

# 茸類の生化学的研究—Ⅳ

## 有機酸代謝に就て 2

橋本 一哉 磯部 信昭 高橋善次郎

### BIOCHEMICAL STUDIES ON THE MUSHROOMS - IV

#### ON THE ORGANIC ACID METABOLISM 2

Kazuya Hashimoto, Nobuaki Isobe and Zenjiro Takahashi

The metabolism of organic acids by mushroom fungus were studied in relation to the formation of oxalic acid. Acetate, citrate, succinate, fumarate, malate and glycolate were consumed with the mushroom fungus and, at the same time, the formation of considerable amounts of oxalic acid was found.

Especially, the considerable amount of oxalic acid was detected, when acetate as a carbon source was added to the medium of *C. shiitake* and it was suggested that the Nord's scheme of oxalate formation was live with mushroom fungus.

The organic acid decomposing ability of *C. shiitake* was lower than that of *P. nameko* and *P. bispora*.

### 結 論

前報で *Psalliota bispora*, *Cortinellus shiitake*, *Pholiota nameko*, の菌体生育にともなう各種有機酸の消長を見た。茸類は培養中に数種の有機酸を生成し又分解した。培地に中和剤を添加して培養すれば殆んど蓚酸のみを蓄積した。蓚酸生成量の大きいシイタケ菌は勿論の事他の二菌も糖の代謝によって各有機酸を経て蓚酸を生成更に分解される事がほぼ推論されるので報告する。

### 実 験 方 法

1. 供試菌及び培地組成：前報に準ずる。

2. 菌 蓋 培 養 法

300 ml の三角フラスコに 50 ml の基本培地を分注し、常法に依り殺菌、種菌接種、25°C にて 25日間前培養し菌蓋を充分に形成させる。培養液を除去してこれを殺菌した  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%、溶液で数回菌体裏面を洗滌した後、この液を 50 ml 加えて室温で24時間飢餓培養を行ない、次でこの飢餓培地を除去した後炭素源を加え実験に供した、培地の pH は 5.5 に調整した。

3. 振盪培養は基本培地 100 ml を 500 ml のフラスコに分注し、振幅 8 cm、毎分 100 回転の速度で行ない培養温度湿度は表面培養に準ずる。

## 実験結果及び考察

### 1. 蓚酸分解能

シイタケ菌糸はマッシュルームやナメコ菌糸に比較して培養中に多量の蓚酸を蓄積するが、更に培養を続けると生成された蓚酸は除々に減少して行く、それ故蓚酸生成量の少ないマッシュルームやナメコ菌糸は、生成した蓚酸を速やかに更に分解するため培地中の蓄積が極めて少ないと推察されるので炭素源として2次培地に蓚酸 100 mg/100 ml を添加し、48時間後培養液中の蓚酸消出量を過マンガン酸カリ法で測定した。

Table I. The decomposition of oxalic acid by mushroom fungus.

species	oxalic acid mg/100 ml		decomposition %
	0 hr.	48 hrs.	
<i>Psalliota bispora</i>	110.68	15.00	86.45
<i>Pholinta nameko</i>	106.84	20.08	78.93
<i>Cortinellus shiitake</i>	111.44	106.78	6.36

マッシュルーム、ナメコ菌では Table 1 の如く、添加蓚酸の80%以上を分解消出するが、シイタケでは殆んど分解を受けず培地中に残存する。この事より蓚酸生成量の多いシイタケでは蓚酸分解能が小さく、マッシュルーム、ナメコでは生成された蓚酸を速やかに分解する事に原因があると推察される。

### 2. グルコースからの有機酸生成

前報で蓚酸以外の有機酸は比較的培養の初期に生成され、その後除々に減少し、菌体の生育が最高に達した20日目頃に、蓚酸量は最高に達する。この事から培養初期に生成した有機酸は、蓚酸えの代謝中間生産物であろうと推定される。2次培地としてグルコース1%溶液を添加し、5時間後及び20時間後にグルコースより生じた有機酸は、酢酸、キ酸、コハク酸、蓚酸、グリコール酸で Table 2 の如く、シイタケ菌糸に於ては蓚酸の生成が著しく、マッシュルーム、ナメコ菌糸に於てはコハク酸が増加したが、特に蓚酸の増加は認められなかった。

Table II. The formation of organic acids on the replacement culture of the mushroom fungus.

