

旭川工業高等専門学校

研 究 報 文

第 59 号

---

JOURNAL

OF THE

NATIONAL INSTITUTE of TECHNOLOGY,

ASAHIKAWA COLLEGE

NO.59

---

令和 4 年 3 月 / March, 2022

## 目 次

### 学術論文

ホタテ貝殻を活用したバイオディーゼル燃料の合成

－ 触媒のメタノール浸漬および共溶媒添加による反応促進効果 － .....	古 崎 睦 1 姉 薺 一 樹 大 城 空 秋 山 円 遠 山 顕 広 長 門 史 昌 花 垣 優 貴 齋 藤 佑 太 高 橋 優 綺 多 田 侑 生 斎 藤 源 生 水 野 佑 亮 山 川 貴 恵
---------------------------------------	---

### 研究紹介

-20° C 凍結での *Saccharomyces cerevisiae* に対する

有機酸水溶液の殺菌性能

～リンゴ酸, コハク酸, クエン酸に注目して～ .....	富 樫 巖 8 千 野 佳奈子
-------------------------------	--------------------

北海道の原木シイタケ栽培施設に分布する

トリコデルマ属菌の特性把握の試み .....	富 樫 巖 16 大 谷 奈 緒 芳 賀 仁
------------------------	------------------------------

市民対象の体験型イベントに利用可能な

微生物実験マニュアル作成の取組み

～家庭用冷蔵庫を用いるエノキタケ栽培～ .....	富 樫 巖 28 福 地 俊 介
---------------------------	---------------------

黒色真菌と灰色カビに対するハッカ油・

l-メントール・メントンの抗カビ活性の評価 .....

富 樫 巖 37 火ノ川 知 詠
---------------------

家庭用冷凍庫 (-18° C 前後) を用いた

シイタケ菌株の凍結保存の試み .....

富 樫 巖 44 内 海 早 智
---------------------

## CONTENTS

### Papers

Synthesis of Biodiesel Fuel using Calcined Scallop Shell – Effects of immersion of catalyst in methanol and addition of co-solvent on promoting of synthesis reaction – .....	Atsushi FURUSAKI 1 Kazuki ANETAI Sora OHSHIRO Tsubura AKIYAMA Akihiro TOHYAMA Humiaki NAGATO Yuki HANAGAKI Yuta SAITO Yuki TAKAHASHI Yuki TADA Genki SAITO Yusuke MIZUNO Kie YAMAKAWA
---	---

### Study Introduction

Sterilization Ability of Organic Acid Aqueous Solutions to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> at $-20^{\circ}\text{C}$ -We pay attention to Malic Acid, Succinic Acid, Citric Acid - .....	Iwao TOGASHI 8 Kanao CHINO
An investigation of characteristics of <i>Trichoderma</i> spp. which are distributed in bed log cultivation houses of shiitake mushroom in Hokkaido- .....	Iwao TOGASHI 16 Nao OHTANI Hitoshi HAGA

Creation of the Microbe Manipulation Manual of Experiment Extension Courses for the Public -Enokitake Mushroom ( <i>Flammulina velutipes</i> ) Cultivation using Household Electric Refrigerator – .....	Iwao TOGASHI 28 Shunsuke FUKUCHI
Evaluation of Inhibitory Effects of a Mint oil, <i>l</i> -Menthol and Menthone on the Growth of <i>Cladosporium</i> spp., <i>Aureobasidium</i> spp. and <i>Botrytis</i> spp. ....	Iwao TOGASHI 37 Chie HINOKAWA
Attempt of the Cryopreservation of Shiitake ( <i>Lentinula edodes</i> ) Mycelia at a Temperature Zone around $-18^{\circ}\text{C}$ using a Domestic Freezer .....	Iwao TOGASHI 44 Sachi UTSUMI

ホタテ貝殻を活用したバイオディーゼル燃料の合成  
－ 触媒のメタノール浸漬および共溶媒添加による反応促進効果 －

古崎 睦*	姉薨一樹**	大城 空**
秋山 円**	遠山顕広**	長門史昌**
花垣優貴**	齋藤佑太**	高橋優綺**
多田侑生**	齋藤源生**	水野佑亮**
山川貴恵**		

Synthesis of Biodiesel Fuel using Calcined Scallop Shell  
－ Effects of immersion of catalyst in methanol and addition of co-solvent  
on promoting of synthesis reaction －

Atsushi FURUSAKI*	Kazuki ANETAI**	Sora OHSHIRO**
Tsubura AKIYAMA**	Akihiro TOHYAMA**	Humiaki NAGATO**
Yuki HANAGAKI**	Yuta SAITO**	Yuki TAKAHASHI**
Yuki TADA**	Genki SAITO**	Yusuke MIZUNO**
Kie YAMAKAWA**		

### Abstract

We have investigated the effective reuse of scallop shells for synthesis of biodiesel fuel (BDF). Calcium oxide obtained by calcination of scallop shell was active for transesterification of glycerides with methanol, but the activity declined rapidly as exposed to the air. To prevent the inactivation, the immersion treatment in methanol was performed, then calcium methoxide which was stronger and stabler base than calcium oxide formed on surface of catalyst during the immersion. Furthermore, BDF was added to the raw mixed solution to improve the miscibility between canola oil and methanol, then it was effective up to the addition amount of 50 % by weight to oil.

### 1. はじめに

北海道で毎年 10-20 万トン排出されているホタテ貝殻の有効利用を目指し、筆者らはこれまで、貝殻を焼成して得た酸化カルシウムをバイオディーゼル燃料(BDF)の合成触媒に活用する方法について検討してきた。貝殻から調製された酸化カルシウム触媒は高い活性を示すものの、短時間の大気暴露によって容易

\* 物質化学工学科教授

\*\* 物質化学工学科卒業生

(令和 4 年 1 月 31 日受理)

に失活するという欠点があり、また高い BDF 転換率を得るには、本来混ざりにくい植物油とメタノールの混和性を高めることが必要である。

本研究では、焼成後の触媒の失活を防ぐために、原料であるメタノールまたは植物油中に浸漬処理することを試み、さらに、予め合成した BDF を反応系に添加しておくことで、メタノールと植物油の双方を溶かす「共溶媒」として作用させ、合成反応を促進させる可能性について検討した。

## 2. 実 験

### 2.1 触媒の調製とキャラクタリゼーション

0.125~0.710 mm の粒径範囲になるように粉碎・ふるい分けしたホタテ貝殻を、大気中 900 °C で 1.5 時間焼成した。炉内温度が 200 °C まで低下した後、①そのままデシケーター内で保管、②室温のメタノールまたはキャノーラ油中に 0.5 時間~34 日間静置浸漬、あるいは③65 °C のメタノール中 1150 rpm で攪拌・還流しながら 0~4 時間浸漬した。また、メタノール浸漬によるカルシウムの溶解量を原子吸光分析により測定した。

浸漬処理した触媒を BDF 合成実験に使用する際は、保留粒子径 1.0 μm のろ紙を用いて懸濁液を減圧ろ過した後、110 °C で 30 分間乾燥させて供した。また、一部の触媒については、Hammett 指示薬による塩基強度の測定、FT-IR 測定、XRD 測定等を行った。

### 2.2 BDF の合成と分析

植物油：メタノールの物質質量比が 1 : 6 になるよう、100 mL-2 ロフラスコにキャノーラ油 (AJINOMOTO) 15 g とメタノール (和光純薬, 特級) 3.3 g を加え、これに触媒を植物油量の 10 wt% となる 1.5 g 加えて、70 °C ・500 rpm の還流下でエステル交換反応 (BDF 合成反応) を行った。共溶媒を添加する場合には、予め合成・精製した BDF 0~15 g をこのフラスコ中に加えて反応を開始した。

所定時間反応させた後生成物 5 mL を取り出し、減圧ろ過により触媒を除去した (ろ紙の保留粒子径 1.0 μm)。ろ液中に残存する過剰メタノールをロータリーエバポレーターで減圧除去した後、生成物を試料瓶に移して静置することで、原料油と BDF からなる混合相 (上層) と副生成物のグリセリン (下層) を分離した。上層から 10 mg の試料をサンプルビンに秤量し、これに 10 mg のノナデカン酸メチル標準試薬 (SIGMA-ALDRICH) とヘキサン (和光純薬, クロマトグラム用) 1000 μL を加えてよく振り混ぜ溶解し、これを分析溶液とした。

FID 検出器を備えたガスクロマトグラフに分析溶液 1 μL を注入し、得られたクロマトグラムから試料中の BDF 含有率を算出した。分析条件は欧州規格 (EN 14103) に準拠し、含有率の算出は次式に従った<sup>1)</sup>。

$$C = \frac{\sum A_{\text{sample}} - A_{\text{I.S.}}}{A_{\text{I.S.}}} \times \frac{W_{\text{I.S.}}}{W_{\text{sample}}} \times 100 \quad \dots \text{式 1}$$

C : BDF 含有率 [wt%]

$\sum A_{\text{sample}}$ ,  $A_{\text{I.S.}}$  : 分析試料中の BDF 由来ピークの面積合計値および標準物質由来ピークの面積値 [-]

$W_{\text{sample}}$ ,  $W_{\text{I.S.}}$  : 分析試料および標準物質の秤量値 [mg]

### 3. 結果および考察

#### 3.1 調製した触媒のキャラクタリゼーション

ホタテ貝殻を大気中 900 °C で 1.5 時間熱処理して得られた焼成物について、その XRD 結果を図 1 に、Hammett 指示薬により求めた塩基強度の測定結果を図 2 に示す。

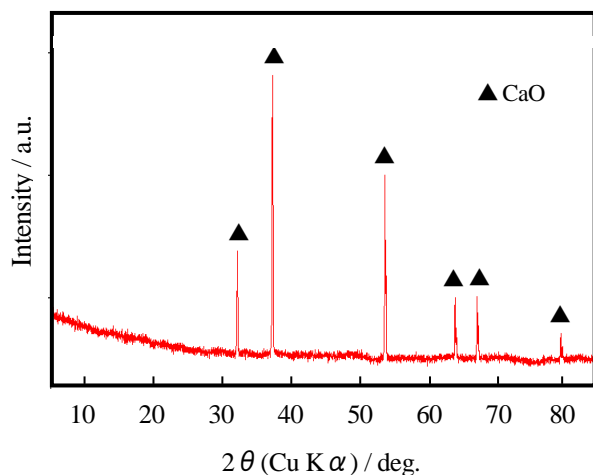


図 1 ホタテ貝殻焼成物(900°C・1.5 時間)の XRD 結果

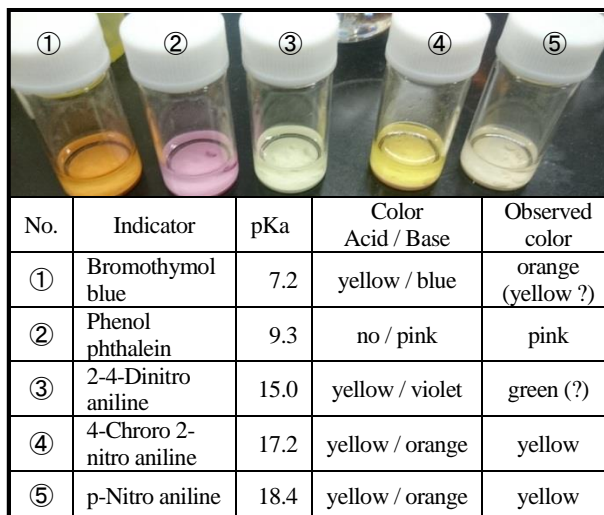


図 2 ホタテ貝殻焼成物(900°C・1.5 時間)の塩基強度

貝殻の主成分である炭酸カルシウムは、700 °C 以上での加熱により酸化カルシウムへと転換するが、図 1 より、今回調製された触媒も酸化カルシウムの単一相であることがわかる。また、Hammett 法<sup>2)</sup>から求めたこの触媒の塩基強度は  $9.3 < H_L < 15.0$  であった。

#### 3.2 メタノール浸漬処理の影響

図 3 および図 4 に、ホタテ貝殻を焼成後、所定時間メタノール中に浸漬して調製した各触媒の FT-IR スペクトルおよび XRD 結果を示す ((a)は室温・静置条件下, (b)は 65 °C 加温・1150 rpm 攪拌条件下)。

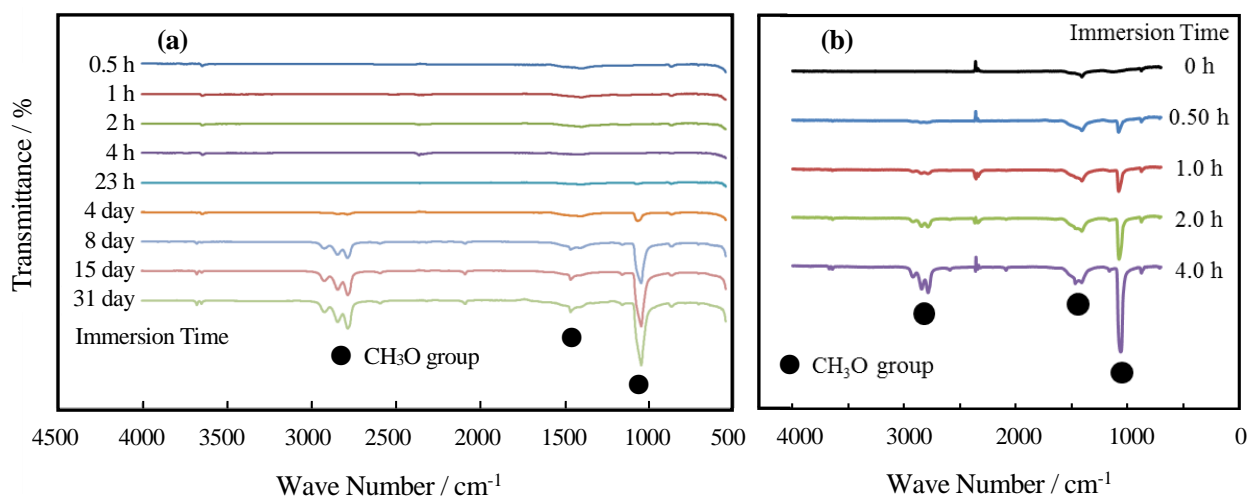


図 3 メタノール浸漬処理した触媒の FT-IR スペクトル((a)室温・静置, (b)65 °C・1150 rpm)

図 3 より、室温・静置条件下での浸漬処理では、4 日間目以降にカルシウムメトキシド (Ca(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) 由来の吸収ピーク (●印) が発現し始め、以降浸漬時間とともに吸収強度は増大している。一方、加温・攪拌条件下での浸漬の場合には 0.5 時間から当該ピークが出現しており、メトキシドの生成が加速的に進行していることがわかる。

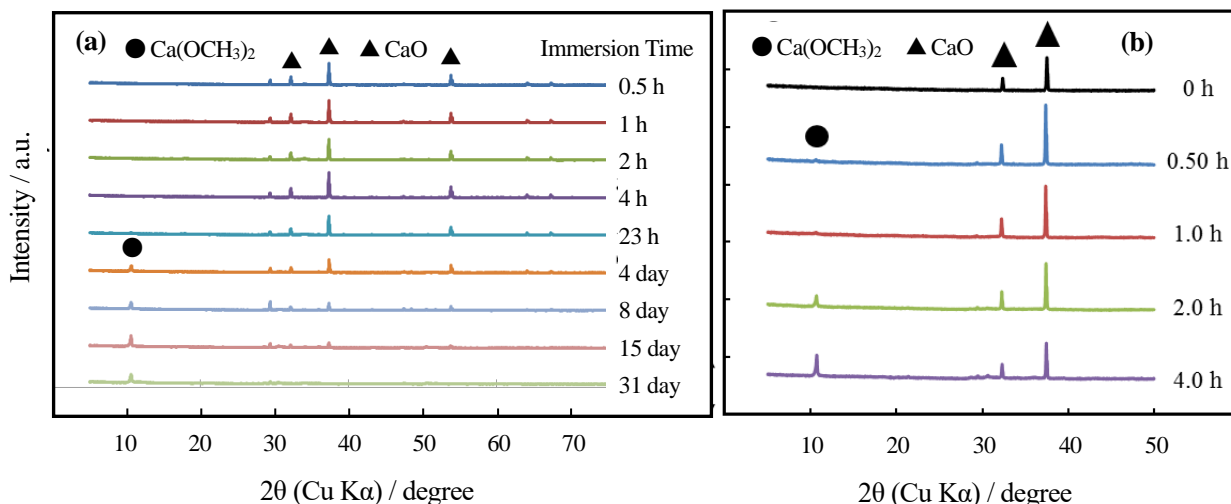
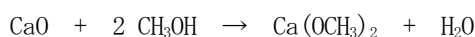


図 4 メタノール浸漬処理した触媒の XRD 結果 ((a)室温・静置, (b)65 °C・1150 rpm)

図4からは、FT-IRの結果と同様、室温・静置条件下での浸漬処理では4日間目以降に、加温・攪拌条件下での浸漬処理では0.5時間以降にカルシウムメトキシドの回折ピークが認められ、その強度増大とともに酸化カルシウムの強度が低下することが確かめられた。いずれの場合も、以式の反応が進行していると考えられる<sup>3)</sup>。



一般的に「酸化カルシウムはメタノールに不溶」とされているが、室温および60 °C加温下で浸漬処理 (共に静置) した際の、溶解度を図5に示す。

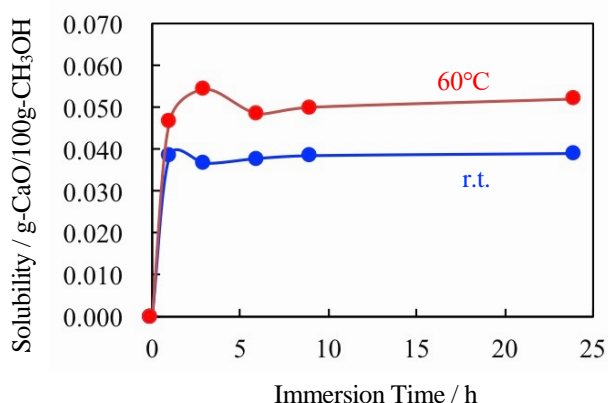


図 5 メタノールで静置浸漬処理(室温・65 °C)した際の酸化カルシウムの溶解度

加温下で幾分増加するが、いずれの溶解度も 0.1 g/100 g-メタノール以下と非常に小さく、且つ速やかに溶解平衡に達していることがわかる。

攪拌しながら浸漬した場合であっても、酸化カルシウムの溶解量はほとんど変化しなかったことから、調製した触媒のメタノール浸漬処理時およびBDF合成反応時における溶媒中への溶解損失は無視小であると考えられる。



図6は、加温・攪拌条件下で様々な時間メタノール浸漬して得た触媒について、BDF合成に用いた際の反応時間とBDF含有率の関係を表している。

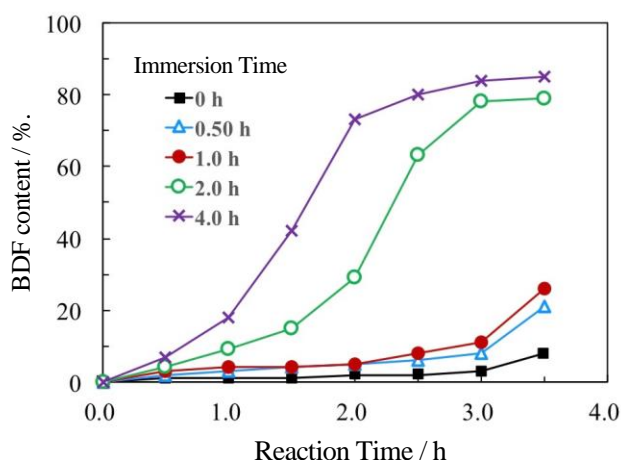


図 6 メタノール浸漬処理(65 °C・1150 rpm)した触媒を用いたときの生成物中の BDF 含有率

浸漬処理していない触媒は大気暴露による失活のため低活性のままであるが (■), 2時間以上の浸漬により活性が大きく向上している (○や×)。前述の図3, 4から分かるように、これらの触媒表面にはカルシウムメトキシドが生成しており、このことが高活性化を引き起こしていると考えられる。

カルシウムメトキシドの塩基強度は $15.0 < H_L < 17.2$ と、前出の酸化カルシウムより強いことが確かめられており、この強い塩基性が高活性の原因であると考えられる。

### 3.3 キャノーラ油浸漬処理の影響

焼成ホタテ貝殻を室温・静置の条件下で所定時間キャノーラ油中に浸漬した後の、各触媒のFT-IRスペクトルおよびXRDパターンを図7に、また図8に、4日間キャノーラ油に浸漬した触媒を用いてBDF合成を行った際の、反応時間とBDF含有率の関係を示す(比較のため、浸漬処理なしおよび同時間メタノール浸漬した触媒の結果も併記)。

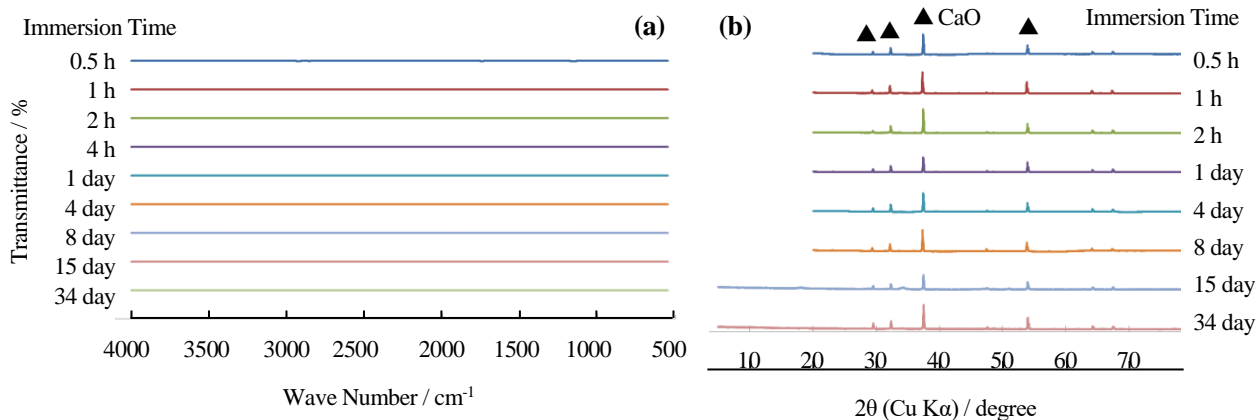


図 7 室温・静置条件下でキャノーラ油に浸漬処理した触媒の FT-IR スペクトル(a) および XRD パターン(b)

