微生物の麴酸代謝に関する研究 (第 3 報)*

麴菌による麴酸の分解に就て

徳山 泰, 野々村誠一, 辰巳忠次 (大阪府立大学農学部)

昭和 33 年 11 月 27 日 受 理

麴酸が 1907 年斎藤に依り発見せられて以来, 糸状菌に依る代謝に就て多くの研究があるにもかかわらず, それに関与する酵素系並びにその中間物の確認は何等行われていない。

著者等は従来の研究が専ら静置培養法のみに依存していた事, 並びに生成した麴酸のそれ以上の分解に就ての研究が皆無である事から, 主として振盪培養法を用いて葡萄糖より麴酸の生成及びその分解経路との二相に就て実験を行ったが, 本報は麴菌に依る麴酸の分解に就て述べる。

実 験 方 法

菌株は *Asp. oryzae* var. *globosus* AA2 (山梨大学醸酵研究所) を用い, 保存培地として, Czapek-Dox 寒天を, 試験培地は, 一次培地として, (A) グルコース 3%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, NH_4NO_3 0.04%, (B) グルコース 10%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, ペプトン 0.7% の組成のもの, 二次培地として KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% と試験濃度の基質を添加した培地を用いた。振盪培養法は往復振盪機(一次用として 7 cm 衝程, 毎分 125~135 回, 二次用 6 cm 衝程, 毎分 110 回)を用い, 一次培養法は予め保存培地上に 7 日間培養した孢子着生菌体に 0.007% の殺菌寒天水を注入し, 白金耳にてなるべく孢子のみをよく掻き取り, 更に之を殺菌ガーゼにて濾し, この孢子懸濁液を上記培地 50 ml を入れた坂口フラスコ中に 2 ml 添加し, 27~30° にて 48 時間培養し, 次いでブフナー漏斗上で菌体を濾別し, 4~5 回殺菌水で洗滌後, 新らし入く菌した培地に懸濁し全容(緩衝液, 阻害剤を含む) 20 ml なる様に太口ピペットにて T 型振盪フラスコに注射して 5 日間二次培養を行った。

静置培養法は 1 立容 Fernbach フラスコを用い, 一次培養 10~14 日間後予め挿入してある硝子管を通して殺菌水にて菌蓋洗滌(約 3 回)後, 二次培地を注入して培養を行い, 試料の採取は 20 ml 容殺菌注射筒で 10 ml を採った。緩衝液は重フタル酸加里と塩酸及び苛性ソーダを, 又硼酸ソーダ及び硼砂, 及び磷酸塩を夫々用いた。

分析法として酸滴定は N/10 苛性ソーダで滴定を行い, 全酸はフェノールフタレン, 麴酸以外の酸はコンゴレッドを指示薬として用い, 培地 10 ml に対する ml 数で示し, 麴酸は比色法⁽¹⁾に依り, インドフェノール値はイソアミルアセテート吸着法⁽²⁾, グライコール酸は Calkins 法⁽³⁾, pH は Beckman type electrode を用い測定した。ペーパークロマトグラフの中, 2,4-dinitrophenyl-hydrazone の調製は Brady 法を用い, この分割は Meigh 法⁽⁴⁾に依り, 中性ヒドラゾンの溶媒はメタノールとヘプタンの飽和液を, 酸性のものには *n*-ブタノール(3% アンモニア水飽和)を用いた。有機酸分割のためにイオン交換樹脂 IR 120(H 型)及び IRA-400 (CO_2 型)で処理後その濃縮液に就て *n*-ブタノール, ギ酸, 水, 又はイソアミルアルコールと 5 N ギ酸⁽⁵⁾を用い, 夫々標準試料と共に展開し同定した。ケトン, アルデハイド類はアニリンフタレートを用い溶媒は上記のものに準じた。ギ酸は錫で還元後クロモトロブ酸法⁽⁶⁾, アルコールは酸化法を, 第 2 鉄塩の反応は 0.1 N $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ で行った。

実 験 結 果

I. 振盪培養法に依る麴酸の分解に就て 培地 A の葡萄糖に替えて麴酸を用うると, 菌体の生育悪く, 且つ不均一であり又長時間(1 週間)を要するので菌体造成のために葡萄糖 3% を用い, 培養時間を異にした菌体を用い二次培養に依る麴酸の分解能を検討した結果は第 1 表の如くである。即ち麴酸の二次的分解力は一次培養菌体の性質に依って著るしく左右される事が示された。即ち一次培養 42 時間の菌体が最大の QK を示したので以下の実験はすべて A 培地(葡萄糖 3%)にて 42~48 時間の培養菌体を用いた。

* Studies on Kojic Acid Metabolism by Microorganism. Part III. Decomposition of Kojic Acid by Mold *Asp. oryzae* var. *globosus*.

