- Microbiol.*, 5(3), 127 (1959).
 (8) A. Zaffaroni, R. B. Burton, E. H. Keutmann: *Science*, 111, 6 (1950).
 (9) K. Tsuda, T. Asai, Y. Sato, T. Tanaka, M. Kato: *J. Gen. Appl. Microbiol.* 5, 1 (1959).
 (10) T. Tsuda et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, in press.
 (11) H. C. Morray et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 4050 (1954).

[農化 第 35 卷, 第 2 号, p. 127~130, 1961]

Acetobacter 属細菌による 5-デヒドロフラクトーズの生成 (第 1 報)*

フラクトーズよりの一新強還元性物質の生成, 並びにグルコソンの異同

寺田 治, 富沢勲治, 木下祝郎 (協和醸酵工業株式会社東京研究所)

昭和 35 年 8 月 8 日 受 理

著者等はフラクトーズイソメラーゼの探索を目的として, 諸種の酸化細菌のフラクトーズ利用能を検討中, たまたま *Gluconobacter* の一株がフラクトーズから強い還元力を有する糖類似物質を生成することを認めた. この物質について検討した結果, この物質がかつて酸化細菌によるフラクトーズの酸化生成物として報告されたいずれの物質にも一致しない新物質であることを認めたのでここに報告する. なお以下 *Gluconobacter*, *Acetobacter* を一括して論ずる場合には *Acetobacter* という語を用いる.

実 験 方 法

1. 培養方法 原則として試験管振盪機を用いた. 振幅 25 mm, 回転数 250 r. p. m., 培養容器は 24×190 mm の大型試験管, 培地量は 15 ml, 挿入傾角は約 15° である. このほか必要に応じて回転振盪機をも併用した. 振幅 50 mm, 回転数 180 r. p. m., 容器は 250 ml 容 Erlenmeyer フラスコ, 培地量は 50 ml である.

2. 分析方法 生成物質の検出は主としてペーパークロマトグラフ法によった. 培地に炭酸カルシウムを添加しない場合はそのまま, 添加した場合は試料中に Amberlite IR-120 (H 型) を投入しカルシウムを除去したものをスポットした. 使用した濾紙は東洋濾紙 No. 50 である.

展開溶剤としては

i) <i>n</i> -butanol-formic acid-water (4:1.5:1)	ii) <i>n</i> -butanol-acetic acid-water (4:1:1)
iii) <i>n</i> -butanol-pyridine-water (3:2:1.5)	iv) phenol-water (4:1)

を目的に応じて適宜使用した.

発色試薬としては

i) B. P. B., 70% エタノール溶液	ii) <i>p</i> -anisidine-HCl, エタノール溶液 ⁽¹⁾
iii) orcinol-HCl, エタノール溶液 ⁽¹⁾	iv) KJO ₄ -Benzidine 試薬 B ⁽²⁾
v) 2,4-dinitrophenylhydrazine-H ₃ PO ₄ 試薬 ⁽³⁾	vi) phenylhydrazine-HCl 5% 溶液
vii) hydroxylamine-FeCl ₃ 試薬 ⁽⁴⁾	

を目的に応じて使用した. 即ち i) は有機酸の検出, ii) は糖および還元性有機酸, iii) はケトヘキソーズ, iv) はポリアルコール, 糖およびその類縁物質, v, vi) はカルボニル化合物, また vii) はエステル, ラクトンの検出に用いた. その他の実験方法については個々の実験の項に記す.

実験結果および考察

I. 諸種の酸化細菌によるフラクトーズおよびその epimer の利用 酸化細菌による糖およびその関連物質の酸化に関しては多数の報告があるが, ケトーズの酸化に関してはいずれの酸化細菌についても Bertrand 型式による酸化は知られておらず一応低分子化合物に分解された後酸化を受けるとされており⁽⁵⁾, 特殊な例としては *Gluconobacter roseus* による醗酸生成に際してフラクトーズが非 Bertrand 型酸化を受けてグルコソンを生成することが池田⁽⁶⁾によって報告されている.

* Formation of 5-Dehydrofructose by Members of *Acetobacter* species. Part I. Formation of a New Strong Reducing Substance from Fructose and its Discrimination from Glucosone.
 By Osamu TERADA, Kanji TOMIZAWA and Shukuo KINOSHITA (Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakkō Kōgyō Co., Ltd.)

