

ボタнтаケ菌群のセルラーゼについて (1)

土居 則子 倉田 宣威

On the cellulases of the genus *Hypocrea* and its allies (1)

By

Noriko DOI and Nobutake KURATA

The genus *Hypocrea* is known to be the perfect state of the form-genus *Trichoderma*, and the form-genus, represented by the form-species *Trichoderma viride*, is well known to possess high cellulolytic activities.

This paper deals with the cellulolytic activities of the twelve species of *Hypocrea* and its allies, including not only species of the form-genus *Trichoderma*, but also those of other form-genera, as far as they are originated from *Hypocrea* and its allies.

The cellulolytic activities are assayed by a method of measuring degrees of breakdowns of filter papers.

(1) The cellulolytic activity of the same strain varies in accordance with the incubation periods.

(2) Each species has the proper cellulolytic activity, although some strains of each species have more or less differentiated activities.

(3) Some species of the form-genera *Verticillium*, *Pachybasium* and a species which only produces aleuria possess high cellulolytic activities. All form-species of them are originated from the genus *Hypocrea*, and they can be considered to be phylogenetically close to *Trichoderma*. Therefore, it will be concluded that the high cellulolytic activities of these fungi can be a good taxonomic criterion for the classification of their perfect states as well as for the identification of species, but not for the artificial classification of their imperfect states.

緒 言

トリコデルマ菌群の生産するセルラーゼは、最近酵素化学的研究が進められると同時に種々の食品の加工や家畜飼料の処理などに利用され、実用化した製品も販売されるに至っている。しかしながら、一方ではトリコデルマ菌群の分類学的整理などは直接酵素化学や応用とは関係がないためか、ほとんどかえりみられず、一般に用いられている *Trichoderma viride* (Pers. ex Fr.) Fr. の名称も化学や応用の分野では多くの種の総括的な呼び名のままである。当然その中にはセルラーゼ生産力の強い種や、比較的弱い種なども含まれている。また、一般に応用の目的でスクリーニングしても分離対象となる種に限られてしまうもので、その点では分類学的研究に基いて多くの種についてスクリーニングを行えば、従来知られているトリコデルマ菌株よりも強力なセルラーゼ生産力をもつ種の検出の可能性も十分にありうることである。より強力なセルラーゼ生産菌が発見され

れば、外山¹⁾らの提唱するように、セルラーゼによる木材セルロースの糖化利用という“人類の夢”を経済ベースにのせることも不可能ではない。

以上のような観点から、最近の土居²⁾によるトリコデルマ菌群を含むボタнтаケ菌群の分類学的研究、および分類学的研究の目的で分離された菌株に基づいてボタнтаケ菌群の、セルラーゼ生産力の測定を試みた。また、それらの菌のセルラーゼ生産力の差を分類学的な観点からみて、その形質が分類に利用できるかどうか吟味した。

従来セルラーゼの研究結果について

セルラーゼを生産する生物としては、動物では環形動物、節足動物、軟体動物などの無脊椎動物のほとんどの分類群で認められ、中でもカタツムリ、アメリカザリガニ、ヤマトシロアリなどはよく知られている。しかしながら、動物によって生産されるセルラーゼの化学的研究は、ほとんど行なわれていないといわれる³⁾。高等植物ではオオムギ、麦芽、バレイショの芽などから知られている⁴⁾。最もよく研究されているのは、微生物によって生産されるセルラーゼであり、微生物の中では真菌類のセルラーゼが最も解明されている。細菌類では、*Pseudomonas fluorescens*, *Cytophaga* sp., *Plectridium* sp., *Cellvibrio gilvus*, *Xanthomonas* spp.などは強いセララーゼ活性を示すが、セルラーゼを細胞外にあまり分泌しないため、研究・応用の上で適当でないといわれている⁵⁾。真菌類でも *Chaetomium globosum* や *Myrothecium verrucaria*などは、細胞外にセルラーゼをあまり分泌しない⁵⁾ことから、最近の研究では敬遠されがちである。真菌類では *Rhizopus* 属などの藻菌類、*Aspergillus* 属、*Penicillium* 属、*Trichoderma* 属などの子囊菌類の他、木材腐朽菌の多くが含まれるヒダナシタケ目の大半の種、ツキヨタケなどマツタケ目の数種⁶⁾などの担子菌類、その他不完全菌の属の相当数についても報告されている⁷⁾。

