

## シイタケ菌と細菌類の複合培養\*

中村耕一\*\*・岸本 潤\*\*・作野友康\*\*

昭和59年7月31日受付

### Co-culture of Shiitake (*Lentinus edodes* (BERK.) SING.) and Bacteria\*

Kouichi NAKAMURA\*\*, Jun KISHIMOTO\*\* and Tomoyasu  
SAKUNO\*\*

Co-culture of shiitake and bacteria, namely, *L. edodes* and *Alcaligenas*, or *L. edodes* and *Bacillus*, was conducted to hasten the growth of shiitake mycelium. Samples were collected and were analyzed by their weight loss and UV and IR spectra from extractives of co-cultured wood medium. It was found out that the loss of weight on the co-culture samples were higher than that of the shiitake culture. The pattern was conspicuous especially in the early inoculation time. The alkaline solvent extraction in the early weeks and the ethanol-benzene extraction in the later part showed that the co-culture was higher than the shiitake mycelium alone. It was observed that the combination of bacteria to shiitake hastened the inoculation and time that the length of cultivation of the mycelium will be shorter.

#### 緒 言

現在、食用キノコ栽培は、木粉あるいは、原木を使用  
して行われている。中でも、シイタケを始めとする原木  
栽培においては、菌糸の早期活着及びまん延が最も重要  
な点である。この点について、今日まで種々の改良がな  
されてきたが、今後、更に検討すべき点も多い。

今までの研究の中で、原木栽培においては、特に水分  
及び温度が重要であることを、岸本<sup>9)</sup>あるいは新井<sup>1)</sup>が指  
摘している。また、近年、稲葉<sup>5)</sup>によるサルファイトパル

ブ廃液中のリグノスルホン酸を利用した食用キノコ菌糸  
の生育促進についての研究及び清水<sup>8)</sup>による米ぬか抽出  
成分を用いてのシイタケ菌生育促進に関する研究にみら  
れるように、化学薬品若しくは各種抽出成分を利用して、  
食用菌の生育を促進しようとする研究が行われている。  
この他、自然条件での菌糸の生育促進に各種菌類の助長  
作用が関与していることが報告されている。例えば、  
Levy<sup>7)</sup>は細菌類が軟腐朽菌及び担子菌の生育を促進す  
ることを明らかにしている。しかしながら、食用菌に関  
するこの種の研究はほとんどなく、シイタケ菌を用いた

\* 本報告は第34回日本木材学会大会(1984年,名古屋)において発表した。

\*\* 鳥取大学農学部林学科木材工学及林産化学研究室

Department of Forestry, Faculty of Agriculture, Tottori University

研究は、なされていない。

そこで本研究では、シイタケ菌の生育に対する細菌類の助長作用を利用した生育促進について検討した。特にシイタケ菌と細菌類との複合培養における菌糸の生育状態並びに木材抽出成分の影響などを検討した。

### 材料及び方法

#### 1. 供試菌及び供試材

シイタケ菌 (*Lentinus edodes* (BERK.) SING.) は菌興514号菌より分離し、J I S 寒天培地にて25℃で10日間平面培養したものを用いた。細菌類は、ブナを主体とした落葉広葉樹林中に放置したブナ辺材木片中より採取した *Bacillus* 属及び *Alcaligenas* 属の2種を使用した。

供試材は、鳥取大学蒜山演習林産のコナラ (*Quercus serrata* THUNB.) を用いた。

#### 2. 実験

##### 2.1 ブロック試験

供試材辺材部から10(R)×10(T)×20(L)mmのブロックを採取した。各ブロックは、全乾重量を測定後、オートクレーブ殺菌を行い、細菌懸濁液10ml中に浸漬し、23℃の恒温器中で4週間予備培養した。培養終了後、風乾し次にJ I S-A9302に準じてシイタケ菌で培養した。1, 2, 4, 6, 8週間培養したブロックの全乾重量を測定し、重量減少率を求めた。

