

マッシュルームの生化学的研究 (第1報)

マッシュルーム菌糸の栄養要求に就て

橋本 一哉 磯部 信昭 高橋 善次郎

Biochemical Studies on the *Psalliota bispora*. Part 1.

Nutritional requirements for vegetative growth of *Psalliota bispora*

Kazuya Hashimoto, Nobuaki Isobe and Zenjiro Takahashi

The commercial mushroom, *Psalliota bispora*, is cultivated on composted rice-straw in this country.

Although a number of investigators have examined the stimulatory or inhibitory effect of various nutritions, there has been no clear definition of the nutritional requirements of *Psalliota bispora*.

The purpose of this work was to investigate the nutritional requirements of *P. bispora* with a chemically defined medium for the mushroom cultivation.

Methods

The medium (table 1) was delivered in 40 ml quantities into 300 ml Erlenmeyer flasks and sterilized by autoclaving for 15 min. at 121 C.

Inocula were prepared by homogenizing mycelium harvested from a 20-day-old culture of *P. bispora* for 30 sec. in a homogenizer.

The suspension was diluted with sterilized and distilled water so that each 1.0 ml contained 3 to 5 mg (dry wt) of fungus tissue, and 1.0 ml was added as inoculum to each flask of medium.

Inoculated flasks were incubated for 20 days at 25C without agitation.

The following results were obtained:

- 1) *P. bispora* was unable to develop in a glucose-mineral salts medium but the fungus did grow when the medium was supplemented with yeast extract.
- 2) Thiamine was the growth-promoting substance in a glucose-mineral salts medium.
- 3) Peptone as nitrogen source was more effective to maximal growth.
- 4) Glucose was the most suitable carbon source in several carbohydrates, and optimal glucose concentration was approximately 3 per cent.
- 5) The initial pH was optimal at either the neutral or the weakly acidic side, this fungus was resistant to acid and fragile to alkali.

緒 論

マッシュルーム菌糸は特別に調整されたコンポストに良く生育し、覆土後適当な管理を行えば子実体の形成を見るに至る。しかしこの生化学的な機構は未だ完全には究明されていない。またその

基礎的な報告^{1) 2)} も比較的にな少ないのでこの点を明らかにするため実験を試みた。特に最近液内培養の研究と相俟ってマッシュルーム菌糸の食品への利用が注目されるようになり、その生化学が漸く取り上げられてきた³⁾⁻⁹⁾。我々はマッシュルーム栽培に資する目的でマッシュルーム菌糸の栄養要求について液体静置表面培養法によって 2, 3 の実験を試みたのでここに報告する。

実験方法

1. 供試菌および接種

当研究室に分離保存せる *P. bispora* 寒天培地より yeast extract liquid media に約20日間25℃にて前培養し冷所に保存せるものを、使用に当っては菌蓋を無菌水にて3回よく洗滌して Blender で 30sec. 高速処理し無菌水に懸濁したものを 1ml/1flask を接種する。

(dry wt. of mycelium 3~5mg/1ml)

2. 培地および培養条件

培地組成は Table 1 の如くで 40ml を 300ml の三角フラスコに分注121℃ 15分加圧殺菌し種菌接種後25℃にて静置培養する。

3. 菌糸の生育と測定

各フラスコの菌蓋は 100ml 以上の蒸溜水にて洗滌し、乾燥炉紙で脱水、105℃ 18時間乾燥恒量となし秤量する。各値は3標品の平均値で表示する。

Table 1 Basal medium.*

glucose	30g	(NH ₄) ₂ SO ₄	4.57g	KH ₂ PO ₄	3.4g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1g	CaCl ₂	0.5g	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10mg
mineral solution	1ml	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₇	0.3mg		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.1mg	MnCl ₂	0.3mg	ZnCl ₂	0.3mg/1L

*Solved in distilled water to 1000ml.

実験および結果

I. 菌糸の発育状態

glucose-mineral salts medium では全く菌糸の生育は見られなかった。

この基本培地に yeast ext. autolysed yeast, malt ext. potato ext. wheat ext. を 0.3% 添加した結果菌糸の発育は促進され、その有効性は yeast ext. ≥ malt ext. > autolysed yeast > potato ext. > wheat ext. の順序で yeast ext. を添加した場合に最も有効であった。

このことより *P. bispora* は glucose mineral salts medium のみでは生育できないが、これに yeast ext. 中に含まれるある物質が生長に関与すると推察された。

II マッシュルーム菌糸の生育に及ぼす物質および条件

1. Vitamin および mineral との関係

yeast ext. 中には vitamin や mineral を多量に含有することに鑑み Table 2 の割合で vitamin を添加、他に yeast ext. 3g を電気炉中で 450℃ にて2日間灰化 100ml に溶解し使用に当っては 1ml/40ml を用い、また特に必要と思われる Zn は ZnCl₂ として 200γ% 用いた。

