



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Sporobolomyces odorusの代謝産物に関する研究 : そのピーチ様香気の本態について
Author(s)	田原, 哲士
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第1271号
Issue Date	1975-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32741
Type	doctoral thesis
File Information	1271.pdf



Sporobolomyces odorus の代謝産物に
関する研究

— そのピーチ様香気の本態について —

北海道大学農学部

田 原 哲 士

1974 年 11 月

謝 辞

本研究の遂行に当り、終始温情あふれる御指導、御鞭撻を頂きました北海道大学名誉教授（現、大妻女子大学家政学部長）小幡彌太郎先生、北海道大学農学部教授水谷純也先生に深甚なる謝意を表します。

また、本論文の作成に際し、御指導、御校閲頂きました北海道大学農学部、伊沢正夫教授、岡坂村貞雄教授に厚くお礼申し上げます。

さらに、赤色酵母を分譲して下さいた北海道大学名誉教授佐々木西二博士、酵母に関する御助言を賜った北海道大学農学部応用菌学教室高尾彰一教授ならびに吉田 忠助教授に心から感謝致します。

同僚の西村弘行博士、渡部賢二技官、北海道教育大学岩見沢分校助教授中村秀子氏からは有益な御討論、御援助を頂きました。また、本研究の一部を分担、御助力を頂いた石坂裕幸、藤原一也、目黒孝司、三浦友三、黒河内 伸諸氏の芳に感謝致します。合成について御助言を頂いた北海道大学農学部吉原照彦博士、NMR分析に御便宜を頂いた岡葛西隆則、佐藤博二両博士、合成サンプルを提供して頂いた岡本間 宇氏、長岡香料株式会社に対し、心からお礼申し上げます。

目次	頁
第1章 緒論	1
第2章 実験材料及び方法	14
第3章 実験及び結果	
第1節 <u>Sp. odorus</u> 培養液中の中性揮発性成分の同定	
緒言	20
(1) <u>Sp. odorus</u> 培養液中の中性揮発性成分の GLC 及び GC-MS 分析	28
(2) 低沸臭カルボニル化合物の同定	35
(3) ラクトン類の同定	38
(3)-1. 4-Decanolide (γ -decalactone) の単離同定	38
(3)-2. <u>Sp. odorus</u> による γ -ラクトン生成量	45
(3)-3. <u>cis</u> -6-Dodecen-4-olide の同定	52
(3)-4. <u>cis</u> -6-Dodecen-4-olide の合成	58
(3)-5. 5-Decanolide (δ -decalactone) 及び <u>cis</u> -7-decen-5-olide の同定	64
第2節 <u>Sp. odorus</u> 培養液中の酸性代謝産物の分析	

緒 言	75
(1) <u>Sp. odorus</u> の酸性代謝産物メチルエステル の調製	76
(2) 減圧水蒸気蒸溜々出部の成分	
(2)-1. 溜出成分の GLC 及び GC-MS 分析	78
(2)-2. <u>trans</u> -2, <u>cis</u> -4-Heptadienoic acid methyl ester の同定	84
(2)-3. Methyl <u>trans</u> -2, <u>cis</u> -4-heptadienoate の合成	90
(3) 減圧水蒸気蒸溜残溜部の成分	97
(3)-1. Dimethyl azelate の同定	100
(3)-2. Dimethyl undecanedioate の同定	104
(3)-3. <u>Sp. odorus</u> に よ る azelaic acid の生成	105
(3)-4. Methyl β -phenyllactate の同定	110
(3)-5. DBP の部分々解物の検出同定	112
(3)-6. その他の成分	115
(3)-7. <u>Sp. odorus</u> 以外の赤色酵母の酸性部	117
第 3 節 脂肪族ラクトン類の生合成	
緒 言	118
(1) <u>Sp. odorus</u> 及びその他の赤色酵母による 脂肪族ラクトンの生成	128
(1)-1. <u>Sp. odorus</u> 及びその他の赤色酵母による ricinoleic acid の γ -decalactone への変換	129

- (1) - 2. Sp. odorus 及びその他の赤色酵母による
4-oxodecanoic acid の γ -decalactone への変換 --- /32
- (1) - 3. Sp. odorus の γ -decalactone 生成に対する
decanoic acid 及び dodecanoic acid の効果 --- /35
- (2) Sp. odorus の構成脂肪酸の分析 --- /37
- (2) - 1. Sp. odorus の脂質抽出及び脂肪酸
メチルエステル の調製 --- /39
- (2) - 2. GLC による構成脂肪酸の定量(組成成分) --- /41
- (2) - 3. Sp. odorus の γ -decalactone 生成に対する
高級脂肪酸の添加効果 --- /47
- (2) - 4. Sp. odorus の構成脂肪酸画分の微量
成分 --- /50
- (3) Sp. odorus の菌体内 γ -decalactone の存在
形態 --- /53
- (4) 4-Hydroxydecanoic acid の安定性(参考データ)
- (4) - 1. 4-Hydroxydecanoic acid の熱安定性 --- /56
- (4) - 2. 稀薄溶液中の 4-hydroxydecanoic acid
の自動的な γ -decalactone への変化 --- /57

第4章 考察

はじめに --- /60

- (1) Sp. odorus の揮発性代謝産物——酵母の
代謝産物との関連性 --- /62

(2) <u>Sp. odorus</u> の特徴的代謝産物	167
(3) 脂肪族ラクトン類	
(3)-1. 天然の脂肪族ラクトン	173
(3)-2. <u>Sp. odorus</u> のラクトン生成とピ-4様 香気	177
(3)-3 食品香気としてのラクトン類	179
(4) 天然の脂肪族ラクトン類の生合成と <u>Sp. odorus</u> のラクトン生成との関係	182

第5章 要 約	188
引用文献	196
Summary	212

第 1 章 緒 論

やまや、おおくじゃく蛾の雌が雄を誘引する現象に物質を想定することの困難さと、Fabre は、ひとびんの赤インクで潮水を染めることに等しいと述べている。¹⁾ この種の情報伝達に化学物質の関与することと確信し、その化合物に興味を持った化学者に要求されたものは、まさしく Fabre の比喻の通り、潮水からひとびん分の赤インクを回収、精製し、本態を解明することに等しい努力であった。その極微量で強い生理作用をもつ物質 (Butenandt や Karlson の蚕蛾の性誘引物質に関する研究以来、sex pheromone と呼ばれるようになった) の仲間が、既に 30 種類以上も同定されるに至った²⁾ のも、近年の分離、分析技術の進歩に負うところが極めて大きい。さらに、現在では分離と分析の技術と組合わせて、揮発性成分の研究に多大な威力を発揮している機器に GC-MS³⁾ (gas chromatography - mass spectrometry) がある。酵母の生成する香気成分に関する本研究に於ても、GC-MS 分析は有効な手段であった。

揮発性成分の研究は、食品香気や香粧品の化学をも含めて、人間の日常生活に密接なかわりをも有す

るのみならず、化学生態学の分野でも、近年、微量の揮発性物質がそれぞれ重要な機能を負っていることが明らかにされつつある。

マタタビ⁴⁾、紅茶⁵⁾、緑茶⁶⁾などにその存在が明らかにされている *dihydroactinidiolide* や、紅茶の揮発性微量成分で厚みのあるまろやかな香が紅茶香気的重要成分とされている *theaspiron*⁷⁾、植物の生長制御物質として知られている *abscisic acid*⁸⁾、ビタミン A、さらには *Mucor* sp. の性ホルモンである *trisporic acid*⁹⁾ 類などの例をあげる迄もなく、生物界に広く分布するカロチノイドに関連づけられる化合物で、食品香気として特徴的な要因となるもの、あるいは動植物に対し顕著な生理活性をもつ例が少なくない。

生物界に於て、より普遍的な生理作用を有する化合物は、より広範にその前駆体あるいは関連化合物が存在していなければならないであろうという考えのもとに、本研究はカロチノイド系色素を生合成する赤色酵母の代謝産物を広く、その生理作用も含めて検討する目的で開始されたものである。

1970年、北海道大学農学部応用菌学教室より分譲を受けた赤色酵母7種の67株の培養試験を行なったところ、寒天培地、液体培地ともに、それら酵母のうちの一株、*Sporobolomyces odorus* AHU 3246 がピー

4様の特徴的な香気を発生することが観察された。
その香気の本体については研究例がなく、それがカロチノイドの代謝中間体などに関連づけられるかどうかは予想できなかつたが、酵母によって芳香が生成されること、さらにその香気の質が極めて桃のそれに類似しているなど興味をそそるものであった。

射出胞子 (ballistospore) を形成し、通常カロチノイド色素を生産することによって特徴づけられている Sporobolomyces 属の一種 Sp. odorus¹⁰⁾ は Lodder の "The Yeasts, A taxonomic studies" 第2版によれば、1930年初めて、Derx によって Nice (France) の近くで、オレンジの病葉から分離された。この酵母は Sp. roseus に非常によく似ていたが、培地に芳香を生成するという特徴を有していたので Sp. "odorus" と命名されたものである。¹¹⁾ その後 Verona および Ciferri は、Sp. odorus と Sp. roseus の変種と見なしたが、¹²⁾ Lodder および Kreger-van Rij は Sp. odorus (Derx の分離した株) に maltose 同化能が見出されなかつたことから Sp. roseus とは区別した。Derx の分離株を含めて3株の記載例: Die Menna による New Zealand の土壌より分離された株、¹³⁾ Tubaki (1953) が日本でカエデの一種から分離した株が挙げられており、これらの株はいずれも CBS (Centraalbureau voor Schimmel-

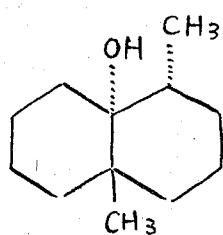
cultures Yeast Division, Laboratory of Microbiology, Technological University, Delft, The Netherlands) に保存されているという。これらの株は α -glucosidase 活性を欠いている臭が共通しており、*Sp. roseus* とは香気を生成すること及び α -glucosidase 活性の有無という臭で区別されている。

本研究に使用した *Sp. odorus* AHU 3246 株は 1955 年、北海道大学農学部応用菌学教室に於て、菊池俊彦氏が札幌近郊石切山付近の野葡萄の葉より分離分類し保存されていたものである。*Sp. odorus* はその種に特有な培地に芳香物質を蓄積するという、分類の基準になるような特徴を有していながら、記載例も少なく、比較的珍しい酵母であること、更に赤色酵母とはいえ、*Rhodotorula* spp. や *Sp. roseus* などとちがって色素の生成も比較的少ない（外見的には malt extract agar 上で、クリーム～肌色、糖濃度の高い液体培地では強くピンク～朱色になる）などの理由によつてか、この酵母の代謝産物、特に果実様の芳香成分に関する化学的な研究は今日まで行なわれていない。*Sp. odorus* が使用された実験例としては、*Sp. odorus* の増殖促進 (Penicillium hydrolyzates) に関するもの¹⁴⁾、細胞壁溶解酵素の酵母細胞壁に対する基質特異性を調べるのに、基質の一つとして選ばれたもの¹⁵⁾

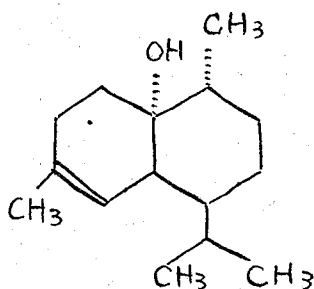
などが散見されるにすぎない。

酵母の代謝産物でも特に揮発性成分に興味を持たれ広く研究されている例として、アルコール飲料の香味や嗜好性に密接な関連をもつアルコール醗酵に伴う高級アルコールやエステル、脂肪酸の生成、分析などの例をあげなければならないが、この方面の従来の研究については後程、Sp. odorus の生成する揮発性成分に関する考察の項で述べる。また、食品の香味増強という実用的な面から、ホエー(whey)を Saccharomyces delbrueckii で醗酵させた後、乾燥したものを cream cheese に添加することなども考えられている。⁽¹⁶⁾

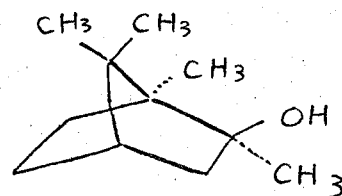
微生物の生成する臭成分については、放線菌の生成する揮発性成分に関する Gerber の一連の研究がある。水道水の earthy odor の本体として、17種の放線菌(ほとんどが streptomycetes)の代謝産物、セスキテルペン系の geosmin⁽¹⁷⁾ (I) が同定されている。さらに、Streptomyces sp. より earthy⁽¹⁸⁾ または woody odor を有する cadi-4-en-1-ol (II), St. lavendulae から methylisoborneol⁽¹⁹⁾ (III) の単離同定がなされた。⁽²⁰⁾ Sipma らは musty taste and odor を呈する河川水より分離した Streptomyces sp. の代謝産物として、それ自身は芳香性の mucidone (IV) を単離した。



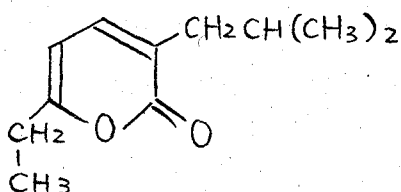
I



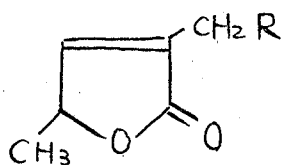
II



III



IV



V

V-A, R = -CH₂CH₂CH₃V-B, R = -CH₂CH(CH₃)₂V-C, R = -CH₂CH₂CH(CH₃)₂V-D, R = -(CH₂)₄CH₃V-E, R = -(CH₂)₃CH(CH₃)₂

また、St. odorifer は名前からも想像されるように、培地中に特徴的な臭気を生成する。この臭気に興味をもった Collins²¹⁾ は、培地に生成される揮発性成分として、アルコール、エステル、アンモニア、アルデヒドを同定(1963)、さらに硫化水素、エステル類²²⁾ (1964)、その後 earthy odor の本体として Gerber²³⁾ の同定した I 及び III、いくつかの未知成分を得た(1970)。一方、Gerber は St. odorifer や St. griseus²⁴⁾ の培養液から5種の揮発性ラクトン(V-A~E)²⁵⁾ を分離同定した。山川²⁵⁾ は芳香物質生産微生物に関する研究の第1報として、過熟メロン様の香気を生成する Geotrichum sp. の培地より揮発性成分として、8種のアルコール、13種のエステル、acetoin

acetaldehyde と同定し、高級アルコールの生成とアミノ酸代謝の結びつきを明らかにしている。揮発性代謝産物に対する興味からではないが、直井²⁶⁾らは細菌の迅速鑑別に培地中の揮発性代謝産物の GLC パターンを利用しようとした。これらの研究例は、方法及び基本的な考え方の一部に於て、本研究と共通した面を少なからず有している。

Sp. odorus の代謝産物、特に果実様の香気成分の分析に当っては、各成分の量が極めて微量のものであり、大量の培養液からエーテル抽出により香気成分を得、高度に濃縮して分析用の試料をえた。成分の分析には検出感度の高い FID (hydrogen flame ionization detector) と装備したガスクロマトグラフを使用した。成分の推定には、さらに、多くの成分の分離 (ガスクロマトグラフィー) と分析 (マススペクトロメトリー) と同時に行なえる GC-MS 分析を主たる分析手段とした。研究の第一の目標としては、まず Sp. odorus の生成するロース様の香気成分の本体を解明することであったが、赤色酵母のカロチノイド系色素生合成能と、Sp. odorus の代謝産物の関連を明らかにするためにも、Sp. odorus と含めて、10株の赤色酵母の代謝産物 (揮発性生成物の GLC パターンの検討) についても併せて実験を進めた。

特徴的な香気のほとんどが中性画分に含まれていたが、中性代謝産物との関連から酸性部の成分についても検討した。中性部には、微生物の代謝産物としては従来知られていなかった4種類の脂肪族ラクトンが含まれていた。反芻動物の乳脂や果実のラクトンの生合成に関連して、Sp. odorus その他の赤色酵母によるオキシ酸のオキシ酸への還元、ラクトン化、長鎖オキシ酸の β 酸化中間体としてラクトン化可能なオキシ酸の生成、Sp. odorus 構成脂肪酸の分析、微量成分の検討、ラクトンの前駆体として構成脂肪酸中にオキシ酸が存在するかどうかの検討、その定量などの実験を併せて行なった。

これらの実験を通して、Sp. odorus の中性香気成分の主要なものを構造決定し、本酵母の生成する特徴的なピーク様の香気に重要な役割を果たしている成分として、高級アルコール、芳香族アルデヒド、脂肪族 γ - および δ -ラクトンなどの寄与を明らかにすることができた。酸性部の成分を分析することにより、中性成分との関連化合物の存在を知り、酵母に於ける揮発性成分の生合成系を通して、諸成分の関連を考察することが出来た。また、Sp. odorus の酸性代謝産物として、新カルボン酸、trans-2, cis-4-heptadienoic acid, cis-4-heptenoic acid の存在を

明らかにし、さらに培地中に C_9 , C_{11} ニ塩基酸が生成されることを見出した。中性部のラクトン類、酸性部のニ塩基酸などが微生物によって合成培地中に生成されることは、本研究によって初めて明らかにされたことである。Sp. odorus の構成脂肪酸の分析、添加したオキソ酸やオキシ酸からのラクトン生成を調べ、Sp. odorus によるラクトン生成の様相を、哺乳類や果実に於けるラクトン類の生合成について得られている知見と比較考察を行なうことができた。

本研究と関連して、Sp. odorus の生成する揮発性成分の究明という本題から派生して、以下に述べるような二つの興味ある事実が明らかにされた。

Sp. odorus 用の合成培地を調製する際に、滅菌のため加熱時間を適度に長くすることによって酵母の増殖を良好ならしめ得ることを観察し、それが加圧滅菌操作により、培地中に生成する化合物によって酵母の lag phase の短縮がひきおこされ、結果的により短時間で最大の増殖に達することが分った。培地の炭素源として glucose、窒素源として ϵ -asparagine を使用すると、滅菌操作により培地中に新たに ϵ -aspartic acid (多分、遊離したアンモニアも何らか

の形で存在するであろう)、 $\underline{L}$ -asparagine と $\underline{D}$ -fructose の縮合物 ($1\text{-deoxy-1-(}\underline{L}\text{-asparagino)-}\underline{D}\text{-fructose}$) など
 が生成していることを確認した。この糖-アミノ
 酸縮合物を濾過除菌して調製した培地に添加すると、
 明らかに Sp. odorus の lag phase が短縮された。
 旧くから、培地の加熱滅菌により微生物の増殖が促
 進(あるいは抑制)される事実が観察されており、こ
 の増殖促進効果を heat activation effect²⁷⁾ といっ
 ているが、その意味するところは必ずしも明確なわけ
 ではなかった。嫌気性菌の窒素源としてアミノ酸
 を使用する場合、適当なアミノ酸の組合せ混合物に
 よって、菌の増殖や醗酵が促進されることが Stickland
 によって明らかにされ、酵母でも部分的に Stickland
 amino acid pairs²⁸⁾ の有効性が指摘されている。ま
 た、Lewis および Rainbow²⁹⁾ は glycine を窒素源とし
 て Sacch. cerevisiae を培養する際に、アミノ酸を
 少量培地に加えると lag phase が極めて短縮される
 ことを見出した。これらの事実は培地成分の複雑
 化によって酵母の増殖促進あるいは lag phase の短
 縮がおこる可能性を示唆するものであり、heat
 activation effect と微生物の増殖生理との関連を解
 明することは興味ある問題である。先に述べたよ
 うに、heat activation effect に関与している化合物

の一つとして、加熱滅菌処理を行なった培地中に、糖アミノ酸縮合物が生成していることも指摘したことは、この問題の物質レベルでの解明のための手がかりになるものと考えられる(参考論文9)。

いまひとつは、Sp. odorus の酸性代謝産物として trans-2, cis-4-heptadienoic acid と同定したが、さらに量的には少ないが、cis-4-heptenoic acid の存在も明らかにされ、構造的に後者は前者の2位の二重結合が飽和になったものであり、これら二成分の関係から、共軛二重結合を有するカルボン酸の微生物による代謝に興味をもたれた。この種の化合物の微生物変換を検討した結果、モデル化合物として選んだ食品添加物(保存料)の一つである sorbic acid (trans-2, trans-4-hexadienoic acid) が土壌より分離した Mucor sp A-73, Geotrichum sp C-48 によってそれぞれ trans-4-hexenol, trans-4-hexenoic acid へ変換されることを見出した。Geotrichum sp C-48 による sorbic acid から trans-4-hexenoic acid への変換は、trans-2, cis-4-heptadienoic acid と cis-4-heptenoic acid との関連を思わせる。類似した反応として、Thauer³⁰⁾ は嫌気性菌の Clostridium kluyveri によって crotonic acid から butyric acid へ変換されることを見出している。Mucor sp. A-73 は

500 ppm の濃度で添加した sorbic acid と、約 48 時間の培養でほぼ完全に trans-4-hexenol へ変換し、著しい青臭を発する。この菌は sorbic acid を sorbic alcohol を経て trans-4-hexenol へ変換していると考えられる。Sorbic acid の微生物による代謝としては、脱炭酸³¹⁾、あるいは一般の脂肪酸と同様の系で β 酸化を受けるといことが知られていたが、カルボキシル基のアルコールへの還元、2位の二重結合への水素添加などの反応を受けることは知られていなかった。これらの事実から 2-alkenoic acid や 2-alkenol の微生物変換あるいは、この種の化合物の還元に関する酵素系（新しいタイプの酵素系が関与している可能性もある）の解明、 $\alpha\beta$ 不飽和カルボニル化合物の生理作用と解毒の問題など、今後の解決を要するいくつかの問題が浮かび上がっている（参考論文 12）。

以下、本実験全般に共通した実験材料、実験方法について述べ、その後、Sp. odorus の代謝産物の同定（中性香気成分、酸性成分）、赤色酵母によるラクトンの生成、構成脂肪酸の分析などの実験及び結果を示す。個別的な実験操作、分析条件については“実験及び結果”のそれぞれの項に述べ、Sp. odorus

の各代謝産物の天然に於ける存在、その由来、合成などの知見との対比は、考察の項でまとめて行なった。

また、脂肪族ラクトンの化学的性質を知るための実験として 4-hydroxydecanoic acid の γ -decalactone への変化（加熱による変化、稀薄溶液中での自動的な変化）を検討した。その結果は、参考データとして“実験及び結果”の項の最後に添えて述べられている。

第 2 章 実験材料及び方法

この項では、本研究全般に共通している実験材料及び実験方法について述べる。分析機器の操作条件は、個々の実験結果に併記されている。また、化合物の分画や合成についても、それぞれの項に述べる。

(1) 分析に使用した機器とその機種

ガスクロマトグラフ

分析用: Yanagimoto GCG-550FP (FID), double column,
3 mm i.d. x 1.5 m. 主として使用したカラムは
10% PEG-20M on Celite 545 AW DMCS (60~80 mesh).
carrier gas N_2 , fuel H_2 .

調製用: Varian Aerograph Model 90-P (TCD), single
column, 4.2 or 6.4 mm i.d. x 1.5 m.
carrier gas He .

ガスクロマトグラフィー: マススペクトロメトリ-
(GC-MS)

ガスクロマトグラフ: Hitachi Model K-53, column
3 mm i.d. x 1 or 2 m, carrier gas He .

マススペクトロメーター: Hitachi Model RMS-4.

Biemann - Watson type enricher (Helium separator) で GC と MS を連結した装置

作動条件

Ionization potential	80 eV
Total emission	80 μ A
Mass range	1 ~ 600
Scanning speed	mass range 1 ~ 300 / 10 sec.
Separator temp.	$\geq 30^{\circ}\text{C}$
Inlet pipe heater	200°C
Tubing	"
Chamber heater	"

核磁気共鳴装置

Hitachi Model R-22 (90 MHz)

赤外線分光光度計

Hitachi Model EPI-S2

紫外線分光光度計

Hitachi Model EPS-3T.

比色計

Hitachi Model 101

(2) 赤色酵母とその培養

北海道大学農学部応用菌学教室 (AHU, 日本微生物株保存機関連盟加盟機関略号) より 1970 年に分譲を受け

た赤色酵母は、下記の通りである。数字は AHU 番号を示す。

<u>Rhodotorula glutinis</u>	3244	3454	3453	3459	3461	3462
	3463	3464	3465	3466	3467	3468
	3469	3471	3472	3475	3476	3479
	3483	3693	3695	3697	3699	3711
	3943	3944	4051	4052		
<u>Rhodotorula minuta</u>	3296					
<u>Rhodotorula mucilaginosa</u>		3243	3248	3249	3250	3303
	3485	3486	3487	3488	3489	3945
	3946	3947	3948	3949	3950	3951
	3952	3953	3954	3955	3956	4002
	4003	4053	4054			
<u>Rhodotorula rubra</u>	3957	3958	3959	3961		
<u>Sporobolomyces odorus</u>	3246					
<u>Sporobolomyces roseus</u>	3442	3446	3980	3981	4024	
<u>Torula rosea</u>	3247					

これらの菌株は 10% malt extract agar の斜面に増殖させた後、室温で保存し 3ヶ月毎にうえ継いだ。
また、液体培養を行なう場合は、寒天斜面に 25°C, 4~5日間増殖させた新鮮な菌体と無菌水に懸濁 (10ml 当り生菌約 10 mg) し、その 1ml をピペットで 150 ml の培地に接種した。

合成液体培地

R. glutinis 3463, R. minuta 3296, R. mucilaginosa

3946, R. rubra 3958, Sp. odorus 3246, Sp. roseus 3981, T. rosea 3247 の 7 株について、Czapeck-Dox 氏液, Hayduck 氏液の炭素源を glucose にかえたもので培養したところ、それぞれかなりの増殖がみられ、いずれもビタミン類無添加の簡単な組成の合成培地に増殖できることが分り、以下の実験には次のような組成の培地を用いた。

glucose - asparagine 培地：本実験に於て標準的な培地として使用した。D-glucose 10%, L-asparagine·H₂O 0.3%, MgSO₄·7H₂O 0.3%, KH₂PO₄ 0.1%, CaCl₂ 0.01% よりなり、pH 6.0 に調整した。

また、この培地の炭素源を他のものに換える場合は、glucose の代りに添加する化合物の濃度を 10% とし、窒素源を換える場合は asparagine の代りに加える化合物の量を、窒素 0.56 g/l になるようにした。さらに、Sp. odorus の大量培養を行なうためには D-fructose 10%, L-alanine 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.3%, KH₂PO₄ 0.2%, CaCl₂ 0.01%, pH 6.0 の培地を用いた。

高級脂肪酸やオキソ酸の赤色酵母による代謝を調べるに当っては、合成培地にこれらの化合物を添加すると酵母の増殖が著しく低下することから、5%

malt extract (Difco 製) で培養を行なった。液体培地での培養は、 25°C 、7~8 日、100~110 往復/分振盪、150 ml の培地を入れた 500 ml 容の肩付フラスコで行なった。

(3) 酵母の揮発性代謝産物の抽出

培養液は酵母の増殖量を測定した後、遠沈分離により菌体を除いた。菌体は脱塩水で洗淨、遠沈を3回くり返し最後にできたペレットを -20°C で保存し、凍結乾燥菌体調製、あるいは菌体構成脂肪酸分析用の試料とした。培養液の菌体量は比色計で測定した。即ち、一定量の培養液を遠沈し、沈澱した菌体を適当量の飽和食塩水に懸濁 (O.D. が 0.1~0.3 になるように) した後、 610 nm で O.D. を測定した。O.D. 610 nm と乾燥菌体量との関係は、Sp. odorus については、O.D. 610 nm 1.6 = 1 mg dry cell / ml 培養液であった。先の培養液遠沈上澄は pH を測定した後、硫酸または塩酸によってコンゴーレッド酸性とし、エーテル抽出を行ない、中酸性代謝産物を得た。エーテル抽出物は高度に濃縮する必要があるため、酵母の代謝産物以外の化合物の混入は極力さなければならぬ。そのため、大量に使用する抽出溶媒のエーテルは、重亜硫酸ソーダ、酸、アル

カリ、飽和食塩水でそれぞれ洗淨した後、分溜カラム³³⁾を付けて蒸溜精製した。

さらに、使用した溶媒中の不純物、培地（酵母未接種のもの）由来の揮発性成分を、酵母の代謝産物と区別するため、ほぼ定量的な条件で使用溶媒の濃縮物、接種していない培地のエーテル抽出画分濃縮物及び代謝産物を含む抽出液濃縮物のGLCパターンを比較した。

第3章 実験及び結果

第1節 Sp. odorus 培養液中の中性揮発性成分の同定

緒言

赤色酵母の揮発性代謝産物について

赤色酵母 7 種 67 株を malt extract agar に培養したところ、そのうちの 1 株 Sporobolomyces odorus AHU 3246 がピーク様の顕著な芳香を生成することが観察された。もともと本研究はカロチノイド色素合成能を有する赤色酵母の代謝産物に対する興味に端を発したもので、Sp. odorus が芳香成分を生成することが見出された際にも、その香気生成とカロチノイド色素合成能との関連が注目された。そこで、glucose-asparagine 培地で、赤色酵母 10 株を培養して、そのエーテル抽出される中性代謝産物の GLC パターンを調べ、各酵母の代謝産物と生成する香気との関連を検討した。入手できた赤色酵母の各種について少なくとも 1 株は培養すること、Sp. odorus に極めて近縁である Sp. roseus は複数の株

Table I. Red-colored Yeasts Cultured to Examine their GLC Patterns of Volatile Metabolites.

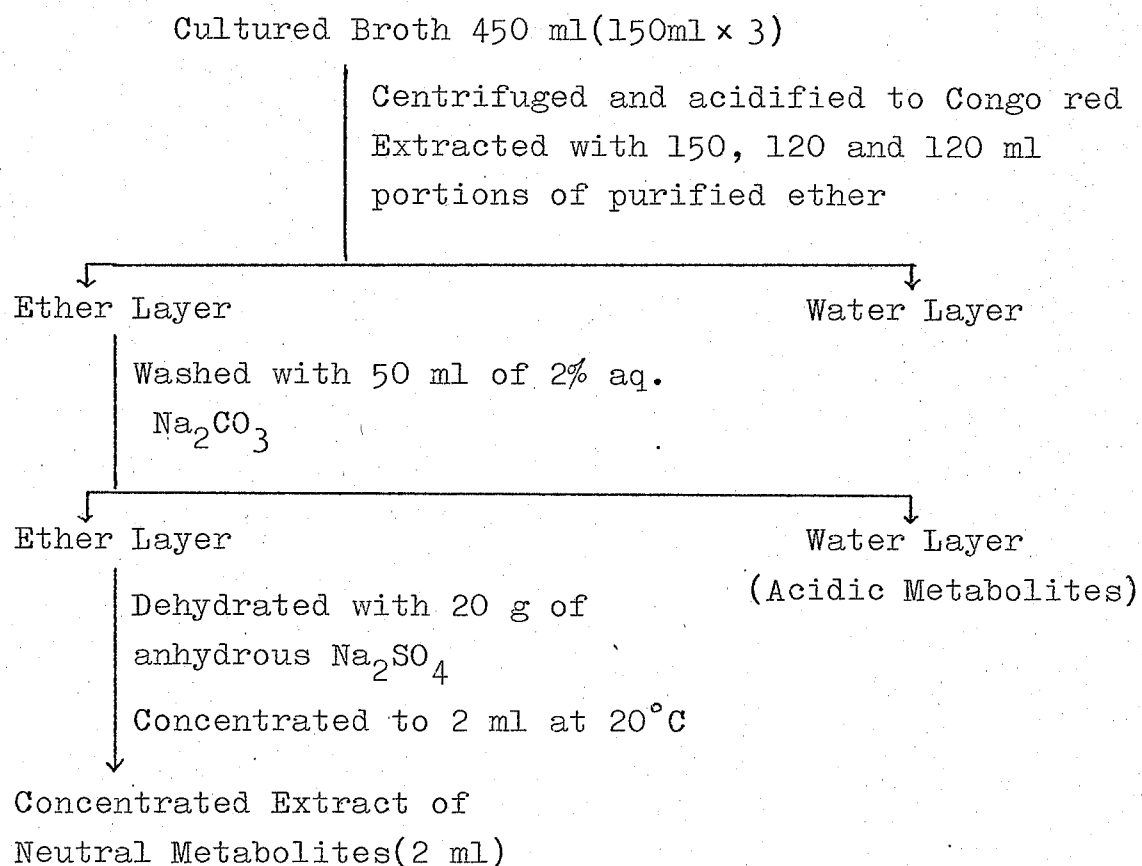
Yeasts were cultured at 25°C for 8 days by shaking. The cultured broths in three shaking frasks were combined, and pH and O.D. were measured.

Yeast	AHU No.	pH	OD _{610nm}	Color and Aroma
<u>R. glutinis</u>	3463	4.8	3.42	salmon pink, miso-like
<u>R. minuta</u>	3296	4.8	0.71	pale brown, pine-apple
<u>R. mucilaginosa</u>	3946	4.8	1.16	cream, withered leaves
<u>R. rubra</u>	3957	5.0	0.40	pale brown, weak
<u>Sp. odorus</u>	3246	5.0	1.70	pale pink, peach-like
<u>Sp. roseus</u>	3439	4.8	1.25	pink, amyl alc.
"	3980	5.2	2.35	pale pink, weak
"	3981	4.8	2.53	pink, miso-like
"	4024	4.8	1.65	pale pink, weak
<u>T. rosea</u>	3247	4.8	0.69	cream, unripe fruit

を培養することなどを基準に、7種10株を選んだ。

Table I には液体培養を行なった赤色酵母、増殖量、培養液の色(菌体懸濁液の外観)、香気をまとめた。揮発性代謝産物は量的に極めて少ないので、抽出、濃縮には多くの困難、問題があったが、標準的な方法として、Scheme 1 に従って実施した。

揮発性物質の量的、ならびに質的比較を行なうために、使用溶媒量、抽出回数、濃縮温度、GLC分析など、すべて同じ条件下に実施するように注意した。



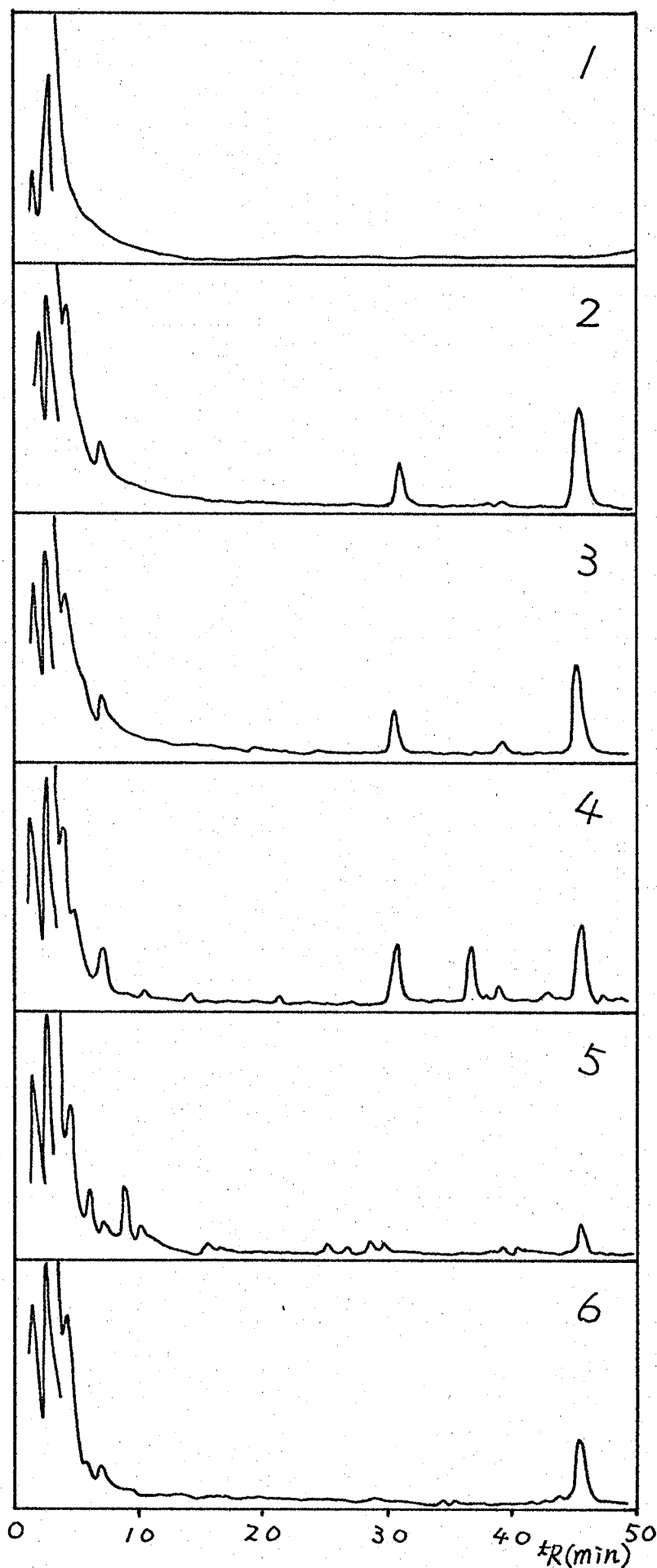
Scheme 1. Preparation Method of Ether Extracts for Semi-quantitative Analysis of Neutral Volatile Metabolites of Red-colored Yeasts.

150 ml の培養液を入れた 500 ml の振盪フラスコ 3 本ずつに、それぞれの酵母を接種し、25°C、8 日間培養、pH、O.D. を測定、上沈上澄はコンゴ・レッド酸性にした後、エーテル抽出し、酸性成分は 2% 炭酸ソーダ水溶液で洗って除き、中性部は最終的に 2 ml に濃縮し、その 20 μ l を分析用 GLC の試料とした。使用した溶媒の不純物、脱塩水中の不純物、滅菌培地（未接種）の揮発性成分も同時に分析し

、酵母の代謝産物とそれ以外のものの区別がつくようにした。各酵母の生成した中性揮発性成分の GLC パターンは Fig. 1 に示されている。Fig. 1 より使用したエーテルは低沸臭部に二成分が混入している（酢酸エチルとエタノールと思われる）が、高沸臭部に不純物は検出されない。培地の調製に用いた脱イオン水には、GLC の保持時間（分）、7 分、30.5 分、39 分、45 分にピークが検出された。最大ピークである 分 45 分の成分は、合成樹脂の可塑剤である *di-n-butylphthalate* (DBP) であった。また 7 分に検出される成分は、DBP が滅菌操作によって加水分解されて生成したと思われる *n-butanol* である。

未接種培地のエーテル抽出部にはさらに少量の成分がいくつか検出され、加熱により培地成分から揮発性成分が生成したものと考えられる。分 31 分に溶出されるピークは未同定だが酵母によって分解されるらしく、酵母の培養後にはほとんど検出されなかった。また、DBP も部分的に、酵母によって加水分解されるようである。DBP の分解産物については、*Sp. odorus* の酸性代謝産物の項で述べる。

赤色酵母の中性揮発性代謝産物は、種類も量も多くない（Fig. 1-9 で 35 分に溶出される成分は 500 μ g/l 程度の生成量を示す）が、培養液が強い芳香を有



Purified
Ether

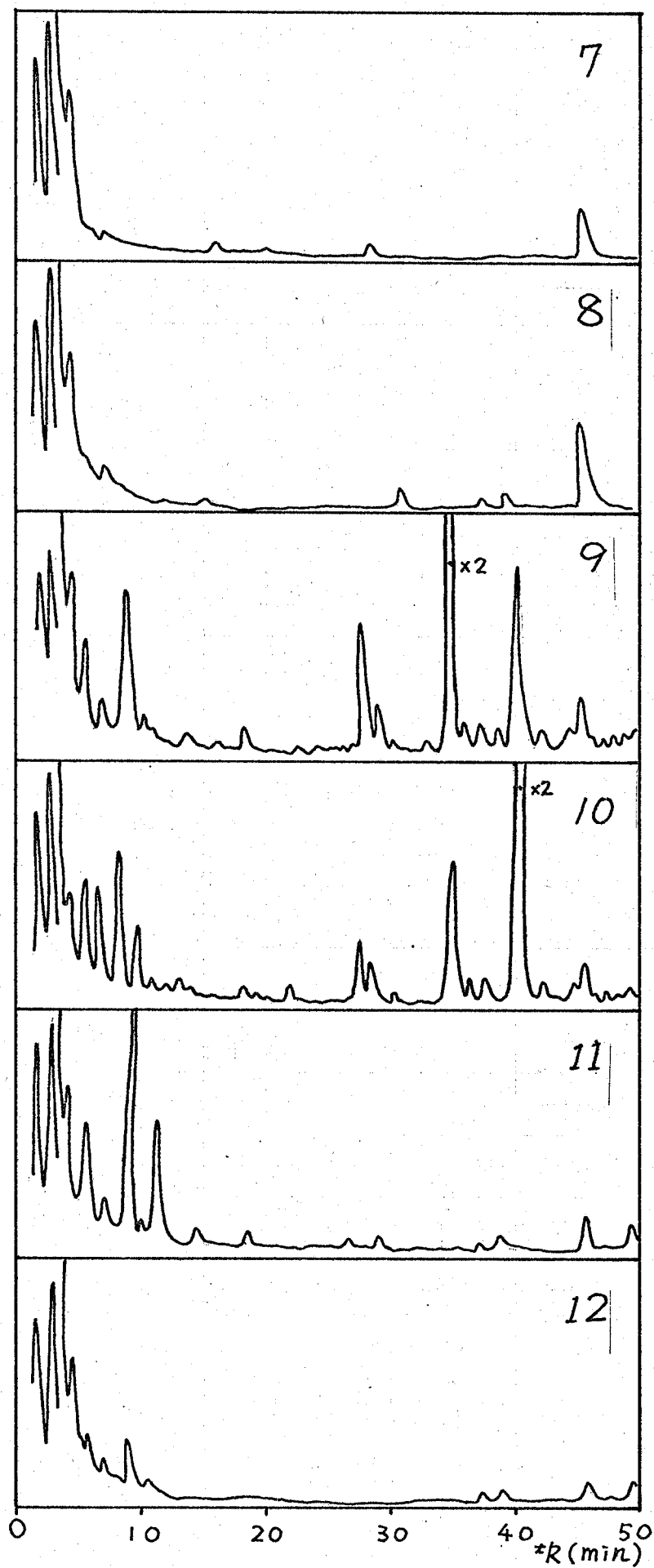
Autoclaved
Water

Medium
Glucose-asparagine

Medium
Fructose-alanine

R. glutinis
AHU 3463

R. minuta
AHU 3296



R. mucilaginosa
AHU 3946

R. rubra
AHU 3957

Sp. odorus
AHU 3246

Sp. odorus
AHU 3246
Fructose-alanine
medium

Sp. roseus
AHU 3439

Sp. roseus
AHU 3980

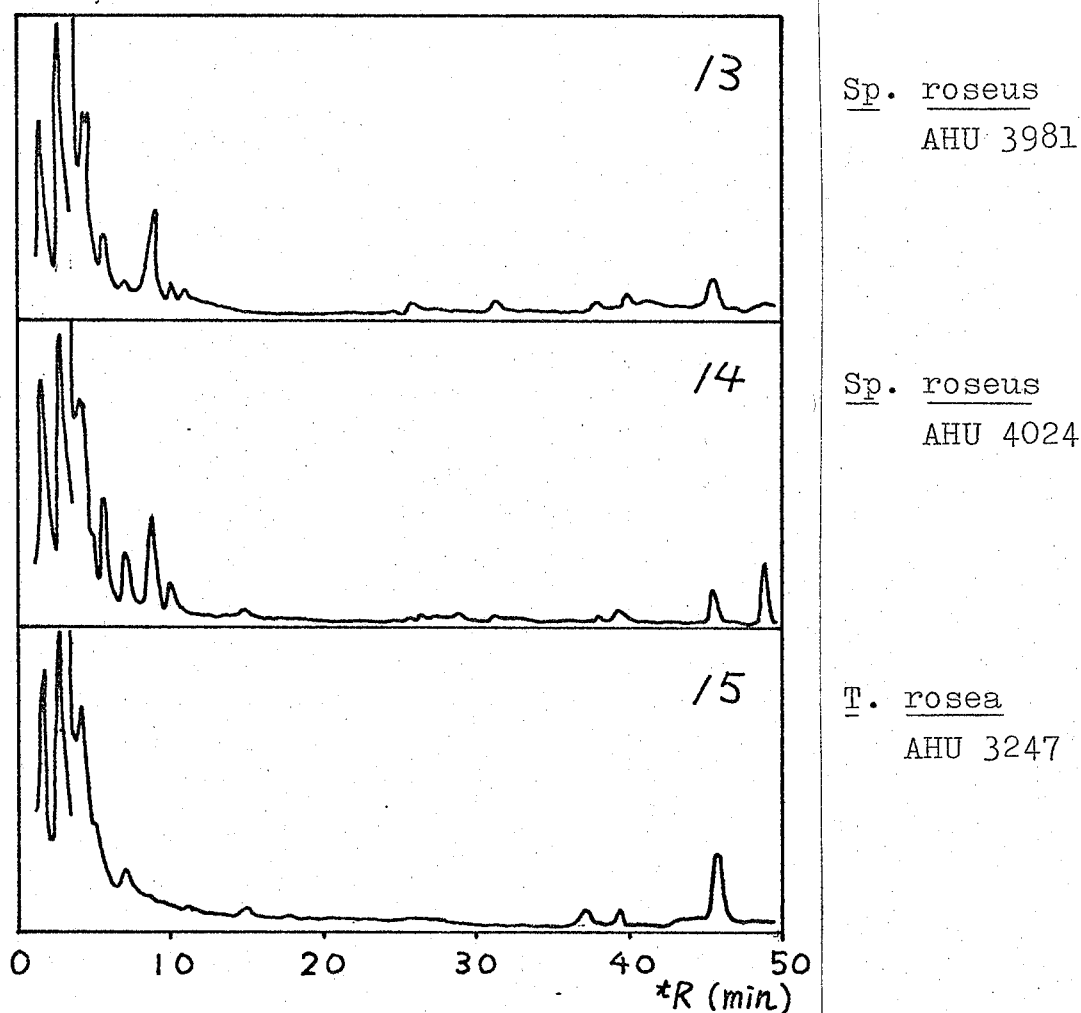


Fig. 1. Gas Chromatograms of Volatile Neutral Metabolites of Red-colored Yeasts.

Samples for analytical GLC were prepared according to the Scheme 1, and analyzed by a Yanagimoto GCG-550FP(FID) equipped with 10% PEG-20M columns. The column temperature was programmed to ascend 4°C/min from 40 to 240°C. Injection port 270°C, carrier gas N₂ 22.5ml/min, fuel gas H₂ 20ml/min, air 0.9 l/min.

Yeasts, 5~9 and 11~15 were cultured in the glucose-asparagine medium.

