スギ材の有機成分抽出による新規用途の開発

—シイタケ栽培用菌床材および天然抗菌剤への応用の試み—

工学部　松井隆尚・松下洋一・菅本和寛



第１章　はじめに

九州を始め我が国の山林にはスギが多く造林されているが，スギ間伐材や製材端材は大半が未利用の状態にある。従って，これらのスギ材の利用による資源の有効活用が望まれている。我々は，スギ材の化学的総合利用の観点から研究を継続している。今回，スギ材から抗菌性を有する有機成分を抽出除去してシイタケ栽培の菌床に利用する研究および除去したスギ材有機成分の植物病原性細菌に対する天然抗菌剤として応用可能性を調べる研究を行った。

シイタケ栽培には普通クヌギ材，コナラ材等の広葉樹材が使用されている。しかし原木の不足や価格高騰がシイタケ栽培産業において近年深刻な問題となっている。スギ間伐材が広葉樹に代替できれば，これらの問題を緩和できると考えられる。しかし，スギ材でシイタケ栽培を行うことは，従来困難とされてきた。スギ材中にシイタケ生育阻害成分が存在するのが原因と考えられる。このため，スギ材有機成分を抽出分離してシイタケ菌生育阻害成分を明らかにし，それらの除去方法を確立する研究を行った。また，生育阻害成分を除去したスギ材を用いてシイタケ菌床栽培の可能性を栽培試験により評価した。

更に，抽出分離したスギ材有機成分についても有効利用を図る目的から，植物病原性細菌に対する抗菌性試験を実施し，天然由来の抗菌物質としての可能性を評価した。

これらの研究で得られた成果を以下に述べる。

第２章　スギ材有機成分の分離とシイタケ生育阻害作用の評価

２．１　緒言

スギ材中の樹脂成分であるフェルギノールにシイタケ生育阻害作用があることが，既に報告されている。しかし，フェルギノール以外のスギ材成分の生育阻害作用は未だにわかっていない現状にある。我々は，スギ材中の有機溶媒可溶な成分にシイタケ菌の生育阻害作用があると推定し，スギ材の溶媒抽出分画と引き続く樹脂成分の単離を行い，シイタケ菌生育阻害作用を調べた。

一方，シメジタケやヒラタケはスギ材菌床で栽培可能であるが，前処理としてスギ材を屋外で数カ月にわたり散水し日光に晒す処理（日光散水処理）を行う方法が経験的に採用されている。我々は，この方法によりスギ材中のキノコ菌の生育に悪影響を与える物質が減少する可能性を想定し，日光散水処理したスギ材（日光散水スギ材）と未処理スギ材の溶媒抽出分画量を比較する研究を行った。

２．２　結果および考察

２．２．１　スギ材の溶媒抽出分画と樹脂成分の分離

スギ材はエノキなどのキノコ栽培に用いている鋸屑状スギ材（未処理スギ材）を用いた。

図1に示す改良ソックスレー抽出器を製作し，スギ材のメタノールによる連続抽出を行った。改良ソックスレー抽出器では1回あたり約 1.7～1.8 *l*(約300 g)のスギ材を処理可能となった。1回当たりメタノール 5 *l* を用いて24時間連続抽出を行った。メタノール抽出溶液は濃縮後乾燥させ，メタノール抽出物を得た。平均すると乾燥スギ材 100 g 中にメタノール抽出物 1.58 g が含まれていた。回収したメタノールは抽出に再使用した。メタノール抽出後の残渣（メタノール抽出スギ材）は乾燥後，シイタケ菌床栽培の培地に使用した。

