

食用担子菌の成育に及ぼす
カラマツ水抽出物の影響に関する研究

高島 幸司

Studies on Effects of Water Extracts
from Karamatsu (Larch Wood)
on Mycelial Growth of Edible Basidiomycete Fungi

Koji TAKABATAKE

食用担子菌の成育に及ぼすカラマツ水抽出物の影響に関する研究

高 畠 幸 司

目 次

緒 言	3
第1章 既往の研究	4
第2章 数種食用担子菌の菌糸体成長に及ぼすカラマツ水抽出物の影響	7
第1節 カラマツ水抽出物の化学組成	7
1. 材料および方法	7
2. 結 果	7
第2節 産地別カラマツの水抽出物添加培地における菌糸体成長の比較	9
1. 材料および方法	9
2. 結 果	9
第3節 シベリア産カラマツの水抽出物添加培地における菌糸体成長	12
1. 材料および方法	12
2. 結 果	12
第4節 考 察	14
第5節 結 論	15
第3章 ヒラタケ菌によるカラマツ水抽出物の資化性と菌体外酵素の産出	15
第1節 カラマツ水抽出物の資化性	16
1. 材料および方法	16
2. 結 果	16
第2節 フェノール酸化酵素の産出	20
1. 材料および方法	20
2. 結 果	21
第3節 多糖分解酵素の産出	21
1. 材料および方法	21
2. 結 果	22
第4節 考 察	23
第5節 結 論	24
第4章 カラマツ水抽出物による ヒラタケ菌の菌糸体成長と菌体外酵素活性の経時変化との関係	24
第1節 菌糸体成長の変化	25
1. 材料および方法	25
2. 結 果	25
第2節 フェノール酸化酵素の経時変化	26
1. 材料および方法	26
2. 結 果	26
第3節 多糖分解酵素の経時変化	27
1. 材料および方法	27
2. 結 果	27

第4節 考 察	29
第5節 結 論	32
第5章 カラマツ水抽出物のヒラタケ栽培への利用	32
第1節 鋸屑培地による栽培への利用	33
1. 材料および方法	33
2. 結 果	33
第2節 未利用培地基材による栽培への利用	34
1. 材料および方法	34
2. 結 果	34
第3節 考 察	37
第4節 結 論	39
第6章 総合考察	40
結 言	43
謝 辞	44
引用文献	45
Summary	52

緒 言

我が国において、食用担子菌類、即ち「きのこ」は平安時代の歌集に「松茸・平茸・滑薄（なめすすき）」と詠まれ、かなり古くから食に供され、親しまれていたと思われる（小川，1978）。また、椎茸は安土・桃山時代には上流社会の料理に盛んに使われるようになり、江戸時代の中期頃より栽培が始まったとされている（中村，1983）。しかし近代的な栽培形態である純粋培養した菌糸体を接種する栽培方法は1940年代に確立され（中村，1982）、鋸屑と米糠やフスマ等の栄養材を混合した培地で栽培する方法は1950年代から長野県を中心に普及が始まった（衣川，1982）。現在、食用きのこ類の総生産額は1993年度実績で2,732億円となり（林野庁，1995）、1975年（1,265億円）以降飛躍的な増加を示し、食用きのこ類は農林作物の中で主要な位置を占めるに至った。このように食用きのこ類の生産が大きく成長した背景には、消費者の嗜好が自然・健康食品に対して高まって、きのこの食品イメージが消費者のニーズに合致したことにより需要が拡大されたこと、きのこ栽培にも施設を利用した生産方式が導入されて一年を通じて新鮮な食用きのこを供給できるようになったことが考えられる。

しかし、きのこ生産農家を取り巻く栽培状況は厳しく、依然としてほとんどの生産農家が零細規模であり、栽培技術は個々の経験に依存しているところが多く、きのこ栽培における生産効率の目安となるホダ木や培養基の単位重量当たりのきのこ収量は未だに不安定である。また、1990年以降、中国より安価な生シイタケの輸入量が急増し（林野庁，1995）、消費者からは近年のグルメブームを反映して野生味溢れる香りと歯ざわりを備えたきのこが求められている。このため、国際競争に耐えることができ、しかも消費者の嗜好の多様性に沿った高品質なきのこを安定して栽培できる高位安定化栽培技術の確立が必要とされている（特用林産ビジョン検討会，1993）。

きのこ栽培において、菌糸体の培養と子実体形成は重要な過程であり、この点についてホダ木・培養基内における菌糸体の動態と腐朽様式（林原ら，1983；中井，1986；Tuneda et al., 1987, 1989；Tuneda, 1988；Ohira et al., 1991, 1992；大平ら，

1993）、菌糸体の栄養生理（Ishikawa, 1967；北本ら，1978, 1980；阪本ら，1978；Tokimoto・Kawai, 1975；杉森ら，1971；吉田ら，1965；大山ら，1976；永曾・吉川，1975, 1978；Niderpruem et al., 1964；Mclaughlin, 1988）、菌糸体の培養過程で生じるホダ木・培地成分の変化（石川ら，1961；沖ら，1981；川上，1978；田中ら，1984；橋本ら，1966；時本ら，1982）、ホダ木の腐朽度や培地の成熟度と子実体形成との関係（福田ら，1987, 1988；Ohga et al., 1992a）、ホダ木や培養基内の菌体量と子実体形成との関係（Tokimoto・Fukuda 1981；Ohga, 1990a）に関して詳細に論じられ、菌糸体がホダ木や培養基を十分に腐朽し、菌体量が多くなるに従い子実体収量の増加が期待でき、さらにホダ木や培養基内に速やかに菌糸体が蔓延すればトリコデルマ菌等の害菌を防御できること（大賀・近藤，1978, 1981；日本きのこセンター，1977）が明らかにされた。したがって、きのこ栽培において菌糸体培養の成否はその後の子実体収量に多大な影響を及ぼすものと考えられる。

このような観点から、ホダ木や培養基の菌糸体の成育を促し、その後の子実体形成を容易にするきのこ菌糸体への成長促進剤の開発は、きのこ栽培における今日的な技術課題を解決する上で重要な役割を果たすものと思われる。これまでに担子菌の成長促進剤として、リグニンおよびリグニン前駆物質（河村ら，1983；池ヶ谷・後藤，1988）、ウロン酸（池ヶ谷ら，1993）、亜硫酸パルプ廃液成分（稲葉ら，1979, 1981；Zadrazil, 1974）、ネギ煎汁成分（大賀，1988）、木酢液蒸留成分（Yoshimura・Hayakawa, 1991, 1993；Ohta・Zhang, 1994）、植物ホルモン2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（Tsujiyam et al., 1993）、さらに子実体誘導物質としてサイクリックAMP（宇野・石川，1974）、酸性プロテアーゼ阻害剤SP-1（寺下ら，1980, 1981；村尾，1985）、セレブロシド（Kawai・Ikeda, 1982, 1983）、安息香酸（村尾，1986）、酵母抽出物（松尾ら，1992）、各種担子菌類の抽出液（Urayama, 1969）等が報告されており、きのこ菌糸体の栄養成長や子実体形成を生理・生化学的に解明する上で貴重な知見が蓄積されてきている。しかし、きのこ生産農家が実際の栽培に使用するには、まず成長促進剤は安価で、安定して入手できることが求められるが、この要件に関しては未だ

に十分に満たされた状態ではない。

ところで、第二次世界大戦後の拡大造林により、特に北海道・長野県を中心に寒冷地域では、成長が早いことからカラマツ造林が積極的に行われ、現在、育成されたカラマツ材は構造材などに利用されている。また、日本海側の地域を中心にシベリア産のカラマツ材が毎年多量に輸入されている。これらカラマツ材を製材する際には多量の鋸屑が生じているが、カラマツ製材鋸屑は毛羽立ちが著しく、アク抜きが難しいとの理由から、製材鋸屑の一般的な用途である家畜敷料やきのこ培地基材として、ほとんど利用されていない。しかし、カラマツ材中に水溶性多糖類であるアラビノガラクトンが多く含有していることに着目し、最近になってカラマツ製材鋸屑を利用してアラビノガラクトンを製造することが可能となった(水本, 1991, 1994)。このアラビノガラクトンを製造する工程の中間生成物であるカラマツ水抽出物は、安定して多量に、しかも低コストで生産できる。この水抽出物が担子菌の菌糸体成長に対して促進作用を示せば、食用きのこ栽培に利用することが可能となる。

そこで本研究では、カラマツ水抽出物のきのこ菌糸体の成長と子実体形成に及ぼす影響を明らかにしてカラマツ水抽出物を食用きのこ栽培の成長促進剤として利用することを目的に、第1章では担子菌類の成長に影響を及ぼす樹木抽出物、カラマツ材抽出物に関する既往の研究を述べ、第2章では、産地の異なるカラマツ材、すなわちシベリア産、長野県産、北海道産のカラマツ材について、その水抽出物の化学組成を明らかにし、各々の水抽出物が数種の食用きのこ菌糸体の成長に及ぼす影響を比較検討した。第3章ではカラマツ水抽出物の添加により最も顕著な菌糸体成長を示したヒラタケ菌を用いて、カラマツ水抽出物の資化性と菌体外酵素の産出状況を、第4章では培養経過に伴う菌糸体成長の変化と菌体外酵素活性の経時変化を明らかにして、菌糸体成長に及ぼすカラマツ水抽出物の促進作用とヒラタケ菌によるカラマツ水抽出物の分解様式を論議した。第5章ではカラマツ水抽出物を鋸屑培地および鋸屑以外の未利用基材の培地に添加してヒラタケ栽培を試み、カラマツ水抽出物の実用的な利用性について検討した。これらの結果に基づき、第6章ではカラマツ水抽出物の食用担子菌類に及ぼす生理作用と食用きの

こ栽培への利用性について、今後の展望を含めて総合的に論議した。

第1章 既往の研究

担子菌類の成長に及ぼす樹木抽出物の研究は、木材腐朽菌に耐久性を有する樹木抽出物の解明、即ち担子菌類の成長に阻害作用を示す成分の検索を中心に展開されてきた。イスノキ、カラマツ、ペイマツのタキシフォリン、ヒノキのトロポロン類、ペイヒバのヌートカチン、ユーカリのスチルベン類、インセスシーダのカルバクロール、パドクの没食子酸、ホワイトオークのエラグタンニン、ベイスギのツヤプリシン類、クリのタンニン(善本, 1983)と樹木抽出物由来の多数の抗菌成分が報告されている。これら抗菌成分のバイオアッセイには、木材腐朽菌を対象としているため、カワラタケ(*Coriolus versicolor*)、オオウズラタケ(*Tyromyces palustris*)、ワタグサレタケ(*Poria vaporria*)、ヒイロタケ(*Polystictus sanguineus*)が供試され、いずれも硬質菌類が用いられた。

食用きのこ栽培が盛んになるにつれて、原木栽培のホダ木適性や菌床栽培における培地適性に関する研究が進められるようになり、樹木の抽出成分と食用担子菌類の菌糸体成長との関係、特に針葉樹材抽出物中の阻害成分について論議されるようになった。大賀ら(1977)は、シイタケ(*Lentinus edodes*)に阻害作用を示すアカマツ、ヤマモモの抽出成分を検索した結果、アカマツでは脂肪酸・フェノール類、ヤマモモではミリシトリンが各々阻害成分であることを明らかにした。金城・近藤(1979)は、針葉樹材(ヒノキ、アカマツ、カラマツ、スギの心辺材)のエタノール・ベンゼン抽出物には、シイタケ、ヒラタケ(*Pleurotus ostreatus*)、エノキタケ(*Flammulina velutipes*)、ナメコ(*Pholiota nameko*)に対する阻害作用があり、金城・屋我(1986)は、特に阻害性の著しいヒノキをとりあげ、阻害成分としてT-muurolol, α -cadinolが含まれていることを明らかにした。中島ら(1980)は、スギ材ではシイタケ菌の成育が劣るので、スギ内皮および辺材中のシイタケ菌に対する阻害成分を検討したところ、多量のフェルギノールの存在を確認した。米山ら(1989)は、トドマツ材のアルコール抽出物中のヘキサン可溶部

にはシイタケ、エノキタケ、ヒラタケ、ナメコ、マイタケ (*Grifola frondosa*)、タモギタケ (*Pleurotus cornucopiae*, var. *citrinopileatus*) に対する阻害作用があり、Yoneyama et al. (1990) はセスキテルペン類のジュバピオンが原因物質であることを明らかにした。三浦ら (1984) は、タモギタケに対するエゾヤマザクラ抽出物の影響を検討し、フラボノイド類が菌糸伸長に阻害作用を示すことを明らかにした。高島 (1987, 1989) は、針葉樹2樹種・広葉樹13樹種の辺心材木粉におけるシイタケ、ナメコ、ヒラタケの培地適性を検討し、シイタケに対してホオノキ・ヒノキの辺心材、ウワミズザクラ・スギ・ニセアカシア・コシアブラの心材、ナメコにはクリ・ウワミズザクラ・ホオノキ・ニセアカシアの心材、ヒラタケにはホオノキ辺心材、ニセアカシア・クリ・コシアブラの心材の各温水抽出物が成育阻害作用を示すことを指摘した。また、担子菌以外の菌類に関して、善本ら (1984) は、コナラ属 (*Quercus*) 樹木 (コナラ、ミズナラ、クヌギ) の樹皮温水抽出物中に存在するポリフラバノール、ポリガロイルエステル様化合物が食用きのこ栽培の害菌であるトリコデルマ菌類の成長を阻害することを明らかにしており、鮫島・善本 (1984) は、スギ、ヒノキ、アカマツ、カラマツの針葉樹温水抽出物にもトリコデルマ菌やヒポクレア菌の成育を阻害する成分が存在することを報告している。

一方、担子菌類の成育に促進作用を示す樹木抽出物に関する研究は乏しく、スギ、ヒノキ、アカマツ材の内樹皮温水抽出物がシイタケ、キクラゲの菌糸体成育に (鮫島・善本, 1984)、シナノキ辺心材部やコナラ、ミズナラ、クヌギの温水抽出物がシイタケの菌糸体成長に (松尾, 1957; 善本ら, 1984)、イチヨウ生葉の酢酸エチル抽出物がシイタケ、エノキタケの菌糸体成長と子実体形成に促進作用を示す (沖・橘, 1994, 1995) ことが報告されている程度である。また、西田ら (1992, 1993, 1994, 1995) は担子菌類の宿主選択性に注目して、サクラ (*Prunus*) 属の樹木に発生しているカワウソタケ (*Innotus mikadoi*) やエゴノキにのみ発生するエゴノキタケ (*Daedaleopsis styracina*) は、それぞれサクラとエゴノキの温水抽出物、特にフラボノイド系の配糖体やリグナン系の配糖体によって菌糸体成長と胞子の発芽が促されることを明らかにしている。

しかし、いずれの樹木抽出物も促進作用を示す担子菌の種類は、一ないし二種類に限定されており、広範囲な菌種に対する作用は明らかにされていない。

カラマツ属 (*Larix*) の樹木は世界的に広く分布しており、カラマツ材いわゆる larch wood には、European larch (*Larix decida*)、Dahurian larch (*L. gmelinii*)、Kurilian larch (*L. gmelinii*, var. *japonica*)、Tamarack larch (*L. laricina*)、Japanese larch (*L. leptolepsis*)、Sabalpine (mountain) larch (*L. lyallii*)、Western larch (*L. occidentalis*)、*L. potaninii*、Siberian larch (*L. siberica*)、*L. sakaczewii* がある。一般に、針葉樹材には1%未満のアラビノガラクトンを含んでいるが、larch wood の心材部に限っては、多量のアラビノガラクトンが仮道管や放射組織の細胞内腔に沈着して含まれており、その含有量は5~30%である (Côté et al., 1966)。アラビノガラクトンの含有量と樹幹内での分布は、Côté et al. (1966, 1967)、Côté・Timell (1967) により、Tamarack larch, European larch, Western larch について詳細に検討されている。その結果、アラビノガラクトンの含有量は、樹種によって異なり、年輪幅が狭く、樹高が高く、樹齢が低い部位で多くなり、樹幹よりも枝の方が、アテ材より正常材の方が多くなること、また、アラビノガラクトンの水平分布は、髄周辺より心辺材の境界付近にかけて含有量が多くなり、心辺材の境界部位で最大含有量を示し、そこから辺心材にかけてアラビノガラクトンの含有量は急激に減少し、辺心材部分では低い含有量で推移することが明らかにされた。このような水平分布の傾向は、橋爪・高橋 (1974) の日本カラマツや水本ら (1994) のシベリア産カラマツにおいても同様な傾向が認められている。さらに、Western larch において、樹齢が高くなるに従い、材中の有機酸濃度が高くなりアラビノガラクトンが加水分解を受けて低分子化されていることが提示されている。カラマツ材由来のアラビノガラクトンの構造は、Tamarack larch のアラビノガラクトンに関して Fu・Timell (1972)、Lynch et al. (1968) により、Japanese larch に関して Aspinall et al. (1968)、Teratani et al., (1987) により検討されており、いずれのアラビノガラクトンも β -D (1 \rightarrow 3) 結合したポリガラクトースを主鎖として、これに0-6位でD-ガラクトース、L-アラビノース、グルクロン酸からなる側鎖が分

岐していることが明らかにされた。しかし、樹種により側鎖の分岐の仕方が異なり、微妙に分子構造が異なっており、カラマツ材由来のアラビノガラクトンの詳細な構造は明らかにされていない。

カラマツ材, Japanese larch のフェノール成分に関しては, 出町ら (1968) により心材部のフェノール成分について, 竹原・笹谷 (1979) により辺材部のフェノール成分について, 笹谷ら (1980, 1987) により樹幹内のフェノール成分の分布について詳細に検討されている。すなわち, 材中の主要なフェノール成分はタキシフォリン, カツラニンのフラボノール類であり, ケルセチン, ケンフェロールのフラボノール類が少量存在している。これらのフラボノイド類の樹幹内での分布は, 半径方向で形成層隣接の辺材から心材へと緩やかに増加し, 辺心材境界の心材側で急激に増加し, 髓へと徐々に減少していく傾向が認められている。フラボノイド類以外のフェノール成分としてリグナン類が確認されている。このフラボノイド類の分布傾向は, アラビノガラクトンの分布傾向と類似しているが, 両者の相互関係については明らかにされていない。

これまでのカラマツ材に関連した担子菌類の研究は, 主に材質腐朽菌について検討されてきた。近年, カラマツ材の良質材生産のため大径木施業が行われているが, カラマツは病害に弱い樹種であり, 生立木の材質腐朽病が多く, 腐朽病の被害は樹齢が増加するとともに拡大している。特に根株心腐病は深刻な被害をもたらしている。カラマツ根株心腐病に関する研究は, Ohsawa et al. (1987, 1992, 1994) により, ハケ岳東山麓, 富士山麓で被害実態, 病原菌の分離とその遷移, 羅病木に成育する菌類による木材成分の資化能力について詳細に検討された。カラマツ根株心腐病菌として, カイメンタケ (*Phaeolus schweinitzii*), レンゲタケ (*Postia balsamea*), ハナビラタケ (*Sparassis crispa*) 等が分離され, いずれも褐色腐朽を起こす担子菌類であり, 単糖類, アラビノガラクトン, ヘミセルロースを資化していること, 生立木の腐朽は腐朽菌のみによって生じるのではなく, 非担子糸状菌の遷移によって生じること, さらに, これら糸状菌はカラマツ冷水抽出物や腐朽材の冷水抽出物を主に資化していることが明らかにされた。

エノキタケ, ヒラタケ, ヤナギマツタケ (*Agrocybe*

cylindracea) の菌床栽培では, 培地基材に針葉樹鋸屑が用いられ, いずれもスギ材の使用が奨められている (農耕と園芸編集部, 1988)。しかし, 最近の鋸屑流通の事情は, 各地でのきのこ栽培が振興してきたことにより良質のスギ鋸屑の入手が困難となり, 他の針葉樹鋸屑に依存しなければならない状況である。しかし, カラマツ材の鋸屑を使用するには, 散水堆積の期間を十二分にとることが求められ (柿本, 1993), カラマツ鋸屑はエゾマツ・トドマツに比べ散水堆積の影響を受けにくく, 鋸屑の改善が遅れることが指摘されている (沓沢ら, 1980)。このため, 他の針葉樹鋸屑に比べて, きのこ菌床培地基材としての適性は低く評価されている。カラマツ鋸屑がきのこ栽培の培地基材として適さないのは抗菌作用を有するフェノール性成分等の阻害成分 (いわゆるアク) が材中に存在し, アク抜きが難しいためであるとされている。

カラマツ鋸屑よりアラビノガラクトンを製造するには, 鋸屑を多量の水で抽出処理を行うが, その際に副次的に生じるカラマツ鋸屑の水抽出残渣は, アラビノガラクトンと共に水溶性フェノール性成分も同時に溶脱されている。そこで高島らは, カラマツ鋸屑の水抽出残渣は, 屋外で散水堆積処理した鋸屑, いわゆるアク抜き処理した鋸屑と同様にきのこ菌床栽培の培地基材として利用できるのではないかと想定し, カラマツ鋸屑の水抽出残渣についてエノキタケ, ヒラタケ, ヤナギマツタケに対する培地適性を検討した。その結果, カラマツ鋸屑の水抽出残渣は未処理のカラマツ鋸屑よりも子実体収量が多くなり, また, 従来より培地基材として利用されているスギ材 (辺材) 鋸屑に比べて, 同等もしくはそれ以上の子実体収量を示した (高島ら, 1991; 高島, 1992)。このことから, カラマツ鋸屑の水抽出残渣は培地基材として十分に利用可能なことが明らかとなったが, 同時にカラマツ材のアクに相当するカラマツ水抽出物には抗菌成分の存在が推察された。次いで, カラマツ水抽出物の抗菌性を検討したところ, きのこ栽培の害菌であるトリコデルマ菌類の成長に対しては強い阻害作用を示した。一方, 食用担子菌の成長に対しては阻害作用が認められず, むしろ菌糸体成長を促進させる傾向が認められた (高島, 1996)。

そこで, これらの結果に基づいて, 本論文では食用きのこ栽培にカラマツ水抽出物を成長促進剤とし

て利用する観点から、食用担子菌の菌糸体成長、子実体形成に及ぼすカラマツ水抽出物の影響に関する検討を展開した。

第2章 数種食用担子菌の菌糸体成長に及ぼす カラマツ水抽出物の影響

これまでにアラビノガラクトランの代謝について、ヒト糞便によりアラビノガラクトランが代謝され低級脂肪酸が産出されること (Englyst et al., 1987)、ヒト腸内優先菌である *Bacteroides ovatus* やラット・ヒトの腸内細菌である *Bifidobacterium longum* がアラビノガラクトランを資化して著しく増殖すること (MaCfarlane・Gibson, 1991; 今村ら, 1992) が報告されている。しかし、食用担子菌類に対するアラビノガラクトランの作用は明らかにされていない。

カラマツ材由来のアラビノガラクトランは材の水抽出液を脱フェノール処理して得られる (水本・高橋, 1987) ので、水抽出物にはアラビノガラクトランが多量に含まれている。本章では、本邦産 (北海道産、長野県産)、シベリア産と産地の異なるカラマツ材の水抽出物について、その化学組成とヒラタケ、エノキタケ、シイタケの食用担子菌の成育に及ぼす影響を比較検討した (高島・水本, 1994)。さらに、三産地間で最も水抽出率が高いため、水抽出物の調製が容易なシベリア産カラマツ材の水抽出物について前述の食用担子菌三菌種の外にヤナギマツタケ、ナメコ、マイタケの三菌種を追加し、液体・寒天・木粉培地と様々な培地条件で食用担子菌の成育に及ぼす影響を検討した (高島ら, 1994)。

第1節 カラマツ水抽出物の化学組成

1. 材料および方法

(1) カラマツ水抽出物

シベリア産カラマツ (*Larix sp.*) および本邦産カラマツ (*Larix leptolepis*: 北海道産・長野県産) の各製材鋸屑 (気乾) に、それぞれ重量比で5倍量の水を加え、室温にて攪拌しながら30分間抽出した。濾別した抽出液を室温にて減圧濃縮し、130℃のドラムで数分間乾燥して、粉末状のカラマツ水抽出物を得た (なお、以下では、シベリア、北海道および長野県の各産地のカラマツ材より得られた水抽出物をそれぞれシベリア産、北海道産、長野県産と略称

する。)。製材鋸屑の気乾重量に対する水抽出物の収率は、シベリア産で約10%、北海道産、長野県産は各々約5%であった。

(2) カラマツ水抽出物の化学組成分析

シベリア、北海道、長野県産の各カラマツ水抽出物について全糖量、中性還元糖の組成、ウロン酸量、全フェノール量、分子量分布および重量平均分子量を測定した。

全糖量は Somogyi-Nelson 法 (Somogyi, 1952) によって測定し、全還元糖量 (重量比 Galactose : Arabinose = 3 : 22基準) に0.9を乗じて求めた。ウロン酸量はカルバゾール・硫酸法 (福井, 1969) によって、全フェノール量は Folin・Denis 法 (Folin・Denis, 1915; Swain・Hills, 1959) (Taxifolin基準) によって測定した。中性還元糖は、ポストカラム方式の HPLC (東ソーKK製、還元糖分析システム) により分析した。すなわち、各単糖を糖-ホウ酸アニオン性錯化合物としてから、陰イオン交換カラム (東ソーKK製, TSKgel, Sugar AXI) で分離 (Sinner et al., 1975) 後、 α -シアノアセトアミドを反応させ (Honda et al., 1981)、UV検出器 (波長275nm) で検出し、定量した。

分子量分布および重量平均分子量は、GPCカラム (東ソーKK製, TSKgel, G4000PWX, G3000PWL) を用い、50mMNaCl溶液を分離溶液として試料を溶出分離し、RIおよびUV (波長280nm) 検出して測定した。なお、標準物質には、Pullulan (昭和電工KK製, Mw850000, 380000, 186000, 100000, 48000, 23700, 12200, 5800), Maltoheptaose (KK林原製, Mw1153), Maltose (KK林原製, Mw360), α -Dextrose (和光純薬KK製, Mw180), L-Arabinose (和光純薬KK製, Mw150) を用いた。

2. 結果

各産地のカラマツ水抽出物の全糖量、中性還元糖量の組成 (以下、糖組成とする。), ウロン酸量、全フェノール量を測定し、その結果を表-2-1に示す。

全糖量ではシベリア産は、91.5%となり、北海道産、長野県産の85~86%に比べて若干高い値を示した。糖組成では、北海道産でマンノースが微量認められたが、シベリア産や長野県産では認められなかった。しかし、いずれの産地もアラビノースが11~13%、ガラクトースが87~89%となり、ほぼ同様な

表-2-1 カラマツ水抽出物の化学組成

The chemical composition of water extracts from larch wood.

Sample	T. Sugar ¹⁾ (%) ⁵⁾	Sugar Compo. ²⁾			Uronic Acid ³⁾ (%) ⁵⁾	T. phenol ⁴⁾ (%) ⁵⁾
		Man	Ara	Gal(%)		
Siberia	91.5	—	11.6	88.4	0.84	0.47
Hokkaido	85.8	0.8	10.7	88.5	0.79	1.50
Nagano	85.1	—	13.1	86.9	0.80	1.58

1) Somogyi-Nelson method (Ara/Gal = 3/22, molecular weight ratio used as the standard.) T. Sugar = T. reducing sugar × 0.9.

2) IEC (column: TSKgel SugarAXI)

3) Carbazole · Sulfuric acid method (Glucuronic Acid used as the standard.)

4) Folin · Denis method (Taxifolin used as the standard.)

5) Percentage of the oven-dried weight.

糖組成となった。ウロン酸量は、いずれの産地も0.8%前後となった。このように全糖量、糖組成、ウロン酸量については、各産地間で顕著な相違は認められなかった。しかし、全フェノール量は、シベリア産が0.47%であったのに対し、北海道産が1.50%、長野県産が1.58%となり、北海道、長野県産はシベリア産の3.5倍余りのフェノール含量を示した。

重量平均分子量、分子量分布を検討したところ、重量平均分子量は、シベリア産は18400、北海道産は18700となりほぼ同じ分子量であった。長野県産は21400となり、シベリア産や北海道産よりやや大きな分子量を示した。分子量分布は、いずれの産地

もほぼ同様な分布状態を示した(図-2-1)。重量平均分子量、全糖量、糖組成の結果から、いずれの産地のカラマツ水抽出物も主要構成成分は水溶性多糖類のアラビノガラクトンであると考えられる。

水溶性フェノール性成分の分子量分布を測定した結果を図-2-2に示す。シベリア産は、本邦産よりも全分子量域で波長280nmの吸収が低く、フェノール性成分の含有量が少ないことが示唆され、表-2-1の全フェノール量の測定結果と符合した。北海道産と長野県産は、概ね同様な分布傾向を示したが、北海道産では、高分子量領域での吸収が認められ、フェノール類の縮重合した成分の存在が示唆された。

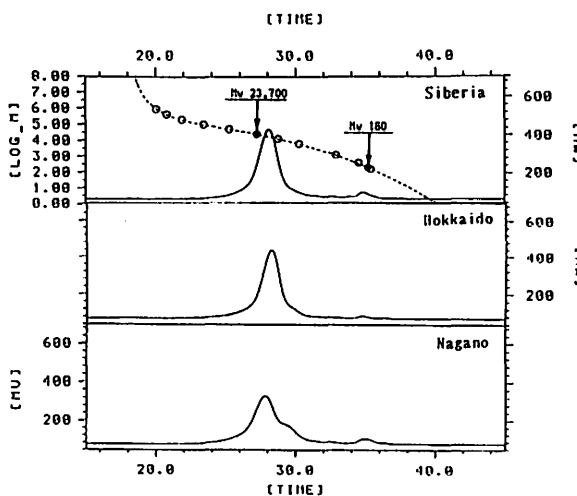


図-2-1 本邦産およびシベリア産カラマツ水抽出物のRIによるGPCクロマトグラフ
GPC-chromatography of water extracts from Japanese or Siberian larch wood by RI.

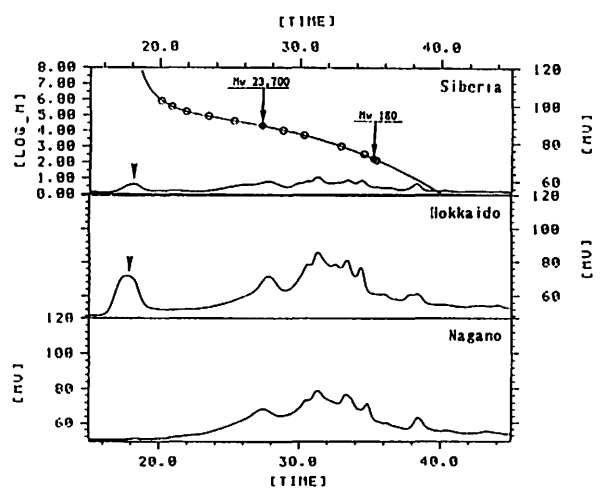


図-2-2 本邦産およびシベリア産カラマツ水抽出物のUVによるGPCクロマトグラフ
矢頭はフェノール性成分の高分子領域を示す。
GPC-chromatography of water extracts from Japanese or Siberian larch wood by UV. Arrow heads indicate high molecular weight regions of phenolic compounds.

