ヒガンバナ鱗茎の炭水化物に関する研究 (第2報)

一新結晶性グルコフラクタンに就て (其の1)

水 野 卓, 林 金 雄 (岐阜大学農学部農芸化学科)

昭和 28 年 7 月 1 日 受 理

Studies on the Carbohydrate in the Bulb of *Lycoris radiata* HERB. Part 2.

A New Crystalline Glucofructan (1)

By Takashi MIZUNO and Kaneo HAYASHI (Faculty of Agriculture, Gifu University)

従来 fructan の中結晶として分離され、かなり良く研究されたものに inulin⁽¹⁾ があるが、この他の fructan (irisin, asparagosin, sinistrin, lävan, tritacin, lävosin, graminin, lävulin, asphodelin, その他)⁽²⁾ は吸湿性或は潮解性大で、無定形粉末或はシラップとして得られ、精製が極めて困難のようである。

著者等は前報に引続き、ヒガンバナ鱗茎の遊離糖を追究中、冷水或は熱含水アルコールで抽出され不純物除去が十分ならば水溶液から容易に結晶する物質の分離に成功し、それが1種の新しい可成り低分子の glucofructan であることを確かめたが⁽⁴⁾、ここに先ずその分離精製法並びに二、三の性質に就て報告する。

I. 供試料 岐阜県安八郡南平野村西保地方に自生したヒガンバナ鱗茎を 1951 年 9~10 月採取し、良く洗滌し葉・根及び黒褐色外皮を除き、薄く片切風乾後更に 80°~90° で乾燥し、粉碎機で碎粉、1 mm 目篩を全部通して供試料とした。

II. Glucofructan の分離精製法 調製法として不純物除去の方法の相異によつて次の2法を案出した。何れに依つても後述の理化学的性質には相異が認められない。

(1) 石灰法： 供試料に 10 倍量の水を加え室温で振盪機を用いて 1.5~2 時間振盪抽出し、石灰乳を少しく加え攪拌し、次いで不純物の洗滌を促す為使用水の 1/50~1/20 容量の 90~100% アルコールを加え、更に洗滌の生成の止むまで石灰乳を加える。濾過洗滌後濾液に CO₂ を通じ過剰の Ca⁺⁺ を沈澱させ、そのまま CO₂ を通じつつ発泡を防止するためにかなりの量のパラフィンを加えて減圧濃縮約半量となし、冷却してパラフィンを除いてから、骨炭を加えて加温脱色し同時に沈降した CaCO₃ を除去する。このようにして得た淡色澄明濾液を更に CO₂ を通じつつ減圧濃縮し、最後に完全に蒸発乾固する。次にこれを殆ど飽和溶液となるように水で加温溶出し、活性炭で脱色して得られる無色乃至淡色澄明な濃稠溶液をそのまま冷所或は減圧デシケーター中に放置すれば、1~3日以内に白色結晶析出し全体が固化する。この方法によつてヒガンバナアルカロイド類は完全に吸着除去される。結晶を吸引濾過して母液と分離し、絶乾アルコール又はエーテルで洗滌し真空デシケーター中で乾燥すれば雪白色の粗結晶末が得られる。

(2) 醋酸鉛法： 供試料に倍量の 95% 以上のアルコールを加え室温に 2 日間時々攪拌しながら放置後濾過、95% アルコールで洗滌しアルカロイド類及び遊離単糖類等を除去する。その残渣に 3 倍量の 80% アルコール又はメタノールを加え逆流冷却器を附し、湯浴上で 1~2 時間浸出後吸引濾過し熱 80% アルコールで洗滌する。その濾液に 1/30 容の 10% 醋酸鉛液を加え不純物を沈澱させ、後骨炭を加え少しく加温静置後濾過する。濾液に CaCO₃ 末を懸濁させて H₂S を通じ脱鉛した後、再び活性炭で脱色し澄明濾液を得る。この濾液は CaCO₃ 粉末を少しく加え 80° 以下で減圧濃縮し完全に乾固する。以下は (1) の石灰法と全く同様に操作して雪白色の結晶末を得た。上記何れの方法に依つて抽出しても粗結晶の収量は供試料に対し約 6% であつた。

以上のようにして得た粗結晶はその熱飽和水溶液から再結晶を繰返すか、飽和溶液に倍量のエタノール或はメタノールを加えて放置し結晶を生ぜしめることを繰返すかによつて精製すると純雪白色微細結晶末が得られる。

