

学位論文要旨

氏名

米山 誠

題目

抗腫瘍性担子菌ヒメマツタケの
栽培に関する研究

ブラジル原産の食用担子菌ヒメマツタケ (*Agaricus blazei*) は、独特の食味性だけでなく、抗腫瘍性が極めて高いことでも知られ、近年大変注目されているキノコである。しかし、今までの研究例は非常に少なく、同属のツクリタケ (*A. bisporus*) を模倣してのコンポスト栽培が小規模で行われているにすぎない。そこで本研究では、従来のコンポスト栽培とは異なる、短期間に大量生産可能な新しい人工栽培方法を見出すことを目的に、ヒメマツタケの培養に関する種々の栄養条件や環境を含めた生育条件について検討した。

(1) ヒメマツタケを、ツクリタケの生産に用いられているコンポスト法を応用して栽培した。ツクリタケに匹敵する発生収量は得られたものの、培地となるコンポストの調製に長時間を要することが分かり、ヒメマツタケを大量にしかも安価に供給するためには、コンポスト法に代わる新しい栽培方法を見いだすことが必要と考えられた。

(2) ヒメマツタケに適した培養方法を知ろうとして、種々の方法を用いて培養し、ヒメマツタケの菌糸成長をエノキタケ、シイタケなど8種類の食用菌と比較検討した。その結果、ヒメマツタケの液体培養での成長は比較的良好であり、PDA及び木粉米糠培地で培養した場合よりも大量の菌糸体を得られた。さらに、ヒメマツタケの液体培養には従来の振盪法よりも、新たに考案した装置を用いた通気法の方が適していることが分かった。

(3) ヒメマツタケの通気液体培養方法を確立するために、種々の培養条件を検討した。通気量は 0.5L/min のときに最大菌糸体重量が得られたが、菌が成長を開始するまでの誘導期が非常に長いことが分かった。しかし、表面培養菌体の代わりに、液体培養菌体を継代し通気液体培養することにより、誘導期を大幅に短縮することができた。

(4) 継代培養により誘導期が短縮される原因を明らかにするために、対溶存酸素親和性を反応速度論的に解析した。ヒメマツタケの表面培養菌体の溶存酸素親和力指数 p_{km} は 4.07であったが、液体培養することにより4.55まで増加した。したがって、液体培養菌体を継代する事により、気体状酸素呼吸から溶存酸素呼吸への順化が完了し、結果として誘導期が短縮されるものと考えられた。

(5) 通気液体培養で得られたヒメマツタケ菌糸を種菌とし、木粉米糠菌床培地での栽培を検討した。その結果、最適米糠配合率 1:1 では、ヒメマツタケ子実体収量は培地重量の約 50%にまで達し、生産効率が極めて高いことが明らかとなった。

以上の検討により、ヒメマツタケの通気液体培養菌体を種菌とし、木粉と米糠とからなる菌床培地を用いる栽培方法により、コンポスト栽培よりも短期間に効率よくヒメマツタケを生産できることを明らかにした。

ヒメマツタケ *Agaricus blazei* Murr. の液体培養 (第1報)

培養方法の検討

(宮大農) ○米山 誠, 目黒貞利, 河内進策

1, はじめに ヒメマツタケは和洋中華に適した食味性をもち、さらに種々の生理活性を有する高機能性担子菌としての評価が高いことから、最近注目されてきている。しかしこのキノコの生産に関し、栄養菌糸の成長が他の食用担子菌と比較して遅く、さらにコンポスト作成の手間がかかり栽培の長期化が最大のネックとなっている。このキノコを大量にしかも安価に供給するためには、培養期間の短縮化が不可欠である。そこで本研究では種々の培養方法での菌糸成長を比較検討することにより、ヒメマツタケに最も適した培養方法を見出そうとした。

