

報 文

[醸工 第40巻, 第2号, p. 51~56, 1962]

沢庵漬着色剤の変色現象に関する研究

(第7報) 細菌による 2,4-dinitro-1-naphthol-7-sulfonic acid の還元物質

芥 田 三 郎 (兵庫県立農業試験場)

Studies on the Discoloring Phenomena of Yellow Pigments for
Radish Pickles (Takuan-zuke) (VII)

On a Reduction Product Formed from 2, 4-Dinitro-1-naphthol-7- sulfonic acid by Bacteria

Saburo Akuta (Hyogo Pref. Agric. Expt. Station)

It is proved from the results of paper-partition chromatography and spectrography that the red discoloration of 2, 4-dinitro-1-naphthol-7-sulfonic acid (DNNS) by bacteria is due to the reduction of this pigment into 2-amino-4-nitro-1-naphthol-7-sulfonic acid (ANNS).

The ANNS solution changes its color sharply in the pH range between 5.3 and 5.0. Above that range, it exhibits red color and the wavelength of its maximum absorption is 486 m μ , but below that range, it produces a orange color whose wave length of absorption is 442 m μ .

緒 言

既報¹⁾のように, 2,4-dinitro-1-naphthol-7-sulfonic acid のNa塩 (以下 DNNS と略記, 即ち食用黄色1号) の赤変は細菌によるものであることが明らかとなり, 変色能をもった細菌の栄養と関連して変色現象を追究し, 適当なアミノ酸を窒素源に, TCA cycle 系の水素供与体となる化合物を炭素源にするとよく赤変が起ることから^{2,3)}, この DNNS の変色は還元によるものと推考されるに至った。

そこで, この DNNS を市販ハイドロサルフェイトを用いて還元して検したところ, 赤変が起り, その際アルカリを加えると赤色度が増すことが判明した。DNNS の還元はその構造 (Fig. 1) から見て, NO₂基が還元を受けると考えられる。それで, DNNSにある2コのNO₂基のうち1コ, あるいは2コともが還元された3種のアミノ化合物を文献に基いて化学的操作によつてつくり, そのうちどれがこの細菌による赤変物質に当たるかを確認しようと試みた。

本報告は, この種の化学的研究によつて確められた DNNS 変色の化学機構解明について記述する。

実 験

DNNS の赤変物質のペーパークロマトグラフィ

前報²⁾に記述したように, 一部のアミノ酸を除き大半のアミノ酸をそれぞれ窒素源として供与するとき, それらアミノ酸の化学構造が違つていても, 適当な炭素源を与えれば変色細菌は同じように DNNS の赤変を起した。

そこで, 種々のアミノ酸を窒素源とした場合, 生成される赤変物質が同一であるかを検するため, 藤井⁴⁾が食用色素の鑑別に使用した butanol, ethanol, N/2 NH₄OH (60 : 20 : 30)を展開液にして東洋濾紙 No. 2を用い, 上昇法で展開した。その結果, DNNS の R_f 値0.50に対し, 赤変物質はどれも 0.25~0.26の R_f 値を示した。従つて, 赤変物質は特殊なアミノ酸分解生成物と DNNS との間の反応生成物質ではなく, DNNS の単なる還元により生成される物質であると推定できる。それで, 0.1%の DNNS 液に市販ハイドロサルフェイトの粉末を加えて加熱したところ, 同様な赤変が起り, その際アルカリを加えると一層赤色を増すことを観察した。この物質を同様にペーパークロマトグラフィ (以下 PPC と略記) 処理すると, 同じ R_f 値の0.25~0.26を示した。

これらの赤変物質に酸を加えると, 赤色は橙黄色に変つた。この事実は前に報告²⁾したように, Massen 液培地を用いて培養試験を行つたとき, 赤変しかけたものが, 糖からの生酸のため橙黄色に逆行し, これにアルカリ

を加えると赤色に戻った現象と一致する。また、ペーパークロマトグラム上で、初めアンモニアによつて濃赤色を呈していたスポットが、濾紙片を取り出して空气中で乾燥していると、褐変するのが認められた。これも沢庵漬が赤変後、上層から褐変したり、空气中にさらすと褐変が進む現象と一致する。