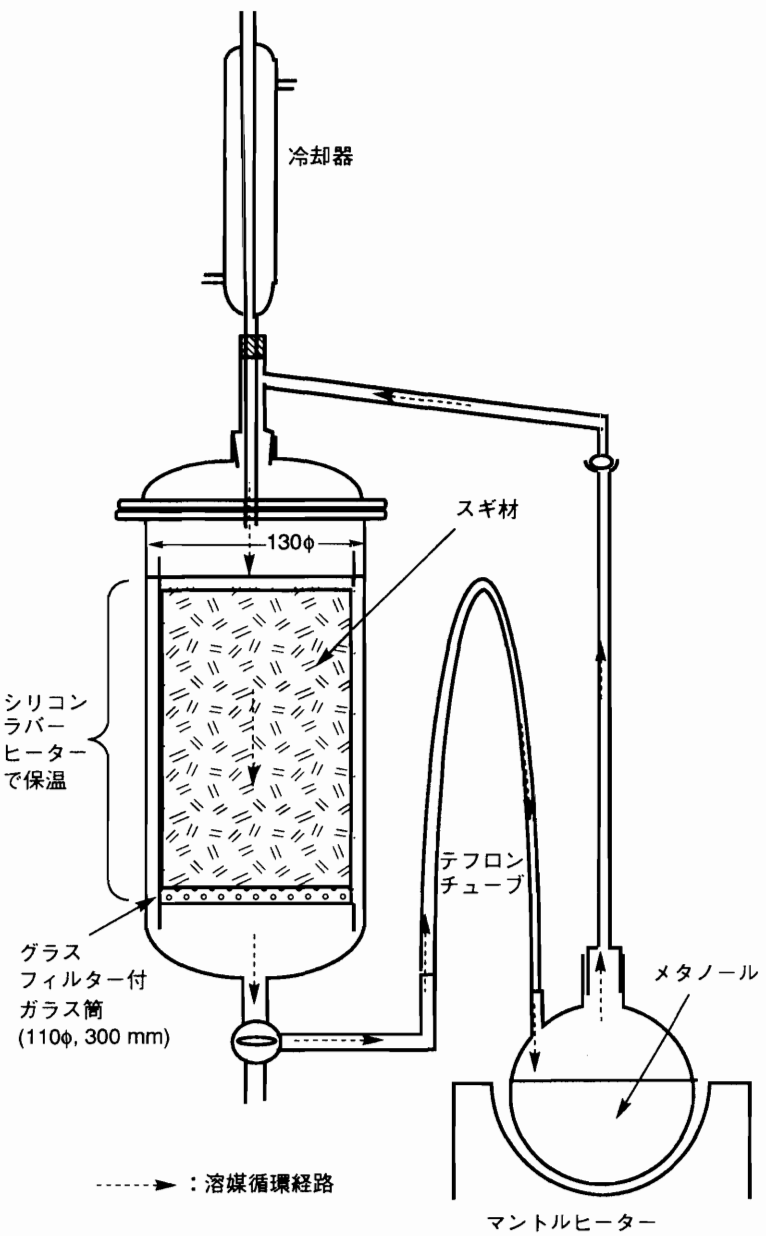


図1．　ソックスレー型抽出器

次に，未処理スギ材のメタノール抽出物を図2に示す方法で溶媒分画した。S-1がメタノール抽出処理スギ材であり，スギ材メタノール抽出物 S-2 を以後の溶媒分画に使用した。S-2 を少量のメタノールに溶解後トルエンを添加した後，メタノールを減圧下に留去して

トルエン不溶物（S-3）を得た。トルエン可溶物（S-4）には更にヘキサンを添加することによりヘキサン不溶物（S-5）を得た。トルエン－ヘキサン溶液は減圧下に溶媒を除去してトルエン－ヘキサン可溶物（S-6）を得た。得られた溶媒分画物 S-2～S-6 を抗菌試験サンプルとして用いた。また，S-6 は更に樹脂成分の分離にも使用した。

