

[研究ノート]

メシマコブ菌糸体の培養 ——材料分析室利用研究成果、その XXVIII(6)——

長山純子¹・斎藤貴²

1 工学研究科博士前期課程応用化学・バイオサイエンス専攻

2 工学部応用化学学科

Culture of mushroom mycelium

-- Research works accomplished by using materials analysis facilities: XXVIII(6) --

Junko NAGAYAMA¹, Takashi SAITO²

Abstract

It is known that *Phellinus linteus* of basidiomycetes have a high antitumor activity. However, it is not practical because it is required for a long time to form fruiting bodies.

When the *ginkgo biloba* leaf extract was used as a growth promoter, which added into a culture medium under 0.005 vol% of concentration, the amount of mycelia produced increased about 4 times as compared with the one not added. It was found that ginkgo biloba extract is effective as a promoting factor on the growth of *Phellinus linteus* mycelium.

Keywords: *Phellinus linteus*, Culture conditions, *Ginkgo biloba* leaf extract

1. まえがき

担子菌類の熱水抽出物の成分はマウス腹水腫瘍細胞であるサルコーマ 180 に対して抗腫瘍活性を有する¹⁾ことが報告されて以来、担子菌の持つ抗腫瘍活性に注目が集まっている。その中でもメシマコブ(*Phellinus linteus*)の子実体にはがんの進行を遅延させることが確認されており²⁾、菌糸体にも抗腫瘍活性を有する³⁾ことが明らかとなっている。また、血糖値上昇抑制効果を有することも明らかとなっており、糖尿病の予防に有効であることも示唆されている⁴⁾。

Phellinus linteus はヒダナシタケ目タバコウロコタケ科キコブタケ属のキノコで、桑の木に選択的に寄生する木材腐朽菌の一つである。漢方薬物名では桑黄と呼ばれ、古くから薬用として用いられてきた。しかし近年、養蚕産業の減少と共に桑の木が減り、子実体の入手が困難となっている。*Phellinus linteus* は多年生のため人工栽培が困難であり、通常 10 cm 程度に成長するには約 10 年程度必要とされている。そのため、近年では液体培地による菌糸体培養を利用する手法が中心となっているが、液体培地での大量培養に関する詳細な報告はされておら

ず、さらに明確な培養条件の検討例は見られない。そこで、*Phellinus linteus* 菌糸体の迅速かつ効率的な培養を目的として培養条件の確立を行った。

2. 菌糸体試料および実験

Phellinus linteus NBRC6989 株は、独立行政法人 製品評価技術基盤機構より分譲されたものを使用した。この *Phellinus linteus* 菌糸体の外観を走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて観察した。その SEM 画像を Fig.1 に示した。菌糸体の直径は 0.8~3.0 μm で、菌糸体組織は糸状の構造を有し、多数に分岐していることが認められた。

Phellinus linteus 菌糸体の液体培養に適した培養条件の検討を、麦芽・酵母培地(麦芽エキス乾燥粉末 20 g/L、粉末酵母エキス 2 g/L)を 121°C、20 分間滅菌して実験に用いた。300 mL 三角フラスコに滅菌済みの液体培地を 250 mL 入れ、種菌としてあらかじめマツタケ培地(エビオス錠 5 g/L、D(+)-グルコース 20 g/L、寒天 20 g/L)で 14 日間平面培養した菌糸体を直径 5 mm の円状に打ち抜き液体培地に植菌した。25°C、暗所下、振とう数 100

rpm の条件で 10 日間往復振とう培養を行い、培養終了した菌糸体は No. 5 A(ADVANTEC)のろ紙を用いた吸引ろ過にて回収し、純水で洗浄した。その後凍結乾燥(FDU-1200)を行い、得られた菌糸体の乾燥質量を測定した。

