酸化細菌に関する研究 (第11報)

Gluconoacetobacter cerinus による α -ケトグルタル酸及び焦性葡萄糖の生成

朝井 勇 宣, 杉崎善治郎, 相 田 浩 (東京大学応用微生物研究所)

昭和 29 年 12 月 23 日 受理

Studies on the Oxidative Bacteria. Part 11. The Formation of α -Ketoglutaric and Pyruvic Acids by *Gluconoacetobacter cerinus*.

By Toshinobu ASAI, Zenjiro SUGISAKI and Kō AIDA (The Institute of Applied Microbiology, Univ. of Tokyo)

緒 言

さきに著者等は *Pseudomonas*, *Serratia*, *B. megaterium*, *B. natto*, *Bact. succinicum* 等がグルコースより著量の α -ketoglutaric acid 及び pyruvic acid を集積する事実を報告したが⁽¹⁾, 所謂 Homo-oxidative bacteria の *Acetobacter* 或は *Gluconobacter* に就ては該酸の生成は未だ報ぜられていない. その生成如何はグルコースの酸化代謝が KOEPSSELL 等の α -ketoglutaric acid を中間体とする直接酸化の経路を通るか否かの重要な拠点と目される. そこで著者等は *Gluconobacter* の菌株に就てその生成を追究していたところ, 今回 *Gluconoacetobacter cerinus* (朝井分離) が α -ketoglutaric acid 及び pyruvic acid を生産することを確認同定し, 且つその生成経過に就いても知見を得たので爰に報告する.

実 験 の 部

1. 培養方法 培地: 0.8% 酵母浸出液にグルコースを5%になるよう溶解し 500 ml 振盪フラスコに 100 ml 宛分注し 120°, 15分, 加圧殺菌したものを使う. 尚別に乾熱殺菌せる CaCO_3 を対糖 25% 接種時添加する.

種菌 *Gluconoacetobacter cerinus* を CaCO_3 添加麹汁斜面寒天に2日間前培養した slant 1 本を滅菌水 10 ml に懸濁し, その 2 ml を各フラスコに接種した.

条件: 振幅 7 cm, 150 r.p.m., 30° で振盪培養.

2. 分析方法 pH の測定, 還元力 (LEHMANN-SCHOOL 法), 溶存カルシウムを経過分析すると共に有機酸のペーパークロマトグラフィを併せ行い, その生成消長を追跡した. なお α -ketoglutaric acid 及び pyruvic acid の定量は FRIEDEMANN-HAUGEN の方法を改良した清水氏の方法を基として Plufrich Stufen-photometer により比色定量した.

3. 代謝生産物の分離確認 4日目の培養に就て行つた. 分離法は醗酵液より遠心分離によつて菌体と過剰の CaCO_3 を除き溶存カルシウムに相当する量よりやや低めに蔭酸アンモニウムを加えてカルシウムを除き, Amberlite IR-120 を通じてカチオンを除き減圧濃縮し, エーテル抽出を行い以下 Table 1 に従つて分離した.

(1) 2-Ketogluconic Acid の確認: Table 1

(A) に得られた柱状結晶を水に溶かし活性炭にて脱色後アルコールを加え氷室に置いて再結せしめた. この物質はフェーリング液及びアンモニア性硝酸銀を還元し m.p. 152°, K 2-ketogluconate の m.p. (文献記載)⁽²⁾ に一致する. これを常法により methylester

Table 1. Separation and Identification of Acids.

* α -K-G means α -ketoglutaric acid

に導きたるものは m. p. 172° で文献記載⁽³⁾に一致する。また K 塩 0.2 g を水 1 ml に溶かし 0.1 ml 濃塩酸と 0.12 g の *o*-フェニレンジアミンを加え攪拌して放置すると結晶が析出する。吸引濾過し水で洗滌した後熱水から再結すると quinoxaline 誘導体の結晶が得られる。m. p. 200° で文献⁽⁴⁾に一致し、また Beckmann Spectrophotometer (Model DU) にてその吸収帯を測定した結果は Fig. 1 に示す如く 335 m μ で標品のそれに一致する⁽⁵⁾。

Fig. 1. Absorption spectrum of 2-hydroxy-tetrahydroxybutyl quinoxaline (quinoxaline derivative of 2-ketogluconic acid) ($6.86 \times 10^{-5} M$).

