

ペクチン酸の代謝に関する研究

*Erwinia aroideae*による5—ホルミル—2—

ピロールカルボン酸の生成について

岡 本 賢 一・堀 井 佳 江

緒 言

Erwinia aroideae をペクチン酸を含む液体培地に培養すると、2～3日頃より培養液は赤褐色に着色し、しかも、この培養液をn—ブタノール・酢酸・水（4：1：2）を展開剤としてペーパークロマトグラフィーを行なうと、Rf 0.85附近にアニリン塩酸で黄色を与える新しい物質（以下便宜上未知物質Aと記す。）の生成が認められる。この褐色色素及び未知物質Aは培養の途中でトルエンを加え、細菌の発育を阻止することによって生成量が増加し、振とう培養を行なうか、ペクチン質以外の糖質を炭素源として用いた場合には、これら両物質の生成は認められない。このような現象は、ペクチン質を多く含む大根などが *Erwinia aroideae* に侵害され、軟腐する場合に見られる急激な褐変現象や、ペクチン質を含む発酵食品類の褐変反応となんらかの機構的な関連があるかも知れない。著者らは、これらのことを明らかにする意味で、まず、*Erwinia aroideae* のアセトン乾燥菌体抽出液、洗浄菌体などを用い、ペクチン酸反応液中に生成される赤褐色色素と、未知物質Aの生成機構及び未知物質Aの確認について検討した。その結果、未知物質Aが5—ホルミル—2—ピロールカルボン酸であることを確認すると同時に、それらの生成機構についてもある程度明らかにすることができた。

実験の方法と結果

1. 未知物質A及び赤褐色色素の生成について

(1) 供試酵素剤の調製

この実験に使用した酵素剤はペクチン酸1.0%、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.5%、 KH_2PO_4 0.1%、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.4%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%を含む pH6.98の液体培地に *Erwinia aroideae* を接種、27°Cで振とう培養した。20時間ののち遠心分離して菌体を集め、蒸留水で2回洗浄、つづいて0.01Mの磷酸塩緩衝液（pH6.98）で1回洗浄、これを同じ緩衝液に懸濁して洗浄菌体として使用した。また、菌体を蒸留水で洗浄したのち、常法に従ってアセトン乾燥菌体をつくり、この乾燥菌体に100倍量の蒸留水を加え、冷蔵庫内（4°C）に20時間放置して酵素を抽出し、遠沈除菌して上澄液を粗酵素液として用いた。

(2) 反応生成物の測定

反応液に生成される赤褐色色素の量は420m μ 、未知物質Aの生成量は300m μ における吸光度（いずれも液層1cm）を日立139型分光光電光度計を用いて測定した。ペーパークロマトグラフィーは東洋汙紙 No.51（2×40cm）を使用し、各反応液を0.1ml あてスポットし、n—ブタノール・酢酸・水（4：1：2）にて展開（上昇法）、風乾したのち、アニリン塩酸液、または、BPB0.1% アルコール溶液を噴霧し発色させ得られたペーパークロマトグラムを比較観察した。各表の結果、ペーパークロマトグラム欄のⅢ、一などの記号は、呈色したスポットの大きさ、色調の濃淡などにより感能的に判定したそれぞれの物質の量的な比較を示した

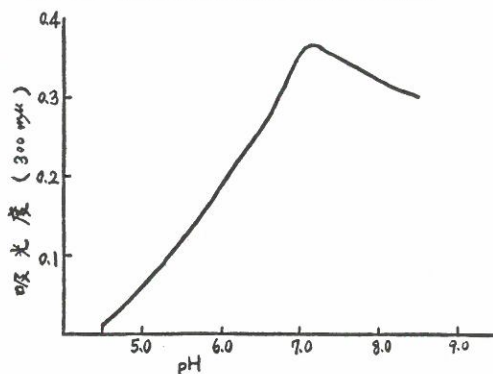
もので、 \equiv は非常に多く、 $-$ は全く生成していないことを意味している。なお、4・5-不飽和ジガラクトuron酸や、4-デオキシ-5-ケトフラクトuron酸^{1,2)}は常に標品を同時展開して比較検討した。

(3) 反応液のpHと未知物質Aの生成量

反応液の終末濃度は、ペクチン酸0.5%、
 燐酸塩緩衝液0.01M, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.4%に
 アセトン乾燥菌体抽出液を加えて総量を10ml
 となし、さらにトルエン0.1mlを加えて27°C
 で24時間反応させた。

