- (7) 辰巳忠次, 飴山 実, 合田 純 : 本誌, 28, 281 (1954).
 (8) 東大農学部 : 実験農芸化学 (上) (1952)
 (9) J. W. Mellor, C. B. E., D. Sc., F. R. S., H. V. Thompson, M. A. : A Treatise on Quantitative Inorganic Analysis (1938).
 (10) 赤堀四郎編 : 酵素研究法, 1, 162 (1955).
 (11) H. Neubauer : Journ. Amer. Chem. Soc., 16, 289 (1894).
 (12) P. Schottländer : Zeit. Anorg. Chem., 7, 343 (1894).
 (13) W. T. Hall : Journ. Amer. Chem. Soc., 50, 2630 (1928).
 (14) V. T. Chuiko : Journ. App. Chem. U.S. S.R., 10, 364 (1937).
 (15) A. W. Epperson : Journ. Amer. Chem. Soc., 50, 321 (1928).
 (16) L. W. Winkler : Zeit. Angew. Chem., 31, 211 (1918).
 (17) 有生会 : X線による物質の内構査察, p. 32 (1934).
 (18) 脇田正二 : 本誌投稿中.
 (19) 脇田正二 : 本誌投稿中.
 (20) 脇田正二 : 本誌, 35, 579 (1961).

[農化 第 35 卷, 第 6 号, p. 579~583, 1961]

えのきたけの生化学的研究 (第 6 報)*

菌糸体無機成分の経時的消長

脇 田 正 二 (横浜国立大学学芸学部)

昭和 35 年 11 月 4 日 受理

緒 言

微生物の無機成分が培養基の組成によって著しく変化することについては多くの研究がこれを認めている^(1~6). 特に Dawson⁽¹⁾ は *Bact. coli* を, Rennerfelt⁽²⁾ は *Asp. niger* を, Aso⁽³⁾ 及び Takata⁽⁶⁾ 氏らは *Asp. oryzae* を用いて広汎な研究を行っている. 天然に自生した茸類の無機成分については既に詳細な報告⁽⁷⁾があるが, 著者は麦芽エキスを菌糸体を培養し, これが成長して発茸 (正常株) または結晶性物質⁽¹⁷⁾を生成 (変異株) するに至る間の菌糸体, 及び培養基中の無機成分の消長を, 正常株 (*Collybia velutipes* No. 57) 及び変異株 (*Collybia velutipes* No. 57 var.) について比較実験を行った結果, 前者は maximum-growth 後, 生育適温⁽⁸⁾の 24°におく時は菌糸体成分に殆んど変化がなく (発茸せず), 冷所に移す時は暫時にして発茸し, 同時に菌糸体成分に顕著な消長が起る. ところが後者は maximum-growth 後生育適温に放置する時は, 菌糸体成分に顕著な消長がある (冷所においても発茸は困難) ということを確認した. 次にその結果を報告する.

実 験 方 法

1. 菌株 : *Collybia velutipes* No. 57 及び *Collybia velutipes* No. 57 var.
2. 培養基及び培養法 : 200 cc 3 角フラスコ中の麦芽エキス 80 cc (Ballg. 9°, pH 5.8, 粗灰分 0.1380g) に 24° で培養した.
3. 灰分の調製 : 供試料が固体のときは適度に破砕後, また液体のときは濃縮乾涸後電気炉で赤熱 (600°以下) で灰化した. また, 麦芽エキス中の硫酸の定量には灼熱前の灰分に dil. Ba(OH)₂ を加え, 乾涸後灼熱して得た灰分を用いた.
4. 分析法 : 分析は農芸化学分析書の食品分析法⁽⁹⁾に従い, また, 一, 二の分析書^(10,11)を参照して行った. すなわち, 燐はモリブデン法, カリ, ソーダは過塩素酸法, マンガンは比色法, 石灰は重量法, 鉄は硫化アンモニア法, 苦土はピロリン酸マグネシウム重量法でそれぞれ定量した.
5. pH の測定 : 菌糸体の pH は, これに pH 試験紙を押当てて, また, 培養基の pH は, pH 試験紙及びガラス電極 pH メーターを用いて測定した.

