

第3章 *Grifola gargal* の香気成分

1. 目的

G. gargal 子実体は、前述のように、杏仁やアーモンドのような芳香があるが、培養菌糸体からも同様の強い芳香が発生する。このことからバイオ技術を利用して *G. gargal* 菌糸体を工業的に培養し、得られた香気成分を天然香料として利用することも可能と考えられる。また、独特の芳香を放つ *G. gargal* の子実体および培養菌糸体は食品としての利用も期待されることから、このきのこを栽培するための培養条件を確立する必要がある。各種きのこの培養特性については多くの検討がなされているが、*G. gargal* に関しては菌糸成長における pH、および温度の影響を検討した報告⁵⁾が見られる程度で、培養菌糸体の栄養特性についての報告は見られない。

そこで、本研究では、*G. gargal* 子実体および培養菌糸体が放つ香気成分を明らかにし、さらに、*G. gargal* を液体培養するための培養条件を検討した上で、*G. gargal* の菌糸体成長とベンズアルデヒドの生成との関係を検討した。また、ベンズアルデヒドの生合成に関与と思われる化合物およびその関連化合物を培地に添加したさいの、*G. gargal* のベンズアルデヒド生成に及ぼす影響についても検討した。

2. 材料および方法

2.1 供試菌

G. gargal の供試菌は、株式会社 岩出菌学研究所保有の菌株のうち、IWADE-GG010 を用い、PGYA 培地で培養し、種菌として実験に供した。

2.2 菌床栽培による子実体の形成

G. gargal の子実体形成は以下の方法により行なった。ブナ木粉とフスマを 4:1 の割合で混合し、水を加えて含水率を約 65% に調整後、その 2.5 kg をポリプロピレン製栽培袋に充填し、121℃で 120 分間滅菌した。これに予め培養しておいた種菌を接種して、20℃の培養室で 60 日間培養し、菌糸体を菌床培地全体に蔓延させた後に温度 10℃、湿度 90%RH 以上、照射下の発生室で子実体を発生させた。

2.3 子実体および培養菌糸体の香気成分の採取

菌床栽培によって得られた *G. gargal* の子実体を細かく刻んでビニール袋に入れ、その気相部分をアスピレーターで吸引して、カラムに詰めた活性炭(和光純薬工業株式会社 クロマトグラム用)に吸着させた。その活性炭カラムからエーテルを用いて吸着した成分を溶出させ、得られたエーテル溶液をガスクロマトグラフィーで分析した。

前培養と同様に PGYA 培地で培養した *G. gargal* 菌糸体を寒天培地ごとエーテルで抽出し、

得られたエーテル抽出液をガスクロマトグラフィーで分析した。

2.4 GC および GC-MS 分析

子実体および培養菌糸体の香気成分はキャピラリーカラム(DB-1;30 m×0.25 mm, J&W Science 社製)を用いてガスクロマトグラフィー(GL18A, 島津製作所製)分析を行った。昇温プログラムは 40°Cで 5 分間保持した後, 200°Cまで 10°C/分で昇温, 200°Cで 20 分間保持した。インジェクションおよび検出器(FID)温度はいずれも 250°Cに設定した。ガスクロマトグラフィー/マススペクトリー(G-3000, 日立)についても DB-1 キャピラリーカラム(50 m×0.25 mm)を用いて, GC 分析と同じ条件で分析を行なった。

2.5 培養条件

培養温度の影響:PGY 液体培地 10m ℓ を 100m ℓ 容三角フラスコに入れ, 121°Cで 20 分間オートクレーブした。これに供試菌を接種し, 10°Cから 27°Cまでの各培養温度で, 暗黒下で 14 日間静置培養した。培養後, 菌糸体をろ過し, 蒸留水で充分洗浄して, 105°Cで 24 時間乾燥させ, その重量を測定した。試料は各条件に対して 5 個とし, その平均を測定値とした。

初発 pH の影響:PGY 液体培地の初発 pH を 1M の HCl あるいは NaOH で, 3.5~7.5 までの範囲に変化させて滅菌後, 供試菌を接種し, 20°Cの暗黒下で 14 日間静置培養した。培養後, ろ過した菌糸体を蒸留水で充分洗浄し, 105°Cで 24 時間乾燥させ, その重量を測定した。

試料は各条件に対して 5 個とし、その平均を測定値とした。

2.6 栄養分の添加

炭素源:Czapek 培地(スクロース 3%, 硝酸ナトリウム 0.2%, 硫酸マグネシウム七水和物 0.05%, 塩化カリウム 0.05%)のスクロースの代わりに五炭糖のキシロースとアラビノース, 六炭糖のグルコース, マンノースとガラクトース, 二糖類のマルトース, トレハロースとセロビオースの 8種類の炭素源をそれぞれ3%になるように添加して, 初発 pH を 4.5 に調整し, 20°Cで 42 日間静置培養した。培養後は上述の方法で菌糸体乾燥重量を測定した。

窒素源:Czapek 培地の硝酸ナトリウムの代わりに無機態窒素の硝酸カリウム, リン酸アンモニウムと硫酸アンモニウム, 有機態窒素のペプトン, 酵母エキス, マルトエキス, アスパラギン, および L-フェニルアラニンの合計8種類の窒素源をそれぞれ 0.2%になるように添加して, 初発 pH を 4.5 に調整し, 20°Cで 42 日間静置培養した。培養後に菌糸体乾燥重量を測定した。

2.7 菌糸体の成長とベンズアルデヒドの生成

PGY 液体培地 10mℓを 100mℓ容三角フラスコに入れ, 121°Cで 20 分間, オートクレーブで滅菌した。これに供試菌を接種し, 20°Cの暗黒下で 56 日間培養した。培養開始後7日間毎に菌糸体乾燥重量とベンズアルデヒド生成量を測定した。

ベンズアルデヒド濃度の測定:一定期間培養後三角フラスコ内にエーテル 3mℓ, 内部標準

として 3mg/mlの安息香酸メチル 0.3mlを加え、三角フラスコを軽く攪拌した。その後、上澄みを遠沈管にとり5分間遠心分離し、エーテル層をGC分析し、検量線によりベンズアルデヒド濃度を求めた。

2.8 各種化合物の添加

添加物としてL-フェニルアラニン、ベンズアルデヒド、ケイ皮酸、安息香酸、L-アスパラギン、ケイ皮酸メチル、ベンジル酸およびシンナムアルデヒドの8種類の化合物(いずれも和光純薬製;特級)を用いた。L-フェニルアラニンおよびL-アスパラギンは加熱した蒸留水に、ケイ皮酸、安息香酸、ケイ皮酸メチル、ベンジル酸およびシンナムアルデヒドはジメチルスルホキシド(DMSO)に、それぞれ添加後の培地内の濃度が1mMとなるように溶解させた。これらをオートクレーブであらかじめ滅菌した10mlのPGY液体培地に0.1mlずつ添加した後、供試菌を接種し、20°C、暗黒下で28日間静置培養した。培養後の菌糸体重量及びベンズアルデヒド濃度を測定した。

