- 737 (1960).
 (5) R. Y. Stanier : *J. Bact.*, 55, 477 (1948).
 (6) J. W. Bartholomew : *J. Gen. Microbiol.*, 3, 340 (1949).
 (7) P. H. H. Gray, H. G. Thornton : *Zent. Für. Bakt.*, II, 73, 74 (1928).
 (8) J. M. Shewan, W. Hodgiss, J. Listen : *Nature*, 173, 208 (1954).
 (9) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th Ed., Williams and Wilsons Co. (Baltimore) (1957).
 (10) *ibid.*, p. 90.

[農化 第 35 卷, 第 1 号, p. 57~61, 1961]

納豆の成分について (第 1 報)*

納豆の糖及び粘質物について

木原芳次郎, 的場慈子, 難波理美子 (お茶の水女子大学食品化学研究室)

昭和 35 年 7 月 27 日 受 理

納豆の化学的成分について多数の研究があるが, 食品化学的にみて未だ十分解明されていない点が多い. 納豆の製造過程において大豆の成分がどんなに変化して行くか, 又どんな成分が生成されるかなどについて研究したい. 先ず糖類, 粘質物について研究した.

実験及び結果

1. 納豆の糖類

A 糖類の定量 : 市販糸

引納豆を熱 95% アルコール及び水で順次浸出して, 浸出液について糖類の定量を行なった. 結果は第 1 表に示す通りである.

第 1 表 納豆の種類

	還元糖	全糖	ペントース
アルコール可溶	0.17%	0.48%	0.07%
水可溶	0.12	1.12	0.35
浸出残渣	—	3.10	1.68

B ペーパークロマトグラフィ :

試料の調製

- a) 納豆に 3 倍容の無水酒精を加え湯浴上で 1 時間加熱して抽出を行なう. 3 回抽出を繰返し抽出液は濾過し減圧濃縮しシラップとする.
 b) 試料 a に 5% H_2SO_4 を加え, 3 時間湯浴上で加熱分解後中和し, 濃縮する.

これ等の試料について, 東洋濾紙 No. 51 を用い, ブタノール-酢酸-水 ($BuOH : AcOH : H_2O = 4 : 1 : 5$) 及び含水フェノール (フェノール : 水 = 7 : 3) を展開剤として, 1 次元上昇法により分離を試みた. 発色剤はアニリン試薬及び尿素リン酸塩を使用した. 結果は第 1 図と第 2 表に示すごとくである. これにより納豆のアルコール抽出物からは 3 つのスポットが得られ, (3) はガラクトースに一致するが, (1) (2) は単糖類でないようである.

又第 1 図中 (1) 及び (2) に相当する R_F の部分を切り取り, 5% 硫酸で浸

第 2 表 納豆アルコール抽出物の水解物中の糖の R_F 値

展開剤	$BuOH : AcOH : H_2O$ (4 : 1 : 5)	フェノール : 水	相当する糖
納豆アルコール抽出物の加水分解物	0.17 0.23 0.22 0.29	0.42 0.50 0.53	ガラクトース フラクトース アラビノース

第 1 図 納豆アルコール抽出物中の糖

第 3 表 スポット (1) 及び (2) の酸による分解生成糖

	R_F 値	相当する糖
(1) のスポット a	0.18	ガラクトース
b	0.24	アラビノース
(2) のスポット c	0.19	ガラクトース

* Chemical Constituents of Nattō. Part I. Sugars and Mucilage in Nattō.

By Yoshijiro KIHARA, Nariko MATOBA and Rimiko NANBA (Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Home Economics, Ochanomizu University, Tokyo)

第2図 カーボンカラムクロマトグラフィによる糖の分離

第4表 カーボンカラムクロマトグラフィによる各溶出区分の糖の種類とその R_F 値

溶出区分	溶媒		相当する糖
	ブタノール 酢酸	ピリジン 酢酸エチル	
1	0.10	0.28	ガラクトース
1~2	0.12	0.30	グルコース
6~8	0.05	0.31	アラビノース
6~8	0.02	0.07	B 糖
6~8	0.02	0.03	A 糖
純粋の糖			
ガラクトース	0.61	0.28	
グルコース	—	0.30	
アラビノース	0.13	0.31	

