

おからを原料とした納豆菌による生分解性プラスチック素材： ポリ γ -グルタミン酸の製造法の開発

鈴木秀之*・渡邊美子

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科

Production of Poly- γ -Glutamic Acid, the Material for Biodegradable Plastic, from Okara Using *Bacillus Natto*

Hideyuki SUZUKI and Miko WATANABE

Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585

ABSTRACT

Okara, soy bean curd refuse, is regarded as an industrial waste. We developed a method to produce useful poly- γ -glutamic acid (PGA) from okara employing *Bacillus natto*. *B. natto* was grown on okara-medium plate containing 5 g dried okara, which corresponds to 25 g raw okara, produced 125 mg of PGA after 3 days of incubation at 37°C. This indicates that 60% of the glutamic acid in okara was transformed to PGA. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 62-65, 2010.

Key words : poly- γ -glutamic acid, biodegradable plastic, waste product, biopolymer, bean curd refuse

おからは豆腐を作るときに豆乳を絞った絞りかすである。日本人はおからを食用にするがそれはごく一部である。残りについては、家畜の飼料、植物の肥料にしたりもするが、年間80万トンといわれるおからの約半分は産業廃棄物として、焼却あるいは埋め立て処理されているのが現状である。おからは水分を多量に含んでいるため、焼却するにはその分余分に費用がかかるが、放っておけば腐りやすく悪臭の原因になる。一方、食品成分表¹⁾によれば、おからは約5%のたん白質を含んでおり、これは茹で大豆の約4割といわれている。また、たん白質以外の栄養分も豊富である。したがって、廃棄物として処分することは、環境に負荷を

かけるだけでなく、有効資源を無駄にすることになる。

大豆たん白質は多量のグルタミン酸を含んでおり、納豆菌は蒸し大豆に生え、大豆たん白質を分解して遊離してきたグルタミン酸を重合させ納豆のネバネバの主成分であるポリ γ -グルタミン酸(PGA)を生産する。PGAは食品の増粘材、カルシウム吸収促進剤、保湿剤として利用されている。また、PGAを γ 線で重合させ強度を持たせたプラスチックを分解する菌は自然界からたくさん見つかっており、このプラスチックはいわゆる“生分解性プラスチック”である^{2,3)}。廃棄物であるおからは大豆そのものには劣るものの、十分多量のたん白質を含んでおり、おからを主成分とする培地に納豆菌を生育させることにより、PGAを容易に生産できると考えた。本研究では、PGA生産に最適なおから

*〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町

培地の開発と培養条件の検討を行った。

方 法

納豆菌と培地

使用した納豆菌は納豆製造用の乾燥粉末（高橋祐蔵研究所，山形県上山市）である。菌株培養にはLB Miller（Becton Dickinson, MD, USA）を用いた。

PGA生産には，300 mL容フラスコに乾燥おからパウダー（さとの雪食品，鳴門市）5 g（または本文中に記載した濃度），水100 mLを加え，アルミキャップをしてオートクレーブしたものを基本培地として用いた。平板寒天培地には2%となるように寒天を加え，直径15 cmのガラスシャーレに作成した。

LB培地，37℃で1晩前培養した。菌液の濁度をOD₆₀₀=1.0になるようにLB培地で調整した後，0.5 mLをPGA生産用培地（100 mL）に植菌した。

PGA量の測定

PGAを精製後，その固体重量を測定する方法もある。しかし，計量までに時間がかかるため，通常は以下に記載の方法⁹⁾でPGA量を算定した。

希釈したPGA標品（1～10 μg相当）をたん白質の分離に用いる12.5%のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した後，3%の酢酸に溶解した0.5%メチレンブルー液で染色した。脱色は蒸留水で行った。各ゲルに段階希釈した市販のPGAを泳動し，検量線を作成した。電気泳動後ゲルを乾燥し，スキャナーで画像を取り込み，NIHのImage Jを用いて各バンドの濃さを求め，PGA量を算出した。このようにして作成した検量線の一例をFig. 1に示した。

結果と考察

PGA収量に及ぼす培地の影響

培地100 mLあたり5 gの乾燥おからパウダーを含む寒天平板培地と液体培地，液体培地の場合はさらに静置培養と振とう培養（140 rpm）の違いがPGAの生成量にどのように影響するか検討した。

