納 豆 菌 の 開 発

Development of natto starter

木内 幹・村松芳多子

Kiuchi, Kan, Muramatsu, Kanako

(共立女子大学家政学部食物学科)

Department of Food Science and Nutrition, Faculty of Home Economics Kyoritsu Womens' University

はじめに

納豆は古来健康食品と見なされ、種々の効用が言い伝えられてきた。「納豆沿革史」によれば、アミノ酸・ビタミンを多量に含有する、肌の色艶を良くする、脚気・皮膚病・下痢・胃ガン・心臓病に効く、血管を丈夫にする、赤痢菌・チフス菌などに抗菌性があるなどの効用を有するとされている¹⁾。納豆を好む者はその臭いと粘りの多いものを好むが、納豆を嫌う者もまたそれらを嫌う傾向がある。それ故臭いの少ない納豆や粘りのない納豆などの納豆の品質改良に関する製品開発がなされる一方で、納豆の食品機能性に関する知見を取り入れた製品開発も行われてきた。

1981年須見らによってナットーキナーゼ活性が発表されて以来納豆が健康食品として注目されて納豆の生産高が急増した²⁾。また、納豆の機能性に注目して、1995年に天然物・生理機能素材研究会主催の公開セミナー「納豆の機能成分と効能について」では納豆の過酸化LDLに対する作用(金沢武道)、抗酸化機能(渡辺乾二)、血圧への影響(丸山真杉)、ビタミンKの最近の話題(白幡聡)、ビタミンのK₂測定(磯部洋祐)、骨粗鬆と納豆摂取(折重肇他)、血栓溶解効果(須見洋行)、血栓溶解活性の高い納豆菌とその増殖特性(熊田薫)、納豆菌胞子経口投与による糞便菌叢の変化(細井智弘)、消化酵素剤としての納豆菌(正田誠)などが報告された。そして納豆の生理機能性に注目して納豆菌の開発がなされ、ヤマダフーズによる上述のナットーキナーゼ高生産菌の開発³⁾、村松らによるエラスターゼ高活性納豆菌の開発⁴⁾が発表されている。

我々は納豆の品質改良のために高粘性高旨味納豆菌の分離と高脂血症に効用を有すると考えられるエラスター

ゼ高生産菌の分離を行い、それらの納豆を用いて納豆を製造するとともに、製品開発に付随する問題として、菌株の保存法に関する問題、納豆の保存上問題となるいわゆるチロシンの結晶析出について、また分離した納豆菌の粘質物利用など2-3の研究を行ってきたので、まとめて報告させていただく。

1. エラスターゼ高生産納豆菌の開発

エラスターゼは1949年、Balo & Banga によってヒト弾性線維エラスチンの代謝酵素としてヒトすい臓中に発見された⁵⁾。エラスターゼは生体内に広く分布し、すい臓・白血球・血小板・平滑筋細胞・マクロファージ起源の酵素が報告されている。すでにエーザイ(株)からブタすい臓エラスターゼがエラスチームという商品名で製剤化されている。エラスチームの効用としては高血圧患者の血清脂質異常改善などがいわれている。

エラスターゼ高活性納豆菌の第1次スクリーニングとしてエラスターゼ高生産納豆菌を検索するに当たり、*Bacillus subtilis*を含めて当研究室の保存菌株約700株についてその液体培養液中に生産されたエラスターゼ活性を測定した⁶⁾。その結果、培養液の活性が市販納豆菌の培養液のそれよりも高い菌株を78株選抜した。第2次スクリーニングではさらに詳細に検討して15株を選抜した。第3次スクリーニングでは第2次スクリーニングで得られた15株と市販納豆菌4株を用いて調べ、市販納豆菌の活性が20~30 Uの範囲であったのに対し野生株KFP355株の⁶⁰Co照射株であるKFP419と418株に高いエラスターゼ活性を見いだした⁴⁾。

自動納豆製造装置 No.2 (鈴与工業(株)製)を用いて、エラスターゼ高活性納豆菌 KFP419 で納豆を製造した。製造した納豆を8名のパネラーで官能検査を行った結果、親株と KFP419 の納豆は特に糸引きが強く、ゴムのような粘りを有しており、市販品に比べて高い評価が得

本稿は第16回研究集会の発題講演を纏めたものである。

表1 納豆粘質物中のエラスターゼ活性

菌 株		エラスターゼ活性 (U/納豆1 g)
KFP	1	7.25
KFP	2	4.41
KFP	4	8.30
KFP	418	14.77
KFP	419	14.82
KFP	355	12.71

