

## 食用キノコ廃培地の活用法に関する研究 (第1報) 栽培キノコ菌糸体の簡易活性測定 によるリグニン分解酵素群の検索

飯田 親\*・西井孝文\*\*・伊藤進一郎・久松 眞

三重大学生物資源学部, \*現所属, 京都府立大学大学院農学研究科

\*\*三重県科学技術振興センター林業研究部

### Study on Application of Cultures Used for Cultivation of Edible Mushrooms (1) Test of Enzymes Digesting Lignin in Mycelia of Cultivated Edible Mushrooms by Using a Simple Method

Chikashi IIDA\*・Takahumi NISHII\*\*・Shinichiro ITO・Makoto HISAMATSU

Faculty of Bioresources, Mie University

\*Presently, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University

\*\*Mie Prefectural Science and Technology Promotion Center

#### Abstract

Many edible mushrooms have been cultivated by using bottles and commercialized in markets, while lots of mycelia which did not convert to mushrooms have been thrown away as industrial waste. If it could be confirmed that these cultivated mycelia produce effective enzymes (lignin per-oxidase, manganese per-oxidase, and laccase) capable of degrading lignin as well as wild ones, it is possible to apply these mycelia to bioremediation to reduce environmental pollution. So, mycelia isolated from six edible mushrooms purchased were tested for their enzyme activities by using the Bavendamm reaction and it was found that all mycelia tested showed notable enzyme activities, suggesting applicability for bioremediation.

**Key words:** Edible mushrooms・Used Medium・Bavendamm reaction・Lignin degrading enzyme

#### 1. 緒 言

現在日本では、人工栽培の技術が進歩して多種のキノコが大量に市場に流通している。その理由として昨今の健康食ブームや自然食ブームが考えられる。キノコは低

カロリーで食物繊維が多く含まれていること、抗腫瘍効果及び抗コレステロール効果、さらには血圧上昇抑制効果などが知られるようになったこともあり、その生産量は年々増加の一途をたどっている。キノコ栽培ではオガクズを培養基材とし、米ぬか、トウモロコシぬか及びフ

平成13年8月1日受理

514-8507 三重県津市上浜町1515

\*606-0823 京都市左京区下鴨半木町1

\*\*515-2602 三重県一志郡白山町二本木3769-1



Fig. 1 Cultivation Process of Edible Mushroom and Unused Culture Grown by Mycelia.

スマなどを栄養剤として添加した培地及び菌床が用いられており<sup>1-3)</sup>、オガクズだけでも年間約 1,590,000m<sup>3</sup>が消費されている。しかしキノコ収穫後の廃培地及び廃菌床は一部は畑などへ堆肥としてすき込まれているが、大半が産業廃棄物として処理され、有効な利用方法がほとんど検討されていない (Fig. 1)。

キノコは、その栄養型式から腐生菌、菌根菌及び寄生菌に大別される。商業的に栽培されているキノコは腐生菌であり、この中で堆肥などの腐植質を栄養源として成長するキノコが狭義の腐生菌、木材を栄養源として成長するキノコが木材腐朽菌と区別される。木材腐朽菌は、セルロースやヘミセルロースの他にリグニンもよく分解できる白色腐朽菌、セルロースとヘミセルロースはよく分解するが、リグニンに対しては低分子化して可溶性とする程度の褐色腐朽菌、さらに高水分条件下で主として

セルロースとヘミセルロースを分解する軟腐朽菌に大別される。この中で、現在人工栽培されている大部分のキノコは白色腐朽菌に属している。

白色腐朽菌のリグニン分解に関与する主要酵素としては、リグニンペルオキシダーゼ (Lignin per-oxidase : 以下 Lip)、マンガンペルオキシダーゼ (Manganese per-oxidase : 以下 MnP) 及びラッカーゼ (Laccase : 以下 Lac) が知られている。

Lip は広い基質特異性を持っており、フェノール性化合物だけではなく非フェノール性化合物も酸化することができる。MnP は、直接的にはリグニン関連化合物を酸化しないが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の存在下で Mn<sup>+2</sup> を Mn<sup>+3</sup> に酸化し、Lac と同様に Mn<sup>+3</sup> がフェノール性のリグニン及びリグニン関連化合物を酸化できるが、非フェノール性化合物は酸化できない。Lac は、O<sub>2</sub> の存在下でリグニン関連