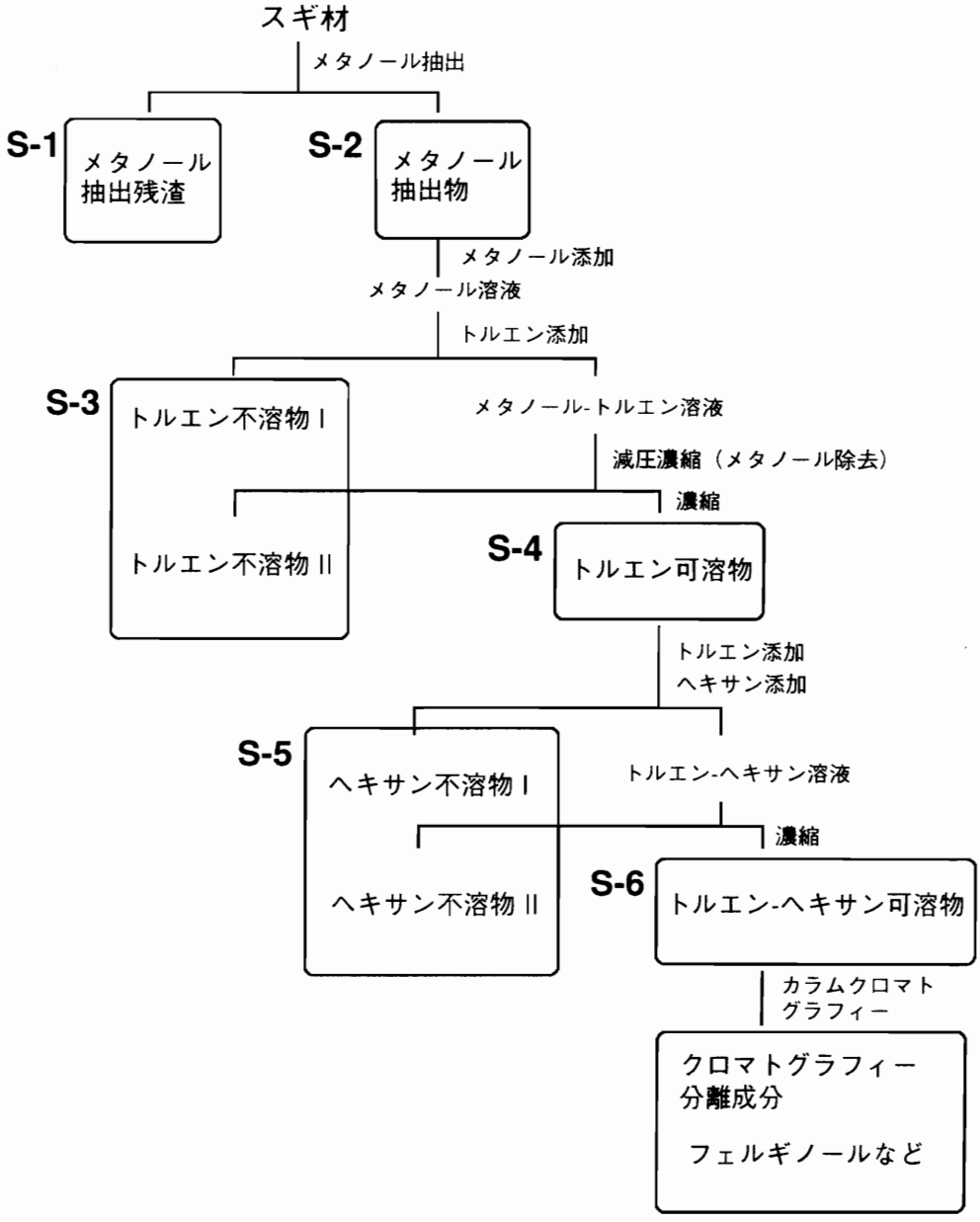
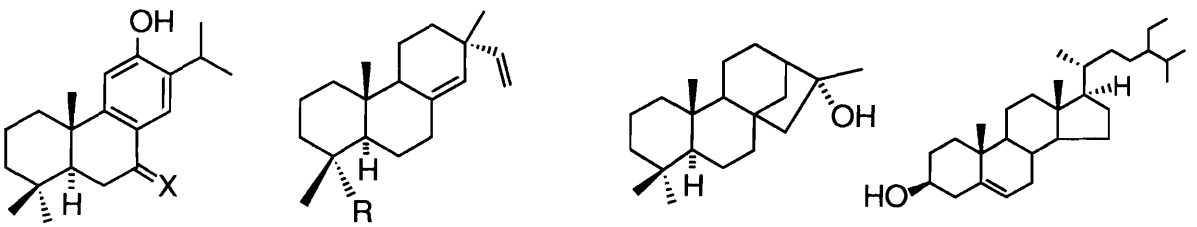


図２．スギ材のメタノール抽出と溶媒分画方法

未処理スギ材のメタノール抽出物を溶媒分画して得たトルエン-ヘキサン可溶物 S-6 5.4 g を，シリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返す方法で分離精製した。図３に示す６種類の樹脂成分であるフェルギノール 819 mg，サンダラコピマリノール 690 mg，サンダラコピマリナール 225 mg，フィロクラダノール 145 mg，スギオール 117 mg，β-シトステロール 36 mgを単離することができた。

