

有色素大豆加工に適した納豆菌に関する試験研究事業（第 3 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な納豆用小粒大豆として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、その納豆加工について、最適使用菌株及び加工条件の研究は、ほとんどなされていない。

2. 目的

茨城県産の有色素大豆を用いることで、茨城産大豆の普及、食の安全・安心といったメリット、更には地産地消への貢献に繋がるのに加え、見た目の新鮮さによるバリエーションの拡大により、高付加価値化が可能と考え、有色素大豆を使用した納豆加工について研究を行うこととした。

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、その表皮が厚く難分解性であるため、従来の納豆菌を用いた加工では、表皮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ある。

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、稲藁から野生の納豆菌を収集し、その中から目的の特性を備えた納豆菌を選抜することとした。

本年度は、まず、昨年度茨城県内を中心に全国から集めた稲藁から野生納豆菌を集積することとした。

また、採取した菌株が本当に納豆菌と呼べる代物なのか(=食品としての安全性の検証)、加えて、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等、遺伝子型及び表現型から検討を行うこととした。

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を明らかにする。

3. 実験方法

3.1 稲藁からの納豆菌採取

茨城県内外から約 100 点集積した稲藁から野生納豆菌の採取を行った。

稲藁 1 本程度を、50ml の滅菌チューブに入れ、生理食塩水を注いだ。これを、95℃～97℃で 10 分加熱した。加熱処理した生理食塩水を、Difco Tryptic Soy Broth に注ぎ、37℃、16～24 時間培養することで、耐熱性芽胞形成能を有する菌株のみを集積培養した。

培養液を、生理食塩水で適宜希釈後、Difco Tryptic Soy Agar へ塗布し、37℃で 16～24 時間培養した。多数の細菌類が生えたシャーレの中から、コロニーの形態から判断して、納豆菌様の菌株を釣菌し、Difco Tryptic Soy Agar にて、純粋培養を繰り返した。

3.2 納豆加工適性の検討

採取した菌株について、納豆試作試験を実施し、糸引きや切断負荷試験を実施することで、菌株の納豆加工適性の有無を評価した。

3.2.1 納豆試作試験

大豆は、小粒の黄大豆を用いた。また、宮城野菌を用いた納豆も試作し、これを比較対象の基準とした。

種菌は、プレートに培養した菌株を白金耳で掻き取り、滅菌水 1ml に懸濁することで調製した。

大豆は、20℃、16 時間浸漬し、0.18～0.2MPa にて 30 分蒸煮した。蒸煮した大豆を PSP パックに 50g 盛り込み、準備しておいた種菌を添加した。全体に良く菌が拡散するように混ぜた後、39℃、90%、18 時間→20℃、50%、2 時間→5℃、24 時間という条件にて発酵させた。

3.2.2 糸引き評価・切断負荷測定試験

3.2.1 に従い作製した納豆について、20℃恒温器にて品温を一定にした後、糸の様子（糸引きや節の様子）並びに菌の被りなどの納豆の外観評価及び、納豆を短軸方向に切断するのに必要な負荷を測定した¹⁾。

3.3 納豆製造における酵素の影響評価

表皮が厚く難分解性の表皮を分解するには、セルラーゼやヘミセルラーゼが有効であると考えられる為、酵素剤添加納豆を製造し、切断負荷を測定することで、その軟化効果を検証した。

3.3.1 酵素剤添加納豆試作

酵素剤としては、HBI 株式会社のセルロシン AC40(セルラーゼ)及び、セルロシン HC100(キシランナーゼ)を用いた。大豆は、小粒黄大豆及び有色素大豆の代表として茨城県生物工学研究所で育種した黒大豆小粒を用いた。製造方法については、種菌の他に酵素剤を添加する以外は、3.2.1 と同様の手順で行った。

*地場食品部門

3.3.2 納豆切断負荷測定

3.2.2 と同様に切断負荷を測定した。

3.4 選抜菌株の遺伝子解析

選抜した菌株について、属及び種を同定する為、16S rDNA の塩基配列解析を実施し、データベースと照合することで、同定を行った。

3.4.1 採取菌株からの PCR テンプレート用 DNA 精製

(株)ニッポンジーン社製の ISOPLANT II を用いて AFLP 試験用ゲノム DNA の精製を行った。

3.4.2 16S rDNA の増幅

試薬は、タカラバイオ(株)製 Takara Ex Taq Hot Start Version を使用し、装置はABsystems Gene Amp PCR system 9700 を用いた。

