化合物或は既知 aldehyde, ketone 類の重合又は縮合に依る化合物が存在すると考えられ, これら化合物の生成が微生物の作用に関係するや或いは STRECKER Degradation⁽¹²⁾に依るかに関しては極めて興味深いことなので今後検討の予定である。

要 約

醤油の着色を濃厚化する化合物を確認しその内容を 2,4-DNPhs として分離しペーパー及びカラム・クロマトグラフィ・分光学的方法で調べ以下の結果を得た。

1. 醤油の着色濃厚化物質として carbonyl 化合物を得た。その内容は aldehyde 類 13, ketonic acid 4 であった。

2. これら carbonyl 化合物の大部分は未知化合物で確認, 推定されたものは acetaldehyde, crotonaldehyde, levulinic acid, diacetyl で aldehyde の重合, 縮合反応に依る未知化合物の生成が推察される。

終りに御指導を賜った京大片桐先生, 試料を戴いた坪田醤油会社に深謝の意を表します。なお本報の要約は農化関西支部例会 (10月, 1953) にて発表した。

(1) 大亦, 上野 : 農化, 27, 575 (1953).	Soc., 68, 214 (1946).
(2) 黒野, 深井, 館野 : 同上, 3, 1193 (1927).	(7) BRAUDE and JONES J. Chem. Soc., 1945, 498.
(3) STADTMAN J. Am. Chem. Soc., 70, 3583 (1948).	(8) 小幡 : 農化, 24, 226 (1951).
(4) RICE and KELLER : Anal. Chem., 23, 194 (1951).	(9) 横塚 : 同上, 24, 355 (1951).
(5) CAVALLINI Nature, 163, 568 (1949).	(10) 山田 : 同上, 4, 1 (1928).
(6) ROBERTS and GREEN : J. Am. Chem. Soc., 68, 214 (1946).	(11) 赤堀 日化, 57, 823 (1936).
	(12) SCHÖNBERG : J. Chem. Soc., 1948, 176.

Summary

The compounds which increase the colour intensity in Soy-sauce were separated as 2,4-dinitrophenylhydrazone compounds. Those compounds were characterized (specified) by paper and column chromatography, ultra-violet absorption.

The results are following

1. Carbonyl compounds promote to darkening of Soy-sauce. These carbonyl compounds were composed 13 aldehydes and 4 ketonic acids.

2. In these carbonyl compounds, acetaldehyde was recognized, crotonaldehyde, diacetyl and levulinic acid were presumed, still unknown 10 aldehydes and 3 ketonic acids were gained.

糸状菌の糖類脱水素酵素に関する研究* (第2報) 微アルカリ性溶液に於ける Methylene blue に依る Glucose の酸化生成物

倉 沢 文 夫, 伊 賀 上 郁 夫 (新潟大学農学部)

昭和 29 年 4 月 2 日 受 理

Sugar-Dehydrogenase of Mould. Part 2. On the Oxidative Products of Glucose by Methylene Blue in an Alkaline Solution.

By Humiwo KURASAWA and Ikuo IGAUE (Laboratory of Biobhistry, Faculty of Agriculture, Niigata University)

緒 論

Glucose が微アルカリ性溶液で酸化還元指示薬によつて酸化される際の生成物の検索は glucose の生理的分解並びに glucose の脱水素酵素による分解の基礎となるので非常に重要である。前報⁽¹⁾に於て私達は glucose が微アルカリ性溶液で酸化還元指示薬によつて 10~15% 分解され, 分解液の pH が最初 7.8 より 6.2 に変化していることを知つた。

一方 glucose の強アルカリ性溶液に於ける分解産物並びに酸化剤による分解産物については多くの研究があ

* 糸状菌の糖代謝の研究 第 12 報

るが, glucose の微アルカリ性溶液での酸化還元指示薬による酸化生成物については比較的少なく, ただ芦田⁽²⁾の報告がある。芦田は glucose を微アルカリ性溶液で酸化還元指示薬にて 70~80° で酸化し酸化生成物をペーパークロマトグラムによつて oxalic acid と erythronic acid としている。

