

細胞融合による納豆菌の新菌開発研究

食品発酵部 長谷川裕正 郡司 章
永井 孝司* 鈴木 英子
市川 重和 田谷 直後**

1. 緒 言

現在、納豆製造業各社は、原料大豆の選別、湯漬、蒸煮、発酵、熟成の各工程に、独自の技術を使用することで、他社との製品の差別化をはかっている。しかし、原料大豆のほとんどを輸入大豆に頼り、かつ、納豆菌も菌供給会社が3社のみである現状では限界がある。そこで、細胞融合により、2株の優良な納豆菌から、両者の良い性質をあわせもつ新菌を分離し、その菌を新しいタイプの納豆の製造に応用する目的で試験を行った。本報では、市販納豆菌（三浦菌，宮城野納豆製造所製）を用い栄養要求性変異株の分離法等を検討したので報告する。

2. 実験方法

2.1 供試菌株

現在、県内の納豆製造業で最も多く使われている納豆菌である三浦菌（*Bacillus natto*三浦，宮城野納豆製造所製）を用いた。

2.2 培地および試薬

納豆菌の生育培地として、肉汁 - ペプトン培地（乾燥ブイヨン：ニッスイ製），標準寒天培地（ニッスイ製）を用いた。最少培地としては Spizizen培地にビオチン $0.1 \mu\text{g/ml}$ を添加して用いた(表1)。また、最少培地に各種アミノ酸を $10 \mu\text{g/ml}$ ずつ添加し栄養要求性変異株選択培地をした。細胞壁再生用培地としてHCP培地¹⁾を用いた（表2）。細胞壁溶解酵素としてリゾチーム（和光純薬製）を用いた。40%PEG溶液は、40g のPEG 6000を2倍濃度のSMMに添加し100ml定容し調製した。

表1 納豆菌最少培地

(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
4K ₂ HPO ₄	14 g
KH ₂ PO ₄	6 g
クエン酸ナトリウム・2H ₂ O	1 g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.2g
ブドウ糖	5 g
ビオチン	100 μg
蒸留水	1000ml
(寒 天)	20 g

表2 HCP寒天培地

カザノミ酸	5 g
K ₂ HPO ₄	3.5 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
0.5M Na Succinate (pH7.3)	
20mM MgCl ₂	
ブドウ糖	5 g
トリプトファン	0.1 g
ポリビニルピロリドン	30 g
ビオチン	100 μg
寒 天	8
蒸留水	1000ml

SMMおよびSMMPは下記のように調製した。

SMM	
庶 糖	0.5M
マレイン酸	0.02M
MgCl ₂	0.02M
pH	6.5

SMMP	
庶 糖	0.5M
マレイン酸	0.02M
MgCl ₂	0.02M
ペナセイ肉汁	2倍濃度
pH	6.5

2.3 栄養要求性変異株分離法¹⁾

栄養要求性変異は図1のように紫外縮照射により分離した。供試菌を肉汁 - ペプトン培地で前培養した後、新鮮な肉汁 - ペプトン培地に接種し、濁度を測定しつつ、37℃で振盪培養を行った。対数増殖期後期まで培養した後、集菌し、菌体を滅菌水で2度洗浄し、滅菌水に懸濁した。これをマグネチックスターラーで攪拌しつつ15W殺菌灯を用いて無菌室内で紫外線照射を行った後、標準寒天平板へ塗布し、37℃で一夜培養した。生成したコロニーをレプリカ法にて最少培地と選択培地に接種し37℃で培養後、最少培地に見られず、選択培地にのみ生成したコロニーを栄養要求性変異株とした。

2.4 プロトプラスト化²⁾

プロトプラスト化は図2のように行った。供試菌株を変異株分離と同様にして対数増殖期後期まで培養した後、集菌し、SMMPで2度洗浄後、SMMPに懸濁し、リゾチームを2 mg/ml 添加し 37℃で保持し、顕微鏡で観察しつつプロトプラスト化した。約1時間でほぼプロトプラスト完了後、リゾチームを除くためSMMPで洗浄し、再びSMMPに懸濁し、プロトプラスト懸濁液とした。

