

食藥用菇類菌種保存法

前 言

菇類菌種是農業上重要的生產菌，世界各菌種中心莫不把菇類菌種列為保存的重點之一，如美國菌種保存中心(ATCC)、英國國家微生物研究中心(CMI)、荷蘭真菌保存中心(CBS)、日本大阪醱酵研究所(IFO)、美國農部北區研究中心(NRRL)等皆保存有相當數量的菇類菌種。在農業、製藥及發酵工業上，環保菌株、生產菌株、接種源及分析用菌種之保存，均是非常重要的事，尤其是可信賴的優良母株，對於微生物利用工業而言，是絕對必要的，故保存微生物的方法很早就受到相當的重視(Martin, 1964)。不管是農業、醫學、工業、食品等所使用的微生物，不僅要鑑定完善，而且必須在接種過程中，維持菌株特性之安定，如以慣用之定期繼代接種方法，在保存和製造種源時，其遺傳上的安定性較難控制(Lincoln, 1960)，所以必須有一種穩定的保存方法，才能確保優良菌種的遺傳特性。

由於菇類菌種的細胞核分裂速度快，且易受環境改變的影響，自然突變的機率大，若未能適當保存，常會發生退化及變異現象而失去其原有之優良特性而降低其生產量及品質，造成栽培者重大損失及食品市場來源不穩定之困擾。民間常用的礦物油保存雖可短時間保存菌種，具有防止污染及避免乾燥之優點，然其穩定性差，一旦寶貴的菌種發生突變或死亡，所造成的損失將無可彌補，所以必須有一套完善的保存制度方是長久之計，任何先進國家成立菌種保存中心之理由亦是在此。因之，如何保存其遺傳之穩定性實為重要之課題。

導致基因重組和突變的有絲分裂，與細胞的分裂及代謝活力有關，一個理想的基因種原保存是應在代謝被不活化的狀態下，將活的菌體控制維持其活性，亦即製止其細胞的分裂與停滯其生長 (Jong and Davis, 1987)，此一目標已用超低溫保存方法發展成功，並為長期保存食用菌類的最好方法 (Jong, 1978 & 1987)。在諸多的冷凍劑中，如液態空氣、氫、氦及氮中，以液態氮被認為是最安全及最符經濟效益的 (Jong, 1987)，然在超低溫凍化過程中，由於水分的傳送均經過細胞膜，冷凍時細胞內冰晶的形成刺傷胞膜與胞內溶質濃度增高，容易導致凍害。控制適度降溫速率可提高細胞存活率，為能降低在凍結及解凍時所發生的冰晶傷害程度，採用適當的化學保護劑，可以減少冰晶的形成。目前已有不少的化學化合物曾被單獨或混合使用為冷凍保存菌種的抗凍劑，這些抗凍劑能控制冰晶的大小及形成速率，能緩和溶質的濃度的急速增高及增加細胞膜的水滲透性，並降低細胞內容物的凝結點，以利冷凍時細胞脫水的進行。抗凍劑有兩大類型，一為浸入型，如甘油及DMSO等，此等溶液能滲入細胞內，而得以胞內及胞外同時發揮其保護效果；二為非浸入型，如糖類及PVP等，用於使胞內胞外於冷凍時與水分子產生結構上的改變與細胞內溶質濃度的平衡，避免脫水過度。

冷凍乾燥法是優良的菌種保存方法，能夠維持菌種的穩定性，通常適用於細菌、酵母菌及能產生孢子的黴菌，但對於只有菌而不會產孢的黴菌及菇類真菌而言是不能適用的，因此凍乾法對於菇類真菌來講是有限制的。由於精液及血液能成功地保存於液態氮中，啟發了真菌或許也能利用此一方法來保存的構想。由於此種超低溫保存法能減少細胞內外的液態水而使許多生理作用不能進行，並能防止細胞核的分裂，使細胞發生變異之可能性降低最低，故對菌種中心及相關研究是最重要的方法。

菇類之研究領域現已逐漸成為世界各國研究發展為高經濟科技及學術探討之對象，故無論在採集、鑑定、分離、複核、栽培、形態、生理生化分類及長期保存菌種上皆具重要性。菇類在分類上是屬於擔子菌及子囊菌之高等真菌，在農業、醫學、工業等研究範疇中具有相當重要的地位及研究潛力，但是若無法妥善保存菌種，則將導致菌體的變異或退化，使其失去其原有優異的遺傳特性，或降低活性甚至死亡，均將嚴重影響其經濟效益及研究價值，故知長時間保存菌種時應採取適當之措施以防止變異發生。因此，菌種保存工作在科學發展領域上扮演著舉足輕重的角色。菇類自古與中國人之食性有密切之關係，例如香菇、洋菇、草菇、木耳等至今仍為我國甚至於全世界各國人民所喜愛的食品。就保存