同様にして，日光散水スギ材の溶媒抽出分画と樹脂成分の分離精製を行った。未処理スギ材と日光散水スギ材の各溶媒抽出分画量と単離フェルギノール量を比較した。表1にスギ材 100 g あたりの抽出分画物量を示す。未処理スギ材に比べて日光散水スギ材のメタノール抽出物 S-2 量が2.5 分の 1 に減少し，相対的にトルエン-ヘキサン可溶物 S-6 も減少した。既にシイタケ生育阻害が知られているフェルギノール量は未処理スギ材で 104 mg であったのに比べ，日光散水スギ材では 23 mg と約 4 分の 1 以下まで減少した。日光散水の効果でスギ材樹脂成分が変化または分解し減少することが考えられる結果となった。スギ材をキノコ菌床栽培に用いる場合，日光散水を行う前処理に効果があることを裏付ける成果と言える。



Ferruginol: X= H, H　Sandaracopimarinol: R= CH_2OH　Phyllocladanol　β-Sitosterol
Sugiol　: X= O　Sandaracopimarinal: R= CHO

図3．スギ材から単離した樹脂成分.

表1．日光散水スギ材と未処理スギ材の溶媒抽出分画物量およびフェルギノール量の比較.

スギ材処理方法	スギ材 100 g あたりの抽出分画物量 / mg				
	メタノール抽出物 S-2	トルエン不溶物 S-3	ヘキサン不溶物 S-5	トルエン-ヘキサン可溶物 S-6	フェルギノール
未処理	1580	830	144	533	104
日光散水	639	345	36	264	23

2．2．2　スギ材成分のシイタケ菌生育阻害試験

シイタケ菌生育阻害試験を実施し，阻害作用の強いスギ材溶媒抽出分画物を確認し，更に単離した樹脂成分の阻害活性を測定する目的で，シイタケ菌生育試験を実施した。

試料は，未処理スギ材の溶媒抽出分画物S-2，S-4，S-6及び単離した6種類の樹脂成分（フェルギノール，サンダラコピマリナール，スギオール，サンダラコピマリノール，フィロクラダノール，β－シトステロール）を用いた。ポテトデキストロース寒天（PDA）培地への溶媒抽出分画物の添加量は，スギ材から得られる各分画物量に相当する濃度とし，培地 1ml あたり S-2 7.0 mg，S-4 3.6 mg，S-6 1.85 mg とした。一方，単離樹脂成分については生育阻害活性を比較するために，培地 1 ml あたり2.5 mgを添加して試験した。試料は難水性であるので，はじめに試料のエタノール溶液を PDA 粉末に混合して乾燥吸着させた後，水を加えて溶解，加熱滅菌して試料を含む PDA 試験培地を調製した。これに，あらかじめ 1 カ月 PDA 培地で培養したシイタケ菌（北研600号）を直径6 mm のコルクボーラーで打ち抜いて，PDA 試験培地中央に植菌し，25℃で静置培養した。植菌した直径(6 mm)を差し引いた生育直径の変化を培養日数についてプロットした（図4 および図5）。

図４から溶媒抽出分画物に阻害作用があり，トルエン－ヘキサン可溶部（S-6）は中程度，またメタノール抽出物（S-2）とトルエン可溶部（S-4）にはかなり強い阻害が認められた。いずれも溶媒可溶性分画物（S-2，S-4およびS-6）に阻害があることになり，テルペノイド類など樹脂成分に生育阻害物質が存在することが明らかになった。

図５は単離樹脂成分のシイタケ菌生育阻害作用を比較した結果を示している。強い阻害が認められたのはフェルギノール，スギオール，サンダラコピマリノールである。一方，サンダラコピマリナール，フィロクラダノール，β－シトステロールなどは阻害作用が弱いか，ほとんど無かった。シイタケ栽培の菌床としてスギ材を用いる場合には，これら樹脂成分の除去が前処理として必要であると判断した。

