食用きのこの深部培養における炭素源と窒素源について†

阪本禮一郎*, 新見 健, 高橋昭之介

(日本パルプ工業株式会社研究所)

昭和 52 年 9 月 16 日 受理

Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Submerged Culture of Edible Fungi (Studies on Submerged Culture of Edible Fungi Part I)

Reiichiro SAKAMOTO*, Takeshi NIIMI and Shyonosuke TAKAHASHI

Research Laboratory, Nippon Pulp Industry Co., Ltd.,

Yoshioka, Yonago-shi, Tottori, 683

Recently, the submerged culture of basidiomycetes has been arousing interest not only in the artificial cultivation of edible fungi but also in the microbial production of enzymes, antibiotics and carcinostatic substances. With a view to consolidate the technical basis of submerged culture of edible fungi, *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus*, a series of studies with the nutrients of culture medium have been undertaken. The dry weight of mycelium obtained from the media containing glucose as the carbon source was 10g/l for *L.edodes* and 15g/l for *P.ostreatus* respectively. The addition of mucous substances, sodium alginate and methyl cellulose, to the media proved to be effective to reduce the pellet size of *P.ostreatus*, but not to stimulate growth.

Use of starch in place of glucose as the carbon source in the media almost trebled the yield of *L.edodes*. However, the subculture with this media tended to fluctuate in mycelium yield considerably. Such a problem of fluctuation in the subculture was found to be remarkably improved by incorporating glucose at the concentration of 2~3% to the starch media, but when used at 4~5% glucose exhibited the inhibitory effect for the growth of *L.edodes*. The mixture of zinc chloride and copper sulfate was effective to stimulate the growth of *L.edodes* when corn steep liquor (CSL) was used as the nitrogen source in the media.

In conclusion, the maximum dry weight of mycelium obtained from the media containing starch, glucose and CSL reached 25g/l for *L.edodes* in 14 days and 27g/l for *P.ostreatus* in 6 days respectively.

(Received September 16, 1977)

* Present address : Japan Pulp & Paper Research Institute, Inc., Daito Bldg. 3-6, Kanda-Ogawamachi Chiyoda-ku, Tokyo, 101

緒 言

担子菌類の中には、古来その子実体を食用に供せられてきたものが多い。近年、食用きのこの生産は人工栽培技術の発達に伴い飛躍的に拡大した⁽¹⁾。さらに最近では、食用きのこの栽培も微生物学的なアプローチが試みられており、栄養世代は増殖の速い深部培養を行い、生

殖世代は静置培養を行って、栽培期間の大幅な短縮と合理化をめざしている^(2~4)。また担子菌類による酵素⁽⁵⁾、抗生物質⁽⁶⁾、抗腫瘍性物質⁽⁷⁾の生産、あるいは、エタノールなどの非糖質炭素源を用いた微生物蛋白質の生産⁽⁸⁾など微生物工業としても注目されつつある。

このように食用きのこの栽培でも、生理活性物質や微生物蛋白質の生産でも、大量培養が可能な深部培養が必要である。ところが、担子菌類の深部培養は糸状菌特有のペレットの形成^(9,10)などの問題もあり、細菌などに比

† 食用きのこの深部培養に関する研究 (第 1 報)。

* 現在、株式会社日本紙パルプ研究所。

べて比較的増殖速度が遅く⁽¹¹⁾, 培養に長期間を要し菌体収量が少なく, 継代培養が不安定であるなど一般に大量培養が難しいとされている。

本研究はこれら培養上の諸問題を解決し, 工業的に大量培養が可能な担子菌類, 特に食用きのこの深部培養法の確立をめざしている。本報では, 主に炭素源, 窒素源などの培地組成が増殖速度や菌体の形態形成, 継代培養の安定性などに与える影響について研究した結果を報告する。

実験方法

1. 使用菌株 市販の種菌より分離したシイタケ (*Lentinus edodes*), ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) を用いた。

2. 培地組成 用いた試薬は, すべて市販品である。

(1) 保存培地: グルコース 20g, コーン・ステープ・リカー (以下 CSL と略す) 10g, 寒天 15g を蒸留水にとかして 1l とし, 培地 pH を 5.5 に調節して殺菌し斜面培地を調製した。CSL は三和殿粉株式会社製の粉末を用い, その主な成分組成は, 粗蛋白質 44%, 有機酸 (乳酸として) 24%, 灰分 22% である。

