

(282)

(松田, 芝崎) 抗微生物に関する研究 (第5報)

gilli amylase opt. pH の中間値にある事から察して Neutral protease-I, -II は其の性質が可成り近似するのではないかと考えられる (尚, 小さな Peak として Alkaline protease system の存在が見られたが此に就ては暫く保留する).

次に, *Rhizopus* Protease の作用好適温度38°C, 全失活限界55°Cの結果は他の糸状菌 Protease の場合と同様で特色は認められなかつた.

次に, *Rh. peka* の蛋白分解曲線と糖化曲線とは相反する形状であつたが Protease, Amylase 酵素力の相反する事実から曲線形状の相違は酵素力の強弱に基因するものと解釈する以外本実験の範囲では判断出来なかつた.

総 括

- 1) *Rh. tonkinensis*, *Rh. javanicus*, *Rh. peka* の3株に就いて Amylase, Protease を検討した.
- 2) Amylase 作用 opt. pH=4.7 で pH=3.0, 40°C, 10min 処理に依り α -amylase の失活大であるが S-amylase は比較的安定であつた.
- 3) Protease は少くとも Acid protease system, Neutral protease system の二つあり, 其の Opt. pH は前者3.0, 後者6.5附近であつた.
- 4) 澱粉糖化に於ては *Rh. javanicus*, *Rh. tonkinensis* の場合初期に直線的であるが以降は緩慢な上昇線を辿り, *Rh. peka* に於ては終始緩慢な弓形曲線であり, 此は岡崎氏の報告と一致した.
- 5) 蛋白分解に於ては *Rh. javanicus*, *Rh. tonkinensis* の場合其の曲線は概して緩慢であり, *Rh. peka* に於ては恰も *Rh. tonkinensis* type の糖化曲線の形状に近似した. 此の相違は酵素力の強弱に依るものと思われる.

終りに臨み御指導を忝うした東大坂口博士, 科研飯田研究員, 富金原研究員, 阪大寺本博士, 照井博士に深謝する. 尚, 本研究費は合成清酒組合, 国税庁援助費に依るもので厚礼申上げる.

文 献

- 1) CORMAN, J. and LANGLYKKE, A.F. : Cereal chem. **25**, 191 (1948).
- 2) PHILLIPS, L.L. and CALDWELL, M.L. : J. Am. chem. Soc. **70**, 3559, 3563 (1952).
- 3) 福本, 辻阪, 南井: 酵素化学シンポジウム, **9**, 94 (1954), 科学と工業, **28**, 92, 287 (1954).
- 4) 岡崎: 農化, **24**, 88, 201 (1951); **25**, 317 (1952), 酵素化学シンポジウム口演, 7月 (1955).
- 5) 鈴木, 布川: 第6回プロテアーゼ研究会口演, 9月 (1956).
- 6) 茂木, 井口, 吉田等: 醸工, **35**, 150 (1957).
- 7) 坂本: 合成清酒技術部大会口演, 5月 (1955), 科学学術講演会口演, 10月 (1955).
- 8) 安井: 第2回プロテアーゼ研究会口演, 2月 (1956).
- 9) 三浦: 第2回プロテアーゼ研究会口演, 2月 (1956). (昭32, 5, 13受理)

抗微生物に関する研究 (第5報)

パラオキシ安息香酸ブチルの分離定量について

芝 崎 勲・松 田 敏 生 (大阪大学工学部醸酵工学教室)

(本報告の1部は第8回大阪醸造学会講演会にて報告済)

食品, 医薬品等の防腐剤として古くより用いられているパラオキシ安息香酸エステル (PHBA エステル) の分離定量については従来ブロム化法¹⁾, 紫外線吸光度測定法²⁾, MILLON 試薬法³⁾, STOUGHTON のニトロソ反応による方法⁴⁾, 4-アミノアンチピリン法^{5), 6)} 等が提案せられ, 吾国では衛生検査指針に示されている方法⁷⁾ が常用されている. 一方 PHBA エステルを種々の試料より分離する方法としてはエーテル或はアルコールによる抽出法が採用せられている.

著者等は種々の食品に含まれる PHBA エステルを迅速且つ高精度を以て定量する方法を確立せむと企図し, 試料に応じた分離法を設定して, 種々の定量法について比較検討した結果, 紫外線吸光度測定法及び4-アミノアンチピリン法によりその目的を達することが出来たので, 茲に報告する.

