

## 水産ねり製品の褐変についてVII

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	藤田, 八束 松本, 寿子 松田, 敏生
巻/号	44巻6号
掲載ページ	p. 643-651
発行年月	1978年6月

## 水産ねり製品の褐変について—VII

*Enterobacter cloacae* UFF-107 による褐変前駆物質の生成機構\*1

藤田 八束・松本 寿子・松田 敏生

(1977年12月3日受理)

## On the Brown Discoloration in Fish Jelly Products—VII

The Mechanism of Browning Precursor Production by *Enterobacter cloacae* UFF-107

Yatsuka FUJITA\*2, Toshiko MATSUMOTO\*2, and Toshio MATSUDA\*2

The brown discoloration by microorganisms in fish jelly products is very interesting as a reaction involved in the microbial deterioration of foods. In this paper, the mechanism of brown discoloration caused by the microorganism *Enterobacter cloacae* UFF-107 was studied, and the following results were obtained.

1. The browning precursor which was participating in the reaction with various amino acids or proteins to form the brown substance was confirmed to be formed from glucose or 2-ketogluconic acid by intact cells of *E. cloacae* UFF-107.

2. We tried to isolate the browning precursor from the fermented liquid containing glucose. This was not successful because the browning precursor was very unstable and decomposed very easily. So, we attempted to isolate it according to KATZNELSON *et al.*, AIDA *et al.*, or KONDO's method. By use of this method, Ca-2,5-diketogluconate was isolated from the fermented liquid containing Ca-2-ketogluconate. The obtained substance was a pale yellow Ca-salt. The aqueous solution containing the Ca-salt and glycine formed a brown substance when it was heated for 1 minute at 100°C or incubated for 1 hour at 37°C.

3. We tried to detect the Ca-salt by descending paper chromatography using a solvent system of water saturated isobutylic acid. The R<sub>F</sub> value was 0.52. KATZNELSON *et al.* or HENDERSON *et al.* reported that the R<sub>F</sub> value for this compound was 0.54 or from 0.57 to 0.61. With *p*-anisidine hydrochloride as a developing agent, the Ca-salt appeared as a pale yellow spot. This Ca-salt reduces FEHLING's solution and ammoniacal silver nitrate in the cold. PINOFF's reaction, SELIWANOFF's reaction, and sodium nitroprusside reaction were all positive. The ferric chloride reaction and orcinol test was negative.

These results agreed well with those reported by KATZNELSON *et al.* and AIDA *et al.* The preparation obtained from the fermented liquid of *Gluconobacter melanogenus* IAM-1836 showed a behavior similar to that of Ca-2,5-diketogluconate. From these data, The browning precursor obtained was identified as 2,5-diketogluconic acid.

4. *Gluconobacter suboxydans* IAM-1829, *G. gluconicus* IAM-1815, *G. melanogenus* IAM-1836, and *G. melanogenus* IAM-1822 were inoculated individually into broth media containing glucose, and were incubated for 2 days at 30°C. After incubation, various amino acids or proteins were then added to the culture media. Only the culture media fermented by *G. melanogenus* IAM 1836 or *G. melanogenus* IAM-1822 formed a brown substance when heated at 100°C for 7 minutes.

水産ねり製品においては、適度の弾性(あし)と外観上の彩色が重要視されるが、これを水分特性からみる場合は、いわゆる高水分食品に区分され、本質的には変質・変敗しやすい食品である。一方、近年包装技術の進

展もあつて、包装加熱され貯蔵性の附与された形態の包装かまぼこ類が生産されるようになり、ねり製品の変質・変敗形式は多様化してきた。

本研究における水産ねり製品の褐変現象は、製品を常

\*1 本研究は昭和 51 年 4 月 3 日日本水産学会春季大会(東京)において発表した。

\*2 上野製菓研究所 (Food Department, Research Laboratories, Ueno Fine Chemical Industries LTD., 1-127, Higashi Arioka, Itami City, Japan).

温に保蔵した場合数日以内に、特に夏期の高温・多湿期では一夜の内に表面の一部が褐色に着色してくる現象であつて、この現象については先に“保蔵中に発現する褐変現象”として報告したが<sup>1,2)</sup>、これに対して包装後の製品の加熱処理、あるいは消費者による調理段階での加熱により瞬時に製品の表面にしみ状に褐変が発生する現象もみられ、これについては、別に“再加熱による褐変現象”として報告した<sup>3)</sup>。また以上の報告において、これら両褐変現象は汚染微生物に起因する現象であることを明らかにした。このような著者らの報告は、本現象を細菌に起因する現象と報告した小川らの説<sup>4,5)</sup>を支持するもので、さらに褐変原因菌として小川らが分離・報告した *Achromobacter brunificans* AJ-3230<sup>4)</sup> の他に *Serratia marcescens* UFF-115<sup>3)</sup> と *Enterobacter cloacae* UFF-107<sup>3)</sup> を追加して本現象が細菌学的に一元的なものではなく、多元的なものであることを明らかにしたものである。

このような微生物の関与するねり製品の褐変現象については小川ら<sup>4,5)</sup>、森ら<sup>7)</sup>、の報告があるに過ぎないが、その機構については未だ明らかにされていない。

また、先報<sup>3)</sup>では褐変原因菌 *E. cloacae* UFF-107 を供試して水産ねり製品の褐変機構を検討し、その結果褐変反応にかかわる直接的原因は、ねり製品に添加されたブドウ糖あるいは蔗糖が原因菌によつて代謝され、その代謝産物としてアミノ酸やたん白質と容易に反応して褐変物質を形成する“褐変前駆物質”が生成されることによることを解明し、さらにこの褐変前駆物質はイオン交換樹脂による吸着試験、薄層クロマトグラフィーによる化学的定性試験などの結果から、ケト酸の一種であろうと推定した。そこで、この褐変前駆物質と考えられるケト酸を究明することは、本ねり製品の褐変機構の解明にきわめて重要と考え、本報ではこの点について検討を行ったので、その結果について報告する。

