琉球大学学術リポジトリ

甘蔗の赤変に関する生化学的研究(農芸化学科)

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 外間, 宏一, Hokama, Koichi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4424

甘蔗の赤変に関する生化学的研究

外　間　宏　一*

Koichi HOKAMA : Biochemical studies on sugar cane reddening

目　　次

緒　　言……39
第1章　色素の単離及び構造の推定……40
実験方法……40
実験結果……40
1.　各色素の単離……40
2.　定性試験……42
3.　各色素の吸収スペクトル……43
4.　各色素の元素組成および分子式……49
5.　構造の推定……49
考　　察……50
要　　約……51
第2章　赤変現象の発現に影響する諸因子……51
実験方法……51
実験結果……51
1.　赤変現象に影響する諸因子……51
2.　酸処理甘蔗切片の赤変……52
3.　甘蔗汁の鉱酸による赤変……54
4.　自然赤変における糖濃度pHの経時変化……55
5.　人為赤変に影響する諸因子……56
6.　自然赤変色素とその他の方法で生成した色素との関係……58
考　　察……60
要　　約……60
第3章　赤変に関与する微生物……61
実験方法及び結果……61
1.　菌の分離同定……61
2.　生きた甘蔗組織の関与……64
3.　微生物の赤変に及ぼす影響……64

*　琉球大学農学部農芸化学科
琉球大学農学部学術報告　**20**：37～93（1973）

考　　察……66
要　　約……68
第4章　甘蔗 Peroxidase ……68
実験方法……69
実験結果……70
1. 酵素の特性……70
2. 赤腐病の進行に伴う酵素活性の変化……74
3. 甘蔗茎各部位の酵素活性……75
考　　察……75
要　　約……76
第5章　赤変機構……76
実験方法……76
実験結果……77
1. 生化学的反応による色素の生成……77
考　　察……85
要　　約……86
第6章　各色素の生理活性……86
実験方法及び結果……87
1. 魚毒性試験……87
2. 抗菌性試験……87
要　　約……87
結　　論……88
総　　括……88
謝　　辞……89
文　　献……89
Summary ……92

緒　　言

甘蔗は，ハワイ，キューバ，インド，台湾など熱帯各地で広く栽培されているが，沖縄においても，糖業は基幹産業のうち，最も重要な地位を占めている。したがって，甘蔗中に起きる諸現象，疾病等について特別に関心が払われて来た。

甘蔗の主要な病害として，赤腐病，糸状菌による病害（40），根ぐされ病（7，17），赤はん病（5），赤条病(19)などが知られているが，そのうち最も関心をもたれたものは赤腐病であろう。

Edgerton (6) によれば，赤腐病は糸状菌 *Physalospora tucumanensis* (*Colletotrichum falcatum*) の感染によるものとされており，古く1893年に，Wentがジャバで serehとして糖業界に知られていた甘蔗赤ぐされ現象を研究し，はじめてこれを "het rood snot" として記載した (5) といわれている。

その頃，Masseeは西印度の甘蔗から*Colletotrichum falcatum*を分離したと報告した。しかし，その後数年間，西印度では甘蔗を汚染する病気は外皮病の原因となる糸状菌*Melanconium sacchari*によって発生するとされていた。次で1903年，Howardは甘蔗を侵害する菌は*C. falcatum*であるとのべ，同時にそれは表皮病の原因でもあると主張した。

Butlerは *C. falcatum* 菌の伝ぱを研究し，この菌は甘蔗若枝に侵入するが，感染は甘蔗の根元と芽を通しても行われることを明らかにした。彼はその病気を "red rot" (赤腐病) と称した。また，赤腐病は昆虫による甘蔗茎部の喰傷，成長期の茎部のひびわれなどから赤腐病菌が感染することによって発生する。甘蔗表皮を攻撃する昆虫のうち最も重要なものは，甘蔗に穴をあける *Diatreae saccharalis* であり，その幼虫が茎の内部に経路を作って表面に通ずる穴をあける。これらの周囲の細胞はよく赤腐病にかかっているのが見受けられるので，この穿孔虫が経路づたいに甘蔗細胞に存在する胞子を運搬すると推論した。

これらの説は植物病理的見解から出されたものであり，化学的立場からの検討は極めて少い。甘蔗は立木のままでも，伐採したものでも切断すると，切断面は3日目頃から赤くなりはじめ，5日目頃には，鮮明に全面が赤変する。なお放置を続けると，赤変は内部深くまで侵透していく。いわゆる赤腐病と類似の現象が起こる。

これらの色素は，生甘蔗のような特定の培地でのみ生産され，菌が直接生産したものと考えるよりも，むしろ，甘蔗の生理的反応により生成したものと見なすべきもののようで，今までに数多く報告されている菌自身の色素とは生成機構において，また色素の本質において異なると考えられる。そこで筆者は，微生物的観点からのみならず，色素の単離同定，生体内化学反応，酵素反応などの面から，甘蔗の赤変機構に関する研究を行なった。以下その大要をのべる。

先ず順序として赤腐病菌と必ずしも近縁ではないが，菌自身の色素について調べたものを挙げれば次の如くである。即ち，

1) Pastac(26) による糸状菌中の rubrroglucin emodinおよびboletolなどの anthraquinone 系色素 2) H. Stodolaら(31) による*Penicillium*培地から$C_{15}H_{17}O_5N$ のpenitric acid の分離，3) Willstaedt (43, 44) による *Catharellus Cibarius* 菌からの β- carotene, α- carotene, 少量の lycopeneの分離，および*Lactarios deliciosus* L菌からの赤色結晶 lactaroviolin ($C_{15}H_{14}O$)，青色液体lactarazone ($C_{15}H_{18}$) および黄色結晶verdazulene ($C_{15}H_{16}$) の単離，4) 柳ら (48) による *Aspergillus awamori* 22—2—2 菌から黄色のasperyellone(n-methyl-13-phenyl-3-oxo-trideca-4,6,8,10,12-pentaene 9) の単離，5) 田中ら (38) による *Asp. niger*および*Asp. awamori*から黄色色素 aurapellone A, B, C, の分離，その他 *Monascus Purpureus* Went菌から赤色結晶 monascorbin

（$C_{22}H_{24}O_5$）（22）の分離などがある。

従って先ず赤変甘蔗より色素の分離，精製，組成，官能基の検索等を行ない上記既知化合物との比較検討をした。殊に菌自身の色素との異同を明らかにしようと試みた。次で甘蔗汁中の成分を分画し，*in vitro* あるいは沪紙上での赤変の発現を行なうことを試みた。更に，この反応に関与する酵素として peroxidase について詳細に検討した。最後にこの赤変色素生成の意味を理解するために，抗菌性等の生理活性をも検討した。

第1章　色素の単離および構造の推定

赤腐病に関する研究は植物病理の面からは数多く報告されているが，化学的に検討を加えた報告は少く，僅かに，バガスから構造不明の saccharetin を単離した Sakuma(29) の報告が見られるだけである。

赤腐病にり病した甘蔗中に含まれる色素は多くの色素の混合物であることが沪紙クロマトグラフィによって判明し，全色素の単離は不可能と思われたので，そのうち量も多く明瞭で安定なスポットを与えた5種の色素を単離した。なお各色素は時間の経過とともに変化しているようで，純粋に得ることは困難であった。

実　験　方　法

1．供試甘蔗は本学付属農場で栽培したN:Co.310品種を用いた。

2．色素の単離はペーパークロマトグラムから目的とする色帯を切りとり，溶媒で抽出して行なった。

3．単離した色素に対して，phenol，quinone，flavonoidの定性試験を行なった。

4．元素分析，質量スペクトル，赤外吸収スペクトル，紫外吸収スペクトルの測定は九州大学に依頼した。

5．分子量は質量スペクトル測定結果から求めた。

実　験　結　果

1．各色素の単離

a）Aの単離：　赤腐病にともない赤変甘蔗茎細片を80～100°Cで乾燥し，メタノールで抽出後，その濃縮液を試料として，ペーパークロマトグラフィ（東洋沪紙No. 50，展開溶媒水胞和ブタノール）を行ない，Rf 0.9の赤紫色帯を切りとり，メタノールで溶離濃縮し，水を加えて生ずる析出物を遠沈後，減圧乾固し，これを更にメタノールに溶解し，ペーパークロマトグラフィを行なった。以下同様の操作を繰返してえた粗結晶を色素Aと称する。

b）Bの単離：　除皮，除節した甘蔗茎を室温で1週間放置赤変（以下自然赤変と称する）させ、80～100°Cで乾燥後メタノールで浸漬抽出し，減圧濃縮後水を加えて懸濁状とし，酢酸エチールで抽出した。溶媒層と水層との境界面に両者に不溶の紫色の色素が析出したが，水層とともに廃棄した。赤色の溶媒層は塩化カルシウムで乾燥後，減圧下で濃縮した後，メタノールに溶解してペーパークロマトグラフィの試料とした。

これを東洋沪紙No.50（40×40）に帯状に塗布して，酢酸：H_2O（1：1 v/v）の溶媒で展開し，Rf値0.5の微黄色（紫外ランプ下褐色）部分を切りとり，下降法によりメタノールで溶離乾固した後，酢酸エチルに溶解して蒸留水を加えてふった。水層には板状不溶性褐色物質が析出したが廃棄した。溶媒層を塩化カルシウムで乾燥した後，減圧濃縮して石油ベンジンを添加し，析出した粗結晶を遠沈分別した（色素B）。この分離系統図を第1図に示す。

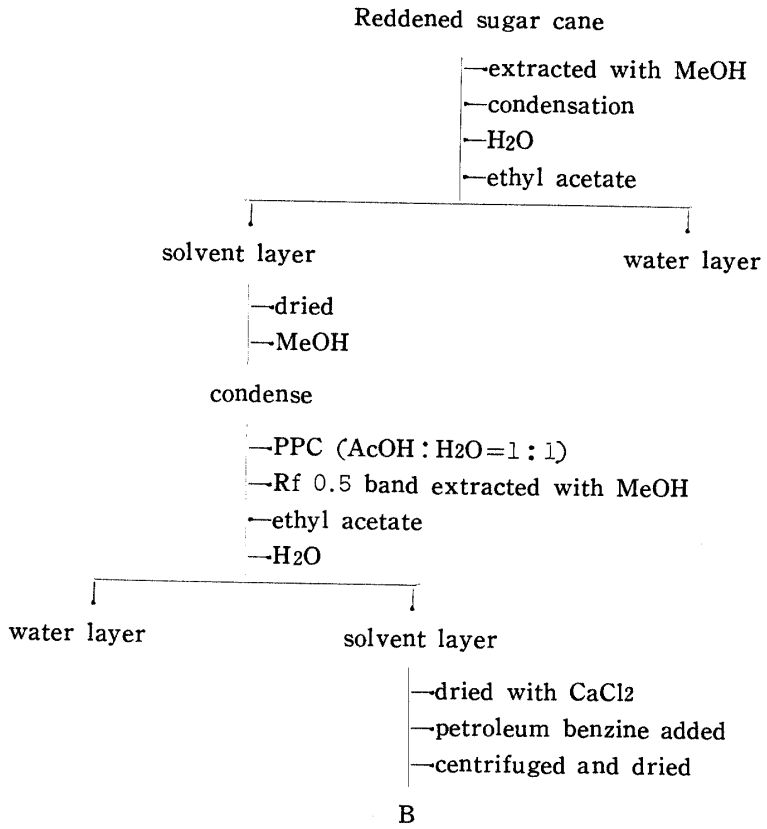

Fig. 1. Isolation of pigment B

c） Cの単離： 水洗バガスを3％蔗糖液に常温で15分間浸漬した後，圧搾して余分の糖液を除き30°Cで保存し，赤変を人為的に発現させた（以下この操作によるものを人為赤変と称する）。以下b項の方法に準じてＰＰＣ用試料を調製し，メタノール：H_2O（3：1 v/v）の溶媒で展開した。Rf値0.80の褐色の色帯を切りとって，前項の方法に準じて処理し，褐色の粗結晶Cをえた（第2図）。

d） D，Eの単離： b項の方法に準じて調製した赤変甘蔗切片に水を加えてミキサーで磨砕し，常温で1時間水中に浸漬抽出した後，沪別して酢酸エチルで抽出した。赤色の溶媒層は硫酸ナトリウムで乾燥後，減圧下濃縮乾固し，メタノールに溶解した後，東洋沪紙No.50（40×40）帯状に塗布し，水：酢酸：メタノール（3：1：1 v/v）で展開した。Rf値0.60の橙色の色帯およびRf値0.51の酸性で橙色，中性で紫色の色帯をそれぞれ切りとり，下降法によりメタノールで溶離し，以下b項の方法に準じて処理し，橙色の色帯および紫色の色帯からそれぞれ粗結晶DおよびEをえた（第2図）。

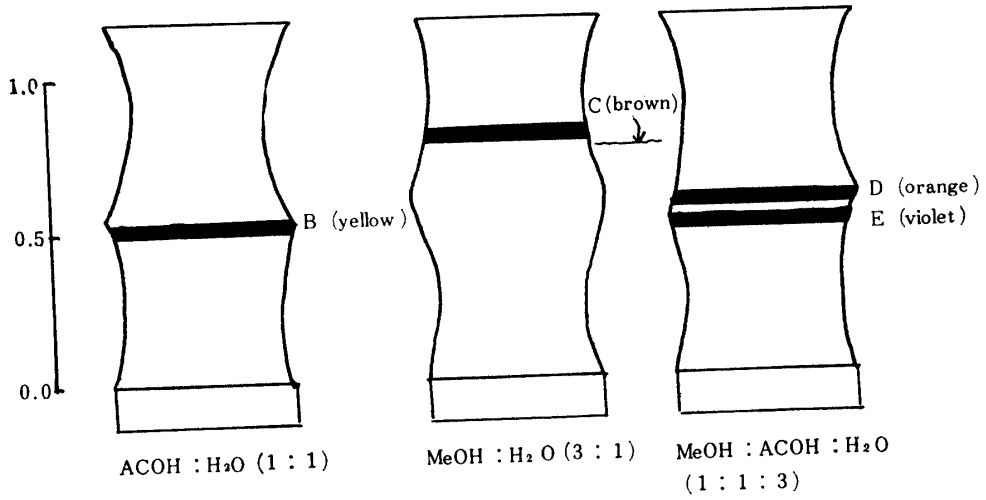

Fig. 2. Paperchromatogram of pigment B, C, D, E.

2. 定性試験

各色素の定性試験の結果を第1，2，3表に示す。用いた発色試薬は下記の通りである。

a）アンモニア性硝酸銀： 沪紙上に試料をスポットし，これに0.1N 硝酸銀と5Nのアンモニア水の同容積混合液を吹きつけ，105°Cで10分間加熱する（第1表）。

b）塩化第二鉄： 1%メタノール溶液（第1表）。

c）Diazo反応： 試料のメタノール溶液にdiazo試薬（第1液：0,7%亜硝酸ナトリウム水溶液，第2液：sulfanilic acid 1 g に5N-HCl50 g および水150 g を加えて溶解し，第1液，第2液を1：4の割合に混合したもの）を加え，1%水酸化ナトリウム溶液でアルカリ性にする（第1表）。

d）Pyrrole： Pyrrole の0.5%エタノール溶液1 mlに試料のエタノール溶液2 mlを加え，ふりまぜ，濃塩酸5滴を加えると陽性であれば紫色を呈する（第2表）。

e）酢酸鉛： 5，8位に水酸基をもつ1，4—naphthoquinone 類はメタノール性酢酸鉛で紫色を呈する。flavone類は黄色の沈澱を生ずる（第2表）。

f）酢酸マグネシウム：hydroxyanthraquinone類のアルコール溶液に酢酸マグネシウムの一片を加えると呈色する（第2表）。

g）アルカリ： hydroxyanthraquinone類は1%水酸液にとけて橙色～青藍色を呈する（第2表）。

h）濃硫酸： hydroxyanthraquinone 類は一般に濃硫酸にとけて赤色～青藍色を呈する。flavonoid類は濃硫酸に溶けて黄色の溶液を与える（第2表）。

i）マグネシウムと濃塩酸： エタノール溶液をマグネシウムと濃塩酸で還元すると，水酸基の位置，数によって黄色～赤紫色を呈する（第2表）。

j）亜鉛と塩酸： flavone 類，flavanol類は亜鉛と塩酸で還元すると，橙黄色～赤紫色を呈する。flavonol類は呈色しない（第2表）。

k）アルカリ処理沪紙をアンモニアの蒸気に触れさせるか，1%炭酸ソーダ溶液または1%水酸カリウム溶液を噴露する。flavanone,catechin 類は黄色～赤褐色になる（第3表）。

l）螢光： 紫外線下flavone，flavonol-3-glucoside は暗褐色を，flavonol は輝黄色を呈する（第3表）。

m) 塩化アルミニウム： 1%塩化アルミニウムメタノール溶液を噴露した沪紙を乾燥して呈色を検する。flavone類は黄褐色，flavonol-3-glucosideは紫外線下美麗な黄色螢光を呈する（第3表）

Table 1. Qualitative test of each pigment isolated (detection of phenol compounds)

Pigment	$AgNO_3$	$FeCl_3$	Diazo
A	−	brown	brown
B	+	brown	brown
C	−	brown	orange
D	−	violet	brown
E	−	violet	brown

Table 2. Qualitative test of each pigment isolated (detection of quinone and flavonoid)

Pigment	benzo-quinone	Naphtho-quinone	Anthraquinone			Flavonoid		
	Pyrrole	Methanolic Pb-acetate	Mg-acetate	Alkali	H_2SO_4	Mg-HCl	Zn-HCl	Pb-acetate
B	−	−	yellow	yellow	brown	violet	−	yellow
C	−	−	−	−	brown	−	−	−
D	−	−	−	violet	brown	−	−	−
E	−	−	violet	−	brown	−	−	violet

Table 3. Qualitative test of each pigment isolated (detection of flavonoid)

Pigment	U V	1%NaOH	$AlCl_3$
B	brown	brown	yellow
C	blue	yellow	−
D	−	violet	−
E	blue	violet	−

3. 各色素の吸収スペクトル

各色素のMS，IR，UVスペクトルの測定結果を第3～16図に示す。

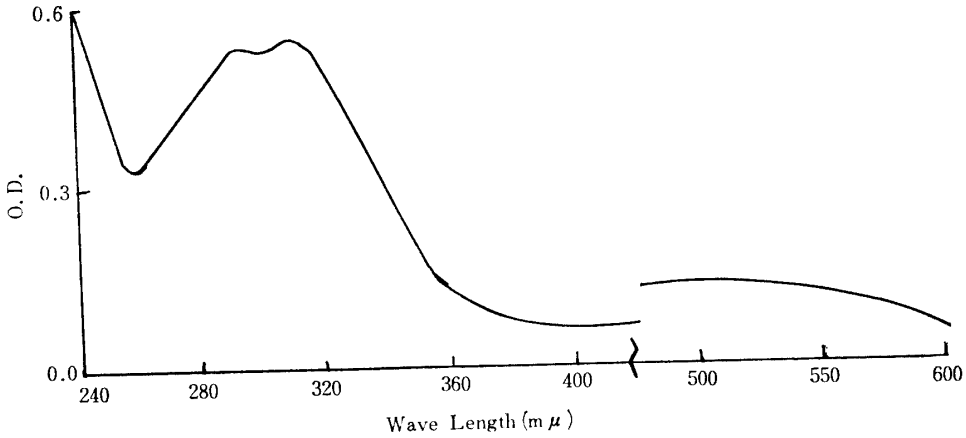

Fig. 3. Absorption Spectrum of pigment A

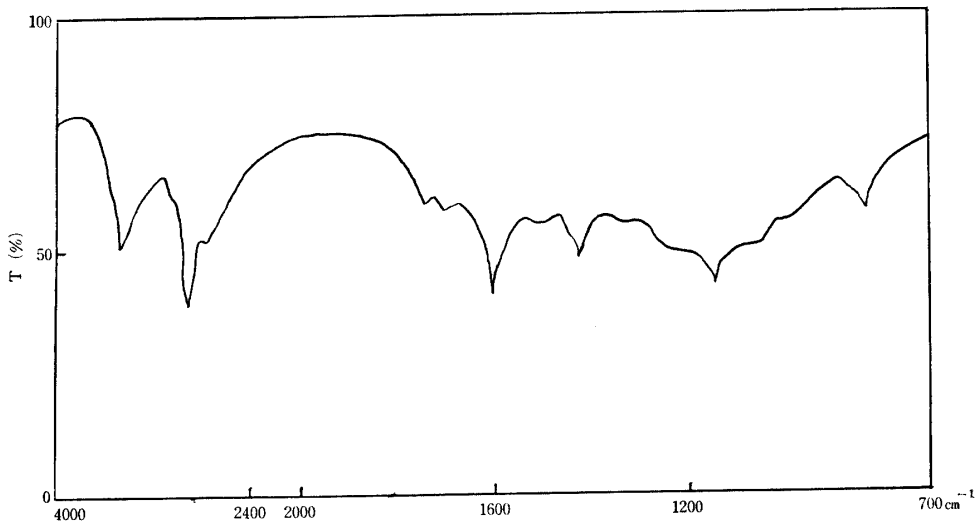

Fig. 4. IR spectrum of pigment A (KBr)

