The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

[J. Ferment. Technol., Vol. 52, No. 3, p. 171～176, 1974]

酵母リボ核酸より2-フロイン酸の分離・同定

藤島　鉄郎・市川　雅常・鈴木　守郎・吉野　宏

ヤマサ醤油株式会社，研究所

Separation and Identification of 2-Furoic Acid from Crude Ribonucleic Acid of Yeast

Tetsuro Fujishima, Masatsune Ichikawa, Morio Suzuki, and Hiroshi Yoshino

Research Laboratory of Yamasa Shoyu Co., Ltd. Choshi

An unknown compound was separated from the enzymatic degradation products of crude ribonucleic acid of yeast by procedures including anion exchange resin chromatography and extraction by acidic ethyl ether. The crystals obtained were identified as 2-furoic acid by comparison of their infrared-spectrum, ultraviolet-spectrum, melting point, and gas chromatogram with those of an authentic sample, and from elemental analysis data.

2-Furoic acid was detected in yeast cells cultured in a medium of sulfite waste liquor, but was not detected in yeast cells cultured in a hydrocarbon medium. It can therefore be presumed that furfural in the sulfite waste liquor was enzymatically converted to 2-furoic acid during yeast fermentation.

緒　　言

酵母リボ核酸の核酸分解酵素による分解液中には，主生成物であるモノヌクレオチドの他に少量のジおよびトリヌクレオチド，微量のオリゴヌクレオチドが存在する．我々はこの酵母リボ核酸の酵素分解液中の微量成分を検索していたところ，3%酢酸溶液で濾紙電気泳動後，飽和硫酸アンモニウム：イソプロピルアルコール：1M 酢酸ナトリウム (79：2：19)[1] を溶媒としてペーパークロマトグラフィーを行うと，濾紙電気泳動で 5′-グアニル酸と殆んど同じ泳動距離で，ペーパークロマトグラフィーで 5′-グアニル酸より R_f 値の僅かに大きいスポットが存在することを見出した．このスポット X は，*n*-ブチルアルコール：酢酸：水 (4：1：1)[2] を溶媒とした時の R_f 値は 0.9 であり，明らかにヌクレオチドとは異なる化合物であることが推定された．酵母リボ核酸の酵素分解液よりこのスポット X を結晶状に単離し，紫外部吸収，赤外吸収，元素分析，融点，ガスクロマトグラフィー等の結果より 2-フロイン酸と同定した．2-フロイン酸の酸素分解に対する影響，酵母リボ核酸中に 2-フロイン酸が混在する理由についても考察したので併せて報告する．

実　験　方　法

核酸分解酵素の調製　ふすま 2 kg に 1.2 *l* の水道水を撒水し殺菌後，5′-former の核酸分解酵素を生産する菌株 *Penicillium citrinum* Thom 1131 の人工変異株 VI-10-14（通常の紫外線照射変異処理によって得た黄色色素非生産性の変異株）を植菌し，30°C 1日，20°C 3日間培養した．このふすま麹に 10 *l* の水を加え1時間放置後濾過し，濾液を酵素液とした．この抽出酵素液 45 ml に 4×10^{-2} M 塩化亜鉛溶液 5 ml を加え，pH 4.8, 60°C, 15分間熱処理した．[3]

沪紙電気泳動　酵母リボ核酸の酵素分解液を試料として東洋濾紙 No. 53 (30×40 cm) に 0.1 ml をスポットし，3%酢酸溶液を溶媒として加電距離 30 cm，電圧勾配 20 v/cm で濾紙電気泳動を行なった．

実験結果および考察

スポットXの確認　リボ核酸の酵素分解液 0.1 ml

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

を試料として3%酢酸溶液で濾紙電気泳動を行ない，二種類の溶媒にてペーパークロマトグラフィーを行なった．溶媒として飽和硫酸アンモニウム：イソプロピルアルコール：1 M 酢酸ナトリウム (79：2：19) の溶媒Iで展開した結果を Fig. 1 に，*n*-ブチルアルコール：酢酸：水 (4：1：1) の溶媒IIで展開したところ Fig. 2 に示すようなスポットが得られた．Fig. 1 では濾紙電気泳動での泳動距離が 5′-グアニル酸と殆んど同じでペーパークロマトグラフィーの R_f 値が 5′-グアニル酸よりやや大きい紫外部吸収スポットが存在することが判明し，このものをスポットXと命名した．一方 Fig. 2 より溶媒IIにおけるスポットXの R_f 値は 0.9 であった．モノヌクレオチドおよびその誘導体，ジおよびトリヌクレオチド或いはオリゴヌクレオチド等は，この溶媒IIでは殆んど R_f 値が変化しないことより，このスポットXは核酸関連化合物以外のものであることが推定された．

