Asparagine.	
(3) Amino acids + Pantothenic acid	
(4) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.	
(5) Asparagine.	

Sugar : 5% as glucose.

Total Nitrogen : 0.03%

Salts solution : (1) Salts solution 50 ml/l.

KH_2PO_4 22g ; KCl 17g ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5g ; MgSO_4 5g ; FeCl_3 0.1g ; MnSO_4 0.1g ; Fill up to 1l by dist. water.

(2) Citrate buffer. 25 ml/l. $\text{K}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100g, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 20g. Fill up to 1l by dist. water.

Pantothenic acid. 1 mg/l.

pH 4.8.

を与え, 更に清酒酵母の必須 vitamin たる pantothenic acid を添加した合計 5 種類の培養液を調製した。各培養液は 2 cc 宛殺菌試験管に pH 4.8 に調節後分注, 115°, 15 分間殺菌培養液とした。

前培養 : 斜面培養せる酵母 1 白金耳を試験管培地 (Ballg. 4) 5 cc に接種 30°, 24 時間培養後同前培地

に植次ぎ 30°, 20~24 時間培養し接種菌体とする。

接 種 : 前培養を遠心分離し, 上澄を傾斜除去後殺菌生理的食塩水に懸濁遠心分離し上澄を傾斜除去する。此の菌体洗滌操作を 2 度繰返し菌体を完全に洗滌後遠心分離して秤量する。この菌体を更に生理的食塩水に 1 cc 中 100,000 以下になるよう懸濁, 稀釈菌体とし, 殺菌スポイトを以て 0.05 cc 宛前記 2 cc 培養液に滴下接種する。

測定法 : 接種後増殖に伴う混濁度を光電比色計を以て測定した。

使用酵母 *Saccharomyces Sake* (協会酵母 4 号) 及び (協会酵母 7 号)

実験結果は Fig. 1 に示す如く

(1) Amino acids に硫酸を添加しても全く繁殖を認めない。

(2) Amino acids に asparagine を添加しても硫酸同様繁殖しない。

(3) 硫酸単独に使用した場合, 及び amino acids に pantothenic acid 添加は前報同様繁殖を示した。

(4) Asparagine を単独に窒素源にしても亦繁殖を認めない。

以上の結果から amino acids に硫酸を添加しても繁殖しないのは一応所謂 C:N Ratio の関係も考慮に入れる必要を認め得る。又 asparagine は HYDUCK 氏酵母培養液の窒素源として使用されているのは前報にも示した接種菌体量を多くしているからであると判断される。合成培地の使用に際し特に vitamins の添加が良好な繁殖を示すことから考えても, これらの合成培地の栄養は完全なものとは考えられない。

実験 (1) でこのような結果を示したので, 更に C:N Ratio を考慮に入れて次の実験を行った。

実験 2. 前述の実験で amino acids 混合及び asparagine を窒素源にした培地では何れも pantothenic acid

Table 2. Composition of the Culture Medium.

- (1) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.03%, as nitrogen
 (2) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Amino acids. (Mixtures are shown below)
 (3) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Asparagine (Mixture rates are shown below)
 (4) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Amino acids, + Pantothenic acid.)

(2)(3) Composition of the nitrogen source. (Total N=0.03%)

	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Mixture of amino acids or Asparagine
1	100%	0%
2	90	10
3	80	20
4	10	30
5	60	40
6	50	50
7	40	60
8	30	70
9	20	80
10	10	90
11	0	100

Sugar. : 5% as Glucose

Salts solution : See Table. 1.

Pantothenic acid : 1mg/l.

pH. 4.8

enic acid を必要とすることを認めた。他方両者に硫

安を添加した実験に於ては各培地中の全窒素量と糖の割合即ち所謂 C:N Ratio が考慮に入れてない。そこで C:N Ratio を考慮に入れた Table 2 の如き培地を調製した。

Fig. 1. Effect of Amino Acids, Asparagine and Pantothenate on the Growth of Yeasts.

- (1) Medium, Contained amino acids & $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 (2) Medium, contained amino acids & asparagine.
 (3) Medium, added pantothenate.
 (4) Basal medium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 (5) Medium of asparagine.

Fig. 2. Effect of Aminoacids, Asparagine and Pantothenate on the Growth of yeasts

- (1) Medium of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 (2) Medium, contained Amino acids & $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 (3) Medium, contained Asparagine & $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 (4) Medium, contained Amino acids & pantothenate & $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 * c.f. Table 2

培養液調製, 前培養, 接種, 使用酵母, 測定法は何れも前実験と同様な方法に依つて行つた. 実験結果は Fig. 2 に示す如くである. 要約すると,

(1) 硫安に amino acids を添加する場合は割合の如何に拘らず全く繁殖を示さない.

