

細胞融合による新菌の開発手法（第 2 報）

- 野生納豆菌の分離法及び簡易同定法の開発 -

食品発酵部 長谷川裕正 市川 重和
佐藤 有紀*

1. 緒 言

現在、納豆製造業者は納豆菌製造メーカー 3 社から納豆菌を購入しているため、他社との製品の差別化が困難になってきている。そこで、自然界からの優良納豆菌の分離とその菌を細胞融合の親株として新しい納豆菌を開発するため野生納豆菌の分離法と簡易同定法を考案した。

2. 方 法

1) 自然界からの納豆菌の分離方法

納豆菌の特徴である耐熱性孢子、粘質物形成能及び大豆上での粘質物生成を利用した二段階の分離方法を考えた。まず、分離源として枯草、土壌などを採集し滅菌生理食塩水に浸しときどき攪拌しつつ室温で 4 時間放置した後、耐熱性孢子のみを残すため軽く煮沸し適量を肉汁寒天培地に塗布した。

これを、37℃、一夜培養した後、釣菌

し粘質物生産能判定培地に接種した。

接種後 37℃、12 時間培養し粘質物生成

の有無を判定した。12 時間の培養時間

は納豆製造において粘質物形成に要す

る時間を参考にし決定した。粘質物生

産能判定培地の組成は表 1 のとおりで

ある。組成は菌が粘質物を培地上で流

れ出さない程度生成るようにグルタミ

ン酸ナトリウム、フィトン、蔗糖等の

量を調整した。粘質物生産能判定培地

上で粘質物を生成した菌を釣菌した。

この菌を肉汁寒天培地を用いて純化、

納豆原料大豆を試験管に入れオートクレーブで滅菌した後純化した分離菌を接種し 37℃、18 時間発酵させて煮豆上で糸引きが認められたものを分離菌として斜面培地に保存した。

表 1 粘質物生産能判定培地組成

蔗 糖	0.2 %
モノグルタミン酸ナトリウム	1.5 %
フィトン	1.5 %
KH ₂ PO ₄	0.27 %
Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O	0.42 %
NaCl	0.05 %
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.05 %
ビオチン	0.1μg/ml
寒 天	2.0 %

* pH 6.8 に調整

* 直径 9 cm のシャーレに 10 ml ずつ分注

* (株)タカノフーズ

2) 納豆菌の簡易同定法

納豆菌は Bergey ' s manual¹⁾では枯草菌に含まれているため、粘質物を生成する枯草菌と考え枯草菌の同定に関する文献¹⁾²⁾³⁾⁴⁾を参考にし、有効と思える同定試験項目を絞り、実際に市販の納豆菌で同定試験を試み、その結果を踏まえ、簡易同定法となるような試験項目を選定した。まず、大部分の *Bacillus* 属が陽性を示すカタラーゼ反応を行い、陽性を示した菌のみを *Bacillus* 属として次の試験にかけた。*Bacillus* 属には食中毒の原因菌である *Bacillus cereus* が含まれるのでこれを除くためレシチナーゼ反応を行い、陰性のもののみセレウス菌ではないとし、より詳しい枯草菌同定試験に供した。第一段階の試験項目としては V - P 反応、硝酸塩還元反応、デンプンの分解、ゼラチンの分解の4項目について試験し各項目の反応結果によって表2のように判定した。この段階で枯菌及び枯草菌の可能性ありと判定された菌について第二段階としてクエン酸の利用、プロピオン酸の利用、チロシンの分解の3項目について試験し第一段階と同様に表3のように判定した。

ここまでの試験にパスした菌を枯草菌と同定し、納豆を試作し官能評価により納豆菌として使用可能な菌を保存した。

表2 同定試験第一段階判定基準

試験項目	結 果											
	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
V-P反応	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
硝酸塩還元	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
デンプン分解	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
ゼラチン分解	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
判 定	枯草菌と判定		枯草菌の可能性ありと判定						枯草菌ではないと判定			

表3 同定試験第二段階判定基準

試験項目	第一段階で枯草菌とされた株の結果								第一段階で枯草菌の可能性ありと判定された株の結果	
	+	+	-	-	-	-	+	+	+	右以外の結果
クエン酸の利用	+	+	-	-	-	-	+	+	+	右以外の結果
プロピオン酸の利用	-	-	-	-	+	+	+	+	-	
チロシンの分解	-	+	-	+	-	+	+	-	-	
判 定	枯草菌と判定	枯草菌可能性あり	枯草菌ではないと判定						枯草菌の可能性あり	枯草菌ではないと判定

