

茸類の生化学的研究—Ⅲ

有機酸代謝に就て(1)

橋本 一哉 磯部 信昭 高橋 善次郎

BIOCHEMICAL STUDIES ON THE MUSHROOMS — III ON THE ORGANIC ACID METABOLISM I

Kazuya Hashimoto, Nobuaki Isobe and Zenjiro Takahashi

Organic acids are of great significance in mushroom metabolism.

The composition of organic acids in medium during the mycelial growth of mushroom was determined by partition chromatography by using silica gel.

The organic acids components formed in medium during mycelial growth of mushrooms were acetic, formic, succinic, glycolic and oxalic acids, and some unidentifed acids were also detected.

It was particularly noted that the amount of oxalic acid in the medium of *C. shiitake* increased during the cultivation process.

The maximal accumulation of oxalic acid was achieved after 20 day incubation, and the acid was decomposed thereafter.

Thus the addition of alkaline neutralizing agents such as CaCO_3 was conducive to maximum yield of oxalate.

緒 論

茸類の培養に関しては従来比較的多数の報告が見られるが、その生育や発茸に関する詳細な生化学的研究は殆んど見られない。

吾々は茸類の栽培に資する目的で茸類の菌糸の行なう物質代謝に関連して有機酸のになう役割の重要性に鑑み、マッシュルーム、シイタケ、ナメコの三種の茸菌糸に就いてその培養中に生成する各有機酸組成を比較し、その経時的变化に就いて、2.3の知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 供試菌及び接種

Cortinellus shiitake, *Pholiota nameko*, *Psalliota bispora*,

培養法、接種法は前報に準ずる。

2. 培地組成及び培養条件

前報の基本培地(GP培地)を使用し、25°Cにて静置培養を行なう。

3. 糖の定量は Somogyi-Nelson の比色法¹⁾により測定し、全窒素はマイクロケルダール法、菌体乾物量は汙別水洗後脱水 105°C 48時間乾燥恒量と成し測定した。

4. 有機酸の定量

有機酸はエーテル連続抽出法にて96時間抽出を行ないW. A. Bullen.²⁾ C. S. Marvel³⁾等のシリカゲルクロマトグラフィーを使用する elution analysis に依った。

- a) シリカゲルの前処理：Mallinckrodt's silicic acid を蒸留水で数回洗滌をくり返し、不純物と微細な粒子を取り除き、約1/2量と成し100°Cで24時間乾燥し密閉容器に保存する。
- b) カラムの調整：前処理したシリカゲル 8g を 0.5 N H₂SO₄ 5ml を加えて均一に混合しクロロホルムに懸濁し 12×300mm のクロマト管に充填する。
- c) 展開用溶剤：クロロホルムに容量比で 5, 15, 25, 40 のブタノールを加え、0.5 N H₂SO₄ で飽和したものをそれぞれ 100 150 150 200ml 用いた。
- d) 指示薬：フェノールレッド 100mg と 0.05N NaOH 5.7ml を 100ml として使用する。
- e) 滴定：0.01N NaOH (Carbonate free) にて滴定する。
- f) 各有機酸の確認：クロマトグラム各ピークを集め、クロロホルムから水に転溶 n butanol ギ酸 水 (4 : 1.5 : 1) にて展開し蔭酸に関しては融点測定 (101°C) を合せ試みた。揮発性酸は各ピークをエステル化し、ヒドロキサム酸とし水飽和ブタノールで展開し塩化第2鉄溶液を噴ムし発色した。

実験結果及び考察

1. 培地組成の変化

マッシュルーム菌糸は Fig 1 の如く 5 日間の lag phase 後、急速に生育し20日目にピークに達し、その後自己消化によって減少する pH も20日前後で 4.7 附近に低下するが、その後自己消化の進展と共に上昇する。

ナメコ菌糸は Fig 2 の如く、マッシュルームと殆んど同様に旺盛な生育を示し18日目にはピークに達する。その後は急速な自己消化によって減少する pH は20日目に 3.5 附近に低下するが、急速に上昇する。

シイタケの菌糸は Fig 3 の如く、両菌に比べて生育は極めて緩慢である。lag phase も従って長く 8 日間を要し20日目までは比較的生育は早い。その後も徐々に生育が続き、pH は培養の経過と共に低下し 3 附近に達する。

