

〔徳島農技セ研報 No.1
15 ~ 18 2014〕

マツタケのデンプン分解能簡易測定法

下北英輔・服部武文*・阿部正範

Simple measurement of starch degradation in *Tricholoma matsutake*

Eisuke SHIMOKITA, Takefumi HATTORI*, Masanori ABE

要 約

マツタケの人工栽培には、デンプン分解能力の高い菌株が適していると考えられている。しかしながら、これまでのデンプン分解能を測定する方法では、時間や手間がかかる割に、得られる結果のばらつきが大きいなど問題があった。

本研究では、マツタケをデンプン寒天培地上で培養すると、デンプンの分解された領域が目視できること、及びその領域を計測することによって菌株ごとのデンプン分解能を測定できることを見いだした。さらには、低温処理をすることによって、より精度を高めることにも成功した。この方法は従来に比べて、①短期間で計測可能、②操作が簡便、③結果のばらつきが少ないといった利点があり、マツタケのデンプン分解能を評価する優れた方法であると言える。

キーワード：マツタケ、デンプン分解、簡易測定法

keyword : *Tricholoma matsutake*, starch degradation, simple measurement

緒 言

マツタケの人工栽培研究は、これまで数多くの取り組みがなされてきたが、未だに実現されていない^{1,6,7)}。マツタケは、栽培が盛んなシイタケやエノキタケ、ブナシメジといった木材腐朽菌とは異なり、木の根から栄養分を吸収する菌根菌に属する³⁾。そのため、自らの力で有機物を分解し栄養素とする能力が弱く、菌床栽培のように宿主を用いない環境でマツタケを育成することは困難である。また、アカマツに人為的に感染させ育成しようとする試みも為されているが、感染させること自体が容易ではなく、まれに感染してもマツタケ菌の生長が持続しないなどの問題がある⁵⁾。

現在、人工栽培が可能な菌根菌としてホンシメジがある。人工栽培が可能となった理由は、用いた菌株がホン

シメジの中でもデンプン分解能力が高かったためであると報告されている⁴⁾。

一般的に、菌根菌はデンプンなどの多糖類を分解する力が弱いことから、グルコースやフルクトースなどの単糖類を用いて培養する。しかしながら、単糖の濃度が3%を越えると浸透圧の上昇により菌糸の生長が抑制されてしまい、単糖を低濃度にすると長期の培養では炭素源が枯渇してしまう²⁾。そのため、デンプンのように分子量の大きな多糖類を徐々に分解させることによって、浸透圧を上げずに炭素源を供給することが重要であると考えられている⁶⁾。よって、マツタケにおいても、デンプン分解能の高い菌株を選抜することが重要であると推測される。

しかしながら、これまでの液体培養によるデンプン分解能の測定法は、要する時間や労力の割に得られる結果

のばらつきが大きいため、選抜方法としては適当ではない。

今回我々は、デンプン液体培地ではなく、固体のデンプン寒天培地を用いることによって、非常に簡便且つ高精度にマツタケのデンプン分解能を測定する方法を見いだしたので報告する。

材料及び方法

1 マツタケ菌のデンプン寒天培地での培養

供試したマツタケを第1表に示す。

第1表 供試菌株

菌株番号	発生の特徴		採取地	備考
	樹種	発生型		
150306-1			山口県本郷村	愛媛県より分与
150306-2			山口県防府市	愛媛県より分与
150306-4			山口県美川町	愛媛県より分与
150306-6			広島県	愛媛県より分与
150306-7			愛媛県宇摩郡 別子村	愛媛県より分与
150306-9			愛媛県北宇和 郡津島町	愛媛県より分与
TMT4	マツ林	1個体	徳島県鳴門市 北灘町	
TMT5	マツ林	1個体	不明	
TMT7			不明	

デンプン寒天培地には、市販の馬鈴薯デンプンを用いた。組成は1Lあたり、イーストエキス2g、リン酸二水素カリウム1g、寒天15g、馬鈴薯デンプンは目的濃度に応じて調整した。この溶液を直径9cmのシャーレに20ml分注し、平板培地を作成した。接種源は、供試菌を浜田培地(1Lあたり、グルコース20g、イーストエキス2g、リン酸二水素カリウム1g、寒天15g)で培養し、生長した菌糸コロニーを直径5mmのコルクボーラーで打ち抜いたものを用いた。培養は25℃、暗黒下で行った。

