

## 納豆の粘質物に関する研究 (第2報)

田口 邦子・河端 信

### Studies on Natto Mucilage (Part II)

KUNIKO TAGUCHI and MAKOTO KAWABATA

In previous paper<sup>1)</sup>, the authors reported that Natto mucilage, an extracellular mucilage from bacterium *Bacillus subtilis var. natto* IFO 3335, is the glycopeptide containing polyuronide in its carbohydrate moiety.

On the basis of this finding, the authors investigated the relation between chemical composition of mucilage and its physicochemical properties. Since Pronase digestion of the Natto mucilage has no effect on the viscosity, it is evident that only carbohydrate moiety contributed to the viscosity.

Identification of uronic acid in Natto mucilage were carried out by column chromatography with Dowex-1 and by thin layer chromatography on Replate-50. The only uronic acid found in Natto mucilage was D-galacturonic acid.

It was also found that Natto mucilage binds metallic ions such as  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$ .

### 緒 言

著者らは前報<sup>1)</sup>において納豆の粘質物が酸性の糖ペプチドであることを報告した。

田中ら<sup>2)</sup>は1971年、第7回国際海藻学会において「アルギン酸が体内のストロンチウム、カドミウムなどの金属を吸着し、体外に排出させる作用がある。」と発表し、D. Waldron-Edward ら<sup>3)</sup>によってもアルギン酸ソーダをラットに経口投与するとカルシウムの骨への沈着量はそれほど減少せず、ストロンチウムの沈着量が大きく減少すること、同様の効果が果実に含まれるペクチン酸についても認められること、また、その選択的イオン交換作用は構成するウロン酸の組成比に密接な関係があることを報告している。さらに、人体実験によるアルギン酸の薬理効果については、R. Hesp ら<sup>4)</sup>や A. Sutton<sup>5)</sup>によって検討され、ストロンチウムの吸収抑制の顕著なことを明らかにし、とくにオリゴウロニドの効果のすぐれていることを確認している。

そこで、アルギン酸やペクチン酸と同じポリウロニドに属する納豆の粘質物にも同様の効果があるのではないかと推察した。

プロナーゼ分解を行なった試料につき、その化学組

成の分析、粘度測定を行ない、粘性に関与する因子を究明するとともに、ウロン酸の同定および金属捕足効果について検討したのでその結果を報告する。

### 実験材料および方法

納豆の製造および粘質物の分離調製は前報<sup>1)</sup>と同じ方法で行なった。

#### プロナーゼによる分解

粗粘質物 1 g を 200 ml の 0.01 M 酢酸カルシウムに溶解し、0.1 N 水酸化ナトリウムで pH 8.0 に調整する。ついで、プロナーゼ-P 20 mg を加え、37°C で 24 時間分解を行なう。分解後、1 N 酢酸で pH 4.5 に調整したのち、ロータリーエバポレータで 10 ml に減圧濃縮する。濃縮液に 10 倍量の 99% エタノールを加えてできた沈殿物を遠心分離して集める。この沈殿物を少量の水に溶解し、透析によりアルコールを完全に除いたのち、同容の 0.02 M 酢酸カルシウムを加え、さらに 0.01 M 酢酸カルシウムで 200 ml とし、ふたたび同様に分解操作を行ない、最後に 5 ml に減圧濃縮する。濃縮液には同容の 10% トリクロル酢酸を加えて沈殿を遠心分離して除く。

#### セファデックス G-25 によるゲルろ過

上記でえた試料液を 0.1 M 酢酸で透析したのち、0.1 M 酢酸を溶媒としてセファデックス G-25 のカラ

ム (2.5×40 cm) によるゲルろ過を行ない、フラクションコレクターで 10 ml ずつ分取し、各フラクションを糖をフェノール硫酸法<sup>6)</sup>、アミノ基をニンヒドリン反応<sup>7)</sup>により検出し、糖を含む画分を集め透析・凍結乾燥してプロナーゼ分解試料とする。

#### 化学組成の分析

全糖はフェノール硫酸法<sup>6)</sup>、ウロン酸はカルバゾール硫酸の改良法<sup>8)</sup>、アミノ糖は Cessi 法<sup>9)</sup>、総窒素は A.O.A.C. の micro-Kjeldahl 法<sup>10)</sup>、アミノ態窒素はニンヒドリン法<sup>7)</sup>で測定する。