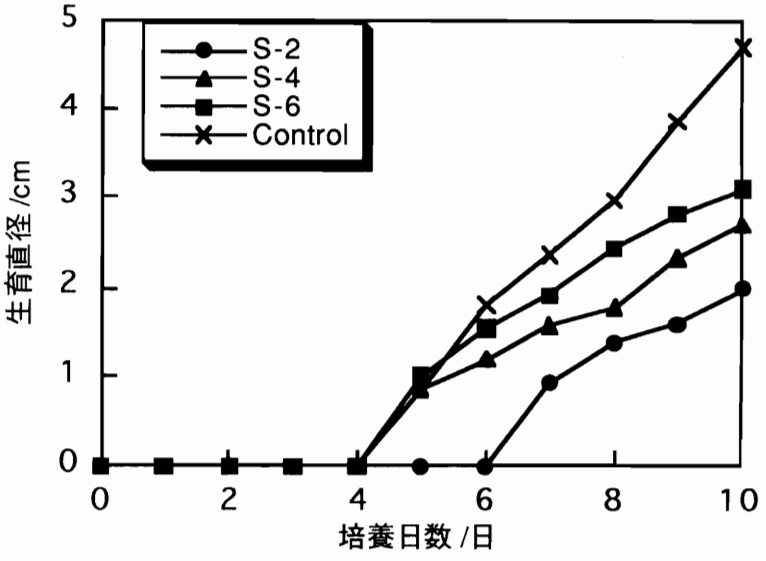


図４．スギ材溶媒抽出分画物のシイタケ菌生育阻害作用．
添加量（mg/ml 培地）：S-2 7.0, S-4 3.6, S-6 1.65.

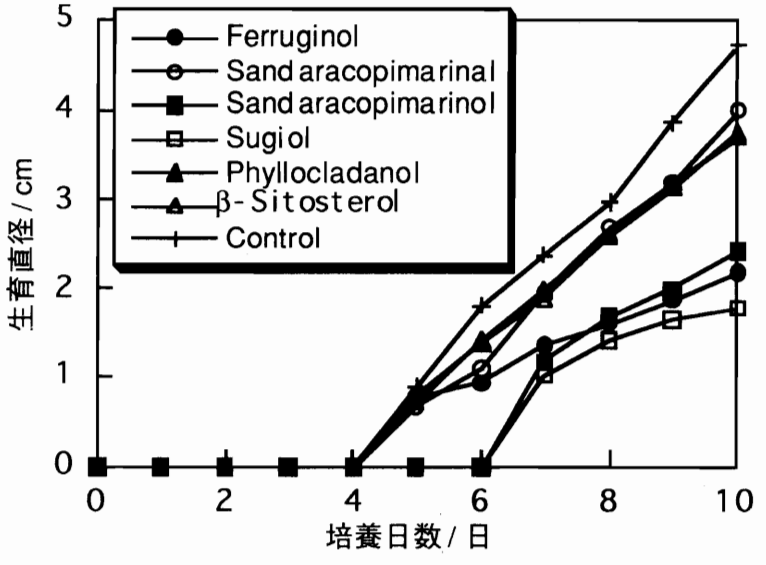


図５．スギ材単離樹脂成分のシイタケ菌生育阻害作用．
添加量 2.5 mg/ml 培地．

第３章　スギ材を用いるシイタケ菌床栽培試験

３．１　緒言

第２章でスギ材の溶媒抽出分画物および単離樹脂成分にシイタケ菌生育阻害作用があることを確認した。また，日光散水処理によりスギ材中のシイタケ阻害成分がある程度除去でき，更にメタノール抽出処理により除去が完全になることがわかった。そこで，これらの方法でシイタケ阻害成分を除去したスギ材を用いたシイタケ小型菌床栽培試験を実施し，生育阻害成分の除去効果を調べた。

３．２　結果および考察

鋸屑状スギ材および広葉樹材を数カ月に渡り散水しながら屋外に放置して日光に晒す前処理（日光散水処理）後、乾燥して使用した。鋸屑状菌床材の密度は，スギ材で 0.17～0.18 g/cm^3 、広葉樹材で 0.27～0.28 g/cm^3 であり，スギ材の方が密度が低かった。本章では，日光散水したスギ材を「**日光散水スギ材**」また日光散水スギ材を更にメタノール抽出処理したスギ材を「**メタノール抽出スギ材**」と省略する。

試験に用いる菌床の調製は広葉樹材鋸屑による実用栽培の場合に準じた。１菌床あたりの鋸屑状木材の使用量は 21.0 g （菌床全体 200 g）とした。これは実際のシイタケ菌床栽培の約 130分の1 のスケールにあたる。シイタケ菌床栽培試験はスギ材と広葉樹材の重量を一定とする条件で行った。スギ材鋸屑は広葉樹材鋸屑に比べ密度が低いので，同重量では体積は約1.6倍多くなる。

