

## 納豆菌による微量生理活性物質の生産

近藤正夫\*<sup>1</sup>、岩月志真\*<sup>2</sup>、高木里枝\*<sup>2</sup>、林 直宏\*<sup>3</sup>、羽田野早苗\*<sup>4</sup>

### Production of Trace Physiological Substances by *Bacillus subtilis* var. *natto*

Masao KONDO, Shima IWATUKI, Rie TAKAGI, Naohiro HAYASHI and Sanae HATANO

Food Research Center, AITEC\*<sup>1</sup> Sugiyama Jogakuen University\*<sup>2</sup> Seto Ceramic Center, AITEC\*<sup>3</sup>  
Retired\*<sup>4</sup>

納豆菌 *Bacillus subtilis* var. *natto* の高橋菌と宮城野菌は、乾燥オカラや大豆煮汁粉の培地で増殖可能であった。固体培養では、20%乾燥オカラ培地で宮城野菌の場合のみジピコリン酸が生産された。大豆煮汁粉の液体培地では、大豆煮汁粉が2%より0.5%で多量のジピコリン酸が生産された。また、ジピコリン酸の生産は、培養条件や栄養状態に伴う芽胞形成によって変動した。ビタミンK<sub>2</sub>であるメナキノノン-7 (MK-7) の生産は高橋菌の方が宮城野菌より優れており、この生産は増殖に連動することが判明した。

### 1. はじめに

納豆菌は、抗菌活性を有するジピコリン酸、骨形成や血液凝固に関与するビタミンK、血栓を溶解する線維素溶解酵素など有用な生理活性物質を生産する。ジピコリン酸の抗菌性は、腸管出血性大腸菌O157等で明確に立証されたが、感染症が頻繁に流行する昨今、納豆から直接摂取することができることから見直されている貴重な抗菌性物質である。

一方、ビタミンKは、骨粗鬆症の予防効果<sup>1)</sup>が期待できること、新生児・乳児出血症がビタミンKの欠乏から起きること等から、その重要性が認識されるようになってきたビタミンである。そこで、納豆菌を用いて、ジピコリン酸とビタミンKを大豆関連素材から効率的に生産する方法を検討した。

### 2. 実験方法

#### 2.1 使用菌株と培養

納豆菌 *Bacillus subtilis* var. *natto* としては、納豆の製造に使用される宮城野菌株と高橋菌株の2種類を用いた。培養は、0.5%大豆煮汁粉培地(5gの大豆煮汁粉を蒸留水10に溶解したもの)で、37℃、18時間静置条件下で培養し、菌濃度が10<sup>8</sup>/ml程度の前培養液を、それぞれの培地に1%接種し、37℃で行った。

#### 2.2 ジピコリン酸の測定

ジピコリン酸はテルビウムイオンとのキレート形成で生成する蛍光を指標とする高感度蛍光測定法<sup>2)</sup>により、励起波長282nm、蛍光波長545nmで測定した。

#### 2.3 ビタミンKの測定

ビタミンKは、逆相カラム NUCLEOSIL 100-5C18 (4.6

×150mm)と(株)資生堂医理化テクノロジー製白金還元カラム RC-10を併用したHPLC-蛍光検出法<sup>3)</sup>により測定した。溶離液としてはメタノール:エタノール=9:1を使用し、流速は1ml/minとした。

#### 2.4 芽胞と栄養細胞の分別

芽胞がマラカイトグリーンで緑色に、栄養細胞がサフランで赤色に染色されるWirtz法による対比染色<sup>4)</sup>により分別した。スライド上に染色固定した試料を用い、顕微鏡下で芽胞と栄養細胞を計測し、芽胞百分率を算出した。

### 3. 実験結果及び考察

#### 3.1 納豆菌によるジピコリン酸の生産

納豆菌の高橋菌と宮城野菌は、乾燥オカラ、大豆煮汁粉単独の培地で増殖が可能であった。そこで、これら培地でのジピコリン酸とビタミンKの発酵生産について検討した。

納豆製造に近い状態に、乾燥オカラと大豆煮汁粉に水を加えて調製した固体培地を用いて固体培養した時の、高橋菌と宮城野菌によるジピコリン酸の生産の結果を**図1**に示す。20%乾燥オカラ培地で宮城野菌の場合のみ、ジピコリン酸が生産された。

固体培養ではジピコリン酸の生産が見られなかった大豆煮汁粉でも、液体培地では**図2**に示すようにジピコリン酸が生産された。その際、2%より0.5%大豆煮汁粉培地の方が多量のジピコリン酸が生産された。また、静置、振盪(100rpm)などの培養条件によってもジピコリン酸の生産は変化した。図2には、培養後の芽胞と栄養細胞の割合を示すため、全細胞に対する芽胞の比率(芽胞

