

491.72
ヤ/

近赤外分析法を用いたキノコ菌床培養管理システムの開発

課題番号 09650482

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）
研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 矢野 卓雄
（広島市立大学 情報科学部 教授）

目次

はしがき	はしがき-1
研究組織, 研究経費, 研究発表	
第一章 固体培地調整の自動化	1-1
はじめに	1-1
方法	1-1
1) 固体培地	1-2
2) 近赤外線分光法	1-2
3) 従来分析法	1-3
結果と考察	1-3
1) 固体培地用各資材の原スペクトルと二次微分スペクトル	1-3
2) ポリエチレン袋と固体培地の原スペクトルと 二次微分スペクトル	1-4
3) 固体培地の原スペクトルと二次微分スペクトルにおける 含水率の影響	1-4
4) 固体培地の含水率測定のための検量式作成と検量式の検定	1-4
5) 固体培地中の米糠含有率計測のための検量式作成と 検量式の検定	1-5
6) 総括	1-6
参考文献	1-6
第二章 近赤外分光法を用いた固体培地における増殖度の自動計測	2-1
はじめに	2-1
方法	2-1
1) 供試菌株と保存方法	2-1
2) 培地の調整	2-1
(a) コーヒー抽出粕を用いた固体培地	2-2
(b) コーヒー抽出粕と副資材を用いた固体培地	2-2
(c) チップダストと副資材を用いた固体培地	2-2
(d) 粃殻(もみがら)と副資材を用いた固体培地	2-2
3) 培養方法	2-2
(a) 接種菌液の調整	2-2

(b) 本培養	2-3
4) コーヒー抽出粕のアセトン抽出の方法	2-3
5) 分析方法	2-3
(a) グルコサミン量	2-4
(b) 近赤外分光分析法	2-4
結果と考察	2-5
1) コーヒー抽出粕を用いた固体培地	2-5
2) コーヒー抽出粕と副資材を用いた固体培地	2-6
3) チップダストと副資材を用いた固体培地	2-7
4) 粉穀と副資材を用いた固体培地	2-7
5) 総括	2-7
第三章 固体培地用資材の検索	3-1
はじめに	3-1
方法	3-1
1) 供試菌株と保存方法	3-1
2) 培地の調整	3-2
3) 培養方法	3-2
(a) 接種菌液の調整	3-2
(b) 本培養	3-3
4) 分析方法	3-3
(a) 液体培養液中の乾燥菌体量	3-3
(b) 菌床(固体培地)重量, 接種位置からの菌糸の生育距離, 菌糸の生育した面積と体積	3-4
(c) 水分含有量	3-4
(d) pH	3-4
(e) グルコース含有量 (酵素法)	3-5
(f) 還元糖量	3-5
(g) グルコサミン量	3-6
(h) 近赤外分光スペクトル	3-6
結果と考察	3-7
1) 蜜柑搾汁粕培地を用いた栽培	3-7
2) コーヒー抽出粕を用いた栽培	3-8

3) コーヒー抽出粕と副資材の混合物を用いた栽培	3-9
4) 烏龍茶抽出粕を用いた栽培	3-10
5) 烏龍茶抽出粕と副資材の混合培地を用いた栽培	3-11
6) 紅茶抽出粕培地を用いた栽培	3-11
7) 総括	3-12
謝 辞	謝辞-1
補 足 グルコサミン定量条件の検討	
はじめに	補足-1
方法	補足-1
A-1 菌床試料の調製	補足-1
A-2 グルコサミン量の分析方法	補足-1
結果と考察	補足-2
A-1 サンプル量と濃硫酸の割合の検討	補足-3
A-2 硫酸下での放置時間	補足-3
A-3 オートクレーブ処理の時間	補足-4
A-4 アセチル化を行う温度と時間	補足-4
A-5 発色反応を行う温度と時間	補足-6
A-6 反応回収率の検討1	補足-7
A-7 反応回収率の検討2	補足-7
A-8 蒸留水と中和水の影響について	補足-8
まとめ	補足-8
参考文献	補足-9

はしがき

永年に渡り担子菌の栽培に関する研究を、栽培技術の近代化、工程の管理や自動計測、自動制御の観点より続けてきたが、このたび文部省科学研究費補助金制度の御助成をいただくこととなり、格段に研究が進行した。ここにその成果をまとめることができたことは、今後の研究遂行の大きな支えとなると思われる。関係各位に心より感謝するところである。

本報告書は三章からなる。第一章では、きのこの栽培に用いる固体培地（菌床）を調製する工程における水分と菌床材料（特に、米糠）の含有量を、非破壊計測法の一つである近赤外分光法を用いて自動計測制御する研究について述べている。

第二章では、不均一系である固体培養における担子菌の生育度を簡便に計測する研究について述べている。ここでも近赤外分光法の応用について検討した。従来から菌床におけるきのこの生育の指標としてきたグルコサミンの定量に替わり得る簡便迅速な非破壊計測方法の開発を試みた。

第三章では、菌床の材料として従来用いられてきた「おが粉」（のこ屑）に替わりうる材料として、食品工業の副産物であるコーヒー抽出粕、ウーロン茶抽出粕、みかん搾汁粕の菌床用材料としての適性を試験した結果をまとめた。菌床の重量や成分分析の結果を示したが、その利用については今後の研究を待たざるを得ない。

補足では、従来から菌床におけるきのこの生育の指標としてきたグルコサミンの定量条件について検討した。グルコサミン定量は非常に不安定な、定量条件の影響を受けやすい系であるので、菌床の定量に適した条件を確立するために入念な検討を行い、その結果をまとめた。グルコサミンは、第二章、第三章の基礎となる測定項目であり、その測定方法の安定化は本研究にとって重要な課題である。

当方の研究はまだまだ続いて行く予定であるが、本報告書が関係各位の御発展にとって、なんらかのお役に立てれば幸いである。

平成11年3月
広島市立大学 情報科学部
教授 矢野 卓雄

研究組織

研究代表者 : 矢野卓雄 (広島市立大学情報科学部 教授
情報機械システム工学科)

研究経費

平成 9年度	1, 700千円
平成10年度	600千円
計	2, 300千円

研究発表

(1) 学会誌等

- 1 Takuo YANO, Ken-ichiro SUEHARA, and Yasuhisa NAKANO;
Determination of the content of water and rice bran in solid media used for mushroom cultivation using near-infrared spectroscopy. J. Ferment. Bioeng., 86(5),, 1998.
- 2 Ken-ichiro SUEHARA, Yasuhisa NAKANO and Takuo YANO; Application of near infrared spectroscopy to measurement of cell mass in solid culture of mushroom. J. Near Infrared Spectrosc., 6, 273-277, 1998.

(2) 口頭発表

- 1 Ken-ichiro SUEHARA, Yasuhisa NAKANO and Takuo YANO; Application of near infrared spectroscopy to measurement of cell mass in solid culture of mushroom. 8th International conference on near-infrared spectroscopy, September 15-19, 1997, Essen, Germany.
- 2 矢野卓雄, 末原憲一郎, 中野靖久; 近赤外分光法を用いたきのこ菌床栽培用培地中の水分, 米糠量の計測, 日本生物工学会, 平成10年9月28日, 東広島市。

(3) 出版物

なし

第一章 固体培地調整の自動化

はじめに

シイタケ (*Lentinus edodes*) , ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) , エノキタケ (*Flammulina velutipes*) , キクラゲ (*Auricularia auricula*) 等の数種のきのこは, おが粉と米糠, 小麦麩の混合物からなる固体培地を用いて培養(栽培), 商業生産されている。おが粉は栄養源としての役割に加えて子実体を支える支持体の役割を担っている。また, 米糠や小麦麩も栄養源として加えられる。固体培地中の米糠と小麦麩の割合は, 一般にそれぞれ10~30%, 10~25%である。固体培地で培養されるきのこの種類は増加しており, 固体培地を用いて生産されるきのこの量も増加している。また近年, きのこと生産工場の設備は大型化してきている。

固体培地によるきのこの培養では, 水分と米糠の含有量は, きんこの成長に影響する大変重要な要素である。固体培地の水分量は米糠と小麦麩とおが粉の混合物に水を加えることで大体60~65%の範囲内に調節される。米糠と小麦麩の水分量はほとんど一定であるが, おが粉の水分量は変化し, その変化の大きさはおが粉の保管状態に依存している。おが粉は通常露天に保管されるため, 雨天時にはおが粉の水分含有量は高くなり, 晴天時には低くなる。一般に水分量の測定には, 培地を一定の重量になるまで乾燥させる乾燥重量法が用いられる。乾燥重量法は時間がかかるため, この方法を固体培地中の水分量調節に適用するのは測定時間の観点から難しい。現在, 固体培地中の水分量は, 手で握り締めるなどによる熟練した職人の経験に基づいて調節されている。

露天に保管されるおが粉の水分量が変動するため, 固体培地の原料資材の混合比を一定にしても, 乾燥重量に基づく米糠の含有量は変動する。固体培地中の米糠の量を測定することは熟練の職人でさえ難しい。固体培地中の水分と米糠の含有量を同時に測定するための簡単な方法の開発は長い間切望されてきた。このような方法の確立は, おが粉や米糠, 小麦麩, 水を混ぜ合わせる自動混合機の開発に役立つであろう。

本章では, きんこ培養に用いる固体培地中の水分と米糠の含有量を測定するために近赤外分光法(NIR)を用いる可能性について検討し, 検量式作成に用いた波長の帰属についても論じた。近赤外分光法は迅速かつ非破壊の分析法として産業界に幅広く用いられている(1)。発酵の分野では, 培養液成分や生産物を同時に測定するために応用されてきた(2-7)。

方 法

1) 固体培地

固体培地の試料は、おが粉に米糠と小麦麩を混ぜたものに水を加えて調整した。加水混合後の試料を室温に約1時間保った後、試料の近赤外スペクトルを計測した。おが粉と米糠と小麦麩はそれぞれ村上産業(広島県廿日市), 日食(広島市), Fuji Ryoko Co.(広島市)から入手した。おが粉は室内に保管した。一方、米糠と小麦麩は使用するまで冷蔵庫内に保管した。検量線作成用試料として113個の試料を用い、検量線作成用試料ではない56個の試料を検定用試料(検量式評価用試料)として用いた。検量線作成用試料の水分と米糠の含有量はそれぞれ28.2~71.3%, 6.0~33.5%の範囲内に調整した。一方、検定用試料の水分と米糠の含有量は、それぞれ27.9~71.7%, 6.0~33.5%の範囲内に調整した。

2) 近赤外線分光法

一般に、固体試料のスペクトル測定には、サンプルホルダーやサンプルカップに試料を直接入れて測定する。しかし、きのこの栽培に用いる固体培地には水分が多く含まれているので、試料を直接入れて測定するとサンプルホルダーが汚れ、次の試料を計るための洗浄、乾燥に時間を要する。本研究では、固体培地の試料をポリエチレンの袋(57x210mm)に入れて測定することにより、サンプルホルダーやサンプルカップなどの試料容器を洗浄する時間を節約した。固体培地の入ったポリエチレン袋をサンプルホルダーの中に入れ、そのサンプルホルダーを近赤外線分光計(NIRS6500SPL, (株)ニレコ, 八王子市)に設置した後、2nm間隔で400nmから2500nmの波長範囲の反射光の吸光度を測定した。ポリエチレン袋とサンプルホルダーはどちらも(株)ニレコより入手した。それぞれの試料のスペクトルは、34回のスキャンの吸光度の平均値をとることにより得、それぞれの試料のスペクトルはコンピュータのハードディスクに保存した(7)。

検量線作成用試料の二次微分スペクトルを用いて検量式を作成した(7)。検量線作成用試料の二次微分スペクトル値と従来分析法を用いて得た検量線作成用試料の分析値から算出された含有率(C_{act})との関係を、最小二乗法(8)を用いた重回帰分析法(multiple linear regression, MLR)を用いて探査し、次の検量式を作成した。

$$C_{pre} = a_0 + \sum_{i=1}^m a_i \cdot A_i \quad (1)$$

C_{pre} はスペクトルデータから計算された予測濃度で、 a は回帰係数である。 i ($i=1, 2, \dots, m$)は回帰分析に用いられた波長の数を表す。原スペクトルデータと二次微分スペクトルデータを使って計算を行うとき、 A はそれぞれ $\log(1/R)$ または $d^2\log(1/R)$ で表される。 R は

各波長における吸光度値である。求めた検量式を、検定用試料(試料数, n=56)を使って評価した。スペクトルの二次微分, 検量式の作成と評価は, (株)ニレコの NSAS (Near-Infrared Spectral Analysis Software) というソフトウェアを使って行った。

3) 従来分析法

米糠, おが粉, 小麦麩および固体培地中の含水率は, 105℃の恒温器内にて一定の重量になるまで乾かすことによる乾燥重量法を用いて測定した。固体培地試料の米糠, おが粉, および小麦麩の含有率は, 乾燥重量をもとにした混合比率より算出した。

結果と考察

1) 固体培地用各資材の原スペクトルと二次微分スペクトル

図1-1に, おが粉, 米糠および小麦麩の原スペクトルを示す。ポリエチレン袋を使わず各成分をサンプルホルダーに直接入れてスペクトル測定を行なった。スペクトルの1208, 1450および1936nm付近でみられるピークは, 主に水の吸収のためであると思われる(9)。1208nmおよび1936nm付近におけるピークは, ヒドロキシル基(O-H)の伸縮振動と変角振動由来の吸収によるものと思われる, さらに1450nmにおけるピークもO-H伸縮振動の第一倍音によるものと思われる(9)。米糠のスペクトルには, 672nm, 1726nm, 1760nm, 2308nm, 2348nmの五つのピークが見られる。これらのピークはおが粉や小麦麩のスペクトルには見られないものである。これまで, 油における主要な吸収は, 1200nmでのCH₂の伸縮振動の第二倍音, 1734nmおよび1765nmでのCH₂の伸縮振動の第一倍音, 2310nmおよび2345nmでの長鎖脂肪酸画分のCH₂の伸縮振動と変角振動であるとされてきた(9)。米糠は精米時の副産物である。ふつう玄米は, およそ3%濃度の脂質を含む。主に40%濃度のオレイン酸, 35%のリノール酸および20%のパルミチン酸を含む米糠油は, 米糠から抽出されて料理用に使われている。米糠のスペクトルにおける1726nm, 1760nm, 2308nmおよび2348nm付近のピークは, 米糠の脂質成分によるものであると思われる。米糠のスペクトルにおける672nm付近のピークの帰属は明らかではない。

各資材の二次微分スペクトルを図1-2に示す。目立ったネガティブピークが, 米糠のスペクトルでは, 674nm, 1718nm, 2306nmに見られる。特に674nmと1718nm付近におけるピークは, 米糠の検量式を作成するのに適している。なぜなら, おが粉と小麦麩のスペクトルでは, これらの波長付近の吸収は微々たるものだからである。

2) ポリエチレン袋と固体培地の原スペクトルと二次微分スペクトル

図1-3に、ポリエチレン袋と、乾燥重量基準で62.6%のおが粉、18.8%の米糠、18.6%の小麦麩を含む、含水率59.4%の固体培地の原スペクトルを示した。固体培地のスペクトルの1210nm, 1446nm, 1930nm付近において見られるピークは、主に水の吸収のためであると思われる。1730nm, 1764nm, 2312nm, 2352nm付近におけるピークは、米糠とポリエチレン袋のCH₂によるものであろう。図1-4に示した米糠の二次微分スペクトルにおける1718nm付近の吸収は、ポリエチレン袋のスペクトルにおいても同様に検出されているため、米糠の検量式をつくる際には有効でないが、674nm付近におけるピークは、米糠の検量式作成に使用できるであろう。

3) 固体培地の原スペクトルと二次微分スペクトルにおける含水率の影響

様々な含水率の固体培地試料を得るため、乾燥重量基準で62.6%のおが粉、18.8%の米糠、そして18.6%の小麦麩を含む固体培地に適当量の水を加えた。30.3%から68.8%の範囲で水を含む固体培地の原スペクトルを図1-5に示す。水分含有量が増加するにつれて、その吸光度値は高くなった。近赤外スペクトルにおける水の影響はとて大きい。それゆえ、原スペクトルを使用して固体培地成分の検量式を作るのはかなり困難だと思われる。

図1-5に示した固体培地試料の二次微分スペクトルを図1-6に示す。固体培地の含水率が970, 1158, 1412, 1900, 2308, そして2354nmに観測されるネガティブピークに顕著に影響していることが明らかになったが、一方で674, 1212, そして1726nmに観測されるネガティブピークは、含水率によって影響されなかった。さらに、可視領域の波長と約2100nm付近での吸収は、含水率の影響をほとんど受けなかった。それゆえ、米糠の検量式を作成するためには、674nm付近の波長の吸光度値を利用することが好ましい。

4) 固体培地の含水率測定のための検量式作成と検量式の検定

安定な検量式を作成するためには、目的物質由来の吸収が観測される波長を選択することが極めて重要である。含水率の検量式を作成するための波長の選択について検討した。水由来の吸収は、図1-5で見られる固体培地の原スペクトルにおける1448と1932nmの波長、そして図1-6で見られる二次微分スペクトルにおける1158nmの波長付近で各々観測された。ゆえに、含水率の検量式を作成するために使用する波長はそれらの波長の中から選ばれるべきである。検量式は、検量式作成用試料(n=113)のN

I Rスペクトルデータと乾燥重量法を用いて得た含水率, C_{act} , について最少二乗法を用いる単回帰分析法 (simple linear regression, S L R) を用いて解析することにより次に示す含水率測定のための検量式を得た。

$$C_{pre} = -1.89 + 47.67A_1 \quad (2)$$

ここで, A_1 は1450 nmでの $\log (1/R)$ の値である。単回帰係数と標準誤差 (standard error of calibration, S E C) の値は, 各々0.995と1.33%であった。

検量式2の検定が行なわれた。評価用試料 (これは検量式作成には使用されていない, $n = 56$) における含水率を, 検量式2を用いて予測し, 乾燥重量測定法で得られた C_{act} の値と比較した。この結果を図1-7に示す。この図において, 含水率の実際の値, C_{act} を横軸に, NIR予測値, C_{pre} を縦軸に記した。従来法によって得られた値とNIRの値との間の相関は, バイアスは-0.103, 標準誤差 (standard error of prediction, S E P) は1.33%であり, 相関係数は0.997であった。

5) 固体培地中の米糠含有率計測のための検量式作成と検量式の検定

米糠含有率を算出する検量式を作成するために用いる波長について検討した。図1-1に示したように, 米糠由来のピークが672, 1726, 1760, 2308, 2348 nm付近に観察された。また, ポリエチレン袋に由来する吸収も図1-3で示されるように1730, 1764, 2312, 2352 nmに観察された。したがって, それらのポリエチレン袋に由来する吸収が観察される波長は米糠用検量式の作成には用いることができない。さらに図1-5, 1-6に見られるように, 二次微分スペクトルでは, 原スペクトルに比べ含水率の影響が小さいため, 二次微分スペクトルの利用は米糠用検量式の作成に好都合である。それゆえに, 二次微分スペクトルにおける674 nmの波長を用いて米糠用検量式を作成した。検量式作成用試料 ($n = 113$) のNIRスペクトルデータと混合比率から求めた乾燥重量法基準の米糠含有率, C_{act} , について, 最少二乗法を用いる重回帰分析法を用いて解析することにより, 次に示す米糠含有率測定のための検量式を得た。

$$C_{pre} = 9.50 - 3007A_1 - 590.6A_2 \quad (3)$$

ここで, A_1 と A_2 は各々672と2100 nmにおける $d^2 \log (1/R)$ の値である。重回帰係数と標準誤差 (S E C) の値は各々0.987と1.73%であった。

検量式3の検定を行った。評価用試料 ($n = 56$) について, 検量式3を用いて予測した米糠含有率を, 混合比率から求めた乾燥重量基準の米糠含有率, C_{act} の値と比較した。その結果を図1-8に示す。バイアスは-0.168, 検定時の標準誤差 (S E P) は1.84%であり, 相関係数は0.975と, C_{act} の値と見事な一致が見られた。

6) 総括

きのこ栽培に利用される固体培地中の水と米糠の含有率の同時測定のために近赤外分光法の応用が研究された。その結果、近赤外分光法が含有率の計測に役立つ方法であることが明らかとなった。近赤外分光法の操作手順は非常に簡単で非破壊的であり、測定所要時間もたったの5分であった。小麦麩とおが粉の含有率もキノコの生育に重要な要素であるので、固体培地におけるそれらの含有率の同時測定も将来において研究されるべきである。

おが粉、米糠、小麦麩、水を混ぜるために使用される自動ミキサーを開発するためには、これら成分のオンライン測定技術の確立が不可欠である。これら成分のオンライン測定には光ファイバースプロブを用いた近赤外分光計の使用が有効であると思われる。光ファイバースプロブを用いた近赤外分光計を使用した場合、本研究では使用しなかった1726, 1760, 2308, 2348 nmの波長が米糠検量式の作成に適しているかもしれない。

参考文献

1. **Stark, E., Luchter, K., and Margoshes, M.:** Near-infrared analysis (NIRA): a technology for quantitative and qualitative analysis. *Appl. Spectrosc. Rev.*, **22**, 335-399 (1986).
2. **Dumoulin, E. D., Azais, B. P., and Guerain, J. T.:** Determination of sugar and ethanol content in aqueous products of molasses distilleries by near infrared spectrophotometry. *J. Food Science*, **52**, 626-630 (1987).
3. **Kaffka, K. J. and Norris, K. H.:** Rapid instrumental analysis of composition of wine. *Acta Aliment.*, **5**, 267-279 (1976).
4. **Coventry, A. G. and Hunston M. J.:** Application of near-infrared spectroscopy to analysis of beer samples. *Cereal Foods World*, **29**, 715-718 (1984).
5. **Halsey, S. A.:** The use of transmission and transreflectance near infrared spectroscopy for the analysis of beer. *J. Inst. Brew.*, **91**, 306-312 (1985).
6. **Yano, T. and Harata, M.:** Prediction of the concentration of several constituents in a mouse-mouse hybridoma culture by near

- infrared spectroscopy. *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 659-662 (1994).
7. **Yano, T., Aimi, T., Nakano, Y. and Tamai, M.:** Prediction of the concentrations of ethanol and acetic acid in the culture broth of a rice vinegar fermentation using near infrared spectroscopy. *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 461-465 (1997).
 8. **Osborne, B. G. and Fearn, T.:** Near infrared spectroscopy in food analysis, p.86-103. John Wiley & Sons, New York (1986).
 9. **Osborne, B. G., Fearn, T., and Hindle P. H.:** Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis, p.13-35 and p.157-159. Longman Scientific & Technical, Harlow (1986).

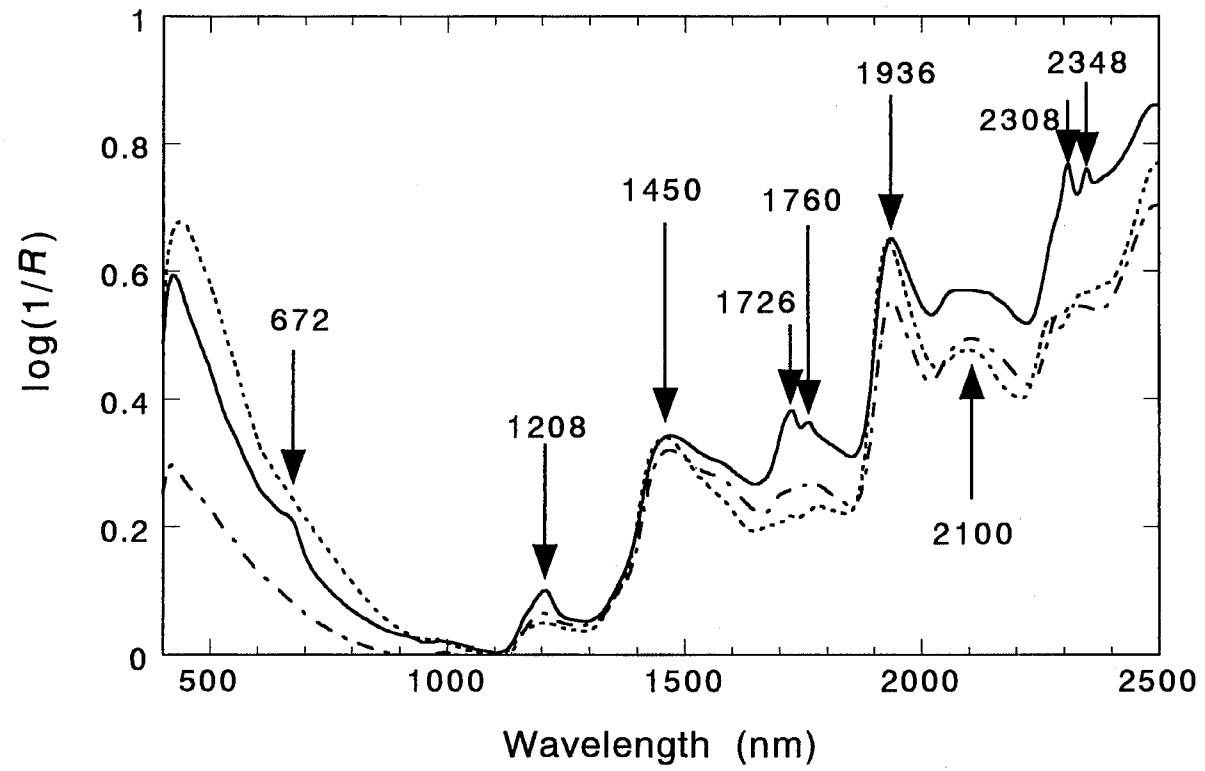


図 1 - 1 固体培地用資材の近赤外原スペクトル

おが粉 -----
 米糠 -----
 小麦麩 - · - · - ·

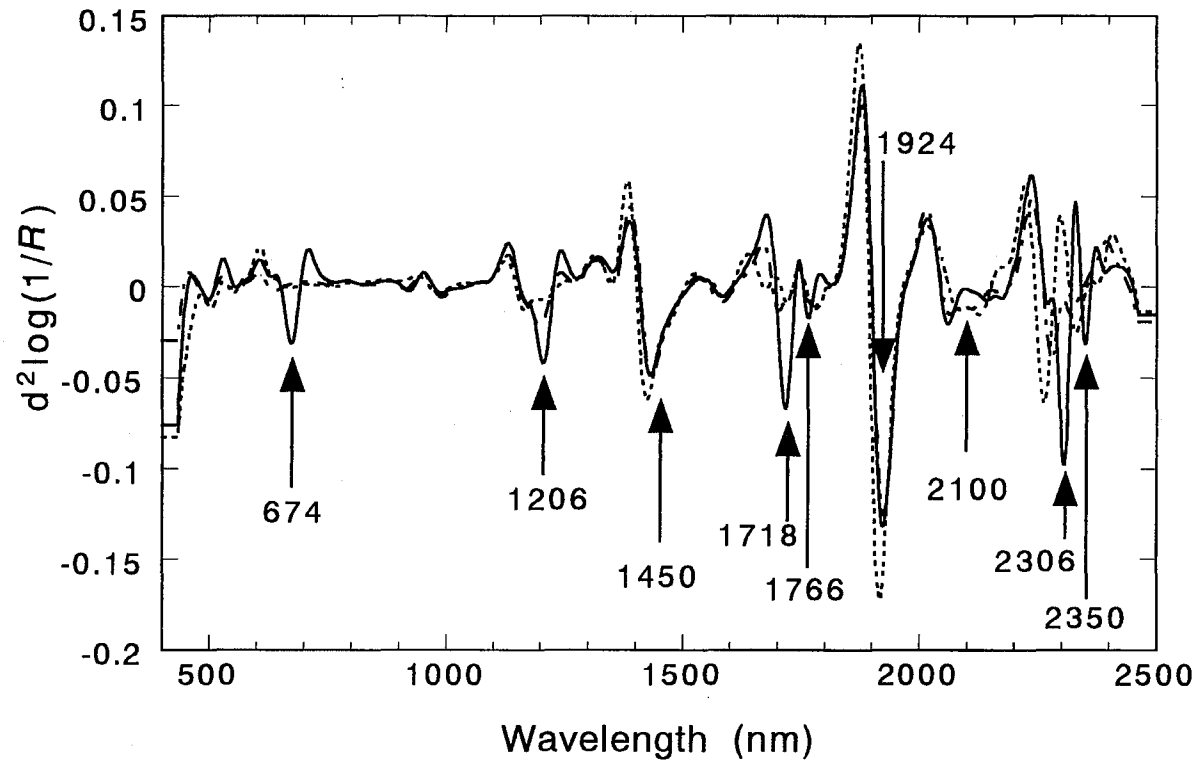


図 1 - 2 固体培地用資材の近赤外二次微分スペクトル

おが粉	-----
米糠	—————
小麦麩	- · - · - · -

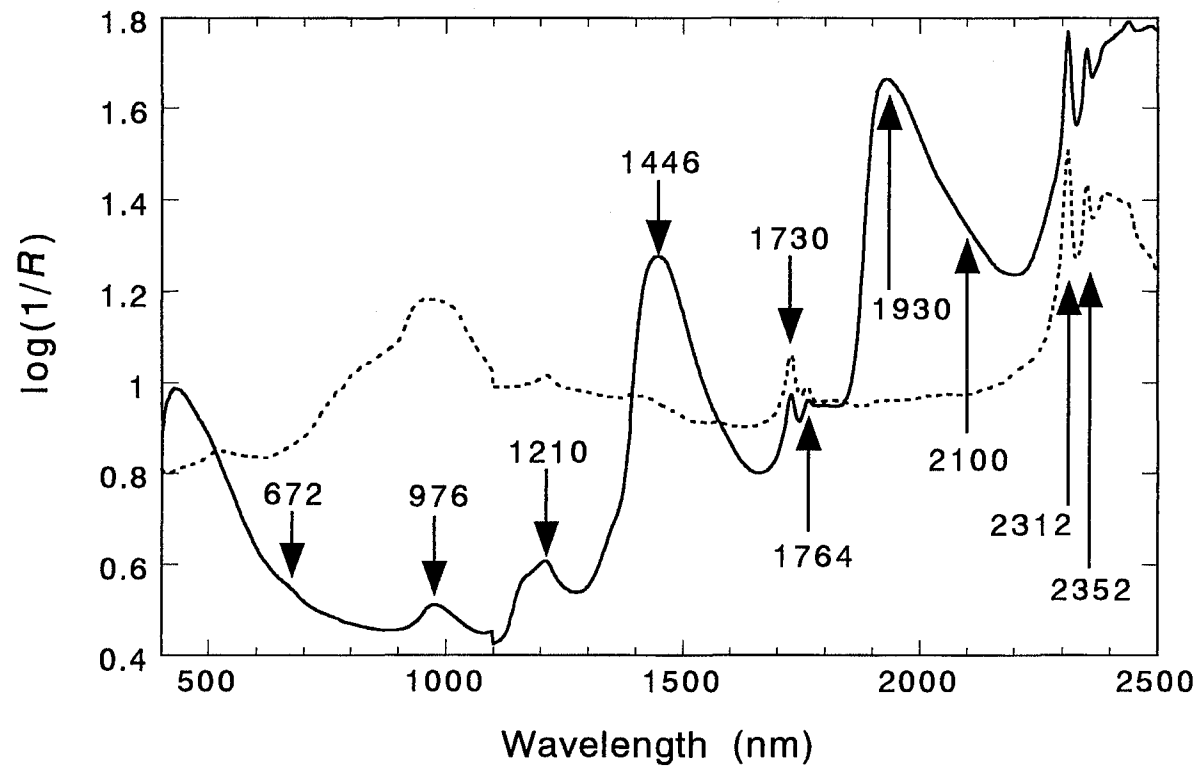


図1-3 固体培地とポリエチレン袋の近赤外原スペクトル

固体培地の資材混合比は乾燥重量基準で、おが粉62.6%、米糠18.8%、小麦麩18.6%であり、水分含有量は59.4%である。

ポリエチレン袋 -----, 固体培地 —————

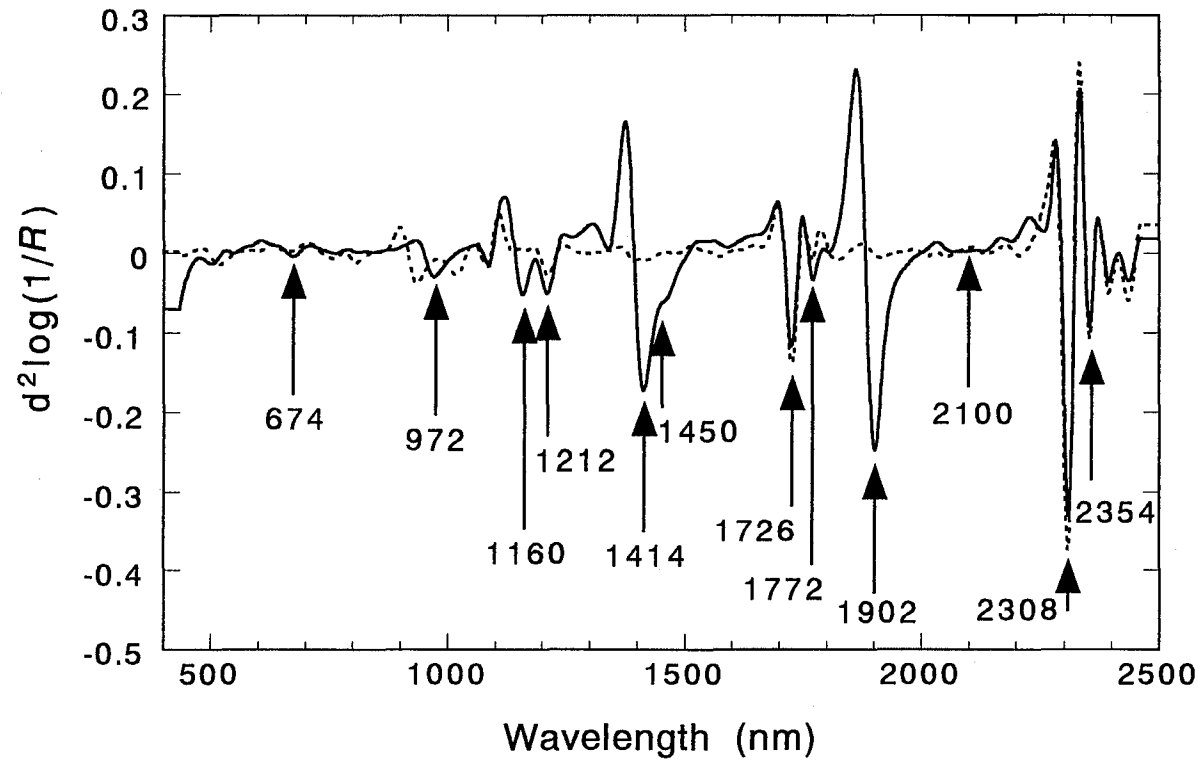


図1-4 固体培地とポリエチレン袋の近赤外二次微分スペクトル

固体培地の資材混合比は乾燥重量基準で、おが粉62.6%、米糠18.8%、小麦麩18.6%であり、水分含有量は59.4%である。

ポリエチレン袋 -----, 固体培地 _____

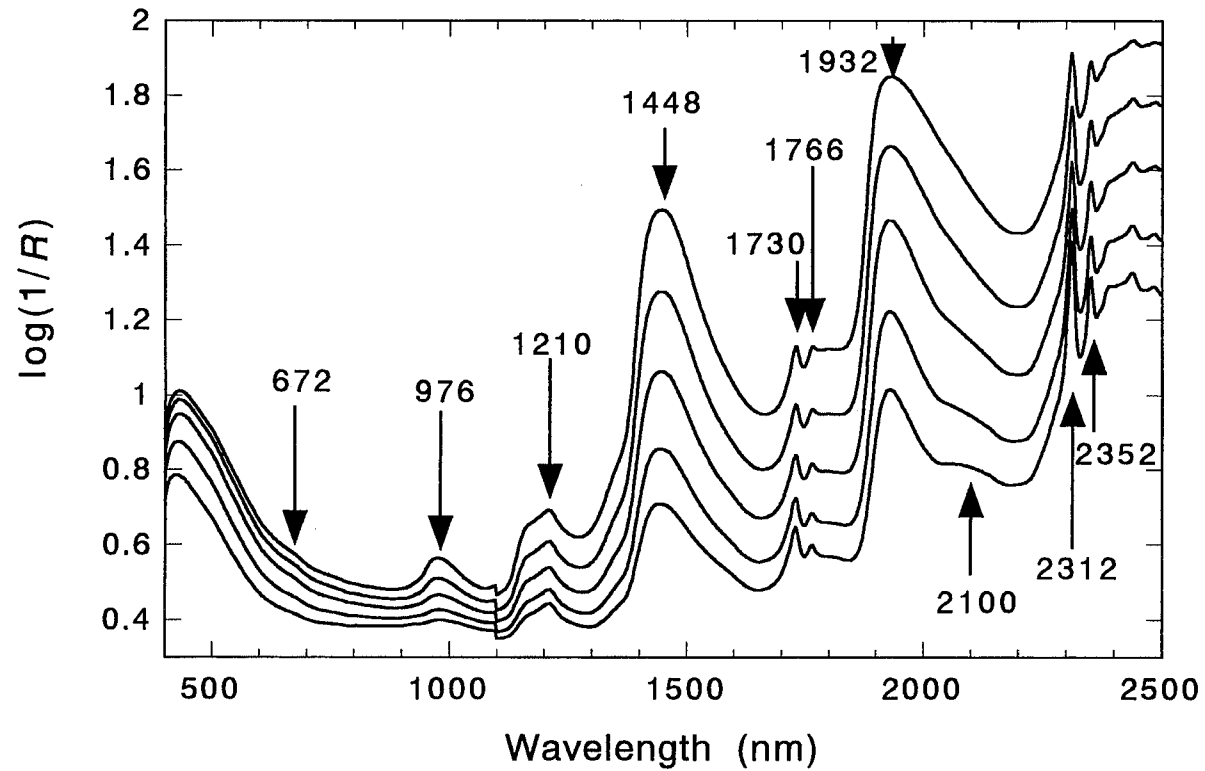


図 1 - 5 固体培地の近赤外原スペクトルに及ぼす水分含有量の影響

固体培地の資材混合比は乾燥重量基準で、おが粉62.6%、米糠18.8%、小麦麩18.6%である。水分含有量は下のスペクトルから上のスペクトルの順に、30.3、39.8、48.6、59.4、68.8%である。

