

微生物によるグリセリン代謝機構 に関する研究 (総括)

大塚 謙 一

(昭和32年12月1日受理)

Studies on the Mechanism of Glycerol-metabolism by microbes

By Ken-ichi OTSUKA

緒言

- 第1編 酵母 (*Hansenula anomala*) のグリセリン酸化機構
 - 第1章 各種酵母のグリセリン酸化能並びに酸化能
 - 第1節 酸化能試験
 - 第2節 グリセリン酸化能
 - 第2章 *H. anomala* と *Sacchar myces sake* との基質酸化能の比較
 - 第1節 各種基質酸化能の比較
 - 第2節 ブドウ糖酸化とグリセリン酸化との比較
 - 第3章 *H. anomala* のグリセリン酸化機構
 - 第1節 無機リン酸及びDPNの関与
 - 第2節 グリセリン→グリセロリン酸系の存在
 - 第3節 グリセリン→ジオキシアセトン系の否定
 - 第4節 グリセロリン酸代謝系の検討
 - 第4章 グリセロリン酸酸化経路に於ける磷六炭糖代謝系の関与
 - 第1節 グリセロリン酸酸化とブドウ糖6リン酸酸化との比較
 - 第2節 Aldolase 反応の存在
 - 第3節 磷六炭糖代謝系の存在
 - 第4節 磷六炭糖代謝系の検討
 - 第5節 三炭糖リン酸代謝系と磷六炭糖代謝系

とに於ける支配因子

- 第5章 *H. anomala* によるグリセリン酸化型式
- 第2編 細菌 (*Bacterium succinicum*) によるグリセリン酸化機構
 - 第1章 酵素液の行動
 - 第1節 酵素液の性質
 - 第2節 グリセリン酸化に於ける Oxidative Phosphorylation の証明
 - 第2章 グリセロリン酸経路系の存在
 - 第1節 α -グリセロリン酸の生成確認
 - 第2節 グリセリン→グリセロリン酸→三炭糖リン酸系の存在
 - 第3節 グリセロリン酸代謝系
 - 第3章 ジオキシアセトン経路系の存在
 - 第1節 グリセリンより三炭糖の生成確認
 - 第2節 三炭糖→三炭糖リン酸系の存在
 - 第3節 三炭糖の非リン酸代謝系の存在
 - 第4章 グリセロリン酸系と三炭糖系とに於ける支配因子
 - 第1節 グリセリン酸化の最適 pH
 - 第2節 三炭糖系の最適 pH
 - 第3節 グリセロリン酸系の最適 pH
 - 第5章 磷六炭糖代謝系及びトリカルボン酸サイクルの関与
 - 第1節 磷六炭糖代謝系の存在
 - 第2節 TCA-cycle の関与
 - 第6章 *B. succinicum* によるグリセリン酸

	化型式		ール系の証明
第3編	細菌 (<i>B. succinicum</i>) によるグリセリン嫌気代謝機構	第2節	トリメチレングライコールよりアクロレインの生成
第1章	グリセリンよりの生成物	第3節	アクロレイン生成酵素
第1節	有機酸の生成	第4節	トリメチレングライコール→アクロレイン系に於ける中間体について
第2節	ガス発生量	第5節	アクロレインよりアリアルアルコールの生成
第3節	メチルグリオクサールの生成	第5章	アリアルアルコール脱水素酵素
第4節	トリメチレングライコールの生成	第1節	酵素の抽出
第5節	アクロレインの生成	第2節	酵素液の特性
第2章	各種基質の醗酵能の比較	第6章	アリアルアルコール代謝に於ける磷酸の影響
第1節	醗酵能と酸化能	第1節	脱水素速度に対する影響
第2節	グリセリン, グリセロ磷酸及び三炭糖の醗酵速度の比較	第2節	アリアルアルコール代謝に於ける磷酸の消長
第3章	水素ガス発生機構	第7章	グリセリン嫌気分解型式
第1節	焦性ブドウ酸生成	結語	
第2節	焦性ブドウ酸の分解		
第3節	水素ガス発生機構		
第4章	アクロレイン生成機構		
第1節	グリセリンとトリメチレングライコ		

緒 言

酵母のアルコール醗酵に際し、グリセリンが生成することは、PASTEUR の時代から認められており、その後 NEUBERG がブドウ糖からのグリセリン生成機構並びに工業的生産に関して行った研究は有名なものである。

しかし、グリセリンが分解される機構については、比較的古くから研究されてきたにも拘らず、その全系が明らかになったのは最近のことである。即ち 1880 年に既に FREUND¹⁰⁾ がグリセリンからトリメチレングライコールの生成を確認しており、1910 年頃には VOISENET⁶⁷⁾ がアクロレインの生成を認め、その後、HUMPHREYS²⁶⁾, BRAAK⁸⁾, VIRTANEN⁶⁶⁾, WERKMAN 一派^{44, 56, 71)}, GUNSALUS²³⁾ らのグリセリン嫌気分解に関する研究が知られている。一方、グリセリン酸化分解についての本質的な研究が行われたのは 1940 年以後であって、馬場^{3, 4)} の黒カビ, GUNSALUS²²⁾ の乳酸菌, MICKELSON⁴³⁾ の *E. freundii*, 山村⁷²⁾ の結核菌, MAGASANIK⁴⁰⁾ の *Aerobacter*, CHELDELIN 一派^{25, 27, 33)} の *Acetobacter*, 池田²⁹⁾ の *Gluconobacter* についての研究が知られている。しかし、これらの研究はグリセリン代謝の全系を総括する立場から考察したものではない。

グリセリン代謝を述べるには、好氣的分解と嫌氣的分解とを考慮しなければならない。何故なら酸素の有無によって異なる代謝系が進展し、特に嫌気代謝に於ては他の炭水化物とは異なったグリセリン特有の機構が存在するからである。

著者⁴⁹⁻⁵⁵⁾ は *Bacterium succinicum* 及び *Hansenula anomala* を用いて研究を行

い、グリセリン代謝の全系を明らかにすることができたので、今までの結果を取りまとめ、なお未発表のデータを補足して総括的に報告する。

即ち、酵母はグリセリンを醗酵できず、また好氣的代謝に於ても磷酸系のみが優先する比較的単純な径路なので、まず第1編に於て酵母 (*H. anomala*) のグリセリン酸化機構を記述し、次いで第2編に於て磷酸系と非磷酸系とを有する細菌 (*B. succinicum*) のグリセリン酸化機構を記述し、さらに第3編に於て、細菌のグリセリン嫌気分解機構を記述した次第である。

第 1 編

酵母のグリセリン酸化機構

第1章 各種酵母のグリセリン資化能並びに酸化能

第1節 資化能試験

約300株の各種酵母⁵²⁾を用いて Table 1 示す培地にて繁殖試験を行った。培地—Iは斜面寒天という好気条件下のグリセリン培地で、無機及び有機窒素を含有する。この培地に繁殖できない酵母はビタミン欠除の条件では、グリセリンを資化できないものである。培地—IIはグリセリン液体培地で窒素源としては無機窒素のみで、これに繁殖できるものはグリセリンを資化する能力のある酵母と判定される。培地—IIIは培地—IIの対照であってグリセリンの代りに蔗糖またはブドウ糖を含有する。

Table 1 に示す如く、*Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Schizosaccharomyces* は蔗糖培地 (III) には繁殖できるが、グリセリン液には繁殖し得ない。一方、いわゆる産膜性酵母はグリセリン液には繁殖することが認められ、*Hansenula* は最も顕著である。*Pichia* はこれより幾分遅いものがある。ここで用いた *Zygosaccharomyces* はグリセリン資化により二つの型になる。

以上のことから酵母をグリセリン資化能をもたない *Saccharomyces* 型と、資化能をもつ産膜酵母型とに分つことができる。

第2節 グリセリン酸化能

微生物の基質に対する資化能と酸化能との関係は必ずしも一致しないものであって、上述の繁殖試験の結果からグリセリン酸化能の有無を論ずることはできない。そこで各 species より菌株を任意的に撰択して、麴液で振盪培養し、洗滌菌体についてグリセリン酸化率及び蔗糖、アルコールの酸化率を測定し、繁殖能と比較した⁵²⁾。

Table 2 に示す如くグリセリンを殆んど酸化できず、しかも資化できない酵母群があって、*Saccharomyces* 及び *Schizosaccharomyces* が殆んど例外なくこの中に含まれる。これらの酵母には蔗糖に対して強い酸化能を示すものがある。一方産膜性酵母をみると一般にグリセリン酸化能が認められ、繁殖しないものでも酸化能のあるものがあり、逆の場

Table 1. The Glycerol-Assimilation by Various Yeasts

Yeasts	Mark	No. of Strains experimented	Growth after 7 days at 30°			
			Medium I ^{a)}	Medium II ^{a)}	Medium III ^{a)}	
<i>Kloekera</i> sp.	KI	9	-	-	- ^{b)}	S
<i>Saccharomyces</i> sp.						
Beer yeast	BH	12	-	-	-	S
Alcohol yeast	BrH	13	-	-	-	
		34	+	-	-	S
Wine yeast	WH	57	+	-	-	S
Cider yeast	AY	12	+	-	-	S
Sake yeast	SH	56	+	-	-	S
<i>Schizosacch.</i> sp.	SHS	8	-	-	-	
		6	+	-	-	S
<i>Mycoderma</i> sp.	My	3	±	-	S	
		9	+	S	S	
		6	++	R	F	
<i>Candida</i> sp.	Ca	4	++	R	F	F
<i>Pichia</i> sp.	Pi	7	±	S	S	S, R, F
		2	-	-	R	F
		6	+	R	R	R, F
		15	++	R	F	F
		11	+++	F	F	F
<i>Hansenula</i> sp.	Ha	21	+++	F	F	F
<i>Zygosacch.</i> sp.	ZS	4	+	-	-	F
		2	++	F	F	F

a) : I, Glycerol-agar: Basal medium (K_2HPO_4 , 0.05%; KH_2PO_4 , 0.05%; $MgSO_4$, 0.03% pH 6.0) ; Glycerol, 2.5%; Peptone, 0.1%*; NH_4Cl , 0.3%;

II, Glycerol-water: Basal medium; Glycerol 2.5%; NH_4Cl , 0.3%;

III, Sucrose-water: Basal medium; Sucrose (or Glucose), 2.5%;

*, Peptone was omitted in the test concerned with film-forming yeasts.

b) : After 14 days.

Growth : S, sediment; F, film; R, ring.

Table 2. Comparison of Q_{O_2} -Value of Glycerol-Oxidation with Sucrose-Oxidation by Various Yeasts

Yeasts	No. of strains	Growth in glycerol	Average of Q_{O_2}	
			Glycerol	Sucrose
SH	26	-	0.3 (0~1.6)	12.4(0.2~33.1)
SHS	8	-	0.6 (0~2.3)	14.1(3.6~19.9)
ZS	6	+, -	10.4 (0~25.7)	12.2(0.5~23.8)
Ha & Pi	9	+	11.1 (0~29.6)	8.7(0.1~47.2)

合もあって資化能と酸化能が一致しないことを示している。然し、概してグリセリンに活

性の酵母は産膜型に含まれることは明らかである。

また蔗糖及びアルコール酸化能と比較すると⁵⁹⁾ いずれの酵母も酸化力は大で特に *Saccharomyces* も顕著であって、このことからグリセリン酸化がアルコールの場合とは異なることが解る。

第2章 *H. anomala* と *S. sake* との基質酸化能の比較

前章で示した如く、各種の酵母のグリセリン酸化能及び酸化能を検討した結果、両性能を持たない *Saccharomyces* 型と両性能を持つ産膜酵母型とが存在することが認められたので、*Saccharomyces* 型はグリセリンに対し不活性である理由及び産膜酵母型がグリセリンを代謝する際、いかなる機構で行なわれるか等の点につき以下検討した。使用菌株として前者より *S. sake* を、後者より *H. anomala* を選び実験を行った。

第1節 各種基質酸化能の比較

ワールブルク検圧計にて、麴汁に振盪培養せる菌体を洗滌したものをを用いて、各種基質の酸化能を検討した結果⁵⁹⁾、*H. anomala* はグリセリンに対し高い酸化率を示し、しかも他のポリアルコールに対しても酸化能が明らかに認められた。

これに反して、*S. sake* はグリセリンに不活性なことは勿論のこと、他のポリアルコールに対しても極く微弱な酸化能しか持たない。

しかし、ブドウ糖、アセトアルデヒド (以下 AcH と略記)、エタノールに対して両酵母共強い酸化能を示し、また焦性ブドウ酸 (以下 Py と略記) に対しても酸化能が認められた。

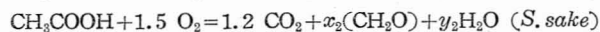
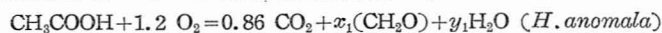
また、*H. anomala* は α -グリセロリン酸 (以下 GP と略記) 酸化率は高いが、ジオキシアセトン (以下 DHA と略記) 及びグリセリン酸 (以下 GS と略記) の酸化能は低い。このことは *H. anomala* のグリセリン酸化に於ては、DHA 及び GS を經由する系が否定される理由となる。

S. sake が GP, DHA, GS 等に対して微弱な酸化しかできないことは、グリセリン酸化能に欠けている一つの理由と考えられる。

酢酸酸化の比較; 近來微生物の糖酸化には WARBURG-DICKENS scheme が認められて、終局的には C_2 -化合物の酸化に導かれることが主張されている。そこで酢酸及びグリコール酸 (以下 Gc と略記) について両酵母の酸化速度を比較したのが Fig. 1;2 である。両酵母共酢酸をよく酸化できるが Gc は *H. anomala* のみが酸化できる。酢酸酸化は菌体重量で比較すると、*S. sake* による酸化速度は遅いが、ガス量の出入はより大である。(Fig. 1)

酢酸濃度を変えてほぼ最大の酸化速度をみると、*H. anomala* ではグリセリン酸化速度にほぼ一致し、また *S. sake* では約 60 分後のブドウ糖酸化速度にほぼ一致している。(Fig. 2)

酢酸酸化反応式は Fig. 2 より次の如く算出された。



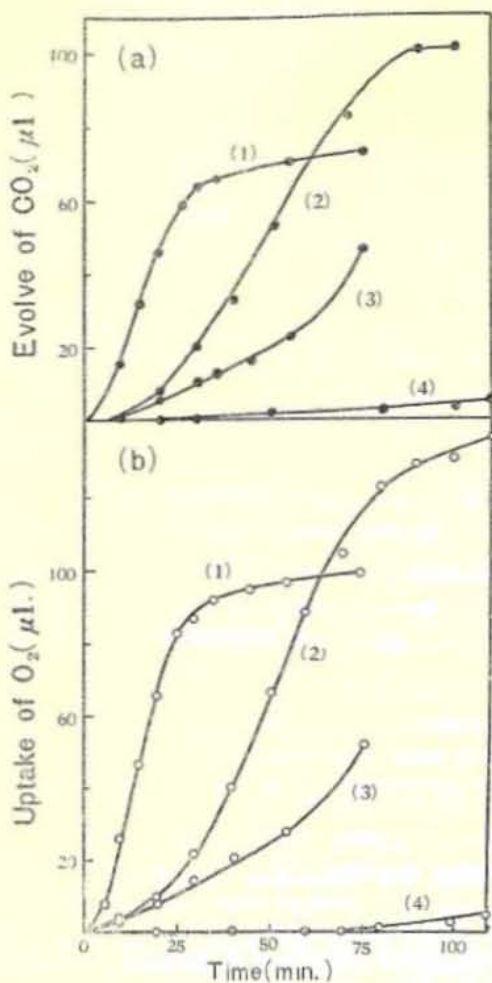


Fig. 1

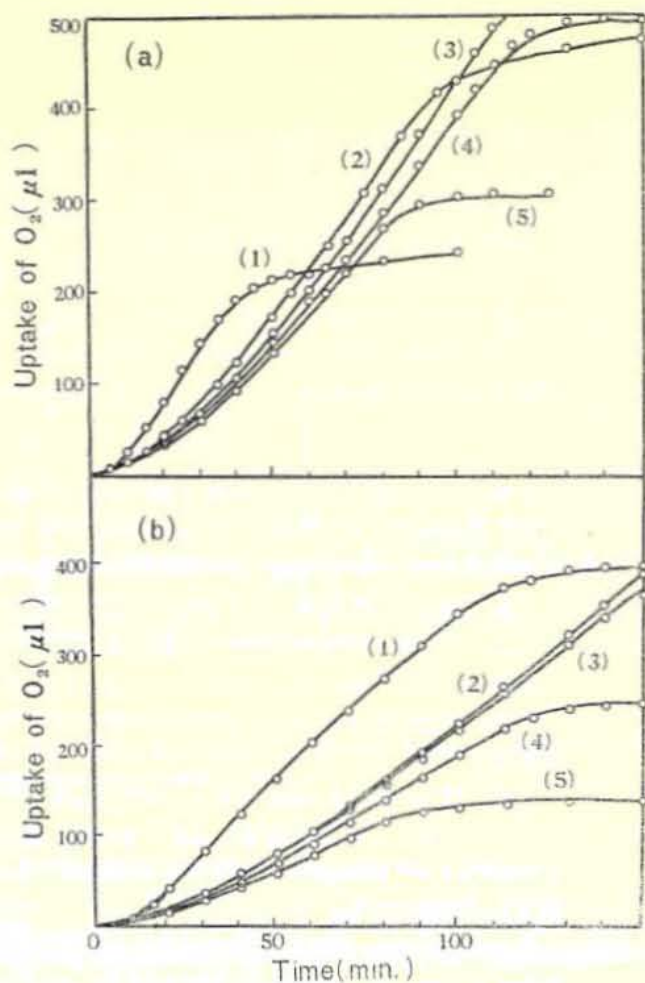


Fig. 2

Fig. 1. Comparison of oxidation of AcOH and Gc by *H. anomala* and *S. sake*. Curve: (1), (2), AcOH, Gc by *H. anomala*; (3), (4), AcOH, Gc by *S. sake*, respectively. Conditions: Phosphate buffer (pH 5.8), 0.5 ml.; yeast susp. (*H. anomala* 7.7 mg. or *S. sake* 10.0 mg. as dry wt.), 1.0 ml.; substrate (.35 μM -AcOH-Na or 3 μM -Gc-Na) 0.3 ml.; temp. 30°, gas phase, air.

Fig. 2. Oxidation of Glycerol, Glucose and AcOH by *H. anomala* (a) and *S. sake* (b). Curve in (a): (1), Glucose, 5.5 μM ; (2), glycerol, 16.6 μM ; (3), AcOH, 25.1 μM ; (4), AcOH, 18.6 μM ; (5), AcOH, 11.2 μM . Curve in (b): (1), Glucose, 5.5 μM ; (2), AcOH, 14.9 μM ; (3), AcOH, 11.2 μM ; (4), AcOH, 7.5 μM ; (5), AcOH, 3.7 μM . Conditions: Phosphate buffer (pH 5.8), 0.5 ml.; yeast susp., 1.0 ml.; substrate, 0.7 ml.; temp., 30°; gas phase, air.

第2節 ブドウ糖酸化とグリセリン酸化との比較

第1項 ブドウ糖酸化進行中にグリセリンを添加した場合

H. anomala と *S. sake* とはポリアルコールに対する酸化能は対照的であるにも拘らず、ブドウ糖は両酵母共酸化できる。そこでブドウ糖酸化中にグリセリンを添加してグリセリンが酸化反応に介入するかどうかを検討すれば両基質の酸化の関係が解る⁵⁾。

Fig. 3a は *H. anomala* の場合であって、勿論単独の基質ではいずれも酸化は旺盛であるが(曲線2,3)ブドウ糖酸化進行中にグリセリンを添加してみると、酸化速度は増加しない(曲線1)。このことはブドウ糖酸化酵素系に対して、基質量が既に飽和しているためである(10 μ M 附近の濃度になるとブドウ糖濃度を増加しても酸化速度は殆んど変らない)。もしグリセリン酸化系がブドウ糖酸化系と全く異なるものであれば、グリセリン添加により酸化速度に変化が現われるか、あるいは両基質を混合した場合は、単独の場合の和に等しい筈である。しかるに、添加したグリセリンはブドウ糖酸化速度を全く変化せしめず、またブドウ糖が先に酸化されてから後にグリセリンが酸化されるように見えるが、曲線—(1)の各点は曲線—(2)；(3)の各点の和より明らかに小さいことが解る。

従って、*H. anomala* の酵素系に対して、グリセリン及びブドウ糖は関連性のある基質である。換言すれば、グリセリンはブドウ糖酸化にある程度介入するものと考えられる。

Fig. 3b は *S. sake* の場合であって、グリセリン単独では酸素吸入は認められないが(曲線—3)、ブドウ糖はよく酸化される(曲線—2)。この場合もブドウ糖酸化速度に対して、グリセリン添加は効果がない(曲線—1)。即ちこの場合はグリセリンが酸化反応に介入しないことを示す。*S. sake* がグリセリンを全く代謝できないことはさらに次の検討からも確められた。

1) グリセリンを基質として、チオニン、メチレン青(以下Mbと略記)、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール等の酸化還元色素を共存させても酸化能は認められない。

2) 大量の洗菌菌体をグリセリン含有磷酸緩衝液に加えて、30°で3時間好氣的に振盪しても、前

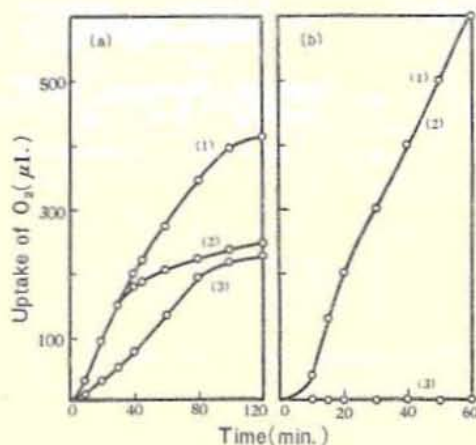


Fig. 3. Effect of Glycerol on Glucose-Oxidation by Intact Cells of *H. anomala* (a) and *S. sake* (b).

