

ナメコ菌菌糸の振盪培養

三野紀雄 信太 寿

近年、鋸屑培養基によるナメコ、ヒラタケなど食用菌の栽培が盛んになってきている。しかし、その栽培方法とくに培養基殺菌・接種・培養の工程が粗放的なために、雑菌による汚染が避けられない。これらは連続殺菌接種装置による栽培あるいは生産方式の確立によりある程度解決できるものと思われる。この方式を確立する際、簡便な方法で有効な接種原菌を大量に培養する必要がある。そして、鋸屑など木質物への接種原菌の均一な分散あるいは接種装置の円滑な運転などを考えた場合、接種原菌を液体培養により得ることが最も望ましいと思われる。

さきの試験では¹⁾、培養基の組成が澱粉40g/l、ポリペプトン10g/l、リン酸1カリ0.5g/l、リン酸2カリ0.5g/l、硫酸マグネシウム0.5g/l、そして60~100メッシュのシナ木粉0.5g/100ccを添加し往復振盪培養することにより、接種装置を運転する際に要求される分散状態をもつ培養菌糸体が得られた。今回の試験も、先の試験と同様、接種装置を運転する際に要求される微細な菌糸体（直径1.5mm以下）を、振盪培養により得ることを目的とした。

1. はじめに

糸状菌を振盪培養する際、ペレットとよばれる菌糸凝塊の形成がみられるが、培養基の粘度・振盪条件・接種源量などの物理的要因が菌糸の分散状態に著しい影響を与え、たとえば、培養基粘度・振盪条件・接種源量を増加させることにより、小形のペレット状菌糸あるいはパルプ状菌糸の生育を促進させることができると報告されている^{2), 3), 4), 5)}。さらに、ある種の非イオン系界面活性剤の添加が菌糸の分散状態に有効に作用するともいわれている^{6), 7), 8)}。

培養菌糸体液を接種源として連続接種装置を運転する際、培養中にみられる大形の菌糸凝塊の形成は連続接種装置の接種口の閉塞の原因となり、また接種原菌の効果的な分散の上からも好ましくない。この解決のために、今回の試験では、物理的手段としてのガラス片の培養基への添加、また化学的手段としての植物油の添加が菌糸の生育状態に与える影響を検討した。

2. 実験材料および方法

2.1 供試菌；ナメコ菌（*Pholiota nameko*），当試験場分離株（番号N67-6）。

2.2 供試培養基および分散材；供試した培養基の

組成、分散材の種類および添加量は第1表に示した。

なお、分散材として用いたガラス片は、破損したフラスコ・ペトリ皿・試験管などをクロム酸混液に浸漬し、水洗・乾燥後粉砕し、標準篩で5メッシュ以上7~8mmの大きさのものと10~5メッシュのものに篩分けし調整した。また、植物油は食用油として一般に市販されているものを供試した。そのうちコーン油としたものはコーンサラダ油として市販されているものでコーン油・ゴマ油・ナタネ油の混合油であるが、その配合割合は不明である。シナ木粉については先の試験¹⁾と同様の方法で調整した。

2.3 培養方法；培養基は振盪培養の場合は坂口フラスコ（500cc）に100cc、また静置培養の場合は三角フラスコ（300cc）に100ccないし50cc入れ、蒸気圧1.1 kg/cm²の高圧殺菌釜で15分間殺菌した。接種は、シユークローズ加用馬鈴薯寒天培地（以下PoSuAと称する）で20日前後培養したナメコ菌の菌そうを径1cmのコルクボーラーで打ちぬいた1コないし3コを使い、培養は23~25℃で12日間間けつ振盪あるいは静置した。ただし、実験8・9ではあらかじめ振盪培養した菌体液も接種源として用いた。振盪培養では、回転振盪機（135r.p.m.）あるいは往復振盪機（振幅