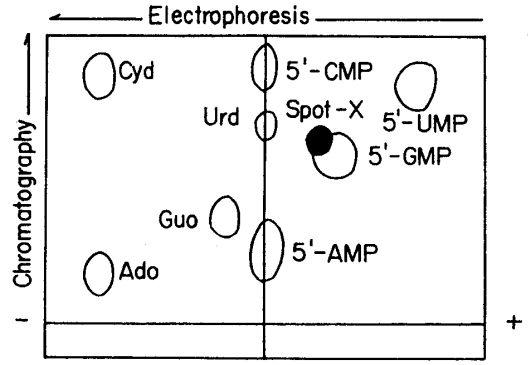


Fig. 1. Separation of the products of RNA formed by the action of nuclease* on RNA.

A mixture of the degradation products of RNA was subjected to electrophoresis on paper in 3% acetic acid, with 300 V and 0.2 mA/cm at room temperature for 2.5 hr, and the dried paper was developed by the ascending method with solvent I** in a direction perpendicular to that of the electrophoresis.

* Nuclease preparation was prepared from solid culture filtrates of *Pen. citrinum* Thom 1131 pigmentless mutant VI-10-14.

** Solvent I: a mixture of saturated ammonium sulfate, *iso*-propyl alcohol, 1 M sodium acetate (79 : 2 : 19 by volume.)

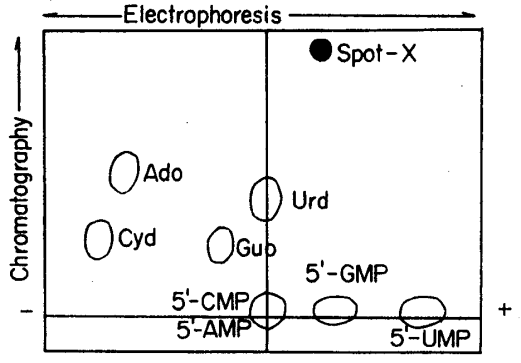


Fig. 2. Separation of the products of RNA formed by the action of nuclease on RNA.

The degradation products of RNA were separated on paper according to the procedure described in Fig. 1.

Chromatographic solvent II, a mixture of *n*-butyl alcohol, acetic acid, and water (4 : 1 : 1 by volume), was employed.

スポットXの酵母リボ核酸分解液よりの分離 酵母リボ核酸の酵素分解液よりスポットXの分離法の1例を Fig. 3 に示した．すなわちリボ核酸 100 g を水に溶解し pH 4.8 に調整後 2.5 *l* とした．この酵母リボ核酸溶液に *Pen. citrinum* のふすま培養酵素液 159 ml を添加し 70°C, pH 4.8, 6時間酵素分解を行なった．この分解液を pH 8.5 に調整後，強塩基性アニオン交換樹脂アンバーライト IRA-402 (塩素型) 750 ml に吸着し，水洗後 0.01 N-塩酸で溶出した．この溶出で得られたアデニル酸区分の pH を 7.0 に調整し 100 ml まで減圧濃縮後塩酸で pH 1.8 に調整し冷却した．この結果アデニル酸は結晶性沈澱として得られるので遠心分離によってこれを除去し，この上澄液をソックスレーで48時間エーテル連続抽出し，エーテル可溶部を集め，エーテル除去後水を加えて 200 ml (pH 7.5) とし，アンバーライト IRA-402 (塩素型) 100 ml のカ

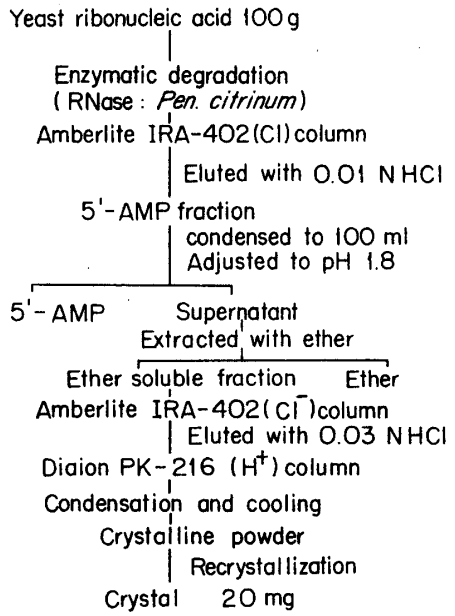


Fig. 3. Isolation procedure of spot-X.

