〔農化 第 36 卷, 第 2 号, p.128~131, 1962〕

Coli-aerogenes 群細菌の醗酵化学的研究 (第 18 報)*アンモニア同化, 特にフマル酸-アスパルターゼ反応に
及ぼすグリオキシル酸の影響

沢 力, 柄倉辰六郎, 片桐英郎 (京都大学農学部農芸化学教室)

昭和 36 年 7 月 3 日 受 理

先に著者等はクエン酸の代謝産物であるグリオキシル酸がクエン酸の代謝並びにアンモニアの同化に重大な影響を及ぼすことを報告した⁽¹⁾。

大腸菌群細菌のアンモニアの同化反応としてはクエン酸より α -ケトグルタル酸の還元的アミノ化反応でグルタミン酸の生成をみるほかに, アスパルターゼ反応でフマル酸よりアスパラギン酸の生成があり, これにトランスアミネーションが連結してグルタミン酸生成が進行する場合のあることも考えられている⁽²⁾。

本報ではグリオキシル酸が, フマル酸-アスパルターゼ反応に著しい影響を及ぼすことを見出したので報告する。

実 験 方 法

使用菌株, 酵素液の調製法, 分析方法などは前報⁽¹⁾に準じて行った。

結 果 並 び に 考 察

クエン酸を基質とするアンモニア同化に対してグリオキシル酸が抑制的な影響を示す事実は前報に述べたが, 今回フマル酸を基質とするアンモニア同化反応, すなわちアスパラギン酸生成反応に対するグリオキシル酸の添加効果を検討した。実験結果を第 1 表に示す。

第 1 表 クエン酸並びにフマル酸を利用するアンモニア同化反応に対するグリオキシル酸の影響

クエン酸添加量 (μ moles)	100	100	0	0	100	100
フマル酸添加量 (μ moles)	0	0	100	100	100	100
グリオキシル酸添加量 (μ moles)	0	100	0	100	0	100
TPN 添 加 量 (γ)	100	100	0	0	100	100
グルタミン酸生成量 (μ moles)	73.4	trace	0	0	69.1	trace
アスパラギン酸生成量 (μ moles)	0	0	60.0	trace	28.6	trace

燐酸緩衝液, pH 7.2, 750 μ moles, 添加有機酸ソーダ塩, $MgSO_4$ 10 μ moles, 塩化アンモン 200 μ moles, *E. coli* No. 2b (グルコース・肉汁生育) の無細胞抽出液 28.0 mg (蛋白量), 反応液量 5 ml, 37°, 2 hrs, 嫌気的反應。

E. coli No. 2b の無細胞抽出液においてはグリオキシル酸はクエン酸を基質とするアンモニア同化に対してのみならず, フマル酸基質のアンモニア同化に対しても著しい抑制作用を惹起した。

2, 3 の菌株の無細胞抽出液のアスパルターゼ反応に対して

同様のグリオキシル酸阻害作用が見られるか否かを比較検討した結果, *Aerobacter aerogenes* No. C-12, *Escherichia coli* No. ER において軽度の阻害効果が見られ, *Escherichia coli* No. 2b においてその作用は顕著であった。

第 2 表 2, 3 の菌株によるアンモニア同化 (フマル酸-アスパルターゼ反応) に及ぼすグリオキシル酸の影響

使用菌株	<i>A. aerogenes</i> No. C-12		<i>E. coli</i> No. 2b			<i>Pseudomonas fluorescens</i> No. 346	
	グルコース		グルコース			酢酸ソーダ	
生育培地炭素源	0 100		0 50 100			0 100	
グリオキシル酸添加量 (μ moles)	0 100		0 50 100			0 100	
無細胞抽出液の蛋白量 (mg)	29.0		7.4			14.0	
反 応 時 間 (hrs)	6		5			5	
アスパラギン酸生成量 (μ moles)	64.4	47.6	26.8	23.0	trace	31.3	31.2
グリオキシル酸消費量 (μ moles)	—	26.0	—	14.8	18.3	—	40.5

