

ヒイロタケの産生する色素 (第一報)

色素産生条件, 物理化学的性質と抗菌性

河野又四*, 寺下隆夫*, 奥本光岡庸**

Studies on the HIIROTAKE (*Trametes sanguinea*) pigments (I)

Cultural conditions of the pigments production, physical and chemical properties, and antibacterial activities

By

Matashi Kōno*, Takao TERASHITA*, and Mitsuyo OKUMOTO**

In generally HIIROTAKE (*Trametes sanguinea*) is known as a saprophyte of a wood. Polyporin that was reported by Bose (1946) were thought different components to over pigments on the properties. We examined on the cultural conditions (inorganic salts, temperatures, light and water) physical and chemical properties, antibacterial activities of the pigments.

As results of the examination, we may conclude that obtain a best amounts of the pigments a addition of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and KCl, $27^\circ \sim 37^\circ C$ in the dark, and solubility of the pigments was a maximum on pH 9.6 at $20^\circ C$ in ethanol and also the pigments was separated the four components by Thin Layer chromatography.

Stability to the ultraviolet ray irradiation found the fading rate 35% for 24 hours, and Tartrazine was 10% in the same conditions.

Concerning with the antibacterial activities, mycelium of HIIROTAKE took precedence with bacteria, and occasionally showed obvious bacteriostatic activities on the serial dilution method, but careful consideration should be given to these problem.

I 緒 言

ヒイロタケ (*Trametes sanguinea*) は 1762 年, Linne によって初めて, *Boletus sanguinea* L. と命名発表されたもので, 和名は 1908 年に安田がヒイロタケと命名¹⁾した。本菌は担子菌門—帽菌目—多孔菌科—マスタケ亜科²⁾に属し, 学名の *sanguinea* は赤血色を意味する。一般に広葉樹腐朽菌として知られ, 全世界に広く分布する。我国に於ては北海道より九州, 沖縄におよび, 各種の針・広葉樹に発生する。

木材腐朽菌としてのヒイロタケに関する研究は多く, 我国では永友¹⁾を初め平山³⁾, 伊藤⁴⁾等の

* 食品栄養学科食品衛生学研究室 Institute of Food and Nutritional Science, Lab. of Food Hygenic.

** フルタ製菓株式会社研究室 Furuta seika Co., Ltd. Research Section

報告があるが、外国では古くは、Bose, S, R⁵⁾を始め、Rea⁶⁾その他の研究がある。Bose⁵⁾によれば、polyporinなる物質が、ヒイロタケの培養液から得られ、それが大腸菌やブドウ球菌に対し、抗菌性があり、酸性条件で溶解性が特にすぐれており、種々の有機溶媒で抽出できること、およびその抗菌性を比較した報告がある。しかし、*T. sanguinea*の産生する色素の細菌に対する抗菌性についての報告はほとんどないと思われる。そこで筆者らは、たまたま美しい色を呈する本菌の培養菌そうから色素を抽出し、粗結晶として、その抗菌性を観察したところ興味ある結果を得た。そこで本菌色素の産生条件、物理化学的性質、および抗菌性などについてさらに検討を試み、2.3の知見を得たので報告する。稿を草するにあたり供試菌の分譲をうけた帝国女子大学永友勇教授に謝意を表す。なお本研究の一部は昭和45年度本学研究助成金により実施した。

II 実 験 方 法

ヒイロタケの菌糸発育および色素生成におよぼす各種培地の影響

ヒイロタケ菌糸発育に関する培地、培養温度との関係については種々報告¹⁾されているが、色素生成に関しての研究は殆んどないようである。本実験は主に色素生成に適切な培地および培養温度を検討した。

1) 麦芽寒天培地、2%グルコース加用ジャガイモ煎汁寒天培地の影響

日水製薬(株)製の麦芽寒天培地 45gを蒸留水で1ℓとしたものと常用のジャガイモ煎汁にグルコース2%と粉末寒天1.5%を加えたものに、それぞれ、本菌菌そうの小片(麦芽斜面寒天培地に37°C、3日間培養した直径3.5mm程度のもの)1個を移植、27°C、30°C、37~28°C(定温器内)の3区分に分け、各区共に5枚のペトリ皿を用いて、11日間培養中の菌糸発育と色素生成の状態を観察した。

2) Czapek—Dox およびその変法培地の影響

Table 1に示す3種の培地¹⁾(Czapek-Dox solution培地、Czapek-Dox solution+N源培地、Czapek-Dox変法培地)を用い、予じめ乾熱滅菌した200mlの振盪培養フラスコに、50ml注入し、高圧滅菌後、供試培養液とする。この3種の培地共、それぞれ5個の振盪フラスコを用い、28°C、12日間培養の直径4~5mmの菌そう片、2~3個を移植する。ついで室内(28±1°C)の明所、暗所に、10日間静置培養し、菌糸の発育および色素の生成状態を観察した。

3) 混合培地の影響

Table 2に示すような木屑を主材とした2種の培地を調製しそれぞれ充分混和後、3枚の大型ペトリ皿(直径150mm)に80gを入れ、高圧滅菌後、30°C、48時間培養の直径4~5mmの菌そうを2~3個培地表面、培地内部へ移植する。ついで室内明所28~31°C、室内暗所27~30°Cに静置、約2カ月近く培養する。また2枚の大型ペトリ皿にMgSO₄·7H₂OまたはKClを培地に

入れ、同様に 37°C の定温器に約 2 カ月近く培養し、色素生成状態、菌糸発育状態を観察した。

ヒイロタケ色素の各種溶媒における溶解性

本実験を行うにあたって、まず試料となる粗色素（粗結晶）を得る必要がある。本実験では効率の最もよかった混合培地上（B）に生成された色素のそうを出来るだけ培地と分けてとり、砕粉後、色素総重量の約 10 倍量以上のエチルアルコール（99.5 vol %）に浸漬、ホモゲナイズし、粘質状となった所で遠心分離（12,000 rpm/min）し、沈澱させた色素が完全にエチルアルコール液に移行するまで、操作をくりかえす。集液を濾過後、濾液を減圧蒸溜装置⁷⁾にかけ、65°~67°C で蒸溜する。大部分蒸溜されてくると、フラスコ内の液は赤橙色を呈する。残液が 5~10 ml で蒸溜を止め、これを予じめ恒量を求めた秤量ビンに少量づつ投入し、湯浴（70°~80°C）上にて、エチルアルコールを蒸発、濃縮し、デシケーター内で 24 時間放置、乾燥後再び秤量、その差から粗色素重量を算出する。得られた粗色素は針状結晶状で赤かつ色を呈している。

