

担子菌類菌糸体のペレット形状に着目した  
効率的培養方法に関する研究

2022年3月

奥村亮祐

## 目次

緒論	2
第1章 Tween 及び寒天がヤマブシタケ菌糸体培養へ与える影響について	3
1.1. 緒言	3
1.2. 実験	3
1.2.1 微生物	3
1.2.2 培地および培養方法	4
1.2.3 添加剤を用いた培養	4
1.2.4 フラスコ形状	4
1.2.5 分析方法	5
1.3. 結果と考察	5
1.3.1 Tween シリーズが菌糸体生産および $\beta$ -グルカン生産へ与える影響	5
1.3.2 寒天の添加が菌糸体生産および $\beta$ -グルカン生産へ与える影響	9
1.3.3 バッフル付き三角フラスコによる培養検討	12
1.3.4 バッフル付き三角フラスコ内における寒天及び Tween80 が菌糸体および $\beta$ -グルカン生産に与える影響	14
1.4. 結言	16
1.5. 引用文献	16
第2章 攪拌条件及びフラスコ形状がハナビラタケ菌糸体培養へ与える影響について	18
2.1. 緒言	18
2.2. 実験	20
2.2.1 微生物	20
2.2.2 培地および培養方法	20
2.2.3 分析方法	23
2.3. 結果と考察	23
2.3.1 振盪培養と攪拌培養及び通常フラスコとバッフル付きフラスコによる培養の比較	23
2.3.2 攪拌培養における攪拌速度の検討	28
2.3.3 攪拌培養における培地量の検討	33
2.3.4 均質化处理が菌糸体培養へ与える影響	36
2.4. 結言	40
2.5. 引用文献	40
結論	44
謝辞	45

## 緒論

担子菌類は真菌類に属し、その可食部である子実体は一般的にキノコとして古くから親しまれている。近年、キノコには様々な生物的、免疫学的な活性があることが明らかになってきている。生理活性をもつ代表的なキノコには *Ganoderma lucidum* (マンネンタケ)、*Lyophyllum decastes* (ハタケシメジ)、*Schizophyllum commune* (スエヒロタケ)、*Lyophyllum shimeji* (ホンシメジ)、*Agaricus blazei* (アガリクス) などが挙げられる。特に *Hericium erinaceus* (ヤマブシタケ) は古くから中国で生薬として、胃炎や肝炎の症状改善、強壮といった効果に用いられてきた。近年では神経成長因子合成促進物質が見つけられており、アルツハイマー型認知症の改善に効果を示すことも期待されている。また、*Sparassis crispa* (ハナビラタケ) は日本に自生するが発生量が少なく夏の短期間のみ生育する事から幻のキノコと呼ばれてきた。抗腫瘍活性を有するとされる  $\beta$ -グルカンを多く含み、コレステロール値上昇抑制効果や高血圧抑制効果があるとされている [1]。

担子菌類の培養において、子実体の形成・栽培には最適日照時間、強度が必要であり、更に温度と湿度の管理が必要不可欠であり、菌糸体培養に比べると栽培期間が長いという特徴がある。従って担子菌類由来の高機能物質を得るために、より短期間で効率的な菌糸体培養の方法が求められている。

本研究では担子菌類菌糸体の効率的な培養方法の確立を目的とし、第 1 章では *H. erinaceus* 菌糸体の培養において Tween シリーズや寒天による効率的な培養方法を検討し、第 2 章では *S. crispa* 菌糸体の培養において新しい攪拌方法による効率的な培養方法の検討を行った。糸状菌は液体培地ではペレットと呼ばれる球状を形成し生長する。各章において菌糸体が液体培地中で形成するペレット形状に着目し、液体培地における菌糸体の形状と菌糸体生産量及びグルカン生産量の関係性について研究を行った。

## 引用文献

[1] “種子植物・菌類を利用した健康食品中の有害な成分に関する調査” 食品安全委員会(2004年3月31日)

## 第 1 章 Tween 及び寒天がヤマブシタケ菌糸体培養へ与える影響について

### 1.1. 緒言

*Hericium erinaceus*(日本名ヤマブシタケ)は生理活性があるキノコとして知られている。その多糖類は、癌、胃潰瘍、糖尿病、高脂血症、肝障害、神経変性疾患などの主要な疾患を予防や緩和に効果がある事が知られている[1-4]。特に  $\beta$ -グルカンには、抗がん作用、抗炎症作用、免疫調整作用などの生物学的活性を有することが知られている。この主要な生理活性化合物である  $\beta$ -グルカンは、水溶性、粘性、ゲル化などの特異な物性を有していることから、食品業界などでの利用が進んでいる[5]。そのため、大規模で一年中を通じて生産ができることが求められている。多糖類は、担子菌類の子実体、培養菌糸、培養液中から分離することができる。

子実体の培養は、木や穀物、おがくずなどの基材を用いた菌床栽培では、収穫までに 2~3 ヶ月を要し、その生育には季節性があるため供給が不安定になりやすい。液体培地を用いた菌糸体の培養であれば、より短い培養期間(8~10 日)で工業的規模での多糖類生産が可能となる[6]。しかし、*H. erinaceus* の液体培地による菌糸体の培養と  $\beta$ -グルカンの生産に関する研究は数少ない。Tween80 は、*Grifola frondosa* (マイタケ) [7]、*Schizophyllum commune* (スエヒロタケ) [8]、*Pleurotus tuber-regium* (ヒラタケ) [9]などの担子菌類の菌糸体と菌体外多糖の生産に最も適した界面活性剤の一つであることが知られている。また、Tween80 により細胞膜の透過性が著しく増加するとも考えられている。この細胞膜透過性の増加は、細胞膜中の不飽和脂肪酸の組成や含有量の変化に起因すると考えられ、栄養分の取り込みや、 $\beta$ -グルカンなどの代謝物の分泌を促進する可能性があると考えられる[10-12]。

本研究では、Tween シリーズの界面活性剤と寒天を用いて、*H. erinaceus* の振盪培養における菌糸体の成長と  $\beta$ -グルカンの生産に及ぼす影響を調べた。寒天は菌糸の凝集を防ぎ、ペレットを小型化するために使用した。次にバッフル付きの三角フラスコの使用が、菌糸の成長と  $\beta$ -グルカンの生産に及ぼす影響を調べた。最後に、バッフル付き三角フラスコでの添加物を用いた培養を検討した。

### 1.2. 実験

#### 1.2.1 微生物

*H. erinaceus* の菌糸は、尾瀬商事株式会社よりご提供いただき、ポテトデキストロース寒天培地(和光純薬工業株式会社)で 25℃で培養した。

### 1.2.2 培地および培養方法

前培養はポテトデキストロース寒天培地から採取した菌糸を、0.4M フタル酸 (pH5.0) で緩衝した基礎培地を 50 mL 入れた 200 mL の三角フラスコに接種した。(基礎培地; グルコース 30 g/L、ポリペプトン 6.3 g/L、酵母エキス 0.2 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L) すべての培地成分は和光純薬から購入した。菌糸体を摂取したフラスコは前培養としてロータリーシェーカー (TAITEC、Bio-Shaker BR-300LF) を用いて、25°C で 100rpm、7 日間培養した。

本培養は、60 mL の基礎培地を入れた 300 mL の三角フラスコで行った。前培養液をポリトロンホモジナイザー (Model PT-MR 2100、Kinematica AG、Switzerland) を用いて 15000 rpm で 20 秒間均質化した。均質化した前培養液を 2%(v/v) となるように本培養液に接種した。その後、三角フラスコを 25°C で 100 rpm で培養した。培養期間は、グルコース濃度が 0 g/L に達した日とした。菌糸の形態的特徴を肉眼で観察し、各フラスコから採取した菌糸体で平均ペレット径を測定した。各サンプルについて、少なくとも 20 個のペレットの直径を定規により測定し平均ペレット径を求めた。培養は 2 回実施し、その平均値を示した。

### 1.2.3 添加剤を用いた培養

界面活性剤 Tween シリーズとして Tween20、Tween40、Tween60、Tween80、または寒天の添加が *H. erinaceus* の培養に及ぼす影響を調べた。使用した Tween シリーズの濃度は、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0%(w/v)、寒天の濃度は 0.05、0.1、0.2、0.3%(w/v) とした。これらの添加剤を液体培地に添加し、前述したようにロータリーシェーカーを用いて 25°C で 100 rpm で振盪培養を行った。

### 1.2.4 フラスコ形状

また、使用したフラスコの種類による培養条件の比較も行った。培養に使用したフラスコは、バッフル付き及びバッフルなしの通常の三角フラスコである。300 mL のバッフル付き三角フラスコは、高さ 7.0 cm、幅 1.0 cm、深さ 0.8 cm の 3 つのくぼみを持つフラスコ (SIBATA、Erlenmeyer flask、narrow neck、Borosilicate Glass、SIBATA SCIENTIFIC TECHNOLOGY、Japan) を使用した。

### 1.2.5 分析方法

培養終了後、ADVANTEC no.131 ろ紙を用いて培養液から菌糸をろ過した。ろ過した菌糸体を 300 mL の蒸留水で洗浄し、35°C で 2 日間風乾させた。その後、シリカゲルを入れた真空デシケーターに入れ、室温で保存し、乾燥細胞重量(DCW)を測定した。グルコース濃度は、ムタロターゼ GOD 法(Glucose C-Test ; 和光純薬、大阪、日本)で測定した。

乾燥菌体における  $\beta$ -グルカン含有量は、Mushroom and Yeast-glucan Assay Kit (Megazyme International Ireland Ltd., Bray Business Park, Co. Wicklow, Ireland) を用いて測定した。

それぞれの測定は少なくとも 2 回実施した。

### 1.3. 結果と考察

#### 1.3.1 Tween シリーズが菌糸体生産および $\beta$ -グルカン生産へ与える影響

*H. erinaceus* 培養の目的は DCW と  $\beta$ -グルカンを得ることである。これらの成分の生産を促進するために、界面活性剤である Tween シリーズの添加が液体培地における *H. erinaceus* の生育に与える影響を調べた。既に界面活性剤 Tween80 の添加が冬虫夏草の菌糸成長と菌体外多糖の生産に及ぼす影響が調査されている[13]。具体的には、Tween80 を添加する事により DCW と菌体外多糖の生産量が増加し、菌体外多糖の生産量は、1.5%の Tween80 を添加した場合に最大値が得られ、コントロールと比較して 2 倍となったことが報告されている。