数種の vitamin を単独または合せ glucose-mineral salts に添加したときのマッシュルーム菌糸の生育は Table 3 の如くであり vitamin としては thiamine が有効であり、さらに無機物質も必要な成分であることがうかがえる。しかし thiamine と無機物質を同時に使用したものも yeast ext. に比較して生育は良くなかった。なお窒素源としては peptone (0.2%) を用いたときの thiamine の濃度と生育の関係は Table 4 の如くで 5γ% のときに最も良好であった。

なお thiamine を添加しない場合にも peptone を窒素源とすると菌糸の生育は見られたが、菌糸は濃い褐色を呈し正常な発育ではないことより thiamine は菌糸の正常な発育のためには必須の vitamin であることが推察された。

2. 窒素源との関係

上記の如く *P. bispora* は thiamine の他に Peptone を少量添加すると生育が著るしく促進された。それ故窒素源としてある種のものを必要とすると考えられるので基本培地の窒素源を無機塩の場合には各窒素 100mg% になるように置き換えて、また tyrosin 等溶解度の小さいものは適量添加した、窒素源と生育の関係は Table 5 に示す。

Peptone を窒素源として用いたときには最高の生育が見られたが、他の窒素源ではかなり低い値を得たにすぎなかったので比較的良好と思われる上位 6 者にさらに蛋白源として casein を加えた各濃度における菌糸生育の状態を Table 6 に示す glycocoll 以外の窒素源を用いた

ときには生育と濃度の関係は 0.8 ~ 0.1% の間で比例関係を示し酒石酸アンモンを別とすれば Protein > amino acid > ammonium salt > nitrate の順序でマッシュルーム菌糸の生育に適しており従来の蛋白態窒素が菌糸生育に最適の窒素源であろうという考えと一致した。

Table 2 Medium supplements.

Vitamins	Concn (amt/liter)
Biotin	5μg
Nicotinic acid	200
p-Aminobenzoic acid	100
Pyridoxine-HCl	50
Ca-pantothenate	150
Thiamine-HCl	100

Table 3 Influence of various medium supplements on growth of *P. bispora*.

Medium supplements	dry wt. of mycelium mg/40ml
yeast extract	315
ash of yeast ext.	16
thiamine + ZnCl ₂	24
thiamine + ash of yeast ext.	71
thiamine	20
biotin	12
thiamine + biotin	13
thiamine + pyridoxine	14
thiamine + nicotinic acid	5
thiamine + p-aminobenzoic acid	9
thiamine + phantothenate	23
none	4

Table 4 Influence of thiamine on growth of *P. bispora*.

thiamine (γ%)	dry wt. mycelium mg/40ml
100	258.3
50	281.5
10	295.3
5	306.4
1	269.0
0.5	256.1
0.1	220.6
0	207.9

3. 炭素源との関係

mushroom (*P. bispora*) は稲ワラを基本とする Compost に生育し主たる炭素源として稲ワラに依存しているが稲ワラの推積中に生ずる炭素源として可能性のあると思われる数種の糖と生育の関係は Table 7 に示す如く glucose が最も適当な炭素源であった。さらに Foster¹⁰⁾ によれば菌類は osmotic effects または specific enzyme effects によって適当な糖濃度のときに最も良く生育し糖消費を行なうことを述べている。

Humfeld & Sugihara³⁾⁸⁾ Block⁴⁾等は培地の糖濃度を 5% glucose として用いたが、Ahmad M. Moustfa¹¹⁾は *A. campestris* の通気および振盪培養において糖濃度と菌糸生育の関係は 2% glucose のときに最高の菌糸生育を見ている。

窒素源として Peptone 0.2% を添加したときの glucose の濃度と生育の関係は Table 8 に示す如く 3% glucose を最高にして 5% glucose 程度まで菌糸の良好な生育を示した。

Table 5 Growth in culture media containing one of various nitrogen compounds as N-source

N-source	addition mg/100ml	dry wt. mycelium mg/40ml	growth *
Yeast ext.	300	351	100
peptone	324	348	99
ammonium tartarate	658	122	35
glycocoll	267	58	17
(NH ₄) ₂ SO ₄	457	22	6
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	843	20	5
NH ₄ NO ₃	285	20	5
ammonium oxalate	508	18	5
KNO ₃	722	16	5
NaNO ₃	607	13	4
β-alanine	330	10	3
ammonium citrate	693	10	3
tyrosin	100	6	2
L-aspartic acid	949	3	1
ammonium benzonate	907	2	1
NaNO ₂	493	2	1
L-glutamic acid	546	1	1
ammonium molybdate	1471	0	0

* Reported as per cent of that obtained on medium containing yeast extract (351mg dry wt./40ml).

Table 6 Influence of some nitrogen compounds as N-source and its concentration on growth of *P. bispora*.

N-source	dry wt. of mycelium mg/40ml			
	0.8%	0.5%	0.3%	0.1%
peptone	—	352.2	324.1	94.8
casein	—	—	—	182.3
glycocoll	—	57.2	58.8	68.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	36.2	15.3	3.8
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	16.9	2.9	—	0
ammonium tartrate	111.4	80.2	—	71.4
none				0

Table 7 Influence of some carbon-source on growth of *P. bispora*.