以上の操作により得た粗色素を用いて、種々の溶媒に対する溶解性を調査した。

溶媒は、Table 3 に示す様に蒸溜水、エチルアルコール（99.5 vol %）、メチルアルコール（95 vol %）、n-ブチルアルコール（95 vol %）、イソアミルアルコール（90 vol %）、ベンゼン（95 vol %）、二硫化炭素（97 vol %）、クロロホルム（95 vol %）、アセトン（95 vol %）、エチルエーテル（95 vol %）、石油エーテル（90 vol %）、の 11 種について調査し、20°C、湯浴上における 70°C の高温時、pH 変化などの条件について溶解性を比較した。

なを粗色素量 5~12 mg を三角フラスコまたは秤量ビンを用いて試験した。

ヒイロタケ色素の物理化学的特性

1) 吸収スペクトルおよび薄層クロマトグラフィー実験

本色素と既知の生体色素の吸光度とを比較し、検討した。実験にあたっては 99.5 vol % のエチルアルコール溶液で 10^{-3} 、 10^{-5} 濃度の本色素液を調製し、分光々度計（Uv-Vis Spectrophotometer Hitachi Perkin-Elmer）で 200~600 m μ まで測定を行う。また粗結晶を、99.5 vol % のエチルアルコールで 10^{-3} 濃度に調製したものをサンプルとし、ベンゼン：アセトン（7：3）の展開液⁸⁾にて、シリカゲル G 薄層クロマトグラフィーで展開、分離を試みた。分離した 4 つのスポットをそれぞれ、シリカゲル薄層ごとにかき取り、再びエチルアルコールで抽出、それぞれの R_f 値を取る 4 スポット、a、b、c、d、について、紫外吸収スペクトルを測定した。

2) 熱および光に対する安定性

粗色素より、濃度 2×10^{-3} 倍の溶液を調製する。対照として同濃度の食用タール色素 3 種類（ターラジン、エオシン、サンセットエロー FCF）、以上 4 種類の色素液を直径 1.8 cm の試験管に 10 ml づつ、各区 6 本をそれぞれ 4 条件〔25°C 暗所、70°C 暗所、人工光線下（ナショナル白色蛍光灯 10 W、距離 40 cm）、紫外線下（東芝 FL-20BLB 紫外線蛍光灯、距離 40 cm）〕に設置し、

4時間おきに24時間、430m μ の比色計で、吸光度を測定し、スタンダードとの比較から、退色率を求めた。

ヒイロタケ色素の抗菌性実験

1) 液体系列希釈法⁹⁾

ヒイロタケ色素を溶解性試験の場合と同様な方法により、エチルアルコールで抽出、粗結晶を得る。次に70%エチルアルコールで1/100の色素溶液を調製する。試験管の中に滅菌ブイヨン8mlづつ分注、次にこの色素溶液を0.5mlづつ無菌的に入れ、1/1000, 1/5000, 1/25000, 1/125000に希釈する。これに、37°C, 48時間培養した供試菌 (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas vulgaris*, *Escherichia coli*, *Vibrio sp.*) を、1白金耳 ($10^5 \sim 10^6$ 個) ずつ接種し37°Cの恒温器内に静置し、24時間毎に120時間観察を行った。比較の為にソルビン酸カリウムを1/25, 1/50, 1/250, 1/1250, 1/6250の各濃度で抗菌性を観察した。またエチルアルコールのみの制菌作用および木屑のエチルアルコール抽出液について試験した。なお培地のみものを標準区にとった。

抗菌性の判定は抗菌性最大のものを一とし、發育に従って十の数を増し、發育最大のものを卅とした。

2) 十字線法およびその変形の一文字線法

予じめ乾熱滅菌したペトリ皿に2%グルコース加用ジャガイモ煎汁寒天平板培地 (pH 6.0) 上にヒイロタケ菌そうの薄片 (直径4mm) 4個を2.5cm間隔で4ヶ所に接種し、菌そう直径10~15mm (37°C, 24時間) まで生長したものに、予じめ培養した *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseud. fluorescens*, 各1白金耳を滅菌生理食塩水10mlで懸濁液とし、トーマ氏血球計算器¹⁰⁾で菌数を測定 (10ml中: *B. sub* $10^5 \times 1.4$, *B. mes* $10^5 \times 1.6$, *E. coli* $10^5 \times 3.6$, *St. au* $10^5 \times 7.8$, *Ps. flu* $10^5 \times 6.4$) 後、1白金線分を菌系の周囲、十字形に塗抹した。各区共にペトリ皿3枚を細菌の發育温度に保って、48~72時間培養し、その状態を観察した。一方、2%グルコース加用ジャガイモ煎汁寒天平板培地 (pH 5.8) 上、中央部一直線上にヒイロタケ菌糸を塗抹し、37°C, 24時間培養し菌糸が88.5 \times 13mmになった所へ、直角に先述の菌数既知の細菌を1白金線分、それぞれ塗抹する。各区共ペトリ皿3枚づつ細菌の至適温度に保って、72時間対峙培養しその状態を観察した。

III 実験結果

ヒイロタケ菌糸発育および色素生成におよぼす各種培地の影響についての結果は、それぞれ Fig. 1, 2, 3, 4, Table 1, 2 に示した。Fig. 1 に示した麦芽寒天培地上と、Fig. 2 の2%グルコース加用ジャガイモ煎汁寒天培地上とにおける、菌そうおよび色素生成については、30°C 定温器内において、7日目に至ってペトリ皿一面の菌そうが、ひだ状、リン紋状を呈し、中央部より放射状に淡黄色乃至淡橙色となる。20日目には、培地が乾燥し、ひび割れを生じたが、色素生成は一定の傾向を示し、橙色～淡朱色となって、菌そう、色素の菌そうも厚くなっていた。一方、2%グル