2 ヨウ素デンプン反応

市販のヨウ素配合溶液を20倍に希釈し、マツタケ培養中のデンプン寒天培地に20ml注ぎ、1分間ほど放置し、蒸留水で洗浄後、着色状況を観察した。

3 デンプン分解能の計測

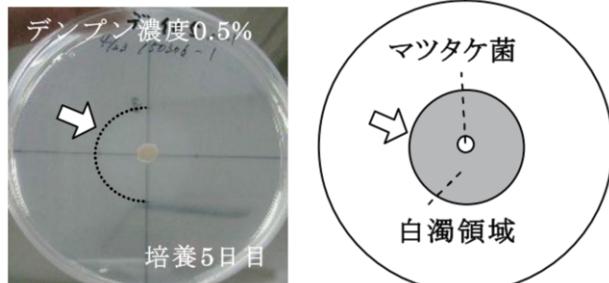
接種源をデンプン寒天培地に接種後7日目に、接種源を中心に垂直する線をシャーレ上に引き、交差点からデ

ンプン分解領域と未分解領域との境界(屈折率や透明度が異なるため目視可能)までの長さを計測した。1サンプルにつき4方向計測し、平均した値をサンプルごとの結果とした。14日目の計測では、培養シャーレを5℃で12時間放置し、現れた白い輪の内側から接種源の中心までの長さを計測した。

結 果

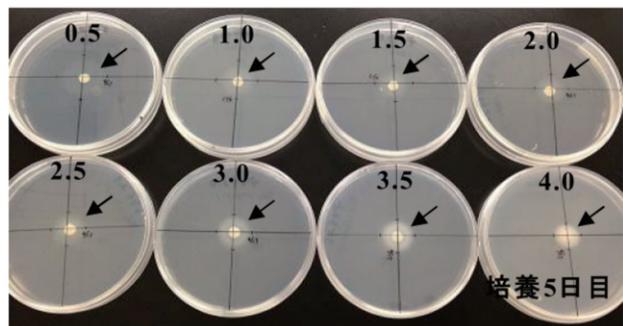
1 マツタケ菌をデンプン寒天培地で培養すると、デンプン分解領域が目視可能となる

マツタケ菌をデンプン寒天培地上で培養すると、接種源を中心に円状の白濁した領域が観察された(第1図)。また、デンプン濃度を変えると、この白濁した領域は、濃度が濃くなるにつれて、小さく白くなっている(第2図)。当初は、この領域が白濁していること、及び時間の経過と共に徐々に大きくなっていくことから、マツタケ菌糸が広がっていっているのではないかと考えた。そこで、この白濁領域を切り取り、他のデンプン寒天培地へ移し培養を行った。すると、接種領域を中心に白濁した領域が広がったが、60日間培養しても菌糸様の構造は見ら



第1図 マツタケ菌周囲に白濁領域がつくられる

デンプン寒天培地上でマツタケ菌を培養すると、マツタケ菌を中心として同周円上に白濁した領域が見られた。供試菌株: 150306-1

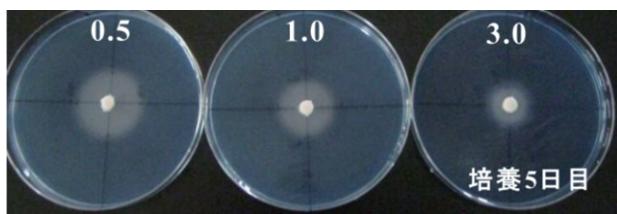


第2図 白濁領域はデンプン濃度が高くなるにつれて小さく、白くなる

デンプン濃度0.5～4.0%の寒天培地。濃度が上がるにつれて白濁領域の白さが濃く小さくなっていた。数字: デンプン濃度(%)、供試菌株: 150306-1

れなかったため、マツタケ菌糸ではないと判断した（結果未掲載）。

次に、この現象はグルコースなどの培地では起こらず、デンプン培地のみで見られる現象であることから、マツタケ菌から分泌された物質がデンプンと化学反応を起こし白濁しているのではないかと考えた。そこで、ヨウ素デンプン反応を行ったところ、第3図に示すように白濁領域ではデンプンの存在を示す青色の色素沈着が見られなかった。よって、マツタケ菌周囲に現れる白濁領域はデンプン分解により起こる現象であることがわかった（以降、この領域をデンプン分解領域と呼ぶ）。



