- (3) W. H. Ward : *Text. Res. J.*, 22, 405 (1952). *Biol. Sci.*, 6, 630 (1953).
 (4) E. F. Woods : *Aust. J. Sci. Res.*, A5, 555 (1952).
 (5) J. A. Friend, I. J. O'Donnell : *Aust. J.* (6) P. Alexander, R. F. Hudson : *Wool.* 359 (1954).
 (7) 船津 勝, 船津軍喜 : 本誌, 31, 221 (1957).
 (8) 船津 勝 : 本誌, 30, 298 (1956).

ブ タ ノ ール 醗 酵 (第 14 報)*

糖の磷酸エステル化(その1)

特異解糖毒物による阻害

本 江 元 吉 (九州大学農学部農芸化学教室)

昭和 32 年 4 月 11 日 受理

ブタノール醗酵の化学機構には不明瞭な点が多く、ピルビン酸が中間体であることには一応疑いが無いとしても、この酸に至るまでの糖の磷酸エステル化については研究も少なくほとんど何もわかっていない。これは代謝能の強い菌体を得ることが困難で、たとえ菌体を単離取得しても活性がごく弱く数時間で失活してしまう⁽¹⁾のが一因だったと考えられる。

古く hexose-diphosphate (以下 HDP と略) に乾燥菌体を作用させて methylglyoxal が分離された⁽²⁾が、これは毒性が強く⁽³⁾醗酵液中にも検出されなかった⁽⁴⁾ので中間生成物とするには無理があると考えられた。さりとて Embden-Meyerhof 系を経る磷酸エステル化をうけるとするには、むしろ否定的な事実が観察された。すなわち、HDP を基質にして弗化ソーダ阻害で 3-phospho glyceric acid (以下 3-PGA と略) の生成を確認するという常用手段が、好気性細菌では成功したのに *Clostridium* 属細菌では不成功に終り⁽⁵⁾、また生菌体や乾燥菌体で glyceraldehyde や 3-PGA が醗酵されず、HDP からはまたしても methylglyoxal ができた⁽⁶⁾。こうした実証からすれば Embden-Meyerhof 系を経ることはむしろ否定される傾向が強い⁽⁷⁾。ただこれらの否定的事実に対して肯定的実証としては、葡萄糖の醗酵でフェニルヒドラジン蔭酸法によって三炭糖とピルビン酸が分離確認されている⁽⁸⁾にすぎない。もっとも、ブタノール菌によく似た酪酸菌については、この菌の取り扱いが容易で、得られる菌体も活性が強く、菌体抽出液でも酵素力が失活されないで、かなりはっきりした肯定的実証が呈示されている。すなわち、以前に三炭糖とピルビン酸が分離確認された⁽⁴⁾ほか、近年には菌体抽出液を用いて HDP の分離確認⁽⁹⁾や ATP 共存下での葡萄糖と磷酸の減少のモル比からする hexokinase 存在の推定、沃度酸化前後のアルカリに弱い磷酸塩量の変化からする triosephosphate isomerase 存在の推定、3-phospho glyceraldehyde を基質にした DPN の還元による triosephosphate dehydrogenase 存在の推定が呈示されている⁽¹⁰⁾。

さて、前報⁽¹¹⁾した方法によるとブタノール菌のごく活性が強い菌体を分離取得できるので、これを用いて今なお明らかになっていないブタノール醗酵での糖の磷酸エステル化を究めることにした。磷酸エステルの中間生成物についての研究に入るに先だって、解糖機構の或反応を特異的に阻害すると知られている毒物を使用して、これによる本醗酵の阻害状態を検することにした。ブタノール菌についてこれらの特異毒物のうちのあるものは前にも検せられたことがある。しかし、その実験の一つは玉蜀黍培地に最初から、あるいは培養中に、毒物を加えて生育や醗酵の阻害を検したもので⁽¹²⁾実証としては粗雑不確実のそしりを免れがたく、他の一つはピルビン酸の分解と関連して、葡萄糖について弗化ソーダの 0.02 M 濃度でだけ阻害が検せられたもの⁽¹³⁾である。それで代謝機構研究の常法にしたがって生菌体を使用して糖醗酵の阻害を検した諸結果を一括してここに報ずることにする。

実 験

使用菌株；単孢子分離によって純粋にした Wietmann 型の *Clostridium acetobutylicum* 314⁽¹⁴⁾。菌体の取得；前報⁽¹¹⁾。定量法；アセトン法 Goodwin 改良の Messinger 法、ブタノールとエタノールは Johnson 法、糖は

* Butanol Fermentation. Part XIV. Phosphorylation of Hexose (1). Inhibition of Fermentation by Selective Poisons.