一方 *Pseudomonas hydrophila*⁽⁷⁾, *Lactobacillus pentosus*⁽⁸⁾, *Pasteurella pestis*⁽⁹⁾ その他の細菌^(10,11)について種々の aldose-ketose isomerase の存在が報告されており, 酸化細菌については未だ報告はないが, fructose isomerase が存在してフラクトーズがその epimer であるグルコース或はマンノーズに転換されて後酸化を受ける可能性が考えられる。かかる場合 fructose isomerase の存在はフラクトーズよりグルコース, マンノーズ或はこれらの酸化生成物であるグルコン酸, 2-ケトグルコン酸, 5-ケトグルコン酸, マンノン酸, 5-ケトマンノン酸等の生成によって推定することができる筈である。

以上の見地からフラクトーズ, グルコース, マンノーズを基質とした場合の各種酸化細菌の生産物について予備的検討を試みた。

ここに用いた培地は上記の糖 5% に粉末酵母エキス 0.5%, 炭酸カルシウム 2% を添加したものであり, 酸化細菌としては *Acetobacter suboxydans* ATCC 621 (A-1-1)*, *Gluconobacter cerinus* (G-1-1), *Pseudomonas fluorescens liquefaciens* (P-1-2), *Serratia marcescens* (S-1-1) を用いた。なおこの実験に使用した菌株はすべて東大応微研より分譲されたものである。振盪培養 5 日後の生産物について検討した結果を第 1 表に示す。

表に示したごとく *Acetobacter*,

Pseudomonas はフラクトーズをほとんど, 或はまったく利用せず, *Serratia* はかなりの利用を示したが, 残糖以外の生成物は検出しえなかった。ただ *Gluconobacter* においてのみフラクトーズから未知還元性物質の生成を認めた。なお対照としたグルコース, マンノーズからは 5-ケトマンノン酸と思われる還元性有機酸のほかは常識的な酸化生成物を検出しえなすに止まる。

第 1 表 酸化細菌によるフラクトーズおよびその epimer の酸化

菌株	基質	生 産 物
A-1-1	G	グルコン酸, 2-ケトグルコン酸, 5-ケトグルコン酸
	M	(マンノーズ), マンノン酸
	F	(フラクトーズ)
G-1-1	G	グルコン酸, 2-ケトグルコン酸, 5-ケトグルコン酸
	M	(マンノーズ), マンノン酸, 5-ケトマンノン酸(未確認)
	F	(フラクトーズ), 未知還元物質
P-1-2	G	2-ケトグルコン酸
	M	マンノン酸
	F	(フラクトーズ)
S-1-1	G	2-ケトグルコン酸, α -ケトグルタル酸
	M	(マンノーズ), マンノン酸
	F	(フラクトーズ)

(註) 括弧内は未利用の基質

G: グルコース, M: マンノーズ, F: フラクトーズ

上に述べた *Gluconobacter* によってフラクトーズから生成される未知物質は, クロマト上の挙動および諸種の呈色反応より基質と同程度の炭素数を有する還元性ポリアルコール類似化合物であり, 酸或はそのラクトン又はエステルではないと考えられるので, これについて更に検討を試みることにした。

II. 醋酸菌群におけるフラクトーズ酸化能の分布 前実験において *Gluconobacter cerinus* の 1 株がフラクトーズより未知還元性物質を生成することが認められたので, さらに広く *Acetobacter*, *Gluconobacter* の諸菌株についてフラクトーズの酸化能を検討した。ここに用いた培地は実験 I のフラクトーズ培地, また使用菌株は *Acetobacter suboxydans* ATCC 621 (A-1-1), *A. rancens* (A-1-8), *A. pasturianum* (A-1-9), *A. kützingianum* (A-1-10), *A. melanogenum* (A-1-11), *A. roseus* (A-1-12), *A. oxydans* (A-1-13), *A. gluconicum* (A-1-14), *Gluconoacetobacter cerinus* Asai (G-1-1), *G. cerinus* IFO 3264 (G-1-2), *G. cerinus* IFO 3265 (G-1-3), *G. cerinus* var. *ammoniacus* Asai IFO 3267 (G-1-4), *G. cerinus* var. *ammoniacus* IFO 3268 (G-1-5), *G. cerinus* var. *nonoxygluconicus* IFO 3275 (G-1-6), *G. cerinus* var. *monoxygluconicus* IFO 3276 (G-1-7), *G. roseus* G-2 (G-1-8), *G. roseus* H-23 (G-1-9) である。

5 日間振盪培養した培養液について検討した結果, *p*-anisidine によって明らかに未知物質の生成が認められたものは A-1-1, A-1-11, A-1-12, A-1-13, A-1-14 および G-1-1~G-1-9 であり, 特に A-1-14, G-1-2, G-1-4 に於てはフラクトーズが完全に消失し著量の未知物質の蓄積が認められた。副生産物としては少量の 2-ケトグルコン酸, 5-ケトグルコン酸が認められたのみで他の有機酸, 糖アルコール等の生成は認められなかった。そのクロマトグラムの一部を第 1 図に示す。