シイタケ菌床栽培に用いた菌床組成を表２に示す。全体で10系列の試験を計画した。メタノール抽出スギ材を使用する 1a～1d と日光散水スギ材を使用する 2a～2d が対応する同条件での比較を目的としている。発茸段階での効果を期待し，1 b と 2b では金属塩と発茸促進物質の添加し，また 1c と 2c ではクヌギ抽出物を添加した。 2e と 2f は金属塩と発茸促進物質をそれぞれ単独で加えた。1d および 2d は広葉樹材との混合効果を期待して設定した。3 が広葉樹材での対照試験である。

小型菌床栽培試験方法の概略を下に図示する。調製した10系列の菌床培地を 200 g 用のポリプロピレン製栽培袋に入れ，滅菌後シイタケ菌（北研600号）を植菌した。培養は23℃，200ルクス以下の暗所の恒温室で行い，培養期間は66日間とした。67日目に菌床を滅菌水に12時間浸水した後余剰の水を切り，13℃の低温室で300ルクスの蛍光灯下に発茸試験を行った。発茸処理後１週間目位から子実体の発生が始まり，２週間目以降にかさが開き充分生長した子実体の収穫を順次行った。３週間後，ほとんど子実体の発生および生長が終わったので，全ての子実体を収穫し，発茸数，収穫数，収穫量および乾燥重量を測定した。

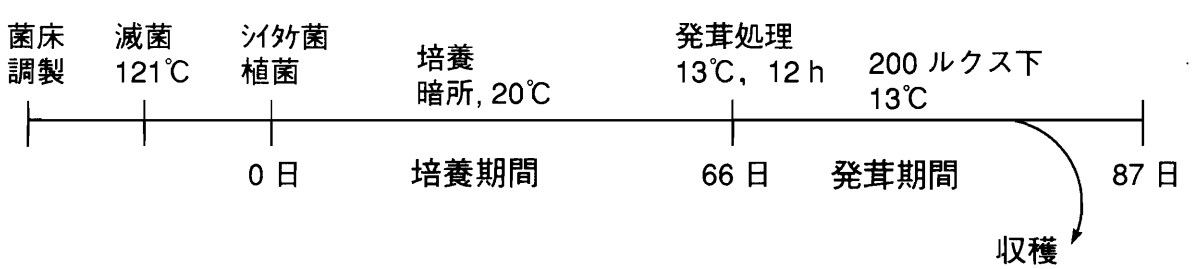


表2．シイタケ菌床栽培試験に用いる菌床組成.[a]

試験系列	菌床木材		添加物[b]	含水率 / %
	種類	使用量 / g		
1a	メタノール抽出スギ	21.0	なし	75.0
1b	メタノール抽出スギ	21.0	金属塩+発茸促進物質	77.3
1c	メタノール抽出スギ	21.0	クヌギ抽出物	75.5
1d	メタノール抽出スギ 広葉樹材	14.0 7.0	なし	76.4
2a	日光散水スギ	21.0	なし	75.3
2b	日光散水スギ	21.0	金属塩+発茸促進物質	77.5
2c	日光散水スギ	21.0	クヌギ抽出物	77.9
2d	日光散水スギ 広葉樹	14.0 7.0	なし	73.8
2e	日光散水スギ	21.0	発茸促進物質	73.9
2f	日光散水スギ	21.0	金属塩	76.9
3	広葉樹	21.0	なし	73.8

a) 菌床木材 21.0 g に対して，栄養物質（米糠 2.21 g, フスマ 1.12 g, コーンブラン 0.63 g）を加え，更に水 75 g を加えて良く混合して約 200 g の菌床を調製した.
b) 金属塩：KH_2PO_4 75.0 mg, $MgSO_4$ 37.5 mg, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 37.5 mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.75 mg, $ZnCl_2$ 0.225 mg, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.225 mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.075 mg.
発茸促進物質：ポリペプトン 187.5 mg, 酵母抽出物 187.5 mg, ビタミン B1 硝酸塩 0.75 mg, フェルラ酸 3.75 mg
クヌギ抽出物：メタノール抽出物 105 mg（抽出率 1.42 g / クヌギ材鋸屑 100 g）.