Reese等は、セルロースの分解性に関して次のような分類を試みた。この分類方法は、生態学的にも興味深い考え方であると思われるので、外山⁷⁾に従って紹介する。

グループA；セルロース分解性、セルロースまたはその誘導体がなくても Cx を生産する。

(例) *Aspergillus luchuensis* QM873 のみ。

グループB；セルロース分解性、種々のセルロース性基質を与えると Cx を生産するが、非セルロースでは生産しない。

(例) *Myrothecium verrucaria*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium luteum* など。

グループC；セルロース分解性、種々のセルロース性基質から Cx を生産するが、alkali linter cellulose を用いるとそれが速かに分解されても Cx が生産されない。

(例) *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, *Fusarium roseum*, *Memmoniella echinata* など。

グループD；セルロース分解性であるがいかなるセルロース性基質を用いても培地中にほとんど、または全く Cx を蓄積しない。

(例) *Chaetomium globosum*, *Botrytis cinerea* など。

グループE；セルロース非分解性。

(例) *Aspergillus niger* (非分解性 strain), *Aspergillus flavus*, *Mucor hiemalis*, *Rhizopus arrhizus* など。

グループA, B, Cに属する真菌類のセルラーゼ測定法としては、北御門・外山⁸⁾による方法が

簡単で効果的である。

トリコデルマ属のセルラーゼの研究は、外山⁸⁾による研究以来定性、定量的な詳しい研究や、応用に関する研究も活発に行なわれている。定性分析については、小川・外山⁹⁾は *Trichoderma viride* のセルラーゼは cellobiase, CMC-ase および avicelase の3酵素に区分されることを報告した。また、丹羽・岡田・石川・西沢等¹⁰⁾は、*Trichoderma viride* の生産するセルラーゼ標品はいくつかの成分、あるいは isozyme より成っているので、その酵素作用の測定には種々の基質を用いて吟味しなくてはならないことを指摘した。また、彼らは、それらの成分間の相互作用によるセルロース分解の促進効果も重要であると報じた。

Trichoderma によるセルロースの分解産物として、外山¹¹⁾はセルロースの加水分解量に相当するグルコースができると報告し、後に単独の菌で糖にまで分解可能な菌としては *Trichoderma* に優るものはないことを報告した¹¹⁾。トリコデルマのセルラーゼ生産に適した培養法や、セルロースの糖化率を向上させる補助手段などについては、様々の方法が報告されている。

トリコデルマのセルラーゼの応用は様々の分野で試みられている。食品加工や農産加工の開発例には次のようなものがある。

- (1) 大豆蛋白質の分離
- (2) 甘藷澱粉の分離
- (3) 即席緑茶の製造
- (4) 醤油醪の可溶化
- (5) 寒天の分離、増収、海藻ゼリーの製造
- (6) 大豆種皮の除去
- (7) バガス飼料の製造
- (8) 蜜柑皮より酢の製造
- (9) 醸造発酵の促進
- (10) 酵母の細胞膜分解
- (11) 野菜および果実の処理、特に幼児食の製造および人参の加工
- (12) クロレラなど単細胞藻類の消化向上

その他、消化剤を製造したり、下水処理の能率向上にも用いられる。

実験の部

実験材料および方法

1. 供試菌 供試菌は第1表のとおりである。

第1表 供試菌の一覧表

供試菌番号	種名および産地(採集時期)	分生子型など
D- 6	<i>Peloronectriella sasae</i> Doi 岩手県 (1967)	one-septate <i>Fusarium</i> -type, ボタntaxe属とはかなりはなれた分類位置の菌
D- 44	<i>Podostroma cornu-damae</i> (Pat.) Boedijn 三重県 (1965)	irregular <i>Trichoderma</i> with green conidia
D- 47	<i>Hypocrea nigricans</i> (Imai) Doi 三重県 (1965)	<i>Trichoderma</i> with green conidia