(2) 硫安に asparagine を添加する場合は asparagine の割合が多くなるに従い定量的に繁殖が劣る. 特に asparagine が全窒素の 60% 以上をしめると 144 時間を経過しても繁殖を認め得ない.

(3) その他の培地に於ては前回迄の実験結果と等しく前回同様な繁殖を認めた.

以上の結果から清酒酵母の増殖に対して amino acids 併びに asparagine は何等かの阻害作用をしている如く考えられる.

特に amino acids は阻害の傾向が強く現われている.

実験 3. 実験 2 に依り清酒酵母の増殖に対し, amino acids が発芽阻害をなしていることを認めたので 先ず硫安 (窒素として 0.03%) に各 amino acid を単独に添加して窒素源として与えた培地を調製, 其の影響を検討した.

Table 3. Composition of the Culture Medium.
(NH₄)₂SO₄ + Amino acid. + Glucose + Salts solution.

		(NH ₄) ₂ SO ₄ .				0.03% as nitrogen.					
		Glucose				5%.					
		Salts solution :				See Table 1.					
		Amino acid				pH 4.8					
		hrs.				hrs.					
Amino acids.	mg/Md.l	40	48	72	96	Amino acid	mg/Md.l	40	48	72	96
1. <i>dl</i> -Alanine	400	+	+	+	+	10. <i>l</i> -Proline	400	+	+	+	+
2. <i>dl</i> -Aspartic acid	800	+	+	+	+	11. <i>dl</i> -Threonine	400	—	+	+	+
3. <i>l</i> -Arginine	400	—	—	±	±	12. <i>l</i> -Tyrosine	200	—	+	+	+
4. <i>l</i> -Glutamic acid	1000	—	—	+	+	13. <i>dl</i> -Valine	400	—	+	+	+
5. <i>l</i> -Lysine HCl H ₂ O	400	+	+	+	+	14. <i>dl</i> -Tryptophan	200	+	+	+	+
6. <i>l</i> -Histidine HCl	200	—	—	—	—	15. <i>l</i> -Cystine	200	+	+	+	+
7. <i>dl</i> -iso Leucine	400	—	—	+	+	16. <i>dl</i> -Serine	200	—	—	+	+
8. <i>dl</i> -Methionine	400	—	—	+	+	17. Glycine	200	—	—	+	+
9. <i>dl</i> -Phenylalanine	400	+	+	+	+	18. <i>l</i> -Leucine	200	+	+	+	+
— No growth,		+	Normal growth,		±	Slightly growth,					

— No growth, + Normal growth, ± Slightly growth.

培養液調製, 前培養, 接種, 使用酵母, 測定法は何れも前実験と同様な方法に依り行つた. 各 amino acid の含有量は Table 3 に示す如くで, 此の量は amino acid 混合培地の場合の濃度の約 2 倍である.

此の結果は Table 3 に示す如くで接種後 40 時間に於ては

1. *l*-Arginine⁽¹⁾·HCl, *l*-Glutamic acid, ⁽²⁾ *l*-Histidine·HCl, *dl*-iso Leucine, ⁽⁴⁾ *dl*-Methionine⁽⁵⁾ *dl*-Threonine, ⁽⁶⁾ *l*-Tyrosine, ⁽⁷⁾ *dl*-Valin, ⁽⁸⁾ *dl*-Serine, ⁽⁹⁾ Glycine⁽¹⁰⁾

の 10 種類の amino acids は繁殖を認めない. 即ちこれらの amino acids は一応阻害的に作用している. ところが接種後 48 時間になると, *dl*-threonine⁽¹⁾ *l*-tyrosine⁽²⁾ *dl*-valine⁽³⁾ は繁殖を始め, 更に 72 時間を経過すると *l*-histidine を残して他の amino acids は総て繁殖を示す. 換言すれば histidine は清酒酵母に対して阻害的な作用をしていると考えられる.

考 察

著者は前回迄の報告で *Saccharomyces* 属が窒素源として amino acids を同化する為には vitamins を必要とすることと, 硫安を窒素源とするときは vitamins が無くても繁殖することを認めた. しかし本実験に於ては清酒酵母のみに就き試験を行い amino acids を窒素源として利用し得ないのは amino acids の阻害作用に依ることを認めた. この事実は種種な文献と異なる結果である. 即ち BARTON-WRIGHT⁽¹⁾ の麦芽汁を用いた報告に於ても, THORNE⁽²⁾ の amino acids 合成培地に依る実験に於ても amino acids は酵母の窒素源として高度の利用率のあるものとしている. これらの論文に依れば培地中利用される窒素の 70% は amino acids に由来するといひ. 其の間に vitamin の関与していることを無視しているように思われる. 著者は本実験に於て, amino acids に硫安を添加した培地を調製し, 其の時の窒素量は十分に酵母が繁殖し得る濃度である. しかも amino acids と硫安の比率を代えて常に全窒素含有量を 0.03% に調節した培地で培養しても, これら培地では酵母の繁殖を認め得なかつた. 又, 硫安, asparagine 混合培地も asparagine が全窒素含有量の 60% 以上

