Summary

The authors reported previously* that the heterocaryotic strains of *Asp. oryzae* produce generally larger and multinucleate (10 to 20) conidia while the original or parent homocaryons form smaller conidia which have only one to four nuclei. The present investigation has been carried out with the purpose to examine whether 17 strains of *Asp. oryzae* var. *magnasporus*, var. nov. SAKAGUCHI et YAMADA,** which were isolated from Koji of saké and soy sauce and described under the new varietal names, are also heterocaryons or not.

1) Those strains can be divided into two distinct groups according to their abilities for segregation. The group A consists of 13 strains which are very liable to produce segregants and therefore are regarded as heterocaryons. Other four strains belonging to the group B remained constant through 4 or more successive generations of pedigree cultures as if they are homocaryotic, although their conidia are large in diameters and multinucleate.

2) The members of the group A generally give rise to several types of colonies upon subsequent monospore culture from 2 to 3 generations. Each strain is multiple heterocaryon and is composed of 3~6 factorial types. Most of the segregants are homocaryotic and form conidia with small diameters and 2~4 nuclei. But several segregants which produce multinucleate and large conidia but remain constant without any segregation through many generations just as the strains of the group B.

3) The large conidial strains similar to the parent types (group A) can be produced by mix-cultures of the factorial types or the homo-type segregants.

4) As regards to the size and the caryotic conditions, two types, the smaller and 1~4 nucleate and the larger and multinucleate types, may be distinguished among the constant and homocaryotic strains of *Asp. oryzae*. The new varietal name "*magnasporus*" proposed formerly by one of the authors, is therefore applicable to the latter strains of the group B.

5) It has occasionally observed that during the formations of conidia in the constant multinucleate strains (B group) more than two nuclei migrate at the same time from sterigmata into newly formed conidia. The phenomenon was reported by the present authors* only in the case of heterocaryotic strains.

* K. SAKAGUCHI & C. ISHITANI: *J. Agr. Chem. Soc. of Japan*, 26, 85 (1952).

** K. SAKAGUCHI & K. YAMADA: *J. Agr. Chem. Soc. of Japan*, 20, 65, 141 (1944).

稲馬鹿苗病菌の生化学 (第31報) ゼベレリンの物理化学的定量法

北村 博, 住木 諒介 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭和 29 年 2 月 16 日 受理

The Biochemistry of *Bakanae* Fungus. Part 31. The Physico-Chemical Determination of Gibberellin.

By Hiroshi KITAMURA and Yusuke SUMIKI

(Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

著者等はさき⁽¹⁾にゼベレリンの多量生産の目的から稲馬鹿苗病菌の優良株を選択し、これを用いてタンク培養を行つたが、ゼベレリンの収量は静置培養に劣り、所期の目的を達し得なかつた。その後培養基の組成、精製法の改良を企画し、その為には従来の生物試験による検定法より、より迅速により正確に定量し得る物理化学的方法を確立せんとし、I ベックマンの光電光度計による方法、II ポーログラフ法を採用した。

I. ゼベレリン A を塩酸分解して得られるゼベル酸⁽²⁾の紫外部に於ける特有な吸収曲線 (Fig. 1) に着目し、最大吸収部に於ける吸光係数と濃度とが LAMBERT-BEER の法則に従い比例関係を有することを知つたので、これを用いて培養液中のゼベレリン A を定量せんとした。

培養液をエーテル或いは醋酸エチルにて抽出し、抽出物の一定量を塩酸分解し、或いは培養液そのままを塩酸分解した後エーテル抽出してゼベル酸を分離せしめ、常法に従いメタノールを溶媒として吸光係数を測定した。ゼベル酸の吸収曲線に比べて最大吸収部のピークがシャープでないために測定誤差が大きいと考え、エーテル抽出物中の他の不純物除去を目的として該エーテル抽出物を稀アルコールにとかし、イオン交換樹脂 1R4B (分析用) を用いたが不純物除去の目的を達し得なかつた。依つてゼベル酸については紫外部吸光係数を用いて定量

Fig. 1. Absorption Spectra of Crystalline Gibberic Acid ($M/500$ in Methanol)

