Summary

The mucilage was refined by "Copper-sulfate method" and used for the investigation (its ash content was 0.15%).

(1) The mucilage was a white amorphous powder which did not reduce Fehling's solution, and it gave no blue coloration with iodine and gave positive naphthoresorcin test of uronic acid and their anhydrides.

(2) The reducing sugar obtained by hydrolysis of the mucilage with dilute mineral acid(2-10%) under normal pressure was less than 66.5% of the mucilage as glucose. The low value might be owing to the producing of Di- or Tri-saccharide as a result of hydrolysis.

(3) From the quantitative analyses of sugar components, it was made clear that the mucilage has only two components, rhamnose and gaacturonic acid, and the molecular ratio between these two components was about 1:2.

Penicillium chrysogenum Q-176 による Phenylacetic Acid

の酸化的代謝に関する研究 (第 8 報) Phenylacetic Acid より

代謝生成されるニトロ化合物について (その 1)

ニトロ化合物の分離及びその定性的性質

磯 野 正 雄 (武田薬品工業株式会社大阪工場)

昭和 29 年 4 月 1 日 受 理

Oxidative Metabolism of Phenylacetic Acid by *Penicillium chrysogenum* Q-176. Part 8.

Production of a Nitro Compound on the Phenylacetic Acid Metabolism.

(1) Isolation of the Nitro Compound and its Qualitative Properties.

By Masao ISONO (Osaka Factory, Takeda Pharmaceutical Industries Ltd.)

著者は phenylacetic acid (PAA) の代謝中間物質として 2-hydroxyphenylacetic acid (2-OH-PAA) の生成を確認して第 3 報⁽¹⁾に報告したが、更に中間代謝物を検索する目的で諸種の培養条件に於ける PAA の添加培養を試みた。第 2 報⁽²⁾で述べたように PAA 酸化能の至適 pH は 5.6 附近で、これよりアルカリ側に傾くと酸化能は徐々に低下する事実に着目し、アルカリ性に於ける PAA 添加培養にあつては未知代謝中間体の集積が認められないかと考えるに至つた。著者はこの見解にもとづいて PAA 添加培養に際し過量の CaCO_3 を加え pH 7.5~8.0 の培養を行つてみた。その結果培養濾液には PAA を添加培養した時のみ FeCl_3 反応によつて赤色を呈する物質の生成を認めることが出来た。この物質は培養濾液の濃縮液から ether で 2-OH-PAA と同時に抽出され、融点 148~9° を示し分子式 $\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_5\text{N}$ に相当する黄色針状結晶として単離された。定性的試験の結果、本物質は文献未知のニトロ化合物と推定され、微生物の生成するニトロ化合物として特に興味深い。

〔I〕 実験 及 び 結 果

I. 含窒素化合物の単離

3l 容振盪フラスコを用い、培地、培養条件及び使用菌株は 2-OH-PAA の分離⁽¹⁾に実施した時と全く同様に行つた。ただし培養全期間を通じて培地の pH を 7.5~8.0 に保つため、培養 48 時間後と 96 時間後とに粉末 CaCO_3 をそれぞれ 5 g 及び 2.5 g 添加し、更に培地が酸性に傾く時は 10% NaOH を加えて pH を調整した。

培養 168 時間後にブフナーの漏斗で菌体を濾別し、濾液に H_2SO_4 を加えて pH 3~4 に下げしばらく放置して生ずる凝固蛋白を濾別した。除蛋白濾液を NaOH で完全に中和して 60° 内外で約 1/10 容に減圧濃縮した。濃縮液を再び H_2SO_4 で酸性としてから濾過し、まず ether で 6~8 時間連続抽出を行い 1st Ether Fraction

を得た。抽出母液を更に ether で 18~20 時間連続抽出し淡黄色の 2nd Ether Fraction を得た。

1st Ether Fraction からは第3報⁽¹⁾記載の処理により未代謝の PAA と 2-OH-PAA とが得られた。

2nd Ether Fraction には FeCl_3 反応により赤色を呈する物質が含まれており、ether を溜去すると直ちに1種の結晶が析出した。この結晶を数度水から再結晶して帯黄色針状ないし板状の結晶が得られた。その収量は

非常に少なく 2-OH-PAA の 1/7~1/10 程度であつた。しかしこの結晶は 90~95° の間に緩慢に熔け鋭敏な融点を示さなかつたので、更に benzene と水とから交互に再結晶を繰返したところ融点 148~9° を示し FeCl_3 反応を顕著に呈する黄色針状結晶を分離することが出来た。この結晶はもはや再結晶を繰返してもその融点及び元素分析値が不変であつたから純粋であると認められた。

この元素分析値並びに分子量の測定結果は次のとおりでその分子式は $\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_5\text{N}$ に相当する。

Analysis: Calculated for $\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_5\text{N}$			
	C 48.74,	H 3.58,	N 7.11.
Found,	" 48.78,	" 3.74,	" 7.31.
	" 48.88,	" 3.62,	" 7.15.
Molecular Weight: Calcd. for $\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_5\text{N}$			
			197.14.
Found,			190±10.