## 実験方法

**2-ケト・グルコン酸カルシウム塩からの褐変前駆物質の生成** ブレインハート・インフュージョンブイオン末(日水製薬) 10 g を蒸留水 800 ml に、別にブドウ糖 50 g を蒸留水 200 ml に溶解し、両液をそれぞれ 120°C・15 分間滅菌、冷却後混合し、これを基礎培地 (pH 7.2) として供試した。

基礎培地 1,000 ml に、あらかじめ普通寒天斜面培地で前培養した *E. cloacae* UFF-107 の 1 白金耳量を、少量の滅菌生理的食塩水に懸濁して、その全量を接種し、30°C で 2 日間振盪培養を行った後、遠心 (15,000×g, 15 分, 0°C) により集菌した菌体を、滅菌生理的食塩水で 2 回、さらに蒸留水で 1 回洗滌し、約 2 g (湿重量)

の洗滌菌体を得た。

次に、この全洗滌菌体を 0.2% (w/v) 2-ケト・グルコン酸カルシウム溶液 400 ml に懸濁させ、その 50 ml 宛を坂口フラスコ 7 本に分注し、N-NaOH あるいは N-HCl で pH を 8.0, 7.0, 6.5, 6.0, 5.5, 5.0, および 4.0 に修正した後、30°C で 7 時間振盪しながら十分反応させた後、遠心して除菌し、得られた上澄液を 10 ml 宛 18×180 mm の試験管に分注、それぞれグリシン 1 g 宛を添加・溶解して沸騰水中で 7 分間加熱後、水道水で冷却し、490 nm における吸光度<sup>9)</sup>を測定して着色度の比較を行った。

次に、上記の反応液の内 pH 5.0 区の遠心上澄液ならびに基礎培地に *E. cloacae* UFF-107 の 1 白金耳を接種し、30°C で 2 日間振盪培養した後、遠心して得た上澄液について、それぞれ薄層クロマトグラフィー (展開層、シリカゲル F<sub>254</sub>, メルク社; 展開溶媒、*n*-ブタノール:アセトン:水=4:3:1, v/v/v) による展開後 (15 cm), 十分風乾し、2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride 溶液<sup>10)</sup>とグリシン溶液<sup>9)</sup>で発色させ、各スポットの比較を行った。

**褐変前駆物質としての 2,5-ジケト・グルコン酸カルシウム塩の分離とその化学的定性試験** 前記と同様の方法で得た *E. cloacae* UFF-107 の洗滌菌体 2 g (湿重量) を、0.2% (w/v) 2-ケト・グルコン酸カルシウム溶液 300 ml に懸濁し (この時、溶液の pH は 4.8~5.0 となる)、30°C で 7 時間振盪しながら反応させた後、その遠心上澄液を凍結乾燥して得た微黄色の粉末 (300 mg) を少量の蒸留水に溶解し、3~5 倍量のメタノールを加えて沈澱させ、淡黄色の Ca-塩を得た。なお、本 Ca-塩は吸湿性が高く、かつきわめて不安定であつた。

次に、この Ca-塩について KATZNELSON ら<sup>11)</sup>、近藤ら<sup>12)</sup>の方法に従つて過沃素酸分割を行った。すなわち、本 Ca-塩の約 100 mg を 20 ml の水に溶解し、これを 20 ml の水に溶解した過沃素酸ナトリウム 400 mg を加えて良く混合し、密栓・遮光して一昼夜氷室に放置して反応を完結させた後、反応液を分液漏斗に移し、エーテルを加えて良く振盪し、エーテル層を分取し、さらに不溶部にエーテルを加えて同様の操作を数回繰り返して、分取した全エーテル層を合して、これよりエーテルを留去、残液について薄層クロマトグラフィー (展開層、アピセル SF, フナコシ薬品) を行った。すなわち、*n*-ブタノール:アセトン:水=4:3:1 (v/v/v) の混合溶媒で展開し、B.T.B. 溶液<sup>13)</sup>で発色させ、同時に展開したグリコール酸、蔞酸および蟻酸を対照に R<sub>f</sub> 値の比較を行った。また本 Ca-塩について、フェーリング溶液とアンモニア性硝酸銀溶液の冷時還元性試験、PINOFF 反応、SELIWANOFF 反応、ニトロプルシッドナトリウム反応、

塩化第二鉄溶液反応、オルシノール試験などの 2, 5-ジケト・グルコン酸の同定法に関する化学的定性試験<sup>13)</sup>を行つた。

次に、本 Ca-塩の 0.4% (w/v) 水溶液を 10 ml 宛分注した各試験管中に、Table 2 に示したアミノ酸もしくはたん白質のそれぞれ 1 種類を 1 g 宛加えて混合し、37°C で 1~3 時間インキュベートすると共に、別に同様の混合液を沸騰水中で 7 分間加熱し、これらの混合溶液の褐変度を肉眼的に観察した。すなわち、全く褐変しなかつたものを (-)、淡黄色を帯びたものを (±)、褐色を帯びたものを (+)、黒褐色を帯びたものを (++) と判定した。

***Gluconobacter melanogenus* IAM-1836 による 2, 5-ジケト・グルコン酸カルシウム塩の調製とその褐変反応の検討** 基礎培地 1,000 ml に *G. melanogenus* IAM-1836 の前培養菌体の 1 白金耳量を接種し、30°C で 2 日間振盪培養を行つて前記と同様の方法で約 3 g (湿重量) の洗滌菌体を得、得られた洗滌菌体を 0.2% (w/v) 2-ケト・グルコン酸カルシウム水溶液 300 ml に懸濁して 30°C で 7 時間振盪しながら反応させた後、その遠心上澄液を凍結乾燥して得た微黄色の粉末を少量の蒸留水に溶解し、さらに 3~5 倍量のメタノールを加えて淡黄色 Ca-の塩を得た。この Ca-塩について KATZNELSON<sup>11)</sup>、相田<sup>14)</sup>の 2, 5-ジケト・グルコン酸の同定法に従つてフェーリング溶液とアンモニア性硝酸銀溶液の冷時還元性、PINOFF 反応、SELIWANOFF 反応、ニトロプルシッドナトリウム反応、塩化第二鉄反応、オルシノール試験などの化学的定性試験<sup>13)</sup>を行つた。

