

## 納豆菌変異株の特徴解析及び製品試験\*

小浜 恵子\*\*、山本 忠\*\*、大澤 純也\*\*

納豆の粘質物の主成分である $\gamma$ ポリグルタミン酸 (PGA) の生産性が変異した納豆菌 (M-17, M-21) を取得して特徴解析を行った。M-21は親株 (M) にくらべてPGAの培地への分泌が早い時期から検出され、PGA生産との相関が報告されている $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ活性は親株の約1.6倍であった。生産されたPGAの分子量は $1.0 \times 10^6$ 以上の分子量を有しており、差異はなかった。PGA生産変異株 (M-17, M-21) を用いて納豆の試作を行ったところ、その相対粘度は親株のものより高く、官能的にも粘りが感じられた。また、血栓溶解効果があると言われているナットウキナーゼ高生産株 (M-2) を取得した。M-2を用いて試作した納豆のナットウキナーゼ含有量は親株の約2倍であった。

キーワード：納豆菌、ポリグルタミン酸、 $\gamma$ グルタミルトランスぺプチダーゼ、ナットウキナーゼ

## Characterization of Nattokinase and Polyglutamate Producing Mutants and their Application

KOHAMA Keiko, YAMAMOTO Tadashi and OHSAWA Junya

Polyglutamate(PGA) producing mutants were obtained from *B. natto* M. Mutant(M-21) secreted PGA faster than *B.natto* M and  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase activity of M-21 was higher than that of *B.natto* M. Molecular weight of PGA produced were about  $10^6$ , no difference was observed between *B.natto* M and mutants. Relative viscosity of natto made by PGA mutants showed higher value than that of parent strain.

We also obtained a mutant(M-2) highly producing nattokinase and made natto by the mutant.

Natto made by M-2 had about two times higher activity of nattokinase than that of parent strain.

key words : *Bacillus natto*, polyglutamate,  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, nattokinase

### 1 緒 言

納豆は、納豆菌 (*Bacillus natto*) により生産されるビタミンを多く含み、酵素作用によって難消化性大豆の栄養価を高めたすぐれた発酵食品である。納豆菌により生産される生理機能物質としては、血栓を溶解する効果のある細胞外セリンプロテアーゼ (ナットウキナーゼ)<sup>1)</sup>、抗酸化物質<sup>2)</sup> や免疫付活作用<sup>3)</sup>、抗菌性サーファクタント<sup>4)</sup> などの報告もある。また納豆の粘質物はPGAとレバンで構成されており納豆の食感や品質の重要な鍵であると同時に、粘性の主成分であるPGAは腸内でのカル

シウムの吸収を促進するとの報告<sup>5)</sup>もある。しかしPGAの生合成経路には未だ不明部分が多く、納豆菌を継代培養すると容易に生産性が失われるがこの理由も不明である。本報告では納豆に含まれるこれら生理機能成分のうち、ナットウキナーゼとPGAに着目し生産変異株を取得して解析するとともに製造適性についても検討したので報告する。

### 2 実験方法

\* 遺伝子情報を利用した納豆菌の改良 (第3報)

\*\* 応用生物部

### 2-1 *Bacillus subtilis natto*変異株の取得

*Bacillus subtilis natto*M株は市販の納豆製造用の宮城野菌液から単離した。M株をLB培地(1.0% Bacto peptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl)にて一昼夜培養したものをLB培地100 mlに2%植菌し、3時間培養後に8,000rpmにて遠心分離により菌体を回収した。0.1M トリスマレイン酸緩衝液(pH 6.0)で洗浄後、5 mlの同緩衝液に懸濁しニトロソグアニジン $200 \mu\text{g/ml}$ となるように添加して37°C 1時間処理した。遠心分離して菌体を回収し、0.1M リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)で2回洗浄の後、LB培地100 mlにて37°C 8時間培養した。ナットウキナーゼ高生産株はLB培地にカゼイン2%を添加した寒天培地に変異処理した菌体を塗布し、37°Cで6時間培養後に生成されるハローの大きいものを取得した。また $\gamma$ -PGA生産変異株はLB寒天培地上で糸引き能を有するもの(M株はLB培地ではPGAを生成しない)を選択した。

