みとめられることから、実験に使用した上記両菌種の間には明らかな株間の相違が考えられる。

本実験に使用した菌はすべて香川大学農学部内藤中人教授、山中 啓助教授の御好意により分譲して頂いたものであり、ここに謝意を表します。本研究の発表を許可された当研究所所長武田健一博士に感謝致します。

(1) D. H. Peterson, H. C. Murray et al. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 74, 5933 (1952).	merda : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 59, 304 (1955).
(2) D. R. Colingsworth, M. P. Brunner, W. J. Haines : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 74, 2381 (1952).	(7) E. Vischer, Ch. Meyster, A. Wettstein : <i>Helv. Chim. Acta</i> , 38, 835 (1955).
(3) F. R. Hanson, K. M. Mann, D. R. Colingsworth et al. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 75, 5369 (1953).	(8) E. Vischer, Ch. Meyster, A. Wettstein : <i>Helv. Chim. Acta</i> , 38, 1502 (1955).
(4) G. M. Shull, D. A. Kita : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 77, 763 (1955).	(9) A. Zaffaroni, R. B. Burton, E. H. Keutmann : <i>Science</i> , 111, 6 (1950).
(5) A. Nobile, W. Charney et al. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 77, 4184 (1955).	(10) R. B. Burton, A. Zaffaroni, E. H. Keutmann : <i>J. Biol. Chem.</i> , 188, 763 (1951).
(6) T. H. Stoudt, W. J. McAleer, J. M. Che-	(11) D. H. Peterson, H. C. Murray et al. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 75, 412 (1953).

微生物によるステロイドの酸化に関する研究 (第 2 報)* *Helminthosporium* 属菌による Reichstein's Substance S の酸化について

近 藤 栄 二 (塩野義製薬株式会社研究所)

昭和 35 年 5 月 14 日 受 理

前報⁽¹⁾において Genus *Glomerella* 並びに *Gloeosporium* の数菌種のステロイド酸化能を吟味したとき、不完全菌に編入せられている *Gloeosporium olivarium* がその完全時代といわれている *Glomerella cingulata* とステロイド酸化形式の点で著しく相違することを指摘した。本報においては不完全菌群として更に heterogeneous collection と考えられる Genus *Helminthosporium* 29 株について夫々の Reichstein's substance S に対する酸化挙動を検討した。

実 験 の 部

供試菌株 : 試験した *Helminthosporium* 属菌はいずれも岡山大学付属大原農業生物研究所より分譲をうけた下記 29 菌株である。

<i>H. zizaniae</i> Nisik. (H-4)	<i>H. velutinum</i> Link (H-30)
<i>H. brizae</i> Nisik. (H-10)	<i>H. gramineum</i> Rabenh. (H-32)
<i>H. turcicum</i> Pass. (H-11)	<i>H. leptochloae</i> Nisik. et Mke. (H-5)
<i>H. leersii</i> Atkinson (H-20)	<i>H. leptochloae</i> Nisik. et Mke. (H-6)
<i>H. tritici-vulgaris</i> Nisik. (H-25)	<i>H. leptochloae</i> Nisik. et Mke. (H-19)
<i>H. teres</i> Sacc. (H-43)	<i>H. sigmoideum</i> Cav. (H-37)
<i>H. oryzae</i> V. Br. de Haan (H-2)	<i>H. sigmoideum</i> Cav. (H-39)
<i>H. panici-meliacei</i> Nisik. (H-3)	<i>H. sigmoideum</i> Cav. (H-40)
<i>H. setariae</i> Saw. (H-8)	<i>H. sigmoideum</i> Cav. (H-42)
<i>H. avenae</i> Eidman (H-9)	<i>Helminthosporium</i> sp. (H-12)
<i>H. sativum</i> Pk. et B. (H-15)	<i>Helminthosporium</i> sp. (H-13)
<i>H. maydis</i> Nisik. et Mke. (H-18)	<i>Helminthosporium</i> sp. (H-16)
<i>H. kusanoi</i> Nisik. (H-21)	<i>Helminthosporium</i> sp. (H-27)

* Studies on the Oxidation of Steroids by Microorganisms. Part II. On the Oxidation of Reichstein's Substance S by *Helminthosporium* species.

By Eiji KONDO (Research Laboratory of Shionogi and Co., Ltd.)