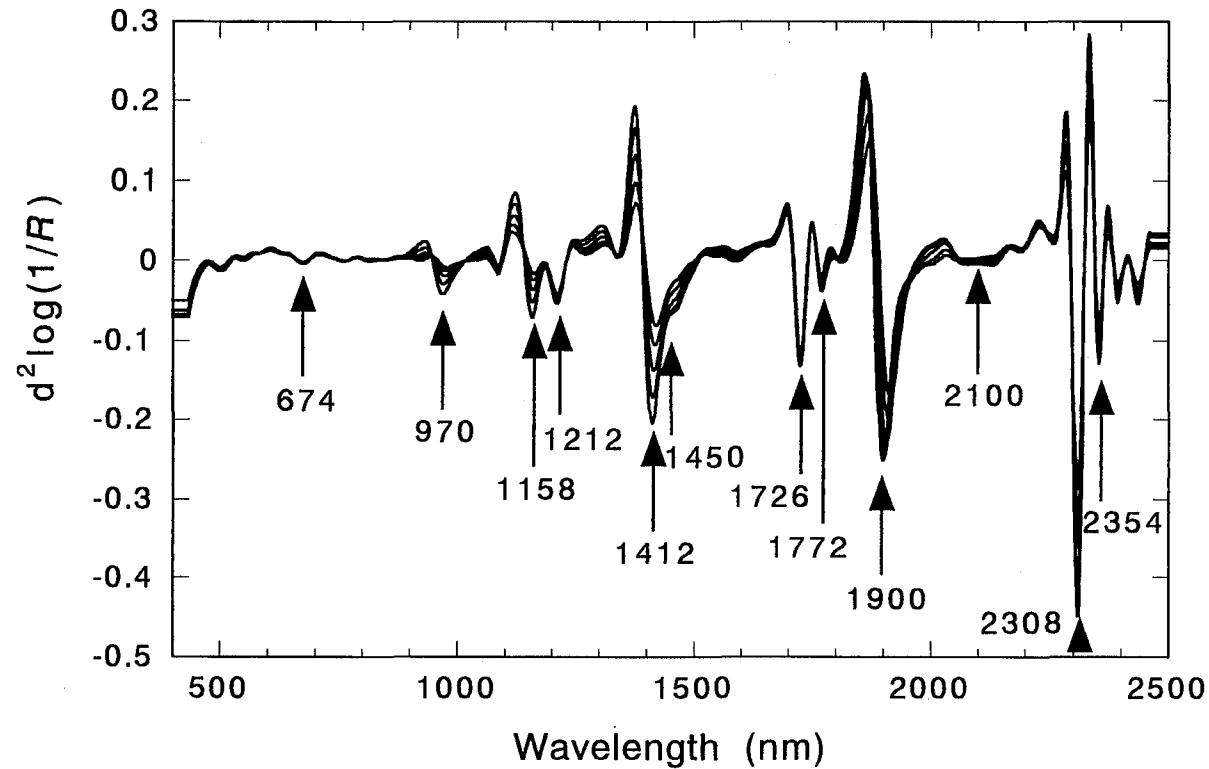


図1-6 固体培地の近赤外二次微分スペクトルに及ぼす水分含有量の影響

固体培地の資材混合比は乾燥重量基準で、おが粉62.6%、米糠18.8%、小麦麩18.6%である。水分含有量は、970, 1158, 1412, 1450, 1772, 1900, 2308, 2354nmにおいて、上から下のスペクトルの順に、30.3, 39.8, 48.6, 59.4, 68.8%である。

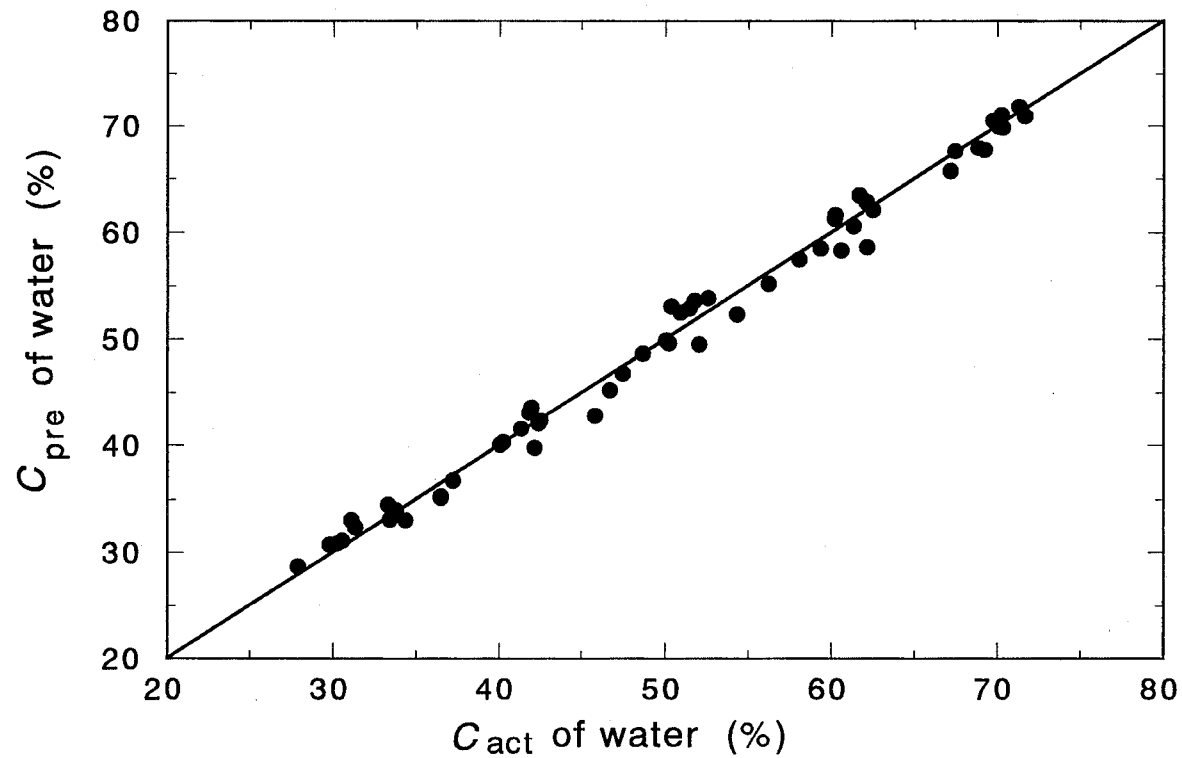


図1-7 固体培地の水分含有量計測における近赤外分光法の検量式の検定結果

検定に用いた検量式は、 $C_{pre} = -1.89 + 47.67 A_1$ である。ここで A_1 は1450nmにおける原スペクトル値である。図中の実線は、近赤外分光法で得られた値＝乾燥重量測定法で得られた値、を表している。検定標準誤差は1.33%、バイアスは-0.103、相関係数は0.997であった。

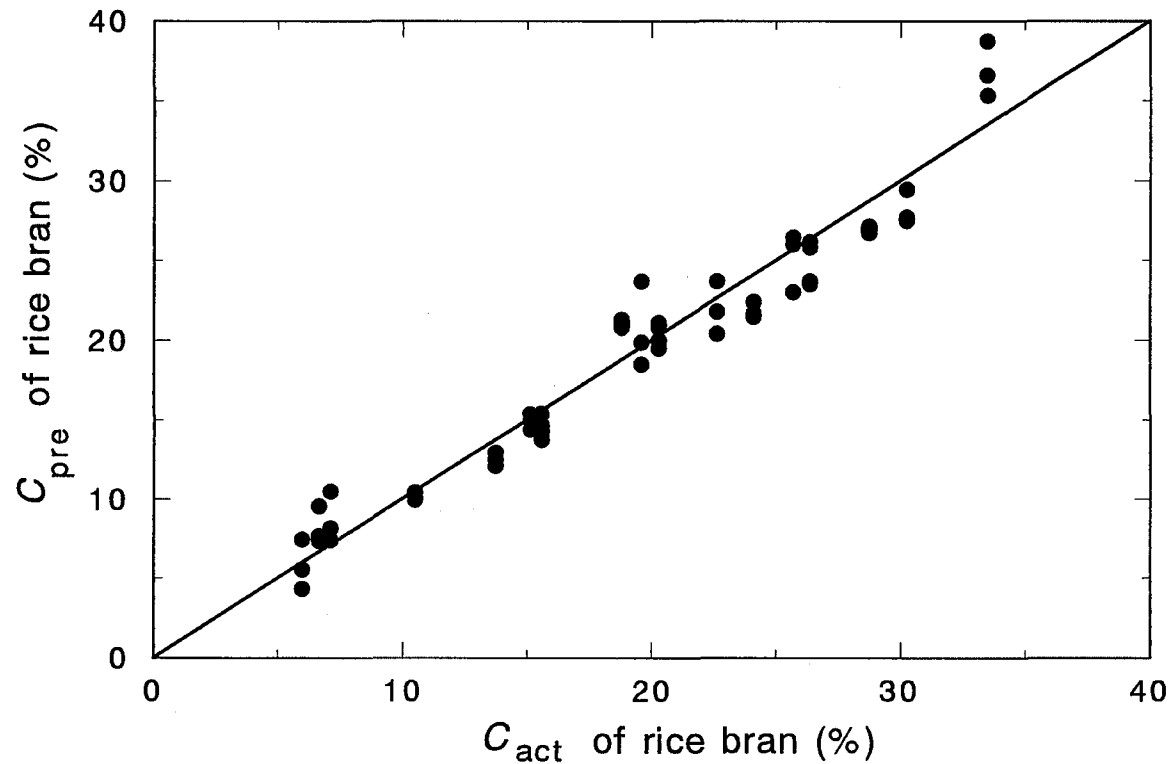


図1-8 固体培地の米糠含有量計測における近赤外分光法の検量式の検定結果

検定に用いた検量式は、 $C_{pre} = 9.50 - 3007A_1 - 590.6A_2$ である。ここで A_1 , A_2 はそれぞれ672, 2100nmにおける二次微分スペクトル値である。図中の実線は、近赤外分光法で得られた値 = 乾燥重量測定法で得られた値, を表している。検定標準誤差は1.84%, バイアスは-0.168, 相関係数は0.975であった。

第二章 近赤外分光法を用いた固体培地における増殖度の自動計測

はじめに

微生物の培養において、菌体濃度を計測し、増殖速度を把握することは培養を管理する上で大変重要なことである。液体培養の場合には光度計を用いて培養液の濁度を計測し、あらかじめ作成しておいた菌体濃度と濁度の関係から菌体濃度を得る。一方、「かび」や「きのこ」の培養に用いられる固体培養の場合には、一般に、細胞壁の構成成分であるグルコサミンの濃度を分析することにより菌体濃度に置き換えている。しかし、グルコサミンの分析方法は大変複雑であり、労力と時間を必要とする方法であるため、簡便迅速な菌体濃度の計測方法の開発が望まれている。本章では、近赤外分光法を用いた菌床中のグルコサミン濃度の計測の可能性について検討した。

方 法

1) 供試菌株と保存方法

本研究には、漢方薬として有名な *Ganoderma lucidum* (靈芝・マンネンタケ) を用いた。

菌株の保存方法は次の如くである。100ml容三角フラスコを用いてポテトデキストロース培地(日水製薬) 1.95gを50mlの水道水に懸濁した。アルミホイルで蓋をし、沸騰水浴中にて寒天粉を溶解させた後、121℃、15分間オートクレーブした。クリーンベンチ中で滅菌済シャーレに分注し、保存用培地から寒天ごと菌体を切り取り(約1cm角)、菌体生育面を下にして新しい培地上に乗せた。Para Filmを用いてシャーレの蓋をシールした後、シャーレ上面積の7~8割程度生育するまで28℃の恒温器内にて培養し、その後冷蔵庫内に保存した。この植え継ぎ作業は3ヵ月に1度行った。本株は、1年に1度の植え継ぎ作業でも保存可能である。

2) 培地の調整

固体培地を菌床用袋(シナノパックSK12-20, (株)シナノポリ, 〒381-2214 長野市稲里町田牧1607-5, TEL 0262-84-3368, FAX 0262-84-5629)に詰め専用キャップをした。袋と袋が触れないように間を開けて121℃、30分間オートクレーブし、熱いうちに外に出して空冷させた。

(a) コーヒー抽出粕を用いた固体培地

缶コーヒー製造行程の廃棄物（副産物）であるコーヒー抽出粕（宝積飲料（株）志和工場，〒739-0267 東広島市志和町大字別府字長坪2061-3，TEL0824-33-4959）6kgに対し水を1kg加え，よく混合した。

(b) コーヒー抽出粕と副資材を用いた固体培地

重量比でコーヒー抽出粕：米ぬか：小麦麩：水=2.33：0.31：0.31：1.05をよく混合した。

(c) チップダストと副資材を用いた固体培地

チップダスト（清川チップ工業，〒720-1621 広島県神石郡油木町大字李229番地，TEL08478-2-2411，水分含有量は約20%）4kgに米糠（水分含有量は約10%）1.2kg，小麦麩（水分含有量は約10%）1.2kgをよく混合した後，水9lを混合しながら加えて混合物の水分含有量を約65%に調整した。

(d) 初殻（もみがら）と副資材を用いた固体培地

爆砕処理した初殻（中国きのこバイオセンター，〒720-1624 広島県神石郡油木町字上野，TEL08478-2-2055，水分含有量は約1%）4.4kgに米糠（水分含有量は約10%）1.5kg，小麦麩（水分含有量は約10%）1.5kgをよく混合した後，水9lを混合しながら加えて混合物の水分含有量を約58%に調整した。

3) 培養方法

(a) 接種菌液の調整

・前前培養

300ml容ビーカーを用いて麦芽エキス2gを100mlの水道水に溶かし，30% NaOHでpH5.6に調整した。150℃，3時間乾熱滅菌した500ml容綿栓付坂口フラスコに移した。綿栓部分をアルミホイルで覆った後，121℃，15分間オートクレープした。保存用培地から寒天ごと菌体を切り取り，2mm×2mmの寒天片を10～15片程度坂口フラスコに接種して28℃，115spmで7日間振盪培養した。

・前培養

2l容三角フラスコを用いて表2-1に示した培地成分を500mlの水道水に溶かし，150℃，3時間乾熱滅菌した3l容三角フラスコに移した。綿栓部分をアルミホイルで覆った後，121℃，15分間オートクレープした。冷却後，1l容三角フラスコ中で300mlの水道水に溶かしてあらかじめ別殺菌しておいたグルコース溶液をクリーンベンチ内で添加した。

Thiamin・HClはろ過滅菌済のもの1.0mlを培養の直前にクリーンベンチ内で滅菌済ピペットを用いて培地中に加えた。前前培溶液100ml×2本を加え1 lとし、28℃、120rpmで7日間振盪培養した。デカンテーションによって上清液を捨て、菌体濃度を高めて接種用菌液とした。

表 2 - 1 前培養培地の組成

Malt extract	8.0 g/l
Glucose	5.0
NH ₄ Cl	3.51
KH ₂ PO ₄	0.39
K ₂ HPO ₄	4.32
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.30
CaSO ₄ ・2H ₂ O	0.10
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	0.30 mg/l
FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.15
CuSO ₄ ・5H ₂ O	0.10
MnSO ₄ ・5H ₂ O	0.10
(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ ・HCl	0.02
Thiamin・HCl	0.50

(b) 本培養

クリーンベンチ内にて、乾熱滅菌済みメスピペット（さきわれ）を用いて前培養液接種菌液10mlを殺菌済みの固体培地の上面の中央部に接種した。各袋の培地重量を測定し27℃の加湿器付恒温器中にて培養を開始した。

4) コーヒー抽出粕のアセトン抽出の方法

ソックスレー脂肪抽出器を用いてコーヒー抽出粕のアセトン抽出を行い、コーヒー抽出粕のアセトン抽出物とコーヒー抽出粕のアセトン抽出残渣を得た。コーヒー抽出粕のアセトン抽出残渣は105℃の乾燥器内にて乾燥させ、近赤外スペクトル測定用試料とした。

5) 分析方法

(a) グルコサミン量

Elson-Morgan法を用いた。採取した菌床試料を105℃の乾燥器内にて乾燥させ、粉碎機（三田村理研Ultra Centrifugal Mill ZM1,メッシュ 0.2mm）で粉碎した後、0.5gを35mm×100mmの栓付試験管に入れ、18N H₂SO₄を5ml加え、18時間室温に放置した。その後硫酸濃度が1Nになるまで蒸留水を加えて希釈し、121℃、1時間オートクレーブして酸加水分解を行った。この分解物を60%NaOHを用いてpH7.0に調整し、濾紙No.2A（φ110）を用いて濾過を行ない濾液をメスアップした。20×120mmの栓付試験管に標準液と試料をそれぞれ0.5mlずつとアセチルアセトン試薬（表2-2）0.5mlを加えて、よく混合した後、95℃、20分間アセチル化を行った。その後、水中で冷却した後、3mlの96%エタノールと0.5mlのエールリッヒ試薬（表2-3）を加えて60℃、15分間発色させ、OD₅₃₅を測定した。（なお、標準液は0~100μgグルコサミン/mlになるように調整した）アセチル化や発色反応は大変温度の影響を受けやすいため、温度むらがるべくできないように注意した。各試料とも6回の分析結果の平均値を用いた。

表2-2 アセチルアセトン試薬

0.5N Na ₂ CO ₃	50.0ml
アセチルアセトン試薬	1.0ml

表2-3 エールリッヒ試薬

p-Dimethylaminobenzaldehyde(DMAB)	0.8g
(CH ₃) ₂ NC ₆ H ₄ CHO	
濃硫酸	30.0ml
96% エタノール	30.0ml

(b) 近赤外分光分析法

(a)で使用した乾燥粉末試料を近赤外分光分析法用試料として用いた。試料をサンプルカップ（Bran+Luebbe Co., Tokyo）に詰め、近赤外分光計（InfraAlyzer 500, Bran+Luebbe Co., Tokyo）のサンプルホルダーに置き、2nm間隔にて1100から2500nmの吸光度を測定した。

検量式を作成するため、得られた菌床の近赤外スペクトルの1次微分スペクトルを作成し、試料（30個）のグルコサミン濃度（4.21-12.6mg/g乾燥試料）との相関を重回帰分析

法を用いて解析し、検量式作成に用いる波長を選択した。1次微分スペクトルの作成と重回帰分析にはIDAS (Bran+Luebbe Co.) と呼ばれるソフトウェアを用いた。

また、コーヒー抽出粕、アセトン、コーヒー抽出粕のアセトン抽出物、コーヒー抽出粕のアセトン抽出残渣の近赤外スペクトルは、近赤外線分光計 (NIRS6500SPL, (株) ニレコ, 八王子市) を用いて得た。コーヒー抽出粕とコーヒー抽出粕のアセトン抽出残渣の乾燥試料はサンプルカップ (株) ニレコ) に直接入れて 2 nm 間隔で 400 nm から 2500 nm の波長範囲の反射光の吸光度, $\log(1/R)$ を測定した。アセトンとコーヒー抽出粕のアセトン抽出物は、光路長 2 mm の石英ガラスセルに試料を入れ、それをセルホルダーに設置した後、2 nm 間隔で 400 nm から 2500 nm の波長範囲の透過光の吸光度, $\log(1/T)$ を測定した。それぞれの試料のスペクトルは、34回のスキャンの吸光度の平均値をとることにより得た。

結果と考察

1) コーヒー抽出粕を用いた固体培地

コーヒー抽出粕を用いて *Ganoderma lucidum* を培養した試料の近赤外スペクトルを図 2-1 に示す。培養の進展にともない近赤外スペクトルのベースラインは低くなった。1450と1950nmにみられるピークは水由来である。2300nm付近に見られる二つのピークは脂質由来の吸収であり、培養の進展にともないピークが低くなった。この2300nm付近のコーヒー由来の脂質のピークの低下は菌による脂質の分解を意味する。

図 2-2 にコーヒー抽出粕、アセトン、コーヒー抽出粕のアセトン抽出物、コーヒー抽出粕のアセトン抽出残渣の近赤外スペクトルを示す。コーヒー抽出粕のスペクトルにおける2308と2348nmの吸収は、アセトン抽出処理後は抽出物の方へ移り、抽出残渣には観察されなかった。このことは、2308と2348nmの吸収がコーヒー中の脂溶性物質由来であることを意味している。

図 2-1 に示した菌床の原スペクトルを1次微分処理したスペクトルを図 2-3 に示す。1次微分処理によりベースラインのシフトは無くなった。Elson-Morgan法を用いて測定した菌床中のグルコサミン量と1次微分スペクトルデータ間における重回帰分析の結果、1203, 1635, 1751, 2103, 2375, 2431nmを用いた検量式を得た。これらの波長の帰属は明確ではないが、1203nmの吸収は CH_3 や CH_2 におけるC-Hの伸縮振動の2倍音と思われる。1635, 1751, 2103, 2375, 2431nmの吸収は、それぞれRCONHRにおけるC-Hの伸縮振動の倍音、 CH_2 におけるC-Hの伸縮振動の倍音、O-H変角振動とRCONHRにおけるC-O伸縮振動の結合音、ROHにおけるO-H変角振動の2倍音、C-Hの伸縮振動とC-C伸縮振動の

結合音と思われる。培養物はさまざまな物質を含んでいるのでこれらの吸収が菌体のグルコサミンに直接由来しているか否かは不明である。検量式作成に用いた試料（30個）のデータを用いて、近赤外分光法を用いて算出したグルコサミン濃度（縦軸）とElson-Morgan法を用いて測定した菌床中のグルコサミン量（横軸）の相関を図2-4に示した。相関係数は0.969、検量標準誤差は0.622mg/g菌床と良好であった。

検量式作成に用いなかった試料（11個）のデータを用いて検量式の検定を行った結果を図2-5に示す。近赤外分光法を用いて算出したグルコサミン濃度を縦軸に、Elson-Morgan法を用いて測定した菌床中のグルコサミン量を横軸に表わしている。相関係数は0.992、検定標準誤差は0.346mg/g菌床と良好な結果であった。

コーヒー抽出粕を培地に用いて *Ganoderma lucidum* を培養した試料中のグルコサミン濃度の経時変化について、近赤外分光法を用いて得た値とElson-Morgan法を用いて測定した値とを比較した結果を図2-6に示す。両者はよく一致しており、グルコサミン濃度の変化から得たこの固体培養における *Ganoderma lucidum* の比増殖速度は $0.021d^{-1}$ と求められた。

2) コーヒー抽出粕と副資材を用いた固体培地

コーヒー抽出粕と副資材からなる固体培地を用いて *Ganoderma lucidum* を培養した試料の近赤外スペクトルを図2-7に示す。培養の進展にともない近赤外スペクトルのベースラインは低くなった。1450と1950nmにみられるピークは水由来である。1750, 2300nm付近に見られる二つずつのピークは脂質由来の吸収であり、培養の進展にともないピークが低くなった。この1750, 2300nm付近のコーヒーおよび米糠由来の脂質のピークの低下は菌による脂質の分解を意味する。

図2-7に示した菌床の原スペクトルを1次微分処理したスペクトルを図2-8に示す。1次微分処理によりベースラインのシフトは無くなった。Elson-Morgan法を用いて測定した菌床中のグルコサミン量と1次微分スペクトルデータ間における重回帰分析の結果、5波長を用いた検量式を得た。検量式作成に用いた試料（30個）のデータを用いて、近赤外分光法を用いて算出したグルコサミン濃度（縦軸）とElson-Morgan法を用いて測定した菌床中のグルコサミン量（横軸）の相関を図2-9に示した。相関係数は0.978と良好であった。

コーヒー抽出粕と副資材からなる固体培地を用いて *Ganoderma lucidum* を培養した試料中のグルコサミン濃度の経時変化について、近赤外分光法を用いて得た値とElson-Morgan法を用いて測定した値とを比較した結果を図2-10に示す。1つの試料を除いて両者はよく一致している。

3) チップダストと副資材を用いた固体培地

チップダストと副資材からなる固体培地を用いて *Ganoderma lucidum* を培養した試料の近赤外スペクトルを図 2-11 に示す。図には蜜柑搾汁粕固体培地と副資材を加えた籾殻固体培地を用いて *Ganoderma lucidum* を培養した試料の近赤外スペクトルも示す。2300nm 付近にかすかに見られるピークは米糠に含まれる脂質由来の吸収であり、培養の進展の指標になりうるものと思われる。

Elson-Morgan法を用いて測定した菌床中のグルコサミン量と1次微分スペクトルデータ間における重回帰分析の結果、5波長を用いた検量式を得た。検量式作成に用いた試料(28個)のデータを用いて、近赤外分光法を用いて算出したグルコサミン濃度(縦軸)とElson-Morgan法を用いて測定した菌床中のグルコサミン量(横軸)の相関を図 2-12 に示した。相関係数は0.976と良好であった。

チップダストと副資材からなる固体培地を用いて *Ganoderma lucidum* を培養した試料中のグルコサミン濃度の経時変化について、近赤外分光法を用いて得た値とElson-Morgan法を用いて測定した値とを比較した結果を図 2-13 に示す。両者はよく一致している。

4) 籾殻と副資材を用いた固体培地

Elson-Morgan法を用いて測定した菌床中のグルコサミン量と1次微分スペクトルデータ間における重回帰分析の結果、2波長を用いた検量式を得た。検量式作成に用いた試料(14個)のデータを用いて、近赤外分光法を用いて算出したグルコサミン濃度(縦軸)とElson-Morgan法を用いて測定した菌床中のグルコサミン量(横軸)の相関を図 2-14 に示した。相関係数は0.993と良好であった。

副資材入りチップダスト固体培地を用いて *Ganoderma lucidum* を培養した試料中のグルコサミン濃度について得られた検量式を用いて、副資材入り籾殻固体培地を用いて *Ganoderma lucidum* を培養した試料中のグルコサミン濃度を推測した結果を図 2-15 に示す。傾はほぼ一致しているがシフトが見られた。すなわち、固体培地の組成が変わると検量式を作り替えなければならないようである。この点については、さらに詳しい研究が必要である。

5) 総括

近赤外分光法によるグルコサミンの測定は、Elson-Morgan法などの化学的分析法と比べ、労力と所要時間の点で優れており、Elson-Morgan法などの化学的分析法に替わりうる方法であった。本研究では菌床を乾燥、粉碎した試料を用いたが、光ファイバプローブを用いた近赤外計を用いれば、非破壊計測が可能であると期待される。

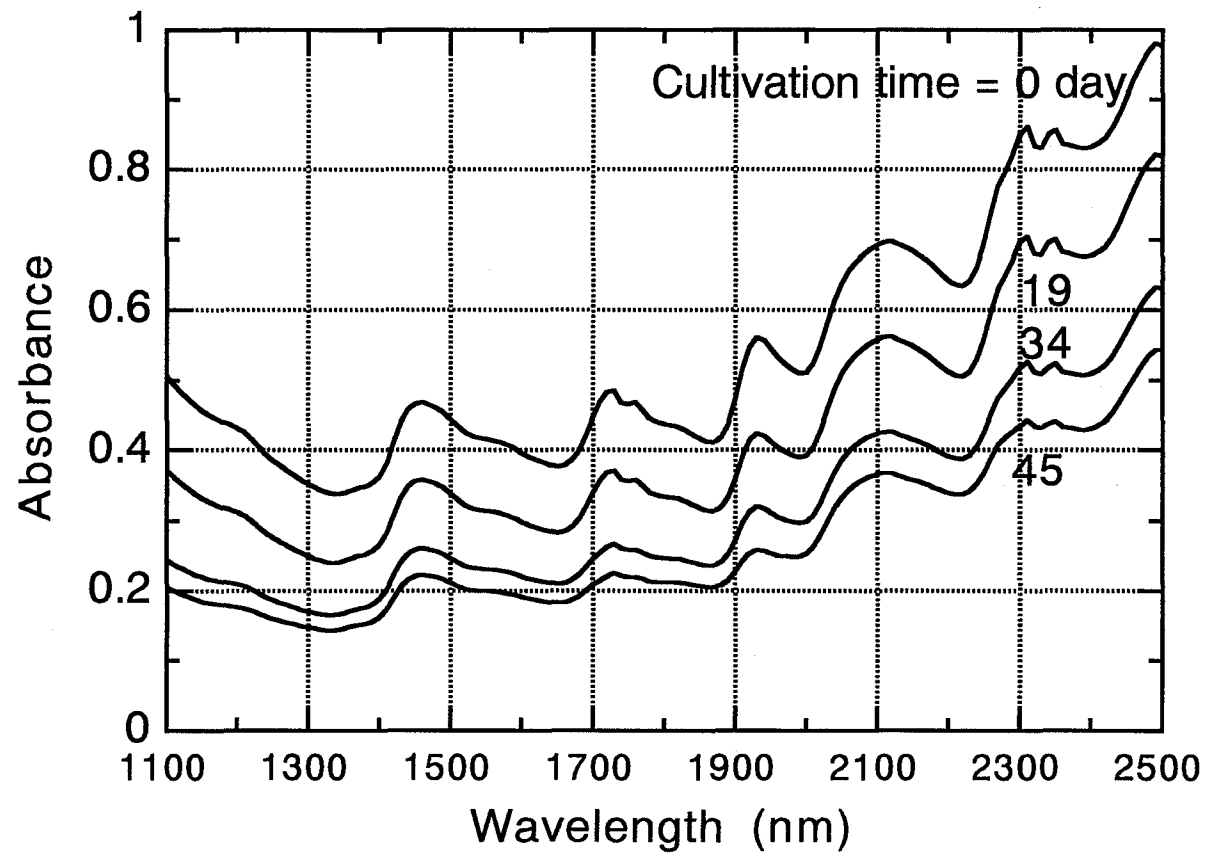


図2-1 コーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の近赤外原スペクトル

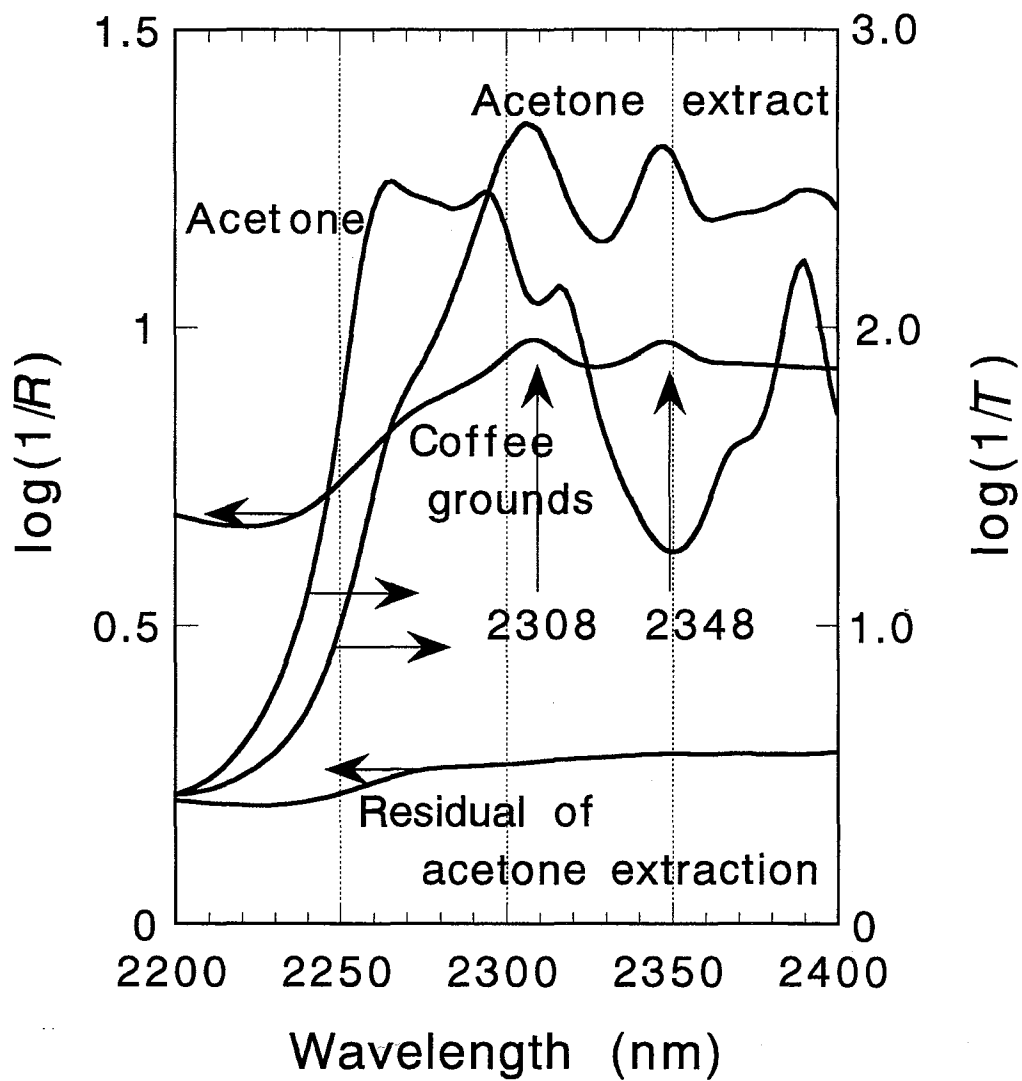


図2-2 コーヒー抽出粕, アセトン, コーヒー抽出粕のアセトン抽出液, コーヒー抽出粕のアセトン抽出残渣の近赤外原スペクトル

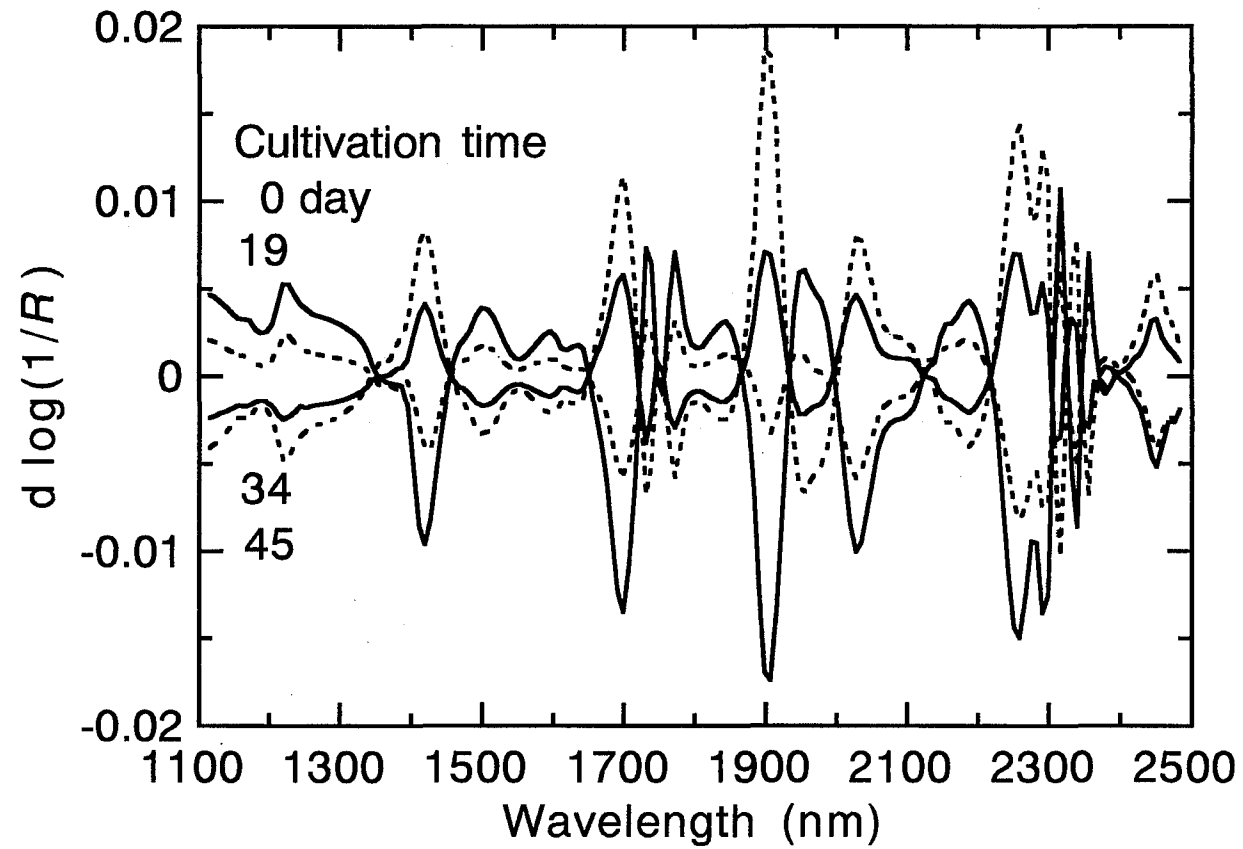


図 2 - 3 コーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の近赤外一次微分スペクトル

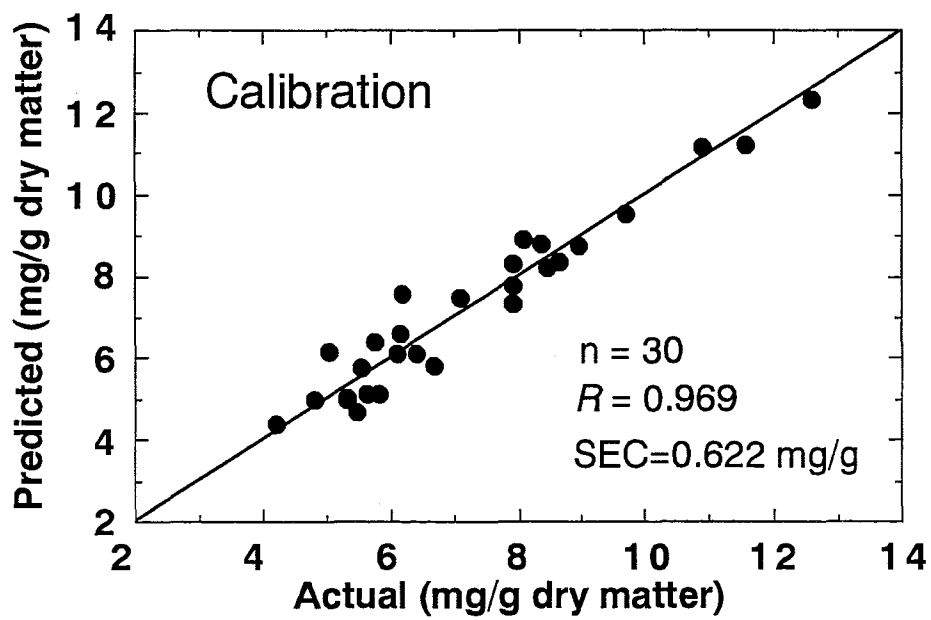


図2-4 コーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床中のグルコサミン測定用検量線

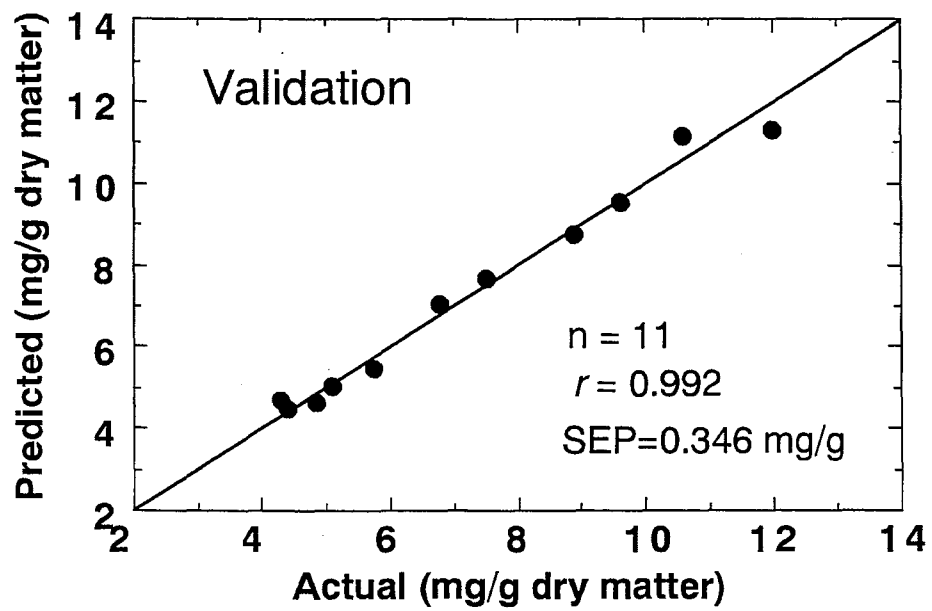


図2-5 コーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床中のグルコサミン測定用検量線の検定結果

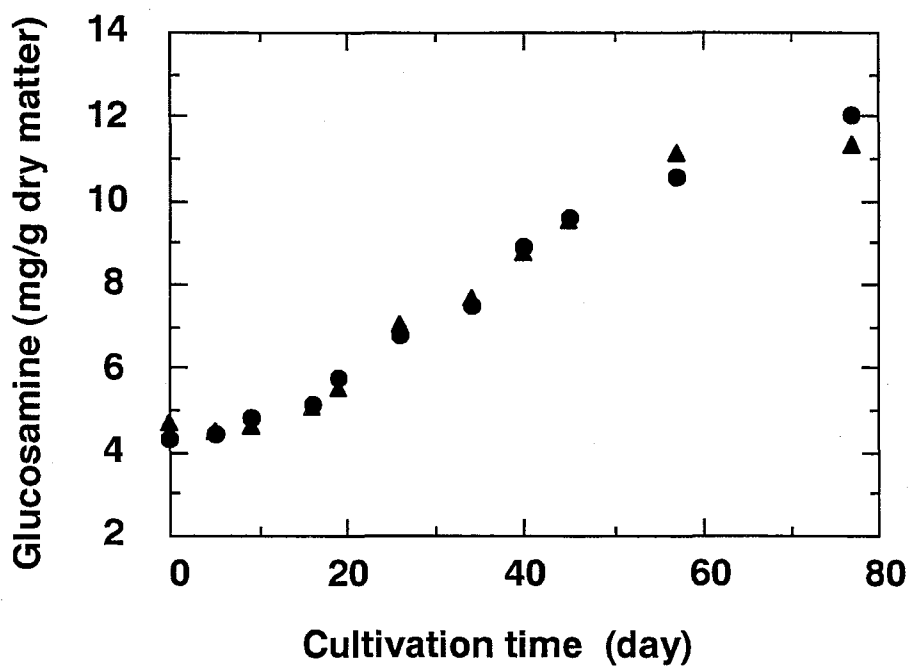


図2-6 コーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderuma lucidum* 培養菌床中のグルコサミンの経時変化