By Tai TOKUYAMA, Seiichi NONOMURA and Chuji TATSUMI (Faculty of Agriculture, University of Osaka Prefecture)

第1表 時間を異にせる一次培養菌体による麴酸分解力

培養法	培養時間	42	88	138	186	256	307
一次培養 グルコース 3%	残存グルコース %	1.765	0.795	0.424	0.127	0.086	0.098
	pH	3.55	3.95	3.85	4.80	4.88	5.22
	生成麴酸 %	0	0.053	0.183	0.126	0.118	0.03
二次培養 5日間 基質麴酸濃度 1%	単位時間の麴酸分解量	0.0157	0.00686	0.0042	0.0069	0.00135	0.00317
	pH	5.99	5.72	5.80	5.65	—	—
	菌体量 (gr)	0.193	0.259	0.307	0.318	0.130	0.128
	Q _K *	0.814	0.265	0.137	0.217	0.104	0.248

* 消費麴酸 mg/菌体 mg/1 時間×10 として表わした

a) 二次培養に依る麴酸の分解: 第2表に示す如く酸価は増大せず認め得べき変化はない. インドフェノール価は Arnstein 等⁽⁷⁾ のアルカリ分解の結果と又 Petuely⁽⁸⁾ の実験から推定される分解の第1段階の酸素環の開裂に依るエンジオールの生成が他のエンジオールと同様に, インドフェノールを還元するかを調べ, 菌体を用いての分解の手掛りを得る目的で行ったが予期の結果は認められなかった. 尚著者等は 1N NaOH を用い 100° で麴酸を分解したる場合, インドフェノール価が漸次増大し, 麴酸の分解と共にその価が減少する事を認めているが菌体に依る分解では明瞭なる結果は得られなかった.

b) 磷酸濃度の効果: 第1図は磷酸の影響を示したが, 一般に磷酸の濃度を増加するに従い分解量は多く, 且つ菌体量も増加した. 尚B培地 (ペプトン 0.7%) の菌体を使用した時は殆んど其の影響は見られなかった.

第1図 麴酸分解に対する磷酸の効果
●—● 麴酸 ●---● 菌体量 △—△ 最終 pH 第2図 麴酸分解に対する pH の影響
●—● 麴酸 ●---● 菌体量

c) pH の効果: 麴酸の分解に対する pH の影響を第2図に示した. 即ち分解の最適 pH は 5~6 であり, その他の pH では非常に麴酸の分解量を減少した. 従来麴酸生成 (一次培養) には可成り低い事 (pH 2~3)⁽⁹⁾ が報告されているが, 本実験で得た結果は生成麴酸の分解を阻害する意味で最適 pH を 3 附近に保持する意味の一半の解釈を与えるものである.

d) 阻害剤の効果: 麴酸分解に対する各種阻害剤の効果を検討した. その結果は第3表に示してある. 又基質麴酸の外にその分解 (アルカリ) 生成物であると推定されるグリコール酸をも基質として用いた.

以上の結果から麴酸分解を阻害するものとして, アジ化ソーダ, 2,4 ジニトロフェノール, α, α' ジピリジル, ヨード醋酸があるが, Mann⁽¹⁰⁾ に依れば, シアニド, アジド (0.001 N), ヨード醋酸 (0.001 N), フロライド (0.005 N) は *Asp. niger* の磷酸代謝を強力に阻害するとし, 又前二者は磷酸化に対する阻害剤である事から磷酸関与系を阻害していると考えられるが, 休止細胞に依って得られたる之等の結果から断定的結論は尚考慮の余地があるように思われる.

