

2S2-AM3 低臭納豆の開発

○竹村 浩¹, 塚本 義則²
 (1) (株) ミツカン, (2) (株) ミツカングループ本社)

【緒論】

納豆にはビタミンK2、イソフラボン、大豆タンパク等々、いわゆる健康機能をもっている成分が多く含まれる。そのため、納豆は健康食品的な色合いが強い食品となりつつある。我々が実施した消費者調査においても、納豆購入理由の第一位は「健康に良いから」である。かつて納豆は、関東、東北地方を中心に食されている地方色のある食品であり、近畿地方を中心とした西日本では余り食されていなかった。しかし、納豆は健康食品の代表格として近年の健康ブームに乗り市場を拡大しており、現在では全国的に食されるようになってきている。とは言うものの、現在でも西日本における納豆消費量は東日本に比べて多くはない。西日本で納豆消費が増えない理由は、もともと食べる習慣がないということもあるが、納豆のネバネバおよび独特の臭いが敬遠されているためと一般に考えられている。本発表では、この納豆独特の臭いを抑えた納豆の開発について紹介する。

【方法】

納豆臭の原因物質としては、アセトイン、ジアセチル、短鎖分岐脂肪酸、ピラジン類、アンモニア等が知られており、おそらくこれらの成分が混合されて納豆臭が作り出されると理解されている。これらの化合物のなかで最も納豆の臭いに影響を与えていると思われる短鎖分岐脂肪酸（特にイソ酪酸、イソ吉草酸、2-メチル酪酸、以後bcfaと略す）の低含有納豆開発を試みた。

【結果】

bcfaは分岐アミノ酸から生成すると予測し、その最初の反応を触媒する酵素としてロイシン脱水素酵素 (LDH)、分岐アミノ酸アミノトランスフェラーゼを想定した。相同組み換えを利用して両酵素の挿入変異株を取得したところ、LDHの挿入変異株でbcfaの生成量が顕著に減少した。この結果より、LDHがbcfaの生合成の最初のステップを触媒すると結論した。

次に、相同組み換えを利用してLDH遺伝子の一部が欠失した納豆菌を育種した。得られた納豆菌 (B2株) を用いて製造した納豆は、bcfaをほとんど含まなかった。また、その納豆は、通常の納豆菌を用いて作った納豆に比べて香りが弱く、低臭納豆としての品質を有していた。

B2株の分離により、技術的には低臭納豆の商品化が可能になった。B2株は外来遺伝子を含まず遺伝子組換え体ではないが、育種の過程で一旦組み換え体を経ている。そのため、B2株をそのまま納豆の生産に使用したのでは、消費者が抵抗感をもつことが予測された。そこで、LDH欠損株を突然変異法で再取得することとした。

市販納豆から分離した納豆菌O-2株をNTG変異処理し、得られた18896コロニーを最少培地プレートおよびbcfa(イソ酪酸、イソ吉草酸、2メチル酪酸、各0.1mM)を添加した最少培地プレートにレブリカシ、115株のbcfa要求性変異株を選択した。得られた115株のうち納豆製造適性を有していた32株についてLDH活性を測定し、3株がLDH活性を欠失していることを確認した。これら3株を用いて製造した納豆は、所期の目的どおりbcfaをほとんど含まなかった。これら3株のうち試食評価において最も評価が高かった変異株 (N64株) を選択し、低臭納豆の商業生産に用いている。

Development of weak-smelling natto

○ Hiroshi TAKEMURA¹, Yoshinori TSUKAMOTO²
 (1) Mitsukan Co., Ltd., (2) Mitsukan Group Corporation)

Key words natto, *Bacillus subtilis*, branched short-chain fatty acid, leucine dehydrogenase

2S2-AM4 食酢醸造過程の微生物学的解析

○石井 正治¹, 春田 伸², 五十嵐泰夫¹
 (1) 東大院・農生科・応生工, (2) 東大院・農生科)