Helminthosporium sp. (H-14)*Helminthosporium* sp. (H-7)*Helminthosporium* sp. (H-44)

菌株の培養とステロイド酸化方法： 前報⁽¹⁾において行ったのと全く同様であるので省略するが、本実験では培養基の pH を 10% NaOH を用いて 7.0 に調節した。

酸化生産物の検索と単離方法： 大略前報に記載した方法に従って行ったが、今回の実験では供試菌株によって培養菌液抽出後に溶媒を濃縮しても油状となって結晶化しにくい場合があったので、かかるときにはハイフろスーパーセルを用いるカラムクロマトグラフ法によって分離精製を試みた。このカラムクロマトグラフ法の詳細は別報として報告する。

実 験 結 果

A. Reichstein's substance S 酸化生産物のペーパークロマトグラフ法による吟味 前報におけるときと同様の要領で 29 株の *Helminthosporium* sp. による Reichstein's substance S の酸化生産物のペーパークロマトグラフ法を施行した結果は第 1 表及び第 1 図に示す如くである。このペーパークロマトグラフ法には固定相としてプロピレングリコール：クロロホルム (30 : 70 v/v) を移動相としてジオキサン：トルエン (22 : 78 v/v) を用いて下降法により、又呈色試薬にはトリフェニールテトラゾリウムクロリッド (TPTZ) 又は 2,4-ジニトロフェニールヒドラジン (DNPH) を使用した。

第 1 表 *Helminthosporium* 属菌による Reichstein's substance S の酸化

供試菌 の番号	菌体培養 日数 (days)	酸化時間 (hrs)	ペーパークロマト グラフィによる 酸化力の判定
H-4	4	42	卅
H-10	4	42	土
H-11	4	42	土
H-20	4	42	卅
H-25	4	42	卅
H-43	4	42	卅
H-2	3	70	卅
H-3	10	96	卅
H-8	3	70	卅*
H-9	6	43	卅
H-15	3	70	卅
H-18	3	70	土
H-21	3	70	卅*
H-30	6	43	卅
H-32	3	70	卅
H-5	3	70	**
H-6	4	67	**
H-19	7	42	十
H-37	4	67	卅
H-39	4	67	卅
H-40	4	67	卅
H-42	3	67	十
H-44	4	67	卅
H-7	4	43	十
H-12	4	43	十
H-13	4	43	十
H-16	6	43	十
H-27	4	45	卅
H-14	4	45	十

* TPTZ (-), DNPH (+)

** TPTZ (-), DNPH (-)

第 1 図 *Helminthosporium* sp. による substance S

酸化生産物のペーパークロマトグラム

- (i) 11-Epihydrocortisone
- (ii) 6β-Hydroxy-substance S
- (iii) Hydrocortisone
- (iv) Cortisone, 2β-, or 14α-Hydroxy-substance S
- (v) 4β-Substance S
- (vi) Substance S

B. 酸化生産物の単離同定 第 1 図に示したものの中から比較的効率よく酸化の行われているもの 8 菌株を選び、夫々の酸化生産物を単離し物理化学的性状を検討することにした。

(1) *H. zizaniae* (H-4) による酸化生産物： グルコース、ペプトン、corn steep liquor よりなる培養基にて 4 日間振盪培養を行い、菌体を充分増殖させてから培養液 100 cc 当り 50 mg の割合で substance S を微粉末のまま投入し振盪を継続して 42 時間酸化を行わした。酸化終了後、菌体部と濾液部に分ち夫々を酢酸エチルで抽出する。抽出液を合せ充分水洗後、芒硝にて脱水してから減圧下で溶媒を溜去すると結晶性の生産物

が得られた。このものをメタノールで再結晶するとペーパークロマトグラフィーでは Δ^1 -substance S と全く同一の動向を示す m. p. 224~229° の結晶が得られる。この結晶は $[\alpha]_D^{24} + 77^\circ$ (EtOH) で元素分析値は C 73.33%, H 8.17% となり, $C_{21}H_{28}O_4$ としたときの計算値 C 73.22%, H 8.19% とよく一致する。赤外線吸収スペクトルは $\lambda_{\max}^{nujol}$ 2.97 μ , 3.03 μ (OH), 5.83 μ (20-ketone), 6.00 μ , 6.18 μ , 6.22 μ ($\Delta^{1,4}$ -3-ketone) を示し, 標準の Δ^1 -substance S と全く一致することを知った。以上の結果, 本菌により得られた酸化生産物を A 環の 1, 2 位に二重結合の導入された Δ^1 -substance S であると決定することが出来た。