III. Glucofructan の物理的諸性質

(1) 結晶形： 飽和水溶液或は飽和含水アルコール溶液から 2.5×3~3×4 μ の微細楕円形雪白色結晶となり、又稀薄水溶液から徐々に水の放散を待てば径 45~85 μ のイヌリン様球晶となる (Fig. 1, Fig. 2)。

(2) 融点及び分解点： 結晶水を含むものは m. p. 165°~167° (uncorr., Sint.), 205°~208° (decomp.), 結晶水の無いものは m. p. 168~170° (uncorr., Sint.), 208°~212° (decomp.). 何れも再結晶を繰返しても m. p. の上昇はなく半融で、分解点も鋭敏とはならない。

Fig. 1. Crystals from saturated aqueous solution or 80% alcohol ($\times 200$) Fig. 2. Crystals from dilute aqueous solution slowly ($\times 200$)

(3) 旋光度: $108^{\circ}/3\sim 4$ mm Hg で4時間乾燥した無水結晶 2g を水に溶して 100 cc としたものと及びその 40 cc を採り 20% HCl で 0.1% HCl 溶液とし沸騰水浴中で 30 分間分解, 正確に中和後 100 cc としたものの両者について旋光度を測定した結果は次のようである。

$$\text{結晶の旋光度: } [\alpha]_{\text{D}}^{11} = \frac{-1.57 \times 100}{2.1216 \times 2} = -37.00^{\circ} (\text{in } \text{H}_2\text{O})$$

溶解後 28 時間後にも変旋光は見られない。

$$\text{加水分解後の旋光度 (結晶に対する): } [\alpha]_{\text{D}}^{10} = \frac{-1.51 \times 100}{0.8486 \times 2} = -88.97^{\circ} (\text{in } \text{H}_2\text{O})$$

(4) 結晶水: 結晶 1g を減圧デシケーター中で毎日吸引し室温に1週間置き恒量となつた後, 60° , 80° ,

Table 1. Crystal Water (% for water-free crystal)

hrs.	1	2	3	6	Total
60°	6.41	1.03	0.18	0	7.62
80°	1.11	0.08	1.01	0	2.20
100°	0.32	0.15	0.22	0	0.69
98°	0.11	0.04	0		0.15
(3~4mm.)					
108°	0	0	0		0
(3~4mm.)					
Sum					10.66

100° の電気乾燥器中でそれぞれの温度で恒量となし, 更に ABDERHALDEN 氏乾燥器 (乾燥剤 P_2O_5) を用い $98^{\circ}/3\sim 4$ mm Hg, $108^{\circ}/3\sim 4$ mm Hg でも恒量となし, それぞれの温度で逸散する水分量を求め, Table 1 の結果を得た。

(5) 吸湿性: 絶乾結晶末を秤量管に入れ, 水を入れたデシケーター中に放置し (関係湿度 100% , 絶対湿度 $7.1 \pm 0.7 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$, 飽和水蒸気圧 6.54 ± 0.91 mm Hg, $5^{\circ} \pm 2^{\circ}$), 一定日数毎に秤量しその増加量から

秤量管の吸湿量を差引き, その吸湿度を 100 分率を以て算出した結果は Table 2 のようである。

Table 2. Absorptivity (% for water-free crystal)

Days	0	1	2	4	6	8	10	12	14	16
Absorptivity	0	11.39	16.81	21.20	23.88	25.92	26.74	28.00	29.49	30.68
Days	18	20	22	24	26	28	30	32	34	
Absorptivity	31.61	32.72	34.25	35.11	35.27	36.84	37.76	38.17	38.83	

34日間水を入れたデシケーター中に放置すると水分 38.83% を保持するに至るが潮解はしない, これを1週間真空デシケーター中で乾燥すると水分含量 10.04% となり, 更に1週間放置しても水分含量には殆ど変化がない。

(6) 溶解性: 結晶に一定量の被検溶剤を加え時々攪拌しながら1時間一定温度に保ち, その上澄液又は濾液の一定量を濾紙に点着し溶剤を放散させた後, 1% phloroglucinol・ 1% HCl ethanol で現像し, その呈色の度合によつてその溶剤に対する溶解性を検した, なお検鏡法も並用した, その結果は Table 3 のようである。

