グラフによる実験結果とよく一致することを知った。

本研究を行うにあたり終始御懇篤な指導を賜った京都大学農学部館勇教授及び分子量測定に御援助を頂いた三井哲夫教授, 並びに実験に協力をされた第六陸軍技術研究所の北原文雄, 山本久の諸氏に感謝する。

(本研究は昭和 27 年 4 月 4 日, 第 23 回日本農学会大会及び昭和 27 年 9 月 20 日, 第 92 回日本農芸化学会関西支部例会において発表)

(1) 小野田 潔: 本誌, 35, 1323 (1961).	<i>ibid.</i> , 1432 (1937).
(2) C. Bedel: <i>Comp. rend.</i> , 176, 168 (1923).	(10) 小野田 潔: 第六陸軍技術研究所研究資料, p. 169 (1944).
(3) N. Rast: <i>Ber.</i> , 55, 1051, 3727 (1922).	(11) 館 勇: 化学実験学Ⅱ, 河出書房, 3 巻, p. 697 (1941).
(4) E. Beckmann: <i>Z. Physik. Chem.</i> , 2, 638 (1888).	(12) 品川陸明: ポーログラフ分析法, 共立出版, p. 107 (1952).
(5) J. Liebig: <i>Ann.</i> , 77, 102 (1851).	(13) W. Böttiger: "Physik. Method. d. Analyt. Chem." Leipzig Akad. Verlagsges., Teil 2, p. 295 (1936).
(6) A. O. Beckmann: <i>J. Optical Soc. Am.</i> , 31, 682 (1941).	(14) 館 勇: 化学実験学Ⅱ, 河出書房, 3 巻, p. 718 (1941).
(7) O. Piloty u. H. Steinbeck: <i>Ber.</i> , 38, 3116 (1902).	
(8) E. Gryschkewitsch-Trochimovski: <i>J. Chem. Soc.</i> , 1424 (1923).	
(9) L. E. Hinkel, G. O. Richard, O. Thomas:	

[農化 第 35 巻, 第 11 号, p. 1331~1335, 1961]

酢酸菌によるフラクトースの酸化(第4報)*

麴酸, イソ麴酸および新 γ -pyrone の生成

寺田 治, 鈴木静子, 木下祝郎(協和醸酵工業株式会社東京研究所)

昭和 36 年 7 月 7 日 受 理

緒 言

ある種の酢酸菌がフラクトースを酸化して 5-ケトフラクトースを生成することはさきに報告⁽¹⁻³⁾ したところであるが, その生理的意義については明らかではなかった。しかるにその後さらに培養を継続すれば麴酸等 3 種の γ -pyrone 化合物を生成することが見出された。酢酸菌の麴酸生成には基質としてフラクトースが要求されることは古く高橋等⁽⁴⁾ によって報告されたところで, かかる事実から著者等は 5-ケトフラクトースが麴酸の前駆物質であろうと推定し, 結晶 5-ケトフラクトースについて以上の推定を確認し得た。以下これについて報告する。

実 験 の 部

I. フラクトース培地における醸酵経過 フラクトース培地における醸酵経過を経時的に追跡した結果について述べる。

実 験 方 法

1. 培養方法: 酵母エキス 0.5%, フラクトース 10% よりなる培地に *G. cerinus* var. *ammoniacus* Asai IFO 3267 (G-1-4) を接種, 28° で振盪培養し, 50 日間にわたってその醸酵経過を検討した。

2. 分析方法: 醸酵生産物の検出はペーパークロマト法によった。展開溶剤, 発色試薬等は個々の実験の項に記載する。なお, γ -pyrone 化合物の検出には必要に応じて 2% FeCl_3 水溶液(塩酸酸性)を用いたが, 一般にはかかる操作を経ずとも濾紙中の物質と結合して橙黄-赤褐色のスポットとして認識される。もっとも鋭敏な

* Oxidation of Fructose by Members of *Acetobacter*. Part IV. Kojic Acid Formation through 5-Ketofructose.

By Osamu TERADA, Shizuko SUZUKI and Shukuo KINOSHITA (Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakkō Kōgyō Co., Ltd.)

