

後藤 実：生物試験法による生薬ならびに生薬方剤の研究 その8**

微生物試験法によるハチミツ中の果糖の検討

(有用天然物成分の研究 第10報)*

Minoru Goto : Studies on Useful Components in Natural Sources. X.
Studies on Crude Drugs and Oriental Crude Drug Preparations by
Bioassay. (8). Studies of Fructose in Honey by microbiological Assay.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.)***

前報¹⁾で述べた通り、ハチミツは医薬品として用いられるばかりでなく、滋養強壮飲料あるいは調味料としてわれわれの日常生活と密接な関係をもつ。ハチミツはミツバチが貯えた花蜜を採集するのであるからその品質は一定しがたく、かつ不良品、贋造品の鑑別も困難である。前報で述べた通り、天然のハチミツは種々の性質を備えてはいるが、これらはハチミツ特有のものではなく、かつそれらの偽造も容易である。著者は天然ハチミツの主成分の一つであり、かつ入手が困難、しかも価格的にも贋造の原料となる可能性の少ない果糖の試験を行うことは、ハチミツを試験する上に有利な1手段であると考えた。

ハチミツはブドウ糖、果糖 (各30~40%)、シヨ糖⁺⁾ 数%が含まれる。種々の糖類と共存する果糖の分離定量⁺⁾ には、重量法、比色法などが見られるが、微生物による定量法については報告を見ない。著者は最近児玉が発見した乳酸菌の1新種 *Lactobacillus fructosus strain* No. 353⁺⁺⁾ がその発育に果糖を特異的に要求する性質を応用して、ハチミツ中の果糖の定量を行いほぼ満足な成績を得た。そこで本法によって数10種の日本産ハチミツ中の果糖を定量し、他方アゾトメトリー法で果糖、ブドウ糖の総量をしらべ、両者の値からブドウ糖の量を算出し、日本産ハチミツ中の糖類について検討したのでこれらの成績を報告する。

実験の材料と方法

microbiological assay による果糖の定量

本法は下記菌種を用いる微生物定量法であるが、特に記載するものの他はビタミン、アミノ酸などの定量に用いられる microbiological assay 法の常法で行った。

接種菌種 *Lactobacillus fructosus strain* No. 353 を用いた。

培養液の組成 (double strength 100cc) は下記の通りである。

Casamino acid	1g	Guanine	4mg	PABA	100 γ
Glucose	3 "	Uracil	"	Niacinamide	200 "
Na acetate	1 "	Xanthine	"	Biotin	1 "
Cysteine	40mg	Thiamine	200 γ	Folic acid	100 "
Tryptophan	"	Riboflavin	"	Tween-80 ⁺⁺⁾	3 滴
Asparagine	20 "	Pyridoxal	400 "	A液, B液	各1cc
Ascorbic acid	100 "	Pyridoxine	"	水を加え全量を100cc(PH. 6.8) にする	
Adenine	4 "	Ca Pantothenate	200 "		

標準曲線 標準果糖 10~50mg/tube を数段階にわけて添加した。その1例をグラフに示す。

* 本研究は立岡末雄：有用天然物成分の研究 (Sueo Tatsuoaka : Studies on Useful Components in Natural Sources) の一部である。第9報本誌投稿中

** 生物試験法による生薬ならびに生薬方剤の研究その7：薬誌 76, 1143 (1956)

*** Juso-nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

1) 渡辺, 後藤：本誌投稿中

+) 日本産ハチミツについてペーパー・クロマトグラフィーでしらべたところ、これら以外にベンチジンによる呈色部は見られなかった。

2) 児玉：農化 30, 219, 224 (1956)

++) 菌学的研究については児玉礼次郎氏が農化に投稿中である。

++) 後藤, 川島, 辺見：薬誌 74, 527 (1954), を用いた。

培養温度と時間 35° で 40 時間培養した。

測定法 Coleman spectrophotometer (650m μ) で菌の増殖度をしらべた。

アプトメトリー法による糖 (果糖とブドウ糖との和) の定量

ハチミツを蒸留水でうすめ、推定糖量 20~100 γ /cc とし、山岸、横尾の報告による方法でしらべ、ブドウ糖換算値として求めた。

試料 当研究所に保存するハチミツ 2g を精秤し、蒸留水にかして全量を 40~80cc (PH.6.8) とし、その濾液の 1, 2cc を検液として加え常法により菌の増殖度から果糖の換算値を算出した。本実験に用いたハチミツは Table 4 に示す通りである。