第5表 A糖及びB糖の水解生成糖と純粋の糖の R_F 値

試料	溶媒		相当する糖
	ブタノール 酢酸	ピリジン 酢酸エチル	
A 糖分解物	0.11	0.15	ガラクトース
A 糖分解物	0.13	0.18	アラビノース
B 糖分解物	0.11	0.16	ガラクトース
B 糖分解物	—	0.19	グルコース
B 糖分解物	0.14	0.21	アラビノース
B 糖分解物	0.20	0.31	ラムノース?
グルコース	—	0.18	
ガラクトース	0.11	0.16	
アラビノース	0.13	0.21

第3図 A糖及びB糖の酸分解生成糖の Wedge Techniqueによるペーパークロマトグラム

出し浸出液を3時間湯浴で加熱加水分解し炭酸カルシウムで中和し濾過した液について同様ペーパークロマトグラフィを行ない第3表の結果を得た。

Spot はそれぞれ既知の糖に対照して a はガラクトース, b はアラビノースに相当し, c もガラクトースであると推定される。最初に出たフラクトースはスポットの部分を取り加水分解したものでは認められなかった (尿素燐酸呈色)。

大豆アルコール抽出物については, ピリジン, 酢酸エチル, 水 (1:2:1) で上昇法にて展開し尿素燐酸で発色させ, スタキオース, ラフィノース, シュクロースのそれぞれの R_F 値 0.04, 0.08, 0.19 を得たが, 納豆についてははっきりしたスポットが得られなかった。これ等の糖は製造中に消失したものと思う。

C カーボンカラムクロマトグラフィ: 更に糖類の性質を精査するため, カーボンカラムクロマトグラフィ⁽¹⁻³⁾を行なった。

カラム 3.2×40 cm

吸着剤 活性炭 30 g, セライト 30 g

カラムに約 150 cc の水を入れ吸着剤が洩れないようガラスウールと濾紙を底につめてから吸着剤を少しずつ静かに落す, 一夜放置して安定させた上濾紙をのせ蓋とする。吸着層の高さは 24 cm とする。次に水

約 300~500 cc で吸着層を水洗した後試料液を吸着させる。水流ポンプで軽く吸引しながら, 初めは水で, 次には 5%, 10%, 15% のアルコールで溶出する。溶出速度は 1 分間 13~15 滴である。糖の溶出はアンスロン反応により見当をつけ, 各 1 l ずつ分散しそれぞれ低圧濃縮し無水アルコールを加えて粉末状の試料とした。結果は第2図のごとく最初ガラクトースのフラクションが溶出し次いで B 糖, A 糖のフラクションを分離した。各部に溶出する糖をペーパークロマトグラフィで検し第4表の結果を得た。

D オリゴ糖の重合度: 2つのオリゴ糖は共にフェーリング液を弱く還元するので直接還元糖及び全糖をソモギ変法にて測定し, 全糖/還元糖を求めて重合度とした。

A 糖の重合度 2.51

B 糖の重合度 2.94

共に 1% H_2SO_4 で 2.5 時間湯浴上で加水分解したものをペーパークロマトグラフィによって糖の種類を検した。結果は第5表の通りである。

なお最近知られた Wedge Technique^(4,5) でプロパノール, 水, 酢酸エチル, α -ピコリン (14:4:2:9) で上昇展開させアニリン燐酸にて発色させ, 第3図の結果を得て, それぞれ2種の糖分のあることを知った。

E オリゴ糖のアセチル化 オリゴ糖の粉末試料に無水酢酸と無水酢酸

第 4 図 粘質物の分離

第 6 表 試料 A 及び B の糖と蛋白質の組成

	粗蛋白質	糖分
試料 A	44.5%	30.3%
試料 B	78.2	1.5

ソーダと湯浴上に加熱 2.5 時間行ない、水中に注入し酢酸エステルを得た。

A, B 両糖共にクロロホルム, エタノール, メタノールに溶解するが, ペンゼンには溶解しなかった。

m. p. A 糖のアセテート 106~109°; B 糖のアセテート 82~84°

A, B 糖のアセチル化物をエタノールで再結して, B 糖から柱状の結晶を得た。A 糖も柱状であるがはっきりしなかった。

F オリゴ糖のオサゾン: Phenylhydrazine HCl と酢酸ソーダと加熱してオサゾンをつくる。温水可溶のオサゾンの結晶が析出する。

m. p. A 糖のオサゾン 102~103°; B 糖のオサゾン 120°

既知の糖には A 糖 B 糖のオサゾン, アセチル化物の m. p. に一致する糖はみあたらず, ペーパークロマトグラフィの結果から推定される構成糖も考慮すると A 糖 B 糖は未知の糖と思われる。