2, 実験方法 (1) 供試菌: ヒメマツタケ (*A. blazei*) は(株) 応徹研保有の二核菌糸を用い、PDA培地(Difco社製)で予め25℃暗黒下で14日間培養し、この培養菌糸を内径5mmのコルクボーラーで切りとり実験に供した。エノキタケ, タモギタケ, マイタケ, ヒラタケ, シイタケ, マンネンタケ, ナメコ, アラゲキクラゲは本研究室保存の二核菌糸を用い、ヒメマツタケと同様の方法で前培養し接種片とした。(2) 培養方法: ヒメマツタケと上述の8種類の担子菌をPDA及び木粉米糠(4:1(w/w))表面培養、振盪液体培養(0.3%酵母エキス、1%スクロース、0.3%ポリペプトン、0.1%燐酸buffer(基本液体培地))の3種類の 방법으로25℃暗黒下で培養し菌糸体の成長を比較した。さらに基本液体培地を用いて、振盪および通気の2種類の 방법으로培養し、菌糸体の成長量をシイタケと比較した。振盪培養は菌接種後120回/minで往復振盪した。通気培養は通気量は0.5l/minで培養した。どちらの培養も25℃、暗黒培養下で行ない、菌糸体量は105℃で24時間乾燥させ、その後重量を測定して求めた。なおPDA表面培養および木粉米糠培養ではコロニーの直径から菌糸成長速度を求め、振盪液体培養では菌糸体乾燥重量を求めることにより菌糸成長量をそれぞれ比較した。

3, 結果および考察 (1) ヒメマツタケの成長は培養方法によらず他の担子菌と比較し全体的に劣っていた。特にPDA表面培養及び木粉米糠表面培養では極めて成長が悪く、9種類の担子菌の中では最も成長が劣っていた。従ってこれらの培養方法はヒメマツタケの大量培養には適さないと考えられた。しかし、一方液体培養(振盪)においては、ヒメマツタケの成長がマイタケやアラゲキクラゲを上回り、タモギタケやマンネンタケとも大差ないことが明らかとなった。また他の担子菌のエノキタケ、ヒラタケ、シイタケ、及びナメコについてはPDA表面培養及び木粉米糠表面培養での成長の差とほぼ同程度であることが判明した。またヒメマツタケの液体培養での成長は良好でありPDA及び木粉での培養と比較して大量の菌糸体を得られることも分かった。以上の結果よりヒメマツタケの培養には液体培養法が適していると考えられた。(2) 液体培養を振盪法と通気法で比較検討した。その結果通気培養では振盪培養で30日間を要するヒメマツタケの菌体量をわずかに12日間で得ることができ、培養期間の大幅な短縮が可能であることが分かった。よってヒメマツタケの培養は振盪法よりも通気法が適していると考えられた。

ヒメマツタケ *Agaricus blazei* Murr. の液体培養 (第2報)

培養条件の検討

(宮大農) ○米山 誠, 目黒貞利, 河内進策

1, はじめに 前報によりヒメマツタケの培養方法は通気液体培養が、最も適していることが明らかとなった。そこでさらにヒメマツタケの培養期間の短縮を図ることと大量の菌体量を得ることを目的として、よりヒメマツタケに対し適した培養条件について、詳細な検討を加えた。

2, 実験方法 (1) 供試菌: ヒメマツタケ (*A. blazei*) は (株) 応微研保有の二核菌糸を用い予め前培養し、実験に供した (前報参照)。

(2) 培養方法: ヒメマツタケの菌糸片を通気培養装置と連結した基本液体培地 (前報参照) 350ml を加えた 500ml 平底フラスコ内で、通気量を 0~2l/min に変化させて、9 日間培養した。また 13 種類の糖を基本液体培地のスクロースの代わりにそれぞれ 1% となるように加えて振盪培養し、ヒメマツタケの菌体重量を求めた。さらに、リボース、アラビノース、マルトース、トレハロース及びスクロースは濃度を 0~4% まで変化させ振盪培養し成長量を比較した。さらにマルトース、トレハロースおよびスクロースについては最適添加量となるように培地に加えて通気培養を行なった。予め 12 日間通気培養した菌体 0.42mg を新しい培地に接種し継代培養を行なった。

3, 結果と考察 (1) 液体培地への通気量のヒメマツタケの成長に及ぼす影響を検討した。その結果、通気量の増加に伴い菌体量は急速に増加し、0.5l/min で最大となり、その後は漸次減少した。従って本実験条件下での最適通気量は 0.5l/min と考えられた。そこでこの最適通気量を用いて培養したところ、成長曲線は典型的な S 字型曲線を示したが、安定期に達する 12 日間の培養のうち、菌接種後増殖を開始するまでの誘導期に 5 日間も要することが判明した。