シイタケ菌床栽培試験結果を表3にまとめる。発茸数と収穫数が一致しないのは芽はでるものの子実体まで成長しないで芽のままで終わる例があるためである。経過観察および子実体収穫結果から次の点がわかった。

培養段階

1）菌糸生長は，メタノール抽出スギ材菌床 1a-d に比べ日光散水スギ材菌床 2a-d の系列で遅れが目立ち，メタノール抽出によるシイタケ菌生育阻害成分除去の効果が見られた。同様に，褐変の進行もメタノール抽出スギ材菌床 1a-d の方が全般に早かった。

2）2b および 2e は褐変も発茸もせず菌床が崩れやすく，1b および 2f も同じく菌床が崩れやすい傾向があった。これは，菌床全体へ菌糸が伸長していないためである。金属塩や発茸促進物質の添加はむしろマイナス効果であり，添加しない方が良かった。また，クヌギ抽出物の添加（2c および 2c）も効果はほとんどなかった。

発茸段階

3）子実体収穫に関して1菌床あたりに平均した収穫数・重量，乾燥重量を比較すると，下記の順で良い結果を与えている。すなわち，日光散水やメタノール抽出の前処理に

よりスギ材でもシイタケ栽培が可能とわかった。また，前処理したスギ材と広葉樹材との混合系（1d と 2d）が更に優れた結果をあたえることがわかった。

子実体収穫の優れた試験系列の順：　3 > 1d, 2d > 1a, 1b, 1c, 2a, 2c, 2f >> 2b, 2e

以上のように，スギ材に対し日光散水やメタノール抽出のような前処理を行うことで，従来困難であったスギ材を使用するシイタケ菌床栽培が可能になることを今回明らかにした。次ページに発茸処理後１４日目のシイタケ子実体形成の写真を示す。広葉樹材菌床（試験系列 3）と全く同様の形状と大きさを持つ子実体がスギ材菌床でも収穫できており，実用栽培に向け期待が持てる。現在，実際のシイタケ菌床栽培の規模の試験を行い，経済効果の高い栽培条件の実現に向け研究を継続中である。

表３．シイタケ菌床（200 g 袋）栽培試験結果.[a]

試験系列	試験菌床数	発茸菌床数	発茸数[b]	収穫数[b]	収穫重量/g	乾燥重量/g	菌床あたりの平均値		
							収穫数	収穫重量/g	乾燥重量/g
1a	5	5	13	8	59.5	4.8	1.6	11.9	0.96
1b	5	5	26	10	51.7	3.9	2.0	10.3	0.78
1c	5	3	15	9	41.3	3.0	1.8	8.3	0.60
1d	5	5	22	16	113.5	7.5	3.2	22.7	1.50
2a	5	4	11	5	58.4	3.9	1.0	11.7	0.78
2b	5	0	0	0	0	0	0	0	0
2c	5	5	29	16	44.7	3.2	3.2	8.9	0.64
2d	4	4	16	11	97.2	6.2	2.8	24.3	1.55
2e	4	0	0	0	0	0	0	0	0
2f	4	4	18	11	40.9	2.9	2.8	10.2	0.73
3	4	4	22	17	133.0	10.0	4.3	33.3	2.50

a) 栽培条件：培養段階（23℃，200ルクス以下，66日間），発茸段階（浸水処理12時間，次いで13℃，300ルクス，21日間）.

b) 発茸数と収穫数が一致しないのは，芽はでるものの子実体まで成長しないものがあるためである.

シイタケ菌床栽培試験（66日間培養，発茸処理後14日目の写真）



1a
1b
1c
1d



3



2a
2b
2c
2d
2e
2f

第4章　スギ材から抽出分離した有機成分の抗菌性試験

4．1　緒言

スギ材から抽出分離した有機成分（溶媒抽出分画物および樹脂成分）にはシイタケ生育阻害作用があることを明らかにした。これらは，植物病原性の糸状菌や細菌に対しても抗菌性を示すことが期待される。環境ホルモン（内分泌撹乱物質）の問題も含め農薬による環境汚染の心配が増大している。スギ材から天然由来の抗菌成分が見いだせれば，合成農薬に比べ力価が低くても農薬の減量のための補助に使用可能と考えて研究を行った。トマト青枯病菌（*Pseudomonas solanacearum*）に対する抗菌性を評価した結果について報告する。

4．2　結果および考察

トマト青枯病菌（*Pseudomonas solanacearum*）はグラム陰性の好気性細菌であり，トマト，トウガラシ，ピーマン，ナス，ジャガイモ，タバコ等に土壌を通じて感染し発病する。野菜の収穫直前に発病するケースが多く，株全体が青枯れてしまうため被害が大きく，深刻な病害の一つである。この細菌に対する抗菌性を評価した。