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

ラムに再吸着し，0.03 N-塩酸溶液で溶出した．溶出液のうち紫外部吸収区分を集め，強酸性カチオン交換樹脂ダイヤイオン PK-216（水素型）100 ml のカラムを通過させ，通過水洗液を減圧濃縮後冷却し粗結晶を得た．この粗結晶の再結晶操作を行ない，針状結晶 20 mg を得た．この結晶は，濾紙電気泳動後溶媒 I および II によるペーパークロマトグラフィーの結果，スポットXと本結晶が同一であることを確認した．なお使用した 5′-former の核酸分解酵素液中には全くスポットXが検出できなかったことより，スポットXは酵母リボ核酸より由来したと考えられる．

分離した結晶の同定

1. 元素分析値および分子量　本結晶を日立 026 型 CHN 分析計で分析した結果，C 53.64%，H 3.84% であり，窒素，イオウ，リン等の定性反応は陰性であった．分子量を日立 115 型分子測定装置で分析した実測値は 113±3 で，この分析値より予想される分子式は $C_5H_4O_3$ でその構成元素の理論値は，C 53.58%，H 3.60%，O 42.82% であり上記分析値と一致した．これらの元素分析値および分子量より本結晶は，2-フロイン酸と推定した．

2. 融点　本結晶は昇華性で，柳本微量融点測定器で融点を測定した結果，本結晶の融点は 127°C，2-フロイン酸標品は 127.5°C と一致し，混晶試験の結果でも融点降下は見られなかった．

3. 紫外部吸収スペクトル　本結晶の紫外部吸収スペクトルを示したのが Fig. 4 である．すなわち本結晶 2 mg を水および 0.1 N-水酸化ナトリウムで 1 *l* とした溶液の紫外部における最大吸収は共に 245_{nm} であり，0.1 N-塩酸溶液では 253_{nm} に極大吸収があった．水および 0.1 N-水酸化ナトリウム溶液における極大吸収波長は，イノシン酸，イノシンおよびヒポキサンチンに類似しているが，0.1 N-塩酸溶液ではヒポキサンチン系化合物とは異なり極大吸収が 253nm と長波長にシフトしているのが特徴的である．本結晶と 2-フロイン酸標品の紫外部吸収スペクトルを三種類の溶液で測定した結果，本結晶と 2-フロイン酸標品のスペクトルは完全に一致した．

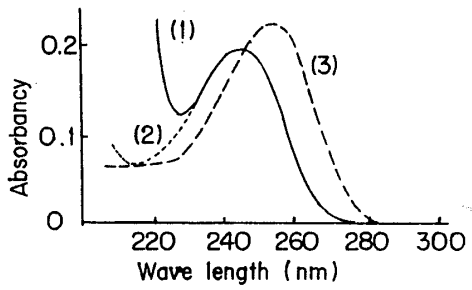


Fig. 4. Ultraviolet absorption spectra of the isolated crystal.
(1) : 0.1 N NaOH,　(2) : H_2O
(3) : 0.1 N HCl
Concentration : 2 mg/*l*

4. 赤外吸収スペクトル　日立 EPI-G2 型回析赤外分光光度計を用いて本結晶を KBr タブレット法で赤外吸収スペクトルを測定した結果が Fig. 5 である．その結果 3154 cm^{-1} にフラン核の CH 伸縮振動，1695 cm^{-1} にカルボン酸，890 cm^{-1} にフランの特徴的な吸収が見られ，本結晶と 2-フロイン酸標品の赤外吸収スペクトルは完全に一致した．

