

「ナノテラス」の次世代放射光による納豆の
発酵・熟成過程の再評価

東北大学大学院 農学研究科

金子 淳

糸引き納豆の発酵・熟成の過程では、原料であるダイズと納豆菌、加工工程の温度や湿度管理、発酵容器の形状、匂い成分や色調、物性の分析、微生物汚染対策などが詳細に研究されている。ダイズの品種改良や機能性を持つ納豆菌の育種では、既存の分析手法で遺伝子・分子レベルのデータを得ることができる。一方、納豆菌が蒸し大豆という固体の培養基内の有機物を分解し増殖する過程の解析には、匂いや粘り試験など、納豆そのものから切り離して非破壊的分析が可能なものを除き破壊的手法を用いるしかない。

本研究ではナノテラスの高輝度 X 線を活用し、固体発酵・熟成過程の納豆内部の非破壊的可視化の可能性を探ることを目的とした。

実験方法

実験室レベルの納豆製造：実験室での製造法(1)を参考に製造した。極小粒品種（スズマル）50 g を 300 ml の水に 24 時間浸漬、網ひしゃくに移して 121°C で 15 分オートクレーブした。タカノフーズ「おかめ納豆極小粒」1 粒を 5 ml の LB 培地で 37°C 一晚培養した培養液 2 ml を滅菌ビーカー中で約 80°C に冷ました豆にまぶし、納豆用スチレンパックに移した。上にラップかけて蓋をテープでシールし、プラスチックケースに入れて 40°C で 24 時間発酵、その後 4°C に移して熟成した。白色紙上で薬匙で潰した粒の色調をスマートフォンのカメラと「色しらべ (kamusoft)」アプリケーションを用い、白色 LED 照明下で Lab 値を測定した。硬さは上皿天秤を用いて直径 7 mm の金属棒で押し潰す簡便法で測定した。

アルギン酸カルシウムゲルによる納豆菌の固定化：滅菌した 2% アルギン酸ナトリウムと培地、きな粉懸濁液を 1:1 で混合し、口径約 5 mm のチューブからビーカー中の 200 ml の 100 mM 塩滅菌化カルシウム中に攪拌しながら滴下し、3~4 mm のビーズを得た。

ナノテラスにおける X 線 μ CT 測定：BL09W では視野横 20 × 縦 5 mm、画素サイズ 4.6 μ m の X 線 μ CT 測定を行った。ウィグラー光源により放射された白色 X 線を、X 線ミラーと 20 mm のアルミアブソーバーでピークエネルギー 25 keV 近傍かつ顕著な試料損傷が生じない強度に調整した。サンプル-カメラ間距離を 1 m とし、X 線吸収に加えて X 線の屈折効果により構造の界面が強調された屈折コントラストの投影像を取得した。サンプルはポリエチレン(PE)チューブに密封して CT ステージにセットし、露光時間 50 msec で回転させ、0.1 度ずつ 1800 枚の投影像を撮影した。BL10U では視野横 1.3 × 縦 1.3 mm、画素サイズ 0.65 μ m の高解像度 X 線 μ CT 測定を行った。8.3 keV の単色放射光を用い、サンプル-カメラ間距離を 15 mm として PE 製 PCR チューブに入れた納豆の糸に対し、BL09W と同様に 1800 枚の投影像を撮影した。屈折コントラスト投影像からの CT 像の再構成には大型放射光施設 SPring-8 で開発された CT 再構成ソフトウェア(2)のナノテラス実装版「wakame」を用いた(2)。また共同実験者の高山博士が実装した位相回復法(3)により位相 CT 像の再構成を行った。CT 像の表示および解析には ImageJ Fiji を用いた。

結果と考察

サンプルの色調と硬さ：次ページの表にまとめた。色調 (Lab 値) は乾燥状態と浸漬後の差は少なく、a* はマイナスで緑がかった。一方、オートクレーブ後には a*、b* ともプラス側に上昇し、赤身と黄身が強くなる褐色化がみられた。a*、b 値は発酵・熟成の過程の変化は小さいが、L* は明らかに減少して褐色が濃くなった。硬さは浸漬吸水後では 2

kg 以上と簡単には崩れなかったが、オートクレーブ処理により 500-700 g 程度まで軟化した。40℃24 時間の発酵後には約 200 g と簡単に崩れるようになり、熟成後もほとんど変わらなかった。賞味期限日の「おかめ納豆極小粒」の Lab 値 47.6、15.2、37.5 であり実験室で 7 日間熟成した場合と比べ赤みがやや強かった。硬さは 150-200 g であった。納豆製造過程の硬さ変化に関して小川らは、ダイズの硬さは蒸煮後に 1/8 となり、発酵・熟成過程では徐々に低下すると報告しており(4)、簡便法でもその傾向が確認された。