3. 結果および考察

3.1 子実体の香気成分

本実験で菌床栽培によって形成させた *G. gargal* 子実体は、チリで自然に発生した野生きのこと同様に強い杏仁様の芳香を放っていた。そこで、この香気成分を明らかにするために、子実体から発生する揮発性成分を活性炭に吸着させ、エーテルで溶出したものを GC、および GC-MS 分析に供試した。GC 分析の結果、リテンションタイム約 9.3 分に大きなピークが 1 本現れたが、それ以外には特に目立つピークは検出されなかった (Fig. 3-1-A)。このことにより、*G. gargal* 香気は単純な成分組成からなるものと推定された。*G. gargal* 子実体の香りはベンズアルデヒド臭に類似していることから、ベンズアルデヒド標品の GC 分析を行い、*G. gargal* の香気成分と比較した。その結果、両ピークのリテンションタイムは良く一致したため、*G. gargal* 子実体の香気成分の主体はベンズアルデヒドではないかと考えられた (Fig. 3-1-C)。そこで、GC-MS 分析を行った結果、*G. gargal* 子実体の香気成分の分子量は 106 で、標品ベンズアルデヒドと一致し、また開裂パターンも両者でほぼ一致したことから (Fig. 3-2-A, -C)、*G. gargal* 子実体の香気成分をベンズアルデヒドと同定した。

きのこ子実体の香気成分には C_8 系脂肪酸アルコール、アルデヒド、ケトンなどが豊富に含まれており、新鮮なきこの主な香気成分は C_8 化合物の 1-octen-3-ol であることが知られている

⁸³⁾ この 1-octen-3-ol は一般的にきのこ臭といわれるもので、多くのきのこに含まれている香気成分であるが、*G. gargal* 子実体の揮発性成分中には検出されず、仮に含まれていたとしても

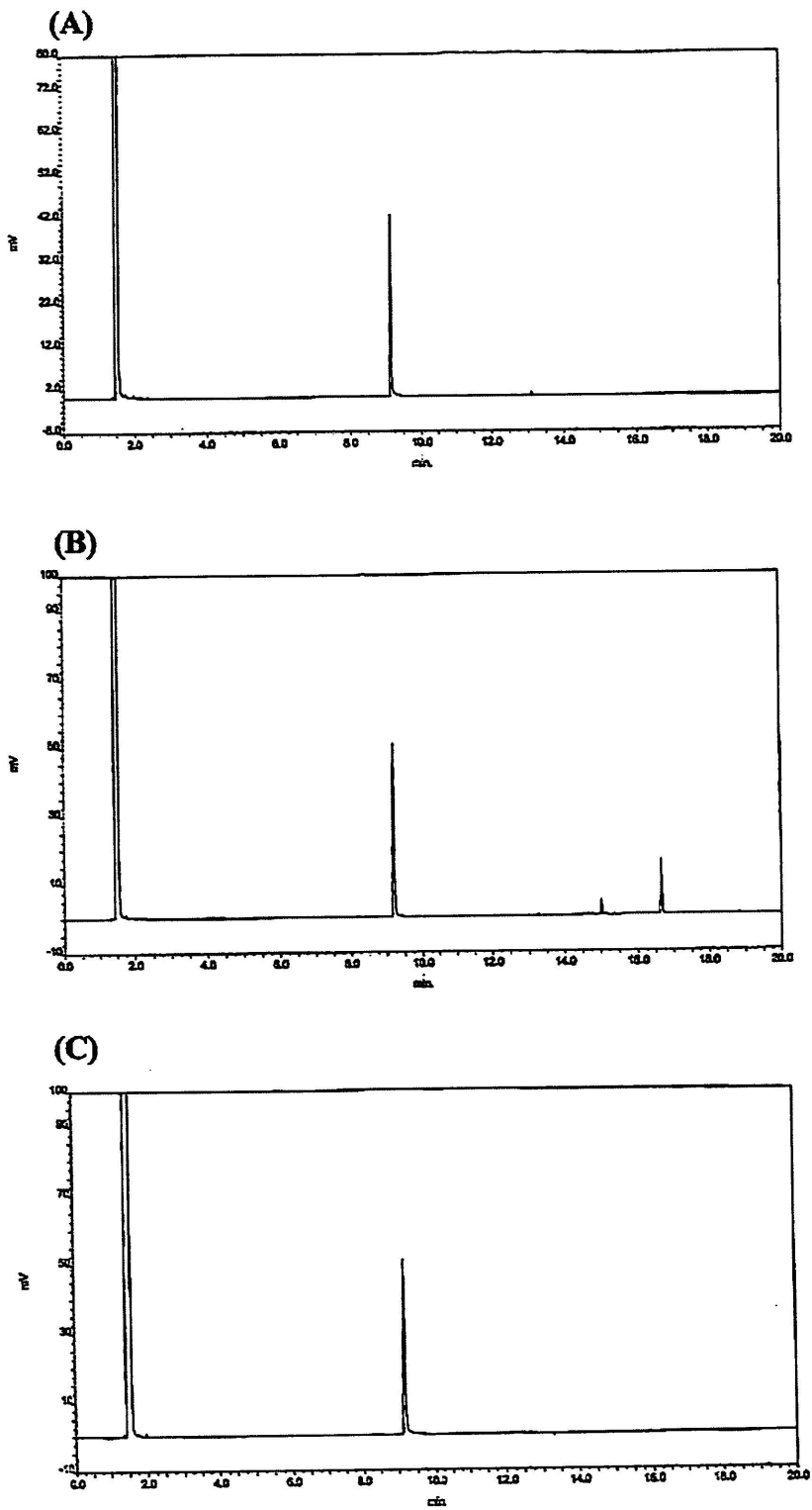
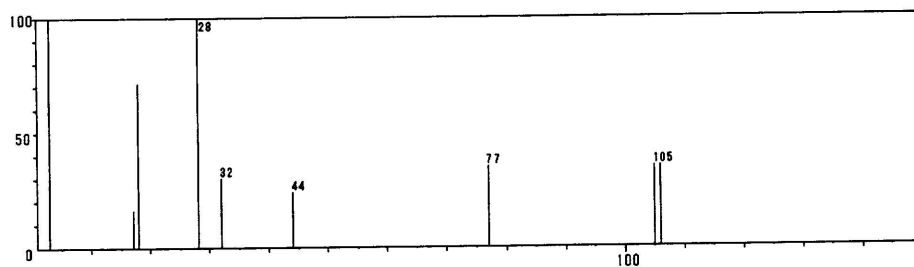
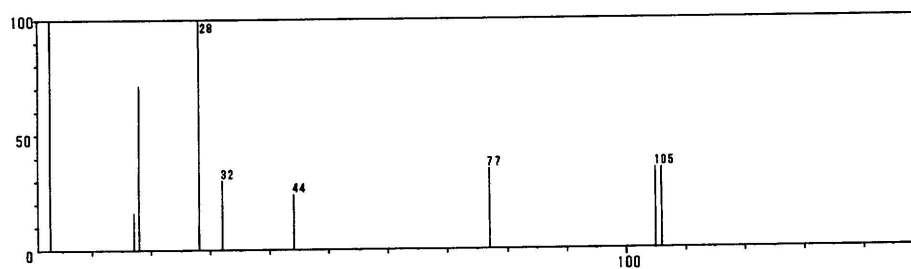


