

連結バイオプロセス (CBP) に適した野生エノキタケのスクリーニングとその系統の栽培特性

高島 幸司*1・金子 周平*2・吉田 誠*3・金子 哲*4

Screening of wild type *Flammulina velutipes* suited for Consolidated Bioprocessing (CBP) and cultivation characteristics of its strain

Koji TAKABATAKE*1, Syuhei KANEKO*2,
Makoto YOSHIDA*3, Satoshi KANEKO*4

エノキタケは糖質分解酵素とアルコール脱水素酵素を有するため、通常は糖化と発酵の二段階で行われるエタノールの生産工程を一つとし、さらに酵素生産も行う連結バイオプロセス (CBP) が可能である。本研究では、エノキタケの野生菌株11系統、市販系統1菌株の中からCBPに適した系統をスクリーニングしたところ、富山県森林研究所が保有する野生菌株Fv-1が選抜された。Fv-1は基質分解能 (セルラーゼ, キシラナーゼ) が高く、エタノール発酵能が優れ、子実体形成能も高かった。また、この菌株の栽培特性を検討したところ、最適培養温度は21℃、最適培養期間は5週間、最適発生温度は15℃であった。

1. はじめに

地球温暖化対策、化石資源代替エネルギー確保のためにバイオ燃料の製造、利用に注目が集まっている。バイオエタノールの生産に穀類を用いると食料生産と競合し、価格高騰を招くため、リグノセルロース系バイオマスを原料とした効果的なエタノール製造技術の確立が求められている。リグノセルロース系バイオマスのエタノール製造は、前処理、糖化、発酵を段階的に実施するものであるが、その製造コストが高価であることがネックになっており、特に前処理および糖化酵素の生産または購入に関わるコストが焦点になっている (1)。連結バイオプロセス (Consolidated Bioprocessing; CBP) は、酵素生産から糖化、発酵までのプロセスを生物的に一まとまりで行う方法であり (2)、糖化酵素の生産プロセスも含むため大幅な生産コストの削減が見込まれ、次世代のエタノール製造技術として期待されている (3)。

CBPに適する微生物はリグノセルロース系バイオマスを完全に分解するためのリグニン分解能を有する必要があるが、単独でリグニンを分解してセルロースを糖化できる微生物は担子菌類のみである。担子菌類の中でもヒメマツタケ、ヒラタケ、エノキタケはアルコール脱水素酵素

を有し、エタノール発酵させて清酒やワインの製造が可能である (4, 5) ことから、エノキタケはCBPに適した微生物の一つである (1)。

一方、エノキタケは他の栽培きのこに先駆けて大規模生産方式を取り入れ、我が国で最も生産量の多い食用きのこである。エノキタケの生産量は平成11年に110千トンに達し、その後、横ばいないし微増して平成21年には139千トンとなった。生産額は平成11年で380億円であったが、その後、横ばい、あるいはやや減少して平成21年には340億円になった (6, 7)。このようにエノキタケ生産は飽和状態が続いており、新たな需要開発が望まれている。そのためには、これまでの市販エノキタケと異なる斬新なエノキタケの開発が必要である。

原木栽培のエノキタケは、自然界で採取する野生エノキタケに近い状態で発生し (8, 9)、直販所等で販売されて非常に好まれている。市販エノキタケは、ならし、抑制、紙巻き、低温育成等のエノキタケ特有の栽培工程によって現在の「もやし状」の形態が確立された (10) が、これらの菌床栽培の工程を省けば、野生に近い形態になることが期待できる。市販エノキタケと風味、形態が異なる野生型エノキタケは新たな需要を生むことが期待できる。

*1: 森林研究所, *2: 福岡県森林林業技術センター, *3: 東京農工大農学部,

*4: (独) 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

安価なバイオ燃料を製造するために林地残材や間伐材の利用が提案されており(3)、これらを用いて食用きのこ栽培を行い、子実体を収穫した後の廃菌床をCBPの原材料とすれば、収穫した子実体はバイオ燃料製造のコスト削減にも寄与する。

そこで本研究では、エノキタケの複数の系統について基質分解能、発酵能、子実体形成能の調査を行い、CBPに適した系統のスクリーニングを行った。さらにスクリーニングした系統の最適な培養温度、培養期間、発生温度について検討した。

2. 材料および方法

2.1 野生エノキタケのスクリーニング

2.1.1 供試菌

供試菌の一覧を表-1に示す。富山県森林研究所保存の野生株6系統、福岡県森林林業技術センター保存の5系統、市販栽培株1系統(千曲化成T-010)を用いた。

2.1.2 基質分解能

供試菌を稲わら・キシラン培地(重量比5:1,含水率65%)で25℃にて2週間、暗条件下で静置培養し、50mMリン酸緩衝液(pH 5.0)で抽出して粗酵素液を調整した。基質としてセルラーゼにはアビセル、キシラナーゼにはキシランを用いた。粗酵素液と基質を酵素反応させて生じる還元糖量をソモギー・ネルソン法(11)で測定し、1分間に1μmolの還元糖量(グルコース,キシロース換算)を生成する酵素活性を1ユニット(U)として酵素活性量を算出した。酵素

