

標準気泡塔によるマツタケ菌糸の液体培養

河越 幹男 伊藤 嘉章

Submerged Culture of *Tricoloma matsutake* Mycelium by a Bubble Column Fermentor

Mikio KAWAGOE and Yoshiaki ITOH

A novel species of *Tricoloma matsutake* that grew extremely faster than an original species was found in our laboratory. The new species of *T. matsutake* was cultured using a standard bubble column to investigate the influences of pH, concentration of nitrogen and carbon sources, and aeration rate on the culture. As a result, the maximum growth rate attained in this experiment was about five times as fast as the one of original species. The optimum conditions of the submerged culture by the bubble column were as follow ; pH of 4.5, glucose concentration of 20g/L, concentration of nitrogen source of 4g/L and aeration rate of 1.8 L/min (about 0.2 vvm).

緒言

我々は、これまでに気泡塔型培養装置を用いて有用き菌糸の液体培養を行い、培養特性を調べた^{1,2)}。マツタケ菌もそのうちの一つである。マツタケ菌糸の場合には、空気流量や装置条件により、菌糸は三つの形態（球形、粒状、線条）をとることを見出した。最大増殖速度は形態が球状ペレットを形成するときに達成され、また、最大菌体濃度は粒状ペレットのときに達成された²⁾。

上述の培養に用いたマツタケ菌糸をフラスコ培養していたところ、増殖速度が異常に速い菌種が出現した。そこで、我々はこの菌種を気泡塔を用いて液体培養し、オリジナル菌と比較、検討した。

1. 実験

(1) 気泡塔型培養装置 実験に用いた培養装置は塔径10cm、高さ150cm（全容量=約12L）のガラス製の標準気泡塔である。塔頂と塔底にはステンレス製の閉じ蓋が設置されている。空気分散のため、塔底に内径1mmのノズルを4本取り付け付けた。温度調節のため、塔壁には板状ヒーターと冷却コイルを巻き付けた。コンプレッサーからの空気は、0.45 μ mのフィルターにより除菌した後、塔へ供給した。

菌体の増殖をモニターするため、レーザー透過率（阻止率）を測定した。塔軸に対して対象な位置にレーザー発信器と受光器を設置し、透過光信号をA/D変換器を介してパソコンに取り込み、解析した。発信器にはレーザーポインター、受光器にはフォトトランジスターを用いた。

(2) 菌株およびシード培養 本研究に用いたマツタケ菌は、近畿大学農学部食品栄養学科の寺下隆夫教授提供の菌株から派生した菌種で、増殖速度が異常に速い菌である。本実験では、この菌株を種菌としてシード培養し、本培養に用いた。シードは、150mLの培地を入れた500mLフラスコをオートクレーブで滅菌したのち、種菌を植菌して培養した。温度はオリジナル菌の最適温度である22 $^{\circ}$ Cとした。3個のシードを作り、そのうちの成長の良い2本を本培養に用いた。

(3) 培地組成 シード培養にはPGY培地を用いた。組成(g/L)は、グルコース=20、ペプトン=2、酵母エキス=2、MgSO₄·7H₂O=0.5、KH₂PO₄=0.5である。pH=4.5に調整した。

本培養に用いた培地の組成(g/L)は、グルコース=10~20、ペプトン=1~3、酵母エキス=1~3、pH=4~5、MgSO₄·7H₂O=0.5、KH₂PO₄=0.5である。本培養の場合、組成の影響を調べるため、炭素源濃度、窒素源濃度、pHを変化させた。

(4) 本培養 気泡塔は常圧法によって滅菌した。即ち、100 $^{\circ}$ Cの飽和水蒸気で約1時間滅菌し、この操作を3日間

Table 1 Culture conditions and results obtained

Run No.	Aeration rate [L/min]	pH [-]	C_G [g/L]	C_{PE} [g/L]	C_{CG} [g/L]	Culture time [d]	Cell mass [g/L]	Yield [g/g]	R_x [g/L/d]
1	1.8	4.2	19.8	4	5.74	3.0	5.97	1.04	1.99
2	1.8	4.65	19.5	4	6.49	3.0	7.43	1.14	2.48
3	1.8	5.02	19.2	4	4.88	3.0	5.95	1.22	1.98
4	1.8	4.62	20.0	6	6.96	2.4	4.30	0.62	1.78
5	1.8	4.53	20.8	2	5.38	3.0	5.22	0.97	1.74
6	1.8	4.65	10.5	4	5.25	3.0	4.31	0.82	1.44
7	1.8	4.63	30.0	4	7.87	3.0	3.73	0.47	1.25
8	0.9	4.70	19.9	4	5.65	3.0	2.98	0.53	1.01
Ref. (2)	1.8	5.00	20.0	4	4.40	11.0	5.06	1.15	0.46

