ruvate and oxalacetate by twice-washed particulate enzyme (presumably mitochondria) of mung bean or soy bean seedlings as shown in Table 1.

(II) The plant enzyme was devoid of acetate activating activity even in the presence of CoA, but in combination with *E. coli* preparations, it actively catalyzed the citrate synthesis from acetate, oxalacetate, CoA, and ATP (reaction IIB and III). The results can be taken as an indirect evidence for the presence in the plant preparations of "condensing enzyme" which catalyzes the synthesis of citrate from acetyl-CoA and oxalacetate. (Table 2).

えのきたけの生化学的研究 (第2報) 培地の Sucrose/ NaNO_3 ratio が菌糸体の生育及び発芽に及ぼす影響

脇田 正二 (横浜国立大学学芸学部)

昭和29年4月14日受理

Biochemical Studies of *Collybia velutipes* Part 2. Effect of Sucrose/ NaNO_3 ratio on the Growth of Mycelium and the Fructification of Fungus.

By Shoji WAKITA (Yokohama National University)

STEINBERG は *Aspergillus niger* についての研究で窒素源として NH_4NO_3 を用いたとき菌糸中の乾物量生成は培地の糖の増加するに随つて増加するという事を発表し、糖の増加は菌糸の発育を盛んにする事を認めている⁽¹⁾。又 WAKSMAN 等の研究によれば培地中に窒素を多く含む程、又は直ちに利用し得る炭水化物の少い時 (Low c/N ratio) に菌糸中の蛋白質の量は多いという事を報告している⁽²⁾。著者は sucrose 及び NaNO_3 の用量を種種 modify した 24 種の CZAPEK sol. にえのきたけ菌糸を移植し、菌糸の生育並に発芽について実験を行つたのでその結果を報告する。

実 験 の 部

1. 供試菌種 *Collybia velutipes* No. 67.

2. 培養液窒素源の選定 菌糸の生育及び発芽に及ぼすアンモニヤ態窒素と硝酸態窒素の比較を行つた。培養基は次の如き組成のものである。蒸溜水 800 cc, 磷酸緩衝液* 200 cc, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, CaCl_2 0.1 g, vitamin B_1 , 40 mg, glucose 30 g, $\text{**NH}_4\text{Cl}$ 1.387 g $\div$ 0.363 g N/l, NaNO_3 2.204 g $\div$ 0.363 g N/l (* Na_2CO_3 及び H_2SO_4 で pH を調節, ** pH 7 以上については殺菌後無菌的に NH_4Cl を加えた) 10日間 25° で培養の結果は Fig. 1 の如くである。即ち培養基が酸性の場合でも、アルカリ性の場合でも菌糸は窒素源として硝酸ソーダより塩化アンモニウムによく生育し、両者共 pH 6.5 附近が最もよく生育した。然しこの培養を 60 日間継続すると二つの窒素源の間に顕著な差は生育の上に見られなくなり、然も pH 4.5 の硝酸ソーダ培養区には菌糸の生育は極めて貧弱であるにもかかわらず 3 割のものに菌が發生した。他の実験に於ても窒素源として硫酸アンモニウムよりも NaNO_3 及び KNO_3 培養基に菌がよく發生した。又麦芽エキスを磷酸緩衝液で pH を変えた培養基に於ては合成培養基に於ける程菌糸の生育並に菌の發生は培地の pH に敏感でなかつた (Table 1)。

Fig. 1. Effect of NH_4Cl and NaNO_3 at different pH values, upon the amount of mycelial growth.

Cultures incubated 10 days in liquid medium at 25°

3. 炭素源の選定 前記2の実験に使用した如き用量の培養基 (窒素源は NaNO_3) に炭素源としてそれぞれ3%の glucose 及び sucrose を用い (pH 6.5) で培養を行つた処両者の間に生育に於て顕著な差はなかつた (Table 2)。

4. 培養液中の Sucrose/ NaNO_3 ratio と菌糸体の生育及び発芽との関係

Table 1. Relation between the Fungous Fructification and pH Value of the Medium*.

pH	5.5	5.7	5.9	6.1	6.3	6.5	6.7	6.9	7.1	7.3
No. of mushroom/25 cc	6	8	9	9	7	5	5	5	3	4
Dry Wt. of mushroom mg/25cc	81	86	110	85	117	123	115	102	104	95
Dry Wt. of mycelium mg/25cc	69	73	72	99	85	81	76	83	95	74
Fructified ratio	100	100	000	100	100	100	100	70	100	50

* Initial medium is malt extraction.

Table 2. Comparison of Glucose and Sucrose on the Growth of Mycelium.

Days	7	14	21	60
	mycelium's diameter (m.m.)			mycelium's dry wt.mg.
Glucose	25	48	70	145.0
Sucrose	22	47	70	151.0

Table 3. Effect of Sucrose/NaNO₃ ratio on the Growth of Mycelium and the Fructification of *C. velutipes*.

