

茸類の生化学的研究—X

ヒラタケの栄養要求性について—1

橋本 一哉

Biochemical Studies on the Mushroom - X

1-Nutritional Requirements for Vegetative Growth of *Pleurotus ostreatus*

KAZUYA HASHIMOTO

P. ostreatus is one of the white-rot fungi which attack both cellulose and the lignin fractions of wood.

The fungi grows on dead tree trunks and branches in nature. *P. ostreatus* has not been studied thoroughly and literatures contain little information on its physiology and metabolism.

The purpose of the present paper is to describe the results of an attempt of growing *P. ostreatus* with synthetic and semisynthetic media.

P. ostreatus showed a omnivorous behavior in the utilization of carbon source and was able to grow satisfactorily with many kinds of carbohydrates. (Table 2)

Organic nitrogen sources were more effective on the maximal growth of *P. ostreatus* than inorganic nitrogen sources. (Table. 3)

Asparagine as nitrogen source was most suitable among other amino acids tested. (Table 4)

Thiamine was required for growth and fruiting, and its suitable concentration was approx. 100 $\mu\text{g}/\text{l}$. (Table 5)

The optimal initial pH of the medium is neutral to weak acid. (Table 7)

結 論

ヒラタケは自然界では、枯木の幹や枝上に発生し、白腐を示す腐朽菌であって、樹木のセルロースとリグニンを共に消費する、傘は扇型をなし側方に短い茎があり群生する、その形が牡蠣の殻に似ているので Oyster mushroom と称される、これを人工培養すると一般に傘は茎に直生し、シメジに類似するため近年各地で栽培が盛になりつつある。しかし形態発生や物質代謝の機構については未だ究明されていない、今後各種の担子菌の培養法を開発する上からも極めて重要なことと思われるので、本報では、ヒラタケの栄養要求について液体静置培養法により基礎的な実験を試み、2, 3の知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1 供試菌および接種

Pleurotus ostreatus (Fr.) Quel を使用した。供試菌は麦芽エキス (2%) 寒天培地を用い、27°C、1週間培養した栄養菌糸を2×2×2 mmの寒天片に無菌的に切りとり接種した。

2 培地および培養

培養法は Table 1 に示した培地組成を基礎培地とし実験目的により、それぞれ物質を添加し、20 ml を 100 ml のフラスコに分注し 120°C で15分間加圧殺菌した。種菌接種後 27°C にて10日間培養をおこなった。

Table 1 Basal medium*

Glucose	20g.,	Peptone	2g.,	KH ₂ PO ₄	0.5g.,
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g.,	CaCl ₂	0.1g.,	ZnSO ₄ ·7HO	0.3mg.,
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.15mg.,	CuSO ₄ ·5H ₂ O		0.05mg.,	
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.05mg.,	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·H ₂ O		0.02mg.,	
Thiamine. HCl	0.5mg.,				

* Dissolved in distilled water and the solution was made up to 1000 ml.

3 菌糸と子実体の測定

菌糸および子実体収量は培養容器当りの乾物重量で示した。即ち菌糸又は子実体を 100 ml 以上の蒸留水で洗滌し、両者を分離後 100°C で 18 時間乾燥恒量とし測定した。各値は 3 本当りの平均値をもって示した。又二列並行しておこない、前後に多少の変動を認めたが、その傾向は変わらず、同一のパターンを示した。

実 験 結 果

1 炭素源の影響

各種炭素源の効果を調べるため、基本培地のグルコースの代わりに、Table 2 に示す各種の炭素源を添加した。結果はマンノース、澱粉、グルコースを速やかに利用して菌糸の生育はすぐれていた。しかしキシロース、アラビノース等の 5 炭糖類による栄養生長は劣った。

2 炭素源濃度の影響

炭素源の濃度効果を知るため、培地にグルコース、マンノースおよび澱粉をそれぞれ 0.5~8% の初発濃度で添加して培養した結果は Fig. 1 に示すように、菌糸の生育は炭水化物の濃度とともに増加し、最適濃度をこえると減少する傾向を示した。

各炭水化物間で最適濃度はグルコースが低く、分子量に比例して高くなった。澱粉では 8% の高濃度でも生育は旺盛である。10 日間培養した菌糸を更に 20 日間、20°C で培養を継続すると各炭素源共に濃度 1% 以下の培地では子実体の形成を示した。このことから子実体の形成は炭素源の高濃

Table 2 Effect of some carbon sources on vegetative growth

Carbon Source (2%)	Dry Wt. of Mycelium mg/20ml
malt extract	102.8
mannose	181.9
starch	175.8
glucose	167.2
maltose	144.0
sucrose	119.0
fructose	109.7
mannitol	106.3
galactose	97.3
xylose	52.5
arabinose	35.5
carbon free	9.5

Medium: Basal medium in which glucose is replaced with other carbohydrates indicated.