D-49	<i>Hypocrea pallido-virens</i> Doi 三重県 (1965)	<i>Pachybasium</i> -type <i>Trichoderma</i> with green conidia
D-77	<i>Hypocrea pachybasioides</i> Doi 高知県 (1966)	<i>Pachybasium</i> -type <i>Trichoderma</i> with hyaline conidia
D-240	<i>Hypocrea peltata</i> (Jungh.) Sacc. 宮崎県 (1966)	conidia 形成せず, aleuria あり
D-243	<i>Hypocrea cornea</i> Pat. 宮崎県 (1966)	<i>Verticillium</i> -like <i>Trichoderma</i> with green conidia
D-288	<i>Hypocrea purpureosplendens</i> Doi 高知県 (1966)	<i>Verticillium</i> with hyaline conidia
D-342	<i>Hypocrea</i> sp. 岩手県 (1967)	<i>Trichoderma</i> with hyaline conidia
D-357	<i>Hypocrea muroiana</i> Hino et Katsumoto 東京都 (1967)	<i>Trichoderma</i> with green conidia
D-610	<i>Hypocrea submultiformis</i> Doi 日光 (1969)	primitive <i>Verticillium</i> with hyaline conidia
D-626	<i>Hypocrea nigricans</i> (Imai) Doi 和歌山県 (1969)	<i>Trichoderma</i> with green conidia
D-644	<i>Hypocrea nigricans</i> (Imai) Doi 北海道 (1969)	<i>Trichoderma</i> with green conidia
Ōshima	<i>Hypocrea rufa</i> (Pers. ex Fr.) Fr.	狭義の <i>Trichoderma viride</i> (Pers. ex Fr.) Fr. の本州型

2. 培養 供試菌の培養は黴培養基を用いて行なった。水洗黴 20 g と水 (pH 2.0 に調整) 24 ml を三角フラスコ (300 cc 容) に入れて間歇滅菌をした黴培養基に、供試菌を1白金耳接種し 25°C で培養した。

培養後、黴培地の菌株を培養して目的の菌株であることを再確認した上でアセトン処理を行ない風乾してデシケーター中に保存し実験試料とした。

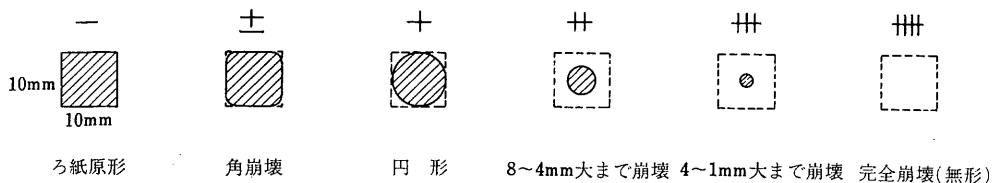
3. セルラーゼ活性の測定

セルラーゼ活性の測定は、北御門・外山¹²⁾の濾紙崩壊度による測定法に準じて行なった。すなわち、粗酵素液の調製は次のように行なった。アセトン処理をして得た黴麩 10 g に5倍量の水を加えて室温で1時間抽出し、絹布で濾過、さらに遠心分離 (3000回転, 10分) してその上澄液をそのまま粗酵素液とした。

酵素反応は、次のように行なった。L型試験管 (内径 17 mm, 垂直部高さ 80 mm, 水平部長さ 115 mm) に粗酵素液 3 ml と Michaelis の 0.1N 酢酸 -0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) 3 ml を入れ、コルク栓をして Monod 式恒温振盪機の 40°C 恒温槽中に約 10 分間置いたのち、基質 1 × 1 cm の濾紙片 (東洋濾紙 No. 2, 60 × 60 cm 使用) 2 枚を酵素反応液中に投入して、振