含窒素化合物は PAA の代りに 2-OH-PAA の添加培養に於ても同様に生成されるが、これらの芳香族化合物を添加せずに培養した時には全くその生成が認められなかつた。すなわち含窒素化合物は *Pen. chrysogenum* Q-176 により生成される PAA の代謝生成物の1つであり、かつ 2-OH-PAA の下位代謝物であると考えられる。

Fig. 1. Summary for the Isolation of an Unknown Nitro Compound from the Phenylacetate Culture Broth.

II. 含窒素化合物の定性的試験

(1) 物理化学的性質 前記のように融点 148~9° の黄色針状結晶で、ethanol によく溶解し、水、ether、benzene 及び chloroform には冷時やや溶ける程度であるが熱時はかなりよく溶ける。また試料を小試験管に入れて熔融すれば一部昇華して管壁に針状ないし板状の結晶を附着する。

(2) COOH 基の存在 試料は下記の試験結果からモノカルボン酸と推定された。(a) 水溶液の性質：水溶液は酸性を呈し、酸性溶液からは ether に抽出されるが中性またはアルカリ性溶液からは全く抽出されない。(b) ヒドロキシ酸の生成⁽³⁾：thionyl chloride と作用させると酸クロリドを生じ、これに NH_2OH を加えればヒドロキシ酸を生成して FeCl_3 により呈色する。(c) 中和等量：アルカリ滴定によつて求められた中和等量値は大略試料の分子量 (197) に一致する。

(3) フェノール性 OH 基の存在 試料は FeCl_3 反応を呈するほか、MILLON 反応及び LIEBERMANN のニトロソ反応⁽⁴⁾を呈するからフェノール性 OH 基を持つと推定される。

(4) NO_2 基の存在 試料は Biuret 反応、Ninhydrin 反応、SAKAGUCHI 反応のいずれも陰性であり、下記のように還元の種類によつてヒドロキシルアミン、ニトロソ化合物及び第1級アミンを与えるからニトロ基を持つと推定される。(a) アルカリ溶液に於ける変色：多くのニトロフェノール類と同様に試料の水溶液は黄色を呈し、アルカリ性となれば赤橙色に変ずる。(b) ヒドロキシルアミンの生成： CaCl_2 の存在で Zn 末還元を行えばヒドロキシルアミンを生成し TOLLEN のアンモニア性硝酸銀溶液を還元する。(c) ニトロソ化合物の生成⁽⁵⁾：電解還元によつてニトロソ化合物を生じ、sodium pentacyanoamineferate* による呈色を示

* Sodium pentacyanoamineferate ($\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]$) は sodium nitroprusside を2倍量の濃アンモニア水に溶かし冷所に放置して析出する黄色結晶を分離し、ethanol で洗滌して調製した。

す。(d) 第 1 級アミンの生成: $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ による還元によつて第 1 級アミンを生成し, ギアゾ反応** 及び FOLIN の β -naphthoquinone sulfonic acid 反応⁽⁶⁾を呈する。

(5) ラクトンの生成 試料の少量を小試験管にとり, 加熱して融点附近に放置すれば試料は熔融して褐色化する。この処理により試料の一部は昇華するがその量は僅かで, 試料は大略 1 分子量に相当する水を失う。熔融処理後の試料は少量かつ着色が著しいため精製してその融点及び元素分析値を測定出来なかつたが, NH_2OH と容易にヒドロキサム酸を作り FeCl_3 によつて呈色⁽³⁾するから熔融によつて得られた試料はラクトンと考えられる。また熔融前の試料は全くこの反応を示さない。

III. 含窒素化合物の赤外部吸収スペクトルの分析

未知含窒素化合物の構造を推定する一助として Perkin Elmer double beam infrared recording spectrophotometer を用い赤外部吸収スペクトルを測定した。なお測定に使用した試料は Nujol oil によく摩砕して paste 状として用いた。

Fig. 2 は未知試料の吸収スペクトルで, これを解析すれば, (a) 3.5μ 及び 6.9μ の吸収は $-\text{CH}_2$ 及び $-\text{CH}$ の存在を, (b) 5.8μ の吸収は $-\text{COOH}$ の存在を, (c) 6.2μ の吸収は benzene 核の存在を, (d) 6.5μ 及び 7.3μ の吸収は $-\text{NO}_2$ の存在を, (e) 8.4μ の吸収は phenol 核の存在をそれぞれ示し, 未知窒素化合物の定性的試験の結果と一致した。即ち未知窒素化合物には COOH 基, フェノール性 OH 基及び NO_2 基が存在する。

Fig. 2. Infrared Absorption Spectrum of the Unknown Compound.