5. ガスクロマトグラフィー　本結晶および 2-フロイン酸標品をシリコン DC-550 (2 m) カラムを用い，カラム温度 150°C，キャリアガスはヘリウム 40 ml/min，検出器は TCD の条件で島津 GC-IC 型ガスクロマトグラフィーで分析した．試料はエーテルに溶解し，この溶液に常法通りジアゾメタンを窒素ガスで吹き込みメチルエステル化し，この一定量をマイクロシリンジでガスクロマトグラフに供した．得られたガスクロマトグラム上の本結晶および 2-フロイン酸標品の保持時間は完全に一致した．以上 5 項目の試験結果より，本結晶は 2-フロイン酸であると同定した．

亜硫酸パルプ廃液，酵母，酵母エキス中の 2-フロイン酸含量　亜硫酸パルプ廃液，飼料用酵母，医薬用酵母および酵母エキスの水溶液或いは懸濁液の pH を 2.0 とし，48 時間エーテル連続抽出を行ない，エーテル可溶部を集めエーテル溜去後 pH 7.0 に調整した．この酸性エーテル抽出液を濾紙電気泳動および濾紙クロマトグラフィーの二次元展開を行ない2-フロイン酸を定量した結果を Table 1 に示した．亜硫酸パルプ廃液中の 2-フロイン酸の含量は 0.002%と微量であるが，この亜硫酸パルプ廃液を培地として調製した飼料用酵母には 0.525%の 2-フロイン酸が含まれていた．このことより亜硫酸パルプ廃液に酵母を生育させるこ

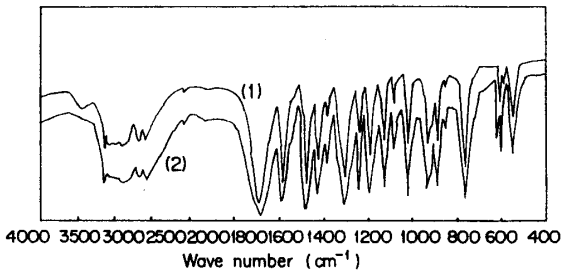


Fig. 5. Ir-spectra of 2-furoic acid.
(1) Authentic 2-furoic acid
(2) Isolated 2-furoic acid

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

Table 1. 2-Furoic acid content in sulfite waste liquor, dry yeast, medical yeast, and yeast extract.

Material	2-Furoic acid
Sulfite waste liquor	0.002%
Dry yeast	0.525%
Medical yeast	0.086%
Yeast extract	1.265%

とによって，培養基中に存在する或る種の成分例えばフルフラール等が2-フロイン酸に変換したか，或いは新たに生合成したものと推定される．この飼料用酵母より調製した医薬用酵母の2-フロイン酸含量は1/6に減少していたが，酵母中の2-フロイン酸の所在は酵母菌体内に存在するよりはむしろ酵母菌体表面に2-フロイン酸が附着しており，飼料用酵母を洗滌，精製することにより2-フロイン酸が酵母菌体表面より除去されたと考えられる．飼料用酵母より調製した酵母エキス中には1.265%の2-フロイン酸が含有されていた．この他に酢酸を培地として調製した酵母3試料および石油酵母7試料を酸性エーテル抽出操作を行ない2-フロイン酸を測定したところ殆んど検出できなかったことより，酵母中の2-フロイン酸は亜硫酸パルプ廃液を培地として培養した時にのみ生成するものと推定される．

市販酵母核酸中の2-フロイン酸含量 市販のパルプ廃液由来の酵母リボ核酸 A.B.C の3試料について，2-フロイン酸含量を測定した結果を Table 2 に示した．供試酵母リボ核酸 10g を秤量し 1N-塩酸溶液 200ml を加え，100°C，1時間酸分解後 pH を 1.5 に調製し，エーテル抽出後濾紙電気泳動および濾紙クロマトグラフィーの二次元展開を行ない，2-フロイン酸含量を定量した．酵母リボ核酸を酸分解で低分子化したのは，リボ核酸が酸性溶液中では沈澱となり抽出効果が低下するためで，酸分解によってリボ核酸をプリン塩基とピリミジンヌクレオチドにまで低分子化したわけである．2-フロイン酸含量の最も高いのは試料Aでその含量は0.3090%であり，最少は試料Cで0.0103%で，2-フロイン酸の含量で30倍の差があった．酵母リボ核酸 500 mg を水に溶解し 100 ml (pH 6.0) とし遠心分離した上澄液の OD_{370} の吸光度を着色度とした場合，着色度の高い酵母リボ核酸（精製度の低いもの）程2-フロイン酸の含有量が高いことより，酵母リボ核酸の着色度と2-フロイン酸の含有量との間には，或る程度の相関性があった．

Table 2. 2-Furoic acid content in commercial yeast RNA.