Fig.3-1 Gas chromatograms of the flavor from the fruit body of *G.gargal* (A), the ether extract from the mycelia of *G. gargal* (B) and authentic benzaldehyde (C).

(A)



(B)



(C)

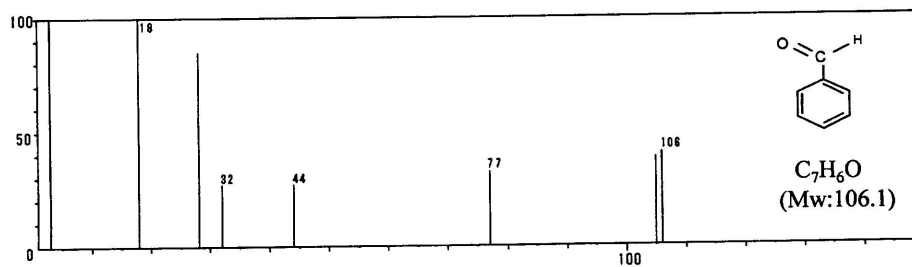


Fig.3-2 Mass spectra of the main flavor compound from the fruit body (A) and the mycelia (B) of *G. gargal*, and authentic benzaldehyde (C).

ベンズアルデヒドの含有量に比べると極微量であると考えられる。一方、多くのきのこの香気成分としてもベンズアルデヒドは検出されているが¹¹⁶⁾、それは香気の一成分に過ぎず、*G. gargal* のようにベンズアルデヒドのみを多量に生成する食用きのこについての報告は見あたらない。

3.2 菌糸体の香気成分

G. gargal 子実体の香気成分の主体はベンズアルデヒドであることが判明したが、子実体から分離し培養した菌糸体では、さらに強い杏仁様の香りがした。このため、PGYA 培地で培養した菌糸体を培地ごとエーテルで抽出し、子実体の香気成分と同様に GC、および GC-MS 分析を行なった。その結果、培養菌糸体のエーテル抽出液からも子実体の場合とほぼ同じリテンションタイムにピークが見られ (**Fig. 3-1-B**)、GC-MS 分析により分子量は 106 で、スペクトルパターンもベンズアルデヒド標品とほぼ一致することが分かった (**Fig. 3-2-B**)。このことから、培養菌糸体の香気成分の主体もベンズアルデヒドであることが判明した。ベンズアルデヒドを培養中に生成する担子菌は数多く報告されており⁸³⁾、その中でも *Polyporus tuberaster*¹¹⁷⁾、*Bjerkandera adusta*¹¹⁸⁾、*P. cinnabarium*⁸⁴⁾ などは比較的多くのベンズアルデヒドを生成していると報告されている。

ベンズアルデヒドは食品用香料や食品添加物等に使用される安息香酸や医薬品の原料等に用いられており¹¹⁹⁾、バニリンに次いで生産量の多いフレーバーでもある。その多くは化学合

成品であり、天然物はアーモンド、桃、桜桃等の核から精製され、大変貴重であることから、ベンズアルデヒドを培養中に生成する担子菌 *P. cinnabarium* や *Ischnoderma benzoinum* 等を利用して、工業的に天然のベンズアルデヒド生産する研究も盛んに行なわれている。しかし、これらの担子菌は食用ではなく、ベンズアルデヒド以外にもベンジルアルコール等の香気成分も同時に生成する。このため、食用担子菌であり、ベンズアルデヒドを生成する *G. gargal* 菌糸体を工業的に培養することは、天然香料の工業的生産とともに、杏仁の香りを持つ菌糸体の食品としての利用という側面からも有用性があると考えられる。

3.3 培養温度と pH の菌糸成長に及ぼす影響

培養温度の *G. gargal* 菌糸体成長に及ぼす影響を Fig. 3-3 に示す。最適培養温度は 20°C で、10°C および 27°C ではほとんど成長せず、15°C～25°C の範囲で菌糸成長が良いという結果が得られた。同属のマイタケの最適培養温度は 24°C～27°C との報告¹²⁰⁾ があり、マイタケよりもより低温を好む菌であることが分かる。また、Postemky ら⁸⁸⁾ の報告でも *G. gargal* は 24°C では成長せず、低い温度である 18°C での成長が良いとの報告があり、一般的な食用担子菌(最適温度 20～25°C)¹²¹⁾ よりもやや低い温度で培養する必要があると考えられる。

G. gargal 菌糸体成長に及ぼす初発 pH の影響を Fig. 3-4 に示す。初発 pH 3.5～7.5 の範囲で生育が可能であり、酸性側での成長が比較的良かった。一般にきのこの菌糸体成長における最適 pH は弱酸性(5.0～6.0)であることが報告されている¹²²⁾。しかし、*G. gargal* に関しては