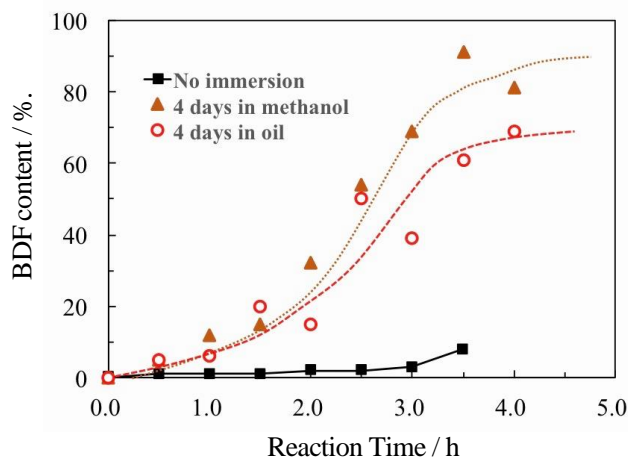


図 8 室温・静置下で 4 日間キャノーラ油浸漬処理した触媒を用いたときの、生成物中の BDF 含有率

キャノーラ油中に長時間浸漬しても、IR スペクトルおよび XRD パターンには何も変化は見られず、触媒の表面組成や構造に変化がないことがわかる。

また図 8 より、メタノール浸漬ほどではないが、キャノーラ油に浸漬した触媒は浸漬処理なしで保管・使用した触媒より明らかに活性が大きく、油中での浸漬処理が大気暴露時に進行する触媒の不活性化を十分に抑制していることがわかる。

### 3.4 BDF 含有率に及ぼす共溶媒添加の影響

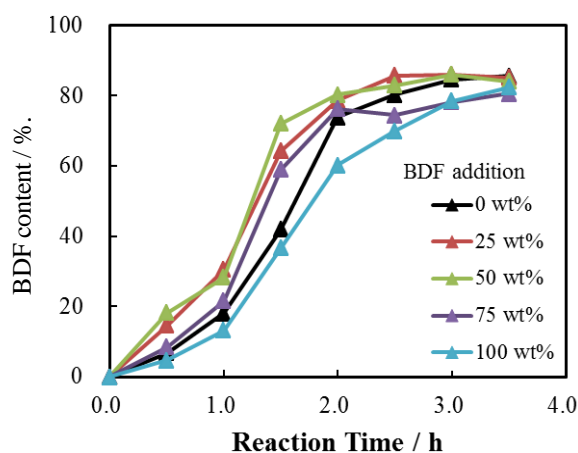


図 9 共溶媒として BDF を添加したときの生成物中の BDF 含有率

図9は、加温・攪拌下でメタノール中に4時間浸漬した触媒を用い、反応系に予めBDFを所定量添加した場合の、反応時間とBDF含有率の関係を表している。

植物油に対してBDFを25または50 wt%添加することにより、反応速度が向上した(▲, ▲)。これは、添加したBDFが植物油とメタノールの混和を促進したためと考えられ、BDF自身がその合成反応における共溶媒として作用していることを示唆している。

一方で、BDF添加量をさらに増加させると反応速度はむしろ低下した(▲, ▲)。これは、多量のBDF添加により反応物ならびに触媒が希釈されたためと考えられ、共溶媒としてのBDFの最適添加量は対植物油50 wt%程度であると考えられる。

## 4. 結 論

ホタテ貝殻を焼成して得られた酸化カルシウムを「不均一系塩基触媒」として用い、BDFを合成した。本触媒は大気暴露によって急速に失活するという欠点を有していたが、メタノール中に浸漬処理することで表面にカルシウムメトキドを形成し、その強い塩基性によってBDFへの転換反応を促進できることがわかった。また、予め原料液中にBDFを共溶媒として添加することにより、本来混ざり合いにくい植物油とメタノールの混和性を高め、対油比50 wt%までの添加範囲で反応速度の増加に有効であることが確かめられた。

### 参 考 文 献

- 1) The European Standard EN 14103:2011 (E) : Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents (2011)
- 2) K.Tanabe, T.Yamaguchi, *J.Reseach Inst.Catalysis*, **11**, 179 (1964)
- 3) 荒井康夫, 安江 任, 涌井康之: 水酸化カルシウムのメトキシド化と生成物の性質, 日本化学会誌, (9) : 1402 (1981)

【研究紹介】 $-20^{\circ}\text{C}$  凍結での *Saccharomyces cerevisiae* に対する  
有機酸水溶液の殺菌性能  
～リンゴ酸, コハク酸, クエン酸に注目して～

富樫 巖\*  
千野佳奈子\*\*

Sterilization Ability of Organic Acid Aqueous Solutions  
to *Saccharomyces cerevisiae* at  $-20^{\circ}\text{C}$   
- We pay attention to Malic Acid, Succinic Acid, Citric Acid -

Iwao TOGASHI  
Kanakano CHINO

**Abstract**

The sterilization effect of three kinds of 0.01 - 2.0 % (w/w) organic acid aqueous solutions (i.e. malic acid, succinic acid, citric acid) was evaluated to *Saccharomyces cerevisiae* NBRC 0308 at  $-80 - 7^{\circ}\text{C}$ . Consequently, the 0.5 - 2.0% (w/w) of malic acid and citric acid solutions showed superior sterilization performance by processing for five days of  $-20^{\circ}\text{C}$ . The survival rates of NBRC 0308 were 0.01% and less than 0.01%. On the other hand, with the 0.01 - 0.1% (w/w) solutions of malice acid and citric acid or the 0.01-2.0% (w/w) succinic acid solution, the tendency that survival rates of NBRC 0308 decreased by processing for 5 - 10 days of  $7^{\circ}\text{C}$  than  $-20^{\circ}\text{C}$  was observed.

**1. はじめに**

上川地域は、特産品の米や大雪山系の雪を源とする良質な水に恵まれており、さらには寒冷・冷涼な気候から清酒造りが盛んな地域である。しかし、近年のビール類やリキュール類、そしてウイスキー（特にハイボール）人気に押され、清酒の消費は低迷している。そこで著者らは市内の造り酒屋と連携し、ビン内二次発酵を用いた発泡清酒の開発に取り組んだ。二次発酵後の酵母の殺菌については、一般的な加熱方法を避けて凍結を用いた新規手法を見出した。すなわち、同発酵を終えた製品をビンごと  $-20^{\circ}\text{C}$  で 5 日間程度凍結する。その殺菌メカニズムは、清酒に 0.05～0.1% 程度含まれる乳酸の働きであることを明らかにした<sup>1)3)</sup>。

以上に引き続き本研究では、主に  $-20^{\circ}\text{C}$  における乳酸以外の有機酸の殺菌性能把握を目的に、清酒に含まれるリンゴ酸とコハク酸<sup>4)</sup>、種々の発酵食品に含まれるクエン酸<sup>5)</sup>に注目した。低濃度の各有機酸水溶液に日本酒酵母を接種し、 $-20^{\circ}\text{C}$  を中心とした凍結下と冷蔵下での生存率変化を観察した。

\* 旭川高専名誉教授

\*\* 物質化学工学科卒業生

## 2. 実験方法

### 2.1 供試酵母, 有機酸水溶液, 殺菌性能の評価温度

日本酒酵母には *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen NBRC 0308 を供試した。各試験に際してはポテトデキストロース寒天 (以下, PDA) 平板培地に接種し, 25°C で 2 日間培養したものを種菌とした。

有機酸水溶液としてはいずれも和光純薬工業製試薬の DL-リンゴ酸 (特級 99.0%), コハク酸 (特級 99.5%) およびクエン酸 (特級 98.0%) と純水を用いて 0.01~2.0% (w/w) の水溶液を調製し, 高圧蒸気滅菌 (121°C, 15 分) 処理した。酵母に対する各有機酸水溶液の殺菌性能の評価温度は -80°C, -50°C, -20°C, -7°C, -5°C および 7°C の 6 種類とした。

### 2.2 有機酸水溶液の殺菌性能の評価方法

血球計算板 (トーマタイプ) と位相差顕微鏡を用い, 供試菌株の全菌数濃度が原則として  $10^7$  個/ml オーダーとなるように各有機酸水溶液へ接種した。1.5 ml マイクロチューブに酵母を含む各有機酸水溶液を 1 ml 分注したものを出発試料とし, 2.1 の温度環境下に投入後に原則として 5 日, 10 日および 20 日間経過時にサンプリングした。凍結試料は室温で自然解凍し, 出発試料を含めた各試料を生理食塩水で対数希釈した後, 直径 90 mm の PDA 平板培地に 0.2 ml 接種 (反復数 2) して 25°C で 2 日間培養を行うことで生菌数 (cfu/ml) を求めた。各出発試料の生菌数を 100% とし, サンプルごとの生存率を算出することで殺菌性能を評価した。なお, 生菌数の測定に際しては 1 枚の平板培地当たりコロニー数が 30~300 個発現したものを採用した<sup>9)</sup>。

### 2.3 有機酸水溶液の pH 測定

各有機酸水溶液の pH (25°C) は高圧蒸気滅菌後にニッコー・ハンセン社製の pH 計を用いて測定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 リンゴ酸水溶液の殺菌性能

濃度 0.1% (w/w) 以下のリンゴ酸水溶液中に酵母を接種し, -80°C, -20°C および 7°C に最大 20 日間投入した場合の生存率変化を表 1 に示す。全般的には投入期間の経過とともに生存率が減少する傾向がみられた。また, 濃度にかかわらず -80°C 凍結での生存率が他の温度よりも高く<sup>7)</sup>, 投入 10 日後の値は 10% を上回っている。これに対して 7°C 冷蔵での生存率が最も低く, かつリンゴ酸の濃度が高いほど生存率が低下した。7°C では, 0.05% (w/w) ・ 5 日間で生存率が 1% を切り, 0.1% (w/w) ・ 10 日間で生存率が 0.01% 未満となった。-20°C 凍結での生存率の値は両温度の生存率の中間で, リンゴ酸濃度の上昇と共に生存率が低下した。

図 1 には 0.1% (w/w) リンゴ酸水溶液に酵母を接種し, -80°C, -50°C, -20°C, -7°C, -5°C および 7°C に 5 日間または 10 日間投入した場合の生存率変化を示す。全般的に投入期間の影響はほぼみられなかった。図に注目すると -80~50°C での生存率が 10% 前後と高く, -20°C 以上で温度上昇と共に生存率が低下する傾

向がみられ、7°C・10 日間投入で生存率が 0.01%未満となった。以上の結果から、0.1% (w/w) までのリンゴ酸水溶液では濃度が高いほど酵母の生存率が低下し、凍結状態よりも冷蔵状態で酵母に対する殺菌性能が高いことが示された。

表 1. 濃度 0.1% (w/w) 以下のリンゴ酸水溶液中の酵母の生存率 (%)

酸濃度 (% (v/v))	投入温度 (°C)	生存率 (%)		
		投入期間		
		5日間	10日間	20日間
0.01	-80	—	20.5	11.4
	-20	24.0	11.6	6.5
	7	12.4	6.0	0.6
0.05	-80	—	11.7	5.4
	-20	3.1	2.2	3.7
	7	0.8	0.3	0.06
0.1	-80	—	16.2	9.0
	-20	0.9	0.8	1.0
	7	0.3	< 0.01	< 0.01

注：各生存率は反復数 2 回の平均値；—：未測定

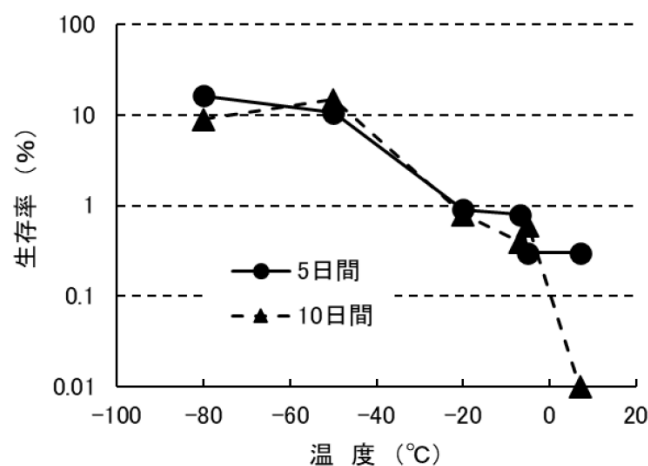


図 1. 0.1% (w/w) リンゴ酸水溶液中における酵母の生存率に及ぼす投入温度の影響

注) 各生存率は反復数 2 回の平均値；7°C・10 日間投入試料の生存率は 0.01%未満

濃度 0.5% (w/w) 以上のリンゴ酸水溶液中の酵母を、-20°Cと 7°Cに最大 10 日間投入した場合の生存率の変化を出発試料の生菌数と共に表 2 に示す。0.5% (w/w) 以上では、-20°C凍結で 7°C冷蔵よりも酵母に対する殺菌性能が高く、-20°C凍結・5 日間で生存率が 0.01%未満となった。リンゴ酸では 0.5% (w/w) 以上の水溶液濃度になることで-20°C凍結で日本酒酵母に対する殺菌性能が顕在化した。なお、乳酸水溶液では 0.05~0.1% (w/w) 濃度で同様の殺菌性能が発現している<sup>1-3)</sup>。

出発試料の全菌数は  $10^7$  個/ml オーダーに調整し、直後に出発試料の生菌数を測定した。表2の0.5% (w/w) と1% (w/w) では全菌数と生菌数のオーダーが一致したが、2% (w/w) では出発試料の生菌数が2桁低下した。同濃度では接種直後から酵母に対してリンゴ酸の殺菌性能が発揮された可能性がある。

表2.  $-20^{\circ}\text{C}$ と $7^{\circ}\text{C}$ における0.5% (w/w) 以上のリンゴ酸水溶液中の酵母の生存率 (%)

酸濃度 (% (v/v))	投入温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	生存率 (%)		出発試料 の生菌数 (cfu/ml)
		投入期間		
		5日間	10日間	
0.5	-20	<0.01	<0.01	$2.2 \times 10^7$
	7	0.07	<0.01	
1.0	-20	<0.01	<0.01	$7.9 \times 10^7$
	7	0.01	<0.01	
2.0	-20	<0.01	<0.01	$6.4 \times 10^5$
	7	1.7	0.06	

注：各生存率は反復数2回の平均値

### 3.2 コハク酸水溶液の殺菌性能

濃度0.01~2% (w/w) のコハク酸水溶液に酵母を接種して $-20^{\circ}\text{C}$ と $7^{\circ}\text{C}$ に投入した場合の生存率変化を表3に示す。全般的に $-20^{\circ}\text{C}$ 凍結よりも $7^{\circ}\text{C}$ 冷蔵での生存率低下が大きい傾向がある。 $-20^{\circ}\text{C}$ では5日間と10日間の生存率に差がないか、後者の生存率が大きいケースがみられた。 $7^{\circ}\text{C}$ では0.5% (w/w) ・10日間投入で

表3.  $-20^{\circ}\text{C}$ と $7^{\circ}\text{C}$ におけるコハク酸水溶液中の酵母の生存率 (%)

酸濃度 (% (w/w))	投入温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	生存率 (%)	
		投入期間	
		5日間	10日間
0.01	-20	14.9	13.8
	7	4.2	2.2
0.05	-20	12.9	13.4
	7	4.6	2.3
0.1	-20	2.2	2.3
	7	2.9	1.5
0.5	-20	0.7	1.4
	7	0.08	0.01
1.0	-20	6.9	13.3
	7	0.5	0.3
2.0	-20	11.7	35.6
	7	8.3	2.0

注：各生存率は反復数2回の平均値

生存率が 0.01% まで低下したが、それ以外の濃度では生存率の低下が小さかった。コハク酸水溶液には酵母に対する殺菌性能を發揮する最適濃度が存在する可能性もあるが、詳細の解明は今後の検討課題とした。以上から、リンゴ酸水溶液に比べてコハク酸水溶液の殺菌性能が低いことが示された。

図 2 には 0.1% (w/w) コハク酸水溶液に酵母を接種し、-50°C、-20°C、-7°C、-5°C および 7°C に 5 日間または 10 日間投入した場合の生存率変化を示す。サンプリング時の試料は -50°C と -20°C が凍結状態、-7°C と 7°C は非凍結状態、-5°C では 5 日間が凍結状態で 10 日間が非凍結状態であった。このように凍結と非凍結が不安定だったことが -5°C・10 日間投入の生存率低下に影響した可能性があるが、詳細は不明である。

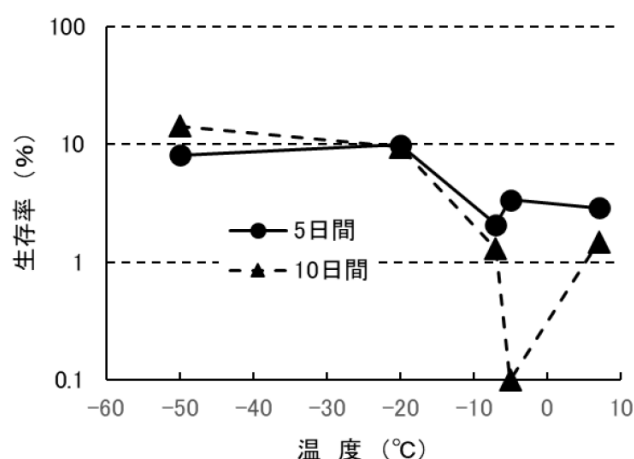


図 2. 0.1% (w/w) コハク酸水溶液中における酵母の生存率に及ぼす投入温度の影響  
 注：各生存率は反復数 2 回の平均値

### 3.3 クエン酸水溶液の殺菌性能

濃度 0.1% (w/w) 以下のクエン酸水溶液に酵母を接種して -20°C と 7°C に投入した場合の生存率変化を表 4 に示す。10 日間投入試料に注目すると、-20°C 凍結よりも 7°C 冷蔵の生存率低下が大きく、0.1% (w/w)

表 4. -20°C と 7°C における濃度 0.1% (w/w) 以下のクエン酸水溶液中の酵母の生存率 (%)

酸濃度 (% (w/w))	投入温度 (°C)	生存率 (%)	
		投入期間	
		5日間	10日間
0.01	-20	1.4	0.6
	7	1.6	0.1
0.05	-20	0.7	0.6
	7	3.0	0.1
0.1	-20	0.5	0.2
	7	0.9	0.07

注：各生存率は反復数 2 回の平均値



の7°C・10日間投入試料の生存率は0.07%まで減少した。

図3には0.1% (w/w) クエン酸水溶液に酵母を接種し、-50°C、-20°C、-7°C、-5°Cおよび7°Cに5日間または10日間投入した場合の生存率変化を示す。原因は不明であるが、-7°Cでの生存率低下が低い結果となった。図に示される生存率は0.2~7%であり、全体的にリンゴ酸並みの殺菌性能がみられた。

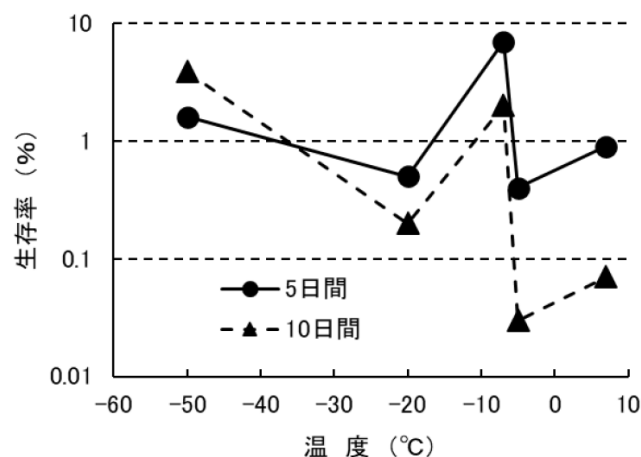


図3. 0.1% (w/w) クエン酸水溶液中における酵母の生存率に及ぼす投入温度の影響

注：各生存率は反復数2回の平均値

濃度 0.5% (w/w) 以上のクエン酸水溶液中の酵母を、-20°Cと7°Cに最大10日間投入した場合の生存率変化を出発試料の生菌数と共に表5に示す。いずれの濃度でも5日間投入では、リンゴ酸と同様で-20°C凍結で7°C冷蔵よりも酵母に対する殺菌性能が高く、生存率が0.01%またはそれ未満となった。一方、10日間投入では両温度の生存率に差異はほぼなく、リンゴ酸の挙動とは異なった。加えて、1.0~2.0% (w/w) 濃度で出発試料の生菌数が10<sup>8</sup>個/mlオーダーとなり、リンゴ酸の場合と逆に全菌数の1桁程度のオーバー状態となった。実験操作の確認を含めて今後の検討課題としたい。

表5. -20°Cと7°Cにおける濃度0.5% (w/w) 以上のクエン酸水溶液中の酵母の生存率 (%)

酸濃度 (% (w/w))	投入温度 (°C)	生存率 (%)		出発試料 の生菌数 (cfu/ml)
		投入期間		
		5日間	10日間	
0.5	-20	0.01	<0.01	8.1×10 <sup>7</sup>
	7	0.1	0.01	
1.0	-20	<0.01	<0.01	9.7×10 <sup>8</sup>
	7	0.01	<0.01	
2.0	-20	<0.01	<0.01	2.1×10 <sup>8</sup>
	7	0.08	<0.01	

注：各生存率は反復数2回の平均値

### 3.4 有機酸水溶液の pH と殺菌性能の関係

表 6 には、酵母を接種した有機酸水溶液と 0.01~0.1M 塩酸水溶液を-20°Cと 7°Cに投入して 5~10 日間経過後の生存率、および各水溶液の pH (25°C) を示す。本研究で供試した有機酸水溶液の pH は 2.1~3.3 の範囲にあり、両塩酸水溶液の pH は 1.9~3.0 とほぼ等しい。pH=3.0 の有機酸水溶液 (0.1% (w/w) 以下の濃度) と pH=3.0 の 0.1M 塩酸水溶液における酵母の生存率を比べると両温度共に後者の値が低く、有機酸水溶液よりも塩酸水溶液の殺菌性能が勝った。一方で-20°C・5 日間経過後に注目すると、pH=2.4 以下のリンゴ酸水溶液とクエン酸水溶液 (両者の濃度 0.5% (w/w) 以上) では pH=1.9 の 0.1M 塩酸水溶液よりも酵母の生存率が低く、乳酸の 0.05~0.1% (w/w) 水溶液と同様に-20°Cでの殺菌性能<sup>1,2)</sup>が発現したと考える。

表 6. -20°Cと 7°Cにおける各有機酸水溶液および塩酸水溶液の pH (25°C) と酵母の生存率 (%)

酸	酸濃度 (% (v/v))	pH	生存率 (%)			
			-20°C		7°C	
			5日間	10日間	5日間	10日間
リンゴ酸	0.01	3.3	24.0	11.6	12.4	6
	0.05	2.8	3.1	2.2	0.8	0.3
	0.1	2.7	0.9	0.8	0.3	<0.01
	0.5	2.4	<0.01	<0.01	0.07	<0.01
	1	2.2	<0.01	<0.01	0.01	<0.01
	2	2.1	<0.01	<0.01	1.7	0.06
コハク酸	0.01	3.2	14.9	13.8	4.2	2.2
	0.05	3.1	12.9	13.4	4.6	2.3
	0.1	2.9	2.2	2.3	2.9	1.5
	0.5	2.4	0.7	1.4	0.08	0.01
	1	2.4	6.9	13.3	0.5	0.3
	2	2.3	11.7	35.6	8.3	2
クエン酸	0.01	3.3	1.4	0.6	1.6	0.1
	0.05	2.8	0.7	0.6	3	0.1
	0.1	2.7	0.5	0.2	0.9	0.07
	0.5	2.3	0.01	<0.01	0.1	0.01
	1	2.2	<0.01	<0.01	0.01	<0.01
	2	2.1	<0.01	<0.01	0.08	<0.01
塩酸	(0.01M)	3	0.2	0.1	0.2	0.07
	(0.1M)	1.9	0.08	<0.01	<0.01	<0.01

