

納豆菌の発酵・熟成に関わる遺伝子の機能解析と制御に関する試験研究事業

(第4報)

久保 雄司* 武田 文宣*

1. はじめに

納豆の賞味期限は製造後 10 日程度で設定されることが多く、かつ、作り置きが難しい製品であるため、メーカーは季節や時期を問わず生産を続けなければならない。賞味期限を既存製品よりも長く設定できる技術を確認すれば、メーカーにとって製造計画にゆとりが生じる、土産等の製品開発の促進に繋がるなどのメリットが生じる。更に賞味期限切れにより、まだ食べられるのに廃棄される製品を減らすことで、昨今問題となっている食品ロスの軽減への寄与も期待される。

2. 目的

納豆は製造後も菌が生きた状態で存在し、酵素も穏やかに働き続けるため、貯蔵流通の過程で熟成が進み続ける。熟成速度に影響を与える要因を明らかにするとともに、賞味期限を延ばすことのできる納豆菌株の育種を目的とした。

平成 28 年度から 30 年度にかけて、ペプチダーゼやポリアミン¹⁾代謝遺伝子を破壊した納豆菌を合計 9 株作成した^{2,3,4)}。平成 30 年度に、それらの遺伝子破壊納豆菌株の培養液や納豆を調整し、納豆の熟成が進むと増加するアンモニア態窒素含量や遊離アミノ酸含量を測定することで品質劣化の指標として、ターゲット遺伝子の機能と納豆の品質変化について評価を実施した⁴⁾。その際の納豆調製手順として、大豆を蒸煮後、ボトルに移してオートクレーブにて完全滅菌したものをポリスチレンペーパー(PSP)容器に取り分け、菌液を添加する方法を採用した。しかし、特にボトルの底に近い大豆を PSP 容器に掻き出す際、皮剥け、割れや潰れが生じ易いことを認識していた。また、一つの容器から 3 連でサンプリングと分析を実施したため、PSP 容器間の不均一性を反映していない可能性が高い。大豆の皮剥け、割れ、潰れにより種子が露出した状態では、種皮に包まれた状態よりも、菌の生育に有利、且つ、ペプチダーゼなどの酵素が作用しやすい可能性が高い。そこで本年度は、そうした影響を排除した結果を得るために納豆サンプルの調製法を変え、データを再取得することとした。加えて、遺伝子組み換え微生物の直接的な食品製造への利用は認められていないため、納豆菌に遺伝子変異処理を施し、賞味期限延長に寄与する菌株の育種も実施した。

3. 研究内容

昨年度までに作成した遺伝子破壊納豆菌株を使用して納豆を調製し、アンモニア態窒素や遊離アミノ酸含量の再測定を実施した。併せて賞味期限延長を可能にする菌株の育種も実施した。遺伝子変異を誘発する方

法として X 線と紫外線を選択した。

3.1 試験データ採取及び結果解析

本試験では、各試験区において複数個の納豆を試作し、1 個当たり 1 回分析を行い、結果の平均を算出した。この解析法は、1 個のサンプルを複数に分けて分析し、平均値を算出する手法と比べ標準偏差が大きくなる。そこで、本報告での分析値の比較は、単純に測定結果の大小で実施した。

3.2 遺伝子破壊納豆菌株を用いた評価

3.2.1 試験菌株での納豆試作

一晚浸漬した国産大豆(スズマル)を加圧釜で 0.18MPa、20 分蒸煮した後、50ml の遠心チューブに約 10g ずつ入れ、121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌した。種菌は、宮城野菌(宮城野納豆製造所)をベースにタンパク質分解或いはポリアミン代謝に関与する遺伝子を破壊した 9 株の納豆菌株⁴⁾($\Delta ybaC$, $\Delta yjbG$, $\Delta paiA$, $\Delta b1tD$ と $\Delta paiA$ の二重破壊株, $\Delta b1tD$, $\Delta ywaD$, $\Delta pepA$, $\Delta yf1G$, $\Delta yqjE$)及び対照として非遺伝子組み換えの宮城野菌株(WT)を使用した。それぞれの菌株を LB 培地で培養した後、上記の遠心チューブ入りの蒸し大豆に植菌した。蓋を緩め、酸素等の出入りを可能にした状態で、発泡スチロール製のラックにセットし、40°C で 18 時間加温した。発酵完了後は、蓋を完全に閉め、水分の飛散が無い状態で 4°C にて所定の期間保存して試験に供した。

