

令和 2 年 11 月 27 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02998

研究課題名(和文) ナノファイバー化技術を用いたきのこ栽培廃菌床の持続的利用技術の開発

研究課題名(英文) Technology development for sustainable utilization of the spent mushroom substrates by its nanofibrillation

研究代表者

上中 弘典 (KAMINAKA, Hironori)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：40397849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：きのこの菌床栽培の際に大量に生じる廃菌床の持続的な利用技術の開発を目的に、本研究ではきのこ栽培廃菌床からバイオナノファイバーを製造する技術を確立し、得られたナノファイバーがもつ農業分野と食品分野に貢献できる機能を調査した。培地の樹種が異なるきのこ栽培廃菌床からナノファイバーが製造可能であることを、観察ならびに化学/物理的な評価法を駆使して証明した。これらナノファイバーを処理した植物・きのこにおいて、キチンナノファイバーを処理した場合と同様の効果が観察された。一方で、キチン/セルロースナノファイバーで見出された小麦粉生地強化効果は、きのこ栽培廃菌床由来バイオナノファイバーでは見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

農工連携の異分野融合研究により、セルロースとキチンの両方を含む廃棄物から実際に機能をもったバイオナノファイバーを安定的に製造する新しい製造技術を確立できた。またそのナノファイバーには、キチンナノファイバー同様に農業分野に利用可能な機能が備わっていることを明らかにした。きのこの菌床栽培の際に大量に生じる廃菌床は利用用途が無く、廃棄物として処理されている。そのため、本研究により確立された持続的に供給可能なきのこ栽培廃菌床由来のバイオナノファイバーの利活用に関する基盤技術を用いることで、未利用バイオマスの農業利用による新たな持続的な資源利用システムの構築が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：For technology development for sustainable utilization of the spent mushroom substrates largely produced during mushroom cultivation, we have, in this study, established the methods to produce bionanofibers from the spent mushroom substrate and examined those functions that can contribute to the field of agriculture and food. It was demonstrated by using microscopic observation and chemical/physical evaluation methods that bionanofibers can be obtained from the spent mushroom substrates cultured using media derived from different tree species. Plants and mushrooms treated with these nanofibers showed similar effects as the treatment with chitin nanofibers. On the other hand, the dough strength of wheat flour was not affected by the addition of these bionanofibers, unlike chitin/cellulose nanofibers.

研究分野：農学

キーワード：未利用バイオマス利用 きのこ栽培廃菌床 ナノファイバー 持続可能システム 植物 食品 きのこと

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

未利用バイオマスの利活用は、農林水産業の発展や地球温暖化の防止等の地球規模での環境問題の解決に向けて、社会的要請が高まっている。特に農林水産業・食品産業において発生する廃棄物を高付加価値な素材へと変換し、その利用技術を開発することで、将来の新産業の創出が可能になると期待される。農林水産業における未利用の大量の廃棄物としては、きのこの菌床栽培の際に生じる廃菌床が知られる。廃菌床は菌床栽培で生産されるきのこのことほぼ同量の約40万トンが年間に排出されている。その用途として堆肥や飼料での利用が検討されているが、ほぼ全てが産業廃棄物として処理されているのが現状である。きのこのこととして子実体が収穫された後に残る廃菌床は、オガクズと米ヌカからなる木粉培地と、そこにきのこの菌糸が蔓延したものである。つまり、廃菌床はオガクズと米ヌカ由来のセルロースときのこの菌糸由来のキチンといった未利用バイオマスの宝庫であるともいえる。そのため廃菌床の利活用には、セルロースやキチンの有効利用が必須であるといえるが、これらは素材として加工性、成形性に劣るため、そのままでは利用困難なのが現状である。

