

- 研究 -

食用菌菌系の生育に及ぼすトドマツ抽出物の影響

米山 彰造 富樫 巖
本間 千晶*1 青山 政和*2

Inhibitory Effects of Extracts of Todomatsu, Abies Sachalinensis Mast, on the Mycelial Growth of Edible Fungi

Shouzo YONEYAMA Iwao TOGASIII
Sensho HONMA Masakazu AOYAMA

Studies were made on inhibitory effects of extracts of Todomatsu wood on the mycelial growth of edible fungi. The growth was greatly inhibited when the hexane-soluble part of the extracts was added to the growth media. Similar effects were also recognized when the wood volatile oil was added to the media. These results indicate that antifungal substances exist in the lipophilic fraction of the extracts.

トドマツ抽出物の食用菌菌系生育阻害要因を検討した。

木粉のアルコール抽出物のヘキサン可溶部を平板培地に添加したところ、菌系生長が強く阻害された。同様なことが、材部揮発油を添加した場合にも観察された。

これらの結果から、阻害成分は脂溶性のフラクションに存在することが分かった。

1. はじめに

食用菌の菌床栽培が普及し、その培地原料としての木粉の需要が増大している。それにとまなない従来から使用されてきた広葉樹木粉の不足が深刻化している。

一方、北海道での森林資源をみると、トドマツやカラマツなど針葉樹の蓄積が多く、慣用資材の代替えとして期待されている。しかし、これらの針葉樹木粉をそのまま培地原料として用いると、広葉樹に比べて、菌系の生長速度が遅れたり、子実体の収量が減少したりすることが観察される。食用菌の大半を占める白色腐朽菌による木材の生分解過程を考えると、木材の主成分であるセルロース、ヘミセルロース、リグニンは

代謝される。したがって、この場合にみられる菌系生長速度の遅れや子実体の収量の減少は木粉に含有される抽出成分に起因すると思われる¹⁻⁶⁾

そこで、本研究では針葉樹材中に含有される食用菌生育阻害物質の性状を明らかにする目的で、北海道で最も蓄積の多いトドマツ(20%)を取り上げ、汎用性の高い16種類の食用菌の菌系生長に対する阻害性を検討した。

2. 実験方法

2.1 供試菌

下記の菌株をPDA平板上で培養し供試した。

シイタケ(*Lentinus edodes*(Berk.)Sing.)河村食菌 S54号

エノキタケ(*Flammulina velutipes*(Curt.:Fr.)Sing.)日本農林

ヒラタケ(*Pleurotus*(Jacq.:Fr.)Kummer)日本農林ひらたけ中生

ナメコ(*Pholiota nameko*(T.Ito)S.Ito et Imai in Imai)森14号

マイタケ(*Griifola frondosa*(Dicks.:Fr.)S.F.Gray)北研産業M-1

タモギタケ(*Pleurotus cornucopiae*(Paulet)Rolland var.*Citrinopileatus*(Sing.)OHIRA)北林産試分離76-5

2.2 供試木粉

当麻町の道有林で1986年5月に伐採した40年生のトドマツ(*Abies sachalinensis*Mast.)材から16~60meshの粒度の木粉を調製し供試した。

2.3 阻害成分の抽出および分析

トドマツ木粉を95%エタノールで約1か月常温抽出し、得られたアルコール抽出物をヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部、抽出残渣の3つのフラクションに分画し供試した⁷⁾。

これとは別に、冷凍保存しておいたトドマツの生材および樹皮、針葉をそれぞれ10時間水蒸気蒸留して精油を得た。得られた精油の部位による違いを定性、定量的に検討するために、下記の条件でガスクロマトグラフィー(GC)による分析をおこなった。

キャピラリーカラム: PEG20M, 0.35mm×50m

Heガス流量: 3ml/min

カラム温度: 60 から 190 まで 5 /minの速度で昇温

注入温度および検出温度: 250

検出器: FID

また、ヘキサン可溶部と材部精油について下記の条件で薄層クロマトグラフィー(TLC)による分析を行った。

展開溶媒: ヘキサン-酢酸エチル(85:15v/v)