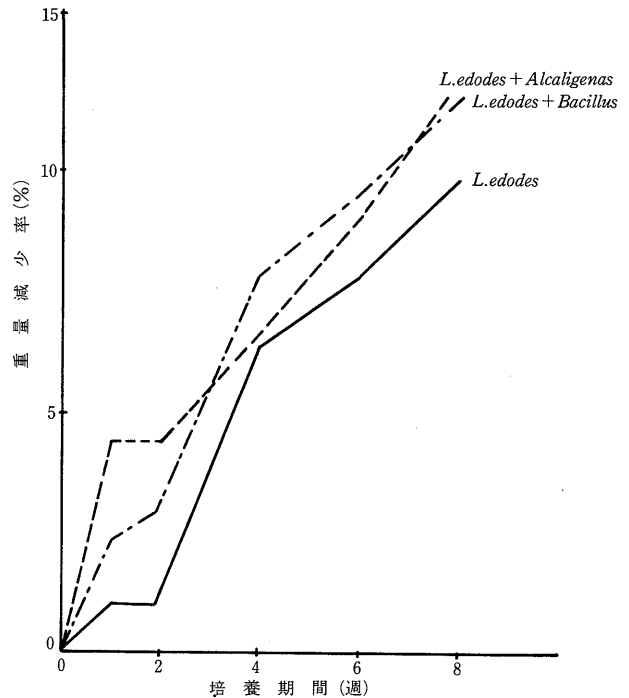
##### 2.2 木粉試験

供試材の辺材部から40~60meshの木粉を採取した。全乾木粉4.0gを中型試験管にとり、これに細菌懸濁液を4ml加えて含水率100%に調整した。あらかじめ平面培養しておいたシイタケ菌を直径10mmのコルクボーラーで打ち抜き、その一片を木粉上に接種した。25℃で1, 2, 3, 4週間培養後、試験管上層部のコロニーを取り除き、105℃で全乾した。その木粉を木材分析法に従いアルカリ(1% NaOH)抽出、エタノール・ベンゼン(1:2)抽出、温水抽出を行った。また、それぞれの抽出物のUV及びIR吸収スペクトルを測定した。なお、IR吸収スペクトルの測定は、KBr錠剤法を用い、日立295型赤外分光光度計で行った。また、アルカリ抽出物は、1N酢酸で中和した後、エタノール・ベンゼン及び温水抽出物は、50℃で真空乾燥後、エタノールと蒸留水に再溶解し、日立181型分光光度計を用い、UV吸収スペクトルを測定した。

### 結 果

#### 1. ブロック試験

第1図に示すように、複合培養したものは、シイタケ菌単独のものより高い重量減少率を示した。特に1~4週間目までの初期において顕著にその傾向が見られた。



第1図 重量減少率に及ぼす複合培養の影響

例えば、培養1週間目において、*Alcaligenas* 菌との複合培養では、シイタケ菌単独に比べ約4倍の重量減少率を示した。また、菌糸が、ブロックを被覆する速さも複合培養の方が速く、培養1週間目で全体を被覆していた。このように、シイタケ菌糸の生育促進に対して、細菌類による前処理が有効であることが明らかになった。

