

気泡塔を用いたキノコ菌糸体の液体培養

(Submerged Culture of Mushroom Mycelium by Bubble Columns)

奈良工業高等専門学校 物質化学工学科 教授

河越 幹男

1. はじめに・・・古くて新しい神秘の食材

キノコは、正式には「きのこ」と書くのが正しいのですが、平仮名が続くと判別し難くなりますので、キノコと表記します。このキノコは、古くから食材として利用されてきました。ドイツで街の本屋さんに入りますと、キノコの図鑑や料理本がたくさん並べられており、ゲルマン民族が森林民族であることを改めて認識しました。また、キノコは洋の東西を問わず、神秘的な食物と考えられていたようで、絵本や本の挿絵で魔法使いの“おばあさん”が、カラスの頭やガマガエルなどの怪しげな食材を大釜に入れてグツグツと煮込んでいる絵をよく見かけますが、その食材の中には、必ずと言ってよいほど、キノコが描かれています。キノコには、生理活性作用をもった成分を代謝するものが多くあります。もちろん、人間にとって有益な薬理効果のあるものばかりではなく、テングタケ科のキノコのように極めて有毒な成分を出すものもあります。中には、シビレタケのように幻覚作用をもつシロシビンなどの成分を分泌する恐ろしいキノコもあります。古代人がキノコに神秘性を見出したのは、このようなキノコによる嬉しい薬理効果と同時に、不思議な幻覚作用を体験したためと思われます。

このように書きますと、キノコは何やら怪しげなものに思われますが、決して、そのようなことはありません。むしろ、最近では、キノコの薬理効果が注目を集め、健康食品として注目されており、代謝成分やその効果について科学的にも研究されています。特に、キノコが抗ガン作用をもつ多糖類を代謝することは広く知られています。

特に、シイタケからレンチナン、カワラタケからクレスチン、スエヒロタケからシゾフランが発見・単離され、それぞれ医療に応用されています。最近では、ブラジルのピエダーテ地方に自生していたアガリクスブラゼイがガン阻止率 99.4%という驚異的な制ガン作用を発揮することから、爆発的なブームになったことは記憶に新しいところではあります。

キノコは進化の過程では遅れて登場した微生物であるため、利用しやすい植物成分は既に他の微生物が利用しており、残された分解しにくい成分を利用する以外に生きていく方法がありませんでした。そのため、リグニンやセルロースなど、他の微生物では歯がたたない難分解成分を分解する酵素をもっており、残り物をきれいに分解してしまいます。キノコが森の掃除屋と言われるゆえんです。中には、PCBやダイオキシンなどの有害成分を分解する凄腕のキノコもいます。この意味で、キノコは自然界の物質循環の中で重要な役割を担っています。これ以外にもキノコは特異な機能を有するタンパク質分解酵素や酸化還元酵素を代謝します。中にはチーズの生産に欠かせない凝乳活性のある酵素（レンネット）をつくるウスバタケのようなキノコもあります。このキノコのお陰で、多くの仔牛の命が救われた筈です。

このように、キノコは様々な機能を持っていますが、これらの機能を利用する観点から見ると、必ずしも、我々が親しんでいるキノコの形（難しくは、子実体と言います）をとる必要はありません。菌糸体でも十分にその機能を利用することが出来ます。菌糸体と子実体では、その生産方法において大きな違いがあります。前者は工業生産が可能ですが、後者はあくまで農業生産です。従いまして、経済性を考えれば、菌糸体の方が、断然、お得です。この観点から、我々は気泡塔を用いた有用キノコ菌糸体の液体培養に関する研究を続けてきました。本稿では、この研究を行う上で知り得た知識と我々が得たささやかな結果について述べさせていただきます。

2. 子実体と菌糸体

まず、子実体と菌糸体の違いについて見てみます。菌糸が成長すると、菌糸の集合体を形成します。集合体は液体培地中と固体培地中ではその形態が異なりますが、いずれにしても、そのままですと菌糸体のままです。この菌糸体にある刺激を与えますと、それを契機に子実体を形成し始めます。この刺激には、温度変化、光、化学物質などがあり、キノコの種類によって異なります。マツタケなどはこの刺激が何であるのか未だに分からないため、人工栽培が成功していません。