Fig. 3. Standard Curve between the Concentration and the Wave-Height of Gibberellin A. (Sensitivity $1/10$)

Fig. 2. Polarograms of $0.5 \times 10^{-3} M$ Gibberellin A in $0.04 N (CH_3)_4NBr$ aq. pH 3.3, Sensitivity $1/5$
 $\pi_{1/2} = -1.56 \text{ volt (vs. S.C.E.)}$

は出来るが、デベレリン A の定量は不可能であつた。

II. デベレリン A (d. p. 240°) を少量のアルコールに溶かし水溶液とし tetramethyl-ammonium-bromide を加えて電解液を作り pH 3.3 でポーラログラフによつて測定した結果、1 個の還元波を示した (Fig. 2)。この半波電位 $\pi_{1/2}$ (切点法の拡散電流の $1/2$ に於ける電位) と培養液のエーテル或いは醋酸エチル抽出物の電位と、該抽出物にデベレリン A を添加したものの電位とはそれぞれほぼ同一であつて、デベレリン A 添加の回収率は標準波高に比し殆んど 100% であつた。従つて既知濃度の標準波高濃度関係直線を求め、その図表 (Fig. 3) に照らして未知試料の濃度を測定することが出来る。尙この実験に用いた検流計の感度は $2.0 \times 10^{-10} A \text{ mm}^{-1} \text{ m}^{-1}$ であり、電位の記載はすべて飽和甘汞電極規準である。pH はガラス電極を用いて測定した。

実 験 結 果

1. 電解質 デベレリン A は水に難溶であるから先ず少量の 95% アルコール (アセトアルデヒドなきもの) に溶解して水溶液とした。培養液は酸性にてエーテル或いは醋酸エチルにて抽出し、これをデベレリン A と同様な方法で処理して水溶液とした。無関係塩としては KCl, KI 等無機塩類では還元波を示さないの、有機電解質である tetramethyl-ammonium bromide, chloride, iodide を用いたが、培養液の有機溶剤抽出物中に混在する他の有機酸の還元波と分離する為、tetramethyl-ammonium bromide $(CH_3)_4NBr$ を用いることとした。ポーラログラフ法による定量の際温度は拡散電流即ち還元波の波高に及ぼす影響⁽³⁾ が大であるので $20^\circ \pm 0.5$ の恒温槽に電解瓶を入れて測定した。

2. デベレリン A、培養液有機溶剤抽出物の半波電位 電解質としてデベレリン A (d. p. 233°) 0.51 mg, $N/5 (CH_3)_4NBr$ 0.5 cc, pH 3.3, 感度 $1/20$ 。全容を 2.5 cc とする。振盪培養 5 日目の培養液 100 cc を醋酸エチル 50 ずつにて 4 回抽出し、抽出物を前述の如く処理して 10 cc の水溶液とし、試料となす その中から

2 cc 採り $N/5$ $(CH_3)_4NBr$ 0.5 cc を加える. 全容 2.5 cc, pH 3.3.

次にデベレリン A (d. p. 233°) 0.522 mg を前記抽出物の水溶液 2 cc に加え, $N/5$ $(CH_3)_4NBr$ 0.5 cc, 全容 2.5 cc, pH 3.3. 以上 3 つの試料につきポーログラムを撮つた結果その還元波の半波電位はいずれも $-1.54 \sim$

Table 1. Wave-Height and Half-Wave Potential of Gibb. A and Culture Media.

	Wave-Height S=1/20 mm	Half-Wave Potential $\pi_{1/2}$ volt	Calcd. Gibb. A mg/cc	Found Gibb. A mg/cc
Gibberellin A	15	-1.56	0.204	0.200
Broth	19	-1.57		0.280
Gibberellin A + Broth	32	-1.54	0.208	0.500

1.57 volt (vs S. C. E.) である.

Table 1 より gibberellin A の回

収率は 102.4% であつた.

3. デベレリン A の濃度と波高との関係 デベレリン A の還元波の定量的に最も典型的な波形が得られるの

は pH 2.5~6 である. この pH 領域に於ける濃度と波高との関係を Table 2, Fig. 3 に示す.

