

# 「櫨の実（ドングリ）」と共生的に生育し、特異的に芳香（甘い香気）を放つ真菌の発見と、その機能解析

中島伸佳\* 中島辰幸\*\* 石原浩二\*\*\*

**要旨** 岡山県立大学内に生育する常緑広葉樹のシラカシの種子（ドングリ）に共生的に生育する微生物を単離した。本菌はドングリの存在下でのみ甘い香気を発する微生物であり、その主成分はブタン酸エチルなどのエステル類であることが確認された。また、簡易的な同定を行った結果、本菌は結束糸を有することなどから、ドングリと共生的に生育する菌核菌（真菌の一種）であると推定された。

**キーワード**：真菌、香気成分、シラカシ、ドングリ、櫨の実

## 1. はじめに

化学物質には様々な香りを有するものがあり、香料として食品、化粧品、日用品などとして我々の生活の広範囲に関わっている。また、香りの生成に微生物が関与していることも少なくない。長時間にわたる複雑な化学反応の組み合わせで、ようやく合成できる香料が、微生物によって短時間で効率的に生産できるという観点から、発酵や微生物酵素を触媒として食品フレーバーを工業的に生産する方法も研究されている。

一方、酒造りには微生物による発酵作用は欠かせない反応過程であり、この過程で多数の各種のアルコール、有機酸、エステル、アルデヒド、ケトンなども生成する。これらは蒸留によって酒に移行し、重要な香気成分になる。

さらに、熟成に伴って生成する香気成分もある。ウイスキーやブランデーを長期間保存すると、樽材のリグニンがエタノールで分解して芳香族アルデヒド、芳香族カルボン酸やケトン、ラクトンが生成して芳醇な熟成香に寄与する。樽材が櫨の木の場合はウイスキーラクトン（ $\beta$ -メチル- $\gamma$ -オクタラクトン）と呼ばれるウイスキーの代表的な香気成分になる<sup>1)</sup>。

ウイスキーの樽材である櫨の木は、ブナ科の一群の常緑高木で、シラカシ・アカガシ・アラカシ・ウ

ラジロガシなどの総称である。日本では中部地方から南に生育し、高さ10m程度に達する。果実はやぶを多量に含む。果実は秋に落下する。

今回、本学内に植えられているブナ科コナラ属のシラカシ (*Quercus myrsinifolia* Blume) の櫨の実（ドングリ）を採取し、「フィルムケース」に入れて嫌氣的に保管しておく、微生物が生育し、ウイスキー様の甘い芳香を産生することを発見した。そこで本研究では、この現象に関与している微生物の単離・同定を試みると共に、産生された香気成分の分析を行った。

## 2. 材料と方法

### 1) 単離および培養

本学敷地内で採取され、室温で静置されていたシラカシ (*Quercus myrsinifolia* Blume) の実のうち、ウイスキー様の甘い芳香を放つものの表面に生育していた微生物を採取し、滅菌水に懸濁し、表1に示した組成のYM培地に櫨の実の粉末（10%）を加えて調製したプレートに塗布し、25℃で静置培養した。得られたコロニーを新たなプレートに塗布し、培養する操作を何度か繰り返し、微生物を単離した。

次に、単離された微生物を櫨の実の粉末（10%）を加えて調製したプレートと櫨の実の粉末を加えずに調製したプレートにそれぞれ塗布し、25℃で培養

\*岡山県立大学保健福祉学部栄養学科

\*\*東真産業(株)植津サービスステーション

\*\*\*岡山理科大学理学部臨床生命科学科

岡山県総社市窪木111 (E-mail:nkmt-nakajima@fhw.oka-pu.ac.jp)

岡山県岡山市北区植津967-3

岡山県岡山市北区理大町1-1

表1 YM培地の組成

Yeast extract	5.0 g
Malt extract	10.0 g
D - Glucose	5.0 g
Distilled water	1.0 L
Agar	2.0 g
	(pH 6.0)

表2 SPME\* - GC/MS 分析装置の測定条件

<u>GC-MS</u>	
Instrument	Agilent 6890N & 5973N
Column	DB-WAX (0.25 mm i.d. × 60 m, film thickness 0.25 μm)
Carrier gas	He (1.0 ml/min)
Oven temp.	80 °C - 210 °C, 3 °C/min
Injection	250 °C, Split ratio 5 : 1
Detector	220 °C, MS
<u>SPME conditions</u>	
SPME Fiber	75 μm Carboxen/PDMS (SUPELCO)
Incubation temp.	40 °C
Pre Inc Agitator speed	500 rpm
Agitator on time	5 s
Agitator off time	2 s
Vial penetration in	22 mm
Extraction time	900 s
Injection penetration in	54 mm
Desorption time	60 s

