セチルトリメチルアンモニウムブロミドを用いた 納豆の γ -ポリグルタミン酸の定量[†]

菅野彰重*・高松晴樹*

Determination of γ -Polyglutamic Acid in "Natto" Using Cetyltrimethylammonium Bromide (Studies on "Natto" Part V)

Akishige KANNO* and Haruki TAKAMATSU*

* Asahi Shokuhin Co., Ltd., 180-2, Wado, Ushibori-machi,
Namekata-gun, Ibaraki, 311-24

A simple and rapid spectrophotometric method has been established for determination of γ -polyglutamic acid (γ -PGA) which is the sticky material in fermented soybean food "natto". The method is based on the complex formation between γ -PGA and cetyltrimethylammonium bromide (CET). The complex could be determined by the measurement of absorbance at 400 nm. The linear relationship was obtained between absorbance and γ -PGA concentration in the range from 0 to 54.85 μ g per 6 ml of a reaction mixture. The complex formation with CET was not observed on glutamic acid, glutamylglutamic acid, levan and pectin. When γ -PGA prepared from "natto" was decomposed by γ -glutamyldepolymerase induced by *Bacillus natto* bacteriophage infection, viscosity of the reaction mixture decreased rapidly, while the absorbance of the complex with CET was not decreased. Therefore, it was confirmed that values obtained by the method was not affected by the molecular weight of γ -PGA. We demonstrated the formation of γ -PGA during manufacturing process of "natto" and its content of the commercial products by the method. γ -PGA was detected at 10h from the beginning of the fermentation and then increased. The mean value of the γ -PGA content and standard deviation in 34 commercial "natto" were 328 mg $\pm$ 120.99 per 100 g on wet basis.

(Received Aug. 5, 1994)

わが国の伝統的な発酵食品の一つである糸引納豆（以下納豆と略す）は、他の食品に見られない強力な曳糸性を示す粘質物を有することが最大の特徴である。納豆菌によって生産されるこの粘質物は、藤井^{1)~6)}や松本^{7)~9)}によって、D, L-グルタミン酸を含む γ -ポリグルタミン酸（以下 γ -PGA）とレバンから構成され、 γ -PGAが糸引の主体であることが明らかにされている。納豆から調製した粘質物の γ -PGAは酸性溶液下で α -ヘリックス構造をとり、中性下では分子が引き伸ばされたランダムコイル構造をとって粘性が高くなる^{10)~13)}。納豆中

の粘質物の定量は主に官能的な手法や粘度の測定で行われており¹⁴⁾、化学的な定量方法としては松本らによるサフランニン-Oを用いた方法⁸⁾が報告されているが、反応の特異性や納豆製造中の挙動、市販製品中の含有量など詳細には検討されていない。このように γ -PGAは納豆の特性を語る上で重要であるにもかかわらず、化学的な定量方法とその適応についてはほとんど検討されておらず、簡便で実用的な定量法の確立が望まれる。

一方、陽イオン界面活性剤は一定条件下でポリペプチドやペクチンと複合体を生成したり、沈澱を形成する性

[†] 納豆に関する研究（第5報）

** 朝日食品株式会社（〒311-24 茨城県行方郡牛堀町上戸 180-2）

質を持つ^{15)~17)}。本報告では、陽イオン界面活性剤の一つであるセチルトリメチルアンモニウムブロミド (セタブロン, 以下 CET) と γ -PGA を混合して複合体を形成させ、この複合体の混濁度を測定することによって γ -PGA を定量する方法 (以下 CET 法) を考案し、本法を用いて納豆の分析を試みた。

実験方法

1. 材料及び試薬

納豆の製造過程の試料は試作調製して用いた。原料として米国産納豆用小粒大豆を用い、室温にて 18 時間浸漬し、 1.8 kg/cm^2 にて 30 分蒸煮した。宮城野納豆製造所(株)製の納豆菌を噴霧によって接種し、発泡スチロール製角形容器に 50 g ずつ量り取り、 41°C で 16 時間発酵した。 5°C で 1 日熟成し、 5°C および室温 (20°C 前後) で 7 日間保存した。試料の採取は発酵中には 2 時間毎に、保存時には発酵終了後 2, 4, 7 日後に行った。市販の納豆 34 品目は冷蔵ケースを備えた小売店から入手し、冷蔵庫に保管し、3 日以内に分析に供した。大豆煮汁 80% エタノール沈殿物は、朝日食品(株)茨城工場で得た大豆煮汁を遠心分離 (9 200 $\times$ g, 15 min) し、上澄みにエタノールを加えて (80%) 沈殿を形成させ、沈殿物を水中で透析し、内液を凍結乾燥して得た。

