

# 有色素大豆加工に適した納豆菌の開発

久保 雄司\*

## 1. はじめに

茨城県の特産物と言えば納豆と言うイメージは全国的に浸透しているが、現在の納豆用大豆「納豆小粒」以外的大豆を用いた場合について、納豆菌及び納豆加工条件の研究はなされていない。

## 2. 目的

県産大豆振興、県産大豆のブランド化を目的として、県生物工学研究所が育種し、県農業研究所が栽培試験を行っている有色素大豆に着目し、その加工に適した納豆菌の研究を行う事とした。有色素大豆の特徴は、表皮が厚いことである。その為、従来の納豆菌を用いて納豆加工を行った場合、表皮の成分の分解が十分進まず、食感が悪くなるという問題点がある。そこで本研究では、自然界から有色素大豆を納豆に加工するのに適した納豆菌株の採取を行うと共に、単離した納豆菌を用いた場合の最適な加工条件を見出す事を目的とする。また、自然界より採取した菌群から、納豆菌を簡便に選抜する手法として、分子生物学的手法を応用した技術を確立する事も目指す。

## 3. 実験方法

### 3.1 稲藁からの納豆菌採取・培養法の確立

県内数カ所から集めた稲藁を用いて納豆菌の採取・培養を行った。稲に付いた多数の細菌から、出来る限り納豆菌だけを培養するべく、そのプロトコルについて最適な条件になる様、幾つかポイントを絞り検討を行った。検討を行った主なポイントは、①培地(栄養成分)②加熱③抗生物質の使用(ナリジキシ酸, シクロヘキシミド)④培養条件の4点である。

### 3.2 分子生物学的手法による菌種識別

#### 3.2.1 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析による方法

採取した細菌の内、約 20 株について試験を行った。純粋培養した細菌から DNA を抽出後、16S rRNA 遺伝子の全長を増幅する条件で PCR に供した<sup>2)</sup>。PCR により、遺伝子を増幅した後、特に多型性に富む、上流 500~600bp までをターゲットとしてシーケンス反応に供した。シーケンスにより、その塩基配列の解析を行い、データベースと照合する事で、種の同定を試みた。

#### 3.2.2 PCR 及びアガロースゲル電気泳動法による方法

*B. subtilis* 3 株と 16S rRNA 遺伝子の配列に近い *Bacillus* 属細菌<sup>3)</sup> 7 株及び市販納豆菌 1 株の計 11 菌株(表 1)を用いて、特定菌種(*B. subtilis*)のみの識別を試みた。データベースを利用し 16S rRNA 遺伝子~23S rRNA 遺伝子の領域について配列比較を行い、こ

の領域を利用して、数種のプライマーセットを設計した<sup>4,5)</sup>。これらのプライマーセットを用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動にて結果を確認した。

表 1 実験に用いた *Bacillus* 属細菌

	NBRC番号	微生物名
1	NBRC 15305	<i>Bacillus cereus</i> Frankland and Frankland 1887
2	NBRC 15718	<i>Bacillus mojavensis</i> Roberts et al. 1994
3	NBRC 12200	<i>Bacillus licheniformis</i> (Weigmann 1898) Chester 1901
4	NBRC 15539	<i>Bacillus atrophaeus</i> Nakamura 1989
5	NBRC 14144	<i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg 1835) Cohn 1872
6	NBRC 101239	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> Nakamura et al. 1999
7	NBRC 101236	<i>Bacillus vallismortis</i> Roberts et al. 1996
8	NBRC 12092	<i>Bacillus pumilus</i> Meyer and Gottheil 1901
9	NBRC13719	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (Ehrenberg 1835) Cohn 1872
10	NBRC 15535	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (ex Fukumoto 1943) Priest et al. 1987
11	—	<i>Bacillus subtilis</i> (宮城野菌)

## 4. 結果及び考察

### 4.1 稲藁からの納豆菌採取・培養法の確立

培地については、大豆成分を含有するものとしなもので検討を行った。その結果、コロニー形状及び生育速度において、大豆成分を含有するものの方が明確に優れていた。プロトコルについて検討した結果、加熱処理については、95℃、5 分程度加熱を行う事で、孢子形成能のない細菌は、ほぼ完全に死滅し、孢子形成能を有する枯草菌のみが生育することを確認した。抗生物質の使用も検討したが、加熱のみで十分選択的に *Bacillus* 属の細菌のみが採取できた。そして、最大の鍵となるのは加熱処理後の集積培養である事が分かった。加熱処理液をただ寒天培地に塗布するのと、集積培養を行うのでは、細菌の集菌効率に大きな開きがあった。粘質物生産培地(GSP 培地<sup>1)</sup>)を用いた糸引き試験も行う事で効率よく納豆菌を集菌出来るスキームを確立した(図 1)。今回確立したスキームにより、県内数カ所から集めた稲藁 17 サンプルから、納豆菌様の特徴を持つ菌株を約 70 菌株得た。