次に、本 Ca-塩について前記と同様に KATZNELSON<sup>11)</sup>、近藤<sup>12)</sup>の方法に従つて過沃素酸分割を行つた。

また、本 Ca-塩の 0.4% (w/v) 水溶液の各 10 ml に Table 4 に示したアミノ酸もしくはたん白質のそれぞれ 1 種類を 1 g 宛加えてよく混合し、37°C で 1~3 時間インキュベートし、一方同様の混合液を沸騰水中で 7 分間加熱し、前記同様にそれらの褐変度を肉眼的に観察した。

***Gluconobacter melanogenus* IAM-1836, *G. melanogenus* IAM-1822, *G. suboxydans* IAM-1829 および *G. gluconicus* IAM-1815 によるブドウ糖加液体培地における褐変前駆物質の生成** ブドウ糖 5 g, 酵母エキス 0.2 g, NH<sub>4</sub>Cl 0.1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05 g を蒸留水 100 ml に溶解し、pH を 7.0 に修正、120°C · 15 分間滅菌して培養液として供試した。すなわち、上記の各供試菌株をそれぞれ培養液 100 ml に接種、30°C で 5 日間振盪培養し、遠心して得た各上澄液を 18×180 mm の試験管に 10 ml 宛分注し、Table 5 に示したアミノ酸もしくはたん白質のそれぞれ 1 種類

を 1 g 宛添加・混合した後、沸騰水中で 7 分間加熱し、褐変の発現を観察した。

また、各上澄液についてケト酸の生成を確認するため KATZNELSON<sup>11)</sup>、相田<sup>14)</sup>の方法に従つてペーパークロマトグラフィーを行つた。すなわち、展開用濾紙として東洋濾紙 No. 50、展開溶媒として水飽和イソ酪酸を用いて降下法によつて一昼夜展開し、十分に風乾した後 aniline hydrogen oxalate 溶液<sup>10)</sup>を噴霧して発色させケト酸の生成を確認した。

## 実験結果

**2-ケト・グルコン酸カルシウム塩からの褐変前駆物質の生成** 前報<sup>9)</sup>までの研究結果から、本褐変反応の原因物質としてグルコン酸より生成されるケト酸が推定されたので、*Enterobacter cloacae* UFF-107 における、その生成能について検討した。

*E. cloacae* UFF-107 の洗滌菌体を 2-ケト・グルコン酸カルシウム溶液に懸濁し、その pH を 4.0~8.0 範囲に種々調整し、30°C で 7 時間反応させた後、遠心して得た各上澄液にグリシンを各 1 g 宛添加し、沸騰水中で 7 分間加熱した結果、各混合液は Fig. 1 に示したような吸光値を示した。

すなわち、褐変は反応液の pH によつて影響され、pH 7.0 以上のアルカリ側では殆んど発現せず、酸性側、特に pH 5.0 において最も強い褐変が観察された。

次に、褐変が最も強く発現した上記 pH 5.0 区の遠心上澄液、ならびに基礎培地に *E. cloacae* UFF-107 を接種後、30°C で 2 日間振盪培養を行つた培養液の、遠心上澄液について、それぞれ薄層クロマトグラフィーを行い、2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chloride 溶液とグリシン溶液で発色させて各スポットの比較を行つた。その結果 Fig. 2 にみられるように基礎培地中のブドウ糖から生成された褐変前駆物質 (C の Rf 値 0.05 のス

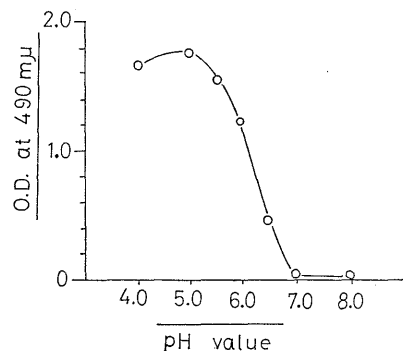


Fig. 1. Effect of pH value on the production of browning precursor from Ca-2-keto-gluconate by *Enterobacter cloacae* UFF-107.

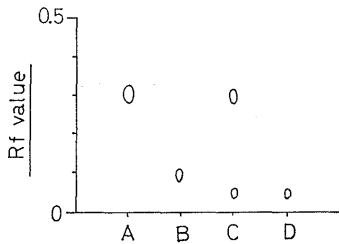


Fig. 2. Thin layer chromatogram of browning precursor from Ca-2-ketogluconate by *E. cloacae* UFF-107.

A, glucose solution; B, Ca-2-ketogluconate solution; C, cultured medium containing glucose; D, Ca-2-ketogluconate solution incubated with cell suspension of *E. cloacae* UFF-107 for 7 hours at 30°C.

Each sample was tested by silicagel F 254 thin layer chromatography, using a solvent mixture consisting of 4 volumes of *n*-butanol, 3 volumes of acetone and 1 volume of water. After drying, it was sprayed with 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride solution or glycine solution.