検出法は紫外外部吸収を利用する方法であって著者等は紫外線検出器(マナスル化工製, 波長 2,536 Å, 蛍光板使用)を用いて満足すべき結果を得た。

実験結果 結果の1例を第1図に示す。すなわちフラクトーズは培養3~5日で完全に消失して5-ケトフラクトーズとなり, 約3週間後から3種の γ -pyrone と思われる塩化鉄呈色物質の生成が認められた(以下 R_F の高い順に pyrone-I, II, III と仮称する)。このうち pyrone-I, II は後述のごとくそれぞれイソ麩酸および麩酸と同定された。pyrone-III は未確認である。以上の結果は5-ケトフラクトーズが麩酸の precursor であることを強く示唆するものである。なおこれらの化合物のほかには第1図bに見られるとき還元性ポリアルコール酸-1, 2 の生成が認められたが, これらについては後報に譲る。

II. γ -Pyrone の抽出, 単離, 同定 フラクトーズ培地に生成する3種の γ -pyrone の抽出, 単離, 同定について述べれば次のごとし。

1. 抽出: 40~50日を経過した培養液を CaCO_3 で中和し, 過剰の CaCO_3 および菌体を遠沈除去した後エーテルで約50時間抽出する。エーテルを溜去すれば主として麩酸よりなる淡黄色針状結晶および橙体色のシラップよりなる粗抽出物を得る。

2. 単離: (1) 麩酸; 粗抽出物を少量のメタノールに加熱溶解し放冷すれば麩酸(pyrone-II)の針状結晶が析出する。メタノールより数回再結すれば m. p. 152° の淡黄色針状ないし長柱状結晶を得る。さらにトルエンより再結すれば m. p. 153.5° の無色鱗片状結晶を得る。

(2) Pyrone-III; pyrone-III が酸麩に比し晶出し難くかつ一旦生成した結晶が麩酸より難溶である性質を利用して分別した。すなわち数回に渉って麩酸を回収し pyrone-III 濃度の高くなった母液を濃縮冷却し, 析出した結晶を湯浴上で再び加熱すればまず麩酸の結晶が溶解し器底に pyrone-III の結晶塊を残す。メタノールより

数回再結すれば淡橙色短柱状微晶塊(m. p. 185~6°)が得られ, さらにトルエンより再結すれば無色の特徴ある彎曲樹板状結晶(m. p. 186.5~7°)を得る。

(3) Pyrone-I; Pyrone-II, III を回収した母液を濃縮しエーテルを注加すれば残存するpyrone-II, IIIの大部分が結晶或いは無定形沈澱として析出する。この上澄よりエーテルを溜去し残ったシラップを少量のメタノールに溶解し氷室中に放置すれば pyrone-I の結晶が析出する。メタノールより数回再結すれば m. p. 181~2° の菱形板状ないし斜方状結晶を得る。トルエンよ

第1図 フラクトーズ培地における経時的变化

展開剤: (a) *n*-ブタノール-ギ酸-水 (4:1.5:1)

(b) *n*-ブタノール-ピリジン-水 (3:2:1.5)

発色剤: ○ *p*-anisidine-HCl ● FeCl_3

* 培養日数を示す。

第2図 Pyrone-II の赤外部吸収 (KBr tablet 法)

り再結すれば m. p. 183.5~4° の針状結晶を得る。

なおこれら γ -pyrone の収量については定量的検討を欠くが概ね麴酸は 2 mg/ml, pyrone-III, I はそれぞれこの 1/10, 1/20 程度に過ぎない。

3. 同定: (1) 麴酸 (pyrone-II) i) m. p. 152~3° (文献値⁽⁶⁾ 152°), 標準試料と混融するも m. p. 低下を認めない。

ii) 元素分析値; 次のごとく麴酸に一致する。

Calcd. for $C_6H_6O_4$: C 50.71, H 4.26%. Found: C 50.79, H 4.21%.

iii) その他; クロマト的にも標準麴酸に一致し, また赤外部吸収(第 2 図)も標準に一致する。赤外吸収が細部において文献⁽⁶⁾と一致しない点があるのは測定法によるものと考えられる。

以上の結果より pyrone-II を麴酸と同定した。

(2) イソ麴酸 (pyrone-I) i) m. p. 183.5~4° (文献値⁽⁷⁾ 183°), 標準試料を入手し得なかったので混融による同定は実施し得なかった。

ii) 元素分析値; 次のごとくイソ麴酸に一致する。

Calcd. for $C_6H_6O_4$: C 50.71, H 4.26%. Found: C 51.09, H 4.41%.

iii) ジアセチル誘導体; 無水酢酸でアセチル化して得られる誘導体は無色柱状結晶で m. p. 105~5.5° (文献値⁽⁷⁾ 103°) を示し下に示す元素分析値とともにイソ麴酸ジアセチル誘導体に一致する。

Calcd. for $C_6H_4O_2(OCOCH_3)_2$: C 53.09, H 4.42%. Found: C 53.01, H 4.23%.

