

納豆菌の粘質物に関する研究. II ※

粘質物の定量法および粘質物の生産条件

松木宗人・岩原章二郎 (農産製造学研究室)

Muneto MATSUMOTO and Syōjirō IWAHARA

Studies on the slime substance of nattō bacteria

(II) A method for the determination of the slime substance and the effects of cultural conditions on the production of the slime.

緒 言

納豆菌の粘質物の構成成分の主体は Polyglutamate であることを既報¹⁾したが、その後粘質物の定量法を検討設定して納豆菌の合成培地における粘質物の生産条件について実験を行い、また実用的な面から納豆における粘質物の生産条件をも検討して興味ある結果を得たので以下にその概要を報告する。

実験材料および方法

使用菌株、培地および培養方法：前報¹⁾に従ったが、培地の N-源は実験の目的に応じて変更した。

菌体量の測定法：菌体分散液を蒸留水で稀釈し光電分光光度計で $515m\mu$ における吸光度を測定して菌体量とした。

グルタミン酸の定量：前報¹⁾で述べたペーパークロマトグラフィーによる定量法を適用した。この試料は、培養液を遠心分離 (16,000RPM., 20分間) して菌体その他の不溶性成分を除去した上澄液 $2ml$ に 99% 酒精 $3ml$ を加えて生ずる沈澱を遠沈除去して用いた。

粘質物の定量法の検討：納豆菌の粘質物の生産条件や、その生産過程などを検討するには粘質物の定量法を確立しなければならないが、polyglutamate の定量法が既報²⁾されており納豆菌の粘質物も polyglutamate を主体とすることを明らかにしたので、¹⁾ 納豆菌の粘質物の定量に polyglutamate の定量法を適用してみたところ以下に述べる如き好結果を得た。

既報²⁾の方法は、粘質物を含む試料に Safranin-O 溶液を加えて粘質物と結合沈澱せしめて残った色素を $520m\mu$ で比色して、標準曲線から粘質物量をためしているが、納豆菌の場合には、培養液中に多量の核蛋白質を

生産するし、³⁾ この核蛋白質は Safranin-O と結合して粘質物の定量の際の誤差の原因となるので、粘質物を定量するにはあらかじめ、出来るだけこの核蛋白質を除去しなければならない。

著者らは Bovarnick ら²⁾の方法を次の如く改良して好結果を得た。

すなわち、試液を遠心分離 (16,000RPM., 20分間) したの上澄液 $5ml$ に $0.1N-HCl$ $5ml$ を加えて液中に存在している核蛋白質を沈澱せしめ、遠心分離によりこの沈澱を除去して核蛋白質をほとんど含まない上澄液を得る。この液 $2ml$ を目盛付試験管に入れて、これに $0.05N$ NaOH 約 $2ml$ を加えて中和する。以上の操作は酸による粘質物の加水分解を防ぐために $0^{\circ}C$ 下の低温で行なわなければならない。中和した試料液に $0.06M$ Citric Acid-NaOH buffer (PH=6.0) $2ml$ を加え、さらにこれに 1% Safranin-O 溶液 $2ml$ を加え、生理的食塩水を加えて全量を $10ml$ とする。これを30分放置したのちに遠心分離して色素-粘質物の沈澱を除去し生理的食塩水で $1:50$ に稀釈して $520m\mu$ における吸光度を測定し、粘質物を含まない試料を同様に処理して吸光度を測定して対照とする。対照から各試料での吸光度を差引いて粘質物量を標準曲線 (前報の核蛋白除去酒精沈澱による方法で得た粘質物について作製、第1図) により算出する。

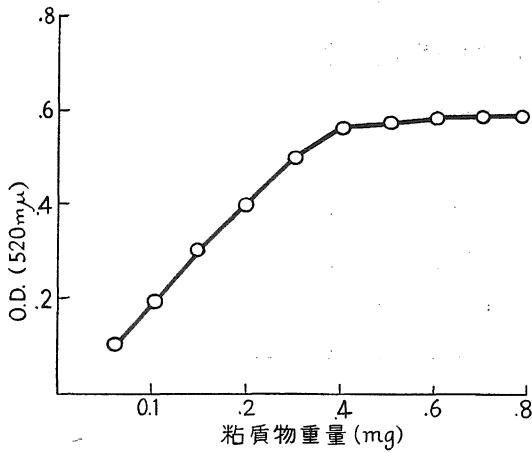
この改良法を実際に適用してみた結果は第2図に示す如くでこの方法で粘質物を定量することが可能であることを認めた。