C-source	dry wt. of mycelium mg/40ml	
	3 %	1 %
glucose	311.3	—
cellulose	—	(382.1)*
starch	129.6	129.0
xylose	39.8	56.4
lignin (rice straw)	—	79.2
lignin (wood)	—	0

* The mycelium divided perfectly from cellulose was impossible.

4. Initial pH との関係

基本培地の pH を硫酸（または苛性ソーダ）でそれぞれ変化せしめて培養を行なった結果 Table 9 に示すごとく微酸性（pH 6.5 附近）において生育が最もよく酸性側では比較的耐性であるが、アルカリ性に対しては弱く pH7.5 以上では完全に生育は阻害される。

Initial pH の影響を経時的に比較すると Table 10 の如くになり微酸性の場合には培養初期から生育がより良好であることが解る。

5. 生育に伴う消費糖量との関係

菌糸の生育中培地中における糖消費状態は Fig. 1 の如くで菌体は 20 日で最高に達し糖は 13 日目まで急速に減少し以後漸減し 50 日で完全に消費される pH は菌体生育後再び減少し 40 日を最低として菌体の自己消化が進むと共に上昇をたどっている 20 日以後の糖の減少は菌体生育以外に消費されたものである。

Table 8 Influence of concentration of glucose on growth of *P. bispora*.

glucose %	dry wt. of mycelium mg/40ml	growth
0	22	14.4
1	94	59.1
1.5	109	68.6
2	114	71.7
2.5	115	72.3
3	159	100
3.5	132	83.0
4	140	88.1
4.5	139	87.4
5	124	78.0
10	90	56.6

Table 9 Influence of initial pH on growth of *P. bispora*.

initial pH	final pH	dry wt. of mycelium mg/40ml	glucose consumption	economic coefficient
3.48	3.43	1.5	0.3	2.0
4.22	4.77	151.4	37.6	72.8
5.50	4.80	297.3	73.8	76.2
5.81	5.42	353.8	87.9	62.1
6.50	5.63	402.5	100.0	61.2
6.78	5.91	400.6	99.5	58.1
6.91	5.92	345.9	85.9	58.4
7.10	5.93	317.7	78.9	58.3

Table 10 Influence of two different initial pH on growth of *P. bispora*.

Time (Days)	Initial pH 5.56			Initial pH 6.39		
	pH	dry mycelium mg/400ml	residual glucose mg/ml	pH	dry mycelium mg/40ml	residual glucose mg/ml
0	5.53	0	31.3	6.39	0	29.1
8	5.85	80.2	26.6	6.41	123.7	23.4
11	5.78	182.1	23.9	5.95	240.1	19.3
13	5.29	237.9	20.6	5.71	278.4	16.5
15	4.87	284.9	16.9	5.70	293.3	16.3
18	4.80	304.4	12.6	5.69	337.9	14.1
20	4.88	330.2	12.1	5.70	354.3	13.7

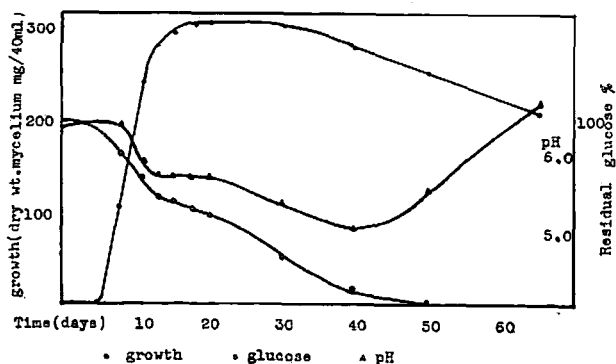


Fig. 1 Assimilation of glucose during growth of *P. bispora*.

REFERENCES

1. Stoller B. B. Principles and Practice of Mushroom Cultiv. Economic Botany, 8 48-95(1954)
2. Treschow C. Nutrition of Cultivated Mushroom. Dansk Bot. Arkiv 11. 1-180(1944)
3. Humfeld, H. The Production of Mushroom Mycelium in Submerged Culture. Science 107(1948) 373
4. Block, S. S. etc. Mushroom Mycelium Experiments with Submerged Culture. Jour. Agr. Food Chem. 1. 890-893(1953)
5. Humfeld, H. & T. F. Sugihara. Mushroom Mycelium Production by Submerged Propagation. Food Technol. 3 (11) 335 (1949)
6. Jszuecs. Submerged Culture. Mushroom Sci. 3 269-272
7. Eddy B.P. Production of Mushroom Mycelium by Submerged Cultivation. J. Sci. Food Agr. 644-649 (1958)
8. Humfeld, H. and T. F. Sugihara. Submerged Culture of the Mycelium of Various Species of Mushroom. Appl. Microbiol 2 170-172(1954)
9. J. H. Litchfield. R. C. Overbeck & R. S. Davidson. Factors Affecting the Growth of Morel Mushroom Mycelium in Submerged Culture. J. Agr. Food Chem. 11 150-162(1963)
10. J. W. Foster. Chemical Activities of Fungi. Academic Press(1949)
11. Ahmad M. Moustafa. Nutrition and Development of Mushroom Flavor in *Agaricus campestris* Mycelium. Appl. Microbiol 8 63-67(1960)