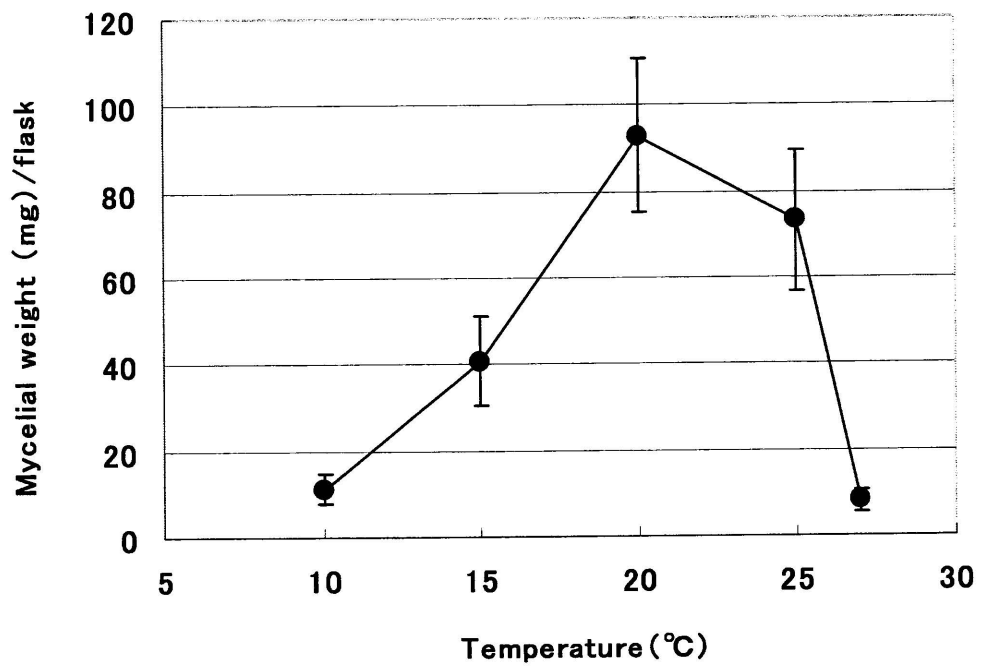


Fig.3-3 Influence of temperature on the mycelial growth of *G.gargal*

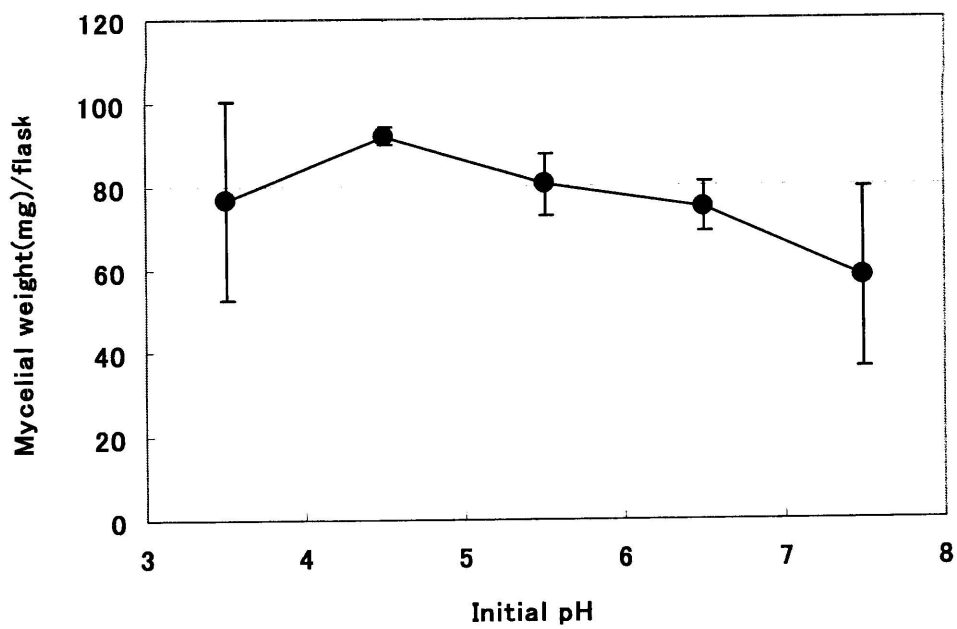


Fig.3-4 Influence of initial pH of media on mycelial growth of *G. gargal*

pH4.0～6.0 の範囲で成長が良好であり, pH4.5 のときに菌糸体成長が最大となった. この結果は, 同属のマイタケ¹²³⁾ やヒダナシタケ目であるカバノアナタケ¹²¹⁾ と同様であり, Postemky らの結果ともほぼ一致した.

3.4 栄養源の菌糸体成長に及ぼす効果

G. gargal 菌糸体成長に及ぼす炭素源の影響を検討するために, Czapek 培地における培養 42 日目の菌糸体重量(乾燥重量)を Growth index1.0 として, 種々の炭素源を添加した培地で得られた菌糸体重量と比較した結果を Fig. 3-5 に示す. 対照の Czapek 培地における *G. gargal* 菌糸体の成長は非常に遅く, 菌叢もきわめて薄かったが, スクロースを他の炭素源に変更することにより, その成長はかなり改善された. 単糖類ではグルコース, マンノースの六炭糖で良好な成長を示し, 二糖類のマルトースもグルコースの 2/3 程度の菌糸体重量が得られた. これらの傾向は同属のマイタケ¹²³⁾ とも類似している. *G. gargal* はマイタケと同様に五炭糖を利用しにくいことも判明した.

G. gargal 菌糸体成長に及ぼす窒素源の影響は, 炭素源の場合と同様に Czapek 培地における培養 42 日目の菌糸体重量を Growth Index1.0 とし, 他の培地と相対的に比較した. その結果を Fig. 3-6 に示す. 有機態窒素の酵母エキスとペプトンで高い菌糸体重量が得られた. 無機態窒素での菌糸体重量は有機態窒素よりも少なく, この傾向は一般的な食用担子菌の場合と同様であった.