注：各生存率は反復数 2 回の平均値

#### 4. まとめ

本研究では、日本酒酵母に対するリンゴ酸、コハク酸およびクエン酸の各有機酸水溶液の-20℃を中心とした凍結下と冷蔵下での殺菌性能を観察した。明らかになった点を以下にまとめる。

各有機酸水溶液の日本酒酵母に対する殺菌性能は有機酸の種類によって異なり、リンゴ酸水溶液とクエン酸水溶液では0.5～2.0% (w/w) で-20℃凍結・5日間で7℃冷蔵より顕著な殺菌性能（生存率0.01%以下）を発現した。しかし、著者らがこれまでに報告した日本酒酵母に対する乳酸水溶液の-20℃凍結・5日間の殺菌性能<sup>1-3)</sup>と比較すると、乳酸水溶液の0.05～0.1% (w/w) に対してリンゴ酸水溶液とクエン酸水溶液では10倍程度高い濃度が必要であった。

一方、0.01～0.1% (w/w) 濃度のリンゴ酸水溶液とクエン酸水溶液、および0.01～2.0% (w/w) 濃度のコハク酸各水溶液では-20℃凍結での顕著な殺菌性能はみられず、7℃冷蔵で日本酒酵母の生存率が低くなる傾向があり、生存率を0.01%程度まで低下させるには10日間の投入期間が必要であった。

#### 参 考 文 献

- 1) 富樫巖, 永井一輝, 亀田剛, 土田義之: スパークリングワイン中および乳酸水溶液中の酵母に対する低温の影響. 日本菌学会会報, **52**(1): 43-46 (2011)
- 2) 富樫巖, 永井一輝, 亀田剛: 酵母と細菌に対する乳酸水溶液の低温環境での殺菌能. 旭川工業高等専門学校研究報文, **49**: 28-34 (2012)
- 3) 富樫巖, 福田拓巳: -20℃凍結下で日本酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の生存に及ぼす乳酸, 糖類, pH の影響. 日本菌学会会報, **56**(1): 10-14 (2015)
- 4) 浅野忠男: 清酒酵母の有機酸生成に関する研究. 生物工学会誌, **82**(2): 63-68 (2007)
- 5) 山本泰, 東和男, 好井久雄: 有機酸の抗菌性. 日本食品工業学会誌, **31**(8): 525-530 (1984)
- 6) 保田仁資: 食品衛生実験 (6章 微生物実験法 6.2 生菌数の測定), 東京化学同人: 125-128 (2005)
- 7) 中川恭好: 微生物の保存法—微生物管理の実際—. 防菌防黴, **38**(5): 351-359 (2010)

## 【研究紹介】北海道の原木シイタケ栽培施設に分布する トリコデルマ属菌の特性把握の試み

富樫 巖 \*  
大谷 奈緒 \*\*  
芳賀 仁 \*\*

An investigation of characteristics of *Trichoderma* spp. which are distributed in bed log cultivation houses of shiitake mushroom in Hokkaido

Iwao TOGASHI  
Nao OHTANI  
Hitoshi HAGA

### Abstract

To understand the fungal contamination of culture facilities for the bed log cultivation of shiitake (*Lentinula edodes*) in Hokkaido, we examined airborne fungi in four plastic greenhouses by the use of plates made of PDA (potato dextrose agar) from June to October once a month in 2005. Furthermore, antifungal effects of benomyl (BEN) and thiabendazole (TBZ) on 74 isolates of *Trichoderma* spp. collected from airborne fungi were studied. The results obtained were as follows:

- (1) The mean value of airborne microorganisms in the four plastic greenhouses (for the fruiting and the rest of the bed logs) was 30.8 CFU (colony forming unit)/plate of diameter 90 mm (the value of fungi was 25.9 CFU/plate, the value of bacteria was 4.5 CFU/plate, the value of yeasts was 0.4 CFU/plate).
- (2) Mycelia Sterilia (MS), the most dominant fungi, accounted for 36.1% the total colonies, followed by *Penicillium* spp. (25.5%), *Cladosporium* spp. (23.2%), *Aspergillus* spp. (5.5%), *Trichoderma* spp. (4.2%) and others in the two houses for fruiting of the bed logs.
- (3) The mycelial growth of 56 isolates of *Trichoderma* spp. which was isolated from the airborne fungi was inhibited completely on PDA plates containing 0.01% (w/v) of BEN. On the other hand, the three isolates of *Trichoderma* spp. (including ANCT-05090) grew up vigorously on the plates.
- (4) MIC (Minimum Inhibitory Concentration) against ANCT-05090 exceeded 1% (w/v) of BEN, and was 1% (w/v) of TBZ.

### 1. はじめに

積雪・寒冷地域の北海道におけるキノコの周年栽培は、暖房付き簡易施設（農業ハウス）や空調施設などの閉鎖空間で行われる。子実体の安定生産を図るには、栽培環境（閉鎖空間）に侵入・顕在化してキノ

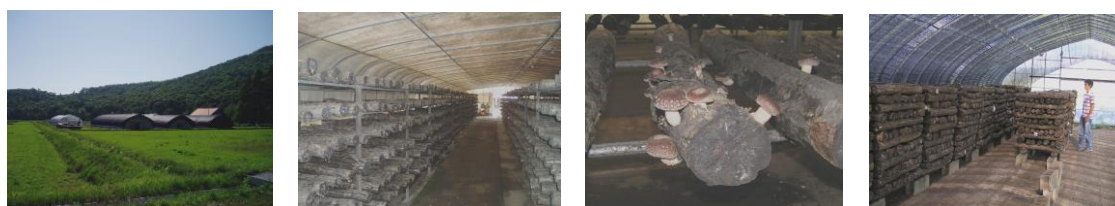
\* 旭川高専名誉教授

\*\* 物質化学工学科卒業生

コの発生不良を引き起こす雑菌や害菌の防除が求められる。具体的には栽培環境を汚染している微生物の分布状況を把握し、雑菌・害菌の分布密度を低減する微生物制御の取組み（薬剤の散布や噴霧など）が不可欠となる。

シイタケの原木栽培では菌寄生菌であるトリコデルマ属菌が原因の発生不良被害が広く知られ<sup>1)</sup>、同菌の防除薬剤にはベノミル（BEN）やチアベンダゾール（TBZ）などのベンツイミダゾール系薬剤が汎用される。一方、同系薬剤には耐性菌（非感受性のトリコデルマ属菌やペニシリウム属菌など）が発現することが指摘されている<sup>2)</sup>ことから他の薬剤とのローテーション利用が望ましい。しかし、その具体的マニュアルは見当たらない。著者らはその対応に向けた一歩（栽培環境の現場状況把握）として、原木シイタケ栽培施設における微生物分布状況およびベノミルに対する非感受性トリコデルマ属菌の分布状況の調査を試みることにした。

本研究では20年間シイタケの原木栽培を行う上川管内愛別町の事業所（年間稼働ホダ木2万4千本、年間植菌ホダ木1万2千本強；ホダ木寿命2年の多孔式・ハウス管理栽培<sup>3)</sup>）の理解・協力を得て、「発生ハウス」と「休養ハウス」のトリコデルマ属菌に注目した落下菌調査、および落下菌から分離したトリコデルマ属菌の温度特性やベンツイミダゾール系薬剤に対する感受性の特性把握に取り組んだ。同栽培施設では栽培開始以後15年間はベノミル水和剤を使用したが、その後の5年間は防カビ薬剤を使用していない。なお、発生ハウスはシイタケの子実体の発生・生育を行い、休養ハウスは次の子実体生産に向けて子実体発生後のホダ木を休ませる役割分担を担う農業ハウスである（写真1参照）。



↑栽培施設の全景      ↑発生ハウスの内部      ↑子実体の発生      ↑休養ハウスの内部

写真1 微生物調査を行った原木シイタケ栽培施設（左から全景，発生ハウス，  
ホダ木からの子実体発生，休養ハウス）

注：発生ハウスのホダ木は棚差し，休養ハウスのホダ木は井桁積み，ホダ木の一生（約2年間）は約半年のホダ化後に約8週間単位の発生・休養サイクルを10回程度繰り返す

## 2. 実験方法

### 2.1 栽培施設と落下菌の採取方法

2005年6月から同年10月において毎月1回，合計5回に渡って原木シイタケ栽培施設（暖房設備付き農業用ハウス：合計4棟，内訳：発生ハウス2棟，休養ハウス2棟，サイズ：間口6.8～8.6×長さ29m）における落下菌を採取した。採取に際しては直径90mmのシャーレとポテトデキストロース寒天（以下PDA，日水製薬製）で作成した平板培地を各ハウス当たり5枚使用し（ハウスの四隅と中央の床上約1m

の高さに配置), シャーレの蓋を 5 分間開放した (章末の写真 2 参照)。

## 2.2 落下菌の菌数把握と同定

落下菌を採取した PDA 平面培地を 25°C で最大 7 日間培養し, 培地上に発現するコロニーを計数して生菌数 (CFU/平板) を求めた (写真 2 参照)。生菌数は細菌, 糸状菌および酵母ごとに取りまとめた。発生ハウスの糸状菌については目視によるコロニーの特徴と顕微鏡 (実体顕微鏡と生物顕微鏡) による分生子柄や分生子の特徴の観察から属レベルの同定を行った<sup>47)</sup>。

## 2.3 落下菌から分離したトリコデルマ属菌の特性把握

2.1 の PDA 平板培地に発現コロニー (発生ハウスと休養ハウス) からトリコデルマ属菌を分離・培養することで 74 株を得た。これらのトリコデルマ属菌株を各種試験に供試する場合には, PDA 平板培地を用いて 25°C で 5 日間前培養したものを用いた。

### 2.3.1 温度特性

直径 90 mm の PDA 平板培地の中央にトリコデルマ属菌 75 株 (落下菌 74 株, 対照株: *Trichoderma harzianum* Rifai NBRC 33016) を接種して 15°C および 25°C で 10 日間培養し, 接種源のへりからコロニー先端までの菌糸伸長量を経時的に測定した (最大伸長量 40 mm, 平板培地当たり 4 つの半径方向を測定)。接種源としては, 前培養したコロニーからコルクボーラを用いて寒天培地ごと打ち抜いた直径 5 mm の菌体ディスクを用いた。供試菌株当たりの平板培地の反復数は 2 とした (合計測定数: 8)。

以上 74 株のトリコデルマ属菌について, 25°C における菌糸伸長の速さの違いから 2 つのグループ (I ~ II 型) に分類した。すなわち, I 型は菌糸伸長速度が速く平板培地全面をコロニーが覆うのに培養後 3 日前後の培養で十分な菌株, II 型は菌糸伸長速度が遅く平板培地全面をコロニーが覆うのに 5 日以上培養を要する菌株である。

### 2.3.2 ベノミル水和剤に対するトリコデルマ属菌の感受性

PDA 培地に濃度が 0.001% (w/v) または 0.02% (w/v) になるようにベノミル水和剤 (有効成分: BEN 50%, 商品名: ベンレート 住友化学工業製) を添加し, 高圧蒸気滅菌後に平板培地を作成した (BEN 濃度: 0.0005% (w/v) または 0.01% (w/v))。この平板培地と対照の PDA 平板培地にトリコデルマ属菌を 2.3.1 と同様に接種し, 25°C 培養時の菌糸伸長挙動を観察した (反復数 2, 測定数 8)。0.02% (w/v) ベノミル水和剤添加 PDA 平板培地での菌糸伸長挙動を観察することで, 感受性レベル I (BEN 感受性・高: 10 日間の培養後に菌糸伸長がみられないか活着のみ), 感受性レベル II (BEN 感受性・中: 0.02% (w/v) ベノミル水和剤添加 PDA 平板培地で菌糸伸長が可能だが, 対照の PDA 平板培地より顕著な遅れあり), および感受性レベル III (BEN 感受性・弱 ⇔ BEN 非感受性: 0.02% (w/v) ベノミル水和剤添加 PDA 平板培地で対照の PDA 平板培地程度の菌糸伸長挙動を示す) に分類した。

### 2.3.3 チアベンダゾール液剤に対するトリコデルマ属菌の感受性 (正の交差抵抗性観察)

ベノミル水和剤に対して感受性レベル I (BEN 感受性・高) の ANCT-05001, 感受性レベル III (BEN 非

感受性)の ANCT-05090, ANCT-05110 および NBRC 33016 を供試して交差抵抗性の観察を行った。すなわち、高圧蒸気滅菌後の PDA 培地にチアベンダゾール液剤(有効成分:TBZ 10%, 商品名:ピオガード液剤 北興化学工業製)が 1% (W/V) になるように添加して作成した PDA 平板培地を作成した(TBZ 濃度: 0.1% (w/v))。この平板培地と対照の PDA 平板培地に供試両菌株を 2.3.1 と同様に接種・培養して菌糸伸長量を測定し、チアベンダゾール液剤に対する感受性を観察した(反復数 2~3, 測定数 8~12)。

### 2.3.4 ベノミル水和剤とチアベンダゾール液剤のトリコデルマ属菌に対する最小発育阻止濃度(MIC)と最小殺かび濃度(MCC)

GP 培地<sup>7)</sup>(グルコース 20g, ポリペプトン 5g, 麦芽抽出エキス 2g, リン酸二水素カリウム 1g, 硫酸マグネシウム 7 水和物 0.5g, 純水 1000 ml), およびベノミル水和剤とチアベンダゾール液剤を供試し、各薬剤の有効成分濃度(BEN と TBZ)が 1~0.004% (w/v) の 2 倍希釈溶液を試験管中にそれぞれ 2 ml 調製した。そこに  $1.8\sim 2.3 \times 10^7$  個/ml の ANCT-05090 と NBRC 33016 の孢子懸濁液を 0.1 ml 接種し、25°C で 7 日間培養して各薬剤の最小発育阻止濃度(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)を決定した(反復数 2)。その後、MIC を測定したサンプルを PDA 平板培地に白金耳で塗抹接種し、25°C で 7 日間培養して各薬剤の最小殺かび濃度(Minimum Cidal Concentration: MCC)を決定した<sup>8)</sup>(反復数 4)。なお、孢子懸濁液は前培養したコロニーを白金耳で掻き取って滅菌水に孢子を含む菌体を懸濁し、無菌的に濾過することで調製した。



↑落下菌の採取



↑落下菌のコロニー例

写真2 落下菌の採取と培養後に発現したコロニー

## 3. 結果と考察

### 3.1 ハウスの落下菌の菌数と菌相

4 棟の農業ハウスの 5 回の測定において(4 棟×5 回×5 枚の平板/回・棟=100 枚の平板培地使用), 全平板培地の平均落下菌数は 30.8 CFU/平板(うち細菌 4.5 CFU/平板, 糸状菌 25.9 CFU/平板, 酵母 0.4 CFU/平板)となった。糸状菌数のみでは 30 CFU/平板 以下のものが約 80% を占めた。1996 年に富樫らが報告した北海道内における菌床シイタケ栽培施設の落下糸状菌調査<sup>9)</sup>とほぼ同様の結果であった。一方、その範囲は 7.6~77.2 CFU/平板(1 棟当たり 5 枚の平板培地を使用した平均値)となり菌床栽培施設の 6.0~142.2 CFU/平板(平均糸状菌数: 29.4 CFU/平板)と比較して狭く、平板培地 1 枚当たりでも 100 CFU/平板 を超えるものはなかった。

トリコデルマ属菌はシイタケ栽培においてホダ木（菌床）と子実体に発生し、子実体の発生不良を引き起こす菌寄生性の害菌である。しかし、落下糸状菌におけるトリコデルマ属菌の占有率は、発生ハウス 4.2%、休養ハウス 1.8%、平均で 2.7%に過ぎなかった。菌床シイタケ栽培の場合と同様、原木シイタケ栽培施設の落下菌としてのトリコデルマ属菌の占有率は低いことが分かった。

原木シイタケ栽培では子実体の発生・生育を行う発生ハウスの微生物汚染状況把握が最重要と考える。そこで発生ハウスの全落下菌数（2 棟・5 回測定、50 枚の平板培地使用）について、表 1 には細菌、糸状菌および酵母ごとの生菌数と占有率、表 2 には表 1 の 927 個（CFU）の全糸状菌コロニーに占める各糸状菌の属レベルの同定結果と生菌数および占有率をそれぞれ示す（章末にまとめた、以下同様）。害菌として注目するトリコデルマ属菌 39 個（占有率 4.2%）以外に検出された糸状菌としては、コロニー数の多い順に *Mycelia sterilia*（菌糸型不完全菌類）335 個（同 36.1%）、ペニシリウム属菌 236 個（25.4%）、クラドスポリウム属菌 215 個（23.2%）、アスペルギルス属菌 51 個（5.5%）、不明・同定不能 33 個（3.6%）などであった。北海道の空中浮遊糸状菌としてはクラドスポリウム属菌、*Mycelia sterilia*、ペニシリウム属菌が多いことから、ハウス外の空中浮遊糸状菌がハウスに侵入していると考察できる<sup>10)</sup>。ペニシリウム属菌はキノコの栄養源を横取りして増殖する雑菌である。菌床シイタケ栽培では菌床や子実体を弱らせてトリコデルマ属菌への遷移を誘発する役割を担う傾向があり、栽培施設の落下糸状菌の 7 割強をペニシリウム属菌が占めた<sup>8)</sup>。原木栽培においてもペニシリウム属菌の分布密度は低い方が望ましいと考える。

### 3.2 トリコデルマ属菌の温度特性

表 3 には 25°Cでの菌糸伸長挙動から、発生ハウスと休養ハウスの各 2 棟から分離した 74 株のトリコデルマ属菌を 2 つのグループ（I～II型）に分類した結果を示す。加えて、図 1（章末にまとめた、以下同様）には各グループの 15°Cと 25°Cでの菌糸伸長挙動例を示す（I型の ANCT-05001 と ANCT-05100、II型の ANCT-05082）。表 3 のように I 型は 72 株、II型は 2 株であった。菌床シイタケ発生施設ではII型の検出率が最も高く 50%以上を占めており<sup>11,12)</sup>、本研究と異なった。この原因については不明であり、今後における課題としたい。なお、対照株の *T. harzianum* NBRC 33016 は I 型に属す。

図 1 の代表例にも示されるが、15°C培養でコロニーが平板培地全面を覆うのに要した日数はほぼ 6～7 日間で、グループ間の差異は観察されなかった。培養温度が 10°C低下したことで I 型の菌糸伸長速度は半減したが、II型では低下割合が小さい。特に、II型の ANCT-05082 では両培養温度においてコロニーが平板培地全面を覆うのに要した日数が等しく 5 日間であった。I 型はハウス内の気温の高い時期に活発な活動が可能で、II型は気温が下がっても大きな影響を受けにくい可能性があるが、より詳細な検討は今後の課題としたい。

### 3.3 ベノミル水和剤に対するトリコデルマ属菌の感受性

ベノミル水和剤添加濃度 0.02%（w/v）の PDA 平板培地での感受性の判定結果を表 4 に示す。供試 74 株の 76%にあたる 56 株が高い感受性を示すレベル I であった（うち 10 株は活着あり）。感受性が中のレベル II は 15 株、感受性が弱いレベル III（非感受性）は ANCT-05090 を含めた 3 株であった。図 2 には、各感受性レベルの代表的菌株（感受性レベル I：ANCT-05001、同 II：ANCT-05104、同 III：ANCT-05090）の 25°Cでの菌糸伸長挙動例を示す。感受性レベル I の ANCT-05001 は図 1 のように（加えて 3.4 の図 3 参照）2～3



日間で対照の PDA 平板培地全面にコロニーが成長したが、0.02% (w/v) ベノミル水和剤添加 PDA 平板培地では菌糸伸長が全くみられなかった。

感受性レベルⅡの ANCT-05104 と同レベルⅢの ANCT-05090 は対照の PDA 平板培地で 3 日間の培養で全面にコロニーが成長した (3.4 の図 3 参照)。しかし、図 2 のようにベノミル水和剤添加 PDA 平板培地では、感受性レベルⅡの ANCT-05104 は培地全面をコロニーが覆うことはなく、感受性レベルⅢの ANCT-05090 は 5 日間で培地全面にコロニーが成長した。なお、対照株の *T. harzianum* NBRC 33016 はベノミル水和剤に非感受性で感受性レベルⅢ型に該当し、対照の PDA 平板培地では 3 日間、0.02% (w/v) ベノミル水和剤添加 PDA 平板培地では 4 日間で培地全面にコロニーが成長した。

参考までに、ベノミル水和剤添加濃度を低下させて 0.001% (w/v) で感受性レベルを観察した場合 (表 4 参照)、その分布状況はベノミル水和剤添加濃度 0.02% (w/v) と大きく変わらなかった。通常環境殺菌でベノミル水和剤は 0.1% (w/v) で使用するが、その 1/100 濃度の 0.001% (w/v) でも 70% 強の 52 株が成長しなかった。

ベノミル水和剤に対して非感受性の菌株は 5 回調査の 2 回のみで分離されたこと (ANCT-05090 : 2005 年 8 月に発生ハウスの落下菌として分離, ANCT-05110 と ANCT-05114 : 2005 年 9 月に休養ハウスの落下菌として分離), トリコデルマ属菌 74 株中の 3 株であったことから分布密度は低いと推察される。この原因としては、非感受性株のトリコデルマ属菌密度が過去を含めて低かったか、または調査時の 5 年前にベノミル水和剤の使用を中止したことでハウス内に生息するトリコデルマ属菌に占める非感受性株の密度が相対的に低下した可能性が考えられる。当該事業所でベノミル水和剤の利用中止に至った理由は、ハウス内の環境殺菌と育成中のホダ木管理に同薬剤を使用した場合、試験的に使用を中断した場合を比べてところトリコデルマ属菌がホダ木に発現する度合いに明確な差異がなかったからであった。