(2) *H. gramineum* (H-32) による酸化生産物: 3 日間振盪培養してから substance S を投入し, 70 時間酸化した。酸化終了後の培養液を同上の方法で処理すると酸化生産物は容易に結晶状に得られる。メタノールで再結晶を行いその性状を詳細に検討したところ前記 Δ^1 -substance S に全く一致した。従って本菌による酸化生産物も Δ^1 -substance S であることが判明したが酸化力は *H. zizaniae* よりは若干劣るようである。

(3) *H. leersii* (H-20) による酸化生産物: 4 日間振盪培養すると旺盛な菌体の増殖がみとめられるのでこの時期に濾過して菌体を濾液から分離した。100 cc の培養液から得られた菌体を水導水で洗滌し, 充分水をしぼりとりてから 500 cc 容肩付フラスコ中の 100 cc の水導水に懸濁した後, substance S 50 mg を加えて再び振盪して酸化を行わした。酸化終了後酢酸エチルで生産物を抽出し極めて容易に結晶状に得ることが出来た。メタノールで再結晶すると m. p. 225~231°, $[\alpha]_D^{24} + 54.7^\circ$ (Dioxane) でペーパークロマトグラフィーでは単一のスポットを呈する結晶が得られる。元素分析値は C 69.65%, H 8.50% で monohydroxy-substance S ($C_{21}H_{30}O_5$) としたときの計算値 C 69.58%, H 8.35% とよく一致する。尚赤外線吸収スペクトルは $\lambda_{\max}^{nujol}$ 2.91 μ (OH), 5.89 μ (20-ketone), 6.04 μ , 6.18 μ (Δ^4 -3-ketone) を示し, *Rhizopus arrhizus* (ATCC 11145) (4) により調製した標準の 6 β -hydroxy-substance S (6 β , 17 α , 21-trihydroxy-4-pregnene-3, 20-dione) と全く一致することを知った。従って本菌には 6 β 位に水酸基を導入する性質のあることが明らかになった。

(4) *H. avenae* (H-9) による酸化生産物: ペーパークロマトグラムでは酸化生産物は 4 種みとめられる。酸化生産物の酢酸エチル抽出物は油状で結晶しなかったので, ハイフロスーパースセルによるカラムクロマトグラフィーで単離結晶化を試みた。グリセリンをしみこませたハイフロスーパースセルをガラス管につめ, ベンゼールヘキサン混液で流出するのであるが, 詳細については種々実験例をあつめて報告する予定である。酸化生産物中量的に最も多い物質が残存している substance S の次の区分に流出されてくる。同一物を含育すると考えられる各区分を合せ, 溶媒を溜去すると結晶が得られる。アセトンで再結晶すると m. p. 227~230°, $[\alpha]_D^{22} + 148^\circ$ (MeOH), 元素分析値は C 69.31%, H 8.41% を示し, monohydroxy-substance S の計算値 C 69.58%, H 8.35% によく一致する結晶が得られる。赤外線吸収スペクトルは $\lambda_{\max}^{nujol}$ 2.85 μ , 3.07 μ (OH), 5.86 μ (20-ketone), 6.07 μ , 6.20 μ (Δ^4 -3-ketone) を示し標準品の 14 α -hydroxy-substance S (14 α , 17 α , 21-trihydroxy-4-pregnene-3, 20-dione) と全く一致することを知った。従って本菌により得られる主酸化生産物を 14 α -hydroxy-substance S と決定したが, 併成されている 3 種の生産物の本体については今のところわかっていない。

(5) *H. tritici-vulgaris* (H-25) による酸化生産物: 前述のような方法で resting cell をつくり酸化を行ったが, growing cell のときよりも酸化は順調に進行した。このときにも生産物は 4 種みとめられたので, 培養液からの抽出残渣についてハイフロスーパースセルによるカラムクロマトグラフィーを施行し, 各生産物の単離結晶化をはかった。主酸化生産物と考えられる物質はごくわずかに残存している未変化 substance S の次に流出されてくる。ペーパークロマトグラフィーで同一物と判定される各区分を合一し, 溶媒を溜去すると簡単に結晶化する。メタノールで再結晶したものは m. p. 208~213°, $[\alpha]_D^{22} - 59^\circ$ (Dioxane) で元素分析値は C 69.49%, H 8.12% を示し, monohydroxy-substance S の計算値とよく一致する。なお, 赤外線吸収スペクトルは $\lambda_{\max}^{nujol}$ 2.98 μ (OH), 5.80 μ (20-ketone), 5.94 μ , 6.17 μ (Δ^4 -3-ketone) を示し, 標準品の 2 β -hydroxy-substance S (2 β , 17 α , 21-trihydroxy-4-pregnene-3, 20-dione) と全く一致することが判明した。従って本菌による主酸化生産物を 2 β -hydroxy-substance S と決定したが, 約 35% の収率で結晶状にとることが出来た。尚, この 2 β -hydroxy-substance S の次に流出されてくる区分中に 4, 5 位の二重結合の還元された生産物がみとめられているが, このものについては別に報告するつもりである。

(6) *H. sigmoideum* (H-37, H-39) による酸化生産物: 酸化生産物はいずれの菌の場合にも 1 種であり, 且つ同一物質であることがわかった。酢酸エチル抽出物は簡単に結晶する。メタノールで再結晶すると m. p.