化学操作による推定還元物質の調製

前述のように、DNNS の赤変した物質はその NO_2 基が還元された物質であると推考されるに至つたので、Fig. 1 に示す 3 種のアミノ化合物(II, III, IV)を Beilstein Handbuch der organischen Chemie 記載の次の方法で調製した。

1. DNNS の精製, $\text{HO} \cdot \text{C}_{10}\text{H}_7(\text{NO}_2)_2$, $\text{SO}_3\text{H} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

5%の DNNS(Na塩)をつくり、これに濃塩酸を滴下して淡黄色の針状結晶を得た。これをグラスフィルターで吸引濾過し、塩酸で洗い、減圧乾燥した(Fig. 2)。mp は 143°C (Richter の Lexikon der Kohlenstoff Verbindungen には 4 物質とも記載なく、Merk Index, 6Ed.⁹⁾ には DNNS の mp は $140 \sim 150^\circ\text{C}$ と記載されている)。

2. ANNS (2-amino-4-nitro-1-naphthol-7-sulfonic acid) HCl 塩の調製

文献⁹⁾ には詳細な記載がなく、硫化アルカリとか、硫化ナトリウムを使用するとだけあつたので、次の方法で調製した。

DNNS 5 g を 300 ml フラスコ中の 100 ml の水に溶かし、濃アンモニア水 2 ml を加えてアルカリ性にし、 85°C に湯浴しながら、50 ml の水に溶かした硫化ソーダ ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 12 g を徐々に加えると、還元が起つて赤変し、次第に赤色度を増してくる。その間 20 分 85°C に保つた。次に、フラスコを取り出して冷却すると、液表面に硫黄の黄白色結晶が析出するので、これを濾過し去り、300 ml 容三角フラスコに入れた濃塩酸 15 ml 中に注ぐと、ANNS の HCl 塩が黄色針状結晶となつて析出した。三角フラスコにはゴム栓をし、器内の空気を炭酸ガスで置換して ANNS の酸化を防いだ。一夜放置後、濾紙上に濾別し 15% 塩酸液で洗浄した。精製には 20% 苛性ソーダ液 10 ml に溶かし、再び濃塩酸 10 ml で沈澱させ、上空部を炭酸ガスで置換し、一夜放置後濾別し、さらに水 20 ml と 20% 苛性ソーダ液 3 ml に溶解し、次に濃塩酸 5 ml を滴下し、生じた結晶をグラスフィルター上で吸引濾過し、デシケーター中で減圧乾燥して過剰の塩酸を除いた。収量は 2.8 g、黄色針状結晶 (Fig. 3)、冷水に難溶、アルカリに易溶で濃赤色を呈する。mp は測定中に $126 \sim 127^\circ\text{C}$ から次第に褐赤変し不明であつた。

