1. The conidia of Yellow-, Albino-type and green conidia of Yellow mutant produced by the addition of culture-filtrate of Albino mutant have been found to contain 4 nuclei.

The green conidia formed by mix-culture are somewhat multinucleate (4~8).

2. (i) In mix-culture of Yellow-type mutant (Y_1) and Albino-type mutant (Al_1), we have recognized two types of conidial heads. The one have entirely homogenous green and the another have three colored, white, yellow and green conidial chains.

(ii) The green heads produced by mix-culture of Yellow-type mutant (Y_1) and other species strains of *Aspergillus* or their culture-filtrates were homogenous.

3. While in the original Yellow- or Albino-type mutants, one nucleus moved into conidium from distal part of the sterigmata at the begining of the conidium formation, in the strains obtained by mix-culture of the both strains two nuclei migrated simultaneously in the rate of 50% of total conidial chains examined.

麴菌の生産する抗生物質 Oryzacidin に関する研究 (第 5 報)

β -Nitropropionic Acid の存在に就て

中 村 精 二 (東大農化, 山邑酒造), 下田忠次郎 (山邑酒造研究所)

昭和 29 年 7 月 26 日 受 理

[Studies on an Antibiotic Substance *Oryzacidin*, produced by *Asp. oryzae*.

Part 5. Existence of β -Nitropropionic Acid.

By Seiji NAKAMURA (Dept. of Agr. Chem., Fac. of Agr., Univ. of Tokyo)

and Chujiro SHIMODA (The Yamamura Sake-Brewing Laboratory)

緒 言

著者の一人下田⁽¹⁾は麴菌の 1 種(*Asp. oryzae* A-33) が抗火落菌性物質を生産することを発見し、その人工培養液からこの抗生物質を抽出し、キニーネ塩を経て遊離の結晶に単離して Oryzacidin と命名、その分子式は $C_8H_{13}NO_5$ なることを報告した。

著者等はその後 Oryzacidin の化学構造を究明すべく研究中であるが、その際前記の人工培養液中より抽出した粗曹達塩粉末中には Oryzacidin 以外に尙 1, 2 の有効物質の存在することを知つた。今回先ずその中の 1 物質を *S*-benzylthiuronium chloride 及びイオン交換樹脂 Amberite IR 120 処理により遊離の結晶として単離することに成功し、これが β -nitropropionic acid であることを証明し得たのでここに報告する。

尙 β -nitropropionic acid ははじめ hiptagenic acid と称せられ生物界に於ては 1921 年 GORTER⁽²⁾ によつて *Hiptage mandobla* という樹木の樹皮より分離された glycoside “Hiptagin” を加水分解して得られその後 CARTER 及び MCCHESENEY⁽³⁾ 等によりこれが β -nitropropionic acid と同一物質であることを証明された。又最近 (1951 年) M. T. BUSH⁽⁴⁾ 等によつて *Asp. flavus* が生産する抗生物質 “Flavicin” の抽出の際にその low potency の部分にこれの存在を発見せられている。同氏等は *Asp. flavus* の人工培養液より 4×4 Systematic multiple fractional extractor によつて isopropyl acetate 及びエーテルでこれを抽出している。

ともあれ β -nitropropionic acid が Oryzacidin と共存することは興味あることである。

実 験 の 部

(I) Oryzacidin Na 塩の抽出

Asp. Oryzae A-33 の培養濾液から Oryzacidin Na 塩粗粉末の抽出は第 1 報⁽¹⁾の方法で行つた。

即ち第 1 報記載の人工培養基 (蔗糖 500 g, ペプトン 200 g, KH_2PO_4 50 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 25 g, $CaHPO_4$ 25 g, 蒸溜水 10 l, pH 6.2) に *Asp. oryzae* A-33 を 25° 13 日間静置培養して得たる培養濾液を pH 2.5 となし、これを醋酸ブチルにて抽出後 2% 重曹水で pH 6.8 まで滴定、逆転溶した水溶液を凍結乾燥して Oryzacidin Na 塩粗粉末とした。培養濾液 12,730 l より 0.7 g の Oryzacidin Na 塩粗粉末を得た。このものは火落菌に対して 30% 加水清酒を試験液として 15 万倍の稀釈度に於てその發育を阻止した。