反応は、1%基質1mlと50mMリン酸緩衝液(pH 5.0)0.8mlを混合後、37℃で5分間予熱した後、粗酵素液0.2mlを加えて2時間反応させた。

2.1.3 発酵能

発酵能はMizunoらの方法(12,13)に準拠して測定した。供試菌をYMGA 平板培地(0.3%酵母エキス,0.3%ポリペプトン,0.3%麦芽エキス,1%グルコース,1.5%寒天)に温度25℃で培養して接種源とした。500ml容三角フラスコに分注した200ml PG液体培地(1%グルコース,1%ポリペプトン,1%酵母エキス,0.1%KH₂PO₄,0.01%MgSO₄·7H₂O)に接種源(約1cm³,8片)を接種し、その後、ホモジナイザー(ポリトロン製Kinematica, Kriens, Switzerland)で接種片が培地中で均一になるように調整し、25℃にて14日間、回転振盪(120rpm)で培養した。培養後遠心処理(3,000×g)により集菌した。集菌した菌糸体より、乾重で30mg相当を秤量して滅菌水で洗浄後、10ml発酵培地(10%グルコース,0.3%ポリペプトン,0.3%酵母エキス,0.1%KH₂PO₄,0.01%MgSO₄·7H₂O)に混合し25℃で260時間および330時間培養して、エタノール測定酵素キット(F-kit:Roche Diagnostics,Darmstadt,Germany)により培地中のエタノール濃度を測定した。

2.1.4 子実体形成能

供試培地として広葉樹オガコ・米ぬか培地(重量比3:2,含水率63%)を用いた。800mlポリプロピレン製栽培ビンに供試培地を500g詰め、118℃で45分間滅菌処理した。放冷後、供試菌

表-1 供試菌株一覧

菌株No.	分譲元	分譲元菌株No.	採取場所	分離方法	採集年月日
Fv-1	富山県森林研究所	FV-1	富山県立山町	孢子	1990/10/16
FV-2	富山県森林研究所	FV-2	富山県立山町	孢子	1988/10/17
FV-4	富山県森林研究所	FV-4	富山市有峰	子実体	1988/10/7
FV-5	富山県森林研究所	FV-5	富山市有峰	孢子	1988/10/27
FV-6	富山県森林研究所	FV-6	富山市有峰	孢子	1988/10/27
FV-7	富山県森林研究所	FV-7	富山市有峰	子実体	1988/10/27
FV-8	福岡県森林技セ	Fve9901	福岡県確井町	子実体	1999/11/8
FV-9	福岡県森林技セ	Fve9801	福岡県宮若市	子実体	1998/2/18
FV-10	福岡県森林技セ	06092401-3	長野県小海町	子実体	2006/9/24
FV-11	福岡県森林技セ	白山A-1-9	石川県尾口村	子実体	2001/11/2
FV-12	福岡県森林技セ	黒髪山B-3	佐賀県有田町	子実体	2006/12/1
T-010	購入種菌(株)千曲化成				

の各種菌を約10 g 接種し、温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ で50日間、暗黒下で静置培養した。培養後、菌掻きを行い、温度 $13 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度90%以上、照度300luxの条件下で子実体形成を促した。接種から子実体収穫までの栽培日数、子実体収量、子実体発生個数、子実体個体重を調査した。なお種菌は、ブナオガコ・米ぬか培地（重量比3:1）にPDA培地（日水製）で予め培養した供試菌を接種し、温度 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度70%、暗黒下で8週間培養して調製した。

子実体形成率、子実体収量、子実体発生個数、子実体個体重、接種から子実体収穫までの栽培日数を調査測定した。子実体形成率は供試ビン数に対する子実体形成したビン数の百分率で示した。子実体収量、子実体発生個数、子実体個体重は、子実体形成したビンを対象に測定した。1試験区当たり16本供試した。

2.2 野生エノキタケの栽培特性

2.2.1 供試菌、鋸歯培地

基質分解能、発酵能、子実体形成能ともに前節のスクリーニングの結果で最も優れていると判断した当研究所保存株Fv-1を供試菌として用いた。供試培地、滅菌条件は「2.1.4 子実体形成能」と同様である。ビン詰め条件は、850mlポリプロピレン製栽培ビンに供試培地を550g詰めとした。

2.2.2 栽培の標準条件

培養過程は培養温度 $21 \pm 2^\circ\text{C}$ 、暗黒下で培養期間を6週週間とし、その後、菌掻き、注水処理（室温にて3時間）後、発生温度 $15 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度90%以上、照度300luxの発生室に培養基を移して子実体形成を促した。

2.2.3 スクリーニングした菌株に適した栽培条件

スクリーニングした菌株に適した栽培条件を明らかにするため、培養期間、培養温度、発生温度について検討した。

培養温度は、「2.2.2 栽培の標準条件」における培養温度を9, 12, 15, 18, 21°C にして栽培試験を行った。それぞれの温度によって菌糸体が栽培ビンを蔓延するまでに要する日数（蔓延日数）を調査した。熟成日数は各培養温度で蔓延日数後に14日間設定した。

培養期間は、「2.2.2 栽培の標準条件」の培養期間を4, 5, 6, 7, 8週間にして栽培試験を行った。

発生温度は、「2.2.2 栽培の標準条件」の発生温度を9, 12, 18, 21°C にして栽培試験を行った。

子実体収量、子実体発生個数、子実体個体重、接種から子実体収穫までの栽培日数を調査測定した。1試験区当たり16本供試し、測定値は、統計処理プログラムJMP-Jを用いてTukey-KramerのHSDにより試験区間で多重比較を行った。

