

気軽に読める「微生物の小話講座」

(その15 高専生活10年&微生物との付き合い 下編)

旭川工業高等専門学校 物質化学工学科 富 横 嶽



■はじめに

2017年が始まっています。昨年、北海道は各地で台風被害に見舞われました。今年は是非ともその穴埋めとなる様なハッピーな出来事があることを願っています。一方、小生としては高専勤務13年目に突入です。終わってみれば速いと感じますが、教員という想定外の立場になってから色々とあった12年間だったと思い返しています。この間に、高専生たちと共に挑戦してきた微生物に関わる研究活動の紹介をこの原稿（下偏）で締めます。

■卒業研究テーマ・特別研究テーマ（その5）

本講座の「その11」（2013年11月号）に、温度約-18.5°Cの家庭用冷凍庫（-20～-12°C：霜取りのために変温が生じる）でエノキタケの菌株保存ができるることを紹介しました。この研究の狙いは、5～7°C程度でエノキタケ菌株を継代培養保存する際に子実体（いわゆるキノコ：写真1参照）が形成されることを避けることがあります。これはエノキタケの発芽温度（5～20°C）と保存温度（5～10°C）が重なっているためであり、保存中の培地に子実体が生じることで菌株の遺伝的性質が変化する確率が高まります。7°C前後の冷蔵庫がまずければ約-18°Cの冷凍庫に移すことで、可能な限り安価に菌株保存をする発想でした。

継代培養保存以外には、一般的に-80°C以下の超低温でキノコや細菌の菌株を凍結保存する方法が用いら

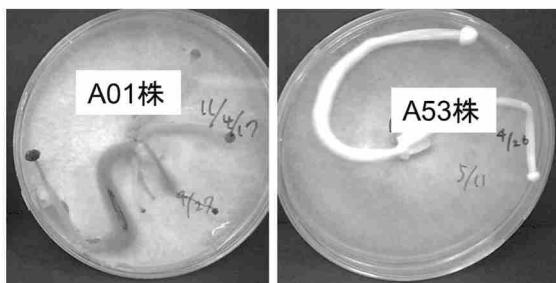


写真1. 約7°Cでの継代培養保存中に発生したエノキタケの子実体（左：野生系、右：白造り系）

れます。一方、2011年の東日本大震災以降に節電が叫ばれました。微生物の菌株保存を-80°C以上に出来ないかとの打診が、電力会社から一部の試験・研究機関にあったと言われています。小生はその状況を察知し、-20°Cでシイタケ菌株の凍結保存の検討を行うことを考えました。この場合の研究の狙いはキノコ菌株保存の節電になります。

凍結温度としては、-20°C一定で始めることにしました。凍結保存時の温度変化の影響を避けるためです。シイタケを選んだのは、栽培キノコの中での存在感の大きさです。すなわち、平成27年における北海道内キノコ生産量第1位の7,200トン余りで、全国の11%弱に当たります。ちなみに北海道の第2位はエノキタケの3,900トン弱で、全国の3%弱です。

文献を調べてみたら、20年以上前にシイタケを含む主要な23種類の食用キノコ菌株を-20°Cで凍結保存する試みに挑戦していた研究者がいました。キノコの種類によって-20°C凍結に対する耐性が異なっており、最も耐性の高いものがエノキタケ菌株、最も耐性の低いものがヒラタケ菌株、そしてシイタケ菌株はヒラタケに負けないくらい-20°C凍結に弱いことを報告しています。エノキタケ菌株の生存率を100%とすると、ヒラタケ菌株は0%，シイタケ菌株は8%でした。23種類のキノコ菌株で-20°C凍結保存で生存率50%以上は7種類に過ぎませんが、-85°C凍結保存では生存率100%が14種類、同80%以上が21種類に達していました。-20°Cは多くのキノコ菌株にとって命を落とすことになる危険な凍結温度なのです。

その理由は、保存する細胞（キノコでは菌糸体）の内外の水分が凍り出し、徐々に氷の結晶が成長して大きな塊になってしまうため、細胞が破壊されると考えられています。水が氷になることで体積膨張することを皆さんご存知ですね…その膨張力がキノコの菌糸体を破壊します（図1参照）。

