

納豆菌の生産する特殊アミノ酸について*

松本宗人・岩原章二郎（農産製造学研究室）

Muneto MATSUMOTO and Syōjirō IWAHARA

On the peculiar amino acid production by Nattō bacteria

緒言

納豆菌の培養液中に多量の特殊なアミノ酸が生産されることを見出し、その化学的性状及び生産条件について興味ある知見を得たので報告する。菌株を分譲して頂いた発酵研究所に深謝申し上げる。

実験材料及び方法

使用菌株：主として市販納豆より分離した粘質物をよく生産する菌株を用いた。また比較のために *Bacillus subtilis*, *Bacillus vulgatus* および *Bacillus mesentericus* の数株をも用いた。

培養基および培養：既報¹⁾の培養基を基本培養としそれぞれの実験目的に応じて多少の変更を加えて使用しすべて38~40°Cで静置培養した。

菌体量の測定：培養液を適当に一定割合に蒸留水で希釈して分光光度計を用いて515m μ における吸光度を測定して菌体量とした。

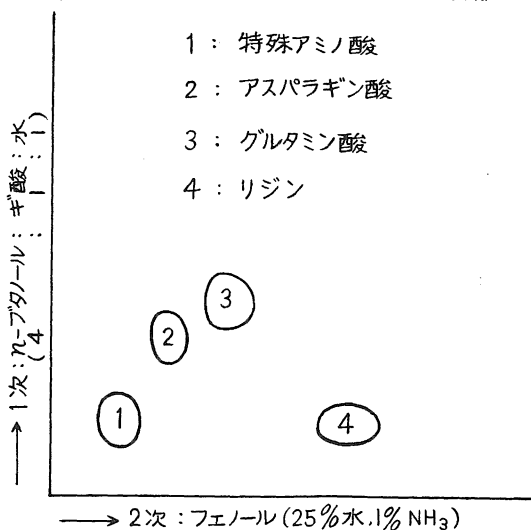
アミノ酸の定量：培養液を遠心分離(16,000 R. P. M., 20分)して菌体を除去し、上澄液に3倍量の99%エタノールを加えて蛋白質その他の高分子化合物を除去してから分析に供した。定量はペーパークロマトグラフィーにより、展開剤としてn-ブタノール：ギ酸：水(4:1:1)を用いてアミノ酸を分離し、ニンヒドリン(0.5%, 75%エタノール溶液)で発色せしめて相当部を切り取り75%エタノールで色素を溶出して分光光度計を用いて715m μ における吸光度を測定してアミノ酸量を求めた。アミノ酸はすべてグルタミン酸-Nとして示した。

実験結果

特殊アミノ酸のペーパークロマトグラフィーによる分析：納豆菌の培養液中のアミノ酸をペーパークロマトグラフィーで検索中にこの特殊アミノ酸の存在に気付いた。この特殊アミノ酸をペーパークロマトグラフィーを用いて、種々の展開剤を用いて分析してみた。その結果は第1図、第1表及び第2表に示す通りで、これに相当

* 納豆菌に関する生化学的研究, VII

第1図 特殊アミノ酸の2次元展開による分離



第1表 特殊アミノ酸のRf値

※展開剤	I	II	III
アミノ酸			
リジン	0.46~0.47	0.14~0.15	—
シスチン	0.24~0.30	0.06~0.07	0.07~0.08
特殊アミノ酸	0.13~0.15	0.08~0.10	0.11~0.13

※ I: Phenol-ammonia (1%NH₃, 20%Water)
 II: n-Butanol: Acetic acid: Water (4:1:1)
 III: n-Butanol: Formic acid: Water(4:1:1)

第2表 特殊アミノ酸の分布

菌体 Fraction	特殊アミノ酸
菌体の水抽出物	—
菌体のアルカリ抽出ペプチド	±
菌体のアルカリ不溶性成分	++
培養液中の粘質物及びペプチド	+
培養液中の核蛋白質	±

する普通の既知アミノ酸はないようである。

特殊アミノ酸の生産条件：先づ各種の納豆菌株のゲ

ルタミン酸の生産量について実験を行った。その結果は第3表に示す通りである。各菌株はいずれもグルタミン

第3表 各種納豆菌菌株によるグルタミン酸の資化性および特殊アミノ酸の生産性

培養 菌 株	20 時間			55 時間		
	菌体量 515m μ	遊離グル タミン酸 γ /ml	特殊ア ミノ酸 γ /ml	菌体量 515m μ	遊離グル タミン酸 γ /ml	特殊ア ミノ酸 γ /ml
I	0.380	292.5	trace	0.640	10.0	13.5
II	0.450	292.5	"	0.680	10.5	10.5
III	0.450	290.5	"	0.610	12.5	12.5
IV	0.320	300.0	"	0.800	10.0	10.0
V	trace	400.0	"	0.300	400.0	trace
VI	0.570	225.3	"	0.750	10.0	12.5
VII	0.410	286.4	"	0.750	10.0	12.5

I : *Ecillus natto* Sawamura (発酵研究所),
 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 : "千島納豆" (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.