3. 試験結果

自然界からの納豆菌分離方法として図1のような手順を決定し、菌の粘質物測定用として表1のような組成の粘質物生産能測定培地を作った。

簡易同定法として枯草菌同定試験8項目と食中毒菌であるセレウス菌同定試験1項目からなる図2のような方法を決めた。

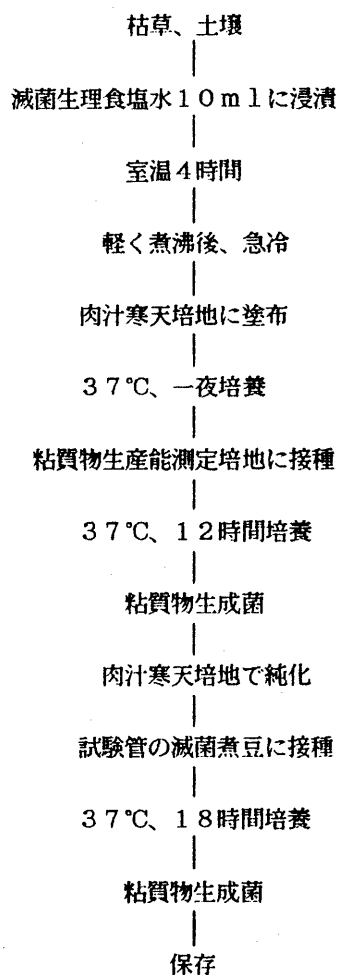


図1 自然界からの納豆菌分離法

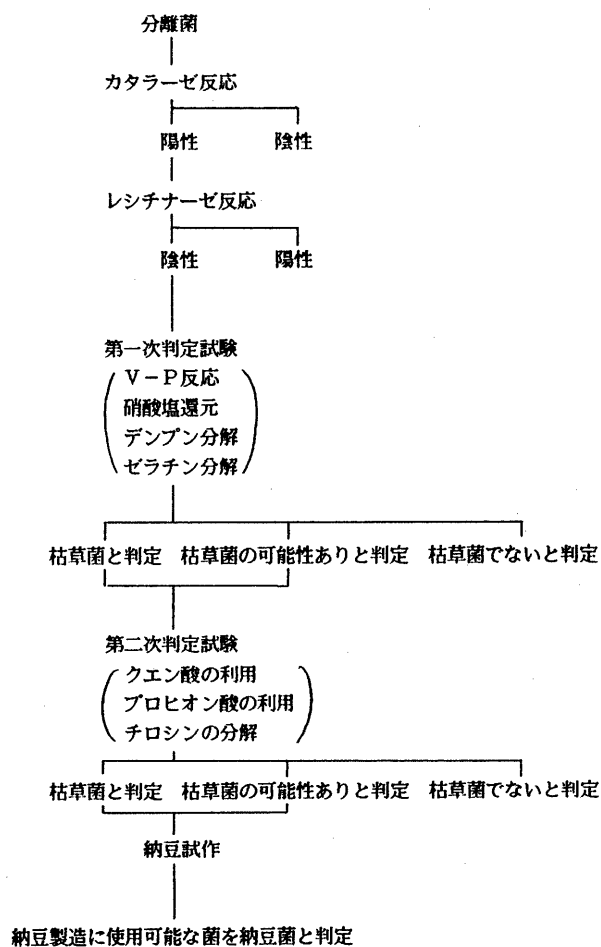


図2 納豆菌簡易同定法

この分離方法により土壌や枯草 16 検体から 225 株を分離し，そのうち 128 株について同定試験をした結果，納豆菌と考えられる菌 102 株を得た。今後，さらに多くの検体について調査し，自然界より新しい納豆菌を見いだすとともに，細胞融合等により改良を加えていく必要がある。

4. 結 言

自然界から新しい納豆菌を分離するために納豆菌が耐熱性孢子，粘質物を形成し，分類上枯草菌に入ることを利用して

上壤，枯草等からの菌の分離法，及び 分離菌を納豆菌と同定するための簡易同定法を作った。

参考文献

- 1) SNEATH, P. H. A. , MAIR, N. S. , SHARPE, M. E. and HOLT, J. G. edited : Bergey ' s Manual of Systmatic Bscteriology , Volume 2 (Williams and Wilkins) , p. 1105 (1986)
- 2) 長谷川武治 編：微生物の分離と同定（学会出版センター） , P203 , (1981)
- 3) 東 良三：ニュー・フード・インダストリー , 4 (9) , 67 (1962)
- 4) 東 良三：ニュー・フード・インダストリー , 4 (10) , 61 (1962)