(2) 静置培養培地: グルコース 20g, CSL 10g, KH_2PO_4 1g を蒸留水にとかして 1l とし, 培地 pH を 5.5 に調節して殺菌し液体培地を調製した。

(3) 振盪培養培地: 本文にそれぞれ示した。

3. 培養方法 (1) 静置培養: 保存用斜面培地に生育した菌体を, 100 ml 三角フラスコに調製した静置培養培地 25 ml に接種し, 15~30 日間室温で静置培養した。

(2) 振盪培養: 500 ml 容振盪フラスコに仕込んだ振盪培養培地 100 ml に, 静置培養で得た菌体を接種し振盪培養した。振盪培養は, 28~29°C, 140rpm, 往復振盪の条件で行った。培養は, 同一条件で 5 本行い, 菌体量の測定に 2 本用い, 継代培養する場合には残りの 3 本から生育菌体をピペットで採取して接種した。

4. 生育菌体量の測定 生育した菌体は培養液から分別し, 蒸留水で充分洗滌した後, 105°C で乾燥し秤量した。

Table I. Composition of Basal Medium Except for Carbon and Nitrogen Sources

Constituent	Content
Thiamine-HCl	1 mg/l
KH_2PO_4	1 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	7.2 mg/l
ZnCl_2	4 mg/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 mg/l
Initial pH	5.5

実験結果および考察

1. グルコースを炭素源とした培養

(1) グルコース濃度の影響 担子菌類の深部培養については, Humfeld⁽¹²⁾ がマッシュルームの培養を試みて以来, 多くの研究がなされている^(10, 13~15)。そこで培地組成の検討を進めるにあたり, 吉田ら⁽¹⁰⁾の振盪培養培地を参考にして無機塩類の添加量を決め, ビタミン類はアミスギタケの必須生育因子であるチアミン⁽¹⁶⁾を添加して, これらを Table I に示した。炭素源は, これまでの研究で主に用いられているグルコースとし, 窒素源は, 微生物工業によく用いられている CSL として, 初めにシイタケを培養した。

Table II に示すように, 1 回目の培養では, グルコース 2~5% の濃度範囲で 5% の場合にやや菌体収量が増加する傾向を認めたが, 培養期間が 19 日と長い上に, 10g/l 程度の乾燥菌体しか得られていない。1 回目の培養で得た菌体をシードとして 2 回目の継代培養を行ったが同様な結果であった。培養終了時の pH は初発 pH 5.5 より低下し, 3.7~3.8 であった。

Table II. Effect of Concentration of Glucose on the Growth of *Lentinus edodes*

Culture sequence	Culture period (day)	Glucose (g/l) CSL (g/l)	20	30	40	50
			10	10	10	10
1st	19	Mycelium ^{a)} (g/l)	9.7	9.3	9.9	10.3
		Final pH	3.8	3.9	3.8	3.8
2nd	19	Mycelium ^{a)} (g/l)	8.6	8.3	11.6	11.3
		Final pH	3.8	3.7	3.7	3.7

^{a)} Dry weight of mycelium.

Culture media consisted of glucose and CSL indicated above, constituents described in Table I and distilled water to make 1l (pH 5.5). Cultures were carried out with liquid medium on a reciprocal shaker (140 rpm) at 28~29°C.

Table III. Effect of Concentration of Glucose on the Growth of *Pleurotus ostreatus*

Culture sequence	Glucose (g/l)		20	50
	CSL (g/l)		20	10
1st	Mycelium ^{a)}	(g/l)	9.0	7.0
	Culture period	(day)	4	9
2nd	Mycelium ^{a)}	(g/l)	13.3	15.0
	Culture period	(day)	7	10
3rd	Mycelium ^{a)}	(g/l)	8.2	
	Culture period	(day)	8	

^{a)} Dry weight of mycelium.

Culture media were identical with those described in Table II except for the addition of glucose and CSL indicated above. Culture conditions were the same as described in Table II.

