プロピオン酸菌の醗酵化学的研究 (第 5 報)*

プロピオン酸の酸化 (その 1)

市 川 吉 夫 (京都大学化学研究所)

昭和 31 年 6 月 26 日 受 理

前報⁽¹⁾において *Propionibacterium arabinosum* を振盪培養して得られる菌体は T. C. A. 系に属する各種の有機酸を酸化し得ることを報告したが、このようにして調製された菌体は嫌氣的糖分解過程の最終生成物たる酢酸、プロピオン酸を好氣的条件において能く酸化する事実を認めた。ワールブルグ検圧計による酸素吸収試験の結果ではプロピオン酸を基質とした場合の酸素吸収速度は酢酸のそれよりも遙かに大である。

本報では、振盪培養菌体によるプロピオン酸酸化の機構について得られた知見を報告する。

実 験 方 法

ブドウ糖、酵母エキス、ペプトンの各 0.5% を含む培地 (pH 7.0) 100 ml を 500 ml 容の振盪用フラスコに入れ、同一培地に 24 時間、30° に培養した菌体を接種し、約 60 時間振盪培養を行う (振幅 55 mm, 振盪数 100 r. p. m.)。遠心分離して得た菌体は洗滌後約 10 ml の蒸留水に懸濁して酵素試料とした。培地 100 ml より洗滌菌体の平均収量は 1.2 g で、菌体懸濁液はその 1 ml に菌体 0.1 g を含むように調製した。基質の酸化能は主としてワールブルグの検圧計を用いて酸素吸収量を測定する方法によつた。

実 験 結 果

振盪培養菌体より上述の如くして得た菌体懸濁液を用い、酢酸、プロピオン酸、乳酸及びコハク酸を基質として酸素吸収速度を測定した結果は第 1 図のようになる。容器の主室には M/15 磷酸緩衝液 (pH 6.0) 及び菌体

第 1 図 *P. arabinosum* の洗滌菌体による酸素吸収

第 1 表 振盪培養菌体による呼吸商の測定

基 質	実測値	計算値
酢 酸	—	1.000
プロピオン酸	0.78	0.857
乳 酸	0.88	1.000
コ ハ ク 酸	1.45	1.430

懸濁液各 1 ml を、副室には 15% 苛性カリ溶液 0.2 ml を加え、側室には基質 0.2 ml (ナトリウム塩, pH 6.0) を入れ、蒸留水を加えて全量を 3.0 ml とする。液温は 30°, 気相は空気である。第 2 図を除き図示した曲線は全て菌体の自家呼吸量を差し引いて表わしてある。

次に之等の各基質について呼吸商を測定した。第 1 表に示す如く、完全酸化が行われるものとして得られる計算値と大差はなく、プロピオン酸は主として炭酸ガスと水とに分解されることが予想せられる。測定は宇佐美の方法⁽²⁾によつた。

マロン酸の共存の下においてプロピオン酸、酢酸に菌体を作用せしめると、第 2 図に示したようにその酸素吸収は著しく阻害される。我々はさきにこの菌が T. C. A. 系に属する各種有機酸を酸化し得る事実を認めているが、以上の結果から酢酸プロピオン酸の酸化には本菌の有する T. C. A. 系の酵素群が関与することが考えられる。

プロピオン酸が酸化を受ける過程には、1) β 酸化によつてマロン酸となり、脱炭酸されて酢酸を生成し T. C. A. 系に入る径路。2) アクリル酸、乳酸を経てピルビン酸となる径路。3) 炭酸固定によつてコハク酸を生じ、T. C. A. 系に入る径路等が考えられるが、第

* Microbiological Studies on Propionic Acid Bacteria. Part. V. Oxidation of Propionic Acid By Yoshio ICHIKAWA (Institute for Chemical Research, Kyoto University)

第 2 図 マロン酸による酸素吸収の阻害
(本図のみは菌体の自家呼吸量を含んだ値を図示した)