子実体と菌糸体の生産性を比べてみますと、次のようになります。まず、①菌糸体の方が、培養時間が短くて済みます。子実体を栽培する場合には、通常、固体培地を用いますが、まず、この固体培地の調整や菌の植え付けに時間がかかります。さらに、菌糸を固体培地に植菌してから子実体を形成するまでには、キノコの種類にもよりますが、かなりの日数を要します。これに対して、液体培養の場合には、培地の調整は短時間で済みます。菌糸体の増殖速度も速く、3～5日程度で十分に増殖するものもあります。通常のキノコの菌糸体は1週間以内で十分成長します。もちろん、マツタケやアガリクスのように2週間から1ヶ月以上かかる場合もありますが、それでも、これらの子実体の成長速度に比べますと、はるかに短時間で済みます。次に、②培養に必要な場所です。子実体の栽培には、かなり広い面積を必要とします。最近は、おがくずを詰めた容器による栽培も行われ、省スペース化がはかられていますが、それでも広い面積を必要とします。これに対し、菌糸体の液体培養では、バイオリアクターとその周辺機器の設置面積のみですから、非常に少なく済みます。さらに、③労力は菌糸体の培養の方がはるかに少なく済みます。子実体の栽培は本質的に農業生産であり、菌の植え付け、栽培条件の管理、収穫などにかかなりの労力を必要とします。これに対して、液体培養の場合には温度、pH、培地組成などはコンピューターを用いて精密にコントロールすることができ、かつ、植菌や収穫も人手を煩わせることなく自動的に行うことができますので、工業的な大量培養に適しています。

3. キノコ菌糸の液体培養の歴史

キノコ菌糸の液体培養の始まりは、第2次世界大戦直後の1946年ごろまで遡ります。カビのタンク培養による抗生物質（ペニシリン）の生産における成功が、その契機になったようです。キノコ類も、カビと同様、糸状菌の一種ですので、カビで旨くいくのであればキノコでも出来るはずだ、と考えられたのでしょう。平和な時代が到来すると、直ちにキノコ菌糸の液体培養が試みられ、幾種類かのキノコ菌糸は液体培養が可能であることが見出されました。

最初に液体培養による大量生産が試みられたキノコは、マッシュルーム（学名；*Agaricus bisporus*）です。このキノコはツクリタケとかセイヨウマツタケとかシャンピニオンとも呼ばれており、生産量は世界第1位の食用キノコです。培養液としては、柑橘類の搾汁残液や缶詰工場からの廃液が使われていました。液体培養された菌糸体は固体培地の上に散布されます。やがて、固体培地から子実体が成長し、商品となります。従いまして、最終目的は、あくまで子実体を得ることにあり、菌糸体のままでの利用は考えられていませんでした。

初期の頃の培養装置は全て通気攪拌槽です。しかし、キノコのような糸状菌の場合、菌糸が攪拌羽根によって損傷を受けたり、あるいは絡みついたりします。また、菌体濃度が高くなると培養液の非ニュートン性が顕著になって、培養液の攪拌が旨くいかなくなったりします。さらに、軸受け部分からの雑菌の進入によるコンタミネーション（コンタミ）が起りやすいため、大型化には自ずと限界があります。このように機械的攪拌を伴う攪拌槽にはいくつかの問題点があるため、機械的攪拌を伴わない通気のみによる液体培養も試みられました。

最初の通気のみによる液体培養はアミガサタケ（学名；*Morchella esculenta*）で試みられました。アミガサタケはスープにするとおいしいと言われていています。ただ、中毒をおこすものもあるようなので、気を付けなければなりません。この培養では、約10リットルの試薬瓶に通気用のガラス管が挿入された簡単な装置が使われてい

ます。それでも、培養はうまくいき、直径 10mm 程度のマリモ状の球形ペレットが形成されています。この培養装置は、機械的な攪拌を伴わないので、気泡塔の原型と考えてもよいと思います。