ポット) と上記 pH 5.0 区の上澄液すなわち 2-ケト・グルコン酸カルシウム溶液 (D) から生成された褐変前駆物質は Rf 値 0.05 で全く一致した。

以上の結果はブドウ糖から生成される褐変前駆物質と 2-ケト・グルコン酸カルシウム塩から生成される褐変前駆物質が同一のものであることを示すものと考えられる。

**褐変前駆物質としての 2, 5-ジケト・グルコン酸カルシウム塩の分離とその化学的定性試験** これまでの結果と細菌による糖の資化に関する既往の文献<sup>11, 15-17)</sup> から、褐変前駆物質として、2, 5-ジケト・グルコン酸が疑われることから、前記の方法により本物質の分離試験を試みた。

すなわち、2-ケト・グルコン酸カルシウム溶液に *E. cloacae* UFF-107 の洗滌菌体を懸濁し、30°C で 7 時間反応させ、その遠心上澄液を凍結乾燥して淡黄色の粉末を得た。なお、ここで反応時間を 7 時間としたのは Fig. 2 に示した実験において、pH 5.0 の 0.2% (w/v) 2-ケト・グルコン酸カルシウム溶液に供試菌の懸濁させた例において 30°C・7 時間の反応で 2-ケト・グルコン酸カルシウムの殆んどが褐変前駆物質に転化されることが薄層クロマトグラフィーの結果から推察されたからである。この粉末を蒸留水に溶解し、メタノールを加え、Ca 塩として淡黄色の結晶を得たが、本 Ca-塩は KATZNELSON ら<sup>11)</sup>、相田ら<sup>12)</sup>が 2, 5-ジケト・グルコン酸カルシウム塩の同定に用いた方法、すなわち水飽和イ

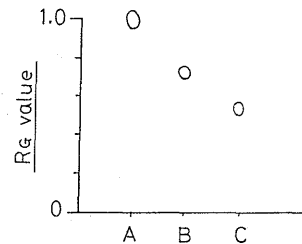


Fig. 3. Comparison of glucose, 2-ketogluconic acid and browning precursor by paper chromatography.

A, glucose solution; B, Ca-2-ketogluconate solution; C, browning precursor solution.

The spots were detected by spraying aniline hydrogen oxalate solution.

Table 1. Chemical properties of browning precursor produced by *E. cloacae* UFF-107

Reduction of FEHLING's solution in the cold .....	Positive
Reduction of ammoniacal silver nitrate in the cold .....	Positive
PINOFF's reaction .....	Positive
SELIWANOFF's reaction .....	Positive
Sodium nitroprusside reaction .....	Positive
Ferric chloride reaction .....	Negative
Orcinol test .....	Negative

ソ酪酸で常温降下法によつて東洋濾紙 No. 50 に一層展開し、aniline hydrogen oxalate 溶液<sup>10)</sup>で発色させた結果、その単一性が確認された。

次に、本褐変前駆物質、ブドウ糖および 2-ケト・グルコン酸カルシウム塩について上記と同じ方法でペーパークロマトグラフィーを行つた結果、Fig. 3 に示すようにブドウ糖の Rg 値 1.0 に対し 2-ケト・グルコン酸の Rg 値は 0.75、褐変前駆物質の Rg 値は 0.52 で、褐変前駆物質は 2-ケトグルコン酸とは異なる Rg 値を示した。

次に本褐変前駆物質について 2, 5-ジケト・グルコン酸に関連する種々の化学的定性試験を行つて Table 1 の結果を得た。すなわち、本物質はフェーリング溶液とアンモニア性硝酸銀溶液を冷時還元し、PINOFF 反応、SELIWANOFF 反応およびニトロプルシッドナトリウム反応が陽性、塩化第二鉄溶液反応およびオルソノール試験は陰性で、この結果は 2, 5-ジケト・グルコン酸の性状と全く一致した。

また、本物質について過沃素酸ナトリウムによる酸化分割を行つて、その分割産物について薄層クロマトグラフィーを行つた結果、Fig. 4 に示したように 2, 5-ジケ

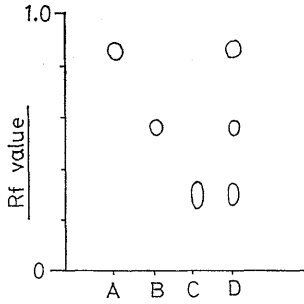


Fig. 4. Thin layer chromatogram of oxidation products from browning precursor by periodic acid oxidation.

A, formic acid; B, glycollic acid; C, oxalic acid; D, oxidation product of browning precursor.

Thin layer chromatogram was developed by the ascending method with a solvent mixture consisting of 4 volumes of *n*-butanol, 3 volumes of acetone and 1 volume of water. After drying, it was sprayed with B.T.B. solution.

ト・グルコン酸において分割産物として認められる蟻酸, グリコール酸および蓚酸に一致する各スポットが確認された。

以上の結果から, この褐変前駆物質が 2, 5-ジケト・グルコン酸であることが推定された。

次に, 本物質の 0.4% (w/v) 水溶液を調製し, その各 10 ml に対し Table 2 に示した種々のアミノ酸もしくはたん白質の種類を 1 g 宛混合し, 沸騰水中で 7 分間加熱した結果, 本物質は供試した種々のアミノ酸やたん白質ときわめて良く反応して褐変物質を形成した。特にアミノ酸においてはグリシン, リジン, アルギニン, アラニン, バリン, ヒスチジン, グルタミン酸ナトリウムなど, また, たん白質ではカゼイン, ゼラチンなどで強い褐変が認められた。

*Gluconobacter melanogenus* IAM-1836 による 2, 5-ジケト・グルコン酸カルシウム塩の調製とその褐変反応の検討 前項で褐変前駆物質として推定された 2, 5-ジケト・グルコン酸は吸湿性がきわめて強く, かつ不安定で化学的合成が困難であることから, KATZNELSON<sup>13)</sup>, 相田ら<sup>14)</sup>の方法を参照し, すでにブドウ糖から 2, 5-ジケト・グルコン酸を生成することが知られている *Gluconobacter melanognus* IAM-1836 を供試して微生物学的に本物質の Ca-塩を調製し, 前出の *E. cloacae* UFF-107 による結果と比較検討した。

