

# 好気性孢子形成桿菌類の抗生性に関する研究 IV<sup>※</sup>

## 糸引納豆菌類の抗菌性

松本宗人 (農産製造学研究室)

Muneto MATSUMOTO

On the Antibiotic Activity of Some Bacilli

(IV) Antibiotics of several strains of nattō bacteria

### 緒言

著者は、分離扁平培養基上で抗菌環らしきものを呈する好気性孢子形成桿菌の1株について抗菌性を確認し、該菌を *B. prausnitzii* T. の1菌株と同定し、その抗菌性を検討し、抗菌性物質を追究して、該菌の培養ろ液の呈する抗菌力は、極く一部が培養ろ液の中性エーテル抽出物に抽出される物質に由来し、一部は培養ろ液の酸性エーテル抽出物の水蒸気蒸溜々出部に由来する物質（主として揮発性有機酸のギ酸や酢酸）に基き、主体は此の酸性エーテル抽出物の不揮発酸部にあることを知り、該部より結晶物質を分離してこの物質が抗菌力の主体をなすものと判断し、該物質をジピコリン酸と同定したが、<sup>1,2,3)</sup> 該物質が有働<sup>4)</sup> によって糸引納豆洗脱液より分離され、各種微生物に対して抗菌性を有することが確認されていることを知った。よって著者の供試した菌について糸引納豆生成能を調べたところ、其の能力あるものと判定した。納豆または納豆菌の抗菌性については古くから

伝承されているものらしくまた研究も病原菌に対する効果について行われている<sup>5,6,7,8)</sup> が、その抗菌性物質は微生物化学的に精査されていないので、著者はいわゆる納豆菌の数菌株について前報<sup>3)</sup> の方式でそれらの抗菌性物質を精査追究したところ、何れの菌株についても前報<sup>3)</sup> で検討した供試菌株についての成果とほぼ同様の結果を納豆菌についても得たのでその概要を報告する。

此の実験は前報と同当時のもので、御指導賜わった恩師片桐教授、北原助教授に対し、また種々御指示頂いた村松舜祐氏に対し、また菌株を御分譲頂いた北大佐々木教授に対し深く感謝申し上げる。

### 実験ならびに考察

1. 前報で供試した菌株の糸引納豆生成試験：浸漬煮熟後三角瓶に収めて加圧殺菌した大豆に接種して、経過性状を観察して第1表に示す結果を得た。糸引納豆を鑑別することは（従って糸引納豆生成能を判別することは）

第1表 供試菌株の納豆生成試験結果

菌 株	K 8	H 1	B 3	D 2	E 1	G 6
菌苔色調	白から黄白に移る	白から黄白に	白から黄白に	白から黄褐に	白から黄白に	白から黄褐に
皮膜	乾燥様粉状、厚	同左、薄	同左、同左	同左、厚	同左、普通	同左、厚
皺	多、大	多、小	多、小	多、大	多、小	多、大
粘質	多	普通	普通	多	普通	多
均質性	良、やゝ固い	良	良	やゝ固い	良	やゝ固い
糸引	良	中	良	良	良	良
軟化	普通	同左	同左	同左	同左	同左
PH	7.6	6.6	7.4	7.6	7.4	7.4
納豆臭	良	良	良	やゝ良	良	やゝ良
NH <sub>3</sub> 臭	強	中	中	強	中	強
異臭	ない	ない	ない	ない	ない	ない
納豆味	普通	同左	同左	同左	同左	同左
苦味	やゝ強い	普通	普通	やゝ強い	普通	やゝ強い
納豆生成能	有	有	有	有	有	有

※ 納豆菌に関する生化学的研究 IV

容易では無いが、表示せる各項目につき検討の結果、供試菌（前報<sup>1)</sup>で *B. prausnitzii* T. の1株と同定）は生成能を有するものと結論した。普通にいわれる納豆よりも粘質物が多く、その質がやゝ強固で、菌苔が厚く、皺がやゝ大きく、NH<sub>3</sub>臭が強く、苦味がやゝ強い等の点が趣を異にしている。呉、中村<sup>2)</sup>も糸引納豆生成能あるものと判定した菌株のうちに、やゝ他の株と性状を異にした菌株（呉、中村の No. 6, No. 11 の株）があり、*B. prausnitzii* T. に近いと報じて居り、それらの性状と供試菌のそれとを比較すると相異点もあるが近い。