#### 粘度測定<sup>11)</sup>

オストワルド粘度計を使用して pH を 6.0 から 11.0 まで変化させて各標準液体 (緩衝液) に対する相対粘度を次式により算出する。

$$\text{相対粘度 } (\eta_r) = \eta/\eta_0 = \rho t/\rho_0 t_0$$

$\rho$ : 密度

$t$ : 時間 (脚字  $0$  は溶媒に関する量)

なお、それぞれの pH は 6.0 から 8.0 は 0.05 M リン酸塩緩衝液、9.0 以上は 0.05 M 炭酸緩衝液を使用した。ウロン酸の同定

粗試料 80 mg を封管用試験管に採取し、2 ml の 2 N 硫酸で溶解して減圧封管ののち、110°C で 8 時間加水分解を行なう。分解液は炭酸バリウムを加えて中和し、遠心分離した上清をアンバーライト IR-120(H<sup>+</sup>) のカラムを通したのち約 10 ml に濃縮してカラムクロマトグラフィー用の試料液とする。

#### 1) カラムクロマトグラフィー<sup>12)</sup>

上記濃縮液を 0.02 M 水酸化ナトリウムで弱アルカリ性としてダウエックス-1 (200~400メッシュ、酢酸型、1.1×12 cm) のカラムに吸着し、0.15 M 酢酸を展開液としてクロマトグラフィーを行ない、各フラクションをフェノール硫酸法<sup>6)</sup> およびカルバゾール硫酸法の改良法<sup>8)</sup> で糖、ウロン酸の検出を行なう。標準としては、D-アラビノース、D-ガラクトース各 5 mg、D-ガラクトツロン酸、D-グルクロン酸各 10 mg を 0.02 M 水酸化ナトリウム 10 ml に溶解したものを同じ条件でクロマトグラフィーを行ない比較して同定した。

#### 2) 薄層クロマトグラフィー

カラムクロマトグラフィーにより分画したウロン酸を含む 2 番目のピーク部分を濃縮、減圧乾固後 0.2 ml の水に溶解しその 5  $\mu$ l をリプレート-50 (ヤマト科学製) にスポットし n-ブタノール:酢酸:水 (10:3:7, v/v/v) を展開液として約 2 時間室温で展開する。発色剤はナフトレゾルシン-トリクロル酢酸液<sup>13)</sup> を用い、標準の D-ガラクトツロン酸、D-グルクロン酸各 10  $\mu$ g を同時に展開、発色してその R<sub>f</sub> 値から同定した。

#### 金属結合能

##### 1) アンバーライト IR-120(H<sup>+</sup>) による前処理<sup>14)</sup>

7%試料液をアンバーライト IR-120(H<sup>+</sup>) のカラム (3×20 cm) に通し試料自体に結合している金属を除き凍結乾燥し粉末試料をえる。

##### 2) 金属結合量の測定

1%試料液と 1%金属塩溶液 (CaCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub> および FeCl<sub>3</sub>) を各 10 ml ずつ混合してマグネチックスターラーで 2 時間攪拌したのち Visking の透析膜に入れ、外液に Cl<sup>-</sup>反応がなくなるまで透析し、内液を凍結乾燥して金属結合試料をえる。

金属結合試料を 100~150 mg 採取し、次のそれぞれの方法で結合した金属量を測定し、試料 100 g に結合した金属量として表わした。なお灰化は硝酸-過塩素酸による湿式法で行なった。

カルシウム 灰化した試料を 1~2 ml の 2 N 塩酸で溶解し、一定容としたのち中性溶液 50 ml について NN 指示薬による EDTA 滴定法<sup>15)</sup>で測定する。

カドミウム 灰化した試料を 1~2 ml の 2 N 塩酸で溶解し、一定容としたのち中性溶液についてジチゾン-クロロホルムによる比色定量法<sup>16)</sup>で測定する。

水銀 希釈した試料液一定量 (1  $\mu$ g 以下) をとり還元気化法を用いた分光分析法<sup>17)</sup>にて測定する。

鉄 灰化した試料を 2 N 塩酸 1~2 ml で溶解し、バリアミンブルー-Bを指示薬とする EDTA 滴定法<sup>18)</sup>で測定する。

### 実験結果および考察

#### プロナーゼによる分解

プロナーゼ分解後の粘質物をセファデックス G-25 によりゲルろ過した結果を Fig. 1 に示す。ニンヒドリン反応のピークがかなり後の方に溶出されることから、プロナーゼ分解によりペプチド鎖が切れて低分子のアミノ酸となり糖部分と明瞭に分離したことがわかる。この高分子の糖を含むピーク部分を集め透析、凍結乾燥して粉末試料をえ、プロナーゼ分解粘質物とした。その化学組成の分析結果を分解前の粘質物と比較した結果を Table 1 に示す。この結果からもプロナーゼ分解によりペプチド部分がかなり除かれて糖部分と分離したことがわかる。