#### 2. 木粉試験

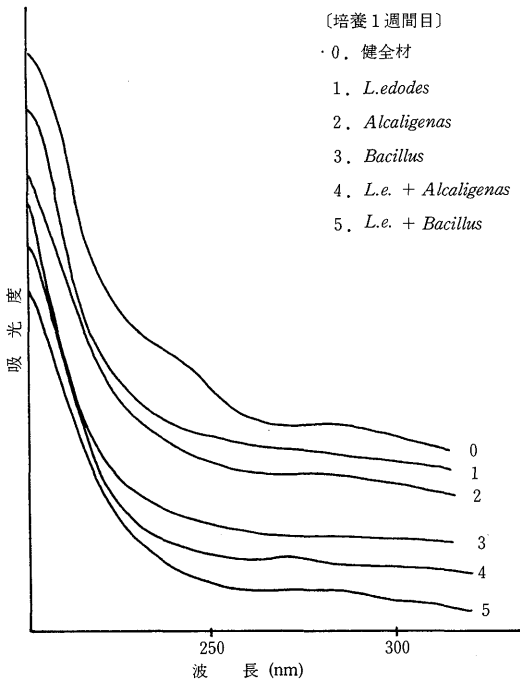
##### 2.1 アルカリ抽出物

それぞれの菌培地におけるアルカリ抽出物量の変化を第1表に示す。コナラ健全材木粉では、19.5%であったが、シイタケ菌単独及び細菌類と複合培養させたものは、4週間目で30%近くまで増加した。しかし細菌類単独のものは、ほとんど変化せず、腐朽の進行は認められなかった。培養初期においては、重量減少率でも認められたように、細菌類との複合培養による生育促進効果が認められ、培養1週間目の抽出物量は、複合培養の場合、シイタケ菌単独に対して約20%増加した。

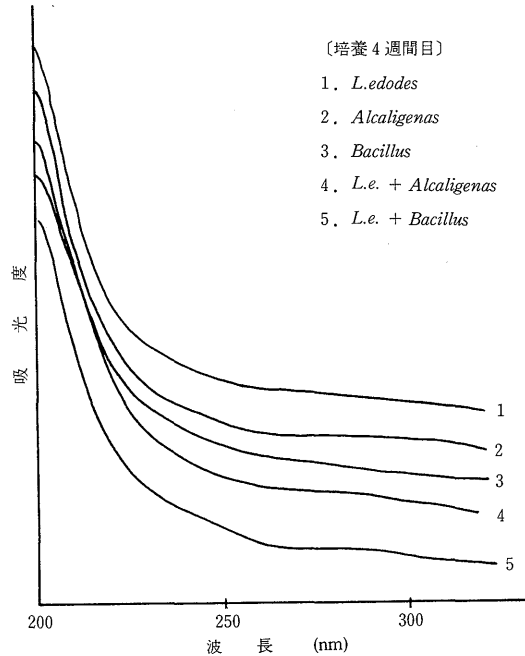
第1表 アルカリ抽出物量の変化 (重量%)

培養期間 (週)	1	2	3	4
<i>Lentinus edodes</i>	20.1	21.6	28.8	30.0
<i>Alcaligenas</i>	23.4	19.0	24.0	21.3
<i>Bacillus</i>	22.9	22.3	26.0	20.8
<i>L.edodes</i> + <i>Alcaligenas</i>	24.5	27.2	25.6	29.9
<i>L.edodes</i> + <i>Bacillus</i>	24.0	22.8	26.2	29.0
健全材	19.5%			

健全材及び1週間目の菌培地からのアルカリ抽出物のUV吸収スペクトルを第2図に示す。各培地の吸収スペクトルでは、健全材で認められる230nm付近及び270nm付近の弱い吸収がほとんど認められなかった。これは、前述の抽出物量で認められた、1週間目の菌培地における増加を表わしていると考えられる。しかし、各培地間で、UV吸収スペクトルの差は少なく、一様に、ゆるやかな曲線を描いていた。この傾向は、4週間目のUV吸収スペクトル(第3図)においても同じで、各培地間の差は、表われておらず、よりゆるやかな曲線となった。これは、糖のようなアルカリによって抽出される成分に対して、シイタケ菌及び細菌類とも同じ分解を行っているためと考えられる。



第2図 アルカリ抽出物のUV吸収スペクトル



第3図 アルカリ抽出物のUV吸収スペクトル

## 2.2 エタノール・ベンゼン抽出物

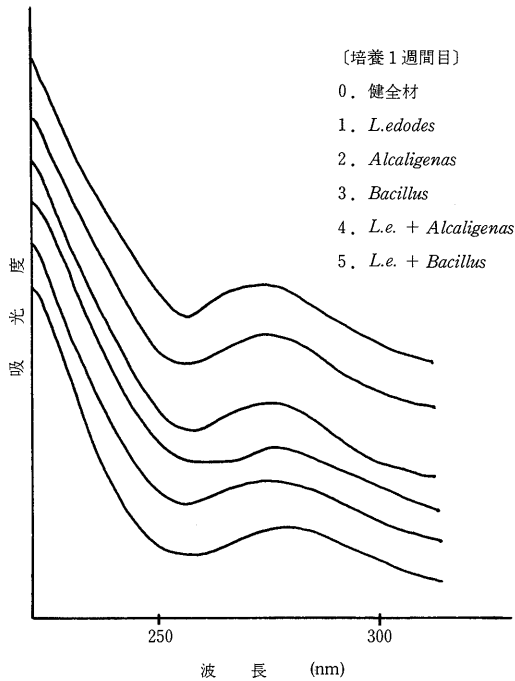
4週間目までの抽出物量変化を第2表に示す。抽出物量は、細菌類単独の場合に比較的多く、シイタケ菌では少なかった。複合培養の場合、1週間目には、抽出物量が最も少なかったが、4週間目には最も多くなった。このことから、前述の重量減少やアルカリ抽出物量のように培養初期の顕著な変化は、認められなかったが、比較的ゆるやかな助長作用があるものと思われる。