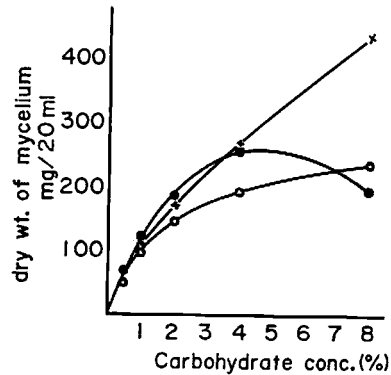


Fig 1 The response of growth to carbohydrate concentration

● glucose ○ maltose
× starch

度では阻害されることを認めた。

3 窒素源の影響

ペプトンの代わりに菌の培養に常用されている各種の窒素化合物を基礎培地に添加してその効果を比較した。窒素濃度は 0.1 gN/L とした、その結果は Table 3 に示した、菌糸の生育はカザミノ酸、アスパラギンなどの有機窒素源が適しており、アンモニウム塩がこれに続き、硝酸塩は栄養生長に不適であった。*Agaricus bisporus*¹⁾ の窒素要求性とも全く一致した。

4 窒素源濃度の影響

菌糸の生育と C/N 比との間に相関関係が見られることは一般に知られている。ここでは基礎培

Table 3 Effect of some nitrogen sources on vegetative growth

Nitrogen Source (0.1 gN/L)	Dry wt. of Mycelium mg/20 ml
peptone	125.9
casamino acid	145.6
ammonium tartarate	84.6
(NH ₄) ₂ SO ₄	47.3
NH ₄ Cl	45.4
NH ₄ NO ₃	43.7
KNO ₃	21.5
Ca(NO ₃) ₂	12.2
nitrogen free	10.3

Medium; Basal medium in which peptone is replaced with substances indicated.

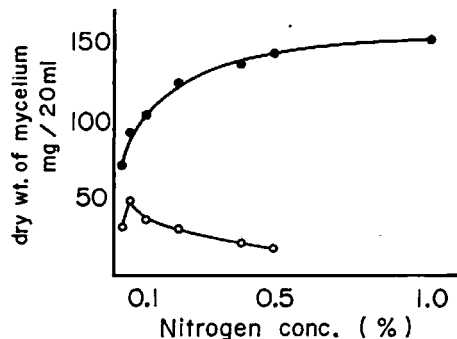


Fig. 2 The response of growth to nitrogen concentration

● peptone ○ (NH₄)₂NO₃

地の炭素源を一定として、ペプトン量を0.025~2.0%の初発濃度で培養した。同時に硝酸アンモンと比較した、結果は Fig. 2 に示した。ペプトンを用いた時菌糸量は0.2%添加までは濃度と平例して急速に増加し、その後も漸増を示した。このことは高濃度ではペプトンが炭素源としても利用されていることを意味する。硝酸アンモンでは0.05%で最高に達し、これより濃度が高くなると硝酸塩による発育阻害作用が顕著となり菌糸の生育は低下した。

5 アミノ酸類の窒素源としての影響

窒素源として有機態窒素が菌糸の生育に適することを認めたので、数種のアミノ酸についてその効果を調べた結果を Table 4 に示した。培地の初発 pH は 6.2 に調整した。

アスパラギンはペプトンやカザミノ酸の複合有機窒素の効果と一致した。その他、セリン、ロイシン、アラニン、アルギニン、グリシン等は菌糸の栄養生長に適するアミノ酸であることを知った。これに対して二塩基酸のアスパラギン酸やグルタミン酸は最終 pH が低下し菌糸の生育を阻害した。

Table 4 Effect of some amino acids on vegetative growth

Nitrogen Source (0.2g N/L)	Dry wt. of Mycelium mg/20 ml	Final pH
L-asparagine	157.4	5.38
L-serine	130.2	5.30
L-leucine	129.2	4.94
L-alanine	107.8	5.12
L-arginine HCl	98.0	5.20
glycine	95.2	5.20
L-phenylalanine	62.6	5.52
L-methionine	40.7	6.22
L-aspartic acid	18.3	3.40
L-proline	17.4	5.83
L-glutamic acid	8.5	3.42

Table 5 Effect of different thiamine concentration on vegetative growth

Thiamine concentration ($\mu\text{g/L}$)	Dry wt. of mycelium mg/20ml
1000	134.9
500	121.1
100	134.1
10	109.3
5	116.2
1	88.4
0.1	83.8
0.01	81.8
0	50.4

Medium: Basal medium in which thiamine concentration is varied.