表.納豆製造の各段階における豆の色調と硬さの変化

	浸漬吸水	オートクレーブ	40℃ 12h	40℃ 24h	発酵後 4℃ 1d	発酵後 4℃ 7d
色調(Lab値)	77.6, -2.9, 24.8	59.1, 10.3, 42.2	51.9, 5.3, 34.0	49.3, 3.9, 42.8	50.2, 4.7, 39.2	46.6, 8.2, 39.5
硬さ	>2 kg	500-700 g	500 g	200 g	100 g - 200 g	100 g - 200 g

BL09W X線μCT測定：小川らは、納豆製造工程の内部構造観察の試みとして、パラフィン包埋したダイズ粒の 20 μm 厚切片の観察を行っている(4)。細胞壁を構成するフェノール性化合物の自家蛍光を蛍光顕微鏡で観察することで子葉組織細胞壁の蜂の巣状構造や細胞内部の多孔質構造を確認しているが、後者は切片作製時の脱水など操作に伴うアーティファクトの可能性の可能性も指摘している。

一方 X線-μCT測定で、切片を調製することなく納豆の内部構造の観察に成功した。本装置での撮影範囲は水平方向 20 mm × 高さ 5 mm であり、CT 画像は CMOS カメラの 1 ピクセルごとの切片画像を 1080 枚積層して、納豆粒の一部分をスライスした形として再構成される。ここでは、発酵の各過程における納豆の CT 像を構成する積層画像の中から、視野の中心付近にあたる画像を示した。吸収像では X 線の屈折効果による界面強調がかかっており、密度が高く X 線を吸収する箇所は明るく、密度が低い領域は暗くなる。また、位相回復計算法(3)によりコントラストが向上した像を位相回復像とした。同心円状の線は、照射 X 線ビームの強度ムラによるものである。なお、本条件ではダイズ組織は観察できるが、画素サイズ(4.6 μm)より小さい納豆菌(あるいは孢子)は描写されない。

ダイズ乾燥(休眠)種子の断面(図 1 A):吸収像ではリグニン化され密度が高い種皮が明るい線として観察され、表皮柵状細胞、時計皿細胞、表皮柔細胞からなる層状構造(5-7)が確認できた。子葉の合わせ目も判別でき、子葉内部は一様に見える外側領域と内側の隙間がある領域に分かれていた(イラスト参照)。一方、位相像では、向軸側が暗く、背軸側は明るく観察され、登熟期の子葉に見られる向背軸の組織間の差(8)が可視化された。

24 時間浸漬後の断面(図 1 B):ダイズの吸水過程の MRI 観察で、水は維管束を通じて吸水後 5 時間の時点で子葉全体に行き渡ることが確認されている(9)。子葉が完全に膨潤している 24 時間後では、吸収像では明るい線状の X 線の吸収が高い領域が見られるようになり、位相回復像では子葉の向背軸間の明るさの差が少なくなった。

オートクレーブ処理後(図 1 C)：山本らは煮熟により細胞壁中層部が離れることで子葉内部の細胞間に隙間が生じることを固定標本の 1 μm 厚切片の光学顕微鏡観察で、オイルボディが融合して数 μm の油滴となることを透過型電子顕微鏡での切片観察でそれぞれ示している(10)。オートクレーブ後の吸収像では子葉内側で暗い亀裂のような領域が明確になったこと、有意に軟化したことは、これらの変化を反映している可能性がある。一方、位相回復像では X 線吸収が高い領域が輝点として観察されるようになったが、子葉向背軸

の差は明確でなかった。この試料のみ短い軸方向の断面であることを踏まえ、長軸方向での再測定が必要である。

全粒納豆では、納豆菌は種皮表面に糸で付着した状態で増殖すると考えられており、子葉内部は納豆菌が分泌した酵素によって発酵すると考えられている(4)。今回の試料でも可溶性タンパク質が発酵 24 時間後にはかなり低分子化していることを確認した。