透析膜は Spectrapor (No. 1, Spectrum Medical Inc.), CET は東京化成工業(株)製, γ -L-Glutamyl glutamic acid および *N*-(γ -L-glutamyl) tyrosine は Aldrich Chem. Inc. 製を用いた。枯草菌中性プロテアーゼおよびアルカリプロテアーゼは Nagase Biochemical Ltd. 製を、卵白リゾチームは生化学工業(株)製を、レモンペクチンは関東化学(株)製を用いた。ポリグルタミン酸標準品は、分子量 4 000, 30 600, 106 000, 47 000 のものは Bio-Yeda Ltd. 製を、分子量 2 000~15 000, 15 000~50 000 のものは Div. of Miles Laboratories, Inc. 製を用いた。その他特記した以外の試薬は市販特級品を用いた。水は純水製造装置 (WA-32, ヤマト科学(株)) を用いて蒸留・イオン交換したものを用いた。

略号: Cetyltrimethylammonium bromide, CET; γ -polyglutamic acid, γ -PGA; crude sticky material of natto, CSM; the precipitate on the reaction of CET and sticky materials of natto; CET-P, the supernatant on the reaction of CET and sticky materials of natto, CET-S; γ -polyglutamic acid depolymerase, PGAase.

2. 納豆の粘質物の調製

(1) 粗粘質物の調製

市販の納豆 1 kg に 3 l の 1 M 塩化ナトリウム溶液を加え、ガラス棒で 15 分間攪拌して粘質物を抽出し、ガーゼで豆を除き、遠心分離した。上澄み 1 l を 3 l のエタノール中にガラス棒で攪拌しながら加え、ガラス棒に巻き付いてきた粘質物を得、75% エタノールを用いて 3 回洗浄した。これを少量の水に溶解して 5°C で一夜透析した。透析内液を 3 倍容のエタノール中に加え、ガラス棒で巻き取った。エタノールによる沈殿と透析操作を 3 回繰り返す。沈殿物の水溶液を凍結乾燥して白色粉末を得、これを塩化ナトリウム溶液抽出粗粘質物 (以下 CSM) とした。

(2) CET 沈殿画分および上澄み画分の調製

市販納豆 100 g に 300 ml の 2.5% トリクロロ酢酸溶液 (以下 TCA 溶液) を加え、 50°C の水浴中で攪拌しながら 15 分間粘質物を抽出し、豆を除いた後遠心分離し、上澄みを 1 N 水酸化ナトリウムで pH 7.0 に調製した。これを 1.2 l のエタノール中に注いで攪拌し、しばらく放置した後遠心分離した。沈殿を 300 ml の 80% エタノールで洗浄し、100 ml の水に溶解した。この溶液に 0.1 M CET の 1 M 塩化ナトリウム溶液 (以下 CET 溶液) を沈殿が生じなくなるまで加えた。しばらく放置した後遠心分離し、沈殿を 80 ml の 2 M 塩化ナトリウム溶液に溶解し、250 ml のエタノール中に注ぎ込んだ。生じた沈殿を 100 ml の 80% エタノールで 3 回洗浄した。これを少量の水に溶解して凍結乾燥し、CET 沈殿画分 (以下 CET-P) とした。一方、CET 溶液を加えた溶液の遠心分離上澄みと洗浄液を合わせて 1 l のエタノールに加えて攪拌放置後遠心分離し、生じた沈殿を 100 ml の 80% エタノールで 3 回洗浄し、少量の水に溶解し、凍結乾燥し、CET 上澄み画分 (以下 CET-S) とした。

3. 分析方法

(1) 薄層クロマトグラフィーによる CSM, CET-P, CET-S 中の構成アミノ酸および糖の分析

試料 20 mg を 6 N 塩酸にて 120°C で 15 時間加熱分解し、構成アミノ酸を以下の条件にて TLC 分析した。プレート: シリカゲル G 60 (E. Merck, Darmstadt), 展開溶媒: 28% アンモニア水-エタノール=23-77 (v/v), 検出: ニンヒドリン¹⁸⁾。

