

# 細菌の氷核活性因子の機能解析および調理素材の 凍結組織化への活性因子の応用

渡辺道子\*

東京学芸大学教育学部

## Functional Analysis of a Bacterial Ice Nucleation-active Factor and Its Application to Freeze Texturing of Food Materials

Michiko WATANABE

Faculty of Education, Tokyo Gakugei University, Tokyo 184-8501

### ABSTRACT

My group isolated an edible ice nucleation-active bacterium, *Xanthomonas campestris* INXC-1, and clarified that 4-hydroxy-3-nitrophenylacetic acid enhanced the activity. This paper reports a possible mechanism involved in the activity enhancement and its application to freeze texturing of SPI. Cultivation of the bacterial cells in the presence of the activity enhancer resulted in enhancement of their ice-nucleation activity. Both the ice nucleation-active protein and its mRNA were effectively expressed in the bacterial cells cultured in the presence of the enhancer. This indicates that the enhancer stimulated the biosynthesis of the ice nucleation-active protein at the transcription step. The active cells were killed by pressurization before use for freeze texturing. SPI dispersion and its heat-induced gel began to freeze with a slight degree of supercooling in the presence of the pressurized cells and formed ice crystals with a dendrite structure. The frozen samples were dried before setting the resulting textures by steaming if necessary, to form anisotropic textures. SPI showed a weak ice-nucleation activity which gave a similar texture to the resulting product, when freezing was done at -10°C. Mouth-feel of the textured SPI resembled that of some mushrooms. *Soy Protein Research, Japan* **1**, 31-35, 1998.

Key words : freeze texturing, soybean protein isolate, bacterial ice nucleation

私どもの研究グループは細菌の氷核活性を食品加工の分野で有効利用し、食品の凍結濃縮、凍結乾燥などに応用できるという基礎データを報告してきた<sup>1)</sup>。さ

らに、茶芽から新規の食用氷核活性細菌 (*Xanthomonas campestris* INXC-1) を単離し、その培養条件を明らかにした<sup>2)</sup>。本菌の氷核活性はカラシ種子の熱水抽出物によって増強され、氷核活性増強成分が4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニル酢酸であることを明らかにした<sup>3)</sup>。

\*〒 184-8501 東京都小金井市貫井北町 4-1-1

本菌は 5℃, 300 MPa で高压殺菌され<sup>4)</sup>, この殺菌菌体は 1994 年厚生省によって食品添加物として認可され, キュービー(株)によって工業化されている。

本研究は, 4- ヒドロキシ-3- ニトロフェニル酢酸が氷核活性を増強する機構を解析し, 殺菌氷核活性菌体を用いて大豆たん白質ゾルおよびゲルを凍結組織化し, 新しいタイプの食品素材を作り出すことを目的とした。

## 方 法

### 氷核活性細菌

*Xanthomonas campestris* INXC-1 を 0.1% 乳酸と 1 ppm の 4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニル酢酸を含むイーストエキス・ペプトン培地<sup>2)</sup> で 25℃ で 20 ~ 80 時間振とう培養した。4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニル酢酸だけを除いた培地で同様に培養したものを対照とした。

### 菌体増殖度

培養液を 9 倍量の水で希釈後, 希釈液の 600 nm の吸収を測定し, 増殖度の指標とした。

### 氷核活性

培養液を 10<sup>6</sup> 倍の水で希釈し, 水滴法<sup>5)</sup> で氷核活性を測定した。水滴の 10, 50, 90% が凍る温度を T<sub>10</sub>, T<sub>50</sub>, T<sub>90</sub> とした。

### 氷核活性たん白質

菌体超音波破碎物の遠心分離上清について, アルカ

リフォスファターゼ標識抗 InaA 抗体を用いた ELISA 法で氷核活性たん白質を測定した。別に, たん白質定量キット (Bio-Rad) で全たん白質を定量した。20 時間培養液の氷核活性たん白質量と全たん白質量の比を 1 とした相対値で表わした。

### ina X の mRNA

60 時間培養液から mRNA を抽出し, inaU の R-ドメインに相当する DNA フラグメントを用いたノーザン解析を行った。

### 殺菌

4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニル酢酸存在下, 60 時間培養液を遠心分離 (3000 g, 15 分間) して集菌し, 4℃, 300 MPa で高压殺菌した。

### 熱収支

市販鶏卵白については氷核活性細菌存在および不在下で, 15% 大豆たん白質 (フジプロ-R, 不二製油) については氷核活性細菌不在下で示差走査熱量計 (第二精工社) を用いて凍結および融解過程での熱の収支を測定した。

### 組織化

大豆たん白質 (フジプロ-R) および乾燥卵白 (キュービー) を 15 重量% になるように水に分散させ, 遠心分離 (1000 g, 10 分間) して気泡を除き, 下層を得た。下層を緩やかに攪拌して均質化し, 100 g ずつ各試料について 4 枚のガラスシャーレ (直径 15 cm) に入れて,

Table 1. Effects of 4-hydroxy-3-nitrophenylacetic acid on the cell growth rate, ice-nucleation activity and ice nucleation-active protein content of *Xanthomonas campestris* INXC-1.