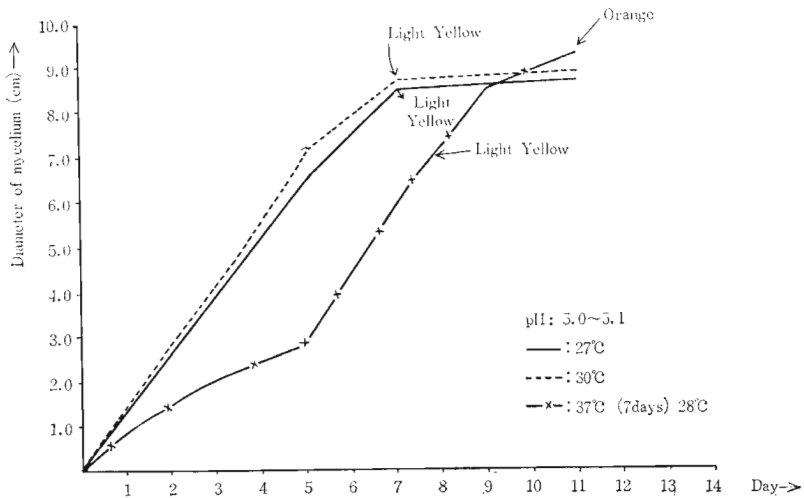


Fig. 1. Mycelial growth of *T. sanguinea* and the pigments production on the malt agar medium

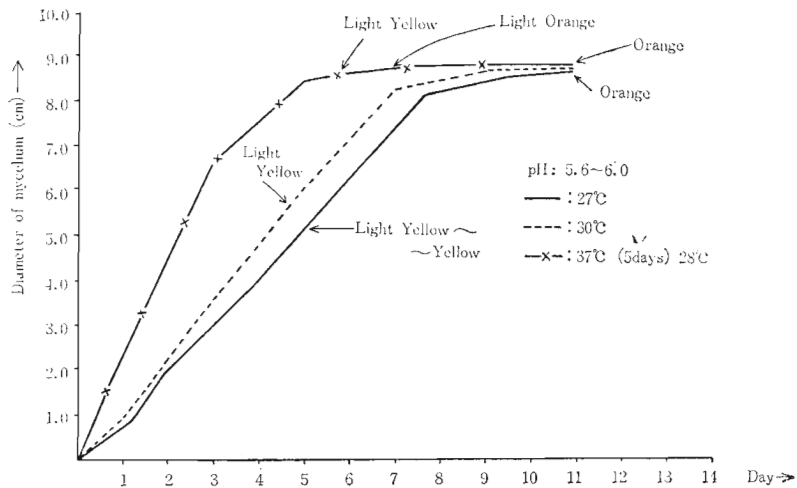


Fig. 2. Mycelial growth of *T. sanguinea* and the pigments production on the potato agar medium added 2% glucose

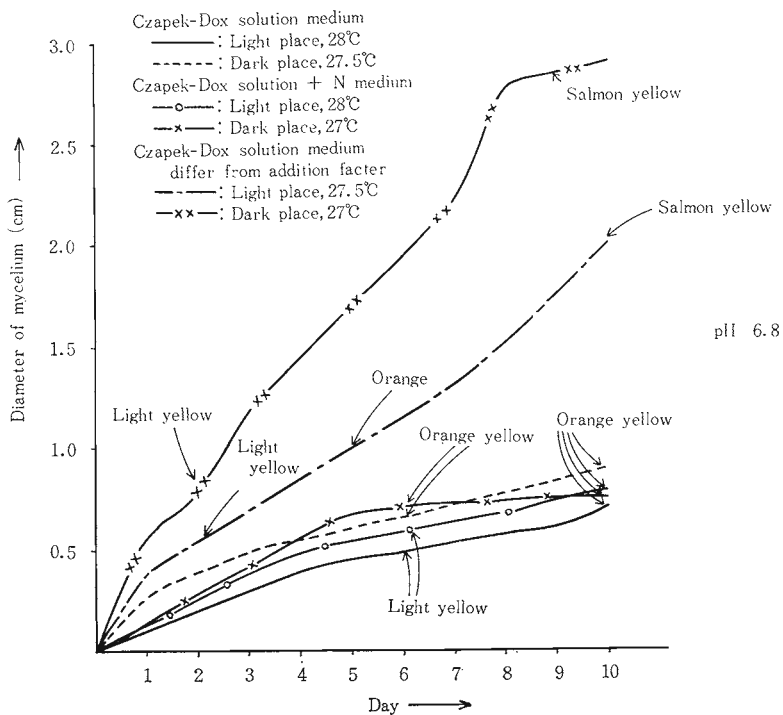


Fig. 3. Mycelial growth of *T. sanguinea* and pigments production on the liquid medium

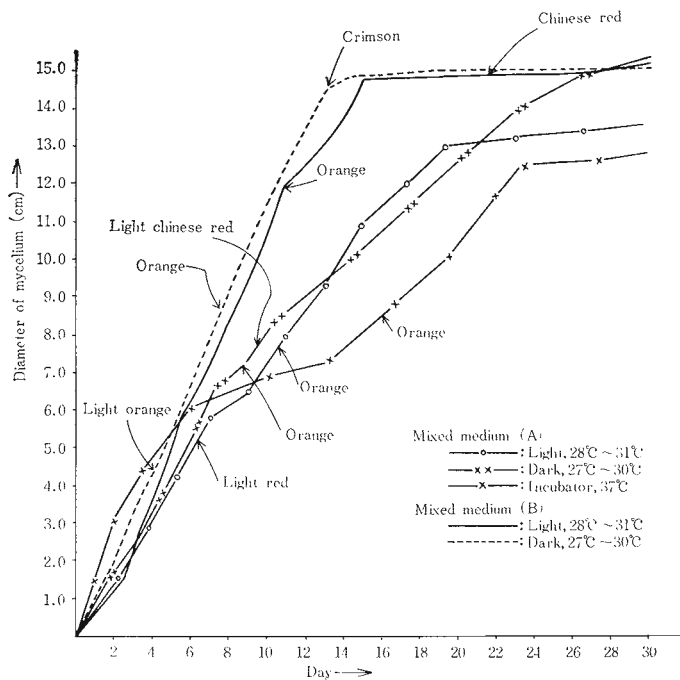


Fig. 4. Mycelial growth of *T. sanguinea* and pigments production on the mixed medium