試料 20 mg を 0.01 N 塩酸にて 100°C で 1 時間加熱分解し、構成糖を以下の条件にて TLC 分析した。プレート: シリカゲル G 60, 展開溶媒: クロロホルム-エタノール-酢酸=3-2-1 (v/v), 検出: ジフェニルアミン・

アニリン・燐酸¹⁹⁾

(2) グルタミン酸の定量

CSM および CET-P の 6 N 塩酸加水分解試料 2 ml を 1 N 水酸化ナトリウムにて pH 9~10 に調整し、40℃ で減圧濃縮乾固してアンモニアを除き、水に溶解して 100 ml に定容した。この一部をニンヒドリン法²⁰⁾にてグルタミン酸として定量し、総グルタミン酸とした。また、この一部を F-キット・L-グルタミン酸（ベーリンガーマンハイム山之内(株)）を用いて L-グルタミン酸含量を求め、両者の差を D-グルタミン酸量とみなした。

(3) レバンの定量

レゾルシン塩酸法（Roe 法）²¹⁾ でフルクトースとして分析し、0.9 を乗じてレバン含量とした。

(4) 相対粘度の測定

後述する納豆調製液 6 ml をオストワルドの粘度計（内径 1 mm, 柴田科学(株)）にて 35℃ における流時間を測定し、水を対照として相対粘度を算出した。

(5) 官能検査による糸引の測定

納豆を菜匙で攪拌し、糸引の強さを 5 段階評価した²²⁾。

4. CET を用いた納豆中の γ -PGA の定量（CET 法）

後述した CET 法の反応条件の検討結果に基づき、次のように設定した。25 g の納豆を 200 ml のビーカーに取り、75 ml の 2.5% TCA 溶液を加え、50℃ の水浴中で菜匙を使って 15 分間攪拌しながら粘質物を溶解した。ステンレス製の紅茶漉（外径 63 mm）を漏斗にのせて豆を除き、漉液を 100 ml のメスフラスコに集め、残渣を少量の TCA 溶液で洗浄し、流水中で冷却後、定容した。この一部を遠心分離（9 200×g, 10 min）し、上澄み 25 ml を取って 1 N 水酸化ナトリウムで pH 7.0~7.2 に調整して 50 ml に定容した。この 5 ml を 50 ml の遠心分離管に取り、20 ml のエタノールを加えてよく攪拌し、10 分間放置した。これを遠心分離し、沈澱を 20 ml の 80% エタノールで洗浄した後、水に溶解し、25 ml に定容した（納豆調製液）。この 1 ml または 0.5 ml を試験管に取り、水を加えて 5 ml として混和し、1 ml の CET 溶液を加えてタッチミキサで攪拌し、20 分後に 400 nm の吸光度を測定した。

5. CET 法の反応条件の検討

(1) 吸収スペクトル

1 ml の CSM 溶液（250 μ g）、1 ml の CET 溶液（100 μ M の CET および 1 mM の塩化ナトリウムを含む）および 4 ml の 0.2 M トリス塩酸緩衝液（pH 7.2）を混和し、室温で 20 分静置した後に、同緩衝液で 10 倍に希釈

し、吸収スペクトルを UV-160（(株)島津製作所）を用いて測定した。同様に CSM 溶液の代わりに水を用いたものを測定した。

(2) CET 濃度の影響

CSM について、反応時に CET 溶液の添加量を 0.1~2.0 ml の範囲で変えて、水を加えて 5 ml とし、1 ml の CET 溶液を加えて測定した。

(3) 塩濃度の影響

2.5 ml の 0.01 M~2 M の塩化ナトリウム溶液、2.5 ml の CSM 溶液および 1 ml の CET 溶液を加えて測定した。

(4) pH の影響

CSM を用い、反応時に 2.5 ml の緩衝液と 2.5 ml の水および CET 溶液 1 ml を加えて測定した。使用した緩衝液はクエン酸緩衝液（pH 4.0~7.5）、トリス-塩酸緩衝液（pH 7.5~9.5）、炭酸水素ナトリウム-水酸化ナトリウム緩衝液（pH 9.5~11.5）および塩化カリウム-水酸化ナトリウム緩衝液（pH 11.5~13.0）の各々 0.2 M および 0.02 M 溶液を用いた。

