

有色素大豆加工に適した納豆菌の開発（第 2 報）

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

しかしながら、全国的に見ても、大豆の育成品種というのは豆腐用、味噌用が主であり、納豆用小粒大豆の育種はあまり行われていない。納豆どころ茨城として、多様な商品開発に対応できる納豆用品種の育成及び高品質な原料の安定供給が求められている。

茨城県生物工学研究所では、こうした点に着目し、黄大豆との差別化が可能である納豆用小粒大豆である有色素大豆の育種試験を行っている。

一方、有色素大豆は黄大豆とは異なる特性を有するものの、一部の大手を除き、黄大豆以外的大豆を用いた納豆加工について、最適使用菌株及び加工条件の研究がなされていない。

2. 目的

茨城県産の有色素大豆を用いることで、見た目に新鮮な納豆開発によるバリエーションの拡大及び食の安全・安心といったメリットがあり、高付加価値化につながると考え、有色素大豆を使用した納豆加工について研究を行う事とした。

有色素大豆を使用して良食味の納豆を製造する際に問題となるのは、特に黒豆で顕著であるが、その表皮が厚いために、従来の納豆菌を用いて納豆加工を行うと、表皮の成分の分解が十分進まず、糸引きや食感が悪くなるという点ではないかと考えた。

この問題点を解決するには、納豆菌が表皮成分（主にセルロース及びキシラン等のヘミセルロース）を十分に分解することが必要である。

そこで本年度は、昨年度に稲藁からスクリーニングした菌株の表皮分解酵素活性を評価する事とした。

また、採取した菌株が従来から用いられている納豆菌と本当に異なるものであるか、或いは、興味深い性質を持つ菌株が居ないか等、遺伝子型及び表現型から検討を行う事とした。

本研究では、こうした評価を重ね、最終的に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を選抜すると共に、選抜した納豆菌を用いた場合の最適な加工条件の検討を目的とする。

3. 実験方法

3.1 野生納豆菌株のセルラーゼ活性測定

Congo-red を含む培地¹⁾を用いて、あらかじめセルロースの分解活性が高いと思われる株を選抜し、可溶性基質 Azo-CMC を用いて酵素活性測定を行った。

3.1.1 粗酵素液調製

野生納豆菌株を以下に示す培地で 2 日間培養し、粗酵素液とした。

グリセロール 1.6g, クエン酸三ナトリウム・2H₂O 0.3g, NH₄Cl 0.14g, K₂HPO₄ 0.05g, MgSO₄・7H₂O 0.05g, FeCl₂・2H₂O 0.0031g, CaCl₂・2H₂O 0.015g, MnSO₄・5H₂O 0.014g, 蒸留水 85ml, セルロース又は キシラン 0.05g
(セルラーゼ測定用培地にはセルロースを、キシラナーゼ測定用培地にはキシランをそれぞれ添加した。)

3.1.2 セルラーゼ活性測定

基質に AZO-CMC を用い、以下のスキームに従い実施した²⁾

基質 0.2% Azo-CMC

エッペンチューブに酵素液として、前培養液を 125 μ l 注ぎ、次いで基質溶液 125 μ l をサンプル用チューブに注いだ。これを 37°C, 1hr インキュベートし、1 時間後 96%エタノールを 625 μ l 注いだ。

尚、酵素液に基質溶液を加え、直ちに 96%エタノールを 625 μ l 注いだものをブランク(ゼロタイム)とした。10 分間放置した後、14,000rpm で 10 分間遠心分離して上清を取得し、590nm の吸光度を測定することで酵素活性を評価した。

3.2 野生納豆菌株のキシラナーゼ活性測定

Congo-red を含む培地¹⁾を用いて、あらかじめキシラン分解活性が高いと思われる株を選抜し、可溶性基質 RBB-Xylan を用いて酵素活性測定を行った。

3.2.1 粗酵素液調製

3.1.1 と同様の培地で培養を行った。

3.2.2 キシラナーゼ活性測定

基質に RBB-Xylan を用い、以下のスキームに従い実施した²⁾。

基質 0.2% RBB-Xylan

エッペンチューブに酵素液として、前培養液を 125 μ l 注ぎ、次いで基質溶液 125 μ l をサンプル用チューブに注いだ。これを 37°C, 1hr インキュベートし、1 時間後 96%エタノールを 625 μ l 注いだ。