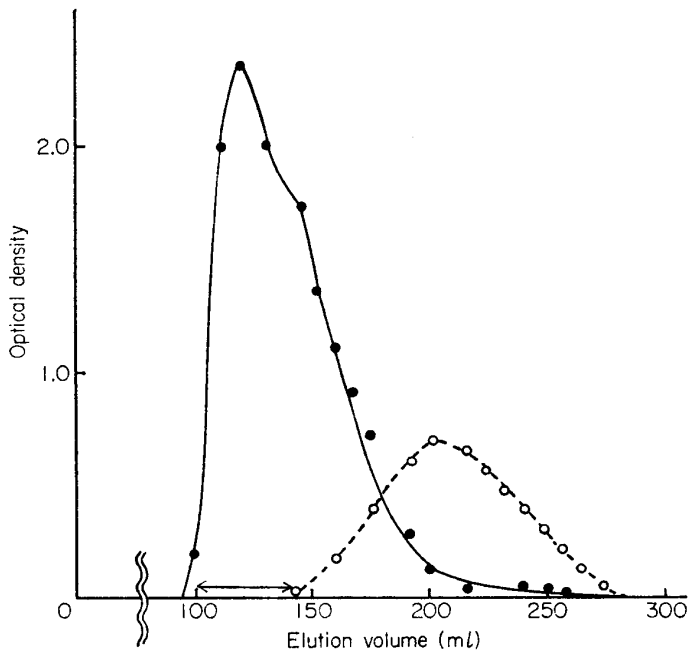
#### 粘度測定

試料 10 mg を溶媒 10 ml に溶解し、その 7 ml を粘度計に入れ 20°C の恒温槽に 10 分間保ったのち、液を吸い上げて液面が一定区間流れ落ちるに要する時間を測定した。溶媒は各緩衝液を使用し、pH 6.0 から 11.0 まで変化させてこの操作を繰り返し、それぞれの

**Table 1** Composition of Natto Mucilage Fractions obtained before and after Digestion with Pronase-P

Constituent	Natto Mucilage		Methods of Analysis
	Original wt %	Pronase Digest wt %	
Total Sugar <sup>a)</sup>	61.5	74.1	Phenol-sulfuric acid method (6)
Uronic Acid <sup>b)</sup>	20.4	21.2	Carbazol-sulfuric acid method (8)
Amino Sugar <sup>c)</sup>	2.8	2.9	Cessi's method (9)
Amino Nitrogen <sup>d)</sup>	2.8	1.2	Ninhydrin value (7)
Total Nitrogen	4.1	0.3	AOAC micro-Kjeldahl (10)

- a) Mixture of Galactose and Arabinose (1 : 1 by weight) was used as standard.
- b) D-Galacturonic acid was used as standard.
- c) Determined as D-Glucosamine.
- d) L-Alanine was used as standard.



**Fig. 1** Gel Filtration of Pronase-P Digest of Natto Mucilage

Pronase digest was applied to a Sephadex G-25 column (2.5 × 40 cm).

Equilibration and elution were carried out with 0.1 M acetic acid and fractions indicated by (←→) were collected.

●—● : Total sugars, by phenol-sulfuric acid method (O.D. at 490 nm).

○···○ : Amino compounds by ninhydrin color (O.D. at 570 nm).

標準液体 (緩衝液のみ) に対する相対粘度を求めた。pH による差はあまり顕著に現われず, pH 7.2 から 7.6 でやや高い値を示した。

つぎに, 粘性に影響を与える因子を知るため, pH

7.4 における各精製段階での相対粘度を測定した結果, ゲルろ過粘質物およびプロナーゼ分解粘質物において粗粘質物の値より低下していない事実より, セファデックス G-100 によって除かれた分子の小さい画分およびプロナーゼ分解で分離したペプチド部分は粘性に関与せず, 分子の大きい糖部分が粘性に関与していることがわかった。

