〔農化 第 35 卷, 第 2 号, p. 122~127, 1961〕

Diplodia tubericola によるステロイドの酸化について*

微生物によるステロイドの酸化に関する研究 (第 3 報)

朝井勇宣, 相田 浩, 田中篤治, 佐藤良博 (東京大学応用微生物研究所)

昭和 35 年 8 月 6 日 受理

緒

言

著者等は既に前報において *Rhizopus* 属菌がprogesteroneを酸化して 11 α -hydroxyprogesterone を, また菌株によってはさらに 6 β , 11 α -dihydroxyprogesterone を生成すること⁽¹⁾, *Syncephalastrum racemosum* がprogesteroneから短時間では 7 α , 15 β -dihydroxyprogesterone を^{(2-4)**}, 長時間ではさらに 7 α , 14 α , 15 β -trihydroxyprogesterone^{(5)**}, 11 α -hydroxyprogesterone から 6 β , 11 α -dihydroxyprogesterone を, compound S から 11-epihydrocortisone を生成するが, 6 β , 11 α -dihydroxyprogesterone および hydrocortisone からは酸化生成物の認められぬこと^(6,7) について報告した. その後さらに植物病原菌についてステロイドの酸化能を有する菌株の検索を続けた結果, 甘藷ジャワ黒腐病菌である *Diplodia tubericola* が諸種のステロイドの転換を行う事実を見出したのでその結果について報告する.

実 験 方 法

使用菌株: 実験に使用した *Diplodia tubericola* は東京大学農学部農学科明日山研究室より分譲されたものである.

培養方法: 馬鈴薯培地は馬鈴薯の皮をむき細切したものを 20% (w/v) になる如く水を加え 60° で 3 時間加熱した後ガーゼで固形物を濾過し, 濾液にグルコースその他を添加して調製した. 培養には 500 ml 容肩付振盪フラスコあるいは 5 l 容三角フラスコを用いて往復振盪培養機 (125 r. p. m.) あるいは回転振盪培養機 (120 r. p. m.) を用い 27° で培養した. また大量培養の際は 15 l 容ジャーファーメンターあるいは 200 l 容通気攪拌タンクで培養を行った.

酸化生成物の検索: 培養液あるいは菌体から酸化生成物を酢酸エチルで抽出し, 溶媒を溜去した後 Zaffaroni⁽⁸⁾ のペーパークロマトグラフィー (下降法) を行い, スポットは紫外線照射あるいは TPTZ 試薬, 三塩化アンチモン試薬を用いることによって検出した. 生成物の分離法については実験の部で述べる.

実 験 結 果

1. 培養条件の検討

(1) 培地組成: *Diplodia tubericola* は植物病原菌であるから一般に植物病原菌用の培地として常用される馬鈴薯培地が菌の増殖には適当であると考えられるが, ステロイドの酸化能に対する影響, タンク培養等の大量培養の際の培地調製の難易等を考慮して下記の如き諸種の成分の培地について検討を行った.

培地 A 20% 馬鈴薯抽出液 (w/v) にグルコース 5% 添加

B 培地 A にグルタミン酸ソーダ 0.5% 添加

C グルコース 5%, ペプトン 2%

D 培地 C にコーンステープリカー 0.3% 添加

E グルコース 5%, コーンステープリカー 0.3%

F 培地 E にグルタミン酸ソーダ 0.5% 添加

G 培地 E に α -ケトグルタル酸 0.5% 添加

500 ml 容肩付振盪フラスコに上記培地を 100 ml 分注し, 120°, 15 分間加圧滅菌後種菌を接種し, 往復振盪

* Hydroxylation of Steroids by *Diplodia tubericola*. (Studies on the Microbiological Hydroxylation of Steroids. Part III.)