Table 1. comppsition of the liquid medium

Czapek-Dox solution medium		Czapek-Dox solution +N medium		Czapek-Dox solution medium differ from addition factor	
Sucrose	20~30 g	Sucrose	20~30 g	Glucose	40 g
NaNO ₃	3 g	Aspartic-acid	2 g	Peptone	3.7 g
K ₂ HPO ₄	1 g	Glutamic-acid	2 g	KCl	1 g
KCl	0.5 g	K ₂ HPO ₄	1 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g	KCl	0.5 g	K ₂ HPO ₄	0.5 g
FeSO ₄	0.01 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g	FeSO ₄	0.01 g
Water	1000 ml	FeSO ₄	0.01 g	Water	1000 ml
		Water	1000 ml		

コース加用ジャガイモ煎汁寒天培地では、30°C、3日後で約10倍、5日目以降には本菌菌そう小片中央12mm四方より放射状にまた、周囲から中央部へと色素（色調は淡黄色～薄橙色）を生成し初め、8日目には、色調も橙色へと移行して、最終の11日目には橙色から淡朱色を呈した。この様に

Table 2 Compositions of the mixed medium

	Mixed medium (A)		Mixed medium (B)	
Composition	Chips	400 g	Chips	400 g
	Rice bran	40 g	Rice bran	40 g
	Straw	10 g	Straw	10 g
	Water	400 ml	Water	400 ml
			MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
			KCl	0.5 g

色調は日毎にいちじるしく変化したが、色素のそうは、麦芽寒天培地の場合より薄く、菌そうも同様の結果を示した。

Fig. 3 と Table 1 に示した Czapek-Dox solution と Czapek-Dox solution+N 源添加培地の影響については、培養10日目に至っても、明、暗所共に色素生成がわずかで、菌糸発育もほとんど無い状態であった。しかし培養液は淡黄色乃至橙色を呈し、にごっていた。実験後の培養液の pH は両培地、明所、暗所共にやや酸性側に傾いていた。

Czapek-Dox 変法培地では、上述実験の2種の培地とは多少異なり、培養10日後では、明所で直径20mm、暗所で30mm近くの菌そうを生じた。色素生成も菌糸発育につれて、薄いけれどもほぼ菌そう上一面に認められ、色調も橙色乃至淡赤橙色を呈した。培養液は明、暗所共に、にごりを生じ、橙黄色乃至赤橙色を呈した。実験後の培養液の pH は明、暗所いずれも同様に、実験前より、やや酸性側に傾いていた。

Table 2, Fig. 4 に示した混合培地2種では、MgSO₄·7H₂O または KCl 添加培地 (B) が、他の培地よりも菌糸発育および色素の生成は良好であった。

ヒイロタケ色素の各種有機溶媒に対する溶解性については、Fig. 5, 6, Table 3 に示した。20°C で50%以上溶解したものは、全く無く、70°C で、エチルアルコール、メチルアルコール、n-ブチルアルコール、イソアミルアルコール等のアルコール類とベンゼンが、50%以上の溶解性を示した。石油エーテルでは全く溶解しなかった。Fig. 5 には、ヒイロタケ色素のエチルアルコー

ルに対する溶解性を示したが、pH 9.6 の時が最大で、水に対する溶解性は、Fig. 6 で示す通り、70°C, 20°C 共、pH 9.2 が最も溶解しやすい。

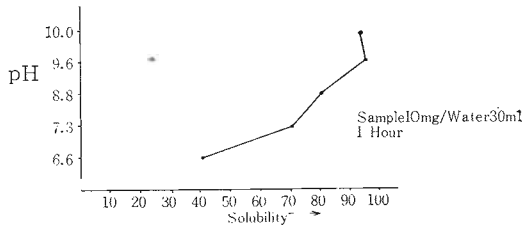


Fig. 5. Solubility of *T. sanguinea* pigments against the ethyl-alcohol (20°C)

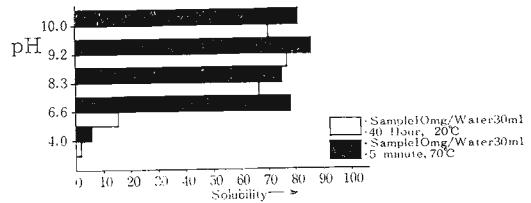


Fig. 6. Solubility of *T. sanguinea* pigments against the water

Table 3. Solubility of *T. sanguinea* pigments

Solvent	Temperature (°C)	Solubility	Solvent	Temperature (°C)	Solubility
Ethyl alcohol	20	+	Acetone	20	+
	70	++		70	+
Methyl alcohol	20	+	Chloroform	20	+
	70	++		70	+
Distilled water	20	+	iso-Amyl alcohol	20	-
	70	++		70	++
Petroleum ether	20	-	Benzene	20	-
	70	-		70	++
n-Butyl alcohol	20	-	Carbon disulfide	20	-
	70	++		70	+
Ethyl ether	20	+	+ : below 50%, ++ : above 50%, - : 0%, Sample : 10 mg/Water 30 ml, 1 hr.		
	70	+			

物理化学的特性については、Fig. 7~13 に示した。ヒイロタケ色素の可視紫外吸収スペクトルを測定した所、314 mμ と 426 mμ 付近に大きな 2 つのピークと、535 mμ 付近に小さなピークが認められた。