第2節 産地別カラマツの水抽出物添加培地における菌糸体成長の比較

1. 材料および方法

(1) カラマツ水抽出物

前節「カラマツ水抽出物の化学組成」において、調製、供試したシベリア産、北海道産、長野県産の各カラマツ材の水抽出物を供試した。

(2) 供試菌

当センター保存菌株である以下の3菌株を供試した。

ヒラタケ

Pleurotus ostreatus (Jacq: Fr.) Kummer. (Po-03)

エノキタケ

Flammulina velutipes (Curt.: Fr.) Sing. (Fv-4)

シイタケ *Lentinus edodes* (Berk.). (Le-01)

(3) 供試培地

培地には、ポテトデキストロース培地 (PD培地, Difco製) および同寒天培地 (PDA培地, 日水製) を供試した。カラマツ水抽出物の添加量は、W/V比で1, 2, 3, 5, 10, 15%とした。なお、接種源には、供試菌を麦芽エキス・酵母エキス寒天培地 (MYA培地: Glucose 4g, Malt extracts 10g, Yeast extracts 4g, Agar 15g, Dis.Water 1L) で24℃, 6~10日間平面培養した後、コルクボーラーで直径5mmに打ち抜いたディスクを用いた。

(4) 菌糸体成長量

菌糸体成長量として、培養菌糸体の伸長量と乾燥重量を測定した。伸長量は善本らの方法 (善本ら, 1984) に準じて測定した。即ち、直径12mm, 長さ160mmのライアン管にPDA培地を1.8ml分注して菌糸体伸長量測定用培地を調製し、その一端に接種源を接種した後、24℃にて7日間培養して菌糸体伸長量を測定した。

菌糸体乾燥重量は、次の方法で求めた。即ち、50ml容三角フラスコにPD培地を5ml分注して菌糸体乾燥重量測定用培地を調製し、120℃, 15分間の条件で殺菌した後、各供試菌を接種し、24℃にて7日間静置培養した。その後、菌糸体を濾別し、温水、冷水で順次洗浄後、菌糸体の乾燥重量を測定した。各試験区とも5検体づつ供試し、繰り返しを行った。

2. 結果

(1) 菌糸体伸長成長

各産地のカラマツ水抽出物について、水抽出物濃

度の異なるPDA培地でヒラタケ、エノキタケ、シイタケの菌糸体を培養し、菌糸体伸長量を測定した結果を図-2-3~5に示す。

ヒラタケに関して、シベリア産では添加濃度を1~3%とした場合、対照区より若干良好な伸長量を示した。2%の添加濃度で最大値となり、対照区の1.2倍の伸長量を示した。しかし、添加濃度を10%以上にすると、伸長量は対照区よりも低下し、15%濃度では対照区の0.9倍となった。北海道産および長野県産は、ともに添加量が増加するに従い、伸長量は低下する傾向を示し、低下の程度は北海道産が顕著であった。15%の添加濃度では、北海道産は対照区の0.5倍となり、長野県産は対照区の0.8倍となった (図-2-3)。

エノキタケに関して、シベリア産、長野県産ともに1~5%の添加濃度で伸長量は、対照区に比べて良好となった。伸長量の最大値を示す添加濃度は、シベリア産では2~5%であり、対照区の1.3倍となった。長野県産では1%であり、対照区の1.5倍となった。しかし、10%あるいは15%の添加濃度では、対照区と同等もしくは、それより劣った伸長

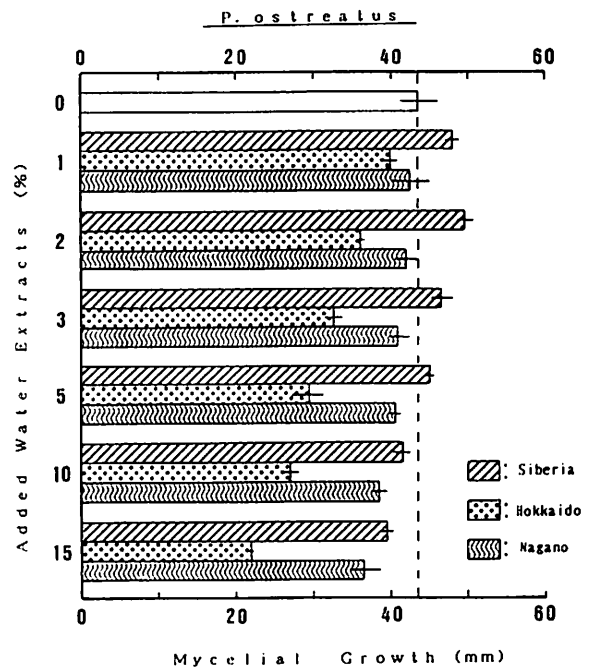


図-2-3 本邦産およびシベリア産カラマツ水抽出物の添加濃度と菌糸体伸長成長との関係 (ヒラタケ) 横棒は標準偏差を示す。

Relationships between added amount of water extracts from Japanese or Siberian larch wood in PDA medium and mycelial growth of *Pleurotus ostreatus* incubated for seven days. The horizontal bars represent standard deviations.

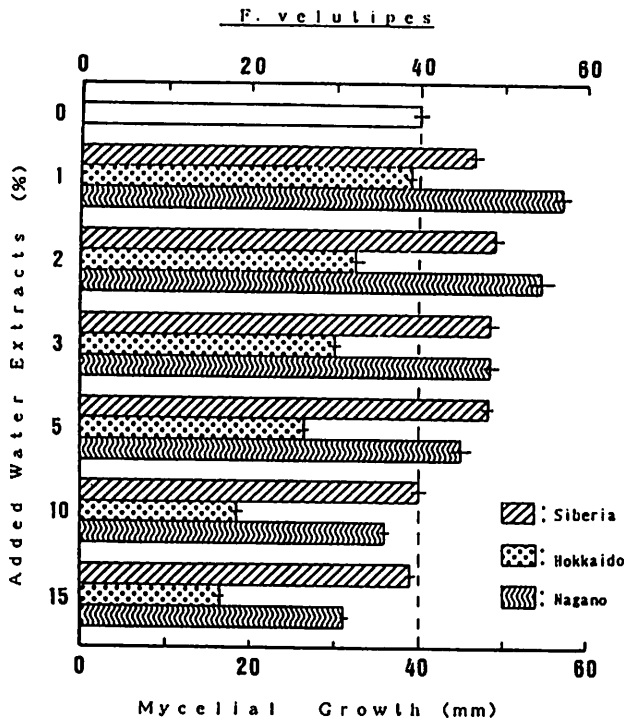


図-2-4 本邦産およびシベリア産カラマツ水抽出物の添加濃度と菌糸体伸長成長との関係(エノキタケ) 横棒は標準偏差を示す。

Relationships between added amount of water extracts from Japanese or Siberian larch wood in PDA medium and mycelial growth of *Flammulina velutipes* incubated for seven days. The horizontal bars represent standard deviations.

量となった。北海道産は、添加量が増加するに従い伸長量は著しく低下し、10%の添加濃度で対照区の0.5倍、15%の添加濃度で0.4倍となった(図-2-4)。

シイタケに関して、シベリア産は、1%の添加濃度で対照区よりやや良好となったが、添加濃度を2%以上とした場合、添加量が増加するに従い、伸長量は低下し、15%の添加濃度では対照区の0.6倍となった。北海道、長野県産は、添加量が増加するに従い、伸長量は低下し、低下の度合いは北海道産が著しく、10%の添加濃度で対照区の0.5倍、15%の添加濃度で0.35倍となった。長野県産は、10%の添加濃度で対照区の0.9倍、15%の添加濃度で0.85倍となった(図-2-5)。

菌糸体伸長量において、シベリア産は、いずれの供試菌に対しても1~2%の添加濃度で、対照区の1.1~1.3倍の伸長量となり、若干の促進作用を示したが、10%以上の添加濃度では、対照区と同程度以下の伸長量となった。北海道産は、供試した全ての菌種で添加濃度が高くなるに従い、伸長量は低下し、10%あるいは15%の添加濃度では、対照区の1/2~

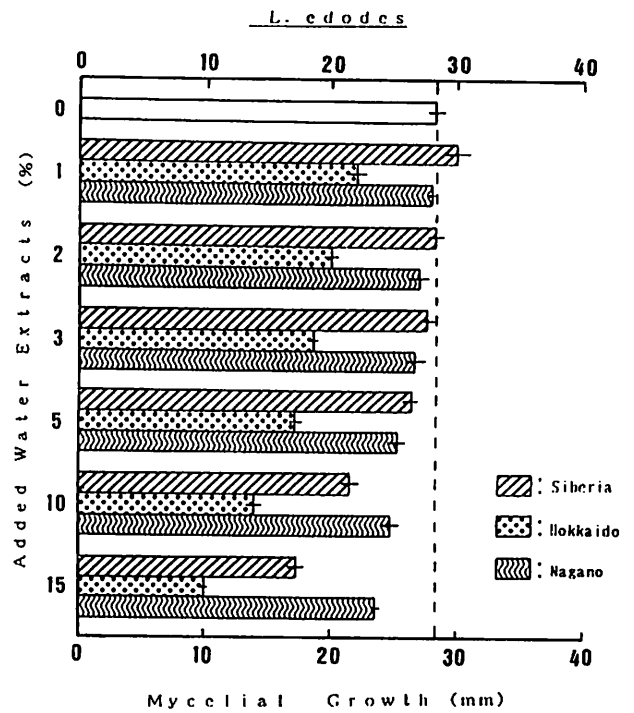


図-2-5 本邦産およびシベリア産カラマツ水抽出物の添加濃度と菌糸体伸長成長との関係(シイタケ) 横棒は標準偏差を示す。

Relationships between added amount of water extracts from Japanese or Siberian larch wood in PDA medium and mycelial growth of *Lentinus edodes* incubated for seven days. The horizontal bars represent standard deviations.

1/3の伸長量に抑制された。長野県産は、エノキタケにおいて1~5%の添加濃度で若干の促進作用を示したが、10%以上の添加濃度では、対照区より低下した。ヒラタケ、シイタケでは、北海道産と同様に添加量が増加するに従い、伸長量は低下し、いずれも15%の添加濃度では対照区の0.8倍前後となった。

(2) 菌糸体重量成長

各産地のカラマツ水抽出物について、添加濃度の異なるPD培地でヒラタケ、エノキタケ、シイタケ菌糸体を培養し、菌糸体重量を測定した結果を図-2-6~8に示す。

ヒラタケに関して、いずれの産地のカラマツ水抽出物も添加量が増加するに従い、菌糸体重量は顕著に増加した。1~3%の添加濃度では、産地間で差が生ぜず、3%の添加濃度で、いずれの産地も対照区の2倍程度の菌糸体重量を示した。添加濃度を5%以上とした場合、添加濃度が高くなるに従い、産地間で差が認められ、15%の添加濃度では、シベリア産は対照区の7.5倍、北海道産、長野県産は4.5倍前後となった(図-2-6)。

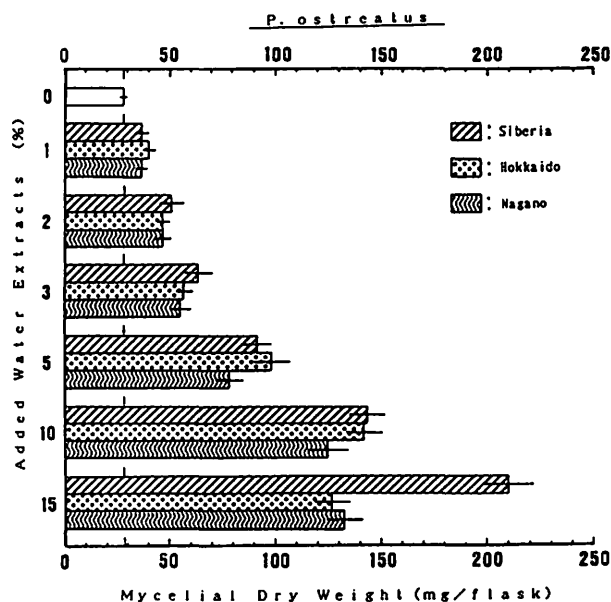


図-2-6 本邦産およびシベリア産カラマツ水抽出物の添加濃度と菌糸体重量成長との関係(ヒラタケ)
 横棒は標準偏差を示す。
 Relationships between added amount of water extracts from Japanese or Siberian larch wood in PD medium and mycelial dry weight of *Pleurotus ostreatus* incubated for seven days. The horizontal bars represent standard deviations.

エノキタケに関して、ヒラタケ同様に、いずれの産地も添加濃度が高くなるに従い、菌糸体重量は増加した。1～3%の添加濃度では、産地間で差が生ぜず、3%の添加濃度で対照区の1.5～1.9倍の菌糸体重量を示した。5%以上の添加濃度では、産地間で差が生じ、その差は、添加濃度が高くなるに従い大きくなった。15%の添加濃度では、シベリア産、長野県産は対照区の4.6倍の菌糸体重量を示したのに対し、北海道産は対照区の2倍程度にとどまった(図-2-7)。

シイタケに関して、いずれの産地も添加量が増加するに従い菌糸体重量は増加した。1～3%の添加濃度では産地間で差が生ぜず、3%の添加濃度で対照区の3～4倍の菌糸体重量を示した。しかし、5%以上の添加濃度では、産地間で差が生じ、その差は濃度が高くなるに従い大きくなった。15%の添加濃度では長野県産が対照区の約9倍の菌糸体重量を示したのに対し、シベリア産、北海道産は5倍余りとなった(図-2-8)。

供試した3菌種全てに対して、シベリア産および本邦産ともに添加濃度が高くなるに従い菌糸体重量

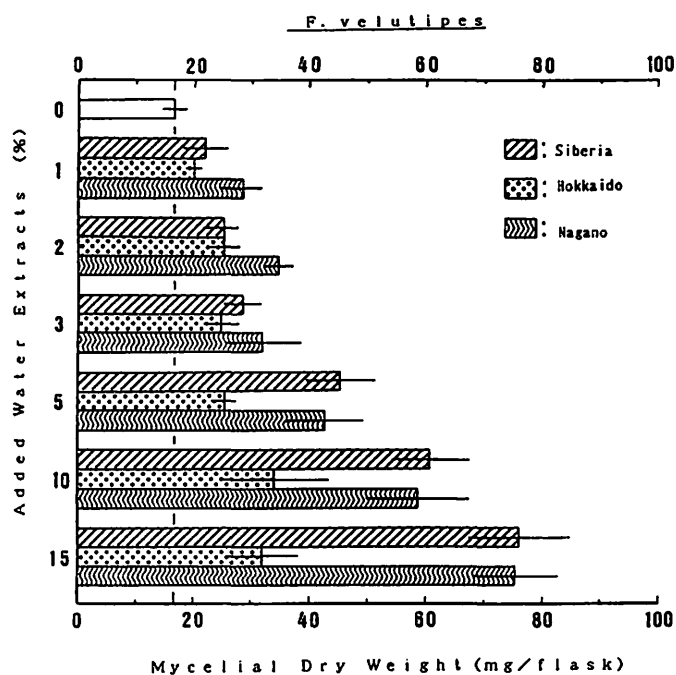


図-2-7 本邦産およびシベリア産カラマツ水抽出物の添加濃度と菌糸体重量成長との関係(エノキタケ)
 横棒は標準偏差を示す。
 Relationships between added amount of water extracts from Japanese or Siberian larch wood in PD medium and mycelial dry weight of *Flamulina velutipes* incubated for seven days. The horizontal bars represent standard deviations.

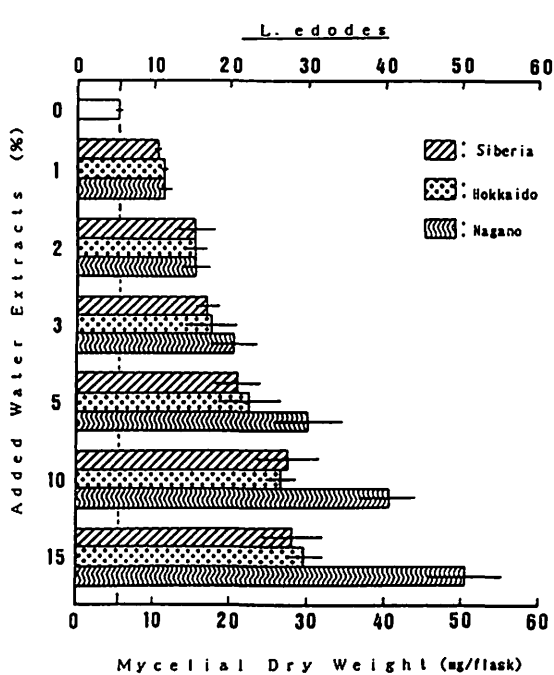


図-2-8 本邦産およびシベリア産カラマツ水抽出物の添加濃度と菌糸体重量成長との関係(シイタケ)
 横棒は標準偏差を示す。
 Relationships between added amount of water extracts from Japanese or Siberian larch wood in PD medium and mycelial dry weight of *Lentinus edodes* incubated for seven days. The horizontal bars represent standard deviations.

は顕著に増加した。1～3%の範囲では、産地間で差は生じなかったが、5%以上の添加濃度では菌種に応じて産地間において差が生じた。すなわち、ヒラタケではシベリア産、エノキタケではシベリア産および長野県産、シイタケでは長野県産のカラマツ水抽出物は各々の菌糸体の重量成長に対して顕著な促進作用を示した。

第3節 シベリア産カラマツの水抽出物添加培地における菌糸体成長

1. 材料および方法

(1) シベリア産カラマツ水抽出物

シベリア産カラマツ (*Larix sp.*) の製材鋸屑 (気乾状態) に重量比で5倍量の水を加え、室温にて攪拌しながら30分間抽出した。濾別した抽出液を室温で減圧濃縮し、130℃のドラム中で数分間乾燥して粉末状のカラマツ水抽出物 (以下、KWEと略する。) を得た。使用した鋸屑の粒度分布は、気乾重量比で0～12メッシュのものが6%、12～48メッシュが72%、48～100メッシュが19%、100メッシュ以上が3%であった。

(2) 供試菌

当センター保存菌株である以下の6菌株を供試した。

ヒラタケ

Pleurotus ostreatus (Jacq: Fr.) Kummer. (Po-03)

エノキタケ

Flammulina velutipes (Curt.: Fr.) Sing. (Fv-4)

ヤナギマツタケ

Agrocybe cylindracea (DC.: Fr.) Maire. (Ac-01)

シイタケ *Lentinus edodes* (Berk.). (Le-01)

ナメコ

Pholiota nameko (T.Ito) S. Ito et Imai. (Pn-03)

マイタケ

Grifora frondosa (Dicks.: Fr.) S. F. Gray. (Gf-01)

(3) 供試培地

培地には、ポテトデキストロース液体培地 (PD培地: 馬鈴薯200g, グルコース20g, 蒸留水1L): 20ml/100ml容三角フラスコ, 同寒天培地 (PDA培地: 日水製): 20ml/直径90mmペトリ皿および木粉培地: 16g/直径18mm試験管を用いた。木粉培地は木粉: 米糠 = 3:1 (全乾重量比) とし、含水率65% (湿量基準) に調整した。なおヒラタケ, エノキタケ,

ヤナギマツタケにはスギ辺材を, シイタケ, ナメコ, マイタケにはブナ材の木粉をそれぞれ用いた。KWEの添加量はPD, PDA培地ではW/V比で, 木粉培地においては, 培地の全乾重量当たりのW/V比で各々1, 2, 3, 5, 10, 15%とした。

なお, 接種源には, 供試菌を酵母エキス・麦芽エキス寒天培地 (MYA培地) で24℃, 6～14日間平面培養した後, コルクボーラーで直径5mmに打ち抜いたディスクを用いた。

(4) 菌糸体成長量

培養はすべて24℃暗黒下で行った。PD培地では, 10日間培養した後, 菌糸体を濾別し, 温水, 冷水で順次洗浄後, 菌糸体の乾燥重量を測定した。PDA培地では, 6日間培養した後, コロニーの直径を測定した。さらに, 4日間培養後, 電子レンジを用いて培地を溶解し, 菌糸体を濾別, 温水, 冷水で順次洗浄後, 菌糸体の乾燥重量を測定した。木粉培地では2～5日間の前培養を行い, その後20日間の菌糸体伸長量を測定した。各試験とも5検体ずつ供試し, 繰り返しを行った。

2. 結果

(1) 菌糸体伸長量

KWE添加濃度の異なるPDA培地で培養した各種供試菌の菌糸体伸長量を図-2-9に示す。KWEの添加により, 供試した6菌種全てにおいて菌糸体伸長量は対照区に比べて若干増加し, 1～3%の添加濃度で最大伸長量を示した。最も菌糸体伸長量が大きかったのはヒラタケで, 2%の添加濃度で最大伸長量 (81.4mm) を示し, 対照区 (69.6mm) の1.17倍であった。しかし, いずれの供試菌も添加濃度が高まるにつれて菌糸体伸長量は低下した。添加濃度が15%の場合, マイタケを除いた全ての供試菌において対照区よりも低下し, ヒラタケ, ナメコ, ヤナギマツタケでは対照区の0.8～0.85倍, さらにエノキタケとシイタケでは0.85～0.6倍の菌糸体伸長量となった。

KWEの添加濃度の異なる木粉培地で培養した各種供試菌の菌糸体伸長量を図-2-10に示す。木粉培地での菌糸体伸長量は供試した6菌種全てにおいて1～3%の添加濃度で最大伸長量を示し, 添加濃度が高くなるにつれて漸減したが, 15%の添加濃度でも対照区とほぼ同程度またはそれ以上の菌糸体伸長が認められた。

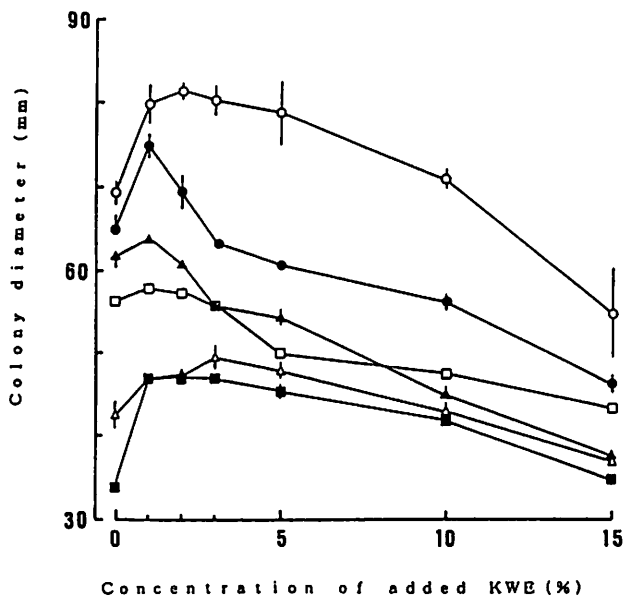


図-2-9 KWE(シベリア産カラマツ水抽出物)の添加濃度と数種食用きのこのコロニー直径との関係
 ○：ヒラタケ，●：エノキタケ，△：ヤナギマツタケ，▲：シイタケ，□：ナメコ，■：マイタケ。縦棒は標準偏差を示す。
 Relationships between added amount of KWE (water extracts from Siberian larch wood) in PDA medium and colony diameter of some edible mushrooms incubated for six days.
 ○： *P. ostreatus*，●： *F. velutipes*，△： *A. cylindracea*，▲： *L. edodes*，□： *P. nameko*，■： *G. frondosa*. The vertical bars represent standard deviations.

(2) 菌糸体重量

KWE添加濃度の異なるPDA培地で培養した各種供試菌の菌糸体重量を図-2-11に示す。供試した全ての菌種でKWEを添加することにより菌糸体重量が増加した。すなわち、KWE添加濃度と菌糸体重量成長との関係は、菌種によって異なっているが、5~10%の添加により、ナメコ以外のすべての菌種で対照区の2倍以上の菌糸体重量を示した。ヒラタケでは10%の添加濃度で最高値(470.9mg/plate)を示し、対照区(137.0mg/plate)の3.4倍の成長量を示した。しかし、15%の添加濃度では、対照区の0.7倍に激減した。ナメコではKWE添加による菌糸体重量は、最大で対照区の1.3倍にとどまり、ヒラタケ同様15%の添加では、対照区より低下した。

KWE添加濃度の異なるPD培地で培養した各種供試菌の菌糸体重量を図-2-12に示す。いずれの供試菌においても、KWEを添加することにより菌糸体重量は増加した。KWE添加濃度と菌糸体重量成長との関係は、菌種によって異なった。しかし、全

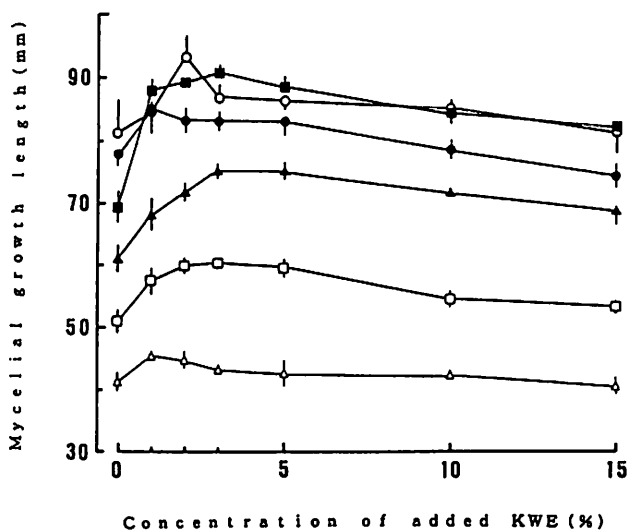


図-2-10 KWE添加濃度と数種食用きのこの菌糸体伸長成長との関係
 ○：ヒラタケ，●：エノキタケ，△：ヤナギマツタケ，▲：シイタケ，□：ナメコ，■：マイタケ。縦棒は標準偏差を示す。
 Relationships between added amount of KWE in sawdust-rice bran medium and mycelial growth length of some edible mushrooms incubated for twenty days.
 ○： *P. ostreatus*，●： *F. velutipes*，△： *A. cylindracea*，▲： *L. edodes*，□： *P. nameko*，■： *G. frondosa*. The vertical bars represent standard deviations.

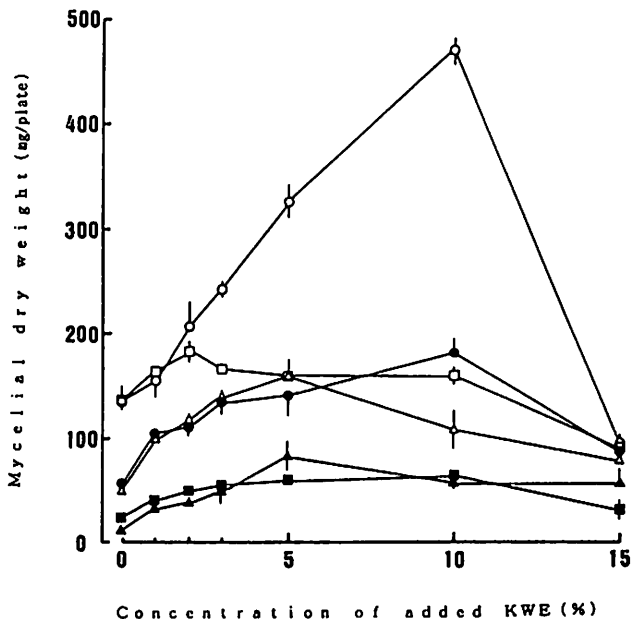


図-2-11 KWE添加濃度と数種食用きのこの菌糸体重量成長との関係(PDA培地)
 ○：ヒラタケ，●：エノキタケ，△：ヤナギマツタケ，▲：シイタケ，□：ナメコ，■：マイタケ。縦棒は標準偏差を示す。
 Relationships between added amount of KWE in PDA medium and mycelial dry weight of some edible mushrooms incubated for ten days.
 ○： *P. ostreatus*，●： *F. velutipes*，△： *A. cylindracea*，▲： *L. edodes*，□： *P. nameko*，■： *G. frondosa*. The vertical bars represent standard deviations.

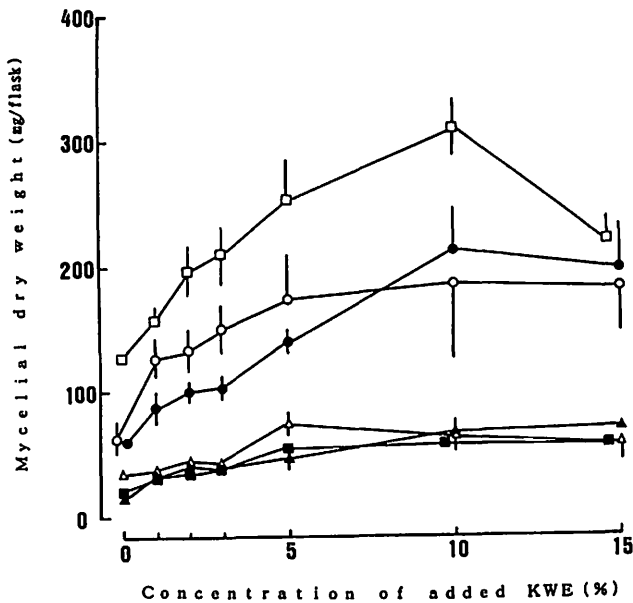


図-2-12 KWE添加濃度と数種食用きのこの菌糸体重量成長との関係(PD培地)

○：ヒラタケ，●：エノキタケ，△：ヤナギマツタケ，▲：シイタケ，□：ナメコ，■：マイタケ。縦棒は標準偏差を示す。

Relationships between added amount of KWE in PD medium and mycelial dry weight of some edible mushrooms incubated for ten days.

○： *P. ostreatus*，●： *F. velutipes*，△： *A. cylindracea*，▲： *L. edodes*，□： *P. nameko*，■： *G. frondosa*. The vertical bars represent standard deviations.