加温しエーテル抽出を行う。抽出液のエーテルを除去した後之に 2N 塩酸に飽和した 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを加えると黄色の沈澱を生じる。之を 2N 塩酸、ついで水で洗滌したのち、少量の炭酸ソーダ溶液に溶解してペーパークロマトグラフィの試料とする。ブタノール-アンモニア水を用いて展開した結果、得られたス

溶 媒	4% アンモニア水 飽和ブタノール	3% アンモニア水 飽和ブタノール
プロピオン酸に菌体を用いて 得られた試料	0.41	0.36
乳酸に菌体を用いて得られた 試料	0.39	0.35
ビルビン酸のジニトロフェ ニルヒドラゾン	0.39	0.36

ポットは純粋のビルビン酸を試料とした場合と同一の R_F 値を示した。

一方、同様にプロピオン酸に菌体を用いて得られる反応液を硫酸酸性にてエーテルで抽出し、之についてエーテル-酢酸-水 (13:3:1) を展開剤として不揮発酸のペーパークロマトグラフィを試みたところ、乳酸 ($R_F=0.73$)、ビルビン酸 ($R_F=0.64$) 及び更に一種の不揮発酸 ($R_F=10$) を検出し得た。この未知の酸はクエン酸、 α -ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸及びリンゴ酸のいずれでもないことが各純粋試料について試験した結果から明らかとなった。

第 3 図 マロン酸 ($M/100$) 及びピオチアニン ($M/1500$) の存在する場合の酸素吸収

1 図に示したように本菌による酢酸の酸化は同じ条件におけるプロピオン酸のそれと比較すると甚だ小である事、前報に述べた如く、明かに基質の完全酸化が行われている醗酵条件において、なお酢酸の生成量の減少が認められない事、更に本菌は培養試験においても静止菌体を用いた場合においてもマロン酸を分解することが出来ない事等からプロピオン酸の酸化がマロン酸を経て行われると考えることは妥当でない。従つて 2), 3) の場合についてその可否を検討することとした。

プロピオン酸が酸化されてビルビン酸を生成することは次の実験により確かめられた。

$M/15$ の基質溶液 (ナトリウム塩, pH 6.0) 2.5 ml, $M/15$ 酸性亜硫酸ソーダ 5 ml, 菌体懸濁液 5 ml 及び $M/15$ 磷酸緩衝液 (pH 6.0) 10 ml の混合液を 200 ml 容のフラスコに入れ, 30° にて 5 時間振盪して反応せしめた後、菌体を遠心分離し濾液を硫酸酸性として

第 2 図に示したようにプロピオン酸の酸化はマロン酸の添加によつて顯著に阻害されるが、この場合ピオチアニンの少量を共存せしめると酸素吸収の回復が認められる。この事実はプロピオン酸がコハク酸に変化する以前に既に酸化を受けていることを推論せしめるものであつて、乳酸、コハク酸及びプロピオン酸のピオチニン共存下におけるマロン酸添加の影響は第 3 図に示す。又嫌氣的条件においてピオチアニンの脱色時間を測定すると、コハク酸の場合は乳酸、プロピオン酸の場合に比較して明かに長時間を要した。即ち、 $M/15$ 磷酸塩緩衝液 (pH 6.0) 5 ml, $M/100$ 基質 (ナトリウム塩, pH 6.0) 5 ml, $M/100$ ピオチニン塩酸塩溶液 0.5 ml を THUNBERG 管に入れ、側管に菌体懸濁液 5 ml を入れる。減圧とした後 30° 恒温槽内に

第 2 表 色素の還元に対するマロン酸添加の影響

基 質	脱 色 時 間	
	0.03M マロン酸添加	マロン酸無添加
プロピオン酸	3 分以内	3 分以内
乳 酸	2 分 "	2 分 "
コハク酸	20 分	2 分 "

第 3 表 振盪培養菌体の酸素吸収に及ぼす阻害剤の影響

阻 害 剤	基 質	酸素吸収量 (μl/30 分)	
		プロピオン酸 (27 μM)	乳酸 (20 μM)
無 添 加		94	125
NaF 20 μM		87	111
" 100 μM		16	82
モノヨード酢酸 2 μM		49	117
KCN 10 μM+ピオチアニン		22	—
" 3 mM+ピオチアニン		16	52