3.2.2 前処理

3.2.1 に記載の納豆について、①発酵終了直後、②4°C で 10 日間及び③4°C で 20 日間保存したサンプルについて、30メッシュの裏ごし器で裏ごしし、各種分析に使用するサンプルとした。

3.2.3 アンモニア態窒素含量測定

3.2.2 で裏ごしした納豆について、アンモニア態窒素の量を、アンモニアテストワコー(富士フィルム和光純薬(株))を使用して測定した。約 150mg を秤量した後、50ml にメスアップし、試験サンプルとした。測定のプロトコルは添付のマニュアルに従い測定を実施した。

3.2.4 遊離アミノ酸含量測定

3.2.2 で裏ごしした納豆について、遊離アミノ酸含量の測定を行った。ターゲットとするアミノ酸は、アミノ酸混合標準液、AN-II 型及び B 型(富士フィルム和光純薬(株))を合わせた 35 種とした。実験操作は、既報⁴⁾を参考に実施した。

裏ごし納豆を遠心チューブに約 1g ずつ秤量し、70%

エタノールで遊離アミノ酸の抽出操作を3回繰り返した後、10mlにメスアップした。抽出溶液をシリンジフィルター(ADVANTEC 13CP020AS)にて濾過し、不溶物及び菌体を除去した。pH2.2クエン酸リチウムバッファーと混合し、既報⁴⁾と同じ条件でHPLC分析を実施した。

3.3 遺伝子変異処理と評価

当センターが保有する納豆菌Namegata-2-2株に対し、X線または紫外線を照射することで、遺伝子変異を誘発し、その中から目的とする賞味期限延長に寄与する株の選抜作業を実施した。

3.3.1 X線照射

納豆菌Namegata-2-2株をLB培地にて、37°C、110rpmで20~22時間程度振盪培養後、培養菌体を遠心分離して回収し、滅菌水で 1×10^7 (CFU/ml)程度に調整して照射サンプルとした。滅菌シャーレにサンプルを20ml注ぎ、ポリイミドフィルムを被せてX線発生装置にセットした。X線照射装置として、軟X線発生装置OM-100R(株式会社オーミック)を使用した。照射電圧を80~100kV、照射電流を6mAとし、照射ムラが生じないように、軟X線の照射中は試料台を回転させ続けた。照射サンプルを適宜希釈し、LB寒天培地にて培養することで死滅率を算出し、照射線量を設定した。同時に、単一分離したコロニーをピックアップし、LB寒天培地にて培養することで、この後の試験サンプルとした。

3.3.2 紫外線照射

クリーンベンチ(NS-8A, 十慈フィールド株式会社)を使用して紫外線の照射を行った。3.2.1と同様に納豆菌Namegata-2-2株をLB培地中で振盪培養後、菌体を回収し滅菌水に懸濁し 1×10^6 (CFU/ml)程度に調整した。滅菌シャーレにサンプルを20ml注ぎ、蓋をしない状態で紫外線ランプの下に設置した。その際の紫外線ランプ(東芝GL15)からシャーレまでの距離は約57cmだった。この状態で30秒から5分照射した。照射箇所には偏りが生じないように2分以上照射する場合は、1分ごとにシャーレを振盪した。照射サンプルを適宜希釈後、LB寒天培地にて培養して、単一のコロニーをピックアップし、この後の試験サンプルとした。

3.3.3 納豆の試作と保存試験(一次スクリーニング)

3.3.1及び3.3.2でピックアップしたX線または紫外線照射株を用いて納豆の試作と保存試験を行った。試作方法は、3.2.1と同様である。発酵終了後は容器の蓋を閉め、一度10°C以下に冷却した後、20°C前後で管理された部屋に保管することで保存試験を行った。