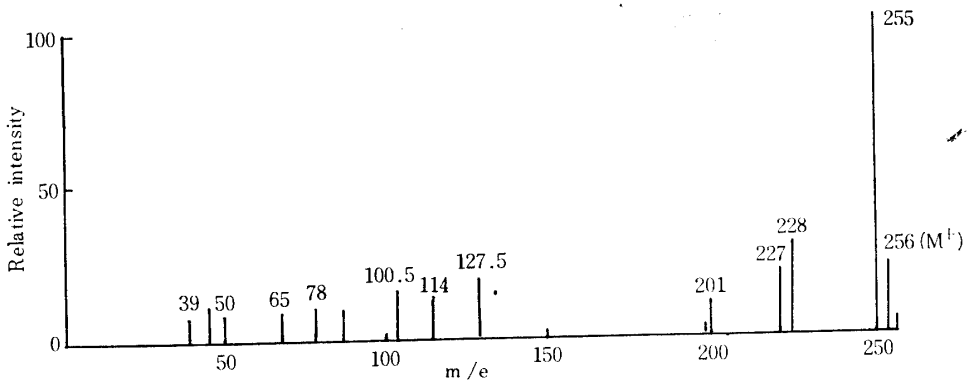

Fig. 5. Mass spectrum of pigment A

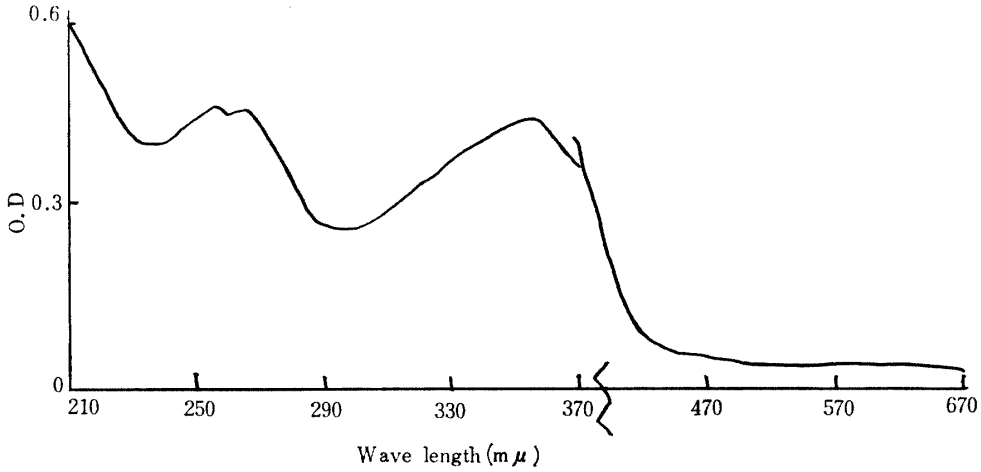

Fig. 6. Absorption spectrum of pigment B

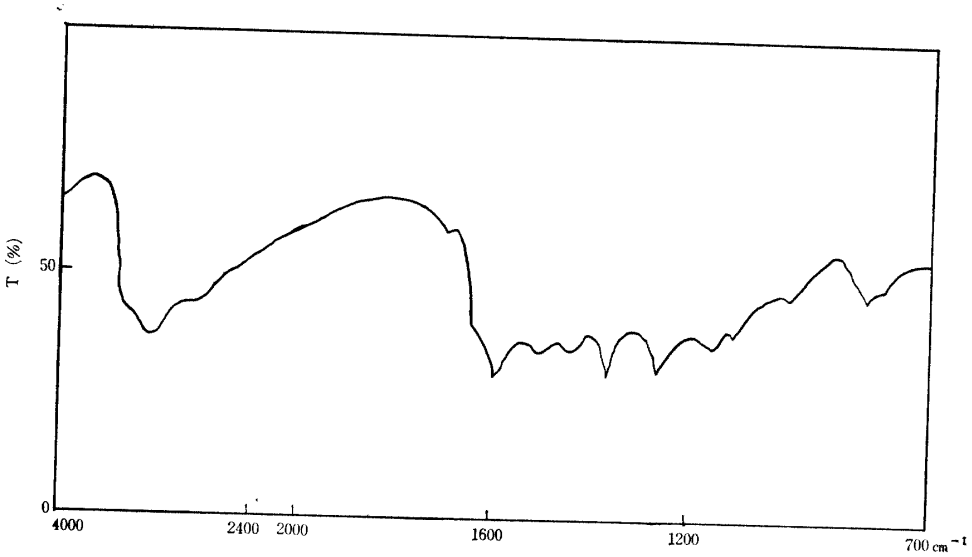

Fig. 7. IR spectrum of pigment B (KBr)

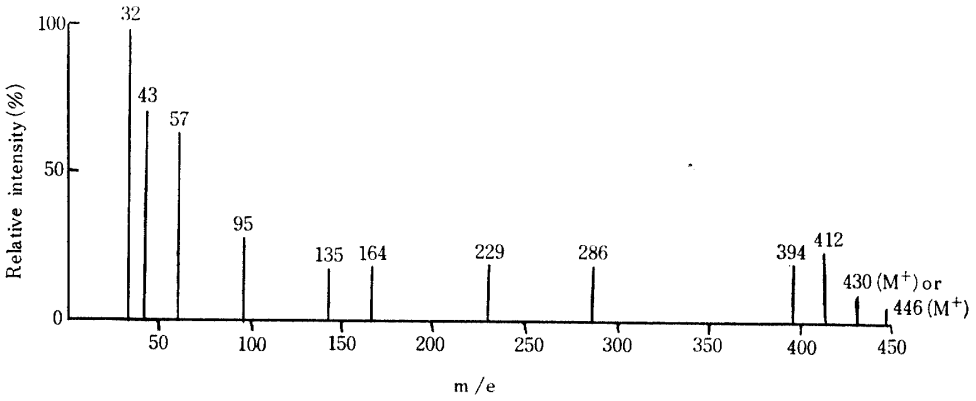

Fig. 8. Mass spectrum of pigment B

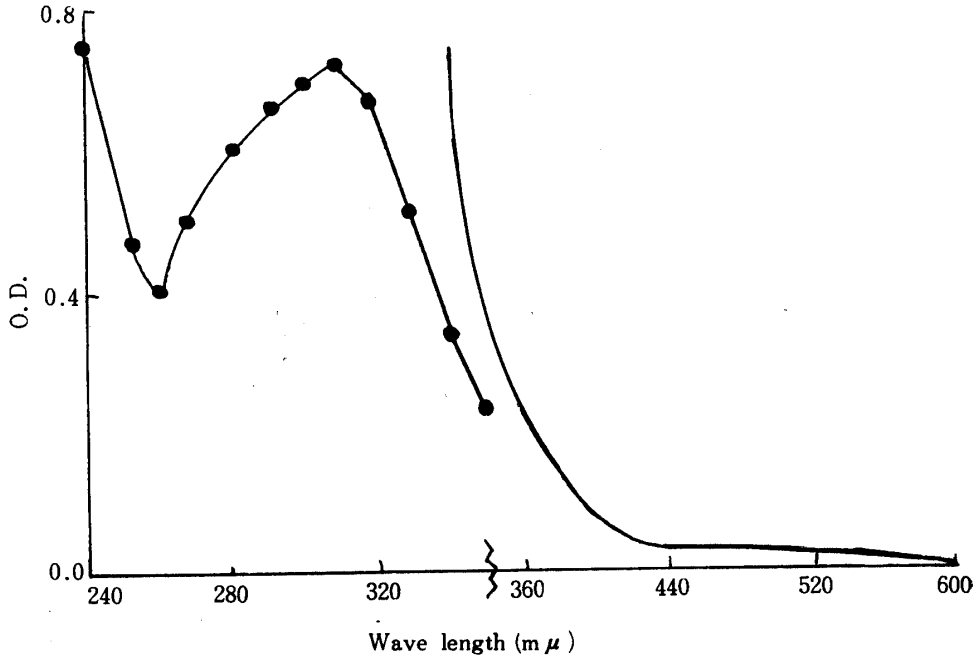

Fig. 9. Absorption spectrum of pigment C

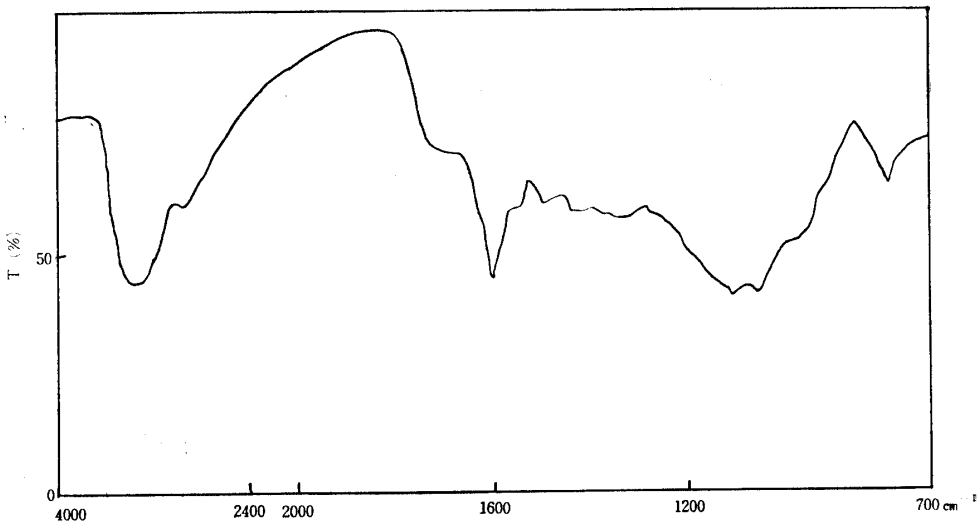

Fig. 10. IR spectrum of pigment C (KBr)

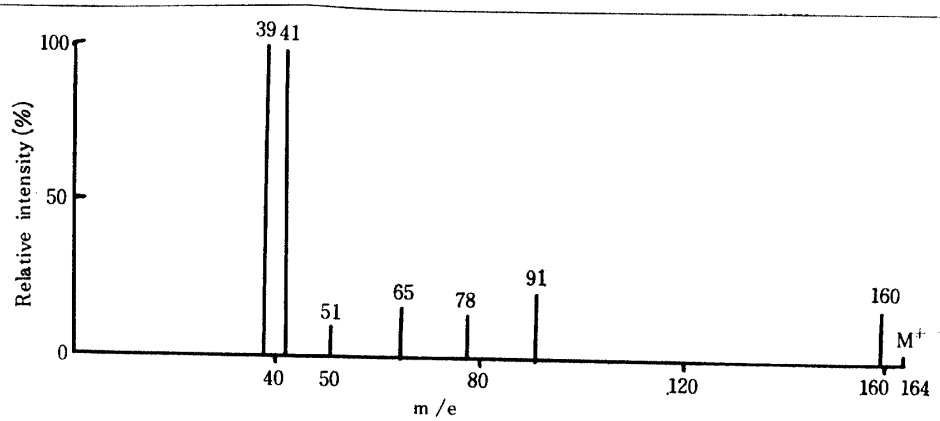

Fig. 11. Mass spectrum of pigment C

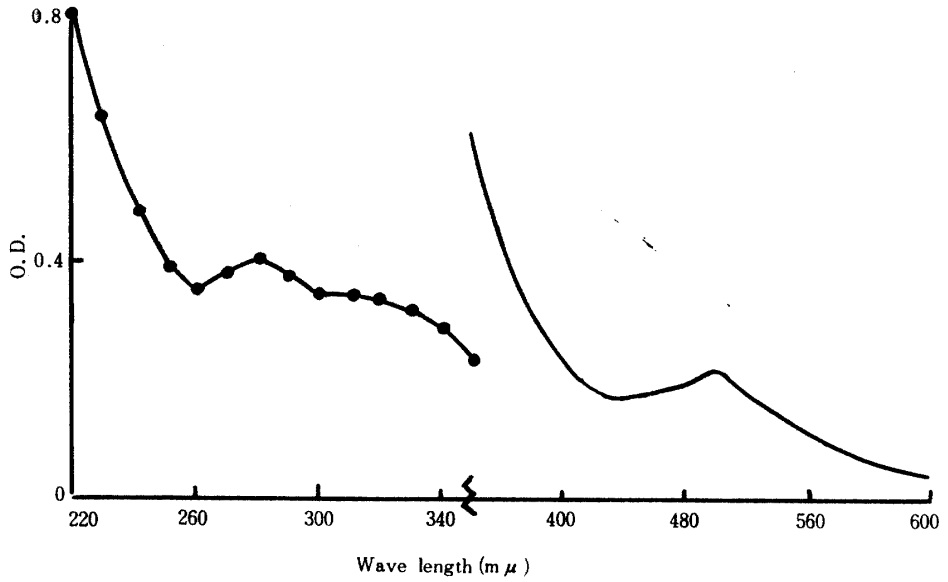

Fig. 12. Absorption spectrum of pigment D

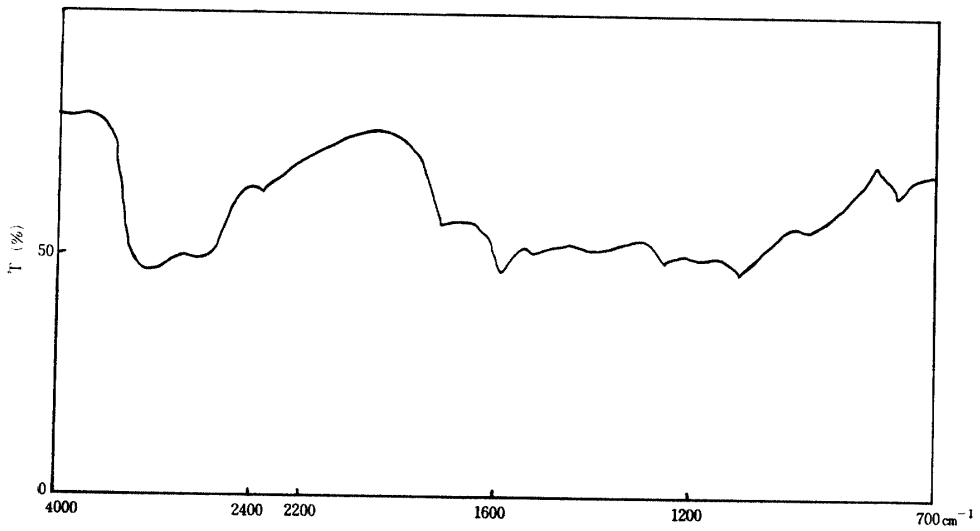

Fig. 13. IR spectrum of pigment D (KBr)

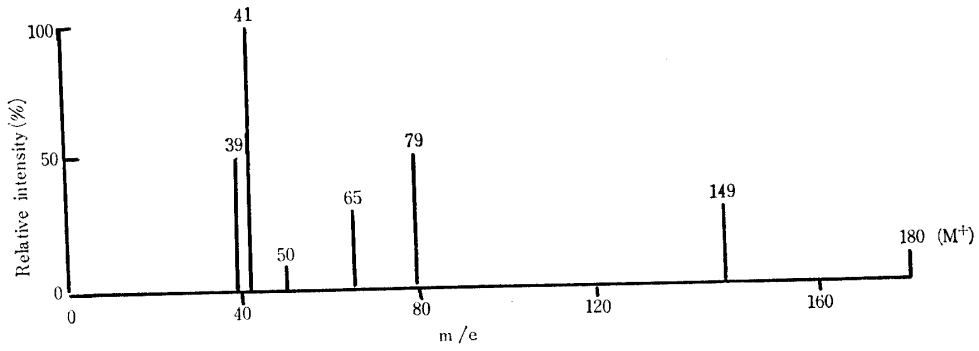

Fig. 14. Mass spectrum of pigment D

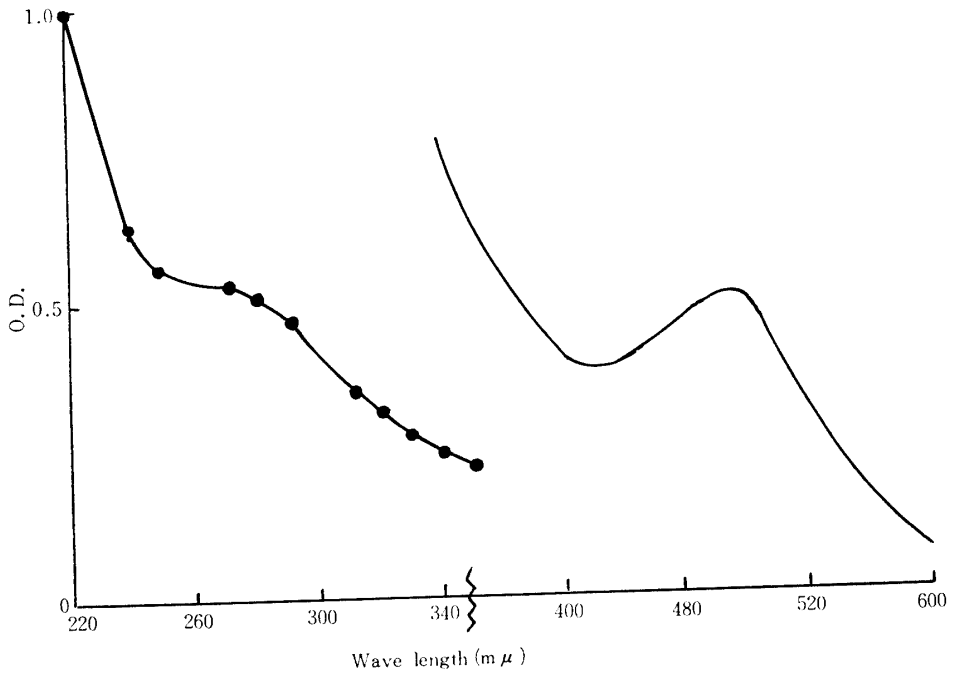

Fig. 15. Absorption spectrum of pigment E

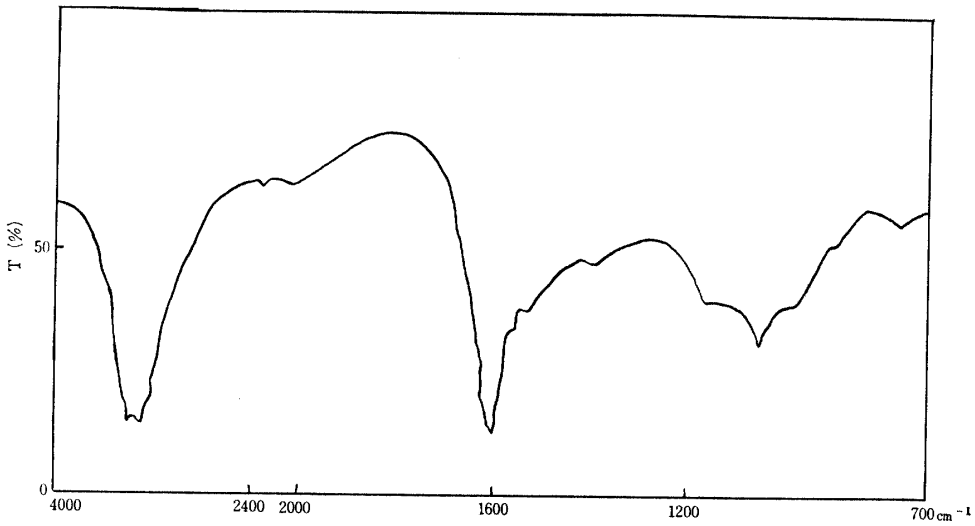

Fig. 16. IR spectrum of pigment E (KBr)

4. 各色素の元素組成および分子式

分子量はMSチャート上のM^+ピークから求めた。分子式は分子量と元素分析結果から求めた。元素分析の結果，各色素とも窒素を含有しないことがわかった。しかし，Aは23%，Eは2%の灰分を含んでいたので，第4表に示される元素分析結果はそれらの値を差引いて換算した値である。結果を第4表に示す。

Table 4. Result of elementary analysis and other physico-chemical data of each pigment identified

		A	B	C	D	E
m. p. (C°)		—	>260	139～143	168～176	>260
M. W.		256	B-1:446 (B-2:430)	164	180	—
C %	Found	84.36	60.27	61.18	62.00	62.36
	Calcd.	84.32	B-1:59.19 (B-2:61.39)	65.85	59.98	—
H %	Found	9.98	5.24	5.62	5.62	5.88
	Calcd.	9.36	B-1: 4.97 (B-2: 5.15)	4.19	4.47	—
Formula		$C_{18}H_{24}O$	B-1:$C_{22}H_{22}O_{10}$ (B-2:$C_{22}H_{22}O_8$)	$C_9H_8O_3$	$C_9H_8O_4$	—
Crystal Form		amorphous	amorphus	amorphous	plate	glass

5. 構造の推定

各色素の元素分析，ＩＲ，ＭＳの測定結果からえられたデーターを解析することによって，化構造学

の検討を試みた。

a）色素A（$C_{18}H_{24}O$）：　定性試験におけるphenol性水酸基の存在，ＩＲにおける 3400cm^{-1}(23)，MS（14）におけるe/m 228（$M^{+}-CO$）および227（$M^{+}-CHO$）の比較的強い両ピークおよび分子式から察して，１コのフェノール性水酸基の存在が考えられる。ＩＲにおける3250cm^{-1} 付近の幅広い吸収，1600cm^{-1}，830cm^{-1}，ＵＶ290$m\mu$(35)，ＭＳにおけるm/e 39，50，52，65，78などから察して芳香核の存在が推定される。