\* SPME : Solid Phase Micro Extraction (固相マイクロ抽出)

し、数日～数週月培養後、上記のプレートのみには生育した微生物がウイスキー様の甘い芳香を発するかどうかを確認した。

単離された微生物は、YM培地に榎の実の粉末(10%)を加えて調製したスラントに菌糸および菌核を白金耳で移植して25℃で数日静置培養し、その後4℃で保存した。

## 2) 微生物の同定

麦芽エキス寒天培地及びポテトデキストロース寒天培地<sup>2)</sup>でコロニーの形成及びスライド培養による形態観察を行った。微生物の同定は、(株)ユニオンバイテック(大阪)に依頼した。

## 3) 香気成分の分析

香気成分の抽出及び分析は、小川香料(株)(東京)に依頼した。単離した微生物が産生する香りを特定するために、YM培地に榎の実の粉末(10%)を加えて調製したスラントに菌糸と菌核をそれぞれ移植し、移植から3週間後のスラントを用いて香気成分の抽出を行った<sup>3)</sup>。また、得られた香気成分を20 ml容のヘッドスペースバイアル瓶に入れて密栓し、SPME\* -GC/MS分析装置を用いて、下記の測定条件(表2)によりヘッドスペース香気成分の分析(気相GC/MS分析)を行った。成分の同定は、各ピークのMSスペクトルを、小川香料(株)ライブラ

リーのデータバンクと照合することにより同定した。

\*SPME : Solid Phase Micro Extraction (固相マイクロ抽出)

## 3. 結果と考察

### 1) 培養・単離および同定

本研究では、ウイスキー様の芳香を産生する微生物を榎の実から単離した。単離された微生物は、YM寒天培地、麦芽エキス培地、ポテトデキストロース寒天培地で生育することが確認された。温度の相違による生育状態を比較してみると、25℃では数日の培養後に菌糸の伸長が確認されたのに対して、37℃では本菌は生育しなかった。また、本菌はスラント培養にて25℃で約1ヶ月の培養後、4℃にて約一年間の保存が可能であった。この微生物は、菌糸の伸長が進むと菌核を形成する真菌であると推定され、生育とともに培地は黒変した(図1、図2)。ウイスキー様の芳香は、榎の実の粉末(10%)を加えたYM寒天培地では、本菌の増殖1週間後にウイスキー様の甘い芳香の産生が確認され、2～3週間後の期間において、最も強くかつ継続的に産生された。その後芳香は消失したが、新たな培地に移植すると再び芳香の産生が確認された。

また、榎の実の粉末(10%)を加えたYM寒天培地から榎の実の粉末を加えていないYM寒天培地に移植した菌を再び榎の実の粉末(10%)を加えた

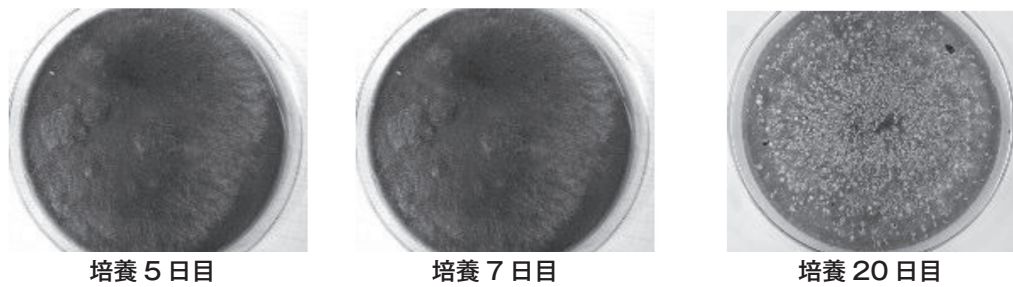


図1 単離された真菌の生育状態

櫛の実の粉末（10%）を加えたYM寒天培地に植菌し、25℃で平板培養した。菌糸の伸長（培養5日目）に続き、甘い香気の産生と共に、菌核の形成（培養7日目以降～）が確認された。



図2 単離された真菌の実体顕微鏡写真（×20）

YM寒天培地に移植すると、芳香が強くなった。ところが、櫛の実の粉末を加えていないYM寒天培地ではウイスキー様の芳香が確認されなかった。従って、本菌によるウイスキー様の芳香（香気成分）の産生には、培地中に櫛の実（または、その含有成分）の存在が必須であると考えられた。

微生物の簡易的な同定の結果から、今回単離された真菌は、細胞の特徴から酵母類ではなく、またクランプ結合は認められなかったため、担子菌類（キノコ類）の特徴はなく、菌糸状生育のみで分生胞子の形成なども認められず、隔壁らしきものを有しており、菌核様の結束糸を形成する真菌類で、「菌核菌」の一種であると考えられた。また、櫛の実の粉末を含まない寒天培地での培養では、詳細な分類を考察できる特徴が現れなかったことから、本真菌はなんらかの宿主に寄生した時に、その特徴が出現する櫛の木の「菌根菌」の一種である可能性も推察された。