一方、セルロース、もしくはキチンをナノレベルまで微細化したナノファイバーは均一に水中で分散するため、混合や成形などの加工性が格段に向上しており、セルロース、もしくはキチンの利用を促すためのブレイクスルーとなっている。セルロースナノファイバーは国の成長戦略にも位置づけられている有望な素材であり、産学問問わず様々な分野で研究が展開されている。最初に報告されたセルロースのナノファイバー化技術を参考に、申請者らはキチンをナノファイバーの形状で簡単に単離する技術を独自に開発している (Ifuku and Saimoto, *Nanoscale*, 2012)。我々は、農作物の生産性向上と農薬使用量の低減に貢献できる病害抵抗性誘導能と成長促進効果が、キチンをナノファイバー化することで飛躍的に増強できることを発見している (Egusa et al., *Front. Plant Sci.*, 2015 他)。また、カロリー量やグルテン摂取量の低減に貢献できる生地強度の増強効果をキチンナノファイバーとセルロースナノファイバーの両方がもつことを発見している (田中ら, *日本食品科学工学会誌*, 2015 他)。健康に関する機能ももつこれら素材を用いることで、様々な面から食品を高付加価値化することが可能である。そのため、安定的に産出されるきのこ栽培廃菌床からセルロースナノファイバーとキチンナノファイバーの混合物が製造できれば、未利用バイオマスの利活用に貢献できる持続可能な資源利用システムが構築可能であると考えられた。

### 2. 研究の目的

きのこの菌床栽培の際に大量に生じる廃菌床は利用用途が無く、廃棄物として処理されているが、豊富に含まれるセルロースとキチンを利活用できれば、持続可能な資源利用システムが構築可能であると考えられる。セルロース、もしくはキチンをナノファイバー化して製造できるバイオナノファイバーに農業分野と食品分野に貢献できる機能が備わっていることをこれまでに明らかにしてきた。そこで本研究では、「きのこ栽培廃菌床から製造したバイオナノファイバーの農業・食品分野での利用をベースとした持続的な資源利用システムの構築」を最終目標とし、その達成に必要な不可欠な基盤的な知見を得るために、農工連携の異分野融合研究を実施した。

### 3. 研究の方法

#### (1) きんこの栽培廃菌床由来バイオナノファイバーの製造技術開発

子実体の発生を8回繰り返した後のシイタケ廃菌床と1回子実体を発生させたあとに収穫したエリンギ廃菌床を天日で乾燥後、ブレンダー (Vita-Mix 5200, Vita-mix) で20分間粗粉碎した。得られた粉末状の廃菌床を、ソックスレー抽出器を用いて脱脂し、Wise法に従いリグニンとヘミセルロースを除去した。次いで、抽出残渣に純水を加え濃度を1wt%とした。この懸濁液を石臼式磨砕機 (スーパーマスコロイダー (MKZA12-20J), 増幸産業) で粉碎した。粉碎は2回実施した。

得られたきのこ栽培廃菌床由来バイオナノファイバーは、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した。また、FT-IR分光光度計を用いてFT-IR法により化学的に評価した。結晶構造はX線発生装置を用いて評価した。元素分析装置を用いて、キチンの含有量を元素分析により評価した。比表面積は自動比表面積/細孔分布測定装置を使用してBET法により測定した。

#### (2) 植物を用いた廃菌床由来バイオナノファイバーの機能評価

植物の生育促進効果を評価するために、(1)で得られた様々な濃度のきのこ栽培廃菌床由来バイオナノファイバー分散液を添加した土壌にてモデル植物であるシロイヌナズナを5週間生育させた植物体について、成長度 (総葉数、バイオマス量 (乾燥重量)、SPAD値 (葉緑素量)) の測定を行った。栽培土壌については、その化学特性を明らかにするためにpHと電気伝導度を測定した。また同様の試験をイチゴとキャベツでも実施した。

病害抵抗性は、同様に生育させた植物に病原菌であるアブラナ科黒すす病菌 (糸状菌) の胞子を接種し、処理後の植物における病斑形成度を指標に評価した。また同様の試験をイチゴとキャベツでも実施した。さらに、病害抵抗性誘導の指標となるエリシター活性を、シロイヌナズナ、イネ、イチゴ、キャベツ、トマトのリーフディスクもしくは培養細胞に分散液を添加した後に産生される活性酸素量から経時的に測定した。

