

納豆の粘質物に関する研究

林 義 男・河 端 信・田 口 邦 子

Study on natto mucilage

YOSHIO HAYASHI, MAKOTO KAWABATA and KUNIKO TAGUCHI

納豆の粘質物については市販納豆および合成培地の生産する粘質物については研究がなされているが、純粋に培養された納豆については報告がみあたらない。

そこでわれわれは、純粋に培養された *B. subtilis natto* IFO 3335 を使用して納豆を製造し、その粘質物を単離・精製して化学組成の分析を行なった。

その結果、これまでの報告とは異なった組成を持つ分子量10万以上の酸性の糖ペプチドであることがわかった。

I 結 言

日本独自の食品である糸引納豆は、その独自の風味とともに多量の粘質物を生産し、栄養面でも食品の価値は高く評価されている。

納豆の品質の良否は粘質物の量および質と大きな相関をもっており、一般に糸引が強く、しかも納豆をかきまわして糸を十分に引かせてから、できるだけ長くその糸が切れないものが良いとされている。

納豆菌は1905年沢村により発見され、枯草菌 (*B. subtilis*) に類似するピオチン要求性、単一窒素源としてのアミノ酸資化性が異なる新種として *Bacillus natto Sawamura* という学名が与えられている。

科学的研究としては、明治27年矢部の細菌学的研究に始まり、以来納豆生成菌に関する研究、製法、製品の品質および納豆菌の利用に関する研究などは非常に多いが、その粘質物については2,3の報告がみられるだけである。

木原¹⁾によれば、納豆の粘質物は蛋白質と糖分とが結合したものであり、藤井²⁾によれば、ペプチド様化合物が主体となり、そこにケトヘキソースよりなる多糖類が混在してこれが糸引き性を増大すると言っており、なお、合成培地で粘質物を生成させるためには、培地中にグルタミン酸とシユクロースを添加することが有効であり、粘質物はグルタミン酸ポリペプチドとフラクトース

の重合体であるフラクタン³⁾の2成分より成っており、グルタミン酸ポリペプチドが強い粘性を示し、フラクタンは粘性の安定化に役立っていると報告している。しかしながら、いまだ粘質物の化学組成や生理作用、生成機構等については不明な点が多い、

そこでわれわれは、純粋に培養した納豆菌を使用して納豆を製造し、その粘質物を単離・精製して化学組成の分析を行ない2,3の結果を得たので報告する。

II 実 験

1) 試料の調製

1 納豆の製造

使用菌種：武田発酵研究所で純粋培養された *B. subtilis natto* IFO 3335 を使用する。

培養方法：原料ダイズは北海道産鶴の子を使用する。

ダイズを洗浄して夾雑物、不良品を除き16~18時間10~15°Cの水に浸漬する。(吸水して約2.2倍の重量となる。)浸漬終了ダイズは余分の水を切ってから500ml容培養フラスコに入れ綿栓をしてオートクレーブで加圧蒸煮する。(115°C, 1.7kg/cm², 30分) ついでダイズの品温が60°Cぐらいに下ったとき、あらかじめ0.4%食塩を含むペプトン1%溶液に液体培養した納豆菌を原料ダイズ100gに対して10mlずつ振りかけてよく混合し、器内温40°C、湿度80~90%に調節したフラン器中で18

時間培養し、発酵が終わったら冷蔵庫で冷却する。

2 粘質物の分離調製

納豆 220 g に 300 ml の温水 (40°C) を加えて粘質物を抽出し、ガーゼで大豆粒をこし分け、粘性を持った抽出液を得る。この抽出液に終濃度 5% になるように 20% トリクロロ酢酸を加えて生成する沈殿を遠心分離 (3,000 rpm, 5 分) して除き、得られた上清に 99% エタノールを加えて行くと約 70% で白濁し、80% で粘塊を生じるので遠心分離 (8,000 rpm, 10 分) して沈殿を集める。この沈殿を水に溶かすと粘性を生じるが完全に懸濁したのちふたたび 99% エタノールを加え終濃度 80% として沈殿を集める。この操作をさらに繰り返し、最後に 99% エタノールで脱水、アセトンで洗浄したのち、濃硫酸の入ったデシケーター中で脱アセトンし乾燥粉末試料を得る。(Fig. 1)