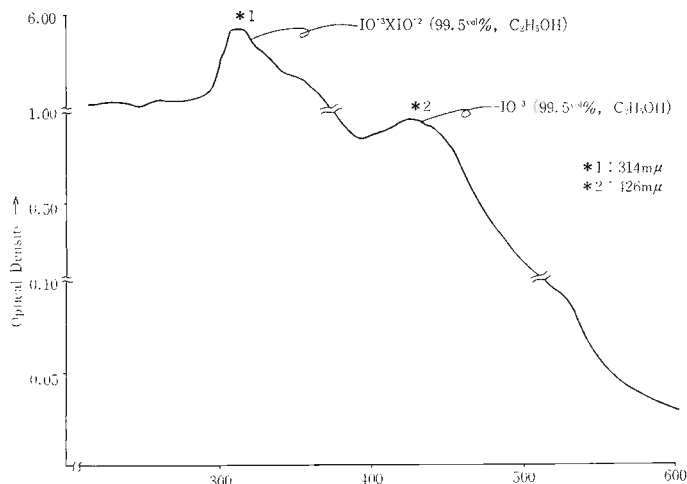


Fig. 7. Absorption spectra of *T. sanguinea* pigments

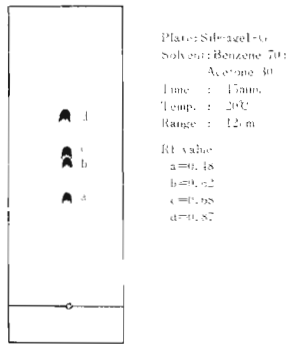


Fig. 8. Thin Layer chromatography of *T. sanguinea* pigments

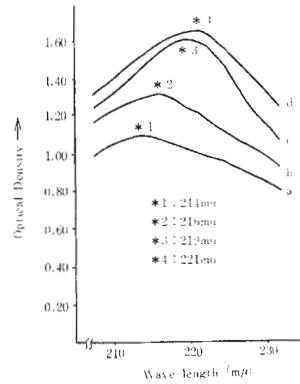


Fig. 9. Absorption spectra of four components by Thin Layer chromatography of *T. sanguinea* pigments

ヒイロタケ抽出色素液の薄層クロマトグラフィー実験の結果は Fig. 8 に示したが、4個のスポットに分離した。これらの Rf 値は、0.48, 0.62, 0.68, 0.87 であるが、グラフでの c スポットののみが、薄い赤色を呈し、他の a, b, d は黄色を示した。またこの各スポットの紫外外部吸収スペクトルをとった所、Fig. 9 の結果を得た。

Fig. 10 ~ 13 でのヒイロタケ色素の安定性については特に紫外線照射の場合大きな退色率を示し、24 時間で約 35% となった。

抗菌性試験を液体系列希釈法により行った結果は、Table 4 に示したが、4% エチルアルコール

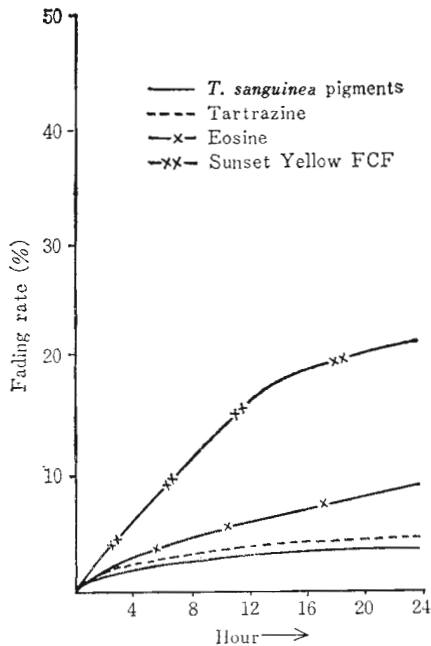


Fig. 10. Fading rate of the pigments in the dark place at 25°C

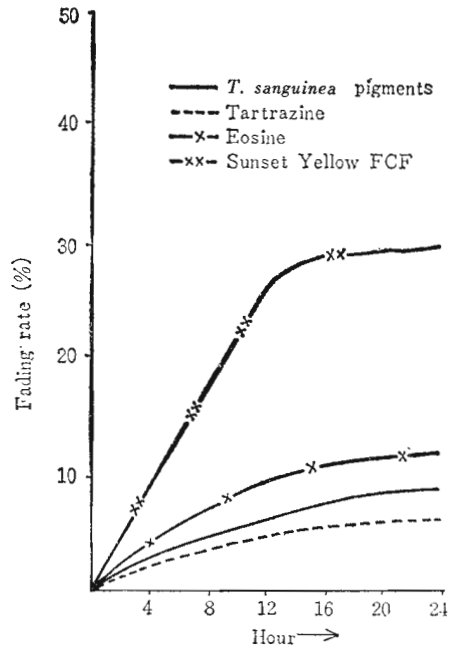


Fig. 11. Fading rate of the pigments in the dark place at 75°C

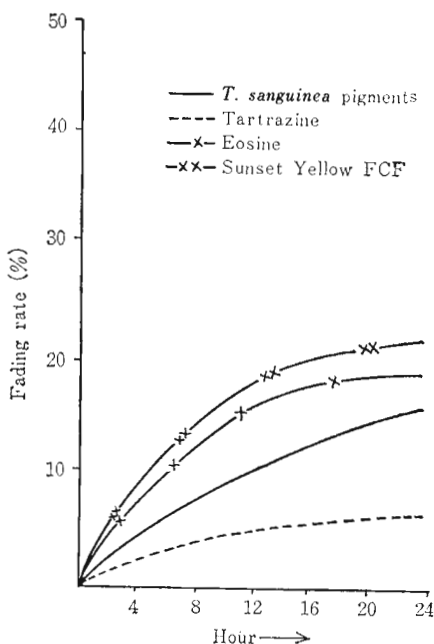


Fig. 12. Fading rate of the pigments on the fluorescent lamp (10 w. 40 cm)