本 Ca-塩の化学的定性反応の結果は Table 3 に示すように, フェーリング溶液とアンモニア性硝酸銀溶液を冷時還元し, PINOFF 反応, SELIWANOFF 反応およびニ

Table 2. Browning caused by the addition of various amino acids or proteins to browning precursor produced by *E. cloacae* UFF-107

Amino acid or protein added	Incubation time at 37°C			Heating time at 100°C
	1 hr	2 hr	3 hr	7 min
Glycine	+	++	+++	+++
L-Alanine	-	-	±	++
L-Valine	-	-	±	++
L-Leucine	-	-	-	+
L-Isoleucine	-	-	-	+
L-Serine	-	-	±	+
L-Threonine	-	-	±	+
L-Cysteine	-	-	-	-
L-Cystine	-	-	-	-
L-Methionine	-	-	±	+
Na-Glutamate	-	-	+	++
Na-Aspartate	+	+	+	+
L-Lysine	+	+	+	+++
L-Arginine	+	++	++	++
L-Histidine	+	+	+	+
L-Phenylalanine	-	-	±	+
L-Tyrosine	-	-	-	±
L-Tryptophan	-	-	±	+
L-Proline	-	-	±	+
L-Hydroxyproline	-	-	±	+
Gluten	-	-	±	+
Casein	+	++	++	+++
Gelatin	+	+	+	+++
Nil	-	-	-	-

-, no browning; ±, slight browning; +, moderate browning; ++, extreme browning.

Table 3. Chemical properties of Ca-2, 5-diketo-gluconate produced by *G. melanogenus* IAM-1836

Reduction of FEHLING's solution	
in the cold	Positive
Reduction of ammoniacal silver	
nitrate in the cold	Positive
PINOFF's reaction	Positive
SELIWANOFF's reaction	Positive
Sodium nitroprusside reaction	Positive
Ferric chloride reaction	Negative
Orcinol test	Negative

トロプルシッドナトリウム反応が陽性, 塩化第二鉄溶液反応およびオルシノール試験は陰性で, この結果は 2, 5-ジケト・グルコン酸の性状と全く一致した。

次に, 本物質について過沃素酸ナトリウムによる酸化分割を行つて, その分割産物について薄層クロマトグラフィを行つた結果, 前出の Fig. 4 の結果と全く同様

**Table 4.** Browning caused by the addition of various amino acids or proteins to 2, 5-diketogluconic acid produced by *G. melanogenus* IAM-1836

Amino acid or protein added	Incubation time at 37°C			Heating time at 100°C
	1 hr	2 hr	3 hr	7 min
Glycine	+	±	±	±
L-Alanine	-	-	±	±
L-Valine	-	-	±	±
L-Leucine	-	-	-	+
L-Isoleucine	-	-	-	+
L-Serine	-	-	±	+
L-Threonine	-	-	±	+
L-Cysteine	-	-	-	-
L-Cystine	-	-	-	-
L-Methionine	-	-	±	+
Na-Glutamate	-	-	+	±
Na-Aspartate	+	+	+	+
L-Lysine	+	+	+	±
L-Arginine	+	±	±	±
L-Histidine	+	+	+	+
L-Phenylalanine	-	-	±	+
L-Tyrosine	-	-	-	±
L-Tryptophan	-	-	±	+
L-Proline	-	-	±	+
L-Hydroxyproline	-	-	±	+
Gluten	-	-	±	+
Casein	+	±	±	±
Gelatin	+	+	+	±
Nil	-	-	-	-

- , no browning; ±, slight browning; +, moderate browning; - , extreme browning.

に分割産物として、有機酸、有機酸およびグリコール酸に一致する3つのスポットを確認した。これらの結果は KATZNELSON ら<sup>11)</sup>、近藤ら<sup>12)</sup>および相田ら<sup>14)</sup>の報告と一致し、本 Ca-塩が 2, 5-ジケト・グルコン酸カルシウムであることが確認された。

そこで、この 2, 5-ジケト・グルコン酸カルシウムの 0.4% (w/v) 水溶液を調製し、Table 4 に示した種々のアミノ酸もしくはたん白質の一種類を混合し、沸騰水中で7分間加熱した結果、2, 5-ジケト・グルコン酸カルシウム溶液は種々のアミノ酸やたん白質ときわめて良く反応し、褐変物質を形成した。

以上の結果は前出の Table 2 の *E. cloacae* UFF-107 より生成された褐変前駆物質の Ca-塩の場合と完全に一致する結果であった。

*Gluconobacter melanogenus* IAM-1836, *G. melanogenus* IAM-1822, *G. suboxydans* IAM-1829 および *G. gluconicus* IAM-1815 によるブドウ糖加液体培地における褐変前駆物質の生成 ブドウ糖から 2-ケト・グ

**Table 5.** Browning caused by heating of mixture of various amino acid or protein and the supernatant of the culture fluid of *G. melanogenus* IAM-1836, *G. melanogenus* IAM-1822, *G. suboxydans* IAM-1829 and *G. gluconicus* IAM-1815

Amino acid or protein added	Test bacteria			
	<i>G. melanogenus</i> IAM-1836	<i>G. melanogenus</i> IAM-1822	<i>G. suboxydans</i> IAM-1829	<i>G. gluconicus</i> IAM-1815
Glycine	±	±	-	-
L-Alanine	±	+	-	-
L-Valine	+	+	-	-
L-Leucine	+	-	-	-
L-Isoleucine	+	-	-	-
L-Serine	±	+	-	-
L-Threonine	±	+	-	-
L-Cysteine	-	-	-	-
L-Cystine	-	-	-	-
L-Methionine	±	+	-	-
Na-Glutamate	±	+	-	-
Na-Aspartate	±	±	-	-
L-Lysine	±	+	-	-
L-Arginine	±	+	-	-
L-Histidine	+	+	-	-
L-Phenylalanine	±	±	-	-
L-Tyrosine	-	-	-	-
L-Tryptophan	+	±	-	-
L-Proline	+	-	-	-
L-Hydroxyproline	+	-	-	-
Gluten	±	±	-	-
Casein	±	±	-	-
Gelatin	±	±	-	-
Nil	-	-	-	-

- , no browning; ±, slight browning; +, moderate browning; - , extreme browning.

