

# 納豆菌の粘質物に関する研究 I ※

## 粘質物の化学組成

松本宗人・岩原章二郎（農産製造学研究室）

Muneto MATSUMOTO and Syōjirō IWAHARA

On the production of slime substance by nattō bacteria

(I) Chemical composition of the slime substance.

### 緒 言

納豆菌は特有の粘質物を生産し、納豆を特徴ある食品としている。納豆の粘質物については古くから研究が行なわれているが、<sup>1,2)</sup> 粘質物と菌体を完全に分離することが出来なかったことや、化学分析の技術が進んでいなかったために、粘質物の化学成分は明確にされていない。この粘質物の化学的性状を明らかにすることは微生物学的にも、食品学的にも、理論面と実用面とにわたって重要であると考えて実験を計画し、著者等は粘質物を納豆に求めないで、合成培地に産生する粘質物について検討を試みた。

今日までに数種の細菌の生産する粘質物についていろいろ報告されているが、Bruckner and Ivanovics<sup>3)</sup>は *Bacillus anshracis* の capsular substance が D-polyglutamate であるといひ、Bovarnick et al<sup>4,5)</sup>は *Bacillus subtilis* の可溶性ペプチドも D-polyglutamate であることを明らかにしているので、納豆菌が *Bacillus subtilis* の一変種であると考えられているところから、納豆菌の粘質物もおそらく polyglutamate ではないかと考えて実験を進めた結果、納豆菌の粘質物もまた polyglutamate であることを明らかにし得たので以下にその概要を報告する。

### 実験材料および実験方法

使用菌株：市販納豆より分離した粘質物をよく生産する菌株を使用した。その性状は *Bacillus natto* Sawamura<sup>6)</sup> に一致する。

培養基および培養：培養基は第1表に示した合成培養基を用い、38～40°C で静置培養した。

アミノ酸の定性および定量：粘質物試料を塩酸で加水分解して、ペーパークロマトグラフィーで分析した。すなわち、後述の方法で得た粘質物試料100mgに6-NHCl

第1表 合成培地組成

NaH-Glutamate	10.0g
Glycerin	20.0g
Citric acid	2.0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.0125g
Biotin	0.01mg
Tap Water	to 1000ml
pH (with 10% Am. aq.)	7.4

10ml を加えて 120°C で3時間加水分解し、10% NaOH で中和して、不溶物を遠沈除去してペーパークロマトグラフィー用の試料とした。この試料の一定量 (0.05～0.1ml) を東洋ろ紙 No. 53 にスポットして、一次元又は二次元法で展開し、ドラフト中で乾燥せしめた後に Ninhydrin 液 (0.5%, 75% 酒精中) を噴霧して 45°C に30分加熱発色せしめる。発色したスポットを切り取り 75% Ethanol 5ml で色素を溶出して 570mμ における吸光度を測定して、各アミノ酸の標準曲線からアミノ酸量を算出した。

展開剤は：1次に n-Butanol : ギ酸 : 水 (4 : 1 : 1, 容積比) 2次に phenol (1% NH<sub>3</sub>, 25% 水) を主として用いた。

全窒素およびアミノ態窒素の定量：全窒素はケルダール法で、アミノ態窒素は Vav Slyke 法で常法に従って分析した。

粘質物の分離方法：粘質物の分離精製は次の2種の方法を用いて行った。

A. アルコールによる沈殿法—納豆菌を前述の培養基で24時間 38～40°C で静置培養して、菌体を遠心分離 (16,000 R. F. M, 20分) して除去し、最終濃度が 0.05N になるように 3 N-HCl を加えて生ずる沈澱を遠心分離し

※ 納豆菌に関する生化学的研究, VI

て除去する。この液を 10% NaOH で中和し、3 倍量の 99% Ethanol を加えると粘質物は塊状の沈澱となる。この粘質物を熱水中に分散せしめて遠心分離 (3,000 R. P. M, 5 分) して残存している菌体の破片等を除去する。これに更に 99% Ethanol を加えて再び塊状の沈澱とし、これを乳鉢中で十分にすりつぶして、これにさらに 99% Ethanol を加えて十分攪拌して後に Ethanol を傾斜して洗浄する。この操作を数回くりかえして残存する不純物を除去する。さらに同様の方法で Acetone で 3 回処理して沈澱を洗浄し、デシケーター中で乾燥せしめて乳鉢ですりつぶして白色の粉末として粘質物を得た。培養液 1 l からこの粘質物約 1 g の収量であった。

B. 硫酸銅による沈澱方法——A 法と同様に処理して得た培養液の遠心分離上澄液を醋酸で pH 2~3 にして生ずる沈澱を遠心分離して除去し、上澄液に NaOH を加えて pH を 6~7 に調整する。この液 1 l に対し 20% 硫酸銅溶液を 200 ml を加えて粘質物を銅塩とせしめる。この沈澱を乳鉢中で十分にすりつぶして、蒸溜水を加えてよく攪拌して後に傾斜して水を除去する。この操作を数回くりかえして行い不純物を除去する。さらに同様の方法で 99% Ethanol で 3 回、Acetone で 3 回、Ether で 3 回

処理して、デシケーター中で乾燥せしめて乳鉢で十分にすりつぶして粉末とする。この方法では培養液 1 l から約 3 g の収量であった。これらの方法で得た粘質物を以下に述べる分析に供した。

