

有用微生物の分子生物学的解析に関する研究（第 1 報）

田畑 恵*

1. はじめに

食品の発酵過程においては、微生物が生産するさまざまな酵素によって、食品の風味や成分が変化している。

現在ゲノム解析がすすんでいる麹菌については、酵素の生成に関与している有用遺伝子が多数解明されたことにより、酒・味噌・醤油等の伝統的発酵食品に利用される麹づくりのノウハウや、杜氏の経験と勘による匠の技が遺伝子レベルで解明され、有用菌株の開発や醸造技術の改善に活用されている。また納豆菌についても、有用遺伝子の解明により得られた知見をもとに、食品だけでなく化粧品や化成品への応用研究が行われるようになっており、さまざまな微生物について、遺伝子レベルでの特性解明が求められている。

2. 目的

近年、日本でも大豆発酵食品としてテンペが注目されはじめている。テンペは大豆を *Rhizopus* 属の糸状菌で発酵させたものであり、インドネシアの代表的な発酵食品の一つである。しかし、テンペの製造に用いられている *R. oligosporus* については、菌株ごとの特性解明も不十分であり、また大豆発酵過程における成分変化を始め、どの酵素が関与しているのか、またその酵素を作る遺伝子が何であるのか、などについての研究がほとんど行われていないため、有用菌株の選択や発酵技術の改善が困難な状況にあるのが現状である。そこで、*R. oligosporus* の特性について解明することを目的とした。

3. 実験方法

3.1 供試菌株

テンペ製造に用いられている主な菌株を表 1 に示した。これらを供試菌株として、以下の実験を行った。なお、培地は市販ポテト培地を用い、必要に応じて寒天 1.5% を添加した。

表 1 テンペ製造に用いられている主な菌株

No.	菌株名	属種
1	NBRC 8631	<i>R. oligosporus</i>
2	NBRC 31987	<i>R. oligosporus</i>
3	NBRC 32002	<i>R. oligosporus</i>
4	NBRC 32003	<i>R. oligosporus</i>
5	IK 001 [※]	<i>R. oligosporus</i>

[※]特許微生物 FERM AP-20492

(くめ・クオリティ・プロダクツ株と共同出願)

3.2 外観の比較

各菌株をスラントから 1 白金耳取り、新たなスラントに植菌し、30°C で 7 日間培養した。

3.3 炭素源の資化性の比較

10² 程度に調整した各菌株の孢子懸濁液を API 50 CH プレートに 100μl 接種し、32°C で 3 日間培養し、炭素源の資化性確認を行った。

3.4 テンペのアミノ酸含量の比較

各菌株を用いてテンペを製造した。凍結乾燥後、ヘキサソで脱脂処理し、0.5g を 80%メタノール 10ml で抽出した。溶媒を減圧除去し、クエン酸リチウム緩衝液 (pH2.2) に溶解し、メンブランフィルターでろ過し、測定用試料溶液とした。アミノ酸の測定は、OPA ポストカラム誘導化法を用いた島津アミノ酸分析システムにより行った。

3.5 GAD 相同遺伝子断片の取得

麹菌等の GAD 遺伝子のアミノ酸配列をもとに、混合塩基プライマーを作成し、IK001 株の DNA を鋳型として degenerate PCR を行った。反応液の一部を取り、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 1.2%, 1 × TAE buffer) を行った。

4. 結果及び考察

4.1 外観の比較

IK001 株は孢子化が遅く、また他の菌株に比べて灰色～白色の孢子を生成することが明らかとなった。これは、テンペにしたときに良好な外観を保てる、という利点である。

4.2 炭素源の資化性の比較

炭素源の資化性の主な結果を表 2 に示した。スクロース、マルトース、スターチは大豆に含まれる主要な糖類である。その結果、糖類の資化性に大きな違いが見られ、スクロースを顕著に分解する菌株と、ほとんど分解しない菌株が存在することが明らかとなった。スクロースを分解しない菌株を用いてテンペを製造した場合、大豆の甘味がそのまま残るので、食味のよいテンペが得られる。

表 2 炭素源の資化性

No.	スクロース	マルトース	スターチ
1	—	+	+
2	—	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	—	+	+

4.3 テンペのアミノ酸含量の比較

遊離アミノ酸の主な測定結果を表 3 に示した。リジ

*食品バイオ部門

ンは必須アミノ酸，グルタミン酸は呈味アミノ酸，GABA（ γ -アミノ酪酸）は抑制系の神経伝達物質である。その結果，いずれの菌株でも遊離アミノ酸の増加が確認され，特に菌株 No.3, 4 (NBRC 32002, NBRC 32003) で GABA の著しい増加が認められた。

表 3 遊離アミノ酸 (mg/100g-D.W.)

No.	リジン	グルタミン酸	GABA
1	50	107	49
2	57	112	52
3	111	30	648
4	98	29	638
5	50	69	47
煮大豆	10	79	17

以上の結果により，5 菌株は大きく 2 つのグループに分類されることが明らかとなった（表 4）。

表 4 特徴によるグループ分け

グループ	菌株	特徴
I	NBRC 8631 NBRC 31987 IK 001	リジン 少
		グルタミン酸 多
		GABA 少
		スクロース資化性 無
II	NBRC 32002 NBRC 32003	リジン 多
		グルタミン酸 少
		GABA 多
		スクロース資化性 有

4.4 GAD 相同遺伝子断片の取得

GABA 生成量に大きな違いが見られたために，GABA の生合成に関与していると考えられる GAD 遺伝子に注目し，GAD 相同遺伝子断片の取得を試みた。麹菌等の GAD 遺伝子のアミノ酸配列をもとに，混合塩基プライマーを作成し，IK001 株を鋳型として degenerate PCR を行い，反応溶液を電気泳動した結果を図 1 に示した。その結果，矢印の部分に GAD 相同遺伝子断片と思われるバンドが確認された。

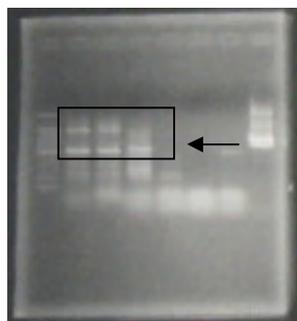


図 1 アガロースゲル電気泳動
(左右のレーンはマーカー，
間は複数の異なるプライマーセットの結果)

テンペの製造に用いられる *R. oligosporus* について，5 菌株を用いて外観，炭素源の資化性，アミノ酸量を比較した結果，菌株間に違いがあることが明らかとなり，大きく二つのグループに分けることができた。グループ I は呈味アミノ酸であるグルタミン酸が多く，またスクロースの資化性がないために大豆の甘味が残る，食味のよい発酵食品が得られる。一方グループ II は，血圧降下作用や抗ストレス作用を持つ GABA を多く生成することから，機能性を強化した発酵食品の製造に適している。

また，GABA 生成量に大きな違いが見られたために，IK001 株を鋳型として，GABA の生合成に関与していると考えられる GAD 相同遺伝子断片の取得を試みたところ，数百 bp の遺伝子断片が得られた。今後，遺伝子断片の精製と塩基配列の決定を行い，遺伝子レベルで菌株の特性解明を行っていく予定である。

謝辞

本研究を行うにあたり，サンプル提供および測定に協力していただいたくめ・クオリティ・プロダクツ(株)に感謝いたします。

5. まとめ