食用菌類之長期保存

王伯徹　許文輝　食品工業發展研究所

摘要：蘑菇與靈芝等食用菌屬於擔子菌類，此類菌種絕大多數係純粹菌絲生長型，在培養基上極少產生孢子，而其遺傳特性在繼代保存過程中極易發生變異，其栽培生產之優良性狀常因此失去再現性。所以，除了能形成節孢子或芽生孢子的菌種外，一般是不適用矽膠與冷凍乾燥保存法，而應採用液體石蠟覆蓋法在室溫下保存，或利用液氮來長期保存菌種，是爲當前最可靠的保存方法之一。將24株菌株以－80°C 低溫及超低溫液氮保存三個月後，發現其存活率平均在80%以上，而冷凍保護劑之效果則以甘油最佳，有較多的菌株能獲得存活；再經由栽培測試得知，用液氮保存之菌源其出菇時期較早且產量亦比－80°C及＋4°C保存者來得大，顯見此法之用於長期保存食用菌種的可行性，又因能保存菌種原有之基因型與表現型而能確保菌源高度的遺傳穩定性是其最大優點。

前　　言

在與微生物有關之農業、醫學、工業和研究的範疇中，若是菌種的保存方法不當，將導致菌體的變異或退化，失去原有優良形質之再現性、降低活性甚或死亡，而大大地影響了其經濟效益及研究價值，因此，在長時間保存菌種時應採取適當的措施以防止變異發生，足見微生物菌種的保存工作在科學發展領域上扮演著舉足輕重的角色[2]。有鑑於此，政府乃於民國71年由經濟部專案計畫補助，在新竹食品工業發展研究所成立了國內首座的菌種保存及研究中心（CCRC），主要負責國內外菌種之收集、分類、保存並提供業者與教學、研究上所需的微生物菌株。

菌類自古與中國人之食性有密切的關係，例如：香菇、洋菇、草菇和木耳等至今仍爲我國甚至世界各國人民所喜愛的食品，且因菇類之可能抗癌成份和香味的發現，與靈芝之藥效成份的探討等，已使得食用菌逐漸發展成爲工業產品，而不再只是單純的農業產物，成爲近來各業界的重要資源並發展成一獨立體系[3]。又本省氣候條件優異，正適於食用菌類的生長繁殖，目前臺灣人工大量栽培之食用菌類雖僅十種左右，但每年生產總額達新臺幣七十億以上，對農村社會之經濟繁榮貢獻頗鉅。惟此等菌類之細胞核分裂速度快，自然突變機會多，且易受環境因素影響，若未適當保存，常發生退化、變異現象而失去原有優良特性嚴重影響生產，造成栽培者的重大損失及食品加工業原料來源不穩定之困擾，因之，食用菌類菌種之妥善保存以維持其遺傳特性穩定重要性自不待言。而菌種保存中心即緣於市場及各界的需要，乃自民國76年起著手食用菌類收集，並對保存方法加以探討研究，以期能提供各界優良的菌種與完善的服務。

內　　容

（一）食用菌類之分類地位與特性

食用菌包含兩大部份，亦即蘑菇與靈芝，二者皆爲眞菌界之擔子菌綱類，其中之蘑菇下屬傘菌目（Agaricales），而靈芝則屬於非褐菌目（Aphyllophorales），其分類地位如下所示：

眞菌界……Fungi
無鞭毛菌門……Amastigomycota
擔子菌綱……Basidiomycetes
傘菌目（蘑菇目）……Agaricales
非褐菌目……Aphyllophorales

兩目間之最大差異在於子實體（Fruiting body）覃蓋內子實層體（hymenophore）之形態，傘菌目係覃褶狀（lamellate），而非褶菌目則爲孔狀（porous），且非褶菌成熟的子實體仍木質性，相反地，傘菌蘑菇爲肉質性，極易於區別。另則傘菌目下含三個主要的科，其類別及特性列於表一。