Fig.1-1 は、基礎培地における *H. erinaceus* の振盪培養時のグルコース消費と DCW の経時変化を表している。初期グルコース濃度 20.7g/L が 8 日間の培養期間中に 0 g/L となり、3.33 g/L の DCW が得られた。Tween シリーズが菌糸体培養に与える影響の調査として、Tween 20、40、60、80 をそれぞれ 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0%(w/v)の濃度で添加し培養を行った。その際の *H. erinaceus* の DCW、 $\beta$ -グルカン、およびコントロールに対する相対比を Table1-1 に示した。*H. erinaceus* の DCW は、Tween40、60、80 のいずれの濃度でも増加し、DCW のコントロールに対する相対比は 1.16~2.18 であった。最大 DCW は Tween80 を 4.0%(w/v)の濃度で添加した際に得られた。一方、 $\beta$ -グルカンの大幅な増加は、Tween 80 の濃度が 3.0%(w/v)と 4.0%(w/v)の高濃度の場合にのみ見られ、コントロールに対する相対比は、3.0%(w/v)で 1.86、4.0%(w/v)で 1.87 であった。

この結果から、Tween40 と 60 は菌体内に蓄積され、これらを添加しても  $\beta$ -グルカンなどの代謝物生成にはほとんど影響しないと推測される。また

*Ganoderma lucidum* (マンネンタケ) 菌糸体の振盪培養における菌体外多糖に対する Tween 80 の影響を調査した論文では、3 日目に 0.25%(w/v)の Tween 80 を添加したところ、DCW と菌体外多糖の生産量が最大となり、それぞれ 19.8%と 137.5%の増加が見られている[11]。このことから、Tween 80 は細胞膜の透過性を増加させることが判明した。細胞膜の透過性が増加することにより、栄養分の取り込み促進だけでなく、菌体外多糖生産のための生合成活性、更に菌体外多糖を分泌するための膜透過性を促進する可能性が考えられる[10,12]。

Tween80 は、ポリオキシエチレンソルビタンの脂肪酸エステルからなる。脂肪酸組成は主にオレイン酸であるが、パルミチン酸やリノール酸などの他の脂肪酸が含まれることもある。また、*P. tuber-regium* の培養において、培地に Tween 80 を添加すると、*P. tuber-regium* 菌糸体の脂質中に含まれる全脂肪酸量が増加し、特にオレイン酸量が有意に増加したという報告もある[12]。Tween80 に含まれるオレイン酸が *P. tuber-regium* 菌糸体の細胞膜に取り込まれ、その脂肪酸におけるオレイン酸が増加し、細胞膜の透過性が向上すると考えられている。また *Inonotus obliquus* (カバノアナタケ) の振盪培養において、オレイン酸と Tween80 が菌糸体と菌体外多糖の生産に好影響を与えたという調査もある。Tween 80 はリパーゼなどの酵素によって加水分解され、オレイン酸を培地中に供給している可能性がある[14]。Tween 80 の効果のひとつに、オレイン酸への変換が考えられる。オレイン酸は菌糸体と菌体外多糖の量を増加させることが知られているが[15]、4%(w/v)の Tween 80 を培地に加えると、DCW 中のグルカン含有量が減少した。この結果は、4%(w/v)以上の Tween 80 の添加は、DCW を増加させるが、 $\beta$ -グルカン生産には影響しない可能性を示唆している。一方で、すべての Tween シリーズにおいて、培養期間を短縮する効果は見られなかった。Tween20 の濃度が 2、3、4%(w/v)の場合、培養 4 日以降の段階で菌糸体の成長が著しく阻害され、グルコース消費の延伸が見られた。そのため、僅かな DCW となり  $\beta$ -グルカンも検出されなかった。同様の現象は、*G. frondosa* の振盪培養に Tween 20 を培地に添加した場合 (0.1-1.0%(w/v)) でも報告されている[7]。炭素鎖の短い界面活性剤は、細胞膜を損傷したり、細胞内の他の生体成分と相互作用したりして、細胞の生育を阻害するのではないかと推測された。

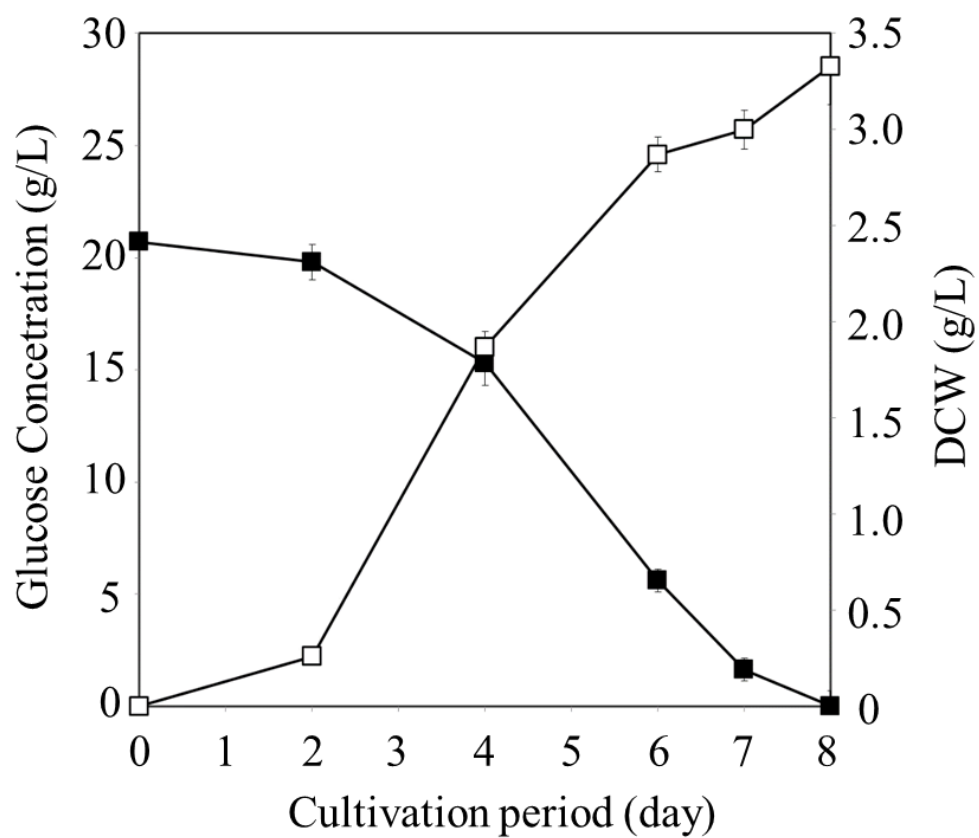


Fig. 1-1 Basal glucose consumption time course and growth curve of *Hericium erinaceus*  
 ■, glucose concentration (g/L); □, DCW production (g/L).



Table 1-1 Effects of Tween series surfactants on *Hericium erinaceus* cell growth and  $\beta$ -glucan production

Surfactant (‰(w/v))	Cultivation period (day)	DCW <sup>a</sup> (g/L)	DCW productivity (g/L/day)	DCW yield (%) <sup>b</sup>	$\beta$ -glucan (g/L)	$\beta$ -glucan productivity (g/L/day)	$\beta$ -glucan yield (%) <sup>c</sup>	Glucan content (%) <sup>d</sup>	
Control	8	3.33	0.42	16.1	0.65	0.081	3.1	19.52	
Tween 20	0.5	10	3.48	0.35	1.05	0.74	0.074	3.6	21.26
	1.0	9	3.64	0.40	1.09	0.88	0.098	4.3	24.18
	2.0	14	0.74	0.053	0.22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	3.0	12	1.01	0.084	0.30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	4.0	18	1.78	0.098	0.53	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tween 40	0.5	7	3.93	0.56	1.18	0.63	0.090	3.0	16.03
	1.0	7	4.90	0.70	1.47	0.77	0.110	3.7	15.71
	2.0	8	5.31	0.66	1.59	0.56	0.070	2.7	10.54
	3.0	10	5.24	0.52	1.57	0.82	0.082	4.0	15.65
	4.0	9	6.22	0.69	1.86	0.75	0.083	3.6	12.05
Tween 60	0.5	7	4.63	0.66	1.39	0.66	0.094	3.2	14.25
	1.0	8	4.04	0.51	1.21	0.66	0.083	3.2	16.33
	2.0	8	5.16	0.65	1.55	0.49	0.061	2.4	9.49
	3.0	9	5.48	0.61	1.64	0.80	0.089	3.9	14.60
	4.0	9	6.16	0.68	1.85	0.92	0.102	4.4	14.93
Tween 80	0.5	7	4.17	0.60	1.25	0.64	0.091	3.1	15.35
	1.0	7	3.87	0.55	1.16	0.71	0.101	3.4	18.35
	2.0	6	4.48	0.75	1.34	0.74	0.123	3.6	16.52
	3.0	8	6.06	0.76	1.82	1.21	0.151	5.8	20.00
	4.0	8	7.27	0.91	2.18	1.22	0.153	5.9	16.78

a, DCW, dry cell weight

b, DCW yield (%), [produced concentration of DCW (g/L) / glucose consumption (g/L)] x100

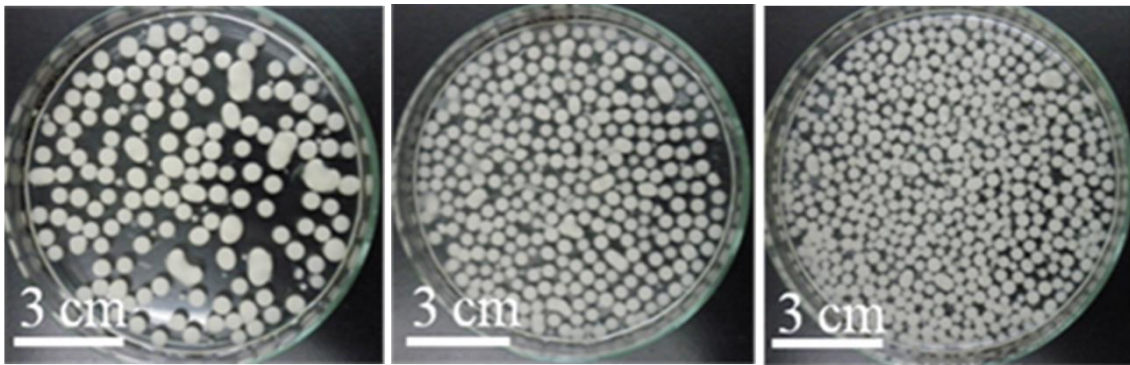
c,  $\beta$ -glucan yield (%), [produced concentration of  $\beta$ -glucan (g/L) / glucose consumption (g/L)] x100

d, Glucan content (%), [ $\beta$ -glucan (g/L) / DCW (g/L)] x 100

### 1.3.2 寒天の添加が菌糸体生産および $\beta$ -グルカン生産へ与える影響

糸状菌を液体培地で培養すると、ペレットと呼ばれる球状の細胞塊を形成する。菌糸のペレット化は、培養条件に依存し、糸状菌固有のものと考えられている。またペレットの形態や大きさは、代謝物の生産に大きな影響を与えることが知られおり、一般的に、大きなペレットでは中心部への酸素や栄養分が制限されるため、ペレット内部において細胞の自己分解が生じるとされている[16,17]。*Phanerochaete chrysosporium* (マクカワタケ) を培養して得られたペレットのうち、2 mm を超えるサイズの全てのペレットにおいて、中心部で自己消化が生じているという報告もある[18]。そこで、培地に寒天を加えることで培地の粘度を上昇させ、2 mm 以下のペレットとすることを目的として実験を行った。既に *G. lucidum* の培養において、様々な高分子化合物が菌糸成長に及ぼす影響が調査されている[19]。この調査では寒天を 0.4% (w/v) の濃度で添加する事により、培地の粘度が上昇し、菌糸の凝集を抑えてペレットを小型化することに成功している。

