

有色素大豆加工に適した納豆菌に関する試験研究

久保 雄司* 中川 力夫* 長谷川 裕正**

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、納豆の原料は大豆と納豆菌のみで、製造法もほぼ画一的であり、差別化が難しいという側面を持つ。

差別化を図る一つの手段として、特徴のある大豆品種の使用が挙げられる。

そこで本研究では、見た目に特徴があり、抗酸化に効果を発揮すると言われるポリフェノールが豊富に含まれている等、機能面においても特筆すべき点が多い有色素大豆に着目した。

しかし、有色素大豆の中には黄大豆に比べ表皮が厚く硬い為、既存の納豆菌では柔らかく糸引き良く仕上げるのが難しい品種も存在する。

最も顕著なのは黒大豆であり、糸引きが弱い、皮残りの食感が気になると言った指摘があった。

納豆菌は、大手メーカーが自社開発した物を除くと、全国的に見ても、わずか3社の納豆菌製造販売業者が販売する3種類に大別される。

そこで、納豆製品の幅を広げ、他との差別化を図るべく、従来、満足の行く加工が出来ていない有色素大豆加工に適した納豆菌の開発研究に取り組むことにした。

2. 目的

本研究では、現在の製品製造で最も多く用いられている納豆菌に比べて、大豆の発酵プロセスで重要になる幾つかの酵素活性が高い納豆菌株を開発する。

この菌を用いることで、既存の納豆菌では十分な発酵が難しい有色素大豆において問題となっていた、発酵不十分に起因する皮残りの食感及び糸引き具合の改善を達成する。

3. 研究内容

3.1 納豆菌の収集

茨城県を中心に北海道から沖縄まで稲藁を集め、そこから耐熱性胞子を作り、 γ -PGAを生産する細菌を収集した。

集めた菌全てで納豆の試作を行い、納豆製造適性のある株を選抜した。

3.2 系統解析

(Multilocus sequence typing; MLST)

gyrA, *rpoB*, *purH*, *polC*, *groEL*, 16S rRNA のシーケンスを行い、納豆製造に用いられている菌株を含めた近縁種間の系統解析を実施した。

尚、表2に示した通り、MLST及び後述のAFLPについては、納豆製造適性を有した菌株及び加工適性の無

かった菌株から選択して試験を行った。

これにより、遺伝子から見た納豆菌の定義づけに言及すると共に、今研究にて稲藁より収集し3.1にて納豆を作ることの出来た菌株を、納豆菌と称して良いか検証を試みた。

3.3 菌株間の相違検証

(Amplified Fragment Length Polymorphism ; AFLP)

AFLPという手法を用いて、菌株間の遺伝子的な相違について検討した。

PCR後、ABI310(DNAシーケンサ)を用いた分析と、Gene Mapper(解析ソフトウェア)による解析を行った。

これにより、3.1で納豆試作を試作した結果、納豆製造が可能だった菌株同士で、違いがあるのか、或いは、市販納豆製造に用いられる既存の納豆菌と違いがあるのかについて評価・検証を行った。

尚、本研究報告では、既存の納豆菌として、メーカーの使用割合が最も高い(有)宮城野納豆製造所の宮城野菌を実験対照株として採用した。

3.4 菌株間の相違検証

全国に3社の納豆菌製造業者が販売する納豆菌は、いずれもIS4*Bsu*1及びIS256*Bsu*1を保有する他、ピオチン要求性を示し、納豆菌フェージに感受性を示すと言う共通点を持つことが知られている。

そこで、本研究において収集した菌株が同様の特徴を有しているのか検証試験を実施した。

3.5 納豆菌の変異処理と評価

有色素大豆の中でも特に硬い表皮を持つ黒大豆を用いて、表皮が柔らかく糸引き良い納豆に仕上げる為には、大豆表皮の分解や、発酵に関わる酵素活性が通常よりも高いことが求められる。

そこで、収集した納豆菌について、抗生物質耐性を獲得した変異株を取得し、①酵素活性の測定、②発現した蛋白質のパターン評価実施③黒大豆納豆を製造した際の切断強度測定試験を実施することで、目的の特性を有する菌株のスクリーニングを行った。

4. 研究結果と考察

4.1 納豆菌の収集

集めた稲藁及び菌株について表1にまとめた。104の稲サンプルから、424の粘性物質生産細菌を収集し、試作を行ったところ、そのうちの59株で納豆が作れることを確認できた。稲によっては、容易に納豆加工適性を有する菌株が得られたが、逆に、納豆を作る菌株が全く得られなかった稲も存在した。