By Toshinobu ASAI, Kô AIDA, Tokuji TANAKA and Yoshihiro SATO (The Institute of Applied Microbiology)

** 7 位の配位については, その後協同研究者である津田・佐藤等によって β 位であると訂正された. (K. TSUDA, Y. SATO: *Chem. Pharm. Bull.*, 8, 626, 1960)

第1表 プロゲステロン酸化に対する培地の影響

培地*	pH	残糖量 (mg/ml)	乾燥菌体量 (g/100ml)	プロゲステ ロン酸化
A	4.0	6.4	—	冊
B	5.8	0.6	0.51	冊
C	4.4	2.3	0.78	冊
D	4.4	2.6	1.04	冊
E	4.0	27.0	0.51	+
F	6.4	0.9	0.59	冊
G	4.0	1.8	0.54	冊

* 培地の成分については本文参照

第2表 各種アミノ酸のプロゲステロン酸化に及ぼす影響

アミノ酸	pH	残糖量 (mg/ml)	プロゲステ ロンの酸化
DL-アラニン	4.2	0.3	冊
L-アルギニン塩酸塩	3.4	18.5	冊
L-スレオニン	3.6	20.3	冊
DL-スレオニン	3.0	9.9	冊
L-ヒスチジン塩酸塩	3.8	27.5	+
L-リジン塩酸塩	4.4	24.6	+
L-シスチン	3.6	17.1	冊
L-フェニルアラニン	4.0	15.1	冊
L-アスパラギン酸	3.6	40.0	±
L-プロリン	4.0	1.2	冊
DL-バリン	3.8	17.4	冊
オキシプロリン	3.2	34.8	+
L-メチオニン	2.8	3.8	冊
DL-メチオニン	3.4	16.8	冊
L-ロイシン	3.0	24.9	+
DL-セリン	4.0	0.6	冊
グリシン	3.8	18.3	冊
L-チロシン	3.6	10.4	冊
DL-トリプトファン	3.0	3.5	冊

グルコース 5%, コーンステープリカー 0.3% に上記アミノ酸を 0.5% 添加, 27° で 72 時間培養後プロゲステロンを培地 100 ml 当り 25 mg を 1 ml のメタノールに溶解して添加更に 24 時間培養

第3表 各種ステロイドの酸化に対する培地の影響

培地	ステロイド	pH	残糖量 (mg/ml)	乾燥菌体量 (g/100ml)	基質の 酸化
C*	対 照	4.6	2.0	1.14	—
	pregnenolone	4.4	2.9	0.72	冊
	compound S	5.0	2.0	0.97	冊
D*	対 照	5.4	2.9	1.47	—
	pregnenolone	6.4	2.6	0.92	冊
	compound S	4.2	2.6	0.91	冊
F*	対 照	6.2	0.6	1.13	—
	pregnenolone	6.4	0.6	0.59	冊
	compound S	6.4	0.6	0.88	冊

* 培地の組成については本文参照

培養機で 27°, 72 時間培養後, プロゲステロン 25 mg を 1 ml のメタノールに溶解して添加し, 更に 24 時間培養を行って酸化を行わせた。

その結果を第1表に示す。その結果菌体の増殖とプロゲステロンの酸化能とは必ずしも平行していない。培地 B と培地 F がプロゲステロンの酸化にいい結果を示し、特に培地 F を用いれば馬鈴薯を用いる必要がないことがわかった。この培地にはグルタミン酸ソーダが有効であると考えられたので、その濃度について 0.1% から 1% の範囲について検討を行ったがやはり 0.5% 程度で十分であった。次にグルタミン酸以外の各種アミノ酸について本菌の菌体生育とプロゲステロン酸化に対する影響を試験した。第2表に示す如く、DL-アラニン、DL-スレオニン、L-プロリン、L-メチオニン、DL-セリン、L-チロシン、DL-トリプトファン等がプロゲステロンの酸化に良い結果を示したが、L-ヒスチジン、L-リジン、L-アスパラギン酸、オキシプロリン、L-ロイシン等は菌体の増殖も悪く、プロゲステロンの酸化も不良であった。但しこの場合にはコーンステープリカー中のアミノ酸含量を考慮に入れる必要があるので、この結果から本菌のアミノ酸要求について直接の推定を下すことは出来ない。

次に各種ステロイドの酸化に対する培地の影響についても検討を行ったが、その中で後で述べるように酸化生成物の分離確認を行った pregnenolone と Reichstein's compound S の酸化に対する菌体増殖と基質の酸化に及ぼす影響を第3表に示す。培地は大量培養の場合を考えて馬鈴薯を用いる培地を除き上記諸培地中で好結果を示した C, D, F の三種の培地について試験した。この結果 pregnenolone の酸化にはグルコース 5%, コーンステープリカー 0.3%, グルタミン酸ソーダ 0.5% の培地 F が適当であり、compound S の場合には培地 C が良い結果を示したが、後で述べる還元生成物分離のためには培地 D のグルコース 5%, ペプトン 2%, コーンステープリカー 0.3% の培地が適当であった。この実験でも明かに基質ステロイド添加によって菌体増殖に対する阻害が認められる。