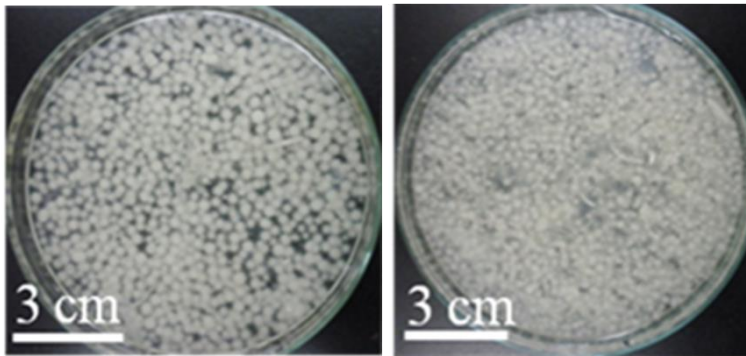
本研究では、0.05、0.1、0.2、0.3%(w/v)の寒天濃度を検討した。Fig. 1-2 は、培養終了時の寒天を添加した培地と添加していない培地における *H. erinaceus* の菌糸体のペレット形状を示している。写真でも分かるように寒天濃度の増加に伴い、ペレットサイズが明らかに小さくなっている。培養した *H. erinaceus* の DCW、 $\beta$ -グルカン、ペレットサイズ（直径）に対する寒天濃度の影響を Table 1-2 にまとめた。寒天なしの場合の 4.3 mm だったペレットの直径は、0.3%(w/v)の寒天を添加することにより直径 1.5 mm まで小さくなった。寒天を 0.3%(w/v)の濃度で添加した場合、DCW および  $\beta$ -グルカンの生産量は、コントロールに比べてほぼ 1.3 倍になった。一般に、ペレットのサイズが大きくなると、ペレットの中心部への栄養分、特に酸素の供給が制限されるようになり、生産性だけでなく二次代謝物の生産量にも影響すると言われている[19]。*Ganoderma pfeifferi* (霊芝) の菌糸体培養において、ペレットの形態は培地の pH と培地の攪拌速度に影響されることが報告されている[20]。この調査によるとペレットの直径が大きくなると DCW は増加し、分散した小さなペレットでは菌体外多糖や  $\beta$ -グルカンの生産性が増加していた。顕微鏡観察によると、寒天入りの培地には多くの寒天の結晶粒子が存在し、菌糸体の先端は結晶粒子に付着していた。また、結晶粒子は菌糸体よりも大きく、結晶粒子同士は結合しない。従って結晶粒子と菌糸が付着する事より菌糸同士の凝集が妨げられ、ペレットが小さくなると考えられている[19]。なお、本研究では、0.3%(w/v)の寒天濃度で目標である 2 mm 以下のペレットサイズ (1.5 mm) が得られたため、0.3%(w/v)よりも高い濃度での検討は行っていない。



(a) Without agar

(b) agar 0.05%(w/v)

(c) agar 0.1%(w/v)



(d) agar 0.2%(w/v)

(e) agar 0.3%(w/v)

Fig. 1-2 Micromorphologies of *Hericium erinaceus* mycelia in submerged culture

Table 1-2 Effects of agar on *Hericium erinaceus* cell growth, the production of  $\beta$ -glucan, and pellet diameter

		Cultivation period (day)	DCW (g/L)	Medium viscosity (mPa·s)	Peller diameter (mm)	$\beta$ -glucan (g/L)
Control		8	3.3	3.3	4.34 $\pm$ 0.9	0.65 $\pm$ 0.01
agar (%(w/v))	0.05	8	3.7	4.6	3.84 $\pm$ 0.5	0.70 $\pm$ 0.01
	0.1	7	3.8	9.6	3.08 $\pm$ 0.5	0.76 $\pm$ 0.03
	0.2	7	3.7	27.7	2.42 $\pm$ 0.5	0.73 $\pm$ 0.06
	0.3	6	4.3	48.7	1.5 $\pm$ 0.4	0.86 $\pm$ 0.05

### 1.3.3 バッフル付き三角フラスコによる培養検討

培養器が菌糸体の成長や代謝物の生成に与える影響を調べるために、通常の三角フラスコとバッフル付きの三角フラスコを用いて、*H. erinaceus* の振盪培養を行った。通常の三角フラスコとバッフル付き三角フラスコを用いた培養での *H. erinaceus* の DCW 生産量、 $\beta$ -グルカン生産量、ペレットサイズ（直径）を Table 1-3 にまとめた。バッフル付き三角フラスコでの DCW 生産量および  $\beta$ -グルカン生産量は、通常の三角フラスコに比べて約 1.2 倍となった。さらに、ペレットサイズ比較では、通常の三角フラスコでは 4.5 mm だったのに比べバッフル付き三角フラスコのペレットサイズは 1.6 mm と、バッフル付き三角フラスコを使用する事でペレットサイズを 2 mm 以下にする事ができた。*Trichophyton rubrum*（白癬菌）や *Laccaria trichodermophora*（キツネタケ）の菌糸体を通常の三角フラスコとバッフル付き三角フラスコを用いて振盪培養した研究報告もある[21,22]。これらの報告では、本研究と同様の傾向がみられ、バッフル付き三角フラスコを使用する事でペレットサイズの直径は小さく、通常の三角フラスコでは大きなペレットが形成された。バッフル付き三角フラスコの独特な形状が強い攪拌力を生じさせ、ペレットの微細化と効率的な空気の取り込みが可能となったと考えられる。ペレットが大きいと、酸素や栄養分の拡散が不足し、効率的な成長が抑制されるため、ペレットサイズのコントロールは重要である。

Table 1-3 Comparison of cell growth,  $\beta$ -glucan production, and pellet diameter in submerged cultures of *Hericium erinaceus* between normal and baffled Erlenmeyer flasks

	Cultivation period (day)	DCW <sup>a</sup> (g/L)	DCW productivity (g/L /day)	DCW yield (%) <sup>b</sup>	$\beta$ -glucan (g/L)	$\beta$ -glucan productivity (g/L/day)	Peller diameter (mm)
Normal Erlenmeyer flask	8	3.33	0.42	16.1	0.65	0.08	4.34
Baffled Erlenmeyer flask	6	4.76	0.79	24.7	0.89	0.15	1.61

a, DCW, dry cell weight

b, DCW yield (%), [produced concentration of DCW (g/L) / glucose consumption (g/L)] x100

c,  $\beta$ -glucan yield (%), [produced concentration of  $\beta$ -glucan (g/L) / glucose consumption (g/L)] x100

#### 1.3.4 バッフル付き三角フラスコ内における寒天及び Tween80 が菌糸体および $\beta$ -グルカン生産に与える影響

これまで添加物による培養の効率化、バッフル付き三角フラスコによるペレットの微細化検討をそれぞれ実施した。Fig.1-3 にこれらの組合せ検証を行った結果を示した。具体的には、バッフル付き三角フラスコを使用した振盪培養を行い、3.0%(w/v)の Tween 80 または 0.3%(w/v)の寒天を添加した際に得られた DCW 及び  $\beta$ -グルカン濃度を示した。その結果、バッフル付き三角フラスコと 0.3%(w/v)の寒天の組合せにおいてより培養期間が短くなり(5日間)、最も高いグルカン濃度 (1.89g/L) が得られた。しかし、Tween80 を 3.0%(w/v)添加した培地では効果が見られなかった。これは、Tween80 を添加しても粘度は低いままであり (3.0mPa $\cdot$ s)、コントロール (3.3mPa $\cdot$ s) と同程度である。従ってバッフルによる酸素の取り込み効率の向上が見られなかったためであると考えられる。一方で寒天を 0.3%(w/v)の濃度で加えると粘度は 48.7mPa $\cdot$ s とコントロールよりも高くなっていたため、バッフルによる攪拌力が大きく影響したと考えられる。

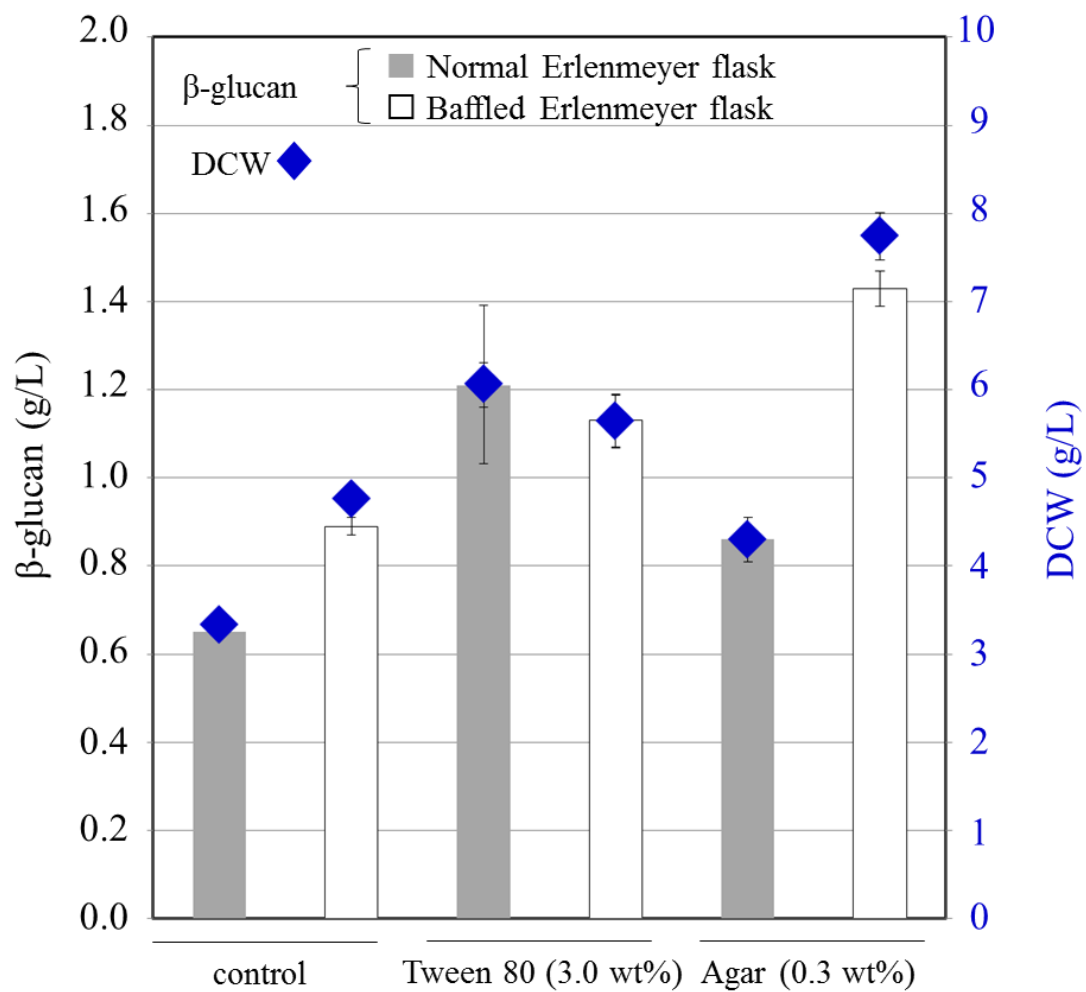


Fig. 1-3 Influence of Tween 80 (3.0%(w/v)) and agar (0.3%(w/v)) addition on *Hericium erinaceus* mycelial growth (DCW) and  $\beta$ -glucan production in normal and baffled Erlenmeyer flasks



