Bacillus natto におよぼす γ 線の影響

大阪府立大学農学部	大亦正次郎, 稻森茂樹, 村尾沢夫
大阪市立大学家政学部	浦上智子, 城野彰子, 森藤春代
大阪府立放射線研究所	上野照雄

The Effects of γ -Ray Irradiation on *Bacillus natto*

Shojiro OMATA, Shigeki INAMORI, and Sawao MURAO*
Chieko URAKAMI, Akiko JONO, and Haruyo MORITO**
Teruo UENO***

- * College of Agriculture, University of Osaka Prefecture
- ** Faculty of the Science of Living, Osaka City University
- *** Radiation Research Institute of Osaka Prefecture

Summary

The following results were obtained when the spores of *B. natto* isolated from natto (fermented soybean) were irradiated with ^{60}Co γ -rays:

1. Irradiation of the spores at 1.86, 3.72 and 7.44 x 10^5 rad resulted in decrease in bacterial counts by 97, 99.7, and 99.996%, respectively. These results are in agreement with those previously reported by Teramoto.
2. Irradiation of 3.7 x 10^5 rad gave a large number of isolates that produce more mucilage than the non-irradiated spores.
3. The isolates obtained by irradiation of more than 7.44 x 10^5 rad showed decrease in protease activity and mucilage production.
4. The colonies formed on the synthetic medium from irradiated spores differed in appearance from those of non-irradiated, although the mucilage produced by the former was found to be composed of polyglutamate.

緒 言

納豆は栄養価の高い食品であることはよく知られているが、非常に腐敗しやすいため、夏期には多量に生産することができない。そこで放射線を利用して長期間貯蔵ができるような製品の改良を目的として、まず第1段階として市販納豆に放射線照射を行ない、納豆成分や香気、米引きへの影響を調べた結果、 1.3×10^5 rad、の線量では蛋白質、脂肪、糖、米引き、香気にはあまり大きな変化は認められなかつ

た。しかし 4.5×10^5 rad, では糸引きが悪くなり, 異臭が発生し, カルボニルに顕著な差がみられた。

本報では第2段階として, このような放射線量に対する納豆菌ならびに納豆に混在する汚染菌の影響につき検討を行なったので, その結果を報告する。

実験方法

1. 分離方法

大阪市内の食品店で時期, 場所を異にして購入した市販納豆8試料を使用。Table 1. の分離用培地を用い, 常法通り平板培養を繰り返し行ない, 純化分離を行なった。

Table 1. The composition of culture media

1) The medium for isolation of various strains of *B. natto*

Meat extract	1.0 g.
Polypeptone	1.0 g.
NaCl	0.3 g.
Distilled water	100 ml.
pH	6.8 - 7.2

2) The medium (synthetic) for mucilage production

Glucose	5.0 g.
Sodium glutamate	1.5 g.
KH ₂ PO ₄	0.27 g.
K ₂ HPO ₄	0.42 g.
MgSO ₄	0.05 g.
NaCl	0.05 g.
Biotine	10 µg.
Distilled water	100 ml.
pH	6.4 - 6.6

3) The medium for preparation of natto (steamed soybeans)

The soybeans were soaked in cold distilled water overnight, separated from water and sterilized 10 min. by dry heat in Erlenmeyer flasks under a pressure of 1 kg./cm².

2. 培養方法

Table 1 の合成培地および大豆培地を用い, 一定量の孢子懸濁液を接種, 37 ~ 40°C で静置培養を行なった。

3. 粘質物の分離

培養液を遠心分離 (14,000 r.p.m 30分) により除菌, NaCl を2%添加後, 2倍容の95%アルコール中に注入, 攪拌することにより粘質物は沈澱としてはほぼ定量的に得られる。この沈澱を蒸留水に溶解, 透析後再びアルコール沈澱を行って精製標品を得る。このものは99%アルコールで可及的に脱水後, デシケーター中で真空乾燥を行なって, 白色粉末の精製標品とする。

4. 粘質物の同定

ここに得た標品を6 N-HCl 100℃ 3時間加水分解後、構成アミノ酸について常法通りペーパークロマトグラフィーにより決定、粘度はオストワルド型粘度計を用い30℃で測定、同一条件での水の落下時間との差を相対粘度としてあらわした。