Curve: (1), Glycerol and glucose, (glycerol was tipped after 15 min. from the arm of Warburg's vessel); (2), Glucose (10 μ M); (3), glycerol (20 μ M). Conditions Phosphate buffer (pH 5.5), 0.5 ml.; yeast susps., 1.0 ml.; glycerol, or glucose, 0.2 ml.; temp., 30.5°; gas phase, air.

後のグリセリン量の差は誤差範囲内で殆んどグリセリンは消費されない。

なお、嫌気下(5%炭酸ガス含有の無酸素窒素ガスに置換)で両酵母共ブドウ糖を醗酵するが、グリセリンは両酵母共に醗酵できない。さらにブドウ糖醗酵進行中にグリセリンを添加しても炭酸ガス発生量に差を生じない。従って *S. sake* は勿論、*H. anomala* もグリセリンを嫌気的には醗酵することはできない。

第2項 グリセリン及びブドウ糖酸化方程式

炭水化物の酸化式については CLIFTON¹³⁾ が詳細に研究している。著者が酵母で得た結果は Fig. 4 に示す如く *H. anomala* のグリセリン酸化曲線より算出される反応式は次の如く示される。



ここで AcH を導入したのは後述の如く、菌体磨砕液には Py に対し decarboxylase 力のみが見出されることと、式の算出に当って炭酸ガス発生曲線の折れを問題とし以後の酸素吸収を除外したためで、AcH が更に酸化されることは当然行なわれる。

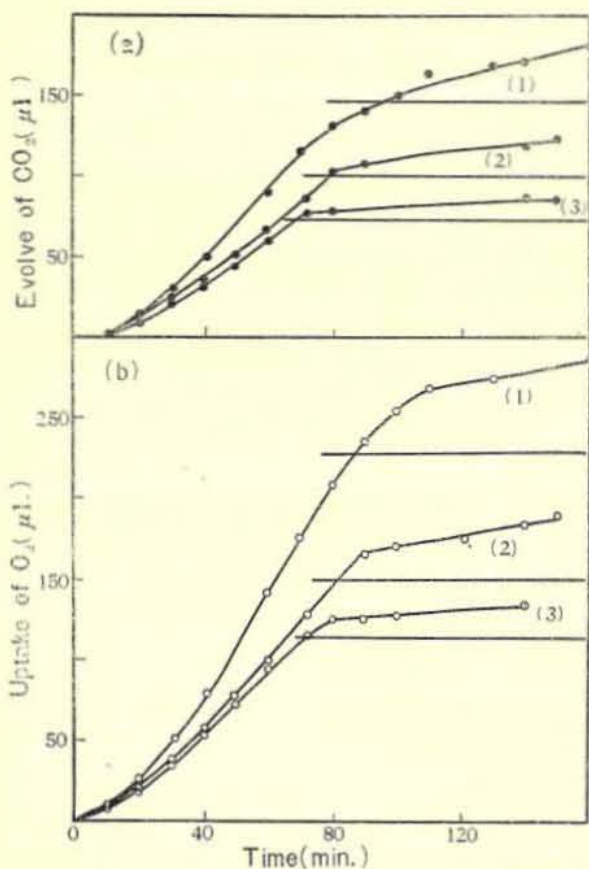


Fig. 4. Oxidation of Glycerol by *H. anomala*.

Curve: (1), (2), (3) were responsible for the oxidation of 10.1, 6.7 and 5.0 μ M glycerol, respectively.

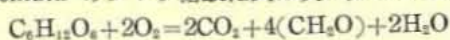
Each line means the theoretical levels of CO_2 -evolve or O_2 -uptake calculated on the basis of the equation:

$$3C_3H_8O_3 + 3O_2 = 2CO_2 + x(CH_2O) + yH_2O$$

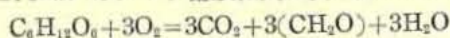
Conditions; Phosphate buffer (pH 5.8), 0.5 ml.; yeast susp., 1.0 ml. (correspond to 2.4 mg. of dry wt); substrate 1.0 ml.; center well, 0.2 ml. (20% KOH); temp., 30.5°; gas phase, air.

グリセリンの場合は炭酸ガス発生と酸素吸収との曲線の折れに時間のずれがあったが、ブドウ糖の場合は曲線の折れは殆んど一致している (Fig. 5)。

H. anomala のブドウ糖酸化式は次の如く示される。



一方 *S. sake* のブドウ糖酸化式は次の如くガス量の収支は大である (Fig. 6)。



両酵母のブドウ糖酸化曲線は傾向に違いが認められ、*S. sake* では曲線の折れが2カ所以上認められる。

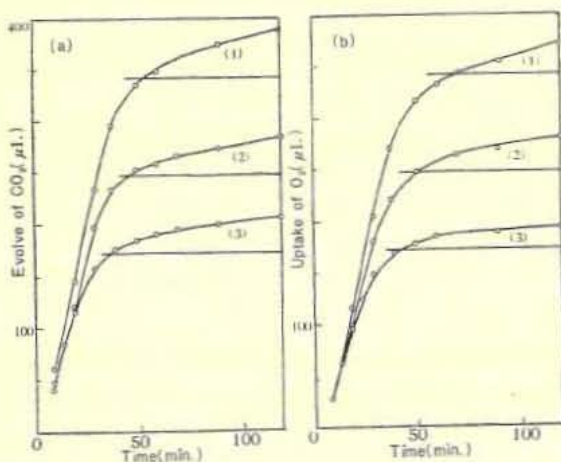


Fig. 5

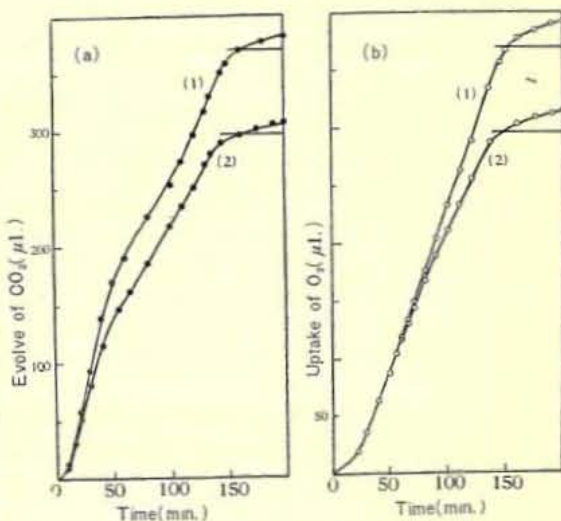
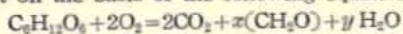


Fig. 6

Fig. 5. Oxidation of Glucose by *H. anomala*, Curve: (1), (2), (3) were responsible for the oxidation of 7.65, 5.72 and 3.82 μ M glucose, respectively. Each line means as in Fig. 4 except on the basis of the following equation;



Conditions were as in Fig. 4 except yeast susp., 0.5 ml. (5.8 mg. of dry wt.) and temp., 30°.

Fig. 6. Oxidation of Glucose by *S. sake*. Curve: (1), (2) were responsible for the oxidation of 5.52 and 4.42 μ M glucose respectively.

Conditions: Phosphate buffer (pH 5.8), 0.5 ml.; yeast susps., 1.0 ml. (correspond to 5.0 mg. of dry wt.); substrate, 0.4 ml.; gas phase, air; temp., 30°.

第3章 *H. anomala* のグリセリン酸化機構

第1節 無機磷酸及び DPN の関与

炭水化物が代謝される場合、一般に磷酸化が行なわれることはよく知られる所であって、グリセリンもまず GP を経て代謝されることは当然予想される。そこで磷酸の効果

並びに DPN の効果について検討した。⁵⁹⁾

用いた材料は次のものである。

- a) 透折菌体；洗滌菌体をセロファン紙を用いて、氷室内にて15時間、5 l の蒸溜水に対して透折し、再び遠心分離して2回洗滌した。
- b) 緩衝液；磷酸区には *Soerensen* 緩衝液、(M/15) 無磷酸区にはフタル酸カリ-苛性ソーダ緩衝液を用いいずれも pH 6.0 に調節した。
- c) DPN；パン酵母より調製したもので、約 60% 純度のものである。⁷⁾

磷酸無添加区と磷酸区とを比較すると、初め 20 分位は差がないが、その後は磷酸区の方が早く lag-phase に達する。DPN 存在下では lag-phase は短縮され、DPN 添加並びに磷酸区の lag が最も短い。また磷酸の有無による差も顕著となる。

各区とも lag-phase に於ける酸化速度には差がないので、以上の効果は反応の初期に生ずるものと判定される。

以上のことから、*H. anomala* のグリセリン酸化の初期には phosphorylation と DPN 一系とが共軛的に関与していること換言すれば、Oxidative phosphorylation が起っているものと考えられる。

第2節 グリセリン→GP 系の存在

第1項 Glycerokinase 及び Phosphatase 反応

糖源の磷酸化には普通は kinase 系が働くもので、三炭糖化合物の磷酸化に glycerokinase が関与することが、KALCKAR⁸¹⁾、LINDBERG⁸⁶⁾、KENNEDY 一派^{9・10・22)} により報告されている。著者は *H. anomala* 菌体より抽出した酵素がグリセリンの磷酸化を行なうことを確かめ⁵⁹⁾、GP を生成する系の存在を証明した。これと同様の方法で *S. sake* より抽出したものは kinase 作用が認められなかった。このことは *S. sake* がグリセリンに対して不活性な原因と考えられる。

酵素反応は次のようにして行なった。即ち ATP 存在下で酵素液にグリセリンを添加して、15分間反応せしめた後、直ちに冷却して除蛋白（三塩化酢酸使用）した上澄液の 1.0 ml づつにつき次の区分で磷の定量を行なった⁵⁹⁾。

- 1) P-direct；直接磷。
- 2) P-_{15'}；1N 塩酸にて 100°、15分処理して得られた磷量より P-direct を差引いた値で ATP-P を示す。
- 3) P-_{180'}；上記(2)の条件で 180分処理して得られた磷量から P-direct と P-_{15'} とを差引いた値。

結果は、ATP 存在下に於いてグリセリン区は無機磷が増加し、残存 ATP-P は殆んどなくなる (0.6 γ)。これに対しグリセリン無添加区は ATP-P の分解は微弱で残存量は 4.4 γ である (これらの値は反応液 1/7 ml 中のもの)。P-_{180'} には予想される GP の蓄積は認められなかった。ここでいえることは酵素液がグリセリンの存在下では ATP の labile-P を終局的に無機磷に迄分解していることである。

一方酵素液中には GP-phosphatase が強力に存在していることが示された⁵⁹⁾ ので、前述の結果は、酵素液によりグリセリンが ATP より磷酸を転移されて GP となり、こ

れが強力な phosphatase の作用で再びグリセリンと無機磷酸とに分解したものと考えられる。

以上のことから *H. anomala* には glycerokinase の存在が証明されたが、生菌のような有機的組織系では恐らく phosphatase 作用は抑制されていて、グリセリン酸化が行なわれる場合は生成した GP は次の酸化過程に連結されるものと考えらるべきである。

第2項 *H. anomala* 乾燥菌体の活性度

著者は *H. anomala* 菌体よりグリセリン酸化酵素系の抽出を試みたが、いずれも不成功であった。しかし乾燥菌体が弱いながら GP に対して酸化能をもっていることを見出した⁵³⁾ (後に乾燥を早急に行なうことにより、かなり強い活性のものが得られた)。この際グリセリン及びブドウ糖は酸化されず、ATP の効果もなかった。これは kinase 系の不活性化と考えられる。

第3節 グリセリン→DHA 系の否定

後述(第2編)の如く、細菌のグリセリン酸化の際には GP 経由系の他に DHA 経由系が存在する。しかし *H. anomala* の洗滌菌体で、ツンベルク法にてグリセリン脱水素反応を検討したところ、チオニン、Mb, 2, 6-ジクロロフェノールインドフェノールの3種の色素に対して活性度は極めて微弱であった。⁵³⁾

先述の如く、*H. anomala* は DHA 及び GS に対する酸化力は弱く、これらのことは DHA 経由系が否定的なことを示す。

第4節 GP 代謝系の検討

前節の結果より、*H. anomala* のグリセリン酸化は GP を経由することが予想されたので、ここでは GP 脱水素酵素の性質並びに三炭糖磷酸代謝(C₃-P)系の検討、GP よりの生成物の検索等を行ない GP 代謝系を明らかにした。

第1項 GP 脱水素酵素

酵素液の調製: ペースト状の洗滌菌体を石英砂と共に乳鉢で約 30 分間すりつぶし、0.01M の磷酸緩衝液(pH 6.5)を加えて抽出し、初め 3,000 回転の遠心分離により沈澱部を除き、上澄部をさらに 15,000 回転 10 分間遠心分離して黄色の上澄部を集める。この部分は未だ混濁しているが、細胞は除かれている。上澄液はセロファン紙にて 0.0001M の磷酸緩衝液に対して氷室内で 2 時間透析する。透析酵素液の自己呼吸は殆んど認められず、GP を酸化することができる。

S. sake は乾燥菌体では活性は認められないが、上述の方法で得た酵素液は弱い活性が示され、*H. anomala* の酵素液と比較した結果⁵⁴⁾ 両者の顕著な差はチオニンの効果であって、*H. anomala* の酵素液は色素により酸化力の増加が認められた。

更に *H. anomala* の酵素液は DPN 効果が明らかに示された (Fig. 7)。

GP 脱水素酵素については、EULER²¹⁾ の酵素と、GREEN²²⁾ の酵素とが知られてお

り、前者は DPN-link で後者は cytochrom-link である。GUNSALUS¹⁰ が *S. faecalis* で得た結果では酸素直結で GREEN の酵素に似ているが、cytochrom の関与しない点が異っている。著者の *H. anomala* の酵素は DPN-link で効果が著しいことは EULER の酵素に属するものである。チオニン効果が *S. sake* の酵素には認められないことは両酵母の酵素が異なるのであろう。

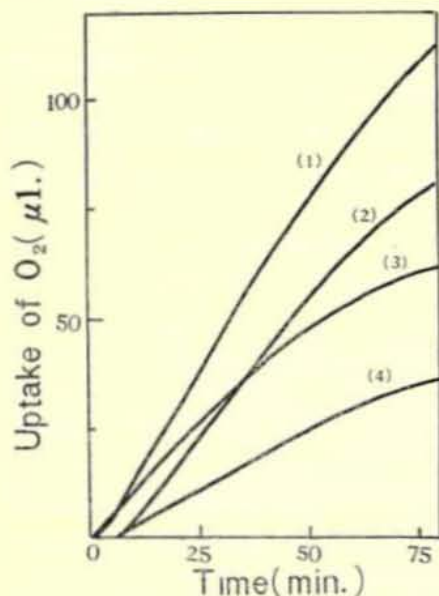


Fig. 7

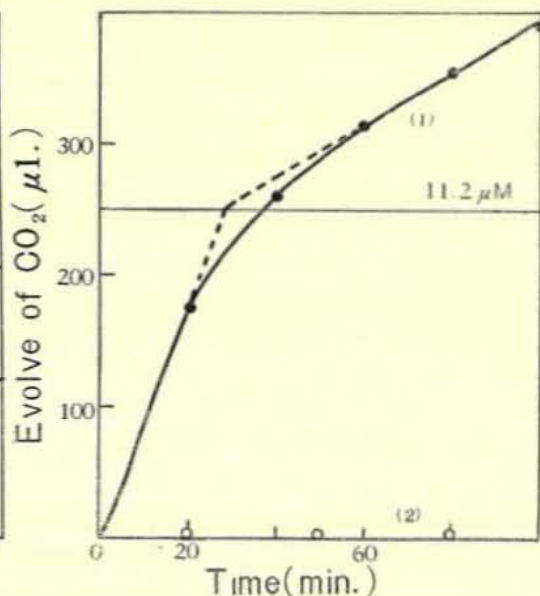


Fig. 8

Fig. 7. Effect of Dye (Thionine) and DPN on Oxidation of GP by Enzyme Solution obtained from *H. anomala*. Curve: (1), DPN+thionine; (2), DPN; (3), thionine; (4), GP only. Conditions: Phosphate buffer (pH 5.8), 0.5 ml.; enzyme soln., 1.0 ml.; GP-Na(0.5M), 0.2 ml.; thionine (0.001 M), 0.1 ml.; DPN, 1 mg.; total volume, 1.8 ml.; temp., 30°; gas phase, air. Enzyme soln. was treated with centrifugation of 12,000 r. p. m.

Fig. 8. Decomposition of Pyruvate by Enzyme Solution of *H. anomala* under Aerobic Condition. Curve: (1) and (2), evolve of CO₂ and uptake of O₂, respectively. Conditions: Phosphate buffer (pH 5.8), 0.5 ml.; enzyme soln., 1.0 ml., thionine, 0.2 ml. (26.5 μM); temp., 30°; gas phase, air. Consumed pyruvate was 11.2 μM.

第2項 C₃-P系の検討

GP脱水素酵素の働いた結果は三炭糖磷酸(TP)を生成せしめるのであるから、このものの代謝系を検討した。*S. sake*の乾燥菌体磨砕液は調製法如何でGP酸化を示さないが、ブドウ糖醗酵力をもっている。そこでEMBDEN-MEYERHOF-Schemeに於るC₃-P系が存在している。一方*H. anomala*の乾燥菌体磨砕液はGP酸化系をもっているから、もし両者が合一してGP酸化速度が増加すればGP酸化がC₃-P系を経由するという推定が成立する。

この際 *S. sake* 磨砕液中の Co-factors の影響が問題となるので、あらかじめ磨砕液を 100°, 5 分間加熱したものを *H. anomala* の磨砕液に添加してみたが、GP 酸化速度には全く影響なく、従って *S. sake* 磨砕液の添加は Co-factors または新たに基質を添加したことにはならない。

加熱処理をしない *S. sake* の磨砕液を添加して、*H. anomala* 磨砕液の GP 酸化速度を追跡すると明らかに速度の増大が認められた⁵⁴⁾。

以上の如く C₃-P 系の添加により GP 酸化力が増加することは、GP が TP を経て、さらにこれが C₃-P 系によって酸化されることを裏書きしている。

第3項 GP より Py 及びαケトグルタル酸 (KG) の生成

GP が酸化されると、終局的には炭酸ガスにまで分解するので、その中間体として予想されるケト酸の検索を行った。

H. anomala の生菌磨砕液を用いて、GP を 60 分間酸化せしめ、反応液に三塩化酢酸液を約 3% になるまで加え、混和後遠心分離して上澄液を得る。これに 2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン (以下 2, 4-DNPH と略記) 塩酸溶液を加え一晩放置する。これにキシロールを加えて振盪し、抽出部と非抽出部とに分つ。抽出部は酸性の水で洗滌後、炭酸ソーダ液に転溶し再び塩酸酸性とし酢酸エチルにて抽出する。非抽出部はそのまま酢酸エチルにて抽出する。酢酸エチル抽出液について、CAVALLINI¹²⁾ の方法に従い、沔紙クロマトグラフィーを行いキシロール抽出部に Py, 非抽出部に KG の 2, 4-DNPH 誘導体に相当する物質が確認された⁵⁴⁾。

即ち GP より Py 及び KG が生成されることが認められたが、その生成量は Py 量に対して KG 量は極めて少量である。

第4項 Py 脱炭酸酵素

前項に於て、GP が Py を経由することが明らかとなったが、Py 分解が decarboxylation によるか、oxidative decomposition によるかが問題である。

H. anomala の磨砕液で Py を分解せしめると、好気条件にも拘わらず酸素吸収は全く認められず、しかも脱炭酸は旺盛に行われることが解る (Fig. 8)。この際、発生炭酸ガス量は消費された Py 量と等モルであって、従って磨砕液による Py 分解は decarboxylase によるものである。

第5項 GP よりの生成磷酸化合物

H. anomala の生菌体磨砕液による GP 酸化液を三塩化酢酸にて除蛋白して、上澄液を中和後、Ba-alcohol 不溶区分を集める。この Ba 塩をイオン交換樹脂にて陽イオンを除き、EBEL¹⁶⁾、大村⁴⁸⁾ の方法によって二次元の沔紙クロマトグラフィーを行った。

a) 正常酸化の場合：生成物として確認される磷酸エステルは TP 及び隣グリセリン酸 (以下 PG と略記) である。TP は 1N アルカリ処理により完全に分解してしまう。

b) 弗化ソーダ (NaF) 存在の場合：NaF を終濃度として 0.0025 M を添加した。この場合 TP 及び PG の生成はより顕著に確認され、これらが NaF により蓄積されたことを示す。この他不明のスポットが生じた。

Table 3. Chromatographic Identification of Phosphoric Esters from GP-Oxidation in *H. anomala*

Normal		NaF		Hydrazine		Standard		Detection
A	B	A	B	A	B	A	B	
89	100	83	123			91	112	PG
101	12	100	18	100	0	100	0	TP
		85	14					Unknown
				100	157			Unknown
				93	228			Unknown

A : Isopropanol:isobutanol:NH₄OH:H₂O=40:20:1:39 (alkaline)

B : Isopropanol:trichloroacetic:NH₄OH:H₂O=75:5g:0.3:25 (acidic)

c) ヒドラジン存在の場合：ヒドラジンは hydrazine hydrate を硫酸にて中和し、終濃度として 0.001 M 添加した。生成リン酸化化合物は TP の他、2カ所に不明のスポットが認められ、PG は生成されない。

以上の結果から、NaF の enolase 阻害及びヒドラジンの TP 代謝阻害が明らかに示されたわけで、本章に於て得られた結果を総括すれば次の型式の存在が明らかである。

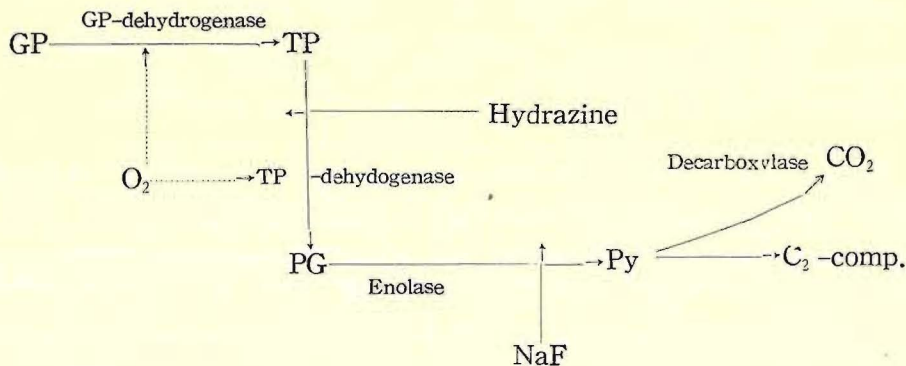


Fig. 9. Mechanism of Oxidation of GP by the Enzyme Solution obtained from *H. anomala* (Presence of the C₃-P Shunt). GP, α-glycerophosphate; TP, Triosephosphate; PG, Phosphoglycerate; Py, Pyruvate.