3. 結果

3.1 野生エノキタケのスクリーニング

3.1.1 基質分解能、発酵能

供試菌株について、基質分解能としてセルラーゼ活性、キシラナーゼ活性を測定した。発酵能として260時間、360時間後のエタノール濃度を測定した。結果を表-2に示した。

セルラーゼ活性は、供試菌株間で2.7~14.7Uと幅広い値となり、野生系統の大部分は市販系統より高い活性を示した。Fv-15 (14.7U)が最も高くなり、以下Fv-10 (12.7U), Fv-7 (10.0U), Fv-1 (9.1U)と続いた。キシラナーゼ活性は供試菌株間で6.9~22.6Uとセルラーゼと同様に幅広い値となり、Fv-1(22.6U)が最も高く、以下Fv-5 (21.3U), Fv-9 (20.4U), Fv-8 (20.1U)と続いた。Fv-5, Fv-1は、セルラーゼ、キシラナーゼの両活性で高い値を示し、高い基質分解能を示した。

発酵能に関して、エタノール濃度は260時間後で0~31g/L、330時間後で0~31g/Lとなり、供試菌株間で大きくばらつき、野生系統でのみエタノールが検出された。Fv-1, Fv-2は260時間で30 g/L前後のエタノール濃度を示し、高い発酵能を示した。

3.1.2 子実体形成能

供試菌株における子実体の発生状況を図-1に示した。通常の栽培工程より、ならし・抑制を省いているため、市販系統T-010も菌傘が大きく、菌柄が太くなり、淡い乳白色を帯びた。野生系統では菌傘や菌柄の大きさ、色が非常に変化に富んで発生した。

供試菌株における栽培試験の結果を表-3に示した。Fv-6では子実体を形成しなかった。また、

表-2 供試菌株の基質分解能・発酵能

系 統	セルラーゼ 活性	キシラナーゼ 活性	エタノール濃度	
			260 h	330 h
Fv-1	9.1	22.6	29	31
Fv-2	5.7	16.2	31	30
Fv-4	5.2	6.9	13	10
Fv-5	14.7	21.3	26	22
Fv-6	8.3	16.2	18	22
Fv-7	10.0	16.6	21	19
Fv-8	4.3	20.1	22	21
Fv-9	2.7	20.4	16	18
Fv-10	12.7	19.4	25	30
Fv-11	7.4	13.8	11	10
Fv-12	4.7	13.3	17	19
T-010	3.4	7.2	-	-

(単位: $\mu\text{mol/l} \cdot \text{min}$) (単位: g/L)

Fv-2, Fv-4, Fv-5では子実体形率が16.7~83.3%となり, 子実体形成が不安定であった。

栽培日数に関して, 供試菌株間で64.0~76.5日間と, 供試菌株間で大きく異なった。市販系統T-010は70.0日間となり, Fv-1, Fv-11, Fv-12は市販系統T-010より短く, Fv-1は64.0日間と最も短い栽培日数を示した。

子実体形成率100%の供試菌株間では, 子実体収量は37.5~141.1g/ビンとなった。市販系統T-010は127.0g/ビンとなり, 大半の野生菌株は市販系統より劣ったが, Fv-1は141.1g/ビンと