- 従来分析方法により得られた濃度
- ▲ 近赤外分光法により得られた濃度

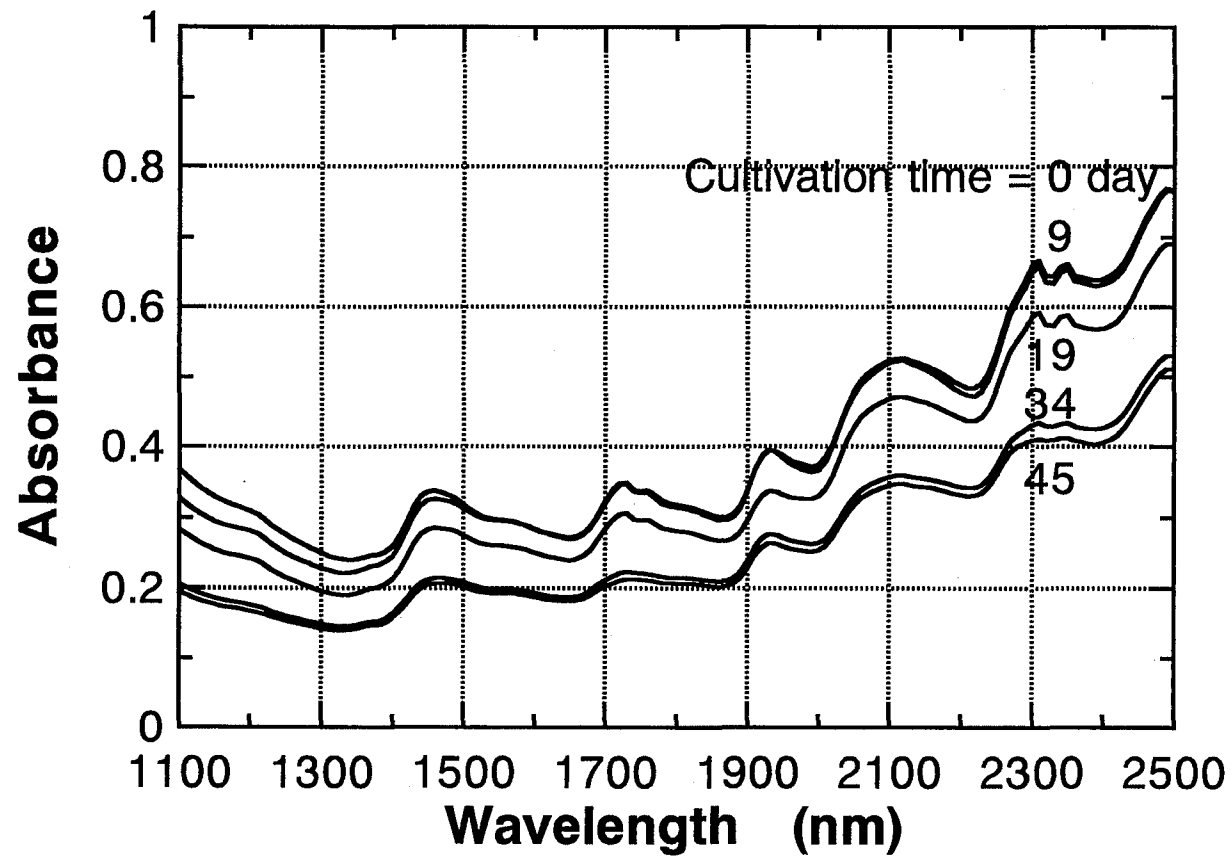


図2-7 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の近赤外原スペクトル

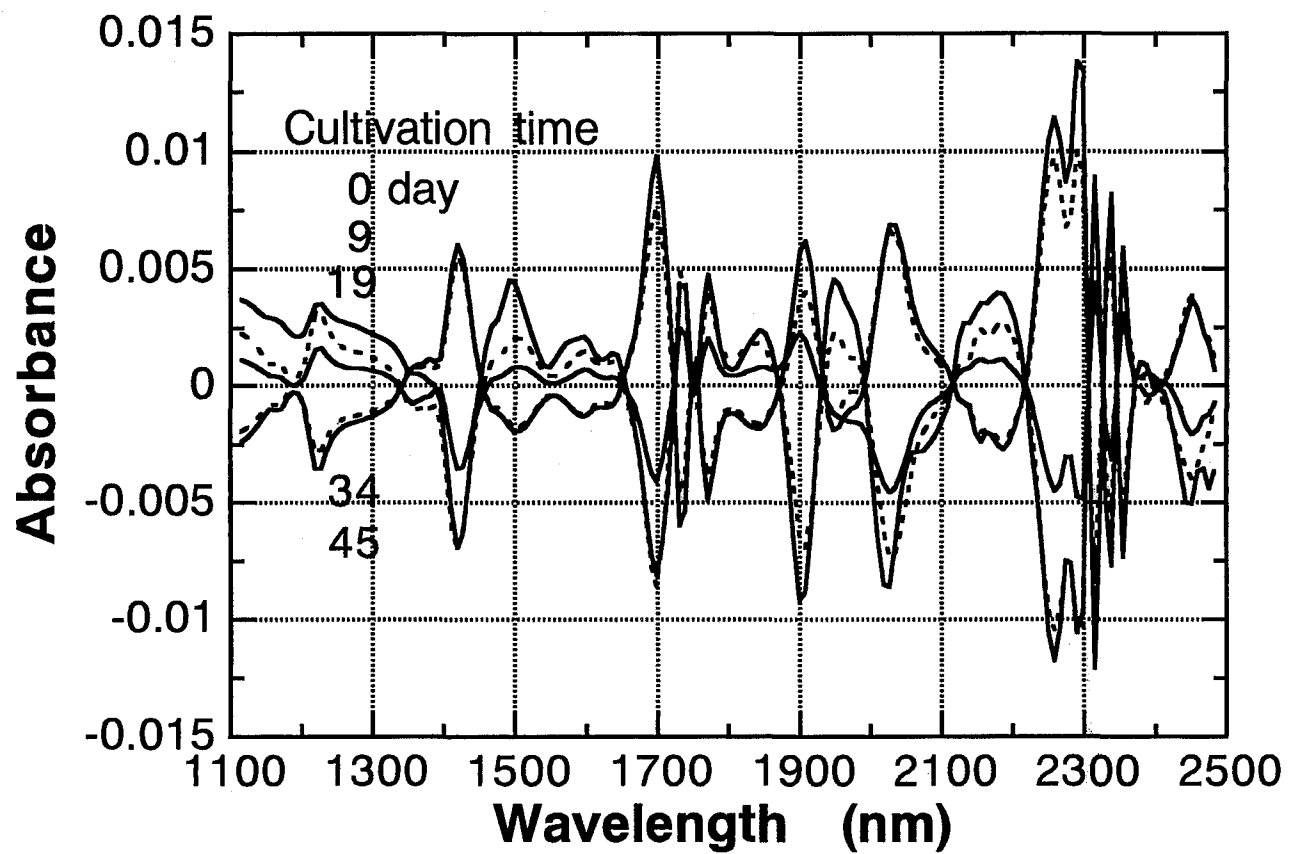


図 2 - 8 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の近赤外一次微分スペクトル

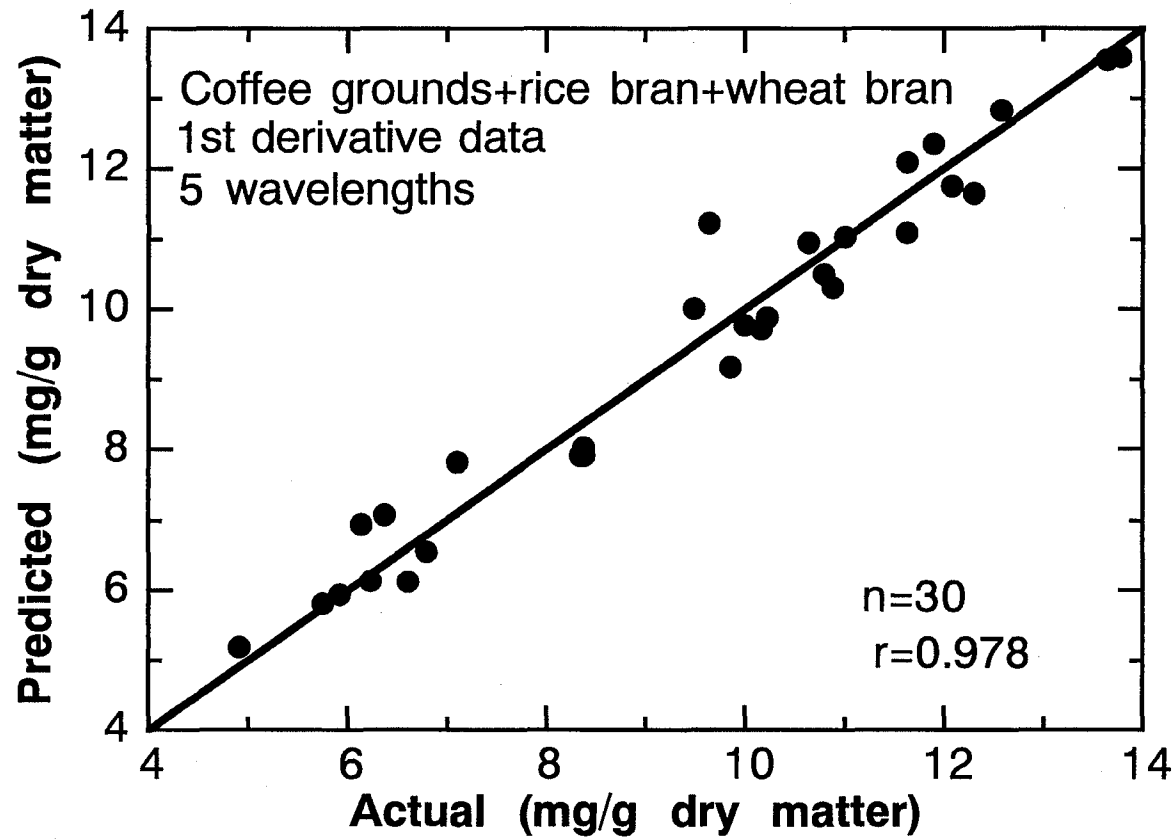


図2-9 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床中のグルコサミン測定用検量線

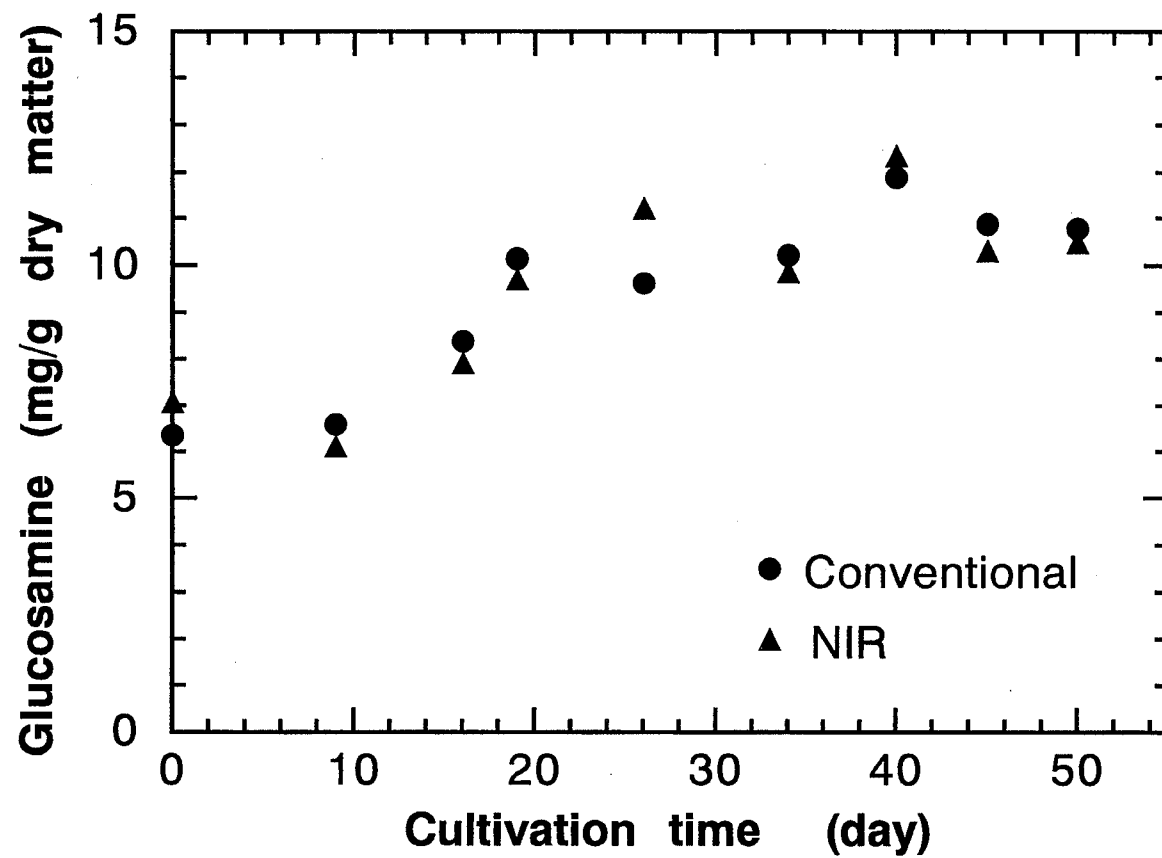


図2-10 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床中のグルコサミンの経時変化

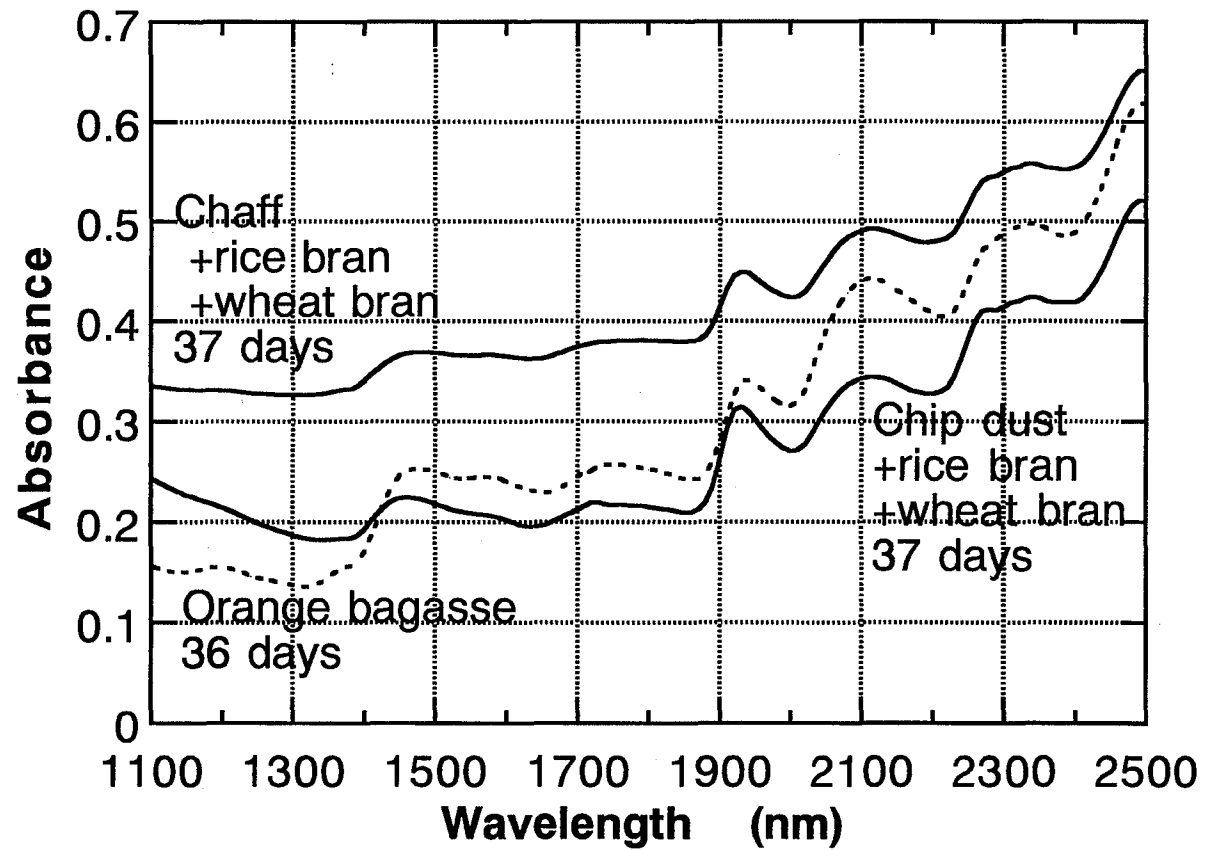


図 2 - 1 1 副資材入りチップダスト固体培地, 副資材入り籾殻固体培地, 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の近赤外原スペクトル

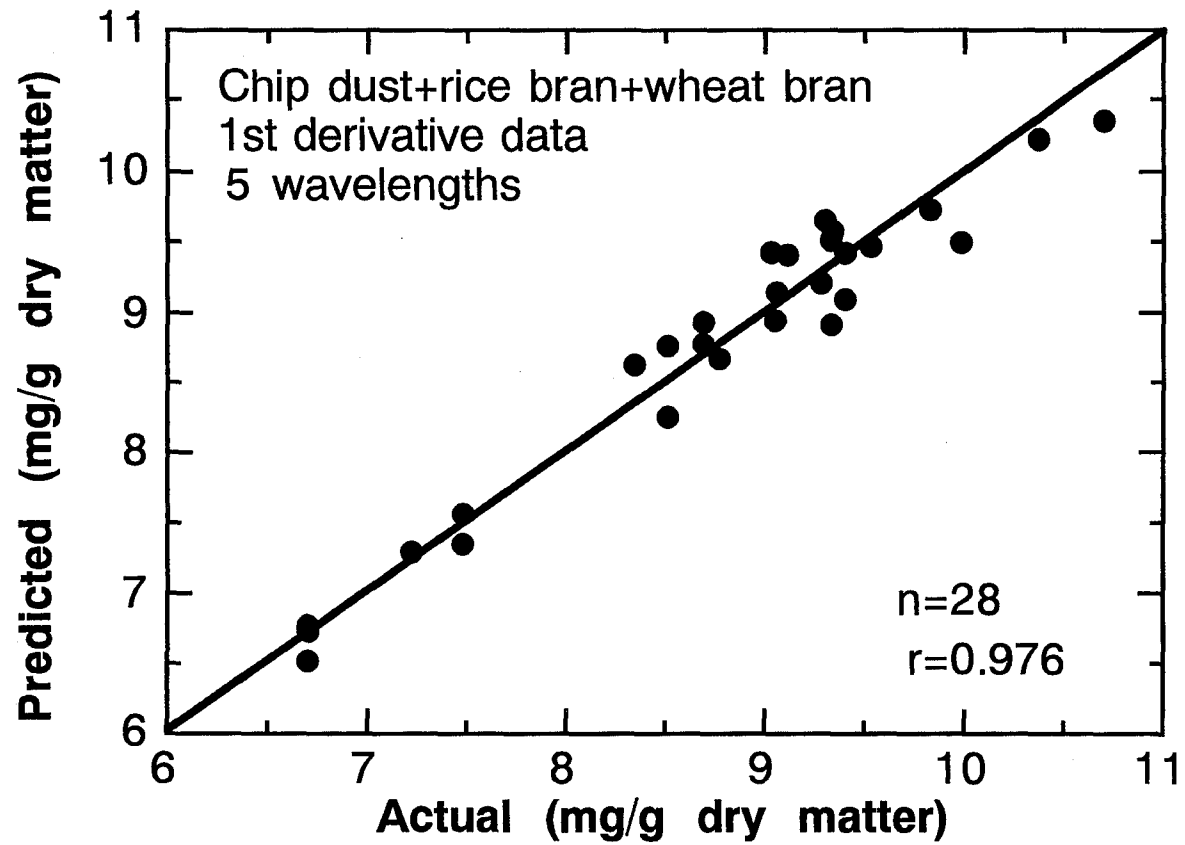


図2-12 副資材入りチップダスト固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床中のグルコサミンの検量線

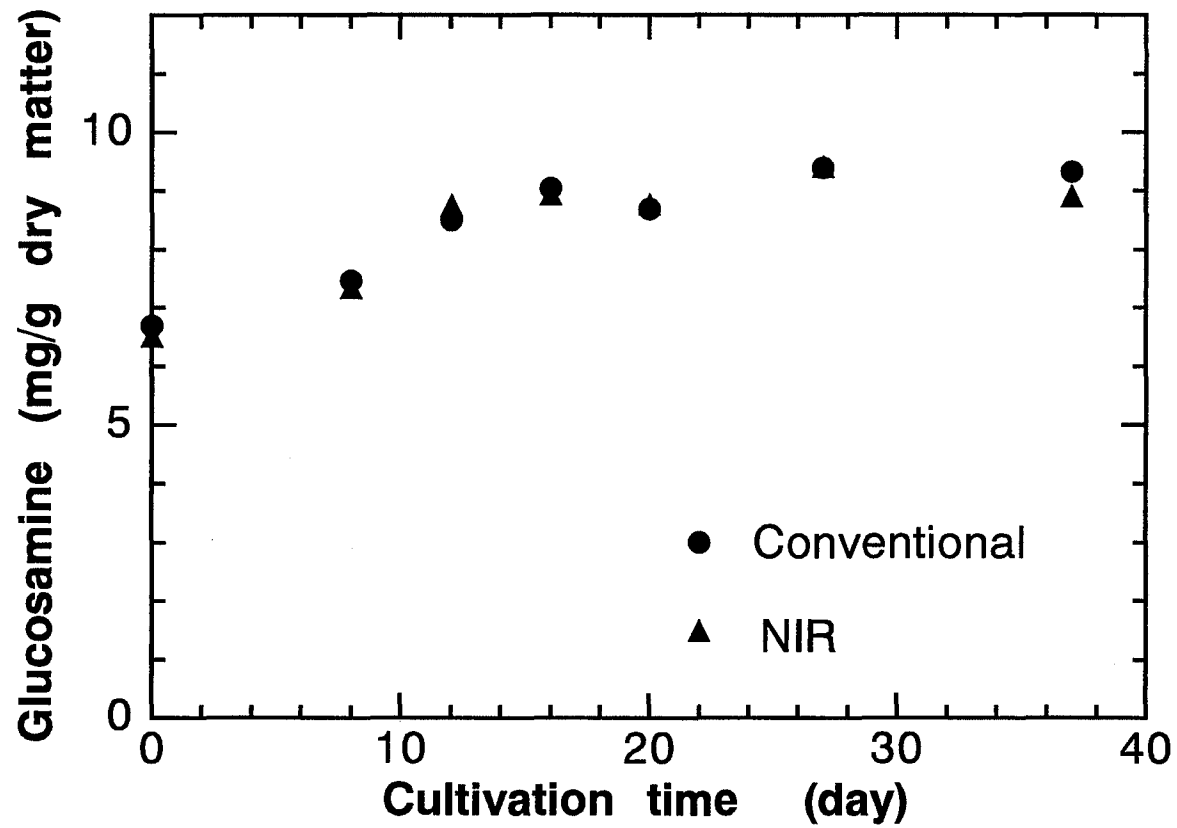


図2-13 副資材入りチップダスト固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床中のグルコサミンの経時変化

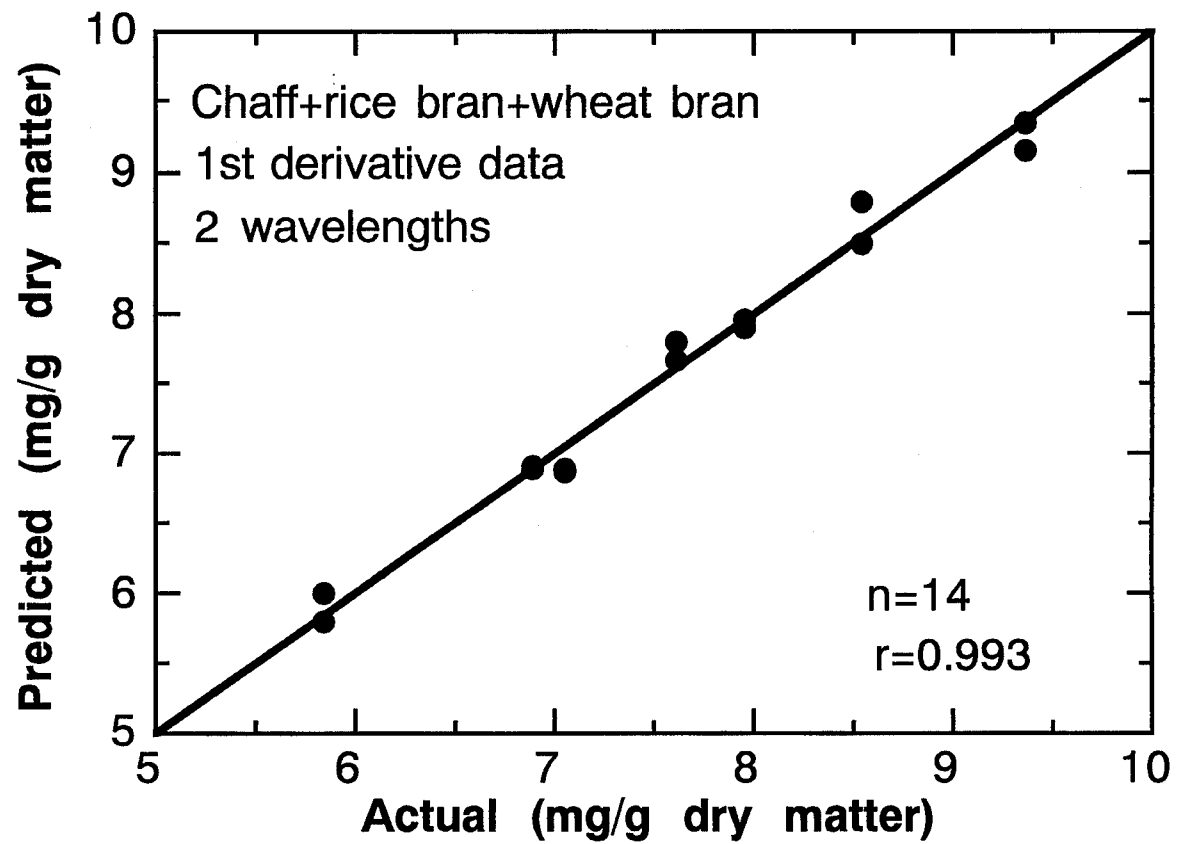


図2-14 副資材入り粉殻固体培地を用いた *Ganoderuma lucidum* 培養菌床中のグルコサミンの検量線

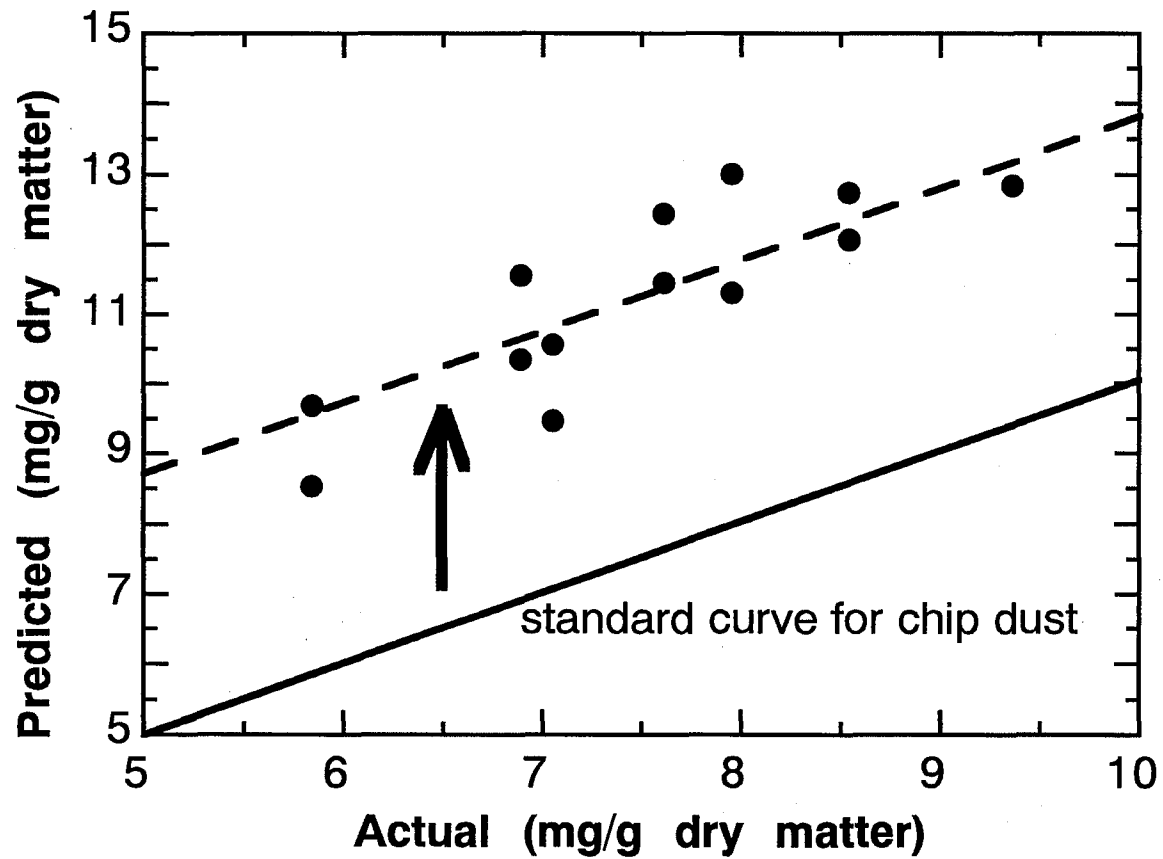


図2-15 副資材入りチップダスト固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床中のグルコサミンの検量式を用いた, 副資材入り粉殻固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床中のグルコサミンの測定結果

第三章 固体培地用資材の検索

はじめに

一般に、担子菌の菌床栽培にはおが粉を主資材とし、米糠や小麦麩を副資材として調整した固体培地が用いられている。本章の研究では、おが粉の代替になりうる、あるいは固体培地の代替になりうる資材の探索を目的として、いずれも食品工業の副産物である蜜柑搾汁粕、コーヒー抽出粕、紅茶抽出粕、烏龍茶抽出粕の担子菌の菌床栽培用培地としての可能性を検討した。

蜜柑搾汁粕は蜜柑ジュース製造工程の副産物（廃棄物）である。現在、蜜柑搾汁粕の一部は牛の飼料に混合されて利用されているが、大部分は廃棄物として処理料金を支払って処分している。大量の蜜柑搾汁粕を牛の飼料に混合した場合には、蜜柑由来の橙色の色素が牛乳中に現われ、牛乳の商品価値に悪影響がある。蜜柑搾汁粕は有機質を多く含んでいるので堆肥としての利用も考えられる。

コーヒー抽出粕、紅茶抽出粕、烏龍茶抽出粕は各飲料製造工程の副産物（廃棄物）である。現在、これらも廃棄物として処理料金を支払って処分している。これらも有機質を多く含んでいるので堆肥としての利用も考えられる。しかし、コーヒー抽出粕は大部分が木質であるため生物的分解には長時間を要するので、肥料としての効果よりは土壤改良材としての効果が大きいと思われる。

蜜柑搾汁粕、コーヒー抽出粕、紅茶抽出粕、烏龍茶抽出粕の担子菌の菌床栽培用培地としての可能性を評価するため、蜜柑搾汁粕、コーヒー抽出粕、紅茶抽出粕、烏龍茶抽出粕を用いて漢方薬として有名な霊芝（*Ganoderma lucidum*）を実際に栽培し、菌糸の生育度や子実体の生育度、固体培地成分の変化等を測定した。

方 法

1) 供試菌株と保存方法

本研究には、漢方薬として有名な *Ganoderma lucidum*（霊芝・マンネンタケ）を用いた。

菌株の保存方法は次の如くである。100ml容三角フラスコを用いてポテトデキストロース培地（日水製薬）1.95gを50mlの水道水に懸濁した。アルミホイルで蓋をし、沸騰水浴中にて寒天粉を溶解させた後、121℃、15分間オートクレーブした。クリーンベンチ中で滅菌済シャーレに分注し、保存用培地から寒天ごと菌体を切り取り（約1cm角）、菌体生育面を下にして新しい培地上に乗せた。Para Filmを用いてシャーレの蓋をシールした

後、シャーレ上面積の7～8割程度生育するまで28℃の恒温器内にて培養し、その後冷蔵庫内に保存した。本株は、1年に1度の植え継ぎ作業でも保存可能であるが、植え継ぎ作業は3ヵ月に1度行った。

2) 培地の調整

下に述べた各培地を菌床用袋（シナノパックSK12-20, (株)シナノポリ, 〒381-22 長野市稲里町田牧1607-5, TEL 0262-84-3368, FAX 0262-84-5629)に詰めキャップをした。袋と袋が触れないように間を開けて121℃, 30分間オートクレーブし、熱いうちに外に出して空冷させた。また、烏龍茶抽出粕を用いた培地は雑菌汚染を受けやすかったので、30分間の殺菌操作を1日おいて2回行った。

蜜柑搾汁粕培地の調製では、蜜柑搾汁粕（ヒロシマコープより入手）に水分が65%になるように水を加えた。コーヒー抽出粕培地の調製では、コーヒー抽出粕（宝積飲料より入手）6kgに対し水を1kg加えた。副資材入コーヒー抽出粕培地の調製では、重量比でコーヒー抽出粕：米ぬか：小麦麩：水=2.33：0.31：0.31：1.05をよく混合した。烏龍茶抽出粕培地の調製では、烏龍茶抽出粕（宝積飲料より入手）をそのまま用いた。副資材入烏龍茶抽出粕培地の調製では、重量比で烏龍茶抽出粕：米ぬか：小麦麩：水=2.8：0.31：0.31：0.64をよく混合した。紅茶抽出粕培地の調製では、水分が65%になるように水を加えた。

3) 培養方法

(a) 接種菌液の調整

・前前培養

300ml容ビーカーを用いて麦芽エキス2gを100mlの水道水に溶かし、30% NaOHでpH5.6に調整した。150℃, 3時間乾熱滅菌した500ml容綿栓付坂口フラスコに移した。綿栓部分をアルミホイルで覆った後、121℃, 15分間オートクレーブした。保存用培地から寒天ごと菌体を切り取り、2mm×2mmの寒天片を10～15片程度坂口フラスコに接種して28℃, 115spmで7日間振盪培養した。

・前培養

21容三角フラスコを用いて表3-1に示した培地成分を500mlの水道水に溶かし、150℃にて3時間乾熱滅菌した31容三角フラスコに移した。綿栓部分をアルミホイルで覆った後、121℃, 15分間オートクレーブした。冷却後、11容三角フラスコ中で300mlの水道水に溶かしてあらかじめ別殺菌しておいたグルコース溶液をクリーンベンチ内で添加した。Thiamin・HClはろ過滅菌済のもの1.0mlを培養の直前にクリーンベンチ内で滅菌済ピペットを用いて培地中に加えた。前前培養液100ml×2本を加え11とし、28℃,

120rpmで6~9日間振盪培養した。

表 3 - 1 前培養培地の組成

Malt extract	8.0 g/1
Glucose	5.0
NH ₄ Cl	3.51
KH ₂ PO ₄	0.39
K ₂ HPO ₄	4.32
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.30
CaSO ₄ •2H ₂ O	0.10
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.30 mg/1
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.15
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.10
MnSO ₄ •5H ₂ O	0.10
(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ •HCl	0.02
Thiamin•HCl	0.50

(b) 本培養

クリーンベンチ内にて、乾熱滅菌済みメスピペット（口径が大きくなるように先端を切断したもの）を用いて前培養液を殺菌済みの固体培地の上面の中央部に接種した。各袋の培地重量を測定し27℃の恒温器中にて培養を開始した。