#### 1.4. 結言

以上のことから、*H. erinaceus* の振盪培養用培地に Tween 80 や寒天を添加することで、細胞の増殖や  $\beta$ -グルカンの生産量を大幅に増加させることができた。また、バツフル付き三角フラスコがグルカン生産に効果があることがわかった。将来的には、攪拌効率を検証するためにラボスケールより大きなスケールでの実験が必要である。また、タンクスケールでの回分培養や連続培養による研究も必要であると考えられる。

#### 1.5. 引用文献

- [1] Cheng JH, Tsai CL, Lien YY, Lee MS, Sheu SC (2016) High molecular weight of polysaccharides from *Hericium erinaceus* against amyloid beta-induced neurotoxicity. BMC component BMC Complm Altern M 16: 1-9.
- [2] Lee JS, Hong EK (2010) *Hericium erinaceus* enhances doxorubicin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. Cancer Lett 297: 144-154.
- [3] Shang HM, Song H, Xing YL, Niu SL, Ding GD, Jiang YY, Liang F (2016) Effects of dietary fermentation concentrate of *Hericium caput-medusae* (Bull.:Fr.) Pers. On growth performance, digestibility, and intestinal microbiology and morphology in broiler chickens. J Sci Food Agric 96: 215-222.
- [4] Zhang Z, Pan GLH, Pandey A, He W, Fan L (2012) Antioxidant and hepatoprotective potential of endo-polysaccharides from *Hericium erinaceus* grown on tofu whey. Int J Biol Macromol 51:1140-1146.
- [5] Zhu F, Du B, Xu B (2016) A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. Food Hydrocolloids 52: 275-288.
- [6] Singh U, Gautam A, Singha TK, Tiwari A, Tiwari P, Sahai V, Sharma S (2020) Mass production of *Pleurotus eryngii* mycelia under submerged culture conditions with improved minerals and vitamin D2. Food Sci Technol-LEB 131:109665.
- [7] Hsieh C, Wang HL, Chen CC, Hsu TH, Tseng MH (2008) Effect of plant oil and surfactant on the production of mycelial biomass and polysaccharides in submerged culture of *Grifola frondosa*. Biochem Eng J 38:198-205.
- [8] Hao LM, Xing XH, Li Z, Zhang JC, Sun JX, Jia SR, Qiao CS, Wu TY (2010) Optimization of effect factors for mycelial growth and exopolysaccharide production by *Schizophyllum commune*. Appl Biochem Biotechnol 160:621-631.
- [9] Zhan BB, Chen L, Cheung PCK (2012) Proteomic insights into the stimulatory effect of Tween 80 on mycelial growth and exopolysaccharide production of an edible mushroom *Pleurotus tuber-regium*. Biotechnol Lett 34:1863-1867.
- [10] Sheng L, Zhu G, Tong Q (2013) Mechanism study of Tween 80 enhancing the

- pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. Carbohydr Polym 97:121-123.
- [11] Yang X, Yang Y, Zhang Y, He J, Xie Y (2020) Enhanced exopolysaccharide production in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* by Tween 80 supplementation. Bioprocess Biosyst Eng Published online.
- [12] Zhang BB, Cjeung PC (2011) A mechanistic study of the enhancing effect of Tween 80 on the mycelial growth and exopolysaccharide production by *Pleurotus tuber-regium*. Bioresour Technol 102:8323-8326.
- [13] Liu YS, Wu JY (2012) Effects of Tween 80 and pH on mycelial pellets and exopolysaccharide production in liquid culture of a medicinal fungus. J Ind Microbiol Biotechnol 39:623–628.
- [14] Breuil C, Schindler DB, Sijger JS, Kushner DJ (1978) Stimulation of lipase production during bacterial growth on alkanes. J Bacteriol 133:601–606.
- [15] Xu X, Quan L, Shen M (2015) Effect of chemicals on production, composition and antioxidant activity of polysaccharides of *Inonotus obliquus*. Int J Biol Macromol 77:143-150.
- [16] Grimm HL, Kelly S, Krull R, Hempel DC (2005) Morphology and productivity of filamentous fungi. Appl Microbiol Biotechnol
- [17] White S, McIntyre M, Berry DR, McNeil B (2002) The autolysis of industrial filamentous fungi. Crit Rev Biotechnol 22:1-14.
- [18] Zmak P.M, Podgornik A, Podogornik H, Koloini T (2006) Impact of pellet size on growth and lignin peroxidase activity of *Phanerochaete chrysosporium*. World J Microb Biot 22:1243-1249.
- [19] Yang FC, Yang MJ, Cheng SH (2009) A novel method to enhance the mycelia production of *Ganoderma lucidum* in submerged cultures by polymer additives and agitation strategies. J Taiwan Inst Chem E 40:148-154.
- [20] Supramani S, Jailani N, Ramarao K, Zain NAM, Klaus A, Ahmad R, Wan-Mohtar WAAQ.I (2019) Pellet diameter and morphology of European *Ganoderma pfeifferi* in a repeated-batch fermentation for exopolysaccharide production. Biocatal Agric Biotechnol 19:101118.
- [21] Bermek H, Gülseren I, Li K, Jung H, Tamerler C (2004) The effect of fungal morphology on ligninolytic enzyme production by a recently isolated wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LSK-27. World J Microb Biot 20:345-349.
- [22] Ángeles-Argáiz RE, Carmona-Reyes IA, Quintero-Corrales CA, Medina-Macias FJ, Blancas-Cabrera A, Valdez-Cruz NA, Ulloa M, Trujillo-Roldán MA (2020) From field sampling to pneumatic bioreactor mycelia production of the ectomycorrhizal mushroom *Laccaria trichodermophora*. Fungal Biol 124:205-218.

## 第 2 章 攪拌条件及びフラスコ形状がハナビラタケ菌糸体培養へ与える影響について

### 2.1. 緒言

キノコは古くから食用として知られている。現在では、その治療能力の高さに注目を浴び、新たな研究対象となっています。栄養面では、必須タンパク質、難消化性炭水化物、不飽和脂肪、ミネラル、各種ビタミンなどが豊富に含まれているため、消費量が増加し、さまざまな加工品が開発されている[1]。特にキノコ類の抗腫瘍活性について研究が進んでいる。キノコ類の治療メカニズムは、がん細胞の増殖の抑制、細胞周期相における細胞の割合の調節不能、オートファジーとファゴサイトーシスの誘導、免疫系の反応の改善、プロアポトーシス因子のアップレギュレーションとアンチアポトーシス遺伝子のダウンレギュレーションを介した細胞のアポトーシス死の誘導で構成されている[2]。更に近年の研究ではキノコ類の摂取によりうつ病になる確率を下げるという報告もある[3]。

*Sparassis crispa* は、日本ではハナビラタケとして知られ、治療への応用が期待できるキノコとして文献に記載されている。このキノコの薬効は、主に 6 分岐の 1,3- $\beta$ -グルカン(SCG)が豊富に含まれていることに起因する。化学分析の結果、*S. crispa* の液体培養菌糸体から精製した  $\beta$  グルカンの一次構造は、約 6 残基ごとに 1 つの分岐を持つ 6 分岐 1,3- $\beta$  グルカンであり、その分岐の度合いは SCG よりも相対的に低いことがわかった[4, 5]。*S. crispa* 由来の  $\beta$ -グルカン(SCG)は、ICR マウスの固形状の Sarcoma 180 に対して、強い血管拡張と出血反応を伴う抗腫瘍活性を示した。また、これらの画分は、シクロホスファミドで誘発された白血病のマウスに腹腔内または口腔内投与したところ、造血反応の増強を示した[5]。SCG は用量依存的に全血球培養のサイトカイン合成を促進したという報告もある。SCG は投与量に依存して補体フラグメントである C5a を放出した。また、ヒト血漿中に抗 SCG 天然抗体が検出された。これらのことから、SCG はヒトの白血球および関連する免疫系を活性化する能力があると考えられる[6]。ヒト臍帯静脈内皮細胞では、SCG の塗布によって細胞の成長、移動、毛細血管様チューブの形成に影響がなかったことから、これらの効果は内皮細胞に直接作用するものではない。SCG を経口投与することにより、腫瘍に誘導される血管新生を阻害し、肺の腫瘍の成長と転移を抑制することが明らかになった[7]。SCG がマクロファージ様の RAW264.7 細胞の誘導性 NO 合成酵素 (iNOS) の発現を促進するとともに、NO の産生を刺激することを示されている。また一酸化窒素の産生は、細胞外シグナル調節キナーゼであるマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) 阻害剤によって強く抑制され

た。このことから、SCGによるNO放出はMAPKを介して行われている可能性があることが示された[8]。他にも、*S. crispa*には大脳皮質におけるAkt依存性のeNOSリン酸化の回復を促進する効果があることが報告されている。NO産生を増加させることにより、脳血管内皮機能障害を改善することができた。*S. crispa*は脳卒中や高血圧症の予防に有用であると考えられる[9]。*S. crispa*は糖尿病性創傷の治癒障害を改善することができる。この効果には、マクロファージや線維芽細胞の移動の増加が関与していると考えられ、SCGはI型コラーゲンの合成を直接増加させることが分かっている[10]。*S. crispa*の子実体から3種類の新規フタリド(hanabiratakelide A (1), B (2), C (3))を単離されている。3つのハナビラタケライドは、ビタミンCよりも強いスーパーオキシドディスムターゼ様活性を示し、抗酸化作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用を有することが示された[11]。

