

# 気軽に読める「微生物の小話講座」

(その11 -20℃の家庭用冷凍庫でエノキタケの菌株を保存できる?)

旭川工業高等専門学校 物質化学工学科 富 樫 巖



## はじめに

もうすぐ、2013年が終わろうとしています。今年、北海道林産技術普及協会さんは創立60周年を迎え、会長さんのバトンタッチも行われましたね。この紙面で恐縮ですが、前会長の高橋秀樹さん、本当に長い間お疲れ様でした。小生が林産試験場の普及課長を勤めていた際には、創立50周年対応などにおいて高橋さんの斬新な考え方や説得力のあるご発言に種々助けていただきました。改めまして感謝申し上げます。

さて、本講座は今回で11回となります。少しマニアックな話題かもしれませんが、食用キノコのエノキタケについて、その大切な原菌（菌株）を比較的高い温度（-20℃）で凍結保存する研究結果を紹介します。キノコ産業の裏方的な話題でしょうから、それ以外の分野の方々にはいまいちの興味レベルかも知れませんが…お許してください。

## -20℃凍結保存の意味と意義とは

一般的に、年レベルの中長期的な期間を考慮した食用キノコの菌株保存に注目すると、設備的に恵まれている試験・研究施設等であれば-80~-196℃での凍結保存法が用いられます。一方、そうでない場合や恵まれた施設であっても、必要に応じて5℃前後（家庭用冷蔵庫の温度）を用いる継代培養保存法が汎用されます。この方法は設備・機材的に手軽ですが、数か月～半年程度で新たな培地への植え継ぎ作業を行う煩雑さがあります。

旭川市に近い「キノコの里・愛別町」でたくさん栽培されている作目の一つがエノキタケです。その菌株を継代培養保存すると、発芽温度と保存温度が重なっていることなどが原因で、写真1のように保存用の寒天培地に子実体（キノコ）が発生します。栽培用のノコクズ培地にキノコが発生するのは問題ないのですが、保存用培地にキノコが発生すると菌株の性質が変異することになり、困ってしまいます。そこで、この課題解決の一方策を狙い、リーズナブルな家庭用冷凍庫レベルの温度（-20℃程度）を利用したエノキタケ菌株の凍結保存の可能性を探ってみることにしまし

た。凍結後にも菌株が生きていることはもちろんですが、最も大切なことは、この保存方法が原因でキノコが発生しなくなるとか、発生するほとんどのキノコが奇形になるなどのマイナス影響が出ないことでしょう。

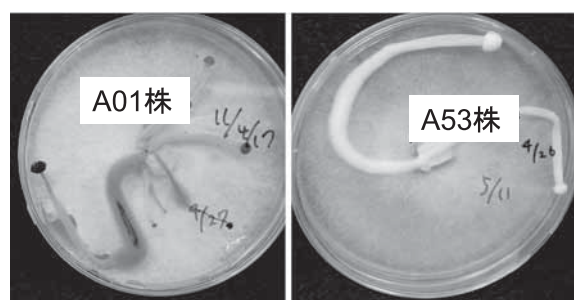


写真1 継代培養保存中に発生したエノキタケの子実体（7℃、左：野生系、右：白造り系）

菌株を凍結保存する場合には、氷の結晶成長による凍結障害からキノコの菌糸を守る「凍結保護溶液」を用います。キノコとの相性もありますが、一般的には10%のグリセリン水溶液が汎用されます。しかし、今回はより簡便な方法を目指して「純水」を用いる可能性も検討してみました。

## 供試菌株と供試材料、菌株の保存条件、および生存率の測定方法

供試菌のエノキタケとしては、野生系（A01）と白造り系（A53）の2菌株を用いました。いずれもポテトデキストロース寒天（PDA）平板培地を用いて温度7℃の冷蔵庫中で継代培養保存していたもので、試験に用いる場合には、直径9cmのPDA平板培地にこれらを接種して25℃で7日間培養し、コルクボーラーで培地ごと打ち抜いた直径5mmの菌体円盤を接種源としました。凍結保護液はグリセリン10%水溶液と純水とし、1.5mlマイクロチューブにエノキタケ菌株の菌体円盤5枚を入れた後、いずれかを投入して同円盤全体を覆いました（図1）。そしてそれらを、-80℃（デープフリーザー）、-20℃（デープフリーザー）、-18.5℃（家庭用冷凍庫）、7℃（家庭