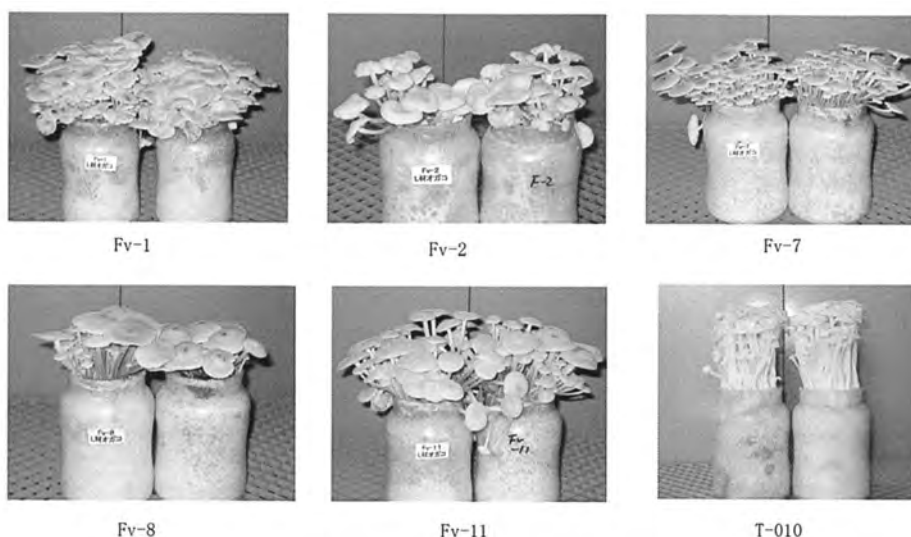


図-1 供試菌株の子実体形態

表-3 供試菌株の子実体形成能

系 統	子実体 形成率 (%)	栽培日数 (日間)	子実体収量 (g/500mlビン)	子実体発生個数 (個/500mlビン)	子実体個体重 (g/個)
Fv-1	100.0	64.0	141.1 ± 22.3 ^{a)}	103.9 ± 30.2 ^{a)}	1.4 ± 0.2 ^{a)}
Fv-2	83.3	70.3	63.7 ± 13.5	70.9 ± 29.4	1.0 ± 0.4
Fv-4	16.7	71.0	109.4 ± 10.4	182.0 ± 5.7	0.6 ± 0.1
Fv-5	25.0	76.5	118.4 ± 7.8	108.5 ± 19.1	1.1 ± 0.1
Fv-6	0.0	—	—	—	—
Fv-7	100.0	70.8	84.2 ± 10.2	100.1 ± 30.5	0.9 ± 0.3
Fv-8	100.0	70.6	74.7 ± 16.1	63.4 ± 18.6	1.2 ± 0.2
Fv-9	100.0	71.8	98.9 ± 11.5	97.1 ± 15.7	1.0 ± 0.1
Fv-10	100.0	71.9	37.5 ± 17.6	43.8 ± 15.7	0.8 ± 0.3
Fv-11	100.0	68.6	115.7 ± 16.3	87.9 ± 11.9	1.3 ± 0.3
Fv-12	100.0	69.5	88.6 ± 20.1	88.6 ± 26.0	1.0 ± 0.1
T-010	100.0	70.0	127.0 ± 5.1	71.7 ± 7.1	1.8 ± 0.1

a) : 平均値±標準偏差

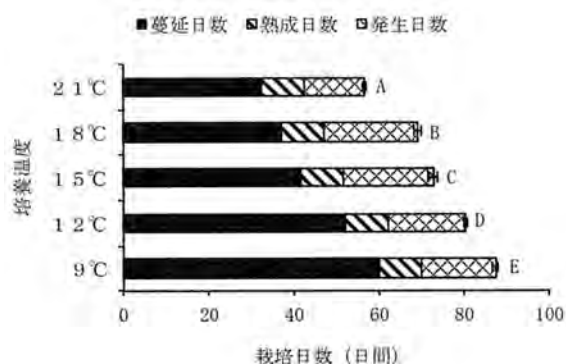


図-2 培養温度が栽培日数に及ぼす影響

異なる文字間で有意差有り (Tukey-Kramer のHSD, $p < 0.05$)
 図中横棒は標準偏差を示す。

市販系統より多かった。子実体発生個数は43.8~103.9個/ビンとなり、Fv-1が最も多い子実体発生個数を示した。市販系統T-010は供試菌株間では中位であった。子実体個体重は0.8~1.8g/個となった。市販系統T-010は、菌柄が太く、長い状態で発生したため、1.8g/個と最も個体重の重い子実体を発生した。野生菌株はいずれも市販系統より軽い個体重となった。

子実体形成率が100%であり、栽培日数、子実体収量で優れていることが要件であることから、子実体形成能に関しては、野生系統の供試菌株間ではFv-1が最も優れていると判断した。

以上の結果から、基質分解能、発酵能さらに子実体形成能に優れた系統は、Fv-1であった。このことからCBPに適したエノキタケ野生菌株としてFv-1を選抜した。

3.2 CBPに適した野生エノキタケの栽培特性

3.2.1 培養温度

Fv-1の栽培日数の結果を図-2に示した。蔓延日数は21°Cで32.5日間と最も短く、培養温度が下がるにつれて蔓延日数は長くなり、9°Cでは60.1日間であった。発生日数は9°Cで13.2日間となり、培養温度が上がるにつれて発生日数は長くなり、18°Cでは18.0日間と最も長くなったが、21°Cでは10.3日間と試験区間で最も短くなった。蔓延日数では試験区間で28日間、発生日数では8日間の差が生じたが、培養温度は発生期間に比べて培養期間に強く影響した。その結果、栽培日数は21°Cで最も短く56.8日間となり、培養温度が下がるに従い栽培日数が長くなり、9°Cでは87.3日間となった。

