

# 菌類の構成糖に関する生化学的研究 III

—*Rhizopus delemar* および *Russula pseudodelica* の  
chitin について—

藤井昭治・瓦谷光男・志賀 博

SHOJI FUJII, MITSUO KAWARADANI and HIROSHI SHIGA

Biochemical studies on carbohydrates of fungi III.

—chitin of *Rhizopus delemar* and of *Russula pseudodelica*—

**要旨**：*Rhizopus delemar* はその菌糸中の chitin 含有量が培養中菌糸の増殖と共に徐々に増加する培養4～7日頃より菌糸の総重量（乾燥重量）は減少しはじめ、それと共に chitin 総量の増加率が低下する。V-8 juice を培養基として用いた場合、chitin 総量は対照に比し24倍にも増加した。*Rhizopus delemar* からは純粋な chitosan が分離出来たが *Russula pseudodelica* の子実体からの chitosan 分画は糖蛋白様物質の除去が困難であり、これらの事から chitin の存在状態の多様性がうかがえる。

## 緒 言

chitin は 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose が  $\beta$  (1 → 4) 結合で結合した直鎖の多糖体であり、節足動物の外殻や菌類の cell wall 中に広く分布している。或種の *Copepoda* だけで毎年  $7\sim 8 \times 10^8$  トンの chitin を生成しているともいわれ<sup>1)</sup>、全世界の chitin の生産総量はこの値をはるかに上廻るものであり、cellulose の年間世界推定生産量  $10^{11}$  トンにつづいて多い有機資源であると考えられる。しかしながら cellulose や starch に比して現在の段階ではその大部分が殆んど利用されていない。従って人類に残された未利用有機資源としては最大のものと云えよう。最近この未利用資源をめぐって種々論議され、chitin 或はその脱アセチル化物 chitosan およびその誘導体の有用性が報告され<sup>2)</sup> 又1977年4月第1回の chitin, chitosan の国際学会がボストンで開催されている<sup>3)</sup>。

現在 chitin の原料としては crabs や shrimps の殻が最も利用し易い形であるが今後需要が増力する場合、

菌の培養を考慮する必要があり、本論文はこの点に基いて chitin の生産能およびその存在形態について予備的な検討を行った。

Blumenthal は振とうフラスコ培養8日間の生育における25種の菌類の chitin 含有量を検討し<sup>4)</sup>、菌糸の重量の2.6%から26.2%の範囲であると報告している。通常菌類は発育中、菌糸の総重量、炭水化物の含有量等変化し続ける事が知られているので<sup>5)</sup> chitin の最大収量为目标とする場合、発育期間中、菌糸の総重量と chitin 含有量の2点から検討する必要がある。まず12種の菌を用いて検討した結果 (Table 1), *Pseudocoprinus* の一種および *Rhizopus delemar* に chitin 含有量が多い事が判明した。培養法による chitin の生産に野菜の廃棄物を利用することを想定して、培養実験としては *Rhizopus delemar* を用いた実験結果を報告する。glucosamine 含有量から chitin 含有量を計算した結果も報告されているが<sup>4)</sup>、生体内における chitin の存在状態は複雑であって chitin の分離を問題にする場合は chitin の量的な観点だけでなく、純

Table. 1. Chitin content of various fungi.

Fungi	Chitin content* %
<i>Psathyrella candoleona</i>	2.9
<i>Lyophyllum ulmatium</i>	4.1
<i>Oudemasiella sp.</i>	2.1
<i>Oudemasiella sp.</i>	1.9
<i>Coriolus sp.</i>	1.9
<i>Naematoloma fasciculare</i>	5.8
<i>Earliella corrugata</i>	2.8
<i>Agaricus arvensis</i>	4.0
<i>Pseudo coprinus sp.</i>	8.8
<i>Daedela modesta</i>	1.6
<i>Rhizopus delemar</i>	5.2
<i>Mucor circinellaides</i>	3.6

\* in mycerium (7 days culture)