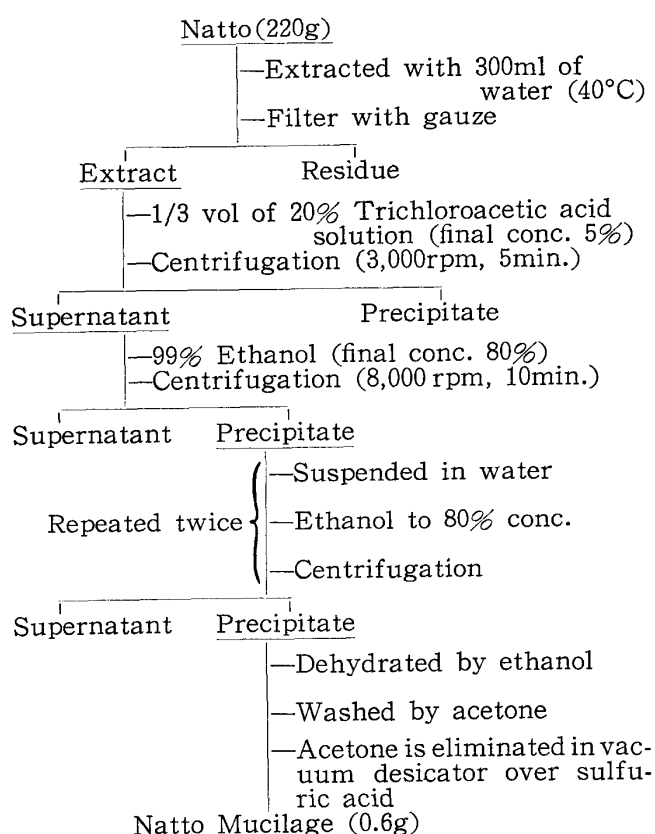


Fig. 1. Preparation of Natto Mucilage

2) セファデックス G-100 によるゲルろ過

Fig. 1 で得た納豆粘質物の粉末試料をセファデックス G-100 を使用したゲルろ過法により分別する。すなわち、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で緩衝化したセファデックス G-100 を 2.5 cm × 38.0 cm のカラムにつ

め、上記緩衝液に溶解した試料 5 ml (100 mg) を添加し、フラクションコレクター (Toyo SF-160K) で 5ml ずつ分画し、糖含量をフェノール硫酸法³⁾ により比色定量する。ついで分画された第 1 のピーク部分を集め、透析したのち凍結乾燥して精製試料を得る。

3) 分 析

セファデックス G-100 によりゲルろ過して得た精製試料につきつぎの分析を行なう。

1. 水 分

熱風乾燥器を使用した常圧乾燥法による。

2. 窒 素

総窒素

AOAC のマイクロケルダール法による。

アミノ態窒素

試料 5 mg を 6N-塩酸 1 ml を加えて 110°C, 24 時間加水分解した液につきニンヒドリン反応⁴⁾ によりアミノ基の定量を行なう。標準としては L-アラニンを使用する。

3. アミノ酸

試料を 6N-塩酸 で 110°C, 18 時間加水分解したのちアミノ酸自動分析計 (日立 KLA-3B 型) によりアミノ酸の定量を行なう。なお、トリプトファンは紫外外部吸収法⁵⁾ により個別定量を行なう。すなわち、試料をそのまま 0.1N-水酸化ナトリウム溶液に溶解し、294.4 mμ および 280 mμ の吸光度を測定してモル濃度を計算する。

