菌体外分解酵素が増強された納豆菌 *rpoB* 変異株による 黒大豆納豆の製造

久保雄司^{1*}, 齋藤勝一², ダニエル ホルヴェック^{2,3}, 舟根和美², 中川力夫¹, 木村啓太郎²

¹ 茨城県工業技術センター, 地場食品部門

² 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

³ ベルリン工科大学, 応用分子微生物学部

Black Soybean Fermentation using a *rpoB* Mutant Strain of *Bacillus subtilis* (natto)

Yuji Kubo^{1*}, Katsuichi Saito², Daniel Hohlweck^{2,3}, Kazumi Funane²,
Rikio Nakagawa¹ and Keitarou Kimura²

¹ Industrial Technology Institute of Ibaraki Prefecture, 3781-1 Nagaoka, Ibarakimachi, Ibaraki 311-3195

² Division of Applied Microbiology, National Food Research Institute (NFRI)-National Agriculture and Food Research Organization (NARO), 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

³ Technical University Berlin, Department of Applied and Molecular Microbiology,
Seestr. 13, 13353 Berlin, Germany

A new *Bacillus subtilis* natto-fermenting strain, Miyagi-4100, showing enhanced exoenzyme production and developed from the parental Miyagi-4 strain, was used to prepare natto from hard-hulled black soybeans. In this study, we evaluated the ability of Miyagi-4100 to ferment black soybeans, based on the amount of viscous substances, poly- γ -glutamic acid and levan, as well as the degree of hardness of the fermented black soybean component. Miyagino, a commercial starter strain, and Miyagi-4 were compared to Miyagi-4100. Black soybean natto produced with Miyagi-4100 contained much more levan than that produced with Miyagi-4, and showed a tendency for decreased hardness. Therefore, we conclude that Miyagi-4100 is highly applicable to fermenting black soybeans to natto.

(Received Mar. 27, 2013; Accepted Jul. 8, 2013)

Keywords : natto, black soybean, levan, poly- γ -glutamic acid, *rpoB* gene

キーワード : 納豆, 黒大豆, レバン, ポリ- γ -グルタミン酸, *rpoB* 遺伝子

黒大豆は種皮に抗酸化性物質アントシアニンを含む¹⁾²⁾。そのため、黒大豆は機能性を高めた納豆の原材料として着目され、実際に商品化された事例がある。しかし、黒大豆納豆は黄大豆納豆に比べて硬いテクスチャーを持つ点に改善の余地が残されている¹⁾²⁾。その原因として、黒大豆の種皮が固く、発酵による大豆タンパク質の分解が十分でないことが考えられた。

我々は、黒大豆の煮豆にセルラーゼやキシラナーゼを作用させると柔らかくなることを報告した³⁾。このことから、大豆成分の分解に関わる酵素活性が高い納豆菌を用いれば、種皮と大豆タンパク質の分解が進み、柔らかい黒大豆納豆の製造が可能となると考えた。

そこで、我々はプロテアーゼやセルラーゼ等の菌体外分解酵素生産能が向上した納豆菌の育種に取り組み、プロテアーゼ生産量が約4倍に向上した候補株 Miyagi-4100 を取得し、その諸性質について既に報告した⁴⁾。

Miyagi-4100 株は *rpoB* 遺伝子に1つのアミノ酸置換変異(487番目のセリン残基のロイシンへの置換、以下 S487L 変異とする)を持つ。*rpoB* 遺伝子は RNA ポリメラーゼ β -サブユニットをコードする遺伝子であり、S487L 変異は2つの作用機作によって遺伝子発現に影響する^{5)~7)}。一つは、シグマ A で制御される遺伝子の転写増強である。もう一つは、転写終結を制御するターミネーター配列認識増強による遺伝子発現抑制である^{5)~7)}。Miyagi-4100 株では、現在使われている主要な納豆種菌に比べ、プロテアーゼに加えて、セルラーゼ、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼなど納豆発酵に関わる菌体外分解酵素の発現量が多い⁴⁾。一方、Miyagi-4100 株ではレバン (Levan, D-fructofuranosyl homo-

