[農化 第 35 卷, 第 2 号, p. 131~134, 1961]

Acetobacter 属細菌による 5-デヒドロフラクトーズの生成 (第 2 報)*

醱酵経過, 精製, および結晶の性質

寺田 治, 富沢勸治, 鈴木静子, 木下祝郎 (協和醱酵工業株式会社東京研究所)

昭和 35 年 8 月 11 日 受理

著者等は前報⁽¹⁾において醋酸菌群の種々の菌株がフラクトーズを酸化して未知の強還元物質を生成することを見出し, その性質について二, 三の予備的検討をこころみた結果, この物質がこれまで醋酸菌によってフラクトーズから生成されるとして報告されたいずれの物質とも一致せず, もっとも性質の近似しているグルコソソとも明かに異なることを確認した。

著者等はこの未知物質の精製単離を試み, 種々検討の結果その結晶化に成功したので, その醱酵経過, 精製過程および得られた結晶の諸性質について検討した結果を報告する。

なお実験方法は便宜上個々の実験の部に記した。特に記載のないものは前報⁽¹⁾の方法を踏襲したものと解せられたい。

実 験 の 部

I. 未知物質の醱酵経過 フラクトーズよりの未知物質の醱酵生成の経過について検討をこころみた。

実験方法: 使用菌株としては *Gluconobacter cerinus* var. *ammoniacus* Asai IFO 3267 (G-1-4) を用いた。これは前報の知見からフラクトーズの酸化能が強く, 且つ 2-ケトグルコン酸, 5-ケトグルコン酸等の還元性有機酸の副生が少なく実験上好都合であったことによる。培地はフラクトーズ 5%, 粉末酵母エキス 0.5% である。

pH はガラス電極 pH メーターで測定した。還元力の測定は Somogyi の新試薬による定量法⁽²⁾によったが, フラクトーズ, 未知物質ともに還元力を有するので, 岡崎⁽³⁾の方法に従って酵母による分別定量をこころみた。しかるに酵母が中性乃至微酸性領域で徐々にではあるが未知物質をも消費することが認められたので (第 1 図参照), 一定時間一定条件下で醱酵せしめてフラクトーズを除去し, その間の未知物質の減少は計算によって補正した。即ち pH 5.5~6.5 で 30 分間醱酵せしめ, その遠沈上清の示す還元力に $1.062 \times 113 \times 100 / 110$ を乗じたものを未知物質質量とした。この第 1 項は酵母処理による稀釈の, 第 2 項は酵母による消費の, また第 3 項は未知物質が同量のフラクトーズの 110% の還元力を示すことに対する補正である。その他の操作法は岡崎⁽³⁾の方法を踏

第 1 図 酵母による未知物質の分解
温度 30°, 静置, 30 分毎に攪拌, pH 5.5~6.5

第 2 図 フラクトーズの醱酵経過
○—○ 全還元力 △—△ pH
●—● 未知物質 □—□ 菌体量

* Formation of 5-Dehydrofructose by Members of *Acetobacter* species. Part II. Studies on the Fermentation, Purification and Properties of Crystal.

By Osamu TERADA, Kanji TOMIZAWA, Shizuko SUZUKI and Shukuo KINOSHITA (Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakkō Kōgyō Co., Ltd.)

襲した。菌体量の測定は便宜的に 550 m μ における吸光係数をもって示した。なお接種量は上述の培地に 28° で 20 時間前培養したもの 3% である。

醗酵経過の一例を第 2 図に示す。即ち 5% 程度のフラクトーズは 24 時間でほぼ完全に未知物質に転換する。その後の経験によれば糖濃度が 10% の場合も 50~60 時間で酸化が完了する。なお図中、1 日目以後の全還元力と未知物質量の間に差があるのは、さきにも述べたごとく未知物質がフラクトーズの 110% の還元力を有することによるものであって、副生産物によるものではない。生成した未知物質は 24~48 時間の間にかなり明瞭な消費が見られるが、その後はほぼ定常化する。pH は初期に急激に 4.0 内外に低下するがその後は定常化し、また菌体の増殖は初期の 24 時間にその大部分が生成され、その後はごく緩慢な増殖が認められるに過ぎない。

以上は 6 日間の培養についての知見であるが、更に培養を継続すれば麴酸を含む 2 乃至 3 種類の塩化鉄呈色物質を生成し、また炭酸カルシウムの存在下では一旦生成した未知物質がかなり速かに消失してグリセリン酸、グリコール酸、その他の低分子酸を生成することが認められる(後報参照)。従って上述の醗酵の緩慢化は、少くともその一部は低い pH に起因するものと考えられる。

