



微生物の麴酸代謝に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2009-08-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 野々村, 誠一 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24729/00009550

微生物の麴酸代謝に関する研究

野々村 誠 一

Studies on Kojic Acid Metabolism by Microorganisms.

by

Seiichi NONOMURA

(Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture)

(Received January 28, 1962)

Summary

The influence of phosphate on kojic acid formation by koji-mold, and the formation of kojic acid from low molecular weight carbohydrates, particularly ethanol, were studied. Further-more, in the study of kojic acid decomposition by koji-mold and by some bacterium utilizing the acid, where the acid was used as the sole carbon source, comenic and d-galacturonic acids, thought to be the decomposed intermediates, were isolated and identified.

From these experiments, some steps of the mechanism of kojic acid decomposition by microorganisms were proposed as follows:

In the study of the relation between kojic acid formation by koji-mold and phosphate in both surface and shake cultures, with glucose or ethanol as the carbon source, it was found that with phosphate in the medium in both cultures, mycelium was first produced, and then kojic acid was formed using phosphate stored in the mycelium. Consequently, in the secondary cultures, the acid was formed utilizing the phosphate in the mycelium, even when phosphate was absent in the replacement medium.

From the study of the mechanism of kojic acid biosynthesis from ethanol, including the subject of phosphate participation, it was proposed that, assuming the biosynthesis would proceed via the reverse process of glycolysis, ethanol would be converted to acetic acid via acetaldehyde, and then via TCA cycle to a triose phosphate, which would either undergo condensation with itself to form kojic acid directly, or be converted to the acid through a hexose as an intermediate. Either way it is obvious that phosphate is related to kojic acid biosynthesis.

The mechanism of kojic acid decomposition by microorganisms is not yet known. In this study kojic acid decomposition by koji-mold in surface culture was taken as a main topic, and glycolic acid, a few other organic acids found on TCA cycle, two unknown organic acids, and two unknown substances positive to ferric chloride were qualitatively identified as the decomposed intermediates.

A kojic acid-decomposing bacterium, capable of growing in the medium containing kojic acid as the sole carbon source, was isolated from soil, and from the study

of the decomposition by this bacterium the following experimental results were obtained: 2.6 moles of molecular oxygen are required for complete decomposition of 1 mole of the acid. The R.Q. is 0.83. The acid is anaerobically decomposed in presence of methylen blue. The influence of inhibitors on the decomposition was also investigated.

After the resting cell of the bacterium was allowed to act on kojic acid, comenic acid was isolated, and identified by its analytical data, derivatives, infrared and ultra-violet absorption spectra.

From the culture fluid of kojic acid fermentation by the bacterium, d-galacturonic acid was isolated in the form of its derivative, and identified by infrared and ultra-violet absorption spectra, and, in addition to this, the presence of comenic, d-tagaturonic, succinic, and fumaric acids was also proved by paper chromatography.

Based on the identification of these acids, and on experimental results mentioned above, the mechanism of kojic acid decomposition by microorganisms was proposed as follows:

kojic acid \rightarrow (comen aldehyde) \rightarrow comenic acid \rightarrow d-galacturonic acid \rightarrow d-tagaturonic acid \rightarrow succinic acid \rightarrow fumaric acid.

緒 言

麴酸は 1907 年齋藤¹⁾によって米麴から分離され、1913 年その構造が藪田²⁾によって確立されて以来、麴酸の生合成機構や化学的性質について数多くの研究がなされてきた。特に麴かびによる生合成機構については今まで数多くの説^{3,4)}が提案されてきている。近年ラベルしたグルコースを用いた研究⁵⁾から麴酸の生合成機構がほぼ見通された。

麴かびが生成する麴酸は糸状菌が生成するその他の有機酸類に較べて非常に多く生成されるにかかわらず、麴酸の生理的意義については全く不明の有様であって、例えば、BRACKEN⁶⁾は「何故この酸が有益な機能を持っているようには思えないのに、かびが生産するのか、また未知の酵素反応の中間体として存在するのか、というような点については全く説明することができない」と述べている。

麴かびによって生成した麴酸は二次的に分解されてゆくことから、ARNSTEIN 等⁷⁾は麴酸は最終の生産物ではなく、普遍的な代謝産物であると考えている。麴酸の分解経路については現在まで殆んど研究されていない。この分解経路を解明することによって麴かびの別の生理的性質を解明できるのではないかと考えられるのである。

著者はこのような意図で麴酸の代謝について研究を進め、第 1 編では麴かびで静置培養と振盪培養の両法を用いて麴酸生成機構の主要点を磷酸関与の点に置いて実験を進めた。かびの生育は勿論その代謝活性に対して磷酸が必須であることは醸酵生理学上当然である

が、麴酸の生合成に対する磷酸関与の点については全く相反する見解が報告されている。BARHAM 等⁸⁾は *Asp. flavus* によるキシロースの麴酸醸酵(生育培養)で磷酸濃度の関係について検討して、磷酸の低い濃度のときにむしろ麴酸が高収量であったことを見出している。ARNSTEIN⁷⁾等は生育培養 (*Asp. flavus oryzae*) で高濃度の磷酸 (0.25% w/v) のとき麴酸の生成は早く、かつ最高であり (10日間)、30日後には分解、消失した。低濃度 (0.01% w/v) のときは生産はおそい上に、高濃度のときの収量に達しなかった (約 5%)。その状態が 20日間つづいた後、徐々に分解し 150日後でもなお麴酸が存在していた。このことから低濃度の磷酸は麴酸の生成とその分解の両方に作用し、特に麴酸生成よりもむしろかびの一般的な代謝過程に作用するものであると述べている。これに反して GOULD⁹⁾は *Asp. tamaris* を用いた菌蓋培養で磷酸含有のものよりも無磷酸培地の方が麴酸の収量が多かったことから、麴酸の合成に磷酸は必要でないと強調している。これと同じ意見は己に早く KLUYVER 等¹⁰⁾によっても認められ、飴山¹¹⁾も二次振盪培養法で磷酸がなくても麴酸が生成すると述べている。磷酸がない培地で麴酸が生成することについては麴酸の precursor が磷酸化した型でなく、単一の化合物として麴酸に合成されるのか、或は菌蓋自体に己に存在する無機磷酸ないしは有機磷酸を利用するのではないかの疑いがかけられる。この疑問に対して GOULD⁹⁾は、WALKER¹²⁾や MANN¹³⁾が *Asp. niger* を用いて phosphorylation を阻害した量の弗化ソーダやヨー

酢酸を添加しても麩酸の生成が増加していることから、麩酸合成過程に磷酸化は関係しないことを強く示唆している。

このように麩酸の生合成に磷酸が関与するか、どうかについて相反する結果が得られているが何れの報告にも醗酵中に於ける磷酸の量的ないし質的關係に対する調査がなく、それに加えて培養法にもそれぞれ別個の培養法を用いているので、これらの実験条件を規定して静置及び振盪培養両法の一次、二次培養に於ける無機及び有機態磷酸の量的関係と麩酸生成の関係を調査し、上述のような麩酸生成に対する磷酸関与の問題点を統一するために本実験を行ったのである。

また麩酸生合成機構の研究はグルコースやペントースのような C_6 , C_5 化合物以外に C_2 , C_3 , C_4 等の種々な化合物を基質として行われている。ARNSTEIN 等^{5,7)} は $[1-^{14}C]$ グルコースを用いて生成した麩酸の $[^{14}C]$ の分布から麩酸の生合成機構はグルコースの直接的な脱水と酸化による経路と、他は三炭糖磷酸の縮合による二つの経路によって生成するものであることを推定している。彼等は使用した麩かびの菌絲中にアルドラーゼとトリオースイソメラーゼの存在することと、 $[1-^{14}C]$ グルコースを用いて生成した麩酸の radioactivity を測定すると全 radioactivity の 17% 以上が麩酸の 6 位 (側鎖 $-CH_2OH$) に分布していること、またその醗酵の最終で回収したグルコース中の radioactivity をみると第 6 位の炭素にかなり存在することから、麩酸の第 1 位と第 6 位、グルコースの第 1 位と第 6 位の炭素原子の間に at random に radioactivity を分布せしめる酵素系があるため、このことはグルコースが三炭糖磷酸の平衡混合物に convert され、それに加えて一部分醗酵中にグルコースに再合成された結果によるものであると推定している。また $[1-^{14}C]$ グルコースと $[3, 4-^{14}C]$ グルコースを基質として醗酵させたときに生じた炭酸ガスの radioactivity をみると、 $[1-^{14}C]$ グルコースのときに排出した炭酸ガスの方に可なり大きい量の radioactivity の存在することから E.M.P. scheme の存在を推定している。このような実験結果から麩かびはアルドラーゼと三炭糖磷酸イソメラーゼを含み、その結果としてジヒドロオキシアセトンが形成され、かつグリセリンアルデヒドと平衡にあることを認め、おそらく麩酸の 6 位の炭素 ($-CH_2OH$) に radioactivity のあることは三炭糖磷酸の縮合によっても麩酸が合成されるものであることを推定している。三炭糖の

縮合による麩酸の生合成については己に CORBELLINI 等¹⁴⁾ によって提案され、さらに CHALLENGER 等¹⁵⁾ はジヒドロオキシアセトンから高収量 (30%) で麩酸が生成することから、この縮合説を強調し、また片桐等¹⁶⁾ はジヒドロオキシアセトンからはグルコースと同じほどの収量を得たがグリセリンアルデヒドからは生成しないことを述べてこの縮合説を支持している。

このように三炭糖 (ジヒドロオキシアセトン) の縮合による麩酸の生成はグルコースからの麩酸生成の場合の主経路ではないとしても一部の経路をなすものであることが窺われる。また ARNSTEIN 等¹⁷⁾ は酢酸、ピルビン酸、グリシンのような低分子化合物を基質グルコースに加えて麩酸の radioactivity の取り込みをみた結果、麩酸の第 4, 5, 6 位に分布していたがその量は少く 1% 以下であった。これらの実験結果から麩酸の生合成機構の第 1 経路はグルコースの直接的な脱水と酸化が大部分であり、E.M.P. scheme によって分解された三炭糖磷酸はその縮合によって麩酸に合成され、さらに分解の進んだ化合物は殆んど麩酸合成の母体 (2.3~1%) とはならず、大部分は酸化され、かつ菌体の組成に構成されたことを麩酸の radioactivity の分布から結論している。

また C_2 化合物例えばエタノールから麩酸が生成することについて坂口¹⁸⁾ はグルコースにエタノールを添加すると麩酸の収量が著るしく増大することと、また炭素源としてエタノールだけの場合でも多量の麩酸が生成することから各種炭素源は一度 C_2 化合物例えばエタノールに分解されてのち合成過程を経て麩酸になるという見解を提出した。さらに BARNARD 等はエタノールから麩酸の中間物としてアセトアルデヒドを分離、証明してこのものが transformation を行い麩酸になると述べている。さらに坂口¹⁹⁾ はその後ふたたびエタノールの外に乳酸、ピルビン酸だけからも麩酸が生成すること、また基質グルコースにこれら三種の化合物を添加すると麩酸が増加することを時間的に観察して麩酸生成力及び添加増収率ともエタノールがすぐれていること、また麩酸生成に対する阻害剤の効果等からみて、麩酸の生成は各種炭素源が一度 C_2 化合物例えばエタノールに分解されてのち再び炭素数の多い麩酸の直接の母体、フラクトースまたはそれに近い化学的構造を有する化合物に合成されてのち麩酸になるであろうという見解を再確認している。

前述のように麩酸の生成に磷酸が関与するかどうかは単にグルコースより由来した radioactivity の分

布だけでは判らないし、また麴酸の直接的な precursor が単一な化合物であるか或は磷酸エステル型の化合物であるかどうかについても不明である。著者は磷酸関与の点を解明することからもまた麴酸生成の precursor を検討することから坂口によって示されたようにエタノールだけから麴酸を生成する麴かびを用いて麴酸の生成について検討し、併せて坂口の提示した C₂ 化合物縮合説を実証しようと考えたのである。

生成した麴酸はなお培養を継続してゆくと同じ麴かびで分解されてしまう。このことから麴酸は最終生産物でないといえる。麴酸が麴かびによって利用されることは二、三の研究者によって認められ、CORBELLINI 等²⁵⁾は *Asp. flavus* によって麴酸が形成されたのち、またそのかびによって分解されると述べているし、このことは著者等も麴かびによって生成した麴酸は同じかびによって分解、消失してゆくことを認めた。また TRAETTA-MOSCA²⁰⁾は酵母によってエチルアルコールに醗酵されたと述べているが、麴酸の reassimilation については全く未知のまま残っている。それで第 2 編に於ては生成した麴酸の二次的基質としての分解経路を麴かびと、そして麴酸を利用する細菌を土壤より検索、分離してこの細菌を用いて麴酸の分解経路の解明を試み、麴酸生成機構の手掛りともまた麴かびの麴酸に対する生理的意義を検討しようと考えたのである。

附言。本研究の題目を指示されかつ終始御指導を賜った大阪府立大学教授辰巳忠次博士に心から感謝の意を現わします。また本研究の遂行に当り麴かびを与えられた山梨大学工学部小原 巖教授に感謝します。また実験の遂行に当り多大の御協力を頂いた徳山 泰、樺本五男、門脇凱男の各氏ならびに研究室の各位に感謝します。なお本研究論文は下記の研究報告と学会に於ける講演及びこれに新しい実験結果を加えて展開したものである。

- 1) 徳山 泰, 野々村誠一, 辰巳忠次: 農化 **33**, 558, (1959)
微生物の麴酸代謝に関する研究(第 3 報), 麴かびによる麴酸の分解について
- 2) 野々村誠一, 樺本五男, 辰巳忠次: 農化 **34**, 732, (1960)
微生物の麴酸代謝に関する研究(第 4 報), 菌蓋培養法によるエタノールより麴酸の生成
- 3) 野々村誠一, 樺本五男, 辰巳忠次: 農化 **34**, 1008, (1960)
微生物の麴酸代謝に関する研究(第 5 報), 麴

酸生成に対する磷酸の影響

- 4) 野々村誠一, 辰巳忠次: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **24**, 741, (1960)
MICROBIAL FORMATION OF COMENIC ACID FROM KOJIC ACID.
- 5) 野々村誠一, 辰巳忠次: 農化 **35**, 951, (1961)
微生物の麴酸代謝に関する研究(第 6 報), 細菌による麴酸よりコメン酸の生成
- 6) 野々村誠一, 門脇凱男, 辰巳忠次: 農化関西支部第 178 回講演会, 昭和 36 年 4 月。
微生物の麴酸代謝に関する研究(第 8 報), 細菌による麴酸分解の諸条件について

文 献

- 1) 斎藤賢道: 植物学雑誌 **21**, 7, (1907)
- 2) 藪田貞次郎: 東京化学会誌 **37**, 1185, (1916)
- 3) J. W. FORSTER: CHEMICAL ACTIVITY OF FUNGI, ACAD. PRESS, INC., N.Y. (1949) p. 430.
- 4) 朝井勇宜: 化学の領域 **6**, 509, (1952)
- 5) H.R.V. ARNSTEIN, R. BENTLEY: *Biochem. J.*, **54**, 493, (1953)
- 6) A. BRACKEN: 赤井重恭, 獅山茲孝訳: 微生物の化学, p. 192 南江堂, 昭和 35 年
- 7) H.R.V. ARNSTEIN, R. BENTLEY: *Biochem. J.*, **54**, 508, (1953)
- 8) H.N. BARHAN, B.L. SMITS: *Trans. Kans. Acad. Sci.*, **37**, 91, (1934)
- 9) B.S. GOULD: *Biochem. J.*, **32**, 797, (1938)
- 10) A.J. KLUYVER, L.H.C. PERQUIN: *Biochem. Z.*, **266**, 68, 82, (1933)
- 11) 飴山 実: 農化 **30**, 196, (1956)
- 12) T.K. WALKER: *J. Soc. Chem. Ind., Lond.*, **56**, 61T, (1936)
- 13) T. MANN: *Biochem. J.* **38**, 339, (1944)
- 14) A. CORBELLINI, B. GREGORINI: *Gazz. chim. ital.* **60**, 244, (1930)
- 15) F. CHALLENGER, L. RLEIN, T.K. WALKER: *J. Chem. Soc.*, **1931**, 16
- 16) 片桐英郎, 北原覚雄: *Mem. Coll. Agr., Kyoto Imp. Univ.*, No. **26**, 1, (1933)
- 17) H.R.V. ARNSTEIN, R. BENTLEY: *Biochem. J.*, **54**, 517, (1953)
- 18) 坂口謹一郎: 農化 **8**, 265, (1932)
- 19) 坂口謹一郎, 朝井勇宜, 池田庸之助: 農化 **19**, 711, (1943)
- 20) F. TRAETTA-MOSCA: *Ann. chim. applicata* **1**, 488, (1914)

第 1 編 麴かびによる麴酸の生成

第 1 章 実験方法

1. 菌株と培養方法

この研究で静置培養法に用いた麴かびは *Aspergi-*

Illus tamaris var. crassus J 47 (山梨大学醸酵研究所), 炭素源としてエタノールを, 振盪培養法には *Aspergillus oryzae var. globosus* AA 2, 炭素源としてグルコースを用いた. 培地組成は KH_2PO_4 1.0gr, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 gr, NH_4NO_3 0.4 gr. 粉末酵母エキス (大五栄養 K.K. 製) 0.002 gr と, これに炭素源としてエタノールまたはグルコースを実験条件に従ってそれぞれの量を加えて蒸留水で 1l にした. 殺菌法はエタノール添加のときはエタノール以外の組成液を蒸気殺菌釜で30分間殺菌してのち冷後, 無菌的にエタノールを添加した. なおエタノール濃度は v/v で示した.

実験法は特記しない限り静置培養は菌蓋培養法, 振盪培養は二次培養法を用いた. 静置培養法は綿栓を通して硝子管を立てた 1l フェルンバツハフラスコに培地 700 ml を加え殺菌し, 冷後エタノールを加え, 固体ツァベック培地に 7日間培養した胞子を接種し, 31°C で 2週間培養後, 硝子管を通して培養液を吸引, 排出し 1回約 200 ml の殺菌水を硝子管を通して注水し, 菌蓋下面下の培養液を洗う. この操作を 3~4回繰り返すと第 2 鉄イオンによる麴酸の反応がなくなる. ついで二次培地として KH_2PO_4 1.0 gr, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 gr を蒸留水で 1l にした組成液 700 ml を殺菌後所要量のエタノールを添加し, 無菌的に菌蓋下に加え 31° で静置培養を行った.

振盪培養法は基礎培地 1l にグルコースを 20~50 gr を加えた培地を 500 ml 容坂口フラスコまたは平底フラスコに 40 ml を分注し, 殺菌したものに供試菌株を固体ツァベック培地に 7日間培養した胞子を殺菌した 0.007% 寒天水に懸濁した液 3 ml を接種して $30 \pm 1^\circ$ で 48時間振盪培養した (70 cm 衝程, 毎分 125~135回), 二次培養は 48時間一次培養の菌体をブフナー漏斗で菌体を汙別し, 4~5回殺菌水で洗滌後この菌体をほぼ等量とり, これを二次培地に懸濁して培養を行った (二次培養用 6 cm 衝程, 毎分 110回).

2. 麴酸の定量法

麴酸を銅の chelate complex として秤量する重量法や第 2 鉄塩との chelate complex が特有の濃ぶどう酒色を示すことから比色定量する方法がある. 後者は麴酸の量が 1/20 万量でもよく発色することから微量定量に充分利用できるので本実験では第 2 鉄塩による比色法を採用した. 今まで第 2 鉄塩として主として塩化第 2 鉄塩が用いられたが本実験では辰己, 飴山¹⁾の硫酸第 2 鉄塩を用いて発色し, ITO's SPECTRO-

PHOTOMETER を用いて定量した. 培養液 2~5 ml を採りこれに M/10 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 2 ml, M/2.5 H_2SO_4 1 ml を加え全量を 10 ml に満たし, 10 mm または 5 mm セルを用いて 500 m μ でその吸光度を測定し次式に従って定量する.

$$\text{麴酸}\% = \frac{\kappa}{1000} \cdot a = 0.055 \left(10 \text{ mm セルを用いた時の系数} \right) \cdot \kappa = \text{吸光度}$$

第 2 章 静置および振盪両培養法による麴酸の生成

1. ま え が き

麴かびによる麴酸の生成についての研究は専ら静置培養法と静置菌蓋培養法について研究が扱われてきた. これに対し submerged culture が麴酸生成に KLUYVER 等²⁾によって始めて行われている. その後飴山³⁾により静置培養法と振盪培養法について二, 三の基礎的な条件が検討されている.

著者は本実験に於て特に麴かびによる麴酸の生成に対する磷酸関与の問題点より, 静置培養法には炭素源としてエタノールを, 振盪培養法にはグルコースを用い麴酸生成に対する磷酸の影響について検討したのである. 静置および振盪一次培養法による麴酸の生成には菌体生育の点から一, 二の無機塩に加え磷酸の必要なことは勿論であるが菌蓋培養や二次振盪培養に磷酸が関与するかどうかについて実験条件を規正して検討しようとして試みたものである.

BARNARD 等⁴⁾はペントースを基質とした麴酸生成の実験に於て磷酸濃度の低いものの方がむしろ麴酸の生成が高収量であり, GOULD⁵⁾は二次培養に於て無磷酸グルコース培地の方が高収量であったことから, 麴酸生成に磷酸は関与しないとしている. また二次培養に於て無磷酸培地でも麴酸が生成することは KLUYVER 等²⁾によっても認められ, 飴山³⁾も静置二次培養に於て磷酸は関与しないと述べている. しかし ARNSTEIN 等⁶⁾は一次培養に於て麴酸の生成およびその分解に磷酸は必須であることを述べている.

2. 分 析 法

麴酸は比色法により, 水素イオン濃度は pH メーター (堀場製作所製) を用い, 全酸はフェノールフタレンを指示薬として培地 10 ml を中和するに要する 0.1 N NaOH の ml 数で示した. グルコースはベルトラン法を用いその還元量より麴酸が示す還元量を差引いてグルコース量とした (0.68 mg グルコース/1 mg 麴

酸). エタノールは重クロム酸カリ酸化法により, 無機磷酸は FISKE-SUBARROW 法⁷⁾および高橋法⁸⁾を用い, 7分磷は一定量の試料に 2N 塩酸を加え, これを沸騰水中で7分間加水分解し苛性カリで中和後, 無機磷酸定量法に従い, 全磷酸は試料を 5N 硫酸で湿性灰化後, 無機磷酸として定量した. 菌体内の有機磷酸化合物抽出には菌体を冷蒸溜水で洗滌し, これをなるべく低温 (10°以下) の下で30分間 8% 三塩化醋酸 (T.C.A.) で抽出し, 酸可溶部と不溶部に分けこれについて磷酸を定量した. 菌体中のポリ磷酸の分解により徹底的の抽出は不可能であるから同条件の抽出は2回にとめた.