納豆菌接種後 12 時間培養(図 1 D)：吸収像では種皮の一部の剥離が観察されたが、その他は吸収像、位相回復像ともオートクレーブ後との明確な差は見られなかった。

納豆菌接種後 24 時間培養(図 1 E)：糸を引き始め、吸収像では子葉外部と同程度の明るさで観察された。子葉内部の明るい網状の領域と位相像では輝点は明確に観察されるようになり、納豆がさらに軟化したことと合わせ、子葉内部構造の崩壊が考えられた。

発酵後 4℃で 1 日熟成(図 1 F)：吸収像では、納豆粒周囲の糸が顕著となり、種皮の割れ目が観察された。子葉内の網状の模様と位相像の輝点には変化はなかった。

発酵後 4℃で 7 日熟成(図 1 G)：1 日熟成と差は見られなかった。

吸水したダイズでは使用の葉脈が可視化されており(9)、さらにオートクレーブすることで酵素の拡散を容易にする通路が形成され则认为られる。熟成後の網状の模様はその結果生じた子葉内部組織の不均一性を反映している可能性がある。比較として、ひきわり納豆製品を測定した結果、A 社のひきわり納豆大粒像で暗い亀裂のような領域が見られる一方で、位相像の輝点は明確でなかった(図 2 A)。子葉断面が露出しているひきわり納豆では納豆菌が断面に直接付着することで酵素が子葉内部組織にアクセスし易くなると考えられ、その影響を解析する必要がある。B 社のひきわり小粒では、吸収像、位相回復像とも子葉内部の像と似ていたが、細かい粒の場合はダイズ上での位置を含め、多数の断片を観察する必要がある。

CT 画像は一部をブロックとして切り取ることで内部構造の詳細な変化を解析できるようになる。例として 40℃で 24 時間発酵後、4℃で 1 日熟成させた納豆粒の種皮付近を拡大し、3D 構成した 3D 画像の一部を図 3 に示す。大豆の表皮柵状細胞には無数の突起が観察され、これは吸水によって切断されやすくなる時計皿細胞(4)の断片と推定される。今後はこれまでに SPring-8 で実施された調理過程のエダマメの位相 CT 解析結果(11)を踏まえ、納豆の全体像を構成する精細 CT を取得し、比較解析を進めていく予定である。

BL10U 高解像度 X 線 μ CT 測定：本装置で撮影される像の解像度は解像度は 1 ピクセル = 0.65 μm であり、BL09W の μ -CT より約 7 倍拡大された像を撮影可能であるが、視野が横約 1.3 mm × 垂直約 0.5 mm と小さい。そこで製品の納豆から「糸」のみを PCR チューブにサンプリングして観察した。CT 画像は 1 pixel ごとの積層画像 2040 枚で構成されているが、そのうち 1050 pixel 目の切片画像を図 4 A に示した。右側の 600 ピクセル四方を切り出した領域には、X 線の吸収が低い数 μm 程度の暗色の粒子と、灰色の「糸」の領域、そして X 線の吸収が高く白く光る輝点(矢印)が観察された。図 4 B では 3 つの輝点に注目し、擬似カラー化して見やすくし、2 ピクセル (1.3 μm 相当)ごとの切片画像における存在を解析した。その結果、輝点のサイズが 2-3 ピクセル程度であることから、1 μm 程度の芽胞の可能性が考えられた。今後、暗い粒子の同定や、納豆菌の胞子をアルギン酸ビーズに包埋して高解像度 X 線 μ CT で観察して芽胞であることを確認する必要がある。