表一、傘菌目之主要科別與其特性比較

項目＼科別	牛肝科（Boletaceae）	蘑菇科（Agaricaceae）	紅菇科（Russulaceae）
覃蓋	灰或黑色	白至灰褐或褐色，肉質至堅韌肉質	常具顏色偶鮮艷硬肉質、易碎的具球狀胞（sphaerocyst）
覃髓	軟肉質、易腐敗		
子實層體	管狀並垂直排列且易於整層剝離	條板狀或覃褐形	覃褐形或隔間的，極脆，且新鮮時具乳汁
孢子	顏色淡至各顏色橢圓形至紡錘形平滑、或具紋飾，非澱粉質的	透明或各種顏色橢圓形 紋飾之有無不定，似糊精的（dextrinoid）偶爲澱粉質的	白至赭黃或黃色，圓形至寬橢圓形 具紋飾 澱粉質的（amyloid）
生長習性	許多係菌根性	在草地發現	大多爲菌根生長
例舉	*Boletus edulis* *Suillus cavipes*	*Agaricus bisporus* *A. campestris*	*Russula heterophylla* *Lactarius deliciosus*

（二）菌種的保存

微生物菌種保存，最方便、便宜的方法是繼代培養保存法（subculturing），菌體定期反覆移植適當的培養基，再放入冰箱裡低溫保存，但在反覆培養當中，菌種的遺傳特性容易發生改變，諸如生產力及型態、生理性質等[11]，並增高菌種被污染的危險性，因此，儘管此法十分簡易，但卻不宜採用[2]。爲長期保存菌種，目前最普遍採用的方法係冷凍乾燥法（freeze-drying），其原理很簡單，首先將微生物冷凍，然後在減壓下利用昇華現象除去水分，因之，細胞生理活動停止，而得以在生活狀態下長期保存菌種，它的優點是體積小、便於輸送；但因食用菌絕大多數屬於擔子菌綱類，於純培養時極少產生孢子，而只靠菌絲生長發育的菌株不宜用冷凍乾燥法保存，所以，除了能形成節孢子或芽生孢子的個別種類外，一般是不適用保存孢子形成菌的冷凍乾燥法來保存，

另則在繼代培養保存過程中極易發生特性遺失、變異及有汚染之虞，因此，歷來均使用液體石蠟覆蓋法在室溫下保存，或利用液氮法進行長期保存食用菌種[1]。有關各保存法之優缺點及保存年限列於表二，而爲能確實瞭解低溫（−80°C）凍結保存與超低溫液氮貯存（cryo-preservation）兩種方法之適用性，並對照傳統繼代培養法，特選用24株食用眞菌（表三），分別測定其保存後之存活率及栽培活性，以證諸保存法之優劣，提供各界參考。

表二、各類菌種保存法之優缺點及保存年限

比較 / 方法	優點	缺點	年限
繼代培養保存法	操作便利	容易變異、汚染	室溫下1—6個月
	省工省錢	生理活性降低	+4°C 6—12個月
液體石蠟覆蓋法	防止汚染	遺傳穩定性差	數年至十年
	避免乾燥	佔空間	（至三十年）
懸液保存法	操作簡便	水分蒸發	2—5年
冷凍乾燥保存法	便於輸送	只適產孢菌株	4—40年
	穩定性高	黴菌絲存活率低	0
低溫凍結保存法	存活率高	某些菌敏感不適	4至5年以上
超低溫液氮貯存	存活率高	須注意凍害問題	10年以上
	保存期長	設備及耗費較昂	

表三、供試菌種之學名與俗名

學名	CCRC 編號	俗名
Agaricus bisporus	36001—36012	洋菇
Volvariella volvacea	36013—36015	草菇
Pleurotus cystidiosus	36017	鮑魚菇
Flammulina velutipes	36018	金針菇
Auricularia mesenterica	36019	黑木耳
Tremella fuciformis	36020	白木耳
Ganoderma lucidum	36021	靈芝
Poria cocos	36022 & 36023	茯苓
Lentinus edodos	36016 & 36024	香菇