¹ 〒311-3195 茨城県東茨城郡茨城町長岡 3781-1

² 〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

³ Seestr. 13, 13353 Berlin, Germany

* 連絡先 (Corresponding author), kubo@kougise.pref.ibaraki.jp

polysaccharide) 合成酵素のシヨ糖による発現誘導が起らない⁴⁾。レバンは納豆の粘性に関与する多糖であり⁸⁾、その合成酵素遺伝子のプロモーター領域にはシヨ糖による発現誘導に関与するターミネーター配列がある⁹⁾。S487L変異による該ターミネーター配列の認識増強がレバン合成酵素誘導発現抑制の原因であると考えられた⁴⁾。

本研究では、納豆発酵における Miyagi-4100 株の有用性を検討するため、黒大豆納豆を実際に作成してレバンおよび粘性の主成分であるポリ- γ -グルタミン酸 (γ PGA) の生産量、納豆の硬さ等の解析を行った。

実験方法

1. 使用菌株および納豆の製造

実験に使用した納豆菌宮城野株 (Miyagino) は宮城野納豆製造所より入手した。Miyagi-4 株は新たに稲わらから分離した納豆菌である¹⁰⁾。Miyagi-4100 株は Miyagi-4 株を親株とする *rpoB* 遺伝子変異株である⁴⁾。

黒大豆 (品種名: 黒大豆小粒) および黄大豆 (品種名: スズマル) を用いて、既報¹⁰⁾に従って納豆を製造した。

2. レバンと γ PGA の定量

レバンおよび γ PGA は既報に従って調製した⁸⁾¹¹⁾。具体的には、次の通りである。

Miyagino, Miyagi-4, Miyagi-4100 の3株を用いて製造した納豆 (約13g) を50mlの遠心チューブに秤量し、1 mol/Lの塩化ナトリウムを含む10 mmol/Lリン酸バッファ (pH7.0) を5ml添加した。大豆表面をよく攪拌・洗浄した後、8000rpm, 4℃で5分間遠心し、上清を新しい50mlの遠心チューブに分取する作業を3回繰り返し、水溶性成分を回収した。回収した水溶性成分を8000rpm, 4℃で20分間遠心し、得られた上清10mlに99.5%エタノール25mlを添加した。8000rpm, 4℃で10分間遠心し、レバンおよび γ PGA を含む沈殿物 (以下、納豆粘性物質とする) を回収した。回収した納豆粘性物質を減圧乾燥後、重量を測定した。

レバンの定量および定性分析はF-キット (J.K.インターナショナル) および薄層クロマトグラフィー (TLC) により次のように行った。 γ PGA量は、粘性物質重量から後述の全糖重量を差し引いて算出した。

納豆粘性物質30 μ l (50mg/ml) に0.1N塩酸を570 μ l添加し、70℃で30分加温して加水分解した後、アンバーライト MB-1 (オルガノ株式会社) を用いて脱塩処理を行い、TLC用のサンプルとした。未分解のTLC用サンプルは、納豆粘性物質10 μ l (50mg/ml) を水190 μ lに溶解して調製した。レバン標品 (5mg/ml, *Serratia levanicum* 由来, 和光純薬) を同様の処理により加水分解したものをスタンダードとして用いた。その他のスタンダード、フルクトース (和光純薬), スタキオース (ナカライテスク), ラフィノース (東京化成工業) は1.5mg/mlに調製した。各試料

1 μ l を70%アセトニトリルにて2回TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) で展開し、5%硫酸/メタノール溶液で発色した。

納豆粘性物質10 μ l に0.1N塩酸を590 μ l添加し、70℃で30分加温して加水分解を行ったものをサンプルとし、F-キットにより計測されたフルクトース量に0.9を乗じることで、レバン量とした⁸⁾。

3. レバン分解酵素 LevP による納豆粘性物質の分解

納豆粘性物質10 μ l (10mg/ml) およびレバン標品10 μ l (5mg/ml) に納豆菌バクテリオファージ由来のレバン分解酵素 LevP (1mg/ml) を10 μ l添加し、37℃で30, 60, 120分間保持し、反応産物をTLCで分析した。尚、LevP精製標品は東北大学大学院農学研究科の金子淳准教授より分与いただいた¹²⁾。

