The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

〔J. Ferment. Technol., Vol. 50, No. 10, p. 710～715, 1972〕

黄麹菌による芳香族化合物の代謝に関する研究

(第3報) Dopa から Protocatechuic Acid の生成について

備前 次雄*・原 昌道・大場 俊輝
村上 英也・菅間誠之助
(国税庁 醸造試験所)

Studies on the Metabolism of Aromatic Compounds of *Aspergillus*

(III) Formation of Protocatechuic Acid from Dopa

Tsugio Bizen, Shodo Hara, Toshiteru Ohba, Hideya Murakami and Seinosuke Sugama

(Research Institute of Brewing, Tax Administration Agency, 2-6 Takinogawa, Kita-ku, Tokyo, Japan)

In previous papers, the authors found both 3, 4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-dopa) and protocatechuic acid in rice *koji* as precursors of the brown pigment which develops during storage in the air. Moreover, it was known that the L-dopa was formed from tyrosine by the tyrosinase of *A. Spergillus oryzae*. In this paper, the formation of protocatechuic acid, another precursor, was studied.

1) When a strain of *A. oryzae* was cultured for 7 days at 30℃ in Czapek solution containing dopa, protocatechuic acid was formed from dopa.

2) Protocatechualdehyde was found to be an intermediate in this pathway.

3) Productivity of protocatechuic acid from dopa was found in most strains of *Aspergillus* produced protocatechuic acid from dopa.

4) From these results, we recognized a new pathway for the formation of protocatechuic acid via L-dopa from tyrosine in *Aspergillus*.

緒 言

米麹を水で2～3時間浸漬後，沪過した米麹残渣を空中に放置すると，しばしば褐変する現象がみられる．この褐変現象は麹上に繁殖した麹菌の種類により異なり，常に褐変する麹菌は褐変性麹菌（例えばRIB 128 菌），褐変しない麹菌は非褐変性麹菌（例えば RIB 647 菌）と呼ばれる．米麹の褐変は麹中に含まれる褐変前駆物質の存在にもよるものであり，著者らは前報[1]でそれが dopa, protocatechuic acid であると報告した．またこの両者のうち主褐変前駆物質である 3, 4-dihydroxyphenyl-L-alanine (dopa) は麹菌の tyrosinase により tyrosine から生成されることを証明した[2]．本報では後者の protocatechuic acid の生成経路について検討し，新しく dopa より protocatechuic acid の生成を認めたので報告する．

実 験 方 法

1. 使用麹菌株　米麹の褐変において褐変度の高い *A. oryzae* の RIB 128[3] (ATCC 2278) を主として用

* 現在 小西酒造(株)

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

い，他に醸造試験所保存菌株の *Aspergillus* 属50種類を用い検討した．

2. Dopa より protocatechuic acid の生成試験

a．麹菌の培養　綿栓試験管に pH 5.0 Czapek 液体培地を ($NaNO_3$ 3 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, KCl 0.5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, sucrose 30 g, H_2O 1 l) 4 ml, 0.5% dopa 溶液 1 ml を取り，基質として最終濃度 0.1% の dopa 含有 Czapek 液体培地を作製した．この培地に麹菌を接種し．30°C 7 日間静置培養反応を行なった．またブランクとして，Czapek 液体培地に麹菌を接種した試験管，0.1% dopa 含有 Czapek 液体培地の麹菌無接種の試験管を同様な条件のもとで処理した．

b．代謝生成物の抽出　上記培養液を沪紙で回収，沪液を 1 N HCl で pH 2.0 に調整後，同量エーテルで3回抽出を行ない，エーテル層を脱水後濃縮した．

c．代謝生成物の分離精製　エーテル濃縮液の paper chromatography を行なった結果，複数 spot が確認されたので生成物の分離及び精製を行なった．

エーテル濃縮液を polyamido column (樹脂 10 g, column 内径 20 mm) に吸着させ H_2O, 20～100% methonol, acetone : acetic acid : water (6 : 1 : 3) の各展開溶媒で展開を行なった．各展開溶媒溶出区分について Folin 反応を行ない，反応陽性区分を回収，減圧濃縮し，再びエーテルで抽出を行なった．

d．Paper chromatography による確認　Polyamido column chromatography における Folin 反応陽性区分をエーテル抽出し，エーテル層を濃縮した液を試料として種々の phenol 性物質と R_f 値，呈色性を比較した．