C_G = glucose concentration, C_{PE} = total concentration of pepton and yeast extract, C_{CG} = glucose concentration consumed
 R_x = (cell mass concentration) / (culture time), overall growth rate

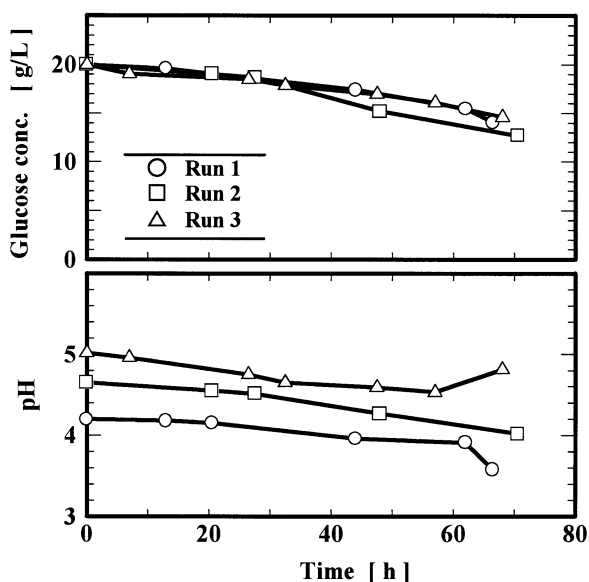


Fig. 1 Time course of glucose concentration and pH

にわたって連続して行った。その間、無菌空気を通気して塔内を陽圧に保った。3日目の滅菌後、10Lの培地を無菌的に仕込んだ後、シードを無菌的に植菌した。植菌量は培地量の約3%である。培養温度はシード培養のときと同じ22℃とした。

増殖速度が速いので、サンプリングは1日に2回行った。空気排出口を一時的に止め、塔内圧力を高めることにより、培養液を塔頂に取り付けた採取管から圧出した。1回当たりの採取量は約150mLである。採取後、サンプリング量に相当する培養液を補充した。グルコース濃度の定量はHPLCで行なった。同時に、レーザ透過率を測定し菌体増殖速度をモニターした。

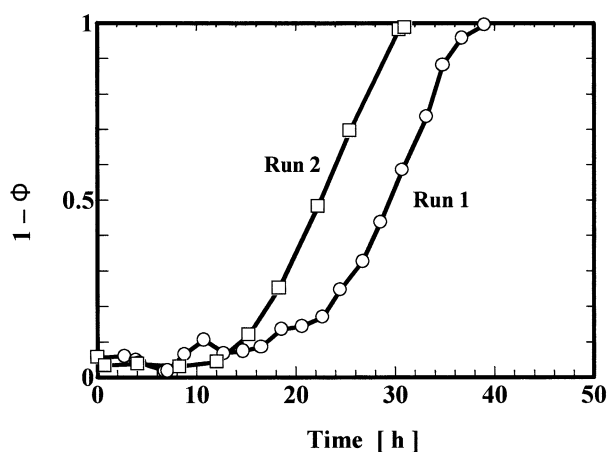


Fig. 2 Change of laser transmission with time

2. 実験結果

Table 1に培養結果をまとめて示した。培養日数はRun4以外は3日である。Run4の場合、気中菌糸が塔頂部の気液分離面上で異常に増殖し、空気の流れを妨害するようになったので、これ以上の培養の続行は不可能と判断して、2.4dで培養を終了した。Table 1には、比較のためオリジナル菌の結果²⁾も示した。

(1) 菌糸の形態 この培養実験で得られた菌体ペレットは繊維状(線条)ペレットであり、オリジナル菌の球状および粒状のペレットとは異なっていた。培養後期では繊維状ペレットの濃度が高くなったため、培養液の粘度は見かけ上かなり高くなった。そのため、液の流動は緩慢になり、スラッグ状の気泡が観察されたが、培養終了後、培養液を液と菌体に分離したところ、液の粘度は水とほとんど変わらなかった。

(2) 培養曲線および増殖曲線 Fig. 1にグルコース濃度とpHの時間変化を示した。グルコース濃度は培養初期では徐々に減少し、中期以降ではその減少速度は速くなる。Table 1に示したように、グルコースの消費率は小さく、最大でも50% (Run6)である。

pHは、培養末期を除けば、時間と共に減少する。このことは有機酸のような酸性物質を代謝していることを示唆している。

レーザー阻止率の経時変化を示したFig. 2から、菌体は培養開始12~16時間後に増殖し始めることが分かる(誘導期間)。誘導期間は培養条件により若干影響される。培養30~40時間で、塔は菌糸体で充満してレーザーはほとんど透過しなくなる。本法によって増殖をモニター出来るのはこの時点までである。