(2) 培養方法の影響： 次に培養方法について検討を行った

第1図 各種培養法による *Diplodia tubericola* の培養経過

- [I] ○—○ 往復振盪培養機 (125 r.p.m.)
 [II] △—△ 回転振盪培養機 (120 r.p.m.)
 [III] □—□ ジャーフェルメンター

第 2 図 プログステロンの酸化生成物
Zaffaroni 下降法
U. V. 照射及び三塩化アンチモン発色 ●>●>○>○

結果を第 1 図および第 2 図に示す。[I]は 500 ml 容肩付振盪フラスコに培地を 100 ml 入れて 125 r. p. m. で往復振盪培養を行ったもの、[II]は 5 l 容三角フラスコに培地を 1.5 l 入れ 120 r. p. m. の回転振盪培養機で培養したもの、[III]は 15 l 容ジャーフェーマンターに培地を 10 l 入れ、攪拌数 120 r. p. m., 通気量毎分 10 l で培養したもの。この結果からみるとジャーフェーマンターが最も糖の消費が早く、また菌体の増殖も速かで往復振盪培養機が最も劣っている。従って基質添加の時期も図に示す如く変化して行った。ステロイド酸化の状況は第 2 図に示す如く、プロゲステロンから 2 種の酸化物が生成される。このものについては後で述べる。前報に於て報告した *Syncephalastrum* の場合には回転振盪培養機ではステロイドの酸化が非常に悪かったが、本菌の場合には十分に酸化が行われた。これはこの 2 種の菌の深部培養法による菌体の形状にも関係があるようである。すなわち *Syncephalastrum* の場合には回転振盪培養機ではビレット状になるが *Diplodia* の場合にはパルプ状を呈している。またこの菌は振盪コルベンの綿栓の上をビニール膜で覆い、通気を悪くした場合 *Syncephalastrum* では通常接種時間後の糖消費率 93% のものが 52.6% に低下するのに対し、通常 96.6% の糖消費率が 94.8% にしかならぬことから一般に通気条件が悪いと考えられる大型三角コルベンによる回転培養法でもよく増殖するものと思われる。

2. プログステロンの酸化 グルコース 5%, コーンステープリカー 0.3%, L-グルタミン酸ソーダ 0.5% の組成の培地を 5 l 容三角フラスコ 5 本に夫々 1.5 l ずつ分注し、120°, 20 分間高圧滅菌し、この各々へ別に同じ組成の培地で振盪培養した種菌を 100 ml ずつ接種し、120 r. p. m. のロータリーシェーカーで 27°, 24 時間培養、菌体を十分増殖せしめた後プロゲステロン 4 g を 80 ml のメタノールに溶解、夫々のフラスコに 10 ml ずつ添加し、更に 24 時間培養し基質の酸化を行わせた。酸化生成物の分離法は第 3 図に示す如くで、培養終了後菌体を濾別して培養液と分ち、菌体は酢酸エチルで抽出し、抽出液は培養液を酢酸エチルで抽出したものと合し、減圧で 300 ml 位に濃縮し(熱水で洗滌する操作については後記) 2% の重曹水で 2 回洗滌、次に蒸留水で洗滌、脱水芒硝で乾燥後再び減圧で濃縮して粗結晶を得た。これをシリカゲルのカラムクロマトグラフィーにかけ 2 種の物質を得た。その中の 1 種は精製の結果 m. p. 190.5~192.5°, $[\alpha]_D^{20} + 144.2$ ($c=0.5$, in dioxane), 紫外線吸収スペクトルの λ_{max}^{MeOH} 242.6 m μ ($\epsilon=19,000$) で 7 β -hydroxyprogesterone と同定された⁽⁹⁾。他の 1 種は、m. p. 231~2°, $[\alpha]_D^{18} + 122^\circ$ ($c=0.9$, $CHCl_3$), 紫外線吸収スペクトル λ_{max}^{MeOH} 240.2 m μ ($\epsilon=17,000$), アセチル化して monoacetate を調製した結果、m. p. 188~190°, $[\alpha]_D^{20} + 118^\circ$ ($c=1.1$, $CHCl_3$), 紫外線吸収の λ_{max}^{MeOH} 237 m μ ($\epsilon=15,500$) で、7 β , 15 β -dihydroxyprogesterone と津田・佐藤等によって同定された⁽¹⁰⁾。収量は純粋の結晶として 7 β -hydroxyprogesterone が 17%, 7 β , 15 β -dihydroxyprogesterone が 1% であっ