活性はエラスチンオルセインからオルセイン1 mg/納豆gを遊離する活性を1単位とする。

られた。外観・溶菌状態・色・臭いなどにおいては市販納豆菌の納豆との間には大きな差が見られなかった。エラスターゼは納豆菌によって生産されるため、大部分のエラスターゼ活性は粘質物中に存在すると推定されたので、納豆試験法によって粘質物を抽出し、エラスターゼ活性を測定した結果、納豆1 g当たりのエラスターゼ活性は、KFP419納豆で最も高い値が得られた。KFP419と市販納豆菌KFP 2のそれとの比は約3.4倍であった(表1)。KFP419の粘質物の相対粘度、 γ -GTP、プロテアーゼ活性を市販納豆菌4株のそれらと比較してみると、KFP419の活性は他の菌株のそれらよりも高かった。そして全般的に粘質物の相対粘度が低くなるにつれて、 γ -GTP活性とプロテアーゼ活性も低下する傾向を示した。

菅野らは原料大豆にはスクロースとスタキオースが多く、ラフィノースとデンプン少量を検出した⁷⁾。納豆ではスクロースもスタキオースも急減し、少量ながらマンニトリオースやデンプンが主成分となっていた。KFP419納豆ではラフィノースが減少したが、スクロースなどの成分がまだ残存していた。菅野らとの相違は発酵と熟成の過程によるもので、菅野らの納豆よりも本研究室で試作した納豆の方が、早い時期に仕上がったものと考えるのが妥当であろう。また、有機酸成分では最も多いものとして酢酸、次いで多い順にイソ吉草酸・イソ酪酸・ヘキサン酸の順で検出された。

KFP419の大量培養を行い、その培養液からエラスターゼを生成した。培地中に糖源としてグルコースを添加すると、かえってエラスターゼの活性が低下してしまうので、グルコースは添加しなかった。培養液から60～80%硫酸画分の沈殿物を取り、透析、ゲルろ過クロマトグラフィー、陰イオンクロマトグラフィーを行って活性を有する単一のピークを得た(図1)。酵素の収率は10.0%であった。さらに硫酸溶液を用いて結晶を得た(図2)。SDS-PAGEにかけた結果、マーカーの泳動パター

図1 セファデックスG-75カラムクロマトグラフィーによる *Bacillus subtilis* (natto) KFP419エラスターゼの精製
●: エラスターゼ活性 (590nmにおける吸光度)
○: 溶出液の各フラクションのたんぱく質量 (280nmにおける吸光度)

図2 *Bacillus subtilis* (natto) KFP419エラスターゼの結晶

ンとエラスターゼのそれとの比較から分子量29,800と推定された。等電点電気泳動でも単一のバンドを得た。本酵素は凍結しておけば非常に安定で4℃、210日保存した後も60%の残存活性が見られた。なお、エラスターゼはNaClとKClで阻害され、50mMでそれぞれ50、25%の阻害が見られた。

2. Phytone の効果

納豆菌の開発に際し、非常に大きな問題になるのは、せっかく見つけた菌株が種々の試験を行っている期間中あるいは保存するために継代培養を繰り返している間に糸引能(曳糸性)を消失することである。納豆菌を Nutrient Agar(NA, 牛肉エキス1%, Polypeptone 1

図3 Phytone(BBL)とL-グルタミン酸ナトリウムの納豆菌粘質物生産に及ぼす効果
データは7日目の培養液の相対粘度を示す。

%, NaCl 0.5%) で継代培養していると納豆菌が粘質物を生成しなくなることが知られていたが, NA の Polypeptone に替えて Phytone を添加して培養すると再び粘質物をよく生成するようになることを見いだした⁸⁾。粘質物生産に及ぼす培地濃度の影響を検討するため, 基礎培地としてスクロースとグルタミン酸を加えた合成培地 (SG 培地と称する) を使用して, SG 培地に Phytone 添加すると対照に比べて相対粘度が約 4 倍に増加した。Phytone の濃度は 1% が最適で, それ以上でも相対粘度の増加は見られなかった。また, グルタミン酸ナトリウム濃度は 3~5% が最適であった (図 3)⁹⁾。

3. ストラバイトの生成条件

納豆は製造後古くなると, いわゆるチロシンの結晶といわれる白色ないし黄白色の結晶を生じ, そのため, じゃりじゃりした食感の悪いものになり, 商品価値がなくなる。味噌では「きび粒」と呼ばれているが, それはロイシン・イソロイシン・チロシンなどの結晶であることが明らかにされている。一方, ストラバイトは魚介類の缶詰・塩蔵品・濃縮エキス・魚醤油などによく析出することが知られている。田中らによって納豆の結晶はチロシンとストラバイトであることがすでに明らかにされている¹⁰⁾が, 結晶の生成条件や納豆の品質保持との関連を調べた報告はない。

我々は KFP419 のストラバイト生成条件を明らかにするため KFP419 の液体培養で容易に結晶を析出する条件を検討し, 生成した結晶がストラバイトであることを確認した (図 4)¹¹⁾。結晶は蒸留水には溶解せず, HCl 酸性下で容易に溶解した。アミノ酸アナライザーで分析するとアンモニアのピーク以外には検出されず, 陰イオン