発色剤: 0.5%過マンガン酸カリウム

2.4 生物検定

生物検定法として、川合らのペーパーディスクを用いる方法³⁾(以後ペーパーディスク法と呼ぶ)と、抽出成分を拡散させた寒天培地上で生育した菌糸の重量を測定し、定量的に生育を比較する方法(以後寒天培地拡散法と呼ぶ)の2つを用いた。なお菌糸の培養は25のふ卵器で行った。

2.4.1 ペーパーディスク法

第1表に示す半合成寒天培地を入れたシャーレの中央に食用菌を接種し、菌糸先端がシャーレの縁から2cm程度に達するまで培養する。この時点で、菌糸先端より5mmのところから抽出成分をしみこませた直径8mmのディスクを置き、数日間培養し、菌糸に対する影響を観察した。シャーレ1枚には抽出成分を注入したディスク2枚とコントロールディスク2枚を置き、1水準につき5枚のシャーレを用いた。

評価にあたっては、1水準10枚のディスク(抽出成分が注入されたもの)のうち、6枚以上の阻害が観察された区を+、1枚から5枚のディスクに阻害が観察された区を±、阻害がまったく観察されなかった区を-とした。

2.4.2 寒天培地拡散法

培地には第1表の半合成寒天培地を用いた。各抽出成分は、種々の濃度のエタノール溶液として加えた。溶液の添加量は、いずれの場合にも、培地に対して0.5%濃度となるようにした。コントロール培地には、エタノールのみを添加した。こうして調製した培地上に

第1表 半合成寒天培地の組成

組 成	17当たりの 添 加 量
でんぷん	20 g
ポリペプトン	1.5 g
粉末酵母エキス	3 g
寒 天	20 g
塩化カルシウム (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	0.5 g
硫酸マグネシウム (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.5 g
硫酸第一鉄 (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	2 mg
硫酸マンガン (MnSO ₄ ·6H ₂ O)	2 mg
硫酸亜鉛 (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	2 mg
硫 酸 銅 (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.04 mg
モリブデン酸ナトリウム (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	0.02 mg
リン酸緩衝液 (リン酸一カリウムとリン酸二カリウムを加えてPH 5に調整する)	100 ml

菌を接種し、コントロール培地上の菌糸先端がシャーレの縁から1 cm 程度に達するまで、全区分の菌糸を培養した。ついでこの菌糸を培地とともに熱水を加えて煮沸し、寒天を溶かしてろ過した。さらに熱水で洗浄後、105℃で16時間乾燥し、恒量に達するまで重量を測定した。そしてコントロール上の菌糸重量を100として各濃度での生育率を求めた。なお、1水準につき10枚のシャーレを用いた。

3. 結果および考察

3.1 アルコール抽出物の阻害性

アルコール抽出物の生物検定結果を第2表に示す。また、ペーパーディスク法によるシイタケ菌の検定結果を写真に示す。木粉に対するアルコール抽出物の収率が1.38%であることから、ペーパーディスク法で54 μg/disc、寒天培地拡散法で4,500ppmが、木粉中の抽出成分の濃度に相当する。

ペーパーディスク法では、木材中の濃度よりも低濃度の40 μg/discで、供試菌すべてに阻害性が観察された。一方、拡散法では木材中の濃度の1/4以下の1,000ppm

第2表 アルコール抽出物の生物検定結果

菌種	ペーパーディスク法					寒天培地 拡散法			
	抗 菌 性 生 育 率 (%)					濃 度 (ppm)			
	濃 度 (μg / disc)					100	300	500	1,000
シイタケ	±	+	+	+	+	83	48	45	44
エノキタケ	±	+	+	+	+	59	32	31	31
ヒラタケ	-	+	+	+	+	66	37	29	31
ナメコ	+	+	+	+	+	70	63	54	54
マイタケ	-	+	+	+	+	70	43	40	37
タモギタケ	-	±	+	+	+	46	28	27	29



抽出物による菌糸の阻害(上下のディスク)