（三）冷凍保存的原則與方法

由於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，一個理想的基因種源保存是應在代謝被不活化的狀態下，將活生的菌體控制維持其活性，亦即制止其細胞的分裂與停滯其生長[11]，此一目標於近二十年來已用超低溫保存發展成功，並

爲長期保存食用菌類的最好方法[9,10]，且已自1960年起爲美國菌種保存中心（ATCC）採行之[7]。

在諸多的冷凍劑中，例如液態空氣、氫、氦及氮中，目前一般採用低達 −196°C的液態氮或利用其低於 −150°C的氮氣體來超低溫保存菌體，咸認爲最安全且最符經濟效益[9,11]。而在液氮凍化過程中，應嚴防凍害的發生，主要問題有二：細胞內冰晶的形成、傷及胞膜與胞內溶質濃度增高、構成毒害的影響等，前述兩種問題主要的受害部位是在細胞膜上，乃由於在凍化時，水分的傳送均經過細胞膜，因此易在其上導致凍害[10]；所以，理論上在要凍存菌體時，應注意其最適的降溫速率以能保護其細胞免受凍害而影響存活率。目前用於保存眞菌採用二法，即控溫緩慢冷凍或快速降溫冷凍。控溫

表四、洋菜塊及小米粒菌源於低溫及液氮中保存後之存活比較[a]

CCRC 編號	低溫（−80°C）		液氮（−150～−196°C）	
	洋菜塊	小米粒	洋菜塊	小米粒
36001	3[b]	3	3	3
36002	3	3	3	3
36003	3	3	2	3
36004	3	3	3	3
36005	3	3	3	3
36006	3	3	2	3
36007	3	3	3	3
36008	3	3	3	3
36009	3	3	0	3
36010	3	3	3	3
36011	3	3	3	3
36012	2	3	2	3
36013	0	1	1	1
36014	2	3	0	3
36015	2	2	3	2
36016	3	3	3	3
36017	3	3	3	3
36018	3	3	3	3
36019	2	3	3	3
36020	3	1	3	0
36021	0	3	3	3
36022	3	3	1	1
36023	2	3	3	3
36024	3	3	3	3

a. 使用10%油當抗凍劑。
b. 每一處理三重複，保存七天後之存活數。

冷凍能使得細胞外溶液率先凍結，而細胞本身不凍結（胞外凍結），因此在擴散的原理下而導致細胞的逐漸脫水至胞外並結冰，那麼即可防止致死的胞內凍結現象發生；但若降溫步驟過於緩慢、拖延過久，則仍會因嚴重失水而形成胞內毒害的問題，然而降溫速率太快卻又使得細胞內結冰而傷及細胞、甚而致死[12,14]。一般來說，加抗凍劑就能防止胞外凍結所引起的損傷，而在緩慢冷凍速度於每分鐘100°C以下時，可以不必那麼擔心胞內凍結（1ml溶液裝於試管內直接接觸液態氮，其凍結速度也才每分鐘大約100°C）。前述現象對大部分的眞菌來說均不致構成問題，只是大體上說來，仍以經控溫緩慢冷凍保存菌體較能存活。

菌種經保存後，菌體的活化對大部分的眞菌而言，是以將保存管放在37至40°C的水浴中快速解凍1至2分鐘，比室溫下緩慢暖化會獲致較高的存活率[6]，乃因菌體解凍不够快而當溫度高過 −130°C時，存留在細胞內的水分子將再凍結，而此種冰晶將導致胞器與胞膜的破裂、終至死亡。食用菌於洋菜塊或小米粒生長的菌絲即須經由37°C快速解凍活化爲宜，而在小米粒上生長保存、其活存率較高（表四）。

