

Current situation in National Food Research Institute microorganism bank and consideration of energy conservation method and data management method for microorganism preservation.

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-12-20 キーワード (Ja): キーワード (En): microorganism bank, energy-saving management 作成者: 岩橋, 由美子, 鈴木, 忠宏, 北村, 義明 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002973

技術報告

食品総合研究所微生物バンクの現状と菌株の省エネルギー保存方法
およびデータ管理方法の検討

岩橋 由美子*, 鈴木 忠宏, 北村 義明

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

**Current situation in National Food Research Institute microorganism bank
and consideration of energy conservation method
and data management method for microorganism preservation.**

Yumiko Iwahashi*, Tadahiro Suzuki and Yoshiaki Kitamura

National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, JAPAN

Abstract

We have described that the current situation and the past distribution situation of collected strains that are stored in the National Food Research Institute microorganism bank. We are exploring a more energy-saving management methods of strains that are currently stored.

Keywords: microorganism bank, energy-saving management

緒言

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所微生物バンク（食研微生物バンク）は1983年以降当所研究員が用いて来た菌株を、当該研究員が当所を離れた後も研究財産として有用に使えるよう、長期間保存することを目的として設立

された。当初から食研微生物バンクは微生物バンク委員会により運営され、各委員は所長が任命することになっていた。設立当初の構成は委員長、細菌委員、乳酸菌委員、酵母委員、糸状菌委員、放線菌委員、耐塩菌委員となっていた。保存菌株は好気性細菌類、乳酸菌類、酵母類、糸状菌類、放線菌類、耐塩菌類であり、受け入れる菌株は第二次スクリーニングを通ったもので、純粋培養したもの、その他微

* 連絡先 (Corresponding author), yumiko@affrc.go.jp

生物バンク委員会で認めたものである。受け入れの際、寄託者によって菌株名や菌株番号、培養法など、その菌株に関しての詳細な情報を記入した菌株カードが作成され、現在まで微生物バンク委員会が保管している。微生物バンク委員会は受け入れた菌株について、極力その保存、維持に努めなければならないとしているが、不測の事故や雑菌の混入、死滅等についてはその限りではないとしている。また微生物バンク委員会規則は2006年に変更されており、委員会の構成として7名以内に変更されている。また寄託された菌株は随時希望者に分譲しているが、その分譲範囲は国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所の職員及び共同研究で所内使用のみに限定している。本報告では食研微生物バンクの寄託・分譲の現状について報告する。また2011年の東日本大震災を機にエネルギー節減および人件費の削減が急務となったことから、菌株の省エネルギー保存方法の検討および菌株情報の電子化による利用しやすいデータベースの構築を行った。

実験方法

1. 植え継ぎ方法

培地については、細菌類は栄養寒天培地、乳酸菌類はブリックス寒天培地、酵母類はYM寒天培地、糸状菌類はポテトデキストロース培地、放線菌類はISP-II培地、耐塩性菌類は8%食塩含有ブリックス寒天培地とした(すべてDIFCO)。菌株の植え継ぎは斜面培地又は穿刺とし、培養は原則として30℃数日間、雑菌の混入の有無は肉眼で判定のうえ、当初は原則として4℃で保存していた。植え継ぎ期間は菌株の性質にあわせて3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月としたが、乳酸菌類は2ヶ月とした。これらと同時に寄託された全ての菌株について流動パラフィン(Wako)を重層した斜面培地を作成し、13℃の部屋で保存した。変異又は生育が弱い菌は再度植えることとした。新規受け入れ菌株は継代培養と流動パラフィン重層で1年間様子を見て流動パラフィン重層した菌株が1年後生存していれば流動パラフィン重層保存のみに移行してもよいこととした。糸状菌類以外は上記液体培地で培養後、等量(v/v)のグリセロールを添加し-80℃で保存した。糸状菌類については別途平板培地で増殖させた菌体の一部を寒天ごと50%グリセロール液水溶液(v/v)中に投じて-80℃にて保存した。-80℃保存植え継ぎは10年とした。

2. 菌株情報の管理方法

菌株受け入れに際し、寄託者は菌株カードを作成することとした。菌株カードには、菌株名、菌株番号、寄託年月日、寄託者氏名、その他培養方法や保管方法などの詳細なデータを記載することとした。菌株カードは微生物バンク委員会が保管した。