また２コの準安定イオンピークは次の場合に対応するものである。

m/e 201（$M^{+}-C_4H_7$）に強いピークがあることは，C_4H_7（55）の脱離を意味する。したがってC_4H_7基が芳香核に結合しておればα位置換である。

b）色素B（$C_{22}H_{22}O_{10}$ または $C_{22}H_{22}O_9$）：　定性試験における phenol 性水酸基の存在およびＩＲにおける 3200cm^{-1} 付近の幅広い吸収帯から polymeric 水酸基の存在，ＵＶ265，350$m\mu$，ＩＲ 1600cm^{-1}，840cm^{-1}から芳香核の存在がそれぞれ推定される。1600cm^{-1}付近の吸収帯は carbonyl 基に起因する吸収帯と芳香核に起因する吸収帯が重複したためにおこったものと考えられる。

明瞭で比較的大きいＭＳにおけるm/e430ピークと不明瞭で極微小のm/e446ピークのうち，いずれがM^{+}ピークであるのか判断がつかないので，前者をB-２，後者をB-１として並記した。第２，３表に示される呈色反応はあきらかにflavonoid に特有な反応であり，しかも亜鉛と塩酸による還元反応が陰性であることから，色素Bはflavonol誘導体と推定される。

C）色素C（$C_9H_8O_3$），D（$C_9H_8O_4$）：　色素Cは人為赤変バガスからえられた色素であり，Dは自然赤変甘蔗からえられた色素であるが，分子式およびＩＲスペクトルにおいて，類似性が認められたので，CおよびDは同時に化学構造の検討をした。

定性試験における phenol 性水酸基の存在およびＩＲにおける 3300cm^{-1}からphenol 性水酸基，ＵＶ 310$m\mu$（C），280$m\mu$（D），ＩＲ790cm^{-1}，1600cm^{-1}，ＭＳのm/e 39，50，51，52，65，77，78，79などから芳香核の存在がそれぞれ考えられる。各分子式の酸素のうち少くとも1コはphenol 性水酸基である。尚不明の酸素が１～２コ存在する。例えば，ＩＲ 1050cm^{-1}からエーテル型酸素，methylendioxide型酸素などである。

天然には色素Cと異性体であるものに*p*-coumaric acid（*trans*-hydroxycinnamic acid）の存在が知られているが，*p*-comaric acidはm. p.206～208°(18) の無色結晶であるので，色素Cが*p*-coumaric acid でないことは明白である。したがって色素Dも coumaric acid の水酸基１置換体ではないと考えられる。

考　　察

甘蔗に関連する色素についての報告は，紫色の表皮を有する甘蔗から単離されたものが多い。その主なるものは，1) Fawcett (8) によると甘蔗葉赤変物質は有色液体であるとの報告，2) Sakumaら(30) によると赤紫色甘蔗の色素はanthocyanineであり，また甘蔗汁中の紫色の色素は Fe-tannin化合物であるとの報告，3) Viswa (41) によるとpurple mauritius, red mauritiusおよびbadila種のような有色甘蔗の外皮から単離された色素の大部分は delphenidine の誘導体であろうとの報告，4) 大島ら(24) によると紅蔗茎皮の色素はメトキシ基，糖を含まず，既知の anthocyanidin とは異なるとの報告および Rad(28) らによる甘蔗からえられた mauritinin と呼ばれる色素の報告などであるが，しかし構造の確定したものは未だない。著者もいくらか推定を試みたが決定することはできなかった。

要　　約

1. 色素の単離はペーパークロマトグラフィと溶媒操作で行ない，自然赤変甘蔗茎から，色素A（$C_{18}H_{24}O$），B（$C_{22}H_{22}O_9$ または$C_{22}H_{22}O_{10}$），D（$C_9H_8O_4$），E（分子式不明）および人為赤変バガスから色素C（$C_9H_8O_3$）をえた。

2. 色素A，B，C，Dはいづれも芳香族化合物であり，1）Aは phenol 化合物で butenyl 基を有し，2）Bはflavonol誘導体，3）CおよびDは少くとも1コのphenol性酸素を有するが，なおエーテル型酸素，methylendioxide型酸素の存在することが推定された。

第2章　赤変現象の発現に影響する諸因子

甘蔗断面におこる赤変機構は次の二つの方面から検討されなければならない。すなわち，1）たとえば甘蔗断面と塩酸，水洗バガスと蔗糖によって生じた色素，黒糖色素などのように，非酵素化学的反応のみによって生成する赤変物質と，2）たとえば甘蔗成分であるphenol性物質と酵素との反応による赤変のように，生化学的反応による色素の生成の2点であるが，更に両者による生成物の異同，あるいは変換の可能性なども追究する必要がある。ここでは主として赤変現象の発現に関連ありと想像される各因子について検討した。

実　験　方　法

1. 第3図，第6図，第9図，第12図，第15図から判るように各色素は可視部以外にそれぞれ紫外部に吸収をもっているので，紫外部の吸収を一つの指標として実験を進めた。Hitachi Perkinelmer 分光光度計により，uv λ maxを求め検量曲線を作成し，色素濃度を測定した。
2. 糖定量はFehling-Soxhlet法で行なった。
3. pHはpH試験紙で測定した。

実　験　結　果

1. 赤変現象に影響する諸因子

a) 温度の影響

1）低温保存の影響： 冷蔵庫の上段（フリーザー，−10°C），中段（4°C），下段（7°C）にそれぞれ試料をあらかじめ乾熱滅菌たし綿栓試験管に入れて保存し，24時間後とりだして室温に放置し赤変状況を観察した。赤変現象の発現には室温放置後通常2～3日間を要した。−10°Cに保存した場合は赤変は起きなかった。結果を第5表に示す。

Table 5. Effect of low temperature treatment for 24 hours on sugar cane reddening

Position in refrigerater	Temp. (C°)	Reddening
Upper	−10	−
Middle	4	+
Lower	7	+

2）加温処理の影響：　試料甘蔗を45°，50°，55°，60°，65°Cの温水にそれぞれ5分間浸漬した後，とりだしてシヤーレに入れ，室内に放置し，観察した結果，45°C処理のものに3日目に赤変が僅かに認められた。5日目には45°C処理試料は完全に赤変し，50°C，55°C処理のものにも，僅かに赤変が認められた。60°C処理のものは赤変が認められなかった。

b）水分の影響：　試料を乾燥剤（$CaCl_2$）を入れたデシケータ中に保存したもの，水分を含ませたガーゼに包みこんだもの，無処理のものについて，それぞれ赤変の発現を観察した。その結果，デシケータ中に保存したものは赤変しなかった。ガーゼに包み込んだものは対照に比して，赤変が促進された。試料を輪切にしたもの（厚さ約3*cm*）を水を入れたシヤーレに下半分を水中に漬けて直立させ，室内に5日間放置した。その結果，水に浸漬した部分は赤変しなかったが，大気中に露出した部分は対照ほどではなかったが，赤変した。

c）酸素の影響：　無酸素状態における発現状況を観察した。

1）水蒸気飽和デシケーター中における発現：　第17図に示すように，底に水を入れたデシケーター中に試料を入れたシヤーレを置き，数回減圧（10*mm*Hg）とし，デシケーター内の空気を水蒸気で置換し，水蒸気で飽和させた。これを5日間放置して赤変現象が発現するか否かを観察した結果，赤変現象は対照よりも促進されることがわかった。

2）窒素ガス飽和デシケーター中における発現：　1）の方法に準じて行なった。なおNガス飽和はNガスボンベより導入することによってなされた（第17図）。その結果，赤変現象は対照と同程度に発現した。

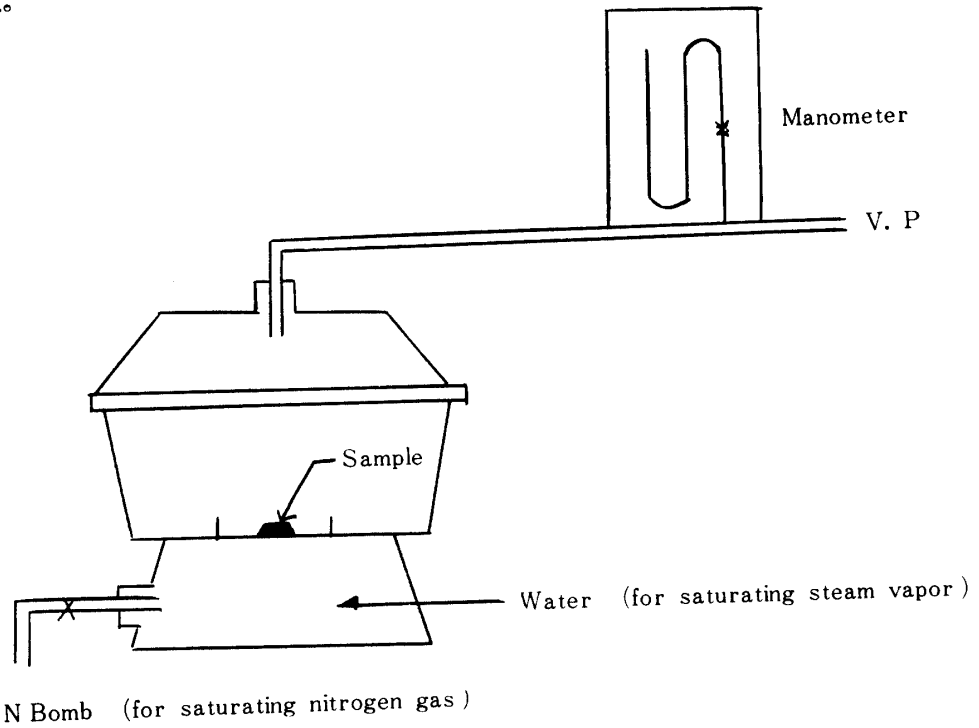

Fig. 17. Apparatus for saturating steam vapor or nitrogen gas

2. 酸処理甘蔗切片の赤変

a）無機酸および有機酸による赤変：　減圧乾燥した甘蔗切片を第6表に示される各濃度の無機酸および有機酸にシヤーレ中で浸漬した後，液をすて室温で7日間放置してその赤変現象を観察した。その結果，塩酸（2.5～10%）と硫酸（5～20%）を使用した場合は赤変したが，硝酸を用いた場合は赤変しなかった。

しかしいづれの場合にも高濃度では赤変はおこらずに褐変した。結果を第6表に示す。

Table 6. Effect of acid treatment on sugar cane reddening

Concn. / Acid	0	1.3	2.5	5	10	20	35 (%)
HCl	−	−	+	+	+	brown	brown
HNO_3	−	−	−	−	−	brown	brown
H_2SO_4	−	−	−	+	+	+	brown
CH_3COOH	−	−	−	−	−	−	−

+ : reddened　　− : not reddened

一般に鉱酸が存在すると，糖類とフェノール類との間に強い呈色反応（赤紫色）がおこることが知られているので，この酸存在下における赤変は前述のものとは異なるものと推定される。

b） 糖糖度の赤変現象に及ぼす影響： 第6表に示す5％塩酸処理試料から1部をとり，充分水洗して除酸除糖を行なった赤変甘蔗切片をメタノールで抽出後沪過し，沪液を50°Cで減圧乾固し，更にメタノールに溶解後遠沈して，同条件下で蒸発乾固したものを試料とし，可視部及び紫外部吸収を測定して第18図の曲線を得た。

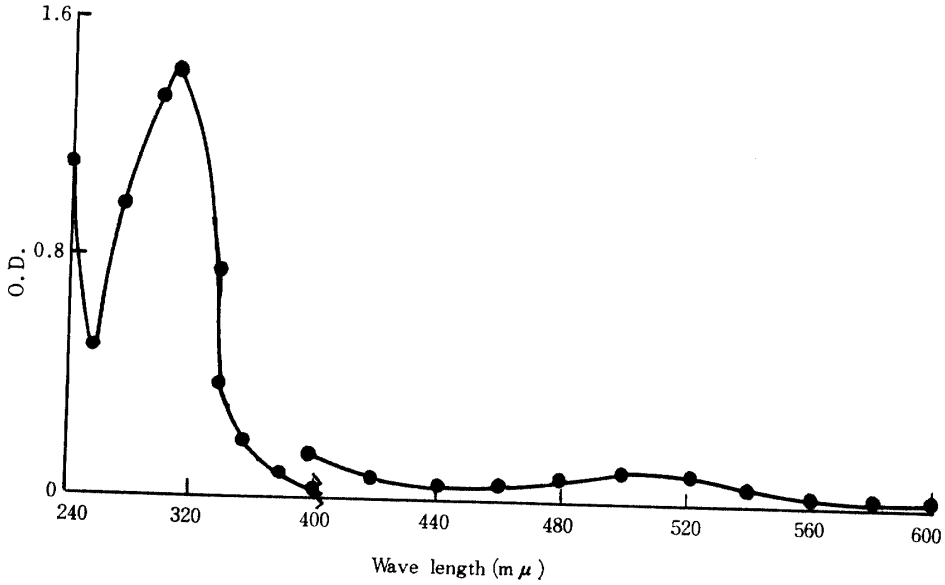

Fig. 18. Absorption spectrum of methanol extract from reddened sugar cane slices treated with acid

次に除皮除節した甘蔗をミキサーで磨砕し，これを減圧乾燥し，その約20gを大型シャーレにとり，第6表に示した結果に基づいて5％塩酸300mlを加えて2時間浸漬膨潤させ，液をすて，一様に広げて蓋をして室温で放置し，赤変色素生成と糖濃度の経時的関係を調べた。

すなわち，赤変試料2gをメタノール10mlで24時間抽出後遠沈し，上清を10mlに満たし，そのうちより1mlをとり，メタノールで20倍に希釈して極大吸収310mμの吸光度を測定して色素濃度を比色定量した。

糖の定量は同試料7gを蒸留水80mlで30分間抽出して100mlに満たしたものについて行なった。結果

は第19図に示すように，最初の40時間で還元糖は急増しほぼ一定となり，色素はその頃から生成し始めていることがわかる。

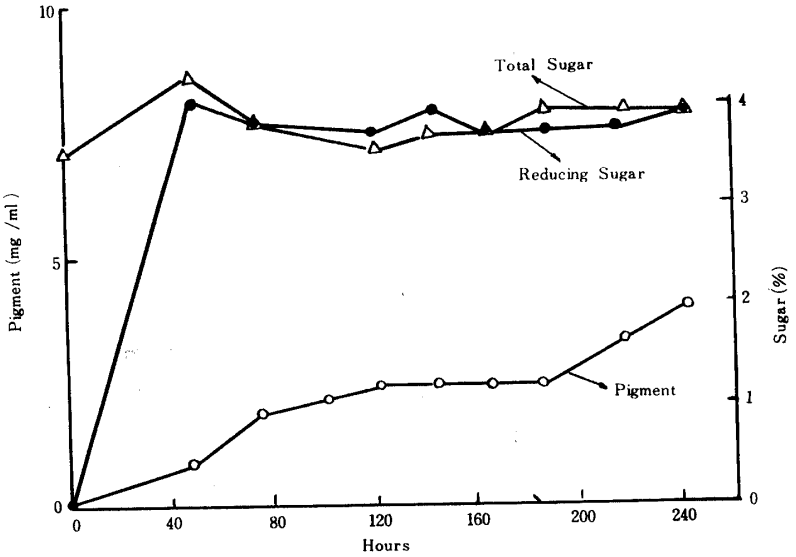

Fig. 19. Effect of sugar concentration on pigment formation of reddened sugar cane slices treated with acids

3. 甘蔗汁の鉱酸による赤変

a） 無機酸および有機酸による赤変： Bx21° の甘蔗汁 5 *mℓ*宛を綿栓した試験管にとり，これに塩酸，硫酸，硝酸および酢酸を添加してそれぞれ 8 *mℓ*となし，第21図に示した濃度に調製した酸性甘蔗汁を孵卵器中30°C で 8 日間保存して赤変状況を観察した。その結果は第21図に示すように塩酸添加の場合に著しい色素の生成が認められた。

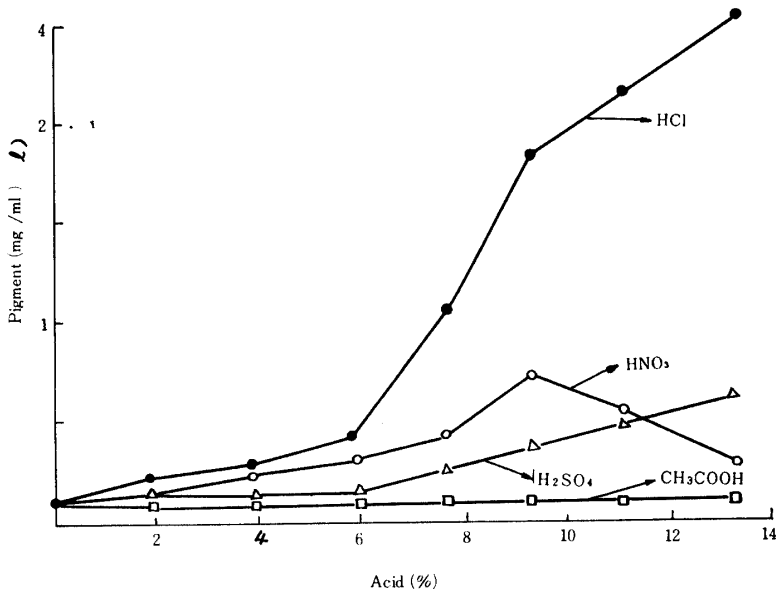

Fig. 21. Effect of sugar concentration on pigment formation of reddened sugar cane juice treated with acids

b）酸濃度の色素生素生成におよぼす影響： 上記a）の方法で8日間保存して赤変した溶液そのままで可視部及び紫外部吸収を調べたものは第20図の通りである。極大吸収 280mμの吸光度を測定して，反応溶液の色素濃度を比色定量した。結果を第21図に示す。

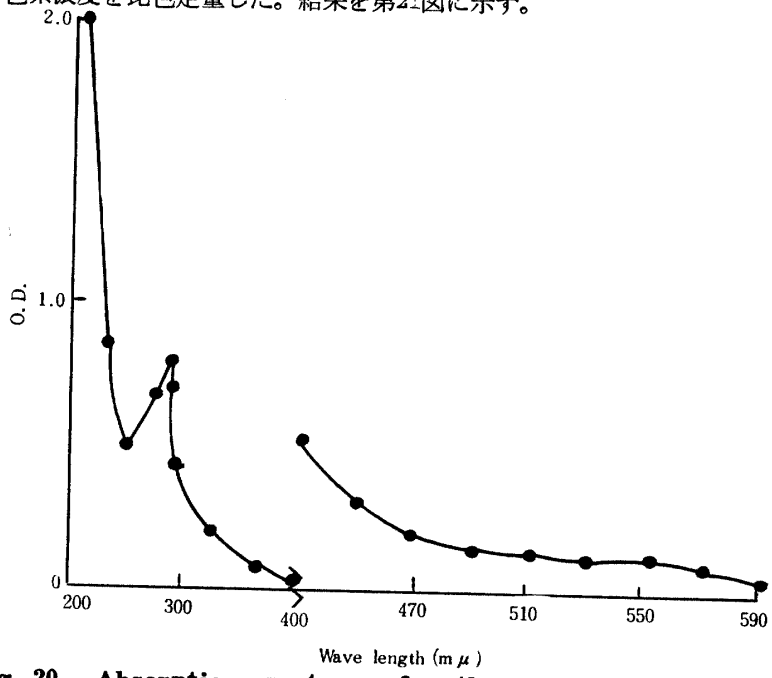

Fig. 20. Absorption spectrum of methanol extact from reddened suger cane juice treated with acids

4. 自然赤変における糖濃度，pHの経時変化

自然赤変した甘蔗を80°Cで乾燥後，メタノールで抽出濃縮し，蒸留水を加えて懸濁し，除糖の目的で酢酸エチルとふって一昼夜放置後，水層をすて，上層は塩化カルシウムで乾燥，沪過，減圧濃縮した。これに石油ベンジンを添加して沈澱させ，沈澱物を減圧乾固後，メタノールに溶解してえた試料につき吸収スペクトルを測定した（第22図）。

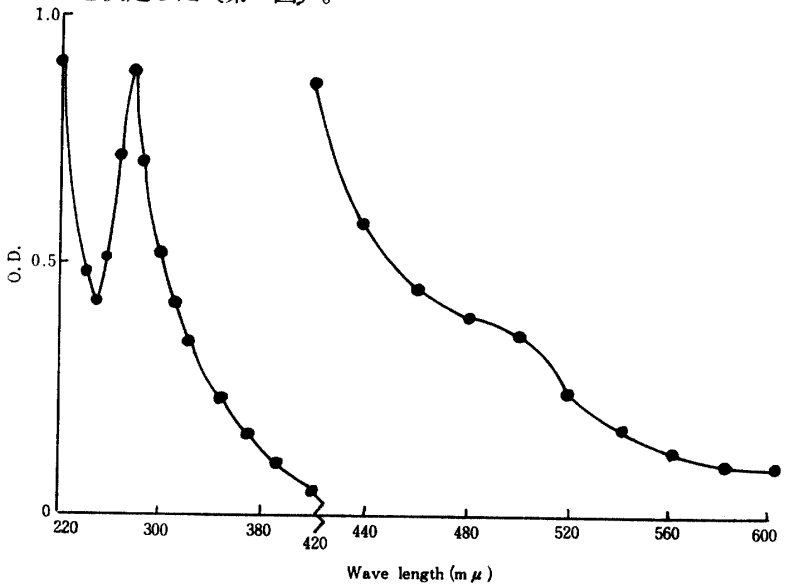

Fig. 22. Absorption spectrum of pigment involved in naturally reddened sugar cane