第4章 GP 酸化径路に於ける燐六炭糖代謝 (C₆-P) 系の関与*

前章に示した GP 代謝経路は C₃-P 系であって、完全のものではない、というのは

* : C₆-P 系は WARBURG—DICKENS—COHEN 型式を示す。

H. anomala の磨砕液には鱗六炭糖を酸化する酵素系が含まれ、また aldolase の存在も認められるからであって、 $C_3 \rightarrow C_6$ の縮合を考慮せねばならない。CHELDELIN 一派は²⁷⁾ *Acetobacter* で C_3 -P 代謝に pentose-cycle が関与することを報告している。

第1節 GP 酸化と G-6-P 酸化との比較

第1項 磨砕液の Particle について

H. anomala の菌体磨砕液を 7,000 回転, 5 分間程度の遠心分離した上澄液はかなり混濁しており, これを更に 12,000~15,000 回転, 15 分間遠心分離すると僅かに濁った黄色液が得られる。この両区分について GP 及び G-6-P の酸化活性を比較してみると, Table 4 に示す如く, 強い遠心力をかけた酵素液の GP 酸化力はかなり低下し, G-6-P のそれより下廻ってくる。従来経験よりみて, 酸化能は酵素液の調製条件によってかなり強弱があり, ここで得られた結果と併考すると GP 脱水素酵素は Particle により緊密に附着していることが解る。

第2項 呼吸率 (RQ) の比較

Table 5 に示す如く GP 酸化の RQ は 0.61~0.65 であるが, G-6-P では RQ は時間の経過と共に増大し, 炭酸ガス発生が大となる。これは生菌体に於ける傾向と類似しており, 従って大部分の酵素系が抽出されているものとみることが出来る。

Table 4. Effect of Centrifuge Treatment of Enzyme Solution on Oxidative Activity of GP and G-6-P

Reaction time (min.)	GP O_2 -uptake (μ l.)		G-6-P O_2 -uptake (μ l.)	
	A	B	A	B
30	31	18	26	20
50	53	24	38	29
70	71	33	58	40
100	98	47	78	51

(A) and (B) were treated with centrifuge of 7,000 r.p.m. for 5 min. and 12,000 r.p.m. for 15 min., respectively.

Conditions : phosphate buffer ($M/15$), 0.5 ml.; enzyme soln., 1.0 ml.; substrate (0.5 M-GP or 0.1 M-G-6-P), 0.2 ml.; pH, 5.8; temp., 30°; gas phase, air.

Table 5. Comparison of Respiratory Quotient of GP-and G-6-P-Oxidation by Enzyme Solution

Reaction time (min.)	O_2 -uptake (μ l.)		CO_2 -evolve (μ l.)		RQ	
	GP	G-6-P	GP	G-6-P	GP	G-6-P
30	18	24	11	15	0.61	0.64
50	31	54	20	42	0.62	0.80
70	42	74	27	90	0.63	1.20
100	65	105	42	159	0.65	1.51

第2節 Aldolase 反応の存在

磨砕液は果糖二リン酸（以下 F-1 ; 6-P と略記）を酸化しうるので aldolase が存在すれば TP は C₆-P 系を経由する可能性がでてくる。aldolase が可逆反応を行なうことは有名であり、平衡は著しく F-1 ; 6-P 系に寄っている。そこで実験的には F-1 ; 6-P 分解を TP の生成量から追及することが aldolase 反応の証明に簡便である。

ワールブルク容器内にて F-1 ; 6-P を酵素液で反応せしめ、ガスの消長、TP 及び Py を測定した。TP は除蛋白液について 1N アルカリ中で室温 20 分で分解するリン酸より算出し Py は 2,4- DNPH 誘導体⁶⁵⁾ として比色定量した。

Table 6 に示す如く、酵素液で F-1 ; 6-P を酸化せしめ、TP 生成を経過的に測定したところ、初期（5分目）に TP が著しく増加し、以後は減少する結果を得た。この初めの TP 量は炭酸ガス及び Py 量に比してはるかに多く、直接 F-1 ; 6-P から生成されたことは確実である。また同様の実験を嫌気条件で行なったが、この際はガス発生なしに TP が生成した。

これらの事実は *H. anomala* が強力な aldolase を含んでいることを示す。

Table 6. Formation of TP from F-1 ; 6-P in *H. anomala*

Reaction time (min.)	O ₂ -uptake (μ l.)	CO ₂ -evolve (μ l.)	Pyruvate formed (μ M)	TP formed (μ M)
5	13	10	0.41	3.25
15	27	75	0.62	1.85
30	35	203	0.69	0.32
50	—	—	0.47	1.05

Conditions : Phthalate buffer, 0.5 ml.; enzyme soln., 1.0 ml.; thionine, 0.1 ml.; F-1;6-P (0.1 M), 0.2 ml.; pH, 5.8; temp., 30°; gas phase, air.

第3節 C₆-P 系の存在第1項 F-1 ; 6-P \longrightarrow F-6-P \longrightarrow G-6-P

F-1 ; 6-P を酵素液にて酸化せしめた反応液についてリン酸の薄紙クロマトグラフィーを行ってみると、Table 7 に示す如く F-6-P 及び G-6-P の生成が認められる。F-6-P の Rf はリボース-5-リン酸のそれと近いが、別に嫌気条件で F-1 ; 6-P を反応せしめたものでも同じ位置にスポットを生ずるのでここでは F-6-P と判定される。酵素液は遊離の糖源に働かず、ATP 効果もないので F-6-P \longrightarrow F-1 ; 6-P の反応は酵素液では認められない。

第2項 F-6-P \rightleftharpoons G-6-P

G-6-P を基質とした場合、反応液には Table 7 ; 8 に示す如く F-6-P の生成が認められる。更に嫌気条件下でも F-6-P が生成する。

一方 F-6-P を基質とすると G-6-P が生成される。従って酵素液には phosphohexo-

isomerase が存在し, $F-6-P \rightleftharpoons G-6-P$ の可逆反応を行うことが解る。

Table 7. Chromatographic Identification of Oxidation Product of G-6-P and F-1;6-P in *H. anomala*

Substrate	R _f value: (R _f of phosphoric ester/R _f of inorganic P)×100								Detection
	Normal		NaF		Hydrazine		Standard		
	A	B	A	B	A	B	A	B	
G-6-P	66	116	68	126	64	122	68	125	F-6-P
	100	9	97	0	100 (98)	0 (9)	100	0	6-PG (TP)
			90	114			91	112	PG
	61	6	51	0					Unknown
			85	0					Unknown
F-1;6-P	56	108	53	112			54	109	G-6-P
	70	114	68	123			68	125	F-6-P
	86	106	88	111			91	112	PG
	100	17	100	10			100	0	TP

A : Alkaline solvent,

B : Acidic solvent.

Table 8. Formation of Phosphoric Esters from G-6-P, F-6-P and F-1;6-P under Anaerobic Conditions

Substrate	Phosphoric ester formed
G-6-P	F-6-P
F-6-P	G-6-P
F-1;6-P	G-6-P F-6-P TP

第3項 G-6-P→6-PG

G-6-P 及び F-6-P よりの生成磷酸化合物には, アルカリ性溶媒で移動しないスポットが認められ (Table 7) これはアルカリに安定であって, 標準の 6-PG に一致する。このスポットは嫌気条件では生成されない。

従って酵素液にはいわゆる Zwischen-ferment が存在し, $G-6-P \xrightarrow{+O} 6-PG$ の酸化反応が行なわれることが解る。

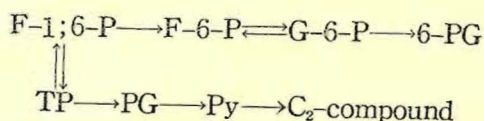
第4項 C₆-P 系の関与

G-6-P 及び F-1;6-P の酸化生成物には Py が認められ, NaF 存在下では PG が蓄積し, ヒドラジン存在下では PG が消滅する (Table 7)。これらのことは先に GP の項で示した C₆-P 系が C₆-P 系にも関与していることを示している。

第4節 C₆-P 系の検討

前節に得られた C₆-P 系は次頁のように示される。

そこで F-1;6-P は C₆-P 系と C₃-P 系二つの系が直接的に関与することとなり, しかも酵素液では kinase 系が欠除されているので F-1;6-P は F-6-P, G-6-P とは異



F-1;6-P, Fructose-1;6-Phosphate; 6-PG, 6-phosphogluconate; For other abbreviations see page 4.

った行動をするであろう。これを阻害剤の効果から比較した。同時に GP の行動と比較検討した。

第1項 ヒドラジン阻害

先述の如く、ヒドラジンは TP 代謝を阻害する傾向がある。そこでヒドラジンの GP, G-6-P, F-1;6-P 代謝に対する影響をガスの消長, TP 及び Py 生成量について比較した。Table 9 に示す如く、CO₂/O₂ 比をみるとヒドラジンによる比率の低下は GP が 20% F-1;6-P が 50%, G-6-P が 80% であって、F-1;6-P は中間の値を示した。

Table 9. Effect of Hydrazine on the Oxidation of GP, G-6-P and F-1;6-P by the Enzyme Solution from *H. anomala*

Substrate	Reaction time (min.)	Hydrazine	O ₂ -uptake (μM)	CO ₂ -evolve (μM)	Pyruvate formed (μM)	TP formed (μM)	CO ₂ /O ₂
GP	110	-	2.0	1.1	0		0.55
		+	1.4	0.5	0		0.36
G-6-P	70	-	2.0	3.1	0.68	0.58	1.55
		+	1.6	0.4	0.44	0.87	0.25
F-1;6-P	110	-	2.8	1.6	0.49	3.88	0.57
		+	2.7	0.9	0.49	4.33	0.33

Table 10. Effect of Sodium Fluoride on the Oxidation of GP, G-6-P and F-1;6-P by the Enzyme Solution from *H. anomala*

Substrate	Reaction time (min.)	NaF	O ₂ -uptake (μM)	CO ₂ -evolve (μM)	Pyruvate formed (μM)	(CO ₂ +Py)/O ₂	Rate of inhibition (%)
GP	150	-	3.7	2.1	0.03	0.58	
		+	3.6	1.7	0.02	0.46	20.7
G-6-P	90	-	3.1	3.6	1.34	1.57	
		+	1.5	0.1	0.10	0.12	92.3
F-1;6-P	60	-	2.1	2.9	0.60	1.70	
		+	1.3	0.4	0.04	0.36	78.8

第2項 NaF の影響

酵素液による基質酸化の際に NaF を添加すると、Table 10 の如く G-6-P と F-1;6-P より炭酸ガス発生及び Py 生成は著しく阻害される。(CO₂+Py)/O₂ 比について

NaF による比率の低下は、GP が 20%, F-1;6-P が 78%, G-6-P が 92% である。ヒドラジンの場合と同様にここでも F-1;6-P は中間の値を示したことは、F-1;6-P が C₃-P 系と C₆-P 系との両方で代謝されることを示す。

第5節 C₃-P 系と C₆-P 系に於ける支配因子

第1項 磷酸による C₃-P 系制御効果

DICKENS¹⁵³, LYNEN³⁸⁻³⁹, JOHNSON⁴⁰, LE PAGE³⁵, SCOTT⁵⁰ らは高濃度の磷酸が G-6-P 酸化を抑制することを認めている。著者は *H. anomala* の酵素液を用いて GP, G-6-P, F-6-P, F-1;6-P 酸化を行なう際、磷酸濃度如何により各基質よりのガスの収支に影響があり、特に F-6-P 及び G-6-P に著しい影響のあることから、C₃-P 系と C₆-P 系との関係を知り得た。

即ち磷酸添加濃度を 0.018 M と 0.29 M として比較すると、Table 11 に示す如く高濃度磷酸区では、G-6-P 酸化のガスの収支は抑制され、殊に F-6-P 酵化は殆んど抑制されてしまう。これに対し F-1;6-P では逆に高濃度磷酸区の方が酵素の吸収は増大し、炭酸ガス発生も lag はあるがかなり発生する。GP は酸素吸収はかなり抑えられるが、炭酸ガス発生は抑制は少ない。

Table 11. Effect of Phosphate Addition on Phosphoric Ester Oxidation by the Enzyme Solution from *H. anomala*

Substrate	Reaction time (min.)	Concentration of Phosphate			
		0.018 M		0.29 M	
		O ₂ -uptake (μl.)	CO ₂ -evolve (μl.)	O ₂ -uptake (μl.)	CO ₂ -evolve (μl.)
G-6-P	20	34	159	0	0
	50	56	338	22	2
	100	110	609	40	29
	200	143	690	52	89
F-6-P	20	38	49	0	0
	50	60	184	0	0
	100	108	419	11	0
	200	116	540	18	0
F-1;6-P	20	25	123	31	0
	50	60	410	69	25
	100	87	513	103	96
	200	110	544	130	289
GP	20	18	18	2	7
	50	47	40	11	25
	100	81	52	18	40

結局、G-6-P と F-6-P は磷酸濃度の差に対して同様の傾向を示し、F-1;6-P は反対の結果である。GP 酸化には GP 脱水素酵素の要因が入ってくるので酵素吸収については同一に論ぜられないが、炭酸ガス発生の傾向としては F-1;6-P の傾向に属する。

以上のことは高濃度磷酸が C₆-P 系を抑制し、F-1;6-P は aldolase により TP 系を経ることができるために G-6-P 及び F-6-P と異なる結果を示したのであって、C₃-P 系は高濃度磷酸によりむしろ活性化されるものである。

第2項 PASTEUR 効果に対する考察

PASTEUR 効果については古くから問題にされてきたが、LYNEN^{23,24)} らは磷酸濃度が PASTEUR 効果に関係する一つの要因であることを提示している。著者の結果も同様に考えることができる。殊に磷酸濃度の効果が F-6-P と F-1;6-P とで截然と区別されること、ENGELHARDT²⁵⁾ が PASTEUR 効果は fructokinase が酸素により阻害されるためだと提唱していることと併考すると興味深い。

著者は PASTEUR 効果とグリセリン代謝との関係については LYNEN, ENGELHARDT 説を併考して次のように考えた。即ち生菌体の場合、酸素の豊富な条件では酸素により PASTEUR 酵素が働き菌体内の磷酸濃度

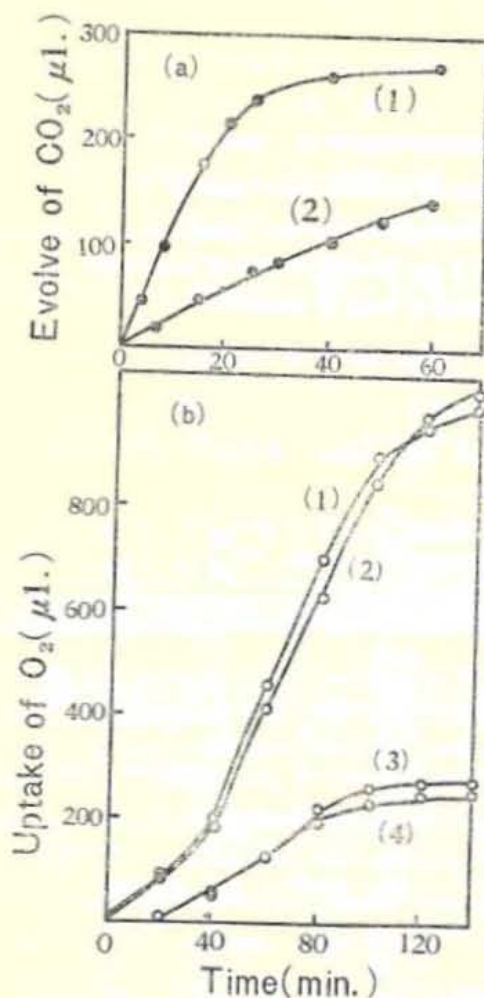


Fig. 10. Effect of NaF on Fermentation of Glucose under Anaerobic Condition (a) and on Oxidation of Glycerol and Glucose under Aerobic Condition (b) by *H. anomala*.

Curve: (1) and (2), evolve of CO₂ responsible for glucose and glucose (NaF), respectively; (3) and (4), glycerol and glycerol (NaF).
Conditions: Phosphate buffer (pH 5.8), 0.5 ml.; cell susp., 1.0 ml (7.5 mg. of dry wt.); NaF (0.05 M), 0.2 ml.; 0.7% (a) or 2% (b) glucose 0.2 ml. or glycerol (1%), 0.2 ml.; temp., 30.5°; gas phase, N₂+CO₂ (a) or air (b).

が低下して、 C_6 -P 系が優先的に進み、F-6-P は G-6-P へ強力に代謝される。このため、fructokinase の基質減少により F-1;6-P の生成は抑制される結果になる。逆に嫌気条件になれば菌体内の磷酸濃度が高まり C_6 -P 系は抑制されて、F-6-P → F-1;6-P が強くなるわれ C_3 -P 系が優先する。

H. anomala はブドウ糖を嫌気下で醸酵できるので、EMBDEN-MEYERHOF 型式をもっているが、グリセリン及び GP は嫌気的には代謝できない。これらは酸素があって初めて代謝される。従って好気下では C_6 -P 系が強力に行なわれるから、グリセリン酸化は C_6 -P 系を通るものと考えられる。

生菌体の NaF 阻害をみると、ブドウ糖、グリセリン、G-6-P、6-PG 酸化は影響を受けない。同様の条件で嫌気下ではブドウ糖の醸酵は NaF で明らかに阻害される (Fig.10)。これらのことは NaF が EMBDEN-MEYERHOF 型式を阻害し、 C_6 -P 系に働かないことを示しており、グリセリンが生菌体で酸化される際は aldolase の逆行により C_6 -P 系で進行されることことが結論される。

第5章 *H. anomala* によるグリセリン酸化型式

以上第1編に於て得られた結果より次のことが結論される。

1) 各種酵母のグリセリン酸化能及び酸化能の検討により、*Saccharomyces* 型と産膜酵母型と区別した。

2) グリセリンを酸化できない *S. sake* と酸化旺盛な *H. anomala* とにつき、各種基質の酸化能を比較し、*H. anomala* がポリアルコールを酸化できること、さらに GP 酸化力も強いことが示された。*S. sake* はグリセリンに全く不活性なことが確められた。両酵母共グリセリンを嫌気的に醸酵することはできない。

3) *H. anomala* には glycerokinase が存在し、グリセリンはこのものの作用で GP に代謝され、GP は脱水素酵素の作用で TP となり、これは PG を経て Py となる。Py

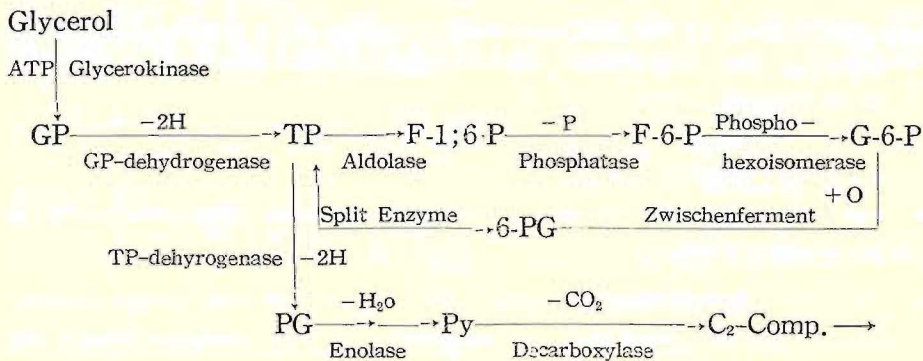


Fig. 11. Oxidative Pathway of Glycerol by *H. anomala*.