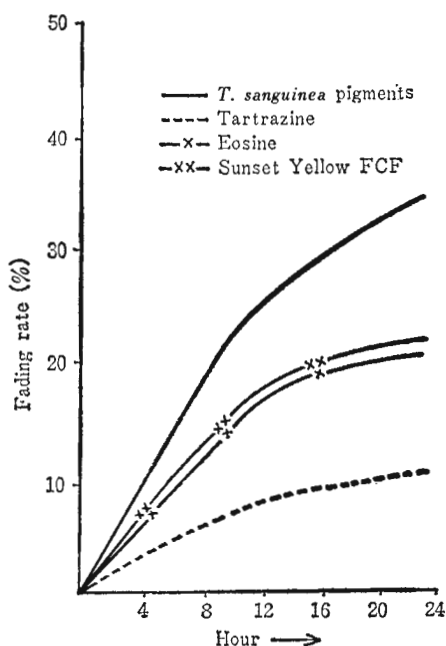


Fig. 13. Fading rate of the pigments on the ultra-violet lamp (TOSHIBA, FL, 20S-BLB, 40 cm)

中で、各菌に対して1/1700倍の本色素濃度で、120時間後でも抗菌性があつたが、水溶液中では、本色素は抗菌性をいくらか示し、菌の発育に対し、4%エチルアルコール単用ではいくらか抑制を示し、木屑単用ではほとんどその影響を認めなかつた。

また十字線法による試験では、本菌菌糸が円形状に発育している所に、バクテリアが発育し各区

Table 4. Antibacterial activities of *T. sanguinea* pigments on the serial dilution method.

Sample	Condi- tion	B. sub.				Sta. au.				Ps. vul				E. coli.				V. sp.				
		24	48	72	96	120	24	48	72	96	120	24	48	72	96	120	24	48	72	96	120	
Ethyl alcohol	4 %	±	+	++	+++	-	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Ethyl alcohol	6 %	-	-	±	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HIROTAKE pigments	4 %	$\frac{1}{17} \times \frac{1}{100}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		$\frac{1}{17} \times \frac{1}{1000}$	+	+	++	+++	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		$\frac{1}{17} \times \frac{1}{5000}$	++	++	+++	+++	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		$\frac{1}{17} \times \frac{1}{25000}$	+++	+++	+++	+++	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	pH 7.0	$\frac{1}{17} \times \frac{1}{59}$	±	+			-	±			+	+			+	+			-	+		
		$\frac{1}{17} \times \frac{1}{100}$	±	+			-	±			+	+			+	+			-	+		
Distill- ed H ₂ O	$\frac{1}{17} \times \frac{1}{1000}$	±	+			-	±			+	+			+	+			+	+			
	$\frac{1}{17} \times \frac{1}{10000}$	±	+			-	+			+	+			+	+			+	+			
Blank		++	++	+++	+++	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
Chips	Et. OH	+	+	++	+++	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Sorbic acid	pH 7.0	$\frac{1}{5} \times \frac{1}{5}$	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		$\frac{1}{5} \times \frac{1}{10}$	-	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Distill- ed H ₂ O	$\frac{1}{5} \times \frac{1}{50}$	+	+	++	+++	-	±	±	±	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		$\frac{1}{5} \times \frac{1}{250}$	++	++	+++	+++	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	$\frac{1}{5} \times \frac{1}{1250}$	++	++	+++	+++	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	

(*Sta. au.*, *Ps. flu* 以外) の接触部分はヒイロタケ菌糸により、かく線形成（半けん触）を示し、72時間後には、徐々に発育して、その部分が赤かっ色を示し、色素を生成しはじめ細菌は接触部で増殖を停止した。一字線法による場合も、十字線法の場合と殆んど同様の結果を得た。

IV 考 察

麦芽寒天培地と2%グルコース加用ジャガイモ煎汁寒天培地上での菌糸発育と色素生成については、麦芽寒天培地では、37°C→28°Cでは、永友氏¹⁾らの研究報告によれば、ヒイロタケ菌糸は比較的 HUMPHREY¹¹⁾等のいう High temperature group に属して、4~5日の短期間でペトリ皿一杯に発育するとあるが、筆者の実験では、少しちがった結果を示した。これは比較的培地が古く、水分の減少が原因と考えられる。しかし一定期間を経過すると他と同様、菌糸発育も盛んになり、8日目頃には、ほぼペトリ皿一面に菌糸が発育し、淡黄色を呈し初めた。28°Cに移し変えてからは、色素生成速度も増し、橙色を呈し初めた。色素生成は一般に、菌糸発育が極めて盛んな時には行なわれず、発育の劣えかけた時期（菌糸がペトリ皿の壁に接触し生育がストップしかける時）より生成しはじめる事を認めた。さらに27°C、30°Cでは日毎の菌糸の伸長度の大きくない時に、むしろ色素生成が行なわれた。

このことから（今後さらに温度と菌糸発育、色素生成との関係を検討する必要を認めるが、一応実験をまとめれば）菌糸発育は比較的高温度の方が良好で、色素生成には低温度が良好であると思われ、培地は、同温度でも2%グルコース加用ジャガイモ煎汁寒天培地（以下G-P培地と略す）が良く色素生成すること、長時培養によれば麦芽寒天はG-P培地より以上の色素生成を認めた点から、色素生成に最も適した条件は、この2種の培地に限定すれば、短期培養ではG-P培地、温度が27~29°C、長期培養は同温度の麦芽寒天が良いと思われる。

Czapek-Dox 及びその変法培地すなわちこれらの合成培地は、ヒイロタケ菌糸の発育、色素の生成のためには好適とは云いがたく、培養日数をさらに増しても殆んど無変化に等しく、合成培地と天然培地とのちがいは明確である。しかし今後、合成培地についてさらに検討することによって、本菌菌糸の発育および色素産生の条件を明確に出来るであろう。

温度との関係では、他の培地同様、色素生成には、28°C附近が最も良いと思われ、明、暗に關しては、暗所で色素生成、色調も濃く、紅色乃至淡朱色でやや良く、これは単に、密閉される為、容器内の温度が高い事と、水分の蒸発が少いのが関係しているようにも考えられる (Fig. 3, 4)