II. 納豆の粘質物

A 粘質物の分離: 市販納豆に約 3 倍量の水を加え, 粘質を溶出し吸引濾過及び遠心分離して上澄液を分別する。この溶液に約 1% のトリクロル酢酸を加えてできる沈澱を遠心分離し上澄液は減圧濃縮してアルコールで脱水し乾燥粉末とする(試料 A)。トリクロル酢酸による沈澱も無水アルコールで脱水(試料 B)とする。

試料 A は粘性を有するが, 試料 B は粘性を殆んど持たない。この試料 A は蛋白質と糖分がほぼ等しい割合であるが, 試料 B は大部分が蛋白質でわずかな糖を含む。分析結果は第 6 表のとおりである。

B 粘質物の性質: 粘質物(試料 A)の水溶液はトリクロル酢酸, タンニン, ピクリン酸, 硫酸アンモニア, 硫酸マグネシウムでは沈澱しないが, 水酸化バリウム, 酢酸鉛, 昇汞で沈澱する。

これ等沈澱によって, 粘質物の蛋白質と糖分の分離を試みたができなかった。粘質物は蛋白質と糖分が結合したものと考えられる。

粘質物水溶液は酸性であって pH 4.2 である。粘質物の粘度をオストワルド粘度計 No. 2 を用いて 200 mg を 30 cc に溶解した液について測定し, 液温 9° の時に 42.4 sec の結果を得た。その時水では 21.2 sec であった。粘質物の表面張力は Du Nouy の表面張力計によって 100 mg を 10 cc の水に溶解した溶液について測定した。結果は 16° で 59.6 dyn/cm で, その時水の測定値は 73.3 dyn/cm であった。

C 粘質物の反応: 粘質物について各種の定性反応を試み次の結果を得た。

ビウレット反応 — ミロン反応 + 坂口反応 + エールリッヒ試薬との反応 —
フェーリング溶液との反応 — セリワノフ反応 + アニリン反応 +

D 粘質物中のアミノ酸: 粘質物を 6N HCl と 24 時間加熱し中和後ペーパークロマトグラフィーによってアミノ酸の検索を行なった。

東洋濾紙 No. 50 を用いブタノール-酢酸-水 (4:1:2) 及び含水フェノール (15% H₂O 添加) により二次元展開を行なった。発色剤にはニンヒドリン溶液を使用した。結果は第 5 図に示す通りである。

E 粘質物のペプチド末端基⁽⁶⁾: 0.2 g の試料に 0.45 g の重曹, 0.2 g の 2, 4-dinitrofluorobenzene (DNFB) を暗所にて反応し, 過剰の DNFB をエーテルで除去する。これを 6N HCl で pH 3 とし微量の沈澱を得た。この沈澱に 6N HCl を加え, 湯浴上で 16 時間加熱し分解物についてペーパークロマトグラフィーにより N 末端基を検討した。展開剤には水飽和ブタノール及び 2N アンモニア飽和ブタノールを用い, 濾紙は東洋濾紙 No. 51 を使用した。その結果水飽和ブタノールでは R_F 値 0.17, 0.42, 0.80 を示す 3 つのスポットを認め, 2N アンモニア飽和ブタノール

第 5 図 粘質物のアミノ酸のペーパークロマトグラム

1 シスチン	2 ?	3 アスパラギン酸
4 セリン	5 グルタミン酸	6 スレオニン
7 アルギニン	8 アラニン	9 バリン?
10 チロシン		

第 6 図 トリクロル酢酸沈澱蛋白のアミノ酸のペーパークロマトグラム

- 1 アルギニン 2 シスチン 3 アスパラギン酸
4 セリン 5 グルタミン酸 6 グリシン
7 スレオニン 8 アラニン 9 チロシン
10 メチオニン 11 ロイシン
12 フェニルアラニン 13 プロリン

