

## 担子菌による線溶活性物質生産の培養条件

平澤 玲子, 後藤いずみ, 岡村 徳光, 堀江 登,  
清原 利文, 大杉 匡弘

(武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科)

## Cultivation Condition for Production of Fibrinolytic Active Substance by Basidiomycetes

Reiko Hirasawa, Izumi Goto, Tokumitsu Okamura, Noboru Horie,  
Toshibumi Kiyohara and Masahiro Osugi

*Department of Food Science and Nutrition  
School of Human Environmental Science,  
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663, Japan*

Cultivation condition of production of fibrinolytic active substance derived from Basidiomycetes was investigated. Basidiomycetes used were 11 strains of commercial product and 30 strains isolated from nature. Fibrinolytic activities were found in Tamogitake of commercial product and 5 strains of Isolants from nature. Isolant W510 strain showed almost the same fibrinolytic activity with *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto* and *Streptomyces griseus*. Production of fibrinolytic active substance by W510 strain was high on the glucose media containing potato dextrose, malt extract or cornsteep liqure, but low on the glucose media of yeast extract, soybeen meal digest or polypeptone. Sucrose and corn starch were better carbon sources than glucose. No urea was used for nitrogen source.

### 緒言

血栓溶解剤として、現在のところウロキナーゼや組織プラスミノゲンアクチベーターが臨床的(静注投与)にもちいられている。しかしながら、静注投与によらないで、日常の食品である納豆<sup>1)~2)</sup>やカツオ塩辛<sup>3)</sup>に線溶活性が報告されている。須見ら<sup>4)~6)</sup>は、これを経口線溶療法と提唱している。きのこは、特有のテクスチャーをもつことやまた制ガン効果をもつものがあることなどから、食生活や健康の面からも注目されている食品である。日本におけるきのこの種類は4000種ともいわれており、そのなかには食用になるものも多いが、現在実際に人工栽培されているものは11, 2種類にしかすぎない。

本研究は、市販のきのこ及び自然界から分離した

きのこについて、その菌糸体培養をおこなって線溶活性の検索をおこない、活性物質生産のための培養条件の検討を目的とした。

### 試料および実験方法

#### 1. 供試菌株

市販食用きのこは、アワビタケ、ブナシメジ、クラウンマッシュ、エノキタケ、ヒマラヤマツタケ、ヒラタケ、マンネンタケ、マイタケ、マッシュルーム、ナメコ、シイタケ、タモギタケで、長野県経済連、日本きのこセンター、植物生産センター、森本養菌所より分譲されたものである。野生きのこは、京都の雲が畑、宝が池、滋賀県の足尾谷、北小松、仙台の森林公園から採集した。カビ、酵母、細菌の type culture は、京都大学農学部より分譲のものを持ちいた。

## 2. 培地および培養方法

きのこおよびカビ、細菌、酵母の菌株は、いずれも 2% malt extract (ナカライテスク社製) 150ml (300ml 容三角フラスコ中) を培地として、初発の pH を各々 6.0, 5.0, 7.0, および 5.0 に調整した。培養は、25~30℃, 1~3 週間, 旋回培養 (80rpm) をおこなった。

## 3. 線溶活性の測定方法

Astrup and Mullertz<sup>7)</sup>の方法に準じて、フィブリン平板に試料(培養液)の 30 $\mu$ l を滴下し、38℃, 18 時間, インキュベーションした後の溶解面積(長径 $\times$ 短径 mm<sup>2</sup>)で表した。

## 結果および考察

### 1. きんこの菌糸体培養と線溶活性

Table 1 に、数種の培地できのこの菌糸体培養をおこなって、培養液の示す線溶活性をまとめた。2% グルコースの基本培地に窒素源とその他の栄養源を含む培地について検討した結果、urea はいずれのきのこにも窒素源とはならなかった。それに反して、malt extract, corn steep liquir および yeast extract は、きのこの菌糸体培養および線溶活性に有効な窒素源であった。しかし soybean meal,

polypeptone は、タモギタケ (C8), マスタケ (W8), カワラタケの仲間 (W27), シメジの仲間 (W510) には、全く窒素源とはならなかった。カワラタケの仲間属するところの W141 は、もっとも高い活性を示し、次いでシメジの仲間の W510 に強い線溶活性がみられた。これらの活性は、表中に示した納豆菌やストレプトミセス属の示す活性に全く劣らなかった。その他の微生物で、こうじ菌 (M3) やカンヂダ属酵母に線溶活性がみられたことは、日常の食生活の中で発酵食品を食膳に供給することは健康志向の一つの提案となるものと思われる。

### 2. 線溶活性を高める炭素源

前述の結果から、市販常用種のタモギタケ (C8) に線溶活性がみられたことは、健康志向として食生活の中へきのこを食することの意識が重要である。Table 2 に、モルツ培地でのタモギタケおよび W141 と W510 の菌糸体培養における炭素源の線溶活性におよぼす効果を示す。結果からも明らかのように、スクロースやコーンスターチの効果がみられた。コーンスターチの効果は、その他 W141 や W510 の場合においてもグルコースよりも高かった。しかしながら、グリセロールの添加は線溶活性の低下をもたらした。モルツ培地中には、糖成分と

Table 1. Effect of nutrients on fibrinolytic activities of culture broths of Basidiomycetes

Nutrient	Fibrinolytic activity (mm <sup>2</sup> )									
	Strain No.									
	C8	W8	W27	W130	W141	W510	B10	B15	M3	Y9
Potato dextrose	-	56	-	64	875	168	-	-	-	72
Malt extract	143	105	110	30	675	63	81	25	20	-
Corn steep liquir	42	51	56	342	360	425	90	306	36	204
Yeast extract	-	64	-	-	856	380	288	156	-	272
Soybean meal	-	-	-	48	35	-	460	68	-	280
Polypeptone	-	-	-	20	-	-	340	63	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Basal medium contained 150ml of 2% glucose, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O in 300ml volume of Erlenmyer flask.