被還元物の電解還元に於て波の高さ即ち限界拡散電流 I_a の大きさは ILKOVIČ 式⁽⁴⁾にて示される.

Table 2. Relation between the Concentration and the Wave-Height of Gibberellin A.

	Concentration of Gibb. A mg/cc	Half-Wave Potential $\pi_{1/2}$ volt	Wave-Height S=1/10 mm
1	0.075	-1.52	12
2	0.150	-1.52	20
3	0.240	-1.54	27
4	0.300	-1.54	38
5	0.391	-1.54	48
6	0.450	-1.55	52
7	0.543	-1.56	65
8	0.600	-1.57	70

$$I_a = 0.63 n F D^{1/2} C m^{2/3} t^{1/6}$$

但し C は被還元物質の濃度, m は 1 秒間に流出する水銀量, t は水銀の滴下時間, n は還元に関与する水素原子或いは電子数, F は Faraday, D は拡散係数である. 故に同一物質を同じ電極で電解する場合には

$$I_a = KC \quad (K \text{ は比例恒数})$$

であり, 今の場合には Fig. 3 に示した如く波高と濃度とは直線関係にあり, 定量可能である. ことに波高を測定するに交点法を用いた.

4. デベレリン A 以外の有機物の半波電位

デベレリン A の誘導体及び培養液の有機溶剤抽出物中に存在するデベレリン A 以外の不純物と思われる有機酸の還元波を検した結果は Table 3 にて示す.

5. 還元波の高さと徒長試験による結果との比較

従来著者等の行つて来た徒長試験⁽⁵⁾はデベレリン A の生理学的特性として極めて重要な試験であつたが, 被検体としての稲の生育には温度, 湿度, 日照, 水等種種なる因子による影響が大きく, 又稲の個体差による徒長率の不均一等により, その生物試験には測定時日の長さと共に種々の困難を伴つた. ポーログラフに

よる定量にはポーログラム上の作図等の測定誤差はあるが, その迅速さに於て生物試験と比較にならない. 著者等は波高と生物試験による徒長率との関係を検討したが, ポーログラムによるデベレリン量と波高とは直線関係にあるも, 生物試験によるデベレリンの量と徒長率との関係は S 字曲線であるので, 必ずしも両者は平行とは云えない. ここに於てはただ波高と徒長率とを比較したにすぎない.

Table 4. Comparative Experiments of Abnormal Elongation Growth Test and Polarograph.

Days of Cultivation	2	3	4	5	6	7	8	9	振盪培養 温度 $27^\circ \pm 0.5$, 日数 8~9 日, 菌株 G4, As6.
* Abnormal Elongation	G4 9	57	93	93	93	100	100	93	培養条件, 徒長試験 前報
Growth Ratio %	As6 0	0	86	93	100	100	93	—	(1)と同じ, 各日培養液 200 cc
Wave-Height	G4 0	5	40	49	57	90	105	60	を醋酸エチルにて抽出, 等分し
S=1/10 mm	As6 0	0	12	40	90	90	65	—	て 1 つはポーログラフ測定用

に, 他は徒長試験 (15日間) に供した, 両者の比較を Table 4 に示す.

6. デベレリン精製法の検討 著者等は前報⁽⁶⁾の如くデベレリンの結晶を得る手段として培養液を pH 2 附近で活性炭に吸着せしめアンモニア性メタノールで溶出したが, この方法にては収量に於てどの位の損失があるかを検討した結果は次の如くである. 静置培養 (温度 $27^\circ \pm 0.5$, 日数 30 日, 菌株 G4, 培養条件前報⁽¹⁾に同じ)

の培養液 1 l, 活性炭 5.5 g, アンモニア性メタノール 85 cc, 第1回 15 cc, 第2回~第7回 10 cc を用いて抽出し, その各のポーログラムを撮った結果を Table 5 に示す: 又同一培養液 100 cc を醋酸エチルにて抽出,

Table 5. Elution Test of Gibberellin A.