反応後、蒸留水を加えて100倍に希釈し、
 300m μ における吸光度を測定し未知物質Aの
 生成量を比較した。結果は第1図に示す通り
 で、その最適pHは7.0~7.3である。

第1図 pHと未知物質A生成との関係



(4) 反応形式、トルエンの有無と未知物質A及び色素生成量

反応液の組成は(3)と同一とし、pHは6.98で第1表に示す5試験区を設定し、27°Cで24時間反応させた。その結果は第1表に示したようにトルエンを加えて静置反応させた時、未知物質A及び色素は最も多く生成される。

第1表 反応形式、トルエンの有無と未知物質A及び色素生成量との関係

区 分		結 果				
反 応 形 式	トルエン 有 無	吸 光 度		ペーパークロマトグラム		
		420m μ	300m μ	Rf0.25物質	0.32物質	0.85物質
静 置	有	0.71	0.36	\equiv	++	\equiv
〃	無	0.27	0.13	\equiv	+++	++
振 と う	有	0.20	0.10	±	+	+
〃	無	0.05	0.00	±	—	—

※ Rf 0.25 物質 …… 4・5-不飽和ジガラクトuron酸

〃 0.32 〃 …… 4-デオキシ-5-ケトフラクトuron酸

〃 0.85 〃 …… 未知物質A

※ 以後は省略する。

(5) 炭素源の種類、アンモニウム塩の有無と未知物質A及び色素生成量

反応液の終末濃度はペクチン酸、4・5-不飽和ジガラクトuron酸、グルコース、D-ガラクトuron酸はともに0.5%、燐酸塩緩衝液(pH6.98)0.01M, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.4%(含有区のみ)、アセトン乾燥菌体抽出液2.0ml、反応液の総量10mlとし、それにトルエン0.1mlを加えて、27°Cで24時間静置反応させた。結果は第2表に示したようにペクチン酸、4・5-不飽和ジガラクトuron酸を炭素源とし、アンモニウム塩の存在する区分にのみ両物質の生成が認められる。なお、吸光度とペーパークロマトグラムの結果とはよく一致していた。

第2表 炭素源の種類、アンモニウム塩の有無と未知物質A及び色素生成量との関係

区 分		結 果				
炭 素 源	アンモニウム塩	吸 光 度		ペーパークロマトグラム		
	有 無	420m μ	300m μ	Rf0.25物質	0.32物質	0.85物質
ペ ク チ ン 酸	有	0.82	0.42	+++	++	+++
	無	0.05	0.02	+++	+++	±
4・5 — 不 飽 和 ジガラクトuron酸	有	0.80	0.41	++	++	+++
	無	0.05	0.04	++	+++	±
D—ガラクトuron酸	有	0.04	0.01	—	—	—
グ ル コ ー ス	有	0.04	0.01	—	—	—

(6) 窒素源の種類と未知物質A及び色素生成量

第3表に示した各窒素源を、窒素に換算して同一量になるように、その他は(5)と同一条件でペクチン酸と反応させた。第3表に示したように窒素源の種類により生成量に差はあるがいずれも必ず生産される。アミノ酸の場合は10日後において、はじめてその生成が認められた。

第3表 窒素源の種類と未知物質A及び色素生成量との関係

区 分		結 果				
窒 素 源		吸 光 度		ペーパークロマトグラム		
		420m μ	300m μ	Rf0.25物質	0.32物質	0.85物質
(NH ₄) ₂ HPO ₄		0.63	0.34	+++	++	+++
(NH ₄) ₂ SO ₄		0.45	0.24	+++	++	++
NH ₄ NO ₃		0.21	0.14	+++	+++	++
L—グルタミン酸ソーダ		0.0(0.23)	0.0(0.16)	(++)	++	(++)
グ リ シ ン		0.0(0.25)	0.0(0.14)	(++)	++	(++)

() 内は10日後の結果、その間トルエンで防霉した。

(7) 4—デオキシ—5—ケトフラクチュロン酸より未知物質Aの生成

いままでの各種の生成条件に関する実験の結果から、未知物質Aは4—デオキシ—5—ケトフラクチュロン酸から非酵素的にアンモニウム塩と反応し、生成するものと考えられるのでこれらのことを確認する意味で4—デオキシ—5—ケトフラクチュロン酸を基質とし、第4表に示す各試験区を設定して検討をした。第4表のごとく未知物質Aはアンモニウム塩の存在で4—デオキシ—5—ケトフラクチュロン酸より非酵素的に生成される。