(5) 各種物質との反応

各物質を 0.022 M リン酸緩衝液（pH 7.2）に溶解して測定した。

(6) 定量精度と回収率

同一試料を繰り返し 5 回分析したときの精度と抽出時に 10 mg および 20 mg の CSM を加えた場合の γ -PGA の回収率を測定した。

6. γ -ポリグルタミン酸デポリメラーゼ（PGAase）による CSM と CET-P の分解と CET 法測定値に与える影響

(1) PGAase の調製

HONGO らの方法²³⁾に従って、納豆菌バクテリオファージ誘導性 PGAase を調製した。納豆菌は宮城野納豆製造所製のものから分離して使用し、ファージは朝日食品株式会社研究室保存株を用いた。

(2) γ -PGA の酵素分解物が与える CET 法測定値への影響

CSM もしくは CET-P を 35℃ に調整した 0.022 M リン酸緩衝液（pH 7.2）に溶解して（7 mg/6 ml）、オストワルド粘度計（内径 3 mm, 柴田科学(株)）中に入れ、35℃ に調製した恒温器に 1 時間放置した。0.1 ml の粗酵素液（17.25 Units）を加えて 5 分間隔に流時間を測定し、相対粘度を算出した。この一部を試験管に取って密栓し、沸騰水浴中で 10 分間加熱して酵素反応を止め、希釈後 CET 法にて γ -PGA を測定した。また、この一部を

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 3.5) で 10 倍希釈し, ゲル濾過による高速液体クロマトグラフィーにて分子量分布の変化を確認した。分析条件は以下の通りである。カラム: Shodex, OHpak, B-805, 500×8 mm I.D. (昭和電工(株)), プレカラム: Shodex, OHpak, B-800 P, 50×8 mm I.D., クロマトグラフおよび検出器: BIP-1 および UVDEC-10-IV (210 nm, 日本分光(株)), モニター: Chromatopak CR 3 A ((株)島津製作所), 展開溶媒: 0.1 M リン酸・リン酸水素二ナトリウム緩衝液 (pH 3.5), 流速: 1 ml/min, 注入量: 100 μ l。本カラムの排除限界はプルランで 5×10^6 である。

実験結果及び考察

1. CET と CSM との反応

納豆から調製した CSM は, 1% の高濃度の場合には CET 溶液を加えると直ちに沈澱を形成し, 低濃度の場合には懸濁した。この現象は, 陽イオン界面活性剤である CET の親水基と γ -PGA の α -カルボキシル基が結合し, 疎水性が増すために沈澱もしくは懸濁すると考えられた。

CET と CSM および CET との懸濁形成時の吸収スペクトルを Fig. 1 に示した。CET は 209 nm に吸収のピークが認められ, 250 nm 以上の波長ではほとんど吸収がなかった。CSM と CET の懸濁物は 550 nm 以下の

Fig. 1 Spectrum of the complex formed between γ -PGA and CET

The line shows the spectrum of the complex and the broken line shows the spectrum of CET.

波長で吸収の増加が認められたが, ピークは見られなかった。吸光度は反応開始 20 分以後一定になった。Fig. 2 には CET 量の影響を示した。CET 溶液の添加量 1 ml で吸光度が最大となった。Fig. 3 および Fig. 4 には塩濃度および pH の影響を示した。塩濃度の増加と共に吸光度は明らかに低下した。また, 広い pH 範囲で複合体の形成が認められ, 塩基性側で吸光度はやや高くなる傾向が見られた。Fig. 5 には CSM および CET-P の濃度と 400 nm の吸収との関係を示した。吸光度は両者の濃度に対して直線的に上昇し, CSM 1 mg 以上では沈澱を形成した。

本反応にて納豆中の粘質物を測定する際に, 前処理として納豆から粘質物を抽出すると共に, 納豆中に多量に含まれる蛋白質やペプチドを抽出液から除去する必要がある。このため粘質物の粘性が酸性下で低下し, 加温す

Fig. 2 Effect of additional volume of CET solution on the reaction between CET and γ -PGA

CSM content: 200 μ g/6 ml of each reaction mixture.