私達は微アルカリ性溶液にて glucose の methylene blue による酸化を 35° にて行い, 得られた生成物をペーパークロマトグラムにて検索し, 一, 二の有機酸を結晶状に単離し得たので報告する。

本実験を遂行するに当り終始御指導下さいました恩師農学博士三宅捷先生に感謝します。実験に使用した 2-ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid は匠藤圭二氏からいただいた。実験の一部は山口貞美君, 陶山朝博君に援助していただいた。併せて感謝します。

実 験 の 部

1. 反応系としては次の 2 つの系を用いた。

A	M/5 Glucose	30 cc	B	M/5 Glucose	30 cc
	M/5 NaHCO ₃	20 cc		M/10 K ₂ HPO ₄ (pH 7.8)	20 cc
	Methylene blue (1 : 1000)	15 cc		Methylene blue	15 cc

試薬は前報⁽¹⁾に記載したものを用いた。

2. 実験の方法 実験に際しては donator, acceptor, buffer solution を特殊大型 THUNBERG tube に採り, 直ちに外部を氷水で冷却しつつ 5 分間真空ポンプで 3 mm/Hg まで吸引し, 35° の恒温水槽中にて 24 時間反応させ反応液について糖酸及び有機酸の検出を行つた。

3. 実験の結果

前報⁽¹⁾に於て反応後 glucose では 10~15% 分解され, 且つ反応液の pH は酸性に傾いていることを認めた

Table 1. Treatment of Reacted Solution

Buffer solution : M/5 NaHCO₃ solution.

Reacted solution 65 cc

Decolorization by active carbon

IR-120 ion exchange resin

Adsorbed fraction Solution

IRA-400 ion exchange resin

Unadsorbed fraction Adsorbed fraction

Elution by 1N Na₂CO₃ solution

Eluate

IR-120 ion exchange resin

Adsorbed fraction Solution

Concentration under reduced pressure

Syrup I

Ether extract for 70 hrs.

Ether soluble

Syrup II

Ether residue

Concentration under reduced pressure

Syrup III

Fig. 1. Paper chromatogram of the produced substance from glucose in spontaneous dehydrogenation.

S₁ Syrup I, S₂ : Syrup II.

R_F value of the produced substance

Substance	R _F value	Control
1	0.15	Gluconic acid
2	0.52	Glycolic acid

Solvent : *n*-butanol : acetic acid : H₂O = 4:1:1⁽³⁾

Spraying reagent : 0.1% bromphenol blue in 95 % alcohol solution. (B.P.B.)

ので反応液を Table 1 の如く処理して糖酸及び有機酸の検出を行う。

2. Buffer solution として M/5 NaHCO₃ を用いた場合 得られた Syrup I, 及び Syrup II を酸のペーパークロマトグラムにかけた。即ち

1) 濾紙 : 東洋濾紙 No. 50

2) 展開剤 : *n*-butanol : acetic acid : H₂O = 4 : 1 : 1⁽³⁾

3) 噴霧液 0.1% bromphenol blue (B.P.B) in 95% alcohol solution.

結果は Fig. 1 の如くである。即ち Syrup I は gluconic acid 及び glycolic acid の位置に spot を与える物質が含まれている。Syrup II には glycolic acid の位置に spot を与える物質が含まれている。依つて Syrup I には gluconic acid 及び glycolic acid が、Syrup II には glycolic acid の存在が推定される。Syrup III (gluconic acid と glycolic acid の混液から gluconic acid を除き、gluconic acid のみと思われる部分) について gluconic acid の存在を証明⁽⁴⁾するために次の実験を行つた。

得られたる syrup 0.5 g に水 5 cc を加え良く攪拌す。一方醋酸ソーダ 3 g 及び塩酸 phenylhydrazine 2 g を水 20 cc に溶解後濾過する。両液を混合 45 分間加温する。後濾過し、濾液を冷蔵庫内に 1 夜放置する時には黄色の結晶が析出する。結晶を少量の加温水に溶解し、脱色炭にて脱色後冷蔵庫中に放置すると prism 型の結晶が析出。融点 198°。純粋な gluconic acid より調製した gluconic acid phenylhydrazid と混融するも融点降下せず。依つて得られた結晶は gluconic acid phenylhydrazid であることを認めた。Syrup III には gluconic acid が存在す。