盪回数 70 rpm (上下振幅約 4 cm) で 150 分間反応させた。その間 15 分おきに濾紙の崩壊度を目測した。

セルラーゼ活性は、次のように表示した。



実験結果

(1) 同一菌株の培養日数によるセルラーゼ生産量の変化

黴に生育した菌の状態がどの程度のときが最もセルラーゼ量が多いかについては、実験報告の例が乏しい。外山⁸⁾の報告によれば、*Trichoderma koningi* においては培養日数が 13~18 日で最もセルラーゼ量が多い。第2表は、ボタntaxe属の5種の各々1菌株について培養期間を変えて測定した結果である。表において、短い日数の方が、黴に菌糸が全般に広がった日数であり、長い方は、さらに日数をおいたものである。第2表に示したとおり、黴に菌糸が全般に広がった後さらにある程度の日数をおいた場合の方がセルラーゼ量が多かった。この表では、標品間に pH 0.2 程度の差や、培養日数の長い方の培養温度が 25°C よりわずかながら高かったことなど、実験上の不備

第2表 同一菌株の培養日数によるセルラーゼ生産量の変化

供試菌番号	(註) 培養日数	抽液 出色	抽出液 pH	反応液 pH		作用時間 (分)										終末 pH	
						15	30	45	60	75	90	105	120	135	150		
D-44	10	暗褐色	6.5	4.4	各L型管での結果	-	-	-	±	±	+	+	+	+	+~++	4.5	
						-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	4.4	
						-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	4.4	
						-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	4.4	
						平均値	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	4.4
D-44	12	淡褐色	6.6	4.5	各L型管での結果	-	±	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	4.55	
						-	±	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	4.55	
						-	±	+	+	+	+	++	++	++	++	4.65	
						-	±	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	4.65	
						平均値	-	±	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	4.6
D-47	3	褐色	5.8	4.1	各L型管での結果	-	-	-	-	+	+	+	++	+++	+++	4.3	
						-	-	-	-	+	+	+	+~++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	4.35
						-	-	-	±	+	+	++	++~+++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	4.35
						-	-	-	±	+	+	++	++~+++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	4.35
						平均値	-	-	-	-	+	+	++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	4.3
D-47	7	褐色	5.9	4.6	各L型管での結果	+	++	+++~++++	++++							4.55	
						+	++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	+++				4.5	
						+	+	+++	+++							4.55	
						+	++	+++~++++	+++							4.5	
						平均値	+	++	+++~++++	+++							4.5

D-240	6	淡褐色	5.8	4.4	各L型	-	+	+	++	++~+++	+++~++++	++++				4.45
					管での	-	+	+	++~+++	+++~++++	++++				4.45	
					結果	-	±	+	++	++~+++	+++~++++	++++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	4.45
					平均值	-	+	+	++	+++	+++~++++	++++				4.5
					各L型	±	+	+++	++++							4.7
15	黄褐色	6.3	4.6	管での	±	+	+++	++++								4.75
				結果	±	+	+++	+++	+++						4.65	
				各L型	±	+	+++	++++							4.75	
				管での	±	+	+++	++++							4.7	
				結果	±	+	+++	++++							4.7	
平均值	±	+	+++	++++							4.7					
D-288	10	褐色	6.4	4.5	各L型	-	±	±	+	+	+	+	++	++~+++	++~+++	4.5
					管での	-	±	±	+	+	+	+	++	++	++	4.45
					結果	-	±	±	+	+	+	+	++	++	++~+++	4.5
					平均值	-	±	±	+	+	+	+	++	++	++~+++	4.5
					各L型	-	±	+	++	++	+++	+++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	4.6
18	褐色	6.3	4.7	管での	-	±	+	++	+++	+++	+++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	4.6	
				結果	-	±	+	++	+++	+++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	4.6		
				各L型	-	±	+	++	+++	+++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	4.6		
				管での	-	±	+	++	+++	+++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	4.65		
				結果	-	±	+	++	+++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	4.65		
平均值	-	±	+	++	+++	+++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	4.6					
Ōshima	3	褐色	6.0	4.4	各L型	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+	4.4
					管での	-	-	-	-	±	+	+	++	++	+++	4.4
					結果	-	-	-	-	±	±	±	±	±	±	4.4
					平均值	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+	4.4
					各L型	±	++	+++	+++	+++~++++	+++~++++	++++				4.6
7	褐色	6.6	4.6	管での	±	++	+++	+++	+++~++++	+++~++++	++++				4.6	
				結果	±	++	+++~++++	+++~++++	+++					4.6		
				各L型	±	++	+++~++++	+++~++++	+++					4.6		
				管での	±	++	+++~++++	+++						4.6		
				結果	±	++	+++~++++	+++						4.6		
平均值	±	++	+++	+++~++++	+++					4.6						
無接種 麹		黄褐色	6.3	4.7	各L型	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.7
					管での	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.7
					結果	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.7
					平均值	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.7
					各L型	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.7