### 2-2 プロテアーゼ活性(ナットウキナーゼ活性)測定

プロテアーゼ活性はカゼインを基質として遊離するTyrを定量するAnsonらの方法を改良した一島らの方法<sup>6)</sup>により測定した。

### 2-3 PGA調製及び分子量の測定

PGA生産培地としてはLBGN培地(LB培地にグルタミン酸ナトリウムを3%添加)を用いた。PGAは藤井らの方法<sup>7)</sup>に従い、エタノールにて沈殿させた後、水に透析して乾燥して調製した。分子量の測定はカラムTSKgel  $\alpha$ -M(東ソー製)を用いて0.3M NaClを含む50mMリン酸緩衝液(pH 7.0)で溶出させ、標準物質として $1.6 \times 10^6 \sim 5.8 \times 10^3$ の分子量を有するプルランを用いて測定した。

### 2-4 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)活性測定

GGT活性は $\gamma$  GTP Cテストワコーキット(和光純薬製)を用い、L- $\gamma$ -グルタミル-p-N-エチル-N-ヒドロキシエチルアミノアニリドを基質として測定する方法により行った。

### 2-5 相対粘度の測定

相対粘度は被検液を適宜希釈して10 ml採取し、25°Cにおいてオストワルド毛細粘度計により、純水を対照として測定した。

### 2-6 変異株による納豆の試作と製品試験

大豆は平成7年産の県産大豆「鈴の音」を用いた。納豆菌は親株M株、ナットウキナーゼ高生産株、 $\gamma$ ポリグルタミン酸生産変異株をそれぞれLB培地で37°C一昼夜培養し、菌体を回収して滅菌水に懸濁して菌数が $10^5$  / mlとなるように希釈した。大豆は水で16時間浸漬させてステンレスの網カゴに入れてオートクレーブで $1\text{kg/cm}^2$  60分蒸煮した。蒸煮後すぐに取り出し、納豆菌液を100 g当たり1 ml加えて攪拌した。50 gずつポリスチレンペーパー容器に入れ、ポリエチレンフィルムをかけて容器のふたをし恒温器にて40°C、湿度90%で24時間発酵させた後、4°Cにて2日間熟成させた。

製品中のナットウキナーゼ活性は1 gを秤量し、2 mlの水で抽出し、前述の方法で測定した。製品の相対粘度は10 gを秤量して攪拌し粘質物を形成させて生理食塩水50 mlに懸濁した被検液を4倍に希釈して前述の方法により測定した。アンモニア量はFキットアンモニア(ペーリンガー・マンハイム製)により測定した。

## 3 結果

### 3-1 ナットウキナーゼ高生産株の取得

親株にくらべてプロテアーゼ活性の高い菌株M-2を取得した。M-2をLB培地にて37°C 24時間培養後の培養上清の活性は、親株の2.5倍であった。

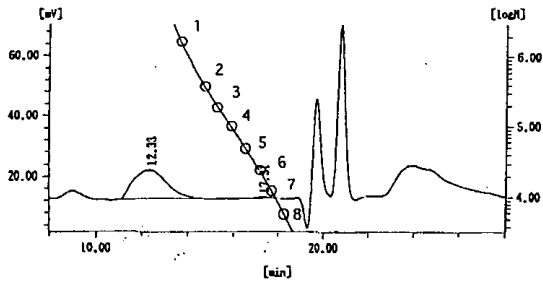
### 3-2 PGA生産変異株の解析

LB寒天培地上で粘性の糸をひくM-17及びM-21を取得した。それぞれをLBGN液体培地で37°C、48時間培養後のPGA生産量を表1に示した。このとき取得したPGAをゲル濾過により分離した結果、親株と変異株の生産するPGAは標準プルラン( $1.6 \times 10^6$ )より保持時間が短く約12分に溶出され $10^6$ 以上の分子量を有しているものと思われた(図1)。