### (3) きのをを用いた廃菌床由来バイオナノファイバーの機能評価

シイタケの菌床栽培用の木粉培地に(1)で得られた様々な濃度のきのこ栽培廃菌床由来バイオナノファイバー分散液を添加し、栽培して発生させたシイタケの子実体について、菌床毎の発生個数と子実体の新鮮重を測定した。

### (4) 廃菌床由来バイオナノファイバーの製パン性における機能評価

小麦粉には市販の強力粉を用いた。食パンの製造は、ホームベーカリーを用い、取扱説明書の基本の食パンの作成方法に従って行った。食パンの基本の原料配合は強力粉 200g、バター 10 g、砂糖 17 g、スキムミルク 6 g、塩 5 g、ドライイースト 2.8 g、水 180 mL を用いた。廃菌床由来バイオナノファイバー分散液は、小麦粉量に対しキチン重量が 0.15% となるように 1% (w/v) のキチン NF 分散液 30 mL を水と合わせ、加水量が合計 180 mL となるように添加した。パン生地調製および焼成をホームベーカリーの食パンコースにより行った。製パン後のパンの高さを、電子ノギスを用いて測定した。

## 4. 研究成果

### (1) きのを栽培廃菌床由来バイオナノファイバーの製造技術開発

シイタケおよびエリンギを栽培したの廃菌床からバイオナノファイバーを製造する技術を確立した。粉碎処理後に得られたバイオナノファイバーは均一に分散しており、セルロースナノファイバーやキチンナノファイバーのそれと同様であった。また SEM による観察から、ナノサイズの繊維状の像が広い視野にわたり確認できた。バイオナノファイバーの形状は概ね均一であり、繊維の幅はおよそ 10 nm であった。化学的評価と結晶構造の解析から、得られたバイオナノファイバーはセルロースとキチンより構成されていることが明らかになった。成分分析により、シイタケおよびエリンギ由来バイオナノファイバーのキチン含有率はそれぞれ 2.03% と 0.94% であった。興味深いことに、 $\beta$ -グルカンが 7% 含まれていることが明らかとなり、それに伴ってか、相対結晶化度がセルロースナノファイバーやキチンナノファイバーよりも低い値を示した。BET 法により算出されたバイオナノファイバーの比表面積は極めて大きく、このことはナノサイズまで微細化されていることを端的に表している。

### (2) 植物を用いた廃菌床由来バイオナノファイバーの機能評価

シイタケ栽培廃菌床由来バイオナノファイバーの分散液について、モデル植物シロイヌナズナを用いた生育促進効果の評価を行った。分散液を添加した土壌にて生育させた植物では、未処理区と比べ高濃度(1%, 0.1%)の場合は総葉数とバイオマス量(乾燥重量)が顕著に減ったが、低濃度(0.01%, 0.001%)の場合は有意に総葉数とバイオマス量が増加した。これらの結果はキチンナノファイバー処理をした結果と非常に類似していた。また、分散液を添加しても土壌の化学性(pH、電気伝導度)は変化しないため、バイオナノファイバーによる植物への直接の作用によりこれらの変化が起こっていると考えられる。つまり、比較的低濃度のバイオナノファイバー分散液の土壌への施用により、植物の生育が促進されることが明らかになった。