合成品のそれに一致し、また両者の同量混合物を用いても spot の分離が認められない。元素分析: Found. C 40.47, H 2.96, N 16.71, Calcd for $C_{11}H_{10}O_8N_4$: C 40.00, H 3.09, N 17.18. この黄色結晶を

Table 2. Maximum Absorption Band of 2, 4-Dinitrophenylhydrazone of α -ketoglutaric acid

Solvents	Standard m μ	Experimental m μ
(a) 10% Na_2CO_3	380~383	381
(b) 1.25 N NaOH	424~426	424
(c) 10% Na_2CO_3 + 1.25 N NaOH	405~407	406
(d) M/100 phosphate buffer	380~382	381

(a) 10% Na_2CO_3 に溶解せるもの、(b) 1.25 N NaOH に溶解せるもの、(c) a, b の 1:1 混合液に溶解せるもの、(d) 0.01 M phosphate buffer (pH = 7.2) に溶解せるものの 4 溶液について Beckmann spectrophotometer により吸収帯を測定した結果は Fig. 2 の如くであつて、いずれも合成品のそれと一致し (Table 2), また文献記載⁽⁷⁾に一致した。

吸収率に就いて: 一 供試黄色結晶の吸収曲線から算出した任意の二つの波長間の optical

Fig. 2. Absorption spectra of 2, 4-dinitrophenylhydrazone of α -ketoglutaric acid.

1: in 10% Na_2CO_3 , 2: in 1.25 N NaOH, 3: in 10% Na_2CO_3 and 1.25 N NaOH mixture, 4: in M/100 phosphate buffer (pH 7.2).

density の比はまた合成した 2, 4-dinitrophenylhydrazone of α -ketoglutaric acid のそれと一致した (Table 3).

Table 3. Ratio of Optical Density between Two Wave Length of Absorption Spectrum of 2, 4-DNP hydrazone of α -ketoglutaric Acid

Ratio of opt. dens.	Standard		Experimental	
	10% Na_2CO_3	1.25 N NaOH	10% Na_2CO_3	1.25 N NaOH
400:440	1.16	0.93~0.97	1.15	0.94
400:520	2.43	1.62~1.69	2.20	1.59
420:520	2.30	1.83~1.86	2.10	1.74

(3) Pyruvic Acid の確認: (c) に得られた黄色結晶は (B) よりも橙黄色に近く次の諸性質より pyruvic acid の 2, 4-dinitrophenylhydrazone と確認される。m. p. 218°, 合成品と混融するも融点降下を示さない。ペーパークロマトグラム: $R_F = 0.46$ (条件前同), 合成品のそれに一致する。元素分析: Found: C 40.03, H 2.78, N 21.28, Calcd for $C_9H_8O_6N_4$

Fig. 3. Absorption spectra of 2,4-dinitrophenylhydrazone of pyruvic acid.

1: in 10% Na_2CO_3 , 2: in 1.25 N NaOH , 3: in 10% Na_2CO_3 and 1.25 N NaOH mixture, 4: $M/100$ phosphate buffer (pH 7.2).

Table 4. Maximum Absorption Band of 2, 4-Dinitrophenylhydrazone of Pyruvic Acid

Solvents	Standard	Experimental
(a) Na_2CO_3	370~372 $m\mu$	371 $m\mu$
(b) 1.25 N NaOH	444~446	444
(c) 10% Na_2CO_3 1.25 N NaOH	345~447	445
(d) $M/100$ phosphate buffer	370	370

Table 5. Ratio of Optical Density between Two Wave Length of Absorption Spectrum of 2, 4-DNP hydrazone of Pyruvic Acid

Ratio of opt. dens.	Standard			Experimental	
	10% Na_2CO_3	1.25 N NaOH		10% Na_2CO_3	1.25 N NaOH
400 : 440	0.44	0.54	0.60	0.43	0.56
400 : 520	0.62	0.83	0.87	0.64	0.86
420 : 520	1.03	1.26	1.31	1.01	1.27