での供試菌で5～15%の添加濃度が最適濃度となり、対照区の2倍以上の菌糸体重量を示した。ヒラタケでは、PDA培地と異なりKWEの添加濃度が15% (185mg/flask) であっても10%の添加濃度 (187mg/flask) と同程度の菌糸体重量を示した。また、シイタケではPD培地において15%が最適添加濃度となり、その他の供試菌においてもPD培地ではPDA培地と異なり15%の添加濃度であっても菌糸体重量は著しく減少しなかった。これらの結果は、KWEの飽和濃度に近い15%の添加濃度では、寒天の有無による培地の物性条件の相違が菌糸体成長に影響することを示唆している。

第4節 考 察

シベリア産および本邦産 (北海道産，長野県産) と供試した産地の異なるカラマツ材の水抽出物には、共通してアラビノガラクトンが主要構成成分として含まれていた。各々の水抽出物における全糖量，中性還元糖の糖組成，ウロン酸量に著しい相違が認められなかったことから，水抽出物に占めるアラビノ

ガラクトンの割合は，産地間で大きな相違はないと考えられる。しかし，水抽出物の収率がシベリア産で約10%，本邦産が約5%であることから，シベリア産カラマツ材におけるアラビノガラクトンの含有率は，本邦産カラマツ材の2倍以上であると考えられる。カラマツ材のアラビノガラクトンの含有率は，カラマツ材の樹種，樹齢，年輪幅，樹高によって異なる (Côté et al., 1966, 1967; Côté et al., 1967) が，本実験におけるアラビノガラクトンの含有率の相違は，樹種による違いが大きな要因であると推察される。

カラマツ水抽出物中のフェノール性成分の含有量は，シベリア産と本邦産では大きく異なり，本邦産にはシベリア産の3.5倍余りのフェノール性成分が含まれていた。また，北海道産のフェノール性成分には長野県産には見られない高分子量の成分が存在していた。一般に樹木抽出成分には，その樹種固有の代謝産物が含まれており (今村ら，1983)，特に樹皮や材の温水抽出物・酢酸エチル抽出物・タンニン類は，材を識別する上で指標となることが報告されている (岸本ら，1979, 1981)。したがって，カラマツ材の樹種，生育立地条件の違いは，微量成分である水溶性フェノール性成分の形成に影響を及ぼしているものと考えられる。

シベリア産，北海道産，長野県産のいずれの産地においても，ヒラタケ，エノキタケ，シイタケと供試した3菌種に対してカラマツ水抽出物を添加するにすぎない，菌糸体重量は増加し，特に5～15%の添加濃度で顕著な増加を示した。一方，菌糸体伸長量は10%以上の添加濃度では，供試した3菌種すべてにおいて抑制された。このように10%以上の添加濃度では，菌糸体の伸長成長と重量成長に対して全く逆の作用を示した。食用きのこの子実体発生には，ホダ木や培養基内の菌体量が関与し，菌体量が多いほど子実体発生量が増えることが知られている (Tokimoto・Fukuda, 1981; Ohga, 1990a)。また，木粉培地の伸長試験と子実体形成試験では，両者の結果は必ずしも一致しないことが指摘されている (有田ら，1969)。これらのことは，菌糸体の総成長量を現す菌糸体重量は伸長成長量よりも子実体形成の状況を反映していることを示唆している。したがって，いずれの産地のカラマツ水抽出物も子実体形成を促すことが期待できる。この点については，

第5章で検討を行う。

菌糸体重量成長に対して、1～3%の添加濃度では産地間で成長量に差が生じなかったが、5%以上の添加濃度では産地間で著しい差が生じた。いずれのカラマツ水抽出物も主要構成成分がアラビノガラクトタンであり、抽出物中の糖関連成分はほぼ同様な傾向を示したことから、産地間における添加効果の差には、糖関連成分以外の物質の関与が推察される。

シベリア産カラマツ水抽出物は、ヒラタケ、エノキタケ、ヤナギマツタケ、シイタケ、ナメコ、マイタケと供試した6菌種全ての食用担子菌に対して、PD培地、PDA培地のいずれの培地においても菌糸体重量成長に顕著な促進作用を示した。カラマツ内樹皮の温水抽出物は、エノキタケ、ナメコ、ヒラタケ、キクラゲ、アラゲキクラゲに対して顕著な成育抑制作用を示すこと（善本ら、1984）から、カラマツ材の水抽出物は、内樹皮温水抽出物とは化学組成が異なることが示唆される。

スギ、ヒノキ、アカマツの内樹皮温水抽出物は、キクラゲ、シイタケの成育には促進作用を示すが、ヒラタケに対しては成育抑制作用を示している（善本、1984）。また、シイノキ辺材部の熱水抽出物はシイタケには成育促進作用を示すが、ナメコ、ヒラタケに対しては成育抑制作用を示している（松尾、1957）。一般に、樹木心材の温水抽出物は、食用担子菌の成長に対して抑制作用を示す場合が多く、例外的にブナ心材がナメコ、ヒラタケに対して、ミズナラ心材がシイタケに促進作用を示すことが報告されている（高島、1987、1989）。カラマツ材の製材鋸屑は大部分が心材から生じていることを考慮に入れると、シベリア産カラマツ水抽出物が供試した6菌種全ての食用担子菌に対して顕著な促進作用を示すことは、樹木心材の水抽出物として極めて特異的であり、カラマツ水抽出物には、特定菌種に限定されることのない、広範囲な担子菌の菌種に共通して作用する成育促進成分の存在が示唆される。

第5節 結 論

シベリア産、北海道産、長野県産と産地の異なるカラマツ材水抽出物について、化学組成を検討したところ、いずれも主要構成成分は共通してアラビノガラクトタンであり、糖関連成分は産地間で顕著な差が認められなかった。しかし、全フェノール量は、

本邦産（北海道産、長野県産）では、シベリア産の約3.5倍の含有量を示した。三産地のカラマツ水抽出物について、ヒラタケ、エノキタケ、シイタケと三菌種の食用担子菌の菌糸体成長に及ぼす影響を検討したところ、いずれのカラマツ水抽出物も供試した三菌種全てに対して添加量が増加するに従い菌糸体重量は顕著に増加した。1～3%の添加濃度では産地間で添加効果に差が生じなかったが、5%以上の添加濃度では菌種に応じて産地間で差が生じた。シベリア産カラマツ水抽出物について、さらにヤナギマツタケ、ナメコ、マイタケと対象菌種を増やして食用担子菌の菌糸体成長に及ぼす影響を検討したところ、全ての菌種で寒天、液体、木粉と物理条件の異なるいずれの培地においても、菌糸体成長に顕著な促進作用を示した。

第3章 ヒラタケ菌によるカラマツ水抽出物の資化性と菌体外酵素の産出

前章において、カラマツ水抽出物はヒラタケ、エノキタケ、シイタケ等の有用な食用担子菌の菌糸体成長に顕著な促進作用を示すことを見いだした。また、カラマツ水抽出物の主要構成成分は、水溶性多糖類のアラビノガラクトタンであることを明らかにした。

シイタケ（吉田ら、1987）、ヒラタケ（吉田ら、1986）、エノキタケ（Kitamoto・Gruen 1976）において、栄養成長の段階で菌糸体の発育にともない培地中の炭素源がトレハロース、グリコーゲン等の多糖類に変換されて菌糸体中に蓄積されることが知られている。このことから、カラマツ水抽出物中のアラビノガラクトタンは培地中の炭素源として資化されている可能性がある。培地成分は菌糸体成長を左右し、これに付随して菌体外酵素活性も変化する事がシイタケ（池ヶ谷ら、1993）、ヒラタケ（岩原ら、1983）で報告されていることから、カラマツ水抽出物の添加は食用担子菌の菌体外酵素活性にも影響を及ぼしている可能性がある。

そこで、本章ではカラマツ水抽出物として水抽出物の調製が容易なシベリア産カラマツ材の水抽出物（以下、KWEと略する。）を用い、KWEの添加によって菌糸体重量の増加が最も顕著であったヒラタケ菌について、KWEおよびその主要成分であるア

ラビノガラクトランを添加した培地での菌糸体重量及びフェノール酸化酵素、多糖分解酵素の活性を測定し、菌糸体成長および菌体外酵素活性に及ぼすKWEとアラビノガラクトランの影響を検討した(高島ら, 1995)。

第1節 カラマツ水抽出物の資化性

1. 材料および方法

(1) 供試菌

当センター保存菌株であるヒラタケ *Pleurotus ostreatus* (Jacq: Fr.) Kummer. Po-03菌株を供試した。なお、接種源として供試菌をMYA培地で24℃にて6日間平面培養した後、コルクボーラーで直径5mmに打ち抜いたディスクを用いた。

(2) カラマツ水抽出物

前章第1節1.で記述したシベリア産カラマツ (*Larix sp.*) の製材鋸屑より調製した粉末状のカラマツ水抽出物(KWE)を供試した。

(3) 供試培地

基本培地には、アスパラギン・グルコース培地(AsG培地)を用いた。AsG培地の組成は、Glucose 20g, L-Asparagine 2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, K_2HPO_4 0.46g, KH_2PO_4 1g, Thiamine-HCl 0.1mg, 蒸留水 1Lである。AsG培地よりグルコースを除いた培地をアスパラギン培地(As培地)とし、AsG培地とAs培地にKWEおよびアラビノガラクトラン(Sigma社製, minimum 98% (TLC), 以下AGと略する。)を添加し、1N-HClでpH5.5に調製して供試培地とした。KWEおよびAGの添加量はW/V比で0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 15%とした。なお以下、AsG培地, As培地にKWEを添加した培地をKWE-AsG培地, KWE-As培地と表示し、また、AsG培地, As培地にAGを添加した培地をAG-AsG培地, AG-As培地と表示する。

(4) 菌糸体の培養および菌糸体重量の測定

供試培地20mlを100ml容三角フラスコに分注し、121℃にて15分間滅菌し、供試菌を接種した。培養は、24℃にて10日間静置培養を行った。培養後、菌糸体を濾別し、温水、冷水で順次洗浄後、菌糸体の乾燥重量を測定した。

(5) グルコースと還元糖の定量

培地中のグルコース量はPOD-GOD法(Trinder, 1969)を用い、波長505nmの吸光度から測定した。

還元糖量は、供試培地および培養濾液を加水分解してSomogyi-Nelson法(Somogyi, 1952)によって測定した。

2. 結果

KWEおよびその主要構成成分であるAG, KWEの構成単糖であるアラビノース(以下, Araと略する。), ガラクトース(以下, Galと略する。), さらにKWEの糖組成の割合(Ara:Gal = 12:88, 重量比)(高島・水本, 1994)に従って, AraとGalを混合した混合糖(以下, Ara+Galと略する。)のそれぞれをAsG培地に添加してヒラタケ菌を培養し、菌糸体重量を測定した。その結果を図-3-1に示す。KWE-AsG培地では、菌糸体重量はKWE添加の増加

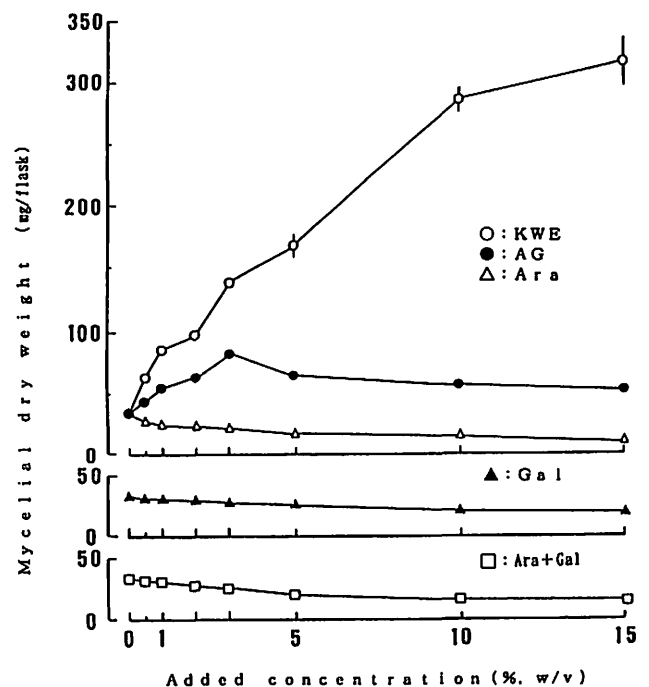


図-3-1 KWE, AG(アラビノガラクトラン)およびKWE構成糖の添加濃度とヒラタケ菌の菌糸体重量成長との関係

縦棒は標準偏差を示す。KWEはシベリア産カラマツ水抽出物, AGはアラビノガラクトラン, Araはアラビノース, Galはガラクトースを示す。Ara+GalはアラビノースとガラクトースをKWEの構成比と同様の割合(重量比12:88)で混合したものを示す。

Relationships between mycelial dry weights of *Pleurotus ostreatus* incubated for ten days in AsG medium and added concentrations of KWE, AG and the component sugars in KWE.

The vertical bars represent standard deviations. KWE, AG, Ara and Gal mean Karamatsu (*Larix sp.*) water extracts, arabinogalactan, arabinose and galactose, respectively.

Ara + Gal means both arabinose and galactose added at similar rates to the KWE composition; arabinose:galactose = 12:88 in weight ratio.

にもなって著しく増加した。KWEの5, 10, 15% 添加培地では、菌糸体重量はそれぞれ無添加培地 (33.2mg/flask) の5.1倍 (168.2mg/flask), 8.6倍 (286.8mg/flask), 9.6倍 (317.2mg/flask) となった。AG-AsG培地では、AG添加濃度が3%まで、添加量の増加とともに菌糸体重量は増加し、無添加培地の2.3倍 (74.9mg/flask) となった。しかし、さらにAGの添加濃度を高くすると菌糸体重量は漸減し、添加濃度10, 15%では、無添加培地の1.7倍前後となった。Ara, GalおよびAra+Gal添加培地では、いずれも添加するに従い菌糸体重量は漸減し、15%添加区では無添加培地の2/3~1/2となった。このようにヒラタケ菌糸体成長に対して、KWEとその構成糖の作用は、全く逆の傾向を示した。また、AGは促進作用を若干示したが、KWEのような顕著な促進作用は示さなかった。

炭素源としてのKWEの資化性を他の炭素源と比較するために、表-3-1に示す各種炭素源を供試し、基本培地であるAsG培地のグルコース (2% (W/V)) と置き換えて菌糸体重量を測定した。マンノース, グルコース, 可溶性デンプンで良好な成長を示し、次いでガラクトン酸が良好であった。KWE関連の単糖類であるAra, Gal, Ara+Galでは、キシロース, ラクトース, シュクロースとともに菌糸体成長量が劣り、ヒラタケ菌にとって資化し難い炭素源であった。また、KWEやAGはグルコースの40~50%の成長量となり、フラクトース, マルトースとともに供試した炭素源の中では、中庸な成長量を示した。

炭素源としてのKWEの添加濃度とヒラタケ菌糸体の成長量との関連性を検討するために、AsG培地からグルコースを除いたAs培地にグルコース, KWE,

表-3-1 ヒラタケ菌の菌糸体重量成長に及ぼす各種炭素源の影響

Effects of various carbon sources on mycelial dry weight of *Pleurotus ostreatus*.

Carbon sources (2%, W/V)	Mycelial dry weight (mg/flask)
Carbon free	1.7±0.2
Glucose	33.2±1.5
Mannose	35.4±3.0
Fructose	16.2±1.3
Xylose	8.6±0.8
Lactose	6.0±0.4
Sucrose	8.1±0.5
Maltose	12.1±1.1
Soluble starch	31.2±0.2
Citric Acid	1.7±0.5
Galacturonic Acid	27.9±1.6
KWE	15.8±0.9
AG	13.2±0.3
Galactose	4.5±0.2
Arabinose	7.5±0.4
Ara + Gal	5.5±0.2

Notes: KWE, AG, Ara and Gal mean Karamatsu (*Larix sp.*) water extracts, arabinogalactan, arabinose and galactose, respectively.

Ara + Gal means both arabinose and galactose added at similar rates to the KWE composition; arabinose: galactose = 12 : 88 in weight ratio.

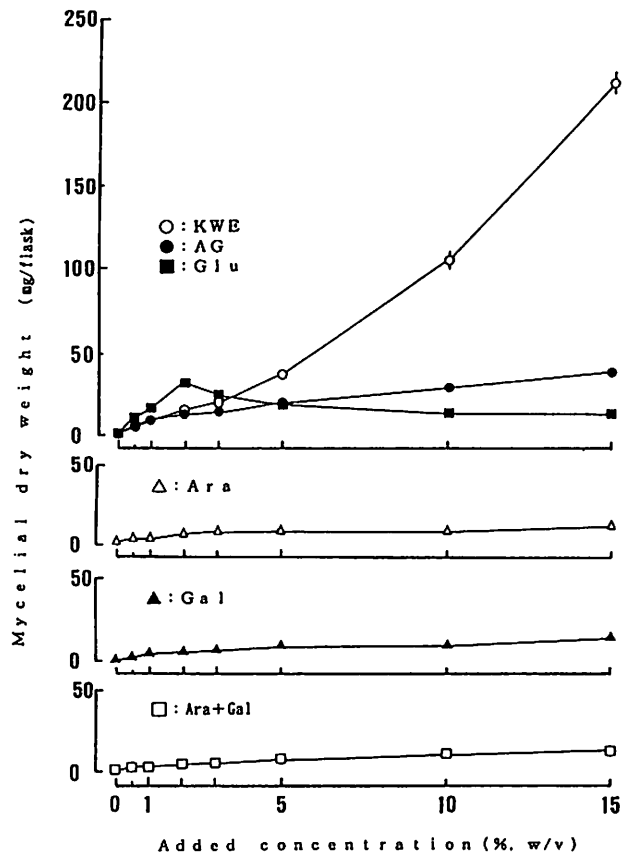


図-3-2 KWE, グルコース, AG, KWE構成糖の添加濃度とヒラタケ菌の菌糸体重量成長との関係
Gluはグルコースを示す。記号は図-3-1を参照。

Relationships between mycelial dry weights of *Pleurotus ostreatus* incubated for ten days in As medium and added concentrations of KWE, Glu, AG and the component sugars in KWE. Glu mean glucose. Symbols are the same as Fig. 3-1.

AG, Ara, Gal, Ara+Galを添加し、それぞれの培地でヒラタケ菌を培養した。その場合の結果を図-3-2に示す。Glu添加培地では濃度2%で最大となり、それ以上添加しても、菌糸体の重量は逆に減少した。これに対してKWE-As培地では、KWE添加濃度が高くなるに従って、菌糸体重量が急激に増加した。すなわち、3%の添加濃度まではグルコースよりも菌糸体重量は低かったが、添加濃度が5%以上になると菌糸体重量が急激に増加した。KWEを10, 15%添加した培地での菌糸体重量は、グルコース2%添加培地の3.2倍 (106.3mg/flask), 6.3倍 (211.7mg/flask) となった。AG-As培地では、AGの添加濃度の増加にともなって、菌糸体重量が漸増した。しかし、添加濃度15%でもグルコース2%添加培地の1.2倍 (40.1mg/flask) 程度であった。Ara, Gal, Ara+Gal添加培地においても同様な傾向を示し、それぞれの15%添加培地は、グルコース2%添加培地の約0.5倍にとどまった。これらのことから、KWEはヒラタケ菌糸体に炭素源として容易に資化され、しかもKWEの資化性は添加濃度が高くなるにつれて良くなり、これが急激な菌糸体重量の増加となって現れたものと考えられる。これに対して、AGやKWEの構成単糖を添加した培地では、KWE添加の場合に比べて菌糸体重量の増加は僅かであった。

KWEの添加による成長促進作用は、KWE-As培地よりKWE-AsG培地の方が、いずれの添加濃度においても大きかった。このことから、菌糸体成長に対してKWEとグルコースは相乗的に作用していることが推察される。この点についてAsG培地中のグルコース濃度を0.5, 1, 2, 3%に調整し、KWEの添加量と菌糸体重量成長との関係を検討した。その結果を図-3-3に示す。グルコース添加濃度が2%までは、グルコースとKWEのそれぞれの添加濃度が高くなるに従って、菌糸体重量はKWE単独の場合より著しく増加した。しかし、グルコース3%添加培地では、KWE添加による促進作用を示すものの、その効果の程度はKWEの添加濃度が高くなるほどグルコース1%, 0.5%添加培地より、さらにグルコース無添加培地よりも低くなった。これらのことから、KWEとグルコースとは菌糸体成長に相乗的に作用し、グルコース添加濃度は2%が最適濃度であることが明らかとなった。また、グルコー

ス無添加培地においては、KWEを5%以上添加したKWEの高濃度域で菌糸体重量が急激に増加したが、グルコース添加培地では、KWE添加濃度3%以下のKWEの低濃度域においても菌糸体重量の急激な増加が認められた。

図-3-3の結果から、培地中のグルコースの存在によりヒラタケ菌の菌糸体成長に対するKWEの添加効果が著しくなることが明らかとなった。一方、表-3-1の結果より、単糖類の種類によってヒラタケ菌糸体の成長が異なることが示されことから、グルコース以外の単糖類ではKWEの添加効果に差が生じることが考えられる。ヒラタケ菌糸体の成長に対して単糖類の中でグルコースと同様に良好であったマンノース、中庸であったフラクトース、劣ったキシロース、ラクトース、ガラクトースを供試し、AsG培地のグルコースを各々の供試単糖類に置き換えて (添加濃度, 2% (W/V)), KWEの添加効果に及ぼす各単糖類の影響を検討した。その結果を図

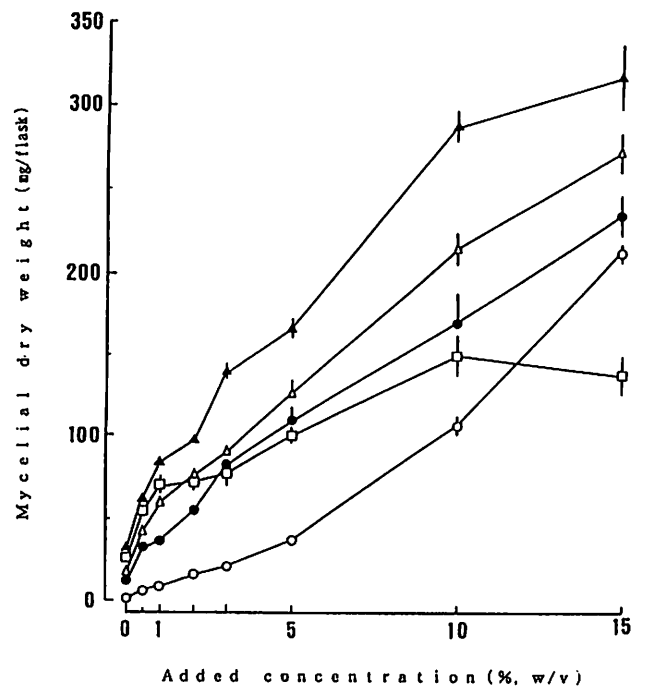


図-3-3 グルコースとKWEの添加濃度が異なる合成培地(As培地)で培養したヒラタケ菌の菌糸体重量成長

グルコース濃度: ○: 0%, ●: 0.5%, △: 1%, ▲: 2%, □: 3%。縦棒は標準偏差を示す。

Mycelial dry weights of *Pleurotus ostreatus* incubated for ten days in As medium with different concentrations of Glucose and KWE. Glucose concentrations: ○: 0%, ●: 0.5%, △: 1%, ▲: 2%, □: 3%. The vertical bars represent standard deviations.

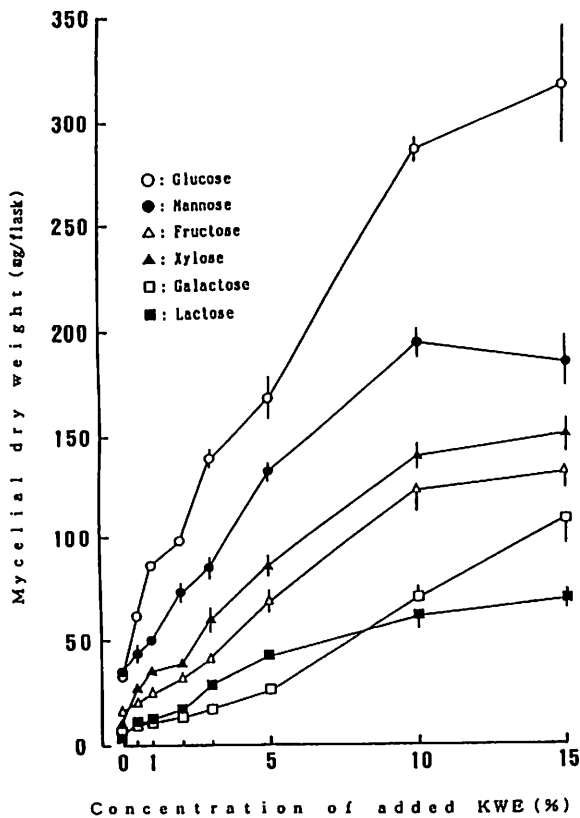


図-3-4 KWEを添加したAs培地におけるヒラタケ菌の菌糸体重量成長に及ぼす単糖類の影響

○：グルコース，●：マンノース，△：フラクトース，▲：キシロース，□：ガラクトース，■：ラクトース。縦棒は標準偏差を示す。

Effects of monosaccharides on mycelial dry weights of *Pleurotus ostreatus* incubated for ten days in As medium added various concentrations of KWE.

○：Glucose，●：Mannose，△：Fructose，▲：Xylose，□：Galactose，■：Lactose. The vertical bars represent standard deviations.

図-3-4に示す。いずれの単糖類においてもKWEの添加濃度が高くなるに従い菌糸体重量は増大し、単糖の種類を問わずにKWE添加による成長促進作用が認められた。しかし、KWE添加の促進効果は、単糖の種類によって異なって現れ、グルコース、マンノースと資化性の高い単糖ではKWEの添加効果も顕著に現れ、ガラクトース、ラクトースと資化性の低い単糖ではKWE添加の効果は低くなって現れた。ただし、キシロースは炭素源としての資化性は低いにもかかわらず、KWE添加の促進効果は炭素源としての資化性が中庸なフラクトースよりも大きくなって現れた。

ウロン酸はシイタケ菌の菌糸体成長や子実体形成に促進作用を示すことが知られている(池ヶ谷ら, 1993)。KWEやAGにもウロン酸が含まれている(高

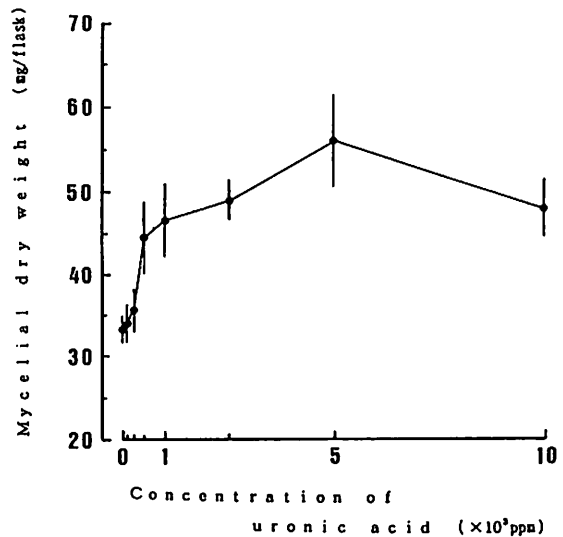


図-3-5 ウロン酸添加濃度とヒラタケ菌の菌糸体重量成長との関係

縦棒は標準偏差を示す。

Relationships between mycelial dry weights of *Pleurotus ostreatus* incubated for ten days in AsG medium and added concentrations of uronic acid (Galacturonic acid).

The vertical bars represent standard deviations.

島・水本, 1994) ことから、ウロン酸の添加濃度とヒラタケ菌糸体成長との関係を検討した。250~10000ppm濃度のガラクトン酸を添加した基本培地(AsG培地)でヒラタケ菌糸体を培養し、菌糸体重量を測定した結果を図-3-5に示す。ウロン酸の添加によりヒラタケ菌糸体の成長は促進され、5000ppmまでは添加濃度が高くなるに従い菌糸体重量は増加した。5000ppmの添加で無添加培地の1.7倍(56.4mg/flask)の菌糸体重量を示した。

KWEを添加することによりヒラタケ菌糸体は著しく成長したが、菌糸体が吸収する炭素源の由来を明らかにするために、培養濾液のグルコースおよび還元糖を定量し、培養前後においてヒラタケ菌糸体によって吸収されたグルコースおよび還元糖の消費量を求めた。その結果を図-3-6に示す。

グルコースの消費量は、AGやKWEの添加によって増大した。特に、AGよりKWEを添加した培地で消費量が多くなった。KWE添加培地では、添加濃度0.5、1%でグルコースが急激に消費され、さらに添加濃度を高くするとグルコースの消費量は漸増し、添加濃度5%で81.4mg/flaskと最大値を示し、10%以上に添加すると70mg/flask前後に漸減した。AG添加培地において、AGの添加濃度3%まででは、

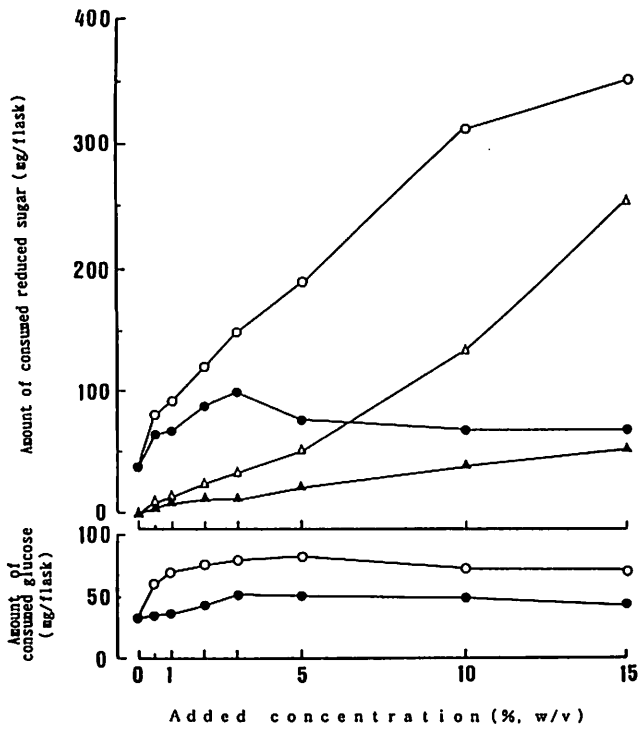


図-3-6 KWEあるいはAGを添加したAsG培地, As培地におけるヒラタケ菌のグルコースおよび還元糖の消費量

- : KWEを添加したAsG培地(KWE-AsG培地)
 ●: AGを添加したAsG培地(AG-AsG培地)
 △: KWEを添加したAs培地(KWE-As培地)
 ▲: AGを添加したAs培地(AG-As培地)

Amounts of consumed glucose and reduced sugar by *Pleurotus ostreatus* incubated for ten days in AsG or As media with different concentration levels of KWE or AG. ○: KWE-AsG medium with added KWE, △: KWE-As medium with added KWE, ●: AG-AsG medium with added AG, ▲: AG-As medium with added AG.