6 サイアミン濃度の影響

サイアミンは *P. ostreatus* における必須生育因子であることは BLOCKS, S. ら²⁾によって報告されている。ここでも同様の結果を得たが Table 5 に示すようにサイアミンの最適濃度は 100 $\mu\text{g/L}$ であると考えられるが、低濃度でも菌糸の生育に支障なく無添加の培地にも生育出来た。これは“inoculum”中のサイアミンによるものと思われる。一方過剰添加による生育の阻害は認められなかった。

7 その他のビタミンの影響

サイアミン 1 mg/l を添加した基礎培地に各種ビタミンを添加したが、Table 6 のようにその効果は認められなかった。

Table 6 Effect of some vitamins on vegetative growth

Vitamins Added (mg/L)		Dry wt. of mycelium mg/20 ml
thiamine	1 +	127.3
"	biotin 0.01	134.9
"	niacin 0.3	136.4
"	pyridoxine 0.5	114.0
"	pantothenic acid 0.5	123.5
"	riboflavin 0.5	136.1

Table 7 Effect of pH on vegetative growth

pH		Dry wt. of Mycelium mg/20 ml
Initial	Final	
3.42	3.28	7.4
4.18	3.74	32.5
5.00	4.34	76.6
5.52	4.68	98.3
6.20	4.98	127.5
6.48	5.10	152.4
6.98	5.28	145.2

Medium: Basal medium. Incubated at 27°C for 10 days.

8 初発 pH の影響

栄養生長における初発 pH の影響を調べるため、基礎培地の pH を 3.5~7.0 に調整し培養した結果は Table 7 に示すように、かなり広い pH 域で生育出来た、pH 3.5 以下では生育は非常に遅れ、生育に対する pH の下限は 3 附近と思われた。

9 栄養生育中の培地組成の変化

培養初期から菌糸は急速に増殖し Fig. 3 に示すように、15 日目に菌糸生育は最大に達する。この間培地中のグルコース、窒素は消費され、pH は 7 日目に最低値を示すが、その後上昇する。菌糸が充分増殖した 15 日目に 15±5°C の室温に保つと接種後 32 日目に子実体の発生を見る (Fig. 4 写真)

このように菌糸の充分な生育は子実体形成のための養分の蓄積にあると考えられる。

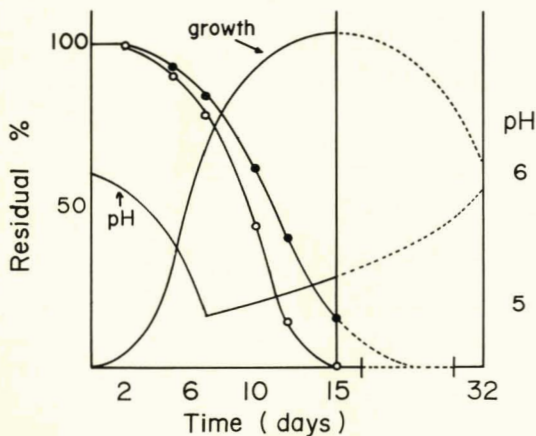


Fig. 3 Assimilation of glucose and nitrogen during growth

○ glucose ● nitrogen



Fig. 4 Fruit-bodies of *Pleurotus ostreatus* on a synthetic medium

Table 8 Effect of some carbon sources on fruiting

Carbon source	1 %		0.5 %	
	Fruit-body mg/50 ml	Final pH	Fruit-body mg/50 ml	Final pH
glucose	21.0	5.04	0	7.28
sucrose	106.7	5.08	50.7	5.08
maltose	48.0	5.00	41.8	6.28
mannose	55.8	5.30	24.2	6.70
fructose	118.3	5.10	52.7	6.18
starch	30.9	5.80	0	7.12
cellulose	94.2	5.20	41.4	5.70

Medium : Basal medium in which glucose is replaced with other carbohydrates indicated.

10 炭素源の子実体形成におよぼす影響

基礎培地の炭素源を各種の炭水化物 1%又は 0.5% に代えて 10日間 27°C で培養したた後、24日間 15±5°C に放置して発生する子実体量は Table 8 に示すように、子実体形成のための炭素源の初発濃度は 1%が適していた。

適した炭素源は蔗糖、果糖、セルロースであり、セルロースは 2%濃度でも子実体形成が旺盛であった、最終 pH が 7 以上に上昇した培地では子実体の形成は起きず、子実体形成は酸性域で行われることを認めた。

要 旨

Postreatus の栄養要求について基礎的な実験を行い、次の結果を得た。

炭素源として 5 炭糖以外の糖類およびセルロース、澱粉等の炭水化物をよく利用した。窒素源としては有機態窒素が最も適し、アンモニウム塩、硝酸塩は不適であった。菌糸生育に対する炭素源の最適濃度はグルコースでは 4%であるが、分子量に比例して高くなる傾向を示した。

アミノ酸を窒素源として用いた時、アスパラギンが最も適した。

サイアミンは必須生育因子であり 100 µg/L 附近が適当であったが、他のビタミンの効果は認められなかった。生育に対する最適初発 pH は 6.0~6.5 であった。

子実体形成に適した炭素源は、蔗糖、果糖、セルロースであった。子実体形成は菌体の十分な生育により養分を蓄積し更に培地の物理的・化学的環境が適した後に始まるものと推論された。

本研究を行うに当たって終始有益なご教示を賜った高橋善次郎先生に深く感謝の意を表す。

文 献

- 1) 橋本, 磯部, 高橋, 本誌 6, 1 (1964)
- 2) BLOCK S.S., G. TSAO and L. HAN, Mushroom Sci. 4, 309 (1959).