第 7 表 粘 質 物 の 糖

	分解条件 (5% H ₂ SO ₄) による	フェノール 水	BuOH AcOH H ₂ O	Propanol* AcOEt H ₂ O α, picolin	発色剤		相当する糖
					アニリン	尿素	
No. 1	100° 30分	0.44	0.19	0.41	褐		ガラクトース
		0.49	0.23	0.46	褐	青	フラクトース
		0.54	0.26	0.49	赤		アラビノース
No. 2	室温 24時間	0.16	0.04		褐		
		0.42	0.24		褐	青	フラクトース
No. 3	60° 30分		0.03		褐		
			0.22		褐	青	フラクトース

* Wedge technique

り 5% H₂SO₄ で 3 時間湯浴上で分解後, 再びペーパークロマトグラフィーによって糖を検索しガラクトース並びにアラビノースに相当する 2 つのスポットを認めた. この結果アラビノースとガラクトースよりなる糖類であることを知った.

要 約

(1) ペーパークロマトグラフィーにより納豆中の糖を検索したところ, その熱アルコール抽出液中に遊離のガラクトースと R_F 値 0.03 と 0.06 (BuOH, AcOH, H₂O) を示す 2 つのオリゴ糖を認めた.

大豆の熱アルコール抽出液中に存在するシュクロース, ラフィノース, スタキオースは認められなかった. R_F 値 0.03 の構成糖はガラクトースとアラビノースであり, R_F 値 0.06 のオリゴ糖はアラビノース, ガラクトース, グルコースよりなっていると思われる. 更にカーボンカラムクロマトグラフィーにより, この 2 つの糖を単離し, それぞれのアセチル化物及びオサゾンを得た.

(2) 納豆の水浸出液にトリクロル酢酸を加え沈澱させ, 濾液にアルコールを加えて粘質物を分離した. しかしこの糖と蛋白質を分離することはできなかった. この蛋白部分はビウレット反応や多くの沈澱反応を示さずベプチド様のものと考えられるが, この構成アミノ酸はグルタミン酸, アスパラギン酸, チロシン, アルギニン, アラニン, スレオニン, シスチン, セリン, バリン? であると推定した. 又構成糖はアラビノース, ガラクトース, フラクトースであり, 不完全分解でアラビノースとガラクトースからなるオリゴ糖とフラクトースとに分かれる.

ルでは R_F 値 0.09, 0.44, 0.72 のスポットを検出した. 文献値⁽⁷⁾ から DNP-glutamic acid, DNP-threonine?, Oi-DNP-tyrosine と考えられる.

F Sample B 蛋白のアミノ酸: 6N HCl 加水分解液を含水フェノール(15% H₂O 添加)及びブタノール-酢酸-水(4:1:2)を用いて 2 次元展開を行なった. 結果は第 6 図に示すとおりである.

次に Ba(OH)₂ で加水分解したものについて, エーデルリッヒ試薬で反応するのでトリプトファンの存在が推定される. この結果以上 14 種のアミノ酸の存在を推定した.

G 粘質物の糖分: 粘質物を 5% H₂SO₄ で加水分解し, ペーパークロマトグラフィーにより糖分の組成を検索した.

東洋濾紙 No. 51 を用い, 展開剤にはブタノール-酢酸-水(4:1:5)及びフェノール-水(7:3)を使用, 上昇法により展開した. 発色剤には尿素磷酸溶液及びアニリン試薬を使用した.

又溶媒にプロパノール-酢酸エチル-H₂O-α-ピコリン(14:2:4:9)を用い, Wedge technique による展開もあわせて行なった. 結果は第 7 表のとおりである.

これにより糖類はガラクトース, フラクトース, アラビノースよりなることを知った. No. 2 と No. 3 ではフラクトースに相当するスポットと R_F 値 0.04 (BuOH:AcOH:H₂O) を示すスポットを得た. この R_F 値 0.04 のスポットの部分を取り

(1) 小野英男, 太宰宙朗: 工業技術院発酵研究所研究報告, 14, 51 (1957).

(2) 小野英男, 太宰宙朗: 同上, 17, 65(1959).