グルコースの消費量は徐々に増加して51.1mg/flaskとなり, さらに添加濃度を増加した場合, グルコースの消費量は僅かに減少した。

還元糖の消費量に関しては, KWEを添加した場合, 添加濃度の増加にともなって還元糖の消費が著しく増加した。KWE-AsG培地では, KWEの10%添加培地で無添加培地(37.5mg/flask)の8倍程度(311.4mg/flask), 15%添加培地では9倍程度(351.4mg/flask)となった。As培地でも, KWEの添加濃度の増加にともなって還元糖の消費は急激に増加した。すなわち, 3%以下の低濃度のKWE添加では還元糖の消費量の増加は緩やかであったが, 5%以上の添加では著しく増加した。AG-AsG培地では, AGの添加濃度が3%までは添加量とともに還元糖の消費量は増加し, 最大消費量(99.0mg/flask)を示した後, 消費量は減少した。AG-As培地では, AGの添加に

ともなって還元糖の消費量は増加するものの, KWEを添加した場合に比べてその消費量は少なく, 添加濃度の増加にともなってKWE-As培地との消費量の差は大きくなった。

ところで, AsG培地中の炭素源はグルコースのみである。したがって, KWE-AsG培地の炭素源はグルコースとKWE中の構成糖, 主にAG(以後, KWE中のAGをK-AGと略する。)となり, 同様に, AG-AsG培地の炭素源はグルコースとAGであることから, 菌糸体によって消費された還元糖量とグルコース量の差は, KWE-AsG培地ではK-AGの消費量, またAG-AsG培地では添加したAGの消費量に相当する。KWE-AsG培地ではKWEの添加濃度が2%以上では, グルコースの消費量は70~80mg/flaskであり, 還元糖の消費量はKWEの添加濃度の増加にともなって120~370mg/flaskとなり, K-AGが急激に消費されたことが分かる。一方, AG-AsG培地において, AGの添加濃度が3%以上ではグルコースの消費量は51.1~43.7mg/flask, 還元糖の消費量は99.0~68.9mg/flaskであることから, AGの消費量はK-AGの消費量に比べて明らかに少量であった。また, KWE-As培地およびAG-As培地における炭素源はK-AGとAG単体であるので, 還元糖の消費量は各々の培地におけるK-AGとAGの消費量に相当すると考えられる。KWE-As培地におけるK-AGの消費量はAG-As培地におけるAGの消費量に比べて多く, K-AGとAGとの消費量の差は, 添加濃度の増加にともなって大きくなった。

第2節 フェノール酸化酵素の産出

1. 材料および方法

供試菌, カラマツ水抽出物, 供試培地および菌糸体の培養条件に関しては, 前節「カラマツ水抽出物の資化性」の1.材料および方法における記述と同様である。

(1) 粗酵素液の調製

供試培地中の菌体外酵素活性の測定には, 培養濾液をTokimoto et al. (1987), Matsumoto (1988)の方法に準拠して透析した粗酵素液を用いた。即ち, 所定量の培養濾液にその1/9容量の10mM酢酸緩衝液(pH4.2)を加えてよく混合し, この混合液をセルロースチューブ(和光純薬製)にて1mM酢酸緩衝液(pH4.2)で24時間透析したものを粗酵素液と

した。

(2) フェノール酸化酵素活性の測定

フェノール酸化酵素としてジフェノールオキシダーゼ、ラッカーゼの各活性を既報 (Ohga, 1992b : Mastumoto, 1988) に準拠して測定した。ジフェノールオキシダーゼ、ラッカーゼ活性は、それぞれL-ジヒドロキシフェニルアラニン (L-DOPA, 和光純薬製)、フェニレンジアミン (和光純薬製) を基質とし、波長475nmおよび波長525nmの吸光度を測定した。1分間あたりに吸光度を0.001増加させる酵素量を1酵素単位とした。

2. 結果

KWEおよびAGの添加が、ヒラタケ菌糸体のフェノール酸化酵素の産出に及ぼす影響を検討した。すなわち、KWE-AsG培地、KWE-As培地、AG-AsG培地およびAG-As培地でヒラタケ菌糸体を24℃、10日間培養した後、培養濾液のジフェノールオキシダーゼ (DPO)、ラッカーゼの活性を測定した。その結果を図-3-7~8に示す。

DPOおよびラッカーゼ活性は、KWE-AsG培地およびKWE-As培地において、ともにKWEの添加濃度が高くなるに従い著しく増大した。AG-AsG培地およびAG-As培地では、AGの添加量が増大しても、両酵素の活性は僅かに増加しただけで、その活性もKWE添加培地に比べて非常に低かった。KWE添加培地とAG添加培地における両酵素活性の差は、添加濃度が高くなるにしたがって大きくなり、10%以上の添加濃度では、KWE添加培地のDPO、ラッカーゼ活性は、それぞれAG添加培地の4.5~6.7倍、16~26倍となった。

第3節 多糖分解酵素の産出

1. 材料および方法

供試菌、カラマツ水抽出物、供試培地および菌糸体の培養条件に関しては、第1節「カラマツ水抽出物の資化性」の1.材料および方法における記述と同様である。また、粗酵素液の調製に関しては前節

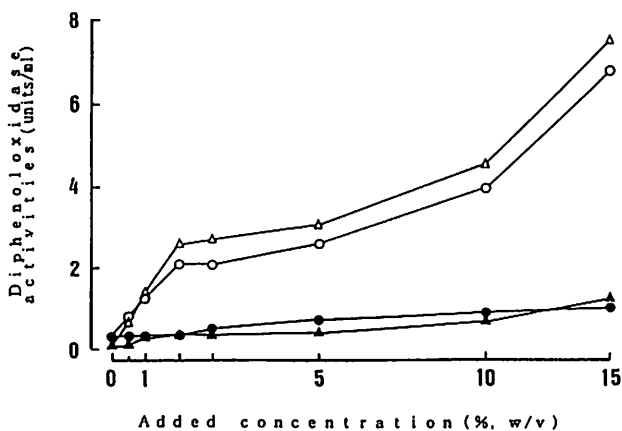


図-3-7 KWEあるいはAGを添加したAsG培地、As培地において10日間培養したヒラタケ菌の菌体外ジフェノールオキシダーゼ活性
○：KWEを添加したAsG培地 (KWE-AsG培地)
●：AGを添加したAsG培地 (AG-AsG培地)
△：KWEを添加したAs培地 (KWE-As培地)
▲：AGを添加したAs培地 (AG-As培地)
Extracellular diphenol oxidase activities of *Pleurotus ostreatus* incubated for ten days in AsG or As media added with different concentration levels of KWE or AG.
○：KWE-AsG medium with added KWE, △：KWE-As medium with added KWE, ●：AG-AsG medium with added AG, ▲：AG-As medium with added AG.

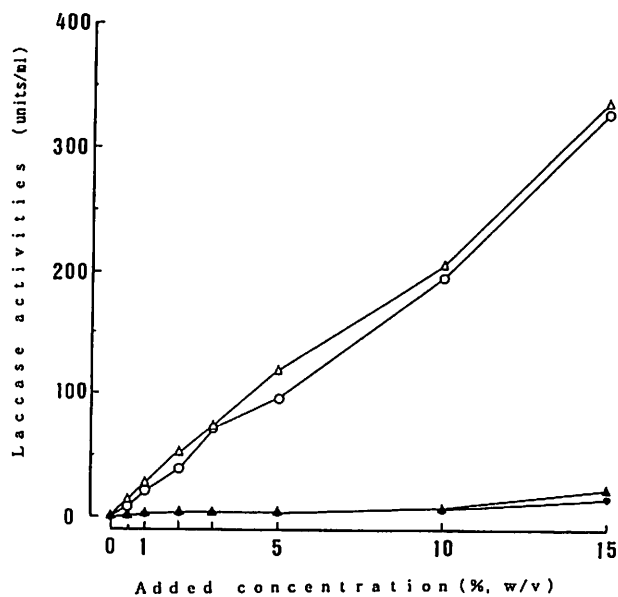


図-3-8 KWEあるいはAGを添加したAsG培地、As培地において10日間培養したヒラタケ菌の菌体外ラッカーゼ活性
○：KWEを添加したAsG培地 (KWE-AsG培地)
●：AGを添加したAsG培地 (AG-AsG培地)
△：KWEを添加したAs培地 (KWE-As培地)
▲：AGを添加したAs培地 (AG-As培地)
Extracellular laccase activities of *Pleurotus ostreatus* incubated for ten days in AsG or As media added with different concentration levels of KWE or AG.
○：KWE-AsG medium with added KWE, △：KWE-As medium with added KWE, ●：AG-AsG medium with added AG, ▲：AG-As medium with added AG.

「フェノール酸化酵素の産出」の1.材料および方法の記述と同様である。

(1) 多糖分解酵素の測定

多糖分解酵素として β -グルコシダーゼ、セルラーゼおよびアラビノガラクターナーゼ (AGase) の各活性を既報 (Ohga, 1992b; Matsumoto, 1988) に準拠して測定した。

β -グルコシダーゼは、p-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド (Sigma社製) を基質とし、遊離したp-ニトロフェノールを波長400nmの吸光度で測定した。1分間に1 μ molのp-ニトロフェノールを遊離する酵素量を1酵素単位とした。

セルラーゼ、AGase活性は、それぞれカルボキシメチルセルロース (CMC-Na, 和光純薬製), AG (Sigma社製, minimum 98% (TLC)) を基質とし、生成された還元糖をSomogyi-Nelson法 (Somogyi, 1952) で定量した。1分間にグルコース換算で1 μ molの還元糖を遊離する酵素量を1酵素単位とした。

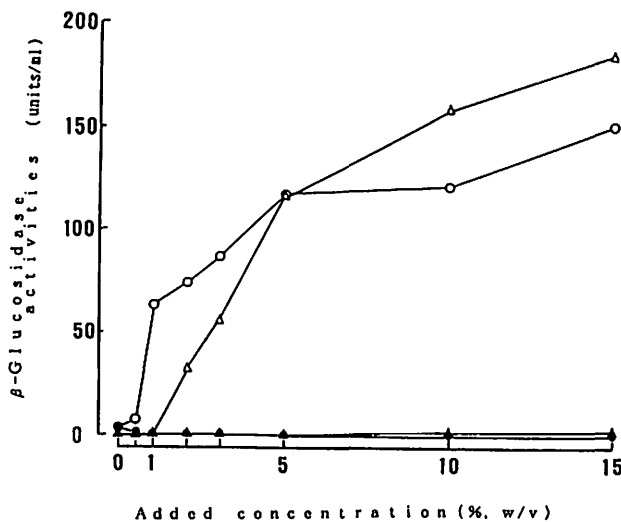


図-3-9 KWEあるいはAGを添加したAsG培地, As培地において10日間培養したヒラタケ菌の菌体外 β -グルコシダーゼ活性

- : KWEを添加したAsG培地 (KWE-AsG培地)
- : AGを添加したAsG培地 (AG-AsG培地)
- △: KWEを添加したAs培地 (KWE-As培地)
- ▲: AGを添加したAs培地 (AG-As培地)

Extracellular β -Glucosidase activities of *Pleurotus ostreatus* incubated for ten days in AsG or As media added with different concentration levels of KWE or AG.

- : KWE-AsG medium with added KWE, △: KWE-As medium with added KWE, ●: AG-AsG medium with added AG, ▲: AG-As medium with added AG.

2. 結果

KWEおよびAGの添加が、ヒラタケ菌糸体の多糖分解酵素の産出に及ぼす影響を検討した。すなわち、KWE-AsG培地, KWE-As培地, AG-AsG培地およびAG-As培地でヒラタケ菌糸体を24 $^{\circ}$ C, 10日間培養した後、培養濾液の β -グルコシダーゼ, セルラーゼおよびアラビノガラクターナーゼ (AGase) の活性を測定した。その結果を図-3-9~10に示す。

β -グルコシダーゼ活性に関しては、KWE-AsG培地において、KWEの添加濃度が5%までは、添加量の増大とともに活性が急激に増加し、それ以上の添加量では、活性の増加は緩やかであった。これに対してAG-AsG培地では、添加濃度を変えても活性は、ほとんど認められなかった。KWE-As培地およびAG-As培地においても、それぞれKWE-AsG培

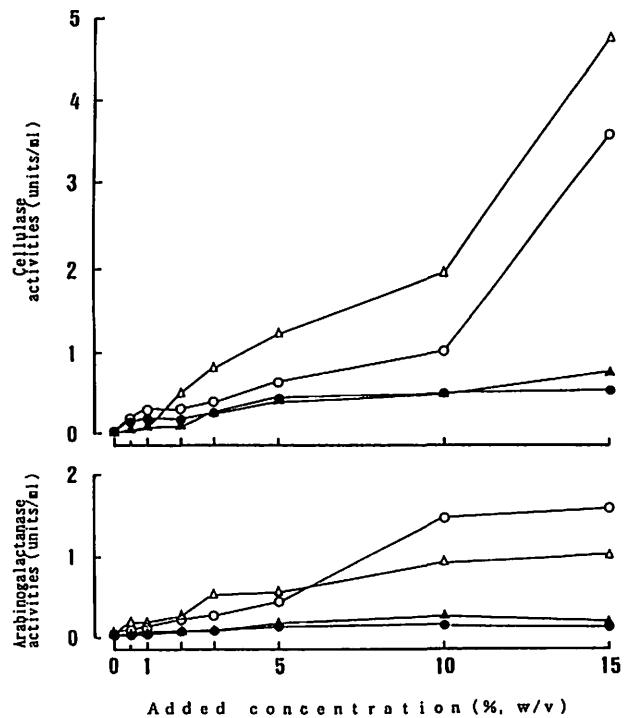


図-3-10 KWEあるいはAGを添加したAsG培地, As培地において10日間培養したヒラタケ菌の菌体外セルラーゼおよびアラビノガラクターナーゼ活性

- : KWEを添加したAsG培地 (KWE-AsG培地)
- : AGを添加したAsG培地 (AG-AsG培地)
- △: KWEを添加したAs培地 (KWE-As培地)
- ▲: AGを添加したAs培地 (AG-As培地)

Extracellular cellulase and arabinogalactanase activities of *Pleurotus ostreatus* incubated for ten days in AsG or As media added with different concentration levels of KWE or AG.

- : KWE-AsG medium with added KWE, △: KWE-As medium with added KWE, ●: AG-AsG medium with added AG, ▲: AG-As medium with added AG.

地、AG-AsG培地とはほぼ同様の傾向が認められた(図-3-9)。

セルラーゼおよびAGase活性は、KWE-AsG培地、KWE-As培地ともにKWEの添加濃度の増加とともに両酵素の活性が増加した。これに対してAG-AsG培地、AG-As培地では、AGの添加濃度が増加するに従い、両酵素の活性は僅かに増加するものの、KWE添加培地に比べて非常に低い活性を示した。KWEとAGをそれぞれ添加した培地のセルラーゼ、AGase活性の差は、添加濃度が高くなるに従って大きくなり、添加濃度15%では、KWE添加培地のセルラーゼ、AGase活性は、AG添加培地のそれらの6.2~6.5倍(セルラーゼ活性)、8.1~9.2倍(AGase活性)となった(図-3-10)。

第4節 考 察

ヒラタケ菌の菌糸体成長に対する炭素源としてマンノース、グルコース、可溶性デンプンは資化性が高く、アラビノース、ガラクトース、ラクトースは利用し難いことが示された(表-3-1)。このような結果は、ヒラタケ菌糸体成長の栄養環境を検討したHashimoto et al. (1974)の結果と同様な傾向を示した。グルコースの資化性が高く、そしてアラビノース、ガラクトース、ラクトースのいずれかが低い資化性を示すことが、シイタケ(Ishikawa, 1967)、エノキタケ(北本ら, 1985)、ナメコ(早川・吉村, 1991)、ヤナギマツタケ(木内, 1985)、マイタケ(松本・大平, 1982)、ブナシメジ(寺下ら, 1995)と現在生産されている主要な食用担子菌において報告されている。このことから、ヒラタケ菌の炭素源の資化性は、他の食用担子菌とはほぼ同様な傾向を示すと考えられる。

基本培地(AsG培地)および基本培地よりグルコースを除いたAs培地にKWE、AGおよびKWE構成単糖を添加したところ、KWEの場合では、KWEを添加するに従いヒラタケ菌糸体は、成長促進を示し、特に5%以上の高濃度の添加では顕著に成長した。AGやKWE構成単糖ではKWE添加のような著しい促進作用を示さなかった(図-3-1~2)。したがってKWEのヒラタケ菌糸体成長に対する促進作用は、AGやKWEの構成単糖とは異なる成分の関与が示唆された。

ウロン酸はシイタケ菌の菌糸体成長や子実体形成

に促進作用を示すことが報告されている(池ヶ谷ら, 1993)が、本研究において、ヒラタケ菌の菌糸体成長にも促進作用を示すことが明らかとなり、最適濃度はAsG培地では5000ppm付近で、無添加培地の1.7倍の菌糸体重量を示した(図-3-5)。KWEやAGにもウロン酸が含まれており、その含有率は0.7~0.8%であった。KWE、AGを15%濃度で添加した場合、1000~1200ppmのウロン酸が含まれていることとなる。AsG培地にKWEを10~15%濃度で添加した場合、ヒラタケ菌糸体重量は無添加培地の9倍前後となり、AGを10~15%濃度で添加した場合、無添加培地の1.8倍前後となった(図-3-1)。KWE添加効果とウロン酸添加効果には大きな隔たりがあり、KWE中のウロン酸はKWE添加の著しい促進作用の一助にはなっているが、主たる要因であるとは考え難い。一方、AG添加とウロン酸添加の促進作用はその添加濃度と促進効果が符合することから、AG添加効果の主たる要因はAG中のウロン酸に起因する可能性が高いと考えられる。

AsG培地、As培地の両培地における、KWE、AGの添加によるヒラタケ菌の還元糖消費量の変化は、菌糸体重量の変化とよく似た傾向を示した(図-3-1~2, 6)。このことは、還元糖の消費量は菌糸体成長と関連しており、菌糸体によって消費された還元糖は新たな菌糸体の形成と代謝に利用されたことを反映していると考えられる。

本研究では培養10日目において、KWE添加濃度の増加とともに、菌糸体重量が顕著に増加し、フェノール酸化酵素と多糖分解酵素の産出が著しく活発になった。

Leathamの合成培地でシイタケ菌を培養した場合、接種後の培養経過とともに菌糸体重量が増加し、フェノール酸化酵素と多糖分解酵素の活性も高くなること(Leatham, 1985)、また、*Pleurotus sajor-cajyu*、*P. eryngii*の菌糸体からのプロトプラストの再生菌で、ラッカーゼ欠損株は親株に比べて菌糸体成長速度が著しく遅くなること(Eguchi et al., 1994)が報告されている。これらのことから、きのこ菌糸体の成育とフェノール酸化酵素、多糖分解酵素の産出とは密接な関連性のあることが推察される。

DPO、ラッカーゼはフェノール類を酸化し、 β -グルコシダーゼはフェノール類と糖とのグルコシド結合を分解する酵素である。いずれも基質により誘

導される酵素であることから、KWE添加培地においてこれらの酵素活性が著しく増加したことは、KWE中のフェノール性成分が関与していると考えられる。

カラマツ材中の主要な水溶性フェノール性成分はタキシフォリンである。さらに、カツラニン、ケルセチン、ケンフェロールなども少量共存しており、これらのフラボノイド類以外にはリグナン類の存在が確認されている（笹谷ら，1980；笹谷，1987）。カラマツ材中のフラボノイド類は熱水可溶部より単離されており（出町ら，1968），これらのフェノール性成分がKWE中には、0.5%程度含まれている（高島・水本，1994）。したがってKWE中の主要なフェノール性成分もタキシフォリンを主体としたフラボノイド類である可能性が高い。ところが、タキシフォリンやケルセチン等のフラボノイド類やリグナン類には担子菌の菌糸体育成に対して阻害作用のあることが知られている（善本，1983）。したがって、KWE中のフェノール性成分が単独でヒラタケ菌の育成を促進させたり、フェノール酸化酵素や多糖分解酵素の産出を促したとは考え難い。また、KWE中のAG（K-AG）は、KWEの添加濃度が高くなるに従い、ヒラタケ菌糸体に著しく資化されて菌糸体成長の促進作用に寄与したのに対し、AG単体の添加培地ではAGの資化性が低く、菌糸体成長に顕著な促進作用が認められず、KWE、AG添加培地におけるセルラーゼ、AGaseの産出状況と符合する結果となった。これらのことから、KWE中のフェノール性成分とAGが混在した状態、あるいはそれらが結合した状態において始めて、ヒラタケ菌糸体育成の急激な促進およびフェノール酸化酵素や多糖分解酵素の顕著な産出がもたらされるものと推察される。

植物ホルモン2,4-ジクロロフェノキシ酢酸は、10ppmの添加でカワラタケ菌の菌糸体成長を高め、酵素生産を活性化させることが報告されている（Tsujiyama et al., 1993）。しかし、本研究のKWEは5～15%の多量の添加によって菌体外酵素の産出が活発となり、K-AGが資化されて菌糸体成長が顕著に促進されたことから、KWEはヒラタケ菌に対して炭素源としての栄養源の作用を有していると推察される。

第5節 結 論

ヒラタケ菌によるカラマツ水抽出物（KWE）の資化性およびヒラタケ菌の菌体外酵素の産出に及ぼすKWEの影響について検討した。アスパラギン培地（As培地）およびアスパラギン・グルコース培地（AsG培地）とも、KWEを添加した場合、添加濃度が高くなるに伴って菌糸体の重量は著しく増加した。しかし、KWEの主要構成成分であるアラビノガラクトサン（AG）やKWEの構成単糖類を単独で添加した場合には、KWEのような成長促進作用は認められなかった。一方、KWEとグルコースの両者を同時に添加した場合には、KWEのみを添加した場合より著しい成長促進作用があり、KWEとグルコースには相乗的な作用が認められた。KWE添加培地では、AG添加培地に比べてグルコース、還元糖の消費量が多かった。したがって、KWE中のAG（K-AG）は、AG単体の場合よりも資化されやすく、このことはAG添加培地に比べてKWE添加培地で菌糸体重量が著しく増加したことに寄与していると考えられる。KWE添加培地では、添加濃度の増加にともなってフェノール酸化酵素の産出が著しくなり、多糖分解酵素の産出も著しくなった。しかし、AG添加培地では、そのような酵素活性の増加は認められなかった。

これらのことから、KWEのヒラタケ菌糸体成長に対する促進作用は、KWEの構成単糖やAGによって生じるのではなく、KWE中のフェノール性成分が関与しており、AGとフェノール性成分が混在、あるいは、結合していることによって生じることが推察される。また、KWEの促進効果は、5～15%の多量の添加濃度で顕著となり、K-AGの資化性が高くなることから、KWEはヒラタケ菌に対して炭素源としての栄養源の作用を有していると考えられる。

第4章 カラマツ水抽出物によるヒラタケ菌の菌糸体成長と菌体外酵素活性の経時変化との関係

カラマツ水抽出物は、有用な食用担子菌の菌糸体成長に促進作用を示し、特に、ヒラタケ菌に対して顕著であった。カラマツ水抽出物の主要構成成分はアラビノガラクトサン（AG）であり、カラマツ水抽

出物中に90%以上含まれている。しかし、AG単体やカラマツ水抽出物の構成単糖ではヒラタケ菌糸体成長に促進作用を示すことがなく、カラマツ水抽出物中のAG、即ちAGとフェノール性成分が結合あるいは混在した状態のAGは、AG単体よりも資化性が高く、さらにカラマツ水抽出物を添加した培地では菌体外酵素のフェノール酸化酵素、多糖分解酵素の産出が活発であった。

きこの栽培過程における菌糸体の栄養要求性と菌体外酵素活性の変化とは密接な関係がある。例えば、シイタケ菌の栄養成長や子実体形成において、リグニン前駆物質のフェノール化合物やウロン酸は、菌体外のセルラーゼ、ラッカーゼ、グルタミン酸脱水素酵素の各活性に変動をもたらすことが報告されている(河村ら, 1983; 池ヶ谷ら, 1988, 1993, 1994)。このことから、カラマツ水抽出物はヒラタケ菌糸体の成育過程で菌体外酵素の産出動向に影響を及ぼしている可能性がある。

そこで本章では、カラマツ水抽出物およびAG単体を添加した培地でヒラタケ菌糸体を培養し、培養10日目までの初期成長時の菌糸体重量と菌体外酵素活性の経時変化を測定し、カラマツ水抽出物添加培地におけるヒラタケ菌の初期成長と菌体外酵素産出との関連性について検討した(高畠ら, 1996a)。

第1節 菌糸体成長の変化

1. 材料および方法

(1) 供試菌およびカラマツ水抽出物の調製

供試菌には当センターに保存されているヒラタケ *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer Po-03 菌株を用い、供試菌をMYA培地で24℃にて6日間平面培養し、コルクボーラーで直径5mmに打ち抜いたディスクを接種源とした。カラマツ水抽出物は、シベリア産カラマツ (*Larix sp.*) の製材鋸屑を水抽出し、抽出液を減圧濃縮後、乾燥して粉末状に調製した(以下、KWEと略する)。

(2) 菌糸体の培養および菌糸体重量の測定

基本培地にはアスパラギン・グルコース培地(AsG培地)を用い、基本培地にKWEあるいはアラビノガラクトラン(Sigma社製, minimum 98%(TLC): AG)を15%(W/V)添加し、1N-HClでpH5.5に調整して供試培地とした。供試培地20mlを100ml容三角フラスコに分注して滅菌し、供試菌を接種した。

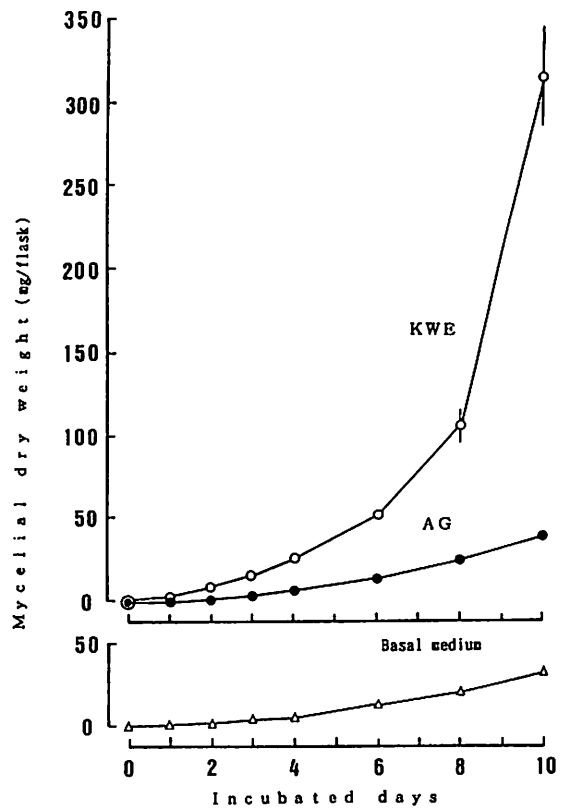


図-4-1 KWE添加培地、AG添加培地および基本培地において10日間培養したヒラタケ菌の菌糸体重量の経時変化
縦棒は標準偏差を示す。○: KWE, ●: AG, △: 基本培地(AsG培地)
Changes of mycelial dry weight of *Pleurotus ostreatus* during ten days incubated in basal (AsG) medium and basal medium added 15% (W/V) of KWE or AG. The vertical bars represent standard deviation.
○: KWE, ●: AG, △: Basal (AsG) medium.

暗所にて24℃で静置培養を行い、所定期間培養後、菌糸体を濾別、洗浄して乾燥重量を測定した。

2. 結果

KWE、AG添加培地および基本培地における培養10日目までのヒラタケ菌の菌糸体重量の変化を図-4-1に示す。KWE添加培地における菌糸体重量は培養4日目まで緩やかな増加を示し、その後、急激に増加して培養8日目で110mg/flask、10日目で316mg/flaskとなった。一方、AG添加培地および基本培地では、菌糸体は培養3日目までほとんど成長せず、培養4日目以降より僅かに成長し始め、10日目で各々41mg/flask、31mg/flaskとなった。このように、KWE添加培地での菌糸体成長はAG添加培地、基本培地に比べて終始良好であり、KWEの有無による培地間の菌糸体重量の差は、培養4日目以降において著しく大きくなった。

第2節 フェノール酸化酵素の経時変化

1. 材料および方法

供試菌株, 供試培地および菌糸体の培養は, 前節「菌糸体成長の変化」において記述したとおりである。粗酵素液は, 培養濾液をセルロースチューブ (和光純薬製) によって, 1 mM 酢酸緩衝液 (pH4.2) で24時間透析して調製した。フェノール酸化酵素としてラッカーゼ, ジフェノールオキシダーゼ (DPO) を既報 (Ohga, 1992b; Matsumoto, 1988) に準拠して測定した。ラッカーゼ, DPO活性は, それぞれフェニレンジアミン (和光純薬), L-ジヒドロキシフェニルアラニン (L-DOPA, 和光純薬製) を基質とし, 波長525nmおよび475nmの吸光度を測定し, 1分間あたりに吸光度を0.001増加させる酵素量を1酵素単位とした。

2. 結果

KWE, AG添加培地および基本培地における培養10日目までのラッカーゼ活性の経時変化を測定した。その結果を図-4-2に示す。KWE添加培地において, ラッカーゼ活性は, 培養1日目において既に認められ, その後, 培養経過とともに著しく高くな

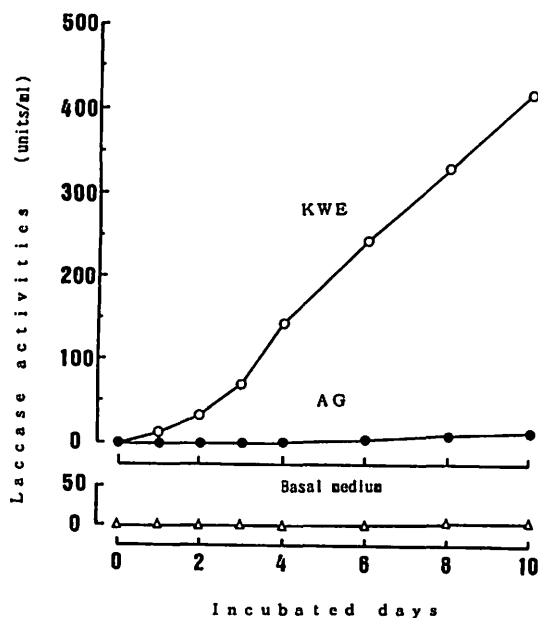


図-4-2 KWE添加培地, AG添加培地および基本培地において10日間培養したヒラタケ菌のラッカーゼ活性の経時変化

○: KWE, ●: AG, △: 基本培地 (AsG培地)

Changes of Laccase activities of *Pleurotus ostreatus* during ten days incubated in basal (AsG) medium and basal medium added 15% (W/V) of KWE or AG.

○: KWE, ●: AG, △: Basal (AsG) medium.

った。AG添加培地, 基本培地では, 培養2日目に活性が微かに認められたが, その後, 培養日数が経過しても低い活性のままで推移した。KWE添加培地では, ラッカーゼ活性が培養1日目にて認められたので, 培養24時間以内の活性の経時変化, すなわち培養1, 3, 6, 12, 24時間における活性を測定した。その結果を図-4-3に示す。KWE添加培地では, 活性は培養1時間後で認められ, その後, 培養時間の経過とともに高くなった。AG添加培地や基本培地では, 培養24時間以内において, 活性は認められなかった。

KWE, AG添加培地および基本培地における培養10日目までのDPO活性の経時変化を測定した。その結果を図-4-4に示す。KWE添加培地では, 活性は培養1日目で5 units以上を示し, その後, 培養日数の経過とともに漸増した。AG添加培地, 基本培地では, 活性は培養4日目にて微かに認められたが, その後, 培養日数が経過しても非常に低い状態のままで推移した。KWE添加培地では, 培養1

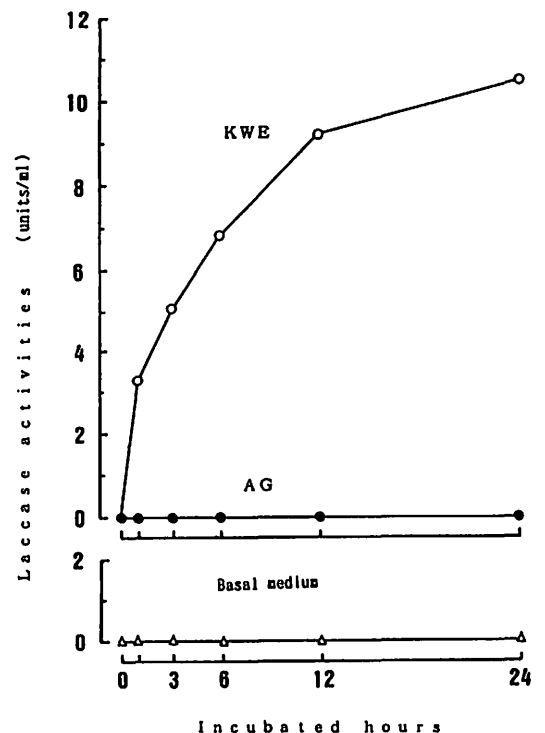


図-4-3 KWE添加培地, AG添加培地および基本培地において24時間培養したヒラタケ菌のラッカーゼ活性の経時変化

○: KWE, ●: AG, △: 基本培地 (AsG培地)

Changes of Laccase activities of *Pleurotus ostreatus* during twenty-four hours incubated in basal (AsG) medium and basal medium added 15% (W/V) of KWE or AG.