次に、同様な培地組成でヒラタケを培養し、その結果を Table III に示した。シイタケの培養に比べて培養期間は 10 日以内と短かく、乾燥菌体収量は最大 15 g/l であった。またグルコース 5 % の培養では培養期間が長くなる傾向がある。

Table IV. Effect of Concentration of Corn Steep Liquor in the Glucose Media on the Growth of *L. edodes*

Culture sequence	Culture period (day)	Glucose (g/l)		50	50	50	50
		CSL (g/l)		3	5	7	10
1st	14	Mycelium ^{a)}	(g/l)	3.8	5.5	6.2	8.1
		Final pH		3.4	3.5	3.8	3.8
2nd	7	Mycelium ^{a)}	(g/l)	1.9	3.8	3.8	5.0
		Final pH		3.3	3.6	3.6	3.8
3rd	10	Mycelium ^{a)}	(g/l)	1.9	3.6	4.7	7.7
		Final pH		3.4	3.6	3.8	3.8
4th	17	Mycelium ^{a)}	(g/l)		7.3	9.0	12.1
		Final pH			3.7	4.0	3.7

^{a)} Dry weight of mycelium.

Culture media were identical with those described in Table II except for the addition of glucose and CSL indicated above. Culture conditions were the same as described in Table II.

Table V. Effect of Nitrogen Sources in the Glucose Media on the Growth of *L. edodes*

Culture sequence	Culture period (day)	Glucose (g/l)		50	50	50	50
		CSL (g/l)		10	6	6	6
1st	17	Yeast extract (g/l)			4		2
		Peptone (g/l)				4	4
2nd	10	Mycelium ^{a)}	(g/l)	11.5	10.8	9.2	10.5
		Final pH		3.9	3.7	4.0	3.7
2nd	10	Mycelium ^{a)}	(g/l)	8.8	10.8	7.4	9.8
		Final pH		4.0	3.9	4.0	3.9

^{a)} Dry weight of mycelium.

Culture media were identical with those described in Table II except for the addition of carbon and nitrogen sources indicated above. Culture conditions were the same as described in Table II.

(2) 窒素源の影響 イ. CSL 濃度の影響: 炭素源はグルコース 5 % 濃度で菌体収量が多いので、次に窒素源である CSL の濃度を変えて培養した。Table IV に示すように、CSL 濃度 0.3~1.0 % では 1 % が高い菌体収量となった。この CSL 濃度 1 % を窒素量に換算すると 0.07 % 程度になり、担子菌類の深部培養でこれまで用いられている窒素量 0.04~0.06 %^(2,10) よりやや高い濃度である。培養終了時の pH は CSL 濃度の低い方が低下している。この培養では Table III のヒラタケの培養と同様に、継代培養すると培養期間が長くなった。このような培養成績の悪化は培養菌体を植継ぐごとにベレットの形成、肥大が認められるので、その結果増殖速度が低下すると思われる^(9,10)。

ロ. 他の有機窒素源の影響: CSL の最適濃度が 1 % とやや高いので、他の有機窒素源との違いを知るため酵母エキス、ペプトンについて検討した。この実験では CSL の一部を他の窒素源と置き換えて培養し、Table V

の結果を得た。酵母エキス、ペプトンには CSL 以上に生育を促進する効果は認められなかった。

このようにグルコースを炭素源としたシイタケ、ヒラタケ培養では、窒素源として CSL が好ましいものの、増殖速度が遅く、ベレットの形成、肥大が起り継代培養が困難となることがわかった。したがって、担子菌類の深部培養ではベレットの形成、肥大を防ぐことが重要と思ひ、次に粘性物質の効果を検討した。

2. 粘性物質の影響

糸状菌のベレット形成には「凝集型」と「非凝集型」があり、菌株の特性や培養条件によって影響を受けるといわれている⁽¹⁷⁾。特に「凝集型」菌株は培地の粘性を高めることにより繊維状菌体を形成しやすいとされている⁽¹⁸⁾。そこでベレットの形成、肥大を防ぎ、増殖速度を増すために粘性物質のアルギン酸ソーダ、メチル・セルロースを培地に添加してヒラタケを培養し、その結果を Table VI に示した。アルギン酸ソーダ、

メチル・セルロースはペレットの形成に大きな影響を与えて菌体は非常に小さくなり、継代培養が容易になると思われた。しかし、ペレットの形成、肥大は防がれたが、菌体収量の増加はあまり認められず、粘性物質無添加の培養と同様に菌体収量は変動の大きい結果となった。大山ら⁽³⁾はメチル・セルロースの添加によって培地粘度を増すことが、ペレット径を小さくし、比増殖速度を高めることになり菌体収量を増加させるとしている。一方、永曾ら⁽¹⁹⁾はペレット状や繊維状の形態差が菌体収量に大きい影響を与えないとしている。菌株や窒素源