(備考) 培養温度は 25°C, ただし各菌株内では期間の長い方がやや高くなった。

(註) 各菌株の上段は、麹培地全体に菌糸がひろがるのに要した日数, 下段は麹培地全体に菌糸がひろがったのちさらにおいた。

があるが、いずれも生育やセルラーゼ活性に対する影響は、日数による差に比して無視できる程度と考えてもよいと思われる。

(2) 同種内での株間のセルラーゼ生産力の差異

同種内での株間のセルラーゼ生産力の差については、従来、多くのトリコデルマの種が、*T. viride* あるいは *T. koningi*, *T. lignorum* の名で扱われてきているので、それらに基く報告に

第3表 同種内での株間のセルラーゼ生産力の差異

供試菌番号	培養日数	抽液色	抽出液 pH	反応液 pH		作用時間 (分)										終末 pH
						15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	
D-47	3	褐色	5.8	4.1	各L型管での結果	-	-	-	-	+	+	++	+++	+++	+++	4.3
						-	-	-	-	+	+	+~++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	4.35
						-	-	-	±	+	++	++~+++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	4.35
						-	-	-	-	+	+	++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	4.3
						-	-	-	-	+	+	++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	4.3
D-47	7	褐色	5.9	4.6	各L型管での結果	+	+++	+++~++++	+++							4.55
						+	++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	+++~++++	+++				4.5
						+	+	+++	+++							4.55
						+	++	+++~++++	+++							4.5
						+	++	+++~++++	+++							4.5
D-626	4	暗褐色	6.0	4.4	各L型管での結果	-	±	+	+	+	++~+++	+++	+++	+++~++++	+++~++++	4.5
						-	±	±	±	+	++	++	++~+++	+++~++++	+++~++++	4.45
						-	±	+	+	+~++	++	++~+++	++~+++	+++~++++	+++~++++	4.45
						-	±	+	+	+	++	++	++~+++	+++~++++	+++~++++	4.5
						-	±	+	+	+	++	++	++~+++	+++~++++	+++~++++	4.5
D-644	4	暗褐色	6.0	4.6	各L型管での結果	-	±	++	++~+++	+++~++++	+++~++++	+++			4.5	
						-	+	++	+++	+++	+++~++++	+++			4.4	
						-	+	++	+++	+++	+++				4.4	
						-	+	++	+++	+++	+++~++++	+++			4.4	
						-	+	++	+++	+++	+++~++++	+++			4.4	

(備考) 培養温度は 25°C, ただし D-47 の 7 日培養はやや高くなった。

については、当然ながら十分に信頼性があるとは考えられない。実験材料としてとりあげられたトリコデルマの記載をみると、それらがどの種であるかは大体見当がつくが、それらの検討は本文では省略する。

