

## エノキタケの栄養生長および子実体形成に おける栄養要求性

北本 豊\*・村田達雄\*・小林 淳\*・市川吉夫\*

昭和60年5月31日受付

### Nutritional Requirement for Mycelial Growth and Fruit-body Formation in *Flammulina velutipes*

Yutaka KITAMOTO\*, Tatsuo MURATA\*,  
Atsushi KOBAYASHI\* and Yoshio ICHIKAWA\*

The nutritional requirement for mycelial growth and fruit-body formation of a colony of *Flammulina velutipes* was investigated by using a chemically defined basal medium.

A wide range of carbohydrates was utilized as carbon sources in medium which supported growth and fruiting of this fungus. Trehalose was especially good carbon source for mycelial growth, whereas mannose or glucose was superior to the former substrate for fruiting. Ammonium salt was a poor nitrogen source for mycelial growth and suppressed fruiting. On the other hand, peptone, soytone, meat extracts and the amino acids mixture of the basal medium were acceptable nitrogen sources for the growth and fruiting. The fungus did not grow in the absence of thiamine. Each of the other vitamins and nucleic acid bases composed of the basal medium did not produce a significant effect on the growth and fruiting, although the application of the mixtures of those growth factors increased fruit-body yields effectively. The addition of potato or onion extracts into the basal medium remarkably enhanced mycelial growth and increased the yield of fruit-bodies by three or four times as compared with those produced in the basal synthetic medium.

#### 緒 言

担子菌の子実体発生の制御には、光条件、温度条件などの物理的因子と、栄養条件、生理活性物質などの化学的因子による方法が考えられる<sup>13)</sup>。子実体形成に対する物理的因子の影響については、光<sup>6)</sup>、温度<sup>13)</sup>、湿度<sup>13)</sup>

による子実体の発生および発育の制御に関する多くの報告があり、その一部は実用的栽培技術にも適用されている。しかし、子実体形成に対する化学的要因の知見はきわめて少なく、その栄養条件の詳細な解析は、合成培地で良好に子実体を形成するアミスギタケ (*Favolus arcularius*)<sup>9)</sup>、シビレタケ属の一種 (*Psirocybe panae-*

\* 鳥取大学農学部農芸化学科農産製造学研究室

Department of Agricultural chemistry, Faculty of Agriculture, Tottori University

*oliformis*)<sup>8)</sup>, スエヒロタケ(*Schizophyllum commune*)<sup>11)</sup> など、一部の属種に限られている。一方、子実体発生の化学物質による制御については、*P. panaeoliformis*<sup>5,15)</sup>, ヒラタケ近縁種 (*Pleurotus frorida*)<sup>3)</sup>, スエヒロタケ<sup>10)</sup>に対する微生物あるいは植物起源の活性物質の存在が報告されているが、化学的自体は未解明であり、わずかにウシグソヒトヨタケ (=ネナガノヒトヨタケ (*Coprinus cinereus*))の特定の単核菌糸系統株における cyclicAMP による子実体誘導<sup>14)</sup>, およびスエヒロタケにおける子実体誘導促進物質としてのセレブロシド<sup>4)</sup>の報告があるのみである。

エノキタケ (*Flammulina velutipes*) は冬季、広葉樹の枯れ木などに群生して子実体を形成する木材腐朽菌であり、その栄養要求性については Punkett (1953)<sup>12)</sup> および Aschan (1954, 1958)<sup>1,2)</sup> による報告がある。しかし、これらの合成培地上で形成される子実体は天然培地と比較してきわめて稀少で、その収量も低水準にある。そこで、著者らは、天然培地成分中に存在するエノキ