本報告では PHBA エステルの内汎用せられるブチルエステル (MP. 71~2°C, 上野製薬株式会社製品) (以下 BPHB と略称する) を供試し, 吸光度測定には島津製ベックマン型分光光度計を用いた.

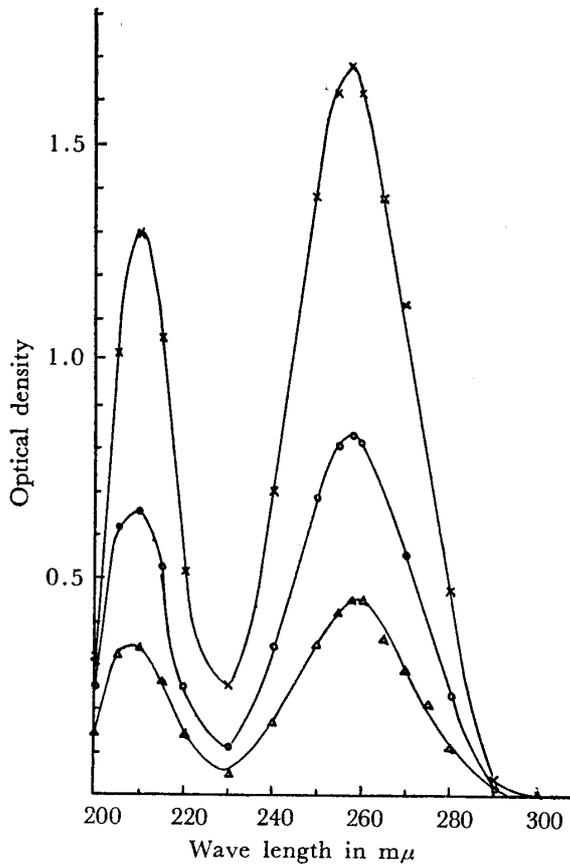


Fig.1 Ultraviolet absorption spectrum of BPHB

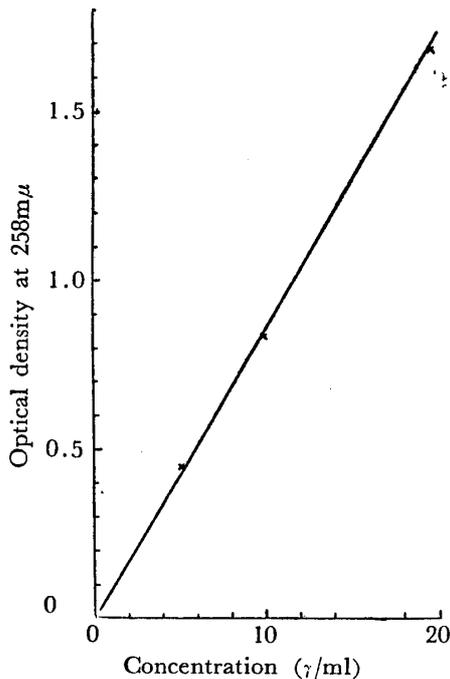
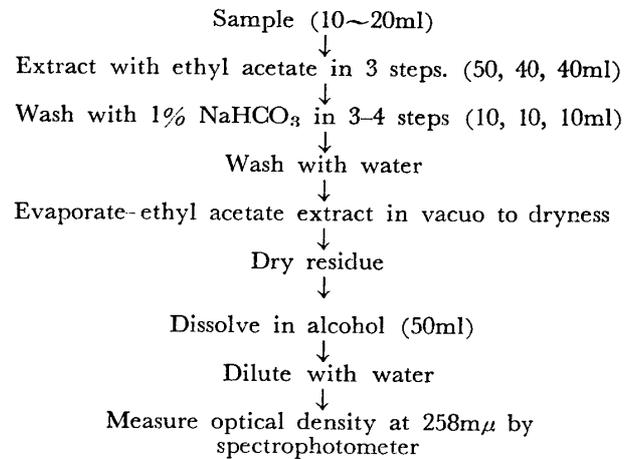


Fig.3 Optical density at 258mμ and BPHB concentration

I. 紫外線吸光度測定法

BPHB は Fig.1 に示す様に258mμの紫外部で顕著な吸収を示し、これを妨害する不純物不含の試料に対しては極めて簡単に定量可能である。しかし食品の如き複雑な試料では妨害物質を除去する方法の確立が先決問題である。著者等は種々の予備試験の結果より Fig.2 に示す分離定量法を設定した。