実 験 結 果

I. 麦芽エキスの無機成分 分析の結果は第 1 表の通りである. なお, 著者が従来本菌の培養にしばしば用

* Biochemical Studies of *Collybia velutipes*. Part VI. Periodical Fluctuation of the Contents of Inorganic Compounds in the Mycelium.

By Shōji WAKITA (Agricultural Institute, Yokohama National University)

第 1 表 麦芽エキスの無機成分

無機成分	灰分中の百分率	g/l	Henneberg* 培養基 g/l
SiO ₂	7.83	0.1331	—
P ₂ O ₅	40.80	0.6936	1.756
SO ₃	0.82	0.0139	0.163
Fe ₂ O ₃	2.11	0.0359	—
CaO	4.57	0.0777	0.087
K ₂ O	20.61	0.3504	1.276
Na ₂ O	4.35	0.0740	—
MnO	0.06	0.0010	—
MgO	17.67	0.3004	0.082
合計	98.82	1.6800	3.364

* Henneberg 培養基: MgSO₄·7H₂O 0.5 g,
KH₂PO₄ 1.0 g, KNO₃ 2.0 g, CaCl₂ 0.1 g,
NH₄H₂PO₄ 2.0 g, グルコース 50 g, 水 1,000 cc.

第 2 表 発芽前後の菌糸体及び茸の無機成分

試 料	菌 糸 体		茸
	発芽前	発芽後	
灰分 (crude) %	6.17	7.79	8.73
SiO ₂	1.49	7.61	0.73
P ₂ O ₅	51.50	47.75	36.35
SO ₃	0.11	0.12	1.16
Fe ₂ O ₃	2.45	3.95	0.23
CaO	2.78	2.97	1.53
K ₂ O	26.92	22.18	46.37
Na ₂ O	4.18	7.24	2.48
MnO	0.08	0.05	0.03
MgO	9.44	6.18	11.94
合 計	98.95	98.05	100.87

第 3 表 正常株菌糸体及び培養基無機成分の経時的消長*

培養日数	30	40	50	60	70
pH	{ 菌糸体 5.8 培養基 5.8	{ 5.8 5.8	{ 5.8 5.8	{ 5.8 5.8	{ 5.8 5.8
菌糸体重量(乾物)	1717.0	1777.1	1762.2	1708.0	1649.1
灰分	{ 菌糸体 106.8 培養基 32.5	{ 109.2 29.6	{ 109.8 27.5	{ 106.8 30.5	{ 105.5 31.4
SiO ₂	{ 菌糸体 1.7 培養基 7.9	{ 3.0 7.7	{ 4.1 6.1	{ 3.6 6.7	{ 3.5 6.9
P ₂ O ₅	{ 菌糸体 55.0 培養基 1.2	{ 55.3 1.3	{ 55.3 1.2	{ 55.2 1.3	{ 55.0 1.4
MgO	{ 菌糸体 10.1 培養基 14.2	{ 10.3 14.4	{ 10.5 13.8	{ 10.2 14.1	{ 10.4 14.2
K ₂ O	{ 菌糸体 28.9 培養基 0.5	{ 28.8 0.5	{ 28.9 0.3	{ 26.6 2.1	{ 26.3 2.6
Na ₂ O	{ 菌糸体 4.6 培養基 1.3	{ 4.5 1.1	{ 4.9 1.1	{ 4.4 1.3	{ 3.8 2.2

* Ballg. 9° の麦芽エキス 80 cc に培養の結果

第 4 表 正常株菌糸体無機成分の経時的消長 (菌糸体に対する百分率)

培養日数	30	40	50	60	70
灰分 (crude)	6.22%	6.15%	6.23%	6.25%	6.40%
SiO ₂	0.10	0.17	0.23	0.21	0.21
P ₂ O ₅	3.21	3.11	3.13	3.23	3.33
MgO	0.59	0.58	0.60	0.59	0.63
K ₂ O	1.68	1.62	1.64	1.56	1.60
Na ₂ O	0.26	0.25	0.28	0.26	0.23