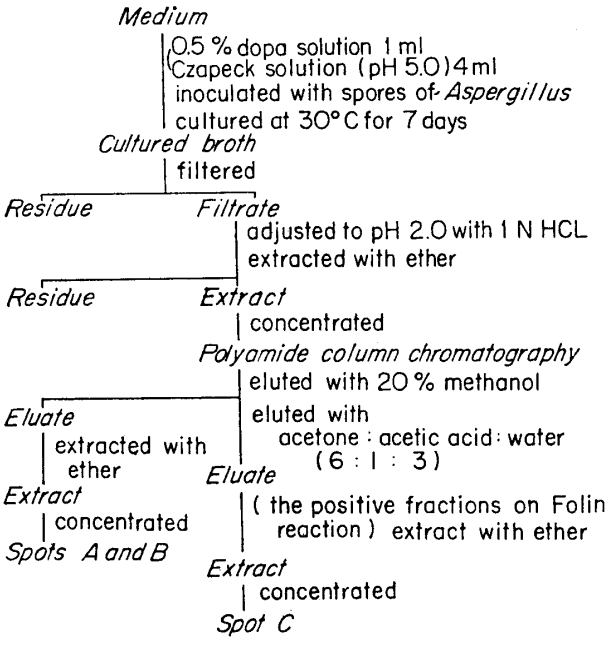

Fig. 1. Isolation of protocatechuic acid from the broth cultured with dopa.

1) 沪紙　東洋沪紙 No. 50 を pH 7.4, 0.05 M 燐酸緩衝液で緩衝化を行なった．

2) 展開溶媒　次の3種類を使用した．

溶媒 I　*n*-butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 2)

溶媒 II　benzene : methanol : acetic acid (45 : 4 : 8)

溶媒 III　*sec*-butanol : water (4 : 1)

3) 検出方法　前報[4]の方法に従い次の方法を用いた．

uv：紫外線燈 (2,537 Å) での蛍光

Folin 反応：0.4 M Na_2CO_3 を噴霧後 Folin 試薬を噴霧する．

Diazo 反応：*p*-diazobenzene sulfonic acid を 0.4 M Na_2CO_3 溶液に 0.2% 溶かした液を噴霧する．

Nihydrin 反応：nihydrin を acetone に 0.2% 溶かした液を噴霧後 100°C, 5 分間加熱する．

$FeCl_3$ 反応：0.5% $FeCl_3$ を噴霧する．

Ferricyanide 反応：赤血塩を pH 7～8 の燐酸緩衝液に 0.5% 溶かした液を噴霧する．

BTB 反応：0.1% BTB の ethanol 溶液を噴霧する．

ARNOW の反応：ARNOW 試薬を噴霧する．

DNP 反応：2,4-dinitropheny hydrazine の methanol 溶液を噴霧する．

e．Gas chromatography による確認　試料の確認のため，gas chromatography を行なった．

Polyamido column chromatography より得たエーテル濃縮試料を一部使用，エバポレーターで濃縮乾固し，少量の methanol に溶解し試料のメチル化を行なった．

試料のメチル化は diazomethane を用いて行なった．試料の methanol 溶液を冷却し，あらかじめ冷却してある diazomethane を添加，室温で15～20時間反応させた．その反応液を濃縮し，GC の試料とした．また比較標準物質のメチル化の方法は，試薬 10 mg を 1 ml の methanol に溶解し，上記と同様な方法でメチル化を行ない標準試料とした．

3. Protocatechualdehyde より protocatechuic acid の生成試験

a．洗滌菌体による反応　Protocatechualdehyde は水に溶解するが，長時間放置すると濃く着色するため，dopa から protocatechuic acid の生成の方法と異なり次の方法を使用した．