5. 孢子懸濁液の調整方法

一般に枯草菌の孢子の耐熱性は測定する懸濁液の孢子数、孢子凝塊の存否が重要な影響を与えることが認められている。そこで天羽氏等の方法に準じて孢子懸濁液の調整を行ない、その条件を検討した。

すなわち、10日間肉汁寒天培地で培養した菌体をかきとり、生理食塩水に懸濁、定性濾紙（東洋濾紙No.2）で濾過、これを遠心分離（14,000r.p.m. 5分）して集め、2回洗滌、60℃30分熱処理を行ってから再び定性濾紙で濾過、濾液を比色計にかけてO.D.(600mμ)=0.1になるように濁度を調整したものを調整孢子懸濁液とした。この懸濁液中の生孢子数は、平板培養で測定した結果、培養期間の短い場合孢子数に変動があったが、10日以後のものではほぼ一定となり80~86×10⁶/mlの値を示し、またこのものは氷室に保存すれば10日間は生孢子数に変化はなかった。

6. プロテアーゼ活性測定法

Folin法により発色を行ない、660mμで比色した。

実 験 結 果

1. 納豆菌の分離

市販納豆から常法により分離した菌株の外観的特徴をTable 2に示す。

Table 2. The properties of strains separated from *B. natto*

Strain	Cell structure	Spore formation	Appearance of colony
1	short rod	+	white gray, flat, irregular circle, irregular edge
2	rod	+	white gray, wrinkles, irregular edge
3	rod	+	white gray, wrinkles, irregular circle
4	rod	+	white gray, circle, upheaval

これらのうちでNo.1株は分離菌の大多数を占めるもので、他の3株は僅かに認められた。

次にこれら分離菌を用い、Table 1の合成培地ならびに大豆培地での粘質物生成ならびに納豆生成能を検討した結果をTable 3に示す。この場合*Bacillus natto* (IFO No. 3013)を併用して分離菌との比較を行なった。すなわちいずれの菌株もビオチンを含む培地で粘質物を生成し、大豆培地では納豆を生成したが、No.2, 3, 4菌株では異臭が認められた。

次にNo.1菌についてその菌学的諸性質を調べた結果Table 4に示すごとくであり、この結果は*Bacillus natto* (IFO No. 3013)のそれと一致したので以後の実験にはNo.1菌株を用いた。

Table 3. The production of mucilage and natto by the isolated strains

Strain	Synth. medium		Synth. medium ^a		Steamed soybeans		
	growth	mucilage	growth	mucilage	growth	thread	flavor
1	++	++	-	-	++	+++	a natto-like
2	++	++	-	-	++	+++	off flavor
3	++	++	-	-	++	+++	off flavor
4	++	++	-	-	++	+++	strong ammonia
A	++	++	-	-	++	++	a natto-like

A *Bacillus natto* strain 3013

a Biotin-deficient medium

Table 4. Microbiological characteristics of *B.natto* strain 1

A Morphological characteristics

A motile rod of $0.9 - 1.0 \times 3 - 5 \mu$.

Gram-positive

Spore $0.8 - 0.9 \times 1.2 - 1.6 \mu$, localized at the center.

A colony on meat extract agar plate - white gray, flat, irregular circle, irregular edge.

In the meat extract medium - sheathe on the surface, the liquid portion being transparent.

B Biological characteristics

Optimum growth temperature 35 - 40°C

Catalase activity positive

Formation of indole negative

Growth in 7% NaCl solution positive

Assimilation of sugars: glucose, sucrose, fructose, xylose, glycerol, lactose and galactose positive

Table 5. Per cent survival of the spores of *B.natto* by irradiation of ⁶⁰Co γ-rays

Dose rad ($\times 10^5$)	Survival %
0.465	54
0.93	30
1.86	3.2
3.72	0.3
7.44	0.004
9.3	0.0006
18.6	-

Fig. 1 Survival curve for the spores of *B. natto* strain 1 and 2 by irradiation of ^{60}Co γ -rays

2. 納豆菌内生孢子のコバルト60 γ 線照射効果を5の方法で調整した孢子懸濁液に γ 線を照射した結果をTable 5ならびにFig 1に示す。

照射は水冷下で行ない，照射の線量率は $3.5 \times 10^5 \text{R} / \text{時間}$ である。すなわち分離納豆菌と雑菌 (No. 2 菌株) では生存率に大差が認められなかった。