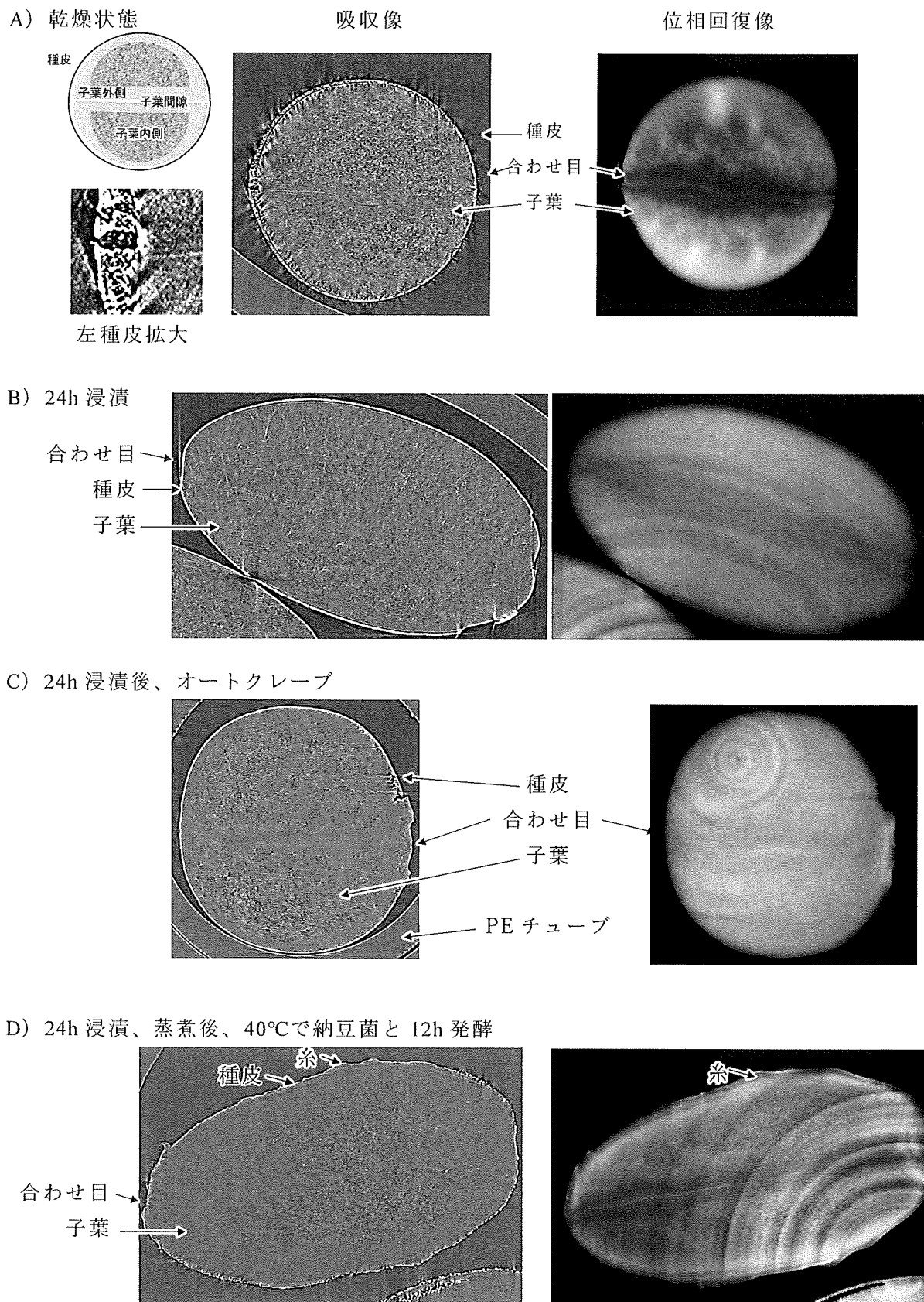
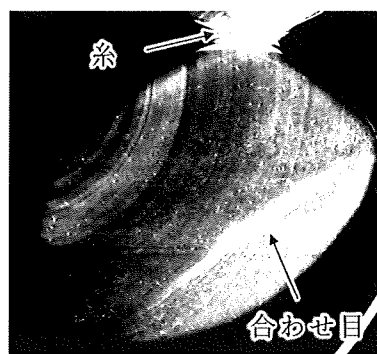
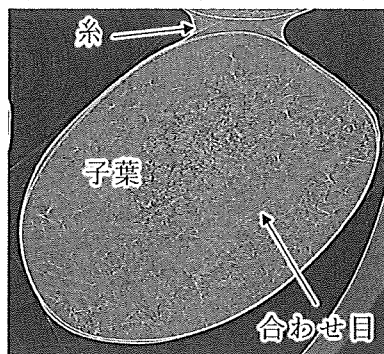