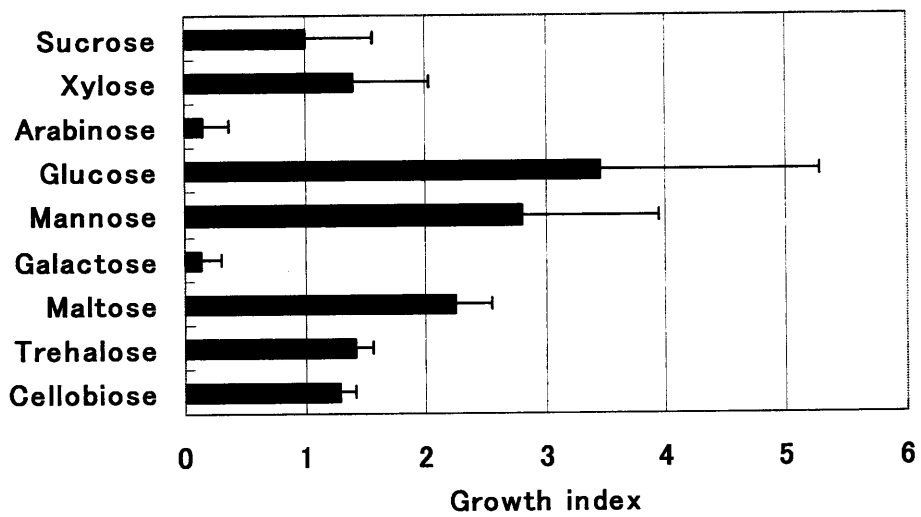


Fig.3-5 The effects of various carbon sources on mycelial growth of *G.gargal*

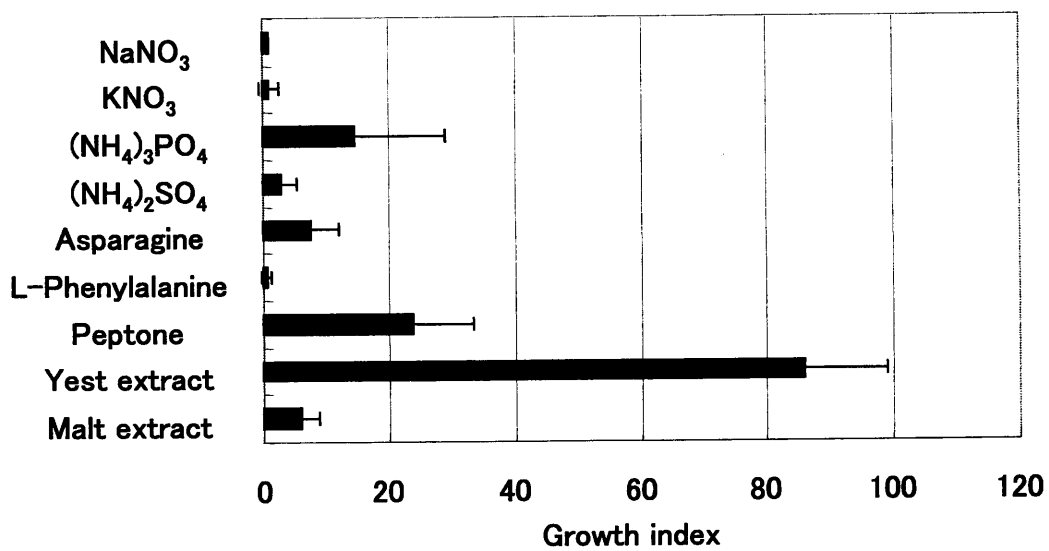


Fig.3-6 The effects of various nitrogen sources on mycelial growth of *G.gargal*

これらの栄養源の *G. gargal* 菌糸体成長に及ぼす影響を検討した結果、炭素源としてグルコースが、窒素源として酵母エキスとペプトンが最適と考えられた。これらの成分組成からなる代表的な培地は、本研究で *G. gargal* 種菌の培養に用いたペプトン・グルコース・酵母エキス培地 (PGY 培地) であり、ポテトエキス・グルコース培地 (PG 培地) や濱田培地などと同様、担子菌の培養に用いられる汎用培地の1つである。 *G. gargal* の栄養特性は一般的担子菌のきのこと大差ないと考えられ、とくに著しい特徴は見られなかった。したがって、今後は pH を 4.5 に調整した PGY 培地を用いた 20℃、暗黒下での静置培養を *G. gargal* の標準培養条件として用いることにした。

3.5 菌糸成長と香気成分の生成

PGY 培地における菌糸体重量およびベンズアルデヒド生成量の培養期間中の変化を **Fig. 3-7** に示す。菌糸体成長は7日間の誘導期を経て急速成長期 (Linear growth phase) に入った後、21日目ごろから定常期に入り、培養56日目までほぼ一定となった。一方、ベンズアルデヒドは菌糸体重量の急速な増加が始まった約1週間後にその生成が始まり、菌糸体重量が安定した培養21日目以降急激にその生成量が増加した。培養35日目にはベンズアルデヒドは最大値 2.44 mg/culture に達したが、それ以後も急激に減少することなく、培養52日目までほぼその量を維持した。このことから *G. gargal* はベンズアルデヒドを二次代謝物として生成したと考えられた。

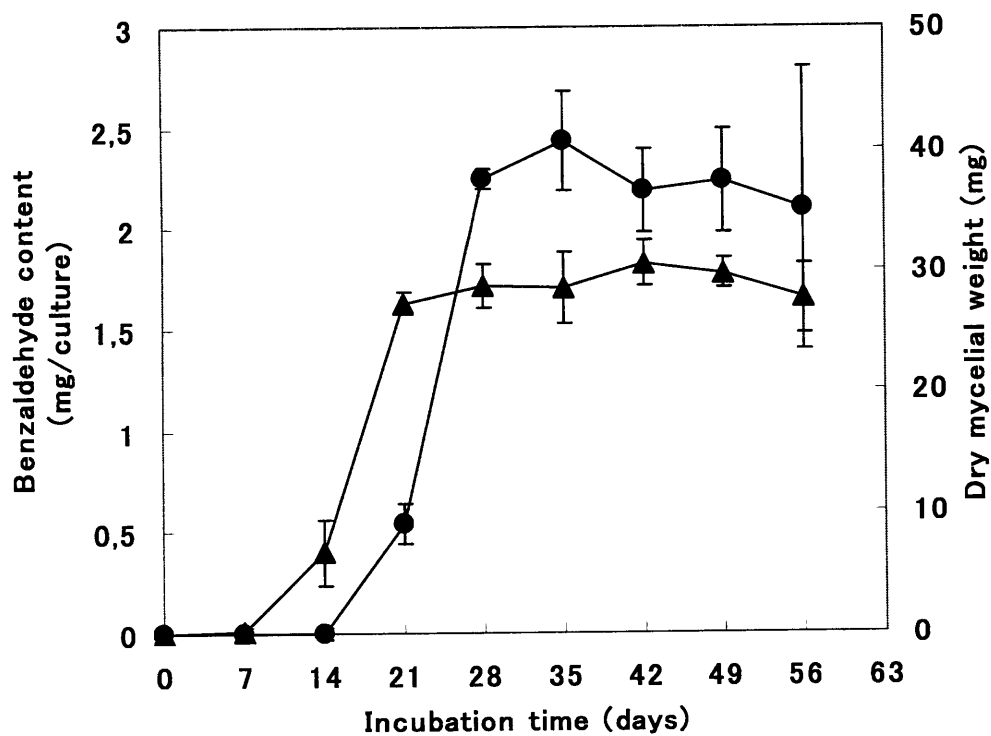


Fig.3-7 Time course of mycelial growth and benzaldehyde accumulation of *G.gargal* on PGY media.

Symbols: closed circles, dry mycelial weight; closed triangles, amount of benzaldehyde.

