

ヒラタケ菌糸体のフラスコ振盪培養での培地の炭素と窒素の濃度比が菌糸体の成育に及ぼす影響

松 村 博 子

I 緒 言

食用きのこは単なる嗜好食品としてではなく、19世紀の後半において、貴重なタンパク質源として考えられていた。きのこの子実体だけでなく、深部培養法による大量生産可能な菌糸体および代謝物の生産を目的とした研究も数多く報告されている。菌糸体をたんぱく質源として使用するにはできるだけ安価な基質の利用のために炭素と窒素成分の比率について注意すべきである。有機物中の炭素と窒素の含有比率が窒素の同化作用に大きく影響することはよく知られているが^{1)~3)}、キノコ類についても同様に、菌糸体の発育や含有成分量の変化及び子実体の形成に関与していることが数多く報告されている^{4)~10)}。

先に、有機炭素源としてブドウ糖を、同じく有機窒素源としてペプトンを用い、濃度を前者は2.0%と4.0%とし、後者を0.0、0.2、0.4、及び0.6%と4段階に変化させた8種類の培地でのヒラタケ菌糸体の生育と、炭素及び窒素の代謝に及ぼす培地の炭素/窒素比との関連について報告したが¹¹⁾、本報では有機炭素源としてのブドウ糖の濃度を6.0%と高めた培地でのヒラタケ菌糸体の生育と炭素、窒素の利用率について追及を行い、先報で得た結果と比較検討を行うことにした。尚本報では、ペプトン濃度を1.0%まで変化させた6種類の培地を用いた。

II 材料および方法

1. 供試菌株

本実験に使用したヒラタケの菌糸体は(財)発酵研究所より分譲を受けたヒラタケ *Pleurotus ostreatus* 30776株の培養菌糸体で、継代培養は日水製薬製ポテト-デキストロース寒天培地から調製した斜面培地で培養温度22°Cで20日毎に行った。

2. 培地の調製

予先実験で安価な無機窒素源として硫酸アンモニウム、リン酸1水素アンモニウム、塩化アンモニウムを使用したが高くなるに従って培養日数の経過に伴いpHが著しく低下したので、pHの変化の小さかったペプトンを主窒素源として使用する事にした。主炭素源としてのブドウ糖濃度を6.0%と一定とし、ペプトンを0.0%から0.2、0.4、0.6、0.8、及び1.0%の各濃度になるように添加した。

各培地には発育促進と pH 調節のため酵母エキス 0.10%、リン酸 2 水素カリウム 0.05%、硫酸マグネシウム 0.10%をそれぞれ添加した。調製した各培地の C/N 比は下記の通りである。

G6-0 : 199.5 G6-2 : 66.1 G6-4 : 40.7 G6-6 : 30.0 G6-8 : 24.0 G6-10 : 20.3 C/N 比の算出はブドウ糖は分子式より、ペプトンと酵母エキスはそれぞれの元素分析値から求めた。〔ブドウ糖 (C : 40.0%, N : 0.0%)、ペプトン (C : 45.0%, N : 13.0%)、酵母エキス (C : 34.4%, N : 12.2%)〕。使用した試薬は、ペプトン及び酵母エキスは大五栄養化学製の乾燥粉末で、これら以外の物はすべて和光純薬製の試薬特級品である。これら成分を一定量ずつ計量し、脱イオン水に溶解後、100ml 定容し、それぞれを 300ml 容三角フラスコに入れ、信越ポリマー製の T-32 シリコ栓をして、120°C で 30 分間高圧蒸気滅菌を行った。

3. 植菌及び培養法

広口瓶 (内径 33mm、高さ 78mm) に 20ml の溶解したポテトデキストロース寒天培地を入れ、アルミニウム箔で蓋をし 120°C で 30 分間高圧蒸気滅菌を行い平面培地とした。冷却後、継代培養した 20 日目の菌糸体を白金耳で摂取し、平面培地に植菌し 20 日間、22°C で培養した。20 日後、成育した繊維状の菌糸体を白金耳で約 5 mm 角を掻き取り G6-0 培地を入れた三角フラスコに植菌し、10 日間、22°C で振幅 6 cm、1 分間 110 回の往復振盪培養を行った。培養後、成育した菌糸体をクリーンベンチ内で予め高圧蒸気滅菌した日本薬局方ガーゼで上部を覆ったガラス漏斗を用いて漏別採取し、菌糸体を乾熱殺菌した東洋濾紙製 No.1 で付着水を吸収除去した後、その 2.0 g を電子天秤で秤取し、乾熱殺菌した 200ml 容のステンレス製のホモジナイザー用容器に入れ、0.8% の生理食塩水で 100ml とした後、1 分間、精機工業製電動ホモジナイザーで攪拌した。調製した菌糸体懸濁液 5.0ml を先に示した本培養のそれぞれのフラスコに植菌し、20 日間、上記の種菌培養と同じ条件で往復振盪培養を行った。1 回の実験に 1 試料について 3 本、計 18 本使用した。