い⁽¹²⁾ている Henneberg 培養基の組成を比較のため記載した。

すなわち Ballg. 9° の麦芽エキス培養基は Henneberg 培養基に比して灰分 50%, 燐酸 50%, 硫酸 8%, 石灰 89%, カリ 27%, 苦土 366% を含有し, 無機栄養素には比較的乏しいが, 苦土が著量に存在する。本菌の培養には好適な培養基⁽¹²⁾である。

II. 発芽前後の菌糸体及び茸の無機成分 正常株を 20 日間培養後 (この頃 maximum-growth に達す) 15~17° の冷所に静置すると, 約 2 週間後には菌膜表面の 1 部が隆起して発芽の様相を呈する。この時実験個体数の約 1/3 の培養菌糸体をフラスコから取出し, 水道水, 次に蒸留水で洗って乾燥する (発芽前の菌糸体)。他の約 2/3 の培養菌糸体は茸がよく成長した時 (これ以上放置すれば茸が萎凋すると認められる時——発芽後約 2 週間経過) フラスコから取出して菌膜部と茸を分離し, 菌膜部 (発芽後の菌糸体) は前記のように洗滌してから, それぞれ天日で乾燥し, 次に 105° で 1 時間乾燥後硫酸上で冷却して秤量, これらの試料を前記の如く灰化, 分析して第 2 表の結果を得た。

茸の灰分は三浦氏⁽⁷⁾の野生茸についての実験結果とほぼ一致する。発芽後の菌糸体灰分はこれより少く, 発芽前のものはさらに少く, 菌糸体は茸より炭水化物に富み特に発芽前の菌糸体にこれが多く存在⁽⁸⁾するためである。ケイ酸, 鉄, 石灰, ソーダ, マンガン及び燐酸等は菌糸体に多く存在し, 殊にケイ酸及び鉄は茸の約 10 倍量が菌糸体に存在する。燐酸, 石灰及びソーダ等が茸より菌糸体に多く存在し, カリ, 硫酸及び苦土等が菌糸体より茸

に多く存在することは, Aso⁽⁵⁾, Takata 氏ら⁽⁶⁾の *Asp. oryzae* の菌糸体及び胞子における結果とほぼ一致する。石灰が菌糸体に多く茸には少ないことについて, Rennerfelt⁽²⁾は, 菌糸体中の石灰は燐酸と結合して燐酸石灰となり, 胞子に移動することができなくなるためであると説明している。カリ及び苦土の含量は茸に菌糸体の約 2 倍量が存在する。カリの存在理由について, Rippel 氏⁽¹³⁾は K イオンは生体内の中和作用のために摂取されるもので, 生育には至大の関係をもつが代謝には直接影響を与えないものと述べている。

III. 菌糸体無機成分の経時的消長

(1) 正常株無機成分の経時的消長:

正常株菌糸体を麦芽エキスを培養し, その maximum-growth 以後の菌糸体及び培養基の無機成分を経時的に測定して第 3, 4 表の結果を得た。

すなわち, 本菌は 70 日の培養期間中, 培養基, 菌糸体共 pH は殆んど変化なく, 菌糸体重量, 灰分, ケイ酸, 燐酸, カリ及びソ

第 1 図 変異株菌糸体無機物の経時的消長
菌糸体 (乾物) 中の百分率

第 2 図 変異株菌糸体及び培養基無機成分の
経時的消長 (灰分中の百分率)
●—● 菌糸体 --- 培養基

一ダ等が培養の末期に、それぞれわずかに減少する程度の極めて安定した菌で、これを冷所に移して培養すれば約 2 週間後には発芽する。

灰分の中、ケイ酸、磷酸、カリ及びソーダ等は漸次減少の傾向があるが、苦土はかえって増加する。Rippel ら⁽¹⁶⁾も *Asp. niger* の自己消化過程において苦土が増加することを認めている。著者の変異株ではこの傾向がさらに顕著で、後述の如く遂に結晶⁽¹⁷⁾の生成に至るものと思われる。Rippel ら⁽¹³⁾によれば、一般にカビ類のカリ含量は蔭酸を生産することが多いものほど多いという。