Fig. 3 Effect of salt concentration on the reaction between CET and γ -PGA

CSM content: 200 μ g/6 ml each reaction mixture

Fig. 4 Effect of pH on the reaction between CET and γ -PGA

CSM content, 250 μ g/6 ml of each reaction mixture; —●—, 0.2 M citric acid buffer; ...○..., 0.02 M citric acid buffer; —▲—, 0.2 M tris-hydrochloric acid buffer; —△—, 0.02 M tris-hydrochloric acid buffer; —■—, 0.2 M sodium bicarbonate-sodium hydroxide buffer; ...□..., 0.02 M sodium bicarbonate-sodium hydroxide buffer; —▼—, 0.2 M potassium chloride-sodium hydroxide buffer, ...▽..., 0.02 M potassium chloride-sodium hydroxide buffer.

ると抽出が容易であり、また粘質物が TCA 溶液に溶解する性質⁴⁾を利用して、50°C の水浴中で粘質物を抽出すると同時に TCA にて除蛋白するものとした。また、TCA 溶液に CET を加えると水飴状になって測定に影響を与えたので、中和後エタノールを加えて粘質物を沈澱させると共に TCA および塩類をエタノール中に溶解除去するものとした。本法では納豆中の粘質物の定量を目的とし、予め抽出液の pH を 7~7.2 としてエタノール沈澱にて粘質物を調製した後、調製液中に混入する可能性のあるペプチドなどの影響の少ない 400 nm の吸収を測定する方法を採用した。高感度分析を必要とする場合には塩基性下紫外領域における測定が有効であり、pH 13 (0.02 M 塩化カリウム-水酸化ナトリウム緩衝液を使用)、250 nm による測定では約 5 倍高い吸光度が得られた。

2. CET 複合体の組成と定量精度

粘質物の塩酸加水分解物の構成アミノ酸の TLC 分析

Fig. 5 Relationship between γ -PGA content and absorbance at 400 nm on the reaction between CET and γ -PGA

—○—, CET-P; —△—, CSM;

** Significant at 1% level

r: Coefficient of correlation.

Table 1 Composition of CSM, CET-P and CET-S

	CSM	CET-P	CET-S
L-Glutamic acid (mg/g)	119.0	186.2	101.9
D-Glutamic acid (mg/g)	343.5	438.8	nd*
D-Glutamic acid ratio	0.74	0.70	nd*
Levan (mg/g)	37.7	0.57	274.8

* Not determined

により、CSM および CET-S にはグルタミン酸以外のアミノ酸が含まれていたが、CET-P には痕跡程度であった。構成糖の TLC 分析から、CSM と CET-S にはフルクトースが検出され、CET-P には糖は検出されなかった。この結果、本条件下において CET はアミノ酸やペプチド、糖類とは反応せず、CSM 中の γ -PGA と特異的に複合体を形成すると考えられ、 γ -PGA とレバンとの分離定量が可能であった。Table 1 に納豆の粘質物中のグルタミン酸とレバン含量を示した。CET-P には 62.5% のグルタミン酸が含まれており、本反応条件において 400 nm の吸光度 1.0 はグルタミン酸として 125 μ g に相当し、 γ -PGA 含量は次式にて算出した。

γ -PGA 含量 (mg/6 ml 反応液)

$$= 400 \text{ nm の吸光度} \times 0.125 \times 0.8776^{**}$$

*: 試料反応液の吸光度 - 水反応液の吸光度
- 未反応液の吸光度

** : グルタミン酸 $\rightarrow$ γ -PGA 換算係数

同一試料を用いた本法による平均値と標準偏差は 316.7 ± 5.187 mg/100 g であり, γ -PGA の回収率は, CSM 10 mg を添加した場合には $96.5 \pm 4.683\%$, 20 mg を添加した場合には $102.5 \pm 9.863\%$ であった. 本法は充分実用に耐えうる信頼性を有することが確認された.

3. CET 複合体形成反応の特異性

CET と γ -PGA の複合体形成の特異性を種々の水溶性物質を用いて検討した. 本反応条件において, グルタミン酸およびグルタミルグルタミン酸, あるいはいくつかの蛋白質はほとんど吸光度の上昇を生じず, CET と複合体を形成しなかった (Table 2). また, 酸性多糖であるペクチンや, ペクチンやヘミセルロースなどからなる多糖を含む大豆煮汁²⁴⁾ の 80% エタノール沈殿物ともほとんど反応しなかった. D-あるいはL-ポリグルタミン酸の標準品は吸光度の上昇を生じ, より高分子のものの吸光度の方が低分子のものよりも高くなる傾向があったが, 分子量 30 600 以上の標準品では吸光度に明確な差は見られなかった. 納豆の γ -PGA の分子量について Saito 氏¹¹⁾ は 2×10^5 , 山口氏²⁵⁾ は 3×10^5 としており, これら標準品よりも分子量が大きいと思われる. CET-P の吸光度を γ -PGA に換算すると 6.64/mg であり, 高

分子のポリグルタミン酸標準品の値と近似し, 分子量が数万を超えた場合には分子量の違いが吸光度に与える影響は少ないと考えられた.