次に直経15cmのシャーレの中央に，蒸発水分を補給するために，水をいれた直経7cmのシャーレをおき，その周囲に除皮除節した細断甘蔗85gを一様に広げて30°Cの孵卵器に保存して赤変させ，糖濃度，色素濃度およびpHの経時的変化を調べた。

所定の時間後，試料5gを乳鉢で粉砕し，蒸留水で抽出し50mlとなし，還元糖，総糖分を定量するための試料とした。また80°Cで2時間乾燥した試料1gをメタノール10mlで24時間浸漬抽出した後，遠沈したものを試料として極大吸収280mμで吸光度を測定し，比色定量した。pHは最高5.8，最低2.8であった。結果を第23図に示す。

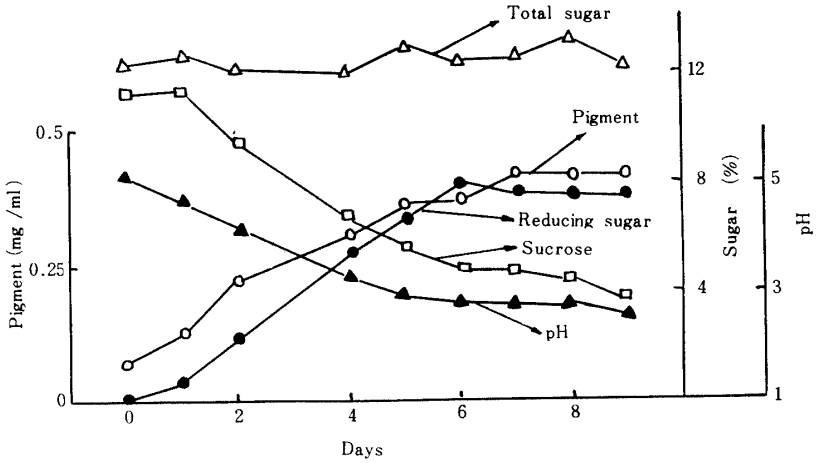

Fig. 23. Changes of pigment, sugar concentration and pH value with time in naturally reddened sugar cane

5. 人為赤変に影響する諸因子

a) 糖反応がなくなるまで，充分水洗搾汁したバガスに5％の蔗糖溶液を加え圧搾後放置し，赤変させたものについて，4項に準じて色素試料液を調製し，吸収スペクトル（24図）を求めた。

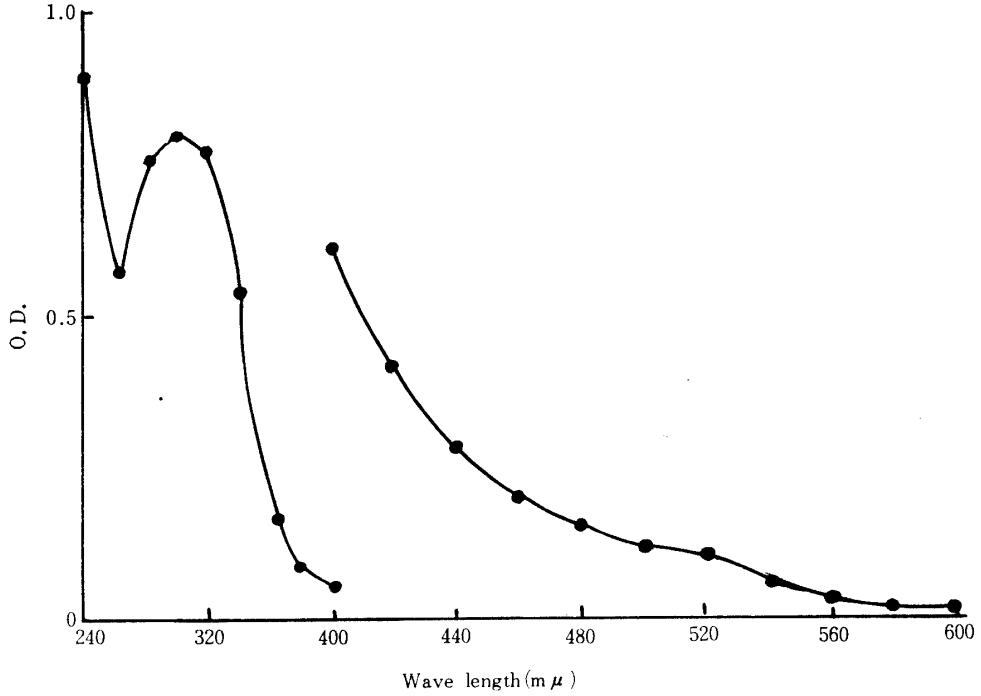

Fig. 24. Absorption spectrum of pigment involved in artificially reddened sugar cane

次に5％の蔗糖溶500mℓに，充分水洗したバガス50gを30分間浸漬し，後充分水切りして，蒸発水分を補給するために，中央に水を入れた小シャーレをおいた直径15cmシャーレ中に均一に広げて，30°Cの孵卵器中に放置赤変させたものを試料として，糖濃度，色素濃度およびpHの経時的変化を調べた。

すなわち，所定時間後，試料5gを蒸留水で抽出して50mℓとなし，還元糖，総糖分を定量した。また試料1gを減圧乾固して，メタノールで抽出して50mℓに満たしたものについて，290mμで吸光度を測定し，色素濃度を比色定量した。結果を第25図に示す。

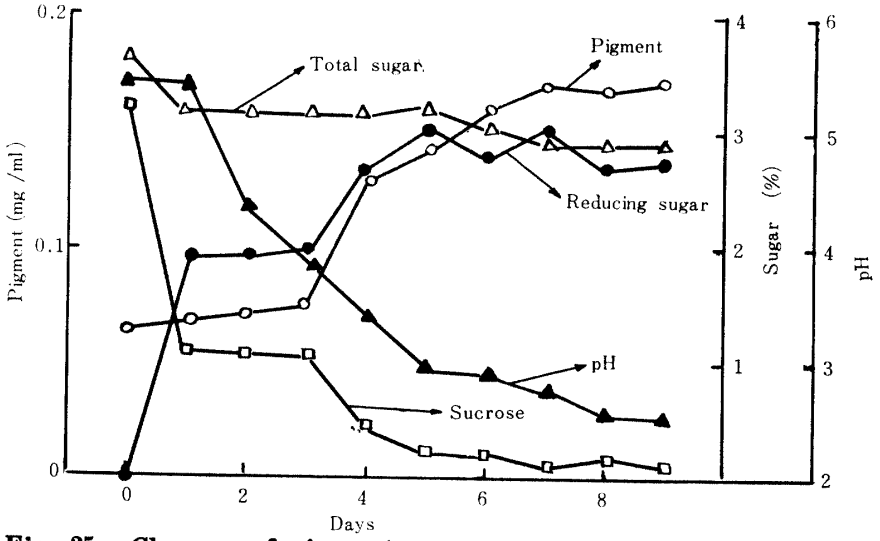

Fig. 25. Changes of pigment, sugar concentration and pH value with time in artificially reddened bagasses

b) 除皮除節した甘蔗をミキサーでホモジナイズして，除糖の目的で充分水洗搾汁したバガスをいろいろの濃度に調製した糖液15mℓにそれぞれ30分間浸漬し，水切りして30°Cの孵卵器中に6日間放置して赤変したものについて，糖濃度と色素濃度との関係を検量曲線から求めた。その結果は第26図に示すように蔗糖濃度は色素の生成にあまり影響しないことが明らかである。

glucose， fructoseでも同様の赤変がおこる。

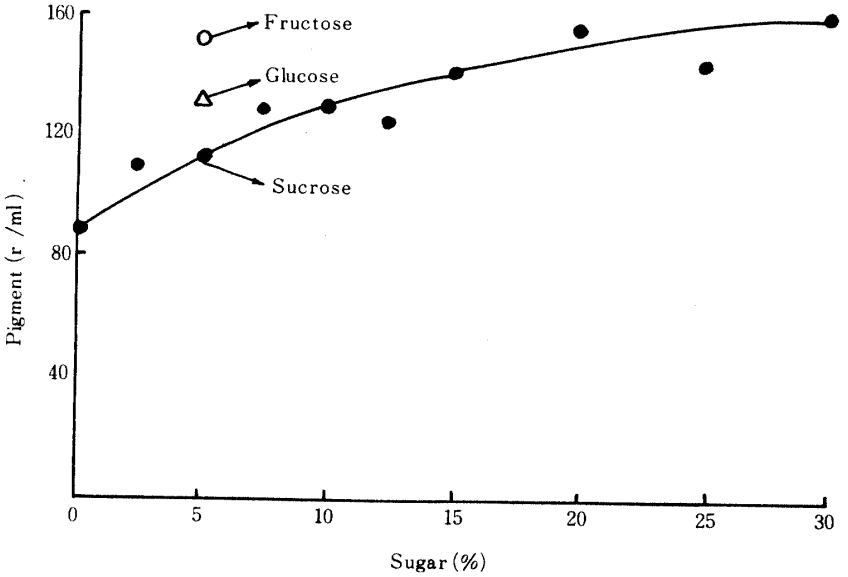

Fig. 26. Effect of sugar concentration on pigment formation in artificially reddened bagasses

6. 自然赤変色素とその他の方法で生成した色素との関係

以上の各方法で生成した各色素および黒糖中の色素との相互関係を知るためにペーパークロマトグラフィで検討した。試料は次の8種である。

a) 第4項に準じて自然赤変甘蔗から調製した色素をメタノールに溶解したもの

b) 黒糖色素をメタノールで抽出後濃縮したもの

c) 第5項に準じて人為赤変バガスから調製した色素をメタノールに溶解したもの

d) 第2項 b) に準じて鉱酸酸性甘蔗切片から調製した色素をメタノールに溶解したもの

e) 第3項 a) に準じて鉱酸酸性甘蔗汁から調製した色素をメタノールに溶解したもの

f) 赤変甘蔗茎より分離した*Candida pulcherrima*（A菌，分離同定は次章でのべる）を斜面培養し，3週間後寒天もろともとりだして，メタノールで抽出濃縮したもの

g) 甘蔗茎の赤変部より分離した*Phoma* sp.（B菌，分離同定は次章）を坂口一王培地(37)を用いてシャーレで8日培養呈色（赤褐色）させ，メタノールで抽出後減圧濃縮したもの

h) *Phoma* sp. 菌をMayer培地(37)を用いてシャーレで5日間培養呈色（橙色）させ，メタノールで抽出後減圧濃縮したもの

i) 除皮除節した生甘蔗を減圧乾燥後メタノールで抽出後濃縮したもの（対照）

濾紙は東洋濾紙NO.50（40×40）を用いてa～iまでの試料をスポットして3種の溶媒AcOH：H_2O（1：1v/v），AcOH：H_2O（1：3v/v），BuOH：AcOH：H_2O（4：1：2v/v）で展開し，紫外線照射下の螢光色によってスポットの位置を判断した。結果を第27，28，29図に示す。

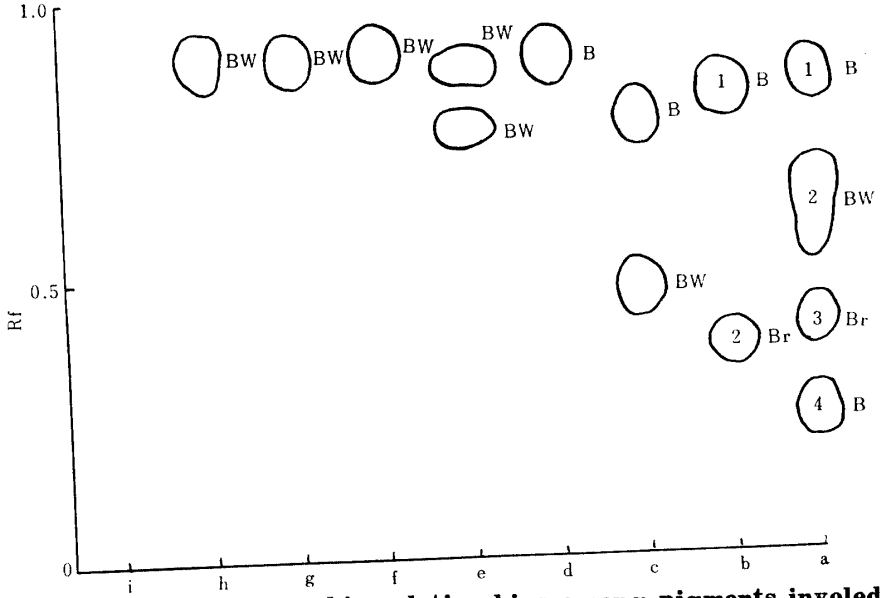

Fig. 27. Paperchromatographic relationships among pigments involed in naturally reddened sugar cane and ones prepared by other methods

Solvent system: AcOH: H_2O (1:1) under UV
B: Blue Br: Brown W: White
a: Naturally reddened sugar cane.
b: Artifcially reddened bagasses.
c: Black sugar.
d: Reddened sugar cane treated with acid.
e: Reddened sugar cane juice treated with acid.
f: Yeast A cultivated with sugar cane juice.
g: Fungus B cultivated with SAKAGUCHI-WO culture medium.
h: Fungus B cultivated with MAYER culture medium.
i: Raw sugar cane juice.

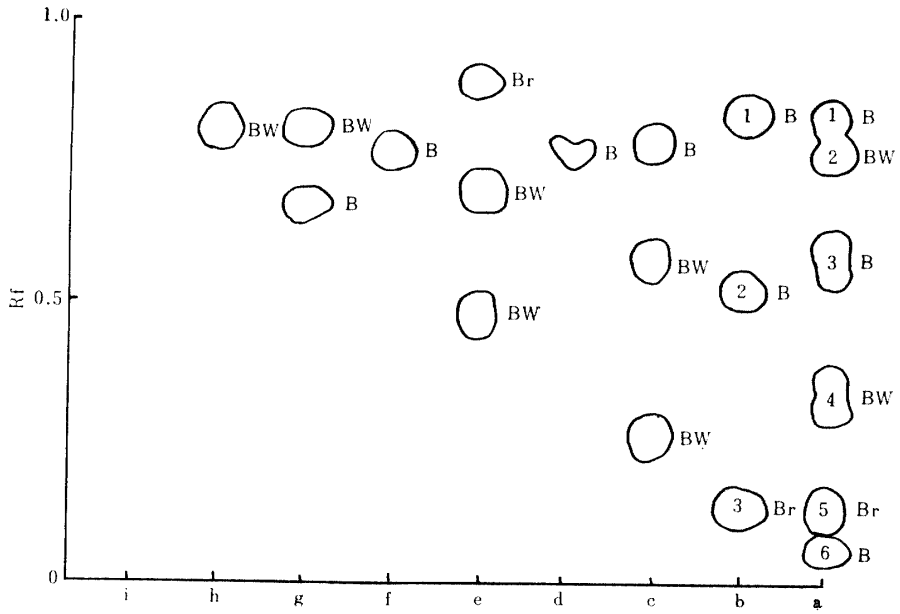

Fig. 28. Paperchromatographic relationships among pigments involved in naturally reddened sugar cane and ones prepared by other methods

Solvent system: AcOH:H_2O (1:3) under UV

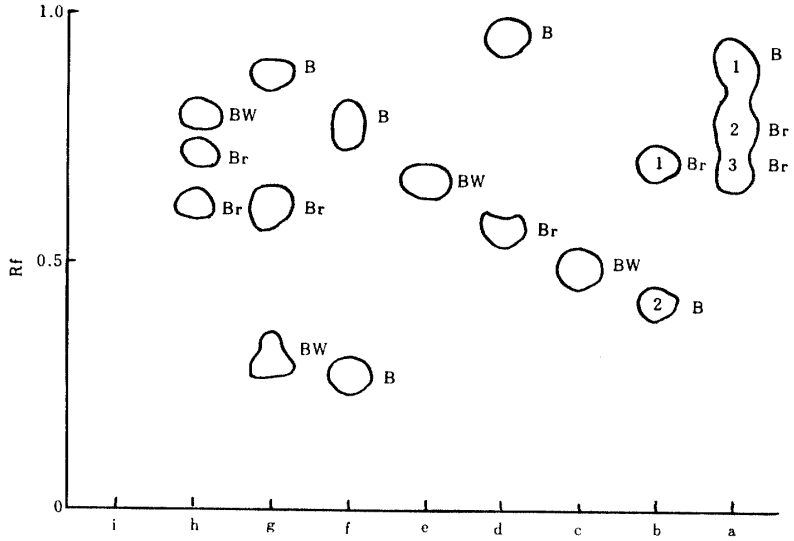

Fig. 29. Paperchromatographic relationships among pigments involed in naturally reddened sugar cane and ones prepared by other methods.

Solvent system: BuOH: AcOH: H_2O (4: 1: 2) under UV

考　　察

赤変は低温では僅かであって，−10°Cに保存した甘蔗切片は再び大気中に放置しても，赤変しなかった。他方，60°C以上に加温した甘蔗切片も同様に赤変しなかった。さらに減圧乾燥した試料は勿論，吸水してもとの状態に戻しても赤変しなかった。以上のことから自然赤変には酵素が関係していると思われる。物理的処理，たとえば圧搾あるいは乳鉢ですりつぶしたものは褐変はしたが，赤変しなかった。

窒素気流中でも赤変することから，赤変現象は酸素の存否には関係がないように思われる。これは赤腐病が甘蔗組織の内部深くまで浸入しているのをしばしば見受けることと矛盾しない。

筆者が分離し，*Candida pulcherrima*, *Phoma* sp.と推定した2つの菌を用い，甘蔗汁培養液中に生成する物質をPPCで調べた結果は第27，28，29図に示す通りであり，これらの菌に起因するスポットは検出できなかった（f，g，h）。従って赤色は少くとも菌の色素そのものではない。

次に上記のそれぞれ異なった方法（b〜i）によって生成した色素の位置づけをするために，分離の最もよい第28図を基準にしてPPC上で検討した。

黒糖色素をここに加えた理由は，黒糖色素は蔗糖の加熱により生成するカラメル色素のほかに赤変色素の混在も考えられるからである。甘蔗汁は約0.2%の塩素を含み(46)，かつpH5–6位の微酸性を呈しているので，塩酸が存在する可能性があること，糖類は鉱酸が存在すると，phenol類やアミン類と反応して赤〜黄に呈色(10)することが知られていることなどから，塩酸処理甘蔗切片および塩酸酸性甘蔗汁より得られた色素も比較に供した。

a）の褐色スポットはバガスから人為赤変させた褐色色素と一致している。すなわち，それらの結果は，第27図a–3とb–2，第28図a–5とb–3，第29図a–3とb–1に示すとおりである。しかし他のスポットについては，a）の方法で生成した色素と一致するものは見当らない。

自然赤変と人為赤変において，類似性を予想したのであるが，実験結果は下記のようにかなり相違している。

すなわち，1）第28図のPPCにおいて，前者は6スポッであるのに対し，後者は3スポットである。2）UVスペクトルにおいて，前者はシャープな極大吸収280 mμを有しているのに対して，後者は300 mμ付近に幅広い吸収を有している。3）前者は酸分解液を中和した場合，pH 4〜5で褐色，5〜7で紫色，強アルカリ性で褐色に呈色したが，後者は全く変色しなかった。

もし赤変現象が微生物によるものとするならば，アルコール発酵(11)や酵母の増殖(12)などのように，糖分が炭素源として消費されることが考えられるが，自然赤変，人為赤変のいづれの場合においても，総糖分はほとんど変化してないことがわかった。赤変現象における色素生成に対する糖濃度の影響について，人為赤変の場合を例にとって検討したが，第26図に示されるとおり，糖濃度の影響はほとんど認められなかった。

塩酸処理甘蔗切片の赤変色素の吸収最大（510 mμ及び310 mμ）およびPPCが塩酸処理甘蔗汁のそれら（550 mμ及び280 mμ）と異なるのは，前者は完全な組織下における植物成分と塩酸との反応であるのに対して，後者は水溶性成分だけを含む水溶液中における反応であるためと考えられる。したがって前者が紅色を呈しているのに対して，後者が紅褐色を呈しているのは，この水溶性成分の褐変に原因があるのであろう。

要　　約

1．甘蔗赤変の発現には適当な水分と少量の糖分が必要であろうが，酸素の存否には無関係のようである。

2. 赤腐病に関与している色素は *Physalospora* 菌の寄性によって甘蔗組織が生産したものだけでなく，その他いろいろの要因によって生じた色素の混合体であることがわかった。

3. 赤ぐされ現象の初期の甘蔗茎あるいはかなり進行したと思われる甘蔗茎について調べた結果，色素濃度の増加，pHの低下にかかわらず，糖分低下の現象はほとんどみられなかった。