第 4 表 アセトン処理菌体による酸素吸収

酸素試料	基 質	酸素吸収量 (μl/30 分)		
		無処理菌体	10° の 70% アセトンで 2 分ずつ 2 回処理した菌体	15° の 70% アセトンで 7 分ずつ 2 回処理した菌体
基 質 無 添 加		32	6	1
プロピオン酸 10 μM		98	8	0
d-乳 酸		123	65	3
l-乳 酸		128	70	21
dl-乳 酸		129	74	17

第 4 図 アクリル酸の酸化

て両者を混合して脱色に要する時間を測定した結果は第 2 表の如くとなる。

即ちマロン酸の存在する場合はプロピオン酸はコハク酸よりも遙かに速かに酸化される。一方乳酸を基質とした場合は、種種の阻害剤を添加しても常にその酸化の速度はプロピオン酸より大であつた (第 3 表)。

アセトン処理菌体を用いて酸素吸収を測定した結果は第 4 表の如くであつて、この場合においてもプロピオン酸酸化能の消失は乳酸に対するそれよりも速かである。

プロピオン酸が直接脱水素される場合にはアクリル酸が生成することが考えられるが、後者の酸素吸収は前者に比べれば遙かに小であり、且つプロピオン酸の酸化に対して阻害的効果を示すことが認められる (第 4 図)。

LANG-BÄSSLER⁽⁷⁾ は *Torula* によるプロピオン酸の酸化を試みて上記の場合と同様の結果を得、アクリル酸はプロピオン酸酸化の中間体として考え難いと結論している。一方 HUENNKENS et al.⁽⁸⁾ は liver cyclophorase を用いた実験において、アクリル酸の酸素吸収がプロピオン酸のそれに劣る事実のみを以て之が中間体でないと結論すべきではないとしている。従つてアクリル酸を中間体とすることの可否については更に検討を要するものと考えられるが、第 4 図に示したように基質として加えるアクリル酸の濃度を減少すると僅かではあるが酸素吸収速度が増大する結果を得た。この事実は HUENNKENS et al. の見解を支持するものと考えられる。

プロピオン酸は以上の実験結果の如く *P. arabinosum* の洗滌菌体により容易に酸化されるが、この菌がプロピオン酸を炭素源として増殖を行い得るか否かを検討するために以下の実験を行った。

M/15 乳酸ソーダ又はプロピオン酸ソーダを炭素源とし、0.4% ペプトン、0.3% 酵母エキスを含む培地を調製する。対照として基質溶液の代りに之と同量の蒸留水を添加した培地を用いる。10 ml の菌集殖用培地に 30°、30 時間培養して得た菌体懸濁液の 0.1 ml 又は 0.2 ml を上記試験培地に添加し、30° に一定時間培養し光電光度計を用いて濁度を測定した。菌体を添加しない上記各培地はいずれも同じ透過率を示すので之を透過率 100% とした。種菌培地にペプトン・酵母エキス グルコース各 0.5% を含む基本培地を使用した場合はプロピオン酸添加培地における菌体の生成量は基質無添加の場合よりも小であるが、このプロピオン酸添加培地を種菌の培養に使用し、2 度馴養を行つて得た菌体を用いるとプロピオン酸添加培地における菌体の増加は基質無添加の場合よりも大となることが認められた (第 5, 6 表)。

菌の増殖及び酸素吸収に対する 2,4-ジニトロフェノールの影響を検討した処、生菌懸濁液の酸素吸収に対する

第 5 表 基本培地に生育した菌体によるプロピオン酸の利用

基 質	培養時間	透過率 (T)	濁濁度 (2-log T)
乳 酸	0	90	0.045
	48	17	0.769
プロピオン酸	0	90	0.045
	48	36	0.444
基質無添加	0	90	0.045
	48	27	0.569