4. 気泡塔型培養装置

最初に本格的な気泡塔をキノコ菌糸体の液体培養に用いたのは、我々ではないかと思えます。気泡塔には様々なタイプがありますが、我々は図 1 に示しました標準気泡

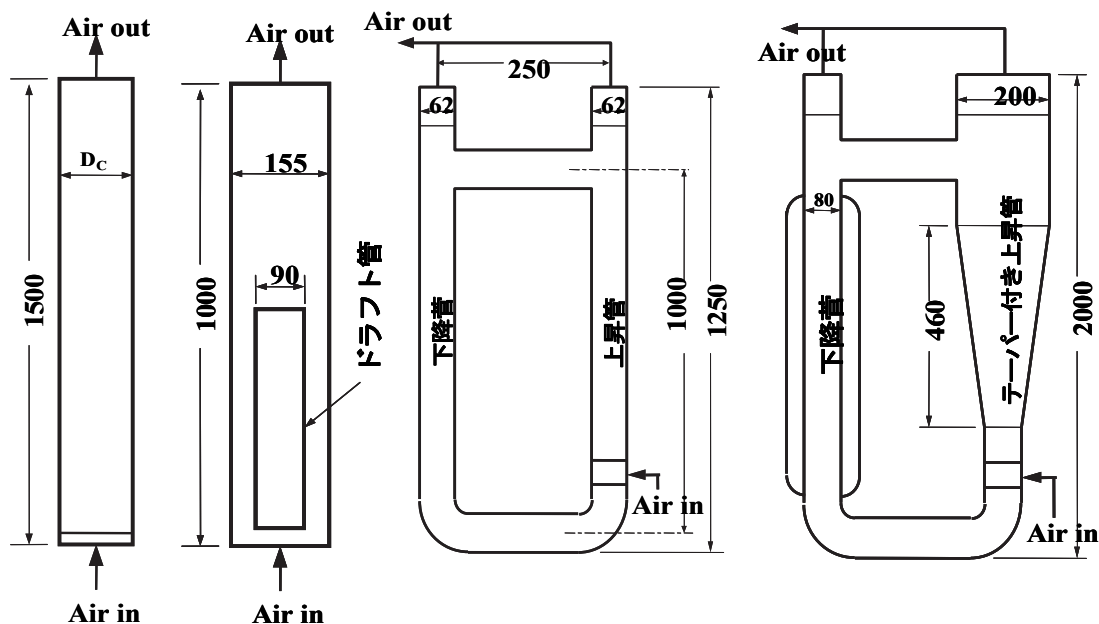


図 1 キノコ菌糸体の液体培養に用いた気泡塔型培養装置

塔、内部循環式気泡塔、外部循環式気泡塔を用いました。

標準気泡塔は塔径 D_c が 60mm と 100mm の 2 基を使用しました。また、外部循環式気泡塔は、上昇管が直管のものとテーパ管のもの 2 種類を用いました。テーパ部を有する上昇管の場合には、テーパ部分に菌体ペレットが保持されやすくなります。

塔内の気液混相の流動状態は塔形式によってかなり異なります。この流動状態は培養した菌糸体の形態に少なからず影響を与えます。標準気泡塔の場合、大気泡を多く

含んだ上昇流と微小気泡を含んだ下降流が存在しますが、この上昇流と下降流が一つの断面内を通過するため、流動状態は複雑で、乱れの程度も大きくなります。内部循環式気泡塔は外管と内管（ドラフト管）の二重管から構成されており、気泡を含んだ上昇流が内管内を上昇し、内管と外管の間の環状部を液が下降する大きな循環流が存在します。この循環流の起動力は内管と外管の間の密度差です。即ち、内管内の上昇流は気泡を多く含むため密度が小さく、環状部の下降流は気泡を殆ど含まないため密度が大きくなっています。この密度差に起因する浮力によって循環流が発生します。この場合、塔中央部では上昇流と下降流がドラフト管によって分離されているため、流れは単純で、乱れの程度も標準気泡塔ほど大きくはありませんが、塔上部（ドラフト管上端と気液分離面の間の部分）では、標準気泡塔と同様、上昇流と下降流が混在するため、流れは複雑で乱れの程度も大きくなります。外部循環式気泡塔では、上昇管と下降管が完全に分離しているため、流れ様式は単純で、乱れの程度も前の二者に比べて小さくなっています。従いまして、乱れの程度は標準塔、内部循環式、外部循環式の順に小さくなっています。

5. 気泡塔による各種キノコの液体培養

我々は、これまでに気泡塔を用いて図2に示しましたようなアミガサタケ、スエヒロタケ、マツタケ、シイタケ、アガリクスブラゼイ、エノキタケの6種類のキノコの

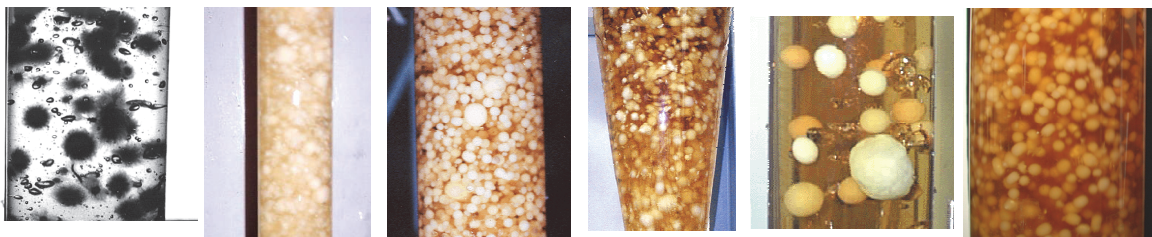


図2 気泡塔で液体培養した菌糸体：左から、アミガサタケ、スエヒロタケ、マツタケ、シイタケ、アガリクスブラゼイ、エノキタケ

液体培養を行いました。このうち、アミガサタケだけは子囊菌であります。他のキノコは担子菌類に属します。菌糸体の形態や代謝産物はキノコの種類によって異なります。以下では個々のキノコについて、個別に液体培養の結果を説明します。なお、エノキタケはまだ研究途中ですので、ここでは割愛させて戴きます。