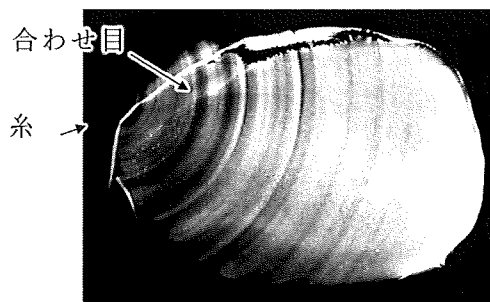
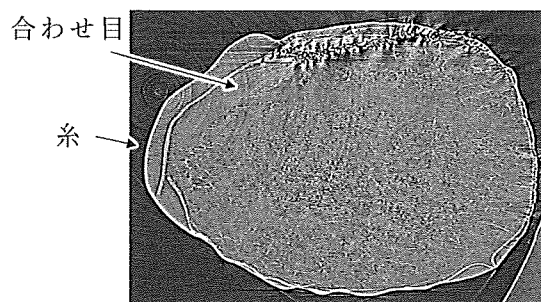
図1. 納豆製造の各段階における断面像。

CT 画像を構成する積層画像のうち、対象物のほぼ中央に当たる画像を示した。

E) 24h 浸漬、煮沸後、40℃で納豆菌で 24h 発酵



F) 4h 浸漬、煮沸後、40℃で納豆菌で 24h 発酵、4℃1 日熟成



G) 4h 浸漬、煮沸後、40℃で納豆菌で 24h 発酵、4℃7 日熟成

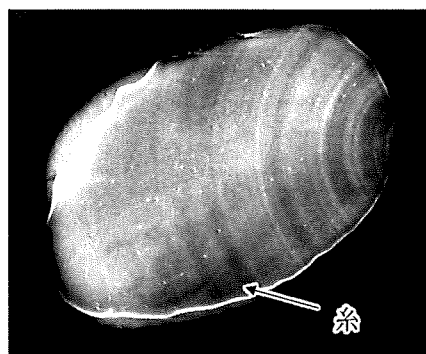
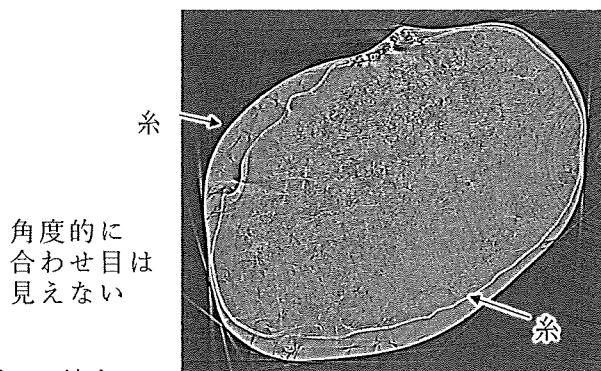


図 1. 続き

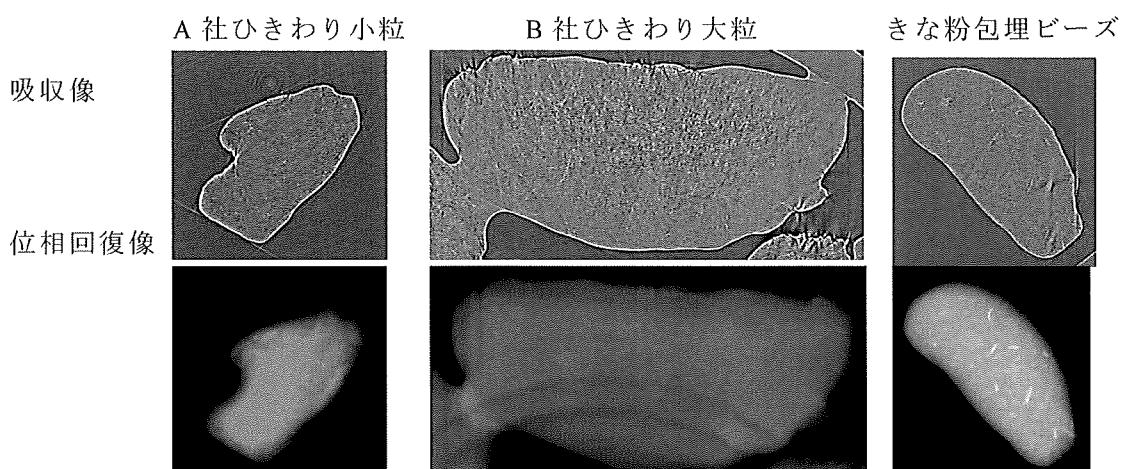


図 2. ひきわり納豆及びきな粉を包埋したアルギン酸ビーズの断面像。
CT 画像を構成する 1 ピクセルごとの積層画像のうち、対象物のほぼ中央に当たる画像を示した。