(2) そこで菌糸成長速度の増加と、誘導期の短縮の 2 点からさらに検討した。13 種類の糖類を濃度 1% 添加し、振盪培養した結果、リボース、アラビノース、マルトース及びトレハロースに基本培地として用いたスクロース以上ないしは同程度の添加効果が認められた。そこでさらにこれらの糖と基本培地のスクロースの濃度を変化させて振盪培養し、成長量を検討した結果、スクロース 3% で成長速度と菌体量が最大となった。次にこの糖濃度及び前述の最適通気量の条件で通気培養した菌体の継代を試みたところ、PDA 培地で培養した菌糸体を接種した場合と比較して、誘導期が 3 日間、安定期に達するまでの期間が 5 日間それぞれ短縮されることが明らかとなった。さらに菌体量も基本液体培地での通気培養と比較すると約 2.8 倍にも増加することが明らかとなった。

以上の結果より、通気液体培養条件をさらに改善することにより、ヒメマツタケの培養期間の短縮と菌体収量の増加が可能となった。

ヒメマツタケ *Agaricus blazei* Murr. の液体培養 (第3報)

溶存酸素に対する親和性

(宮大農) ○米山 誠, 目黒貞利, 河内進策

1, はじめに 昨年の本大会で、ヒメマツタケの培養には種々の培養法の中で液体培養法が適していることを報告した。しかも通気を伴う液体培養法がヒメマツタケの培養には最も適し、培養期間の大幅な短縮と大量の菌体を得ることが可能なことを明らかにしてきた。そこでこれらの一連の効果が何に基づいているのかを明らかにするため、ヒメマツタケの溶存酸素に対する親和性を検討した

2, 実験方法 (1) 供試菌: ヒメマツタケ (*A. blazei*) は (株) 応微研保有の二核菌糸を用い、前報同様の方法で予め前培養し実験に供した。シイタケ及びヒラタケは本研究室保存の二核菌糸を用い、ヒメマツタケ同様に前培養し実験に供した。(2) 表面培養: 内径200 mm・内高50 mmのペトリ皿内に、0.3%酵母エキス、3%スクロース、0.3%ポリペプトン、0.1%リン酸buffer (初期pH 6.0) に寒天2%を加えた培地を敷き、その上に培養菌体と培地を容易に分離できるようにするために、セロファン紙を施した。次に前培養菌体を内径5 mmのコルクボーラーで切り取り (菌体乾燥重量0.24 mg) セロファン紙上で30日間25℃下で暗期培養した。同様にシイタケ及びヒラタケをそれぞれ20日間培養した (初期pHはともに5.5)。(3) 通気液体培養: 通気条件はすべて0.5 l/minとし、①前培養菌体を接種源として液体培養した (液体培養1回目)。②次にその液体培養菌体を継代して、液体培養した (液体培養2回目)。③さらにその液体培養菌体を継代して、液体培養した (液体培養3回目)。(4) 溶存酸素濃度測定: 榊東興化学研究所製の溶存酸素濃度形を用いて、表面培養及び通気液体培養菌体の湿菌体約3 gを生理的食塩水中に攪拌し、飽和酸素濃度から0に達するまで1分毎に溶存酸素濃度を測定した。

3, 結果及び考察 (1) 表面培養菌体における溶存酸素濃度が0に達するまでの時間は、ヒメマツタケ512分、シイタケ421分及びヒラタケ266分であった。ヒメマツタケの対溶存酸素呼吸活性は3種類の担子菌の中で最も低く、ヒラタケの約半分であることが明らかとなった。(2) 液体培養1回目のにおける溶存酸素濃度が0に達するまでの時間は、ヒメマツタケ51分、シイタケ53分及びヒラタケ46分であった。(3) ヒメマツタケの液体培養菌体の継代を繰返しても対溶存酸素呼吸活性はほとんど変化しなかった。したがって、対溶存酸素呼吸への順化は継代1回で完了することが明らかとなった。(4) 表面培養、液体培養1回目、液体培養2回目及び液体培養3回目の菌体の溶存酸素親和力指数 pK_m はそれぞれヒメマツタケでは4.07, 4.55, 4.88, 4.90、シイタケでは4.39, 4.51, 4.81, 4.90、ヒラタケでは4.64, 5.01, 5.17, 5.28であった。ヒメマツタケの溶存酸素親和性は、表面培養菌体では極めて低いものの、液体培養菌体ではシイタケと同程度まで上昇することが明らかとなった。これらのことから、ヒメマツタケの表面培養菌体は気体状酸素呼吸から溶存酸素呼吸への順化に長時間を要するが、1回の継代で順化は完了し対溶存酸素呼吸活性は10倍にも増加することが明らかとなった。