Sucrose	A	B	C	D	E	F
NaNO ₃						
*Wt. of mycelium	2.65	4.90	6.59	9.30	11.80	11.80
Fructified %	20	100	100	90	40	20
Wt. of mycelium	2.50	2.81	6.30	8.90	16.50	22.00
Fructified %	60	0	50	90	30	60
Wt. of mycelium	2.06	3.21	5.76	5.46	17.06	24.80
Fructified %	10	30	50	50	20	20
Wt. of mycelium	2.31	3.25	4.15	8.40	12.95	21.30
Fructified %	30	40	10	50	30	0
Wt. of mycelium	1.90	2.90	3.60	5.14	5.25	9.43
Fructified %	0	0	0	0	0	0

* m. grams grown on 10 cc. of the medium.

Sucrose	A = 0.48 (0.2)% B = 1.44 (0.6) C = 2.88 (1.2) D = 4.32 (1.8) E = 8.64 (3.6) F = 14.40 (6.0)	NaNO ₃	a = 0.012 (0.002)% b = 0.180 (0.030) c = 0.420 (0.070) d = 9.600 (0.100) e = 0.780 (0.130)
---------	--	-------------------	--

() = carbon or nitrogen %

C. 結果：(1) 菌糸の生育と Sucrose/NaNO₃ ratio：一 培地中に糖分の多くなるに従って菌糸体の重量は増加し (Fig. 3), 糖含量の多い培地では窒素含量も少ない方が菌糸の生育は良好であるが, 糖含量

Fig. 2. Effect of NaNO₃ on the growth of mycelium.

sucrose: A=0.48% D= 4.32%
B=1.44 E= 8.64
C=2.88 F=14.40

A, 培養方法：液体, 静置培養で直接合成培養基に接種したのでは生育が遅く, 発芽に関する実験は困難であるので予め直径約 2 cm の試験管を用い, Balling 5° (pH 6.5) の麦芽エキスを菌糸を接種し, 1 週間 24° で培養した菌糸体を無菌的に洗滌後直径約 1.8 cm の試験管中の合成培養基 (B) 10 cc 上に菌糸体の下面に小気泡のある如く浮上して移植し, 24° で更に 30 日間培養後 15~18° の室に移し, 20 日間放置して発芽を促した。結果は次の如くである (Table 3).

B, 合成培養基：CZAPEK 培養液を sucrose 及び NaNO₃ について modify した 24 種の培養基を作り HCl-NaOH で pH を 6.5 に調節した。Medium: Sucrose L g, NaNO₃ Mg, K₂HPO₄ 1 g, KCl, 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, Fer-SO₄ 0.01 g, FeCl₃ trace, Service water 1 l. (L, M は変数)

Fig. 3. Effect of sucrose on the growth of mycelium.

(a, b, c, d, e: each indicate the NaNO₃ concentration as Tabel 3.)

の高い E, F 行では窒素含量の増加に随つて菌体重量も増加し, c 列に於て最高となり, 更に窒素含量が増加すると菌体重量は漸次減少する. (Fig. 2, Table 3).

(2) 菌の発生と Sucrose/ NaNO_3 ratio :— 窒素源が少い培地では炭素源も少い場合に菌の発生は多く, 窒素源が増加するに随つて炭素源も増加した場合に菌の発生数は多くなっている (Fig. 5). 菌の重量は窒素源の最も少い a 列では炭素源 D 行のものが最も多く, 窒素源が増加するに随つて炭素源も増加する場合に菌の重量が増加してゆくが, 窒素源が更に増加して d 列では炭素源の少い D 行に於て最も菌の重量が多くなっている (Fig. 4) 然して全試験区中, 窒素源の最も少い a 列が炭素源の D 行に於て最も菌の重量が多いという事は窒素源及び炭素源がこの程度の時に正常な発芽をなすものと推察し得る. 菌の発生率は窒素源 a 列が最も高く炭素源 B, C 行に於ては 100% 発芽した. 窒素源濃度が増加するに随つて炭素源濃度も増加する程度菌の発生は多くなるが, 更に窒素源が増加すると e 列の如く全く発芽しなくなる (Table 3).

Fig. 4. Weight of mushrooms grown on 100 cc of the medium.

(a, b, c, d: each indicate the NaNO_3 concentration as Table 3.)

Fig. 5. Number of mushrooms grown on 100 cc of the medium.

(a, b, c, d: each indicate the NaNO_3 concentration as Table 3.)

(3) 菌の発生と培地の pH との関係 :— 各試験区に於て菌の発生した培養液の pH を菌体を除去後比色

Fig. 6. Relation between pH of the medium and the fungous fructification. (data obtained from the 480 cultures.)

法によつて測定した処 35% は pH 6.7~6.9 であり, 発生しないものについて同様に測定を行つた処 42% は pH 7.3~7.6 であつた (Fig. 6). この事実より菌の発生のためには pH 6.7~6.9 程度が好ましい事が推察し得る.