燐酸緩衝液, pH 7.2, 250 μ moles, フマル酸ソーダ 100 μ moles, $MgSO_4$ 5 μ moles, 塩化アンモン 200 μ moles, 反応液量 2.5 ml, 37°, 静置条件。

Pseudomonas fluorescens No. 346 においては殆んど阻害作用が認められなかった。これらの結果を第 2 表及び第 3 表に示す。また, 生育培地の炭素源の種類を変えてグリオキシル酸の影響を検討した結果を第 3 表並びに第 4 表に示す。グリ

* Microbiological Studies of *Coli-aerogenes* Bacteria. Part XVIII. Effect of Glyoxylate on the Assimilation of Ammonia, Especially on the Fumarate-aspartase Reaction.
By Tsutomu SAWA, Tatsurokuro TOCHIKURA and Hideo KATAGIRI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyoto University)

第3表 *Escherichia* sp. ER 菌におけるフマル酸を利用するアンモニア同化に及ぼすグリオキシル酸の影響

生育培地炭素液	グルコース			酢酸ソーダ		
	0	50	100	0	50	100
グリオキシル酸添加量 (μ moles)	0	50	100	0	50	100
反応時間 (hrs)		4.5			5	
無細胞抽出液の蛋白量 (mg)		5.0			35.0	
反応液量 (ml)		2.5			5.0	
アスパラギン酸生成量 (μ moles)	55.6	43.9	27.8	50.0	50.0	49.5
グリオキシル酸消費量 (μ moles)	—	23.7	26.0	—	19.2	17.1

燐酸緩衝液, pH 7.2, 750 μ moles, フマル酸ソーダ 100 μ moles, $MgSO_4$ 5 μ moles, 塩化アンモン 200 μ moles, 37°, 静置条件.

オキシル酸阻害はグルコースもしくはグルタミン酸生育菌に顕著であったが、酢酸生育菌ではその効果が減少する傾向が認められた。

次に上述のアスパラギン酸生成の阻害がグリオキシル酸そのものの作用によるのか、或いはグリオキシル酸に由来する代謝

中間体によるのか、或いは試薬グリオキシル酸にはじめから混在する物質によるのかを明らかにするために数種の有機酸の添加効果を検討した結果を第5表に示す。グリオキシル酸以外の有機酸に顕著な阻害作用が認められなかったが、酢酸に軽度の阻害作用が観察された。

第4表 *Escherichia coli* No. 2b におけるフマル酸を利用するアンモニア同化に及ぼすグリオキシル酸の影響

生育培地炭素源	グルコース			グルタミン酸ソーダ			酢酸ソーダ		
	0	50	100	0	80	130	0	80	60
グリオキシル酸添加量 (μ moles)	0	50	100	0	80	130	0	80	60
無細胞抽出液の蛋白量 (mg)		7.5			19.6			19.0	
反応時間 (hrs)		5			4			3	
アスパラギン酸生成量 (μ moles)	26.8	23.0	trace	49.5	27.9	trace	38.5	38.5	40.0
グリオキシル酸消費量 (μ moles)	—	13.8	17.3	—	73.3	101.8	—	33.9	52.5

燐酸緩衝液, pH 7.2, 250 μ moles, フマル酸ソーダ 100 μ moles, $MgSO_4$ 10 μ moles, 塩化アンモン 200 μ moles, 反応液量 2.5 ml, 37°, 静置条件.

第5表 *Escherichia coli* No. 2b (グルコース・肉汁生育) におけるフマル酸を利用するアンモニア同化に及ぼす各種有機酸の影響

添加物	無添加	グリオキシル酸ソーダ	酢酸ソーダ	コハク酸ソーダ	DL-乳酸ソーダ	グリコール酸ソーダ	DL-リンゴ酸ソーダ	シュウ酸ソーダ	ギ酸ソーダ
添加濃度 (M)	0	4×10^{-2}	8×10^{-2}	8×10^{-2}	8×10^{-2}	8×10^{-2}	8×10^{-2}	1×10^{-1}	1×10^{-1}
アスパラギン酸生成量 (μ moles)	33.9	trace	23.6	30.4	30.1	31.5	32.9	28.7	27.2

燐酸緩衝液, pH 7.2, 380 μ moles, $MgSO_4$ 5 μ moles, 塩化アンモン 100 μ moles, フマル酸ソーダ 100 μ moles, 無細胞抽出液 8.0 mg (蛋白量), 反応液量 2 ml, 38°, 5 hrs, 静置条件.