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

麹菌を Czapek 液体培地に接種しその菌体を回収，蒸留水で洗滌後，この菌体 500～1,000 mg，pH 6.5 の燐酸緩衝液に基質として protocatechualdehyde を 0.1% 溶解した反応液を殺菌試験管に入れ，30°C で 24時間振盪培養反応を行なった．

b．反応生成物の抽出　上記培養反応液を沪紙で回収，1 N HCl で pH 2.0 に調整後エーテルで同量3回抽出を行なった．エーテル層を回収，濃縮しその濃縮液を試料とした．

実験結果

1. Dopa 含有 Czapek 液体培養沪液中の phenol 性物質の分離，精製　麹菌の dopa 含有 Czapek 液体培養の沪液のエーテル抽出試料を展開溶媒 II (benzene : Ac-OH : Me-OH) で paper chromatography を行なった結果，Rf 0.82 (A)，Rf 0.52 (B)，Rf 0.23 (C) の3種類の Folin 反応陽性 spot が見い出された (Fig. 2)．これらの3種の spot 物質を分離するため polyamido column chromatography を行なった結果，spot A, B 両物質は，20% methanol 区分に溶出され，spot C 物質は acetone : acetic acid : water (6 : 1 : 3) の混合溶媒によって溶出された．

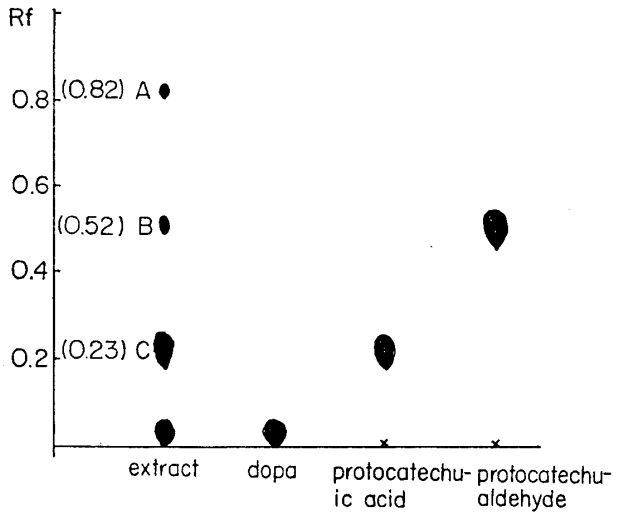

Fig. 2. Paper chromatogram of the extract with ether from culture broth.
Solvent : Benzene : Acetic acid : Water (45 : 4 : 8).
Color reaction : Folin's reagent.

2. Spot A, B, C 物質の paper chromatography による確認　種々の phenol 物質と polyamido column chromatography で分離した spot C 物質を溶媒 I (*n*-butanol : acetic acid : water) で展開し，Rf 値，diazo 反応による呈色性，ならびに紫外線照射時の蛍光色を比較した結果を Table 1 に示した．エーテル可溶性，Rf 値，呈色性，蛍光色が全て spot C 物質と protocatechuic acid が一致した．また溶媒 II，III について paper chromatography を行ない protocatechuic acid と比較した Rf 値，呈色性の結果を Table 2 に示した．その結果 spot C 物質は全て protocatechuic acid と一致したことから，この物質は protocatechuic acid か，あるいはこれに良く似た物質であると考えられる．

Table 1. Rf value, diazo reaction, and flourescence of spot C in comparison with those of some phenols.

Substances	Rf	Diazo reaction	uv
C	0.80	Orange-red	Violet
Catechol	0.86	Orange-red	Violet
Resorcinol	0.89	Light-brown	Violet
Hydroquinone	0.85	Orange	Violet
Pyrogallol	0.72	Brown	Violet
Phloroglucinol	0.73	Yellow	Violet
Protocatechuic acid	0.80	Orange-red	Violet
Gentisic acid	0.83	Light brown	Light blue
Caffeic acid	0.83	Brown	Blue
p-Cumaric acid	0.91	Red	Violet
Protocatchualdehyde	0.83	Orange-red	Violet

Table 2. Identification of spot C with protocatechuic acid.

