- (3) 天羽幹夫 : 農化, 26, 306 (1952).
 (4) 天羽幹夫 : 同上, 26, 339 (1952).
 (5) 天羽幹夫 : 同上, 26, 420 (1952).
 (6) E. J. CAMERON : *Canner*, 64, No. 10, 146 (1927).
 (7) C. R. STUMBO *Advances in Food Research*, 2, 80 (1949).
 (8) C. T. TOWNSEND, J. R. ESTY and F. C. BASELT : *Food Research*, 3, 323 (1938).
 (9) C. R. STUMBO *Food Technol.*, 2, 228 (1948).
 (10) C. R. STUMBO, J. R. MURPHY and J. COCHRAN : *Food Technol.*, 4, 321 (1950).
 (11) N. W. DESROSIER and W. B. ESSELEN : *J. Bact.*, 61, 541 (1951).
 (12) J. M. REED, C. W. BOHRER and E. J. CAMERON : *Food Research*, 16, 383 (1951).
 (13) G. S. BURKE : *J. Am. Med. Assoc.*, 72, 88 (1919).
 (14) E. C. DICKSON : *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, 25, 426 (1928).
 (15) K. E. MEYER and O. W. LANG : *J. infect. Dis.*, 39, 321 (1926).
 (16) C. O. BALL : *Nat. Res. Coun. Bul.*, 37, (1923).
 (17) F. C. W. OLSON and H. P. STEVENS : *Food Research*, 4, 1 (1939).
 (18) H. REYNOLDS, A. M. KAPLAN, F. B. SPENCER and H. LICHTENSTEIN : *Food Research*, 17, 153 (1952).
 (19) J. R. ESTY and K. F. MEYER : *J. infect. Dis.*, 31, 650 (1922).

Summary

The spores of P. A. 3679 (*Clostridium sporogenes*) were suspended and heated in neutral phosphate buffer and then subcultured in liver-broth. Marked increases in the survival times of the spores were observed by the presence of stratified thioglycolate agar on the liver-broth. The survival times of the various spore concentrations were determined at the four heating temperatures, 105°, 110°, 115°, and 120°C.

The relationships between spore concentrations and survival times of each heating temperature could also be expressed by a general equation, which has been previously obtained on the spores of aerobic bacilli.

Thermal-death-time curves for the three different spore concentrations in neutral phosphate buffer were constructed. It was shown that the z values for P. A. 3679 spores are equal to 23°F for every spore concentration, while F values vary with the spore concentration giving the following values. $F=12.03$ (minutes) for 1×10^6 spores per ml, $F=8.69$ for 1×10^4 spores per ml, and $F=5.79$ for 1×10^2 spores per ml.

Temperature coefficients of death of P. A. 3679 spores decreased slightly with rising temperature. Consequently, it should be pointed out that the thermal-death-time curve was not essentially a straight line, but was very slightly concaved downward.

醗酵による Vitamin C の製造 (第5報)

Na-2-Keto-L-gulonate より Vitamin C の合成

山 崎 正 孝 (財団法人 医薬資源研究所)

昭和 28 年 2 月 20 日 受理

Production of Vitamin C by Fermentation. Part 5. Synthesis of
Vitamin C from Na-2-Keto-L-gulonate.

By Masataka YAMAZAKI (Research Institute of Pharmaceutical Resources)

緒 言 Vitamin C の基材を得る目的を以て Ca-L-idonate⁽¹⁾ (半量の Ca-D-gluconate の純結晶を含む, 以下 Ca-I-G と略記) を基質とし, 著者の分離した *Pseudomonas fluorescens*⁽²⁾ を用い, 第2報⁽³⁾ は cell suspension により振盪酸化を行い, 第3報⁽⁴⁾ は高濃度窒素培地で振盪培養を行い, 第4報⁽⁵⁾ は低濃度窒素培地で振盪培養を行い, それぞれ Na-2-keto-L-gulonate を分離する事が出来たが, 今回該 Na 塩より 2-keto-L-gulonic acid を得, vitamin C に導く適当な方法を検討した。

代表的な vitamin C の合成法は REICHSFEIN の方法⁽⁶⁾で, 同氏は始め diacetone-2-keto-L-gulonic acid

より 2-keto-L-gulonic acid を得、methyl ester 化を行い、之より vitamin C を得た。次いで diacetone-2-keto-L-gulonic acid より直接 vitamin C を得る工業的に有利の方法⁽⁷⁾を發表した。著者は初め 2-keto-L-gulonic acid を methyl ester 化する最適反応温度を測定し、得た methyl ester を vitamin C に変ずる最適の方法を検討し methyl ester と CaCO_3 を用いた同氏の方法を改良した。次に diacetone-2-keto-L-gulonic acid の代りに 2-keto-L-gulonic acid を用い直ちに vitamin C に転位をなす事が出来たが、更に反応溶媒の改良を試み、その目的を達する事が出来た。