用冷蔵庫；コントロール）へ最大150日間投入しました。

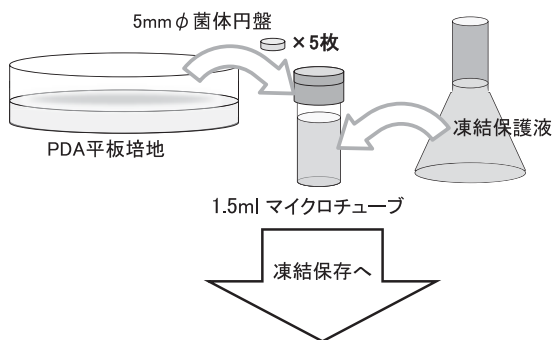


図1 エノキタケ菌株の凍結保存方法

一定期間の凍結後にマイクロチューブを取り出し、コントロールを除いて30℃の湯浴中に3分間浸漬することで解凍しました。PDA平板培地にマイクロチューブから取り出した菌体円盤5枚を接種し、25℃のインキュベーター中で最大10日間培養することで菌糸の再生状況を目視と実体顕微鏡で観察しました。菌体円盤からの菌糸再生が確認された時を「発菌」、再生菌糸がPDA平板培地中に伸長した時を「活着」とし、活着したものは全てPDA平板培地上で成長が認められたことから、活着数を「生存数」とした生存率を求めました。

#### グリセリン水溶液または純水を用いた-20℃凍結後の菌糸再生は如何に

手始めに、凍結保護液に純水またはグリセリン水溶液を用い、エノキタケ菌糸を-20℃で3、5、10日間凍結し、その菌糸再生状況を観察しました。そして、その結果を図2と図3に示しました。凍結保護液の違い、菌株の違いにより生存率が100%に達する培養日数に多少の差があったものの、遅くとも5日間で全ての菌体円盤が活着しました。図4には生存率100%に達するまでに要した日数をまとめています。野生系(A01)をグリセリン水溶液で10日間凍結保存した場合に5日間を要したものの、多くが2~3日間となり、凍結保護液と純水の差異は殆ど生じませんでした。この結果からエノキタケ菌株の凍結保存では純水と-20℃の組み合わせが使えるという可能性を得ました。

参考までに、純水と-80℃または純水と-20℃凍結の組み合わせで、同様に3、5、10日間凍結した場合の両菌株の挙動を観察し、得られた結果を図5に示しました。菌株により生存率が100%に達するまでの