実験結果ならびに考察

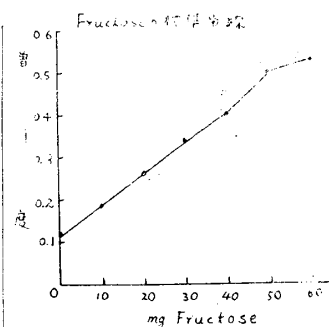
標準曲線ならびに検液の添加による菌の増殖度

3~5 本 1 組の試験管を用いて試験した成績の 1 例を Table 1 に示す。Table 1 から作製した標準曲線はグラフに示す通りである。

この成績が示す通り、1 組中の各試験管の測定値には 2, 3 の例外を除いては大差を認めなかった。天然ハチミツの希釈度を 1cc および 2cc 添加して得られる菌の増殖度と標準曲線とから求めた果糖の換算値はほぼ近い値を示した。

Table 1 標準果糖ならびに検液の添加による菌の増殖度

Fructose/tube		菌の増殖度 (Coleman spectrophotometer の読み)					平 均	
0 (mg)		0.14	0.12	0.14	0.125	0.12	0.129	
10		0.22	0.195	0.195	0.185	0.195	0.186	
20		0.28	0.265	0.265	0.25	0.265	0.265	
30		0.35	0.34	0.33	0.33	0.34	0.334	
40		0.36	0.355	0.38	0.38	0.39	0.38	
50		0.45	0.45	0.44	0.51	0.45	0.46	
ハチミツ (×20)								
								Fructose 換算値 (mg)
								Fructose %
No. 22	1(cc)	0.255	0.245	0.255	0.235	0.25	0.248	16
	2	0.35	0.35	0.35	0.36	0.35	0.35	34
No. 23	1	0.245	0.25	0.24	0.245	0.23	0.241	16
	2	0.335	0.36	0.36	0.36	0.36	0.355	34
No. 25	1	0.275	0.265	0.30	0.265	0.265	0.274	21
	2	0.40	0.38	0.375	0.365	0.375	0.378	37.5
No. 26	1	0.28	0.265	0.245			0.263	20
	2	0.39	0.40	0.39	0.39		0.392	39.5



培養時間の差異による測定値の変化

同一検液について、培養時間をそれぞれ 20, 32, 70 時間とした際、定量値がどうかかわるかをしらべ、Table 2 の成績を得た。

Table 2 培養時間の差異による試験値の変化

検体番号	培 養 時 間 (35°)			Recovery (%)	
	3 2 hr	2 0 hr	7 0 hr	2 0 hr	7 0 hr
22	32 ~ 35(%)	30 ~ 36(%)	32 ~ 36	107	95
23	32 ~ 35	32 ~ 33	36 ~ 38	114	93
25	37 ~ 42	36 ~ 44	38 ~ 44	100	80
26	39 ~ 40	32 ~ 38	32 ~ 36	115	124

3) 山岸、横尾：薬誌 **74**, 958 (1954)

Table 2 に示す通り, No. 26 ではやや大きい差異を示したが他のものではその差異が $\pm 10\%$ 以内である. 32時間培養ではその回収率は 90~110%であったが, 20および70時間ではふれの大きいものが見られた. 著者は 32~48時間培養後測定して好成績を得ている.

ブドウ糖, ショ糖, 麦芽糖による菌の増殖

ハチミツに添加したり, あるいは人工ハチミツの原料となる可能性の考えられる糖類についてしらべ Table 3 の成績を得た.

Table 3

ブドウ糖, ショ糖, 麦芽糖による菌の増殖度

糖 類	添加量/tube	菌の増殖度 (比濁計の読み)
果 糖	0(mg)	0.085
	10	0.155
	30	0.380
ハチミツ (× 20)	1(cc)	0.21
	2	0.37
ブドウ糖	50(mg)	0.085
	100	0.075
シ ヨ 糖	50	0.10
	100	0.10
麦 芽 糖	50	0.085
	100	0.095

註) 培養時間は32時間である.