5-1 アミガサタケ

アミガサタケは、名前のおり、傘の部分が網目状になっています。この菌糸を P D Y 培地の中で液体培養しました。P D Y とは **Potato-Dextran-Yeast Extract** のことです。Potato とありますように、ジャガイモを用いました。学校の前のスーパーでジャガイモを買ってきて、その煮汁を使いました。どんなジャガイモでも良いわけではなく、学生が「新ジャガはデンプンが出て良くない」とか、「メイクインよりも男爵イモの方が良い」とか言っていたのを憶えています。このキノコ菌糸は直径 10~20mm 程度のマリモ状の球形ペレットを形成し、5 日程で気泡塔に充満してしまいました。後で述べますマツタケやアガリクスブラゼイが 1 ヶ月程度かかったのに比べますと、成長が非常に早いことが分かります。培養末期では p H が急激に低下しますので、これが培養終了の目安になりました。不思議なことに、炭素源として入れましたメインの基質であるグルコースをほとんど消費しませんでした。一体、何を食べて大きくなったのか、未だに分かりません。そのくせ、グルコースを入れないと成長しませんでした。

5-2 スエヒロタケ

スエヒロタケは木材腐朽菌で、世界中どこにでもいる生息範囲の広いキノコです。森や林の中で、朽ちた倒木に生えている白いキノコを見つけたら、それはスエヒロタケであるかもしれません。皆様も、これまでに、それをスエヒロタケと認識しないで見ている可能性は十分にあります。それほどポピュラーなキノコです。ただし、必ずしも安全ではなく、たまに人に寄生することがありますので、注意が必要です。

このキノコは、先にも述べましたように、抗ガン剤として利用されていますシゾフラン (Schizophyllum) という多糖を代謝します。このキノコの学名 *Schizophyllum*

commune はこの物質に由来します。これ以外に、このキノコのある種はリンゴ酸を大量に代謝します。これは炭酸固定発酵と呼ばれ、立命館大学の立花先生が詳細に研究されています。立花先生はジャーファーメンターを使っておられ、気泡塔型培養装置には全く触れておられません。

図3に標準気泡塔と外部循環式気泡塔におけるリンゴ酸収率と空気流量の関係を示しました[1]。何れの塔でもリンゴ酸収率を最大にする空気流速が存在しますが、その値は標準気泡塔で 0.7cm/s, 外部循環式気泡塔で 1.6cm/s と約 2 倍異なっています。ここで、空気流速は塔単位断面積当たりの空気流速であり、外部循環式気泡塔の場合は上昇管基準の値です。外部循環式気泡塔の液仕込量は、標準気泡塔のそれよりも下降管の体積分だけ多いので、約 2 倍になります。そこで、単位培地量当たりの空気流量（以下では、比空気流量と呼びます）で比較してみました。ここで、比空気流量の単位は、単位培地量(L)当たりの空気流量 (L/min) ですので min^{-1} になりますが、慣用的に vvm と言われていますので、ここでも以下では vvm を用います。そうすると、標準気泡塔で 0.33vvm, 外部循環式気泡塔で 0.40vvm になり、両者はほぼ等しくなることがわかりました。リンゴ酸収率は外部循環式気泡塔の方が 2 倍以上大きくなっています。この培養系は炭酸固定発酵と言われる通り、培養液中に約 50kg/m^3 程度の炭酸カルシウムを含んでいます。スエヒロタケは粘性の高いシゾフランを生成しますので、菌体ペレットは培養液中に懸濁している炭酸カルシウムを吸蔵し、密度が大きくなります。このため、標準気泡塔の場合には多くのペレットが塔底に沈降しましたが、外部循環式気泡塔の場合には、強い循環流のためペレットは沈降することなく、浮遊状態に保たれていました。塔底に沈降したペレット内の菌体には酸素や栄養素が十分に供給されないため、リンゴ酸の生産が低下します。標準気泡塔のリンゴ酸収率が外部循環式気泡塔のそれよりも小さくなったのはこのためと考えられます。