4. 試料の分析法

1 回目は 4 日後に、それ以後は 2 日目毎に試料を 3 本ずつ取り出しフラスコ中の菌糸体を個別に、ガラスフィルター (G-1) で濾別し、濾液の pH を堀場製作所製 D-12 型 pH メーターで測定後、ガラスフィルター中の菌糸体を各 5ml の脱イオン水で 2 回洗浄し、先の濾液と合せ、200ml 容のメスフラスコに入れ、脱イオン水を加えて 200ml に定容し、ブドウ糖濃度測定に用いた。測定は和光純薬製グルコース B-テストワコー試薬キットを用いるグルコースオキシダーゼ酵素法によって行った。洗浄した菌糸体は恒量となるまで真空凍結乾燥を行った後、秤量をした。乾燥菌糸体はガラス製乳鉢中で微粉とし、CN コーダー (MT-600 ヤナコ) で炭素及び窒素の分析を行った。結果はそれぞれの 3 個の試料からの測定値の平均値で示した。変動係数は 3 ~ 7% の範囲内であった。

III 実験結果および考察

20 日間、6 種の培地の培養期間中の培養濾液の pH、ブドウ糖残量及び菌糸体の成育の状況の変化を下記に示した。

1. pH の変化

図 1 は pH の経時的变化を示したものである。先に報告した G2 (ブドウ糖 2%) では培地により pH の変化に差が見られた。傾向として、G4 (ブドウ糖 4%) の培地での経過と類似しており、これらの培地よりペプトンの濃度の高い G6-8 及び-10 の培地では培養期間の後半で僅かに高くなった。G6-0、G6-2 の培地での pH が他の培地より低下しているのは、糖の消費が少ない割にシュウ酸の生産に使用されているのもであろう。木材腐朽担子菌が酢酸やシュウ酸などの有機酸及び無水炭酸を代謝することはよく知られており¹²⁾、pH 低下の一因とされている。また、利用される糖の濃度および窒素源によっても異なることが報告されている¹³⁾。培地中の窒素量が増加するに従って変化が少ないのは成分中のアミノ酸などによる緩衝作用によるものと思われる。

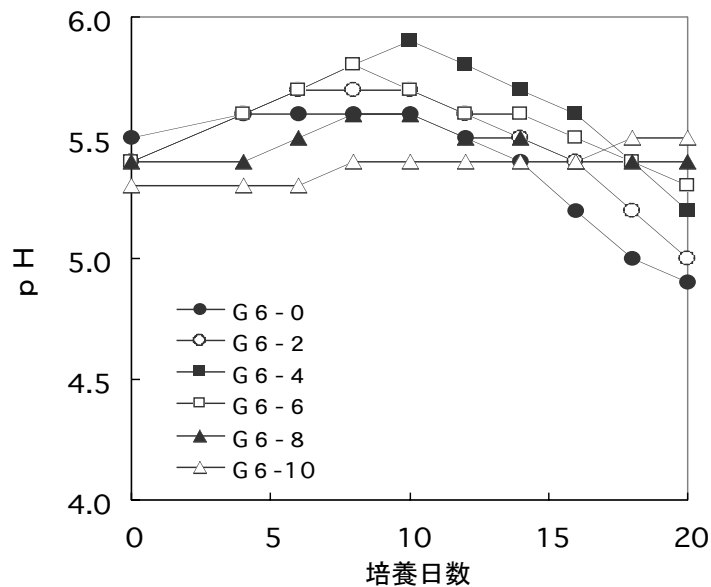


図 1 C / N 比の異なる G6 培地での培養期間中の培養液の pH の変化

2. ブドウ糖の変化

図 2 はブドウ糖濃度の経時的变化を示したものである。図に示したように培地の C/N 比により大きく異なることが見られた。これを消費率から見てみると表 1 に示すような結果となった。