4. 糖 類

① 中性糖

全糖はフェノール硫酸法³⁾ による。標準曲線は D-ガラクトースと L-アラビノースの 1:1 混液により作成した。

ペーパークロマトグラフィーによる分離・定量

試料 30 mg を N-塩酸 7 ml で 110°C, 4 時間加水分解した液を蒸発乾固して塩酸を除いたのち Amberlite IR-120(H⁺) カラムに通してアミノ糖、アミノ酸などを除き、濃縮した液を検液としてペーパークロマトグラフィーを行なう。東洋ろ紙 No. 50 を用い下端より 4 cm を原点とし、上昇法により原点より 25 cm 3 回反復展開を行なう。展開剤はピリジン:n-ブタノール:水 (6:4:3)、発色剤はアニリン水素フタレート試薬を使用した。同時に標準糖を展開、発色してその R_f 値と発色の色合により糖を同定した。なおケトースの検出には 0.2% レゾルシン・エタノール液 50 ml にリン酸 5 ml を混和した液を使用した。

定量は検出の場合と同様に展開したのち、アニリン水

素フタレート試薬に短時間浸し、乾燥させたのちに 110°C 10分間加熱する。ついでそれぞれ発色したスポットを同面積に切りとり細く切り込んだのち 0.7N-塩酸を含む80%エタノール溶液 5ml で1時間抽出を行ない、ヘキソースおよびメチルペントースは 390 m μ 、ペントースは 360 m μ で比色定量を行なう。盲検にはろ紙の一部を同面積に切りとったものを用い、回収率は加水分解後にラクトース一定量を添加して確認した。

② アミノ糖

全ヘキソサミンは試料 5mg を 2N-硫酸 1ml で 110°C, 18時間加水分解し 2N-水酸化ナトリウム 1ml で中和した液を検液として Cessi 法⁶⁾により比色定量を行なう。標準として D-グルコサミン塩酸塩を使用する。

カラムクロマトグラフィーによる分別定量

試料 30mg を 4N-塩酸 7ml で 110°C, 8時間加水分解し蒸発乾固したのち水に溶解して Dowex 50 (H⁺) カラム 1.0cm×35.0cm に吸着させ、十分水で洗浄して中性糖を除く。ついで 0.3N-塩酸で溶出、フラクションコレクターで溶出液を分取し、各試験管の一定量を検液とし Elson-Morgan の Blix 変法⁷⁾により比色定量する。標準として D-グルコサミン塩酸塩 および D-ガラクトサミン塩酸塩を 450 μ g ずつ含む混液を使用する。

③ シアル酸

試料 5mg に 0.1N-硫酸 2ml を加えて 80°C で1時間加水分解した液につき Aminoff のチオバルビツール酸法⁸⁾により比色定量を行ない N-アセチルノイラミニン酸として算出する。

④ ウロン酸

カルバゾール硫酸法の改良法⁹⁾により比色定量を行ない、標準として D-グルクロン酸を使用する。

III 結果および考察

納豆粘質物の収量は原料ダイズ 100g から乾燥物として 600mg を得た。

セファデックス G-100 によるゲルろ過の結果から Fig. 2 に示したように、納豆粘質物は分子量的に均一なものではなく、分子量10万以上の成分が60%を占め、残りの部分はこれよりも分子量のやや小さいものを含んでいることがわかる。今回の分析は分子量10万以上の画分のみについて行なった。