3. 静置培養法によるエタノールより麴酸の生成

本実験には炭素源としてエタノールを用い, 麴かびは *Asp. tamaris var. crassus* J47 を用い, 一次および二次培養に於ける磷酸の影響についてのべる.

i 一次培養に於ける菌体生育及び麴酸生成に対する磷酸の影響: 磷酸は麴かびの菌体生育及び代謝系に於ける必須な無機化合物であるが, 麴酸生成にもまた磷

酸の関与することが考えられるのでこれらのことについて実験を行った. 実験結果をそれぞれ第1表と第2表に示した. 第1表より菌体生育とともに培地中の磷酸が吸収され, 12日目に最高の吸収量を示し, 菌体に吸収された磷酸の形態も約半量が酸可溶の磷酸化合物でその中の約30%は無機磷酸で他の大部分は有機磷酸化合物 (無機のポリ磷酸を含む) として存在する. これと同様なことが MANN⁹⁾ および KRISHNAN¹⁰⁾ によっても認められている. 最高濃度に達した後, 転移反応により, またメタフォスファターゼにより加水分解されて減少し, 真の無機磷酸が増加する. また麴酸も12日目に最高生成量を示した. 麴酸が二次的基質として消費されるに従い菌体の磷酸量は減少する. 従って培地中の無機磷酸が多くなり, また麴酸の消失とともに菌体の自己消化が始まることが判る.

磷酸濃度の影響をみると菌体 100 mg 当り磷酸量は 0.874~1.07 mg で顕著な差はなく (第2表), 酸可溶磷酸にやや影響を認めたことは麴酸がすでに二次的基質として使用され始めた結果であろうことを考えられ

第1表 一次培養に於ける菌体及び麴酸生成に対する磷酸の影響 [基質, エタノール 1.5% (v/v)]

培養日数		0	3	6	9	12	14
培地	P ₀ mg/100ml	15.0	13.4	12.7	11.78	9.26	11.82
	麴酸 mg/100ml	—	—	—	1.43	16.14	痕跡
	滴定酸 0.1N NaOH ml/10ml	0.72	0.96	0.7	0.65	0.65	0.43
	pH	4.6	3.0	3.2	3.4	3.6	6.2
菌体	乾燥重量 mg	—	252	1539	1995	2130	1999
	P _{tot} mg/100mg 乾菌量	—	1.155	—	1.122	1.550	0.810
	TCA抽出P mg/100mg 乾菌量	—	0.403	0.698	0.770	0.735	0.662
	P ₀ mg/100mg 乾菌量	—	0.195	0.192	0.187	0.235	0.484

第2表 一次培養に於ける磷酸濃度の影響
〔培養12日間, 基質エタノール 1.5% (v/v)〕

KH ₂ PO ₄ 濃度 mg/100ml		50	100	200
培地	培養始期P ₀ mg/100ml	8.15	16.0	32.15
	培養終期P ₀ mg/100ml	2.78	9.04	24.80
	麴酸 mg/100ml	1.00	2.71	1.25
	滴定酸 0.1N NaOH ml/10ml	0.19	0.69	1.20
菌体	pH	5.0	4.9	5.6
	乾燥重量 mg	2239	2465	2240
	P _{tot} mg/100mg 乾菌量	0.874	0.972	1.070
	TCA抽出P mg/100mg 乾菌量	0.359	0.492	0.728
P ₀ mg/100mg 乾菌量		0.112	0.141	0.206

る.

以上の結果から菌体生育及び麴酸生成には少くとも KH₂PO₄ として 50 mg/100 ml を用うれば充分であると考えられる.

ii 二次培養に於ける磷酸の影響: 一次培養に於て菌体の生育ならびに麴酸の生成に磷酸の必要であることを認めたので二次培養 (菌蓋培養) に於ける磷酸の影響について検討した. 使用

第3表 二次培養に於ける麩酸生成に対する磷酸の影響〔基質エタノール 1.5% (v/v)〕

培養日数		0	3	6	9	12	14
培地	P ₀ mg/100ml	17.90	17.40	17.70	18.15	18.43	19.40
	P _{tot} mg/100ml	17.90	17.50	18.00	18.60	18.59	19.70
	麩酸 mg/100ml	—	痕跡	2.14	7.57	28.00	6.80
	エタノール mg/100ml	6.095	3.220	2.294	1.080	—	—
	pH	4.95	3.15	3.60	3.70	5.22	—
菌体	乾燥重量 mg	2067.0	2310.5	2348.5	2208.5	2310.9	2204.0
	P _{tot} mg/100mg 乾菌量	1.64	1.45	1.18	1.05	0.975	0.715
	TCA抽出P mg/100mg 乾菌量	0.806	0.730	0.587	0.510	0.390	0.273
	P ₀ mg/100mg 乾菌量	0.120	0.113	0.135	0.100	0.080	0.067

菌蓋は基礎培地にエタノールを 15 ml/l を加えた培地に12日間培養し、ほぼ同じ状態のものを選択、使用した。その実験結果は第3表に示してある。菌体の磷酸量は徐々に減少し、14日目に半量以下に減少し、酸可溶磷酸は約1/3に減少する。培地中の磷酸量は3日間はわずかに減少するが、その後は徐々に増加する。麩酸は3日目から出現しエタノールが完全に消費された12日目に最高に達し以後消費されている。麩酸が二次的基質として消費されると菌体量は減少し、菌体の磷酸量の減少も多く培地中の磷酸量を増大する。菌体量は3日目まで僅かに増加し、その後はほぼ一定でエタノールの消費とともに減少し始める。これらの結果から二次培養に於ける麩酸生成には培地中の磷酸量に関係

なく、菌体の無機及び有機磷酸化合物が関与するものと考えられる。また磷酸濃度の影響を検討したが顕著な影響は認められなかった。何れにしても菌体中の磷酸を利用することに変わりはない。

iii 基質グルコースの場合の一次培養に於ける菌体生育及び麩酸生成に対する磷酸の影響：基質エタノールをグルコースに取り換えて菌体生育及び麩酸生成に対する磷酸の影響について検討した。この実験に使用した麩かびは *Asp. oryzae var. globosus AA 2* である。この実験結果は第4表に示した。グルコースの場合もエタノールの場合と大体同じような傾向を示し、二次的基質として麩酸が消費されるとこれにつれて磷酸が放出されることを示した。

第4表(I) 一次培養に於ける基質としてエタノール及びグルコースを用いた時の磷酸の影響

〔基質：グルコース 3% (w/v), エタノール 1.5% (v/v), 始期 P₀ 15.7 mg/100 ml〕

培養日数		5		7		10		12	
基質	培地	麩酸 mg/100ml	P ₀ mg/100ml						
	グルコース	I	9.37	13.56	54.67	12.30	88.75	8.72	75.00
グルコース	II	11.66	14.20	68.00	12.75	110.00	8.80	100.00	10.80
グルコース	III	13.00	14.30	75.83	12.50	111.25	8.40	102.50	11.50
エタノール	I	0	14.15	痕跡	12.80	0.86	8.00	1.72	11.40
エタノール	II	0	14.15	痕跡	12.90	0.94	9.00	1.20	10.80

(II) 菌体中の磷酸化合物の分布 (12日間培養)

		乾燥菌体重量 mg	P _{tot} mg/100mg 乾菌量	TCA抽出P mg/100mg 乾菌量	P ₀ mg/100mg 乾菌量
グルコース	I	2370.0	1.630	0.406	0.172
グルコース	II	2310.0	2.070	0.528	0.217
グルコース	III	2310.0	1.920	0.583	0.231
エタノール	I	2445.0	1.410	0.505	0.233
エタノール	II	2070.0	1.500	0.721	0.321

静置培養に於ける以上の結果を総合してみると、まず一次培養に於ては菌体の生育にもまた麴酸の生成にも培地中の磷酸を必要とし、その量は KH_2PO_4 として 50 mg/100 ml で充分であり、菌体中の磷酸は酸可溶部と不溶部とが相半ばし、前者の大部分は有機磷酸化合物（無機のポリ磷酸を含む）として存在するようである。

つぎに二次培養に於ては麴酸生成には培地中に磷酸を必要とせず、関与する磷酸は一次培養に於てすでに菌体中に吸収、蓄積された無機磷酸及び有機磷酸化合物であろうという事は菌体の磷酸量の減少と培地中の磷酸量の増加によって首肯し得られる。また実験結果に於て記述しなかったが麴酸生成には二次培地の磷酸濃度は影響しなかったことを認めている。二次培養に於て麴酸の生成に培地中に存在する磷酸の直接的関与は認められなかったが、後述するように二次培養に於ける最適水素イオン濃度は 4.5~6 であることから磷酸が緩衝作用を与えようと思ふことが妥当であろう。

また一次培養に於て基質をグルコースとした場合もエタノールの場合と同様な傾向を示した。

4. 振盪培養法によるグルコースより麴酸の生成

本実験には炭素源としてグルコースを用い、麴かびは *Asp. oryzae var. globosus* AA2 を用い一次及び二次培養に於ける磷酸の影響について述べる。

麴かびによる麴酸の生成は主として静置培養法で研究さ

れ、振盪培養法によるものは少く、わずかに飴山³⁾が静置培養法に比較して半分の培養期間で約 2 倍の収量を得たと報告している。振盪培養法が静置培養法に比して多量の麴酸を生成する点から振盪培養に於ける磷

第 5 表 一次培養に於ける菌体生育及び麴酸生成に対する磷酸の影響（振盪培養）

(I) 磷酸の消長と麴酸生成

培養日数	培 地		菌 体		
	P_0 mg/100ml	グルコース g/100 ml	麴 酸 mg/100 ml	乾燥重量 mg	P_{tot} mg/100 ml 乾菌量
0	20.40	5.094	—	—	—
1	15.70	4.550	—	80.8	1.835
2	8.98	3.483	痕跡	219.5	1.400
3	7.85	2.899	37.3	290.0	1.080
5	11.30	1.668	600.0	344.0	0.853
7	11.30	0.478	1340.0	361.0	0.818
10	11.50	—	1420.0	358.0	0.685
12	11.70	—	940.0	349.0	0.565
14	11.90	—	615.0	343.0	0.552

(II) 培養初期の磷酸の吸収状態（振盪培養）

培養時間 hr.	培 地		菌 体		
	P_0 mg/100 ml	グルコース g/100 ml	麴 酸 mg/100 ml	乾燥重量 mg	P_{tot} mg/100 ml 乾菌量
0	21.10	3.00	—	—	—
12	20.20	2.99	—	13.0	—
24	15.40	2.52	—	60.5	1.96
36	12.20	2.15	—	107.5	1.70
48	9.64	1.79	痕跡	233.0	1.42
60	9.80	1.41	13.65	254.0	1.24
70	9.86	1.22	32.70	322.0	0.95

(III) 磷酸の吸収と分布

		培 養 時 間 hr.	0	42	64	115
培 地	P_0	mg/100ml	20.0	9.65	9.07	12.10
	P_7	mg/100ml	—	—	0.25	0.45
	P_{tot}	mg/100ml	20.0	9.65	10.10	13.45
地	麴 酸	mg/100ml	—	痕跡	8.43	100.0
	グルコース	g/100ml	5.30	3.54	3.03	2.42
菌 体	乾燥重量	mg	—	216.0	260.0	250.0
	P_{tot}	mg/100mg 乾菌量	—	1.320	1.000	0.810
	TCA抽出P	mg/100mg 乾菌量	—	0.407	0.351	0.294
	TCA抽出 P_7	mg/100mg 乾菌量	—	0.271	0.261	0.232
	P_0	mg/100mg 乾菌量	—	0.049	0.051	0.045

酸の影響を検討した。

i 一次培養に於ける菌体生育及び麩酸生成に対する磷酸の影響：静置培養と同様に麩酸生成に対する磷酸の影響を検討しその結果を第5表(I)に示した。7日間にて菌体量は最高に達し(5日目まで加速度的に増加する)グルコースは殆んど消失し、麩酸の生成は最盛期に入る。10日間にてグルコースは完全に消失し、麩酸生成は最高に達する。しかし菌体量はすでに減少し始める。菌体の磷酸量は3日目に最高に達し、その後菌体の有機磷酸化合物(無機のポリ磷酸を含む)は麩酸生成とそのエネルギー供給に利用され、無機磷酸を培地中に放出し、従って培地中の磷酸量も徐々に増加する。菌体への磷酸の吸収は培養初期に最高であり、麩酸の生成は2日目に始まる。後述するが麩酸の生合成には菌体の有機磷酸化合物(無機のポリ磷酸を含む)が利用されるものと考えられる。培養初期に於ける菌体の磷酸の吸収状態を検討した結果を第5表(II)に示す。培養12時間までは極くわずしか吸収されないが、24時間には最高 1.96mg/100mg 乾菌量を示し、その磷酸の形態をみると(第5表III)酸可溶性磷酸は全磷酸の約 $\frac{1}{3}$ を占め、またその中約 $\frac{1}{2}$ が7分磷として存在するようである。MANN⁹⁾の提示するところの嫌

氣的培養条件下よりも好氣的条件下に於て菌体が早く無機磷酸から易水解性磷酸化合物を構成するということと、上記実験結果を照合して振盪培養法は磷酸代謝が静置培養法に比して活発に行われ、従って磷酸代謝回転率も早く、麩酸生成も迅速であることが考察し得られる。

ii 二次培養に於ける麩酸生成と磷酸の影響：使用菌体は48時間振盪培養のものである。その実験結果は第6表(I)に示してある。菌体は非増殖菌糸懸濁液(non-proliferating mycelial suspension)でも二次培養48時間にて約1.5倍の増殖量を示し、96時間にて大体一定となる。磷酸量は培地中にわずかに増加するが反対に菌体の磷酸量は減少している。このことは静置二次培養の場合と同様に培地中の磷酸は利用されないと考えられる。このことは第6表(II)に示すところの無磷酸培地に於て培地中に磷酸が徐々に放出されて来ることから明らかである。菌体の磷酸量の減少は培養初期(48時間)に著るしく、麩酸の生成は同時に始まりグルコースの殆んど消費された時(9日目)に最高に達し、その後消費され始める(第6表(I))。菌体の磷酸化合物は酸可溶性及び不溶性がほぼ等量を示し、有機磷酸化合物(無機のポリ磷酸も含む)が利

第6表 二次培養に於ける磷酸の影響(振盪培養)

(I) 0.1% KH₂PO₄ 含有培地

培 養 日 数		0	2	4	6	7	9	11
培 地	P _o mg/100ml	23.65	22.85	23.80	25.00	25.10	27.80	29.10
	P _{tot} mg/100ml	23.65	24.94	25.27	27.20	27.00	28.13	29.83
	麩 酸 mg/100ml	—	15.45	89.00	110.00	187.50	275.00	240.00
	グルコース g/100ml	2.030	1.340	0.895	0.648	0.444	0.110	—
菌 体	乾 燥 重 量 mg	14.75	225.5	250.0	250.0	259.0	252.0	248.0
	P _{tot} mg/100ml 乾菌量	2.160	1.235	1.110	0.910	0.902	0.887	0.790

(II) 無磷酸培地

培 養 日 数		0	1	2	3	4	7
培 地	P _o mg/100ml	—	0.286	0.602	0.900	0.948	0.915
	P _{tot} mg/100ml	—	0.499	0.745	1.265	1.483	1.900
	麩 酸 mg/100ml	—	6.59	26.00	41.50	63.00	102.50
	グルコース g/100ml	2.106	1.835	1.723	1.574	1.346	1.119
菌 体	乾 燥 重 量 mg	101.5	128.5	134.5	139.5	154.0	147.0
	P _{tot} mg/100mg 乾菌量	1.950	1.395	1.290	1.050	0.872	0.810
	TCA抽出P mg/100mg 乾菌量	1.065	0.700	0.663	0.575	0.474	0.496
	P _o mg/100mg 乾菌量	0.057	0.063	0.051	0.060	0.050	0.057

第 7 表 生育時間を異にした菌体による二次培養に於ける麴酸生成に対する磷酸の影響

二次培養時間 生育時間別菌体区		0			120			240		
		48	96	144	48	96	144	48	96	144
培 地	P ₀ mg/100ml	0.098	0.098	0.098	0.457	0.411	0.533	0.725	0.766	1.260
	麴酸 mg/100ml	—	—	—	74.0	107.5	90.0	520.0	230.0	175.0
	グルコース g/100ml	3.050	2.958	2.950	2.486	2.663	2.714	1.690	2.373	2.469
菌 体	乾燥重量 mg	33.8	38.0	46.5	51.0	45.2	48.0	49.3	45.0	50.0
	P _{tot} mg/100mg 乾菌量	1.625	1.085	1.017	0.681	0.685	0.638	0.483	0.418	0.288
	TCA抽出P mg/100mg 乾菌量	0.912	0.463	0.343	0.533	0.400	0.362	0.212	0.332	0.139
	P ₀ mg/100mg 乾菌量	0.208	0.110	0.091	0.058	0.060	0.031	0.035	0.059	0.045

用されることを示している。

iii 生育期間を異にした菌体による二次培養に於ける麴酸生成に対する磷酸の影響：実験 ii に於て48時間一次培養の菌体を用いた二次培養に於てその初期に著しい生育を示し、菌体量が約1.5倍に増加したので非増殖菌懸濁液の状態では磷酸の影響を検討するために本実験では完全に生育した菌体を用いて二次培養を行い磷酸の影響を検討した。一次培養48, 96, 144時間の菌体を用い無磷酸二次培地で培養を行った。その実験結果は第7表に示してある。二次培養120時間の結果では一次培養48時間区では17.2mg (50.8%), 96時間区は7.2mg (18.9%), 144時間区は1.5mg (3.2%)の菌体量の増加をそれぞれ示した。このように磷酸が存在しなくてもなお同化が行われることを示すが、大体一次培養144時間区(6日間)ではほぼ一定菌体量を示す。しかし菌体の磷酸量は一次培養時間の長い程減少を示し、このことは己に一次培養に於て麴酸生成が行われ、麴酸生成に菌体の有機磷酸化合物(無機のポリ磷酸を含む)が使用される結果、長時間培養した菌体には磷酸量の減少があらわれたものと思われる。麴酸生成量は長時間培養のものは少い。即ち二次培養240時間に於ける麴酸収量をみると、48時間区は144時間区に比して3倍量を示した。このことはおそらく老熟菌体は幼弱菌体に比して麴酸分解力が強勢になるのではないかと推定する。これはまた菌体の磷酸量が非常に減少することからも裏づけられるものである。

振盪培養法による以上の結果を総合してみると、まず一次培養に於ける麴酸と磷酸の関係は静置一次培養と同様に振盪一次培養に於て生育培地中のオルソ磷酸を吸収してポリ磷酸の型に於て貯蔵し、二次培地中に於ける磷酸とは無関係にすでに菌体中に貯蔵した有機

磷酸化合物(無機のポリ磷酸をも含む)を麴酸生成ないし二次的基質としての麴酸の分解に利用するものであろう。また振盪培養に於て麴酸の高収量は好氣的条件下に於ては磷酸の代謝回転率が迅速であることと、ポリ磷酸の生産が活発に効率的に行われることに原因するものと考えられる。MANN⁹⁾はかびの好氣的代謝に対する各種の阻害剤がまた磷酸代謝も阻害する事実によって、彼は糖代謝に加えて磷酸代謝も好氣的であることが特徴であると説明したが、本実験の結果も振盪法が静置法に比して麴酸の高収量であることと、かつ短時間で得られることから一般的菌株(*Aspergillus oryzae*)を用う場合、好氣的条件下に於ては磷酸代謝回転が活発であり、ポリ磷酸の生成が効率的であると考えると妥当であろう。

5. 考 察

麴酸生成に対する磷酸の量的ないし質的な消長を主眼点として静置培養法では基質をエタノールとし、振盪培養法ではグルコースとした場合の一次及び二次培養を行って麴酸生成に対する磷酸の影響について検討した。

基質エタノール及びグルコースの何れの場合でも一次培養(生育培養)では菌体増殖のため磷酸が必須であり、このことは菌体増殖につれ培地中の磷酸量が減少し、菌体量が最大るとき菌体中の全磷酸も最大量を示し、菌体中に存在するTCA抽出磷酸も多く、その質的な分布を調べた(第5表Ⅲ)一次培養法では7分磷酸はTCA抽出磷酸の約75%を占めている。また菌体の増殖量は静置培養法に較べて振盪培養法が早く60~70時間で最大量に達しているがこのことはMANN⁹⁾が麴かびは糖代謝もまた磷酸代謝も好氣的であると説明していることから一致する。然し菌体100mg当りの全磷酸量では菌体中の磷酸量に著しい相異は認め

られない。

菌体の増殖がほぼ最大に達して麴酸の生成が行われる時期になると菌体中に蓄積した TCA 抽出磷を利用して菌体中で kojic phosphate のような型に convert して蓄積し、これが phosphatase 作用で遊離の麴酸として菌体外に排出されるので菌体中の TCA 抽出磷量の減少と培地中無機磷酸の増加となって現われたものであろう。特に第 5 表Ⅲの結果がこの事情を明らかにしている。培地中の無機磷酸は麴酸生成量が最大のときに増加を示し、これに反して菌体中の TCA 抽出磷と TCA 抽出 7 分磷はそれぞれ減少を示している。

二次培養に於ては両培養法とも培地の無機磷酸は徐々に増加し、これに並行して菌体中の全磷酸及び TCA 抽出磷も麴酸の生成に伴って減少する。このことは特に振盪法で無磷酸培地で行った第 6 表Ⅱの結果がよくこの間の消長を示している。これらの結果から静置及び振盪両法の二次培養法による麴酸生成には培地中に磷酸がなくてもすでに一次培養で菌体中に蓄積した磷酸化合物を用いて合成が行われるものと推定できる。

これらの実験結果から一次培養では静置培養及び振盪培養の何れでも菌体の生育は勿論、麴酸の生成にも磷酸が関与するであろうことが推定できる。二次培養では磷酸がないときでも麴酸の生成が行われ、その磷酸は一次培養中に蓄積した磷酸化合物を利用しているものと推定できる。

ARNSTEIN 等⁶⁾のグルコースからの麴酸生合成機構の主経路は次図のように示されている。この経路による磷酸が関与する必要もないが、然しこれら一連の生

化学的反應にあずかるエネルギーは当然磷酸化合物より供給されなければならないであろう。おそらく 7 分磷として現わされる ATP がこの反應エネルギーとして利用されなければならないが、著者の実験結果はこの推定を下すに充分ではない。これらの点については今後 radioactive な ³²P を用いて菌体中への取り込み、菌体中の磷酸の諸形態及び菌体中から菌体外への移動の様子等の検討の後に推定しようと考えている。