第6表 *Escherichia coli* 2b (グルコース・肉汁生育) におけるフマル酸を利用するアンモニア同化に及ぼす 2, 3 の有機酸とグリオキシル酸の併用効果並びにそれらに対するセミカルバジッドの効果

セミカルバジッド添加 (300 μ moles)	—	—	+	—	—	+	—	+
酢酸ソーダ添加 (150 μ moles)	—	—	—	+	—	—	+	+
L-リンゴ酸ソーダ添加 (150 μ moles)	—	—	—	—	+	+	+	+
グリオキシル酸ソーダ (150 μ moles)	—	+	+	+	+	+	+	+
アスパラギン酸生成量 (μ moles)	29.0	trace	31.5	trace	trace	47.0	trace	47.0

燐酸緩衝液, pH 7.2, 250 μ moles, フマル酸ソーダ 100 μ moles, 塩化アンモン 100 μ moles, $MgSO_4$ 5 μ moles, 無細胞抽出液 19.0 mg (蛋白質), 反応液量 3.5 ml, 5 hrs, 37°, 静置条件.

次にグリオキシル酸と 2, 3 の有機酸の混用及びグリオキシル酸をセミカルバジッド添加によって不活性化した場合について検討した。第6表に示すようにセミカルバジッド添加によってグリオキシル酸の阻害効果が消失することが観察されるので、アスパラギン酸生成の阻害はグリオキシル酸によるものと考えられる。第6表よりこれらの酵素液にフマルーゼの存在が予想されたので、L-リンゴ酸を基質にしてアスパラギン酸の生成並びにグリオキシル酸の阻害作用を検討した。その結果第7表及び第8表に示すように L-リンゴ酸よりアスパラギン酸が生成され、グリオキシル酸がその生成を阻害し、セミカルバジッドによってグリオキシル酸の阻害作用が消失することが認められた。

Nils Elfölk⁽³⁾ は *Propionibacterium* の乾燥菌体を用いてクエン酸、シュウ酸がアスパルターゼを強く阻害することを認め、その作用はそれらのキレート作用によってアスパルターゼの活性に必要な Mg^{++} を除去するため

第 7 表 *Escherichia coli* No. 2 b (グルコース・肉汁生育) による L-リンゴ酸からのアスパラギン酸生成に及ぼす グリオキシル酸の影響

セミカルバジッド添加 (300 μ moles)	—	+	—
グリオキシル酸ソーダ添加 (150 μ moles)	+	+	—
L-リンゴ酸ソーダ添加 (150 μ moles)	+	+	+
アスパラギン酸生成量 (μ moles)	trace	36.5	39.0
燐酸緩衝液, pH 7.2, 250 μ moles, 塩化アンモン 100 μ moles, $MgSO_4$ 5 μ moles, 無細胞抽出液 19.0 mg (蛋白量), 反応液量 3.5 ml, 反応時間 5 hrs, 37°, 静置条件.			

第 8 表 *Escherichia coli* No. 2 b (グルコン酸ソーダ・肉汁生育) による L-リンゴ酸からアスパラギン酸生成に及ぼすグリオキシル酸の影響

グリオキシル酸ソーダ添加量 (μ moles)	0	40	80
アスパラギン酸生成量 (μ moles)	26.6	4.7	4.7
燐酸緩衝液, pH 7.2, 200 μ moles, L-リンゴ酸ソーダ 100 μ moles, 塩化アンモン 100 μ moles, $MgSO_4$ 5 μ moles, 無細胞抽出液 15.0 mg (蛋白量), 反応液量 2.5 ml, 反応時間 4 hrs, 37°, 静置条件.			