尚、比較のために G2 と G4 の培地での計算値も併記した。

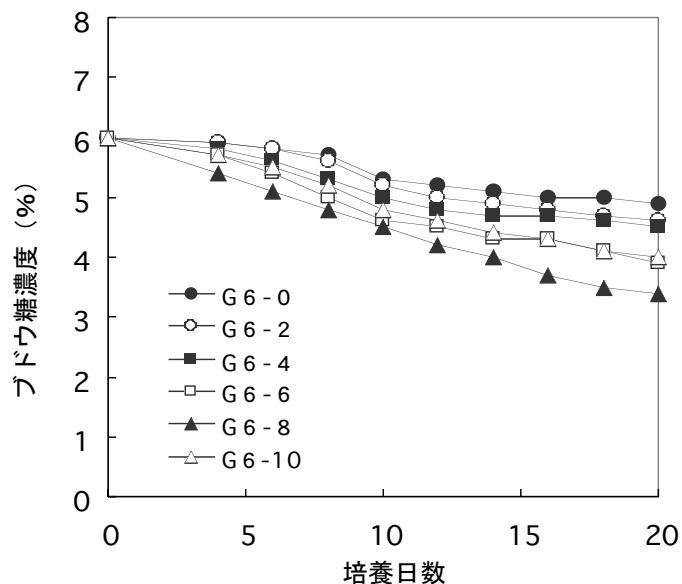


図2 C / N比の異なる G 6 培地での培養期間中の培養液のブドウ糖濃度の変化 (%)

表に見る如く、C/N 比が 24.8 の G6-8 の培地での消費率 42%まで C/N 比の低下に従って上昇していくが、20.3 の G6-10 の培地では減少することが見られた。G2、G4 の培地での消費率との比較から、糖濃度が高くなると極端に糖の消費が低下するのは浸透圧に関係していることが明らかで、菌の代謝機能に影響を及ぼしているためと考えられる。G2、G4 及び G6 の各培地で消費率の高かった培地では G2 では-6、G4 では-4、G6 では-8 でそれぞれの C/N 比は 12.2、28.3 及び 24.0 で C/N 比での関連性は見られなかった。

表 1 C/N 比の異なる G6 培地のブドウ糖の消費率 (%)

培地	消費率 (%)	培地	消費率 (%)	培地	消費率 (%)
G6-0	18	G2-0	50	G4-0	28
G6-2	22	G2-2	58	G4-2	49
G6-4	25	G2-4	74	G4-4	74
G6-6	38	G2-6	84	G4-6	63
G6-8	42				
G6-10	30				

3. 乾燥菌糸体量の変化

各培地で 20 日間培養を行った時の乾燥菌糸体の収穫量の経時的变化を図 3 に示した。図に見る如く菌糸体収量は G6-8、-6、-10、-4、-2、-0 の順に低下していき、それぞれの最大収量は 18 日目、580mg/100ml から最低 355mg/100ml となった。G2、G4 培地での収量と比較すると、G2、G4 培地ともに 17 日目に最大値となり、収量は G2 培地では C/N 比の低下に反比例して増加し、

最高の G2-6 では 795mg/100ml であった。G4 では G4-0 から G4-4 まで C/N 比に反比例して増加するが、21.1 の-6 では減少した。これら 3 種の培地での最高収量を比較すると、G2、G4、G6 の順となりブドウ糖濃度が 4 % では収量に大きな差は見られないが、6 % になると著しい低下が生じることが判明した。ブドウ糖濃度が同一の培地の C/N 比では収量の変化を比較すると G2、G4、G6 三者ともに類似の傾向を示しているが、糖濃度が収量に大きく関与していることが認められ前記の如く培地の浸透圧が大きく影響していることを示している。種々のキノコ菌糸体の生育と培地の C/N 比との関係について数多くの報告が発表されているが、ヒラタケ菌糸体を用いた Jauhiri ら¹⁴⁾ のバガスを基質とした C/N 比 25 ~ 45 の 5 種の培地では、30 : 1 が最大収量を示した。窒素量を多くした 6 種の培地でも、同一の値であった。Quimio ら¹⁵⁾ はブドウ糖濃度を変化させ一定濃度のアスパラギンとの C/N 比 10 ~ 100 の 11 種の培地では 80 : 1 が、ブドウ糖濃度を一定としアスパラギン濃度を变化させた同じ C/N 比の培地では、60 : 1 がそれぞれ最大収量を示した。このように C/N 比值と最大収量の関係を示した実験結果は培地成分により、またそれらの濃度によっても大きく変化することが認められる。これらの観点からみても C/N 比は限定された実験条件でのみ有用なものである。