粘質物の化学組成は Table 1 に示したが、ニンヒドリン反応は加水分解前の粘質物では陰性でアミノ基が何らかの形でブロックされていることが考えられる。

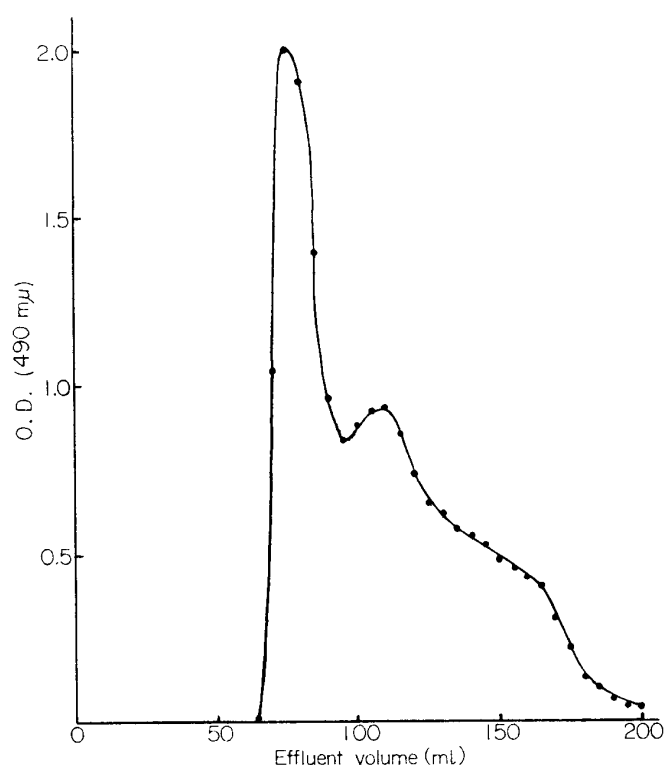


Fig. 2. Gel Filtration of Natto Mucilage on Sephadex G-100 Column
column size : 2.5 cm×38.0 cm
eluting solution : 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4)
sample : 100 mg

Table 1. Chemical Composition of Natto Mucilage

	% (by weight)	Methods of Analysis
Total Sugar*	61.5	Phenol-sulfuric acid (3)
Amino Sugar	2.8	Cessi's Method (6)
Total Nitrogen	4.1	AOAC Micro-Kjeldahl
Amino Nitrogen**	2.9	Ninhydrin (4)
Uronic Acid	20.4	Carbazol-sulfuric acid (9)

*1:1 mixture of Galactose and Arabinose was used as standard.

**Amino-N was determined after hydrolysis in 6N HCl for 18 hours at 110°C.

また、ペプチド部分のアミノ酸組成は Table 2 に示したが、シスチンおよびシステインを除く17種のアミノ酸から成りグルタミン酸が最も多くこれは粘質物の3%を占め、ついでアスパラギン酸、グリシン、アラニン、リジンが多いことがわかる。粘質物中のペプチド部分は約16%を占め、分子量10万とした場合のアミノ酸残

Table 2. Amino Acid Composition of Natto Mucilage

Amino Acid	μ moles /mg	Residues /mole*	g/100g
Tryptophane**	0.032	3	0.65
Lysine	0.090	9	1.32
Histidine	0.037	4	0.57
Arginine	0.055	6	0.96
Aspartic acid	0.120	12	1.60
Threonine	0.041	4	0.46
Serine	0.068	7	0.71
Glutamic acid	0.210	21	3.09
Proline	0.071	7	0.82
Glycine	0.120	12	0.90
Alanine	0.110	11	0.98
Cystine	0.000	0	0.00
Valine	0.056	6	0.66
Methionine	0.036	4	0.54
Isoleucine	0.046	5	0.60
Leucine	0.061	6	0.80
Tyrosine	0.032	3	0.58
Phenylalanine	0.036	4	0.59

*A molecular weight of 100,000 was assumed for Natto Mucilage.

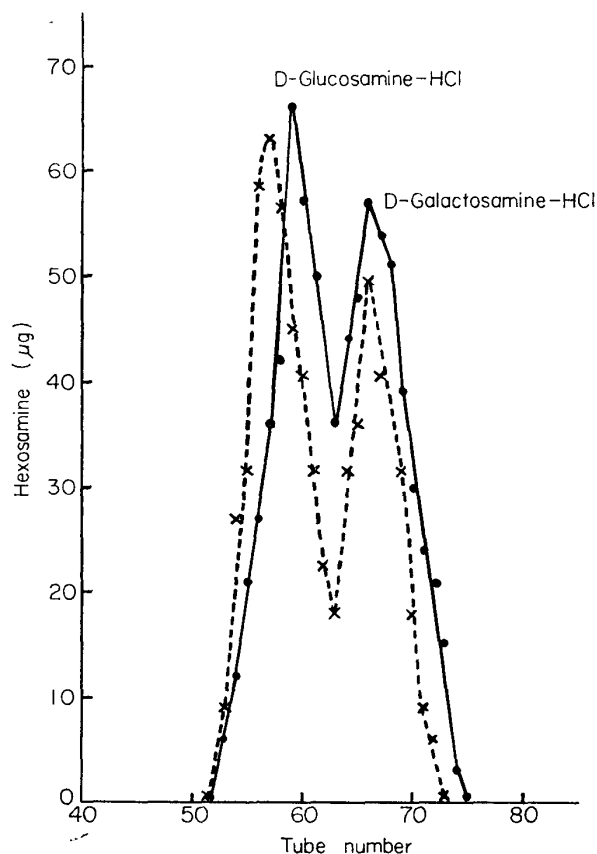
**Tryptophane residues was determined directly by ultra-violet absorption (5).