タケの子実体形成に活性を有する物質の検索を行う予備的段階として、本菌の栄養生長および子実体形成に対する既知の栄養素や培地素材の効果を検討した。

### 実験方法

本研究には、エノキタケ (*Flammulina velutipes*) 721B1株を用いた。常法の Potato-Dextrose (PD) 培地上であらかじめ平板培養した本菌の栄養菌糸の菌叢から菌糸体片を切り出し、三角フラスコに無菌的に分注した Table 1 の組成の液体基礎合成培地に接種した。栄養菌糸の生長に対する実験では、暗所、23°C で2週間培養後、菌糸体を収穫して乾燥重量を測定した。子実体形成に対する実験では、変温培養法を適用し、23°C, 暗所で2週間培養後、17°C, 約200luxの蛍光灯照射下に移して子実体形成を誘導した<sup>7)</sup>。接種後4週間に栄養菌糸体および子実体を収穫し、乾燥重量を測定した。供試する化学物質は、上記の基礎合成培地に無菌的に添加して、培養により栄養生長および子実体形成に対する効果を評価した。

Table 1. Basal medium for mycelial growth and fruiting of *Flammulina velutipes*.

Glucose	20.0g	Inositol	2.5 mg
		Nicotinamide	0.2
Glycine	0.05	Riboflavin	0.2
Alanine	0.40	Pyridoxine · HCl	0.1
Valine	0.07	Folic acid	0.1
Leucine	0.12	Biotin	0.1
Isoleucine	0.06	Cyanocobalamin	0.1
Phenylalanine	0.10	Orotic acid	0.2
Tyrosine	0.04	Thiamine · HCl	0.2
Serine	0.25		
Threonine	0.30	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g
Proline	0.06	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.3
Cystein · HCl	0.08	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.1
Methionine	0.02	NaCl	0.05
Aspartic acid	0.30		
Glutamic acid	0.50	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 mg
Arginine · HCl	0.40	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2
Histidine · HCl	0.14	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.1
Lysine · HCl	0.30	MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.1
Adenine · HCl	5.0mg		
Guanine · HCl	5.0		
Cytosine · HCl	2.0		
Thymine	2.0		
Uracil	2.0	(pH was adjusted to 5.8-6.0.)	

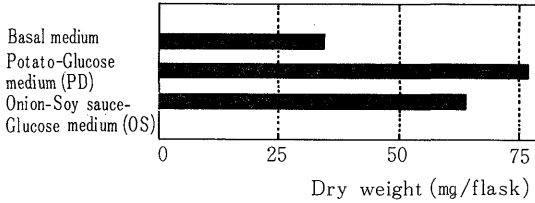


Fig. 1. Mycelial growth of *Flammulina velutipes* in the basal and natural media.

実験結果

1. 合成および天然培地におけるエノキタケの栄養生長  
 エノキタケの栄養生長に適した培地組成を決定するに先立ち、上記の基礎合成培地と2種の天然培地の培地性能を比較した。その結果をFig. 1に示す。

合成培地における菌叢の総乾燥重量を指標とした栄養菌糸の生長 (34.7mg / flask) は、天然培地の45~55%程度であり、この基礎培地がこれまで報告のある担子菌用合成培地<sup>16)</sup>のいずれよりも複雑な組成を有するにもかかわらず、本菌に対してはかなり低性能であった。

2. 合成培地における種々の栄養素の栄養生長に対する効果

栄養生長に対する培地性能を改善するため、種々の栄養素の効果を検討した。

a. 炭素源 基礎培地の炭素源 (グルコース) に代替して各種の炭素源を添加した本菌の培養では、トレハロースで菌糸体収量が20%以上増加し、フラクトース、マンノース、シュクロース、でんぶんでも10~20%菌糸成長が改善された。しかし、天然培地にみられる大幅な生長促進効果は合成培地では得られなかった (Fig. 2)。

b. 窒素源 基礎培地で使用したアミノ酸混合物と比較して、ペプトン培地では菌糸体収量が10~20%増加した。しかし、カザミノ酸、ソイトンでは対照区と大差がなく、無機窒素添加培地での菌糸体収量はアミノ酸混合物の15%程度であった (Fig. 3)。

c. ビタミン類 栄養生長に対する既知の生長因子の添加効果を調べた。

担子菌は、チアミン要求性であるので、本菌においてもチアミン要求性を調べたところ 30  $\mu\text{g}/\text{l}$  の添加で菌糸体増収効果が飽和に達した (Fig. 4)。つぎに、チアミン以外の生長因子をすべて除去した組成を基礎にしてビタミン類および核酸塩基の添加効果を調べたが、いずれも顕著な菌糸体増収は認められなかった。しかし、これ