Table 3. Solubility

Cool Water	+	Hot Pyridin	+	Cool~Warm absol.	
Tepid Water	++	Cool~Hot Phenol	-	Methanol	-
Warm Water	+++	Cool~Hot Benzene	-	Cool~Tepid Ether	-
Hot Water	++++	Cool Toluol	+	Cool Glycerin	-
Hot 95% Ethanol	±	Hot Toluol	+	Cool~Warm Acetone	-
Hot 90% Ethanol	+	Warm Glycerin	+	Cool~Warm Chloroform	-
Hot 80% Ethanol	++	Cool~Warm absol.		Hot Campher (180°)	-
Cool Pyridin	+	Ethanol	-	Cool~Hot Amyl alcohol	-

Cool : 15° (5~30°), Tepid : 45° (31°~ 50°)
 Warm : 65° (51°~80°), Hot : 95° (81°~100°)

(7) 粘度 : 絶乾結晶 2g を水 100 cc に溶かしたものを基準として, これを 2, 4, 8, 16, 32 倍に稀釈した液を調製し, 25° に於いて OSTWALD 氏粘度計を用いてその粘度を測定し, Table 4 の結果を得た. 但し溶液と水との密度の比を 1 とする.

Table 4. Viscosity

Dilution	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	(H ₂ O)
Viscosity (C. G. S)	0.00992	0.00948	0.00930	0.00918	0.00906	0.00899	0.00895

(8) その他 : 常温に於いて潮解性, 風解性共になく, 無味無臭で甘味を有しないが稀酸で加水分解すればかなりの甘味を呈する.

IV. Glucofructan の加水分解 ABDERHALDEN 氏乾燥器で乾燥 (P₂O₅, 108°/3~4 mm Hg, 4 hrs.) した無水結晶末 3g を水に溶して 2l とし, これを供試液として各種酸に対すを分解度を BERTRAND 法により定量し, 無水結晶 1g から生ずる還元糖を fructose として算出しその mg 数で示した.

(1) 鉱酸による加水分解

0.1% HCl による分解 (100°) : 供試液 10 cc を採り 2% HCl 0.5 cc を加え, 逆流冷却管を附し沸騰水浴中で一定時間分解後直ちに予め混合したペルトラン氏法 AB 混液 20 cc を加え反応を止め, 生じた還元糖を定量し, Table 5 の結果を得た.

Table 5. (0.1% HCl, 100°)

Time of Hydrolysis (min.)	0	1	2	3	5	7	9	10	12	15	20	25	30	35
Degree of Hydrolysis (mg. Fructose)	0	238	864	982	1021	1042	1070	1080	1084	1090	1085	1082	1085	1083

0.2% HCl による分解 (30°) 供試液 10 cc に 2% HCl 1 cc を加え, 密栓して 30° 恒温器中に一定時間放置後還元糖を定量し Table 6 の結果を得た.

Table 6. (0.2% HCl, 30°)

Time of Hydrolysis (hrs.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	17	18	20	22	24	26
Degree of Hydrolysis (mg. Fructose)	106	161	202	244	311	340	379	406	467	518	900	942	1015	1066	1090	1090

(2) 有機酸による加水分解

1% 醋酸による分解 (100°) : 2% HCl の代りに 20% 醋酸 0.5 cc を使用し (1) と同様にじて Table 7 の結果を得た.

Table 7. (1% Acetic acid, 100°)

Time of Hydrolysis (min.)	5	10	15	20	25	30	33	35	37	40	45	50
Degree of Hydrolysis (mg. Fructose)	240	426	604	732	880	1033	1084	1090	1084	1086	1085	1088

1% クエン酸による分解 (100°) : 2% HCl の代りに 10% クエン酸 1 cc を使用し (1) と同様にして Table 8 の結果を得た.

Table 8. (1% Citric acid, 100°)

Time of Hydrolysis (min.)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20	25	30	35	40	45
Degree of Hydrolysis (mg. Fructose)	188	262	400	520	753	908	945	997	1000	1022	1047	1061	1070	1088	1090	1090

(3) 酸性塩による加水分解

30%- KH_2PO_4 による分解 (100°): 供試液 10 cc に $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4.3 g を加え沸騰水浴中で一定時間加温後分解度を算出し Table 9 の結果を得た.