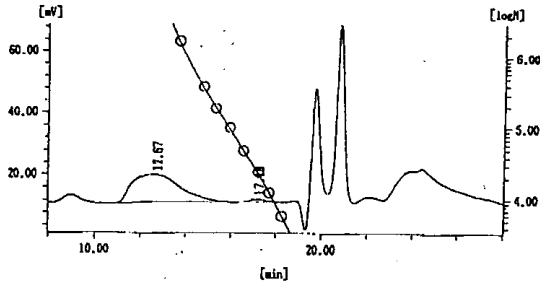
表1 変異株のPGA生産性

菌株	生成PGA量 (mg/ml)
<i>B.natto</i> M	6.0
M-17	7.0
M-21	7.0

B.natto M



M-21



column: TSKgel  $\alpha$ -M(7.8mmI.D.  $\times$  30cm)  
 solvent: 50mM phosphate buffer pH7.0  
 0.3M NaCl  
 flow rate: 1ml/min  
 detector: RI

1	$1.6 \times 10^6$	5	$4.8 \times 10^4$
2	$3.8 \times 10^5$	6	$2.3 \times 10^4$
3	$1.8 \times 10^5$	7	$1.2 \times 10^4$
4	$1.0 \times 10^5$	8	$5.8 \times 10^3$

図1 PGAの分子量の測定

またLB液体培地で37℃24時間培養時の培養上清のGGT活性は親株よりもM-17、M-21とも高かった(表2)。M株とM-21をLB培地及びLBGN培地で培養したときのgrowthと培養上清のGGT活性の経時変化を図2に示した。またこのときの24時間後、54時間後の相対粘度とGGT活性はM-21の方が高かった(表3)。

### 3-3 変異株を用いた納豆の試作と評価

製品のナットウキナーゼ活性(Tyr 1nmol/mgprotein  $\cdot$  minを1Uとした)相対粘度、アンモニア濃度を表4に示した。官能検査ではM-17が一番粘りが感じられた。アンモニア量には差異が認められなかったがM-2の香りが良く思われた。M-21は菌の被りが均一ではなく、外観としては好ましくなかった。

## 4 考察

納豆は健康食品として注目を集めており今後も需要が増すものと考えられ、多様なニーズに合わせた製品開発が必要である。今回、ナットウキナーゼ高生産株を取得したが親株と特に遜色ない試作品ができた。むしろ香り

表2 LB培地培養上清のGGT活性

菌株	GGT活性 (mU/ml)
B.natto M	160.0
M-17	211.0
M-21	265.8

表3 LBGN培地培養上清の相対粘度とGGT活性

菌株	相対粘度		GGT活性 (mU/ml)	
	24hr	54hr	24hr	54hr
B.natto M	1.6	2.0	69.7	107.0
M-21	2.7	3.0	104.6	221.5