與銷售方面而言，菇類因屬真菌，在培養基上採菌絲培養是最直接簡便之方法，不過因菌體在培養基上極少產生孢子，不適用於冷凍乾燥法長期保存菌種。若是收集子實體之擔孢子或子囊孢子，雖可利用冷凍乾燥法保存，然因子實體產生之孢子在採收時已曝露在空氣中，尤以野生採集為然，極易受到污染，故在活化接種時必須採用單孢分離，而且必須正負兩個品系交配，所以雖然能確保長久保存的成功率，但因操作繁瑣，只有少數學者研究某特定之屬，且為了雜交育種之便才被採用，以菌種保存中心而言，此法難以被採用。

理想之基因種源保存是制止細胞分裂及停滯其生長使其生理代謝完全停止活動。由於食用菇類絕大多數係以純菌絲生長，在培養基上極少產生孢子。所以，除了能形成節孢子或芽孢子之菌株外，均不適用於凍乾保存。近二十年來已成功地使用超低溫保存法長期保存食用菌類菌種(Jong, 1987; Jong & Davis, 1987)。其中液氮保存係利用液氮液相(-196°C)及其氣相(-150~180°C)的超低溫，使細胞內外的液態水減少而無法進行生理作用，同時抑制細胞核分裂，防止其變異。而細胞在冷凍解凍的過程中，常因溫度超過-139°C時所形成的冰晶對細胞造成傷害，以致於影響其存活率。因此需配合冷凍解凍速率之控制及保護劑之添加，以減少細胞在液氮保存過程中損傷。目前已知以 1 °C/min 的速率緩慢降溫冷凍(Hwang, 1966)及以37°C~40°C快速解凍法(Jong, 1987)，並以10%甘油或5%DMSO作為抗凍劑(Jong, 1987; Jong & Davis, 1987)對大部份菇類保護效果較佳，因此液態氮咸認是最好及最安定之長期保存食用菌之方法(Goos, 1967; Miler and Jong, 1987; Smith and Onions, 1983)。由於使用冷凍乾燥法保存菇類菌種仍有困難，如欲有效地保存菌種原有之基因型及表現型之遺傳穩定性，則只能採用超低溫保存法保存之。經研究絕大部份之菇類能以小米粒為生長基質，10%甘油作為抗凍劑，經 1 °C/min 降溫速率保存在-80°C冰櫃及液態氮中，可維持相當高之存活率(陳, 1988 & 1989)。一般抗凍劑以10%甘油即可以避免冰晶的形成造成細胞之傷害，但是甘油滲透速度慢，須靜置一段時間才能完全滲入，而滲透過久對某些菌會造成毒害(Smith & Onions, 1983)。例如草菇在甘油中保存在4°C三週後，其存活率及生長速率普遍降低，即可能為甘油對草菇菌體造成毒害之結果。而 5% DMSO是相當好之抗凍劑而且滲透速度快，唯DMSO對人體毒性較大，所以較少為學者所採用，但許多菌種仍需靠此一抗凍劑來保存菌株且存活率優於甘油(Hwang, 1968; Smith & Onions, 1983)。

控制冷凍之降溫速率能使細胞外溶液凍結而細胞內不凍結(Pegg, 1976)，由於擴散的原理而導致細胞逐漸脫水至細胞外結冰，以防止冰晶對細胞造成膜的破裂，形態的改變、抑制 RNA, DNA 的合成等等傷害(Calcott, 1985)。細胞質的冰點(freezing point)常大於-1°C，而且有超冷的現象(supercooled)，即使細胞外的液體已結冰，而細胞內尚未凍結，此現象顯示細胞膜可防止外部冰晶進入超冷的內部，亦即細胞內不含有超冷的冰核(Mazur, 1970)。然降溫速度若過於緩慢，則會因嚴重失水造成胞內毒害，但降溫速度若太快易使得細胞內結冰而刺傷細胞(Pegg, 1976; Pegg & Shell, 1984)，而直接置入 -80 °C及液態氮中保存，由於降溫速度太快阻礙保存之效果(Jong, 1987)。快速解凍可以減少解凍過程中冰晶的再形成對菌體造成傷害，故以37-45°C快速解凍可以減少解凍過程冰晶之再形成，提高存活率(Goos, 1967)。