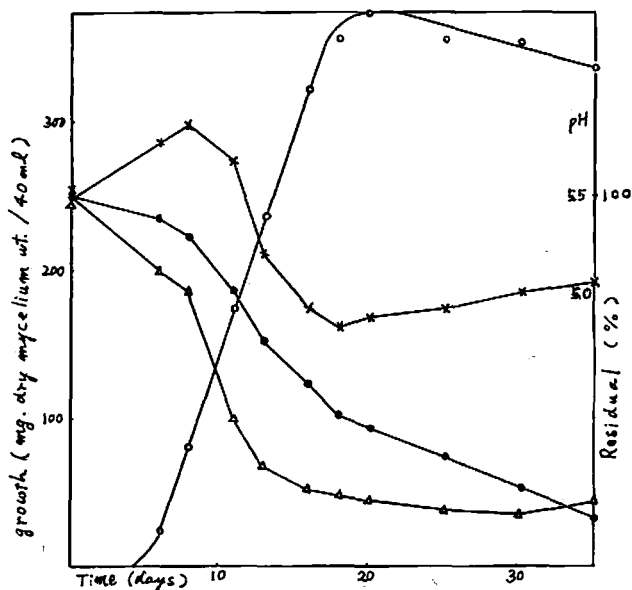


Fig. 1 Chemical changes during mycelial growth of *Psalliotia bispora*.

Symbols; ○ - growth ● - glucose
 △ - nitrogen × - pH

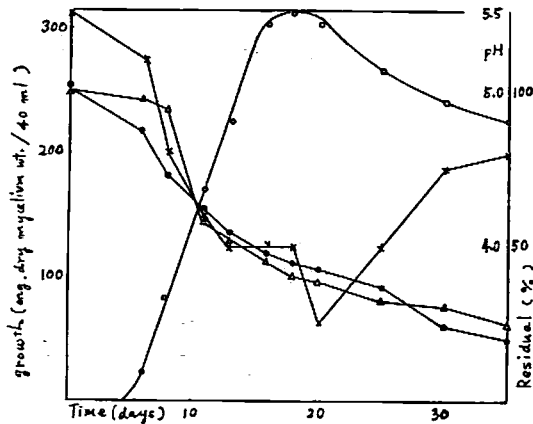


Fig. 2 Chemical changes during mycelial growth of *Pholiota nameko*. Symbols were the same as Fig. 1

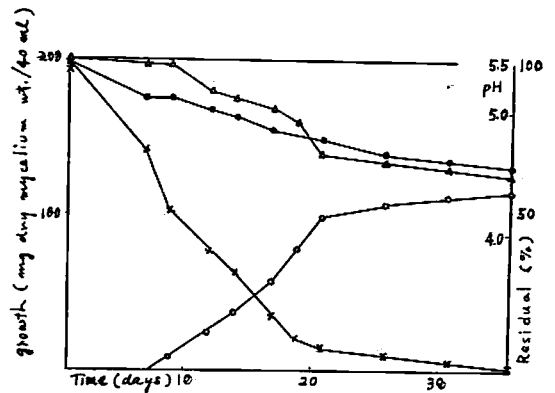


Fig. 3 Chemical changes during mycelial growth of *Cortinellus shiitake*. Symbols were the same as Fig. 1

2. 茸類培養中に生ずる各種有機酸

茸類の菌糸の生育と共に各培地中の pH が動変動するが、主たる原因は生成される各種有機酸に基因すると推察される。

(1) 既知酸による回収試験

茸類の代謝によって生ずる各種有機酸をシリカゲルクロマトグラフィーに依って相互分離し定量に供し得るかどうかを検討するために、既知の有機酸を用いて回収試験を行なった。溶出速度は1分間 1ml に調節し、溶出液は 5ml 宛小試験管中に採取し 0.01 N NaOH 液で滴定し得られた値を図示すると Fig 4 の如くで図で解る各分画毎に blank を差引いた滴定値よりその分画に含まれる酸の量を算出した結果