第4表 4—デオキシ—5—ケトフラクチュロン酸より未知物質Aの生成

区 分		結 果		
アンモニウム塩 の 有 無	酵 素 有 無	吸 光 度 300m μ	ペーパークロマトグラム	
			Rf0.32物質	0.85物質
有	有	0.2	++	++
無	有	0.02	+++	—

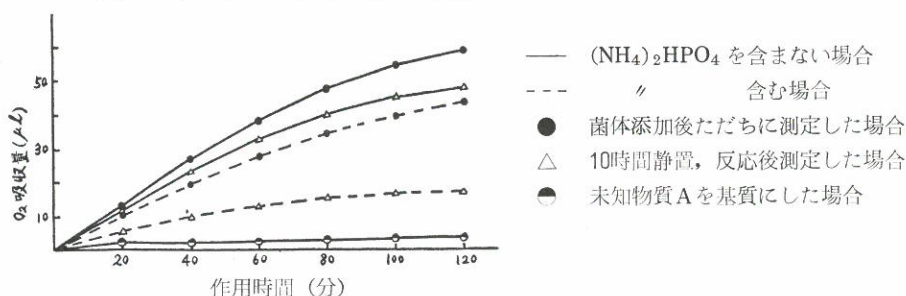
有	無	0.15	冊	±
有	加熱酵素	0.15	冊	±

(8) 未知物質Aの生成と呼吸の関係

トルエンを加えて静置反応させた場合に未知物質及び色素の生成量が多いこと、また培養時この両物質が生成した時は菌体の生成量が比較的少ないことが観察されるので、第2図に示した試験区を設定してペクチン酸に対する呼吸の速度を常法に従ってワールブルグ検圧計で測定した。結果は第2図に示したように未知物質Aは *Erwinia aroideae* の呼吸基質には利用されない。また、炭素源の不足は考えられないので未知物質Aの生成区の呼吸速度が減退していることは、あるいはこの物質が阻害的であることを示しているのかも知れない。

第2図

(NH₄)₂HPO₄の存在と呼吸速度との関係



2. 未知物質Aの確認について

(1) 未知物質Aの分離と結晶化

前述した方法により調製した *Erwinia aroideae* の洗浄菌体3gを0.1M磷酸塩緩衝液(pH6.98)に懸濁し、これをペクチン酸の溶液(pH7.0)に添加し、総液量を750mlとして30°Cにて48~72時間反応させた。反応液の組成はペクチン酸1.0%, 磷酸塩緩衝液0.01M, (NH₄)₂HPO₄0.4%, トルエン1.0mlを含む溶液である。赤褐色に着色した反応終了液は、まず硅藻土を汙過、除菌し、得られた澄明な汙液に1N H₂SO₄数滴を加えて微酸性としたのち、減圧下に100ml程度まで濃縮する。この濃縮液に更に1N H₂SO₄を加え、pH1.8に補正し、つづいて約20時間エーテル抽出を行なう。抽出部のエーテルを蒸発させると紫褐色の粗結晶物質が得られる。ついでこの結晶を50%温エタノールに溶解し、活性炭を加え脱色し、ガラスフィルターにて汙過、得られた澄明な汙液を放置冷却して黄色の針状結晶を析出させた。

この結晶を50%温エタノールより再結晶を繰り返し無色の針状結晶約0.2gを得た。この結晶物は、n-ブタノール・酢酸・水(4:1:2)を展開剤としてペーパークロマトグラフィを行なうと、反応液中の未知物質Aと全く同一のペーパークロマトグラムを与える。

また、BPBの0.1%アルコール溶液を噴霧すると黄色の酸性スポットを与える点も未知物質Aと同じである。これらのことからこの結晶物を未知物質Aとして以後の実験に使用した。

(2) 未知物質Aの性質

前記した無色の針状結晶物を用い、それぞれ常法に従って試験して得られた性質はつぎの通りである。

- 本物質の50%温エタノールよりの結晶は無色の針状結晶である。
- 本結晶は結晶水をもたない。

- c) 本物質は閉管中 180°C より徐々に褐変し、 207°C にて分解溶融した。
- d) 本物質は、エチルアルコール、メチルアルコール、アセトンに易溶、エーテル、水、クロロホルムにやや易溶、5%重炭酸ソーダに発泡して易溶、そして0.1%の50%エチルアルコール溶液のpHは3.0である。
- e) 本物質の元素分析値は第5表の通りで、 $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$ に相当する。