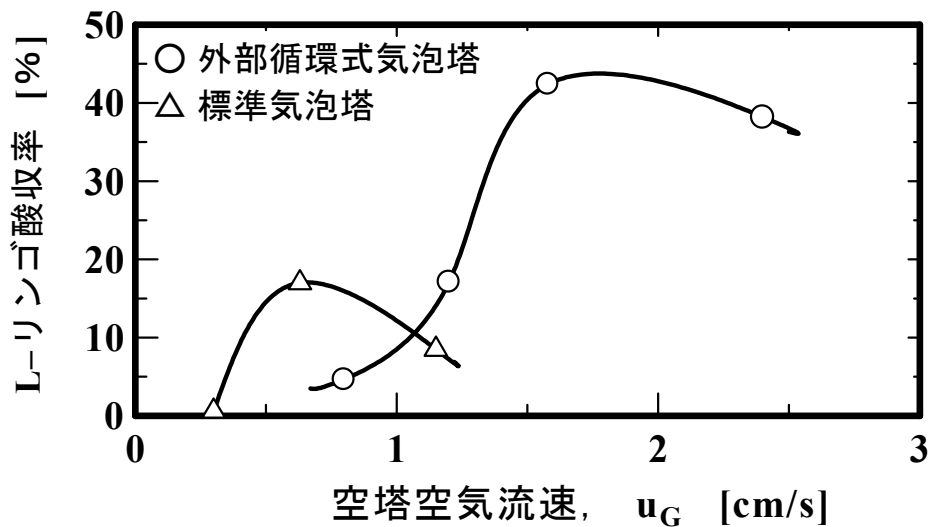


図3 リンゴ酸収率に及ぼす塔形式の影響

5-3 マツタケ

日本人にとって、何と云ってもマツタケはキノコの王様です。マツタケは食材として優れているのみではなく、抗ガン性も高く、水野先生らによると第6番目にランクされ、シイタケよりも高い効能をもっています。また、マツタケは至適温度が80℃程度という高い温度で働くタンパク質分解酵素のプロテアーゼを作ります。このように、マツタケは食材価値が高く、高機能成分を代謝するにも係わらず、子実体を形成する分化のメカニズムが解明されていないため、人工栽培は未だ成功していません。しかし、抗ガン作用とか高機能性の酵素を利用するなどの観点からみれば、必ずしも子実体を作る必要はなく、菌糸体でも十分にその役割を担うことができます。また、菌糸体そのものも、食材として利用でき、事実、蒲鉾で有名な「紀文」はフラスコによる振盪培養によって、球形ペレットをつくり、「マツタケボール」という名で特許をとっています。このような観点から、標準気泡塔と外部循環式気泡塔を用いて、マツタケ菌糸の液体培養を試みました[2]。

図2に示した写真は標準気泡塔で培養したマツタケ菌糸体の培養11日目の状態です。写真に示しましたように、マツタケ菌糸は球形のペレットを形成しました。塔の直径が100mmですので、その比較からペレットの直径は7~20mm程度であることが分かります。空気流量や塔形式などの培養条件を変えますと、ペレットの形態も変化しました。形態は、上述の球形ペレットの他に直径が5mm程度の粒状ペレットと不定形のフィラメント状ペレットに大別できました。それぞれの形態の特徴を簡単に述べます。球形ペレットは直径が大きいため、沈降速度も大きく、標準気泡塔では菌体濃