4) 分析方法

(a) 液体培養液中の乾燥菌体量

乾燥重量測定法を用いた。メンブレンフィルター (ADVATEC TOYO, Cellulose Nitrate, Diameter 47mm, Pore size 0.45 μm) を2時間程度 105℃の乾燥器内にて乾燥させ、重量を測定した。クリーンベンチ内で培養液が均一になるようによく混合して培養液試料を分取した。予め乾燥重量を測定しておいたフィルターを吸引濾過器の上に乗せ、水で湿らせてアスピレーターで吸引した。菌体量に合わせて5~20mlをメスシリンダーで測り取った培養液を入れ、水でメスシリンダーや濾過器の内壁をよく洗い流しながら吸引濾過した。

吸引後、ピンセットでフィルターをシャーレに乗せて、105°Cの乾燥器内にて恒量になるまで乾燥させた。フィルターの重量を差し引き、単位培養液量あたりの乾燥菌体量を得た。

(b) 菌床（固体培地）重量，接種位置からの菌糸の生育距離，菌糸の生育した面積と体積

上皿計りを用いて風袋込みの菌床重量を測定し，風袋重量を差し引き，菌床のみの重量とした。

菌床における接種位置からの菌糸の生育距離は，定規を用いて接種位置から菌糸が生育している先端の距離までを測定し，生育距離とした。また，その結果と菌床の大きさから菌糸が生育した表面積を算出した。さらに，菌床を包丁を用いて縦に切断して計測した断面面積から菌糸が生育した体積を算出した。

・表面積…円又は随円の公式に代入する。(S1+S2=S)

$$\text{上面} \cdots S1=r^2 (\text{半径}) \times \pi \quad \text{又は} \quad S1=a \times b \times \pi$$

(a,b,一番長いところと一番短いところ)

$$\text{側面} \cdots S2=2\pi r \times h(\text{高さ}) \quad S2=(a+b)\pi \times h(\text{高さ})$$

・体積…断面積の形により代入する式をかえる。

①生育断面積が三角形の場合 三角すいの公式に代入する。

$$V=(1/2c)^2 \times \pi \times h \times 1/3$$

②生育断面積が半円の場合 球の公式に代入し1/2をかける。

$$V=3R^3 \pi / 4 \times 1/2$$

ここで，cは三角形の底辺の長さ，hは三角形の高さ， π は円周率，Rは円の直径である。

(c) 水分含有量

乾燥重量測定法を用いた。あらかじめシャーレの重量を測定し，均一に混ぜた菌床試料を入れ，恒量になるまで105°Cの乾燥器内にて乾燥させ，培地中の水分含有量を算出した。

(d) pH

菌床を熱水抽出した液のpHを測定した。200ml容三角フラスコ内にて湿菌床試料約12gを蒸留水100mlに懸濁し，冷却管として約1mの長さのガラス管を取付けたゴム栓を用いて蓋をし，沸騰水浴中で6時間抽出した。その熱抽出した抽出液を冷却後，濾紙No.2を用い

て濾過し、pHメーターを用いてろ液のpHを測定した。

(e) グルコース含有量 (酵素法)

(d)で述べた熱抽出液のろ液をグルコース含有量分析用の試料とした。分析には酵素分析キット、ダイヤカラー・GC (グルコースオキシダーゼと4-アミノアンチピリン 0.185gを溶解液 N-N-ジエチルアニリン300mlに溶かす) を使用した。標準液としてグルコース水溶液(1.00g/l)を用意し測定範囲がOD₅₅₀で0~20mg/lであるため、試料を適当に蒸留水で希釈した。酵素液と試料をそれぞれ 0.4ml:1.0ml で混合した。37°C恒温槽で 9 0 分反応させた後、OD₅₅₀の吸光度値を測定し、検量線 (検量式) よりグルコース濃度を求めた。

ダイヤカラー・GCに替わる酵素分析キットとしてグルコースCII-テストワコー (和光純薬工業) も用いた。

(f) 還元糖量

ソモギー法を用いて分析を行った。標準液としてグルコース水溶液(100mg/l, 200mg/l)を調製し、測定範囲を0~200mgグルコース/lに入るように試料を水で希釈した。

試験管 (30 x 200mm, 日電理化硝子, A-30ニューリップ) に試料5mlを採り、それに銅試薬 (表 3 - 2) を5ml加えてアルミホイルで蓋をした。100°C, 2 0 分間湯浴中で煮沸後、氷水中で急冷却した。2N H₂SO₄を2ml加えて泡立ちがなくなるまでよく振った。

褐色のビュレットに入った5×10⁻³Nチオ硫酸ソーダを黄色が薄くなるまで滴下した。薄くなったところで1%澱粉溶液を1ml加え青紫色がわずかに残るまで滴定を行った。グルコース標準液試料を用いて同時に反応、滴定して作成した検量式より、菌床試料の還元糖量を求めた。

表 3 - 2 銅試薬の組成

CuSO ₄ ·5H ₂ O	8.0 g/l
KNaC ₄ H ₄ O ₆ ·4H ₂ O	30.0
NaCO ₃	30.0
NaOH	1.6
Na ₂ SO ₄	180.0
KI	8.0
KIO ₃	0.357

注意： 試薬の調製にあたっては、記載順に各試薬が完全に溶けたのを確認しながら、順々に入れていった。

(g) グルコサミン量

採取した菌床試料を105℃の乾燥器内にて恒量になるまで乾燥させ、粉碎機（三田村理研Ultra Centrifugal Mill ZM1,メッシュ 0.2mm）で粉碎した後、0.5gを35mm×100mmの栓付試験管に入れ、18N H₂SO₄を5ml加え、18時間室温に放置した。その後硫酸濃度が1Nになるまで蒸留水を加えて希釈し、121℃、1時間オートクレーブして酸加水分解を行った。この分解物を60%NaOHを用いてpH7.0に調整し、濾紙No.2A（φ110）を用いて濾過を行ない濾液をメスアップした。20×120mmの栓付試験管に標準液と試料をそれぞれ0.5mlずつとアセチルアセトン試薬（表3-3）0.5mlを加えて、よく混合した後、95℃、20分間アセチル化を行った。その後、氷中で冷却したあと3mlの96%エタノールと0.5mlのエールリッヒ試薬（表3-4）を加えて60℃、15分間発色させた後OD₅₃₅を測定した。（なお、標準液は0~100μgグルコサミン/mlになるように調整した。）アセチル化や発色反応は大変温度の影響を受けやすいため、温度むらがなるべくできないように注意した。

表3-3 アセチルアセトン試薬

0.5N Na ₂ CO ₃	50.0ml
アセチルアセトン試薬	1.0ml

表3-4 エールリッヒ試薬

p-Dimethylaminobenzaldehyde(DMAB)	0.8g
(CH ₃) ₂ NC ₆ H ₄ CHO	
濃硫酸	30.0ml
96% エタノール	30.0ml

(h) 近赤外分光スペクトル

(g)で使用した粉末試料を用いて第二章で述べた方法と同様の方法で行った。試料をサンプルカップ（Bran+Luebbe Co., Tokyo）に詰め、近赤外分光計（InfraAlyzer 500,

Bran+Luebbe Co., Tokyo) のサンプルホルダーに置き、2nm間隔にて1100から2500nmの吸光度を測定した。

結果と考察

1) 蜜柑搾汁粕培地を用いた栽培

蜜柑搾汁粕を培地に用いた培養経過の一例を図3-1に示す。菌糸の生育は菌床内部においても良好であり、断面の写真からは菌糸の生育部分の菌床の性状変化が観察される。26日目には、子実体原基の発生が観察された。31, 37日目には子実体原基のさらなる生育が見られ、63日目では子実体形成が観察された。*Ganoderma lucidum* (霊芝・マナンタケ) 特有の「かさ」を形成し、蜜柑搾汁粕が培地として適していることを示している。

蜜柑搾汁粕を培地に用いた栽培(培養)時の菌床の重量変化を、図3-2に示す。1袋当りの接種菌体量は0.021gであった。培養開始時を100とした菌床の重量はゆっくりと低下し、キャップを退けて袋を開放した43日以降からは低下の速度は大きくなった。

菌床の水分含有量の経時変化を図3-3に示す。袋を開放した後も水分含有量は大きく低下することはなかった。菌糸の生育も良好であり、子実体の形成にともない培地の水分が急激に吸い取られ、菌床の収縮をもたらした。結果として、菌床の水分含有量は大きく低下しなかったものと思われる。

種菌を接種した固体培地上面の中央部から固体培地表面を生育する菌糸の先端部までの距離から算出した生育面積を図3-4に示す。接種後、良好に生育し、43日後に袋全体に生育した。

種菌を接種した固体培地上面の中央部から固体培地表面を生育する菌糸の先端部までの距離と菌床の断面の様子から算出した菌床中の菌糸生育体積の経時変化を図3-5に示す。生育面積よりやや早く最大値に達し、その後急激に低下した。この低下は、菌床の収縮を意味している。子実体収穫後の菌床部分は堆肥としての利用が考えられる。したがって、蜜柑抽出粕はきのこ栽培の菌床として適しているのみならず、きのこ栽培用培地としての利用は廃棄物の減量化に大きく役立つものと思われる。

固体培地の熱抽出液のpHの経時変化を図3-6に示す。蜜柑抽出粕のpHは4.3と低いが、培養開始後4.6付近まで上昇し、15日以降から子実体形成開始の40日頃まで低下した。子実体の収穫時には4.9付近まで上昇した。

固体培地の熱抽出液中のグルコース、還元糖および菌床中のグルコサミンの経時変化を図3-7に示す。蜜柑抽出粕中のグルコース、還元糖量とも高く、菌体の増殖に連れてグ

ルコース濃度は低下し、還元糖量は高分子の分解によると思われる増加が培養初期に観察された。子実体の形成につれ減少した。培地中のグルコース、還元糖とも多く、栄養豊かな培地であり、良好な生育を支えていると思われる。グルコサミン濃度は生育に連れて増加し、袋全体に菌糸が広がった時点からはほぼ横這い傾向にあった。この変化から比増殖速度は 0.0125day^{-1} と算出された。また子実体も大きく育ち、担子菌の栽培に適しているといえる。

菌糸が生育した表面積や体積とグルコサミン量の関係を図3-8に示す。表面積も体積もグルコサミン量と相関関係が有り、菌糸生育の目安に用いることができると思われる。今後の研究が待たれる。

2) コーヒー抽出粕を用いた栽培

コーヒー抽出粕を培地に用いた培養経過の一例を図3-9に示す。19日目に見られるように、菌糸の生育は菌床内部においても良好であり、39日目には子実体の形成が観察された。60日目には子実体のさらなる生育が見られ、*Ganoderma lucidum*（靈芝・マンネンタケ）特有の「かさ」を形成した。

コーヒー抽出粕を培地に用いた培養時の菌床の重量変化を図3-10示す。1袋当りの接種菌体量は0.032gであった。培養開始時を100とした菌床の重量はゆっくりと低下し、キャップを退けて袋を開放してからは低下の速度は大きくなった。

菌床の水分含有量の経時変化を図3-11に示す。袋を開放にするまではほぼ一定の60-70%であったが、開放後は30%台まで低下した。菌糸の生育も良好であり、培地の水分が急激に吸い取られたものと思われる。

種菌を接種した固体培地上面の中央部から固体培地表面を生育する菌糸の先端部までの距離から算出した生育面積を図3-12に示す。接種後、生育曲線に沿って生育し、19日後に袋全体に生育した。その後はほぼ一定であった。これはコーヒー抽出粕は木質であり、水分含有量が変化しても大きく体積を変化することがないためと思われる。

種菌を接種した固体培地上面の中央部から固体培地表面を生育する菌糸の先端部までの距離と菌床の断面の様子から算出した菌糸生育体積の経時変化を図3-13に示す。生育面積と同じ傾向が観察された。

固体培地の熱抽出液のpHの経時変化を図3-14に示す。コーヒー抽出粕のpHは4.5と低く、培養開始後3.9付近まで低下した。培養が進むに連れpHは4付近を推移した。全体に低いpHにも関わらず良好な生育が観察された。

固体培地の熱抽出液中のグルコース、還元糖および菌床中のグルコサミンの経時変化を図3-15に示す。菌体の増殖に連れてグルコース、還元糖とも増加し、菌糸が培地全体に広がった19日に最高濃度に達し、その後減少した。培地中のグルコース、還元糖とも少

なく、かならずしも栄養豊かな培地とはいえないが、多糖質物質を分解し利用しながら生育しているものと思われる。培地由来のグルコサミン濃度は高く、生育に連れて増加し、袋全体に菌糸が広がった時点からはほぼ横這い傾向にあった。この変化から比増殖速度は 0.0206day^{-1} と算出された。

子実体を作り、大きな「かさ」を開いた。コーヒー抽出粕は本菌の培養に適しているものと思われる。培養の時最終日のサンプルの菌床の上部と中心部、下部の様子が違ったため、菌床の上から1.5 cmを上部、菌床の下から2.0 cmを下部、残りを中心部と分け水分含量とグルコサミン量を測定した。その結果水分含量は上部の方がすごく少なかったが、グルコサミン量は一番多くよく分解されていると考えられる。

3) コーヒー抽出粕と副資材の混合物を用いた栽培

コーヒー抽出粕と副資材の混合物を培地に用いた培養経過の一例を図3-16に示す。16日目に見られるように、菌糸の生育は菌床内部においても良好であり、子実体原基の発生が観察された。19, 26日目には子実体原基のさらなる生育が見られ、53日目では多数の子実体形成が観察された。しかし、*Ganoderma lucidum* (霊芝・マンネンタケ) 特有の「かさ」を開かなかった。「かさ」の生育のためには、培地組成のさらなる検討が必要である。

コーヒー抽出粕と副資材の混合物を培地に用いた培養時の菌床の重量変化を図3-17示す。1袋当りの接種菌体量は0.032 gであった。培養開始時を100とした菌床の重量はゆっくりと低下し、キャップを退けて袋を開放してからは低下の速度は大きくなった。

菌床の水分含有量の経時変化を図3-18に示す。袋を開放にするまではほぼ一定の60-70%であったが、開放後は30%台まで低下した。菌糸の生育も良好であり、培地の水分が急激に吸い取られたものと思われる。

種菌を接種した固体培地上面の中央部から固体培地表面を生育する菌糸の先端部までの距離から算出した生育面積を図3-19に示す。接種後、生育曲線に沿って生育し、39日後に袋全体に生育した。その後はほぼ一定であった。

種菌を接種した固体培地上面の中央部から固体培地表面を生育する菌糸の先端部までの距離と菌床の断面の様子から算出した菌糸生育体積の経時変化を図3-20に示す。

固体培地の熱抽出液のpHの経時変化を図3-21に示す。培養開始後4.1付近まで低下し、その後上昇した。全体に低いpHにも関わらず良好な生育が観察された。

固体培地の熱抽出液中のグルコース、還元糖および菌床中のグルコサミンの経時変化を図3-22に示す。菌体の増殖に連れてグルコース、還元糖とも増加し、その後減少した。培地中のグルコース、還元糖ともコーヒー抽出粕単独培地の場合よりは多い。比増殖

速度は 0.0159day^{-1} であった。しかし、今回の培養でも、菌糸の生育は良好であったが、木の枝状の子実体を形成したが、さるの腰掛け状のかさを形成しなかった。子実体の効率的形成と培地成分の関連に関してはさらなる研究が必要である。

4) 烏龍茶抽出粕を用いた栽培

烏龍茶抽出粕を培地に用いた培養経過の一例を図3-23に示す。18日目に見られるように、菌糸の生育は菌床内部においても良好であった。29日目には菌床の体積の縮小が観察された。57日目ではますます菌床の体積は小さくなり、子実体を形成した。しかし、*Ganoderma lucidum*（靈芝・マンネンタケ）特有の「かさ」を開かなかった。「かさ」の生育のためには、培地組成のさらなる検討が必要である。

烏龍茶抽出粕を培地に用いた培養時の菌床の重量変化を図3-24に示す。1袋当たりの接種菌体量は 0.020g であった。培養開始時を100とした菌床の重量はゆっくりと低下し、キャップを退けて袋を開放してからは低下の速度は大きくなった。

菌床の水分含有量の経時変化を図3-25に示す。袋を開放にするまではほぼ一定の70-80%であったが、開放後は60%台まで低下した。

種菌を接種した固体培地上面の中央部から固体培地表面を生育する菌糸の先端部までの距離から算出した生育面積を図3-26に示す。接種後、生育曲線に沿って生育し、28日後に袋全体に生育した。

種菌を接種した固体培地上面の中央部から固体培地表面を生育する菌糸の先端部までの距離と菌床の断面の様子から算出した菌糸生育体積の経時変化を図3-27に示す。培地の構造的な不均一性のため固体培地内部への生育に大きなばらつきが観察された。

固体培地の熱抽出液のpHの経時変化を図3-28に示す。烏龍茶抽出粕のpHは5弱と低く、培養開始後4.3付近まで低下した。培養が進むに連れpHは4.8付近まで徐々に上昇した。

固体培地の熱抽出液中のグルコース、還元糖および菌床中のグルコサミンの経時変化を図3-29に示す。菌体の増殖に連れてグルコース、還元糖とも増加し、20から30日に最高濃度に達し、その後減少した。培地中の多糖質物質を分解し、利用しながら生育しているものと思われる。グルコサミン濃度も生育に連れて増加し、袋全体に菌糸が広がった時点からはやや減少傾向にあった。この変化から比増殖速度は 0.0130day^{-1} と算出された。

烏龍茶抽出粕を培地に用いた場合、培養時の雑菌汚染が甚だしく、培地由来の汚染と思われる。子実体を作りはしたが「かさ」を開かなかった。このため培地自体が雑菌汚染しやすいことと考え合わせ、烏龍茶抽出粕を担子菌の菌床として利用する場合には殺菌時間の延長や組成の改良などが必要と思われる。

菌床中のグルコース量とグルコサミンサン量の関係はほぼ直線であった。また、還元糖量とグルコサミンサン量の関係もほぼ直線関係になった。このことから培地中のグルコースや還元糖量を指標にして生育速度の算出を行えることがわかる。

5) 烏龍茶抽出粕と副資材の混合培地を用いた栽培

烏龍茶抽出粕と副資材の混合培地を用いた培養経過の一例を図3-30に示す。18日目に見られるように、菌糸の生育は菌床内部においても良好であった。55日目では子実体を形成するが、*Ganoderma lucidum* (霊芝・マンネンタケ) 特有の「かさ」を開かなかった。「かさ」の生育のためには、培地組成のさらなる検討が必要である。

烏龍茶抽出粕と副資材の混合培地を用いた培養時の菌床の重量変化を図3-31示す。1袋当りの接種菌体量は0.020gであった。培養開始時を100とした菌床の重量はゆっくと低下し、キャップを退けて袋を開放してからは低下の速度は大きくなった。

菌床の水分含有量の経時変化を図3-32に示す。袋を開放にするまではほぼ一定の60-70%であったが、開放後は60%以下まで低下した。

種菌を接種した固体培地上面の中央部から固体培地表面を生育する菌糸の先端部までの距離から算出した生育面積を図3-33に示す。接種後、生育曲線に沿って生育し、23日後に袋全体に生育した。

種菌を接種した固体培地上面の中央部から固体培地表面を生育する菌糸の先端部までの距離と菌床の断面の様子から算出した菌糸生育体積の経時変化を図3-34に示す。培地の構造的な不均一性は副資材の添加により改良され、固体培地内部への生育に大きなばらつきは観察されなかった。接種18日後に最大となり、その後徐々に低下した。

固体培地の熱抽出液のpHの経時変化を図3-35に示す。烏龍茶抽出粕と副資材混合物のpHは、烏龍茶抽出粕よりは若干高く、5.2であった。培養開始後低下し、菌糸が培地全体に広がった18日後に4.5付近まで低下した。さらに培養が進むに連れpHは4.8付近まで徐々に上昇した。

固体培地の熱抽出液中のグルコース、還元糖および菌床中のグルコサミンの経時変化を図3-36に示す。副資材の添加により培地中のグルコース、還元糖量とも高く、さらに菌体の増殖に連れてグルコース、還元糖とも増加し、18および23日に最高濃度に達し、その後減少した。グルコサミン濃度も生育に連れて増加し、袋全体に菌糸が広がった時点からはやや減少傾向にあった。この変化から比増殖速度は 0.0139day^{-1} と算出され、烏龍茶抽出粕のみを用いた培地における値より若干高かった。

6) 紅茶抽出粕培地を用いた栽培

紅茶抽出粕を培地に用いた培養経過を図3-37に示す。菌糸の生育は良好であった。

64日目では子実体を形成し、よく生育している。しかし、77日目でも *Ganoderma lucidum*（霊芝・マンネンタケ）特有の「かさ」を開かなかった。大きな「かさ」の生育のためには、培地組成のさらなる検討が必要である。

7) 総括

蜜柑搾汁粕やコーヒー抽出粕は *Ganoderma lucidum*（霊芝・マンネンタケ）培養用菌床培地として優れていた。蜜柑の収穫期と関連し、蜜柑搾汁粕は秋から冬の期間に限られる副産物であるため、年間を通じた生産に用いることはできない。一方、コーヒー抽出粕は年間を通じての供給が可能であり、毎日大量に産するので、おが粉にかわる菌床用資材としても注目される。

その他の試験した資材は、*Ganoderma lucidum*（霊芝・マンネンタケ）培養用としてはさらなる培地組成の検討が必要である。しかし、他の種類のきのこ栽培にはそのまま利用できる可能性は否定できない。今後の研究が期待される。



図3-1 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例 1/14

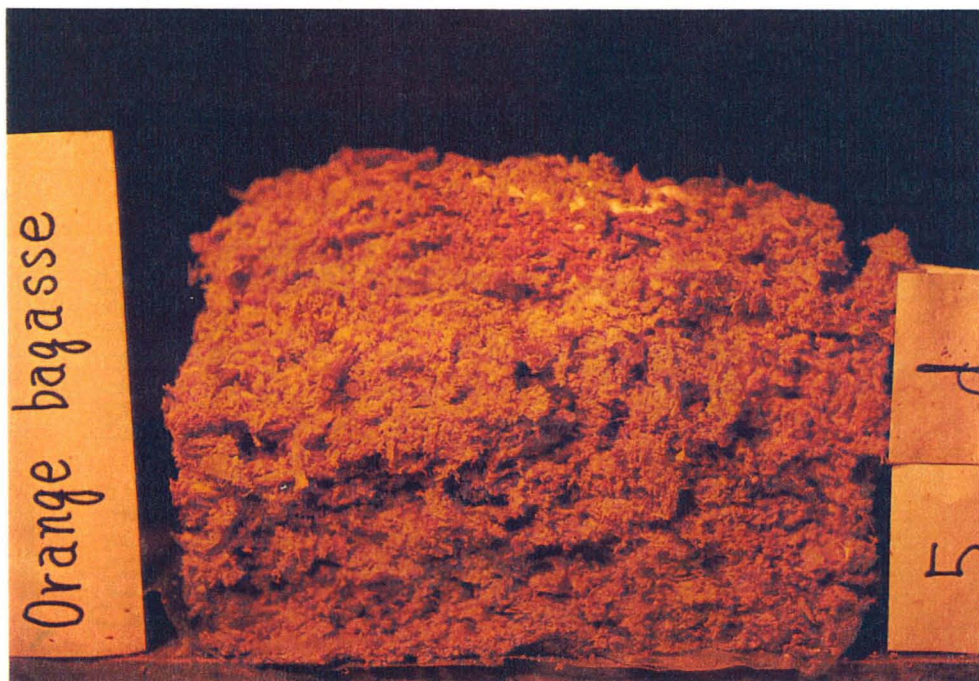
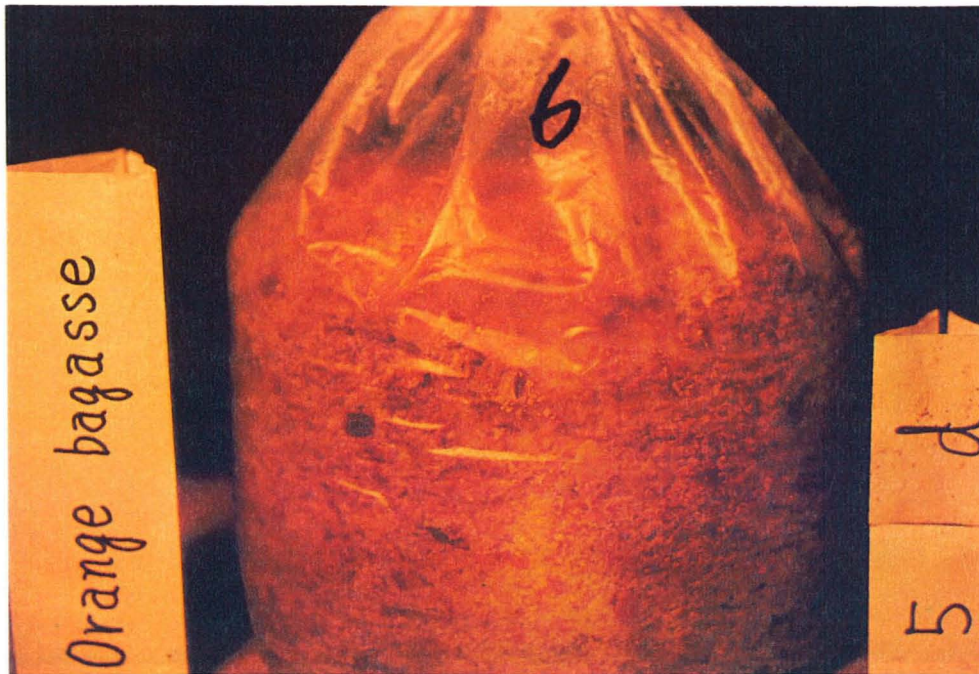