3.3.4 タンパク質分解活性の評価

角型シャーレを用いて、2%スキムミルク寒天(pH7)プレートを作成した。滅菌した抗生物質測定用のペーパーディスク(ADVANTEC, ϕ 8mm)を等間隔に設置した。3.3.3で有望と思われた菌株について、2mlのLB培地中37°C、120rpmで前培養を行った。その後、前培養液を新たな2mlのLB培地に 2μ l添加し前培養と同様の条件で本培養を行った。対照株として、Namegata-2-2株も同様に培養した。24時間前後で本培養を終了し、遠心

分離及びフィルター滅菌(ADVANTEC 13CP020AS)処理して上清を回収し、スキムミルク培地上のペーパーディスクに 20μ lずつ添加した。37°Cで48時間加温して、スキムミルクが分解されて透明化した部分の直径からタンパク質分解酵素活性を評価し、透明部分の直径が小さく、分解活性が低い株をスクリーニングした。

3.3.5 アンモニア態窒素含量測定

3.3.4で対照株よりもスキムミルクの分解活性が低下していた株について、3.3.3と同様に納豆を試作し、発酵終了直後のもの、10°Cで10日間及び20日間保存し、裏ごししたものを本項(3.3.5)以降の試験サンプルとして準備した。アンモニア態窒素は、アンモニアテストワコーを使用し、3.2.3と同様の手順で測定した。

3.3.6 遊離アミノ酸含量測定

3.3.5で裏ごしした納豆について、遊離アミノ酸含量の測定を行った。試験方法、結果の算出方法は、3.2.4と同様である。

3.3.7 納豆の外観、糸引き等の評価

試作した納豆を10°Cで20日間保存した際の、目視によるチロシン析出の有無及びかき混ぜた際の糸引きの強さを評価した。

3.3.8 硬さの測定

対照株を含む試験菌株で納豆を製造し、10°Cで20日間保存した後、テンシプレッサーTTP 50BX II(有限会社タケトモ電機)により硬さの測定を実施した。サンプルは氷上で保つことで、氷温まで冷却して測定に供した。 ϕ 25mmの円形プランジャーを使用し、圧縮速度を1mm/secとした。70%圧縮で大豆は崩壊することを確認し、圧縮率を70%とした。各サンプル30粒測定し、最高圧力の平均値を比較した。

4. 研究結果と考察

4.1 遺伝子破壊納豆菌株を用いた結果

4.1.1 アンモニア態窒素含量測定結果

アンモニア態窒素含量の測定結果を図1に示した。

製造直後において対照である宮城野菌株(88 ± 13 mg/100g)よりも小さな値を示したのは、 $\Delta b1tD(74 \pm 3$ mg), $\Delta ywaD(73 \pm 5$ mg), $\Delta pepA(76 \pm 11$ mg), $\Delta yf1G(74 \pm 14$ mg)の4株だった。保存期間が10日間になると、やや減少する株(4株)も見られたが、ほとんど変化がない(2株)か、やや増加する傾向(3株)が確認された。この時点で、対照株(86 ± 11 mg/100g)よりも小さな値を示したのは、 $\Delta paiA(81 \pm 1$ mg), $\Delta b1tD(77 \pm 16$ mg), $\Delta ywaD(73 \pm 12$ mg), $\Delta pepA(77 \pm 6$ mg), $\Delta yf1G(81 \pm 8$ mg)の5株であった。大よそ、発酵終了直後と同様の傾向を示したことになる。20日時点では、宮城野菌株(127 ± 6 mg/100g)よりも小さな値を示したのは、 $\Delta ybaC(103 \pm 10$ mg), $\Delta paiA(92 \pm 4$ mg), $\Delta paiA, b1tD$ の2重破壊株(106 ± 19 mg), $\Delta b1tD(94 \pm 12$ mg), $\Delta ywaD(83 \pm 5$ mg), $\Delta pepA(91 \pm 6$ mg), $\Delta yf1G(92 \pm 6$ mg), $\Delta yqjE(101 \pm 17$ mg)の8株となり、宮城野菌株よりも高い数値を示したのは、 $\Delta yjbG(152 \pm 12$ mg)のみであった。特に、 $\Delta ywaD$ は20日経過時点の数値が、宮城野菌