子実体収量の結果を図-3に示した。15, 18°Cで117~121g/ビンと子実体収量が最も多くなっ

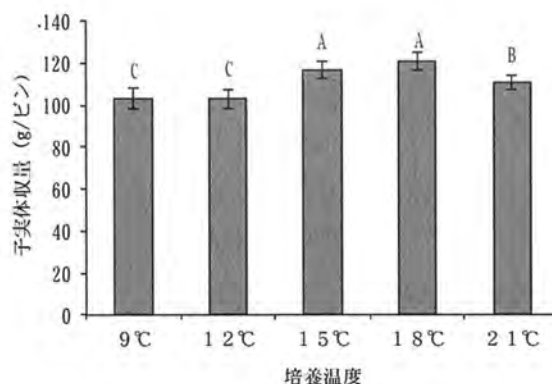


図-3 培養温度が子実体収量に及ぼす影響

異なる文字間で有意差有り (Tukey-Kramer のHSD, $p < 0.05$)
 図中縦棒は標準偏差を示す。

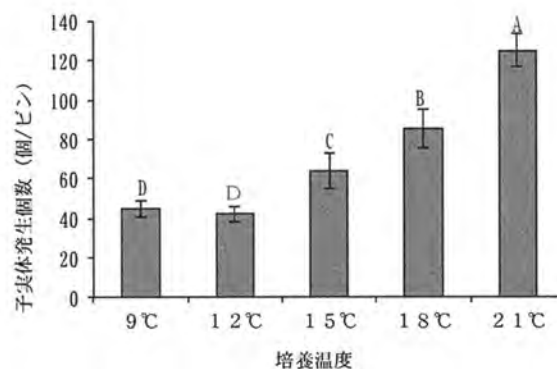


図-4 培養温度が子実体発生個数に及ぼす影響

異なる文字間で有意差有り (Tukey-Kramer のHSD, $p < 0.05$)
 図中縦棒は標準偏差を示す。

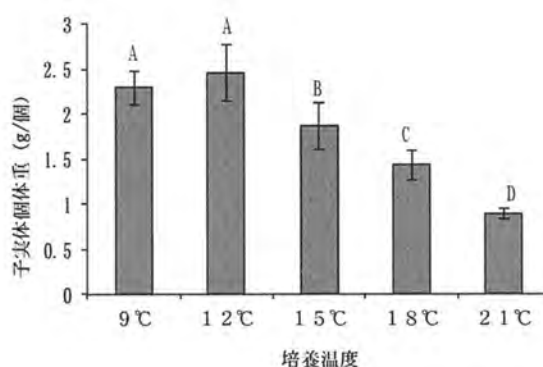


図-5 培養温度が子実体個体重に及ぼす影響

異なる文字間で有意差有り (Tukey-Kramer のHSD, $p < 0.05$)
 図中縦棒は標準偏差を示す。

た。次いで21°Cで110g/ビンとなり、9, 12°Cでは103g/ビンと最も少なくなった。

子実体発生個数、子実体個体重の結果をそれぞれ図-4, 図-5に示す。子実体発生個数は21°Cで125個/ビンと最も多く、培養温度の低下と共

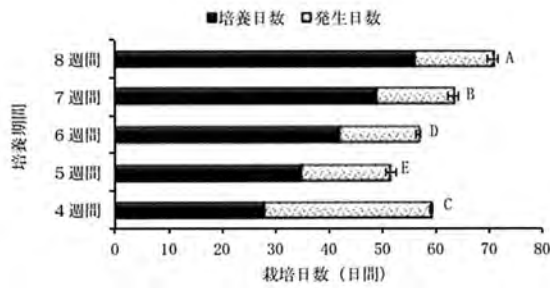


図-6 培養期間が栽培日数に及ぼす影響

異なる文字間で有意差有り(Tukey-Kramer のHSD, $p < 0.05$)
 図中横棒は標準偏差を示す。

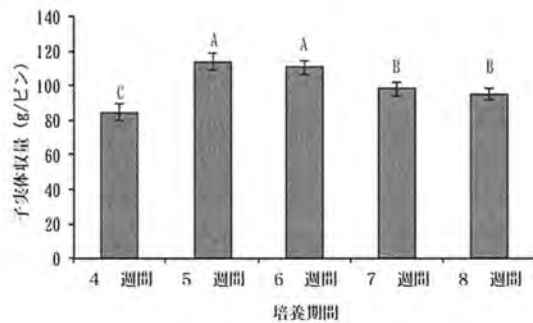


図-7 培養期間が子実体収量に及ぼす影響

異なる文字間で有意差有り(Tukey-Kramer のHSD, $p < 0.05$)
 図中縦棒は標準偏差を示す。

に子実体発生個数は少なくなり、9、12℃では42~45個/ビンと21℃の1/3程度であった。子実体個体重は発生個数と逆の傾向を示し、9、12℃で2.3~2.5g/個と最も重く、培養温度が高くなるにつれて個体重は軽くなり、21℃では0.9g/個と最も軽かった。

これらのことから、子実体収量の観点からは15、18℃で最も収量が多く15~18℃が好適な温度となるが、子実体収量を栽培日数で除した子実体生産効率 (g/栽培日数) の観点では、21℃が1.94g/日数と最も高い値を示し、21℃が最適培養温度であることが明らかになった。

3.2.2 培養期間

培養期間が野生エノキタケFv-1の子実体形成に及ぼす影響を検討した。栽培日数の結果を図-6に示した。栽培日数は培養期間5週間で51.6日間と最も短く、次いで、6週間、4週間と続き、8週間が最も長く、培養期間5週間からのズレが大きくなるに従い長くなった。培養期間6~8週間の発生日数は14~15日間であるが、培養期間が5週間より短くなると発生日数が長くなる傾向を示し、培養期間4週間では発生期間が特に長かった。

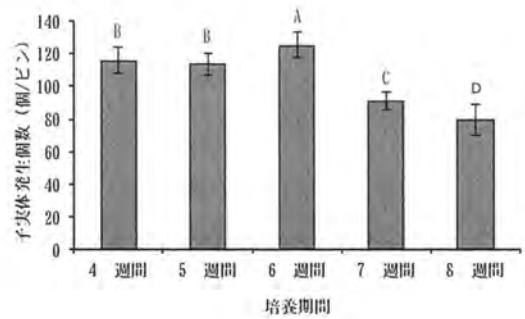


図-8 培養期間が子実体発生個数に及ぼす影響

異なる文字間で有意差有り(Tukey-Kramer のHSD, $p < 0.05$)
 図中縦棒は標準偏差を示す。

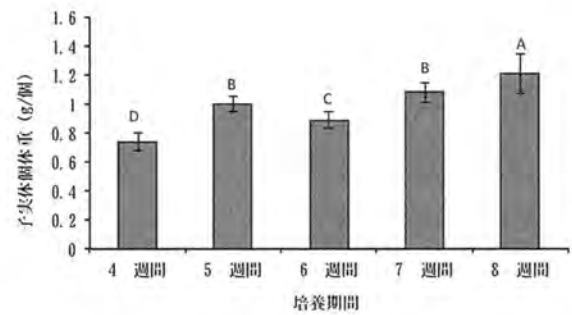


図-9 培養期間が子実体個体重に及ぼす影響

異なる文字間で有意差有り(Tukey-Kramer のHSD, $p < 0.05$)
 図中縦棒は標準偏差を示す。

子実体収量の結果を図-7に示した。培養期間5、6週間で110~114g/ビンと子実体収量が最も多くなった。次いで培養期間7~8週間で95~98g/ビンとなり、培養期間4週間では85g/ビンと最も少なかった。