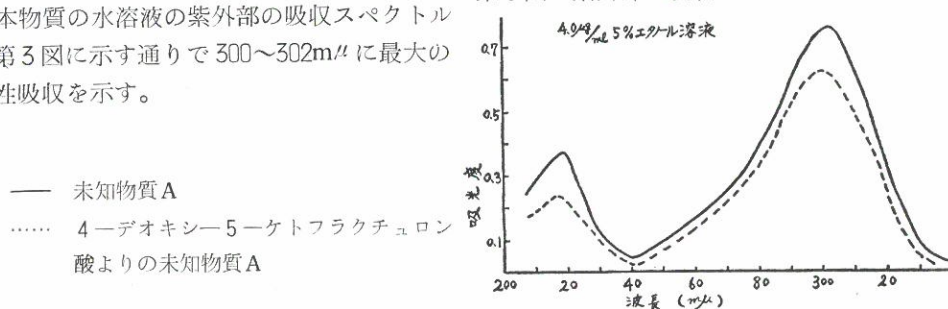
第5表 未知物質Aの元素分析値 (Nはケルダール法による分析値)

	C %	H %	N %
分 析 値	52.33	3.74	10.20
$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$ としての計算値	51.80	3.62	10.07

- f) 本物質をあらかじめ中和した50%エチルアルコールに溶解し、フェノールフタレインを指示薬として0.01N NaOHで滴定し、この滴定値より求めた分子量は一塩基性酸として138である。

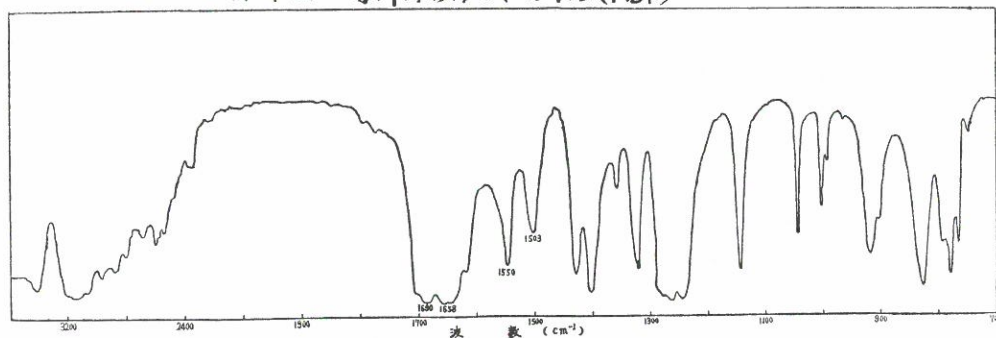
- g) 本物質の水溶液の紫外部の吸収スペクトルは第3図に示す通りで300~302m μ に最大の特長吸収を示す。

第3図 紫外部の吸収スペクトル



- h) 本物質の赤外部の吸収をKBr錠剤法で測定した結果は第4図の通りで、1690;—COOH, 1658;—CHO, 1550, 1503;C=Cの吸収と思われる結果を与えている。
- i) ピロール誘導体としての呈色反応、すなわち、松材反応³⁾、Ehrlich反応³⁾、Liebermann—Burchard反応⁴⁾、ニンヒドリン反応はいずれも陽性でピロール核の存在を示唆している。

第4図 赤外線吸収スペクトル(KBr)



- j) Tollens試薬⁵⁾、Bertrand試薬⁵⁾を直ちに還元し、O—ジアニシジン反応⁶⁾陽性、2・4—デニトロフェニールヒドラジン試薬と反応して直ちにヒドラゾンを与える。