次に、同じバイオナノファイバー分散液について、シロイヌナズナを用いて病害抵抗性の誘導効果の評価を行った。同様に分散液を添加した土壌にて生育させた植物にアブラナ科黒すす病菌(糸状菌)の胞子を接種し、処理後の植物における病斑形成度を指標に評価した結果、濃度依存的に病斑の形成が抑制されることが明らかになった。本結果はキチンナノファイバー処理をした結果と非常に類似していた。また、病害抵抗性誘導の指標となるエリシター活性を、シロイヌナズナの幼苗に様々な濃度のバイオナノファイバー分散液を添加した後に産生される活性酸素量から経時的に測定した結果、0.1%の処理により顕著なエリシター活性が見られたが、興味深いことにキチン受容体変異体である *cerk1-2* においても若干のエリシター活性が見られた。病害抵抗性の誘導活性は廃菌床由来のキチンナノファイバーによるものであると考えられるが、キチンナノファイバーのエリシター活性は *cerk1-2* では全く見られないことを報告している(Egusa et al., Front. Plant Sci., 2015) ため、シイタケ栽培廃菌床由来バイオナノファイバーにはキチンとは異なる抵抗性を誘導可能な物質が含まれていると考えられる。先述通り、本バイオナノファイバーには  $\beta$ -グルカンが多量に含まれていることが原因である可能性も考えられる。

イチゴとキャベツの栽培土壌への低濃度(0.01%)のシイタケ栽培廃菌床由来バイオナノファイバー分散液の添加により、シロイヌナズナの場合と同様に総葉数とバイオマス量が増加することが明らかになった。また、イネ、イチゴ、キャベツ、トマトにおいて、本バイオナノファイバー処理によりエリシター活性が誘導されることも明らかにした。

さらに、シイタケ栽培廃菌床由来バイオナノファイバーとエリンギ栽培廃菌床由来バイオナノファイバー分散液のとの比較も行った。シロイヌナズナのエリシター活性測定系を用い、様々な濃度のバイオナノファイバー添加による病害抵抗性の誘導能を定量的に比較した。その結果、エリンギ栽培廃菌床由来バイオナノファイバーのエリシター活性はシイタケ廃菌床由来のものと比較して顕著に低いため、病害抵抗性誘導能が低いと考えられた。また、リグニン除去の試薬量を 1/4 に減らして製造したシイタケ栽培廃菌床由来バイオナノファイバー分散液を用いて

試験したところ、植物の成長が逆に抑制された。シロイヌナズナのエリシター活性測定系を用いて定量的に評価した結果、0.1%だけでなく0.01%でも本バイオナノファイバー処理による顕著なエリシター活性が見られ、*cerk1-2*ではエリシター活性が見られなかった。残留するリグニンの影響でこれらの結果の違いが生じていると考えられるが、病害抵抗性の誘導能への影響は本成果からだけでは評価できなかった。

これらの結果をまとめると、比較的低濃度のきのこ栽培廃菌床由来バイオナノファイバー分散液の土壌への施用により、植物の成長が促進され、病害抵抗性も誘導されることが明らかになった。これらの結果は3%もしくはそれ以下しか含まれないキチン由来の効果であると考えられるが、 $\beta$ -グルカンの関与も否定はできなかった。また、リグニンは製造工程で完全に除去する必要があることも明らかとなった。さらに、エリンギよりもシイタケの栽培に用いた廃菌床の方の効果が高かったことから、子実体の発生回数や栽培期間、すなわちキチンを細胞壁に持つきのこの菌の蔓延度が本効果の発現に関わると示唆された。

### (3) きのこを用いた廃菌床由来バイオナノファイバーの機能評価

シイタケの菌床栽培系を用いて当初確認できていた廃菌床由来バイオナノファイバー天下による子実体の発生個数の増加は、複数回の同じ試験や濃度を変えても再現することができなかった。また、リグニン除去の試薬量を1/4に減らして製造したシイタケ栽培廃菌床由来バイオナノファイバー分散液を処理すると、子実体の発生個数が減少した。

### (4) 廃菌床由来バイオナノファイバーの製パン性における機能評価

(1)で得られたきのこ栽培廃菌床由来バイオナノファイバーについて、製パン性における機能評価を行った。きのこ栽培廃菌床由来バイオナノファイバーを添加して、強力粉を用いて製造した製パンしたパンの膨化サイズは、無添加時と差は無かった。本結果から、キチンもしくはセルロースナノファイバーの添加により見られた小麦粉生地強度の強化効果は、きのこ栽培廃菌床由来バイオナノファイバーの添加では発揮されないことが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計25件)