尚、酵素液に基質溶液を加え、直ちに 96%エタノールを 625 μ l 注いだものをブランク(ゼロタイム)とした。15 分間放置した後、14,000rpm で 5 分間遠心分離して上清を取得し、590nm の吸光度を測定することで酵素活性を評価した。

*地場食品部門

3.3 宮城野菌のキシラナーゼ活性の挙動試験

宮城野菌について、培地の栄養成分によりキシラナーゼ活性が大きく変化する様な挙動が見られた。そこで、培地の栄養成分によりキシラナーゼ遺伝子の発現が誘導されるのではないかと考え、宮城野菌のキシラナーゼ活性について、培地の栄養成分の違いによる活性の変化を検討した。

3.3.1 粗酵素液調製

宮城野菌を様々な培地で 2 日間培養し、粗酵素液とした。

3.3.2 キシラナーゼ活性測定

3.2.2 と同様の手法で活性測定を行った。

3.4 野生納豆菌株の挿入配列 IS4BsuI 及び IS256BsuI の有無及び配列パターンの検討

標記遺伝子領域は、宮城野菌を初めとする市販の納豆菌では既にその存在が確認されている。そこで、今回採取した野生納豆菌について、これらの遺伝子領域の有無と配列パターンを解析すべく、サザンブロットを行った^{3,4)}。

3.4.1 プローブ作製

IS4BsuI 及び IS256BsuI それぞれについてプローブを作製した。

ゲノム DNA(宮城野) 1 μ l, 5' プライマー(1pmol/ μ l) 10 μ l, 3' プライマー(1pmol/ μ l) 10 μ l, 10 $\times$ KOD buffer 5 μ l, 10 $\times$ dNTP 5 μ l, 25mM MgSO₄ 2 μ l, H₂O 16 μ l, KOD-plus(酵素) 1 μ l (計 50 μ l) を混合し、PCR 反応に供した。[(94 $^{\circ}$ C 4'00 $\rightarrow$ 96 $^{\circ}$ C 0'30 $\rightarrow$ 50 $^{\circ}$ C 0'30 $\rightarrow$ 68 $^{\circ}$ C 1'20) $\times$ 25 cycle]

反応終了後プローブを電気泳動し、MACHEREY-NAGEL Nucleo Spin Extract II を使用して、ゲルから DNA を抽出した。

3.4.2 ゲノム DNA の消化とメンブタンへの転写

ゲノム DNA 6 μ l, 10 $\times$ H バッファー 2 μ l, 制限酵素(EcoRV) 2 μ l, 滅菌水 10 μ l を混合し 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。次いで、酵素消化した DNA をアガロースゲル電気泳動に供した。

核酸バキュームブロッティングシステムにメンブタンと泳動したゲルをセットし、表面が乾かないように注意しながら減圧を維持し 0.5M NaOH, 1.5M NaCl 混合溶液で 2 時間かけ変性 DNA をメンブタンに移し込んだ。

3.4.3 プローブラベリング

Amersham Biosciences 社製 Gene Images Random Prime II を使用した。抽出・濃度測定を行ったプローブ 7 μ l (200~300 ng), nucleotide mix 12 μ l, primer mix 6 μ l, 滅菌水 32 μ l をエッペンチューブで混合し、2 分ボイル・急冷を行った。これに、Klenow DNA polymerase 3 μ l を添加、よく混

合し 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。

3.4.4 サザンハイブリダイゼーション

プレハイブリが完了する頃合を見計らって、ラベル化したプローブを 2 分間ボイル後急冷した。プレハイブリを行ったバッグにラベル化したプローブを添加し、シーリングして 60 $^{\circ}$ C で一晩反応させた

翌日、メンブタンの洗浄を行った。

ハイブリバッグにメンブタン, 0.1%SDS, 0.5%SSC 溶液を封入し、60 $^{\circ}$ C, 20 分振盪した。その後、洗浄液を 0.1%SDS, 0.1%SSC 溶液に換え 60 $^{\circ}$ C, 20 分浸透した。次いで、0.1M Tris-Cl PH7.5, 0.6M NaCl (Buffer A) でリンス後、Buffer A 47.5ml, liquid block 2.5ml 中で、室温下 1 時間振盪した。次に、Anti fluorescein 30 μ l, BSA 0.15g, Buffer A 30ml 中で、室温下 1 時間振盪した。その後、Buffer A に 0.1% Tween20 を加えた溶液中、室温下 10 分振盪することを 3 回行った。