○: KWE, ●: AG, △: Basal (AsG) medium.

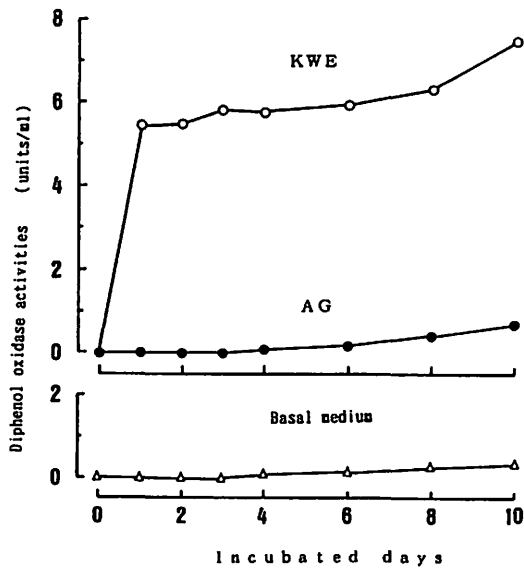


図-4-4 KWE添加培地, AG添加培地および基本培地において10日間培養したヒラタケ菌のジフェノールオキシダーゼ(DPO)活性の経時変化
○: KWE, ●: AG, △: 基本培地(AsG培地)
Changes of diphenol oxidase activities of *Pleurotus ostreatus* during ten days incubated in basal (AsG) medium and basal medium added 15% (W/V) of KWE or AG.
○: KWE, ●: AG, △: Basal (AsG) medium.

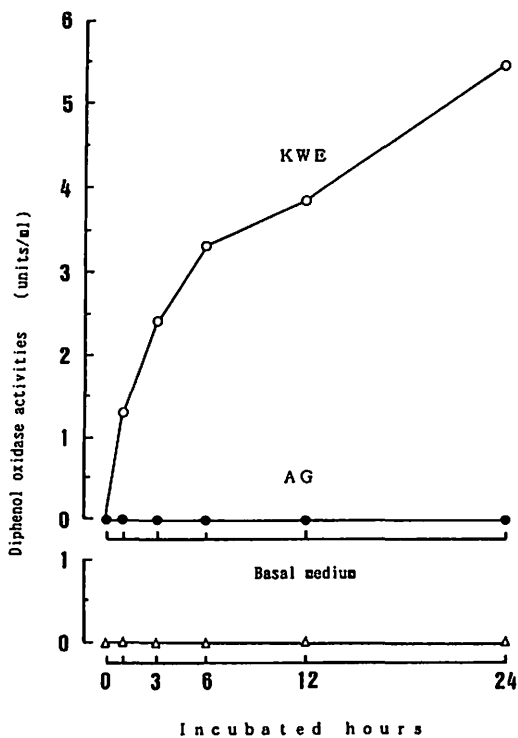


図-4-5 KWE添加培地, AG添加培地および基本培地において24時間培養したヒラタケ菌のジフェノールオキシダーゼ(DPO)活性の経時変化
○: KWE, ●: AG, △: 基本培地(AsG培地)
Changes of diphenol oxidase activities of *Pleurotus ostreatus* during twenty-four hours incubated in basal (AsG) medium and basal medium added 15% (W/V) of KWE or AG.
○: KWE, ●: AG, △: Basal (AsG) medium.

日目において,すでにDPO活性が認められたので,ラッカーゼの場合と同様に培養24時間以内のDPO活性の経時変化を測定した。その結果を図-4-5に示す。KWE添加培地では,活性は培養1時間後に既に認められ,その後,培養経過とともに高くなった。AG添加培地や基本培地では,培養24時間以内において活性は認められなかった。

このようにKWE添加培地では,培養後1時間でラッカーゼ, DPOの活性が認められたことから,フェノール酸化酵素はヒラタケ菌を接種した後に直ちに誘導され,培養経過とともに著しく産出されたと考えられる。

第3節 多糖分解酵素の経時変化

1. 材料および方法

供試菌株, 供試培地および菌糸体の培養は第1節「菌糸体成長の変化」, 粗酵素液の調製は前節「フェノール酸化酵素の経時変化」において記述したとおりである。多糖分解酵素として, β -グルコシダーゼ, セルラーゼおよびアラビノガラクターナーゼ(AGase)の各活性を既報(Ohga, 1992b; Matsumoto, 1988)に準拠して測定した。 β -グルコシダーゼは, p-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド(Sigma社製)を基質とし, 遊離したp-ニトロフェノールを波長400nmの吸光度で測定した。1分間に1 μ molのp-ニトロフェノールを遊離する酵素量を1酵素単位とした。セルラーゼ, AGase活性は, それぞれカルボキシメチルセルロース(CMC-Na, 和光純薬製), AG(Sigma社製, minimum 98%(TLC))を基質とし, 生成された還元糖をSomogyi-Nelson法(Somogyi, 1952)で定量した。1分間にグルコース換算で1 μ molの還元糖を遊離する酵素量を1酵素単位とした。

2. 結果

KWE, AG添加培地および基本培地における培養10日目までの β -グルコシダーゼ, セルラーゼ, AGaseの経時変化を測定した。その結果を図-4-6~8に示す。

β -グルコシダーゼ活性に関して, KWE添加培地では, 活性は培養6日目で認められ, その後, 培養日数の経過とともに急激に高くなった。AG添加培地および基本培地では, 活性は培養8日目で認められ, その後, 10日目に向けて僅かに高くなったが,

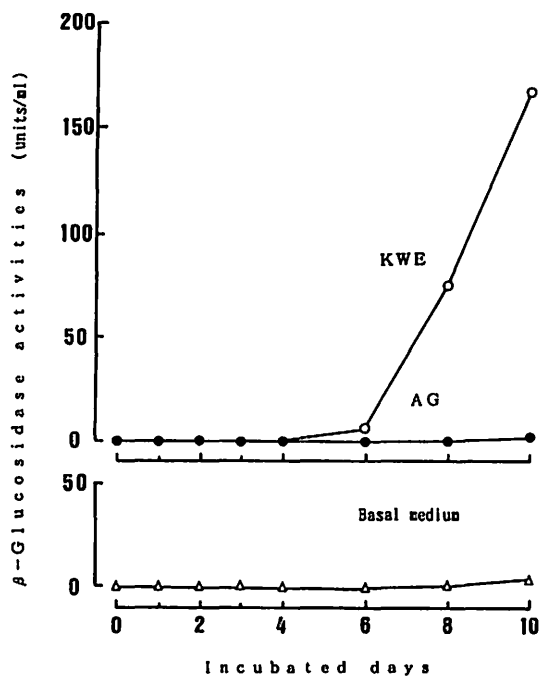


図-4-6 KWE添加培地, AG添加培地および基本培地において10日間培養したヒラタケ菌の β -グルコシダーゼ活性の経時変化

○: KWE, ●: AG, △: 基本培地 (AsG培地)
 Changes of β -Glucosidase activities of *Pleurotus ostreatus* during ten days incubated in basal (AsG) medium and basal medium added 15% (W/V) of KWE or AG.
 ○: KWE, ●: AG, △: Basal (AsG) medium.

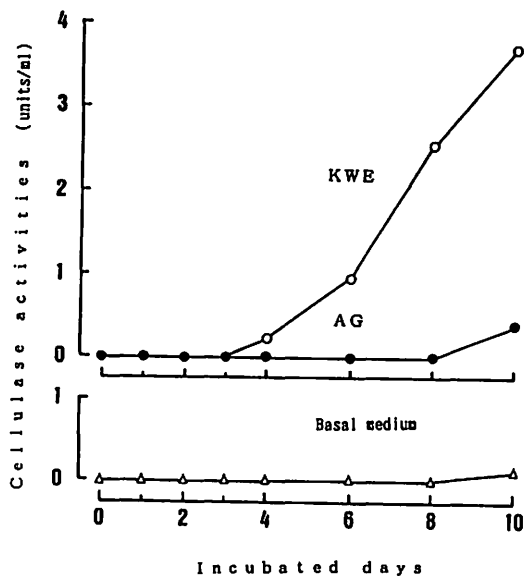


図-4-7 KWE添加培地, AG添加培地および基本培地において10日間培養したヒラタケ菌のセルラーゼ活性の経時変化

○: KWE, ●: AG, △: 基本培地 (AsG培地)
 Changes of Cellulase activities of *Pleurotus ostreatus* during ten days incubated in basal (AsG) medium and basal medium added 15% (W/V) of KWE or AG.
 ○: KWE, ●: AG, △: Basal (AsG) medium.

KWE添加培地に比べて非常に低い活性であった(図-4-6)。

セルラーゼ活性に関して, KWE添加培地では, 活性は培養4日目で認められ, その後, 培養日数の経過とともに著しく高くなった。AG添加培地および基本培地では培養10日目で活性が認められたが, KWE添加培地に比べて非常に低い活性であった(図-4-7)。

AGase活性に関して, KWE添加培地では, 活性は培養4日目で認められ, その後, 培養日数の経過とともに高くなった。AG添加培地および基本培地では培養10日目で活性が認められたが, KWE添加培地に比べて非常に低い活性であった(図-4-8)。

KWE添加培地における β -グルコシダーゼ, セルラーゼ, AGaseの多糖分解酵素は, フェノール酸化酵素が十分に産出された後の培養4~6日目以降で確認され, その後, 培養経過によっても活性は著しく高くなった。これに対してAG添加培地や基本培地では, フェノール酸化酵素と同様に多糖分解酵素においても, KWE添加培地に比べて誘導時期が遅く, 非常に低い活性で推移した。

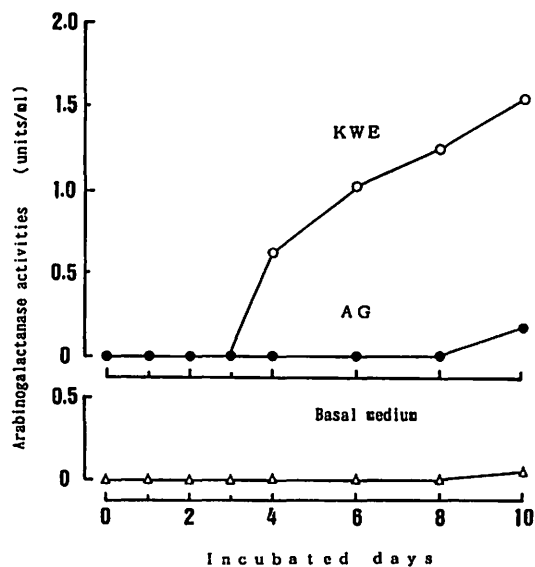


図-4-8 KWE添加培地, AG添加培地および基本培地において10日間培養したヒラタケ菌のアラビノガラクターナーゼ活性の経時変化

○: KWE, ●: AG, △: 基本培地 (AsG培地)
 Changes of Arabinogalactanase activities of *Pleurotus ostreatus* during ten days incubated in basal (AsG) medium and basal medium added 15% (W/V) of KWE or AG.
 ○: KWE, ●: AG, △: Basal (AsG) medium.

第4節 考 察

ヒラタケ菌の菌糸体成長に関して、KWE添加培地では培養4日目まで緩やかに成長し、4日目以降で急激に成長し始めたことから、培養4日目までが菌糸体成長の誘導期であり、4日目以降に対数増殖期に入ったと考えられる。一方、AG添加培地や基本培地では培養10日目まで緩やかな成長を示し、この培養期間は誘導期に相当すると考えられる(図4-1)。

菌糸体の栄養成長とともにラッカーゼ活性が高くなるのが、キコブタケ (*Phellinus igniarius*) (Szklař et al., 1989), カワラタケ (*Coriolus versicolor*) (Szklař et al., 1989), ツクリタケ (*Agaricus bisporus*) (Wood, 1980), シイタケ (*Lentinus edodes*) (池ヶ谷ら, 1993 : Ohga, 1992b : Leatham・Stahmann, 1981), スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) (Leonard・Phillips, 1973) と数多くの担子菌で報告されている。食用担子菌であるヒラタケ菌を供試した本研究において、KWE添加培地では培養経過とともに菌糸体重量は著しく増加し、ラッカーゼ活性も顕著に高くなった。一方、AG添加培地や基本培地では、培養日数が経過しても菌糸体重量はさほど増加せず、ラッカーゼ活性も低い状態で推移した。このように本研究のヒラタケ菌の場合も、これまでに報告されている担子菌の場合と同様に菌糸体重量とラッカーゼ活性の経時変化は相似した傾向を示した。

また、フェノール酸化酵素のDPO、多糖分解酵素のβ-グルコシダーゼ、セルラーゼ、AGaseの菌体外酵素は、産出される時期が供試培地に依りて異なるが、菌糸体重量が増加するに従い、各々の酵素活性も高くなり、ラッカーゼ同様に菌糸体重量成長と連動する傾向が認められた。

ところで、培養10日間でKWE添加培地では菌糸体成長が誘導期から対数増殖期へと移行した。これに対してAG添加培地や基本培地では、菌糸体成長は誘導期のままであった。したがって、KWE添加培地においてAG添加培地や基本培地と比較して菌体外酵素活性が高いのは、ヒラタケ菌の育成ステージの相違による菌糸体重量の差によって生じているとすれば、AG添加培地や基本培地においても菌糸体成長が対数増殖期に入ると、KWE添加培地と同様に菌体外酵素が活発に産出されることが予想される。しかし、KWE添加培地において菌体外酵素活

性が著しく高くなるのは、培養初期時にKWEを資化する上で特異的に菌体外酵素を産出することにより生じていると推察することもできる。そこで、KWE添加培地における初期成長時のヒラタケ菌の菌糸体成長と菌体外酵素活性との関連性を検討するために、KWE、AG添加培地および基本培地と各供試培地ごとに菌糸体乾燥重量当たりの酵素活性、即ちラッカーゼ、DPO、セルラーゼ、AGaseの比活性 (unit/ml・mg) の経時変化を求めた。その結果を図4-9~11に示す。

KWE添加培地において、ラッカーゼは培養1日目に認められ、培養経過とともに上昇して4日目に最大となり、その後、急激に低下して10日目には4日目の1/4以下となった。DPOは、培養1日目が最大となり、その後、培養日数が経過するにつれて急激に低下した。セルラーゼ、AGaseは培養4日目よ

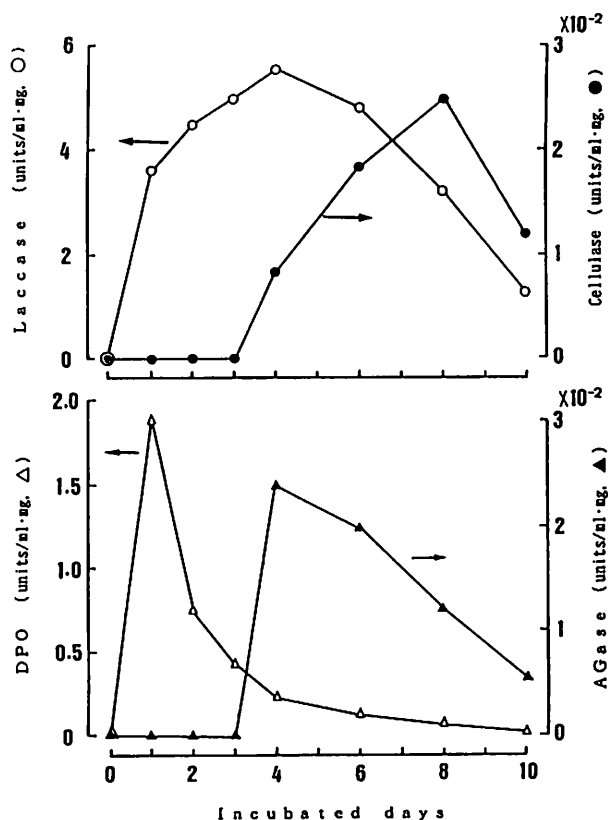


図4-9 KWE添加培地において10日間培養したヒラタケ菌の菌体外酵素の比活性の経時変化
 ○：ラッカーゼ, ●：セルラーゼ, △：ジフェノールオキシダーゼ(DPO), ▲：アラビノガラクターナーゼ(AGase)
 Changes in specific activities of extracellular enzyme of *Pleurotus ostreatus* during ten days incubated in basal (AsG) medium added 15% (W/V) of KWE.
 ○ : Laccase, △ : Diphenol oxidase (DPO), ● : Cellulase, ▲ : Arabinogalactanase (AGase).

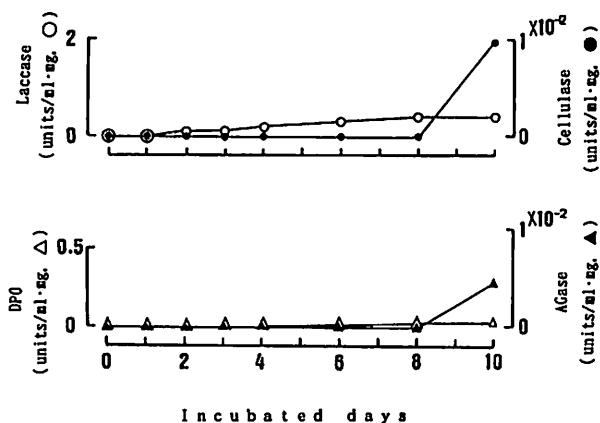


図-4-10 AG添加培地において10日間培養したヒラタケ菌の菌体外酵素の比活性の経時変化

○：ラッカーゼ，●：セルラーゼ，△：ジフェノールオキシダーゼ(DPO)，▲：アラビノガラクターナーゼ(AGase)

Changes in specific activities of extracellular enzyme of *Pleurotus ostreatus* during ten days incubated in basal (AsG) medium added 15% (W/V) of AG.

○：Laccase, △：Diphenol oxidase (DPO), ●：Cellulase, ▲：Arabinogalactanase (AGase).

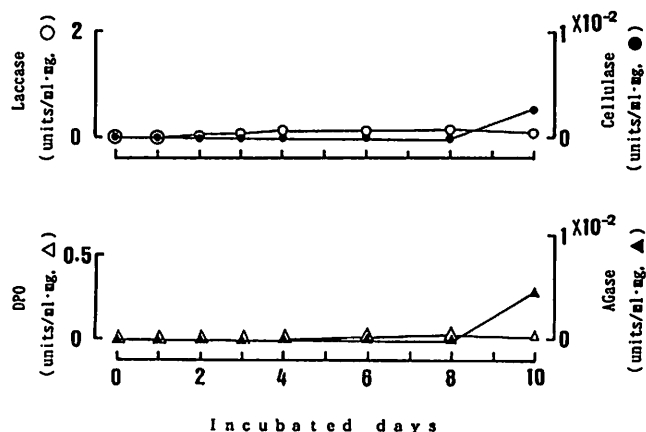


図-4-11 基本培地において10日間培養したヒラタケ菌の菌体外酵素の比活性の経時変化

○：ラッカーゼ，●：セルラーゼ，△：ジフェノールオキシダーゼ(DPO)，▲：アラビノガラクターナーゼ(AGase)

Changes in specific activities of extracellular enzyme of *Pleurotus ostreatus* during ten days incubated in basal (AsG) medium.

○：Laccase, △：Diphenol oxidase (DPO), ●：Cellulase, ▲：Arabinogalactanase (AGase).

り認められ、セルラーゼは8日目まで上昇して最大となり、AGaseは4日目まで最大となり、その後低下した(図-4-9)。

このようにKWE添加培地では、ラッカーゼ、DPOのフェノール酸化酵素は培養開始後、直ちに産出され、菌糸体が緩やかな成長を示す初期成長時に著しく産出し、菌糸体成長が顕著になるに従い急激に低下する傾向を示した。一方、多糖分解酵素の活性は、菌糸体成長が旺盛になり始めた培養4日目以降で認められた。これらのことは、フェノール酸化酵素がKWEを構成するフェノール性成分の領域により培養開始後直ちに誘導され、培養1~4日目の菌糸体成長の誘導期に著しく産出され、その後KWE中のAG等の多糖成分の領域を分解・資化するために多糖分解酵素が顕著に産出されたことを示唆している。ヒラタケ菌がKWEを構成するAGを効率的に分解・吸収して資化するには、できるだけ早期に多量の多糖分解酵素を産出することが求められる。したがって、多糖分解酵素はフェノール酸化酵素と同時に、あるいはフェノール酸化酵素に先立って産出する方が、フェノール酸化酵素を産出した後に産出する場合より、KWE中のAGを効率的に資化できるはずである。しかし、KWE添加培地では、フェノール酸化酵素が多糖分解酵素に先立って顕著に産出さ

れており、このことは、多糖分解酵素を産出するための欠くことの出来ない過程であり、KWEを構成するAGを資化して成長する場合のヒラタケ菌の生理特性であることを示唆している。

AG添加培地および基本培地において、ラッカーゼ、DPOは、培養2日目ないし4日目に微かに認めれ、培養日数が経過しても非常に低い活性のままで推移した。また、セルラーゼ、AGaseは、培養8日目まで認められず、10日目に認められた。このようにAG添加培地と基本培地における菌体外酵素の産出動向は、極めて類似した傾向を示したが、KWE添加培地とは著しく異なる動向を示した(図-4-10~11)。

AG添加培地や基本培地においても、培養期間が経過するにつれて、菌糸体重量が増加してフェノール酸化酵素の産出量が微かに増加する傾向が認められた(図-4-1~2, 4)。また、培養10日目までは、AG添加培地、基本培地ともに菌糸体成長の誘導期に相当することから、培養10日目以降で誘導期から対数増殖期に入ることによって菌糸体重量が増加してフェノール酸化酵素の産出量も増大することが推測される。したがって、菌糸体重量の増加に伴ってフェノール酸化酵素の産出量が多くなる点に関して、KWE添加培地と同様な傾向を示した。

しかし、菌体外酵素の比活性に関して、KWE添加培地とAG添加培地・基本培地を比較した場合、KWE添加培地では、培養1～24時間後の菌糸体の成長開始期に既にフェノール酸化酵素が産出され、著しく高い比活性を示した。一方、AG添加培地や基本培地では、菌糸体の成長開始期におけるフェノール酸化酵素の比活性は極めて低い状態であった。これらのことから、菌糸体の成長開始期に示されるKWE添加培地におけるフェノール酸化酵素の著しく高い比活性は、ヒラタケ菌に対してKWEを構成するフェノール性成分がフェノール酸化酵素の誘導物質として直接関与したことを示唆しており、ヒラタケ菌に対するフェノール酸化酵素の誘導はKWEの特性であると考えられる。

培養過程において菌糸体の蔓延とともにフェノール酸化酵素が産出され、その後、子実体原基形成、子実体形成へと成長段階が進展するにつれて、フェノール酸化酵素の活性が低下し、多糖分解酵素の活性が高くなるのが、これまでにシイタケ(池ヶ谷ら, 1993: Ohga, 1992b: Matsumoto, 1988: 石川ら, 1983: Tokimoto et al., 1987)、ヒラタケ(岩原ら, 1981)、ブナシメジ(天野ら, 1992)、ツクリタケ(Wood・Goodenough, 1977)等の多数の食用担子菌で知られている。これらの食用担子菌の子実体形成前後に示す酵素産出の動向とKWE添加培地でのヒラタケ菌の初期成長時における酵素産出の動向は類似した傾向を示した。エノキタケでは、栄養菌糸体中のグルコースの大部分がトレハロースに代謝されて子実体に転流することが推測されている(Kitamoto・Gruen, 1976)。子実体形成時に多糖分解酵素の活性が高くなるのは、栄養菌糸体から菌糸体に配向性のある子実体に分化するため、呼吸代謝が激しくなることにより多量の炭素源の確保が必要となるためであると考えられる。一方、KWE添加培地で多糖分解酵素の活性が高くなるのは、KWEを構成するAGを分解・資化して栄養菌糸体が成長するためであると考えられる。子実体形成時の代謝には、外界、栄養菌糸体、子実体の三者が相互に関与しているのに対し、栄養成長時の代謝には、外界と栄養菌糸体が相互に関与しているだけであり、子実体形成の代謝は、栄養成長時に比べて、より複雑な代謝経路に基づいていると考えられる。したがって、KWE添加培地においてヒラタケ菌が初期成長

時に示す酵素産出の動向と食用担子菌が子実体形成期の前後で示す酵素産出の動向は、それぞれ異なる代謝経路より生じている可能性が強い。

また、シイタケ菌の木材細胞壁の分解において、リグニン成分が優先的に除去され、二次壁の分解途上でセルロースマイクロフィブリルが露出し、腐朽の進展にともないセルロース領域が分解されることが形態的に観察されることから、シイタケ菌は木材細胞壁を分解する際に、先ずリグニン分解酵素を産出し、その後セルロース分解酵素を産出するものと推察されている(Ohira et al., 1992: Tsuneda et al., 1989: 林原ら, 1983)。このことから、ヒラタケ菌と同様の白色腐朽菌であるシイタケ菌が木材細胞壁を腐朽する過程で分泌するリグニン分解酵素と多糖分解酵素の産出順序とヒラタケ菌がKWE添加培地でKWEを構成するAGを資化する過程で分泌するフェノール酸化酵素と多糖分解酵素の産出順序は、断片的に符合する傾向を示した。

シイタケ、ヒラタケ等の白色腐朽菌の子実体は、通常では枯死した広葉樹幹木から発生しており、基質となる樹木は高分子多糖類のセルロース、ヘミセルロースとフェニルプロパンが構成単位であるリグニンの複合体で構成されている。自然界において木部組織の分解は主に担子菌類が担っており、他の真菌類では分解しがたい木部組織を担子菌類である白色腐朽菌が基質として利用している。白色腐朽菌が、腐朽進展する過程でリグニンを選択的に、あるいはリグニンとセルロースを同時に資化するために、リグニン分解酵素を先に産出し、次いで多糖分解酵素を産出する傾向は、白色腐朽菌が自然界で他の微生物と競合せずに成長する上で理にかなった酵素産出動向であり、このことは白色腐朽菌の特性として見なすことができる。仮に、白色腐朽菌には栄養成長する上で、必ずフェノール酸化酵素(リグニン分解酵素)をまず産出し、そのフェノール酸化酵素の産出に基づいて多糖分解酵素を産出する生理的な特性が備わっているとすれば、KWEは白色腐朽菌が有する酵素産出の特性を誘導し、強調する役割をも果たしていると考えられる。しかし、この点に関しては今後KWEの構造を明らかにすることにより検討していく必要がある。

第5節 結論

カラマツ水抽出物 (KWE), アラビノガラクトサン (AG) を添加した基本培地 (アスパラギン・グルコース培地) でヒラタケ菌糸体を培養し, 初期成長時での菌糸体重量と菌体外酵素活性を測定し, それらの関連性を検討した。KWE添加培地では, 培養1~4日目が菌糸体成長の誘導期となり, 4日目以降対数増殖期を示した。AG添加培地や基本培地では, 培養10日目まで誘導期のままであった。ヒラタケ菌糸体の重量成長が増加するに従い, フェノール酸化酵素, 多糖分解酵素の菌体外酵素は活発に産出される傾向を示し, 菌糸体重量が顕著に増加したKWE添加培地では, AG添加培地や基本培地に比べて菌体外酵素の産出が顕著であった。特に, フェノール酸化酵素は培養1時間後に認められ, 菌糸体の培養開始後直ちに産出されるものと推察された。

ヒラタケ菌がKWEを分解・資化するために菌体外酵素を特異的に産出しているのか否かを明らかにするために, 菌糸体重量当たりの酵素活性 (比活性) の経時変化を検討した。KWE添加培地では, フェノール酸化酵素は菌糸体成長が緩やかな培養1~4日目で最大となり, その後急激に低下した。多糖分解酵素はフェノール酸化酵素が十分に産出された後に認められ, 菌糸体成長の旺盛な時期に高くなった。AG添加培地や基本培地ではKWE添加培地でのような酵素産出の動向を示さず, いずれの酵素も低く推移した。これらのことから, ヒラタケ菌はKWEのフェノール性成分の領域によりフェノール酸化酵素が培養開始後直ちに誘導されて産出が著しくなり, その後, KWE中の多糖成分の領域を分解し, 資化するものと推察される。

KWE添加培地におけるヒラタケ菌のフェノール酸化酵素と多糖分解酵素の産出動向は, ヒラタケ菌と同様の白色腐朽菌であるシイタケ菌による木材細胞壁の腐朽形態と符合するものであり, 白色腐朽菌の栄養成長時の成長特性と関連性があるものと推察される。

第5章 カラマツ水抽出物のヒラタケ栽培への利用

シイタケにおいて, ホダ木や菌床培地内の菌体重量が多くなるに従い, 子実体の発生量が多くなることが知られている (Tokimoto・Fukuda, 1981; Ohga,

1990a)。これまでに, カラマツ水抽出物はヒラタケ, エノキタケ, ヤナギマツタケ, シイタケ, ナメコ, マイタケと主要な食用担子菌の菌糸体成長に促進作用を示すことを明らかにした。このことから, カラマツ水抽出物を添加することにより菌糸体重量の増加を促し, 子実体収量の増加を見込むことが可能である。しかし, 担子菌類では菌糸体蔓延の栄養成長から子実体原基形成, 子実体形成の生殖成長へと進展するには, 光照射, 低温処理, 冠水処理等の物理的的刺激が必要であり, シイタケ (Ishikawa, 1967; Matsumoto・Kitamoto, 1987; Leatham・Stahmann, 1987; Song・Cho, 1991), エノキタケ (Kinugawa・Furukawa, 1965), *Pleurotus florida* (Egar, 1970), ウシグソヒトヨタケ (*Coprinus cinereus*) (Morimoto・Oda, 1973) 等, 多数の菌種で報告されている。また, 栄養成長と生殖成長では栄養生理的な特性が異なることが, スエヒロタケ (大山ら, 1976), シイタケ (Ishikawa, 1967; Tokimoto・Kawai, 1975), エノキタケ (北本ら, 1985), アミスギタケ (*Polyporus arcularius*) (北本ら, 1978, 1980) で報告されている。したがって, カラマツ水抽出物はヒラタケ菌に対して培養初期の菌糸体成長に顕著な促進作用を示すが, 成育ステージの異なる培養後期の子実体形成に対しても同様な促進作用を示すとは限らない。そこで本章では, 鋸屑・米ぬか培地にカラマツ水抽出物を添加してヒラタケのビン栽培を行い, 子実体形成に及ぼすカラマツ水抽出物の影響を検討した (高島ら, 1994)。

ところで, 昨今, 菌床栽培用鋸屑の供給不足, 価格高騰の問題が顕在化し, 食用きのこ生産者に深刻な影響を与えている。この問題の解決策の一つとして, 鋸屑などの木質材料に替わる安価で, 安定して入手可能な培地基材の開発が望まれている。未利用培地基材において, 保水性などの物性が鋸屑と同等の培地基材であれば, カラマツ水抽出物は木質由来成分であるので, カラマツ水抽出物を混合することにより鋸屑と同等の機能を有する菌床栽培用培地基材として利用することが可能となる。そこで本章では, 安価で, 入手が容易なモミ殻, 多孔質石 (バーミキュライト), セルロースアセテート, 故紙 (新聞紙) に着目し, それぞれにカラマツ水抽出物を添加してヒラタケのポット栽培を行い, 菌床栽培用培地基材としての適性を検討した (高島ら, 1996b)。

第1節 鋸屑培地による栽培への利用

1. 材料および方法

供試菌にはヒラタケ *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummerの市販種菌(森39号)を用い、850ml容ポリプロピレン製ビンによるビン栽培を行った。培地組成はスギ鋸屑：米ぬか = 18：17(全乾重量比)とし、含水率は約65%(湿量基準)に調整した。カラマツ水抽出物にはシベリア産カラマツ水抽出物(KWE)を供試した。KWEの添加量は、培地の全乾重量当たりのW/W比で0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 15%とし、各処理区とも12本を供試した。培地重量は480g/本とし、120℃で45分間滅菌後、種菌を接種し、19±2℃で28日間培養した。培養終了後、菌掻きを行い2時間冠水処理後、14±2℃、湿度90%以上に保ち子実体形成を促した。収穫は8分開きとし、発生操作から収穫までに要した日数と子実体収量を調査した。

2. 結果

各種濃度のKWEを添加した鋸屑培地を調製し、ヒラタケのビン栽培を行った。KWE添加培地での子実体形成状況を図-5-1に示す。いずれの添加濃度の場合も対照区と同様に正常な子実体を形成し、KWEの添加量が増加するに従い、子実体のサイズが大きくなる傾向が認められた。

発生操作から収穫までの子実体形成に要する日数、

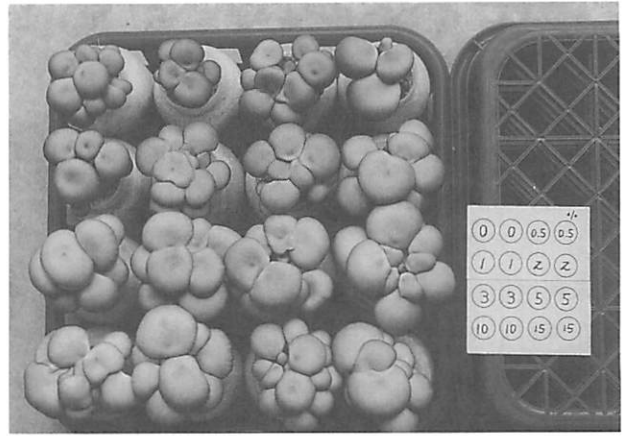


図-5-1 KWEを添加した鋸屑米糠培地で発生したヒラタケ子実体
数字はKWEの添加濃度を示す。
Fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* on sawdust-ricebran medium with added KWE. Shown are duplicate cultures of 0% through 15% addition from top to bottom, left to right.