Glycolic acid の R_F 値を有する Syrup II について glycolic acid の呈色反応⁽⁵⁾を行う。即ち Syrup II を少量の水に溶かし、醋酸、硫酸及び 1 滴の guajacol を加えたと紫色に呈色す。*依つて glycolic acid の存在の推定を確めた。

即ち glucose を NaHCO_3 溶液にて methylene blue にて酸化するときには生成物として gluconic acid の存在を認め且つ glycolic acid の存在を推定した。

b. Buffer solution として $M/10 \text{ K}_2\text{HPO}_4$ を用いた場合

得られた syrup を酸のペーパークロマトグラムにかけたのに a の場合と全く同様に glycolic acid と同一の R_F 値を示し、且つ glycolic acid の呈色反応を示した。一方 Ca-salt は β -naphthol 反応は青色、 α -naphthol 反応は赤色を呈し、gluconic acid の呈色反応⁽⁶⁾を示した。加温 30% エタノールにて精製するときには甘藍状結晶が得られた。

得られた結晶に当量の oxalic acid を加え結晶からカルシウムを、除きこれに醋酸ソーダ及び HCl -phenylhydrazine⁽⁴⁾を加え、生ずる oxalic acid-phenylhydrazid を除いた後に前述の a の場合と全く同様に phenylhydrazid を調製す。融点 198°にして gluconic acid phenylhydrazid であることを認めた。依つて Ca

salt は Ca-gluconate であることを確めた。

依つて glucose を K_2HPO_4 溶液にて methylene blue にて酸化するときには NaHCO_3 と全く同様な結果を得ることを認めた。

c. Buffer solution として $M/5 \text{ NaHCO}_3$ を用い多量の反応液を用いて糖酸及び有機酸の検出

反応系として $M/5$ glucose 30 cc, $M/5 \text{ NaHCO}_3$ 20 cc 及び methylene blue (1:1000) 15 cc を用い、この反応系を大型 THUNBERG tube 中に入れたもの 8 本を作り、これを a の場合と全く同様に処理して ether soluble 部 (Syrup II') 及び ether residue (Syrup III') を得た。それぞれの syrup を少量の水に稀釈してペーパークロマトグラムにかけた結果は Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4 の如くである。但し Fig. 2 は展開剤 butanol : acetic acid : H_2O ⁽³⁾, Fig. 3 は 1% formic acid を含む phenol : H_2O ⁽⁷⁾, Fig. 4 は ether : acetic acid : H_2O ⁽⁸⁾ を用いた結果である。

即ち Fig. 2 (展開剤として butanol : acetic acid : H_2O) の場合には ether insoluble の部には R_F 値から推定すると 2-ketogluconic acid, gluconic acid, 5-ketogluconic acid 及び未知物質が ether soluble の部分には glycolic acid, succinic acid 及び lactic acid の存在が推定される。Fig. 3 (展開剤として formic acid を含む phenol : H_2O) の場合には ether insoluble 部は gluconic acid, ether soluble 部は glycolic acid, succinic acid の存在が推定され、Fig. 4 (ether : acetic acid : H_2O) の場合には ether insoluble 部は 2-

Fig. 2. Paper chromatogram of produced substances from glucose in spontaneous dehydrogenation.

Solvent : *n*-butanol : acetic acid : H_2O = 4:1:1(3)
 Spraying reagent : 0.1% B.P.B. in 95% alcohol solution

<i>R_F</i> value of produced substances		
Substance	<i>R_F</i> value	Control
1	0.06	2-Ketogluconic acid
2	0.14~0.15	Gluconic acid
3	0.23~0.24	5-Ketogluconic acid
4	0.35~0.37	Glycolic acid
5	0.52~0.54	Glycolic acid
6	0.68~0.70	Lactic acid
7	0.75~0.76	Succinic acid

Fig. 3. Paper chromatogram of produced substances from glucose in spontaneous dehydrogenation.