危険な-20°Cを超えて-80°Cまで達すると氷の結晶

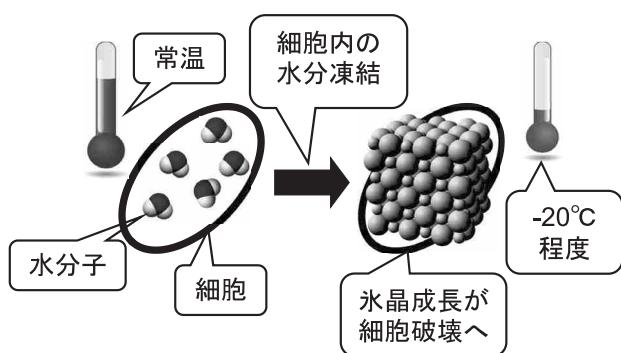


図1. 細胞内の氷晶成長が微生物の死を招く。

は大きく成長することができないため（細かな結晶が沢山できるらしい），微生物菌株の生存率が向上します。

-20℃凍結でエノキタケ菌株の生存率が100%を維持できるのは、細胞の中に凍結防止剤となるキシロマンナンという多糖類（デンプンのようなもの）が生産されるためです。残念ながらシイタケにはそのような特技がありません。シイタケ細胞を-20℃凍結から守るには、我々が特別な援助をする必要が生じます。どのような援助の手を差し伸べればいいのでしょうか。

単純な考え方としては、細胞内の氷の生成と成長を邪魔すればよいことになります。キノコの保存種菌（菌糸体）を凍結保存する方法は「菌体ディスク法」と呼ばれるものです。図2に示すように、保存種菌として菌糸体を培養中の寒天培地ごと打ち抜いた直径5mm程度の「菌体ディスク」数個をマイクロチューブに入れ、凍結保護液で満たしてから凍結保存します。凍結保護液は、先人の取り組みから10%程度のグリセリン水溶液の性能がよいとされ（凍結後の微生物の生存率が高い），広く用いられています。-80℃以下の凍結保存においても純水を凍結保護液にした場合には、細胞内外の氷の結晶成長による悪影響が無視で

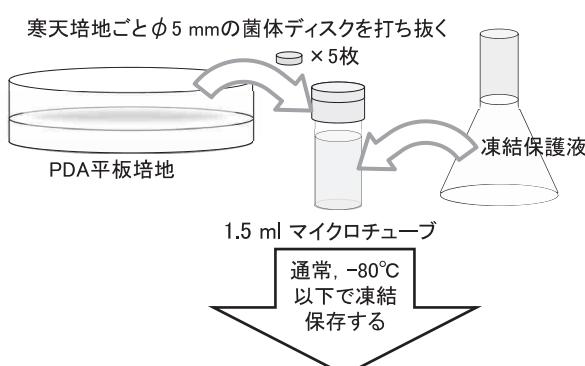


図2. 菌体ディスク法によるキノコ菌株の凍結保存概略図

きません。

微生物細胞の水分は60～70%程度です。そこで、細胞が完全に凍結する前に水分量を減らしてしまえば、内部に大きな氷の結晶が生成できないのではないかと考えてみました。-20℃に達する前に細胞内の水を吸い取るのです。具体的には、漬物の野菜保存理論を用います。濃度の高い糖液（20～50%のグルコース溶液など）を凍結保護液にするのです。漬物の活用ですから食塩水でも同じ脱水原理が発現しますが、生きているシイタケに対して食塩は毒に近い働きをします。

その実験結果を示します。シイタケの菌株により差が出るもの、-20℃凍結に敏感な菌株（旭川高専整理番号：ANCT-05072）では保護液を10%グリセリン水溶液にすると-20℃凍結で3日間の生存、そして40%グルコース溶液を用いると28日間に渡って生存率100%となりました。細胞の回りの40%グルコース溶液が凍ることで徐々に浸透圧が上昇します。この時にシイタケ菌糸体の中から水分が抜かれ、菌糸体内が適当な脱水状態となるため、大きな氷の結晶ができにくいと考えています。

その後、グルコース以外の糖類であるフルクトース（果糖）、キシロース、マンノース、スクロース（砂糖）、マルトース（麦芽糖）、トレハロースを試してみました。水溶液の糖濃度も変えて試験を繰り返した結果、理由は不明ですが40%マルトース水溶液の性能がよく、ANCT-05072では6週間（40日以上）を超えた生存が確認されました。当初の寿命が3日間、現在は1か月以上も生存率100%が維持されます。目標は2～3年間程度においています。まだまだいろんな工夫が必要ですが、トンネルの中から明かりが見えた気がしました。そして、平成27年度からは-20℃に最も弱いとされたヒラタケ菌株の凍結保存に挑戦しています。担当する高専生に本研究の目標とその意義を確認せながら取り組みを進めています。

■卒業研究テーマ・特別研究テーマ（その6）

-20℃程度の凍結で微生物が死滅するのであれば、「殺菌に使えないか？」との考えが生まれます。もしも本当に微生物が殺菌されるのならば、冷凍庫で凍結している肉や魚に付いている細菌などが死滅し、食中毒も防ぐことが可能なはずです。しかし、現実には完