爲能降低在凍結及解凍時所發生的傷害程度，採用適當的化學保護劑將能妥善保存菌體[9,14]，目前已有很多的化學化合物曾被單獨或混合使用爲冷凍保存菌種的抗凍劑，此些抗凍劑能控制冰晶的大小及形成速率，以能緩和溶質的濃度急速增高及增加胞膜的水滲透性，並降低細胞內容物的凝結點，以利冷凍時細胞脫水的進行。抗凍劑具有這些優點外，另外還須配合高水溶性及低毒性，其抗凍保護之效果才是最理想的。抗凍劑

表五、草性菇菌種於冷凍保存中，不同抗凍劑之保護效果[a]

CCRC 編號	低溫（−80°C）				液氮（−150～−196°C）			
	10%甘油	10%葡萄糖	10%蔗糖	無菌水	10%甘油	10%葡萄糖	10%蔗糖	無菌水
36001	3[b]	3	2	1	3	3	3	0
36002	3	3	3	0	3	3	3	0
36003	3	3	3	0	3	3	3	0
36004	3	0	3	1	3	3	3	2
36005	3	3	3	0	3	3	3	2
36006	3	3	3	1	3	2	3	1
36007	3	3	3	3	3	3	1	1
36008	3	3	3	0	3	3	3	0
36009	3	2	3	0	2	1	3	1
36010	3	3	3	0	3	3	3	3
36011	3	3	3	1	3	3	0	0
36012	2	3	3	0	3	2	1	3
36013	0	0	0	0	1	2	2	3
36014	2	1	0	0	0	0	1	0
36015	2	3	3	0	3	3	2	2

a. 使用小米粒菌源。
b. 每一處理三重複，保存三個月後之存活數。

表六、木屑菇菌種於冷凍保存中，不同抗凍劑之保護效果[a]

CCRC 編號	低溫（−80°C）				液氮（−150～−196°C）			
	10%甘油	10%葡萄糖	10%蔗糖	無菌水	10%甘油	10%葡萄糖	10%蔗糖	無菌水
36016	3[b]	3	3	0	3	3	3	2
36017	3	1	3	1	3	3	3	3
36018	3	3	3	3	3	3	3	3
36019	2	3	3	3	3	3	3	1
36020	3	3	3	2	3	3	3	3
36021	0	0	0	0	3	1	1	0
36022	3	3	3	0	1	3	1	0
36023	3	3	3	0	3	2	0	0
36024	3	3	3	3	3	3	3	1

a. 使用小米粒菌源。
b. 每一處理三重複，保存三個月後之存活數。

表七、冷凍保存與傳統繼代培養保存對菌種菇體形成前菌絲生長期日數長短的影響*

CCRC 編號	繼代保存（+4°C）	低溫保存（−80°C）	液氮保存（−196°C）
36001	36.5 b**	34.0 ab	33.0 [a]
36002	36.5 [a]	36.0 [a]	36.5 [a]
36003	34.0 [b]	31.0 [a]	31.0 [a]
36005	33.0 [a]	32.5 [a]	32.0 [a]
36007	31.5 [a]	31.0 [a]	32.0 [a]
36008	38.0 [b]	31.0 [a]	31.0 [a]

* 菌種保存三個月後，於民國77年2月12日下種，2月27日覆土。
** 每數值爲每一處理四重複之平均值。每列數值之比較係依據鄧肯氏（Duncan）測驗法（P=0.05）之顯著性測定。

表八、冷凍保存與傳統繼代培養保存對菌種菇產量之影響*

CCRC 編號	繼代保存（+4°C）	低溫保存（−80°C）	液氮保存（−196°C）
36001	280 b**	306 ab	348 [a]
36002	255 [a]	153 [a]	211 [a]
36003	389 [b]	509 [a]	440 ab
36005	308 ab	251 [b]	411 [a]
36007	391 [a]	363 [a]	430 [a]
36008	173 [b]	215 ab	293 [a]