species	acid mg/100 ml	acetic	formic	succinic	oxalic	glycolic
P. bispora	5 hrs.	2.25	1.35	2.06	0.24	+
	20 hrs.	2.20	1.24	6.62	1.42	+
P. nameko	5 hrs.	3.12	1.32	1.66	0.21	1.45
	20 hrs.	2.30	1.74	3.49	1.92	0.84
C. shiitake	5 hrs.	1.59	1.41	0.94	9.54	—
	20 hrs.	2.49	3.20	2.03	24.09	—

The composition of the replacement medium (g./100 ml)  $K_2HPO_4$  0.2,  $KH_2PO_4$  0.2,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01, glucose 1.0

### 3. 種々の有機酸からの蓚酸生成

糖から蓚酸生成に至る中間生産物として、或る種の有機酸を経るものと推定されるので、培養中に生産される有機酸及び2、3の有機酸からの蓚酸の生成を測定した。蓚酸生成量は Table 3 の如くである。

各有機酸は Na 塩を用い、遊離の有機酸は NaOH にて中和後使用した。

烏菌はアラゲカワラタケ (*Corilus hirsutus*) の蓚酸をギ酸と CO<sub>2</sub> に分解する酵素はモノヨード酢酸によって阻害されることを認めているので、これ等茸類の菌糸に於ても同様にこの酵素が阻害されて、蓚酸が蓄積されると推定されたので 10<sup>-2</sup>M モノヨード酢酸を培地中に添加したが、蓚酸の特に著しい蓄積は認められなかった。

Table 3 の如く、シイタケの蓚酸生成は各有機酸共に多く、特に酢酸からの蓚酸生成は多く、培養初期に酢酸の蓄積が見られる事等より考えて、酢酸は蓚酸生成のための重要な中間生産物であると推察される。それ故酢酸から蓚酸を生成する際の中間生産物の経時的变化を知るため、2次培地の炭素源を酢酸に代替し、5時間後、24時間後、48時間後に検出された有機酸は Table 4 の如くでナメコ菌を比較のため共に表示する。

Table III. The formation of oxalic acid from the several organic acids by mushroom fungus\*

substrate 10 <sup>-2</sup> M	mg oxalic acid formed per 100 ml medium		
	<i>P. bispora</i>	<i>P. nameko</i>	<i>C. shiitake</i>
acetate	3.03	17.30	60.58
citrate	4.26	16.12	39.38
succinate	0.94	15.52	32.50
fumarate	0.94	14.28	48.98
malate	1.08	18.46	44.10
glycolate	1.14	10.48	58.00

\* After 2 days of incubation temp 25°

Table IV. The change of acetic acid on the replacement culture of mushroom fungus

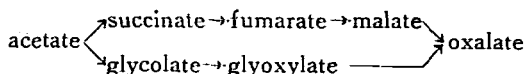
species	acids mg/100 ml	acetic	formic	succinic	oxalic	malic	citric
<i>C. shiitake</i>	0 hr.	110.25					
	5 hrs.	30.26	0.98	2.42	5.85	8.50	2.61
	24 hrs.	1.85	1.44	1.97	82.71	2.06	0.80
	48 hrs.	3.35	1.23	2.38	102.18	—	—
<i>P. nameko</i>	0 hr.	110.25					
	5 hrs.	36.60	0.60	2.38	0.52	0.50	—
	24 hrs.	10.38	—	0.60	1.30	0.47	—

シイタケ菌は酢酸を急速に分解すると共に、蓚酸の増加が著しいが、ナメコ菌では酢酸の急速な分解は見られるが、特殊な有機酸の生成は見られなかった。

この事は前にも述べた様にナメコ菌は有機酸の中間生産物である蓚酸をよく分解するに反してシイタケ菌では蓚酸の分解能が低く、その結果蓚酸を培地中に蓄積するものと推察される。

これ等茸類の蓚酸代謝に於て酢酸をプールとする経路の存在を推定した。

Nord 及び Vitucci は<sup>1) 2)</sup> *Merulius niveus* 等の4種の木材腐朽菌を用いて acetate より oxalate に至る二通りの代謝経路を提案した。