でも、阻害が認められた。すなわち、生育率はナメコ菌糸の54%が最高で、他の菌種はすべてそれ以下であった。したがって、ペーパーディスク法および拡散法による生物検定結果から、アルコール抽出物中に明らかに阻害要因が存在していることが分かった。

3.2 アルコール抽出物の分画フラクション

の阻害性

アルコール抽出物をヘキサソおよび酢酸エチルにより分画した。木粉に対してヘキサソ可溶部が0.56%、酢酸エチル可溶部が0.48%、抽出残渣が0.34%の収率で得られた。

これらの分画フラクションのペーパーディスク法による生物検定結果を第3表に示す。なお、ヘキサソ可溶部は64 μg/disc、酢酸エチル可溶部は55 μg/disc、抽出残渣は39 μg/discが、それぞれ木材中の抽出成分の濃度に相当する。

ヘキサソ可溶部は木材中の濃度より低濃度の50 μg/discで、全供試菌に阻害性が観察された。酢酸エチル可溶部は木材中の濃度より低濃度の50 μg/discで、シイタケ、ヒラタケ、ナメコ菌に阻害性が観察されたが、エノキタケ、マイタケ、タモギタケ菌には阻害性は観

第3表 ペーパーディスク法によるアルコール抽出物の分画フラクションの生物検定結果

画分	菌種	濃 度 (μg/disc)					
		5	10	20	30	50	100
ヘキサソ可溶部	シイタケ	-	+	+	+	+	+
	エノキタケ	-	-	±	+	+	+
	ヒラタケ	±	±	+	+	+	+
	ナメコ	-	-	±	+	+	+
	マイタケ	-	-	±	+	+	+
酢酸エチル可溶部	シイタケ	-	-	-	-	±	+
	エノキタケ	-	-	-	-	-	-
	ヒラタケ	-	-	±	+	+	+
	ナメコ	-	-	-	-	±	+
	マイタケ	-	-	-	-	-	-
抽出残渣	シイタケ	-	-	-	-	-	-
	エノキタケ	-	-	-	-	-	-
	ヒラタケ	-	-	-	-	-	-
	ナメコ	-	-	-	-	-	-
	マイタケ	-	-	-	-	-	-
抽出残渣	タモギタケ	-	-	-	-	-	-

第4表 寒天培地拡散法によるアルコール抽出物の分画フラクションの生物検定結果

画 分	生 育						率 (%)		抽 出 残 渣	
	ヘキサン可溶部						酢酸エチル可溶部			
濃度 (ppm)	50	100	300	450	900	1,800	390	1,560	275	1,100
菌 種										
シイタケ	62	53	35	22	12	1	95	94	111	121
エノキタケ	-	-	-	44	30	19	88	82	109	121
ヒラタケ	-	-	-	53	38	33	123	113	107	116
ナメコ	-	-	-	34	23	16	70	77	89	83
マイタケ	61	51	25	16	6	4	82	115	109	134
タモギタケ	-	-	-	22	19	12	110	158	107	106

察されなかった。抽出残渣については木材中の濃度の2.5倍に相当する100 μ g/discでも、いずれの菌種とも阻害性は観察されなかった。このことから、3つのフラクションのうち、特にヘキサン可溶部に強い阻害性があることがわかる。

つぎに、分画フラクションの拡散法による生物検定結果を第4表に示す。供試濃度は、ヘキサン可溶部については木材中の濃度、その1/2, 1/4に相当する1,800, 900, 450ppmとし、酢酸エチル可溶部および抽出残渣については、それぞれ木材中の濃度、その1/4に相当する1,560と390、および1,100と275ppmとした。なお、ヘキサン可溶部については、シイタケ、マイタケについて、より低濃度の50, 100, 300ppmでも検定した。

ヘキサン可溶部では木材中の濃度に相当する1,800ppmで、シイタケ、マイタケ菌はほとんど生育せず、他のエノキタケ、ヒラタケ、ナメコ、タモギタケも生育率は低かった。酢酸エチル可溶部、抽出残渣については若干低い生育率を示す菌種(ナメコ)もみられたが、概して、顕著な阻害性を示さなかった。