する Sp. odorus では高沸臭部に、4つの比較的大きなピークが検出された。Sp. odorus と他の赤色酵母では、GLCパターンに於て低沸臭部の成分は一部類似している面もあるが、Sp. odorus 以外の揮発性成分の高沸臭部に、ほとんど代謝産物らしいピークが検出されないことと考えあわせると、中性部に特徴的なピーク様の香気に移行する Sp. odorus の高沸臭部の成分が香気に関与している可能性が大きいと思われた。Sp. odorus の揮発性成分は、glucose-asparagine 培地、fructose-alanine 培地とも、成分の量的変動はあるが、成分の種類には大差なかった。また、Sp. odorus の培養液が芳香を有し、GLCで高沸臭部にいくつかの成分が検出されるにもかかわらず、分類学的に極めて近縁といわれる Sp. roseus では、3439株、4024株で低沸臭部の成分(主としてC₄, C₅ アルコール)は類似していたが、培養液の香気も弱く、高沸臭部に Sp. odorus のような揮発性成分は全く検出されなかった。

これらの結果から、Sp. odorus の生成する香気成分と同定するには、各成分が量的に少ないため、GC-MSにより成分を推定し、さらに単離した化合物の各種スペクトル分析、化学的性質などを検討するには、少なくとも数10リットルの培養液から揮発性成

分の抽出を行なわなければならないと判断された。

(1) Sp. odorus 培養液中の中性揮発性成分 の GLC 及び GC-MS 分析

培養液中にピーク様の香気成分を生成する Sp. odorus の培養液のエーテル抽出物中には、他の赤色酵母に見られない幾つかの成分を高沸臭部に含んでいることが GLC 分析により明らかになった。さらに、ピーク様の香気は中性部に移行し、やや揮発し難く、重い感じの香気であったことから、主要成分は比較的高分子ではないかと予想された。また、特徴的な香気は減圧水蒸気蒸溜によって溜出部に移った。そこで、glucose-asparagine 培地 20 l に Sp. odorus を培養し、一部を GLC, GC-MS 分析用の試料とし、残りの試料を用いて主要成分の調製用 GLC による単離を試みた。

約 20 l の培養液の遠沈上澄をコンゴー・レッド酸性にした後、 $\frac{1}{3}$ 量のエーテルで3回抽出、エーテル層を2%炭酸ソーダ水溶液で洗浄し、エーテル層は無水硫酸ソーダで乾燥、常圧で分溜管をつけた蒸溜装置によりエーテルのほとんどを溜去、約 10 ml まで濃縮した。濃縮液は減圧水蒸気蒸溜しても、GLC

パターンはほとんど変化しないので GC-MS 分析、調製用 GLC による分取のための試料としては、水蒸気蒸溜を行なった方がよいと思われた。

Fig. 2 には中性揮発性成分のガスクロマトグラムを示した。それぞれのピークは、多くが一成分よりなると思われたが、微量成分や接近して溶出される成分の分離、濃縮には *silicic acid column chromatography* (溶出溶媒として *isopentane-ether* 混合物を使用) による分画操作も併せて実施した。

GLC により検出された各ピークは、それぞれ GC-MS によってマススペクトルを得た。構成々分は主としてマススペクトルから構造を推定し、市販あるいは合成標準品と GLC の保持時間 (t_R) 及びマススペクトルの比較により同定を行なった。

Table II には、このようにして構造の確認された化合物を示した。GLC の感度をあげるとか、さらに濃縮した試料を分析すれば、より多くのピークが検出されるようになるが、培地や脱イオン水に由来する成分などのピークが大きく現われるようになり、分析が複雑になるので、量的に多い成分から同定してゆく方針で実験を進めた。

揮発性の極めて大きな化合物は、Fig. 2 のピーク 1 の前の排気中に含まれている。GC-MS 分析用の

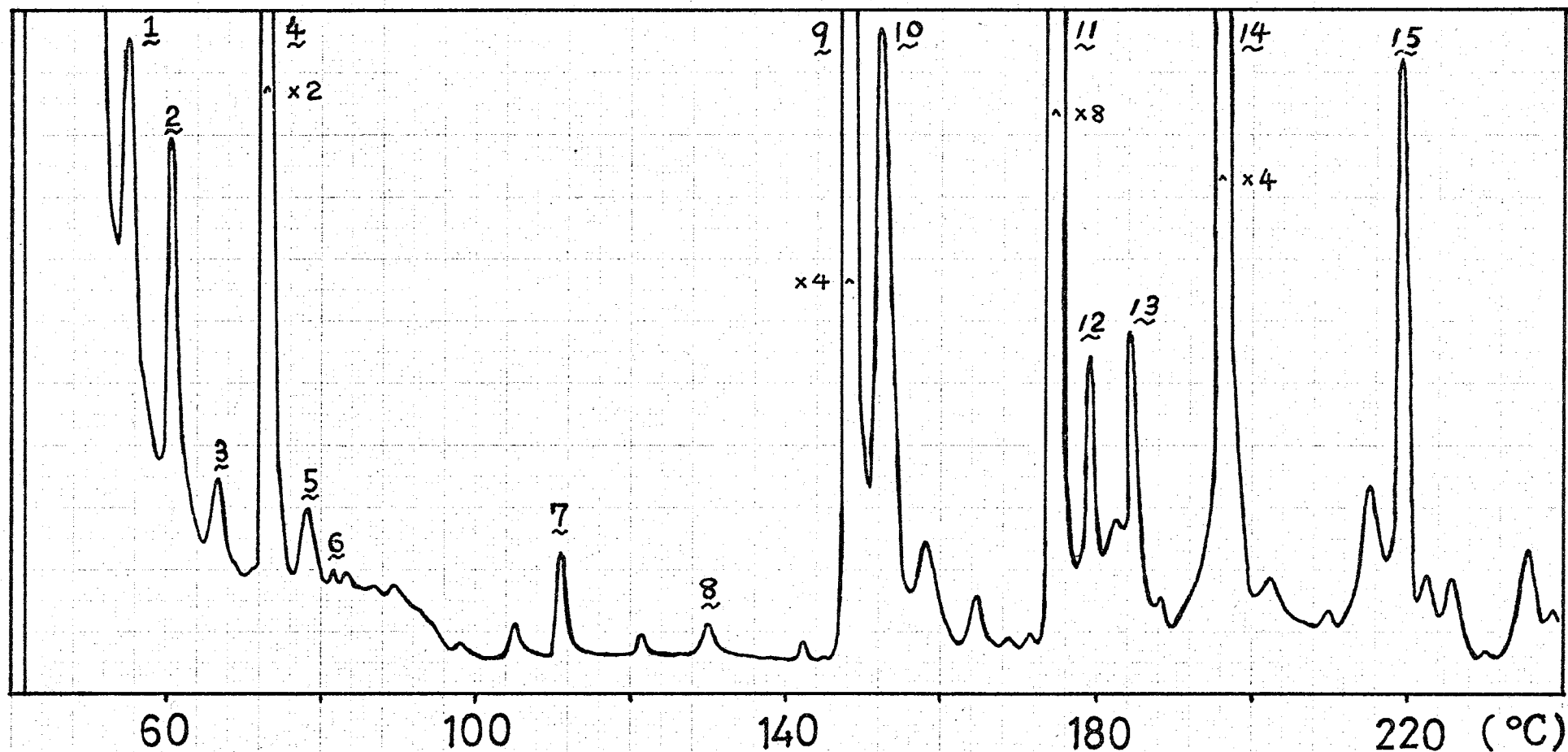


Fig. 2. Gas Chromatogram of Neutral Volatile Constituents Produced by Sp. odorus.

The gas chromatogram of neutral constituents was recorded on a Yanagimoto GCG-550FP. The oven temperature was programmed from 40 to 240°C at a rate of 4°C/min. Extremely volatile components were contained in the initial exhaust.

Table II. Characterized Neutral Volatile Constituents in the Cultured Broth of Sp. odorus.

Analytical conditions were as follows. GC: 10% PEG-20M column(3mm i.d. x 2m); carrier gas, He 0.9kg/cm²; oven temp., programmed from 40°C to 220°C at a rate of 3°C/min; injection port temp., 250°C. MS: See the text.

Peak No. in Fig. 2	Compound	t_R	Mass spectral peaks** $M^+ / m/e$ (relative intensity)
a.	<u>n</u> -Propyl ethyl ether(?)	*	88(13)/73(1), 59(55), 45(22), 44(47), 43(44), 42(12), 41(18), 39(7), 31(68), 29(100), 27(30)
b.	Ethyl formate	*	74(10)/56(4), 47(9), 45(38), 43(12), 31(100), 29(59), 28(63), 27(50)
c.	Methanol	*	32/31
d.	Ethyl acetate	*	88(2)/73(4), 70(5), 61(10), 45(17), 43(100), 31(7), 29(21), 27(13)
e.	ethanol	*	46(15)/45(43), 31(100)
1.	<u>sec</u> -Butanol	3.7	74(0.4)/73(2), 59(18), 57(4), 45(100), 43(16), 41(15), 31(26), 29(16), 27(20)
2.	Isobutanol	5.1	74(7)/73(5), 59(7), 57(5), 45(19), 43(100), 42(54), 41(65), 39(21), 33(48), 31(57), 29(23), 27(41)
3.	<u>n</u> -Butanol	6.6	74(3)/73(12), 56(56), 55(14), 45(41), 43(100), 41(58), 31(72), 29(34), 27(40)
4.	Isoamyl alcohol	8.2	88(1)/87(2), 70(31), 57(42), 56(30), 55(40), 43(100), 42(38), 41(58), 39(23), 31(44), 29(75), 27(44)
5.	<u>n</u> -Amyl alcohol	9.5	88(1)/87(3), 86(4), 70(32), 57(23), 56(32), 55(72), 43(50), 42(99), 41(100), 39(47), 31(79), 29(65), 27(46)
6.	Acetoin	10.3	88(6)/73(2), 71(0.7), 45(100), 43(66), 29(14), 27(20)

Table II (continued).

7.	Benzaldehyde	17.8	106(87)/105(92), 78(16), 77(100), 52(15), 51(54), 50(27)
8.	Phenylaceto- aldehyde	22.5	120(18)/92(27), 91(100), 65(24), 63 (11), 51(10), 41(12), 39(22)
9.	Benzyl alcohol	27.1	108(86)/107(75), 91(27), 90(12), 80 (13), 79(100), 78(16), 77(62), 69(22), 59(22), 51(33), 43(60), 31(21),
10.	β -Phenylethyl alcohol	28.0	122(20)/104(4), 92(60), 91(100), 78 (6), 77(6), 65(24), 63(7), 51(11), 50(5), 39(19), 31(15)
11.	4-Decanolide	33.6	170(0.7)/171(1), 169(0.8), 152(2), 141(1), 134(1), 128(10), 100(5), 86 (5), 85(100), 69(7), 57(12), 56(11) 55(14), 43(21), 41(26), 29(25), 27(13)
12.	5-Decanolide	34.7	170(0.4)/171(1), 152(2), 141(0.9), 134(1), 123(1), 114(10), 100(7), 99 (100), 85(8), 71(52), 70(36), 69(13), 57(10), 56(19), 55(48), 43(49), 42(53), 41(57), 39(28), 29(34), 28(23), 27(45)
13.	Cis-7-decen- 5-olide	36.1	168(6)/150(4), 139(1), 121(3), 108(8), 100(7), 99(96), 91(6), 81(14), 79 (8), 71(100), 67(14), 66(13), 55(65), 53(12), 43(66), 42(31), 41(74), 39(38), 29(22), 28(30), 27(48)
14.	Cis-6-dodecen- 4-olide	39.0	196(2)/178(0.4), 167(0.4), 136(2), 96(6), 85(100), 81(5), 69(5), 67(6), 57(11), 55(14), 41(21), 39(13), 29(29)
15.	Di-n-butyl phthalate	44.7	278(1)/223(3), 205(5), 167(5), 150(11), 149(100), 76(8), 65(7), 57(13)

(?), The authentic sample was not available.

* , These compounds were contained in the initial exhaust
in Fig. 2.

** , Molecular ion peaks, the five strongest peaks and
characteristic peaks are listed.

試料はさらに濃縮してエーテルが少なくなっていること、2mのカラムで分離を行なわせていること、carrier gasとしてヘリウムを使用していることなどの理由により、低沸異部の成分の分離が良好であった。そのため、GC-MS分析の段階では、sec-butanolよりも前にいくつかのピークが分離して現われ、5成分の構造が推定あるいは同定された。

高級アルコール類は、アルコール醗酵の際にも広く見出されることもあり、Sp. odorusの培養液中にも生成していることが予想され、マススペクトルだけからでもほぼ構造が判明した。芳香族アルコール類は、マススペクトルに於て、分子イオンが強く現われること、benzyl alcoholからは m/e 79, 77の特徴的なフラグメントの生成、 β -phenylethyl alcoholは脱水イオン m/e 104, トロピリウムイオン m/e 91が基準ピークとして検出されるなど、同定には有力な決め手となった。

成分は中性成分を isopentane 中の silicic acid column (Mallinckrodt AR 100 mesh) にマウントし、isopentane: ether (1:1) で溶出した後、ether で溶出した区分の低沸異部には、ほとんど一成分となっていて含まれていた。そこで別途に GC-MS 分析を行ない、acetoin と推定、定温による GLC の TR を標準

品と比較したところ完全に一致した。

成分11~14の脂肪族ラクトン類の構造決定は項と改めて述べる。

Table II にあげた化合物のうち、*n*-propyl ethyl ether, ethyl formate, methanol, ethyl acetate, ethanol, *n*-butanol, di-*n*-butyl phthalate などは、その一部あるいは全部が使用した溶媒や水、培地などに由来するものである。特にピーク15の成分は、マススペクトル及び t_R が標準の DBP と一致 (220°C, PEG-20M column, 7.66 min, authentic DBP, 7.65 min) することから、DBP と決定した。この成分は脱塩水中にも存在しており、DBP が微生物によって合成されるという Miyoshi および Harada³⁴⁾, 内藤 および 有川³⁵⁾ の報告もあるが、*Sp. odorus* の培養により量的に少なくなるなどことから、汚染物質と考えられる。培養液に使用した水は、北大の井戸水とイオン交換樹脂で脱塩したもの、ポリエチレンの容器に貯えたものである。³⁶⁾ 片瀬によれば、深井戸の水以外、実験室のあらゆるものがフタル酸エステル系のプラスチック可塑剤によって汚染されているという。揮発性微量成分の分析に際しては、この事実に留意しておかなければならない。本実験で培養に使用した水の定量分析(3回)により、414.4, 405.3, 407.8

$\mu\text{g/l}$, 平均 $409 \mu\text{g/l}$ (0.4 ppm) の DBP が検出された。

中性揮発性成分のうち、揮発性の大きいカルボニル化合物は、2,4-dinitrophenylhydrazone (2,4-DNPH) を調製し、TLC, 再生したカルボニル化合物の GLC による tr の標準化合物との比較によって、別に同定した。

(2) 低沸臭カルボニル化合物の同定

低沸臭のアルデヒド、ケトン類は PEG-20M のカラムでは極めて溶出されやすく、他の成分と重複し同定が困難であったので、2,4-DNPH として分離した後同定した。

(2)-1. 2,4-DNPH の調製

Sp. odorus の中性揮発性成分濃縮液に 2N-HCl に飽和させた 2,4-dinitrophenylhydrazine 溶液を加えてよく振盪、生成した 2,4-DNPH を酢酸エチルで抽出、有機層は 2N-HCl , 2N-NaOH 及び水で数回洗浄、酢酸エチル層を脱水濃縮乾固して、2,4-DNPH 混合物を得た。市販のアルデヒド、ケトン類の

2,4-DNPH を調製し、標準品として使用した。

(2) - 2. 2,4-DNPH の薄層クロマトグラフィー

37)

Mehlitz³⁷⁾ らの方法により、内部標準として *butter yellow* を用い、標準化合物の 2,4-DNPH と同時に展開して、その R_B を比較した。

(2) - 3. α -Ketoglutaric acid と 2,4-DNPH のカルボニル部分の交換反応によるカルボニルの再生とその GLC による分析

38)

39)

Ralls³⁸⁾, Stephens および Teszler³⁹⁾ の方法に従って実施した。即ち、2,4-DNPH から酢酸エチルを十分除去し、それに 3 倍重量の α -ketoglutaric acid を混ぜ、注射器をつけた小型試験管中で 250°C , 30 秒間加熱、内圧の上昇により再生したカルボニル化合物は注射器に入った。これを GLC で分析した。

標準の 2,4-DNPH から再生したカルボニル化合物の R と比較し、formaldehyde, acetaldehyde, acetone, methyl ethyl ketone の存在が明らかにされた。

TLC 及び GLC (液相として 20% Reoplex 400 を使用) の結果は、Table III にまとめられた。

Table III. Extremely Volatile Carbonyls Found in the Cultured Broth of Sp. odorus.

TLC: Kiesel Gel plate, solvent system, chloroform/n-hexane/ethyl acetate = 10/2/1, butter yellow(internal standard).

GLC: Column, 20% Reoplex 400 on C-22(40~60mesh), 1.5m x 5mm i. d., temp. 20°C; carrier gas, N₂ 24ml/min.

TLC of 2,4-DNPH			
spot No.	R _B	coincided compound	
1	0.45	acetaldehyde	
2	0.57	acetone	
3	0.72	methyl ethyl ketone	
4	0.81	?	
5	0.91	?	
6	0.96	?	

GLC of regenerated carbonyls			
peak No.	t _R (min)	authentic sample	t _R
0	1.80	formaldehyde	1.80
1	2.80	acetaldehyde	2.81
2	6.30	acetone	6.05
3	10.65	methyl ethyl ketone	10.65

(3) ラクトン類の同定

成分Ⅱ及びⅣはGC-MS分析により、極めて強い基準ピーク m/e 85 が観察され、さらに中性部の加水分解によって消失することから、 γ -ラクトンであろうと予想された。脂肪族 γ -および δ -ラクトン類のマスマスペクトルについては、Honkanen⁴⁰⁾、McFadden⁴¹⁾ の報文、Porter および Baldas⁴²⁾ の著書にも分析例や開裂機構の解説がある。成分Ⅱ及びⅣも後から述べるように、 δ -ラクトンであることが確認されたが量的に少なく、含量は成分ⅡやⅣの $1/10$ 程度で、ⅡやⅣから部分的にでも分離濃縮してからGC-MS分析を行なわなければ、成分が重複して解析に耐えるようなマスマスペクトルは、得られなかった。

(3)-1. 4-Decanolide (γ -decalactone) の単離同定

Glucose-asparagine 培地で Sp. odorus と培養した場合のエーテル抽出中性画分の最大構成成分である成分Ⅱ (Peak Ⅱ) はGC-MS分析によってマスマ

ペクトルを得た。

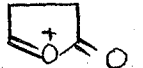
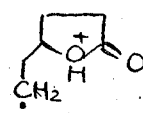
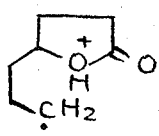
脂肪族 γ -ラクトンは $C_6 \sim C_{18}$ のいずれについて
も、マススペクトルに於て、側鎖の基がとれた γ -ラ
クトン環 m/e 85,  が基準ピークとなり、
特徴的なフラグメントとしては $M^+ - H_2O$, $M^+ - 2H_2O$,
 C_8 以上の γ -ラクトンでは m/e 114, , C_9
以上では m/e 128,  が検出
される。これらの知見をもとに、Fig.
3-I の成分IIのマススペクトルを解析すれば、 m/e
170 は小さいが、 m/e 152, 134, 128 の存在から
分子量 170 ($170 - H_2O = 152$, $170 - 2H_2O = 134$) が推
定され、際だって強い m/e 85 の基準ピークから、
分子量 170 の γ -ラクトン即ち 4-decanolide (r-
decalactone) と予想される。その構造は、成分II
の赤外線吸収 (IR) スペクトル、マススペクトルを
標準の 4-decanolide (東京化成工業製) と比較して
同定した。また、成分IIと標準化合物の IR の比
較は、二種類のカラムを使用して行なった。

Fig. 3 には成分II及び市販の 4-decanolide のマ
ススペクトルを示す。

成分IIの単離

Glucose - asparagine 培養液 15 l 相当の中性画

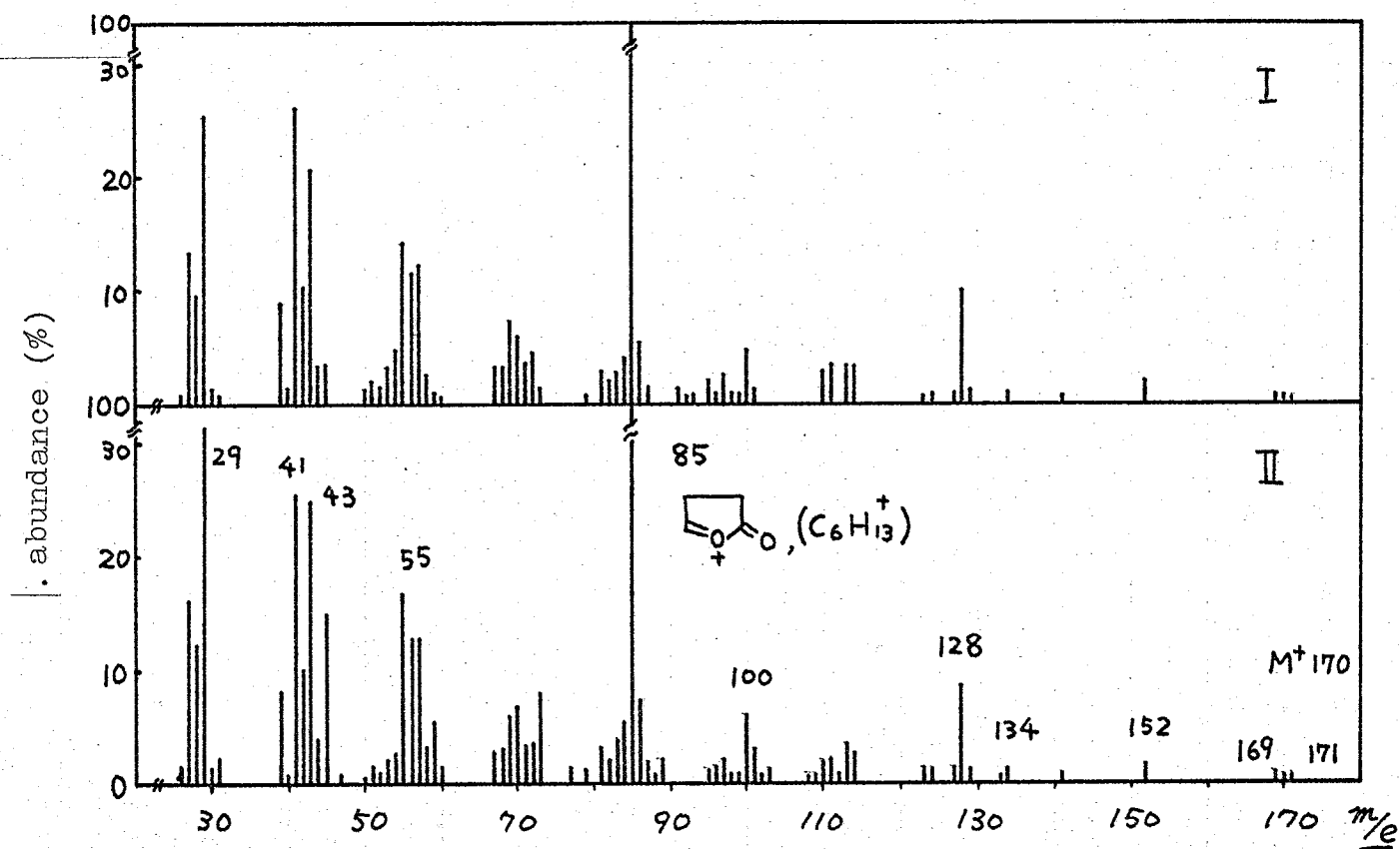


Fig. 3. Mass Spectra of Component 11 and Authentic 4-Decanolide.

These spectra were taken by GC-MS.

I, component 11; II, authentic 4-decanolide

分を最終的に 0.5 ml まで濃縮した。この濃縮液中には、成分 11 が 6~7 mg, 成分 14 が 3 mg 程度含まれていた。これを 10% PEG-20M column (4.2 mm i.d. x 1.5 m) を装備した分取用 GLC にかけた。分析条件は、column temp. 190°C, carrier gas He 30 ml/min, injection temp. 270°C, thermal conductivity detector 270°C で実施した。成分 11 と小さなガラス管に分取し、純度は分析用 GLC によって調べた。なお、Peak 12 らしい成分が混入していたが、分取物の純度は高かった。分取物及び標準品の IR スペクトルを Fig. 4 に示した。1770 cm^{-1} 付近に γ -ラクトン環を形成したカルボニル由来の特徴的な吸収バンドが観察され、IR スペクトルからも γ -ラクトン構造が支持される。脂肪族ラクトンの側鎖が直鎖が枝分れしているかによって t_R は当然違ってくる(枝分れ脂肪酸メチルエステルの例などから)と考えられるので、二種類のカラム (PEG-20M および OV-17) について、成分 11 と 4-decanolide の t_R を比較した (Table IV) ところ、両者はよく一致した。

成分 11 は t_R , IR, マススペクトルが 4-decanolide に一致することから、4-decanolide と同定された。なお、分取した成分 11 の量が少なかつたので、旋光度は正確には測定できなかったが、メタノール

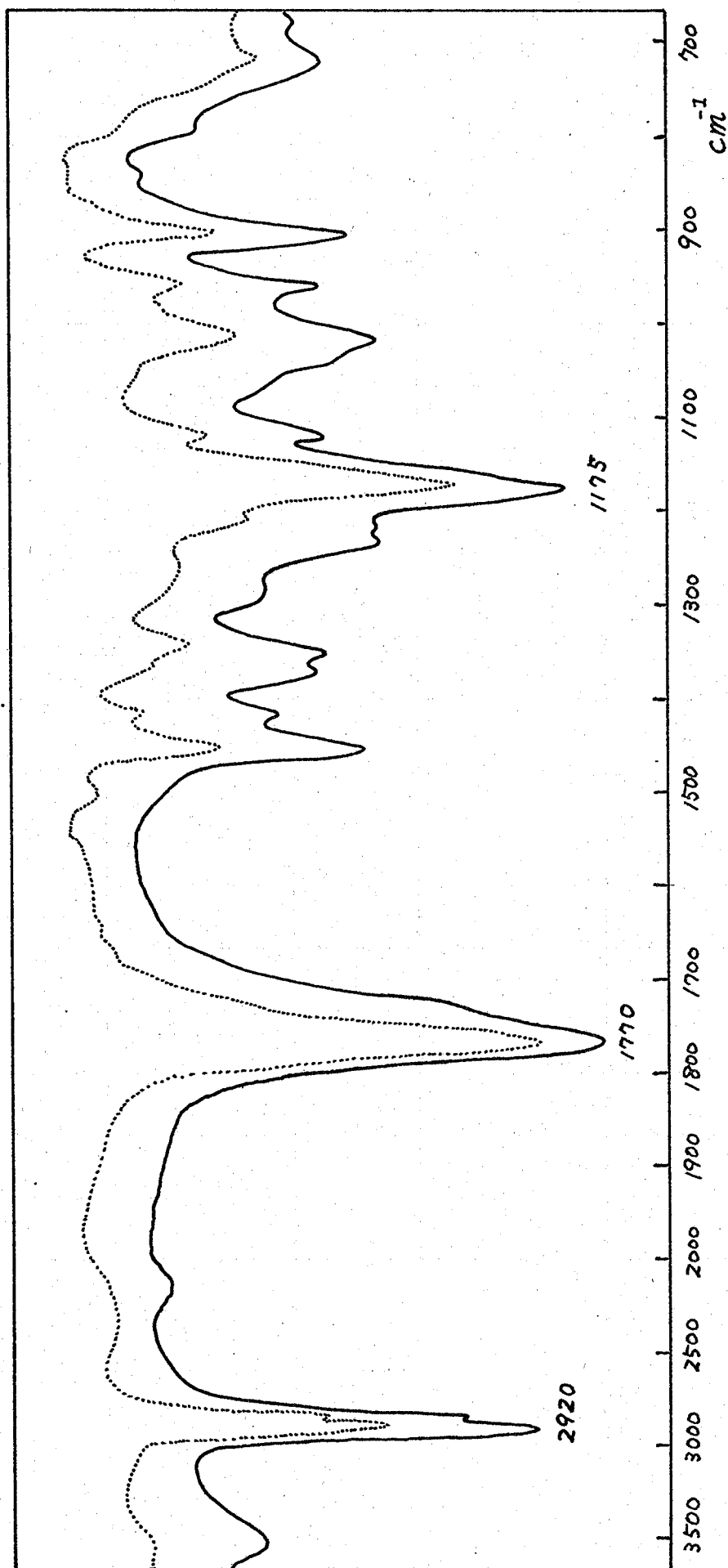


Fig. 4. Infrared Spectra of the Isolated Component 11 and Authentic 4-Decanolide(liquid film).

——, isolated; ·····, authentic sample

Table IV. Retention Times of the Component 11 Compared with Those of Authentic 4-Decanolide.

Analytical condition were as follows: Column and carrier gas; 1.5% OV-17 on Chromosorb W AW(60~80mesh), N₂ 12.5ml/min; 10% PEG-20M, N₂ 19ml/min. Injection port temp., 230°C.

column	column temp. °C	t_R (min)	
		component 11	authentic 4-decanolide
PEG-20M	170	8.10	8.11
OV-17	140	4.02	4.00

ル中で右旋性を示すことが分った。成分11と分取した際に、成分14と少量分取された。成分14も m/e 85に基準ピークがあり、IR スペクトルで 1770 cm^{-1} の吸収が見られたことから、 γ -ラクトンの一種であろうと推測されたが、構造の確認には至らなかった。そこで、次に成分14の同定のため、成分11及び成分14の γ -ラクトン生成量を培地成分を変えて定量し、より成分14を多く生成する条件を検討した。

(3)-2. Sp. odorus による γ -ラクトン生成量

Sp. odorus の中性代謝産物の最大成分は 4-decanolide と同定された。微生物による 4-decanolide の生合成は知られておらず、ピーク様の香気による同定

化合物の寄与が少なくないと考えられ、興味ある代謝産物といえる。Sp. odorus による 4-decanolide 及びもう一つの γ -ラクトンである成分の生成をより詳しく検討するため、各種炭素源、窒素源を用いて γ -ラクトンの生成量を定量した。また、Sp. odorus の γ -ラクトン生成と増殖の関係を明らかにするため、4-decanolide の量的変動と経時的に追った。

定量方法

合成培地の組成は炭素源 10%、窒素源 0.56g N/l, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3%, CaCl_2 0.01%, pH 6.0 (糖は D 型, P ミノ酸は L 型を使用), 150 ml の各種培地を入れた振盪フラスコ、3本ずつに Sp. odorus を接種、8日間振盪培養を行なった。4-Decanolide の経時的变化をみる場合は、glucose-asparagine 培地で、所定培養日数毎に3本ずつ培養した。培養液は O.D. 測定後、Scheme 1 (22頁) に従ってエーテル抽出中性部を 2ml まで濃縮し、GLC パターンをみると共に、GLC により外部標準として市販 4-decanolide を用いて、Sp. odorus の生産した γ -ラクトンを定量した。GLC の分析条件: PEG-20M column, 180°C, carrier gas N_2 22.5 ml/min, injection port 270°C. 試料は 10 μl 注入、3回ずつ分析し平均ピーク面積

と外部標準のそれと比較して定量値を算出した。

また、成分は 4-decanolide との相対的な面積から含量を算出した。この分析方法による回収率をみるために 450 ml の glucose-asparagine 培地 (未接種) に市販の 4-decanolide 225 μ g を添加し、培養液と同様の操作により 4-decanolide の定量を行った。

4 実験の回収率はそれぞれ 95.4, 92.9, 93.7, 98.0 %, 平均 95.0 % (標準偏差 1.95) であった。

(3)-2-1. 各種培地での 4-decanolide の生成量

31 種の培地について、4 回に分けて培養実験を行ったが、いずれの場合も標準培地として glucose-asparagine 培地を用いて、他の培地での Sp. odors の増殖、ラクトン生成量との比較を考慮した。

(i) 炭素源を換えた場合

窒素源として asparagine を用い、炭素源を glucose, sucrose, fructose, xylose, mannitol, glucose + glycerol (各 5%), glucose + sodium succinate (各 5%), glucose + sodium acetate (各 5%) の 8 種の培地で培養した。

その結果、glucose-asparagine の標準培地よりも、sucrose, fructose, mannitol を炭素源とした方が

、増殖がや、良好で 4-decanolide の生成量も多いことが分った。また、fructose により成分 14 の生成量が増大し、mannitol で生成が抑制される傾向がみられた。Xylose, glucose + sodium acetate を炭素源とする培地では、増殖がみられなかった。

(ii) 窒素源を換えた場合

炭素源として glucose (10%) を用い、窒素源として asparagine, glutamine, monosodium glutamate, alanine, Polypepton[®] (Daigo Eiyo Kagaku), urea, sodium nitrate, ammonium sulfate の 8 種の培地で培養した。

その結果、4-decanolide は alanine, urea 以外で標準の asparagine より多く生成し、成分 14 は、Polypepton, ammonium sulfate 以外で標準より多く生成した。窒素源として Polypepton を使用すると増殖が標準の 6 倍、4-decanolide の生成量は 10 倍に達したが、成分 14 は抑制されてほとんど生成しなかった。alanine 及び sodium nitrate により成分 14 の生成量が増大する傾向にあった。

(iii) 窒素源として各種アミノ酸を使用した場合

アミノ酸は酵母の代謝に於て、高級アルコールの前駆体になることが知られており、Sp. odorus の場

合も、生成香気の質を変えるのに有効ではないかと
 考えられたので (II) 以外の 7 種の アミノ酸を窒素源
 として新たに培養を試みた。標準の asparagine の
 ほかに、cysteine, leucine, lysine-HCl, methionine,
 phenylalanine, threonine, tryptophan を使用した。
 しかし、いずれも増殖が標準より不良で、4-
 decanolide も標準を上回るものはなかった。また、
 cysteine では全く増殖できなかった。成分は
 methionine で標準よりわずかに多く生成する以外は
 標準とかなり下回った。しかし、培地の香気には
 かなり差があり、asparagine, peach-like and sour;
 leucine, strongly yeast-like; lysine, roasted
 barley; methionine, onion-like; phenylalanine,
 floral; threonine, fresh and sweet; tryptophan,
 withered fern のようにそれぞれ特徴があった。
 Leucine の場合、isoamyl alcohol が、phenylalanine
 の場合 β -phenylethyl alcohol が抽出液中の主成分
 として見出され、methionine の場合 Fig. 5 に示
 した通り、methionol (3-methylthiopropanol) が最
 大成分であった。Methionol の t_R は PEG-20M,
 120°C, carrier gas N_2 22.5 ml/min で 11.1 min であ
 り、標準品のそれとよく一致した。

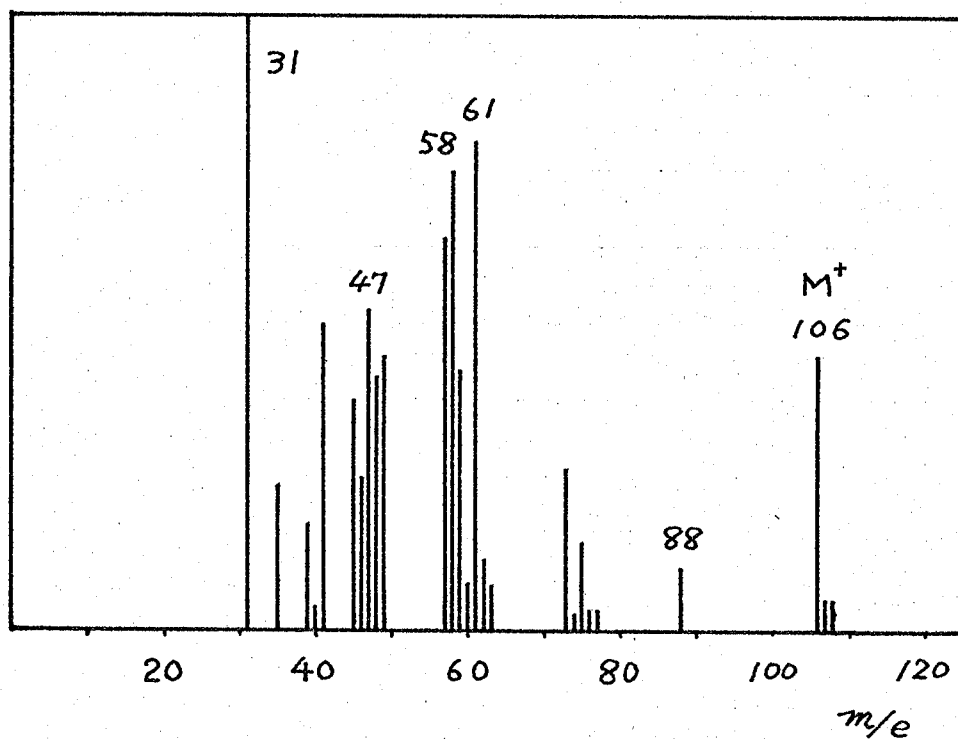


Fig. 5. Mass Spectrum of the Main Volatile Metabolite of Sp. odorus Cultured in the Glucose-Methionine Medium.

The spectrum was taken by GC-MS : PEG-20M column at 170°C.

(IV) 各種炭素源、窒素源と組合わせた場合.

これまでの結果をもとに、4-decanolide, 成分はをより多く生成させるという観点から、炭素源、窒素源の組合わせにより9種類の培地を設定し、両ラクトンの生成量を定量した。結果は Table V に示されている通り、glucose-asparagine 培地よりはるかに多くの 4-decanolide, 成分はを生成させ得ることが明らかとなった。特に窒素源として、

Table V. γ -Lactones Produced by Sp. odorus.

Sp. odorus was cultured at 25°C for 8 days by shaking in three vessels. O.D.: Centrifuged cells were suspended in a saturated solution of sodium chloride and the optical density was measured at 610nm. Analytical GLC: Carrier gas N₂ 22.5 ml/min, temp. of column and injection port, 180°C and 270°C, respectively.

Medium		O. D. 610m μ	4-Decanolide μ g/liter	<u>cis</u> -6-Dodecen- 4-olide * (Component 14)
Carbon source	Nitrogen source			
10%	0.04mole N/liter			
Glucose	Asparagine	1.35	450	234
Sucrose	Glutamine	1.22	718	1479
"	Polypepton**	12.48	2671	a)
Fructose	Glutamine	1.32	751	1352
"	Alanine	1.27	527	1860
"	Polypepton**	6.73	1915	a)
"	Sodium nitrate	0.78	226	464
Mannitol	Polypepton**	13.76	4490	a)
"	Sodium nitrate	1.94	723	a)
"	Ammonium sulfate	1.92	971	a)

* calcd. from the ratio of peak areas of the lactone to those of 4-decanolide.

** Daigo Eiyo Kagaku Co., Ltd. 4.44g/liter.

a) The lactone was not detected by GLC.

Polypepton を使用すると成分14は抑制されるが 4-decanolide は、最高 4.49 mg/l まで増大した。

また、成分14は窒素源として alanine, あるいは炭素源として fructose を使用すると、生成量が増加する傾向にあったが、両者の組合わせによりこの傾向

は、さらに顕著となった。Fructose-alanine 培地では、成分14と成分11の比が3.5に増大し、成分14の絶対量も1.86 mg/lと多かった。この事実より、成分14の単離同定に fructose-alanine 培地で Sp. odorus と培養するものが効果的であることが分った。(i), (ii) より mannitol, Polypepton が成分14の生成を抑制することが分ったが、さらに Table V から、炭素源として mannitol、窒素源として Polypepton を使用すれば、窒素源、炭素源が何であっても、成分14はほとんど生成していないことが分る。

(3)-2-2 Sp. odorus の増殖と 4-decanolide 生成の経時的変化

同定された成分11、4-decanolide が Sp. odorus の代謝産物かどうかを確かめる一つの方法として、酵母の増殖とラクトン生成の変動を経時的に追ってゆくことが考えられる。Fig. 6 には、Sp. odorus の増殖、pH、ラクトン生成量の1~11日間にわたる振盪培養中の変動を示した。図からも明らかなように、Sp. odorus の対数増殖期に 4-decanolide の量も急激に増えており、増殖が最大を過ぎるとラク

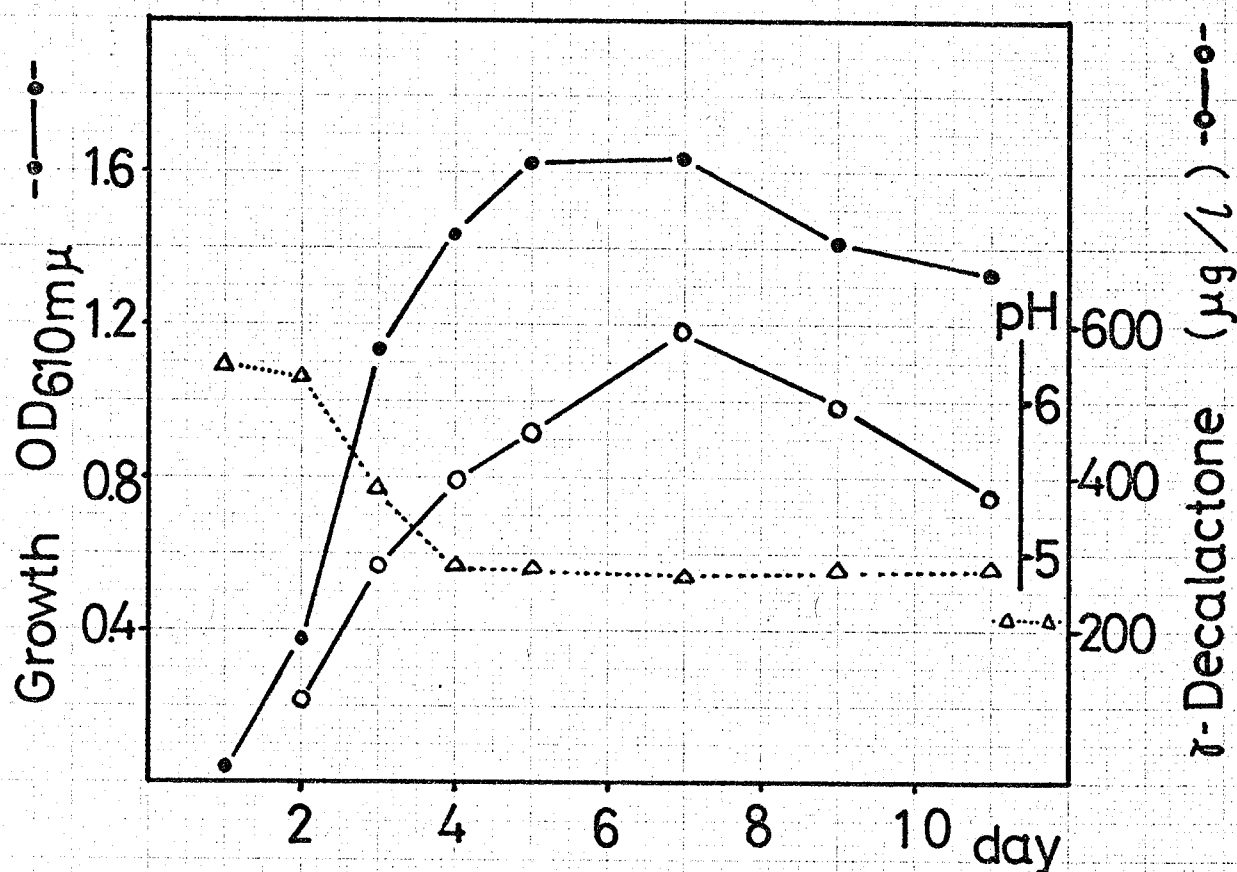


Fig. 6. Growth Phase of Sp. odorus and 4-Decanolide Production.

The cultured broths in three vessels were combined in each time, and O.D., pH and 4-decanolide(γ -decalactone) were measured(See, Table V).

トニも減少してゆく。この事實は、4-decanolideの生成が培地成分から非生物的行なわれているのではなく、菌体の自己消化などによっているのではないことを示している。先の Table V に示した結果から、培地組成が違ふ場合、増殖量とラクトン類の生成量の間には、必ずしも比例関係がないこと

、成分11と14の間には、直接量的な関係がないことなどもまたラクトン類が Sp. odorus の代謝産物であることを支持していると思われる。

(3)-3 cis-6-Dodecen-4-olide の同定

先に述べたように成分14は $IR \nu_{\max} 1770 \text{ cm}^{-1}$ (γ -lactone ring $\text{C}=\text{O}$)、 m/e 85 の基準ピークが観察されたことより成分11と同様に γ -ラクトンであろうと予想された。そこで14の生成量が多い fructose と alanine を炭、窒素源とする培地 (以下 fructose-alanine 培地という、組成 fructose 10%, alanine 0.5%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3%, CaCl_2 0.01%) 20 l に Sp. odorus を培養し、エーテル抽出中性部を得た。濃縮液を成分11の場合と同様に分取GLCによって単離し、GLC的にほぼ一成分として14を得た。分取条件: column, injection port の温度はそれぞれ 220, 270°C. TCD, 290°C。

成分14の tr は標準の 4-dodecanolide (MW 198) よりわずかに大きく、さらにマスパクトルで m/e 196 にピークが見出されたことから、これが分子イオンピークであろうと思われた。 m/e 178 ($196 - \text{H}_2\text{O}$) にもフラグメントイオンが観察されることから、

成分14の分子量196が支持される。基準 C_{12} が m/e 85で γ -lactone ring によっていることから、飽和の γ -lactone ring を有し、 $M^+ 196$ とすれば、側鎖に二重結合1個をもつ dodecen-4-olide ということになる。飽和の脂肪族ラクトンとらかて m/e 114, 128 などのフラグメントが見出されないことも、この推定の根拠となっている。そこで、分取した成分14について接触還元、酸化的二重結合の開裂反応により、二重結合の存在の確認、二重結合位置の決定を行なった。

(3)-3-1. 成分14の接触還元

分取した成分14、約1.5 mgを40 mlの90%メタノールに加え、palladium black 75 mgを添加、攪拌しながらゆっくり水素を通じ2時間反応させた。反応液は濾過して触媒を除き、エーテルで洗浄、濾液にエーテル200 mlを加え飽和食塩水で3回洗浄、無水芒硝で脱水し、減圧下に濃縮、GLC及びGC-MS分析に付した。成分14及び水素添加後のマススペクトルをFig. 7-I, IIに示した。成分14は水素添加によって分子量が水素原子2個分だけ増加、飽和の γ -ラクトンに共通したマススペクトルを与えることがわかり、分子量198より4-dodecanolideで

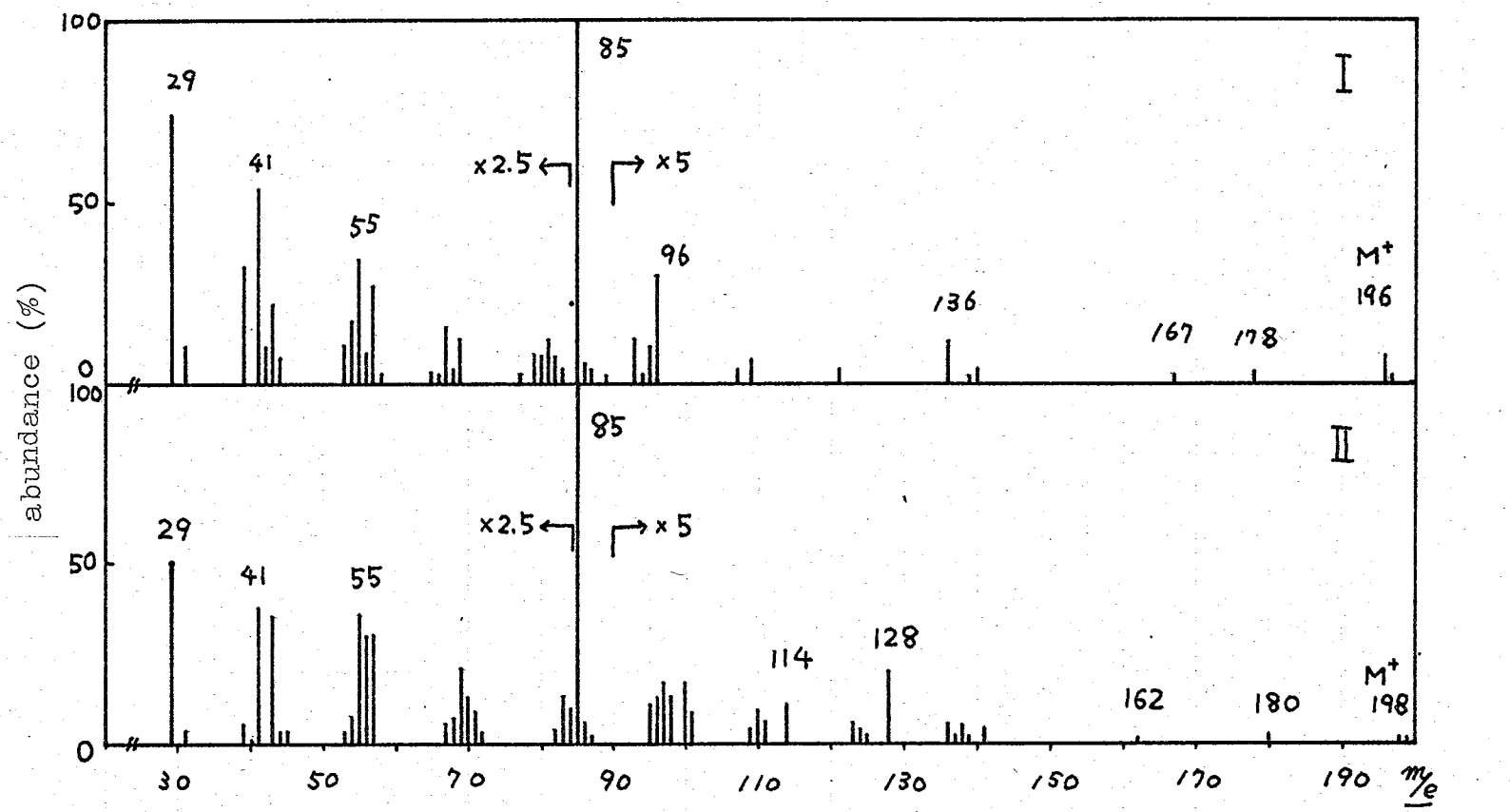


Fig. 7. Mass Spectra of Component 14 and Catalytic Hydrogenation Product.