食用菇類多數具有豐富之營養價值，其所含之蛋白質、氨基酸、維生素及礦物質之含量與種類均較一般蔬菜為高為多。彼等之栽培較容易，能利用富有纖維素之農業廢料如穀類禾稈，鋸木廠之木屑廢棄物來生產，而栽培後之廢棄培養基質，又可當做飼料、肥料或供抽取酵素及特殊成分之用，利用價值甚高，因此廣泛蒐集菇類菌株，對今後台灣新興菇的發展及其新產品之開拓，當極有助益，菌種中心成立的目的亦即除保存本土特有菌種之外，同時提供國內外各類食藥用菇菌種供國內業者及學者採用。

保存方法

菇類菌種保存方法，大致上可分為五種：繼代培養法、液體石蜡覆蓋法、無菌水保存法、冷凍乾燥法、低溫保存法(表一)，其中繼代培養方法是一般人常用的方法，雖操作簡便，但容易產生變異而影響其原有的優良品種；經過滅菌的液體石蜡覆蓋在菌種上面，可

阻隔空氣的水分散失，減緩空氣的進出，但菌體代謝仍照常進行，遺傳穩定性仍差；將菌體懸浮在無菌水上面，在冰箱冷藏可短時間保存菌種，這是較適合一般菇農實施的方法，唯一菌種應以保存時間不超過半年為限，否則變異仍將逐年明顯；冷凍乾燥保存方法是一種不會產生變異的方法之一，一般僅適用於產孢的黴菌而言，對於其他菇類菌種，則目前荷蘭真菌保存中心(CBS)已初步試驗成功 (Tan & Stalpers, 1991)，利用雙糖之trehalose為保護劑，對裂褶菌 (*Schizophyllum commune*) 及鬼傘 (*Coprinus psychromorbidus*) 冷凍乾燥後可以存活，但還不穩定，此方法仍有待更多的實驗，不過若能成功的話，則將使銷售及運輸達到相當的便利程度。

低溫保存法可分為兩種，一為 -20°C 至 -135°C 之間的保存，另一種為超低溫液態氮保存【溫度介於 -150°C (氣相) 至 -190°C (液相) 之間】， -20°C 至 -135°C 之間的保存是靠冰箱冷凍保存，選擇適當的抗凍劑可保存兩三年，但由於冰箱會受到停電、機器的穩定性及開關溫度變化大等因素，使菌種容易受到外在因子的影響而導致死亡，因此必須時常測試其存活；而液態氮保存，不管是液相或氣相，溫度均低於 -139°C ，完全不受電力影響，是目前被公認世界上最佳的保存方法。食品工業發展研究所所有菇類菌種皆保存於液態氮中，除極少數比較敏感的菌株之外，其餘皆可妥善保存 (陳, 1988, 1989)，例如木生菇中之香菇、金針菇、鮑魚菇、木耳、靈芝、伏苓等菌種保存在 -80°C 及液態氮時，以10%甘油、10%葡萄糖、10%蔗糖及無菌水當抗凍劑時，在10%甘油中能維持相當高的存活率；而草性菇中之洋菇及草菇於 -80°C 及液態氮保存，以不同抗凍劑保護，除草菇保存較差之外，不同品系的洋菇在保存上皆沒有問題(王, 1989)，而利用此種超低溫保存與傳統之繼代培養方式對菌種菇體形成前菌絲生長期日數長短有顯著的影響，而且若經人工栽培試驗比較其產量時，也很明顯可以看出液態氮保存的菌種有較高的產量。

一、繼代培養法

- 1、選擇適當培養基，製成斜面試管，將菌種移植生長。
- 2、每一菌種最好有五至十根試管培養。
- 3、每次更新培養基時，最好以適當培養基及營養條件差的培養基輪流替換，以減少因長期生長在營養成分高的培養基造成突變率增高或生理活性降低。例如夏季鮑魚菇可培養於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基(PDA) 及麥芽糖抽出物培養基(MEA) 或單純洋菜培養基(WA)。
- 4、隨時留意貯放期間是否受到污染，棉花塞試管應避免瞞的侵襲造成污染，若為螺旋試管，則應留意管口是否因濕氣而有雜菌滋生。
- 5、若發現有老化、退化、污染等情形，應捨棄重新購入菌種，以免因污染或菌種活性退化而產量降低造成損失。