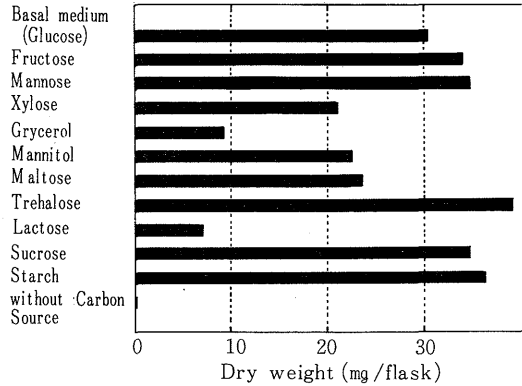


Fig. 2. Effect of various carbon sources on mycelial growth in *Flammulina velutipes*. The carbon source concentration was 20.0 g/l.

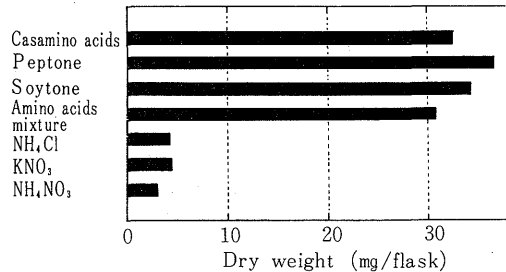


Fig. 3. Effect of various nitrogen sources on mycelial growth in *Flammulina velutipes*. \* The nitrogen source concentration was 0.32gN/l.

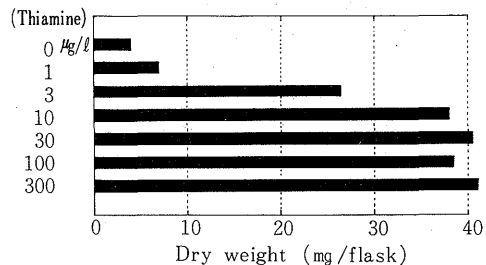


Fig. 4. Effect of different thiamine concentrations on mycelial growth in *Flammulina velutipes*.

らの生長因子を混合して添加すると、前者で1.3倍、後者で1.5倍収量が増加した。両者の混合物を同時に添加した場合は収量がさらに若干増加したが、天然培地との比較では培地性能が劣っていた (Fig. 5)。

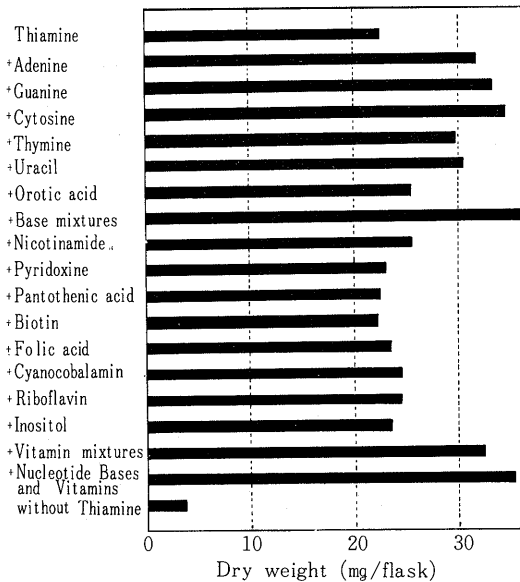


Fig. 5. Effect of addition of various growth factors into the basal medium on mycelial growth in *Flammulina velutipes*.