第 2 図 *Helminthosporium* sp. による Reichstein's substance S

酸化生産物

- [I] Substance S
- [II] 4^k-Substance S (*H. zizaniae*, *H. gramineum*)
- [III] 2 β -Hydroxy-substance S (*H. tritici-vulgaris*)
- [IV] 14 α -Hydroxy-substance S (*H. avenae*)
- [V] 6 β -Hydroxy-substance S (*H. leersii*)
- [VI] Hydrocortisone (*H. sigmoideum*)
- [VII] 11-Epihydrocortisone (*H. sigmoideum*)

元素分析値 C 69.38%, H 8.19% で monohydroxy-substance S の計算値とよく一致する結晶が得られた。 $[\alpha]_D^{24} + 160^\circ$ (EtOH), $\lambda_{\max}^{\text{nujol}}$ 2.88 μ (OH), 5.83 μ (20-ketone), 6.08 μ , 6.20 μ (4^k-3-ketone) を示し、標準品の hydrocortisone と全く一致することを知った。従って本菌には 11 β 位に水酸基を導入する能力のあることが判明した他 2, 3 の興味ある生産物が併成されていることがみとめられた。11-epihydrocortisone とペーパークロマトグラフィーの動向が非常によく似た物質 [m. p. 214~217°, $[\alpha]_D^{26} + 150.8^\circ$ (Dioxone), $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 242 m μ ($\epsilon=16840$)] が分離されたが、これについては又更めて報告する。尚、酸化様式により生産物の量的割合にかなり変動を来すことがはっきりした。即ち resting cell で酸化を行っても growing cell で酸化を行っても生産物の種類には変化はみられないが、hydrocortisone の収率という点からみると growing cell で酸化を行った方が良好な結果が得られている。

要 約

(1) *Helminthosporium* sp. 29 株を用いて Reichstein's substance S に対する酸化能を検討してみたが、半数以上の菌に強い酸化力をもとめることが出来た。

(2) 酸化生産物を単離し検討したところ、第 2 図に示すように A 環 1, 2 位間に二重結合を導入する性質を有するものと、核に水酸基を導入する性質を有するものとがみとめられ導入された水酸基の位置はかなり広範囲に及んでいる。即ち *Rhizopus* sp.⁽⁴⁾ により代表される 11 α 並びに 6 β 位, *Cunninghamella blakesleeana*⁽⁵⁾ 及び *Curvularia* sp.⁽⁶⁾ により代表される 11 β 位, *Streptomyces* sp.⁽⁷⁾, *Rhizoctonia* sp.⁽⁸⁾ 及び *Sclerotinia* sp.⁽⁹⁾ により報告されている 2 β 位, そして *Helicostylum* sp.⁽¹⁰⁾, *Stemphylium* sp.⁽¹¹⁾ によって報告された 14 α 位等 *Helminthosporium* 属菌にはこれらのすべての位置に水酸基を導入する能力のあることが判明した。

210~213°, $[\alpha]_D^{22} + 120^\circ$ (EtOH) の針状晶が得られ、元素分析値は C 69.61%, H 8.20% で monohydroxy-substance S の計算値とよく一致した。赤外線吸収スペクトルは $\lambda_{\max}^{\text{nujol}}$ 2.86 μ , 2.92 μ (OH), 5.84 μ (20-ketone), 6.07 μ , 6.21 μ (4^k-3-ketone) で標準品の 11-epihydrocortisone と全く一致することが明らかになった。副産物が殆どみとめられないので結晶状にとりやすく、収率は極めて良好で 70% 以上であった。

(7) *H. sigmoideum* (H-40) による酸化生産物：かなり多種類の酸化生産物がみとめられ、酢酸エチル抽出残渣は結晶しにくいのでハイフろスーパーセルによるカラムクロマトグラフィーで各生産物の単離をはかった。残存している substance S から 2 番目に流出されてくる区分にかなり多量の結晶が得られるので、この部分をあつめクロロホルムエーテルにて再結晶すると, m. p. 208~212°,