(3) A. Thompson, K. Anno, M. L. Wolfram: J. Am. Chem. Soc., 76, 1309 (1954).

- (4) Athineos J. Philippu : *Anal. Chem.*, 31, 1743 (1959).
 (5) 北原新哉, 檜山八郎 : 科学と工業, 28, 562 (1954).
 (6) 京大農芸化学教室 : 農芸化学実験書, 2, 759 (1957).
 (7) 紫田村治 : ペーパークロマトグラフ法の実際, 149 (1958).

[農化 第 35 卷, 第 1 号, p. 61~66, 1961]

微生物に対する表面活性剤の作用*

殺菌作用と透過性に及ぼす影響

大 林 晃 (鹿児島大学農学部)

昭和 35 年 7 月 27 日 受 理

緒 言

表面活性剤の殺菌作用に関しては 1940 年代によく研究され, その機作として微生物蛋白質の変性及び酵素の失活^(1,2), 滲透圧の変化による菌体内物質の漏洩^(1,3,4)等種々の説が提出されている。

著者等は乳酸菌の intact cell に cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) などの陽イオン活性剤を添加すると, D-, L-乳酸の菌体内への透過が高められることを認めたので, 種々の表面活性剤についてその殺菌力と微生物の透過性に及ぼす効果の相関関係を調べ, 表面活性剤の殺菌機作について検討した。

実 験 方 法

使用表面活性剤 : 第 1 表に示した 8 種の表面活性剤。

殺菌力試験 : 細菌,

酵母及び糸状菌の孢子を夫々 10^5 cell/ml になる如く pH 6.8 の M/30 磷酸緩衝液に懸濁し, 各種表面活性剤を 0.1 mg/ml と 1.0 mg/ml になるように添加し, 25° に 5 分間放置後, 直ちに稀釈して plate count 法にて生菌数を測定して殺菌力を調べた。

第 1 表 使用した表面活性剤

表 面 活 性 剤*	種 類	構 造
リボソックス LCR (N-1)	非イオン	polyoxyethylene lauryl alcohol ether
リボソックス NCI (N-2)	"	polyoxyethylene alkyl phenol ether
CTAB	陽イオン	cetyl trimethyl ammonium bromide
CPC	"	cetyl pyridinium chloride
リボノール AS (A-1)	陰イオン	$C_{12}H_{23}-O-SO_3Na$
ライボン P-106 (A-2)	"	$C_{12}H_{23}-\text{C}_6\text{H}_4-SO_3Na$
リボミン SA (D-1)	両性イオン	$C_{18}H_{37}\cdot NH\cdot CH_2\cdot CH_2COONa$
リボミン COH (D-2)	"	$C_{11}H_{23}-C \begin{array}{l} \nearrow N-CH_2 \\ \searrow N \begin{array}{l} \nearrow CH_2 \\ \searrow CH_2COONa \end{array} \end{array}$ $\begin{array}{l} \\ OH \end{array} \begin{array}{l} \\ CH_2CH_2OH \end{array}$

* () 内は略号

乳酸菌の intact cell : ポリペプトン 0.5%, 粉末酵母エキス 0.3%, グルコース 3% の液体培地に培養した (30°, 48 時間) 菌体を遠心分離にて集め, 3 回蒸留水で洗滌し intact cell とした。

Aerobacter aerogenes の intact cell : ポリペプトン 0.5%, グルコース 3% の液体培地にて振盪培養 (30°, 36 時間) して得る。

Saccharomyces cerevisiae の intact cell : ポリペプトン 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, グルコース 12% の培地にて静置または振盪培養 (30°, 60 時間) して得る。

無細胞酵素液の調製 : paste 状の菌体を石英砂と共に乳鉢中にて磨砕し, M/30 磷酸緩衝液 (pH 6.8) にて抽出した。

脱水素酵素力の測定 : $10^{-2}M$ の各基質 [D-乳酸, L-乳酸, グルコース-6-リン酸 (以上曹達塩), グルコン酸石灰及びグルコース] 0.1 ml, pH 6.8 M/20 磷酸緩衝液 0.2 ml, 菌体懸濁液または酵素試料 0.1 ml, $5 \times 10^{-4}M$

* Actions of Surface Active Agents upon Microorganisms. The Germicidal Action and the Effect on the Permeability.