3. 培養結果に及ぼす諸因子の影響

培養成績を比較する評価関数として、菌体濃度(収量)、増殖速度および対糖収率がある。前二者は培養装置の設計・操作に直接関係し、また対糖収率は代謝経路や代謝産物に関与すると考えられるので、これらに及ぼす各因子の影響を検討した。

(1) 菌体収量と増殖速度 Fig. 3に示すように、増殖速度と菌体濃度はいずれもpH=4.65で最大になり、最適pHは4.5前後であることが分かった。

Fig. 4に窒素源の影響を示した。窒素源としてポリペプトンと酵母エキスの等量混合物を用いた。菌体濃度と総括増殖速度のいずれも窒素源濃度が4g/Lで最大値を示している。この最適値はシード培地の組成と等しく、シードで馴染んだ組成で最大値になると解釈することもできる。

Fig. 5に培養成績に及ぼす初発グルコース濃度の影響を示した。最適濃度は約20g/Lであることが分かる。このときの菌体濃度および総括増殖速度は、10g/Lおよび30g/Lに比べると約2倍になっており、グルコース濃度の影響は顕著である。

Fig. 6に空気流量の培養成績に及ぼす影響を示した。0.9L/minと1.8L/minを比較すると、後者の方が菌体濃度、総括増殖速度ともに前者の2倍程度になっており、空気流量の影響は大きい。しかし、空気流量を1.8L/min以上にすると、泡沫層が気液分離面上に発達して培養が困難になったので、1.8L/min以上の空気流量では実験できなかった。

オリジナル菌の結果²⁾と比較すると、本実験で用いた菌種は、菌体濃度と増殖速度の両方とも、同一条件(Runs 1, 2, 3)のオリジナル菌のそれらよりも2~2.5倍大きいことがわかる。

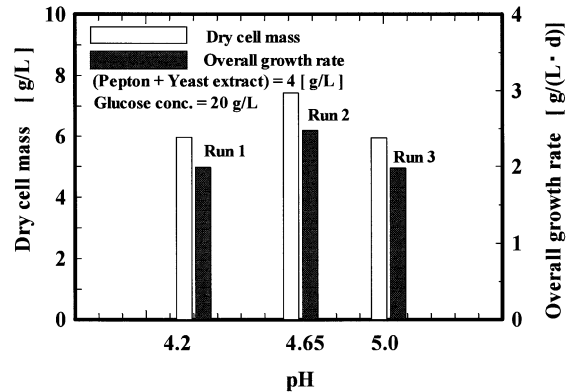


Fig. 3 Effect of pH on dry cell mass and overall growth rate

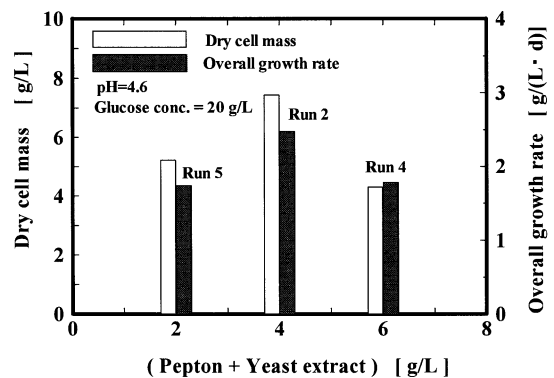


Fig. 4 Effect of nitrogen source on dry cell mass and overall growth rate

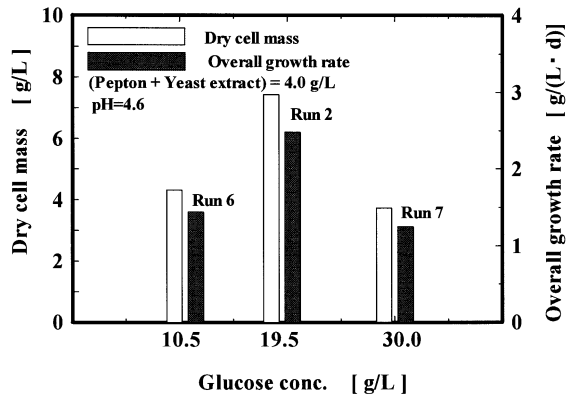


Fig. 5 Effect of glucose concentration on cell mass and overall growth rate

(2) 対糖収率 Table 1および Fig. 7に全培養実験における対糖収率を示した。Runs 1~3ではpHのみを変化させ、グルコース濃度と窒素源の濃度はほぼ一定に保った(Table 1参照)。これからpHが大きくなるほど収率も大きくなる傾向が認められるが、その影響はそれほど大きくはない。