など培養条件の違いなどの問題があるものの、ペレットの形成、肥大を防ぐことが必ずしも増殖速度や菌体収量の増加につながらないことがわかった。また粘性物質の添加は培地の流動性を低下させるため培養液からの菌体分離は困難となり、操作上問題となると思われる。ヒラタケの培養終了時の pH はシイタケの場合と異なり、初発 pH 5.5 とあまり変わらず 5.6~5.8 であった。

このようにグルコース培地に粘性物質を添加し、ペレットの形成、肥大を防いでも増殖速度は遅く、シイタケ、ヒラタケともに、10 日以上培養期間が必要であり、しかもシイタケで 10g/l、ヒラタケで 15g/l 程度の乾燥菌体しか得られない。したがって、この程度の培養成績では工業的な大量培養に用いることは困難であると思われたので、さらに他の炭素源などの検討が必要と考えた。

3. デンプンを炭素源とした培養

多糖類は担子菌類の深部培養の炭素源としても用いられている^(3,4,10,13)。シイタケはデンプン、デキストラン、ベクチンでよく増殖するので⁽¹⁰⁾、粘性物質であるがアルギン酸ソーダなどと異なり分解されやすいと思われるデンプンを用いて培養条件を検討した。

(1) デンプン濃度の影響 この実験に用いたデンプンは市販の生コーン・スターチである。グルコースの場合と同様にデンプン濃度を 2~5% に変えて培養した。Table VII に示すように、初めの培養ではデンプン濃度が高いほど菌体収量が増加し、デンプン 5% では 20g/l 以上の乾燥菌体が得られた。2 回目の培養では乾燥菌体収量が 25g/l にも達しただけでなく、培養期間が 13 日から 8 日に短縮された。ただし、3 回目の継代培養で乾燥菌体収量が 20g/l 以下に減少し、継代培養が不安定であることがわかった。

デンプン 5% で高い菌体収量が得

Table VI. Effect of Mucoids on the Growth of *P. ostreatus*

Culture sequence	Culture period (day)	Sodium alginate (g/l)		10	
		Methyl cellulose (g/l)		10	
1st	10	Mycelium ^{a)} (g/l)	7.0	11.8	5.7
		Final pH	5.6	5.8	5.7
2nd	10	Mycelium ^{a)} (g/l)	15.0	9.9	12.9
		Final pH	5.7	5.7	5.7

^{a)} Dry weight of mycelium.

Culture media consisted of glucose 50g, CSL 10g, constituents described in Table I, mucoids indicated above and distilled water to make 1l (pH 5.5). Culture conditions were the same as described in Table II.

Table VII. Effect of Concentration of Starch on the Growth of *L. edodes* at Lower Starch Concentrations

Culture sequence	Culture period (day)	Starch (g/l)	20		50	
			CSL (g/l)		10	
1st	13	Mycelium ^{a)} (g/l)	11.5	16.5	20.2	22.5
		Final pH	4.0	3.3	3.6	3.3
2nd	8	Mycelium ^{a)} (g/l)	11.4	17.6	20.6	25.4
		Final pH	3.4	3.4	3.3	3.4
3rd	7	Mycelium ^{a)} (g/l)	6.6	8.9	13.4	18.2
		Final pH	3.8	3.7	3.4	3.6

^{a)} Dry weight of mycelium.

Culture media consisted of starch and CSL indicated above, constituents described in Table I and distilled water to make 1l (pH 5.5). Culture conditions were the same as described in Table II.

Table VIII. Effect of Concentration of Starch on the Growth of *L. edodes* at Higher Starch Concentrations

Culture sequence	Culture period (day)	Starch (g/l)	50		80	
			CSL (g/l)		10	
1st	13	Mycelium ^{a)} (g/l)	20.5	26.6	33.2	29.3
		Final pH	3.8	3.7	3.7	3.7

^{a)} Dry weight of mycelium.

Culture media were identical with those described in Table VII except for the addition of starch indicated above. Culture conditions were the same as described in Table II.