粹な chitin が実際に分離出来るかどうかの検討も必要である。このため *Rhizopus delemar* の菌糸および *Russula pseudodelica* の子実体を用いて chitin の分離を試み、これらを crub shell より分離した chitin と比較検討した。

#### 材料ならびに方法

供試菌は本学農学部農学科第4構座(植物病理学研究室)および農芸化学科第4構座(醱酵生理応用微生物学研究室)より提供されたものである。*Russula pseudodelica* については京都加茂別雷神社(上加茂神社)境内で昭和54年7月20日から25日にかけて採取した子実体を用いた。

*Rhizopus delemar* 等は2種の培養基を用い、20~24°C 140 r.p.m の Rotaly shaker で培養した。培養基Aは蒸留水1l中に sucrose 30g, NaNO<sub>3</sub> 2.0g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0g, KCl 1.5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g, yeast extract 2.0g を含み pH 5.0 に調製したもの(Czapek 培地+yeast extract)。培養基Bは市販の V-8 juice を用いた。

chitin 含有量は、加水分解後アミノ糖を定量し<sup>6)</sup>アミノ糖測定値より計算した。菌培養中の培養液を20秒間ホモジナイザーで処理しそのうち20mlをとって定量用試料とした。まずその20mlを遠心分離し得られた沈殿を蒸留水で洗浄する。ついで100°Cで6時間減圧乾燥して乾燥重量を測定する。子実体については後に述べる如くまず分画し<sup>10)</sup>、夫々各分画を同様100°C 6時間減圧乾燥する。乾燥重量を測定後夫々アミノ糖定量用標品とする。加水分解は12N塩酸で3時間加熱の条件で行う。培養基Bでの場合は、培養基Aの場合

と同様アミノ糖を測定し、その測定値から培養基Bのみのアミノ糖含有量を差引いて計算した。加水分解後まず減圧濃縮して過剰の塩酸を除去し、残渣を水に溶解して Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>型) を通す。ついでこの樹脂を1N塩酸で溶出し溶出液を D-glucosamine 塩酸塩を標準として Elson-Morgan 法で定量する<sup>6)</sup>。

chitosan の分離法としては D. Horton の方法<sup>7)</sup> に従った。*Rhizopus delemar* の場合、乾燥菌体を窒素気流下40%水酸化ナトリウム水溶液で115°C、5時間処理する。253mgの乾燥菌体より約126mgの粗 chitosan が得られる。菌類の cell wall 中に chitin ではないアミノ糖含有多糖体の存在が知られているが<sup>8,9)</sup>、glycoprotein やこれらの多糖体は一般にアルカリ可溶性であり<sup>8)</sup>、40%水酸化ナトリウム処理後の残渣、粗 chitosan 分画へ混入してくる可能性はないと思われる。*Rhizopus delemar* の菌糸の40%水酸化ナトリウム処理残渣を10%酢酸で抽出し、アルカリで中和する所謂再沈澱法で精製してえられた標品は、Crub shell より調製した chitosan<sup>7)</sup> と全く同一の IR-spectrum を示した。

*Russula pseudodelica* の子実体は水洗後、クロロホルム:メタノール1:1を加えてホモジナイザーで均質化し、残渣にさらに50%メタノールを加えて同様処理する。この残渣を Wessel の方法<sup>10)</sup>に従ってまず5%水酸化カリウムで25°C 8時間処理し、濾過後不溶残渣を更に2N水酸化ナトリウム溶液で70~80°Cで1.5時間処理してアルカリ可溶の多糖体を除去する。ついでこの残渣を窒素気流中で40%水酸化ナトリウム溶液で115°C 5時間処理して不溶性残渣(粗 chitosan 分画)を得る。この分画を10%酢酸で抽出し、可溶部を中和すると沈殿を生じ、再沈澱 chitosan 分画とする。これらの重量関係およびアミノ糖含有量より計算した仮の chitin 含有量を表示すれば Table. 2. の様である。

Table. 2. Chitin content of various fractions of fruit body of *Russula pseudodelica*

Fraction	Weight %	Chitin content %
Crude cell wall fraction	100.0	6.6
5% KOH insoluble fraction	43.6	13.1
2N NaOH insoluble fraction	28.3	19.6
40% NaOH insoluble fraction	12.1	24.1
10% HOAc soluble fraction	4.0	50.9