Fig. 2に示すように，寒天平板培地で培養した場合にPGAは最もよく生成され，液体静置培養した場合にはほとんど生成されなかった。これは納豆菌が好気細菌であり，通気の良い条件が生育に必要なためと考えられた。また，培養3日目以降PGA量が急速に減少することが分かった。5%おから培地100 mL中には約200 mgのグルタミン酸が含まれていると考えられ，寒天平板培地を用いた場合は，そのうちの約6割をPGAに

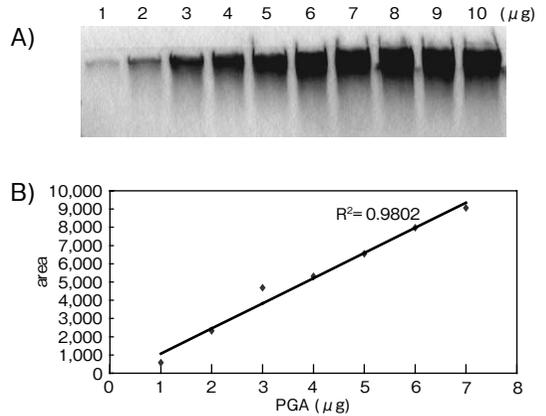


Fig. 1. Standard curve of PGA. Various amounts of PGA (average molecular weight 1,500,000-2,000,000; Wako Pure Chemicals) were loaded onto SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis, the gel was stained with methylene blue, destained, and dried. The image of the gel was scanned by a scanner (A) and the density of each PGA band was digitalized by Image J from NIH. The amounts of PGA were calculated from standard curve (B).

変換できたことになる。

PGA収量に及ぼす培養温度の影響

前項の実験では培養は37℃で行った。ここでは，培養温度のPGA収量に及ぼす影響を検討した。

納豆菌を平板寒天培地に植菌後，様々な温度で培養した。PGA収量を経時的に測定したところ，Fig. 3 (A)に示すように37℃で3時間培養したときに最も多かったが，その後急速に収量が減少した。30℃の場合は生育に時間がかかり，PGA収量も少なかった。20℃の場合はほとんど菌が生育せず，全くPGAが出来なかった。一方，42℃の場合は，菌の生育と同様PGAは培養の早い時期から生成し始めるが，その後収量は増大しなかった。この結果より，培養温度37℃が最適であると判断した。

PGA収量に及ぼす培地中のおから濃度の影響

平板寒天培地中のおからの濃度を2.5，5，7.5 mg/mLに変えて，PGAの収量を検討した。

Fig. 3 (B)に示すようにおから濃度が7.5 mg/mLのときに収率収量とも最高となったが，平板寒天培地にこれ以上の濃度のおからを入れることは不可能である。また，おから濃度が2.5 mg/mLのときは全くPGAが生成しなかった。5のときも7.5 mg/mLのときも，PGA収量が最高値に達した次の1日間の内にPGA量

は半減した。これは定常期後期に入り、培地中の養分が減少すると納豆菌がYwtDや γ -グルタミルトランスペプチダーゼなどのPGA分解酵素を生成してPGAをグルタミン酸にまで分解し、それを栄養源としようとするためと考えられる⁵⁾。そのため、今後の課題としては、YwtDや γ -グルタミルトランスペプチダーゼ遺伝子を破壊した納豆菌を育種し、その菌株を使ってPGAを生産することが効果的であると考えられる。