1. Mayumi Egusa, Roxana Y. Parada, Yihun Fantahun Aklog, Shinsuke Ifuku, Hironori Kaminaka: Nanofibrillation enhances the protective effect of crab shells against Fusarium wilt disease in tomato. International Journal of Biological Macromolecules, 128, 22-27, 2019, 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.088, 査読有
2. Roxana Y. Parada, Mayumi Egusa, Yihun Fantahun Aklog, Chihiro Miura, Shinsuke Ifuku, Hironori Kaminaka: Optimization of nanofibrillation degree of chitin for induction of plant disease resistance: Elicitor activity and systemic resistance induced by chitin nanofiber in cabbage and strawberry. International Journal of Biological Macromolecules, 118, 2185-2192, 2018, 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.089, 査読有
3. 上中弘典、江草真由美、永江(雨坪)知音、岩本涼、磯和由希子、才所美晴、伊福伸介、田中裕之: 小麦粉生地と製パン性に対するセルロースナノファイバーの影響およびキチンナノファイバーとの比較, キチン・キトサン研究, 24, 4-10, 2018, <http://jssc.kenkyuukai.jp/images/sys%5Cinformation%5C20170926140442-321B792FC5D8007A99FDAFDCDE0BDA9B31014BED62B69FC9679AD78C786925DA.pdf>, 査読有
4. 上中弘典、江草真由美、松川すみれ、吉岡麻衣、磯和由希子、Roxana Y. Parada、三浦千裕、伊福伸介: 新素材と未解明の機能が拓くキチン研究の新展開、植物感染生理談話会論文集, 53, 97-106, 2018, 査読無
5. 上中弘典、磯和由希子、三浦千裕、江草真由美、伊福伸介: 新素材キチンナノファイバーによるダイズの窒素固定能の促進効果に関する研究、大豆たん白質研究, 20, 31-36, 2017, 査読無
6. Yihun Fantahun Aklog, Mayumi Egusa, Hironori Kaminaka, Hironori Izawa, Minoru Morimoto, Hiroyuki Saimoto, Shinsuke Ifuku: Protein/CaCO<sub>3</sub>/chitin nanofiber complex prepared from crab shells by simple mechanical treatment and its effect on plant growth. International Journal of Molecular Sciences, 17, 1600, 2016, 10.3390/ijms17101600, 査読有

### 〔学会発表〕(計44件)

1. Mayumi Egusa, Roxana Y. Parada, Yihun F. Aklog, Mai Yoshioka, Chihiro Miura, Shinsuke Ifuku, Hironori Kaminaka: Optimization of nanofibrillation degree of chitin to induce disease resistance against fungal pathogens in plants. 14th International Chitin and Chitosan Conference & 12th Asia Pacific Chitin and Chitosan Symposium (国際学会), 2018年
2. Sumire Matsukawa, Mayumi Egusa, Chihiro Miura, Shiori Nakatani, Jyunpei Yamada,