稲の収穫時期、収穫後の処理方法の違いが影響した

ものと思われる。

表 1 稲及び納豆菌の収集結果

稲採取地域	集めた稲の数	粘りを指標に集めた菌株数	
		納豆製造可	納豆製造不可
茨城県内			
常陸大宮地域	8	0	28
水戸地域	26	14	25
つくば地域	5	0	33
土浦地域	5	0	14
行方地域	9	21	10
稲敷地域	6	4	0
坂東地域	19	7	88
筑西地域	15	2	86
他県			
北海道－札幌地域	2	0	22
宮城－仙台地域	2	1	20
新潟－上越地域	1	0	1
広島－福山地域	2	10	5
福岡－筑後地域	2	0	12
沖縄－石垣地域	2	0	21
合計	104	59	365

表 2 MLST 及び AFLP に使用した菌株一覧

●納豆製造適性を有する菌株

- Bandou-7-3 Hiroshima-13 Hiroshima-14 Ibarakimachi-6-1
- Inashiki-2-1 Itako-9-1 Mito-5-1 Mito-5-10
- Miyagi-4 Namegata-2-2 Namegata-6-2 Namegata-7-1
- Ooarai-10-1 Ryuugasaki-4-1 Sakai-17-3 Tikusei-11-1

●納豆製造適性を有さない菌株

- Sakuragawa-10-1 Goka-4-3 Bandou-23-5-2 Mito-7-4
- Mito-5-13 Miyagi-2 Hitachioomiya-8-2
- Tikusei-12-1 Tikusei-14-1

●参照菌株

- BEST195 Marburg 168

4.2 系統解析 (MLST)

遺伝子解析後、株間配列を比較し、系統解析を実施したところ、納豆を作ることが出来た菌株は、例外なく *B.subtilis* subsp *subtilis* に分類され、その中でも、図 1 の点線で囲った範囲にまとまってクラスターを形成することが分かった。

尚、宮城野菌もこのクラスター内に分類された。

逆に、納豆を製造できなかった菌株について見ると、同じ *B.subtilis* subsp *subtilis* に分類されたものはあったが、このクラスター内に分類された菌株は 1 株もなかった。

この結果により、今回同一クラスターに分類された菌株は納豆菌と言って良いことを確認した。

本試験の応用として、今回解析に利用した遺伝子領域の中で、特に多様性の高かった部分を上手く利用することで、納豆菌判別用のプライマー構築も可能であると考えられる。

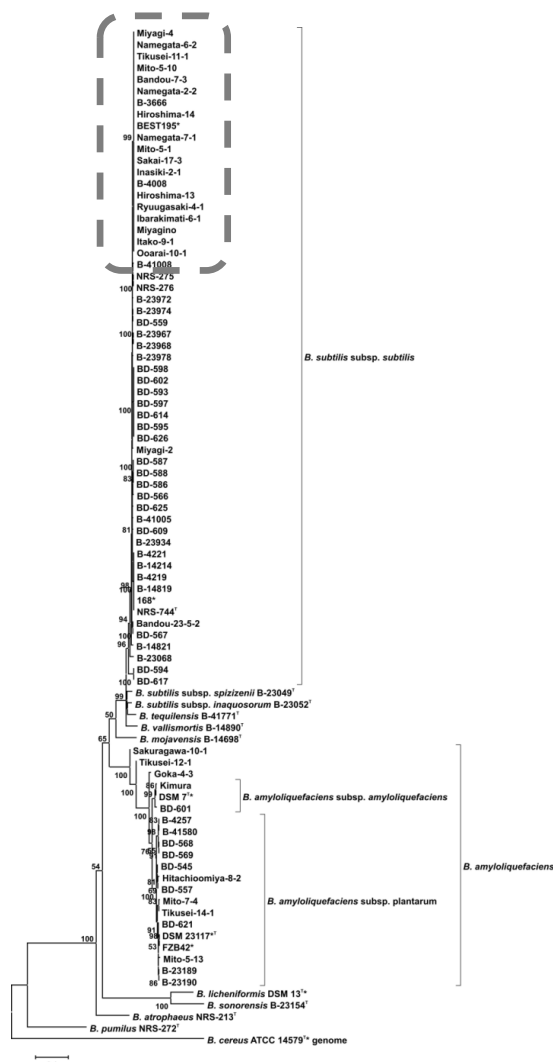


図 1 納豆菌の系統解析結果

4.3 菌株間の相違検証 (AFLP)