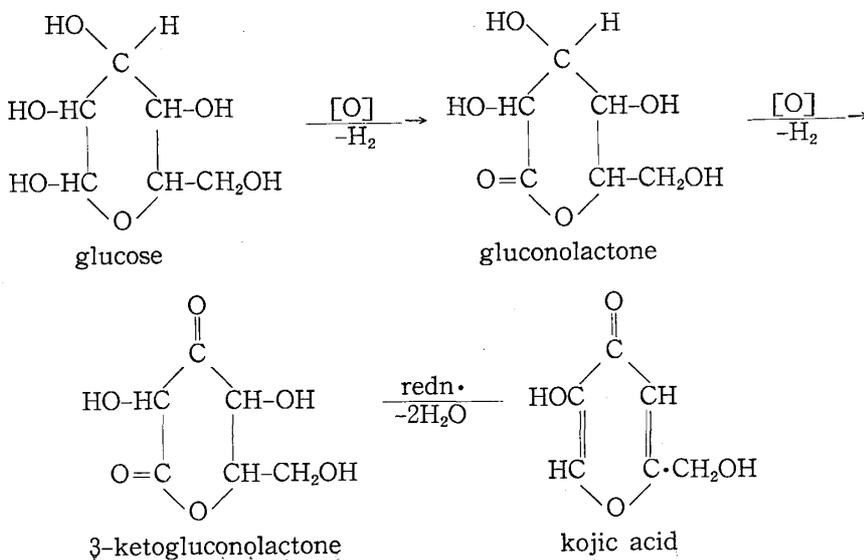
ARNSTEIN 等の第 2 の経路, dihydroxyacetone-phosphate の縮合による麴酸の生合成には磷酸が関与していることは当然で radioactive な ¹⁴C が第 6 位 (-CH₂OH) に入ることから、おそらく kojic-phosphate として菌体中で合成されてのち phosphatase の作用によって麴酸が排出され、同時に無機磷酸も菌体外に排出されるのであろう。従って C₂ 化合物より麴酸が生成する場合, triose-phosphate が縮合して形成することから磷酸が関与するであろうことが推定できる。

6. 要 約

静置及び振盪両培養法による一次、二次培養に於ける磷酸代謝回転は、(1) まず菌体は培地中のオルソ磷酸を吸収し、その大部分をポリ磷酸の型に於て、一部はそのまま無機磷酸として貯蔵しついでこれを用いて麴酸生成ならびに二次的基質としての麴酸の分解に用い、(2) 二次培養に於てはすでに一次培養に於て貯蔵したポリ磷酸を用いて培地中の磷酸とは無関係に麴酸形成ならびに分解に利用するものであると考えられる。

7. 文 献

- 1) 辰巳忠次, 飴山実: 農化誌, **28**, 274, (1954)
- 2) A. J. KLUYVER, L. H. C. PERQUIN: *Biochem. Z.*, **266**, 68, 82, (1933)
- 3) 飴山実: 農化誌, **30**, 196, 199, 201, (1956)
- 4) H. N. BARNARD, B. L. SMITS: *Trans. Kansas Acad. Sci.*, **37**, 91, (1934)
- 5) B. S. GOULD: *Biochem. J.*, **32**, 797, (1938)
- 6) H. R. V. ARNSTEIN, R. BENTLEY: *Biochem. J.*, **54**, 508, (1953)
- 7) C. H. FISKE, Y. SUBBAROW: *J. Biol. Chem.*,



- 66, 375, (1925)
 8) 高橋泰常: 生化学, 26, 690, (1955)
 9) T. MANN: *Biochem. J.*, 38, 339, (1944)
 10) P.S. KRISHNAN, S.P. DAMLE, VIOLET BAJAJ: *Arch. Biochem. Biophys.*, 67, 35, (1937)

第3章 菌蓋培養法によるエタノールより麴酸の生成

1. まえがき

麴かびによりヘキソースまたはペントース等から麴酸の生合成機構について数多くの研究が行われたが、最近 ARNSTEIN 等¹⁾のラベルしたグルコースを用いた実験結果からその生成機構が部分的に明らかとなり、麴酸はグルコースからその炭素鎖が解裂せずに直接の脱水、酸化によって生成されるという見解が強くなった。他方 DENISON 等²⁾も同様な結果をのべ、またグルコースより小さい化合物はグリコリシスの逆反応に従ってまずヘキソースに合成されて後に麴酸になるものと考えている。

麴酸がエタノールからも生合成されることは古く坂口³⁾によって示され、BARNARD⁴⁾はやや組織的に研究し、中間物としてアセトアルデヒドをヒドラゾンとして分離、同定し、このものが transformation を行い麴酸を合成すると述べている。BIRKINSHAW 等⁵⁾は麴酸を生成するすべての麴かびはエタノール及びアセトアルデヒドを形成し、後者が主要中間物で一連の縮合反応によって麴酸を生成すると提言しているが、他方アルデヒドの補獲剤を添加しても麴酸の生成に対し影響がないという報告⁶⁾もある。坂口³⁾は麴かびの酸酹酵の研究に於てグルコースにエタノールを添加すると麴酸の収量が著るしく増大することと、エタノールを単一の炭素源とした場合にも多量の麴酸が生成することを述べ、その後再びエタノール添加の効果を確認し⁷⁾、さらに乳酸、ピルビン酸の添加も効果のあることを提示して前報⁸⁾の麴酸生成に関する見解すなわち各種炭素源が一度 C₂ 化合物、たとえばエタノールに分解されこれが再び炭素数の多い麴酸の直接の母体と考えられるフラク

トースまたはこれに近い化学的構造を有する化合物に合成されてのち閉環するという見解を提出した。

本章に於ては炭素源としてエタノールを利用して麴酸を生成する *Asp. tamaris* var. *crassus* J47 の菌蓋培養によってエタノールからアセトアルデヒド、醋酸を経て TCA サイクルに入り、さらにグリコリシスの逆反応に従って C₆ 化合物となりこれから生成されるであろうと推定できる実験結果について述べる。

2. 菌株と培養法

使用麴かびは *Asp. tamaris* var. *crassus* J47 を用い、実験法はすべて菌蓋培養法に従った。

一次培養法は殺菌基礎培地 700 ml に無菌的にエタノールを 10 ml 加えた培地に 2 週間培養し 1 章 1 の方法に従って供試菌蓋を作った。

二次培養法は予め殺菌後無菌的にエタノールを添加した二次培地 700 ml を置きかえて実験に供した。

3. 分析法

有機酸は Buch⁹⁾ のイソアミルアルコールと 5N 硝酸の混合上層部を用いて 20~35° で展開し、0.02% B. P.B. で発色して同定した。エタノールは重クロム酸カリ酸化法によった。滴定酸は 0.02N NaOH でフェノールフタレンを用い、試料 10 ml に対する ml 数で示し、水素イオン濃度は pH メーター (堀場製作所製) を用いて測定した。

4. エタノールより麴酸の生成

i: エタノール濃度と麴酸生成量: エタノールの濃度の差による麴酸生成量は第 1 表に示すように実験範囲内の濃度では酵素作用を害することはないが、高濃

第 1 表 エタノール濃度と麴酸生成量

培養日数	エタノール添加量 ml	エタノール % (w/v)	pH	滴定酸 0.02N NaOH ml/10ml	0.05N KMnO ₄ ml/10ml	麴酸 mg/100 ml
直後	5	0.368	4.4	3.6	0.2	—
	7	0.552	4.4	3.5	0.1	—
	10	0.816	4.4	3.6	0.2	—
	15	1.172	4.6	3.6	0.2	—
5日	5	0.057	3.6	5.5	3.0	17.6
	7	0.145	3.4	6.4	2.2	7.2
	10	0.316	3.5	6.4	1.7	1.7
	15	0.581	3.4	5.9	1.5	—
10日	5	0.04	5.4	3.7	2.0	3.6
	7	0.053	3.9	5.1	6.4	26.4
	10	0.199	3.4	5.7	4.2	8.8
	15	0.472	3.0	5.8	2.6	—

第2表 pHと麩酸生成量

直 後		3 日		5 日		7 日		10 日			12 日			
pH	滴定酸 0.02N NaOH ml/10ml	pH	麩酸 mg/ 100ml	pH	麩酸 mg/ 100ml	pH	麩酸 mg/ 100ml	pH	滴定酸 0.02N NaOH ml/10ml	麩酸 mg/ 100ml	pH	滴定酸 0.02N NaOH ml/10ml	麩酸 mg/ 100ml	菌体量 (g)
4.6*	3.6	3.0	2.2	3.0	3.6	3.1	8.7	3.9	5.0	24.6	5.2	4.3	6.6	2.39
2.3	20.6	2.3	—	2.3	—	2.3	—	2.3	21.1	—	2.3	21.5	—	1.65
3.0	13.9	3.0	—	3.0	—	3.0	痕跡	3.0	16.2	2.9	3.0	16.5	8.3	2.54
4.0	10.8	3.6	痕跡	3.5	1.0	3.5	2.9	3.5	15.3	11.7	3.7	18.4	16.4	2.63
5.0	7.4	4.2	1.9	4.0	2.8	4.0	5.7	4.0	13.9	16.6	4.2	13.3	30.0	2.57
5.9	4.5	4.3	7.0	4.1	11.4	4.1	20.9	4.4	13.3	28.6	5.2	7.6	21.7	2.51

* 二次培地のみ

度になるにつれその生成に長時間を要する(17日後の生成量は 10 ml 区で 52 mg/100 ml, 15 ml 区で 17 mg/100 ml であった。)それで以後の実験は二次培地 700 ml にエタノール 7~10 ml を添加した濃度で行った。

ii 水素イオン濃度と麩酸生成量: グルコースからの麩酸生成最適水素イオン濃度は 2~3⁹⁾であることが報告されている。本実験に於ける二次培養法によるエタノールからの麩酸生成最適水素イオン濃度は第2表に示すように pH 4.1~4.3 (始発 pH 5.0~5.9) である。また酸性側に傾くに従い代謝機能が害され次第に自己消化を始めて菌体量の減少を示した(緩衝液は酸性フタル酸カリと塩酸または苛性ソーダでそれぞれの水素イオン濃度溶液を作り, この液 200 ml を二次培地 700 ml に含まれる無機塩を蒸留水 500 ml に溶かしたものに加えて所定の水素イオン濃度の二次培地を作って用いた)。

iii 麩酸生成量と滴定酸及び KMnO₄ 消費量: 二次培地(エタノール 10 ml 添加)を使用した二次培養中の水素イオン濃度, 滴定酸, 0.05N KMnO₄ 消費量を経時的に測定した結果を第3表に示す。滴定酸は麩酸及び他の有機酸の生成によって増大し, エタノールの消失とともにこれらの酸が二次的呼吸基質として使用されるので14日目に殆んど消失する。KMnO₄ 量も同様の経過を示すがなお麩酸の反応のないときにも 1 ml 位の値を示したことは麩酸分解生成物のためであろう。

iv エタノールから生成する酸類: 糸状菌によってエタノールから生成する酸類はクエン酸, コハク酸, フマル酸, リンゴ酸, 蔞酸, グライコール酸及びギ酸が報告されている¹⁰⁻¹²⁾。本実験は二次培地に炭酸

第3表 麩酸生成量と滴定酸及び KMnO₄ 消費量

培 養 日	実験 番号	pH	滴定酸 0.02N NaOH ml/10ml	0.05N KMnO ₄ 消費 ml/10ml	麩酸 mg/ 100ml
直後	1	5.6	3.1	0.1	—
	2	5.6	3.1	0.1	—
3 日	1	4.6	3.9	2.5	10.8
	2	4.6	3.8	2.4	6.6
5 日	1	4.4	4.3	3.9	19.0
	2	4.6	4.1	3.6	16.4
7 日	1	4.8	4.7	9.8	55.0
	2	4.8	4.5	9.6	45.5
11 日	1	4.8	4.2	7.7	40.6
	2	4.8	3.9	8.6	47.4
14 日	1	5.4	3.2	1.3	痕跡
	2	5.3	3.2	1.6	痕跡

石灰(エタノール 10 ml, 炭酸石灰 3 gr.)を添加したとき生成する有機酸を検討した。二次培養10日間後, 菌体を取り出し残存する炭酸石灰及び不溶石灰塩を汙別し(エタノール0.13%, アルデヒド反応+), この石灰塩を10%醋酸で処理して不溶石灰塩 280 mg を得た。これは蔞酸であることを認めた。石灰塩を分けた汙液(30 ml)を硫酸々性にして蒸溜して揮発酸(0.02 N NaOH 1.15 ml)を得たが少量で確認しなかった。残部の汙液は濃縮し, IR-120 と IR-4B で処理し, これについてペーパークロマトグラフ法を行い, クエン酸, リンゴ酸, コハク酸, フマル酸, グライコール酸及び Rf 0.5 の酸の6種を認めた。また二次培地のエタノール含量が全量 20 ml/700 ml (培地)になる

第4表 麴酸生成中の滴定酸と揮発酸の消長

培養 日数	実験 番号	pH	滴定酸 0.02N NaOH ml/10ml	揮発酸 0.02N NaOH ml/20ml	エタノー ル % (w/v)	麴酸 mg/ 100ml	菌体量 (g)
3日	1	4.2	5.8	0.35	0.29	8.2	
	2	4.1	5.3	0.43	0.27	7.6	
6日	1	4.4	6.5	0.43	0.12	41.6	2.62
	2	4.7	5.9	0.48	0.14	49.3	2.38

ように5日目毎に5mlづつ3回にわたり加えた後、さらに20日間(培養期間35日間)培養した培養液より酢酸21mg, 麴酸56mg/100mlを得た。酢酸はBROWN法¹³⁾で確認した。つぎに第4表に示すような経過の二次培養に於ける個々の酸類をペーパークロマトグラフ法で検討した結果、それぞれクエン酸、リンゴ酸、コハク酸、フマル酸、麴酸及びグリコール酸を認められたが蔞酸は認められなかった。

v 有機酸の影響: 前実験に於てTCAサイクル上の酸類が認められたのでこれらの酸類のM/250量を二次培地に添加して麴酸の生成量を検討した。その結果は第5表のように何れの酸についても無添加の場合の2~4倍量の麴酸生成量を示した。なお二次培養に於てこれらの酸類を基質として用いた場合酢酸のみが麴酸を生成することを認めた。

vi 阻害剤の影響: 基質をエタノールとした二次培養に於ける阻害剤の効果を検討した報告は坂口⁷⁾及びBARNARD⁴⁾だけである。本実験はモノフロロアセトアミド、亜硫酸、ジエチルマロン酸のようなTCAサ

イクルを特異的に阻害するものを始め、各種阻害剤の効果を検討した。培地700mlに対し表示のような濃度の阻害剤を加え、10日間培養後生成麴酸量を測定してその阻害効果を判別した。使用した阻害剤の中、2, 4ジニトロフェノール, α , α' -ジピリジル, フロライドは菌体量の著しい減少を示し、モノヨード酢酸は低濃度(10^{-3}

M)でやや促進的に作用するが、高濃度になると全酵素系を破壊して菌体量の激減を示した。モノフロロアセトアミドは殆んど完全な阻害を示し、ジエチルマロン酸及び亜硫酸は 10^{-2} Mで約90%阻害を示した。また硫酸は 2×10^{-3} Mでは阻害程度を減少した。以上の実験結果から使用した阻害剤の中、効果のあったものはモノフロロアセトアミド、亜硫酸、ジエチルマロン酸及び硫酸でそれぞれの阻害程度を第6表、I, II, III, IVに示した。何れも80%以上の阻害効果を示した。

vii 阻害剤により蓄積した生成物の検討: 前記4種の阻害剤とアルデヒド捕獲剤-酸性亜硫酸ソーダーを用いたときの基質をエタノールとした二次培養に於ける蓄積物を検討した。

(a) 酸性亜硫酸ソーダーによるアルデヒドの固定: 二次培地700mlにエタノール7mlと3gr.の酸性亜硫酸ソーダーを添加し、10日間培養後濾液を濃縮し、これに重炭酸ソーダーを添加し、50mlの0.5%の2, 4ジニトロフェニルヒドラジン2N塩酸中に蒸溜すると

第5表 麴酸生成に対する各種有機酸類の影響

培養日数 添加酸 M/250*	直 後		7 日		10 日			12 日			菌体量 (g)
	pH	滴定酸 0.02N NaOH ml/10ml	pH	麴酸 mg/ 100ml	pH	滴定酸 0.02N NaOH ml/10ml	麴酸 mg/ 100ml	pH	滴定酸 0.02N NaOH ml/10ml	麴酸 mg/ 100ml	
無 添 加	4.6	3.7	3.5	22.0	4.8	4.6	21.0	5.4	3.6	1.7	1.82
酢 酸	3.0	6.4	3.0	44.0	3.5	7.2	94.0	4.3	5.8	57.0	2.24
ク エ ン 酸	3.0	9.3	3.0	37.1	3.9	7.1	90.0	4.8	6.7	82.5	2.15
α -ケトグルタル酸	3.0	7.3	3.0	23.7	3.4	6.8	50.0	4.7	6.0	57.0	2.09
コ ハ ク 酸	3.4	7.4	3.0	34.6	4.2	6.1	60.0	5.2	4.9	31.0	2.09
フ マ ー ル 酸	3.0	7.5	3.7	23.4	4.4	5.4	40.6	5.5	4.8	10.6	2.03
リ ン ゴ 酸	3.0	7.4	3.0	19.4	4.6	5.4	36.0	5.2	4.0	5.0	2.19
ピ ル ビ ン 酸	3.0	6.0	3.0	37.1	3.0	7.8	66.0	3.0	7.8	74.6	2.16
グ ラ イ コ ー ル 酸	3.0	5.6	3.0	21.4	3.9	5.7	40.0	5.1	4.7	18.8	2.11

* 二次培地 700 ml にエタノール 10 ml 添加培地に対する添加量

第6表I 麩酸生成に対するモノフロアセトアミドの影響

阻害剤 モル濃度	pH		滴定酸 0.02N NaOH ml/10ml		エタノール % (w/v)		麩酸 生成量 mg/100 ml	阻害率 %	菌体量 (g)
	培養前	培養後	培養前	培養後	培養前	培養後			
無添加	4.7	4.1	3.5	4.3	0.52	0.023	20.0	—	2.23
1×10^{-3}	4.8	4.2	3.5	4.4	0.52	0.005	2.0	90	1.95
2×10^{-3}	4.8	3.6	3.5	5.9	0.52	0.005	2.1	89.5	1.92
4×10^{-3}	4.8	4.2	3.5	4.8	0.52	0.005	痕跡	100.0	1.87
1×10^{-2}	4.8	3.0	3.5	11.1	0.52	0.018	痕跡	100.0	1.80

第6表II 麩酸生成に対するジエチルマロン酸の影響

無添加	4.7	3.7	3.5	6.3	0.52	0.059	49.1	—	2.20
1×10^{-3}	4.7	3.5	3.5	6.1	0.52	0.072	39.7	19.1	2.14
2×10^{-3}	4.6	3.3	3.7	7.1	0.52	0.082	40.5	17.5	2.23
4×10^{-3}	4.6	3.1	3.7	9.9	0.52	0.069	14.0	71.5	2.03
1×10^{-2}	4.3	2.8	3.9	—	0.52	0.169	2.6	95	1.84
2×10^{-2}	4.0	3.0	4.0	11.5	0.52	0.217	2.1	95.7	1.42

第6表III 麩酸生成に対する亜硫酸ソーダの影響

無添加	4.6	3.9	3.6	4.8	0.70	0.004	11.6	—	2.30
1×10^{-3}	4.9	4.9	3.7	4.0	0.70	0.004	3.7	74.4	2.29
2×10^{-3}	4.7	5.0	3.8	4.2	0.70	0.005	1.8	84.5	2.40
4×10^{-3}	4.8	4.5	4.0	4.4	0.70	0.006	5.7	50.8	2.30
1×10^{-2}	5.1	4.6	4.2	4.5	0.70	0.007	1.1	91.4	2.26

第6表IV 麩酸生成に対する硫酸ソーダの影響

無添加	4.6	4.0	3.7	5.1	0.67	0.015	18.1	—	2.58
1×10^{-3}	4.8	5.6	4.5	4.1	0.67	0.012	4.0	77.8	2.53
2×10^{-3}	4.7	5.6	5.0	4.0	0.67	0.044	2.8	84.5	2.11
4×10^{-3}	4.6	5.6	6.2	4.6	0.67	0.048	3.0	83.4	2.27
1×10^{-2}	4.6	5.4	9.8	7.2	0.67	0.022	5.9	67.4	2.62

黄色のヒドラゾン析出する。炭酸ソーダで処理しても可溶部がなく（ピルビン酸に相当するケト酸はない）、94%アルコールで処理してヒドラゾンを得た。m.p. 161~162° でアセトアルデヒドの2, 4ジニトロフェニルヒドラゾンである。

(b) モノフロアセトアミドによる蓄積物：二次培地 700 ml にエタノール 10 ml とモノフロアセトアミドを $2 \times 10^{-3}M$ を添加し、10日間培養後汚液を中和して濃縮しエーテル抽出して抽出液よりクエン酸、グリコール酸、モノフロア酢酸及び Rf 0.6 の酸を認め、エーテル不溶部には酸類は認めなかった。

(c) ジエチルマロン酸による蓄積物：クエン酸、リンゴ酸、グリコール酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸を認めた。

(d) 亜硫酸による蓄積物：クエン酸、リンゴ酸、 α -ケトグルタル酸、麩酸、コハク酸、フマル酸、グリコール酸（スポットテストによる）及び Rf 0.57 の酸を認めた。

(e) 硫酸による蓄積物：クエン酸、グリコール酸及び Rf 0.52 の酸を認めた。

5. 考 察

本実験は特にエタノールを炭素源として利用する *Asp. tamaris var. crassus* を用い、エタノールを唯一の炭素源とした場合の麩酸醗酵の条件ならびに生成物の検索を行い、さらに各種阻害剤の影響を検討したものである。

まずフロアセトアミドでは $10^{-3}M$ で殆んど阻害(90%)され、その蓄積物としてクエン酸、リンゴ酸、

グリコール酸及び Rf 0.6 の酸を認めた。この阻害剤はアコニターゼを特異的に阻害する。糸状菌でこの酵素が *Pen. chrysogenum* Q 176¹⁴⁾ 及び *Asp. niger*¹⁵⁻¹⁶⁾ に認められていることから本実験の結果もこの酵素系を阻害したものと考えられる。

マロン酸は TCA サイクルの特異的な阻害剤としてコハク酸と競合的に作用することが知られている。この使用法として BEEVERS¹⁷⁾ 及び GOLDSCHMIDT¹⁴⁾ の指摘したようにジエチルマロン酸を用いて $10^{-2}M$ で殆んど完全 (95%) に阻害され、その蓄積物としてクエン酸、リンゴ酸、グリコール酸、コハク酸、フマル酸を認めた。

亜硫酸も TCA サイクル上の α -ケトグルタル酸からコハク酸への酸化脱炭酸作用に対する阻害剤であるが、糸状菌に対するこの阻害剤の効果については GOLDSCHMIDT¹⁴⁾ は *Pen. chrysogenum* の resting cell による酢酸の酸化が阻害されることを認めた。本実験の結果は $10^{-3}M$ で約75%, $2 \times 10^{-3}M$ で約84%, $10^{-2}M$ で約91%阻害された。その蓄積物としてクエン酸、リンゴ酸、 α -ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、グリコール酸及び Rf 0.57 の酸を認め、特に前実験で認められなかった α -ケトグルタル酸を認めたことは酸化脱炭酸作用が行われていることが推定できる。

砒酸は加砒酸分解として知られているが RAMAKRISHNAN¹⁵⁾ が *Asp. niger* の cell-free prep. 中に transacetylase を認めているので、本実験で得た阻害作用も acetyl-phosphate + CoA \rightarrow acetyl-CoA + Pi の反応に関係して阻害作用を示したものと考えられ、クエン酸、グリコール酸及び Rf 0.52 の酸を認めた。また高濃度 ($10^{-2}M$) でも67%余の効果しか示さなかったが RAMAKRISHNAN が acetyl-CoA の形成に acetate activating enzyme と transacetylase の両酵素の存在を示唆しているので前者の酵素系によりその阻害効果が減少したものと推定する。

