ヤマブシタケ菌床栽培における廃菌床のリサイクル利用*1

高畠幸司*2, 五十嵐圭日子*3, 鮫島正浩*3

Recycle Utilization of Waste Sawdust Substrate for Sawdust-Based Cultivation of *Hericum erinaceum**1

Koji TAKABATAKE*2, Kiyohiko IGARASHI*3 and Masahiro SAMEJIMA*3

The waste substrate from sawdust-based cultivation of *Hericum erinaceum* was reused. This process was conducted three times. Even when the waste substrate was reused three times, the yield of fruiting bodies was equal to that of fresh medium. However, the yield of the 1st waste substrate was the best of all waste substrate media, and the yields of subsequent waste substrate media decreased with recycling times. The yield of the 1st or 2nd waste substrate medium was 1.3-1.4 times that of the fresh medium. The content of low molecular α -glucan and β -glucan of the 1st or 2nd waste substrate medium increased and the C-N ratio of the 1st or 2nd waste substrate medium decreased. These results suggest that low-molecular glucan and N sources contribute to increased fruiting bodies. It was clear that the 1st and 2nd waste substrates were useful for the cultivation of *Hericum erinaceum*.

Keywords: *Hericum erinaceum*, waste substrate, recycle utilization, sawdust-based cultivation.

ヤマブシタケ菌床栽培において、栽培後に生じる廃菌床を培地材料に用いて再び栽培した。この工程を3回繰り返した。子実体収量は繰り返し3回目でも最初の培地（基本培地）と同等であった。しかし、廃菌床培地は1回目の廃菌床培地で子実体収量が最も多く、その後、リサイクルする毎に減少した。子実体収量はリサイクル2回目までは基本培地の1.3~1.4倍になった。1回目、2回目の廃菌床培地では、低分子 α -グルカン、 β -グルカンの含有量が多くなり、C-N比が低くなった。低分子グルカン並びにN源の増加が子実体収量の増加に寄与することが示唆された。ヤマブシタケ菌床栽培において、リサイクル2回目までの廃菌床は、培地材料として有用であることが明らかになった。

1. 緒 言

ヤマブシタケ *Hericum erinaceum* (Bull.: Fr.) Pers. は、ブナ、ナラ、カシなどの広葉樹の立木、倒木に発生し、日本、中国、ヨーロッパ、北米に分布するサンゴハリタケ属のきのこである¹⁾。ヤマブシタケ

は神経成長因子合成誘導促進物質、花粉管発芽成長阻害物質等、様々な生理活性成分を有し²⁾、機能性に富むきのことして注目され、栽培されるようになった。シイタケ栽培に準じた原木栽培が可能であるが、オガコ+栄養材の培地で容易に子実体を形成するので市場には菌床で栽培された子実体が流通している³⁾。

近年、食用きのこ生産の大半は菌床で栽培されている。菌床栽培の主要材料であるオガコは、以前は製材時に生じる鋸屑のみが使われていたが、現在では山間部で伐採した素材を専用工場で粉碎してオガコの確保が図られている。オガコは畜産業でも敷材として利用されており、今後、オガコ不足と価格上昇、さらに山間部での乱伐による荒廃が危惧される。しかし、食用きのこ栽培における収穫後の廃培地、即ち、廃菌床が菌床栽培に再利用できれば、生産コ

*1 Received May 29, 2008; accepted August 25, 2008. 本研究の一部は第58回木材学会大会(2008年3月、つくば)で発表した。

*2 富山県農林水産総合技術センター森林研究所 Toyama Prefectural Agricultural, Forestry and Fisheries Research Center, Forest Research Institute, Toyama 930-1362, Japan

*3 東京大学大学院農学生命科学研究科 Graduate School of Agricultural and Life Science, The university of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan

ストの低減のみならず, バイオマス資源の有効利用, 山間部の樹木保全と荒廃防止にも寄与することになる。

菌床栽培における廃菌床の再利用に関する報告は少なく, エノキタケ廃菌床によるシイタケ菌床栽培⁴⁾, ナラタケ属廃培地を用いたヒラタケ菌床栽培⁵⁾, ヒラタケ並びにナメコ廃菌床によるハタケシメジ栽培⁶⁾と僅かに検討されている。ヤマブシタケは針葉樹オガコで子実体を形成し^{7, 8)}, 培地基材の選択性が広いことから, 培地基材としてマイタケ廃菌床⁹⁾, ナメコ・エノキタケ廃菌床¹⁰⁾, シイタケ廃菌床¹¹⁾の利用性を検討し, 広葉樹オガコの廃菌床であれば, 利用可能であった。同一きのこ種で廃菌床をリサイクル利用できれば, 一層の効率的なきのこ生産が見込める。これまでにシイタケ原木栽培の廃ホダをオガコに調製してシイタケ菌床栽培への利用性¹²⁾が検討されているが, 菌床栽培における廃菌床の再利用について同一種での報告はない。そこで, 本研究ではヤマブシタケ菌床栽培におけるヤマブシタケ廃菌床の再利用の可能性を明らかにするために廃菌床を3度目までリサイクル栽培して子実体収量に及ぼす影響を検討した。

2. 実 験

2.1 供試菌

供試した菌株は, 富山県農林水産総合技術センター森林研究所にてPDA培地で継代培養しているヤマブシタケ (*Hericium erinaceum* (Bull.: Fr.) Pers.) Her-14菌株を用いた。栽培試験のオガコ種菌は, ブナ (*Fagus crenata* Blume) オガコ (粒度12~60メッシュ) とフスマを絶乾重量比4:1で混合し, 水道水を加えて含水率63%に調整して高圧滅菌(118℃, 45分間)後, 供試菌を培養したものをを用いた。

2.2 培地調整

培地基材にブナオガコ, 栄養材にフスマを用い, それぞれを絶乾重量比1:1で混合し, 水道水を加えて含水率63%に調整した培地を基本培地とした。基本培地を850 mlのポリプロピレン製培養ビンに1本あたり550 g充填し, 高圧滅菌処理した。廃菌床培地の含水率調整および滅菌処理も同様とした。

2.3 栽培方法

滅菌処理した培養ビン1本あたり約10 gのオガコ種菌を接種した後, 22±2℃, 相対湿度75±5%, 暗黒下の条件で28日間培養した。培養後, キャップを外して12±2℃, 照度300~500 lux, 相対湿度90%以上の条件下に移した。14日後に子実体の針が十分に発育して胞子が落下し始める状態となり, 子実体

を採取して生重量を測定した。

2.4 ヤマブシタケ廃菌床培地

ヤマブシタケ廃菌床培地の調製の概要をFig. 1に示す。基本培地でヤマブシタケを栽培し, 子実体を採取した後, 栽培ビンより掻き出した廃菌床を1st廃菌床とした。基本培地のブナオガコを1st廃菌床で代替した培地を1st廃菌床培地, 基本培地のブナオガコの半量(絶乾重量)を1st廃菌床で代替した培地を1st廃菌床半量培地とした。1st廃菌床培地でヤマブシタケを栽培し, 子実体を採取した後, 栽培ビンより掻き出した廃菌床を2nd廃菌床とした。基本培地のブナオガコを2nd廃菌床で代替した培地を2nd廃菌床培地, 基本培地のブナオガコの半量(絶乾重量)を2nd廃菌床で代替した培地を2nd廃菌床半量培地とした。2nd廃菌床培地でヤマブシタケを栽培し, 子実体を採取した後, 栽培ビンより掻き出した廃菌床を3rd廃菌床とした。基本培地のブナオガコを3rd廃菌床で代替した培地を3rd廃菌床培地, 基本培地のブナオガコの半量(絶乾重量)を3rd廃菌床で代替した培地を3rd廃菌床半量培地とした。基本培地を対照区とし, 各試験区の供試ビン数は16本とした。

2.5 培地材料並びに培地の元素分析

高圧滅菌処理したフスマ、ブナオガコ、1st 廃菌床、2nd 廃菌床、3rd 廃菌床並びに供試培地を凍結乾燥して30メッシュ以下に粉碎し、供試試料とした。供試試料を元素分析装置 (Elementar 製, VarioEL) で炭素、窒素の含有量を測定し、C-N比を算出した。