Solvent	Rf value	
	C	Protocatechuic acid
n-BuOH : AcOH : H_2O (4 : 1 : 2)	0.80	0.80
Benzene : AcOH : MeOH (45 : 4 : 8)	0.23	0.23
sec-BuOH : H_2O (4 : 1)	0.34	0.34

color reaction	Color	
uv	Violet	Violet
Folin	Blue	Blue
Diazo	Orange-red	Orange-red
$FeCl_3$	Dark green	Dark green
Ferricyanide	Orange-red	Orange-red
B.T.B	Yellow	Yellow
Ninhydrin	—	—
ARNOW's reagent	Red	Red

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

また polyamido column chromatography により分画された spot A, B 物質について paper chromatography を行ない spot C 物質と同様3種類の展開溶媒，呈色反応を用い検討した結果は Table 3 に示した．Spot B 物質は3種類の展開溶媒での Rf 値，呈色性において，特に aldehyde の反応に顕著に示す DNP 反応が陽性などから protocatechualdehyde と同物質と思われる．また spot A 物質は，前報[5]に示した vanillin より vanillalcohol が生成される反応を考慮すると protocatechu alcohol であると推定されるがまだ確認は出来ない．

3. Spot C 物質の gas chromatography による確認　Polyamido column chromatography によって精製された spot C 物質は，paper chromatography の Rf 値および呈色性より protocatechuic acid と似た物質であると考えられるため，gas chromatography により検討した．

あらかじめメチル化を行なった spot C 物質を gas chromatograph に注入し，また標準試薬 protocatechuic acid とその異性体を同様にメチル化を行なった標準物質との retention time を比較した結果は Fig. 3, Table 4 に示した．

この結果より，spot C 物質は SE-30, F-60 の両 column において同 retention time が測定され，また spot 物質と標準物質 protocatechuic acid のメチル化後の化合物の混合液を注入した結果，単一 peak として確認された．このことより spot C 物質は protocatechuic acid であると確認された．

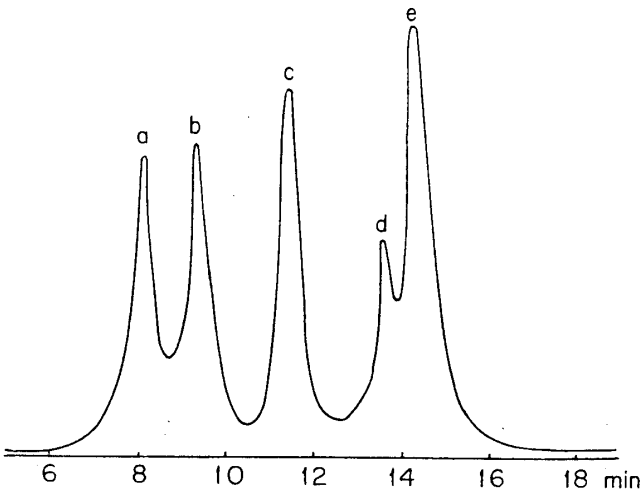

Fig. 3. Gas chromatogram of methylated dihydroxybenzoic acids and methylated C.
a : Methyl-2,5-dimethoxybenzoate.
b : Methyl-2,4-dimethoxybenzoate.
c : Methyl-2,6-dimethoxybenzoate.
d : Methyl-3,5-dimethoxybenzoate.
e : Methyl-3,4-dimethoxybenzoate and methylated C.
Gas chromatography parameters :
Column, 1 m×3 mmϕ stainless-steel; packing, 10 % SE-30 on 80～100-mesh Diasolid-L; gas flow, N_2(5.5 ml/min), H_2 (10.7 ml/min), Air (138.0 ml/min); injector temperature, 215°C; column temperature, 160°C; sample size, 10 μl.

Table 3. Rf value on paper chromatogram and color reaction of spots A and B.

Sollvent	Rf value		
	A	B	Protocatechu-aldehyde
n-BuOH:AcOH:H_2O (4 : 1 : 2)	—	0.83	0.83
Benzene:AcOH:MeOH (45 : 4 : 8)	0.82	0.52	0.52
sec-BuOH:H_2O (4 : 1)	0.83	0.94	0.94

Color reaction	Color		
Diazo	Orange-red	Orange-red	Orange-red
Folin	Blue	Blue	Blue
$FeCl_3$	Green	Blue-green	Blue-green
Ferricyanide	Brown	Brown	Brown
Ninhydrin	—	—	—
ARNOW's reagent	Red	Red	Red
D.N.P	—	Yellow	Yellow

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

Table 4. Retention time of methylated dihydroxy benzoic acids and methylated C by gas chromatography.