は脱炭酸酵素によって分解される。即ち C_3 -P 系の存在が認められた。

4) 酵素液には aldolase の存在が認められ、また磷六炭糖酸化が認められることより、 C_6 -P 系の存在が認められた。酵素液では GP 酸化は C_3 -P 系で行なわれるが、生菌体は磷濃度が低い好気条件下ではグリセリンを C_3 -P 系により酸化することが想定された。

第 2 編

細菌 (*B. succinicum*) によるグリセリン酸化機構

H. anomala のグリセリン酸化は GP 経由系のみであったが、供試菌株 (*B. succinicum*) ではこの他に DHA 経由系が存在しより複雑な機構となる。

第 1 章 酵 素 液 の 行 動

H. anomala よりはグリセリン酸化酵素系の抽出は不成功であったが、供試菌株の乾燥菌体の磨砕によりほぼ完全な酵素系の抽出に成功した。

第 1 節 酵 素 液 の 性 質

第 1 項 酵 素 液 の 調 製

乾燥菌体の調整：供試菌株をブイオンで約 20 時間振盪培養する。菌体を遠心分離して集め、生理的食塩水にて 3 回洗滌して、ペースト状の菌体を塩化石灰上にて一晚真空乾燥する。

菌体の磨砕と抽出：乾燥菌体 0.1~0.5 g をガラス製のミルに入れ、真空中にて 18~24 時間磨砕する。回転数は 1 分間、50~60 回にて行なった。開栓後速く、あらかじめ氷冷せる蒸溜水または磷酸緩衝液 (pH 6.5~7.2) 5~15 ml を加えよく混和後、沈澱管に移し遠心分離して (12,000 回転で 3 分間または 4,000 回転で 15 分間)、最低部の沈澱を除いた上澄液を酵素液とする。

第 2 項 Particle の酸化能

上記の酵素液は更に 12,000 回転で 15 分間遠心分離すると、沈澱部と黄色の上澄部とに分れる。この両部につきグリセリン酸化力を測定した結果、酸化能は殆んど沈澱部に集まっていることが解った。⁵⁰⁾

沈澱部は極く僅かの細胞が認められるが、粘稠な蛋白質様物質が大部分で、三塩化酢酸により殆んど完全に凝集してしまう。

従ってグリセリンを酸化しうる酵素系はこの沈澱部に集められ、結局は細胞外に於て実験出来ることが認められた。

第 3 項 ATP の効果

GUNSALUS⁵²⁾ は *S. faecalis* の磨砕液によるグリセリン酸化には ATP が必要なことを述べているが、著者の得た酵素液はそのままでグリセリンを酸化出来ることが特徴的

である。しかし ATP の効果は明らかに示され⁵⁰⁾、グリセリン酸化に ATP 系が関与していることが明らかである。

第4項 各種基質に対する酵素液の活性度

乾燥菌体 0.35 g のを磨碎し、微量の Mg^{++} を含む $M/60$ —磷酸緩衝液 (pH 7.0) 11 ml にて抽出して得た酵素液を 10 倍に稀釈して、ツンベルク法にて各基質による Mb 脱色時間を比較した結果⁵⁰⁾ 酵素液は沢山の脱水素酵素を含んでおり、特に乳酸脱水素酵素は強力である。グリコール類には作用が認められるが、第1級アルコールには活性度が認められない。

第2節 グリセリン酸化に於ける酸化的磷酸化 (Oxidative Phosphorylation) の証明

第1項 酸化的磷酸化

近時、組織及び微生物の物質代謝に酸化的磷酸化は重要因子と考えられている。この証明には酸素の有無による有機磷酸生成の比較を行なう方法が簡単である。

著者は酵素液を用いて、好気的にはワールブルク容器を、嫌気的にはツンベルク管を用いてグリセリンを代謝せしめ有機磷酸生成量を比較した。なお、嫌気条件は無酸素窒素による置換で得たものである。

磷酸の定量：反応液 (全容 2.2 ml) を氷冷し、あらかじめ氷冷せる 10% 三塩化酢酸 4 ml を加えてよく混和し、沈澱管に移して遠心分離する。上澄液の 1.0 ml 宛につき直接及び全磷酸を定量し、その差を有機磷酸とした⁵¹⁾。

実験の結果、好気下に於てグリセリン区は著しい磷酸化が認められ、(P:O) の比は 2 であった。これに対し嫌気下の磷酸化は緩慢であって、明らかに酸素の存在によって磷酸化が活潑に行なわれ、酸化的磷酸化が関与していることが解る。

第2項 酸化的磷酸化の阻害

阻害剤としてモノヨード酢酸 (MJA); As_2O_3 ; As_2O_5 ; NaF; NaN_3 ; 2, 4-DNP を用いた。このうち MJA 及び As_2O_3 は redox system を、NaF は enolase と phosphatase を、 As_2O_5 は arsenosis による磷酸化を、 NaN_3 及び DNP は uncoupler としての阻害を起す試薬である。これらの阻害剤はその性質からグリセリンの磷酸化代謝に影響を与える筈である。

実験の結果、阻害剤添加区はいずれも有機磷酸の形成は阻害されている⁵¹⁾。このうち MJA, NaF, As_2O_3 は酸素吸収も阻害するが As_2O_5 及び NaN_3 は阻害しない。DNP は磷酸化と酸素吸収共に阻害を示したが (GP 酸化は阻害しない) $10^{-5}M$ 位の濃度では酸素吸収は NaN_3 の場合と同様にむしろ増大した。

以上の如く、阻害剤によりいずれも磷酸化が減少しこの際 MJA, NaF, As_2O_3 では酸素吸収も減少し、DNP 及び NaN_3 ではむしろ酸素吸収が増大することはグリセリンの磷酸化が酸素吸収と関係しており、酸化的磷酸化の存在を裏書きしている。

第2章 GP 経路系の存在

第1節 GP の生成確認

前章に於てグリセリンはリン酸化を受けることが認められたが、生成リン酸は何かが問題となる。ここにこのものが GP なることを明らかにした。

乾燥菌体 0.5 g をすりつぶし、RINGER 氏液 15 ml にて抽出した酵素液を用い次の組成で2時間 30° にて反応せしめた。

反応液組成：酵素液 5 ml, M/60 磷酸緩衝液 (pH 6.4) 10 ml, 1%, グリセリン 2 ml

反応液は三塩化酢酸にて除蛋白後、Ba-不溶部と Ba-alcohol 不溶部を得る。このものにつき AXELROD⁵⁾ の方法で沓紙クロマトグラフィーを行なった。沓紙は東洋 No.2 を用い、これはあらかじめ塩酸及び水にて洗い風乾後、後に用いる溶媒を上昇せしめ、上昇方向と直角方向に沓紙を帯状に切り取ったものを使用した。⁵⁰⁾

検出されたリン酸は無機リン酸と GP とに一致した。二つのフラクション共同一の結果を示した。GP の α 型と β 型との区別については発色と R_f とによった。即ち前者は緑色に近く、後者は青色であり、また R_f も β 型の方が高いことより、ここでは α 型と判定された。

第2節 グリセリン→GP→TP 系の存在

酵素液のグリセリン酸化の際 NaF を存在せしめた場合は、GP の他に TP が認められる。

即ち酵素液 1.0 ml, 1% グリセリン 0.2 ml, NaF (0.01 M) 0.1 ml, グリシン緩衝液 (pH 5.8) 0.5 ml, DPN 1mg の組成にて110分反応せしめ、反応液の Ba-alcohol 不溶部について EBEL¹⁸⁾, 大村⁴⁹⁾ の方法で沓紙クロマトグラフィーを行った。

Table 12 に示す如く生成リン酸化合物として GP と TP が検出された。

Table 12. Chromatographic Identification of GP and TP from Glycerol-Oxidation in the Presence of NaF by the Enzyme Solution from *B. succinicum*

R _f Value ($\frac{R_f \text{ of phosphoric ester}}{R_f \text{ of inorganic P}} \times 100$)				
Found		Standard		Detection
A	B	A	B	
90	123	91	146	GP
99	6	100	0	TP

A : Alkaline solvent ; B : Acidic solvent

第3節 GP 代謝系

前節に於てグリセリンが GP を経て、TP に代謝されることが示されたので、第1編の酵母の項で認められた C₃-P 系及び aldolase の存否が問題となる。

第1項 GP よりの生成物 (C₃-P 系の存在)

酵素液を用いて NaF 存在下に GP を酸化せしめ、反応液の Ba-alcohol 不溶部につき濾紙クロマトグラフィーを行った。

Fig. 12 に示す如く、生成された磷酸化合物は TP と PG である。これは NaF 存在下に於ける結果であるが、正常の場合は生成磷酸の位置は不明確であって NaF により明らかに蓄積されたことを示す。

従って *H. anomala* で認めた C₃-P 系が供試菌株にも存在することが明らかである。

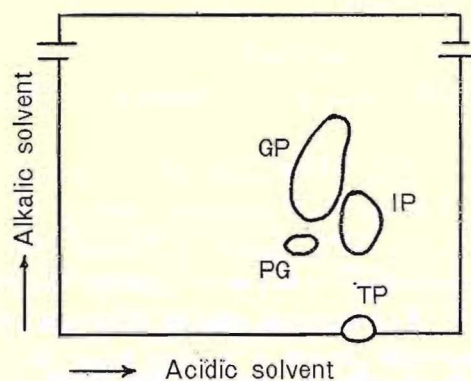


Fig. 12. Chromatographic Identification of TP and PG from GP by Enzyme Solution of *B. succinicum*.

IP : inorganic phosphoric acid.

Conditions : GP-Na (0.5 M), 0.2 ml.; NaF (0.01 M), 0.1 ml.; DP N, 1 mg.; glycine buffer (pH 5.8), 1.0 ml.; enzyme soln., 1.0 ml.; reaction time, 80 min.; temp., 30°. gas phase, air.

第2項 Aldolase 反応の存在

酵素液を用いて好気並びに嫌気条件下で F-1; 6-P の分解を行ない、経過的に TP の生成量を測定した。

反応条件は、ワールブルク容器中でグリシン緩衝液(pH 6.0)を 0.5 ml, 酵素液を 1.0 ml, F-1; 6-P (0.2 M) を 0.2 ml 添加して 30° で振盪した。好気区は空気、嫌気区は窒素ガス中で行った。

反応液はすばやく三塩化酢酸 (20%) を 0.5 ml 添加し混和後、遠心分離して上澄液の 0.4 ml 宛につき、直接及びアルカリで分解したあとの磷を測定し、その差より TP 量として算出した。

Table 13 に示す如く、好気下では初めの 5 分間で TP 生成は最大で以後は減少する。好気下ではこの際、酸素吸収をとまなうので TP は更に酸化を受けて減少するわけであ

Table 13. Formation of TP from F-1; 6-P by the Enzyme Solution from *B. succinicum*

Reaction time (min.)	Aerobic		Anaerobic	
	Pd (μM)	TP (μM)	Pd (μM)	TP (μM)
5	7.15	1.10	7.92	0.64
15	9.52	1.06	—	—
40	14.36	0.85	15.95	1.06
60	14.36	0.85	—	—

Pd : Phosphorous of orthophosphoric acid

る。一方嫌気下では初めの5分間より、40分以後の方がTP生成量が多い。

従って、好気並びに嫌気下でF-1;6-PからTPが生成することは酵素液中にaldolaseが存在することを示している。

以上本章に於て、供試菌株の磨碎酵素液がグリセリン酸化を行う際に次の過程が存在することが示された。なお、aldolaseが存在するのでC₃-P系が考慮されねばならないが、これは後述する。

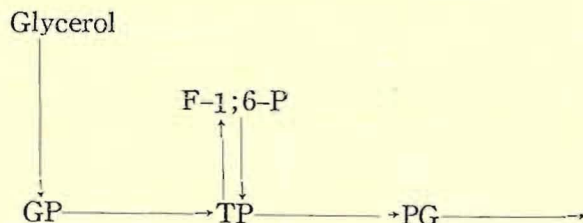


Fig. 13. Oxidative Pathways of Glycerol by *B. succinicum* (Presence of C₃-P Shunt).

第3章 DHA 経路系の存在

グリセリンよりDHAの生成は培養的には古くより知られており、最近ASNIS¹⁷⁾、BURTON¹⁸⁾によりグリセリン脱水素酵素が抽出された。*H. anomala*ではこの系は否定的であったが供試菌株では以下の如くその存在が認められた。

第1節 グリセリンより三炭糖の生成確認

DHAは古くから認められていたものはいずれも長時間培養液より分離されたもので、このことから一次的生成径路であるとは即断し難い。HAUGE²⁷⁾は*A. suboxydans*を用いてグリセリンよりのDHA生成が直接的なることを証明した。これよりさき著者⁵⁰⁾は以下の如く供試菌株の乾燥菌体を用い、3時間の反応でグリセリンより三炭糖の生成を確認した。

反応は0.26gの乾燥菌体を用い、食塩水10ml、M/15 磷酸緩衝液(pH 6.5) 5ml、グリセリン0.5gの混液で30°、3時間振盪した。

反応液に10N硫酸1mlを加え混和後遠心分離して菌体を除き、上澄液をエーテルにて60時間抽出した。抽出液は溶媒を駆逐後、2,4-DNPHの硫酸アルコール飽和溶液2mlを加えて加温放置すると、赤橙色の沈澱が得られる。これをピリジンとエタノールとで3回再結した。このもののm.p.は235°であった。

別にDHA純品につき同様に調製したものと混融によりm.p.の降下が認められず、三炭糖の2,4-DNPO(オサゾン)に一致する。

得られた2,4-DNPOは酒精性苛性カリに濃紫色に溶け、この点も標準のものと同じであった。

しかし生成物は、DHAかGAかの区別は判定されない。そこでエーテル抽出部につき、滷紙クロマトグラフィーを行った。溶媒はブタノール：酢酸：水=4：1：1と、発

色は硝酸銀を用いた。検出されたスポットは $R_f=0.47$ であって、DHA の標準の値 $0.47\sim 0.49$ に一致した。したがってグリセリンよりの三炭糖は DHA と考えられる。

なお、乾燥菌体の反応の際、ツンベルク管を用いた Mb 存在下に嫌氣的に反応せしめたものからも同一の物質が得られた。

これらのことは DHA がグリセリンからの一次的生成物であることを示す。

以上の実験において基質無添加区には DHA は認められない。元来 DHA はエーテル不溶とされているが、長時間の液体抽出法によると幾分抽出されるものである。

第2節 三炭糖→TP 系の存在

MAGASANIK⁴⁰⁾ は *Aerobacter* のグリセリン酸化の研究で、DHA と GA が類似の行動をし、KALCKER³¹⁻³⁶⁾ らの glycerokinase 作用も両物質とも同様に働かれるとしている。

HAUGE²⁷⁾ らは *Acetobacter* の研究で DHA が磷酸化され、TP を経て pentose cycle で代謝されることを示した。

著者は供試菌株の酵素液が DHA 並びに GA に対して磷酸化反応を行なうことを認めた。即ち酵素液、1.0 ml (Mg^{++} を含む、tris 緩衝液、1.0 ml (pH 7.2), NaF (0.04M), 0.1 ml, DHA (0.2 M) または GA (0.5 M), 0.2 ml をワールブルク容器に加え、30° で 60 分間反応せしめた。反応液は除蛋白後、Ba-alcohol 不溶部につき、沱紙クロマトグラフィーを行なった。

Fig. 14 に示す如く、DHA, GA 共 TP に相当する磷酸化合物を生成した。従って酵素液には三炭糖を磷酸化する glycerokinase が存在する。

第3節 三炭糖の非磷酸代謝系 (C_3 -系)の存在

前節に於いて三炭糖が磷酸化を受ける代謝系の存在を証明したが、供試菌株ではこの他に磷酸の関与しない三炭糖酸化系 (C_3 -系)が存在するものと思われる。Cozic¹⁴⁾ は DHA

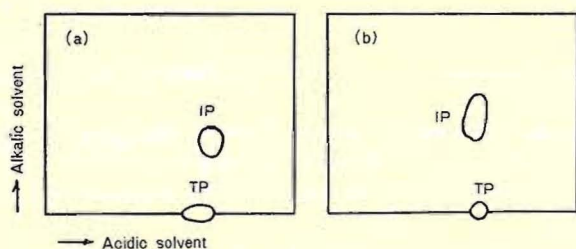


Fig. 14. Chromatographic Identification of TP from GA (a) and DHA (b) by Enzyme Solution of *B. succinicum*. IP : inorganic phosphoric acid. Conditions : tris buffer (pH 7.2), 1.0 ml; GA (0.5 M) or DHA (0.2 M), 0.2 ml; NaF (0.04 M), 0.1 ml; enzyme soln., 1.0 ml. ATP, ca. 0.1 mg.; temp., 30°; gas phase, air; reaction time, 60 min.

脱水素酵素について報告しているが、著者の用いた菌の酵素液にも DHA 脱水素反応が認められること⁵³⁾及び高橋⁶²⁾らが *Gluconobacter* でグリセリンより DHA の他に GS を捕獲していること等の事実よりみて、三炭糖より GS を經由する径路が予想されるわけである。

第1項 磷酸無添加下の基質酸化速度の比較

第1章第2節で示した如く、供試菌株のグリセリン酸化の際、無機磷酸の添加は酸素吸収量を増大せしめたが、ここで磷酸を添加せず乾燥菌体によるグリセリン、DHA、GA及びGSの酸化速度を比較してみると、いずれも殆んど同一速度で酸化された(Fig. 15)。このことは三炭糖がGSを経由することの裏書となる。

第2項 DHA と GA 酸化の比較

Fig. 16 に示す如く、DHA 及び GA の酸化速度は等しく、この事は炭酸ガス発生に於いても認められた。GA のガス消費量は大体、DHA に比し約半分であり、このことは使用した GA の m.p. が 140° であって、*dl* 型であるため、恐らく *d* 型のみが酸化された結果と考えられる。以上のことはグリセリン酸化に於いて DHA と GA が可逆的に移行することを想定せしめる。

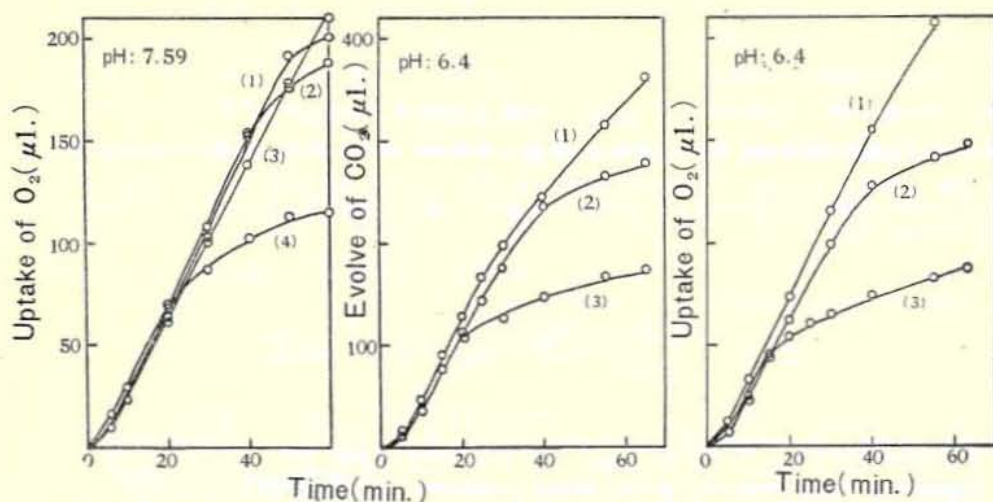


Fig. 15

Fig. 16

Fig. 15. Comparison of Oxidation of Glycerol with GA, DHA and GS by Dried Cells of *B. succinicum* under No Addition of Phosphate. Curve : (1), DHA; (2), GA; (3), Glycerol ; (4), GS. Conditions : Tris buffer, 1.0 ml.; cell susp., 1.0 ml.; substrate, 0.4 ml.; temp., 30.5° ; gas phase, air.

Fig. 16. Comparison of Oxidation of Glycerol with GA and DHA by *B. succinicum* under No Addition of Phosphate. Curve : (1), glycerol ($10 \mu\text{M}$); (2), DHA ($8.8 \mu\text{M}$); (3), GA ($10 \mu\text{M}$). Conditions : Tris buffer (pH 6.4), 1.0 ml.; cell susp. (dried cells), 1.0 ml.; substrate, 0.4 ml.; temp., 30.5° ; gas phase, air.

第3項 GA より AcH の生成 (好気条件)

静置培養で得た菌体を洗滌し、1%のGA液(tris緩衝液, 10%含有)に懸濁し、好氣的に 30° で2時間振盪した。反応液を遠心分離して菌体を除き、蒸留液に2,4-DNPH溶液を加え、生ずる沈澱について、沝紙クロマトグラフィーを行ない²⁵⁾、このものが

AcH に一致することを確めた。(この方法は逆相法でテトラリンの噴霧量によって R_f が異なるので常に標準のものとは並行した。) 従って, 磷酸無添加に於ても, 好氣的に GA が AcH に分解することがわかった。

第4項 グリセリンの非磷酸代謝経路

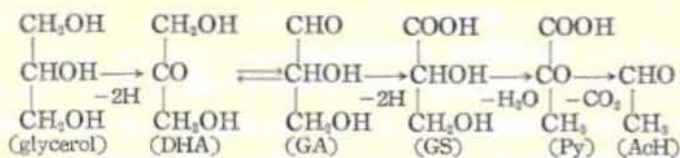


Fig. 17. Oxidative Pathways (in the Absence of Phosphate) by *B. succinicum*.

第4章 GP系と C_3 -系とに於ける支配因子

前章迄において供試菌株によるグリセリン酸化には GP 経由系と三炭糖経由系とが存在することが明らかとなったが, この両系を支配する因子として HAUGE²⁰⁾ らは pH を考慮している。著者も各系について最適 pH を測定したが, HAUGE らの *Acetobacter* に於て得たところと幾分異なる結果が得られた。著者は pH と同時に磷酸濃度も支配因子と考えた。

第1節 グリセリン酸化の最適 pH

第1項 磷酸塩存在の場合

乾燥菌体のグリセリン酸化を SÖRENSEN の磷酸緩衝液(M/15)

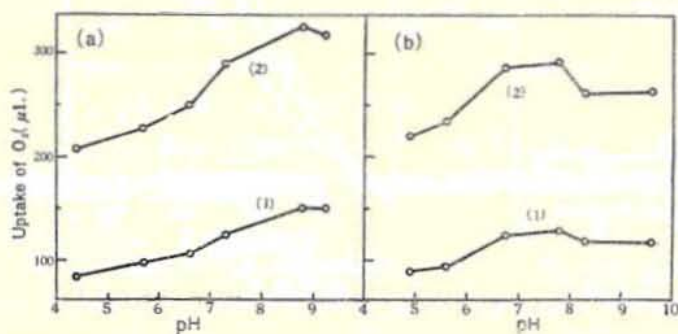


Fig 18

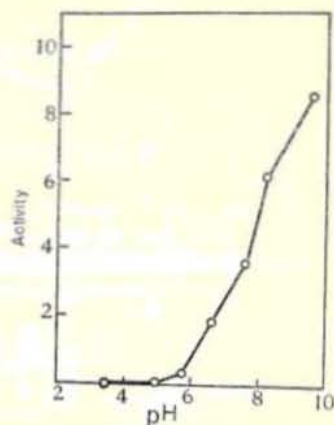


Fig 19

Fig. 18. The Optimum pH of Oxidation of Glycerol by Dried Cells of *B. succinicum* using of Tris-buffer Solution (a) and Phosphate-buffer Solution (b). Curve: (1), After 50 min.; (2), after 100 min. (a) and 90 min. (b), respectively. Conditions: Glycerol (1%), 0.2 ml.; cell susp., 1.0 ml.; tris-buffer or phosphate-buffer, 0.5 ml.