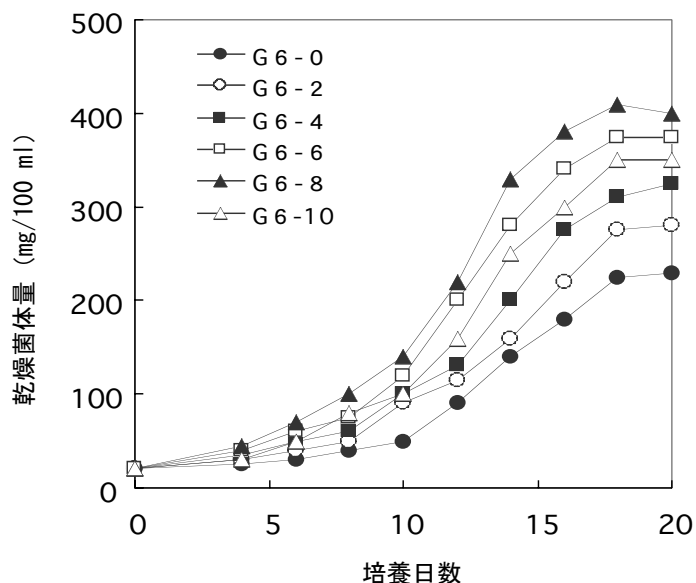


図3 C / N比の異なるG6培地での培養期間中の乾燥菌糸体の収量の変化 (mg/100ml)

4. 乾燥菌糸体中の炭素及び窒素量の変化

最大収量を得た日数での乾燥菌糸体中の炭素と窒素量を G2 と G4 のそれぞれの培地で得た結果と比較したものを表 2 に示した。

G6 培地では炭素量は G6-8 まで C/N 比の低下とは逆に高くなるが、その後かなり低い値となった。G2 と G4 培地では共に C/N 比は反比例して高くなっていった。窒素量は G2 培地では G2-4 まで上昇していくが G2-6 では低下した。G4 と G6 培地では共に反比例して高くなっていった。

炭素、窒素量ともに G6-8 と G6-10 以外著しい差は無かった。最高収量を示す日数で収穫した乾燥菌糸体中の炭素、窒素量は共に培地の C/N 比に反比例することが認められた。C/N 比と菌糸体中の炭素量の関係についての報告は見られないが、タンパク質量変化について Srivastava ら¹⁶⁾ はヒラタケ属の一種である *Pleurotus flabellatus* を用い、ブドウ糖を 5% としクエン酸アンモニウムの濃度を変えた C/N 比 12.8 ~ 466.2 の 10 種の培地での結果では 15.6 が最大で、G2-4 の 15.8 とほぼ同じであってが、糖濃度の近い G4-6、G6-10 ではそれぞれ 21.1 と 20.0 で、菌の種類、培地成分に影響されるものであろう。

5. 菌糸体の炭素及び窒素の利用率

これらから G6 培地と他 2 種の炭素及び窒素の利用率を比較した結果を表 3 に示した。3 種の培地での炭素及び窒素の利用率は C/N 比が低下するに従って前者は高く、後者は低くなる傾向が見られたが、ブドウ糖濃度が高くなると炭素は G6 では全般的に G2 の 1/6、G4 の 1/3 に、窒素では炭素ほど著しくないが同様に低下することが認められた。

表 2 3 種の培地群で最大収穫量を示した日数での菌糸体中の炭素と窒素含量 (%)

培地	炭素	窒素
G2-0	35.4	2.1
G2-2	36.9	4.6
G2-4	37.6	6.3
G2-6	38.5	5.6
G4-0	35.1	1.5
G4-2	36.5	4.0
G4-4	38.2	4.8
G4-6	39.4	5.6
G6-0	35.5	2.8
G6-2	37.4	4.6
G6-4	38.0	5.0
G6-6	38.8	5.8
G6-8	40.1	6.2
G6-10	37.4	6.6

表 3 3 種の培地群で最大収穫量を示した日数での菌糸体中の炭素及び窒素の利用率 (%)

培地	炭素	窒素
G2-0	18.7	73.9
G2-2	24.1	72.0
G2-4	26.3	69.2
G2-6	27.7	48.9
G4-0	7.4	49.2
G4-2	12.7	62.8
G4-4	15.7	55.8
G4-6	13.6	40.4
G6-0	3.3	51.6
G6-2	4.1	33.2
G6-4	4.5	40.6
G6-6	5.4	24.2
G6-8	5.9	21.0
G6-10	4.5	16.2