ルコン酸と 2, 5-ジケト・グルコン酸を生成する *G. melanogenus*, 5-ケト・グルコン酸を生成する *G. suboxydans* および 2-ケト・グルコン酸を生成する *G. gluconicus* を供試して、それらの生成するブドウ糖代謝産物の褐変前駆物質としてのアミノ酸およびたん白質に対する反応を検討した。

ブドウ糖加液体培地に各供試菌を接種し、30°C・5 日間振盪培養を行い、その培養上澄液 10 ml に対し Table 5 に示した各種アミノ酸あるいはたん白質の一種類を 1 g 宛混合し、沸騰水中で7分間加熱した結果、*G. melanogenus* IAM-1836 および *G. melanogenus* IAM-1822 の 2 株においてはいずれも種々のアミノ酸、もしくはたん白質と良く反応して褐変物質を形成したが、*G. sub-*

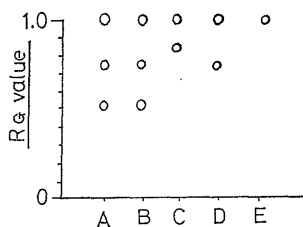


Fig. 5. Paper chromatography of culture fluids of *Gluconobacter melanogenus* IAM-1836, *G. melanogenus* IAM-1822, *G. suboxydans* IAM-1829 or *G. gluconicus* IAM-1815.

A, culture fluid of *G. melanogenus* IAM-1836; B, culture fluid of *G. melanogenus* IAM-1822; C, culture fluid of *G. suboxydans* IAM-1829; D, culture fluid of *G. gluconicus* IAM-1815; E, 5% (w/v) glucose solution.

Spots were detected by spraying aniline hydrogen oxalate.

*oxydans* IAM-1829 および *G. gluconicus* IAM-1815 の2株では褐変の発現が全く認められなかつた。さらに、各々の培養上澄液について KATZNELSON ら<sup>11)</sup>、相田ら<sup>14)</sup>の方法に従ってペーパークロマトグラフィーを行い、その結果を Fig 5 に示した。この結果を KATZNELSON ら<sup>11)</sup> および相田ら<sup>14)</sup>の報告結果と比較すると、*G. melanogenus* IAM-1836 と *G. melanogenus* IAM-1822 の培養液では RG 値 0.75 と 0.52 のスポットが観察され、2-ケト・グルコン酸と 2,5-ジケト・グルコン酸の生成されることが確認されたが、一方 *G. suboxydans* IAM-1829 では RG 値 0.85 の 5-ケト・グルコン酸、また、*G. gluconicus* IAM-1815 では RG 値 0.75 の 2-ケト・グルコン酸の生成が確認された。すなわち、Table 5 と Fig. 5 の結果を対比させると、2,5-ジケト・グルコン酸 (褐変前駆物質) を生成する *G. melanogenus* IAM-1836 と *G. melanogenus* IAM-1822 の2株では、アミノ酸あるいはたん白質と反応して褐変物質が形成され、一方、5-ケト・グルコン酸あるいは2ケト・グルコン酸のみを生成するそれぞれ *G. suboxydans* IAM-1829, *G. gluconicus* IAM-1815 の培養液では褐変物質が形成されなかつた。

以上の結果から細菌の種の如何を問わず、2,5-ジケト・グルコン酸生成菌は褐変原因菌となり得ることが確認された。

## 考 察

先報<sup>9)</sup>で水産ねり製品の褐変現象は製品に添加されるブドウ糖や蔗糖が原因細菌によつて資化される結果として“褐変前駆物質”が生成され、この物質がアミノ酸や

たん白質と反応して褐変物質を形成する結果であることを明らかにすると共に、ブドウ糖の代謝産物についての検討から、代謝産物として未知のケト酸が生成されることを明らかにした。

細菌によるブドウ糖からケト酸を生成する酸化経路については、ブドウ糖→グルコン酸→2-ケト・グルコン酸→2,5-ジケト・グルコン酸の経路、ブドウ糖→グルコン酸→5-ケト・グルコン酸の経路およびブドウ糖→グルコン酸→2-ケト・グルコン酸の経路が知られている。しかるに、グルコン酸および2-ケト・グルコン酸はグリシンを加えて沸騰水中で加熱しても褐変物質を形成しないことから、褐変前駆物質をケト酸の一種と考える見地に立てば、その物質は2-ケト・グルコン酸以後のケト酸か、5-ケト・グルコン酸あるいはその類似の物質と考えられる。

そこで本報においては先ず蔗糖、ブドウ糖のいずれからも褐変前駆物質を生成する *E. cloacae* UFF-107 を供試して、2-ケト・グルコン酸の直接酸化について検討を加えた。

Fig. 1 に示したように2-ケト・グルコン酸からの褐変前駆物質の生成は pH によつて大きく影響され、アルカリ側では殆んど生成されず、酸性側、特に pH 5.0 において最も顕著に生成されることが知られた。

ねり製品中にブドウ糖などの糖類が添加される場合、鮮度の低下と共に pH の低下することが清水ら<sup>10)</sup>によつて指摘されているが、このように糖類が酸化されて有機酸が生成されると製品の pH が酸性側に移動し、その結果褐変原因菌による2-ケト・グルコン酸からの褐変前駆物質の生成は著しく促進されるものと考えられる。

