各種水産物中の動物性蛋白因子 (APF)

及びビタミン B₁₂ について—V.魚介類の鮮度低下に伴うビタミン B₁₂ の変化* (その 2)

森高次郎・橋本芳郎・前田安彦

(東大農学部)

Animal Protein Factor (APF) and Vitamin B₁₂ in Marine Products—V.Variations in the Vitamin B₁₂ Content of Marine

Animals in the Spoilage (Part 2).

Takajiro MORI, Yoshiro HASHIMOTO and Yasuhiko MAEDA

In previous paper, the authors have reported that the bacterial decomposition or synthesis seemed to be the main cause of the marked variations observed on the vitamin content in spoilage of marine animals.

To ascertain this respect, aerobic and anaerobic bacteria were isolated from jack mackerel, baby clam, sardine, mackerel-pike and goby meats and their abilities of decomposition or production were tested (from Table 2 to 4). These bacteria were isolated in an usual manner and some of them were classified after the Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The isolated bacteria were incubated with vitamin B₁₂ in the tests for decomposing activity and without it for producing power. After incubation, culture media and bacterial cells were treated and extracted at 90°C for 10 mins. and analysed for the survival vitamin by the *Euglena* method.

On the other hand, fifty-six species of the authentic various bacteria were examined on their activity on the vitamin in the same manner above mentioned and the results are summarized in Table 5.

Some of these bacteria decomposed the vitamin remarkably, where as others synthesized it or remained unconcerned, and the behavior of bacteria for vitamin B₁₂ seemed to be species-specific. However, it is noticeable that *Achromobacter* and *Pseudomonas*, common fish-spoiling bacteria, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* contain more decomposing species and producing bacteria less.

水産物のビタミン B₁₂ 含量は鮮度低下に伴って変化するが、その原因が魚体中の酵素の作用ではなく水産物の附着細菌の作用によると考えられる事は既に述べた。

今回はこの点を確認する為附着細菌のビタミン B₁₂ に対する作用を調べた。一方微生物のビタミン B₁₂ 合成作用に関しては RICKES²⁾, LEWIS³⁾, 酒井⁴⁾, その他⁵⁻¹⁰⁾, 非常に多くの報告があるが、微生物による B₁₂

1954 年 5 月 19 日受理

* 本報告は昭和 28 年 9 月の日本ビタミン学会、及び昭和 28 年 11 月、同 29 年 4 月の日本水産学会に於て発表したものを取纏めたものである。

の分解もしくは消費に関する報告は現在迄見当らない。従つて我々は上記実験に關聯して菌名既知の多くの細菌の B₁₂ 分解能に關しても研究を行つたので併せ報告する。

尙最近北大五十嵐、北海道水研機構等は磨碎ホツケ肉より菌を分離同定し、それらは *Lactobacillus* 13 株, *Sarcina* 1 株であり、*Sarcina* 1 株は B₁₂ を消費し、*Lactobacillus* は最初 B₁₂ を合成するが日数経過に従つて合成した B₁₂ を分解してしまうと報告した。

実 験

1. 分離細菌の B₁₂ に対する作用

水産動物附着細菌は試料の放置日数の相違により細菌相が異なる事が考えられるので購入直後或は死直後のもの及びそれらを 48 時間鮮度低下させたものから分離を行つた。試料には前回 B₁₂ の減少著しかったアジと増加したアサリを用いた。B₁₂ は前回同様 Table 1 に示すように明らかにアジでは減少し、アサリでは増加することを今回も確認した。

Table 1. Variations in the vitamin B₁₂ content in spoilage at room temperature.
r % on fresh basis

		Treat- ment	Storage period in hours			
			0	24	48	96
Jack mackerel <i>Trachurus japonicus</i>	Dark colored meat	a* b**	13.0	8.0 11.5	5.0 9.5	3.2 8.5
	Liver	a* b**	55.0	35.0 42.5	+ 40.0	+ 37.5
Bzby clam <i>Venerupis semidecussata</i>		b**	1.2	3.0	4.2	4.4

* Round fishes were allowed to spoil. ** Minced material was allowed to spoil.

+ Sample became liquid.