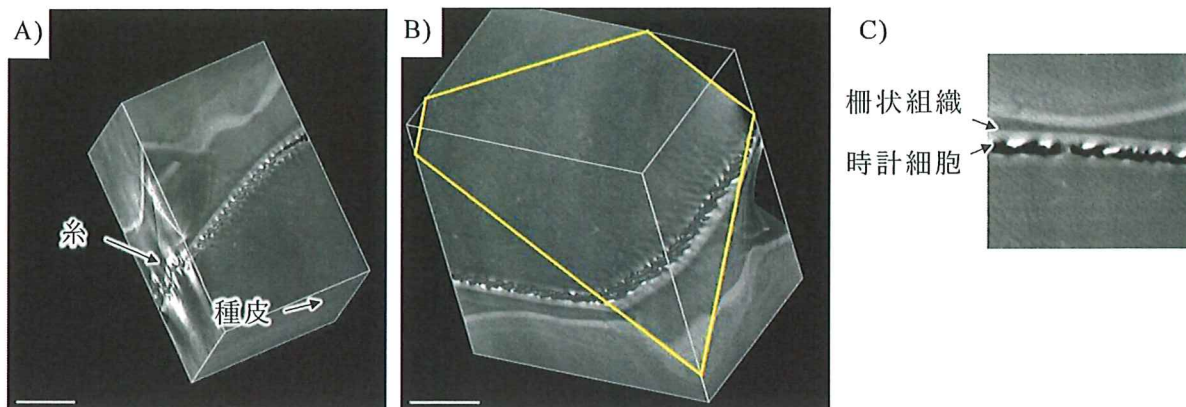


図 3. X 線 μ CT 画像の例

A) は 3D 画像の一例を、B はその切片画像を示す。C) は種皮部分の拡大図。

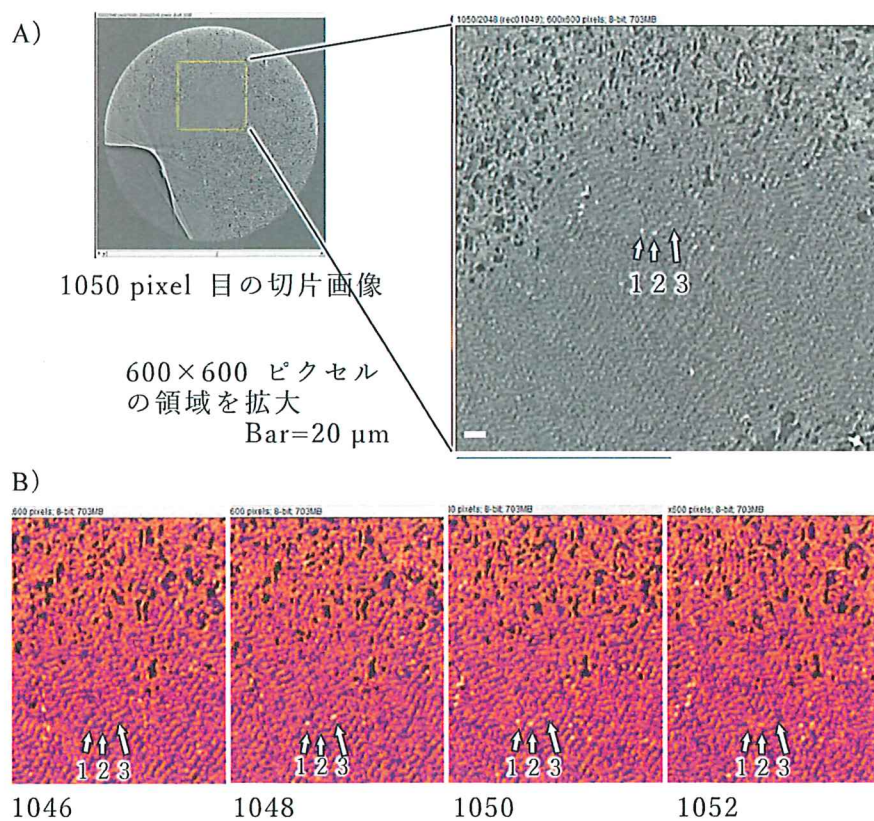


図 4. 高解像度 X 線 μ CT で撮影した位相回復像

A) グレースケールで示したオリジナル画像とその拡大図。CT 画像を構成する 2040 枚の積層画像のうち、1050 pixel 目の切片画像を示した。矢印は輝点を示す。

