水産ねり製品の変敗に関する研究—IV

Pseudomonas 属細菌によるかまぼこの褐変について (2)*¹

鍋谷 修・平野とも子・森 一雄

(1974年6月12日受理)

Studies on the Spoilage of Fish Jelly Products—IV.

Browning of Kamaboko by *Pseudomonas* sp. (2)Osamu NABETANI*², Tomoko HIRANO*², and Kazuo MORI*²

It has been reported previously that the bacterial browning of kamaboko is probably due to the amino-carbonyl reaction between carbohydrates and amino compounds, but the detailed mechanism of this reaction has not yet been clarified.

The precursor of the browning substance produced by *Pseudomonas* sp. isolated from browning kamaboko was investigated in order to make clear the mechanism of browning.

It was recognized that the precursor was derived from glucose and not from the amino acids tested. Besides, it was confirmed by paper chromatography that the precursor was acidic and had strong reducing power. This precursor reacted nonenzymatically with ϵ -amino-*n*-caproic acid or acidic amino acids to produce the browning substance. It is likely that this precursor is 2,5-diketogluconic acid or its related compound.

前報¹⁾では新たな褐変原因菌として *Pseudomonas* 属細菌を分離同定すると共に、本菌によるかまぼこの褐変には、かまぼこに添加されるショ糖とグルコースの両物質が密接に関連していることを報告した。

微生物によるかまぼこの褐変について、小川ら²⁾と藤田ら³⁾は、それぞれ *Achromobacter brunificans*, および *Serratia marcescens* (褐変原因菌) を用いて検討し、褐変にはグルコースが特異的に関与すること、および魚肉蛋白以外の蛋白質やアミノ酸でもグルコースが存在すれば褐変することを見だし、この反応はアミノカルボニル反応に類似した反応であろうと報告しているが、詳しい褐変機構については触れていない。

そこで、著者らは前報¹⁾で報告した褐変原因菌を用い、褐変機構について検討を加え、本分離菌による褐変反応に関与する諸物質について調べ、褐変物質の前駆体についても検討を加えたのでそれらについて報告する。

実験方法

供試菌株 前報¹⁾に報告した *Pseudomonas* 属細菌の1菌株を使用した。

褐変関与物質の検討 基礎培地 (Table 1) と種々の蛋白質、アミノ酸、および糖の各2倍濃度溶液を別々に加圧滅菌 (120°C, 15 分間) した後、それぞれ 10 ml ずつ 100 ml 容の滅菌三角フラスコに分注し、本菌を接種した後、30°C で5日間振盪培養した。褐変度は主として 7,500×g で10分間遠沈処理をした培養ろ液を10倍、あるいは50倍に希釈した後、470 nm での吸光度を測定し、これと希釈倍数の積で表わしたが、蛋白質では不溶性のものが多いため、その着色度合の肉眼観察によつて比較した。

*¹ 本研究は昭和49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 日本新薬(株)食品技術研究所 (Nippon Shinyaku Co., Ltd., Food Research Institute, Nishioji-dori, Minami-ku, Kyoto).

Table 1. Composition of basal medium for culturing browning bacteria

Yeast extract	0.2 g
NH ₄ Cl	0.1 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 g
Distilled water	100 ml
pH	7.0

褐変物質前駆体のペーパークロマトグラフィー 基礎培地にグルコース 5% を添加した培地を用いて、上記供試菌、ならびに *Gluconobacter melanogenus* IFO 3293 (グルコースより 2, 5-ジケトグルコン酸を生産する)^{4, 5)} のそれぞれ 2 日後の培養液から調製した遠沈後の上清を 30°C の減圧下で 1/10 容に濃縮し、これを 1 次元上昇法にて展開した。展開液は *n*-ブタノール: 酢酸: 水 = 4: 1: 5, ろ紙は Whatman No. 1, 展開時間は 16 時間 (室温), 発色剤はブロムフェノールブルー (1% エタノール溶液), 塩化第 2 鉄 1% 水溶液⁶⁾, および ϵ -アミノ-*n*-カプロン酸 (10% 水溶液) を用い、噴霧後、後者のみ 70°C にて 5 分間加熱した。

培養液からの褐変物質前駆体の分離方法 基礎培地にグルコース 5% と炭酸カルシウム 1.25% (別途、滅菌して添加) を添加した培地を用いて、供試菌を 2 日間培養した後、Fig. 1 に示した方法により褐変物質前駆体を遊離の酸として分離した。

Fig. 1. Separation method of browning substances produced with ϵ -amino-*n*-caproic acid in culture medium.

Pseudomonas sp. was cultured in the basal medium added with 5% glucose and 1.25% CaCO₃, at 30°C for 2 days.