菌の分離は全て集殖培養 12 時間の試料懸濁液を用い常法に従つた。嫌気性菌は黄磷法によつた。この結果、コロニー、斜面培養、検鏡により同一と見られるものを除いてアジからは好気性菌 16 株、嫌気性菌 4 株が、アサリからは好気性菌 8 株、嫌気性菌 3 株が得られた。

上記分離菌は各 B₁₂ 添加肉汁及び普通肉汁中で 32°C. で一定時間培養後、培養液を Euglena 法で定量し合成、分解力をみた。

尙 B₁₂ が菌体に残存し実際の値より低く出ることが考えられるので定量にはこの点を考慮する必要がある。プロピオン酸菌の B₁₂ 合成の研究で Hodge S.C. 等⁵⁾ は菌体洗滌法を、麻生等¹⁰⁾ は熱水抽出法を最良の方法としている。我々は *B. subtilis*, *E. coli*, *Pr. vulgaris*, を用いて冷水抽出, 60, 80, 90°C. 各 10 分間熱水抽出及び 90°C. 10 分間熱水抽出後、残渣をトリプシン及びタカジアスターゼで消化する方法を比較検討したが、90°C. 10 分間熱水抽出が最もよく、残渣の酵素処理は不要と認めたので爾後の実験は全て 90°C. 10 分間熱水抽出法によつた。

次に同様にしてハゼの死直後、サンマ、イワシの購入直後のものから細菌を分離同定し附着細菌の種類をみると共に分離菌の B₁₂ に対する作用をみた。菌の同定は Bergey's Manual of the Determinative Bacteriology 1940 年及 1948 年版を併用し常法によつた。分離菌としてハゼ 6 株、サンマ 9 株、イワシ 5 株の好気性菌を得た。嫌気性菌の発生はみながつた。これらの菌を同定した結果 *Pseudomonas* 属 9 株、*Achromobacter* 属 10 株、*Micrococcus* 属 1 株を確認した。分離菌の B₁₂ に対する作用は上記実験と同様に行つた。

得られた結果を表示すれば Table 2, Table 3, Table 4 の如くである。

Table 2. Vitamin B₁₂ decomposition by microorganisms isolated from jack mackerel meat.

	Isolated from:*			Gram	Moti- lity	Shape**	Survival vitamin B ₁₂ mγ /c.c. after incubation for			Decomposi- tion of vita- min B ₁₂ %
	a	b	c				0hr	48 hr	168 hr	
Aerobes										
No. 1	+++	+		—	+	R.	110***	90	65	40
2	+++	+		—	+	"	"	95	55	50
3	+			—	+	"	"	110	95	—
4	++	++	++	—	+	"	"	100	90	—
5	+	+	+	—	+	"	"	120	120	—
6	+	++	++	—	+	"	"	90	50	55
7	+	+		—	+	"	100	70	45	65
8	+	+		—	+	"	"	75	75	—
9	+	+		+	—	C.	"	80	60	40
10		+		—	+	R.	"	70	55	45
11			+	+	+	"	"	85	65	35
12			+	—	+	"	"	95	95	—
13			++	—	+	"	"	100	90	—
14			+	—	+	"	"	100	80	—
15			++	—	+	"	"	95	70	—
16			+	—	+	"	"	—	75	—
Anaerobes										
No. 1	+	+	+	+	+φ	R.	150	115	65	40
2	+	+	+	+	—φ	C.	"	135	75	50
3	+	+	+	+	+φ	R.	"	135	100	—
4	+			+	—φ	"	"	150	70	50

* a...fresh meat, b...spoiled meat of the round fish stored for 48 hr. at room temperature, c...spoiled meat stored for 48 hr. in the minced state at room temperature.