通常、キノコ類子実体の木や穀物、おがくずなどを基材とした固体培養では、収穫までに2~3ヶ月を要し[12]、その生育には季節性がある。これらの問題を解決するために、浸水培養技術を用いた菌糸体の培養は、より短い培養期間(8-10日)で工業的規模での多糖類生産の代替方法として利用できる[13]。担子菌類の液体培養の歴史は古く、1950年代から始まっている。より安全な製品と培養の再現性という利点から、この液体培養が行われている[14]。主たる生理活性物質である多糖類は、キノコの子実体だけでなく、培養菌糸、培養液などから分離することができる[15]。キノコの液体培養では、子実体栽培と同等の生理活性物質の生産量を実現することが課題となっている。培養時間の短縮や培養の再現性などの利点を考慮すると、液体培養は産業レベルでのキノコ栽培に最適な技術といえる[16]。

キノコの菌糸は液体培養において、細胞は栄養分を受け取り、代謝し、多数のサイズの菌糸球体ペレットを作成する[17]。菌糸体が形成するペレットサイズを制御する研究はいくつか行われていた。培養液中に高分子化合物である寒天やCMCを添加する事でペレットサイズを小さく出来る事が報告されている[18]。液体培養では培地の組成とは別に、攪拌の強さもペレットの形成と構造に大きな影響を与える。ペレットの形成と構造に影響を与えるもう一つの大きな要因である。攪拌速度と攪拌羽のせん断作用が糸状菌の形態や生産性に与える影響が注目されている。攪拌強度とペレットサイズには逆の関係があると考えられている。激しいペレットの形成を妨げていると考えられるため、攪拌量を増やすとペレットは小さく、よりコンパクトになる。このような観察結果は、いくつかの糸状菌で記録されている[18, 19, 20]。

バッフル付きフラスコは、バッフルなしのフラスコと比較して、物質移動能力とせん断形成の両方で優位性を示している[21]。攪拌速度の上昇(順序流体

力学) は、通常は細胞の完全性に有害であるせん断応力を発生させ[22]、菌糸体の凝集体のサイズを減少させる。*Ganoderma lucidum* の液体培養では、初期の体積酸素移動係数が細胞の成長速度およびガノデリン酸の生産に影響を与えることが報告されている[23]。

この研究では *S. crispa* 菌糸体の液体培養において、添加物を使用せずに物理的な方法でペレットサイズを調整し、免疫賦活作用が期待できるグルカンの効率的な生産を検討した。通常の三角フラスコではなく、バッフル付き三角フラスコを使用したほか、振盪培養ではなく攪拌子を用いた攪拌培養の検討を行い、さらに微細化の組み合わせの検討を行い、*S. crispa* 菌糸体の培養においてグルカンの最も効率的な生産が行う事ができる条件を検討した。

## 2.2. 実験

### 2.2.1 微生物

この研究では徳島大学で継代培養されていたハナビラタケ菌糸体を使用した。ハナビラタケ菌糸体は Potato Dextrose Agar (Wako) を使用し 25°C で培養を行った。

### 2.2.2 培地および培養方法

前培養は 200 mL 三角フラスコに 0.4 M フタル酸緩衝液で pH を 5.0 に調整した基礎培地を 50 mL ずつ分注し行った。培地を分注した三角フラスコに継代培養したハナビラタケ菌糸体を 5 mm 四方片植菌した。(基本培地; グルコース 30 g/L、ポリペプトン 6.3 g/L、酵母エキス 0.2 g/L、Kirk salt 10 mL/L) Kirk salt 及び Kirk trace element solution の組成はそれぞれ、Table 2-1 と Table 2-2 に示した。全ての培地成分は和光純薬で購入した。植菌したフラスコはロータリーシェーカー (TAITEC、BR-300LF) で 25°C、100 rpm で 7 日間培養した。

本培養は 300 mL の三角フラスコに基本培地を 60 mL ずつ分注して行った。前培養液をポリトロンホモジナイザー (Model PT-MR 2100、Kinematica AG、Switzerland) を用いて微細化処理 (15000 rpm、20 秒間) し、2% (v/v) になるように本培養フラスコに接種した。植菌後のフラスコは 25°C で培養した。

本培養に使用する三角フラスコとして、通常の三角フラスコとバッフル付き三角フラスコを使用した。バッフル付き三角フラスコはフラスコ内部に 3 つの突起があり、内部の液体に複雑な水流を生じさせる事ができる。また、

培養条件の検討としてロータリーシェーカーによる振盪培養のほかに、攪拌子とマグネティックスターラーを使用した攪拌培養を試みた。特別に記載がない限り、振盪培養は 100 rpm で、攪拌培養は 750 rpm でそれぞれ培養を行った。

Table 2-1 Component of Kirk salt

Nutrients	Concentration
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	20 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.3 g/L
Thiamine-HCl	0.01 g/L
Kirk trace element solution	16.7 mL/L

Table 2-2 Component of Kirk trace element solution

Nutrients	Concentration (g/L)
Trisodium Nitrilotriacetate	9
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3
$\text{MnSO}_4$	2.73
NaCl	6
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.6
$\text{CoSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.6
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.06
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.11
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.06
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.07

### 2.2.3 分析方法

培養終了後、菌糸体を ADVANTEC no.131 ろ紙により培養液からろ別した。得られた菌糸体は培養液の 5 倍量の蒸留水で洗浄した。洗浄後の菌糸体を 37℃で 2 日間乾燥させ、減圧デシケーターで常温まで冷ました後に重量を測定した。以上の方法で乾燥菌体重量 (DCW) を測定した。グルコース濃度はムタロターゼ GOD 法 (和光純薬) により定量した。エタノール量の定量はろ別により得られた上清を HPLC (島津製作所 RID-10A) で分析する事で測定した。HPLC に使用したカラムは Aminex HPX-87X (300 mm×7.8 mm) でカラム温度は 65℃で分析を行った。

乾燥後粉末化した菌糸体 0.1 g に対し 72wt%濃硫酸を 2 mL を加え、常温で 1 時間静置した。その後、終濃度が 4wt%になるように蒸留水を加え、オートクレーブを行った (121℃、60 分間)。室温になるまで冷却後、上澄みをフィルターろ過 (Minisart RC4、Membrane 0.45 μL) し、得られたろ液をエタノールの定量と同様に HPLC により分析する事でグルカン量の定量を行った。全ての実験は 2 回実施し、それぞれの分析は少なくとも 2 回ずつ実施した。

## 2.3. 結果と考察

### 2.3.1 振盪培養と攪拌培養及び通常フラスコとバッフル付きフラスコによる培養の比較

担子菌類菌糸体の液体培養において、植菌後、培地が適切な速度で均質に混合されれば、ペレットと呼ばれる球状の菌糸体が形成される。ペレットはある程度の大きさ以上になると、ペレット内部で酸素不足によりペレット中心部の自己消化が生じ、中心部が欠けた状態となる [18]。自己消化は細胞の代謝や生成物合成に重要な影響を与えるため、ペレット状態で菌糸体を効率的に増やすためにはペレットサイズのコントロールが必要である。このペレットが形成される培養方法としては、振盪培養法やエアリフト型バイオリアクターによる培養方法が挙げられる。筆者らは振盪培養を主として、いくつかの過去の研究を行ってきた。[25, 26]

しかしながら一般的なバイオリアクターや工業スケールの培養タンクは攪拌羽による攪拌が一般的である。そのため最終的な目標である菌糸体の大量培養に向け、攪拌羽や生じる水流が菌糸体の生育に及ぼす影響を調査する必要がある。そのため本研究では攪拌羽のモデルとして攪拌子を使用し、振盪培養との比較をし、DCW やグルカン量、代謝産物であるエタノール量の比較を行った。また通常の三角フラスコだけではなく、バッフル付きの三角



フラスコを使用することで更に複雑な水流を生じさせ、菌糸体の生長にどのような影響が生じるか研究を行なった。

Table 2-3 に *S. crispa* 菌糸体の通常三角フラスコ/バッフル付き三角フラスコ、振盪培養/攪拌培養の各組合せ条件における培養日数、DCW、グルカン量、生成されたエタノール量を示した。培養日数は攪拌培養よりも振盪培養の方が短くなり、DCW とグルカン量は通常フラスコよりもバッフル付きフラスコの方が高くなる傾向が見られた。最も培養期間が短くなったのはバッフル付き三角フラスコ/振盪培養条件で 8 日間、最大 DCW が得られた条件はバッフル付き三角フラスコ/攪拌培養で  $5.91 \pm 0.32$  g/L だった。同じ攪拌方法においては、通常三角フラスコよりもバッフル付き三角フラスコの方が菌糸体の生産性が向上しており、バッフル付き三角フラスコの方が菌糸体の生長を促すという面で優れていると考えられる。

三角フラスコ内に存在するバッフルの影響により十分に攪拌されることで酸素の供給が増したことが要因のひとつであると推測される。更にエタノール量に関しては攪拌培養よりも振盪培養の方が多く、バッフル付きフラスコよりも通常フラスコの方が多くなるという DCW、グルカン量とは逆の傾向が見られた。

Fig. 2-1 に各条件で培養した際の培養終了時の *S. crispa* 菌糸体の形状を示した。通常三角フラスコ/振盪培養では大小様々な大きさのペレットが形成されている。しかし同じ振盪培養でもバッフル付き三角フラスコを使用することで、ペレットのサイズが明らかに小さくなっていることが分かる。これはバッフル付き三角フラスコ内部の 3 つの突起により複雑な水流が生じた結果、菌糸体同士の結合が阻止されペレットの微細化につながったと考えられる。

一方で攪拌培養では通常三角フラスコ、バッフル付き三角フラスコのどちらにおいても *S. crispa* 菌糸体はペレット状ではなくフィラメント状に生育していた。これは攪拌子により物理的な菌糸体の剪断が生じたためと考えられる。更に通常三角フラスコよりもバッフル付き三角フラスコの方で、フィラメント状菌糸体が多く形成されているようだった。これは攪拌子とバッフル内部の突起の組み合わせの相乗効果により、菌糸体が更に細くなり、結果として培養液中を覆い尽くすように菌糸体が分散した可能性が考えられる。そのためバッフル付き三角フラスコ/攪拌培養において、酸素が十分に供給されたことで、ペレット内部で生じる自己消化が引き起こされず、好気呼吸により効率よく生長できたため DCW、グルカン量が著しく増加したと考えられる。

通常、リアクターなどで目的の物質を生産する際には攪拌培養を行うが、この際に攪拌羽による剪断力が問題となる場合がある。攪拌羽が高速で回転するため、羽先端部分の剪断力が大きくなりカビ・放線菌といった糸状菌は損傷を受けやすく、有用物質の生産に対して悪影響を及ぼすことが多いためである。しかしながら Table 2-3 の結果では振盪培養よりも攪拌培養の方が得られる菌体量が増加しており、*S. crispa* 菌糸体は物理的的刺激に比較的強いことが示唆され、攪拌羽を使用したリアクターや培養タンクにおいても遜色ない生産性を得られる可能性が考えられる。