4. CET 法における γ -PGA の分子量の影響

納豆の γ -PGA を PGAase にて分解し, γ -PGA の分子量が CET 法の測定結果に与える影響を検討した. CET-P および CSM を PGAase で分解した時の CET 法による吸光度, 溶液の相対粘度および HPLC によるピークの保持時間の経時的な変化を Fig. 6 に示した. CET-P の HPLC 分析において 210 nm の吸収を与えるピークは約 12 分のも一つだけであった. 酵素反応と共にピークの保持時間は遅延し, γ -PGA の分解が確認されたが, グルタミン酸に相当する 19.6 分のピークは増加しなかった. γ -PGA の分解と共に相対粘度は急激に低下したが, CET 法による測定結果はほとんど変化せず, γ -PGA の分子量の違いは CET 法の測定結果にほとんど反映しなかった. CSM 中の γ -PGA の挙動も CET-P と同様であったが, 相対粘度の低下は緩慢であり, CSM 中に含まれるレバンが粘度の低下を妨げていると考えられた.

5. 納豆中の γ -PGA 含量

CET 法を納豆中の γ -PGA の定量に応用した. Table

Table 2 The complex formation by the reaction of standard materials with CET

Materials	Absorbance/mg*
L-Glutamic acid	0.00
γ -L-Glutamyl glutamic acid	0.00
N- (-L-glutamyl) tyrosine	0.00
Poly L-glutamic acid (MW : 4 000)	0.67
Poly L-glutamic acid (MW : 2 000 - 15 000)	1.19
Poly L-glutamic acid (MW : 15 000 - 50 000)	4.47
Poly L-glutamic acid (MW : 30 600)	6.98
Poly L-glutamic acid (MW : 106 000)	6.11
Poly D-glutamic acid (MW : 47 000)	5.97
Neutral protease of <i>B. subtilis</i>	0.00
Alkaline protease of <i>B. subtilis</i>	0.00
Lysozyme egg white	0.00
Lemon pectin	0.01
The material prepared from soybean steam waste water	0.02
CSM	2.54
CET-P	4.73

* Absorbance at 400 nm per 1 mg of the materials reacted with CET

Fig. 6 Decomposition of γ -PGA by PGAase

—○—, η of CSM; —△—, absorbance at 400 nm of CSM; —□—, retention time on HPLC of CSM; —●—, η of CET-P; —▲—, absorbance at 400 nm of CET-P; —■—, retention time on HPLC of CET-P.

*Relative viscosity, η of water at 35°C was 7.26.

3には納豆の発酵、熟成、保存時における γ -PGA、レバン含量およびHPLCによる保持時間12分のピーク面積の変化を示した。官能的な糸引は発酵開始後8時間目からわずかに見られ、10時間目以後次第に強まって豆と豆とが付着し合うようになり、保存中には糸の量は室温保存の方が多く感じられたが、糸引の強さは5°C保存でも非常に強かった。CET法による γ -PGAは発酵開始後10時間から現れて以後増加し、保存中には5°Cよりも室温の方が含量が高かった。レバンは発酵開始後6時間目から検出され、以後増加し、既報²⁶⁾と同様に5°Cの保存では大きな変化はなかったが、室温保存では減少した。納豆の調製液の相対粘度は発酵10時間から急増し、保存中には5°Cよりも室温保存の方が高かった。CET法による γ -PGA含量と相対粘度との間には、危険率1%で正の相関関係が認められた($r=0.965$)。HPLCによる12分のピークはCET法による γ -PGAと同様に発酵10時間目から検出され、以後面積は増加したが、保持時間は大きな変化は認められなかった。納豆の粘質物の分子量分布が発酵過程においてほとんど変化しないことは、ゲル濾過にて大西ら²⁷⁾によって確認されており、納豆菌