3. 菌株情報の電子化

菌株カードに記載されている情報の電子化は、FileMaker Pro Advanced(ファイルメーカー株式会社)を用いてデータベースを構築した。FileMakerのランタイムアプリケーションを作成することで当該ソフトを有していなくても菌株情報の閲覧を可能とした。さらに利用しやすいように、収集した文献への直接リンクや糸状菌類の寒天平板培地上での画像を収録した。

4. 菌株の省エネルギー保存方法の検討

13℃専用保存室を停止することを目的として、保存している流動パラフィン入りのスラントや穿刺培養されていたものの廃棄を検討した。流動パラフィン入りの保存菌株の大半は同時に-80℃にも保存されているため、-80℃保存菌株を一度復元し、生存の確認を行った。また-80℃に保存されている糸状菌類のうち、NFRI 1281株について平板寒天培地での培養を行い、孢子・菌糸の形状の比較や色素産生について目視で観察した。

結果と考察

1. 現在の寄託菌株の分布

現在食研微生物バンク委員会が管理している菌株は、2015年11月時点で酵母類が758株、糸状菌類が492株、乳酸菌類が169株、細菌類が1,061株、放線菌類が47株、総数2,527株である。

酵母類の内訳は22属であり、その約63%が*Saccharomyces*属である。糸状菌類の内訳は41属であり、*Aspergillus*属と*Penicillium*属だけで糸状菌類全体の約70%を占める。乳酸菌類は6属でありそのうち*Lactobacillus*属が約64%である。図1にその属の構成割合を円グラフで示した。また図には示していないが、放線菌類は4属であるが、そのほとんどは*Streptomyces*属(44株)、他の3属はそれぞれ1株ずつであり、同様に細菌類に関しても、そのほとんどが*Bacillus*属(941株、88.6%)であった。

2. 現在までに分譲した菌株数

今までに、分譲した菌株数は表1の通りである。これまでに、酵母類はのべ1,793株、糸状菌類はのべ997株、乳酸菌類がのべ679株、細菌類がのべ1,071株、放線菌類がのべ74株、総数のべ4,614株を分譲した。

3. 省エネルギーに寄与する保存方法の検討

凍結保存が困難な一部の糸状菌類について、 -80°C 保存がどのように影響するかを確認した。図2に *Fusarium graminearum* NFRI 1281株について2002年に斜面培地に植え継ぎをした後そのまま 4°C 保存していたもの(図2, 1-A), 寒天を一部はぎ取り50% (v/v) グリセロール液中で -80°C にて保存していたものから2015年8月に斜面平板培地へ植菌(図2, 1-B), 生育後に両者をポテトデキストロース寒天平板培地に植菌, 培養したコロニーを示した(図2, 2-A, B)。保存方法の異なる2種の株では, 色素産生に目視で若干の変化が見られた。この結果は, 糸状菌類については -80°C での長期生存は可能であるが物質産生能等の維持に関しては -80°C 保存のみとするにはまだ検討が不十分であることを示している。13年前に植え継ぎをして 4°C に保存してあった斜面培地保存菌株での生存

は確認出来ており, この結果より現在保管している斜面培養菌株を全て廃棄することは不適切と考え, 最古のものを含め今後も最小本数を維持していく予定である。1985年からスタートした農林水産省ジーンバンク事業のセンターバンクとなっている農業生物資源ジーンバンクでは保有菌株は凍結乾燥法(細菌類・放線菌類・酵母類など), 凍結保存法(糸状菌類など)などで保存されているが, 凍結保存が難しいものについては, 継代培養により維持している。当食研微生物バンクでも今後, 酵母類, 乳酸菌類, 放線菌類及び糸状菌類の胞子については凍結乾燥保存への移行を検討してさらなる冷凍庫の削減を行い, より省力保存を進めていく予定である。

また, 雑菌の混入が疑われる場合, 例えば過去に特許を取得しているような有用な菌株については, 分譲に当たってrRNAの部分構造の比較などの方法を用いて正しい菌株であるか, 精査する必要がある。