実験結果および考察

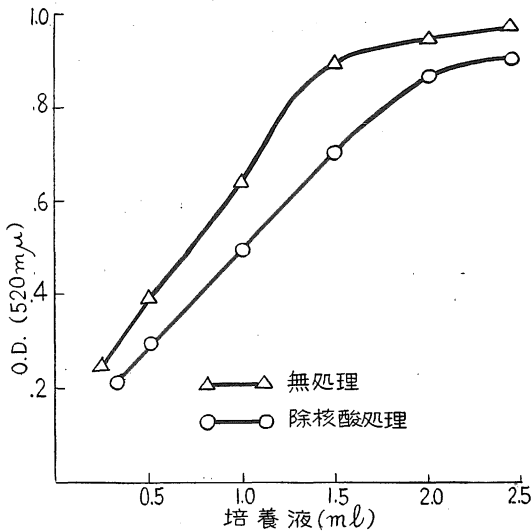
納豆菌の培養中における粘質物の消長：第3図に示す如く粘質物の生産は菌の発育と共に増大し培養後48時間目頃にその量は最高に達し、それ以後は(分解して)

※ 納豆菌に関する生化学的研究 VI

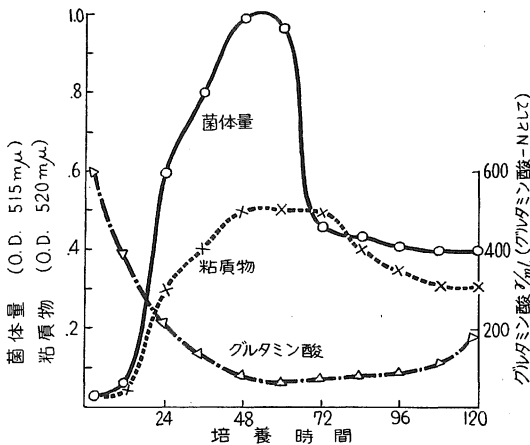
第1図 粘質物に定量法を適用した例



第2図 定量法を納豆菌培養液に適用した例



第3図 納豆菌によるグルタミン酸の資化性および粘質物の生産



減少する。培養液中の遊離グルタミン酸も培養後48時間目頃にはほとんど完全に資化される。培養後92時間目頃からは一旦生産された粘質物が分解を起すために、また菌体蛋白なども分解するので培養基中の遊離グルタミン酸が増大してくる。菌体量は48時間目頃に最高に達し以後は自己消化により著しく減少してくる。これは静置培養の場合の結果であるが、しんとう培養を行った場合にも大体これと同様の傾向が認められた。

各種納豆菌株による粘質物の生産性の比較：各種納豆菌を静置培養してその粘質物の生産性を比較した。結果は第1表に示す通りであり、菌株により粘質物の生産性も多少異なっている。

第1表 各種納豆菌株による粘質物の生産性

培養時間	24 時間 培養		48 時間 培養	
	菌 株	菌体量	粘質物	菌体量
I	.380	.410	.640	.445
II	.320	.510	.680	.625
III	.450	.595	.610	.620
IV	.320	.680	.800	.625
V	trace	trace	.300	.330
VI	.570	.700	.750	.605
VII	.410	.400	.750	.500

※ I : *Bacillus natto* Sawamura (発酸研究所) II : 宇都宮大学製納豆より分離した菌株 No. 1. III : 全上 No. 2 IV : “千鳥納豆” (市販) より分離した菌株. V : “仙台納豆” (市販) より分離した菌株. IV : “強化納豆” (市販) より分離した菌株. No. 1. VII : 全上 No. 2

第2表 数種の *Bacillus* 類による粘質物の生産性.