Solvent : phenol : H_2O = 3:1 containing 1% formic acid

Spraying reagent : 0.1% B. P. B. in 95% alcohol solution

<i>R_F</i> value of produced substances		
Substance	<i>R_F</i> value	Control
1	0.23	Gluconic acid
2	0.27	Cl'
3	0.27	2-Ketogluconic acid
4	0.36	5-Ketogluconic acid
5	0.59~0.60	Glycolic acid
6	0.70	Succinic acid
7	0.72	Lactic acid

ketogluconic acid, gluconic acid, 5-ketogluconic acid 及び未知物質が, ether soluble 部は glycolic acid, succinic acid 及び lactic acid の存在が推定される. 依つて glucose の分解物としては, gluconic acid, 2-ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid, glycolic acid, succinic acid, lactic acid 及び未知物質の存在が推定される. 而して前項の実験で gluconic acid, glycolic acid の存在をペーパークロマトグラム以外に gluconic acid は誘導体を調製し, glycolic acid は呈色反応によつて認めたので他の酸についてもペーパークロマトグラム以外に呈色反応に依つて確認するために次の実験を行った.

i Ether insoluble 部

Ether insoluble 部に gluconic acid の存在を証し, 更に 2-keto 及び 5-ketogluconic acid 及び未知物質の存在が推定されたので, 先ず 2-keto-, 5-ketogluconic acid の存在を証明するために糖の呈色剤を用いて呈色させた. 即ち solvent として butanol : acetic acid : H_2O ⁽³⁾ を用い, 呈色剤として benzidine⁽⁹⁾ 及び HCl-aniline⁽¹⁰⁾ を用いた. 2-keto- 及び 5-ketogluconic acid の位置は benzidine によつて褐色に呈色し, HCl-aniline によつては 2-ketogluconic acid の位置は桃色に, 5-ketogluconic acid の位置は褐色に呈色して, 標準に用いた 2-keto 及び 5-ketogluconic acid と同様な *R_F* 値及び呈色反応を示した. 更に 5-ketogluconic acid については次の実験を行う. 即 ether insoluble 部を少量の水に溶かし, $Ca(OH)_2$ 及び $CaCO_3$ にて中和した処, 結晶性の沈澱が得られた. 沈澱と濾液とに別け, 沈澱は BERTRAND A 液, B 液を加えて煮沸すると赤色の Cu_2O の沈澱を生じ, 又沈澱は少量の灰分を残して燃焼した. 依つて得られた有機性の Ca 塩は水に不溶にして且つ還元基を有している. 又その Ca 塩について 5-ketogluconic acid の呈色反応⁽¹¹⁾ である orcin-HCl 反応は強い

Fig. 4. Paper chromatogram of produced substances from glucose in spontaneous dehydrogenation.

Solvent : ether : acetic acid : $H_2O = 13:3:1$ ⁽⁸⁾

Spraying reagent : 0.1% B. P. B. in 95% alcohol solution

Substance	R_F value of produced substances	Control
1	0.03	Gluconic acid or 2-Ketogluconic acid
2	0.07	Cl^-
3	0.13~0.15	5-Ketogluconic acid
4	0.35~0.37	Glycolic acid
5	0.52~0.53	Glycolic acid
6	0.70~0.73	Lactic acid
7	0.75~0.77	Succinic acid

報に報告する) 依つて glycolic acid の R_F 値を示す物質は glycolic acid であるとした。succinic acid の検出には Resorcine 反応⁽¹⁴⁾, Pyrrole 反応⁽¹⁵⁾ 及び塩化鉄⁽¹⁴⁾ 反応を行つた。

Resorcine 反応 : syrup を水で薄め resorcine と濃 H_2SO_4 とを加え $190^\circ \sim 195^\circ$ に加熱し, 冷却後稀釈し, 再び煮沸冷却後アンモニアを加えると紅色を呈し, 緑色の螢光を発した。

Pyrrole 反応 : 試料にアンモニアを加え乾燥するまで蒸発し, 乾燥試験管中に加熱し, 塩酸にて湿したマッチ棒を挿入したのに紅色となつた。

塩化鉄反応 : 試料に塩化鉄液を加えると膠状の沈澱が生じた。以上の反応によつて ether soluble 部に succinic acid の存在の推定を確めた。