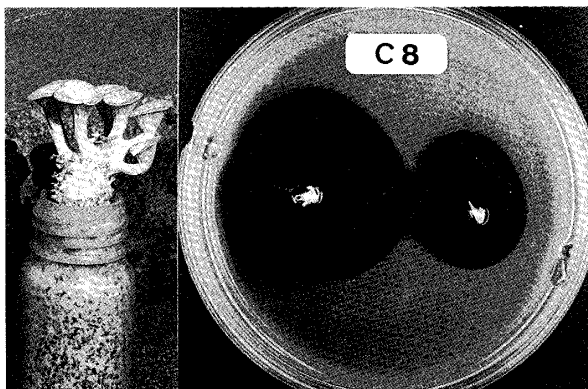
Each nutrient in table was added to the basal medium at the concentration of 2%, respectively. Cultivation was carried out for 2 weeks on rotary shaker at 25-30 °C. Initial pH of the medium was adjusted to 5.5. Fibrinolytic activity was determined by measuring the area of dissolved zone. Abbreviation in table shows ; C8 : tamogitake, W8 : masutake, W27 : kawaratake family, W130 : suehirotake, W141 : kawaratake family, W510 : shimeji family, B10 : *Bacillus natto* AKU 0206, B15 : *Streptomyces griseus*, M3 : *Aspergillus oryzae*, Y9 : *Candida tropicalis*.

**Table 2.** Effect of carbon sources on fibrinolytic activities of Basidiomycetes

Carbon source added	Fibrinolytic activity (mm <sup>2</sup> )		
	Strain No.		
	C8	W141	W510
None	110	306	225
Glucose	218	644	323
Glycerol	100	225	90
Sucrose	256	380	342
Lactose	210	676	289
Corn starch	272	729	326

Basal medium was 2% malt extract. Each carbon source in table was added to the basal medium at the concentration of 2%. Cultivation was carried out as the same condition as described in Table 1.

して、グルコース、フラクトースの他にマルトースとそのオリゴ糖からなっている。線溶活性の実験結果は、糖成分の添加効果とともに特にコーンスターチのようなデンプンの添加がもっとも線溶活性を高めることが認められた。これら線溶活性は、菌糸体培養における培養液中の示す活性であるが、菌糸体中にもその活性を保持しているものと考えられる。実際に、タモギタケの子実体形成をおこなって線溶活性を調べた結果を Fig.1 に示す。写真の結果は、ブナ・フスマのオガクス培地でのタモギタケの子実体形成と、子実体の傘の部分の大きな線溶とそ

**Fig.1.** Fibrinolytic activity of tamogitake (C8)

Left-hand photograph is 15 days old fruiting body on the sawdust medium, right-hand's shows dissolved zone of cap and stem on fibrin plate.

れより小さな茎の部分の線溶を示している。この線溶活性を示す物質については、精製分離して検討中であるが、酵素の性質を保持していることを確認している。きのこの種類によって、線溶活性を示す酵素にも相違のみられるものと考えられる。

### 3. 線溶活性を示した野生きのこ

Fig.2 に線溶活性を示した自然界から分離のきのこの写真を示す。滋賀県の足尾谷から採取したのカワラタケの仲間 (W27) とスエヒロタケ (W130)、仙台の森林公園から採取のカワラタケ (W141) と滋賀県朽木村から採取のシメジの仲間 (W510) である。他に、写真には掲載しなかったが足尾谷から採取のマスタケ (W8) がある。マスタケは食べられるきのこであること、また W510 はシロシメジと推定されるきのこでマスタケよりも線溶活性が高い。

**Fig.2.** Photographs of wild type strains (W27, W130, W141 and W510) having fibrinolytic activity

## 要 約

線溶活性物質の検索をきのこについて、その菌糸体培養による培養液中への生成を検討した。その結果、市販常用種のタモギタケに、自然界から分離のきのこでは、マスタケ、カワラタケ、シメジ科のものに線溶活性がみられた。菌糸体培養による線溶活性物質の生成に対する培養条件の検討の結果、モルツ培地を基本としてこれに糖源やコーンスターチなどのデンプンの添加が有効であることがわかった。

## 謝 辞

自然界から分離の野生きのこの同定について、お世話になりました菌類研究家、吉見昭一氏(京都市教育委員会、龍谷大学)に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Muraki, H. : *Experientia*, 43, 1110-1111(1987)
- 2) Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K. and Hiratani, H. : *Acta Haematol.*, 84, 139-143 (1990)
- 3) Sumi, H., Nakajima, H. and Mihara, H. : *Thromb. Haemostas.*, 54, 1267-1268(1993)
- 4) Sumi, H., Toki, N., Sasaki, K. and Robbins, K. C. : *Thromb. Res.*, 20, 711-714 (1980)
- 5) Toki, N., Sumi, H., Sasaki, K., Boreisha, I. and Robbins, K. C. : *J. Clin. Invest.*, 75, 1212-1222(1985)
- 6) Sumi, H.: *Molecular Med.*, 30, 1048-1049 (1993)
- 7) Astrup, T. and Mullertz, S.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 40, 346-351(1952)