のフェノール性基質をフェノキシラジカルを形成して酸化分解する能力を有しているが、非フェノール性基質を酸化する能力はないとされている。

一方、ダイオキシンやビスフェノール A などの内分泌攪乱物質（環境ホルモン）、PCB、DDT などの農薬類、そして PCP などの防腐剤などの難分解性物質による環境汚染が地球の生態系に重大な悪影響を与えている。これらの物質の特徴は、天然には存在しない環構造を有したりフェノール性化合物を多数含む点が上げられる<sup>9)</sup>。

白色腐朽菌は植物の繊維質を分解する能力に優れている上に、近年農薬やダイオキシン類などの環境汚染物質の分解能力もあることが明らかにされ、野生株の白色腐朽菌を用いたバイオレメディエーション研究が盛んになってきた<sup>9)</sup>。これら汚染物質に汚染された土壌は、ほとんどの場合複合汚染であるが、白色腐朽菌はフェノール系と非フェノール系化合物の汚染物質を分解する能力を持っているため、このような複合汚染の分野に適していることが注目されている<sup>9)</sup>。さらに、食用とされている白色腐朽菌のキノコは本来野外に自生していたことから考えると、これらキノコの環境に対する安全性は非常に高い。

一般に、食用キノコは形質維持が難しいため商業的に長期安定栽培することは容易ではない。そのため、現在商業的に栽培されているキノコ類は人工培地での培養が容易で、しかも形質形態の安定性が持続されてきた菌株である<sup>5, 7)</sup>。そのために、野生株ではリグニン分解活性が高いとしても、栽培品種として人工栽培に選抜されていく過程で、本来有していた分解活性が欠落する可能性が考えられる。

本研究では、収穫後の食用キノコ廃培地の活用法を見いだす目的で、実際に栽培されているキノコの菌糸体を用い、簡易測定法の分析を通してリグニン分解酵素系の確認を行った。

## 2. 材料及び方法

### 1. 使用キノコ

市内小売店より購入したヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*)、シイタケ (*Lentinus edodes*)、ハタケシメジ (*Lyophyllum decastes*)、エリンギ (*Pleurotus eryngii*)、ブナシメジ (*Hypsizigus marmoreus*)、エノキタケ (*Flammulina velutipes*) (Fig. 2) から組織分離し、PDA 平板培地 (Nissui) 上

で 20°C で培養した後、PDA 斜面培地に移植し保存菌株として 4°C で保存した。

### 2. バーベンダム反応

バーベンダム反応用培地<sup>8, 9)</sup> (Table 1) に、反応用基質として濾過滅菌 (Milipore filter, 0.45 μm) した 0.5 M α-naphthol, 0.5 M 没食子酸, 及び 0.5 M Guaiacol (Table 2) を混合し平板培地を調製した。前培養として 6 種の保存菌株を PDA 平板培地に植菌し、シャーレに蔓延するまで培養 (20°C) を行った。その後、前培養した菌糸体をコルクボーラー (φ5 mm) で打ち抜き、反応用培地に植菌後 1 ヶ月間 20°C, 暗黒下で培養を行い、平板培地の着色状況を観察、色調と着色範囲を記録した。

### 3. 結果及び考察

反応に用いた 3 種類の基質に対して全てのキノコで着色し陽性を示したので (Fig. 3, Table 3), Phenoloxidase 活性が確認できた。しかし各基質に対する着色状態は、それぞれのキノコで異なっていた。この結果、検定した全てのキノコが白色腐朽菌であり、菌体外に Phenoloxidase を分泌していることが追認された。

**Table 1.** Composition of Medium for Bavendamm Reaction

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Glucose                         | 2%     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0.15%  |
| Polypeptone                     | 0.1%   |
| MgSO <sub>4</sub>               | 0.05%  |
| FeSO <sub>4</sub>               | 0.001% |
| Agar                            | 3%     |

Medium was adjusted to pH 6.0 with 1 M KOH.

**Table 2.** Concentration of Reagent Used and Property of Coloring on Bavendamm Reaction

| Reagents    | Concentrations                   | Property of coloring |
|-------------|----------------------------------|----------------------|
| α-Naphthol  | 0.5 mM dissolved in 0.5% ethanol | Purple               |
| Gallic acid | 0.5 mM                           | Dark green           |
| Guaiacol    | 0.5 mM                           | Brown                |

ハタケシメジの形状はホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*) と非常に似ているため、ホンシメジの腐性型であると見なされてきた<sup>10)</sup>。しかし菌根性であるホンシメジがマツやコナラなどの混交林に発生するのに対し、ハタケシメジは樹木のない道の法面や公園などにも発生する。さらに、土壤中の木材や古くなった樹木の根を栄養源としていること、傘の色がホンシメジよりも概して暗色で柄が多少褐色を帯びることなどから、本郷は別種としてホンシメジから分離した<sup>11)</sup>。

