

子実体からキノコ菌糸の分離培養法

古茂田 恵美子, 綿貫 知彦

(平成13年10月4日受理)

Methods of Isolation and Culture Mycelium from Fruit Body Mushroom

Emiko KOMODA and Tomohiko WATANUKI

(Received on October 4, 2001)

キーワード：キノコ, 菌糸, 子実体, 培養

Key words : mushroom, mycelium, fruit body, culture

I 緒 言

最近では、キノコ類は低エネルギーで、食物繊維が豊富であることなどから健康食品として人気が高まっている。しかしながら日本では、特別な種類を除いて、野生キノコの消費量はあまり多とはいえない。それに対して栽培キノコは、その種類が豊富であり、栽培量さらに消費量は、かなり多いといえる。

また、様々な薬効を期待した医薬品としてのキノコの成分が注目を浴び、いろいろな研究・報告がされている。

種々の栽培や研究には、その目的に適したキノコを選択すること、それらのキノコを自然界から探ることが必要である。そのためにキノコを純粋分離することが必要不可欠になってくる。しかしながら、その分離培養方法^{1), 2)}や分離培地については、研究者独自の方法によってなされているのが現状である。

そこで我々は、キノコを分離するには、一般的に真菌によく使われている培地のなかで、どの培地が適しているか比較検討した。

そして、キノコの分離する部位については、一般的に子実体の傘と柄の境目がよいとされている。その理由についてはあまり明らかではないが、他の菌の汚染を受けにくい部位であることは考えられる。子実体の成長過程をからみれば、傘の先端部分の方が成長が早いのではないだろうか。しかしながら、キノコのなかには、柄と傘の区別が付きにくいもの、傘の小さいものもある。また、

今までの経験上、外気にふれていない部分なら、キノコのどの部分でもよいと考えられたので検討を行った。

さらに天然のキノコを分離培養する際、当然のことながら、細菌の汚染を防ぐことが不可欠である。そのため、真菌類の分離と同様に培地のpHを調整したり、阻害剤を添加したりする方法がとられている。それらの方法は、キノコの生長に少なからずダメージを与えていると思われるので、その影響について検討を行った。

II 実験方法

1. 供試菌株

実験には、既に栽培されており、身近で入手しやすい市販のキノコで、種の異なる菌株^{3), 4)}を選んだ。

実験に用いた菌株は以下のとおりである。

① シイタケ：栃木のしいたけ(自然木栽培)、南摩きのこ組合、*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.

② ブナシメジ：superやまびこしめじ、JA長野経済連・JA中野市、*Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigelow

2. コロニーの作製および計測方法

子実体は、外気にふれていない部分を無菌的にメスあるいはピンセットで5mm程度の大きさに切取る。そのキノコ片をそれぞれの寒天平板上に1ないし3カ所接種した。25℃で培養、24時間おきにノギスで直径または半径を4ないし8カ所測定した。

3. 培地選択実験

キノコは供試菌株のシイタケ、ブナシメジを用い、真菌の代表的な培地で、子実体からコロニーを作製、コロ

ニーの生長速度および肉眼的に菌糸の生育の状態を観察、比較した。

使用培地とその組成は以下のとおりである。

①麦芽寒天培地 (MA) DIFCO製:

麦芽エキス30 g, 寒天15 g, pH5.5±0.2

②ポテトデキストロース寒天培地 (PDA) 日水製:

ポテトエキス4.0 g, ブドウ糖20.0 g, 寒天15.0 g, pH5.6±0.1

③サブロー培地 (SA) 日水製:

ペプトン10.0 g, ブドウ糖40.0 g, 寒天15.0 g, pH5.8±0.1

④ツアベック培地 (CDA) DIFCO製:

ブドウ糖36.0 g, 硝酸ナトリウム2.0 g, リン酸一水素カリウム1.0 g, 硫酸マグネシウム0.5 g, 塩化カリウム0.5 g, 硫酸第一鉄0.01 g, 寒天13.0 g, pH6.0±0.1

⑤コーンミール培地 (CMA) DIFCO製:

コーンミールエキス2.0 g, 寒天15.0 g, pH6.0±0.2

4. 子実体の分離部位について

分離する子実体の部分については、①傘と枝の境目、②傘の周辺部、③柄を比較してみた。キノコは、子実体が比較的大きいシイタケのみ選び、麦芽寒天培地を用い

て、コロニーの大きさと菌糸の状態と比較した。

5. 各種薬剤添加の影響

キノコは供試菌株のシイタケとブナシメジを用い、次の条件に調整した麦芽寒天培地で、子実体からコロニーを作製した。調整した4種類の培地でのコロニーの生長速度と菌糸の状態で、シイタケ菌糸に対する影響を比較した。