Fig. 19. The Optimum pH of Glycerol Dehydrogenase. Conditions using Thunberg's method: methylene blue (0.01 M), 0.5 ml.; glycerol (1%), 0.2 ml.; DPN(0.25%), 0.1 ml.; enzyme soln., 0.5 ml.; phosphate buffer (M/15), 1.0 ml.

を用いて行った。Fig. 18 b に示す如く、酸化速度の最適 pH は 6.70~7.75 に認められる。

第2項 磷酸無添加の場合

乾燥菌体はあらかじめ2時間透析した菌体を乾燥して調製したもので、pH 4.47~9.2 の範囲で tris 緩衝液で調節した。この場合は透析及び磷酸無添加のため、反応は磷酸濃度が極度に低い状態で行なわれ、非磷酸反応が大部分投影されるものと考えてよい。

Fig. 18 a に示す如く、グリセリン酸化速度はアルカリ性になる程大となり、最適 pH は 8.77~9.22 に認められ、第1項の場合よりはるかにアルカリ側に寄っていることが示される。このことは非磷酸代謝系の最適 pH が強アルカリ側にあることを示す。

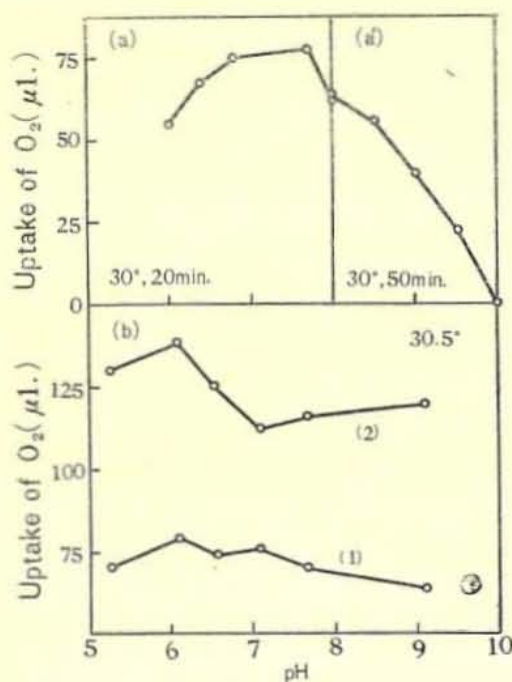


Fig 20

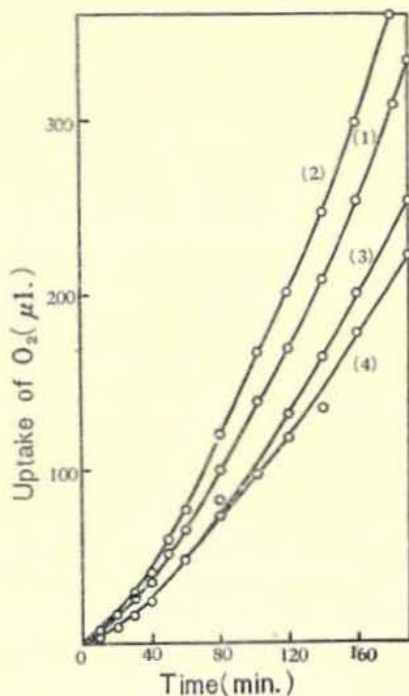


Fig 21

Fig. 20. The Optimum pH of Oxidation of DHA (a) and GP (b) by Dried Cells of *B. succinicum*. Curve in (b): (1), after 40 min.; (2), after 80 min. Conditions: Buffer, 1.0 ml. to (a) and (a'); 0.8 ml. to (b); cell susp.: 1.0 ml.; 0.4 M-DHA or 0.5 M-GP, 0.2 ml.; gas phase, air. Buffers used in (a), (a') and (b) were tris, NH₄Cl-NH₄OH and glycine (pH 5.25~6.55) or tris (pH 7.05~9.05) respectively.

Fig. 21. Effect of Phosphate on Glycerol-Oxidation at different pH by Dried Cells of *B. succinicum*. Curve: (1), Glycerol at pH 7.38; (2), Phosphate added in (1); (3), Glycerol at pH 5.78; (4), Phosphate added in (3). Conditions: Cell susp., 1.0 ml.; tris buffer, 0.5 ml.; phosphate, 6.6 μM; glycerol (1%), 0.3 ml.

第2節 C₃-系の最適 pH

第1項 グリセリン脱水素酵素の最適 pH

ASNIS¹⁾によればこの酵素の最適 pH は 10.0 にある。著者は供試菌株の磨碎酵素液を用いて、ツンベルク法にて Mb の脱色時間の追及により、最適 pH が 9.60 以上にあることを見出し、ASNIS の値と一致した (Fig. 19)。

第2項 C₃-系の最適 pH

乾燥菌体を用い、リン酸無添加で酸性側は tris 緩衝液、アルカリ側は塩化アンモニウムアンモニア緩衝液で行った。Fig. 20 a に示す如くこの条件に於ける DHA 酸化の最適 pH は 6.8~7.7 に認められる。

第3節 GP 系の最適 pH

第1項 グリセリン酸化に於けるリン酸の影響

リン酸無添加下の透析乾燥菌体によるグリセリン酸化はほぼ C₃-代謝系の投影と考えられるので、これにリン酸を初めから添加して GP 系を発現せしめて、酸化速度の増加の大小を pH 別に検討すれば、リン酸の関与する系の最適 pH が解る筈である。

添加リン酸量は (相当する pH をもつリン酸液を加える) 6.6 μM である。

Fig. 21 に示す如くリン酸添加による酸化速度の増大は微アルカリ性 (pH 7.38) で認められ、酸性側はむしろ減少の傾向がある。したがってグリセリンより GP を生成する系は微アルカリ側で進行しやすいものと判定した。

第2項 GP 酸化の最適 pH

乾燥菌体を用い、酸性側はグリシン緩衝液、アルカリ側は tris 緩衝液で GP 酸化速度を比較した。Fig. 20b に示す如く、pH 5.25~9.05 の範囲内で顕著な最大値を示さないが、pH 6.10 が最適と思われる。

以上に得られた各系の最適 pH を総括して図式化したのが、Fig. 22 であって、結局グリセリン酸化に於ける二つの経路はリン酸濃度と pH とによって支配されるものと結論できる。

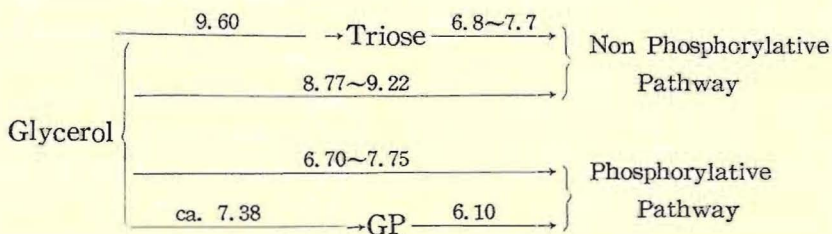


Fig. 22. Favorable pH Range of Each Phase Concerning with Glycerol-Oxidation by *B. succinicum*.

第5章 C₆-P 系及び TCA-cycle の関与

第1節 C₆-P 系の存在

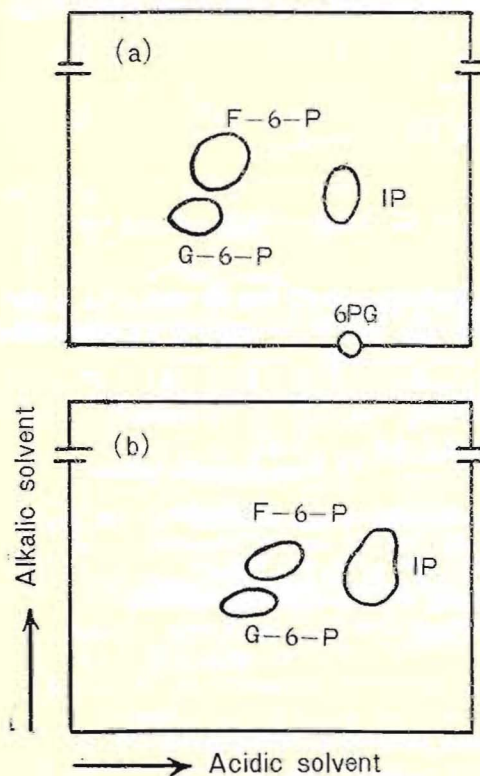
供試菌株に aldolase の存在が認められたことは、*H. anomala* で証明されたように、TP が C₆-P 系に連結される可能性があり、C₆-P 系の有無が問題となる。

供試菌株の酵素液を用いて、G-6-P 及び F-1;6-P を好氣的に代謝せしめ、反応液中の生成リン酸化化合物を検索する方法を行った結果、G-6-P よりは Fig. 23 a に示す如く、F-6-P 及び 6-PG の生成が認められ、また F-1;6-P よりはアルカリに不安定な TP が認められた（この場合は 6-PG の生成はなく、aldolase が分裂方向に強く働いたものと考えられる）。

一方、嫌気条件では G-6-P よりは F-6-P のみが検出され、6-PG は生成しない。（Fig. 23 b）従って、供試菌株でも C₆-P 系が存在するわけで、*H. anomala* の場合と同様に考えられる。

第2節 TCA-cycle の関与

CHELDELIN一派³³⁾は *Acetobacter* が TCA-cycle 中の有機酸を酸化せず、グリセリン酸化の際有機酸が sparker として働かずまた Co-A の役割も認められないことから、グリセリン酸化に TCA-cycle は関与しないと述べている。しかし山村⁷²⁾は結核菌でグリセリンの酸化に C₄-デカルボン酸系が関与していることを報告している。



ら、グリセリン酸化に TCA-cycle は関与しないと述べている。しかし山村⁷²⁾は結核菌でグリセリンの酸化に C₄-デカルボン酸系が関与していることを報告している。

Fig. 23. Chromatographic Identification of 6-PG and F-6-P formed from G-6-P under Aerobic (a) and Anaerobic (b) Conditions. IP: inorganic phosphoric acid. Conditions: G-6-P Na (0.1 M), 0.2 ml.; glycine buffer, 0.5 ml.; phosphate buffer, 0.1 ml.; NaF (0.01 M), 0.1 ml.; enzyme soln., 1.0 ml.; pH 6.0; reaction time, 60 min.; temp., 30; gas phase, air (a) or N₂ (b).

一方、供試菌株に於ては、多田⁶³⁾、高橋⁶¹⁾らによってクエン酸を嫌氣的に酢酸とコハク酸に分解する機構が証明されている。

著者は供試菌株が有機酸を酸化しうること及びグリセリン酸化にマロン酸阻害があることの事実から TCA-cycle の関与を提唱したい。

第1項 有機酸酸化能

a) 乾燥菌体の場合：フマル酸、クエン酸及びコハク酸に対して酸化能が示された。この際、グリセリン酸化速度に比してフマル酸酸化速度の方が大である。クエン酸酸化には lag が認められる⁵¹⁾。

b) 酵素液の場合：この場合も、クエン酸、フマル酸、コハク酸、リンゴ酸、Py に対して酸化能が認められる。各酸の彎曲点以後はコハク酸の酸化速度にほぼ一致している⁵⁰⁾。

第2項 マロン酸阻害

グリセリン酸化に対してマロン酸は終期に於て阻害が認められた⁵¹⁾。

第6章 *B. succinicum* によるグリセリン酸化型式

以上第2編に於て得られた結果より次の事項が結論される。

- 1) 供試菌株のグリセリン酸化機構には二つの径路即ち GP 生成系と DHA 生成系とが存在し、磷酸と pH が両系の支配因子である。
- 2) GP 生成系は *H. anomala* で認められた C₃-P 系及び C₆-P 系が関与する。
- 3) 磷酸が関与する系は酸化的磷酸化に関係がある。
- 4) DHA 生成系は磷酸が附加して TP となって C₃-P 系及び C₆-P 系に入る径路と、磷酸が関与せず代謝される径路 (GS 経由系) とがある。
- 5) グリセリン酸化は終局的には炭酸ガスになるが、この間 TCA-cycle が関与する。

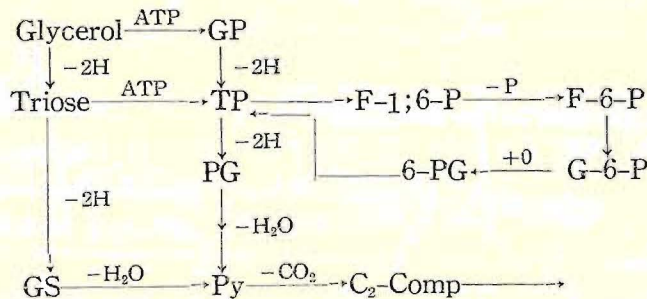


Fig. 24. Oxidative Pathways of Glycerol by *B. succinicum*.

第 3 編

細菌 (*B. succinicum*) によるグリセリン嫌気代謝機構

第1章 グリセリンよりの生成物

細菌によるグリセリン分解生成物には種種のものが知られているが、BRAAK³⁾ 及び WERKMAN一派⁴⁾ の用いた *Citrobacter* の生成物は、水素ガス、炭酸ガス、エタノール、トリメチレングライコール (以下 TMG と略記)、アクロレイン (以下 AC と略記)、蟻酸、酢酸、乳酸、コハク酸である。著者の用いた供試菌株による生成物も全く同様のものが認められた。

第1節 有機酸の生成

第1項 嫌気培養液よりの生成有機酸

培養液: グリセリン, 2%, 塩化アンモニウム, 0.3%; 塩類溶液, 1% ($MgSO_4 \cdot 2H_2O$, 10 g; NaCl, 0.5 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.5 g; H_2O , 250 ml)

5 l 容器に 3 l の培養液を入れ, 常法通り殺菌する。これに同一培養液 (30 ml) に前培養した供試菌株を植菌し, 直ちに窒素ガスにて置換して, 30° で 14 日間静置培養した。

培養後の液 2 l を硫酸酸性にてエーテル抽出を行ない, 抽出部をエーテルにて 25 ml とし, これより 15 ml を取り, エーテルを駆逐後, シリカゲルを用いてクロマトグラフ

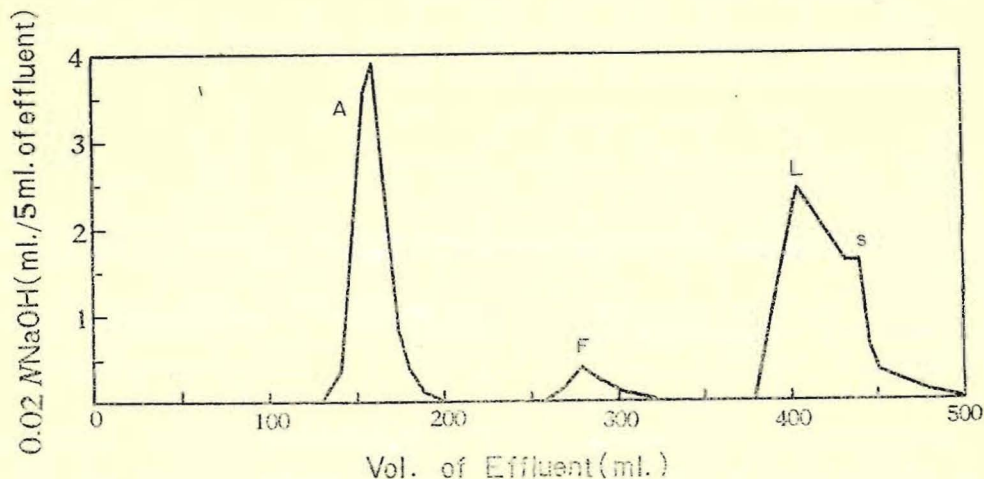


Fig. 15. Chromatographic Separation of Acetic (A), Formic (F), Lactic (L) and Succinic Acid (S) in the Ether Extract Resultant from Glycerol Dissimilation by *B. succinicum*. Eluting solvents used were in the following constituents: 100% chloroform; 5% butanol+95% chloroform; 10%butanol + 90% chloroform; 15% butanol + 85%, chloroform; 20%butanol + 80% chloroform. Each peak volume of effluent of standard acids was 175 ml. (A), 190 ml. (F), 395 ml. (L), and 425 ml. (S).

イー⁴¹⁾を行なった。Fig. 25 に示す如く、溶出液の酸度のピークの位置より酢酸、蟻酸及びコハク酸区分が認められた。

別に培養せるもののエーテル抽出部について濾紙クロマイグラフィーを行い、コハク酸区分が乳酸とコハク酸なることを確めた。

第2項 洗滌菌体による生成有機酸

洗滌菌体：500 ml 三角ビンに 80 ml のブイオンを入れ、供試菌株を植菌して 10 時間好氣的に振盪培養し、これを 2.5 l のブイオン液 (0.5% グリセリン含有) に加え、窒素ガスにて置換して約 20 時間嫌気培養する。菌体を遠心分離して集め、蒸留水にて 2 回洗滌する。

磷酸緩衝液を含むグリセリン 1% 液に洗滌菌体懸濁液を加え、窒素ガスにて嫌気状態とし、40° で 2 時間振盪する。

反応液を遠心分離して菌体を除き、硫酸酸性にてエーテル抽出し、抽出部につきクロマトグラフィーにより第 1 項と同一の有機酸を検出した。

第2節 ガス発生量

嫌気培養洗滌菌体を用いて、窒素ガス中にてグリセリンを分解せしめその際発生するガス量を計測した。

即ちワールブルク検圧計を用い、容器の副室にアルカリを入れたものと、入れないものと並行し、前者に示されたガス量を水素ガスとし、両者の差を炭酸ガス量として算出した。ガス腔を窒素ガスのみで置換したので、炭酸ガス量に誤差があるが、反応液の pH を 5.8~6.0 で行ったので、反応後側室より硫酸を添加してみると 5% (約 25 mm) 程度が発生する程度である。

洗滌菌体に 39.2 μM のグリセリンを添加し窒素ガス中にて反応せしめると、約 50 分でガス発生量は最大となる。(水素ガス, 23.4 μM; 炭酸ガス, 24.6 μM)

これより、グリセリン 1M よりのガス発生量は次の如く算出される。

$$\text{H}_2/\text{glycerol}=0.60; \text{CO}_2/\text{glycerol}=0.63$$

第3節 MG の生成

従来、微生物代謝で MG が得られたのは、F-1; 6-P からの特殊な場合のみであるが⁴²⁾、BRAAK はグリセリン酸酵で MG を中間体と考えている。

著者は供試菌株の静置培養液 (第 1 節第 1 項と同一のもの) を蒸溜し、その再溜液に 2,4-DNPH 溶液を添加し、生ずる沈澱よりベンゾール、アルコールに難溶の物質を得た。このものはジオキサン、ピリジンには溶ける。テトラリンを用いた濾紙クロマトグラフィー⁴³⁾に於て殆んど移動しない。またメタノール性苛性カリ溶液に濃紫赤色に溶解する。

沈澱を濾紙クロマトグラフィーにより、他の 2,4-DNPH と分離し、切りとった濾紙をクロロホルムにて溶出し、近紫外部の吸収曲線を測定すると Fig. 26 の如き曲線を示した。

別に GA を硫酸と共に加熱蒸溜して、MG を得て、この 2,4-DNPH 誘導体 (MG のオサゾン) の吸収曲線を測定したところ、上記の培養液より得たものと一致した。またメ

タノール性苛性カリ溶解に於ても性質が一致した。

一方、供試菌株の洗滌菌体を GA と嫌氣的に接触せしめ、その蒸溜液の 2,4-DNPH 誘導体の吸収曲線も上記のものに一致した。

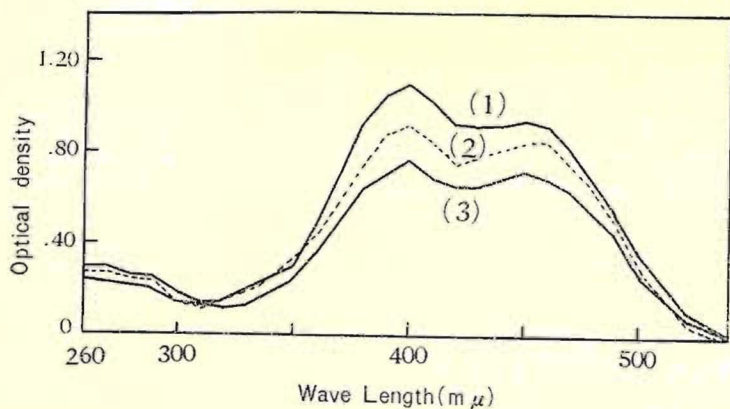


Fig 26

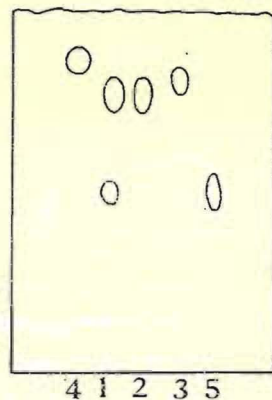


Fig 27

Fig. 26. Absorption Curves of 2,4-DNPH Derivative of MG in Chloroform. Curve : (1), 2,4-DNPH of the matter obtained from glycerol-medium cultured *B. succinicum*; (2), 2,4-DNPH of MG synthesized from GA, (3), 2,4-DNPH of the matter obtained from GA dissimilation by intact cells of *B. succinicum*.