Fig.2. Determination of BPHB by spectrophotometric method



例えば醤油の場合についてのべると試料10~20mlを分液漏斗にとり、これに1N硫酸1mlを添加し(省略してもよい)、全量50~150mlの醋酸エチルにて3回にわけて抽出する。抽出液は合一して1%重曹水にて3回洗滌する。次に蒸溜水にて洗滌後、減圧下に溶剤を溜出せしめ、残渣をアルコールに溶解して一定量となし、更に適当に稀釈して258mμの吸光度を測定する。別にBPHB無添加試料を同様操作して吸光度を求め、上の値との差を以て含有BPHBの吸光度とし、検量曲線よりその濃度を算出する。

Table 1. Recovery of added BPHB by spectrophotometric method.

Sample	Treatment*	BpHB added (γ/ml)	Recovery (%)
water	—	100	105.0
soy sauce	—	100	97.0
"	precipitation by alcohol	100	89.0
"	treatmet by alcohol and GARREZ reagent	100	97.2
"	CCl ₄ extraction	100	96.0
Tamari soy sauce	—	100	94.3
"	ether extraction	100	103.0

* other treatment : cf. Fig.2

(284)

(芝崎, 松田) 抗微生物に関する研究 (第5報)

BPHB の258m μ に於ける検量曲線は Fig.3 の如くで BEER の法則に従う。検査指針では醤油を始め何れの試料を対象とする場合にも、検液調整時にアルコール及び GARREZ 試薬を添加して沈澱を除去する前処理を行っている。醤油を試料とした場合 Fig.2 の分離法に於ける検液をアルコール及び GARREZ 試薬を添加して回収実験を行つたが、Table 1 の結果より明かな様にこれら処理の効果は認められない。又エーテルを抽出溶剤とした場合は Table1 より明かな様に回収成績は良好であるが、対照の吸光度が醋酸エチルの場合に比し大きい値を示す。

Table 1 には Fig.2 の方法による回収試験成績の1例を示した。以上の結果より適当な対照試料が得られる場合は極めて短時間に多くの試料の定量が可能である。しかし Fig.4 に示す様に本法では醤油の場合、対照の吸光度は試料により相違しているので常に BPHB 無添加対照を必要とする欠点がある。

I. 比色法

PHBA エステルの比色定量法としては前述の如く多くの提案があるのでこれらの適用性(主として醤油を対象)について検討した。MILLON 試薬による呈色反応では Fig.5 に示す様に510m μ の波長にて吸収の最大があり、水溶液では10 γ /ml以上の濃度では定量可能であるが、呈色が不安定で而も 100 γ /ml 程度では生成色素が沈澱する場合がある。これらの点は PHBA でも BPHB でも同様の挙動を示す。

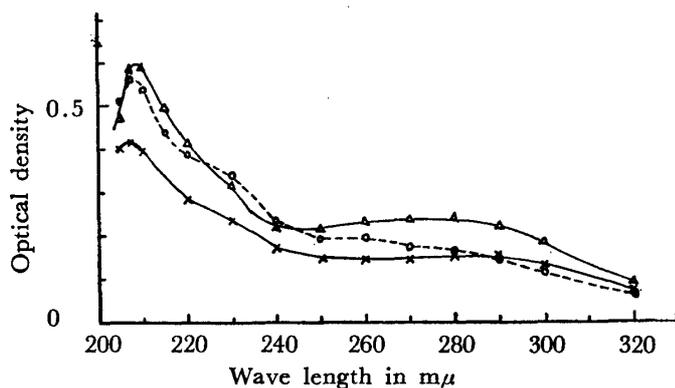


Fig.4 Ultraviolet absorption spectrum of some soy extract isolated from soy sample in which BPHB was absent

Isolation procedure: cf. Fig.2.