### 4.2 分子生物学的手法による菌種判別

#### 4.2.1 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析による方法

試験を行った、約 20 株について、データベースとの照合を行ったところ、ほぼ間違いなく *B. subtilis* であろうという結果が得られた。

#### 4.2.2 PCR 及びアガロースゲル電気泳動による方法

一度に多検体を処理できて、簡便に種を特定できる手法確立を目指した。

納豆菌は、*B. subtilis* に分類される。*B. subtilis* だけで選択的に伸長反応が起こるプライマーを構築す

\*地場食品部門

ることが出来れば、そのプライマーを用いてPCRを行い、電気泳動でターゲット領域のバンドの有無を確認する事で、*B. subtilis*を識別出来るのではないかと考えた。

そこで、*B. subtilis*及びその近縁種について、実験を試みた。

結果として、今回試した*B. subtilis*以外の*Bacillus*属細菌7株の内、5株と*B. subtilis*を識別することには成功した。しかしながら今回設計した、どのプライマーを用いても、*B. mojavensis*及び*B. licheniformis*の2株についてはPCR反応が進行してしまい、完全に*B. subtilis*だけを識別する事は出来なかった(図2)。

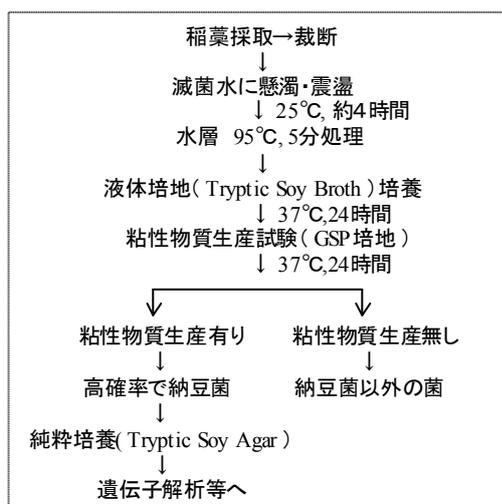


図1 稲藁からの納豆菌採取・培養スキーム

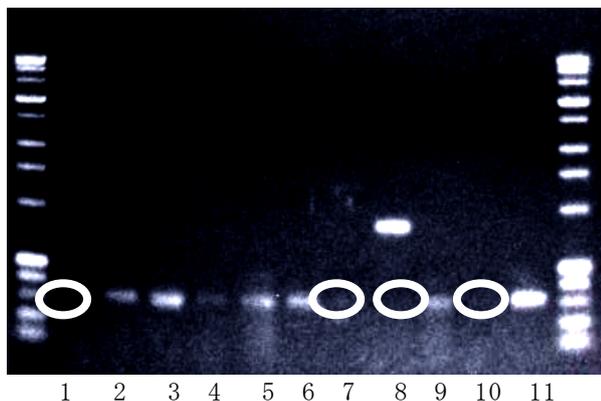


図2 PCR及びアガロースゲル電気泳動による菌種識別実験結果一例

(1~11は表1の菌株に対応。丸で囲んだ菌株については、ターゲット領域の増幅が起こらず、*B. subtilis*と種の違いを識別できた事を示している。)

## 5. まとめ

菌種の判別には、16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析が、広く用いられる手法ではあるが、この手法により得られた結果は、絶対といえるものではない。事実、今回の実験においても、データベースを用いた検索結果によれば、幾つかの菌株では、*B. subtilis* 以外でも、高い相同性を示す種の菌株が存在する事を示していた。

今回検討した、PCR 及びアガロースゲル電気泳動による *B. subtilis* 判別法は、一度に多検体を処理可能で、しかも簡便であるというメリットがある。今回の報告では、本手法の完全な確立には至らなかったが、更に検討を進めることで、本手法の確立は可能であると考えている。また、本手法と、シーケンサによる塩基配列解析を併用する事で、同定結果の確実性が増すとと思われる。

今後は、*B. subtilis*判別法の完全な確立を目指すと共に、自然界からの納豆菌採取を進め、培養至適温度の検討や、代謝産物分析による酵素活性の評価など表現型の特徴評価を行いながら、有色素大豆加工に適した納豆菌の探索を行う。

## 謝辞

本研究を進めるに当たり、ご協力下さった、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 酵母ユニット長 島 純氏、同 研究員 安藤 聡氏に感謝いたします。

## 参考文献

- (1) 納豆試験法 納豆試験法研究会、農林水産省食品総合研究所 編
- (2) 佐藤留美, 蒲生卓磨, 島純, 川本伸一, (2002) 臭気低減化細菌の16S rDNA 遺伝子配列解析による系統分類. 食総研報., 66, 9-14
- (3) Goto, K., Omura, T., Hara, Y., Sadaie, Y. (2000) Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 46, 1-8.
- (4) Ouba, L. I. I., Diawara, B., Amoa-Awua, W. K., Traore, A. S., Moller, P. L. (2004) Genotyping of starter cultures of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) to produce Soubala. *J. Appl. Microbiol.*, 90, 197-205
- (5) DAFFONCHIO, D., BORIN, S., CONSOLANDI, A., MORA, D., MANACHINI, P. L., SORLINI, C. (1998) 16S-23S rRNA internal transcribed spacers as molecular markers for the species of the 16S rRNA group I of the genus *Bacillus*. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 163, 229-236