また、過マンガン酸カリウムの硫酸々性溶液、臭素水を直ちに脱色し、その場合の臭素の消費量は本物質の分子量139.1と考えると1モルに対して0.93モルであった。

(3) —CHO基の位置について

いままでの実験から間違いなく本物質はピロール核の α か α' 位に—CHO基と—COOH基を有する物質と考えられるが、なお、確認の意味で脱炭酸反応による生成物の検討を行なった。すなわち、共通すり合せフラスコに未知物質A100mgをとり、これに無水炭酸ソーダを1.0g添加し、よく混和したのち、約22°Cに加熱、吸引乾溜すると硝子管壁に美しい無色の針状結晶が析出する。この結晶物の融点は42~43°Cで、別にピロールよりジメチルホルムアミド法⁷⁾により合成した α -ピロールアルデヒドと混融するも融点の降下を示さなかった。更に本結晶物20mgに、0.5mlの酢酸及び新たに蒸溜したフェニールヒドラジン0.5mlを混合し、水にて25mlとした液1.5mlを加えると直ちに白色のフェニールヒドラゾンを生ずる。これをよく洗浄し、リグロインから再結した無色針状晶の融点は139~139.5°Cで、 α -ピロールアルデヒドのフェニールヒドラゾンの融点⁸⁾と一致する。したがって未知物質Aはピロール核の α か α' 位に—CHO基を有することに間違いはない。

(4) —COOH基の位置について

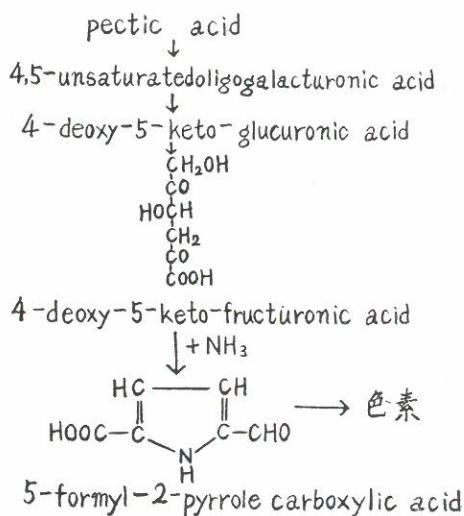
未知物質Aは脱炭酸が容易であること、その他から考えて、 α か α' 位にあると考えられるが、更にBambergerら⁹⁾の方法にならいピロール—2.5—ジカルボン酸を生成するかどうかについて検討した。すなわち、未知物質A250mgを水10mlと30滴(約2ml)の1NNaOH液に溶解し、これに過マンガン酸カリウムの粉末を少量あて加え、40°Cにて酸化する。酸化終了時(約60分)過剰の過マンガン酸カリウムをエチルアルコールと反応させ、二酸化マンガンをとして汙別する。汙液は冷時希硫酸で酸性としてエーテル抽出を行なう。抽出部のエーテルを蒸発させると無色の結晶が得られる。50%温エタノールから再結を繰り返し純化したこの結晶物の融点(分解点)は260°Cで、Ciamicianら¹⁰⁾のピロール—2.5—ジカルボン酸の値と一致する。また、この結晶を、あらかじめ中和した50%エチルアルコールに溶解し、フェノールフタレインを指示薬として0.01NNaOHで滴定し、その滴定値より求めた分子量は二塩基性酸として160で、ピロール—2.5—ジカルボン酸の155.1にはほぼ一致する。以上の実験から未知物質Aは5—ホルミル—2—ピロールカルボン酸であることを確認した。

考 察

アンモニウム塩を含むペクチン酸培養液は、*Erwinia aroideae* を静置培養するか、またはその酵素を作用させると、反応液の中に多量の5—ホルミル—2—ピロールカルボン酸を生成蓄積すると同時に赤褐色の色素を生成する。この5—ホルミル—2—ピロールカルボン酸の生成機構は第5図に示すようにペクチン酸はPreiss¹¹⁾、岡本²⁾らの報告のようにペクチン酸トランスエリミナーゼの作用をうけて4.5—不飽和オリゴガラクトン酸になり、更にこの種エリミナーゼ、その他の酵素の作用をうけて4—デオキシ—5—ケトフラクトン酸を生成する。この4—デオキシ—5—ケトフラクトン酸が反応し易い窒素化合物と反応して脱水し、ピロール核を形成、5—ホルミル—2—ピロールカルボン酸を生成するものと思われる。したがってグルコースやD—ガラクトン酸を炭素源とした場合は生成しないし、トルエンが存在しない場合、振とう培養をした際生成量が少ないのは第6図に示したように4—デオキシ—5—ケトフラクトン酸は更に代謝が進みアンモニウム塩などと反応する時間がないためと思われる。赤褐色色素の生成についてはまだ明らかでないが、4—デオキシ—5—ケトフラクトン酸は構造上分解し易く、着色物質を生成する可能性は多分にあるが、著者らの実験における着色は、この物質がいかに多く生成された場合でもアンモニウム塩が存在しな