2.6 培地材料並びに培地のグルカン分析

培地材料並びに供試培地の α -および β -グルカンの組成分析は Yeast β -glucan assay kit (Megazyme) に基づいた橋本らの方法¹³⁾ に準拠した。ネジ口試験管 (10 ml) に供試試料400 mg を秤量し、50%エタノール 8 ml を加え80℃にて15分間加温した。その後、3000 g で10分間遠心処理し上澄み液と残渣とに分けた。上澄み液は50%エタノールで8 ml にメスアップして50%エタノール抽出液とした。残渣は50%エタノールで洗浄し、凍結乾燥して50%エタノール抽出残渣とした。50%エタノール抽出液のグルコース濃度を測定して供試試料中の遊離グルコース量を算出した。100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) で2倍希釈した50%エタノール抽出液と exo-1,3 β -glucanase (10 U/ml) plus β -glucosidase (2 U/ml) (Megazyme) を等量ずつ混合して40℃, 60分間加温した。反応液のグルコース濃度を測定し、粉末試料中の全 β -グルカン量を算出し、遊離グルコース量を差し引いて低分子 β -グルカン量とした。100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) で2倍希釈した50%エタノール抽出液と Amyloglucosidase (32 U/ml) (Megazyme) を等量ずつ混合して40℃, 30分間加温した。反応液のグルコース濃度を測定し、粉末試料中の全 α -グルカン量を算出し、遊離グルコース量を差し引いて低分子 α -グルカン量とした。

ネジ口試験管 (10 ml) に50%エタノール残渣40 mg を秤量し、2 M トリフルオロ酢酸 4 ml を添加して加水分解 (121℃, 30分間) した。その後、2 N KOH 4 ml を加え、3000 g で10分間遠心処理し、上澄み液を回収した。上澄み液を100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) で3.5倍に希釈し、exo-1,3 β -glucanase (10 U/ml) plus β -glucosidase (2 U/ml) (Megazyme) と等量ずつ混合して40℃, 60分間加温した。反応液のグルコース濃度を測定し、50%エタノール残渣中の全グルカン量を算出した。ネジ口試験管 (10 ml) に50%エタノール残渣80 mg を秤量し、2 N KOH 1.6 ml を加え、氷温中で20分間攪拌し1.2 N 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.8) 6.4 ml を加え Amyloglucosidase (3200 U/ml) (Megazyme) を100 μ l 加え、40℃, 30分間加温した。反応後、3000 g で10分間遠心処理し、上澄み液のグルコース濃度を測定

し、50%エタノール残渣並びに試料中の α -グルカン量を算出し、高分子 α -グルカン量とした。試料中の非結晶性高分子 β -グルカン量は50%エタノール残渣中の全グルカン量より50%エタノール残渣中の α -グルカン量を差し引き、試料中の含有量を算出した。なお、グルコース濃度はグルコース CII テストワコー (和光純薬) を用いて Mutarotase-GOD 法¹⁴⁾ で測定した。

2.7 培地材料並びに培地の pH 測定

50 ml ビーカーに供試試料を10 g 秤量し、蒸留水を25 ml 添加し、室温で60分間攪拌し、上澄み液を pH メーターで測定した。

2.8 統計処理

子実体収量に関して、統計処理プログラム JMP-J を用いて Tukey の HSD 検定により試験区間で平均値を多重比較した。

3. 結果と考察

3.1 ヤマブシタケ子実体収量

1st 廃菌床培地、2nd 廃菌床培地、3rd 廃菌床培地並びに1st 廃菌床半量培地、2nd 廃菌床半量培地、3rd 廃菌床半量培地といずれの培地においても基本培地と同様に正常な針を形成し、正常に子実体を形成した。

基本培地並びにヤマブシタケ廃菌床培地におけるヤマブシタケ子実体収量の結果を Fig. 2 に示す。供試したヤマブシタケ廃菌床培地では、3rd 廃菌床培地を除いたいずれの培地においても基本培地に対して有意に子実体収量が増加した。1st 廃菌床培地で最も子実体収量が多くなり、基本培地 (130 g/ビン) に対して約4割増加した。次いで1st 廃菌床半量培

Fig. 2. Relationships between recycle times of waste substrate from sawdust-based cultivation of *H. erinaceum* and yields of fruiting body.

Note: Basal medium, All and Half are the same in as Fig.1. The vertical bars represent standard deviations. The letters indicate differences statistically significant at 5% level by Tukey's HSD.