## 2) 香気成分の分析

YM培地に櫛の実の粉末（10%）を加えて調製したスラントに菌糸と菌核を移植してから3週間培養

後のスラントにおいて、それぞれウイスキー様の甘い芳香を産生していることを確認した。次に、これらの抽出された香気成分のGC/MSのトータルイオンクロマトグラムを図3に示した。クロマトグラム上の各ピークについて、成分名と面積比は表3に示した。但し、不明部分や汚染物質のピーク（例：SPME Fiber由来のピーク等）は除外した。検出されたピークの中で、acetaldehyde、acetone、ethanol、ethyl butyrate、isobutanol、isoamyl alcohol、1-octen-3-ol、acetic acid、2-phenylethyl alcohol、vanillin はウイスキーからも検出される香気成分であった。

本香気成分は、果実が発酵したようなフルーティーな甘さに特徴があった。ヘッドスペースGC/MS分析の結果、主要な揮発成分としてacetone、ethanol、isobutanol、isoamyl alcohol、acetoin、さらに「菌糸」の場合は2-phenylethyl alcoholを検出した。acetoneはエーテルあるいはハッカ様の香りがあり、ethanolは酒をイメージさせる特有の芳香がある。isobutanolはアミルアルコール様の臭気、isoamyl alcoholは不快臭がある。acetoinは甘みのあるクリームやバターを思わせる香気を有しており、バター、チーズ、コーヒー、フルーツフレーバーなどの香気成分のひとつである。2-phenylethyl alcoholはバラ様またはハチミツ様の甘い香りを有する。

しかし、これらの成分の匂いの閾値は比較的高く、今回の香気成分にはそれほど寄与しない可能性が高いと考えられた（表3）。本香気成分の匂いの特徴や閾値を考慮すると、ethyl butyrate（酪酸エチル）や、特にethyl 2-methylbutyrate（2-メチル酪酸エチル）が寄与している可能性が高いと考えられた。ethyl butyrateはパイナップル様の香気成分の