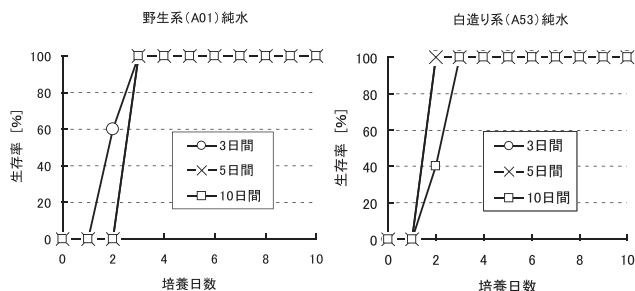


図2 純水を使用して-20℃で3~10日間凍結保存菌後のエノキタケ菌株の菌糸再生状況（解凍後25℃培養）

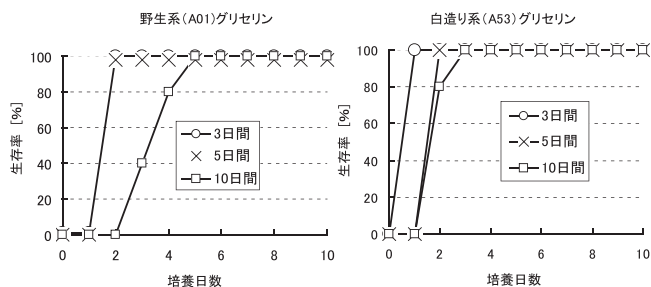


図3 グリセリンを使用して-20℃で3~10日間凍結保存菌後のエノキタケ菌株の菌糸再生状況（解凍後25℃培養）

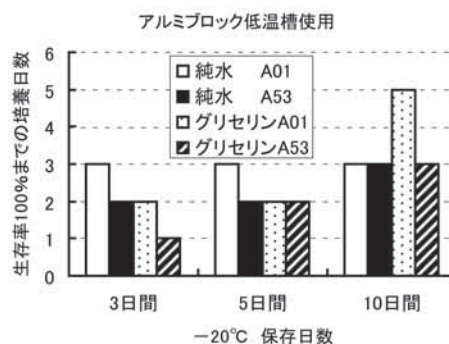


図4 -20℃で凍結保存後のエノキタケ菌株が生存率100%に達するまでに要した培養日数（解凍後25℃培養）

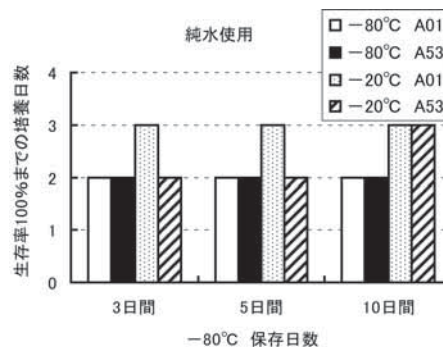


図5 純水を使用して-80℃または-20℃で凍結保存後のエノキタケ菌株が生存率100%に達するまでに要した培養日数（解凍後25℃培養）

日数に多少の差があるものの、 $-80^{\circ}\text{C}$ では2日間そして $-20^{\circ}\text{C}$ では最大3日間で全てが活着しました。これは、 $-20^{\circ}\text{C}$ よりも $-80^{\circ}\text{C}$ が望ましいことを意味します。すなわち、 $-20^{\circ}\text{C}$ 凍結はエノキタケ菌糸への何らかのストレスを与えており、菌糸の活着までに要した時間の長さはそのストレス回復に必要な時間と解釈できます。

### 純水を用いて1~5カ月間凍結した場合のエノキタケの菌糸再生は如何に

純水、そして $-80^{\circ}\text{C}$ ・ $-20^{\circ}\text{C}$ （デープフリーザー）・ $-18.5^{\circ}\text{C}$ （家庭用冷凍庫）を用い、両菌株に対する30~150日間の長期的な凍結の影響を観察しました。その結果、全てで生存率が100%となりましたが、100%に到達する培養日数に差異が生じました。図6には、菌株ごとの凍結温度と生存率100%までに達する培養時間の違いをまとめました。 $-80^{\circ}\text{C}$ ではいずれも2~3日間で活着が全て確認されたものの、 $-20^{\circ}\text{C}$ と $-18.5^{\circ}\text{C}$ では120日間以上の凍結で4~6日間を要しています。

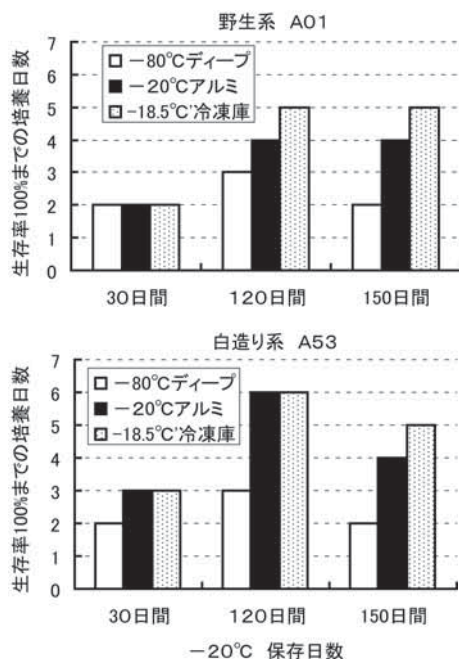


図6 純水を使用して $-80^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $-18.5^{\circ}\text{C}$ で凍結保存後のエノキタケ菌株が生存率100%に達するまでに要した培養日数（解凍後 $25^{\circ}\text{C}$ 培養）

$-20^{\circ}\text{C}$ のアルミブロック超低温槽と $-18.5^{\circ}\text{C}$ の家庭用冷凍庫の僅かな温度の違いは、前者の温度変動幅はほぼ0であるのに対し、後者の庫内には $10^{\circ}\text{C}$ 程度の温度変動幅( $-20\sim-12^{\circ}\text{C}$ )が存在したからです。凍結