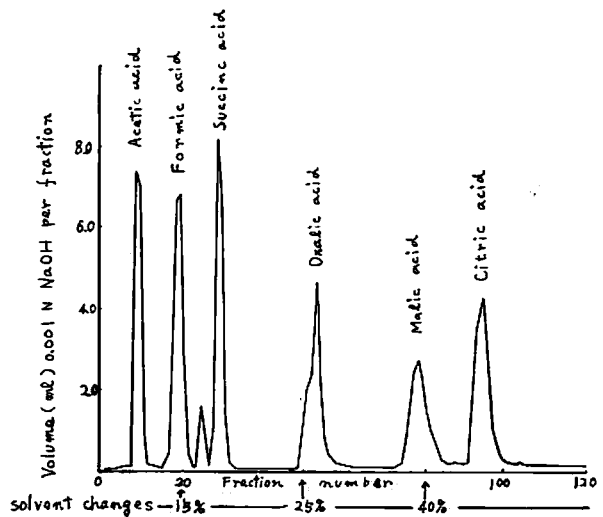


Fig. 4 Chromatographic separation of authentic acids

は Table 1 の如く 90% 以上の回収率を得て充分定量に供し得ることを知った。

Table I. The peak effluent volume and recovery of a known organic acids

Acids	Fraction No.	Peak E. V.		Amount added ml	Amount found ml	Recovery %
		F. No.	ml			
acetic	9...12	9	45	16.94	15.64	92.9
formic	17...26	20	100	23.12	21.82	94.4
succinic	28...32	29	145	18.22	17.88	98.1
oxalic	50...57	53	265	15.80	14.40	91.1
malic	75...84	78	390	16.28	14.34	88.1
citric	92...99	94	470	14.16	13.88	98.0

(2) 茸類菌糸の培養中に於ける各種有機酸の消長

茸類菌糸の培養中に生じた主たる有機酸は何れも酢酸、ギ酸、コハク酸、蓚酸、グリコール酸及び未知の揮発性酸であったが、この内未知の揮発性酸及びグリコール酸は培養初期に少量生成し、以後急速に消出するので、捕捉し難く、比較的に大量に生成を認められ、又茸類の有機酸代謝過程に於て重要な因子であると推定される酢酸、ギ酸、コハク酸及び蓚酸の経時的な動向を追跡した。

a) 酢酸 (Fig 5)

マッシュルームは11日目、シイタケ、ナメコでは13日目にピークを有し、その後減少し18日目より殆んど変化は見られない。

b) ギ酸 (Fig 6)

シイタケ及びマッシュルームでは30日目にピークを有し、特にマッシュルームは他の二者に比較して大量に生成する。ナメコでは10日目より殆んど培養期間を通じて変化が見られない。

c) コハク酸 (Fig 7)

ナメコでは7日目に、シイタケ、マッシュルームでは10日目にピークを有し、その後減少する。他の有機酸に比較して培養の初期に培地中に多量に存在するのが特徴的で、次の蓚酸生成への中間代謝物であろうと推定される。

d) 蓚酸 (Fig 8)

三茸類共に他の有機酸に比較して遅く、菌体の生育が最高に達する20日目にピークを有する。シイタケは他の二者に比較して非常に多量の蓚酸を生成蓄積し、同菌の培養に於て著るしく pH が低下し、生育が阻害を受けるのはこの蓚酸の蓄積に起因するものと推察された。

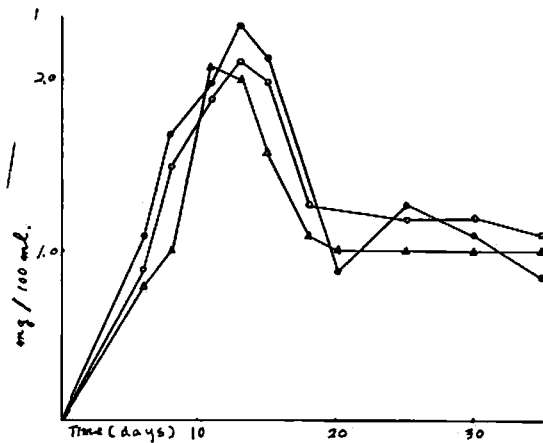


Fig. 5 Changes in acetic acid during mycelial growth of mushroom fungus. Symbols; △ *Psalliota bispora*, ○ *Pholiota nameko*, • *Cortinellus shiitake*