\*1 食品工業技術センター 応用技術室 \*2 椋山女学園大学 \*3 瀬戸窯業技術センター 開発技術室

\*4 前食品工業技術センター 応用技術室

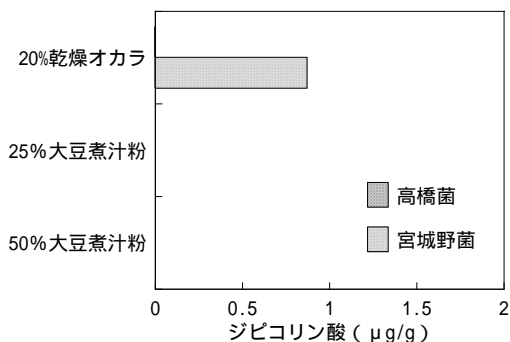


図1 納豆菌の固体培養によるジピコリン酸の生産

率)を記載したが、芽胞率が高い程、ジピコリン酸の生産が多い傾向が観察された。この傾向は、ジピコリン酸が貧栄養状態など生育環境の悪化に伴う芽胞形成時に生産されるためと考えられる。より貧栄養である0.5%大豆煮汁粉培地で、2%大豆煮汁粉培地より多量のジピコリン酸が生産された結果も、同様の理由によるものと考えられる。

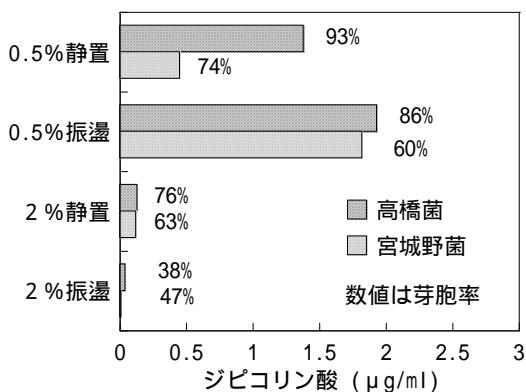


図2 大豆煮汁粉培地によるジピコリン酸の生産

### 3.2 納豆菌によるビタミンKの生産

高橋菌と宮城野菌が生産するビタミンKは、ナフトキノ骨格の側鎖にイソプレノイド基が7個付いた、ビタミンK<sub>2</sub>に属するメナキノ-7 (MK-7)であった。MK-7の発酵生産は、固体培養では乾燥オカラ培地の方が大豆煮汁粉培地より良好であった。しかし、大豆煮汁粉も液体培養にするとMK-7の生産は向上した。乾燥オカラや大豆煮汁粉の液体培地では、高橋菌の方がMK-7の生産能が優れていた(図3)。

MK-7の生産能が優れている高橋菌を用い、容積1.5ℓの発酵槽に0.5%大豆煮汁培地800mlを入れ、500rpmで攪拌しながら培養した結果を図4に示す。MK-7生産は24時間後にピークを示し、増殖のピークと一致した。こ

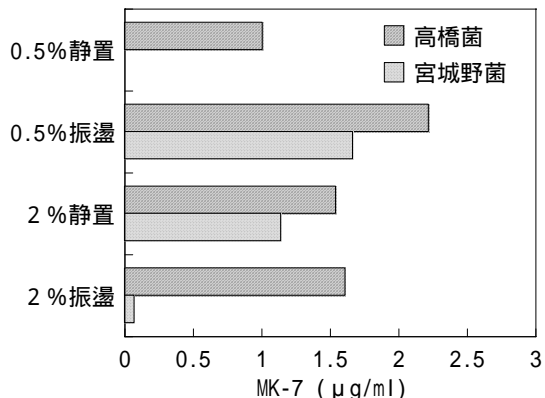


図3 大豆煮汁粉の液体培地によるMK-7の生産

のことから、MK-7の生産は増殖に連動することが判明した。逆にジピコリン酸は、増殖しやすい培養条件ではほとんど生産されなかった。

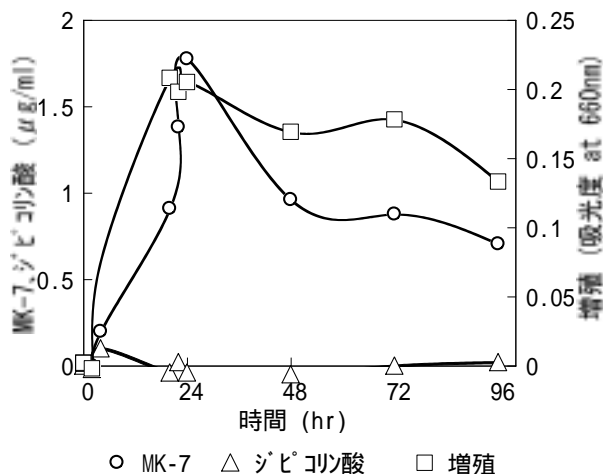


図4 攪拌発酵による高橋菌のMK-7の生産

## 4. 結び

乾燥オカラや大豆煮汁粉といった安価な大豆関連素材から、納豆菌によりジピコリン酸やMK-7が生産されることが明らかとなった。今後更に培養条件を改良すれば、生産効率は向上することが期待できる。そして、大豆関連素材以外の他の素材を用いるようにすれば、より新規性が生まれるものと考えられる。

### 文献

- 1) 腰原康子: ビタミン, 72(11), 641(1998)
- 2) L. E. Sacko: *Appl. Environ. Microbiol.*, 561, 1185(1991)
- 3) 坂野俊行ほか: ビタミン, 62(8), 393(1989)
- 4) 近藤雅臣、渡部一仁: スポア実験マニュアル, P4(1995), 技報堂出版