* This procedure was repeated three times.

結果と考察

褐変に関与する物質 前報¹⁾では供試菌によるかまぼこの褐変には魚肉蛋白質とグルコース、あるいはショ糖が関与することを報告した。本報では、その他の蛋白質やアミノ酸が存在する場合の褐変について検討した。その結果を Table 2, および Table 3 に示した。褐変には蛋白質、あるいはアミノ酸が必須であつて、前者ではほとんどのもので強く褐変し、後者では酸性アミノ酸類、 ϵ -アミノ-*n*-カプロン酸、および γ -アミノ-*n*-酪酸などのアミノ基とカルボキシル基とが離れた位置にあるもので強く褐変する傾向があつた。

糖類での検討結果を Table 4 に示した。かまぼこでの褐変と異なり、グルコースにおいて特に強く褐変し、ショ糖ではかなり褐変度が劣っていたが、これは魚肉蛋白質とグルタミン酸ナトリウムとの反応性の相違に基づくものであらうと考えた。

培養ろ液の非酵素的褐変 基礎培地にグルコースを添加した培養液から Fig. 2 に示した方法に従つ

Table 2. Effect of various proteins on browning with glucose

Proteins	Browning	Proteins	Browning
None added	—	Saltine	++
Ovalbumin	++	Glutenin	++
Lactalbumin	+++	Gluten	+++
Collagen	+++	Casein	+++
Gelatin	++	Fish protein	+++
Zein	+		

Pseudomonas sp. was inoculated into the basal medium added with 20% protein and 5% glucose, and incubated at 30°C for 5 days.

Key to symbols used was the same as described in the previous report¹⁾.

Table 3. Effect of various amino acids on browning with glucose

Amino acids	Intensity of browning	Amino acids	Intensity of browning
Glycine	0.0	L-Glutamic acid	24.5
L-Alanine	2.3	L-Aspartic acid	13.6
L-Leucine	0.0	L-Glutamine	8.2
L-Threonine	3.3	L-Lysine HCl	1.5
L-Cysteine	0.0	L-Arginine	0.0
L-Methionine	1.0	L-Histidine HCl	2.6
L-Tyrosine	0.0	ϵ -Amino- <i>n</i> -caproic acid	43.2
L-Proline	0.6	γ -Amino- <i>n</i> -butyric acid	16.5

Pseudomonas sp. was inoculated into the basal medium added with 10% amino acid (glycine and L-histidine HCl: 3%) and 5% glucose, and was incubated at 30°C for 5 days.

The intensity of browning was determined by measuring the absorbance at 470 nm.

Table 4. Effect of various carbohydrates on browning with sodium glutamate

Carbohydrates	Intensity of browning	Carbohydrates	Intensity of browning
D-Xylose	0.7	Lactose	0.0
D-Glucose	27.3	Sucrose	5.7
D-Galactose	1.5	Cellobiose	0.0
D-Mannose	0.0	Mannitol	0.0
D-Fructose	0.8	Inulin	0.0

Pseudomonas sp. was inoculated into the basal medium added with 5% carbohydrate and 10% sodium glutamate, and incubated at 30°C for 5 days.

The intensity of browning was measured as described in Table 3.

て無色の無菌ろ液を調製し、これに ϵ -アミノ-*n*-カプロン酸の適量を添加すれば、30°C の温度でも数時間後にはかなりの程度にろ液は褐変した。そこで、このろ液を 100°C で 5 分間加熱、あるいは塩化第 2 水銀 (2 mm) を添加して培養液中に存在する酵素を失活させた後に、 ϵ -アミノ-*n*-カプロン酸を添加すれば、前者ではやや褐変の程度が低下したものの、後者では酵素失活以前とほぼ同程度に褐変した。この結果から、本褐変反応は非酵素的反応であると推定した。さらに、以上の実験とは逆に、基礎培地にグルタミン酸ナトリウム 10% を添加した培養液から Fig. 2 に準じて無菌のろ液を調製した後、グルコースを添加した場合には、ろ液は全く褐変しなかつた。このことから、本褐変反応はグルコースの代謝産物とアミノ化合物とが非酵素的に反応して生じたものであると推定した。

Fig. 2. Nonenzymatic browning of culture filtrate with ϵ -amino-*n*-caproic acid.

Pseudomonas sp. was cultured in the basal medium added with 5% glucose, at 30°C for 2 days.