フロライドの阻害作用は DAMODARAN¹⁸⁾ によると *Asp. niger* のクエン酸生成に対して強く阻害すると述べているが、本実験ではグリコール酸のみを認めた。また2,4ジニトロフェニールヒドラジンによる沈澱も生成しない。また菌体量が激減したことから菌体自体破壊したものと考えられる。

ヨード酢酸もまた同様の傾向を示し、ただ低濃度にして阻害作用はない。その他2,4ジニトロフェノール、アジド、 α,α -ジピリジル等も同様であった。

酸性亜硫酸ソーダはアセトアルデヒドを固定してそのため麩酸を生成しない。またこれをヒドラゾンとして分離、同定した。

糸状菌による酢酸の代謝について KORNBERG, KREBS 等¹⁹⁾ は C_2 化合物からクエン酸の生成及びジカルボン酸サイクルをグリオキザル酸側路で説明しているがその側路の中、isocitritase は OHLSON²⁰⁾ によって *Asp. niger* 及び *Rhizopus sp.* に存在することが、また malate synthetase は KORNBERG 等²¹⁾ によって *Asp. niger* に認められている。本実験に使用した菌株にもこの側路が存在することが考えられるが両酵素が存在する実験結果がないので保留する。また別に BARRON 等²²⁾ によると酢酸は TCA サイクルにより酸化されるがクエン酸合成のために必要なオキザロ酢酸は嫌氣的条件下で DPN, CoA, FAD, 及び Mg^{++} の存在で酢酸を酸化する acetic-dehydrogenase によってコハク酸になり、さらにオキザロ酢酸になる DCA サイクルのあることを述べ、この酵素が *Aspergillus* の cell-free prep 中にあることを述べている。また醗酵液中及び阻害剤を加えた培地より常にグリコール酸を認めたがこれは前記の acetic-dehydrogenase によるか、または WEINHOUSE²³⁾ が *Asp. niger* の二次培養で酢酸からグリコール酸を認め、また木材腐朽菌²⁴⁾ に於ても認められたように別の経路によるのか、またこの酸の麩酸醗酵上に於ける意義については今後の検討に残したい。

6. 要 約

以上の実験結果よりエタノールから麩酸が生成される経路をつぎのように推定した。

エタノールはまずアセトアルデヒドから酢酸になり、ついで活性酢酸を形成するために acetate-activating enzyme または acetokinase と transacetylase の両作用によって acetyl-CoA を形成する。砒酸により阻害されることは後者の経路を推定できる。このようにして生成した acetyl-CoA は縮合酵素の介在によってクエン酸になり、TCA サイクルに入る。モノフロアセトアミド、亜硫酸、ジエチルマロン酸によってそれぞれ阻害されることはこのサイクルに入ったことを推定できる。また麩酸醗酵培地中にサイクル上の2, 3の酸の存在を認めたことと、基質エタノールにこれらの酸を添加、培養すると2~3倍量の麩酸が増加することからエタノールから麩酸になる経路として、エタノール \rightarrow アセトアルデヒド \rightarrow 酢酸 \rightarrow TCA サイクル \rightarrow 逆解糖経路 \rightarrow C_6 化合物 \rightarrow 麩酸

の経路を推定した。

7. 文 献

- 1) H.R.V. ARNSTEIN, R. BENTLEY : *Biochem J.* **54**, 493, 508, 517, (1953)
: *ibid.*, **62**, 403, (1956)
- 2) F.W. DENISON, C.F. CARSON, J.W. FOSTER : *Bacteriol. proc.*, **99**, (1954)
- 3) 坂口謹一郎 : 農化誌, **8**, 265, (1932)
- 4) D. BARNARD, F. CHALLENGER : *J. Chem. Soc.*, **10**, (1949)
- 5) J.H. BIRKINSHAW, J.H.T. CHARLES, C.H. LILLY, H. RAISTRICK : *Trans. Roy. Soc. Lond.* **B 220**, 127, (1931)
- 6) B.S. GOULD : *Biochem. J.*, **32**, 797, (1938)
- 7) 坂口謹一郎, 朝井勇宜, 池田庸之助 : 農化誌, **19**, 711, (1943)
- 8) M.L. BUCH *et al* : *Analy. Chem.*, **24**, 489, (1954)
- 9) 片桐英郎, 北原覚雄 : 京農誌, **26**, 1, (1933)
- 10) 坂口謹一郎, 馬場真一郎 : 農化誌, **18**, 405, (1942)
- 11) 坂口謹一郎, 朝井勇宜, 棟方博久 : 農化誌, **17**, 19, (1941)
- 12) F. CHALLENGER, V. SUBRAMANIAN, T.K. WALKER : *J. Chem. Soc.*, **1927**, 200
- 13) F. BROWN : *Biochem J.*, **47**, 598, (1950)
- 14) E.D. GOLDSCHMIDT, I. YALL, H. KOFFLER : *J. Bacteriol.*, **72**, 436, (1956)
- 15) C.V. RAMAKRISHNAN : *Enzymologia*, **17**, 169, (1954)
- 16) N.E. NEILSON : *J. Bacteriol.*, **71**, 356, (1956)
- 17) H. BEEVERS, E.P. GOLDSCHMIDT, H. KOFFLER : *Arch. Biochem. and Biophys.*, **39**, 236, (1952)
- 18) M. DAMODARAM : *Enzymologia*, **15**, 83, (1951)
- 19) H.L. KORNBERG, H.A. KREBS : *Nature*, **179**, 988, (1957) ; *Biochem. J.*, **68**, 535, 542, 547, (1958)
- 20) J.A. OHLSON : *Nature*, **174**, 695, (1954)
- 21) H.L. KORNBERG : *Biochem. J.*, **68**, P 3, (1958) ; J.F. COLLINS, H.L. KORNBERG : *ibid.*, **77**, 430, (1960)
- 22) E.S.G. BARRON, F. CHIRETTE : *Biochem. et Biophys. Acta.*, **12**, 239, (1953)
- 23) S. WEINHOUSE : *Phosphorus metabolism*, **1**, 283, (1951), W.O. McELROY, B. GLASS-BALTIMORE.
- 24) F.F. NORD, J.C. VITUCCI : *Adv. in Enzymology*, **8**, 269, (1948)

第2編 麴かび及び細菌による麴酸の分解

第1章 まえがき

麴酸の生成条件ないし生合成機構の研究は専ら一次及び二次静置培養法によって行われていたが, submerged culture 法が糸状菌の研究法及び工業的手法として広く採用されてきたことから, 著者は第1編に於て麴酸の生成にもこの方法を用い, 麴かびによる麴酸の生成に関し, 特に磷酸関与の問題点から静置培養法は *Asp. tamarisii var. crassus* J47 を用いてエタノールから, 培盪培養法は *Asp. oryzae var. globosus* AA2 を用いてグルコースから, それぞれ一次及び二次培養法による麴酸の生成について考察を加え, また今まで麴酸の生成機構の研究がグルコース等を用いたものであったがグルコースよりも小さい C₂ 化合物, エタノールを用いて C₂ 化合物より C₆ 化合物への生合成機構の考察を試みた。

前編に於てもしばしば述べたように各種炭素源より生成した麴酸は培養日数が長くなると麴酸自身二次的呼吸基質として消費, 分解されてゆくが二次的呼吸基質としての麴酸の分解経路ないしはその分解生産物について, 坂口¹⁾は最終生産物として蔞酸を得たというだけで全く不明の状態である。或る種の麴かび²⁾は66%の好収量で得られるが麴かびに対する麴酸の生理的意義については全く知られていない。例えば BRACKEN³⁾は「何故この酸が有益な機能を持っているようには思えないのに, かびが生産するのにかまた未知の酵素反応の中間体として存在するの^かか」と述べている。このようことから麴酸の分解機構を解明することが, 麴かびの生理的性質を解明する一助になると考えるのである。

著者はこのような意図で本編では麴かびを用いて静置及び振盪両培養法による麴酸分解の二, 三の条件と, 静置二次培養法で分解した麴酸の分解生産物の検索を行い, 他方麴酸を単一の炭素源として利用する細菌を土壤中より分離して, この細菌による麴酸々化の諸条件を検討し, さらにこの細菌の resting cell と生育培養から麴酸分解物の検索を行い, 細菌による麴酸分解経路の推定を試みたのである。

文 献

- 1) 坂口謹一郎 : 醸学, **9**, 788, (1931)
- 2) 片桐英郎, 北原覚雄 : 京農記, **26**, 1, (1933)

- 3) A. BRACKEN, 赤井重泰, 獅山茲孝訳: 微生物の化学, p. 192, 南江堂, 昭和35年.

第2章 麴かびによる麴酸の分解

1. まえがき

本章に於ては静置培養法と振盪培養法によって麴かび *Asp. oryzae var. globosus* AA2 を用いた麴酸の分解について述べる.

2. 実験法

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%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04%, ペプトン 0.7% の 2 種を用い, 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(麴酸)を添加した培地を用いた. 振盪培養法は往復振盪機を用い, 一次培養は予め保存培地(ツテペックトック寒天培地)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, 孢子のみを集めさらに消毒ガーゼで濾し, 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° で 48 時間培養しつ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, 新らしく殺菌した培地に懸濁し全溶(緩衝液, 阻害剤を含む) 20 ml になるように太口ピペットで T 型振盪フラスコに注入して 5 日間, 二次培養を行った. 静置培養法は前述のように行った. 緩衝液は重フタル酸カリと塩酸及び苛性ソーダを, また硼酸ソーダと硼酸及び磷酸塩をそれぞれ用いた.

分析法として, 酸滴定は 0.1N 苛性ソーダで滴定を行い, 全酸の場合はフェノールフタレン, 麴酸以外の酸のときはコンゴレッドをそれぞれ指示薬として用い, 培地 10 ml に対する ml 数で示した. 麴酸は比色法, インドフェノール値はイソアミルアセテート吸

着法¹⁾, グライコール酸は CALKINS 法²⁾, ペーパークロマトグラフのうち, 2,4 ジニトロフェニールヒドラゾンの調製法は BRADY 法を用い, この分割は MEIGH 法³⁾により, 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 (CO₂ 型) で処理後, その濃縮液について *n*-ブタノール, ギ酸, 水またはイソアミルアルコールと 5N ギ酸⁴⁾を用いそれぞれ標準試料とともに展開し同定した. 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マトロープ酸法⁵⁾, アルコールは酸化法を, 第 2 鉄塩の反応は 0.1N $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ で発色した.

2. 振盪培養法による麴酸の分解

培地 (A) のグルコースに替えて麴酸を用いると菌体の生育が悪く, かつ不均一でまた長時間 (1 週間) を要するので菌体造成のためにグルコース 3% を用い培養時間を異にした菌体を用い二次培養による麴酸の分解能を検討した結果は第 1 表のようである. 一次培養 42 時間の菌体が最大の Q_k を示したので以下の実験はすべて (A) 培地 (グルコース 3%) で 42~48 時間の培養菌体を用いた.

i 二次培養による麴酸の分解過程: 第 2 表に示すように酸価は増大せず認められる変化はない. インドフェノール価は ARNSTEIN 等⁶⁾ のアルカリ分解の結果とまた DETUELY⁷⁾ の実験から推定される分解の第一段階の酸素還の開裂によ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て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. なお 1N 苛性ソーダを用い, 100° で麴酸を分解した場合インドフェノール

第 1 表 時間を異にす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

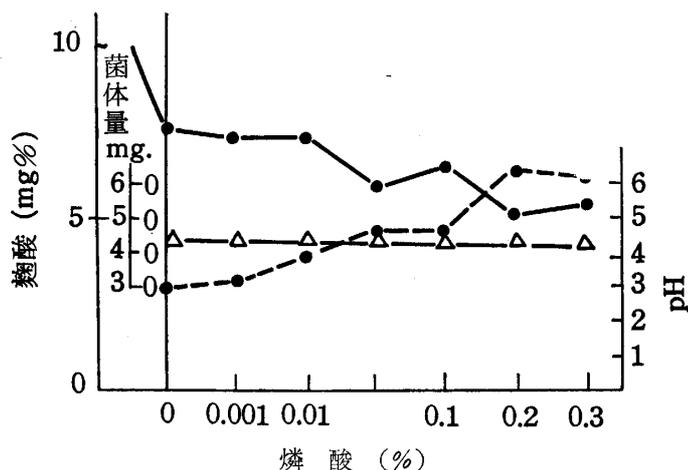
* 消費麴酸 mg/菌体 mg/l 時間×10 として表わした

第2表 二次培養による麩酸の分解

培養日数	麩酸 %	pH	全酸 D.N. NaOH ml 数	インドフェノール価	菌体量 gr/20 ml
0	0.715	5.05	0	0.25	
2	0.515	4.95	0	0.245	0.066
4	0.355	4.90	0	0.260	0.070
5	0.312	4.50	痕跡	0.230	

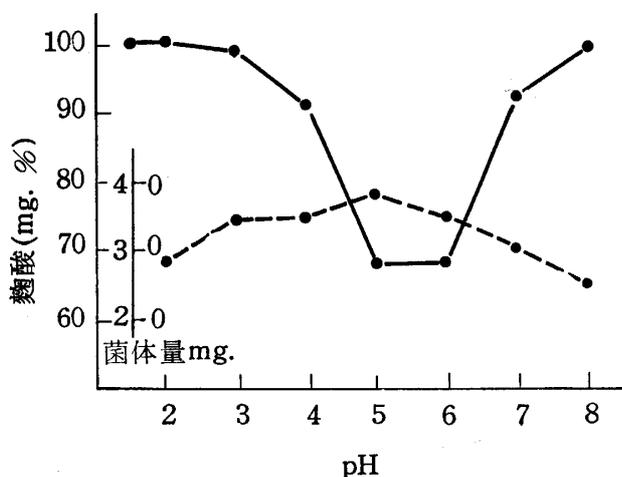
ル価が漸次増大し、麩酸の分解とともにその価が減少することを認めているが、菌体による分解では明瞭な結果は得られなかった。

ii 麩酸分解に対する磷酸の効果：第1図は磷酸の影響を示したが一般に磷酸の濃度が増加するに従い麩酸の分解量は多くかつ菌体量も増加した。なお(B)培地(ペプトン0.7%)の菌体を使用したときは殆んど



第1図 麩酸分解に対する磷酸の効果

●—● 麩酸 ●---● 菌体量 △—△ 最終 pH



第2図 麩酸分解に対する pH の影響

●—● 麩酸 ●---● 菌体量

その影響は認められなかった。

iii 麩酸分解に対する水素イオン濃度の影響：麩酸の分解に対する水素イオン濃度の影響を第2図に示した。分解の最適水素イオン濃度は5~6でその他の水素イオン濃度では非常に麩酸の分解量を減少した。従来麩酸生成(一次培養)にはかなり低いこと(pH 2~3)⁹⁾が報告されているが本実験で得た結果は生成麩酸の分解を阻害する意味で最適水素イオン濃度を3附近に保持する意味の一半の解釈を与えるものと考えられる。

iv 麩酸分解に対する阻害剤の影響：麩酸分解に対する各種阻害剤の影響を検討してその結果を第3表に示した。また基質麩酸のほかにアルカリ分解生成物であるグリコール酸をも基質として用いた。これらの結果から麩酸分解を阻害するものとしてアジド、2,4-ジニトロフェノール、 α, α' -ジピリジル、ヨード醋酸であるが、MANN⁹⁾によるとシアナイド、アジド(0.001N)、ヨード醋酸(0.001N)、フロライド(0.005N)は *Asp. niger* の磷酸代謝を強力に阻害するとし、また前二者は磷酸化に対する阻害剤であることから磷酸関与系を阻害していると考えられるが、休止細胞によって得られたこれらの結果から断定的の結論はなお考慮の余地があるように思われる。

v 生産物の検索：既述の条件(42~50時間培養菌体による分解)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表に示すように酸度も増大せず単に阻害剤を用いたときグリコール酸の検出を認めたのみであった。

vi 検圧計による検討：麩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、炭酸ガス排出 473.3 μ l (163分間)であることから約1であった。また195分間で5分子の酸素吸収があることから麩酸は完全に分解する傾向にあると推定される。(磷酸緩衝液水素イオン濃度6を用い、菌体調製には(B)培地、2時間飢餓培養を行った)。

4. 静置培養法による麩酸の分解

本実験は(A)培地を用い、静置培養法で

第3表 麩酸分解に対する各種阻害剤の影響

阻害剤 Mol	基質	麩酸 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
亜硫酸ソーダ	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
アシ化ソーダ	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
硫酸ソーダ	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

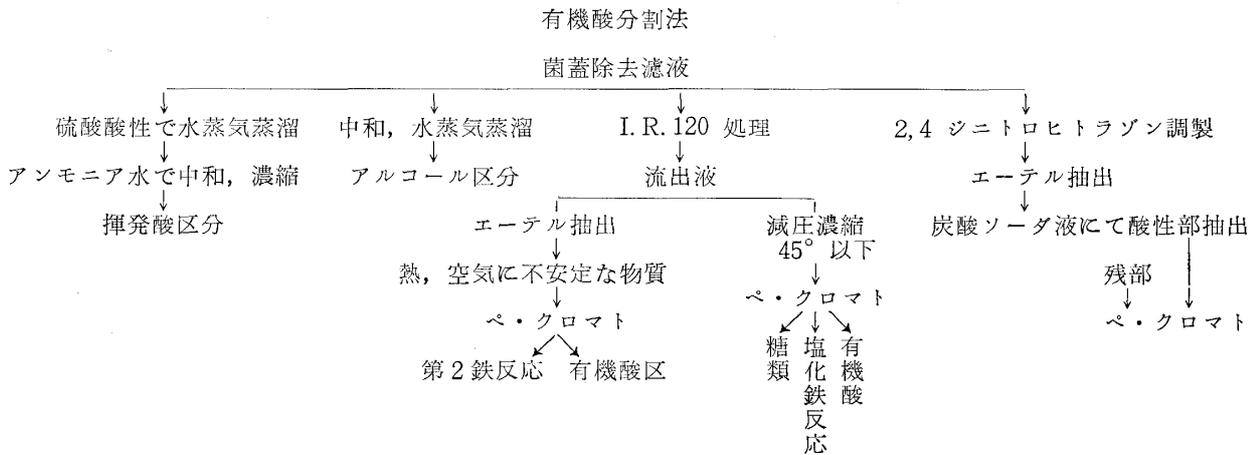
菌蓋形成後 (7~10間, 32°) 常法に従って洗滌後, 基質麩酸 1~4% 含有無窒素 (A) 培地を注入して分解状況を調査した。

i 静置培養法による麩酸の分解経過: 第4表に示したように麩酸はほぼ7日間で殆んど消失し, 全滴定酸は麩酸以外の酸として 0.75 ml を要したことは分解生成物によるものと考えられる。また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を示さなかった。紫外線吸収帯は4日目に 360 μ に僅かに認められたが明瞭に現われなかった。

第4表 静置培養法による麩酸の分解状況

分析 培養日数	麩酸 %	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
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



ii 生成物の検索：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、かつ振盪培養法でグライコール酸の検出量の比較的多いモノフロアセトアミド ($1 \times 10^{-2} M$)、亜硫酸 ($2 \times 10^{-3} M$)、硫酸 ($1 \times 10^{-3} M$) をそれぞれ阻害剤として用い、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モノフロアセトアミド $1 \times 10^{-2} M$ 添加したもの、(4)、同じく亜硫酸ソーダ $2 \times 10^{-3} M$ 添加したもの、(5)、同じく硫酸ソーダ $1 \times 10^{-3} M$ 添加したもの等の5種類の培養条件で培養し、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%の時期を選んで培養を中止して試料とした。分割法は上図のように行ったがなお酢酸を補獲する目的で炭酸石灰を添加したものより10%酢酸不溶石灰塩は殆んど認められなかった。表示のような分割法で得た結果を要約すると、2,4-ジニトロフェニルヒラゾン区ではアセトール等を予想したが得られず、酒精類もまた認められなかった。有機酸類としてグライコール酸の反応は振盪培養法で認めたように強く現われなかったが何れもグライコール酸の反応を認め、硫酸阻害区がその反応を強く示し同時にこれに附随してクエン酸の反応である緑色の螢光を認めた。また別に β -ナフトールとバニリンによるクエン酸の反応を認めたが乳酸の反応はない。クロマトグラムによる有機酸類の検出結果として、(1)区酢酸、グライコール酸、コハク酸及び不明有機酸、(2)区グライコール酸、コハク酸、フマル酸に近い未知酸、3区クエン酸、フマル酸、グライコール酸と2種類の不明有機酸、(4)区グライコール酸、コハク酸及びクエン酸、(5)区グライコール酸等の有機酸類

を認めた。

また同溶媒のクロマトグラムにヒドロゼンフタレートで中性部を検出したが麴酸以外認められるようなカーボニルまたはアルデヒド化合物を検出し得られなかった。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以外に Rf 0.42~0.43, Rf 0.86 に新しい紫色の呈色物質を認めた。この Rf 0.86 の物質はエーテル抽出部にだけ現われ、減圧濃縮で失われる。また Rf 0.42 の呈色物質はとくに亜硫酸阻害の試料に多く現われた。またイソアミルアルコール溶媒のクロマトグラム上でも Rf 0.28~0.3, Rf 0.78 にそれぞれ認められた。揮発酸部としてとくにギ酸は試料1, 2, 3区から得られ、フロアセト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。なお菌蓋の自己消化によるこれら酸類生成の可能性について検討したが基質麴酸 (1%) 添加のものの菌体 (2.7 gr.) に較べて無添加のものは菌体重量 (2ヶ平均 1.69 gr.) が減少し、その培地 (1700 ml) からエーテルで抽出される有機酸類は殆んど認められなかった。

5. 考 察

上述の実験結果から振盪培養法からはとくに認められるような分解生成物は得られなかったが、これに反し静置培養法で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、ほかに未知酸2種類を認めた。また第2鉄塩による呈色物質として麴酸以外2種類を認めたがいずれも量的に少くかつ不安定であることから麴酸分解過程の中間物であると考えられる。

阻害剤の効果については振盪培養法についてだけ行ったが、二、三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。また中性区に何物も見出し得な

ったが、たとえアルコールが生成しても蓄積することなしに直ちに分解し去ることは検圧実験による R.Q. = 1 であることから示唆し得られる。なおエンジオールによるインドフェノールの還元も認められなかった。

6. 要 約

麹かび, *Asp. oryzae* var. *globosus* AA 2 を用いて麴酸の分解を振盪培養法と静置培養法の両方について観察してつぎのような結果を得た。

(1) 振盪培養法による麴酸の分解に対する磷酸の濃度の効果は、磷酸の濃度を増すと分解量は多い。このことは ARNSTEIN¹⁰⁾ 等の静置培養法の結果と同じようである。最適水素イオン濃度は 5~6 であり、分解産物の結果による酸価は増大せず、またインドフェノール価の増大もなかった。ワールブルグ法による検圧実験は R.Q.=1 であった。

(2) 振盪培養分解法および麴酸分解に対する阻害剤の効果は窒化ソーダ、2,4-ジニトロフェノール及び α, α' -ジピリジルが完全に阻害し、またその効果の余り著るしくないモノフロアセトアミド、砒酸塩、亜砒酸塩等を使用した場合にグリコール酸の呈色反応が著るしく、またグリコール酸を基質とした場合これらの阻害剤の挙動もこれに類似していた。