地, 2nd 廃菌床培地, 2nd 廃菌床半量培地が基本培地に対して約3割増加した。廃菌床のリサイクル回数が増えるにつれて子実体収量は漸減する傾向を示し, 3rd 廃菌床培地では基本培地と同程度の子実体収量となった。

子実体収量のみの観点からは, 3rd 廃菌床培地でも基本培地と子実体収量に有意差がないことから3度のリサイクル利用が可能であるが, 3rd 廃菌床を用いた培地で発生した子実体は脆弱になり, 子実体の日持ちが悪くなるように感じた。したがって, 栽培現場で適応するには2nd 廃菌床まで, 即ち, 廃菌床の再利用, 再々利用が望ましいと考えられる。

子実体収量は, 1st 廃菌床では廃菌床全量培地は半量廃菌床培地より多くなり, 2nd 廃菌床では廃菌床全量培地と半量廃菌床培地は同程度となり, 3rd 廃菌床では廃菌床全量培地は半量廃菌床培地より少なくなったが, このことは, 廃菌床をリサイクル利用する過程でヤマブシタケ菌糸体由来の代謝成分の中で阻害成分が培地中に蓄積されたためと推察される。

3.2 培地材料並びに培地の C-N 比

培地材料並びに供試培地の C-N 比を Table 1 に示す。培地材料では, フスマ16.8, プナオガコ306.3と, 既報^{12, 15)} の値と近似した。1st 廃菌床31.5, 2nd 廃菌床22.9, 3rd 廃菌床19.7と, 廃菌床のリサイクル回数が増加するにつれて C-N 比は低下した。供試培地も 1st 廃菌床培地から 3rd 廃菌床培地へリサイクル

回数が増加するにつれて C-N 比が低下した。また, 廃菌床半量培地では廃菌床培地に比べてプナオガコを含むため C-N 比は高くなった。ヤマブシタケ子実体にはタンパク質が乾重比で30~50%含まれているが⁸⁾, 子実体形成が始まると栄養菌糸体に蓄積された大部分の窒素化合物が消失して子実体で窒素化合物が蓄積されることが知られている¹⁶⁾。子実体形成時に消失しなかった窒素化合物が廃菌床中に残存し, リサイクル回数が増すに従い廃菌床中に蓄積されて C-N 比が低下したものと推察される。

C-N 比は, きのこの栄養成長, 子実体形成に大きく影響し, 適正な値はきのこ種によって異なるが, 栄養成長には20, 子実体形成には30~40が適正とされている^{17, 18)}。子実体形成時に N 源が過剰に存在すると子実体形成を阻害することが知られている¹⁹⁾。これらのことから, 3rd 廃菌床では C-N 比が20より低く, N 源過剰の状態であると考えられる。

3.3 培地材料並びに培地のグルカン組成

培地材料並びに供試培地の低分子グルカン組成を Fig. 3 に示す。遊離グルコース量はフスマ0.23%, プナオガコ0.04%となり, 1st 廃菌床, 2nd 廃菌床ではフスマ程度, 3rd 廃菌床ではプナオガコ程度の含有量となった。1st 廃菌床培地, 2nd 廃菌床培地で基本培地の3倍量, 3rd 廃菌床培地で1.4倍量となった。低分子 α -グルカン量はフスマ2.67%, プナオガコ0.03%となり, 1st 廃菌床から 3rd 廃菌床へ0.25%~0.80%とリサイクル数に伴って増加した。基本培地1.1%に対して廃菌床培地では基本培地の1.5倍前後の含有量を示した。低分子 β -グルカン量はフスマ0.41%, プナオガコ0.25%となり, 1st 廃菌床, 2nd 廃菌床で0.5%前後, 3rd 廃菌床では0.33%となった。基本培地0.49%に対して1st 廃菌床培地, 2nd 廃菌床培地では基本培地の2.5倍, 3rd 廃菌床培地では1.5倍の含有量となった。プナシメジ菌床栽培において, 廃菌床中にアミラーゼ, セルラーゼ, β -1, 3 グルカンナーゼが蓄積されること²⁰⁾ が報告されている。このことから, ヤマブシタケ廃菌床中に蓄積された多糖分解酵素とフスマが培地調整中に酵素反応を起こし, さらに殺菌工程の高温高压処理を通じて, 廃菌床培地では遊離グルコース, 低分子 α -グルカン, 低分子 β -グルカンの含有量が高くなることが推察される。