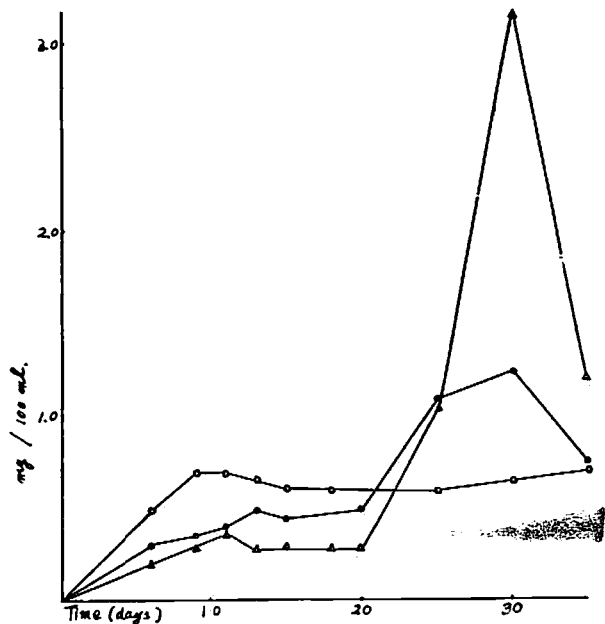


Fig. 6 Changes in formic acid during mycelial growth of mushroom fungus. Symbols were the same as Fig. 5

20日目以後は生成された蓚酸も除々に消費されるがシイタケでは30日以後の培養では殆んど変化は見られなかった。

(3) 酸中和剤による影響

生成された有機酸は更に培養を続ける事に依って除々に消費される。

マッシュルーム、ナメコ両菌では Fig 8 の如く蓚酸生成量は培養期間を通じて非常に少ない、しかし De Bary に依れば *Psalliota campestris* の菌糸に Ca-oxalate の存在することを、又島菌は19種の木材腐朽菌の培養中の蓚酸生成及び分解の機作を研究している。又最近では G. T. Tsao に依れば *Pleurotus ostreus*, *Agaricus campestris* を CaCO_3 の存在で培養すれば大量の蓚酸を蓄積することを述べている。

蓚酸の生成が比較的少なかったマッシュルーム菌を用いて CaCO_3 を接種直前に培地に添加し培養35日及び70日目の生成有機酸組成は Table 2 の如くで CaCO_3 を添加した場合には70日では蓚酸のみを大量に蓄積する。遊離型の蓚酸は菌によって更に分解を受けるが Ca-塩は酵素作用を受けず、培地中に蓄積されるものと推察された。

マッシュルームと同様に蓚酸生成量が比較的少ないナメコ菌を使用して塩と遊離型の蓚酸の分解能を比較すると Fig 9 の如くで遊離型は塩に比較して2倍分解され易いと推定される。

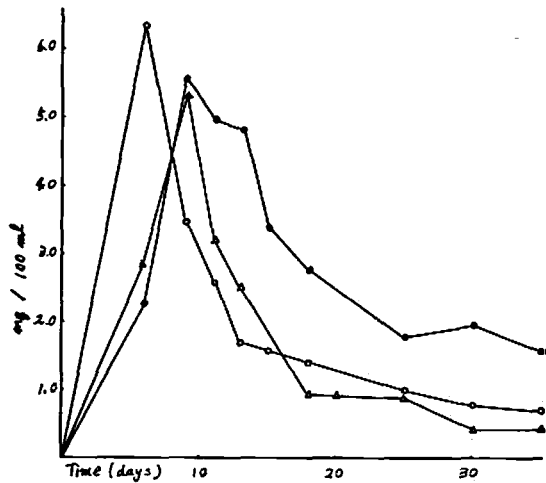


Fig. 7 Changes in succinic acid during mycelial growth of mushroom fungus. Symbols were the same as Fig. 5