食酢は塩と共に最古の調味料と言われており、現在日本では年間約430千Lが生産されている(平成14年工業統計年表より)。食酢は用いる原料により、醸造酢と合成酢に大きく分けられるが、現在製造されている食酢はその殆どが醸造酢である。また、食酢の発酵様式は、表面発酵法、深部発酵法、固定化発酵法、固体発酵法の4種類に分類される。我々は、表面発酵法により醸造酢を製造している2ヶ所の現場(壺酢醸造現場として坂元醸造、粕酢醸造現場として横井醸造に、それぞれ我々との共同研究としてご協力戴いた)を研究対象として、食酢醸造過程に関わる微生物群の解析、並びに食酢醸造過程の物理化学的パラメータの測定と解析、を行ってきた。そこで、これまでの研究経過並びに結果を、シンポジウムにおいては既報の結果との比較討論も含めて、報告する。

「壺酢醸造」の解析

壺酢は、鹿兒島県福山町で1805年から製造されており、屋外に置かれた壺の中で糖化、アルコール発酵、酢酸発酵の3つの発酵が順次進行するという方法により製造されている。実際には、壺に蒸した玄米、麴、水を仕込んでから、水面を薄く覆うように麴を振る。振った麴が蓋となり糖化、アルコール発酵が進む。次いで、酢酸発酵が進むと覆った麴が沈み、さらに熟成が進み酢ができ上がる、というプロセスを経る。糖化、アルコール発酵は概ね20日目頃までで、その後酢酸発酵が始まる。

まず、PCR-DGGE法により発酵液中(発酵液面から15 cmの深さ)の微生物叢の変遷を大まかに検討した。細菌のDGGE解析の結果、仕込み1日後には *Lactobacillus fermentum* 並びに *Lactococcus lactis*由来と推定されるバンドがメジャーバンドとして検出された。その後の糖化、アルコール発酵過程(20日目頃まで)ではバンドパターンに大きな変化はなかった。20日目を過ぎ酢酸発酵過程に入ると、*Acetobacter pasteurianus*や *Lactobacillus acetotolerans* 由来と推定されるバンドが検出されるようになり、これらのバンドは解析終了時(90日目)まで検出され続けた。一方、*Lactococcus lactis*由来と推定されるバンドは酢酸発酵過程に入ると殆ど検出されなくなった。

次いで、壺間での微生物叢の差異を検証するために、3個の壺を対象として2種類のPCR-DGGE(バクテリア、カビ酵母)解析を経目的に行った。その結果、全ての壺が同様なバンドパターンを示し、均質な発酵過程が進行していることが示唆された。

粕酢醸造の解析

粕酢醸造の概要は以下の通りである。3年前後槽の中で熟成させた酒粕に温水を加え、その抽出物に対し、酸度が1.5%、アルコール濃度が5~6%となるように種酢並びにアルコールを添加し、4700 Lの静置発酵槽に入れる。仕込み液の表面に酢酸菌膜を浮かべ、2~3ヶ月間静置発酵を行わせる。

PCR-DGGE的に菌膜中の微生物の変遷を検討した所、変遷そのものは殆ど観察されず、*Acetobacter pasteurianus*由来と推定されるバンドが主要なものとして検出された。プレート解析の結果からは、静置発酵開始から2週間頃までは酢酸菌に比して乳酸菌が高い割合で検出されていた。そこで、乳酸菌特異的なプライマーによりPCR-DGGEを行った所、全ての静置発酵期間を通じて検出されたメジャーなバンドが存在し、*Lactobacillus acetotolerans*由来と推定された。

Microbial analyses of vinegar fermentation process

○ Masaharu ISHII¹, Shin HARUTA², Yasuo IGARASHI¹
 (1) Dept. Biotech., Univ. Tokyo, (2) Dept. Biomat. Sci., Univ. Tokyo)

Key words vinegar fermentation, microbial diversity