4. 菌株カードの電子化及びデータベースの構築と配布

寄託された菌株の一つ一つはその詳細がカードに記載されていたが, 膨大な量であるために必要な時に容易に取り出して閲覧することが難しく, 研究員の利用

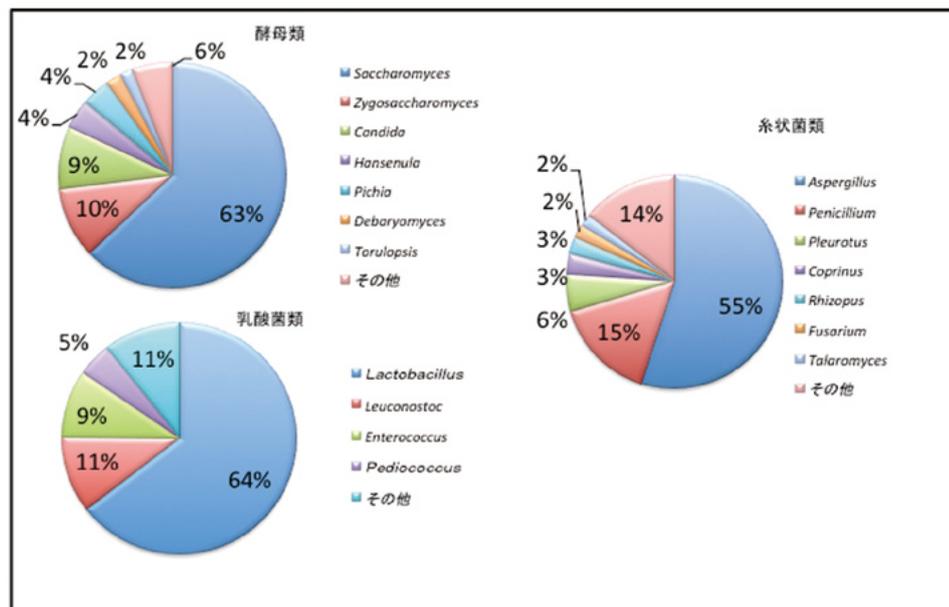


図1. 食品総合研究所微生物バンク寄託菌株の分布

食品総合研究所微生物バンクに寄託されている菌株のうち, 酵母類, 糸状菌類, 乳酸菌類について, それぞれの属の構成割合を円グラフで示した。

表 1. 保存菌株の分譲実績

年度	分譲総数	糸状菌類	酵母類	細菌類	放線菌類	乳酸菌類	申請件数
1983 (昭和58) 年度	47	10	37	0	0	0	5
1984 (昭和59) 年度	43	11	29	3	0	0	7
1985 (昭和60) 年度	76	22	40	14	0	0	13
1986 (昭和61) 年度	386	17	367	2	0	0	18
1987 (昭和62) 年度	76	13	3	51	10	0	10
1988 (昭和63) 年度	190	63	99	23	2	3	14
1989 (昭和64/平成元) 年度	110	28	23	58	1	3	15
1990 (平成2) 年度	350	84	230	32	1	0	22
1991 (平成3) 年度	198	78	30	35	52	3	20
1992 (平成4) 年度	55	21	27	7	0	0	15
1993 (平成5) 年度	49	21	21	6	0	1	14
1994 (平成6) 年度	59	24	27	5	0	3	11
1995 (平成7) 年度	107	54	23	18	2	10	17
1996 (平成8) 年度	59	35	6	4	1	13	12
1997 (平成9) 年度	61	23	22	10	0	6	15
1998 (平成10) 年度	154	103	10	36	0	5	12
1999 (平成11) 年度	99	33	16	50	0	0	15
2000 (平成12) 年度	58	3	19	11	0	25	11
2001 (平成13) 年度	241	13	8	119	1	100	22
2002 (平成14) 年度	193	7	15	14	0	157	18
2003 (平成15) 年度	249	3	7	129	0	110	14
2004 (平成16) 年度	108	24	11	57	0	16	20
2005 (平成17) 年度	289	57	31	179	0	22	23
2006 (平成18) 年度	116	38	12	17	2	47	16
2007 (平成19) 年度	671	1	654	3	0	13	11
2008 (平成20) 年度	111	29	1	11	2	68	14
2009 (平成21) 年度	182	3	11	148	0	20	12
2010 (平成22) 年度	61	47	8	0	0	6	5
2011 (平成23) 年度	74	24	2	7	0	41	7
2012 (平成24) 年度	22	0	0	22	0	0	2
2013 (平成25) 年度	12	12	0	0	0	0	3
2014 (平成26) 年度	96	89	0	0	0	7	6
2015 (平成27) 年度	11	7	4	0	0	0	2