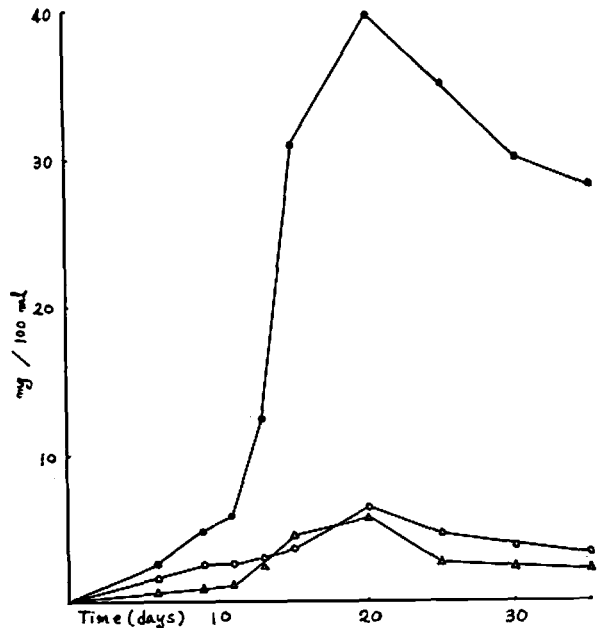


Fig. 8 Changes in oxalic acid during mycelial growth of mushroom fungus. Symbols were the same as Fig. 5

Table II. Effect of CaCO_3 on the organic acid formation by *Psalliota bispora*

Acids mg/100ml	No neutralizing agent		CaCO_3 5%	
	35 days		35 days	70 days
acetic	0.40		0.46	—
formic	1.25		0.95	—
succinic	0.99		2.93	—
oxalic	1.94		19.29	60.30
citric	2.96		—	—

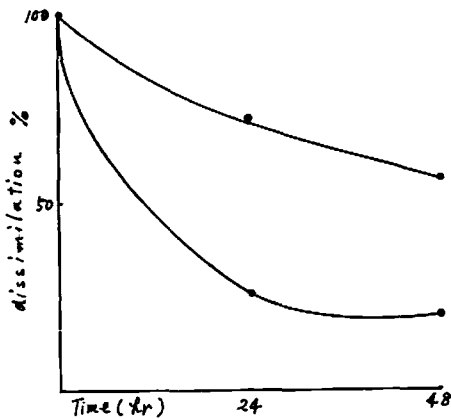


Fig. 9 Dissimilation of oxalic acid and potassium oxalate by *Pholiota nameko*

Symbols; • oxalic acid as *Pholiota nameko*
 ○ oxalic acid as free crystalline acid

要 旨

茸類の菌糸の有機酸代謝に就いて基礎的な研究を行ない次のことを明らかにした。

1. マッシュルーム及びナメコの菌体量は20日前後で最高に達し、有機酸の蓄積に依って pH は低下するが、培養の経過と共に菌体は自己消化し pH の上昇を見る。シイタケの菌体生育は緩慢で30日培養で最高に達せず自己消化も pH の上昇も見られない。
 2. 茸類菌糸の生成する有機酸組成を比較し、培養中に生成された主な有機酸は何れも酢酸、ギ酸、コハク酸、蓚酸、グリコール酸及び未知の揮発性酸であった。
 3. シイタケ菌は他の二者に比して旺盛な蓚酸生成菌である。
 4. マッシュルームの蓚酸生成量は少ないが CaCO_3 を添加すれば、培地中に蓚酸のみを蓄積する。
 5. ナメコ菌を用いて蓚酸分解能を測定すると遊離型は塩型に比較して約2倍分解を受けた。
- 本研究の要旨は日本菌学会大会に於いて1965, 4, 5 発表した。

文 献

- 1) Nelson N. 1944 A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153, 375-380
- 2) W. A. Bullen, J. E. Varner, and R.C. Burrell 1952 Separation of organic acids from plant tissues. Anal. Chem. 24, 187

- 3) Marvel, C. S, and Rands. R.D.Jr. 1950
Separation of organic acids. J. Am.Chem.Soc 72 2642
- 4) Shimazono. H 1955 Oxalic acid decarboxylase a new enzyme from the mycelium of wood—
destroying fungi. J Biochem. (Japan) 42 321-340
- 5) George Tsu-Ning Tsao 1963 Production of oxalic acid by a wood-rotting fungus. Appl.
Microbiol. 11, 249-254
- 6) George Tsu-Ning Tsao 1963 Production of oxalic acid by a strain of *Agaricus campestris*.
Appl. Microbiol. 11, 255