4-Hydroxy-3-nitrophenyl-acetic acid <sup>a</sup>	Cultivation time (h)	Absorbance at 600 nm <sup>b</sup> (× 10)	Ice-nucleation activity <sup>c</sup> (°C)			Relative ice nucleation-active protein <sup>d</sup>
			T <sub>10</sub>	T <sub>50</sub>	T <sub>90</sub>	
Presence	20	0.02	<-15	- <sup>e</sup>	-	1
	40	0.28	-7.5	-8.4	-9.0	1.52
	60	0.42	-3.5	-6.3	-7.0	2.04
	80	0.59	-7.0	-7.1	-7.3	0.91
Absence	20	0.02	<15	-	-	0.91
	40	0.31	-7.7	-8.6	-8.7	1.17
	60	0.47	-4.5	-7.0	-8.9	1.30
	80	0.55	-7.4	-7.5	-7.5	0.65

<sup>a</sup> Cells were cultured in the presence (1 ppm) or absence of 4-hydroxy-3-nitrophenylacetic acid in yeast extract-peptone medium at 23°C.

<sup>b</sup> Showing cell growth rate.

<sup>c</sup> Each culture was diluted by a 10<sup>6</sup>-fold volume of autoclaved water and then measured for ice-nucleation activity.

<sup>d</sup> Determined by ELISA.

<sup>e</sup> Not measured because T<sub>10</sub> was low.

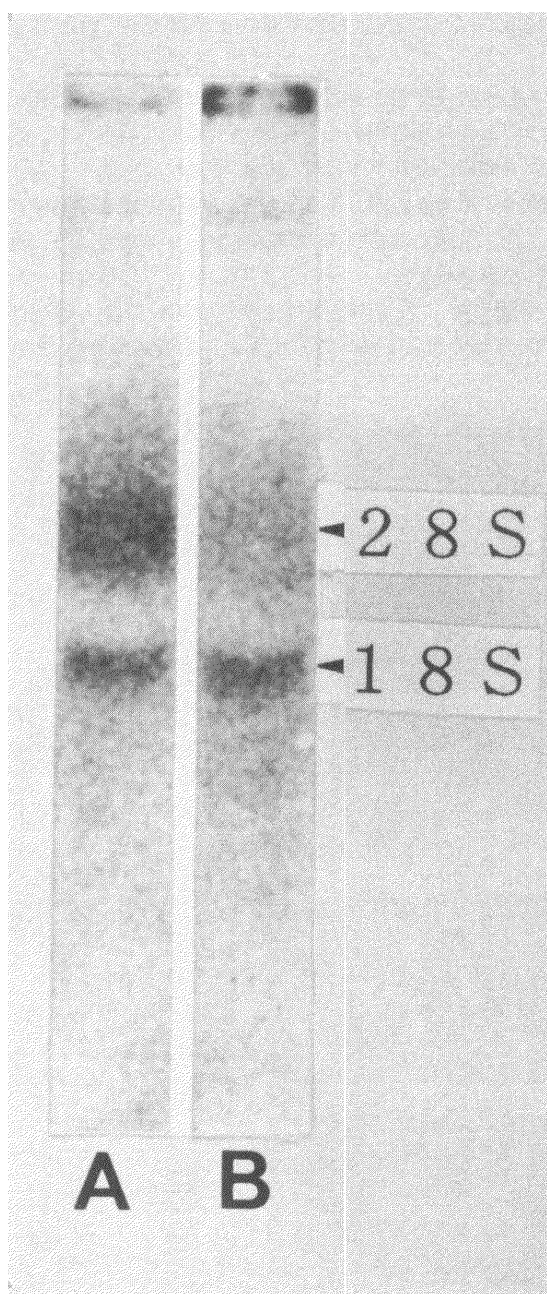


Fig. 1. Northern blot analysis with *Xanthomonas campestris* INXC-1. RNA is from cells cultured for 60 h in the presence (lane A) or absence (lane B) of the enhancer. An image analysis of the two bands at 28S shows that 1.4 times more *inaX* mRNA was expressed in A than in B.