時の温度が変動しないアルミブロック超低温槽が僅かに優れるように見えます。以上から、 $-80^{\circ}\text{C}$ と比較して $-20^{\circ}\text{C}$ はエノキタケに何らかの凍結ストレスを与えるものの、5カ月程度の凍結期間では菌糸の成長に回復可能なダメージしか与えていないと判断しました。そこで、キノコ発生への影響観察へと進みました。

### 純水中で凍結保存したエノキタケ菌糸の栽培試験方法

栽培用種菌培地は、エゾマツのノコクズ（水分：7.9%）と米ぬか（水分：7.5%）を体積比4：1で混合後に水道水を加えて攪拌し、強く握った時に指の間から僅かに水が染み出る程度の水分（60~63%）としました。それをスクリュウキャップ付の200mlガラス培養ビンに約100g充填し、高圧蒸気殺菌（ $121^{\circ}\text{C}$ ・20分）後、凍結後に再生したエノキタケ菌糸を接種し、 $25^{\circ}\text{C}$ で2週間培養して培地全体に菌糸を蔓延させたものを同種菌としました。

栽培培地は、種菌培地とほぼ同様に調製しました。ただし培養ビン当たりの培地充てん量は60gとし、その培地組成は絶対乾燥質量換算でノコクズ10g、米ぬか11g、水39g（水分：65%）としています。殺菌後に冷却した栽培培地の上面と通気孔へ1ビン当たり約5gの種菌を接種し、 $25^{\circ}\text{C}$ で培養することで培地全体に菌糸を蔓延させ（菌回り日数として把握）、菌回り後に菌掻きと殺菌水の吸水処理を1時間行いました。各試験区当たりの栽培培地の繰り返し数は6としました。その後、培養ビンに再度キャップをし、 $12^{\circ}\text{C}$ に設定した蛍光灯の照明付きインキュベーター（照度約300lux）でキノコの発芽と生育を促しました。採取時期は菌傘が培養ビンのキャップに到達した時点とし、発芽までに要した日数と採取までに要したそれぞれの日数（発芽日数と採取日数、いずれも $12^{\circ}\text{C}$ に投入後の日数）、および子実体の収量と本数を測定し、併せてキノコの形態を目視観察しました。

### エノキタケの栽培試験結果

栽培試験を行った2菌株のエノキタケの再生菌糸としては、純水を用いて $-80^{\circ}\text{C}$ と $-20^{\circ}\text{C}$ で30、120、および150日間凍結したもの、そしてコントロールは $7^{\circ}\text{C}$ で継代培養していたものです。結論としては、コントロールを含めた全部の試験区でキノコが発生しました。菌回り日数に注目すると、いずれの試験区も12日間前後で差はなく、発芽日数と採取日数については、それぞれ野生系（A01）が12日間前後と24日



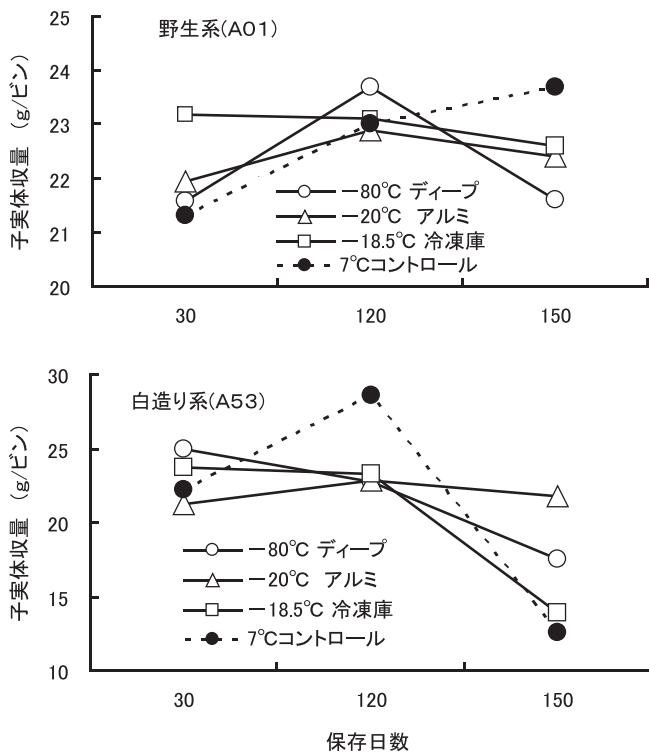


図7 純水を使用して-80℃または-20℃凍結保存後のエノキタケ再生菌糸を用いた栽培試験結果(子実体収量)  
注) ディープ：小型超低温槽；アルミ：アルミブロック超低温槽