(2) 変異株無機成分の経時的消長 正常な菌株も長期間培養する時は菌糸体成分に若干の消長があるが、変異株を同様に培養する時は第 5 表の如く顕著な消長がある。すなわち

(A) 菌糸体の pH は培養 40 日までは培養基と同様 (5.8) であるが、その後菌糸体の pH はしだいに高くなり、従って培養基の pH も漸次上昇する。

(B) 菌糸体のカリ、ソーダは培養日数 40 日以後はしだいに減少する。これに対して培養基中のカリ、ソーダは対照的に増加する。

(C) 菌糸体の磷酸は培養日数 40 日までには増加し、その後漸次減少するが、50 日以後は再び急激に増加する。苦土は培養期間中常に増加を続け、50 日以後は急激に増加し、この頃の菌糸体における苦土及び磷酸増加の比率は $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ における重量比 1:3.9 に近似する。すなわち 50 日以後の菌糸体においては $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の生成がさかに行われるものと思われる。

菌糸体重量に対する無機成分比を示せば第 1 図の通りである。灰分の百分率は、培養 40 日までは急激に減少するが、これは炭水化物

第 5 表 変異株菌糸体及び培養基無機成分の消長*

培養日数	30	40	50	60	70
pH { 菌糸体	5.8	5.8	6.7	7.0	7.0
培養基	5.8	5.8	6.2	6.2	6.5
菌糸体重量 (乾物)	mg 802.0	mg 1086.2	mg 827.2	mg 738.3	mg 699.1
灰分 { 菌糸体	65.1	68.0	63.3	81.1	79.4
(crude) 培養基	73.1	69.3	75.5	57.3	58.7
SiO ₂ { 菌糸体	1.5	1.7	1.9	1.3	1.1
培養基	10.1	8.5	8.1	8.3	8.8
P ₂ O ₅ { 菌糸体	35.7	36.6	29.8	43.3	43.4
培養基	20.3	19.5	26.0	12.7	13.0
MgO { 菌糸体	6.1	8.6	12.1	20.4	20.9
培養基	18.3	16.1	12.3	4.6	3.9
K ₂ O { 菌糸体	12.9	13.1	9.3	6.0	4.9
培養基	15.9	14.7	18.5	21.8	22.4
Na ₂ O { 菌糸体	3.8	4.0	3.9	3.1	2.2
培養基	1.7	1.6	2.1	3.0	3.9

* Ballg. 9° の発芽エキス 80 cc に培養の結果

等の増加による相対的な減少である。

40 日以後の培養でカリ、ソーダ及びケイ酸などが減少するにもかかわらず、灰分の絶対量及び相対量は増加するが、これは菌糸体が自己消化の結果、培養基中に放出した磷酸がマグネシウムと共に再び菌糸体（菌糸塊）中に結晶性物質⁽¹⁷⁾として集積するに因る。

灰分中の無機成分の百分比を示せば第 2 図の通りである。培養日数 40 日では菌糸体の生育は maximum で磷酸、カリとともに実際の重量は増加している（第 5 表）のに、これらの百分比が減っているのは苦土の増加量が著しいために生じた見かけの減少である。このように苦土は培養期間中減少することなく絶えず増加を続ける。Rippel ら⁽¹⁵⁾は *Asp. niger* を中性培養基で培養する場合には酸性培養基に比して、菌糸体の苦土は 3 倍であったことを報じている。著者⁽¹⁷⁾も結晶中の苦土が他の無機質に比して溶出し難いことを指摘した。

このように maximum-growth 以後の変異株菌糸体の無機質はしだいに減少して培養基に移行するが、磷酸及びマグネシウムは漸次菌糸体に集積する。

考 察

正常な菌株では長期間の培養でもわずかにカリ及びソーダ等が培養基に浸出するに過ぎないが、発芽能力を殆んど失った変異株菌糸体は培養中における成分の消長が顕著である。すなわち、菌糸体重量において培養日数 70 日では、maximum-growth (40 日) の約 64% になる。これは単に呼吸による成分の減少ばかりでなく、菌糸体成分の浸出ないし溶出が主な原因である。一般に菌糸体の無機質は maximum-growth 以後は、速度に遅速はあるが次第に培養基に浸出する傾向がある。