(II) β -Nitropropionic acid *S*-benzylthiuronium 塩の生成⁽⁵⁾と分離

Oryzacidin Na 塩粗粉末約 7 g をメタノールに溶解し不溶物を除去し、メタノールを減圧下に蒸発せしめシ

ラップ状とする。これを水に溶解しその水溶液に *S*-benzylthiuronium chloride の 15% アルコール溶液を少しく過剰に加え放冷すれば *S*-benzylthiuronium 塩の結晶が析出する。これを少量のアルコールより再結して白色針状の結晶約 1g が得られた (Table 1 参照)。収量は粗 Na 塩の 15% に相当する。このものは m.p. 137° (分解) で、温アルコール、アセトンに易溶、冷アルコールにやや難溶、水及びエーテル、ベンゾール、醋酸エステル、クロロホルム、石油エーテル、リグロイン等に不溶である。

Table 1. Isolation of β -Nitropropionic Acid from Crude Oryzacidin Na salt.

Calcd. for $C_{11}H_{15}N_2SO_4$: C 46.30%, H 5.27%, N 14.75%, S 11.22%. Found: C 46.56%, H 5.39%, N 14.81%, S 10.86%.

(III) β -Nitropropionic acid の分離

上記 *S*-benzylthiuronium 塩 1g をアルコール、水 (1:1) の混合溶媒 100 cc に溶解し予め 1N HCl で前処理して水素型にした陽イオン交換樹脂 Amberlite IR 120 を充填したイオン交換筒を通過せしむれば effluent は酸性 (pH 3.0) を示す。これを減圧下で蒸発乾涸して生ずる結晶をクロロホルムより再結すれば白色柱状の結晶 310 mg を得た (Table 1 参照)。尙又 *S*-benzylthiuronium 塩を dil. HCl 又は dil. H_2SO_4 に溶解して醋酸エチルにて抽出しても同様の結晶が得られる。但し収量は前記の方法に劣る。m.p. 67~8°. 水、アルコール類、醋酸エステル、温クロロホルム、アセトン、エーテルに溶解、冷クロロホルムに難溶、リグロイン、石油エーテル、ベンゾールに

不溶である。N を含むがハロゲン、S、P を含まない。

Calcd. for $C_3H_5NO_4$: C 30.22%, H 4.21%, N 11.75%, O 53.70%, M.W., 119.

Found: C 30.52%, H 4.30%, N 11.70%, O 53.48%, M.W. 123.5 (RAST method)

これを既往文献に徴するに β -nitropropionic acid に一致している。よつて著者等の得た結晶が果して β -nitropropionic acid と同一物であるか否か以下に述べる方法によつて検し、同一物なることを証明することが出来た。

(IV) 第一級ニトロ基の確認

本物質は Ninhydrin 反応は陽性で赤紫色に呈色するが VAN SLYKE 法によりアミノ態窒素は検出されなかった。然るに Victor MEYER 法⁽⁶⁾によりニトロ基の検出を試みた処第一級ニトロ基の存在を確認した。

(V) 赤外線吸収スペクトル⁽⁷⁾

本物質の赤外線吸収スペクトルは Fig. 1 の如くである。N に関する functional group は 3.0μ 附近に吸収がなく、 6.5μ (強)、 7.3μ (弱) に吸収があるので $-NO_2$ であることが確認され、残り 2 個の酸素については $3.5\sim 4.0$, 5.8 , 7.0 , 8.0μ

Fig. 1. Infrared absorption spectrum of β -nitropropionic acid from crude Oryzacidin Na salt.

附近 10.6μ (broad) より $-COOH$ である事はほぼ確実である。従つて nitropropionic acid であると推定された。

(VI) 電 圧 滴 定

本物質の水溶液につき Beckman 社製 Glasselectrode により電気滴定を行い中和曲線を求めると Fig. 2 に

示す如くである。

即ち本物質の結晶 52.1 mg を約 4 cc の予め CO_2 を除去した蒸溜水に溶解し 0.475 *N* NaOH 溶液により滴定して pH-滴定数 (mg. eq.) の曲線を求めた。この曲線から PK_1 3.55, PK_2 9.4, N.E. (Neutral equivalent) 119 なる値を得た。この結果は分子中に $-\text{NO}_2$ 基と $-\text{COOH}$ 基が各 1 個存在することを証明する。