テンプレート DNA 0.5 μ l, 10 $\times$ ExTaq buffer 2 μ l, 2.5mM dNTPmix 3.2 μ l, 50mM Primer [for. 0.2 μ l, rev. 0.2 μ l], Ex Taq 0.2 μ l, H₂O(sterilized) 13.7 μ l を加え、PCR に供した。尚、反応条件は、95 $^{\circ}$ C, 4 分 $\rightarrow$ (94 $^{\circ}$ C, 30 秒 $\rightarrow$ 54 $^{\circ}$ C, 30 秒 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C, 1 分 30 秒) $\times$ 35 サイクル $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C, 5 分で行った。

3.4.3 塩基配列解析による菌種の同定

Beckman coulter 社製 DTCS クイックスターターキットを用いて、添付のプロトコルに従いシーケンス反応及び精製を行った。

精製したサンプルを同社製の遺伝子解析システム CEQ8000 に供し、塩基配列解析を実施し、解析終了後、データベース (BLAST) にて同定を行った。

3.5 ドットプロット

宮城野菌をはじめとする、国内納豆製造に用いられる納豆菌は、IS4 及び IS256 family という挿入配列を持っていることが確認されている^{2), 3)}。

しかしながら、世界の納豆類似食品製造に用いられる菌の中にはそうした配列を持ち合わせていないものも少なくない。

そこで、稲藁より採取した 350 の菌株から納豆加工適性に優れた株を中心に、90 株程度を選抜し、網羅的にそうした配列の有無を検証することとした。

3.5.1 ゲノム DNA の制限酵素 (EcoRI) による消化

ゲノム DNA 1 $\sim$ 2 μ g, 10 $\times$ H バッファー 2 μ l, EcoRI 2 μ l, 滅菌水 (up to 20 μ l) を混合し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間培養した。

3.5.2 プローブ作成

IS4*Bsu*I 及び IS256*Bsu*I についてプローブを作製した。

宮城野菌ゲノム DNA (70 μ g/ml) 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, 滅菌水 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

分 $\rightarrow$ (96 $^{\circ}$ C, 30 秒 $\rightarrow$ 50 $^{\circ}$ C, 30 秒 $\rightarrow$ 68 $^{\circ}$ C, 1 分 20 秒) $\times$ 25 サイクル $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C, ∞]。ゲル電気泳動後、MACHE-REY-NAGEL Nucleo Spin Extract II を使用し、ゲルからの DNA 抽出を行いプローブとした。

3.5.3 プローブラベリング

Amersham Biosciences 社 Gene Images Random Prime II を使用し、操作は添付の説明書に従った。

3.5.4 サザンハイブリダイゼーション

メンブタンへ試験菌株 DNA を 10 μ l ずつマウントし、風乾した。メンブタンのアルカリ変性を実施後、ハイブリバックにメンブタンと、55 $^{\circ}$ C に保ったプレハイブリバッファを注いで完全にシーリングした。これを 55 $^{\circ}$ C で 1 時間保つことでプレハイブリを行った。

プレハイブリ後、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ハイブリバッファに溶解して添加し、シーリングして 55 $^{\circ}$ C で一晩反応させることでハイブリダイゼーションを行った。

翌日、メンブタンを洗浄し、検出・撮影に供した。

検出・撮影には、Amersham Gene Images CDP-star Detection Kit を使用し、映写室で露光、撮影を行った。

3.6 ビオチン要求性試験

宮城野菌を初めとする市販納豆で用いられる納豆菌は、生育にビオチンを必須とする性質がある。そこで、遺伝子型に加え、表現型の評価も行うことで宮城野菌との違いを調べる為、納豆加工適性の高い菌株を中心にビオチン要求性の評価を行った。