ウロン酸の同定

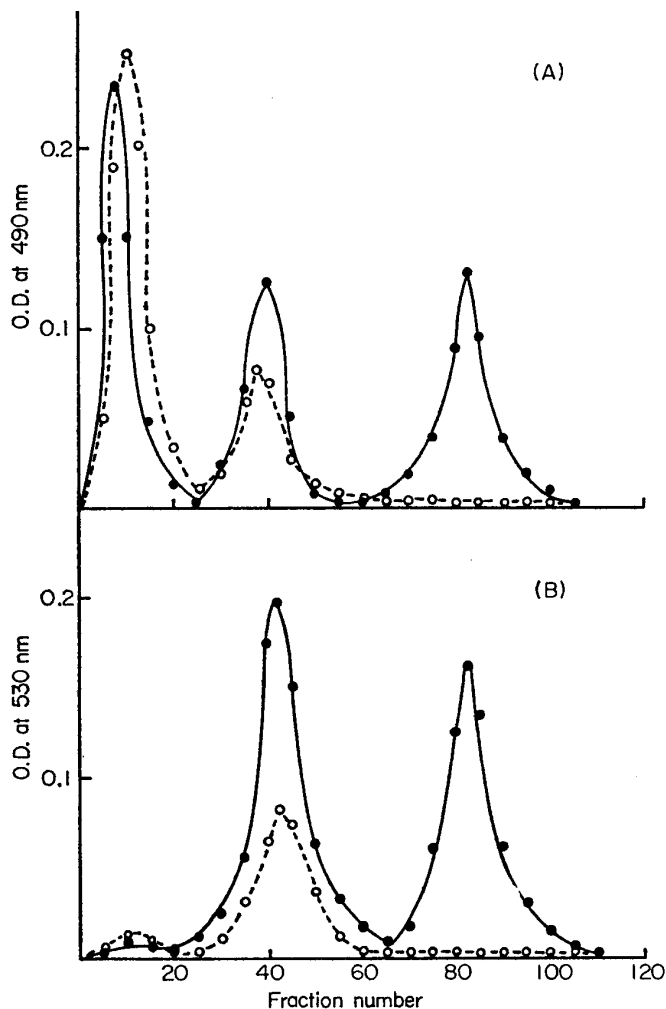
加水分解した粘質物をダウエックス-1 を用いてカラムクロマトグラフィーを行ない中性糖と分画し, ウロン酸の同定を行なった結果を Fig. 2 に示す。吸着されない中性糖以外に溶出されるただ1つのピークは標準の2番目のピークと一致することから, 構成するウロン酸としてガラクトン酸を確認した。

さらに, この画分について薄層クロマトグラフィーを行なった結果を Fig. 3 に示す。試料のスポットは標準のガラクトン酸のスポットと Rf 値が一致し, 別に行なったペクチンのウロン酸の Rf 値とも一致したのでガラクトン酸であることが確認された。

ペクチンのウロン酸もガラクトン酸のポリマーであることから, 同様に納豆の粘質物にも金属捕捉効果を期待することができる。

金属結合能

粘質物が金属をどれだけ結合することができるかを知るため, アンバーライト IR-120(H<sup>+</sup>) 処理した試料とカルシウム, カドミウム, 水銀および鉄の各金属塩溶液を混合攪拌する方法で結合した金属の量を測定した結果を Table 2 に示す。それぞれの金属について結合能の違いはあるが, いずれにおいても結合することがわかった。



**Fig. 2** Column Chromatogram of Natto Mucilage Acid Hydrolyzate on Dowex-1 for Identification of Uronic Acid

Column size, 2.5×40 cm; flow rate, 2.0 ml/min.

The column was equilibrated and eluted by 0.15 M acetic acid.

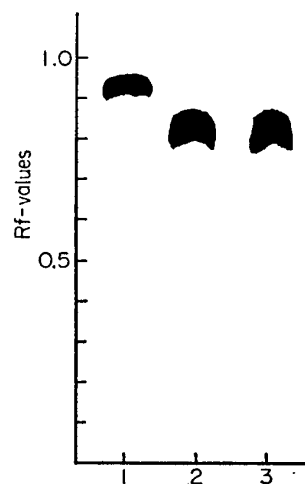
(A) Detection of total sugar by phenol-sulfuric acid method.

(B) Detection of Uronic acid by carbazol-sulfuric acid method.

●—● Standard; Mixture of Arabinose (5.0 mg), Galactose (5.0 mg), Galacturonic acid (10 mg) and Glucuronic acid (10 mg) was dissolved in 10 ml of 0.02 M NaOH.

○---○ Sample; Natto Mucilage was hydrolyzed with 2 N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 110°C for 8 hours.