By Motoyoshi HONGO (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

第 1 表 モノ沃度醋酸ソーダによる阻害

0.3 g の炭酸石灰を加えた培地 200 ml から減酸期に取得した菌体を 2 回洗滌し、表示濃度にモノ沃度醋酸ソーダを加え磷酸塩緩衝 (pH 5.5) した 3% 葡萄糖液 50 ml に懸垂した。37°

モノ沃度醋酸ソーダ (M) (液中濃度)		1/7×10 ³	1/10 ⁴	1/2×10 ⁴	1/8×10 ⁴	1/3×10 ⁵	0	
醗酵 経過	1 日	0	0	0	0.03	0.51	0.84	0.58
	2 "	"	"	0	0.61	0.92		0.93
	3 "	"	"	0.07	0.86			
	g/50 ml	4 "	"	0.64	0.95			
	5 "	"	"	0.91				
原	糖 (g) ^a	1.62	1.62	1.81	1.81	1.81	1.62	1.81
pH		5.5	5.5	5.2	4.2	5.2	4.2	4.5
酸	度	0.6	0.4	1.1	2.2	1.2	2.6	1.8
残	糖 (g) ^a	1.61	1.59	0.09	0.05	0.06	0.06	0.06
アセトン	(mg) ^a	微量	0.6	138	158	145	159	154
ブタノール	"	"	3.5	346	331	356	304	359
エタノール	"	"	10.6	76	59	75	53	61
阻 害 率	糖 消 費 (%) ^b	100	98					
	アセトン生成 (%) ^c	100	100	10	-4	6		
	ブタノール生成 "	100	99	4	8	1		
	エタノール生成 "	100	80	-3	3	-10		

a: 作用液全空中の量

b: 残糖率。対照でも残糖があるので必ずしも当を得ないが、残糖の多いものについてはこれによつて示しても大過ないと考えられる。

c: 対照に対して求めた阻害の率。

第 2 表 弗化ソーダによる阻害

実験条件: 第 1 表に同じ

弗化ソーダ(液中濃度) M		2/100	1/200	1/500	1/10 ³	1/5×10 ³	0
醗酵 経過	1 日	0	0.04	0.09	0.08	0.79	0.75
	g/50 ml	2 "	0.06	0.11	0.11		
原	糖 (g) ^a	1.58	1.58	1.58	1.58	1.58	1.58
pH		5.5	5.2	5.2	5.2	4.2	4.2
酸	度	0.2	1.2	1.6	1.6	3.7	2.8
残	糖 (g) ^a	1.57	1.48	1.46	1.42	0.14	0.14
アセトン	(mg) ^a	微量	2.7	5.1	9.4	123	107
ブタノール	"	"	5.1	10.8	23.8	285	297
エタノール	"	"	0.5	1.5	9.0	55	76
阻 害 率	糖 消 費 (%) ^b	100	94	93	90		
	アセトン生成 (%) ^c	100	98	95	91	-15	
	ブタノール生成 "	100	98	96	92	4	
	エタノール生成 "	100	99	98	88	28	

a, b, c: 第 1 表に同じ

Bertrand 法.

I. モノ沃度醋酸ソーダによる阻害 この毒物は稀薄濃度 (M/10³) で triosephosphate dehydrogenase 及び alcohol dehydrogenase を阻害し、これとエネルギー的に共軛している糖の磷酸エステル化を停止すると知られている。結果は第 1 表。1 次阻害は M/8×10⁴ の稀薄濃度で現われるが、M/2×10⁴ 以下の濃度ではこの阻害からの回復がみられる。このとき炭酸石灰の共存で生起するエタノール増収については前報した⁽¹⁵⁾。回復を伴わない完全阻害は M/10⁴ の稀薄濃度で呈せられる。

II. 弗化ソーダによる阻害 この毒物は 2 M/100 濃度で enolase を阻害すると知られている。結果は第 2 表。2 M/100 で完全阻害、M/10³ で 90% 阻害、M/5×10³ で阻害は現われない。

III. 砒酸ソーダによる阻害 この毒物はかなり高い濃度 (2 M/10) で各種 dehydrogenase を阻害し、微量 (M/4×10⁴, 酵素の実験) で酸化還元反応と ATP 系との共軛を阻止すると知られている。結果は第 3 表。M/10³ でほとんど完全に阻害される。

附. 亜砒酸ソーダによる阻害 この毒物は解糖酵素系阻害とは関係がないが、hydratase 及び α-ケト酸還元酵素や succino-dehydrogenase を阻害すると知られている。結果は第 4 表。M/750 でほとんど完全に阻害される。M/10³ では糖は消費されるが、酸度が高くソルベント生成は 60% 前後の阻害を受ける。