ナメコ菌系の振盪培養

第1表 供試培養基の種類と組成および分散材の種類と添加量

実験	培養方法	培養基の略称	培養基組成 (g/l)				分散材の種類と添加量 (100cc当り)
			炭素源	窒素源	生長素	無機塩類, その他	
実験1	振盪培養	StPYI	St. 40	注) P. 10	Y 3	リン酸1カリ0.5, リン酸2カリ0.5, 硫酸マグネシウム0.5	ガラス片: 5~10メッシュあるいは5<のもの2~8g
実験2	〃	〃	〃	〃	〃	〃	ガラス片: 5~10メッシュ4g シナ木粉: 60~100メッシュ0.5g
実験3	静置培養	StPYIA	〃	〃	〃	無機塩類については同上, 粉末寒天15	コーン油: 0.5~1cc
実験4	振盪培養	StPYI	〃	P. 3	Y 10	無機塩類については同上	ガラス片: 5~10メッシュ4g
		GPM	G. 40	〃	M 10	—	
		GPY	〃	〃	Y 10	—	
		SuPM	Su 40	〃	M 10	—	
		SuPY	〃	〃	Y 10	—	
実験5	振盪培養	SuPY	S 20,40	P. 1.5,3,6,12	Y 1	—	ガラス片: 5~10メッシュ4g
		SuPY	S 40	P 1.5	Y 1,3,5,10	—	
実験6	振盪培養	SuPY	〃	〃	Y 3	—	ガラス片5~10メッシュ4gと植物性油1ccの併用
実験7,8	振盪培養	SuPY	〃	〃	〃	—	ガラス片5~10メッシュ4gと大豆油0.5ccあるいは1ccの併用
実験9	振盪培養	SuPY	〃	〃	〃	—	ガラス片5~10メッシュ4gと大豆油0.5ccとの併用

注) St: 可溶性澱粉(試薬用) P.: ポリペプトン(培養基用) I: 無機塩類(試薬用)
 G.: グルコース(〃) M.: マルトエキストラクト(〃) A: 粉末寒天
 Su.: シュクローズ(市坂の砂糖) Y.: イーストエキストラクト(〃)

90mm, ただし実験1においては60mm, 102r.p.m.) で2時間づつ1日3回振盪した。

2.4 培養菌体の生育重量, 粒度, 接種効果の評価方法; 菌体生育重量については, 培養菌体を東洋ろ紙No. 101でろ過し, 熱水洗後80℃で2日間乾燥し秤量した。なお, 培養基に植物性油を添加して培養した菌糸体はエチルエーテルによっても洗った。菌糸体の粒度は三段階(直径1mm以下の菌糸体のものを1とし, 1~2mmのものが多く含むものを2とし, 2mm以上のものが多く含むものを3とした)に肉眼で区別し評価した。接種効果については, 鋸屑培養基で検討するのが実際的であるが, その方法が煩雑であるので寒天平板での菌糸の生育をもって替えた。すなわち, 培養菌体液を殺菌水で1/10・1/100・1/1000に希釈し, その希釈液をあらかじめ調整したペトリ皿のPoSuA平

板に2ccづつ流し込み, さらに適度に冷却した1% マルトエキストラクト添加PoSuAを15cc加え, 希釈菌液がペトリ皿全面に分散するように留意して25℃で培養し, ペトリ皿全体に菌糸が伸長するまでの日数と厚い密な菌そうが形成されるまでの日数を測定し, それらの日数の長短をもって接種効果を判定した(以下, この方法を希釈平板法と称する)。

2.5 実験の条件設定と解析方法; 各実験の設定因子とその水準およびデータの解析方法を第2表に示した。

実験1においては各区9本のフラスコを用い, そのうち6本は菌体重量を測定するのに, 残りの3本は菌糸体の粒度の評価と希釈平板法とに用いた。実験2以降では各区3ないし6本のフラスコを用い, 菌体重量の測定に3本を, その他に3本をあてた。そして, 3

第2表 各実験の設定条件と解析方法

	解析方法	因子	水準						
			1	2	3	4	5	6	
実験1	直交表 L8(4×2 ⁴)	ガラス片添加量(g/100cc)	4水準	2	4	6	8		
		ガラス片の大きさ(メッシュ)	2水準	5-10	5<				
		接種源量(コ/100cc)	2水準	1	3				
		振盪型式	2水準	往復	回転				
		培養日数	2水準	8	12				
実験2	一元配置	分散材の種類	3水準	無添加	ガラス片 5~10 メッシュ 4g/100cc	シナ木粉 60~100 メッシュ 0.5g/100cc			
実験3	一元配置	コーン油の添加量 (cc/100cc)	3水準	無添加	0.5cc	1cc			
実験4	二元配置	培養基組成	炭素源の種類	2水準	G	Su			
			生長素の種類	2水準	M	Y			
実験5	二元配置	培養基組成	Suの添加量 (g/l)	2水準	40	20			
			Pの添加量 (g/l)	4水準	12	6	3	1.5	
	一元配置	培養基組成	Yの添加量 (g/l)	4水準	10	5	3	1	
実験6	一元配置	植物性油の種類	6水準	大豆油	米油	コーン油	ゴマ油	オリーブ油	無添加
実験7,8	二元配置	大豆油添加量(cc/100cc)	2水準	0.5	1				
		接種源の種類と接種量 (コ/100cc)	3水準	寒天片 3コ	菌体液 10cc	菌体液 5cc			
実験9	一元配置	培養日数	6水準	6	8	10	12	14	16