子実体発生個数、子実体個体重の結果をそれぞれ図-8、図-9に示した。子実体発生個数は培養期間6週間で125個/ビンと最も多く、次いで4、5週間、7週間と続き、培養期間8週間で最も少なく、培養期間6週間からのズレが大きくなるに従い少なくなった。子実体個体重は培養期間4週間で0.74g/個と最も軽く、培養期間が長くなると個体重が重くなる傾向を示した。

子実体収量の観点からは培養5、6週間で最も子実体収量が多くなったが、子実体生産効率 (子実体収量/栽培日数) では、培養期間5週間では2.21g/日数、培養6週間では1.94g/日数であったことから、培養期間5週間が最適培養期間であると判断した。

3.2.3 発生温度

発生温度が野生エノキタケFv-1の子実体形成に及ぼす影響を検討した。栽培日数の結果を図-10に示した。発生温度18℃、21℃で栽培日数は

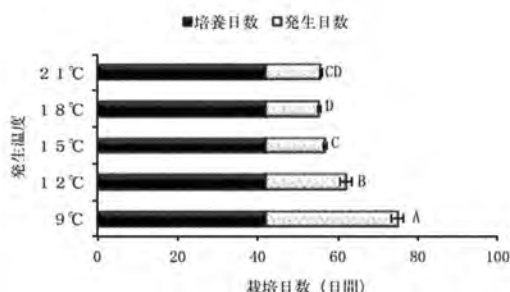


図-10 発生温度が栽培日数に及ぼす影響
異なる文字間で有意差有り(Tukey-Kramer のHSD, $p < 0.05$)
図中横棒は標準偏差を示す。

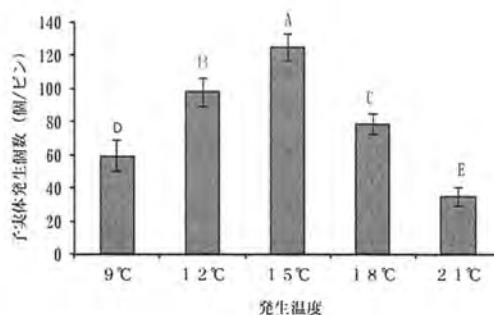


図-12 発生温度が子実体発生個数に及ぼす影響
異なる文字間で有意差有り(Tukey-Kramer のHSD, $p < 0.05$)
図中縦棒は標準偏差を示す。

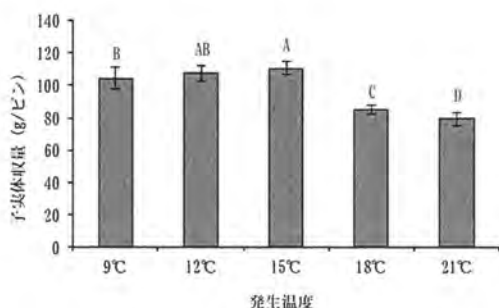


図-11 発生温度が子実体収量に及ぼす影響
異なる文字間で有意差有り(Tukey-Kramer のHSD, $p < 0.05$)
図中縦棒は標準偏差を示す。

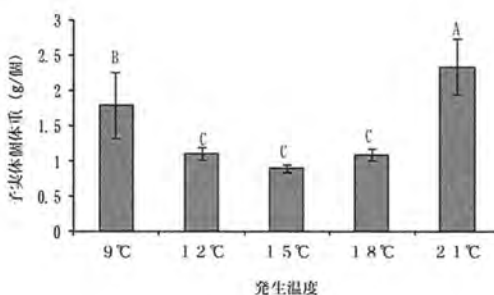


図-13 発生温度が子実体個体重に及ぼす影響
異なる文字間で有意差有り(Tukey-Kramer のHSD, $p < 0.05$)
図中縦棒は標準偏差を示す。

55~56日間と最も短く、発生温度が低下するに従い栽培日数は長くなる傾向を示した。

子実体収量の結果を図-11に示した。発生温度15°Cで110g/ビンと最も多くなった。発生温度15°Cよりズレが大きくなるのに伴い子実体収量は低下する傾向を示した。低温域への12, 9°Cへのシフトでは、それぞれ107g/ビン, 104g/ビン, 高温域への18, 21°Cへのシフトでは、それぞれ85g/ビン, 80g/ビンとなり、高温域へのシフトが収量低下に大きく影響した。

子実体発生個数, 子実体個体重の結果をそれぞれ図-12, 図-13に示した。子実体発生個数に関して、発生温度15°Cで125個/ビンと最も多く、子実体収量の場合と同様に、発生温度が15°Cよりズレが大きくなるに伴い子実体発生個数は低下し、12, 9°Cで15°Cの1/2に対して、18, 21°Cでは15°Cの1/3となり、発生個数の低下は低温域よりも高温域で著しくなる傾向を示した。子実体個体重は12~18°Cの間で有意差がなく、これらに対して9°C, 21°Cでは重くなる傾向を示した。平均値で比較すると、15°Cで最も小さく、15°Cよりズレが大きくなるに従い重くなる傾向を示した。