子実体収量を表-5-1に示す。子実体形成に要する日数はKWEの添加量を増加するにしたがい若干長くなるものの最大2日程度にとどまった。子実体収量は、KWE添加濃度が高いほど増加した。0.5%の添加濃度では対照区と有意差が認められなかったが、1%以上添加した場合には、1%水準で子実体収量の増加が認められた。2~3%の添加濃度では対照区の収量の約1.2倍、10~15%の添加濃度では約1.3倍となった。

表-5-1 ヒラタケ菌の子実体形成に及ぼすKWE添加の影響
Effects of KWE-addition on the fruiting body formation of *Pleurotus ostreatus*.

Added amounts of KWE (%)	Days required for fruiting body formation ^{a), b)} (Day)	Fresh weights of fruiting body ^{b)} (g/bottle)	Ratio ^{c)}
0	13.7±1.0	71.6±6.5	1.00
0.5	13.4±0.7	76.4±5.6	1.07
1	14.3±1.1	82.9±6.5	1.16 ^{d)}
2	15.0±0.9	85.4±7.7	1.19*
3	15.6±0.9	88.2±7.4	1.23*
5	16.3±1.1	89.9±8.1	1.26*
10	16.3±0.9	92.3±4.5	1.29*
15	16.2±0.7	92.1±5.3	1.29*

a) Periods from the start of fruiting induction to harvest.
b) Each data represents mean ± standard deviations with twelve replicates. The fruiting bodies were harvested at 80% pileus opening.
c) Values based on the fresh weight of fruiting bodies of the control.
d) Significant differences from the control at P<0.01.

第2節 未利用培地基材による栽培への利用

1. 材料および方法

(1) 供試菌

供試菌にはヒラタケ *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummerの市販種菌(森39号)を供試した。

(2) 供試培地

未利用培地基材として、モミ殻(粉碎モミ殻)、多孔質石(バーミキュライト)、セルロースアセテート、故紙(新聞紙)を供試し、スギ鋸屑(1年間以上、散水屋外堆積処理したスギ製材鋸屑)を対照に用いた。培地組成は、培地基材:米ぬか=18:17(全乾重量比)とし、含水率は約65%(湿量基準)に調整した。KWEの添加量は、培地の全乾重量当たりのW/W比で15%とした。

(3) 栽培条件

供試培地をバイオポット(日医製、直径80mm、高さ100mm)に100g詰め、120℃で45分間滅菌処理した後、供試菌を接種した。19±2℃で19日間培養し、培養終了後、14±2℃、湿度90%以上に保ち、子実体形成を促した。各処理区に15検体を供試し、栽培日数と子実体収量を調査した。栽培日数は、供試菌を接種してから菌糸体が培養基全体を蔓延するまでの「蔓延日数」、菌糸体の蔓延完了から子実体の発生操作を行うまでの「熟成日数」、子実体発生操作から収穫までに要した日数、即ち「子実体形成に要する日数」およびそれぞれの栽培過程における培養開始からの「延べ日数」を調査した。なお、培養過程が終了する「熟成日数」までの「延べ日数」を各

試験区ともに19日間に統一して子実体発生操作を行った。収穫は8分開で行い、子実体の生重量を測定した。

(4) 水分活性の測定

各試験区において、滅菌処理後の接種時および培養過程を終了した子実体発生操作時の培地について、水分活性測定装置(Rotronic社製、Hygroscope DT-II型)で水分活性値(A_w)を測定し、

$$\psi = (RT/V_m) \times \ln(p/p_o)$$

ψ : 水ポテンシャル; R: 気体定数;

T: 絶対温度; V_m: 1 mol当たりの水体积;

p/p_o(相対湿度)=A_w より

培地中の水ポテンシャルを求めた(森川・丸山, 1987: Lang, 1967)。

(5) グルコサミンの定量

培養過程終了後の各試験区の培地を80℃にて乾燥し、十分に乾燥した培地を乳鉢で粉末化した。この粉末試料を用いてArima・Uozumi, 時本の方法(Arima・Uozumi, 1967: 時本, 1985)に準拠して試料中に含まれるグルコサミンの部分純化を行い、溶出したグルコサミンをRondle・Morgan法(Rondle・Morgan, 1955)で定量した。

2. 結果

スギ鋸屑、モミ殻、バーミキュライト、セルロースアセテート、新聞紙を培地基材として供試し、KWEの有無により菌床培地を調製してヒラタケのポット栽培を行った。

表-5-2 KWEを添加した培地基材およびKWE無添加の培地基材におけるヒラタケの栽培期間

Cultivated periods of *Pleurotus ostreatus* in various substrates with or without added KWE.

Substrate	Required days for spread over the medium by mycelia	Maturity-days/ the total number of days	Required days for fruiting formation/ the total number of days
Sugi	13	6/19	28/47
Sugi + KWE	12	7/19	31/50
Rice hulls	15	4/19	20/39
Rice hulls + KWE	14	5/19	20/39
Vermiculite	12	7/19	39/58
Vermiculite + KWE	12	7/19	35/54
Cellulose asetate	15	4/19	24/43
Cellulose acetate + KWE	13	6/19	21/40
Newspaper print	14	5/19	20/39
Newspaper print + KWE	13	6/19	21/40

+ KWE represents the addition of KWE to the substrates.

栽培日数に関して、表-5-2に結果を示す。培養基内を菌糸体が一通り蔓延するために要する日数（蔓延日数）では、培地基材間で著しい差が生じることなく、菌糸体は12~15日間で蔓延した。また、KWE添加の影響はほとんど認められず、いずれの培地基材においてもKWEの添加によりせいぜい1~2日間短くなる程度であった。これに対して、子実体形成に要する日数では、供試した培地基材間で差が生じた。KWE無添加の各未利用培地基材において、スギ鋸屑を対照区として比較すると、バーミキュライトは対照区より11日間長くなった。しかし、他の培地基材ではいずれも短くなり、モミ殻および新聞紙で8日間、セルロースアセテートで4日間短くなった。また、子実体形成に要する日数に及ぼすKWE添加の影響は、培地基材によって異なって現れた。子実体形成に要する日数はKWEを添加することによりスギ鋸屑では3日間、新聞紙では1日長くかかったのに対してバーミキュライト、セルロースアセテートでは、それぞれ4日間、3日間短くなり、モミ殻では無添加区と同じ日数であった。

各試験区における接種時および培養過程終了時の

培地の水分活性値を測定して培養基中の水ポテンシャルを求めた。その結果を図-5-2に示す。いずれの培地基材においても接種前では、KWEを添加することにより水ポテンシャルは低くなった。しかし、19日間の培養により、KWEを添加した各試験区では、無添加区と同等あるいは無添加区よりも高い水ポテンシャルを示した。したがって、接種時と培養過程終了時の水ポテンシャルの差は、いずれの培地基材においてもKWEを添加した試験区で大きくなって現れた。

各試験区における培地中のグルコサミン含有量を定量した。その結果を図-5-3に示す。いずれの培地基材においてもKWEを添加することによりグルコサミンの含有量が増加した。0.6~1.2mg/mg·dry wt.増加したスギ鋸屑、バーミキュライト、セルロースアセテートに比べ、モミ殻、新聞紙では、0.1~0.2mg/mg·dry wt.と少量の増加にとどまった。

スギ鋸屑および未利用培地基材について、KWE添加の有無によって調製した各々の供試培地からの子実体形成状況を図-5-4~8に示す。いずれの未利用培地基材においても対照区であるスギ鋸屑と

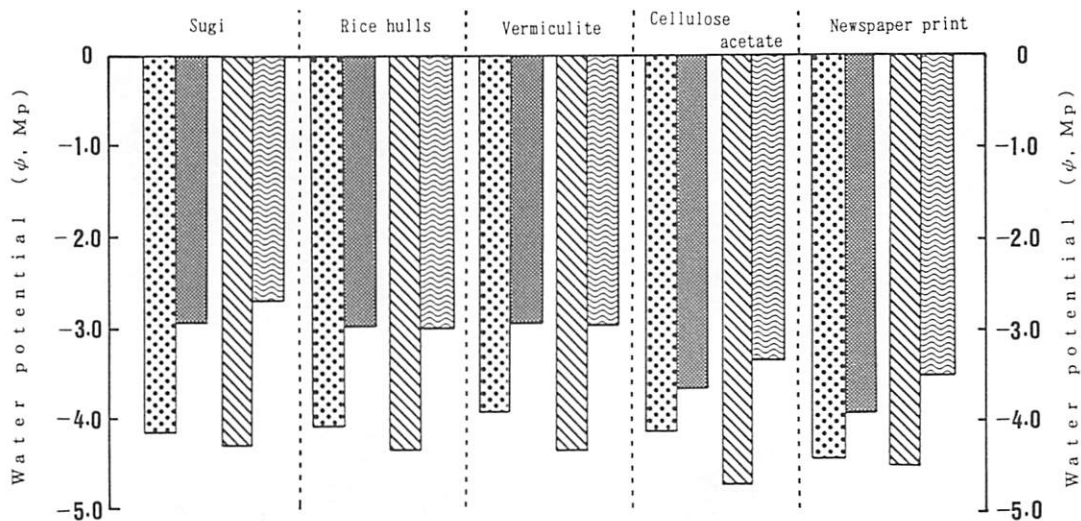


図-5-2 KWEを添加した培地基材およびKWE無添加の培地基材において接種前の水ポテンシャルと19日間ヒラタケ菌を培養した後の水ポテンシャル
Water potential of the various substrates with or without added KWE before incubation and incubated for 19 days by *Pleurotus ostreatus*.

- : 接種前のKWE無添加培地
(the substrate without KWE, before incubation)
- : 19日間培養後のKWE無添加培地
(the substrate without KWE, incubated for 19 days.)
- : 接種前のKWE添加培地
(the substrate with KWE, before incubation.)
- : 19日間培養後のKWE添加培地
(the substrate with KWE, incubated for 19 days.)

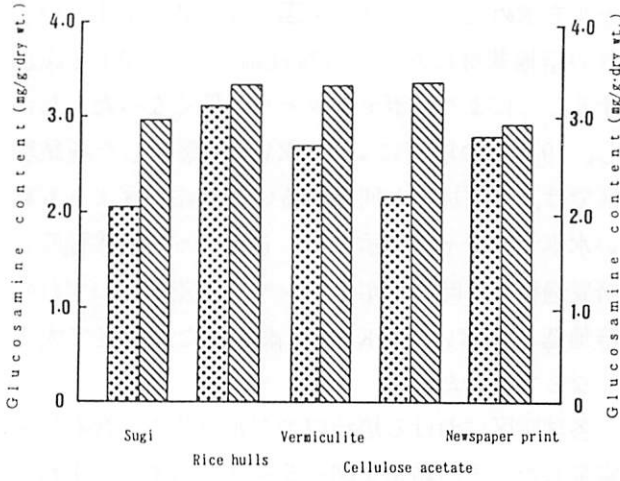


図-5-3 ヒラタケ菌を24℃で19日間培養した後のKWEを添加した培地基材およびKWE無添加の培地基材におけるグルコサミンの含有量
Glucosamine content of the various substrates with or without added KWE incubated at 24℃ for 19 days by *Pleurotus ostreatus*.

: KWE無添加培地
(the substrate without added KWE.)
: KWE添加培地
(the substrate with added KWE.)

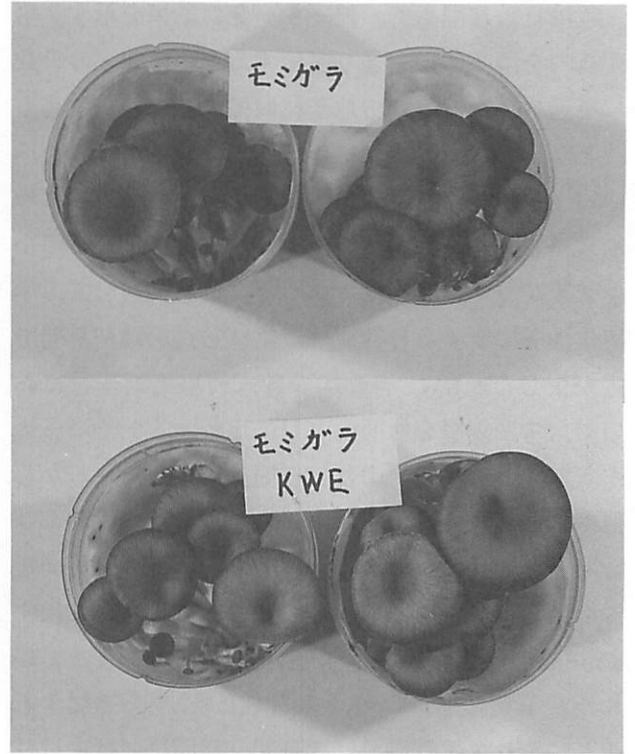


図-5-5 KWEを添加したモミ殻・米糠培地およびKWE無添加のモミ殻・米糠培地で発生したヒラタケ子実体
Fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* on rice hulls-ricebran medium with or without added KWE.

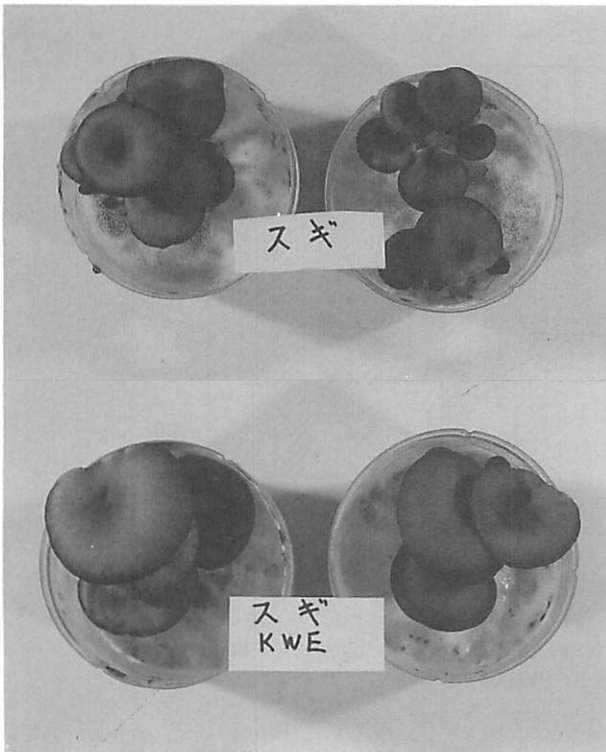


図-5-4 KWEを添加したスギ鋸屑・米糠培地およびKWE無添加のスギ鋸屑・米糠培地で発生したヒラタケ子実体
Fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* on Sugi sawdust-ricebran medium with or without added KWE.

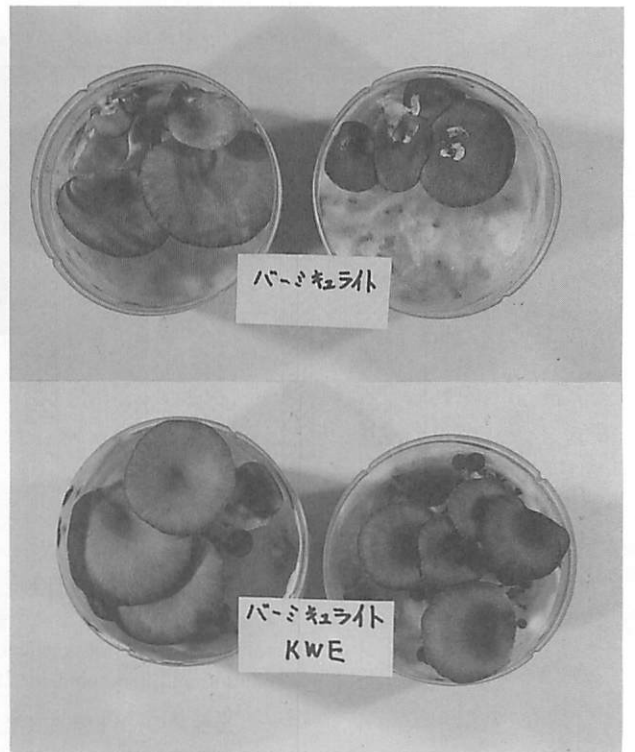


図-5-6 KWEを添加した多孔質石(バーミキュライト)・米糠培地およびKWE無添加の多孔質石(バーミキュライト)・米糠培地で発生したヒラタケ子実体
Fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* on poly-porus stone (vermiculite)-ricebran medium with or without added KWE.

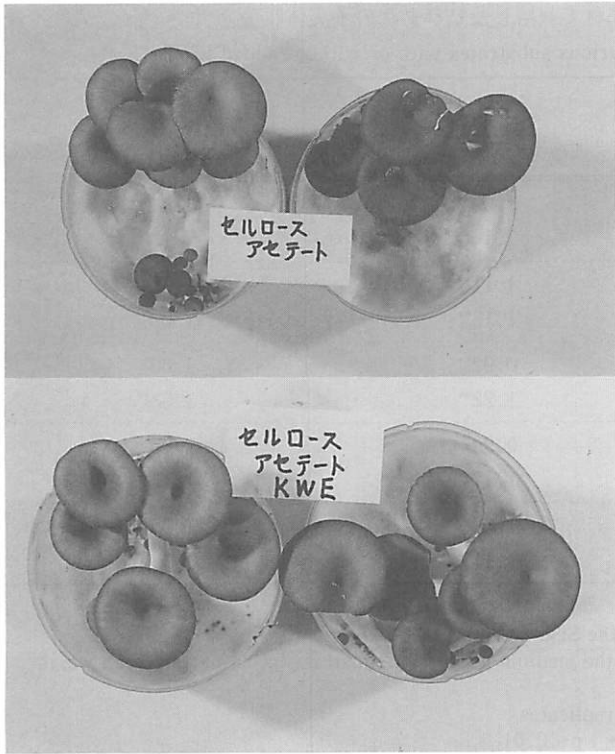


図-5-7 KWEを添加したセルロースアセテート・米糠培地およびKWE無添加のセルロースアセテート・米糠培地で発生したヒラタケ子実体
Fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* on cellulose acetate-ricebran medium with or without added KWE.

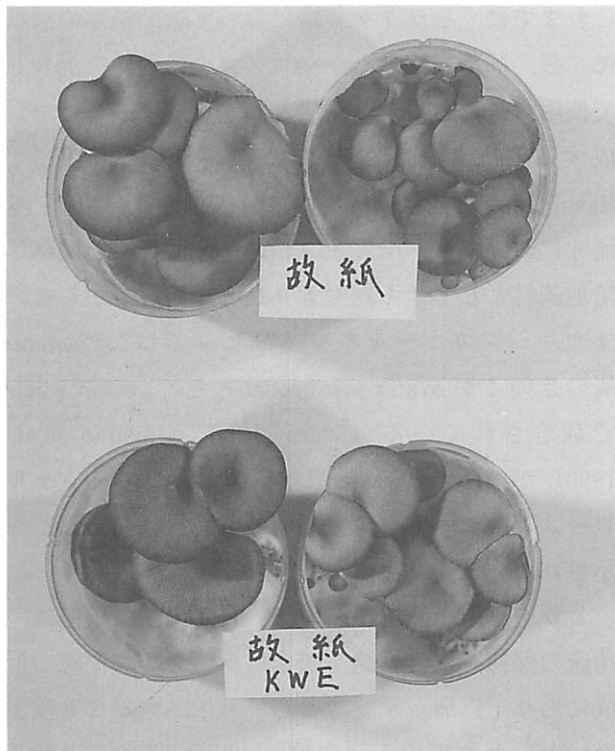


図-5-8 KWEを添加した故紙(新聞紙)・米糠培地およびKWE無添加の故紙(新聞紙)・米糠培地で発生したヒラタケ子実体
Fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* on used paper (newspaper print)-ricebran medium with or without added KWE.

同様に正常な子実体を形成した。

各試験区における子実体収量の結果を表-5-3に示す。モミ殻、新聞紙では対照区より子実体収量が多くなった。KWE添加の作用は、培地基材によって異なって現れた。即ち、モミ殻、新聞紙ではKWE添加による影響が現れなかったが、スギ鋸屑、バーミキュライト、セルロースアセテートでは無添加区に比べて子実体収量が13~33%増加した。セルロースアセテートおよびバーミキュライトは、それぞれスギ鋸屑区と有意差がないか、あるいはスギ鋸屑区より子実体収量が劣った。しかし、KWE添加による効果が著しいため、KWEを添加したバーミキュライト、セルロースアセテートではスギ鋸屑区に比べて子実体収量が2割前後増加した。

栽培日数および子実体収量の結果(表-5-2~3)から未利用培地基材の適性およびKWE添加の有効性を検討した。未利用培地基材の適性に関して、モミ殻と新聞紙は、スギ鋸屑区に比べ栽培日数が短く、子実体収量が多いことから、スギ鋸屑より優良な培地基材であることが示された。また、セルロースアセテートは、スギ鋸屑区に比べ栽培日数は短くなり、子実体収量は有意差が無いことから、スギ鋸屑の代替材になる可能性が示された。しかし、バーミキュライトは、スギ鋸屑区に比べて栽培日数が長く、子実体収量も少ないため、培地基材として適さないことが示された。

KWE添加の有効性に関して、モミ殻や新聞紙では、KWEの添加によって子実体収量に有意差が認められず、KWEの添加効果は明らかではなかった。セルロースアセテートでは、KWEを添加した場合、無添加区に比べて栽培日数が短くなり、子実体収量も2割余り増加することから、KWE添加は有効であった。バーミキュライト、スギ鋸屑では、KWEを添加した場合、無添加区に比べて栽培日数が3~7日間長くなったが、子実体収量は1~2割余り増加した。したがって、子実体収量に重点を置く観点では、KWEの添加は有効であった。

第3節 考察

鋸屑培地におけるKWEの添加量は、培地の全乾重量比で添加したため、培地中の水分量に対する割合は、KWE添加濃度が等しい場合、鋸屑培地では、液体培地(PD培地、AsG培地)や寒天培地(PDA

表一五—3 KWEを添加した培地基材およびKWE無添加の培地基材で栽培したヒラタケの子実体収量
 Fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* cultivated in various substrates with or without added KWE.

Substrate	Fresh weight of fruiting bodies (g/bottle) ^{a)}	A · Ratios	B · Ratios
Sugi	14.4±1.2	1.00 ^{**b)}	1.00
Sugi + KWE	16.2±0.9	1.13 ^{**}	1.13 ^{***c)}
Rice hulls	16.0±1.8	1.11 ^{**}	1.00
Rice hulls + KWE	16.3±1.5	1.13 ^{**}	1.02
Vermiculite	13.2±1.1	0.92 ^{**}	1.00
Vermiculite + KWE	17.6±1.3	1.22 ^{**}	1.33 ^{**}
Cellulose acetate	14.3±1.2	0.99	1.00
Cellulose acetate + KWE	16.8±1.7	1.17 ^{**}	1.17 ^{**}
Newspaper print	15.6±1.6	1.08 [*]	1.00
Newspaper print + KWE	16.0±1.3	1.11 ^{**}	1.03

+ KWE represents the addition of KWE to the substrates.

A · Ratios : Values based on the fresh weight of fruiting bodies in the Sugi-medium.

B · Ratios : Values based on the fresh weight of fruiting bodies in the medium used each substrate based on the fresh weight of fruiting bodies in the medium used that substrate without KWE.

a) : Each data represents mean ± standard deviations with fifteen replicates.

b) : Significant differences from the Sugi-medium. * : p<0.05, ** : p<0.01.

c) : Significant differences from the each substrate-medium without KWE. ** : p<0.01.

培地) の約1/2に相当する。したがって、培地中の水分量に対する鋸屑培地における15%濃度の添加割合は、液体培地・寒天培地での添加濃度7.5%に相当することとなる。このことから、液体培地・寒天培地と鋸屑培地におけるヒラタケ菌糸体に対するKWEの添加効果が同様であると仮定すれば、次のように考えることが出来る。すなわち、PD, AsG培地, PDA培地といずれの培地においてもKWEの添加濃度が10%までは、ヒラタケ菌の菌糸体重量はKWEを添加するにしたがい著しく増加したことから(図一2—11~12, 図一3—1), 鋸屑培地において15%濃度までKWEを添加するにしたがい菌糸体重量が増加することが推察される。

一般に、食用担子菌の子実体形成には、培養基中の菌体量が多いほど子実体発生量が増えることが知られている(Tokimoto・Fukuda, 1981 : Ohga, 1990a)。このことから、本研究における子実体形成試験において、前述のように鋸屑培地中の菌糸体重量がKWEの添加により増加したものと推察すれば、それによって子実体収量が増大したものと考えられる。

これらのことから、KWEは、培地基材として鋸屑を用いた鋸屑・米ぬか培地等の菌床培地による食用担子菌類の栽培に増収剤としての利用が可能であると考えられる。

鋸屑以外の未利用培地基材として、モミ殻、バーミキュライト、セルロースアセテート、新聞紙について、ヒラタケ菌床栽培に対する適性を検討した。これまでに、ヒラタケ栽培において新聞紙等の故紙、モミ殻、稲藁は、米ぬかやフスマの栄養材を混合して使用することにより鋸屑と同等以上に子実体を形成することが報告されている(大森ら, 1976 : Hashimoto・Takahashi, 1974 : 古川ら, 1995)。本研究においても、モミ殻(粉碎モミ殻)や新聞紙は、培地基材としてスギ鋸屑より良好な適性を示した。また、シンガポールやフィリピンでは、*Pleurotus*属のきのこが oyster mushroom として cotton waste で栽培されている(Leong, 1980 : Qiumino et al., 1990)が、cotton waste に類似した素材であるセルロースアセテートもスギ鋸屑の代替材になることが示された。

ヒラタケ菌床栽培において、鋸屑の主な役割は、菌床の保持、水の供給、酸素供給のための間隙の形成にあり、鋸屑が栄養源として利用されることは少ないといわれている(中村, 1982)。このことに基づいて、山下ら(1983)は、吸水した多孔質石(ヒウガ石)と米ぬかによりヒラタケ栽培を試み、栄養源として米ぬか単独で子実体が形成され、米ぬか添加量の82~88%を子実体収量として得ることができ

ることを示した。本研究では、多孔質石としてパーミキュライトを使用し、1ポット当たり17gの米ぬかを添加して栽培したところ、子実体収量は13.2g（添加した米ぬかの78%に相当する。）であったことから、栽培条件が異なるので一様に比較できないが、山下らの結果とほぼ同様な傾向を示した。しかし、パーミキュライトは培地基材としてスギ鋸屑より劣ることが示された。

菌糸体細胞壁の構成成分であるキチンはグルコサミンより構成されていることから、培養基中のグルコサミンの含有量は菌体量を反映している。シイタケ栽培においてホダ木中や菌床培地中のグルコサミン量、即ち菌体量と子実体発生量とは相関関係があることが知られている（Tokimoto・Fukuda, 1981：時本, 1985：Ohga, 1992a）。KWEを培地に添加することにより、いずれの培地基材においても、培養基中のグルコサミン含有量は増加した。KWEの添加によりグルコサミン含有量の増加が顕著であったスギ鋸屑、パーミキュライト、セルロースアセテートでは、子実体収量に対するKWEの添加効果が顕著であり、グルコサミン含有量があまり増加しなかったモミ殻、新聞紙では、子実体収量に対するKWE添加の効果は明らかでなかった。したがって、KWEの添加により、いずれの培地基材においても菌体量が増加する傾向を示したが、KWE添加による子実体形成への効果は、KWEの添加によって菌体量の増加が著しい培地基材で明らかであることが示された。

シイタケ菌床栽培において、培養基中に菌糸体が蔓延するに従い、培地中の水分状態は、水ポテンシャルが大きくなって子実体を形成するために利用されやすい状態になることが報告されている（Ohga, 1992b）。シイタケ菌の菌糸体成長が最大となる最適水ポテンシャルは $-0.5 \sim -1.0$ MPaであり、水ポテンシャルが低下するにしたがい菌糸体成長は低下し、 $-5.3 \sim -6.7$ MPaが菌糸体成長の限界水ポテンシャルであるとされている（Ohga, 1990b：Badham, 1989）。供試したいずれの培地基材においても接種時の水分状態は、KWEを添加することにより、水ポテンシャルが小さくなり、ヒラタケ菌にとって利用できにくい状態となった。しかし、培養過程終了時における供試培地の水ポテンシャルは、KWEを添加した試験区では無添加培地と同程度、あるいは無添加培地より大きくなった。したがって、培養過