第5図

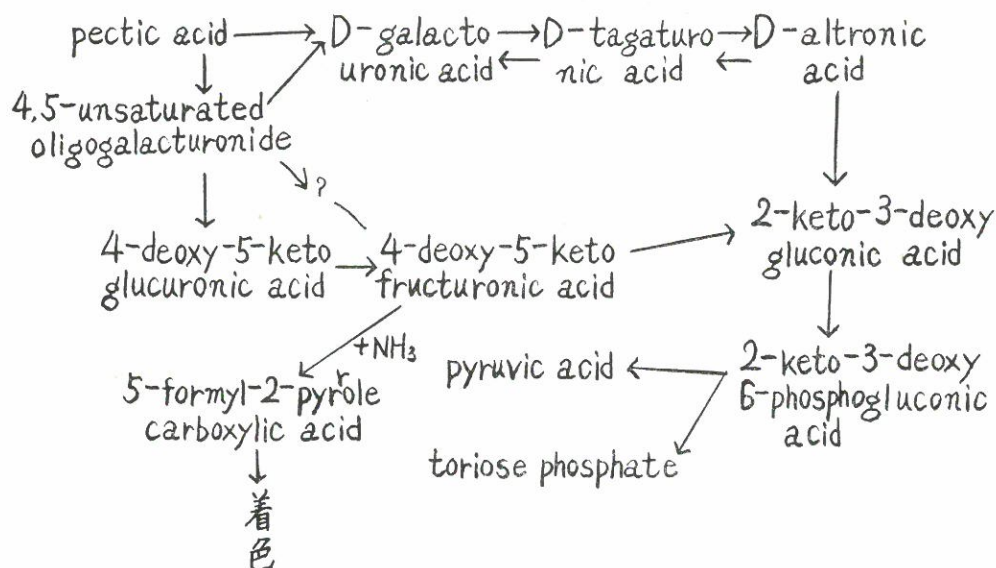
5-formyl-2-pyrrole carboxylic acid
の生成経路



い限り着色は起こらなかったことから考えて窒素化合物が着色の原因であろう。また、アンモニウム塩が存在した場合でも4-デオキシ-5-ケトフラクチュロン酸、5-ホルミル-2-ピロールカルボン酸が生成しない時にこの着色が見られたことはない。したがって確実なことはまだ不明であるが5-ホルミル-2-ピロールカルボン酸が着色の原因ではないかと考えられる。

ペクチン酸の代謝経路は第6図に示したように現在D-ガラクトチュロン酸を通る経路と、トランスエリミナーゼの作用をうけて代謝される経路が知られているが野菜類が軟腐する場合の褐変現象や、ペクチン質を含む発酵食品の着色反応において関与する微生物が、もしペクチン酸を4-デオキシ-5-ケトフラクチュロン酸を経て代謝する酵素系を含んでいるならば当然著者らの示した機構により5-ホルミル-2-

第6図 ペクチン酸の代謝経路



ピロールカルボン酸を生成し、着色の原因になっていると考えられる。また、発酵食品中にかりに5-ホルミル-2-ピロールカルボン酸が生成すると考えた場合、この物質が発酵食品の熟成、品質にどのような影響を与えるか興味ある問題である。

文 献

- 1) 岡本, 小沢 : 農学研究, 48, 39~47 (1960).
- 2) 岡本, 畑中, 小沢 : 農化誌, 38, 237~241 (1964).

- 3) 日本化学会編 : 実験化学講座, 21, 391 (1958).
- 4) 日本化学会編 : 実験化学講座, 22, 67 (1958).
- 5) 日本化学会編 : 実験化学講座, 16, 354 (1958).
- 6) F, Feigl : 有機ハン点分析, 212 (1956).
- 7) Smith : J. Chem. Soc, 3822 (1954).
- 8) 共立出版 : 化学大辞典, 8, 802.
- 9) Bamberger, E, Djerdjian. G : Ber, 33, 541 (1900).
- 10) G. L, Ciamician, P, Silber : Ber, 20, 2595 (1887).
- 11) J, Preiss, G, Ashwell : J. Biol. Chem, 238, 1577 (1963).