Fig. 27. Chromatographic Identification of TMG Obtained from Glycerol Medium Cultured of *B. succinicum*. (1), sample; (2), TMG; (3), propylene glycol; (4), 2,3-butylene glycol; (5), glycerol. n-Butanol : acetic acid : Water = 4 : 1 : 1 Color-development was carried out by $\text{AgNO}_3\text{-NH}_3$.

第4節 TMG の生成

前節第2項と同様に培養した液 10 l を減圧濃縮して、硫酸酸性にてエーテル抽出し、抽出部を中和して再びエーテルにて抽出した。抽出部のエーテルを駆逐し残渣につき濾紙クロマトグラフィーを行なった (Fig. 27)。これは、大部分が TMG であった。更に 3,5 デニトロベンゼートに導いたが、このものの m. p. は 164° で TMG と一致した。収量は 1% グリセリン培養液 10 l より約 2g であった。

第5節 AC の生成

上記の培養液の蒸溜液を再溜し、2,4-DNPH 塩酸溶液を加え、生ずる沈澱をクロロホルム、ベンゾールにて再結し、m. p. $164\sim 165^\circ$ の赤橙色の結晶を得た。これは AC の同じ誘導体と混融しても融点降下なく AC に一致した。なお、この他にも 2,4-DNPH 誘導体が生成している。

なお、ブイヨン、酵母水、グリセリン、ブドウ糖を以下の割合で組合せた培養液について AC 生成の有無を検索した。

ブイヨン (1%), 10%; 酵母水, 10%; グリセリン, 2%; ブドウ糖, 0.5%; 塩類溶液, 6%; 1M 磷酸緩衝液, 5%; CaCO_3 , 2%。

前培養はブイヨン液 5 ml で行ない、これを上記培養液 400 ml に添加した。培養期間

は5日間。

培養液 300 ml を蒸溜して、初溜 50 ml を集め、このものにつき定性反応及びメタフエニレンデアミン法によって定量した。定性は RIMINI 反応 (A) 及び (B)* を併用した。

Table 14 に示す如く、グリセリンを含む培養液にのみ AC が生成され、ブドウ糖のみからは生成されないことが明らかである。またグリセリン区ではグリセリン単独のものが最も顕著で、次いで酵母水のもの、プイヨンのものという順であった。

Table 14. Ac Formation from Glycerol by *B. succinicum*

Medium	RIMINI's Reaction		AC found (mg./ml.)**
	A	B	
1. Glycerol	+++	+++	0.22
2. Glucose	-	-	0.04
3. (1)+(2)	+	++	0.09
4. Bouillion	-	-	0.04
5. (1)+(4)	+	+	0.14
6. (1)+(2)+(4)	+	+	0.14
7. Yeast extract	-	-	0.00
8. (1)+(7)	++	++	0.19
9. (2)+(7)	-	-	0.08
10. (1)+(2)+(7)	++	+	0.18

A) : 1 drop of 5% Na-nitroprussid+1 drop of 20% pyrimidine.

B) : 10 drops of 0.1% phenylhydrazine-HCl+1 drop of 5% Na-nitroprussid
+1 drop of 10% NaOH.

**) : Determined by the spectrophotometric measurement with m-phenylenediamine.

第2章 各種基質の醗酵能の比較

第1節 醗酵能と酸化能

嫌気培養の洗滌菌体でワールブルク検圧計を用いて Table 15 に示す各種基質を嫌気状態 (窒素ガス置換) にてガスの発生を検索した。

ガス発生しかも水素ガスと炭酸ガスの発生の認められたものは、グリセリン; GP; 2,3-ブチレングライコール (以下 BG; と略記); DHA; GA; MG; Py; 蟻酸であって、他の基質特にグリセリン酸は不活性である。

グリコール類について同一菌体で酸化能を比較したのが Fig. 28 であって、酸化に於ける酸素吸収はいずれも認められる。しかしこの際炭酸ガス発生が顕著に認められるのはグリセリンと 2, 3-BG のみであった (GA 及び DHA は後に行ったが同様である)。

* Table 14 参照 AC は両反応とも陽性である。

Table 15. Gas Formation from Various Compounds by *B. succinicum* (Anaerobic Grown Cells) under Anaerobic Conditions

Substrate	Gas Formation	Substrate	Gas Formation
Glyceraldehyde (GA)	+	Ethanol	-
Methylglyoxal (MG)	+	Isopropanol	-
Dihydroxyacetone (DHA)	+	Pyruvate (Py)	+
Glyoxal	-	Formate (F)	+
Formaldehyde (ACh)	-	Glycerophosphate (GP)	+
Acetone	-	Lactate (L)	-
Acrolein (AC)	-	Succinate (S)	-
Glycerol	+	Citrate*	-
2, 3-Butyleneglycol (BG)	+	Fumarate	-
Ethylene glycol	-	Acetate* (A)	-
Propylene glycol	-	Glycolate (GC)	-
Trimethylene glycol (TMG)	-	Glycerate (GS)	-

* These acids were metabolized by adapted cells⁽¹⁾

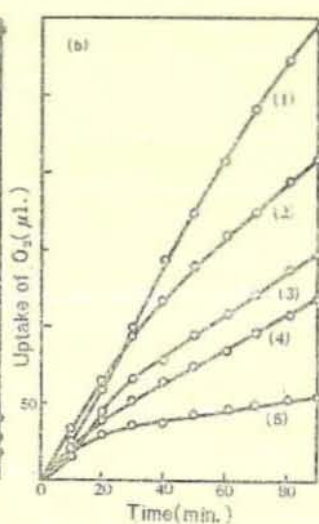
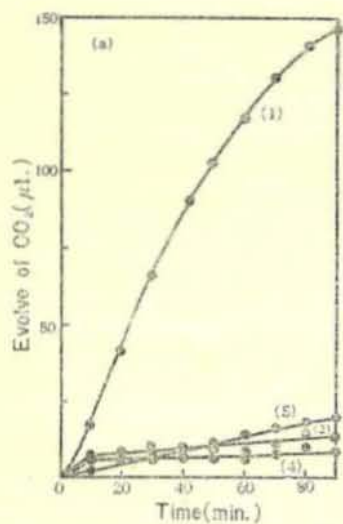


Fig. 28

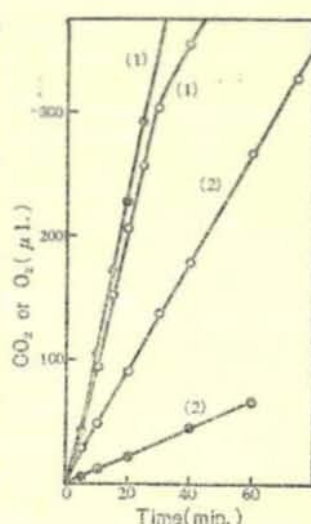


Fig. 29

Fig. 28. Oxidative Decomposition of Various Glycols by Anaerobic Grown Cells of *B. succinicum*. Curve : (1), Glycerol ; (2), propylene glycol ; (3), 2, 3-butylene glycol ; (4), TMG ; (5), ethylene glycol.

Fig. 29. Comparison of Velocity of Glycerol Decomposition with GP by *B. succinicum* (Anaerobic Grown). Curve : (1), Glycerol ; (2), GP. Evolve of CO_2 in anaerobic (○) and uptake of O_2 in aerobic Condition (○).

第2節 グリセリン、GP 及び三炭糖の醗酵速度の比較

第1項 グリセリンと GP との比較

嫌気培養の洗滌菌体について両基質の好気及び嫌気に於ける分解速度をガスの消長より追跡した。Fig. 29 に示す如く、GP に対しては嫌気的には著しく醗酵力が低くなる。好気の場合はグリセリンが GP より速度は大であるが、30 分頃より同一速度になる。これは第2編に示した如く、供試菌株が GP 系と C₃-系とを持つため初期には C₃-系が先行するものと思われる。

以上の如く、嫌気下の GP 分解速度が著しく低いことは、グリセリン分解が GP 系を主要経路としないものと判定される。

第2項 グリセリンと三炭糖との比較

三炭糖として GA と DHA とを比較したが、Fig. 30 に示す如く、炭酸ガス発生速度に於いて、三炭糖はいずれもグリセリン分解速度と同一速度であった。

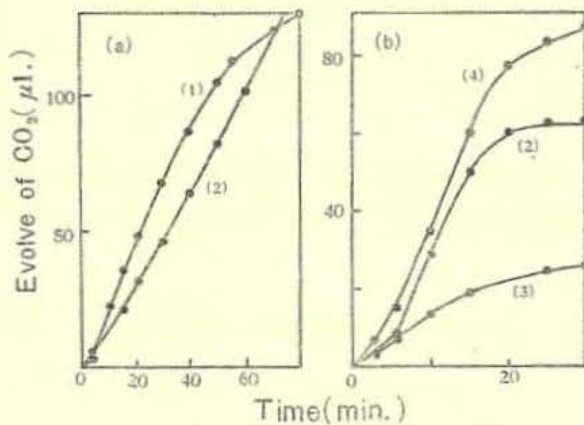


Fig. 30. Comparison of Velocity of Glycerol Decomposition (CO₂-Evolve) with GA and DHA by *B. succinicum*. Curve: (1), GA; (2), glycerol; (3), MG; (4), DHA, Conditions: Phosphate buffer (pH 6.10), 0.5 ml.; call susp., 1.0 ml.; substrate, 0.2 ml.; temp., 30°; gas phase, N₂.

第3項 グリセリン嫌気分解経路

本節に於いて、グリセリン分解が三炭糖を経て行なわれ、さらにGSが醗酵されず、培養液よりMGが捕獲され、またFig. 30に示す如く、MGが醗酵されることより、GS経路系が否定され(恐らく嫌気下ではkinaseが働けないため)、MG経路系がグリセリン嫌気分解に於ける主要経路と判定された。

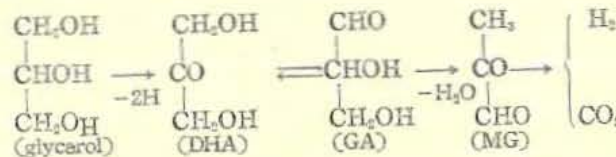


Fig. 31. Anaerobic Pathways of Glycerol-Decomposition by *B. succinicum* (C₃-Shunt via MG).

第3章 水素ガス発生機構

グリセリン, DHA 及び GA の酸酵の際は, 炭酸ガスの他は水素ガスである。また酸酵される基質からは殆んどすべて水素ガス発生を伴なうことを知った。そこでグリセリン分解が Py を経由することを証明し, 水素ガス発生について以下検討した。

第1節 Py の生成

洗滌菌体をグリセリンまたは GA (約1%液) と嫌氣的に反応せしめた。反応液を除菌後硫酸酸性にて 2,4-DNPH 溶液を加え, 一晚放置後, キシロールにて抽出し, 第1編第4節に示した方法にて濾紙クロマトグラフィーを行なった結果, グリセリン及び GA 共に Py を生成することがわかった。

また, 第1章で行なった嫌気培養液を同様に処理したものにも Py に一致する 2,4-DNPH が得られた。

第2節 Py の分解

第1項 磷酸添加の有無による差異

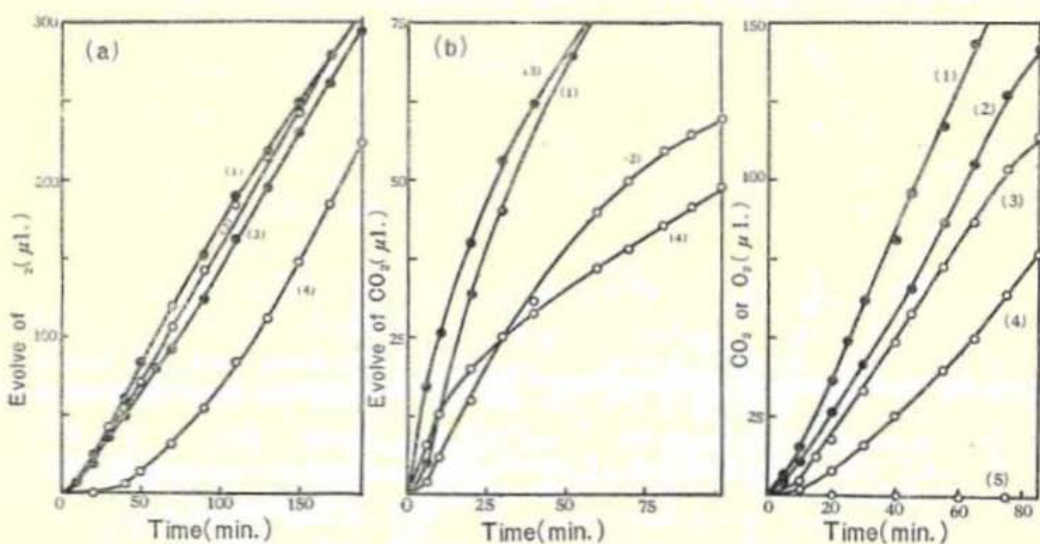


Fig. 32

Fig. 33

Fig. 32. Effect of Phosphate Addition on Pyruvate Decomposition (a) and Formate Decomposition (b) under Anaerobic Condition. Curve: (1) and (3), CO_2 -evolve in addition and no addition of phosphate, respectively; (2) and (4), H_2 -evolve in addition and no addition of phosphate, respectively. Conditions: Glycine buffer (pH 6.0), 0.5 ml.; cell susps., 1.0 ml.; substrate, 0.2 ml.; phosphate soln. ($M/10$) or dist. water, 0.1 ml.; gas phase, N_2 .

Fig. 33. Effect of AcH on Py Decomposition under No Phosphate Addition by *B. succinicum*. Curve: (1), (2), Evolve of CO_2 with Py and Py + AcH, respectively; (3), (4), Evolve of H_2 with Py + AcH and Py; (5), AcH only (0.5 μM added).

Py は洗滌菌体により嫌気分解されて、ほぼ同一速度で水素ガスと炭酸ガスを発生する。しかしこれは磷酸緩衝液を用いた場合であって、磷酸を添加せずにグリシン緩衝液を用いると、Fig. 32 a の如く炭酸ガス発生は殆んど変わらないのに、水素ガス発生に顕著な lag が生じた。これに対して、蟻酸の場合は Fig. 32 b の如く炭酸ガス、水素ガス共に速度が小さくなるが、特に水素ガスに lag は生じない。

即ち磷酸の影響は（水素ガス発生 of lag）Py の分裂に関係がある。

第2項 磷酸無添加に於ける AcH の効果

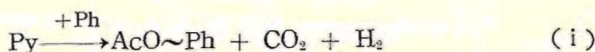
Py の磷酸無添加分解の際に、微量の AcH を添加しておくこと、水素ガス発生に生じた lag が著しく短縮された。(Fig. 33)

この事は AcH が水素ガス発生に関係していることを示しており、以上の結果を第3節に於て解析した。

第3節 水素ガス発生機構

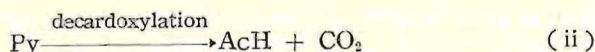
前節に於て、Py 分解に磷酸及び AcH の影響があることを認めたが、これは次の如く説明される。

1) 嫌気下に於ける Py 分解には磷酸が関与して、いわゆる加磷酸分裂が行なわれることは従来認められている。

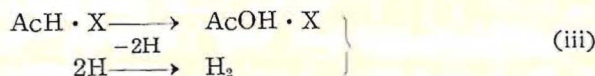


著者の用いた供試菌株の磷酸緩衝液に於ける Py 分解は水素ガスと炭酸ガスが並行して発生するので、(i) の反応が行なわれている。

2) 磷酸無添加の場合、水素ガス発生に lag の生じたことは、磷酸欠乏のために (i) の反応は進行しにくく、decarboxylation が先行することになる。



水素ガスは lag の後、炭酸ガスと並行して発生することと、AcH の添加がこの lag を短縮することは AcH より水素ガスが発生するものと考えざるを得ない。BARKULIS⁶⁾ らによれば、AcH · X 脱水素酵素と hydrogenyase とで水素ガスが発生する。

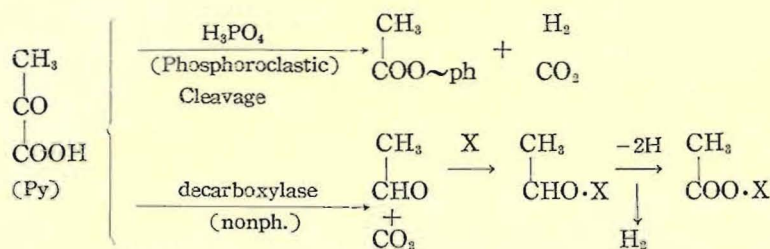


ところが AcH 自体からは水素ガスを発生しないことは、



恐らく (iv) の反応が必要なためであって、これは Py の分裂と共軛して行なわれるのであろう。従って AcH が添加されれば、より速く (iv) — (iii) の反応が進行して水素ガス発生 of lag が短縮されるわけである。

3) 以上の解析により、供試菌株の Py 嫌気分解には磷酸濃度により、次の二つの径路が存在する。

Fig. 34. Anaerobic Decomposition of Pyruvate by *B. succinicum*.

第4章 AC 生成機構

グリセリンより TMG の生成については、緒言でも記した如く、古くから知られているが¹⁹⁾、BRAAK⁸⁾ 及び WERKMAN 一派⁴⁴⁻⁷¹⁾ の研究により、グリセリンの酸化還元の結果生成されることが考えられている。一方、AC もグリセリンのみから生成される物質であり、VOISENET⁶⁷⁾ の研究を始めとして、果実酒⁵⁷⁻⁶⁴⁾、ブランデー⁶⁹⁻⁷⁰⁾、ウィスキー⁴²⁻⁶⁰⁾ 及びイモを原料とするアルコールに⁴⁵⁻⁴⁶⁾ その存在が認められた。

VOISENET⁶³⁾ は AC の生成はグリセリンの脱水によって行なわれ中間体として β-オキシプロピオンアルデヒド (以下 OPA と略記) に注目し、想定径路を提出している。WERKMAN 一派⁴⁴⁾ は TMG の中間体が AC ではないかと想定し亜硫酸石灰添加により AC を捕獲したが、TMG 生成量は変らなかったと報じた。著者は TMG より AC の生成を確認し、VOISENET 説がかなり正しかったことを認め、ここに AC 生成機構を明らかにした。

第1節 グリセリン ⇌ TMG 系の証明

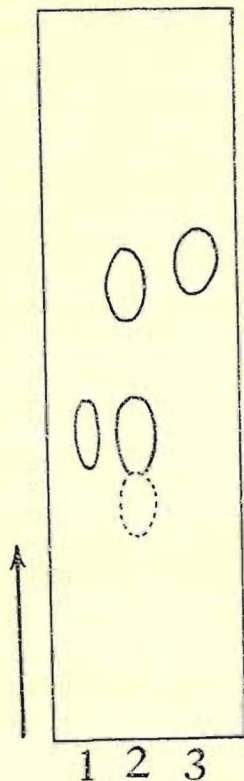
本編第1章で示した如く、グリセリン培養液から TMG が生成したわけであるが、ここでは供試菌株の好気培養の洗濯菌体により、TMG よりグリセリンの生成を確めた。即ち、供試菌株の乾燥菌体 0.3 g を用いて、Tris 緩衝液 (pH 7.59) 中にて TMG を好氣的に 8 時間反応せしめた。これは 500 ml 容三角瓶に綿栓して振盪したものである。

反応液は遠心分離して菌体を除き、上澄液を蒸溜して約 20 ml を溜出して、残液を 50° 附近にて減圧濃縮して約 50 ml とする。これに硫酸を加えて酸性とし、エーテルにて約 40 時間連続抽出を行なう (ここでエーテル可溶の酸及び大部分の残留 TMG が抽出される)。抽出残渣を苛性カリにて中和して、50° 附近にて減圧濃縮してシラップ状とし、これに 95% アルコールを約 40 ml 加えて、不溶物を汙別する。汙液のアルコールを低温にて駆逐して残渣 (シラップ状の粘稠液) を得る。これはグリセリンと類似の甘味をもつ (TMG の味は甘味の他に独特な油臭と刺戟味を感じ、グリセリンと区別できる)。

この粘稠液について滷紙クロマトグラフィーを行なったところ、Fig. 35 に示す如く、グリセリンに一致する物質を同定した。

従って TMG が酸化されてグリセリンとなる反応が見出された。

グリセリンが嫌氣的に分解される際は、WERKMAN一派¹¹⁾ のいう如く、グリセリンが酸化還元を受けて、三炭糖と TMG とが生成するものと考えられる。



第2節 TMG より AC の生成

第1項 AC 生成の証明

従来、AC の生成はグリセリンの培養液より見出されていたが、著者は洗滌菌体、乾燥菌体及び抽出酵素液により、TMG より短時間に AC を生成させることに成功した。

a) 洗滌菌体による反応：嫌気培養菌の洗滌菌体を次の組成の液に懸濁し、約5時間好氣的に振盪した。(反応液組成：TMG, 0.5 g; Tris 緩衝液 (pH 7.2), 20 ml; 菌体懸濁液, 10 ml; 蒸溜水, 125 ml)

反応後、遠心分離して菌体を除き、上澄液を蒸溜して初溜分 20ml を集めた。このものは刺戟臭をもち、RIMINI 反応A及びB共陽性であり、SCHIFF 硫酸酸性液で紫で陽性、さらに VOISENET 反応、青でいずれも AC の反応に一致した。

Fig. 35. Chromatographic Identification of Glycerol Formed from TMG by Dried Cells of *B. succinicum*. Conditions of reaction : Tris buffer (pH 7.59), 20 ml., TMG, 0.5 ml. cell susp., 80 ml. (contained 0.3 g. of dry cells); temp., 30°; gas phase, air; reaction time, 8 hr.