(3) 一方還元反応もみとめられ 4, 5 位の二重結合の還元並びに 20-ketone の還元された生産物も得られているが、これらについては更めて報告する。

本研究に使用した菌の分譲を願った岡山大学付属大原農業生物研究所西門義一教授, 14 α -hydroxy-substance S の標準品を頂いた財団法人醸酵研究所長谷川武治博士並びに 2 β -hydroxy-substance S の標準品を頂いた三共製薬株式会社研究所岡崎浩博士の各位に謝意を表します。

尚, 本研究の遂行にあたり終始鞭達指導を頂いた当研究所増尾栄太郎研究員並びに本研究の発表を許可された研究所長武田健一博士に感謝致します。

(1) 近藤栄二, 増尾栄太郎 : 本誌, 34, 759 (1960).	(7) H. L. Herzog et al. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 79, 3921 (1957).
(2) A. Zaffaroni, R. B. Burton, E. H. Keutmann : <i>Science</i> , 111, 6 (1950).	(8) G. Greenspan, C. P. Schaffner et al. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 79, 3922 (1957).
(3) R. B. Burton, A. Zaffaroni, E. H. Keutmann : <i>J. Biol. Chem.</i> , 188, 763 (1951).	(9) M. Shirasaka, M. Tsuruta, M. Nakamura : <i>Bull. Agr. Chem. Soc. Japan</i> , 22, 273 (1958).
(4) D. H. Peterson, H. C. Murray et al. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 75, 412 (1953).	(10) S. H. Eppstein, P. D. Meister, D. H. Peterson, H. C. Murray et al. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 80, 3382 (1958).
(5) F. R. Hanson, K. M. Mann, D. R. Colingsworth et al. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 75, 5369 (1953).	(11) 西川正元, 荻原彦一 : 薬誌, 78, 1256 (1958).
(6) G. M. Shull, D. A. Kita : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 77, 763 (1955).	

広葉樹溶解用硫酸塩パルプに関する研究 (第 1 報)*

前水解硫酸塩蒸解に於ける広葉樹の特性 (1)

前水解度とパルプの性質の関係

高橋昭之介, 西山勝海, 福田祐作 (日本パルプ工業株式会社研究所)

昭和 35 年 5 月 16 日 受理

緒 言

前水解硫酸塩法溶解用パルプ (DKP) の我国に於ける工業化は堀尾, 福田等の研究⁽¹⁾に基いて昭和 28 年 2 月日本パルプ K. K. 米子工場に於て始めて実現されたが, 当初は専ら赤松を原料として N・DKP が製造された。然しその後赤松の供給は急激に逼迫し, 量的に潤沢な広葉樹材の利用が緊急の課題となつた。

広葉樹の前水解硫酸塩蒸解に就ては F. A. Simmonds 等の二・三の研究^(2, 4)から一般的な輪郭は示されていたが, 実際に広葉樹 DKP (L・DKP) を工業化するに当って直面する具体的な障碍を克服し, 更に L・DKP の応用分野拡大の可能性を開発する為には, 更に本質的な研究の必要が痛感された。前水解硫酸塩法の特色はサルファイトに比して著しく高純度の重合度分布の均質なパルプを与える点にある事は既に N・DKP に就ては実証されているが, これらの特色は当然広葉樹に対しても期待される所である。然し広葉樹を原料とする場合, 赤松と異なる幾つかの制約が存在する。例えば L・DKP の原料として唯一種の広葉樹を選定する事は本邦の原本事情からみて工業的には殆ど無意味であり, 多数の樹種の混合材の使用を余儀なくされる場合が多い。又原木の化学的, 物理的性格も赤松とは著しく異なる点が多い等幾多の問題点があるが, これらの制約を克服してビスコース繊維原料として優れた性能を有する溶解用パルプを低原価で生産する方法を確立する事は, 企業化の段階に於て極めて重要な問題となる。

上述の観点から L・DKP の化学分析値の性質, ビスコース化反応性, 物理的性質, 紡糸性能の 4 面に亘って工業的生産の基礎確立を目的として本研究を開始した。

* Studies on the Hardwood Dissolving Sulphate Pulp. Part I. Behavior of Hardwood during Prehydrolysis Sulphate Cooking. (1) The Effect of Prehydrolysis upon Pulp Properties. By Shonosuke TAKAHASHI, Katsumi NISHIYAMA and Yusaku FUKUDA (Research Institute of Nippon Pulp Industry Co., Ltd.)