第2表 エタノール・ベンゼン抽出物量の変化 (重量%)

培養期間 (週)	1	2	3	4
<i>Lentinus edodes</i>	4.1	1.0	1.5	1.0
<i>Alcaligenas</i>	4.0	1.5	2.0	3.0
<i>Bacillus</i>	6.0	4.0	3.2	5.2
<i>L.edodes</i> + <i>Alcaligenas</i>	3.1	1.6	3.2	5.2
<i>L.edodes</i> + <i>Bacillus</i>	3.0	4.0	4.5	5.1
健全材	1.5%			

第4図に示す1週間目のUV吸収スペクトルにおいてシイタケ菌と複合培養にみられる、255nmに極小値、275nmに極大値という吸収のパターンは、健全材のパターンと同じであった。しかし、細菌類は、275nmの吸収が

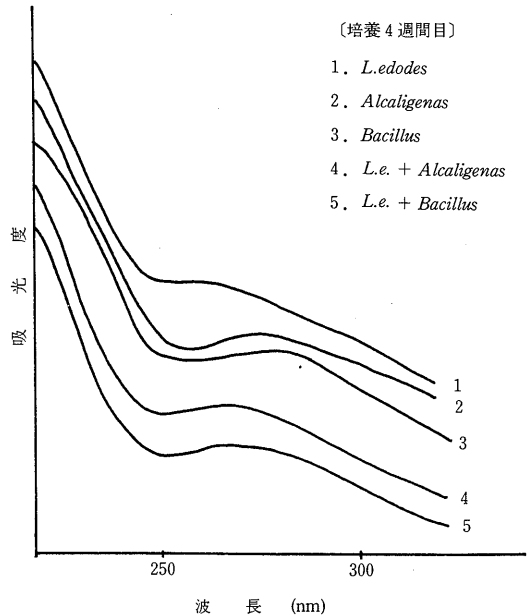
減少しており、これが、初期における細菌類の抽出物量増加を表わしているものと考えられる。



第4図 エタノール・ベンゼン抽出物のIR吸収スペクトル

4週間目のUV吸収スペクトル(第5図)において、細菌類を除く各培地は、1週間目 비해275nmの吸収が減少していた。特に、シイタケ菌の場合、顕著にその傾向が見られ、前述の抽出物量における、シイタケ菌の1週間目から4週間目までの大きな変化と一致していると考えられる。一方、細菌類は、あまり変化せず、1週間目と似た曲線を描いていた。複合培養の場合にも、275nmの吸収が減少していたが、その変化量は、シイタケ菌の場合より少なかった。これは、細菌類がシイタケ菌生育に参与していることを表わしているものと考えられる。

次に、脂肪族化合物及びグリグニンに起因するC=C結合の分解について抽出物のIR吸収スペクトルによって検討を行なった。ここでは、C=O基に基づく $1,720\text{cm}^{-1}$ 、及びC=C基に帰属する $1,600\text{cm}^{-1}$ 、 $1,520\text{cm}^{-1}$ の吸収の変化について比較検討した。1週間目のIR吸収スペクトル(第6図)において、シイタケ菌、*Bacillus*属及び複合培養では、健全材と比べ $1,600\text{cm}^{-1}$ 、 $1,520\text{cm}^{-1}$ の吸収が減少していた。しかし*Alcaligenas*属では、 $1,720\text{cm}^{-1}$ の吸収が減少しており、分解作用が異っているものと考え