実 験 並 に 考 察

1) Na-2-keto-L-gulonate より 2-keto-L-gulonic acid 供試品は第 4 報に於て得られたものの内、窒素源に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を使用した場合を A とし、 $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{NH}_4$ を使用した場合を B とす。以上 2 種類につき得られた Na-2-keto-L-gulonate (第 2 報に於て確認。1 分子結晶水を含む) 5 g を採り、各に水 50 cc を加えて溶解し、活性炭を加えて濾過し、イオン交換樹脂 IR 120 を通して Na イオンを除去す。A 液は pH 1.8, B 液は pH 2.0 となる。減圧濃縮を行いシラップ状となす。A は黄褐色を呈し 1 日放置して結晶を析出す。B は微黄色を呈し直ちに結晶を析出す。濾過し少量の acetone で洗い乾燥す。A の収量 3.50 g, 収率 77.3%, mp. 152°. B の収量 3.65 g, 収率 80.6%, mp. 154°. 水から再結した精製品の mp. A・B とともに 164° (REICHSTEIN⁽⁸⁾ mp. 165°). 1 g を採り脱水した重量 A = 0.913 g, B = 0.914 g. 理論量 0.915 g (1 分子結晶水含有物に対して). $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$ 計算値 C 37.11, H 5.15. 実験値 (A) C 37.30, H 5.67. (B) C 37.17, H 5.27.

A の収率のやや不良の原因は窒素源として使用した $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の硫酸根が Na-2-keto-L-gulonate 中に Na_2SO_4 として含まれ、遊離の酸に導いた場合生じた H_2SO_4 が濃縮過程に 2-keto-L-gulonic acid に作用し之を分解した為であると考えられる。B の如き所謂無反応窒素源即ち $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{NH}_4$ を使用した際、例え $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ として Na-2-keto-L-gulonate 中に共存するも酢酸は揮発酸であり且つ弱酸なるため、濃縮過程に容易に溜液中に移行し、2-keto-L-gulonic acid に作用せず直ちに該酸を析出したと考えられる。故に該酸の結晶分離は培地に影響する所大で、窒素源に鉍酸塩の使用は不適当である。陽イオンを除去濃縮のさい基質の分解を引き起さない酢酸の如き揮発酸のアモニウム塩、又は尿素の如く其の組成を分解せず基質に無作用の窒素源⁽⁹⁾を使用すれば、生じた 2-keto-L-gulonic acid は分解せず、従つて容易に結晶を析出し、高収率に得る事が出来ると考えられる。

2) 2-Keto-L-gulonic acid より 2-keto-L-gulonic acid methyl ester 供試品は 1-B によつて得られた無水体を使用。REICHSTEIN の ester 化⁽¹⁰⁾に従い反応最適温度を決定した。

2-keto-L-gulonic acid (anhydrous) 1g	} 左の混合物を還流冷却器を附したコルベン中で次の条件で反応せしむ。反応終了液は乾燥空気を通じ、減圧濃縮後析出した結晶を濾別し少量の無水 methanol にて洗滌後乾燥す。
0.5% HCl gas を含む methanol 3.5 cc	
dimethylsulphite 0.9 cc	

Table 1. Effect of Reaction Time and Temperature on the Yield of Methyl ester.

Sam. ple no.	1	2	3	4	5	6	7
Reaction	{ time	22h.	30min.	//	//	//	//
	{ temp.	29.0	36.0	42.0	48.5	51.5	57.0
Yield	{ g.	0.38	0.62	0.75	0.89	0.78	0.68
	{ %	35.5	57.8	69.9	83.0	72.8	63.4

Table 1 の如く methyl ester 化の最適温度は反応時間 30 分で 48~50° であつた。得られた結晶を合し無水 methanol で再結。mp. 156° (REICHSTEIN⁽¹¹⁾ mp. 155~157°)

$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_7$ 計算値 C 40.38, H 5.77. 実験値 C 40.29, H 6.00.

3) 2-Keto-L-gulonic acid methyl ester より vitamin C REICHSTEIN の chloroform, alcohol 等を使用し vitamin C を得る方法⁽¹²⁾は純度並に収量の点で良好であるが、工業的には出来るだけこれら高価につく溶媒の使用を避けるべきである。故に炭酸石灰の水溶液で短時間に enol 化を完了する方法⁽¹³⁾を改良し次のように実施した。

(1) 炭酸石灰 1g を加えて 80°, 2時間
(3) 炭酸カリ 1g を加えて 80°, 10分間

(2) 炭酸ソーダ 1g を加えて 80°, 10分間
(4) 重炭酸ソーダ 1g を加えて 90°, 4分間

供試品は 2 の混合物を無水 methanol にて 1 度再結して使用。蒸溜水 10 cc に CO_2 を通じ加熱しながらそれぞれ熱す。急冷後活性炭を加えて濾過す。濾液はイオン交換樹脂 IR 120 を通して陽イオンを除去後濃縮し、析出した結晶を濾別し acetone にて洗い乾燥恒量となす

Table 2. Effect of Alkali Compounds on the Yield of Vitamin C.