第3表 麴酸分解に対する各種阻害剤の影響

阻害剤 Mol	基質	麴酸 1 %				グリコール酸 0.4025 %	
		始発 pH	最終 pH	グリコール酸反応	阻害率 %	最終 pH	阻害率 %
シアン化加里	1×10^{-2}	7.15	6.85	++	87.2	4.88	66.0
	2×10^{-3}	6.3	6.15	+	42.0	4.45	61.5
	1×10^{-3}	—	6.0	+	34.0	4.9	58.5
モノフロロ醋酸アミド	1×10^{-2}	6.0	5.3	++	-48.0	—	—
	2×10^{-3}	6.0	5.65	++	-27.5	—	—
	1×10^{-3}	6.0	5.6	++	-22	—	99.0
2,4 ジニトロ フェノール	2×10^{-3}	6.0	6.0	0	98	4.3	97.5
	1×10^{-3}	6.0	6.0	0	100	4.3	97
	5×10^{-4}	6.0	5.85	+	91.5	4.3	94
亜砒酸ソーダ	1×10^{-2}	6.65	6.45	0	98	4.5	91.5
	2×10^{-3}	6.1	5.90	++	25	5.75	1.0
	1×10^{-3}	—	5.95	+	10.5	5.65	1.0
アジ化ソーダ	1×10^{-2}	6.0	6.2	0	100	4.5	97
	2×10^{-3}	6.0	6.0	0	95	4.3	98.5
	1×10^{-3}	6.0	6.0	0	98	4.3	99
砒酸ソーダ	1×10^{-2}	6.75	6.7	+	100	4.5	91.5
	2×10^{-3}	6.2	6.4	++	-4	4.4	99
	1×10^{-3}	—	6.05	++	5.5	4.65	61.5
モノヨード醋酸	1×10^{-2}	5.1	5.1	+	98	4.2	94
	2×10^{-3}	5.8	5.7	+	71.5	4.3	99
	1×10^{-3}	—	5.7	痕跡	34	4.3	99
弗化ソーダ	1×10^{-2}	5.95	5.8	+	-135	4.49	100
	2×10^{-3}	6.0	5.9	0	-10.5	5.6	5.5
	1×10^{-3}	6.0	5.9	0	-5.5	5.6	4
α, α' ジピリジル	5×10^{-3}	6.0	5.8	0	95	—	—
	1×10^{-3}	6.0	5.7	0	95	—	—
	5×10^{-4}	6.0	5.9	0	87.5	—	—

緩衝液はフタル酸加里 pH 6.0 の半量を用いた。

e) 生産物の検索: 既述の条件 (42~50 時間培養菌体) に於ける実験での生産物は殆んど見出し得なかった。第2表に示すが如く酸価も増大せず、単に阻害剤を用いた時グリコール酸の検出を認めたのみであった。

f) 検圧計に依る検討: 麴酸は振盪培養に於て殆んど完全に分解されるのでこの点を明瞭にする目的で、ワールブルグ検圧計を用いた実験の結果、R. Q. は酸素吸収 477 μ l, 炭酸瓦斯放出 473.3 μ l (163 分間) である事から約1であった。又 195 分間で5分子酸素の吸収がある事から麴酸は完全に分解する傾向にあると推定される。(磷酸緩衝液 pH 6 を用い、菌体調製にはB培地、2時間飢餓培養を行った)

II. 静置培養法に依る麴酸の分解に就て 本実験はA培地を用い静置培養法にて菌蓋形成後 (7~10 日間, 32°) 常法に従い洗滌後、基質麴酸 1~4 % 含有無窒素源A培地を注入して分解状況を調査した。

a) 麴酸の分解状況: 第4表に示した如く、麴酸は大凡7日間で殆んど消失し、全滴定酸は麴酸以外の酸として 0.75 ml を要した事は分解生成物の結果である。又インドフェノール価も振盪培養法と同じく期待した結果

第4表 静置培養法による麴酸の分解状況

分析	麴酸 %	pH	全滴定酸 D. N. NaOH ml 数	インドフェノール価	紫外線部吸収波長
培養日数					
0	1.022	4.5	0	0.225	216, 270
2	0.752	3.6	0.75	0.175	216, 270
4	0.252	3.8	0.25	0.190	216, 270 (360)
6	0.075	—	—	0.150	—
7	0.015	4.4	痕跡	—	—