菌 株	20 時間 培養	
	粘 質 物	菌 体 量
A	.390	.350
B	.290	.400
C	.380	.450
D	.290	.380
E	.290	.430
F	.590	.450
G	.320	.400

※ A : IFO *Bacillus mesentericus* Flugge No. 3035. B. IFO *Bacillus subtilis* Cohn emend prazmowski No. 3134, C : 全上 No. 3022 D : 全上 No. 3007 E : IFO *Bacillus vulgatus* Trevisan No. 3037 F : IFO *Bacillus subtilis niger* (Migula) Smith et Gordon et Clark No. 3214. G : IFO *Bacillus mesentericus* Trevisan No. 3037

各種 *Bacillus* group の粘質物の生産性 : 各種の

Bacillus group についても粘質物の生産性を調べた、その結果は第2表に示す通りである。一般に粘質物の生産は納豆菌に比較して少ないようである。

粘質物の生産に対するグルタミン酸の効果：納豆菌の粘質物の主体は polyglutamate であるからグルタミン酸を培養基に添加すれば粘質物が増加するものと予想される。そこで培養基に各種濃度にグルタミン酸を添加して粘質物の生産性を比較した。その結果は第3表に示す如くで予想通りグルタミン酸増加量と共に粘質物の生産量が増加し平衡に達することを確認した。

第3表 粘質物の生産に対するグルタミン酸添加の効果(大豆煮汁培養基に添加) (24時間培養)

グルタミン酸添加量	菌体量	粘質物
0 %	1.100	0.285
0.5	0.780	.520
1.0	1.100	.630
2.0	1.200	.650
3.0	1.300	.650
4.0	1.300	.650
5.0	1.300	.650
10.0	1.300	.650

またグルタミン酸の添加により納豆の粘質物が増加することを認めた。その実験結果の1例を第4表に示す。

第4表 納豆製造におけるグルタミン酸添加量

グルタミン酸添加量	菌体量		粘質物	
	18時間培養	40時間培養	18時間培養	40時間培養
0 %	0.700	0.580	0.320	0.367
0.5	0.650	0.600	0.516	0.430
1.0	0.650	0.700	0.520	0.450
5.0	0.710	0.730	0.536	0.564
10.0	0.300	0.620	0.520	0.585
15.0	0.100	0.105	0.470	0.560

すなわち、納豆を製造する場合にグルタミン酸を添加すれば粘質物の多い良質の納豆を得ることが出来るわけである。

各種窒素源の粘質物の生産に対する効果：合成培養基にグルタミン酸に代えて各種のN源を加えて納豆菌を培養しその生育状況および粘質物の生産性を比較した。

その結果は第5表に示す如くである。この結果から粘質物の生産のためには、グルタミン酸、アスパラギン酸、

第5表各種窒素源の粘質物の生産性に対する効果

窒素源	24時間培養	
	菌体量	粘質物
NH ₄ OH	.440	trace
(NH ₄) ₂ SO ₄	.520	"
NaNO ₃	.250	"
NaNO ₂	.000	"
NH ₄ NO ₃	.170	"
NH ₄ Cl	.370	"
CO(NH ₂) ₂	.225	"
グルタミン酸	.480	.520
アスパラギン酸	.450	.450
アスパラギン	.550	.500
アルギニン	.410	.320
リジン	.500	.310
ロイシン	.230	.300

およびアスパラギンの如きN源が好適であることがわかった。試験したその他のN源では、菌体は十分に発育するが粘質物をほとんど全くあるいはわずかししか生産しない。

要 約

1. 納豆菌の粘質物の定量法を考案した。
2. 納豆菌の粘質物はN源としてグルタミン酸、アスパラギン酸、アスパラギンを与えた場合に著しく多量に生産された。
3. 納豆を製造する場合にグルタミン酸を添加すれば粘質物の多い良質の納豆が得られる。
4. 納豆菌以外の菌は納豆菌に比べて粘質物の生産性が弱かった。
5. 納豆菌の中でも菌株により粘質物の生産性にかんがりの差異を認めた。

文 献

1. 松本・岩原：本誌 9, 170, '61.
2. BOVARNICK, *et al.* : J. Biol. Chem. 207, 593, '54.
3. 松本・岩原：日農化会第167回関西支部例会, '61.

Summary

The authors described an improved method for the determination of the slime substance produced in the culture fluids of nattō bacteria and other strains of Bacillus group as well as some investigations on the conditions for the production and various factors affecting the yield of the slime substance.

Only three N-sources, glutamic acid, aspartic acid or asparagine were essential for the production of the slime substance.

The yield of the slime substance was proportional to the concentration of glutamic acid in the culture media.

The slime productions by other strains of Bacillus group were inferior to those of nattō bacteria.

The quality of nattō was improved by the addition of glutamic acid to the material (cooked soybeans).