られたので、さらにデンプン濃度を高くして培養した。Table VIII に示すように、デンプン 7% で最大収量となり、33 g/l の乾燥菌体を得られた。培養期間が 13 日とやや長いものの、担子菌類の深部培養としては従来の乾燥菌体収量 10 g/l^(6,7,10) に比べて非常に高い菌体収量である。ところが、この培養菌体を 2 回目の継代培養に用いると、培地のデンプンが可溶化しないで菌体の生育がほとんど認められず培養を中止した。デンプン 5% 以下での培養よりも、さらに継代培養が不安定であると思われる。

デンプンのみを炭素源とした場合、アルギン酸ソーダなどの粘性物質を添加した場合と異なり、ペレットの形成、肥大が認められる。ただし、繊維状菌体も多く見ら

Table IX. Effect of the Addition of Glucose to the Starch Media on the Growth of *L. edodes*

Culture sequence	Culture period (day)	Starch (g/l) Glucose (g/l) CSL (g/l)	50	50
			10	10
1st	11	Mycelium ^{a)} (g/l)	20.0	19.0
		Final pH	3.3	3.6
2nd	12	Mycelium ^{a)} (g/l)	18.0	23.1
		Final pH	3.2	3.2
3rd	14	Mycelium ^{a)} (g/l)	23.7	25.5
		Final pH	3.6	3.5

^{a)} Dry weight of mycelium.

Culture media consisted of starch, glucose and CSL indicated above, constituents described in Table I and distilled water to make 1 l (pH 5.5). Culture conditions were the same as described in Table II.

Table X. Effect of the Addition of Glucose to the Starch Media on the Growth of *P. ostreatus*

Culture sequence	Culture period (day)	Starch (g/l) Glucose (g/l) CSL (g/l)	50	50
			10	10
1st	6	Mycelium ^{a)} (g/l)	19.7	27.7
		Final pH	5.5	5.6
2nd	6	Mycelium ^{a)} (g/l)	22.3	25.1
		Final pH	5.8	5.0
3rd	7 ^{b)}	Mycelium ^{a)} (g/l)	11.9	21.9
		Final pH	7.6	5.7

^{a)} Dry weight of mycelium.

^{b)} Culture periods of 3rd culture were for 10 days when glucose was not added.

Culture media were identical with those described in Table IX. Culture conditions were the same as described in Table II.

れる点がグルコース培養と異なる。また培養終了時に菌体を浮別した培養母液は濁っており、可溶化されないデンプンが残っていると思われる。特にデンプン 5% 以上の高濃度培地では、培養母液の濁度が高いようである。川合によれば⁽²⁰⁾、シイタケ、ヒラタケなどの“まつおじ族” (*Lentineae*) はアミラーゼ活性が弱く、デンプン培地では菌体外にアミラーゼを生成する例はきわめて少ないとされている。デンプン培地で生育し高い菌体収量を得ているので、シイタケにアミラーゼ活性が存在すると思われるが、比較的その活性が弱く、特に菌体量の少ない培養初期にはデンプンの分解、利用が不十分となり、順調な生育を妨げられる場合も考えられる。そこで、培養初期に菌体の生育を促進することが培養の安定化に結びつくと考えた。

(2) グルコース添加の効果 培養初期に利用されやすい炭素源として単糖であるグルコースがよいと思われたので、Table IX に示したように、デンプン培地にグルコースを 20 g/l 添加して培養した。初めの培養ではグルコース添加と無添加との差は、ほとんど認められないが、2、3 回目の継代培養ではグルコース添加の方が菌体収量が多く、培養が安定している。ただ、この実験ではグルコース無添加培養でも 2 回目で菌体収量が減少しているものの、3 回目では高い菌体収量を得られている。それだけにグルコース無添加培養の安定性が問題となる。培養母液を見れば、培養終了時にはグルコース添加の方が透明度は高く、デンプンがよく分解されているように思われる。培養終了時の pH は 3.2~3.6 であり、グルコース添加の有無とは関係ないようである。

ヒラタケについてもデンプン培養でシイタケの場合と同様な結果が得られるか検討した。Table X に示すように、デンプン 5% で 20 g/l 前後の乾燥菌体を得ているが、シイタケの場合と同様に炭素源としてデンプンのみを用いると、3 回目の継代培養で生育が極端に悪化し、培養終了時の pH も 7.6 と高くなった。これに対してグルコース添加培養では 3 回目の培養で若干収量の低下があるものの、培養期間が 6~7 日と大幅に短くなり、培養も比較的安定し、25 g/l 前後の乾燥菌体を得ている。ヒラタケの場合、シイタケより以上にグルコース添加効果が顕著であり、菌体収量の増加だけでなく培養期間も短縮される。