Alkali compds. used for experiment	Yields		Purities
CaCO_3	0.63 g	74.5%	82%
Na_2CO_3	0.44	52.0	91
K_2CO_3	0.53	62.6	85
NaHCO_3	0.76	89.8	97

最も収量並に純度の高い NaHCO_3 より得られたものを水から再結, mp. 188°, 合成品と混融するも mp. 降下せず, $[\alpha]_D^{24} = +52^\circ$ (C = 1.0 in methanol) [REICHSTEIN⁽¹³⁾ mp. 189~190° $[\alpha]_D^{20} = +49^\circ$ (C = 1.0 in methanol)]
 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 計算値 C 40.91, H 4.55. 実験値 C 40.78, H 4.89

4-a) 2-Keto-L-gulonic acid より vitamin C REICHSTEIN の diacetone-2-keto-L-gulonic acid 或は 2-keto-L-gulonic acid methyl ester から vitamin C を得る方法⁽¹⁴⁾に 2-keto-L-gulonic acid を適用した。供試品は 2) によつて得たものを使用。

2-Keto-L-gulonic acid 1 g, chloroform 3.3 cc, 15% HCl gas を含む ethanol 0.6 cc.

以上を丸底フラスコに入れ還流冷却器を附し時々振盪し乍ら 60~63° に 70 時間加温。灰白色の結晶析出。濾別し ethanol で洗滌後乾燥す。収量 0.73 g, 収率 80.5%, 純度 95% (N/20 I_2 にて滴定)。水より再結 mp. 188°, 3) と混融するも融点降下せず

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 計算値 C 40.91, H 4.55. 実験値 C 40.94, H 4.52

即ち diacetone-2-keto-L-gulonic acid の場合と同様の結果を得た。

4-b) REICHSTEIN は無反応稀釈剤に chloroform を使用しているが安価な benzol の使用を試みた。HCl gas を吸収した ethanol は benzol に難溶なるため 2-keto-L-gulonic acid の vitamin C への転位は約 1/4 進行し他は分解した。故に benzol に易溶の butanol を HCl gas 吸収剤に使用した。2-keto-L-gulonic acid (anhydrous) 1 g, benzol 3.3 cc, 15% HCl gas を含む butanol 0.6 cc を 4-a と同様に反応せしむ。収量 0.70 g, 収率 77.2%, 純度 93% (N/20 I_2 にて滴定)。水より再結 mp. 188°, 3) と混融するも融点降下せず。

2-Keto-L-gulonic acid (anhydrous) 1 g, benzol 3.3 cc, 5% HCl gas を含む butanol 1.8 cc で反応した場合、収量 0.58 g, 収率 63.9%, 純度 98%, 淡黄色光沢ある結晶。mp. 185°, 水より再結, mp. 188°, 3) と混融するも融点降下せず 即ち butanol と benzol の使用は 4-a に近い収率 (77.2%) 並に純度 (93%) を得た。更に butanol 量を 3 倍に増加した場合、収率は減少 (63.9%) するも純度高き (98%) 淡黄色光沢ある結晶を得た。本法は工業的に利用価値を認める事が出来た。

総 括

1) N 源に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ と $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{NH}_4$ を使用し Ca-I-G を基質として *Pseudomonas fluorescens* を接種し振盪培養によりて Na-2-keto-L-gulonate を得た (第 4 報)。該結晶をイオン交換樹脂 IR 120 を用いて Na イオンを除き 2-keto-L-gulonic acid に導いた所、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 培地を使用するより $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{NH}_4$ 培地を使用した方が収率良好で、前者が 77.3% に対し後者は 80.6% であった。前者の収率不良の原因は主として培地より来る硫酸によつて 2-keto-L-gulonic acid の分解される為なる事を知った。

2) 2-Keto-L-gulonic acid の methyl ester 化の最適温度は 30 分間の反応で 48~50° で、収率 83.0% であった。此の methyl ester を弱アルカリ溶液と加熱して vitamin C に変えイオン交換樹脂で陽イオンを除き濃縮し vitamin C (収率 89.8%) を得た。

3) REICHSTEIN method を改良し free 2-keto-L-gulonic acid に benzol と HCl gas を含む butanol を加えて反応せしめ vitamin C 結晶収率 77.2%, 純度 93% を得た。又 butanol 量を 3 倍に増加し、収率 63.9%, 純度 98% を得た。

