

スギ材でのシイタケ栽培

— フェノールオキシダーゼ活性と菌糸の成長 —

宮崎大学農学部 日黒 貞利・河内 進策

1. はじめに

エノキタケやヒラタケの菌床栽培ではスギ木粉が用いられるが、シイタケはスギ原木同様、木粉培地においても栽培が極めて難しいことが知られている¹⁾。この原因の一つとして、スギ心材抽出成分に含まれるフェルギノールによるシイタケ菌糸成長阻害があげられる²⁾。スギ材でのシイタケ栽培を可能にするためには、フェルギノールに耐性を示すシイタケ菌を選抜することが必要となるが、選抜するための適当なスクリーニングの方法がまだ確立されていない。

我々は、チモールがフェルギノールとほぼ同様のシイタケ菌糸成長阻害効果を示すことを明らかにし、さらにその阻害効果が、シイタケに比較して、エノキタケやヒラタケで著しく小さいのは、これらの菌が高活性のフェノールオキシダーゼを産生し、阻害物質を急速に酸化無毒化しているためと推定した。

そこで本研究では、フェノールオキシダーゼ活性とチモールを含む培地での菌糸成長との関連について検討し、シイタケ菌の示すバーベンダム反応を利用したスクリーニング方法を見出そうとした。

2. 実験材料と方法

(1) 供試菌

当研究室保有のシイタケ (*Lentinus edodes*) 保存菌株の内から高温性菌 12 種類を選び用いた。

(2) チモールによるシイタケ菌糸の成長阻害

チモールを 0.2mmol/l になるように添加したポテト・グルコース・寒天培地の中央にシイタケ菌を接種し 25℃、暗黒下で培養した。培養 7 日後に、コロニーの直径を計測し、チモールを含まない培地での菌糸成長との比から阻害率を求めた。

(3) バーベンダム反応

バーベンダム反応の基質として、表-1 に示す 5 種類の化合物を用いた。没食子酸および α -ナフトールは

0.1%、グアイアコール、*p*-フェニレンジアミン及び 3, 4-ジヒドロキシフェニールアラニン (DOPA) は 0.01% となるようにそれぞれ添加した。

100ml 容三角フラスコに入れたポテト・グルコース液体培地 5ml を滅菌後、基質をエタノール溶液として添加した。シイタケ菌を接種後、25℃暗黒下で培養した。培養 24 時間後に菌体をろ過し、得られたろ液の着色 (吸光度) を分光光度計で測定した。

3. 結果と考察

(1) チモールによるシイタケ菌糸成長阻害

今回検討した 12 種類のシイタケ菌株のチモールによる阻害率を図-1 に示す。ここでは、チモールによる菌糸成長阻害の小さい菌株から順番に並べ、その順に 1~12 番までの菌株番号を付した。すなわち、菌株番号 1 番の菌株は、チモールによる菌糸成長阻害が最も小さく、阻害率は 38.6% であった。一方、12 番は阻害の最も大きい菌株で、67.4% と 1 番の菌株の約 2 倍の阻害率を示した。残り 10 種の菌株は 1 番と 12 番の間の阻害率を示すが、1 番から 6 番 (阻害率 45.4%) までの菌株をチモール阻害が比較的小さいグループ、8 番 (阻害率 55.6%) から 12 番までの菌株をチモール阻害が比較的大きいグループ、7 番 (阻害率 48.4%) の菌株をその中間と、一応分類した。

(2) バーベンダム反応

表-1 に示す 5 種類の化合物を添加した PG 液体培地でシイタケ菌を培養すると、培養液は没食子酸の場合には茶褐色に、グアイアコールの場合には赤色に、 α -ナフトール、*p*-フェニレンジアミンおよび DOPA の場合には葉から赤葉にそれぞれ着色する。

一例として、*p*-フェニレンジアミンを基質として用いた際のバーベンダム反応の結果を図-2 に示す。図から明らかなように、2 番の菌株の着色が、他の菌株に比較して著しいことが分る。この菌株は没食子酸、グアイアコールや DOPA を基質とした際にも、その着色は

著しく、シイタケ菌を接種後数時間で明らかな着色が認められた。このことから、菌株番号2番のシイタケのフェノールオキシダーゼ活性が他の菌株よりかなり高いことが分った。5番の菌株は2番と比較すると相当低いものの、残りの菌株中では着色が著しく、次いで3, 6, 1番の順に濃色であった。一方、11番の菌株はわずかに着色する程度で、7番、10番の着色も小さかった。残りの菌株間の吸光度の差は余りなく、肉眼での判別は難しかった。