II. 菌体標品によるフラクトーズの酸化 後述の精製実験に伴って大量の菌体を得られたので、生菌、凍結乾燥菌体、アセトン乾燥菌体について、フラクトーズおよび二、三の糖並びに糖アルコールの酸化能を検討した。

実験方法：ここに用いた菌体標品は醗酵液を 12,000 r. p. m. で遠心沈澱して得られた菌体を生理食塩水で 2 回、蒸留水で 1 回洗滌したもの (intact cell), およびこれを更に常法に従って凍結乾燥、アセトン乾燥したものである。以上の菌体についてそのグルコース、フラクトーズ、マンノーズ、ガラクトーズ、ソルボーズ、ソルビット、マンニットの酸化能を検討した。操作は基質の 5% 水溶液 2 ml に 0.05 M の Arsenate buffer (pH 7.0) または Acetate buffer 2 ml, 菌体標品懸濁液 1 ml を添加し、試験管振盪機上で 3~12 時間振盪した。温度は 28°, なお菌体量は反応液が 550 m μ で 1.0 前後の吸光係数を示す程度である。

結果および考察：Intact cell について経時的に試料を採取し、ペーパークロマト法によって生成物を検討した結果を第 1 表に示す。

種の糖, 糖アルコールの酸化が認められる。以上のうち培養の場合と異なる点の一つはグルコースの酸化であって、培養では 5-ケトグルコン酸, 2-ケトグルコン酸を同時に生成し、むしろ 5-	第 1 表 Intact cell による糖, 糖アルコールの酸化	
	基 質	生 産 物
	グルコース	→グルコン酸→2-ケトグルコン酸
	マンノーズ	→マンノン酸→2-ケトマンノン酸(=2-ケトグルコン酸)
	ガラクトーズ	→ガラクトン酸→2-ケトガラクトン酸
	フラクトーズ	→未知物質
	ソルボーズ	不 変
	ソルビット	→ソルボーズ
	マンニット	→フラクトーズ→未知物質

ケト酸化が 2-ケト酸化に優越しているが、菌体標品の場合は 2-ケト酸化のみが行われ、5-ケトグルコン酸は検出し得なかった。この傾向はマンノーズの酸化において一層顕著で、培養では前報⁽¹⁾に報告したごとく 5-ケトマンノン酸と思われる *p*-anisidine で黄褐色の呈色を示す還元性酸を生成するが、菌体標品ではかかるスポットは認められず、2-ケトマンノン酸 (=2-ケトグルコン酸) のみが生成される。恐らく pH の影響によるものと推測されるが未だ確実な実験的根拠を得ていない。酸化の速度はかなり速かであって上述程度の濃度の基質は 3~4 時間でほぼ完全に酸化される。buffer の種類による差は認められなかった。凍結乾燥菌体、アセトン菌体も定性的には全く同様の活性を示すが、その酸化能はかなり弱く、特にアセトン菌体が弱い。以上のフラクトーズ培地から得られた菌体の他に、グルコース培地で得られた生菌体についても検討したが、前者よりは弱いが明瞭にフラクトーズの酸化が認められた。即ちこの菌のフラクトーズ酸化能は適応的に生じたものではなく構成的なものであると考えられる。

III. 未知物質の精製、単離 これまでに得られた知見によれば、フラクトーズから未知物質への転換はかなり急速且つ完全であって、副生物も少量の 2-ケト、5-ケトグルコン酸が検出されるに過ぎない。したがってその精製は、未知物質の安定性に疑点を残すほかは、かなり簡単であることが予想されたのでこれを試みた。

実験方法、結果ならびに考察：結晶化までの精製過程を次に示す。即ち G-1-4 をフラクトーズ 10%, 粉末酵母エキス 0.5% よりなる培地で 3~4 日間培養し、ペーパークロマト上 *p*-anisidine, orcinol, KJO₄-

benzidine でフラクトーズの消失を確認した後遠心沈澱 (12,000 r. p. m.) によって菌体を主とする固形物を除く。得られた微蛋白濁を呈する上清を Amberlite IR-120 に通して活性炭処理を行い, さらに IR-4 B に通して塩類および着色物質を除く, この中性溶液を 70° の水浴上で N₂ ガスを通じつつ減圧濃縮し, 約 1/5 容に濃縮した後, 生成した着色物質を活性炭で除き, 濾液に 4~5 容の無水アルコールを添加し, 50° 以下で減圧濃縮する。適時アルコールを添加しつつ共沸脱水をつづければ液は著しく濁し, 時として残存する活性炭末を包蔵した絮状の沈澱を生ずる。活性炭を加えて温時濾過し, 得られた無色透明の濾液をアルコールを添加しつつ, さらに共沸脱水すれば液は微かに濁したのち結晶の析出が始まり, 短時間後全体が粥状となって突沸のため濃縮を続行し得ざる状態となる。約 30 分間水浴中に冷却し, 結晶を吸引濾過して少量の冷アルコールで 3~4 回, さらにエーテルで数回洗滌し, 塩化カルシウム上で減圧乾燥する。濾液はそのまま濃縮, 脱水を続行すればさらに数回結晶を回収することが出来る。この間, 液に着色が認められれば炭末処理によって除く。4~6 回結晶を回収した後は液が粘稠化し結晶の析出が困難になるが, かかる溶液からは 1~2 容のエーテル或いはアセトンの添加によって未知物質が白色の粉末として回収される。但しかくして得られた粉末は夾雑物のため強い吸湿性を有し, また再結による結晶の回収も収量が低い。再結はかくして得られた粗結晶を少量の水に溶解し, 必要があれば活性炭で脱色し, 温時微濁を生ずるまでエタノールを加えて一夜放置すれば結晶を析出する。収率は定量的である。得られた結晶を第 3 図に, また精製中の各段階のクロマトグラムを第 4 図に示す。