混合培地では $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KCl 添加の培地 (B) の方が無添加培地より良好であった。今後はその添加量と、他の色素生成促進物質の種類についても検討する必要がある (Table 2, Fig. 4)。色素生成の至適温度は27°C~29°Cであったが、明、暗所の27~31°Cで他の実験に用いた培地の時とほぼ同様であった。培養日数は22~26日間が最適と考えられ、この時期が最も色素生成が

良好であった。従ってこの時期をピークにして日数が増すにつれ、ペトリ皿内で菌糸の発育は劣え、色調も退化(紅色→橙色)する事が一部で認められた。以上の結果から混合培地に $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KCl 添加培地で暗所 (27°~30°C), 22~26日間培養が最も良好な条件と云うことが出来る。

溶解性についてはヒイロタケ色素はエチルアルコール (99.5 vol %) が他の溶媒に比較して最も易溶性を示し、全般にすぐれていた。溶解の至適条件は、エチルアルコール, 20°C, pH 9.6 の場合と思われる。しかしこれらの溶媒中、完全に溶解するものは、見あたらなかった。実験当初、本色素は水に不溶性と考えられていたが、40時間以上浸漬静置させておけば、かなりな程度まで溶解することが示された。また沸騰点近くでは大部分が溶解し、冷却後も再結晶はしなかった。従って条件さえ整えれば、水溶性色素群に入れることも不可能ではない。又水、エチルアルコール共に NaOH を加えて pH を 9.6~10.0 近くにすると、白色沈澱物を生じ、特に水の場合、70°C 以上に加温すると、沈澱物を生じ、放冷後は、pH が酸性側に傾き、色調も退化、あるいはかっ色になる。沈澱物を採取、乾燥後、pH を測定した所、9.8~9.9 を示した。Na 塩、塩酸塩等の形にすれば、実験が容易になると考えられるが、塩の形でも、抗菌性を示すかどうかは、今後、検討する必要がある。

次にペーパークロマトグラフィーにより、展開分離を試みたが、常法ではまったく展開されなかった。この粗色素の吸光度(紫外、可視部吸収スペクトル)を調べた結果、Fig. 7 に示した様に、314 m μ , 426 m μ に極大吸収波長を認めた。これは他の生体色素と同一波長、あるいは類似の波長を示していることから、本色素は単一成分ではないことは明らかである。しかし本色素がカビから得られる色素群に属し、多くのカビの色素がキノン系化合物であることと、少々問題はあるがヒイロタケ培養液から得られた「polyporin^{1,5,12)}」なる抗生物質も知られ、これがキノン核を有する事実から本色素構成の一部をキノン系化合物が占めると推定される。また本色素生成段階に於て、Xanthorametin¹⁾なる色素を生成することも知られている。以上のことから、本色素は単一物質より成るものではなく、数種の物質からなり、構造もきわめて複雑な物と推定されるもので、今後さらに検討しなければならぬ、また色素を展開液ベンゼン:アセトン(7:3)を用い、シリカゲルG薄層で薄層クロマトグラフィーを行った所、4つのスポットに分離した。さらにこのスポットを溶出して紫外部吸収スペクトルを取った所、それぞれ、2~3 m μ づつずれた極大吸収スペクトルを呈した。可視部吸収スペクトル (Fig. 7) で 426 m μ を呈したのは食用色素黄色4号(タートラジン)と同様なもので、これが黄色を呈する原因だが、N=N などの構造をその一部とするものと思われる。今後さらに赤外吸収スペクトル、その他により、生化学的立場から、検討を加える必要がある。

ヒイロタケ抽出色素の安定性では、先述のタートラジン(食用黄色4号)と、25°C あるいは70°C の暗所保存による退色率はかなり一致しているが、蛍光灯照射下における退色率は、ヒイロタケ色素の方が大きい値を示して、紫外線照射下では、エオシン、サンセットエロー F C F よりも不

安定である。その分解途中における生化学的研究も必要で、今後の研究上の大部を占めるものと思われる。

最後にヒイロタケエチルアルコール抽出色素の抗菌性について、液体系列希釈法や、対峙培養の十字線法や一字線法では、抗菌力が選択的に認められたが、*B. subtilis* 等の芽胞菌に対しては、さほどの抗菌力は示さなかった。*S. aureus*, *Vibrio sp.* に対しては希薄な色素液でも抗菌力を示したが、再検討の必要がある。4%エチルアルコールが殺菌効果があるかどうかも問題になるので、6%および4%エチルアルコールのみで抗菌力試験を重ねたところ、4%では影響が少ないことを確認した。混合培地（B）使用時にエチルアルコール抽出色素に混入すると推定される木屑成分の影響についても陰性であった点から考察して、やはり何らかの抗菌物質がこの色素中に存在することは明らかである。しかして水溶液ではほとんど抗菌力を示さないことについては水溶性色素とエチルアルコール溶性色素の差異を検討しなければならない。ソルビン酸カリウムの効力¹³⁾に比較して本色素は菌種によっては、すぐれた効力を示した。本実験に使用した色素の純度についても検討の必要がある。

対峙培養時の2%グルコース加用ジャガイモ煎汁寒天培地上での十字線法では、本菌菌糸が円型状に発育している所に細菌が発育し、*S. aureus*, *P. fluorescens* 以外の各区に半けん触を示し、72時間後には、徐々に発育して、その部分が赤かつ色を示し、色素を生成し始め、細菌は、接触部で止まっている状態からはヒイロタケ菌糸の発育が優勢であることを示した。*S. aureus*, *P. fluorescens* に対してはかく線を生じることなく、細菌上を半ば被覆し、発育した。一字線法でも、ほぼ十字線法の場合と同様の結果を得た。*S. aureus*, *P. fluorescens* は菌糸におおわれていて、その接触部は、72時間では、いちじるしく白色を呈した。これは培養を続けると赤かつ色のかく線を形成してくるものと思われる。*B. subtilis*, *B. mesentericus*, *E. coli* では、かく線は生じないが、著しい拮抗現象を示し、本菌菌糸の生長は抑制されている。またペトリ皿の裏面を観察した場合、接触部分は、赤かつ色乃至茶かつ色を呈していたので、いずれは、かく線が形成されるものと思われる。