3. ^{60}Co - γ 線照射孢子による納豆の生成

次にこの照射残存孢子を用いて合成培地での粘質物の生成ならびに大豆培地での納豆生成について検討した結果をTable 6に示す。すなわち $7.44 \times 10^5 \text{rad}$ 以下の照射線量では納豆の生成について異常は認められず， $9.3 \times 10^5 \text{rad}$ では納豆生成能はほとんど認められない。粘質物生成については照射株と非照射株 (原株) で変化は認められず，常に同程度の粘質物の生成があり，また生成粘質物の構成アミノ酸は常にグルタミン酸であった。

4. ^{60}Co - γ 線照射による変異株について

照射による生存率測定のパネル培養の集落を観察すると照射線量の増加とともに集落の外観の変化したものも多く認められるようになる。このことは照射による変異株の存在の可能性を予想させる。そこで照射後のパネル培養から無差別的に釣菌し，それぞれの菌株について粘質物生成能，粘質物の構成アミノ酸，プロテアーゼ活性を調べた。生成粘質物の構成アミノ酸はいずれの場合もすべてグルタミン酸のみであった。

Table 6. Production of mucilage and natto by ^{60}Co γ ray irradiated *B. natto*

Dose rad ($\times 10^5$)	Survival %	Synthetic medium		(40°C, 7 days) Mucilage(mg.)	A. A. ^a	Steamed soybeans(40°C, 15 h)		
		Rel. viscosity	pH			Powder	Flavor	Thread
Control	100	25 - 30	6.4	300 - 400	Glutamic a.	++	natto	+++
0.93	30	20 - 30	6.5	"	"	++	"	+++
3.72	0.3	25 - 30	6.4	"	"	++	"	+++
7.44	0.4×10^{-2}	30 - 32	6.6	"	"	++	"	++
9.3	0.6×10^{-3}	25 - 30	6.7	"	"	-	±	±

^a Amino acid composition of mucilageTable 7. Biological activities of *B. natto* mutants obtained by ^{60}Co γ -ray irradiation

Dose rad ($\times 10^5$)	Synthetic medium		Amino A. ^a	Protease activity	
	Viscosity	No. of strains (%)		Activity	No. of strains
Control	100		glutamic a.	100	
0.465	>100	5 - 15	"	>100	7 - 13
	100	60 - 75	"	100	50 - 60
	<100	10 - 20	"	<100	20 - 30
0.93	>100	20 - 30	"	>100	0
	100	45 - 60	"	100	20 - 30
	<100	20 - 30	"	<100	60 - 70
1.86	>100	60 - 75	"	>100	10 - 20
	100	20 - 25	"	100	60 - 70
	<100	0	"	<100	20 - 25
3.72	>100	60 - 70	"	>100	20 - 30
	100	10 - 20	"	100	60 - 70
	<100	20 - 30	"	<100	10 - 20
7.44	>100	0	"	>100	0
	100	20 - 30	"	100	30 - 40
	<100	65 - 75	"	<100	50 - 60

^a Amino acid composition of mucilage

Table 7の結果から明らかごとく, $1.86 \sim 3.72 \times 10^5 \text{ rad}$ の線量照射で得られた菌株は, 対照の非照射株と比較して粘質物生能の増加するものが多く得られた。更に強い照射では粘質物生成能は低下する。

要 約

市販納豆菌胞子の $^{60}\text{Co}-\gamma$ 線照射による影響を調べた結果

- (1) $1.86 \times 10^5 \text{ rad}$ の照射で約97%, $3.72 \times 10^5 \text{ rad}$ で99.7%, $7.44 \times 10^5 \text{ rad}$ で99.996%の胞子が死滅した。(この結果は寺本氏等の結果と大体同じである。)
- (2) $3.72 \times 10^5 \text{ rad}$ 照射により納豆粘質生成能の強くなる菌株が多く得られた。
- (3) $7.44 \times 10^5 \text{ rad}$ 以上の照射により得られた菌株は一般に粘質物生成能およびプロテアーゼ活性が低下した。
- (4) 被照射株の集落は外観上稍変化が認められるが、合成培地で生成される粘質物についてはすべてグルタミン酸のみからなるポリグルタミン酸であった。