(1) : glycerol : (2) : sample : (3) : TMG. Solvent : Butanol : acetic : Water = 4 : 1 : 1. Color : Developed by $\text{AgNO}_3\text{-NH}_3$ at 110°.

初溜液に 2,4-DNPH 溶液を加え、一晚放置後沈澱を集め蒸溜水にて洗滌後、乾燥してからベンゾール、クロロホルムにて再結すると緋赤色結晶が得られた。m. p. 165~166° で、純 AC の 2,4-DNPH と混融しても融点降下は認められなかった。

また滷紙クロマトグラフィー²⁵⁾の結果も AC に一致し、結局 TMG 酸化の際生ずる揮発性物質は AC なることが確認された。

b) 嫌気下では AC は生成されないこと：上記の反応の際、Mb を添加して、窒素ガスにて嫌気状態として反応せしめたものも同様に AC が生成した。しかしこの際 Mb を添加せず、嫌気状態としたものには AC は生成されなかった。

c) AC 生成菌はグリセリンに適応的なこと：TMG よりの酸化的 AC 生成は使用菌体の培養液条件によって左右された。即ちグリセリンを含まないブイオンで培養した菌体を用いた場合は TMG より AC は生成しなかった。

d) 菌体の条件：以上は嫌氣的に培養した菌体についての結果であるが、好氣的に培養した菌体も TMG より強力に AC を生成した。そこで好気培養菌体について乾燥条件を検討した所、アセトン菌体は不良であったが真空乾燥したものは生菌体と同程度に AC 生成力があった。即ち菌体懸濁液

30 ml を 10 ml ずつに部に分け、1部はそのまま窒素ガス中で氷室に保ち、1部は沈澱させて塩化カルシウム上にて真空乾燥し、他の1部はアセトンを経加えて沈澱させ真空乾燥した。この3種類の菌体製品を Tris 緩衝液 (pH 7.4), 100 ml; 水, 50 ml; TMG, 0.3 g の組成液 50 ml に 10 ml の菌体懸濁液として添加して、30° 2時間好氣的に振盪した。反応液 25 ml を水蒸気蒸溜し、溜液 100 ml を集め、NaHSO₃-ヨードメトリーにて定量した。

Table 16 に示す如く、アセトン菌体は AC を生成しなくなるが、乾燥菌体は生菌体と同程度の活性を保持した。

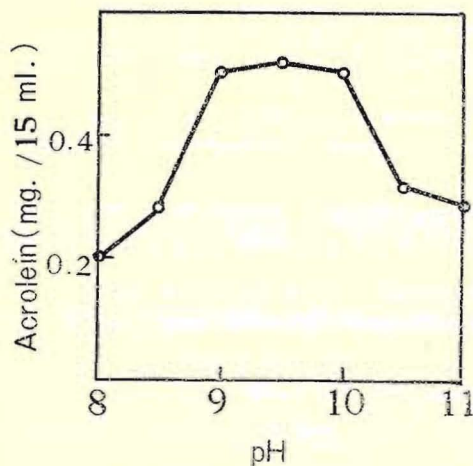
Table 16. AC Formation from TMG by *B. succinicum*

Cells	VOISENET's Reaction	AC found (mg/25ml)*
Intact Cells	Blue	1.31
Dried Cells	Blue	1.29
Acetone Treated Cells	Pink	0.30

*: Determined by the method of NaHSO₃-Iodometry.
滴を加えて水蒸気蒸溜して溜液 70 ml をとり、NaHSO₃-ヨードメトリーにて定量した。

Fig. 36 に示す如く、pH 9~10 の間で TMG より AC が最も生成されることがわかった。

阻害剤の影響：乾燥菌体による AC 生成に於ける阻害剤の影響をみると、Table 18 に示す如く、NaF, DNP, As₂O₃ が阻害を示した。



なお、VOISENET 反応⁶⁷⁾ について著者が類縁の物質について検討した結果は Table 17 に示す通りである。

第2項 反応条件の検討

AC 生成の最適 pH (乾燥菌体)：緩衝液は塩化アンモニウム-アンモニア緩衝液を用いた。反応液組成は TMG (1%), 10 ml; 菌体懸濁液, 5 ml; 緩衝液, 15 ml である。これを好氣的に 5 時間反応せしめ、反応液の 15 ml に 2 N 硫酸 1

ml を加えて水蒸気蒸溜して溜液 70 ml をとり、NaHSO₃-ヨードメトリーにて定量した。

磷酸の影響：アルカリ性に於て磷酸を添加して、AC 生成量を比較したが、微アルカリ側では磷酸区の方が AC 生成量が多いが、全体量がアルカリ性に比べて著しく低い。アルカリ性に於ける磷酸の効果は余りなかった (Table 19)。

Fig. 36. The Optimum pH Acrolein Formation from TMG by Dried Cells of *B. succinicum*. Conditions: TMG (1%), 10 ml., cell susp., 5ml.; buffer (NH₄Cl-NH₃), 15 ml. temp., 30°; gas phase, air: reaction time, 5 hr.

Table 17. Development of Color in VIOSENET'S Reaction

Compound	Cold	Heated	Compound	Cold	Heated
None	Yellow	Yellow	Propylene glycol	None	Pink
AC	None	Green-blue	Propion-aldehyde	None	Yellow
OPA	Yellow	Violet-red	ALA	None	Blue
Formalin	Pink	Pink	Acrylic acid	Yellow	Yellow
AcH	None	Dark Yellow	TMG	Yellow	Yellow

Conditions of reaction : sample, 2 ml. ; albumine soln., 0.5 ml. ; HCl (contained NO_2), 7.5 ml. Mixture was heated for 10 min. at 50°

Table 18. Effect of Gift on AC Formation from TMG by Dried Cells of *B. succinicum*

Gift	Concentration of gift (M)	AC found (mg./20 ml.)
None	—	0.45
NaF	0.01	0.27
MJA	0.0005	0.43
DNP	0.001	0.16
As_2O_3	0.001	0.26
AsO_3	0.001	0.34

Conditions of reaction : TMG, 0.1% ; cell susp., 5 ml. ; tris buffer (pH 7.44), 15 ml. ; total volume, 45 ml. ; temp., 30° ; gas phase, air ; reaction time, 3.5 hr.

Table 19. Effect of Phosphate on AC Formation by Dried Cells of *B. succinicum*

pH	Phosphate buffer	Tris-buffer	H_2O	TMG (15%)	Cell susp.	AC found mg./15 ml.
7.16	ml.	ml.	ml.	ml.	ml.	mg./15 ml.
	—	5.0	11	0.5	5.0	0.15
8.97	1.0 ^a	5.0	10	0.5	5.0	0.34
	—	5.0	11	0.5	5.0	1.49
	1.0 ^b	5.0	10	0.5	5.0	1.60

a) pH 7.09 ; b) pH 9.05

第3節 AC 生成酵素

第1項 酵素系の抽出

グリセリンを含有せるブイオンに好気培養せる菌体を洗滌後、真空乾燥する（能率のよい塩化カルシウムを用い、2時間以上連続排気する）。乾燥物を約 0.5 g とり、ガラスミルにて約 18 時間真空中にて磨砕する。Tris 緩衝液 (pH 8.9) を 4 倍に稀釈して、20 ml にて抽出し、これを遠心管に移し 1,200 r.p.m. にて 20 分間遠心分離する。こうして帯黄色の殆んど透明な上澄液を得る。

酵素液、5 ml ; Tris 緩衝液 (pH 8.9), 10 ml ; TMG, 0.1 g の組成液を好氣的に 30° で 2 時間反応せしめると、反応液の VOISENET 反応は青色で AC の生成が明らかに認められた。

従って酵素反応により TMG より AC の生成が確かめられた。

第2項 TMG 脱水素酵素の性質

第4節に示す如く、TMG より AC 生成には二つの酵素が働くものと考えられるが、ここでは TMG 脱水素酵素について検討した。

基質特異性：第1項で得た酵素液のグリコール類に対する脱水素作用を Table 20 に示した。最も速度の早いのはプロピレングリコール次いで乳酸であるが、グリセリン始め TMG, エチレングリコールさらに三炭糖に対しても活性力を示した。

Table 20. Dehydrogenation Responsible for Various Glycols by Enzyme Solution (Cell-free) of *B. succinicum*

Substrate	Concentration (M)	Reduction Time (t min.)	Activity (1/t ⁻¹ /E)×100
Glycerol	1/70	13.5	6.0
TMG	1/20	10.5	8.1
Propylene G	1/7	2.0	48.6
Ethylene G	1/70	10.8	7.8
GA	1/14	28.0	2.1
DHA	1/175	17.5	4.3
AC	1/1400	∞	—
Lactate	1/14	4.8	19.4
Py	1/70	33.8	1.5
Autorepiration (E)	—	70	—

Conditions : Substrate, 0.3 ml.; methylene blue (2×10^{-3} M), 0.4 ml.; tris buffer (pH 7.59), 0.5 ml.; enzyme soln., 1.0 ml.

TMG 脱水素反応の最適 pH：塩化アンモニウム-アンモニア緩衝液で pH を調節して行なった所、Table 21 に示す如く、pH 9.5 が最適と認められた。第2節で示した乾燥菌体による TMG より AC の生成の最適 pH は 9.0~10.0 にあり大体一致している。

助酵素として TPN が関与すること：いわゆるアルコール脱水素酵素またはグリセリン脱水素酵素は DPN—link として知られているが、著者はここに TMG 脱水素酵素が TPN—link であって、新しい酵素であることを認めた。即ち Table 22 に示す如く、TPN 添加区は最も速く反応が行なわれた。表中の値は Mb, 0.05 ml 迄のものであるが、途中の経過では TPN 区が顕著に脱色が起り、その後は反応が遅くなった。DPN 共存の場合、TPN 単独より遅くなる理由は不明である。

Table 21. Optimum pH of TMG Dehydrogenation by Enzyme Solution of *B. succinicum* (THUNBERG'S Method)

pH	Reduction Time (t min.)	Activity (1/t×10 ²)
8.0	∞	0
8.5	100	1.0
9.0	32	3.1
9.5	29	3.4
10.0	44	2.2
10.5	48	2.0
11.0	150	0.6

Conditions: Each pH was adjusted by NH₄Cl-NH₃ buffer. TMG (2.5%), 0.3ml.; methylene blue (2×10⁻³); buffer, 0.5 ml.; enzyme soln., 1.0 ml.

Table 22. Effect of Co-Enzyme on TMG Dehydrogenase (THUNBERG'S Method)

Coenzyme	Reduction time (min.)
DPN	33
TPN	29
DPN+TPN	38
None	54

Conditions: Tris buffer (pH 8.9), 0.5 ml.; enzyme soln., 1.0 ml.; methylene blue (2×10⁻³-M), 0.5 ml.; MgSO₄ (0.01 M), 0.1 ml.; TMG (2.5%), 0.3 ml.; total, 2.6 ml.; DPN, 0.1 ml. (0.1 mg.); TPN, 0.1 ml. (0.1 mg.)

第4節 TMG→AC 反応に於ける中間体について

TMG からの AC 生成は嫌気下では行なれず、色素 (Mb) または酸素の如き水素受容体が存在して初めて行なわれる。従って反応系には脱水素反応が関与していることは明らかである。そこで脱水素反応を考えると AC 生成には Fig. 37 の径路が仮定される。

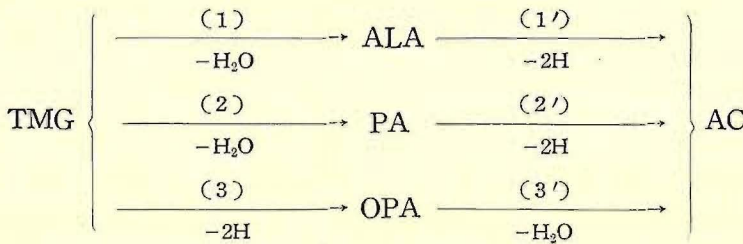


Fig. 37. Pathways from TMG to AC.

このうち (1) — (1') 及び (2) — (2') の径路は脱水反応が先行するわけであるが、TMG を嫌氣的に反応せしめた場合、AC は勿論のこと、他にもアルデヒド反応は認められないので、(2) の径路は否定され、また TMG 嫌気反応液の蒸溜液を硫酸と MnO_2 にて酸化した溜液には AC 反応がないので、(1) の径路も否定された。

従って (3) — (3') の径路が考えられるわけで以下に於て証明することができた。

第1項 TMG より OPA の生成

好氣的培養菌体の乾燥の際、塩化カルシウムの乾燥能力を弱めて、徐々に乾かすと、半透明のアメ色をしたかなり固い乾燥物となる (乾燥を素早く行なったものは、白味をおびた、かさかさのもろいもので酵素活性力は強い)。ここで用いた乾燥菌体は TMG より AC 生成力は殆んど認められない。しかし反応液の VOISENET 反応は淡赤紫色を示した。

菌体を一晩ガラスミル (真空) 中にて磨砕し、Tris 緩衝液 (pH 8.9) 20 ml にて抽出し、12,000 r.p.m., 20 分間の遠心分離処理によって得た上澄液に、TMG, 0.1 g を加えて 30° で 3 時間好氣的に振盪した。反応液を水蒸気蒸溜して、溜液 20 ml をとり、これに 2,4-DNPH 溶液を加えて一晩放置した。生ずる沈澱を集め、洗滌、乾燥後、沓紙クロマトグラフィー²⁵⁾を行なった所、OPA の 2,4-DNPH に一致した。

従って、ここで用いた乾燥菌体は TMG より OPA を生成する能力を保持していた。

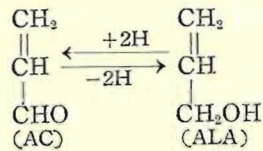
第2項 OPA より AC の生成

OPA の合成：二酸化マンガンを硫酸とで TMG を酸化蒸溜し、再溜した。OPA は油状に分離するので、この部分を集めた。臭気は AC とは異なる刺戟臭で、VOISENET 反応は赤紫色である。

生菌体懸濁液に OPA (18 mg) を添加し、嫌気下に於いて、約 6 時間反応させ、反応液を蒸溜した (OPA は b.p. が高いので、常圧下では溜出しにくい)。溜液に 2,4-DNPH 溶液を加えて、生ずる沈澱を洗滌、乾燥後沓紙クロマトグラフィー²⁵⁾を行ない、AC に一致することがわかった。沈澱は再結の結果、m. p. 165° に恒定し、AC の 2,4-DNPH との混融に於いて融点降下がなく、AC として同定された。

なお、乾燥菌体の状態により、その磨砕液の TMG 酸化反応液が VOISENET 反応青紫色を呈することがある。この水蒸気蒸溜液 (同反応青紫色) をさらに生菌体懸濁液で反応せしめたところ、このものの同反応は青色になった。このことは乾燥菌体の AC 生成力がかかなり不活性となっていたために、OPA が幾分蓄積して同反応に紫色を附加せしめたもので、これを生菌体で反応せしめた結果、OPA が AC に変化したのである (従って反応は青となって AC のみの反応を呈する)。

第5節 AC より ALA の生成



第1項 AC の還元

AC を嫌気下に於いて、洗滌菌体と反応せしめ、蒸溜液に 2,4-DNPH-塩酸溶液を過剰に加え一晩放置する。沈澱を除いた母液を再び蒸溜し、溜液に 2,4-DNPH 溶液を加え一晩放置し、母液を蒸溜する。この溜液はもはや RIMINI 反応 (A) (B) 陰性で残存 AC は全く除かれており、臭気は ALA 臭気に酷似している。この溜液に二酸化マンガンを硫酸を加えて酸化蒸溜した溜液は RIMINI 反応陽性であって、2,4-DNPH の沈澱を生ずる。このものの濾紙クロマトグラフィーのスポットの位置は AC の 2,4-DNPH に一致した。

したがって AC が還元されて ALA が生成されることが確かめられた。

第2項 ALA の酸化

好気下に於て ALA を洗滌菌体を反応せしめ、反応液を蒸溜した液は RIMINI 反応 (A) (B) は陽性となる (使用した ALA は RIMINI 反応陰性)。溜液の 2,4-DNPH は AC の 2,4-DNPH に一致した。

一方反応液を硫酸酸性にエーテル抽出を行い、抽出部について有機酸の濾紙クロマトグラフィー (ブタノール:酢酸:水=4:1:1) を行ってみると、 R_f 0.7 及び 0.9 附近の 2カ所に有機酸が検出された。このことは AC がさらに変転していることを示している。このうち 0.7 は乳酸、0.9 はアクリル酸のスポットに一致している。

以上のことから AC, ALA 間には可逆反応があり、2,4-DNPH の生成量より見てこの反応は還元方向に平衡がずれているようである。

したがって本章に於てグリセリンよりの AC 生成機構は次の如く証明された。

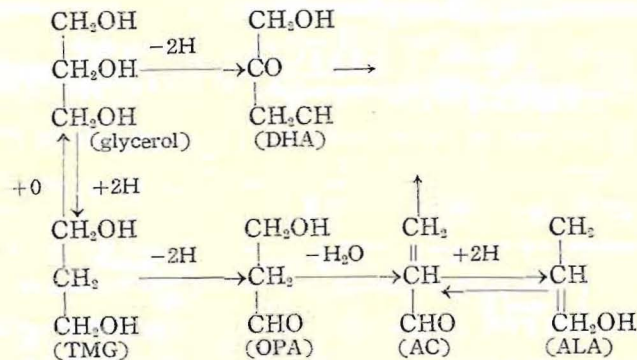


Fig. 38. Mechanism of AC-Formation from Glycerol by *B. succinicum*.

第5章 ALA 脱水素酵素

前章に於て、AC が ALA に変転することが認められたが、これには脱水素酵素の関与が考えられる。著者は約 10 種の大腸菌について、ALA の脱水素反応の存在を認め、その一種より該酵素の抽出に成功した。

第1節 ALA 脱水素酵素の抽出

使用菌株：短桿菌で遠藤培地を赤変せしめ、VOGES-PROSKAUER 反応(-)、メチル赤試験(+)、クエン酸資化性(-)、乳糖を酸酵、グリセリン資化性(+)で、*Escherichia coli* の一種である。

培養条件：乳糖またはブドウ糖 1%、肉エキス 1%、ペプトン(武田製) 1%、グリセリン 0.2%、pH 7.2 の培養液で 20~24 時間振盪培養する (30°)。

培養菌体を遠心分離して集め (2l より湿量で約 10g)、洗滌後、約同量の石英砂と共に乳鉢にて約 30 分間すりつぶす。冷却蒸溜水 200 ml を加えよく攪拌後、3500 回転にて 50 分間遠心分離して石英砂及び生菌体を除く。上澄液は再び遠心分離して上澄液に硫酸を加えて 50% 飽和 (重量法) とする。暫時冷却してから遠心分離して沈澱を集め、蒸溜水に懸濁してセロファン紙を用いて蒸溜水に対して 40~60 時間透析する (氷室内)。透析液は炭酸ソーダにて pH 7.0 として遠心分離して沈澱を除くと上澄液に ALA-脱水素酵素液が得られる。

酵素の諸性質の検索には硫酸塩析—溶解—遠心—透析—遠心の操作を 2 回くり返したものをを使用した。酵素液は検鏡しても菌体は全く認められず、cell-free の酵素である。

酵素液は pH 5.0 附近以下より沈澱するが、再び pH を中性にもどせば、これにより活性化に著しい変化は認められない。

第2節 酵素液の特性

第1項 基質特異性

酵素液の活性化度はツンベルク法によって Mb の脱色時間(分)の測定値より算出した。

$$Q_{Mb} = \frac{1}{t_{min}} \times 100$$

酵素液の特にアルコール類に対する活性化度を比較した所。顕著に活性の示されたのは ALA, 2,3-BG 及び乳酸である⁴⁹⁾。

エタノールに対しては極く僅かの脱色が認められるが、semicarbazid (0.1 M) を添加しても脱色には 1 時間を要し、この際の ALA の脱水素速度 9 分 25 秒に比して極めて遅い。酵母より分離した DPN を添加しても効果はない。エタノール脱水素酵素 (いわゆるアルコール脱水素酵素) は NEGELEIN⁴⁵⁾ によって酵母より結晶状に得られており、DPN を助酵素とする。このものは他のアルコールにも作用があることが認められている。細菌よりは未だ細胞外に抽出されていないようである。これらの事は著者の得た酵素はアルコール脱水素酵素とは異なるもので、ALA に特異的に働く新しい酵素であることを示している。透析に対して安定で、特に助酵素を必要としないことも特徴的である。

酵素液には乳酸脱水素反応が顕著に認められるが、硫酸アンモニウムによる分別沈澱を行なってみると、乳酸脱水素酵素のみは65%飽和の区分に殆んど集まってくることから、ALA 脱水素酵素とは異なることが解る。しかし BG 脱水素酵素は同一の行動を示すので、今のところ ALA 脱水素酵素との異同は明らかではない。

第2項 ALA 脱水素酵素の性質

a) ALA 脱水素反応の最適 pH: 0.1 M 磷酸一カリ, 磷酸二カリ, 磷酸三カリの緩衝液で, 最適 pH 7.6~7.7 を示した⁴⁹⁾。

b) 熱による不活性化度: 60° または 70° に於て, 酵素液を 5~30 分間浸漬した後, 急冷したものについて, 反応速度を測定した結果, 60°, 10 分にて 50%; 70°, 20 分で殆んどが不活性になった⁴⁹⁾。

c) 阻害剤の影響: 生菌体及び酵素液とによる ALA 脱水素反応に対する KCN, NaF, MJA の阻害を比較した⁴⁹⁾。

KCN は酵素液では阻害を示し, 生菌体の場合は呼吸酵素を阻害できる濃度(0.01 M)でも阻害されない。このことは脱水素反応であることを明らかに示している。MJA は酵素液では効果はないが, 生菌体ではむしろ促進の傾向がある。NaF はいずれにも効果がない。

第3項 反応生成物

大型のツンベルク管を用い, Mb存在下に嫌氣的に ALA を酵素液で脱水素せしめた。

Constituent of Reactant in ALA-Dehydrogenation: Methylene blue (1/250 M), 8 ml.; Allyl alcohol (4%), 2 ml.; Phosphate buffer (pH 7.2), 10 ml.; Enzyme solution, 5 ml.