以上の実験結果よりすればフラクトーズから未知物質を生成する能力は醋酸菌群にかなり広範囲に分布しており, 著者等の経験の範囲内では特に *Gluconobacter* に多い。またその能力もかなり強力なものがあり, その後の検討によれば 10% のフラクトーズを 50 時間前後で完全に未知物質に転換するものがある。なお以上の実験によ

* 括弧内は当研究所の菌株整理番号。

第 1 図 醋酸菌によるフラクトーズの酸化の一例

展開剤: *n*-Butanol-pyridine-water (3:2:1.5)発色剤: *p*-Anisidine-HCl R_F 0.48; フラクトーズ(鮮黄); R_F 0.44, 未知物質(緑褐); R_F 0.18, 5-ケトグルコン酸(淡褐); R_F 0.15, 2-ケトグルコン酸(紅紫) 括弧内は *p*-Anisidine による呈色

より再結すれば m. p. 137~138° (分解) を示す。

3. B.P.B. で呈色せずまた hydroxamic acid test⁽⁴⁾ も陰性である。従って有機酸、ラクトンまたはエステルではない。

4. *o*-Phenylenediamine と規定条件⁽¹²⁾下で quinoxaline の結晶を与えず、従って vicinal dicarbonyl を有しない。

5. Br を吸収せず、Br 水に安定である。

6. クロマト上 *p*-anisidine-HCl で緑褐色を呈し、orcinol-HCl には陰性、また 2,6-dichlorophenolindophenol を脱色しない。

7. KJO₄-benzidine 試薬⁽²⁾ではポリアルコールの反応を呈す。

以上の結果からすれば、この物質は還元性糖類似化合物であると考えられる。

IV. 未知物質とグルコソンの異同 以上の検討の結果からこの物質はかなり強い還元力を有する糖類似化合物であると考えられるが、これに何等かの類似点を有するものとしては池田⁽⁶⁾によって麴酸の precursor として報告されたグルコソンがあるのみである。しかしながらグルコソンであれば phenylhydrazine とは glucosazone, m. p. 205~210° の黄色針状結晶を与え、また *o*-phenylenediamine とは vicinal dicarbonyl 化合物の特性として quinoxaline の結晶を与えなければならないが、著者等の新物質はすでに述べた如く phenylhydrazine との縮合物において m. p. 結晶形を異にし、また *o*-phenylenediamine とは結晶性縮合物を与えない。よってさ

第 2 図 グルコソン, 未知物質のペーパー
クロマトグラム

展開剤: 80% フェノール水

● *p*-Anisidine ● Phenylhydrazine○ KJO₄-Benzidine

り G-1-4 がフラクトーズ酸化能が強力であり、副生酸も少いことが認められたので、爾後の実験には主として G-1-4 を用いた。

III. 未知物質の性質 以上のごとく適当な菌株を選択することによって、フラクトーズを完全に未知物質に転換することができる。またかかる培養液中には他の糖関連物質としては少量の 2-ケトおよび 5-ケトグルコン酸を混在するのみで、これらはイオン交換樹脂によって簡単に除去することができる。よって培養液の Amberlite IR-120, IR-4 B 処理液或は培養液のペーパークロマト上のスポットについて未知物質の性質についての予備的検討を試みた。その結果の概要は次のごとくである。

1. Fehling 溶液を室温下で速かに還元する。

2. Phenylhydrazine と室温で速かに縮合し、淡黄色板状結晶を生ずる。エタノール-水又はピリジン-水

らに詳細に両者の異同を検討するために化学的にグルコソンを合成し未知物質との比較を試みた。

グルコソンの合成法としては種々の方法⁽¹³⁻¹⁸⁾を試みたが、最終的にはグルコースをメタノール溶媒中で醋酸銅により酸化する Weidenhagen 法の変法⁽¹³⁾によった。この方法は収量は必しも良好ではないが簡単であり、且つ反応生産物中には原理的にグルコソンと未反応のグルコースのみが存在し、著者等の実験目的に好都合であった。

a. ペーパークロマト上の比較: 合成グルコソンおよび未知物質のペーパークロマトグラムの一例を第 2 図に示す。

グルコソンは $R_F=0.25\sim0.27$ で *p*-anisidine で

紫灰色を呈するに反し, 未知物質は $R_F=0.34\sim0.35$ で緑褐色を呈する. phenylhydrazine 水溶液では両者ともに黄色を呈し, グルコース, フラクトーズは呈色しないが, 2,4-DNP 試薬では両者ともただちに橙赤色を呈するほか, 十数分後にはグルコース, フラクトーズにも同様の呈色が見られる. KJO_4 -benzidine 試薬に対する態度は四者まったく同様である. この $R_F 0.25$ のスポットがグルコソンであることは, このほかこのスポットが室温で Fehling 液を還元するに反し, $R_F 0.41$ の未反応のグルコースと考えられるスポットがまったくかかる性質を示さないこと, またこのグルコソン標品中には両者以外に KJO_4 -benzidine 試薬に反応する物質を認めないことより明かである.