をしめると酵母の繁殖を認め得ないのである。これらの現象は何れも *pantothenate* の添加に依つて変化し、通常の繁殖を認めた。 *pantothenate* を添加した理由は前報に於て報告した如く清酒酵母は *pantothenate* を必須 *vitamin* とすることが解つていた為である。ここでこのように *amino acids* 又は *asparagine* が何故に硫安と共存してしながら酵母に利用されないかを追及する必要が起つた。そこで *amino acid* を単独に硫安に添加した 18 種類の培養液を調製し培養試験を行なつたのである。其の結果 *l-arginine*, *l-glutamic acid*, *l-histidine*, *dl-iso leucine*, *dl-methionine*, *dl-threonine*, *l-tyrosine*, *l-valine*, *dl-serine*, *glycine* の 10 種の *amino acids* が接種後 24 時間繁殖を認めない。

更に時間の経過と共に変化を生じ 72 時間後にも繁殖を認め得ないものは *histidine* だけとなつた。即ちこの *amino acids* は完全な阻害作用をしているのである。 THORNE⁽³⁾ は *amino acid* の単体を窒素源として用いる場合酵母は繁殖が劣り、特に *glycine*, *lysine*, *histidine* は同化され難いものとしてあげている。然し乍ら酵母の繁殖に *histidine* が阻害作用をするという報告は見当らない。しかし、 β -*alanine* で酵母の培養を行う場合に *aspartic acid*, *asparagine*, β -*aminobutyric acid* が阻害作用をするということが NIELSEN⁽⁴⁾⁽⁵⁾, HARTELIUS⁽⁴⁾⁽⁵⁾, SARETT⁽⁶⁾, CHELDELIN⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾ 等に依つて報告されている。

今回の実験のみで酵母の *amino acid* 同化能が *histidine* で阻害されるとか又はこの *amino acid* が *pantothenate* の生成を阻害するのであるかを定めることは困難である。只この *amino acid* 即ち *histidine* が清酒酵母の繁殖を阻害していることを認めたことに止める。

総 括

1. 清酒酵母は *amino acids* のみを窒素源とすると繁殖せず *vitamins* を必要とする。 *Amino acids* に硫安を添加していても繁殖を認めない。

2. *Asparagine* も清酒酵母では単独に利用し得ず *amino acids* の場合と同様 *vitamins* を要求する。 *Asparagine* に硫安を添加した場合は *amino acids* の時とやや異り、培養液の全窒素の 50% 迄 *asparagine* を混合しても繁殖は起る。但し、*asparagine* と硫安の比率が繁殖の度合に比例し *asparagine* が多くなる程酵母の繁殖が悪くなる。(Fig. 2)

3. 硫安に *amino acid* を一種宛添加した培地では繁殖阻害の現われるものがあり、培養時間 24 時間で *l-arginine*, *l-glutamic acid*, *l-histidine*, *dl-isoleucine*, *dl-methionine*, *dl-threonine*, *l-tyrosine*, *l-valine*, *dl-serine*, *glycine* の 10 種が阻害をしている。この中で更に培養時間の経過と共に変化が生じ、72 時間経過すると *histidine* が完全な阻害を示す。

4. これらの現象は常に接種菌体量に密接な関係があり、前報より主張している如く、培養液 1 cc 当り 5000 以下で接種しなければならない。

本報告を終るに臨み本研究に終始御懇篤なる御指導を賜りました恩師坂口教授に御礼申上げると共に常に御助言戴きました有馬助教授、田村学造、角田俊直、宮沢 滋の諸氏始め坂口教室の諸兄に厚く感謝する。

(1) BARTON. WRIGHT : *Wallerstein Lab. Comm.*, 15, 49, 115 (1952).

(2) R. S. W. THORNE : *Wallerstein Lab. Comm.*, 13, 43, 319 (1950).

(3) R. S. W. THORNE, : *J. Inst. Brewing*, 47, 255 (1941).

(4) NIELSEN and HARTELIUS : *Biochem. Z.*, 301, 125 (1939).

(5) NIELSEN and HARTELIUS : *Compt.*

rend. trav. lab. Carlsberg, ser. physiol., 22, 267 (1938).

(6) SARETT. H. P, and CHELDELIN. V. H. : *J. Biochem.*, 49, 31 (1945).

(7) WEINSTOCK, H.H. and MITCHELL. H. K., : *l. Am. Chem. Soc.*, 61, 1421(1939).