*菌種保存三個月後，使用三公斤裝之堆肥栽培，每一處理四重複之平均公克數。
**每列數值之比較係依據鄧肯氏（Duncan）測驗法（P=0.05）之顯著性測定。

有兩大類型，一爲諸如甘油及 DMSO 等的浸入型劑，此等溶液能滲入細胞內，而得以在胞內及胞外同時發揮其保護性；二爲如糖類及PVP等非浸入型劑，效果亦不差，惟前者於目前最常使用及較具保護效果[9.10.11]。經由實際測試結果（表五、六），以－80°C低溫及超低溫液氮保存三個月後，發現其存活率平均在80%以上，但抗凍劑之效果則以甘油最佳，有較多的菌株能獲得存活。再經由栽培測試得知，用液氮保存之菌源的出菇日期較早（表七），且產量亦比－80°C及＋4°C保存者來得大（表八），足見液氮保存法之優異性。

（四）食用菌類之長期保存

菌種保存中心（CCRC）基於如上所述之各注意事項，目前採用低溫冷凍保存食用菌種之方法與步驟如下所述：

1. 首先測定菌株之理想培養基與生長溫度，並置入小米粒使其盤上菌絲佔據生長。
2. 挑小米粒菌種放入裝好0.8ml之10%甘油的2ml大小膠管（Vial）中。
3. 經由控溫冷凍器緩慢降溫至－90°C後，取出膠管即刻放入液氮槽中保存。
4. 保存後七天，取出一膠管放在37°C的水浴中振盪解凍1至2分鐘，待解凍後即移植至適當的培養基上培養，以測得其存活係數（凍後測試＝同天數生長菌落大小／原菌落大小）。

爲確保菌種保存之不致遺失及重複使用而失去其遺傳特性與發生變異，所有保存的菌種除了在菌種中心內儲放外，並在另一大樓內置放一液氮槽，儲放一組保存管當爲種源（Seed）庫。而液氮槽內液氮之安全量則由一部自動控制器二十四小時隨時調節，當液氮低於安全量時，液氮將自動充足，因而可確保菌種保存之安全無虞。

結　　論

食用菌（例如：蘑菇）之生長栽培受環境氣候之影響極大，也因之只是季節性的生產，但在已開發的工業先進國家，乃控制其生長環境條件使能在全年栽培生產，並獲致頗豐的利潤。而諸如此些菌株間的遺傳差異性大，因此一般環境下適於某菌株存活的條件就未必適於其他的菌株存活，導致將菌種保存以供全年隨時取用之可行性降低，也使工業的發展脚步遲緩下來。近來，許多的食用菌類已經分離及培養成功，大量的野生種也能人工栽培生產了，更有甚者，經由育種改良技術獲得高產質佳、均一性高，且適於某特定便利條件栽培的菌株等等，使得如何將這類珍貴的菌株妥善保存下來，使不發生變異並確保其優良的形性，已成形目前最重要的課題[1.10.11]。

基於如是所需，菌種保存及研究中心乃在新竹食品研究所成立，爲建立一套良好規劃之菌種保存系統而努力，其主要之工作目標，係收集、保存及供給教學、研究與工業上有用的栽培及野生食用菌之純培養菌種。而經由多月來之資料收集與研究探討得知：微生物的世代時期一般都很短促，在繼代過程中極容易發生變異、且易於污染，因此就有必要選擇能够長期穩定的保存方法。但由於微生物的種類不同，保存的難易即有不同，譬如：食用菌類即不宜採用冷凍乾燥保存法；然而冷凍保存法之用於多類菌種，其效果均不差，顯見其可行性之高。

將菌體保存在－139°C以下，使得沒有任何冰結晶的形成及緩慢其他的生理步驟，可獲得細胞極好的存活性[11]，而在超低溫下（－150°C至－196°C），所有細胞的代謝