3. NANS (2-nitro-4-amino-1-naphthol-7-sulfonic acid) HCl 塩の調製^{7,8)}

調製の方法は前項と同様に不詳であつたので、次のように行つた。

DNNS の Na 塩 5 g を 100 ml の水に溶かし、塩酸で微酸性としてから濃塩酸 25 ml を加え、湯煎中で温めながら

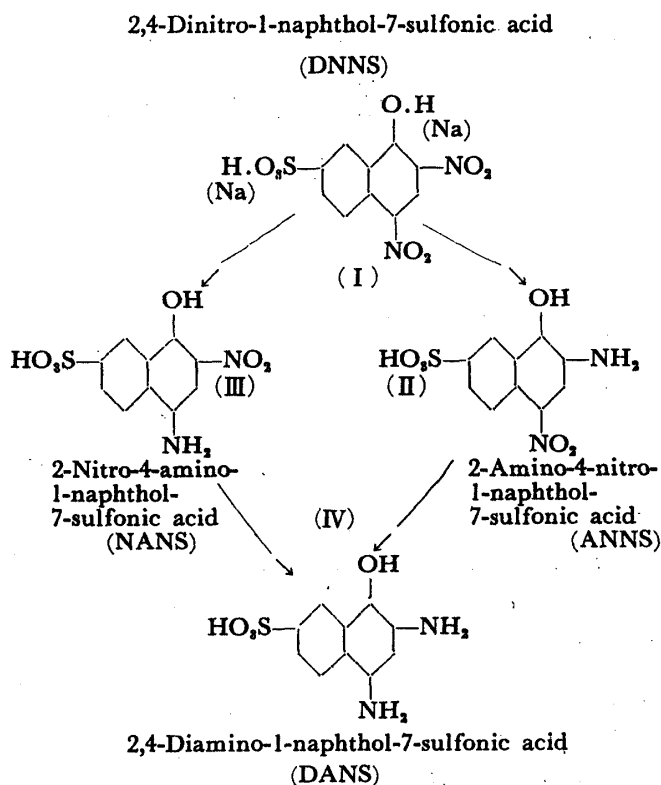


Fig. 1. 2,4-Dinitro-1-naphthol-7-sulfonic acid and its reduction product.

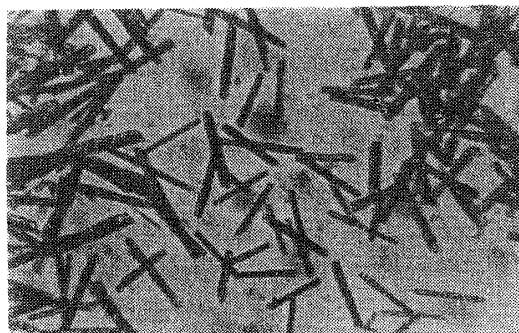


Fig. 2. Crystals of 2,4-dinitro-1-naphthol-7-sulfonic acid ($\times 450$).

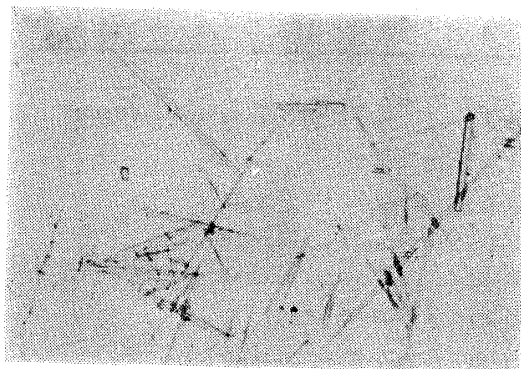


Fig.3. Crystals of HCl salt of 2-amino-4-nitro-1-naphthol-7-sulfonic acid ($\times 450$).

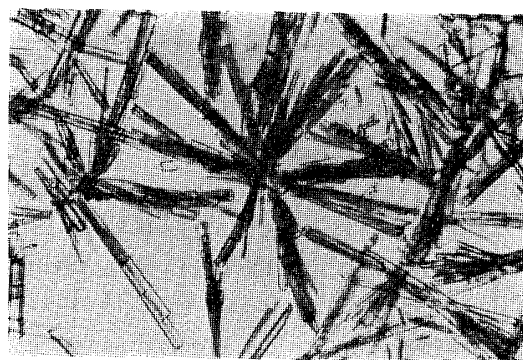


Fig.4. Crystals of HCl salt of 2-nitro-4-amino-1-naphthol-7-sulfonic acid ($\times 900$).

水50mlに溶かした第1塩化錫($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 20 gを徐々に加えると、直ちに黄色針状結晶が沈殿した。1時間放置後濾別し、2倍に希釈した塩酸液で洗い、吸引した。つぎに、水100mlと20%苛性ソーダ2.5mlとを用いて溶解し、濃塩酸8 ml中に滴下して再結晶させ、さらにもう一度精製を繰返して針状結晶を得た (Fig. 4)。冷水に不溶、熱水にかなり溶け、アルカリ中で前物質と同様に血赤色となるが、空気中での酸化褐変度は遅い。収量2.6 g, mpは測定中137°C付近から着色し始めるため不明。

4. DANS (2,4-diamino-1-naphthol-7-sulfonic acid) HCl 塩の調製

金属錫と塩酸とで還元する方法⁸⁾もあるが、sodium hyposulfite を使用する方法⁹⁾で行なった。この市販品はANNS までしか還元しないので、次の方法で調製した。

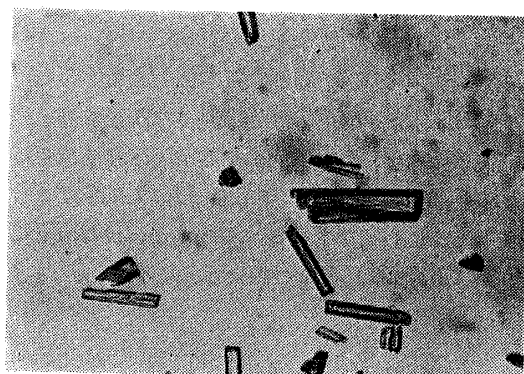


Fig.5. Crystals of di-HCl salts of 2,4-diamino-1-naphthol-7-sulfonic acid ($\times 900$).