4. 全糖分析

2.で調製した納豆粘性物質 (0.5~1.0mg/ml) をサンプルとして全糖分析を行った。スタンダードとしてフルクトース溶液 (0~0.25mg/ml) を用いた。サンプル溶液50 μ l に400 μ lの5% (w/v) フェノール溶液と1mlの濃硫酸を加え、ボルテックスミキサーで直ちに混和した。30分室温で静置した後、490nmの吸光度を測定し、検量線から全糖量を求めた。納豆粘性物質の重量から全糖量を差し引いた値を γ PGA 量とした。

5. 納豆の硬さ試験

切断用のアダプタ¹³⁾とピークホールドタイプの重量計を用いて、納豆の短軸方向の切断強度を測定した。測定は皮剥けのない納豆50粒について行い、数値の大きい方と小さい方の各10粒分のデータを除いた、中間30粒分のデータを採用して硬さの比較を行った。

6. データ解析

統計処理は、エクセル統計2010 (社会情報サービス) を用いて行った。

実験結果および考察

Miyagi-4100 株は、菌体外分解酵素生産能の高さおよびレバン合成酵素の誘導発現欠失の2つの特徴を持つ⁴⁾。そのため、Miyagi-4100 株で作られた納豆のレバン量が少ないことが予想された。

黒大豆納豆由来の納豆粘性物質と、それを酸加水分解したものについて TLC 分析を行った結果を図1Aに示した。レバン (図1A, レーン1) は原点から動かなかったが、0.1N塩酸で70℃, 30分間処理すれば構成単位であるフルクトースまで分解された (図1A, レーン2)。レーン6~8の結果は、納豆粘性物質に原点から動かない物質と移動度がスタキオースに相当する物質が含まれていることを示した。一方、納豆粘性物質を酸加水分解すると、原点のスポットはほぼ消失し、フルクトースに相当するスポットが生じた (レーン9~11)。黄大豆納豆についても検討したところ

図 1 納豆粘性物質に含まれる多糖の分析 (TLC; A, 黒大豆納豆; B, 黄大豆納豆)

レーン 1, レバン (Lev); レーン 2, レバン加水分解物; レーン 3, フルクトース (Frc); レーン 4, ラフィノース (Raf); レーン 5, スタキオース (Sta); レーン 6-8, 納豆粘性物質 (Miyagino 株, Miyagi-4 株, Miyagi-4100 株); レーン 9-11, 納豆粘性物質の加水分解物 (Miyagino 株, Miyagi-4 株, Miyagi-4100 株); レーン 12, フルクトース (Frc).

図 2 レバン標準品および納豆粘性物質の LevP による分解

レーン 1, フルクトース (Frc); レーン 2, ラフィノース (Raf); レーン 3, スタキオース (Sta); レーン 4-7, レバンと LevP の反応物 (左から 37℃ で 0, 30, 60, 120 分処理); レーン 8-11, 納豆粘性物質と LevP の反応物 (左から 37℃ で 0, 30, 60, 120 分処理).

ろ, 黒大豆納豆とほぼ同様の結果を得た (図 1B). 尚, Rf 値はグルコースとフルクトースでほとんど変わらないが, TLC 発色時の色および, F-キットでのグルコース測定結果が検出限界以下 (<0.05 (mg/g 納豆)) だったことから分解物はフルクトースであると推定された.

納豆粘性物質に含まれる糖の主要成分がレバンであることは, LevP による分解結果からも確認できた (図 2). レーン 4 のレバン標品は原点から全く動かないが, 30 分から 120 分まで反応時間が経過するに従って, レバンは低分子化し, スポットが上へと伸びた (レーン 4-7). 同時に原点のスポットが薄くなっていく様子も確認できる. 納豆粘

性物質 (レーン 8-11) についても, 原点から上へ伸びる分解産物の発色が経時的に濃くなり, 120 分では更に分解が進み, 多糖の一部が四糖以下まで分解していることを示唆した. 酸加水分解と LevP による分解試験の結果から, TLC で原点に留まるスポットは主にレバンであることが示唆された.