Detection kit として GE Healthcare 製 Amersham ECL Detection Reagents for use with ECL Nucleic Acid Labelling and Detection System を使用し、映写室で撮影を行った。

3.5 野生納豆菌株の粘り成分 (γ -PGA) 分析

野生菌株の中に、 γ -PGA の質が宮城野菌と大きく異なるタイプのものが数株見つけられた為、その組成分析とファージ酵素による分解実験を試みる事にした。

3.5.1 粘性物質 (γ -PGA) 採取・精製

グリセロール 8g, クエン酸三ナトリウム $\cdot$ 2H₂O 1.5g, NH₄Cl 0.7g, K₂HPO₄ 0.05g, MgSO₄ $\cdot$ 7H₂O 0.05g, FeCl₂ $\cdot$ 2H₂O 0.0031g, CaCl₂ $\cdot$ 2H₂O 0.015g, MnSO₄ $\cdot$ H₂O 0.1g, RO 水 85ml, 寒天 1.5g の培地で 4 日間培養した。生成した PGA を生理食塩水でなじませながら掻き取り、遠心分離 (6,000 $\sim$ 7,500 rpm) しながら清澄な上清を取得した。取得した上清に対し、界面を乱さないよう 2 倍量の 99.5%エタノールを加え、生じた PGA をガラス棒で巻き取って回収した。減圧乾燥後、生理食塩水で 10mg/ml となるよう溶解し、PGA サンプルとした。

3.5.2 γ -PGA の組成分析

1 mg/ml PGA 溶液 100 μ l に conc.HCl 40 μ l, 水 60 μ l を加え計 200 μ l とし、オートクレーブにかけて、110 $^{\circ}$ C で 3 時間反応させ PGA を加水分解した後、減圧乾燥した。分解した γ -PGA の組成分析は、キラル HPLC を用いたポストカラム誘導体化法により行った。移動相の組成は、H₂O / HClO₄ (PH 2), 反応液は、 α -フタルアルデヒド 0.24g, エタノール 4.2ml, ポリオキシエチレンラウリルエーテル 0.12g, N-アセチルシステイン 0.3 g, アルカリバッファー^{*} (※炭酸ナトリウム(0.384M), ホウ酸(0.216M), 硫酸カリウム(0.108M)) 300ml の割合で調製した。

カラムは DAICEL CR(-)及び CR(+)を用い、反応槽温度 55 $^{\circ}$ C, カラム温度 0 $^{\circ}$ C, 流速 0.4ml/min, 検

出 Ex 345nm, Em 445nm で分析を実施した。

3.5.3 納豆菌ファージ酵素 (PghP) による分解試験⁵⁾

γ -PGA 3 μ l, 1M Tris-Cl (PH 7.5) 2 μ l, PghP (原液は 5 μ g/ μ l, 水により 10 倍ずつ段階希) 5 μ l, 10mM ZnCl₂ 5 μ l, 滅菌水 35 μ l (計 50 μ l) を調製し, 37℃で 1 時間インキュベートした後, 煮沸 10 分, 急冷した。これを, 1%アガロースゲル電気泳動に供した後, メチレンブルー染色(振盪 10 分間), 脱染を行い, 分解の程度を観察した。

3.6 スウォーミング試験

納豆製造を行う際, 納豆菌は豆の表面に広がって生える事により, 素豆が残る様なことがないのが望ましい。そうした広がって生える性質がどの程度かを評価する為にスウォーミング試験を行った。

Bacto trypton 1g, Yeast Extract 0.5g, NaCl 1g, 寒天 0.8g, 滅菌水 100ml の割合で調製したプレートの中に滅菌した抗生物質試験用ペーパーディスクを置き, そこに前培養液 10 μ l を滴下し 37℃で 24 時間培養し, 生え方の比較を行った。

4. 結果及び考察

4.1 野生納豆菌株のセルラーゼ活性測定

試験した野生菌株に比べ, 宮城野菌の方がやや高いセルラーゼ活性を示す傾向があることが確認された(図 1)。今後の本研究の鍵は, 高セルラーゼ活性を有する野生納豆菌株の採取であると考えられる。