3.6.1 生育試験・評価

最小培地である E9 寒天培地について、ビオチン添加区分と非添加区分を作製し、LB broth で前培養したサンプルを塗布した。37 $^{\circ}$ C で 3 日間培養後、生育を確認することで、要求性を判断した。

3.7 AFLP による菌株間識別試験^{4), 5), 6)}

選抜した菌株に対し AFLP 試験を実施し、従来菌 (宮城野菌) 並びに採取菌株間での違いについて、遺伝子型からの評価を試みた。AFLP 試験には、Applied Biosystems 社製、AFLP EcoRI Ligation/Amplification Module, AFLP MseI Ligation/Amplification Module, Amplification Core Mix Module を用い、プロトコルについては、条件を最適化しながら試験を進めた。

3.7.1 AFLP 試験用ゲノム DNA の精製

(株)ニッポンジーン社製の ISOPLANT II を用いて AFLP 試験用ゲノム DNA の精製を行った。

3.7.2 ゲノム DNA の制限酵素消化

ゲノム DNA 1 μ g, NEbuffer 2 μ l, EcoRI 1 μ l, MseI 1 μ l, 滅菌水 up to 20 μ l の割合でサンプルを混合し、37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させた。

3.7.3 アダプターのライゲーション

EcoRI adaptor pair, MseI adaptor pair 各々を、95℃、5分加温することでアダプターペアのアニールを行った。制限酵素消化 DNA 0.5 μl (0.025 μg ゲノム DNA), 2×T4 DNALigation mix(日本ジーン) 5.5 μl, 0.5M NaCl 1.0 μl, 0.5mg/ml BSA 1.0 μl, MseI adaptor 1.0 μl, EcoRI adaptor 1.0 μl, 滅菌水 1.0 μl / 11 μl を混合し、16℃、1.5時間反応させた。その後、TE_{0.1} を 189 μl 添加した。

3.7.4 Preamplification reactions

テンプレート DNA 4.0 μl, Primer EcoRI-0 0.5 μl, Primer MseI-0 0.5 μl, AFLP amplification Core Mix 15 μl / 20 μl を混和し、PCR に供した。

尚、増幅反応は、(94℃、20秒→56℃、30秒→72℃、2分) × 20 サイクル→4℃、∞で行った。

反応終了後 TE_{0.1} で 2.5 倍に希釈し、次の反応に供した。

3.7.5 Selective amplification reactions

Preamplification mixture 1.5 μl, MseI primer 0.5 μl, EcoRI primer 0.5 μl, AFLP amplification Core Mix 7.5 μl / 10 μl で試薬類を混合し、PCR に供した。試験は以下のプライマーセットの組み合わせについて実施した⁷⁾。

①EO-MA②EA-MA③EG-MA④EC-MA⑤EAC-MA

上記混合液を Touch down PCR に供した。反応サイクルは添付のプロトコルに従った。

3.7.6 ゲル電気泳動(蛍光)による検出・結果確認

(株)バイオクラフト シーケンス電気泳動装置 (BE-623; 無蛍光ガラス) を使用した。

泳動ゲルは、6%アクリルアミドゲルを調製して用いた。サンプルをマウントし、TBE バッファを泳動液として、1000V const., 約 120 分泳動を行った。

泳動終了後、バリアブルイメージアナライザー Typhoon (GE health care) を使用して蛍光検出を行った。

3.7.7 DNA シーケンサによるフラグメント解析

Selective amplification product 4.0 μl, Size standard 0.5 μl, Hi-Di formamide 24 μl を混合し、95℃、5分加熱後、急冷してサンプルとした。

装置として、ABI310 (DNA シーケンサ) を用いて分析を実施し、Gene Mapper (解析ソフトウェア) により結果を解析した。

4. 結果及び考察

4.1 稲藁からの納豆菌採取

γ-ポリグルタミン酸生成能を有することを指標に、350 株程の菌株を収集した。

4.2 納豆加工適性の検討

3.1 により収集した菌株全てについて、納豆の試作

試験を実施し、糸引きや菌の被りから加工適性を評価したところ、350 株のうち、60 株について加工適性を有することを確認した。

更に、切断負荷を測定したところ、宮城野菌より柔らかく仕上がる野生株も複数見受けられた。今後、きちんと試験を実施していく必要があるが、こうした株は有色素大豆用として有望ではないかと推測された。