: C 40.29, H 3.01, N 20.90. (2) 項に於けると同一の方法により試料と合成品につき吸収帯を測定し比較検討した結果は Fig. 3 及び Table 4 の如くであつて何れも合成品と一致した文献記載⁽⁷⁾ と一致した。

Table 6. Formation of α -Ketoglutarate and Pyruvate from Glucose, Gluconate and 2-Ketogluconate

R_F -values			Microorganisms					
			<i>Gluconoacetobacter cerinus</i>			<i>Serratia marcescens</i> No. 18		
			Substrates					
			glucose	Ca gluconate	K-2-keto gluconate	glucose	Ca gluconate	K-2-keto gluconate
Free acid	pyruvic	0.73	+	+				
	α -ketoglutaric	0.56	+	+	+	+	+	+
	malic	0.32				+		
2,4-Dinitro-phenylhydrazine	pyruvic	0.46	+	+				
	ketoglutaric	0.05	+	+	+	+	+	+
pH			5.8	5.6	7.2	5.8	5.9	8.9
red. power*			1.74	0.03	0.08	4.16	5.75	0.65
Ca dissolved**			4.23	6.02	—	6.07	3.59	—
α -K-G mg./100 ml			360	trace	—	1340	145	trace
pyruvic "			28	20	—	—	—	—

α -K-G means α -ketoglutaric acid. * $N/10$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ml per ml broth by LEHMANN SCHOOL method. ** g. per 100 ml broth. Initial substrate concentration: glucose 4.51%, gluconate 5.48%, 2-ketogluconate 2.00%, 7 day's in cubation at 30°.

吸収率に就て:— Optical density の比はまた合成 pyruvic acid の 2, 4 dinitrophenylhydrazone に一致した (Table 5)。

4. 醗酵経過に就て グルコースを基質としその醗酵の経過を pH, 溶存カルシウム, 還元力, α -ketoglutaric acid, 及び pyruvic acid の生産消長に就て振盪培養 7 日間にわたつて追跡した結果は Fig. 4 の如くである。即ち pH は糖の消費及び生酸に伴つて一時低下し。溶存カルシウム量は増大するが、その後は酸の消費、溶存カルシウム量の減少が起こり pH は上昇する。同時に還元力は増大しケト酸の生成を来すものと思われるが、終期には減少しケト酸の分解が起る。即ち初期には gluconic acid の生成によつて急激に還元力が減少し溶存カルシウム量が増すが、続いて 2-ketogluconic acid, pyruvic acid, α -ketoglutaric acid 等ケト酸の生成するに及んで還元力の増加を来し、pyruvic-, α -ketoglutaric acid が消費されるその後の時期には溶存カルシウム量は急激に減少しこれ等の酸の酸化分解が起こり還元力も減少する結果となる。 α -ketoglutaric acid 及び pyruvic acid の生成曲線は前第 4 報⁽⁸⁾に報告せる *Pseudomonas* 33F の場合とほぼ同様であるが、その消費

は *Pseudomonas* 或いは *Serratia marcescens* の場合⁽⁹⁾ よりも早期に現われ、両酸の生成分解がこれらの菌よりも急激に行われることが考えられる。併し pyruvic acid のピークが α -ketoglutaric acid のそれよりも早く現われることは *Pseudomonas* の場合と一致し pyruvic acid の生成が α -ketoglutaric acid に先行すると考えられる。

5. Glucose, gluconate, 2-ketogluconate の代謝

グルコース, Ca-gluconate, K-2-ketogluconate を基質にしてその代謝生産物を *Serratia marcescens* No. 18 を対照として比較検討した。その結果は Table 5 に示す如くである。即ち *Gluconoacetobacter cerinus* に於いてはいずれの基質からも α -ketoglutaric acid を生産し、またグルコース, Ca-gluconate より pyruvic acid の生成が認められた。 *Serratia marcescens* の場合にはいずれの基質からも α -ketoglutaric acid を生産し、また glucose から malic acid の生成が観察された。pyruvate から α -ketoglutarate の生成に関しては実験未了なのでその確認を為し