Table 9. (30% KH_2PO_4 , 100°)

Time of Hydrolysis (hrs.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Degree of Hydrolysis (mg. Fructose)	103	277	430	632	763	889	1011	1082	1090	1090

(4) 酵素による加水分解

タカヂアスターゼによる分解 (55°): 供試液 100 cc に 1% タカヂアスターゼ液 10 cc を加えたもの及び対照として蒸留水 100 cc に 1% タカヂアスターゼ液 10 cc を加えたものをそれぞれ密栓して 55° に保ち, 一定時間毎に 10 cc を採取し生ずる還元力を測定し Table 10 の結果を得た.

Table 10 (Takadiastase, 55° , pH 6.8~6.9)

Min.		30	60	90	120	150	180	210	240
KMnO ₄ * cc	Reacted	1.18	1.24	1.18	1.26	1.25	1.28	1.26	1.27
	Control	1.17	1.23	1.18	1.26	1.26	1.26	1.27	1.28
	Difference	0.01	0.01	0	0	0.01	0.02	0.01	0.01

* 1 cc=4.32 mg. Cu

タカヂアスターゼによる分解 (30°): 供試液 200 cc に 1% タカヂアスターゼ液 20 cc 及びトルエン 10 cc を加えたもの及び対照として供試液を蒸留水で置き換えたものとを密栓して 30° に放置し, 一定日数毎にそれより 10 cc づつを採りその還元力を測定し Table 11 の結果を得た.

Table 11. (Takadiastase, 30° , pH 6.4~6.2)

	Days	0**	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
KMnO ₄ * cc	Reacted	0.98	1.16	1.36	1.50	1.61	1.80	1.69	1.67	1.65	1.65	1.63	1.68
	Control	1.01	1.05	1.24	1.42	1.46	1.68	1.54	1.62	1.62	1.60	1.57	1.54
	Difference	0.03	0.11	0.12	0.08	0.15	0.12	0.15	0.05	0.03	0.05	0.06	0.14

* 1 cc=4.32 mg. Cu

** After 1 hrs.

麦芽アミラーゼによる分解 (55°): 1% タカヂアスターゼ液の代りに麦芽粉 10 g に水 100 cc を加え, 20 分間振盪後濾過して得た透明酵素浸出液を使用しタカヂアスターゼの場合と全く同様にして Table 12 の結果を得た.

Table 12. (Malt-amylase, 55° , pH 7.0~6.8)

Min.		30	60	90	120	150	180	210	240
KMnO ₄ * cc	Reacted	4.72	5.11	5.09	5.10	5.08	5.03	5.02	5.02
	Control	4.73	5.13	5.09	5.06	5.04	5.07	5.02	5.08
	Difference	0.01	0.02	0	0.04	0.04	0.04	0	0.06

* 1 cc=4.32 mg. Cu

以上の結果から, ここに得た glucofructan は鉍酸に依つては非常に分解され易く 100° では 0.1% HCl で 15 分, 30° に於いても 0.2% HCl で 24 時間で殆ど完全に加水分解される. 又稀薄有機酸, 例えば 1% 醋酸で 35 分, 1% ケエン酸では 40 分加熱すれば殆ど完全に分解される. なお酸性塩である 30% KH_2PO_3 に依つても 9 時間で完全に単糖類にまで分解される. しかしタカヂアスターゼ, 麦芽アミラーゼに依つては殆ど分解されない.

V. その他の性質 Glucofructan 水溶液はフェーリング氏液を還元せず沈澱も生じない. 又醋酸鉛液, 石灰乳, 稀酸に依つても沈澱を生じない. 沃度溶液によつて着色しない. Inulin 水溶液及び scorobose 水溶液の場合と同様に glucofructan 水溶液に飽和 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 液を加えれば白い積雲状の絮状沈澱を生じ, $70^\circ \sim 100^\circ$ に加熱すると完全に溶解し澄明液となる. 醋酸ソーダ及びフェニールヒドラジンを加えて加熱してもオサゾンを生じない. 又 *Saccharomyces cerevisiae* によつて醗酵されない.

摘 要

ヒガンバナ麟基の冷水又は熱 80% アルコール抽出液から glucofructan を結晶状に分離し, その理化学的性質を明かにした.