- Tsuneyoshi Endo, Shinsuke Ifuku, Hironori Kaminaka: Chitin promotes growth and nitrogen uptake with the modulation of global gene expression in plants. 14th International Chitin and Chitosan Conference & 12th Asia Pacific Chitin and Chitosan Symposium (国際学会), 2018 年
3. Mamu Gonnami, Yukiko Isowa, Sarasa Takashima, Naoya Takeda, Mayumi Egusa, Shinsuke Ifuku, Hironori Kaminaka: Chitin nanofiber promotes rhizobial symbiosis in the model legume *Lotus japonicus*. 14th International Chitin and Chitosan Conference & 12th Asia Pacific Chitin and Chitosan Symposium (国際学会), 2018 年
  4. 上中弘典、江草真由美、松川すみれ、吉岡麻衣、磯和由希子、Roxana Y. Parada、三浦千裕、伊福伸介、新素材と未解明の機能が拓くキチン研究の新展開、平成 30 年度植物感染生理談話会(招待講演), 2018 年
  5. 権並真夢、磯和由希子、高嶋さらさ、武田直也、江草真由美、伊福伸介、上中弘典、キチンナノファイバーはミヤコグサ根粒における共生窒素固定を促進する、第 28 回植物微生物研究会研究交流会, 2018 年
  6. 江草真由美、Roxana Y. Parada、三浦千裕、Yihun F. Aklog、伊福伸介、上中弘典、カニ殻由来キチンナノファイバー/タンパク質/炭酸カルシウム複合体のトマト萎凋病に対する防除効果、平成 30 年度日本植物病理学会関西支部会, 2018 年
  7. 吉岡麻衣、Roxana Y. Parada、松川すみれ、江草真由美、三浦千裕、伊福伸介、上中弘典、キチンによる全身抵抗性の誘導メカニズムの解明、第 59 回日本植物生理学会年会, 2018 年
  8. 吉田早織、上中弘典、松本晃幸、井澤浩則、齋本博之、伊福伸介、廃菌床由来ナノファイバーの製造と補強繊維としての応用、第 31 回キチン・キトサン学会大会, 2017 年
  9. 松川すみれ、江草真由美、三浦千裕、中谷汐里、山田淳平、今泉(安楽)温子、遠藤常嘉、西澤洋子、伊福伸介、上中弘典、既知の受容体を介さない植物のキチンに対する応答メカニズム、植物微生物研究会第 27 回研究交流会, 2017 年
  10. Hironori Kaminaka, Sumire Matsukawa, Mayumi Egusa, Chihiro Miura, Shiori Nakatani, Jyunpei Yamada, Tsuneyoshi Endo, Yoko Nishizawa, Shinsuke Ifuku: The mechanisms underlying growth promotion in chitin-treated plants. Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (国際学会), 2017 年
  11. Roxana Y. Parada, Mayumi Egusa, Yihun Fantahun Aklog, Shinsuke Ifuku, Hironori Kaminaka, Chitin nanofiber: a promising novel material for plant disease control, 平成 29 年度日本植物病理学会大会, 2017 年
  12. Mayumi Egusa, Shiori Nakatani, Chihiro Miura, Sumire, Matsukawa, Jyunpei Yamada, Yoko Nishizawa, Shinsuke Ifuku, Hironori Kaminaka: The mechanisms underlying growth promotion in chitin-treated plants, 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年
  13. 伊福伸介、浦上剛士、江草真由美、上中弘典、井澤浩則、齋本博之、キチンナノファイバー/タンパク質複合体の製造とその機能、第 30 回キチン・キトサン学会大会, 2016 年
  14. 岩本涼、齋本博之、伊福伸介、江草真由美、田中裕之、上中弘典、キチンナノファイバー添加小麦粉による製パン性の向上、セルロース学会第 23 回年次大会, 2016 年

〔図書〕(計 8 件)

1. 伊福伸介、上中弘典、阿部賢太郎：技報堂出版、キチン・キトサンの最新科学技術 機能性ファイバーと先端医療材料、2016 年、288 ページ
2. 伊福伸介、NTS, バイオマス由来の高機能材料 セルロース、ヘミセルロース、セルロースナノファイバー、リグニン、キチン・キトサン、炭素系材料, 2016 年, 312 ページ

〔その他〕

ホームページ等

<http://muses.muses.tottori-u.ac.jp/faculty/kaminaka/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松本 晃幸

ローマ字氏名：(MATSUMOTO, teruyuki)

所属研究機関名：鳥取大学

部局名：農学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 60132825

研究分担者氏名：伊福 伸介  
ローマ字氏名：( IFUKU, shinsuke )  
所属研究機関名：鳥取大学  
部局名：大学院工学研究科  
職名：教授  
研究者番号 ( 8 桁 ) : 70402980

(2)研究協力者

研究協力者氏名：江草 真由美  
ローマ字氏名：( EGUSA, mayumi )

研究協力者氏名：三浦 千裕  
ローマ字氏名：( MIURA, chihiro )

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。