そのうちの2枚を5分間蒸煮した後、室温にまで冷却した。蒸煮したものとしらないものの各1試料の表面に殺菌菌体を刷毛で塗り付け、 $-5^{\circ}\text{C}$ のインキュベータ(サンヨー)で1晩静置して凍結させた。凍結試料は熱風乾燥した。蒸煮しないで組織化した試料は凍結乾燥後、2分間蒸煮して組織を固定した。蒸煮したものとしらないものの別の各1試料はそのまま $-10^{\circ}\text{C}$ で凍結させた後、同様に乾燥と組織固定を行った。対照として用いた卵白では氷核活性細菌を塗付したものでは大豆たん白質と同様に、塗付しなかったものでは $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結させた以外は同様に処理した。

#### 走査型電子顕微鏡観察

乾燥試料の表面を電子顕微鏡(ABT WS-250)で観察した。

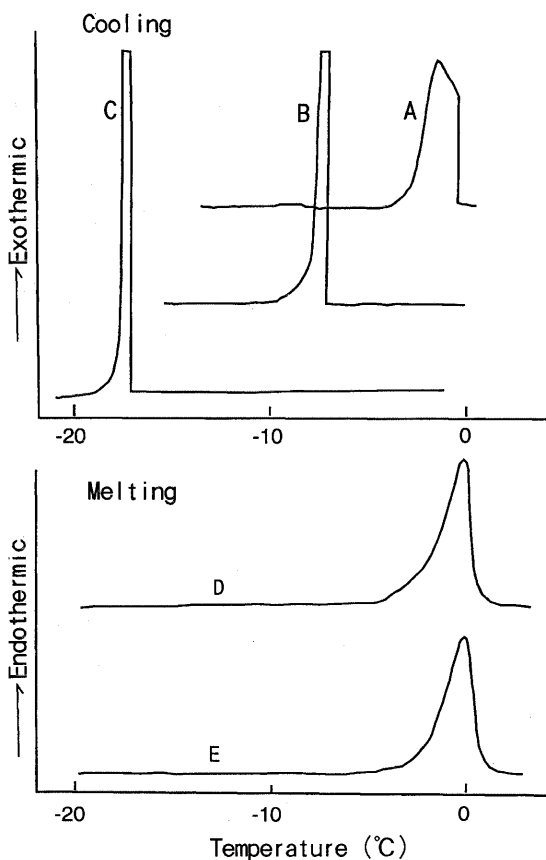


Fig. 2. Freezing and melting thermograms. A, egg white in the presence of the pressurized cells; B, SPI in the absence of the cells; C, egg white in the absence of the cells; D, egg white in the presence of the cells; and E, SPI in the absence of the cells.

## 結果と考察

細菌の水核活性は氷核活性たん白質に起因するといわれている。そこでまず氷核活性たん白質量を測定した。Table 1 に示すように、氷核活性の高いもので氷核活性たん白質が多く、4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニル酢酸は氷核活性たん白質の生合成を促進しており、高い氷核活性を得るにはこの化合物の存在下で60時間培養するのがよいことがわかった。ノーザン解析の

結果、生合成の促進は転写レベルで起こっていた (Fig. 1)。

氷核活性細菌が共存すると食品の凍結と融解過程でどのような効果があるかを卵白を用いてしらべた。氷核活性細菌存在下では卵白は殆ど過冷却することなく凍結が始まったが、不在下では $-18^{\circ}\text{C}$ 付近まで過冷却した。大豆たん白質の凍結特性をしらべたところ、卵白と異なって $-7\sim-8^{\circ}\text{C}$ までしか過冷却しなかった (Fig. 2)。これらの結果は氷核活性細菌にはA級( $-5^{\circ}\text{C}$ 以上で核となる)の、大豆たん白質にはB級( $-10$