第3図 白濁領域ではデンプンが分解されている

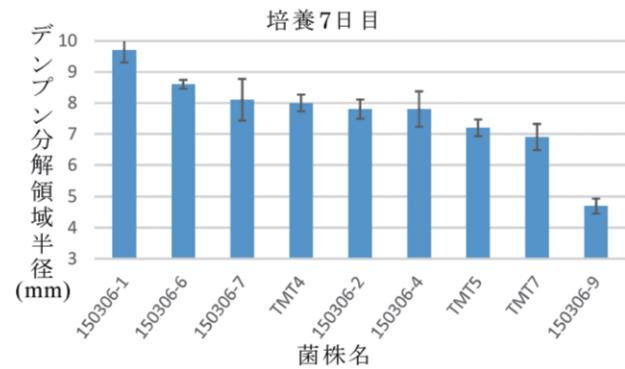
ヨウ素デンプン反応を行ったところ、白濁領域では青い色素が沈着しなかった。よって、白濁領域ではデンプンが分解されていることがわかった。数字：デンプン濃度（%）、供試菌株：150306-1

2 デンプン分解領域の大きさを比較することによって、デンプン分解能を測定できる

デンプン分解領域の大きさが菌株ごとに特有であれば、その大きさを計測することによって、各菌株のデンプン分解能が測定できると考えた。そこで、本研究室で保管していた9種類のマツタケ菌株を用いて計測を行った。各菌株5サンプルずつ7日間培養を行い、光にかざして境界線を計測した。その結果、第4図に示すようにデンプン分解領域の大きさは菌株ごとにばらつきが少なく、特有の値が示された。よって、この結果を順位付けすることにより、高デンプン分解能を持つ菌株を選抜することが可能となる。

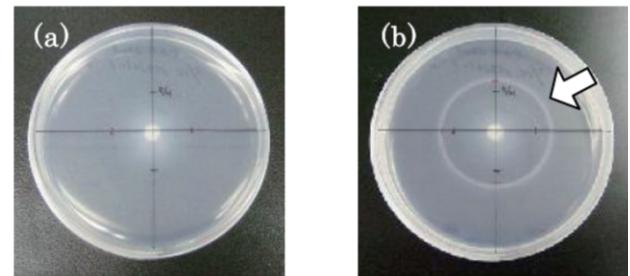
しかしながら、上の方法ではサンプルによって境界が不鮮明なため計測が困難であるなど問題があったことから、より簡便な方法を模索した。そこで見いだしたのが、培養中の菌株を5°C程度の低温に放置するという方法である。第5a図に示すように未処理ではデンプン分解領域の境界が不明確であるが、低温処理を行うことによって明確な白い輪が現れることがわかった（第5b図）。そこで、培養14日目において、低温処理を行い、計測をしたところ、得られた値は極めてばらつきが少なく、より精度の高い結果が示された（第6図）。

以上のことから、デンプン分解領域の大きさを計測す

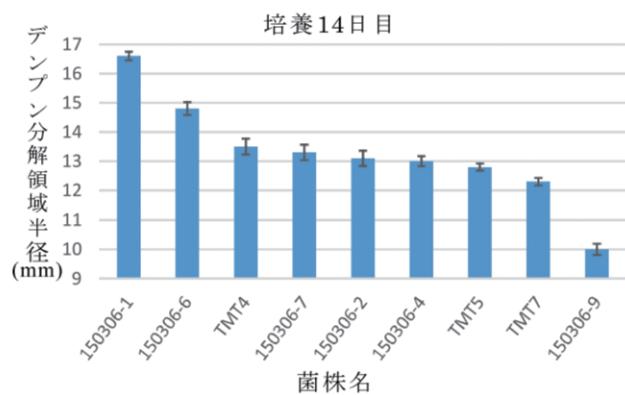


第4図 デンプン分解領域の大きさを計測することによって、菌株ごとのデンプン分解能が測定できる

デンプン分解領域の半径を計ると、菌株ごとの特有の値が示された。しかし、分解領域の境界が不鮮明なため、計測が困難であった。デンプン濃度：2.0%，供試数：各菌株5サンプル、エラーバー：標準偏差