に不便であった。さらに経年による紙の劣化に伴い、文字が不鮮明・欠落する事象が頻発していた。そのため、カードに記載されていた内容はすべてデータベースプログラムである FileMaker Pro Advanced に登録してデータベース化（管理用データベース）した。さらに搭載されているランタイムアプリケーションを用いて、当該ソフトを保有しておらずとも検索・閲覧出来るランタイム版としてDVDに収録することで所内への配布も可能となった。上述の糸状菌類の平板培養画像も収録・参照出来るようにし、分譲を受けた菌株と比較する事が出来るようにした。また、寄託された菌株を用いて行った研究に関する文献は、可能な限りそ

の全文をネットから直接参照出来るようにリンクを作成し、データベースの利便性を高めた。食研微生物バンクから分譲された菌株を使用した発表文献等は本稿の最後に収集文献として示した。新たに寄託された菌株については直接データベースに収録しているためカードを作成していない。過去にノート等に手書きで記載されたままになっている菌株の保存場所一覧、植え継ぎ情報などを今後順次追加して管理用データベースを充実させていきたい。ただ過去にどのような植え継ぎをなされているかの記録が欠落しているものがあり、現在する実際の菌株に直接記載されている情報をたどるしか方法のない菌株もある。今後も継続して

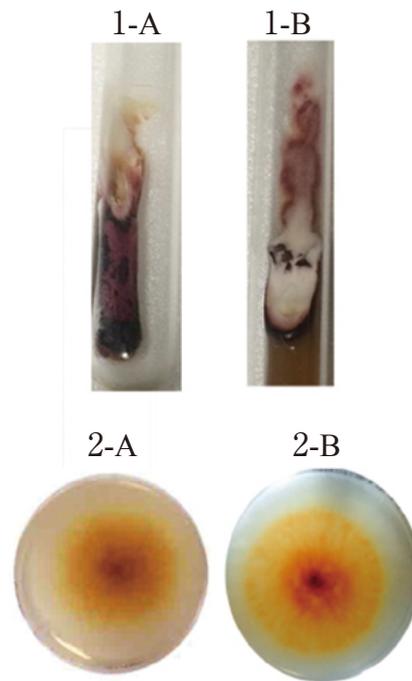


図2. 保存方法の違いによる色素生産の変化.

- 1-A : 2002年に植え継ぎをし, その後4℃保存していた斜面寒天培地
 1-B : 50% (v/v) グリセロール溶液中で-80℃保存していた株から2015年に斜面寒天培地に移植した株
 2-A : 1-Aから平板寒天培地への移植し, 25℃で3日培養したコロニー
 2-B : 1-Bから平板寒天培地への移植し, 25℃で3日培養したコロニー

データベースを充実させてより使いやすい形にすることにより, 食研微生物バンクの利用の促進を図り, 微生物研究の一層の発展を目指す。

食研微生物バンクに寄託されている菌株は各種物質産生菌や耐冷凍性, 耐糖性酵母類, 様々な分離源から分離された乳酸菌類などである。古いものは50年以上前に分離された菌株もあり, 当初の分析方法では測れない能力を秘めている可能性がある。食研微生物バンクに寄託されている菌株は, 現在食品総合研究所内の研究員にのみ分譲が許可されているが, 共同研究であれば所外からの使用が可能である菌株が存在する。食研微生物バンクに寄託されている菌株を使用した共同研究は当所研究員や共同研究の窓口である産学連携チーム, あるいは微生物バンク委員長等に是非お声をかけていただきたい。微生物の分離・同定に関わる研究者がすくなくなりつつある中, 省エネルギーに寄与しつつも先人の不朽の研究成果・財産の有効利用を図るとともに, 今後も有用菌株の収集に努めてまいりた

い。

要約

食研微生物バンクに寄託された菌株の内訳及び分譲数を記載した。また省エネルギーに寄与するため糸状菌類の凍結保存の可能性を検討した。さらに, 紙ベースで保存されていた寄託菌株の詳細(来歴, 培養条件, 参考文献等)をデータベース化し, ランタイムアプリケーションを用いて, 当該ソフトを保有しておらずとも検索・閲覧出来るDVDを作成することで所員への配布を可能とした。