一方で、振盪培養に比べると攪拌培養ではグルコースの消費速度が低下し培養日数が増加している。これは菌糸体が攪拌によりフィラメント状になったことで培地の粘度が上がったことが原因であると考えられる。菌糸体は生長の初期段階において菌糸体同士の相互作用により生長が促されているという報告があり、フィラメント状菌糸体が培地を覆いつくし培養液の粘度が高くなる攪拌培養では菌糸体同士の相互作用が抑制されてしまった。従って培養初期段階におけるグルコースの消費速度が低下したと考えられる。

また、培養終了後のエタノール生産量は攪拌培養よりも振盪培養の方が高く、グルカンは振盪培養よりも攪拌培養の方が多く得られた。通常フラスコとバッフル付きフラスコの比較でも同様の傾向がみられている。エタノールは主として解糖系により生成される。従って攪拌培養よりも振盪培養の方がエタノール生産量が多いという事は、振盪培養の方が解糖系が多く行われたと考えられる。菌糸体に対する酸素供給が十分に行われた攪拌培養やバッフル付きフラスコでは好気呼吸が優位に働き、グルカンの生産量増加にもつながったと考えられる。

以上のことから攪拌培養でグルカンを多く得られたため、続いてバッフル付き三角フラスコによる攪拌培養の条件検討を行なった。

Table 2-3 Results of comparing Erlenmeyer flask and Baffled Erlenmeyer flask between Shaken culture and Stirred culture

Flask type	Cultivation methods	Cultivation period (day)	DCW (g/L)	Amount of total glucan (g/L)	Ethanol production (g/L)
Erlenmeyer flask	Shaken (100 rpm)	10	4.42 ± 0.26	0.99 ± 0.01	10.36 ± 0.57
	Stirred (500 rpm)	12	5.04 ± 0.55	1.37 ± 0.07	9.15 ± 0.94
Baffled Erlenmeyer flask	Shaken (100 rpm)	8	5.77 ± 0.12	1.39 ± 0.05	9.03 ± 0.44
	Stirred (500 rpm)	11	5.91 ± 0.32	1.71 ± 0.03	6.61 ± 1.02

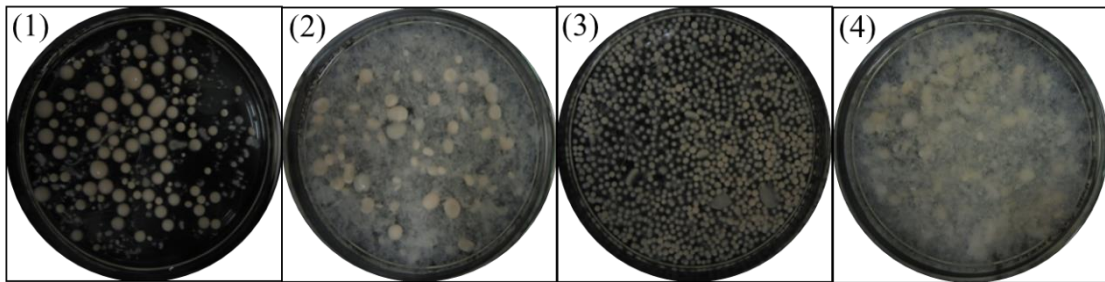


Fig. 2-1 Shape of *S. crispa* mycelia at the end of culture under each culture condition  
(1) Erlenmeyer flask/Shaken, (2) Erlenmeyer flask/Stirred, (3) Baffle Erlenmeyer flask/Shaken,  
(4) Baffled Erlenmeyer flask/Stirred

### 2.3.2 攪拌培養における攪拌速度の検討

振盪培養をコントロールとし、攪拌条件を 250、500、750 rpm として *S. crispa* 菌糸体の培養を行なった結果を Table 2-4 に示す。攪拌速度 250 rpm ではコントロールである振盪培養と DCW はほぼ変わらなかった ( $5.56 \pm 0.58$  g/L)。しかし培養日数は振盪培養の 2 倍以上 (18 日間) となった。250 rpm では攪拌が不十分であり、酸素が十分に供給されなかったため培養日数が大幅に増加したと考えられる。攪拌培養では攪拌速度を上げることで、グルコースの消費速度が上昇し、培養期間が 18 日間 (250 rpm) から 13 日間 (500、750 rpm) に短縮された。振盪培養の培養日数 (8 日間) と比較すると、攪拌培養の培養日数は長い。攪拌により菌糸体同士の相互作用が阻害されたためであると考えられる。検討した攪拌速度のうち、250 rpm では阻害は発生し辛いと考えられるが、逆に攪拌速度が遅すぎることによって生長に必要な酸素が十分量供給されていないのではないかと考えられる。一方で DCW は攪拌培養 500 rpm で最大値 ( $6.47 \pm 0.49$  g/L) が得られた。効率的に酸素が供給された事で菌糸体成長が促されたためであると考えられる。また、*Trichoderma harzianum* のバッフル付きフラスコにおける培養において、6-Pentyl- $\alpha$ -pyrone (6-PP) 濃度は、100 rpm で最大 (96 mg/L) となり、それ以上の攪拌速度では低下した。このデータから、6-PP の生産性は流体力学的ストレスによって決定され、約 0.9 kW/m<sup>3</sup> の推定消費電力で最大となり、消費電力が大きくなると低下することが示唆された [27]。この研究から一定以上の攪拌速度では流体的ストレスにより菌体の生育が阻害される可能性が考えられる。

Fig. 2-2 に各攪拌速度における培養終了時の *S. crispa* 菌糸体の形状を示す。攪拌速度を上げることで菌糸体がより微細になっていることがわかる。攪拌速度が上がることによって培養液中の剪断力が増し、ペレットが形成されなかったと考えられる。また Table 2-3 の結果と同様にフィラメント化が進むにつれ、グルカン量が増加し、エタノール量が減少していた。

以上のことから、培養条件 (三角フラスコの形状、攪拌・振盪) が菌糸体の形状に影響を与え、その結果として DCW、グルカン生産量、エタノール生産量が変化していると考えられる。したがってこの 3 つのファクターについて、培養条件の検討結果、攪拌条件の検討結果から得られた相関性を Fig. 2-3 に示した。グルカン量と DCW には正の相関が見られた。グルカンは菌糸体細胞壁の構成要素のひとつであるため、DCW の増加はグルカンの増加につながる。何らかの添加物を加えることでも DCW は増加する場合があるが、添加物を加えた際は DCW とグルカンに相関がみられない場合がある。これは添加物を菌糸体として計量している為であると考えられる。本研

究において、添加物は加えていないため、DCW の増加は直接的な菌糸体の増加を表し、グルカン量の増加も確認された。

一方でグルカン量 (DCW) とエタノール量には負の相関が見られた。更に相関図と培養終了時の菌糸体形状を比較すると、菌糸体がペレット状に生長するとエタノール生産量は多く、グルカン量は少なくなり、逆に菌糸体がフィラメント状に生長するとエタノール生産量が少なく、グルカン量が多くなる結果が得られた。これは菌糸体がペレットを形成すると、ペレット内部で酸素不足が発生し、好気呼吸ではなく嫌気呼吸 (エタノール発酵) によりグルコースが消費され、菌糸体が十分に生長できなくなるためであると考えられる。*Phanerochaete chrysosporium* (マクカワタケ) を培養して得られたペレットのうち、2 mm を超えるサイズの全てのペレットにおいて、中心部で自己消化が生じているという報告もある [19]。ペレットサイズの巨大化抑制は、効率的な菌糸体の生産において憂慮すべきポイントのひとつである。以上の結果から、*S. crispa* 菌糸体をフィラメント状に生長させることが効率的にグルカンを生産することに繋がる事が示唆された。従って以降はバフフル付き三角フラスコを用いた攪拌培養をコントロールとして、更なるグルカン生産の効率化を目指した。

Table 2-4 Results of the effect of stirring speed on *S. crista* mycelial growth

Stirring speed (rpm)	Cultivation period (day)	DCW (g/L)	Amount of total glucan (g/L)	Ethanol production (g/L)
Shaken (100 rpm)	8	5.37 ± 0.11	1.20 ± 0.02	9.16 ± 0.43
250	18	5.56 ± 0.58	1.62 ± 0.01	6.34 ± 0.24
500	13	6.47 ± 0.49	1.98 ± 0.02	4.88 ± 0.30
750	13	6.30 ± 1.97	2.04 ± 0.02	3.81 ± 2.90

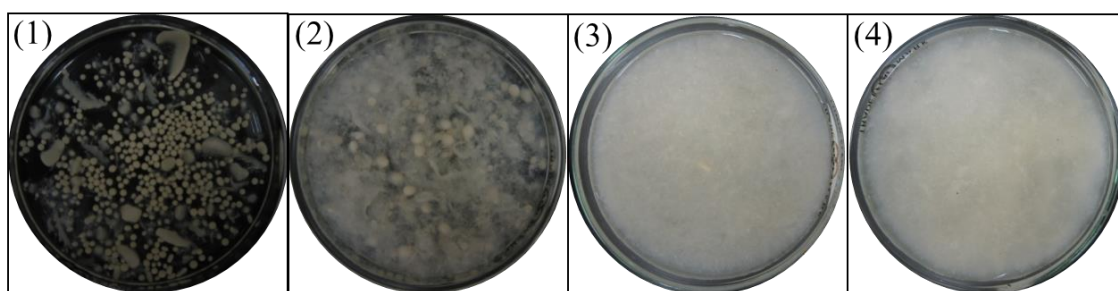


Fig. 2-2 Shape of *S. crispa* mycelia at the end of culture under each stirring speed  
(1) Shaken (100 rpm), (2) Stirred (250 rpm), (3) Stirred (500 rpm), (4) Stirred (750 rpm)



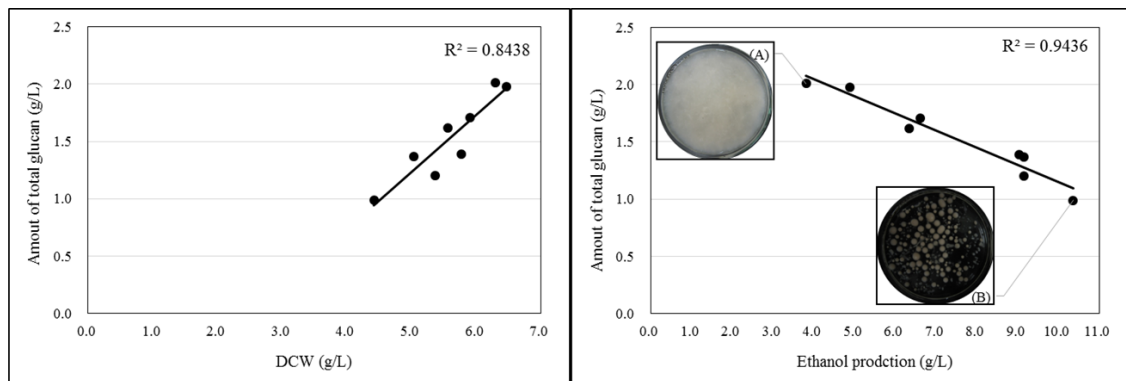


Fig. 2-3 Correlation between amount of glucan, DCW and ethanol production  
 (A) Baffled Erlenmeyer flask/Stirred (750 rpm), (B) Erlenmeyer flask/Shaken (100 rpm)