酸性硫酸ソーダ25 gを100mlの水に溶かし、亜鉛末5 gを加え、沸騰させながらDNNSの粉末5 gを素早く加え、激しく煮沸した。生成された $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を消費しつくした頃、濃塩酸20ml中に投入、一夜放置して亜硫酸ガスを揮発させると、淡赤白色透明の長針状結晶が生成した。これを濾別し、2倍希釈の塩酸で洗い、水に溶かし、塩酸を加えて再結晶した (Fig. 5)。この斜方形に近い針状結晶のDANS塩酸塩は水に溶け易く、アルコールに不溶である。アルカリ溶液は3者中赤色度中位、酸性では淡色となる。mp209~210°C。

還元赤変物質の鑑別確認

1. ペーパークロマトグラフィによる鑑別

前述した3種の調製還元物質のうち、どれがDNNS変色細菌による赤変物質と一致するか、PPCにより鑑別しようと試みた。

溶媒にはTable 1の3種類を、濾紙は東洋濾紙No. 50を使用した。3種の還元物質はアルカリに溶かすと血赤色ないし赤色となり、スポットの判定が容易なので、それぞれ少量ずつを5%の苛性ソーダ液に溶かし、原点につけ、上昇法によつて室温で展開させた。展開が終ると、直ちにスポットのRf値を測定し、室内

で風乾し、その間のスポットの色の変化を記録した。その結果をTable 2およびFig. 6に示す。

別に、ペプトン水培地のDNNSを*Ps. geniculata* [N 12-2] 株及び*Ps. mildenbergii* [N5C] 株によつて赤変せ

Table 1. Composition of solvents used on paper-partition chromatography.

Solvent	Composition
B-1	BuOH, EtOH, N/2 NH_4OH (60 : 20 : 30)
B-2	BuOH, Pyridine, H_2O (60 : 30 : 40)
B-3	BuOH, Pyridine, N/2 NH_4OH (60 : 30 : 40)

BuOH : Butanol, EtOH : Ethanol.

Table 2. Rf values of DNNS and its reduction products.

Solvent Reduction product	B-1	B-2	B-3	Color of spot and its change
DNNS	0.53~0.54	0.54~0.56	0.55~0.57	Yellow
ANNS	0.22~0.23	0.26~0.28	0.33	Deepred→Light brown
NANS	0.12~0.13	0.16~0.18	0.18	Yellowish red→Reddish orange
DANS	0.05~0.06	0.14~0.15	0.16	Red→Orange
Red substance by bacteria	0.22~0.23	0.27~0.28	0.33	Deep red→Light brown

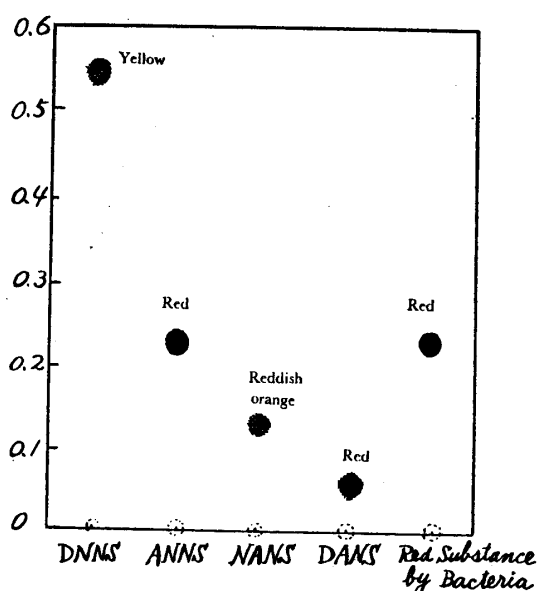


Fig. 6. Paper chromatogram of DNNS and its reduction products.