前に述べた通り, ハチミツの試験は20~40倍希釈 1, 2 cc を検液として行われた. この際検液中に共存するブドウ糖, ショ糖は, 20~10mg および 5mg 以下となる. 50~100mg の糖類の添加は, 偽造ハチミツがこれらの糖のみによって贗造された際の試験を意味するが Table 3 の成績が示す通り果糖, ハチミツ以外のどの糖でも菌の発育はほとんど見られなかった.

日本産ハチミツ中の果糖ならびにブドウ糖含量

bioassay とアプトメトリーによる試験成績とから, 各種ハチミツ中の果糖, ブドウ糖をしらべ Table 4 の成績を得た.

Table 4 の成績を要約すると次の通りである.

1) 26種類の日本産ハチミツ中の果糖含量は 33~44%, 平均36%を示した. この値は従来報告されている外国産ハチミツ中の果糖含量とほぼ等しい.

2) 果糖とブドウ糖との含量比は一般に果糖がブドウ糖にくらべてわずかに多い.

3) 果糖, ブドウ糖の含量ならびにそれらの割合は, 採集地貯蔵年数とは関係がないようである.

Table 4

日本産ハチミツ中の果糖, ブドウ糖

検体番号	蜜源植物	採集地	採集期	Fructose (%)	Fructose + Glucose (%)	Glucose (%)
10	レンゲソウ	滋賀	1953	36	64	28
4	"	山口	1954	44	78	34
9	"	滋賀	"	35	63	28
32	"	岐阜	"	34	75	41
23	"	滋賀	1955	35	65	30
25	"	富山	"	40	71	31
27	"	岐阜	"	36	77	41
	平均			37	70	33
14	トチノキ	秋田	1954	34	63	29
29	"	新潟	"	36	91	55
19	"	岐阜	1955	34	58	24
28	"	秋田	"	40	59	19
	平均			36	68	32
33	ナタネナ	岐阜	1956	34	75	41
34	"	"	"	33	78	45
35	"	滋賀	"	36	91	57

	平 均			34	81	48
6	ア カ シ ヤ	北 海 道	1952	38	73	35
16	〃	〃	〃	39	66	27
24	〃	秋 田	1955	36	79	43
	平 均			38	73	35
17	シ ナ ノ キ	北 海 道	1952	34	76	42
37	不 明	不 明	1954	36	66	30
36	ソ ヨ ゴ	山 口	〃	41	73	32
38	不 明	不 明	1955	36	76	40
20	カ キ	富 山	1954	34	66	32
21	ネ ギ	北 海 道	〃	36	73	37
22	ア ザ ミ	〃	〃	33	71	38
26	雑 草 (木)	滋 賀	1955	40	77	37
30	〃	北 海 道	1954	34	70	36

4) 蜜源植物によって分類すると、個々のハチミツ中の含量にかなりのばらつきが見られるが、平均値における果糖含量は、アカシヤ、レンゲソウ、トチノキ、ナタネナの順に多く、また果糖とブドウ糖との和ではナタネナ、アカシヤ、レンゲソウ、トチノキの順に、またブドウ糖含量ではナタネナが特に多く、アカシヤがこれにつぎ、レンゲソウ、トチノキは相等しい。

5) 蜜源植物によって分類したハチミツ中の果糖とブドウ糖との比率 (fructose/glucose) はレンゲソウ、トチノキでは 1.12、アカシヤは 1.08 であるが、ナタネナのみは 0.7 でブドウ糖がより多い。

以上の通り著者は果糖による微生物の増殖を応用してハチミツ中の果糖をしらべ、その品質を判定する方法について報告した。もちろん本報に用いた菌種は最近発見されたものであり、これを天然物の試験に応用するにはさらに検討すべき点があるかとも思うが、少なくとも現在ハチミツ中の果糖の試験に用いられている方法にくらべて、多数の試料を同時に試験し得る点で採用し得る方法であろう。さらにアゾトメトリー法を応用して糖類を検討したが、これらの成績は日本産ハチミツ中の糖類を考察する上に有意義であると考え。

終りに終始御指導御鞭撻を賜った朝比奈泰彦先生、研究所長桑田智博士に謹謝する。また有益な示唆と助言を与えられた主任研究員渡辺武博士、同田中邦喜博士、同大村栄之助博士および *L. fructosus* を恵与された兄玉礼次郎氏に謝意を表す。本研究に協力された野口、横尾、井上、堀内ならびに材料を提供された諸氏に深謝する。

武田薬品工業株式会社研究所 (昭和32年1月19日受理)