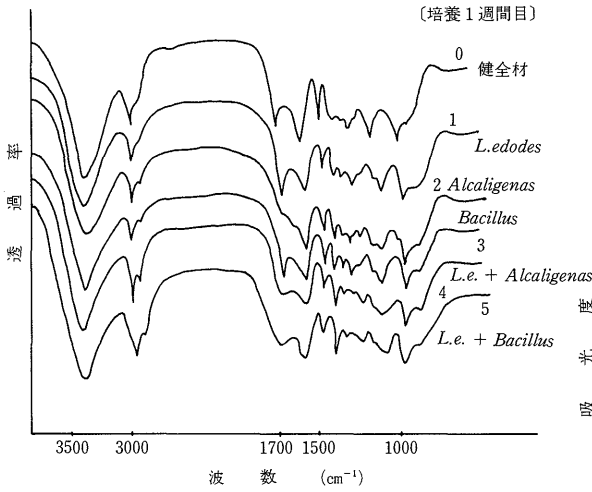
第5図 エタノール・ベンゼン抽出物のIR吸収スペクトル

られる。

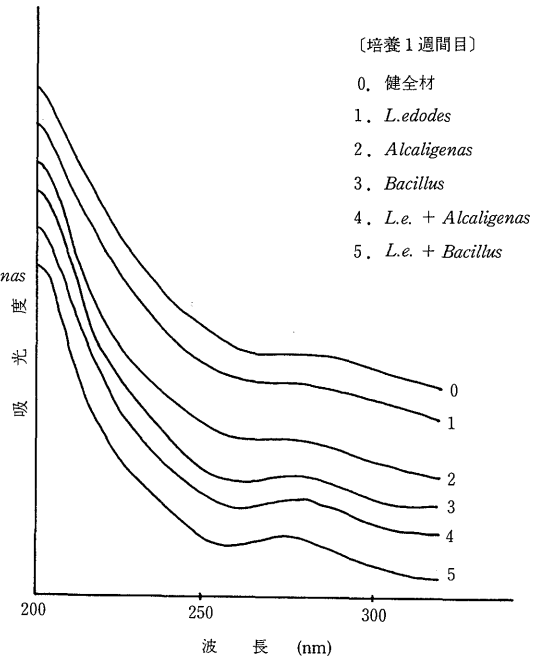
培養4週間目のIR吸収スペクトル(第7図)においては、シイタケ菌の場合、 $1,600\text{cm}^{-1}$ の吸収が消失しているが、複合培養においては、この吸収が認められた。これは、UV吸収スペクトルで認められたように、細菌類が作用しているために変化したものと考えられ、シイタケ菌と細菌類との中間の値を示していた。このことよりシイタケ菌は、エタノール・ベンゼン抽出物中のC=C基に基づく脂肪族化合物及びグリグニンを分解しており、細菌類がC=C基を含む化合物を生産するため、複合培養が有効であると考えられる。

### 2.3 温水抽出物

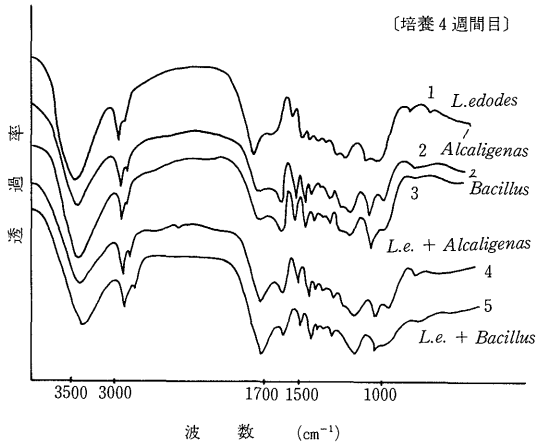
培養1週間目の温水抽出物のUV吸収スペクトルを、第8図に示す。健全材木粉からの抽出物は、260~270nmに極小値、280nm付近に極大値的な吸収を持つ曲線である。シイタケ菌は、280nm付近の弱い吸収が減少しゆるやかな曲線を描いている。これに対し、細菌類単独および複合培養とも280~285nm付近が明瞭になった。これは、タンニン類と思われる二重結合を持つフェノール成分を細菌類が生成しているためであると考えられる。4週間目(第9図)になると、シイタケ菌及び細菌類は、培養1週間目とほぼ同じ傾向を示すが、複合培養地においては、シイタケ菌に似た曲線を描いている。これは、