## 実験結果

上記の方法で得た粘質物について化学分析を行った。結果は第 2 表の通りである。

第 2 表 納豆菌の粘質物の化学組成

試料	全 N	NH <sub>2</sub> -N 全 N	粗灰分	Cu
	%	%	%	%
A 法で得た粘質物	10.15	96.50	1.25	—
B 法で得た粘質物	<sup>**2</sup> 9.95	95.00	<sup>**2</sup> 1.12	35.0
理論値 ((C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> N) <sub>x</sub> )	9.79	100.00	—	—

\* 1 : Polyglutamate, \* 2 : Cu を含有しない粘質量に対する値に換算。

次にこの粘質物試料を HCl で加水分解してアミノ酸組成の定量分析を行った。結果は第 3 表に示す通りである。

第 3 表 粘質物のアミノ酸組成

試料	試料の全 NH <sub>2</sub> -N に対する %			
	グルタミン酸-N	アスパラギン酸-N	メチオニン-N	未知アミノ酸 N
A 法で得た粘質物	83.0	0.55	15.50	0.85
B 法で得た粘質物	82.55	0.53	15.25	1.00
理論値 <sup>**1</sup> ((C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> N) <sub>x</sub> )	100.0	—	—	—

\* 1 : Polyglutamate, \* 2 : グルタミン酸-N として計算した値

次に、この実験の初期には A 法で、除菌ろ液に酒精を添加して粘質物を分離したが、このものの諸性質を検討したところ Diphenylamine 反応も、Orcin-FeCl<sub>3</sub> 反応も陽性で、DNA や RNA の存在を示した。従って上記の如く除菌液を酸性にして<sup>7)</sup>核蛋白質を沈澱除去してからアルコール沈澱を行う方法に改良した。この方法で分離した粘質物でも DNA, RNA の呈色反応は改良前の方法で分離した粘質物の反応よりもかなり弱いがなお陽性であった。B 法で得た粘質物の反応も明らかに核酸様物質の存在を示した。

これらの粘質物について念のため紫外部の吸収をしらべたが、260 mμ 付近に明らかに吸収の山を認めたので上述の核酸の存在は間違いないものと考える。

## 考 察

納豆菌の粘質物を 2 種の方法で分離して、その化学成分を検討したが、いずれの方法で得たものもその化学組成においては大きな差異を認めなかった。

第 2 表および第 3 表から明らかな如く粘質物の構成成分の本体はグルタミン酸であるが、その他にアスパラギン酸、メチオニンおよび 1 種の未知アミノ酸<sup>8)</sup>がかなり多量に含有されている。

このグルタミン酸はおそらく Polyglutamate の形で存在しているものであろう。グルタミン酸以外のアミノ酸は粘質物中の Polyglutamate に結合している peptide として粘質物の構成成分として存在しているものか、

あるいは粘質物の精製法が不十分なため不純物として混入しているものか、現在までの実験結果からは確認し難い。

次に、種々の方法で分離した粘質物に核酸の反応を認めることや核蛋白質が一般に粘性の高いものであることなどから、納豆菌の粘質物が多元的なもので、polyglutamate を主体として、核蛋白質もまたいわゆる粘質物に一役持っているかとも考えられ、一方においては核酸が混在成分としてではなくて、polyglutamate と結合した核蛋白質として存在しているものかとも考えられる。

またグルタミン酸以外のアミノ酸も、Glutamate と化学的に結合しているかどうかは別として、粘質物標品中に核酸が存在することや納豆菌の培養液中に多量の核蛋白質が蓄積<sup>7)</sup>することなどから考えて、核蛋白質の構成成分として存在しているものとも考えられる。またこれらアミノ酸がD-型であるかL-型であるかは重要な問題であるが、いずれもさらに追究して後報したい。

### 要 約

納豆菌の粘質物の分離方法とその化学成分について実験を行い次の結果を得た。

1. 納豆菌の粘質物の分離方法として、アルコールで

沈澱せしめる方法と銅塩として沈澱せしめる方法を適用して粘質物を分離した。

2. 粘質物を水解して構成アミノ酸をしらべた結果、主体はグルタミン酸であり、その他にメチオニン、アスパラギン酸および1種の未知アミノ酸が存在していたので粘質物の主体を polyglutamate と認めた。

3. 粘質物に核酸反応を認め、このものやグルタミン酸以外のアミノ酸の存在状態等を推論した。

### 参 考 文 献

1. 阿部久三：日農化，10，545 ('34).
2. 木原芳次郎ほか：同誌，35，37 ('61).
3. BRUCKNER and IVANOVICS, G. : Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 247, 281-284, '37.
4. BOVARNICK, M. : J. Biol. Chem. 145, 415-424 '42.
5. BOVARNICK, *et al.* : *ibid.* 207, 593, '54.
6. SAWAMURA, S. : Bull. Coll. Agr., Tokyo Imp. Univ. Japan 1, 107, '06.
7. 松本・岩原：第176回日農化会関西支部例会発表，'61.
8. 全上：本誌 9, 177, '61.

### Summary

Two methods, alcohol-precipitation and Cu-salt method, were applied for the isolation of the slime substance produced in the culture fluids of nattō bacteria.

Glutamic acid, Methionine, Aspartic acid and one unknown amino acid were detected in the hydrolysates of the slime substances isolated by the two methods from the culture fluids of nattō bacteria.

Polyglutamate will be the main component of the slime substance of nattō bacteria, because the main product in the hydrolysate of the slime was always glutamic acid.