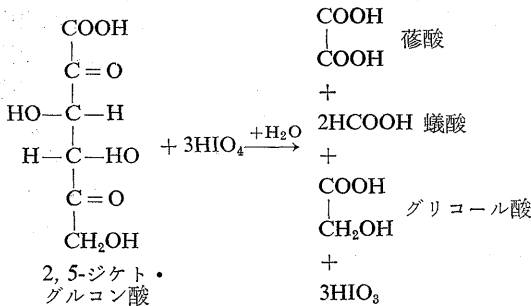
次に、*E. cloacae* UFF-107 によるブドウ糖酸化によつて生成される褐変前駆物質と同じく2-ケト・グルコン酸より生成される褐変前駆物質について、薄層クロマトグラフィー的に比較検討した結果 Fig. 2 に示したように両生成物質の Rf 値は全く一致し、同一物質であることが認められた。また、2-ケト・グルコン酸溶液中に *E. cloacae* UFF-107 の洗滌菌体を懸濁して直接酸化させると、2-ケト・グルコン酸は7時間以内にその殆んどが褐変前駆物質に酸化されることが知られたので、この上澄液から褐変前駆物質の分離について検討を行つた。

本褐変前駆物質は吸湿性が強く、かつ不安定で空気中に放置すると褐色に着色してしまうことから、NMR、マススペクトル、X線その他による理化学的確認がきわめて困難であるが、本物質は KATZNELSON ら<sup>11)</sup>、近藤ら<sup>12)</sup>、相田ら<sup>14)</sup>の報告における2,5-ジケト・グルコン酸の性質にきわめて類似していることが文献的に知られたので、氏らの2,5-ジケト・グルコン酸の分離方法を参照して、本褐変前駆物質の分離とその化学的定性試験を



試み、先ず褐変前駆物質を Ca-塩として分離することができたが、この Ca-塩もかならずしも安定でなく、その性状検査はきわめて迅速に実施する必要が認められた。

また、この褐変前駆物質の化学的性状を KATZNELSON ら<sup>11)</sup>、相田ら<sup>14)</sup>の方法によつて *G. melanogenus* IAM-1836 を供試して調製した 2, 5-ジケト・グルコン酸カルシウム塩の性状と比較対照した結果、Table 1 および Table 3 に示したように両物質の諸性状はきわめて良く一致した。なお、褐変前駆物質のペーパークロマトグラフにおける RG 値は Fig. 3 に示したように 0.52 であつた。相田ら<sup>14)</sup>は 2, 5-ジケト・グルコン酸のそれを 0.54、HENDERSON<sup>10)</sup>は 0.57~0.61 と報告し、著者の結果とは若干の相異が認められるが、これは 2, 5-ジケトグルコン酸の不安定さからくる実験技術上の問題によるものと考えられる。また HENDERSON<sup>10)</sup>は 2, 5-ジケト・グルコン酸のスポットを *p*-anisidine hydrochloride 溶液<sup>10)</sup>でペールイエローのスポットとして確認しているが、著者らも 2, 5-ジケト・グルコン酸は勿論、褐変前駆物質についても同様の所見を認めた。さらに本褐変前駆物質が 2, 5-ジケト・グルコン酸であるかどうかを確認するために過沃素酸ナトリウムによる酸化分割を行つた結果、Fig. 4 に示したように 2, 5-ジケト・グルコン酸と同様に蟻酸、蔞酸およびグリコール酸に分割され、本褐変前駆物質が下記のように 3 つの物質に酸化分割されることが示唆された。



また、KATZNELSON ら<sup>11)</sup>、近藤ら<sup>12)</sup>、相田ら<sup>14)</sup>の方法に従つて *G. melanogenus* IAM-1836 を供試して調製した 2, 5-ジケト・グルコン酸は、*E. cloacae* UFF-107 により調製した褐変前駆物質と全く同様に種々のアミノ酸やたん白質と容易に反応して褐変物質を形成した (Table 2 および Table 4 を参照)。

以上の結果から、本褐変前駆物質を 2, 5-ジケト・グルコン酸と確認して差支えないものと考えられる。

なお、先に述べたようにブドウ糖酸化によるケト酸の産生については多くの研究報告がみられ、BOUTROUX<sup>20,21)</sup>、BERTRAND<sup>22)</sup>、HERMAN<sup>23)</sup>、BERNHAEUER<sup>24)</sup>、高橋・朝井<sup>15,16)</sup>は *Acetobacter* (= *Gluconobacter*) *suboxydans* がブドウ糖ならびにグルコン酸から主として

5-ケト・グルコン酸を生成することを、また近藤ら<sup>25)</sup>、朝井<sup>17)</sup>は *Acetobacter gluconicus* に 2-ケト・グルコン酸を生成するものと 5-ケト・グルコン酸を併成するものがあることを、さらに KATZNELSON ら<sup>11)</sup>、DATTA ら<sup>26)</sup>は *Acetobacter melanogenus* が 2, 5-ジケト・グルコン酸を生成することを報告している。著者はこのような報告に基づき *G. melanogenus* IAM-1836, *G. melanogenus* IAM-1822, *G. suboxydans* IAM-1829 および *G. gluconicus* IAM-1815 を供試して褐変発現試験を試みた結果、Table 5 に示したように *G. melanogenus* IAM-1836 と *G. melanogenus* IAM-1822 の 2 株においてのみ褐変が確認された。

また、KATZNELSON ら<sup>11)</sup>、相田ら<sup>14)</sup>の方法に従つてペーパークロマトグラフを行つた結果、同様に *G. melanogenus* IAM-1836 と *G. melanogenus* IAM-1822 の 2 株においては、2, 5-ジケト・グルコン酸の生成が認められた。他の 2 株においては 5-ケト・グルコン酸あるいは 2-ケト・グルコン酸の生成が認められたが、2, 5-ジケト・グルコン酸の生成は認められなかつた。