第 3 図 Pyrone-I の赤外部吸収 (KBr tablet 法)

iv) 赤外部吸収; 第 3 図に示すごとく主要吸収において文献⁽⁷⁾に一致する。細部の差は前述の麴酸の場合と同様測定法の差によるものであろう。

以上の結果から pyrone-I をイソ麴酸と同定した。

(3) pyrone-III i) m. p. 186.5~7°.

ii) 元素分析値; 下に示すごとく麴酸に酸素が 1 個附加したものに一致する。

Calcd. for $C_6H_6O_5$: C 45.58, H 3.83%. Found: C 45.72, H 3.99%.

iii) メチル誘導体

a) ジメチルエーテル; ジアゾメタンで活性水酸基をメチル化したものは m. p. 115.5~7° の無色柱状結晶ではや塩化鉄反応を呈せず, 元素分析値はジメチルエーテルに一致する。すなわち pyrone-III は 2 個のフェノール性水酸基を有する。

Calcd. for $C_6H_4O_5(CH_3)_2$:
C 51.61, H 5.41%. Found:
C 51.85, H 5.56%.

b) トリメチルエーテル; 沃化メチルと酸化銀によってすべての水酸基をメチル化すれば m. p. 85~6° の無色絹糸状結晶が得られその元素分析値はトリメチルエーテルに一致する。pyrone-III はカルボキシル基を有しないから, 以上の結果から

第 4 図 Pyrone-III の赤外部吸収 (KBr tablet 法)

2個のフェノール性水酸基と1個のアルコール性水酸基を有すると考えられる。

Calcd. for $C_6H_3O_5(CH_2O)_3$: C 54.00, H 6.04%. Found: C 53.78, H 5.99%.

iv) トリアセチル誘導体; 無水酢酸でアセチル化すれば無色板状結晶 (m. p. 90.5~91.5°) を与え元素分析値は下に示すごとくトリアセチル誘導体に一致する。この結果も pyrone-III が3個の水酸基を有することを示す。

Calcd. for $C_6H_3O_2(OCOCH_3)_3$: C 50.70, H 4.25%. Found: C 50.60, H 4.24%.

v) ヨードホルム反応; 常法⁽⁸⁾によりヨードホルム反応を検討すれば麩酸が陽性であるに反し陰性の結果を与える。これは γ -pyrone の3,5-位置が置換されていることを示し、上述の諸結果とともに次の3構造が可能であることを示唆する。著者等は構造 (I) を推定しているが最終的決定については後報に譲る。(第8報参照)

なお pyrone-I, II, III の紫外外部吸収を一括して第5図に示す。このうち麩酸, イソ麩酸については文献⁽⁷⁾記載との一致から, 同定の一根據となり得る。

III. 5-ケトフラクトーズよりの麩酸の生成 実験Iの結果は5-ケトフラクトーズが麩酸の precursor であることを強く示唆するものである。一方, 酢酸菌による麩酸生成が基質としてフラクトーズを要求することはよく知られた事実であり, また著者等の経験によっても他の糖を基質とした場合或いは酵母エキスのみを与えた場合, 菌体の増殖は良好であるが麩酸をまったく生成しない事実も以上の推論を支持するものである。よってこれを直接証明するため結晶5-ケトフラクトーズを基質として次のごとく検討をこころみた。

実験方法 結晶5-ケトフラクトーズ7.0%, 酵母エキス0.5%よりなる培地に *G. cerinus* (G-1-4) を接種し14週間振盪培養して適時生成物をペーパークロマトにより検討した。麩酸は結晶として単離, 同定した。

実験結果 5-ケトフラクトーズ培地, 約3週間後のクロマトグラムを第6図に示す。図に明らかなごとく5-ケトフラクトーズを基質とした場合もフラクトーズ培地におけるまったく同様の γ -pyrone の生成が認められる。このうち麩酸については既述の操作によって m. p. 152~3° の結晶として単離し, 標準試料との混融, 赤外部吸収の一致によって同定した。pyrone-I, III については量的に少ないため結晶としては得られなかったがクロマト的に R_F およびスポット抽出物の紫外外部吸収がフラクトーズより得られた標準結晶のそれと一致することにより同定した。