第 9 表 *Escherichia coli* No. 2 b (グルコース・肉汁生育) によるフマル酸を利用するアンモニア同化に及ぼすグリオキシル酸の添加時期の影響

反応開始後における	—	反応 30分	1 時	2 時	
グリオキシル酸の添加時期	直後	後	間後	間後	
グリオキシル酸添加量(μ moles)	0	100	100	100	
アスパラギン酸の生成量	33.9	trace	8.9	14.1	23.6
燐酸緩衝液, pH 7.2, 380 μ moles, フマル酸ソーダ 100 μ moles, 塩化アンモン 100 μ moles, $MgSO_4$ 5 μ moles, 無細胞抽出液 8.0 mg (蛋白量), 反応液量 2 ml, 反応時間 5 hrs, 37°, 静置培養.					

第 10 表 *Escherichia coli* No. 2 b (グルコース・肉汁生育) の硫安分別区分によるフマル酸及び リンゴ酸を基質とするアスパラギン酸生成に及ぼすグリオキシル酸の影響

硫安 0~30% 飽和区分 [蛋白 3.0 mg/ml] (ml)	0.5	0.5	0.5	—	0.25	0.25	—	—
硫安 30~80% 飽和区分 [蛋白 13.0 mg/ml] (ml)	—	—	—	0.5	0.25	0.25	0.5	0.5
フマル酸ソーダ添加 (100 μ moles)	+	+	—	+	+	+	—	—
グリオキシル酸ソーダ添加 (50 μ moles)	—	+	—	—	—	+	—	+
L-リンゴ酸ソーダ添加 (100 μ moles)	—	—	+	—	—	—	+	+
アスパラギン酸生成量 (μ moles)	13.5	trace	trace	54.0	40.0	14.0	51.6	trace
燐酸緩衝液, pH 7.2, 125 μ moles, NH_4Cl 100 μ moles, $MgSO_4$ 3 μ moles, 反応液量 1.5 ml, 4 hrs, 37°, 静置条件.								

第 11 表 アスパラギン酸の分解に及ぼすグリオキシル酸の影響

アスパラギン酸添加量 (μ moles)	120	120	120
グリオキシル酸添加量 (μ moles)	0	50	100
アスパラギン酸消費量 (μ moles)	57.9	60.0	60.0
グリシンの生成 (ペーパークロマトによる定性試験)	—	+	+

燐酸緩衝液, pH 7.2, 250 μ moles, $MgSO_4$ 5 μ moles, *Escherichia coli* No. 2 b (グルコース・肉汁生育) の無細胞抽出液 13.0 mg (蛋白量), 反応液量 2.5 ml, 5 hrs, 37°, 静置条件.

要 約

(1) フマル酸-アスパルターゼ反応によるアンモニアの同化を大腸菌群細菌, 並びに *Pseudomonas* の無細胞抽出液について検討し, 数種の菌株においてグリオキシル酸の阻害作用が認められた.

(2) 二, 三の生育培地 (グルコース, グルタミン酸, グルコン酸, 酢酸培地) の影響について検討し, 酢酸培地以外の生育培地から得られた無細胞抽出液のフマル酸-アスパルターゼ反応が, グリオキシル酸によって著しく阻害されることを認めた.

(3) 数種の有機酸の添加効果を検討したが, グリオキシル酸以外に著しい阻害作用を示すものは見出されなかった. セミカルバジッド添加によってグリオキシル酸の阻害作用が除去された.

(4) フマル酸の代りに, リンゴ酸を用いてもアスパラギン酸の生成が認められ, この場合においてもグリオ

であると述べている. 著者等の場合はフマル酸からのアスパラギン酸生成に対してシュウ酸は殆んど作用を示さず, クエン酸が僅かに阻害を示した. 後者の場合にはクエン酸より生ずるグリオキシル酸の作用による可能性も考えられる.

また反応開始後グリオキシル酸の添加時間を変えてその阻害作用を検討した. 反応開始後添加時期がおそくなるほどアスパラギン酸の生成量が増加することが第 9 表より認められる. 次に菌体抽出液を硫酸アンモンで分別し, それらについてリンゴ酸, 並びにフマル酸を基質とするアンモニア同化とグリオキシル酸の添加効果を検討した.

アスパルターゼ及びフマラーゼは硫安 30~80% 飽和部分にありグリオキシル酸の阻害作用はこれらの酵素液についても認められた. その結果は第 10 表に示す.