この結果は 5-ケト・グルコン酸および 2-ケト・グルコン酸生成菌は褐変原因菌になりえず、2, 5-ジケト・グルコン酸生成菌のみが褐変原因菌となり得ることを示している。また、このことは森ら<sup>7)</sup>、鍋谷<sup>27)</sup>らが同じく褐変かまぼこから *Pseudomonas* sp. を原因菌として分離し、本菌がブドウ糖を資化して 2, 5-ジケト・グルコン酸を生成することを推定しており、同氏らの結果は著者らの知見を裏付けるものと考えられる。

ここにおいて著者らは、*E. cloacae* UFF-107 の褐変機構を Fig. 6 のように提案する。すなわち、ねり製品中に添された蔗糖あるいはブドウ糖は褐変原因菌によつて (蔗糖の場合はいつたんブドウ糖と果糖に分割された後) 酸化されてグルコン酸、2-ケト・グルコン酸を経て 2, 5-ジケト・グルコン酸を産生する。この 2, 5-ジケト・グルコン酸はグルタミン酸ナトリウムなどのアミノ酸類あるいは魚肉などのたん白質と容易に反応して褐変物質を

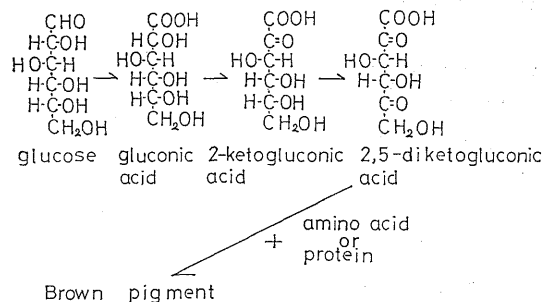


Fig. 6. Proposed mechanism of browning caused by *E. cloacae* UFF-107.

形成し、その結果として、ねり製品に褐変現象が発現する。この際加熱されると 2,5-ジケト・グルコン酸とアミノ酸あるいはたん白質との反応はさらに促進・助長され、きわめて強い褐変が発現し“再加熱による褐変現象”としてあらわれる。

すなわち、いずれの場合もねり製品における褐変の原因は、ねり製品中に添加された蔗糖あるいはブドウ糖が褐変原因菌によつて代謝され、その代謝産物として 2,5-ジケト・グルコン酸が生成される結果によるもので、このような代謝特性をもつ微生物であれば菌種の如何に拘わらず、ねり製品の褐変を惹起するものと考えられる。

稿を終るに当り、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜わつた北海道大学名誉教授坂井稔博士に深甚なる謝意を表すると共に、種々有益なる御助言と御指導を賜わつた北海道大学水産学部木村喬久教授ならびに同学部絵面良男助教授に感謝申し上げます。また種々適切な御助言と御教示を頂いた北海道大学水産学部秋場稔教授ならびに同学部信濃晴雄助教授に衷心よりお礼申しあげる。

#### 文 献

- 1) 藤田 八東・金山 龍男: 日水誌, **39**, 229-326 (1973).
- 2) 藤田 八東・金山 龍男: 日水誌, **39**, 327-331 (1973).
- 3) 藤田 八東・宮本美和子: 日水誌, **41**, 1263-1269 (1975).
- 4) 小川博望・小名木正躬・福島 清: 食衛誌, **11**, 352-355 (1970).
- 5) 小川博望・小名木正躬・福島 清: 食衛誌, **11**, 356-360 (1970).
- 6) 藤田 八東・宮本美和子・松田敏生: 日水誌, **40**, 825-833 (1974).
- 7) 森 一雄・鍋谷 修・平野とも子: 日水誌, **40**, 959-962 (1974).
- 8) 藤田 八東・松本寿子・松田敏生: 日水誌, **42**, 549-556 (1976).
- 9) 加藤 博通・桜井 芳人: 食工誌, **11**, 313-416 (1964).
- 10) 鈴木郁生: 薄層クロマトグラフィーの実際, 200 pp., 広川書店, 東京 (1967).
- 11) H. KATZNELSON, S.W. TANENBAUM and E.L. TATUM: *J. Biol. Chem.*, **204**, 43-59 (1953).
- 12) 近藤圭二・飴山 実・山口 務: 農化誌, **30**, 419-426 (1956).
- 13) 三井哲夫・満田久輝・秦 忠夫: 農芸化学実験書, 第3巻, 1424 pp., 産業図書, 東京 (1957).
- 14) K. AIDA, M. FUJII, and T. ASAI: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **21**, 30-37 (1957).
- 15) 高橋 偵造・朝井 勇宣: 農化誌, **6**, 407-412 (1930).
- 16) 高橋 偵造・朝井 勇宣: 農化誌, **9**, 351-360 (1933).
- 17) 朝井 勇宣・池田 庸之助: 農化誌, **22**, 50-51 (1948).
- 18) 清水 亘・本橋邦郎: 水産製造会誌, **3**, 217-222 (1935).
- 19) J. T. HENDERSON: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5304-5308 (1957).
- 20) L. BOUTROUX: *Compt. rend.*, **102**, 924-927 (1886).
- 21) L. BOUTROUX: *Compt. rend.*, **11**, 185-187 (1890).
- 22) G. BERTRAND: *Compt. rend.*, **127**, 728-731 (1898).
- 23) S. HERMAN: *Biochem. Z.*, **214**, 357-367 (1928).
- 24) K. BERNHAUER: *Biochem. Z.*, **280**, 367-378 (1935).
- 25) 近藤平三郎・成田象一: 薬学誌, **63**, 289-291 (1943).
- 26) A. G. DATTA and H. KATZNELSON: *Arch. Biochem. Biophys.*, **65**, 576-578 (1956).
- 27) 鍋谷 修・平野とも子・森 一雄: 日水誌, **40**, 963-967 (1974).