グルコース含有培養液の化学的性質 基礎培地にグルコースを5%添加した培地にて、供試菌を2日間培養した際の培養液の化学的性質をTable 5に示した。本培養液はフェーリング液や硝酸銀溶液を冷時、速やかに還元した^{4,7)}。しかし2,6-ジクロロフェノールインドフェノールの還元はさほど強くなかったことから還元性物質が存在するが、アスコルビン酸のようなエンジオール基を有する物質の存在は少量と考えられた⁶⁾。さらに塩化第2鉄と反応して培養液が赤紫色になったことから、本物質は2,5ジケトグルコン酸の代謝関連物質であろうと推定した⁶⁾。また酸性物質の生成によつて、pHは2.4に低下していた。

褐変物質前駆体のペーパークロマトグラフィー グルコースの代謝産物である褐変物質前駆体をペーパークロマトグラフィーにより検討した結果をFig. 3に示した。供試菌の培養液には、 ϵ -アミノ-*n*-カプロン酸と褐変するRf約0.03の物質が確認された。これはブロムフェノールブルーで黄色に変化し、塩化第2鉄とは反応しなかった。さらに同様の性状を示す物質が*Gluconobacter melanogenus*の培養液中にも認められたが、本物質は硝酸銀を還元し、酢酸エチル：酢酸：水=3：1：1の溶媒で展開するとRf 0.03付近で、2

Table 5. Chemical properties of culture filtrate (pH: 2.4)

Reaction with ϵ -amino- <i>n</i> -caproic acid (10%)	+
Reduction of Fehling's solution in the cold	+
Reduction of silver nitrate (0.1%) in the cold	+
Reduction of 2,6-dichlorophenol indophenol (0.01%)	±
Reaction with ferric chloride (10%)	+

Pseudomonas sp. was inoculated into the basal medium added with 5% glucose.

Culture filtrate was prepared from the culture medium cultivated at 30°C for 2 days.

Fig. 3. Paper chromatograms of oxidation products

from glucose or fructose by *Pseudomonas* sp. and *Gluconobacter melanogenus* (IFO 3293).

Solvent systems: A, *n*-BuOH:AcOH:H₂O (4:1:5); B, EtOAc:AcOH:H₂O (3:1:1).

Bacteria: I, *Pseudomonas* sp.; II, *Gluconobacter melanogenus*.

Spots: open, BPB acid; dotted, BPB neutral; shadowed, FeCl₃; closed, ϵ -amino-*n*-caproic acid.

Authentic compounds: 1, ascorbic acid; 2, glucono- δ -lactone; 3, glucose; 4, gluconic acid.

種の同性状の物質に分別された。これらの詳細な化学的性状については今後の検討課題であるが、強い還元性を有することと、*Gluconobacter melanogenus* での 2, 5-ジケトグルコン酸⁴⁾、および *Gluconobacter roseus* での 2-ケトグルコン酸⁸⁾の報告結果との比較から、本物質は 2, 5-ジケトグルコン酸と類似しているものと考えられた。

褐変物質前駆体の分離 Fig. 1 の方法に従つて分離された褐変物質前駆体は、 ϵ -アミノ-*n*-カプロン酸と反応し、室温で数時間後に褐変した。この分離された褐変物質前駆体をペーパークロマトグラフィーにより検討した結果、Fig. 3 に示した培養濃縮液中のそれと全く同一の性質を示すことが見出された。

要 約

新たに分離されたかまぼこの褐変原因菌である *Pseudomonas* 属の細菌を用い、褐変機構について検討し、次の結果を得た。

1. 培養液の褐変にはアミノ化合物とカルボニル化合物の両方が必須であつた。
2. アミノ化合物では供試蛋白質の大部分、およびアミノ基と離れた位置にカルボキシル基を有するアミノ酸の多くがグルコースと強い褐変反応を示した。
3. 糖類ではグルコースが特異的に強くグルタミン酸ナトリウムと褐変した。
4. 褐変物質前駆体はグルコースの代謝産物であり、強い還元性を有する酸性物質であつて 2, 5-ジケトグルコン酸、あるいはその代謝関連物質であると推定された。この物質は非酵素的にアミノ酸と反応して褐変した。

文 献

- 1) 森 一雄・鍋谷 修・平野とも子：本誌，**40**, 959-962, (1974).
- 2) 小川博望・小名木正躬・福島清：食衛誌，**11**, 356-360 (1970).
- 3) 藤田八束・金山竜男：本誌，**39**, 327-331 (1973).
- 4) H. KATZNELSON, S. W. TANENBAUM and E. L. TATUM: *J. Biol. Chem.*, **204**, 43-59 (1953).
- 5) 片桐英郎・近藤圭二：生化学講座，**11**，共立出版，東京，1959, pp. 125-160.
- 6) K. AIDA, T. KOJIMA and T. ASAI: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **1**, 18-29 (1955).
- 7) 池田庸之助：農化，**24**, 51-59 (1950).
- 8) 池田庸之助：同誌，**28**, 538-543 (1954).