第 6 表 プロピオン酸培地に馴養した菌体によるプロピオン酸の利用

基 質	培養時間	透過率 (T)	濁濁度 (2-log T)
乳 酸	0	89	0.049
	24	21	0.678
	48	12	0.921
プロピオン酸	0	86	0.049
	24	36	0.442
	48	20	0.699
基質無添加	0	89	0.049
	24	37	0.431
	48	28	0.553

果並びに本菌に T. C. A. 系の酵素系が存在すること⁽⁶⁾から考えて、おそらく T. C. A. 系の酵素群が関与していることが推論される。静置培養した菌体を用いた場合はプロピオン酸の酸化速度は減少するが、酢酸と異つてなお顕著な酸素吸収を示す。この場合呼吸商の値及びマロン酸の阻害効果は共に小となり別個の酸化系路の存在を予想せしめる。

コハク酸を基質とした場合の酸素吸収は pH 6.0 においてはややプロピオン酸の場合に劣るが pH 7.0 では却つて大となり、プロピオン酸→コハク酸→T. C. A. 系の経路の可能性が考えられる。しかしながらマロン酸の存在下におけるコハク酸の脱炭酸反応の速さはプロピオン酸の酸素吸収速度よりも遙かに小であり、又プロピオン酸酸化に及ぼすマロン酸の阻害効果がピオチアニンの添加により回復される事実はこの経路のみがプロピオン酸の酸化に関与するものではないことを示している。

一方乳酸を基質とした場合は各種の阻害剤の添加の如何にかかわらず常にプロピオン酸の場合よりも大きい酸素吸収を示し、又酸性亜硫酸ソーダ存在の下において、プロピオン酸を基質とした場合と同様ビルビン酸の生成

DNP の作用は軽微であるが (30 分間の酸素吸収量 : DNP 無添加 92 μ l, M/5000 DNP 110 μ l, M/1500 85 μ l), 増殖に対しては M/5000 DNP の添加は明かに阻害効果を示す (48 時間後の濁濁度 (2-log T) の増量 : 基質無添加 0.508, プロピオン酸添加 0.654, プロピオン酸 + M/5000 DNP 0.307)。

考 察

プロピオン酸の酸化については、肝臓或は腎臓のミトコンドリアについてその研究が行われており⁽³⁾, プロピオン酸は乳酸, ビルビン酸を経て T. C. A. 系に入ることが推論されている。一方, プロピオン酸菌においてはプロピオン酸 + CO₂ → コハク酸の反応が認められており⁽⁴⁾, この反応を経てプロピオン酸が酸化される可能性がある。振盪培養菌体によるプロピオン酸の酸化は、呼吸商の値, マロン酸及びシアンの阻害効

が認められる。更にプロピオン酸の酸化生成物中に乳酸を検出しており、これらの事実からプロピオン酸からビルビン酸の変化の中間に乳酸を生成することが予想されるのであるが、乳酸の前駆物質と考えられるアクリル酸に対する酸素吸収は甚だ微弱であり、又之をプロピオン酸と共存せしめると酸素吸収の阻害が認められる。更に、プロピオン酸菌による乳酸の還元反応に関しては LIPMANN 等⁽⁶⁾の否定的実験結果が報告されていて、乳酸がプロピオン酸からビルビン酸に至る変化の中間体として生成するものか、或はビルビン酸との間に別個の平衡関係が存在するものかと云う点についてはなお検討を加える必要がある。乳酸をプロピオン酸酸化の終末生産物として蓄積せしめる目的で、阻害剤の添加、菌体のアセトン処理等を試みたが成功しなかつた。静止菌体による酸素吸収のみでなく本菌はプロピオン酸を炭素源として増殖することが出来るが、2,4-ジニトロフェノール添加の結果から、この際 oxidative phosphorylation が行われることが推測される。静止菌体についても、プロピオン酸の消失量と