図3-1 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例 2/14

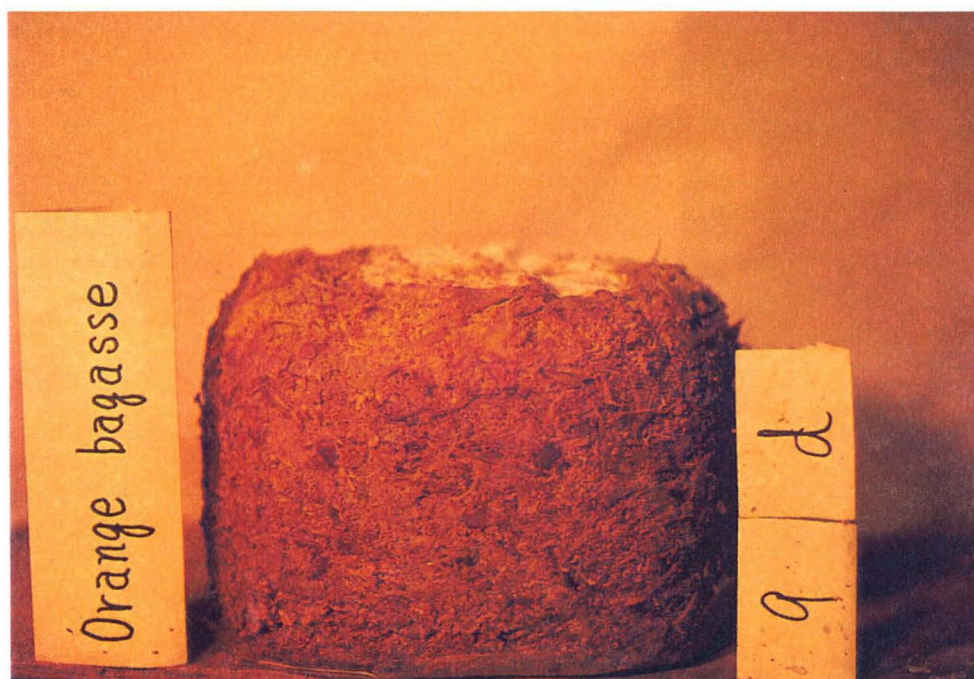


図 3 - 1 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例 3/14



図3-1 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例 4/14

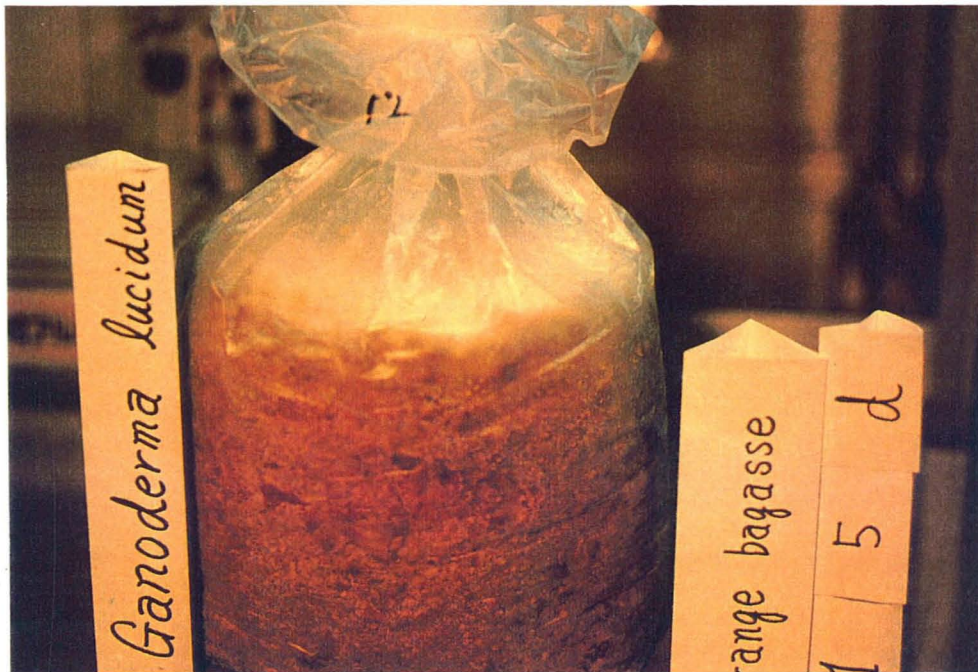


図3-1 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例 5/14



図3-1 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例 6/14

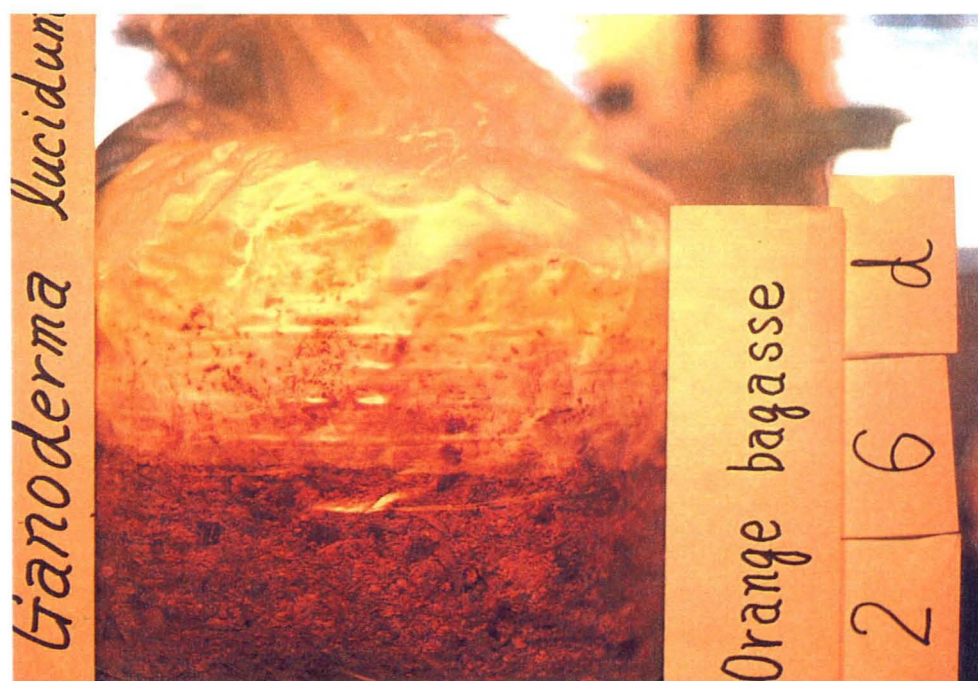


図3-1 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例 7/14

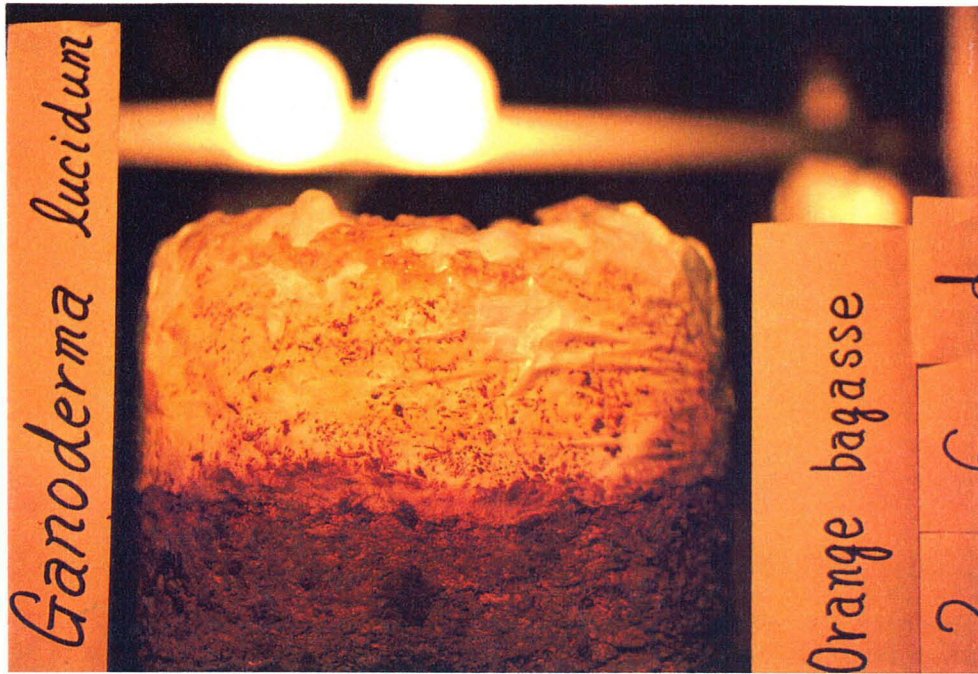


図3-1 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例 8/14



図3-1 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例 9/14

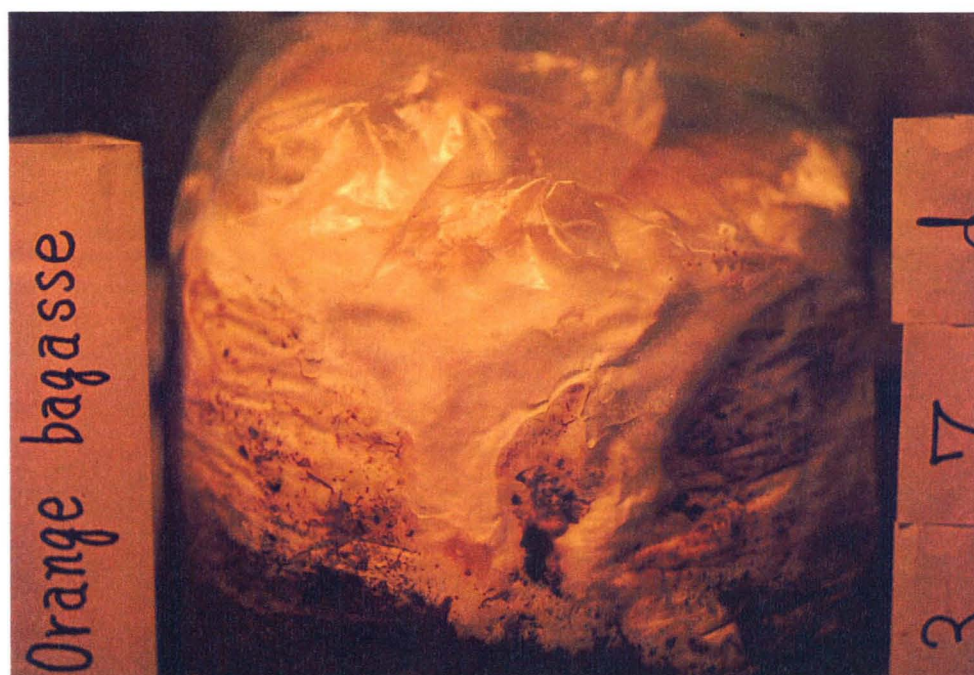


図3-1 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例 10/14



図3-1 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例 11/14



図 3 - 1 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例 12/14



図3-1 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例 13/14

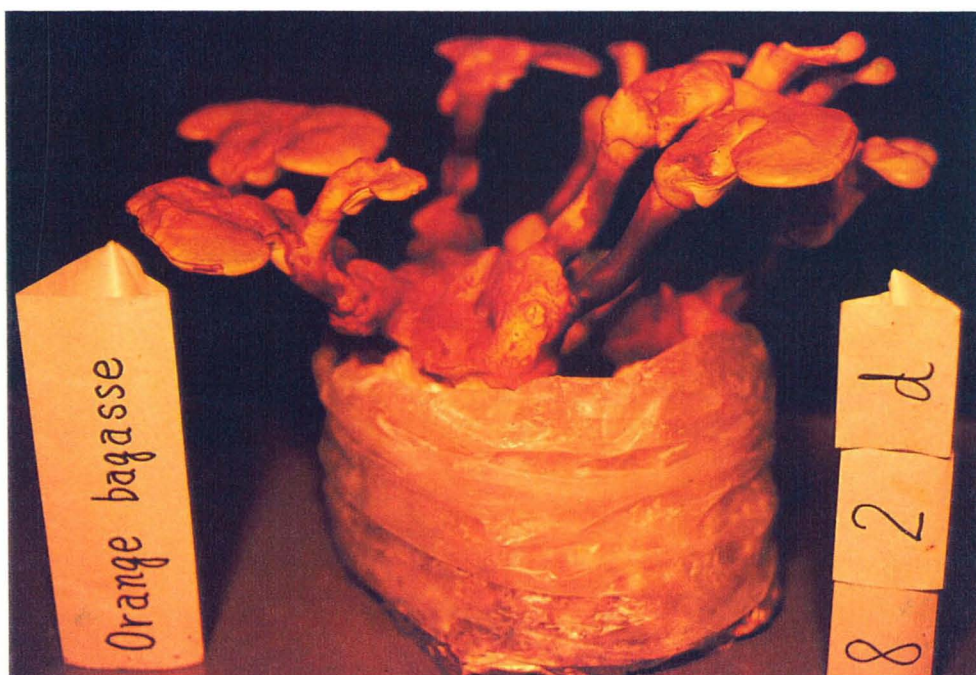


図3-1 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例 14/14

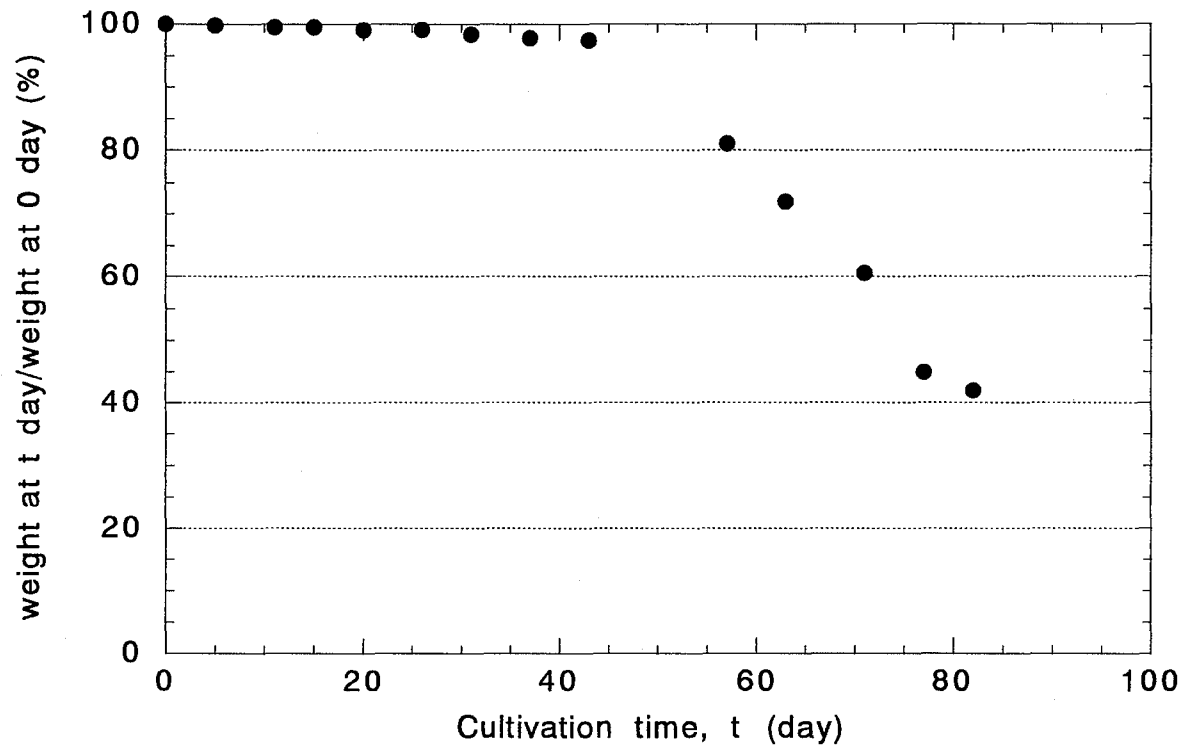


図3-2 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の重量経時変化

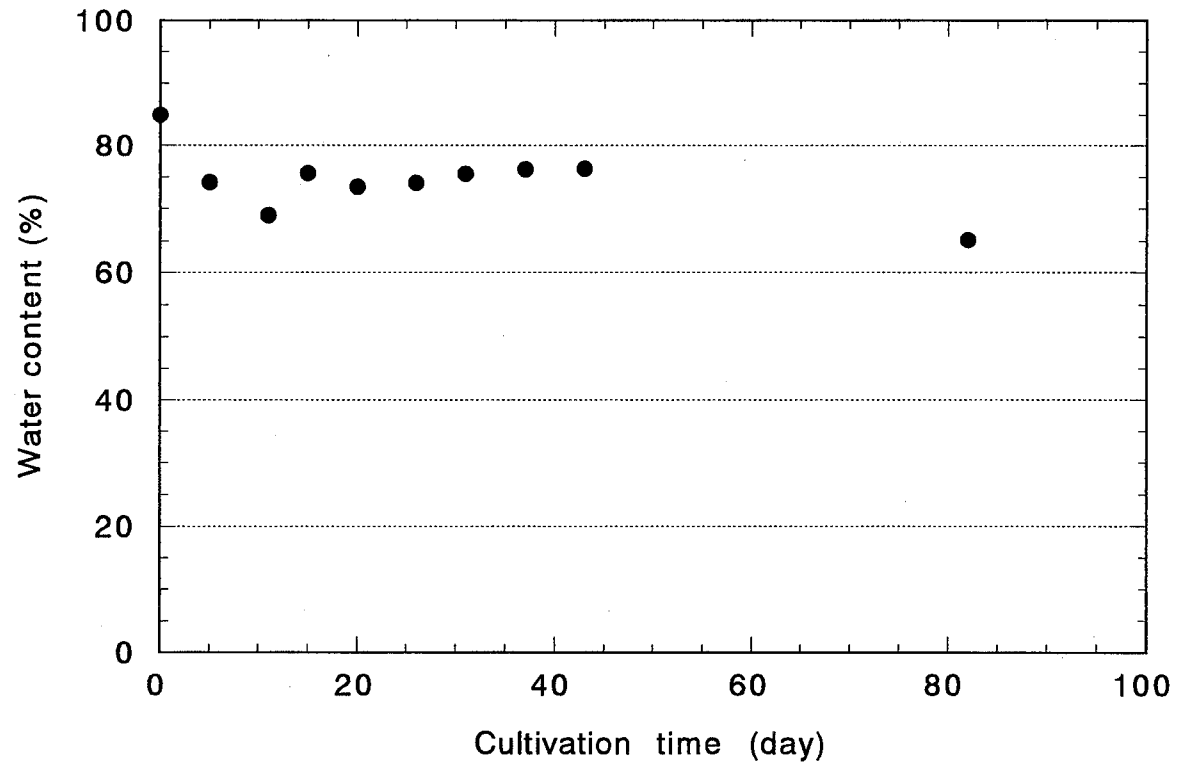


図 3 - 3 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の水分含有量経時変化

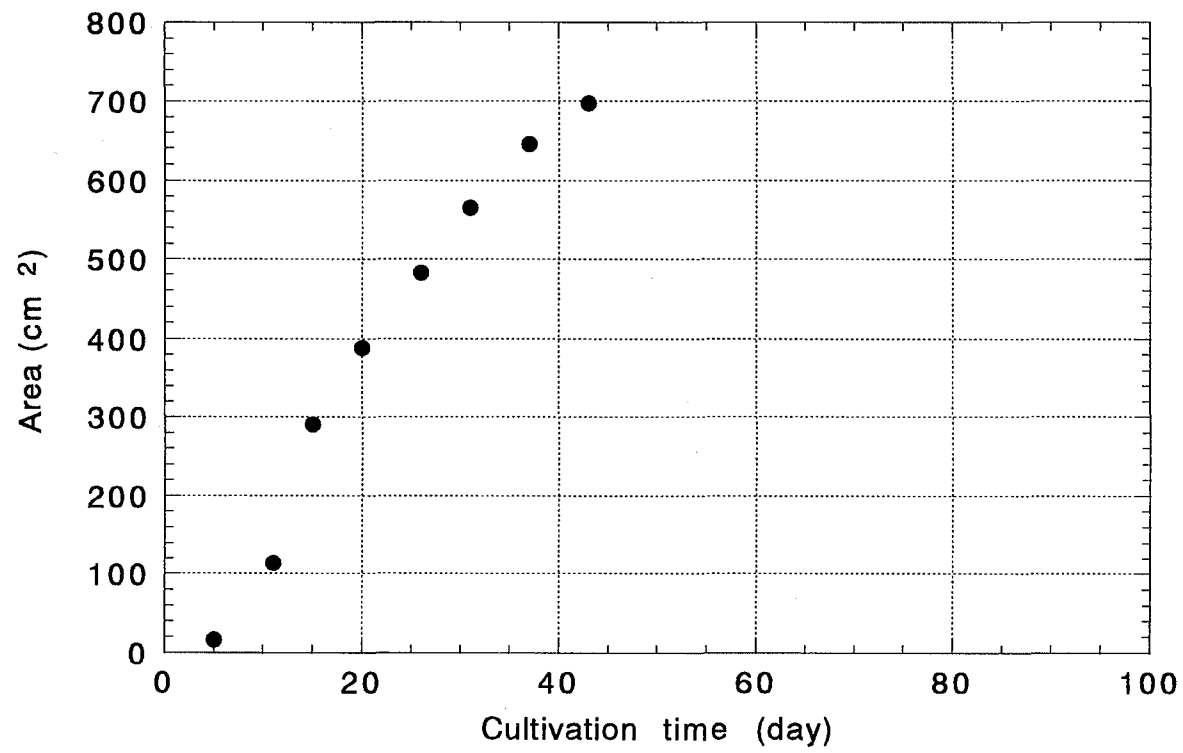


図3-4 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の菌糸生育面積経時変化

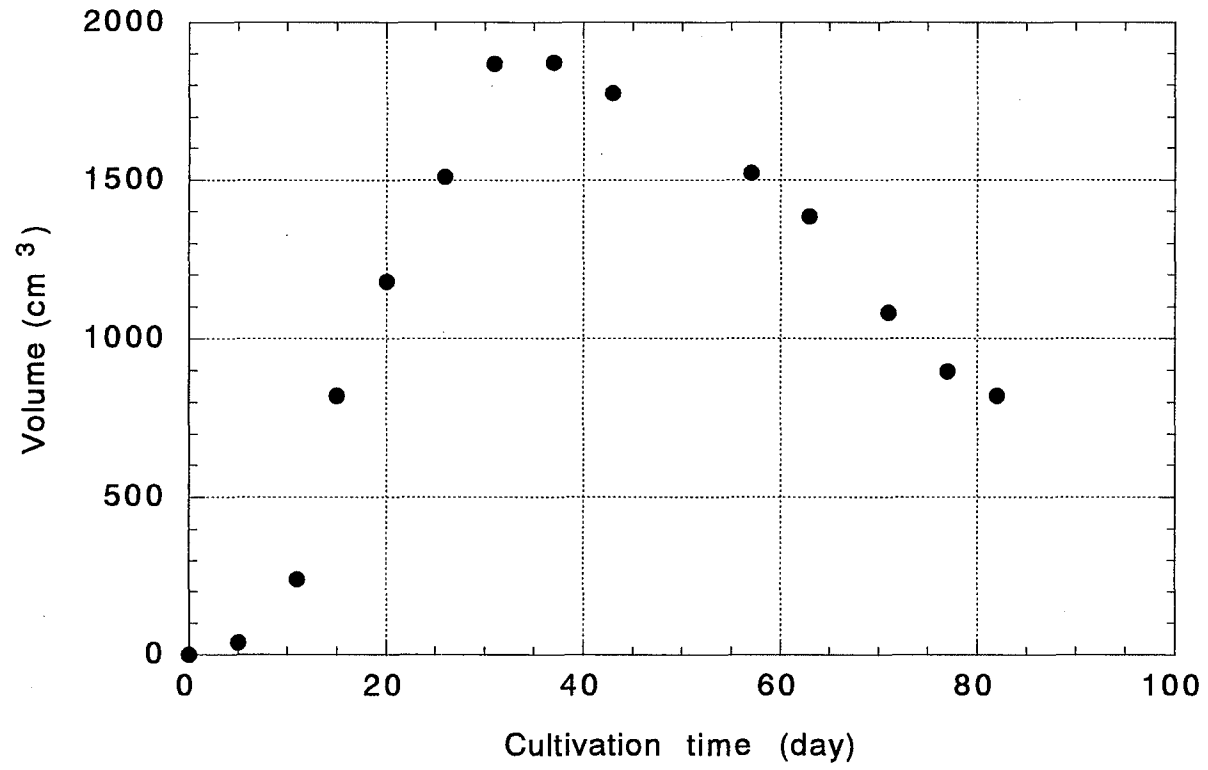


図3-5 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の菌糸生育体積経時変化

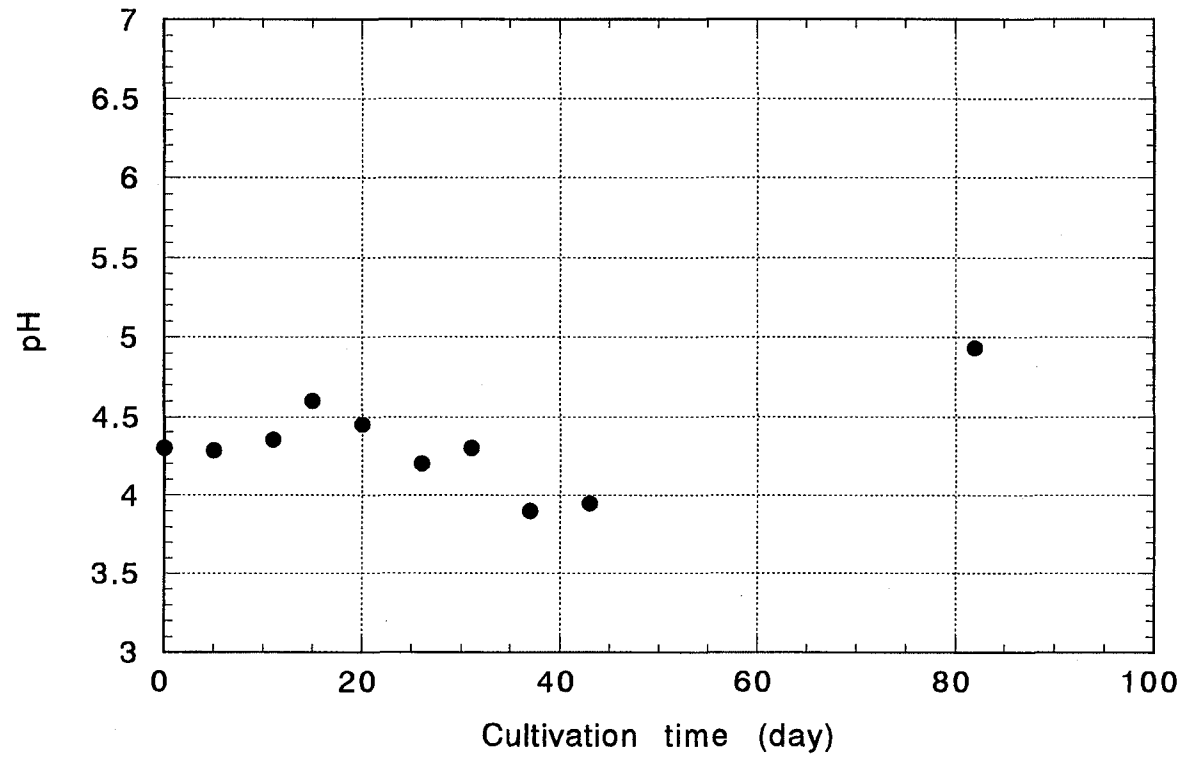


図3-6 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床のpH経時変化

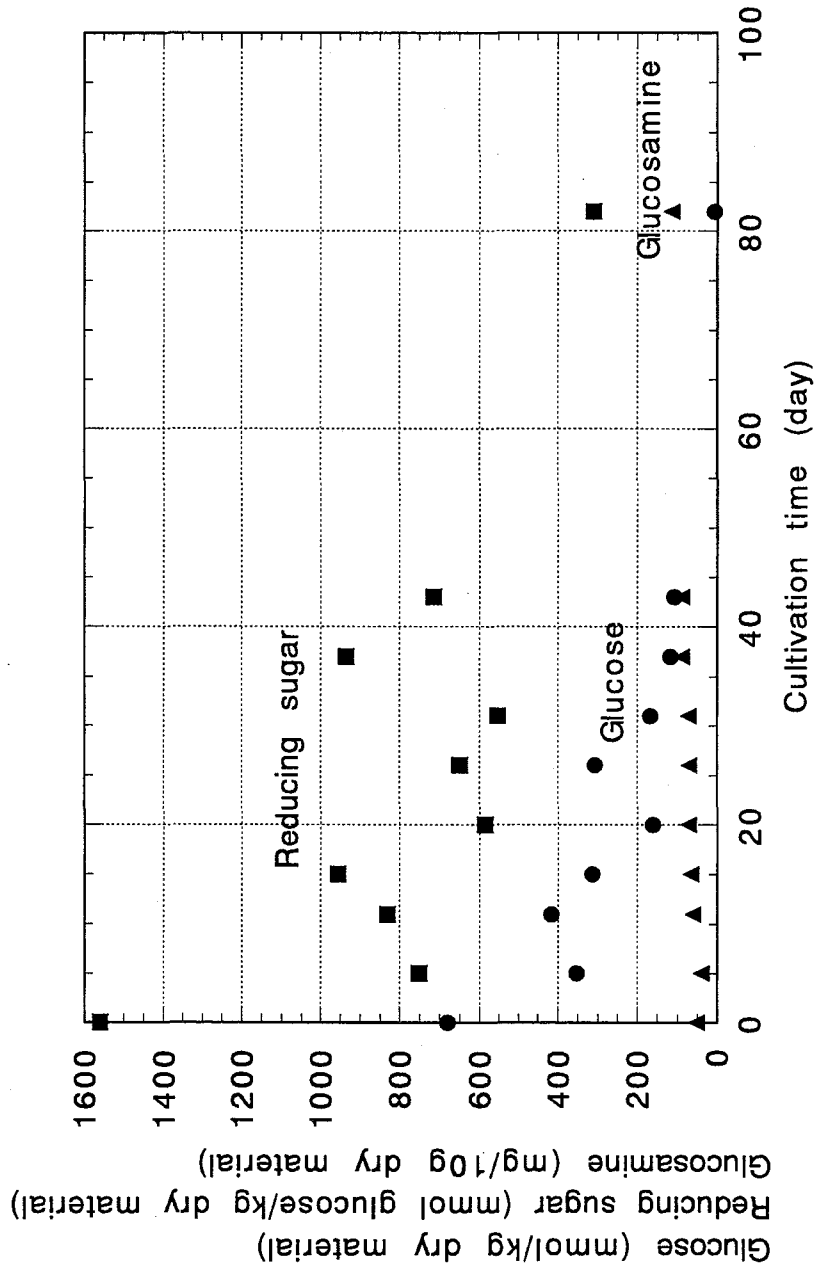


図3-7 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床成分の経時変化

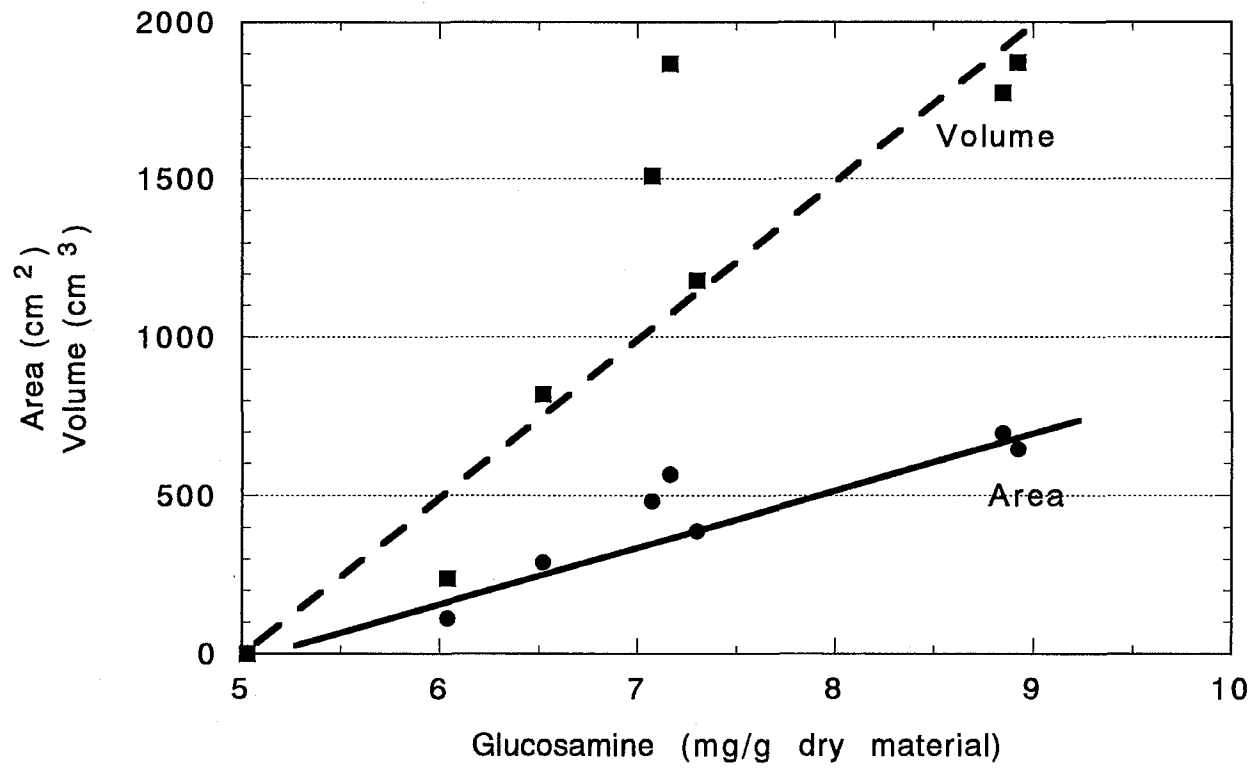


図3-8 蜜柑搾汁粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床のグルコサミンと菌糸生育面積および菌糸生育体積の関係

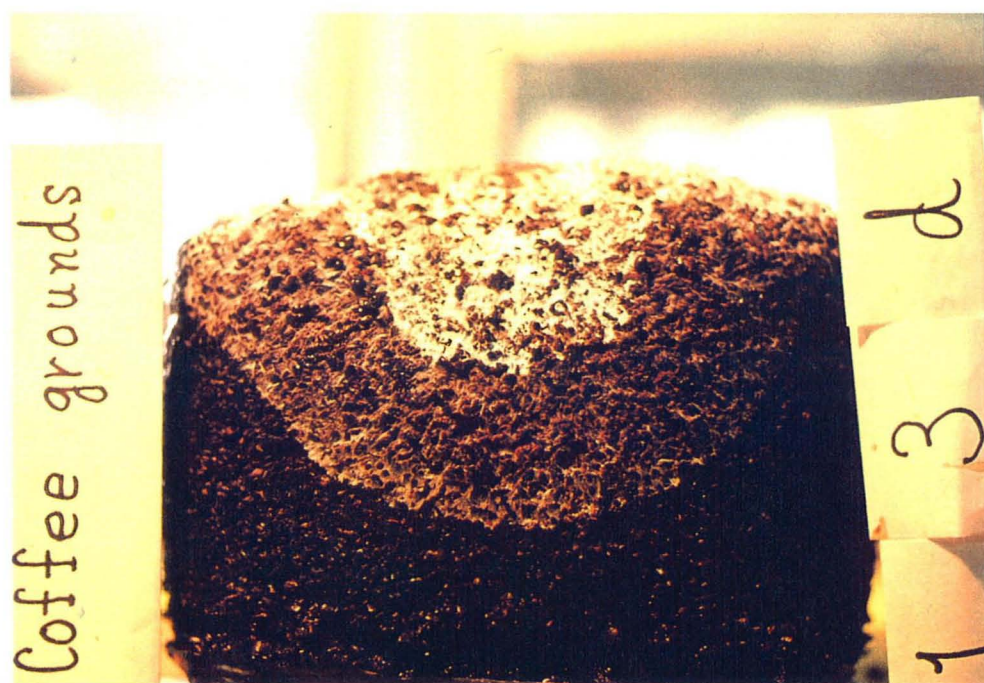


図3-9 コーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例
1 / 4

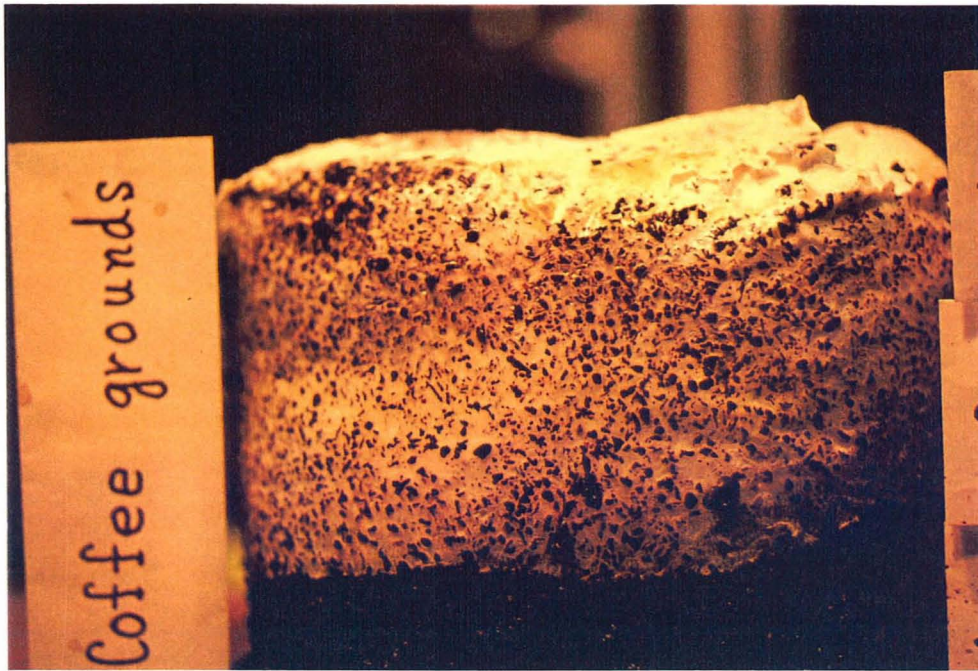


図 3 - 9 コーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例
(19日) 2 / 4

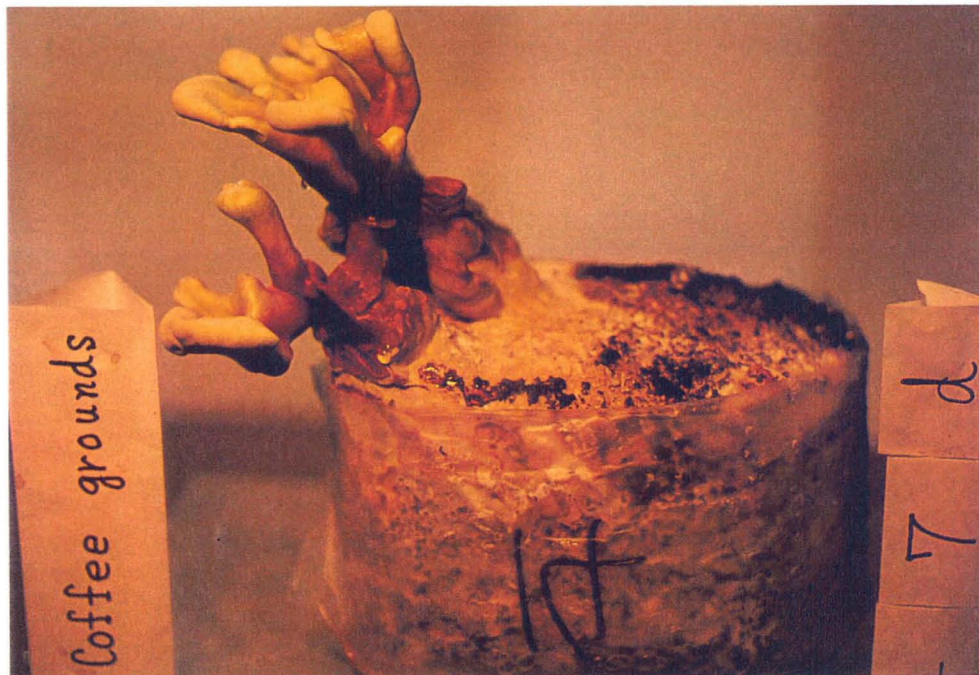


図3-9 コーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例
(上39日, 下47日)