Table 3 The changes of γ -PGA and levan in "natto" during fermentation, maturation and storage

	η^*	γ -PGA content (mg/100 g)	Levan content (mg/100 g)	Retention time of γ -PGA on HPLC (min)	Peak area of γ - PGA on HPLC (mV/sec)
Fermentation period (hr)					
0	7.56	2	0	—	—
2	7.51	2	0	—	—
4	7.40	3	0	—	—
6	7.40	3	83	—	—
8	7.40	5	119	—	—
10	8.26	114	156	12.31	1 814
12	8.47	164	147	12.24	2 203
14	7.79	201	188	12.00	2 181
16	8.79	212	183	12.05	1 929
After maturation	9.49	218	195	11.99	2 269
After storage					
for 2 days at 5°C	9.92	256	188	11.91	2 862
for 2 days at room temp.	10.35	261	132	11.68	3 469
for 5 days at 5°C	9.78	226	236	11.70	2 590
for 5 days at room temp.	12.38	395	43	11.51	5 463
for 7 days at 5°C	9.76	278	213	12.09	1 775
for 7 days at room temp.	12.06	433	38	11.79	5 662

* Relative viscosity of extracts at 35°C, η of water was 7.26.

の菌株間でも大きな差がないことが SDS-PAGE で山と CET 法による γ -PGA 含量との間には危険率 1% で
口ら²⁶⁾によって確認されている。12 分のピークの面積正の相関関係が認められ ($r=0.942$), 12 分のピーク面積

Table 4 Composition of commercial "natto"

No	Type	Vessel	Indicated weight per vessel(g)	γ -PGA content (mg/100 g)*	Levan content (mg/100 g)*	Sticky by sensory evaluation (1~5)
1		PSP	50	496	219	2
2		PSP	85	503	236	3
3		PSP	50	174	79	4
4		PSP	50	360	137	2
5		PSP	50	302	125	3
6		PSP	50	287	152	4
7		PSP	50	527	268	4
8		PSP	50	313	192	4
9		PSP	50	488	224	5
10	#1)	PSP	50	191	77	3
11		PSP	50	413	165	4
12		PSP	80	549	190	3
13	#1)	PSP	50	365	99	3
14		PSP	30	172	77	3
15		WS	80	321	180	2
16		RS	100	338	142	3
17	#2)	PF	120	377	108	4
18	#3)	PSP	50	280	140	4
19		PSP	85	306	78	3
20		PSP	50	438	187	3
21		PSP	85	281	91	4
22		PSP	90	468	45	4
23	#1)	PSP	90	162	80	3
24		PSP	50	227	54	3
25		PSP	90	348	62	3
26		PSP	100	436	259	4
27		PSP	50	342	108	4
28		PSP	50	358	98	2
29		PSP	50	189	89	4
30		PSP	50	217	97	3
31		RS	110	62	75	1
32		PSP	50	434	176	3
33		WS	80	202	164	2
34	#1)	PSP	30	221	204	2
Mean $\pm$ std. dev.				328 $\pm$ 120.99	138 $\pm$ 62.04	3.2 $\pm$ 0.149

*Contents were on wet basis

Type: No mark, Natto; #1) Hikiwari-natto; #2) Natto with salt for temakisusi; #3) Natto made from soybean containing wheat.

Vessel: PSP, Polystyrene package; WS, Package made from wood shaving; RS, Package made from rice stem; PF, Package made from plastic film.

と相対粘度との間にも正の相関関係が認められた ($r=0.950$). レバン含量は他のいずれの測定項目との間にも相関関係は認められなかった.

Table 4 には市販納豆 34 品目の γ -PGA とレバン含量および官能検査による糸引を示した. 市販納豆中の γ -PGA 含量は商品によって著しく変動した. 官能検査による糸引と γ -PGA 含量およびレバン含量の間には明確な相関関係が認められず, 官能的な糸引はこれらの含有量だけでは決定されず, 他の要因が関与すると考えられた.