Compound	Column packing	
	SE-30	F-60
Methyl-2, 4-dimethoxybenzoate	9.3 (min)	8.6 (min)
Methyl-2, 5-dimethoxybenzoate	8.1	7.4
Methyl-2, 6-dimethoxybenzoate	11.4	—
Methyl-3, 4-dimethoxybenzoate	14.2	13.4
Methyl-3, 5-dimethoxybenzoate	13.6	—
Methylated C	14.2	13.4

SE-30 : Silicon SE-30 F-60 : Silicon DC F-60

4. Protocatechualdehyde より protocatechuic acid の生成 前項2で protocatechualdehyde の確認ができたが，この物質が中間物質であれば，この物質を基質として麹菌を使用することによって protocatechuic acid が生成されることを推定し実験を行なった．

麹菌体を使用し振盪培養反応を行ない，経時的に paper chromatography を行ない Folin 反応にて呈色し，生成の有無，増減を調べた結果，18～24時間において最高量の protocatechuic acid と同 R_f 値（溶媒 II，R_f 0.32）の spot 物質が見出され，また基質である protocatechualdehyde は経時的な減少が見られた．また spot (C) 物質は24時間後より次第に減少し，48時間後においてはほとんど確認出来ないような状態になることが認められた．これはこの生成された物質が分解して行くものと思われる．

振盪反応24時間後に回収した試料について paper chromatography の R_f 値および呈色性は，Table 2 の spot C 物質と同じであり protocatechuic acid と同定した (Table 2')．これより麹菌によって protocatechualdehyde から protocatechuic acid が生成されることが確認された．

5. *Aspergillus* 属50種類[6]による protocatechuic acid の生成試験 生成方法は実験方法2と同様にそれぞれの菌株について培養反応を行ない，培養液を直接沪紙に spot し，溶媒 II で展開，Folin 試薬で呈色を行ない生成の有無を調べた．この結果 protocatechuic acid の生成はほとんどの菌株に見られ，また protocatechuic acid の他に R_f 0.52 の protocatechualdehyde，R_f 0.82 の spot が見られた．この結果は Table 5 に示した．

Table 5. Productivity of protocatechuic acid from dopa by various strains.

	Productivity of P. A.
Asp. oryzae (10 strains)	++
Asp. flavus (10 strains)	++
Asp. sojae (5 strains)	++
Asp. awamori (5 strains)	++
Asp. usami (2 strains)	++
Asp. tamari (6 strains)	++
Asp. parasiticus (3 strains)	++
Asp. toxicarius (3 strains)	++
Asp. niger (IAM 3008)	++
Asp. avenaceus (WB 517)	++
Asp. clavatus (IAM 2120)	++
Asp. flavipes (IAM 2160)	++
Asp. fumigatus (IAM 2176)	++
Asp. ochraceus (IAM 2135)	++
Asp. terreus (IAM 2179)	++
Asp. wentii (IAM 2133)	++
Asp. rugulosus (IAM 2052)	+
Asp. ustus (IAM 2075)	+
Asp. vercicolor (IAM 2080)	+
Asp. restrictus (IAM 2008)	+
Asp. amstelodami (IAM 2035)	+
Asp. glaucus (IAM 2124)	−
Asp. repens (IAM 2123)	−
Asp. ruber (IAM 2051)	−
Asp. zonatus (WB 5079)	−

P. A.: Protocatechuic acid

考 察

糸状菌による protocatechuic acid の生成に関しては Tatum ら[7]が *Neurospora crassa* の変異株を用い，

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

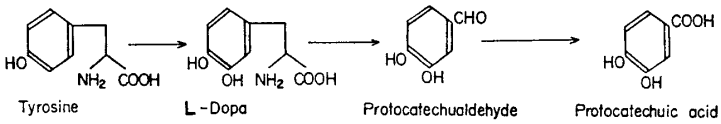

Fig. 4. Pathway of the formation of protocatechuic acid in *Aspergillus*.