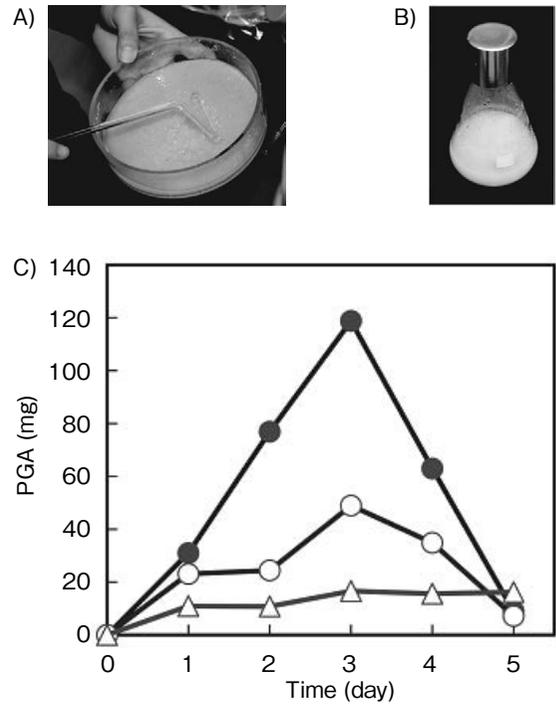


Fig. 2. Effect of cultivation condition of *Bacillus natto* on PGA production. *B. natto* was grown at 37°C on plates (A) (closed circles) or in the liquid media (B) with (open circles) and without (triangles) shaking. The amounts of PGA produced were measured (C).

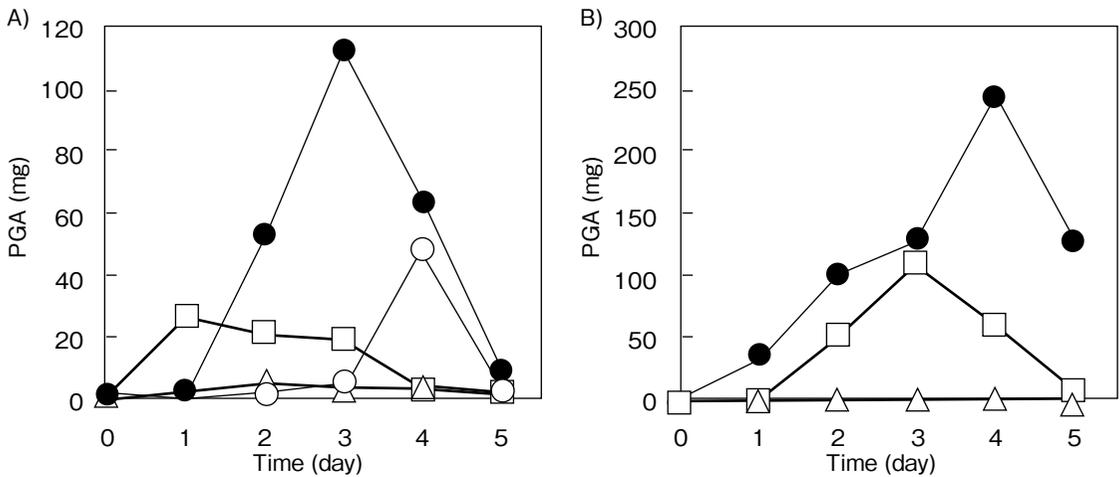


Fig. 3. Effect of culture temperature (A) and okara concentration (B) on PGA production. (A) *B. natto* was grown at 20, 30, 37, and 42°C (triangles, open circles, closed circles, and squares, respectively) on the plates. (B) *B. natto* was grown at 37°C on plates containing 2.5, 5, and 7.5% okara (triangles, squares, and circles, respectively).

要 約

産業廃棄物であるおからを原料として、様々な有効利用法が開発されているポリ γ -グルタミン酸 (PGA) の製造法を開発した。納豆菌を5 gの乾燥おから粉末 (湿ったおからでは、25 gに相当する) を含む平板寒天培地上、37°Cで3日間培養すると125 mgのPGAが製造できた。これはおからに含まれているグルタミン酸の6割をPGAに変換できたことになる。

文 献

- 1) 香川芳子 (2008) : 五訂増補食品成分表2009. 女子栄養大学出版部
- 2) 芦内誠, 味園春雄 (2002) : 『納豆の糸』の主成分ポリ- γ -グルタミン酸 : その機能と生産メカニズム. バイオサイエンスとインダストリー, **60**, 27-30.
- 3) Goto A and Kunioka M (1992): Biosynthesis and hydrolysis of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335. *Biosci Biotech Biochem*, **56**, 1031-1035.
- 4) Yamaguchi F, Ogawa Y, Kikuchi M, Yuasa K and Motai H (1996): Detection of γ -polyglutamic acid (γ -PGA) by SDS-PAGE. *Biosci Biotech Biochem*, **60**, 255-258.
- 5) Kimura K, Tran L-S P, Uchida I and Itoh Y (2004): *Microbiology (SMG)*, **150**, 4115-4123.