4. 色素の生成量は日数の経過とともに，徐々に増加し，11日目の生成量は4日目の約2倍に達した。

5. 甘蔗汁の酸処理では，酸の低濃度では紅褐色を呈したが，高濃度では褐変した。塩酸処理の場合は，他の酸に比較して，濃度の増加とともに，異常に色素の生成量が増加した。

6. しかしこの 4)，5) で生成した色素は自然赤変の色素とは異なっていた。

第3章 赤変に関与する微生物

Physalospora tucumanensis 菌の感染によって起こるとされている赤腐病とその他の菌たとえば赤変甘蔗から分離推定した *Candida pulcherrima* 菌，*Phoma* sp. 菌の汚染または感染によって起こる赤変，その他茎の裂傷などの原因でおこる赤変に相違があるかどうか，あるいは *Phoma* 菌の分泌する色素および *C.pulcherrima* 菌体色素と甘蔗赤変色素の異同等を検討した。

実験方法及び結果

1. 菌の分離同定

赤変甘蔗を殺菌蒸留水2 *ml* に入れてよく振とうし，分離用試料とした。これを用い，2%寒天甘蔗汁を培地として扁平培養を行なったところ，白い菌糸を持つ糸状菌Bと酵母様菌Aをえた。B菌は白色の糸状菌であるが，培地中に生育するに従い培地を赤変させた。

発色の程度および色調は培地のpHあるいは種類などによって異なるようであった。A菌は光沢のあるピンク色のコロニーを形成した。またC菌として琉球農業試験場保存株の *Physalospora tucumanensis* Speg. についても検討したが，色素の産生がみられなかった。

a) A菌の同定： 麦芽汁寒天培地に斜面培養をしたものを試料とした。

1) 細胞形態と増殖形式を検鏡により観察した。

2) gram染色の陰陽性をHucker変法(16) により確認した。

3) Möller(16) の子のう胞子染色法により胞子の有無と形態を調べた。

4) carotinoid性色素あるいはpulcherrimin性色素であるか否かを検討した。

5) Einhorn発酵管法により発酵性試験を行なった。

6) Auxanograph法(16) により炭素源の資化性試験を行なった。

7) ジャガイモ－ブドウ糖寒天培地に斜面培養した菌体は，oil globule (pulcherrima cell) (22) を形成するか否かを検討した。第7表，第30，31図に示された実験結果から，A菌を *Candida pulcherrima* と推定した。

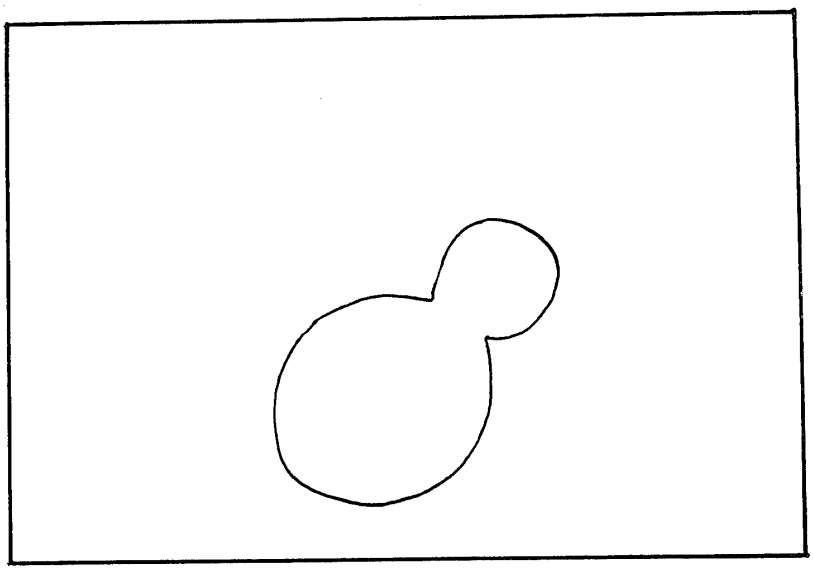

Fig. 30. Cells and germination of *C. pulcherrima* cultivated with malt-agar culture medium (x3000)

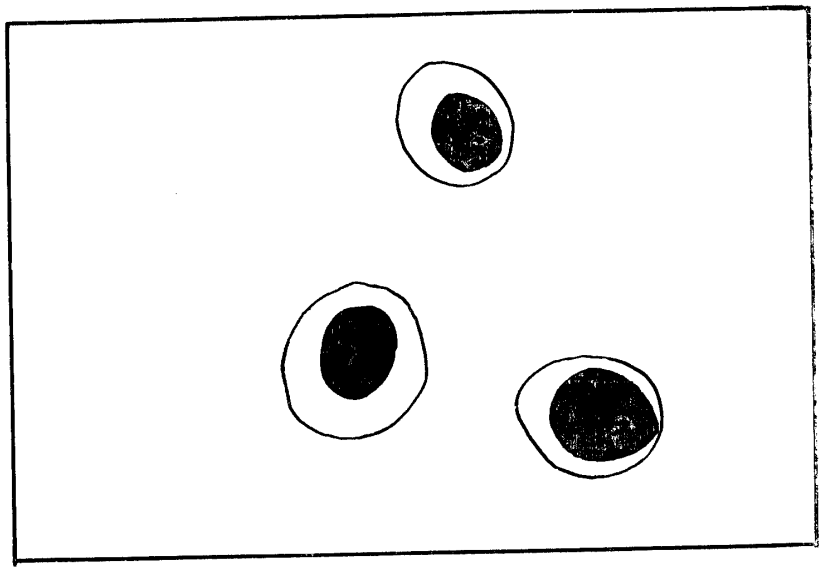

Fig. 31. Oil globule of *C. pulcherrima* cultivated with potato-agar culture medium (x3000)

Table 7. Properties of *Candida pulcherrima*

Form	Size	Pul. Cell	Pul. pig.	Cart. pig.	Gram	Fermentation						Assimilation					
						Gl	Ga	SU	La	Ma	Ra	Gl	Ga	Su	Ma	La	KNO_3
s.ov~ circ.	6.3~ 3.6μ	found	+	−	+	−	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−

Pul. cell: Pulcherrima cell　　pul. pig : pulcherrimin pigment
s. ov~circ. : short oval~circular　　Cart. pig.: Carotinoide pigment
Gl: Glucose　　Ga: Galactose　　Su: Sucrose
La: Lactose　　Ma: Maltose　　Ra: Raffinose

b) B菌の同定： 原菌株からジャガイモ—ブドウ糖培地上に移植してえた菌叢とB菌原株培地上菌叢との間には形態的に，また色素分泌性においてなんらの相違もみられなかった。上記培地では，子実体(14)を形成しなかったので，その形成を容易ならしめるために，細切した乾燥葉（サトウキビ，エンバク，イネ）を加えた素寒天培地に移植し，28°Cで2日間，その後室温で培養した。培養開始後5日目に子実体の形成をみたので，直ちに検鏡した。結果を下記に示す。

柄子殻（第32，33図）を形成する。柄子殻は球形，大きさは150～250μ，基質（寄主）に埋没し，孔口は黒色で表面に突出する。この中に小形の柄胞子ができる。柄胞子は透明，やや楕円形，大きさ長軸で8～10μである（第34図）。以上の事実からB菌を*Phoma* sp. と推定した。

Fig. 32 Pycnidium of *Phoma* sp.

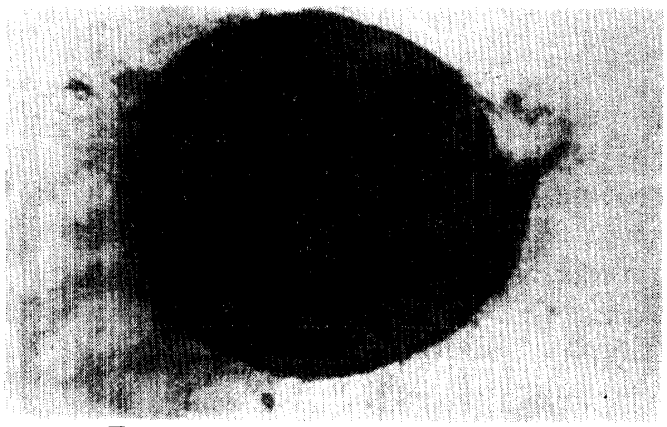

Fig. 33. Empty pycnidium of *Phoma* sp.

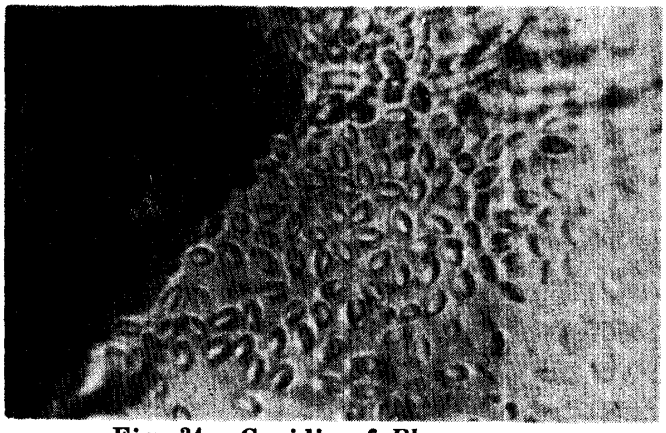

Fig. 34. Conidia of *Phoma* sp.

2. 生きた甘蔗組織の関与

乾熱滅菌した綿栓試験管18本の各々に，甘蔗切片（地上から約50cmの節間部分約4×5cm厚さ約5mm）1本宛を入れ，3個単位で次の6グループを作った。

1) フリーザー（約−10°C）に冷凍保存
2) メタノールに5分間浸漬
3) メタノールで表面処理
4) コツホの殺菌釜で30分間蒸気加熱
5) 真空デシケータで24時間減圧乾燥
6) 新鮮生甘蔗

これらの各グループの2本はそれぞれA，B菌を接種，残り1本は接種しないで30°Cの孵卵器中で4日間培養した。操作はすべて無菌箱中で無菌的に処理したが，減圧乾燥したものは無菌的処理が不可能であったので，雑菌の混入がみられた。結果を第8表に示す。人為赤変の場合も全く同じ結果をえた。

Table 8. Effect of variuos treatment on sugar cane reddening

Germs inoculated	Freezing	Methanol immersing	Methanol wiping	Vacuum drying	Raw sugar cane
A	−	−	+	−	+
B	−	−	+	−	+
Control (no-inoculation)	−	−	+	−	+

若し甘蔗の赤変がA，B菌の感染のみによるものとすれば，冷凍，メタノール処理，蒸気加熱，減圧乾燥，生甘蔗のいずれの場合にも赤変現象が見られる筈であるが，メタノール表面処理と生甘蔗の場合だけが発現し，他は発現しなかった。前者は甘蔗組織が生きてあり，後者では死んでいることが考えられる。すなわち赤変の発現には生きた組織が関与していると思われるので，それらを確認するために更に下記の実験を行なった。

生甘蔗の茎（約40cm），および24時間，−10°Cで凍結保存した甘蔗茎をそれぞれ500mℓ広口瓶に入れ水道水で水耕し，赤変の発現状況を観察した。生甘蔗は6日目頃から出芽をはじめ，15日目頃には約7cmにのびた。大気中に露出している上端および水浸部下端の両切断面に同時に赤変現象が発現し，培地も淡赤色を呈した。

それとは対照的に，凍結甘蔗は4日目頃から腐敗して悪臭を放ち，培地もさかんに発酵をはじめた。10日目頃にはかなり発酵は止んだが，節々の周辺にはいろいろの微生物の発育がみられた。勿論上端，下端の切断面に赤変現象の発現はみられなかった。すなわち甘蔗組織が死んでいる場合は赤変現象は起こらないことがわかった。

3. 微生物の赤変に及ぼす影響

第8表に示すように，菌株を接種したものも，無接種のものも，同様に赤変することから判断すると，甘蔗の赤変現象の発現は生体組織内における1種の生理現象で，A，B菌は赤変には直接関与してないように思われたので，接種試料と無接種試料の発現状況を比較検討した。

すなわち無菌的に処理した生甘蔗縦断薄片（4×1.5cm）3個と輪切薄片（約茎2.5cm厚さ5mm）3個を用意し，前者は乾熱滅菌した3本の綿栓試験管に，後者は1個の乾熱滅菌したシヤーレにいれ，試験

管，シャーレいずれも２個はそれぞれA，B菌を接種し，他は無接種のものを30°C の孵卵器中で培養した。接種したものは，接種点である中央部を起点として赤変しながら拡散するが，無接種のものは，中央部にこのようなことがおこることはなく一様に赤変した。結果を第35図に示す。

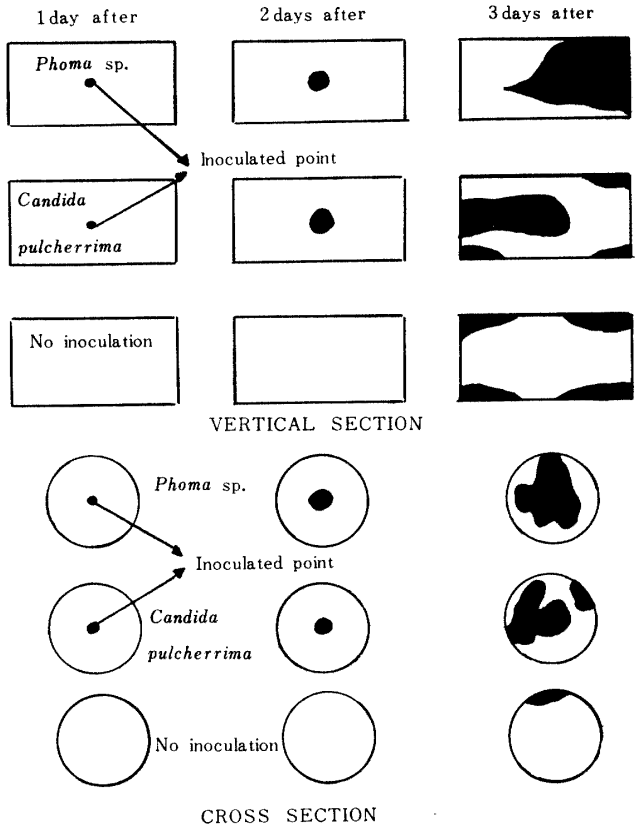

Fig. 35. Reddening of sugar cane surface into which red rot fungi were inoculated

もし赤腐病の色素がA，B菌の生産によるものとすれば，B菌の生産する色素と罹病赤変甘蔗の色素は同一物質であるべきであるが，以下の実験によって全く異質のものであることがわかった。

すなわち完全に赤変したAあるいはB菌接種甘蔗切片，無接種切片およびB菌の色素（A菌の色素は有機溶媒不溶）をメタノールで抽出してＰＰＣを行なってえたクロマトグラム上，各甘蔗切片より抽出した色素のスポットは，色調（赤），Rf値とも一致したが，B菌の生産する色素は褐色でRf値も上記３スポットとは異なっていた（第36図）。

従って，A，B菌少くとも後者においては赤変色素は菌体に由来するものでなく，菌の感染に対して甘蔗生体が例えば防護などのために生産したものと推察される。

自然赤変において，微生物の関与は間接的に過ぎないことがかなりはっきりしてきたが，人為赤変の場合にも同様に微生物は直接に関与してないのではないかと推察されるので，この点を検討した。すなわち常法により甘蔗処理バガスと蒸留水処理バガスを作り，それぞれシャーレに入れ無菌箱中に放置した。

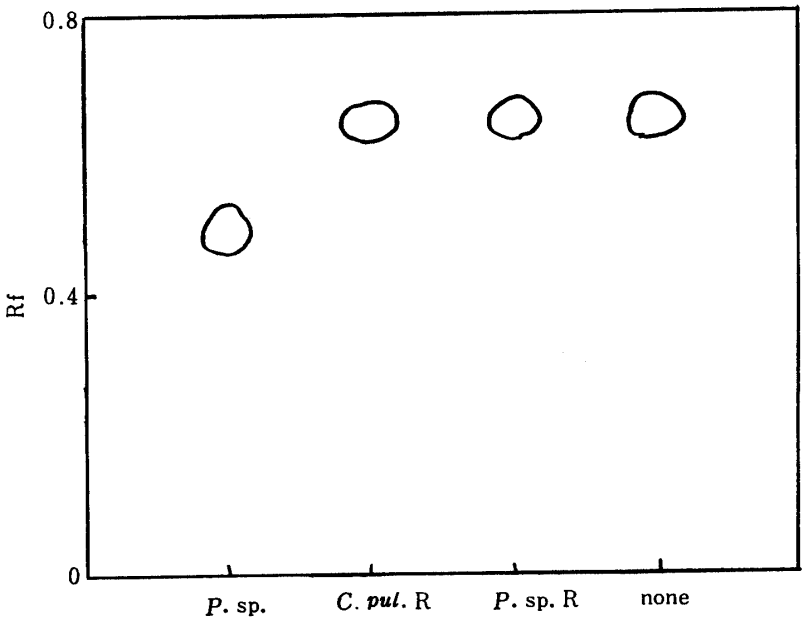

Fig. 36. Paperchromatograms of pigment[22] of red rot fungi and reddened suger cane infected with them

P.sp : *Phoma* sp.
C. pur. R : Reddned sugar cane infected with *C. Pulcherrima*.
P.sp.R : Redden ed sugar cane infected with *Phoma* sp.
None : Naturally reddened sugar cane.
Solvent system : AcOH : H_2O (1 : 1)

その結果，前者は通常と何ら異なることなく赤変したが，後者は僅かに赤変が認められる程度であった。このように，赤変現象は糖とバガス成分との反応によるものであり，微生物の直接的関与はないものと考えられる。

考　　察

*Candida pulcherrima*の類似菌として，

1) *Torula pulcherrima* Linder
2) *Torulopsis pulcherrima* Linder Sacc
3) *Saccharomyces pulcherrima* Linder Belierinck
4) *Rhodotorula pulcherrima* (Linder) Harrison
5) *Torulopsis rosea* Berlese
6) *Torula rubefaciens* Crosbüsch
7) *Monilia (Cryptoccocus) castellanii* Re
8) *Cryptococcus castellanii* (Re) Castellani
9) *Torulopsis castellanii* (Re) Castellanii (Re) et Jacono
10) *Torulopsis pulcherrima* (Linder) Sacc. var. variabilis Lodder
11) *Torulopsis pulcherrima* (Linder) Sacc. var. rubra (Castelli)
12) *Asporomyces uvae* Mrak et Mcclung
13) *Castellania castellanii* (Re) C. W. Dodgeの13菌が知られているが，その中には*Candida pulcherrima*と同一菌であるとわかったものもある。*Candida pulcherrima*の strain として，13菌が

知られているが(21)，そのうち3菌は人間から，残りはすべて果実から分離されたものである。

C. pulcherrima に対する生理試験の結果は研究者によって異なっている。たとえば飯塚ら(16)は糖の資化性について，glucose(+)，maltose(−)，galoctose(+) saccharose(−)，lactose(−)であり，Lodderら(21)はgl(+)，ma(+)，ga(+)，sac(+)，la(−)であるとのべている。第17表に示された発酵性および資化性試験の結果は文献記載と若干異なるが，A菌の色素はacetoneにとけず，5%ethanolic KOHに溶解しえび茶色を呈するので，*C. pulcherrima* の有するpulcherrimin性色素であること(16)，酵母でgram染色陽性であるものには *Saccharomyces cerevisiae*, *C. pulcherrima* などが知られているが，A菌は陽性であること，oil globule (Pulcherrima cell) を形成するなどの *C. pulcherrima* の特徴から，A菌を同菌と推定した。

Physalospora tucumanenensis Speg.の不完全時代（有性時代が発見されてない間）は*Colletotrichum falcatum* Wentとして知られていた。沖縄においては未だ完全時代は発見されてない(39)。*Phoma* sp. の形態を赤腐病菌 *P. tucumanensis*の不完全時代（*C. falcatum*）のそれと比較すると次のとおりである。

1) 柄子殻を形成する（第32図）（*Physalospora* は分生胞子層（第37，38図）を形成，以下（ ）は*Physalospora*）

2) 柄胞子（第34図）は球形一楕円形，透明，大きさは5～10μ（分生胞子（第39図）は半月形かまたは鎌型，屈折力のあるか粒が充満している。大きさは約25×6μ）

3) 剛毛がない（分生胞子層内から不規則に剛毛（第37図）を生ずる。剛毛は長さ11～24μで，頂端は無色か淡黄色，下部は暗色である）

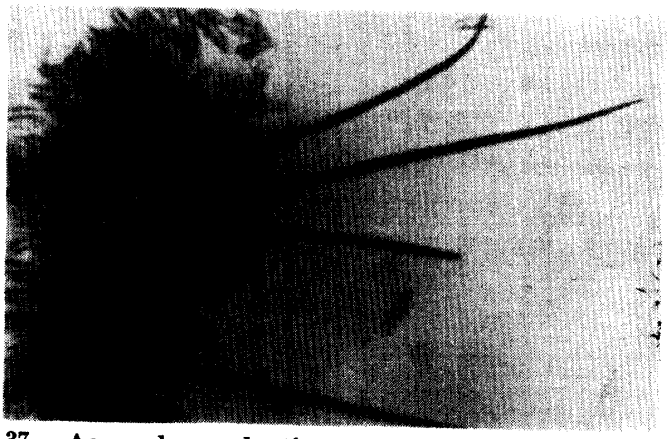

Fig. 37. Acervulus and spines or setae of *C. falcatum* (x1200)