Run 2, Run 6, Run 7ではpH, 窒素源濃度を一定に保ち、グルコース濃度を変化させた(Table 1参照)。グルコ

ース濃度が約20g/L (Run2) の場合に収率は最大値を示した。グルコース濃度が30g/L (Run7) の場合、糖消費量は大きいが菌体量は20g/Lのときの約1/2であり、糖消費量の多くは代謝熱として失われていることを示している。グルコース濃度が10g/Lの場合 (Run6) の収率は30g/Lのときと比べれば約2倍大きく、過剰の糖は収率を著しく低下させることが分かる。

Runs 2, 4, 5では窒素源の濃度を変え、その他の条件は一定に保った。窒素源の濃度が他の場合に比べて高いRun 4の場合、収率は他のRunに比べ0.5~0.7倍になっており、糖の場合と同様、過剰の窒素源は収率を著しく低下させることが分かった。

空気供給速度が小さいRun8の場合も収率が小さくなっている。空気流量は、溶存酸素濃度と流動状態に関係するが、菌体ペレットの酸素消費速度は遅いので、溶存酸素濃度は空気流速によらず平衡濃度の一定値と見なすことができる。従って、空気流速の影響は流動状態によると考えられる。

気泡塔による培養の場合、一般に塔頂の気液分離面上の塔壁面に気中菌糸が成長する。空気流速が小さい場合、気液分離面の変動が小さく気中菌糸の液中への巻き込みが少ないため、気中菌糸の成長が著しい。空気流量が大きくなると、気液分離面が激しく変動するようになるため塔壁面が洗われ、塔壁面への気中菌糸の付着が少なくなり、洗い落とされた気中菌糸は液中に巻き込まれる。液中に巻き込まれた菌糸は液中で成長する。Fig. 7に示した菌体量には気中菌糸は含まれていないので、菌体量はその分少なくなる。対糖収率が小さくなったのはこのためと思われる。

Fig. 7には、比較のためオリジナル菌の文献値²⁾も示した。同一条件であれば、両者の対糖収率にはほとんど差は認められない。

4. 結 言

増殖速度の速いマツタケ菌糸を見出した。気泡塔により液体培養した結果、オリジナル菌に比べると菌体濃度は最高で約1.5倍、増殖速度は最高で約5.4倍であった。増殖速度を最大にする培養条件は、pH=4.5、グルコース濃度=20g/L、窒素源 (ポリペプトン+酵母エキス) 濃度=4g/L、空気流量=1.8L/minであり、オリジナル菌とほぼ同じであった。対糖収率は、グルコース濃度と窒素源濃度に大きく影響され、過剰の糖と窒素源は対糖収率を著しく低下させることが分かった。また、対糖収率はpHの増加と共に僅かに増加する傾向が認められたが、その影響は小さい。

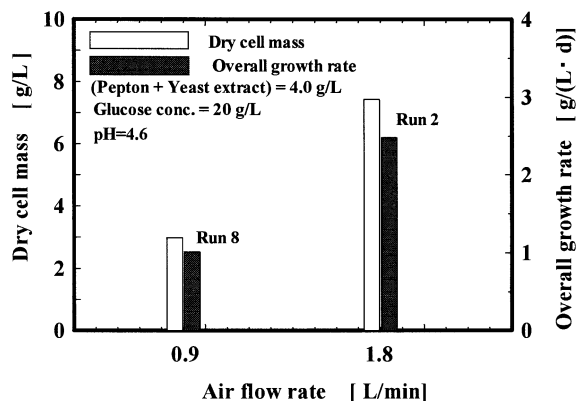


Fig. 6 Effect of aeration rate on cell mass and overall growth rate

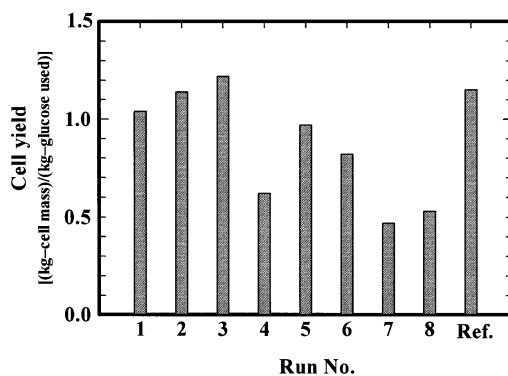


Fig. 7 Cell yield against glucose consumed in each run in this investigation: Ref. (see ref.(2))

引用文献

- 1) Kawagoe, M., K. Hyakumura, S. Suye, K. Miki and K. Naoe; "Application of Bubble Column Fermentors to Submerged Culture of *Schizophyllum commune* for Production of L-Mmalic Acid," J. Ferment. Bioeng., 84, 333-336 (1997)
- 2) Kawagoe, M., K. Kawakami, Y. Nakamura, K. Naoe and H. Noda; "Submerged Culture of *Tricholoma matsutake* Mycelium in Bubble Column Fermentors," J. Biosci. Bioeng., 87, 116-119 (1999)