菌体重量 2点平均 4.403 g/400 ml 培地

を示さなかった。紫外線吸収帯は4日目に 360 μ m に僅かに認められたが明瞭なる差異は現われなかった。

b) 生産物の検索: 前実験に於て分解生産物として麴酸以外の酸類の存在が推定されるし、且つ振盪培養法でグリコール酸の検出量の比較的多いモノフロロ醋酸アミド (1×10^{-2} M), 亜砒酸 (2×10^{-3} M), 砒酸 (1×10^{-3} M) を夫々阻害剤として用い、その生成物及び阻害蓄積物の検索を試みた。即ち (1) 麴酸を基質

として一次培養したもの。(2) 二次培養に於て麴酸を基質としたもの。(3) 二次培養に於て麴酸を基質として $\text{FCH}_2\text{CO}\cdot\text{NH}_2$ $1\times 10^{-2}\text{M}$ 添加のもの。(4) 同じく NaAsO_2 $2\times 10^{-3}\text{M}$ 添加, (5) 同じく Na_2HAsO_4 $1\times 10^{-3}\text{M}$ 添加の 5 種類に就て主として有機酸類を検索した。基質麴酸濃度は 2~4% を用い, 麴酸の分解量 70~90% の時を選んで行った。分割法は次の如く行ったが尚, 蔞酸を捕獲する目的で炭酸石灰を添加したものより 10%

醋酸不溶石灰塩は殆んど認められなかった。表示の如き分割法で得た結果を要約すると, 2,4 ジニトロヒドラゾン区に於ては, 麴酸のヒドラゾン以外, アセトール等を予想したが得られず, 酒精類も亦認められなかった。有機酸類としてグリコール酸の反応は振盪培養法で認めた程強く現われなかったが, 何れもグリコール酸の反応を認め砒酸阻害区が強く之を示し, 同時に之に附随してクエン酸の反応である緑色の螢光を認めた。又別に β -ナフトールとバニリンに依るクエン酸の反応を認めたが, 乳酸の反応はない。クロマトグラムに依る有機酸類の検出は溶媒として n -ブタノール, ギ酸及び水(第 3 図), 及びイソアミルアルコール, 5N ギ酸(第 4 図)を用い

第 3 図 有機酸のクロマトグラム
(ブタノール, 醋酸, 水の溶媒)

第 4 図 有機酸のクロマトグラム
(イソアミルアルコール, ギ酸の溶媒)

第 5 図 第 2 鉄塩による呈色物質のクロマトグラム
(n-ブタノール, 醋酸, 水の溶媒)

第 6 図 第 2 鉄塩による呈色物質のクロマトグラム
(イソアミルアルコール, ギ酸の溶媒)

- (1) より, 蔞酸, グライコール酸, コハク酸, 不明有機酸,
- (2) より, グライコール酸, コハク酸及びフマル酸あたりの未知酸,
- (3) より, クエン酸, フマル酸, グライコール酸及び 2 種の不明有機酸,
- (4) より, グライコール酸, コハク酸及びクエン酸を認め,
- (5) より, グライコール酸以外有機酸は認められなかった.

又同溶媒のクロマトグラムに hydrogenphthalate を以て中性部を検出したが麴酸以外認むべき カーボニル又はアルデヒド化合物を証明し得なかった. 第 2 鉄塩呈色区分として, *n*-ブタノール溶媒のクロマトグラムに麴酸 ($R_F=0.57$) 以外に $R_F=0.42\sim 3$, $R_F=0.86$ に新しい紫色の呈色物質を認めた (第 5 図). この $R_F=0.86$ の物質は, エーテル抽出部に於てのみ現われ, 減圧濃縮により失われ, 又 $R_F=0.42$ の呈色物質は特に亜砒酸阻害の試料に多く現われた. 又イソアミル溶媒のクロマトグラム (第 6 図) 上に於ても亦 $R_F=0.28\sim 0.3$, $R_F=0.78$ に之を認めた.

揮発酸部として特にギ酸は試料 1, 2, 3 区分から得られ, 特にフロロ醋酸アミド阻害のものに特に多く, クロモトローブ酸によるギ酸の呈色を認めた.