ヤマブシタケの菌糸体成長において, 既存培地へグルコース, 可溶性デンプンの添加が有効であり, 菌床培地において子実体形成の旺盛な培地ほど培養時に α -グルカンを多く消費すること²¹⁾ が報告されており, 本研究においても遊離グルコース, 低分子

Table 1. C-N ratio of substrate materials and waste substrate medium from sawdust-based cultivation of *H. erinaceum* reused for cultivation of *H. erinaceum*.

		C(%)	N(%)	C-N ratio	
Substrate Materials	Wheat bran	44.4	2.64	16.8	
	Buna-Sawdust	47.9	0.16	306.3	
	Waste substrate	1st	47.4	1.50	31.5
		2nd	46.8	2.04	22.9
		3rd	47.1	2.39	19.7
	Basal medium	46.7	1.29	36.3	
Medium	All waste substrate	1st	46.2	1.91	24.2
		2nd	46.2	2.30	20.1
		3rd	46.0	2.61	17.6
	Half waste substrate	1st	46.7	1.78	26.2
		2nd	46.4	2.12	21.9
		3rd	46.3	2.45	18.9

Note: All waste substrate means medium substituted Buna sawdust in basal medium with waste substrate from sawdust-based cultivation of *H. erinaceum*. Half waste substrate means one half of the Buna sawdust in basal medium was substituted with waste substrate from sawdust-based cultivation of *H. erinaceum*.

Fig. 3. Content of low molecular glucan in sawdust substrate materials and waste substrate medium from sawdust-based cultivation of *H. erinaceum* reused for cultivation of *H. erinaceum*.
 Legend: Black bar: Free glucose, Gray bar: α-glucan, Open bar: β-glucan

α-グルカン、低分子β-グルカンの増加が菌糸体成長、子実体形成に影響したと考えられる。

培地材料並びに供試培地の非結晶性高分子グルカン組成を Fig. 4 に示す。高分子α-グルカンは、フスマ30%、ブナオガコ0.4%となり、1st 廃菌床1.1%、2nd 廃菌床および3rd 廃菌床では6%前後であった。栄養材のフスマと供試培地基材間で差が大きいため、フスマを利用することで供試培地間では顕著な差が認められなかった。非結晶性高分子β-グルカンは、フスマ7.6%、ブナオガコ、1st、2nd、3rd 廃菌床では3~4%となり、供試培地間でも3~4%となり、顕著な差は認められなかった。

3.4 培地材料並びに供試培地の pH

培地材料並びに供試培地の pH を Fig. 5 に示す。

培地材料ではフスマ6.3、ブナオガコ5.0に対して廃菌床では1st 4.2、2nd 4.1と低下し、3rd では4.8とやや高くなった。廃菌床の pH の変化が供試培地に反映されて基本培地5.5に対して、廃菌床培地、廃菌床半量培地供に培地基材の場合と同様に1st、2ndでは低下し、3rd ではやや高くなった。栄養菌糸体が生育する過程で培地中に有機酸が蓄積されること^{22, 23)}が知られており、1st 廃菌床、2nd 廃菌床では、培養過程でヤマブシタケ菌糸体の生育に伴って培地中に有機酸が蓄積され、pH が低下したと推察される。

一方、3rd 廃菌床培地では pH が若干高くなった。廃菌床のリサイクル利用を重ねることにより培地中に菌糸体由来のタンパク質が蓄積され、さらに分解されてアミン類を生じたとすれば、1st 廃菌床培地、

Fig. 4. Content of non-crystallized high molecular glucan in sawdust substrate materials and waste substrate medium from sawdust-based cultivation of *H. erinaceum* reused for cultivation of *H. erinaceum*.
 Legend: Gray bar: α-glucan, Open bar: β-glucan

Fig. 5. pH of sawdust substrate materials and waste substrate medium from sawdust-based cultivation of *H. erinaceum* reused for cultivation of *H. erinaceum*.