第5図 低温処理をすると、デンプン分解領域が明確になる
(a) 培養9日目。未処理の場合、デンプン分解領域が不鮮明である。
(b) (a)を5度で一晩放置すると、デンプン分解領域の境界に白い輪状のものが現れる。



第6図 低温処理により、さらに精度が上がる

低温処理によって現れる白い輪を基にして計測を行ったところ、菌株ごとに非常にばらつきの少ない結果が得られた。デンプン濃度：2.0%，供試数：各菌株5サンプル、エラーバー：標準偏差

ることによって、マツタケのデンプン分解能の測定ができること、さらには低温処理によって、より簡便且つ高精度な計測が可能となることがわかった。

考 察

今回報告したデンプン寒天培地を用いたデンプン分解能の測定法は、従来の液体培地を用いた方法に比べ、非常に簡便迅速且つ精度の高い結果を得ることができる。このような利点が生じた理由は、①寒天培地が固体であるためデンプンが分解された領域と未分解の領域とが混ざり合わず平均化されないこと、②短期間で計測可能なためマツタケ菌の生長を考慮に入れる必要がないことが考えられる。

また、低温処理によって白い輪が現れる理由は定かではないが、分解途中のデンプンが析出しているのではないかと推測している。なぜなら、ヨウ素デンプン反応ではデンプン分解が進むにつれて青から紫、無色へと変化するが、その色の変化がデンプン分解領域周辺において見られ、且つ白い輪と重なるからである。

その他、マツタケの栽培が困難な理由として、有機物の分解能力が低いことの他に、菌糸の成長速度が他のキノコ類に比べて極端に遅いことが挙げられる。そこで今後は、マツタケのデンプン分解能と菌糸成長量の関係について調べ、デンプン分解能が高く、且つ菌糸成長量の優れた菌株を選抜する予定である。

さらに、ヨウ素デンプン反応では12グルコース残基以下で無色になることからグルコースの定量ができないため、マツタケ菌のより詳細なデンプン分解能を計測することを目的とし、デンプン分解領域におけるグルコースの定量法の開発を試みる。

このように、デンプン分解能を基とした独自の測定法を用いて、人工栽培に適したマツタケ菌株の探索を行いたいと考えている。

摘 要

デンプン分解能の高いマツタケを選抜するため、デンプン寒天培地を用いた新しい測定法を検討した。

1) デンプン寒天培地上でマツタケ菌を培養すると、菌の周囲に白濁した領域が見られた。

- 2) ヨウ素デンプン反応の結果、白濁領域ではデンプンが分解されていた。
 - 3) デンプン分解領域（白濁領域）の大きさを計測すると菌株ごとに特有の値を示した。
 - 4) 低温処理をすることによって、デンプン分解領域の周囲に白い輪が現れることを見いたした。
 - 5) 白い輪を目印に計測を行うと菌株ごとのより正確な値を得られることが示された。
- この方法を用いることによって、従来法に比べ、迅速簡便且つ正確にマツタケのデンプン分解能を測定することが可能となった。

謝 辞

本研究は、徳島大学革新的特色研究プロジェクトの一環により実施した。

引用文献

- 1) 近藤民雄・大賀祥治 (2011) : マツタケの菌床栽培を目指して. 九大演報, 92: 1 ~ 3.
- 2) Kusuda M., Ueda M., Konishi Y., Yamanaka K., Terashita T. and Miyatake K (2007) : Effects of carbohydrate substrate on the vegetative mycelial growth of an ectomycorrhizal mushroom, *Tricholoma matsutake*, isolated from *Quercus*. Mycoscience, 48, 358 ~ 364.
- 3) 小川眞・衣川堅二郎編 (2000) : きのこハンドブック. 朝倉書店 (東京) : 12.
- 4) Ohta A (1994) : Production of fruit-bodies of a mycorrhizal fungus. Mycoscience, 35 : 147 ~ 151.
- 5) 菅原冬樹・阿部実・菱川敬太・田中修 (2012) : マツタケ栽培技術の開発. 秋田県森技研報, 21 : 82 ~ 102.
- 6) 寺下隆夫・楠田瑞穂 (2013) : マツタケ人工栽培における課題と今後の展望. 近畿大学農学部紀要, 46 : 343 ~ 353.
- 7) 吉村文彦 (2004) : ここまで来た! まつたけ栽培. トロント (東京) : 1 ~ 112.