## 結果と考察

Fig. 1. に示すごとく、*Rhizopus delemar* の chitin 含有量は最初の1週間は徐々に増加し、菌糸の cell wall に chitin が蓄積されていく様子がよくわかる。以後或程度まで cell wall 中に chitin が増加するとあとの増加率は最初の1週間に比して少い。chitin 含有量がこの様に増加の傾向を示すのに比して菌糸の重量（乾燥重量）は5日頃迄は増加するが以後は減少の傾向を示す。これは細胞中の cytoplasmic matrix の減少を意味すると考えられる。従って chitin の総量の増加は培養1週間以後は最初の1週間に比して極めて少なく、chitin 生産を目的とする場合、7~10日以後の培養はその意義を失う。V-8 juice を用いた培養では培養4日目ですでに菌体乾燥重量が培養液 20 ml 当り 238mg, chitin 含有量が6%であって chitin 総量が 14.3 mg となり、培養基 A の4日目における chitin 総量 0.6mg に比して24倍の chitin 生産能を示した。

従来 chitin の全合成に対して種々の物質の影響が研究されている。*Saccharomyces cantabrigiensis* に対して glucose, mannose, glycerol の添加が chitin 生産能を増加し<sup>11)</sup>、又マグネシウムイオンが *Mortierella vinacea* の chitin 合成酵素の活性化を促進することが知られている<sup>12)</sup>。しかしこれらは何れも対照に比して

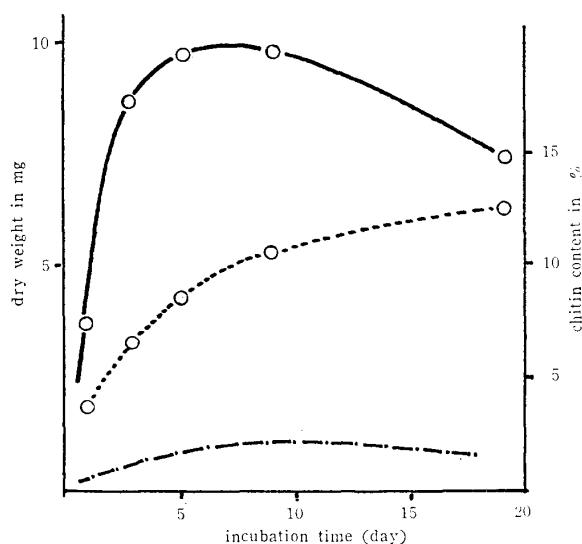


Fig. 1. Changes in dry weight and Chitin content of developing mycelium of *Rhizopus delemar* in 20ml culture.

(—○—), dry weight of mycelium;  
 (---○---), chitin content;  
 (-·-·-○-·-·-), total chitin in mg.

約2倍程度の促進効果にすぎない。V-8 juice 中の如何なる要素がこの様な24倍もの chitin 生産能の増加を示すのかは今後の問題であるが、この結果は chitin 生産能の飛躍的な増加の可能性を示し興味深い。

前述の如くこの *Rhizopus delemar* の菌糸からは完全に蛋白質を含まない Chitosan を分離することが出来た。*Russula pseudodelica* の場合はその子実体の40%水酸化ナトリウム処理残渣をさらに10%酢酸で抽出した。しかしこの所謂 Chitosan 分画ですら約50%の糖蛋白様物質を含む物質であった。この分画を6N-塩酸で空気を遮断した状態で10時間加水分解した後、日立 KLA-5 によるアミノ酸分析の結果、多量の D-glucosamine と serine, glycine および varine 等のアミノ酸を検出した。さらに SE-30によるガスクロストグラフィーで D-glucose の存在を確認した。K. H. Herzog らは昆虫の外殻より分離した Chitin-complex を Papain 或は Pronase で処理して除蛋白し、純粋な Chitin を得ているが<sup>13)</sup>、この方法に準じて Papain, Pronase 処理を試みたが殆んど糖蛋白部分は消化されなかった。