酸をよく利用し、特殊アミノ酸を生産する。その生産量は菌株による違いは少ない。V 株はこの培養基には発育し難く、また特殊アミノ酸も生産しない。

次に納豆菌以外の *Bacillus* Group の菌株について同様の実験を行った。その結果は第4表に示す通りである。

第4表 数種の *Bacillus* 類によるグルタミン酸の資化性と特殊アミノ酸の生産性 (5日間培養)

菌 種	遊離グルタミン酸 (γ /ml)	特殊アミノ酸 (γ /ml)
A	25.0	12.5
B	25.0	12.5
C	25.0	22.5
D	25.0	20.0
E	37.5	25.0
F	25.0	25.0
G	20.0	17.5

※A : IFO *Bacillus mesentericus vulgatus* Flugge No. 3035.

B : IFO *Bacillus subtilis* Cohn emend prazmowski No. 3134.

C : IFO " " No. 3022.

D : IFO " " No. 3007.

E : IFO " *vulgatus* Trevisan No. 3037.

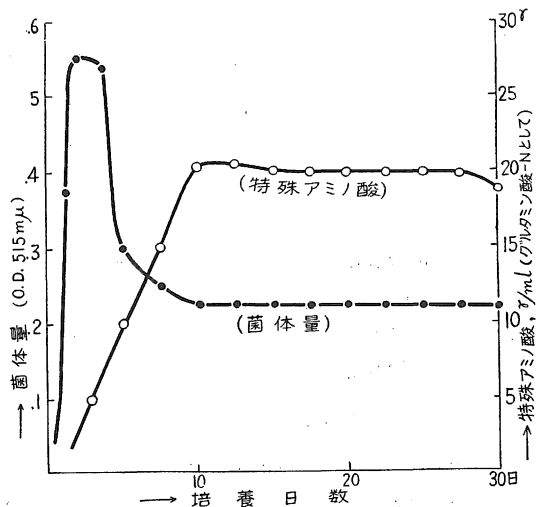
F : IFO " *subtilis niger* (Migula) Smith. Gordon et Clark No. 3214.

G : IFO " *mesentericus* Trevisan No. 3037.

次に納豆菌 II 株を使用してこの特殊アミノ酸の培養中における消長および生産条件について実験を行った。結

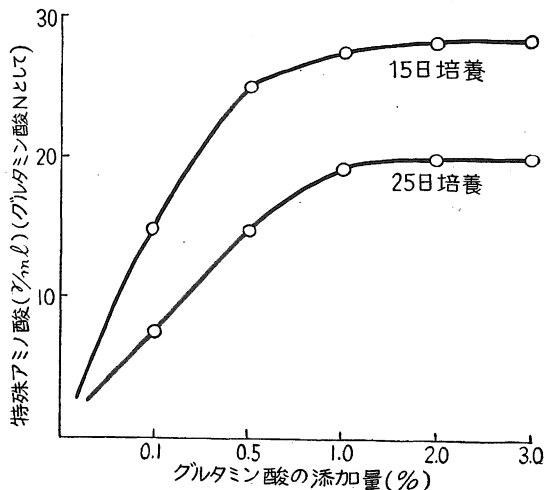
果は第2図、第3図に示す通りである。第2図は納豆菌 II 株についてグルタミン酸の資化性および特殊アミノ酸

第2図 納豆菌の培養中における特殊アミノ酸の消長



の生産の状況を示すものであるが、他の菌株についても多少の相異はあるが大体同様の結果が認められた。第2図から明らかな如く、培養の条件により多少の変動はあるが、この特殊アミノ酸は早い時で培養後2日目頃より培養後10~15日目頃に最高に達してその後は培養日数の進むにつれて多少減する傾向がある。又この特殊アミノ酸は菌の濁度が減少して来る頃、すなわち、菌が溶菌を起し始める頃に見出されるようになる。第3図から明ら