考 察

酢酸菌による麩酸の生成が, *Aspergillus* における場合と異なり, 基質としてフラクトーズまたはマンニトール, シュクローズのごとき酢酸菌によってフラクトーズ源となりうるごとき糖を要求することは高橋, 朝井⁽⁴⁾はじめ多くの研究者によって報ぜられたところである。池田⁽⁹⁾は麩酸生成能を有する酢酸菌の1株 *G. roseus* につ

第5図 Pyrone-I, II, III の紫外外部吸収

濃度はすべて 40 γ /ml.
 --- Pyrone-I (*i*-kajic acid)
 — Pyrone-II (*kajic acid*)
 Pyrone-III

第6図 5-ケトフラクトーズ培地における γ -pyrone の生成

展開剤: *n*-ブタノール-ギ酸-水 (4:1.5:1)
 発色剤: $\bigcirc$ *p*-anisidine-HCl $\otimes$ $FeCl_3$

* 5-ケトフラクトーズ培地.
 ** フラクトーズ培地.

いてフラクトースからグルコソンの生成を報告し、これが麴酸の precursor であるとしてグルコソンを経由する麴酸生成経路を提案した。しかしながら純グルコソンからの麴酸生成の証明を欠き、また著者等の追試⁽¹⁾によれば *G. roseus* も *G. cerinus* と同様フラクトースから専ら 5-ケトフラクトースを生成し、グルコソンの生成はまったく認められなかったことからグルコソン中間体説は疑問であるといわざるを得ない。

著者等は実験の部に述べたごとく *G. cerinus* をフラクトース培地で培養した場合、まずフラクトースが完全に 5-ケトフラクトースに酸化されて後徐々に麴酸等 3 種の γ -pyrone 化合物が生成することから 5-ケトフラクトースが麴酸の precursor であることを推定し、結晶 5-ケトフラクトースを基質とする培地において麴酸の生成を確認し、上の推定を証明、確認した。この場合麴酸が他の培地成分たる酵母エキスより由来し得ないことは酵母エキスのみ或いはこれにフラクトース以外の炭素源を与えた場合まったく麴酸の生成が認められないことより明らかである。

以上の実験結果に基づき著者等はグルコソン中間体説に替わるべきものとして次のごとき 5-ケトフラクトースを経由する新麴酸生成経路を提案したい。

なお著者等は中間体 (anhydro-enol-5-ketofructopyranose) の分離および intact cell, 磨砕菌体による 5-ケトフラクトースからの麴酸の生成証明について種々検討を試みたが成功するに至っていない。これは酢酸菌の麴酸生成が 3 週間以上を要する極めて緩慢な反応であることによると考えられるので、他の方法、例えば fructose-1-¹⁴C による証明等について検討中である。

要 約

G. cerinus のフラクトース培地における醗酵経過より 5-ケトフラクトースが麴酸の precursor であることを推論し、結晶 5-ケトフラクトースを基質としてこれを証明した。この結果に基づき 5-ケトフラクトースを経由する新麴酸生成経路を提案した。この間麴酸のほかにイソ麴酸および $C_6H_6O_5$ の分子式を有する新 γ -pyrone 化合物 (m. p. 187°) の生成を認めた。

終りに臨み対立的な立場を越えて御助言を惜しまれなかった東大応微研池田庸之助教授に深く尊敬と感謝の意を表します。

(本報告の一部は昭和 35 年 9 月 24 日日本農芸化学会関東支部例会において報告した)

(1) 寺田 治, 富沢勸治, 木下祝郎: 本誌, 35, 127 (1961).	(5) 藪田貞治郎: 東京化学会誌, 37, 1185(1916).
(2) 寺田 治, 富沢勸治, 鈴木静子, 木下祝郎: 本誌, 35, 131 (1961).	(6) 相田 浩: 本誌, 28, 523 (1954).
(3) 寺田 治, 鈴木静子, 木下祝郎: 本誌, 35, 178 (1961).	(7) K. Aida, M. Fujii, T. Asai: <i>Proc Japan Acad.</i> , 32, 600 (1956).
(4) 高橋偵造, 朝井勇宣: 本誌, 9, 55, 369(1927).	(8) 山口一孝: 植物成分分析法, 上巻, 南江堂, p. 102 (1958).
	(9) 池田庸之助: 本誌, 28, 538 (1954).