Kinuta et al.<sup>10)</sup> は、野外から採取したハタケシメジ 10 菌株を用いた木材腐朽能力に関する実験において、没食子酸、タンニン酸、 $\alpha$ -naphthol を基質としたときのパー

ベンダム反応は全て陽性であるが、比較したヒラタケよりも強い着色は認められなかったとしている。またブナ木片に対するハタケシメジの接種試験によって、木片の重量減少が確認できたためリグニン分解能力を持つ白色腐朽菌であるが、腐朽能力はヒラタケよりもかなり弱いと結論づけている。

本実験の結果からも Kinuta et al.<sup>10)</sup> と同様に  $\alpha$ -naphthol を基質とした試験を含む全ての試験区に着色が認められ、ハタケシメジが白色腐朽菌の性質を持つことが確認された。しかし各基質の着色強度に関してはヒラタケをはじめとした他のキノコと比較しても遜色はなく、他の木材腐朽菌と同程度の菌体外酵素が分泌されて

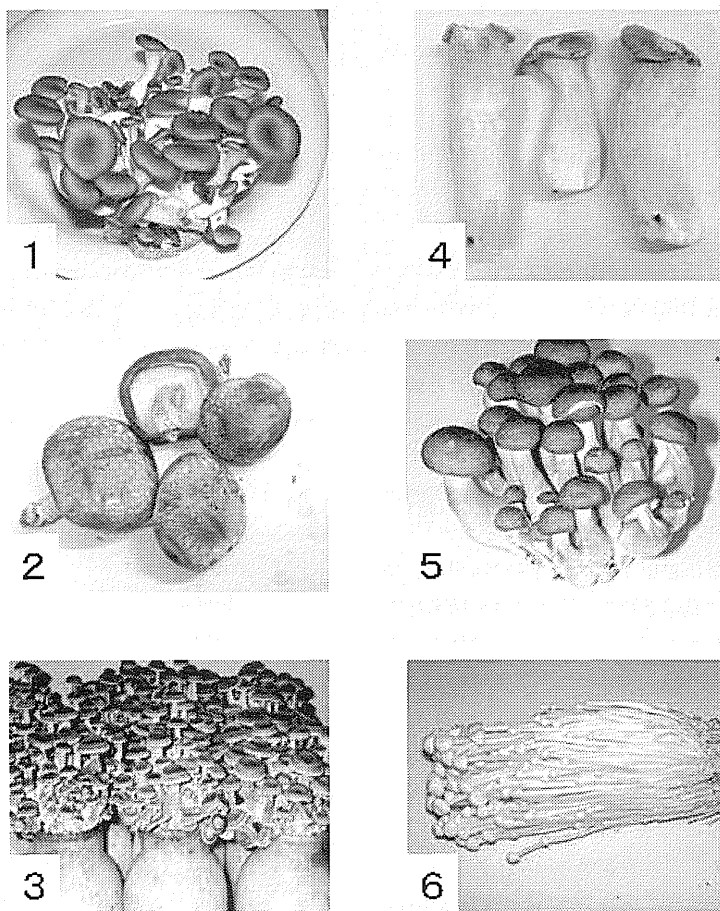


Fig. 2 Edible Mushrooms Experimented.

- 1: *Pleurotus ostreatus*, 2: *Lentinus edodes*, 3: *Lyophyllum decastes*,  
4: *Pleurotus eryngii*, 5: *Hypsizigus marmoreus*, 6: *Flammulina velutipes*