活力將被抑止而不會有遺傳變異發生[9,10]，因此可確保其活性。而在保存時，取用眞菌最有效的甘油或DMSO浸入型抗凍劑[9,10]，獲得胞內外同時保護之效果，且經由控溫緩慢冷凍再加以保存，可避免凍害之問題發生，再於取用時，置於 37°C 水浴中，急速解凍下可獲致較高的存活率，然後經適當培養後即可取得最接近原來形性的菌體[11]。綜括可知，利用液氮法來保存食用菌類，可確保菌體的活性且操作上省時省力，並於長期保存下可保免於特性的遺失退化、基因的變異，及確保遺傳的穩定性，因此，被公認爲是目前最好及最安定之長期保存食用菌之方法[6,13,16]。

引用文獻

1. 江晃榮1985，微生物菌種保存法，華香園出版社。
2. 許文輝1984，發展菌株保存工作，科學發展月刊12 (10) 795—798。
3. 陳瑞青1986，臺灣地區菌類相調查之現況與展望，科學發展月刊14（7）：741—754。
4. Butterfield, W., S. C. Jong, M. T. Alexander. 1978. Polypropylene vials for preserving fungi in liquid nitrogen. Mycologia 70:1122—1124.
5. Daily, W. A. and C. E. Higgens. 1973. Preservation and storage of microorganisms in the gas phase of liquid nitrogen. Cryobiology 10 : 364—367.
6. Goos, R. D., E. E. Davis, and W. Butterfield. 1967. Effect of warming rates on the viability of frozen fungus spores. Mycologia 59 : 58—66.
7. Hwang, S. W. 1960. Effect of ultra-low temperature on the viability of selected fungus straius. Mycologia 52 : 527—529.
8. Hwang, S. W. 1966. Long-term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. Applied Microbiology 14 : 784—788.
9. Jong, S. C. 1978. Conservation of cultures. In S. T. Chang and W. A. Hayes (Eds.), The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms. Academic Press, London. pp. 119—135.
10. Jong, S. C. 1987. Germplasm preservation of edible fungi for mushroom cultivation. Mushroom Science 12 : 1—10.
11. 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 R. B. Beelman (Eds.) Cultivating Edible Fungi. Elsevier, Amsterdam. pp. 213—225.
12. Meryman. H. T. and R. J. Williams. 1985. Basic principles of freezing injury to plant cells; natural tolerance and approaches to cryopreservation. In. K. K. Kartha (Editor), Cryopreservation of Plant Cells and Organs. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 13—47.
13. Miller, M. W. and S. C. Jong. 1987. Cryopreservation of spawn cultures for mushroom industry. USFCC Newsletter 17(1) Suppl. 1 : 2—5.

14. Pegg, D. E. 1976. Long-term preservation of cells and tissues: a review. J. Clin. Pathol. 29 : 271—285.
15. R. J. Heckly. 1978. Preservation of Microorganisms. In Advances in applied microbiology V. 24 : 1—53.
16. Smith, D. and A. H. S. Onions. 1983. The preservation and maintenance of living fungi. Commonwealth Mycological Institute, England.

Summary

Almost edible fungi of *Agaricus spp.* and *Ganoderma spp.* which belonged to Basidiomycetes are mycelial growth without sporulating in culture medium. Mutation and loss of good genetic characteristics of cultivation are happened very often within time of subculturing preservation. Therefore, these cultures except that arthrospore-and blastospore-reproducing ones are not suitable for preservation with silica gel and freeze drying method. It is best to maintain them by mineral oil stored at room temperature or in liquid nitrogen. We have achieved in preserving 24 isolates mycelial spawn of edible fungi in 9 genera of Basidiomycetes through freezing at −80°C and cryogenic storage at liquid nitrogen temp. as low as −196°C. After 3 months storage, more than 80% of survivals could be obtained. The results showed that 10% glycerol was better than DMSO, dextrose, sucrose and distilled water as a cryoprotectant for reduction of freezing injury to get the highest recoverable vitality. It took shorter time for mycelial growth before fructification of cultures preserved in liquid nitrogen, and got more amount of cultivation than those maintained by subculturing and −80°C refrigeration method.