アルデヒド基を持つベンズアルデヒドは比較的強い抗菌活性を示すことが知られている²⁾。

また、食用担子菌である *P. ostreatus* から香り成分として、*p*-アニスアルデヒド (*p*-anisaldehyde) および 3-クロロ-*p*-アニスアルデヒド(3-chloro-*p*-anisaldehyde)が検出されるが、これらの香り成分は抗菌活性を持つとの報告⁸⁵⁾もある。これらのことから *G. gargal* も他の微生物の侵入を防ぐために、二次代謝産物として抗菌作用を持つベンズアルデヒドを生成し、自らの生体防御機能を高めているのではないかと思われる。

一方、培養 28 日目以降のベンズアルデヒド生成量は急速に減少することがなく、菌糸成長が停止した後は安定的に検出された。近年、担子菌 *P. cinnabarium* を培養することにより天然ベンズアルデヒドを工業的に生産する研究も進められているが、*G. gargal* が生成するベンズアルデヒドも天然香料として利用できる可能性が示唆された。

3.6 各種添加物の菌糸体成長と香り成分生成に及ぼす影響

8 種類の化合物の菌糸成長に及ぼす影響を Fig. 3-8 に示す。培養初期には *L*-フェニルアラニンと *L*-アスパラギンを添加した培地で菌糸成長が促進され、安息香酸を添加した培地では逆に菌叢が薄く、やや成長が遅いように思われたが、培養 20 日目以降にはコントロールと比較して大きな差は認められなかった。ケイ皮酸メチルを添加した培地では培養 20 日以降にわずかに菌糸が成長したが、ケイ皮酸とシナナムアルデヒドでは、ほとんど成長はみられなかった。ベンジル酸を添加した培地ではコントロールよりやや成長が遅かったが、厚みのある菌層を形

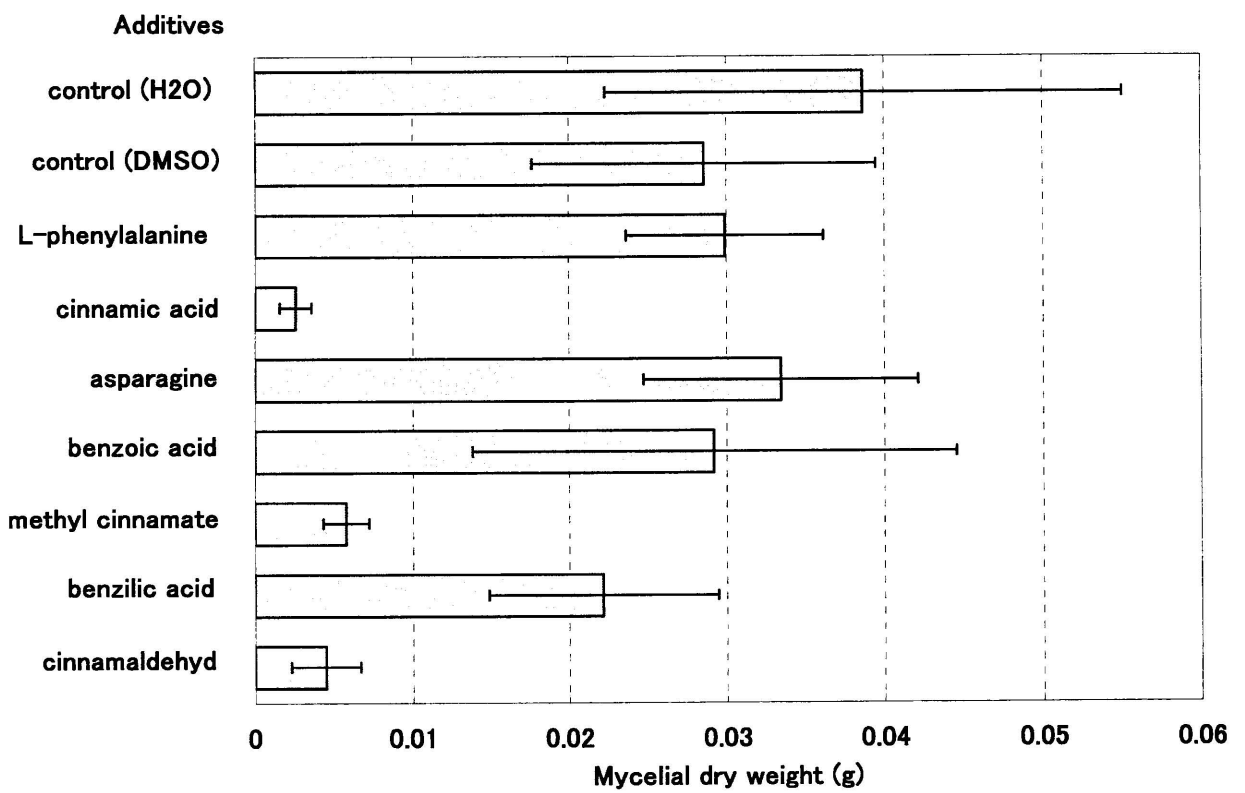


Fig.3-8 The effects of additives on the mycelial growth of *G.gargal*

成した。

各種添加物が *G. gargal* のベンズアルデヒド生成量(mg/培地)に及ぼす影響を Fig. 3-9 に示す。両者のコントロール間に差が認められないことから、蒸留水と DMSO の添加によるベンズアルデヒド生成への影響はないと考えられる。ベンズアルデヒド生成量は、ベンジル酸、安息香酸、L-アスパラギン、L-フェニルアラニンの順で増加した。ケイ皮酸、ケイ皮酸メチルおよびシナムアルデヒドを添加した培地では、*G. gargal* によるベンズアルデヒドの生成がコントロールよりかなり減少した。

菌体乾重量当たりのベンズアルデヒド生成量を Fig. 3-10 に示す。菌体乾重量当たりのベンズアルデヒド生成量はベンジル酸の添加でコントロールよりも約 3 倍、安息香酸、L-フェニルアラニンおよび L-アスパラギンにおいても約 2 倍という著しい増加が認められた。一方、ケイ皮酸とシナムアルデヒドを添加した培地では菌体乾重量当たりでもベンズアルデヒドの生成量は非常に低かった。

Lapadatescu ら¹²⁴⁾ は、芳香族代謝物の生合成を L-フェニルアラニンを添加した液体培地で培養した白色腐朽菌 *Bjerkandera adusta* を用いて検討している。培養液から検出同定された主要な芳香族化合物はベンジルアルコール、ベンズアルデヒドおよび安息香酸であった。彼らは得られた結果を基に、Fig. 3-11 に示す L-フェニルアラニンから芳香族代謝物への新しい代謝スキームを提案している。まず、L-フェニルアラニンがフェニルアラニンアンモニアアールゼによって脱アミノ化されてケイヒ酸が生成し、これがさらに種々の芳香族酸を経て、ベンズアルデ