二、液體石蜡覆蓋法

- 1、選擇營養成份較低的培養基（但也必須菌株能生長良好的培養基），將菌種移植生長，直到長滿試管。
- 2、將已殺過菌的液體石蜡油倒入試管內，拴上螺旋蓋子或塞入棉花塞。
- 3、於室溫中或 4°C 以上低溫保存。
- 4、保存期間應維持乾燥，以避免雜菌或昆蟲滋生。
- 5、此法保存應存備而不用的心態，萬一繼代培養方法菌種污染退化或其他方法發生問題才考慮自此菌種再活化，因為石蜡會阻礙生長及保存過久會老化。

三、無菌水懸浮保存法

- 1、將菌種培養於試管或培養皿上。
- 2、將蒸餾水裝入三角燒瓶或試管內，殺菌備用。
- 3、取菌落外圍0.5公分以內的菌絲塊，約0.5公分見方大小，丟入無菌水內。
- 4、於冰箱冷藏室保存。
- 5、取用時直接將菌絲塊接入適當培養基即可。

備註：可將無菌水直接倒入試管內亦可（培養皿不宜，因為太寬容易污染），不過因為培養基仍含有大量養分，菌體仍持續生長，老化現象比切塊置入無菌水還快，較不適採用。

四、冷凍乾燥保存法

- 1、將已滅過菌的半透膜(PT cellophane membrane)鋪在培養基上，然後接入菌種，待菌絲

長至直徑五至八公分。

- 2、撕下半膜透，將菌絲移入液體培養基，以果汁機打碎。
- 3、取菌絲片段懸浮液75ml加入300ml液體培養基，並以150rpm振盪培養數天。
- 4、將菌絲團放入 300 μ l，12% 的 skimmed milk 中，此抗凍劑中須含有糖類，如 trehalose即是一種很好的保護劑，然後以每分鐘 1 $^{\circ}$ C緩慢冷凍至-70 $^{\circ}$ C後，於真空乾燥機中真空乾燥至含水量底於5%。
- 5、活化時將凍乾管打破，並將菌體懸浮於液體培養基中復水，此時可接種於洋菜培養基或直接在液體培養基中生長。

備註：存活率將隨凍乾程度而有不同，愈乾則保存期限愈長，但存活率愈低，反之含水量愈高存活率高，相對的保存期限愈短。

五、超低溫保存法

- 1、將菌種接種於小米或洋菜培養基上，待長滿後取小米或洋菜塊。
- 2、將已長菌絲之小米或洋菜塊移入冷凍小管(vial)內，內含10%甘油或5%DMSO，置於4 $^{\circ}$ C或室溫下靜置兩小時，使抗凍劑完全滲透進去菌體內。
- 3、以每分鐘 1 $^{\circ}$ C緩慢冷凍至-70 $^{\circ}$ C後，保存於-80 $^{\circ}$ C或液態氮氣相中。
- 4、活化時將低溫保存管取出置於37~40 $^{\circ}$ C,70%酒精浴中迅速解凍，然後取出菌體移植入適當培養基上生長。

備註：某些較敏感的菌種可以考慮於抗劑凍中再加入糖類，可提高保存效果。

結 論

菌種保存工，除了保存微生物之遺傳及生理性質不變，提供鑑定上的標準菌株之外，更可利用原生質體融合及遺傳工程的技術，改良菌種，以生產高效益之產品，實為一知識及科技的寶庫 (張, 1988)。由於菌種鑑定及保存是屬於專業知識，且必須投以大量的人力及財力，故在開拓之初非常艱辛。食品工業發展研究所於民國七十一年奉經濟部之指示，成立菌種保存及研究中心 (Culture Collection and Research Center, 簡稱CCRC)，十年來，無論在菌種蒐集、保存、鑑定、改良及服務工作上，已紮實了儲備國內生物科技種原的基礎。菌種之低溫保存也從原先的-80 $^{\circ}$ C冷凍保存提昇至液態氮超低溫保存 (圖六~圖八)，使菌種保存更趨完善。

針對一般食用菇栽培種，如木耳、香菇、洋菇、金針菇、鮑魚菇等等菌種而言，在超低溫液態氮保存上皆沒有問題，可以毫無問題地長久保存，至於其他新興食用菇則視菌種而定，大致上都沒有問題，若有保存上的困難情形發生則須再施以其他技巧及方法來加以保存。