Fig. 38. Conidiophords and spores of *C. falcatum* (x1200)

Fig. 39. Conidia of *C. falcatum* (x1200)

上記無性時代（不完全時代）の形態のほかに子のうが確認されると*P. tucumanensis* の完全時代の発見となる。子のうの形態について記すと次のとおりである(45)。子のう殻はややフラスコ形の球面体で短い孔口を有し（*Phoma* の柄子殻に似たもの），内部に子のうがある（*Phoma*は胞子を有する），子のうは根棒状，大きさは80～100×15～18μ，無色，この子のう胞子は無色透明，形は変化する。菌体は雌雄同株である。

甘蔗切片にA，B菌を接種しても，赤変が進行するにともない，菌本来の色素は消失して，赤腐病本来の色素が生成してくる。以上の事実から，A，B菌の色素は赤腐病に伴って生ずる色素とは関係がなく，A，B菌は赤腐病の発現を促進するにすぎないことが明らかになった（第36図）。赤腐病菌 *P. tucumanensis* についても，同じ実験結果をえた。

縦に赤変した罹病茎部のところどころを横切る白斑から，*P. tucumanensis* の感染が確認される。類似の赤変現象は *P. tucumanensis*だけでなく，その他の微生物，昆虫の食傷，生育中の裂傷，その他茎に生じた傷が原因で現われることも多い(39)ので，A菌，B菌あるいはその他の菌の感染が原因となって植物生体が生産するものと推論される。

要　　約

1. 赤腐病罹病甘蔗から赤色の色素を分泌する糸状菌Bと紅色酵母Aを分離したが，B菌を *Phoma* sp.，A菌を*Candida pulcherrima* と同定した。
2. 赤腐病の発現は甘蔗組織の生死と密接な関係があり，死滅しているときは発現しなかった。
3. 赤腐病菌自身の色素と赤腐病に伴って生成する色素はまったく異質のものであることおよび赤腐病菌を接種したものは無接種のものより発現速度が早いことから察して，赤腐病菌は色素形成に直接関与することはなく，ただその促進に寄与するにすぎないことがわかった。

第4章　甘蔗 Peroxidase

生体内外で褐変に関与する peroxidase とその基質となるべきphenol性化合物がともに甘蔗組織中に存在して褐変反応をおこすことが明らかになったこと，および甘蔗peroxidaseについての研究が極めて少いことから，本酵素の一般的性質を検討する必要があった。

実　験　方　法

1. 酵素活性の測定はPurpurogalline法(2)で行なった。すなわち，除皮除節した甘蔗52.5gを乳鉢で磨砕搾汁した後濾過して，粗酵素液28mlをうる。次に0.5%pyrogallol溶液200mlに1.1%過酸化水素20mlと粗酵素液全量を加え，5分後5%硫酸5mlを加えて反応を停止させる。生じたpurpurogallinをエーテルで抽出分液した後，乾固して黄色結晶0,2788gをえた。これをエーテル50mlに溶解して標準溶液とした。

第40図に示すように，purpuroyallineの$\lambda_{max}^{Et_2O}$はUV部分で270$m\mu$と310$m\mu$にあり，可視部で430$m\mu$にあった。以後の実験では430$m\mu$の波長を測定に使用した。検量曲線は5，10，20および40倍の各標準液を用いて作成した（第41図）

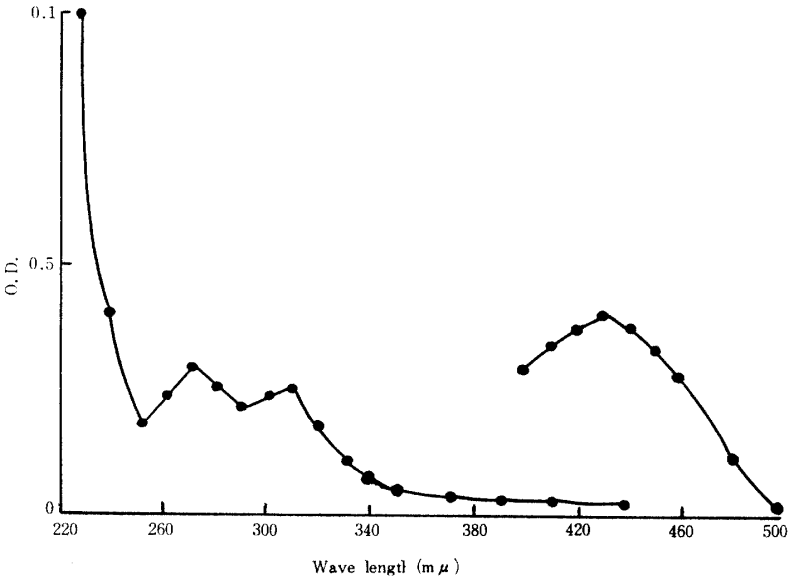

Fig. 40. Absorption spectrum of purpurogalline

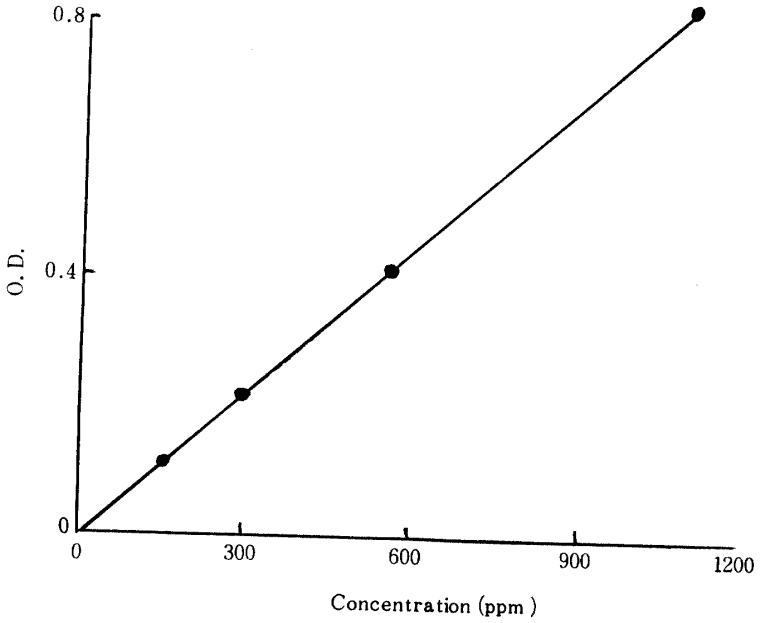

Fig. 41. Calibration curve of purpurogalline at 430 $m\mu$

実 験 結 果

1. 酵素の特性

a) 酵素作用に及ぼすpHの影響： 除皮除節した甘蔗400gに蒸留水150mlを加えて，ミキサーで磨砕し，搾汁を濾過して調製したpH5.5の粗酵素液560mlを試料とした。希アンモニア水と希塩酸でpH調整を行ない，常法により実験を行なった結果至適pHは7.8にあった（第42図）。

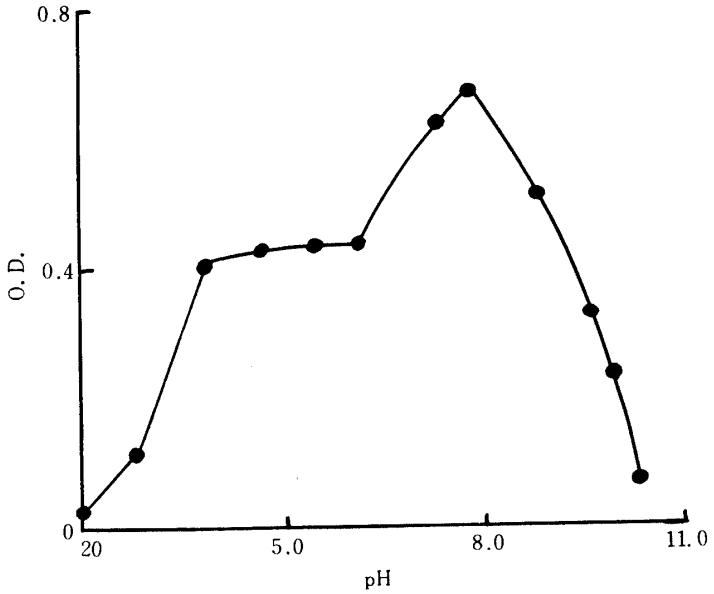

Fig. 42. Effect of pH values on sugar cane peroxidase activities

1) 5 *ml* of 0.5% pyrogallol as substrate
2) 0.25 *ml* of 1.1% H^2O^2
3) 10 *ml* of crude enzyme solution
4) 0.25 *ml* of 5% H_2SO_4
5) 50 *ml* of ether
6) 5 minutes
7) 30°C

b) 温度の影響： 甘蔗約6kgを前項に準じて処理してえたpH5.4の粗酵素液約500mlを冷蔵庫中（4°C）に保存し，b－g項までの実験に供した。酵素活性に対する温度の影響を30°C（室温）から80°Cの範囲で5°間隔で検討した。試験管に酵素液を注入し，湯浴上で加温し，規定温度に達したとき，1.1％過酸化水素を添加し，次にその温度に保ちながら基質を注加し，3分間反応さたのち，5％硫酸を加え，常法により酵素活性を測定した。第43図に示すように，至適反応温度は50°Cであった。

c) 基質量の影響： 酵素量を一定にし，基質量をいろいろかえて反応させ，常法により酵素活性を測定した結果を第44図に示す。

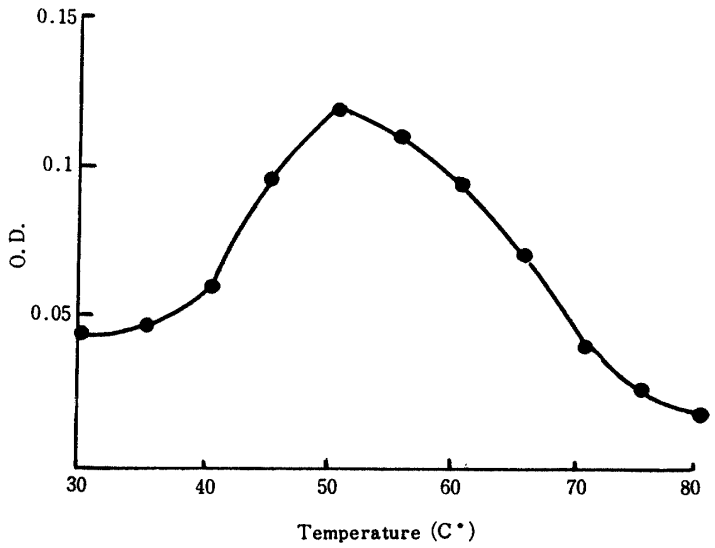

Fig. 43. Effect of temperatures on sugar cane peroxidase activities

1) 5 *ml* of 0.5% pyrogallol as substrate
2) 0.25 *ml* of 1.1% H_2O_2
3) 5 *ml* of crude enzyme solution
4) 0.2 *ml* of 5% H_2SO_4
5) *ml* of ether
6) 3 minutes 7) pH 7.8

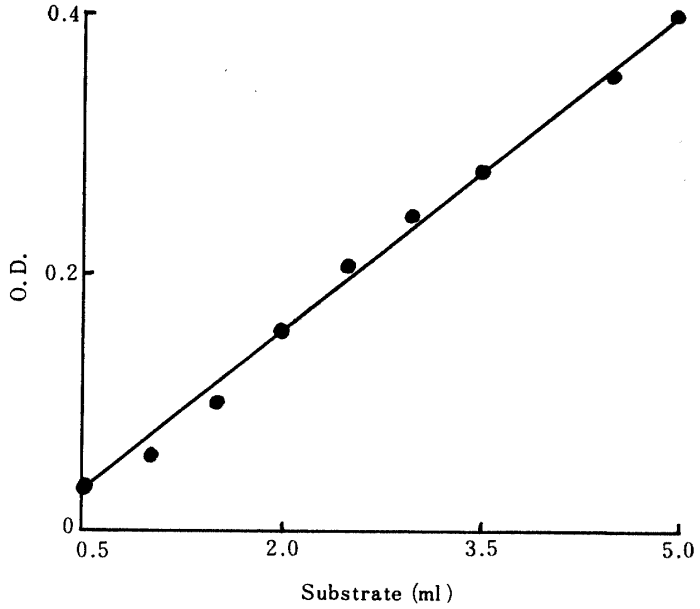

Fig. 44. Effect of substrate on sugar cane peroxidase activities

1) 0.2 *ml* of 1.1% H_2O_2
2) 2 *ml* of crude enzyme solution
3) 0.25 *ml* of 5% H_2SO_4
4) 50 *ml* of ether
5) 3 minutes 6) 30°C 7) pH 7.8

b) 酵素量の影響：基質量を一定にし，酵素量をいろいろかえて反応させ，常法により酵素活性を測定した結果を第45図に示す。

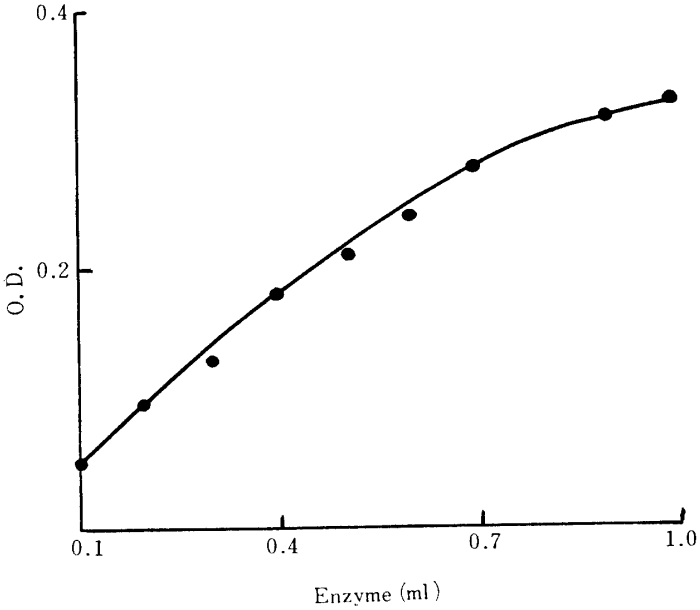

Fig. 45. Effect of enzyme on sugar cane peroxidase activities

1) 2 *ml* of 0.1% pyrogallol as substrate
2) 0.1 *ml* of 1.1% H_2O_2
3) 0.1 *ml* of 5% H_2SO_4
4) 25 *ml* of ether
5) 5 minutes 6) 30°C 7) pH 7.8

e) 酵素作用の時間経過： pH7.8, 30°Cにおける反応経過を1分間隔で測定しこ結果を第46図に示す。

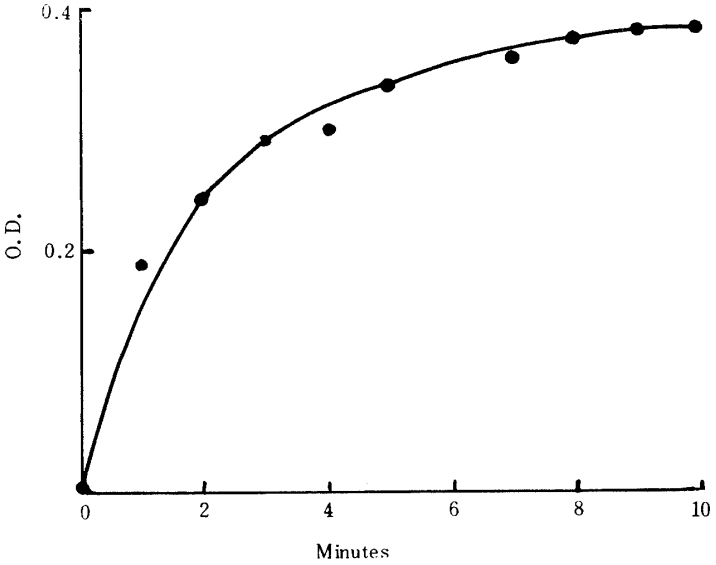

Fig. 46. Effect of time course on sugar cane peroxidase activities

1) 2.5 *ml* of 0.25% pyrogallol as subsrate
2) 0.1 *ml* of 1.1% H_2O_2
3) 1.0 *ml* of crude enzyme solution
4) 0.2 *ml* of 5% H_2SO_4
5) 25 *ml* of ether
6) pH 7.8 7) 30°C

f) 阻害剤の影響： 金属酵素に対するEDTA (ethylenediaminetetraacetate) の阻害作用，金属結合剤による阻作用(15) および peroxidase に対するシアン化カリの失活作用(2) が知られているので，2-Na—EDTA，シュウ酸アンモンとクエン酸ソーダによる甘蔗 peroxidase 活性の阻害を検討した。下記試薬濃度 2×10^{-3} Mにおける酵素活性を測定し，無添加の対照に対する比活性度を求めた。結果を第9表に示す。EDTA，クエン酸ソーダによってむしろ，賦活される傾向になったのは，粗酵素液中に存在する不純物の金属が吸着除去されたためと思われる。他方，シュウ酸アンモンは僅かに，シアン化カリカリは著しく阻害した。

Table 9. Effect of inhibitors on sugar Cane peroxidase activities

Inhibitor	Concn. (M)	Relative activity
2 Na-EDTA	2×10^{-3}	136
KCN	2×10^{-3}	16
Ammonium oxalate	2×10^{-3}	91
Sodium citrate	2×10^{-3}	123
Control	0	100

1) 2 *ml* of 0.25% pyrogallol as substrate
2) 0.2 *ml* of 1.1% H_2O_2
3) 10 *ml* of crude enzyme solution
4) 0.2 *ml* of 5% H_2SO_4
5) 50 *ml* of ether
6) 5 mintes
7) 30° C
8) pH 7.8

g) 金属イオンの影響： 2×10^{-2} Mの金属塩類を含む酵素液の活性を測定し，無添加の対照に対する比活性度を求めた。第10表に示すように，Co^{2+}，Ag^{+}，K^{+}，Mg^{2+}，Na^{+}の影響はほとんどみられなかったが，Ca^{2+}，Fe^{3+}，Zn^{2+}は中程度に，Cu^{2+}，Fe^{2+}，Pb^{2+}は著しく阻害した。

Table 10. Effect of metallic ion on sugar cane peroxidase activities

Ion	Salt used	Concentration (M)	Relative activity
Ca^{2+}	$CaCl_2$	2×10^{-2}	76
Cu^{2+}	$CuSO_4\ 5H_2O$	2×10^{-2}	11
Co^{2+}	$Co(CH_3CO_2)_2\ 4H_2O$	2×10^{-2}	84
Ag^{+}	Ag_2SO_4	2×10^{-2}	103
Fe^{2+}	$FeSO_4\ 7H_2O$	2×10^{-2}	20
Fe^{3+}	$FeCl_3\ 6H_2O$	2×10^{-2}	58
K^{+}	KCl	2×10^{-2}	92
Mg^{2+}	$MgCl_2\ 6H_2O$	2×10^{-2}	104
Na^{2+}	NaCl	2×10^{-2}	100
pb^{2+}	$pb(CH_3CO_2)_2\ 3H_2O$	2×10^{-2}	17
Zn^{2+}	$ZnSO_4\ 7H_2O$	2×10^{-2}	58
Control		0	100

2. 赤腐病の進行に伴う酵素活性の変化

除皮，除節した甘蔗を細断し，8日間，30°C の孵卵器中で培養して自然赤変を発現させた。この間毎日，培養甘蔗7 *g* をとり，蒸留水10*ml*を加えて乳鉢で磨砕し，搾汁を遠沈し，希アンモニア水と希塩酸でpH7.8に調整して自然赤変試料用粗酵素液とした。また常法により3％蔗糖処理バガスを作り，8日間30°Cの孵卵器中で培養赤変させたものを，上と同様に処理して人為赤変試料用粗酵素液とした。

なお両酵素液の10*ml*をそれぞれ減圧で蒸発乾固し，固形物の重量を求め，それに対する両者の比酵素活性度を求めた。その結果，自然赤変区においては，酵素活性は4日目に僅かにピークが見られた以外はほとんど一定な値を示し，その頃から色素の生成は上昇し始め，6日目には最高に達した。（第23,47図）人為赤変区においては，活性上昇が急で2日目には初日の5倍にも達するピークを形成し，それを過ぎると，2日間は急激に減少し，その後は徐々に低下し最終日には初日と同じ程度になった。なお色素生成は酵素活性が最も旺盛な時期より3日おくれて最高に達した（第25，47図）。比活性度は2日目より2日間は人為赤変区が高く，それ以外はすべて自然赤変区が高かった（第48図）。