b. Phenylhydrazine との縮合物の比較: 合成グルコソン標品は醋酸ソーダの存在下, 室温で phenylhydrazine-HCl と縮合して鮮黄色針状晶を与え, このものはピリジン-水より 3 回再結すれば m. p. $209\sim210^\circ$ を示し, グルコースより常法に従って製した glucosazone と混融するも融点の降下を示さない. これに反し, 未知物質は同一条件下で前述のごとく m. p. $137\sim138^\circ$ の淡黄色板状晶を与える. しかしながらこの未知物質と phenylhydrazine との縮合体は, 元素分析によれば C 60.34, 59.56; H 5.68, 6.44; N 16.44, 15.54% で glucosazone の計算値 C 60.32; H 6.19; N 15.63% と一致する. 従ってもし分子量が一致するとすれば (後報参照), 未知物質はグルコソンと同じ $C_6H_{10}O_6$ の分子式を有し, vicinal carbonyl を有しない dicarbonyl 化合物であり, 上の板状晶はその bis-phenylhydrazone であると考えられる.

以上の結果から著者等の得た未知物質は少くともグルコソンではなく, 恐らくはグルコソンと同一の分子式を有する dicarbonyl 化合物であると考えられる. その構造決定については後報⁽¹⁹⁾ にゆずる.

要 約

(1) *Gluconobacter cerinus* の一株がフラクトーズより一新強還元性糖類似化合物を生成することを見出した. この物質の生成能はかなり広く醋酸菌群に分布し, 特に *Gluconobacter* に強い.

(2) この物質は冷時 Fehling 液を速かに還元し, また phenylhydrazine と冷時速かに縮合して m. p. $137\sim138^\circ$ の淡黄色板状結晶をつくり, その元素分析値は $C_6H_{10}O_6$ 化合物の bis-phenylhydrazone に一致する.

(3) この物質に近似した化合物としてはグルコソンがあるが, ペーパークロマト上の挙動, 呈色, phenylhydrazine との縮合体の性質において明らかに異なる.

終りに臨み有益な示唆を与えられた東大応微研池田庸之助教授および元素分析をお願いした東大薬学科農芸化学科分析室の方々に深く感謝する.

(本報告の一部は昭和 35 年 9 月 24 日, 日本農芸化学会関東支部例会に於て発表した.)

(1) L. Hough, J. K. N. Jones, W. H. Wadman: <i>J. Chem. Soc.</i> , 1950, 1702.	(10) M. Green, S. S. Cohen: <i>J. Biol. Chem.</i> , 219, 557 (1956).
(2) J. A. Cifonelli, F. Smith: <i>Anal. Chem.</i> , 26, 1132 (1954).	(11) M. J. Palleroni, M. Doudoroff: <i>J. Biol. Chem.</i> , 218, 535 (1956).
(3) 日本化学会編: 実験化学講座, 丸善, 16, 358 (1959); G. D. Johnson: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 73, 5888 (1951).	(12) C. R. Bond, E. C. Knight, T. K. Walker: <i>Biochem. J.</i> , 31, 1033 (1937).
(4) M. Abdel-Akher, F. Smith: <i>ibid.</i> , 73, 5859 (1951).	(13) L. L. Salomon, J. J. Burns, C. G. King: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 74, 5161 (1952).
(5) 朝井勇宣: 本誌, 31, A 25 (1957).	(14) J. K. Hamilton, F. Smith: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 74, 5162 (1952).
(6) 池田庸之助: 本誌, 28, 538 (1954).	(15) S. Bayne, G. A. Collie, J. A. Fewster: <i>J. Chem. Soc.</i> , 1952, 2766.
(7) R. H. Hochster, R. W. Watson: <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 48, 120 (1957); R. O. Marshall, E. R. Kooi: <i>Science</i> , 125, 648 (1957).	(16) 井上吉之, 小野寺幸之進, 唐沢郁夫: 本誌, 25, 75 (1951).
(8) S. Mitsuhashi, J. O. Lampen: <i>J. Biol. Chem.</i> , 204, 1011 (1953).	(17) E. E. Percival, E. G. V. Percival: <i>J. Chem. Soc.</i> , 1935, 1398.
(9) M. W. Slein: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 77, 1663 (1955).	(18) H. ElKhadem: <i>J. Chem. Soc.</i> , 1953, 3452.
	(19) 寺田 治, 鈴木静子, 木下祝郎: 本誌, 35, 131 (1961).