これらのことから、寒天培地拡散法においても、ヘキサン可溶部に強い阻害性があると判断された。以上、2つの生物検定の結果から、アルコール可溶部に認められた阻害成分の大部分はヘキサン可溶部に存在していると思われる。

阻害成分がヘキサンのような非極性溶媒で抽出されるフラクションに存在することから、その本体はパラフィン類、高級脂肪酸とそのエステル類、テルペノイドなどであろう⁹⁾と推定した。実際、これまでのスキ⁹⁾、ヒノキ⁹⁾、ヒバ¹⁰⁾からテルペノイド系の食用菌阻害物質が

単離されている。そこで、つぎに著者らは、テルペノイド系の化合物を主成分とする精油について検討した。

3.3 精油の阻害性について

トドマツ生材を水蒸気蒸留し0.17%の収率で得た材部精油について、その阻害性の有無をペーパーディスク法および寒天培地拡散法で生物検定した。

ペーパーディスク法では、比較のために葉部および樹皮部の精油についても生物検定した。その結果を第5表に示す。材部精油については木材中の濃度に相当する20 μ g/discおよびそれ以下の15 μ g/discでも全供試菌に阻害性が観察された。しかし葉部および樹皮部の

第5表 ペーパーディスク法による精油の生物検定結果

部 位	菌 種	濃 度 (μ g/disc)			
		5	10	15	20
材	シイタケ	±	+	+	+
	エノキタケ	-	±	+	+
	ヒラタケ	-	+	+	+
	ナメコ	+	+	+	+
	マイタケ	-	-	±	±
樹皮	タモギタケ	-	+	+	+
	シイタケ	-	-	-	-
	エノキタケ	-	-	-	-
	ヒラタケ	-	-	-	-
	ナメコ	-	-	-	-
葉	マイタケ	-	-	-	-
	タモギタケ	-	-	-	-
	シイタケ	-	-	-	-
	エノキタケ	-	-	-	-
	ヒラタケ	-	-	-	-
葉	ナメコ	-	-	-	-
	マイタケ	-	-	-	-
	タモギタケ	-	-	-	-

精油には阻害性がまったく観察されなかった。

つぎに、寒天培地拡散法の結果を第1図に示す。供試濃度は、木材中の濃度、その1/2, 1/4にそれぞれ相当する560, 280, 140ppmとした。菌種による差異はあるものの、最も低濃度の140ppmで全供試菌が50%以下の生育率となった。このことから、アルコール抽出物のヘキサン可溶部と同様に、材部精油中にも阻害成分が存在することが明らかになった。

3.4 精油のガスクロマトグラフィー(GC)

精油のペーパーディスク法による生物検定から、材部と葉部および樹皮部では菌糸に与える影響がまったく違うことがわかったので、それぞれの精油の化学組成をGCで調べた。その結果を第2図に示す。

標品との比較から、葉部にみられる主要なピーク1~3はそれぞれ α -ピネン、 β -ピネン、 β -フェランドレン、樹皮部のピーク4はボルニリアセテートと判断された。大賀らの報告³⁾によると α -ピネンや β -ピネンを含むモノテルペン類には、シイタケ菌に対して100ppmの濃度でも強い阻害性は認められないとのことであるが、これはペーパーディスク法の結果とよく一致している。

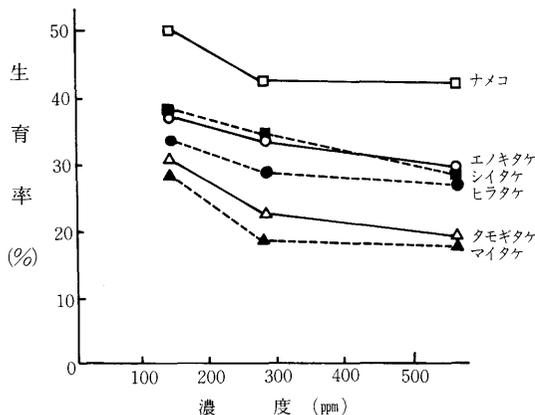
阻害性を示した材部精油では、モノテルペン類はほとんど認められず、より高沸点側に大きなピーク(No.5, 面積比70%)が存在していた。一方、阻害性を示さなかった葉部および樹皮部精油については逆に、モノテルペンが主成分であり、高沸点側にはピークはみとめ