** R...rods, C...coccus. ***Added vitamin B₁₂. φ Spore

2 各種細菌の B₁₂ に対する作用

千葉大学腐敗研究所, 京大農学部水産学科, 阪大工学部醸酵化学科及び東海区水産研究所より得た菌名既知の各種細菌 56 種類について上記実験と全く同様の方法により B₁₂ 分解能及び合成能をみた。

結果は Table 5 の如くである。

考 察

以上の結果から鮮度低下に伴う B₁₂ の変化が主として細菌によるという我々の前報に於ける主張は尙一層確かめられたものといえよう。

アジでは B₁₂ を減少させる菌が多く, 一方アサリでは減少させる菌が極めて僅で而もその力が弱く, 搥碎肉放置中の細菌相の大部分を占める菌に B₁₂ を増加させるものが見られたことは Table 1 の結果と併せ考えると興味深い。

又前報に於てアジの魚体そのままを放置した場合と肉を搥碎放置した場合の減少の相違は微生物に対する環境の相違に基く細菌相の違いによるものと想像したが, 細菌相が両者異なることは Table 2 から明瞭に

Table 3. Vitamin B₁₂ decomposition or production by microorganisms isolated from baby clam meat.

		Isolated from*		Gram	Motility	Shape**	Survival vitamin B ₁₂ mr/c.c. after incubation for			
		a	c				0 hr.	120 hr.	0 hr.	120 hr.
Aerobes										
No.	1	+	++	—	+	R.	100***	90	2.4ψ	2.2
	2	+	++	—	+	"	"	115	"	16.0
	3	+	++	—	+	"	"	130	"	17.5
	4	+		—	+	"	"	70	"	1.3
	5	+		—	+	"	"	100	"	2.0
	6	+		—	+	"	"	95	"	2.0
	7	+		—	+	"	"	90	"	2.0
	8	+		—	+	"	"	70	"	1.6
Anaerobes										
No.	1	+	+	+	+ψ	R.	160	170		
	2	+	+	+	+ψ	"	"	160		
	3	+	+	+	—ψ	C.	"	110		

*, **, *** See Table 2. ψ Spore ψψ Without the addition of vitamin B₁₂.

Table 4. Vitamin B₁₂ decomposition or production by microorganisms isolated from various fresh fish meat.

		Survival vitamin B ₁₂ mr/c.c. after incubation for				Genus identified
		0 hr.	120 hr.	0 hr.	120 hr.	
Sardine	No. 1	160	60 (60)*	2.0	1.5	<i>Pseudomonas</i>
	2	"	180	"	9.5 (7.5)**	"
	3	"	80 (50)	"	1.5	"
	4	"	170	"	7.2 (5.2)	<i>Achromobacter</i>
	5	"	120	"	2.0	"
Mackerel-pike	1	"	90 (45)	"	1.7	<i>Pseudomonas</i>
	2	"	140	"	2.0	"
	3	"	80 (50)	"	1.0	"
	4	"	80 (50)	"	1.8	<i>Achromobacter</i>
	5	"	50 (70)	"	1.0	"
	6	"	100 (40)	"	1.8	"
	7	"	80 (50)	"	1.8	"
	8	"	170	"	12.5 (10.5)	"
	9	"	160	"	4.5 (2.5)	<i>Micrococcus</i>
Goby	1	"	70 (55)	"	1.7	<i>Pseudomonas</i>
	2	"	70 (55)	"	0.8	"
	3	"	130	"	1.7	"
	4	"	120	"	1.4	<i>Achromobacter</i>
	5	"	50 (70)	"	1.2	"
	6	"	50 (70)	"	1.6	"

* Parentheses show the decomposition rate in %.

** Parentheses show the increase of vitamin B₁₂.

Table 5. Vitamin B₁₂ decomposition by various bacteria. (in incubation for 120 hrs.)