### 3.4 ベノミル水和剤とチアベンダゾール液剤のトリコデルマ属菌に対する生育阻害効果

0.02% (w/v) ベノミル水和剤添加および 1% (w/v) チアベンダゾール液剤添加の各 PDA 平板培地での 4 株のトリコデルマ属菌の菌糸伸長挙動を図 3 に示す。ANCT-05001 は対照の PDA 平板培地では菌糸伸長が旺盛であるが、ベノミル水和剤に対して感受性が高い (図 1 参照)。加えてチアベンダゾール液剤 (TBZ 含有率 10%) に対しても感受性が高く、25°C・10 日間の培養で菌糸成長がみられなかった。ANCT-05090 と ANCT-05110 はベノミル水和剤に対して非感受性株で、チアベンダゾール液剤に対しても感受性が低かった。チアベンダゾール液剤は通常 100 倍希釈 (TBZ=0.1% (w/v)) で使用するが、その濃度で菌糸成長が生じたことになる。調査施設ではチアベンダゾール液剤を使用しておらず、両菌株はベノミル水和剤に非感受性となったことでチアベンダゾール液剤に対する正の交差抵抗性も獲得したと考えられる。なお、NBRC 33016 は 1994 年に十勝管内帯広市の菌床シイタケ栽培施設の落下菌として分離された *T. harzianum* (林産試験場保存株 94110Tr) であり<sup>9)</sup>、ベノミル水和剤に対する非感受性とチアベンダゾール液剤に対する正の交差抵抗性を有す<sup>12)</sup>。今回の調査で分離したトリコデルマ属菌にも同様の特性が確認された。

ANCT-05090 と NBRC 33016 を供試し、ベノミル水和剤有効成分の BEN とチアベンダゾール液剤有効成分の TBZ の MIC と MCC を測定した結果を表 5 に示す。本研究では両成分の最大濃度を 1% (w/v) とした。両株において TBZ ではその最大濃度が MIC と MCC となったが、BEN では 1% (w/v) でも両菌株の成長を阻止することができなかった。ベノミル水和剤は通常 1000 倍希釈で使用するが (BEN=0.05% (w/v)),

ANCT-05090とNBRC 33016はその20倍濃度でも孢子発芽・菌糸成長が可能であることが分かった。

表1. 発生ハウス（2棟）における落下菌の分布状況

微生物の種類	生菌数 (CFU)	占有率 (%)
細菌	144	13.0
糸状菌	927	83.5
酵母	39	3.5
合計	1110	100.0

注：2棟×5回（6～10月に各1回測定）×5枚・平板/回・棟=50枚のPDA平板培地を使用した

表2. 発生ハウス（2棟）における落下糸状菌の同定結果と占有率

種類（属レベル）	生菌数 (CFU)	占有率 (%)
<i>Mycelia sterilia</i> （菌糸型不完全菌類）	335	36.1
ペニシリウム属菌	236	25.5
クラドスポリウム属菌	215	23.2
アスペルギルス属菌	51	5.5
トリコデルマ属菌	39	4.2
バーティシリウム属菌	3	0.3
ペシロミセス属菌	3	0.3
フィアロフォラ属菌	3	0.3
ピシウム属菌	2	0.2
ニグロスポラ属菌	2	0.2
アルタナリア属菌	1	0.1
オーレオバシジウム属菌	1	0.1
ゲオトリクム属菌	1	0.1
フザリウム属菌	1	0.1
ヘルミントスポリウム属菌	1	0.1
不明	26	2.8
不能	7	0.8
合計	927	100

注：表1参照

表 3. 発生ハウスと休養ハウスから分離したトリコデルマ属菌の温度特性 (25°C)

分類	株数	割合
I 型	72	97.3%
II 型	2	2.7%
合計	74	100%

注：I 型：25°C培養後 3 日前後で直径 90 mm の PDA 平板培地全面をコロニーが覆う，II 型：25°C培養後 5 日以上で同 PDA 平板培地全面をコロニーが覆う

表 4. トリコデルマ属菌のベノミル水和剤に対する感受性 (PDA 平板培地・25°C)

感受性レベル	ベノミル水和剤濃度 (% (w/v) )	
	0.02	(0.001)
レベル I (感受性・高)	56株 (52)	
レベル II (感受性・中)	15株 (15)	
レベル III (感受性・弱)	3株 (7)	
合計	74株 (74)	

注：レベル I：10 日間の培養後に菌糸伸長がみられないか活着程度，  
 レベル II：菌糸伸長がみられるが対照の PDA 平板培地より顕著な遅れあり，  
 レベル III：対照の PDA 平板培地程度の菌糸伸長挙動を示す

表 5. ベノミル (BEN) とチアベンダゾール (TBZ) のトリコデルマ属菌に対する MIC と MCC

菌 株	有効成分	MIC	MCC
ANCT-5090	BEN	> 1%	> 1%
	TBZ	1%	1%
NBRC 33016	BEN	> 1%	> 1%
	TBZ	1%	1%

注：BEN：ベノミル水和剤の含有率 50%，TBZ：チアベンダゾール液剤の含有率 10%

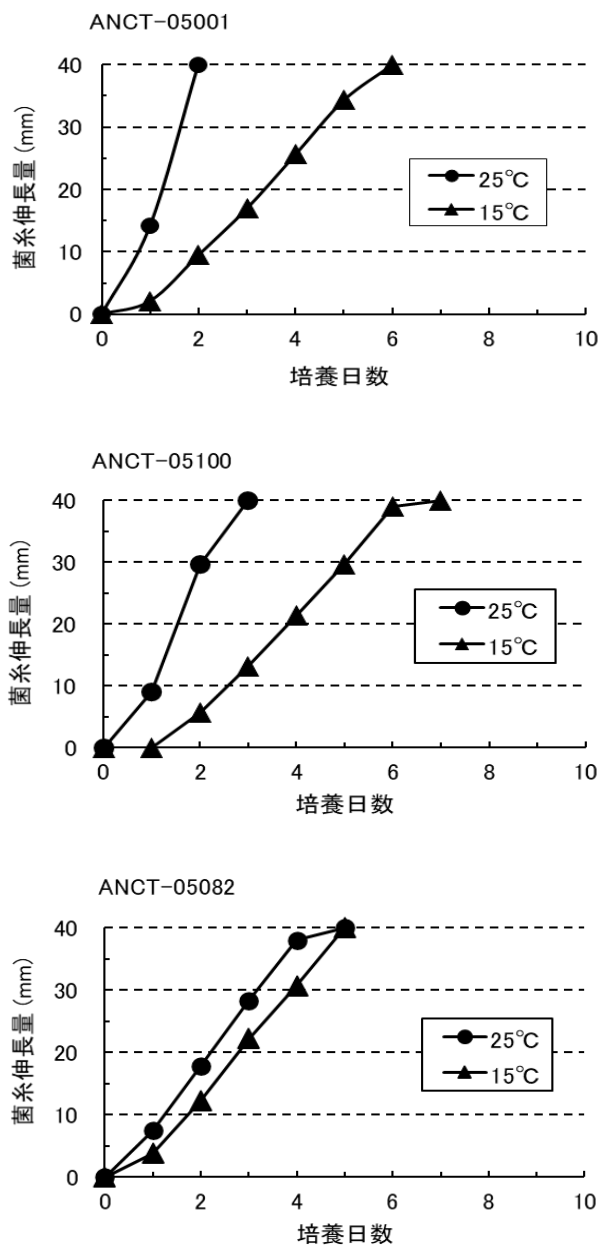


図1. 15°Cと25°Cでのトリコデルマ属菌の菌糸伸長挙動の代表例（上：I型のANCT-05001，中：I型のANCT-05100，下：II型のANCT-05082；PDA平板培地使用）

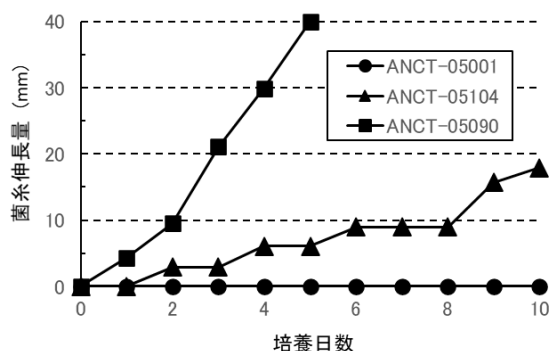


図2. 0.02% (w/v) ベノミル水和剤添加 PDA 平板培地でのトリコデルマ属菌の菌糸伸長挙動 (ANCT-05001: 感受性レベルI, ANCT-05104: 感受性レベルII, ANCT-05090: 感受性レベルIII; 25°C培養)

注: 各感受性レベルの定義は表4参照

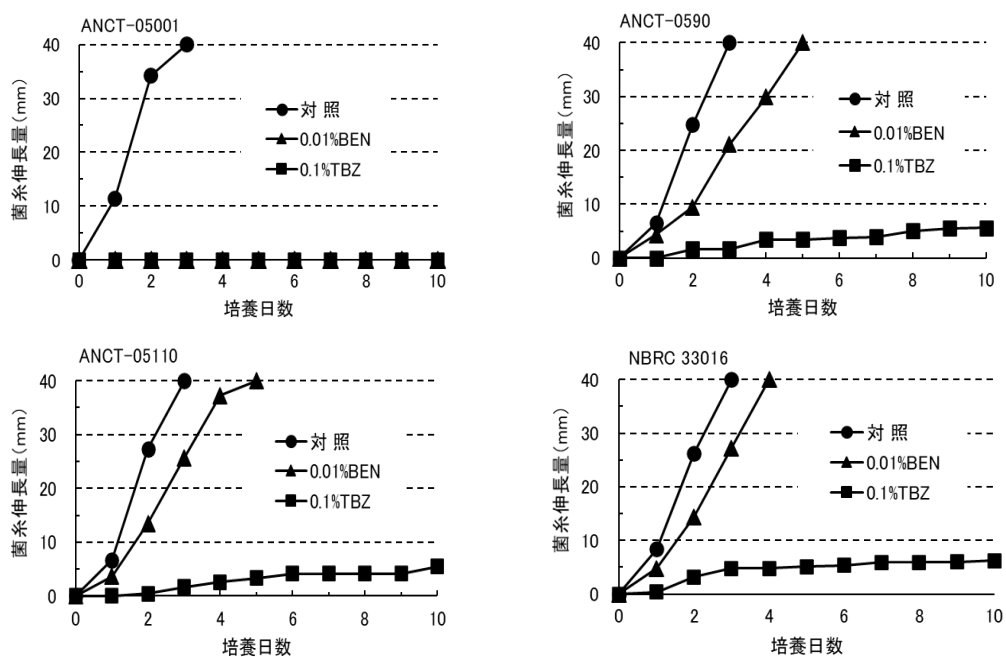


図3. 0.02% (w/v) ベノミル水和剤および1% (w/v) チアベンダゾール液剤添加のPDA 平板培地でのトリコデルマ属菌の菌糸伸長挙動 (25°C)

注: BEN (ベノミル): ベノミル水和剤の含有率50%,

TBZ (チアベンダゾール): チアベンダゾール液剤の含有率10%

#### 4. まとめ

北海道の原木シイタケ栽培で主流となっている周年栽培の多孔式・ハウス管理栽培<sup>3)</sup>に注目し、閉鎖空間となる農業ハウス（周年栽培，暖房付き）の微生物汚染状況および薬剤耐性トリコデルマ属菌の分布状況の把握を試みた。その結果，調査対象とした上川管内愛別町の農業ハウス 4 棟の平均落下菌数は 30.8 CFU/平板（内訳：細菌 4.5 CFU/平板，糸状菌 25.9 CFU/平板，酵母 0.4 CFU/平板）で，糸状菌数のみでは 30 CFU/平板以下のものが約 80%で数値的には栽培施設内の微生物密度は適正と判断される<sup>14)</sup>。シイタケ栽培の主な害菌であるトリコデルマ属菌の分布状況としては，落下糸状菌の占有率で発生ハウス（2 棟）が 4.2%，休養ハウス（2 棟）が 1.8%，平均 2.7%と数値的には低いことが分かった。発生ハウス（2 棟）の落下糸状菌占有率でトリコデルマ属菌よりも高かったものは *Mycelia sterilia*（菌糸型不完全菌類）36.1%，ペニシリウム属菌 25.4%，クラドスポリウム属菌 23.2%，アスペルギルス属菌 5.5%であった。空中浮遊糸状菌としてクラドスポリウム属菌，*Mycelia sterilia*，ペニシリウム属菌が多い<sup>10)</sup>ことからハウス外の空中浮遊糸状菌がハウスに侵入していると考察できる。

4 棟のハウスから分離した 74 株のトリコデルマ属菌の温度特性としては，25°Cで菌糸伸長が活発な I 型が 72 株を占め，15~25°Cの菌糸伸長速度がほぼ変わらない II 型は 2 株と少なかった。また，ベノミル水和剤に対する感受性については添加濃度 0.02%（w/v）の PDA 平板培地使用で，74 株の 76%にあたる 56 株が高い感受性を有し（レベル I：25°C・10 日間培養で菌糸伸長なし），やや感受性が劣るレベル II が 15 株，感受性が弱いレベル III（非感受性）が 3 株となった。非感受性トリコデルマ属菌の分布密度は低いと考察できるものの，チアベンダゾール液剤に対する正の交差抵抗性を獲得していた。感受性レベル III の ANCT-05090 についてベノミル水和剤の有効成分 BEN とチアベンダゾール液剤の有効成分 TBZ の MIC と MCC をそれぞれ測定したところ，TBZ では両値が 1%（w/v），しかし BEN では MIC が 1%（w/v）以上となり本検討では値を確定できなかった。ベノミル水和剤は通常 1000 倍希釈で使用するが（BEN=0.05%（w/v）），ANCT-05090 はその 20 倍濃度でも胞子発芽・菌糸成長が可能であった。

今回，顕在化はしていないもののベンツイミダゾール系薬剤（BEN や TBZ が有効成分）に非感受性のトリコデルマ属菌が発現していることが示された。ベンツイミダゾール系薬剤はシイタケに対する悪影響が少ない<sup>15)</sup>防カビ剤（殺カビ剤）で，その使い勝手の良さからトリコデルマ属菌の防除に汎用されている。しかし，本研究の結果からベンツイミダゾール系とは異なる作用を有し，かつ安全性の高い（低毒性薬剤）の活用<sup>16-19)</sup>も不可欠と判断された。

#### 謝 辞

原木シイタケ栽培施設の微生物調査にご理解・ご協力を賜った愛別町の矢部農園（2006 年 3 月で原木シイタケ栽培部門を廃止）の矢部福二郎氏および眞美恵氏に深謝する。また，本調査時に種々の作業支援を頂いた旭川高専・物質化学工学科 5 年生（2005 年当時）の宮崎貞之氏に感謝する。

## 参 考 文 献

- 1) 小松光雄：シイタケに抗菌性の *Hypocrea*, *Trichoderma* および類縁菌群の研究. 菌蕈研究所研究報告, No.13, 1-113 (1976)
- 2) Nakata M, Sano S, Hashimoto S, Hayakawa K, Nishikawa H, Yasuda Y: Negatively correlated cross-resistance to N-phenylformamidoximes in benzimidazole-resistant phytopathogenic fungi. *Annals Phytopathological Society of Japan*, **53**(12), 659-662 (1987)
- 3) 富樫 巖：随筆・シイタケの原木栽培進化論-ハウス利用, 菌床の原木栽培, そして……。ウッデイエイジ, No.527, 11-14 (1997)
- 4) Malloch, D. (宇田川俊一, 室井哲夫訳)：カビの分離・同定, 医歯薬出版：100 (1983)
- 5) 渡辺恒雄：写真と図解・土壌糸状菌-培養株の検索と形態-, ソフトサイエンス社：392 (1993)
- 6) 山崎省二：環境微生物の測定と評価, オーム社：250 (2001)
- 7) 山崎省二：カラーアトラス 環境微生物, オーム社：154 (2002)
- 8) 高鳥浩介：一目でわかる図説かび検査・操作マニュアル, テクノシステム：345-357 (1991)
- 9) 富樫 巖, 伊藤 清, 宜寿次盛生, 原田 陽：北海道における菌床シイタケ発生施設の糸状菌汚染状況と *Trichoderma* spp. 分離菌株に対するペノミル水和剤の影響. 木材学会誌, **42**(12), 1258-1263 (1996)
- 10) 富樫 巖, 寄谷明香, 菅野良平, 山本将平, 後藤静香, 藤原 彩：浮遊糸状菌の分布調査を寒冷地農業に生かす試み その1-灰色カビに注目したバイオバーデンと施設栽培-. *New Food Industry*, **59**(4)：1-12(2017)
- 11) 富樫 巖：北海道の菌床シイタケ栽培施設で分離されたトリコデルマ属菌の培養特性, 北方林業, **50**(12), 273-275 (1998)
- 12) 富樫 巖：北海道の菌床シイタケ栽培施設で分離されたトリコデルマ属菌の培養特性 (その2), 北方林業, **51**(6), 145-148 (1999)
- 13) Togashi I, Gisusi S, Harada A：Antifungal activity of commercial disinfectants against a benomyl-tolerant strain of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Wood Science*, **44**(5)：414-416 (1998)
- 14) 横山 博：食品製造現場における環境微生物検査. 防菌防黴, **49**(6)：289-293 (2021)
- 15) 富樫 巖, 宜寿次 盛生, 原田 陽：トリコデルマとシイタケの菌糸成長に及ぼす高圧蒸気殺菌したペノミル水和剤の影響. 林産試験場報, **13**(1), 1-5 (1999)
- 16) 富樫 巖, 宜寿次 盛生, 原田 陽：キノコ栽培における環境殺菌剤の利用効果, 日本木材学会北海道支部講演集. No.29, 67-70 (1997)
- 17) 富樫 巖, 宜寿次盛生, 原田 陽：ベンズイミダゾール系薬剤に耐性を持った *Penicillium* spp. に対するグルコン酸クロルヘキシジンとグルタルアルデヒドの防除効果. 木材学会誌, **44**(9)：375-379 (1998)
- 18) 富樫 巖：北海道のキノコ栽培施設で分離されたベンズイミダゾール系薬剤耐性 *Penicillium crustosum*. 日本菌学会会報, **40**(1)：11-13 (1999)
- 19) 富樫 巖, 大谷奈緒, 芳賀 仁, 宮崎貞之：原木シイタケ栽培施設に分布するトリコデルマ属菌の特性把握の試み, 第56回日本木材学会大会研究発表要旨集 (秋田市)：127 (2006)

【研究紹介】 市民対象の体験型イベントに利用可能な  
微生物実験マニュアル作成の取組み  
～家庭用冷蔵庫を用いるエノキタケ栽培～

富樫 巖 \*

福地 俊介 \*\*

Creation of the Microbe Manipulation Manual  
of Experiment Extension Courses for the Public  
- Enokitake Mushroom (*Flammulina velutipes*) Cultivation  
using a Household Electric Refrigerator -

Iwao TOGASHI

Shunsuke FUKUCHI

**Abstract**

Several times, enokitake mushroom (*Flammulina velutipes*) cultivation were examined to make the manual for small scale cultivation using 200 ml culture bottles and a refrigerator.

The results obtained were as follows:

- (1) Many fruit bodies occurred in the media made of spruce sawdust and rice bran than PDA (potato dextrose agar) media.
- (2) The fruit body formation was promoted by Kinkaki (removal of the mushroom spawn) and water filling processes after the incubation for spawn running at 25°C.
- (3) The fruit body formation in a refrigerator at 5-10°C after the incubation was promoted by light irradiation.

**1. はじめに**

高等教育機関の業務の一つに地域社会への貢献活動がある。旭川工業高等専門学校（以下、旭川高専）においても春光台フラワーロードの取組み（対象：地域住民）、公開講座の開講（対象：小中学生および一般市民）、高専祭での実験・実習パートの開設（対象：一般市民）、地域開放特別事業の開催（対象：小中学生）、出授業の企画・運営（対象：小中学生および一般市民）など多種多様の活動を行っている<sup>1)</sup>。その多くは、旭川高専として保有する種々の専門分野の知識や技術を市民に普及啓発する講演会・体験講座などのイベントである。

旭川高専・物質化学工学科では、有機・無機化学、分析化学、物理化学、化学工学、(微)生物学などの専門分野を扱っており、上述の体験型イベントであればその専門性を生かしたカリキュラムを準備す

\* 旭川高専名誉教授

\*\* 物質化学工学科卒業生



ることになる。そこで本研究では、小中学生を中心とした一般市民が生活環境中に存在する身近な微生物の存在に気付き、その特性について体験学習できるプログラム開発に取り組むこととした。具体的には微生物として食用キノコ（担子菌）に注目し、小スケールのキノコ栽培マニュアル作成に必要なデータ収集を目指す。キノコ栽培では生殖成長である子実体の発茸工程と生育工程において比較的厳密な温度管理が求められる。多くの家庭にあり、温度の制御が可能な設備類は冷蔵庫（庫内温度：5～10℃）である。そして、その低温下で発茸可能なキノコとしてエノキタケ（*Flammulina velutipes* (Curtis:Fries) Singer, 地方名：ユキノシタ, 発茸温度：5℃以上から<sup>2)</sup>）に注目した。エノキタケは晩秋に、雪に覆われた風倒木から子実体を発生する。

## 2. 実験方法

### 2.1 供試菌株（前培養, 種菌）

旭川高専保存株の白色系エノキタケ ANCT-05153 と野生系（褐色）エノキタケ ANCT-08001 を一連の試験に用いた。いずれもポテトデキストロース寒天（日水製菓製, 以下 PDA）培地を用いて約 7℃で継代培養保存されていたものである。各試験に用いる接種源（または栽培用種菌）としては、PDA 平板培地に供試菌株を接種して 25℃で 7 日間培養したコロニーから培地ごとにコルクボーラーで打ち抜いた直径 5 mm の菌体ディスクを用いた。また、栽培用のノコクズ種菌<sup>34)</sup>としてはエゾマツ（*Picea iezoensis* Carr.）ノコクズと米ぬかを 5 : 1（体積比）の割合で混合し、水分を 65%に調整して高圧蒸気滅菌（121℃・20 分）した後菌体ディスクを接種・培養して調製した。

### 2.2 栽培容器と栽培培地

栽培容器には 200 ml のスクリュウキャップ付きガラス培養ビンを用い、栽培用の培地には PDA 培地とノコクズ培地の 2 種類を用いた。PDA 培地は通常の濃度に加えて PD 濃度を 1/2, 1/5 にしたものを使用し（寒天濃度は全て 1.5%に調整）、いずれも上述のガラス培養ビン当りに 40 ml の PDA 培地を分注した後に高圧蒸気滅菌（121℃・15 分）した。ノコクズ培地<sup>34)</sup>はエゾマツノコクズと米ぬかを 3 : 1（体積比）の割合で混ぜて水分を 65%としたものをガラス培養ビン当りに 60g 充填し、培地の中央に直径約 9 mm の通気穴を 1 個開けた後に高圧蒸気滅菌（121℃・20 分）した。培養ビン当りの栽培用ノコクズ培地の組成は、絶乾重量換算でノコクズ 10 g と米ぬか 11 g, そして水 39 g 程度となる。

### 2.3 栽培環境・条件

#### 2.3.1 培養条件（栄養成長, 菌糸成長）

培養は 25℃のインキュベーターで行った。なお、培養ビンのスクリュウキャップを少し緩めることで換気ができ、かつ発茸後の子実体の保湿が保てる工夫をした<sup>56)</sup>（2.3.2 参照）。培養期間については PDA 培地、ノコクズ培地共に同一試験区の培養ビン全ての菌回りが終了するまでとした（反復数は各 3）。