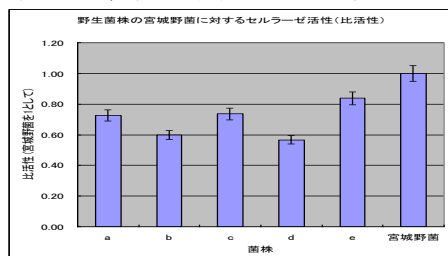


図 1 野生株と宮城野菌のセルラーゼ活性の比較
グラフ左から: 野生菌株 (a~d), 宮城野菌

4.2 野生納豆菌株のキシラナーゼ活性測定

程度の差はあるが, 試験した野生菌株全てで, 宮城野菌に比べ, はるかに高いキシラナーゼ活性が認められた(図 2)。

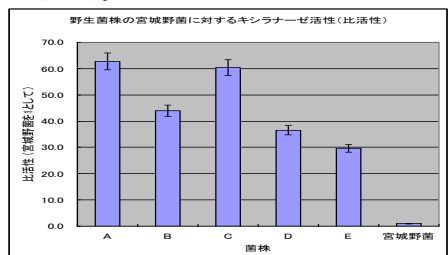


図 2 野生株と宮城野菌のキシラナーゼ活性の比較
グラフ左から: 野生菌株 (A~E), 宮城野菌
※注 図 1・2 共にグラフは宮城野菌の活性を 1 とし, 野生株の活性を宮城野菌に対する比で表示している。

4.3 宮城野菌のキシラナーゼ活性の挙動試験

様々な栄養組成で宮城野菌を培養しキシラナーゼ活性を測定した結果を図 3 に示す。結果として, セルロース存在下で, キシラナーゼ活性が大きく上昇することが確認された(図 3 丸囲い)。これは, 恐らくセルロースによりキシラナーゼをコードする遺伝子の発現が誘導された為ではないかと思われる。

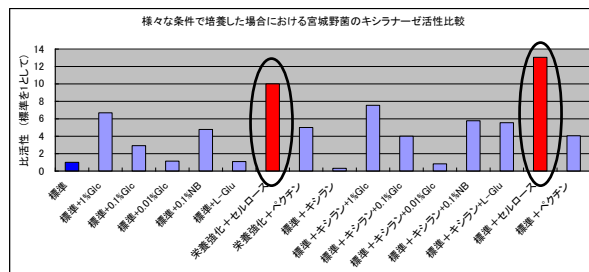


図 3 宮城野菌の培養条件によるキシラナーゼ活性変化
(図中一番左が標準, 丸囲いがセルロース添加条件)

4.4 野生納豆菌株の挿入配列 IS4BsuI 及び IS256BsuI の有無及び配列パターンの検討

サザンブロットの結果, 今回試験した野生納豆菌株の中には, IS4BsuI 及び IS256BsuI と相同配列を持つ菌株は一株も見うけられなかった(図 4)。また, この結果から, 試験した菌株は少なくとも宮城野菌を初めとする市販菌株とは別物であることが確認された。

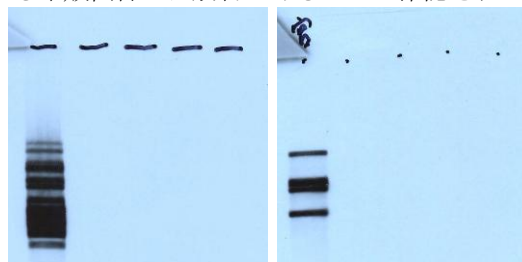


図 4 宮城野菌及び野生菌のサザンブロット結果
フィルム左: IS256BsuI の結果, 右: IS4BsuI の結果
(双方, 一番左が宮城野菌の結果; 実験結果一部抜粋)

4.5 野生納豆菌株の粘り成分(γ -PGA)分析

4.5.1 組成分析

宮城野菌と粘りの強い野生菌株の γ -PGA の組成分析を行った結果を表 1 に示した。

宮城野菌に比べ, 試験した野生菌株が作る, γ -PGA では構成比に占める D-グルタミン酸の割合がかなり高いという興味深い結果が得られた。

表 1 野生株と宮城野菌の γ -PGA 組成比較

	γ -PGA の構成比	
	D-Glu	L-Glu
ミヤギノ	60.3%	39.7%
野生株 1	86.6%	13.4%
野生株 2	88.1%	11.9%
野生株 3	84.3%	15.7%