2. 供試糸引納豆菌：保存菌を分譲して頂いたものや、市販納豆または稲わらより分離して糸引納豆生成能が有るものと認めたものゝうちから、菌の性状や生成納豆の性状等から選別して酷似せるものを除外して、次の数株

を選んで供試した。

- 1) H1 菌：北大応用菌学教室保存の納豆菌。
- 2) B3 菌：東京市販納豆より分離。
- 3) D2 菌：全上、菌苔厚く、粘質物多い。
- 4) E1 菌：京都市北郊の稲わらより分離。
- 5) G6 菌：全上、菌苔の皺大きく、粘質物多い。

分離は、市販納豆は菌苔を殺菌水で洗脱した液を分離源とし、稲わらは煮熟大豆加圧殺菌試料で納豆を作り判別後殺菌水で菌苔を洗脱して分離源とし、これらを超音波で分散して大豆汁寒天培地に扁平分離、集落は大豆汁中で超音波分散して扁平分離を繰り返して純粋分離とみなした。保存は前記培地斜面。供試菌類の納豆の性状並びに菌学的性状はそれぞれ第1表並びに第2表の如くであ

第2表 供試菌株の菌学的性状

	B 3	D 2	E 1	G 6
形 状	桿状、2～数箇連続	桿状、2～数箇連続	桿状、2～数箇連続	桿状、2～数箇連続
太さ(μ)	3～4.6×0.8～1.0	3.6～5.0×0.8～1.0	3.2～4.8×0.8～1.0	3.6～4.8×0.8～1.0
鞭 毛	周毛、運動性	周毛、運動性	周毛、運動性	周毛、運動性
細胞の膨大	する	する	する	する
孢子 形成部	端部	多く中央	端 部	中央的
形状	やゝだ円形	卵形に近い	やゝだ円形	卵形に近い
大 小(μ)	1.2～1.6×1.0～1.2	1.2～1.6×1.0～1.2	1.2～1.6×1.0～1.2	1.2～1.4×1.0～1.2
グラム染色	陽性	陽 性	陽 性	陽 性
集落 肉汁寒天平面	灰白色、扁平、乾燥状、粉状面小皺、円形に近い、周辺裂開、中央に星状小隆起核あり。	淡黄褐色、余り拡がらず噴火口の外輪山の如く辺隆起、類円、厚い。皺やゝ粗大。	淡褐灰白色、扁平、乾燥粉状、無光沢、類円形、周辺小裂開、中央核あり	帯褐黄白色、類中円、辺部隆起、中央凹む、厚い、皺はやゝ粗大、粘質物多い
肉汁寒天斜面	扁平、小皺乾燥状、周辺は鈍歯状、凝縮水澄。	皺粗大で中央垂れ下がる粘質多い。凝縮水は澄。	扁平、小皺、乾燥状後に溶けた様相を呈す始めは凝縮水澄	大皺は横平行に生じ中央部下方に流れる。凝縮水に繁殖皮膜、液澄
馬 鈴 薯	帯灰白、中皺、粘性やや大、凝縮水に皮膜、液澄濃粉分解陽性。	褐灰色、皺大きく、厚い粘性大、凝縮水に繁殖、濃粉分解	帯褐灰、皺やゝ大、粘性あり、凝縮水に繁殖皮膜、液澄、濃粉分解	帯褐黄灰色、皺やや大、半光沢面、液に皮膜、液澄、濃粉分解
肉 汁	灰白小皺皮膜、壁を上昇液澄明、膜直下はやや濁	淡黄白色、中皺、厚い膜壁を昇る、液澄、膜の直下はやゝ濁	灰色、小皺の皮膜、壁を上昇る、液澄明直下はやゝ濁	淡黄灰色、中皺、厚い膜、液澄、膜の直下はやゝ濁
膠質穿刺	皿状溶解、速やかに溶解(凝固後)	皿状溶解、速やかに酸性凝固後溶解	皿状、速やかに溶解凝固後直ちに溶解しはじめる	皿状、速やかに溶解凝固後溶解
インドール形成	陰 性	陰 性	陰 性	陰 性
硫化水素形成	陽 性	陽 性	陽 性	陽 性
ガス形成	陰 性	陰 性	陰 性	陰 性
硝酸塩還元	陽 性	陽 性	陽 性	陽 性
酸素分圧	通性好気性	通性好気性	通性好気性	通性好気性
発育適温	40, 45°C	35, 40°C	40, 45°C	40, 45 (50°Cも)