の発酵終了直後の数値よりも小さく、日持ち向上に影響を与えることが示唆された。

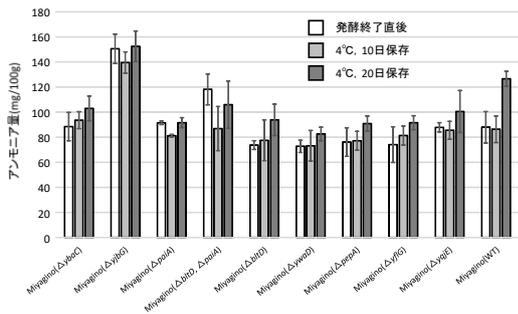


図1 遺伝子破壊納豆菌株のアンモニア態窒素含量

4.1.2 遊離アミノ酸含量測定結果

遊離アミノ酸含量の測定結果を図2に示した。

製造直後において対照である宮城野菌株 (485 ± 50mg/100g) よりも大きな値を示したのは、 $\Delta yjbG$ (596 ± 20 mg) のみであった。保存期間が10日間では、宮城野菌株 (554 ± 41mg/100g) よりも小さな値を示した株は $\Delta ywdD$ (509 ± 28mg), $\Delta pepA$ (530 ± 36 mg) の2株のみであったが、それ以外の菌株も $\Delta b1tD$ (622 ± 41 mg) を除き、全て500mg台となり、対照株と大きな差は見られなかった。20日時点では、宮城野菌株 (942 ± 159mg/100g) に対し、 $\Delta yjbG$ (1419 ± 101 mg) 以外は全て対照株よりも小さな値を示した。特に $\Delta yqjE$ (702 ± 29 mg), $\Delta ywdD$ (723 ± 44 mg), $\Delta b1tD$ (739 ± 41 mg) は低い値を示し、タンパク質の分解が低く抑えられ、日持ちに対し影響のある領域であることが示唆された。

納豆においてアンモニア態窒素や遊離アミノ酸の生成が低く抑えられる点、また、液体培養においてもアンモニア態窒素の生成が低い点⁴⁾から、 $ywdD$ の活性を抑制すると、納豆の日持ちには正の影響が出るであろうことが示唆された。尚、本研究の目的から逸れるが、 $yjbG$ の機能を欠損すると、タンパク質分解が亢進し、アンモニア態窒素生成量も増加する点は興味深い。

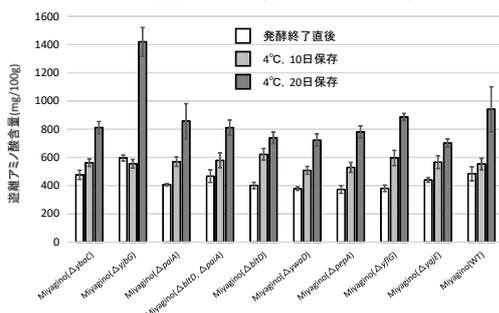


図2 遺伝子破壊納豆菌株の遊離アミノ酸含量

4.2 遺伝子変異処理と評価

4.2.1 X線照射

1,000Gyから4,000Gy照射して死滅率を算出し、照射X線量を設定した。死滅率と照射量を表1にまとめた。3,500Gy以上照射した際の死滅率は98%を超え、培地上で培養した際のコロニーの外観にも非照射の場合と異なる株が増えたことから、3,500~4,000Gyを本研究における主要な照射量として設定した。照射したサンプルをLB培地にて培養し、単一コロニーを合計563株収集し、以降の評価サンプルとした。

表1 X線照射線量と納豆菌の死滅率

照射X線量 (Gy)	死滅率 (%)
1,000	86.1
1,500	91.3
2,000	92.1
2,500	95.7
3,500	98.5
4,000	99.1

4.2.2 紫外線照射

30秒から5分まで照射時間を振り、各区分で菌株のピックアップを行った。X線照射の際と同様、培地上におけるコロニーの外観の変化を感じた株を中心に合計1,183株を収集し、3.2.3以降の試験に供した。