4.3 納豆製造における酵素の影響評価

セルラーゼ添加区分で、優位に切断負荷が小さくなる、つまり、皮が柔らかく仕上がる事が確認された(図1)。本試験により、有色素大豆表皮分解に特に効果的な酵素は、セルラーゼであり、目指す納豆菌は、キシラナーゼ活性よりもセルラーゼ活性の高い菌株である事が確認された。

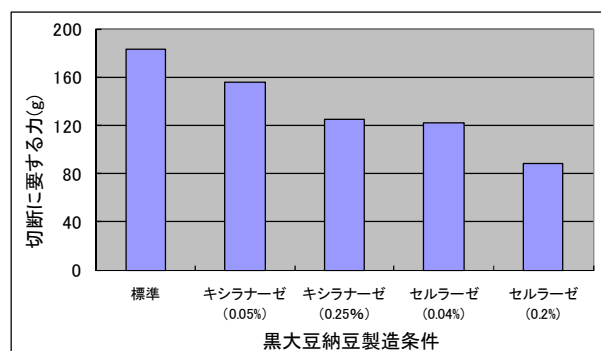


図1 酵素添加による納豆の軟化効果

4.4 選抜菌株の遺伝子解析

BLAST による同定から、3.2 で納豆加工適性“有り”と認められた菌株について、*B. subtilis*であることを確認した。また、粘性物生成能を有しながら、加工適性の認められなかった菌株についても、試験を行った株の多くが、*B. subtilis*であったことも確認された。

4.5 ドットプロット

表1に示したような結果が得られた。この結果から、納豆の加工適性を有する菌株の中にも *IS4BsuI* および *IS256* を持たない菌株が存在することが確認された。また、一方で、今回の試験株では、どちらかの IS を持つ菌株は、例外無くもう一方の IS も持っていることが確認された。

4.6 ビオチン要求性試験

表1に示したような結果が得られた。ドットプロット試験同様、宮城野菌と異なる結果を示すものが少なくなかった。

特に、No. 2 の菌株は、納豆加工適性には優れているものの、ビオチン要求性を全く示さない点で、かなり特異的であると言える。

4.5, 4.6 により、宮城野菌と異なる結果を示した菌株については、この時点で、宮城野菌とは別物(オリジナル)の菌株である事が確認された。

表 1 ドットプロット, ビオチン要求性の試験結果

菌株 No.	試験内容			菌株 No.	試験内容		
	ビオチン 要求性	ドットプロット IS256	IS4		ビオチン 要求性	ドットプロット IS256	IS4
1	++	—	—	32	+	—	—
2	—	—	—	33	+	+	+
3	±	+	+	34	+	—	—
4	±~+	—	—	35	+	—	—
5	+	+	+	36	+	+	+
6	+	+	+	37	+	—	—
7	+	+	+	38	++	—	—
8	+	—	—	39	++	+	+
9	+	—	—	40	+	—	—
10	+	+	+	41	+	+	+
11	+	—	—	42	+	+	+
12	+	+	+	43	+	—	—
13	+	+	+	44	++	—	—
14	+	+	+	45	++	—	—
15	+	+	+	46	++	—	—
16	+	—	—	47	++	—	—
17	+	+	+	48	++	+	+
18	+	—	—	49	+	+	+
19	+	—	—	50	+	+	+
20	+	—	—	51	+	+	+
21	±	—	—	52	+	+	+
22	±	—	—	53	+	—	—
23	±	—	—	54	+	+	+
24	+	—	—	55	+	—	—
25	±	—	—	56	++	+	+
26	+	+	+	57	+	+	+
27	+	+	+	58	++	+	+
28	+	—	—	59	++	+	+
29	+	—	—	60	++	—	—
30	+	—	—	宮城野	+	+	+
31	+	—	—	168	—	—	—

No. 1~60;加工適性株, 宮城野;宮城野菌, 168;実験室基準株. 空欄は試験未実施.