さらにグルコース添加濃度の影響を知るため、グルコース濃度を 5% まで高めてシイタケを培養し、Table

Table XI. Effect of Concentration of Glucose Added to Starch Media on the Growth of *L.edodes*

Culture sequence	Culture period (day)	Starch (g/l)	Glucose (g/l)			
			50	50	50	50
			20	30	40	50
		CSL (g/l)	10	10	10	10
1st	11	Mycelium ^{a)} (g/l)	21.4	20.5	18.7	20.8
		Final pH	3.6	3.4	3.3	3.6
2nd	11	Mycelium ^{a)} (g/l)	19.5	21.1	14.6	15.0
		Final pH	3.4	3.6	3.5	3.5

^{a)} Dry weight of mycelium.

Culture media were identical with those in Table IX except for the addition of glucose indicated above. Culture conditions were the same as described in Table II.

Table XII. Effect of Minerals on the Growth of *L.edodes*

Culture sequence	Culture period (day)		Minerals (g/l)			
			CaCl ₂ ·2H ₂ O	MgSO ₄ ·7H ₂ O	FeSO ₄ ·7H ₂ O	MnSO ₄ ·6H ₂ O
			0.5	0.5	10	7.2
			0.5	0.5		
			10		10	
			7.2		7.2	
			4			4
			1			1
1st	10	Mycelium ^{a)} (g/l)	20.7	19.9	19.3	22.4
		Final pH	3.4	3.5	3.3	3.2
2nd	13	Mycelium ^{a)} (g/l)	22.4	21.7	25.2	24.9
		Final pH	4.0	3.2	3.8	3.5
3rd	12	Mycelium ^{a)} (g/l)	23.2	18.6	18.4	19.4
		Final pH	4.0	4.0	3.8	3.6
4th	11	Mycelium ^{a)} (g/l)	22.9	21.3	24.6	25.7
		Final pH	4.2	3.8	3.7	3.6

^{a)} Dry weight of mycelium.

Culture media consisted of starch 50g, glucose 10g, CSL 10g, KH₂PO₄ 1g, thiamine-HCl 1mg, minerals indicated above and distilled water to make 1l (pH 5.5). Culture conditions were the same as described in Table II.

XI の結果を得た。興味深いことにはグルコース 2～3 % 添加では比較的安定した菌体収量が得られているのに対し、グルコース 4～5 % 添加では特に 2 回目の継代培養で菌体収量が減少している。また培養液もグルコース 4～5 % では濁っており、デンプンの分解が不十分であると思われた。

このようにデンプン培地にグルコースを添加すると、継代培養が安定化し菌体収量や増殖速度が増加することは明らかであり、この生育促進効果はアミラーゼ活性の弱い培養初期に添加されたグルコースが利用されることによると推察される。ただし、この効果はグルコース 2～3 % 添加で起るが、グルコース 4～5 % 添加では逆に生育を阻害し、グルコース高濃度による基質阻害が生じるものと思われる。

4. 無機塩類の影響

これまでの培養では、すべて無機塩類としてリン酸カ

リウムの他に、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、硫酸第 1 鉄、硫酸マンガン、塩化亜鉛、硫酸銅を添加してきた。しかし、窒素源の CSL には 20 % 程度の灰分が含まれており無機塩類の添加量を減らすことも必要と考え、Table XII の実験を行った。4 回に及ぶ培養で安定した菌体収量を示したのは、すべての無機塩類を添加した場合である。ところが、塩化亜鉛と硫酸銅の添加培地は 3 回目の継代培養で菌体収量が低く、やや安定性に欠ける面もあるが、3 回目の培養以外は菌体収量が最大であり、平均菌体収量も最大である。培養終了時の pH をみると、すべての無機塩類を添加したものは pH 4 前後であるのに対して、塩化亜鉛と硫酸銅を添加したものは pH 3.5 前後とやや低い。大山ら⁽³⁾によれば、スエヒロタケの深部培養で硫酸銅、硫酸マンガン、硫酸亜鉛に生長促進効果があるとしている。したがって、CSL が相当量の無機塩類を含んでいることもあり、CSL を窒素源として用いる場合には、リン