4.2.3 納豆の試作と保存試験 (一次スクリーニング)

4.2.1と4.2.2でスクリーニングした1,746株を用いて、50mlの遠沈チューブにて納豆を試作し、約20°Cの部屋に20日間保管した中で、チロシンの析出、大豆の崩壊具合、褐変などを確認項目として品質変化が少ないサンプルを選抜した。結果、X線照射株より79株、紫外線照射株より86株、合計165株を選抜した。

4.2.4 タンパク質分解活性の評価結果

4.2.3で一次スクリーニングを通過した合計165株について試験を実施した。寒天と混合したスキムミルクが分解されれば透明になるため、透明になる直径が小さい株のスクリーニングを行った。培養ロット毎に同一株でも透明化する直径が多少なりとも変化するため、プレート毎に対象株 (Namegata-2-2) の試験区分を設け、相対評価とした。結果、UA3, UB66, UB80, XC91, XF3及びXF36の6株を選抜し、4.2.5以降の試験に供した。

4.2.5 アンモニア態窒素含量測定結果

アンモニア態窒素含量の測定結果を図3に示した。

製造直後において対照株であるNamegata-2-2 (56 ± 18mg/100g) よりも小さな値を示したのは、UB66 (33 ± 3 mg), XF36 (43 ± 2 mg) の2株であった。保存10日間では、対照株 (85 ± 2mg/100g) と同等かそれよりも小さな値を示したのは、UB66 (52 ± 5 mg), XC91 (77 ± 6 mg), XF36 (84 ± 19mg) の3株であった。20日時点では、対照株 (83 ± 8mg/100g) よりも小さな値を示したのは、UB66 (62 ± 6 mg) の1株であった。

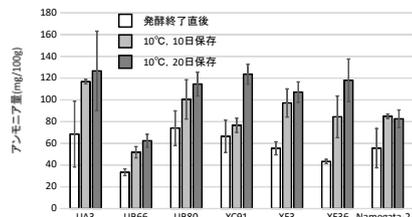


図3 遺伝子変異処理株のアンモニア態窒素含量

4.2.6 遊離アミノ酸含量測定結果

遊離アミノ酸含量の測定結果を図4に示した。

製造直後において対照であるNamegata-2-2 (355 ± 50mg/100g) よりも小さな値を示したのは、UB66 (276 ± 30 mg) 及びXF36 (335 ± 10 mg) の2株であった。保存期間が10日間では、対象株 (644 ± 12mg) よりも小さな値を示

した株はUB66(518 ± 23mg), UB80(528 ± 88 mg), XC91(620 ± 55mg), XF3(617 ± 84 mg)の4株であった。20日時点では、対照株(691 ± 28mg/100g)に対し、UB66(698 ± 50mg)が同程度の値を示した。また、納豆のシャリシャリした食感の原因となるチロシンは、対象株(101 ± 4mg/100g)に対し、UB66(88 ± 5mg)で少なくなっており、賞味期限延長可能性が期待される。

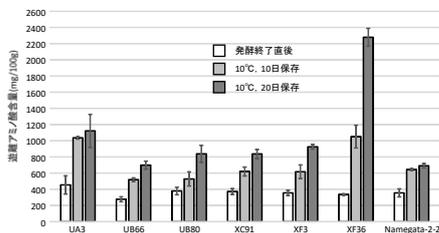


図4 遺伝子変異処理株の遊離アミノ酸含量

4.2.7 納豆の外観、糸引き等の評価

試作した納豆を10°Cで20日間保存した際の、チロシン析出の有無及び糸引きの強さを表2に示した。チロシン析出が確認された株は無かったが、糸引きの違いは明確だった。とりわけ、XF36は保存期間を経ても糸引きが強く、長期保存に向くと思われた。

表2 チロシン析出の有無及びかき混ぜた際の糸引き

菌株	チロシン析出 ^{※1}	糸引き ^{※2}
UA3	-	±
UB66	-	+
UB80	-	~±
XC91	-	++
XF3	-	++
XF36	-	+++
Namegata-2-2	-	++