った。納豆は37°Cに1日培養し以後室温に置いて、1, 5, 10日目に観察し、PHは10日目に測った。無接種対照は5.6～5.8(何れも試験紙)。第2表の菌学的性状は分

離同定が直接の目的でないので概略を示したが記載の表現よりも実際の観察では菌苔外觀は明かに区別しうる差異があった。H1 菌は記載を省略したが分譲願った北大

では沢村株<sup>9)</sup>に一致する由であった。B3菌とE1菌は類似して性状は井口株<sup>10)</sup>や山本・田村の株<sup>11)</sup>に近く、村松のNo.1株<sup>12)</sup>にも似たところが多いが、B3菌よりもE1菌の方が粘質物形成は強い気味であった。D2菌とG6菌も比較的類似して、他の菌株とは粘質を多量に生産する点や集落が余り拡がらないで隆起して厚く、孢子形成も中央的である点等が異り、この性質は納豆生成試験の結果にも見られた苦味のやゝ多い特徴も見られる。両菌株とも沢村株の記載に近いところもあるが一致しない点もあり、Bergey's Manual<sup>13)</sup>で引くと、前者は *B. prausnitzii* T. に近く、後者は適温の態度から *B. tumescens* Zopf. に近いものと判断した。

3. 抗菌性の確認： 供試菌株について、前報<sup>1)</sup>の液体培地共棲試験、高層固体培地共棲試験および培養液の無菌ろ液の試験を、黄色葡萄球菌寺島株について行ったところ、何れも前報<sup>1)</sup>のK8菌とは同程度の抗菌力を示すことを確認した。菌株間には判定し難い程度にわずかながら差異あるものゝように認められ、D2菌とG6菌がやゝ強く、H1菌、B3菌、E1菌はかすかに劣る様に観察された。

4. 抗菌性物質の抽出と抗菌力の測定並びに抗菌性物質の分離同定： 風乾大豆1kg宛にそれぞれ各菌株を接種して、37°C1日培養して納豆とし室温に2日放置したものに水道水を加えて攪拌して菌苔を洗脱してガーゼでろ過し、洗脱を重ねて洗脱液を合して、大凡2立程度の洗脱液を得てこれを抽出試料とした。苛性ソーダ液を加えて先づアルカリ性にして大型連続抽出器2基で約16時間エーテル抽出してアルカリ性抽出物を得、これに温水を加え温水溶出液を得てその抗菌力をはかった。ついでアルカリ性抽出残液に硫酸を加えて酸性とし約40時間エーテル抽出して酸性抽出物を得（刺戟性酸臭の強い酸性溶液、抽出の途中に受器エーテル液中に結晶の出現をみる）、この温水溶出液について抗菌力をはかった。次に此の酸性抽出物水溶液の一定量をとって水蒸気蒸溜し、供試料の20倍容量の揮発酸部を溜りさせ、中和濃縮後抗菌力を検定し、不揮発酸部も中和して抗菌力をはかった。抗菌力は何れも、試液を中和してザイツ無菌ろ液として、肉汁稀釈法で、黄色葡萄球菌寺島株について行い、検定結果を前報の表記法<sup>3)</sup>に従って抗菌物質量を全試料に対応する価として算出した。ついで、大半の不揮発酸部を加熱濃縮後冷却し、晶出物をろ別乾燥秤量して、全洗脱液に対する収量を算出した。結晶はそれぞれ、肉汁5ml中に0.1%として抗菌力を調べ、何れも寺島株の生育を阻止することを確認した。以上の経過に由る、各菌株の納豆の洗脱液の検討結果の要点は第3表に示す如くである。すなわち、どの菌株の場合もアルカリ性抽出