第 3 図 酸化生成物の分離法

た。

3. **7 β -hydroxyprogesterone の酸化** シューカーによる小規模の培養では酸化生成物が得られなかったが、50l のタンクを用いて大量培養を行った。すなわちグルコース 5%, ペプトン 2%, コーンステープリカー 0.3% の組成の培地を 30l 調製し、滅菌、接種して 24 時間培養後 7 β -hydroxyprogesterone 6g を 240 ml のメタノールに溶解して添加、更に 48 時間培養して酸化を行った。培養終了後前記の如く抽出、濃縮して結晶を析出させ、ペーパークロマトグラフィーにより酸化物の確認を行った所、7 β , 15 β -dihydroxyprogesterone に対応するスポットを見出したので、確認の為抽出物全量 6.5 g を使用してシリカゲルのカラムクロマトグラフィーを行った。その結果原料 4.4 g を回収した他油状の物質 350 mg を得、再びシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い 267 mg の粗結晶を得、アセトンで 3 回再結晶し m. p. 230~2° の板状結晶を得た。7 β , 15 β -dihydroxyprogesterone の標準

品と混融しても融点降下は認められず、 $[\alpha]_D^{25} + 122^\circ$ ($c=0.9$, CHCl_3), 紫外線吸収 $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 240.2 m μ ($\epsilon=17.000$) も一致することから 7 β , 15 β -dihydroxyprogesterone と同定した。

4. **Pregnenolone の酸化** 前記と同様の方法で培養した結果 pregnenolone から 7 β -hydroxyprogesterone を 6.3%, 7 β , 15 β -dihydroxyprogesterone を 21.3% の収量で得ることが出来た。

5. **Compound S よりの生成物** 500 ml 容肩付振盪フラスコに培地を 100 ml 入れ、プロゲステロンの場合と同様に培養を行いペーパークロマトグラフィーによって生成物を検索した所 2 種の物質の生成が認められた。そしてこの場合通気の条件によって生成物に変化が認められた。即ち第 4 図に示すように [I] 綿栓をして培養した場合、[II] ゴム栓をして培養した場合、[III] 減圧にして更に酸素を少くした場合では明かに差が認められた。一番原点に近いスポットの物質 [A] の生成には酸素の存在が必要であるが、2 番目のスポットの物質 [B] は酸素の少ない状態に於いても生成された。この各々を大量培養して分離し同定を行った結果、物質 [A] は m. p. 227.5~231.5°, $[\alpha]_D^{20} + 146^\circ$ ($c=0.52$, MeOH), 紫外線吸収スペクトル $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 240 m μ ($\epsilon=18.900$), アセチル化した結果、この物の monoacetate は m. p. 253~6°, $[\alpha]_D^{25} + 144^\circ$ ($c=0.56$, dioxane), 紫外線吸収スペクトル $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 241 m μ ($\epsilon=17.800$), diacetate は m. p. 170~3° で 7 β -hydroxy compound S と推定される。物質 [B] は m. p. 189~90°, 紫外線吸収スペクトル $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 242 ($\epsilon=18.100$), diacetate は m. p. 191~2° で compound S の 20 位が還元された 17 α , 20 β , 21-trihydroxy- Δ^4 -pregnen-3-one と同定された。すなわち本菌は Rerchsteins compound S を酸化する酵素系と還元する酵素系の両者を保有していることが明かになった。

6. **コハク酸の生成** 本菌の培養液について有機酸のペーパークロマトグラフィーを行った所、コハク酸らしい強いスポットが認められたのでその分離同定を行った。第 3 図に示す操作で酢酸エチル抽出物を熱水で洗滌し、これを濃縮し冷蔵庫中に放置すると柱状の結晶が得られた。また熱水抽出後の酢酸エチルを重曹水で洗滌し、これを塩酸性にしてエーテル抽出を行い、エーテルを溜去すると結晶が得られた。この両者は同一物で再結すると m. p. 186~7° で標品のコハク酸と混融しても融点の降下は認められなかった。コハク酸の生成はグルタミン酸に由来するものと考えられたが、グルタミン酸以外の窒素源を用いた場合にもかなり生成された。その一例を示すとグルコース 5% 入りのツァペクドックスの無機培地で培養しても糖に対して約 7% の収量で生成された。又グルコースの代りに可溶性澱粉を用いてもコハク酸の生成が認められた。