4.7 AFLP による菌株間識別試験

ゲル電気泳動の結果は, 4.2 加工適性評価の結果を強く裏付けるものであった。

3.7.5において, プライマーの組み合わせを EAC-MA にした結果が最も明瞭であったが, 加工適性の無かった菌株は, 宮城野菌とはかなり異なる泳動パターンを示していたのに対し, 加工適性有りと確認できた野生株は, どの菌株においても, 市販納豆スターター株である宮城野菌と酷似したパターンを示した(図 2)。このことから, “適性有りと確認された菌株は, “納豆菌” と呼べる代物であることが確認された。

一方で, DNA シーケンサにより, その結果を詳細に分析してみると, ゲル電気泳動では判然としなかった微妙な違いも解析することが可能であった。結果, 電気泳動では同一のパターンに見えた結果も多くの菌株で, 多少の違いが有ることが確認された(結果未掲載)。

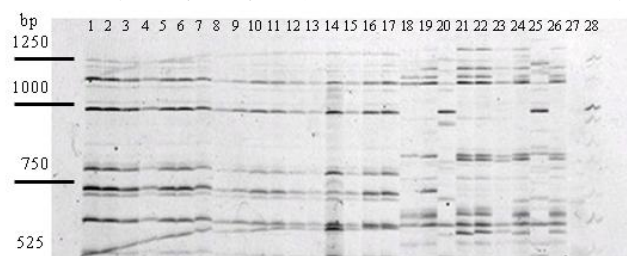


図 2 AFLP 試験電気泳動結果 (一部拡大) ; (レーン 1: 宮城野菌, 2~17: 加工適性株, 18~27: 非加工適性株, 28: 168 株 (実験室基準株))

5. まとめ

本年度は, 納豆菌の採取から, 加工・遺伝子解析による評価まで, かなり幅広く, 且つ, サンプル数も数多く試験を実施することが出来た。

「生育環境の差」=「菌源である稲藁の採取地域の違い」が野生菌株のゲノム DNA へ影響を与え, フラグメントパターンに差異が認められることも期待したが, 残

念ながらそうした傾向は見受けられなかった。

しかしながら, ドットプロット, ビオチン要求性試験, AFLP 試験の結果により, 4.2 加工適性評価の結果において, “加工適性有りと確認された 60 株の菌株については, 「市販納豆スターター株 (宮城野菌) とは “別物” の “納豆菌” = “オリジナル納豆菌株” である」と言って問題ないことが確認された。

次年度は, 本年度加工適性有りと確認された 60 菌株の中から, “有色素大豆向けの納豆菌” = “セルラーゼ活性の高い納豆菌” の選抜を行う。

謝辞

本研究を進めるに当たりご協力下さった, (独) 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) 納豆試験法研究会, 農林水産省食品総合研究所 編. 納豆試験法. 光琳. 1990
- 2) Keitarou Kimura, Yoshihumi Itoh(2007) Determination and Characterization of IS4*Bsu*I-Insertion Loci and Identification of a New Insertion Sequence Element of the IS256 Family in a Natto Starter. *Biosci.Biotechnol.Biochem*, 71, 2458-2464
- 3) 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, 38, 780~781
- 4) Masato Akiba, Hiroya Ito et al(2003) Comparison of *Salmonella enteric* serovar Abortusequi isolates of equine origin by pulsed-field gel electrophoresis and fluorescent amplified-fragment length polymorphism fingerprinting. *Veterinary Microbiology*, 92, 379-388
- 5) Mariko Saitoh, Ikuo uchida et al(2005) The *art-AB* genes encode a putative ADP-ribosyltransferase toxin homologue associated with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Microbiology*, 151, 3089-3096
- 6) P.H.M.Savelkoul, J.A.Lenstra et al(1999) Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. *American Society for Microbiology*, 37, 3083-3091
- 7) M.Heyndrickx, R.C.W.Berkeley et al. (1996) Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens*(Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a Later Subjective Synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a Subspecies of *P.larvae*, with Emended Descriptions of *P.larvae* as *P.larvae* subsp.*larvae* and *P.larvae* subsp.*pulvifaciens*. *International Union of Microbiological Societies*, 46, 270-279