第3表は、カラスノボタнтаケ *Hypocrea nigricans* (Imai) Doi の 3 株についてのセルラーゼ生産量の差異について比較した結果である。3 株はそれぞれ採集地、採集時期が異なっており、いずれもボタнтаケの子嚢をマイクロマニプレーターによって分離培養し、麦芽寒天培地で継代しているものである。人工培地で長年継代したものと、野外から分離したばかりのものとは、セルラーゼ生産力にも差が生じる可能性も考えられる。このことについては今後詳しく実験を行なう予定である。第3表でみる限りでは、D-47 株のそれぞれ 3 日、7 日の培養日数によるセルラーゼ量の差の間に、他 2 株の 4 日間培養によるセルラーゼ量がはさまっており、特に有意の株間の差はみられなかった。

(3) 同一培養条件下での種間のセルラーゼ生産力の差異

ボタнтаケ属および近縁属の種間では、数に菌糸が十分に広がる日数、あるいは、それ以上増殖する様子がなくなる程度まで生育するのに要する培養日数には一般に明確な差がある。ときに同種間の株間でも差がみられるが、全般的には、種内では、ある定数を中心に正規分布的にまとまっていると考えてよい。第4表は、菌糸が数に全般に広がった後、さらにある日数をおいたときのセルラーゼ量の差異についての測定結果である。一般に *H. nigricans* のように生育の速かな種はセルラーゼ生産量も多いが、一方、*H. peltata* のように生育のやや遅い種でも強いセルラーゼ生産力を

もつ種もあり、特に相関々係は認められない。第4表に示したとおり、種によってセルラーゼ生産力に差が認められた。

また、*Hypocrea* 属およびその近縁属では強いセルラーゼ生産力をもった菌が多いことがわかった。また、*Hypocrea* 属に由来する不完全菌には、白色分生子をもつ *Verticillium* 属、*Pachybasium* 属、*Trichoderma* 属などの他、分生子型のみつからない菌もあるが、それらの中にも緑色のトリコデルマと同様あるいはより強いセルラーゼ生産力を示す種が認められた。

第4表 同一培養条件下での種間のセルラーゼ生産力の差異

供試菌番号	(註)培養日数	抽出液色	抽出液pH	反応液pH	作用時間(分)										終末pH	
					15	30	45	60	75	90	105	120	135	150		
D-240	15	黄褐色	6.3	4.6	各L型管での結果	±	+	≡	≡≡							4.7
						±	+	≡	≡≡							4.75
						±	+	≡	≡≡	≡≡						4.65
						±	+	≡	≡≡							4.75
						±	+	≡	≡≡							4.7
					±	+	≡	≡≡							4.7	
					平均值	±	+	≡	≡≡							4.7
D-47	7	褐色	5.9	4.6	各L型管での結果	+	≡	≡~≡≡	≡≡							4.55
						+	≡	≡~≡≡	≡~≡≡	≡~≡≡	≡~≡≡	≡				4.5
						+	+	≡	≡≡							4.55
						+	≡	≡~≡≡	≡≡							4.5
					+	≡	≡~≡≡	≡≡							4.5	
					平均值	+	≡	≡~≡≡	≡≡						4.5	
Ōshima	7	褐色	6.6	4.6	各L型管での結果	±	≡	≡	≡	≡~≡≡	≡~≡≡	≡≡				4.6
						±	≡	≡	≡	≡~≡≡	≡≡					4.6
						±	≡	≡~≡≡	≡~≡≡	≡≡						4.6
						±	≡	≡~≡≡	≡≡							4.6
					±	≡	≡~≡≡	≡≡							4.6	
					平均值	±	≡	≡	≡~≡≡	≡≡					4.6	
D-357	5	褐色	6.5	4.4	各L型管での結果	-	+	+	≡~≡≡	≡~≡≡	≡~≡≡	≡≡				4.4
						-	+	+	≡	≡	≡≡					4.4
						-	+	±~≡	≡	≡~≡≡	≡≡					4.4
					-	+	±	≡	≡	≡≡					4.4	
					平均值	-	+	±	≡	≡	≡≡				4.4	
D-288	18	褐色	6.3	4.7	各L型管での結果	-	±	+	≡	≡	≡	≡	≡~≡≡	≡~≡≡	≡~≡≡	4.6
						-	±	+	≡	≡	≡	≡	≡~≡≡	≡~≡≡	≡~≡≡	4.6
						-	±	+	+	+	≡	≡	≡~≡≡	≡~≡≡	≡	4.6
						-	±	+	+	≡	≡	≡~≡≡	≡			4.65
					-	±	+	+	≡	≡	≡	≡~≡≡	≡		4.6	
					平均值	-	±	+	+	≡	≡	≡~≡≡	≡~≡≡	≡	4.6	
D-44	12	淡褐色	6.6	4.5	各L型管での結果	-	±	+	+	≡	≡	≡	≡	≡	≡	4.55
						-	±	+	+	≡	≡	≡	≡	≡	≡	4.55
						-	±	+	+	+	+	≡	≡	≡	≡	4.65
						-	±	+	+	≡	≡	≡	≡	≡	≡	4.65
					-	±	+	+	≡	≡	≡	≡	≡	≡	4.6	
					平均值	-	±	+	+	≡	≡	≡	≡	≡	4.6	