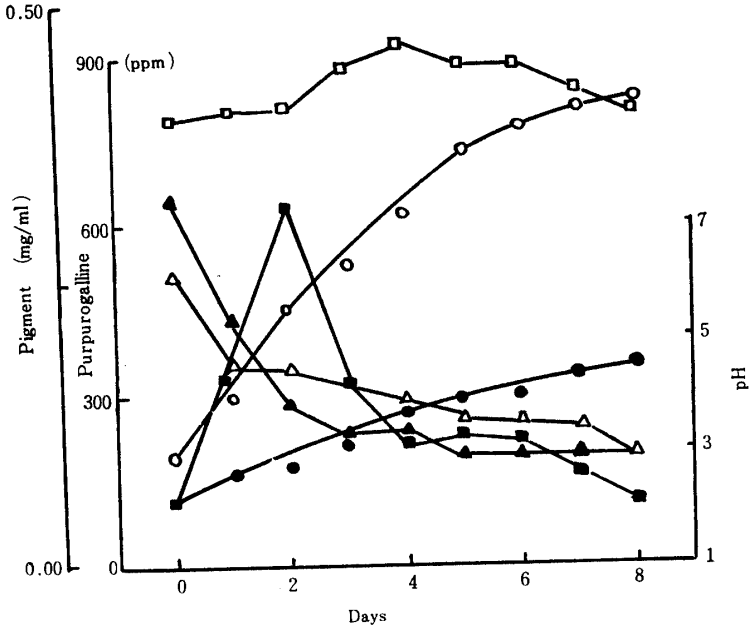

Fig. 47. Changes of the peroxidase activities with time during the reddening of sugar cane

□——□ ■——■ Enzyme activies △——△ ▲——▲ pH value
○——○ ●——● Pigment concentration
White: Naturally reddened sugar cane
Black: Artificially reddened bagasses

1) 5 *ml* of 0.25% pyrogallol as substrate. 2) 0.25 *ml* of 1.1% H_2O_2, 3) Enzyme solutions were extracted from 7 *g* samples with 10 *ml* of water,
4) 0.25 *ml* of 5% H^2SO_4, 5) 50 *ml* of ether. 6) 30°C
7) 5 minutes, 8) pH 7.8

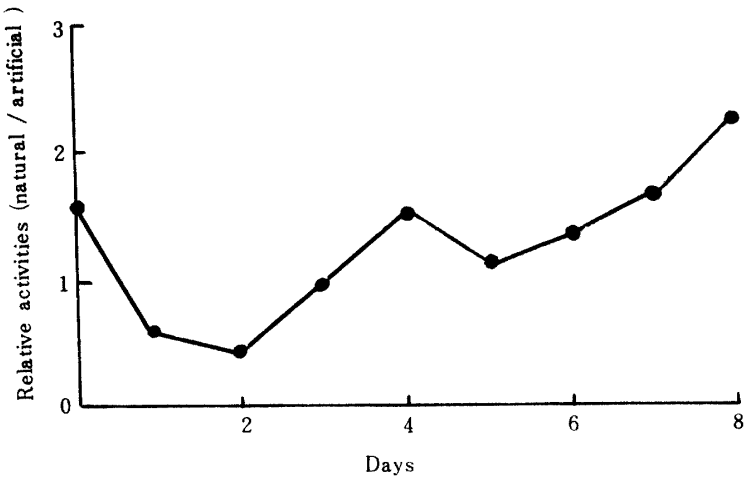

Fig. 48. Changes of sugar cane relative activities with time

3. 甘蔗各茎の酵素活性

糖含量の最も少い梢頭部より第3節以降の抽出液は褐変が緩慢であることから察して，梢頭部のperoxidaseが最も高いのではないかと思われたので，そのことを確認するために，下記の如く実験を行なったが，各茎の酵素活性は糖含量には関係がなく，その差異はほとんど認められなかった。その結果を第11表に示す。

Table 11. Relative peroxidase activities of each part of sugar cane stem

Order of stem	1	3	5	7	9	11
Relative activity	100	101	100	81	90	104
Sucrose (%)	1.88	3.03	7.83	8.98	9.69	10.17

1) 2.5 *ml* of 0.25% pyrogallol as substrate
2) 1 *ml* of 1.1% H_2O_2
3) Enzyme solutions were extracted from 5 *g* samples with 10 *ml* of water
4) 2 *ml* of 5% H_2SO_4
5) 50 *ml* of ether
6) 5 minutes
7) 30°C
8) pH 7.8

考　　察

Alexander (3) は，甘蔗peroxidaseの一般的性質として，purpurogalline法により至適pH7.3，至適温度36°Cをえ，阻害剤としてCa^{2+}，Mn^{2+}，Zn^{2+}をあげている。またLipetzら(20)は，植物の組織培養においては，Ca^{2+}，Mg^{2+}，NH^{4+}はperoxidase活性を高めるのに最も効果があると報告している。これらを著者が求めた至適pH7.8，至適温度50°Cと比較すると，pHはかなり接近した値を示したが，至適温度は著しい開きがあった。またCa^{2+}，Zn^{2+}の阻害作用およびMg^{2+}の賦活作用についても，第10表

で示すように，ある程度認められる。

甘蔗の成熟度を糖含量によって判断すると，梢頭部が最も低く，以下順次根茎に向って高くなっている筈である。1本の甘蔗の成熟度とperoxidase活性との関係を求めた第11表ではほとんど差異は認められなかった。以上のことから考察すると，甘蔗peroxidase活性は成熟度の影響をほとんど受けないことがわかる。

自然赤変甘蔗の酵素活性は経時的にほとんど変化はなく，罹病度との相関関係は明らかでなかったが，人為赤変バガスの酵素活性は色素生成がようやく認められる3日目頃，すなわち，罹病初期に最も高かった。

赤腐病抵抗性品種は赤腐病菌を接種するとき，polyphenoloxidse活性は高くなるが，感染し易い品種は増減いづれも認められないとのChiranjiviら(4)の報告がある。またバイラス感染甘蔗はcatalase活性が健全葉より低いとのYamafujiら(47)の報告があるがperoxidaseについての研究はなかった。

植物の病気と酵素活性との関係について諸家の研究，例えば，1) potato-peroxidase活性は罹病した塊茎部が最も高いとの Tonekha (36) の報告，2) バレイショに *Synchytrium* 菌を接種するとそのperoxidase 活性は急激に増加し，正常葉より150%も高い活性を示すとの Grenchushnikov (9)らの報告，3) 結実過程にある果実に病原菌を接種すると，接種側はcatalaseおよびperoxidase活性が高くなるとのSokolov(32)らの報告があげられる。なおモザイク病罹病タバコ葉はperoxidase活性が高く，貯蔵期間中4日間はわづかに増加したが，それ以降は次第に減少するとの奥田(25)らの実験結果は第47図に示される赤腐病のそれと同じ傾向にあった。以上のことをまとめて考察すると，一般に，植物のperoxidase活性は罹病するとともに増加するようである。

要　　約

1. 甘蔗 peroxidase の作用至適 pH は7.8，至適温度は50° C であった。酵素活性阻害剤として，EDTA，シュウ酸アンモンおよびシアン化カリを用いたが、前2試薬がかえって賦活したのは，粗酵素液中の阻害金属が除去されたことによると思われる。後者は完全に阻止した。

酵素活性に対するAg^{+}、K^{+}、Na^{+}の影響はほとんど認められなかったが，Ca^{2+}，Fe^{3+}，Zn^{2+}は中程度に、Cu^{2+}、Fe^{2+}、Pb^{2+}は著しく阻害した。

2. 甘蔗各茎の酵素活性はほとんど一定で、含有糖分の影響は認められなかった。

3. 酵素活性の増加は，自然赤変区においては、緩慢で4日目に小さいピークを示したに過ぎないが、人為赤変区においては2日目に顕著なピークに達した。

第5章　赤　変　機　構

定性試験の結果、甘蔗にperoxidase活性が認められたので、その基質となるべきphenol性化合物を検索した。また両者の反応により生体外で赤変の発現を実証した。なお赤変の前駆体になるものはferulic acidに極めて近いものと思われるが同定には到らなかった。

実　験　方　法

1. ペーパークロマトグラフィと薄層クロマトグラフィ（以下TLCと略記する）により、phenol性化

合物の同定および色素生成の証明を行なった。

2. 5-hydroxymethylfural（以下HMEと略記）は蔗糖を硫酸で分解蒸留留して調製した。

3. 酢酸アニリン法により、furfuralの検出を行なった。

実　験　結　果

1. 生化学的反応による色素の生成

a） 粗phenol性化合物の分離

1) 除皮除筋して風乾した水洗バガスおよび甘蔗切片それぞれ約30gをメタノール約1ℓで抽出し，濾別して減圧濃縮後水を加えて懸濁し，エーテルで抽出した。

2) エーテル層に1％水酸化ナトリウム溶液を加えて若干の脂肪酸，phenol性化合物をアルカリ層に転溶し，分液した。

3) アルカリ層を塩酸酸性にしてエーテルでふってphenol，フェノールカルボン酸を移行させた。

4) エーテル層に2％炭酸ソーダ溶液を加えてふると，phenol類はエーテル層に残り，フェノールカルボン酸は炭酸ソーダ層に移行する。

5) 炭酸ソーダ層を塩酸酸性にしてエーテルを加えてふると，フェノールカルボン酸はエーテル層に転溶する。エーテル層をとり溶媒を留去すると，褐色をおびたフェノールカルボン酸の区分（b）の少量をうる。

6) 4) のエーテル層をとり溶媒を留去すると，phenol類の区分（a）の少量をうる。また赤変甘蔗および赤変バガスからも，同様に処理して，フェノールカルボン酸及びphenol類の区分（a，b）をうる。分離系統図を第49図に示す。

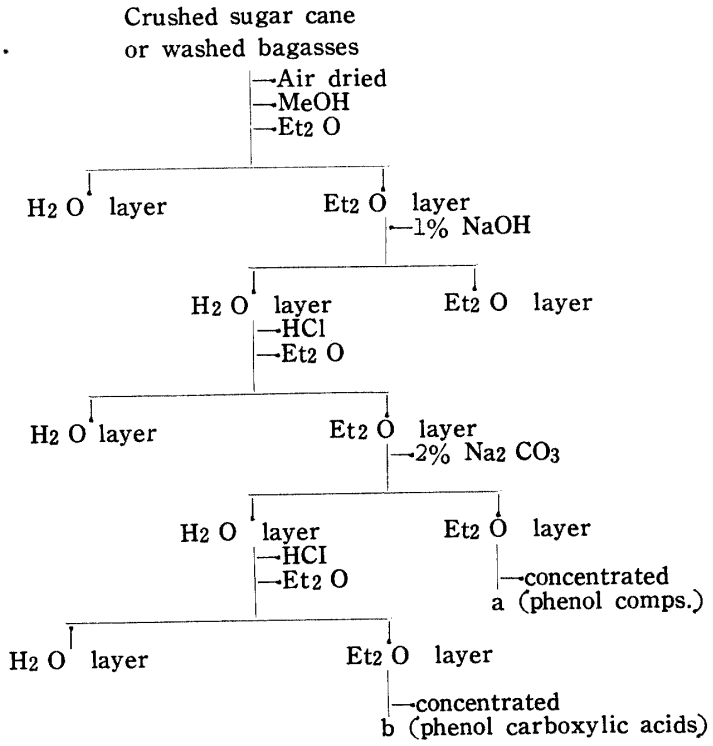

Fig. 49. Scheme of extraction of crude phenolic compounds from sugar cane

b) Phenol性化合物の同定： 区分（a）および（b）を phenol類, phenol carboxylic acid類とともにＰＰＣとＴＬＣに付したところ，試料中に phenol, ferulic acid, *p*-coumaric acid および不明の３コのphenol carboxylic acidの存在が認められた。１次元ＰＰＣ，２次元ＰＰＣおよびＴＬＣの結果をそれぞれ第12, 14, 15表，第50，第51図および第13, 16表に示す。

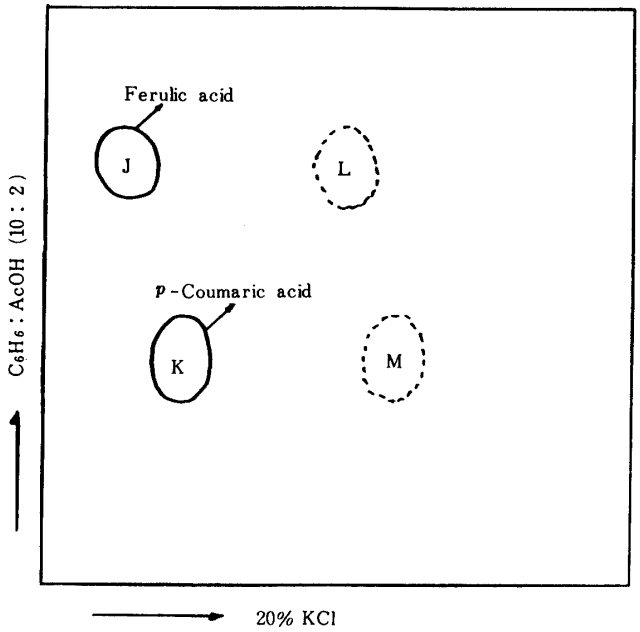

Fig. 50. Two dimentional paperchromatogram of the phenol carboxylic acids in washed bagasses
Visualization : Diazotized sulfanilic acid

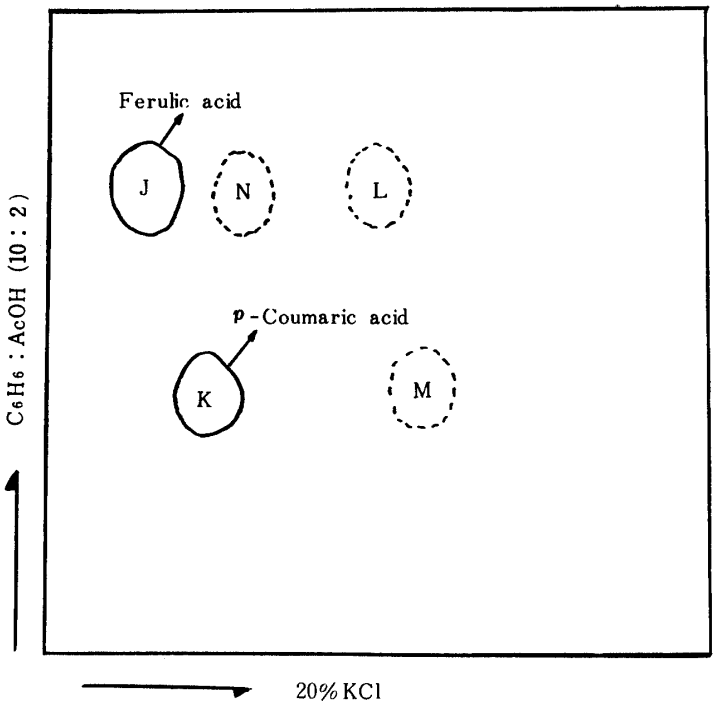

Fig. 51. Two dimentional paperchromatogram of the phenol carboxylic acids in raw sugar cane
Visualized by diazotized sulfanilic acid

Table 12. Paperchromatography of the phenol compounds in sugar cane

Sample and Reference	Visualization			Rf	
	UV	Diazo #	$FeCl_3$	C_6H_6 10 AcOH 2	KCl 20 H_2O 80
Ba*	—	yellow	—	0.82	0.68
Ra*	—	yellow	—	0.82	0.68
Phenol*	—	yellow	—	0.82	0.68
Saligenin	—	yellow	gray	0.00	0.46
Phloroglucinol	brown	brown	gray	0.00	0.46
Vanillin	blue	—	gray	0.89	0.57
Pyrocatechol	brown	violet	brown	0.32	0.68
Resorcinol	—	yellow	gray	0.11	0.61
Pyrogallol	brown	brown	violet	0.40	0.61

Ba: Fraction prepared from washed bagasses
Ra: Fraction prepared from raw sugar cane
#: Diazotized sulfanilic acid

Table 13. Thin layer chromatography of the phenol compounds in sugar cane (C_6H_6 : MeOH : AcOH=45 : 8 : 4)

Samples and rferences	Diazo #	Rf values
Ba*	yellow	0.72
Ra*	yellow	0.76
Phenol*	yellow	0.78
Saligenin	yellow	0.60
Phloroglucinol	brown	0.25
Vanillin	yellow	0.61
pyrocatechol	brown	0.51
Resorcinol	brown	0.49
pyrogallol	brown	0.35

#: Diazotized benzidine (27)

Tabl 14. Paperchromatography of the phenol carboxylic acids in sugar cane (C_6H_6 : AcOH=10 : 2)

Sample and Reference	UV	Diazo	$FeCl_3$	Rf
Bb NO.1*	white blue	violet	—	0.77
NO.2**	blue violet	red vilet	brown	0.45
Rb NO.1*	white blue	violet	—	0.77
NO.2**	blue vioet	red violet	brown	0.45
Ferulic acid*	white blue	violet	—	0.77
p-Coumaric acid**	blue violet	red violet	brown	0.45
Salicylic acid	blue violet	yellow	violet	o.87
m-Hydroxybenzoc acid	gray	yellow	brown	0.35
p-Hybroxybenzoic acid	gray	yellow	brown	0.29
Gallic acid	gray	yellow	gray	0.00
Syringic acid	pale brown	red	violet	0.71
Caffeic acid	white blue	brown	blue	0.10

Bb: Fraction prepared from washed bagasses
Rb: Fraction prepared from raw sugar cane

Table 15. Paperchromatography of the phenol carboxylic acids in sugar cane (KCl : H_2O=20 : 80)

Sample and reference		UV	Diazo	$FeCl_3$	Rf
Bb	NO.1**	blue violet	red violet	brown	0.30
	NO.2*	white blue	violet	—	0.20
Rb	NO.1**	blue violet	red violet	brown	0.30
	NO.2*	white blue	violet	—	0.20
Ferulic acid*		White blue	violet	—	0.20
p-Coumaric acid**		blue violet	red violet	brown	0.30
Salicylic acid		blue violet	yellow	violet	0.61
m-Hydroxybenzoic acid		gray	yellow	brown	0.73
p-Hydroxybenzoic acid		gray	yellow	brown	0.58
Gallic acid		gray	yellow	gray	0.42
Syringic acid		pale brown	red	violet	0.50
Caffeic acid		white blue	brown	blue	0.50

♯: Diazotized sulfanilic acid

Table 16. Thin layer chromatography of the phenol carboxylic acids in sugar cane

Sample and reference		Diazo♯	Rf
Bb	NO.1	brown	0.78
	NO.2*	brown	0.66
	NO.3**	yellow	0.52
Rb	NO.1*	brown	0.66
	NO.2**	yellow	0.55
Ferulic acid*		brown	0.65
p-Coumaric aid**		yellow	0.52
Saliculc acid		yellow	0.72
m-Hydroxybenzoic acid**		yellow	0.55
p-Hydroxybenzocacid**		yellow	0.55
Gallic acid		orange	0.22
Syringic acid*		brown	o.63
Cffeic acid		brown	0.30

♯: Diazotized benzidine

Solevent system: C_6H_6 : MeOH : AcOH=45 : 8 : 4

またこれらの3化合物は赤変前後でどのような変化をうけるかを調べるために，生甘蔗，水洗バガス，赤変甘蔗，赤変バガスからえた8フラックションを同時にＰＰＣに付して調べたところ，赤変バガスにはphenolとferulic acidの消失が認められた。結果を第52図に示す。

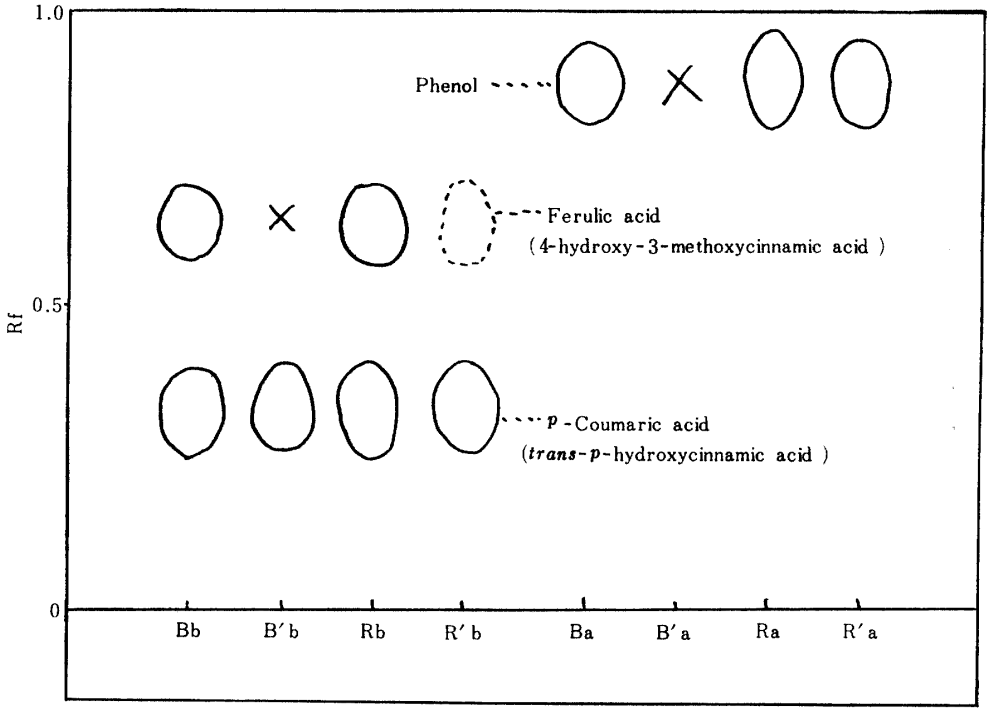

Fig. 52. Paperchromatogram of the phenolic compounds before and after the reddening of sugar cane and bagasses (C_6H_6 : AcOH=10:2)