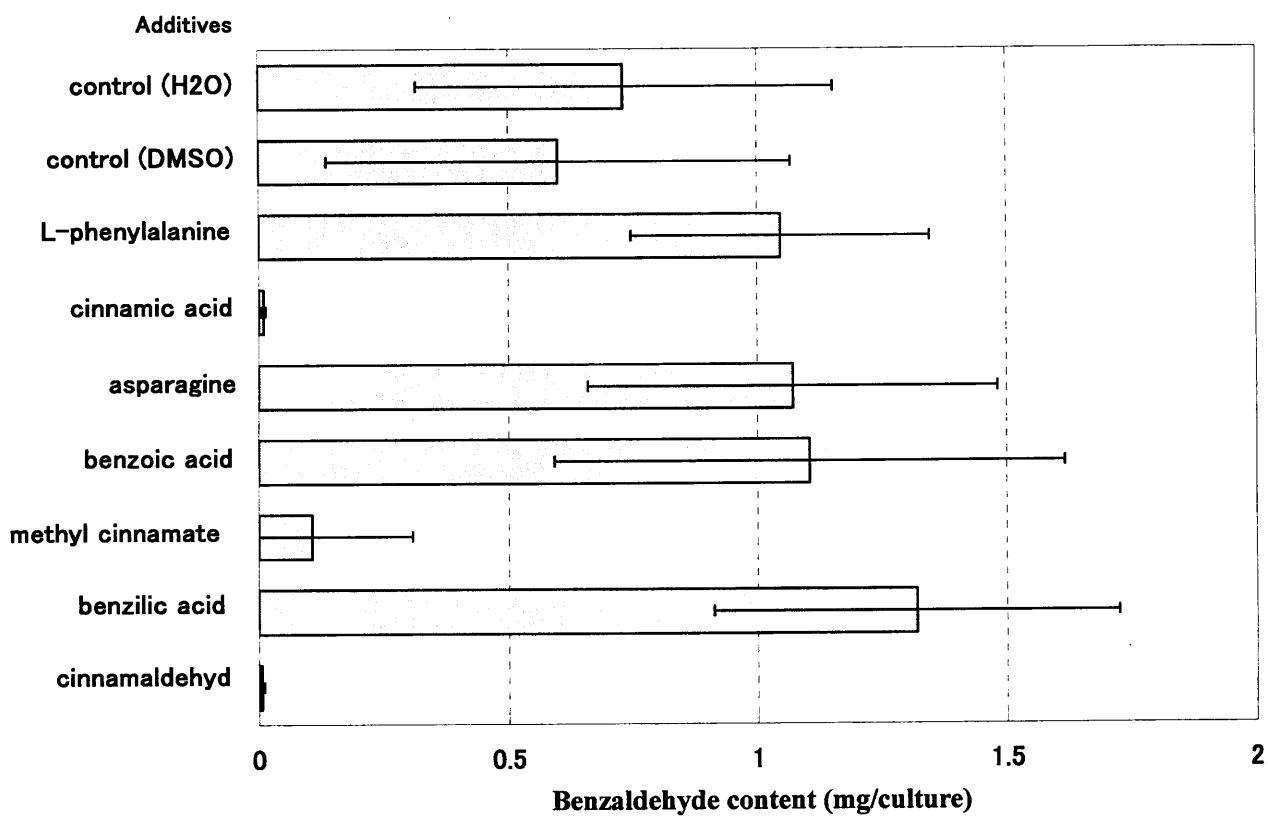


Fig.3-9 The effects of additives on the benzaldehyde formation by *G.gargal*

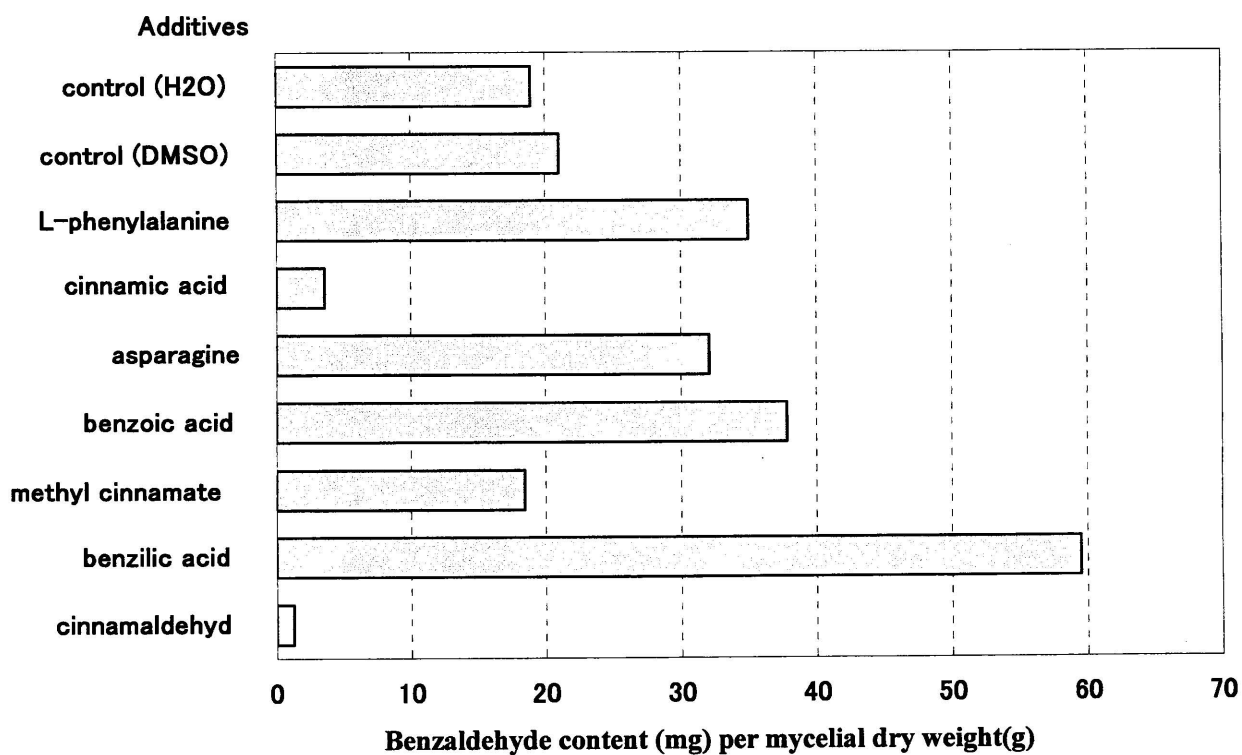


Fig. 3-10 The yield of benzaldehyde per mycelial weight

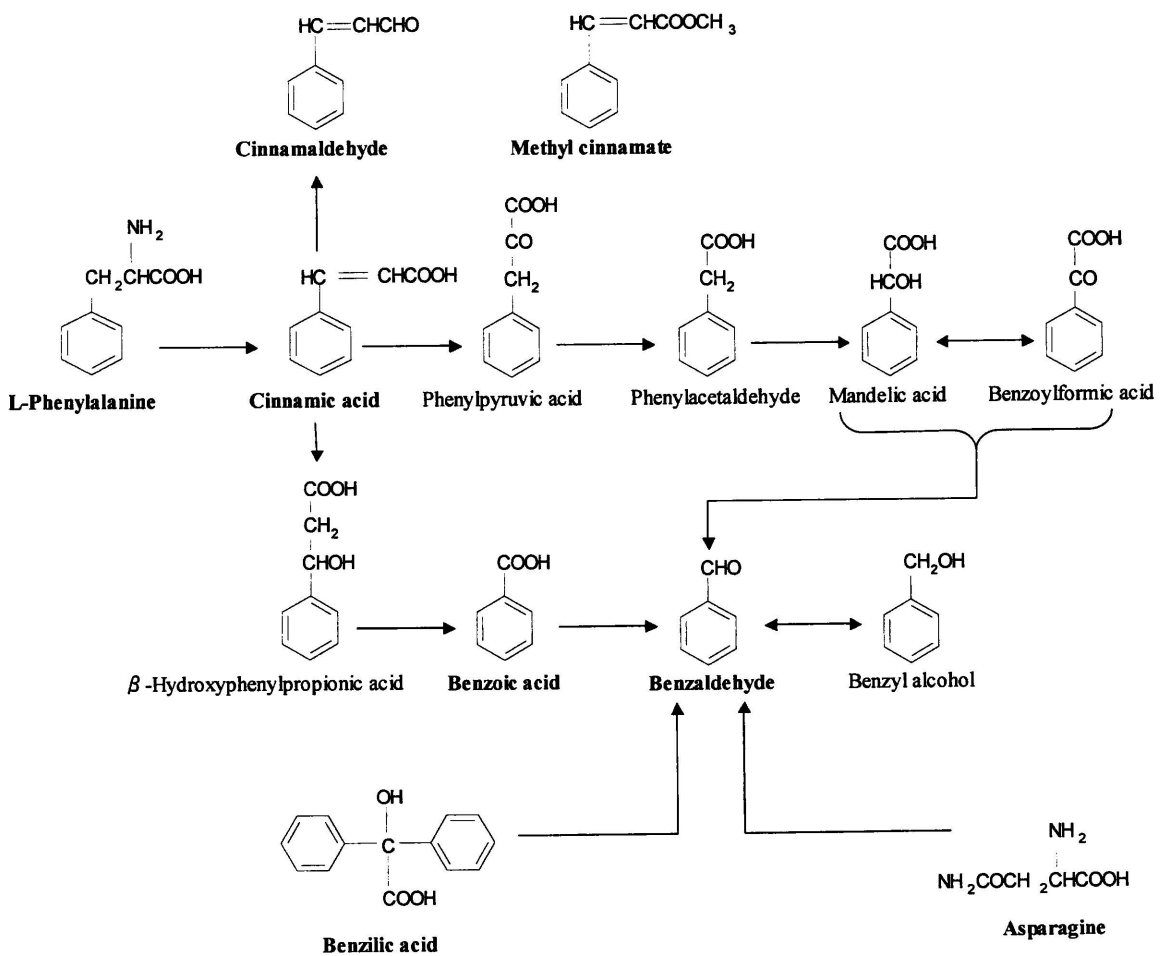


Fig.3-11 Estimated pathway for degradation of L-phenylalanine

ヒド、ベンジルアルコールおよび安息香酸へと変換される。これとは別に、ケイ皮酸がβ酸化を経て安息香酸に変換される経路の存在も確認している。出発物質のL-フェニルアラニン、中間代謝生成物と考えられるケイヒ酸と安息香酸を培地に添加したところ、L-フェニルアラニンと安息香酸は予想通り *G. gargal* によるベンズアルデヒドの生成を促進した。しかし、彼らが提案する代謝経路では分岐点となるケイヒ酸により *G. gargal* の菌糸成長は著しく阻害され、ベンズアルデヒドの生成も激減した。

一方、L-フェニルアラニンからケイヒ酸を経由せず、フェニルピルビン酸、フェニルアセトアルデヒドを経由してベンズアルデヒドに至る経路が、*Ischnoderma benzoinum* ATCC 26314¹²⁵⁾⁻¹²⁷⁾, *Bjerkandera adusta* CBS595.79¹¹⁸⁾, *Polyporus tuberaster* K2606¹¹⁷⁾, *I. benzoinum* CBS 311.29 などの菌株について Lomascolo ら⁸⁴⁾ によって紹介されている。*G. gargal* の L-フェニルアラニンからベンズアルデヒドに至る生合成経路については不明であるが、ケイヒ酸の添加によって菌糸成長が著しく阻害されることを考慮すれば、ケイヒ酸を経由しない後者の経路を経由している可能性もあると思われる。