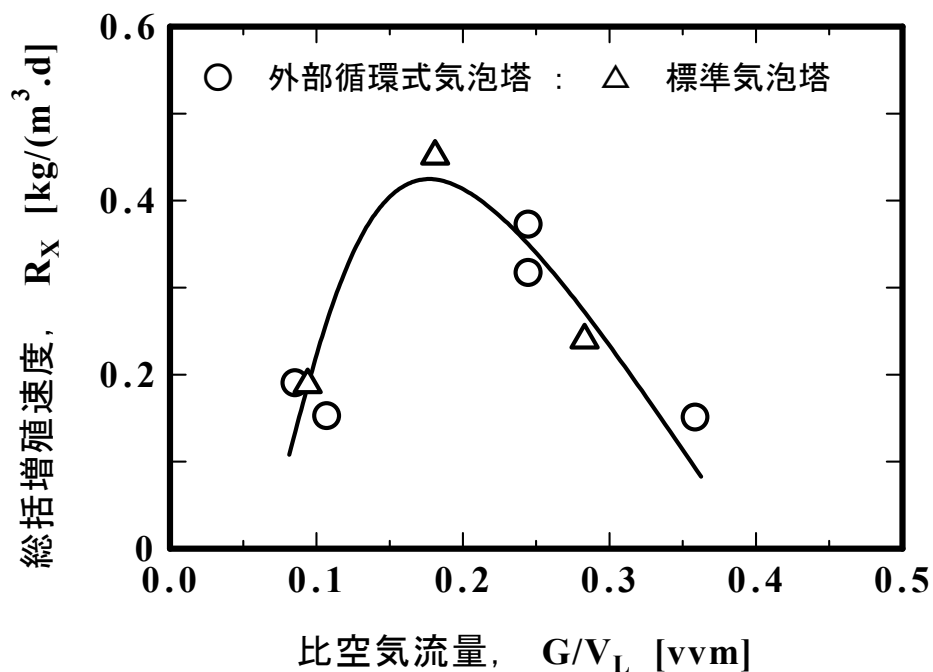


図4 総括増殖速度と比空気流量の関係

度がある限界値以上になりますと、塔底に沈降します。この時点で培養は終了になります。これに対し、粒状ペレットは直径が小さいため沈降することなく、長時間、培養することができます。フィラメント状ペレットの場合には、繊維状の菌糸が培養液中に懸濁した状態になるため、培養液全体としては非ニュートン性をもちます。このため、塔径100mmの標準気泡塔でも塔径いっぱい広がった大きな砲弾状の気泡(いわゆるスラッグ流れ)が形成されました。この状態になりますと、酸素吸収速度が低下して、培養に悪影響を及ぼしますので、適当な時点で培養を終了しなければなりま

せん。

図4に、収穫した乾燥菌体量を培養日数で除した総括増殖速度と比空気流量（vvm）の関係を示しました。この図から、総括増殖速度は塔の形式に依存せず、1本の曲線で相関でき、かつ、総括増殖速度が最大になる比空気流量が存在することが分かります。スエヒロタケの場合、標準気泡塔では菌体が塔底に沈降しましたが、マツタケの場合には培養中はペレットは浮遊状態に保持されていました。気泡塔形式の影響がマツタケの場合に現れなかったのは、このためと思われます。

5-4 シイタケ

シイタケは、マツタケのように高価なキノコではなく、庶民的なキノコの代表ですが、日本料理や中華料理にはなくてはならない食材の一つです。シイタケの学名は *Lentinula edodes* で、*Lentinus edodes* とも言われます。名前の通り、多糖であるレンチナンを代謝しますが、この多糖は強い抗ガン性を示すことで知られています。

図2に示した写真はテーパー付外部循環式気泡塔で培養したシイタケ菌糸の様子です。シイタケ菌糸のペレットは、マツタケに比べますと、非常に柔らかく、形状も球形ではなく不定形なものが多くありました。

図5に示しましたように、総括増殖速度は空気流量とともに若干増加する傾向が認められますが、その程度は小さく、ほぼ一定と見なしても差し支えありません。しかし、培地組成（グルコース、ポリペプトンと酵母エキス）とpHは増殖速度に大きな影響をおよぼすことが分かりました。これらの培養結果から、総括増殖速度を最大にする培養液の条件を決定することができました[3]。総括増殖速度はマツタケの1/5程度であり、かなり成長が遅いキノコです。