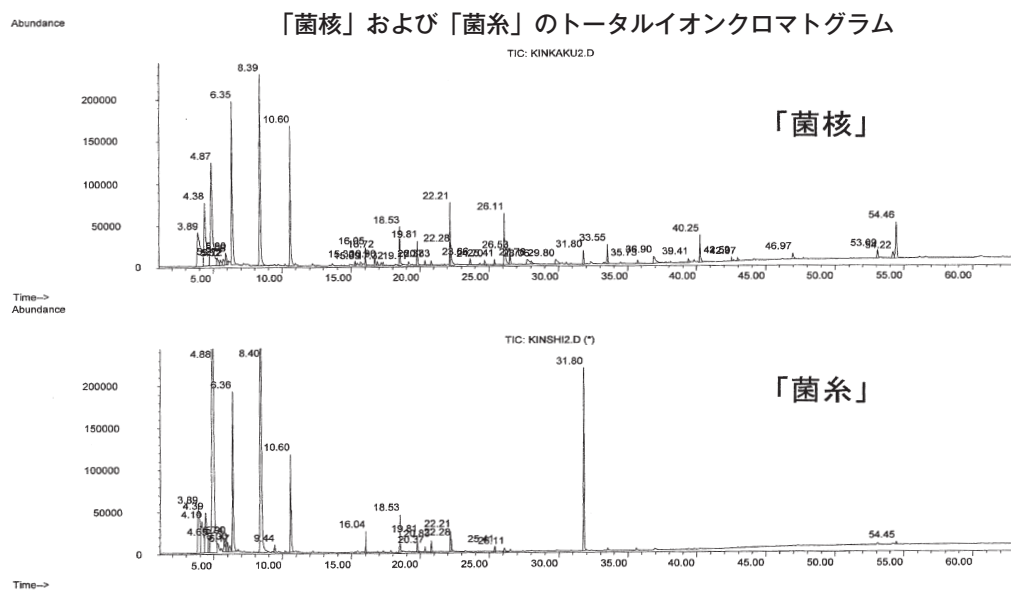


図3 気相GC/MS分析のクロマトグラム

## 「菌核」および「菌糸」のSPME - GC/MS分析結果

no.	保持時間 (min)	保持指標	成分名	ピーク面積 (%) <sup>a</sup>		参考データ: 水中で匂い 閾値 (ppb) <sup>b</sup>
				「菌核」	「菌糸」	
1	3.9	nd <sup>c</sup>	carbon dioxide	10.7	4.1	
2	4.1	nd	acetaldehyde	tr <sup>d</sup>	3.0	8.7-120
3	4.4	nd	acetone	10.3 <sup>e</sup>	3.3 <sup>e</sup>	500000
4	4.9	872	ethanol	15.5 <sup>e</sup>	31.3	
5	5.7	1003	ethyl butyrate	tr	0.6	1
6	5.9	1016	ethyl 2-methylbutyrate	0.7 <sup>e</sup>	0.6	0.08-0.3
7	6.4	1054	isobutanol	14.8	6.1	360-22500
8	8.4	1182	isoamyl alcohol	19.4	38.0	250-1005
9	9.4	1229	3-methyl-3-buten-1-ol	tr	0.4	
10	10.6	1276	acetoin	11.8	4.2	55-800
11	15.3	1429	1-octen-3-ol	0.3	tr	1-30
12	15.7	1440	acetic acid	0.5	tr	~500000
13	16.7	1470	2-ethylhexanol	1.0	tr	830-1500
14	18.5	1522	2,3-butanediol の立体異性体	2.6	1.3	4500-50000
15	19.2	1540	octanol	0.4	tr	110-1000
16	19.8	1557	2,3-butanediol の立体異性体	1.7	0.6	4500-50000
17	20.4	1573	propyleneglycol + (Z)-alpha-bergamotene	0.4	0.2	
18	24.7	1692	dodecanal	0.4	tr	0.53-5; 31
19	26.5	1742	decanol	1.0	tr	6.6-47
20	31.8	1892	2-phenylethyl alcohol	1.0	6.4	86-1500
21	33.5	1945	dodecanol	1.3	tr	73-820
22	36.9	2047	octanoic acid	1.5	tr	910-19000
23	54.2	2531	vanillin	0.8	tr	20-200

<sup>a</sup> ピーク面積の合計(100%)に対する相対値<sup>b</sup> 参考文献: FLAVOR-BASE 2004 (Leffingwell & Associates)<sup>c</sup> nd = not determined<sup>d</sup> tr = trace<sup>e</sup> 不純物との混合ピーク

表3 気相GC/MS分析結果と匂いの閾値

ひとつで、ethyl 2-methylbutyrate は甘い果実香でややグリーンな香気があり、リンゴ、イチゴなどのフルーツフレーバーであった<sup>4)</sup>。

本研究では、本菌が放つ香気成分中のウイスキーラクトンの有無は、今回、検査・同定に用いたデータバンクでは照合できなかったため確認はできなかった。しかし本菌が、櫂の実に共生して果

実様の芳香として ethyl 2-methylbutyrate や ethyl butyrate を特異的に産生する真菌（菌核菌の一種）であることは確認された。

なお、培養中の一定期間のみにウイスキー様の芳香が産生されたことから、ウイスキー様の芳香と感じた香りは、単離された真菌が櫂の実から産生した果実様の芳香と、アルコール発酵により生じたアル



コールとが混在した匂いであった可能性、もしくは  
ウイスキーラクトンそのものの産生に起因する可能  
性などが考えられた。

#### 文献

- 1) 杉田浩一, 平宏和, 田島眞, 安井明美 編  
(2003)、日本食品大事典、医歯薬出版.
- 2) 微生物研究法懇談会 編 (1982) 微生物学実験  
法、講談社.
- 3) Schieberle P and Buettner A (2000).  
Comparison of the key odorants in hand-  
squeezed juices of oranges (Valencia late) and  
grapefruits (Citrus paradise macfayden).  
(Schieberle P and Engel KH eds. Frontiers of  
Flavour Science. pp.10-16. Germany. Deutsche  
Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie)
- 4) 川岸舜朗 (1985) 植物性食品の香気. 並木満  
夫, 中村良, 川岸舜朗, 渡邊幹二編, 現代の食品  
化学、pp.75-80、三共出版.

## Occurrence of a new fungus which could grow with an acorn (nut of oak) symbiotically

NOBUYOSHI NAKAJIMA\*, TATSUYUKI NAKAJIMA\*\*,  
KOHJI ISHIHARA\*\*\*

*\*Department of Nutritional Science, Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University, 111 Kuboki, Soja, Okayama, Japan (E-mail : nkmt-nakajima@fhw.oka-pu.ac.jp)*

*\*\*Toushin Sangyo Co. Ltd., Narazu Service Station, 967-3 Narazu, Kita-ku, Okayama, Japan*

*\*\*\*Department of Life Science, Okayama University of Science, 1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama, Japan*

### Abstract

A new fungus, which had grown symbiotically with an acorn (nut of oak) , was isolated. It has produced sweet-ester flavors such as ethyl butyrate and ethyl 2-methylbutyrate only in the presence of the acorn powder in the growth medium.

**Keywords** : fungus, flavor, *Quercus myrsinifolia* Blume, acorn, nut of oak