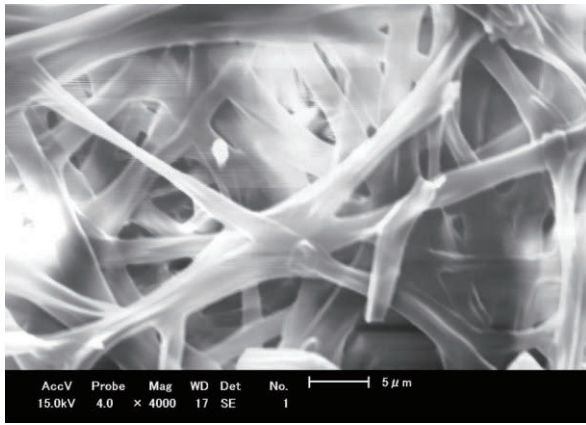


Fig.1 Appearance of *Phellinus linteus* mycelium (×4000)

3. 実験結果と考察

3-1. 初発 pH の影響

担子菌の成育に伴う最適 pH、生育可能な pH 範囲などは、菌の種類や培養条件によって異なり、*Phellinus linteus* 菌糸体でも、最適 pH が 5.5⁵⁾との報告や、4.0⁶⁾との報告がある。そこで今回は、培養温度 25°C、pH4~8 の範囲で最適初期 pH の検討を行った。

麦芽・酵母培地の初発 pH を 1M-HCl と 1M-KOH を用いて 4~8 にそれぞれ調製した。各液体培地で 10 日間菌糸体を培養した際に得られた菌糸体の乾燥質量を Fig.2 に示した。いずれの pH 域においても生育が認められたが、特に pH7 において乾燥菌糸体量が最も多くなることが分かった。このことから、麦芽・酵母培地を用いた *Phellinus linteus* 菌糸体の液体培養において、初期 pH7 が最も培養に適していることが明らかとなった。

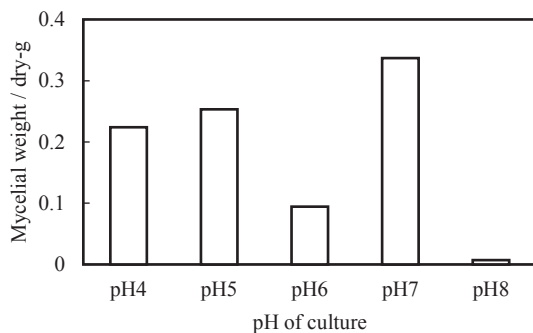


Fig.2 Effect of initial pH in medium on growth of *Phellinus linteus* mycelium

3-2. 培養温度の影響

最も生育に優れていた初期 pH7 の麦芽・酵母培地を用いて 25~35°C の範囲で 10 日間培養を行い、培養至適温度の調査を行った。10 日間培養した菌糸体の乾燥質量を Fig.3 に示した。pH7 に調製した麦芽・酵母培地を用いて 25,30,35°C の培養温度で生育状況を調べたところ、いずれの温度域においても生育が認められ、特に 30°Cでの生育量が高いことが分かった。また、本菌糸体においては 35°C以上で成長の急激な低下が確認された。

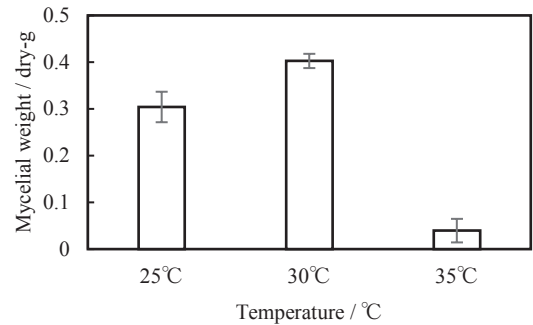


Fig.3 Effect of culture temperature on growth of *Phellinus linteus* mycelium

3-3. イチョウ葉抽出物の成長促進効果

初発 pH7 の麦芽・酵母培地を用いて、培養温度 30°Cにおいてイチョウ葉抽出物添加による *Phellinus linteus* 菌糸体への成長促進効果を検討した。イチョウ葉抽出物として、イチョウ葉抽出成分を 18%、エタノールを 17% 含有している、イチョウ葉総活性エキス(イチョウ葉産業株式会社)を使用した。Fig.4 にイチョウ葉総活性エキスを 0~0.015 vol%になるよう添加した培地で 10 日間培養した際の乾燥菌糸体量を示した。