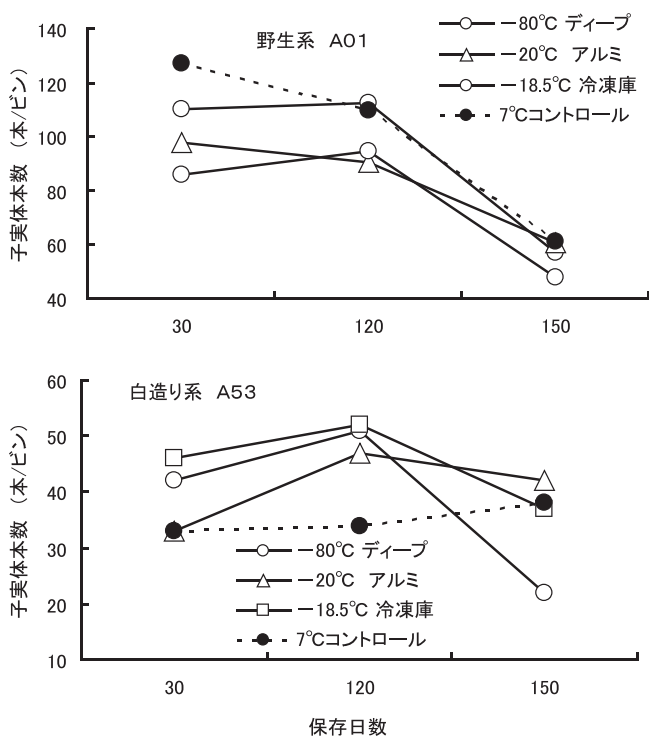


図8 純水を使用して-80℃または-20℃凍結保存後のエノキタケ再生菌糸を用いた栽培試験結果(子実体本数)  
注) 図6と同じ

前後、白造り系(A53)が18日間と33日間前後であり、両菌株共に凍結保存条件の影響は確認されませんでした。

両菌株の培養ビン当たりの子実体収量と子実体本数の結果をそれぞれ図7と図8に示しました。野生系(A01)と白造り系(A53)を比較した場合の顕著な差としては、後者のコントロールにおいて子実体収量が少ない試験区があったこと、前者の子実体数が多いことでした。この原因としては、本研究で用いた培養温度などの栽培条件が白造り系(A53)に適していなかった可能性があります。

子実体発生が安定していた野生系(A01)の結果を中心に考察すると、写真2に示したようにコントロールと凍結試験区共に大きさの揃った正常な形態のキノコが発生し、子実体収量に関してコントロールとの間に有意な差が認められませんでした。図7に示すように、全ての試験区で培養ビン当たりの子実体収量は21gを超え、培地質量の35%以上が利用されたこととなります。なお、図8において凍結保存150日の試験区で、コントロールを含めて子実体本数が減少していますが、残念ながら原因は不明です。



-20℃のアルミブロック超低温槽を用いて120日間凍結保存した野生系エノキタケ(A01)の再生菌糸から発生した子実体

コントロール(7℃・家庭用冷蔵庫で継代培養保存)の野生系エノキタケ(A01)の子実体

写真2 栽培試験で発生した野生型エノキタケ(A01)の子実体  
注) エゾマツ・米ぬか培地使用(培養温度：25℃；発芽・生育温度：12℃)

以上から、エノキタケ菌株については、純水に投入した菌糸を家庭用冷蔵庫レベルの温度で凍結保存しても、半年程度であれば生存の維持と正常な子実体形成能が維持されることが示されました。今後においては、実用化に向けてより長期間の凍結保存の影響把握が必要と考えています。

(つづく)