Lot No.	2-Furoic acid
Yeast RNA-A	0.3090%
Yeast RNA-B	0.0468%
Yeast RNA-C	0.0103%

核酸の酵素分解におよぼす2-フロイン酸の影響 基質として2-フロイン酸を含まない石油酵母より調製したリボ核酸を使用し，純核酸3%溶液 10 ml に *Pen. citrinum* の固体ふすま培養で調製した 5′-former の核酸分解酵素液を 0.47 ml 添加し，70°C, pH 4.8, 4時間酵素反応を行なった．この酵素分解時に2-フロイン酸を添加し，核酸分解に対する影響を検討したのが Table 3 である．Table 3 のリボ核酸の酵素分解率より判るように反応液への2-フロイン酸の添加は，リボ核酸の酵素分解に対しては阻害を示さず，3%の核酸溶液に2-フロイン酸を1%以上添加すると分解を促進するような傾向が見られた．

イオン交換樹脂による2-フロイン酸の分離 杉本らは，[4] 興人トルラ酵母を基質としてこれに放線菌の生産する酵素系を作用させ，酵素分解を行なって得た分解液中には，5′-イノシン酸に重合して出現する夾雑物の存在を報告している．5′-イノシン酸と2-フロイン酸の純品混合溶液のイオン交換樹脂による分離を試

Table 3. Effect of 2-furoic acid on enzymatic degradation of ribonucleic acid.

RNA	2-furoic acid	Incubation time (hr)		
		0.5	1.0	1.5
3%	0	78.7%	79.1%	97.6%
3%	0.25%	79.1	97.8	98.6
3%	0.50%	79.1	96.4	98.8
3%	1.00%	81.4	100.0	100.0
3%	1.50%	82.3	100.0	100.0
3%	2.00%	78.8	100.0	100.0

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

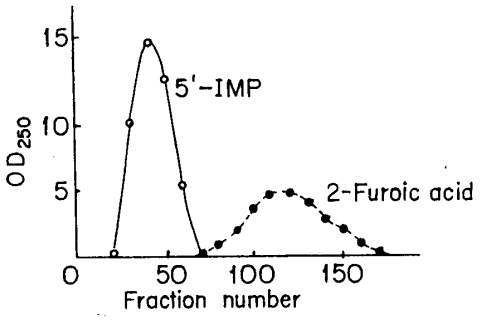
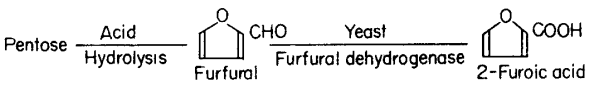


Fig. 6. Chromatography of 5′-IMP and 2-furoic acid on Amberlite IRA-402.

みたのが Fig. 6 である．陰イオン交換樹脂（ギ酸型）に吸着後ギ酸で溶出した場合は 5′-イノシン酸と 2-フロイン酸は重複して溶出され完全に両化合物は分別できなかった．次に強塩基性アニオン交換樹脂としてアンバーライト IRA-402（塩素型）100 ml カラムに 5′-イノシン酸 181.1 mg と 2-フロイン酸 56.1 mg を溶解して 200 ml にした溶液（pH 8.0）を吸着し，0.015 N-塩酸で溶出したのが Fig. 6 である．20 ml のフラクションで分画した結果であるが，5′-イノシン酸はフラクション No. 45 附近に，2-フロイン酸は No. 115 附近にピークを有し殆んど完全に分別できた．

酵母によるフルフラールより 2-フロイン酸の生成

パルプ廃液中には五炭糖が多量に含有されており，この五炭糖が酸性条件下で加熱するとフルフラールが生成し，パルプ廃液中には約 0.5～1.0%のフルフラールが存在している．フルフラールは本来酵母の生育を抑制するが，このフルフラールが誘導物質となりフルフラール脱水素酸素が誘導され，酵母に無害の 2-フロイン酸に変換できる酵母のみがフルフラール添加培地に生育可能である．森本ら[5]によると，パン酵母の醗酵