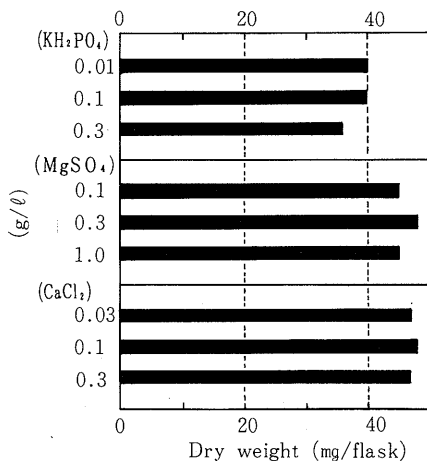


Fig. 6. Effect of different concentrations of inorganic macroelements on mycelial growth in *Flammulina velutipes*.

d. 無機塩 合成培地における無機塩濃度を検討した。しかし、リン酸塩、マグネシウムおよびカルシウム塩の基礎培地組成の濃度域では各成分濃度の菌糸生長に対する影響は顕著でなく、初発の培地組成における濃度でほぼ最大生長がみられた (Fig. 6)。

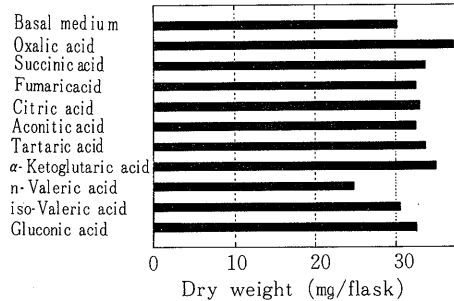


Fig. 7. Effect of various organic acids on mycelial growth in *Flammulina velutipes*.

e. 有機酸 基礎培地に種々の有機酸を添加して菌糸体増収効果を調べた。シュウ酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸により菌糸体収量が若干増加した。その他の有機酸の添加効果は認められなかった (Fig. 7)。

3. 子実体形成に対する合成および天然培地の培地性能の比較

既知物質で構成するエノキタケの子実体形成用合成培地の基本組成の確立に先立って、前述の基礎合成培地と2種の天然培地の子実体形成における効果を調べた。その結果をFig. 8に示す。

合成培地の性能は、天然培地に比較して子実体原基発生数が少なく、形成された原基の子実体への発育も充分ではなかった。子実体収量は天然培地の10%以下であった。天然培地における比較では、PD培地よりも玉ねぎ-醤油 (OS) 培地の子実体収量がいくぶん高かった。

4. 合成培地における種々の栄養素の子実体形成に対する効果

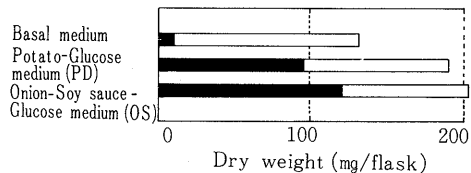


Fig. 8. Effect of various natural media on growth and fruiting of *Flammulina velutipes*.

子実体形成に対する合成培地の培地性能を改善するため、栄養生長に対すると同様に、既知の栄養素や天然抽出物の添加効果を検討した。

a. 炭素源 栄養菌糸体の増収効果が多少とも認められた数種の糖質を炭素源として、基礎培地のグルコースに代替して、培養を行った。本菌では、供試したどの炭素源培地でも比較的迅速に子実体が形成された。また、グルコースよりもマンノース培地に若干子実体増収効果がみられたが、その子実体収量はPD培地の25%程度であった (Fig. 9)。

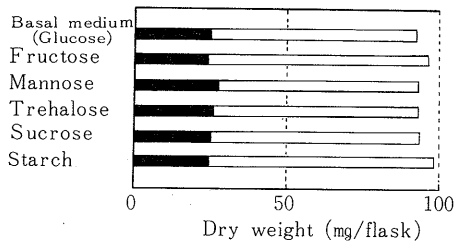


Fig. 9. Effect of various carbon sources on growth and fruiting of *Flammulina velutipes*.

The carbon source concentration was 20.0g/l.

■: Fruiting bodies, □: Mycelium.