第3表 納豆洗液の抗菌性物質の抽出効果

AU	H1菌	B3菌	D2菌	E1菌	G6菌
納豆洗液	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000
アルカリ性抽出物	200	200	200	180	200
酸性抽出物	8,000	10,000	10,000	8,800	10,000
揮発酸部	2,800	2,000	1,750	2,000	1,850
不揮発酸部	7,750	7,800	8,000	7,500	8,800
結晶収得量, g	0.10	0.10	0.12	0.10	0.11
結晶融点, °C	232 ~235	237 ~239	226 ~228	232 ~235	233 ~234.5

物に少量の抗菌力が認められ、また酸性抽出物の揮発酸に一部の抗菌力が、不揮発酸部に大部分の抗菌力が認められた。また各菌株の不揮発酸部よりすべて抗菌性ある結晶が得られ、融点に多少の差異があるが何れもジピコリン酸と推察した。等量の原料大豆の納豆より得た洗脱液の諸区分の抗菌力に菌株によるわずかな差異があり、抽出物の抗菌力価が大きくまた抗菌性物質の収量も高いD2菌とG6菌は共に粘質物生産性の高い、集落が扁平に広く拡がらない性状を持った株であって、集落が薄く広く乾燥粉状に拡がる他の3菌株の抗菌力価が低く抗菌性物質の収量もやゝ少いことから、抗菌性と粘質物との関係を暗示するとも考えたが、抗菌力価の検定算出法がかなり誤差のある価を与えるものであるから、単純には判断できない。同じ意味で、各菌株の納豆の洗脱液の抗菌力価が何れも等しい値となっているが、これもかなりの誤差を蔵しているものと承知しなければならない。

以上の実験経過から、ジピコリン酸の生産が納豆菌の特徴的性状ではないかと考えられる。

### 摘 要

培養液中にジピコリン酸を生産する既報の菌株は、糸引納豆生成能を持っていることを知った。数株の糸引納豆生成菌を用いて調製した納豆の洗脱液の抗菌性は、アルカリ性エーテル抽出部にその極く一部があり、酸性エーテル抽出の揮発酸部にも一部が存在し、同不揮発酸部に主力があることを知り、此の主力区分よりジピコリン酸と見られる物質を分離した。

ジピコリン酸の生産が納豆菌の特徴的性状の一つではないかと考えた。

### 文 献

1. 松本宗人：本誌，134.
2. 同上：同上，150.
3. 同上：同上，158.
4. 有働繁三：農化，12，386，'36
5. 有馬玄：海軍軍医学雑誌，25，509，'36；26，

- 398, 483, '37.
6. 桜田 穆：日本伝染病学会雑誌, 11, 755, '37.
  7. 斉藤 勉：北海道医学雑誌, 16, 82, '38.
  8. 千本信次：台湾医学会報, 39, 14, '40.
  9. SAWAMURA, S : Bull. Coll. Agr. Tokyo Imp. Univ., 7, 107, '07.
  10. 井口重次：札幌農林学会報, 9, 1, '17.
  11. 山本・田村：醸学, 5, 589, '28.
  12. MURAMATSU, S : J. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo, 5, 81, '12.
  13. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 3rd ed., 388, 389, '30.

### Summary

Antibiotic substances in nattō of several strains of nattō bacteria were observed.

Antibiotic activity of nattō was attributed partly to the substance(s) in the alkaline ether extract, partly to the substances in the volatile fraction of the acidic ether extract and mainly to the substance(s) of the non-volatile fraction of the acidic ether extract of nattō.

A crystalline substance like dipicolinic acid was isolated from the non-volatile fraction.

The production of dipicolinic acid was surmised to be one of specific characters of nattō bacteria.