尚菌蓋の自己消化による之等酸類の生成可能性に就て検討したが, 基質麴酸 (1%) 添加のものの菌体 (2.7 g) に比し無添加のものはその自己消化のために菌体重量 (2 ケ平均 1.69 g) の減少を来たし, その培地 (1700 ml) からエーテルにて抽出される有機酸類は殆んど認められなかった.

結 論

上述の実験結果より振盪培養法からは特に認め得べき分解生成物は得られなかったが, 之に反し静置培養法に於ては, 有機酸として, クエン酸, コハク酸, フマル酸, グライコール酸及びギ酸の各酸類を見出し尚未知酸 2 種類を認めた. 又第 2 鉄塩に依る呈色物質として, 麴酸の外, 2 種類を認めたが何れも量的に少く且つ不安定である事から麴酸分解過程の中間物であると考え. (本物質が酸性物質かどうかは少量で確認出来なかったが, $R_F=0.3$ 附近のものは, コメン酸に疑をかけられる).

又阻害剤に就ては振盪培養法に就てのみ行ったが、2, 3 の阻害剤の効果から磷酸代謝系を阻害するものと推定した。又中性区に何物も見出し得なかった事は、仮令アルコールが生成しても蓄積する事なく直ちに分解し去る事は検圧実験に依る $RQ=1$ である事からも之は示唆し得られる。尚エンジオールに依るインドフェノールの還元は認め得なかった。

以上の諸実験事実から、麩酸, *Asp. oryzae* var. *globosus* による分解過程を推定する事は困難ではあるが、若し本菌に依る分解が前記アルカリ分解の過程と類似の経路を経るとすれば次の図式が推定される。

Fragments, III 及び IV より

Fragments, I 及び II より

要 約

- (1) 麩かび *Asp. oryzae* var. *globosus* を用いて、麩酸の分解を振盪培養と静置培養の両方に就て観察した。
- (2) 振盪培養法に依る磷酸濃度の効果は明瞭でなかった。

分解の最適 pH は 5~6 であり、分解模様は酸価増大せず、予期したインドフェノール価の増大もなかったがワールブルグ法に依る検圧実験は $RQ=1$ であった。

(3) 振盪培養法を用いての阻害剤の効果は、アジ化物、2,4-ジニトロフェノール及び $\alpha\alpha'$ -ジピリジルが完全に分解を阻害し、又その効果の余り著しくないモノフロロ、アセトアミド、砒酸塩、亜砒酸塩を使用した場合に、グリコール酸の呈色反応が著しく、またグリコール酸を基質とした場合之等阻害剤の挙動もこれに類似していた。

(4) 静置培養を用いての分解生産物としてギ酸、グリコール酸、蔞酸、コハク酸及びクエン酸の各酸類を認め、尚未知の酸 2 種と又第 2 鉄塩に依る呈色物質として麩酸以外 2 種類を認めた。

終りに際し麩かびの分与を御願ひした山梨大学、小原敏教授に感謝致します。

(本報告は昭和 32 年 4 月、日本農芸化学会大会で講演した。)

(1) 辰巳忠次, 飴山実: 本誌, 28, 274 (1954).	(1948).
(2) 藤田秋治: ビタミンの化学的定量法, 誠文堂新光社 (昭和 23 年).	(7) H. R. V. Arnstein, R. Bentley: <i>J. Chem. Soc.</i> , 1951, 3436.
(3) V. P. Calkins: <i>Analy. Chem.</i> , 15, 762 (1943).	(8) F. Petuely, U. Kussberg: <i>Monatsh.</i> , 83, 80, (1952); <i>C. A.</i> , 47, 1600 a (1953).
(4) D. F. Meigh: <i>Nature</i> : 170, 579 (1952); <i>C. A.</i> 47, 8012 h (1953).	(9) N. H. Barham, B. L. Smith: <i>Trans. Kansas Sci.</i> , 37, 91 (1934); <i>C. A.</i> , 29, 2544 (1935).
(5) M. L. Buch, R. M. Montgomery, W. L. Porter: <i>Analy. Chem.</i> , 24, 489 (1954).	片桐英郎, 北原覚雄: 京農記, 26, 1 (1933).
(6) W. M. Grant: <i>Analy. Chem.</i> , 20, 267	(10) T. Mann: <i>Biochem. J.</i> , 38, 339 (1944).