(3) パーベンダム反応とチモールによるシイタケ菌糸成長阻害との関係

パーベンダム反応とチモールによるシイタケ菌糸成長阻害との関係を表-1にまとめた。ここでは、5種類の基質のそれぞれについて、最も濃色を示す菌株から着色の度合い(吸光度)によって順次菌株をならべた。すなわち、一番左に位置する菌株が最も濃く着色し、一番右に位置する菌株の着色が最も低いことを意味する。

先に述べたチモール阻害の比較的小さい菌株グループと対応させると、没食子酸を基質とした場合には、阻害の小さい2番、1番の着色が著しいことがわかる。次に濃色を呈する11番、8番はいずれもチモールによる阻害が比較的大きいグループに属する菌株である。その次の4番は阻害の小さいグループに、10番は大きいグループにそれぞれ属する。この結果、チモールによる阻害の比較的小さい6菌株のうち、没食子酸のパーベンダム反応の着色度によって検出される菌株は3個とな

る。同様にグアイアコールの場合には、2, 3, 6及び4番の4個を、 α -ナフトールの場合には、3, 5, 2番の3個を、またDOPAの場合には、2と1番の2個をそれぞれ検出できる。P-フェニレンジアミンは最も検出個数が多く、阻害率が低い6菌株のうち、2, 5, 6, 3と1番の5菌株を検出可能なことが明らかとなった。チモールによる阻害が、中間及び比較的大きいグループについても同様の検討を行い、それぞれのグループに対応する菌株の個数を数え、検出率及び見逃し率を求めた。

その結果を表-2に示す。今回用いた12菌株について、パーベンダム反応を用いて、そのチモールによる阻害を判定可能な割合、すなわち検出率は没食子酸の場合33%, グアイアコールの場合50%, α -ナフトールの場合33%, P-フェニレンジアミンの場合75%, DOPAの場合25%であった。

以上の結果、今回用いた5種類の基質の中では、ラツカーゼ活性の検出試薬であるP-フェニレンジアミンを用いた場合の検出率が最も高かった。チモール阻害の最も大きい12番の菌株を阻害が比較的小さい菌株として判定してしまう危険はあるが(表-1)、スギ材で栽培可能なシイタケ菌株を見つけるための一次スクリーニングの方法としては使用可能と思われる。

引用文献

- (1) 中島 健ほか: 木材学会誌, 26, 698~702, 1980

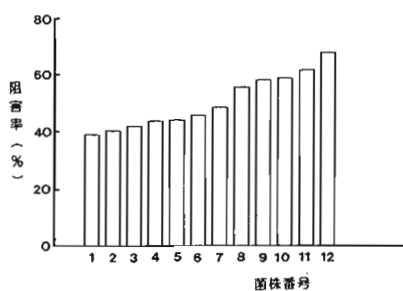


図-1 チモールによるシイタケ菌糸の成長阻害

表-1 チモールによるシイタケ菌糸の成長阻害とパーベンダム反応による着色

チモールによる阻害 菌株番号	阻害率の順												
	小	←	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	大
	[1	2	3	4	5	6]	7	[8	9	10	11	12]	
	阻害の小さいグループ						大きいグループ						
パーベンダム反応	吸光度の順												
	濃色	←	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	淡色
没食子酸 菌株番号	[2	1	11	8	4	10]	12	[3	6	9	5	7]	
グアイアコール 菌株番号	[2	3	9	6	4	10]	11	[8	12	5	1	7]	
α -ナフトール 菌株番号	[9	3	10	5	2	8]	12	[4	7	11	1	6]	
P-フェニレンジアミン 菌株番号	[2	5	6	3	1	12]	4	[8	9	10	7	11]	
DOPA 菌株番号	[2	9	1	10	8	11]	5	[12	4	6	7	3]	

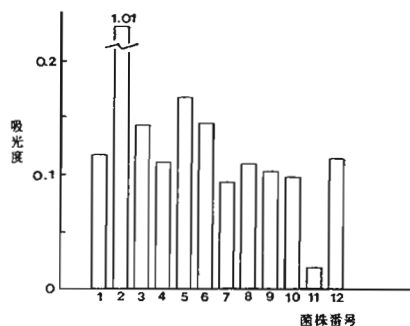


図-2 パーベンダム反応 (P-フェニレンジアミン)

表-2 パーベンダム反応によるスクリーニング

基質	検出数	見逃し数	検出率(%)
没食子酸	4	8	33.3
グアイアコール	6	6	50.0
α -ナフトール	4	8	33.3
P-フェニレンジアミン	9	3	75.0
DOPA	3	9	25.0