Spectra of component 14(I) and hydrogenated component 14(II) were taken by GC-MS : PEG-20M column at 200°C.

あることが確認された。成分14の水素添加物と標準の4-dodecanolideの t_R は10% PEG-20M (176°C, carrier gas N_2 16.0 ml/min), 及び1.5% OV-17 (152°C, 17.5 ml/min) の二つのカラムでそれぞれ15.0分と15.1分、及び5.7分と5.6分とよく一致し、coGLCによっても鋭い一つのピークを与えた。

これらの事実から、成分14は側鎖に二重結合を1個有する C_{12} の γ -ラクトンであり、水素添加によって t_R が4-dodecanolideとよく一致することは、側鎖が直鎖であることも意味している。

(3)-3-2. 成分14の二重結合位置の決定

つぎに、成分14の二重結合の位置を決定するためには Scheuerbrandt および Bloch⁴⁴⁾の方法によって、二重結合の化学的酸化開裂反応を行なった。

分取した成分14約1mg, *t*-butanol (0.4 ml), 水(0.6 ml), 炭酸カリ (0.02 mole) 及び 0.4 ml の酸化剤溶液 ($NaIO_4$ 2.086 g と $KMnO_4$ 0.158 g を 100 ml の水に溶解したものを) と混合し、時々振盪しながら室温に2時間保持、その後、重亜硫酸ソーダで酸化剤を分解する。反応混液に 0.25 ml の 1N-NaOH を加え、混液は70°C, 30分間保持、つぎに減圧濃縮乾固し残留物に 1N-HCl を加えコンゴールレッド酸性にする。

遊離したカルボン酸を少量のエーテルで3回抽出した。エーテル抽出液を濃縮し、ジアゾメタンでメチル化した。生成したメチルエステルはGLC及びGC-MSによって分析した。成分14の開裂反応と並行して、methyl trans-3-decenoate の酸化開裂反応も同時に行なった。この実験条件下に、methyl trans-3-decenoate からは分解生成物のひとつとして methyl heptanoate が検出された。一方、成分14からは IR 及びマススペクトルを標準品と比較することにより、methyl hexanoate の生成が確認された。γ-Lactone ring の側から生成すると思われる lactone-carboxylic acid の methyl ester はGLCでは確認できなかった。成分14の酸化開裂反応生成物のひとつの IR : PEG-20M, 80°C, 3.05 min. 標準 methyl hexanoate との co-GLC で一つのピークを与えた。GC-MS 分析の結果は Fig. 8 に示した通り、 M^+ 130、さらに m/e 74 (基準ピーク)、87、59 は脂肪酸メチルエステルに特有のフラグメントであり、m/e 115 ($M^+ - CH_3$), 101 ($M^+ - CH_2CH_3$), 99 ($M^+ - OCH_3$), 71 ($M^+ - COOCH_3$), 57 ($M^+ - CH_2COOCH_3$) はこのメチルエステルが、methyl hexanoate であることを示唆するものである。

成分14の二重結合の開裂によって hexanoic acid

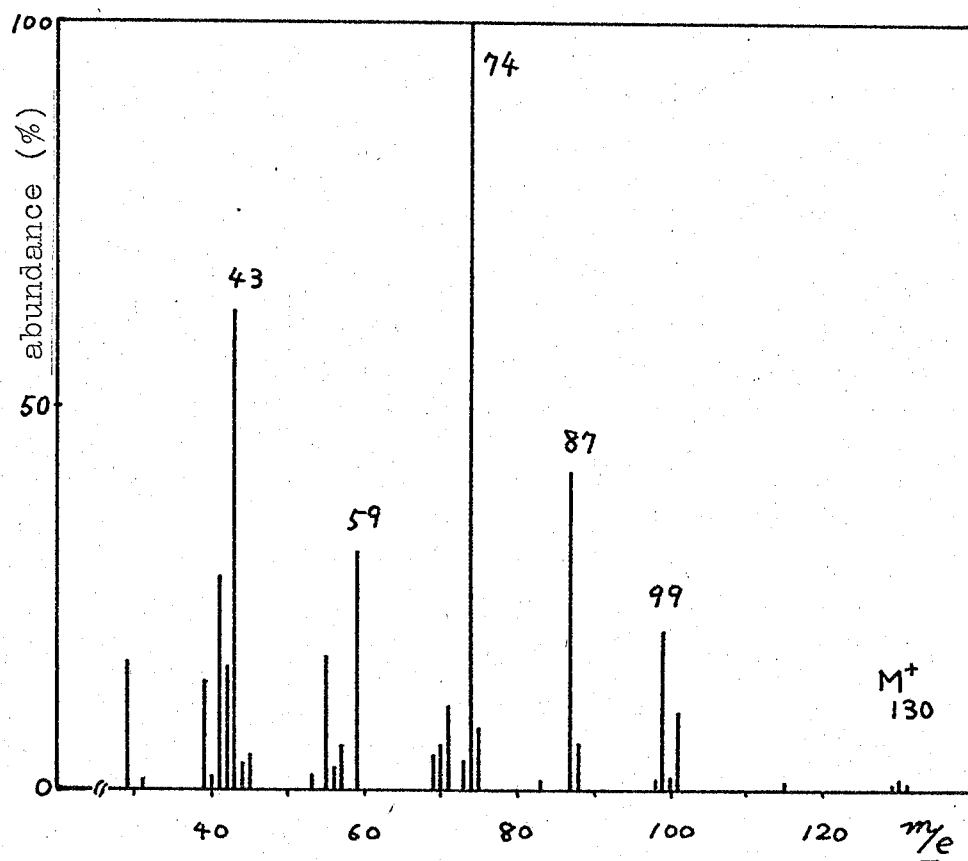


Fig. 8. Mass Spectrum of the Methyl Ester Derived from Component 14 by Oxidative Cleavage of its Double Bond.

The spectrum was taken by GC-MS : PEG-20M column at 100°C.

が生成したことから、二重結合の位置は側鎖のβ,γ間、即ち6位であることが決定した。それ故に、14は 6-dodecen-4-olide である。

二重結合の幾何異性は、成分14のIRスペクトルより trans 二重結合に特徴的な 960 cm^{-1} 付近の吸収が見られないことから Brownlee⁴⁵⁾ の示唆しているように cis 配置であろうと推定された。

cis-6-Dodecen-4-olide は van der Zijden⁴⁶⁾ら、及び Brownlee⁴⁵⁾らにより butter oil 及び black-tailed deer の tarsal scent 中に存在することが指摘されており、Begemann⁴⁷⁾らによって合成されていた。

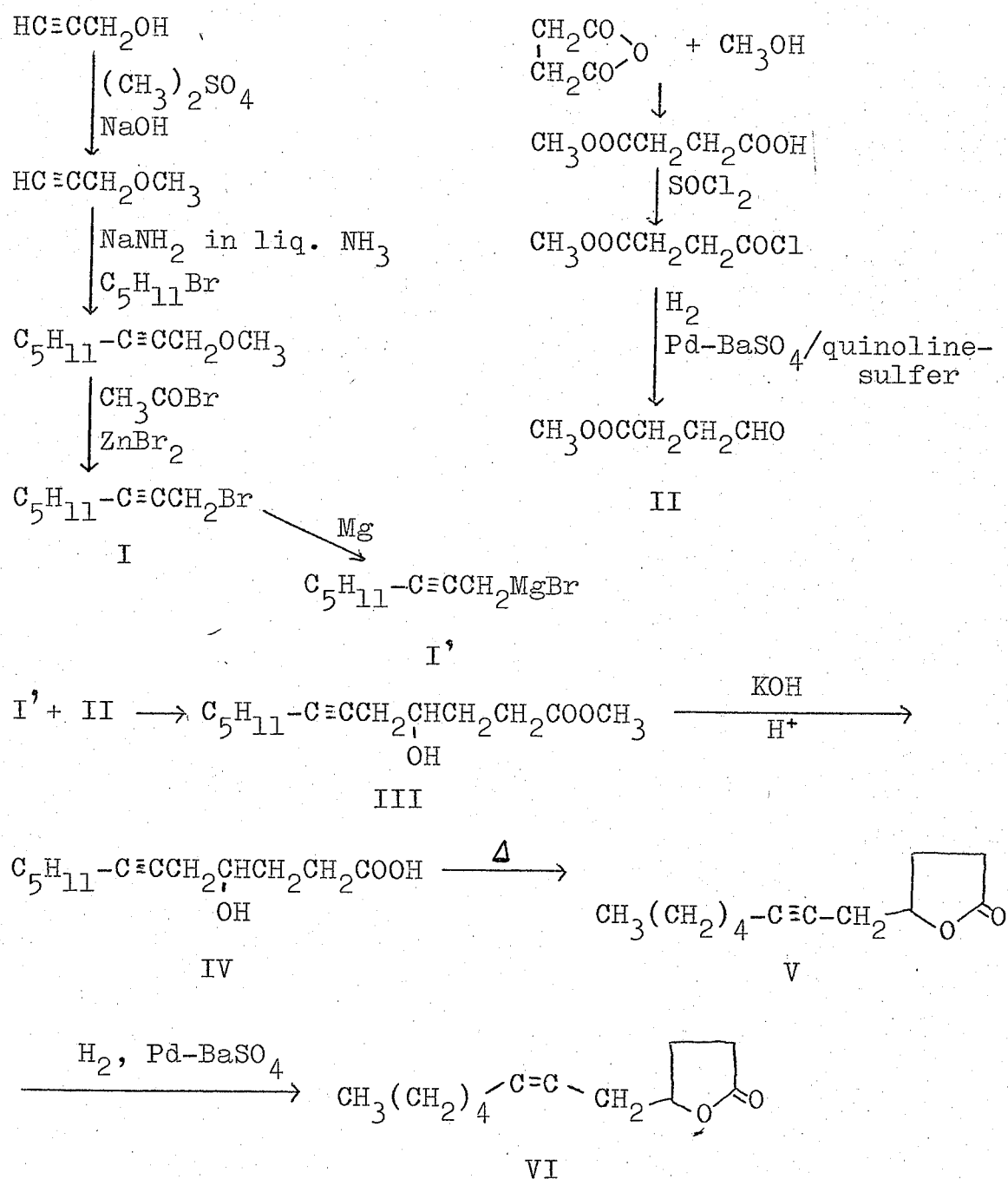
成分 14 の最終的な確認は、合成した cis-6-dodecen-4-olide の t_R , IR, マススペクトルを成分 14 のそれらと比較することによって行なった。

(3)-4. cis-6-Dodecen-4-olide の合成

Begemann⁴⁷⁾らの方法によって合成を行なった。合成経路は Scheme 2 に示した通りである。

(i) 1-Bromo-2-octyne (I). Couffignal⁴⁸⁾らの方法によって液中中、ソーダマイドを介して propargyl methyl ether と *n*-amyl bromide の縮合により調製した 1-methoxy-2-octyne (bp. 69~70°C/11 mm Hg) を acetyl bromide, ZnBr₂ を混合加温したものに滴下してフロム化を行なった。生成物 bp. 88~89°C/11 mm Hg (Couffignal ら, bp. 88~89°C/12 mm Hg)。

(ii) Methyl 4-oxobutanoate (II). Cason⁴⁹⁾の方法により市販の無水コハク酸とメタノールから methyl

Scheme 2. The Route for Synthesis of Cis-6-dodecen-4-olide.

hydrogen succinate を調製、これに thionylchloride を作用させ、 β -carbomethoxypropionyl chloride とした。

これを Rosenmund reduction⁵⁰⁾ によって methyl 4-oxobutanoate (II) に導いた。Bp. $82 \sim 83^\circ\text{C}/18\text{ mmHg}$ 。

(iii) グリニヤール反応による I と II の縮合。I と II のグリニヤール反応による縮合⁵¹⁾ については、0.2 モルの規模で実施したが $\text{I} \rightarrow 2\text{-octynylmagnesium bromide (I')}$ への反応性が低いこと、 $\text{I}' \rightarrow \text{CH}_3(\text{CH}_2)_4-\underset{\text{MgBr}}{\text{C}}=\text{C}=\text{CH}_2$ の転位反応がおこるなどの理由により、目的とする methyl 4-hydroxy-6-dodecynoate (III) は、粗反応生成物 13.8 g の 1/10 以下であった。

(iv) cis-6-Dodecen-4-olide への誘導。III のケニ化によって得られたカルボニル画分は 650 mg が得られなかったが、 150°C 、15 分間の加熱により IR で γ -lactone ring の生成 (1710 cm^{-1} から 1770 cm^{-1} 付近に $\text{C}=\text{O}$ の吸収が移動) がみられた。

加熱によって生成した 6-dodecyn-4-olide (V) を含む反応液をメタノールに溶解し、Cram および Allinger⁵²⁾ の反応例に従って 5% Pd/BaSO_4 22 mg と quinoline 1 滴を加えて、三重結合の選択的 cis-

二重結合への還元を行なった。最終反応生成物は副反応生成物との混合物であったため、成分14を分取したと同様の条件で分取GLCを行なって精製した後、IRスペクトル、マスマスペクトルを得た。

IからI', I'とIIからIII、さらにIVへの経路は、反応性が低いことや、副反応生成物が多く生成することなどもあり、目的物の収率が低く、この種の合成は反応の各段階をGLC, GC-MSでチェックしながら反応を進めてゆくことによりこのみ目的物への到達が可能で、必ずしもよい合成方法とはいえない。

合成によって得られた cis-6-dodecen-4-olide (VI) のマスマスペクトルは Fig. 9 に、IRスペクトルは成分14と共に Fig. 10 に示した。マスマスペクトル、IRスペクトル (1710 cm^{-1} 付近の小さな吸収は不純物に由来するかも知れない) は成分14のそれとよく一致している。さらに、天然物と合成品の trR を4種の液相によるGLCで比較した。Carrier gas N_2 17 ml/min . injection port 250°C , 液相、カラム温度、trR は以下の通りで、co-GLCにより単一のピークを与えた。PEG-20M, 180°C , 10.0 min; Apiezon M, 180°C 5.5 min; AF-1, 176°C , 4.8 min; OV-17, 150°C , 9.2 min. 成分14は、このように合成によっても、cis-6-dodecen-4-olide と確認された。

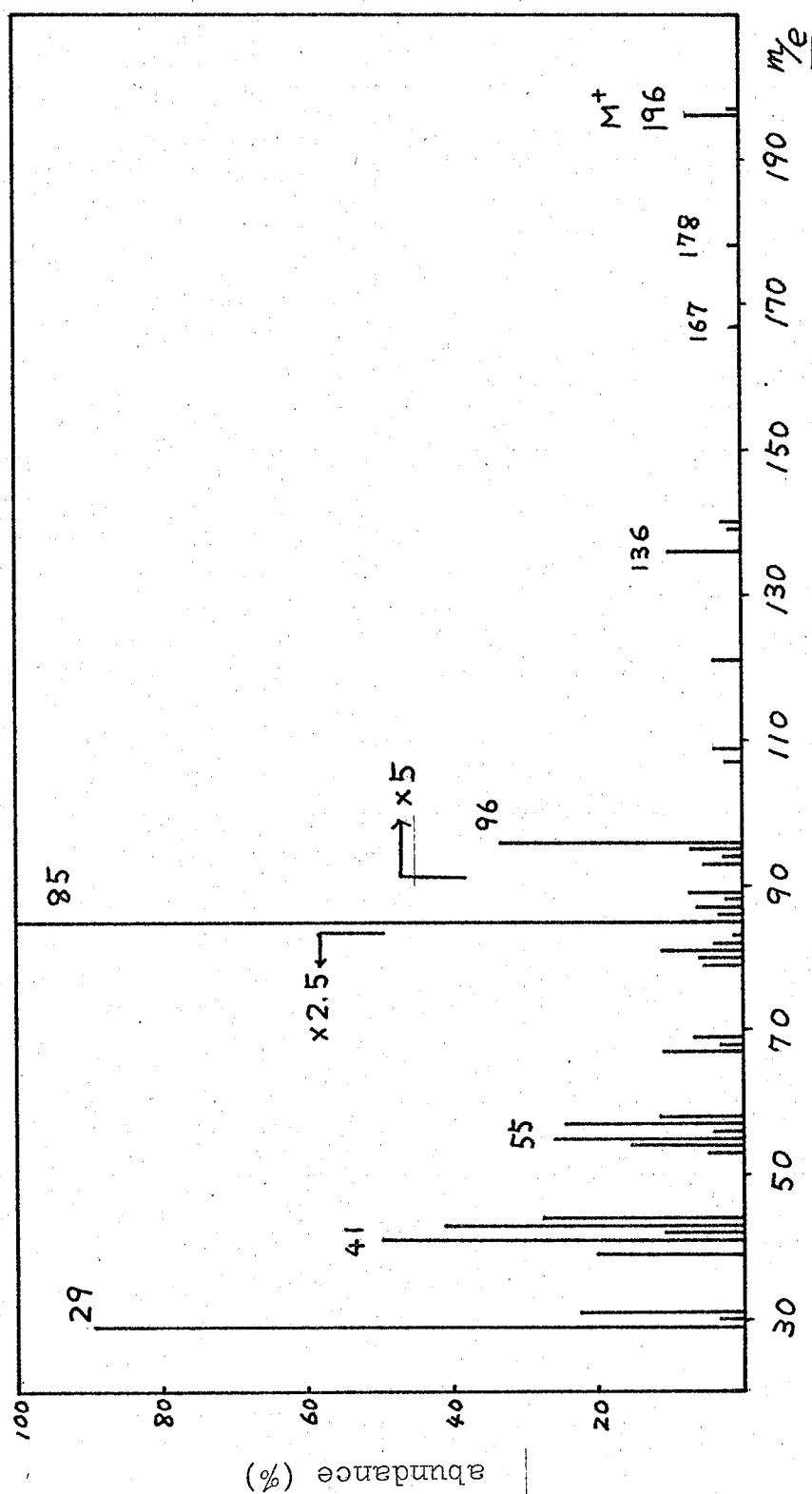


Fig. 9. Mass Spectrum of Synthesized cis-6-Dodecen-4-olide

This spectrum was taken by GC-MS : GC, PEG-20M column at 200°C.

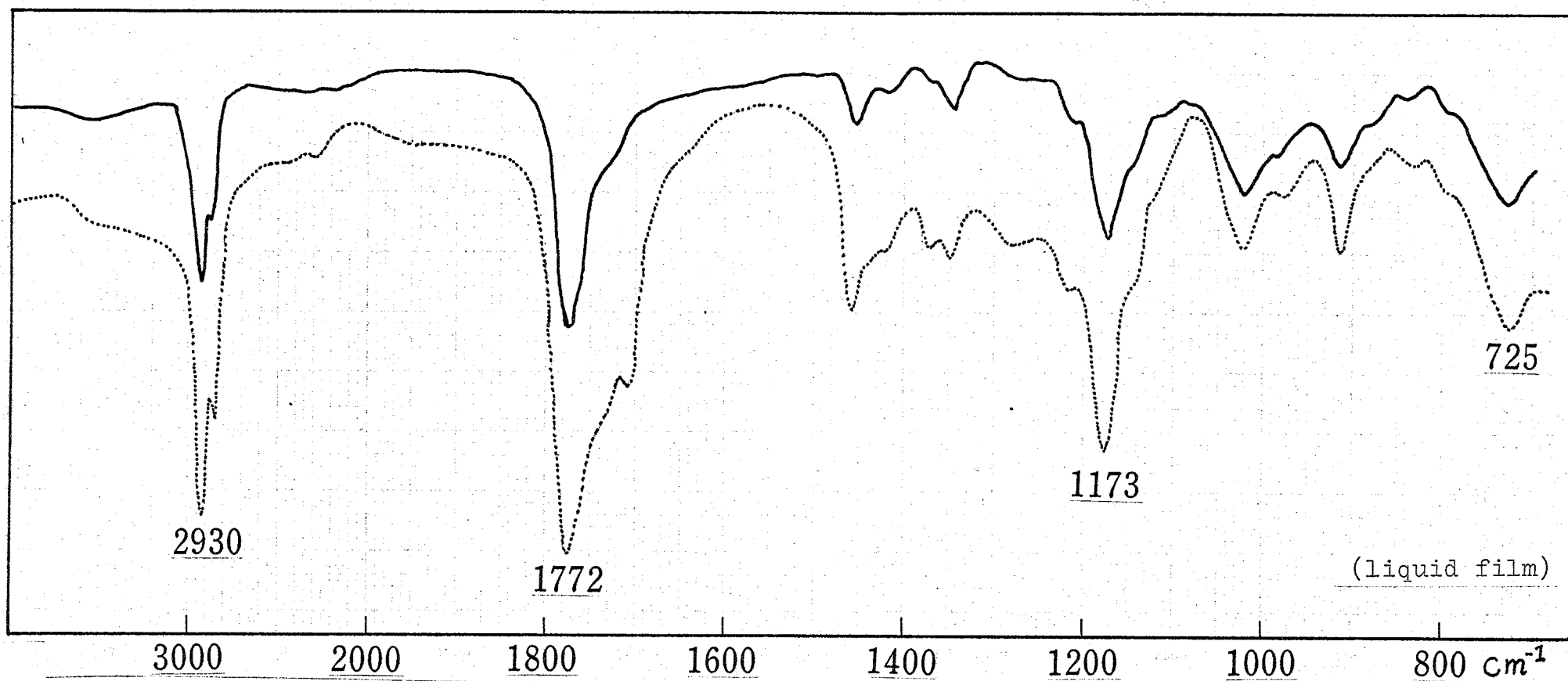


Fig. 10. Infrared Spectra of the Isolated Component 14 and Synthesized cis-6-Dodecen-4-olide.

———, isolated ; , synthesized (The band at 1710cm^{-1} may depend on impurities.).

(3)-5. 5-Decanolide (δ -decalactone) 及び
cis-7-decen-5-olide の同定

成分 12, 13 は含量が少なく、量的に多い成分の間に溶出されるため、エーテル抽出中性部をそのまま、GC-MS 分析に付しても良好なマススペクトルは得られなかった。そこで、これらの成分を部分的に濃縮する目的で silicic acid column chromatography を行なうと、中性揮発性成分の分画を試みたところ、溶媒系 isopentane/ether で、成分 12, 13 は成分 11 や 14 よりも溶出され難いことがわかり、以下の操作によって成分 12, 13 を多く含む画分を得ることができた。

(3)-5-1. δ -ラクトン画分の調製

Sp. odorus を fructose-alanine 培地 40 l に培養して得た中性揮発性成分を最終的に 1 ml まで濃縮し、isopentane 中に落着かせた silicic acid column (3.5 cm i.d. x 3 cm, Mallinckrodt, 100 mesh) にマウントし、100 ml の ether/isopentane (1:3 v/v, 以下溶媒は ether/isopentane の混合比を示す) でカラムを

洗浄し、つづいて (1:1) の溶媒 100 ml で溶出した。

この溶出液中には、芳香族アルコール (成分 9, 10) の一部、 γ -ラクトン (成分 11, 14) の一部及び成分 12, 13 のほとんど (12, 13 を合せて 2~3 mg) が含まれている。溶出液は濃縮後、約 $\frac{1}{20}$ を残して成分 12 の分取 GLC 用試料とした。溶出液の $\frac{1}{20}$ は silicic acid column (2.5 cm i.d. x 2 cm) で再クロマトを行なった。試料をマウントしたカラムは 50 ml の溶媒 (1:4)、つづいて 20 ml の溶媒 (1:1) で洗浄、溶媒 (1:1) でつづいて溶出する 50 ml の画分を得た。この溶出液には、成分 12, 13 のほとんどが含まれ、芳香族アルコール、 γ -ラクトンはさらに少なくなり 12, 13 の相対濃度が大きくなった。再クロマトによって得た画分は GC-MS 分析、GLC 用の試料とした。

(3)-5-2. 成分 12 の同定

二度の silicic acid column chromatography によって濃縮した成分 12 の GC-MS 分析によって得られたマススペクトルは Fig. 11 に示した。 m/e 99 に基準ピーク、170, 171 にピークが検出されるが m/e 152 (170 - H_2O), m/e 134 (170 - $2H_2O$) の存在から成分 12 の分子量は 170 と思われた。 m/e 99 は δ -lactone

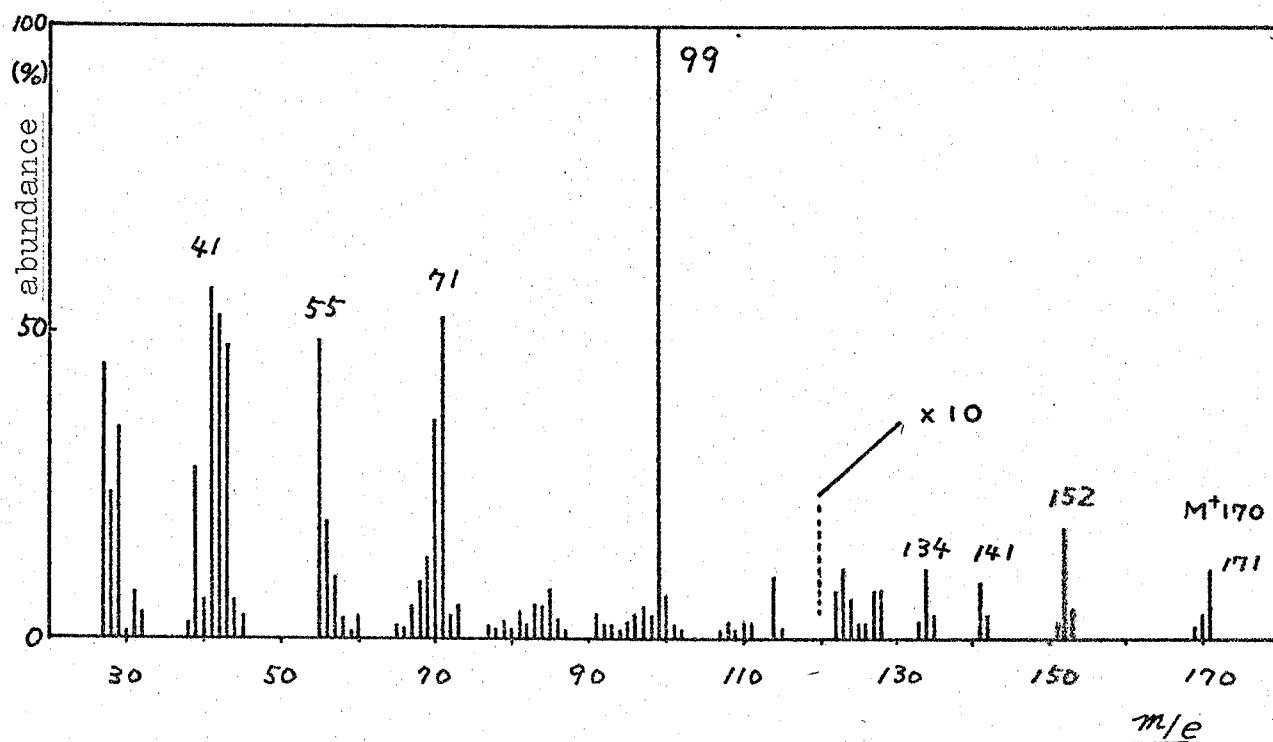


Fig. 11. Mass Spectrum of Component 12.

The spectrum was taken by GC-MS : 15% PEG-20M column
(3mm i.d. $\times$ 1m) at 180°C, injection port 250°C, carrier gas
He 0.3kg/cm².

に特徴的なもので、 m/e 71, 114 などが検出される
までも、成分12のマススペクトルは脂肪族 δ -ラクト
ンの一般的な開裂様式に一致したフラグメントを占
めている (Scheme 3 参照^{40~42})。

成分の量が少なかったため IR スペクトルなどによ
る確認はなされなかったが、マススペクトルが標
準品のそれとよく一致すること、Table VI (73頁) に
示したように IR も標準品と一致することから、成

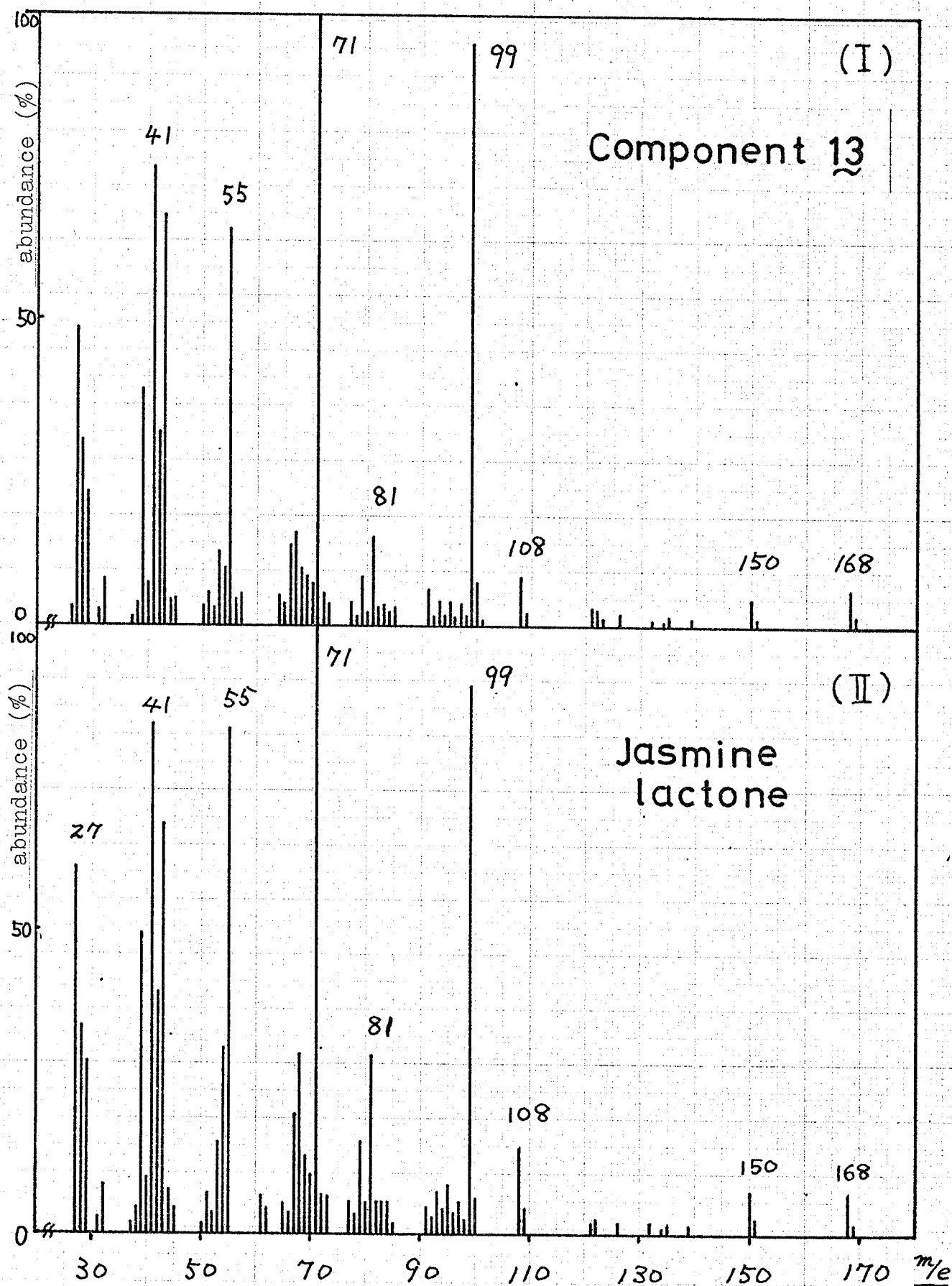


Fig. 12. Mass Spectra of Component 13 and Jasmine Lactone.

m/e 99, 71, 55, 43 などのフラグメントが見出されることから δ -lactone ring の存在が示唆された。

さらに、m/e 150 ($168 - H_2O$) の存在から、成分 13 の分子量は 168 と思われた。5-Decanolide の分子量が 170 であることから、13 には分子内に二重結合が存在し、しかもそれは δ -lactone ring の側鎖中に含まれている decen-5-olide と考えるのが妥当である。成分 13 の側鎖が 12 のそれと違っているため、McLafferty 転位、つまり環から β 位の開裂による m/e 114 のフラグメントが検出されないと考えられる。さらに、cis-6-dodecen-4-olide の場合にも、 $M^+ - 60 = 136$ のフラグメントが検出されたが、成分 13 でも $168 - 60 = 108$ が見出され、ラフトン環と二重結合の存在（あるいはその位置）に関係しているのではないかと思われた。二重結合の存在は水素添加によってさらに確認し、二重結合の酸化的開裂反応によってその位置を決定した。

(i) δ -ラフトン画分の水素添加

中性揮発性画分の silicic acid column chromatography によって得た δ -ラフトン画分 (Fig. 13-I) を 90% メタノール中で接触還元を行ない、GLC パターンの変化を調べた。水素添加後の GLC パターンは Fig. 13-II

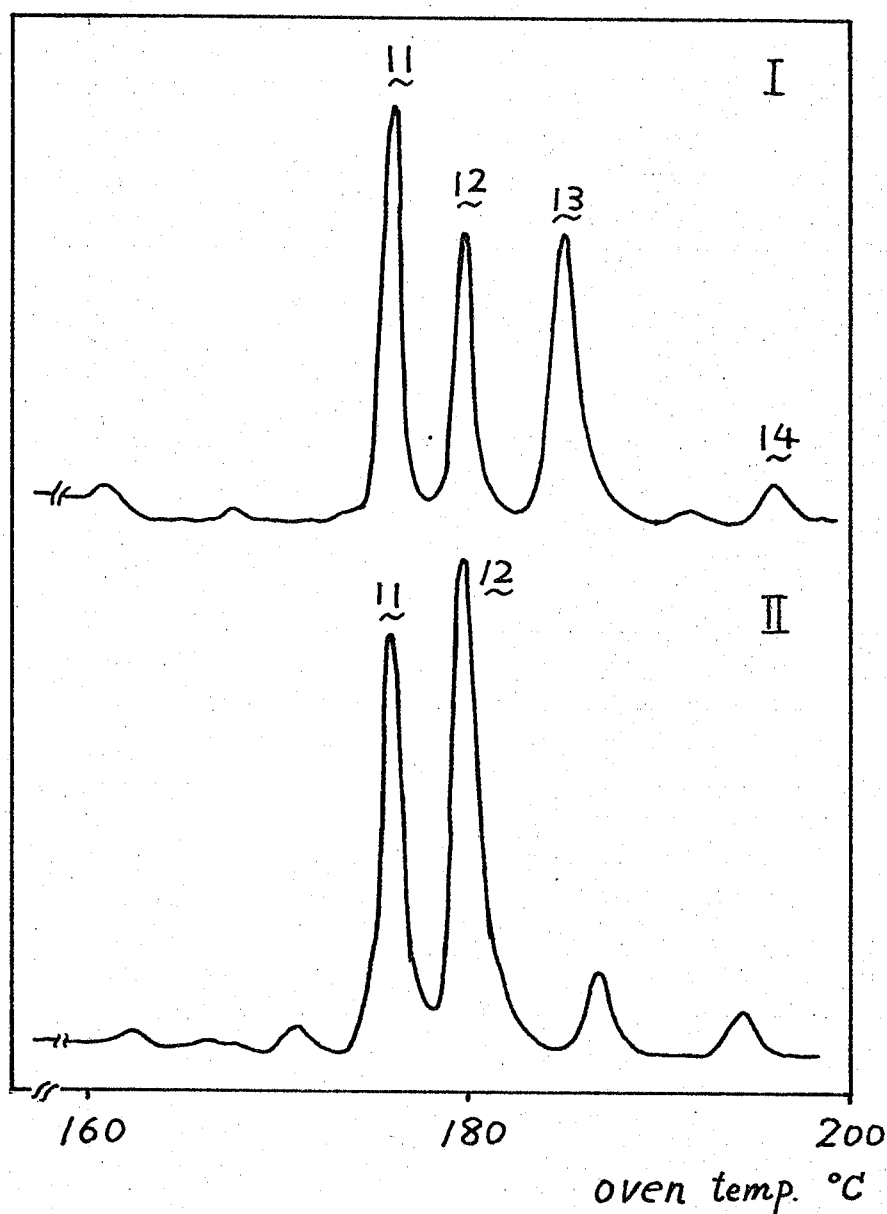


Fig. 13. Gas Chromatograms of the δ -Lactonic Fraction Produced by Sp. odoratus and the Catalytically Hydrogenated.

The δ -lactonic fraction was partly purified by silicic acid column chromatography. The oven temperature was programmed from 120° to 220°C at a rate of 4°C/min and parts of chromatograms are shown.

のように、成分13が失われ、その分だけ成分12が増大することが分った。それぞれの面積強度は、水添前、成分11:12:13 = 1:0.75:0.75, 水添後、成分11:12 = 1:1.4 であつた。このように水素添加によって成分13が12に変化することから13の側鎖は pentenyl 基でなければならぬ。

(ii) 成分13に含まれる二重結合の酸化的開裂

分取 GLC によって単離した成分13 (純度は90%以上) 約120 μ g と成分14の場合と同様 (使用した酸化剤などは約1/10量) に Scheuerbrandt および Block⁴⁴⁾ の方法で二重結合の酸化的開裂反応を行なった。生成したカルボン酸画分は butyric acid 様の臭いが出たが、ジアゾメタンでメチル化し、揮発性エステルと GLC で分析した。検出されたメチルエステルの ピーク は、標準の methyl butyrate でなくて、methyl propionate に一致した。GLC の結果: column temp. 24°C, carrier gas N₂ 10 ml/min; PEG-20M, 4.49 min; DEGS, 6.26 min. 標準の methyl propionate はそれぞれ 4.50, 6.30 min であつた。

この結果より、側鎖の二重結合の位置は δ -lactone ring より β, γ 位即ち、成分13は 7-decen-5-olide であることが明らかとなつた。

(iii) = 重結合の立体構造

成分 13 の量が極めて少なく、分取した試料で IR スペクトルを測定できなかったため、= 重結合の立体構造は天然の *jasmine lactone* [(*-*)-*cis*-7-decen-5-olide] との比較によって決定した。

Jasmine lactone は Winter⁵³⁾ らによって、ジャスミン (*Jasminum grandiflorum*) の oil や wax から得られた芳香成分である。

Jasmine oil (*Jasmin Italia Absolute*, UOP Fragrances) 500 mg を *Sp. odorus* の揮発性代謝産物から δ -ラフトン画分を得たのと同じように *silicic acid column chromatography* により分画を行った。Isopentane 中で落着かせた *silicic acid column* (3.5 cm i.d. x 8 cm) に *jasmine oil* 500 mg をマウントし、200 ml の溶媒 (1:4)、つづいて 200 ml の溶媒 (3:2) で溶出、後者を濃縮し、*Sp. odorus* の δ -ラフトン画分と同様に、再クロマトを行ない GLC でチェックしながら *jasmine lactone* 画分を得た。この *jasmine lactone* 画分と成分 13 を含む *Sp. odorus* 代謝産物の δ -ラフトン画分を用いて IR 及びマススペクトルの比較を行った。Fig. 12-II (68頁) に *jasmine lactone* のマススペクトルが示されている。

Table VI. Retention Times of Two δ -Lactones Produced by Sp. odor.

A partly purified δ -lactonic fraction produced by Sp. odor, jasmine lactone prepared from jasmine oil and authentic 5-decanolide were analyzed by an analytical GLC. Retention times are indicated as minutes from the front of solvent(ether) to the top of each peak.

Column and temp.(°C)	Retention time (min)				
	Products of <u>Sp. odor</u>			Authentic 5-decanolide	Jasmine lactone
	Component	<u>12</u>	- <u>13</u>		
PEG-20M	183	5.42	6.53	5.41	6.53
DEGS	180	4.89	6.37	4.90	6.37
Apiezon M*	170	4.72		4.67	
Reoplex 400	202	7.49	9.03	7.48	9.02

* On this column, a mixture of 5-decanolide and jasmine lactone gave only one dull peak.

また、Table VI には、4種の液相で成分13と jasmine lactone の TR を比較した結果を示した。成分13が jasmine lactone と、成分12が 5-decanolide とよく一致している。Fig. 12-I, II (68頁)より、成分13と jasmine lactone のマススペクトルは、強度に多少の差はあるが、全体の開裂パターンは同じであることがわかる。このようにして、成分13は jasmine lactone と比較のうえ、cis-7-decen-5-olide (jasmine lactone と同じ平面構造) と同定された。⁵⁴⁾ Heeringa らによれば、7-decen-5-olide の cis, trans

異性体は GLC で分れることが確認されており、trans-7-decen-5-olide と成分は α TR の比較は行なっていないが、 α TR が trans-configuration を有する可能性はまずないと考えられる。

後にも述べるが、酵母による δ -オキソ酸の生体活性オキソ酸への還元、そのラクトン化によって得られる δ -ラクトンは、7種の酵母でいずれも右旋性のものであったこと、Sp. odorus の生成する 4-decanolide が右旋性であることなどからすれば、成分は α cis-7-decen-5-olide も jasmine lactone (左旋性) とは逆の旋光性を有している可能性が大きい。

第 2 節 Sp. odorus の培養液中の 酸性代謝産物の分析

緒 言

Sp. odorus の生成するピーク様香氣成分は中性部に含まれ、主要な構成成分の構造が決定された。それらは、高級アルコール、芽香族アルデヒド、脂肪族 γ - および δ -ラクトンよりなっていた。これらの香氣成分との関連化合物（前駆体、分解産物 etc.）あるいは、揮発性有機酸の存在を明らかにするために、Sp. odorus の培養液に含まれる酸性物質の検討を行なった。

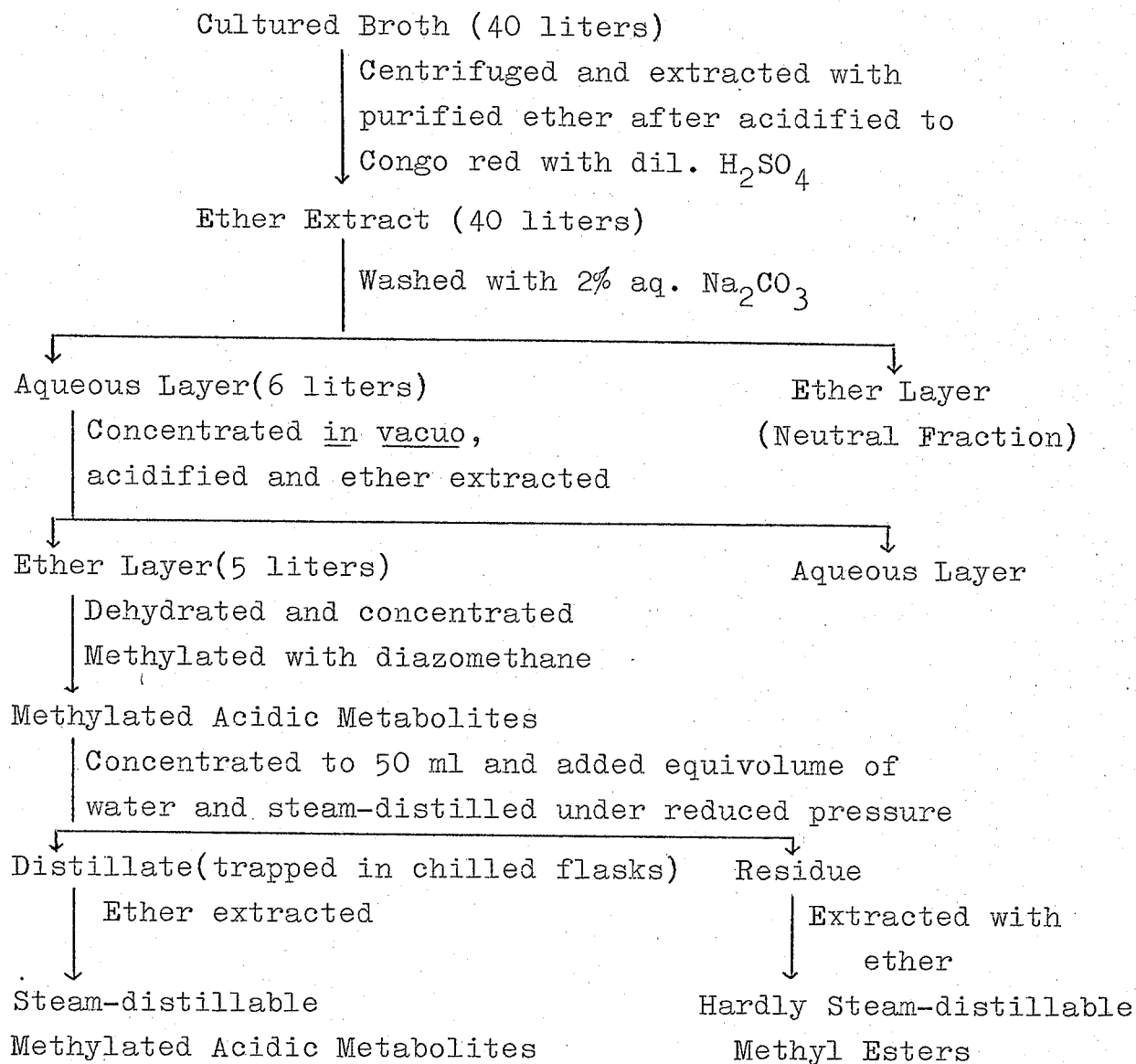
酵母の代謝産物としての有機酸は、アミノ酸代謝、高級アルコール生成などと複雑にみらんでおり、主として Sacch. cerevisiae ⁵⁵⁾ で広く研究されている。一方、Sp. odorus の代謝産物は、化学的にほとんど調べられていないこと、さらに中性香氣成分としてラクトンを生成するなど異色なものであることから、酸性物質で新しい化合物が見出されるのではないかと、いう少なからぬ興味もあった。

Sp. odorus の酸性代謝産物の同定に当っては、代

謝産物の量は少ないが、成分の数が多かったため各成分をメチルエステルに誘導し、GC-MS, GLC によって分析することにした。そこで、酸性部についても中性部と同様、汚染物質、培養液の滅菌処理によって生成する酸性物質と酵母の代謝産物と区別するため、ジアゾメタンのエーテル溶液、酵母未接種培地のエーテル抽出酸性部、培養液の酸性代謝産物画分の GLC パターンと比較した。ジアゾメタンエーテル溶液、エーテルなどに由来する成分として、低沸臭のメタノール、酢酸エチル、エタノールなどと思われる成分はともに検出されたが、それより高沸臭部では、培地由来の成分として昇温がスクリで 4R 10 分付近に比較的大きな成分がひとつ見られるのみであった。この成分は、Sp. odorus を培養した後にも Peak 2 として検出されることが分った。さらに高沸臭部では、実験上問題になるような夾雑物は検出されなかった。

(1) Sp. odorus の酸性代謝産物メチル エステルの調製

Sp. odorus の代謝産物のうち、弱酸性物質は GLC でほとんど検出されなかったため、以下に述べる酸



Scheme 4. Preparation Method of Methylated Acidic Metabolites of Sp. odorus for GC-MS and GLC Analysis.