- 842 (1931), 66, 399 (1933); Q. OHLMEYER u. H. PRINGSHEIM: *Ber.*, 66, 1292 (1933).
- (2) 三宅捷, 林金雄: 炭水化物概論 (岩波書店) 392~399頁参照.
- (3) 林, 永田, 水野: 農化., 27, 234 (1953).
- (4) 速報として本誌に報告した. [農化., 27, 824 (1953)] 尙化学構造についての詳細な研究は第3報として近日本誌に投稿の予定.

Summary

A crystalline glucofructan is isolated from cool water or hot 80% alcohol extract of the bulb of *Lycoris radiata* HERBERT, and its physical and chemical properties are studied.

微生物のクエン酸分解に関する研究 (第4報)

Bact. succinicum の炭酸ガス固定について

高 橋 甫 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 28 年 7 月 8 日 受理

Studies on the Decomposition of Citrate by Microorganisms. Part 4.

On the Fixation of Carbon Dioxide in *Bact. succinicum*

By Hajime TAKAHASHI (Dept. of Agr. Chem., Fac. of Agr., Tokyo Univ.)

第2報に於て筆者は *Bact. succinicum* の乾燥標本を用い, その呼吸能及び各種毒物の阻害等から, 本菌は嫌気条件下でクエン酸を一部はトリカルボン酸 (TCA) サイクルを経てコハク酸に酸化し, 一部は直接的にオギザル醋酸 (OAA) と醋酸に分解し, ここに生成したオギザル醋酸は TCA-サイクルによる酸化と共転する還元反応によりコハク酸に還元されるという想定を下した⁽¹⁾.

クエン酸の直接的分解の生産物が OAA またはそれに近縁の物質と仮定すれば OAA は WOOD-WERKMAN 機構により容易に外囲の炭酸ガスと平衡することが知られているので, 想定した機構が正しいとすれば, 培地に放射性炭酸ガス ($C^{14}O_2$) を与えた場合, コハク酸のカルボキシル基に放射性を認め得る筈である.

今回筆者は *Bact. succinicum* の生菌体及び乾燥標本に OAA の脱炭酸能を認めると共に, $C^{14}O_2$ をクエン酸とともに生菌に与へ, 生産物中のコハク酸のカルボキシル基に放射性を証明し, さらに得られた放射性コハク酸を用いて, クエン酸分解と外囲の炭酸ガスのコハク酸への incorporation との関係について 2, 3 の知見を得たのでここに報告する.

実 験 の 部

(I) オギザル醋酸脱炭酸能の証明

(A) 生菌体の場合

(a) 菌体の調製:- 肉エキス, ペプトン各 1%, クエン酸ソーダ, 食塩各 0.5% の培養液 800 cc を培養瓶に入れ, 菌を接種, 30° に 40 時間静置培養する. 菌体を遠心分離し, 0.2% KCl で 1 回洗滌した後, 蒸留水に懸濁した. この様にして作成した静置培養菌体は嫌氣的クエン酸分解力がいちぢるしく強く $Q_{CO_2}=50\sim70$ 程度に達する.

(b) 脱炭酸能の測定:- pH=6.0 で検圧法により 13.3 μM の OAA を基質とし窒素ガス気流中で脱炭酸能を測定した. OAA は非酵素的に脱炭酸されるので菌体を沸騰水中に 1 分半加熱した対照により非酵素的分解の補正を行つた. 補正した実験結果を Fig. 1 に示す. 図より明かなように基質添加後 5 分間は反応速度は極めて早く $Q_{CO_2}=71.6$ に達したが, 10 分以後は速度は約 1/3 となり $Q_{CO_2}=22.4$ となる. また第1報⁽²⁾, 第2報⁽¹⁾, 第3報⁽³⁾で報告した毒物 α, α' -dipyridyl は脱炭酸を強く阻害し, 毒物濃度 $M/700$ で基質添加 10 分以後の阻害度は 60.7% に達する.

(B) 乾燥標本の場合

(a) 菌体標本の調製:- 前記生菌体の場合と同組成の培養液 100 cc を肩つきガラスコに入れ, 30° で 40 時間振盪培養し, 菌体を遠心分離した後 0.2% KCl で 2 回洗滌し, 新しく焼いた塩化カルシウム上に減圧乾燥した.

(b) 脱炭酸能の証明:- 実験条件はすべて生菌体の場合に準ずる. 但し, 水素ガス気流中で測定した. 生