程における水ポテンシャルの増加量は、無添加培地よりKWE添加培地で大きくなって現れた。このことは、KWE添加培地では、ヒラタケ菌はKWEを分解・資化して菌糸体成長が促され、無添加培地より菌体量が多くなり、多くなった菌糸体によって、より多くの水分が集積されたことを示唆しており、KWE添加培地においてグルコサミン含有量が多くなったことと符合するものと考えられる。

子実体収量に対するKWE添加の効果は、培地基材によって異なって現れた。即ち、スギ鋸屑より優れた適性を示した新聞紙、モミ殻は、KWE添加の効果が認められず、培地基材としての適性がスギ鋸屑と同等あるいは劣ったセルロースアセテート、パーミキュライトは、KWE添加の効果が現れた。

KWE添加の効果は、栽培形態や培地詰め量によっても異なって現れると推察される。前節「鋸屑培地による栽培への利用」のビン栽培では、850ml容ポリプロピレン製ビンに供試培地を480g詰めて栽培し、スギ鋸屑にKWEを15%（W/W）添加した場合、子実体収量は無添加区に比べて30%余り増加した。本実験では、バイオポット（直径80mm、高さ100mm）を使用し、前節と同様にスギ鋸屑にKWEを15%（W/W）添加して調製した培地を100g詰めて栽培したところ、子実体収量は無添加区に比べて13%の増加にとどまった。したがって、KWE添加による効果が同程度であっても、培地詰め量が多ければ、子実体収量はより多くなって現れる傾向が示された。これらのことから、モミ殻、新聞紙ともにKWEを添加することによって培養基中の菌体量が増加し、子実体収量は有意差が認められない程度で増加する傾向を示したが、培地詰め量の多い実用規模の栽培形態であれば、モミ殻、新聞紙においてもKWEを添加することにより子実体収量は明確な増加を示すことが期待される。

第4節 結 論

ヒラタケのビン栽培において、KWEを鋸屑・米ぬか培地に添加することにより栽培期間が1～2日間長くなったが、子実体のサイズが大きくなり、子実体収量は増加した。添加濃度が2～3%のとき子実体収量は、対照区の約1.2倍、10～15%の添加濃度では約1.3倍となった。このことから、KWEは菌床栽培における増収剤としての利用が可能であると

考えられる。

ヒラタケ菌床栽培の未利用培地基材(モミ殻, パーミキュライト, セルロースアセテート, 新聞紙)の適性に関して, モミ殻, 新聞紙はスギ鋸屑よりも適した。また, セルロースアセテートもスギ鋸屑の代替材になると考えられた。しかし, パーミキュライトはスギ鋸屑より劣った。KWEを添加することにより, 供試したいずれの培地基材においても培養過程終了時の培地中のグルコサミン含有量および水ポテンシャルが増加したことから, 培地中の菌体量が増加したことが推察された。子実体収量に及ぼすKWE添加の効果は培地基材によって異なって現れ, スギ鋸屑, パーミキュライト, セルロースアセテートで顕著に現れた。特に, パーミキュライト, セルロースアセテートはKWEを添加することによりスギ鋸屑より適した培地基材となった。

第6章 総合考察

食用担子菌への成長促進剤の開発は, 培養基内における菌糸体の蔓延を促し, その後の子実体形成を容易にするので, きのこと栽培における生産効率の向上, 省力化等の今日的な技術課題を解決する上で重要な要件である。本論文はカラマツ水抽出物を食用担子菌への成長促進剤として利用するために, 食用担子菌の成育に及ぼすカラマツ水抽出物の影響を検討した。

カラマツ水抽出物は, ヒラタケ, エノキタケ, ヤナギマツタケ, シイタケ, ナメコ, マイタケと供試した全ての食用担子菌類の菌糸体成長に促進作用を示した。食用担子菌の菌糸体成長に促進作用を示す樹木抽出物として, これまでに数例の報告があり(松尾, 1957: 鮫島・善本, 1984), シイノキ辺材部の温水抽出物はシイタケに, アカマツ・スギ内樹皮温水抽出物はシイタケ, アラゲキクラゲに促進作用を示す。しかし同時に, シイノキ辺材部の温水抽出物はヒラタケ, ナメコに, アカマツ・スギ内樹皮温水抽出物はヒラタケ, エノキタケ, ナメコに阻害作用を示す。このように, これまで報告された樹木抽出物は促進作用を示す食用担子菌の菌種は1, 2の菌種に限定され, 同時に阻害作用を示す菌種を有するものであった。したがって広範囲な食用担子菌類に及ぼすカラマツ水抽出物の促進作用は, 樹木抽出物

中の特殊成分に起因して特定の木材腐朽菌の成長を促す作用, 即ち担子菌の宿主選択性に基づく作用とは異なるものと考えられる。

また, 食用担子菌の菌糸体成長に促進作用を示す樹木由来の成分として, 木酢液蒸留成分, 亜硫酸パルプ廃液成分が知られている。木酢液蒸留成分はヒラタケ, ナメコ, マイタケ, ヤナギマツタケ, ショウロ (*Rhizopogon rubescens*) に, 亜硫酸パルプ廃液成分はシイタケ, ナメコ, ヒラタケ, エノキタケに促進作用を示し, いずれも広範囲な食用担子菌類に作用することが報告されている (Yoshimura・Hayakawa, 1991, 1993: 稲葉ら, 1979, 1981)。しかし, 木酢液蒸留成分, 亜硫酸パルプ廃液成分の最適添加濃度は, 食用担子菌の菌種によって異なるが, 各々2%, 4%以下であった。これに対してカラマツ水抽出物では, 添加するに従い菌糸体成長は促進され, 特に5%以上の添加濃度で顕著であった。したがって, カラマツ水抽出物は木酢液蒸留成分や亜硫酸パルプ廃液成分と同様に広範囲な食用担子菌類に促進作用を示すものの, 菌糸体への作用は各々で異なるものと考えられる。

カラマツ水抽出物は主要構成成分としてのアラビノガラクトン (AG) と微量成分としてのフェノール性成分より構成され, 分子量20000前後の高分子であった。カラマツ材のAGは β -D (1 \rightarrow 3) 結合したポリガラクトースを主鎖として, これに0-6位でD-ガラクトース, L-アラビノース, グルクロン酸からなる側鎖が分岐していることが報告されている (Fu・Timell, 1972: Lynch et al., 1968: Aspinall et al., 1968: Teratani et al., 1989)。また, カラマツ材の主要な水溶性フェノール性成分はタキシフォリン等のフラボノイドである (笹谷ら, 1980, 1987)。

カラマツ水抽出物の主要構成成分であるAG単体の添加では菌糸体成長に対して顕著な促進作用を示さず, カラマツ水抽出物の主要なフェノール性成分であるタキシフォリン単体の添加は菌糸体の成長を抑制した。また, AG単体とタキシフォリン単体をカラマツ水抽出物を構成するAGとフェノール性成分の割合で混合して添加した場合も, AGとタキシフォリンの混合物の添加濃度が高くなるに従い, 菌糸体の成長は抑制された。これらの結果は, 水溶性多糖類であるAGと水溶性フェノール性成分のタキ

シフォリン等が、カラマツ水抽出物と同様な状態で結合している場合に限って、菌糸体成長に促進作用を示すことを示唆するものであり、カラマツ水抽出物におけるそれらの存在状態や構造に興味をもたれるところである。

カラマツ水抽出物の菌糸体成長に対する促進作用は5%以上の高濃度の添加で著しく現れること、また、カラマツ水抽出物を構成するAGが菌糸体に資化・消費されていることから、カラマツ水抽出物は菌糸体成長に対して炭素源としての栄養源の役割を果たしていると考えられる。カラマツ水抽出物およびAG添加培地における菌体外酵素の産出状況と菌糸体成長との関係を図-6-1~2に模式図とした。

カラマツ水抽出物添加培地では、接種された食用担子菌はカラマツ水抽出物を構成するフェノール性成分を直ちに感知し、そのフェノール性成分が誘導物質となってフェノール酸化酵素が誘導され、菌糸体の成長開始期より著しく産出される。そしてフェノール酸化酵素が十分に多量に産出されたことに基づいて多糖分解酵素が誘導され、著しく産出される多糖分解酵素によってカラマツ水抽出物を構成する

AGが分解されて低分子の糖類となり、炭素源として菌糸体中に取り込まれ、菌糸体成長に寄与するものと推察した。一方、AG単体を添加した場合、フェノール酸化酵素の誘導物質となるフェノール性成分が存在しないため接種された食用担子菌は、誘導物質を感知することができず、菌糸体成長に伴って培養4~6日目によりやく微量のフェノール酸化酵素を産出し、このフェノール酸化酵素の産出状態に基づいて培養8~10日目に多糖分解酵素が僅かに産出され、微量のAGが低分子の糖類に分解されて菌糸体に資化・消費されるものと推察した。

したがって、カラマツ水抽出物中に存在するフェノール性成分はフェノール酸化酵素の誘導・産出に直接関与し、さらに多糖分解酵素の誘導・産出にも間接的に関与し、カラマツ水抽出物は食用担子菌の菌体外酵素の賦活に大きな影響を及ぼしているものと考えられる。シベリア産、北海道産、長野県産と産地の異なるカラマツ水抽出物では、食用担子菌の菌糸体成長に対する促進効果は、それぞれの産地で異なって現れた。各産地のカラマツ水抽出物の糖関連成分には著しい相違がなかったのに対して、フェ

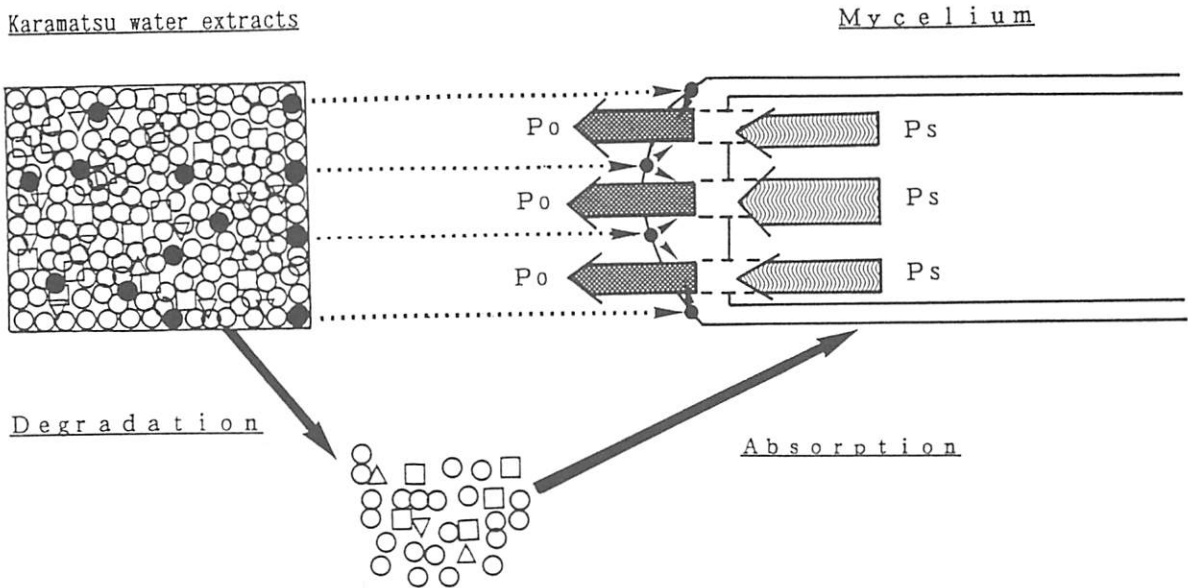
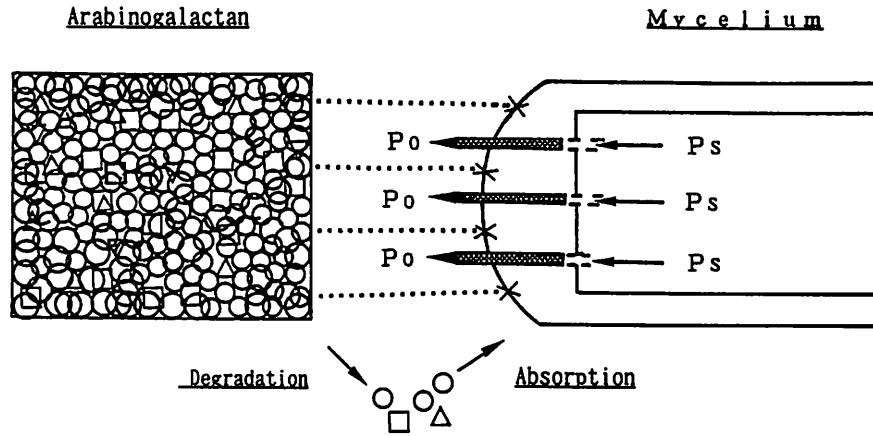


図-6-1 ヒラタケ菌糸体とカラマツ水抽出物との相互作用を示す模式図
 点線は菌糸体がカラマツ水抽出物中のフェノール性成分を認知することを示す。
 ○：ガラクトース，□：アラビノース，△：ウロン酸，●：フェノール性成分。
 Po：フェノール酸化酵素，Ps：多糖分解酵素。
 Diagrammatic representation of interaction between Karamatsu water extracts and mycelium of *Pleurotus ostreatus*. Dotted lines represent that mycelium recognizes phenolic compounds contained in Karamatsu water extracts.
 ○：galactose, □：arabinose, △：uronic acid, ●：phenolic compound.
 Po：Phenoloxidase, Ps：polysaccharase.



図一六二 ヒラタケ菌糸体とアラビノガラクトタンとの相互作用を示す模式図
 点線は菌糸体がフェノール性成分を認知出来ないことを示す。
 ○：ガラクトース，□：アラビノース，△：ウロン酸，●：フェノール性成分。
 Po：フェノール酸化酵素，Ps：多糖分解酵素。
 Diagrammatic representation of interaction between arabinogalactan and mycelium
 of *Pleurotus ostreatus*. Dotted lines represent that mycelium can not recognize phe-
 nolic compounds. ○：galactose, □：arabinose, △：uronic acid.
 Po：Phenoloxidase, Ps:polysaccharase.

ノール性成分に関して、本邦産カラマツ水抽出物の含有量はシベリア産カラマツ水抽出物の約3.5倍であり、シベリア産と北海道産カラマツ水抽出物には長野県産カラマツ水抽出物に存在しない高分子量のフェノール性成分の存在が示唆された。これらのことから、それぞれの産地の異なるカラマツ水抽出物を構成するフェノール性成分は、量的にも質的にも異なっている可能性があり、このことが食用担子菌の菌糸体成長に対する促進効果の程度に差となって反映されたのではないかと考えられる。

カラマツ水抽出物、AG添加培地において、菌糸体成長に大きな相違が生じ、また、菌体外酵素の産出動向に関して、フェノール酸化酵素と多糖分解酵素の産出時期と活性にも大きな相違が生じた。しかし、菌体外酵素の産出順序、即ち培養開始後まずフェノール酸化酵素を産出し、その後、多糖分解酵素を産出する順序は、両者で一致した。白色腐朽菌であるシイタケ菌が木材細胞壁を分解する場合、まずリグニン成分を除去し、続いてセルロースマイクロフィブリルを分解することが形態的に観察されており、このような腐朽進展には菌体外酵素の関与が指摘されている (Ohira et al., 1992; Tsuneda et al., 1989; 林原ら, 1983)。シイタケ菌以外にもカワラタケ菌, *Dichomitus squalens*, *Heterobasidion annosum* 等の数多くの白色腐朽菌は木材細胞壁を分解する場合に、

まずリグニン成分を分解し、続いてセルロース成分を分解することが知られている (Eriksson, 1990)。また、白色腐朽菌は、自然界において他の木材劣化菌類では分解し難い木部組織中のリグニンを選択的に、あるいはセルロースと共に分解・代謝して木部組織中に菌糸体を蔓延させ、枯死した幹木上に子実体を形成する。このように白色腐朽菌が木材組織を基質として栄養成長している状況は、白色腐朽菌が本来有している他の木材劣化菌類とは異なる特性を反映していると思われる。つまり、白色腐朽菌は栄養成長する場合に、まずフェノール酸化酵素を産出し、フェノール酸化酵素の産出に基づいて、その後に多糖分解酵素を産出する特性を有している可能性がある。したがって、白色腐朽菌の多糖分解酵素の産出は、フェノール酸化酵素と連動し、フェノール酸化酵素の産出に規定されて産出するものと仮定すれば、カラマツ水抽出物は白色腐朽菌の酵素産出の特性を強調する作用、即ち白色腐朽菌に本来備わっている栄養成長時の酵素産出動向を賦活する役割をも果たしていると考えられる。

シイタケ、ヒラタケ、ナメコ、エノキタケ等の食用担子菌類の栽培において、栽培用種菌は菌床栽培を繰り返す過程で菌糸体の成長速度や子実体形成能が低下する「種菌劣化現象」を度々生じることが知られている (熊田ら, 1995)。この「種菌劣化現象」

の発生機構は未だに明らかにされていない。しかし、白色腐朽菌が栄養源の豊富な培地で育成した場合、自然界とは基質条件が異なり、リグニンやセルロースを積極的に分解・資化する必要がないため、リグニン分解酵素やセルロース分解酵素を産出する必要がなくなる。したがって、白色腐朽菌に本来備わっている酵素産出の動向が損なわれ、このことが「種菌劣化現象」と関連している可能性がある。そこで、白色腐朽菌由来の食用担子菌の種菌保存には、カラマツ水抽出物を添加した培地を使用することにより、白色腐朽菌が本来有している菌体外酵素の産出動向が保持されて、「種菌劣化現象」の改善に寄与する可能性がある。

しかし、そのような白色腐朽菌の栄養成長時における酵素産出の特性の有無は、カラマツ水抽出物の構造とその機能を明確にすることを通して解明する必要がある。また、木粉培地や未利用基材培地にカラマツ水抽出物を添加することにより子実体収量が増加したが、この子実体収量の増加は、カラマツ水抽出物による培養段階における菌体量の増加が要因の一つになっていると考えられる。しかし、生殖過程である子実体形成に及ぼすカラマツ水抽出物の影響は、本研究では明らかにされていない。この点を明らかにすることは、食用担子菌類の子実体形成機構の解明に関連し、食用きのこ栽培における「きのこの発生操作と管理」に寄与すると考えられるが、この場合もKWEの構造を明確にすることが求められる。

結 言

カラマツ水抽出物を食用きのこ栽培の成長促進剤として利用することを目的に、食用担子菌の育成に及ぼすカラマツ水抽出物の影響を検討し、以下の結果を得た。

1. シベリア産、北海道産、長野県産とカラマツ材の産地が異なっても、カラマツ水抽出物の主要構成成分は、いずれもアラビノガラクトタンであり、糖関連成分は産地間で顕著な差が認められなかった。しかし、全フェノール量に関して、本邦産（北海道産、長野県産）の含有量は、シベリア産の約3.5倍であった。

2. シベリア産、北海道産、長野県産のいずれのカラマツ水抽出物も、供試した食用担子菌（ヒラタケ、

エノキタケ、シイタケ）の全ての菌種に対して、菌糸体成長に顕著な促進作用を示した。1～3%の添加濃度では産地間で添加効果に差が生じなかったが、5%以上の添加濃度では菌種に応じて産地間で差が生じた。

3. シベリア産カラマツ水抽出物（KWE）は、ヒラタケ、エノキタケ、ヤナギマツタケ、シイタケ、ナメコ、マイタケと供試した全ての食用担子菌の菌糸体成長に対して、寒天、液体、木粉と物理条件の異なるいずれの培地においても、顕著な促進作用を示した。

4. アスパラギン培地（As培地）、アスパラギン・グルコース培地（AsG培地）にKWEを添加してヒラタケ菌糸体を培養したところ、KWEの添加濃度が高くなるに従い、菌糸体重量は著しく増加した。しかし、KWEの主要構成成分であるアラビノガラクトタン（AG）やKWEの構成単糖類を単独でAs培地、AsG培地に添加してヒラタケ菌糸体を培養した場合には、KWEのような成長促進作用は認められなかった。また、As培地にグルコースとKWEの両者を同時に添加した場合には、KWEのみを添加した場合より著しい促進作用があり、両者には相乗的な作用が認められた。

5. KWE添加培地では、AG添加培地に比べてグルコース、還元糖の消費量が多く、KWE中のAGはAG単体の場合よりも資化されやすいことが明らかとなった。また、KWE添加培地では、添加濃度の増加にともなってフェノール酸化酵素および多糖分解酵素の産出が著しくなった。しかし、AG添加培地では、KWE添加培地でのような菌体外酵素の著しい産出は認められなかった。

6. KWEのヒラタケ菌糸体成長に対する促進作用は、AG、KWEの構成単糖によって生じるのではなく、KWE中のフェノール性成分が関与しており、AGとフェノール性成分が混在、あるいは結合していることによって生じることが推察された。

7. KWE、AGを添加したAsG培地（基本培地）でヒラタケ菌糸体を培養し、初期成長時での菌糸体重量と菌体外酵素活性を測定し、それらの関係を検討した。KWE添加培地では、培養1～4日目は菌糸体成長の誘導期を、4日目以降は対数増殖期を示した。AG添加培地や基本培地では、培養10日目まで誘導期のままであった。

8. ヒラタケ菌糸体の重量成長が促進されるに従い、フェノール酸化酵素、多糖分解酵素の菌体外酵素は活発に産出される傾向を示し、菌糸体重量が顕著に増加したKWE添加培地では、AG添加培地や基本培地に比べて菌体外酵素の産出が顕著であった。特に、フェノール酸化酵素は培養1時間後に認められ、培養開始後直ちに産出されることが推察された。

9. KWE添加培地では、フェノール酸化酵素の比活性は、菌糸体成長が緩やかな培養1～4日目で最大となり、その後急激に低下した。多糖分解酵素はフェノール酸化酵素が十分に産出された後に認められ、多糖分解酵素の比活性は菌糸体成長の旺盛な時期に高くなった。AG添加培地や基本培地ではKWE添加培地でのような酵素産出の動向を示さず、フェノール酸化酵素、多糖分解酵素の比活性は低く推移した。これらのことから、ヒラタケ菌はKWEのフェノール性成分の領域によりフェノール酸化酵素が培養開始後直ちに誘導され、フェノール酸化酵素を十分に産出した後に多糖分解酵素が誘導されて、KWE中の多糖成分の領域を分解し、資化するものと推察された。したがって、KWEはヒラタケ菌に対して菌糸体の栄養成長時の炭素源を補給する栄養源の役割を果たしていると考えられる。

10. KWE添加培地におけるヒラタケ菌のフェノール酸化酵素と多糖分解酵素の産出動向は、ヒラタケ菌と同様の白色腐朽菌であるシイタケ菌による木材細胞壁の腐朽形態と符合した。栄養成長時に白色腐朽菌がフェノール酸化酵素を最初に産出し、その後多糖分解酵素を産出する菌体外酵素の産出順序は、白色腐朽菌の成長特性であると仮定すれば、KWEは白色腐朽菌の成長特性を強調する役割をも果たしていると考えられる。

11. ヒラタケのビン栽培において、KWEを鋸屑・米ぬか培地に添加することにより、栽培期間が1～2日間長くなったが、子実体のサイズが大きくなり、子実体収量は増加した。添加濃度が2～3%のとき子実体収量は、対照区の約1.2倍、10～15%の添加濃度では約1.3倍となった。このことから、KWEは菌床栽培における増収剤としての利用が可能であると考えられる。

12. ヒラタケ菌床栽培において、モミ殻・新聞紙は培地基材としてスギ鋸屑より適した。また、セルロースアセテートもスギ鋸屑の代替材になるものと考え

られた。しかし、バーミキュライトはスギ鋸屑より劣った。供試したいずれの培地基材（スギ鋸屑、モミ殻、セルロースアセテート、多孔質石、故紙）においても、KWEを添加することにより、菌体量の増加が推察された。子実体収量に及ぼすKWE添加の効果は、培地基材によって異なって現れ、スギ鋸屑、バーミキュライト、セルロースアセテートで明確に現れた。特にバーミキュライト・セルロースアセテートはKWEを添加することにより、スギ鋸屑より適した培地基材となった。

謝 辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、研究全般にわたって終始懇切な御指導と激励を賜った鳥取大学農学部教授、同農学部長 農学博士作野友康先生、論文作成に際して終始御教示と御指導を賜った鳥取大学農学部教授 農学博士古川郁夫先生、島根大学名誉教授 農学博士高橋 徹先生ならびに鳥取大学農学部助手 農学博士川田俊成先生に深甚なる感謝の意を表します。本論文を取りまとめるに当たり御教示を賜った鳥取大学農学部教授 農学博士小笠原隆三先生、島根大学総合理工学部教授 農学博士古野 毅先生に深く感謝の意を表します。また、研究にさいし多くの御協力をいただいた鳥取大学農学部林産科学研究室の方々に深く感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、鳥取大学大学院での研究を許可され、終始御理解と励ましを賜った富山県林業技術センター所長（林業試験場長）深澤庄司氏、同 前次長（前林業試験場長）吉田直隆氏に厚くお礼申し上げます。

本研究のきっかけとなりましたカラマツ水抽出物、カラマツ製材鋸屑の水抽出残渣の調製に多大な援助と格段の御理解を賜ったMRCポリサッカライド株式会社（旧三菱レイヨン株式会社）東京営業所長鈴木晶二氏をはじめMRCポリサッカライド株式会社の各位に厚くお礼申し上げます。

本研究の実施において数々の御教示とご助言を賜った財団法人日本きのこセンター・菌蕈研究所研究部長 大平郁男博士、多大な援助と御助言を賜った同 研究部長 時本景亮博士、同 主任研究員 松本晃幸氏をはじめ財団法人日本きのこセンター・菌

草研究所の各位に謹んで感謝の意を表します。

本研究の実施にあたり、適切なお助言と励ましを賜った富山医科薬科大学名誉教授 理学博士荻田善一先生、新潟大学農学部教授 農学博士早川利郎先生に深く感謝の意を表します。

本研究を実施するうえで、多大な援助とお助言をいただいた富山県林業技術センター・木材試験場副主幹研究員 水本克夫氏、多くの御協力とお助言をいただいた富山県林業技術センター・木材試験場製品開発課長 高野了一氏、同・企画管理部主任研究員 高橋理平博士をはじめ同・木材試験場、同・企画管理部の各位に深く感謝の意を表します。

研究にさいして、終始御教示とお助言をいただいた富山県林業技術センター・林業試験場造林課長 平 英彰博士、同 経営特産課長 西村正史博士、多くの御協力とお助言をいただいた 同 主任研究員 安田 洋氏をはじめ富山県林業技術センター・林業試験場の各位に深く感謝の意を表します。

引用文献

- 天野良彦, 西澤賢一, 床尾力哉, 松澤恒友, 神田鷹久: *Lyophyllum ulmarium* (*Hypsizigus marmoreu*) の菌床過程で生産される菌体外酵素: 木材学会誌, 38, 411-416 (1992).
- Arima, K., Uozumi, T.: A new method for estimation of the mycelial weight in Koji, Agric. Biol. Chem., 31, 119-123 (1967).
- 有田郁夫, 三村公人, 寺谷篤子: ナメコの栽培に関する基礎的研究(II) 樹種別鋸屑培地におけるナメコの菌糸体の生長および子実体の形成, 菌草研報, 7, 90-104 (1969).
- Aspinall, G.O., Fairweather, R.M., Wood, T. M.: Arabinogalactan A from Japanese Larch (*Larix leptolepis*), J. Chem. Soc. (c), 2174-2179 (1968).
- Badham, E. R.: Influence of water potential on growth of Shiitake mycelium, Mycologia, 81, 464-468 (1989).
- Côté, Jr. W. A., Day, A. C., Simson, B. W., Timell, T. E.: Studies on larch arabinogalactan. I. The distribution of arabinogalactan in larch wood., Holzfor-schung, 20, 178-191I (1966).
- Côté, Jr. W. A., Simson, B. W., Timell, T. E.: Studies on larch arabinogalactan. II. Degradation of arabinogalactan within the living tree, Holzfor-schung, 21, 85-88 (1967).
- Côté, Jr. W. A., Timell, T. E.: Studies on larch arabinogalactan. III. Distribution of tamarack., Tappi., 50, 285-289 (1967).
- Egar, G.: Effect of light on primordia formation in Basidiomycete *Pleurotus spec.* from Florida, Arch. Microbiol., 74, 174-192 (1970).
- Eguchi, F., Leonowicz, A., Higaki, M., Fukuzumi, T.: Laccaseless mutant induced by regeneration of protoplasts of *Pleurotus basidiomycetes*, Mokuzai Gakkaishi, 40, 107-110 (1994).
- Englyst, N. N., Hay, S., Macfarlane, G.T.: Polysaccharide breakdown by mixed populations of human faecal bacteria, FEMS Microbiol.Ecol., 95, 163-171 (1987).
- Eriksson, K. E., Blanchette, R. A., Ander, P.: Morphological aspects of wood degradation by fungi and bacteria, Wood degradation by white-rot fungi, "Microbiol and enzymatic degradation of wood and wood components", SpringerVerlag, 1990, p.20-43.
- Folin, O., Denis, W.: A colorimetric method for the determination of phenols and phenol derivatives in urine, J. Biol. chem., 22, 305-308 (1915).
- Fu, Y., Timell, T. E.: Polysaccharides in compression wood of tamarack (*Larix laricina*) . 5. The constitution of an acidic arabinogalactan. Svensk Papperstidn., 75, 680-682 (1972).
- 福田正樹, 時本景亮, 坪井正知, 西尾幸弘: シイタケ原木の形質とほだ木の腐朽度および子実体発生量の関係, 菌草研報, 25, 68-74 (1987).
- 福田正樹, 時本景亮, 坪井正知, 西尾幸弘: シイタケ原木の伐採時期とほだ木の腐朽度および子実体発生量との関係, 菌草研報, 26, 65-70 (1988).
- 福井作蔵: 硫酸処理を基本とする糖の定量法, "還元等の定量法", 学会出版センター, 東京, p.60-64 (1969).
- 古川聡子, 横川洋子, 岸 国平: 新聞紙等を培地材料とした各種きのこ類の栽培, 日菌報, 36, 82-84 (1995).
- 橋本一哉, 磯部信昭, 高橋善次郎: 茸類の生化学的