〔II〕 考 察

著者が PAA の代謝生成物の 1 つとして分離した含窒素化合物は, その定性的性質からフェノール性 OH 基と NO_2 基を持つ芳香族モノカルボン酸と考えられ, このうち $\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_5\text{N}$ の化合物は nitro-hydroxyphenyl acetic acid かまたは nitro-hydroxy-methylbenzoic acid のいずれかである。以上 2 種の化合物のうち FeCl_3 反応により赤色を呈するものは一般に OH 基と COOH 基または COOH 基を有する側鎖が互に *ortho* 位を占めることが必要である。またラクトン形成の事実は OH 基と COOH 基を有する側鎖が互に *ortho* に位置することを示すと同時に OH 基の *ortho* 位は COOH 基が直接 benzene 核に附着するものでなくその側鎖が $\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$ であることを示し, したがつて本物質は 2-OH-PAA のニトロ誘導体の 1 つと考えられる。また生体の脂肪酸酸化は一般に β 位に於て行われ α 位は酸化を受けがたいため, PAA 代謝に於ても側鎖の $\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$ は酸化されず中間代謝物として 2-OH-PAA が生成されるのであるから, 以上の推定構造は生化学的見地からも妥当である。

2-OH-PAA のニトロ誘導体には下記の 4 種が考えられ, このうち文献既知物質は 5-nitro-2-hydroxyphenyl-acetic acid (III) のみで他は全くその報告を見ない。(III) は古く HILL⁽⁸⁾ により合成された融点 162° の白

** ギアゾ化後 coupling reagent として β -diethylaminoc- α -naphthylamine (津田試薬) を加えれば赤紫色を呈する。

(I)

(II)

(III)

(IV)

色結晶であるから著者が分離したニトロ化合物の融点(148~9°)よりかなり高く両者は同一物質と考えられない。したが

つてこの物質の構造はニトロ基の位置を決定することにより確定するものと考えられる。

微生物の生成するニトロ化合物は非常に珍らしく、chloranphenicol の発見以来わずかに BUSH, TOUSTER, BROCKMAN⁽⁷⁾ が *Asp. flavus* の培養濾液から β -nitropropionic acid を分離証明したのみである。したがって著者の分離した物質は *Pen. chrysogenum* Q-176 の PAA 代謝生成物質の1つであると共に微生物の生成するニトロ化合物である点で特に興味深いものがある。

[III] 要 約

(1) *Penicillium chrysogenum* Q-176 の phenylacetic acid 添加培養に於て培地の pH を常にアルカリ性に保つた場合、FeCl₃ 反応によつて赤色を呈する物質の生成を認めた。

(2) FeCl₃ 反応により赤色を呈する物質は培養濾液から濃縮、ether 抽出等の操作によつて単離することが出来た。

(3) 本物質は黄色針状の融点 148~9° を示す物質で、その分子式は C₈H₇O₅N に相当する。

(4) 定性的試験の結果、本物質はフェノール性 OH 基と NO₂ 基とを有する芳香族モノカルボン酸と推定された。

(5) ラクトン形成の事実からその構造が 2-hydroxyphenylacetic acid のニトロ誘導体であると推定された。

終りに臨み御懇篤な御指導を賜わつた坂口謹一郎先生、住木諭介先生並びに有馬啓助教授、武田酸酵研究所、所長佐藤喜吉博士並びに阿部又三博士に謹んで御礼申し上げますと共に、終始御指導と御鞭撻を賜わつた課長日下綱治博士に深謝の意を表します。なお赤外線吸収スペクトルの測定を担当された当研究所神尾英雄氏と元素分析を担当された研究所分析室の諸氏に感謝します。また本研究の発表を許可された工場長岡見清二氏並びに製薬部長倉林育四郎氏に併せて深甚の謝意を表します。

- (1) ISONO, M. : *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 27, 255 (1953).
- (2) ISONO, M. : *ibid*, 27, 198 (1953).
- (3) FEIGL, F., ANGER, V., and FREHDEN, O. : *Mikrochemie*, 15, 9 (1934).
- (4) LIEBERMANN, C. : *Ber.*, 7, 248, 806, 1098 (1874).
- (5) FEIGL, F., ANGER, V., and FREHDEN,

- O. : *Mikrochemie*, 15, 181 (1934).
- (6) FOLIN, O. : *J. Biol. Chem.*, 51, 377, 393 (1922).
- (7) BUSH, M. T., TOUSTER, O., and BROCKMAN, J. E. : *J. Biol. Chem.*, 188, 685 (1951).
- (8) HILL, H. B. *Aem. Chem. J.*, 24, 1 (1900).