以上の結果から、子実体形成には、発生温度

は15°Cが最適であると判断した。

4 考察

CBPに適したエノキタケ野生菌株として基質分解能(セルラーゼ, キシラナーゼ活性), 発酵能, 子実体形成能よりFv-1を選抜した。市販エノキタケ菌株は供試菌株間では基質分解能は下位, 発酵能は最下位で, 子実体形成能は上位であった。市販系統は, ルーツをたどれば数系統より派生し(14), 子実体収量の向上と子実体の純白化を目標に育種されてきた(15)。そのため, 育種過程で子実体形成に関与する要素が強調され, 不要な要素は削ぎ落とされて発酵能が低くなったものと推察される。

また, 子実体形成能と基質分解能とは直接リンクしなかった。即ち, セルラーゼ, キシラナーゼ活性の高い菌株は子実体収量が高くなることを期待したが, 相関はなかった。しかし, セルラーゼ, キシラナーゼ等の糖質分解酵素の菌対外活性と菌糸体生長, 子実体形成と密接に関連することが報告されており(16, 17), 各酵素の菌糸体生長, 子実体形成における作用機序を明らかにする必要がある。

供試した野生菌株間では, 発生した子実体の

色、形態、基質分解能、発酵能、子実体形成能に関して著しい変異を示した。このことは、様々な育種目標に応えるためには、野生系統の収集が基本的な要件であることを示唆している。

Fv-1は、供試菌株間では高い基質分解能、発酵能を示したが、ペントースを発酵できないこと、カタボライト制御による糖化酵素の発現抑制が起きること等の問題が生じている(1, 12, 13)。Fv-1をCBPに適応させるには、形質転換により、これらの問題点を克服する必要がある(18, 19)。

Fv-1に適した培養温度、培養期間、発生温度を検討したところ、培養温度21℃、培養期間5週間、発生温度15℃が最適条件となった。エノキタケの菌糸体伸長の適温は22~26℃(20, 21)であるが、菌床栽培では菌糸体生長に伴って培養基から放熱されることから、培養室の温度は菌糸体伸長の適温より低めにすることが奨められている(10, 21)。Fv-1の最適培養温度は生産効率に基づいて21℃としたが、一ビン当たりの子実体収量に基づけば15~18℃が最適培養温度となる。また、野生エノキタケであることの特徴を強調するために大きなサイズの子実体を収穫することを主眼におけば、子実体個体重が重くなる9~12℃が最適温度となる。シイタケでは原基形成の適温範囲が15~25℃であると報告されている(22, 23)が、エノキタケ菌床栽培では培養後期の温度が原基形成に影響し、9~12℃では原基形成が少なくなり、その結果、子実体個体重に影響したものと推察される。これらのことから、子実体の収量と個体重のどちらを優先するかに応じて培養温度を考慮する必要があると考えられる。

培養期間は、培養温度21℃で検討し、生産効率を考慮すると5週間が最適となったが、子実体収量は5, 6週間共に同程度となった。しかし、7週間以降では子実体収量は減少し、子実体個体重が重くなる傾向を示した。このことは7週間以降では過熟状態となり、原基数が少なくなって子実体個体重が重くなったものと推察される。

エノキタケ野生菌株Fv-1の最適発生温度は15℃となった。エノキタケの子実体形成の適温に関して、Kinugawaらは15℃(20)、Tonomuraは10~15℃(21)と報告しており、本研究の結果はこれらの既報と符合した。

Fv-1の発生温度の適温は、培養温度の適温より低くなったが、このような傾向は、シイタケ(22, 23)、ヒラタケ(24)、ツクリタケ(25)、ヌメリスギタケ(26)、ヌメリスギタケモドキ(27)、ヤナギマツタケ(28)においても報告されており、温帯地域に自生する栽培用きのこの特徴と考えられる。

発生温度が適温からのズレが大きくなるに従い子実体収量、子実体発生個数が低下する傾向を示したが、低温域より高温域に移行する方が大きな影響をもたらした。このことは、低温域より高温域で感受性が強くなることを示唆しており、実際の栽培では、外気温の高い時には、発生室が外気温の影響を受けないように注意することが求められる。

本研究によってCBPに適した野生エノキタケFv-1をスクリーニングし、また、その栽培特性が明らかになったことから、今後は林地残材、間伐材を用いた実験データを積み重ねて中山間地域での実用化に近づけることが期待される。

引用文献

- 1) 金子 哲・我有 満(2009)担子菌とソルガムを用いた連結バイオプロセスによるエタノール変換技術開発、農林水産技術研究ジャーナル32:35-40.
- 2) Lynd L. R, Weimer P.T., Vanzyl W.H., Pretorius I.S.(2002)Microbial Cellulose Utilization, Fundamentals and Biotechnology, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65:506-577.
- 3) バイオ燃料技術革新協議会(2008)バイオ燃料技術革新計画, p.1-80.
- 4) Okamura T., Ogata T., Toyoda M., Tanaka M., Minamimoto N., Takeno T., Noda H., Fukuda S., Ohsugi M.(2000) Production of Sake by Mushroom Fermentation, Mushroom Sci. Biotech. 8:109-104.
- 5) Okamura T., Ogata T., Minamimoto N., Takeno T., Noda H., Fukuda S., Ohsugi M.(2001) Characteristics of Wine Produced by Mushroom Fermentation, Biosc. Biotechnol. Biochem. 65:1596-1600.
- 6) 林野庁経営課特用林産企画班(2010)特用林産物需給動態調査, 平成21年度の主要な