これら三茸菌糸の培養中に、中間生産物として succinate や glycolate を検出される事から、この二経路の存在する可能性を推定した。

#### 4. シイタケ菌の尿酸生成

尿酸生成菌であるシイタケに就て、尿酸生成と生育に及ぼす2, 3の物質及び培養条件に就て振盪法に依って検討した。

##### 1) initial pH との関係

基本培地の pH を硫酸 (又は苛性ソーダ) でそれぞれ変化させて 25°C で14日間培養した。

Table 5 の如く、培養後の pH は約 3.2 と成り、菌体の生育は初期 pH が 5.5 とやや酸性側では最高に達するが、pH 4.0 から 6.5 の広い範囲でよい生育を示した。尿酸の生成は初期 pH がアルカリ性側に近づく程著しかった。この事は前報で述べたアルカリ中和剤添加による尿酸蓄積量の増加に関連し、遊離型が塩型の尿酸に比較して一層分解され易いという結果とよく一致する。

Table V. Effect of initial pH on the growth and formation of oxalic acid by *C. Shiitake*

initial pH	final pH	oxalic acid mg/100 ml medium	dry wt. of mycelium g/100 ml
3.0	2.90	.0	0.0417
4.0	3.16	23.0	0.3896
5.0	3.23	61.3	0.4139
5.5	3.22	79.3	0.4291
6.0	3.24	90.1	0.4079
6.5	3.33	116.8	0.3717

##### 2) 糖濃度との関係

基本培地のグルコースの添加量を1から10%の間で変化して 25°C で培養し生育に伴う尿酸生成量は Table 6 の如くであった、初期 pH を 6.0 とし培養すると終末 pH は 3.2 から 3.6 に低下し、菌体は糖濃度 5% 以下では良い生育を示すが、それ以上濃度が上るに従って生育は阻害される。尿酸生成量は糖濃度とは逆比例し、菌類の尿酸生成量が基質濃度と比例すると云う従来考えに一致しなかった。

Table VI. Effect of concentration of glucose on the growth and formation of oxalic acid by *C.shiitake*.

glucose content %	initial pH	final pH	oxalic acid mg/100 ml	dry wt. of mycelium g/100 ml
1.0	6.0	3.15	91.3	0.3581
2.0	—	3.26	83.7	0.5208
3.0	—	3.14	80.1	0.5592
5.0	—	3.22	79.1	0.5498
7.0	—	3.42	68.0	0.3786
10.0	—	3.57	59.3	0.2863

##### 3) 糖の種類との関係

基本培地の炭素源として、蔗糖、グルコース、フラクトース、ガラクトース、マンノース及びキ

シロースの各2%を添加し初期 pH を 6.0, 培養温度 25°C で14日間培養した菌体及び尿酸生成量は Table 7 の如くである。

最終 pH は 3.1 から 3.6 に低下する。菌体の生育は蔗糖及びマンノースで旺盛で、キシロースでは全く生育しなかった。尿酸生成量はグルコース、フラクトースで比較的多く、尿酸の生成量と菌体の生育との間には明確な関係はないが、やや両者の間には逆の関係が存在すると推定された。

Table VII. Effect of some sugars on the growth and formation of oxalic acid by *C. shiitake*.

sugars 2 %	initial pH	final pH	oxalic acid mg/100 ml	drywt. of mycelium g/100 ml
sucrose	6.0	3.36	57.47	0.4498
glucose	—	3.34	87.61	0.3507
fructose	—	3.43	81.95	0.3748
galactose	—	3.62	64.06	0.2957
mannose	—	3.10	71.60	0.4381
xylose	—	—	—	no growth

## 要 旨

茸類菌糸は尿酸生成菌であることを知ったが、その機作に就て2, 3の基礎的な実験を試みた。

1. シイタケ菌は培養中に尿酸を大量に蓄積するが、これはマッシュルームやナメコ菌に比較して尿酸分解力が小さい事に原因する。
2. 糖からの有機酸の生成はシイタケが尿酸をよく生成するに反してマッシュルーム、ナメコ菌ではコハク酸を主として生成した。
3. 茸類は種々の有機酸から尿酸を生成するがシイタケは特に酢酸からの尿酸の生成量が多く、酢酸→尿酸の経路の存在が推定された。
4. シイタケ菌の尿酸生成の条件は pH が微酸性より中性に近づく程、糖濃度は1%程度、糖源としてはグルコース、フラクトースが秀れていた。

本研究の要旨は日本菌学会大会に於て1965 4, 5 に発表した。

## 文 献

- 1) Nord, F.F, and Vitucci, J.C, 1947 On the mechanism of enzyme action. Arch. Biochim. 14, 228-241
- 2) Gedrg de Stevcns, Robert M. DeBaun and F.F. Nord 1947 On the mechanism of enzyme action. Arch. Biochem 14, 304-313