①コントロール(無添加)培地

②乳酸を添加しpH4.5に調整した培地

③クロラムフェニコールを350mg/ℓ添加した培地

④ローズベンガルを350mg/ℓ添加した培地

III 結果及び考察

1. 培地の選択実験

シイタケの各培地における生長曲線を図1に示した。

シイタケでは、培養4日目より、CDA培地を除く4種の培地で菌糸の生長が確認された。生育速度は、PDA培地、CMA培地、MA培地の順に速く、SA培地とCDA培地は遅かった。

肉眼的に菌糸の生育が良好であったのは、PDA培地、MA培地、SA培地であった。それに対し、CMA培地やCDA培地では、菌糸の状態は、菌糸が薄くあまり良い

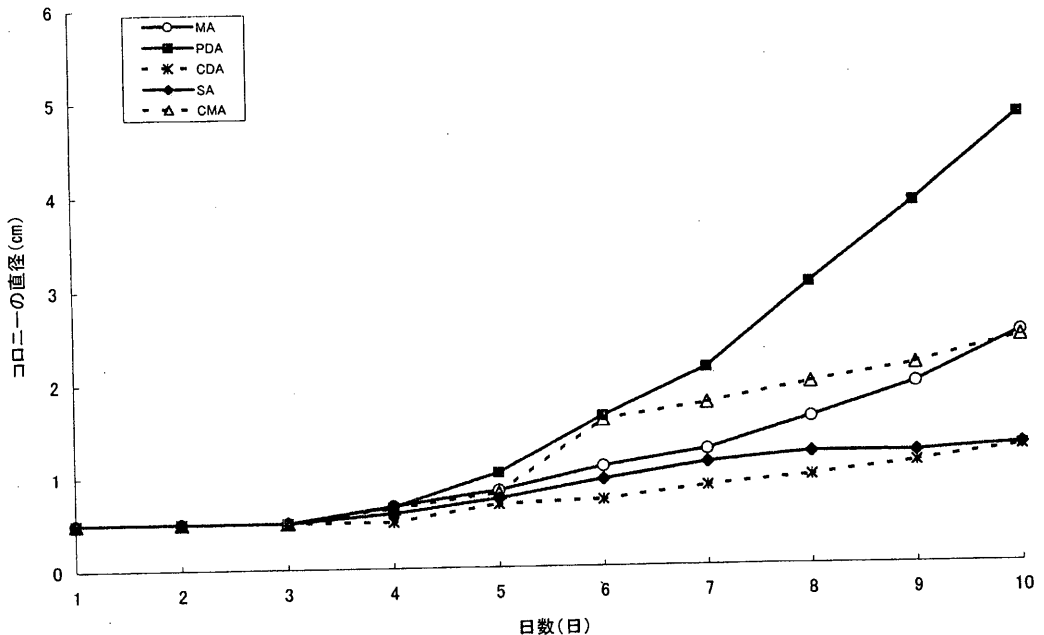


図1 シイタケの培地別成長曲線

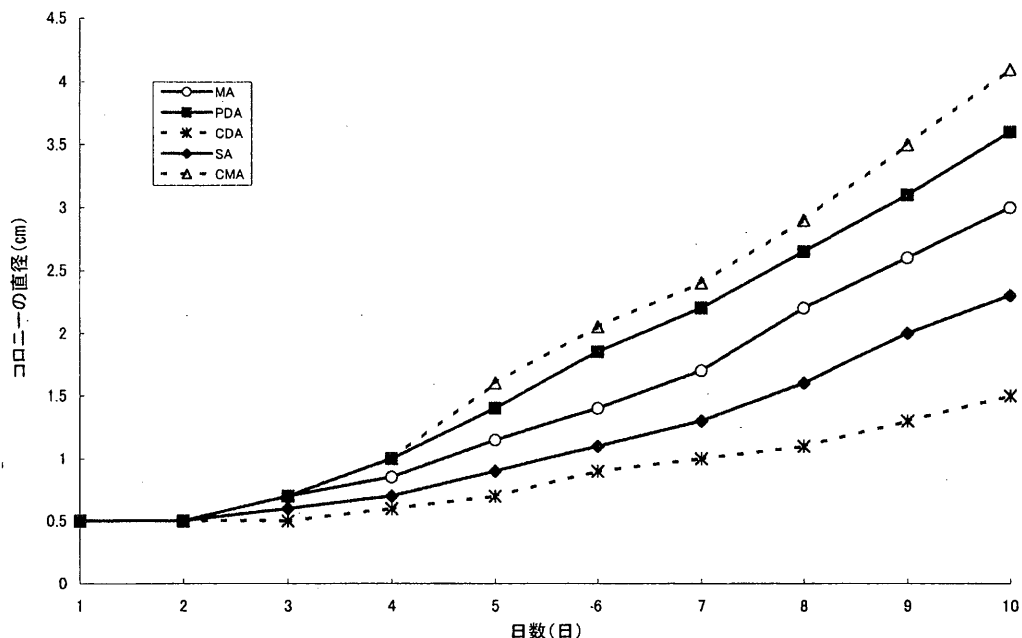


図2 プナシメジの培地別成長曲線

状態ではなかった。

プナシメジの各培地における生長曲線を図2に示した。

プナシメジでは、培養3日目より、すべての培地で菌糸の生長が確認された。生育速度は、CMA培地、PDA培地、MA培地、SA培地、CDA培地順に速かった。

肉眼的観察では、シイタケと同様の結果であった。

2種のキノコのコロニーの生長曲線から、キノコの分離培養には、菌糸の生長速度からは、CMA培地、PDA培地、MA培地が適している。菌糸の状態からはPDA培地、MA培地、SA培地が適している。これらのことから、キノコの分離には、菌糸の成長速度および菌糸の状態の両方の条件を満たすPDA培地、MA培地が適している。