(VII) 還元による β -Alanine の生成⁽⁸⁾

本物質 0.5 g を約 6 g の塩化第一錫と 3 cc の濃塩酸と共に攪拌しつつ長時間湯浴上で加温する。還元終了後更に錫と濃塩酸を加え、更に湯浴上で加熱した後水を加え、硫化水素を通じ過剰の錫を硫化錫として沈澱せしめ全液を湯浴上で加温後之を濾過して除去する。濾液は減圧で蒸発しシラップ状の還元生成物の塩酸塩を得た。このものは結晶しなかつたので次の如き方法で之が β -alanine 塩酸塩であることを証明した。

1) Paper chromatography: 生成物について paper chromatography を行つた。溶媒として Butanol; Acetic acid: 1% NH_4OH , 4:1:1 を用い発色試薬としては Ninhydrid 試薬を使用した。比較のため同様に β -alanine 塩酸塩結晶についても同様に行つた。 R_F 0.31 であつて β -alanine 塩酸塩の R_F と一致した (Fig. 3 参照)。

Fig. 3. Paper chromatograms of reduction product of β -nitropropionic acid

A.: Reduction product of β -nitropropionic acid from crude Oryzacinin Na salt (HCl salt)
B: Control β -alanine HCl salt

2) Benzoyl 化⁽⁹⁾: 生成物を SCHOTTEN-BAUMANN 法により benzoyl 化して β -benzoyl-alanine を生成せしめた。即ち上記還元生成物の塩酸塩 0.125 g に苛性曹達 4 mg を 1~2 cc の水に溶解し、更に重曹 0.36 g を加え、室温で強く振盪しながら benzoyl chloride 0.43 g を滴加し滴加後 30 分間強く振盪する。後濾過し濾液を硫酸で酸性にし生ずる沈澱を濾別して水洗後石油エーテルで数回抽出、不純物を水より再結すれば benzoyl 化物の結晶が 0.1 g 得られた。このものは m. p. 120° を示した。他方 β -alanine より同様の方法で β -benzoyl alanine を生成せしめたが m. p. 120° を示し、両者の混融点は降下を示さなかつた。

(VIII) β -Nitropropionic acid の合成

上述の結果より著者等の分離した結晶は β -nitropropionic acid であることは証明されたが更に J. LEWKOWITSH^(8,4)等の方法によつて之を合成して確証した。即ち 9.6 g の β -iodopropionic acid と 7.7 g の亜硝酸銀に水 50 cc を加えて常温で長時間攪拌し、更に 40 g の亜硝酸銀を加えて攪拌する。反応終了後活化銀の沈澱を除き、濾液に濃塩酸を加えて生ずる塩化銀の沈澱を除き、更に塩酸を加えて液を塩酸酸性にし液の 4 倍量のエーテルで抽出し、エーテル溶液を硫酸マグネシウムで脱水後減圧下でエーテルを除き、デシケーター中に放置すれば β -nitropropionic acid の結晶が得られる。これをクロロホルムより再結して約 1 g の結晶を得た。m. p. $67\sim 68^\circ$ 、前記 Oryzacinin Na 塩粗粉末より分離した結晶と混融したが融点降下はなかつた。

(IX) 抗菌力価の測定

β -Nitropropionic acid の火落菌に対する抗菌性は第 1 報に記載した方法⁽¹⁾ (稀釈法) によつて検定した。即ち防腐剤不含清酒に 30% 加水し、これを 10 cc 宛試験管にとり一定量ずつの β -nitropropionic acid を加え、予め肝片清酒培養基と培養した基本火落菌培養液を 1 滴加え、ゴム栓を固く施して 30° 28 日間に亘つて火落菌の繁殖状態を観察した。その結果 β -nitropropionic acid は 3 万倍稀釈により火落菌の繁殖を阻止することが判

Fig. 2. Electronic titration with glass electrode

Subst 52.1 mg.

0.475 *N* NaOH added

N.E. = $\frac{52.1}{0.435} = 119$ N.E.; neutral equivalent.