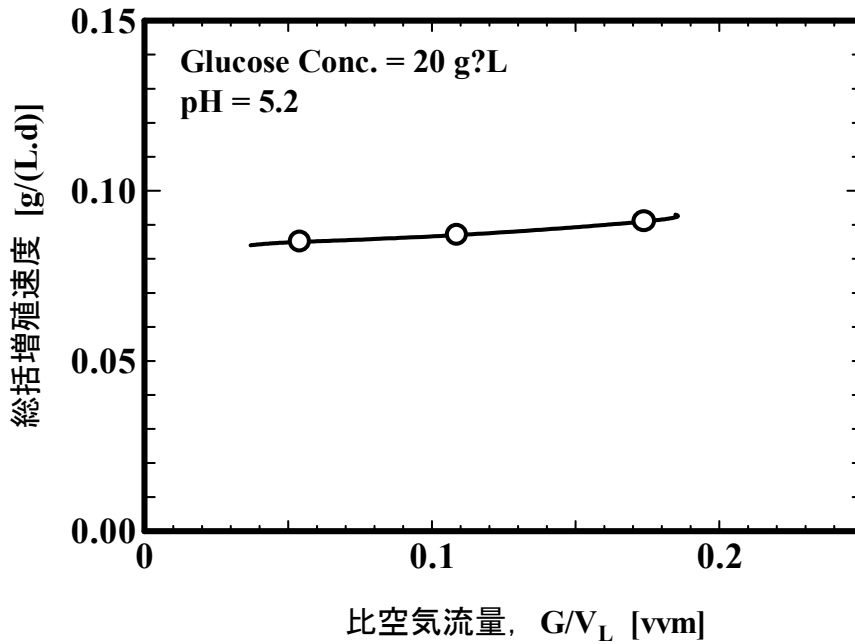


図5 シイタケ菌糸の総括増殖速度

5-5 アガリクス

アガリクスは、非常に高い抗ガン作用があるということで20世紀の末期（1990年代）に爆発的な人気を呼んだキノコです。アガリクスという学名は非常に広い範囲のキノコをさし、通常マッシュルームで知られているツクリタケもアガリクス (*Agaricus bisporus*) の一種です。ここで取りあげるアガリクスは、厳密にはアガリクスブラゼイ (*Agaricus blazei*) で、ブラジルのピエダーテ地方に自生していたキノコです。このキノコを食べていました原住民が非常に長命であるので、このキノコには健康によい成分が含まれていると信じられていました。ただ、このキノコは生育条件が難しく、原産地でもそんなに多くはとれません。人工栽培も難しく、成功するまでに10年以上の歳月がかかっています。本稿では、いちいちアガリクスブラゼイと書くのは煩わしいので、以下では単にアガリクスと表記します。

図2に示しましたアガリクスの写真から、ほぼ球形のペレットが形成されていることが分かります[4]。この標準気泡塔の塔径は60mmですので、塔径との比較から、ほとんどのペレットの直径は7~10mmで、特に大きいものは20mm程度になっているこ

とが分かります。培養終了後にペレットを取り出して見ますと、ペレットはマツタケやシイタケのペレットよりも堅く、表面も艶やかでした。また、どのような培養条件でも必ず球形のペレットを形成しました。このことから、アガリクスは粘着性の高い成分を代謝していることが窺えます。この粘着性成分により、菌糸が固まり易くなり、球形の比較的堅いペレットを形成したと考えられます。

アガリクスの培養では、塔形式の影響を調べるため、標準気泡塔、内部循環式気泡塔、テーパー付外部循環式気泡塔を用いました[5]。図 6 に、各塔形式に対する総括増殖速度 R_x と比空気流量 G/V_L の関係を示しました。どの形式の場合にも、総括増殖速度は比空気流量が 0.1~0.12vvm で最大値を示すことが分かります。増殖速度の最大値は内部循環式の場合に最も大きく、標準型がそれに次ぎ、外部循環式が最も小さくなっていることから、アガリクスの場合の最適な塔形式は内部循環式であることが分かりました。