#### 2.3.2 発茸・生育条件（生殖成長, 子実体形成）

子実体の発茸と生育は人工気象器または家庭用冷蔵庫で行い、発茸と生育に要した期間を測定した。人

工気象器は 10°C に設定し、ガラス製の 4 壁面を通して日中には室内光が入射する。冷蔵庫は 5~10°C に設定 (平均約 7°C)、終日ほぼ暗黒である。子実体の採取時期は、菌傘が培養ビンのキャップにぶつかった時点とし (培養ビン内の培地上部の空間で子実体を生育させる)、子実体の収量と本数を測定した。

### 2.3.3 ノコクズ培地を用いた栽培での菌かきと注水の効果の観察

白色系と野生系の培養終了後の培地に菌かき<sup>3,4)</sup> (栽培培地の表面に接種した種菌の除去、および種菌下部の培地表面 (菌床表面) を僅かに削り取る操作) と注水<sup>3,4)</sup> (菌かき後の培地表面 (菌床の子実体発生部位) に水を注いで数分間菌床に水分を吸わせた後、余分な水を捨てる操作) を施し、人工気象器と冷蔵庫で子実体の発芽と生育を行った (反復数は各 3)。

## 3. 結果と考察

### 3.1 子実体生産に及ぼす培地の影響

PDA 培地を用いた栽培試験結果を表 1 に、ノコクズ培地を用いた栽培試験の結果を表 2 にそれぞれ示す。白色系と野生系の種菌はいずれも菌体ディスクとした。表 1 の 3 種類の PDA 培地に注目すると、両菌株共に PD 濃度の低下に従って子実体の収量と本数が減少し、発芽・採取日数が延びた。また、白色系に比べて野生系において PDA 培地の栽培で長時間を要した。表 2 のノコクズ培地に注目すると、PDA 培地に比べ両菌株共に子実体の収量と本数が増大し、野生系では発芽・採取・栽培日数が顕著に短縮した。

表 1. PDA 培地と菌体ディスクを用いた栽培試験の結果 (発芽~採取: 人工気象器 10°C)

菌 株	PD濃度	収量 (g)	本 数	培養日数	発芽日数	採取日数	栽培日数
白色系	1/1	2.2±0.35 <sup>※</sup>	5.0±1.73	7	21.0±0.00	32.0±0.00	39.0±0.00
	1/2	0.7±0.15	1.7±1.15		25.7±1.15	40.0±6.93	47.0±6.93
	1/5	0.6±0.06	1.0±0.00		58.7±2.31	82.3±2.89	89.3±2.89
野生系	1/1	1.4±0.26	3.7±2.08	10	60.0±0.00	73.7±2.89	83.7±2.89
	1/2	0.8±0.06	3.3±2.08		79.7±1.15	87.0±1.73	97.0±1.73
	1/5	0.5±0.06	2.0±1.00		73.7±9.24	85.3±1.15	95.3±1.15

※: 平均±標準偏差

注: 培養温度 25°C, 菌かきと注水なし, 反復数 3

表 2 ノコクズ培地と菌体ディスクを用いた栽培試験の結果 (発芽~採取: 人工気象器 10°C)

菌 株	収量 (g)	本 数	培養日数	発芽日数	採取日数	栽培日数
白色系	14.7±0.99 <sup>※</sup>	23.0±5.00	12	37.0±6.08	54.0±5.13	66.0±5.13
野生系	17.9±1.81	18.7±0.58	12	25.0±3.79	42.0±1.15	54.0±1.15

※: 平均±標準偏差

注: 表 1 と同じ

図 1 と図 2 に、それぞれ 1/1 濃度の PDA 培地とノコクズ培地で発生した子実体の写真を示す。PDA 培地では菌傘が薄く、かつ一部の子実体の菌傘に奇形・変形が生じた。これに対してノコクズ培地では、菌株によって菌傘の開き具合が異なるが充実した子実体であった。以上の結果から短期間に正常な子実体を一定量発生させるには PDA 培地よりもノコクズ培地が望ましく、栽培期間と子実体の形態から白色系より野生系が扱い易い可能性が示唆された。



図 1 PDA 培地と菌体ディスクで発生したエノキタケ子実体 (左：白色系, 右：野生系)

注：表 1 と同じ



図 2 ノコクズ培地と菌体ディスクで発生したエノキタケ子実体 (左：白色系, 右：野生系)

注：表 1 と同じ

### 3.2 子実体生産に及ぼす種菌の影響

種菌が栽培に与える影響を把握するために両菌株のノコクズ種菌とノコクズ培地を用い、3.1と同様の栽培試験を行った結果を表 3 に示す。表 2 と比較して多少収量が減少したものの発芽日数が約 7~17 日短縮し、両菌株ともに 10℃の人工気象器に投入後 30 日強で子実体採取が可能となり、25℃での培養日数を含めた栽培日数が 42 日程度まで短縮した。3.1 のノコクズ培地での栽培試験結果と比較して栄養成長である培養日数にほぼ変化はないが、菌体ディスクをノコクズ種菌に変えることで生殖成長である発芽・生育が短時間に行われた。その原因は今後に検討を要するが、子実体原基が形成される培地表面の物理的要因(水分など)が異なっていたことが考えられる。すなわち、ノコクズ培地の一部がむき出しとなる菌体ディスク種菌よりも、培地の上面すべてを覆うノコクズ種菌において培地表面部分の水分が保持された可能性が高い。なお、本栽培試験では菌かきと注水は行っていない。

図 3 にノコクズ種菌とノコクズ培地で栽培した子実体の写真を示す。形態的には白色系よりも野生系が優れているが、原因としては供試した菌株特性が影響したと推察する。

表 3 ノコクズ培地とノコクズ種菌を用いた栽培試験の結果（発芽～採取：人工気象器 10℃）

菌 株	収量 (g)	本 数	培養日数	発茸日数	採取日数	栽培日数
白色系	13.8±2.94※	21.7±1.16	11	19.2±7.23	30.8±6.03	41.8±6.03
野生系	13.4±2.59	23.7±2.89	12	18.0±7.00	30.5±9.61	42.5±9.61

※：平均±標準偏差

注：表 1 と同じ



図 3 ノコクズ培地とノコクズ種菌で発生したエノキタケ子実体（左：白色系，右：野生系）

注：表 1 と同じ

### 3.3 子実体の生産に及ぼす菌かきと注水の影響

3.1 でノコクズ培地および 3.2 でノコクズ種菌の優位性がそれぞれ示されたことから，次に両者の利用に加えて菌かきと注水の影響把握を試みた。その結果を表 4 に示す。表 3 と比較して野生系の子実体の収量と本数が大幅に増加したが，発茸と採取日数に大きな違いは生じなかった。さらに野生系の子実体の収量，発茸および採取日数の標準偏差が小さく，菌かきと注水を施すことで計画的な子実体生産が可能になることが期待できる。なお，白色系では表 3 と比較して子実体本数の増加傾向が確認できたものの，野生系ほどの菌かきと注水の効果はみられなかった。図 4 に菌かきと注水を行った子実体の写真を示す。白色系では菌傘の開かない柄の長い子実体が発生し，野生系は培地全面に多数の子実体が生育した。

表 4 ノコクズ培地とノコクズ種菌を用い，  
 菌かきと注水を施した栽培試験の結果（発芽～採取：人工気象器 10℃）

菌 株	収量 (g)	本 数	培養日数	発茸日数	採取日数	栽培日数
白色系	13.2±6.51※	35.0±14.93	11	20.3±6.66	33.7±8.14	44.7±8.14
野生系	21.6±0.35	121.0±7.81	12	16.0±1.73	30.0±0.00	42.0±0.00

※：平均±標準偏差

注：培養温度 25℃，反復数 3

以上のように，野生系では菌かきと注水を施すことで子実体の収量と本数が増加，発茸と採取日数が揃うことになる。この要因としては，菌かきにより老化したノコクズ種菌が除去されると同時にノコクズ培

地表面の菌糸に機械的な刺激を与えることになり、発芽が促されたためと考えられる。さらに、菌かき後の注水が培地表面への水分補給を行い、子実体形成への刺激となったと推定される。



図4 ノコズ培地とノコズ種菌を用い、  
 菌かきと注水を施した後に発生したエノキタケ子実体（左：白色系，右：野生系）  
 注：表4と同じ

ノコズ培地とノコズ種菌の組合せで菌かきと注水の効果が示された。次に野生系エノキタケとノコズ培地を用い、菌体ディスク（種菌）とノコズ種菌の影響の違いを注水の有無別に観察した（いずれも菌かきあり）。その結果を表5に示す。両者共に注水を施すことで子実体の本数が増加し、菌体ディスク（種菌）の注水なしで子実体の収量が減少した。その他の項目に大きな違いは生じなかったが、菌かきと注水によってノコズ種菌で採取日数のバラツキが小さくなることが再確認された。子実体の形態についても実験条件による差異はみられなかった。以上からノコズ培地を用いて菌かきと注水を施す場合、栽培日数はやや長くなるが野生系では菌体ディスク（種菌）でも十分な収量が期待できることになる。

表5 ノコズ培地を用い、菌体ディスク（種菌）またはノコズ種菌で  
 注水の効果を観察した野生系 ANCT-08001 の栽培試験結果（発芽～採取：人工気象器 10℃）

種 菌	注 水	収量 (g)	本 数	培養日数	発芽日数	採取日数	栽培日数
菌体 ディスク	有	22.5±4.45※	42.3±26.31	13	18.3±0.58	32.3±5.58	45.3±5.58
	無	16.4±2.89	16.7±8.96		18.3±0.58	33.7±1.53	46.7±1.53
ノコズ 種菌	有	21.7±1.01	106.5±2.12	10	15.3±1.15	30.0±1.73	40.0±1.73
	無	20.7±3.30	55.7±9.29		15.7±4.04	32.0±5.20	42.0±5.20

※：平均±標準偏差

注：培養温度 25℃，菌かきあり，反復数 3

### 3.4 子実体の生産に及ぼす光の影響

子実体形成（発芽と生育）に対する光の影響を把握するためにノコズ培地とノコズ種菌を用い、菌かきと注水を施した培地入り培養ビンを人工気象器と家庭用冷蔵庫に投入する栽培試験を行った。得られた結果を表6に示す。両菌株ともに冷蔵庫を用いた場合に子実体の本数の増加と発芽の遅れが生じ、野生系は人工気象器で収量が増大した。人工気象器はガラス張りの構造で10℃に設定され、日中において室内

光が入射する。一方、冷蔵庫の庫内温度は少し低く（5～10℃），終日暗黒状態である。エノキタケの発芽温度は5℃以上<sup>2)</sup>であることから人工気象器と冷蔵庫による影響は小さく，光の有無が発芽日数に大きな影響を与えた<sup>27,9)</sup>と推察する。

表6 ノコクズ培地とノコクズ種菌を用い，菌かきと注水を施した栽培試験の結果  
 (発芽～採取：人工気象器 10℃と家庭用冷蔵庫 5～10℃)

装置	菌株	収量 (g)	本数	培養日数	発芽日数	採取日数	栽培日数
人工気象器	白色系	13.2±6.51 <sup>※</sup>	35.0±14.93	11	20.3±6.66	33.7±8.14	44.7±8.14
	野生系	21.6±0.35	121.0±7.81	12	16.0±1.73	30.0±0.00	42.0±0.00
家庭用冷蔵庫	白色系	13.4±0.87	75.7±9.50	11	33.7±12.50	52.0±12.12	63.0±12.12
	野生系	14.7±2.41	192.3±36.69	12	31.0±0.00	44.0±0.00	56.0±0.00

※：平均±標準偏差

注：表4と同じ

図5（上段）に冷蔵庫で生育中の子実体，図5（下段）に採取後の子実体の写真を示した。人工気象器を用いた子実体の形態（図4）と比べ，両菌株ともに柄が細長くて傘が小さかった<sup>27,9)</sup>。加えて，野生系では傘の色が薄かった。以上を考察すると，エノキタケの生殖成長には光の存在が無視できず，効率的な発芽，より自然な形態の子実体形成は冷蔵庫では難しい可能性が示唆された。子実体の発芽と生育を冷蔵庫で行う際には，一時的にでもある程度の光を取り入れる工夫や配慮が求められる。



図5 ノコクズ種菌とノコクズ培地を用い，菌かきと注水後に発生した子実体（発芽～採取：冷蔵庫：5～10℃；上段：生育中の子実体，下段：採取後の子実体）

注：表4と同じ

#### 4. まとめ

以上の結果を活用し、市民対象の体験型イベントとして各家庭でエノキタケの人工栽培を行うには、栽培培地にノコクズ培地、種菌にノコクズ種菌を用い、培養後に菌かきと注水を行って冷蔵庫内で子実体の発芽と生育を行うことになる。ただし、発芽と生育を促進するために時折、培地が入った培養ビンを冷蔵庫の外に出して光を当てる配慮が求められる。培養開始から45日前後、冷蔵庫に投入後30日程度でエノキタケの子実体が収穫できる。なお、培養時には直射日光が当たる場所を避け、25°C程度以下（可能な限り18°C程度以上）の室温環境下に培地を置くのが望ましい。

家庭用冷蔵庫を用いるエノキタケ栽培のマニュアルとしては、ウッディエイジ（一般社団法人北海道林産技術普及協会発行）の679号（2010年3月）に『気軽に読める「微生物の小話講座」（その7冷蔵庫でキノコ栽培）』として掲載されている<sup>10</sup>。体験型イベントでは、2009年1月開催の地域開放特別事業（対象：小中学生）に『冷蔵庫でエノキタケ栽培』、および2009年7月開催の公開講座（対象：一般市民）に『くらしの中の微生物を学ぶ～キノコ栽培から罪な微生物まで～』にて本研究の成果を活用した。公開講座参加者から頂いた「自宅で発生したエノキタケの写真」を図6に示す。手前中央の培養ビンの子実体は、著者らが参加者に見本として配布した培養済の培地（いわゆる菌床）からの2次発生でその発生量が少ない。それ以外は1次発生（初回の発生）の子実体であり、正常なものが多数生育している。時折、培養ビンを冷蔵庫の外に出して光を当てたものと思慮される。



図6 2009年7月の公開講座参加者からの礼状に添えられたエノキタケの様子（手前中央：2次発生）

#### 参考文献

- 1) 例えば、富樫巖，小林渡，杉本敬祐，沼田ゆかり：小中学生を対象とした“キノコ”と“カビ”の培養・栽培体験講座の試み。旭川工業高等専門学校研究報文，44：107-114（2007）
- 2) 寺下隆夫：きのこの生化学と利用（第2章きのこ菌の基礎的培養法 2.3きのこ菌の生長と培養），応用技術出版：32-41（1991）
- 3) 北海道きのこ農業協同組合：菌床きのこのつくり方（I章菌床きのこのつくり方 3.エノキタケ）：44-52（1989）
- 4) 大森清寿，小出博志：キノコ栽培全科（2章キノコ栽培の実際 エノキタケ），農山漁村文化協会：85-94（2001）
- 5) 富樫巖，幸田有以：純水と-20°Cを用いたエノキタケ菌株の凍結保存の試み，New Food Industry，55(1)：6-12（2013）
- 6) 富樫巖，石川榛季，小林育美：エノキタケ菌糸体の純水保存の試み，New Food Industry，58(9)：7-12（2016）
- 7) 山中勝次，柿本陽一：きのこ生育診断ヒラタケエノキタケ篇（2章エノキタケ生育診断），農村文化社：68-109（1991）
- 8) 豊増哲郎：キノコの科学（3章キノコの栽培とバイオテクノロジー 3.2キノコの生理学），菅原龍幸編，朝倉書店：23-28

(1997)

- 9) 衣川堅二郎：菌糸体の発育ときのこの発生・きのこ培養の基礎知識連載XIX，特産情報‘88年5月号：68-69（1988）
- 10) 富樫 巖：気軽に読める「微生物の小話講座」（その7冷蔵庫でキノコ栽培），ウッディエイジ，No.679：1-4（2010）



## 【研究紹介】 黒色真菌と灰色カビに対するハッカ油・ *l*-メントール・メントンの抗カビ活性の評価

富樫 巖\*  
火ノ川知詠\*\*

### Evaluation of Inhibitory Effects of a Mint oil, *l*-Menthol and Menthone on the Growth of *Cladosporium* spp., *Aureobasidium* spp. and *Botrytis* spp.

Iwao TOGASHI  
Chie HINOKAWA

#### Abstract

We tested the inhibitory effects of a mint oil and its two volatile components on the growth of eight strains of fungi (i.e. *Cladosporium* spp., *Aureobasidium* spp. and *Botrytis* spp.) using direct contact experiment based on an agar medium dilution method. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the oil to four NBRC's strains (*C. cladosporioides* NBRC 6348, *A. pullulans* NBRC 6353, *B. cinereana* NBRC 9760 and NBRC 30915) was 0.2-0.3% (v/v) at 25°C. MIC of *l*-menthol was 0.3-0.5% (w/v) to the eight strains including *Cladosporium* sp. ANCT-11002, *Aureobasidium* sp. ANCT-11003, *Botrytis* spp. ANCT-06001 and ANCT-06022. On the other hand, menthone to 0.5%(v/v) concentration inhibited almost none of the growth of the all strains.

#### 1. はじめに

我々の生活空間にはヒトの活動環境になじんだ微生物が分布・生息している。具体的には浴室などの住宅の水回りにカビ汚染を起こすクロカビ (*Cladosporium* spp.) や黒色酵母 (*Aureobasidium* spp.)<sup>1,2)</sup>、ハウス栽培のイチゴやトマトなどの野菜および花きに灰色かび病を引き起こす灰色カビ (*Botrytis* spp.)<sup>3)</sup>である。微生物によるトラブルを始めとする微生物災害の対策としては、一般的に次亜塩素酸ナトリウム、ベンツイミダゾール系などの無機系・有機系化合物からなる各種防カビ剤 (農業用殺菌剤・殺カビ剤などの各種薬剤) が利用されている<sup>4)</sup>が、消費者としてはそうした薬剤よりも安全性イメージの高い天然物利用を好む傾向がある<sup>5)</sup>とされる。

そこで著者らは抗菌性があるとされる精油に注目し、クロカビや黒色酵母などの黒色真菌<sup>5,6)</sup>の防除を目的にローズ油とラベンダー油の抗カビ活性評価を行ってきた<sup>7-10)</sup>。引き続き本研究では、ハッカ油とその主成分のモノテルペノイドを供試して黒色真菌と灰色カビに対する抗カビ活性評価を試みた。北海道オホー

\* 旭川高専名誉教授

(2021年9月23日受理)

\*\* 物質化学工学科卒業生

ツク圏には日本ハッカの産地があり、新たな利用分野の開拓ができれば地域資源の利用拡大および地域産業の振興に繋がることが期待される。

## 2. 実験方法

### 2.1 供試材料

#### 2.1.1 供試菌株と接種源

供試菌株には、クロカビとして*Cladosporium cladosporioides* (Fresenius) de Vries のNBRC 6348と旭川高専保存株の*Cladosporium* sp. ANCT-11002, 黒色酵母として*Aureobasidium pullulans* (de Bary)Arnaud のNBRC 6353と*Aureobasidium* sp. ANCT-11003, 灰色カビとして*Botrytis cinerea* Pres.のNBRC 9760とNBRC 30915および*Botrytis* spp.のANCT-06001とANCT-06022の合計8菌株を用いた。これらの供試菌株は、日水製薬製ポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地で継代培養保存されていたものである。各試験に用いる場合にはPDA平板培地 (直径90 mm, 以下同様) を用い、25℃にて1週間 (NBRC 9760, NBRC 30915, ANCT-06001, ANCT-06022), 2週間 (NBRC 6353, ANCT-11003) または3週間 (NBRC 6348, ANCT-11002) の前培養を行った。そして、成長した各コロニーからコルクボーラーを用いて寒天培地ごと打ち抜いた直径5 mm の菌体ディスクを接種源として用いた。

#### 2.1.2 供試材料

ハッカ精油にはキシダ化学製のハッカ油 (Oil of peppermint, 液体), ハッカ精油の主要成分のモノテルペノイドとして和光純薬工業製の $\ell$ -メントール (特級, 個体) とメントン (含有率 97%, 液体), エタノールにはキシダ化学製のエタノール (特級, 99.5%) を供試した。

### 2.3 抗カビ活性の評価

高圧蒸気滅菌 (121℃, 15分) して70℃以下に放冷したPDA培地に0.05, 0.1, 0.2, 0.3および0.5% (v/v) になるようにハッカ油を添加した各平板培地を調製した。同様に, 0.1, 0.3および0.5% (v/v) になるようにメントンを添加した90 mmの各平板培地, コントロール-1としてPDA培地のみの平板培地をそれぞれ調製した。

また, $\ell$ -メントール10 gを上述のエタノール10 mlに溶解した $\ell$ -メントールのエタノール溶液を作成した。高圧蒸気滅菌後に70℃以下に放冷した各100 mlのPDA培地に, 同エタノール溶液とエタノールを0.1 mlと0.4 ml, 0.3 mlと0.2 mlおよび0.5 mlと0 mlをそれぞれ添加することで $\ell$ -メントール濃度が0.1, 0.3および0.5% (w/v) の各平板培地を調製した。コントロール-2として100 mlのPDA培地にエタノールを0.5 ml添加した平板培地を調製した。

以上の各平板培地の中央に2.1.1の各供試菌株の菌体ディスクを1個接種し, パラフィルムでシールした後に25℃・10日間の菌体成長を観察した (反復数3)。そして, 目視により10日間培養後の平板培地表面のコロニー占有率 (%) を評価した。評価結果の表示としては, 平板培地表面コロニー占有率75%以上を「++++」, 同50%以上75%未満を「+++」, 同25%以上50%未満を「++」, 同5%以上25%未満を「+」, 同5%未満を「±」および成長なしを「0」とした。成長なしについては実体顕微鏡観察による確認も行った。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 ハッカ油の抗カビ活性

JIS Z 2911 かび抵抗性試験方法の第4群に指定される *C. cladosporioides* NBRC 6348 と *A. pullulans* NBRC 6353, そして *B. cinenerea* NBRC 9760 と NBRC 30915 を供試し, ハッカ油を 0.05~0.5% (v/v) 添加した各 PDA 平板培地とコントロール-1 の PDA 平板培地で評価した抗カビ活性を表1に示す。ハッカ油の濃度上昇と共に平板培地表面のコロニー占有率 (25°C・10日間培養後) が減少した。0.3~0.5% (v/v) の濃度で供試菌株の菌体成長が全く観察されなかったことから, 供試したハッカ油の4株に対する最小発育 (成育) 阻止濃度 MIC (Minimum Inhibitory Concentration) は 0.3% (v/v) 付近となる。また, 菌株ごとに判断した場合には, 灰色カビ NBRC 9760 のみハッカ油の MIC が 0.2% (v/v) 付近となる。