### 2.3.3 攪拌培養における培地量の検討

先の研究により *S. crispa* 菌糸体をフィラメント状に生長させることで、グルカンを効率的に生産できることが分かった。続いて培養液量が菌糸体の生長に与える影響を調査した。培養液量を変化させることで、攪拌子と菌糸体の接触頻度が変わり、菌糸体の形状が変化すると予想される。培養液量は 20、40、60、100 mL の 4 種類で検討した。

培養液量の検討を行った結果を Table 2-5 に示した。培養液量が 40、60 mL の時に比べ、20、100 mL の時の DCW は著しく低くなった。最大 DCW は培養液量 40 mL の時に得られ 6.79 g/L だった。また、グルカン量も 40 mL の時に最大となり 2.88 g/L が得られた。一方で、エタノール量は培養液量が 20 mL の時に最大となり 11.27 g/L が得られた。培養終了時の菌糸体の形状を Fig. 2-4 に示した。培養液量と菌糸体の形状を比較すると、20 mL の時はペレット状だが、40 mL 以上でフィラメントが形成されていることがわかる。この原因の一つとして、培養液が少ないことで攪拌子より液面が下になったことが考えられる。攪拌子が液中にないことで培養液の混合が不十分となり菌糸体の滞留が発生していた。そのため菌糸体同士が凝集し、大きなペレットが形成されたと考えられる。ペレットが形成されたことにより内部で酸素不足が生じたと考えられ、DCW とグルカン量が検討した 4 種のうちで最も低くなった (4.73 g/L、1.22 g/L)。一方で培養液量が 100 mL の時は、培養液量が 40、60 mL の時に比べてフィラメント化が進んでいなかった。これは培養液量が多いため同じ攪拌条件 (500 rpm) では、液量が多いほど培養液の動きが緩慢になり、その結果として菌糸体の凝集、ペレット化につながったと考えられる。20 mL の時ほどではないが、ペレット状に生長した菌糸体の特徴であるグルカン量の減少とエタノール量の増加が見られた。

以上のことから、培養液量 40 mL の際に最大グルカン生産量 (2.88 g/L) が得られたため、培養液量 40 mL を攪拌速度 500 rpm 時の最適条件であるとした。

Table 2-5 Results of examination of medium volume  
(stirring speed; 500 rpm, Baffled Erlenmeyer flask)

Medium volume (mL)	Cultivation period (day)	DCW (g/L)	Amount of total glucan (g/L)	Ethanol production (g/L)
20	16	4.73 ± 0.06	1.21 ± 0.00	11.27 ± 0.72
40	13	6.79 ± 0.21	2.88 ± 0.12	7.09 ± 0.00
60	14	6.25 ± 0.08	2.20 ± 0.14	7.77 ± 0.00
100	16	4.99 ± 0.09	1.39 ± 0.00	7.42 ± 0.00

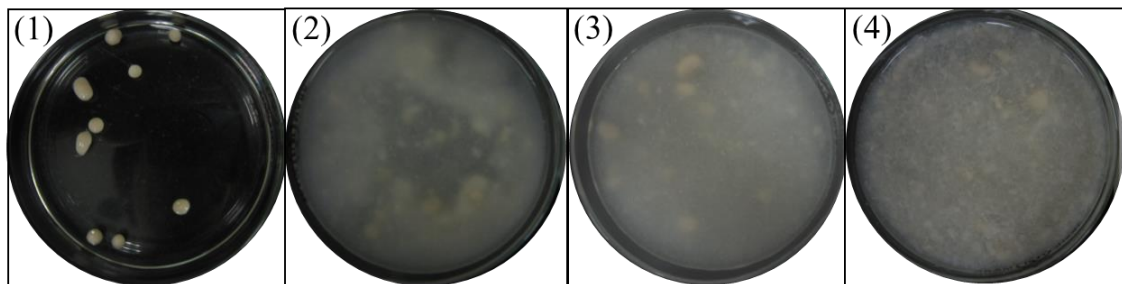


Fig. 2-4 Shape of *S. crispa* mycelia at the end of culture under each Medium volume (1) 20 mL, (2) 40 mL, (3) 60 mL, (4) 100 mL

### 2.3.4 均質化処理が菌糸体培養へ与える影響

これまでの研究によりペレットが形成されるとグルカンの生産量が減少し、エタノールの生産量が増加することが分かっている。これはペレット内部で酸素不足が生じていると考えられるが、ペレットサイズをコントロールすることができればグルカンの生産量を上げることができると推測される。そこでペレットを形成した菌糸体にホモジナイズ処理による物理的な微細化を施すことで、振盪培養においてもフィラメント状菌糸体の生長に酷似した傾向が見られるのではないかと考えた。ここではバツフル付きフラスコを使用し培養液量 40 mL で、振盪培養と攪拌培養のそれぞれでホモジナイズ処理の有無が培養期間、DCW、グルカン量に与える影響を調査した。ホモジナイザー (Model PT-MR 2100、Kinematica AG、Switzerland) を使用して、本培養期間の 2 日ごとに 15000 rpm、10 秒間の条件で均質化処理を実施した。

Table 2-6 に *S. crispa* 菌糸体の培養において微細化処理を検討行った際の培養期間、DCW グルカン量及びエタノール生産量を示す。予想された通り振盪培養、攪拌培養ともに微細化を行った培養の方が DCW とグルカン量が高くなり、エタノール生産量が減少していた。興味深いことに、微細化の効果は振盪培養と攪拌培養で異なっていた。振盪培養では微細化を行うことで DCW は 1.33 倍、グルカン量は 1.39 倍まで増加した。Fig. 2-3 で示した通り、DCW の増加に伴いグルカン量が同じように増加している。振盪培養ではペレットを微細化する事でペレット内部が嫌気性になる事を防ぐ事ができ、通常であれば自己溶解するはずであった菌糸体も生長を続けることができたため、DCW 及びグルカン量が増加したと考えられる。一方で攪拌培養では微細化を行うことで、DCW は 1.03 倍の増加に留まったが、グルカン量は 1.34 倍に増加した。DCW の増加率よりもグルカンの増加率の方が約 3 割多いという結果が見られた。これは攪拌子とホモジナイザーの両方による攪拌作用が菌糸体に大きなダメージを与えたことに起因するのではないかと考えられる。ペレット状の菌糸体はホモジナイザーの剪断力に耐えたのち生長するが、フィラメント状の菌糸体はホモジナイザーの強い剪断力でダメージを受ける。菌糸体はダメージを防ぐために菌体外多糖を分泌する。分泌された菌体外多糖はフィラメント状の菌糸体と相互に絡み合いさらに大きなフィラメント状菌糸体へと生長し一種のバイオフィルムを形成するのではないかと推測される。こうして得られた DCW は多くの菌体外多糖を有する事となり、結果としてグルカン量が増加したのではないかと考えられる。

ホモジナイザーによる均質化を行うことで、エタノール生産量は振盪培養で 0.64 倍、攪拌培養では 0.41 倍となった。これまでの実験と同様に、菌糸

体のフィラメント化及び攪拌による酸素供給の結果、嫌気呼吸が抑制されたことでエタノール生産量が減少したと考えられる。

Fig. 2-5 に培養終了時の *S. crista* 菌糸体の形状を示した。振盪培養、攪拌培養のどちらの場合も微細化により、より均質的なペレット、フィラメント状菌糸体が形成されていることがわかる。振盪培養では微細化された菌糸体が振盪作用により菌糸体同士が再度凝集しペレットを形成しており、攪拌培養では微細化された菌糸体はそのままフィラメント状に生長したと考えられる。ペレットの存在はエタノール生産量に影響しているため、振盪培養のエタノール生産量は、攪拌培養のエタノール生産量よりも多くなる結果となった。

Table 2-6 Results of examination of homogenization on *S. crista* mycelia (medium volume; 40 mL, Baffled Erlenmeyer flask)

Cultivation methods	Homogenization	Cultivation period (day)	DCW (g/L)	Amount of total glucan (g/L)	Ethanol production (g/L)
Shaken (100 rpm)	—	7	7.07 ± 0.34	2.17 ± 0.15	7.29 ± 0.16
	+	6	9.45 ± 0.24	3.01 ± 0.23	4.61 ± 0.54
Stirred (500 rpm)	—	14	7.01 ± 1.43	2.61 ± 0.16	3.60 ± 0.15
	+	14	7.23 ± 0.99	3.50 ± 0.12	1.48 ± 0.29

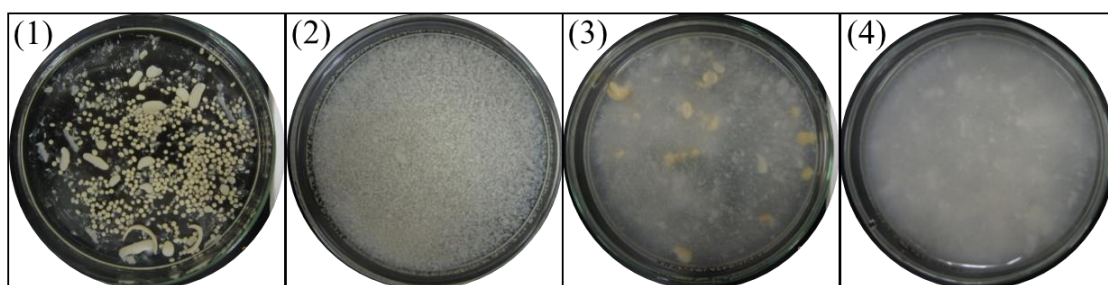


Fig. 2-5 Shape of *S. crispa* mycelia at the end of culture under homogenization  
(1) Shaken/Non-Homogenized, (2) Stirred/Non-Homogenized, (3) Shaken/Homogenized,  
(4) Stirred/Homogenized