AFLP のデータを解析し、系統樹を作成した結果を図 2 に示す。

本試験の結果は、3.2 で行った系統解析の結果を支持する物であった。

納豆菌は、系統的に近いところに分類され、それ以外の菌株とは一線を画す結果となった。

詳細に結果を見ていくと、Ooarai-10-1, Itako-9-1, Hiroshima-14, Mito-5-10 等一部で相互識別が出来なかったが、多くの菌株で相互識別が可能であった。尚、後に述べる IS4Bsu1 及び IS256Bsu1 の有無を比較すると、mito-5-10 はこの配列を有していないことから、その他と識別が出来る。

また、試験に供したほとんどの株が、宮城野菌とは識別可能であり、多少なりとも異なるゲノム情報を持っていることが明らかになった。

つまり、野生納豆菌同士で多様性が見受けられ、納豆製造時に使う菌株を変えることで、食味の異なる納豆が作れる可能性が有ることが確認できた。

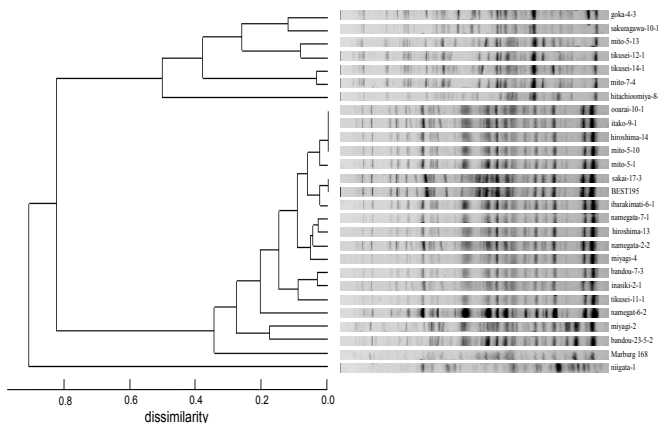


図2 AFLPによる系統分類結果

4.4 菌株間の相違検証

IS4Bsu1 及び IS256Bsu1 の有無, ビオチン要求性, 納豆菌ファージ(*B. subtilis* bacteriophage ΦNIT1)への感受性について試験を行った結果を表3に示す。

表3 菌株の特徴検証結果

Name	bio	IS4Bsu1	IS256Bsu1	species ^a	phage sensitivity ^b
natto-fermenting strains					
Bandou-7-3	-	-	-	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	s
Hiroshima-13	-	-	-	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	s
Hiroshima-14	-	+	+	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	s
Ibarakimachi-6-1	-	+	+	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	s
Ineshiki-2-1	-	-	-	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	s
Itako-9-1	-	+	+	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	s
Mito-5-1	-	+	+	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	s
Mito-5-10	-	-	-	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	s
Miyagi-4	-	-	-	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	s
Namegata-2-2	-	+	+	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	s
Namegata-6-2	-	+	+	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	s
Namegata-7-1	-	-	-	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	s
Ooarai-10-1	-	+	+	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	s
Ryugasaki-4-1	-	+	+	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	s
Sakai-17-3	-	+	+	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	s
Tikusei-11-1	-	+	+	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	s
natto-non-fermenting strains					
Sakuragawa-10-1	+	-	-	<i>B.a.</i>	r
Goka-4-3	+	-	-	<i>B.a.</i>	r
Bandou-23-5-2	+	-	+	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	r
Mito-7-4	+	-	-	<i>B.a. subsp. plantarum</i>	s
Moto-5-13	+	-	-	<i>B.a. subsp. plantarum</i>	r
Miyagi-2	+	-	-	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	r
Hitachiomiya-8-2	+	-	-	<i>B.a. subsp. plantarum</i>	s
Tikusei-12-1	+	-	-	<i>B.a.</i>	s
Tikusei-14-1	+	-	-	<i>B.a. subsp. plantarum</i>	r
reference strains					
BEST195	-	+	+	<i>B.s. subsp. subtilis</i>	s
Marburg 168	+	-	-	<i>B.s. subsp. spizizenii</i>	r

^adetermined by multilocus nucleotide sequencing of *gyrA*, *rpoB*, *purH*, *polC*, and *groEL* as described in Materials and Methods. *B.s.*, *Bacillus subtilis*; *B.a.*, *Bacillus amyloquelificans*.