表1. NBRC株の黒色真菌と灰色カビに対するハッカ油の抗カビ活性 (25°C・10日間培養) ※

濃度	菌株番号			
	NBRC 6348	NBRC 6353	NBRC 9760	NBRC 30915
cont.-1	++	++++	++++	++++
0.05%	++	+++	++++	++++
0.1%	+	+++	+	+++
0.2%	±	+	0	+
0.3%	0	0	0	0
0.5%	0	0	0	0

※: 抗カビ活性評価指標, +++++: 平板培地表面のコロニー占有率 75%以上, ++++: 同 50%以上 75%未満, ++: 同 25%以上 50%未満, +: 同 5%以上 25%未満, ±: 同 5%未満, 0: 成長なし

注) 菌株番号 NBRC 6348: *C. cladosporioides*, NBRC 6353: *A. pullulans*, NBRC 9760 と NBRC 30915: *B. cinenerea*; ハッカ油濃度単位: % (v/v); cont.-1 (コントロール-1) のハッカ油濃度: 0% (v/v); 各繰返し数: 3

#### 3.2 *l*-メントールの抗カビ活性

ハッカ油の抗カビ活性はハッカ油に含まれている成分が影響していると考えられる。ハッカ油のメジャー成分は2種類のモノテルペノイドであることから, その一つである *l*-メントールの防カビ活性を評価した。表1の4株に対する評価結果を表2に示す。ハッカ油の場合と同様に *l*-メントールの濃度上昇と共に平板培地表面のコロニー占有率が減少し, 供試4株に対する MIC は 0.3~0.5% (w/v) と推察できる。なお, 表1のコントロール-1と表2のコントロール-2の平板培地表面のコロニー占有率の各評価結果に差異はなかった。エタノール添加濃度 1% (v/v) の PDA 培地では NBRC 6348 と NBRC 6353 の菌体成長に影響を及ぼさない<sup>9)</sup>ことから, NBRC 9760 と NBRC 30915 に対しても同様と思われる。

表3には旭川高専保存株 (ANCT株) に対する *l*-メントールの防カビ活性を示す。*l*-メントールの濃度上昇と共に平板培地表面のコロニー占有率が減少した。供試4株に対する MIC は 0.3~0.5% (w/v) と推察

できる (ANCT-11002 のみが他の 3 株より MIC が高い)。ANCT 株はいずれも旭川市および隣接する東川町で著者らが採取した菌株である。ANCT-06001 はベンツイミダゾール系薬剤に耐性を持つ灰色カビ (*Botrytis* sp. NBRC 114508 として 2020 年 6 月に一般寄託<sup>11)</sup>) であるが、*l*-メントールに対する感受性に特別な変化はなかった。

表 2. NBRC 株の黒色真菌と灰色カビに対する *l*-メントールの抗カビ活性 (25°C・10 日間培養) ※

濃度	菌株番号			
	NBRC 6348	NBRC 6353	NBRC 9760	NBRC 30915
cont.-2	++	++++	++++	++++
0.1%	+	++	+	++++
0.3%	±	±	0	0
0.5%	0	0	0	0

※: 抗カビ活性評価指標: 表 1 と同じ

注) 菌株番号は表 1 と同じ; *l*-メントール濃度単位: % (w/v); cont.-2

(コントロール-2) は 0.50% (v/v) 濃度のエタノールを含む; 繰返し数: 3

表 3. 旭川高専保存株の黒色真菌と灰色カビに対する

*l*-メントールの抗カビ活性 (25°C・10 日間培養) ※

濃度	菌株番号			
	ANCT-11002	ANCT-11003	ANCT-06001	ANCT-06022
cont.-2	++	++++	++++	++++
0.1%	±	++	+	+
0.3%	±	0	0	0
0.5%	0	0	0	0

※: 抗カビ活性評価指標: 表 1 と同じ

注) 菌株番号 ANCT-11002: *Cladosporium* sp., ANCT-11003: *Aureobasidium* sp.,

ANCT-06001 と ANCT-06022: *Botrytis* spp.; *l*-メントール濃度単位以下は

表 2 と同じ

### 3.3 メントンの抗カビ活性

ハッカ油のもう一つのメジャー成分であるメントンの防カビ活性を同様に評価した。NBRC 株に対する評価結果を表 4 に示す。NBRC 6348 と NBRC 6353 はメントンの濃度上昇と共に平板培地表面のコロニー占有率が減少する傾向を多少示したが、NBRC 9760 と NBRC 30915 では濃度 0.5% (v/v) でもコントロール (cont.-1) と差異が無かった。

表 5 には ANCT 株に対するメントンの防カビ活性の評価結果を示す。ANCT-06001 では濃度 0.5% (v/v) でもコントロール (cont.-1) と差異が無く、それ以外の 3 株ではメントンの濃度上昇と共に平板培地表面のコロニー占有率が減少する傾向を多少示した。以上から、*l*-メントールと異なってメントンの供試菌株に対する防カビ活性は低く、本研究条件で供試菌株に対する MIC は決定できなかった。

表4. NBRC株の黒色真菌と灰色カビに対するメントンの抗カビ活性 (25°C・10日間培養) ※

濃度	菌株番号			
	NBRC 6348	NBRC 6353	NBRC 9760	NBRC 30915
cont.-1	++	++++	++++	++++
0.1%	+	++++	++++	++++
0.3%	+	++++	++++	++++
0.5%	±	+++	++++	++++

※: 抗カビ活性評価指標: 表1と同じ

注) 菌株番号は表1と同じ; メントンの濃度単位は表1と同じ; cont.-1のメントン濃度: 0% (v/v); 繰返し数: 3

表5. ANCT株の黒色真菌と灰色カビに対するメントンの抗カビ活性 (25°C・10日間培養) ※

濃度	菌株番号			
	ANCT-11002	ANCT-11003	ANCT-06001	ANCT-06022
cont.-1	++	++++	++++	++++
0.1%	++	++++	++++	++++
0.3%	+	+++	++++	++++
0.5%	+	+++	++++	++

※: 抗カビ活性評価指標: 表1と同じ

注) 菌株番号は表3と同じ; メントンの濃度単位以下は表4と同じ

#### 4. まとめ

ハッカ油の主成分はモノテルペノイドの *l*-メントールで、それに次ぐものが同じくモノテルペノイドのメントンである (図1)。和種ハッカ (ニホンハッカ, *Mentha arvensis* L. var. *piperascens* Malinvaud) を水蒸気蒸留して得た取卸油であればその65%以上<sup>12,13)</sup>, 洋種ハッカ (ペパーミント, *Mentha x piperita* L.) では40%ほどを *l*-メントールが占め<sup>13)</sup>, メントンが十数%<sup>12)</sup>と続く。取卸油から結晶 (脱脳)・再結晶・脱油・乾燥することで *l*-メントールの結晶を得ている。そして, *l*-メントールの結晶を取り去った油 (脱脳油) がハッカ油となる<sup>12,13)</sup>。和種ハッカのハッカ油では, その35%程度を *l*-メントール, 25%程度をメントンが占め, 以下メンチルアセテートとイソメントンが各7~9%含まれる<sup>12)</sup>。

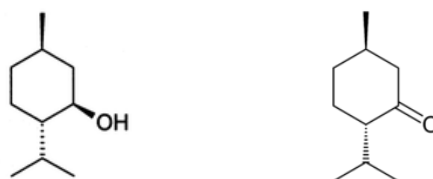


図1. *l*-メントール (左) とメントン (右) の構造

表2からNBRC株に対する $\ell$ -メントールのMICを0.3~0.5% (w/v)と見積り、抗カビ活性が $\ell$ -メントールのみに支配されると仮定すると、35%程度を $\ell$ -メントールが占めるハッカ油のNBRC株に対するMICは単純計算で0.9% (v/v)~1.5% (v/v)の範囲と想定される。しかし、表1のハッカ油のMICは0.2~0.3% (v/v)となった。表4からメントンの抗カビ活性が弱いものの、 $\ell$ -メントールとメントンの相乗効果がハッカ油の抗カビ活性で生じている可能性が示唆される。上述の様にハッカ油にはメンチルアセテート、イソメントンなど他のモノテルペノイド成分も含まれている<sup>12,13)</sup>ことから、 $\ell$ -メントールと他の成分による抗カビ活性の相乗効果も考えられる。こうした点については今後の検討により明らかにしたい。

一方、著者らとしては本研究によりハッカ油と $\ell$ -メントールの黒色真菌や灰色カビに対するMICがほぼ同程度(0.2~0.3% (v/v)と0.3~0.5% (w/v))となった点に注目したい。アロマテラピーなどの普及などにより、近年の市場では主要製品であった $\ell$ -メントール(固体、結晶)よりも副産物のハッカ油(液体、オイル)の需要が高まっている<sup>14)</sup>とされる。通販サイトの $\ell$ -メントール(500g入り)価格は6,000円を切っている(約11円/グラム, 2021.9.19調べ)。 $\ell$ -メントールは水に難溶で41~44°Cが昇華温度とされるが、室温でも昇華する<sup>15)</sup>ことから浴室に置くことで黒色真菌の発現を、農業用ハウスに置くことで灰色カビの発現をそれぞれ抑える可能性もある。具体的な利用方法の確立については今後の課題としたい。

## 参 考 文 献

- 1) 倉田浩, 倉澤喜久雄: 住宅環境とカビ, 化学工業, **48**(11): 874-881(1997)
- 2) 菅原文子: 住宅環境におけるカビの生態 1) 住居, 防菌防黴, **25**(12): 719-725(1997)
- 3) 手塚信夫, 石井正義, 渡辺康正: 施設栽培におけるトマト灰色かび病の発生に及ぼす空気湿度の影響, 野菜試験場報告, No.11: 105-111(1983)
- 4) 氏家昌行, 長谷川誓, 岡本明, 諸角聖, 一言広: 市販の塩素系防カビ剤, アルコール系殺菌剤およびカビ防止剤の真菌防除効果. 防菌防黴, **17**(10): 473-481(1989)
- 5) 濱田信夫: 浴室の微生物汚染の現状と対策. 防菌防黴, **34**(2): 81-88(2006)
- 6) 高鳥浩介, 李憲俊: 暮らしと微生物 13 浴室. 防菌防黴, **40**(3): 161-171(2012)
- 7) 富樫巖, 佐藤明日香: 黒色真菌 (*Cladosporium* spp., *Aureobasidium* spp.) に対するローズ油の生育阻害効果. 日本菌学会会報, **54**(1): 32-37(2013)
- 8) 富樫巖, 鈴木夕湖, 高橋いくり, 高橋桃子, 高田恵多, 林志門: 黒色真菌 (*Cladosporium* spp., *Aureobasidium* spp.) に対するラベンダー油の抗カビ活性評価—水分活性とエタノールの組み合わせ効果—. 日本菌学会会報, **59**(2): 53-59(2018)
- 9) 富樫巖, 鈴木夕湖, 林志門: *Cladosporium* spp.と*Aureobasidium* spp.に対するラベンダー油の抗カビ活性の評価. 旭川工業高等専門学校研究報文, No.57: 9-15(2020)
- 10) 富樫巖, 早川恭世, 鈴木夕湖: *Cladosporium* spp.と*Aureobasidium* spp.に対するラベンダー蒸留水の抗カビ活性の評価. 旭川工業高等専門学校研究報文, No.57: 16-23(2020)
- 11) 富樫巖, 寄谷明香, 菅野良平, 山本 将平, 後藤 静香, 藤原彩: 農業用栽培施設における空中浮遊糸状菌類の調査 ~旭川地域の農業耐性灰色かび病菌に注目して~. 旭川工業高等専門学校研究報文, No.58: 17-28(2021)
- 12) 井上英夫: 北見ブックレットNo.7 北見の薄荷入門. NPO法人オホーツク文化協会, 73(2010)

- 13) 和泉光則：北海道北見地方のハッカ（薄荷）．化学と教育，64(4)：188-191(2016)
- 14) 重松浩子：一年中使える和のハッカ「薄荷」の正しい選び方，使い方，セラピスト2021年2月号，43-47(2021)
- 15) 日医工お客様サポートセンター：矯味，矯臭剤日本薬局方 $\mu$ メントール2012年6月改定（第6版）．日医工，1(2012)

## 【研究紹介】家庭用冷凍庫（ $-18^{\circ}\text{C}$ 前後）を用いたシイタケ菌株の凍結保存の試み

富樫 巖\*

内海早智\*\*

### Attempt of the Cryopreservation of Shiitake (*Lentinula edodes*) Mycelia at a Temperature Zone around $-18^{\circ}\text{C}$ using a Domestic Freezer

Iwao TOGASHI

Sachi UTSUMI

#### Abstract

The preservation of four shiitake (*Lentinula edodes*) mushroom strains using mycelium-agar disks with several kinds of cryoprotectants (i.e. 10-40% (w/w) glucose aqueous solutions, 10-40% (w/w) sucrose ones, 1-4% (w/w) sodium chloride ones and pure water) at a temperature zone around  $-18^{\circ}\text{C}$  of a domestic freezer was investigated. The survival rate of the four strains (ANCT-05072, -05152, -09005, -12001) was 100% only in 40% (w/w) glucose aqueous solutions for 35 days. In 40% (w/w) sucrose ones, the rate of the three strains except ANCT-05072 was 100% for 100 days or more than 100 days. The rate of ANCT-09005 in the sucrose one was 100% until 180 days. Unlike saccharide aqueous solutions, a negative correlation in the survival rate and in the concentration of sodium chloride was observed. Except 1-2% (w/w) of sodium chloride aqueous solutions of ANCT-09005, the survival rate 100% maintenance periods of all others were 7 days or less than 7 days. Similarly, the rate 100% maintenance periods of the all strains using pure water were 7 days or less than 7 days. The survival rate in the cryopreservation using a domestic freezer is affected by a strain, but the concentrated saccharide sugar solutions were suitable for cryoprotectants of shiitake strains.

---

\* 旭川高専名誉教授

\*\* 物質化学工学科卒業生



## 1. はじめに

菌体ディスク法を用いる食用菌・菌株の凍結保存においては菌種・菌株・凍結保護液の組合せによる差異があるものの、 $-20^{\circ}\text{C}$ では超低温の $-85^{\circ}\text{C}$ や液体窒素の $-196^{\circ}\text{C}$ と比べて生存率が低く、特にシイタケ (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) とヒラタケ (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) は死滅し易い<sup>1,2)</sup>。一方、著者らは食用菌・菌株の凍結保存の低コスト化を狙い、 $-20^{\circ}\text{C}$  (定温制御の実験用冷凍庫) の利用可能性を検討<sup>3)</sup>してきた。その結果、シイタケとヒラタケの菌株においてグルコース、スクロース、マルトースなどの 40% (w/w) 水溶液を凍結保護液に用いると 10% (w/w) グリセリン水溶液よりも生存率の改善が見込めること、凍結前に菌体ディスクを凍結保護液 (上述濃度のグルコース水溶液など) と共に  $25^{\circ}\text{C}$  で 24 時間放置すると $-20^{\circ}\text{C}$ 凍結での生存率が改善することを明らかにした<sup>4)</sup>。

本研究では更なるコスト低減を図るため、シイタケ菌株を供試して霜取り機能によって庫内温度に変動が生じる一般的な家庭用冷凍冷蔵庫の冷凍室 (約 $-18^{\circ}\text{C}$ ) での凍結保存の可能性を検討した。凍結保護液にはグルコースとスクロースの 10~40% (w/w) 水溶液および塩化ナトリウムの 1~4% (w/w) 水溶液を供試した。そして、前処理を行うことなく約半年間凍結した場合の生存率変化を経時的に観察した。

## 2. 実験方法

### 2.1 供試材料

#### 2.1.1 菌株と菌体ディスク

シイタケとしては旭川高専保存株の ANCT-05072, ANCT-05152, ANCT-09005, ANCT-12001 の 4 菌株を用いた。いずれも日水製薬製のポテトデキストロース寒天 (以下, PDA) にて約  $7^{\circ}\text{C}$  で継代培養保存していたものである。凍結保存試験に用いる直径 5 mm の菌体ディスクについては、直径 90 mm の PDA 平板培地に各菌株を接種して  $25^{\circ}\text{C}$  で 14 日間前培養し、コロニーを培地ごとコルクボーラーで打ち抜くことで作成した。

#### 2.1.2 凍結保護液

凍結保護液にはいずれも和光純薬工業製・特級の D (+) -グルコース、スクロースおよび塩化ナトリウムで調製した、グルコースとスクロースの各 10, 20, 40% (w/w) 水溶液および塩化ナトリウムの 1, 2, 4% (w/w) 水溶液を用いた。そして、純水のみを加えた合計 10 種類の凍結保護液を高圧蒸気滅菌処理 ( $121^{\circ}\text{C}$ ・15 分) 後に各試験に供試した。

### 2.2 凍結保存試験

#### 2.2.1 凍結方法および解凍方法

1.5 ml のエペンドルフ製マイクロチューブに 2.1.1 に示した菌体ディスク 5 個を入れ、各凍結保護液約 1 ml を分注して菌体ディスク全体を覆った。前処理なしで日立製作所製・家庭用冷凍冷蔵庫 (401 リットルタイプ) の冷凍室へ最大 180 日間投入した (24 時間平均温度 $-18.6^{\circ}\text{C}$ , 変温幅 $-20.1\sim-12.3^{\circ}\text{C}$ , アズワン製簡易データロガー DL171 で測定)。経時的にサンプリングしたマイクロチューブを  $30^{\circ}\text{C}$  のインキュベ

ーターに20分間投入して解凍した。

### 2.2.2 解凍後の生存確認方法

直径90mmのPDA平板培地1枚に2.2.1に示した解凍後の菌体ディスク5枚を接種して25°Cで10日間培養し、経時的な菌糸再生状況を実体顕微鏡観察した。菌体ディスクから菌糸が再生してPDA平板培地に活着した時点で生存と判断し、1組5個の菌体ディスクの活着で生存率100%とした。

### 2.3 凍結保護液のpHと水分活性の測定

各凍結保護液のpH(25°C)の測定はニッコー・ハンセン社のpH計を用い、水分活性 $A_w$ (25°C)の測定はアイネクス社のポータブル水分活性計Pawkitを用いて行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 グルコース水溶液を凍結保護液としたシイタケ菌株の生存状況

10~40% (w/w) グルコース水溶液を凍結保護液に用いてシイタケ4菌株の凍結保存を120日間試み、菌体ディスクの菌糸再生挙動(生存率変化)を観察した。25°C・10日間培養での菌糸再生例として、20% (w/w) 水溶液とANCT-05072の組合せを図1, 40% (w/w) 水溶液とANCT-05152の組合せを図2, 10% (w/w) 水溶液とANCT-009005の組合せを図3, 40% (w/w) 水溶液とANCT-12001の組合せを図4にそれぞれ示す。グルコース濃度と菌株の組合せによって生存率100%維持期間の長さなどの結果は異なるが、全体的には凍結期間が延びることで供試菌株の生存率100%維持が難しくなり、菌体ディスクからの菌糸再生が遅くなる傾向がみられた。

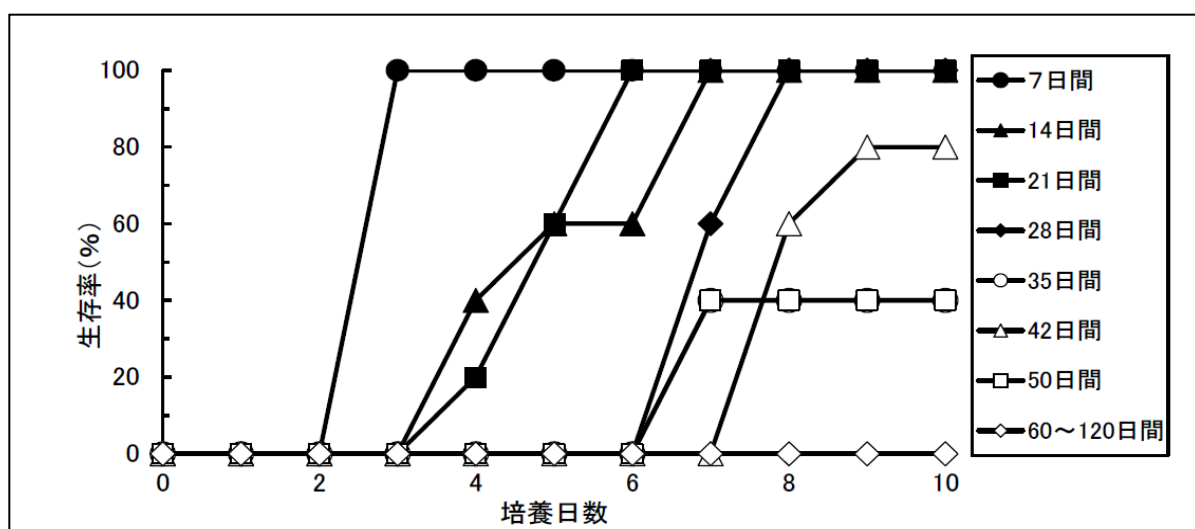


図1. 20% (w/w) グルコース水溶液を用いた凍結後のANCT-05072の菌糸再生挙動(25°C)

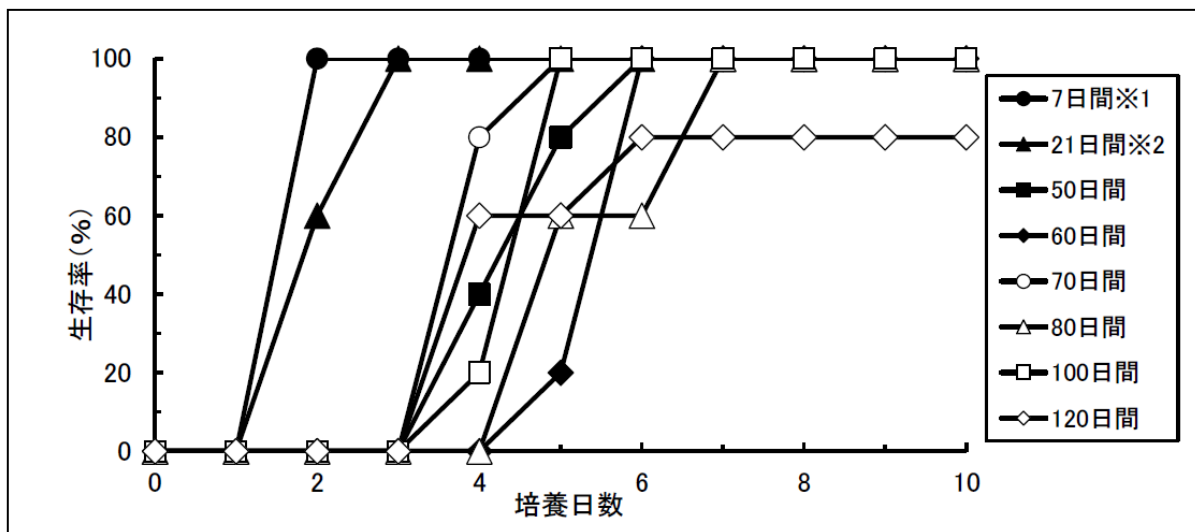


図 2. 40% (w/w) グルコース水溶液を用いた凍結後の ANCT-05152 の菌糸再生挙動 (25°C)  
 注) ※1 : 14 日間と 28 日間が同じ挙動, ※2 : 35 日間と 42 日間が同じ挙動