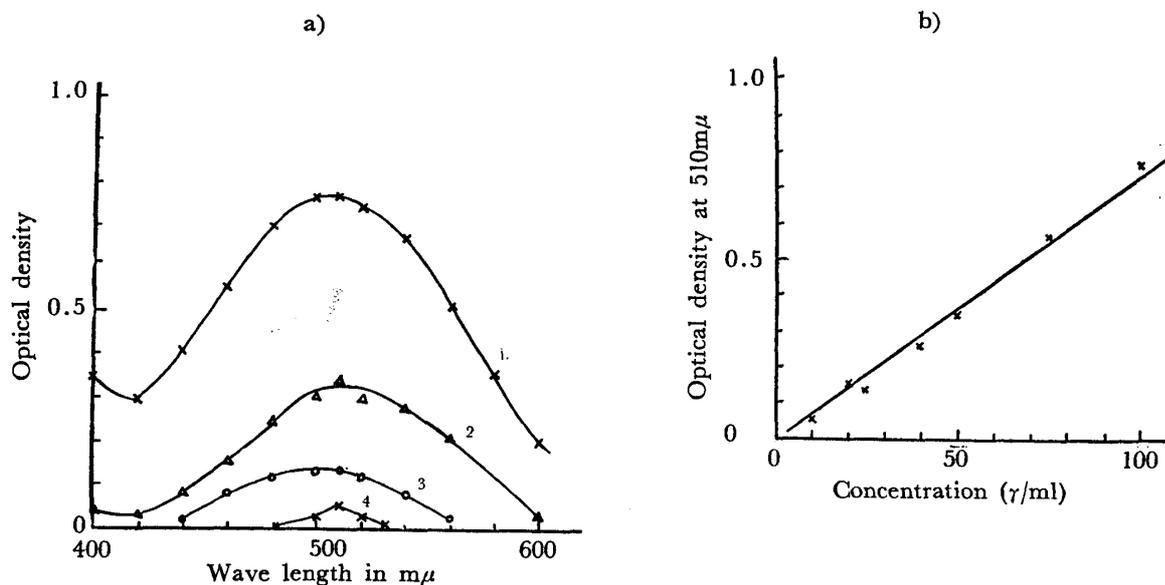


Fig.5 a) Absorption spectrum of color produced by MILLON's reagent

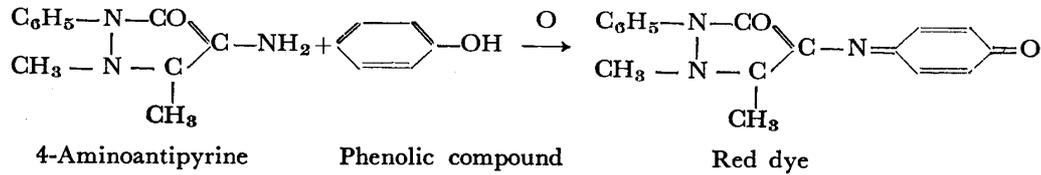
1: BPHB 100 γ /ml, 2: BPHB 50 γ /ml, 3: BPHB 25 γ /ml, 4: BPHB 10 γ /ml

b) Optical density at 510m μ and BPHB concentration

ニトロソ反応では何れも 100 γ /ml 以上の高濃度を必要とするので問題にならない。チロシン定量に用いられる FOLIN 試薬による比色法では Fig.2 の分離法を醤油に適用した場合、BPHB 無添加試料が相当呈色する欠点がある。

4-アミノアンチピリン (以下4-AA) による呈色反応は EMERSON 等⁵⁾によりフェノール性化合物の定量法として提案されている。即ち 4-AA がフェノール及びその誘導体と縮合して 4-AA 色素を形成するので、この着色

を比色する方法である。本法は更に ETTINGER 等⁶⁾により詳細に検討せられた。これらの場合の反応は次式の如くで、2, 3の例外はあるが一般に赤色々素を形成する。



この場合、フェノールのパラ位置に種々の置換基(ハロゲン、カルボキシル、スルホン酸、水酸基、メトキシ基)が存在する場合にも、これらの基が除かれて4-AAと縮合すると云はれている。BPHBでは飽和濃度附近では発色するが、100 γ /ml程度では殆んど発色しない。しかし遊離酸(PHBA)では極めて鋭敏に赤色のアンチピリン色素を生成する。生成色素は水溶液中では510 $m\mu$ にて吸収の最大を示し、クロロフォルム溶液中では460 $m\mu$ で最大吸収を示す(Fig.6参照)。