考 察

1. 菌糸の optimum な生育と Sucrose/ NaNO_3 ratio

菌体重量は Table 3 に於て炭素源だけを考慮すれば $A < B < C < D < E < F$ の如く sucrose の増加するに随つて増加しているが, 窒素源を考慮すると炭素源 D 行までは殆んど $a > b > c > d > e$ であり…①, E 行に於ては $a < b \approx c > d > e$ であり…②, F 行

に於ては $a < b < c > d > e$ である③…③. 即ち①式の如く炭素源 D 行までは $a > b > c > d > e$ であるという事は Da 区が菌体重量最大であることであり, 炭素源が D より少い場合には窒素源は a より更に少い培養基

が菌糸の生育に望ましく、炭素源が増加してDになつた時始めて窒素源が a, 即ち Da 培地が菌糸の生育に好適である事を示すものであり, Da 培地の C/N ratio は約 90 である. ②式に於て $a < b \approx c > d > e$ であるという事は Eb 区, Ec 区の菌体重量が最も大なる事を示すものであり, それぞれの C/N ratio は 51 及び 120 で平均 85.5 である. ③式に於て $a < b < c > d > e$ であるという事は, Fc 区が菌体量最大である事を示すものであり, この区の C/N ratio は 85.0 である. 即ち, ①②③を総合して考えると炭素源として sucrose を窒素源として NaNO_3 を使用した CZAPEK 培養基に於ては菌糸の生育に optimum な C/N ratio は 85~90 である事が推察出来る.

2. 蕈の発生と培養基中の C/N ratio

培養基中の C/N ratio や Thiamine/Glucose ratio が菌類の生殖生長と深い関係のある事は WESTERGAARD 等⁽⁴⁾や BARNETT 等⁽⁵⁾も認める如くであり, 著者の実験に於いても Fig. 5 の如く各培地に発生した蕈数を示す曲線の峯 ((a. b. c. d) は NaNO_3 が増加するに随つて sucrose 濃度の高い方向に移動している. この実験結果は他の条件が一定であるならば培養基中の炭素源及び窒素源の間に或る一定の比率が存在する時に蕈の発生が最もよく行われることを示すものと考え. 而してこの比率は菌糸の生育に optimum な値 85~90 よりは大きく約 300~600 である事が推知される (Table 3). このように栄養生長は培養基の C/N ratio が比較的小さい時にさかに行われ, これが大きい時に生殖生長がよく行われた.

3. 蕈の発生と培養液の pH

全供試培養基 480 を発芽したものと発芽しないものに分け, その各について比色法により pH を測定した処発芽した培養基の 35% は pH 6.7~6.9 であり, 同様に発芽しなかつたものの中 42% は pH 7.3~7.6 であつた (Fig. 6). 著者は他の実験 (例えば麦芽エキスを培養基とした Table 1) に於ては pH が発芽及び菌糸の生育に極めて密接な関係があるという結果は得られなかつたが, 合成培養基を培地とした場合には培養基の pH は発芽及び菌糸の生育と極めて密接な関係のある事が推察される.

(1) STEINBERG, R. A. : <i>J. Agr. Research</i> , 58, 717 (1939).	itenk, Abt. 11, 89, 370 (1934).
(2) WAKSMAN, S. A., and LOMANITZ, S. : <i>J. Agr. Research</i> , 30, 263 (1924).	(4) WESTERGAARD, M., and MITCHELL, H. K. : <i>Am. J. Botany</i> , 34, 573 (1947).
(3) PRUESS, L. M., EICHINGER, E. C., and PETERSON, W. H. : <i>Zentr. Bakt. Paras-</i>	(5) BARNETT, H. L., and LILLY, V. G. : <i>Phytopathology</i> , 40, 80 (1950).

Summary

1. The mycelia, cultured on malt extract solution of 5 degrees Balling (pH 6.5) in 7 days at 24°, were transplanted on Czapek's culture medium (pH 6.5) modified the concentration of sucrose and NaNO_3 and incubated again for 30 days at 24°. And then they were kept in room temperature of 15~18° to urge their fructification. After 20 days they were investigated on their mycelial growth and fructification which were affected by the difference of sucrose/ NaNO_3 ratio in the medium.

2. Excepting the extreme cases, mycelial growth and fructification were well taken when not only sucrose and NaNO_3 were both a little amount, but also the both were abundant. However when the media were scarce of sucrose and NaNO_3 small mushrooms were fructified, and in the contrary when they were abundant of them they fructified large ones.

The optimum C/N ratio to the mycelial growth was 85~90, and to the fungous fructification it was approximately 300~600.

3. As has been shown in the Fig. 6, the high acute curves representing the number of media on which the mushrooms fructified were presented on the pH 6.7~6.9, while the unfructified ones were on the pH 7.3~7.6.

It is supposed that, pH value for the fungous fructification on such a synthetic medium seemed desirable to be 6.7~6.9.