考

察

以上の実験結果を図示すると第 5 図の如くなる。すなわち本実験に使用した *Diplodia tubericola* によってステロイド核の 3 位の脱水素, 20 位の水素添加, 7 位, 15 位の水酸化と 3 通りの異った化学反応を同一菌によ

第 4 図 *Diplodia tubericola* による compound S からの生成物のペーパークロマトグラム

[I] 綿栓をして培養 [II] ゴム栓をして培養 [III] 減圧で培養
ペーパークロマトグラフィーは Zaffaroni の下降法による。

第 5 図 *Diplodia tubericola* によるステロイドの転換反応

[I] pregnenolone [II] プロゲステロン [III] 7β-hydroxyprogesterone
 [IV] 7β,15β-dihydroxyprogesterone [V] reichstein's compound S
 [VI] 7β-compound S [VII] 17α,20β,21-trihydroxy-4Δ-pregnen-3-one

7β,15β-dihydroxyprogesterone の 2 通りの酸化物が得られるが, 7β,15β-dihydroxy 体の収量は極めて悪く, 更に 7β-hydroxyprogesterone を基質に使用した場合, 培養条件の最もよい醗酵タンクによっても僅か 6% の収量しかないと言うことは本菌の酵素系に基質の構造が何等かの影響を与えているものと思われる。

要 約

甘藷黒腐病菌 *Diplodia tubericola* を用いて各種ステロイドの転換に好適な培地組成, アミノ酸の影響, 培養条件について検討を行った。次にこれらの培地を用いて大量培養を行い次の如き反応を確認した。すなわちプロゲステロンより 7β-hydroxyprogesterone と 7β,15β-dihydroxyprogesterone を生成した。収量は夫々 17%, 1%。7β-hydroxyprogesterone を酸化して 7β,15β-dihydroxyprogesterone を生成した。収量 6%。pregnenolone より 7β-hydroxyprogesterone を 6.3%, 7β,15β-dihydroxyprogesterone を 21.3% の収量で生成した。Reichstein's compound S より酸化生成物 7β-hydroxy compound S と還元生成物 17α,20β,21-trihydroxy-4Δ-pregnen-3-one を生成した。本菌はまたグルコースおよび澱粉からコハク酸を生成した。収量 7%。

終りに臨み, 菌株の分譲を賜った東大農学部明日山秀文教授, 研究に協力いただいた東大応微研津田恭介教授, 三共高峰研究所の方々に感謝いたします。本研究は文部省科学研究費によった。

- (1) T. Asai, K. Tsuda, K. Aida, E. Ohki, T. Tanaka, M. Hattori, H. Machida: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 4(2), 63 (1958).
- (2) 朝井勇宣, 相田 浩, 大木英二, 田中篤治, 服部昌子: 本誌, 32, 723 (1958).
- (3) T. Asai, K. Tsuda, K. Aida, E. Ohki, T. Tanaka, M. Hattori: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 4(2), 79 (1958).

- (4) K. Tsuda, T. Asai, E. Ohki, T. Tanaka, M. Hattori: *Chem. Pharm. Bull.*, 6, 387 (1958).
- (5) K. Tsuda, T. Asai, E. Ohki, T. Tanaka, T. Matsuhisa: *ibid.*, 7, 369 (1959).
- (6) 朝井勇宣, 相田 浩, 田中篤治, 大木英二, 松久毅正, 武田義人, 乾 泰治: 本誌, 33, 985 (1959).
- (7) T. Asai, K. Aida, T. Tanaka, E. Ohki, T. Matsuhisa, Y. Takeda: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 4(2), 79 (1958).

で行うことが明かにされた。この中で何れの反応が進行するかは基質となるステロイドによって異なる。pregnenolone を基質に用いた場合には 3 位が脱水素されてプロゲステロンとなり, 次に 7β-hydroxyprogesterone の経路を通して 7β,15β-dihydroxyprogesterone に酸化される。Murray 等は *Rh. arrhizus* を用い pregnenolone より 7β-hydroxyprogesterone を得たと報告しているが⁽¹⁾, 本菌ではこの物質は得られなかった。又プロゲステロンを基質にしても, 7β-hydroxyprogesterone と

- Microbiol.*, 5(3), 127 (1959).
 (8) A. Zaffaroni, R. B. Burton, E. H. Keutmann: *Science*, 111, 6 (1950).
 (9) K. Tsuda, T. Asai, Y. Sato, T. Tanaka, M. Kato: *J. Gen. Appl. Microbiol.* 5, 1 (1959).
 (10) T. Tsuda et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, in press.
 (11) H. C. Morray et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 4050 (1954).