次に生成したアスパラギン酸が添加したグリオキシル酸によって減少する可能性が考えられるので, アスパラギン酸を基質にしてグリオキシル酸の添加の影響を検討し

た. 第 11 表に示す如く少量のグリシンがグリオキシル酸添加によって生成することが認められたが, アスパラギン酸の減少に対しては無視しうる程度であった. またグリオキシル酸はアスパラギン酸の分解を阻害することはなかった.

キシル酸の阻害作用が観察された。

(5) 硫安分別によると 30~80% 飽和沈殿部分にアスパルターゼ及びフマラーゼが存在し、これらの酵素標品を用いてもグリオキシル酸の阻害作用が認められた。

(6) グリオキシル酸はアスパラギン酸の分解に対して著しい阻害作用も促進作用も示さなかった。

(1) 沢 力, 橋倉辰六郎, 片桐英郎: 本誌, 2, 138 (1960).
36, 124 (1962).

(3) N. Elfolk: *Acta Chem. Scand.*, 7, 1155 (1953).

(2) 片桐英郎, 橋倉辰六郎: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 23, 489 (1959); *Amino Acids*,

[農化 第 36 卷, 第 2 号, p. 131~137, 1962]

大豆製品の褐変機構に関する研究 (第 2 報)*

火入醤油の着色濃化現象における 3-デオキシオソン類,
ヘキソース及びペントースの役割

加藤 博 通, 桜井 芳 人 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 36 年 7 月 7 日 受 理

緒 言

火入醤油は保存中に着色度を増して品質を低下するが、この現象は製品の均質化、安定化及び保存等の点から極めて重要な問題である。また火入醤油の壺詰製品の封を切って室温に保存すると、かなり速やかに着色度が増加し、その色調、風味ともに劣変することは日常よく経験するところである。これらの現象の機構は極めて複雑であり未だ不明の点が多い。

著者らは前報⁽¹⁾において各種の醤油、味噌には褐変前駆物質と推定される 3-デオキシグルコソン (3-D-G) がかなり多量に存在していることを確認したが、本報においては火入醤油における 3-デオキシペントソン** (3-D-P) の存在、及びキシロースを添加した火入醤油における 3-D-P の生成、さらに 40° に保存または 80° に加熱した火入醤油の着色度の増加に伴う 3-D-G, 3-D-P, ヘキソース, ペントースの消長関係等について種々検討を行ったのでその結果を報告する。

実 験 方 法

(1) 試 料 火入醤油として市販濃口壺詰醤油を用いた。

(2) 3-D-G の存在量 前報⁽¹⁾の方法に従って火入醤油から 3-D-G をその bis-2,4-dinitrophenylhydrazine (3-D-G-2,4-DNPH) の結晶として単離し、その重量から換算して 3-D-G の存在量を表わした。採取試料は 100 ml, カラムクロマトグラフィーに用いる酸性アルミナ⁽¹⁾は 20 g である。

(3) キシロース添加火入醤油における 3-D-P の存在量 火入醤油に D-キシロース (メルク製または特級試薬) を添加 (5g/100 ml) して保存する。これを試料として第 1 図の方法に従って処理し、得られた 3-デオキシペントソンビス-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン (3-D-P-2,4-DNPH) の結晶の重量を秤量し、これから換算して 3-D-P の存在量を表わした。第 1 図の方法は上述 (2) の方法と同様であるので、同一試料について同時に 3-D-G の存在量も測定できる。

(4) 着色度の測定 試料を水で 100 倍に希釈し、日立光電分光光度計により 470 mμ の $-\log T$ を測定して着色度とした。また醤油の色調には黒味の強いものと黄色味ないし赤味の強いものがあるが、この簡単な表

* Studies on Browning Mechanisms of Soybean Products. Part II. Roles of 3-Deoxyosones, Hexoses and Pentoses for the Darkening of Pasteurized Soy-sauce.
By Hiromichi KATO and Yosito SAKURAI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

** 従来著者らは便宜上 3-デオキシキシロソンと呼称していたが、理論上この化合物は 1 種類しか存在し得ないので、以後 3-デオキシペントソンと呼称する。