## 2.4. 結言

*S. crispa* 菌糸体の培養において、攪拌条件、培養液量、微細化処理の検討を行った結果、バッフル付きフラスコを使用し、攪拌培養、培養液量 40 mL、培養途中で微細化を実施するという条件が最適だった。検討前の条件（通常三角フラスコ、振盪培養、培養液量 60 mL、微細化なし）に比べ、DCW は 1.11 倍（7.23 g/L）、グルカン量は 1.77 倍（3.50 g/L）、エタノール量は 0.26 倍（1.48 g/L）となった。グルカンの生産のためには振盪培養よりも攪拌培養が効率的であり、培養中に微細化することで更にグルカンの生産量を増加させることができることが示された。また、培養終了時のエタノール量とグルカン生産量に負の相関があった。この研究により攪拌培養を行う事でハナビラタケ菌糸体はフィラメント状に生長し、フィラメント状菌糸体は嫌気呼吸によるエタノール生産が抑制され、効率的にグルカンを生産する事ができる生長形態であることが示唆された。しかし、攪拌培養はグルカンの生産に適しているが振盪培養よりも培養期間が増加する傾向があり、より効率的にグルカンを生産するための更なる研究が必要である。

## 2.5. 引用文献

- [1] Divya Yadav, Pradeep Singh Negi (2021) Bioactive components of mushrooms: Processing effects and health benefits. Food Research International. 148
- [2] Patryk Nowakowski, Renata Markiewicz-Żukowska, Joanna Bielecka, Konrad Mielcarek, Monika Grabia, Katarzyna Socha (2021) Treasures from the forest: Evaluation of mushroom extracts as anti-cancer agents. Biomedicine & Pharmacotherapy. (143)
- [3] Djibril M.Ba, Xiang Gao, Laila Al-Shaar, Joshua E. Muscat, Vernon M. Chinchilli, Robert B. Beelman, John P. Richie (2021) Mushroom intake and depression: A population-based study using data from the US National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 2005–2016. Journal of Affective Disorders. 294 (1) 686-692
- [4] Takashi Kimura (2013) Natural Products and Biological Activity of the Pharmacologically Active Cauliflower Mushroom *Sparassis crispa*. Biologic Activity and Biotechnological Development of Natural Products. <https://doi.org/10.1155/2013/982317>
- [5] Naohito Ohno, Noriko N. Miura, Mitsuhiro Nakajima, Toshiro Yadomae (2000) Antitumor 1,3-beta-glucan from cultured fruit body of *Sparassis crispa*. Biological & pharmaceutical bulletin. 23 (7) 866-872

- [6] Naohito Ohno, Sachiko Nameda, Toshie Harada, Noriko N. Miura, Yoshiyuki Adachi, Mitsuhiro Nakajima, Kenshi Yoshida, Hitoji Yoshida, Toshiro Yadomae (2003) Immunomodulating Activity of a  $\beta$ -Glucan Preparation, SCG, Extracted from a Culinary–Medicinal Mushroom, *Sparassis crispa* Wulf.:Fr. (Aphyllorphomycetideae), and Application to Cancer Patients. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. (5) 359-368
- [7] Kyosuke Yamamoto, Takashi Kimura, Akio Sugitachi, Nariaki Matsuura (2009) Anti-angiogenic and Anti-metastatic Effects of  $\beta$ -1,3-D-Glucan Purified from Hanabiratake, *Sparassis crispa*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 32 (2) 259-263
- [8] Song Yi Lee, Yong Gyu Lee, Se Eun Byeon, Soryu Han, Sun Shim Choi, Ae Ra Kim, Jaehwi Lee, Sang-Jin Lee, Sungyoul Hong & Jae Youl Cho (2010) Mitogen activated protein kinases are prime signalling enzymes in nitric oxide production induced by soluble  $\beta$ -glucan from *Sparassis crispa*. *Archives of Pharmacal Research*. (33) 1753-1760
- [9] Hisae Yoshitomi, Emiko Iwaoka, Masahide Kubo, Masaru Shibata, Ming Gao (2011) Beneficial effect of *Sparassis crispa* on stroke through activation of Akt/eNOS pathway in brain of SHRSP. *Journal of Natural Medicines*. (65) 135-141
- [10] Hon Kwon M.D., Zeyu Qiu M. D., Mamiko Hashimoto, Kyosuke Yamamoto, Takashi Kimura (2009) Effects of medicinal mushroom (*Sparassis crispa*) on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *The American Journal of Surgery* 197 (4) 503-509
- [11] Kazuko Yoshikawa, Naoki Kokudo, Toshihiro Hashimoto, Kyosuke Yamamoto, Toshiaki Inose, and Takashi Kimura (2010) Novel Phthalide Compounds from *Sparassis crispa* (Hanabiratake), Hanabiratakelide A–C, Exhibiting Anti-cancer Related Activity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 33 (8) 1355-1359
- [12] Hailong Yang, Weihong Min, Pengyang Bi, Huabin Zhou, Furu Huang (2013) Stimulatory effects of *Coix lacryma-jobi* oil on the mycelial growth and metabolites biosynthesis by the submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Biochemical Engineering Journal*. (76) 77-82
- [13] Umesh Singh, Ashwani Gautam, Tapan Kumar Singha, Abhay Tiwari, Pooja Tiwari, Vikram Sahai, Satyawati Sharma (2020) Mass production of *Pleurotus eryngii* mycelia under submerged culture conditions with

- improved minerals and vitamin D<sub>2</sub>. LWT-Food Science and Technology. (131)
- [14] Mariana L Fazenda, Robert Seviour, Brian McNeil, Linda M Harvey (2008) Submerged Culture Fermentation of “Higher Fungi”: The Macrofungi. *Advances in Applied Microbiology*. (63) 33-103
- [15] Solomon P. Wasser (2011) Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (89) 1323-1332
- [16] Georgios Bakratsas, Angeliki Polydera, Petros Katapodis, Haralambos Stamatis (2021) Recent trends in submerged cultivation of mushrooms and their application as a source of nutraceuticals and food additives. *Future Foods*. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100086>
- [17] Marian Petre, Violeta Petre (2016) Biotechnology of Mushroom Growth Through Submerged Cultivation. *Mushroom Biotechnology: Developments and Applications*. 1-18
- [18] Fan-Chiang Yang, Mine-Je Yang, Shueh Hen Cheng (2009) A novel method to enhance the mycelia production of *Ganoderma lucidum* in submerged cultures by polymer additives and agitation strategies. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. (40) 148-154
- [19] P. A. Gibbs, R. J. Seviour, F. Schmid (2000) Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. *Critical Reviews in Biotechnology*. (20) 17-48
- [20] Maria Papagianni (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*. 22 (3) 189-259
- [21] Chao Li, Jian-Ye Xia, Ju Chu, Yong-Hong Wang, Ying-Ping Zhuang, Si-Liang Zhang (2013) CFD analysis of the turbulent flow in baffled shake flasks. *Biochemical Engineering Journal*. (70) 140-150
- [22] Márcio José Rossi, Francisco Xavier Nascimento, Admir José Giachini, Vetúria Lopes Oliveira & Agenor Furigo Jr. (2017) Transfer and consumption of oxygen during the cultivation of the ectomycorrhizal fungus *Rhizopogon nigrescens* in an airlift bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101 (3) 1013-1024
- [23] Ya-Jie Tang, Jian-Jiang Zhong (2003) Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*. 32 (3-4) 478-484
- [24] Akihiro Kurosumi, Fumihisa Kobayasi, Godliving Mtui, Yoshitoshi

- Nakamura (2006) Development of optimal culture method of *Sparassis crispa* mycelia and a new extraction method of antineoplastic constituent. *Biochemical Engineering Journal*. 30 (1) 109-113
- [25] Chikako Asada, Ryosuke Okumura, Chizuru Sasaki, Yoshitoshi Nakamura (2012) Acceleration of *Hericium erinaceum* mycelial growth in submerged culture using yogurt whey as an alternative nitrogen source. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. (3) 828-832
- [26] Ryosuke Okumura, Yoshitoshi Nakamura, Chizuru Sasaki, Chikako Asada (2021) Effects of Tween series and agar additives on mycelia biomass and  $\beta$ -glucan production by *Hericium erinaceus* in submerged culture. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01342-y>
- [27] Enrique Galindo, Celia Flores, Patricia Larralde-Corona, Gabriel Corkidi-Blanco, J. Antonio Rocha-Valadez, Leobardo Serrano-Carreón (2004) Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma harzianum* cultured in unbaffled and baffled shake flasks. *Biochemical Engineering Journal*. 18 (1) 1-8

## 結論

第1章では *H. erinaceus* 菌糸体の培養時に界面活性剤である Tween シリーズや高分子化合物である寒天を添加した。その結果、Tween 80 や寒天を添加することにより、添加していないときに比べてペレットサイズは小さくなった。ペレットサイズが小さくなったことにより、ペレット内部の酸素不足による自己消化が生じにくくなり、菌体生産量や  $\beta$ -グルカン生産量が増加した。第2章では *S. crispa* 菌糸体の培養において、攪拌方法や使用する三角フラスコ形状を変化させた。その結果、攪拌培養やバツフル付き三角フラスコを用いた攪拌培養を行う事でペレットはフィラメント様に生長した。フィラメント様菌糸体は培養液中に分散して存在し、栄養源や酸素の取り込み効率が上昇していると考えられる。フィラメント様に生長した菌糸体では菌体生産量やグルカン生産量が増加した。

以上のことから担子菌類菌糸体の液体培養において菌糸体のペレット形状を変化させる事により菌糸体生産性及び有用物質生産性を増大させる事が出来る事が示唆された。特に攪拌条件やフラスコ形状の変化は添加物を加える必要がないため、コストパフォーマンスに優れた効率的な生産が可能となる方法だと考えられる。

本研究においては有用成分としてグルカンの生産性を重要視した。その為、菌糸体がフィラメント様に生長し、菌体量が増加したことは望ましい結果だった。しかしながら担子菌類の中には菌体外に有用成分を分泌する種も存在する。

菌糸体がフィラメント様に生長した場合は培地の粘度が上昇する。従って菌体外に有用成分を分泌する担子菌類では、培養液から有用成分を単離する事が困難になることが予測される。そのような場合においては、菌糸体をペレット状に生長させる方法あるいは、フィラメント様菌糸体を担体に固定させ有用成分の分泌を促す方法が後の工程を考慮すると効果的であると考えられる。

今後の研究ではスケールアップだけでなく、担子菌類の有用成分に適した菌糸体形状のコントロールに関する研究が必要だと考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご多忙の身ながら終始ご指導、ご教鞭を賜りました徳島大学大学院 中村嘉利教授に深く感謝申し上げます。中村教授には研究のみならず公私に渡って様々なご指導、ご教示を賜り、日々叱咤激励されここにいたることができました。この場を借りて心より御礼申し上げます。

博士後期過程期間中、研究生活全般にわたり適切なお指導、ご助言を賜りました、浅田元子准教授、佐々木千鶴准教授に深く感謝申し上げます。

さらに、本研究を進める機会を与えてくださり、深い理解と暖かい御支援を賜りました四国化工機株式会社 食品事業生産本部 鵜飼常務取締役本部長、馬詰取締役副本部長をはじめ関係各所の方々に心よりお礼申し上げます。

最後に何かと若輩者の私に力をお貸しくださった全ての皆様に深く感謝の意を表して謝辞に代えさせていただきます。