	Sensitivity	Wave-Height mm	Gibberellin A γ/cc	Half-Wave Potential $\pi/2$ volt	% of Recovery
1	1/100	39	310	-1.54	51.6
2	1/100	27	190	-1.52	30.6
3	1/30	10	25	-1.52	0.8
4	1/20	5	10	-1.51	0.3
5	1/10	5	10	-1.51	0.1
6	1/10	—	—	—	—
7	1/10	—	—	—	—

常法に従いポーログラムを撮った処, 波高 71 mm を得, ギベレリン量は標準波高濃度直線より $6 \times 10^3 \gamma$ であつた. Table 5 より培養液 1 l 中に存在するギベレリン量は $50.8 \times 10^3 \gamma$ なのでその回収率は 83.3% であ

つた. 尚活性炭吸着濾液は還元波を示さなかつた.

t 7. 菌株選択への応用 新に各地の大学, 研究所, 試験場より分与を受けた菌株 15 株につき screening test を行つた結果, 生物試験 (15日) とポーログラフ法による測定値とは Table 6 の如くである. ここに得

Table 6. Comparative Experiments of Abnormal Elongation Growth Test and Polarograph.

Stems	Abnormal Elongation Growth Ratio %	Wave- Height S=1/10 mm	Half-Wave Potential $\pi/2$ volt	Gibberellin A γ/10cc
G 4	25	10	-1.47	60
As6	23	8	-1.48	40
No. 1	—	12	* -1.30	—
" 2	—	16	* -1.25	—
" 3	—	20	* -1.30	—
" 4	20	11	-6.49	65
" 5	—	5	* -1.09	—
" 6	12	6	-1.50	20
" 7	—	30	* -1.04	—
" 8	—	100	* -1.18	—
" 9	—	24	* -1.09	—
140-0	17	10	-1.46	60
140-1	17	8	-1.45	40
140-2	17	7	* -1.09, -1.43	30
140-3	13	5	* -1.45	10

* Half-Wave potential of the substances except Gibb. A

た優良株 (No. 4, 140-0) を現在静置培養の菌株として用いている. 収量の結果は未だ報告するに至つてない. Screening test として振盪培養法を用い, 方法は前報⁽¹⁾の如くである.

この表に於て半波電位 -1.56 volt 前後以外のものはギベレリン以外の不純物により還元波を示し, 徒長試験の結果は発芽を阻止した.

綜 括 (1) ギベレリンの吸収曲線を測定し, その最大吸収部波長 265 mμ の処で吸光係数と濃度とは LAMBERT-BEER

の法則に従い比例関係を示すので, ギベレリンをベックマン光電光度計により測定することが出来る.

(2) ギベレリン A は有機電解質 $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ の存在で還元波を示し, 半波電位は -1.56 volt (vs S. C. E.) である. 波高と濃度とは比例関係を示すのでポーログラフ法によりギベレリン A を定量することが出来る.

(3) 培養液の有機溶剤 (エーテル, 醋酸エチル等) 抽出物の半波電位は上記ギベレリン A と同一であり, ギベレリン A の添加回収率は殆んど 100% であつた. ポーログラフ法により培養液中のギベレリン A を定量することが出来る.

(4) ポーログラフ法によりギベレリン多量生産の為の条件を検討することが可能となつた.

終りにポーログラフ法による測定に際し御便宜をはかつて下さつた 農林省農薬検査所 伊東技官, 東大農学部栄養化学教室森氏, 同佐々木教室藤巻, 小田切両氏, 稲馬鹿苗病菌を御分与下さつた東北大学農学部植物病理学教室, 北陸農業試験場, 岡山大学大原研究所, 農林省農薬検査所, 日本特殊農薬株式会社に厚く感謝の意を表する. 尚本実験は文部省科学研究費によつたものであることを附記する.

(1) 北村, 川原田, 瀬田, 高橋, 大月, 住木: 農化, 27, 545 (1953).

(2) 藪田, 住木, 麻生, 田村, 五十嵐, 玉利: 農化, 17, 897 (1941).

(3) 品川: ポーログラフ分析法, 62 (1952).

(4) 石橋, 藤永: 分析化学の進歩第2巻, 17頁 (1943).

(5) 藪田, 住木, 麻生, 田村, 五十嵐, 玉利: 農化, 17, 724 (1941).

(6) 同上: 同 17, 723 (1941).