Lactic acid の検出には UFFELMANN reaction⁽¹⁶⁾, guajacol reaction⁽¹⁷⁾, 及び高樹, 坂口氏反応⁽¹⁸⁾を行つた。

UFFELMANN reaction : 試料に 1% 石炭酸 10 cc と稀 $FeCl_3$ 液数滴加えた液を加えると黄色に着色した。

Guajacol 反応 : 試料に硫酸 2 cc を加え沸騰重湯煎にて 2 分間熱し, 冷却後 5% alcohol 性 guajacol 溶液 1~2 滴を加えると蒺藂紅色となつた。

高樹, 坂口氏反応 : 試料に少量の β -naphthol の結晶を加え, 加熱したのに青色になつた。依つて lactic acid の存在の推定を確めた。

以上の如く ether soluble 部には glycolic acid, succinic acid 及び lactic acid の存在を確めた。

D. Hydroxamic acid 法による生成有機酸の検索

上述の如く glucose の酸化生成物として gluconic acid を認め, 2-ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid, glycolic acid, succinic acid, glyceric acid 及び lactic acid の存在を推定したが更にこれをたしかめるために酸化生成物を hydroxamic acid の誘導体としてペーパークロマトグラムによる実験を行つた。

* ZIMNO : Pharm. C. H. 38, 780 (1897) の方法で合成す。

緑色, Naphthoresorcin-HCl 反応は特徴ある呈色反応及び Phloroglucin-HCl 反応は暗緑→褐色になり 5-ketogluconic acid であることを認めた。更に Ca 塩は次の如く 5-ketogluconic acid の Ca 塩の精製法⁽¹²⁾ によつて精製す。即ち Ca 塩の結晶 0.9 g を 20% HCl 0.4 cc に溶解後水 4 cc を加える。この溶液に水 2 cc に醋酸ソーダ 1.6 g を溶した溶液を加えると結晶析出す。水にて洗滌後脱水乾燥す 3 回再結を行う。得られた結晶性 Ca 塩は還元基を有していた。以上の事柄によつてこの物質を 5-ketogluconic acid とした。未知の spot は glyceric acid* と同一の R_F 値を示したので glyceric acid であると推定した。依つて ether insoluble 部には gluconic acid の存在を認め, 2-ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid の存在を確め, glyceric acid の存在を推定した。

ii Ether soluble 部

Glycolic acid, succinic acid 及び lactic acid の存在をペーパークロマトグラムで認めた。而して glycolic acid については前述のように呈色反応を行つて推定をたしかめた。一方 fructose の微アルカリ性溶液に於て methylene blue による酸化生成物について実験中 glucose の場合と同様に glycolic acid と同一の R_F 値を示す物質が多量に得られた。この酸を Ca 塩⁽¹³⁾ として針状結晶として単離して Ca の含量よりこのものが glycolic acid である事を証明した。(第 3

i 試料の調製

反応系は 1 と全く同様にして又試料の調製は実験の結果の部の b と同様な方法で行い, ether soluble 部を sample I. mother liquid 部よりの Ca-salt を数回再結晶精製して sample II とした. 但し沈澱部即ち 5-ketogluconic acid の含まれると思われる部分は実験の都合上使用しなかつた.

ii Hydroxamic acid の derivative の調製

実験の方法は FINK⁽¹⁹⁾ 及び井上⁽²⁰⁾ 等の方法によつた.

iii Hydroxamic acid の derivative のペーパークロマトグラフィ

Table 3. Paper Chromatogram of Hydroxamic Acid Derivative

1. Preparation of hydroxamic acid derivative								
Hydroxamic acid derivative was prepared by FINK's method.								
2. Paper chromatogram of hydroxamic acid derivative								
Solvent 1....Butanol (saturated H ₂ O)								
2....Phenol (phenol 100 g+H ₂ O 20 g)								
Ascending one dimensional method								
Spraying reagent 10% FeCl ₃ soln. in 95% ethanol								
R _F value of hydroxamic acid derivative from sample 1 and sample 11								
				Butanol		Phenol		
Sample I (Ether soluble part)	Glycolic acid	0.33				0.45		
	Succinic acid	0.08	0.25	0.28	0.32	0.06	0.24	0.75
	Lactic acid	0.39				0.62		
Sample II (Mother liquid part)	Gluconic acid	0.03				0.17		
	2-Ketogluconic acid	0.03				0.24	0.50	
	Glyceric acid	0.20				0.28		
	Unknown	0.15	0.32	0.42		0.26	0.36	