(3) 静置培養分解法による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、なお未知の酸 2 種とまた第 2 鉄塩による呈色物質として麴酸以外 2 種類を認めた。

文 献

- 1) 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）
- 2) V.P. CALKINS : *Analy. Chem.*, **15**, 762, (1943)
- 3) D.F. MEIGH : *Nature*, **170**, 579, (1952)
- 4) M.L. BUCH, R.M. MONTGOMERY, W.L. PORTER : *Analy Chem.*, **24**, 489, (1954)
- 5) W.M. GRANT : *Analy. Chem.*, **20**, 267, (1948)
- 6) H.R.V. ARNSTEIN, R. BENTLEY : *J. Chem. Soc.*, **1951**, 3436
- 7) F. PETUELY, U. KUSSBERG : *Monatsh.*, **83**, 80, (1952) ; *C.A.*, **47**, 1600a (1953)
- 8) N.H. BARHAM, B.L. SMITS : *Trans. Kansas Acad. Sci.*, **37**, 91, (1934) ; *C.A.*, **29**, 2544, (1935)
- 9) T. MANN : *Biochem. J.*, **38**, 339, (1944)
- 10) H.R.V. ARNSTEIN, R. BENTLEY : *Biochem. J.*, **54**, 508, (1953)

第 3 章 細菌による麴酸の分解

1. ま え が き

前章では麹かびを用いて振盪と静置両培養法によって麴酸の分解について述べたが、その結果によると麹かび自体の酵素系の複雑多様性と活性の強力なために分解、消失が早いので所期の目的物を得ることができなかった。本章では麴酸の分解経路をさらに検討する目的で麴酸を単一の炭素源として利用する細菌を土壤中より検索し、この休止菌を用いて麴酸の分解に影響する種々な条件を検討し細菌による麴酸分解の予備的概念を得る目的でワールブルグ検圧計を用いて行った結果について述べる。

2. 細菌の分離

第 1 表に示すような麴酸を単一の炭素源とする培地

第 1 表 集殖用培地組成

KH ₂ PO ₄	1.0 g	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.03 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.7 g	Kojic acid*	2.0 g
NaCl	1.0 g	水	1 l
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4.0 g	pH	7~7.2**

* KOH で中和して添加 ** KOH で調整

を用いて分離した。この液体培地 10 ml には小豆大の土壤を投入して 30° で培養し混濁したものからさらに 2 代にわたり移殖し、このものから麴酸ブイオン寒天培地（北里研，肉エキス 0.5%，カタヤマペプトン 1%，食塩 0.5%，麴酸 0.2%，KOH で中和）で扁平培養して麴酸分解菌を得て K-1 株と命名した。

3. 実 験 法

i 細菌懸濁液の調製：麴酸ブイオン寒天斜面培地に 31~32° で 70 時間培養した K-1 菌を殺菌水で洗い出し、5 分間、1500 回/分で固形物を遠沈し、この懸濁液をさらに 5 分間、6000 回/分で菌体を遠沈し、殺菌水に懸濁して同様に 2 回遠沈し、洗滌しこの洗滌菌体を

第 2 表 検圧計容器組成

細菌懸濁液	1.0 ml
M/15 磷酸塩緩衝液又は M/5 トリス緩衝液	1.5
0.05 M 麴酸	0.2 (10 μ M)
水又は阻害剤等	0.3
20% 苛性カリ	0.2
全量	3.2
温度	30°C
気相	空気

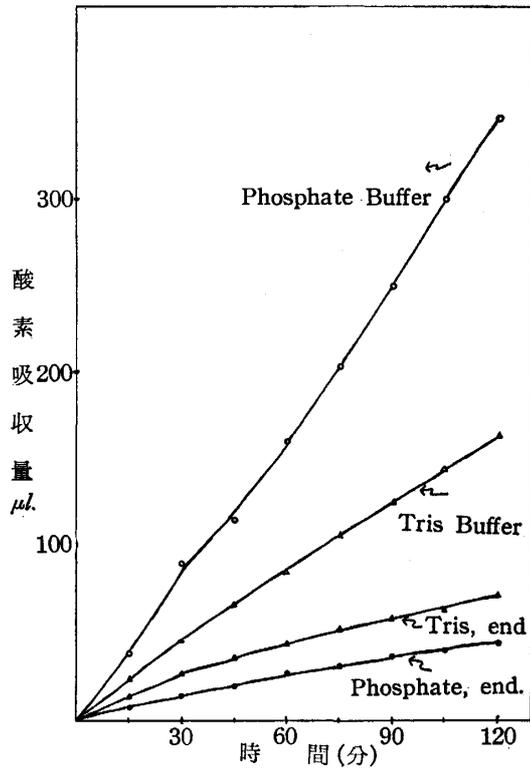
殺菌水に懸濁して用いた。

ii 検圧計による酸素吸収と炭酸ガス排出量の測定：容器組成は第2表のようである。阻害剤や金属塩等の添加の場合は水の代わりにこれらそれぞれの10倍濃度のものを同量加えた。その他実験条件の異るときはその都度説明してある。菌体量の測定は懸濁液 5 ml を採り100°で4時間乾燥後秤量し、1 ml 当りの乾菌量として算出した。

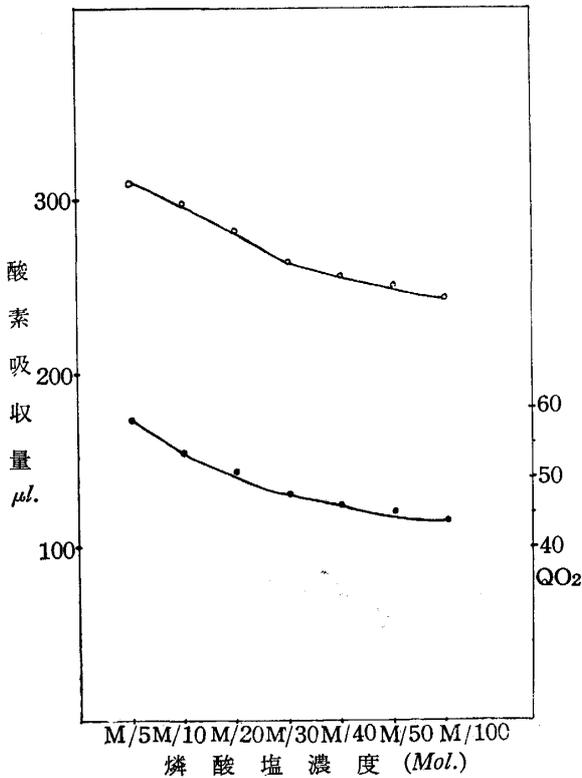
4. K-1 株の休止菌による麩酸分解の諸条件

i 磷酸塩緩衝液濃度の影響：麩酸の酸化に対する最適磷酸塩緩衝液の濃度を決定するために麩酸 10 μM を基質したときの酸化能を水素イオン濃度 7 の M/5 ~ M/100 (最終濃度) までの各種濃度で測定した。第1図は各濃度に於ける90分間の酸素吸収量と QO₂ を比較したもので実験範囲内の濃度では M/5 濃度の磷酸塩緩衝液が最高の酸化能を示した。

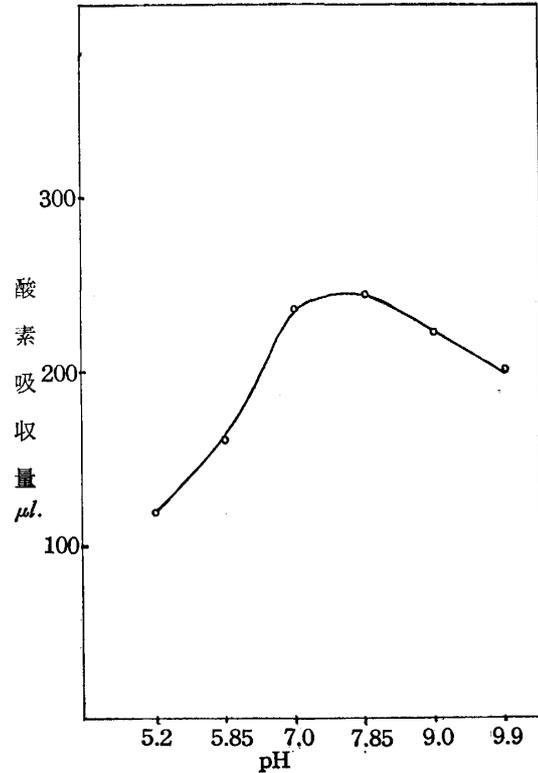
ii 磷酸の影響：麩酸の酸化的分解はその構造上からおそらく側鎖のアルコール基に加磷酸されて分解されてゆくものと考えられたが後述するように麩酸はコメン酸に convert されることを認めたがコメン酸が開環後はその分解に当然磷酸が必要であることが推定されるので、本実験では pH 7.2 の M/15 磷酸塩緩衝



第2図 磷酸の影響



第1図 磷酸塩緩衝液濃度の影響



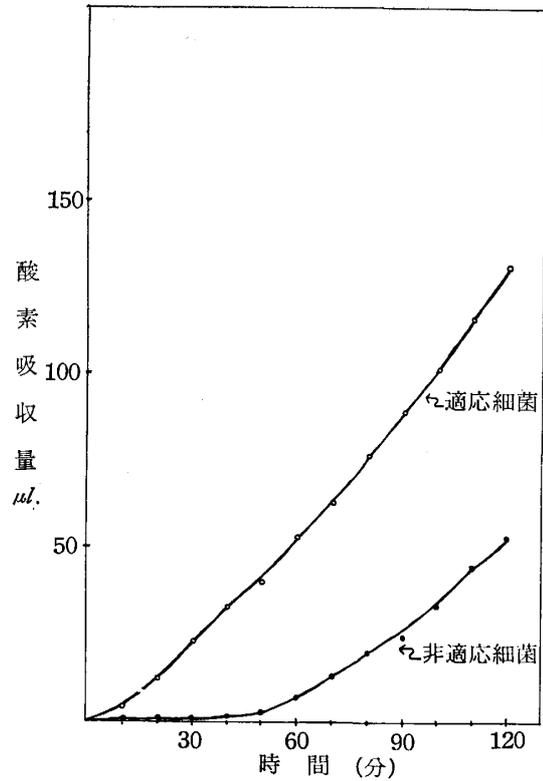
第3図 水素イオン濃度の影響

液と M/5 トリス緩衝液の場合の酸素吸収量を比較した。第 2 図のようにトリス緩衝液の場合は磷酸塩緩衝液の場合に較べて約 60% の酸素吸収量しかないことから麩酸の分解には磷酸が必要であることが推定できる。

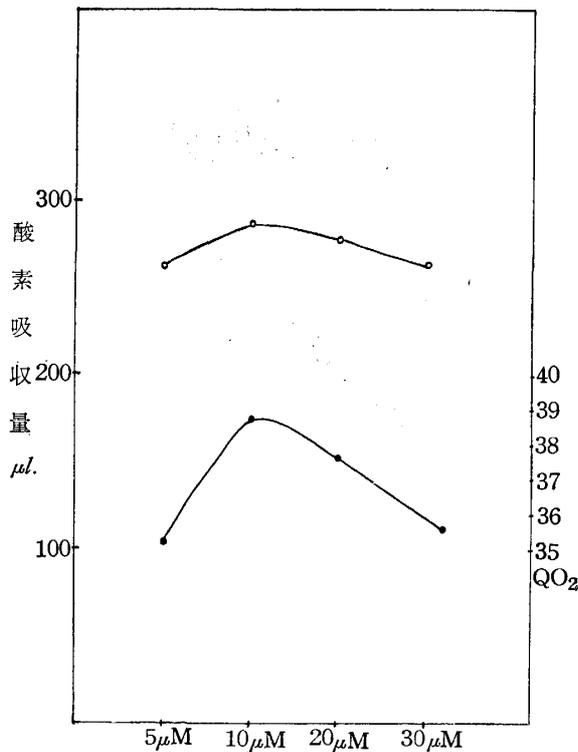
iii 水素イオン濃度の影響：麩酸の酸化に対する水素イオン濃度の影響をみるために 5~10 までの水素イオン濃度に於ける酸素吸収量を測定した。5~7.85 までは M/15 磷酸塩緩衝液，9~9.7 まではホウ酸と塩化カリ緩衝液を用いた。第 3 図に示すような最適水素イオン濃度はほぼ 7~7.85 の範囲内にあることが認められたがなお 9 でも酵素作用に対する著るしい相異は認められなかった。それで便宜上実験はすべて pH 7.2 で行った。

iv 基質濃度の影響：麩酸の抗菌性については 2, 3 の報告があるが FOSTER¹⁾ はグラム陰性菌に対して微弱ながら抗菌力があると述べている。このことから K-1 菌の麩酸々化に対する最適濃度をみるために 5~30 μM 濃度の麩酸を添加して酸化能を比較した。その結果は第 4 図に示すように 30 μM の高濃度になるとやや阻害作用が現われたようで最適濃度は 10~20 μM 即ち 0.0033~0.0066 M である。

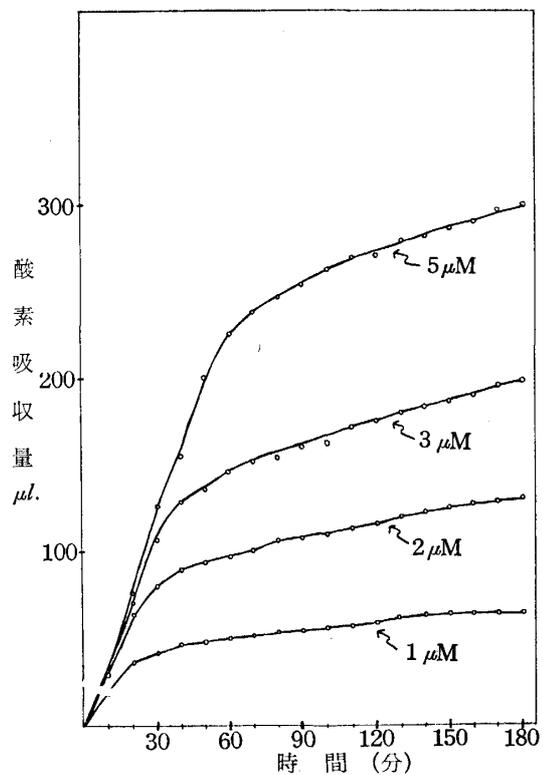
v 麩酸分解の適応現象：麩酸の酸化的分解が適応



第 5 図 麩酸酸化能に対する適応現象



第 4 図 基質濃度の影響



第 6 図 麩酸 1~5 μM を酸化するに要する酸素吸収量

第3表 麩酸 1 μ M を酸化するために要する酸素吸収量

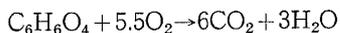
aut resp.	酸素吸収量 μ l.						
	120分			180分			
	1 μ M	2 μ M	3 μ M	aut resp.	1 μ M	2 μ M	3 μ M
41.5	96.6	148.5	196.0	57.3	116.0	174.5	232.0
—	51.1	107.0	152.5	—	58.7	117.2	174.0
1 μ M 当り O ₂ 量	51.1	53.5	50.8		58.7	58.6	58.2

第4表 麩酸 10 μ M を酸化するために要する酸素吸収量と炭酸ガス排出量

時間	酸素吸収量 μ l.			炭酸ガス排出量 μ l.			
	aut resp.	基質麩酸	吸収量	aut resp.	基質麩酸	排出量	R.Q.
90分	26.6	150.6	124.0	17.9	122.1	104.2	0.840
	"	"	"	19.6	126.9	107.3	0.865
120分	33.2	215.7	182.5	23.5	178.2	154.7	0.841
	"	"	"	20.4	170.2	149.8	0.820
平均							0.841

酵素系よりなるかどうかを検討するためにつき実験を行った。麩酸ブイオン寒天培地と麩酸の代りにグルコースを2%加えたグルコースブイオン寒天培地にK-1菌を31~32°で3日間培養した菌体を用いて酸素吸収量をみた。その結果は第5図に示すように40~50分間の lag time の後に酸素吸収が始まることからK-1菌による麩酸分解は適応酵素よりなっていることが推定できる。

vi 酸素吸収量と炭酸ガス排出量：麩酸 1.0 M が酸化されるとき酸素吸収量と炭酸ガス排出量を測定することによって K-1 菌による麩酸分解系の推定ができるので 1~5 μ M 濃度の麩酸に対する酸素吸収量を示すと第6図と第3表のようである。3時間で麩酸 1M 当り 2.62~2.60 M の酸素吸収量がある。いま麩酸が次式のように完全分解すると



5.5M の酸素を必要とするが、実験結果から酸素吸収量は47%で残余は oxidative assimilation に利用されたものと推定される。

つきに基質 10 μ M に対する酸素吸収量と炭酸ガス排出量を直接法に従って測定した結果を第4表に示した。R.Q. 値の

平均は 0.842 で麩酸 1M に対する炭酸ガス排出量は 3.1M~3.5M に相当する。このことから麩酸はすでに開環しているものと推定できる。

vii 麩酸の嫌氣的分解：麩酸の嫌氣的分解を検討するためにツンベルグ管を用い、メチレンブルーの脱色時間を基質無添加の場合と比較した。変型ツンベルグ管の主室にメチレンブルー 0.4 ml, 麩酸 0.5 ml と所要量の水を入れ、側室に磷酸塩緩衝液 0.5 ml, 細菌懸濁液 0.5 ml を入れて排気して(10 mm) 後、30°の恒温槽中で15分間放置後、側室の混合液を主室に加えメチレンブルーが脱色される時間を測定した。その結果は第5

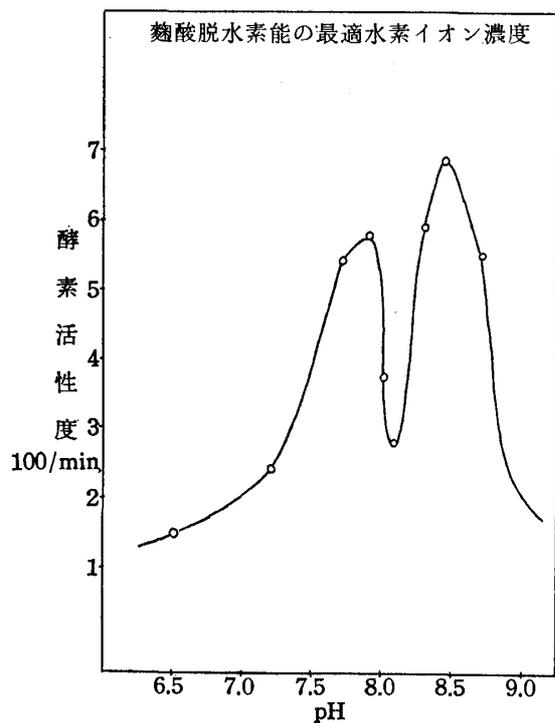
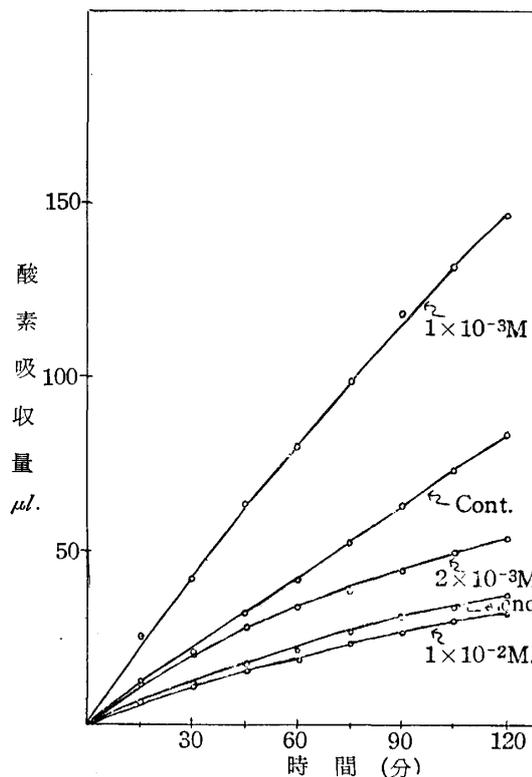
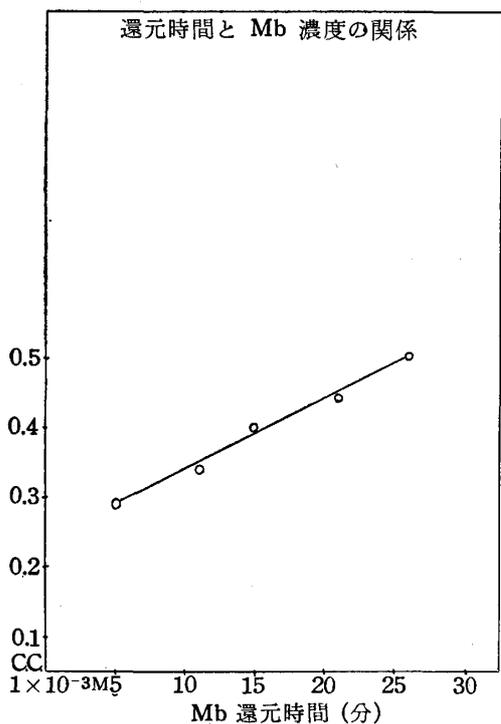
表に示すように基質を添加した場合は無添加に較べて約1/2の時間で脱色されるので麩酸はメチレンブルーの存在で嫌氣的条件の下で酸化されることが認められた。このように麩酸は嫌氣的条件の下で分解されるので嫌氣的酸化に対する二、三の影響について検討した。

(a) 還元時間とメチレンブルー濃度の関係：ツンベルグ法では或る一定の菌体濃度の場合、メチレンブルーの濃度とその還元時間が比例関係にあることが望ましいので、菌体懸濁液の濃度とメチレンブルーの濃度の関係について検討した結果図示のように 0.001 M のメチレンブルー 0.25~0.5 ml (最終濃度 $1 \times 10^{-4}M \sim 2 \times 10^{-4}M$) の間でメチレンブルーの濃度とその脱色還元時間とが比例関係にあることが判ったので、以後の実験は 0.001M のメチレンブルー 0.4 ml (最終濃度 $1.6 \times 10^{-4}M$) を用いた。

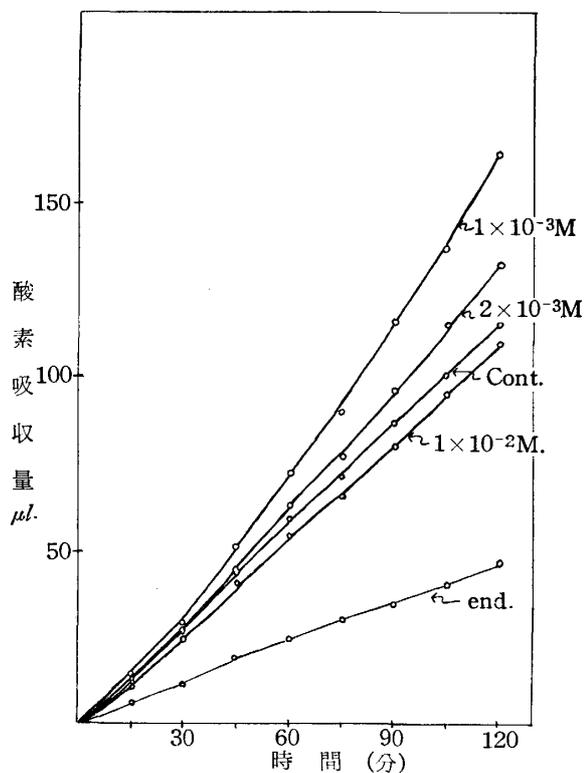
(b) 麩酸の嫌氣的分解と水素イオン濃度：図に示すようにに最適水素イオン濃度と見做される peak が

第5表 麩酸の嫌氣的分解

	M/15 磷酸塩緩衝液 pH7.9	細菌懸濁液	0.1M 麩酸	0.001M メチレンブルー	水	全量	脱色時間(分)
実験1	0.5 ml	0.5	0.5	0.4	0.6	2.5	14.5
	0.5	0.5	—	0.4	1.1	2.5	70.
実験2	0.5	0.5	0.5	0.4	0.6	2.5	23.
	0.5	0.5	—	0.4	1.1	2.5	110.