性成分はすべてカルボン酸画分として扱った。 Sp. odorus は fructose-alanine 培地 40 l に培養してから、Scheme 4 のように酸性代謝産物の分画を行った。即ち、エーテル抽出した中酸性画分を 2% 炭酸ソーダ水溶液で洗浄し、酸性物質を水層に移し、減圧濃縮後 Congo-レッド 酸性にしてエーテル抽

出した。エーテル抽出液を脱水後 20 cm の Vigreux column を付して濃縮し、蒸溜精製したシアソキタンエーテル溶液を加えてメチル化を行ない、メチルエステルのエーテル溶液は 50 ml まで濃縮した後、等量の水を加えて減圧水蒸気蒸溜 (20 mm Hg, 2 時間) を行なって、溜出部と残溜部に分けた。溜出部は氷冷及びドライアイス・アセトン冷却バス中のフラスコに捕捉し、溜出部、残溜部ともにエーテル抽出し脱水濃縮した。溜出部は、分析用 GLC, GC-MS, GLC による成分の分取用試料とした。残溜部のエーテル抽出液は silicic acid column chromatography により脱色、部分的な分画を行なって構成メチルエステルの分析、分取用の試料とした。

以下には、溜出部の成分、残溜部の成分の同定について述べる。酸性部についても中性部の場合と同様、Sp. odorus 以外に 6 種 9 株の赤色酵母の代謝産物を GLC で Sp. odorus のそれと比較検討した。

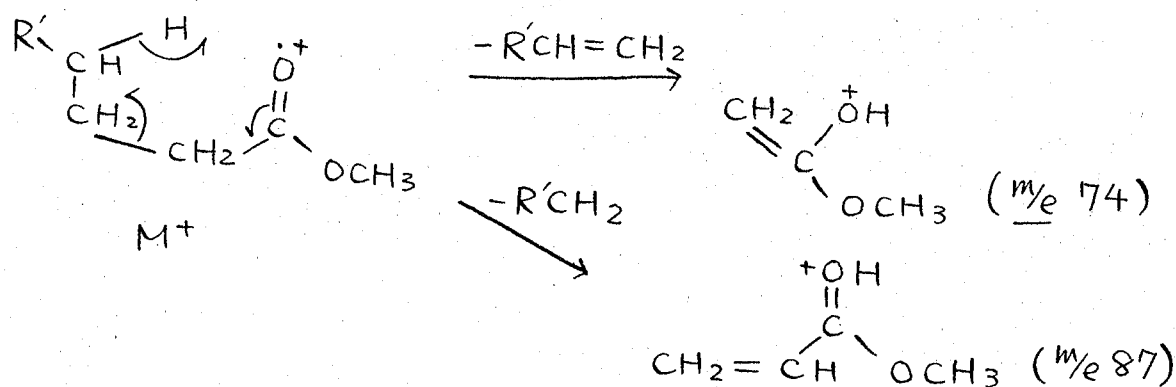
(2) 減圧水蒸気蒸溜溜出部の成分

(2)-1. 溜出成分の GLC 及び GC-MS 分析

Sp. odorus の酸性部は butyric acid 様の臭い加

強かったが、メチル化物の水蒸気蒸溜液は floral (フクナシヤニセアカシアを思わせるような) な芳香を有していた。溜出画分の GLC パターンは Fig. 14 に示した。各成分は中性部と同様、GC-MS 分析によって得られたマススペクトルの解析によって、その構造を推定し、市販または合成した標準化合物とマススペクトル、 R の比較によって同定した。

脂肪族カルボン酸メチルエステルのマススペクトル⁵⁶⁾では、 $R-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{OCH}_3$ から R^+ , $\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}\text{OCH}_3$ (m/e 59), O^+CH_3 (m/e 31) や McLafferty 転位とともなう m/e 74 や 87 のフラグメントイオンの生成が特徴的で



ある。それ故、分子イオン (M^+) が強く現われないもの (飽和の低級カルボン酸メチル) でも M^+-15 , M^+-31 , M^+-59 , M^+-73 などのフラグメントが検出されることから、 M^+ の決定は容易である。芳香族カルボン酸のメチルエステルは、 M^+ が大きくもること、芳香環に特徴的なフラグメント (例えば m/e 77, 91 など) の存在、 M^+-31 , M^+-59 などのフラグメントが構造

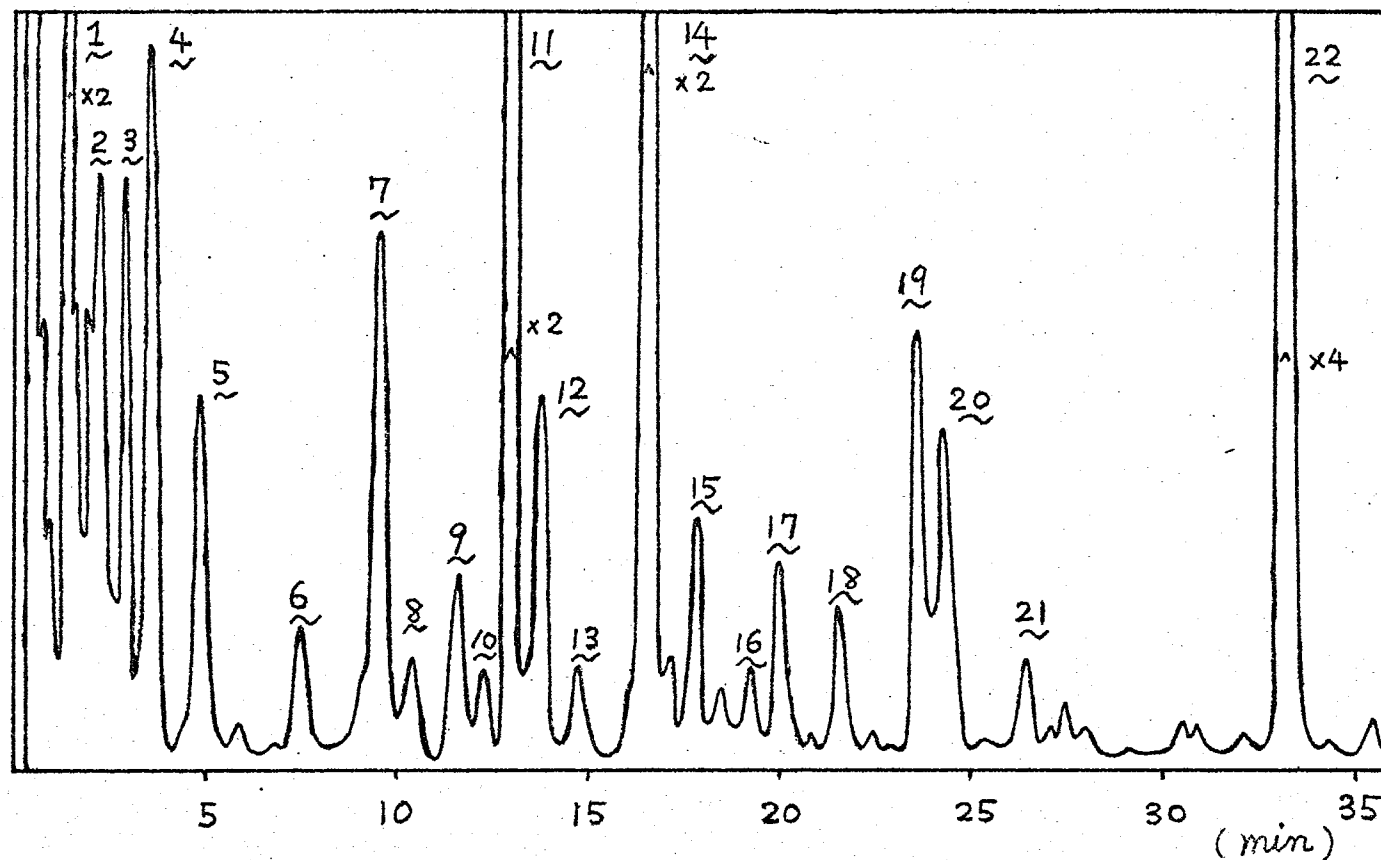


Fig. 14. Gas Chromatogram of Methyl Esters Contained in the Distillate.

The gas chromatogram was recorded on a Yanagimoto GCG-550FP equipped with dual columns containing 10% PEG-20M on Celite 545 AW DMCS. The temperature was programmed from 40 to 180°C at a rate of 4°C/min. Other conditions are shown in Fig. 1.

の推定に役立つ場合が少なくない。また、不飽和酸メチルエステルの同定は、マススペクトルによる二重結合位置の決定 (Rohwedder⁵⁷⁾、二重結合の幾何異性は GLC の保持時間と標準品 (*cis*, *trans* 両方との比較が望ましい) と比較することによって構造を決定することができる。

Table VII にはこのようにして同定あるいは推定した化合物の一覧を示した。*Sp. odorus* の酪性代謝産物の特徴として、低分子の不飽和カルボン酸、しかも奇数炭素よりなるものが多いことと挙げることができる。天然物として初めて見出された *trans*-2, *cis*-4-heptadienoic acid をはじめ、*cis*-4-heptenoic acid, 推定化合物ではあるが、nonadienoic acid (多分 4,6-unsaturated と思われる) などの特異的な成分である。低級な飽和脂肪酸は、酵母によるフーセル油生成の中間体とも考えられる。また、オキシ酸は生合成的にはピルビン酸からの由来が考えられるが、細胞内のオキシ酸プールでアミノ酸代謝中間体、あるいは高級アルコールの前駆体となり得るものである。成分 8 は valine の、成分 11 は isoleucine の、成分 12 は leucine の炭素骨格そのままの構造を有している。

成分 14 の同定及び合成については、別の項で述

Table VII. Results of GC-MS Analysis of Methyl Esters Contained in the Steam-distillate of Methylated Acidic Metabolites of Sp. odorus.

Conditions of GC-MS were as follows: GC, 10% PEG-20M on Celite 545 AW DMCS, 3mm i.d. x 2m, carrier gas He 1.8kg/cm², column temp. 40→220°C at a rate of 5°C/min, injection port 250°C; MS, see the text.

Peak No. in Fig. 14	Characterized compound ^{a)}	t _R ^{b)} (min)	Mass spectral peaks and abundance(%), M ⁺ / m/e ^{c)}
1.	Impurity(ethyl acetate)	1.6	88(3)/73(5), 70(7), 61(12), 45(17), 43(100)
2.	Isobutyric	2.1	102(7)/83(13), 71(24), 59(22), 43(100), 41(32), 27(27)
3.	<u>n</u> -Butyric	2.9	102(2)/87(19), 74(65), 71(51), 59(26), 43(100), 41(35)
4.	Isovaleric	3.5	116(2)/101(11), 85(24), 74(100), 59(65), 57(38), 45(90), 43(84), 41(65)
5.	<u>n</u> -Valeric	4.8	116(1)/101(4), 87(29), 85(30), 74(100), 57(42), 43(58), 41(65)
6.	<u>cis</u> -2-Pentenoic [*]	7.4	114/99, 87, 83, 74, 59, 55
7.	Unknown	9.5	130(?)/102, 87, 57, 55, 43
8.	2-Oxo-3-methyl- butyric	10.3	130(2)/115(1), 87(7), 71(40), 43(100), 41(43), 39(16)
9.	<u>cis</u> -4-Heptenoic	11.7	142(7)/110(25), 82(26), 74(100), 71(11), 69(44), 68(49), 55(53), 43(72), 41(94), 39(44)
10.	<u>trans</u> -3-Heptenoic	12.3	142(5)/110(23), 83(24), 74(80), 71(26), 68(36), 59(57), 55(71), 43(41), 41(100)
11.	2-Oxo-3-methyl- pentanoic	13.0	144(2)/85(29), 57(100), 41(63), 39(14), 29(71)

Table VII (continued).

12. 2-Oxo-4-methyl- pentanoic	13.7	144(3)/85(54), 57(100), 43(39), 41(66), 29(54)
13. Unknown	14.6	?/129, 124, 96, 85, 74, 57, 55, 53
14. <u>trans</u> -2, <u>cis</u> -4- Heptadienoic	16.6	140(29)/125(6), 111(91), 109(31), 81(100), 79(51), 77(17), 53(51) 41(64), 39(73)
15. Isomer of 14 [*]	17.9	140(27)/125(5), 111(100), 109(33), 85(33), 81(92), 79(51), 53(61), 41(67), 39(75)
16. Succinic ^{**}	19.3	146(0)/115(78), 114(25), 87(20), 59(69), 55(100)
17. Benzoic	20.0	136(31)/105(100), 77(88), 51(44), 41(22)
18. Nonadienoic [*]	21.6	168(19)/140(6), 137(5), 109(22), 95(48), 94(68), 79(100), 67(52), 55(36), 41(67)
19. Phenylacetic	23.7	150(23)/92(9), 91(100), 65(17), 59(10), 39(17)
20. Unknown	24.2	186(0)/155(32), 127(100), 95(84), 67(87), 59(69), 53(47), 41(86)
21. Unknown	26.3	?/125, 103, 83, 74, 71, 61, 59, 55, 43
22. Nonanedioic ^{**}	33.1	216(0)/185(15), 152(28), 143(22), 111(33), 83(52), 74(97), 59(80), 55(100), 43(67), 41(75)

a) The acid moiety of methyl ester is shown.

b) See the chromatogram of Fig. 14.

c) Molecular ion peaks, the five strongest peaks and characteristic peaks are listed.

* Authentic compounds are not available.

** These compounds were also found in the residue of steam-distillation.

べる。芳香族カルボン酸としては、17 の benzoic acid, 19 の phenylacetic acid が検出され、メチルエステル画分の香りへの寄与が大きいと思われた。

成分 16, 22 の二塩基酸メチルエステルは、水蒸気蒸溜残溜部にも含まれており、特に成分 22 はそのほとんどが残溜部に見出されたので、これらの成分の同定については、残溜部の成分の項で述べる。

(2)-2. trans-2, cis-4-Heptadienoic acid methyl ester の同定

Glucose-asparagine 培養液 40 l から調製した酸性代謝産物のメチルエステル水蒸気蒸溜々出部を分取 GLC にかけ、Peak 14 に相当する成分をほぼ純粋に 15 mg 得た。このメチルエステルの分子量はマススペクトル、 m/e 125 ($M^+ - CH_3$), 109 ($M^+ - OCH_3$), 81 ($M^+ - COOCH_3$) などのフラグメントイオンの存在から $M^+ 140$ と考えられた。さらに接触還元によって分子量が 4 増加し、methyl heptanoate (M.W. 144) に変化することから、もとめ化合物は methyl heptadienoate のひとつであることが分った。単離した成分 14 の IR スペクトルでは $\nu_{max} \text{ cm}^{-1}$: 1720 ($\alpha\beta$ -不飽和酸メチルエステル), 1640, 1605 (共軛不飽和結合),

紫外線吸収 (UV) スペクトルに於て $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 263 nm (2,4-dienoic acid あるいはそのエステル) が特徴的な吸収であった。Fig. 15 に示したように、核磁気共鳴 (NMR) スペクトルによつて CH_3- , $=\text{C}-\text{CH}_2-\text{Me}$, $-\text{COO}-\text{CH}_3$ 及び 4 のオレフィン性プロトン (共轭した) の存在が示唆された。マスマススペクトルでは m/e 111 (91%, $\text{M}^+-\text{CH}_2\text{CH}_3$) のフラグメントが特異なもので、これは末端のイタール基がとれて残りの部分が芳香族性⁵⁷⁾を帯びた *pyrilium ion* を形成して安定化したフラグメントと考えられた。この種の開裂は *methyl sorbate* (*methyl trans-2, trans-4-hexadienoate*) でも同様におこる。成分はマスマススペクトルと、妥当と思われる開裂様式は Fig. 16 に示した。これらのスペクトル解析結果は、成分は *methyl 2,4-heptadienoate* であることと意味している。

⁵⁸⁾二重結合の幾何学性については、Crombie により *methyl 2,4-decadienoate* の 4 種類の幾何異性体が合成され IR スペクトルが報告されており、その結果と成分^{59, 60)}の IR スペクトルの比較、さらに *methyl hexadienoate* の 4 つの幾何異性体とスペクトルデータの比較によつて *trans-2, cis-4-configuration* と推定された。Crombie の報告では *methyl trans-2, cis-4-decadienoate* に、1305, 1278, 868 cm^{-1} の強い吸収が

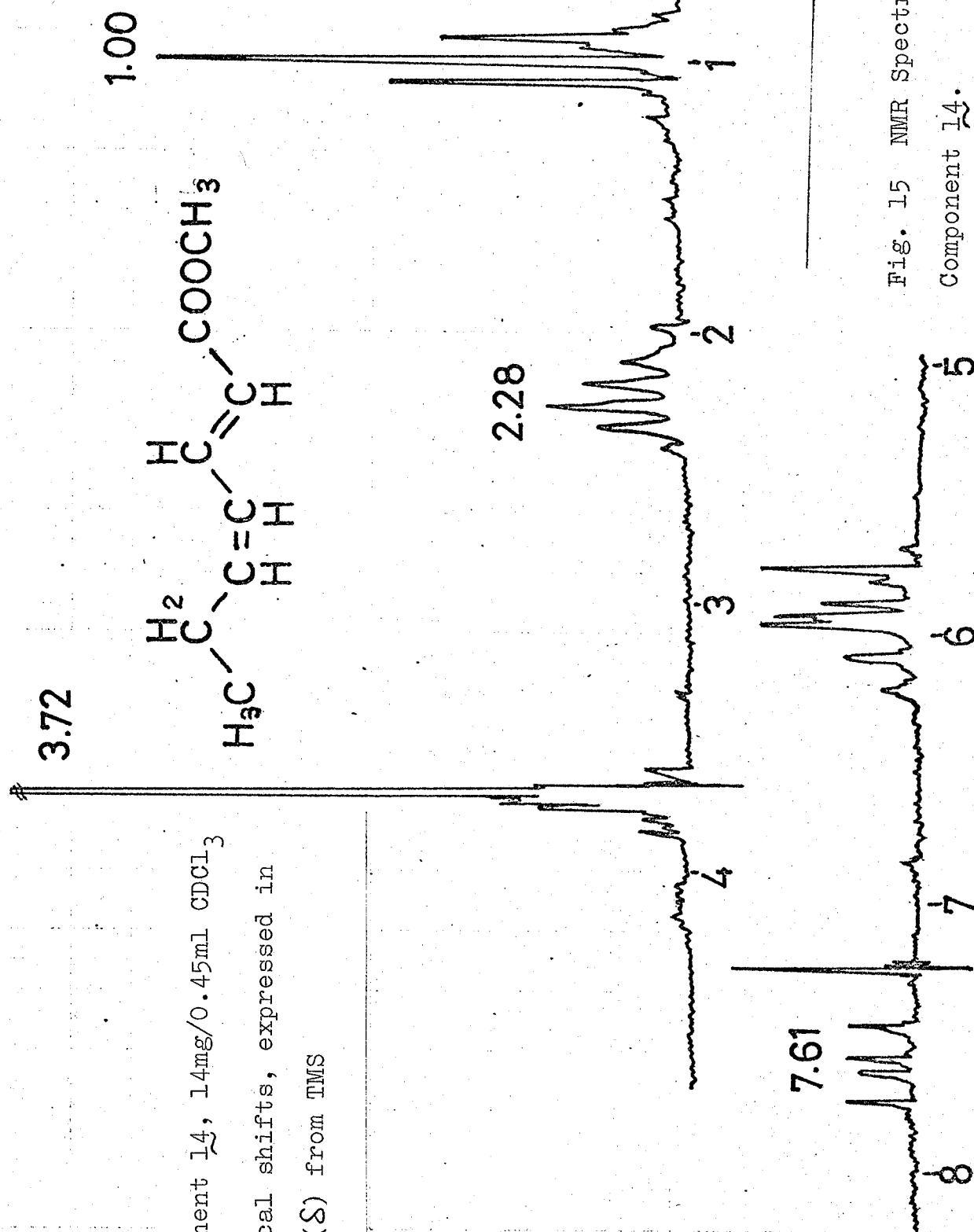


Fig. 15 NMR Spectrum of Isolated

Component 14.

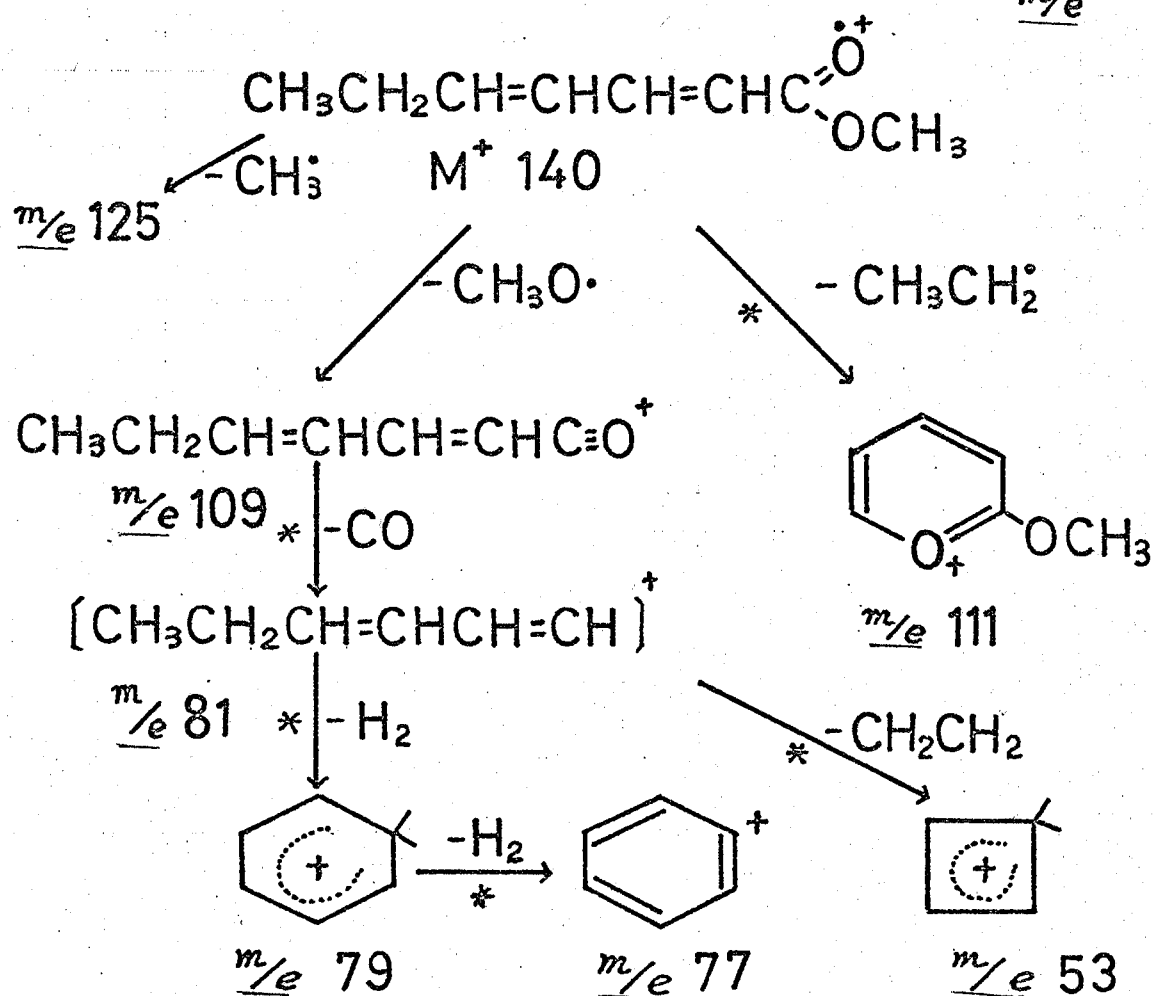
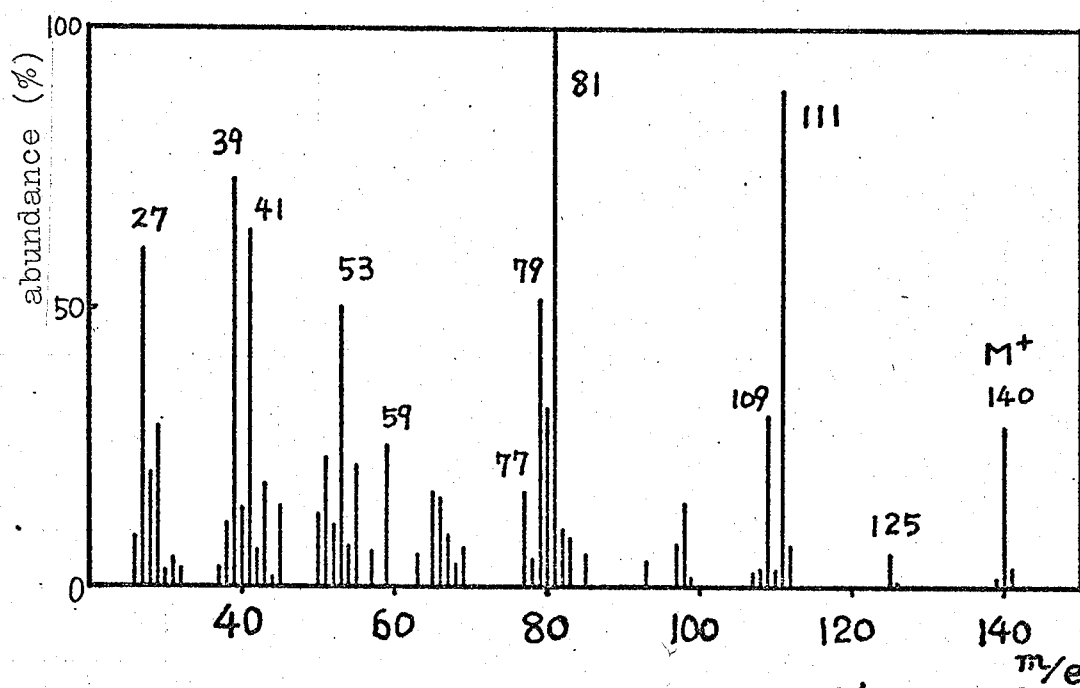


Fig. 16. Mass Spectrum of Component 14 and its Plausible Fragmentation Pattern (GC-MS).

観察され、しかもこれらの吸収は、他の3つの幾何異性体とは共通しないものである。合成品と比較して示した14のIRスペクトル Fig. 17 から分るように、上記の波数に吸収が現われている。この推測をもとに、NMR スペクトルともう一度考えてみると、最低磁場の4本線様の吸収は methyl trans-2, cis-4-heptadienoate の β 水素に帰属され、 α 水素と 15 Hz, γ 水素と 10.5 Hz で共鳴していると考えられるが妥当である。methyl 2,4-hexadienoate の 4 種類の幾何異性体の NMR スペクトルについては Elbridge および Ralph⁶¹⁾ の報告がある。

このように、主として各種スペクトルによる構造解析により、成分14の構造は methyl trans-2, cis-4-heptadienoate と考えたが、この化合物が文献未記載であったため、最終的に推定化合物の合成品と比較することによって、14が推定構造の通りであることを確認した。

成分14の単離及び分析データ

(i) 成分14の単離

酸性部×チルエステルの水蒸気蒸溜々出画分を分取GLCにかけ、成分14を単離した。分取GLCの操作条件は column 20% PEG-20M, 6.4 mm i.d. x 1.5 m,

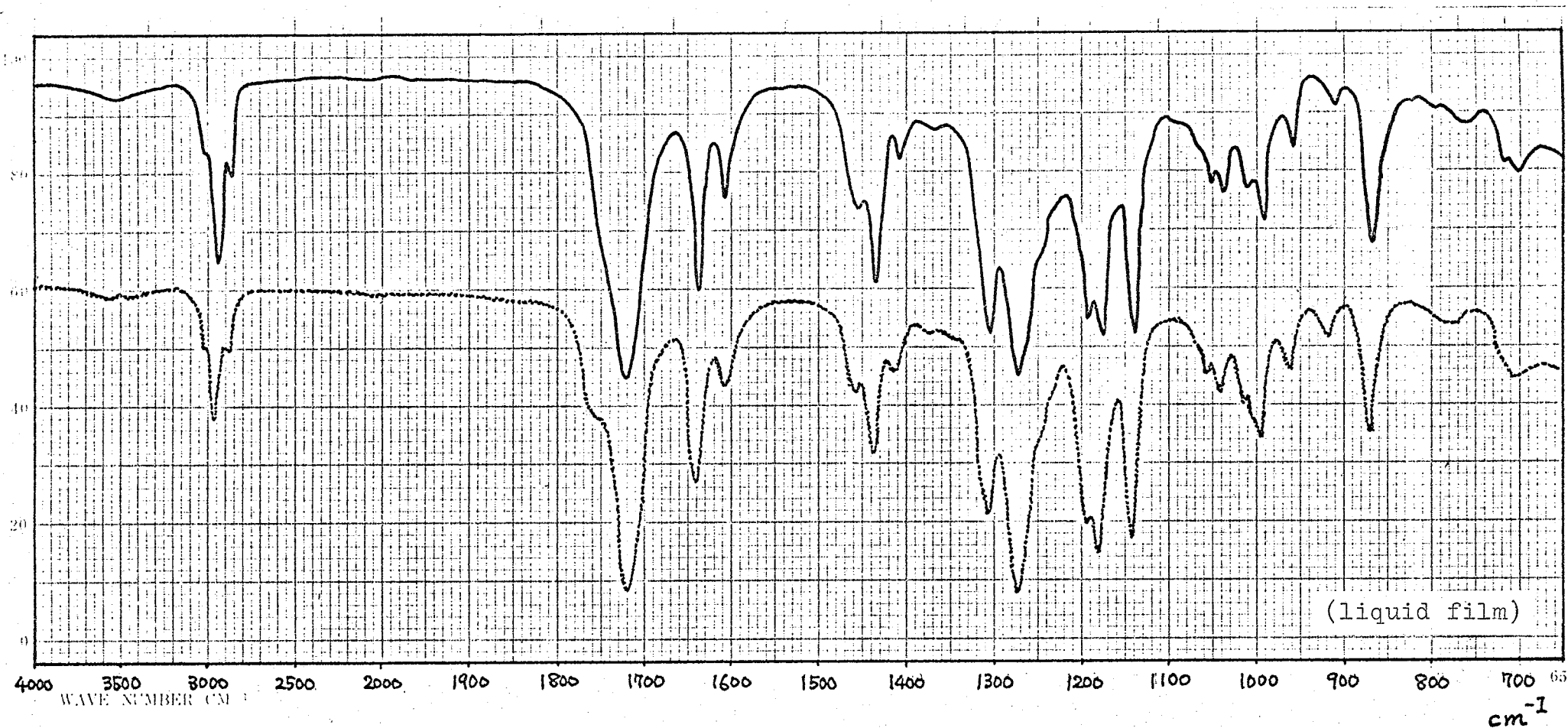


Fig. 17. Infrared Spectra of Isolated Component 14 and Synthesized Methyl trans-2, cis-4-Heptadienoate. — : isolated, ... : synthesized

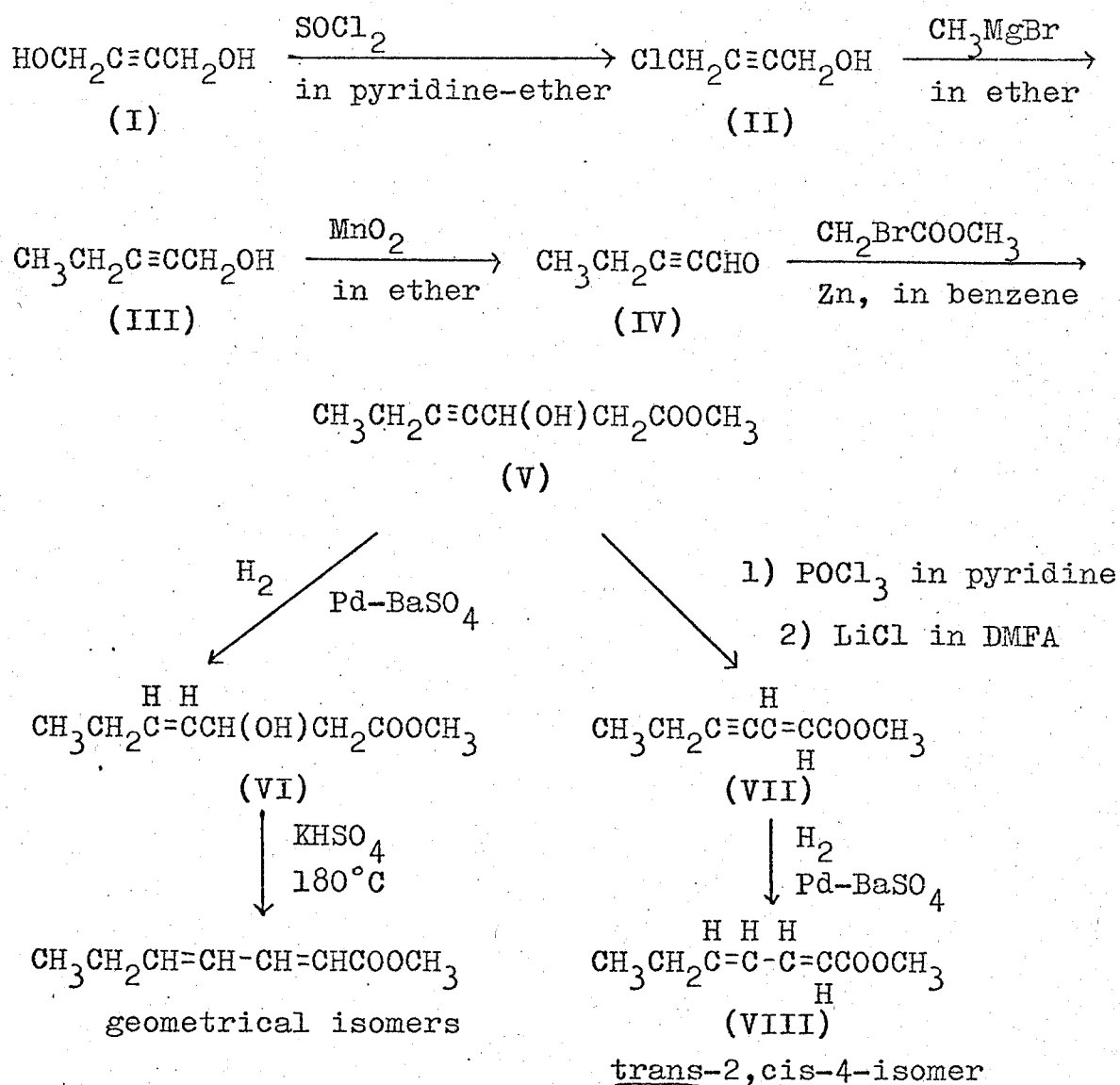
carrier gas He 35 ml/min, injection port, column, detector の 温度 は それ それ 240, 125, 200°C で 行 な
う。T=。

(ii) 成分 14 の スペクトル データ

NMR スペクトル は Fig. 15 (86頁), マス スペクトル は Fig. 16 (87頁), IR スペクトル は Fig. 17 (89頁) に 示 (T= 通 り) で あ る。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 263 (4.312). NMR $\delta_{\text{Me}_4\text{Si}}^{\text{CDCl}_3}$: 1.00 (3H, triplet, $-\text{CH}_3$), 3.28 (2H, broad quintet, $=\text{CHCH}_2-\text{Me}$), 3.72 (3H, singlet, $-\text{COOCH}_3$), ca. 6 (3H, multiplet, $=\text{CH}-\alpha, \gamma, \delta$), 7.61 (1H, quartet, $=\text{CH}-\beta$, $J_{\alpha\beta} = 15 \text{ Hz}$, $J_{\beta\gamma} = 10.5 \text{ Hz}$).
水素添加物の マス スペクトル m/e (relative abundance, %): 144(1)/113(11), 101(12), 87(35), 74(100), 59(28), 43(72), t_R: PEG-20M column, 80°C, 5.03 min (標準の methyl heptanoate, 5.00 min)。

(2) - 3. Methyl trans-2, cis-4-heptadienoate の 合 成

立体配置の はっきりしない 2,4-heptadienoic acid (多分、trans と主とした混合物と思われる) は、Kuhn および Grundmann⁶²⁾ により合成されている。立体特



Scheme 5. Synthetic Route of Methyl trans-2,cis-4-Heptadienoate.

異的な methyl trans-2,cis-4-heptadienoate (VIII) の合成は、Scheme 5 に示したように市販の 2-butyn-1,4-diol を出発原料とした。

(63)

Thomas および Warburton が 2-butene-1,4-diol から 2-pentenal を合成した方法を応用して 2-pentynal を

調製⁶²⁾し、Reformatskii 反応⁵²⁾を行なうと methyl 3-hydroxy-4-hexynoate (V) を得た。5% Pd/BaSO₄, quinoline を用いた接触還元により、V の三重結合を選択的に cis-二重結合に導いて methyl 3-hydroxy-cis-4-heptenoate (VI) を得た。ところが、Kuhn らは類似化合物の脱水を、硫酸水素カリと混合し加熱処理により実施しているにもかかわらず、VI は 180°C 以下では脱水がほとんど進行せず、さらに高温で処理すると脱水物の収率は低く、しかも幾何異性体の混合物しか得られなかった。そこで、V にピリジン中 phosphorus oxychloride⁶⁴⁾ と作用させると、生成物は 83% の methyl 3-chloro-4-heptynoate と methyl trans-2-hepten-4-ynoate (VII) が少量生成した。つぎに、この粗反応生成物を lithium chloride と混合し、DMFA 中で加熱して脱塩化水素反応⁶⁵⁾を行ない二重結合を導入した。このようにして得た VII の二重結合は 97% が trans であった。VII の三重結合を V → VI の場合と同様、選択的に cis-二重結合に還元し目的物を得た。最終生成物は分取 GLC によって精製した。合成品と Sp. odorus の代謝産物 α メチルエステル (成分 14) とは、IR, UV, NMR, マススペクトル, IR がすべてよく一致した。合成品と天然物の IR スペクトルは Fig. 17 (89頁) に、4 種類の液相による GLC の保持

Table VIII. Retention Times of Isolated Component 14 and Synthesized Methyl trans-2,cis-4-Heptadienoate.

Retention times were measured by an analytical GLC equipped with dual columns of 1.5m x 3mm i.d. Carrier gas N₂ 22.5ml/min. Injection port, 250°C.

Column	Temp. (°C)	Retention Times (min)	
		Synthesized	Isolated
PEG-20M 10% Celite 545 AW DMCS	105	4.73	4.73
DEGS 10% Chromosorb W AW	100	6.10	6.08
Reoplex 400 20% C-22	110	12.06	12.10
Silicone DC QF-1 1.5% Chromosorb W AW	75	3.05	3.10

時間 (tr) の比較は Table VIII に示した。また、合成中間体は最終生成物の構造が確かなものであるためにも (特に幾何学性に注意して) IR, NMR, マススペクトルによる確認を行った。

成分 14 はこのようにして methyl trans-2,cis-4-heptadienoate、従って、Sp. odorus の代謝産物として、trans-2,cis-4-heptadienoic acid が同定された。

合成実験

(a). 2-Pentynal (IV). 市販の 2-butyne-1,4-diol (I) ⁶⁶⁾ に Colonge および Poilane の方法に従って thionyl chloride を作用させて 4-chloro-2-butyne-1-ol (II) を得、methylmagnesium bromide との縮合によって 2-pentynol (III) を調製した。III を活性二酸化マンガンによって酸化し、⁶⁷⁾ 2-pentynal (IV) を得た。

(b). Methyl 3-hydroxy-4-heptynoate (V). Methyl bromoacetate 7.8 g, zinc 3.3 g, IV 3.6 g と 30 ml の乾燥ベンゼンと混合し、90 分間加熱還流し、生成した複合体を 2N- H_2SO_4 で分解し、生成物をベンゼンでよく抽出、有機層を炭酸ソーダ溶液、ついで飽和食塩水で洗淨、無水芒硝で脱水後減圧蒸留した。V: 油浴 $130^\circ C$ で 11 mm Hg 溜出物 2.6 g、約 90% の純度 (GLC)。IR $\nu_{max} \text{ cm}^{-1}$: 3500, 2980, 2220, 1735, 1440, 1282, 1165, 1055。MS m/e : 156 (2)/155 (5), 141 (24), 125 (5), 113 (7), 97 (12), 83 (89), 82 (53), 74 (38), 55 (68), 53 (47), 43 (100), 39 (61), 29 (85)。

(c) Methyl 3-hydroxy-cis-4-heptenoate (VI). ヌタ 1-12 (90%) 50 ml 中に 350 mg の V を加え、不溶

性化した触媒集 (200 mg の 5% Pd/BaSO₄ と 100 mg の quinoline) によって、常圧で接触還元した。混合液は水素中で 5 分間激しく振盪し、V と等モルの水素が吸収されたところで反応を止め、反応液は 200 ml のエーテルで稀釈し、稀硫酸、炭酸ソーダ水溶液、飽和食塩水で順に洗浄、脱水後エーテルを溜去して、methyl 3-hydroxy-cis-4-heptenoate (VI) を得た。VI: 357 mg. IR $\nu_{\max}$: 3450, 2950, 1735, 1655, 1430, 1170, 1045, 990, 730 cm⁻¹. MS m/e : 158 (1) / 141 (5), 140 (5), 129 (60), 97 (30), 85 (56), 81 (35), 74 (28), 57 (46), 55 (70), 43 (100), 41 (69).

(d) Methyl trans-2-hepten-4-ynoate (VII). 500 mg の V を氷冷した phosphorus oxychloride (2g) とピリジン (5 ml) の混合物中に添加し、室温で 30 分間保持、その後反応液を氷片の上に注ぎ、エーテル抽出した。エーテル層は、稀硫酸、炭酸ソーダ水溶液、食塩水で洗浄、無水芒硝で脱水した。溶媒を除去した粗生成物は 83% の methyl 3-chloro-4-heptynoate と 13.6% の VII、その他よりなる。Methyl 3-chloro-4-heptynoate のマススペクトル m/e : 174 (2) / 173 (4), 159 (7), 146 (39), 139 (11), 111 (26), 95 (57), 79 (100), 77 (55), 65 (58), 59 (54), 39 (65)。粗反応生成物を

そのまゝ、lithium chloride 1g を溶解した DMFA 20 ml 中に加え、 100°C で 2 時間保持、反応液は水で稀釈し、エーテル抽出した。エーテル抽出液は飽和食塩水で洗浄後、脱水、蒸留した。VII: 11 mmHg / 浴温 $85\sim 90^{\circ}\text{C}$ の溜出部。245 mg. IR $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 2960, 2200, 1720, 1620, 1435, 1305, 1160, 963. NMR $\delta_{\text{Me}_4\text{Si}}^{\text{CDCl}_3}$: 1.15 (3H, triplet, $-\text{CH}_3$), 2.34 (2H, octet, $-\text{CH}_2-\text{Me}$), 3.73 (3H, singlet, $-\text{COOCH}_3$), 6.14 (1H, doublet, $\text{COCH}=\alpha$, $J_{\alpha\beta} = 16 \text{ Hz}$), 6.78 (1H, sextet, $\text{C}=\text{CH}-\beta$, $J_{\beta\alpha} = 16 \text{ Hz}$, $J_{\beta\epsilon} = 2 \text{ Hz}$). MS m/e : 138 (63)/123 (30), 107 (71), 95 (42), 79 (97), 77 (100), 67 (58), 63 (45), 53 (44), 51 (72), 39 (66).

(e) Methyl trans-2, cis-4-heptadienoate (VIII). V の VI への変えと同様に VII, 180 mg を cis = 重結合まで接触還元した。還元生成物は PEG-20M のカラムを付けた分取用 GLC で分取精製した。分取条件: carrier gas He 40 ml/min, injection port 250°C , カラムの温度は $100 \rightarrow 180^{\circ}\text{C}$, 約 $6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温, detector (TCD) 200°C , collector 135°C 。合成した VIII の IR スペクトルは Fig. 17 (89頁) に既に示した。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}} \text{ nm} (\log \epsilon)$: 263 (4.288), MS m/e : 140 (29)/125 (7), 111 (92), 109 (29), 81 (100), 79 (49),

77(18), 59(22), 53(49), 41(52), 39(77). VIII の NMR スペクトルは、単離した成分 14 のものと完全に一致した。また 4 種類の液相を使った GLC によって、成分 14 と合成品の 対 を比較した結果 (Table VIII, 93 頁) も互いによく一致した。

(3) 減圧水蒸気蒸溜残溜部の成分

Sp. odorus の酸性代謝産物をメチルエステルとし、水蒸気蒸溜で溜出されるものと、溜出されにくい画分に分け、それぞれエーテル溶液として得た。溜出画分の構成メチルエステルについては前項で、低級カルボン酸、 α -オキソ酸、特異な成分として奇数炭素の不飽和カルボン酸などが同定された。

ここでは、酸性成分のメチルエステルで減圧水蒸気蒸溜によって溜出されにくい成分の同定について述べる。水蒸気蒸溜されにくい成分は、単一のエステル基の他にも官能基を有するような化合物(ジエステルも含まれる)が予想される。減圧水蒸気蒸溜後、蒸溜フラスコに残った液は油滴を含み、カロチノイド系の色素によると思われる桃赤色を呈していた。エーテル抽出液を脱水濃縮後、hexane 中の silicic acid column (3 cm i. d. x 7 cm) にマウントし、200 ml

の hexane/ether (95:5 v/v) で洗淨、つづいて hexane/ether (70:30) で成分の溶出を行ない、150ml, 200ml の二画分を得。それぞれを Fraction I, Fraction II とした。Fraction II のガスクロマトグラムを Fig. 18 に示した。Fig. 18 の最大ピークである成分 22 は、さらに多くの部分が Fraction I に含まれており、他の成分が少なかったため、成分 22 の単離のために Fraction I を使用、Fraction II は各成分の GC-MS 分析用の試料とした。

残留部には、succinic acid, muconic acid, azelaic acid (nonanedioic acid), undecanedioic acid のような二塩基酸のほか、 β -phenyllactic (2-hydroxy-3-phenylpropionic) acid, 脱塩水の汚染物質である DBP に由来すると考えられる phthalic acid, *n*-butyl hydrogen phthalate がそれぞれのメチルエステルとして検出同定された。

長鎖の二塩基酸は、炭化水素資化性菌(細菌、酵母)による *n*-alkane の ω, ω' 酸化によって生成することが知られているが、糖と炭素源とする培地にこの種の二塩基酸が蓄積されることは、*Sp. odorans* に於て初めて見出されたものである。炭素鎖の由来についても興味ある問題を含んでいるが、詳しくは考察の項で述べる。

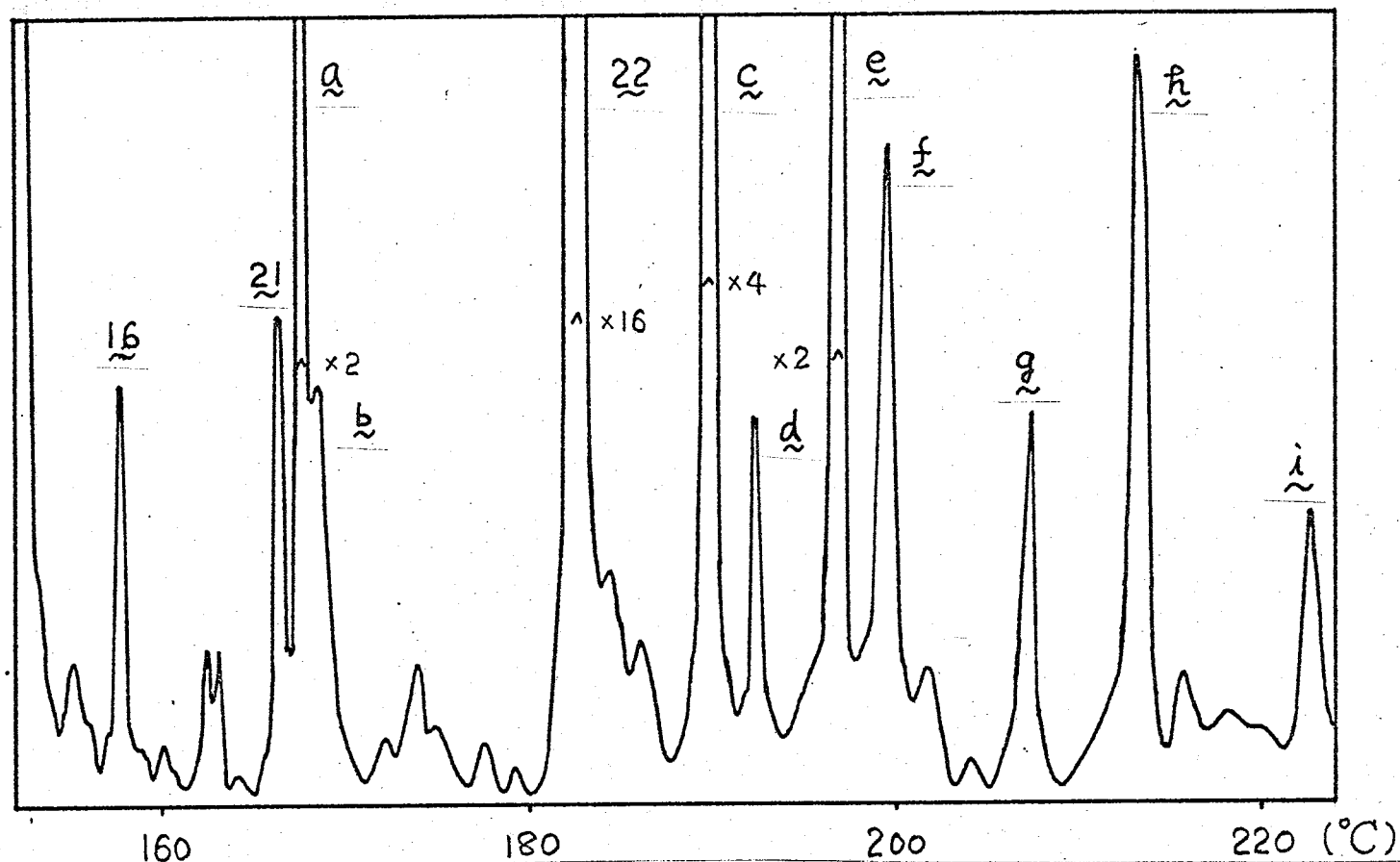


Fig. 18. Gas Chromatogram of Fraction II.