D-610	10	褐色	6.3	4.3	各L型	-	-	±	±	+	+	+	+	++~###	++~###	4.35	
					管での	-	-	±	±	+	+	+	+	++	++~###	##	4.4
					結果	-	-	-	-	±	+	++	++~###	##	##~###		4.4
					平均値	-	-	±	±	+	+	+	++	++~###	##		4.4
D-234	7	暗褐色	6.3	4.5	各L型	-	±	±	±	+	+	++	++	++~###	++~###	4.5	
					管での	-	±	±	±	+	+	+	++	++~###	##		4.5
					結果	-	±	±	±	+	+	++	++	++~###	++~###		4.45
					平均値	-	±	±	±	+	+	++	++	++~###	++~###		4.5
D-77	21	暗褐色	6.6	4.8	各L型	-	±	±	±	+	+	+	+	++	++	4.75	
					管での	-	±	±	±	+	+	+	+	++	++		4.8
					結果	-	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	4.8
					平均値	-	±	±	±	+	+	+	+	++	++		4.8
D-6	15	褐色	6.1	4.6	各L型	-	±	±	+	+	+	++	++	++	++	4.5	
					管での	-	±	±	±	+	+	+	+	+	++~##		4.5
					結果	-	±	±	±	+	+	+	+	+	++~##		4.5
					平均値	-	±	±	±	+	+	+	+	+	++~##		4.5
D-342	18	黄褐色	6.8	4.5	各L型	-	-	±	±	+	+	+	+	+	++	4.5	
					管での	-	-	±	±	+	+	+	+	+	+		4.5
					結果	-	-	±	±	+	+	+	+	+	+	++~##	4.5
					平均値	-	-	±	±	+	+	+	+	+	++~##		4.5
D-49	10	暗褐色	6.1	4.3	各L型	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+	4.4	
					管での	-	-	-	-	±	+	+	+	+	++~##		4.5
					結果	-	-	±	±	±	+	+	+	+	++		4.4
					平均値	-	-	-	-	±	+	+	+	+	++~##		4.4
無接種 麩		黄褐色	6.3	4.7	各L型	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.7	
					管での	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		4.7
					結果	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		4.7
					平均値	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		4.7