本菌（変異株）においても菌糸体の磷酸はやがて（50 日後）培養基に浸出するが、その後再び菌糸体に集積する。マグネシウムは菌糸体の生育が maximum に達した後も、実験結果から見れば培養基に浸出することなく、しだいに菌糸体に集積する（第 5 表）。これは後報⁽¹⁸⁾の如く変異株菌糸体の有機磷酸化合物は酵素作用によって分解し無機磷酸を培養基に浸出する。その後菌糸体にアンモニアが生成⁽¹⁹⁾すると、培養基中の無機磷酸はマグネシウム及びアンモニウムとともに菌糸体（菌糸塊）内に結晶性物質⁽¹⁷⁾を作り、アンモニアの生成によって培養基の pH が上る程ますます結晶の生成が旺んになる⁽¹⁹⁾（アンモニアの生成は無機磷酸の放出におくれることは確実である。もしアンモニアの生成が無機磷酸の放出と同時にし早く行われるのであれば、培養基中に無機磷酸の増加は起らないで、直ちに菌糸体内に結晶が生ずるはずである）。

マグネシウムは磷酸の如く、一時に著量が培養基に浸出することなく、おそらく細胞膜の溶解⁽²⁰⁾によって放出された少量のマグネシウムは、既に培養基中に多量に溶存（第 5 表）するマグネシウムとともに、直ちに磷酸及びアンモニアと難溶性化合物を作って菌糸体に集積するために、分析結果から見ると他の無機質の如く培養基に浸出することなく、培養の古くなるに伴ってますます菌糸体に集積する如く見えるのであろう。

磷酸及びマグネシウムが $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を主成分とする結晶を作って菌糸体に集積するならば、菌糸体における磷酸及びマグネシウム増加の割合は $\text{PO}_4/\text{Mg}=3.91$ になるはずである。結晶が著量に生成する、培養日数 50 日及び 60 日の間の磷酸及びマグネシウムの増加量は、それぞれ 18.1 mg 及び 5.1 mg で、 $\text{PO}_4/\text{Mg}=3.58$ である。このように菌糸体に増加する PO_4/Mg が、理論値 3.91 よりわずかに少いことは、菌糸体に結晶が生成するときにも、たえず菌糸体から培養基に磷酸の放出が行われるに因るものである。

Rippel ら⁽¹⁵⁾は *Asp. niger* の培養において、培養初期には灰分量は培養基が酸性でも中性でも差はないが、自己消化が始まる頃になると酸性培養基の灰分は著しく減り、中性培養基では増加する傾向があること、及び中性培養基において、マグネシウムは培養の古くなるに従って増加することを報じている。*Asp. niger* は尿酸生成菌であって、マグネシウムは尿酸と結合して、特にアンモニア、アルカリ性でよく沈殿を作り易いので、菌糸体に尿酸マグネシウムが集積することも考えられるし、もし磷酸が存在するならば $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の生成も可能である⁽¹⁶⁾。おそらくこのような物質が菌糸体に集積した結果、培養日数の増加に伴ってマグネシウムが増加したのであろう。

磷酸、マグネシウム及びカリウムは発芽前の菌糸体には著量に存在し、発芽後の菌糸体には比較的少いので茸の生成に多く用いられるものと思われる（第 2 表）が、変異株菌糸体においては maximum-growth 以後、これらが培養基に浸出し、マグネシウム及び磷酸はアンモニアその他とともに再び菌糸体にもどって結晶⁽¹⁷⁾を生成する。

このように変異株菌糸体は maximum-growth 以後、茸の生成に必要な成分を多量に細胞外に浸出することによって、ますます発茸が困難になるのであろう。従来かかる結晶が菌糸体に生ずることについて報告を見ないのは、著者が実験に用いた *Collybia velutipes* No. 57 var. の如き自己溶菌作用の顕著な軟質菌類が実験に供せられなかったことに因るものと思われる。