The gas chromatogram of Fraction II was recorded by an analytical GLC with PEG-20M columns. The temperature was programmed from 150 to 240°C at a rate of 4°C/min. Details are shown in Fig. 14. Components found only in this fraction were alphabetically named. 16, dimethyl succinate; 21, a, unknown; b, dimethyl muconate; 22, dimethyl azelate; c, methyl β-phenyllactate; d, dimethyl phthalate; e, dimethyl undecanedioate; f, *cis*-6-dodecen-4-olide; g, methyl n-butyl phthalate; h, i, unknown.

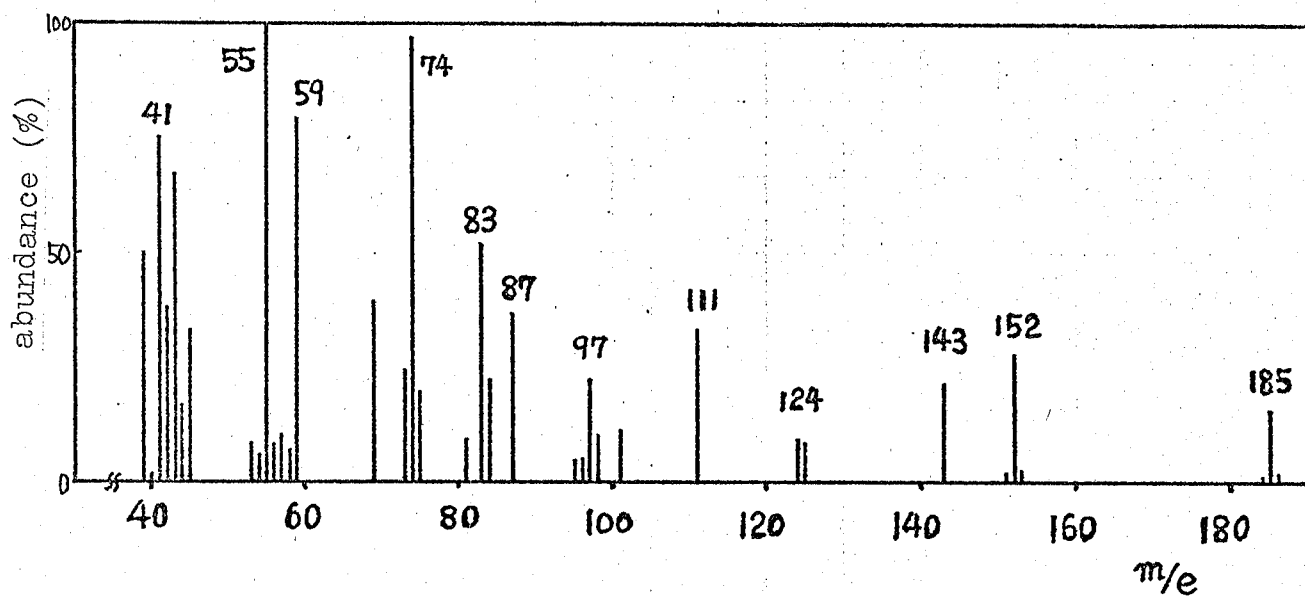


Fig. 19. Mass Spectrum of Component 22.

The spectrum was taken by GC-MS and no peaks were found in the region above m/e 190.

(3) - 1. Dimethyl azelate の同定

水蒸気蒸溜々出部にも一部移行した成分 22 は、Fraction I を分取 GLC に付して単離した。分取は 10% PEG-20M 6.4 mm i.d. x 1.5 m のカラムを使用、injection port, column, detector の温度はそれぞれ、270, 200, 250°C, carrier gas, He 40 ml/min で実施した。22 のマススペクトルは Fig. 19 に示した。 m/e 74, 87 の存在、単離した 22 の IR スペクトル

から、単純な脂肪族カルボン酸αメチルエステルと
 考えられた。質量最大のフラグメントとして m/e
 185 ($M^+ - OCH_3$)、さらに 143 ($M^+ - CH_2COOCH_3$) の存在
 から、成分 22 の分子量は 216 であることがわかつ
 た。また m/e 143 $\rightarrow$ 111 $\rightarrow$ 83 $\rightarrow$ 55 などの開裂も観
 察された。水蒸気蒸留され難いこと、分子量のわ
 りに GLC で溶出されにくいことから、一つのメチル
 エステル基以外に官能基が含まれていると考えられ
 、分子量から C₁₁ のオキシ酸メチルエステル、C₉ の
 ニ塩基酸ジメチルエステルがそれに該当する。マ
 ススペクトルで脱水ピークが存在せず、IR スペク
 トルでも -OH の吸収が見られなかったことから
 、オキシ酸ではないことが分った。Fig. 20 に示
 したように、成分 22 の NMR スペクトルの各吸収
 は以下のように帰属された。 $\delta_{Me_4Si}^{CDCl_3}$: 1.28 (6H,
 broad singlet, $-CH_2CH_2CH_2-$), 1.57 (4H, multiplet,
 $-CH_2-$ x 2), 2.25 (4H, triplet, $-COCH_2-$ x 2),
 3.63 (6H, singlet, $-COOCH_3$ x 2)。NMR スペク
 トルからも 22 が dimethyl azelate であることが支
 持される。さらに、単離した 22 の IR スペクト
 ルを標準の dimethyl azelate のそれと比較したとこ
 ろ、完全に一致した (Fig. 21)。また IR も標
 準品と同じであったことより、成分 22 を dimethyl

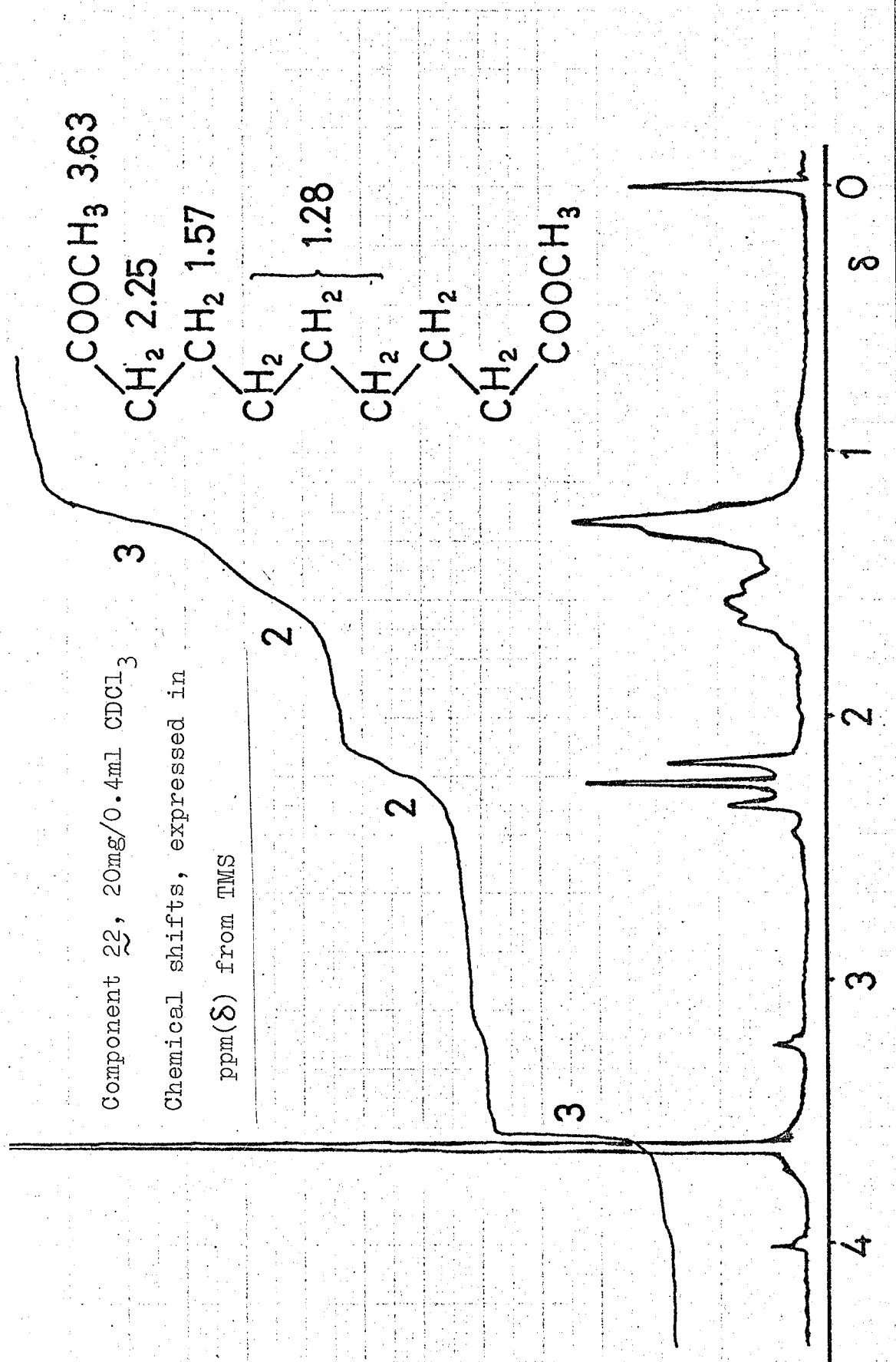


Fig. 20. NMR Spectrum of Isolated Component 22.

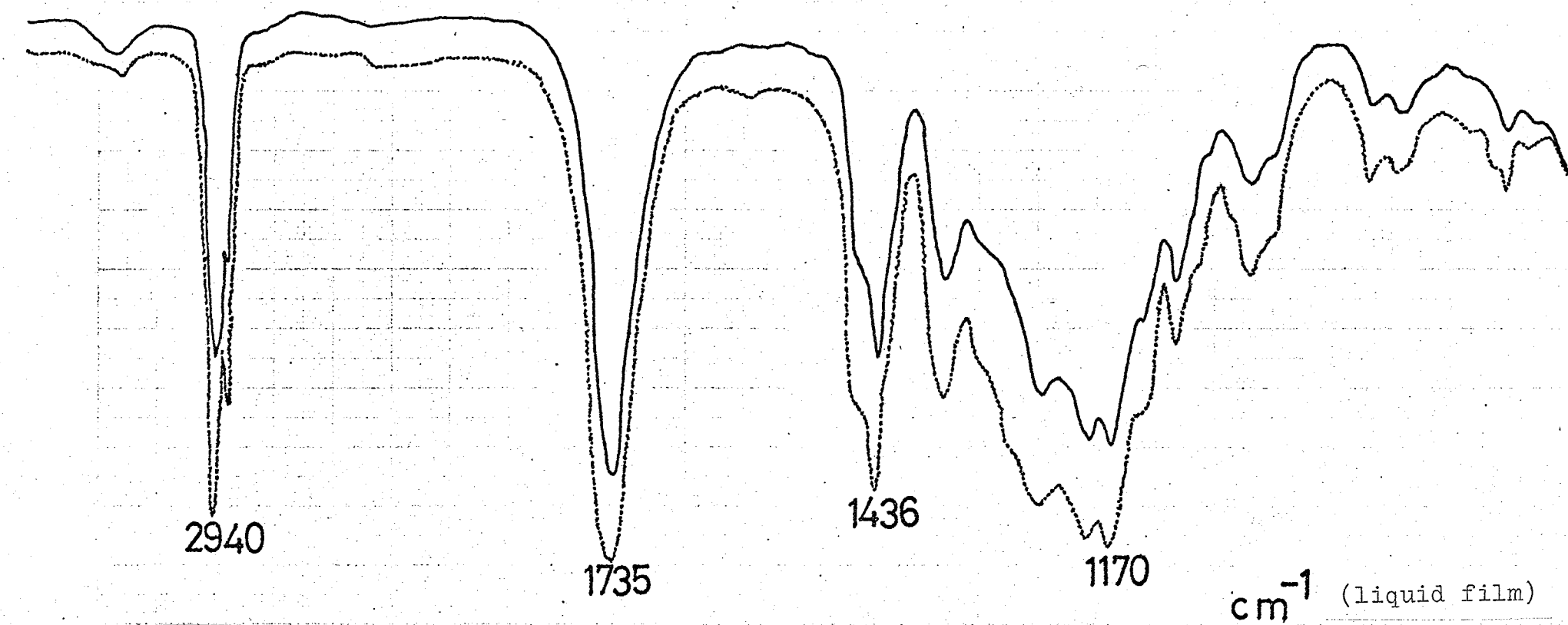


Fig. 21. Infrared Spectra of Isolated Component 22 and Authentic Dimethyl Azelate.

———, isolated; ······, synthesized

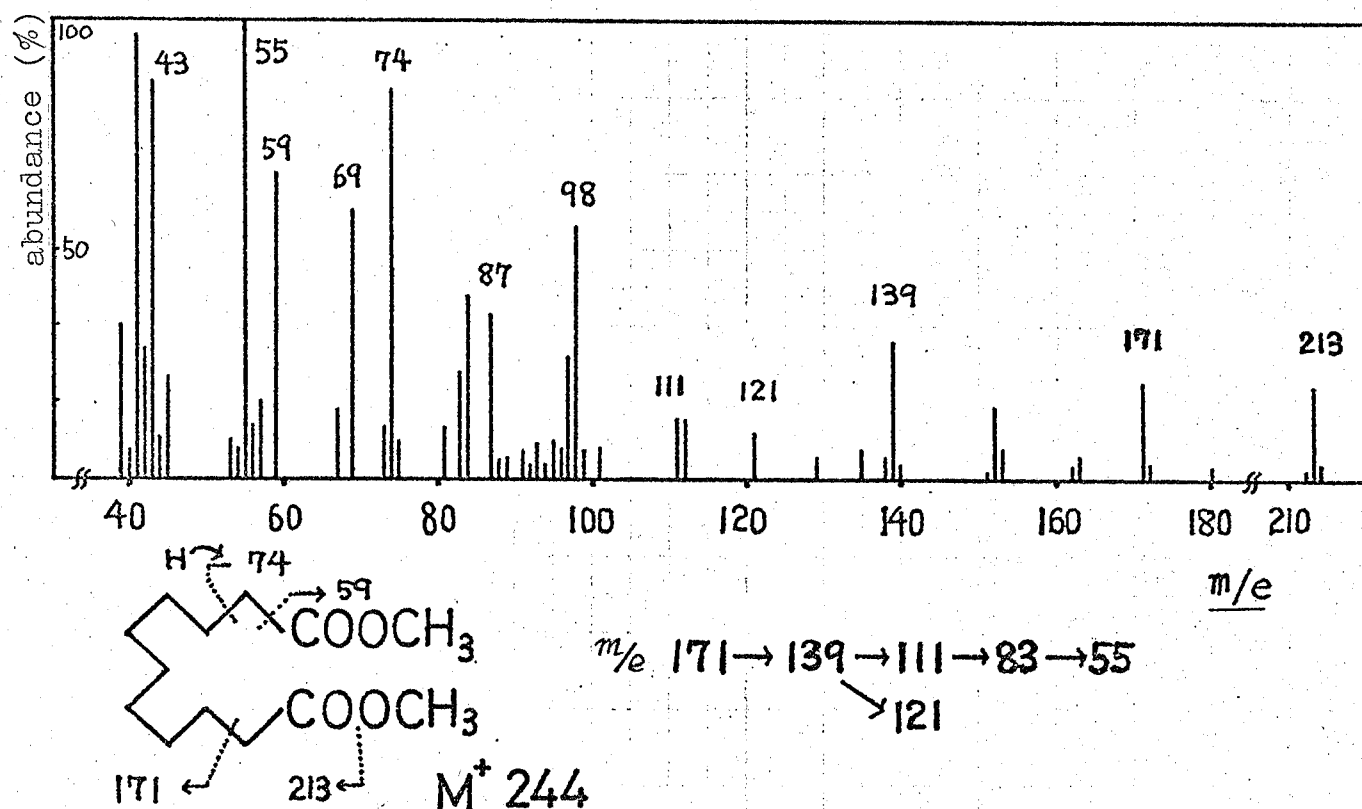


Fig. 22. Mass Spectrum of Component e.

The mass spectrum was taken by GC-MS and no peaks were found in the region above m/e 220.

azelate (dimethyl nonanedioate) と同定した。

(3)-2. Dimethyl undecanedioate の同定

成分 e は単離できなかった。しかし Fig. 22 に示したように、マススペクトルから M^+ 244 は検出されないが m/e 213 ($M^+ - OCH_3$), 171 ($M^+ - CH_2COOCH_3$), が存在していること、 m/e 171 のフラグメントの崩

裂が dimethyl azelate から m/e 143 の開裂と類似していることから、成分 E は dimethyl undecanedioate であろうと推定された。標準物質と IR と比較したところ、PEG-20M column, 190°C , carrier gas N_2 22.5 ml/min, 成分 E, 6.65 min, 標準の dimethyl undecanedioate, 6.65 min とよく一致することから、E は dimethyl undecanedioate と同定した。

Sp. odorus の培養液中に C_9 , C_{11} の二塩基酸が生成していることが明らかになり、このため、 C_7 , C_8 , C_{10} , C_{13} の二塩基酸からジメチルエステルを調製し、それぞれの IR と Fraction II の各成分と比較してみたが、標準品と一致する成分は確認できなかった。

Sp. odorus の培養液のエーテル抽出酸性部に、遊離の azelaic acid が存在することが、ペーパークロマトにより確認されたので、dimethyl azelate が培地中で、メチル化される前に methyl hydrogen azelate として存在する可能性は除かれた。

(3) - 3 Sp. odorus による azelaic acid の生成

B1-3-1. Sp. odorus の増殖と azelaic acid の生成

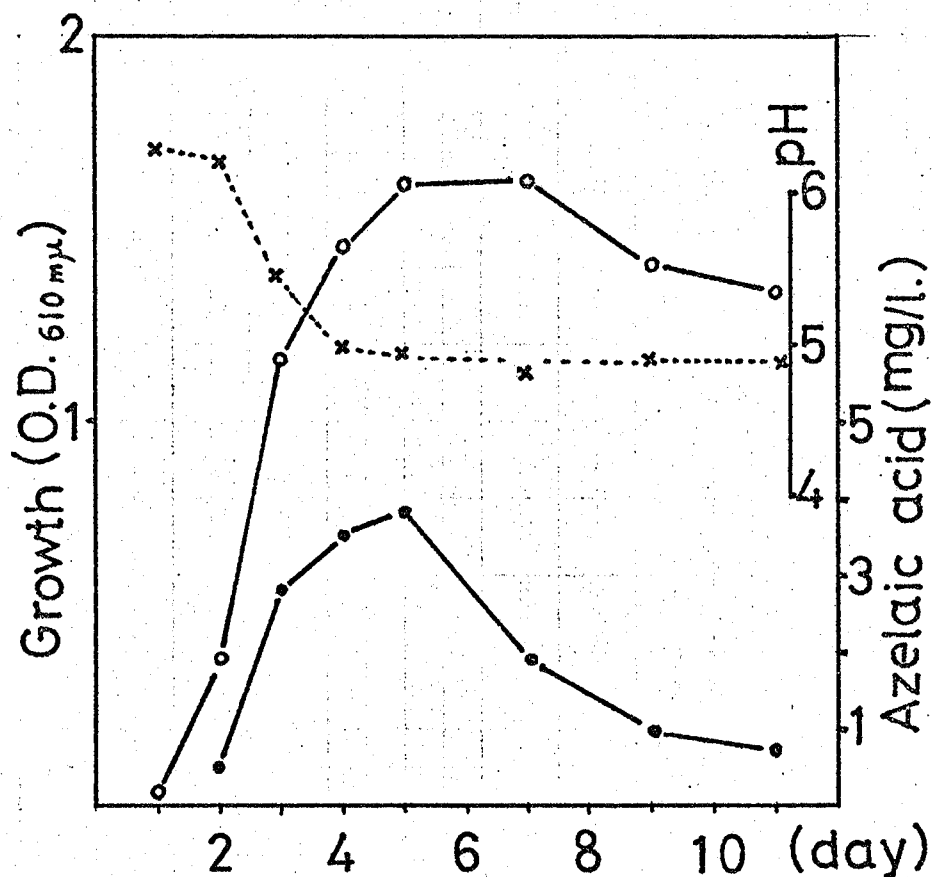


Fig. 23. Growth and Azelaic Acid Production of Sp. odorus in the Glucose-Asparagine Medium.

The cultured broth in three shaking flasks were combined in each time, and pH, O.D. and azelaic acid(as dimethyl ester) of the broth were measured.

○—○ , Growth ; ●—● , Dimethyl azelate ; ×----× , pH

Sp. odorus の増殖と azelaic acid の生成量の経時的な測定を行なった結果を Fig. 23 に示した。

Azelaic acid の定量方法

酸性部を濃縮してエーテルを十分除去した後、水を加えて石油エーテルで抽出し、一塩基酸を除去、

水層に稀硫酸を加えてエーテル抽出し、二塩基酸部と分離、ジアゾメタンによってメチル化後、dimethyl suberate を内部標準として加え、GLCによりピーク面積比から dimethyl azelate の絶対量を算出した。また、一塩基酸の量が少ない場合には、酸性部そのまゝをメチル化して同様に定量した。

Azelaic acid の生成量はかなり少ない（他の実験結果、たとえば Table IX では 13 mg/l ）が、生成量は酵母の増殖曲線に並行しており、培養液の pH 変化ともよく対応している。Azelaic acid は構造的に、不飽和構成脂肪酸（oleic, linoleic, linolenic acid など）の二重結合が酸化的に分解されたものに相当するが、この azelaic acid 生成曲線を見るかぎり、菌体成分の分解などによって azelaic acid が生成したとは考え難い。培養液中の azelaic acid は培養 5 日目で最大に達し、その後急速に低下していった。

(3)-3-2. Sp. odorus による azelaic acid の生成に対する n-alkane の添加効果

長鎖の ω, ω' -二塩基酸は、酵母によっても n-alkane の diterminal oxidation、さらにその β -oxidation⁶⁸⁾ によって種々の鎖長のものが生成することが明らか

にされている。Sp. odorus は糖と炭素源として増殖させたもので、直接二塩基酸の炭素骨格になるような前駆物質は添加していないが、既に報告されているような炭化水素の二塩基酸への変換が、本酵母でもおこるかどうかを調べるために、nonane や undecane を添加した培地で Sp. odorus を培養し、azelaic acid の生成量を定量した。

Sp. odorus は nonane を酸化できず、10% の炭素源の半分を nonane でおきかえると増殖は完全に抑えられた。そこで 3% の nonane または undecane と 7% の glucose を炭素源とする培地（他の成分は glucose-asparagine 培地と同じ）で Sp. odorus を 25°C, 6 日間振盪培養した。Table IX より、生成した azelaic acid の量は炭化水素の添加によってほとんど増大せず、また、undecane の添加によっても undecanedioic acid の増加は見られなかった。この結果は n-alkane が Sp. odorus によって酸化されないことを意味しているであろう。

(3)-3-3. Sp. odorus による azelaic acid の生成に対する不飽和脂肪酸添加効果

Sp. odorus によって生成される二塩基酸の炭素鎖

Table IX. Effect of n-Alkane on Azelaic Acid Production by Sp. odorus.

Sp. odorus was cultured for 6 days at 25°C and dimethyl azelate was determined by GLC in the usual way. Carbon sources of media: glucose only, glucose 10%; nonane added, 3% nonane and 7% glucose; undecane added, 3% undecane and 7% glucose. Other constituents of media were similar to those of the glucose-asparagine medium. Numbers in the table were average values of three vessels (150ml each).

Carbon source	Final pH	Growth OD _{610nm}	Dimethyl azelate mg/l
Glucose only	5.1	0.84	13.7
Nonane added	5.3	0.87	13.4
Undecane added	5.2	0.68	15.9

が何に由来するかは興味ある問題である。その由来を高級脂肪酸に求めることは、最も有りそうなことである。そこで、高級脂肪酸の添加により、azelaic acid の生成が顕著になるかどうかを調べた。

Sp. odorus は合成培地中で、高級脂肪酸により増殖阻害を受けるので、5% malt extract 中、0.2% の脂肪酸をナトリウム塩として添加し、25°C、7日間振荡培養を行なった。結果は Table X の通りで、oleic acid, linoleic acid の添加により azelaic acid はかなり増大したが、同じ部分構造を有する linolenic acid, ricinoleic acid では添加効果が、ほとんど見

Table X. Effect of Long-chain Unsaturated Fatty Acids on Azelaic Acid Production by Sp. odorus.

Sp. odorus was cultured for 7 days at 25°C in the medium consisted of 5% malt extract and 0.2% fatty acids and dimethyl azelate was determined by GLC. Numbers in the table were average values of three vessels(150ml each).

Fatty acid added	Final pH	OD _{610nm}	Dimethyl azelate mg/l
None	5.8	0.96	2.43
Oleic	6.4	2.48	6.26
Linoleic	6.2	1.47	13.50
Linolenic	5.8	1.15	2.71
Ricinoleic	5.8	0.65	3.45

出されなかった。Sp. odorus α = 塩基酸生成に不飽和脂肪酸が部分的に効果があることは明らかだが、前駆体として、それらが有効かどうかについては連断(難しい)。

(3) - 4. Methyl β-phenyllactate の同定

成分は Fraction II より分取 GLC で単離した。
分取条件: 10% PEG-20M column, 4.2 mm i.d. x 1.5 m,
carrier gas He 35 ml/min. injection port, column,
detector の温度はそれぞれ 270, 200, 250°C.

約3 mgの成分Cを80%以上の純度で得た。分取物のIRスペクトルによれば、 $V_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 3460, 1095 (= 級アルコール), 3030, 1603, 1492, 745, 697 (モノ置換ベンゼン), 1735, 1215 (エステル) などの特性吸収帯が見出される。成分Cのマススペクトルより、 m/e 91 ($\rightarrow 65$) 及び77のフラグメントは benzyl group の存在を示唆しており、 m/e 162 ($M^+ - H_2O$), 131 ($162 - OCH_3$), 121 ($M^+ - COOCH_3$), 103 ($162 - COOCH_3$) のフラグメントから分子量180が推定できる。これらのスペクトルデータより、成分Cは methyl 2-hydroxy-3-phenylpropionate (methyl β -phenyllactate) と考えるのが妥当である。

Fig. 24 には成分Cのマススペクトルと予想される開裂様式を示した。GLCの結果は、PEG-20M column, 180°C , N_2 22.5 ml/min, 成分Cの t_R は 8.70 min, 標準 methyl β -phenyllactate, 8.69 min とよく一致した。さらに、Fig. 25 に示したように、単離化合物と標準化合物のIRスペクトルはすべての吸収帯で一致した。従って、成分Cは methyl β -phenyllactate と同定した。*Sp. odorus* の培養液中には、量が少ないが、 β -phenyllactic acid の存在が明らかになった。

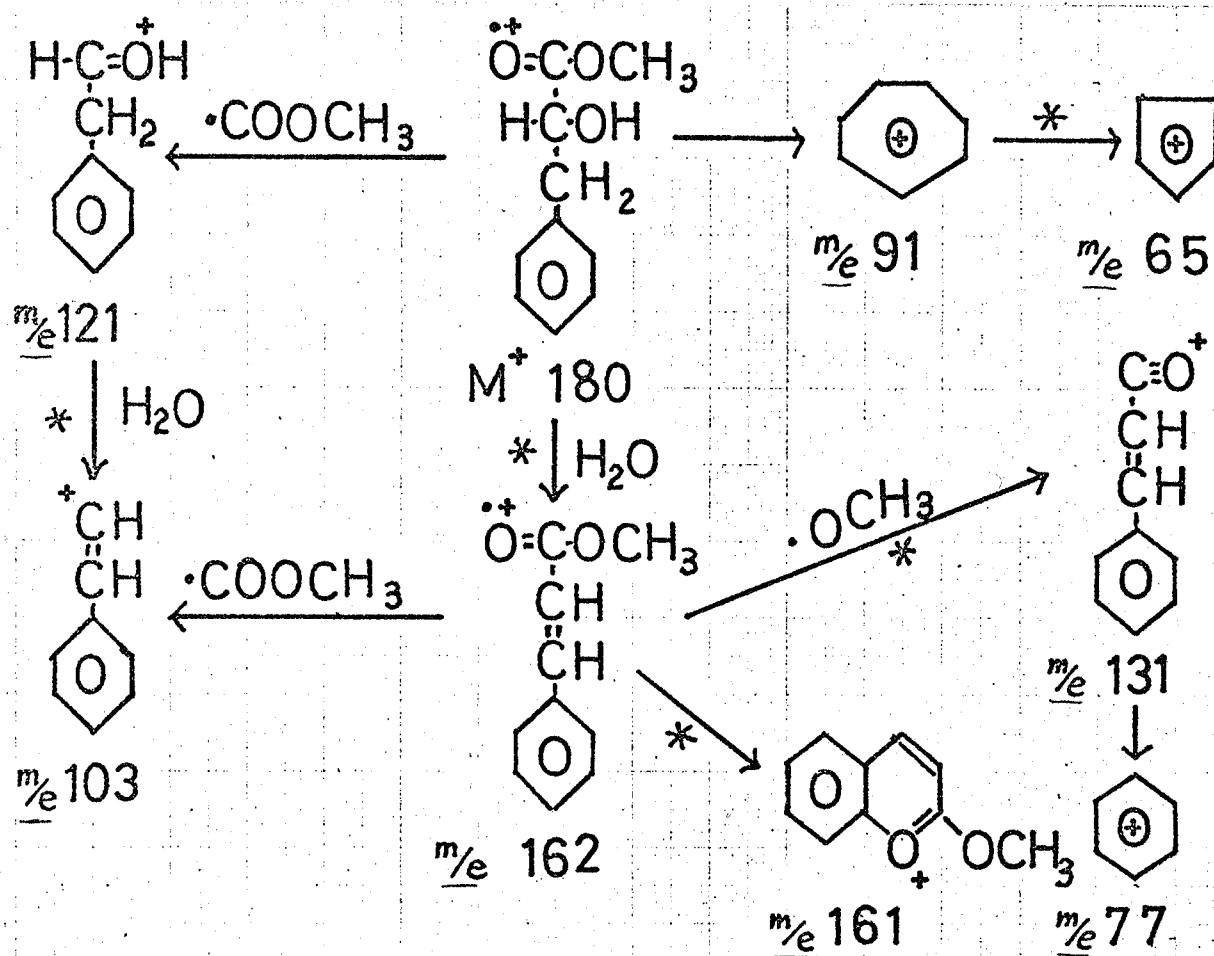
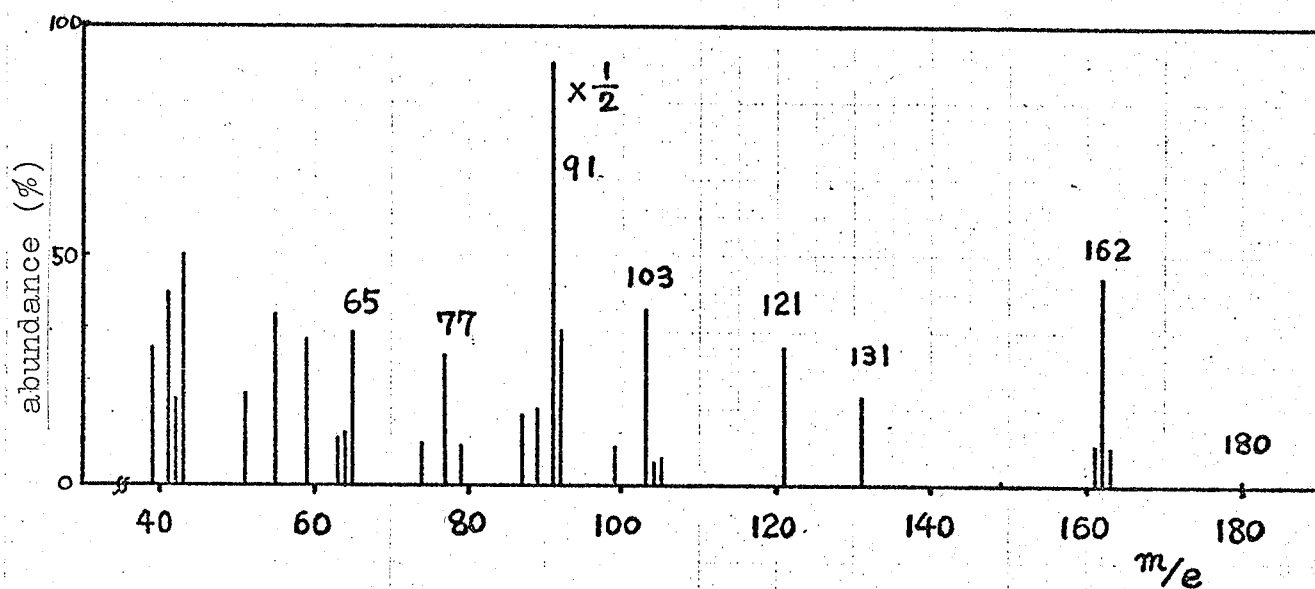


Fig. 24. Mass Spectrum of Component c and its Plausible Fragmentation Pattern(GC-MS).

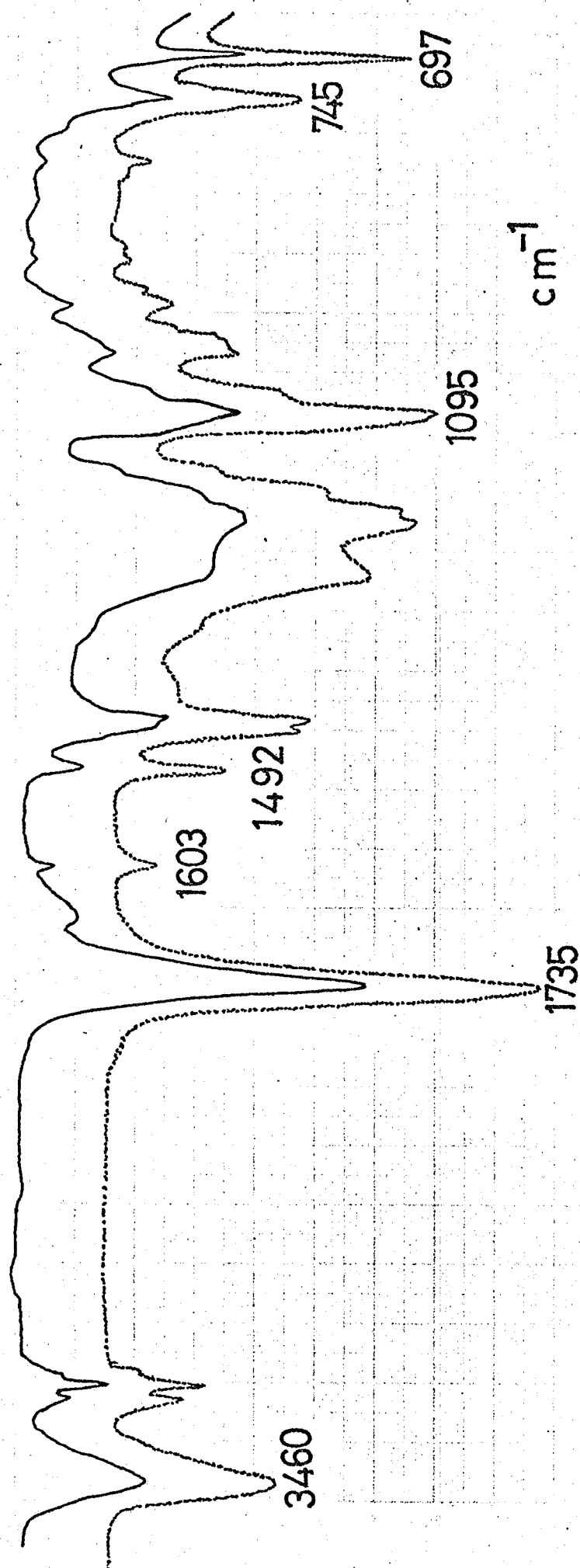


Fig. 25. Infrared Spectra of Isolated Component $\tilde{c}$ and Authentic Methyl β -Phenyllactate (liquid film).

———— : isolated, ----- : authentic

Table XI. Results of GC-MS and GLC of Component d and g.

GLC at 190°C (PEG-20M column)	Retention time (min)
Component <u>d</u>	5.98
Authentic dimethyl phthalate	6.00
Component <u>g</u>	10.61
Authentic methyl n-butyl phthalate	10.63

GC-MS	Mass spectral peaks
Component <u>d</u>	M^+ 194(7) m/e 164(13), 163(100), 135(11), 105(7), 104(9), 92(17), 77(22), 76(21), 75 (11), 74(15), 51(12), 50(29)
Component <u>g</u>	M^+ 236(not detected) m/e 181(10), 163(100), 149(76), 135(9), 105(12), 104(12), 92(15), 77(27), 76(19), 59(17), 50(14)

(3)-5. DBP の部分々解物の検出同定

成分 d, g の同定に関する実験結果は Table XI に
おとめた。成分 d, g とともに標準化合物と GLC, GC-
MS による分析結果が一致することから、それぞれ
dimethyl phthalate, methyl n-butyl phthalate と同
定した。一方、培養液に使用した脱イオン水には
、先にも述べたように 0.4 mg/l 程度の di-n-butyl
phthalate (DBP) が汚染物質として含まれていた。
また、培養によって DBP の量が明らかに低下す

ることとも観察されており、 d , g の構造から、メチル化される前には培養液中に、phthalic acid 及び n-butyl hydrogen phthalate が存在していたことになり、これらの化合物は DBP が Sp. odorans の加水分解作用（一部は培地の滅菌処理によっておこるかもしれない）によって生成したことを意味するであろう。

(3)-6. その他成分

成分 16 は水蒸気蒸溜々出区にも検出されたが、マススペクトル m/e : 146(0)/115(78), 114(25), 87(20), 59(69), 55(100) より dimethyl succinate と推定され、 IR も標準品と一致した。

成分 17 は m/e 170(8)/155(4), 139(18), 123(10), 111(100), 89(22), 87(16), 79(35), 59(46) より dimethyl muconate と推定され、市販の dimethyl trans,trans-muconate とマススペクトルはよく一致したが、 IR がより小さいことから、cis, cis 又は cis,trans-異性体と思われる。

成分 18 は中性部で同定した cis-6-dodecen-4-olide と IR , マススペクトルが一致した。もともと培養液中にオキシ酸として存在していたものか、鹼性部に移行し、メチル化されて methyl 4-hydroxy-cis-6-do-

decanoate となり、これが GLC の注入口内で熱的に、
 脱メタノール (分子内エステル交換) 反応がおこって、
 ラクトン化したものと考えられる。このことは次
 の様な事実からも支持される。即ち、市販の 4-
 decanolide をアルカリ加水分解後、pH 4.0 にして
 エーテル抽出、すぐにジアゾメタンによってメチル
 化すると methyl 4-hydroxydecanoate が調製され、IR
 スペクトルで 3430 (OH), 1725 cm^{-1} (メチルエステル) の
 吸収が見られる。これを 150°C、5 分間加熱する
 と、-OH の吸収が減少し、1750 cm^{-1} より高波数に肩
 が出現した。180°C、10 分間の加熱では、-OH の
 吸収が極めて弱くなり、1770 cm^{-1} に γ -ラクトン性
 の $\text{C}=\text{O}$ の吸収が出現し、メチルエステル性の $\text{C}=\text{O}$
 の吸収は 1750 cm^{-1} 以下に肩として見られた。

GLC (GC-MS の場合もほぼ同様) の分析条件は、注
 入口で 270°C、カラムも 180°C 前後のため、メチル
 エステルから分子内エステル交換によってラクトン
 が生成するには十分高温である。GLC に methyl
 4-hydroxydecanoate を注入しても、4-decanolide と同
 い ピーク を示すピークのみに検出され、ピーク面積か
 らほぼ定量的にラクトン化していると思われた。

以下の成分については、構造を十分に解明できな
 かった。成分 21, 成分 22 m/e : 176(0)/161(5), 145

(30), 130(6), 127(5), 113(14), 101(20), 74(12), 71(72), 59(20), 43(100)。成分は m/e : 238(6)/220(4), 207(17), 178(11), 164(7), 150(6), 136(2), 98(23), 95(23), 87(17), 85(25), 81(42), 74(45), 67(47), 59(61), 55(79), 41(100)。成分は。

(3)-7. Sp. odorus 以外の赤色酵母の酸性部

Sp. odorus の酸性代謝産物と他の赤色酵母のそれとを比較するため、Rhodotorula glutinis AHU 3463, R. minuta AHU 3296, R. mucilaginosa AHU 3946, R. rubra AHU 3957, Sp. roseus AHU 3439, 3980, 3981, 4024, Torula rosea AHU 3247 を glucose-asparagine 培地に培養し、酸性部とエステルと半定量的 GLC パターンを調べた。その結果、各酵母とも酸性部は中性部より構成成分の数及び量とも多かったが、Sp. odorus の酸性代謝産物は、中高沸点部で他の赤色酵母と著しく違い、奇数炭素の不飽和脂肪酸、C₉, C₁₁ のニ塩基酸等は、他の赤色酵母では検出されなかった。一方 β -phenyl-lactic acid は、検討した9種10株の赤色酵母のうち、R. rubra AHU 3957 以外のすべてによって生合成されることが分かった。特に R. mucilaginosa AHU 3946 では酸性部の最大成分となっており、Sp. odorus の生成量の20倍ぐらいに達していた。

第3節 脂肪族ラクトン類の生合成

緒言

脂肪族ラクトン類の天然の存在については考察の項に述べるが、それらの起源あるいは生合成経路を考慮して分類すると次のようになる。

1) 反芻動物の乳製品(単胃動物のものには量が少ない)中に検出される δ -ラクトン類: オキシ酸含有トリグリセリドから遊離してくる。酸化反応は含まれない。

2) 果実、その他油性の果実など、 γ -ラクトンが多い: 前駆体は不明、不飽和脂肪酸 $\rightarrow$ オキシ酸 $\rightarrow$ ラクトンの経路が推測されている。

3) 油脂の加熱(食品の加熱香氣など): 脂肪酸(アルデヒド, アルコール)などから酸化反応を経てオキシ酸、ラクトンの生成。

4) 微生物によるラクトンの生成

(i) Sp. odorus: 合成培地中で生合成。

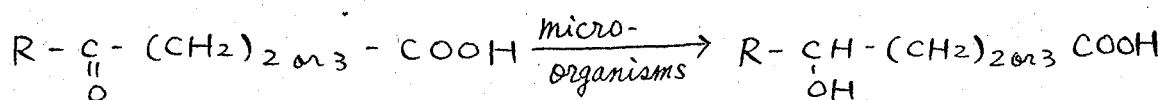
(ii). Candida sp.: ricinoleic acid の β 酸化により 4-hydroxydecanoic acid または 4-decanolide (γ -decalactone) の生成。

(iii) Sacch. cerevisiae : 4-又は5-オキシ酸の還元による光学活性オキシ酸の生成、一部はラクトン化

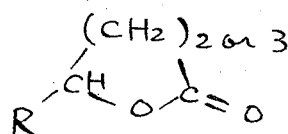
これらの区分のうち3)については、考察(3)-3で述べる。果実(パイナップル, アフリコット, ビー4)その他、種子など植物の生成する脂肪族ラクトンの前駆体、生合成機構等に関しては全く知見が得られていないと言ってもよい。⁶⁹⁾ Tang および Jennings は acetate $\rightarrow R-CH=CH-CH_2CH_2COOH \xrightarrow{H_2O} 4\text{-hydroxy or } 5\text{-hydroxy acid} \rightarrow \gamma\text{- or } \delta\text{-ラクトン}$ の生成経路を予想しているが、全く実験的根拠は与えられていない。ヒマ種子では、ricinoleic acid の生合成に関連して、Galliard⁷⁰⁾ および Stumpf により、oleyl-CoA の12位に水酸基の導入される反応が報告されており、Yamada および Stumpf⁷¹⁾ によつては、10-hydroxypalmitic acid がヒマ種子の酵素により、4-hydroxydecanoic acid にβ酸化されてゆくことが明らかにされている。これらの実験例から、高級オキシ酸のβ酸化中間体として、脂肪族ラクトンの直接の前駆体(4-または5-オキシ酸)が生成することも予想されるが、実証性に乏しい結果しか得られていない。

微生物による脂肪族のラクトン類(γ -, δ -lactone ring は飽和の化合物について)生合成については、本実験

に於て、合成培地中で Sp. odorus によって生合成されることが発見されたのが唯一のものである。(しかし、前駆体を与えてそれとラクトンへ変換させた例は二つ知られている。^{72,73)} その一つは Mays らによる化学的に合成した 4-または 5-オキソ酸のカビ、酵母、細菌などの微生物的還元によるもので、