難いが、別の実験で *Gluconoacetobacter cerinus* が lactate より α -ketoglutarate を生成する事実を確認している。 α -ketoglutarate は pyruvate を先行体として生成される可能性が多分にあることは前実験の醗酵経過の追跡結果から併せ考えても推察し得られることである。

考 察 及 び 要 約

振盪培養によつて *Gluconoacetobacter cerinus* のグルコース酸化代謝生産物を追跡し、従来知られていた gluconic acid, 2-ketogluconic acid の他に新たに α -ketoglutaric acid 及び pyruvic acid の生成されることを確認し、分離同定した。グルコースの醗酵経過を追跡し、pyruvic acid 生産のピークが α -ketoglutaric acid のピークに先行すること、その醗酵経過及び両酸の生成状況が *Pseudomonas* 33F の場合、*Serratia marcescens* の場合に似ていること、またグルコースのみならず gluconate, 2-ketogluconate から α -ketoglutarate の生産されること、glucose, gluconate, から pyruvate の生産されること等の事実から、Homo-oxidative bacteria としての *Gluconobacter* が *Pseudomonas*, *Serratia* と同様に glucose $\rightarrow$ gluconate $\rightarrow$ 2 ketogluconate $\rightarrow$ pyruvate $\rightarrow$ α -ketoglutarate の経路をとつて代謝され得る可能性が有力に示唆された。最近 T. E. KING 及び V. H. CHELDELIN⁽¹⁰⁾ が *Acetobacter suboxydans* の酸化能を cell free extract 及び intact resting cell を用いて研究し、この菌が酢酸及び TCA cycle の中間物質に対して有意義の脱水素能を示めさないこと、また glycolysis の経路を採り得ないことを報告しているが、著者等の今回の実験によれば、磷酸関与の問題は未決としても Koepsell 等の所謂 direct oxidative pathway の系が *Gluconobacter* に於ても、主経路でないにせよ存在するように考えられる。

本研究費の一部は文部省科学研究費によることを附記し、また absorption spectrum の測定に当たられた東京大学水産化学教室の長谷川鈴子氏、元素分析を行われた農芸化学ミクロ分析室の諸氏に対して感謝の意を表する。

Fig. 4. Chemical changes during the fermentation of glucose.

- (1) 朝井, 相田: 農化, 26, 528 (1952).
朝井, 相田, 杉崎: 同誌, 27, 129 (1953).
- (2) BERNHAUER, K and GÖRLICH, B.: Biochem. Zeit., 280, 367 (1935).
- (3) OHLE, H Ber., 70, 2153 (1937).
- (4) OHLE, H: Ber., 67, 155 (1934).

- (5) LANNING M. C. and COHEN S. S.: J. Biol. Chem., 189, 109 (1951).
- (6) 朝井, 相田, 杉崎: 農化, 27, 129 (1953).
- (7) KOEPESELL, H. J. and SHARPA E. S.: Arch. Biochem., 38, 443 (1952).
- (8) 朝井, 相田: 農化, 26, 528 (1952).

(9) 同 前

chim. et Biophys. Acta, 14, 108 (1954).(10). KING T.E and CHELDELIN V.H. : *Bio-*

Summary

Among the oxidative metabolic products of glucose, we found α -ketoglutaric acid and pyruvic acid besides 2-ketogluconic acid in shaking culture of *Gluconoacetobacter cerinus*. Both acids were separated and identified. As is well known, *Pseudomonas* or *Serratia* produce both acids and the oxidative pathway is thought to be glucose $\longrightarrow$ gluconic acid $\longrightarrow$ 2-ketogluconic acid $\longrightarrow$ pyruvic acid $\longrightarrow$ α -ketoglutaric acid by KOEPEL et al., while with regard to *Acetobacter* or *Gluconobacter* there is found no literature about the formation of these two acids. From the results of our experiments on the chemical change during fermentation, it would be considered that α -ketoglutaric acid might be produced via pyruvic acid and the fact that α -ketoglutaric acid being formed from gluconic acid and 2-ketogluconic acid not only from glucose shows the similar oxidative pathway as in the case of *Pseudomonas* acts its role in the oxidative metabolism of *Gluconobacter* though it being not main route.