納豆粘性物質の加水分解により生じるフルクトースのスポット (図 1, レーン 9-11) から, Miyagi-4100 株を用いて製造された納豆が Miyagino 株や Miyagi-4 株を用いた場合よりもより多くのレバンを含むことが推定された. 納豆から回収した納豆粘性物質に含まれるレバン含量 (F-キットを用いてフルクトース換算した) を表 1 に示す. Miyagi-4100 株を用いて黒大豆納豆を製造した場合, Miyagino 株や Miyagi-4 株を用いた場合よりも, レバンの生産量が有意に高くなった (表 1). 黄大豆を使った場合でも, 黒大豆納豆と同様に Miyagi-4100 株が最も高い数値を示し, 図 1 の TLC 分析の結果とよく一致した傾向を示した (図 1, 表 1). γ PGA 生産量に関しては, 黒大豆納豆では Miyagi-4100 株が, 黄大豆納豆では Miyagino 株がより高い数値を示したが, レバンに比べるとその違いは顕著ではなかった. (表 1).

分析に供した納豆粘性物質の構成比率を円グラフで示した (図 3). 菅野らの先行研究⁸⁾ で既に示された様に納豆粘性物質の主成分は γ PGA であり, Miyagino 株と Miyagi-4 株ではその比率は約 90% (w/w) であった. 一方, rpoB 変異を有する Miyagi-4100 では, レバンの比率が顕著に高くなり, 黒大豆納豆の場合には約 20% (w/w) となった.

今回の測定では全糖量をフルクトース換算で求めた. 表 1 の全糖量とフルクトース量の差は原料大豆に含まれるス

表1 黒大豆および黄大豆納豆のレバンと γ PGAの含量

大豆と種菌の 組み合わせ	成分量 (mg/g 納豆)		
	レバン	γ PGA	全糖量
黒大豆			
Miyagino	0.73 $\pm$ 0.02 ^A	13.33 $\pm$ 0.04 ^A	1.65 $\pm$ 0.04 ^A
Miyagi-4	0.53 $\pm$ 0.03 ^A	13.08 $\pm$ 0.02 ^A	1.37 $\pm$ 0.02 ^A
Miyagi-4100	4.52 $\pm$ 0.16 ^B	16.16 $\pm$ 0.42 ^B	6.60 $\pm$ 0.42 ^B
黄大豆			
Miyagino	2.58 $\pm$ 0.20 ^C	36.66 $\pm$ 0.41 ^C	5.50 $\pm$ 0.41 ^C
Miyagi-4	2.21 $\pm$ 0.11 ^C	33.92 $\pm$ 0.06 ^D	4.76 $\pm$ 0.06 ^C
Miyagi-4100	6.38 $\pm$ 0.17 ^D	32.97 $\pm$ 0.34 ^E	8.52 $\pm$ 0.34 ^D

含量の数値は平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=3$)

各列数値の上付き文字の違いは、Tukey-Kramer 法により有意に ($P<0.05$) 異なることを示す。

表2 黒大豆納豆の硬さ試験

サンプル	切断強度 (g)	P 値
黒大豆		
煮豆	225.7 $\pm$ 12.5	0.236
納豆 (Miyagino)	163.3 $\pm$ 12.9	
納豆 (Miyagi-4100)	155.8 $\pm$ 11.9	

サンプルの納豆については、括弧内に使用した納豆菌を示した。納豆 50 粒を測定し、中間 30 粒分のデータを用いて算出した。

図3 納豆粘性物質中に占めるレバン、 γ PGA およびその他の糖の割合 (上段は黒大豆納豆, 下段は黄大豆納豆)

使用した納豆菌は、上下段とも左より Miyagino, Miyagi-4, Miyagi-4100.