(Solvent : B-1, Filter paper : Tokyo No. 50)

しめ, 3還元物質のRf値と比較したところ, その呈色状況及びRf値はANNSのそれと一致した。また, ANNSをB-1溶媒とNo. 2濾紙とを用いて展開すると, IIに記述したと同じくRf値は0.25~0.26であった。

なお, 表中の3種の還元物質のRf値の大小の順位は, 2,4-dinitrophenol¹⁰⁾の3種の還元物質のRf値の順位と, 還元部位, アミノ基のコ数を考え合せるとよく相似している。

2. 吸光度曲線による鑑別

(1) 還元3物質相互の鑑別

DNNSの前記3種の還元物質のM/20,000溶液を酢酸-酢酸ソーダ緩衝液または磷酸塩緩衝液でつくり, pHの異なるそれぞれの液で吸光度を測定して比較すると, 3物質ともpHによつて最大吸光部が急激に変る変色点があることを認めた。そこで, 最大吸光部を示す波長について, pH-吸光度曲線をつくると, Fig. 7に示すように, ANNSはpH5.3と5.0との間で486m μ から442m μ へ, NANSはpH5.6と5.3との間で493m μ から447m μ へと急

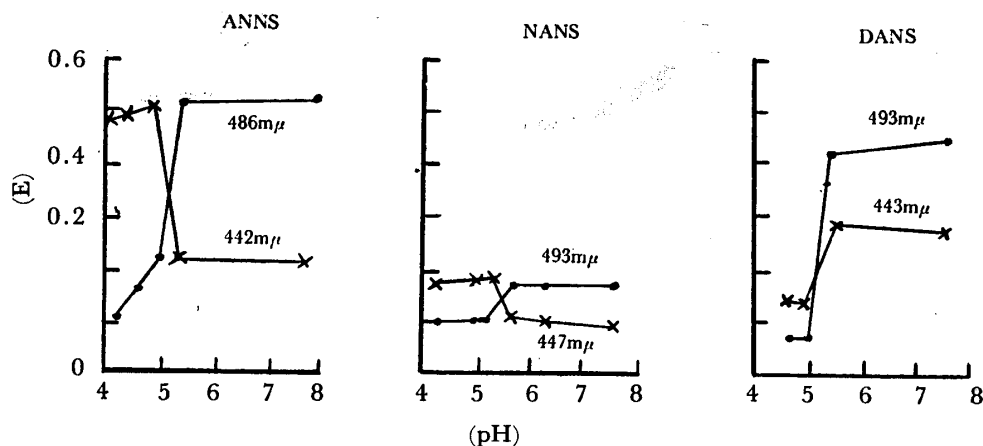


Fig. 7. Comparison of pH-extinction coefficient curves on each color changing wave lengths of DNNS and its reduction product.

(Concentration : M/20,000)

激に変色する。両者の最大吸光部は僅差しかないが、同濃度において比較すると、後者の吸光度は非常に小さく、また pH の変色点が違うので互に識別できる。

次に、DANS は pH 5.3 までは $493\text{m}\mu$ に最大吸光部を有し、その吸光度も ANNS に近い値を示すが、pH 5.0 にすると変色が起つて最大吸光部は $443\text{m}\mu$ へと移り、しかも吸光度は非常に減少する。この点で、DANS は ANNS と区別することができる。

上述のように、一つの特異点である pH 5.3 (磷酸塩緩衝液使用) での濃度 $M/20,000$ にした還元 3 物質の吸光度-波長曲線を求めた結果を Fig. 8 に示す。すなわち、可視部において、ANNS は pH 5.3 で $486\text{m}\mu$ に、DANS は $493\text{m}\mu$ にそれぞれの最大吸光部があり、NANS は pH 5.3 では変色点を過ぎるので橙色の $447\text{m}\mu$ に最大吸光部があり、前 2 者との区別が容易である。さらに、紫外部に移る前に DANS は $363\text{m}\mu$ に小ピークがあり、紫外部に移つて $299\text{m}\mu$ に大ピークがあつて、それ以下では漸減し、 $220\text{m}\mu$ に小波動がある。これに反し、ANNS は $235\text{m}\mu$ に非常に高いピークを示すだけであり、NANS は $235\text{m}\mu$ に大ピークがあるほか、 $288\text{m}\mu$ にも一つのピークを示す特徴を備え、3 者を区別することができる。