全な殺菌はできず（図3参照），生菌数（細菌などの生きている細胞数）が多少減少する程度です。

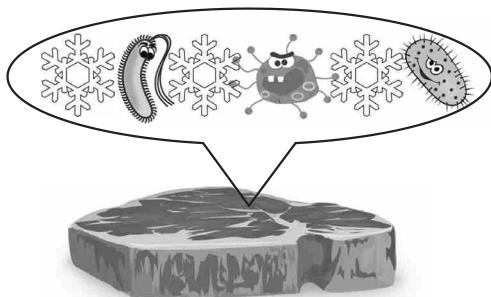
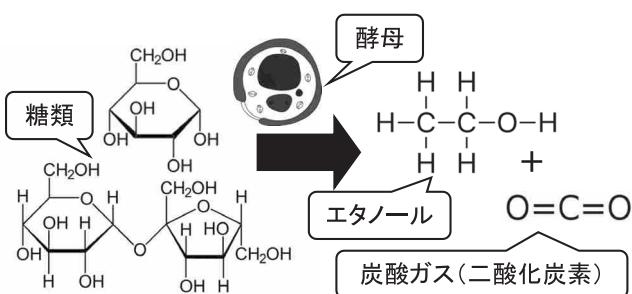


図3. 凍結で微生物殺菌はできない。

平成21年度の後半頃に旭川高専と酒蔵が連携することで「発泡清酒」を作れないかとの話が持ち上がりました。発泡方法としては、出来上がった清酒に炭酸ガスを吹き込むことでも可能ですが、それでは夢がありません。アルコール発酵の主成分であるエタノールを生産する微生物は、酵母の一種である「サッカロミセス・セレビシエ」です。この化学反応の概略を図4に示しますが、原料の糖類（グルコースやスクロース）からエタノールと炭酸ガス（二酸化炭素）が生じます。ビール製造工場ではこの炭酸ガスを逃がすことなく利用します。一方、酒蔵では炭酸ガスを清酒中に閉じ込めるではなく、外部に放出します（捨てます）。この反応を酒瓶に詰めた清酒の中で行うと（図4の反応を販売用の瓶内でも行う「瓶内二次発酵の発泡清酒」），より自然な発泡清酒が出来上がることになります。

風味が変わるために炭酸ガスが生じた酒瓶をそのままにすることはできず、瓶内のサッカロミセス・セレビシエを殺菌する必要があります。約60°Cで30分間程度の加温処理をすると、瓶内の酵母は死滅します。

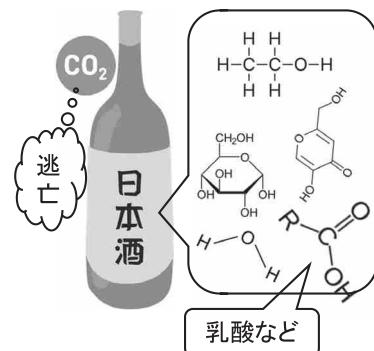


しかし、生風味をだすには加温殺菌をしたくない…とのリクエストがありました。そして、酒蔵の杜氏さんが「炭酸ガスを含んだ清酒を約-25°Cで1週間程度凍結すると瓶内の酵母が死滅することがある」という経験を語ってくれました。

小生としては全く信じられない話でした。-20°C凍結は生きている微生物の生存維持に厳しい温度ですが、意図的な殺菌処理には用いることができないはずです。微生物の教科書にも載っていない「殺菌現象」です。まるで、豆腐の角に頭をぶつけて死ぬか、真綿で首を絞めて即死させるような話です。無理して考えれば「炭酸ガスが-25°C程度の凍結条件で殺菌能力を発揮する」という仮定ができるかも知れません。

炭酸水にサッカロミセス・セレビシエを接種し、-20°C凍結を試みました。すると僅かに生菌数が減少したこともあるものの、最初1000匹いたものが5～10日後に30～50匹くらい減った程度です。950匹はピンピンしています。1000匹が0～1匹まで減れば、発酵反応が停止します。もしやと思い、市販の日本酒（炭酸ガスは入っていない）にサッカロミセス・セレビシエを接種し、5日間の-20°C凍結を施したところ、1000匹いたものが0～1匹まで減少したのです。