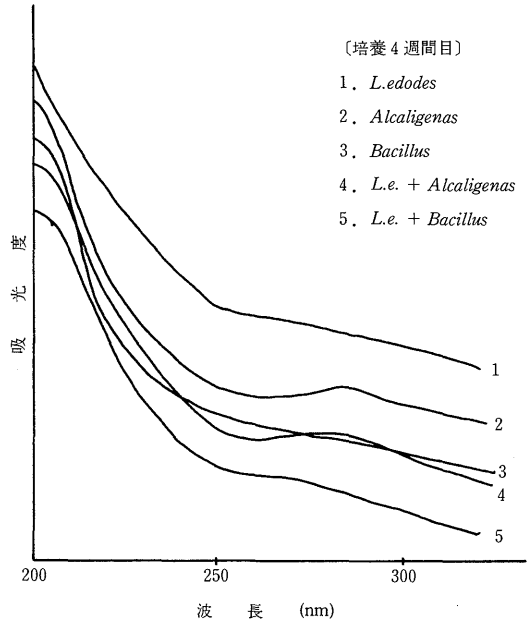
第6図 エタノール・ベンゼン抽出物のIR吸収スペクトル



第8図 温水抽出物のUV吸収スペクトル



第7図 エタノール・ベンゼン抽出物のIR吸収スペクトル



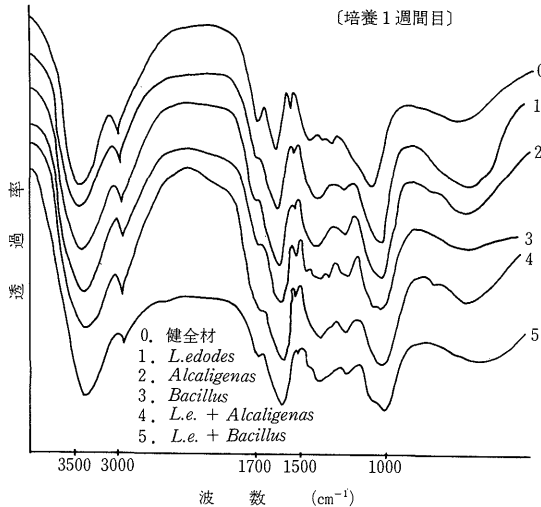
第9図 温水抽出物のUV吸収スペクトル

初期に細菌類が生成したC=C結合に対してシイタケ菌が活発に働いて分解しているため、曲線の傾向が近似してきたものと考えられる。

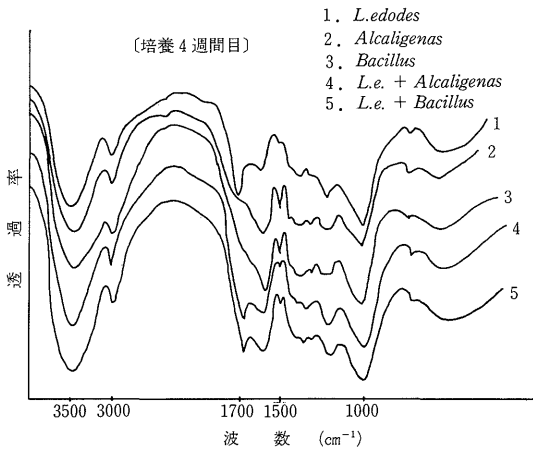
ここで更に、水溶性フェノール類の分解についてIRを用いて検討を行った。ここでは、エタノール・ベンゼン抽出物と同様に $1,720\text{cm}^{-1}$ 、 $1,600\text{cm}^{-1}$ 、及び $1,520\text{cm}^{-1}$ について比較検討した。培養1週間目では、各培地の差は大差なく(第10図)、4週間目(第11図)において顕著な差が見られるようになった。シイタケ菌は、 $1,600\text{cm}^{-1}$ 、 $1,520\text{cm}^{-1}$ の吸収がほとんど認められなくなり、細菌類