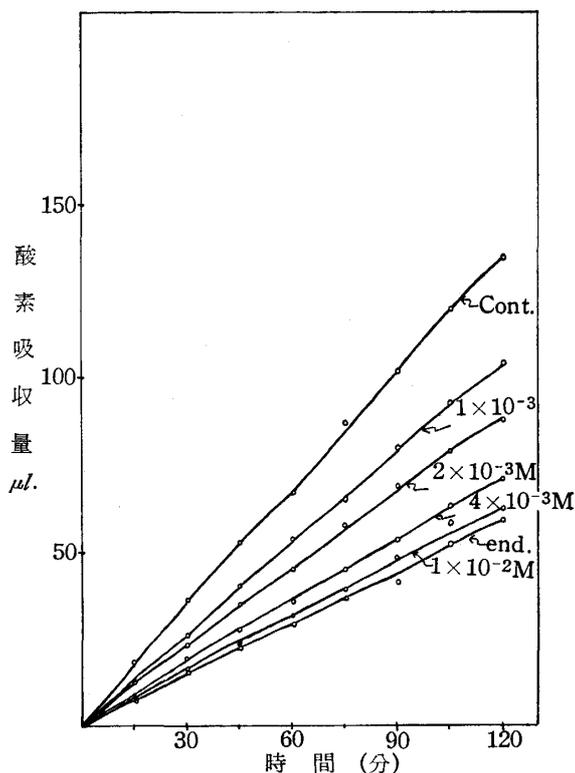
pH 7.9 と 8.4 に認められたのは麴酸分解中間物と推定できるコメン酸が得られたことからおそらく麴酸を脱水素する酵素 (kojic acid dehydrogenase) とその生成物 (コメンアルデヒド) をさらに脱水素する 2 種類の酵素が示した水素イオン濃度であろうと推定する。



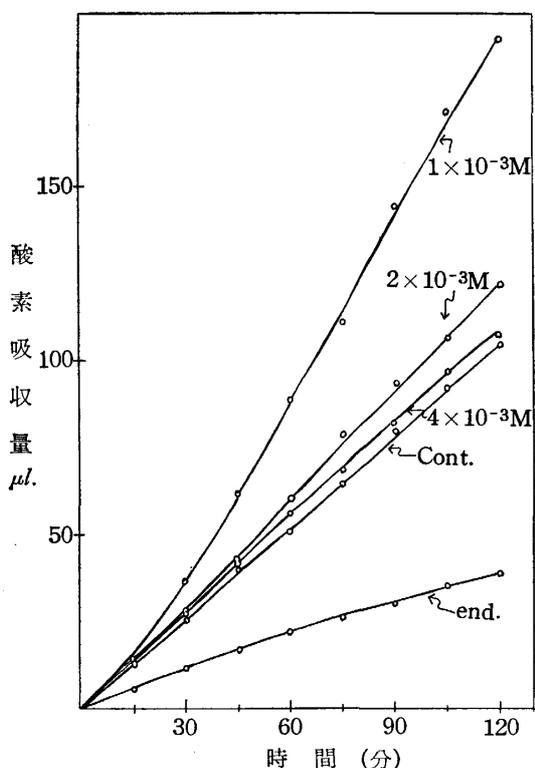
(c) 麩酸の嫌氣的分解と温度：25,30,35°の各温度で脱色時間を比較したが30°の場合最も短時間であったことから嫌氣的分解の最適温度は30°であると考えられる。

(d) 麩酸の嫌氣的分解に対する二、三阻害剤の影響：麩酸の構造上から側鎖の hydroxymethyl は第1級アルコールの性質を持っていることからアルコール脱水素酵素の性質に近いものと考え、二、三の阻害剤と金属塩の影響について検討してみたが、弗化ソーダ、ヨード酢酸(中和して使用)、シアンカリ(計算量の塩酸添加)は阻害作用を示さなかったがヒドロキシルアミン塩酸塩(中和して使用)の場合 $1 \times 10^{-3}M$ で59分(無添加18分)を示して阻害作用が認められ、試験した金属塩、 Ag^+ 、 Hg^{++} 両イオンは何れも完全阻害を示した。

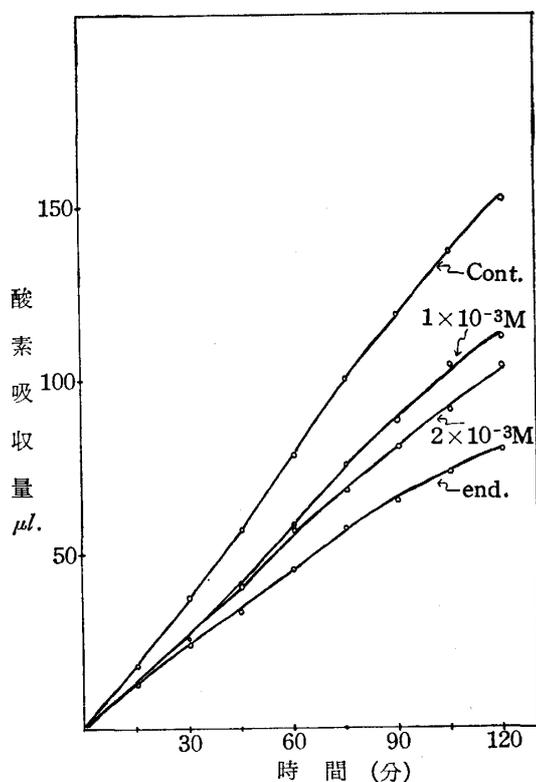
viii ビタミン類の影響：酸化、還元系に關与する酵素類は各種のビタミン類が助酵素の構成成分となっているので K-1 菌による麩酸の酸化に対するビタミン類の効果を検討した。試験したビタミン類(B_1 、 B_6 、riboflavin phosphate, p-aminobenzoic acid, car-pantothenate, nicotinamide, l-ascorbic acid)のうち l-ascorbic acid のみがやや作用があるような結果



第10図 麩酸能化酸に対する Co^{++} イオンの影響



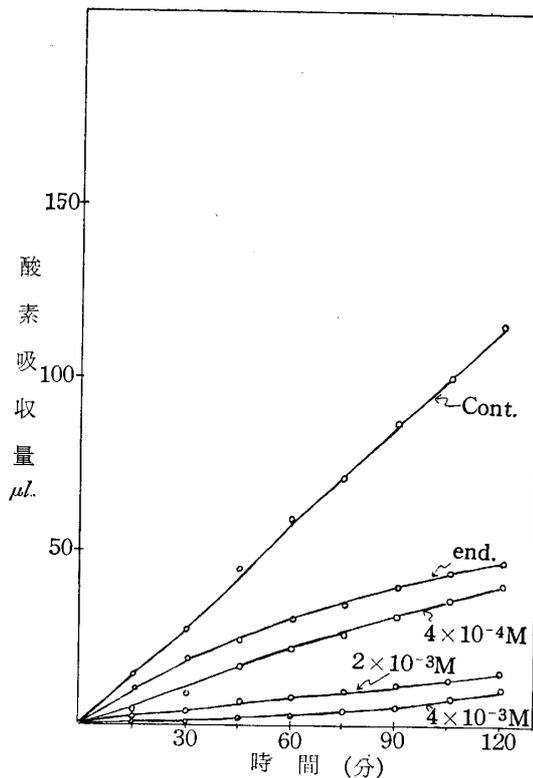
第9図 麩酸酸化能に対する Ca^{++} イオンの影響



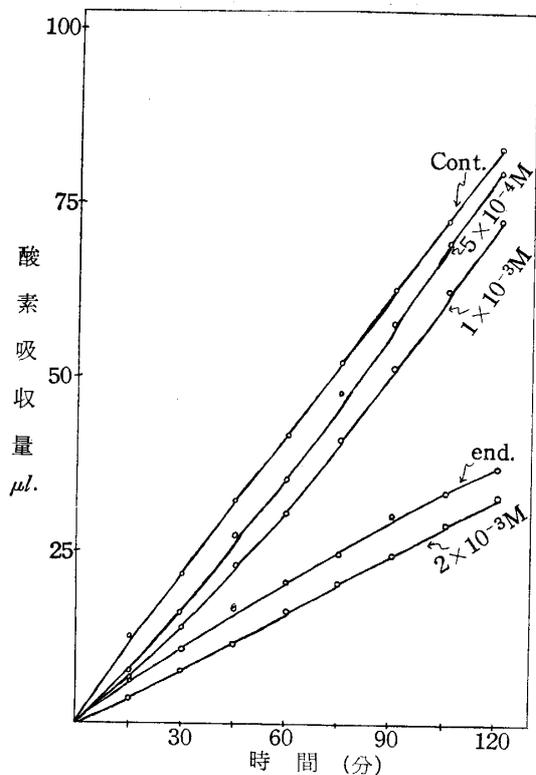
第11図 麩酸酸化能に対する Mn^{++} イオンの影響

を示したが断定的でない。

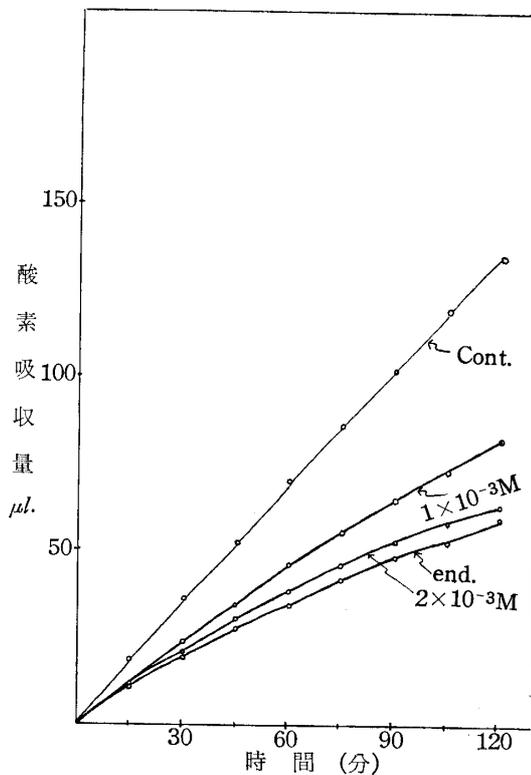
ix 重金属類の影響：各酵素系に対し各種の金属イオンが活性の促進または反対に阻害作用があることが知られているので K-1 菌による麩酸々化に対する重金属イオンの影響を検討してみた。ただ本実験は休止菌による関係上単に洗滌によっては培養菌体から金属イオンを除くことは殆んど不可能と考えられるのでなるべくその影響を除くために透析用セロファンチューブ（ヴィスキング K.K. 製）に細菌懸濁液を入れ、冷蔵庫中で約 20 時間蒸溜水中で透析し遠沈、洗滌した懸濁液を用いた。使用した金属塩は Ca 塩は塩化物、他はすべて硫酸塩を用い、使用緩衝液は pH 7.2 のトリス緩衝液を用いた。試験した各種金属イオンのうちで促進作用を示したものは Fe^{2+} , Ca^{2+} , 及び Mg^{2+} 各イオンで、阻害作用のあるものは Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} でそれぞれ第 7—14 図に示してある。この阻害作用を示した各金属イオンは本来の酵素系に対する阻害であるが或は麩酸が特にせん移元素と強固な chelate 化合物を形成²⁾する結果不溶性の kojate chelate complex を形成して基質として麩酸が利用されにくい状態になるのではないかと考えられるので、この点を解明するために kojate chelate com-



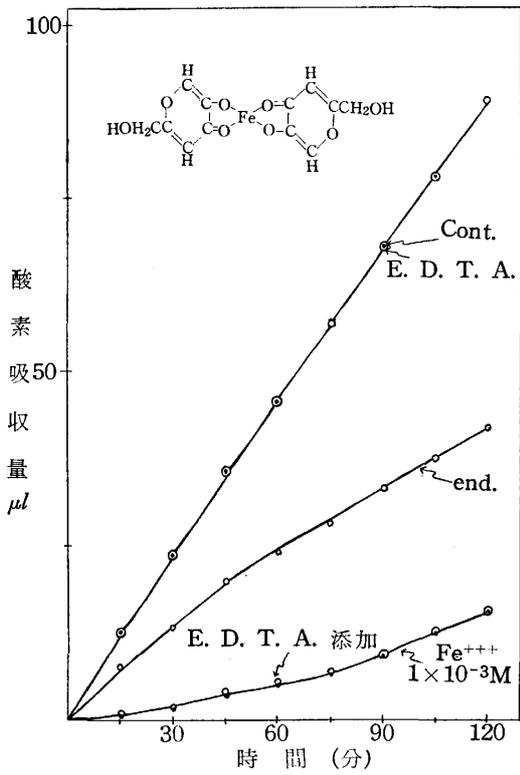
第13図 麩酸酸化能に対する Cu^{2+} イオンの影響



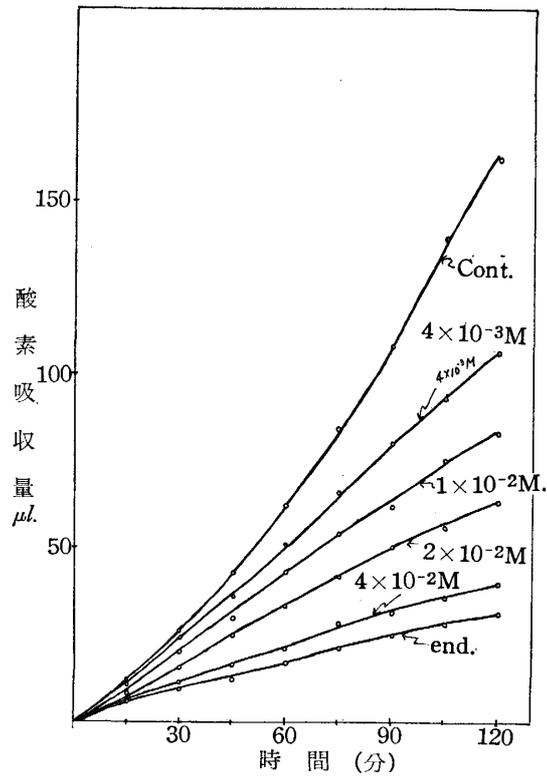
第12図 麩酸酸化能に対する Zn^{2+} イオンの影響



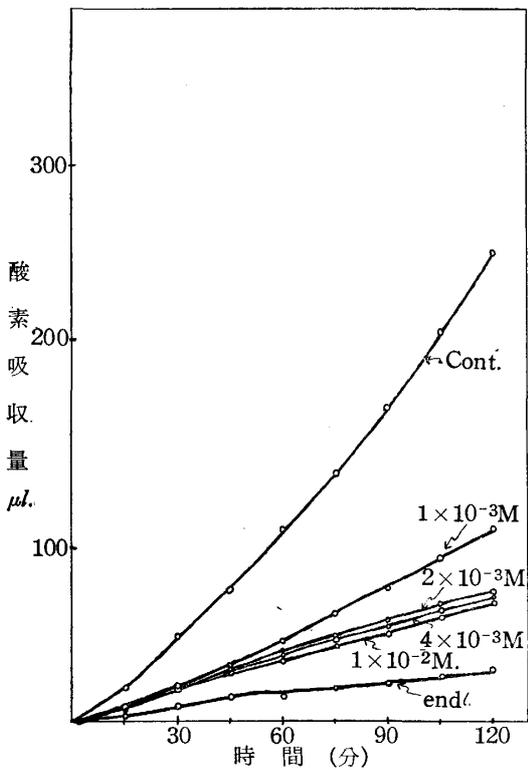
第14図 麩酸酸化能に対する Ni^{2+} イオンの影響



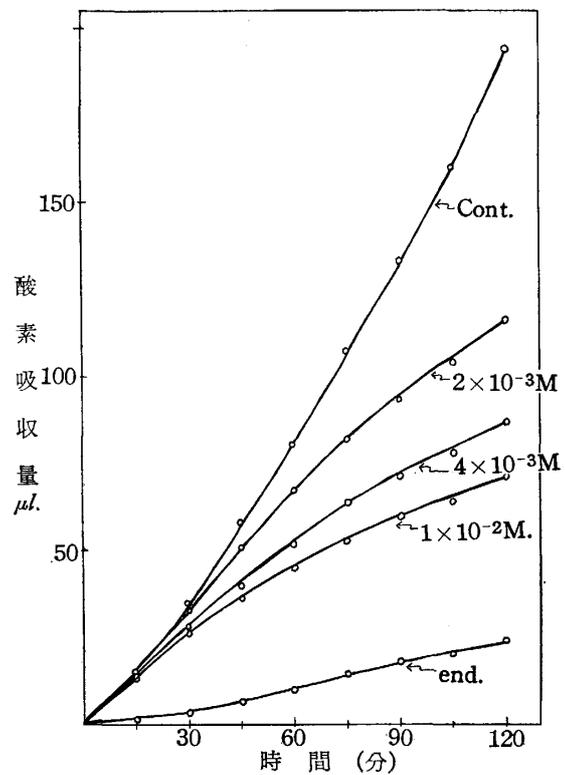
第15図 Fe^{+++} イオンの阻害に対する E.D.T.A. の効果



第17図 麴酸酸化能に対するヨード酢酸の影響



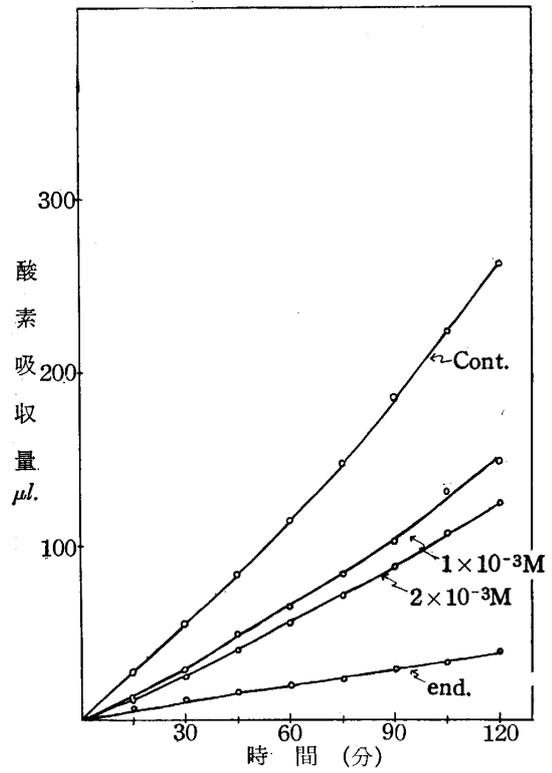
第16図 麴酸酸化能に対する亜砒酸の影響



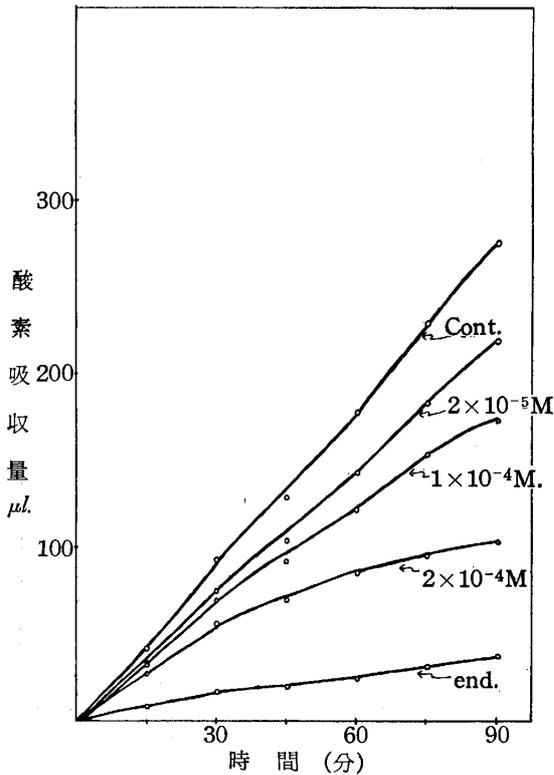
第18図 麴酸酸化能に対するヒドロキシルアミンの影響

plex を解放するために E.D.T.A. を添加して酸素吸収量を測定してみた。Fe^{III} イオン $1 \times 10^{-3}M$ (0.3 ml) を加え、60分後第2側室より $1 \times 10^{-1}M$ の E.D.T.A. (0.2 ml) を添加して前後の酸素吸収量を測定した。(E.D.T.A. は阻害を示さない) 第15図に示すように E.D.T.A. を添加して第2鉄による kojate chelate complex を解放しても酸素吸収量を増加しないから麩酸と第2鉄による complex を形成して基質が不溶性になった結果による阻害作用でないことが推定できる。なお阻害作用を示した他の金属イオンもほぼ同様な結果を示した。

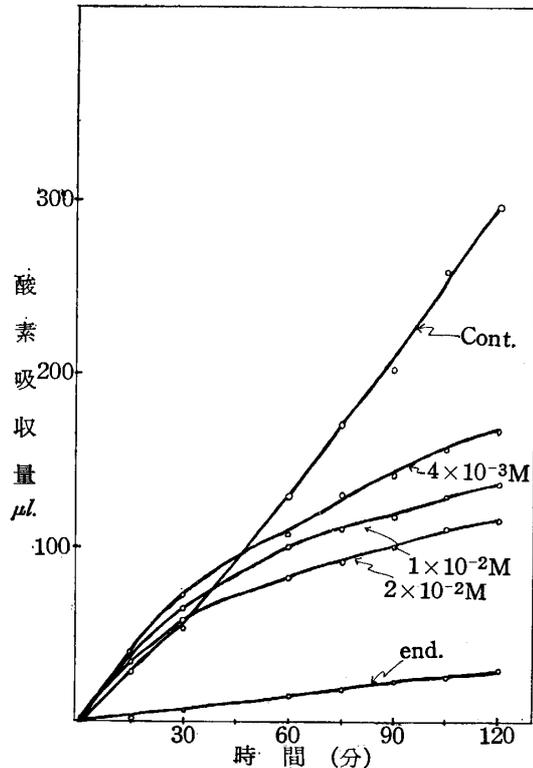
x 阻害剤の影響：K-1 菌による麩酸の酸化的分解系を解明する手段として各種阻害剤の影響を比較、検討した。使用した阻害剤はモノヨード酢酸、砒酸ソーダ、亜砒酸ソーダ、モノフロアセトアミド、マロン酸、弗化ソーダ (Mg^{II} と共用)、ヒドロキシルアミン塩酸塩 (中和して使用)、シアンカリ、窒化ソーダ、2,4-ジニトロフェノール、 α, α' -ジピリジル、E.D.T.A.、p-chloromercuribenzoic acid (稀苛性ソーダに溶かす) の12種でこのうち、阻害作用の認められたものは、モノヨード酢酸、亜砒酸ソーダ、マロン酸、ヒドロキシルアミン塩酸塩、シアンカリ、窒化ソーダ、