2. 分離部位について

分離部位別の生育曲線を図3に示した。

培養4日目ですべての部位で生育が認められた。

生育速度は、5日目までは、すべての部位でほぼ同じであった。6日目より9日目までは、傘の縁と柄はほぼ同じで、傘と柄の間はやや速いが、直径で0.15cm程度の差であり、部位による差はあまりないと考えらる。9日目より傘の縁の成長が著しく速くなった。次いで柄も成長速度が速くなった。

肉眼的観察では、菌糸の状態はいずれも良好で、差は

ほとんど見られなかった。

キノコを純粋分離培養する際には、移植できるだけの菌糸があればよいことから考えれば、9日目まではほぼ同じ成長速度であることから、どの場所を分離してもよいといえる。

3. 各種薬剤添加の影響

細菌などを防止するために各種薬剤を添加した培地におけるシイタケの生長曲線を図4に示した。

シイタケでは、ローズベンガル添加培地で生育が認められなかった。無添加培地で4日目に生育が認められた。乳酸およびクロラムフェニコール添加培地でも、4日目にわずかに生育が認められた。

7日目までは、無添加培地がやや速いものの、ほぼ同様の生長速度を示し、その後生長速度は無添加培地、乳酸添加培地、クロラムフェニコール添加培地の順となった。

細菌などを防止するために各種薬剤を添加した培地におけるプナシメジの生長曲線を図5に示した。

プナシメジでは、6日目にローズベンガル添加培地で生育が認められたが、その後も生長は遅かった。無添加培地、乳酸添加培地、クロラムフェニコール添加培地では、3日目にシイタケと同様、生育が認められ、7日目まではシイタケと同様の生長速度を示した。それ以降は、