依つて ether soluble 部には glycolic acid, succinic acid, lactic acid が存在し, ether insoluble 部には gluconic acid, 2-ketogluconic acid, glyceric acid の存在が考えられる. 5-Ketogluconic acid の含まれる部分は実験しなかつた. Ether insoluble 部に不明の spots があるが, これら spots を与える物質については現在判明しない.

以上実験結果を総合すると glucose を微アルカリ性溶液にて 35° にて methylene blue にて酸化させるときには glucose は gluconic acid, 2-Ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid, glycolic acid, succinic acid, glyceric acid 及 lactic acid 等に分解するものと考えられる.

考察及び結論は第 3 報に記載する.

(1) 金沢文夫, 伊賀上郁夫: 農化, 投稿中.	(11) 化学実験学, 第 2 部 No. 12, 341.
(2) 芦田 淳: 日本農芸化学会講演, 昭和 27 年 4 月.	(12) 化学実験学, 第 2 部 No. 12, 341.
(3) 麻生 清, 柴崎一雄: 醸工, 29, 167(1951).	(13) KLEIN: <i>Handbuch der Pflanzenanalyse</i> , II, -1, 425.
(4) 化学実験学, 第 2 部, No. 12, 331.	高橋偵造, 朝井勇宣: 農化, 11, 1008 (1935).
(5) KLEIN <i>Handbuch der Pflanzenanalyse</i> , II, -1, 425.	(14) 醸酵工業便覧, 183 (昭和 23 年).
(6) 高橋, 坂口: 農化, 1, 1043 (1925).	(15) KLEIN: <i>Handbuch der Pflanzenanalyse</i> , II, -1, 418.
(7) STARK, J. B., GOODMAN, A. E. and OWENS, H. S.: <i>Anal. Chem.</i> , 23, 413 (1951).	(16) 化学実験学, 第 2 部, No. 12, 357.
(8) DENISON, F. W. Jr., and PHARES, E. F.: <i>Anal. Chem.</i> , 24, 1628 (1952).	(17) 化学実験学, 第 2 部, No. 12, 358.
(9) HORROCKS, R. H.: <i>Nature</i> , 164, 444 (1949).	(18) 醸酵工業便覧, 394 (昭和 23 年).
(10) 倉沢文夫, 斎藤昭三, 本間伸夫: 新犬農学術雑誌, 3, 47. (1952).	(19) FINK, K. and FINK, R. M. <i>Proc. Soc. Experi. Bio. Med.</i> , 70, 654 (1949).
	(20) 井上吉之, 野田万次郎: 農化, 23, 294 (1950); 農化, 24, 291 (1951); 農化, 25, 161 (1951); 農化, 25, 491 (1952).

Résumé

The anaerobic oxidation of glucose by methylene blue in an alkaline solution containing phosphate

or bicarbonate was studied by THUNBERG methylene blue method. To determine the oxidation products of glucose, the paper chromatography, the color reaction and the isolation of produced matter were studied. By paper chromatogram of oxidation products, seven acid spots appeared in a paper sprayed with bromphenol blue reagent. The seven acid spots were congruent with gluconic acid, 5-ketogluconic acid, 2-ketogluconic acid, glycolic acid, succinic acid, lactic acid, and glyceric acid. The oxidation products indicated the color reactions of gluconic acid, 5-ketogluconic acid, 2-ketogluconic acid, glycolic acid, succinic acid, lactic acid and glyceric acid. From the oxidation products we obtained gluconic acid as Ca-salt.

In the oxidation products of glucose we recognized that there was gluconic acid, and moreover we assumed that there were 5-ketogluconic acid, 2-ketogluconic acid, glycolic acid, succinic acid, lactic acid, and glyceric acid.