- 林産物の生産動向。
- 7) 林野庁経営課特用林産企画班 (2010) 特用林産物需給動態調査, きのご関係資料.
 - 8) (財) 日本きのごセンター (1985) きのご栽培の実際・エノキタケ, 図解やさしいきのご栽培, p.66-78.家の光協会, 東京.
 - 9) 衣川堅二郎・中村公義 (2000) エノキタケ, 衣川堅二郎・小川 眞編, きのごハンドブック, p.68-76, 朝倉書店, 東京.
 - 10) 山本秀樹 (2001) エノキタケ, 大森清寿・小出博志編, キノコ栽培全科, p.85-96, 農文協, 東京.
 - 11) Somogyi, M. (1952) Notes on sugar determination, J. Biol. Chem. 195 : 19-23.
 - 12) Mizuno R., Ichinose H., Honda M., Takabatake K., Sotome I., Takai T., Maehara T., Okadome H., Isobe S., Gau M., Kaneko S.(2009) Use of whole crop sorghum as a raw material in consolidated bioprocessing bioethanol production using *Flammulina velutipes*, Biosci. Biotechol. Biochem. 73:1671-1673.
 - 13) Mizuno R., Ichinose H., Takabatake K., Kaneko S. (2009) Properties of ethanol fermentation by *Flammulina velutipes*, Biosci. Biotechol. Biochem., 73:2240-2245.
 - 14) 善如寺 厚(1992)育種, 古川久彦編, きのご学, p.158-181, 共立出版, 東京.
 - 15) 北本 豊 (1991) エノキタケ その号生産技術, きのご技術集談会編集委員会編, きのごの基礎科学と最新技術, p.221-229, 農村文化社, 東京.
 - 16) Ohga, S.(1992)Comparison of extracellular enzyme activities among different strains of *Lentinula edodes* growth on sawdust-based culture in relationship to their fruiting abilities, Mokuzai Gakkaishi 38 : 310-316.
 - 17) 天野良彦, 西澤賢一, 床尾力哉, 松澤恒友, 神田鷹久(1992) *Lyophyllum ulmarium* (*Hypsizigus marmoratus*)の菌床過程で生産される菌体外酵素, 木材学会誌 38 : 411-416.
 - 18) Maehara T. Yoshida M., Ito Y., Tomita S., Takabatake K., Ichinose H., Kaneko S.(2010)Development of agene transfer system for mycelia of *Flammulina velutipes* Fv-1 strain, Biosci. Biotechnol.Biochem. 74:1126-1128.
 - 19) Maehara T., Tomita S., Takabatake K., Kaneko S. (2010)Improvement of the transformation efficiency of *Flammulina velutipes* Fv-1 using the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter, Biosci.Biotechnol.Biochem. 74:2523-2525.
 - 20) Kinugawa K. Furukawa H.(1965) The fruit-body formation in *Collybia velutipes* induced by the low temperature treatment of one short duration, Bot., Mag. Tokyo 78 : 240-244.
 - 21) Tonomura H(1978)*Flammulina velutipes*, Chang S.T, Hayes W.A., The biology and cultivation of edible mushrooms, Academic Press, p.409-421, New York.
 - 22) 時本景亮・小松光雄 (1982) シイタケの菌糸生長および子実体原基形成に及ぼす温度の影響, 日菌報 23 : 385-390.
 - 23) 時本景亮・小松光雄 (1982) ほだ木上におけるシイタケの子実体原基形成におよぼす温度および水分の影響, 菌蕈研報 20 : 104-112 .
 - 24) Zadrazil F.(1974)The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cornucopiae*, and *Pleurotus eryngii*, Mushroom Sci.IX : 621-652.
 - 25) Flegg P.B. (1978) Effect of temperature on sporophore initiation and development in *Araricus bisporus*, Mushroom Scie.X : 595-602.
 - 26) Arita I, Teratani A., Shione Y.(1980) The optimal and critical temperatures for growth of *Pholiota adiposa*, Rept. Tottori.Mycol. Inst. 18 : 107-113.
 - 27) 高島幸司(1991)ヌメリスギタケモドキの生育温度, 富山林技セ研報 5:13-19.
 - 28) 木内信行(1985)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の構成成分について, 神奈川林試研報 12 : 1-24.

Summary

Consolidated Bioprocessing (CBP) which weaves one way from two steps composed of saccharification and fermentation and what's more, produces enzymes is possible with *Flammulina velutipes* because it has saccharide hydrolyzing enzyme and alcohol dehydrogenase enzymes. In this research, the wild type *F.velutipes* suitable for CBP was screened among 11 wild type strains and one commercial strain. The wild type FV-1 was superior abilities about substrate hydrolyzing ability (cellulase and xylanase activity), fermentation ability and fruit-body formation to other strains examined. Cultivation characteristics of Fv-1 were investigated. Then the optimal temperature for spawn run and fruit-body formation were 21°C and 15°C, respectively. And the optimal term of spawn run was 5 weeks.