要 約

- (1) 麦芽エキ스는無機成分には比較的乏しいが、マグネシウムが著量に存在する培養基である。
- (2) 茸が発生する時は著量の磷酸、マグネシウム及びカリウムが菌糸体から茸に移行する。
- (3) 正常株 (普通に発茸する菌) は 24° で、70 日間培養する場合でも菌糸体無機成分の培養基に浸出する量は僅少であるが、変異株 (発茸し難い菌) は培養日数 40 日には無機成分が浸出し始める。
- (4) 変異株は培養日数 50 日になると、さきに培養基に浸出した磷酸化合物及び既に培養基に溶存するマグネシウム塩は再び菌糸体に集積する。この頃の菌糸体における磷酸及びマグネシウム増加の比は、 $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ における PO_4/Mg 比に近似する。

(1) A. I. Dawson: <i>J. Bact.</i> , 4, 133 (1919).	(11) J. W. Mellor, C. B. E., D. Sc., F. R. S., H. V. Thompson, M. A.: <i>A Treatise on Quantitative Inorganic Analysis</i> , p. 139, 665 (1938).
(2) E. Rennerfelt: <i>Planta</i> , 22, 221 (1934).	(12) 脇田正二: 本誌, 28, 707 (1954).
(3) A. Damboviceanu, C. Barber: <i>Arch. roum. path. exp. et Microbiol.</i> , 4, 5 (1931).	(13) K. Rippel, G. Behr: <i>Arch. Mikrobiol.</i> , 5, 561 (1934).
(4) R. Schnüche: <i>Biochem. Z.</i> , 153, 372 (1924).	(14) M. Molliard: <i>Compt. rend.</i> , 170, 949 (1920).
(5) K. Aso: 東京帝国大学農学部紀要, 4, 81 (1900).	(15) K. Rippel, G. Behr: <i>Arch. Mikrobiol.</i> , 1, 271 (1930).
(6) R. Takata: <i>J. Soc. Chem. Ind. Japan</i> , 32, 497 (1929).	(16) W. T. Hall: <i>Journ. Amer. Chem. Soc.</i> , 50, 2630 (1928).
(7) 三浦伊八郎, 岩出亥之助, 沢田満喜: 林学, 19, 421 (1937).	(17) 脇田正二: 本誌, 35, 574 (1961).
(8) 脇田正二: 本誌, 32, 562 (1958).	(18) 脇田正二: 本誌, 35, 583 (1961).
(9) 東大農学部編: 実験農芸化学, 上, p. 7, 114 (1952).	(19) 脇田正二: 本誌投稿中.
(10) 木村健二郎: 分析化学実験法 (実験化学講座) 4, 5, 6.	(20) 脇田正二: 本誌投稿中.

[農化 第 35 卷, 第 6 号, p. 583~587, 1961]

えのきたけの生化学的研究 (第 7 報)*

菌糸体磷酸化合物の経時的消長

脇 田 正 二 (横浜国立大学学芸学部)

昭和 35 年 11 月 4 日 受 理

緒 言

生体の自己消化過程における無機磷酸ないしヌクレオチド分泌に関する研究は、主として肝臓⁽¹⁾、水産動物肉類⁽²⁾等の動物体及び酵母^(3,4)等について行われていて、軟質菌類 (茸類) については殆んど研究されていない。

前報⁽⁹⁾において著者は麦芽エキスを数年間繰返し培養を続けた後、発茸力の衰えた変異株菌糸体は maximum-growth 以後その菌糸体磷酸化合物を培養基中に浸出するが、その後この磷酸化合物は $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を主成分とする結晶性物質として再び菌糸体に集積することを認めた。

今回はこの現象を究明する目的で、培養日数の増加に伴って増減する菌糸体有機磷酸化合物の追跡を行ったの

* Biochemical Studies of *Collybia velutipes*. Part VII. Periodical Fluctuation of Phosphorous Compounds in the Mycelium.

By Shōji WAKITA (Agricultural Institute, Yokohama National University)