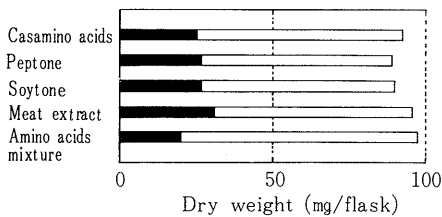


Fig. 10. Effect of various nitrogen sources on growth and fruiting of *Flammulina velutipes*.

■: Fruiting bodies, □: mycelium.

\*: Nitrogen concentration was 0.32gN/l.

b. 窒素源 窒素源を蛋白加水分解物 (カザミノ酸, ペプトン, ソイトン) あるいは肉汁エキスに代替した基礎培地では、子実体がアミノ酸混合物よりも10~20%増収した。しかし、これらの培地でも天然培地に比較して25~35%の子実体収量であった (Fig. 10)。

c. 生長因子 子実体形成に対する既知の生長因子の

添加効果を調べるため、基礎培地組成から各種の生長因子を除去して培養した。Fig. 11に示すように、本菌の必須生長因子であるチアミンを除去した培地では子実体が形成されなかった。アデニン、ニコチンアミド、リボフラビン、シアノコバラミンを除去した培地では子実体収量が若干減少した。しかし、すべての生長因子を添加した基礎培地でもその収量はPD培地の25%程度であった。

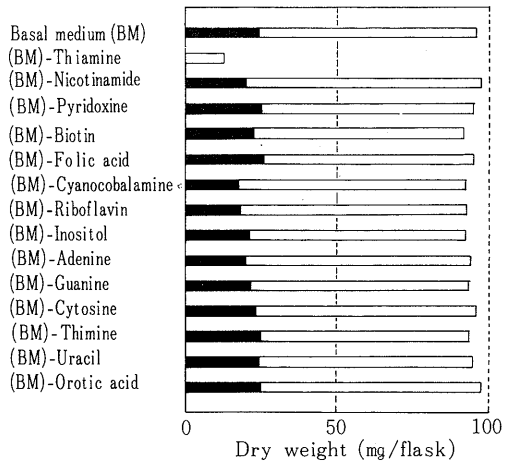


Fig. 11. Effect of various nucleotide bases on growth and fruiting of *Flammulina velutipes*.

Each of the nucleic acid base was omitted from the basal medium.

■: Fruiting bodies, □: Mycelium.

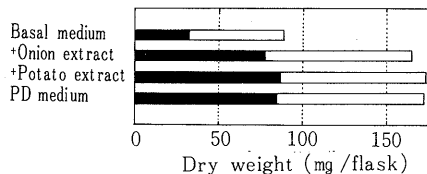


Fig. 12. Effect of addition of various natural extracts into the basal medium on growth and fruiting of *Flammulina velutipes*. The extract prepared with 100g of onion or 400g of potato was added into 1 Liter of the basal medium.

■: Fruiting bodies, □: Mycelium.

d.天然抽出物 子実体形成において天然物抽出物の基礎合成培地に対する添加効果を評価するため、馬鈴薯および玉ねぎ抽出物を培地に添加して培養した。その結果、天然物抽出物を添加した培地ではいずれも迅速に子実体が形成され、基礎培地の約3倍の子実体収量が得られた (Fig.12)。

## 考 察

エノキタケは、種々の炭水化物を栄養生長および子実体形成に利用できた。本菌の炭素源利用能は、同じく木材腐朽菌であるアミスギタケ<sup>9)</sup>と同様に、選択性の低いものであった。糖質ではグルコース、シュークロース、マルトースが好適であった。一方、本菌は無機窒素源をほとんど利用できなかったが、蛋白加水分解物やアミノ酸混合物を栄養源とする有機態窒素源では、栄養生長および子実体形成に対する培地性能が多少改善された。