円グラフ中の 1, γ PGA; 2, レバン; 3, その他の糖類を示す。

タキオース (2 分子のガラクトースと 1 分子のフルクトースおよびグルコースが連なった四糖) やイソフラボン配糖体などレバン以外の糖質に由来すると思われる。

市販黄大豆納豆のレバン含量は 0.45~2.68 mg/g 納豆, γ PGA 含量は 0.62~5.49 mg/g 納豆であると菅野らにより報告されており⁸⁾, その多くが Miyagino 株を用いて製造された納豆と考えられる。今回の γ PGA 数値は菅野らの数値より大きい。 γ PGA は発酵終了後に徐々に分解することが知られている¹⁴⁾。我々は、発酵終了直後の納豆を試料として用いた。製造からの日数および保存状態の違いが収量に影響したと考えられた。

Miyagi-4100 株は、菌体外分解酵素の生産能が高いので、種皮の硬い黒大豆がより柔らかい納豆に仕上がると期待された。そこで、次に製造した納豆の硬さを調べた。発酵後の黒大豆納豆の硬さを調べたところ、Miyagi-4100 株を用

いた場合、Miyagino 株を用いた場合と比べて切断強度が 5 % 程度 (約 8 g) 下がる傾向が見られた (表 2)。切断強度の違いは著者らが試食して明瞭に感じられるものであったが、P 値は比較的高かった (0.236) (表 2)。測定対象がバラツキの大きい生物試料 (種子) であったことがその一因かも知れない。黒大豆納豆の評価については、今後更に官能検査を行って詳細な検討を加えたい。

厚く硬い表皮に覆われた黒大豆は、納豆菌が栄養を資化しにくい環境と言える。そのため Miyagino 株や Miyagi-4 株に比べ、大豆分解に関わる分解酵素生産量が高く、栄養を利用しやすい環境を整えることが出来る Miyagi-4100 株は相対的に生育が良くなり発酵が進んだと考えられた。

Miyagi-4100 株ではレバン合成酵素が発現誘導されないにも関わらず、実際に作成した納豆のレバン量は予想に反して多くなった。大豆にはショ糖が約 5 % (w/w, 乾物当

り) 含まれる¹⁵⁾。おそらく、大豆由来ショ糖を基質として、誘導を受けない基礎発現量の酵素によってレバン合成が行われたのであろう。或いはレバン量が増えた原因は、Miyagi-4100 株ではレバン分解系¹⁶⁾ が働いていないからかも知れない。納豆発酵時における納豆菌の生育状態や細胞生理に関する研究は少なく、実験室レベルでの知見をそのまま適用できない可能性も考えられた。

レバンについては、プレバイオティクスとしての機能性やラットを用いた動物実験でのコレステロール低下作用の報告がある。¹⁷⁾¹⁸⁾ Miyagi-4100 株は、黄大豆と比べて表皮が硬く生育条件の良い黒大豆の発酵に適合したレバン高生産型の納豆菌として利用できることが示唆された。

要 約

新規に取得した納豆菌 Miyagi-4 株を親株とする分解酵素高生産を示す rpoB 遺伝子変異株 Miyagi-4100 株を用いて、硬い種皮を持つ黒大豆を原料として納豆を製造した。Miyagi-4100 株の黒大豆発酵適性を粘り物質であるポリ- γ -グルタミン酸とレバンの含量および納豆の硬さを指標として評価した。比較対照株として、商用スターター株である Miyagino 株と Miyagi-4 株を用いた。試験の結果、Miyagi-4100 株で作った黒大豆納豆は、より多くのレバンを含み、切断強度が 5% 程度 (約 8g) 下がる傾向が見られた。このことから、Miyagi-4100 株は黒大豆を納豆に発酵する適性が高いことが示唆された。

本研究で使用した黒大豆小粒をご提供いただいた茨城県農業総合センター 生物工学研究所 普通作育種研究室 岡野克紀氏、並びにレバン分解酵素 LevP 標品をご提供いただいた東北大学大学院農学研究科の金子淳准教授に感謝いたします。