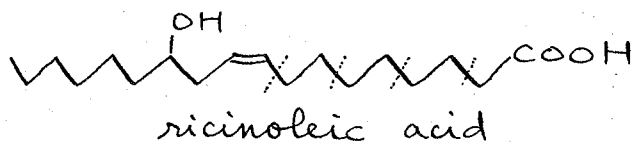
一部自発的
酸又は熱処理



反応式の通り炭素

骨格はそのまま、カルボニル基の還元反応である。⁷⁴⁾

。 Francke は Sacch. cerevisiae のミトコンドリア画分に NADPH, CoA, ATP, Mg^{++} を必要とする 5-オキソ酸の光学活性オキシ酸への還元系があることを見出してゐる。いま一つの例は、C. guilliermondi による ricinoleic acid の代謝中間体として 4-hydroxydecanoic acid 又は γ -decalactone を得た Okui ら⁷⁵⁾ の報告である。



Ricinoleic-acid の構造から、4回 C_2 単位がとれれば 4-hydroxydecanoic acid になることが分る。

後から述べるように、Sp. odorus は ricinoleic acid から著量の γ -decalactone を生成し、4-oxodecanoic acid も同様なことから γ -decalactone に変換することが

見出されたが、本酵母は炭素源として *glucose* (または *fructose* など)、窒素源として *asparagine* (または *alanine* など) と使用した簡単な組成の合成培地中で、4種類⁷⁶⁾の脂肪族ラクトンと培養液中に生成する点で特異的なものである。このように、脂肪族ラクトン合成に関する知見は、果実を含めて植物でも、微生物でも極めて乏しい状態である。

一方、哺乳動物の乳製品に検出されるラクトン類の生成、前駆体については最もよく研究されているので、統一的な理解は得られていない現状だが、多くの研究例を参考にしながら、ラクトン類の由来について述べる。

＜哺乳類乳脂中のラクトン(前駆体)について＞

1954年 Patton⁷⁶⁾ら乳脂の off flavor 生成について、臭い物質が γ - および δ -decalactone であることを指摘し、9-decenoic acid が前駆体ではないかと推測して以来、乳製品の香気成分としての脂肪族ラクトンの生成機構、前駆体の生合成について、多くの研究がなされてきた。研究の経緯については Boldingh⁷⁷⁾ および Taylor⁷⁸⁾ や Dimick⁷⁸⁾らの総説にも述べられている。

新鮮なクリームや貯蔵脂肪中には、わずかのラフ

トン1が存在せず、加熱などの処理によってラクトン量が著しく増加することから、研究の当初より、乳脂や体脂肪中に脂肪族ラクトンの前駆体が含まれていると考えられた。⁷⁹⁾ Mattickらは、脂肪を含む乳製品の香気の本体である δ -decalactone の前駆体は

5-hydroxydecanoic acid で、乳脂中にエステルとして存在することと示唆する実験結果を得ている。

一方、Boldingh および Taylor⁷⁷⁾ は、 β -oxoacyl-CoA と acetyl-CoA の反応によって δ -オキソ酸の生成を予想し、 δ -オキソ酸から δ -オキシ酸への変化を推論した。⁸⁰⁾ そして、同じ研究グループの van der Ven

は、酵母による γ -又は δ -オキソ酸のオキシ酸への還元から類推して、butterfat 中の γ -及び δ -オキソ酸の存在を検討し、還元によって対応するラクトンへ導かれるような C_{12} 以下の γ -及び δ -オキソ酸が 2.5 ppm 程度含まれていることを明らかにした。

(しかし、この前駆体の量は、乳脂中のラクトン量(前駆体から由来し得る量)が、100 ppm 程度が普通であることからしても、かなり少ないものである。

δ -オキソ酸が酵母によって δ -オキシ酸に還元されることは Francke⁷⁴⁾ によって酵素系でも証明されたが、

いまのところ乳腺でオキソ酸がオキシ酸に変換されることは見出されていない。また Katz および Keeney^{81,82)}

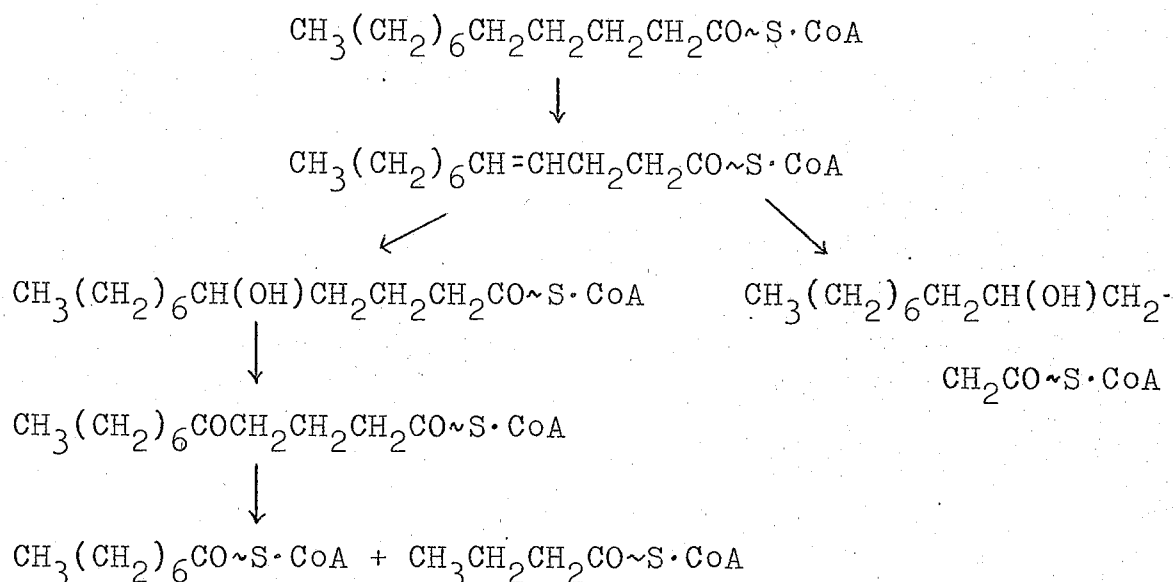
は、ルーメン (rumen) 中にルーメンバクテリアの寄与によると思われる各種の octadecenoic acid や oxo-stearic acid, hydroxystearic acid の存在を明らかにしたが、これらが乳脂に移行してラクトンの前駆体になることを支持するような実験結果は得られていない。乳脂中にラクトン化できる構造のオキシ酸が存在することは、Mattick らにつづいて Boldingh および Taylor⁷⁷⁾ もスペクトル的に推定し、Turriens および Oele⁸³⁾ は butterfat 中のエステル性 (グリセリド) オキシ酸を分離し、Parliment⁸⁴⁾ らも δ -ラクトン前駆体を多く含む画分の分離量測定から、 δ -ラクトン前駆体は monohydroxyacyl triglyceride の可能性が最も大きいことを示した。また同様に、Wyatt⁸⁵⁾ らは milk fat の極性グリセリド画分より一連のオキシ酸を同定した。さらに、Kinsella⁸⁶⁾ らは milk fat のカラムクロマト、TLC により γ -及び δ -オキシ酸を含むトリグリセリドを分離し、これにスイ臓のリパーゼを作用させて、ラクトンの前駆体である極性脂肪酸 (オキシ酸) が、トリグリセリドの α 位に結合していることを明らかにした。以上のような経過から分かるように、乳脂中のラクトン前駆体は、現在ではそのほとんどが対応するオキシ酸に由来するものと考えられている。それ故に、哺乳動物の乳脂 (その

他の脂肪組織)には、生合成されたオキシ酸がトリグリセリドの構成成分として存在する(飼料ヤル-メンバクテリアによるものではないことは Virtanen⁸⁷⁾の実験も支持しており、後から述べるように放射活性 acetate から生合成実験からも明らかである)αが実際であって、このオキシ酸含有トリグリセリドの二次的産物として脂肪族ラクトンが生成する(非生物的な要因が大きい)ものである。この点では、培養液中にラクトンが遊離で蓄積される Sp. odorus の場合と全く同一視することはできない。また、乳脂から得られている脂肪族ラクトンは、Boldingh および Taylor⁷⁷⁾の指摘するように生合成性であることから、Watanabe および Sato の酸化的過程を含む熱反応による飽和脂肪酸から生成したラクトン類とは全く由来を異にするものである。

哺乳動物の乳脂中のラクトン前駆体であるオキシ酸の生合成について現在までに得られている知見は次のようである。

1968 年、Walker⁸⁸⁾ら (Patton, Dimick の研究グループ)は、乳脂の脂肪族ラクトンの主成分である δ -C₁₀, δ -C₁₂, δ -C₁₄, δ -C₁₆ に対応する δ -オキシ酸が乳房で生合成される様子を検討するため、泌乳中の山羊を使用して、血管及び乳房に [1-¹⁴C]acetate を投与し、各時間

毎に乳脂中のオキシ酸含有トリグリセリドを水解、ラクトン化して放射活性を測定した。その結果、 $[1-^{14}\text{C}]$ acetate を投与後 5, 10, 15, 20, 25 時間に得た乳脂の $\delta\text{-C}_{10}$, $\delta\text{-C}_{12}$, $\delta\text{-C}_{14}$, $\delta\text{-C}_{16}$ ラクトンの比放射活性は、対応する炭素数の飽和脂肪酸の比活性に匹敵する大きさを有していることが明らかにされた。このことは、acetate が δ -ラクトン (δ -オキシ酸) と飽和脂肪酸の共通の前駆体であり、さらに δ -オキシ酸が acetate から対応する炭素数の飽和脂肪酸と同様の様式で生合成されることを意味しており、 δ -オキシ酸は長鎖の脂肪酸の酸化生成物ではないことを示唆するものである。 ⁸⁹⁾ 同一研究グループの Dimick らは Walker らの実験結果を基礎に、 $[1-^{14}\text{C}]$ acetate を乳房に注入した山羊で $\text{C}_4 \sim \text{C}_8$ 脂肪酸の比活性は $\text{C}_{10} \sim \text{C}_{14}$ 脂肪酸のそれより低いこと (これは $\text{C}_4 \sim \text{C}_8$ の脂肪酸が acetyl-CoA から来る割合が低いこと、別の見方とすれば乳脂中の $\text{C}_4 \sim \text{C}_8$ 脂肪酸は acetyl-CoA 以外の内生的前駆体から効率よく生合成されることを意味している)、5-hydroxy- $[1-^{14}\text{C}]$ dodecanoate を注入した後、ミルクのトリグリセリド中の脂肪酸はラベルされるが、その比活性は脂肪酸の炭素鎖が長くなる程低下することが特徴的で、これは C_4 単位 (投与した放射活性オキシ酸の 1~4 番炭素) として取込まれているためと考



Scheme 6. Proposed Pathway for δ -Oxidation of Saturated Fatty Acids (Dimick et al., 1969).

えられること、 $[1-^{14}\text{C}]$ dodecanoate を注入した後に分離した 4-及び 5-hydroxydodecanoic acid は高度にラベルされており、dodecanoate 以外のトリグリセリドの脂肪酸のラベリングパターンが、放射活性 δ -オキシ酸の注入によって得られた脂肪酸のそれと同一であった（これは投与した dodecanoate が δ -オキシ酸を経てミルクのトリグリセリド中の他の脂肪酸に変化していると考えられるため）ことなどから Scheme 6 に示すように、飽和脂肪酸の δ -酸化経路を提案した。この反応経路及び δ -酸化の理論は、従来知られていた乳房に於ける malonyl-CoA を経ないで butyric acid の生成する可能性⁹⁰⁾、乳脂中の低

級脂肪酸が *acetyl CoA* よりも C_4 unit の前駆体から効率よく生合成される事実⁹¹⁾、ラクトン類の前駆体である乳脂中のオキシ酸の存在理由、その生理的意味、 γ -及び δ -オキシ酸の存在及びその意味を一挙に説明できる極めて明解なものに思われた。

(しかし、Swenson 及び Dimick⁹²⁾ (1971) の再実験に於て、市販の $[1-^{14}C]$ dodecanoate 中には γ - C_{12} 及び δ - C_{12} ラクトンが 0.27% くらい混入していたことが判明し、 δ -酸化系の最も重要な論拠のひとつであった $[1-^{14}C]$ dodecanoate から 5-hydroxydodecanoate への系が否定され、理論そのものも崩壊してしまった。

また、Walker らの 1968 年の実験では $[1-^{14}C]$ acetate 投与後 5 時間目から乳脂中の脂肪酸の放射活性を測定し、 δ -オキシ酸と、対応する脂肪酸の比活性がほとんど同じことを見出していたが、その後結⁹³⁾ら (1973) は、 $[1-^{14}C]$ acetate の投与後 1, 2, 3, 4, 5, 6 時間と短時間内での同様の実験を行ない、 C_{10} , C_{12} , C_{14} のオキシ酸の比活性が飽和脂肪酸の比活性よりかなり小さい (即ち、milk fat 中の両者のグループは *acetyl-CoA* から同じ経路を通過して最終生成物のちかくまで合成されているのではなく、オキシ酸の生合成は、*acetyl-CoA* 以外の前駆体からも行なわれ、結果的に放射活性物が稀釈される可能性を意味する) ことが分

た。C₁₆では例外的に、オキシ酸の方が脂肪酸よりも高いが、同程度の比活性を有していた。

これらの実験結果から、S-酸化の有名無実であることは勿論、S-オキシ酸の生合成そのものについても Walker らの 1968 年の説明では不十分であり、乳脂中のオキシ酸の存在理由、生理的意義、生合成経路などの諸問題は、今なお混沌としたままに残されている。

(1) Sp. odorus 及びその他の赤色酵母による脂肪酸ラクトン生成

Sp. odorus によるラクトン生成については、これ迄に知られている脂肪酸ラクトン前駆体、あるいは構造的にラクトンへの変換の可能性のある化合物との関連を明らかにする目的で実験を行なった。

以下には、Sp. odorus 及びその他の赤色酵母による ricinoleic acid, 4-oxodecanoic acid の γ -decalactone への変換、Sp. odorus の C₁₀, C₁₂ 飽和脂肪酸への作用、ラクトン生成に対する効果、Sp. odorus の構成脂肪酸の分析、Sp. odorus の細胞内に存在する結合型 4-hydroxydecanoic acid の定量、Sp. odorus のラクトン生成に対する高級脂肪酸の添加効果につ

いて述べる。

(1) - 1. Sp. odorus 及びその他の赤色酵母による
ricinoleic acid の γ -decalactone への変換

Ricinoleic acid は 12-hydroxy-cis-9-octadecenoic acid で 8 番炭素迄 β -酸化によって除去されれば、4-hydroxydecanoic acid を与える。既に述べたように、Candida sp. による ricinoleic acid の中間代謝産物として、 γ -decalactone (対応するオキシ酸をもいれない) が検出同定されている。そこで Sp. odorus のほか 9 株の赤色酵母にも同様の作用があるかどうかを検討した。

実験方法と結果

脂肪酸は Sp. odorus の増殖に阻害的な作用を示す。特に合成培地ではそれが顕著なため、ricinoleic acid に対する赤色酵母の作用を調べるためには 5% malt extract (Difco 製) 中で培養した。0.2% ricinoleic acid をナトリウム塩にし 5% malt extract に加え pH 6.5 に調整、150 ml の培地を入れた 500 ml の振盪フラスコで 25°C 振盪培養を行なった。所定時間後、pH, O.D. 610nm, γ -decalactone の定量を

行なった。培養4日後、7日後と2回定量を行なったが、7日後については酸性部(4-hydroxydecanoic acid)の定量も併せて行なった。

定量方法

培養液の遠沈上澄100 mlに内部標準を加え、pH 10に1してからエーテル抽出し中性部と、水層をコンゴールレッド酸性に1してから内部標準を加えてエーテル抽出し酸性部を得た。酸性部はメチルエステルにした後、GLCで分析した。γ-オキソ酸メチルエステルは先に述べた通り、GLCに注入するとγ-ラクトンに変化する。内部標準としては、酸性部、中性部ともγ-dodecalactoneを使用した。GLC: PEG-20M column, injection port 270°C, column temp. 160°C → 4°C/min または 180°C 定温。各4チャートのピーク面積からγ-decalactoneを算出した。結果はTable XIIに示した。

培養4日間で増殖は、7日間の区々と大差はなかった。Sp. odorusを除き増殖は良好であった。

(しかし、4日間の培養でγ-decalactoneを検出されたものは R. rubra, Sp. odorus, Sp. roseus (2株のうち一方) の3株で、しかも Sp. odorus 以外では、少量の生成がみられたにすぎない。7日間後の区分に

Table XII. Conversion of Ricinoleic Acid to γ -Decalactone or 4-Hydroxydecanoic Acid by Red-colored Yeasts.

Yeasts were cultured for 4 and 7 days at 25°C, in the medium consisted of 5% malt extract and 0.2% ricinoleic acid, pH 6.5.

red-colored yeast		after 4 days	OD _{610nm}	γ-decalactone mg/l
		pH		
1. <u>R. glutinis</u>	3463	6.65	8.45	-*
2. "	3469	7.14	7.38	-
3. <u>R. minuta</u>	3296	6.92	6.83	-
4. <u>R. mucilaginosa</u>	3243	6.65	8.03	-
5. "	3946	6.46	3.70	-
6. <u>R. rubra</u>	3957	5.57	6.93	7.5
7. <u>Sp. odorus</u>	3246	5.24	1.30	140.8
8. <u>Sp. roseus</u>	3980	6.34	6.80	-
9. "	4024	5.98	6.63	1.3
10. <u>T. rosea</u>	3247	7.50	7.78	-

	pH	after 7 days	OD _{610nm}	γ-decalactone mg/l	4-hydroxy- decanoic acid mg/l
1.	6.62		9.30	-	-
2.	7.19		7.23	-	-
3.	7.01		7.35	-	-
4.	6.82		8.58	-	-
5.	7.24		4.38	-	-
6.	5.54		8.82	3.5	101.0
7.	4.86		1.62	147.6	39.7
8.	5.88		5.64	-	-
9.	7.07		6.09	-	-
10.	7.64		8.22	-	-

-* : less than 0.1mg/l

ついでに、4-hydroxydecanoic acid が生成して pH がやや、高いためにラクトン化しないのではないかと疑われたので、中性部を γ -decalactone, 酸性部をメチル化によって得た methyl 4-hydroxydecanoate の両方を定量したが、 γ -decalactone は Sp. roseus 4024 では見つかず、4日間培養に比べて Sp. odorus では増加していたが、R. rubra では半分ぐらいに減少していた。4-Hydroxydecanoic acid も R. rubra と Sp. odorus の培養液中にのみ見もされた。特に Sp. odorus では 79% もラクトンで存在していたが、R. rubra では 97% がオキシ酸として検出されたことは興味深い。水素イオン濃度の差が少なく (pH 4.86 と 5.54)、オキシ酸の非生物的(自動的)なラクトン化によってこのような違いが生ずるとは考え難い。

Sp. odorus の 7日間培養により ricinoleic acid から生成した γ -decalactone, 4-hydroxydecanoic acid の合計量は、加えた ricinoleic acid の 16% に達していた。

(1)-2. Sp. odorus 及びその他赤色酵母による 4-oxodecanoic acid の γ -decalactone への変換

Sacch. cerevisiae を使って 4-又は 5-オキソ酸のオキシ酸への還元を行なわせた Muys⁷³⁾らの実験に関連して、脂肪族ラクトンを生合成する Sp. odorus, ラクトンを生合成しない赤色酵母類の 4-オキソ酸に対する作用を検討した。

実験方法と結果

4-Oxodecanoic acid は Takeda⁹⁴⁾らの方法で heptanal と diethyl succinate から合成した。4-Oxodecanoic acid が酵母の増殖を強く阻害すること、オキソ酸からオキシ酸への変換は還元反応であることから、赤色酵母 10 株を 5% malt extract 中で 4 日間振盪培養を行なった後、1.5 g/l の 4-oxodecanoic acid をナトリウム塩として添加、25°C, 40 時間静置して還元反応を行なわせた。反応後、先の実験と同様に pH, O.D. 610nm を測定、遠沈上澄のエーテル抽出中性部の γ -decalactone, 酸性部の 4-hydroxydecanoic acid を GLC によって定量した。

結果は Table XIII に示した。赤色酵母 10 株による 4-オキソ酸の還元は、T. rosea で最も大きく、ラクトン、オキシ酸の合計値は加えた 4-oxodecanoic acid の 13%, 因42されたオキソ酸が 81% であっ

Table XIII. Reduction of 4-Oxodecanoic acid to 4-Hydroxy-decanoic Acid or γ -Decalactone by Red-colored Yeasts.

Red-colored yeasts were cultured for 4 days at 25°C in the medium of 5% malt extract by shaking and then, 4-oxodecanoic acid 1.5g/l was added and maintained at 25°C for 40hr on standing.

yeasts		pH	OD _{610nm}	determined mg/l	
				γ -deca-lactone	4-hydroxy-decanoic acid
<u>R. glutinis</u>	3463	5.76	4.46	0.8	3.2
"	3469	5.86	4.40	2.3	14.0
<u>R. minuta</u>	3296	5.02	4.93	0.8	17.3
<u>R. mucilaginosa</u>	3243	5.10	5.73	4.6	97.0
"	3946	5.10	2.02	2.1	75.1
<u>R. rubra</u>	3957	5.85	4.90	0.2	39.6
<u>Sp. odorus</u>	3246	5.50	1.73	1.0	3.1
<u>Sp. roseus</u>	3980	5.56	4.08	0.4	1.9
"	4024	5.98	2.68	1.2	28.3
<u>T. rosea</u>	3247	5.66	6.78	17.0	161.8

に。しかし、 γ -decalactone 生合成能を有する Sp. odorus の培養液中には、内生的な γ -decalactone が 1 mg/l 程度含まれており、4-オキソ酸の還元作用は最低 α 部類に属していた。別の実験で、Sp. odorus の菌体量を多く、基質を少なくすれば経時的に γ -decalactone が増大していくことも観察されており、オキソ酸のオキシ酸への還元が Sp. odorus で見られ

ないわけではない。

全体的に、菌体量に対して添加したオキシ酸の量が多く、約80%以上のオキシ酸が未反応物として回収された。・静置状態で反応を行なわせたが、反応生成物はほとんどがオキシ酸のままで、ラクトンになった量は極めて少なかった。

(1)-3. Sp. odorus の γ -decalactone 生成に対する decanoic acid 及び dodecanoic acid の効果

Dimick らの哺乳動物に於ける飽和脂肪酸の δ -酸化理論⁸⁹⁾は根拠のないものであったが、Sp. odorus に於て、それに類似した反応系が存在しないとは断定できない。Sp. odorus の生成する4種のラクトンは、いずれも C_{10} , C_{12} であることから Sp. odorus のラクトン生成に decanoic acid, dodecanoic acid の添加が有効かどうかを調べた。

実験方法と結果

Decanoic acid, dodecanoic acid は5% malt extract 中で Sp. odorus の増殖を強く阻害し、 C_{10} 0.5g/l, C_{12} 0.8g/l の添加でほとんど増殖がみられなかった。そこで Sp. odorus を5% malt extract 中、48時間前

Table XIV. Effect of Decanoic and Dodecanoic Acid Addition on the Production of γ -Decalactone by Sp. odorus.

Sp. odorus was precultured for 48hr and fatty acids were added as sodium salt, followed by incubation for additional 50hr at 25°C by shaking. γ -Decalactone(including 4-hydroxy-decanoic acid) was determined by GLC.

added compound(mM)		pH	O.D. _{610nm}	γ -decalactone mg/l
None		5.84	1.65	2.9
Decanoic acid	1.5	5.48	1.01	2.3
"	3.0	5.87	1.00	2.4
Dodecanoic acid	1.5	5.65	0.96	2.1
"	3.0	6.24	1.02	2.3
Ricinoleic acid	1.5	5.92	2.12	50.2
				(19.7% yield)

培養1日後、 C_{10} 258 mg/l, 516 mg/l, C_{12} 300 mg/l, 600 mg/l をナトリウム塩として添加、その後50時間振盪培養を継続してから、pH, O.D. を測定、遠況上澄をコンゴールレッド酸性にしてエーテル抽出、中性画分と一緒にGLCに注入し γ -decalactone を定量した(4-hydroxydecanoic acid も熱によりラクトン化する)。

培養は各区とも3本(150ml×3)ずつ行ない、反応終了後まとめたうちの100ml を抽出用試料とした。

結果は Table XIV に示した通り、 γ -decalactone の生成量を無添加区、ricinoleic acid 447 mg/l (1.5 mM)

添加区と比較対照した。*Ricinoic acid*からは微量の γ -decalactone (添加物の約20%の収率) が生成する。このような条件下に、*decanoic acid*, *dodecanoic acid* 添加区では、無添加区以上の γ -decalactone の生成は見られず、むしろ脂肪酸の添加によってラクトン生成が抑制された。この事実は、*Sp. odorus* の γ -decalactone 生成に遊離の C_{10} , C_{12} 飽和脂肪酸の添加が全く効果がないこと即ち、飽和脂肪酸から 4-hydroxy acid を経てラクトンが生成する経路の可能性がないことを意味していると思われる。

(2) *Sp. odorus* の構成脂肪酸の分析

Sp. odorus のラクトン生成に関して、前駆体の可能性のある化合物への作用性を調べると同時に、菌体の構成成分の分析を行なうことは重要なことである。特に、哺乳動物ではラクトンが前駆体として対応するオキシ酸が、トリグリセリド中に含まれていることが明らかにされており、*Sp. odorus* に関しても、少なくとも同様の観点から構成脂肪酸の分析を行なう必要がある。

微生物の構成脂肪酸の分析は GLC によって比較的容易に行なえるため、近年の分析データの集積は著

(ii). 高分解能のキャピラリー・カラムを用いて、
 脂肪酸誘導体の GLC パターンを得、細菌の分類に
 用⁹⁵⁾することとも考えられている。GLC による構成脂
 肪酸の分析には、まず脂質の抽出、あるいは菌体か
 ら直接、脂肪酸と遊離又はメチルエステルなどの誘
 導体として分離を行なわなければならない。動物
 組織からの総脂質の抽出には Folch⁹⁶⁾の方法が広く応
 用されているが、Suzuki⁹⁷⁾らは Lipomyces starkeyi から
 脂質の抽出を行なうに際して、種々の菌体前処理、
 抽出方法を検討し、Folch の方法が適当でないこ
 と、Pedersen⁹⁸⁾の方法が優れていることを指摘してい
 る。Pedersen⁹⁸⁾は凍結乾燥した C. terricola を 40 倍量
 の クロロホルム/メタノール (1:1) で攪拌しながら
 3 度抽出し、粗脂質を同、2:1 の溶媒に溶解 (脱塩
 水で洗浄する方法を報告している。抽出した脂質
 の分画などを行わず、菌体全体の構成脂肪酸の組
 成を知りたい場合には Lennarz⁹⁹⁾らの wet cell をその
 まま MeOH/KOH で水解後、メチルエステルにして
 分析する方法が簡便である。

細菌の構成脂肪酸の種類、生合成については
¹⁰⁰⁾O'Leary (1962) や ¹⁰¹⁾Kates (1964) の総説に詳しい。ま
 た、酵母の脂質については Hunter および Rose¹⁰²⁾の解
 説があり、細菌、酵母の構成脂肪酸組成の分析デー

夕は "Handbook of Microbiology (Vol. 2)" (1973) に多く、分析結果の比較のためには便利である。酵母の菌体外脂質の組成については Stodola ら (1967)¹⁰⁴⁾ の総説があり、酵母の構成脂肪酸分析の最近の報文として Hunter および Rose (1972) の Sacch. cerevisiae の培養温度と脂肪酸組成の関係、Mishina ら (1973)¹⁰⁵⁾ の炭化水素資化性 Candida sp. の炭素源が構成脂肪酸組成に及ぼす影響について検討したものとかが参考になった。

(2)-1. Sp. odorus の脂質抽出及び脂肪酸メチルエステルの調製

抽出試料

Sp. odorus は fructose-alanine 培地で 25°C, 7日間培養したものを遠沈、洗浄し -20°C で保存、50 l の培養液から得た菌体を凍結乾燥し、約 75 g の凍結乾燥菌体を得た。このものの水分含量 (105°C 乾燥) は 10.3% であった。

総脂質の抽出

Pedersen の方法を参考に、クロロホルム/メタノール (2:1), 600 ml, 550 ml 及び 600 ml の、凍結乾燥菌体 50 g を各2時間攪拌抽出し、毎回加え

フィルターで分別、抽出液は全部あわせて、300 ml の 0.02% 塩化カルシウム溶液で洗浄、有機層は 250 ml まで減圧濃縮して暗黒下、 -20°C に保存した。

総脂質含量

25 ml の上記抽出液を減圧濃縮し、減圧下デシケータ中で乾燥して水分を除いた。残存物を秤量し、乾燥菌体の 8.75% の総脂質を含んでいることが分かった。この脂質含量は普通の¹⁰²⁾値である。

構成脂肪酸メチルエステルの調製

GLC 用の構成脂肪酸メチルエステルは次の三つの方法で調製した。

(i) エステル交換

総脂質抽出液 25 ml (凍結乾燥菌体 5 g 分) を脱水濃縮後 5% HCl/MeOH w/w 40 ml を加えて、窒素気流下には 3.5 時間、 70°C に保持し、反応後エーテルを加えて有機層を飽和食塩水で 5 回洗浄、間に一度炭酸ソーダ水溶液で洗浄、エーテル層は脱水後 100 ml に定容した。

(ii) 総脂質のアルカリ加水分解、ジアゾメタン

によるメチルエステルの調製

総脂質抽出液を 25 ml とり、減圧濃縮後 5% KOH

を含む 70% メタノールを加え (50 ml)、窒素気流下に 3.5 時間還流、メタノールを減圧溜去し、ヘキサンで不ケン化物を抽出、コンゴーレッド酸性にして 3 回エーテル抽出、ジアゾメタンにより遊離 α 脂肪酸をメチル化、エーテル溶液を炭酸ソーダ水溶液、食塩水で洗浄、脱水後 100 ml に定容した。

(iii) 菌体 α アルカリ加水分解後、遊離脂肪酸の

ジアゾメタンによるメチルエステル α 調製

凍結乾燥菌体 5g を 300 ml の 5% w/v KOH を含む 70% メタノール中で、窒素ガス下に 3.5 時間還流、以下、(ii) と同様に処理して、菌体を分別した加水分解反応液からメチルエステル溶液を得て、100 ml に定容した。

(2) - 2. GLC による構成脂肪酸の定量 (主要成分)

高級脂肪酸メチルエステルの GLC による分離定量を行なうため、液相として OF-1, SE-52, Apiezon M, OV-17, DEGS, PEG-20M について分離試験を行なったところ、DEGS と PEG-20M の二つがメチルエステルの分析に適していた。DEGS は $C_{18:0}$, $C_{18:1}$ の分離もよく、PEG-20M より最高使用温度が低いが、 C_{20} ぐらい迄の脂肪酸メチルエステルの分析には、

極めて有効であることが確認できた。 DEGS column:
10% DEGS on Chromosorb W AW (60~80 mesh), 3mm i.d. x
1.5 m, stainless steel.

DEGS のカラムでは dimethyl azelate が $C_{16}=1$ と C_{18}
の間に溶出され、内部標準として他の脂肪酸メチル
の定量に使用できる。しかし、Sp. odorus は azelaic
acid を培地に生成するため、菌体内にも遊離又は結
合型のものが存在している可能性が大きい。そこ
で、まずその含量を測定した。

(2)-2-1. 脂質画分に含まれる二塩基酸の定量

総脂質抽出液 25 ml を (ii) と同様に処理して、遊離
の脂肪酸エステル溶液を得た。酸性代謝産物の同
定 (3)-3-1 に述べたように、二塩基酸画分のメチル
エステルを得、dimethyl suberate を内部標準として
、成分の定量を行った。その結果、検出された
dimethyl azelate は $0.844 \text{ mg} / 10 \text{ g dry cell}$ であつた。
さらに dimethyl phthalate も同程度検出された。

(2)-2-2. メチルエステル調製方法別の主構成 脂肪酸の構成比と抽出効率

Table XV. Ratio of Constituent Fatty Acids of Sp. odorus and Efficiency of Each Preparation Method of Methyl Esters.

Fatty acid methyl esters were analyzed by GLC equipped with 10% DEGS columns.

preparation method	fatty acid				
		C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
total lipid, ester inter- changed in HCl/MeOH	peak area				
	ratio	13.6	66.6	100	33.2
	mg/5g dry cell (efficiency)	93.3(66)			
total lipid, saponified in KOH/MeOH and esterified	peak area				
	ratio	13.2	66.7	100	31.9
	mg/5g dry cell (efficiency)	92.0(65)			
freeze-dried cells, saponified in KOH/MeOH and esterified	peak area				
	ratio	14.7	66.4	100	33.8
	mg/5g dry cell. (efficiency)	141.8(100)			

総脂質画分に含まれる azelaic acid はメチルエステルとして 0.4mg/5g dry cell と少なく、内部標準として dimethyl azelate と 100 mg 以上使用して主要脂肪酸メチルエステルのピーク面積と比較するので、内生的な azelaic acid の量は定量上の影響は小さいが、定量に際し補正は行なった。Dimethyl azelate と methyl stearate の一定重量当りのピーク面積比を変換係数として使用し、各脂肪酸メチルエステル相互の変換係数は 1 とした。Table XV には、GLC による構成脂肪酸メチル

ケルエステル¹⁰⁷⁾の調製方法別の定量結果を示した。
組成は主要成分についてのみ示したが、総脂質画分
からは、凍結乾燥菌体の直接加水分解によって得ら
れた脂肪酸の65~66%しか得られていない。この
結果からすれば、先に行なった総脂質の抽出方法に
検討の余地が残されている。(しかし、調製方法別
の各成分間の組成の差はなかった。

酵母の脂肪酸生合成については Lynen¹⁰⁷⁾の解説に詳
しいが、哺乳類の脂肪酸合成系も本質的に酵母のも
のと同じことが明らかにされており、不飽和脂肪酸¹⁰⁸⁾
はオレイン酸系列の化合物であることが確かめられ
ている。¹⁰⁹⁾ Andreassen および Stier は、酵母を嫌気
的条件下に培養すると、増殖に *oleic acid*, *linoleic acid*,
又は *linolenic acid* と必要とする事実を見出し、その
後酵母に於ける不飽和脂肪酸の生成機構解明は Bloch
のグループによってなされた。即ち、 $NADH$, O_2 , Mg^{++}
に依存する飽和脂肪酸 (*acyl-CoA*) の好氣的な水素ひ
きぬきによって不飽和化が¹¹⁰⁾あこる。また *T. utilis*¹¹¹⁾
の不飽和化活性は増殖温度が低い場合により大きい
と言われている。

Sp. odorus の脂肪酸を $C_{18:1}$, $C_{18:2}$ のように記載
したが、オレイン酸系列の不飽和脂肪酸とすれば、

$C_{16}:1$, palmitoleic ; $C_{18}:1$, oleic ; $C_{18}:2$, linoleic ; $C_{18}:3$, linolenic acid である。 Sporobolomyces 属酵母の脂肪酸分析例が見当らなかつたので、構成脂肪酸メチルエステルは IR を標準化合物と比較、各成分について GC-MS によるマススペクトルの検討、不飽和脂肪酸の水添を行なった。

(2)-2-3. Sp. odorus の構成脂肪酸と組成

Sp. odorus の構成脂肪酸メチルエステルの IR を標準化合物のそれと比較した。 DEGS, 180°C , 構成脂肪酸メチル、標準化合物の IR (min) : C_{14} , 1.26 ; methyl myristate, 1.26 ; C_{16} , 2.27, methyl palmitate, 2.27 ; C_{18} , 4.12, methyl stearate, 4.12 ; $C_{18}:1$, 4.72, methyl oleate, 4.72 ; $C_{18}:2$, 5.97, methyl linoleate, 5.96 ; $C_{18}:3$, 7.98, methyl linolenate, 7.97. さらにマススペクトルにより C_{14} , $M^{+} 242$; C_{16} , $M^{+} 270$; C_{18} , $M^{+} 298$; $C_{18}:1$, $M^{+} 296$; $C_{18}:2$, $M^{+} 294$; $C_{18}:3$, $M^{+} 292$, であることが確認された。

また、95% メタノール中で、構成脂肪酸メチルエステル画分の接触還元を行なったところ、水素通気後 GLC パターンは、ピークの大きさの順に次のように変動した。 0分 : $C_{18}:2$, $C_{18}:1$, $C_{18}:3$, C_{16} , C_{18} , $C_{16}:1$.

Table XVI. Constituent Fatty Acids of Sp. odorus.

Freeze-dried cells were saponified in KOH/MeOH and free fatty acids were extracted, and methylated with diazomethane.

fatty acid(C _n) methyl ester	ratio of constituents(%)	mg/10g dry cell
C ₁₄	0.64	6.9
C ₁₆	11.17	119.6
C _{16:1}	0.47	5.0
C ₁₈	5.86	62.8
C _{18:1}	26.49	283.6
C _{18:2}	39.90	427.1
C _{18:3}	13.43	144.1
Others	1.98	-

10分: C_{18:1}, C₁₈, C₁₆, C_{18:2}, C_{16:1}, C_{18:3}. 20分: C₁₈, C₁₆, C_{18:1}. 40分: C₁₈, C₁₆. 生成した C₁₈ は鋭いピークとなり, IR が標準の methyl stearate に一致した。

また水素添加前後のピーク面積は次のようであった,

$$\text{水添前} \cdots \cdots C_{18} + C_{18:1} + C_{18:2} + C_{18:3} / C_{16} = 7.7$$

$$\text{水添後} \cdots \cdots C_{18} / C_{16} \text{ (C}_{16:1} \text{ 由来の分は除く)} = 7.9$$

この結果は、C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3} が水素添加によって stearic acid に変化したことを示している。構成脂肪酸の IR, M⁺, 水素添加の結果は Sp. odorus の構成脂肪酸がオレイン酸系列のものであることを支持している。Table XVI は、Sp. odorus の凍結乾燥菌体の

KOH 水解によつて得られた構成脂肪酸のメチル化物の組成を示す。

この脂肪酸組成は Sacch. cerevisiae などと大きな違いがあるが、報告された分析例のうちでは Brown および Rose の ¹¹²⁾ Candida utilis の構成脂肪酸組成と極めて近い値であり、 $C_{18:2}$ が最大成分であること、 $C_{16:1}$ が少ないこと、 $C_{18:3}$ が比較的多いことなど特徴的な点である。しかし主要成分については、ラクトンとの関連を思わせるような構成成分は見出されなかった。

(2)-3. Sp. odorus の γ -decalactone 生成に対する高級脂肪酸の添加効果

C_{18} 不飽和脂肪酸の β 酸化によつて Sp. odorus がラクトン類を生成していると仮定し、生成するラクトンの構造と $C_{18:12}$ 脂肪酸の β 酸化中間体と、二重結合への水素の付加によりオキシ酸の生成、さらにラクトン化し、側鎖の炭素数、二重結合の位置が元の脂肪酸の炭素鎖のまゝに保持されているとすれば、 δ -及び γ -decalactone, cis-6-dodecen-4-olide は linoleic acid に、cis-7-decen-5-olide は linolenic acid に関連づけられる。先に述べたように、Sp.

odorus の構成脂肪酸の特徴として $C_{18:2}$ (linoleic acid) が最大成分であり、 $C_{18:3}$ (linolenic acid) も他の酵母の構成脂肪酸より著しく多いことが挙げられ、構成脂肪酸としては平凡な成分ながら、ラクトン類の生成と関連があるかもしれないと思われた。そこで、高級脂肪酸の添加により Sp. odorus の γ -decalactone 生成量に変化があるかどうかを調べた。

実験方法と結果

5% malt extract に 0.2% の $C_{18:n}$ ($n=0\sim3$) の脂肪酸とナトリウム塩として添加 (pH 6.5) (T=培地で Sp. odorus を培養し、中性部の GLC パターンを見た。

無添加区、ricinoleic acid 添加区を比較対照として、各区 3 本ずつ (150 ml $\times$ 3)、25°C、7日間、振盪培養を行なった。エーテル抽出中性部の γ -decalactone を GLC で定量した。

γ -Decalactone の生成量は Table XVII に示し通り、oleic acid の添加区でや、多い程度で、高級脂肪酸の添加により ricinoleic acid 添加区のような顕著な効果を示すものは見られなかった。Linoleic acid 添加区で δ -decalactone, cis-6-dodecen-4-olide なども多く生成するようには思われたが、いずれも 1mg/l 以下であった。また、linolenic acid 添加区で、

Table XVII. Effect of Higher Fatty Acids on γ -Decalactone Production by Sp. odorus.

Sp. odorus was cultured at 25°C for 7 days in the 5% malt extract medium containing 0.2% of each fatty acid, initial pH 6.5. γ -Decalactone in the neutral extract was determined by GLC.

added acid	pH	OD _{610nm}	γ -decalactone mg/l
None	5.82	0.96	1.78
Stearic	6.28	1.43	2.17
Oleic	6.44	2.48	4.87
Linoleic	6.20	1.47	0.77
Linolenic	5.78	1.15	0.46
Ricinoleic	5.80	0.65	176.6

cis-7-decen-5-olide の生成が他より多いということ
はなかった。

これらの結果は、仮に、高級脂肪酸が内生的に Sp. odorus の生成するラクトン類の前駆体になってい
るとしても、外部から与えた脂肪酸類 (ricinoleic acid
は例外) は、本酵母のラクトン生成にほとんど効果
がないといえる。C₁₈ 脂肪酸だけでなく、C₁₀, C₁₂
の飽和脂肪酸が Sp. odorus のラクトン生成に無効で
あることは先に述べた。

(2)-4 Sp. odorus の構成脂肪酸画分の微量成分

Sp. odorus の生成するラクトン類に関連のある化合物が菌体内に存在しているとしても、その量は少ないと思われる。そこで、Sp. odorus の構成脂肪酸メチルエステル画分を silicic acid column chromatography によって、一塩基酸メチルエステルと二塩基酸やオキシ酸メチルエステルなどの極性の大きい成分とに分画し、後者の成分を GC-MS で分析した。

実験方法と結果

Sp. odorus の凍結乾燥菌体 12.5 g を 5% w/v の KOH を含む 70% メタノール中、窒素気流下に 3.5 時間還流、常法によってメチルエステル画分を得た。

n-Hexane 中の silicic acid column (50 ml の silicic acid を使用) の上に試料をマウントし、i) 200 ml の 5% ether/*n*-hexane で洗浄、ii) 200 ml の ether で溶出、ii) の溶出液を濃縮後 2.5 × 3 cm の silicic acid column で再クロマトを行なった。i)' 5% ether/isopentane, ii)' 50% ether/isopentane, iii)' 100% ether、各 50 ml で溶出。i)' にはオキシ酸、二塩基酸などのより極性の大きいメチルエステルが含まれ、

III) には *dimethyl succinate* と思われる成分のみが検出された。50% ether/isopentane 溶出画分の α カスクロマトグラムは Fig. 26 に示した。各成分について GC-MS によりマススペクトルを得、成分を検討した。

Fig. 26 に示したように、明らかにされた成分は既に酸性代謝産物として同定した化合物ばかりで、*dimethyl azelate* が 0.84 mg/10g dry cell 程度の含量であることからしても、特に多い成分。ラクトン対応のオキシ酸以外のオキシ酸などを検出することはできなかった。未同定の成分も残されているが、その量は比較的少ない成分であった。この画分及び構成脂肪酸主要成分中にも tr が *ricinoleic acid* に対応するような成分は見出されなかった。

酸性部メチルエステル画分にラクトンが検出されるのは、対応するオキシ酸がメチルエステルとして存在していて、GLC に注入した際にラクトン化 (脱メタノール) したものと考えられる。しかし、このオキシ酸が細胞内で遊離で存在していたラクトンに由来する α か、あるいはエステルとして他の成分と結合していたのか明らかではない。この点については次項で検討した。

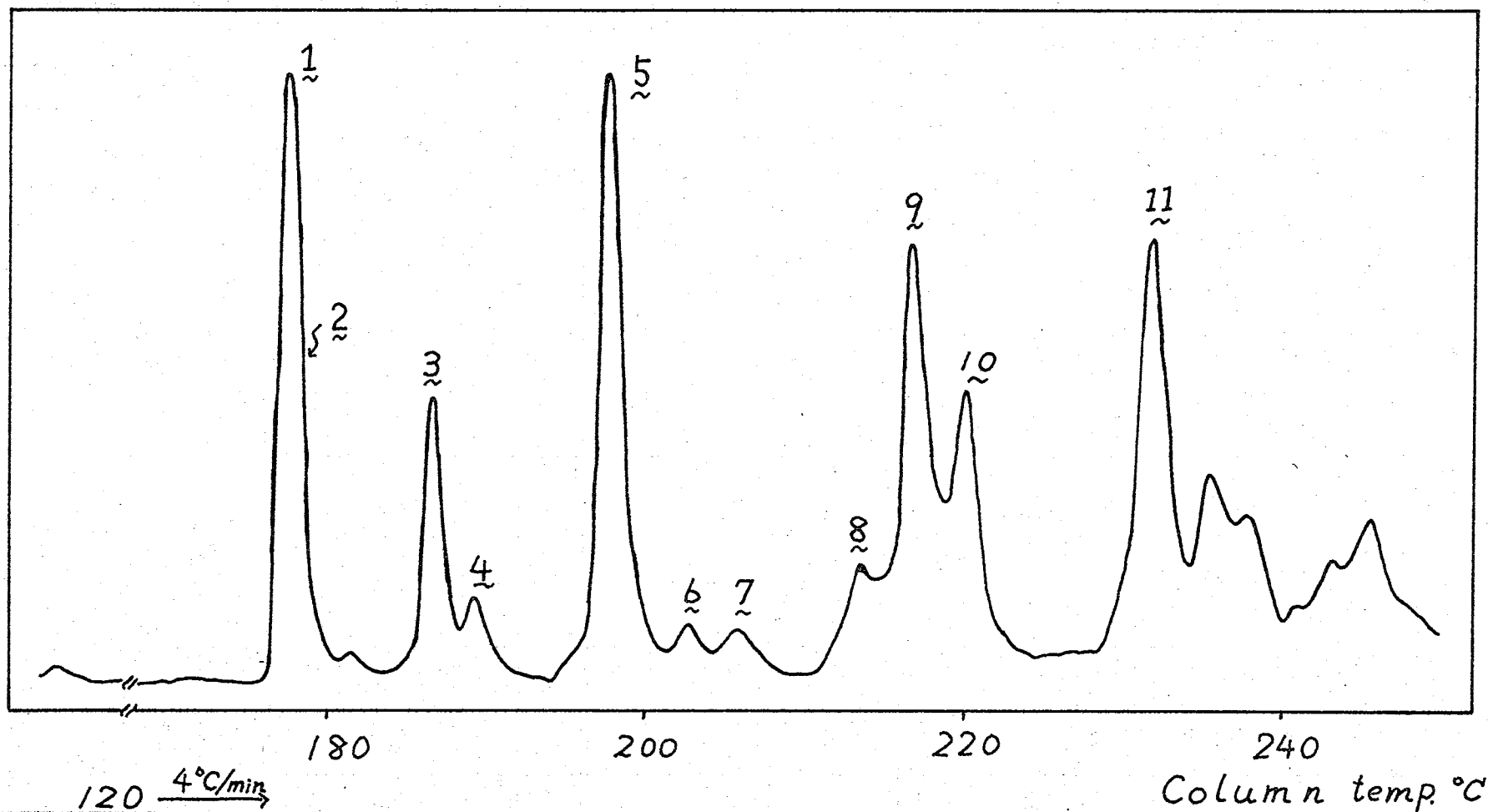


Fig. 26. Gas Chromatogram of Acidic Minor Components of Sp. odorus.

Freeze-dried cells of Sp. odorus were saponified in KOH/MeOH and free fatty acids were methylated with diazomethane. The components were fractionated by application of silicic acid column chromatography. 1, Dimethyl azelate; 2, γ -Decalactone(4-Decanolide); 3, Methyl β -phenyllactate; 4, Dimethyl phthalate; 5, cis-6-Dodecen-4-olide; 6~9 Unknown; 10, DBP; 11, Unknown.