アガリクスの代謝成分（ここでは、糖類に注目しました）の分析を、高速液クロ

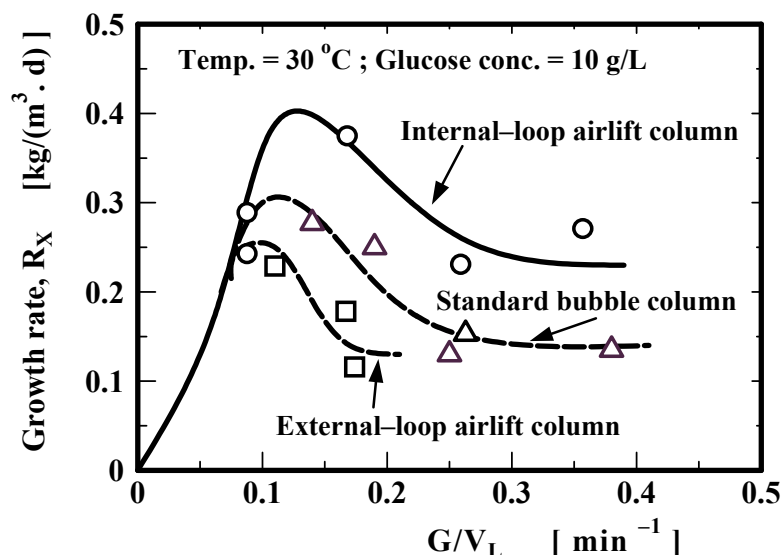


図 6 総括増殖速度に及ぼす塔形式の影響

(HPLC) を用いて行いました。代謝産物には菌体内に蓄積される成分と菌体外に分泌される成分がありますので、それぞれについて分析しました。まず、培養液の分析結

果から、菌体外にはタンパク質と多糖類と思われる成分が分泌されていることが分かりました。次に、菌体内に蓄積されている代謝産物を分析するために、菌体の細胞膜を破碎して熱水抽出しました。熱水抽出液の分析結果から、トレハロース、アラビノース、マンニトールを同定することができました。また、多糖と思われる成分も検出できましたので、奈良県工業技術センターにおいてGPCで分析して戴きました。その結果、平均分子量が約160万の多糖で、クロマトグラムの保持時間がスエヒロタケ由来のβ-グルカンにピッタリと一致することが分かりました。従って、この多糖成分はβ-グルカンであろうと考えています。これら代謝成分は、pH、培地組成、通気量、空気中の酸素分圧などの影響を敏感に受けることも分かりました。

図7には菌糸体と子実体の代謝産物の比較を示しました。比較に用いた子実体は、市販品と我々が培養した菌糸体を用いて得た子実体（キノコ）の2種類です。このキ

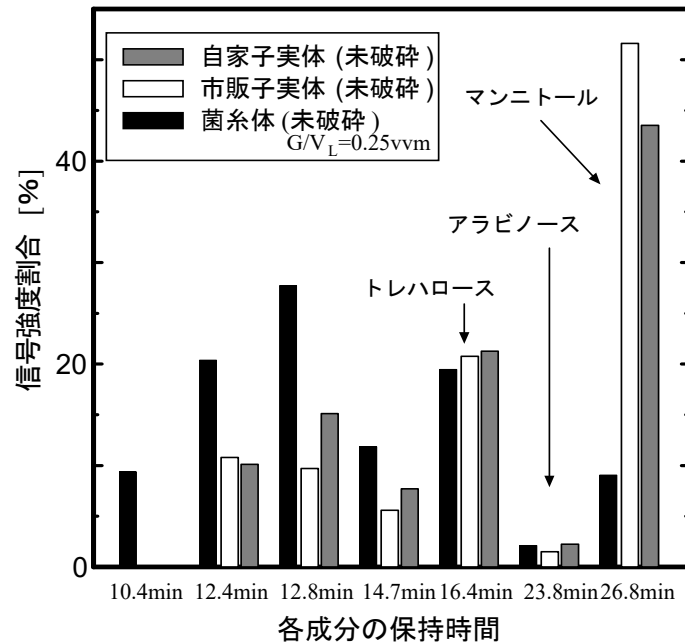


図7 子実体と菌糸体に含まれる代謝成分の比較

ノコを作るのは結構大変だったのを覚えています。全ての代謝産物を同定することは出来ませんでしたので、保持時間で各成分を区別しています。保持時間が短いほど、分子量は大きくなります。このグラフから、保持時間10~13minの成分は菌糸体の方

が子実体よりも多いことが分かります。我々は、抽出液から除タンパクした液を液クロで分析し、保持時間が10~13minの成分は多糖類であることを確かめています。従いまして、図7は抗癌作用などの機能性をもつ多糖成分は子実体よりも菌糸体の方に多く含まれていることを示しています。

6. おわりに

気泡塔はキノコ菌糸のような糸状菌の培養に適していることをお分かり頂けたと思います。キノコ菌糸体の液体培養は、生産面では子実体の栽培よりも有利であり、機能面でも菌糸体の方が子実体よりも多糖類を多く代謝し、有望であるがあることが分かりました。

今後、高齢化社会の進行と共に、健康志向は益々高まると予想されます。これに伴い、今後、キノコの薬理効果に対する関心も一層高まり、科学的研究も進展すると思われます。そのためには、きのこ菌糸体の安全な培養・生産が必要不可欠です。本研究が少しでもこのお役に立てれば望外の幸せです。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、永年にわたり関西化学機械製作株式会社から多額の研究費とご支援を戴きました。本研究を続けて来られましたのもこのご支援のおかげです。ここに記し、深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Kawagoe, M., K. Hyakumura, S. Suye, K. Miki, and K. Naoe: *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 333-336 (1997)
- 2) Kawagoe, M., K. Kawakami, Y. Nakamura, M. Araki, K. Naoe and H. Noda ; *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 116-118(1999)
- 3) 河越幹男： *日本応用きのこ学会誌*, **8**, 1-11 (2000)
- 4) Kawagoe, M., Y. Nagaoka, M. Araki, K. Yamagami, K. Naoe and H. Noda: *J. Chem. Eng.*

Japan, **37**, 1056-1061 (2004)

5) 河越幹男：化学工学, **71**, 365-367 (2007)