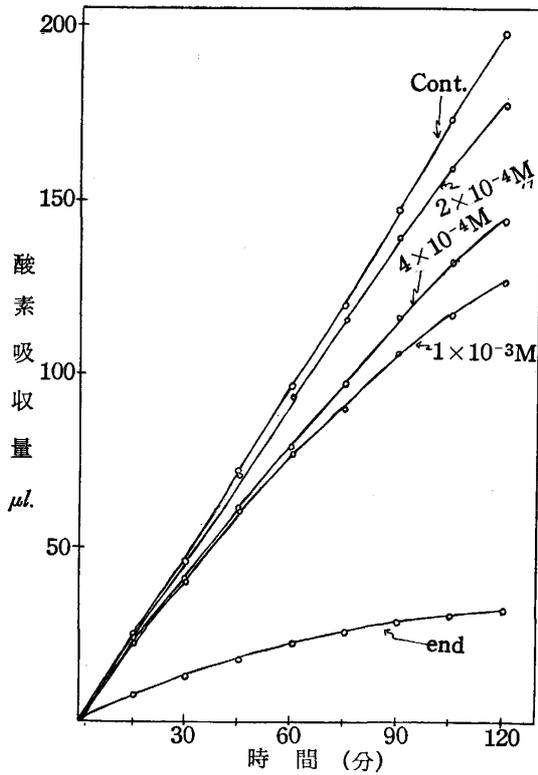
第20図 麩酸酸化能に対する α, α' -ジピリジルの影響



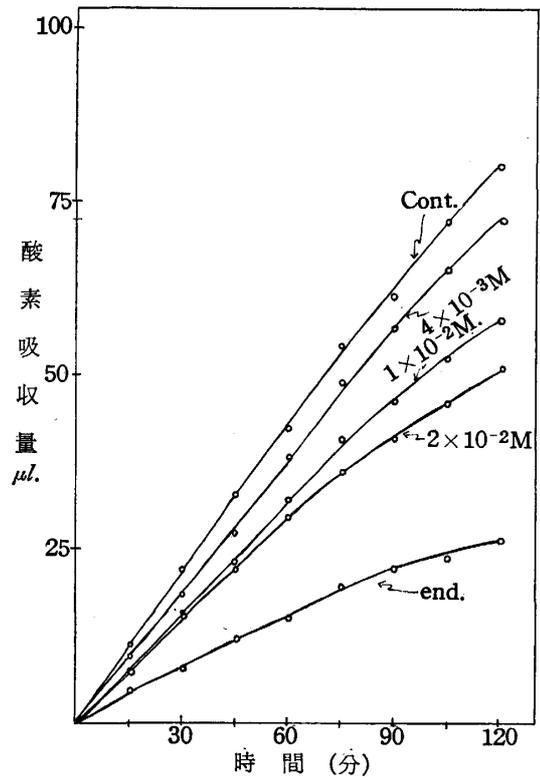
第19図 麩酸酸化能に対する p.C.M.B.A. の影響



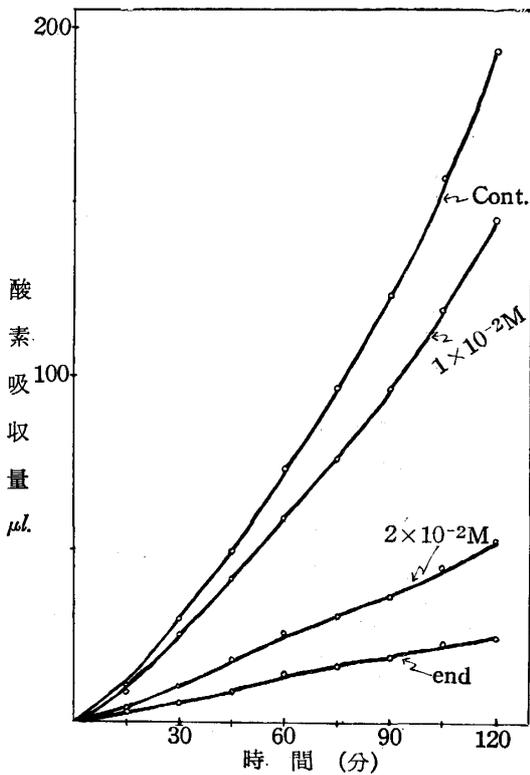
第21図 麩酸酸化能に対するアザイドの影響



第22図 麩酸酸化能に対する 2,4-D.N.P. の影響



第24図 麩酸酸化能に対するシアンの影響



第23図 麩酸酸化能に対するマロン酸の影響

α, α' -ジピジル, 2,4-ジニトロフェノール, p-chloro-mercuribenzoic acid でそれぞれ第16~24図に示した。

モノヨード酢酸や p-chloromercuribenzoic acid は-SH 基を阻害することから dehydrogenase が関与していること, またヒドロキシルアミンも DPN に関与する酵素を阻害することなどから dehydrogenase 系が関与していることを示唆し, 亜硫酸は oxidative decarboxylation を阻害することから oxidative decarboxylation の作用が推定できる. 2,4-ジニトロフェノールと窒化ソーダによる阻害は oxidative phosphorylation に対するものであることから phosphorylation が関係すること, またマロン酸で阻害されることは succino-dehydrogenase の存在を示唆し, シアンカリ, ヒドロキシルアミン, アジド及び α, α' -ジピリジルで阻害を示すことは鉄ボルフィリン酵素系が関与することを示し, このことは Fe^{2+} が促進的作用を示すことから推定できる。

5. 要約

ワールブルグ検圧計を用い K-1 菌による麩酸の酸化的分解に対する種々な条件を検討してつぎのような結果を得た。

(1) 麩酸々化の最適磷酸塩緩衝液の濃度は M/5

(最終濃度)である。(2) 麴酸の酸化的分解には燐酸が必要である。(2) 麴酸々化の最適水素イオン濃度は7~7.8であるが9.0でも著るしい相異はなかった。(4) 麴酸々化の最適基質濃度は0.0033~0.0066Mである。(5) 麴酸の酸化的分解は適応酵素系と考えられる。(6) 1Mの麴酸を完全分解することによって2.60~2.62Mの酸素を吸収し、また2時間の分解によって3.1~3.5Mの炭酸ガスを排出し、このときのR.Q.は0.84である。(7) 麴酸の酸化はメチレンブルーの存在で嫌氣的に分解されることが推定できる。なお嫌氣的酸化に対する二、三の影響を検討した。(8) 各種金属イオンのうちFe²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺イオンが促進的作用を示し、Fe³⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺等のイオンは阻害作用を示した。この阻害作用は金属イオンと麴酸のchelate complex形成による麴酸の不溶性によるものでなく、重金属イオン本来の阻害作用によるものである。(9) 麴酸の酸化的分解に対する各種の阻害剤のうち、モノヨード酢酸、亜砒酸、ヒドロキシルアミン塩酸塩、p-chloromercuribenzoic acid、マロン酸、シアンカリ、窒化ソーダ、2,4-ジニトロフェノール、 α , α' -ジピリジルが阻害作用を示した。

文 献

- 1) J.W. FOSTER, E.O. KAROW, : *J. Bacteriol.*, **49**, 19, (1945)
 - 2) J.W. WILEY, J.N. TYSON, JR., J.S. STELLER : *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, 963, (1942)
- 福島豁行, 木村滋: 徳島大薬研, **5**, 5, (1956)

第4章 細菌による麴酸の一代謝生成物、コメン酸の単離確認

1. まえがき

前章では麴酸を単一の炭素源として利用する細菌を土壌から分離して、その細菌を用いて麴酸の酸化能に対するいろいろな条件を検討して K-1 菌による麴酸分解の予備的概念を得ることができた。

微生物による麴酸の分解については殆んど報告はなく、麴かびによって生成した麴酸が同じ麴かびで分解されて脂肪酸¹⁾が認められている。また著者は第2章で述べたように *Asp. oryzae var. globosus* AA2 の菌蓋培養(3%グルコースで菌蓋形成)で麴酸を分解させてギ酸、グリコール酸、脂肪酸、コハク酸及び2種の未知の酸と麴酸以外の第2鉄塩反応を示す2種の物質を定性的に認めた。また TRAETA-MOSCA²⁾ は麴酸

に水素4原子を吸収させた麴酸誘導体を酵母で醗酵させてエチルアルコールを得たという報告だけでその分解過程は勿論分解生成物と推定できる物質は全く認められていない。ただ著者は麴酸を菌蓋培養法で分解したとき麴酸と異なる Rf を示す第2鉄塩呈色物質があることを推定しただけで定性的にも確認できなかった。

K-1 菌の resting cell で麴酸を分解させた分解液を中和のちエーテルで約50時間抽出して未分解の麴酸を回収し、ついで硫酸々性で抽出(約100時間)を繰り返すとなお第2鉄呈色物質が抽出されてきた。この事実は麴酸の酸性を示すフェノール性 OH よりもより強い酸性基、COOH 基の存在が推定できることから、細菌による分解液をやや多量に処理して酸性で抽出される第2鉄塩呈色物質を単離してこのものがコメン酸であることを認めたので本章ではコメン酸を確認したことについて述べる。

2. K-1 体止菌による麴酸の分解

麴酸ブイオン寒天斜面培地に72時間31~32°で培養した洗滌菌体を pH 7.0 の M/15 磷酸塩緩衝液に懸濁した体止菌を用い反応液組成は第1表のようである。このようなフラスコ10ヶ(麴酸全量 4.96 gr)を30°±1の振盪器上で70時間保持して分解し、遠沈して菌体を除去し上清液を得た。こうして麴酸全量14.88 gr を分解させた。各実験の分解状況は第2表に示してある。この分解上清液全量(2100 ml)を苛性ソーダで中和して減圧、濃縮し、この濃縮液をエーテルで約50時間抽出すると未分解の麴酸(計4.5)を得た。つぎにこの残液を硫酸で pH 2 にしてエーテルで約100時間抽出する。エーテルを溜去すると残留物が得られた。これを大量の温水(300 ml)に溶かし、脱色して

第1表 反応液組成

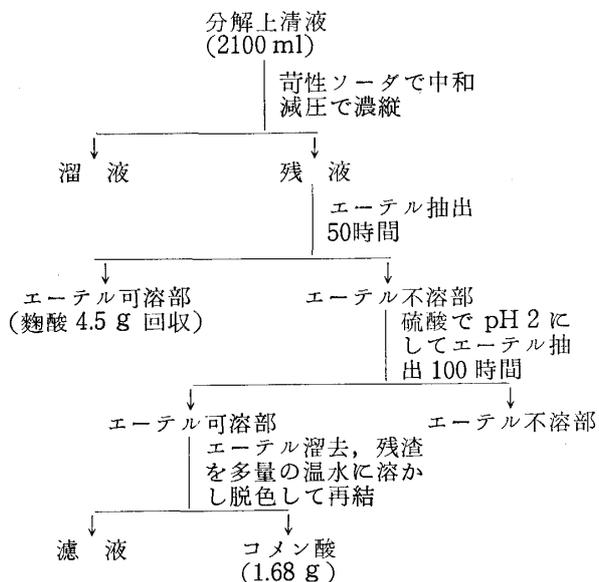
M/15 磷酸緩衝液 pH 7	35 ml*
M/10 麴酸 (KOH で中和)	35 ml*
細菌懸濁液 (乾菌量 11.2 mg)	5 ml
全 量	75 ml

* 15分間蒸気殺菌した

第2表 麴酸分解液の性状

	分解液量 ml	pH	10 ml を中和する D. N. NaOH ml	塩化鉄反応物質 (麴酸とし) (て示した)
第1回	720	6.25	5.6	0.44
第2回	730	5.78	5.6	0.38
第3回	720	—	4.55	0.41

濃縮すると枚状ないし穀粒状の結晶になる。収量 1.35 gr, さらに母液から結晶 0.35 gr を得る。分離法と収量は第 1 図に示した。



第 1 図 麴酸分解上清液の処理法

3. コメン酸の分離, 確認

i 定性試験: この結晶をイソアミルアルコールと

5N ギ酸を溶媒として濾紙に展開し, Fe^{+3} 試薬で発色すると Rf 0.49 (麴酸 Rf 0.525), B.P.B. で発色すると Rf 0.48 (Rf 0.525) である。さらに二, 三の化学的性質を示すと, (a) Fe^{+3} 試薬で濃ブドウ酒色を呈し, (b) 結晶は枚状ないし穀粒状であり, (c) $260\sim 261^\circ$ で黒色になり分解する。(d) 酸性を呈し, (e) Br を吸収する。

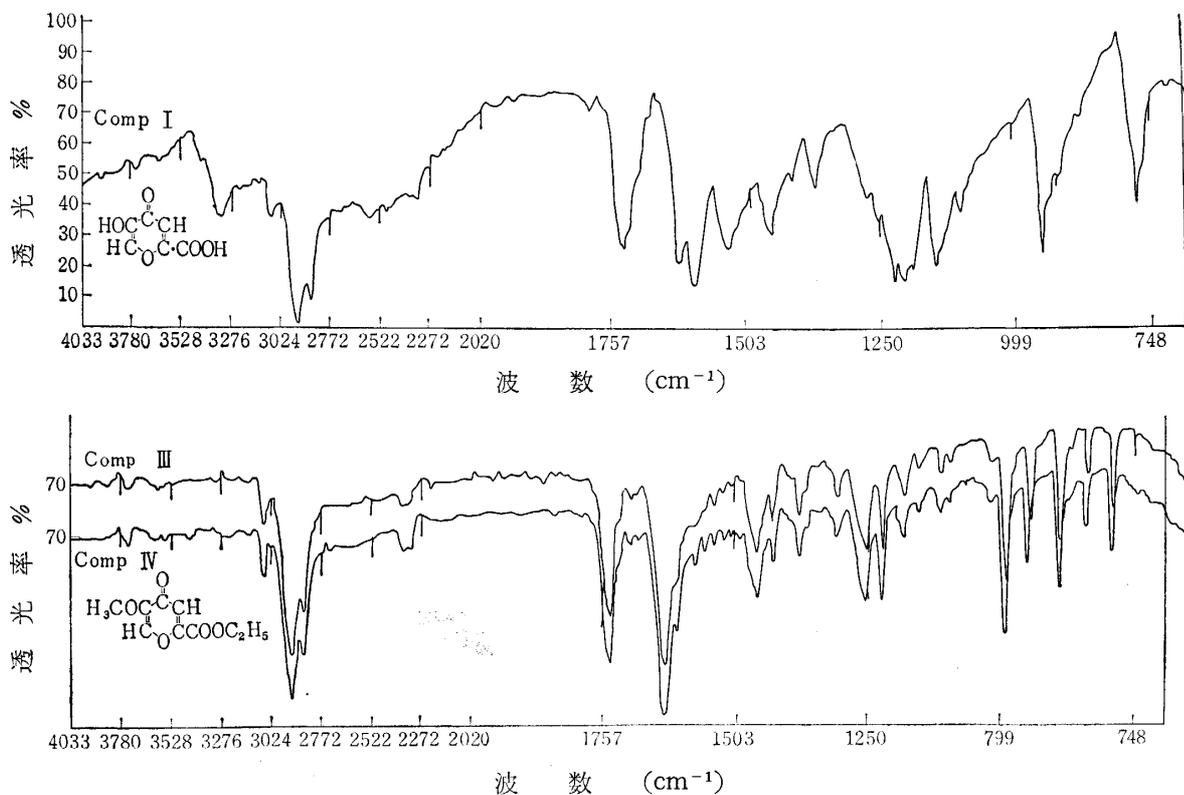
ii 元素分析: 元素分析結果を第 3 表に示す。この結果からコメン酸 ($C_6H_4O_5$) に一致する。

第 3 表 コメン酸の元素分析

物質 mg	CO ₂ mg	H ₂ O mg	C %	H %
4.371	7.328	1.041	45.75	2.67
C ₆ H ₄ O ₅ として			46.15	2.58

4. 誘導体

以上の性質は高橋, 朝井³⁾の記載したコメン酸の性質に一致するのでさらに藪田⁴⁾の方法に倣い, メチルエーテルを作りついでこれをエチルエステルにした。コメン酸 312 mg (2 mole) を 1N 苛性ソーダ 6 ml (3 mole) に溶かし, これにジメチル硫酸 0.4 ml (2



第 2 図 (上) コメン酸の赤外線吸収スペクトル
(下) コメン酸のメチルエーテルのエチルエステルの赤外線吸収スペクトル

mole) を添加する。この混合物をよく振盪し混合すると完全に均一になる。これを室温に4日間放置したところ結晶(137 mg)を析出した。この結晶を熱湯より再結して126 mgを得た。Fe³⁺ 試薬で着色しないからコメン酸メチルエステルである。つぎにこれを藪田⁵⁾の方法に従ってエチルエステルにした。このメチルエステル 70 mg を約 50 ml の無水エタノールに加熱して溶かし、これに乾燥塩酸ガスを5分間通しその後加熱して約半量に濃縮しついで減圧下で乾固する。残留物にリグロイン 30 ml を加えて加熱してとくす。不溶物を濾去して放置すると結晶析出した。m.p. 155.5 で藪田の報告と一致する。

元素分析は第4表に示すようにコメン酸のメチルエステルのエチルエステルに一致する。さらにこれを確

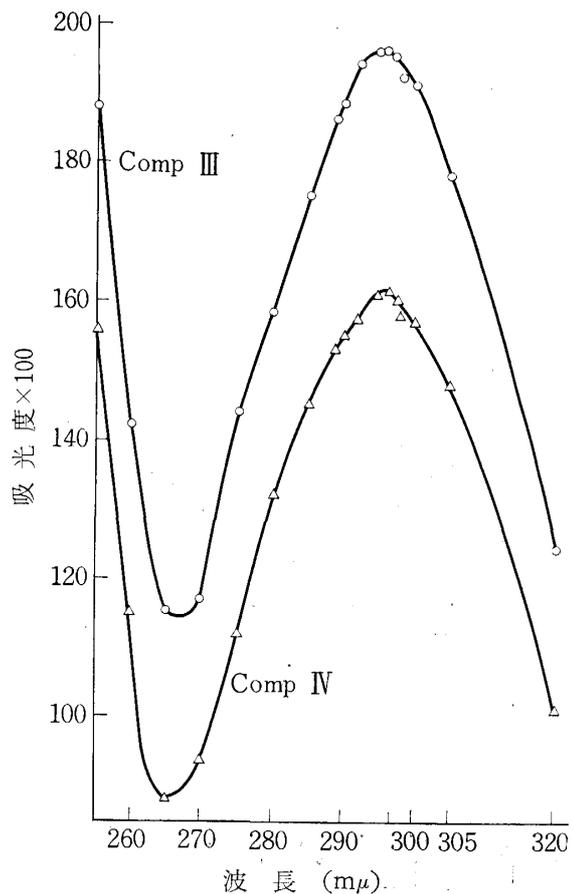
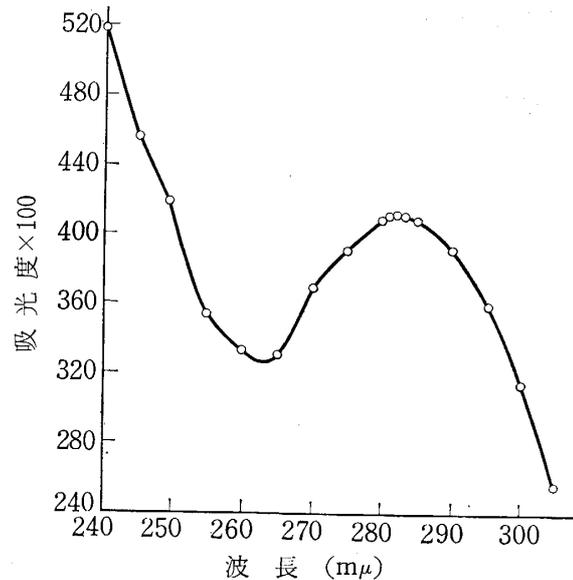
第4表 コメン酸のメチルエステルのエチルエステルの元素分析

物質 mg	CO ₂ mg	H ₂ O mg	C %	H %
4.313	8.56	1.933	54.22	5.02
C ₉ H ₁₀ O ₅ として			54.54	5.09

認するために麴酸より藪田の方に従って麴酸のメチルエステルを作り、これをアセトン中でKMnO₄で酸化してコメン酸メチルエステルにし、ついで前述のようにエチルエステルを作り試料より誘導したものと混融しても融点の降下がなかった。また両試料の赤外線吸収スペクトルは第2図のようによく一致する。なおコメン酸の赤外線吸収スペクトル、コメン酸と麴酸より誘導したメチルエステルのエチルエステルの紫外線吸収スペクトルはそれぞれ第3図に示した。

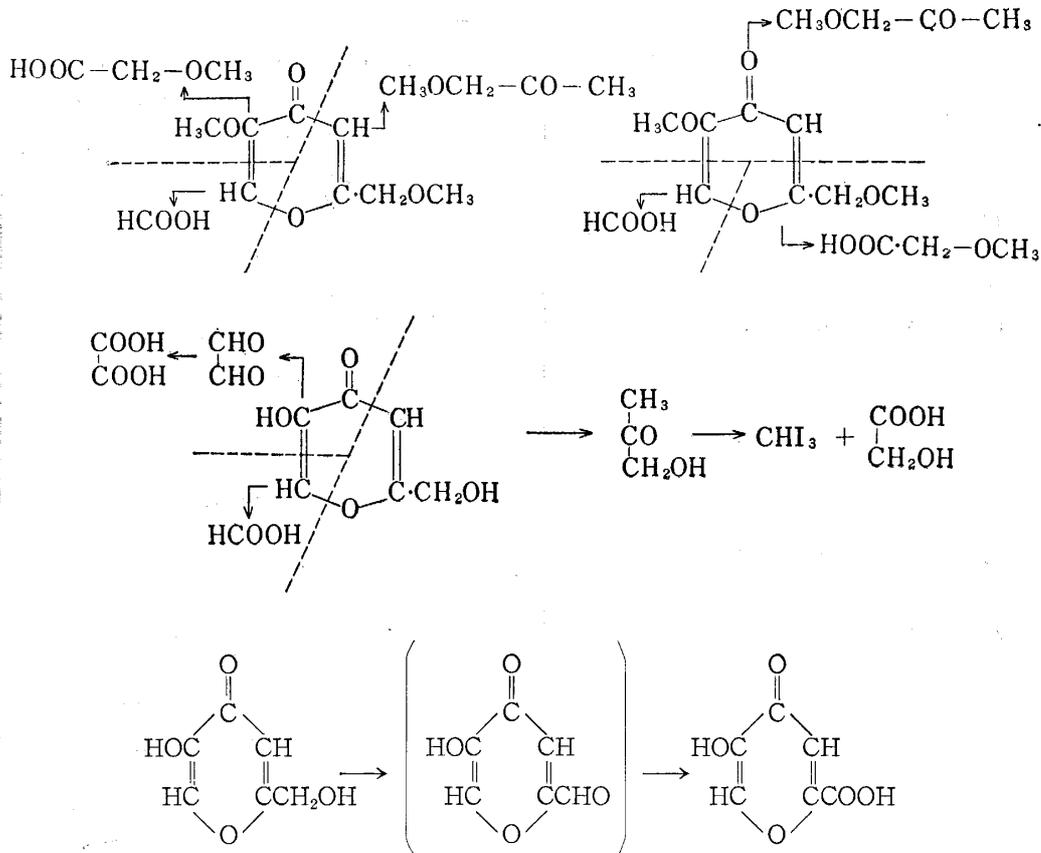
5. 考 察

麴酸を単一の炭素源とした麴かびの分解生産物としてその存在を確認されたものは蔞酸だけである。他方化学的分解(アルカリ分解)による生成物として藪田⁴⁾および ARNSTEIN 等⁶⁾はジ-0-メチル麴酸をバリタで分解して図のような分解生成物と分解機構を提示している。また BIRKINSHAW 等⁷⁾は麴酸のアルカリ液中に於けるヨード酸化の機構をつぎのように示している。これら何れの場合もその生成物はグリコール酸及びアセトールであって化学的分解は二重結合部位で開環する結果を示している。これに反して K-1 菌による麴酸の分解は図示のように直ちに開環することなく、側鎖のアルコール基が酸化されてカルボキシル基になりコメン酸になってから分解されてゆくものと