Fig.4 より、0.005 vol%になるように添加した培地で菌糸体生育量が最大となった。一方で、0.01 vol%を超えると生育阻害が起きていることから、0.005 vol%が最適濃度であることが明らかとなった。さらに、培養開始から 6 日間までは菌糸体の生育はほとんど確認されなかったが、培養開始から 10 日後にはイチョウ葉総活性エキスを 0.005 vol%となるよう添加した培養液では未添加のものと比較して 2.5 倍、さらに 19 日目では 3.8 倍に達することが明らかとなった。以上のことから、イチョウ葉抽出物は *Phellinus linteus* 菌糸体に対して効果的な成長促進作用を持つことが明らかとなった。

4. まとめ

Phellinus linteus 菌糸体の培養に最適な培地は、麦芽・酵母培地であり、最適な初発 pH は 7.0 であることが明らかとなった。培養時の最適温度は 30°Cで、35°C以上では生育阻害を起こすことが明らかとなった。成長促進剤

としてイチヨウ葉抽出物を用いたところ、0.005 vol%となるよう添加した際に高い成長促進効果があることが認められ、未添加のものと比較して菌糸体量が3.8倍増加した。

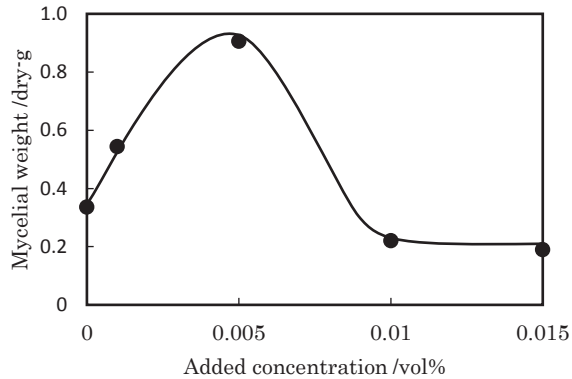


Fig.4 Effect of addition of *ginkgo biloba* leaf extract

参考文献

- 1) Tetsuro IKEKAWA, Miyako NAKANISHI, Nobuaki UEHARA, Goro CHIHARA, Fumiko FUKUOKA: ANTITUMOR ACTION OF SOME BASIDIOMYCETES, ESPECIALLY *Phellinus linteus*, GANN, vol.59, 155-157 (1968)
- 2) 安川憲, 北中進, 高橋宏之, 平山秀樹, 重本桂: 天然メシマコブ子実体のマウス皮膚における発癌プロモーション抑制効果, 生薬学雑誌, vol.61(1), 14-17(2007)
- 3) 中嶋加代子, 岸本律子: メシマコブの抗腫瘍活性成分について, 別府大学短期大学部紀要, 第28号, 1-8 (2009)
- 4) 石原伸治, 渡辺敏郎, Mazumder TapanKumar, 永井史郎, 辻啓介: ラットにおけるメシマコブ菌糸体の血糖値上昇抑制作用, 本栄養・食糧学会誌, 第58巻 第4号, 225-229(2005)
- 5) June Woo Lee, Seong Jin Baek, Yong Seok Kim: Submerged Culture of *Phellinus linteus* for Mass Production of Polysaccharides, Mycobiology, vol.36(3), 178-182 (2008)
- 6) Hye-Jin Hang, Sang-Woo Kim, Jang-Won Choi, Jong-Won Yun: Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC6190, Enzyme and Microbial Technology, vol.33, 309-319 (2003)