4.5.2 納豆菌ファージ酵素 (PghP) による分解試験

試験した野生菌株中の 1 株について、明らかに他より PghP による PGA の分解が起こりにくいことが確認された。図 5 が示すように、宮城野菌の PGA では、PghP 濃度が $5 \times 10^{-2} \mu\text{g} / \mu\text{l}$ 程度でほぼ完全に分解されているが、この野生菌株については、多少の分解は受けているものの、 $5 \times 10^{-1} \mu\text{g} / \mu\text{l}$ でも、未分解の割合が多いことが確認された。

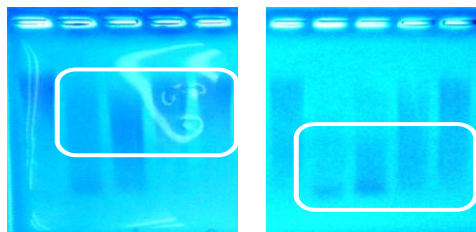


図 5 野生株及び宮城野菌 γ -PGA の PghP による分解

写真左：野生菌株 右：宮城野菌

※注 PghP 濃度は写真 2 枚ともに左から

0(対照), 5×10^{-1} , 5×10^{-2} , 5×10^{-3} , $5 \times 10^{-4} \mu\text{g} / \mu\text{l}$

4.6 スウォーミング試験

宮城野菌よりも広がりや生えが際だって良かった野生株も見うけられた (図 6 丸印)。一方、図 6 四角で囲った菌株のようにかなり広がりや悪かった菌は、納豆製造には向いていないと言える。酵素活性だけでなく、こうした点も実際の製造では重要になってくる為、両方の点で優れた菌株を見つけなければならない。

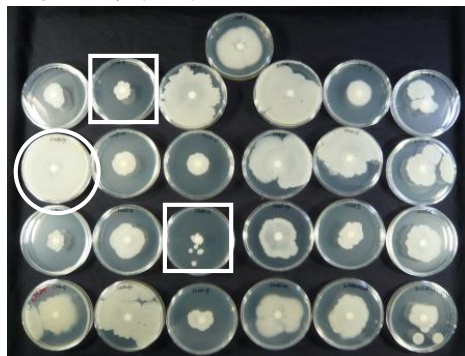


図 6 スウォーミング結果写真

最上段中心が宮城野菌、二段目以降が野生菌株

5. まとめ

本年度は、昨年度採取した菌株について酵素活性測定を中心として、多面的にその特長評価を行った。

酵素活性においては、キシラナーゼ活性は野生菌株の方が宮城野菌よりも概ね高く、セルラーゼ活性は宮城野菌の方がやや高めであるというような、一定の傾向があることがつかめた。しかしながら、現段階では実用に耐えうる菌株が採取できたとは言えない為、次年度以降、特にセルラーゼ活性に注視しながら、目的に合う菌株のスクリーニングを実施していく。

また、様々な表現型の試験を実施し、採取した野生株が生成するかなり粘性の高い γ -PGA について検討を行うなど、通常の納豆菌に比べて特徴的な現象や物質に対してもアプローチし、興味深い結果を得ることが出来たことから、有色素大豆だけでなく、他の原料

大豆に適した納豆菌株が今後採取できる可能性もあるのではないかと手応えを感じた。

次年度以降、菌源の採取範囲を広げることで、より多くのサンプルを採取すると共に、網羅的に試験を実施し、本年度得た試験結果を基に有望な菌株を選抜していく予定である。

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 発酵細菌ユニット 木村 啓太郎氏に感謝いたします。

参考文献

(1) Ronald M. Teather, Peter J. Wood (1982) Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 777-780

(2) Luisa Maurelli, Alfonso Giovane, Alessandra Esposito et al (2008) Evidence that the xylanase activity from *Sulfolobus solfataricus* O α is encoded by the endoglucanase precursor gene (*ssol1354*) and characterization of the associated cellulose activity. *Extremophiles*

(3) Keitarou Kimura, Yoshihumi Itoh (2007) Determination and Characterization of IS4Bsu1-Insertion Loci and Identification of a New Insertion Sequence Element of the IS256 Family in a Natto Starter. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2458-2464

(4) 伊藤義文, 稲津康弘 (2000) 納豆菌の粘性物質生産能を制御する因子, *化学と生物*, 38, 780~781

(5) Keitarou Kimura, Yoshihumi Itoh (2003) Characterization of Poly- γ -Glutamate Hydrolase Encoded by a Bacteriophage Genome: Possible Role in Phage Infection of *Bacillus subtilis* Encapsulated with Poly- γ -Glutamate. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2491-2497