先づ食品試料よりBPHBの分離法並に加水分解法をFig.2並に衛生検査指針を中心に予備的に検討した。分離法に於いては前述の如くFig.2の方法にて一応殆んど定量的に分離出来ることが示されている。加水分解法は検査指針の方法を採用し、加水分解液より最終処理液迄の操作として、分解液を直ちに4-AAによる発色の為pH調整を行う方法と、一度分解液を酸性にし、醋酸エチルにて抽出し更に一定pHの緩衝液に転

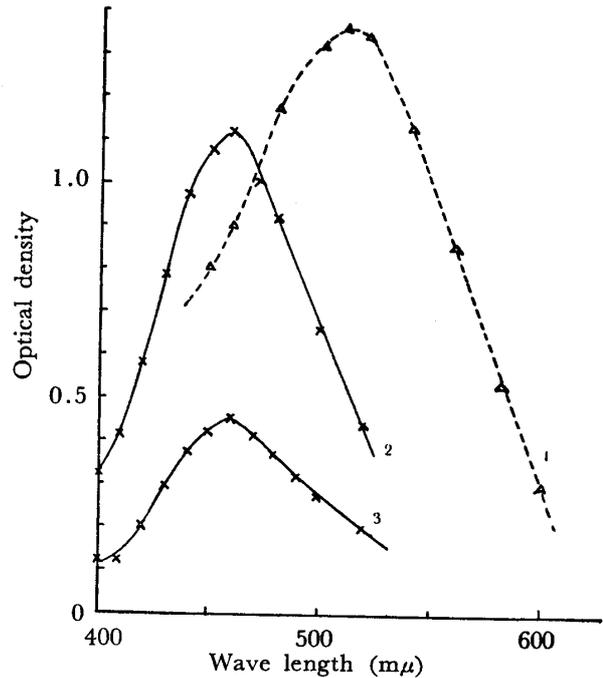


Fig.6. Absorption spectrum of color produced by 4-aminoantipyrine

- 1: aq. solution, 25 γ /ml
- 2: chloroform soln, 22.5 γ /ml
- 3: chloroform soln, 9 γ /ml

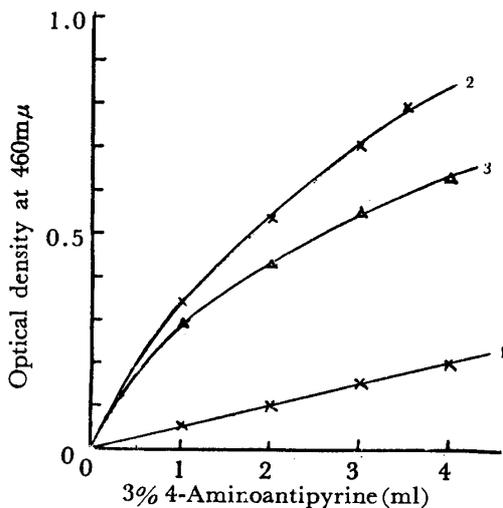


Fig.7. Effect of the amount of reagent upon color production

200 γ of BPHB, pH 10.0; 10ml of 2% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ solution

- 1: blank vs. chloroform
- 2: samples vs. blank
- 3: differential color

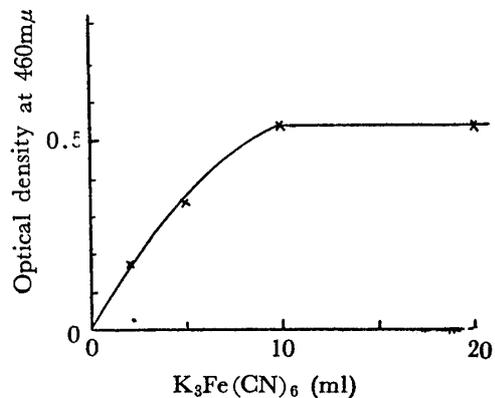


Fig.8. Effect of the amount of reagent upon color production.