(2) 細菌による DNNS 赤変物質の鑑別

D-glutamic acid を窒素源に、lactate を炭素源に用いた Fränkel 液組成の培地 (DNNS 含有) に *Ps. gericulata* [N12-2] 株を接種して DNNS を充分赤変させた後、培地を遠心分離して菌体を除き、赤変物質をアルミナ充填のカラムクロマト管に吸着させて分離した。これを上部から微アルカリ液を補充して行くことによつて脱離流下させ、その赤色部分を pH 5.3 にして吸光度曲線を求めた。その結果をも Fig. 8 に併せ示す。

すなわち、この赤変物質の吸光度-波長曲線は可視部では $486\text{m}\mu$ に、紫外部では $235\text{m}\mu$ に最大吸光部を有し、ANNS のそれと非常によく似た形を示した。

考 察

DNNS の 3 種の還元物質、ANNS, NANS, DANS は何れもアルカリ性にて赤色を呈するので、2 と 4 との NO_2 基の何れが細菌により還元されるのか、興味ある問題であつたが、前項(1), (2)の実験結果から、2 位置の NO_2 基が還元されて ANNS となり、この ANNS は pH 5.3 以上で赤色を呈するので、これが DNNS の Na 塩である食用黄色 1 号で着色した沢庵漬が赤変する本体であると判明した。また、ANNS は pH 5.0 以下では橙色と変るが、よく漬かつた沢庵漬は pH が 4.5~5.1 付近を示す (赤変沢庵漬の pH は 6.4 前後である) ので、前に報告²⁾したように、糖を含む培地で変色細菌を培養中、一旦赤変しかけた培地が黄色に戻り、その pH を測定するとすべて 5.0 以下であつて、これにアルカリを加えると再び赤変した事実とよく一致するのである。なお、この細菌による DNNS の還元は pH 7.5 以上でよく起り¹²⁾、培地が pH 8.5 前後のアルカリ性 (後報) では細菌の繁殖は少ないのにも拘らず赤変し易いことは、硫化アルカリで還元させ ANNS をつくる化学反応もアンモニアを加えてアルカリ性になると、2 位置の NO_2 基が還元を受ける事実と一致するものである。

DNNS と化学構造の類似した 2,4-dinitrophenol (DNP) においても細菌により 2-amino-4-nitrophenol (ANP) が生産され、2-nitro-4-aminophenol (NAP) と 2,4-diaminophenol (DAP) とが検出されなかつたことが報告¹¹⁾されている。これに反し、Parker¹⁰⁾は動物組織を使用して、in vitro に DNP を還元させると、大部分が NAP となり、ANP は約 10% であるのに、動物の尿からは NAP が発見されず、ANP ばかりであつたことを報告している。その理由として、NAP が in vitro で再分解されることから、動物や人体内では NAP がさらに分解を

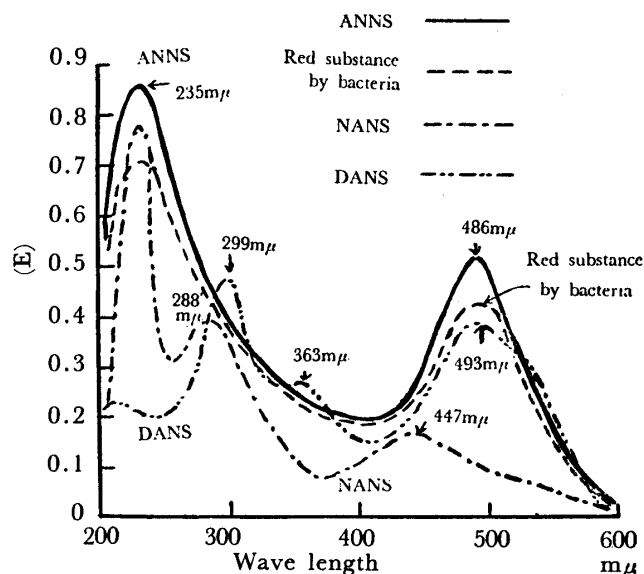


Fig. 8. Comparison of absorption spectra of reduction products of DNNS at pH 5.3.