要 約

納豆の粘質物の構成成分である γ -ポリグルタミン酸 (γ -PGA) の定量のための, 簡単に迅速な吸光度分析法について報告した. 本法は γ -PGA とセチルトリメチルアンモニウムブロミド (CET) との複合体形成を基本としたものである. この複合体を 400 nm の吸光度を測定することにより, γ -PGA を定量することが可能であった. 本法の直線関係は γ -PGA として $0 \sim 54.85 \mu\text{g}/6 \text{ ml}$ 反応液において得られた. グルタミン酸, グルタミン酸, レバン, ペクチンおよび大豆蒸着液から調製した 80% エタノール沈澱物質は, CET と複合体を形成しなかった.

γ -PGA を納豆菌のファージ誘導性 γ -グルタミルデポリメラーゼにて分解したところ, 分子量の低下に伴って反応液の粘性は低下したが本法の数値は大きく変化せず, 本法の分析結果は γ -PGA の分子量に影響されにくかった.

納豆製造工程において, γ -PGA は発酵後 10 時間から検出され, 以後増加した. 市販納豆 34 点中の γ -PGA 含量の平均値と標準偏差は, 100 g あたり $328 \pm 120.99 \text{ mg}$ であった.

本研究にご協力頂きました当社研究室, 高岡カヨ氏および高野伸子氏に感謝いたします.

文 献

- 1) 藤井久雄: 農化, **36**, 1000 (1962).
- 2) 藤井久雄: 農化, **37**, 346 (1963).
- 3) 藤井久雄: 農化, **37**, 407 (1963).
- 4) 藤井久雄: 農化, **37**, 474 (1963).
- 5) 藤井久雄: 農化, **37**, 615 (1963).
- 6) 藤井久雄: 農化, **37**, 619 (1963).
- 7) 松本宗人・岩原章二郎: 島根農科大学研究報告, **9**, 172 (1961).
- 8) 松本宗人・岩原章二郎: 島根農科大学研究報告, **9**, 175 (1961).
- 9) 松本宗人・岩原章二郎: 島根農科大学研究報告, **9**, 179 (1961).
- 10) 石川久雄・大久保克美・沖 妙: 日化誌, **1972**, 2171 (1972).
- 11) SAITO, T., ISO, N., MIZUNO, H., KANEDA, H., SUYAMA, Y., KAWAMURA, S. and OSAWA, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1941 (1974).
- 12) ISO, N., MIZUNO, H., SAITO, T., TAKEUCHI, H., SUYAMA, Y., KAWAMURA, S. and OGAWA, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1871 (1976).
- 13) 島田 昇・高橋利広: 日本食品工業学会第 34 回大会講演要旨, p. 38 (1987).
- 14) 納豆試験法研究会・農林水産省食品総合研究所: 納豆試験法 (光琳, 東京), p. 55 (1990).
- 15) MAEDA, H., KATO, H. and IKEDA, S.: *Biopolymers*, **23**, 1333 (1984).
- 16) MATTICE, W., MCCORD, R.W. and SHIPPEY, P.M.: *Biopolymers*, **18**, 723 (1979).
- 17) 橋本洋一: 総合多糖類科学 (上), 原田篤也・小泉岳夫編 (講談社, 東京), p. 23 (1973).
- 18) 守屋 寛: 薄層クロマトグラフィー, 石川正幸・原 昭二・古谷 力・中沢泰男編 (南山堂, 東京), p. 152 (1972).
- 19) 瀬野信子・阿武喜美子・木幡 陽: 糖質の化学 (下), 山科郁男・山川民夫・鈴木 旺編 (東京化学同人, 東京), p. 283 (1976).
- 20) YEMM, E.W. and COCKING, E.C.: *Analyst*, **80**, 209 (1955).
- 21) 福井作蔵: 還元糖の定量法 (学会出版センター), p. 77 (1969).
- 22) 納豆試験法研究会・農林水産省食品総合研究所: 納豆試験法 (光琳, 東京), p. 61 (1990).
- 23) HONGO, M. and YOSHIMOTO, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 1047 (1970).
- 24) 本藤 智・望月 務: 日食工誌, **26**, 461 (1979).
- 25) 山口典男・小川義彦・湯浅克巳・茂田井宏: 日本農芸化学会 1992 年度大会講演要旨, p. 381, 東京 (1992).
- 26) 菅野彰重・高松晴樹・高野伸子・秋本隆司: 日食工誌, **29**, 105 (1982).
- 27) 大西礼子・阿部啓子・本間清一・相田 浩: 家政誌, **38**, 871 (1987).

(平成 6 年 8 月 5 日受理)