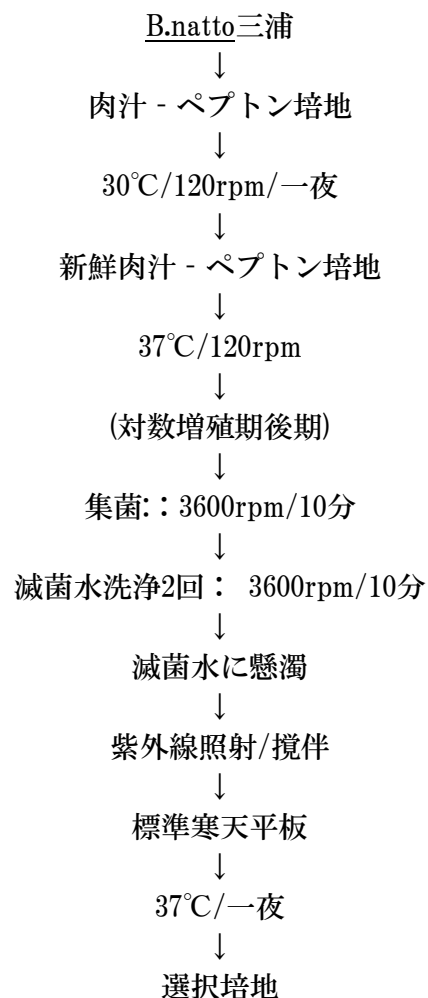


図1 栄養要求性変異株分離法



図2 プロトプラスト化法

2.5 融合³⁾

分離した栄養要求性変異株のうちM-1(Met-)株, T-119(Trp-)株の2株について, プロトプラスト懸濁液を調製した。これを図3のようにして融合を行った。まず, 2株のプロトプラスト懸濁液を等量混合, 集菌しSMMPに懸濁した後, 40%PEG溶液を添加し融合させた後, SMMPを添加集菌してPEGを除き, SMMPに再び懸濁して再生培地のHCP寒天培地に塗布し37°Cで培養した。平板上に形成したコロニーを最少培地に接種し, コロニーを形成したものを融合株とした。