IV 総括

先にブドウ糖濃度を 2.0 及び 4.0% とし、これにペプトンを 0.0 から 6.0% まで C/N 比の異なった 8 種の培地でのヒラタケ菌糸体の育成について報告したが、更にブドウ糖濃度を 6% に高めたときの生育状態と比較を行った。培地の pH 及び糖の消費率は 3 者ともに C/N 比の差によって変化するが、ブドウ糖濃度差による影響のほうが大きかった。菌糸体収量はブドウ糖濃度が 4% まででは大きな差は無いが、6% になると著しく低下した。最大菌糸体収量時における乾燥菌糸体中

の炭素及び窒素量は全般的に C/N 比に反比例して高くなる傾向であったが、糖濃度による影響は大きくなかった。菌糸体の炭素と窒素の利用率は C/N 比が低下するに従って前者は高く、後者は低くなる傾向が見られたが、ブドウ糖濃度が高くなると炭素は G6 では全般的に低下し、窒素では炭素ほど著しくないが同様に低下することが認められた。

《謝辞》

本研究を発表するにあたり、ご指導を賜りました大阪樟蔭女子大学名誉教授 吉川光一先生、大阪樟蔭女子大学 食物栄養学科 食品化学研究室 川端康之助教授に心より厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Wacksmann, S. A. and Lomanitz, S. : Contributin to the chemistry of decomposition of protein and aminoacids by various groups of microorganisms. J. Agr. Res. 30, 263-281 (1925)
- 2) Feck, A. F. : A study of the nature of the nitorogenous compound in fungus tissue and their decomposition in the soil. Soil Sci.. 27, 1- 47 (1929)
- 3) Jensen, H. L. : On the influence of the carbon:nitrogen ratio of organic material on the minerarization of nitrogen. J. Agr. Sci. 19 71-82 (1929)
- 4) 脇田正二：えのきだけの生化学的研究（第1報）生育と培養液および菌体成分の変化について。農化 28, 429-431 (1954)
- 5) Lichfield, J. H. and Overbeck, R. C. : Submerged culture growth of *Marasmius* species in food processing waste substrate. Food Sci. Techn. 2, 511-520 (1962)
- 6) Yusef, H. M. and Allam, M. E. : The carbon and nitrogen nutrition of certain fungi. Can. J Microbiol. 13, 1097-1106 (1967)
- 7) Smith, J. R. : Selective substrate and rapid methods of preparation. Mushroom J. No.23, 424-426 (1974)
- 8) 永曾幸代・吉川光一：はたけしめじの人工培養に関する研究（第1報）液体振盪培養における培地成分について。食工誌 22, 361-365 (1975)
- 9) 吉田博・藤本水石・林淳三：クリタケの栄養成長におよぼす炭素源および窒素源の影響。食工誌 37, 695-701 (1990)
- 10) Gupta, V. K. and Garcha, H. S. : Carbon and nitrogen nutrition of *Lepiota lepria* for biomass protein production in liquid media. J. Res. Punjab Agric. Univ. 28, 71-76 (1991)
- 11) 松村博子・吉川光一：、フラスコ振盪培養での培地のグルコースとペプトンの濃度比がヒラタケ菌糸体の生育と炭素及び窒素利用率におよぼす影響。日本応用きのこ学会誌 10 (1) 7 - 14 (2002)
- 12) 橋本一哉・磯部信明・高橋善次郎：茸類の生化学的研究 IX 有機酸代謝に就いて2. 東洋

- 13) Miceles, J. A. : Induction of oxalic acid by carbohydrate and nitrogen source in the brown-rot fungus *Postia placenta*. *Material and organisms* 28, 197-207 (1993)
- 14) Jauhiri, K. S. and Sen, A. : Production of protein by fungi from agricultural wastes II. Effect of carbon / nitrogen ratio on the efficiency of substrate utilization protein production by *Rhizoctonia melongina*, *Pleurotus ostreatus*, and *Copinus aralus*. *Zbl. II Abt.* 133, 597-603 (1978)
- 15) Quimio, T. H. and Sarsud, U. : Nutrition of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer. *Phil. Agr.* 64, 79-89 (1981)
- 16) Srivasta, H. C. and Zakia bano, : Nutrition requirement of *Pleurotus flabella*. *Appl. Microbiol. Jan.*, 166-169 (1970)