Norman, Peterson は *Aspergillus fischeri* よりアルカリ不溶性の chitin-protein complex を分離し、この分画が更に D-glucose を含有していることを報告している<sup>14)</sup>。この様に chitin は或場合には蛋白質或は papide との結合のみでなく、糖をも含む蛋白様物質と強固な結合での complex を形成し、複雑な構成となっている場合があると考えられる。

以上、菌類における chitin の存在状態は *Rhizopus delemar* の如く容易に精製することが出来る chitin を含有する場合、或は *Russula pseudodelica* の子実体より分離した chitosan 分画の如く糖蛋白様物質と強固に結合した構造等、種々の存在形態があり、純粋な chitin の生産を考える場合にはその生産能のみならず、その存在形態・分離精製法を充分検討しておく必要がある。

謝辞：本研究の一部は昭和51年度文部省科学研究費（特定研究 911414）によって行った。又 *Russula pseudodelica* の子実体の採取に際して御協力いただいた京都上加茂の加茂別雷神社の社務所の方々に謝意を表するものである。

## 文 献

- 1) J. S. Brimacombe and J. M. Webber (1964): "Mucopolysaccharides", Elsevier, P. 18.
- 2) R. A. A. Muzzarelli (1977): "Chitin", Pergamon

- Press.
- 3) R. A. A. Muzzarelli and E. R. Pariser (1978) :  
"Proceedings of 1st International Conference  
on Chitin and Chitosan", MIT, Cambridge Mass.
  - 4) H. J. Blumenthal and S. Roseman (1957) :  
Quantitative Estimation of Chitin in Fungi, *J. Bacteriol.*, **74**, 222-224
  - 5) 藤井昭治・松田久行・松本正男(1979) : 菌類の構成糖に関する生化学的研究 II——ねながのひとよたけの子実体発育時の構成糖の変化について——  
*京府大学報・農*・31号, 137-141
  - 6) 阿武喜美子・瀬野信子 (1968) : "糖質実験法" 蛋白質核酸酵素編集部編, 共立出版, P. 21
  - 7) D. Horton and D. R. Lineback (1965) : "Methods in Carbohydrate Chemistry", Vol. V, Academic Press, P. 403-406
  - 8) P. C. Bardalaye and J. H. Nordin (1976) : Galactosaminogalactan from Cell Wall of *Aspergillus niger*. *J. Bacteriol.*, **125**, 655-669
  - 9) J. J. Mc Cormick, J. C. Blomquist and H. P. Rusch (1970) : Isolation and Characterization of Galactosamine Wall from Spores and Spherules of *Ph ysarum polycephalum*, *J. Bacteriol.*, **104**, 1119-1125
  - 10) J. G. H. Wessels (1965) : Biochemical Process in *Schizophyllum commune*. *Wentia*, **13**, 1-113
  - 11) F. A. Keller and E. Cabib (1971) : Chitin and Yeast Budding, Properties of Chitin Synthetase from *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Biol. Chem.*, **246**, 160-166
  - 12) J. F. Peberdy and P. M. Moor (1975) : Chitin Synthetase in *Mortierella vinacea*, Properties, Cellular Location and Synthesis in Growing Cultures. *J. Gen. Microbiol.*, **90**, 228-236
  - 13) Karl-Heinz Herzog., H. Großmann and M. Liefländer (1975) : Zur Chemie eines Chitin-Proteids ans Flußkrebs. (*Astacus fluviatillis*) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **356**, 1067-1071
  - 14) A. G. Norman and W. H. Peterson (1932) : The Chemistry of Mould Tissue II, The Resistant Cell Wall Material. *Biochem. J.*, **26**, 1946-1953

### Summary

The chitin content of developing mycerium of *Rhizopus delemar* was increased gradually and the total dry weight of the mycerium reached a maximum after one week of culture.

A 24-fold increase in the total weight of chitin

in the mycerium was achieved by using the V-8 juice culture medium.

The pure chitosan was separated from the mycelium of *Rhizopus delemar*, not from the fruit body of *Russula pseudodelica*.