参考文献

- 1) 伊藤寛, 海老根英雄, 小坂正吉, 市販醸造用乳酸菌類の性状, 食糧研究所研究報告, 18, 28-35 (1964)。

- 2) 木内幹, 太田輝夫, 藤家宏子, 海老根秀雄, 大豆炭水化物の酵素的分解に関する研究:(第1報) *Bacillus subtilis* No.17のヘミセルラーゼの精製と性質, 日本食品工業学会誌, **19**, 585-590 (1972).
- 3) 木内幹, 太田輝夫, 加藤なを, 海老根秀雄, 大豆炭水化物の酵素的分解に関する研究:(第2報) *Bacillus pumilus* No.24のヘミセルラーゼの精製と性質, 日本食品工業学会誌, **20**, 239-243 (1973).
- 4) 木内幹, 鈴木紀, 太田輝夫, 伊藤恵美子, 海老根秀, 遊離脂肪酸を資化する耐塩性味噌酵母類の分離, 日本食品工業学会誌, **25**, 508-514 (1978).
- 5) 矢口長彦, 杉本貞三, 佐藤静夫, 鶴田理, 輸入飼料用稲わらの汚染菌, マイコトキシン, **14**, 21-23 (1982).
- 6) Yanagimoto, M. and Enatsu, T., Regulation of a blue pigment production by γ -nonalactone in *Streptomyces* sp., *J. Ferment. Technol.*, **61**, 545-550 (1983).
- 7) Karki, T., Ito H., Nikkuni, S., Ohono, M., and Ebine, H., Microorganisms associated with various pickles, 食品総合研究所研究報告, **43**, 40-53 (1983).
- 8) 春見隆文, 久保直哉, 若生勝雄, 小田恒朗, 特許「醗酵によるポリオール類の製造」昭59-153208, 59.7.25 (公開No. 昭61-31018).
- 9) Tokuoka, K., Ishitani, T., Goto, S., and Kamagata, K., Identificatin of yeasts isolated from high-sugar foods, *J. General Appl. Microbiol.*, **31**, 411-427 (1985).
- 10) Itoh, H., Hadioetomo, R.S., Nikkuni, S. and Okada, N., Studies on lactic acid bacteria in fish sauces (Part 2): Identification of salt-tolerance and acid-producing bacteria from fish sauces, 食品総合研究所研究報告, **47**, 31-40 (1985).
- 11) Hino, A. Takano.,H., and Tanaka, Y., New freeze-tolerant yeast for frozen dough preparations, *Cereal Chem.*, **64**, 269-275 (1987).
- 12) 木内幹, 市販納豆菌の分離と同定, 食品総合研究所報告, **50**, 18-21 (1987).
- 13) Yanagimoto, M., Matsumoto, K. and Mori, K., IM2, a new inducer of blue pigment production in *Streptomyces* sp. MAFF 10-06015, *J. Ferment. Technol.*, **66**, 1-6 (1988).
- 14) Suzuki, C., Yamada, K., Okada, N. and Nikkuni, S., Isolation and characterization of halotolerant killer yeasts from fermented foods, *Agricul. Biol. Chem.*, **53**, 2593-2597 (1989).
- 15) Yanagimoto, M., Tanaka, Y., Mori, K., Regulation of Blue Pigment Production in Two Cycloserine Producers of Actinomycetes, Trends in Actinomycetes in Japan (edited by Y.Koyama) Society for Actinomycetes, 57-59 (1989).
- 16) 進藤昌, 中村以正, 中原忠篤, 木内幹, かが付きバイオリクターの製作と乳酸の連続生産, 発酵工学雑誌, **67**, 525-529 (1989).
- 17) 昭和63年度微生物遺伝資源探索収集調査報告書(農業生物資源研究所), P.59-71 (1990).
- 18) 木内幹, 鷹見勲, 進藤昌, 山本和也, 森江京子, スイートソルガムサイレージ用スターターの開発, 食品総合研究所研究報告, **54**, 44-52 (1990).
- 19) 進藤昌, 中村以正, 中原忠篤, 木内幹, スイートソルガム搾汁液を用いたL(+)乳酸の生産, 日本食品工業学会誌, **37**, 98-103 (1990).
- 20) 木内幹, 森江京子, スイートソルガムサイレージの乳酸菌類スターターの製造, 食品総合研究所研究報告, **55**, 19-23 (1991).
- 21) 木内幹, 森江京子, スイートソルガムサイレージの酵母類スターターの製造, 食品総合研究所研究報告, **55**, 24-30 (1991).
- 22) Sugiyama, J., Tokuoka, K., Suh, S.-O., Hirata, A. and Komagata, K., *Sympodiomyces*: a new yeast-like anamorph genus with basidiomycetous nature from orchid nectar, *Antonie van Leeuwenhoek*, **59**, 95-108 (1991).
- 23) 舟根和美, 大家せつ子, 柳本正勝, *Streptomyces virginiae* MAFF10-06014 株の二次代謝産物生産誘導因子「IMファクター」非生産変異株の分離とその性質, 食品総合研究所研究報告, **55**, 37-44 (1991).
- 24) Kitamoto, H.K., Ohmomo, S, Nakahara, T., Selection of killer yeasts (*Kluyveromyces lactis*) to prevent aerobic deterioration in silage making, *J. Dairy Sci.*, **76**, 803-811 (1993).
- 25) 新国佐幸, 石山朋治, 鈴木チセ, 鈴木忠直, 小坂直治, 森勝美, ヘテロ乳酸菌類 *Lactobacillus fructivorans* に起因する加工味噌の膨れ, 日本食品工業学会誌, **43**, 910-916 (1996).
- 26) 森勝美, 山田知枝, 中島博文, 島純, 北海道における発酵食品微生物の収集, 微生物遺伝資源探索収集調査報告書, **10**, 1-5 (1998).