図4 *Bacillus subtilis* (natto) KFP419 ストラバイトの結晶

交換カラムを用いた HPLC による無機イオンの検出でリン酸が検出された。ICP-AES による分析で Mg と PO_4 が検出され, その組成比が Mg10.31%, リン12.63% でありストラバイト ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の理論値とほぼ一致した。なお, Ca 含有量は無視しうる程度に過ぎなかった。

納豆はたんぱく質が分解されてペプチド・アミノ酸を経てアンモニアが生成し, その結果として pH が上昇すると考えられる。培養液の液量を変えて培養条件を検討して見た結果, ストラバイトが 50~100ml 培養で析出したにもかかわらず, 200ml 培養で析出しなかったのは, ストラバイトの析出が単にアンモニアの生成によるだけではなく, Mg とリンの代謝にも関係していることを示唆している。培地の初発 pH を変えて培養しストラバイトの生成を見ると, pH5~9 の範囲でストラバイトが生成するが, その時最終 pH が 8 以上になっており, アルカリ性の時よく生成することが明らかになった。ストラバイトの生成を経時的に追ってみると, 培養しない培地では 2 週間経ってもストラバイトの生成は見られなかった。3 日目までの培地ではストラバイトの生成は少ないが, 4 日目以降の培地では翌日にはストラバイトの生成が見られた。培地中の Mg とリンの量がストラバイトの析出に影響していると推定されたので, 培地成分の牛肉エキス・ポリペプトン・Phytone の Mg とリンを測定した。ポリペプトンに比べ Phytone 中にはかなりの量の Mg が存在していることが明らかになった (図 5)。

ストラバイトが等量のアンモニウム, マグネシウム, リン酸イオンから構成されているので, 3 イオンの内 2 イオン濃度を一定にしてマグネシウムあるいはリン酸イオン濃度を変えてストラバイトの生成量を測定した結

図5 培養期間とストラバイト生成の関係

▲: pH, □: 増殖 (吸光度660nm), ●: 結晶は検出されず, ○: 少量の結晶が見られる, ◎: 結晶が見られる

図6 ストラバイト生成に及ぼす Mg^{2+} , PO_4^{3-} , NH_4^+ 依存性
横軸は PO_4^{3-} と NH_4^+ 濃度を1.0Mに一定にして Mg^{2+} 濃度を変えた時の濃度と, Mg^{2+} と NH_4^+ 濃度を1.0Mに一定にして PO_4^{3-} 濃度を変えたときの濃度を示す。

果, マグネシウムがリン酸イオンよりも低濃度でストラバイトを多く生成することが明らかになった (図6)。

今後大豆中の Mg とリンが大豆のどの部位に存在し, 無機イオンとなって, 大豆表面に移動して結晶化するのかを検討する必要があると考えている。

文 献

- 1) フーズバイオニア: 納豆沿革史, 全国納豆協同組合連合会, p.243-280 (1975)
- 2) Sumi, H., Hamada, H., Tsusima, H., Mihara, H. and Muraki, H.: A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a typical and popular soybean food and in the Japanese diet, *Experientia*, **43**, 1110-1111 (1987)
- 3) 木内幹, 鈴木英也: 高活性ナットウキナーゼ納豆開発の現状, *食品と科学*, **33**, 1-4 (1991)
- 4) 村松芳多子, 金井幸子, 木村倫代, 三浦紀子, 吉田桂子, 木内幹: エラスターゼ高活性納豆の開発, *食科工誌*, **42**, 575-582 (1995)
- 5) Balo, J. & Banga, I.: Elastase and elastase inhibitor, *Nature*, **4168**, 491 (1949)
- 6) 永井利郎, 西村和典, 鈴木英也, 番場康夫, 佐々木裕, 木内幹, *日食工誌*, **41**, 123-128 (1994)
- 7) 菅野彰重, 高松春樹, 高野伸子, 秋本隆司: 納豆製造工程における糖成分の動向, *日食工誌*, **29**, 105 (1982)
- 8) Sulistyo, J., Taya, N., Funane, K. and Kiuchi, K.: *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **35**, 278-283 (1988)
- 9) 村松芳多子, 永井利郎, 佐藤志津子, 落合祐子, 石村典子, 伊藤義文, 木内幹: 納豆菌の粘質物生産に及ぼす Phytone の効果, *食科工誌*, **44**, 812-815 (1997)
- 10) 田中米實, 富安行雄, 栄食誌, **26**, 473- (1973)
- 11) 村松芳多子, 村岡靖彦, 安井明美, 鈴木忠直, 木内幹: 納豆菌, *Bacillus subtilis* (natto) KFP419によるストラバイトの生成, *食科工誌*, **44**, 285-289 (1997)