第3図 特殊アミノ酸の生産に対するグルタミン酸の効果



かな如くグルタミン酸の濃度に比例してこの特殊アミノ酸の生産が多くなり、培地中のグルタミン酸が1%以上

になると濃度の影響は認められなくなる。

次に窒素源を変えて納豆菌Ⅱ株を培養し、この特殊アミノ酸の生産量を比較した。その結果は第5表に示す通りである。すなわち、窒素源により特殊アミノ酸の生産量が異なることが明らかである。

第5表 特殊アミノ酸の生産に対する窒素源の影響

培 養 窒素源	2 日 間		5 日 間	
	菌体量 515m μ	特殊アミノ酸 γ /m	菌体量 515m μ	特殊アミノ酸 γ /m
NH ₃	0.440	trace	0.950	trace
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.520	〃	0.850	〃
NaNO ₃	0.250	5.30	0.350	18.0
NaNO ₂	0.0	0.0	0.0	—
NH ₄ Cl	0.370	trace	0.880	trace
NH ₄ NO ₃	0.170	trace	0.320	12.0
CO(NH ₂) ₂	0.225	trace	1.000	trace
Glutamic acid	0.480	3.20	0.400	18.0
Aspartic acid	0.505	2.30	0.550	17.5
Asparagine	0.540	2.51	0.540	18.5
Leucine	0.320	trace	0.335	trace

考 察

以上の実験結果からこの特殊アミノ酸についての確定的な同定は行い難いが、ペーパークロマトグラフィーの結果及びこの特殊アミノ酸の菌体内における分布の状態などから考えて、E. Work ら²⁾が *C. diphtheria* から分離した α , ϵ -Diaminopimelic acid と同一のものと認められる。また、この特殊アミノ酸が第2図に示す如く菌体が自己消化を起し始める頃より菌体外に遊離の形態で見出されるようになることや、生理的酸性培地——溶菌は起らない³⁾で納豆菌を培養した場合には遊離して来ないことなどから考えて、このアミノ酸は菌体が自己消化を起すことにより菌体内の蛋白質が酵素的に分解して遊離の状態となって培地中に溶出して来ると考えられる。一般に α , ϵ -Diaminopimelic acid は微生物界に^{4,5)}広く分布しており、微生物の細胞壁中の peptide

に特異的に存在するものであるから、納豆菌の場合にも、菌体のアルカリ不溶部——細胞壁成分と思はれる——の加水分解物中に多量に見出されることから考えて、⁶⁾このアミノ酸も納豆菌の蛋白質又は細胞壁中の peptide の構成成分として存在しているものと考えられる。

要 約

納豆菌の培養液中に特殊なアミノ酸が生産されることを見出し、次の結果をえた。

1. この特殊アミノ酸はペーパークロマトグラフィーによる分析の結果から α , ϵ -Diaminopimelic acid であると考えられる。
2. このアミノ酸は納豆菌の培養中においては、菌が自己消化を起す頃に培地中に溶出して来る。
3. このアミノ酸は培地中のグルタミン酸の濃度に比例してその生産が増大する。
4. 生理的酸性培地で培養した場合には現われない。
5. このアミノ酸は納豆菌の菌体やアルカリ不溶性成分等を酸で加水分解すると遊離の状態となるから、菌体の蛋白質又は peptide の構成成分として存在していると考えられる。
6. このアミノ酸は枯草菌群には共通的に存在するものようである。

参 考 文 献

1. 松本・岩原：本誌 9, 170, '61.
2. WORK, E. : Nature 165, 74, '50. ; Biochem. J. 49, 17, '51.
3. 松本・岩原：日農化会関西支部第176回例会, '61.
4. ASELINEAU, G., BUG, H. J., P. et LEDERER, E. : Bull. Soc. Chim. biol. 12, 1953, '53.
5. JOLLÈS, P., HUYEN-TRUNG-LUONG-CROS, H., et LEDERER, E. : Biochim. et Biophys. Acta 43, 559, '60.
6. 松本・岩原：未発表.

Summary

The paper shows on the production of a peculiar amino acid by natto bacillus.

The acid is produced in the cultural liquid of the organism, is probably identified with α, ϵ -Diaminopimelic acid and is much produced with the fortification of L-glutamic acid in culture media.

The acid is probably synthesized as a component of protein or polypeptide in the organism, because it is begun to appear in the culture media at the stage of the autolysis of the organism, but is never produced in biologically acidic culture media in which the organism does not autolyze and is isolated from the hydrolysates of the protein or alkali insoluble fraction of the organism.

The acid is proved in the culture media of several strains of Bacillus group.