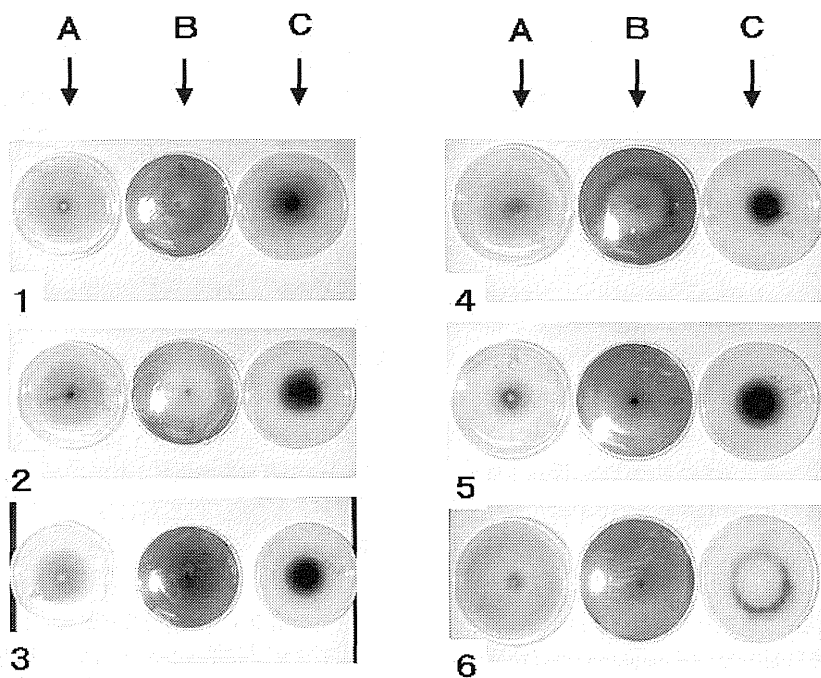


Fig. 3 Photograph of Bavendamm Reaction  
A:  $\alpha$ -Naphthol, B: Gallic acid, C: Guaiacol, 1-6: referred to Fig. 2

Table 3. Evaluation of Bavendamm Reaction on Media Supplied with Reagents

A) On day 11

| Fungal species              | Reagent            |             |          |
|-----------------------------|--------------------|-------------|----------|
|                             | $\alpha$ -Naphthol | Gallic acid | Guaiacol |
| <i>Pleurotus ostreatus</i>  | +                  | +           | ++       |
| <i>Lentinus edodes</i>      | +                  | +           | +        |
| <i>Lyophyllum decastes</i>  | ++                 | +           | +++      |
| <i>Pleurotus eryngii</i>    | +                  | +           | ++       |
| <i>Hypsizigus marmoreus</i> | ++                 | +           | +++      |
| <i>Flammulina velutipes</i> | +                  | ++          | +        |

B) On day 29

| Fungal species              | Reagent            |             |          |
|-----------------------------|--------------------|-------------|----------|
|                             | $\alpha$ -Naphthol | Gallic acid | Guaiacol |
| <i>Pleurotus ostreatus</i>  | +                  | +           | +        |
| <i>Lentinus edodes</i>      | +                  | ±           | ++       |
| <i>Lyophyllum decastes</i>  | +                  | ++          | +++      |
| <i>Pleurotus eryngii</i>    | +                  | +           | +        |
| <i>Hypsizigus marmoreus</i> | +                  | ++          | ++       |
| <i>Flammulina velutipes</i> | +                  | ++          | +        |

- : colorless ± : coloring or colorless + : coloring ++ : coloring deeply +++ : coloring strongly

いと推定でき、特に Guaiacol 添加区においてはブナシメジとならび最も発色が強かった。

本試験において Kinuta et al.<sup>10)</sup> と結果が異なったのは、供試菌株が野生型であるか栽培品種であるかの相違と考えられる。同様に、ハタケシメジでも菌株間でその特性に大きな差異が存在する可能性があり、栽培品種は菌体外酵素分泌能力において活性の高い菌株ではないかと考えられる。

次に野生キノコを栽培化するには色々な品種改良が行われる。育種目標としては、栽培期間の短縮化、1瓶あたりの収量の増加、キノコの色及び形の改良などである。特にこの中で、栽培期間の短縮は重要であるが、育種過程でハタケシメジに選択圧をかけた結果、菌体外酵素の分泌が活発な菌株が選抜され品種登録された可能性も考えられる。しかしながら、ハタケシメジの栽培菌株にも様々な種類があり、栽培法が異なる品種も存在<sup>3, 11)</sup> するため、この点に関してはさらに検討が必要である。

1ヶ月間の培養期間中で、 $\alpha$ -naphthol の試験区では11日目に全てのキノコに着色が認められたが、逆に29日目になると退色現象が観察された (Table 3)。退色の原因としては、着色を誘導する菌体外酵素の分泌が減少または停止により色素生成が止まる、または色素生成以上の速度で色素分解に関与する酵素が分泌された可能性、さらに生成色素の培地内での自己分解が考えらる。没食子酸添加区では、ヒラタケ、エリンギ及びシイタケで11日目から顕著な脱色が観察された (Fig. 3)。没食子酸添加区では、植菌直後から接種点を中心に暗緑色に着色していたが、その後脱色がはじまった。脱色により培地が透明となったことから、没食子酸とその酸化生成物が分解された可能性が示唆された。