によるフルフラールの代謝物を分取後赤外スペクトルで固定した結果フルフリルアルコールであると報告している．我々はフルフラールを添加した培地で代表的な酵母45株を植菌し，28°C，7日間振盪培養後濾紙電気泳動，濾紙クロマトグラフィーの二次元展開で 2-フロイン酸の生成を検討し，フルフラールより 2-フロイン酸を効率よく生産した菌株は，Table 4 に示す 9 株である．使用培地は，麦芽エキス 0.3%，酵母エキス 0.3%，ポリペプトン 0.5%，ブドウ糖 1%，フルフラール 0.25%，pH 6.5 を用いた．微生物の生育源として利用不可能なフルフラールを含有する培地に上記のフルフラール耐性菌を前培養し，醗酵阻害を示さない濃度までに 2-フロイン酸に酸化して後，菌体を除去するか或いはそのまま殺菌するかして微生物にとって良好な培地を調製することも可能である．[6] 亜硫酸パルプ廃液を醗酵原料として酵母菌体を取得する場合，培地中の亜硫酸濃度と同時に混在するフルフラール含量が酵母の生育制限因子となっている．亜硫酸パルプ廃液を培地として酵母を工業的に連続醗酵させて酵母リボ核酸を生産している事実より考慮すると，亜硫酸パルプ資化性酵母は同時にフルフラール耐性菌でもあり，培養中にフルフラールを 2-フロイン酸に変換していると考えられる．この 2-フロイン酸が酵母リボ核酸の調製操作に従って同時に行動し，市販中の酵母リボ核酸中に 2-フロイン酸が混在したと推定される．

Table 4. List of yeast able to produce 2-furoic acid from furfural.

Candida japonica IAM 1119
Candida utilis IAM 4277
Candida albicans IAM 4905
Pichia membranaefaciens IAM 4025
Rhodotorula glutinis IAM 4757
Torulopsis bacillaris IFO 0857
Saccharomyces cerevisiae IFO 0847
Saccharomyces cerevisiae strain OC-2 IAM 4274
Saccharomyces cerevisiae Kyokai No. 6 IAM 4512

要　　約

亜硫酸パルプ廃液より調製した酵母リボ核酸の酵素分解液中の微量成分を検討していたところ，濾紙電気泳動で 5′-グアニル酸と殆んど泳動距離が同じで，ペーパークロマトグラフィーの R_f 値が異なるスポット X が存在することを見出した．酵母リボ核酸を酵素分解後，アンバーライト IRA-402 に吸着後塩酸溶出を行ない 5′-アデニル酸区分を得，pH 2.0 で上澄液をエーテル抽出し結晶標品を得たが，この結晶はスポット X と一致した．酵母リボ核酸分解液より得たこの結晶を元素分析，分子量，融点，赤外吸収，紫外部吸収，ガスクロマトグラフィー等の分析を行なった結果，2-フロインと同定した．一方酢酸を培地として得た酵母リボ核酸および石油酵母より調製した酵母リボ核酸中に 2-フロイン酸が検出されないことより，2-フロイン酸は亜硫酸パルプ廃液を培地として調製した酵母リボ核酸にのみ存在することが判明した．この 2-フロイ

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

ン酸は，市販酵母リボ核酸中に0.01～0.3%存在し，酵母リボ核酸の酵素分解時に2-フロイン酸を添加しても阻害作用は見られなかった．

亜硫酸パルプ廃液中に存在するフルフラールが酵母の生産するフルフラール脱水素酵素によって2-フロイン酸に変換され，酵母リボ核酸の調製操作においてこの2-フロイン酸が行動を共にし，酵母リボ核酸標品中に混在してきたものと推定した．フルフラールを効率よく2-フロイン酸に変換する酵母を検索し9株を得た．

文 献

1) Markham, R., Smith, J. D.: *Biochem. J.*, **49**, 401 (1951).
2) Dorough, G. D., Seaton, D. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2873 (1954).
3) 國中，藤島，藤本：*Amino Acid and Nucleic Acid*, **16**, 28 (1967).
4) 杉本，岩浅，石井，横塚：農化，**38**, 454 (1964).
5) 森本，村上：醱工，**45**, 442 (1967).
6) 藤島，鈴木，吉野：特願昭45-5410（特公昭48-3394）.

（昭48.9.17受付）

NII-Electronic Library Service