清酒に含まれる15%程度のアルコールが原因かもしれないと考え、エタノール水溶液で同様の実験をしましたが酵母は死にませんでした。最終的には、清酒に0.05～0.1%程度含まれる「乳酸」が-20°C凍結で殺菌力を発揮することを突き止めました（図5参照）。乳酸は、モロミ（清酒造りの本発酵のこと）のための酵母の種菌（酒母：しゅぼ）を造る時に、雑菌の増殖防止の目的で意図的に投入しますし、モロミの中で酵母が乳酸を生産します。酵母はリンゴ酸やコハク酸も生



成します。しかし、乳酸と異なり、リンゴ酸とコハク酸の-20°C凍結での殺菌能力は明確に確認できませんでした。

原因が分かれば、発泡清酒の非加熱殺菌方法として-20°C凍結殺菌処理が商品化技術として使えます。瓶内二次発酵の発泡清酒については、1~2年前から酒蔵の見学者が試飲できるようになったと聞いています。

■卒業研究テーマ・特別研究テーマ（その7）

キノコやカビの菌株保存方法として図2に示した「菌体ディスク法」を用いますが、菌体ディスクが入ったマイクロチューブを凍結でさせることなく5~25°Cで保管したら、どれ位の期間で死滅するのか確かめたりました。キノコもカビも好気性微生物ですから、マイクロチューブ内で水死か窒息死するだろうと想像しました。凍結保護液は乾燥防止が目的の保護液に変わりますので、シンプルに考えて殺菌した「純水」にしました。

まずは-20°C凍結に強いエノキタケを使って、7°C、15°C、25°Cで保管してみましたが、なかなか死滅しないのです。最終的に、7°Cと25°Cで320日間保管後にも生存していた菌株を培養し、ノコクズ・米ぬか培地でエノキタケの発生試験を試みました。すると、継代培養保存した種菌（コントロール）と差のない立派な子実体が発生したのです。栽培日数も子実体収量もコントロールと差異がありませんでした。場合によって7°Cや15°Cでは、写真2に示すようにマイクロチューブの中の僅かな隙間に子実体の芽ができることがあります。しかし、25°Cではその心配は無用でした。

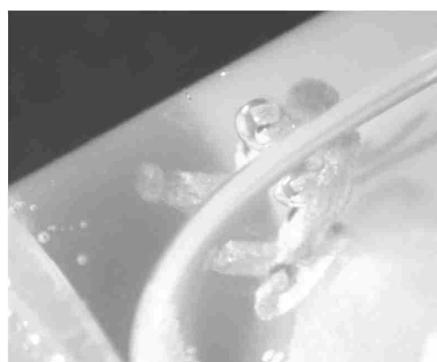


写真2. 純水保存のマイクロチューブ内の隙間に生じたエノキタケA01株の子実体の芽（15°C・3週間）

凍結保存は、温度を下げることで微生物の生命活動を停止若しくは非常に低く抑えるものです。我々人間が寒くなると活動が鈍くなるのと同じです。この原理と同様で、好気性微生物（酸素を要求する微生物）はマイクロチューブ内で密閉&水没させて、酸素不足による仮死状態（生命活動を停止）に陥るのではないかと考えています。微生物は仮死状態に陥るのが特技です。彼らは「生か死か」の二者択一ではなく、その中間の「仮死状態」も使えます。

その後、他のキノコの菌株やカビの菌株で同様の試みを検討しています。成果が出るのが楽しみです。

■卒業研究・特別研究の取り組み姿勢は如何に

旭川高専が育成する技術者像は、「工学的センスを持った実践的研究開発型技術者」です。小生なりの解釈としては、研究開発業務にも就けるセンスを持ち、さらに工学を実学として利用するセンスを実につけた技術者を輩出することになります。その技術者の卵たちの総仕上げ教育として、卒業研究（本科）や特別研究（専攻科）を課します。

19年間勤務した林産試験場で学んだ実学の考え方が高専生に課す研究テーマやその取り組みを支えています。また、研究で大事なことは真摯に実験に取り組むことに加え、得られた結果を公表することと考えています。国民の税金を使っている研究活動について、その領収書として学会発表などで結果を公にします。1年間（本科）または2年間（専攻科）の取り組み結果を第三者に誤解なく理解して貰うため、プレゼンテーション能力も研鑽します。独りよがりの取り組みをしていなかつたかを世に問うことにもなります。

■おわりに

2006年から約10年間に渡って、『気軽に読める「微生物の小話講座』』にお付き合い頂きまして有難うございました。15話を一つの区切りとして本講座を終了させて頂きます。たぶん、小生の原稿が北海道林産技術普及協会の会員数を減少させる要因の一つになったのではないかと反省するばかりです。この間に3名の専務理事さんにお世話になりました。代表として植杉専務理事さんにお詫びを、そして読者の皆さんにお礼を申し上げます。ありがとうございました。