以上のことから、本菌の細菌に対する抗菌性は菌糸と色素とでは異なった選択性を示したものと考えられ、さらに糸状菌または酵母に対する抗菌性についても検討の必要があろう。

V 要 約

① ヒイロタケ菌糸発育、色素生成に関して、7種（麦芽寒天培地、2%グルコース加用ジャガイモ煎汁寒天培地、Czapek—Dox 培地、Czapek—Dox+N 源培地、Czapek—Dox 変法培地、混合培地、混合培地+ $MgSO_4 \cdot 7H_2O + KCl$ ）の培地を用いて特に色素生成の良好なる培地の選択と色素生成の至適温度、および明暗の影響について検討した。短期間培養では、2%グルコース加用ジャ

ガイモ煎汁寒天培地が最も良好で温度は $28^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ であった。長期培養では混合 ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{KCl}$) 培地、麦芽寒天培地が良好で温度はやはり、 $28^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ であった。高温度では (37°C 以上) では菌糸発育は良好だが、色素生成が極めておそい。明・暗所の差は暗所に色素生成が多く見られた。混合培地に $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl を添加したものは $27^{\circ}\sim 30^{\circ}\text{C}$, 暗所が色素生成が良好である。

② ヒイロタケ色素の溶媒に対する溶解性は、エチルアルコール (99.5 vol%) で完全ではないが、比較的溶解性大であり、また水で適当な条件を加えれば、かなりの溶解性を示すことを認めた。

本色素は酸性よりもアルカリ性、特に pH (9.2~9.6) に於て、いちじるしい溶解性を示したが、温度との関係も重要で、アルカリ性で橙色~赤橙色を示し、安定な pH 域は 8.8 付近である。

③ ヒイロタケ色素の化学的特性では、薄層クロマトグラフィー法、吸光度試験の結果より色素の種類を推定した。吸収スペクトルを可視部、紫外部について試験した結果、 $314\text{ m}\mu$, $426\text{ m}\mu$; 付近に極大吸収スペクトルを示した。又色素の TLC により 4 スポットが得られ、それらの紫外部吸収スペクトルを調べた結果、 $214\text{ m}\mu$, $216\text{ m}\mu$, $219\text{ m}\mu$, $221\text{ m}\mu$ に極大吸収が認められた。カビの産生する色素のキノン (p-キノン) はアルコールに溶解性であること、および極大吸収波長等からキノン核を有した物質が本色素に含まれているのではないかと推定される。先に述べたように糸状菌から得られる色素にはキノン系化合物が多い事と、高等植物や、地衣類の色素と関連があることが、特徴である。特にアントラキノン系の *Chrysophanol* の側鎖のメチル基、あるいは核の水素が酸化されて生ずる一連の色素が多い^{14,15)}。さらにヒイロタケ菌糸培養液中から得られた抗生物質「*Polyporin*」もキノン核をもつと思われるし、またこれら色素を、*FLANK* 等がヒイロタケと同属の *Polyporus rutilans*¹⁶⁾ から分離している。

④ ヒイロタケ色素の安定性に関する実験では、熱に対しては、比較的安定で、著るしい退色は示さなかったが、光に対して、特に紫外線に対しては、24 hrs で約 35% の退色を示した。

⑤ ヒイロタケ色素は、天然色素から得られる着色用添加物として利用できるかもしれない。また抗菌性の利用についても今後さらに検討の余地がある。4%エチルアルコール抽出、液体ブイヨン培地上で抗菌性を示し、4%エチルアルコール単用および水溶性色素の抗菌性は共にいくらか認められることはアルコールと本色素の相乗効果があるとも考えられる。また、2%グルコース加用ジャガイモ煎汁寒天培地上で十字線法、一字線法により、ヒイロタケ色素と細菌の対峙培養の結果、ヒイロタケ菌糸の発育が優勢であった。*S. aureus*, *P. fluorescens*, *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *E. coli*, 共、赤かっ色のかく線を生ずるか、あるいは著しい拮抗現象を示した。

いずれにせよ、本色素は極めて複雑な色素であって、今後の研究によって、一層興味ある知見が得られるであろう。

VI 文 献

- 1) 永友 勇：広葉樹材の腐朽に関する研究, p. 38~65 (1961)
- 2) 川村 清：原色日本菌類図鑑第1巻, p. 150, 風間書店 (1954)
- 3) 平山重勝：三重高農校友会学術集報, 第1巻 p. 21~42 (1929)
- 4) 伊藤誠哉：日本菌類誌, 第2巻, 第4号, 養賢堂 (1955)
- 5) BOSE, S, R : Nature, 153, 292~296, (1946)
- 6) REA, CARLETON B. C. L : British Basidiomycetae, London (1922)
- 7) 緒方 章：化学実験操作法, 上巻, p. 317~319, 南江堂 (1963)
- 8) 鈴木郁生：薄層クロマトグラフィーの実際, p. 165, 広川書店 (1964)
- 9) 相磯和嘉, 加藤 博：食品衛生実験, p. 27~30, 光生館 (1967)
- 10) 向 秀夫, 鈴木直治：植物病理実験法, p. 673, 日本植物防疫協会 (1965)
- 11) HUMPHREY, C. J. and P. V. SIGGERS : Jour. Agr. Res. 47. p. 997~1008. (1933)
- 12) 友田宜孝：抗生物質, 医薬品〔微生物工学講座9〕 p. 221, 共立出版 (1965)
- 13) 岡村一弘：食品添加物の使用法, p. 191~196, 食品と科学社 (1964)
- 14) A. ブラッケン：微生物の化学, p. 131, 南江堂 (1960)
- 15) 平井篤造外編：植物病理の生化学, 前編, p. 146, 農業技術協会 (1963)
- 16) 服部静夫, 下郡山正巳：生体色素, p. 93, 朝倉書店 (1967)