受けるので、尿中には ANP だけが検出されるものとしており、実際、犬の肝臓に NAP を検出したと述べている。故に、食用黄色 1 号で着色した漬物や菓子を食べた場合も、細菌で還元される場合と異なる経過で解毒されるのではないかと想像され、その方の研究を進める予定でいる。

なお、DNNS が ANNS となつて赤変した沢庵漬を空气中に放置した場合や、ANNS の結晶および PPC 実験中の ANNS のスポットが褐変するのは、2-amino- α -naphthol が空气中で酸化され、 β -naphthoquinimine¹³⁾になると同じく 4-nitro- β -naphthoquinimine-7-sulfonic acid に変化するのではないかと考えられるので、これも研究を続けている。

摘 要

1. 前報^{2,9)}において、適当なアミノ酸を窒素源とし、TCA cycle 系の水素供与体となる化合物を炭素源にすると、変色細菌は 2,4-dinitro-1-naphthol-7-sulfonic acid (以下 DNNS) はよく赤変することが判明し、DNNS をハイドロサルファイトで還元しても赤変物質を生じ、両者の PPC を行くと、同じ Rf 値を示したので、赤変は DNNS の NO₂ 基の還元によつて起るものと考えられるに至つた。

2. そこで、2 および 4 の位置の NO₂ 基の一方、または両方を化学的に還元させて、2-amino-4-nitro-1-naphthol-7-sulfonic acid (以下 ANNS)、2-nitro-4-amino-1-naphthol-7-sulfonic acid、2,4-diamino-1-naphthol-7-sulfonic acid の 3 種の還元物質をつくり、DNNS 使用沢庵漬中の赤変物質がどれに該当するか比較検討した。その結果、ANNS は種々の溶媒で展開した PPC の Rf 値、および吸光度-波長曲線が、細菌による赤変物質のそれらとよく一致したので、細菌は DNNS の 2 の位置の NO₂ 基を還元して ANNS をつくつて、沢庵漬を赤変させることが明らかとなつた。

3. ANNS は pH5.3 と 5.0 との間で、急激な可視部の変色点があり、pH5.3 以上では最大吸光波長は 486m μ で赤色を呈し、5.0 以下では 442m μ で橙色を呈した。このことは、DNNS 含有培地で変色細菌培養中観察した生酸のため赤色が橙黄色に戻る事実と一致する。

本報告はその概要を昭和31年10月13日、大阪醸造学会第8回謝演会に第6報として発表した。なお、実験遂行に当り、伊福、高坂技師、結晶写真は森元静也氏の援助をえた。深謝の意を表する。

文 献

- | | |
|---|---|
| (1) 芥田：本誌, 39 , 98 (1961). | (8) Lauterbach, P.: <i>Ber.</i> , 14 , 2029 (1881). |
| (2) 芥田：本誌, 39 , 477 (1961). | (9) Gaess, F.: <i>Ber.</i> , 32 , 232 (1899). |
| (3) 芥田：本誌, 39 , 482 (1961). | (10) Parker, V.H.: <i>Biochem. J.</i> , 51 , 363 (1952). |
| (4) 藤井：食品衛生研究, 1 , 6, 31 (1951). | (11) Greville, G.D. & Stern, K.G.: <i>Biochem. J.</i> , 29 , 487 (1935). |
| (5) Merk Index, 6Ed., 435 (1955). | (12) 芥田：本誌, 39 , 104 (1961). |
| (6) D.R.P. 1895 13; <i>Chem. Z.</i> , 1907, II, 2006. | (13) 小竹：有機化学 (第5版), 665. |
| (7) D.R.P. 189, 513; <i>Chem. Z.</i> , 1907, II, 2006; Finger: <i>J. Pr.</i> [2] 79 , 441. | (昭和 36, 11, 22 受付) |

〔醸工 第40巻, 第2号, p.56~63, 1962〕

澱粉糖主として結晶葡萄糖の工業的生産に関する研究

(第4報) 有機汚染せるイオン交換樹脂の工業的回生再生法

東 修一郎・菅野 智栄 (昭和産業株式会社)

Studies on the Production of Crystalline Dextrose (IV)
An Industrial Regeneration Method for Anion Exchange
Resin Fouled by Organic Impurities.

Suichiro Higashi and Tomoei Kanno (Showa Sangyo, Co., Ltd.)