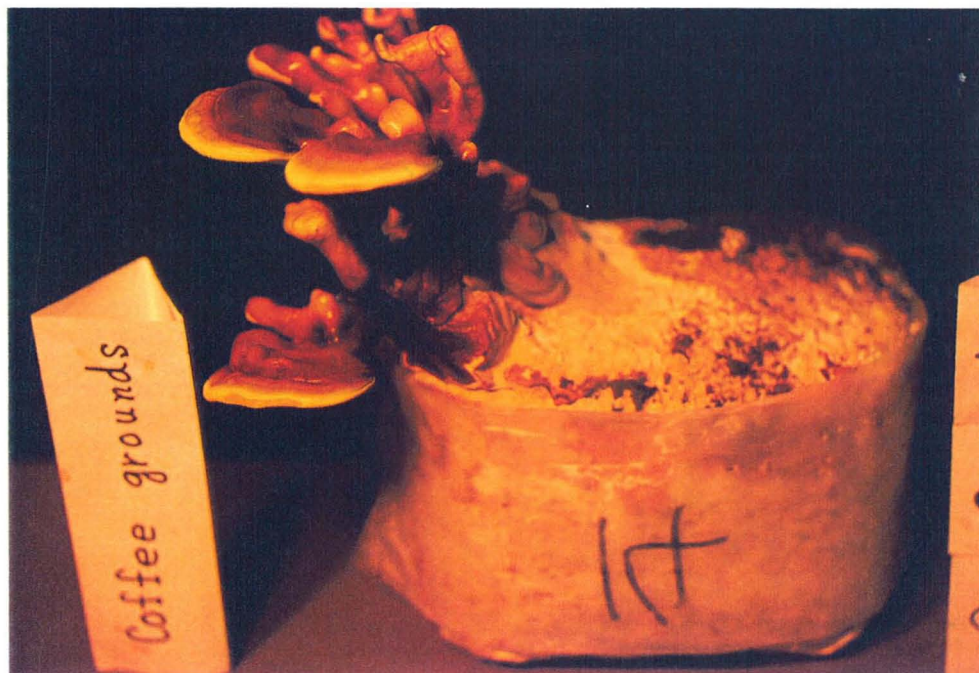


図3-9 コーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例
(60日) 4 / 4

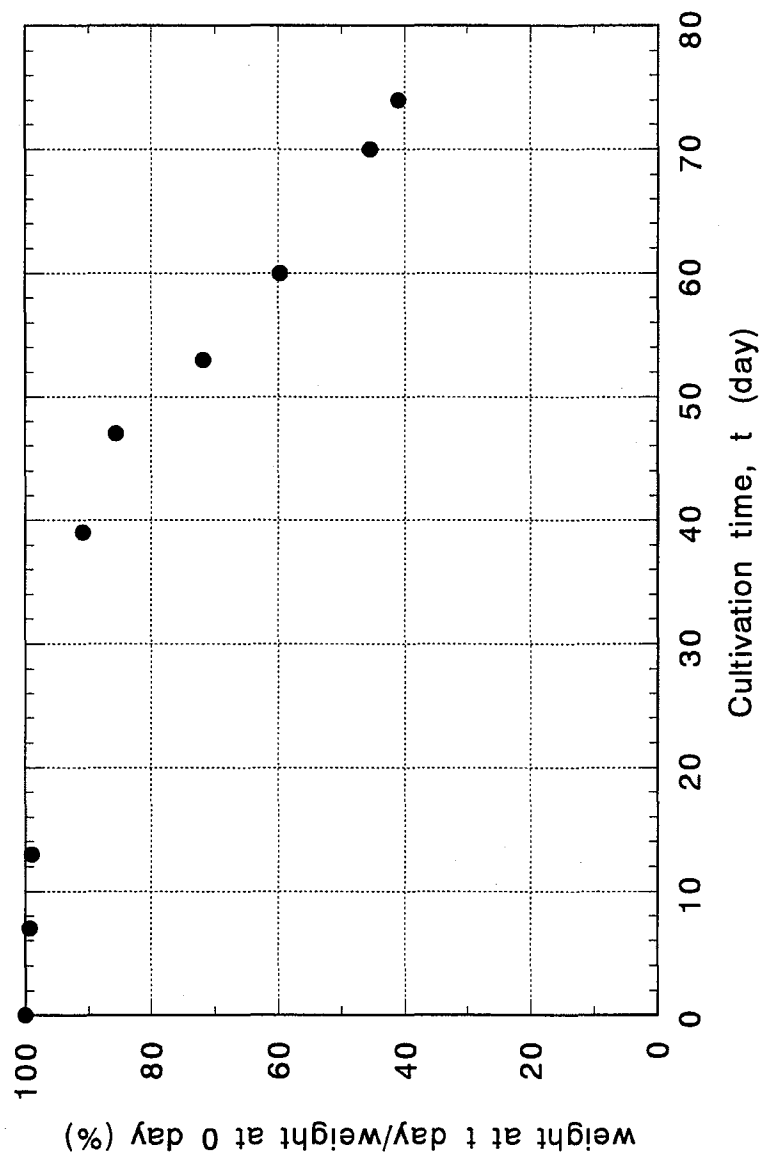


図3-10 コーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の重量経時変化

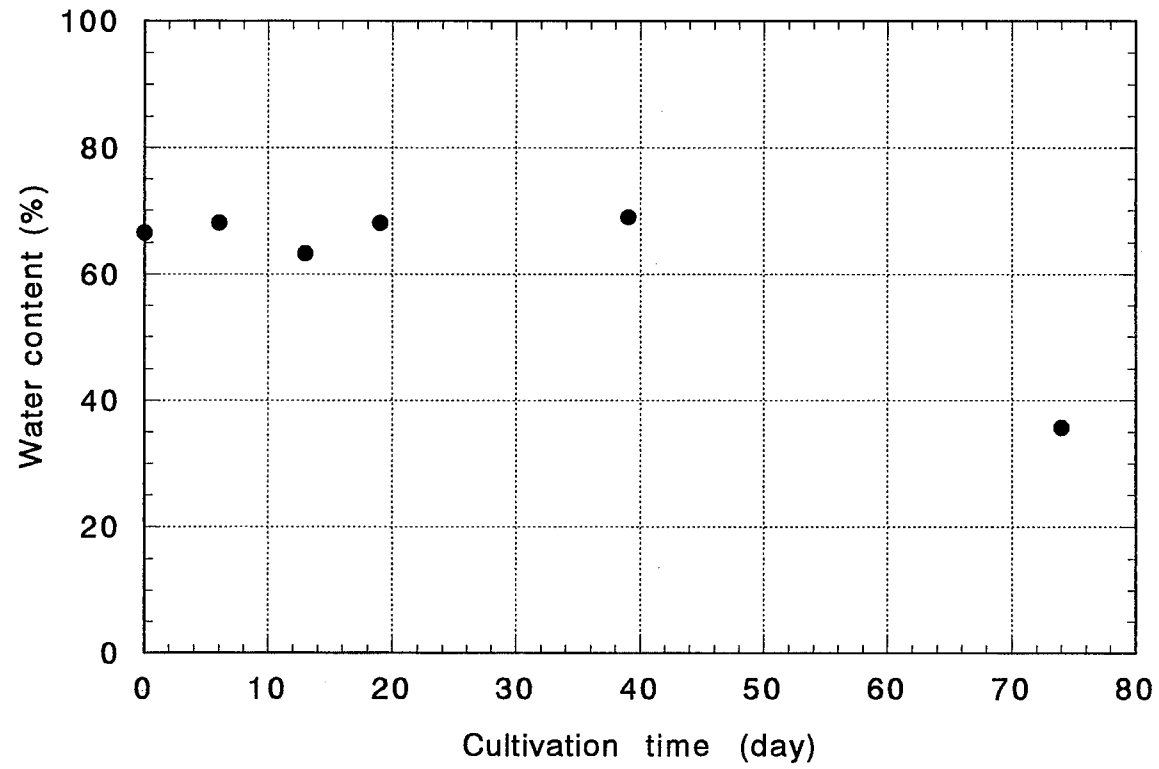


図3-11 コーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の水分含有量経時変化

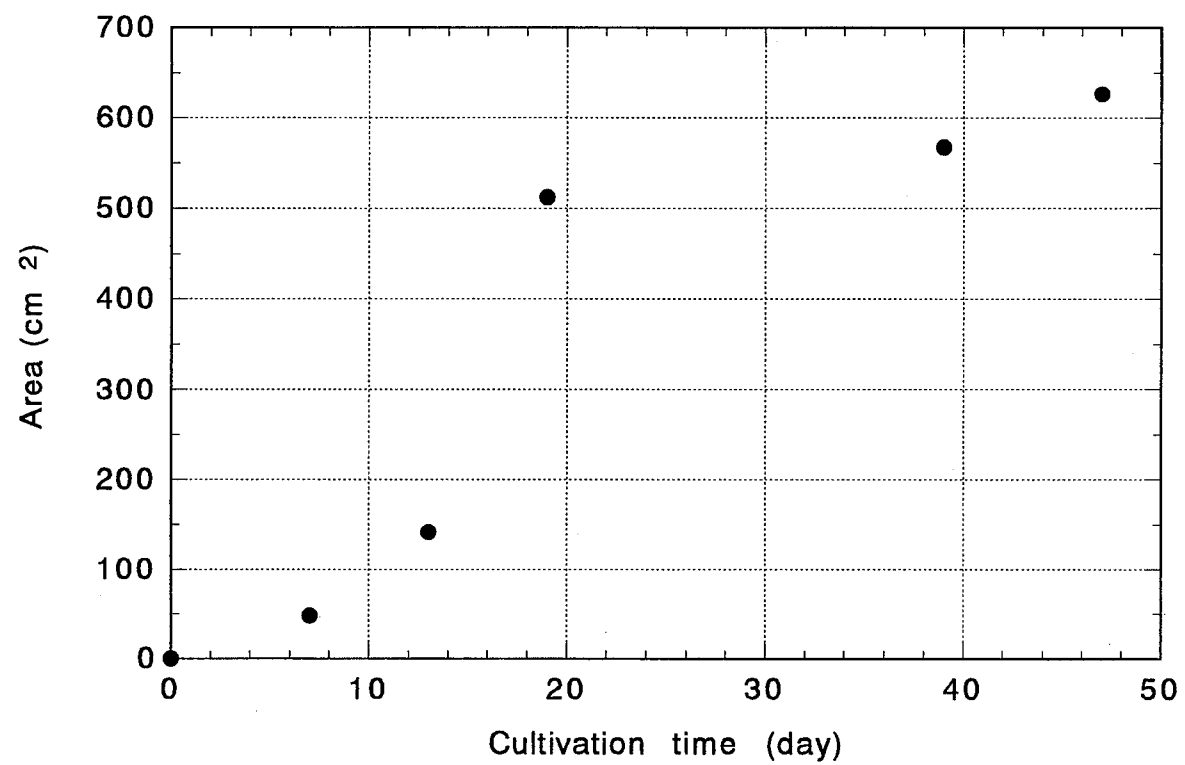


図3-12 コーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の菌糸生育面積経時変化

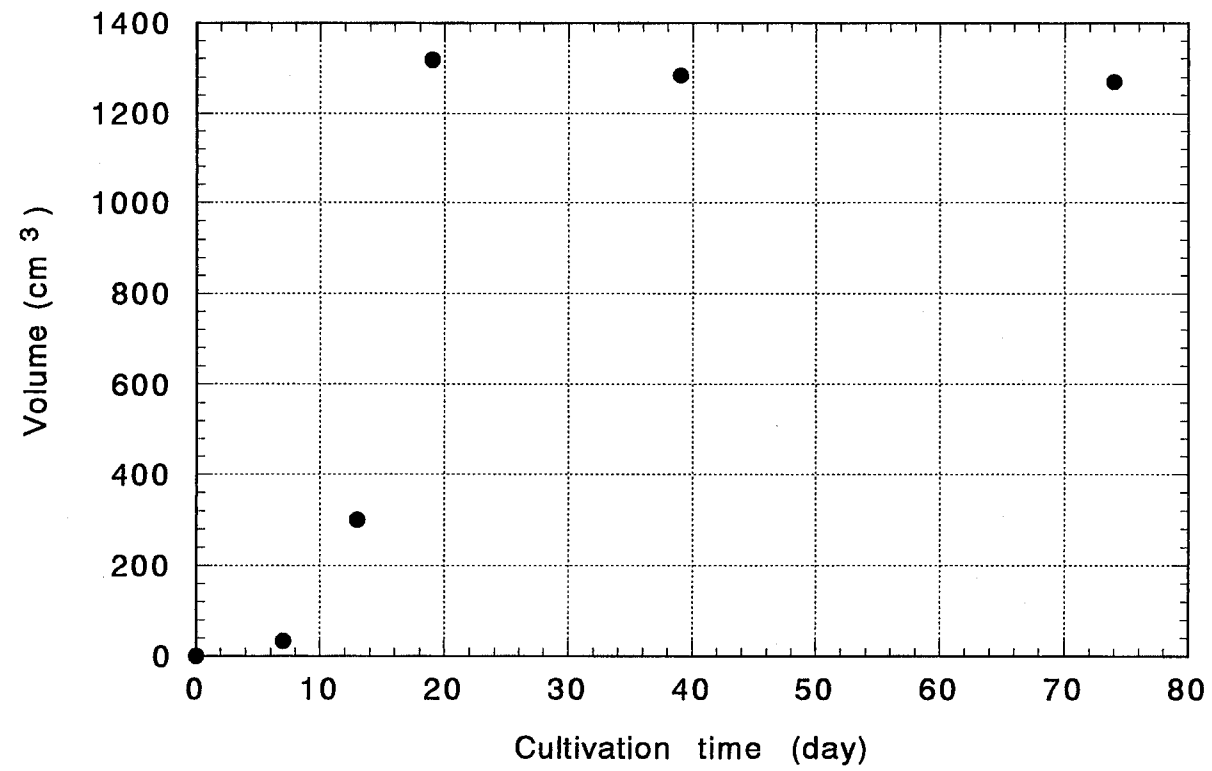


図3-13 コーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の菌糸生育体積経時変化

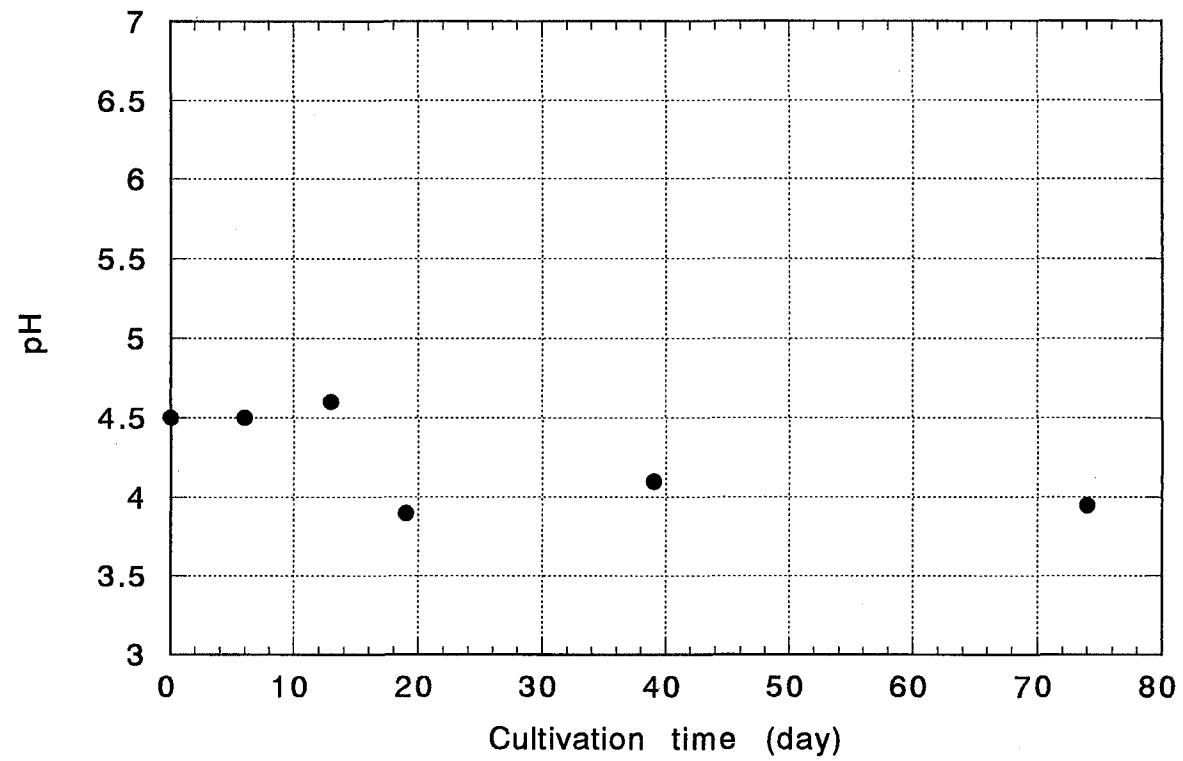


図3-14 コーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床のpH経時変化

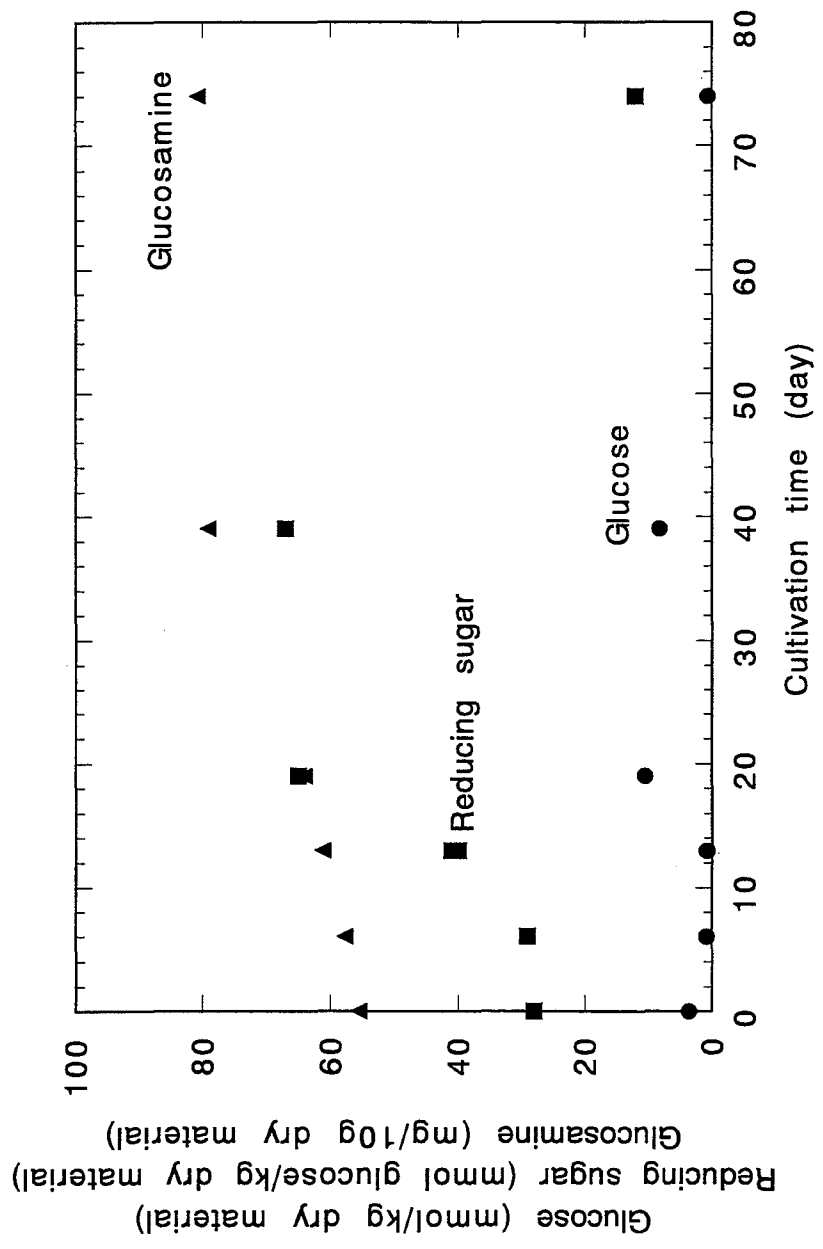


図3-15 コーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の成分経時変化

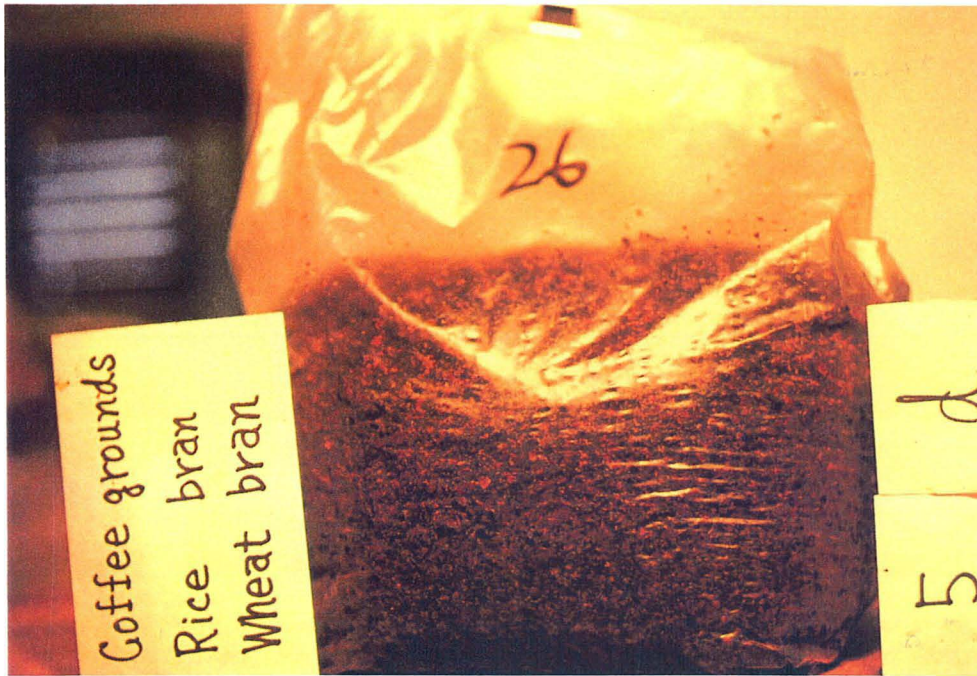


図3-16 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderuma lucidum* の培養例 (5 day)

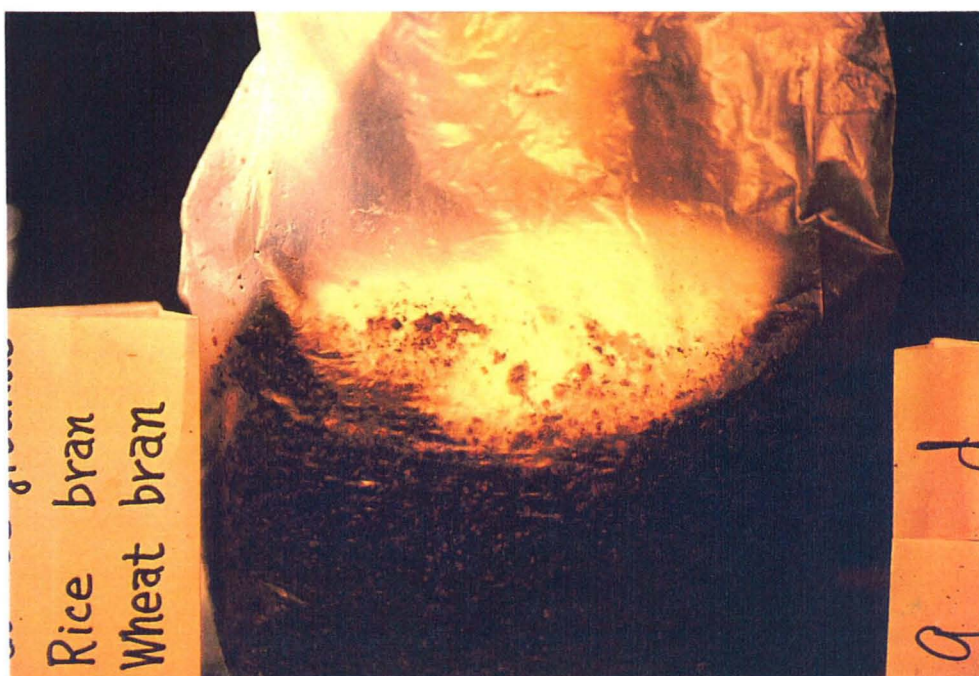


図3-16 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例 (9 day) 2 / 9

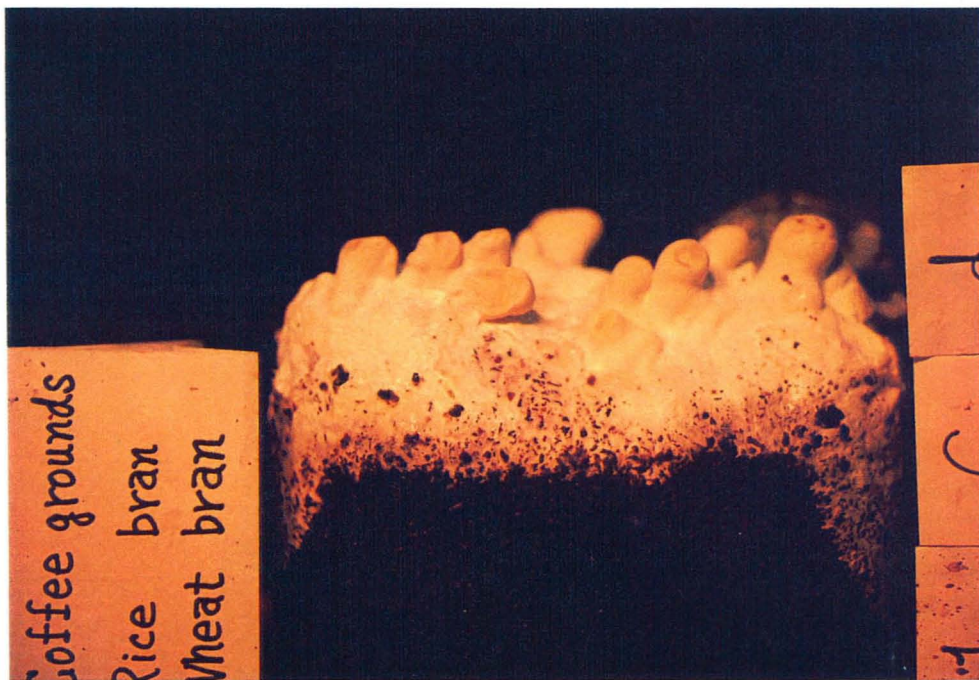
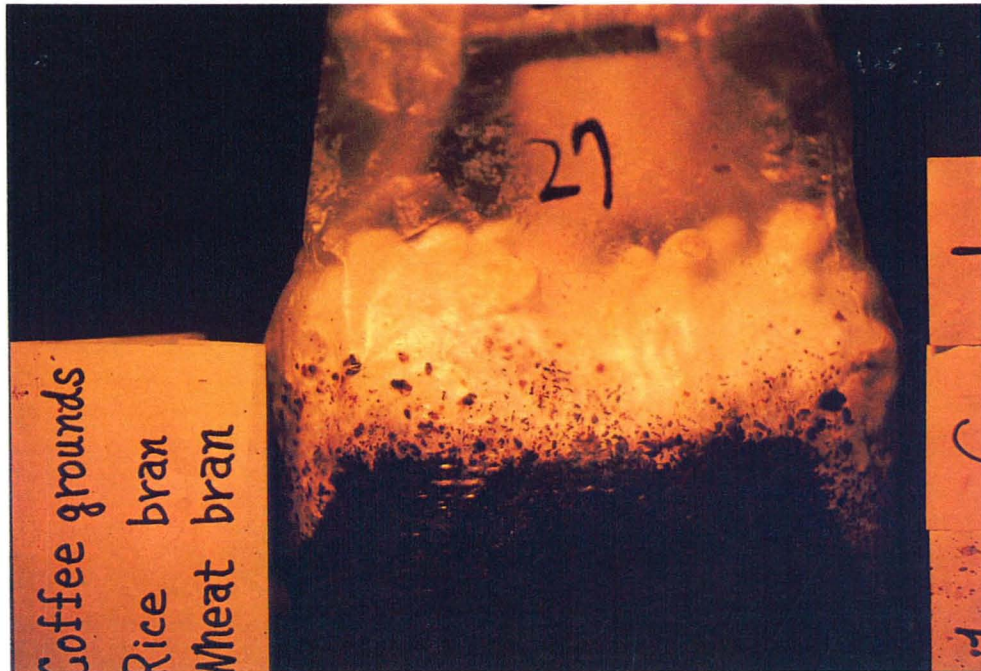


図3-16 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderuma lucidum* の培養例 (16 day) 3 / 9

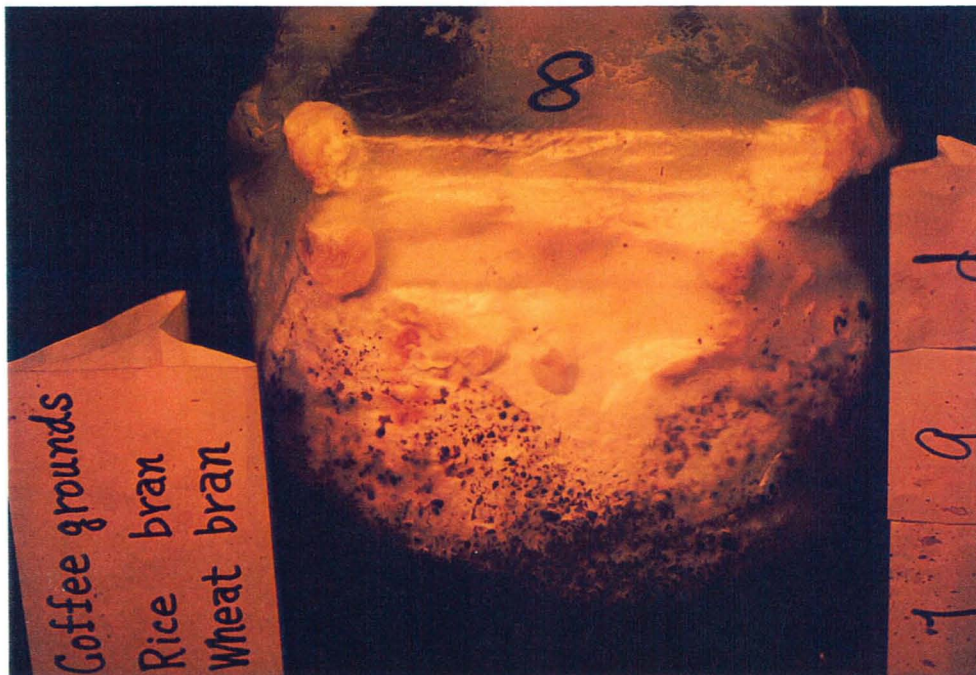


図3-16 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例 (上16 day, 下19 day) 4/9