アルギン酸に薬理効果のあるのは、そのイオン交換性を持っているとともに、そのナトリウム塩は水溶性であるが、腸内で2価以上の金属と結合して水に溶けがたい巨大分子のアルギン酸金属塩をつくり、体内に吸収されずに体外に排出させるためと考えられている。



**Fig. 3** Thin Layer Chromatogram of Uronic Acids from Acid Hydrolyzate of Natto Mucilage on Replate-50

The solvent system used was n-butanol-acetic acid-water (10 : 3 : 7, v/v/v) and developed at room temperature.

Uronic acid were visualized by spraying naphthoresorcinol-trichloroacetic acid followed by heating for 15 min. at 70-80°C in a moist atmosphere.

1; Glucuronic acid

2; Galacturonic acid

3; Uronic acid of Natto Mucilage obtained from the second peak (Fig. 2A) of Dowex-1 column chromatography.

**Table 2** Metal Binding Capacity of Natto Mucilage

Metal Ions	Bound Metal g of Metal/100 g of Mucilage
Ca <sup>2+</sup>	3.2
Cd <sup>2+</sup>	7.6
Hg <sup>2+</sup>	6.5
Fe <sup>3+</sup>	6.8

One per cent solution of Natto Mucilage in water was mixed with 1% Metal chlorides (CaCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> and FeCl<sub>3</sub>) and the mixture solutions were dialysed against water until free of Cl<sup>-</sup> ion.

また、褐藻類の種類の違いによるイオン交換量の違い<sup>19)</sup>は、ウロン酸の組成比すなわちアルギン酸における M/G 比 (D-マンヌロン酸と L-グルロン酸の割合) に密接な関係を持ち、グルロン酸の含量の多いほど Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> よりも Sr<sup>2+</sup> に対するイオン交換量が大きいとされているが、ガラクトuron酸のみからなるペクチン酸も Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> に対するイオン

交換の選択性において、アルギン酸とはほぼ同じ傾向を持っている<sup>3)</sup>ことから、納豆粘質物についても薬理効果やイオン交換量において同様の効果を期待することができ、Ca<sup>2+</sup>などの有用金属の骨への沈着を妨げずに他の金属を吸収抑制して金属公害の防止に役立つ有益な食物ではないかと考えられる。

### 要 約

1. 前報でえられた粘質物のプロナーゼ分解を行ない、セファデックス G-25 によるゲルろ過によりペプチド部分を除き、糖部分を精製分離した。
2. ペプチド部分は粘性に関与していないことがわかった。
3. 粘度は pH 7.2 から 7.6 において高い値を示した。
4. 粘質物を構成するウロン酸はガラクトuron酸のみであることが、カラムクロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィーによって確認された。
5. 粘質物には Ca<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> および Fe<sup>3+</sup> などの金属イオンを結合する力のあることがわかった。

(1974年7月29日受理)

### 文 献

- 1) 林 義男・河端 信・田口邦子：京都府大学術報告理学・生活科学, **22**, 13 (1971).
- 2) Y. Tanaka, K. C. Hong and S. C. Skoryna: VII International Seaweed Symposium, August 8-12 (1971).
- 3) D. Waldron-Edward, T. M. Paul and S. C. Skoryna: *Nature*, **205**, 1117 (1965).
- 4) R. Hesp and B. Ramsbottom: *Nature*, **208**, 1341 (1965).
- 5) A. Sutton: *Nature*, **216**, 1005 (1967).
- 6) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 7) S. Moore and W. H. Stein: *J. Biol. Chem.*, **176**, 367 (1948).
- 8) T. Bitter and H. M. Muir: *Anal. Biochem.*, **4**, 330 (1962).
- 9) C. Cessi and F. Piliego: *Biochem. J.*, **77**, 508 (1960).
- 10) W. Horwitz, "Method of Analysis of the AOAC", 11th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, 1970, p. 858.
- 11) 渡辺 格・島内武彦：生物物理化学実験法, 35 (1965) 培風館。
- 12) J. X. Khym and D. G. Doherty: *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 3199 (1969).
- 13) E. Stohl, "Thin Layer Chromatography," 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1969, p. 888.
- 14) R. L. Whistler, "Methods in Carbohydrate Chemistry," Vol. V, Academic press Inc., New York, 1965, p. 61.
- 15) 上野景平：キレート滴定法, 227 (1965) 南江堂。
- 16) B. E. Saltzman: *Anal. Chem.*, **25**, 493 (1953).
- 17) W. R. Hatch and W. L. Ott: *Anal. Chem.*, **40**, 2085 (1968).
- 18) 上野景平：キレート滴定法, 259 (1965) 南江堂。
- 19) Y. Enomoto and R. Ichikawa: *J. Rad. Res.*, **9**, 26 (1968).