明した。但し *Bac. mesentericus vulgatus* に対しては Oryzacidin と異り抗菌力を示さなかつた。この点抗菌力価より考えても本物質は Oryzacidin と異なるものであると推定される⁽¹⁰⁾。

(X) 毒 性 試 験

マウス尾部に静脈内注射を行つた。体重約 17.5 g のマウスに対し 140 mg/kg の注射では毒性は認められなかつたが 1 回注射 280 mg/kg に達すれば 24 時間後に斃死した。

総 括

1) *Asp. oryzae* A-33 は抗火落菌性物質 Oryzacidin と同時に尙 1, 2 の他の有効物質を生成する。その中の 1 物質を Oryzacidin Na 塩粗粉末より S-benzylthiuronium 塩をへて結晶状に単離した。

2) このものは m.p. 67~68°, 分子式は $C_3H_5NO_4$ で第一級ニトロ基の呈色反応を示し、赤外線スペクトルによつて -COOH 基及び -NO₂ 基の存在を確認し、電気滴定により PK₁ 3.55, PK₂ 9.4, N.E. 119 であることを知つた。又還元によつて β-alanine を生成する事実よりこのものが β-nitropropionic acid であることを証明し、更に β-iodopropionic acid と亜硝酸銀とから合成して混融によつて確証した。

3) β-Nitropropionic acid は火落菌に対して 3 万倍稀釈に於て抗菌性を示す。しかしながら本物質は Oryzacidin と異り *Bac. mesentericus vulgatus* に対しては抗菌力を示さない。

毒性についてはマウス尾部静脈内注射 140 mg/kg では毒性を示さなかつたが 280 mg/kg に達すると 24 時間後に斃死した。

本研究は東京大学住木諭介教授御指導の下に同教授研究室に於て主として行われたものである。御懇篤な御指導を賜つた同教授に深甚の謝意を表するものである。又本研究に対し御鞭撻を賜り発表を許可せられた山邑酒造株式会社々長山邑太左衛門氏、又種々御協力を得た住木研究室の各位に深謝する。特に β-nitropropionic acid の合成には青木博夫氏をわずらはし寺尾道也氏は各実験に協力された。又試料の抽出、培養、検定等は西脇幸喜・国定則行両氏が協力された。又赤外線スペクトルは東大工学部工業分析化学教室鎌田仁氏に解析していただいた。元素分析は東大農化分析室に御願ひした。謹しんで之等の方々に感謝の意を表する。

(昭和 29 年 4 月 2 日日本農芸化学会大会にて講演)

(1) 下田 : 農化, 25, 254 (1951).	58, 1004 (1936).
(2) K. GORTER <i>Chem Abstr.</i> 15, 1299 (1921).	(6) W. J. HICKINBATTOM : Reaction of Organic Compound. 355 (1950).
(3) C. L. CARTER, W. J. MC CHESNEY : <i>Nature</i> , 164, 574 (1949).	(7) 鎌田, 田中 分析化学, 3, 264 (1954).
(4) M. T. BUSH, D. T. TONSTER, J. E. BROCKMAN : <i>J. Biol. Chem.</i> , 188, 685 (1951).	(8) J. LEWKOWITSH : <i>J. prakt. Chem.</i> , 20, 159 (1879).
(5) J. J. DONLAVY : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> ,	(9) 赤堀 : アミノ酸及蛋白質, 209 (1949).
	下田, 西脇 : 農化, 28, 832 (1954).

Summary

As reported in the previous paper, one of the authors (SHIMODA) isolated a new antibiotic substance, "oryzacidin", effective against the "Hiochi" bacteria responsible for the putrefaction of Saké from the broth of a strain of *Asp. oryzae*.

But further investigations showed that in the culture medium there were one or two other antibiotic substances effective against "Hiochi" bacteria as well as oryzacidin.

We have isolated one of these antibiotics in the crystalline form as its S-benzylthiuronium salt, needles, m.p. 137° (decomp.), from crude Na-oryzacidin powder, and as its free acid, needles, m.p. 67-8°, from the thiuronium salt passing through Amberlite I.R. -120.

It is soluble in water, alcohol, ethyl acetate, acetone, ether and hot chloroform, fairly soluble in cold chloroform and insoluble in ligroin, petroleum ether and benzene.