は、 $1,720\text{cm}^{-1}$ の吸収の消失が認められた。複合培養では、

シイタケ菌と細菌類の中間を示し、 $1,720\text{cm}^{-1}$ 及び $1,600\text{cm}^{-1}$ の吸収は、ほぼ同じ割合で認められた。細菌類は、エタノール・ベンゼン抽出物と同様に温水抽出成分を分解し、シイタケ菌の生育を促進すると考えられる。



第10図 温水抽出物のIR吸収スペクトル



第11図 温水抽出物のIR吸収スペクトル

## 考 察

ブロック生育試験において、シイタケ菌の生育は、細菌類によって促進されるとの結果が得られた。これについては、主として 1)シイタケ菌糸が細菌類を窒素源として利用する、2)木材組織に対して細菌類が有効に作用する、3)木材抽出成分に対して細菌類が有効に働く、など

の点が考えられる。すなわち木材中の炭素と窒素との比は、一般に350対1程度と窒素が少なく、担子菌の生育には適しているとはいえない。これに対して複合培養の場合は、1)の要因に関して寒天培地上で比較すると、シイタケ菌は、細菌類を栄養源として利用しにくいという結果を得た。したがって 2)と 3)の要因により、シイタケ菌の生育は、促進されるものではないかと考えられる。

結果の項で述べたように、アルカリ抽出される糖については、性質は同じであるが、その量が増加していると考えられる。Fengel<sup>3)</sup>は細菌類によりセルロース鎖が還元されるため腐朽材のアルカリ抽出物は増加すると述べているが、本研究ではそのような結果は認められなかった。

エタノール・ベンゼン抽出物では、アルカリ抽出物のように、初期に複合培養の効果が認められず、ゆっくりとした影響が見られた。また、細菌類はシイタケ菌が活発に分解していると考えられるC=C基を含む物質を生産しており、これにより、複合培養は、促進作用を受けると推察できる。

温水抽出物について検討した結果、水溶性フェノール類をシイタケ菌は、優先的に分解していると考えられ、細菌類は、その手助けをしていると考えられる。

Dechamps<sup>2)</sup>は、細菌類によりタンニンが分解されることを報告しているが、その中に、*Bacillus*属の細菌も含まれており、本実験においても同様の結果が得られるものと考えられる。

細菌類は、リグニンなど木材の主成分及びタンニンなどの抽出成分をわずかながら分解している。そして、シイタケ菌は、これらの細菌類によって変化した物質を有効に利用し、生育を促進しているものと考えられる。

本報では、シイタケ菌と細菌類を複合培養した際の促進効果について抽出成分を中心に検討してきたが、この他、木材組織構造上の変化について検討することも必要であると考えられる。すなわち、シイタケ菌糸は、木材の細胞内こうにまん延し、更に壁孔部分を優先的に貫通して隣接する細胞へと侵入していくことが明らかにされている<sup>4)</sup>。一般に細菌類は、担子菌の木材細胞壁への貫通を容易にする作用があることが知られている。したがって、この細菌の作用によって、シイタケ菌糸の伸長、まん延が助長されることが十分考えられる。そのためこのような観点からも研究を行う必要があり、これらの点を明らかにすることにより更に詳細な知見を得ることができると思われる。

## 文 献

- 1) 新井守義：きのこ，**8** (3) 44-48 (1976)
- 2) Dechamps A. M. : *Eur. J. For. Path.* **12** 252-257 (1982)
- 3) Fengel. D., Grayter D. : *Wood Chemistry Ultra-structure Reactions*. Walter de Gruyter, Berlin (1984) pp. 399-401
- 4) 林原 稔：広葉樹研究, No.2. 143-152 (1983)
- 5) 稲葉和功：木材学会誌, **30** 251-257 (1984)
- 6) 岸本 潤：木材工業, **34** 240-244 (1979)
- 7) Levy J. F. : *BWPA News*, (1974)
- 8) 清水 豊：木材学会誌, **27** 54-58 (1981)