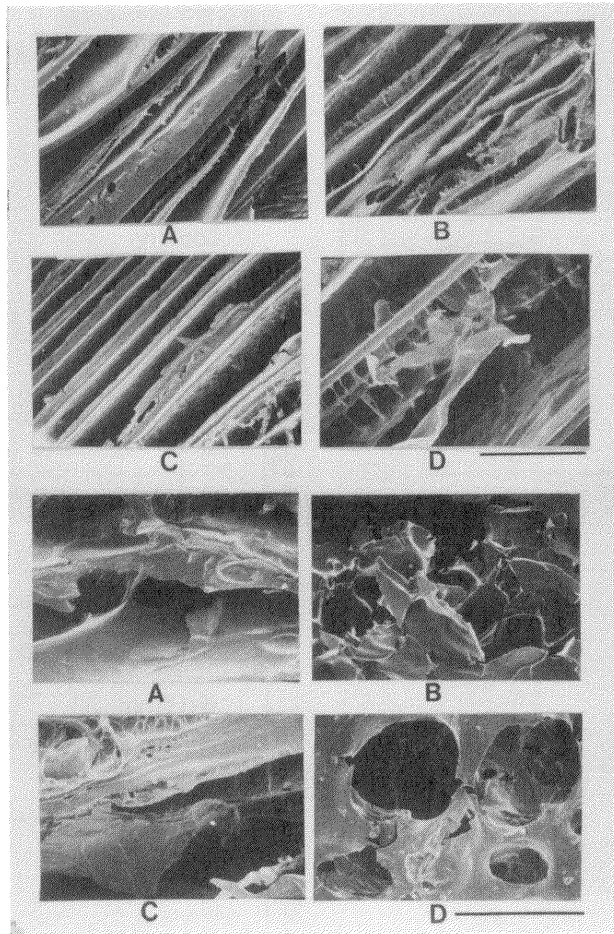


Fig. 3. Scanning electron micrograms of freeze-textured SPI and egg white in the presence and absence of pressurized *Xanthomonas campestris* INXC-1 cells. Bar shows 1 mm. The upper and lower pictures show texturized SPI and egg white, respectively. A, from the dispersion in the presence of the cells; B, from the dispersion in the absence of the cells; C, from the heat-induced gel in the presence of the cells; and D, from the heat-induced gel in the absence of the cells.

℃ 以高, -5℃ 以低で核となる)の氷核活性が存在することを意味している。さらに, -10℃ 付近まで温度を下げれば大豆たん白質の凍結組織化が可能であることも推察できる。これらの現象を踏まえて大豆たん白質の凍結組織化を試みた。卵白を氷核不活性対照とした。

凍結組織化過程で材料に気泡が存在すると, 組織が乱れてしまうので脱気は必須の操作である。気泡を除く最も有効な方法は遠心分離であった。脱気した試料をそのまま凍結組織化したものは水を加えると再分散してしまったので, 組織を固定するためには煮沸する必要があった。予め煮沸しておいた試料を凍結組織化したものでは組織は固定されていた。

組織化物の顕微鏡像をFig. 3に示す。大豆たん白質では生試料でも予め蒸しておいた試料でも, 氷核活性細菌を塗付したものでは-5℃ でフレーク状の組織が得られたが, 氷核活性細菌を塗付しなかったものでは-5℃ では凍結せず, -10℃ にしてはじめて凍結組織化でき, フレーク状の組織が得られた。卵白では氷核活性細菌を塗付したものは-5℃ でフレーク状の組織が得られ, 塗付しなかったものでは-20℃ 付近で凍結し, スポンジ状組織になった。凍結組織化大豆たん白質は加水して加熱すると, きこの様のテクスチャーを呈した。

## 要 約

食用氷核活性細菌, *Xanthomonas campestris* INXC-1 の氷核活性を4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニル酢酸が増強させる機構を検討した。この活性増強化合物の存在下では氷核活性たん白質とそのmRNA 量が増加したことから, この化合物は転写レベルで氷核活性たん白質の生合成を促進していると結論した。氷核活性を増強させた菌体を高圧殺菌したものを大豆たん白質分散液およびその加熱ゲルに塗付してから凍結させると, 殆ど過冷却することなくデンドライト状の氷が生成した。凍結物を乾燥後, 必要に応じて煮沸固定すると異方性のフレーク状の組織化物が得られた。大豆には弱い氷核活性が認められ, 氷核活性細菌を使用しなくても同様の組織が得られた。

## 文 献

- 1) Watanabe M and Arai S (1994): Bacterial ice-nucleation activity and its application to freeze concentration of fresh foods for modification of their properties. In : *Water in Foods*, Fito P, Mulet A and McKenna B eds., Elsevier Applied Science, Oxford, pp. 453-473.
- 2) Watanabe M, Watanabe J, Makino T, Honma K, Kumeno K and Arai S (1993): Isolation and cultivation of a novel ice nucleation-active strain of *Xanthomonas campestris*. *Biosci Biotech Biochem*, **57**, 994-995.
- 3) Watanabe M and Watanabe J (1994): Screening, isolation, and identification of food-originated compounds enhancing the ice-nucleation activity of *Xanthomonas campestris*. *Biosci Biotech Biochem*, **58**, 64-66.
- 4) Honma K, Makino T, Kumeno K and Watanabe M (1993): High-pressure sterilization of ice nucleation-active *Xanthomonas campestris* and its application to egg processing. *Biosci Biotech Biochem*, **57**, 1091-1094.
- 5) Vari G (1990): Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous freezing nucleation of supercooled liquid. *J Atmos Sci*, **28**, 402-409.