Table 3. Sugar Composition of Natto Mucilage

Sugar	Molar Ratio
(Pentose)	
Arabinose	16
Xylose	2
(Methyl Pentose)	
Rhamnose	1
(Hexose)	
Galactose	7
Glucose	5
(Hexosamine)	
Glucosamine	1
Galactosamine	1

基数は 124, ペプチド部分の分子量は約 16,000となる。

糖部分の分析の結果を Table 3 に示したがアラビノースが最も多く, ガラクトース, グルコースがこれにつき, キシロース, ラムノースの存在も認められた。アミノ糖としては Dowex50(H⁺) を用いたカラムクロマトグラフィーによる定量の結果, グルコサミンとガラクト

**Fig. 3.** Quantitative Separation of Hexosamines on Dowex 50(H⁺) Column

column size : 1.0cm × 35.0 cm
eluting solution : 0.3 N-HCl
fraction size : 1.8 ml

—●—●— D-Glucosamine-HCl (450 μ g) and
-x-x-x- D-Galactosamine-HCl (450 μ g)
-x-x-x- sample (30 mg)

サミンが等モル存在した。(Fig. 3)

以上の結果から, 今回分析した納豆粘質物の組成はアラバンを中心とした多糖類 61.5%, ポリウロン酸 20.4%, アミノ糖 2.8%, ポリグルタミン酸を中心としたペプチド部分16%から成る酸性糖ペプチドであると考えられることができる。

IV 要 約

B. subtilis natto IFO 3335 を用いて納豆を製造し, 粘質物を分離精製した。粘質物は原料ダイズ 100 g から 600 mg を得た。セファデックス G-100 によるゲルろ過により粘質物の60%を占める部分は分子量10万以上であることがわかり, この画分の化学組成の分析の結果, 糖成分としてアラビノース, ガラクトース, グルコース, キシロース, ラムノース, グルコサミン, ガラクトサミ

ンおよびウロン酸を含有し、ペプチド部分はシスチンおよびシステインを除く17種のアミノ酸から成り、全糖61.5%、ヘキソサミン2.8%、ウロン酸20.4%、ペプチド16%から成る酸性糖ペプチドであることがわかった。

(1971年8月2日受理)

V 文 献

- 1) 木原・的場・難波：農化, **35**, 57(1961)
- 2) 藤井久雄：農化, **37**, 407(1963)
- 3) J. E. Hodge and B. T. Hofreiter: *Methods in Carbohydrate Chemistry* (ed. R. L. Whistler, M. L. Wolfrom) **1**, 388, Academic Press (1962)
- 4) S. Moore and W. H. Stein: *J. Biol.*, **176**, 367 (1948)
- 5) 波多野博行：アミノ酸自動分析法, **82** (1964) 化学同人
- 6) C. Cessi and F. Piliego: *Biochem. J.*, **77**, 508 (1960)
- 7) S. Gardell: *Acta Chem. Scand.*, **7**, 207 (1953)
- 8) D. Aminoff: *Biochem. J.*, **81**, 384 (1961)
- 9) T. Bitter and H. M. Muir: *Anal. Biochem.*, **4**, 330 (1962)