脱色は 20 分間で行なわれた。脱色後, 冷却してからツンベルク管を開栓し, 50%磷酸 10 ml 及び珪藻土を加え, 混和後遠心分離する。上澄液を蒸溜して初溜 5 ml を取り, この 1 ml につき SCHIFF 試薬 1 ml, 5 N 硫酸, 1 ml を添加して 15 分間放置した。呈色は青紫色であって AC の生成が確められた。

以上本章に於て, 大腸菌を用いて ALA 脱水素酵素の存在が確められたわけであって, 前章に於て示された AC—ALA 間の可逆反応はこの酵素が行なうものと考えられる。

第6章 ALA 代謝に於ける磷酸の影響

第1節 脱水素速度に対する影響

磷酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.2) の添加量を変えて, ALA 脱水素速度を生菌体と酵素液とで比較した。基礎緩衝液は RINGER 液 (pH 7.2) を用いた⁴⁹⁾。

生菌体に於ては脱水素速度は磷酸濃度の増加と共に大となり, 磷酸濃度 1/210 M で最大となる。一方酵素液に於ては磷酸の影響は全く認められない。

なお生菌体による ALA 脱水素反応は硼酸緩衝液により阻害を受け、これにリン酸を添加しても活性度は回復されない⁴⁹⁾。

これらのことは生菌体の ALA 代謝には、リン酸に影響される反応と、影響されない反応(硼酸で阻害されない)とがあることを示している。

第2節 ALA 代謝に於けるリン酸の消長

大腸菌の洗滌菌体を用いて ALA を代謝せしめ、この際の無機リン酸の消長を測定した。LIPMANN³⁷⁾の方法により、無機リン酸分別を行ないリン酸を比色定量した。

即ち測定時に於て、直ちに反応液を氷冷し、氷冷せる5%三塩化酢酸5mlを加え混和後遠心分離して菌体を除き、上澄液0.5mlを円すい型遠心管にとり、チモール青を指示薬として中和し、塩化石灰アルコール溶液2.5mlを加え、遠心分離して沈澱を集める。これを1回沈澱剤にて洗滌し、塩酸にて溶解し直接リンを比色定量した⁴⁹⁾。

10分及び35分目に於て、1ml中70~80%の無機リンが減少している。この際、ALA無添加の場合は3%程度の減少が認められるのみであって、明らかに基質添加により無機リン酸が吸収されたことを示している。

これらのことは ALA がリン酸化を受ける可能性を示している。馬場³⁴⁾は黒カビでグリセリンよりモノアシルリン酸($\text{CH}_2=\text{CH}\cdot\text{CH}_2\text{O}\cdot\text{PO}_3\text{H}_2$)の生成を認め、これが Py に代謝されることを示しており、また AXELROD³⁾はレモンより得た acid phosphatase が nitrophenylphosphate よりリン酸を転移されてモノアシルリン酸を生成することを記している。

第7章 グリセリンの嫌気分解型式

本編で示された事項は次のように結論される。

- 1) *B. succinicum* はグリセリンを醗酵して、水素ガスと炭酸ガスとを発生する。
- 2) GP 醗酵速度は小さく、一方、三炭糖の醗酵速度はグリセリンのそれに匹敵することより C₃-系を経由する。
- 3) GS が醗酵されず MG が捕獲され、また醗酵されることより、MG 経由系の存在を判定した。
- 4) 醗酵される基質は Py を経由し、Py は加リン酸分解を受け、またリン酸欠下では、脱炭酸反応を受ける。
- 5) 以上の主要醗酵径路の他に TMG がグリセリンの還元によって生じ、これより OPA を経て、AC を生成する機構がある。
- 6) AC 生成径路は酵素的に証明された。
- 7) AC はさらに ALA 脱水素酵素によって ALA に還元される。
- 8) *E. coli* より ALA 脱水素酵素を抽出し、ALA 代謝にリン酸が関与することを示した。

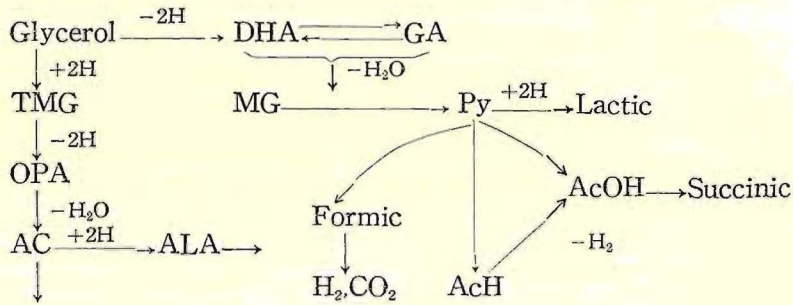


Fig. 39. Mechanism of Anaerobic Decomposition of Glycerol by Bacteria.

結 語

微生物によるグリセリン代謝機構について得られた結果について記述した。

1) グリセリン酸化機構には二つの系があり、一つは GP を経て酸化される系と他の一つは三炭糖を経て酸化される系とである。この両系の存在は微生物の種類によって異なり MAGASANIK, CHELDELIN 一派及び著者が判定した結果は Table 23 の如く示される。両系は pH と磷酸濃度によって支配される。

Table 23. Comparison of Metabolic Pathways of Glycerol within Some Microbes

Microbes	Pathway		References
	Glycerol \rightarrow GP	Glycerol \rightarrow Triose	
<i>S. sake</i>	-	-	OTSUKA & MASUDA ⁵³⁾
<i>H. anomala</i>	+	-	OTSUKA & MASUDA ⁵³⁻⁵⁴⁻⁵⁵⁾
<i>A. aerogenes</i>	+	-	MAGASANIK, BROOKE & KARIBLAN ⁴⁰⁾
	-	+	
<i>A. suboxydans</i>	+	+	KING & CHELDELIN ³³⁻³⁴⁾
<i>B. succinicum</i>	+	+	OTSUKA ⁵⁰⁻⁵¹⁾

- , Signifies, Absent ; + , Signifies, Present

2) TP 代謝に於て、TP が aldolase により C_3 -P 系によって代謝されることである。しかし、*H. anomala* 及び *B. succinicum* は TP を C_3 -化合物のまま分解する系もっており、この二つの系は磷酸濃度によって支配される。

3) C_3 -代謝系は一つは磷酸化されて TP を経由して上述の径路に入る系と、他の一つは磷酸の関与しない系との二つの系があることである。

4) 以上の酸化過程に於ては、いずれも Py を経由して炭酸ガスに分解する。また各系において磷酸濃度は重要な支配因子である。

5) 嫌気分解に於て (*H. anomala* は不活性) 主要径路は三炭糖の非磷酸過程で MG を經由するものであり、発生ガスは水素ガスと炭酸ガスである。

6) 嫌気分解には以上の他に TMG より AC を生成する機構が存在する。

以上明らかとなったグリセリン代謝機構を総掲したのが次の型式である。

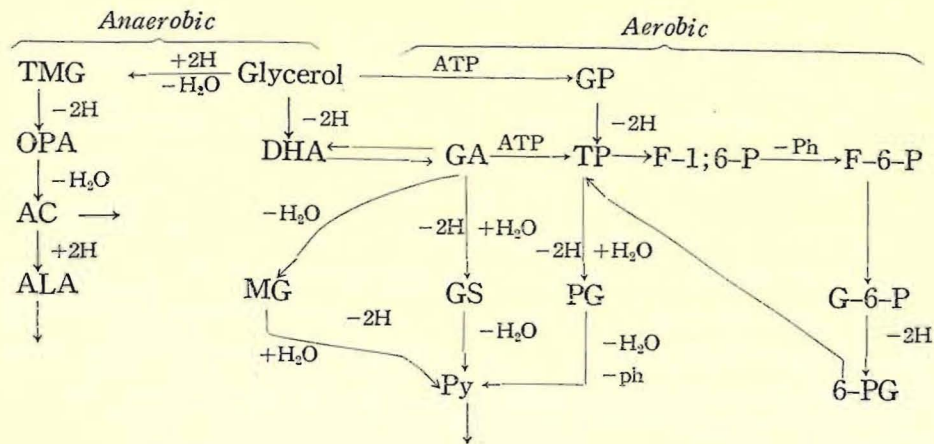


Fig. 40. Pathways of Decomposition from Glycerol to Pyruvate.

AC, Acrolein; ALA, Allyl alcohol; DHA, Dihydroxyacetone; F-1;6-P, Fructose-1;6-Ph.; F-6-P, Fructose-6-ph.; GA, Glyceraldehyde; GP, Glycerophosphate; G-6-P, Glucose-6-Ph.; GS, Glyceric acid; MG, Methylglyoxal; OPA, β -oxy-propionaldehyde; PG, Phosphoglyceric acid; 6-PG, 6-phosphogluconate; TP, Triose-ph.; TMG, Trimethylene glycol.

終りに臨み、本研究に関し終始御懇篤なる御指導を賜りました、東京大学教授坂口謹一郎先生、朝井勇宣先生、国税庁醸造試験所長山田正一先生、山梨大学醸造研究所長六所文三先生、多田靖次先生、小原巖先生に心から感謝と御礼を申し上げます。

なお、本研究の実験に心からの協力を戴きました増田博氏に厚く感謝致します。

文 献

- 1) ASNIS, R. E. and A. F. BRODIE : A glycerol dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **203**, 153 (1953)
- 2) AXELROD, B.: *Ibid.*, **172**, 1 ; **176**, 295 (1948)
- 3) 馬場真一郎 : 黒黴の酸酩酵に就て (第1報) Monopropen-(1)-ol-(3)-phosphorsäure (=Monoallylphosphorsäure) 農化, **19**, 183 (1943)
- 4) 馬場真一郎 : C₃-磷酸エステル並にグリセリンに関する生理学的研究 *Ibid.*, **19**, 651 (1943)
- 5) BANDURSKI, R. S. and B. AXELROD : The chromatographic identification of some biologically important phosphate esters. *J. Biol. Chem.*, **193**, 405 (1951)
- 6) BARKULIUS, S. S. et H. GEST : *Biochim. et Biophys. Acta.*, **11**, 306 (1953)
- 7) *Biochemical Preparations* : **1**, 28 (1949)
- 8) BRAAK, H. R. : *Onderzoekingen over Vergisting van Glycerine*. M. D. Meinema. Delft, Holland (1928) (transl.)
- 9) BUBLITZ, D. and E. P. KENNEDY : Synthesis of phosphatides in isolated mitochondria. III. The enzymatic phosphorylation of glycerol. *J. Biol. Chem.*, **211**, 951 (1954)
- 10) BUBLITZ, C. and E. P. KENNEDY : A note on the asymmetrical metabolism of glycerol. *Ibid.*, **211**, 963 (1954)
- 11) BURTON, R. M. and N. O. KAPLAN : A DPN specific glycerol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes*. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1005 (1953)
- 12) CAVALLINI, D., N. FRONTALI and G. TOSCHI : Determination of keto-acids by partition chromatography on filter paper. *Nature*, **163**, 568 (1949)
- 13) CLIFTON, C. E. : Microbial Assimilation. *Adv. in Enzymology*, New York, **6**, 269 (1946)
- 14) COZIC, M. : Oxidations and reductions brought by *Acetobacter xylinum*. *Compt. rend.*, **196**, 1740 (1933)
- 15) DICKENS, F. : Oxidation of phosphohexonate and pentose phosphoric acids by yeast enzymes. *J. Biochem.*, **32**, 1626 ; 1636 (1938)
- 16) EBEL, J. P. : Phosphates occurring in various living cells, II. Chromatographic and potentiometric study of the polyphosphates of yeast. *Bull. Soc. Biol. Chem.*, **34**, 330 (1952)
- 17) ENGELHARDT, V. A. und N. E. SAKOV : On the mechanism of the Pasteur effect. *Biochimia*, **8**, 9 (1943) (transl.)
- 18) EULER, H. v., E. ADLER and T. GUNTHER : Zur Kenntnis der Dehydrierung von alpha-Glycerinphosphosäure Tierkörper. *Z. phys. Chem.*, **249**, 1 (1937)
- 19) FREUND, A. : Über die Bildung und Darstellung von Trimethylenealkohol aus Glycerin. *Monatsh. Chem.*, **2**, 636 (1881)

- 20) FROMAGEOT, C. : The destruction of carbohydrate by *Bacillus coli*. Isolation of methylglyoxal. *Biochem. Z.*, **316**, 457 (1929)
- 21) GREEN, D. E. : alpha-Glycerophosphate dehydrogenase. *Biochem. J.*, **30**, 629 (1939)
- 22) GUNSALUS, J. C. and J. M. SHERMAN : The oxidation of glycerol by *Streptococcus faecalis*. *J. Bact.*, **49**, 347 (1945)
- 23) GUNSALUS, J. C. and J. M. SHERMAN : The fermentation of glycerol by *Streptococci*. *Ibid.*, **44**, 155 (1943)
- 24) 花井四郎, 正井成之, 佐々木定, 山田正一 : アルコールもろみ蒸溜中発生する刺戟性の物質について, 醸協 : **51**, 920 (1956)
- 25) HATTORI, Y. : Chromatographie sur papier concernant les dinitro-2, 4-phénylhydrazones d'aldéhydes et de acétones. *J. Sci. Res. Inst. (Japan)*, **50**, 51 (1956)
- 26) HAUGE, J. C., T. E. KING and V. H. CHELDELIN : Alternate conversions of glycerol to dihydroxyacetone in *Acetobacter suboxydans*. *J. Biol. Chem.*, **214**, 1 (1955)
- 27) HAUGE, J. C., T. E. KING and V. H. CHELDELIN : Oxidation of dihydroxyacetone via the pentose cycle in *Acetobacter suboxydans*. *Ibid.*, **214**, 11 (1955)
- 28) HUMPHREYS, F. B. : Formation of anolein from glycerol. *J. Infect. Diseases.*, **35**, 282 (1925)
- 29) 池田庸之助 : 糖酸酵に就て (第3報) リダクトン様物質の生成及びその抗菌性に就て, 農化, **26**, 90 (1952)
- 30) JOHNSON, M. T. : Role of aerobic phosphorylation in the Pasteur effect. *Science*, **94**, 200 (1941)
- 31) KALCKAR, H. : The nature of phosphoric esters formed in kidney extracts. *Biochem. J.*, **33**, 631 (1939)
- 32) KENNEDY, E. P. : Synthesis of phosphatides in isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **201**, 399 (1953)
- 33) KING, T. E. and V. H. CHELDELIN : Oxidative dissimilation in *Acetobacter suboxydans*. *Ibid.*, **198**, 127 (1952)
- 34) KING, T. E. and V. H. CHELDELIN : Phosphorylative and non-phosphorylative oxidation in *Acetobacter suboxydans*. *Ibid.*, **198**, 135 (1952)
- 35) LEPAGE, G. A. : Phosphorylated intermediates in tumor glycolysis. *Cancer. Res.*, **8**, 203 (1948)
- 36) LINDBERG, O. : Phosphorylation of glyceraldehyde, glyceric acid and dihydroxyacetone by kidney extracts. *Biochim. et Biophys. Acta.*, **7**, 563 (1951)
- 37) LIPMANN, F. and M. F. TUTTLE : Acetyl-phosphate. Chemistry, determination and synthesis. *Ibid.*, **153**, 571 (1944)
- 38) LYNEN, F. : Phosphatkreislauf und Pasteur-Effekt. *Intern. Symp. Enz. Chem.*, (1957)
- 39) LYNEN, F. and R. KOENIGSBERGER : The mechanism of the Pasteur reaction. The phosphate cycle in the yeast and the effect of 2, 4-dinitrophenol on it. *Ann.*, **573**, 60 (1951)

- 40) MAGASANIK, B., M. S. BROOKE and D. KARIBIAN: Metabolic pathways of glycerol dissimilation. A Comparative study of two strains of *Aerobacter aerogenes*. *J. Bact.*, **66**, 611 (1953)
- 41) MARVEL, C. S. and R. D. RANDS: Separation of organic acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2642 (1950)
- 42) MILLS, D. E., M. D. BAUGH and H. A. CONNER: Studies on the formation of acrolein in distillery mashes. *Appl. Microbiol.*, **2**, 9 (1954)
- 43) MICKELSON, M. M. and F. E. SHIDEMAN: The oxidation of glycerol by *Escherichia coli-aerogenes intermediates*. *Arch. Biochem.*, **13**, 437 (1947)
- 44) MICKELSON, M. M. and C. H. WERKMAN: The dissimilation of glycerol by *Escherichia coli-aerogenes intermediates*. *J. Bact.*, **39**, 709 (1940)
- 45) NEGELEIN, E. and H. J. WULFF: Crystallization of the protein of acetaldehyde reductase. *Biochem. Z.*, **289**, 436 (1937)
- 46) NEUBERG, C. and M. KOBEL: The presence of methylglyoxal as intermediate product in glycolysis. *Ibid.*, **193**, 464 (1928); **199**, 230 (1928); **203**, 463 (1928)
- 47) 能勢繁三郎, 卜部紫朗, 山下庄介: 酒精中の不純物に就て
醸協, **14**, 20 (1956)
- 48) 大村京生, 福土定雄: 燐酸エステルの沱紙クロマトグラフによる分離について
農化, **27**, 516 (1953)
- 49) 大塚謙一: 微生物によるグリセリン代謝機構に関する研究
(第1報) アリルアルコール脱水素酵素に就て, *Ibid.*, **24**, 460 (1951)
- 50) 大塚謙一: (第2報) グリセリン酸化酵素系に就て
Ibid., **27**, 580 (1953)
- 51) 大塚謙一: (第3報) グリセリン酸化機構に就て
Ibid., **28**, 11 (1954)
- 52) 大塚謙一, 増田 博: (第4報) 酵母によるグリセリン資化性に就て
山梨大醸酵研, **1**, 31 (1954)
- 53) 大塚謙一, 増田 博: (第5報) 酵母によるグリセリン酸化機構に就て (その1)
農化, **30**, 166 (1956)
- 54) 大塚謙一, 増田 博: (第6報) 酵母によるグリセリン酸化機構に就て (その2)
Ibid., **30**, 170 (1956)
- 55) 大塚謙一, 増田 博: (第7報) *Hansenula anomala* によるグリセリン酸化経路について
Ibid., **31**, 176 (1957)
- 56) REYNOLD, H., M. M. HOEHN and C. H. WERKMAN: Occurrence of acrolein as an intermediate during the fermentation of glycerol by *coli-aerogenes* bacteria. *Iowa State Coll., J. Sci.*, **13**, 275 (1939)
- 57) RENTSCHLER, H. and H. TANNER: Formation of bitterness in red wines. Acrolein in beverages and the relation to the formation of bitterness in wines. *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg.*, **42**, 463 (1951) (transl.)
- 58) SAKAGUCHI, K. and S. TADA: *Bacterium succinicum* nov. sp. *Zentr. Bakt.* II. Abt., **101**, 341 (1940)
- 59) SCOTT, D. B. M. and S. S. COHEN: Enzymatic formation of pentose phosphate from 6-phosphogluconate. *J. Biol. Chem.*, **188**, 509 (1951)

- 60) SERJAK, W. C., W. H. DAY, J. M. VAN LANEN and C. S. BORUFF : Acrolein production by bacteria found in distillery grain mashes. *Appl. Microbiol.*, **2**, 14 (1954)
- 61) TAKAHASHI, H. and K. SAKAGUCHI : Metabolism of citric acid in *Bacterium succinicum*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **1**, 99 (1955)
- 62) 高橋偵造, 朝井勇宜 : グルコン酸発酵に就て 農化, **11**, 1008 (1935)
- 63) 多田靖次 : 細菌による有機酸代謝に関する研究
Idid. **16**, 663 ; 675 (1940) ; **17**, 569 (1941)
- 64) TAVERNIER, J. and P. JACQUIN : Production anormale d'acroléine dans les cidres par voie microbiologique. *Ind. Agr. et Alim.*, **66**, (1949)
- 65) UMBREIT, W. W., R. H. BURRIS and J. F. STAUFFER : *Manometric techniques and related methods for the study of tissue metabolism*. Burgess Publ. Co. Mineapolis, Minesota, 163 (1951)
- 66) VIRTANEN, A. I., H. KARSTRÖM und O. TURPEINEN : Über die Vergärung von Dioxyaceton. *Z. physiol. Chem.*, **187**, 7 (1930)
- 67) VOISENET, E. : Formation d'acroléine dans la maladie de l'amertume des vins. *Compt. rend. (Acad. Sci.)*, **150**, 1614 (1910) ; **153**, 333, 898 (1911)
- 68) VOISENET, E. : Sur un ferment contenu dans les eaux agent de deshydratation de la glycérine. *Ann. Inst. Pasteur*, **28**, 807 (1914)
- 69) WARCOLLIER, G. and A. Le MOAL : The accidental presence of acrolein in the distilled liquor from cider. *Compt. rend. (Acad. Sci.)*, **194**, 1394 (1932)
- 70) WARCOLLIER, G., A. Le MOAL and J. TAVERNIER : The accidental presence of acrolein in cider, brandy and juice. Its formation from glycerol. *Ibid.* **198**, 1945 (1934)
- 71) WERKMAN, C. H. and GILLEN : Bacteria producing trimethylene glycol. *J. Bact.*, **23**, 167 (1932)
- 72) 山村雄一 : 結核菌の物質代謝 酵素化学の進歩, 共立, **2**, 270 (1950)