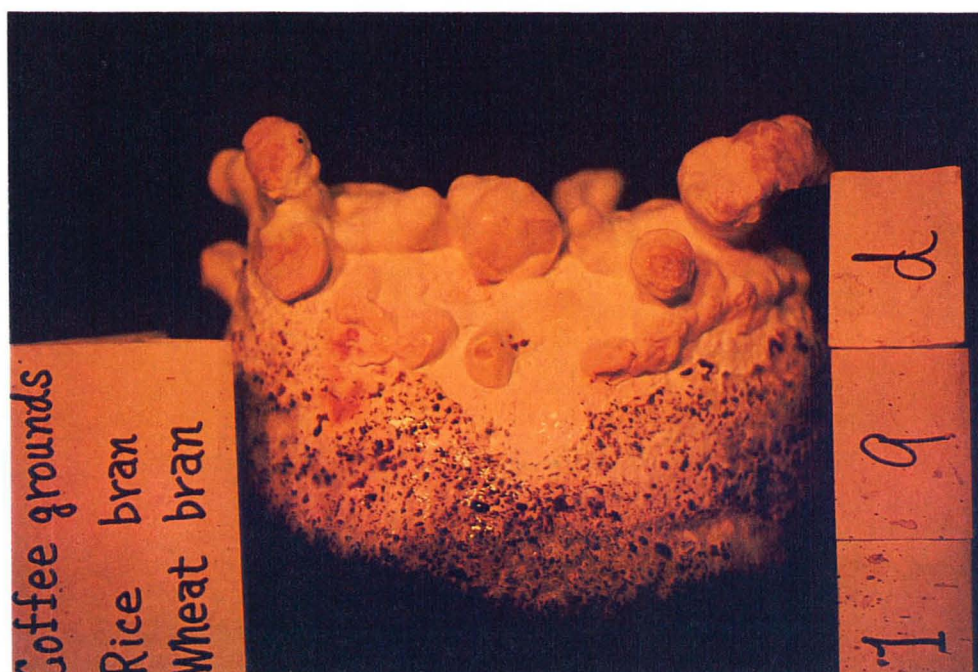


図3-16 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例 (19 day) 5/9

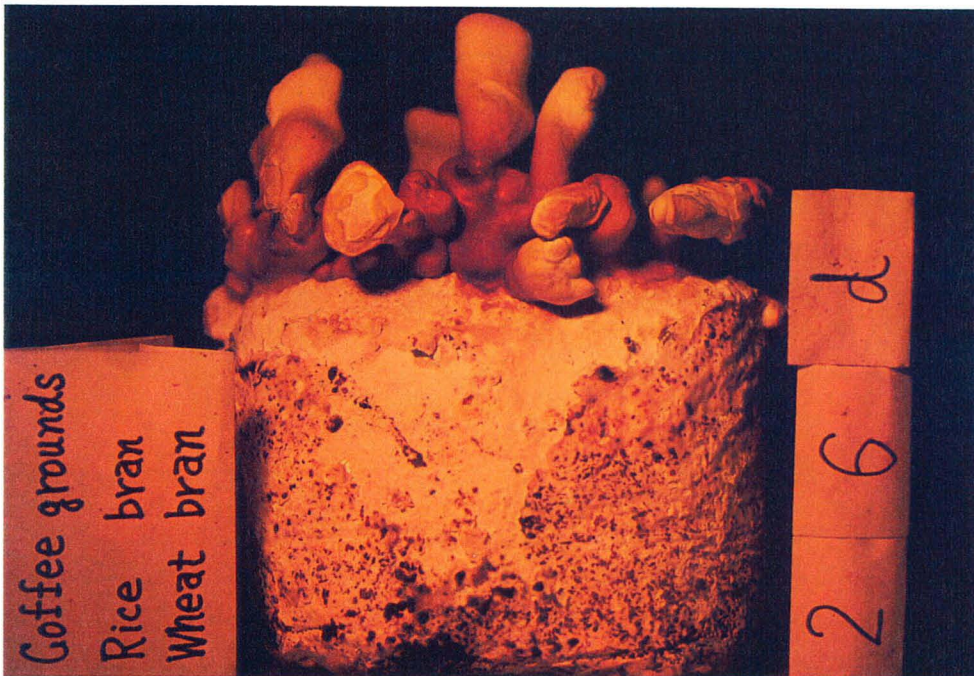


図3-16 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例

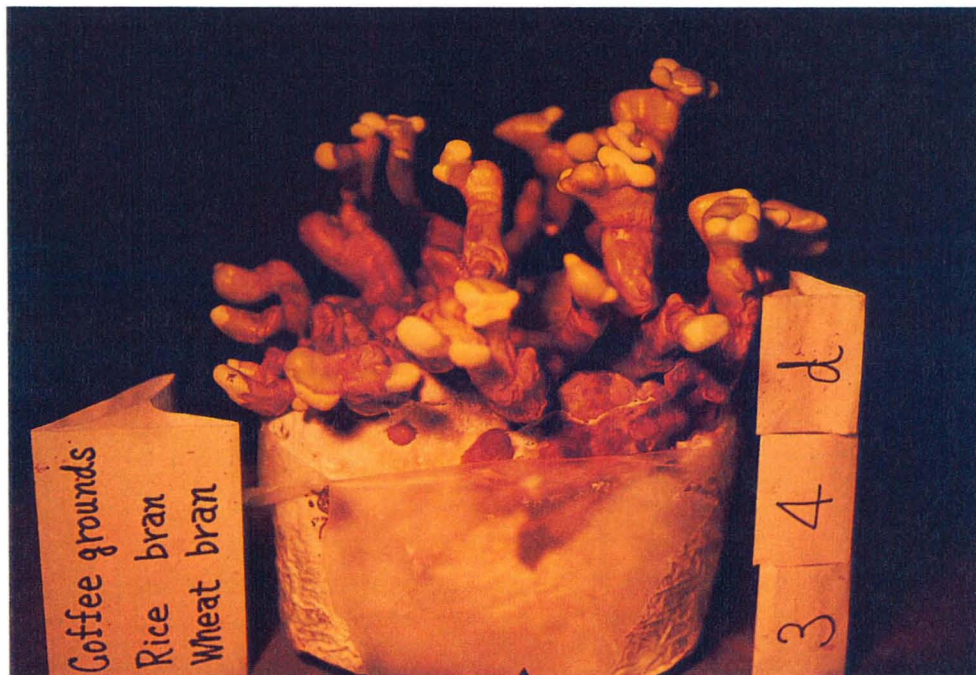


図3-16 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例



図3-16 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例 8 / 9



図3-16 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例

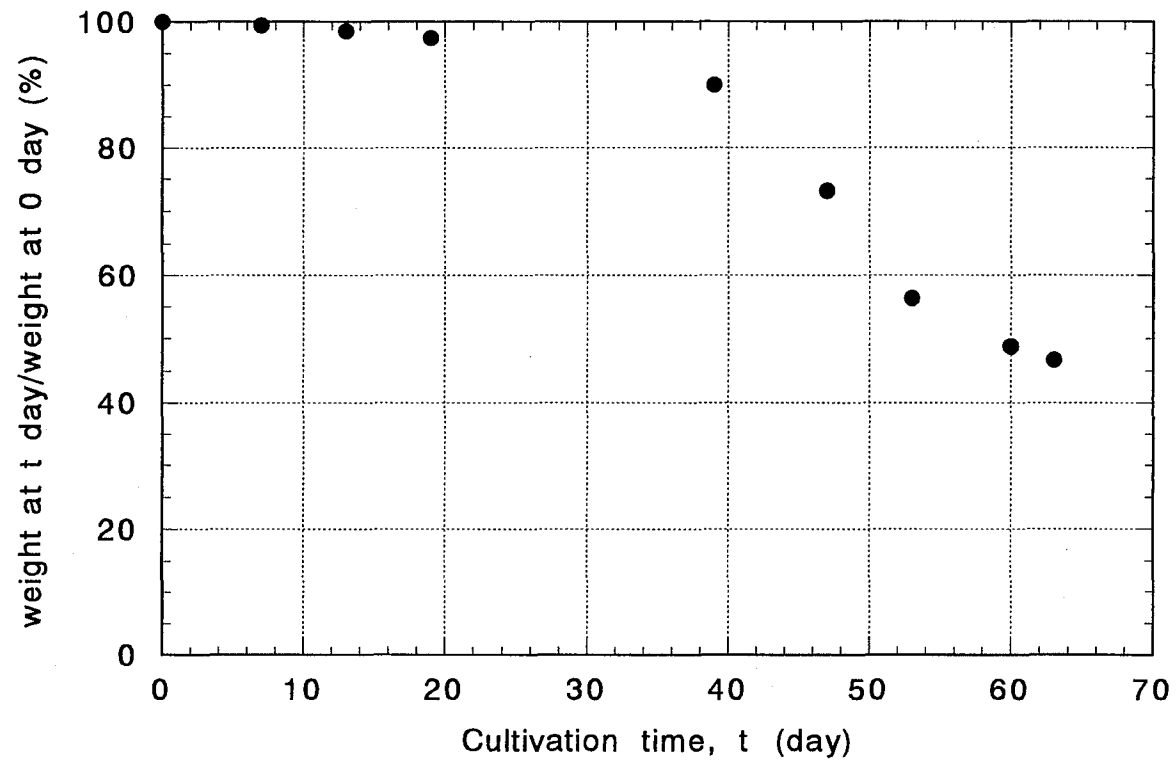


図3-17 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の重量経時変化

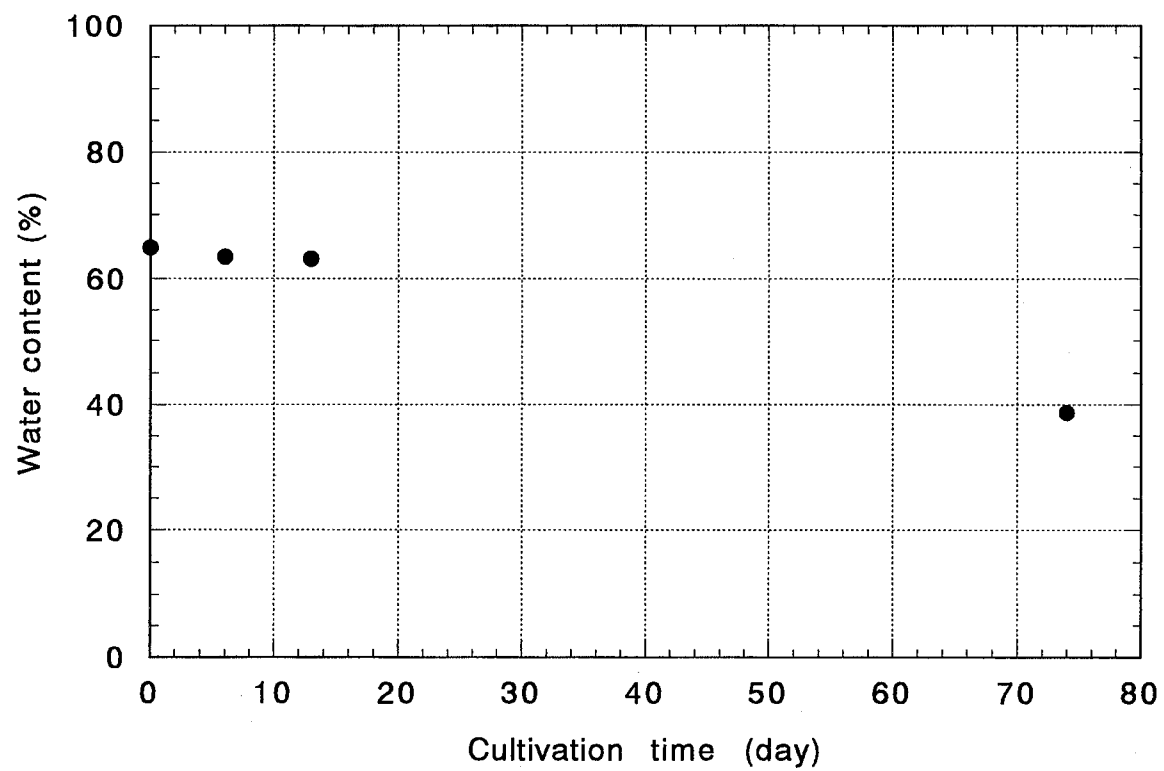


図3-18 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の水分含有量経時変化

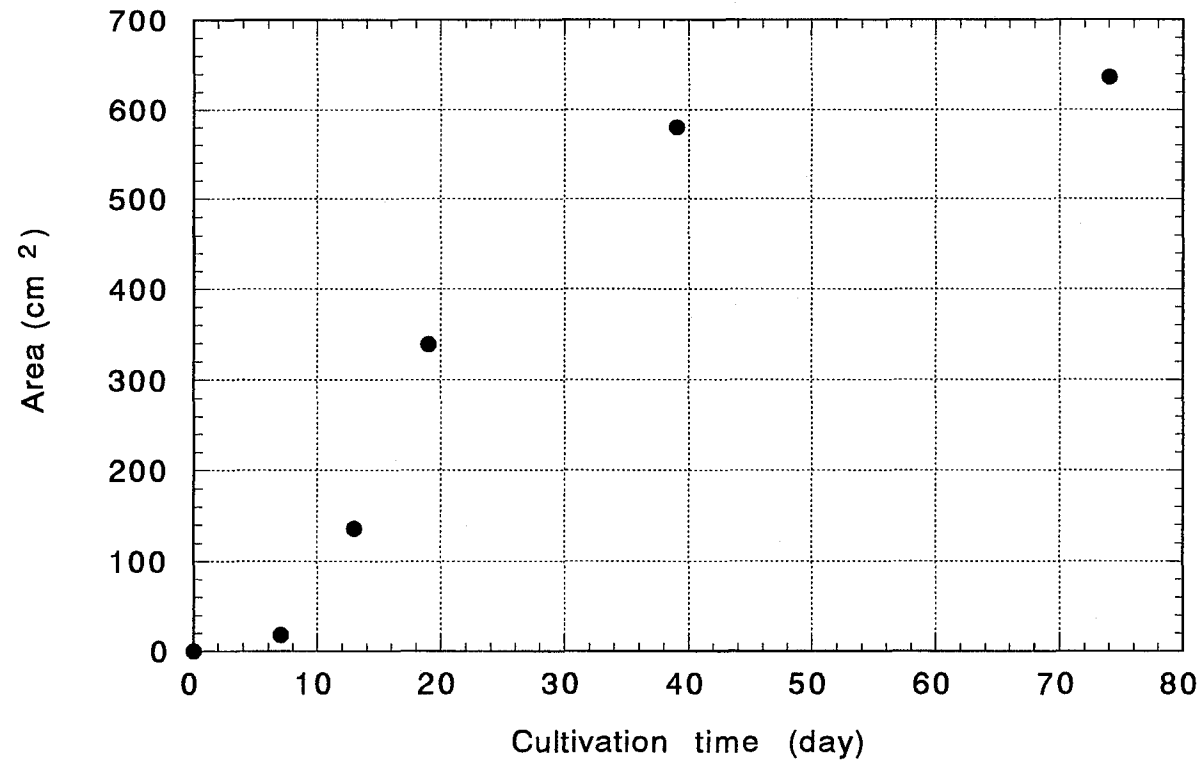


図3-19 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の菌糸生育面積経時変化

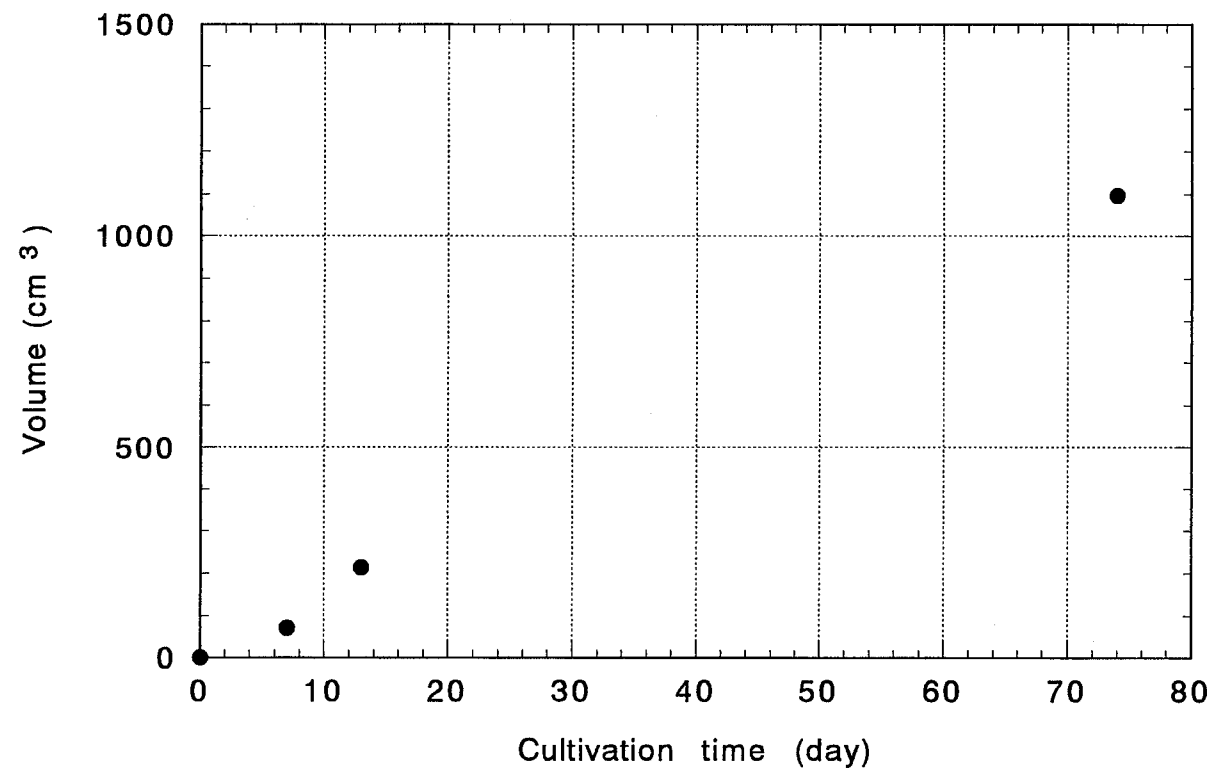


図3-20 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の菌糸生育体積経時変化

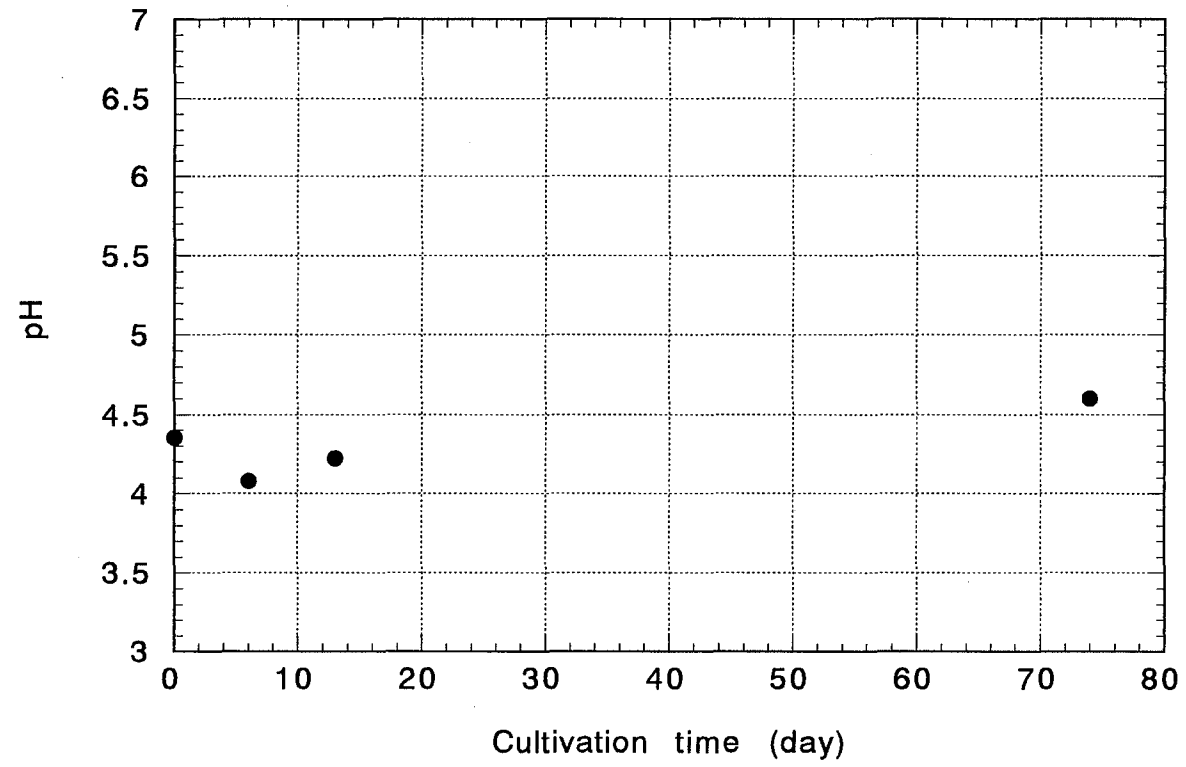


図3-21 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床のpH経時変化

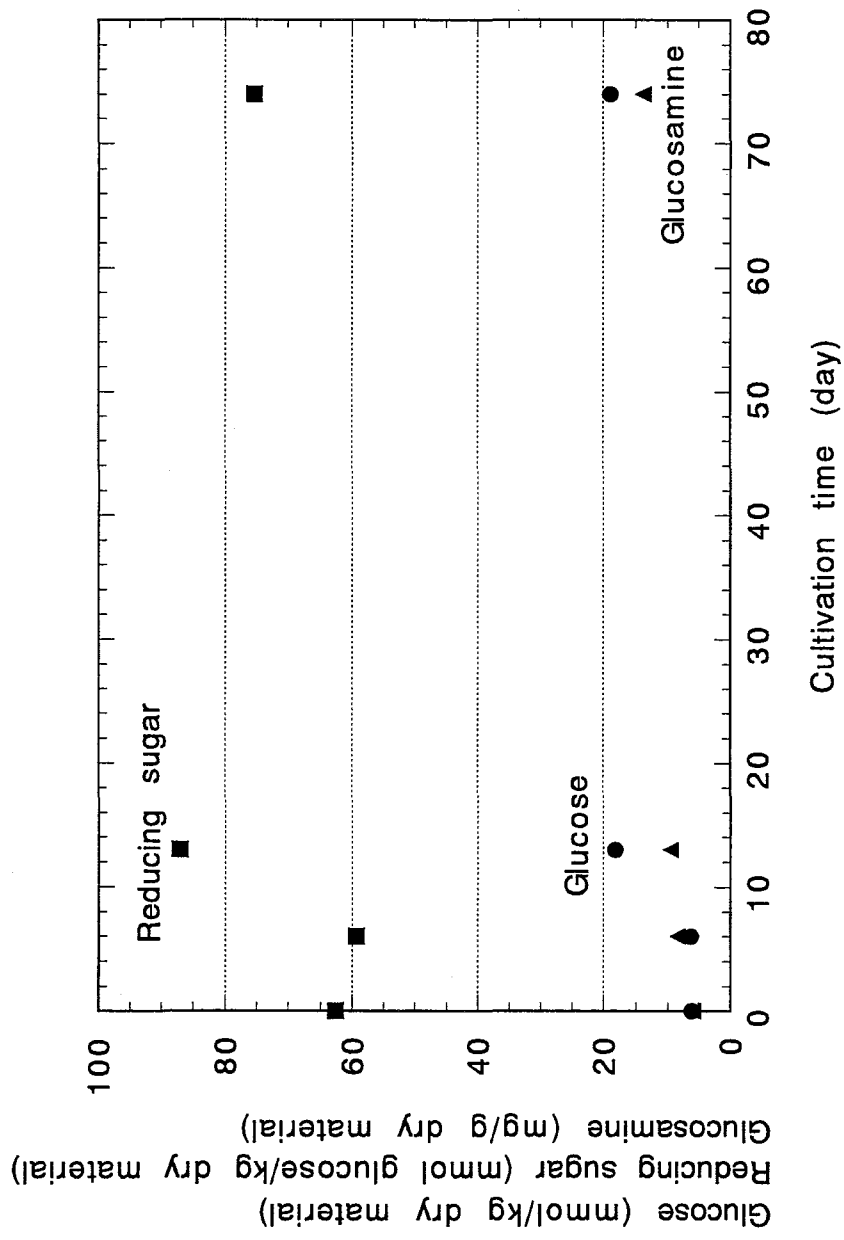


図3-2-2 副資材入りコーヒー抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の成分経時変化

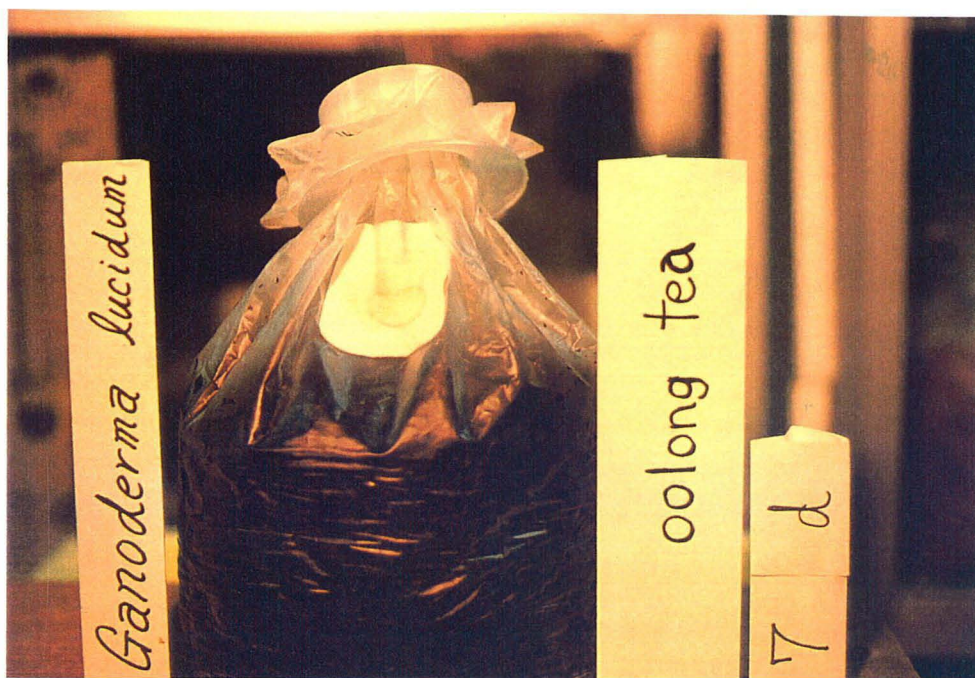


図3-23 烏龍茶抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例
1/6

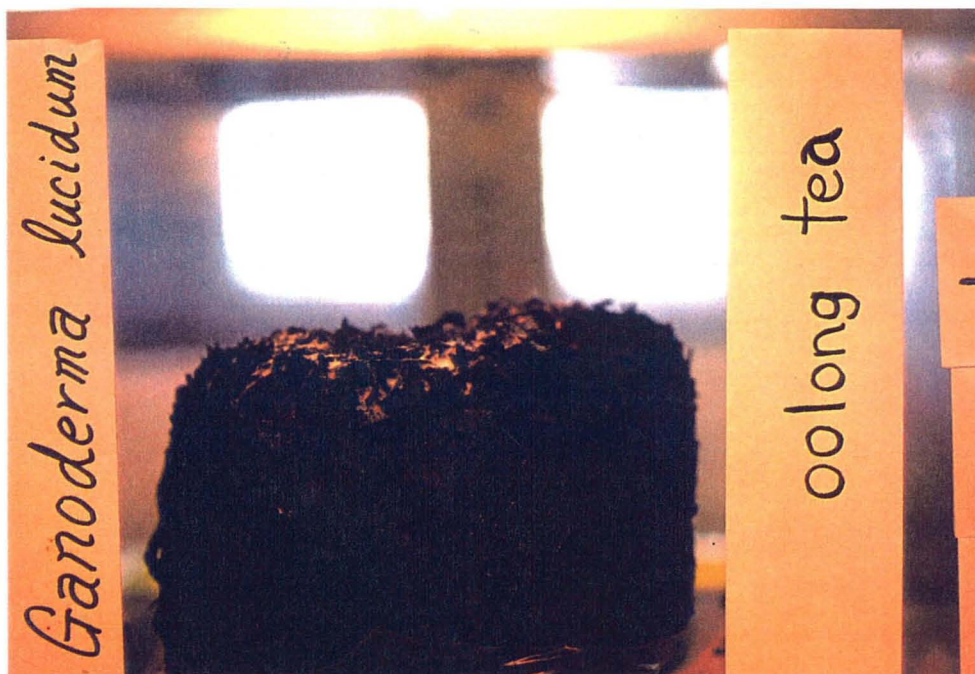


図3-23 烏龍茶抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例
2 / 6

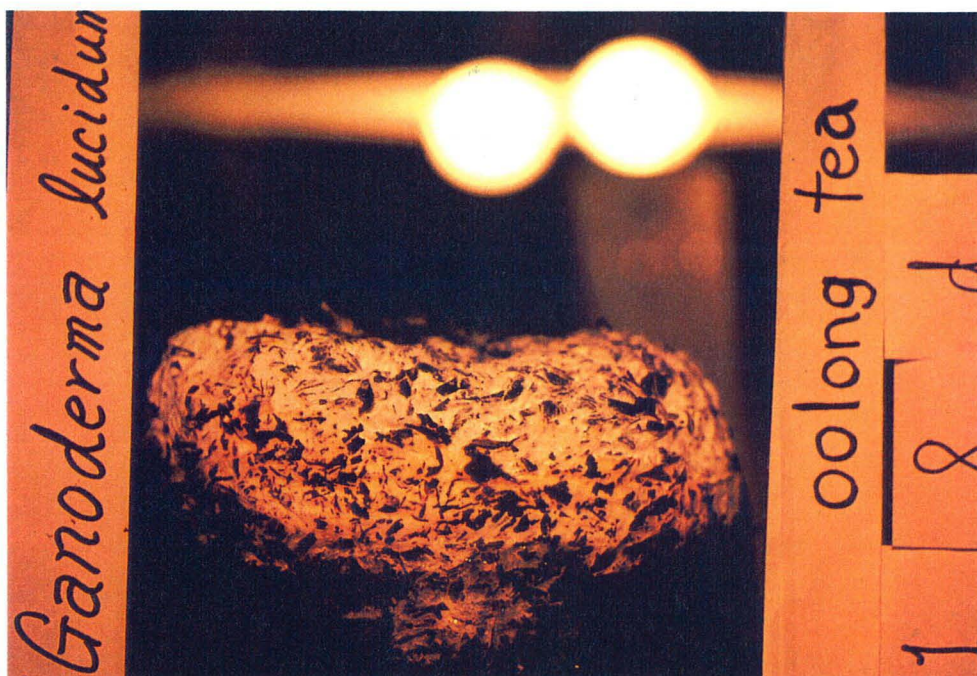


図3-23 烏龍茶抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例
3 / 6

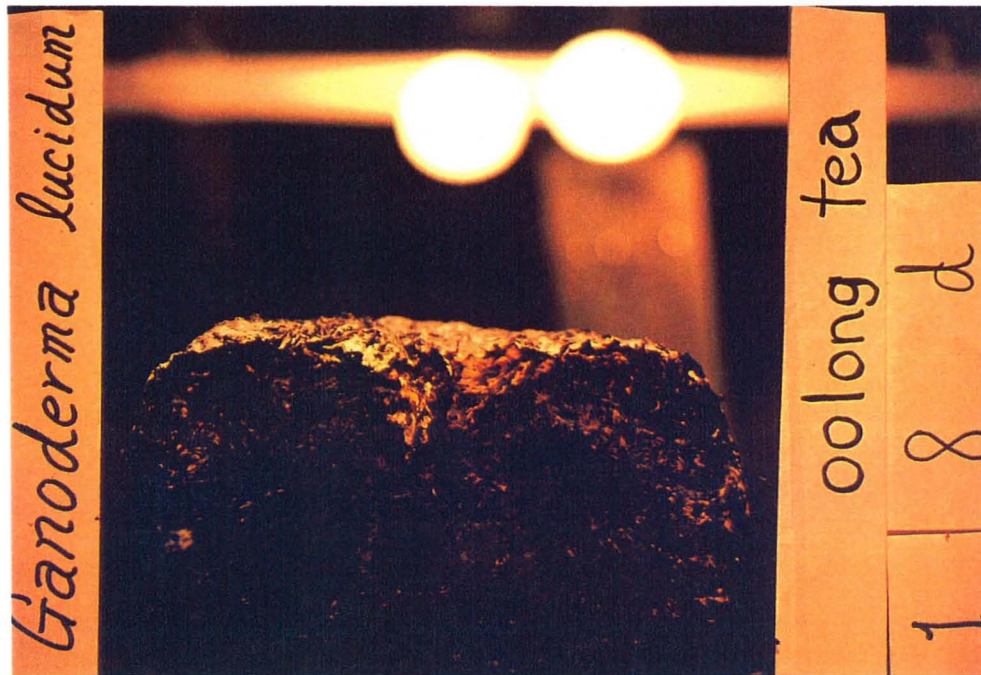


図3-23 烏龍茶抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例
4 / 6



図3-23 烏龍茶抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例
5 / 6



図3-23 烏龍茶抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* の培養例
6 / 6

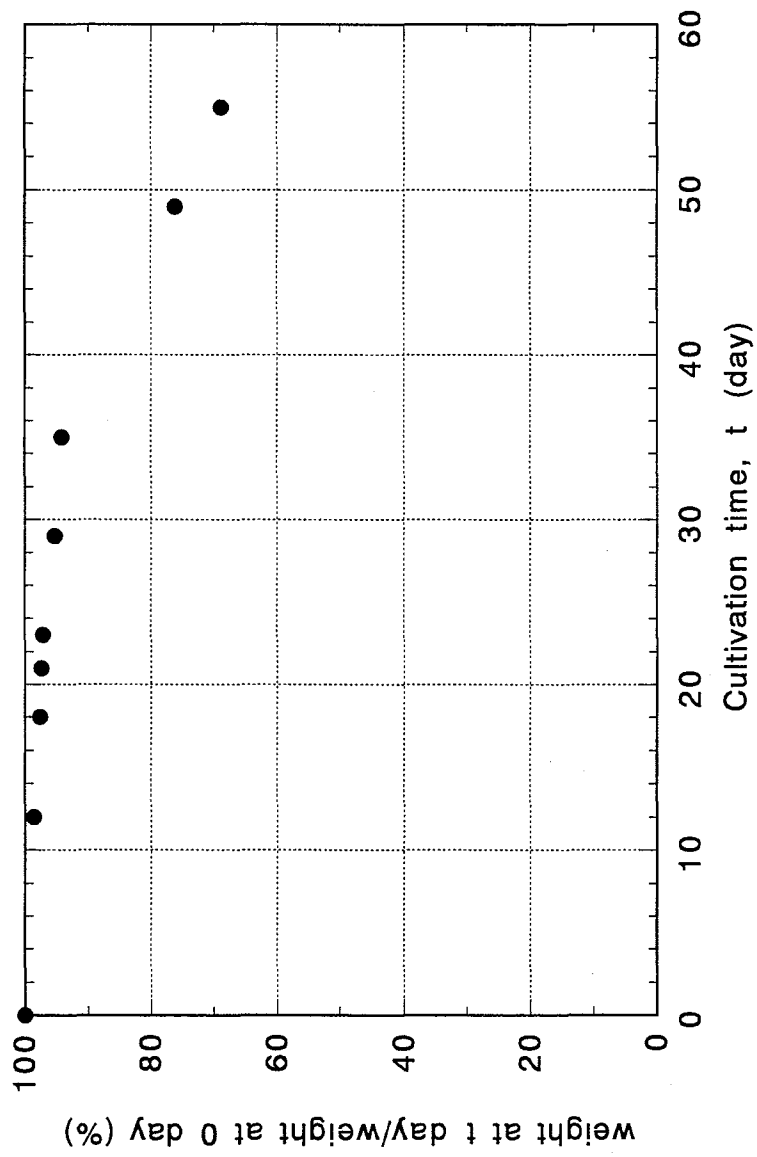


図3-24 烏龍茶抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の重量経時変化

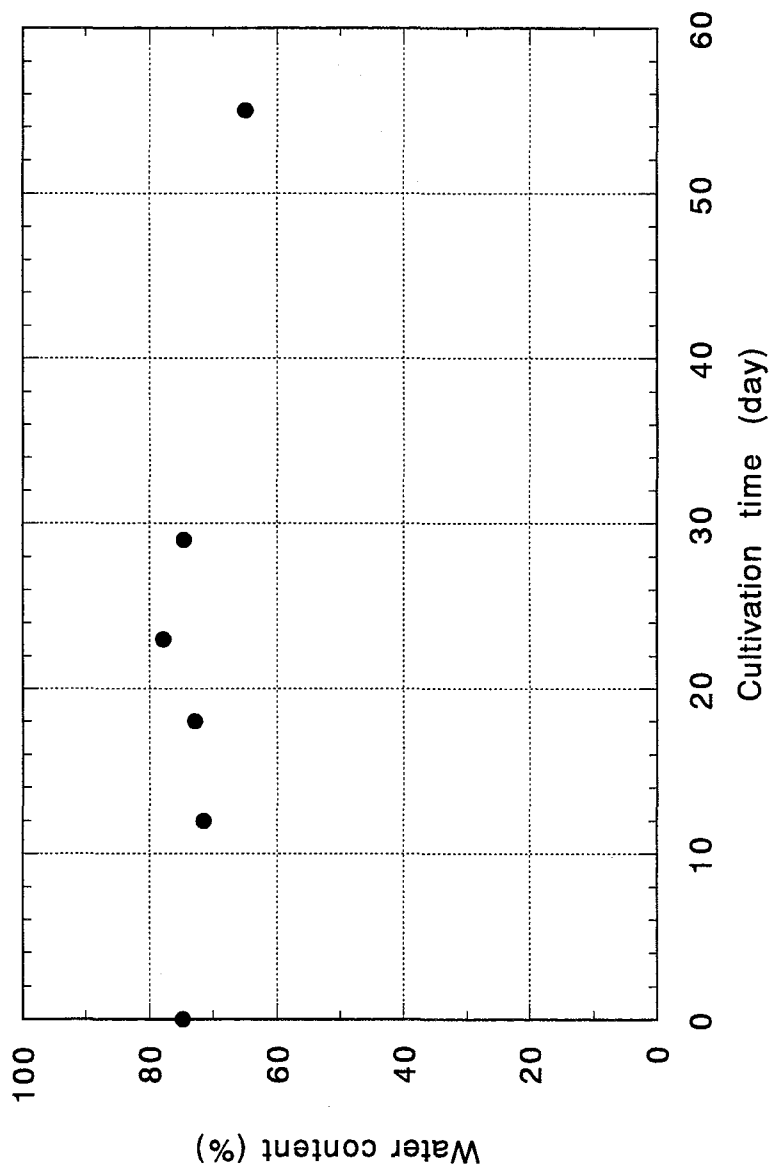


図3-25 烏龍茶抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の水分含有量経時変化

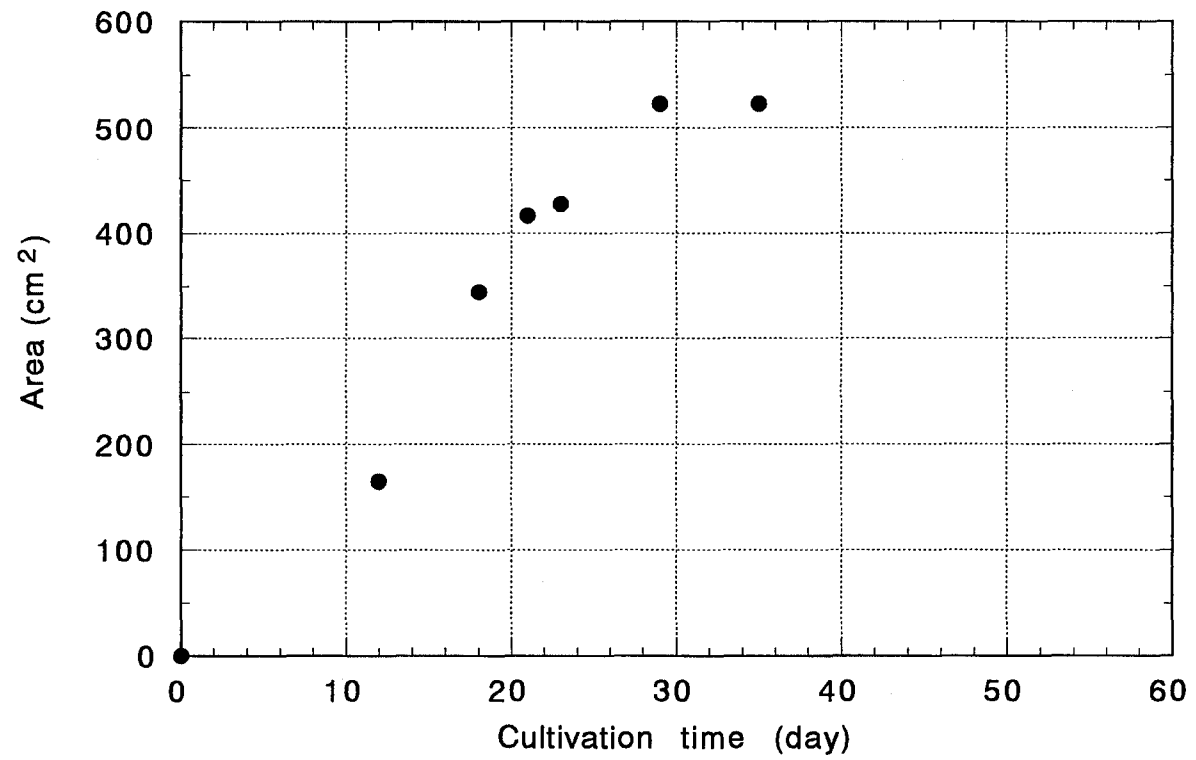


図3-26 烏龍茶抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の菌糸生育面積経時変化

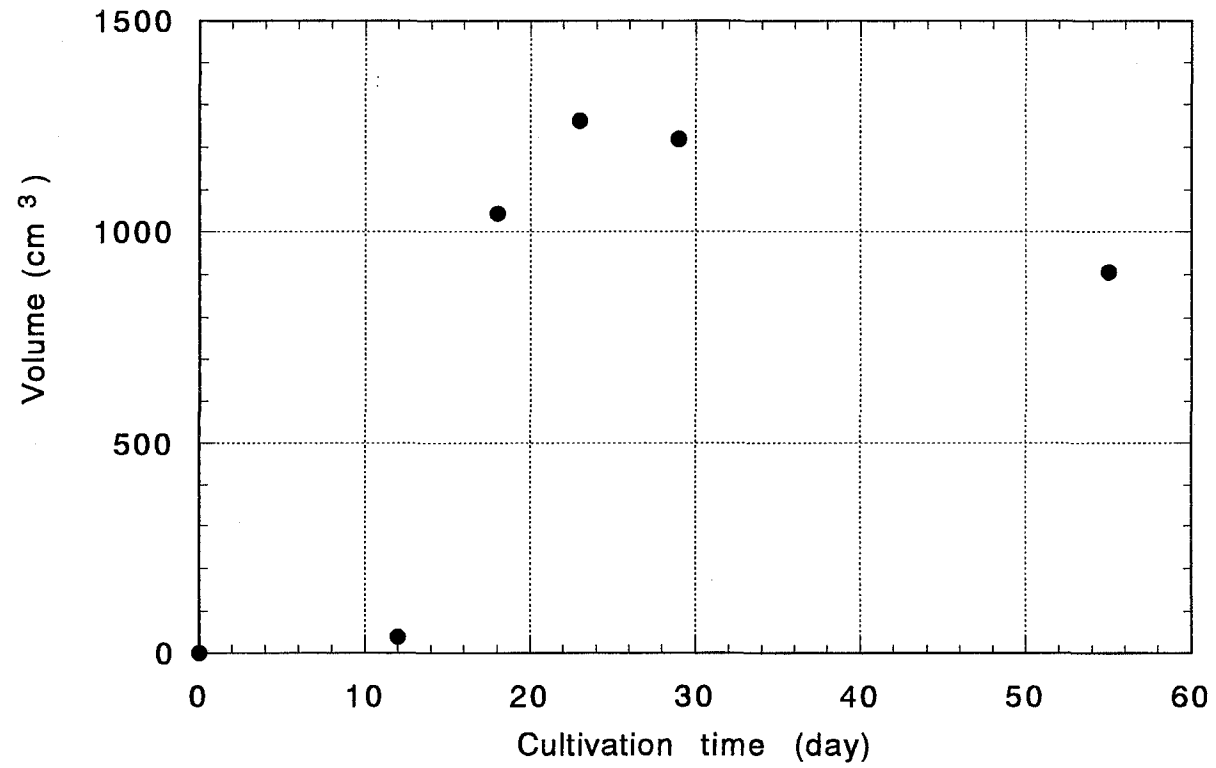


図 3 - 2 7 烏龍茶抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の菌糸生育体積経時変化

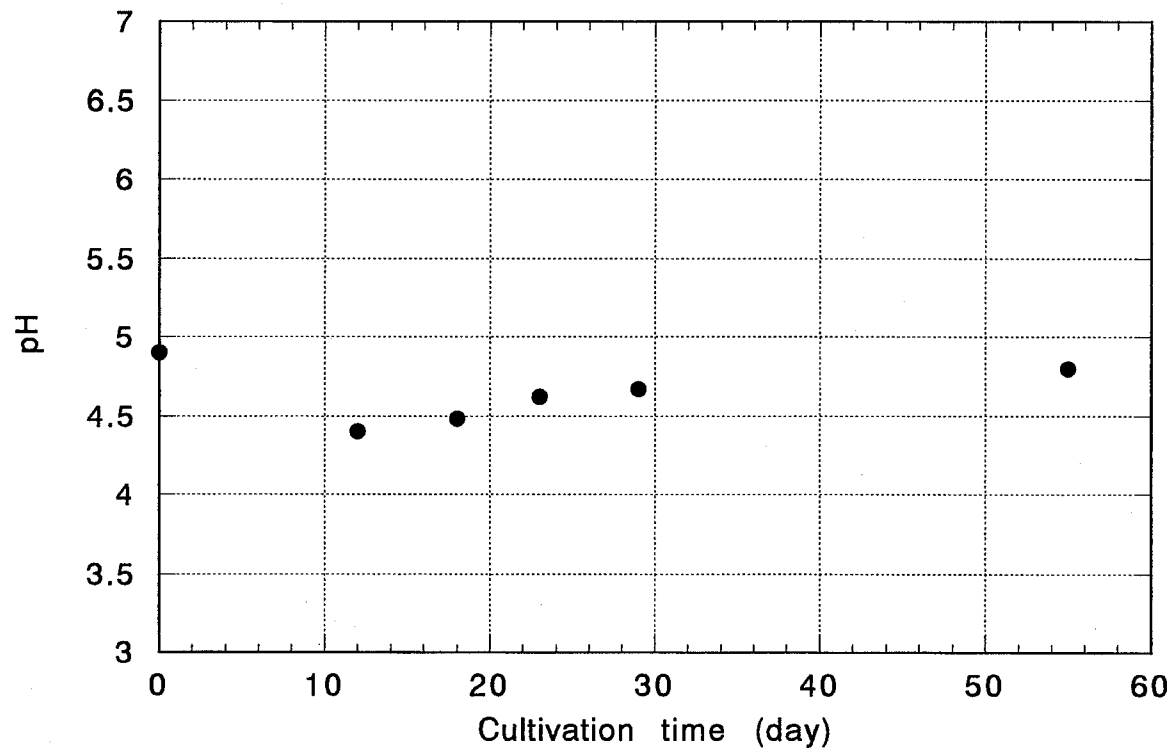


図3-28 烏龍茶抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床のpH経時変化

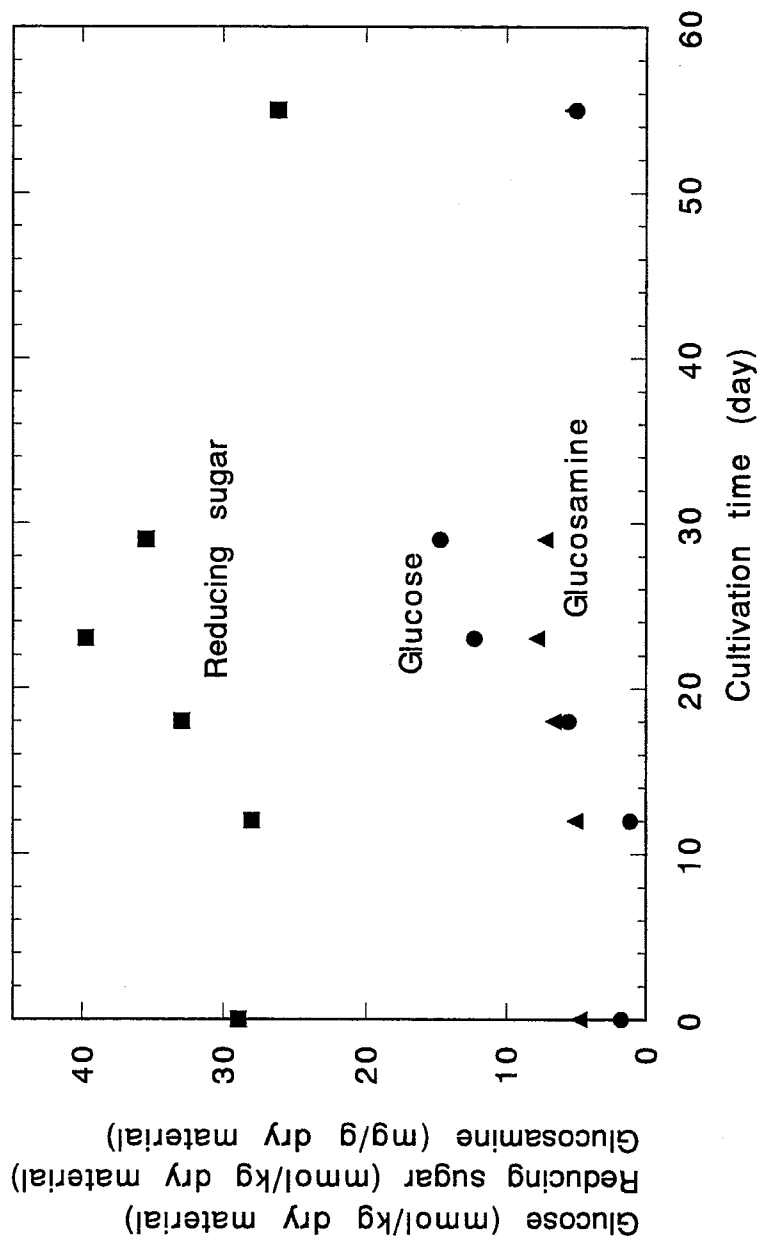


図3-29 烏龍茶抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の成分経時変化



図3-30 副資材入り烏龍茶抽出粕固体培地を用いた
Ganoderma lucidum の培養例 1/6

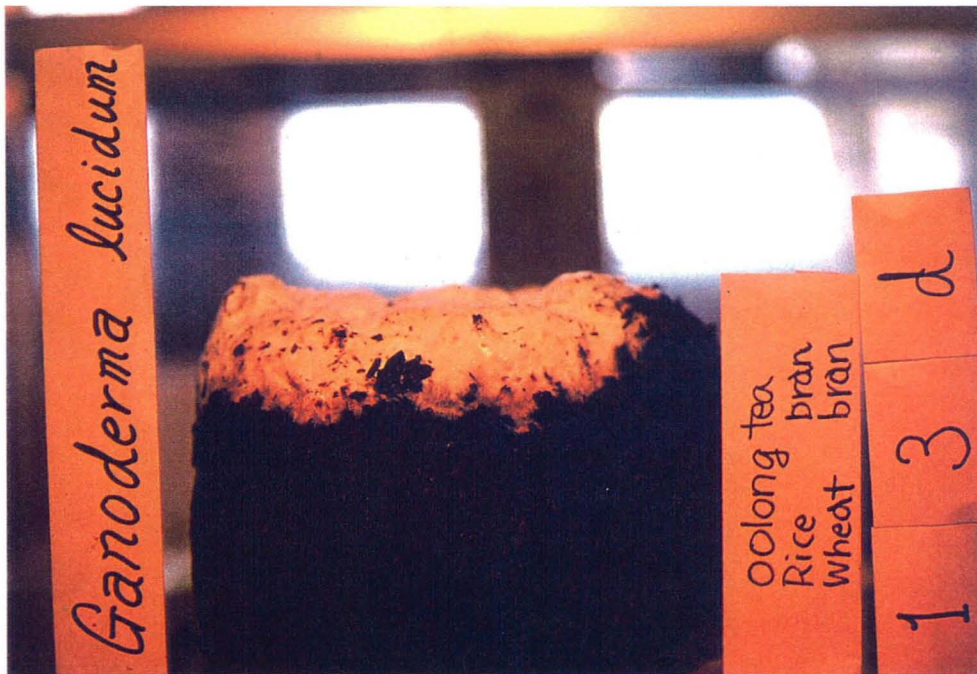


図3-30 副資材入り烏龍茶抽出粕固体培地を用いた
Ganoderma lucidum の培養例 2/6

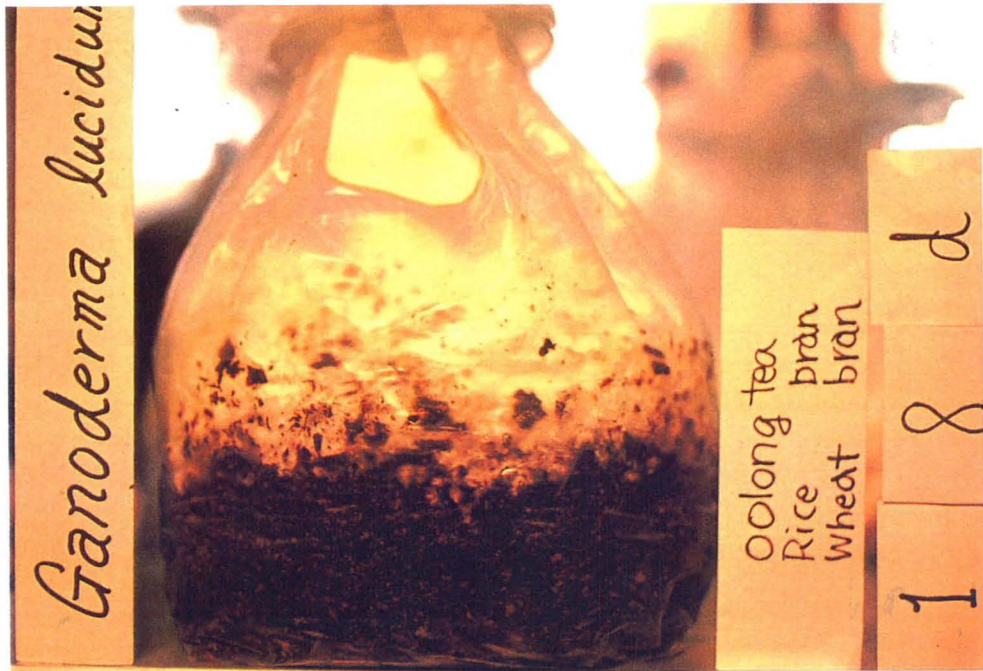


図3-30 副資材入り烏龍茶抽出粕固体培地を用いた
Ganoderma lucidum の培養例 3/6

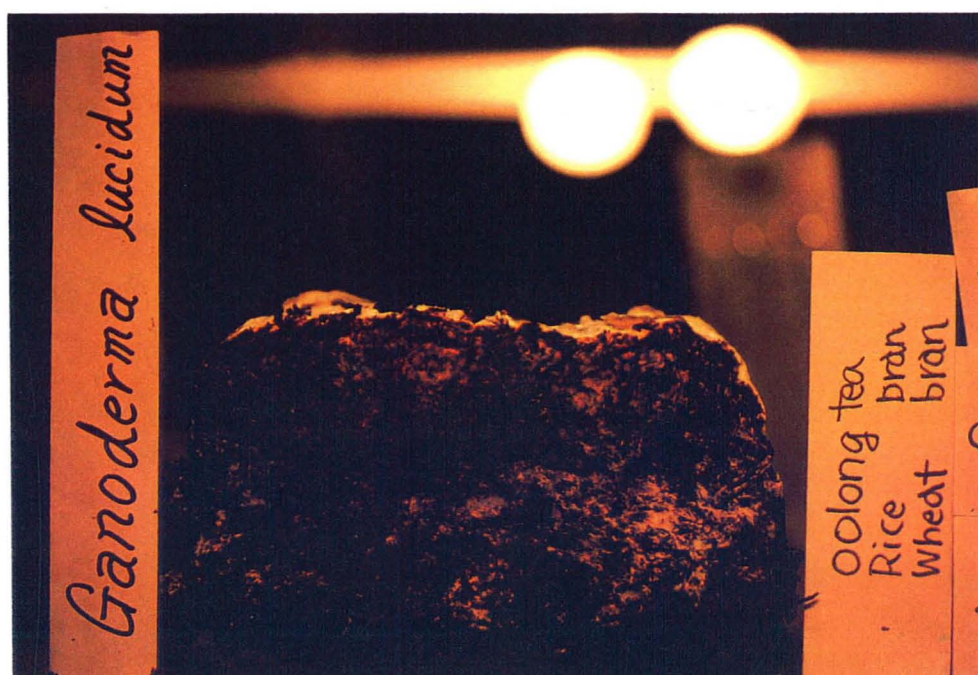


図3-30 副資材入り烏龍茶抽出粕固体培地を用いた
Ganoderma lucidum の培養例 (上18日) 4/6

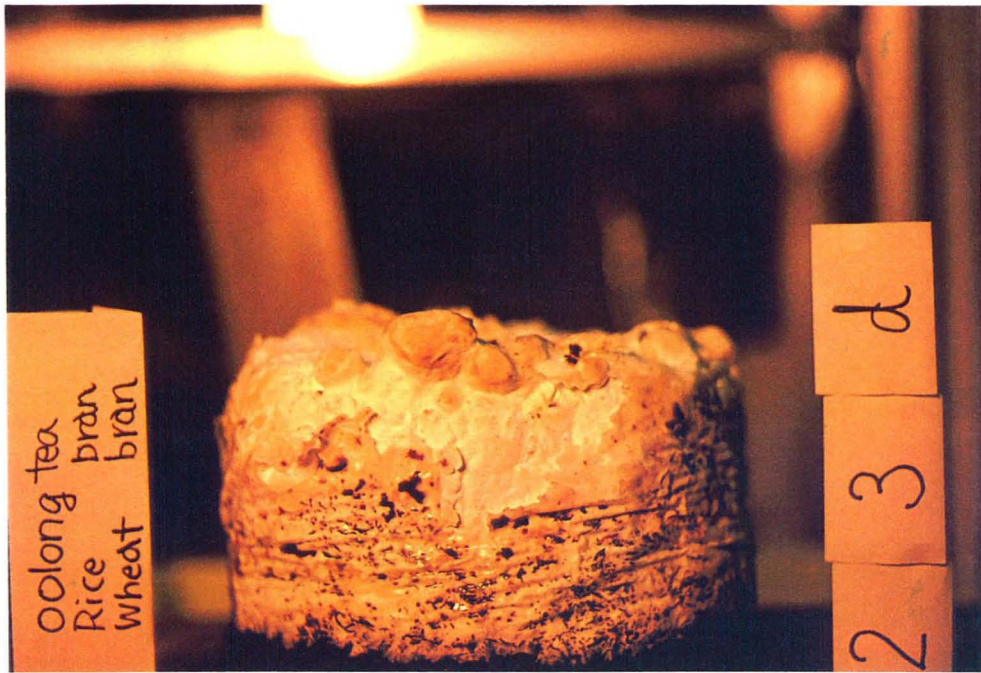


図3-30 副資材入り烏龍茶抽出粕固体培地を用いた
Ganoderma lucidum の培養例 5/6



図3-30 副資材入り烏龍茶抽出粕固体培地を用いた
Ganoderma lucidum の培養例 (55日) 6/6

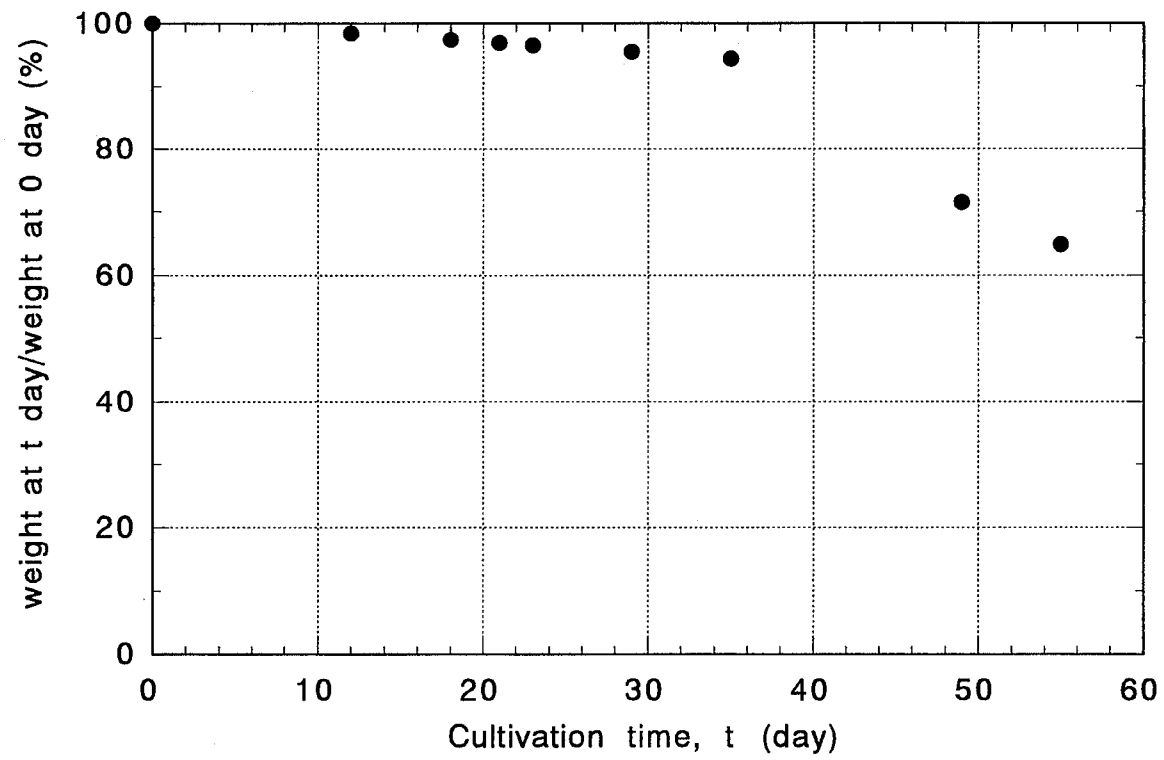


図3-31 副資材入り烏龍茶抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の重量経時変化

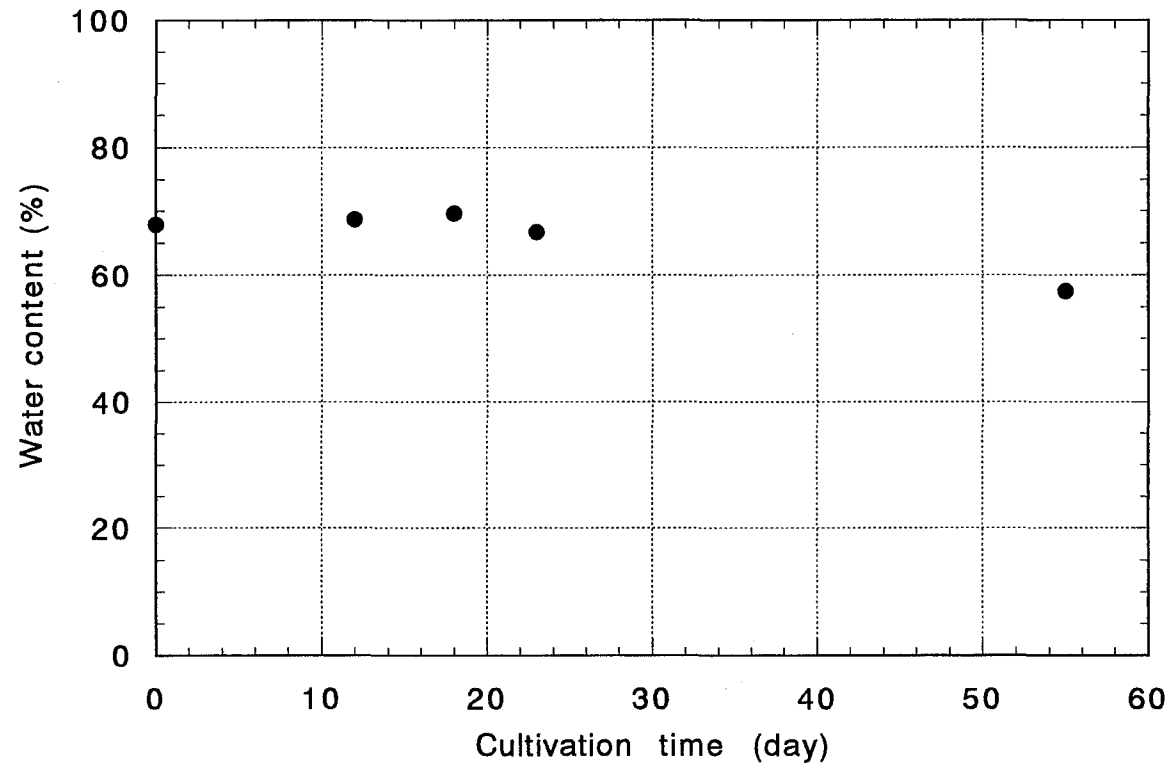


図3-32 副資材入り烏龍茶抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の水分含有量経時変化

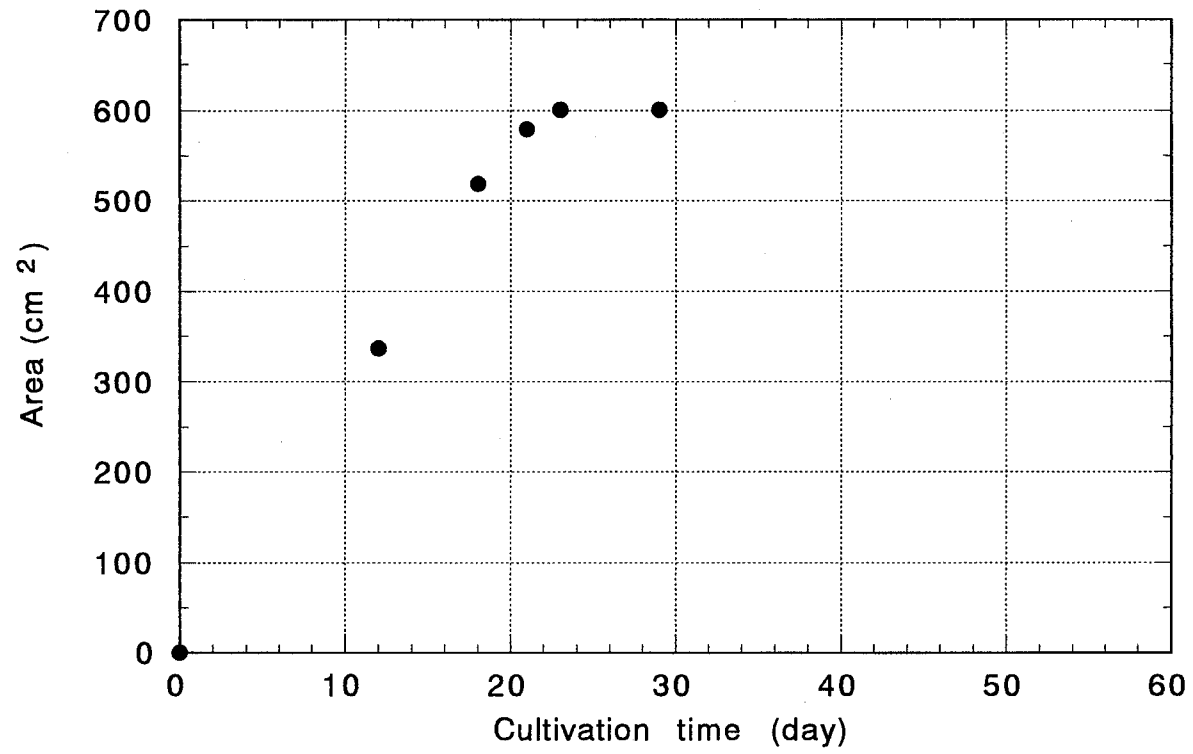


図3-33 副資材入り烏龍茶抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の菌糸生育面積経時変化

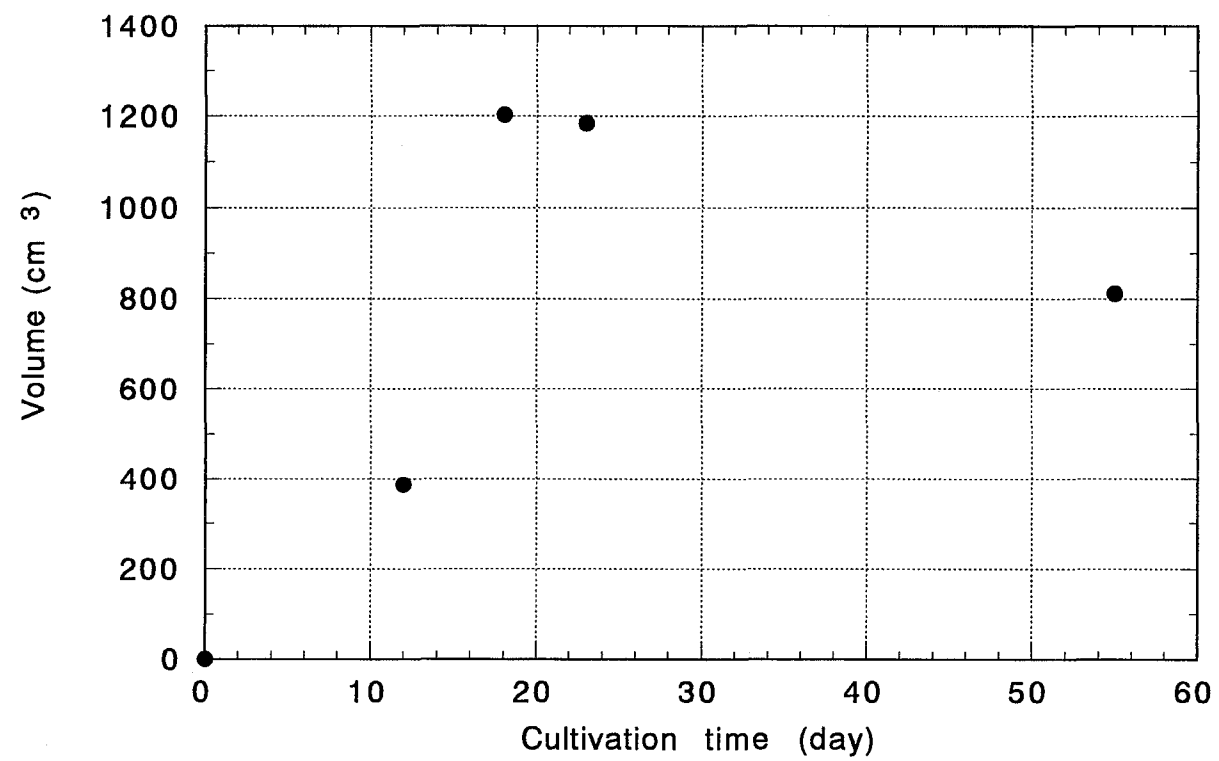


図3-34 副資材入り烏龍茶抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の菌糸生育体積経時変化

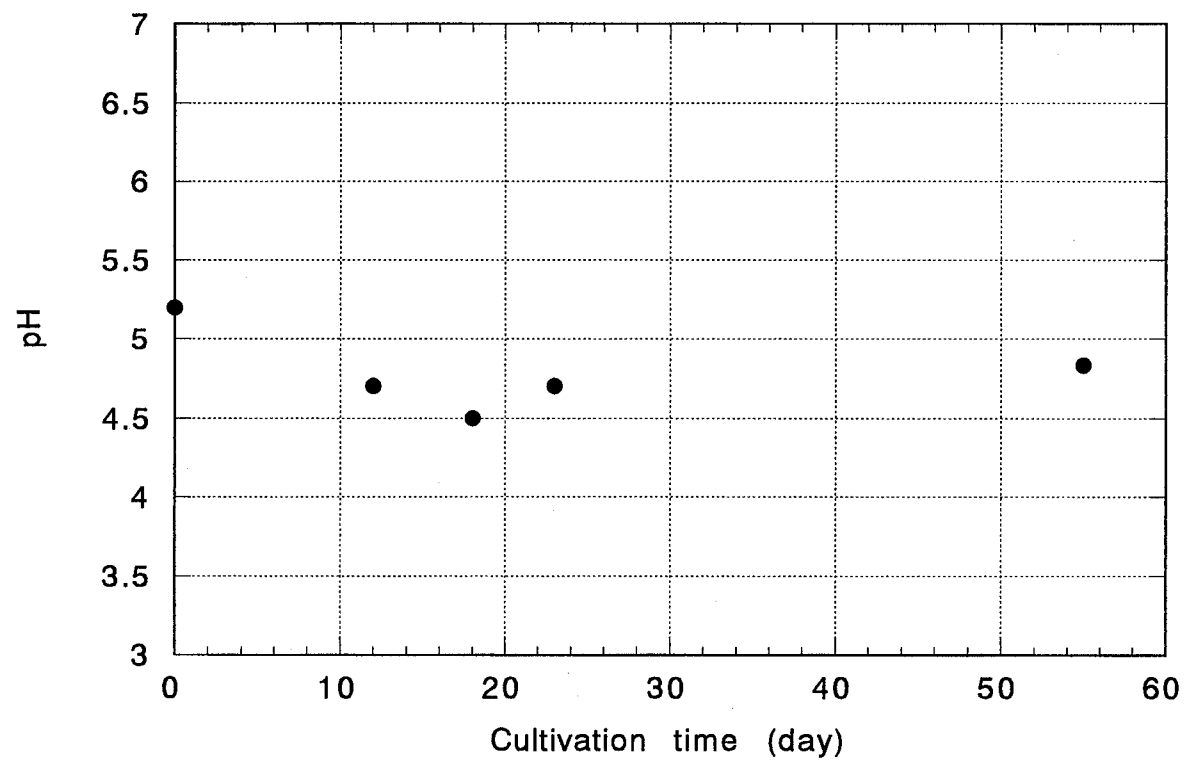


図3-35 副資材入り烏龍茶抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床のpH経時変化

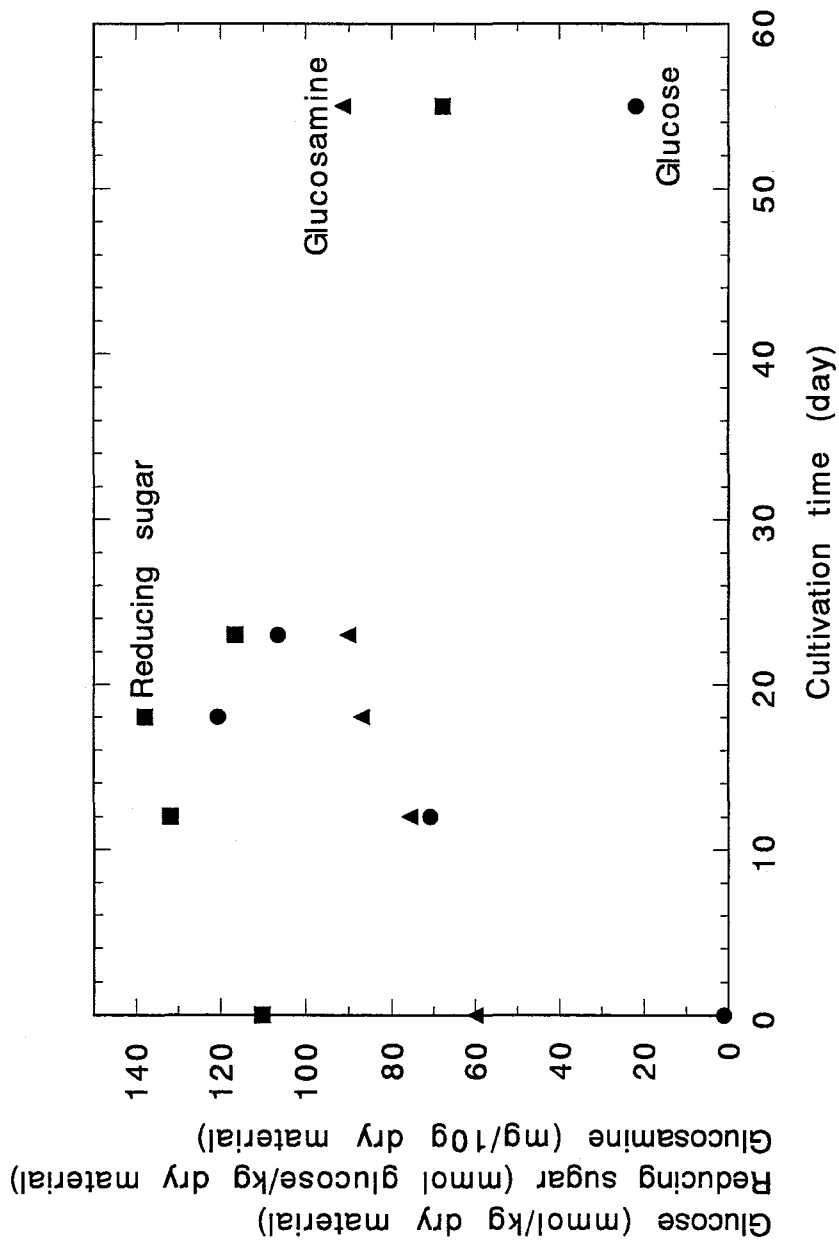


図3-36 副資材入り烏龍茶抽出粕固体培地を用いた *Ganoderma lucidum* 培養菌床の成分経時変化

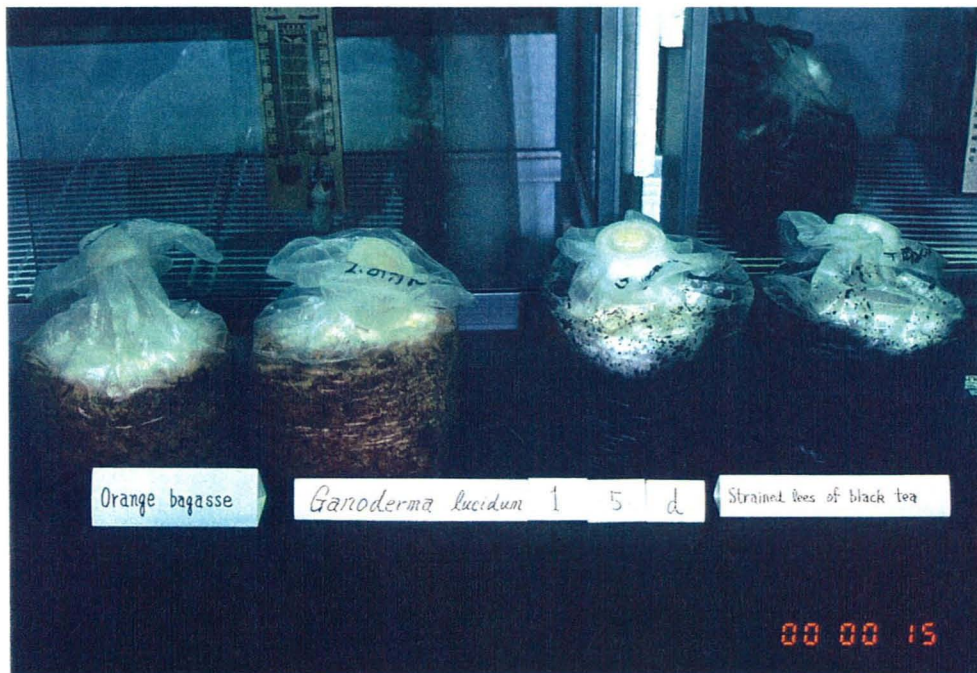


図 3 - 3 7 紅茶抽出粕固体培地（右側 2 個）を用いた
Ganoderma lucidum の培養例



図3-37 紅茶抽出粕固体培地（右側2個）を用いた
Ganoderma lucidum の培養例



図3-37 紅茶抽出粕固体培地（右側2個）を用いた
Ganoderma lucidum の培養例

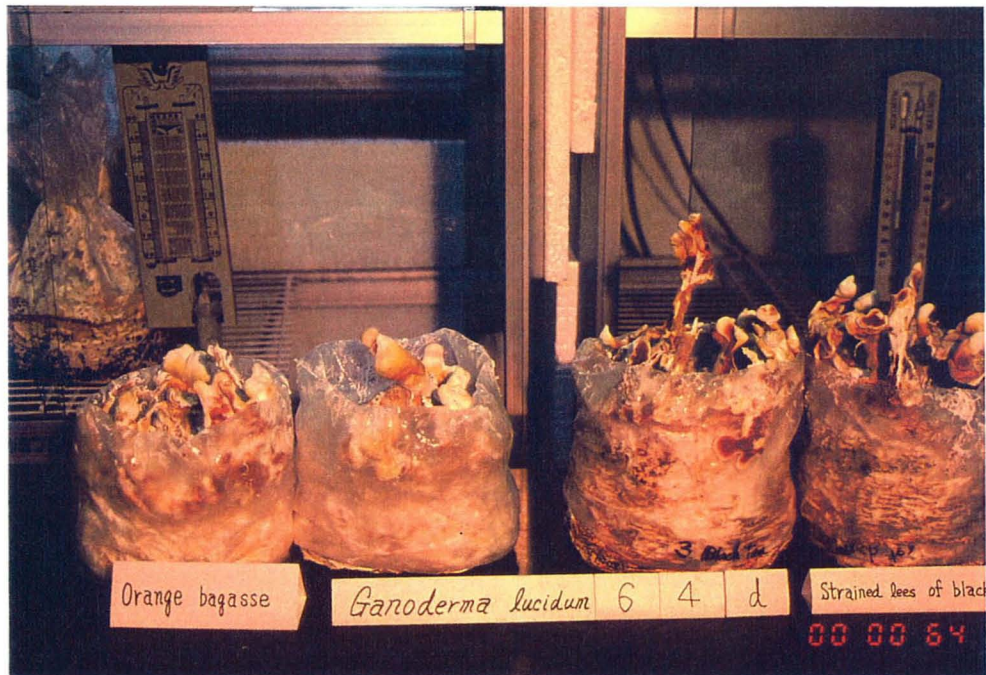


図3-37 紅茶抽出粕固体培地（右側2個）を用いた
Ganoderma lucidum の培養例



図 3 - 3 7 紅茶抽出粕固体培地（右側 2 個）を用いた
Ganoderma lucidum の培養例

謝 辞

本研究の遂行にあたり次の方々に大変お世話になりました。心より御礼申し上げます。また、今後とも御指導御鞭撻をお願いいたします。

森永 力 先生	広島県立大学
永井 光宣 先生	広島県立吉田高等学校
高橋 義人 氏	中国きのこバイオセンター 〒720-1624 広島県神石郡油木町字上野 TEL08478-2-2055
清川 満 氏	清川チップ工業 〒720-1621 広島県神石郡油木町大字李229番地 TEL08478-2-2411
土井 憲司 氏	土井菌茸有限会社 〒724-0611 広島県賀茂郡黒瀬町大多田396-3 TEL0823-82-8977
筒本 真成 氏	宝積飲料株式会社 〒739-0267 東広島市志和町大字別府字長坪2061-3 TEL0824-33-4959
山中 勝次 氏	ホクト産業株式会社きのこ研究所 〒381-0008 長野市大字下駒沢800-8 TEL0262-96-3211
株式会社 ヒロシマ・コープ	〒729-0400 広島県豊田郡本郷町195-1 TEL084886-3355
株式会社 佐竹製作所	〒739-8602 東広島市西条西本町2-30 TEL0824-23-3111
原田 雅美 氏	
岡野 健治 氏	
中野 靖久 助教授	広島市立大学情報科学部
末原 憲一郎 助手	広島市立大学情報科学部

(順不同)

補 足 グルコサミン定量条件の検討

はじめに

担子菌の菌床栽培において、菌床中の菌糸量は、菌類の細胞壁に多く存在するキチン、キトサンを加水分解することによって得ることのできるグルコサミンを測定して、増殖の指標としてきた(1)。しかし、グルコサミンの定量は反応条件の影響を受けやすい不安定な測定方法であるため、研究に先立ち、反応条件の検討を行なった。

方 法

A-1 菌床試料の調製

第三章で述べた方法により蜜柑搾汁粕を培地にして栽培した *Ganoderma lucidum* (霊芝・マンネンタケ) の菌床1袋ごとによく混合し、できるだけ均一にした。混合された菌床から一部採取した菌床試料を105℃の乾燥器内にて乾燥させ、粉碎機(三田村理研Ultra Centrifugal Mill ZM1,メッシュ 0.2mm)で粉碎した。得られた粉末試料を分析用試料として用いた。

A-2 グルコサミン量の分析方法

・操作方法の概略

- ① 乾燥重量を基準にしてサンプルを取る。
- ② 濃硫酸下で長時間放置する。
- ③ 1N H₂SO₄まで水で希釈し、オートクレーブにかける。
- ④ pH=7.0に調整する。
- ⑤ 一定量にメスアップする。
- ⑥ アセチル化を行う。
- ⑦ 発色反応させる。
- ⑧ OD₅₃₅で測定を行なう。

粉碎機で粉碎した粉末試料を35mm×100mmの栓付試験管に入れ、H₂SO₄を5ml加え、室温