- 27) 永井利郎, 伊藤義文, 納豆菌の一般形質導入ファージ *Bacillus subtilis* (natto) phage ϕ BN100, 微生物遺伝資源利用マニュアル, **11**, 1-4 (2002).
- 28) Inatsu, Y., Kimura, K. and Itoh, Y., Characterization of *Bacillus subtilis* strains isolated from fermented soybean foods in southeast asia: comparison with *B. subtilis* (natto) starter strains, *Japan Agricultural Research Quarterly : JARQ*, **36**, 169-175 (2002).
- 29) Suzuki S., Kusumoto, K., and Kashiwagi, Y., Construction of a gene trap vector, pPTR-EGFP1, for the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*, Rep Natl. Food Res. Inst., **67**, 33-38 (2003).
- 30) Saito, M., Rai, D.R. and Masuda, R., Isolation of *Penicillium hirsutum* from spoiled, packaged asparagus spears in Japan, *Journal of General Plant Pathology*, **69**, 304-306 (2003).
- 31) 斉藤道彦, 貯蔵穀類加害菌類の分離・同定, 微生物遺伝資源利用マニュアル, **22**, 1-11 (2007).
- 32) 鈴木聡, 福岡真里, 楠本 憲一, 柏木豊, 生馬鈴薯デンプン滓上にて生育可能な麹菌株, 食品総合研究所報告, **73**, 47-52 (2009).
- 33) Elano, R.R., Kitagawa, Bari, Md.L., Kawasaki, S., Kawamoto, S., and Inatsu, Y., Comparison of the Effectiveness of Acidified Sodium Chlorite and Sodium Hypochlorite in Reducing *Escherichia coli*, *Foodborne Pathogens and Disease*, **7**, 1481-1489 (2010).
- 34) Suzuki S., Fukuoka, M., Tada, S., Matsushita-morita, M., Hattori, R., Kitamoto, N., Kusumoto, K., Production of polygalacturonase by recombinant *Aspergillus oryzae* insolid-state fermentation using potato pulp. *Food Sci. Technol. Res.* **16**, 517-521 (2010).
- 35) Wang, X., Ike, M., Shiroma, R., Tokuyasu, K., Sakakibara, Y., Expression of neutral b-glucosidase from *Scytalidium thermophilum* in *Candida glabrata* for ethanol production from alkaline-pretreated rice straw, *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 362-365 (2013).
- 36) Saito K., Nakamura, T., Lpbayashi, I., Pnishi-Kameyama, M., Ichinose, H., and Funane, K., Xylan-mediated aggregation of *Lactobacillus brevis* and its relationship with the surface properties and mucin-mediated aggregation of the bacteria, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**, 2120-2127 (2014).
- 37) Nakamura T., Yamamoto, M., Saito, K., Ando, A., and Shima, J., Identification of a gene, FMP21, whose expression levels are involved in thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express*, **4**, 67 (2014).

尚, ここに記載されている文献は利用者からの報告に基づくもので, 食研微生物バンクに寄託されている全ての菌株に関して網羅的に収集したものではない.