(8) HARTELIUS : *Naturwiss.*, 31, 440(1943).

(9) NIELSEN : *Naturwiss.*, 31, 146 (1943).

Summary

So-called sake-yeast can not grow in the solution of amino acids mixture as the nitrogen source without vitamins, particularly pantothenic acid. On the contrary ammonium sulphate can be assimilable without vitamins.

But the sake-yeast can not grow when ammonium sulphate added to the solutions of amino acids mixture, or asparagine.

This phenomena, author now speculates, is caused by the inhibition of several amino acids, histidine, arginine, methionine, glutamic acid, isoleucine, threonine, tyrosine, valine, serine, and glycine.

Specially histidine inhibits the growth completely.

えのきだけの生化学的研究 (第 1 報)

生育と培養液及び菌体成分の変化について

脇 田 正 二 (横浜国立大学学芸学部農学教室)

Biochemical Studies on the Velvet-mushroom, *Collybia velutipes* Part 1.

On the Relation between the Growth of Fungus and the Change
of Composition of Medium and Mycelium.

By Shoji WAKITA (Agricultural Institute, Yokohama National University)

えのきだけは茸類の中では比較的旺盛な生育をなし、発茸も亦容易であるのみならず食用菌と云う立場からその培養に関しては比較的多数の報告がみられる。然しその生育や発茸に関する精細な生化学的研究は殆んど見られない。筆者は数年来茸類の菌糸の発育並に発茸に関する生化学的研究を目的とし、先ずえのきだけを材料として行っている。

実 験 方 法

1. 供試菌種 *Collybia velutipes* No. 67 (農林省林業試験場より分与されたもの)。

2. 培養方法：液体、表面、静置培養で 200 cc 3 角フラスコを用い、Balling 5 度の麦芽エキス (pH6.5) 25 cc に 1 週間 24° で培養後傾斜して液を排出し、殺菌蒸溜水で菌体をよく洗滌後、予め殺菌した PFEFFER 氏培養液 25 cc を静に入れて菌体を旧の如く浮上させ、24° で培養し、10 日目毎に取り出して分析に供した。

PFEFFER 氏培養液：Sucrose 50 g, KH_2PO_4 0.2 g, NH_4NO_3 10.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g, FeCl_3 trace, 蒸溜水 1 L.

3. 菌体乾燥法：菌体を濾紙上でよく水を切り、50~60° で約 15 時間放置して菌体を乾燥させ、更に 100° で 3 時間乾燥してデシケーターに入れ冷却後秤量したものを次の分析に供した。

4. 分析方法：1 期間の分析に 9 個の培養を供し、3 個の培養フラスコを合せて 1 回の分析に供し、3 回同じ分析を行い、その結果を平均したものをその期間の結果とした (1 回の分析に供した菌体乾物量は 1 g 内外)。なお糖分はベルトラン法、窒素は改良セミ ミクロ・キニルダール法、pH は水素イオン濃度比色計で、又熱水抽出物は試料 (約 1 g) に 50 cc の蒸溜水を加え、分解瓶中で 1 時間還流冷却器をつけて煮沸し、水洗後乾燥秤量し、減量を以て熱水抽出物量とした。

実 験 結 果

(1) PFEFFER 氏培養液に於ける菌糸の生育 麦芽エキス培養基で 1 週間培養後培養液を排出し、よく水洗の後 PFEFFER 氏培養液で置換し、10 日目毎に 60 日間に亘り分析を行つた処、培養液を交換後約 20 日後新培養液中の Sucrose は 85% が減少し、 NH_4NO_3 は 39% が減少した。その後は両者共次第に減少して 50 日後 sucrose は 5.6% が、 NH_4NO_3 は 42% が残つた。然しながら菌体の重量はこれに比しに余り増加はしなかつた。菌糸は新たな培養基に接すると、最初の約 20 日間に炭素源及び窒素源の著しい吸収をする事を示した。pH は最初降るが後次第に上昇していく傾向が見られる。これは硝酸態窒素よりアンモニア態窒素が先に選択摂取されることも原因の一つと考えられる⁽¹⁾。菌体中の全窒素の割合は培養の経過と共に増加しており、WAKSMAN や LOMANITZ 等⁽²⁾の菌体の生育の初期は窒素含量比は大であるが、生育の進むと共に炭水化物等が蓄積して全細胞物質の窒素含量比は小さくなるという報告と矛盾しているが、これについては培養液中の窒素源により必ずしも WAKSMAN 等の結果と一致するものではない事を高田⁽³⁾、HIPERT 等⁽⁴⁾は認めている。熱水抽出物は移植後 10~20 日間に急激な増加を示し、以後漸次増加して 50 日間頃に最高に達し、その後は減少の傾向