その後の経験によれば, 得られる結晶の純度, 収率は濃縮中の加熱時間によって大きく左右されるものの如くであって, 上述のごとく N₂ 気流中で長時間加熱する場合は結晶収率は 5% 程度に止まるが, ケスナー型 flash evaporator で濃縮した場合は約 70% が結晶として回収される。精製収率の一例を述べれば, 90 g の未知物質を含む醗酵液 2 l より第 1 結晶 18.5 g, 第 2 結晶 14 g, 第 3 結晶 16 g, 第 4 結晶 10.5 g, 第 5 結晶 7 g, 計 66 g (収率 73%) を得た。80% 程度を結晶として回収することはかなり容易であると考えられる。

IV. 未知物質結晶の性質 得られた未知物質の結晶についてその物理的, 化学的性質を検討した。その概要を次に示す。

1) 形状: 無色, 長柱状結晶, 甘味を呈す, 吸湿性なし, 光, 熱にかなり安定で実験室内に放置するも変化を認めない。

2) m. p.: 161.5~162.5° (分解)

3) 溶解性: 水に易溶, グリセリン, グリコール類に可溶, エタノール, 醋酸エチルに難溶, アセトン, エーテル, ペンゼンに不溶, 又はほとんど不溶。

4) 還元性: 室温下 Fehling 液を速かに還元する。同量のグルコースの約 110% の還元力を有し, その 20~25% が室温 (28°) で発揮される。

5) 紫外部吸収: なし。

6) 赤外部吸収: 第 5 図に示す。6 μ 付近に出るはずの carbonyl の吸収が認められないのは, フラクトーズにも同上の吸収がないことからすれば⁽⁴⁾, 恐らくラクトール環の形成等によって掩蔽されているものと考えられる。

7) 元素分析値: Found: C 40.89, 40.71; H 6.05, 5.58%.

Calcd. for C₆H₁₀O₆: C 40.45; H 5.65%.

第 3 図 未知物質結晶

第 4 図 精製各段階のクロマトグラム

展開剤: *n*-Butanol-pyridine-water

発色剤: *p*-Anisidine-HCl

第5図 未知物質の赤外部吸収 (K-Br Tablet.)

8) 分子量, 分子式: 分子量は氷点降下法により測定した. 濃度は 25 mg/ml. 測定値は 172.2~178.9 を示し $C_6H_{10}O_6$ (178.14) によく一致した. 同時に測定したグルコース $C_6H_{12}O_6$ (180.16) は 179.2~186.0 を示した. 以上の結果から未知物質はフラクトーズより2個のHが脱水素されたものであると考えられる. 従って前報⁽¹⁾に報告した本物質の phenylhydrazine に対する態度および縮合体の元素分析値を考慮に入れば, 本物質はフラクトーズより脱水素されて生じた dicarbonyl 化合物であり, 前報に述べた phenylhydrazine との縮合体はその bis-phenylhydrazone であると考えられる.

9) 施光度: $[\alpha]_D^{18.5} = -89.96$ ($c=2.5$, water), 変施光を認めない.

要 約

- (1) 未知物質のフラクトーズよりの生成経過を追跡した.
- (2) 醱酵液より未知物質の分離, 精製をこころみ, 結晶化に成功した.
- (3) 結晶について理化学的性質を検討した. 特に元素分析, 分子量測定の結果, 本物質が $C_6H_{10}O_6$ の分子式を有することを見出した. 恐らくフラクトーズより2個のHを脱離した dicarbonyl 化合物であると考えられる. (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おいて発表した.)

- (1) 寺田 治, 富沢勸治, 木下祝郎: 本誌, 35, 127 (1961).
- (2) M. Somogyi: *J. Biol. Chem.*, 119, 74 (1937).

- (3) 岡崎 浩: 本誌, 24, 202 (1950).
- (4) 山口一孝: 植物成分分析法, 南江堂, 中巻, p. 176 (1959); Sadtler Card No. 2755.