^bphage sensitivity to *B. subtilis* bacteriophage ΦNIT1; s, sensitive; r, resistant.

この結果を見ると、幾つか興味深いことが分かる。まず、これまで納豆の種菌メーカーが販売してきた納豆菌株は例外なく IS4Bsu1 及び IS256Bsu1 を保有しているが、納豆製造が可能な野生株においては保有する株とそうでない株が混在し、納豆製造に必須で無いことが確認された。

ビオチン要求性を見ると、納豆製造適性を有する株についてはビオチン合成能がない為(表中“-”標記)、必須の栄養素であることが確認された。

同様に納豆菌ファージについても全ての製造適性株で例外なく感受性を示した(表中“s”標記)。

一方で、納豆製造適性を持たない菌については、ほぼ全ての非適性株において IS4Bsu1 及び IS256Bsu1 も持っていないこと、納豆菌ファージについては感染するものとそうでないものの両方が存在した。ビオチンに着目すると、必須の栄養素ではなく、要求性を示さない為、この点において適性株と区別可能であることが確認された。

4.5 納豆菌の変異処理と評価

4.5.1 変異株の酵素活性評価

酵素活性測定試料は、LBbrothにて振盪培養を行った培養上清を用いた。AZO-CMCの分解活性によりセルラーゼ活性を、またAZO-caseinの分解活性によりプロテアーゼ活性を評価した。尚、菌体破碎を行っても、酵素活性が変化しないことを確認している。

試験の結果、セルラーゼ活性は、既存菌株である宮城野菌に比べ、発酵開始時点からの立ち上がりが高く、また最高に差が開いた際には1.5倍程度に達することが確認された。

プロテアーゼについては、経時変化を図3に示したが、セルラーゼよりも更に顕著に向上していることが確認され、宮城野菌に比べ最高で2倍以上に達していることが明らかになった。

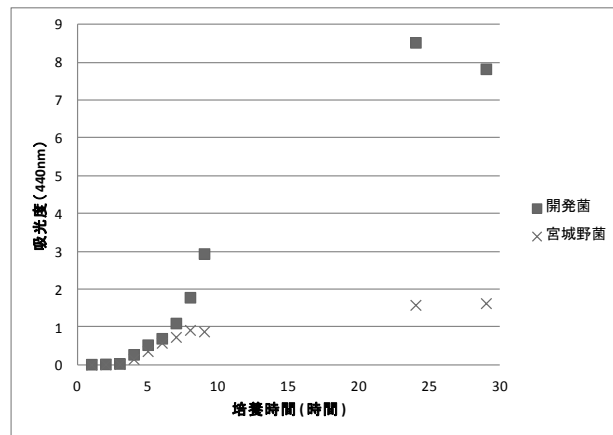


図3 プロテアーゼ活性の経時変化

4.5.2 変異株箇所の検討

遺伝子解析を実施した所、*rpoB*領域に一塩基変位が起きていることを確認した。

4.5.3 発現した蛋白質のパターン評価実施

SDS-PAGEにより蛋白質の発現パターンを比較した。サンプルは、菌株を液体培養し、その上清についてTCA沈殿を行った。BIO-RAD プロテインアッセイ染色液を用いて蛋白質濃度を測定し、トータルタンパク質量が25µgになるよう調整して、泳動を行った。

結果、親株と変異株で、蛋白質の発現パターンが大きく変わっていることが確認された。

尚、発現量が顕著に上昇した蛋白質について、二次元電気泳動により同定を行ったところ、納豆の発酵や食味に関与する酵素であることが確認された。

これにより、今回取得した納豆菌変異株は、既存菌株よりも発酵力が強い菌株であり、黄大豆よりも発酵困難であった黒大豆加工に向いていることが分かった。

4.5.4 切断強度試験結果

発現蛋白質等の実験データ上は、黒大豆加工向けであることを確認した為、黒大豆小粒という品種で納豆を試作し、納豆の粒を短軸方向に切断するのに要する力を測定することで、大豆の軟化効果が認められるのかを確認した。

納豆菌は、胞子化した状態のものを用意し、下記の条件で黒大豆納豆を製造した。

20℃、16時間の浸漬を行った後、0.18~0.19MPaで30分蒸煮を行った。

蒸煮大豆に対し、用意した納豆菌を、10³/gの濃度になるよう添加して39℃、90%RH、18時間で発酵を行った後、20℃、50%RH、2時間粗熟を取り、5℃で1日熟成させた。