From the analytical data, the molecular formula of the free acid was found to be $C_3H_5NO_4$. On the functions of the nitrogen and oxygen, the existences of one nitro and one carboxyl groups were identified from the results of the electrometric titration, Victor MEYER nitrosation test, and infrared absorption spectrum. Reducing with stannous chloride and hydrochloric acid, β-alanine was obtained from its free acid.

From these experiments described above, it was concluded that this new antibiotic is identic-

al with β -nitropropionic acid. Moreover, the synthesized β -nitropropionic acid from β -iodo-propionic acid gave no depression of the melting point when mixed with the substance isolated from broth.

The β -nitropropionic acid inhibited the growth of "Hiochi" bacteria at a dilution of 1:30,000 in the Saké medium.

There was found no toxicity in the intravenous injection of 140 mg per Kg of mice but mice succumbed within 24 hours to injection of 280 mg/kg.

精油類のラマン効果に関する研究 (第 1 報)

しょう脳白油ピネン分の分析とその異性化

片岡 眞一, 中野 操子 (日本専売公社中央研究所)

昭和 29 年 7 月 27 日 受理

Raman Effect in Essential Oils. Part 1. Analysis and Isomerization of Pinene Fraction in Camphor White Oil.

By Shin'ichi KATAOKA and Misako NAKANO (Central
Laboratory, Japan Monopoly Corporation)

しょう脳白油は α -pinene, camphene, β -pinene, cineol, dipentene 及び limonene などからなっており, cineol, dipentene 及び limonene はこれを分離して利用されている。而してこれらを分離した低沸点部の pinene-camphene 溜分即ちしょう脳白油ピネン分はテレピン油類似品として溶剤, 選鉱剤などに用いられているが, 特有の臭気をもっておりその商品価は低い。そこでこの利用途の一つとしてテレピン油と同じくカンフン異性化触媒で処理してみたところ, その異性化率はかなり低くそのままでは合成しょう脳原料として用いることが出来ない。その原因を明らかにするためラマンスペクトルと精溜法を併用して主要成分の分析を行い, また各成分の蒸溜による分離状況を検索し, あわせてその異性化試験を行つた結果, しょう脳白油ピネンは精溜によつて各成分を分離利用すれば合成しょう脳原料として十分使用しうることを認めた。

原油のラマンスペクトルには主成分である α -pinene, camphene, β -pinene のラマン線のほか cineol, dipentene の強いラマン線が観測され, これら異性化反応に関与しない成分が相当量混入していることが認められた。そこでこれらラマン線を詳細にしらべまた各成分の蒸溜による分離状況について検索するため, 原油を理論段数約 18 段の所謂 Fenske の packing column で精密分溜し各溜分のラマンスペクトルからその成分の検出を行つた。また 2, 3 のラマン線を用いてその強度を純粋物質のそれと比較し原油及び各溜分の組成を半定量的に測定した結果, α -pinene 及び camphene は低沸点部に集積し cineol, dipentene 及び limonene 部と完全に分離することを確かめた。依つてこれら各溜分について異性化試験を実施し低沸点部はテレピン油とはほぼ同等の異性化率を示すことを認めた。従来の分析法としては *o*-Cresol 法による cineol の定量及び酢化後の鹼化価による camphene 量の推定のほかなく, これらテルペン炭化水素混合物中の各成分の含量などについては不明確のまま残されていたのであつて, ラマンスペクトルをこれら成分の定性及び定量分析に用いてその監視を行うことによつて試料の純度や不純成分の推定或いは蒸溜によるその分離状況など従来不明確であつた点を比較的簡単に明らかにしえた。

実 験 の 部

1. 試料 試料とした原油は再製樟脳株式会社でしょう脳白油を蒸溜してえた低沸点部のピネン分で下記の性質をもつ淡黄色油である。この原油 800 g を精溜塔で reflux ratio 10:1, 圧力 30 mm として精密分溜し 100 cc ずつ 9 溜分に分別した。精溜塔は充填塔であつて精溜部分は内径 12 mm, 長さ 100 cm のガラス管に径 0.25 mm の 18-8 stainless wire を直径 2.0 mm の ring とした所謂 Fenske ring を約 10 万個充填したもので充填部分は 900 mm である。理論段数は CCl_4 -benzene 混合系で測定の結果 18 段であつた。原油及び各溜分を使用直前再溜してラマンスペクトルを撮影した。その性質は Table 1 の如くである。