られなかった。スギやヒノキに含まれる食用菌阻害物質がそれぞれフェノール性ジテルペンやセスキテルペンアルコールであることも考慮すると、ピーク5の化合物はより高沸点のセスキテルペンあるいはジテルペンでかつ、阻害に関与する可能性が示唆された。

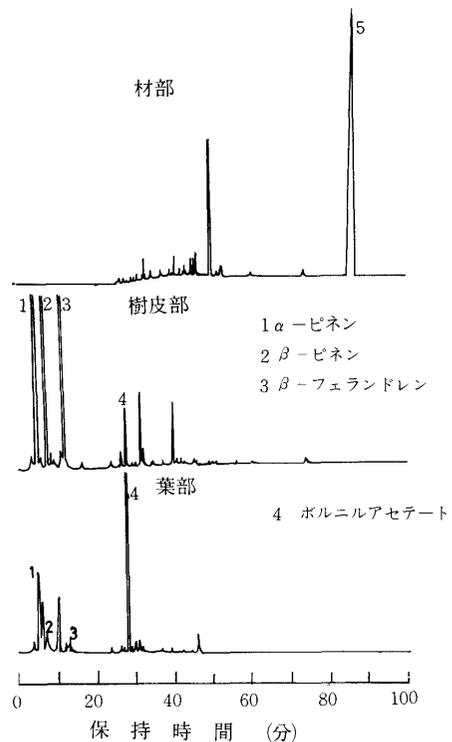
3.5 ピーク5の化合物の単離と生物検定

ピーク5の化合物は分取用薄層クロマトグラフィー(TLC)で黄色油状物として単離され、GCで純粋であることが確認された。この化合物をマスペクトル(MS)で分析したところ、HRMS(ハイマス)で M^+ が266.1893、 $C_{18}H_{26}O_3$ なる分子式をもつことがわかった。したがって、GCの結果と考え合わせると、この化合物はセスキテルペンの一種と思われる。

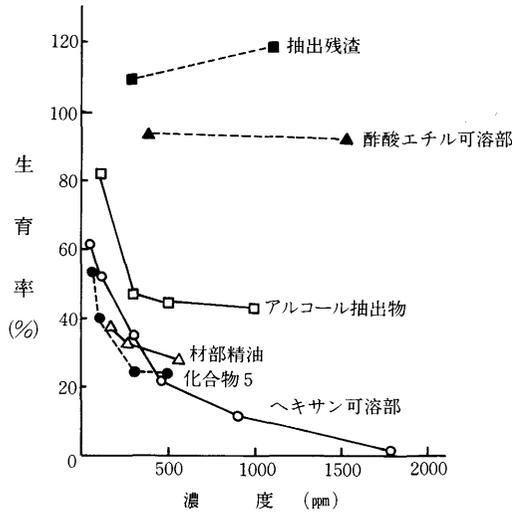
つぎに、単離した化合物を寒天培地拡散法により生物検定した。供試菌はシイタケ菌とし、50, 100, 300, 500ppmの濃度で検定した。その結果を今まで検討してきたアルコール抽出物、ヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部、抽出残渣、材部精油の阻害性の結果とともに



第1図 食用菌の生育に及ぼすトドマツ木粉の精油の影響



第2図 トドマツ精油のガスクロマトグラム



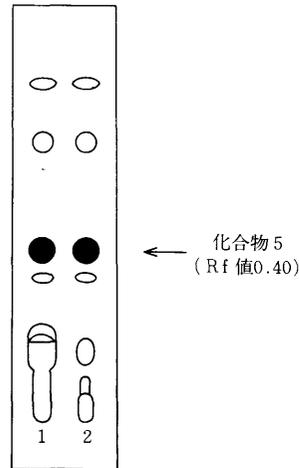
第3図 シイタケ菌の生育に及ぼすトドマツ木粉抽出物の影響

第3図に示す。

シイタケ菌の化合物5に対する生育率は50ppmで54%、100ppmで40%、300および、500ppmで25%を示した。この結果から木材中の濃度に相当する390ppmで生育率はほぼ25%となる。第3図から明らかなように、化合物5の阻害性は材部精油、あるいはアルコール抽出物のヘキサン可溶部のそれよりもやや強い。