酸カリウム以外に塩化亜鉛と硫酸銅の添加だけでもよいと思われる。

以上の結果から、デンプン-グルコース-CSL 培地を用いてシイタケ、ヒラタケを培養すれば、比較的高い菌体収量の得られることが明らかとなったが、デンプン培養でもアルギン酸ソーダなどの場合と異なり、菌体は必ずしも全体が繊維状とならず、一部のペレットは肥大することが観察される。したがって、デンプン-グルコース-CSL 培地による培養も、まだ問題点が残っており、さらに安定で増殖速度の速い培養法とするため詳細な検討を進めている。

要 約

担子菌類、特に食用きのこの深部培養について、工業的な大量培養技術の確立をめざして研究を開始した。本報では、主に炭素源、窒素源などの培地組成について検

討し、次の結果を得た。

1. 炭素源としてグルコースを用いた場合、増殖速度は遅く、シイタケでは 10 g/l (培養期間 19 日)、ヒラタケでは 15 g/l (培養期間 10 日) の乾燥菌体しか得られなかった。窒素源として CSL を用いる場合、1%濃度で菌体収量が最大となり、CSL の一部を酵母エキス、ペプトンに置換しても生育を促進しなかった。

2. グルコース培地に粘性物質のアルギン酸ソーダやメチル・セルロースを添加すると、菌体のペレット径は小さくなるが、菌体収量は増加しなかった。

3. デンプンを炭素源とした場合、シイタケはデンプン 7% 培地で 30 g/l 程度の乾燥菌体を得られたが、継代培養が不安定であった。この培地にグルコース 2~3% を添加すると継代培養が安定となり菌体収量も増加した。この培地によって乾燥菌体でシイタケは 25 g/l (培養期間 14 日)、ヒラタケは 27 g/l (培養期間 6 日) に達した。ただし、4~5% のグルコース添加は、逆に菌体収量を低下させた。

4. 窒素源に CSL を用いて無機塩類の影響を検討し、塩化亜鉛と硫酸銅の混合添加に生育促進効果を認めた。

本研究の遂行に際し、CSL を隅田化学株式会社からご提供いただいた。ここに厚くお礼申し上げます。また、ご援助いただいた株式会社日本紙パルプ研究所、研究所長浅岡宏博士に感謝の意を表わします。本研究の発表を許可された日本パルプ工業株式会社に深謝します。

なお、本研究の一部は昭和 50 年度日本農芸化学学会大会 (札幌市) で発表した。

- (1) 日本海苔食品新聞社編：椎茸きのこ年鑑 (1975)。
- (2) 杉森恒武，大山義朗，大道妙子：醸工，**49**, 435 (1971)。
- (3) 大山義朗，吉田敏臣，田口久治：同上，**54**, 131 (1976)。
- (4) 椎尾 剛：日本醸造協会雑誌，**71**, 418 (1976)。
- (5) 川合正允：発酵と工業，**34**, 834 (1976)。
- (6) 竹内富雄，飯沼寛信：同上，**34**, 843 (1976)。
- (7) 千原呉郎：同上，**34**, 942 (1976)。
- (8) 杉森恒武：醸酵協会誌，**32**, 431 (1974)。
- (9) 高橋譲二，山田浩一，朝井勇宣：農化，**32**, 501 (1958)。
- (10) 吉田敏臣，田口久治，寺本四郎：醸工，**43**, 325 (1965)。
- (11) 川合正允：農化，**47**, 467 (1973)。
- (12) H. Humfeld : *Science*, **107**, 373 (1948)。
- (13) R. F. Robinson : *Advances in App. Mycro.*, **1**, 261 (1959)。
- (14) D. J. Niederpruem : *J. Bacteriol.*, **89**, 954 (1965)。
- (15) J. H. Litchfield, R. C. Overbeck and R. S. Davidson : *J. Agric. Food Chem.*, **11**, 158 (1963)。
- (16) 北本 豊，葛西善三郎：農化，**42**, 255 (1968)。
- (17) 高橋譲二，山田浩一：農化，**33**, 707 (1959)。
- (18) 高橋譲二，小佐野吉泰，山田浩一：農化，**34**, 440 (1960)。
- (19) 永曾幸代，吉川光一：日本食品工業学会誌，**22**, 361 (1975)。
- (20) 川合正允：農化，**47**, 529 (1973)。