第3図 (上) コメン酸の紫外線吸収スペクトル
(下) コメン酸のメチルエステルのエチルエステルの紫外線吸収

考えられ、麴酸の細菌による分解は化学的方法の機構と全く異なることが推定できる。麴酸よりコメン酸を生化学的に得られたことは始めてであり、化学的方法に



よっても直接麴酸よりコメン酸を得ていないがただ藪田等⁵⁾は5-0-メチル麴酸をアセトン中で KMnO_4 で酸化して 5-0-methyl comenic acid を得ただけである。このように麴酸の初期分解中間物と考えられるコメン酸が得られたことは麴酸生合成中間物検索に光明を与えられるものであろうと考えられる。

5. 結論

K-1 菌の resting cell で麴酸を分解した分解液よりコメン酸を単離し、元素分析、誘導体の調製、赤外線及び紫外線吸収曲線等よりコメン酸であることを確認した。

文 献

- 1) 坂口謹一郎：醸造学，9，788，(1931)
- 2) F. TRAETA-MOSCA：Ann. Chim. Applicata, 1, 48, (1914)
- 3) 高橋偵蔵，朝井勇宜：農化，10，604，(1934)
- 4) 藪田貞次郎：東化誌，37，1185，(1916)
- 5) 藪田貞次郎，神戸勝二，化農，6，516，(1930)
- 6) H.R.V. ARNSTEIN, H. BENTLEY：J. Chem. Soc., 1951, 3436
- 7) H.J. BIRKINSHAW, H. RAISTRICK：Trans. Roy. Soc. Lond., B220, 139, (1931)

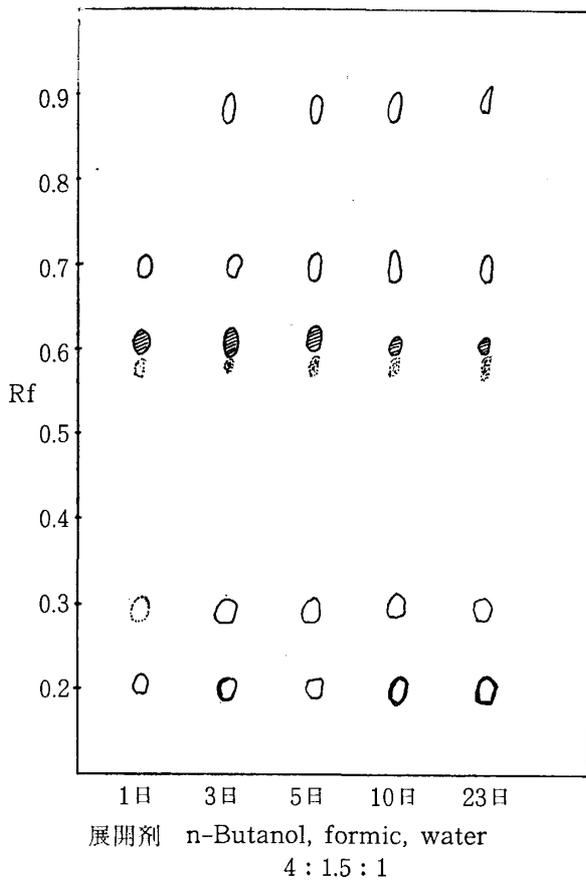
第5章 細菌による麴酸の醗酵中間物の検索

1. まえがき

K-1 菌の休止菌で麴酸を分解させてコメン酸を得たが本実験では生育培地で麴酸を醗酵させた場合の中間物の検索を行った結果についてのべる。

2. 培養と中間物の検索

生育培地としてつぎの組成のものを用いた。M/15 磷酸塩緩衝液 pH 7.0, 300 ml, 粉末酵母エキス (大五栄養 K.K. 製) 3.0 gr, 麴酸 3.0 gr, 水 300 ml, 全量 600 ml, この培地 75 ml 宛を 500 ml 容平底フラスコに採り蒸気殺菌 (30分間, 1回) のうち、麴酸ブイオン寒天培地に 3日間培養した K-1 菌を 2白金耳移植し、 $30^{\circ}\pm 1^{\circ}$ で振盪培養した。それぞれの時間培養後、除菌し、上清液を中和後減圧濃縮し、中性のままエーテル抽出 (約20時間) して麴酸を回収する。ついで残部を硫酸で pH 2 にしてエーテル抽出 (約50時間) する。こうしてエーテル可溶部と不溶部に分け、これについて主として有機酸をペーパークロマトグラフィーで検索した。ペーパークロマトグラフィーは東洋沱紙 No. 2 を用い、*n*-ブタノール、ギ酸、水(4; 1.5;



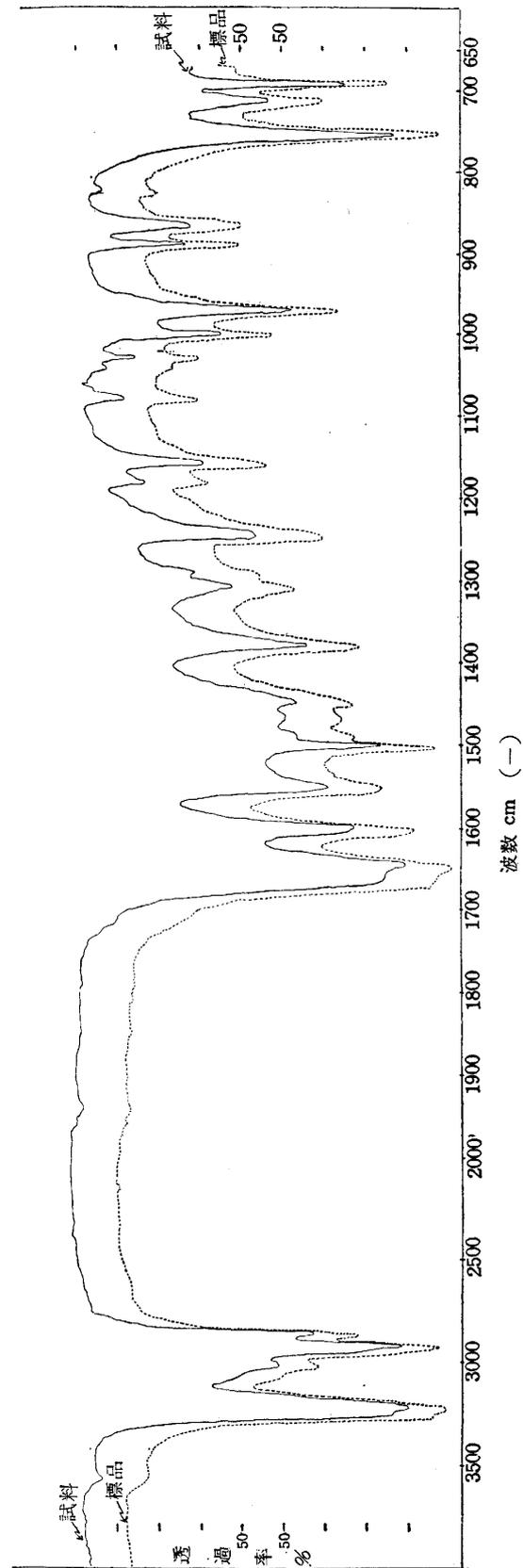
第1図 麩酸分解生成物のペーパー，クロマトグラム

1) 混合上層部 (実験の都度新鮮な上層部を用いた) を用いて、約 20° で上昇法で展開し、0.05% B.P.B., パラアニジジン塩酸塩 3% ブタノール溶液及び第 2 鉄塩溶液をそれぞれ検出剤として用いた。

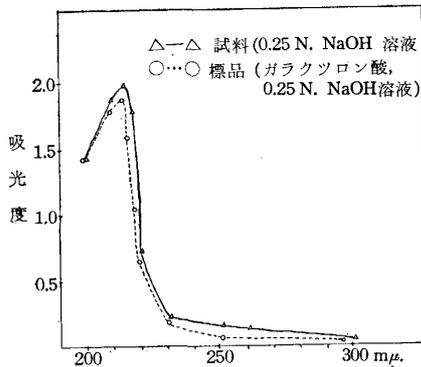
1~23日間の培養経過中のクロマトグラムは第1図のようである。このクロマトグラムから Rf 0.87 はフマル酸と認められ、培養3日目より出現した。Rf 0.73 はコハク酸と固定され、さきにコメン酸を分離した濾液を放置してコハク酸を結晶状に得て混融試験によっても確認している。Rf 0.61 はコメン酸である。Rf 0.30 の物質は1日目より出現する。d-ガラクトロン酸のケトウロン酸に相等する d-タガツロシ酸の Rf に一致することから、この物質は d-ガラクトロン酸の異性体である d-タガツロン酸と推定した。Rf 0.22 の物質も第1日目より出現する。d-ガラクトロン酸と一致する。

このように K-1 菌の生育培地よりコハク酸、d-ガラクトロン酸、d-タガツロン酸、コハク酸、フマル酸をそれぞれ定性的に認めた。

3. d-ガラクトロン酸の確認



第2図 d-ガラクトロン酸のフェニルヒドロラジンのフェニルヒドロラジンの赤外吸収曲線 (一)



第3図 ガラクツロン酸 (0.25N. NaOH 溶液) の紫外外部吸収曲線

エーテル不溶部を前記の溶媒でやや多量に濾紙上に展開して完全に風乾したのち d-ガラクトン酸に相当する部分を切り取り、温水で抽出して濃縮し、このもののフェニールオサゾンのフェニールヒドラジン塩を作り、その融点は 129—130° を示した。同様の標品 (柑橘ペクチンより調製) のフェニールヒドラジン塩は 127—130° を示し、混融試験も融点の降下がなかった。この両フェニールオサゾンのフェニールヒドラジン塩の赤外線吸収スペクトルは第2図に示した。また抽出濃縮液と標品 d-ガラクトン酸の 0.25N 苛性ソーダ液の紫外線吸収スペクトルは第3図に示すように 215 mμ に最高吸収を示しよく一致する。このことから Rf 0.22 の物質は d-ガラクトン酸であることが確認できる。

4. 考 察

K-1 菌の resting cell による分解液よりコメン酸を分離、証明したことはすでに4章でのべたが、本章では K-1 菌の生育培養液よりコメン酸以外 d-ガラクトン酸をフェニールオサゾンのフェニールヒドラジン塩として結晶状に得ることができて、これを標品 d-ガラクトン酸より調製したフェニールオサゾンのフェニールヒドラジン塩との混融試験、赤外線吸収曲線及び遊離酸の 0.25N 苛性ソーダ液の紫外線吸収曲線より d-ガラクトン酸であることを確認することができた。その外にペーパークロマトグラフィーでコメン酸、d-タガツロン酸、コハク酸及びフマル酸を定性的に認めた。麴酸の分解生産物として認められた化合物はコメン酸、d-ガラクトン酸、d-タガツロン酸、コハク酸、フマル酸である。

微生物によるコメン酸の生成を高橋、朝井等²⁾によって d-ガラクトースを *gluconobacter liquifac-*

iens で醱酵 (60日間) させた培地よりコメン酸とガラクトン酸を分離している。その生成機構を BERNHAUER²⁾ は d-ガラクトン酸→(l-ガラクトン酸)→コメン酸の経路を推定している。また朝井、相田、藤井等³⁾は同じ菌の乾燥細胞で 2,5-ジケトグルコン酸→2,5-ジケトグルコン酸エノール型よりルビギン酸→ルビギノール、他方同エノール型よりコメン酸になる経路を推定して3種の γ-パイロン誘導体に分解されることを認めている。

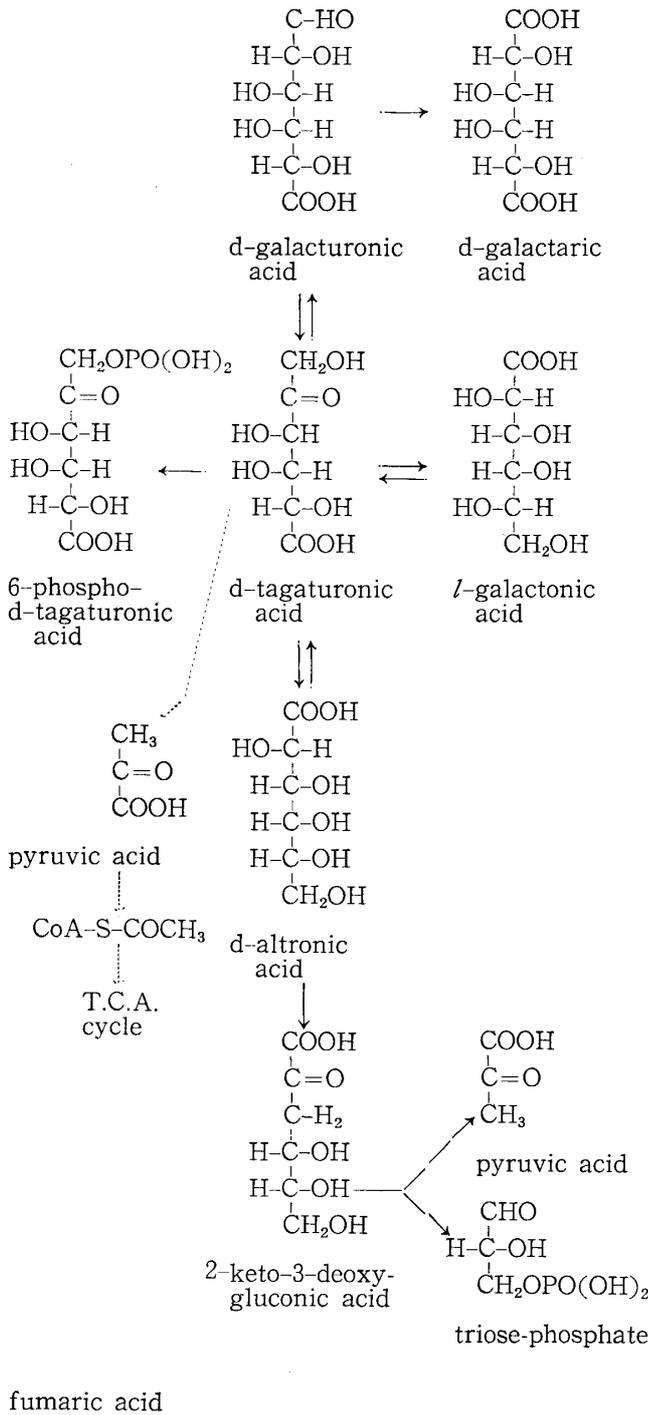
いまもしコメン酸の分解がこれらの分解経路の逆経路によって進行すると考えると当然これらの化合物が培地中に見出される筈であるが、検討して得られた化合物はウロン酸であった。

ウロン酸特に d-ガラクトン酸の分解経路を一括すれば次図のように示される。まず d-ガラクトン酸は d-galactaric acid に酸化される経路⁴⁾と d-タガツロン酸に異性化される経路に大別され、さらに d-タガツロン酸は d-アルトロン酸、2ケト3デオキシグルコン酸に分解される経路⁵⁾また d-タガツロン酸から6-燐酸タカツロン酸、或は直接ピルビン酸、アセチル CoA に分解される荒井⁶⁾と朝井⁷⁾の経路、第3は d-タガツロン酸より l-ガラクトン酸⁸⁾に分解される経路に細別できる。

著者が麴酸の細菌による分解生成物として得た d-ガラクトン酸、d-タガツロン酸、コハク酸、フマル酸等より推定して d-galactaric acid への convert は考えられない。定性的ではあるが d-タガツロン酸を認めたことからおそらく d-ガラクトン酸→d-タガツロン酸への経路が推定できる。それ次後の経路についてはなお研究中である。

5. 要 約

K-1 菌の生育培養ブロスからコメン酸、d-ガラクトン酸、コハク酸、フマル酸をそれぞれペーパークロマトグラム上に認め、d-ガラクトン酸をフェニールオサゾンのフェニールヒドラジン塩として結晶状に得ることができ、標品 d-ガラクトン酸のフェニールオサゾンのフェニールヒドラジン塩との混融試験、赤外線吸収曲線及び遊離酸の 0.25N 苛性ソーダ液の紫外線吸収曲線から d-ガラクトン酸であることを確認した。これら検討して得られた分解生産物より麴酸の分解経路をウロン酸の細菌による分解経路より類推してつぎのように推定した。 kojic acid → (comenaldehyde) → comenic acid. → d-galacturonic acid → d-tagaturonic acid → succinic acid →



J. Biol. Chem. **235**, 1559, 1566, 1571, 1576, (1960)

6) 渡辺正男, 新井昌基: 酵素化学シンポ, **12**, 201, (1957)

7) 朝井勇宜, 那須野精一: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan.* **22**, 1, (1958)

8) W.W. KILGORE, M.P. STAAR: *Biochem et Biophys. Acta.* **29**, 659, (1958)

総括

以上の研究結果から麴かびによる麴酸の生成に対し、特に燐酸関与の問題点からと、また特にエタノールからの麴酸生成について、一、二の知見が得られ、また麴酸の二次的基質として麴酸の分解機構を麴かびと麴酸を利用する細菌を用いて検討し、麴酸分解中間物と考えられるコメン酸と d-ガラクトツロン酸を分離、確認しこれらの事実から麴酸の分解機構の一端を推定した。以上の研究結果を各編各章毎に総括するとつぎのように述べる事ができる。

第 1 編では麴かびによる麴酸の生成をとりあげ、第 2 章に於ては静置及び振盪両培養法による麴酸の生成と燐酸の関係を論じこの編に於ける主要点とした。従来麴酸生成に対する燐酸の影響については全く相反する見解がのべられている点から、著者は実験法(静置及び振盪培養法、二次静置及び二次振盪培養法)を規定し、また麴酸生成機構の両経路(グルコースの direct conversion と triose phosphate の縮合)に於ける燐酸の影響を検討するためにグルコースとエタノールを基質としたときの麴酸生成と燐酸の問題を検討した。それによると静置及び振盪両培養法の何れでも麴酸の生成には培地中の燐酸を用いて菌体が構成せられたのち菌体中に貯蔵した燐酸化合物を用いて麴酸が合成せられること、従って二次培養に於ては置換培地中に燐酸がないときでも麴酸が合成せられることを結論した。ARNSTEIN 等の麴酸生成の第 1 経路、グルコースの direct conversion の場合その仮定中間物は燐酸化を必要としないであろうが、この反応を行わせるに必要なエネルギーを供給すること即ち ATP の生産をも広義に於ける麴酸合成に燐酸を必要とすると解すると当然燐酸は必要であろう。中間物の燐酸化のみと解すればこの第 1 経路では燐酸は必要でないと思われよう。これらの点は麴酸生成の precursor を確認するか或は kojic phosphate のようなエステルとして麴酸が細胞中に存在するかを確認することであろう。これらの点についての著者の実

文献

1) 高橋偵蔵, 朝井勇宜: 農化, **10**, 604, (1934)

2) K. BERNHAUER: *Ergebnisse der Enzymforschung*, **8**, 264, (1938)

3) 朝井勇宜, 相田浩, 藤井光子: *Proc. Japan Acad.*, **32**, 595, (1956)

4) W.W. KILGORE, M.P. STAAR: *Nature*, **183**, 1412, (1959)

5) G. ASHWELL, A.J. WAHBA, J. HICKMAN: *J., Biochem. et Biophys. Acta*: **30**, 186, (1958)

験結果は充分でなかったが、菌体中の燐酸の量的及び質的な移動から考慮すると燐酸はグルコースの場合も必要であろうことが推定できる。

エタノールから麩酸への生合成は第3章にその合成経路をグリコリシンの逆反応によって進むであろうことを推定したことから、当然 triose-phosphate の縮合ないしは C₆ 化合物 (或は hexose-phosphate) に再合成されて麩酸に convert するものであろう。このようなことからエタノールから麩酸への合成は何れの経路をとるにしろ燐酸が関与することは疑いないであろう。

第3章に於ては前章の燐酸関与の問題点を含めてエタノールから麩酸の合成機構について検討し、エタノールはアセトアルデヒドを経て酢酸になり、さらに TCA サイクルを経てグリコリシスの逆反応に従って triose (phosphate) ないしは hexose (phosphate) に合成されて麩酸に閉環するものであろうと推定し、エタノールより麩酸への合成には燐酸が関与するものであろうと推定した。

第2編、第2章に於てはまず麩かびによる麩酸の分解について検討し振盪培養法ではその分解力の強盛なために分解生産物の蓄積は認められなかったので静置培養法を用い分解生産物の検索を行い、グリコール酸のほか TCA サイクル上の二、三の有機酸、二種類

の未知酸、二種類の Fe⁺³ 呈色物質を定性的に認めることができた。

第3章に於ては麩酸分解細菌を土壤中より分離して、この菌の麩酸分解の諸条件を検討してこの菌の麩酸分解は適応的であること、麩酸の完全酸化には 2.6 mole の酸素も必要とすること、R.Q. が 0.84 であること、メチレンブルーの存在下で嫌氣的に分解されること、阻害剤の影響から分解機構を推定した。

第4章ではこの細菌の resting cell を用いて麩酸を分解させた反応液よりコメン酸を分離し、元素分析、誘導体及び赤外線及び紫外線吸収曲線よりコメン酸であることを確認した。

第5章では麩酸を基質として麩酸分解菌で醗酵させた培地中の分解中間物を検索して d-ガラクトン酸を誘導体として分離し、この赤外線吸収曲線及び d-ガラクトン酸の紫外線吸収曲線から d-ガラクトン酸であることを確認し、その他ペーパークロマトグラフィーでコメン酸、d-タガツロン酸、コハク酸、フマル酸を認め、これらの分解生産物より麩酸の分解経路をつぎのように推定した。

kojic acid → (comenaldehyde) → comenic acid → d-galacturonic acid → d-tagaturonic acid → succinic acid → fumaric acid