ないし6回のくり返し実験とした。なお、稀釈平板法での評価に際して、実験1では各区3本のフラスコのおのおのを3段階に稀釈し、各稀釈段階に5枚のペトリ皿を用いた。そして、ペトリ皿5枚の平均値を求め、その値を各区各稀釈段階で3回のくり返し実験とし分散分析を試みた。実験2以降では、3本のフラスコから20ccずつ培養菌体液をとりそれらを混合し、さらにそれを3段階に稀釈し、各稀釈段階に5皿のペトリ皿を用い15回のくり返し実験とした。

3. 実験結果および考察

さきにのべたように、この試験目的は、良好な分散状態を呈する微細な、そして他培養基への接種効果のすぐれた菌糸体を振盪培養により得ることである。他培養基への接種効果の良否は得られた培養菌体液の分散状態・菌体量そして菌糸体の生物的活性などにより決定されるものと思われるが、この試験で用いた稀釈平板法でも培養菌体液の接種効果を評価することは可能

と考えた。今回の試験では、菌糸体の粒度と接種効果の判定に重点を置いた。なお、全体の実験をとおして、おのおの実験で得られた最良の培養条件を次の段階の実験の培養条件として用いた。

2.1 ガラス片の検討

実験1 分散材としてのガラス片の大きさおよびその添加量の検討

この実験では、糸状菌の分生孢子の良好な分散状態を得るために通常用いられるガラスビーズを水とともにフラスコに入れ振盪する方法が振盪培養に適用できるかどうかについて検討した。この際、接種量・振盪型式・培養日数についても合わせて検討した。その結果を第3,4表に示す。

菌糸体重量については、ガラス片の添加量の違いが最も大きな影響を与えている。また同様添加したガラス片の大きさの違いも大きな影響を与えている。ガラス片は大きい方が菌糸体重量がすぐれ、また第4表1-2に示すように、その添加量は少ないほど菌糸体重量は大きい。接種源量また培養日数の違いの間にも有意

ナメコ菌糸の振盪培養

第3表 振盪培養でのガラス片の添加が菌糸生育におよぼす影響

No.	ガラス片の添加量 (g)			接種源量 (コ)	振盪型式	培養日数	測定値			菌体粒度	観察	菌体重量 (mg)
	1	2	3				稀釈平板法での菌糸伸長日数					
	1	2	3				1/10	1/100	1/1000			
1	2	5~10	1	往復	8	4-11	7-12	9-13	2	1~2mmのベレット状菌糸	55.5	
2	2	5<	3	回転	12	6-7	7-11	9-10	2	1~2mmのベレット状菌糸, 大形も含む	79.8	
3	4	5~10	1	回転	12	5-7	7-9	8-15	2	1~2mmのベレット状菌糸	44.8	
4	4	5<	3	往復	8	4-9	5-11	6-13	2	1~2mmのベレット状菌糸, 大形も含む	62.5	
5	6	5~10	3	往復	12	4-6	5-7	7-12	2	1~2mmのベレット状菌糸	35.3	
6	6	5<	1	回転	8	7-10	8-21	12-32	2	1~2mmのベレット状菌糸, 大形も含む	42.3	
7	8	5~10	3	回転	8	6-8	8-10	10-12	2	〃	39.8	
8	8	5<	1	往復	12	5-13	6-21	9-24	2	〃	54.1	

*稀釈平板法での菌糸伸長日数で、前の数字は薄い菌糸がペトリ皿全面に伸長するまでの日数、後の数字は厚い密な菌糸が形成されるまでの日数

第4表 ガラス片添加の効果

1-1 菌糸生育重量におよぼす各因子の効果

因子		ガラス片添加量	ガラス片の大きさ	接種源量	振盪型式	培養日数
測定値 (mg)	第1水準	第4表1-2	43.9	49.2	51.8	50.0
	第2水準	に示す	59.7	54.4	51.7	53.5
F検定		**	**	**		**
寄与率 (%)		55	29	3		1

1-2 菌糸生育重量におよぼすガラス片添加量の効果

水準=ガラス片添加量 (g)		2	4	6
菌体重量 (mg)		67.7	53.7	38.8
8	47.0	**	**	**
6	38.8	**	**	
4	53.7	**		

2-1 稀釈平板法での菌糸生育におよぼす各因子の効果 (稀釈倍率1/10)

因子		ガラス片添加量	ガラス片の大きさ	接種源量	振盪型式	培養日数
測定値 (日)	第1水準	第4表2-2	4.8	5.2	4.3	5.2
	第2水準	に示す	5.5	5.0	6.0	5.0
F検定		**	**		**	
寄与率 (%)		12	10		68	

2-2 1/10稀釈平板法でのガラス片添加量の効果

水準=ガラス片添加量 (g)		2	4	6
生育日数		5.0	4.5	5.4
8	5.5	*	**	
6	5.4	*	**	
4	4.5	*		

3-1 稀釈平板法での菌糸生育におよぼす各因子の効果 (稀釈倍率1/100)