また彼らは、数種の担子菌によるベンズアルデヒド生成の前駆体としてフェニルアラニン、安息香酸、アスパラギンなどをあげている。*G. gargal* もこれら3種の化合物の添加によってベンズアルデヒドの生成が促進された。一般にベンジル酸の化学合成にはベンズアルデヒドが用いられることから、試みにベンジル酸を培地に添加したところ、上記のように *G. gargal* のベンズアルデヒドの生成が著しく促進された。しかし、ベンジル酸 1 モルからベンズアルデヒドが 2 モル生成することを考えれば、ベンズアルデヒドの生成率としては安息香酸と大

差ないように見える。

今回検討した化合物のうち、*G gargal* のベンズアルデヒドの生成促進効果が認められたフェニルアラニンやアスパラギンは一般的なアミノ酸であり、多くの食物に含まれている。したがって、今後は、これらのアミノ酸を豊富に含む食品産業廃棄物などを利用して、*G gargal* による天然香料ベンズアルデヒドの大量生産の実用化を目指したいと考えている。

4. まとめ

独特の杏仁様の香りを持つチリ産食用きのこ *G. gargal* の子実体および菌糸体の香気成分を GC および GC-MS で分析した結果、いずれもベンズアルデヒドが主成分として確認された。

G. gargal を液体培養するための培養条件を検討したところ、ペプトン・グルコース・酵母エキス (PGY) 液体培地を用い、初発 pH を 4.5 に調整し、20℃ で培養したときに、良好な菌糸体成長が得られた。この培養条件下で *G. gargal* の菌糸体成長とベンズアルデヒドの生成量との関係を検討した結果、ベンズアルデヒドは菌糸体成長が定常期に入った後急激に増加し、その後もほぼ一定に維持された。さらに、アスパラギン、ベンジル酸や安息香酸などを添加することによりベンズアルデヒドの収量が 2 倍から 3 倍に増加することを明らかにした。これらのことから、*G. gargal* を新規の香りの良い食用きのことして生産するだけでなく、近年香料として需要が非常に高くかつ高価な天然ベンズアルデヒドの工業的生産に用いることも可能と考えられた。