に放置した。その後、硫酸濃度が1Nになるまで蒸留水を加えて希釈し、オートクレーブ（121℃）して酸加水分解を行った。この分解物を60%NaOHを用いてpH=7.0に調整し、濾紙No.2A（φ110）を用いて濾過を行ない濾液をメスアップした。20×120mmの栓付試験管に標準液と試料をそれぞれ0.5mlずつとアセチルアセトン試薬（表A-1参照）0.5mlを加えて、よく混合した後、湯浴中に入れてアセチル化を行った。氷中で冷却した後、3mlの96%エタノールと0.5mlのエールリッヒ試薬（表A-2参照）を加えて発色させ、OD₅₃₅を測定した。なお、標準液（0~100 μgグルコサミン/ml）も同時に反応させ、OD₅₃₅を測定した。

この時、アセチル化や発色反応は大変温度の影響を受けやすいため、温度むらがあるべくできないように注意した。

0.5N Na ₂ CO ₃	50.0ml
アセチルアセトン	1.0ml

p-Dimethylaminobenzaldehyde(DMAB)	0.8g
(CH ₃) ₂ NC ₆ H ₄ CHO	
濃硫酸	30.0ml
96% エタノール	30.0ml

結果と考察

・検討箇所と内容

- ① サンプル量と硫酸の割合
- ② 硫酸添加後の放置時間
- ③ オートクレーブをかける時間
- ⑥ アセチル化を行う時間と温度
- ⑦ 発色反応を行う時間と温度

A-1 サンプル量と濃硫酸の割合の検討

粉末試料をある濃度の硫酸中に24時間置いた。水を用いて1N H₂SO₄になるように希釈した後、1時間オートクレーブした。アセチル化の条件は95℃、20分間であり、発色反応の条件は60℃、15分間とした。その結果を表A-3に示す。

表A-3 グルコサミンの定量における試料の量と硫酸濃度の影響

No.	H ₂ SO ₄ (%)	サンプル量(g)	Glucosamineの平均値 (mg/g dry菌床)
1	50	0.5g/5ml H ₂ SO ₄	6.8600
2	60	0.5g	6.6313
3	70	0.5g	7.0427
4	50	1.0g	5.1152
5	60	1.0g	4.9498
6	70	1.0g	5.4635

以上の結果より、測定値はH₂SO₄の濃度には大きく影響されなかった。文献(1)によると、硫酸濃度が50%から上がるにつれてグルコサミン量がだんだん減少していく傾向にあったので、本研究では50%を用いることとした。

また、サンプル量と硫酸の液量については、条件1、2、3の方がグルコサミン量が高い値になったため、サンプル0.5g、硫酸5mlの割合で行うことにした。

A-2 硫酸下での放置時間

粉末試料を硫酸中に放置した後、水を用いて1N H₂SO₄になるように希釈し、1時間オートクレーブした。アセチル化の条件は95℃、20分間であり、発色反応の条件は60℃、15分間とした。その結果を表A-4に示す。

表A-4 グルコサミンの定量における硫酸下での放置時間の影響

No.	放置時間 (h)	H ₂ SO ₄ 濃度(%)	Glucosamineの平均値 (mg/g dry菌床)
1	0	50	7.6872

2	6	50	7.9686
3	12	50	7.9245
3'	12	70	7.5674
4	18	50	8.3642
5	24	50	7.7823
6	30	50	8.4125

以上の結果より50%の硫酸を使用し、18時間以上放置するとほぼ一定のグルコサミン値になるため、放置しておく時間は18時間とした。

A-3 オートクレーブ処理の時間

室温にて粉末試料を18N（50%）硫酸中に18時間放置した後、水を用いて1N H₂SO₄になるように希釈し、オートクレーブ処理を行なった。アセチル化の条件は95℃、20分間であり、発色反応の条件は60℃、15分間とした。その結果を表A-5に示す。

表A-5 グルコサミンの定量におけるオートクレーブ処理時間の影響

No.	オートクレーブする時間 (h)	Glucosamineの平均値 (mg/g dry菌床)
1	0	5.7255
2	0.5	7.4445
3	1.0	7.5970
4	1.5	7.2470
5	2.0	7.1607

以上の結果より、オートクレーブの時間は0.5から1時間が良好であるので、今後は1時間の処理を行うこととした。

A-4 アセチル化を行う温度と時間

室温にて粉末試料を60%硫酸中に12時間放置した後、水を用いて1N H₂SO₄になるように希釈し、オートクレーブ処理を1時間行なった。100℃にてアセチル化反応処理をした後、発色反応は60℃、10分間で行なった。その結果を表A-6からA-11に示す。

表A-6 グルコサミンの定量におけるアセチル化（温度100℃）を行う時間の影響

時間(min)	Glucosamineの平均値 (mg/g dry菌床)
20	7.1375
30	4.8423
40	6.4841

表A-7 グルコサミンの定量におけるアセチル化（温度60℃）を行う時間の影響

時間(min)	Glucosamineの平均値 (mg/g dry菌床)
20	31.9154
30	25.1270
40	23.8751

表A-8 グルコサミンの定量におけるアセチル化（温度100℃）を行う時間の影響

時間(min)	Glucosamineの平均値 (mg/g dry菌床)
20	7.0292
30	7.7678
40	-

∴ 40minの標準曲線にバラツキがあった為、測定できなかった。

表A-9 グルコサミンの定量におけるアセチル化（温度80℃）を行う時間の影響

なお、発色反応条件は温度60℃、15分で行なった。

時間(min)	Glucosamineの平均値 (mg/g dry菌床)
20	12.0609 (run1)
20	12.3560 (run2)

表A-10 グルコサミンの定量におけるアセチル化（温度95℃）を行う時間の影響

なお、発色反応条件は温度60℃、15分で行なった。

時間(min)	Glucosamineの平均値 (mg/g dry菌床)
20	7.1668 (a)
20	7.2924 (b)

(a) 試料の量 1.0ml, (b) 試料の量 0.5ml

以上の結果から、反応温度が低いほどグルコサミン量の値が高い。原因として、温度が低い場合、グルコサミン以外の物質に反応していると考えられる。また、サンプル量が1.0mlでも、0.5mlでもほとんど影響がなかったため、0.5mlを用いる。

次に、反応温度95℃の時の経時変化を追った。

表A-11 グルコサミンの定量におけるアセチル化反応（温度95℃）の経時変化
なお、発色反応条件は温度60℃、15分で行なった。

時間(min)	Glucosamineの平均値 (mg/g dry菌床)
10	11.4726
20	13.2890
30	11.8558
45	9.5507
60	8.2071

以上の結果より、アセチル化反応の条件は20分、95℃とした。

A-5 発色反応を行う温度と時間

室温にて粉末試料を60%硫酸中に12時間放置した後、水を用いて1N H₂SO₄になるように希釈し、オートクレーブ処理を1時間行なった。60℃、20分のアセチル化反応後、60℃における発色反応の時間を検討した。その結果を表A-12に示す。

表A-12 グルコサミンの定量における発色反応（温度60℃）を行う時間の影響

時間(min)	Glucosamineの平均値 (mg/g dry菌床)
---------	---------------------------------

(補足-6)

15	38.9803
30	37.2502
45	31.1209
60	31.9336

この結果より，発色反応時間は15分とした。

A-6 反応回収率の検討1

操作⑥の温度 60℃, 20 分,操作⑦の温度 60℃, 15分の条件の再現性について検討するとともに，既知量のグルコサミンを添加した時の回収率について検討した。その結果を表A-13に示す。

表A-13 グルコサミンの定量における回収率1

Sample No.	Glucosamineの平均値 (mg/g dry菌床)
1	27.2308
2	28.5133
Sample 1;サンプル	1ml
Sample 2;サンプル	0.9ml + 50(μgグルコサミン/ml) 0.1ml

Sample 2の既知量は,

$$27.2308 \times 9/10 + 5 = 29.5077 (\mu\text{g/ml})$$

$$16.4580 \times 2 = 32.9160 \quad \text{回収率は96.63\%であった。}$$

A-7 反応回収率の検討2

操作⑥の温度 95℃, 20 分,操作⑦の温度 60℃, 15分の条件の再現性について検討するとともに，既知量のグルコサミンを添加した時の回収率について検討した。その結果を表A-14に示す。

表A-14 グルコサミンの定量における回収率2

Sample No.	Glucosamineの平均値 (mg/g dry菌床)
------------	---------------------------------

(補足-7)

3 7.9161

4 16.2673

Sample 3 ; サンプル 0.50ml

Sample 4 ; サンプル 0.25ml + 50(μ g/ml) 0.25ml

Sample 3の既知量は、

$$15.8321 \times 0.25 + 50 \times 0.25 = 16.4580$$

回収率は98.84%であった。

95°Cのほうが高い収率を得ることができた。また、再現性と回収率ともに良好な結果が得られた。

A-8 蒸留水と中和水の影響について

100°Cと60°Cにおけるグルコサミン量の値が大きく異なるため、標準液調製に蒸留水を使用していることが影響しているか否かについて調べた。なお、各条件は操作⑥の温度60°C、時間 20,40 分、⑦の温度60°C、時間15分で行なった。

表A-15 グルコサミンの定量における水の影響

Sample	1		2	
	(20min)	(40min)	(20min)	(40min)
Glucosamineの平均値	31.8065	25.8062	33.2286	25.5856
(mg/g dry 菌床)				
sample 1: 標準液	50 μ g/ml	100 μ g/ml	それぞれ1.0ml	
2: 標準液	50 μ g/ml	100 μ g/ml	それぞれ0.5ml	
50% H ₂ SO ₄ を60% NaOH で中和した中和水をそれぞれ0.5ml				

蒸留水、中和水ともに測定に影響しないといえる。

まとめ

以上の結果、測定条件をまとめると以下のようなになる。

- ・ サンプルの粒子の大きさを一定にするため粉碎機にかける。
- ・ 硫酸の濃度 50%
- ・ 硫酸に入れて室温に放置しておく時間 18hour
- ・ オートクレーブする時間 1hour
- ・ サンプル（乾燥しているもの）量と硫酸の液量
0.5g sample/5.0ml 50% H₂SO₄

アセチル化，発色反応条件：操作⑥ 95°C，20min

操作⑦ 60°C，15min

すなわち，反応条件は以下のようなものである。採取した菌床試料を乾燥させ，粉碎機（三田村理研Ultra Centrifugal Mill ZM1，メッシュ 0.2mm）で粉碎した後，0.5gを35mm×100mmの栓付試験管に入れ，18N H₂SO₄を5ml加え，18時間室温に放置した。その後硫酸濃度が1Nになるまで蒸留水を加えて希釈し，121°C，1時間オートクレーブして酸加水分解を行う。この分解物を60%NaOHを用いてpH7.0に調整し，濾紙No.2A（φ110）を用いて濾過を行ない濾液をメスアップする。20×120mmの栓付試験管に標準液と試料をそれぞれ0.5mlずつとアセチルアセトン試薬（表A-1参照）0.5mlを加えて，よく混合した後，95°C，20分間アセチル化を行う。その後，氷中で冷却したあと3mlの96%エタノールと0.5mlのエールリッヒ試薬（表A-2参照）を加えて60°C，15分間発色させた後OD₅₃₅を測定する。（なお，標準液は0~100μgグルコサミン/mlになるように調整する。）

参考文献

- 1 Akima,K. and Uozumi,T.; Agr. Biol. Chem. 31(1), 119 (1967).

（補足-9）

寄贈 矢野 卓雄 氏