<i>Micrococcus auranticus</i>	—	<i>Escherichia coli</i> I No. 2	+ (40)
<i>M. caseolyticus</i>	+ (55)*	" 3	+ (25)
<i>M. candidus</i>	—	" II No. 1	—
<i>M. conglomeratus</i>	+ (60)	" 2	+ (60)
<i>M. epidermidis</i>	—	" 3	+ (65)
<i>M. flavus</i>	±	Intermediate Type I	—
<i>M. freudenreichii</i>	±	" II No. 1	+ (45)
<i>M. luteus</i>	—	" 2	—
<i>M. varians</i>	—	<i>Aerobacter sp.</i> No. 1	+ (55)
<i>M. ureae</i>	±	" 2	+ (30)
<i>M. sulflavus</i>	+ (60)	" 3	+ (40)
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	" 4	±
<i>Proteus vulgaris</i> No. 1	—	" 5	+ (35)
" 2	—	" 6	+ (55)
" 3	—	" 7	—
<i>P. morgani</i> Osaka	—	" 8	+ (50)
" Denken	—	<i>Achromobacter aquatilis</i>	±
" Yamanaka	—	<i>A. convexum</i>	+ (45)
<i>P. mirabilis</i> No. 1	—	<i>A. nadaense</i>	±
" 2	—	<i>A. polymorphum</i>	+ (45)
" 3	—	<i>A. reticularum</i>	+ (50)
<i>Bacillus mesentericus</i>	—	<i>A. dacunhae</i>	—
<i>B. mycoides</i>	—	<i>A. desomolyticum</i>	—
<i>B. subtilis</i>	+ (40)	<i>A. liquefacience</i>	+ (70)
" NRRL	+ (55)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+ (50)
" PCL	+ (25)	<i>Serratia marcescens</i>	+ (65)
<i>B. megatherium</i>	±	<i>Flavobacterium citreum</i>	—
<i>Escherichia coli</i> I No. 1	+ (70)	<i>F. gasogenes</i>	—

+ Vitamin B₁₂ decomposed. ± Vitamin B₁₂ not decomposed nor produced.— Vitamin B₁₂ produced. * Parentheses show the decomposition rate in %.

る。

次にヘゼ、サンマ、イワシでは水産物の腐敗に関係深いと一般に認められている *Pseudomonas* 属、*Achromobacter* 属が主に分離され、これらに B₁₂ を分解するものの多い事が判つた。

一方我々は鮮度低下に伴ひ、稀に B₁₂ が増加するが、一般には減少する場合の多い事を述べたが、この様に代表的な水産腐敗細菌が B₁₂ を減少させる能力の強いことは我々の主張を裏付けるものといえよう。これに対し五十嵐等は水産物の鮮度低下に於て B₁₂ が減少する場合より増加する例を多く経験しているが、氏等が腐敗魚肉より主として *Lactobacillus* 属を分離し、これが B₁₂ を合成することを認めているのは我々と対蹠的である。

多くの細菌の B₁₂ 合成能と分解能を調べた処では Table 5 に示すように必ずしも分類学的な区別と一致せず、同一属中のもので合成するものと分解するものとが認められた。次に同一細菌が培地中の B₁₂ の量に応じて分解と合成の両方を行う例は本実験の規模に於ては殆ど認めなかつた。*Pseudomonas* 属、*Achrom-*

obacter 属のものに分解するものが多いことと共に市場その他で二次的に汚染する大腸菌群或は陸上腐敗細菌中にも B_{12} を分解するものの多いことは注意を要する。これら分解能を有する微生物には B_{12} 分解酵素の存在を予想させ、又 Euglena 法で測定するとき分解が略々 50% 程度に止るものが多い事は注目に値するものと思われる。

終りに貴重なる菌株を御恵与下さった京大木俣正夫、千葉大腐敗研相磯和嘉、阪大醸酵工学小田雅夫の三教授及び東海区水研山田金次郎技官に感謝する。尙本研究は文部省科学研究費によつた事を附記して謝意を表する。

文 献

- 1) 森, 橋本, 前田: 日水産 **19**, 991 (1954)
- 2) E. L. RICKES: Science **108**, 634 (1948)
- 3) J. C. LEWIS N. S. SNELL and J. A. GALIBALDI: 117th meeting Am. Chem. Soc.
- 4) 酒井: 日農化 **27**, 405 (1953)
- 5) H. M. HODGE: Ind. Eng. Chem., **44**, 132 (1952)
- 6) D. HENDLIN: Science **111**, 541 (1950)
- 7) A. LVITON and R. E. HARGROVE: Ind. Eng. Chem., **44**, 2651 (1952)
- 8) E. R. HALBROOK and F. CORDS: J. Nutri., **41**, 555 (1950)
- 9) A. P. SAUNDERS and R. H. OTTO: J. Bact., **64**, 725 (1952)
- 10) 麻生: 日農化 **27**, 680 (1953)
- 11) 五十嵐, 横関, 笹島: APF 総合研究委員会議事録 8 号 (1953)