- 研究. I. 有機酸代謝について(a), 日菌報, 7, 20-24 (1966).
- Hashimoto, K., Takahashi, Z.: Studies on the growth of *Pleurotus ostreatus*, *Mushroom Sci.*, 9, 585-593 (1974).
- 早川利郎, 吉村 久: リグニン糖スルホン化物によるナメコ菌糸体の生長および子実体形成促進作用, 日菌報, 32, 449-461 (1991).
- 林原 稔, 古川郁夫, 作野友康, 岸本 潤: シイタケ菌によるコナラ・クヌギ材の腐朽形態, 広葉樹研究, 2, 143-152 (1983).
- Honda, S., Takahashi, H., Nishimura, Y., Kakehi, K., Ganno, S.: Sensitive ultraviolet monitoring of aldoses in automated borate complex anionexchange chromatography with 2-cyanoacetamide, *Anal. Biochem.*, 118, 162-167 (1981).
- 池ヶ谷のり子, 後藤正夫, 中村嘉宏: シイタケ菌の栄養成長および子実体形成に及ぼすリグニンおよびリグニン前駆物質の影響, 日菌報, 24, 213-222 (1988).
- 池ヶ谷のり子, 後藤正夫, 林 康夫: フェノール化合物およびウロン酸のシイタケ菌の栄養成長並びに子実体形成に伴う菌体外酵素活性の変動におよぼす影響, 日菌報, 34, 195-207 (1993).
- 池ヶ谷のり子, 後藤正夫, 林 康夫: シイタケ菌の子実体形成に伴うグルタミン酸脱水素酵素活性の変化, 日菌報, 35, 79-88 (1994).
- 今村博之: 木材加工と抽出成分, “木材利用の化学”, 今村博之ら編, 共立出版, 東京, p.76-83 (1983).
- 今村理佐, 村井健二, 趙 春菊, 竹部幸子, 小橋恭二: アラビノガラクトサンのラットおよびヒト腸内細菌による代謝, *ピフィズス*, 6, 19-29 (1992).
- 岩原博樹, 善本知孝, 福住俊郎: ヒラタケ生育時の菌体外酵素活性の変化, 木材学会誌, 27, 331-336 (1981).
- 稲葉和功, 飯塚吉富, 越島哲夫: 亜硫酸パルプ廃液成分によるシイタケ菌糸の成育促進, 木材学会誌, 25, 510-515 (1979).
- 稲葉和功, 飯塚吉富, 越島哲夫: 亜硫酸パルプ廃液成分の食用担子菌類生育に対する効果, 木材学会誌, 27, 231-236 (1981).
- Ishikawa, H.: Physiological and ecological studies on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., *J. Agric. Lab.*, 8, 1-57 (1967).
- 石川久雄, 河合 晃, 渡辺 計, 沖 妙: シイタケ菌による木材主要成分, 特にリグニンの分解について, 菌草研報, 5, 35-44 (1961).
- 石川久雄, 沖 妙, 仙波裕子: シイタケの子実体形成にともなう菌体外酵素活性の変化について, 木材学会誌, 29, 280-287 (1983).
- James, S. W., McLaughlin, D. J.: The influence of carbohydrate source and concentration and light on fruitbody development in *Clavicornia pyxidata*, *Mycologia*, 80, 89-98 (1988).
- 柿本陽一: 1994年版きのこ年鑑, 農村文化社編集部, 農村文化社, 東京, p138-139 (1993).
- Kawai, G., Ikeda, Y.: Fruiting-inducing activity of cerebrosides observed with *Scizophyllum commune*, *Biochim. Biophys. Acta*, 719, 612-618 (1982).
- Kawai, G., Ikeda, Y.: Chemistry and functional moiety of a fruiting-inducing cerebroside in *Scizophyllum commune*, *Biochim. Biophys. Acta*, 754, 243-248 (1983).
- 川上日出國: シイタケ菌による木材成分の分解, 防菌防霉, 6, 433-437 (1978).
- 河村のり子, 後藤正夫, 中村嘉宏: シイタケ菌の栄養成長および子実体形成に及ぼすリグニンおよびリグニン前駆物質の影響, 日菌報, 24, 213-222 (1983).
- 金城一彦, 屋我嗣良: 担子菌栽培培地に関する研究(第4報)ヒノキの阻害活性, 木材学会誌, 32, 632-636 (1986).
- Kinugawa, K., Furukawa, H.: The fruit-body formation in *Collybia velutipes* induced by the lower temperature treatment of one short duration, *Bot. Mag. Tokyo*, 78, 240-244 (1965).
- 衣川堅二郎: エノキタケ, キノコ事典(中村克哉編), 朝倉書店, 東京, pp.308-310 (1982).
- 岸本 潤, 福田高史, 三原 宏, 作野友康, 古川郁夫: 木材の化学的識別に関する研究(I)ヘミセルロース及びタンニン類のIR吸収について, 鳥大演報, 11, 129-139 (1979).
- 岸本 潤, 福田高史, 作野友康, 古川郁夫: 木材の化学的識別に関する研究(II)タンニン類のIR吸収について, 鳥大農研報, 33, 65-69 (1981).
- Kitamoto, Y., Gruen, H. E.: Distribution of cellular

- carbohydrates during development of the mycelium and fruitbodies of *Flammulina velutipes*, *Plant Physiol.*, **58**, 485-491 (1976).
- 北本 豊, 寺下隆夫, 松田末広, 小畑勝義, 細井登, 河野又四, 市川吉夫: アミスギタケの炭水化物代謝・子実体形成における栄養菌糸と子実体の炭水化物の代謝変動, *日菌報*, **19**, 273-281 (1978).
- 北本 豊, 松本晃幸, 細井 登, 寺下隆夫, 河野又四, 市川吉夫: アミスギタケの窒素化合物の代謝変動, *日菌報*, **21**, 237-244 (1980).
- 北本 豊, 村田達雄, 小林 淳, 市川吉夫: エノキタケの栄養生長ならびに子実体形成における栄養要求性, *鳥大農研報*, **38**, 35-41 (1985).
- 木内信行: ヤナギマツタケの菌糸体生長ならびに子実体形成におよぼす 2, 3 の要因の影響と子実体構成成分について, *神奈川林試研報*, **12**, 1-24 (1985).
- 熊田 淳, 竹原太賀司, 青野 茂: ナメコ (*Pholiota nameko*) 菌床栽培における子実体の発生不良現象, *木材学会誌*, **41**, 114-119 (1995).
- 沓沢 敏, 小田 清, 信太 寿: ナメコ栽培における針葉樹のご屑の利用(第2報)のご屑の散水堆積処理, *北林産試月報*, **365**, 12-14 (1980).
- Lang, A. R. G.: Osmotic coefficients and water potentials of sodium chloride solution from 0 to 40°C, *Aust. J. Chem.*, **20**, 2017-2023 (1967).
- Leatham, G. F., Stahmann, M.A.: Studies on the lacase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies, *J. Gen. Microbiol.*, **125**, 147-157 (1981).
- Leatham, G. F.: Growth and development of *Lentinus edodes* on a chemically defined medium, "Developmental biology of higher fungi", Moor, D.; Cas seltan, L. A.; Wood, D. A.: Frankland, J. C. eds., Cambridge Univ. press., p.403-427 (1985).
- Leatham, G. F., Stahmann, M. A.: Effect of light and aeration on fruiting of *Lentinus edodes*, *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **88**, 9-20 (1987).
- Leonard, J. T., Phillips, E. L.: Study of phenoloxidase activity during the reproductive cycle in *Schizophyllum commune*, *J. Bact.*, **114**, 7-10 (1973).
- Leong Poo-Chow: Utilization of cotton waste substrat with temperature treatment for the cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus*) in Singapore, Singapore *J. Pri. Ind.*, **8**, 21-27 (1980).
- Lynch, R. S. Stillman, J. E., Timell, T. E.: Studies on larch arabinogalactan framework of tamarack arabinogalactan., *Svensk Papperstidn.*, **71**, 890-891 (1968).
- Macfarlane, G. T., Gibson, G. R.: Coultivation of polymerized carbon sources by *Bacteroides ovatus* grown in two-stage continuous culture system, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1-6 (1991).
- 松本晃幸, 大平郁男: マイタケ菌糸体の培養特性, *菌草研報*, **20**, 140-147 (1982).
- Matsumoto, T., Kitamoto, Y.: Induction of fruitbody formation by water-flooding treatment in saw dust cultures of *Lentinus edodes*, *Trans. Mycol. Soc. Japan*. **28**, 437-443 (1987).
- Matsumoto, T.: Changes in activities of carbohydrases, phosphorylase, proteinase and phenol oxidases during fruiting of *Lentinus edodes* in saw dust cultures, *Rept. Tottori Mycol. Inst.*, **26**, 46-54 (1988).
- 松尾綾男: 椎茸菌の生理学的並びに生態学的研究(第2報)椎茸菌の発育に及ぼす糖類および木材抽出物の影響, *鳥農学報*, **11**, 143-146 (1957).
- Mastuo, N., Mohamed, A. B. B., Meduro, S., Kawachi, S.: The effects of yeast extract on the fruiting of *Lentinus edodes* in a liquid medium, *Mokuzai Gakkaishi*, **38**, 400-402 (1992).
- 三浦 清, 前浜充宏, 香山 彊: 食用菌の栽培培地の樹種特性, *北大演林報*, **42**, 207-220 (1984).
- 水本克夫, 高橋理平: カラマツアラビノガラクトンの製造(第1報)マゲネシアによるアラビノガラクトンの精製, *富山林技研報*, **3**, 17-24 (1990).
- 水本克夫: カラマツアラビノガラクトンの利用開発, *木材工業*, **46**, 606-610 (1991).
- 水本克夫: カラマツアラビノガラクトンの実用化, *APAST*, **12**, 3-7 (1994).
- 水本克夫, 高橋理平, 田近克司, 高野了一: カラマツアラビノガラクトンの製造(第2報), シベリア産カラマツにおけるアラビノガラクトンの樹幹内変動, *富山林技研報*, **8**, 63-68 (1994).
- 森川 靖, 丸山 温: 生長と水, "樹木の生長と環境", 畑野健一, 佐々木恵彦編著, 養賢堂, 東京,

- p.297-330 (1987).
- Morimoto, N., Oda, Y.: Effects of light on fruitbody formation in a Basidiomycete, *Coprinus macrorrhizus*, *Plant & Cell Physiol.*, **14**, 217-225 (1973).
- 村尾澤夫：アミズギタケ，エノキタケに有効な発芽誘導物質，*科学と生物*，**24**，215-216 (1986).
- 村尾澤夫：キノコ子実体形成の促進物質と引金物質，*醸酵と工業*，**43**，43-49 (1985).
- 曽根幸代，吉川光一：はたけしめじの人工培養に関する研究(第1報)液体振盪培養における培地成分について，*日食工誌*，**22**，361-365 (1975).
- 曽根幸代，吉川光一：pH，温度及び振盪条件の変化によるはたけしめじの菌糸体の発育について，*日食工誌*，**25**，196-201 (1978).
- 中井幸隆：シイタケ菌に関する細胞学的研究，*菌草研報*，**24**，1-202 (1987).
- 中村克哉：シイタケ，キノコ事典(中村克哉編)，朝倉書店，東京，pp.205-211 (1982).
- 中村克哉：シイタケ栽培の史的研究，東宣出版，東京，502p.(1983).
- 中島 健，善本知孝，福住俊郎：スギ材中のシイタケ阻害成分，*木材学会誌*，**26**，698-702 (1980).
- Niderpruem, D. J., Hobbs, H., Henry, L.: Nutritional studies of development in *Schizophyllum commune*, *J. Bacteriology*, **88**, 1721-1729 (1964).
- 日本きのこセンター(編)：シイタケ栽培技術の経営家の光協会，東京，62p. (1986).
- 農耕と園芸編集部：キノコ栽培の新技术，誠文堂新光社，東京，140p. (1988).
- 西田篤実，阿部恭久，中川麻理子，中村雅哉，広居忠量：木材腐朽菌の樹種選択性(2)，第42回日本木材学会大会要旨集，名古屋，p.506 (1992).
- 西田篤実，阿部恭久，中川麻理子，中村雅哉，広居忠量：木材腐朽菌の樹種選択性(3)，第43回日本木材学会大会要旨集，岩手，p.73 (1993).
- 西田篤実，中村雅哉，高村麻理子，服部 力：木材腐朽菌の樹種選択性(4)，第44回日本木材学会大会要旨集，奈良，p.263 (1994).
- 西田篤実，中村雅哉，高村麻理子：エゴノキタケの寄主選択性について，第45回日本木材学会大会要旨集，東京，p.466 (1995).
- 西田屹二，近藤民雄，船岡洪二：心材色素の木材腐朽菌成長抑制作用，*日林誌*，**33**，390-393 (1951).
- 小川 真：「マツタケ」の生物学，pp.13-19，築地書館，東京 (1978).
- 大賀祥治，田畑武夫，近藤民雄：原木のシイタケほだ木適性について，*木材学会誌*，**23**，459-463 (1977).
- 大賀祥治，近藤民雄：シイタケ菌(*Lentinus edodes*)とヒポクレア菌の拮抗，*木材学会誌*，**24**，650-654 (1978).
- 大賀祥治，近藤民雄：きのこ栽培に関する資源学的研究(第3報)栄養添加培地でのシイタケ菌糸蔓延促進およびヒポクレア菌との拮抗，*木材学会誌*，**27**，136-140 (1981).
- 大賀祥治：きのこ栽培に関する資源学的研究(第7報)ネギ煎汁のシイタケ菌糸生育促進活性と核酸関連物質，*木材学会誌*，**34**，745-752 (1988).
- Ohga, S.: Effects of nutritional component on mycelial growth and fruit body yield of the Shiitake mushroom, *Lentinus edodes*, on sawdust substrates, *J. Fac. Agr. Kyusyu. univ.*, **34**, 405-412 (1990a).
- Ohga, S.: Growth rate of mycelium of Shiitake, *Lentinus edodes*, in relation to water potential of medium, *J. Fac. Agr. Kyusyu. univ.*, **34**, 413-420 (1990b).
- Ohga, S., Roozendaal, F. V., Aspinwall, M., Miwa, M.: Yield and size response of the Shiitake mushroom, *Lentius edodes*, depending on incubation time on sawdust-based culture, *Trans, Mycol. Soc. Japan*, **33**, 349-357 (1992a).
- Ohga, S.: Comparison of extracellular enzyme activities among different strains of *Lentinus edodes* growth on sawdust-based culture in relationship to their fruiting abilities, *Mokuzai Gakkaishi*, **38**, 310-316 (1992b).
- Ohira, I., Furukawa, I., Sakuno, T.: Phloem of *Quercus serrata*: its structure and decay by *Lentinus edodes*, *Mokuzai Gakkaishi*, **37**, 681-687 (1991).
- Ohira, I., Furukawa, I., Sakuno, T.: Decay patterns of fibers and parenchyma cells in the sapwood of *Quercus serrata* by *Lentinus edodes*, *Mokuzai Gakkaishi*, **38**, 85-91 (1992).
- 大平郁男，古川郁夫，作野友康：シイタケ子実体発生にともなうほだ木内菌糸の動態，*日菌報*，**33**，325-335 (1992).

- 大森茂俊, 今野光晴, 吉田栄一: 故紙の利用に関する研究(第2報)ヒラタケ(*Pleurotus ostreatus*)およびエノキタケ(*Flammulina velutipes*)の培地について, 岩手大農報, 15, 1-6 (1976).
- Ohsawa, M., Katsuya, K., Takei, H.: Newly unidentified butt-rot Basidiomycetous fungus of Japanese larch and method for baiting the fungus from the soil, J. JPN. For. Soc., 69, 309-314 (1987).
- Ohsawa, M., Kuroda, Y., Katsuya, K., Takei, H.: Ability of fungal inhabiting larch trunks with butt-rot to utilize components *in vitro*, J. JPN. For. Soc., 74, 300-307 (1992).
- Ohsawa, M., Kuroda, Y., Katsuya, K.: Heart-rot in old-aged larch forests(1) state of damage caused by butt-rot and stand conditions of Japanese larch forests at the foot of Mt. Fuji, J. JPN. For. Soc., 76, 24-29 (1994).
- Ohta, A., Zhang, L.: Acceleration of mycelial growth and fruiting body production of edible mushrooms by wood vinegar fractions, Mokuzai Gakkaishi, 40, 429-433 (1994).
- 大山義朗, 吉田敏臣, 田口久治: 高速度子実体形成きのこの検索と *Schizophyllum commune* の培養条件, 醸酵工誌, 54, 131-137 (1976).
- 沖 妙, 渡辺広行, 石川久雄: シイタケ菌 *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.によるリグニンの生分解について, 木材学会誌, 27, 696-702 (1981).
- 沖 妙, 橋 燦郎: 樹木抽出物の食用キノコに対する成長促進効果, 第38回日本菌学会講演要旨集, 鳥取, p.111 (1994).
- 沖 妙, 橋 燦郎: 食用キノコの子実体形成に及ぼす樹木抽出物の効果, 第39回日本菌学会講演要旨集, 東京, p.15 (1995).
- Qumino, T. H., Chang, S. T., Royse, D. J.: Technical guidelines for mushroom growing in the tropics, FAO, 62-70 (1990).
- Rondle, C. J. M., Morgan, W. T. J.: The determination of glucosamine and galactosamine, Biochem. J., 61, 586-589 (1955).
- 林野庁: 図説林業白書(平成6年度版), 日本林業協会, 東京, pp.69-72 (1995).
- 阪本禮一郎, 新見 健, 高橋昭之介: 食用きのこの深部培養における炭素源と窒素源, 農化, 52, 75-81 (1978).
- 鮫島正浩, 善本知孝: 針葉樹樹皮の温水抽出物が食用担子菌およびその害菌の菌糸生育におよぼす効果, 木材学会誌, 30, 413-416 (1984).
- Somogyi, M.: Notes on sugar determination, J. Biol. Chem., 195, 19-23 (1952).
- Song, C. H., Cho, K. Y.: Effect of low temperature shock treatment on sporophore initiation, lipid profile and nutrient transport in *Lentinus edodes*, Mycologia, 83, 24-29 (1991).
- Sonner, M., Simatupang, M. W., Dietrichs, H. H.: Automated quantitative analysis of wood carbohydrates by borate complex ion exchange chromatography, Wood Sci. Technol., 9, 307-322 (1975).
- 杉森恒武, 大山義朗, 大道妙子: 担子菌に関する研究(第1報)担子菌における非炭水化物より菌糸体および子実体の生産, 醸酵工誌, 49, 435-446 (1971).
- Swain, T., Hills, W. E.: The phenolic constituents of *PRUNUS DOMESTICA* I. The quantitative analysis of phenolic constituents, J. Sci. Food Agric., 10, 63-68 (1959).
- Szklarz, G. D., Antibus, R. K., Sinsabaugh, R. L., Linkins, A. E.: Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi, Mycologia, 81, 234-240 (1989).
- 高島幸司: 未利用材のシイタケ培地適性, 日林中支研論, 35, 181-183 (1987).
- 高島幸司: 未利用材のヒラタケおよびナメコ培地適性, 日林中支研論, 37, 181-183 (1989).
- 高島幸司, 水本克夫, 高野了一: カラマツ水抽出残渣の食用きのこ培地適性, 第41回日本木材学会大会要旨集, 松江, p.221 (1991).
- 高島幸司: シベリア産カラマツ材水抽出残渣の食用キノコ培地適性, 富山林技研報, 6, 29-38 (1992).
- 高島幸司, 水本克夫: 本邦産カラマツ水抽出物の食用きのこ菌糸体成長に及ぼす影響, 富山林技研報, 8, 24-31 (1994).
- 高島幸司, 作野友康, 古川郁夫, 川田俊成: 食用きのこの菌糸体成長に及ぼすカラマツ水抽出物の影響, 木材学会誌, 40, 1147-1151 (1994).
- 高島幸司, 作野友康, 古川郁夫, 川田俊成: ヒラタケの菌糸体成長と菌体外酵素活性に及ぼすカラマ

- ツ水抽出物の影響, 木材学会誌, 41, 844-850 (1995).
- 高島幸司, 作野友康, 古川郁夫, 川田俊成: カラマツ水抽出物添加培地におけるヒラタケ菌の初期成長時での菌体外酵素産出動向, 木材学会誌, 42, 427-431 (1996a).
- 高島幸司, 作野友康, 古川郁夫, 川田俊成: カラマツ水抽出物を添加した未利用培地基材によるヒラタケ栽培, きのこの科学, 3, 155-160 (1996b).
- 高島幸司: きのこの培養基, 国内特許, 特許第2036551号 (1996).
- 田中康則, 作野友康, 古川郁夫, 岸本 潤: シイタケ菌によるコナラ, クヌギの組織変化, 鳥取大演林報, 14, 149-161 (1984).
- 寺下隆夫, 河野又四, 村尾澤夫: シイタケの子実体形成に対する蛋白質分解酵素阻害剤 *Streptomyces-P1* の添加効果, 日菌報, 21, 137-140 (1980).
- 寺下隆夫, 小田耕平, 河野又四, 村尾澤夫: 酸性プロテアーゼ阻害剤S-P1による人工シメジ(ヒラタケ)の増産, 醸酵工誌, 59, 55-57 (1981).
- 寺下隆夫, 盧 成金, 吉川賢太郎, 獅山慈孝: プナシメジの栄養環境と生育時の加水分解酵素活性, きのこの科学, 2, 15-20 (1995).
- Teratani, F., Kato, T., Kai, Y., Yamashita, T.: Low molecular weight component of arabinogalactan isolated from Japanese larch heartwood, *Mokuzai Gakkaishi*, 33, 206-211 (1987).
- Tokimoto, K., Kawai, A.: Nutritional aspects of fruit-body development in replacement culture of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., *Rept. Tottori Mycol. Inst.*, 12, 25-30 (1975).
- Tokimoto, K., Fukuda, M.: Relation between mycelium quantity and fruit body yield in *Lentinus edodes* bed-logs, *Taiwan Mushrooms*, 5, 1-5 (1981).
- 時本景亮: ほだ木内におけるシイタケ菌とトリコデルマ菌との競合に関する生理学的研究, 菌蕈研報, 23, 1-54 (1985).
- 時本景亮, 広居忠量, 西田篤実, 玉井 篤, 福田正樹: シイタケ栽培過程におけるほだ木成分と子実体発生量の変化, 菌蕈研報, 20, 117-122 (1982).
- Tokimoto, K., Fukuda, M., Kishimoto, H., Koshitani, H.: Activities of enzymes in bedlogs of *Lentinus edodes* during fruitbody development, *Rept. Tottori Mycol. Inst.*, 25, 24-35 (1987).
- 特用林産ビジョン: 特用林産の今後の方向, 日本特用林産振興会, 東京, p.1-30 (1993).
- Trinder, P.: Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor, *Ann. Clin. Biochem.*, 6, 24-27 (1969).
- Tsujiyama, S., Azunma, J., Okamura, K.: Influence of plant hormones on a wood-rotting fungus, *Coriolus versicolor*, *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 34, 369-376 (1993).
- Tsuneda, A., Koshitani, H., Furukawa, I.: Micromorphological patterns of incipient wood decay by *Lentinus edodes*, *Rept. Tottori Mycol. Inst.*, 25, 36-48 (1987).
- Tsuneda, A.: Tyloses in the vessels of *Quercus serrata* and incipient decay of the bedlogs by *Lentinus edodes*, *Rept. Tottori Mycol. Inst.*, 26, 29-36 (1988).
- Tsuneda, A., Furukawa, I., Koshitani, H.: Micromorphological patterns of lignin removal and cellulose microfibrill degradation in *Fagus crenata* by *Lentinus edodes*, *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 30, 415-425 (1989).
- 宇野 功, 石川辰夫: キノコの子実体形成とcyclicAMP, 化学と生物, 12, 281-286 (1974).
- Urayama, T.: Stimulative effect of extracts from fruit bodies of *Agaricus bisporus* and some other hymenomycetes on primordium formation in *Marasmiinum sp.*, *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 10, 73-78, (1969).
- Wood, D. A., Goodenough, P. W.: Fruiting of *Agaricus bisporus*, *Arch. Microbiol.*, 114, 161-165 (1977).
- Wood, D. A.: Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*, *J. Gen. Microbiol.*, 117, 327-338 (1980).
- 山下市二, 森 健, 飯野久栄, 柳井昭二: ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Quel.) 栽培におけるハトムギ殻, 落花生殻, 芝草, 多孔質石の利用, 日食工誌, 30, 693-697 (1983).
- 米山彰造, 富樫 巖, 本間千晶, 青山政和: 食用菌菌糸の生育に及ぼすトドマツ抽出物の影響, 北林

- 産試場報, 3, 16-22 (1989).
- Yoneyama, S., Togashi, I., Oikawa, H., Aoyama, M.: An antifungal substance in the volatile wood oil of Todomatsu, *Abies sachalinensis* Mast., Mokuzaï Gakkaishi, 36, 777-780 (1990).
- 善本知孝: 菌と木材成分, “木材利用の化学”, 今村博之ら編, 共立出版, 東京, p.152-160 (1983).
- 吉田 博, 菅原龍彦, 林 淳三: ヒラタケの菌糸体ならびに子実体の発育過程における炭水化物および有機酸の変化, 日食工誌, 33, 519-528 (1986).
- 吉田 博, 菅原龍彦, 林 淳三: シイタケの菌糸体ならびに子実体の発育過程における炭水化物および有機酸の変化, 日食工誌, 34, 274-281 (1987).
- 吉田敏臣, 田口久治, 寺本四郎: Basidiomycetes の深部培養に関する研究(第1報)椎茸菌 (*Lentinus edodes*) の増殖に影響する 2, 3 の要因について, 醸酵工誌, 43, 325-334 (1965).
- Yoshimura, H., Hayakawa, T.: Acceleration effect of wood vinegar *Quercus crispula* on the mycelial growth of some basidiomycetes., Trans. Mycol. Soc. Japan, 32, 55-64 (1991).
- Yoshimura, H., Hayakawa, T.: Promoting effect of wood vinegar compounds on the mycelial growth of two basidiomycete, Trans. Mycol. Soc. Japan, 34, 141-151 (1993).
- Zadražil, F.: The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cornucopiae*, and *Pleurotus eryngii*, Mushroom Sci., 9, 621-652 (1974).

Studies on Effects of Water Extracts from Karamatsu (Larch Wood) on Mycelial Growth of Edible Basidiomycete Fungi

Summary

The effects of Karamatsu (*Larix sp.*) water extracts on the growth of edible basidiomycete fungi were investigated to determine the utilization of the water extracts in the cultivation of edible mushrooms as a growth activating substance. The obtained results were as follows :

1. Even though each of the Karamatsu water extracts tested was different in their growing districts, Siberia, Hokkaido or Nagano-pref., the main component of the Karamatsu water extracts tested was arabinogalactan which they had in common and there were no remarkable differences among them. But the Karamatsu water extracts from Japan had phenolic compounds about 3.5 times than those from Siberia.
2. Each of the Karamatsu water extracts from Siberia, Hokkaido and Nagano-pref. had remarkable accelerative effects on the mycelial growth of all the basidiomycete fungi tested. There were no differences of accelerative efficiencies among Karamatsu water extracts tested by adding 1 ~ 3 %, but there were differences when adding more than 5 % according to the species of edible basidiomycete fungi tested.
3. The Karamatsu water extracts from Siberia (KWE) had remarkable accelerative effects on the mycelial growth of all the edible basidiomycete fungi tested which were *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*, *Agrocybe clindracea*, *Lentinus edodes*, *Pholiota nameko* and *Grifola frondosa* in agar, liquid, or sawdust media tested in which physical conditions were different.
4. When the mycelia of *P. ostreatus* was incubated in the asparagine (As) medium or asparagine-glucose (AsG) medium with added KWE, as the concentration of added KWE in both media were investigated, the mycelial weight increased remarkably. However, the sole addition of arabinogalactan (AG), the main component of KWE, and arabinose (Ara) and galactose (Gal), monosaccharide components of KWE, to the As medium or AsG medium did not result in an increase of mycelial growth, unlike the case in which KWE was added to the media. The simultaneous addition of KWE and glucose (Glu) brought out the mycelial growth more remarkably than the solitary addition of KWE. Multiple accelerating effects of the KWE and Glu on the mycelial growth were observed.
5. Consumed Glu and reducing sugar in the medium with added KWE were much greater than those in the medium with added AG. It was evident that the AG contained in KWE was utilized more for the mycelial growth of *P. ostreatus* than was solitary AG. As the concentration of the added KWE increased, phenoloxidas and polysaccharases in the medium with added KWE were produced remarkably. However, all extracellular enzymes tested in the medium with added AG did not produce remarkably, unlike the case in which KWE was added.
6. The accelerative effects of KWE on the mycelial growth of *P. ostreatus* was not caused by AG or monosaccharide components of KWE and was related to the phenolic compounds contained in KWE. It was assumed that the accelerative effects of KWE was caused by the mixture of AG and the phenolic compounds or combining them.
7. When the mycelia of *P. ostreatus* was incubated in AsG medium (basal medium) with added KWE or AG, the mycelial weight and extracellular enzyme activities were measured in early growth phase and their relationship was investigated. The growth phase of mycelial incubated in the medium with added KWE showed a lag growth phase during the four days incubation after inoculation, the growth phase showed an exponential growth phase, after that. The growth phase of mycelia incubated in the medium with added AG was still in a lag growth phase after ten days of incubation after inoculation.

8. With accelerating the mycelial growth of *P. ostreatus*, the extracellular enzymes of phenoloxidases and polysaccharases were produced actively, extracellular enzymes in the medium with added KWE in which mycelial weight increased were produced remarkably compared with the medium with added AG. Especially, the activities of phenoloxidases in the medium with added KWE were detected after onehour incubation and it was assumed that the extracellular enzymes were produced as soon as the incubation was started.
9. The specific activities of phenoloxidases in the basal media with added KWE reached their maximum between one day-incubation to four day-incubation when mycelia grew gradually. After that, the activities decreased remarkably. The activities of polysaccharases were detected after phenoloxidases were produced enough and their specific activities indicated high during thriving mycelial growth. The enzymatic production pattern in the basal medium with or without added AG did not show like that in the basal medium with added KWE, and the specific activities of all tested extracellular enzymes in those media changed at low levels throughout the incubation period tested. From these above facts, it was assumed that phenoloxidases from mycelia of *P. ostreatus* were induced by the phenolic compound regions contained in KWE as soon as the mycelia was incubated, polysaccharases were induced after enough phenoloxidases were produced, and the polysaccharide regions contained in KWE were degraded for utilization. Therefore KWE played the role of nutrient, as the carbon source, in the vegetative mycelial growth.
10. The enzymatic production pattern of phenoloxidases and polysaccharases in the basal medium added KWE by *P. ostreatus* corresponded to the degradation form of wood cell walls by *L. edodes* of the same white-rot fungi as *P. ostreatus*. It was supposed that if the white-rot fungi had the characteristics in vegetative growth about the order of the extracellular enzymatic production which phenoloxidases were produced first and polysaccharases were produced after that, KWE also played the part of intensifying the mycelial characteristics of the white-rot fungi.
11. According to sawdust bottle cultivation of *P. ostreatus*, with the addition of KWE on the sawdust · rice bran media, the period required for fruiting-body formation was prolonged by 1~2 days, the sizes of the fruiting bodies got gradually bigger, the yields of the fruiting bodies were significantly increased by about 1.2 or 1.3 times compared with that of the control. Above these facts, it was utilized in a sawdust-based culture of edible mushrooms as an accelerative substance to yield the fruiting-body.
12. Rice hulls and newspaper print (used paper) were more suitable substrate than Sugi-sawdust for cultivation of *P. ostreatus*. It was deduced that cellulose-acetate was substituted for Sugi-sawdust, too. The suitability of vermiculite (polyporus stone) for the substrate was inferior to Sugi-sawdust. The increases in mycelial mass by all the substrates tested (Sugi-sawdust, rice hulls, vermiculite, cellulose-acetate, used paper) with KWE added were appreciated. The effects of KWE addition to the substrate on the yield of fruiting bodies varied with the substrates and there were substantial effects in the Sugi-sawdust, vermiculite and cellulose-acetate substrates. In particular, vermiculite and cellulose-acetate with added KWE proved to be more suitable substrates than Sugi-sawdust.