Summary

The bioassay using rice seed was the only method for the quantitative determination of gib-

berellins. But this method is not so good, because not only it takes about 10 days but also the result is unreliable on account of the individuality of every seed. Therefore, it is hoped that some physico-chemical methods should be found as soon as possible. For this reason, this experiment was undertaken and the following results were obtained. The authors consider the polarographic method under described is very useful for studies of gibberellins, such as the studies on the medium composition, preparing process and mode of action in living cell.

1) We found that the relation between the extinction coefficient and the concentration of gibberic acid was proportional satisfying LAMBERT-BEER's law, and therefore gibberic acid could be determined quantitatively by the spectrophotometric measurement. (Fig. 1)

2) We found that gibberellin A gave a reduction wave. In a $0.5 \times 10^{-3} M$ solution of this substance, when $0.04 N$ tetra-methylammonium bromide being used as a supporting electrolyte, the half-wave potential was -1.56 volt (vs. S.C.E.) as shown in Fig. 2. As the relation of the wave-heights of gibberellin A to its concentration was found to be proportional linearly, gibberellin A could be determined quantitatively by means of the polarographic method. (Fig. 3)

3) Except gibberellin A and gibberic acid, the acids such as gibberellin C, fusaric, succinic, fumaric and oxalic acids gave the other reduction potentials. From this fact it was found that gibberellin A in the medium could be determined quantitatively and, moreover, its accuracy was indorsed from the result of bioassay which was carried out as the comparison, at the same time.

所謂内地米及び外地米の澱粉について (第 3 報)

陸羽 132 号米澱粉について

福場博保, 山本フジ子 (お茶の水女子大学栄養化学教室)

昭和 9 年 2 月 17 日 受理

Starches of *Oryza sativa* L. *japonica* and *Oryza sativa* L. *indica*. Part 3.

Rikuu No. 132 Rice Starch.

By Hiroyasu FUKUBA and Fujiko YAMAMOTO

(Lab. of Nutritional Chemistry, Ochanomizu Univ.)

緒 論 第 1 報及び第 2 報⁽¹⁾にて一般に内地米に比して外地米殊にジャム, ビルマ米は amylose 含量が多いか, 又は amylose 全鎖長及び amylopectin 末端鎖長の総和が他の米澱粉に比較して大であるものと推定した。この推定を出すに用いた実験方法としてはヨード電圧滴定法, ヨード反応比色法, β -amylase による糖化率の測定及び BRABENDER の amylogram を用いた。

各種米粉の BRABENDER amylogram をとつてみると糯米が最も BRABENDER unit (粘度単位) が低く, 外地米殊にジャム米が最高値を示し, 内地粳米は丁度両者の中間値を示した。この事は本装置を用いて粘度測定をする時には 25° より 1 分間 1.5° づつ 45 分間温度上昇させ, 更に 45 分間逆に 1 分間 1.5° づつ冷却して 25° にもどすのであるが, この間 1 分間に 75 回転する攪拌棒を等速回転するに要する抵抗を自記するように装置されてある為に線状分子である amylose の多い澱粉程分子と分子とのからみ合いが激しくなり, その為に BRABENDER unit は上昇するが, 球状構造をとる amylopectin 含量の多い糯米ではこのからみ合いが少い為に BRABENDER unit は上昇しないものと推論した。

この点について実際に amylose 及び amylopectin を分離し, この両者の amylograms を求めて以上の推論の正否を確かめてみた。又前報にて陸羽 132 号澱粉が特殊な反応を示し, 恐らく amylose と amylopectin の中間型である末端鎖長の著しく長い amylopectin を多く含む澱粉であろうと推定した。この点についても, このような中間型の性質を確める為に二, 三の実験を行つたので報告する。

実 験 の 部

1. 精製澱粉の分離 佐藤氏の方法により米粉を 0.3% NaOH 液で洗滌する方法に依り分離した。

2. Amylose 及び Amylopectin の分離 SCHUCH のブタノール法⁽²⁾に準じて行つた。精製澱粉の 2% 液を作り加熱糊化した後, この糊化液 1 l 当り 100 ml の *n*-ブタノールを加え pH 6.8 に調整した後 auto-