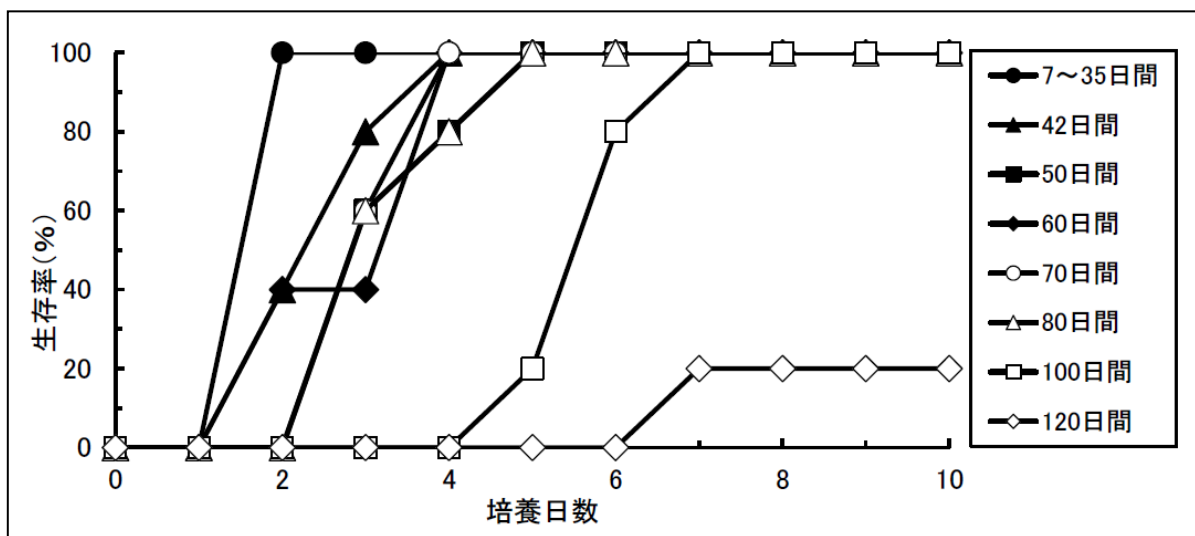


図 3. 10% (w/w) グルコース水溶液を用いた凍結後の ANCT-09005 の菌糸再生挙動 (25°C)

図 5~7 には 4 菌株の凍結期間と生存率 100%に到達した培養日数の関係をグルコース濃度ごとに示す。120 日間までの凍結後で生存率 100%に達しない試験区があり、各図中にグラフが示されていない試験区の生存率は 0~80%となる。全体的な傾向として、ばらつきはあるもののグルコース濃度の増大と共に供試菌株の生存率 100%維持期間が延び、生存率 100%到達までに要する 25°Cの培養日数が短縮した。

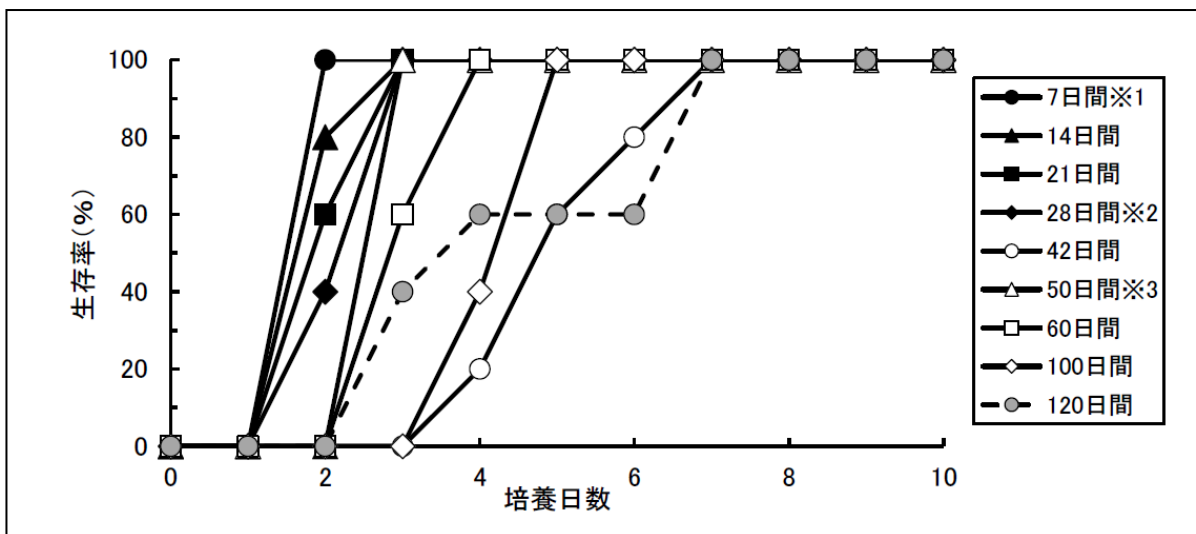


図 4. 40% (w/w) グルコース水溶液を用いた凍結後の ANCT-12001 の菌糸再生 (25°C)

注) ※1 : 35 日間が同じ挙動, ※2 : 80 日間が同じ挙動, ※3 : 70 日間が同じ挙動

図 7 の 40% (w/w) グルコース水溶液に注目すると, ANCT-05072 を除く 3 菌株は凍結 100 日間まで生存率 100% を維持し (ANCT-12001 は 120 日間 100% 維持), 凍結 35 日間まで 4 菌株が生存率 100% を維持した。また, 凍結期間の延長に伴って生存率 100% 到達までに要した 25°C の培養日数が増大したことが分かる。凍結 35 日間までは 2 日間で生存率 100% に到達する菌株が複数存在したが, 凍結 100 日間では生存率 100% 到達に 5~6 日間を要した。

いずれの供試菌株も継代培養後のコロニーから得た菌体ディスクでは培養開始 2 日間以内で活着に至る (生存率が 100% に到達)。凍結した菌体ディスクからの菌糸再生が遅れるのは, 凍結ストレスからの回復に時間を要するためと考察する。以上から家庭用冷凍庫でのシイタケ菌株の凍結においても, より高濃度の 40% (w/w) グルコース水溶液の凍結保存性能が優れると判断した。

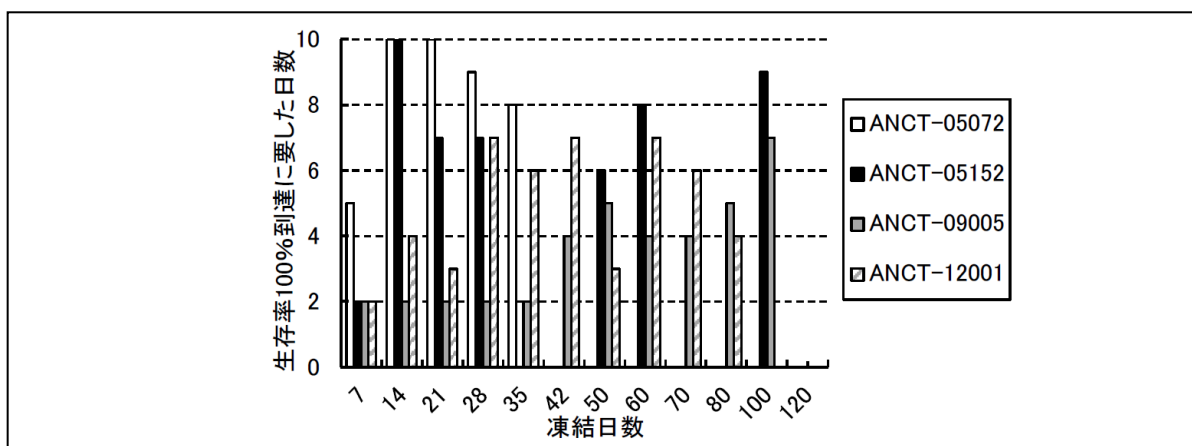


図 5. 10% (w/w) グルコース水溶液での 4 菌株の凍結期間と生存率 100% に到達した培養日数 (25°C)

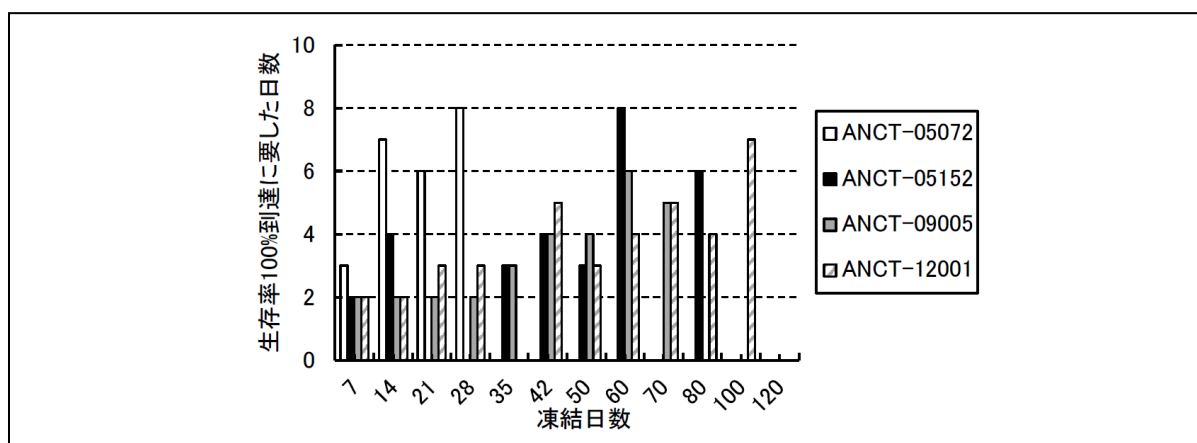


図 6. 20% (w/w) グルコース水溶液での 4 菌株の凍結期間と生存率 100%に到達した培養日数 (25°C)

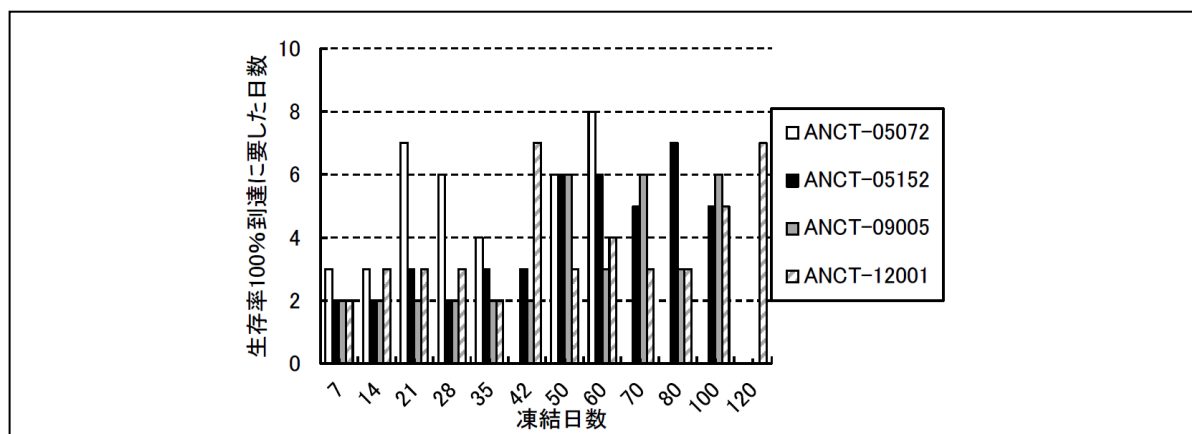


図 7. 40% (w/w) グルコース水溶液での 4 菌株の凍結期間と生存率 100%に到達した培養日数 (25°C)

### 3.2 スクロース水溶液を凍結保護液としたシイタケ菌株の生存状況

10~40% (w/w) スクロース水溶液を凍結保護液に用いてシイタケ 4 菌株の凍結保存を 180 日間試み、菌体ディスクの菌糸再生挙動を観察した。25°C・10 日間培養での菌糸再生例として、ANCT-12001 との組合せを図 8~10 にそれぞれ示す。グルコース水溶液と同様に凍結期間が延びることで供試菌株の生存率 100%維持が難しくなり、菌体ディスクからの菌糸再生が遅くなる傾向がみられた。加えてスクロース濃度の増大と共に供試菌株の生存率 100%維持期間が延び、生存率 100%到達までに要する 25°Cの培養日数が短縮した。

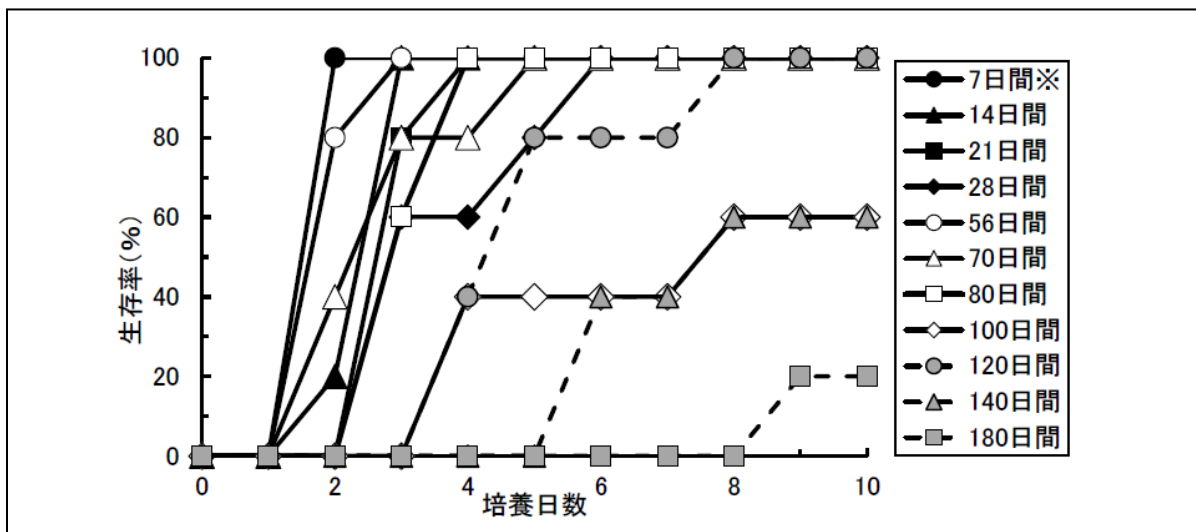


図8. 10% (w/w) スクロース水溶液を用いた凍結後の ANCT-12001 の菌糸再生挙動 (25°C)  
 注) ※ : 35日間, 42日間, 49日間および63日間が同じ挙動

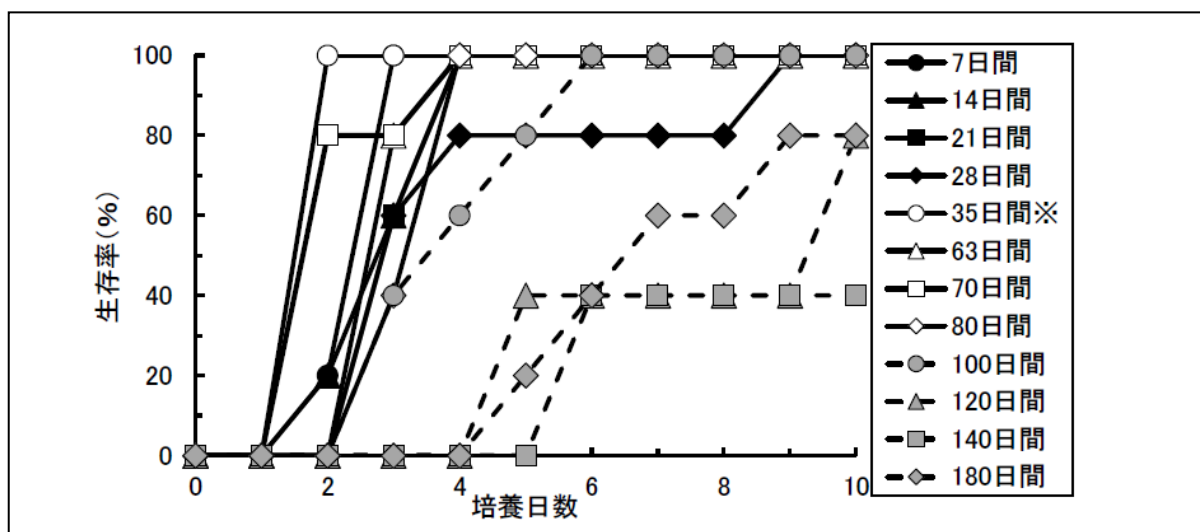


図9. 20% (w/w) スクロース水溶液を用いた凍結後の ANCT-12001 の菌糸再生挙動 (25°C)  
 注) ※ : 42日間, 49日間および56日間が同じ挙動

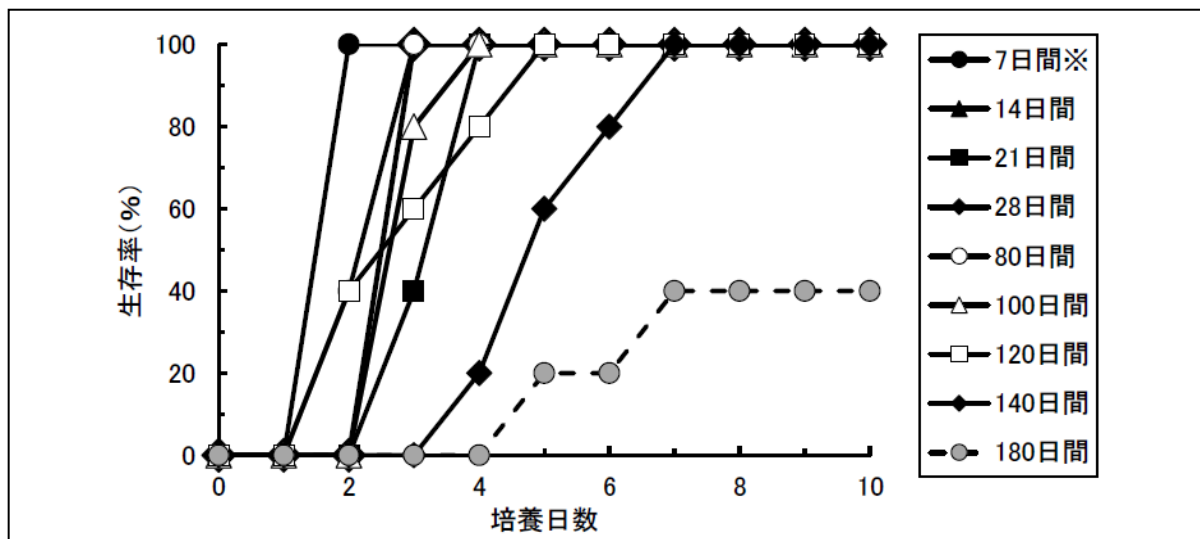


図 10. 40% (w/w) スクロース水溶液を用いた凍結後の ANCT-12001 の菌糸再生挙動 (25°C)  
 注) ※ : 35 日間, 42 日間, 49 日間, 56 日間, 63 日間および 70 日間が同じ挙動

図 11~13 には 4 菌株の凍結期間と生存率 100%に到達した培養日数の関係をスクロース濃度ごとに示す。180 日間までの凍結後において生存率 100%に達しない試験区があり、各図中にグラフが示されていない試験区の生存率は 0~80%となる。ANCT-05072 ではスクロース濃度に関わらず、凍結 7 日間でも生存率 100%未満であった (図 11~13 に ANCT-05072 のグラフなし)。残り 3 菌株では水溶液のスクロース濃度の増大と共に生存率 100%維持期間が延びた。また、生存率 100%到達に要する培養日数がグルコース水溶液と比較して短い傾向がみられたことから、ANCT-05072 の挙動を除けばグルコース水溶液よりもスクロース水溶液の凍結保存性能が優れることが示唆された。

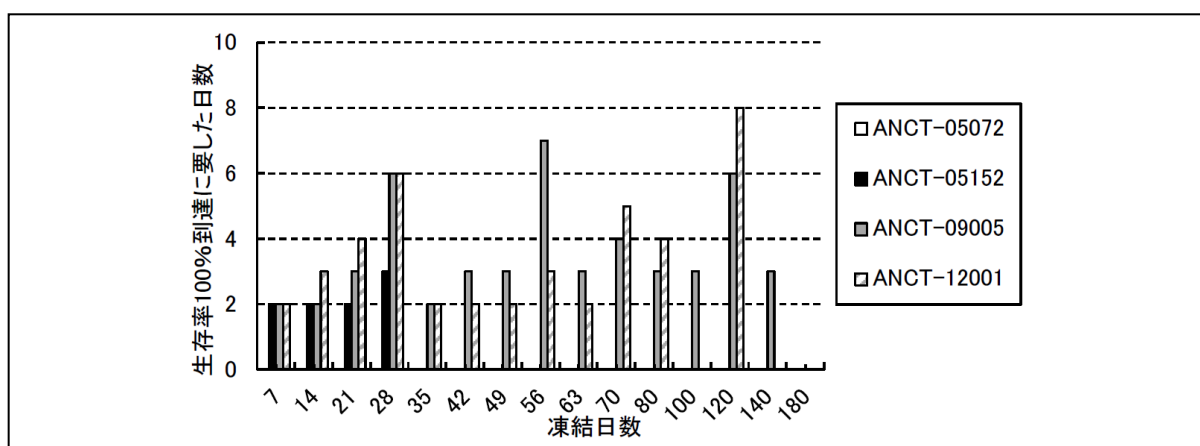


図 11. 10% (w/w) スクロース水溶液での 4 菌株の凍結期間と生存率 100%に到達した培養日数 (25°C)

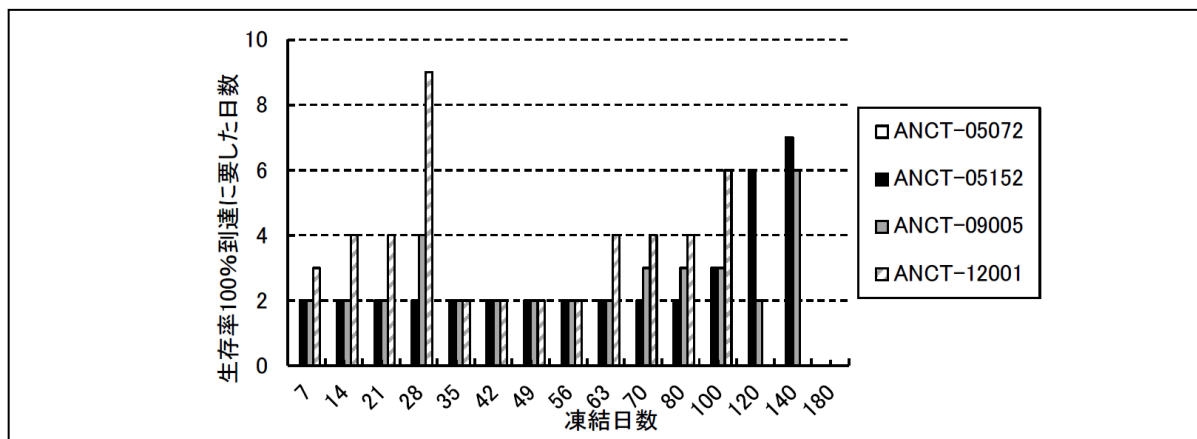


図 12. 20% (w/w) スクロース水溶液中での 4 菌株の凍結期間と生存率 100%に到達した培養日数 (25°C)