(3) Sp. odorus の菌体内 γ -decalactone の存在形態.

哺乳類の乳脂中には、乳製品の香気的主要成分である δ -lactone 類の前駆体として、オキシ酸トリグリセリドとして存在している。一方、Sp. odorus の培養に伴う γ -decalactone の経時的生成量とみても、培養液中のラクトンが Sp. odorus の脂質の構成脂肪酸として存在するオキシ酸から二次的に生成したものと考えることは既に述べた。(しかし、菌体内に対応するオキシ酸がどの程度存在するかを知ることは、Sp. odorus による γ -decalactone の生成経路を考えてゆく上で重要なことである。そこで、Sp. odorus の総脂質画分のラクトン化 (150°C , 10分) 後の γ -decalactone 量と、全脂肪酸画分の熱処理後の γ -decalactone 量と比較定量し、菌体内に存在する遊離の γ -decalactone 及び遊離の 4-hydroxydecanoic acid の合計量と結合型の 4-hydroxydecanoic acid の量を知るための実験を行った。

実験方法と結果

凍結保存した Sp. odorus 120 g (乾物 17.2 g) からアセトンパウダーを調製、アセトン可溶部は 100 ml

に濃縮、以下次の様に扱った。

A) アセトン可溶部 50 ml を濃縮、アセトンと完全に除去し、上記 Sp. odorus のアセトンパウダーの $\frac{1}{2}$ を加え、5% KOH を含む 70% メタノール中で 3.5 時間還流、酸性成分と遊離にした後エーテル抽出、エーテルを溜去後 150°C 、10 分間加熱して 4-hydroxy-decanoic acid をラクトン化し、減圧水蒸気蒸溜により溜出区分の γ -decalactone と、 γ -dodecalactone と内部標準として GLC で定量した。

B) Sp. odorus のアセトンパウダー $\frac{1}{2}$ をクロロホルム / メタノール = 2 : 1, 100 ml ずつ 3 回、2.5 時間ずつ攪拌抽出、さらに水で 2 回抽出し、この水抽出液はコンゴールレッド酸性にしてエーテル抽出。脂質抽出液、水抽出エーテル転溶部、アセトン可溶部 50 ml と合せ、減圧下に溶媒を溜去して、 150°C 、10 分間保持してラクトン化を行なった。遊離のオキシ酸、ラクトンがこの画分にくる。以下 A) と同様に水蒸気蒸溜後 γ -decalactone と定量した。

定量値は、A) $111 \mu\text{g} / 10\text{g dry cell}$, B) $79 \mu\text{g} / 10\text{g dry cell}$ であった。

即ち、遊離の γ -decalactone, 4-hydroxydecanoic acid に由来する γ -decalactone は Sp. odorus の乾物 10g 当り $79 \mu\text{g}$, これは結合型の 4-hydroxydecanoic acid の

加わった値が $111 \mu\text{g}$ ということになる。なお、 150°C 、10分間の熱処理によって、結合型のオキシ酸がエステル交換をおこして一部 γ -decalactone になる可能性については、総脂質画分の 150°C 、10分間処理区、無処理区の間には $15 \mu\text{g}/10\text{g dry cell}$ の差があったことから、結合型 4-hydroxydecanoic acid の量は $111 \mu\text{g} - (79 - 15) \mu\text{g}$ 、約 $50 \mu\text{g}/10\text{g dry cell}$ 程度になると思われる。この値は、 5ppm の含量で乳脂などの値より低い（総脂質に対する含量は約10倍）。

Sp. odorus の培養液中には、菌体乾物 1g 当り 1mg ぐらいの γ -decalactone が生成されるので、単純計算では、培養液濃度 1ppm 、対菌体に換算すれば 1000ppm ぐらいの値となる。

哺乳動物の乳脂中に存在するトリグリセリド中のオキシ酸は加熱により遊離のオキシ酸となった後、⁽¹¹³⁾自動的に脱水環化して対応するラクトンになると考えられているが、先にも述べたように、オキシ酸メチルエステルが無水状態で、分子内エステル交換（脱メチル）を起してラクトンになることは確かである。トリグリセリド中のオキシ酸も加熱により遊離することなく、ラクトンが生成する可能性、リパーゼの関与の可能性もある。この点については、再検討の必要がある。

(4) 4-Hydroxydecanoic acid の安定性 (参考データ)

(4)-1. 4-Hydroxydecanoic acid の熱安定性

市販の γ -decalactone をアルカリ加水分解し、酸性にしてエーテル抽出すると 4-hydroxydecanoic acid のエーテル溶液が得られる。4-Hydroxydecanoic acid の熱による γ -decalactone への変化を調べるため、

- (1) 無処理、エーテル溜去、結晶析出
- (2) エーテル溜去、常圧で 150°C 、5分処理
- (3) " " 10分 "
- (4) " " 20分 "

それぞれの変化について IR スペクトルにより成分の変化を検討した。

IR スペクトルの結果

- (1) $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1} : 3500 \sim 2500$ ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$), 1705 ($-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{OH}$)
が特徴的で γ -lactone ring の 1770 cm^{-1} には全く吸収が見られなかった。
- (2) $\text{C}=\text{O}$ は γ -lactone ring の 1770 cm^{-1} に移り、 1700 cm^{-1} 付近の吸収減少がやや鈍いが、もはや肩は観察されなかった。
- (3) $\text{C}=\text{O}$ は 1770 cm^{-1} のみ、 1700 , $3500 \sim 2500 \text{ cm}^{-1}$ の $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$ に帰属される吸収は見られない。

(4) も (3) と同様.

なお、(1) の結晶を室温に放置すると数日で液状となり、振れば白濁、ラクトンの香気を発するようになる。これらの結果から、遊離の 4-hydroxydecanoic acid のラクトン化は 150°C 、5 分間の加熱によってほぼ完了すると思われる。10 分間加熱したものと 20 分間のもの間には IR スペクトルの差は見られなかった。Methyl 4-hydroxydecanoate は 150°C 、5 分間の加熱では、一部ラクトン化するが、メチルエステルとして残存する方が多いこと、 180°C 、10 分間の加熱によってほとんどが γ -decalactone に変ることと比較すれば、遊離のオキシ酸は、はるかに容易に脱水ラクトン化する。GLC による分析は、注入口の温度 270°C 、カラムは 180°C で実施しているので、遊離のオキシ酸は勿論、オキシ酸メチルエステルも GLC に注入すれば、すべてラクトンになるものと思われる。

(4) - 2. 稀薄溶液中の 4-hydroxydecanoic acid の自動的な γ -decalactone への変化

Sp. odorus によって培養液中に 4-hydroxydecanoic acid が生成されているとしても、オキシ酸が自動的にラ

ラクトン化しやすいものであれば、*γ*-decalactone として検出される。オキシ酸の生成とラクトン生成が同じ意味を持つ程度に、オキシ酸が自動的にラクトンへ変化しやすいものかどうかを知る必要から、4-hydroxydecanoic acid の稀薄溶液中での安定性について検討した。ラクトン化は溶液の pH に依存することが予想されたので、各種 pH のホウ酸緩衝液中での変化量を定量することにした。

実験方法と結果

850 mg の市販 *γ*-decalactone を 50 % エタノール中でアルカリ加水分解し、エーテル抽出後、水層をコンゴー・レッド酸性にし、すぐにエーテル抽出、エーテル抽出液は無水芒硝の層を通して脱水、15 ml に定容後、その 0.5 ml を 150 ml の 0.1 M succinate/sodium borate buffer または脱塩水を入れた 500 ml の振盪フラスコに添加し、ゴム栓をして 25°C, 4 日間振盪した。各区 2 本ずつ振盪後一つにまとめ、その 50 ml をとり、pH 約 10 にした後、内部標準の *γ*-nona- 及び *γ*-undecalactone を加えてからエーテル抽出し、中性部の *γ*-decalactone を GLC で定量、水層をコンゴー・レッド酸性にしてから、中性部の場合と同じ内部標準を加えてエーテル抽出し、この画分に残存する 4-hydroxydecanoic

acidを定量した。オキシ酸はGLCに注入するとラクトン化するので酸性部、中性部とも γ -nona- 及び γ -undecalactone と内部標準にして γ -decalactone として定量した。

結果は Table XVIII として考察の(4)に示されているが、オキシ酸は思っていたよりもかなり、遊離で安定であった。25°C、4日間の振盪によりオキシ酸のラクトンへの変化は、確かに溶液のpHに依存したが、変化の割合いは低く、pH 4~4.5 で 10~20%、pH 5~6 では数%以下、pH 6 以上では 1% 程度であった。

第4章 考察

はじめに

香料、食品香気等の研究に於て、香気成分の同定は、個々の成分が全体の香りの中でどれだけの意味を有するかが不明であるにしても、その重要性を損うものではないであろう。仮え、研究の目的が、*artificial flavor* の調製にあるとしても、香気の生成メカニズムの解明、香気の *fixation* (固定)、新しい合成香料への示唆などは、対象とする香気成分の同定を基礎としない限り、より確かな道は開けてこないと思われる。

香気成分の分析には、1) 原料とそのまま分析する、2) 原料の水蒸気蒸留など、簡単な操作によって香気成分の濃縮画分を得る、3) 原料を溶媒抽出し、濃縮して香気成分を得る、など分析試料の調製の仕方によっても、いろいろの問題が生じてくる。1) → 3) と操作中には、本来原料には含まれていなかった成分が混入する可能性が大きくなってゆく。3) のうちでも、微生物の揮発性代謝産物を培養液から溶媒抽出する場合は、代謝産物以外の微量成分に汚染さ

いる可能性があまりにも大きい。Sp. odorusに限らず、微生物の生成する揮発性成分は、特殊な成分を除き、量的に極めて少ないのが普通である。そのために、培養液、抽出溶媒も宿命的に大量に使用しなければならない。汚染物質の混入、生成の可能性は、培地成分(水、無機塩、有機化合物)、滅菌処理(糖と窒素源との反応など)による揮発性成分の生成、抽出溶媒中の微量不純物などがその主なものと考えられる。本実験に於ても、酵母未接種の培地をエーテル抽出した場合、抽出液の濃縮度を大きくし、GLCの感度をあげれば数十のピークを検出することは容易であった。その故に Fig. 1 に挙げたように、抽出液に含まれる揮発性成分のうち、酵母の代謝産物と非代謝産物の区別が明瞭につく程度の濃縮度によって各成分の同定を行なうてゆくことは、微生物の生成する揮発性成分の同定には致し方のないことかもしれない。しかし、揮発性成分のほとんどは香気への寄与は、その化合物の官能的検出限界値とも関連しており、微量だからといって香気全体への寄与が少ないことを意味するものではないことは忘れる¹¹⁴⁾ならない。

(1) Sp. odorus の揮発性代謝産物 酵母の代謝産物との関連性

微生物の生産する香気性物質の研究は、醗酵飲料、醸造食品などの香味との関連から興味をもたれ、研究されている例が多い。¹¹⁵⁾ 微生物の作用によるこの種の揮発性物質の生成は、微生物の生合成的代謝系と、個々の食品成分あるいは原料成分(微生物の酵素系に対する基質)への微生物の作用性との関りあいによっているもので、同定された成分の内容、予想される生成機構など、極めて複雑な様相を呈している。

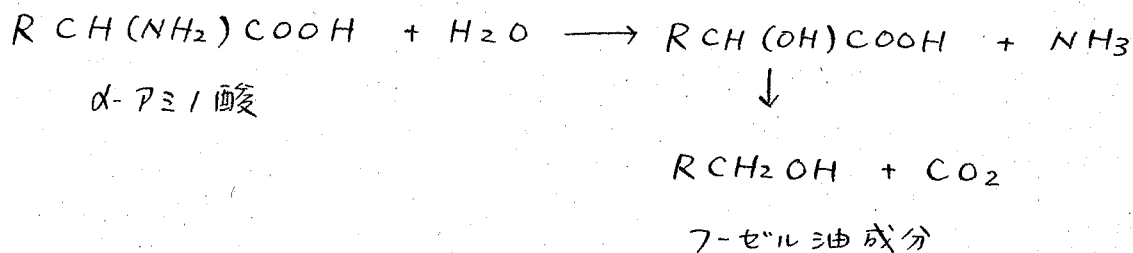
アルコール醗酵に伴う揮発性成分については、¹¹⁵⁾ Suomalainen および Nykanen や、¹¹⁶⁾ Harrison および Graham の総説に詳しい記述がある。後者によれば、brandy, fermented synthetic sugar medium, grain and potato spirit, fermented fruit juice, molasses spirit, rum, fermented sulphite liquor and wood hydrolyzate, vodka, whisky などの蒸溜酒の分析によって、アルコール類 33 種、酸 26 種、エステル類 88 種、カルボニル化合物 40 種、フェノール類 14 種、塩基 7 種、テルペン類 11 種、その他 (H_2S , naphthalene) 2 種などが同定されている。これらの同定された化合物のかなりのものについては、一部あるいは全

部が、直接醗酵原料の揮発性成分に由来するもの、基本的な構造が原料中に含まれる成分に由来するもの、酵母以外の微生物の生成物、熟成中に容器から移行したものの、取扱い中に外部から混入した成分ではないかと考えられている。例えば、whisky や一部の wine, brandy に見出された β -methyl- γ -octalactone は、蒸溜酒や wine の熟成中に樽材 (oak) から移行することが明らかにされたが、それ自身、熟成香氣中の重要な香氣成分の一つであることと Otsuka⁽¹¹⁷⁾ らが報告している。

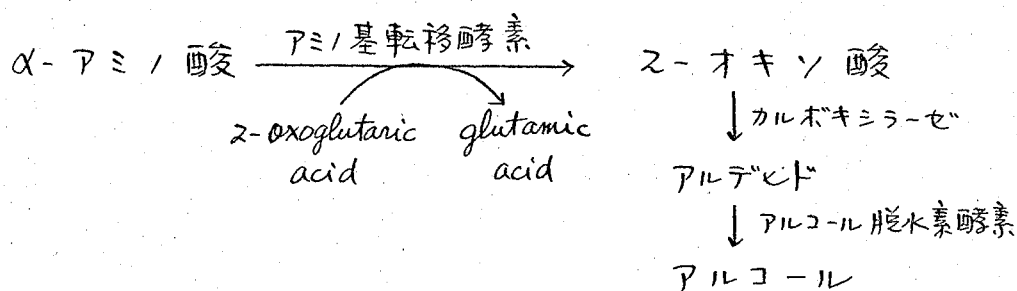
しかし、一方では、Suomalainen⁽¹¹⁸⁾ らは、アンモニアを窒素源とした糖液の酵母による醗酵によって得られる揮発性成分の GLC パターンと brandy や whisky のそれと比較し、それらが互いに驚く程に似ていることを指摘した。この事実は蒸溜酒中の揮発性成分の多くが、酵母によって糖とアンモニアから生成され得ることを示しており、2-オキソ酸やカルボニル化合物、高級アルコールなどの生成に於ても、それらが原料中の α -アミノ酸を前駆体とするという Ehrlich⁽¹¹⁹⁾ mechanism の寄与は、以前程主要なものとは考えられていない。

Ehrlich は酵母の窒素代謝と、フーセル油生成の関連を初めて指摘し、 α -アミノ酸が次のような経路

でアルコールに代謝され、途中で生成したアンモニアが酵母に利用されると考えた。



しかし、その後中間体として 2-オキシ酸は検出されず、アンモニアも遊離しないこと、脱炭酸反応の基質は 2-オキシ酸であること、アルデヒドの還元によりアルコールが生成することが明らかにされ、現在では、下記のパ経路が Ehrlich mechanism の真の反応系であると考えられている。



この系は酵母による醗酵に伴うフーセル油成分の由来を示し、アミノ酸を窒素源にした培地でアンモニアが遊離しないで利用されることの説明になると同時に、酵母の窒素代謝にアミノ基転移が重要な役割を負っていることを物語っている。

フーセル油成分が Ehrlich mechanism によってアミノ酸から生成する事実は否定できないが、Ingraham¹²⁰⁾

も述べているように、培地のアミノ酸組成と醗酵後のフーセル油成分の組成の間には、直接関係がない。培地のアミノ酸消費とフーセル油成分の生成の間に時間的一致がみられない。フーセルアルコールと言われるもののうちには、対応するアミノ酸が天然にはごく稀なものもある。さらに休止菌体による糖の醗酵の際にもフーセル油はそれなりに生成することなどから、Ehrlich mechanismのみでは、それらの生成を説明できない。例えば、窒素源としてアンモニアのみを含む培地で酵母を培養すれば、酵母はアミノ酸を生合成しなけねばならず、その際中間体として2-オキソ酸も生成する筈であり、この2-オキソ酸が脱炭酸、還元によって対応するアルコールになることも考えられてよい。それ故に、WebbとIngrahamの与えた酵母に於けるフーセル油成分の生成経路を示したScheme 7 (一部現著者追加作成)では、フーセルアルコール生成の系がEhrlich mechanismによってアミノ酸から出発するのみならず、炭水化物の分解によって供給されるpyruvic acidあるいはその関連化合物からも、それらへの経路が開かれていることが示されている。Scheme 7に加えて¹²²⁾ acetoin, diacetylの生合成系については、Quadesらの生合成研究によった。酵母によって生合成され

る vicinal diketone (diacetyl や 2,3-pentanedione) はビール中に広く見出され、ビールの香味に寄与するところが多いと考えられている。Acetoin と diacetyl は密接な関係にあり、acetoin reductase によって相互に変換される。

Scheme 7 の経路によって Sp. odorus の比較的微量の揮発性成分、例えば、isobutyl, *n*-butyl, isoamyl 及び *n*-amyl alcohol、それらに対応するカルボン酸、acetoin, 2-oxo-3-methylbutanoic, 2-oxo-3-methylpentanoic 及び 2-oxo-4-methylpentanoic acid などの代謝系に占める位置、生合成経路、各成分間の相互関係などを伺うことができる。

また、Sp. odorus が生成する芳香族アルコール、アルデヒド、カルボン酸なども、アミノ酸の分解的代謝系に結びつけられるが、合成培地に培養したことからすれば、これらの化合物は prephenic acid ($\rightarrow$ phenylpyruvic acid $\rightarrow$ β -phenyllactic acid, phenylalanine) を経る芳香環の生合成系と関連づけるのがより適切かもしれない。

(2) Sp. odorus の特徴的酸性代謝産物

酸性成分として、個々の化合物について既に生理

作用の知られている化合物、あるいはそれらの同族体に相当する化合物がいくつか見出された。酸性部成分の特徴的グループの一つとして、低級不飽和カルボン酸を挙げる事ができる。成分14, 15は2,4-heptadienoic acidである。この種の化合物は食品添加物(保存料)として利用されている sorbic acid (trans-2, trans-4-hexadienoic acid)、サンショヤコショウに含まれる殺虫性の不飽和酸N-イソブチルアミド類の一つ pellitorine の構成成分である 2,4-decadienoic acid など、生理作用を有するものあるいは生理活性物質の構成成分となっている化合物が少なくない。

Sorbic acid はもともと Hofmann⁽¹²⁵⁾ (1859) によって Sorbus aucuparia (ナナカマド) の未熟種子の抽出液を酸やアルカリで処理して得られたが、生体内ではラクトン性の化合物として存在していることを Doebner⁽¹²⁶⁾ が指摘し、その後 Kuhn および Terchel⁽¹²⁷⁾ によってその構造が、右旋性の 2-flexen-5-olide と決定された。Sorbic acid がこのように遊離で天然に存在していないとすれば、成分14の trans-2, cis-4-heptadienoic acid は天然に存在する 2,4-共軛不飽和カルボン酸としては、最も小さい化合物であろうと思われる。立体構造は sorbic acid とちがっているが、生理作用など興味ある問題を含んでいる。

天然の trans-2, cis-4-dienoic acid としては stillingia oil のトリグリセリド構成脂肪酸として Crossley および Hilditch⁽¹²⁸⁾ が 2,4-decadienoic acid の存在を明らかにし、Crombie⁽⁵⁸⁾ が合成的に立体構造を決定した stillingic acid (trans-2, cis-4-decadienoic acid) がよく知られている。立体構造はよく分っていないが、Sebastiana lingustrina の種子油中に 2,4-dodecadienoic acid⁽¹²⁹⁾ の存在も報告されている。その他、非脂質から得られた高度不飽和カルボン酸^(130, 131) については、生理活性化合物が多く、興味ある化合物のグループとなっている。成分との関連化合物として cis-4-heptenoic acid の存在が確認された。この成分は trans-2, cis-4-heptadienoic acid の α, β = 重結合が飽和になった化合物で、sorbic acid のカビによる代謝産物の研究 (参考論文 12) で得られた Geotrichum sp. C-48 による sorbic acid の trans-4-hexenoic acid への変換と関連づけられる興味ある代謝産物である。しかし、5% の malt extract 中で 4 日間培養した Sp. odorus に 500 ppm の potassium sorbate を添加、2 日間静置した後、培養液中の酸性成分を抽出し、GLC による成分の検討を行なったが、trans-4-hexenoic acid は検出できなかった。Sp. odorus の α, β = 重結合への作用性と同時に、Geotrichum sp. についても、基質

特異性の問題など解明されねばならない点も多い。

Methyl cis-4-heptenoate はホップ中の揮発性成分⁽¹³²⁾の一つであると言われている。

詳しい構造は明らかにできなかったが、成分15は成分14の幾何異性体と考えられること、成分18は nonadienoic acid (多分 4,6-共軛不飽和) と推定されるなど、不飽和カルボン酸の生合成に関しても興味ある問題を含んでいる。

Phenylacetic acid や L-β-phenyllactic acid に植物生長促進作用があることは Aberg⁽¹³³⁾ により、合成品の生物検定で確かめられたが、Aoki⁽¹³⁴⁾ らは phenylacetic acid と植物病原菌 (Rhizoctonia solani) の代謝産物として培養液から単離同定した。一方、L-β-phenyllactic acid は phenylalanine との関連が深いと考えられるが、Camien および Dunn⁽¹³⁵⁾ は Lactobacillus casei によって β-phenyllactic acid の phenylalanine への変換を明らかにした。Weiss⁽¹²³⁾ らは、E. coli の芳香環生合成の中間体 prephenic acid からの系を明らかにしている。⁽¹³⁶⁾ Maekawa および Kodama は L-β-phenyllactic acid を食酢より単離同定しているが、Tamura⁽¹³⁷⁾ らは植物病原菌 Exobasidium symploci-japonicae, 及び Gloeosporium lacticolor⁽¹³⁸⁾ の代謝産物の一成分であることと報告している。Sp. odorus の代謝産物と

して、これらの化合物が見出されたが、その量は少なかった。また培養液中には phenylalanine のアミノ基転移反応生成物である phenylpyruvic acid は検出されなかった。Rhodotorula mucilaginosa AHU 3946 の酸性代謝産物としては β -phenyllactic acid が最大成分で、数 mg/l は生成していると思われた。酸性部を検討した赤色酵母 7 種 10 株中、GLC で 9 株まで β -phenyllactic acid に相当するピークが検出されたことからしても、この成分は赤色酵母の代謝産物としては、比較的ありふれたものと思われる。

Sp. odorus の酸性代謝産物のもう一つの特徴的グループは、二塩基酸類である。Succinic acid などのエネルギー代謝中間体は広く見出される化合物であるが、azelaic acid や undecanedioic acid のような長鎖 α, ω, ω' -二塩基酸は珍しいものである。酵母や細菌によって n -アルカンの末端酸化により二塩基酸が生成することは知られているが、炭素骨格になる前駆体を添加していない培養液中に、 C_9, C_{11} などの二塩基酸を生成することは、Sp. odorus で初めて見出されたことである。

石油工業から得られる n -アルカンの資化性微生物の代謝産物として、 ω, ω' -diterminal oxidation を受

けた二塩基酸の生成することは Agino⁽⁶⁸⁾ ら、Tsuboi⁽¹³⁹⁾ ら
 によって見出されたが、Shio および Uchio は n-アル
 カン二塩基酸への微生物変換を行なわせるに当り、
 極めて論理的に研究を進め、i) ω, ω' -diterminal
 oxidation 活性を有する微生物のスクリーニングによ
 り Candida cloacae⁽¹⁴⁰⁾ の取得、ii) ω, ω' -diterminal oxidation
 活性を有しているが、反応生成物である ω, ω' -二塩
 基酸を資化できない変異株⁽¹⁴¹⁾ の取得、iii) ω, ω' -diterminal
 oxidation 活性は有するが、原料の n-アルカン及び生
 成物の ω, ω' -二塩基酸とともにエネルギー源として利
 用できない変異株⁽¹⁴²⁾ の取得、iv) 培養条件⁽¹⁴³⁾ の検討の各
 ステップを経て、長鎖二塩基酸の微生物工業的生産
 への道を開いた。この研究は、単に微生物による
 二塩基酸の生産という事実だけでなく、一つの作用
 を有する微生物の能力をいかに最大限発揮させるか
 という方向性を示しており、極めて示唆に富んだも
 のである。^(144, 145) Sato らは Candida brumptii による n-パ
 ラフィンから succinic acid の醗酵生産を報告してい
 る。

azelaic acid は、オレイン酸系列の不飽和脂肪酸の
 二重結合が酸化的に分解されると生成するため、植
 物油などからも見出されはするが、植物の代謝産物
 かどうか判別がつかない。興味ある例としては、

Housley および Taylor¹⁴⁶⁾ は azelaic acid が馬鈴薯の inhibitor- β (発芽抑制、生長阻害活性を有する) の一成分であることを報告している。

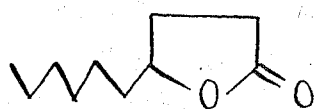
Sp. odorus は炭化水素を資化できず、nonane や undecane を培養液に添加しても、二塩基酸の生成量に変化はなかった。また、oleic acid, linoleic acid, linolenic acid などの添加培地でも C_9 , C_{11} = 塩基酸が著しく生成することはなかった。Sp. odorus における二塩基酸生成の生理的な意味、炭素骨格の起原など今後の研究をまたねばならない。

共軛不飽和二塩基酸である muconic acid は Pseudomonas fluorescens の芳香環分解産物として得られており、さらにラクトン (4-carboxymethyl-2-buten-4-olide) を経¹⁴⁷⁾て 3-oxoadipic acid への経路が Siström および Stainer によって示されている。

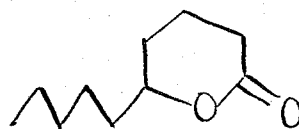
(3) 脂肪族ラクトン類

(3)-1. 天然 α 脂肪族ラクトン

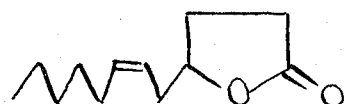
Sp. odorus の生成する 6-4 様の香気には最も寄与の大きいと思われる成分として、脂肪族 γ - および δ -ラクトン 4 種 (I~IV) を同定した。



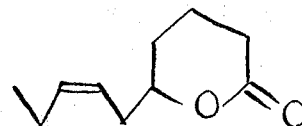
I. γ -decalactone
(4-decanolide)



III. δ -decalactone
(5-decanolide)



II. cis-6-dodecen-4-olide



IV. cis-7-decen-5-olide

単純な構造の脂肪族ラクトン類は、哺乳動物の乳脂、脂肪組織（前駆体のオキシ酸と12）、果実などの揮発性成分として比較的広く存在している。

γ -Decalactone (4-decanolide) の単離同定には以下の⁷⁶⁾ような報告がある。1954年 Patton⁷⁶⁾らは、加工乳の off flavor の原因物質として牛乳の脂質画分から 1~2 ppm の γ -及び δ -decalactone が生成することを見出し、乳製品の香りあるいは off flavor の研究に緒をつけた。¹⁴⁸⁾ Khatri¹⁴⁸⁾らは γ -線照射した milk fat の香気成分として、¹⁴⁹⁾ Watanabe および Sato¹⁴⁹⁾は beef fat の香気成分として γ -decalactone を見出している。一方、¹⁵⁰⁾植物起源のものとしては Schinz および Seidel¹⁵¹⁾が raspberry oil 中に、Jennings および Sevenants¹⁵²⁾はピーチのエッセンス中に、Willhalm¹⁵³⁾らは strawberry 中に、¹⁵⁴⁾ Schultz¹⁵³⁾らは orange に、Tang および Jennings¹⁵⁴⁾は

apricot に、Seifert¹⁵⁵⁾ は carrot seed oil に、von Sydow
 および Anjou¹⁵⁶⁾ は bilberry 中にそれぞれ香気成分とし
 て含まれていることを明らかにしている。

δ -Decalactone (5-decanolide) は Patton⁷⁶⁾ から milk fat
 から得た α にほいまり、Muck¹⁵⁷⁾ は milk より、Day^{158, 159)}
 はチーズより、中西及び渡辺¹⁶⁰⁾ は beef fat より、
 Boldingh¹⁶¹⁾ は、van Beers および van der Zijden¹⁶²⁾ は butter
 fat より定性、定量的に、Fors¹⁶³⁾ は butter oil より
 それぞれ、coconut 様の off flavor あるいは butter な
 ど α 香気成分として同定している。一方、Jennings¹⁵⁴⁾
 および Sevenants¹⁵¹⁾ は peach の、Tang および Jennings¹⁵⁴⁾ は
 apricot の、Allen¹⁶⁴⁾ は coconut oil 中の香気成分とし
 て δ -decalactone と同定した。乳製品については、
 新鮮乳中には遊離のラクトンがほとんど存在せず、
 もともとトリグリセリド中の対応するオキシ酸に由
 来するもので、加工中あるいは保存中に遊離したオ
 キシ酸がラクトン化して香気を発するようになる¹⁶⁵⁾と
 考えられている。Dimick¹⁶⁵⁾ によれば δ -C₁₀ ~ C₁₆ ラク
 トンに相当するオキシ酸の存在する脂質などとして
 次の様な例が挙げられている。Cow: milk fat,
 mammary tissue, depot fat, lipoprotein. Goat: milk fat.
 Sheep: milk fat, depot fat. Swine: milk fat, depot fat.
 Human: milk fat. 量は反芻動物で一般に多く、

単胃動物に少ない。

以上の様に、 γ -decalactone は植物起原のものが多く、 δ -decalactone は哺乳動物の脂質に由来するものが多い。

飽和の脂肪族ラクトンが比較的広く存在しているのに対して、側鎖に二重結合をもつ cis-6-dodecen-4-olide (II) や cis-7-decen-5-olide (IV) の天然の存在は非常に限られており、II は ⁴⁶⁾ van der Zijden ら (1966) によって初めて butter fat 中の微量成分として見出された。その後、⁴⁵⁾ Brownlee らは black-tailed deer (Odocoileus hemionus columbianus) の雄の足根骨付近から分泌される tarsal scent 中の主成分を単離、水添、二重結合のオゾン分解、IR スペクトルによりその構造を cis-6-dodecen-4-olide と推定した。さらに単離化合物を ⁴⁷⁾ Begemann らの合成品と比較することにより構造が確認されたが、¹⁶⁶⁾ Müller-Schwarze はこの化合物が、black-tailed deer の個体識別に役立つ哺乳類のフェロモンの一つだと言っている。

一方、cis-7-decen-5-olide (IV) は Jasminum glandiflorum (ジャスミン) の oil や wax 画分から初めて得られたため通常 jasmine lactone と呼ばれている。今のところ、この化合物の天然物起原はジャスミンが唯

-α も α である。単離同定を行なった Winter らによれば、jasmine lactone は左旋性 ($[\alpha]_D^{16} -30.4^\circ$) である。^{72, 73)} しかし Muys らは、酵母による 4-あるいは 5-オキソ酸のオキシ酸への還元生成物をラクトン化するとすべて右旋性のラクトンが得られたこと、*Sp. odorus* の生成した 4-decanolide は右旋性であったことからすれば、*Sp. odorus* の生成する *cis*-7-decen-5-olide は右旋性である可能性が大きい。¹⁶⁷⁾ Jasmine lactone の合成は、Demole および Winter により、cyclopentanone から enamine の調製、側鎖の導入、Baeyer-Villiger 酸化によって δ-lactone ring の形成を通じてなされた。⁵⁴⁾ そのほか、Heeringa ら、¹⁶⁸⁾ Ijima らの報告がある。van der Zijden らは butter fat 中の微量成分として II 以外にも 9-decen-5-olide, 9-tetradecen-5-olide の存在を確認あるいは推定している。しかし現在のところ、jasmine lactone を含めて、不飽和の側鎖を有するラクトン類については、香氣成分としての意味は判っていない。

(3)-2. *Sp. odorus* のラクトン生成と β^o-4 様香氣

Sp. odorus を培養し、その香りを最初に鼻にした

時から、本酵母の生成する香気をピーチ様と表現してきたが、先にも述べたようにピーチからも γ - δ - δ -decalactoneが見出されている。市販の合成香料 α - γ 、 γ -undecalactoneが稀薄な状態で、ピーチ様の香りを有していることから、別名ピーチ・アルデヒドとも言われるように、ピーチ様の香りには γ -ラクトンの関与が大きいと思われる。Jennings および Sevenants (1964, 1966) は 6 トンの Red Globe 種のピーチから得た典型的なピーチ香気を有するエッセンスの分析を行い、acetaldehyde, methyl acetate, ethyl acetate, ethyl alcohol, hexyl formate, hexyl acetate, trans-2-hexenyl acetate, hexyl alcohol, acetic acid, trans-2-hexenol, benzaldehyde, isovaleric acid, ethyl benzoate, γ -hexalactone, benzyl acetate, γ -heptalactone, caproic acid, benzyl alcohol, γ -octalactone, γ -nonalactone, hexyl benzoate, γ -decalactone, α -pyrone, δ -decalactone を同定した。それぞれ α 量は γ -decalactone $\gg$ δ -decalactone, benzaldehyde $>$ γ -hexalactone $>$ trans-2-hexenol, hexyl acetate $>$ benzyl alcohol $>$ γ -octalactone $>$ γ -nonalactone, γ -heptalactone など α 順になっていた。個々の成分はピーチを思わせるようなものではなかったが、GLC から溶出されてくる γ -decalactone は時として、ピーチジャムを思わせるものであったことから、香気へ

のラクトンの寄与が大きいことを予想している。

Sp. odorus の生成する香氣成分についても、 γ -decalactone $\geq$ cis-6-dodecen-4-olide > benzyl alcohol > isoamyl alcohol > β -phenylethyl alcohol > cis-7-decen-5-olide, δ -decalactone, benzaldehyde, phenylacetaldehyde などが主たる成分で、成分的にも相対的な量的関係も、ピーチ香氣とかなり類似していると判断してよいであろう。これらの結果のみから Sp. odorus の生成する香氣とピーチ香氣の同質性を云々することは出来ないかもしれないが、ある意味では Sp. odorus の香氣がピーチ様と比喻されるゆえんとも言えるであろう。

(3)-3. 食品香氣としてのラクトン類

食品の香氣成分としての脂肪族 γ -および δ -ラクトンは、脂肪酸エステルほど広く見出される成分ではないが重要なグループとなっている。⁷⁸⁾ Patton らの一連の研究が、加工乳のココナッツ様 off flavor の解明から δ -ラクトンへ到達し、前駆体の探求、前駆体の生合成研究へと進められていったのに対し、van der Zijden は Unilever の研究者は butter fat 中の香味成分としての微量成分の研究から、ラクトン類の

同定に至っている α も、食品香気としての α -ラクトン α 占める位置の複雑さを示している。 γ -および δ -decalactone以外にも、桃に含まれる γ -ラクトン類、⁽¹⁷⁰⁾パイン・アップルの γ -hexalactoneなどが知られている。
一方、 γ -および δ -ラクトン類が加熱処理によって脂肪あるいは脂肪酸などから酸化過程を経て生成することもあり、脂肪性食品のうち加熱加工処理を受けるものの香気成分としてラクトン類⁽¹⁷¹⁾が見出されることも多い。⁽¹⁷²⁾Kawadaらは接触還元した脂肪の揮発性成分中に、⁽¹⁷³⁾Fioritiらは自動酸化した植物油中に、Brownらはroasted peanut中に、脂肪族ラクトン α の存在を認めた。

Watanabe および Sato は beef fat 中の γ -および δ -ラクトン類⁽¹⁴⁹⁾を GLC で同定したが、試料の処理の仕方によってラクトン類の GLC パターンが違ふことから、遊離のラクトン、結合性のもの（主として、グリセリド中⁽¹⁷⁴⁾のオキシ酸）、更に加熱によるラクトンの新たな生成を検討した。⁽¹⁷⁵⁾Pork fat を 160~170°C で通気しながら加熱すると、加熱処理によってラクトンが生成し、オキシ酸に由来すると思われるものより量も多く、GLC パターンも変化することを見出した。化学的には γ -ラクトン α の方が δ -ラクトンよりも安定で、加熱による異性化がおこる場合にも、平衡は γ -ラク

トン側に傾いている。さらに彼らは飽和脂肪酸、アルデヒド、アルコールと酸化剤の存在下に、 180°C で加熱して多く α - γ -および δ -ラクトン類(低分子のもの、奇数炭素数 α のものを含む)が生成することを見出し、ラジカル反応を含む酸化反応によるラクトン生成経路¹⁷⁶⁾を提案した。これらの研究で明らかにされた事実は、熱加工食品のラクトン生成要因のひとつとなっていることは確かであると思われるが、食品香気への寄与の大きさについては、猶検討を要する問題も残されている。一方、乳製品中のラクトン、あるいは前駆体のトリグリセリド中のオキシ酸に由来する化合物は光学活性であり、さらに濃縮ミルクあるいは乳脂の保存中の off flavor (主として δ - C_{10} , δ - C_{12} ラクトンなどによる)の生成は、抗酸化剤の有無、酸素分圧などと無関係である(非酸化的過程)ことも広く認められている。

脂肪族ラクトン以外にも、食品香気として重要なラクトン類は少なくない。Maier の総説¹¹⁴⁾にも、coumarin, dihydroactinidiolide, phthalide, dihydrophthalide, furofuranolide などについて述べられている。

環内に不飽和結合を有するラクトンには、抗菌性¹⁷⁸⁾の化合物も知られており、桜井らは、五員環ラクト¹⁷⁹⁾

ン類の抗カビ性を調べている。飽和の脂肪族ラクトンは、それ程強い活性は有していないと言われている。

(4) 天然の脂肪族ラクトン類の生合成と Sp. odorus のラクトン生成との関係

現在のところ、脂肪族ラクトン類、その前駆体であるオキシ酸の生合成機構、生理的意義についての定説は得られていない。Sp. odorus は培養液中に4種類の脂肪族ラクトンを生成することが明らかにされ、生成ラクトンと構造的に関連が考えられる ricinoleic acid (高級オキシ酸)、ラクトンに対応するオキシ酸、高級不飽和脂肪酸、生成ラクトンと同じ鎖長を有する飽和脂肪酸に対する Sp. odorus の作用、 γ -decalactone 生成量に対する効果を検討したが、 γ -decalactone 生成に顕著な効果のあったのは、ricinoleic acid (12-hydroxy-9-octadecenoic acid) のみであった。一方、構成脂肪酸画分の微量成分中にも、ニつの γ -ラクトンに対応するオキシ酸以外には、生合成されるラクトンと関連づけられるようなオキシ酸の存在は明らかにすることができなかった。いくつかの赤色酵母で、オキシ酸 α オキシ酸へ

の還元がみられ、Sp. odorus 以外に R. rubra は、ricinoleic acid から 4-hydroxydecanoic acid を多く生成することが明らかにしたが、合成培地中にラクトン類を生成するのは、Sp. odorus のみであった。ここからも、カロチノイド生合成能と脂肪族ラクトン生合成能は、関係が薄いように思われた。

このように、Sp. odorus の脂肪族ラクトンの生成機構を示唆するような実験結果は、ほとんど得られなかったが、生成ラクトンの構造からしても、脂肪酸の生合成あるいは分解的代謝系との関連が強いように思われる。

生成量の比較的多い r-decalactone と cis-6-dodecan-4-olide の生成が同じ様式によっているとは考えられないかもしれない。その理由として、前者は培地の組成によって生成量の変動はあるにしても、生成そのものが抑えられることはないが、後者は培地中に mannitol, Polypepton を添加すると、その生成がほとんど見られなくなり、一方では、fructose や alanine によって r-decalactone の生成量とは関係なく、生成量の増大が観察された。このような培地組成によるラクトン生成量の制御は、それぞれのラクトンの生理的な意義を暗示するものかもしれないが、詳細は分らない。

また、Sp. odorus の培養液中には、ラクトンに対応するオキシ酸が少量含まれているが、4-hydroxy-decanoic acid は極めて少なく、4-hydroxy-cis-6-dodecanoic acid は酸性价メタルエステル画分に独立したピークとして検出され、量が比較的多かった。

哺乳類の乳脂中には、遊離のラクトンが存在するのではなく、オキシ酸がトリグリセリドとして存在することからしても、微生物の代謝産物として、オキシ酸とラクトンを同一視することには問題が無いわけではない。⁶⁹⁾ Tang および Jennings は、アフリコットの脂肪族ラクトンの由来を考察した際に、ラクトンに相当する 4-又は 5-オキシ酸さえ生成すれば¹⁸⁰⁾ Kossuge および Conn の coumarinic acid から coumarin への変化と同様に、自動的にラクトンが生成するであろうと判断している。しかし、本実験に於て、赤色酵母による ricinoleic acid から γ -decalactone 生成を検討した結果、R. rubra pH 5.54 で 97 % が 4-hydroxydecanoic acid として存在し、Sp. odorus, pH 4.86 では 79 % が γ -decalactone として存在していたことから、オキシ酸からラクトンへの変化に生物的作用を考えた方が理解しやすいように思われた。この推論に関連して、緩衝液中での 4-hydroxydecanoic acid の安定性を検討した結果、

Table XVIII. Stability of 4-Hydroxydecanoic Acid in Buffer Solutions.

