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

をたどる。菌体を移植後最初の 10 日間に培養液中の Sucrose, NH_4NO_3 等は急激な減少曲線を描き、これに伴つて、菌体乾物重量、全窒素等も増加するのに反し、菌体中の熱水抽出物、粗脂肪等は殆んど増加していない事は、熱水抽出物や粗脂肪等が菌体にとっては貯蔵養分であり、まず菌体の形成が行われて後にこれらが増加するものであることを示している。又、50日以後の培養に於て培養液中の sucrose が減少した時に熱水抽出物、粗脂肪等が急激に減少している事実はこれを裏書きするものと考えられる。

Table 1. Growth of *Collybia velutipes* on the PFEFFER'S Solution at 24°. 25 cc Medium.

	Initial	10days	20days	30days	40days	50days	60days
Mycelium dry wt. mg.	90	120	159	182	204	216	220
Total N %	0.88	1.21	1.68	2.33	2.46	2.95	2.74
Crude fat %	2.80	2.83	3.06	3.25	3.33	3.54	2.34
Hot Water extract %	18.60	18.55	32.76	36.86	40.28	43.40	38.60

(Table 1, Fig. 1, Fig. 2)

Fig. 1. Growth of *Collybia velutipes* on PFEFFER'S Solution at 24°, 25 cc Medium. (Part 1)

Fig. 2. Growth of *Collybia velutipes* on PFEFFER'S Solution at 24°, 25 cc Medium. (Part 2)

(2) 培養液の更新と菌体の生育 培養基中の養分が消耗すると菌体は自己消化を始めるものであるが、PFEFFER 氏培養液で一定期間培養後、この培養液を排出し、菌体を水洗の後新に造つた PFEFFER 氏液を注入し、同一条件で培養を継続する場合、培養基中の sucrose 及び NH_4NO_3 は常に同様な比率で吸収されるものか、或いは培養を継続するに従つて両者の比率に差異を生ずるものであるかを確かめるために、次の如く実験を行つた。即ち図の如きコ

Fig. 3. Sucrose and NH_4NO_3 Consumption when the medium was renewed.

—○— Sucrose consumed —●— NH_4NO_3 consumed
---△--- pH

ペンを用い、予め Balling 5 度 (pH 6.5) の麦芽エキス 25 cc に 1 週間 24° で培養後、無菌箱中でこの培養液を図の b より排出し a より殺菌水を注入してよく洗滌後予め殺菌した PFEFFER 氏液 25 cc を a より菌体の下部に注入して菌体を浮上らせる。こうして 24° で培養し、20 日毎にこの培養液を排出交換し、20 日間に減少した sucrose 及び NH_4NO_3 を分析した。なお分析は毎回 5 個体について別に行い、その結果を平均した値をその時間の分析値とした。

(Fig. 3), 第 1 回の結果は sucrose, NH_4NO_3 共に実験 (1) に於ける結果と大体一致しているが、第

第 2 回の結果は sucrose, NH_4NO_3 共に実験 (1) に於ける結果と大体一致しているが、第

2 回、即ち第 1 回の実験に供した菌体をよく水洗してから新に調製した PFEFFER 氏液 25 cc を注入して 24° で 20 日間経過した時は sucrose の消耗は急激に少くなっているが、 NH_4NO_3 は余り減少していない。更に同様に第 3 回の結果は sucrose の消耗は一層減ずるが、 NH_4NO_3 はかえつて増加している。 NH_4NO_3 の減少の激しい時程培養液の pH が降っているのは、前述の如くアンモニア態窒素が先ず消費されることを意味するものと考えられる⁽¹⁾。

考

察

生育しつつあるえのきだけ菌膜の底部裏面に PFEFFER 氏液を注入すると、菌糸は 60 日間の実験中常に生育を続けたが、菌膜の熱水抽出物、粗脂肪、全窒素等は 50 日の培養で最高に達し、以後漸次減少の傾向を示し、培養基中の sucrose は 20 日後既にその 85%、30 日後に 93% が減少し、以後は少しずつ減少するものの、60 日後になお 5% (培養基の 0.25%) が残存した。之に対して NH_4NO_3 は最初の 10 日間にその 35% が減少し、以後減少曲線は緩かになり 50 日後に 59% (培養液中に 0.41% 残存) が減少している。なお培養基の pH は最初の 10 日間に急激に下降し、30 日後頃から次第に上昇して 50 日後に中性附近になり、それ以後は再び降下しているが、最初の pH の降下は NH_4^+ が摂取されて NO_3^- が残った事が主な原因と考えられる。後に於ける pH の降下は培養液中に酸性物質の蓄積したためと考えられる⁽⁶⁾。このように菌糸が養分を摂取する事は移植後 10~20 日の間に於て最も旺んで、以後は次第に減少していくが、これは培養液が稀釈したために菌糸の養分摂取が困難になつたものか、或いは菌体自身の生理に基づくものであるかについては次の実験によつて察知する事が出来た。即ち前と同様に培養し、20 日毎に培養基を更新して 60 日間培養を続けた処、3 回に於て摂取された sucrose/ NH_4NO_3 は、第 1 回 10.61、第 2 回 9.10、第 3 回 3.84 であつた。

このように培養基を更新しても尚培養の経過と共に菌体の要求する sucrose と NH_4NO_3 の比率に変化を生ずるという事は、栄養を与えるならば限りなく生育を続けると考えられる菌体も、個々の細胞に於いてはそれぞれ若い細胞と成熟した細胞との存在する事が推察される。

本研究を遂行するに当つて御指導戴いた故富樫浩吾教授及び貴重な菌種を分与して戴いた農林省林業試験場永井研究室長及び土岐氏に厚く感謝の意を表します。

(1) 脇田：第 2 報として発表の予定。	32, 308 (1929).
(2) WAKSMAN, LOMANITZ: <i>J. Agr. Research</i> , 30, 263 (1924).	(4) HILPERT, FRIESEN, ROSSÉE: <i>Biochem. Z.</i> , 289, 193 (1937).
(3) TAKATA: <i>J. Soc. Chem. Ind. Japan</i> ,	(5) 島園：農化, 24, 346 (1951).

Summary

1. The mycelium of *collybia velutipes* previously grown on malt extract medium in 7 days at 24° were removed on the PFEFFER's culture medium and incubated at the same temperature for 60 days. Shift of the pH value, decreased amounts of NH_4NO_3 and sucrose in the medium, dry weight, total nitrogen, crude fat and hot water extraction of the mycelium were investigated in 10 days interval.

In the media, sucrose and NH_4NO_3 were consumed 85% and 39% after 20 days and 94.4% and 59% after 50 days respectively. The pH value decreased during the first stage of cultivation, and then increased. In the mycelium, total nitrogen increased as the progress of incubated stage; hot water extraction showed a intense increation in the first 10~20 days culture, after 50 days reached to the maximum, and then decreased. (Table 1, Fig. 1 and Fig. 2)

2. The PFEFFER's culture medium was renewed on every 20th day, and the shift of pH value, decrease of NH_4NO_3 and sucrose in the medium were successivly investigated three times. Absorption of sucrose gradually decreased, while NH_4NO_3 was absorbed little during whole periods. The absorption ratio of sucrose and NH_4NO_3 showed: after the 1st 20 days 10.61, the 2nd 9.10, and the 3rd 3.84.

This fact suggests that there is an age, so called young and mature stages in the mycelial cells. (Fig. 3)