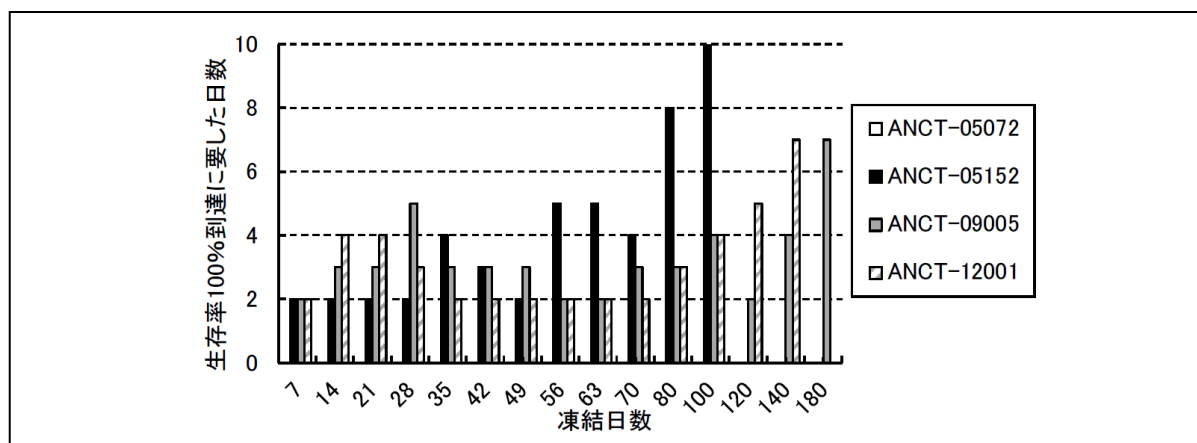


図 13. 40% (w/w) スクロース水溶液中での 4 菌株の凍結期間と生存率 100%に到達した培養日数 (25°C)

### 3.3 塩化ナトリウム水溶液および純水を凍結保護液としたシイタケ菌株の生存状況

1~4% (w/w) 塩化ナトリウム水溶液を用いてシイタケ 4 菌株の凍結保存を最大 60 日間試み、菌体ディスクの菌糸再生挙動を観察した。凍結期間と生存率変化を表 1 に示す。生存率 100%維持期間などの挙動が菌株によって異なるが、全体的には塩化ナトリウムの濃度が上昇すると生存率 100%維持期間の短縮や生存率が低下する傾向が確認された。加えてグルコースとスクロースの両糖類水溶液よりも生存率 100%維持期間が短く、ANCT-09005 の 1~4% (w/w) を除くと 7 日間以内であった。また、両糖類水溶液の場合とは逆に塩化ナトリウムの濃度上昇と共に生存率や生存期間が短くなる傾向がみられた。

図 14~16 には 4 菌株の凍結期間と生存率 100%に到達した培養日数の関係を塩化ナトリウムの濃度ごとに示す。上述と同様に、凍結後に生存率 100%に達しない試験区についてはグラフを示していない (表 1 参照)。両糖類水溶液では培養開始後 2 日間で生存率 100%に到達する試験区が多くみられたが、塩化ナトリウム水溶液では同 2 日間で生存率 100%に到達する試験区が少なかった。以上から、塩化ナトリウムの凍結保護性能がグルコースやスクロースよりも劣ることが明らかになった。



表1. NaCl水溶液を用いた凍結期間と4菌株の生存率 (25°C)

供試菌株	NaCl水溶液 濃度 (% (w/w))	家庭用冷凍庫での生存率 (%) <sup>a)</sup>							
		凍結期間 (日)							
		3	5	7	14	21	28	42	60
ANCT-05072	1	100	100	100	20	0	0		
	2	100	100	100	60	0	0		
	4	100	100	100	0	0	0		
ANCT-05152	1	100	100	100	80	60	20		
	2	100	100	100	60	0	0		
	4	100	100	60	20	0	0		
ANCT-09005	1	100	100	100	100	100	100	100	80
	2	100	100	100	100	40	40	40	80
	4	100	100	100	80	100	40	0	0
ANCT-12001	1	100	100	100	40	0			
	2	100	100	80	20	0			
	4	60	40	20	0	0			

a) : 平板培地へ接種した1組5個の菌体ディスクの全てに菌糸活着が生じると生存率=100%

注) 生存率の記載がないものは未測定

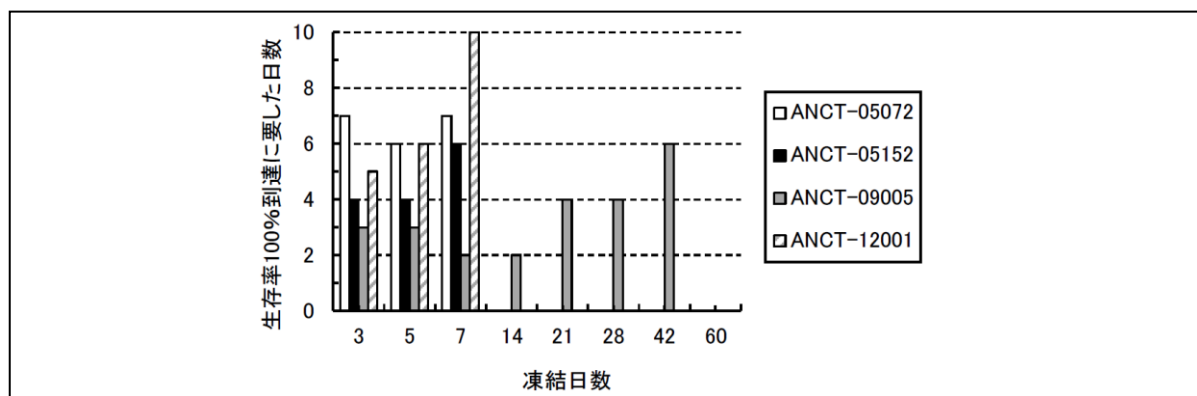


図14. 1% (w/w) NaCl水溶液での4菌株の凍結期間と生存率100%に到達した培養日数 (25°C)

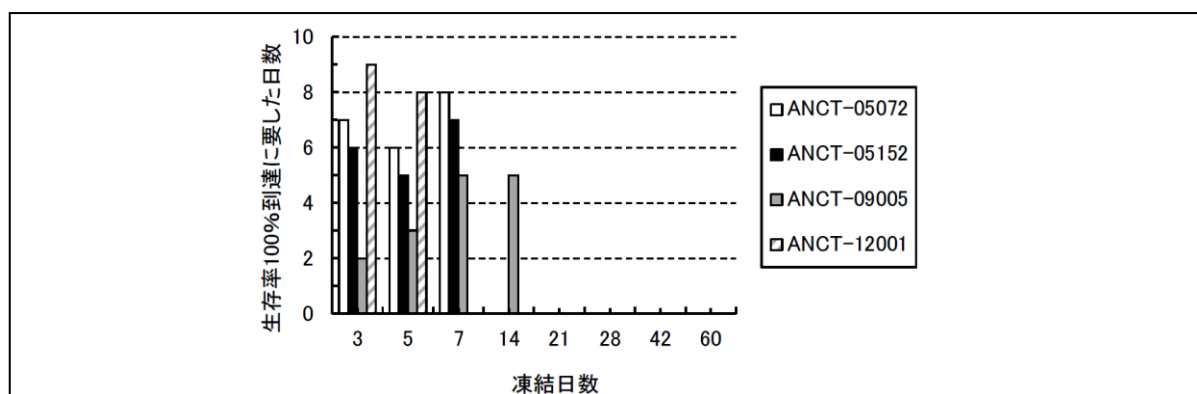


図15. 2% (w/w) NaCl水溶液での4菌株の凍結期間と生存率100%に到達した培養日数 (25°C)

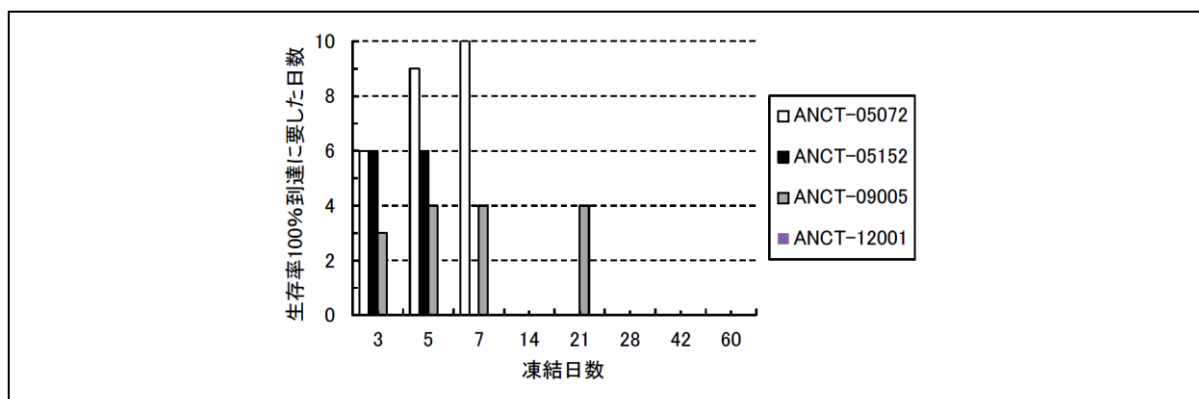


図 16. 4% (w/w) NaCl 水溶液での 4 菌株の凍結期間と生存率 100%に到達した培養日数 (25°C)

次に、純水を用いてシイタケ 4 菌株の凍結保存を試みて菌体ディスクの菌糸再生挙動を観察した。凍結期間と生存率変化を表 2 に示す。ANCT-05072 の生存率 100%維持期間は 7 日間未満、その他の 3 菌株の生存率 100%維持期間は 7 日間と短く、表 1 の塩化ナトリウム水溶液と同程度またはそれ以下の凍結保護性能であると判断できる。

表 2. 純水を用いた凍結期間と 4 菌株の生存率 (25°C)

供試菌株	家庭用冷凍庫での生存率 (%) <sup>a)</sup>			
	凍結期間 (日)			
	7	14	21	28
ANCT-05072	0	0	0	0
ANCT-05152	100	0	0	0
ANCT-09005	100	80	20	0
ANCT-12001	100	0	0	0

a) : 表 1 と同じ

表 3 には、供試した各凍結保護液の pH (25°C) と Aw (25°C) を示す。いずれの水溶液も溶質の濃度上昇に伴って pH (25°C) と Aw (25°C) の値が低下した。塩化ナトリウム水溶液は両糖類水溶液と比較して pH (25°C) がやや高めであるが、Aw (25°C) はほぼ同様の値であった。-20°C でシイタケなど食用菌の菌糸体が死滅し易い主要因としては、凍結により菌糸体の細胞の内外に氷の核が形成し、それが結晶成長し易い温度であるために物理的な細胞損傷に至る <sup>10)</sup>と考えられる。凍結保護液に高濃度糖水溶液 (Aw の値が低い) を用いると菌体ディスク (寒天ゲルと菌糸細胞) への各糖分子の取り込みが生じ、特に凍結中の高い浸透圧によって菌糸細胞の脱水が生じ、細胞内のガラス化や細胞内の水分子の結合水化が促進される可能性 <sup>11,12)</sup>が考えられる。さらには、寒天ゲル内の氷晶成長の抑制も生じることで細胞外部からの物理的なダメージが減少し <sup>4)</sup>、菌糸体の生存率が改善すると推察する。しかし、塩化ナトリウム水溶液では純水とほぼ同様にシイタケの生存率が低かったことから、Aw や浸透圧の物性以外にもシイタケ菌株の耐塩性

など塩化ナトリウムとの関わりの影響があると考察する。

表3. 各凍結保護液のpHとAw

凍結保護液 (濃度: % (w/w) )	pH (25°C)	Aw (25°C)	
グルコース水溶液	(10)	4.4	0.98
	(20)	4.2	0.97
	(40)	4.0	0.93
スクロース水溶液	(10)	4.8	0.98
	(20)	4.7	0.97
	(40)	4.7	0.94
NaCl水溶液	(1)	5.7	0.98
	(2)	5.4	0.97
	(4)	5.2	0.95
純水	6.0	1.00	

#### 4. まとめ

本研究では、霜取り機能によって庫内に温度変動が生じる家庭用冷凍冷蔵庫の冷凍室を用いるシイタケ菌株の凍結保存の可能性を検討した。図17に冷凍庫内の24時間の温度変化を示す。横軸は30秒間毎に温度測定したカウント数である(24時間で2880回)。終日クローズ状態での平均温度 $-18.6^{\circ}\text{C}$ 、同変温値 $-20.1\sim-12.3^{\circ}\text{C}$ 、同 $-17.0^{\circ}\text{C}$ 以上の時間は51分間で、1日でみれば23時間程度が $-20.1\sim-17.0^{\circ}\text{C}$ の温度帯となる。

供試した2菌株(ANCT-05072とANCT-05152)については、これまでに著者らが報告した $-20^{\circ}\text{C}$ 定温制御の冷凍庫での凍結保存データがある。共通部分は前処理なしでの40% (w/w) 濃度のグルコースとスクロース水溶液における生存率の結果<sup>78)</sup>であり、今回の10~20% (w/w) 濃度での生存率を含めた結果を表4に示す。 $-20^{\circ}\text{C}$ 定温冷凍庫の生存率は2~3回の繰返し測定の結果であり、『100』は100%のみの生存率、『 $\leq 100$ 』は0~100%の生存率、『 $< 100$ 』は0~100%未満の生存率を意味する。

ANCT-05072の40% (w/w) グルコース水溶液の比較では28~35日間を超える凍結で生存率100%維持が難しくなる共通点、ANCT-05152の40% (w/w) グルコース水溶液の比較では100日間を超える凍結で生存率100%維持が難しくなる共通点がそれぞれみられた。ANCT-05152の40% (w/w) スクロース水溶液の比較ではいずれも凍結80日間程度まで生存率100%維持された。

表5にはANCT-09005とANCT-12001の本検討での生存率変化を示す。今後、供試菌株を増やしての家庭用冷凍庫での再現性の確認、 $-20^{\circ}\text{C}$ 定温冷凍庫で確認されたように前処理(マイクロチューブに菌体ディスクと凍結保護液を入れた後に $25^{\circ}\text{C}$ で24時間程度放置)効果<sup>59)</sup>の有無を含めた検討が必要となる。

以上の結果から菌株によって挙動が異なる可能性があるが、シイタケ菌株の半年程度の凍結保存では家庭用冷凍庫と $-20^{\circ}\text{C}$ 定温冷凍庫の生存率間に大きな差異が生じないと判断する。その原因として図17に示した温度環境下では、菌糸体を死滅させる主要因の細胞内の氷の結晶成長が大きく進行しなかったためと推察する。加えて、菌株により挙動は異なるものの家庭用冷凍庫を用いたシイタケ菌株の凍結保存においても凍結保護液として高濃度糖液が望ましいことが明らかになった。

表4. 家庭用冷凍庫と-20℃定温冷凍庫における凍結後のシイタケ菌株の生存率変化 (25℃・10日間培養)

凍結保護液 種類	濃度 (% (w/w))	供試菌株	家庭用冷凍庫での生存率 (%) <sup>a)</sup>												-20℃定温冷凍庫での生存率 (%) <sup>ab)</sup>				
			凍結期間 (日)												凍結期間 (日)				
			7	28	35	42	50 <sup>c)</sup>	60 <sup>d)</sup>	70	80	100	120	140	180	7	28	56	70	84
グルコース 水溶液	10	ANCT-05072	100	100	100	60	60	40	0	0	0								
	20		100	100	40	80	40	0	0	0	0								
	40		100	100	100	80	100	100	60	0	0								
	10		100	100	60	80	100	100	80	100	0	20							
	20		100	100	100	100	100	100	80	100	80	20							
	40		100	100	100	100	100	100	100	100	100	80							
スクロース 水溶液	10	ANCT-05072	40	0															
	20		60	0															
	40		40	0															
	10		100	100	80	60	80	40	80	80	80	60	20						
	20		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80						
	40		100	100	100	100	100	100	100	100	100	80	40						
スクロース 水溶液	10	ANCT-05152	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	20		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	40		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	10		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	20		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	40		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

a) : 表1と同じ, b) : 2~3の繰返し実験結果, c) : スクロースは49日, d) : スクロースは63日 ; 注) 表1と同じ

表5. 家庭用冷凍庫における凍結後のシイタケ菌株の生存率変化 (25℃・10日間培養)

凍結保護液 種類	濃度 (% (w/w))	供試菌株	家庭用冷凍庫での生存率 (%) <sup>a)</sup>															
			凍結期間 (日)															
			7	28	35	42	50 <sup>b)</sup>	60 <sup>c)</sup>	70	80	100	120	140	180				
グルコース 水溶液	10	ANCT-09005	100	100	100	100	100	100	100	100	100	20						
	20		100	100	100	100	100	100	40	60	20							
	40		100	100	100	100	100	100	100	100	100	0						
	10		100	100	100	100	100	100	100	100	80	80						
	20		100	100	80	100	100	100	100	100	100	80						
	40		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100					
スクロース 水溶液	10	ANCT-12001	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	20		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	40		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	10		100	100	100	100	100	100	100	100	100	60	100	20				
	20		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80	40	80			
	40		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

a) : 表1と同じ, b) : スクロースは49日, c) : スクロースは63日 ; 注) 表1と同じ

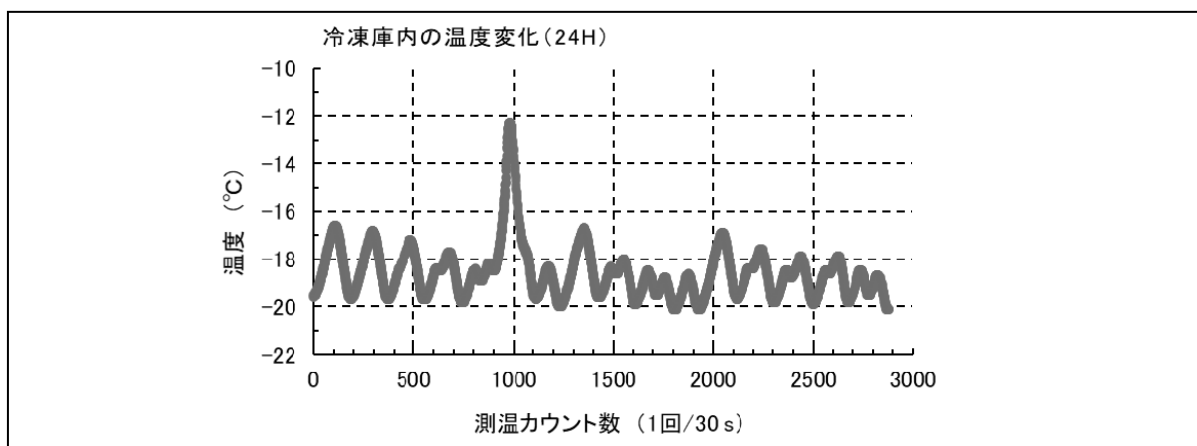


図 17. 供試した家庭用冷蔵冷凍庫 (400 リットルクラス) の冷凍庫内の 24 時間の温度変化  
注) 横軸は 30 秒間毎に温度測定したカウント数を示す (24 時間で 2880 回) ; 終日クローズ  
状態での平均温度 :  $-18.6^{\circ}\text{C}$ , 同変温値 :  $-20.1\sim-12.3^{\circ}\text{C}$ , 同 $-17.0^{\circ}\text{C}$ 以上の時間 : 51 分間

### 参 考 文 献

- 1) Ohmasa M, Abe Y, Babasaki K, Hiraide M, Okabe K: Preservation of cultures of mushrooms by freezing. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, **33**(4): 467-479 (1992)
- 2) 大政正武: 遺伝資源研究-最近の進歩 (2) -栽培さのこ菌株の超低温保存法の検討-. *農業技術*, **48**(2): 74-77 (1993)
- 3) 富樫 巖, 幸田有以: 純水と $-20^{\circ}\text{C}$ を用いたエノキタケ菌株の凍結保存の試み. *New Food Industry*, **55**(1): 6-12 (2013)
- 4) 富樫 巖, 大谷和也, 安東敬史, 細川芽衣, 曾我 瞳, 幸田有以: シイタケ菌糸体の $-20^{\circ}\text{C}$ 凍結保存における高濃度糖水溶液と寒天培地の影響. *日本菌学会会報*, **57**(2): 93-98 (2016)
- 5) 富樫 巖, 新井 悠:  $-20^{\circ}\text{C}$ 凍結保存におけるヒラタケ菌糸体に対する高濃度グルコース水溶液の保護効果. *日本菌学会会報*, **60**(2): 37-41 (2019)
- 6) 富樫 巖, 鬼柳春花:  $-20^{\circ}\text{C}$ と $-50^{\circ}\text{C}$ におけるシイタケ菌糸体とヒラタケ菌糸体の凍結保存. *New Food Industry*, **62**(6): 391-398 (2020)
- 7) 富樫 巖, 梶 暉, 横田喬央: シイタケ菌糸体の $-20^{\circ}\text{C}$ 凍結保存における前処理の効果. *New Food Industry*, **63**(3): 177-184 (2021)
- 8) 富樫 巖, 西脇綾乃, 村上希生, 梶 暉, 鬼柳春花, 横田喬央: シイタケ菌糸体の $-20^{\circ}\text{C}$ 凍結保存における凍結保護剤の性能評価~単糖, 二糖, 多価アルコール類の比較~. *New Food Industry*, **63**(5): 360-366 (2021)
- 9) 富樫 巖, 村上希生, 川島 萌: シイタケ菌株とヒラタケ菌株の $-20^{\circ}\text{C}$ 凍結保存における前処理時間の影響. *New Food Industry*, **63**(8): 555-564 (2021)
- 10) 白樫了: 糖類 (トレハロース) の細胞内凍結抑制?. *生産研究*, **55**(2): 150-152 (2003)
- 11) 渡辺 信: 環境問題と微生物の保存. *環境技術*, **27**(7): 485-487 (1998)
- 12) 桑野和可: 藻類の凍結保存・日本藻類学会創立50周年記念出版・21世紀初頭の藻学の現況 (堀 輝三・大野正夫・堀口健雄 共編), *日本藻類学会*: 108-111 (2002)