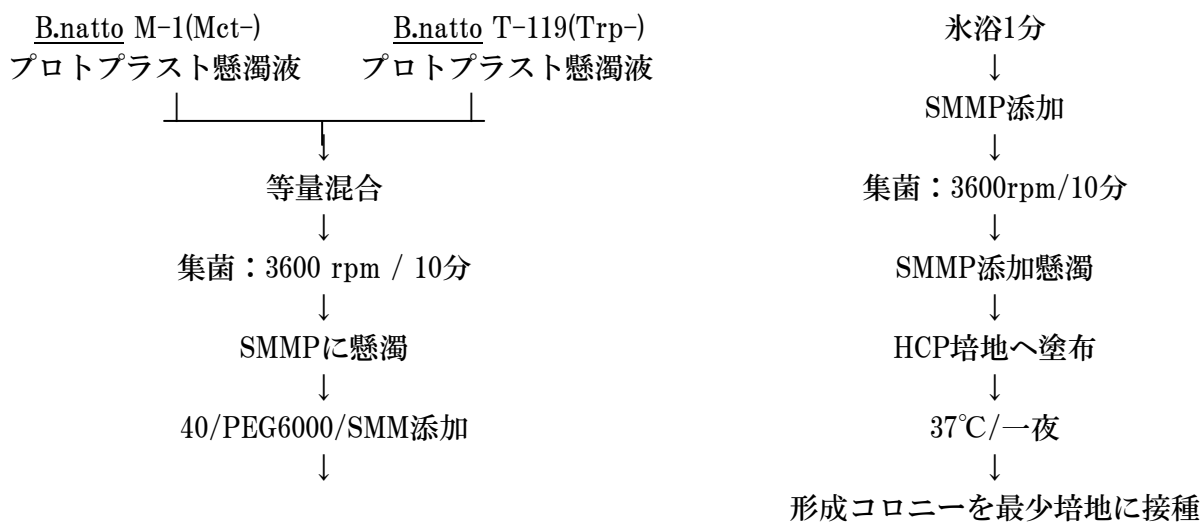


図3 細胞融合法

3. 実験結果及び考察

3.1 栄養要求性変異株の分離

UV照射は15W紫外線殺菌灯を菌懸濁液上30cmに点灯して行った。照射時間と納豆菌の生存率の関係は図4のようになったため、生存率が0.1%程度になる 3~5分が照射時間として適当と考えられた。しかし、変異株の分離にあたっては、これより長時間の照射も試みた。その結果、トリプトファン要求性、メチオニン要求性株、アルギン要求性株、フェニルアラニン要求性株等が多数分離できたが、その中でもトリプトファン要求性株の割合が多かった。市販納豆菌については、比較的容易に変異株が得られたが、今後、野生株を使用する場合には照射条件を再検討する必要があると思われる。

3.2 プロトプラスト化

プロトプラスト化は図2 に従って行ったが、プロトプラスト化率を見るため、反応液を経時的にSMMPで希釈しそれぞれ肉汁・ペプトン平板とHCP平板に塗布し 37℃で培養したところ図5のような結果にたった。プロトプラスト化は反応時間1時間ではば 100%になっており、顕微鏡により観察される反応液の状態と一致していた。

しかし、野生株数株について試みたところ、リゾチームが 2mg/mlと過剰量であるにもかかわらずプロトプラスト化が進まないものもあり今後、野生株については条件を十分検討する必要がある。

3.3 融合

アミノ酸要求性変異株として分離した B.nattoM-1(Met-) と B.nattoT-119(Trp-) について図3のような方法で融合を試みHCP培地上に形成したコロニー1,100個について最少培地に接種したところ、2株が最少培地上でコロニーを形成したため、これを融合株として分離した。この2株は培地上で粘質物を形成しており、粘質的形成能は失活していなかった。

市販納豆菌を用いた本試験では融合株が分離できたが、今後野生納豆菌を親株として用いる場合には各ステップの条件の再検討が必要である。

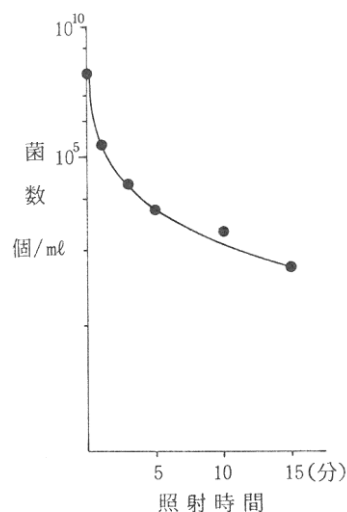


図4 紫外線照射時間と生存率

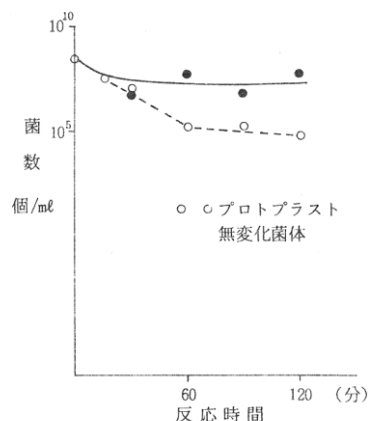


図5 リゾチーム処理時間とプロトプラスト化率

4. 結 言

市販納豆菌(三浦菌)を用いて栄養要求性変異分離等の試験結果を得た。

- 1) 紫外縮照射によりアミノ酸要求性変異株の分離を試み、トリプトファン要求性株など多数を分離した。
- 2) 市販納豆菌からの変異株の場合、リゾチーム処理1時間でプロトプラスト化は完了したが、野生株の場合には条件を再検討する必要がある。
- 3) B.nattoM-1(Met-) と B.nattoT-119(Trp-) を親株として融合を試み、融合株2株を分離した。2株とも粘質物生成能は失活していなかった。

参考文献

- 1) 蛋白質核酸酵素編集部編：細菌・ファージ遺伝実験法，共立出版，P12(1972)
- 2) 石川 辰夫：微生物遺伝学実験法，共立出版，P114(1982)
- 3) 石川 辰夫：遺伝子組換え実用化技術，サイエンスフォーラム，2，P133