エノキタケの栄養生長に対する唯一の必須生育因子はチアミンである<sup>1)</sup>。本実験でもチアミン無添加培地では、栄養菌糸はほとんど生育できず、子実体も形成されなかった。Aschanは、グルコースおよび酒石酸アンモニウムを主成分とする合成培地で本菌の子実体形成に対する栄養要求性を検討し、また、この培地に葉酸、B群ビタミン類、核酸加水分解物、酵母エキスなどを添加してその評価を行ったが、促進効果を有する物質を見出しえず、供試化合物中でIAAのみに弱い促進活性を認めた<sup>1,2)</sup>。著者らも*P. panaeoriformis*の栄養要求性検討で得た合成培地組成<sup>8)</sup>を基本とした、従来より複雑な組成の培地を基礎として既知の生長因子に対する要求性を検討した。この基礎培地は、栄養生長、子実体形成に対する性能とも従来のものよりかなり良好な性能であったが、天然抽出物を添加した培地に比較して $\frac{1}{3}$ ~ $\frac{1}{4}$ 程度の子実体収量であった。これらの事実、本菌の栄養生長および子実体形成に活性を有する未知物質が天然抽出物中に存在することを示唆するものである。本報の基礎合成培地を実験系とした有効物質の検索が期待される。

## 摘 要

エノキタケの栄養生長および子実体形成における栄養要求性を、基礎合成培地を設定して静置培養法により検討した。

本菌は広範な炭水化物を栄養生長および子実体形成のための炭素源として利用した。栄養生長にはトレハロースが、子実体形成にはマンノースおよびグルコースが好適な炭素源であった。本菌はアンモニア態窒素ではほと

んど生長せず、ペプトン、ソイトン、肉エキスやアミノ酸混合物を窒素源とする培地で比較的良好に生長し、子実体を形成した。チアミンは本菌の必須生長因子であった。他の生長因子にはいずれも栄養生長および子実体形成に顕著な効果を示すものはなかったが、これらの混合物を基礎培地に添加すると子実体収量が増加した。

本菌の栄養生長および子実体形成には馬鈴薯、玉ねぎなどの天然物抽出物の基礎合成培地への添加効果がきわめて大きく本菌の栄養生長および子実体形成に活性を有する未知物質が天然物抽出物中に存在することが示唆された。

## 謝 辞

本研究は昭和57~58年度の文部省科学研究費補助金(No.57560128)によって行なわれた。付記して謝意を表す。

## 文 献

- 1) Aschan, K. : *Physiol. Plantarum*, **7** 571—591 (1954)
- 2) Aschan-Aberg, K. : *Physiol. Plantarum*, **11** 312—328 (1958)
- 3) Eger, G. : *Theoret. Appl. Genet.*, **38** 23—27 (1968)
- 4) Kawai, G. & Ikeda, Y. : *J. Bacteriol.*, **113** 228—239 (1982)
- 5) 川合正充 日菌報, **7** 325—334 (1966)
- 6) 北本 豊 遺伝, **31**(9) 14—18 (1977)
- 7) Kitamoto, Y. & Gruen, H. E. : *Plant. Physiol.*, **58** 485—491 (1976)
- 8) Kitamoto, Y., Horikoshi, T., Hosoi, N. & Ichikawa, Y. : *Trans. mycol. Soc. Japan*, **16** 268—289 (1975)
- 9) 北本 豊, 葛西善三郎: 農化, **42** 255—259 (1968)
- 10) Leonard, T. J. & Dick, S. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **59** 745—751 (1968)
- 11) Niederpreum, D. J. : *J. Bacteriol.*, **85** 1300—1308 (1963)
- 12) Plunkett, B. E. : *Ann. Botany*, [N. S.], **17** 193—218 (1953)
- 13) 鈴木 彰: 日菌報, **20** 253—265 (1979)
- 14) Uno, I. & Ishikawa, T. : *J. Bacteriol.*, **113** 228—239 (1973)

- 15) Urayama, T. : Mem. Fac. Liber. Arts & Educ., Miyazaki Univ., **9** 393-462 (1960)
- 16) Volz, P. A. & Beneke, E. S. : Mycopathol. Mycol. appl., **37** 225-253 (1969)