因子		ガラス片添加量	ガラス片の大きさ	接種源量	振盪型式	培養日数
測定値 (日)	第1水準	第4表3-2	6.5	7.0	5.7	6.8
	第2水準	に示す	6.6	6.2	7.4	6.3
F検定		**		**	**	**
寄与率 (%)		11		15	63	8

3-2 1/100稀釈平板法でのガラス片添加量の効果

水準=ガラス片の添加量 (g)		2	4	6
生育日数		6.8	6.0	6.5
8	7.0		**	*
6	6.5		**	
4	6.0	**		

4-1 稀釈平板法での菌糸生育におよぼす各因子の効果 (稀釈倍率1/1000)

因子		ガラス片添加量	ガラス片の大きさ	接種源量	振盪型式	培養日数
測定値 (日)	第1水準	第4表4-2	8.8	10.0	7.6	9.2
	第2水準	に示す	9.0	7.8	10.1	8.5
F検定		**		**	**	**
寄与率 (%)		15		32	44	3

4-2 1/1000稀釈平板法でのガラス片添加量の効果

水準=ガラス片の添加量 (g)		2	4	6
生育日数		9.0	7.6	8.6
8	8.6		**	
6	8.6		**	
4	7.6	**		

*危険率 5%で有意差あり

**危険率 1%で有意差あり

差が見られ、それらは両者とも多いものがすぐれていた。設定した振盪条件下では振盪型式の違いによる差は見られなかった。なお、ガラス片の大きさが5メッシュ以上、ガラス片の添加量が2g/100cc、接種原量が3コ/100cc、培養日数が12日間の培養条件の下で最も多い菌糸体重量が得られた。

培養菌糸体の分散状態すなわち菌体粒度には違いは見られずすべての実験区について、2の段階(1~2mmの菌糸体を含む)の菌糸体を得られた。

接種効果におよぼす影響を評価する際には、薄い菌糸がペトリ皿全面に伸長するまでの日数については一定の傾向が見られたが、厚く密な菌そうが形成されるまでの日数については大きなバラツキがあるため傾向が見いだせなかった。接種効果には振盪型式の違いによる影響が最も大きく働き、今回の振盪条件下では回転振盪よりも往復振盪がすぐれていた。ガラス片の大きさでは小さいものがすぐれ、菌糸体重量での結果とは逆になった。同様、ガラス片の添加量も菌糸体重量での結果とは異なっており、第4表-2-2, 3-2, 4-2で示すように4g/100ccの添加で最もすぐれていた。

なお、接種効果の最もすぐれた菌糸体を得られた条件は、5-10メッシュのガラス片を4g/100cc添加し、接種原を3コ/100cc接種し12日間振盪培養した時であった。以上の結果でも明らかのように、菌糸体を多量に得るための培養条件とすぐれた接種効果を有する菌糸体を得るための培養条件とは違いが見られる。し

かし、この試験の目的は先にも述べたように微細な菌糸体を得るための培養条件の検討と、接種効果の高い菌糸体を得るための培養条件の検討にあった。これらに関してはある程度満足できる結果が得られたものと思われる。したがって、実験2以降の培養はこの条件によった。

実験2 振盪培養における2, 3の分散材の菌糸生育におよぼす影響

実験1において菌糸体粒度それに接種効果がある程度満足できる培養条件がきめられた。この実験では、ガラス片と先の報告¹⁾の試験で用いたシナ木粉とが菌糸の生育状態それに稀釈平板法での接種効果におよぼす影響について比較検討した。その結果は第5表に示すように菌糸体粒度はガラス片の添加区が最も微細であり、次いでシナ木粉添加、分散材無添加の順であった。菌糸体重量は秤量できなかった区もあったが、観察ではシナ木粉添加区が菌糸の生育状態は最もすぐれ、次いで分散材無添加、ガラス片添加の順であった。以上のように、ガラス片を添加した場合、菌糸体重量あるいは稀釈平板法での接種効果はシナ木粉添加に比較し劣っていたが、菌糸体の粒度は最も微細であった。

以上実験1および実験2により、振盪培養で微細なそして他培養基への接種効果のすぐれた菌糸体をうるためにはガラス片の添加が有効であることが明らかとなった。

第5表 振盪培養における分散材が菌糸生育におよぼす影響

培養基	分散材	稀釈平板法での菌糸生育日数			菌体粒度	観 察	菌体重量 (mg)
		1/10	1/100	1/1000			
StPYI	無 添 加	3-7	4-7	5-7	3	かなり大型のバルブ状菌糸	926
	ガラス片添加	3-6	4-7	5-7	1	小形のバルブ状菌糸	788
	シナ木粉添加	2-6	4-7	4-7	1~2	小形のベレット状菌糸	—

(以下次号)