2nd 廃菌床培地に比べて 3rd 廃菌床培地で子実体収量が低下したと整合する。

4. 結 論

ヤマブシタケ菌床栽培において、栽培後に生じる廃菌床を培地材料に用いて再び栽培した。この栽培工程を 3 回繰り返す、ヤマブシタケ廃菌床によるリサイクル利用の可能性を検討した。

子実体収量は 3 回繰り返しても最初の培地（基本培地）と同等であった。しかし、廃菌床培地では 1 回目の廃菌床培地で最も子実体収量が多くなり、その後、リサイクルする毎に減少した。子実体収量はリサイクル 2 回目までは基本培地の 1.3~1.4 倍になった。

1 回目、2 回目の廃菌床培地では、遊離グルコース、低分子 α -グルカン、低分子 β -グルカンの含有量が多くなり、C-N 比が低くなった。高分子 α -グルカン、非結晶性高分子 β -グルカンの含有量は、基本培地と廃菌床培地では含有量に顕著な差は認められなかった。

これらの結果から、ヤマブシタケ菌床栽培において、培地中の遊離グルコース、低分子 α -グルカン、低分子 β -グルカン並びに N 源の増加が子実体収量の増加に寄与することが示唆された。また、リサイクル 2 回目までの廃菌床は、培地材料として有用であることが明らかになった。

文 献

- 1) 今関六也, 本郷次雄: “原色日本新菌類図鑑 (II)”, 保育社, 大阪, 1989, pp. 108-109.

- 2) Stamets, P.: “Growing Gourmet and Medical Mushrooms”, Ten Speed Press, CA, USA, 2000, pp. 387-394.
- 3) 水野 卓: “キノコの化学・生化学”, 水野 卓, 川合正充編, 学会出版センター, 東京, 1992, pp. 307-312.
- 4) Ohga, S., Yano, S., Kira, K.: *Mokuzai Gakkaishi* **39** (12), 1443-1448 (1993).
- 5) 富樫 巖: 木材学会誌 **41** (10), 956-962 (1995).
- 6) Akamatsu, Y.: *J. Wood Sci.* **44** (5), 417-420 (1998).
- 7) 小島 靖: 奈良県林試林業資料 No. 13, 11-14 (1998).
- 8) 高島幸司, 奥崎政美, 根岸由紀子, 佐々木弘子, 菅原龍幸: 日本食生活学会誌 **11** (4), 370-374 (2001).
- 9) 高島幸司: 日本きのこ学会第 9 回大会講演要旨集, 広島, 2005, p. 32.
- 10) 高島幸司: 日本きのこ学会第 11 回大会講演要旨集, 旭川, 2007, p. 50.
- 11) 高島幸司: 中部森林研究 No. 55, 197-198 (2007).
- 12) 中谷 誠: 日本応用きのこ学会誌 **9** (4), 175-180 (2001).
- 13) 橋本由紀, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, 石井 忠, 細谷修二, 下田隆史, 西堀耕三, 大平安夫: 日本応用きのこ学会第 7 回大会講演要旨集, 高崎, 2003, p. 67.
- 14) Trinder, P.: *Ann. Clin. Biochem.* **6** (1), 24-27 (1969).
- 15) 木村栄一: “図説基礎からのエリンギ栽培”, 農村文化社, 東京, 1999, pp. 66-90.
- 16) 北本 豊, 松本晃幸, 細井 登, 寺下隆夫, 河野又四, 市川吉夫: 日菌報 **21** (2), 237-244 (1980).
- 17) 北本 豊, 葛西善三郎: 農芸 **42** (5), 260-266 (1968).
- 18) 北本 豊: 菌草 **24** (9), 29-35 (1978).
- 19) 北本 豊, 山根延夫, 細井 登, 市川吉夫: 日菌報 **15** (1), 60-71 (1974).
- 20) 天野良彦, 西澤賢一, 床尾力哉, 松澤恒友, 神田鷹久: 木材学会誌 **38** (4), 411-416 (1992).
- 21) 小島 靖: 奈良県森技セ研報 No. 30, 11-16 (2000).
- 22) 橋本一哉, 磯部信昭, 高橋善次郎: 日菌報 **7** (1), 20-24 (1966).
- 23) 橋本一哉, 磯部信昭: 日菌報 **7** (2, 3), 335-338 (1966).