Guaiacol による反応は、接種点を中心とした同心円状反応と中心部は反応がなく接種点から少し離れたところに円状に反応がでる2種のタイプに大別された。エノキタケ以外は全て前者であった。エノキタケは菌株によって反応が違うこと、その特性が後代に伝えられる傾向のあることが知られているが、菌体外酵素と着色強度との関係は本実験からは推測できなかった。

本研究では、パーベンダム反応を用いて Lac を中心とした Phenoloxidase の検定を試みたが、一般的な Phenol 性基質を用いたパーベンダム反応では、着色後に生じる脱色反応も知られている。この現象は、培地に

含有される Phenol 基質が菌体外 Phenoloxidase によって発色し、一定期間後に脱色されるものであるが、培地全体が同時に脱色されるのではなく、植菌部分から成長した菌糸体を追いかけるように培地が脱色される。そのためこの脱色には何らかの菌体外に放出されている成分、すなわち菌体外分解酵素が関連していると推定できる。一般的に、Phenoloxidase は菌糸体先端部で活発に分泌されているが、先端部ほどの活性はなくとも他の部位でも菌体外酵素を分泌している可能性があり、これらの酵素群が酸化された Phenol 性基質を分解し、脱色が発生すると推定できる。木材腐朽菌は、同じ基質を酸化することができる複数のリグニン分解酵素を分泌し、この中に Phenol 性基質を酸化するだけではなくリグニンと同様に分解するための酵素も含有し、酸化された Phenol 性基質の濃度によって分解酵素が誘導され色素分解が開始された可能性もある。

木材腐朽菌のリグニン分解酵素活性をパーベンダム反応を用いてスクリーニングする時は、短期間で培地の着色反応だけではなく、その後の脱色反応の有無及び脱色状態の観察を行うことが望ましい。以上のことから、試験した6種のキノコ菌糸体はいずれも顕著な反応が認められたため、これらのキノコの廃培地をフェノール系化合物である難分解性化合物を分解処理するのに利用できる可能性があるかと判断された。

## 要 約

培養瓶などで人工栽培された多種類のキノコ (子実体) が市場に出ているが、瓶中に蔓延した菌糸体は一部分がキノコに成長するだけで残りは産業廃棄物として処理される。これらのキノコの菌糸体は、リグニンを分解する酵素群 (リグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼ及びラッカーゼ) を野生株と同様に生産することが知られている。キノコ栽培に使用された残りの未利用部分の菌糸体中にリグニン関連化合物分解酵素群が分泌されていれば、環境汚染物質の分解への利用に応用できる。そこで、一般的な6種類の栽培キノコから菌糸体を調製し、パーベンダム反応でリグニン分解酵素活性レベルを検定した。その結果、試験したいずれの菌株も顕著な酵素活性を示し、生物修復に利用できる可能性を示唆した。

## 引用文献

- 1) 村尾澤夫, 荒井基夫. 応用微生物学 (改訂版) 培風館, p149-160 (1994)
- 2) 菅原龍幸. キノコの科学. 朝倉書店, p1-45 (1997)
- 3) 衣川堅二郎, 小川真編. キノコハンドブック, 朝倉書店, (2000)
- 4) 化学編集部編. 環境ホルモン&ダイオキシン, 化学同人, p 2-11 (1998)
- 5) BUMPUS, J. A., M. T. D. WRIGHY, and S. D. AUST. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus, *SCIENCE*, **22** : 1434-1436 (1985)
- 6) 化学編集部編. 環境ホルモン&ダイオキシン, 化学同人, p 150-153 (1998)
- 7) 菅原龍幸. キノコの科学, 朝倉書店, p28-33 (1997)
- 8) HIGUCHI, T. and K. KITAYAMA. Biochemical study of wood-rotting fungi (II) Relation between Bavendamm's reaction and tyrosinase. *J. Jpn. For. Soc.*, **35** : 350-354 (1953)
- 9) TAMAI, Y. and K. MIURA. Characterizations of the Strains of Basidiomycetes with Bavendamm's Reaction. ; *Mokuzai Gakkaishi*, **37** : 656-660 (1991)
- 10) KINUTA, M., T. FURUNO, A. TAKAHASHI and I. FUTUKAWA. Ecology and Decay of *Lyophyllum decastes*, *Mokuzai Gakkaishi*, **41** : 511-515 (1995)
- 11) 菅野 昭, 西井孝文編. 新特産シリーズ ハタケシメジ林内栽培・簡易施設栽培・空調栽培, 社団法人 農山漁村文化協会. p46 (2000)