(備考) 培養温度は 25°C よりやや高かった。

(註) 麩培地全体に十分菌糸がひろがった後もしばらく培養を続けた。

考 察

(1) Monod 式恒温振盪機の調節について：濾紙は機械力を加えることによって崩壊する一方、相当強い機械力を加えてもセルラーゼの作用がないと、ほとんど崩壊しない。従って振盪数、振幅および酵素液の濃度は、測定の目的に応じて適当な時間に、各試料間の差が顕著に表われるように調節すれば十分である。一般に 45 分—1 時間半で濾紙が崩壊する程度に調節すると、楽で比較的正確な実験ができると考えられる。誤差を生じる最大の原因は、濾紙がL型管のガラス面に密着して動かなくなった場合で、崩壊は相当遅れる。

(2) 第2表の培養期間はそれぞれ2期づつしか実験していないが、さらにいろいろな培養期間による測定も必要であり、今後の問題である。

(3) 第3表における同種内異株間D-626とD-644間のセルラーゼ生産力の差は、異株間の生育速度の差と関係があるものと思われる。生育速度の差は、最適温度、その他の生理特性と関連している場合も多く、そのような変異株は、*Trichoderma* においても往々観察される。この点についてもさらに詳しい実験を必要とする。

(4) 第4表における生育が遅くてもセルラーゼ生産力の強い菌(D-240)は、25°Cでは生育が遅いということであり、応用に際しては、より生育のよい培養条件を見出すことが可能であると考えられる。

(5) ボタノタケ属に由来する菌であれば、透明(白色)の分生子をもつ *Verticillium* 属の種や、分生子を形成せず *aleuria* のみを形成する種でもセルラーゼ生産力が強いということは、セルラーゼ生産力が完全時代に基く分類の体系と相関しているということであり、一方、不完全菌型に基く人為分類の体系では、同じ分類群にセルラーゼ生産力の強い菌や、全く生産しない菌が規則性のない形で混在することになる。従って、セルラーゼ生産力は、ボタノタケ菌群の分類(Classification)の基準形質となりうると考えられる。また、第4表で扱った種や株に関するかぎりでは、それぞれの種が、少なくとも野生型では、一定範囲のセルラーゼ生産力をもつ可能性が十分に考えられるので、セルラーゼ生産力の差異は、種の区別(identification of species)の上でも有意義な形質と考えることができるが、さらに、今回扱わなかった多くの種や株のセルラーゼ生産力の測定を行なった上で結論すべきである。

要 約

ボタノタケ菌群の12種14菌株のセルラーゼ生産力を測定して、次のような結果を得た。

- (1) 同一菌株のセルラーゼ生産力には、培養日数により著しい差がみられた。
- (2) 同種内異株間のセルラーゼ生産力は、*H. nigricans* の場合には大差なかった。
- (3) ボタノタケ菌群は一般に強いセルラーゼ生産力をもつことがわかった。

本研究にあたって、実験装置の利用の便宜をおはからい下さいました国立科学博物館植物研究部部長小林義雄博士、植物第2室長黒川道博士、実験装置を使用して下さいました日本女子大学の青島郁子先生、セルラーゼ製品を提供下さいました明治製菓株式会社の方々に、厚く感謝いたします。また、実験に協力された国立科学博物館植物部職員齊藤ひろみさんに感謝いたします。本論文の校閲を賜りました本学教授神野節子博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 外山：化学と生物，7 (10)，630—635 (1969)
- 2) Doi：Bull. Nat. Sci. Mus. Tokyo. 12 (3)，693—724 (1969)
- 3) 横江：醸工，44 (11)，858—867 (1966)
- 4) 赤堀：酵素研究法，2 (1966)
- 5) 外山：食品工業，5 (10)，11—16 (1962)
- 6) 川合：日本菌学会第13回大会講演要旨集，48—49 (1969)
- 7) 外山：醸工，35 (5)，196—204 (1957)
- 8) 外山：糸状菌セルラーゼの性質とその応用，110 pp. (1961)
- 9) 小川・外山：醸工，46 (5)，367—374 (1968)
- 10) 丹羽・岡田・石川・西沢：醸工，42 (3)，124—130 (1964)
- 11) 外山：醸工，31，315—320 (1953)
- 12) 北御門・外山：醸工，40 (2)，85—88 (1962)