前述のGCデータからわかるように、ピーク5の化合物は材部精油の70%を占めている。また、材部精油について、GCカラム温度を190℃以上に高めてもピークは認められなかった。このことから、ピーク5は材部精油の主成分と判断される。したがって、ピーク5の化合物は、精油の菌糸生育阻害性の主要因といえる。

化合物5がヘキサン可溶部にも存在するか否かを確認するため、TLCで材部精油とヘキサン可溶部を比較した。その結果を第4図に示す。ヘキサン可溶部は材部精油に比べて、原点付近にとどまっている部分がやや多いものの、全体的には精油と類似のパターンを示した。材部精油のスポットの中に強くあらわれる化合物5のスポットはヘキサン可溶部にも同様に存在していた。したがって、精油の主成分である化合物5がアルコール抽出物のヘキサン可溶部中にも多量に存在し、その阻害性の一因を成しているのは明らかである。現



第4図 トドマツ抽出物の薄層クロマトグラム(TLC)
(1:ヘキサン可溶部 2:材部精油)

在、この化合物5の化学構造について検討中である。

生体内で合成されるこれらのテルペノイド系の化合物は、植物化学の分野で生理活性の面から広範な研究がなされている。テルペンの持つ生理的機能は単に人類にとって有用なだけでなく、樹木を取り巻く他の生物にとっても大きな意義を持つ。少なくとも今回の実験で、針葉や樹皮に多量に含まれるモノテルペン類が食用菌の菌糸生長に悪影響を与えず、材にのみ含まれている成分が菌糸生長を阻害したことは、抽出成分の機能や分布の観点から非常に興味深いことである。

4. まとめ

トドマツ木粉中の食用菌菌糸生長阻害要因を検討した。その結果、アルコール抽出物のヘキサン可溶部が6種類の食用菌を強く阻害することがわかった。

さらに材部精油にも同様の阻害性が観察された。GCで材部精油を分析したところ、モノテルペンはほとんど含まれず、より高沸点のセスキテルペンと思われる化合物が70%の取率で含まれていた。この化合物を単離し、シイタケ菌による生物検定を行った結果、材部精油と同様の阻害性が観察された。この化合物は、アルコール抽出物のヘキサン可溶部にも存在したことから、トドマツ木粉が示す菌糸生長阻害の一因であることが明らかである。

文 献

- 1) 金城一彦, 近藤民雄: 木材学会誌, **25**, 794(1979)
- 2) 金城一彦, 屋我嗣良: 木材学会誌, **32**, 632(1986)
- 3) 大賀祥治ほか2名: 木材学会誌, **23**, 459(1977)
- 4) 中島建ほか2名: 木材学会誌, **26**, 698(1980)
- 5) 三浦清ほか4名: 木材学会北海道支部講演集, **13**, 59(1981)
- 6) P. Rudman: *Holzforchung*, **17**, 54(1963)
- 7) 米山彰造ほか3名: 日本菌学会第32回大会講演要旨集, p6(1988)
- 8) 川合源四郎: 日本農芸化学会誌, **60**, 1027(1986)
- 9) 今村博之ほか17名: 木材利用の化学(共立出版) 78(1983)
- 10) 同上, 153
- 11) 大石武: 天然物化学(朝倉書店)20(1987)

—利用部 微生物利用科—

—*1利用部 化学加工科—

—*2利用部 成分利用科—

(原稿受理 平1.1.26)

林産試験場報

第3巻 第3号

(略号 林産試験場報 林産試験場月報からの通巻第435号)

編集人 北海道立林産試験場編集委員会
発行人 北海道立林産試験場
郵便番号071-01 旭川市西神楽1線10号
電話 0166-75-4233番(代)
F A X 0166-75-3621

平成元年5月20日発行
印刷所 株式会社総北海
郵便番号078 旭川市神楽岡14条5丁目
電話 0166-65-2101(代)