未処理スギ材の抽出分画物であるメタノール抽出物 S-2，トルエン不溶物 S-3，ヘキサン不溶物 S-5 とトルエン-ヘキサン可溶物 S-6 および単離樹脂成分であるフェルギノール，サンダラコピマリノールとサンダラコピマリナールの合計7種類を，抗菌試験の試料に使用した。試料 250 mg をジメチルスルホキシド（DMSO）1 ml に溶解しフィルター濾過して滅菌し，オートクレーブ滅菌したポテトスクロース寒天培地（PSA 培地）2.5 ml を入れたシャーレに所定濃度になるように混合した後，静置固化させて試料を添加した PSA 試験培地を調製した。ポテトスクロース液体培地（PS 培地）で30℃，48時間前培養した *P. solanacearum* を PSA 試験培地に1白金耳画線塗抹し，30℃で72時間培養した。72時間後に細菌の生育が見られない添加した試料の最低濃度を最小発育阻止濃度（MIC）と決定した。

試験結果を表4にまとめる。なお，試料の溶解に使用した DMSO は 80 μl/ml 培地濃度でも *P. solanacearum* の生育に影響を与えないことを確認している。スギ材の溶媒抽出分画物および樹脂成分はいずれもほぼ同じ MIC 値（5.0-10.0 mg/ml）を示した。MIC 値は抗生物質等に比較するとかなり低いが，スギ材中の有機溶媒可溶成分がある程度の抗菌性を有することがわかった。今後，他の細菌や糸状菌に対する抗菌作用を調べると共に，スギの葉や樹皮の溶媒抽出物についての抗菌試験も実施し，有効利用に向けた知見を得る予定である。

表4．スギ材の溶媒抽出分画物および樹脂成分の
トマト青枯病菌に対する最小発育阻止濃度.

試験試料	MIC (mg/ml)
メタノール抽出物 S-2	5.0
トルエン不溶物 S-3	10.0
ヘキサン不溶物 S-5	5.0
トルエン-ヘキサン可溶物 S-6	5.0
Ferruginol	5.0
Sandaracopimarinol	5.0
Sandaracopimarinal	5.0

第5章　まとめ

スギ材の溶媒抽出分画と樹脂成分の単離を検討し，溶媒分画物と6種類の樹脂成分を得た。これらのシイタケ生育阻害作用を調べ，各溶媒分画物に阻害作用があり，またトルエン-ヘキサン可溶分画S-6から単離したフェルギノール，スギオールおよびサンダラコピマリノールに同程度の強い阻害作用があることを見いだした。スギ材をシイタケ菌床栽培に利用可能にするために，スギ材中の生育阻害成分の除去が必要であることがわかった。シイタケ生育阻害成分の除去には，ソックスレー抽出器を用いるメタノール抽出が良いことがわかった。また，野外で散水しながら日光下に晒す前処理をしたスギ材（日光散水スギ材）はフェルギノールなどの阻害成分をかなり減少させる効果を持つことを明らかにした。

日光散水スギ材およびこれを更にメタノール抽出したスギ材を菌床に用い，実験室レベルでのシイタケ小型菌床栽培を試みた。このような前処理により生育阻害成分を減少させたスギ材でシイタケ菌床栽培を行うと，子実体が収穫可能なことを実証した。

スギ材の溶媒分画物および単離樹脂成分であるフェルギノール，サンダラコピマリノールとサンダラコピマリナールのトマト青枯病菌に対する抗菌試験を実施し，ある程度の抗菌性を有することを確認した。

謝辞

本研究の一部は，九州電力株式会社総合研究所と宮崎大学の共同研究で行われたものである。共同研究員として参加された本学農学部　小川喜八郎教授並びに九州電力株式会社総合研究所　小宮山晶子研究員および牟田信次研究員に感謝する。スギ材有機成分の抗菌試験に関して指導を戴いた九州電力株式会社　藤枝國光顧問（九州大学名誉教授）並びに熊本県立大学　松添直隆教授に感謝する。また，スギ材を用いるシイタケ菌床栽培試験に関して指導と多大な協力を戴いた有限会社村田産業　村田正幸会長並びに吉留高志社長に深謝する。