由於繼代培養、石蜡油覆蓋及無菌水保存仍容易在短時間內發生老化及突變等不良情形，因而在栽培上仍建議一年以內短時間施用，而長遠來看，為了達到出菇的品質與產量上的穩定，故而建議以保存效果最佳的液態氮超低溫保存法來妥善保存優良的品種。

參考文獻

- 王伯徹，許文輝. 1989. 食用菌類之長期保存. 台灣區第七屆食用菌研討會報告. p.47-55.
- 陳啟楨，林錦堂，華傑，許文輝. 1988. 建立農業微生物種原庫第二年，食用菌類之蒐集、鑑定、複核與保存(II). 食品工業發展研究報告第601號.
- 陳啟楨，林錦堂，華傑，許文輝. 1989. 草菇菌種保存法之研究. 食品工業發展研究報告第581-4號.
- 陳啟楨，林錦堂，華傑. 1989. 建立農業微生物種原庫第三年，食用菌類之蒐集、鑑定、複核與保存(III). 食品工業發展研究報告第631號.
- 張平平. 1988. 微生物菌種之保存及改良，第一章菌株之液氮保存. 食品工業發展研究所叢書

S-42號. p.13-25.

- Calcott P. H. 1985. Cryopreservation of microorganisms. CRC Cri. Rev. Biotechnol. 4(3):279-297.
- Goos. R. D., E. Elmer and B. Winifred, 1967. Effect of warming rates on the viability of frozen fungous spores. Mycologia 59:58-66.
- Hwang, S. W. 1966. Long-term preservtion of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. Appl. Microbiol. 14:784-788.
- Hwang S. -W, 1968. Investigation of ultra-low temperature for fungal vultures. I. An evaluation of liquid nitrogen storage for preservation of selected fungal cultures. Mycologia 60:613-621. ----, II. Cryoprotection cryoprotection afforded by glycerol and dimethylsulfoxied to 8 selected fungal cultures. Mycologia 60: 622-626.
- Jong, S. C. 1987. Germplasm preservation of edible fungi for mushrom cultivation. Mushroom Science 12:1-10.
- Jong S. C. and E. E. Davis, 1987. Germplasm preservation of edible fungi in culture through cryogenic storage. In P. J. Wuest, D. J. Royse and P. B. Beelman (Eds.). Cultivating Edible Fungi, Elsevier, Amsterdam, pp.213-225.
- Lincoln, R. E. 1960. Control of stock culture preservation and inoculum build-up in bacterial fermentation. J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. 2: 481-500.
- Martin, S. M. 1964. Conservation of microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 18: 1-16.
- Mazur, P. 1970. Cryobiology: The freezing of biological systems. Science. 168: 939-949.
- Miller, M. W. and S. C. Jong. 1987. cryopreservation of spawn cultures from mushroom industry. USFCC Newsletter 17(1) Suppl. 1:2-5.
- Pegg, D. E. 1976. Long-term preservation of cells and tissues: a review. J. Clin. Pathol. 29:271-285.
- Pegg D. E., and J. J. S. Shell, 1984. Maintenance of microorganisms. A manual of laboratory methods. pp:83-107. Academic Press Inc. (London). Ltd. UK.
- Smith D. and A. H. S. Onions. Long-term preservation of cells and tissues: a review J. Clin. Pathol. 29:271-285.
- Tan, C. S. and J. A. Stalpers. 1991. Free-drying of fungal hyphae. Mycologia 83(5): 654-657.

表一、菌種保存方法之比較

方法	優點	缺點	保存年限
繼代培養法	1.使用方法簡單 2.不需特別設備	1.生理活性降低 2.容易發生變異	室溫半年以內 4℃一年以內
石臘油覆蓋	1.減緩代謝反應 2.防止菌體乾燥	2.遺傳穩定性差 2.長期活性降低	一年以上
無菌水懸浮	1.操作方法簡便 2.活化步驟簡單	1.水分容易蒸發 2.適合短期保存	10~15℃半年
冷凍乾燥法	1.容易運輸銷售 2.節省空間浪費 3.安全穩定性高	1.適用菌種有限	4-40 年
超低溫保存	1.安全穩定性高 2.保存期限很長 3.適用各種菌種	1.設備耗材昂貴 2.冰晶造成傷害	4-5 年以上 某些菌10年以上