[農化 第 35 卷, 第 2 号, p. 127~130, 1961]

Acetobacter 属細菌による 5-デヒドロフラクトーズの生成 (第 1 報)*

フラクトーズよりの一新強還元性物質の生成, 並びにグルコソンの異同

寺田 治, 富沢勲治, 木下祝郎 (協和醸酵工業株式会社東京研究所)

昭和 35 年 8 月 8 日 受 理

著者等はフラクトーズイソメラーゼの探索を目的として, 諸種の酸化細菌のフラクトーズ利用能を検討中, たまたま *Gluconobacter* の一株がフラクトーズから強い還元力を有する糖類似物質を生成することを認めた. この物質について検討した結果, この物質がかつて酸化細菌によるフラクトーズの酸化生成物として報告されたいずれの物質にも一致しない新物質であることを認めたのでここに報告する. なお以下 *Gluconobacter*, *Acetobacter* を一括して論ずる場合には *Acetobacter* という語を用いる.

実 験 方 法

1. 培養方法 原則として試験管振盪機を用いた. 振幅 25 mm, 回転数 250 r. p. m., 培養容器は 24×190 mm の大型試験管, 培地量は 15 ml, 挿入傾角は約 15° である. このほか必要に応じて回転振盪機をも併用した. 振幅 50 mm, 回転数 180 r. p. m., 容器は 250 ml 容 Erlenmeyer フラスコ, 培地量は 50 ml である.

2. 分析方法 生成物質の検出は主としてペーパークロマトグラフ法によった. 培地に炭酸カルシウムを添加しない場合はそのまま, 添加した場合は試料中に Amberlite IR-120 (H 型) を投入しカルシウムを除去したものをスポットした. 使用した濾紙は東洋濾紙 No. 50 である.

展開溶剤としては

i) <i>n</i> -butanol-formic acid-water (4:1.5:1)	ii) <i>n</i> -butanol-acetic acid-water (4:1:1)
iii) <i>n</i> -butanol-pyridine-water (3:2:1.5)	iv) phenol-water (4:1)

を目的に応じて適宜使用した.

発色試薬としては

i) B. P. B., 70% エタノール溶液	ii) <i>p</i> -anisidine-HCl, エタノール溶液 ⁽¹⁾
iii) orcinol-HCl, エタノール溶液 ⁽¹⁾	iv) KJO ₄ -Benzidine 試薬 B ⁽²⁾
v) 2,4-dinitrophenylhydrazine-H ₃ PO ₄ 試薬 ⁽³⁾	vi) phenylhydrazine-HCl 5% 溶液
vii) hydroxylamine-FeCl ₃ 試薬 ⁽⁴⁾	

を目的に応じて使用した. 即ち i) は有機酸の検出, ii) は糖および還元性有機酸, iii) はケトヘキソーズ, iv) はポリアルコール, 糖およびその類縁物質, v, vi) はカルボニル化合物, また vii) はエステル, ラクトンの検出に用いた. その他の実験方法については個々の実験の項に記す.

実験結果および考察

I. 諸種の酸化細菌によるフラクトーズおよびその epimer の利用 酸化細菌による糖およびその関連物質の酸化に関しては多数の報告があるが, ケトーズの酸化に関してはいずれの酸化細菌についても Bertrand 型式による酸化は知られておらず一応低分子化合物に分解された後酸化を受けるとされており⁽⁵⁾, 特殊な例としては *Gluconobacter roseus* による醗酸生成に際してフラクトーズが非 Bertrand 型酸化を受けてグルコソンを生成することが池田⁽⁶⁾によって報告されている.

* Formation of 5-Dehydrofructose by Members of *Acetobacter* species. Part I. Formation of a New Strong Reducing Substance from Fructose and its Discrimination from Glucosone.
 By Osamu TERADA, Kanji TOMIZAWA and Shukuo KINOSHITA (Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakkō Kōgyō Co., Ltd.)