終りに臨み終始御懇篤な御指導を賜つた東大教授朝井勇宜・佐橋佳一両博士に、又御激励と御便宜を戴いた医薬資源研究所長並にマイクロ分析をお願いした東大農芸化学科マイクロ分析室の方方に合せて感謝の意を表する。なお研究の所要経費の一部は文部省科学研究費によつて支弁した。

- (1) 山崎 : 醸酵工学, 31, 39 (1953).
- (2), (3) 山崎 : 醸酵工学, 31, 86 (1953).
- (4) 山崎 : 醸酵工学, 31, 126 (1953).
- (5), (9) 山崎 : 醸酵工学, 31, 230 (1953).
- (6), (8), (10), (11) REICHSTEIN and GRÜSSNER : *Helv. Chim. Act.*, 17, 311 (1934).
- (7), (12) REICHSTEIN : 公告 2859, 昭 12 ; U.S.P. 122478.
- (13) REICHSTEIN : U.S.P. 116650 (1933).

Summary

In the previous reports, it was ascertained that *Pseudomonas fluorescens* sp. isolated by the author produced a large amount of 2-keto-L-gulonic acid from Ca-D-idonate (containing a half quantity of Ca-D-gluconate) and that the separation of 2-keto-L-gulonic acid from 2-keto-D-gluconic acid which produced simultaneously from Ca-D-gluconate was achieved by using the difference of the solubility of their Na-salt in methanol.

Now, the author intended about the synthesis of vitamin C from Na-2-keto-L-gulonate thus obtained. The summary of the results is as follows :

1. Free 2-keto-L-gulonic acid crystal was obtained with ca. 80% yield from its Na-salt.
2. The optimum temperature for the methyl esterification of 2-keto-L-gulonic acid was 48~50° in 30 minute reaction and the yield of methyl ester crystal was 83.0% by the REICHSTEIN's method. Then the methyl ester was converted to vitamin C by heating with weak alkalic solution and after removing metallic cations with the ion-exchange resin. The yield of the vitamin C was about 90%.
3. Vitamin C was also prepared directly from free 2-keto-L-gulonic acid by the process of author's modification of the REICHSTEIN's method, viz using benzol instead of chloroform and butanol instead of ethanol as HCl-gas absorbing agent. The yield of vitamin C crystal was ca. 77% (93% purity). (The original REICHSTEIN's method gave 80% (95% purity) yield from diacetone-2-keto-L-gulonic acid.)

イオン交換樹脂による酒精蒸溜廢液の精製に就て

宮 地 昇, 河 野 景 明 (三楽酒造株式会社)

昭和 26 年 9 月 22 日 受 理

Studies on the Refining of the Alcohol Distillers' Solubles by Ion Exchange Resin.

By Noboru MIYACHI and Kageaki KŌNO (Sanraku-Shuzo Co. Ltd.)

緒 言

酒精蒸溜廢液を利用して、調味料を作ることにについては、従来多くの研究と特許とがあるが^{(1)~(10)}、著者は最近漸くその利用価値を認められて来たイオン交換樹脂を使用して^{(14)~(20)}、蒸溜廢液中の雑味、灰味等の嫌味の主成分と考えられている加里、石灰、苦土、鉄及び其の他の陽イオンの塩類を吸着除去し、雑味、灰味等の嫌味及び廢液特有の悪臭、甘藷に起因する臭気の除去を試みた。

この実験に使用したイオン交換樹脂は三菱化成製の所謂 Wofatit K 型及び N 型のもので、之を使用して廢液の濾液を精製するには次の 2 つの方法がある。

1. 陽イオン交換樹脂のみを使用する方法 :— この場合は廢液の濾液をそのまま又は濃縮して^{(11)~(13)} 樹脂を充填した塔を通すことにより、陽イオンのみが吸着除去され、遊離の無機酸が生じて来るため、苛性曹達で元の廢液の酸度まで中和するのである。この場合は雑味を呈する種種の無機塩類が殆んど雑味を呈しない Na の塩類に変化するのである。

2. 陽、陰両イオン交換樹脂を使用する方法 :— この場合は陽イオン樹脂を通した後に陰イオン樹脂の塔を通すのであるが、このとき陰イオン樹脂の量を陽イオン樹脂量の 1/3~1/4 程度使用することにより、遊離の無機酸のみを吸着除去して、琥珀酸、乳酸、アミノ酸等の遊離の有機酸はそのまま液の中に残すことが出来る。従つて此の場合は NaOH による中和は必要としない。

以上の 2 つの方法によつて、廢液の濾液を精製すると、確に雑味、灰味等の嫌味のない、又廢液臭、甘藷臭の