※1 「-」はチロシンの析出が見られなかったことを示す。

※2 「-」、「±」は糸引きが弱く、「+」が多いほど糸引きが強いことを示す。

4.2.8 硬さの測定結果

納豆は保存期間が長くなるほど軟化が進むことが知られている。UB66, XF36株及び対照株 (Namegata-2-2) で製造した納豆を70%圧縮した際の最高圧力を測定した結果を図5に示した。この結果、UB66, XF36共に対照株よりも硬く、特にXF36が秀でていることが確認された。

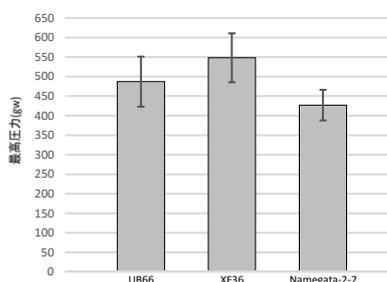


図5 氷温にて測定した納豆の硬さ(10°C, 20日間保存)

5. まとめ

5.1 遺伝子破壊納豆菌株を用いた評価

アンモニア態窒素含量及び遊離アミノ酸含量において、 $\Delta ywaD$ は20日経過時点の数値が、対照株である宮城野菌よりも小さく、この遺伝子領域の活性が日持ち向上に影響を与えることが示唆された。

5.2 遺伝子変異処理納豆菌株を用いた評価

UB66は、製造した納豆を10°Cで20日間まで保存した

際、アンモニア態窒素、遊離アミノ酸量において対照株よりも低く推移する傾向を示した。また、崩壊に必要な最高圧力が対照よりも高く、歯ごたえが残ると期待される。今回試作した条件では、対照株よりも糸引きがやや弱い印象で、糸引きが改善するかは今後の課題であるが、実用化の可能性があると見込んでいる。

XF36は、10°Cで10日以上保存した際のアンモニア態窒素量及び遊離アミノ酸量が対照株よりも増加し、思わしくない結果となった。しかし、見た目にチロシン析出は無く、20日以上経過した場合でも糸引きは対照株を含む他のどの株よりも強く、歯ごたえも残ることが確認された。本試験は、保存温度を10°Cとしたが、実際の流通では、10°Cよりも低温に保たれることが多く、温度条件が改善されれば、遊離アミノ酸やアンモニア態窒素の増加については改善すると期待される。XF36の、保存期間を経ても軟化しにくく糸引きが強く保たれるという特徴は、他の納豆菌株と一線を画すものであり、UB66同様、今後も実用化に向けて検討を続ける価値があると考えられる。

全体として、遺伝子領域の評価と遺伝子変異処理による育種を独立して進めてしまったが、今後は $ywaD$ の変異を指標とするスクリーニング方法を採用すると更に賞味期限を長く設定できる菌株を育種できると期待される。

6. 今後の課題

県内納豆メーカーと共に、試作試験等を通じUB66及びXF36の実用化可能性について検証を行う。

7. 謝辞

研究推進に御協力頂きました国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 微生物機能ユニットの木村啓太郎ユニット長に感謝致します。また、軟X線発生装置を使用させて頂きました、茨城県農業総合センター 生物工学研究所の皆様に感謝致します。

8. 参考文献

- 1) 五十嵐一衛, 柏木敬子, 細胞増殖必須因子ポリアミンと代謝物アクロレインの生理作用と臨床応用, 化学と生物, **49**, 32-39(2011)
- 2) 久保雄司, 中川力夫, 納豆菌の発酵・熟成に関わる遺伝子の機能解析と制御に関する試験研究事業, 茨城県工業技術センター平成28年度研究報告, **45**, 17-20(2017)
- 3) 久保雄司, 中川力夫, 納豆菌の発酵・熟成に関わる遺伝子の機能解析と制御に関する試験研究事業(第2報), 茨城県産業技術イノベーションセンター平成29年度研究報告, **46**, 23-26(2018)
- 4) 久保雄司, 吉浦貴紀, 納豆菌の発酵・熟成に関わる遺伝子の機能解析と制御に関する試験研究事業(第3報), 茨城県産業技術イノベーションセンター平成30年度研究報告, **47**, 27-30(2019)