5-dihydroshikimic acid から protocatechuic acid の生成を認め，片桐ら[8]は *A. oryzae* が shikimic acid, quinic acid より protocatechuic acid を培地中に蓄積することを報告している．また中村ら[9]は米麹中で protocatechuic acid を検出した．著者らは前報[1]で空気中に放置すると褐変してくる麹（褐変性麹）中に dopa ならび protocatechuic acid を見出し，これらが褐変前駆物質であると報告した．さらにこの両者のうち主褐変前駆物質である dopa は tyrosine から麹菌の tyrosinase によって生成されることを述べた．ただし，dopa, protocatechuic acid は米麹中では RIB 128 菌のよう褐変性麹菌の繁殖した麹にのみ見出され，RIB 647 菌のような非褐変性麹菌の繁殖した麹には見出されない．著者らも片桐らの報告にしたがい，shikimic acid, quinic acid から protocatechuic acid の生成試験を行ない，これを確認したが，この経路は褐変性，非褐変麹菌の区別なく存在した．したがって褐変性麹にのみ見い出される protocatechuic acid の生成は shikimic acid, quinic acid を経ない別な経路の存在が考えられる．

本報告では新しく麹菌により dopa から protocatechuic acid が生成することを証明したが，dopa は褐変性麹にのみ見出されるので，おそらく褐変性麹中の protocatechuic acid は，この dopa から生成されるものと推定される．

なお，dopa から protocatechuic acid の生成において中間物質として protocatechualdehyde を認めたが，protocatechualdehyde から protocatechuic acid の生成については糸状菌について報告があり．最近吉沢ら[10]も *A. oryzae* で報告している．さらに著者らが前報[5]で報告したように，vanillin から vanillic acid の生成能を麹菌が有することからも容易に考えられる．

以上の結果から，Fig. 4 に示すように tyrosine から dopa を経て protocatechuic acid を生成する新しい pathway が麹菌に存在することが知られた．

要　旨

前報で著者らは褐変性麹中に 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-dopa), protocatechuic acid が存在することを認め，これらが麹の褐変前駆物質であると報告した．さらに，この両者のうち主褐変前駆物質である L-dopa は麹菌の tyrosinase によって tyrosine から生成されることを見い出した．本報では，もう一つの前駆物質である protocatechuic acid の生成経路について検討した．

1. 麹菌の dopa を含む Czapek solution，液体培養において，dopa から protocatechuic acid が生成した．
2. この代謝系の中間物質として protocatechualdehyde が見出された．
3. Dopa から protocatechuic acid を生成する能力は *Aspergillus* 属の大部分の菌株において見い出された．
4. 以上の結果から *Aspergillus* 属菌により tyrosin から L-dopa を経て protocatechuic acid の生成に至る新しい経路の存在を認めた．

本報告に関し，深い御理解を載き発表許可された小西酒造株式会社に対しまして深謝致します．本研究報告の大要は，昭和47年度日本農芸化学会大会において発表した．

参考文献

1) Ohba, T., Murakami, H., Hara, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 674 (1971).
2) 大場，原，菅間，村上：本誌 **50**, 481 (1972).
3) 村上，鈴木，長縄，大脇：醸試報，**137**, 1 (1965).
4) 大場，村上，原，加藤：醸協，**66**, 71 (1971).
5) 原，村上，大場：本誌，**49**, 428 (1971).
6) 村上：醸試報，**143**, 207 (1971).
7) Tatum, E. L., Gross, S. R., Ehresvärd, G.: *Pro. Natl. Acad. Sci., U.S.*, **40**, 271 (1954).
8) 片桐，北原：京都大学農学紀要，**26**, 1 (1956).
9) 中村，蓼沼，茂木，吉江，佐藤：醸協，**64**, 1092 (1969).
10) Yoshizawa, K., Komatsu, S., Takahashi, I., Otsuka, K.: *Agri. Biol. Chem.*, **34**, 170 (1970).

(昭47.6.15 受付)

NII-Electronic Library Service