測定は20℃で実施した。ピークホールドタイプの電子天秤上で、図4のアダプタにより納豆を切断し、50粒の平均値を採用した。

試験を行ったところ、親株に比べ変異株の方が切断に要する力が小さく、柔らかく仕上がることを確認できた(表4)。

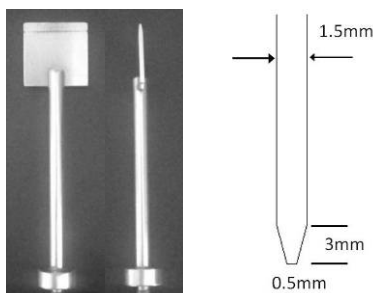


図4 納豆切断用アダプター写真及び切断部概要図

表4 試作納豆の切断強度試験結果

	切断強度 (g)	
	宮城野菌	開発菌
50粒平均	193.8	180.4

4.5.5 試食評価

酵素活性の高まった菌株を用いて、黒大豆納豆を試作し、年代、性別も様々な、計26名に宮城野菌と開発菌を用いて製造した黒大豆納豆について試食・評価を行ってもらった。

尚、試食・評価については、2つの納豆の違いについて何の事前情報も与えず実施した。

結果、今回開発した菌株を用いた方が高い評価を得られた(表5)。

表5 黒大豆納豆試食結果

味	宮城野菌の方が美味しい 7人	開発菌の方が美味しい 19人
臭い	宮城野菌の方が良い 9人	開発菌の方が良い 16人
硬さ	宮城野菌の方が柔らかい 3人	開発菌の方が柔らかい 23人
総合評価	宮城野菌の方が良い 8人	開発菌の方が良い 18人

※臭いについては1名が両方同じと回答

5. まとめ

全国各地で栽培された稲藁より納豆菌を採取し、59株の納豆菌株を収集することができた。

集めた菌株について種々の遺伝子解析を実施し、納豆菌の定義づけについて言及した他、菌株毎の違いや特徴についても評価を行った。

MLST解析の結果、納豆菌は、*B.subtilis* subsp *subtilis* に分類され、その中でも、まとまった範囲にクラスターを形成し、逆に納豆にならない菌株は一株もこのクラスターに分類されないことが明らかになった。

一方、AFLPの結果を見ると、試験を行ったほとんどの野生納豆菌同士で何らかの遺伝子的な違いがあり、相互識別が可能であることが確認された。

この結果から、各々多少異なった遺伝子情報を持つ為、使用する菌株を変えることで多少なりとも違った印象の納豆製品が製造できる可能性が見いだせた。

実際、集めた菌株を用いてメーカーと共同で試作検討を行った結果、既存菌株よりも糸引きや風味に優れた仕上がりになる菌株が有った為、その菌株を用いて新製品開発を行った。

しかしながら、当初目的としていた黒大豆向けと呼べる特徴を有した納豆菌は、集めた菌株の中に無かった為、変異処理を行い、目的の性質を持った納豆菌を得た。そうして得られた納豆菌の評価を行うと、黒大豆加工に必要な酵素活性の上昇が確認され、試作の結果、柔らかさや食味の観点からも既存菌株よりも評価の高い菌株を得ることが出来た。

こうした成果は、学会での口頭発表や、論文投稿を通じて、外部への公表も行っている。

以下に、これまでの主要成果をまとめる。

●製品化

- ・水戸納豆製造(株)より「紅ずきん」及び「雪あかり」が製品化され現在販売中

●特許出願

- ・黒大豆をはじめとする有色素大豆向け納豆菌として、納豆菌及びその使用方法について特許出願中

●外部発表

- ・学会発表：日本食品科学工学会 第57回大会
- ・学会誌掲載：Applied and Environmental Microbiology, 2011Sep;77(18):6463-9.
- ・日本醸造協会誌11月号に記事掲載 等

6. 今後の課題

茨城県内の納豆メーカーに、本研究成果を広くPRすると共に、成果を活用し製品化支援に繋げていきたい。

7. 謝辞

研究推進に御協力頂きました(独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 木村啓太郎様並びに、大豆試料をご提供頂きました茨城県農業総合センター生物工学研究所 岡野克紀様に感謝いたします。