B) 2 ピクセル (0.92 μ m 相当) ごとの切片画像における輝点 (矢印の先端) の見え方。擬似カラー化し、オレンジの輝点を強調している。

要約

ナノテラスの高輝度 X 線を活用し、糸引き納豆のダイズを培養基とした固体発酵・熟成過程における納豆内部の非破壊的可視化に挑戦した。実験室レベルの製造法で発酵・熟

成した納豆の各段階の納豆粒について、Lab 値や硬さが既報の内容と遜色のないことを確認の上、ナノテラスで X 線 μ CT 測定を行い、X 線吸収像と X 線の屈折効果で構造の界面が強調された位相回復像を取得した。乾燥種子と吸水後、オートクレーブ後の断層像の比較では種皮の 3 層状構造の変化や子葉内部の向背軸の組織間の変化の違いなどが可視化され、煮熟による納豆粒の軟化との関係が推察された。一方、発酵・熟成の過程では種皮の剥離に加え、子葉内部の X 線吸収の高い網状模様が観察された。この変化は発酵・熟成のどのような内部構造変化を反映している可能性が考えられる。さらに 7 倍拡大できる高解像度 X 線 μ CT 測定では、納豆の糸の中に X 線吸収の高い輝点が観察された。芽胞であることが確認できれば、発酵・熟成過程での納豆菌の動態解析につながる。今後、CT の 3D 画像の解析を進めるとともに、従来の破壊的手法での解析と合わせ、発酵食品製造における微生物の働きの非破壊的可視化技術の開発に繋げていきたい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり多大なご支援を賜りましたタカノ農芸化学研究助成財団に心より感謝いたします。また共同研究者としてナノテラスでの測定並びに解析に協力いただきました、東北大学農学研究科放射光生命農学センター (A-Sync) の高山裕貴博士、日高将文博士、宮下脩平博士に深く感謝いたします。

文献

- 1) 納豆試験法研究会 編 (1990) 納豆実験法(初版), (株)光琳.
- 2) SPring-8 編 Computed Tomography in SPring-8 (SP- μ CT), <http://www-bl20.spring8.or.jp/xct/index.html>
- 3) Paganin D, Mayo SC, Gureyev TE, Miller PR, Wilkins SW (2002) Simultaneous phase and amplitude extraction from a single defocused image of a homogeneous object. *J. Microsc.*, 206:33-40.
- 4) 小川幸春, 田口聡, 山本奈美, 田口彰男 (2008) 納豆作製工程におけるダイズ粒の力学特性と顕微構造の変化. *日本食品工学会誌*, 9(3):151-156.
- 5) Teixeira SB, Pires SN, Meneguzzo MRR, Deuner S, Zorato MF, Meneghello GR. (2024) Chemical and anatomical characterization of soybean seed coats with the presence of cracks. *J. Seed Sci.*, v.46:e202446034.
- 6) 齋尾恭子 (2006) 豆類種皮の構造と役割. *豆類時報*, 44:15-31.
- 7) Upreti P, Bandaara MS, Tanino KK. (2024) The role of seed characteristics on water uptake preceding germination. *Seeds*, 3: 559–574.
- 8) Pelletiera JM, Chenb M, Lin JY, Le B, Kirkbride RC, Hur J, Wang T, Chang SH, Olson A, Nikolov L, Goldberg RB, Harada JJ. (2025) Dissecting the cellular architecture and genetic circuitry of the soybean seed. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 122(1):e2416987121.
- 9) Koizumi M, Kano H. (2014) Water entry in dry soybeans at imbibition observed by dedicated micro-magnetic resonance imaging. *Am. J. Biol. Life Sci.*, 2(1):6-11.
- 10) 山本奈美, 田村咲江 (1999) 煮熟したラッカセイのテクスチャー, 組織構造及び官能特性 -ダイズ・インゲンマメとの比較-. *日本家政学雑誌*, 50(4):313-321.
- 11) Hidaka, M., Miyashita, S., Yagi, N., Hoshino, M., Kogasaka, Y., Fujii, T., Kanayama, Y. (2022) High-Resolution X-ray Phase-Contrast Imaging and Sensory and Rheometer Tests in Cooked Edamame. *Foods*, 11, 730.