4-Hydroxydecanoic acid added to succinic acid/sodium borate buffer solutions were shaken for 96 hr at 25°C, and then, neutral fractions extracted with ether (γ -decalactone) and acidic fractions (4-hydroxydecanoic acid) were determined by analytical GLC.

pH buffer soln.	determined mg/50ml		lactonized %
	lactone	hydroxy acid	
3.94	1.55	5.97	20.6
4.54	0.66	7.08	8.5
4.91	0.24	7.62	3.1
5.34	0.12	7.60	1.6
5.74	0.11	7.59	1.4
6.65	0.07	7.63	0.9
deionized water			
4.01	0.61	6.87	8.2
4-hydroxydecanoic acid used			
	0.01	7.30	0.1

pH、 γ -decalactone 生成量、残存オキシ酸量は Table XVIII に示した通りであった。25°C, 4日間の振盪によるオキシ酸のラクトンへの変化は、確かに溶液の pH に依存するが、変化の割合は、pH 4~4.5 で 10~20%, pH 5~6 では数%以下、pH 6以上では 1%程度で、4-hydroxydecanoic acid は

緩衝液 (0.1M succinic acid/sodium borate) 中で、思ったより安定であることが分った。従って、Sp. odorus で pH 4.8 ぐらいが下限であるとすれば、R. rubra α pH 5.54 に比較して、オキシ酸が自動的にラクトン化する α に十分低い pH とはいえず、オキシ酸 α ラクトン化する α も α にも、微生物の生理的な作用と想定するか、ricinoleic acid への作用様式のちがいを仮定しなければならないであろう。

乳脂中のオキシ酸生合成研究は、乳脂への $[1-^{14}\text{C}]$ acetate の放射活性とり込み率は高いが、対象とするオキシ酸の生成量が極めて少ないことから、供試放射活性化合物中の微量の不純物、分析画分の純度などによって実験結果が誤って解釈される危険が少なくない。また、果実などでは、ラクトン生合成研究にどのような放射活性化合物を使用するにしても、一般に放射活性 α とり込み率が低い上に、生合成されるラクトン α 量が極めて少ないことから、方法 α 上でも多く α 困難が予想される。

それに対して、微生物では世代の回転が速いこと、比較的大量培養も容易であること、栄養や他の要因の制御が行ないやすいことなど代謝研究には有利な場合が多い。

哺乳動物や植物の脂肪族ラクトン類の生合成機構
と Sp. odorus のそれが同じかどうかは問題があるに
いても、変異株の取得利用の¹⁸¹⁾可能性などを考慮すれ
ば、Sp. odorus は、不明な点が多く残されている脂
肪族ラクトン類生合成及びその生理的意義に関する
確かな知見を得るための有効な研究材料となること
が、大いに期待されるものである。

第 5 章 要 約

射出胞する酵母類でカロチノイド色素を生成する Sporobolomyces 属酵母のひとつ Sporobolomyces odorus は 1930 年、Derx により初めてオレンジの病葉から分離され、培地に芳香性物質を生成することから、種名を "odorus" と命名されたものである。近縁の Sp. roseus とは α -glucosidase 活性の有無、果実様の香気生成の有無などにより区別されている。

もともと、この研究はカロチノイドを生成する赤色酵母の代謝産物に対する興味から出発したものであるが、本論文は Sp. odorus の生成するピーチ様香気の本質解明に関する実験結果を主体としている。供試した Sp. odorus AHU 3246 株は、北海道大学農学部応用菌学教室より分譲を受けたが、この株は、1955 年 菊池らにより、札幌近郊の石切山付近の野葡萄の葉より分離されたものである。

本論文の内容は以下のように要約される。

- 1) Sp. odorus AHU 3246 は簡単な組成の合成培地 (例えば、D-glucose, L-asparagine 及び無機塩) に増殖できる

、 β -4様の芳香を生成する。香氣成分はエーテル抽出され、減圧水蒸気蒸溜によって溜出画分に移り、中性部、酸性部、塩基性部に分画すると、特徴的な香氣は中性部に移行した。Sp. odorusの生成する中性揮発性成分のGC-MS分析により構造を推定し、市販あるいは合成した標準化合物とマススペクトル、GLCの保持時間、その他の機器分析データを比較して各成分の同定を行なった。

同定された中性部成分は次の通りである(PEG-20Mと液相とするGLCで溶出される順): *n*-propyl ethyl ether*, ethyl formate*, methanol*, ethyl acetate*, ethanol*, sec-butanol, isobutanol, n-butanol*, isoamyl alcohol, n-amyl alcohol, acetoin, benzaldehyde, phenylacetaldehyde, benzyl alcohol, β -phenylethyl alcohol, γ -decalactone (4-decanolide), δ -decalactone (5-decanolide), cis-7-decen-5-olide, cis-6-dodecen-4-olide, di-n-butyl phthalate* (DBP) (*を付いた成分についてはその一部あるいは全部が非生物起原の可能性が大きい)。

低沸臭カルボニル化合物は2,4-dinitrophenylhydrazoneに誘導して、別に同定した。成分は、formaldehyde, acetaldehyde, acetone, methyl ethyl ketoneであった。

Sp. odorus 以外に赤色酵母 Rhodotorula glutinis, R. minuta, R. mucilaginosa, Sp. roseus (4株), Torula rosea, R. rubra についても、培養液中の揮発性代謝産物の

検討を行なったが、培地に顕著な香気の生成はなく、ラクトン類の生成も見られなかった。

2) 酸性部には、揮発性で遊離でも培養液の香気に影響を与える成分、エステル類の酸成分、あるいは生合成的に中性成分に関連づけられる成分の存在が予想されたので、*Sp. odorus* 培養液のエーテル抽出酸性部をメチルエステルに誘導した後、水蒸気蒸溜々出部と残部に分け、中性部と同様に成分の同定を行なった。

溜出部のメチルエステル構成酸成分として、*iso-butyric*, *n-butyric*, *isovaleric*, *n-valeric*, *cis-2-pentenoic**, *2-oxo-3-methylbutanoic*, *cis-4-heptenoic*, *trans-3-heptenoic*, *2-oxo-3-methylpentanoic*, *2-oxo-4-methylpentanoic*, *trans-2, cis-4-heptadienoic* とその幾何異性体*, *benzoic*, *nonadienoic**, *phenylacetic acid* と同定あるいは推定 (*を付したものは標準化合物との比較を行っていない) した。
 。 *trans-2, cis-4-Heptadienoic acid* は新化合物であったので、立体特異的に合成し、標準化合物として培地からの単離化合物と比較した。

酸性部メチルエステルの水蒸気蒸溜されにくい画分より、*dimethyl succinate*, *dimethyl muconate*, *dimethyl azelate* (*dimethyl nonanedioate*), *methyl β -phenyllactate*,

dimethyl phthalate, dimethyl undecanedioate, methyl 4-hydroxy-cis-6-dodecenoate, methyl n-butyl phthalate を同定した。

Methyl 4-hydroxy-cis-6-dodecenoate は GLC で検出した段階では、熱による脱メタノール反応によりラクトン化している。また、phthalate は DBP の酵母による加水分解生成物に由来すると思われた。

3) Sp. odorus の生成する中性、酸性代謝産物の特徴：中性部で同定された4種の脂肪族ラクトン類については、微生物による生合成が知られておらず、Sp. odorus の生成香気との関連からも、極めて興味深い代謝産物である。

酸性部にみられる比較的分子量の不飽和酸の存在、特に新化合物として同定された trans-2, cis-4-heptadienoic acid は食品保存料として使用されている sorbic acid のホモログであり、生理作用の点でも興味がある。

また、 C_9 , C_{11} の二塩基酸が培養液中に生成することと明らかにしたが、炭化水素資化性菌の n-アルカン ω, ω' -酸化生成物を除けば、この事実は微生物で初めて見出されたものである。

4) ビーチ様と表現される、Sp. odorus の生成する

香氣成分は、Jennings および Sevenants により Red globe 種の桃のエッセンスから分離同定された香氣成分と類似した臭が多い。Sp. odorus の生成するピーチ様の香りには、4種の脂肪族ラクトン、芳香族アルコール、芳香族アルデヒド、*isoamyl alcohol* などの寄与が大きいと思われた。

5) Sp. odorus による γ -decalactone の生成量は、増殖量にほぼ対応しており、増殖が最大に達した後、(たいてい)減少してゆく。 γ -Decalactone 及び cis-6-dodecen-4-olide の生成量を定量、前者は D-fructose-Polypepton 培地で 4.49 mg/l、後者は D-fructose-L-alanine 培地で 1.86 mg/l であった。さらに、Sp. odorus 以外に 6種9株の赤色酵母では、Sp. odorus の生成するラクトン類、二塩基酸、2,4-heptadienoic acid を生成するものは見出されなかったが、Sp. odorus では生成量の少なかった β -phenyllactic acid は R. rubra 以外の赤色酵母5種8株のいずれでも生成した。

6) Sp. odorus による脂肪族ラクトン生成と、哺乳動物の乳脂、植物(果実)の香氣成分であるラクトン類の生合成研究、前駆体からラクトンへの微生物変換に関する知見と比較検討した。

その結果、Sp. odorus は ricinoleic acid (12-hydroxy-cis-9-octadecenoic acid) から微量の γ-decalactone (150 ~ 170 mg/l) を生成する。他の赤色酵母でも同様の反応を行なわせたところ、R. rubra は 4-hydroxy-decanoic acid 100 mg/l を生成した (この時の培養液 pH 5.54)。この pH 領域で 4-オキシ酸が自動的にラクトン化する速度は小さく、Sp. odorus の場合、オキシ酸からラクトンへの変化も生理的な作用によっていると思われた。

4-Oxodecanoic acid の 4-hydroxydecanoic acid への還元は、T. rosea, R. mucilaginosa でかなり急速にあっただが、Sp. odorus のそれはかなり低かった。

7) Sp. odorus の構成脂肪酸及び微量酸成分の検討を行なった。脂肪酸組成 (%) : C_{14} , 0.64 ; C_{16} , 11.17 ; $C_{16:1}$, 0.74 ; C_{18} , 5.86 ; $C_{18:1}$, 26.49 ; $C_{18:2}$, 39.90 ; $C_{18:3}$, 13.49 ; その他, 1.98。 $C_{18:2}$ が最大成分であること、 $C_{18:3}$ が多いことが特徴であった。

微量成分としては、硅胶カラムクロマトにより、脂肪酸メチルエステルより極性の大きい画分を得、成分の分析を行なったが、酸性代謝産物として同定されている幾つかの成分と、未知成分からなり、二

つの γ -ラクトンに対応するオキシ酸以外に、ラクトン類の合成中間体らしいものは検出できなかった。

脂肪族ラクトン生成に関連がありそうに思われる化合物として、高級不飽和脂肪酸 (oleic, linoleic, linolenic 及び比較のため *stearic, ricinoleic acid*)、炭素数が生成ラクトンと同じ *decanoic, dodecanoic acid* に対する *Sp. odorus* の作用、ラクトン生成量に対するこれらの化合物の添加効果を調べたが、*ricinoleic acid* 以外は、いずれもラクトン生成に著しい効果は見出されなかった。

8) 乳脂中には、ラクトンに対応するオキシ酸が含まれており、乳製品の主要な香氣成分の一つである δ -ラクトン類の前駆体となっていることから、*Sp. odorus* の菌体内の結合型ラクトン (対応するオキシ酸) 量を定量した。総脂質画分の加水分解の前後による γ -decalactone の量 (遊離のオキシ酸は加熱によりラクトン化を行なった) の差は少なく、たかだか乾燥菌体 10g 当り 50 μ g 程度で、これが構成脂肪酸として存在したオキシ酸に由来するとしても、培地に蓄積するラクトンが、これらのオキシ酸から二次的に生成したとは考え難い。

植物(果実など)による脂肪族ラクトンの生成機構あるいは前駆物質については、ほとんど知られていないが、反芻動物の乳製品中に多く検出される δ -ラクトン類は、乳房中で生合成されるトリグリセリド中に含まれるラクトンに対応したオキシ酸に由来することが、一般に認められている。しかし、今のところ、哺乳動物のオキシ酸生合成機構、その生理的意義については推測の域を出ていない。

Sp. odorus は培養液中に、遊離の脂肪族ラクトンと生成する点で特異なものである。

Sp. odorus のラクトン生合成機構の追究は、残された大きな問題だが、哺乳動物、植物の脂肪族ラクトン生成も含めて、ほとんど未知であるラクトン類生合成機構、生理的な意味の解明のために、Sp. odorus は、変異株の取得、利用などを考慮すれば、研究材料として有効なものと考えられる。

引用文献

- 1) J. H. ファーブル (山田 吉彦、林 達夫 訳), 「昆虫記」 岩波文庫 第14分冊, 1964(改版), p 192.
- 2) J. G. MacConell and R. M. Silverstein: Recent results in insect pheromone chemistry. Angew. Chem. international Edit., 12, 644(1973).
- 3) 土屋 利一 編著 「GC-MS とその利用」, 講談社, 1974.
- 4) T. Sakan, S. Isoe and S. Be Hyeon. The structure of actinidiolide, dihydroactinidiolide, and actinidol. Tetrahedron Lett., 1967, 1623.
- 5) J. Bricout, R. Viani, F. Muggler-Chavan, J. P. Marion, D. Reymond and R. H. Egli. Composition of black tea aroma. Helv. Chim. Acta, 50, 1517(1967).
- 6) 福島 清吾, 赤堀 幸男, 恒屋 知之. 緑茶の精油成分よりシクロアクチニジオリドの分離. 葉誌, 88, 646 (1968).
- 7) K. Ina, Y. Sakato and H. Fukami. Isolation and structure elucidation of theaspirone, a component of tea essential oil. Tetrahedron Lett., 1968, 2777.
- 8) K. Ohkuma, F. T. Addicott, O. E. Smith and W. E. Thiessen. The structure of abscisin II. Tetrahedron Lett., 1965, 2529.
- 9) L. Caglioti, G. Cainelli, B. Camerio, R. Mondelli, A. Prieto, A. Quilico, T. Salvatori and A. Selva. The structure of trisporic-C acid. Tetrahedron, Suppl., 7, 175(1966).
- 10) H. J. Phaff. "The Yeasts, A taxonomic study" ed. by J. Lodder, 2nd, ed. North-Holland Pub. Co., Amsterdam, 1970, p831.
- 11) O. Verona and R. Ciferri, Atti Ist Botan. Univ. Pavia, Ser. IV, 10, 241(1938). See, reference 10).
- 12) J. Lodder and N. J. W. Kreger-van Rij. "The Yeasts, A taxonomic study". North-Holland Pub. Co., Amsterdam, 1952, p352.

- 13) K. Tubaki, Nagaoa, 3, 12(1953).
- 14) E. I. Kvasnikov, M. B. Tevelevich, I. F. Shchelokova and L. T. Kuzmenko. Effect of stimulators on the accumulation of biomass by yeasts of different taxonomic groups grown on n-alkanes. Mikrobiol. Zh. (Kiev), 32, 286(1970)(C. A., 73: 106631d).
- 15) T. Kaneko, K. Kitamura and Y. Yamamoto. Susceptibilities of yeasts to yeast cell wall lytic enzyme of Arthrobacter luteus. Agr. Biol. Chem., 37, 2295(1973).
- 16) R. M. Hamilton and S. F. Ziccarelli. Flavor potentiator composing dried, yeast-fermented whey. US 3726519 (C. A., 79: 17230d).
- 17) N. N. Gerber. Geosmin, from microorganisms, is trans-1, 10-dimethyl-trans-9-decalol. Tetrahedron Lett., 1968, 2971.
- 18) N. N. Gerber. Sesquiterpenoids from actinomycetes, cadin-4-en-1-ol. Phytochem., 10, 185(1971).
- 19) N. N. Gerber. A volatile metabolite of actinomycetes, 2-methylisoborneol. J. Antibiot., 22, 508(1969).
- 20) G. Sipma, B. van der Wal and D. K. Kettenes. The structure of mucidone, a metabolite of a Streptomyces species. Tetrahedron Lett., 1972, 4159.
- 21) H. D. Gaines and R. P. Collins. Volatile substances produced by Streptomyces odorifer. Lloydia, 26, 247(1963)(C. A., 60: 9627f).
- 22) R. P. Collins and H. D. Gaines. Volatile constituents produced by the actinomycete, Streptomyces odorifer, and the alga, Synura petersenii. Purdue Univ., Eng. Bull., Ext. Ser. No. 117, 769(1964)(C. A., 66: 35573d).
- 23) R. P. Collins, L. E. Knaak and J. W. Soboslai. Production of geosmin and 2-exo-hydroxy-2-methylbornane by Streptomyces odorifer. Lloydia, 33, 199(1970)(C. A., 73: 83953u).
- 24) N. N. Gerber. Volatile lactones from Streptomyces. Tetrahedron Lett., 1973, 771.

- 25) 山川 祥秀、後藤 昭二、横塚 勇. 芳香物質生産微生物に関する研究, 1. Geotrichum sp. No. 423 の菌学的性質と生産する中性芳香成分について, 2. Geotrichum sp. No. 423 によるアミノ酸から高級アルコールの生成について. 昭和45年度日本農芸化学会関東支部大会講演要旨.
- 26) 直井 家寿太、小久保 弥太郎、二島 太一郎、北村 久寿久、松本 茂. 微生物の代謝産物 I. ぶどう球菌の産生する揮発性物質のガスクロマトグラフィー, 東京衛研年報 20, 149 (1970), 直井 家寿太、小久保 弥太郎、二島 太一郎、松本 茂. 同. II. 好気性有芽胞菌の産生する揮発性物質のガスクロマトグラフィー. 同, 20, 155 (1970) [日本化学総覧 44: 1184].
- 27) B. M. Guirard: Microbial nutrition. Ann. Rev. Microbiol., 12, 247(1958).
- 28) C. Rainbow. Brewer's Yeasts in "The Yeasts" Vol. 3 ed. by A. H. Rose and J. S. Harrison. Academic press, London, 1970, p186.
- 29) M. J. Lewis and C. Rainbow, J. Inst. Brew., 71, 150(1965). See, reference 28).
- 30) R. K. Thauer, K. Jungermann, H. Henninger, J. Wenning and K. Decker. The energy metabolism of Clostridium kluyveri. European J. Biochem., 4, 173(1968).
- 31) E. H. Marth, C.M. Capp, L. Hasenzahl, H. W. Jackson and R. V. Hussong. Degradation of potassium sorbate by Penicillium species. J. Dairy Sci., 49, 1197(1966).
- 32) E. M. Lukas. Biochemical decomposition of sorbic acid by Aspergillus niger. Zentr. Bacteriol. Parasitenk., Abt. II, 117, 485(1964)(C. A., 61: 4752g).
- 33) J. A. Riddick and W. B. Bunger ed. "Organic Solvents, physical properties and methods of purification" 3rd ed. Wiley-Interscience, New York, 1970, p694.
- 34) T. Miyoshi and T. Harada. Formation of dibutyl phthalate from 2-butyne-1,4-diol by a soil bacterium. Biochim. Biophys. Acta, 222, 684(1970).
- 35) 内藤 敦、有川 恵子. 微生物による di-butyl phthalate の生成. 日本農芸化学会. 昭和47年度大会講演要旨集 p15.
- 36) 片瀬 隆雄: フタル酸系可塑剤の安全が. 科学 42, 349

- (1972). 片瀬 隆雄, 磯野直彦: 再びプラスチック添加剤について. 同, 42, 407 (1972).
- 37) A. Mehlitz, K. Gierschner and T. Minas, Chem. Ztg., 87, 573(1963). See, "Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Handbook" E. Stahl ed. M. R. F. Ashworth translated. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1969, p220.
 - 38) J. W. Ralls. Rapid method for semiquantitative determination of volatile aldehydes, ketones and acids. Flash exchange gas chromatography. Anal. Chem., 32, 332(1960).
 - 39) R. L. Stephens and A. P. Teszler. Quantitative estimation of low boiling carbonyls by a modified alpha-ketoglutaric acid-2,4-dinitrophenylhydrazine exchange procedure. Anal. Chem., 32, 1047(1960).
 - 40) E. Honkanen, T. Moisio and P. Karvonen. The mass spectra of some aliphatic lactones. Acta Chem. Scand., 19, 370(1965).
 - 41) W. H. McFadden, E. A. Day and M. J. Diamond. Correlation and anomalies in mass spectra. Lactones. Anal. Chem., 37, 89(1965).
 - 42) Q. N. Porter and J. Baldas. "Mass Spectrometry of Heterocyclic Compounds" Wiley-Interscience, New York, 1971, p181.
 - 43) W. J. Lennarz, G. Scheuerbrandt and K. Bloch, with a note by R. Ryhage. The biosynthesis of oleic acid and 10-methylstearic acid in Mycobacterium phlei. J. Biol. Chem., 237, 664(1962).
 - 44) G. Scheuerbrandt and K. Bloch. Unsaturated fatty acids in microorganisms. J. Biol. Chem., 237, 2064(1962).
 - 45) R. G. Brownlee, R. M. Silverstein, D. Müller-Schwarze and A. G. Singer. Isolation, identification and function of the chief component of the male tarsal scent in black-tailed deer. Nature, 221, 284(1969).
 - 46) A. S. M. van der Zijden, K. de Jong, D. Sloot, J. Clifford and R. J. Taylor. Trace components of butterfat. IV. Isolation and identification of unsaturated

- aliphatic lactones. Rev. Franc. Corps Gras, 13, 731(1966)(C. A., 66: 75049u).
- 47) P. Haverkamp Begemann, V. Lamberti and W. T. Weller. The synthesis of lactones. Part III. δ -Enollactones and lactones with exocyclic double bonds. Rec. Trav. Chim., 87, 1335(1968).
 - 48) R. Couffignal, M. Gaudemer et P. Perriot. Sur la préparation des bromures propargyliques du type $R-C\equiv C-CH_2Br$. Bull. Soc. chim. France, 1967, 3909.
 - 49) J. Cason. β -Carbomethoxypropionyl chloride. Org. Syntheses Coll. Vol., 3, 169(1955).
 - 50) E. Mosettig and R. Mozingo: The Rosenmund reduction of acid chlorides to aldehydes. Org. React., 4, 362(1948).
 - 51) E. E. Dreger. n -Hexyl alcohol. Org. Syntheses Coll. Vol., 1, 306(1941).
 - 52) D. J. Cram and N. L. Alliger. Macro rings XIII. Synthesis and properties of 1,7-cyclodecadiyne and related compounds. J. Amer. Chem. Soc., 78, 2518(1956).
 - 53) M. Winter, G. Malet, M. Pfeiffer et E. Demole. Structure d'une lactone odorante présente dans l'essence de jasmin(Jasminum grandiflorum L.). Helv. Chim. Acta, 45, 1250(1962).
 - 54) L. G. Heeringa, R. Fehn, J. D. Grossman and B. D. Mookherjee. Decenoic and decynoic acid lactones. Ger. Offen., 1803460..
 - 55) C. Rainbow. Brewer's Yeasts in "The Yeasts" Vol. 3, pl47. See, reference 28).
 - 56) H. Budzikiewicz, C. Djerassi and D. H. Williams. "Mass Spectrometry of Organic Compounds" Holden-Day Inc., San Francisco, 1967, pl74.
 - 57) W. K. Rohwedder, A. F. Mabrouk and E. Selke. Mass spectrometric studies of unsaturated methyl esters. J. Phys. Chem., 69, 1711(1965).
 - 58) L. Crombie. Amides of vegetable origin. Part V. Stereochemistry of conjugated dienes. J. Chem. Soc., 1955, 1007.

- 59) J. L. H. Allan, E. R. H. Jones and M. C. Whiting.
Researches on acetylenic compounds. Part XLIX. The preparation and ultraviolet absorption spectra of the stereoisomeric conjugated hexadienoic and hexenynoic acids. J. Chem. Soc., 1955, 1862.
- 60) J. L. H. Allan, G. D. Meakins and M. C. Whiting.
Researches on acetylenic compounds. Part L. The infrared absorption of some conjugated ethylenic and acetylenic systems. Ibid., 1955, 1874.
- 61) J. A. Elvidge and P. D. Ralph. Polyene acids. Part X. The conformation of hexenolactone and the configuration of the derived sorbic acid as indicated by proton magnetic resonance spectroscopy. Ibid., (B), 1966, 243.
- 62) R. Kuhn und C. Grundmann. Synthese der Hildebrandt-Säure; über den Aufbau methylierter Polyen-dicarbon-säuren. Ber., 70, 1894(1937).
- 63) D. A. Thomas and W. K. Warburton. The preparation of cis- and trans-pent-2-enal. J. Chem. Soc., 1965, 2988.
- 64) J. C. Hamlet, H. B. Henbest and E. R. H. Jones.
Researches on acetylenic compounds. Part XXXII. Dehydration of acetylphenyl- and vinylacetyl-alcohols derived from cyclohexanone, and the hydration of the resultant hydrocarbons. Ibid., 1951, 2652.
- 65) R. P. Holysz. Preparation and dehydrohalogenation of 4-halo-3-ketosteroids. J. Amer. Chem. Soc., 75, 4432(1953).
- 66) J. Colonge and G. Poilane. Use of 4-chloro-2-buten-1-ol in organic synthesis. Action on organomagnesium compounds. Bull. Soc. chim. France, 1955, 953.
- 67) J. Attenburrow, A. F. B. Cameron, J. H. Chapman, R. M. Evans, B. A. Hems, A. B. A. Jansen and T. Walker.
Synthesis of vitamin A from cyclohexanone. J. Chem. Soc., 1952, 1094.
- 68) S. Ogino, K. Yano, G. Tamura and K. Arima. Utilization of hydrocarbons by yeasts II. Diterminal oxidation of alkanes by yeasts. Agr. Biol. Chem., 29, 1009(1965).

- 69) C. S. Tang and W. G. Jennings. Lactonic compounds of apricot. J. Agr. Food Chem., 16, 252(1968).
- 70) T. Galliard and P. K. Stumpf. Fat metabolism in higher plants. XXX. Enzymatic synthesis of ricinoleic acid by a microsomal preparation from developing Ricinus communis seeds. J. Biol. Chem., 241, 5806(1966).
- 71) M. Yamada and P. K. Stumpf. Fat metabolism in higher plants. XXV. The enzymic degradation of hydroxy long chain acids by extracts of Ricinus communis. Plant Physiol., 40, 659(1965).
- 72) G. T. Muys, B. van der Ven and A. P. de Jonge. Synthesis of optically active γ - and δ -lactones by microbiological reduction. Nature, 194, 995(1962).
- 73) Idem. Preparation of optically active γ - and δ -lactones by microbiological reduction of the corresponding keto acids. Appl. Microbiol., 11, 389(1963).
- 74) A. Francke. Enzymic reduction of δ -keto acids to the corresponding optically active hydroxy acids. Nature, 197, 384(1963).
- 75) S. Okui, M. Uchiyama and M. Mizugaki. Metabolism of hydroxy fatty acids. II. Intermediate of the oxidative breakdown of ricinoleic acid by genus Candida. J. Biochem(Tokyo), 54, 536(1963).
- 76) S. Patton, P. G. Keeney and C. T. Herald. Lactones in flavor deterioration of milk fat. Science, 119, 218(1954).
- 77) J. Boldingh and R. J. Taylor: Trace constituents of butterfat. Nature, 194, 909(1962).
- 78) P. S. Dimick, N. J. Walker and S. Patton: Occurrence and biochemical origin of aliphatic lactones in milk fat — a review. J. Agr. Food Chem., 17, 649(1969).
- 79) L. R. Mattick, S. Patton and P. G. Keeney. Observations on the origin of δ -decalactone in fat-containing dairy products. J. Dairy Sci., 42, 791(1959).
- 80) B. van der Ven. Detection of γ - and δ -keto acids in butterfat. Rec. Trav. Chim., 83, 976(1964)(C. A., 62: 7033g).

- 81) I. Katz and M. Keeney. Characterization of the octadecenoic acids in rumen digesta and rumen bacteria. J. Dairy Sci., 49, 962(1966).
- 82) Idem. Occurrence of ketostearic acids in the rumen. Ibid., 49, 967(1966).
- 83) G. Jurriens and J. M. Oele. Determination of hydroxy acid triglyceride and lactones in butter. J. Am. Oil Chemists' Soc., 42, 857(1965).
- 84) T. H. Parliment, W. W. Nawer and I. S. Fagerson. Origin of δ -lactone in heated milk fat. J. Dairy Sci., 49, 1109(1966).
- 85) C. J. Wyatt, R. L. Pereira and E. A. Day. The lactone precursor in fresh milk fat. Identification of the hydroxy fatty acids. Lipids, 2, 208(1967).
- 86) J. E. Kinsella, S. Patton and P. S. Dimick. Chromatographic separation of lactone precursors and tentative identification of the γ -lactones of 4-hydroxyoctanoic and 4-hydroxynonanoic acid in butterfat. J. Am. Oil Chemists' Soc., 44, 202(1967).
- 87) A. I. Virtanen: Milk production of cows on protein-free feed. Science, 153, 1603(1966).
- 88) N. J. Walker, S. Patton and P. S. Dimick. Incorporation of (1- ^{14}C)acetate into the aliphatic δ -lactones of ruminant milk fat. Biochim. Biophys. Acta, 152, 445(1968).
- 89) P. S. Dimick, N. J. Walker and S. Patton. Lipid metabolism. Evidence of δ -oxidation pathway for saturated fatty acids. Biochem. J., 111, 395(1969).
- 90) S. Kumar, V. N. Singh and R. Keren-Paz. Biosynthesis of short-chain fatty acids in lactating mammary supernatant. Biochim. Biophys. Acta, 98, 221(1965).
- 91) G. H. Smith and S. McCarthy. Synthesis of milk fat from β -hydroxybutyrate and acetate in mammary tissue in the cow. Ibid., 176, 664(1969).
- 92) P. E. Swenson, P. S. Dimick. Non-involvement of δ -hydroxy acid in the oxidation of milk fatty acids.

- Biochem. J., 125, 1139(1971).
- 93) P. E. Swenson, P. S. Dimick and N. J. Walker. Relations between the aliphatic δ -lactones and fatty acids in ruminant milk lipids. J. Dairy Sci., 56, 1337(1973).
 - 94) A. Takeda, K. Takahashi, S. Torii and T. Moriwake. A convenient preparation of γ -keto acids. J. Org. Chem., 31, 616(1966).
 - 95) K. Uchida and K. Mogi. Fatty acid spectra of Pediococcus urinae-equi, P. homari, comparing with other Pediococci. An application of high resolution capillary column gas-chromatography for bacterial taxonomy. Agr. Biol. Chem., 35, 136(1971).
 - 96) J. Folch, M. Lees and G. H. S. Stanley. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226, 497(1957).
 - 97) T. Suzuki, A. Takigawa and K. Hasegawa. Lipid extraction methods for Lipomyces starkeyi. Agr. Biol. Chem., 37, 2653(1973).
 - 98) T. A. Pedersen. Lipid formation in Cryptococcus terricola. III. Extraction and purification of lipids. Acta Chem. Scand., 16, 374(1962).
 - 99) W. J. Lennarz, G. Scheuerbrandt and K. Bloch. The biosynthesis of oleic and 10-methylstearic acids in Micobacterium phlei. J. Biol. Chem., 237, 664(1962).
 - 100) W. M. O'Leary: The fatty acids of bacteria. Bacteriol. Rev., 26, 421(1962).
 - 101) M. Kates: Bacterial lipids. Advan. Lipid Res., 2, 17(1964).
 - 102) K. Hunter and A. H. Rose. "The Yeasts" Vol. 2. Ed. by A. H. Rose and J. S. Harrison. Academic Press, London, 1971, p211.
 - 103) "Handbook of Microbiology" Vol. II. Microbial Composition. Ed. by A. I. Laskin and H. A. Lechevalier. CRC Press, Cleveland, 1973, p301.
 - 104) F. H. Stodola, M. H. Deinema and J. F. T. Spencer: Extracellular lipids of yeasts. Bacteriol. Rev., 31,

- 194(1967).
- 105) K. Hunter and A. H. Rose. Lipid composition of Saccharomyces cerevisiae as influenced by growth temperature. Biochim. Biophys. Acta., 260, 639(1972).
 - 106) M. Mishina, S. Yanagawa, A. Tanaka and S. Fukui. Effect of chain-length of alkane substrate on fatty acid composition and biosynthetic pathway in some Candida yeasts. Agr. Biol. Chem., 37, 863(1973).
 - 107) F. Lynen: The fatty acid synthetase from yeast, in "Aspect of Yeast Metabolism" ed. by A. K. Mills. Blackwell Scientific Pub., Oxford and Edinburgh, 1967, p271.
 - 108) P. C. Yang, P. H. W. Butterworth, R. M. Bock and J. W. Porter. Further studies on the properties of the pigeon liver fatty acid synthetase. J. Biol. Chem., 242, 3501(1967).
 - 109) A. A. Andreassen and T. J. B. Stier. Anaerobic nutrition of Saccharomyces cerevisiae. II. Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium. J. Cellular Comp. Physiol., 43, 271(1954)(C. A., 48: 12889c).
 - 110) D. K. Bloomfield and K. Bloch. The formation of Δ^9 -unsaturated fatty acids. J. Biol. Chem., 235, 337(1960).
 - 111) F. Meyer and K. Bloch. Effect of temperature on the enzymatic synthesis of unsaturated fatty acids in Torulopsis utilis. Biochim. Biophys. Acta, 77, 671(1963).
 - 112) C. M. Brown and A. H. Rose. Fatty-acid composition of Candida utilis as affected by growth temperature and dissolved-oxygen tension. J. Bacteriol., 99, 371(1969).
 - 113) W. W. Nawar: Thermal degradation of lipids. J. Agr. Food Chem., 17, 18(1969).
 - 114) H. G. Maier: Volatile flavoring substances in foodstuffs. Angew. Chem. internat. Edit., 9, 917(1970).
 - 115) H. Suomalainen and L. Nykanen: Formation of aroma compounds in alcoholic beverage. Wallerstein Lab. Commun.,

- 35, 185(1972).
- 116) J. S. Harrison and J. C. J. Graham: Yeast in distillery practice. "The Yeasts" Vol. 3, p281. See, reference 28).
 - 117) K. Otsuka, Y. Zenibayashi, M. Itoh and A. Totsuka. Presence and significance of two diastereomers of β -methyl- γ -octalactone in aged distilled liquors. Agr. Biol. Chem., 38, 485(1974).
 - 118) H. Suomalainen: The structure and function of the yeast cell, in "Aspects of Yeast Metabolism" See, reference 107).
 - 119) C. Rainbow: Brewer's yeasts, in "The Yeasts" Vol. 3, p179. See, reference 28).
 - 120) J. L. Ingraham, Tech. Quart. Master Brewers Ass. Amer., 2, 85(1965). See, "The Yeasts" Vol. 3, p195 and reference 28).
 - 121) A. D. Webb and J. L. Ingraham, Advanc. appl. Microbiol., 5, 317(1965). See, "Aspects of Yeast Metabolism" p16 (reference 107)).
 - 122) J. L. Owades, L. Maresca and G. Rubin. Proc. A. M. Amer. Soc. Brew. Chem., 1959, 22. See, "The Yeasts" Vol. 3, p202, and reference 28).
 - 123) U. Weiss, C. Gilvarg, E. S. Mingioli and B. D. Davis. Aromatic biosynthesis XI. Aromatization step in the synthesis of phenylalanine. Science, 119, 774(1954).
 - 124) L. Crombie. Amides of vegetable origin. Part IV. The nature of pellitorine and anacyclin. J. Chem. Soc., 1955, 999. A. Banerji, R. N. Rej and P. C. Ghosh. Isolation of N-isobutyl deca-trans-2,trans-4-dienamide from Piper sylvaticum Roxb. Experientia, 30, 223(1974).
 - 125) A. W. Hofmann. Neue flüchtige Säure der Vogelbeeren (Sorbus auctuparia L., Rosaceae). Ann., 110, 129(1859).
 - 126) O. Doebner. Ueber das flüchtige Oel der Vogelbeeren, die Parasorbinsäure und ihre Isomerie mit der Sorbinsäure. Ber., 27, 344(1894), ibid., 23, 2372(1890).
 - 127) R. Kuhn and D. Jerchel. 2-Hexen-4,1-olide and 2-hexen-5,1-olide; constitution of the parasorbic acid from the

- volatile oil of ripe rowanberries. Ber., 76B, 413 (1943).
- 128) A. Crossley and T. P. Hilditch. Constitution and properties of a conjugated diene acid present in stillingia oil. J. Chem. Soc., 1949, 3353.
- 129) R. T. Holman and D. P. Hanks. Isolation of 2,4-dodecadienoic acid from the seed oil of Sebastiana linguistrina. J. Am. Oil Chemists' Soc., 32, 356(1955).
- 130) W. B. Turner. "Fungal Metabolites" Academic Press Inc., London, 1971, p66.
- 131) J. D. BuLock, Quart. Revs(London)., 10, 371(1956), E. M. Meade, Nature, 168, 900(1951). L. Feinstein and M. Jacobson. "Progress in the Chemistry of Organic Natural Products", 10, 423(1953). (参照)市平崎 巖. 高度不能物モノカルボン酸. 大有機化学、4巻、小竹無=雄監修、朝倉書店、1959, p223.
- 132) R. G. Buttery, W. H. McFadden, R. E. Lundin and M. P. Kealy. Volatile hop constituents; conventional and capillary gas-chromatographic separation with characterization by physical methods. J. Inst. Brew., 70, 396(1964).
- 133) B. Aberg. Plant growth regulators XIX. Phenylacetic acid and related substances. Lantbruks-Hogskolans Ann., 29, 3(1963).
- 134) H. Aoki, T. Sassa and T. Tamura. Phytotoxic metabolites of Rhizoctonia solani. Nature, 200, 575(1963).
- 135) M. N. Camien and M. S. Dunn. Responce of lactic acid bacteria to amino acid derivatives IV. Lactobacillus casei 280-16A and phenyllactic acid. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 99, 487(1958)(C. A., 53: 7310e).
- 136) K. Maekawa and M. Kodama. Isolation and identification of phenolic acids in rice vinegar. Agr. Biol. Chem., 28, 436(1964).
- 137) S. Tamura and Ching-Fun Chang. Isolation of L- β -phenyllactic acid as a plant growth-regulator produced by Exobasidium. Ibid., 29, 1061(1965).
- 138) Y. Kimura and S. Tamura. Isolation of L- β -phenyllactic

- acid and tyrosol as plant growth regulators from Gloeosporium laeticolor. Ibid., 37, 2925(1973).
- 139) T. Tsuboi, C. Sekijo and O. Shoji. Production of biotin vitamers from hydrocarbons. Ibid., 30, 1243(1966).
- 140) I. Shiio and R. Uchio. Microbial production of long-chain dicarboxylic acids from n-alkanes. Part I. Screening and properties of microorganisms producing dicarboxylic acids. Ibid., 35, 2033(1971).
- 141) R. Uchio and I. Shiio. Microbial production of long-chain dicarboxylic acids from n-alkanes. Part II. Production by Candida cloacae mutant unable to assimilate dicarboxylic acid. Ibid., 36, 426(1972).
- 142) Idem. Part III. Production of dicarboxylic acids by Candida cloacae mutant unable to assimilate n-alkane. Ibid., 36, 1169(1972).
- 143) Idem. Part IV. Tetradecane-1,14-dicarboxylic acid production from n-hexadecane by Candida cloacae. Ibid., 36, 1389(1972).
- 144) M. Sato, T. Nakahara and K. Yamada. Preliminary screening of microorganisms producing succinic acid from n-paraffin. Ibid., 36, 1745(1972).
- 145) Idem. Fermentative production of succinic acid from n-paraffin by Candida brumptii IFO 0731. Ibid., 36, 1969(1972).
- 146) S. Housley and W. C. Taylor. Plant-growth hormones VI. Nature of inhibitor β in potato. J. Exptl. Botany, 9, 458(1958).
- 147) W. R. Sistrom and R. Y. Stainer. The mechanism of formation of β -ketoadipic acid by bacteria. J. Biol. Chem., 210, 821(1954).
- 148) L. L. Khatri, L. M. Libbey and E. A. Day. Gas chromatographic and mass spectral identification of some volatile components of γ -irradiated milk fat. J. Agr. Food Chem., 14, 465(1966).
- 149) K. Watanabe and Y. Sato. Studies on the changes of meat fats by various processings. Part II. Gas chromato-

- graphic identification of aliphatic γ - and δ -lactones obtained from beef fats. Agr. Biol. Chem., 32, 191(1968).
- 150) H. Schinz and C. F. Seidel. Aromatic materials. I. Raspberry aromatic materials. Helv. Chim. Acta, 40, 1839(1957).
- 151) W. G. Jennings and M. R. Sevenants. Volatile components of peach. J. Food Sci., 29, 796(1964).
- 152) B. Willhalm, E. Palluy and M. Winter. Flavors. XII. The flavor of fresh strawberries. Identification of the volatile acid and other compounds. Helv. Chim. Acta, 49, 65(1966).
- 153) T. H. Schultz, D. R. Black, J. L. Bomben, T. R. Mon and R. Teranishi. Volatiles from orange. V: Constituents of the essence identified by mass spectra. J. Food Sci., 32, 698(1967).
- 154) C. S. Tang and W. G. Jennings. Volatile components of apricot. J. Agr. Food Chem., 15, 24(1967).
- 155) R. M. Seifert, R. G. Buttery and L. Ling. Identification of some constituents of carrot seed oil. J. Sci. Food Agr., 19, 383(1968).
- 156) E. Von Sydow and K. Anjou. Aroma of bilberries (Vaccinium myrtillus). I. Identification of volatile compounds. Lebens. -Wiss. Technol., 2, 78(1969)(C. A., 71: 94684s).
- 157) G. A. Muck, J. Tobias and R. McL. Whitney. Flavor of evaporated milk. I. Identification of some compounds obtained by the petroleum ether solvent partition technique from aged evaporated milk. J. Dairy Sci., 46, 774(1963).
- 158) E. A. Day and L. M. Libbey. Cheddar cheese flavor. Gas chromatographic and mass spectral analyses of the neutral compounds of the aroma fraction. J. Food Sci., 29, 583(1964).
- 159) E. A. Day and D. F. Anderson. Gas chromatographic and mass spectral identification of neutral compounds of

- the aroma fraction of blue cheese. J. Agr. Food Chem., 13, 2(1965).
- 160) 中西 武雄、渡辺 乾二、食肉脂肪の各種処理による変化に関する研究(第1報)。牛脂肪におけるラクトン存在について。農化誌, 40, 222 (1966).
- 161) J. Boldingh, P. H. Begemann, A. P. de Jonge and R. J. Taylor. Trace components of butterfat. I. Isolation and identification of saturated aliphatic lactones. Rev. Franc. Corps Gras, 13, 235(1966)(C. A., 65: 2904b).
- 162) G. J. van Beers and A. S. M. van der Zijden. Trace components of butterfat. III. Quantitative determination of saturated δ -lactones by isotope dilution. Ibid., 13, 463(1966)(C. A., 65: 12778h).
- 163) D. A. Forss, W. Stark and G. Urbach. Volatile compounds in butter oil I. Lower-boiling compounds. J. Dairy Sci., 34, 131(1967).
- 164) R. R. Allen. Volatile flavor constituents in coconut oil. Chem. Ind., 1965, 1560.
- 165) P. S. Dimick, S. Patton, J. E. Kinsella and N. J. Walker. The prevalence of aliphatic delta-lactones or their precursors in animal fats. Lipids, 1, 387(1966).
- 166) D. Müller-Schwarze. Complexity and relative specificity in a mammalian pheromone. Nature, 223, 525(1969).
- 167) E. Demole et M. Winter. Synthèse du cis-(pentén-2-yl)-5-pentanolide-(5,1), composant odorant de l'essence de jasmin(Jasminum grandiflorum L.). Helv. Chim. Acta, 45, 1256(1967).
- 168) A. Ijima, H. Mizuno and K. Takahashi. 6-Alkenyl-, or 6-alkyl- δ -lactones from cyclopentanone. Chem. Pharm. Bull., 20, 197(1972).
- 169) M. R. Sevenants and W. G. Jenninds. Volatile components of peach II. J. Food Sci., 31, 81(1966).
- 170) R. M. Silverstein, J. O. Rodin, C. M. Himel and R. W. Leeper. Volatile flavor and aroma components of pineapple. II. Isolation and identification of chavicol and γ -caprolactone. Ibid., 30, 668(1965).

- 171) T. Kawada, B. D. Mookherjee and S. S. Chang. Chemical reaction involved in the catalytic hydrogenation of oils. III. Further identification of volatile by-products. J. Am. Oil Chemists' Soc., 43, 237(1966).
- 172) J. A. Fioriti, V. Krampl and R. J. Sims. Lactones in autoxidized vegetable oils. Ibid., 44, 534(1967).
- 173) B. A. Brown, K. S. Königsbacher, F. E. Ellison and G. E. Mann. Separation and isolating aroma and flavor constituents of roasted peanuts. J. Food Sci., 33, 595(1968).
- 174) K. Watanabe and Y. Sato. Aliphatic γ - and δ -lactones in meat fats. Agr. Biol. Chem., 32, 1318(1968).
- 175) Idem. Lactones in the flavor of heated pork fat. Ibid., 33, 242(1969).
- 176) Idem. Conversion of some saturated fatty acids, aldehydes and alcohols into γ - and δ -lactones. Ibid., 34, 464(1970).
- 177) J. Boldingh. Trace components of butterfat II. Optical activity of saturated aliphatic lactones. Rev. Franc. Corps Gras, 13, 327(1966)(C. A., 65: 6194a).
- 178) 山本 功男, 水出 治夫, 逸見 昭二, 山野 藤 吾.
糸状菌の生産する抗菌性 α, β -不飽和 δ -ラクトン, 武田研報, 29, 1 (1970).
- 179) 梅井 謙之介, 松本 弘一, 安立 準, 医薬品の防カビ研究 (第1報) 五員環ラクトン化合物の抗カビ性. 薬誌, 88, 919 (1968).
- 180) T. Kosuge and E. E. Conn. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. III. The β -glucosides of *o*-coumaric, coumarinic and melilotic acids. J. Biol. Chem., 236, 1617(1961).
- 181) 原田 篤也: 微生物の変異とその応用, 化学と生物, 10, 662, 736, 801 (1972).

Studies on the Metabolites of Sporobolomyces odorus

— Principles of Peach-like Aroma Produced

by the Yeast —

Satoshi Tahara

Summary

Sporobolomyces odorus, one of ballistosporogenous red-colored yeasts, was isolated for the first time in 1930 by Derx from smut-infected orange leaves near Nice (France) and its name "odorus" was derived from the characteristic and aromatic odor of the cultures. Properties of Sp. odorus are quite similar to Sp. roseus except that the former lacks the α -glucosidase activity.

In spite of the remarkable fact that Sp. odorus produces an aroma, no studies on principles of the aroma were found. The present investigation was begun in the hope of obtaining biologically active substances in the metabolites of red-colored yeasts, and the thesis gives a description of the elucidation of principles of the peach-like aroma produced by Sp. odorus.

A strain of the yeast, Sp. odorus AHU 3246 used in this investigation was supplied from Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University. The strain had been isolated in 1955 by Dr. T. Kikuchi et al., from wild-grape leaves near Sapporo.

The contents of the thesis are summarized as follows.

1) Sp. odors AHU 3246 can grow in a vitamin-free synthetic medium, e. g., consisting of D-glucose, L-asparagine, and inorganic salts and produces a peach-like aroma.

The aroma components were extracted with ether and were steam-distillable. The components of the neutral fraction possessing a typical peach-like aroma were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and other structure determining techniques.

Identified components were as follows : methyl, ethyl, sec-butyl, isobutyl, n-butyl, isoamyl, n-amyl, benzyl and β -phenylethyl alcohol ; formaldehyde, acetaldehyde, benzaldehyde, phenylacetaldehyde, acetone, methyl ethyl ketone and acetoin ; ethyl formate, ethyl acetate and di-n-butyl phthalate ; γ -decalactone (4-decanolide), δ -decalactone (5-decanolide), cis-7-decen-5-olide and cis-6-dodecen-4-olide. Di-n-butyl phthalate and parts of methyl, ethyl and n-butyl alcohol, ethyl formate, and ethyl acetate were thought to be contaminants. γ -Lactones produced by the yeast were quantitatively determined by GLC.

Although the other nine strains of six species of red-colored yeasts were cultured under the same conditions, neither flavorful smelling nor aliphatic lactone production was detected in their cultured broths.

2) Acidic metabolites were subsequently examined to clarify the relationship between neutral and acidic constituents of metabolites in the cultured medium of Sp. odors.

Methylated acidic metabolites were previously divided to steam-

distillable constituents and residues by the steam-distillation under reduced pressure, and constituents of each fraction were analyzed by GC-MS.

Components in the distillate were as follows (acid moiety) : isobutyric, n-butyric, isovaleric, n-valeric, cis-2-pentenoic*, 2-oxo-3-methylbutanoic, cis-4-heptenoic, trans-3-heptenoic, 2-oxo-3-methylpentanoic, 2-oxo-4-methylpentanoic, trans-2,cis-4-heptadienoic and its geometrical isomer*, benzoic, nonadienoic*, and phenylacetic acid (* Authentic compounds were not available.). A new carboxylic acid, trans-2,cis-4-heptadienoic acid, was stereospecifically synthesized.

Components in the residue were as follows : succinic, muconic, azelaic (nonanedioic), undecanedioic, β -phenyllactic (2-hydroxy-3-phenylpropionic), and 4-hydroxy-cis-6-dodecenoic acid. These components were identified as their methyl esters by GC-MS and other spectroscopic techniques. Phthalic acid and its mono-n-butyl ester were also found, but these compounds were thought to arise from di-n-butyl phthalate which was contained in deionized water as one of impurities.

3) The biosynthesis of aliphatic γ - or δ -lactones by microorganisms has not been reported so far. The four lactones identified are particularly interesting metabolites in connection with the peach-like aroma.

Some unsaturated carboxylic acids of considerably low mol. wt. were found in acidic metabolites. One of such compounds, trans-2,cis-4-heptadienoic acid, is a homologue of sorbic acid and was interesting in respect of biological activity.

Long-chain dicarboxylic acids were known as ω,ω' -oxidation products of n-alkanes by microorganisms. But, it has not been found so far that azelaic acid and undecanedioic acid are produced by microorganisms without addition of precursors such as n-alkanes.

4) The quality of the aroma produced by Sp. odorus was previously represented as peach-like one. As the result of the investigation, it was found that identified aroma components of the yeast were surprisingly common to those of peach essence (the Red Globe variety) characterized by Jennings and Sevenants. Four aliphatic lactones, aromatic alcohols, aromatic aldehydes and isoamyl alcohol etc. appeared to make relatively large contributions to the aroma of neutral metabolites of Sp. odorus.

5) The production of γ -decalactone by Sp. odorus corresponded to its growth curve. After the maximum of the growth, the amount of the lactone decreased gradually. The fact may indicate that the lactone is not a degradation product of the yeast cell components, but one of metabolites of the yeast.

γ -Decalactone was produced in a yield of 4.49 mg/liter in the D-fructose-Polypepton medium, and cis-6-dodecen-4-olide, 1.86 mg/liter in the D-fructose-L-alanine medium.

6) The following results were obtained in connection with microbial conversion of precursors to aliphatic lactones. Sp. odorus produced remarkable amounts of γ -decalactone in the medium containing ricinoleic acid (12-hydroxy-cis-9-octadecenoic acid). On the other hand, Rhodotorula rubra AHU 3957 accumulated 4-hydroxydecanoic acid in the same medium.

Final pH of the former was 4.84 and that of the latter, 5.54. The spontaneous conversion of 4-hydroxydecanoic acid to γ -decalactone is relatively slow in these pH region of the medium and so, the conversion of hydroxy acid to lactone in the medium of Sp. odorus may be caused by the biological means.

4-Oxodecanoic acid was rapidly reduced to 4-hydroxydecanoic acid by Torula rosea and R. mucilaginosa, but the reduction activity of Sp. odorus was extremely low.

7) The constituting fatty acids of Sp. odorus were analyzed and compositions of main constituents were as follows (%) : C_{14} , 0.64 ; C_{16} , 11.17 ; $C_{16:1}$, 0.74 ; C_{18} , 5.86 ; $C_{18:1}$, 26.49 ; $C_{18:2}$, 39.90 ; $C_{18:3}$, 13.49 ; others, 1.98. The result was characterized by large amounts of $C_{18:2}$ and $C_{18:3}$. On the other hand, additions of fatty acids, e. g., decanoic, dodecanoic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acid, to the culture medium had no effect on the production of aliphatic lactones by Sp. odorus. It seemed that externally added fatty acids can't become carbon skeletons of the lactone.

Minor acidic constituents of Sp. odorus were fractionated by silicic acid column chromatography. Components of the fraction which contained more polar compounds than fatty acid methyl esters, were analyzed. Several components which were already characterized as those of acidic metabolites in the cultured broth, were also detected in this fraction. Hydroxy acids relating to precursors of aliphatic lactones were not identified except two 4-hydroxy acids corresponding to γ -decalactone and cis-6-dodecen-4-olide.

8) It is generally recognized that 5-hydroxy acids

corresponding to δ -lactones found in the flavor of milk products are contained in the milk fat as monohydroxyacyl triglycerides which are synthesized in mammary tissue of ruminants. In case of Sp. odorus, free lactones were produced in the cultured medium. Although the 4-hydroxydecanoic acid contained in the cell of the yeast was determined as a difference in amounts of γ -decalactone in the heat-treated total lipid fraction after and before saponification, the amount of γ -decalactone derived from bonded 4-hydroxydecanoic acid was not so large and less than 50 $\mu\text{g}/10\text{ g}$ of dry cells.

The biosynthetic mechanism and precursors of aliphatic lactones in plants and fruits remain intriguing questions and the biological role of the 5-hydroxy fatty acids in milk lipids and animal tissues is also obscure. Although it is not clear whether Sp. odorus synthesizes lactones or hydroxy acids by a similar manner to those of mammals or plants, the discovery of the microorganism which biosynthesizes aliphatic lactones may afford a good material for the studies on biosynthetic mechanisms and the elucidation of biological roles of the lactones.