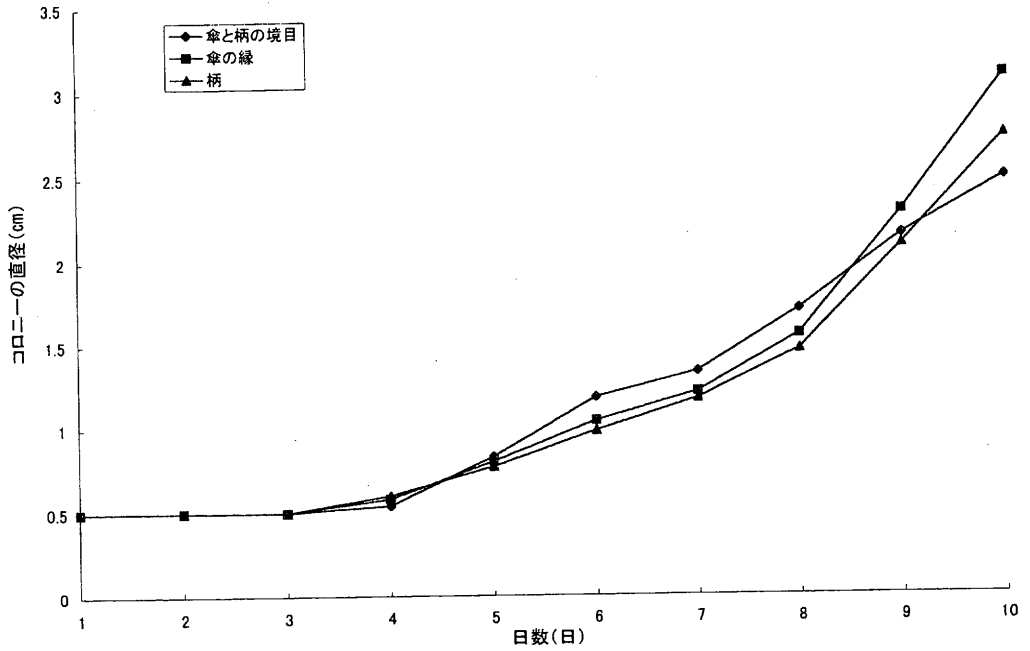


図3 シイタケの部位別成長曲線

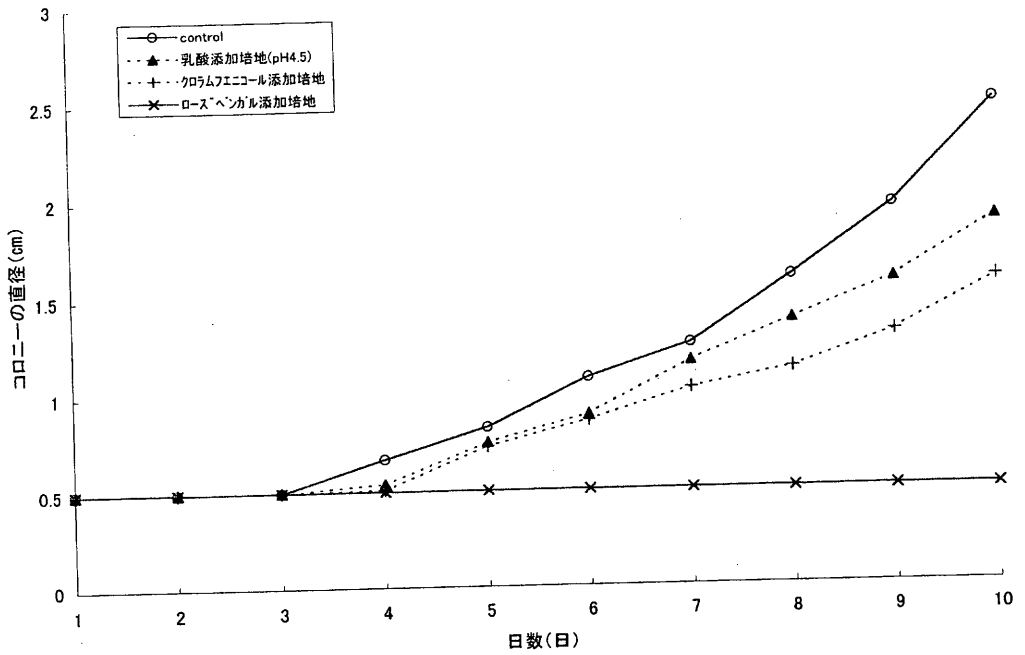


図4 各種薬剤添加培地におけるシイタケの成長曲線

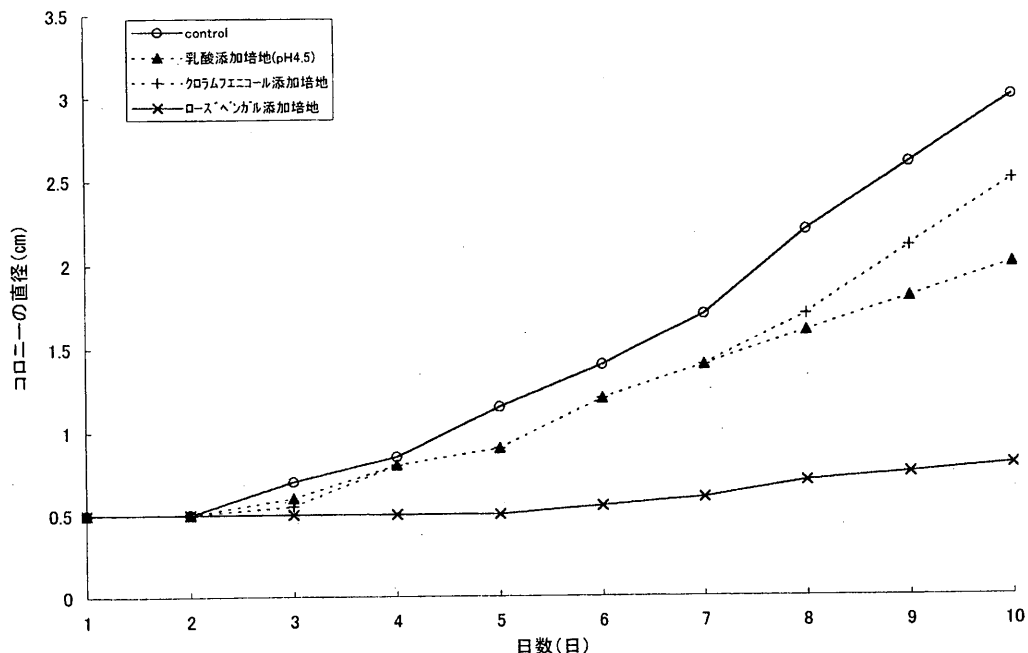


図5 各種薬剤添加培地におけるブナシメジの成長曲線

無添加培地、クロラムフェニコール添加培地、乳酸添加培地の順となった。

肉眼的観察による菌糸の状態は、シイタケ、ブナシメジともに同様で、ローズベンガルは生長が見られないか、菌糸もかなり薄かった。クロラムフェニコール添加培地、乳酸添加培地ともに無添加培地よりわずかに菌糸が薄かった。

細菌などを防止するために添加する各種薬剤のうち、ローズベンガルは菌糸の生育を著しく阻害する。

それに対し、乳酸およびクロラムフェニコールでは、シイタケ、ブナシメジで培養7日目までは菌糸の生育速度、状態とも無添加の場合よりやや生育が抑制されるものの、ほぼ同じで傾向であった。しかし、7日目以降、シイタケは乳酸添加、ブナシメジはクロラムフェニコール添加の培地のほうが生長が速く、キノコの種類によって異なった。

IV まとめ

キノコの子実体から菌糸を分離するために適した培地、分離部位などの培養条件について検討を行った。

菌糸の生育速度および菌糸の肉眼的状態から、シイタケ、ブナシメジともに分離培地としてPDA培地、MA

培地が適していた。

シイタケの傘と柄の境目、傘の縁、柄のどの部分でも、培養9日目までは成長速度、菌糸の状態ともほぼ同じであった。今回の実験では、分離培養にはどの部分でも良いといえる。

菌類の純粋培養時には欠かせない細菌などを防止する薬剤のなかで、ローズベンガルを添加するとキノコの菌糸の生長も阻害してしまうので不適当であるといえる。乳酸添加(pHの調整)やクロラムフェニコール添加は、キノコの生育を少し抑制した。

今回の実験は、キノコのなかで栽培されているうちの比較的实验しやすいものを選んだ。そのため、他のキノコでも応用は可能であろうが、すべてに共通するかどうかこれからさらに検討が必要である。

謝 辞

本研究にご協力下さいました加藤賢三博士に深く感謝申し上げます。また、本研究の一部は、本学共同研究推進費によって行われた。

参 考 文 献

- 1) 微生物の分離法, R & Dプランニング(1986)
- 2) 宮内信之介, 昆喜知郎, 山内健, 下村雅人: 日本菌学会報39, 83-87 (1998)
- 3) 今関六也. 本郷次雄編著: 原色日本新菌類図鑑 I, 保育社 (1989)
- 4) 山溪カラー名鑑, 日本のキノコ, 山と溪谷社 (1988)

Abstract

We tried to culture mycelium from fruit body of mushroom, starting with different part of the mushroom, and several culture media. PDA medium and MA medium were suitable for *Lentinus edodes* and *Hypsizigus marmoreus*, as demonstrated by their growth speed of the mycelium and the macroscopic observation.

Even the borderline between the pileus and stipe, the connection of the pileus, which part of the stipe were about the same as the condition of the growth speed, the growth of the mycelium in the culture at 9 days.

It was concluded from the experiment that the mushroom can be cultured in PDA and MA medium regardless of the part of mushroom as starting materials.

To prevent bacterial contamination, Rose Bengal was added to the cultuer, resulted in the growth inhibition of both bacteria and the mycelium of the mushroom. Therefore, we used Chloramphenicol and Lactic acid with slight growth inhibition, for the purpose of antibacterial and pH adjustment, respectively.

Further study is necessary to apply the culture conditions used in this experiment to other mushrooms.