200 γ of BPHB; pH 10.0;
2ml of 3% 4-AA solution

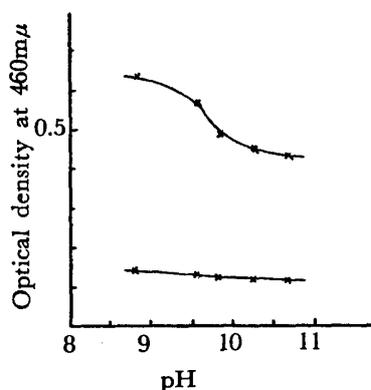


Fig. 9 Effect of pH upon the density of color produced by BPHB

1. blank vs. chloroform
2. samples vs. blank

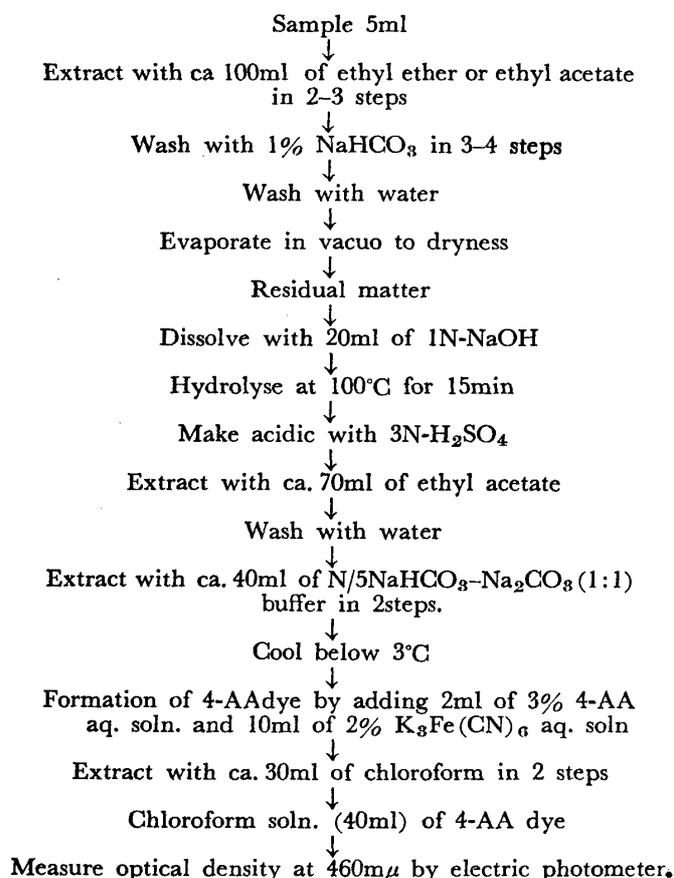
溶する方法とを比較した。操作は少々複雑となるが後の発色操作を考慮して後者の方法を採用した。

一方4-AAによる発色条件は ETTINGER 等⁶⁾の原法を其儘採用できるが、PHBA の場合は検討されていないので4-AA, 赤血塩の添加量並に作用pHについて検討した。4-AA色素の呈色は赤血塩量を一定にする場合、4-AA添加量の増加と共に増加するが、ETTINGER 等のフェノールの場合の如く最適値が見出されない (Fig. 7 参照)。しかし赤血塩添加量は Fig. 8 に示す様に2%溶液10mlにて十分である。

従つて発色条件として3%4-AA溶液2ml, 2%赤血塩溶液10mlを用うることとした。4-AA色素生成は環境pHにより著しく変化することが認められており、ETTINGER 等はフェノールの場合pH9.5~10.2の範囲にて一定値を示すとのべているがPHBAの場合はFig. 9の如くで一定値を示す傾向はない。従つて加水分解液の醋酸エチル抽出液はM/5炭酸ソーダ-重炭酸ソーダ(1:1)緩衝液(pH10.0)にて転溶することとした。この場合ETTINGER 等の用いているアンモニア緩衝液を用いても差支ない。

以上の諸条件を加味して Fig. 10 の如く定量法を設定した。

Fig. 10 Determination of BPHB by 4-aminoantipyrine method



即ち試料5mlをエーテル又は醋酸エチルにて3回抽出し、抽出液を1%重曹水溶液にて3回洗滌する。抽出液は更には水洗後、溶剤を減圧下に溜去し、残渣は苛性ソーダにとかし、水浴上15分間加水分解する。加水分解液は硫酸々性となし、醋酸エチルにて抽出、抽出液は合一して水洗後M/5炭酸ソーダ-重炭酸ソーダ(1:1)緩衝液(pH10.0)に転溶する。この転溶液1定量を3°C以下に冷却し、これに3%4-AA溶液2ml, 2%赤血塩溶液10mlを加えて発色せしめる。