Summary

(6) The author investigated the culture of *Penicillium chrysogenum* Q-176 in an alkaline medium, and found the presence of a phenylacetic acid metabolite which gave a red coloration with the FeCl₃ reaction in the culture liquid.

(2) This metabolite was isolated as fine yellow needles from the concentrated culture liquid by the ether extraction.

(3) This crystalline product had the melting point of 148~149° and a molecular formula of C₈H₇O₅N.

(4) Qualitative examinations of this product indicated that it would be an aromatic monobasic acid with a nitro and a phenolic hydroxyl radical in its structure.

(5) Being melted by a prolonged heating at the melting point, this product was found to lose weight nearly corresponding to one molecule of water and to give its lactone.

(6) The complex of all data available made it probable that the compound in question might be the one of the nitro derivatives of 2-hydroxyphenylacetic acid.

Anyhow, it is probable that the microbiological production of the nitro compound, as a metabolite of phenylacetic acid, have not yet been reported before.

Penicillium chrysogenum Q-176 による Phenylacetic Acid

の酸化代謝に関する研究 (第 9 報) Phenylacetic Acid

より代謝生成されるニトロ化合物について

(その 2) ニトロ化合物の構造

磯 野 正 雄 (武田薬品工業株式会社大阪工場)

昭和 29 年 4 月 1 日 受理

Oxidative Metablism of Phenylacetic Acid by *Penicillium chrysogenum* Q-176.

Part 9. Production of a Nitro Compound on the Phenylacetic Acid

Metabolism. (2) Structural Examination of the Nitro Compound.

By Masao ISONO (Osaka Factory, Takeda Pharmaceutical Industries Ltd.)

前報に於てはアルカリ性培養から単離した含窒素化合物の定性的試験を行い、本物質が 2-hydroxyphenylacetic acid (2-OH-PAA) のニトロ誘導体の 1 つであることを示した。2-OH-PAA のニトロ誘導体はニトロ基の位置によつて 4 種の構造が考えられるが、著者はこのうち文献既知の 5-nitro-2-hydroxyphenylacetic acid (5-NO₂-2-OH-PAA) を合成して著者が得た未知ニトロ化合物と比較検討した。この結果未知ニトロ化合物は 3-nitro-2-hydroxyphenylacetic acid (3-NO₂-2-OH-PAA) であることがほぼ確実となつたので報告する。

[I] 実験及び結果

I. 5-Nitro-2-hydroxyphenylacetic acid の合成

5-NO₂-2-OH-PAA は古く HILL⁽¹⁾ によつて合成された化合物で著者は HILL の報告にしたがつてこれを合成した。ただし mucobromic acid の合成は YANAGITA⁽²⁾ の報告によつた。その合成過程は Fig. 1 に示すとおりである。

Fig. 1. Synthesis of 5-Nitro-2-hydroxyphenylacetic Acid.

(1) **Mucobromic acid (II)**: Furfuraldehyde (I) 30 g と水 250 cc を三頸フラスコに入れ約 0° に冷却し Br₂ 290 g を攪拌しながら滴下する。反応が緩慢となり温度上昇が弱まつた時に冷却を中止し、アスピレータをフラスコに附けて吸引しながら更に Br₂ を滴下する。この間温度を徐々に上昇せしめ 90~100° とする。Br₂ の全量を加えた後更に加熱しながら過剰の Br₂ を吸引除去する。熱時グラスフィルターで吸引濾液し濾液を放冷すれば多量の結晶が析出する。結晶を分離し炭末を加えて水から再結晶すれば融点 123~4° の白色板状結晶が得られる。

(2) **Nitromalonic aldehyde (III)**: NaNO₂ 20 g に水 50 cc と ethanol 50 cc とを加えて溶かしこれに mucobromic acid (II) 20 g を加えて攪拌すれば温度が上昇し盛んに CO₂ を発生する。この間温度を 50° に調整して反応の終るのを待つ。これを冷却して析出する結晶を分離し水から再結晶すれば融点 50~1° の nitromalonic aldehyde (III) の Na 塩が得られる。

(3) **5-nitro-2-hydroxyphenylacetic acid (V)**: Levulinic acid (IV) 20 g を 1 N NaOH 溶液 200 cc に溶し nitromalonic aldehyde (III) の Na 塩 17 g を加えて 24 時間室温に放置する。これに HCl を加えて酸性とし冷却すれば結晶が析出する。結晶を分離して炭末を加えて水から再結晶すれば融点 161~2° の白