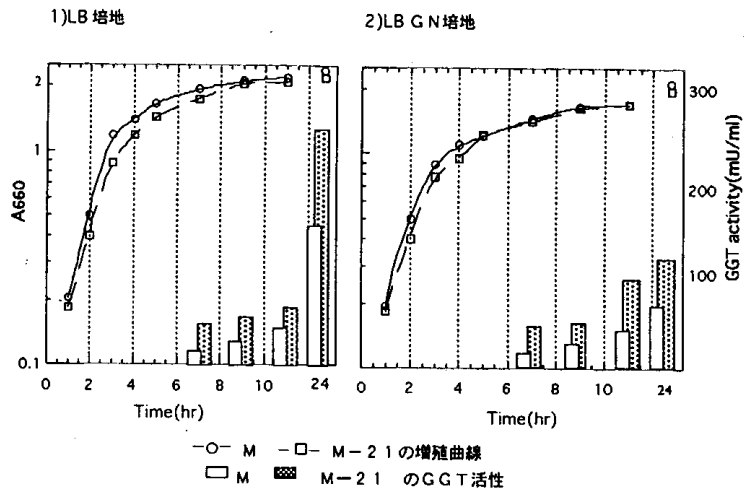


図2 菌株の増殖とGGT活性の発現

がよかったが、使用した大豆「鈴の音」は発酵時間がほかの大豆より長く必要との製造業者の意見もあることから、プロテアーゼ活性の高いM-2が適したとも考えられる。ほかの大豆での試作もする必要がある。また粘性については好みがあると考えれ、商品イメージによって調節が可能であればバラエティに富んだものが得られると思われる。PGAの生成経路についてはB. Anthracisにおいてプラスミド上に粘質物の生産に係わる遺伝子が存在しているとの報告があり<sup>8)</sup>、納豆菌については生産

表4 試作納豆の分析値

菌株	ナットウキナーゼ活性 (U)	相対粘度	アミノ酸量 (%)
M	6.2	2.5	0.2
M-2	13.0	2.5	0.2
M-17	6.2	2.9	0.2
M-21	4.5	2.7	0.2

に係わる遺伝子としてはコンピテンシィに関与する遺伝子の破壊によって生産性がなくなるとの報告<sup>9)</sup>がある。PGAを合成する枯草菌はGGT活性が高いことが知られているが<sup>10)</sup>、GGTのPGA生産における役割を直接証明した例はない。図2及び表3に示したようにGGTは定常期以降に培地中に分泌されており、グルタミン酸ナトリウムを添加したLBGN培地すなわちPGA生産培地においてはLB培地より分泌されるのが遅く、PGAの培地への分泌にともなって分泌されてくる。変異株はPGA生産がGGT活性が高いことによって生産性が高いのではなく、早期からPGAが培地中に分泌されてきているのではないかと推察している。GGT活性が高い理由としては菌体外酵素の調節変異が考えられるが、ほかの主な菌体外酵素としてプロテアーゼ活性とアミラーゼ活性を調べたところ、差がなかった(データ未発表)。最近 *B.subtilis* のGGT遺伝子がクローニングされ<sup>11)</sup>、カタボライトリプレッションを受けることが報告されており今回取得した変異株M-21、M-17について調べたところ、親株よりもGGT活性が強く阻害された<sup>12)</sup>。

この点については遺伝子レベルで現在検討中である。また図1に見られるように変異株とのあいだに分子量的な差はないが構成アミノ酸のDL比についてはまだ検討していないので今後の課題である。

### 5 結 語

納豆菌の変異処理によって高ナットウキナーゼ生産株とPGA生産変異株を取得した。PGA生産変異株はGGT活性が親株よりも高く、PGAが速く培地中に分泌されると推察された。取得した変異株で納豆を試作したところ、高ナットウキナーゼ活性株は親株と遜色なくPGA生産変異株は相対粘度がわずかに高かった。

### 文 献

- 1) 須見洋行：醸造協会誌，85, 518 (1990)
- 2) 江崎ら：日本食品工業学会誌：37, 474 (1990)
- 3) M.Kimura: *Poultry Science* 65, 1217 (1986)
- 4) H.Itokawa et al.: *Chem. Pharm. Bull.* 42, 604 (1994)
- 5) 小寺ら：日本農芸化学会大会講演要旨集, 281(1997)
- 6) E.Ichisima, Y.Takeda, K.Taira and M.Takenouhi: *Biochim. Biophys. Acta* 869, 178 (1986)
- 7) 藤井ら：日本農芸化学会誌，37, 407 (1963)
- 8) I. Uchida et al., : *Molecular Microbiology*, 9, 487 (1993)
- 9) 永井ら：日本農芸化学会大会講演要旨集, 67 (1997)
- 10) A. Aumayr, T.Hara and S. Ueda: *J.Gen. Microbiol.*, 27, 115(1981)
- 11) K. Xu and M. A. Strauch: *J.Bacteriol.*, 178, 4319 (1996)
- 12) 小浜ほか：日本食品科学工学会大会講演要旨集, 149 (1997)