第 5 図 プロピオン酸の濃度と酸素吸収

酸素吸収量の関係から同化が行われている事実を認めることが出来る。即ちプロピオン酸が完全酸化される場合は、 $C_3H_6O_2 + 7O = 3CO_2 + 3H_2O$ の式に従つて、基質 1 モルの消失に当り 3.5 モルの酸素が吸収される筈であるが、測定の結果は第 5 図に示す如く理論値の 1/2 以下の値しか得られなかつた。勿論この際基質の一部は他の酸化経路例えば $C_3H_6O_2 + 3O = C_3H_4O_2 + CO_2 + H_2O$ の如き方式によつて酸化される可能性が考えられるが、マロン酸阻害及び呼吸商測定の実験結果からこの場合後者の如き反応の占める割合は僅少でであると考えられる。一方、プロピオン酸に菌体を作用せしめてのち、濾液をエーテル抽出し抽出液のエーテルを除去すれば次第に油脂類が浮遊して来ることが認められた。プロピオン酸が油脂の合成に用いられるか否かはなお明かに為し得ていないが、かかる現象は本菌によるプロピオン酸酸化に際して同化作用が行われると推定する論拠となり得るものと考えられる。

要 約

好気的条件下において培養した *P. arabinosum* の菌体はプロピオン酸及び酢酸を酸化し得る。この酸化反応には T. C. A. 系の酵素群が関与しているものと推論される。プロピオン酸酸化の中間体としてピルビン酸を検出し得た。即ちプロピオン酸はピルビン酸に酸化されたのち T. C. A. 系に入るものと考えられ、炭酸固定によつてコハク酸となる過程は主な酸化経路とは考え難い。プロピオン酸適応菌体を用いるとプロピオン酸を炭素源として利用して菌体が増殖する事実を認めた。

本研究を行うに当つて終始御懇篤な御指導を得た恩師片桐英郎教授に篤く感謝申上げるとともに、本研究の費用の一部を文部省科学研究助成金によつたことを附記し併せて謝意を表明する。

(1) 市川吉夫 . 本誌, 29, 361 (1955).	<i>Bat.</i> , 65, 318 (1953).
(2) 宇佐美正一郎 化学の領域増刊, 13, 137 (1954).	(6) H. A. BARKER, F. LIPMANN : <i>Arch. Biochem.</i> , 4, 361 (1944).
(3) H. R. MAHLER, F. M. HUENNEKENS : <i>Biochim et Biophys. Acta.</i> , 11, 571 (1953).	(7) K. H. BÄSSLER, L. LANG : <i>Biochem. Z.</i> , 324, 401 (1953).
(4) S. BARBAN, S. J. AJL <i>J. Biol. Chem.</i> 192, 63 (1951).	(8) F. M. HUENNEKENS, H. R. MAHLER, J. NORDMANN : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> 30, 66 (1951).
(5) E. A. DELWICHE, S. F. CARSON : <i>J.</i>	

澱粉における α -グルコサイド結合の化学的任意分解 (第 2 報)*

堀 津 圭 佑 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 31 年 6 月 27 日 受 理

緒 言

前報に記載したように、澱粉における α -グルコサイド結合の化学的任意分解に関し、その撰択的特異性を有する触媒を求めんとし、先ず塩酸、硫酸、磷酸並びにグルタル酸を試験したが、今回は過塩素酸、硫酸並びに蔞酸を用い、次のような結果を得た。

実 験 の 部

1. 各材料の調整

1) アミロースとアミロペクチンの精製 : 前回と同様に東京大学農学部農場産の馬鈴薯(コミー)より T. J. SCHOCH 法⁽¹⁾のアミロース-ブタノール複合体とする稀薄澱粉糊液のオートクレーブを用いた分別沈澱、再結晶化の方法によつて、アミロース及びアミロペクチンをそれぞれ精製した。

2) 触媒の調整 : 過塩素酸及び硫酸は市販の試薬特級品⁽²⁾を用い、蔞酸は L. VANINO (PETER) 法⁽³⁾により精製し、各所定の濃度とした。

3) マルトースの精製 : G. KLEIN 法⁽⁴⁾で市販の試薬 1 級品⁽²⁾について再結を 2 回繰返し、ペーパークロマトグラフィで更にそれを確めた。

* Selective Cleavage of α -Glucosidic Linkage in Starch Using Chemical Agent. Part II.
By Keisuke HORITSU (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
University of Tokyo)