文 献

- Shih, M.C., Yang, K.T. and Kuo, S.T., Optimization process of black soybean natto using response surface methodology. *J. Food Sci.*, **74**, 294-301 (2009).
- Hu, Y., Ge, C., Yuan, W., Zhu, R., Zhang, W., Du, L. and Xue, J., Characterization of fermented black soybean natto inoculated with *Bacillus natto* during fermentation. *J. Sci. Food Agric.*, **90**, 1194-1202 (2010).
- 久保雄司, 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), 茨城県工業技術センター研究報告, **38**, 18-21 (2009).
- Kubo, Y., Inaoka, T., Hachiya, T., Miyake, M., Hase, S., Nakagawa, R., Hasegawa, H., Funane, K., Sakakibara, Y. and Kimura, K., Development of a rifampicin-resistant *Bacillus subtilis* strain for natto-fermentation showing enhanced exoenzyme production. *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 654-657 (2013).
- Inaoka, T., Takahashi, K., Yada, H., Yoshida, M. and Ochi, K., RNA polymerase mutation activates the production of a dormant antibiotic 3,3'-neotrehalosadiamine via an auto-induction mechanism in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 3885-3892 (2004).
- Inaoka, T. and Ochi, K., Glucose uptake pathway-specific regulation of synthesis of neotrehalosadiamine, a novel autoinducer produced in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **189**, 65-75 (2007).
- Inaoka, T. and Ochi, K., Activation of dormant secondary metabolism neotrehalosadiamine synthesis by an RNA polymerase mutation in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 618-623 (2011).
- 菅野彰重, 高松晴樹, セチルトリメチルアンモニウムプロミドを用いた納豆の γ -ポリグルタミン酸の定量, 日本食品科学工学会誌, **42**, 878-886 (1995).
- Shimotsu, H. and Henner, J.D., Modulation of *Bacillus subtilis* levansucrase gene expression by sucrose and regulation of the steady-state mRNA level by *sacU* and *sacQ* genes. *J. Bacteriol.*, **168**, 380-388 (1986).
- Kubo, Y., Rooney, A.P., Tsukakoshi, Y., Nakagawa, R., Hasegawa, H. and Kimura, K., Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* strains applicable to natto (fermented soybean) production. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 6463-6469 (2011).
- Nagai, T., Koguchi, K. and Itoh, Y., Chemical analysis of poly- γ -glutamic acid produced by plasmid-free *Bacillus subtilis* (natto): Evidence that plasmids are not involved in poly- γ -glutamic acid production. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **43**, 139-143 (1997).
- 尾崎達郎, 阿部直樹, 木村啓太郎, 金子 淳, γ -ポリグルタミン酸分解酵素遺伝子を有する納豆菌ファージのゲノム解析, 日本農芸化学会大会講演要旨集, P. 272, 京都 (2011).
- 木内 幹, 品質管理, 「納豆の研究法」, 初版, 永井利郎, 木村啓太郎, 小高 要, 村松芳多子, 渡辺杉夫編, (恒星社厚生閣, 東京), pp. 66-67 (2010).
- Kimura, K., Tran, L.P., Uchida, I. and Itoh, Y., Characterization of *Bacillus subtilis* γ -glutamyl-transferase and its involvement in the degradation of capsule poly- γ -glutamate. *Microbiol.*, **150**, 4115-4123 (2004).
- 平 春枝, 松川 勲, 藤崎麻里子, 下司聡子, 宇田京子, 国産大豆における遊離糖, タンパク質, 脂質含量の品種的特徴と遺伝要因, 日本食品科学工学会誌, **51**, 413-423 (2004).
- Shida, T., Mukaijo, K., Ishikawa, S., Yamamoto, H. and Sekiguchi, J., Production of long-chain levan by a *sacC* insertional mutant from *Bacillus subtilis* 327UH. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **66**, 1555-1558 (2002).
- Marx, S. P., Winkler, S. and Hartmeier, W., Metabolization of β -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **182**, 163-159 (2000).
- Yamamoto, Y., Takahashi, Y., Kawano, M., Iizuka, M., Matsumoto, T., Saeki, S. and Yamaguchi, H., In vitro digestability and fermentability of levan and its hypocholesteremic effects in rats. *J. Nutr. Biochem.*, **10**, 13-18 (1999).

(平成 25 年 3 月 27 日受付, 平成 25 年 7 月 8 日受理)