IV. 総合結果 以上の諸結果から判断すると、本醗酵の化学機構の前半段階に Embden-Meyerhof 系を経る磷酸エステル化が存する可能性はきわめて多い。

第3表 硫酸ソーダによる阻害

実験条件：第1表に同じ

硫酸ソーダ(液中濃度) M		1/10 ³	1/5×10 ³	1/10 ⁴	1/2×10 ⁴	1/4×10 ⁴	0	
醱酵 経過	ガス出量 1 日	0	0.05	0.11	0.49	0.53	0.52	0.58
	g/50 ml 2 "	"	0.12	0.16	0.96	0.93	0.77	0.93
原	糖 (g) ^a	1.49	1.49	1.49	1.81	1.81	1.49	1.81
pH		5.3	5.0	5.0	4.5	5.0	4.5	4.5
酸	度	0.8	3.0	4.0	2.1	1.2	2.0	1.8
残	糖 (g) ^a	1.45	1.13	1.02	0.05	0.07	0.05	0.06
アセトン	(mg) ^a	2.0	8.2	13.7	163	146	119	154
ブタノール	"	4.8	19.5	33.7	330	352	306	359
エタノール	"	3.2	4.6	6.1	38	75	50	61
阻害率	糖消費(%) ^a	97	76	69				
	アセトン生成(%) ^b	98	93	88	-6	5		
	ブタノール生成 "	98	94	89	8	2		
	エタノール生成 "	94	91	88	38	-23		

a, b, c: 第1表に同じ

第4表 亜硫酸ソーダによる阻害

実験条件：第1表に同じ

亜硫酸ソーダ(液中濃度) M		1/750	1/10 ³	1/3×10 ³	0
醱酵 経過	ガス出量 1 日	0	0.03	0.38	0.65
	g/50 ml 3 "	"	0.27	0.65	
原	糖 (g) ^a	1.38	1.38	1.38	1.38
pH		5.5	4.2	4.2	4.2
酸	度	0.3	6.7	4.2	4.0
残	糖 (g) ^a	1.28	0.45	0.02	0.04
アセトン	(mg) ^a	0.8	36	115	115
ブタノール	"	1.7	84	288	277
エタノール	"	8.5	11	28	27
阻害率	糖消費(%) ^b	93			
	アセトン生成(%) ^c	100	63		
	ブタノール生成 "	99	70		
	エタノール生成 "	69	59		

a, b, c: 第1表に同じ

総 括

Weizmann 型の acetone-butanol 菌 *Clostridium acetobutylicum* 314 の生菌体による葡萄糖の醱酵に各種の特異解糖毒物を添加して阻害状態を検した結果、

(1) モノ沃度醋酸ソーダ添加では、1 次阻害は $M/8 \times 10^4$ で現われるが、 $M/2 \times 10^4$ 以下の稀薄濃度では回復現象が呈せられ、この回復を伴わない完全阻害は $M/10^4$ である。

(2) 弗化ソーダ添加では、 $M/50$ で完全阻害、 $M/10^3$ で 90% 阻害が呈せられる。

(3) 硫酸ソーダ添加では、 $M/10^3$ で完

全阻害が呈せられる。

これらの結果から、本醱酵の化学機構の前半段階に Embden-Meyerhof 系を経る磷酸エステル化過程が存する可能性がきわめて多いことが推察される。

終りに御指導を戴いた山崎教授並びに菌株を分譲頂き御意見御鞭撻を戴いた東大坂口教授に深謝する。なお糖の分析での志熊研究員の助力を感謝する。研究費の一部は文部省科学研究費による。

- (1) R. Davies : *Biochem. J.*, 35, 1320(1941); 36, 582 (1942); 37, 203 (1943).
- (2) L. B. Pett, A. M. Wynne : *J. Biol. Chem.*, 97, 177 (1932).
- (3) M. J. Johnson, W. H. Peterson, E. B. Fred : *J. Biol. Chem.*, 101, 145 (1933); R. Davies : *Biochem. J.*, 37, 230 (1943).
- (4) H. Peldán : *Chem. Abstr.*, 38, 2063(1944).
- (5) R. W. Stone, C. W. Werkman : *Biochem. J.*, 31, 1516 (1937).
- (6) E. Simon : *Arch. Biochem.*, 14, 39(1947).
- (7) E. Simon : *Nature*, 152, 626 (1943).
- (8) V. Bolcato, M. E. Scevola, G. F. Betti-netti, G. C. Bussi : *Chem. Abstr.*, 46, 7279 (1952) (*Chimica e Industria*, 33, 285, (1951)).
- (9) R. Gavard : *Compt. rend.*, 234, 1716(1952).
- (10) R. Gavard : *Compt. rend.*, 238, 1620(1954).
- (11) 本江元吉 : 本誌, 31, 548, 552 (1957).
- (12) E. Simon, C. Weizmann : *Enzymologia*, 4, 169 (1938).
- (13) B. Rosenfeld, E. Simon : *J. Biol. Chem.*, 186, 395 (1950).
- (14) 本江元吉 : 本誌, 24, 119 (1951).
- (15) 本江元吉 : 本誌, 31, 618 (1957).