生成色素はクロロフォルムにて抽出して1定

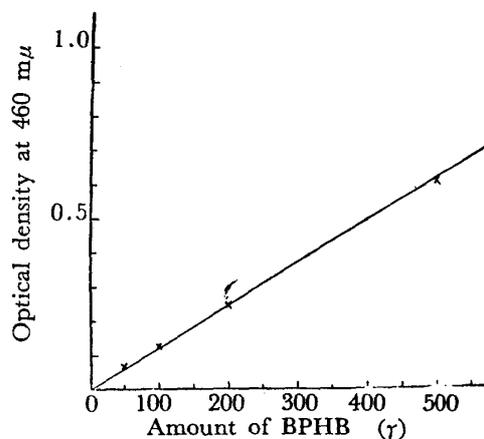


Fig. 11 Optical density at 460 mμ and BPHB amount

量となし、波長460mμ, 液槽10mmにて吸光度を測定する。この際 Blank としては同一pH緩衝溶液に発色試薬を加え同様処理したクロロフォルム溶液を用うる。

この場合クロロフォルム抽出を省略して水溶液のままにても比色可能であるが、呈色が少々不安定で且つ混濁する場合がある。

Table 2. Recovery of added BPHB by 4-AA colorimetric method.

Sample	BPHB added (r)	Recovery
water	100	101.0
soy sauce	100	93.0
soy sauce	100	98.8
soy sauce	200	94.0
soy sauce	200	103.0
Tamari soy sauce	100	95.8
fruit juice	100	93.8
vinegar	100	92.5

BPHB の純結晶を用いて上述の処理を行つて求めた検量曲線はFig.11の如くである。ここでは BPHB 量は供試々料中の全量をとつて示している。

種々の試料についての回収試験成績は Table 2 に示してある。BPHB 無添加試料を同様処理した対照では殆んど発色しないが、抽出溶剤として醋酸エチルを用うる場合、添加試料の吸光度の5%程度の発色が認められる場合もある。

しかし5%前後の誤差を許容するなれば BPHB 無添加試料を対照とすることなく本法により迅速に定量できることができる。

Ⅲ 考察及び総括

食品等の防腐剤として汎用されている BPHB の定量法に関しては古くより衛生検査指針に示されているブロム化法が適用されて来た。しかしこの方法は操作が繁雑で、而も除蛋白、二硫化炭素洗滌等の操作による損失がある。

著者等は簡便且つ精度の高い定量法を確立せむとし、従来示されている多くの方法を比較検討した。食品等の如く組成の複雑な試料に含まれる微量の防腐剤の定量においては妨害物質を出来るだけ除去すべきであるが、紫外線吸光度測定法においては Fig. 2 に示した簡単な方法により定量が可能である。この際無添加試料を同様処理した対照をとる必要があるが、同一系統の試料では大体一定の吸光度を示すので常に blank をとる必要はないものと考えられる。

BPHB の比色定量法については多くの方法が提案されているが、その鋭敏度、妨害物質等の点を考慮すれば一般のフェノール性化合物の定量に利用されている4-AA法が適当している。Fig.10 に示した方法により無添加試料を用うることなく迅速且つ高精度で食品に含まれる BPHB の定量が可能である。

以上著者等は食品の防腐剤として利用されている BPHB の分離法を確立し、紫外線吸光度測定法又は4-AAによる比色法により迅速且つ高い精度をもつて定量可能なことを示した。

終りに臨み、御指導を賜わりつゝある照井教授に深謝の意を表す。

文 献

- 1) 厚生省編：衛生検査指針Ⅱ，食品衛生検査指針(Ⅱ)増補及び一部改訂，324，協同医書出版社(1951)。
- 2) ALTO, T.R., FIRMAN, M.C. and RIGLER, N.E. : J. Amer. Pharm. Assoc. Scientific Ed., XLII(8), 449(1953).
- 3) JOHNSON, H.W. : Analyst, **71**, 77, (1946) ; CA, **40**, 2419 (1946).
- 4) PAN, S.C. : Anal. Chem., **27**, 65 (1955).
- 5) EMERSON, E., BEACHAM, H.H. and BEEGLE, L.C. : J. Org. Chem., **8**, 417 (1943); EMERSON, E., KELLY, K., BEACHAM, H. and BEEGLE, L. : J. Org. Chem., **9**, 226 (1944).
- 6) ETTINGER, M.B., RUCHHOFT, C.C. and LISHKA, R.J. : Anal. Chem., **23**, 1783 (1951).

(昭和32, 5, 15受理)