Visualized by diazotized sulfanilic acid.
B′b, B′a and R′b, R′a: Crude phenol carboxylic acid and phenol compound fractions extracted from the reddened bagasses and sugar cane respctively. X : disappeared ○ : trace

c) 甘蔗peroxidaseおよびHMFによる色素の生成

同定されたphenol, ferulic acidおよび*p*-coumarlc acidを対象とした。

1) 赤変試料中のHMFの検出： 人為赤変バガス55gに蒸留水100*ml*を加え，三角フラスコ中湯煎上で約3時間加温し沪過する。沪液を食塩で飽和し，蒸留して留液約5*ml*を得，之に酢酸—アニリン混合液5*ml*を加えたところ微紅色を呈した。赤変する前に，バガスを充分水洗して蔗糖液に浸漬してあるために，遊離のpentoseの存在は考えられない。また抽出液のpH5位の微酸性では熱湯中でも，バガス成分であるpentosanの分解は考えられない。従って呈色反応はfurfuralによるものでなくて，HMFによるものと思われる。なお自然赤変甘蔗は同様に処理しても，紅色を呈せず，微黄色を呈したことにより，自然赤変の場合にはHMFの関与はないものと考えられる。

2) 沪紙上反応による方法： 沪紙上にphenol. ferulic acid, *p*-coumaric acid, Ba, Ra, Bb, Rb（第12, 14表）をそれぞれ毛細管で点滴し，その上から更に甘蔗peroxidase粗酵素液（以下酵素液と略記）酵素液とH_2O_2混合液；HMF；酵素液，H_2O_2とHMF混合液を同様に点滴し，発色するか否かを検討した。結果を第17表に示す。

Table 17. Color formation by the mutual reactions of phenol compounds, HMF and E_{sc} on filter paper

Addtives	Phenol	Ferulic acid	*p*-Coumaric acid	Ba	Ra	Bb	Rb
None	–	–	–	–	–	–	–
E_{sc}	–	–	–	–	–	–	–
E_{sc} + H_2O_2	–	Yellow	–	–	–	pink	pink
HMF	–	–	–	–	–	–	–
E_{sc} + H_2O_2 + HMF	–	Yellow	–	–	–	pink	pink

E_{sc} : Crude sugar cane peroxidase solution.
HMF : 5-hydroxymethylfurfural

ferulic acid, Bb Rbはそれぞれ酵素液とH_2O_2混合液と反応して呈色することが観察された。更にこのことを確認するために，ferulic acidと*p*-coumaric acidの混合液，Rb,Bbを同時にＰＰＣに付し，紫外ランプ照射で検出されたスポット上に，酵素液，過酸化水素の順で点滴したところ，ferulicacidに相当するスポットだけが，標品は黄色に，試料は紅色に，それぞれ発色した。結果を第53図に示す。

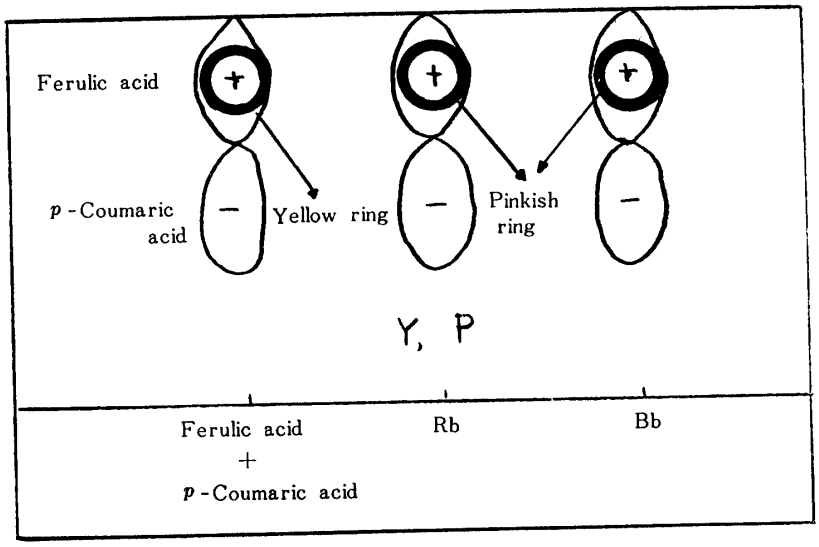

Fig. 53. Paperchromatogram of the pigments formed by the sugar cane peroxidase reaction

即ち，生甘蔗及びバガスから得たphenol carboxylic acid区分はperoxidase,H_2O_2により濾紙上で赤変することが明らかになった。

次でこのphenol carboxlic acidが何であるかを明らかにするために若干の検討をした。

第51図に示されるように，１次元ＰＰＣでferulic acid に相当するスポットは，２次元のＰＰＣで更にＪ.Ｌ.Ｎ（UV下発色せず）の３スポットに分離するので，それらのうちどのスポットが酵素液と反応するかを明らかにするために，Rbのsampleを用いて第53図と同様な方法で２次元ＰＰＣを行なったところ，ferulic acid に相当するＪスポットだけが紅環を形成して発色するのが観察された。しか

し標品のferulic acidは黄色を呈したのに対し，試料のそれは紅色を呈したので，2次元のRfも同一であるが，ferulic acid ではなく，構造的に極めて類似の化合物と思われる。確認は後日にまたねばならないが，仮りに pseudo-ferulic acid と呼ぶことにする。この実験結果を第54図に示す。

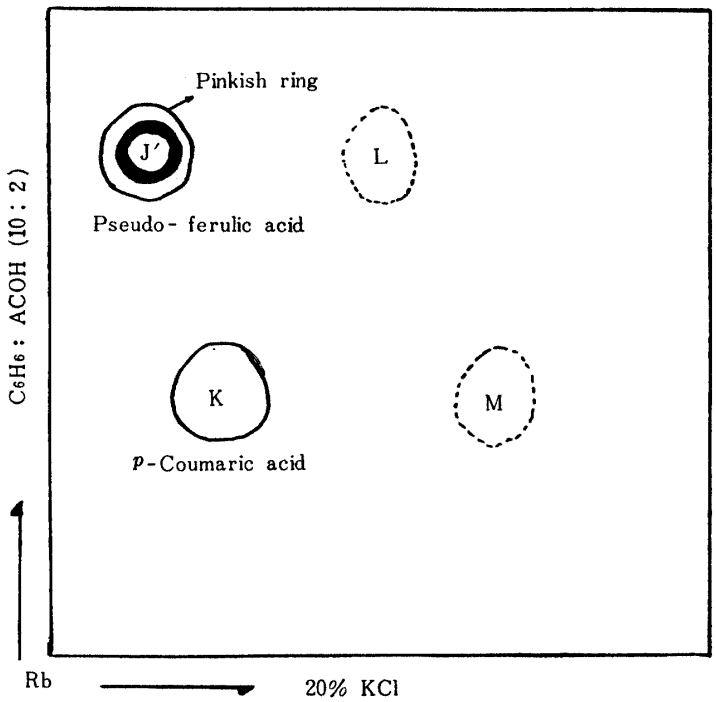

Fig. 54. Two dimentinal paperchromatogram of the pigments formed by sugar cane peroxidase reaction on Rb

3) 溶液反応による方法： 第18表に示す割合の phenol の溶液を綿栓した100 *ml*三角フラスコにそれぞれとると，水属と phenol 属に分離する。これらをそのまま8日室温（約23°C）で放置したところ，phenol層はH_2O_2が関与する酵素反応混合液とHMF反応溶液にだけ褐変が認められた。

また同表に示す割合のferulic acidと酵素液，過酸化水素混合液及びferulic acidとHMF混合液をそれぞれ30°Cの孵卵器中に24時間保存した場合も，前者に黄変が認められたが，前記同様赤変ではなかった。後者には何らの変化も認められなかった。結果を第18表に示す。

Table 18. Color formation by the mutual reactions of phenol compounds, HMF and Esc in Solution

Phenol(*ml*)	H_2O(*ml*)	HMF(*ml*)	Esc(*ml*)	1%H_2O_2 (*ml*)	Ferulic acid(*mg*)	Color
5	20	0	0	0	0	—
5	0	5	0	0	0	brown
5	20	5	5	2	0	red brown
5	20	0	5	2	0	red brown
5	20	0	5	0	0	—
0	1	0	0.5	0.1	2	yellow
0	1	1	0	0	3	—

4) 色素生成の証明： 第18表に示す混合液および自動酸化した赤変phenolから製取した色素を試料として，自然赤変色素および人為赤変色素と，ＰＰＣとＴＬＣにより比較した。第１章でのべたA，B，C，D，E 色素に相当する５スポットを選定し，それぞれの異同を先ず検討した。各試料の主成分色素である各No. １スポットはRf 値，UV，diazo反応，$FeCl_3$ による呈色が色素Ｃと一致した。ferulic acid-E_{sc}-H_2O_2 系のNo. １，No. ２スポットのRf値も色素Ｃのそれにかなり接近していたが，呈色が異なるので両者は関係ないものと推察される。結果を第55図，19,20表に表示す。

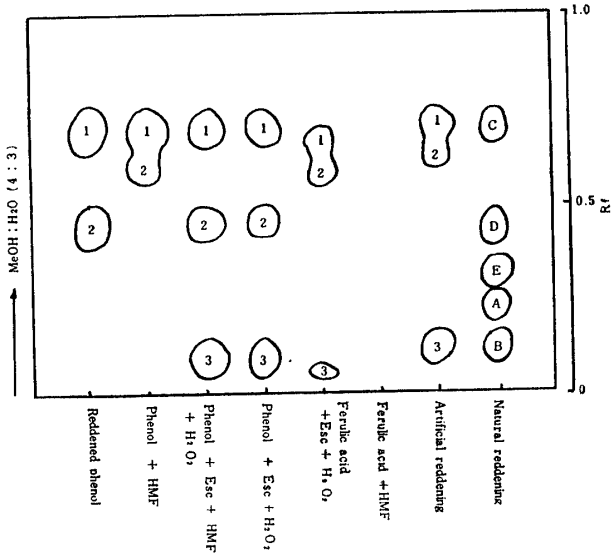

Fig. 55. Paperchromatographic relationship between natural reddenig and others under UV

Table 19. Paper chromatography of the pigments prepared

Reaction mixtures and references	Rf	Visualization		
		UV	Diazo #	$FeCl_3$
Reddened phenol	0.70*	blue	orange	brown
	0.45	blue	—	—
Phenol—HMF	0.70*	blue	orange	brown
	0.62	blue	—	—
Phenol—E_{sc}—HMF—H_2O_2	0.70*	blue	orange	brown
	0.45	blue	—	—
	0.08	red	—	—
Phenol—E_{cs}—H_2O_2	0.70*	blue	orange	brown
	0.45	blue	—	—
	0.08	red	—	—
Ferulic acid—	0.65	blue	violet	gray
E_{sc}—H_2O_2	0.60	blue	—	—
	0.13	red	red	—
Ferulic acid—HMF	0.00	—	—	—
Pigment A	0.25	blue	brown	brown
B	0.13	drown	brown	brown
C	0.67*	blue	orange	brown
D	0.43	—	brown	violet
E	0.33	blue	brown	violet

A : $C_{18}H_{24}O$ B : $C_{22}H_{22}O_{10}$ C : $C_9H_8O_3$ D : $C_9H_8O_4$
Solvent system (MeOH : H_2O=4 : 3)
: Diazotized sulfanilic acid

Table 20. Thin layer chromtography of the pigments prepared

Reaction mixtures and references	Spot No.	Diazo reaction	Rf
Reddened phenol	1	red brown	0.45
Phenol—HMF	1	brown	0.42
Phenol-E_{sc}—HMF—H_2O_2	1	red brown	0.44
Phenol—E_{sc}—H_2O_2	1	red brown	0.42
Ferulic acid-	1	brown	0.48
E_{sc}—H_2O_2	2	brown	0.39
Artifcial	1	brown	0.42
Natural	1	brown	0.44

Absorbent： silica gel G:# ： diazotized benzidine

Solvent system (C_6H_6 :MeOH ： CH_3COOH=45 ： 8 ： 4)

考　　察

甘蔗汁および水洗バガスの1次元ＰＰＣでは ferulic acid と *p*-coumaric acid の2種の phenol carboxylic acic が同定されたが，2次元 ＰＰＣ では更に3種の未知phenol carboxylic acid （L，M，N）が検出された（第51図）。それらのうち，未同定のL，M，N，は痕跡程度しか存在しなかった。

1次元ＰＰＣで1スポットである phenol 区分は揮発性であるために，2次元ＰＰＣができなかったが，ＴＬＣでも1スポットでRf 値，色調ともにphenolに一致したので，phenolと同定した。

結局同定されたphenol性化合物は phenol, ferulic acld, *p*-coumaric acid および未確認の L， M，N，の6種であった。

甘蔗に関連のある phenol 化合物として，*p*-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid, syringic acid, phloroglucinol (33.34) などが知られている。それらのうち，ferualic acidと*p*-coumaric acid は本実験でも分離同定されたが，phenolの報告はない。ferulic acid は甘蔗葉中に最も多量に存在するといわれている。

なおＴＬＣで ferulic acid と syringic acid, *p*-coumaric acidと *m*, *p*-hydroxybenzoic acid が呈色，Rf 値とも一致している（第16表）ために，同定し難く，phenol 化合物の同定手段としてはＰＰＣに劣ると思われる。

赤変した甘蔗および水洗バガスの phenol 性化合物の同定をするために行なったＰＰＣ上で，水洗バガスフラックツョン（Bb, Ba）のphenol および feruic acidに相当するスポットは赤変したとき完全に消失して検出されたなかったことから判断し，3種の既知phenol性化合物中，これらの2化合物が生体色素生成応に関与していることが考えられる（第52図）。そのことは ferulic acidおよび phenolが甘蔗 peroxidase と反応し，あるいは phenol が蔗糖の分解産物であるＨＭＦと反応して褐変すると考えられる。

phenol —酵素液—H_2O_2 系と phenol—酵素液—ＨＭＦ—H_2O_2 系の反応においては同一色素を生成しphenol-HMFにより生成する色素と異なることは，H_2O_2 がＨＭＦよりもphenol-E_{sc}-ＨＭＦ-H_2O_2 系の反応の進行に大きく寄与していることを意味する （第55図，19表）。

標品ferulic acidと試料のそれとの間に，酵素反応による発色に相違があるのは未確認微量成分の混在によるかあるいは，ferulic acidと極めて近いが幾分構造が違う物質によるものと思われる。

溶液反応において，褐変の徴候が認められるのは2日目頃だあることから察して，phenolのＰＰＣ法による酵素反応が湿潤状態にある僅か数分間の反応系では褐変が認められないのはむしろ当然かも知れない（第17，18表）。

色素生成証明のためのＰＰＣおよびＴＬＣにおいては，試料および標品の主要スポットのRf値が接近しているために，正確に同定することは困難であった。phenolの自動酸化および甘蔗peroxidaseによる酸化で生成した褐変物質はＰＰＣおよびＴＬＣから類縁物質であろうと推察される。

第55図に示すように，phenol区分と粗酵素液とから生成したスポットの中，各NO.１スポット及び人為赤変色素のNO.１スポットは自然赤変の色素Ｃスポットに Rf値，呈色ともに一致していた。

ferulic acidとperoxidaseによってできた色素のＰＰＣおよびＴＬＣにおける Rf値は自然赤変色素のそれと一致しているのに，発色色調が異なっているために，色素Ｃと断定することはできなかった。phenol-ＨＭＦ反応によってできたNO.２スポット（第55図）と色素Ｃスポットは，diazo反応による発色が若干異なることから判断して，両者は近縁物質であろうと推察される。

その他甘蔗phenol性化合物の１成分である *p*-coumaric acid（m.p.206°）があるが，これは第52図からわかるように，赤色色素合成反応には関与していないと考えられる。

甘蔗peroxidase は*o*-cresol, hydroquinone, catechol, pyrogallol, benzidine, aniline, tryptophan guaiacol およびアラビアビムに対して活性であることが知られている(3)が，本研究の結果，phenol, ferulic acidに対しても活性を有していることが明らかになった。

要　　約

1. 甘蔗中の phenol 性化合物として phenol, ferulic acid, *p*-coumaric acid その他未確認の3 phenol carboxylic acid が見出された。そのうち phenolとferulic acid が色素生成に関与していることがわかった。

2. phenol の自動酸化により生成した色素群と phenol—peroxidase 反応により生成した色素とはほとんど同一で，そのうちのあるものは人為および自然赤変色素の１成分と同一と考えられる。

3. ferulic acid—peroxidase反応により生成した色素群と赤変甘蔗の色素群との関係は不明である。

4. phenol—ＨＭＦ 反応により生成した色素群の主成分は人為赤変バガスから単離された色素Ｃ（$C_9H_8O_3$）と類縁の物質であろと推察される。

第6章　各色素の生理活性

殺菌処理をほどこして赤変機能を停止した甘蔗は，大気中に放置すると１～２日間で雑菌の繁殖をみるが，赤腐病菌汚染甘蔗は数日を経過しても，他の微生物の発育がみられないのは，植物が病原菌におかされると，その部分が褐変すると同時にphenol化合物が増加し，病原菌の侵入を阻止（1.18.42）するという植物の一般的生理現象と関係があるように思われる。すなわち，植物が菌の侵入傷害に対して抵抗するために，生成した物質が赤変色素であるのではないかと考えられる。従って赤腐病色素には抗菌活性が考えられるので，単離したこれらの赤変色素の抗菌性と魚毒性について検討した。

実 験 方 法 及 び 結 果

1. 魚 毒 性 試 験

0.05*ml*のエタノールに溶解した各試料（色素B，C，D，E）を入れた試験管に蒸留水10*ml*を注加して溶解あるいは懸濁し，50*ml*ビーカーに移して供試液とした。供試魚として沖縄に生息するテルピア（*Tilapia*）およびタップミノー（*Gambusia affinis*）稚魚それぞれ2尾を用い，計4尾を各ビーカーに放って9時間以内の半数致死時間を求めた。それ以上生存したものは>の記号で表わした。実験回数が少く，環境的影響について充分な考慮が必ずしも払われていなかったが，それぞれある程度の魚毒性が認められた（第21表）

Table 21. Piscicidal activties of each pigment identified (time for LD_{50} in minute)

Fish tested \ Pigment	B	C	D	E	Control
Concn. (ppm)	220	90	500	150	0
Top-minnow (Average weight: 0.18 *g*)	360	540	420	100	>540
Tilapia (Average weight: 0.15 *g*)	150	30	90	>540	>540

2. 抗 菌 性 試 験

色素B，C，D，Eを含む甘蔗汁（B×21°，pH 6.1）寒天培地をそれぞれ調製し，乾熱滅菌したシャーレに注入して5分間大気中に露出した後，72時間30°Cの孵卵器中に保存し，生成するコロニー数を対照と比較した。第22表に示す通り，いずれもある程度の抗菌活性が認められた。

Table 22. Antimicrobial activities of each pigment identified

Pigment	Concn. (ppm)	Number of colonies observd in 24 *hrs.*	48 *hrs.*	72 *hrs.*
B	200	0	0	0
C	230	0	0	0
D	120	0	0	4
E	410	0	0	3
Control	0	1	12	14

要 約

魚毒性の優劣ははっきりしなかったが、抗菌力においては、色素BとCは72時間経過してもコロニー形成を認めず、最も強力であった。

結　　論

甘蔗赤腐病は糸状菌 *Physalospora tucumanensis* の不完全時代である *Colletotrichum falcatum* went による汚染が主原因であるとされているが、その他の微生物、昆虫の食傷、生育中の裂傷などが原因でも、類似の現象が起こるといわれているように、赤変機構そのものについては、不明な点が多い。殊に生化学的立場から検討を加えた報告は皆無である。筆者は甘蔗赤変現象の発現に関して化学的並びに生化学的研究を行ない、次の様な結果を得た。即ち

1章では、赤変甘蔗抽出物のペーパークロマトグラムから色素A、B、C、Dを分離し、それぞれ分子式と官能基を元素分析、MS、IRスペクトルおよび定性試験の結果から検討した結果を述べたものである。すなわち、1）色素A（$C_{18}H_{24}O$）はbutenyl 基を有する phenol 化合物、2）色素B（B—1 $C_{22}H_{22}O_{10}$、B—2 $C_{22}H_{22}O_9$）はflavonol誘導体、3）色素C（$C_9H_8O_3$）、D（$C_6H_8O_4$）はともにエーテル型酸素あるいは methylendioxide型酸素を有するphenol化合物であろうと推察された。何れも前掲文献に挙げたものとは一致しなかった。

2章では、甘蔗赤変の発現は糖類の存在と密接な関係があるが、その濃度の影響をほとんど受けないこと、酸素の存否にも関係ないことを明らかにした。

3章では、赤変甘蔗から *phoma* sp菌と *C.pulcherima* 菌の分離同定について述べた。またこの両菌とも*P.tucumanensis*同様赤変については間接的に関与していることを明らかにした。

4章では、甘蔗peroxidaseについて論述した。即ち、自然赤変区においては甘蔗 peroxidase 活性はほとんど一定しているために、色素の生成とperoxidaseとの関係は不明であったが、人為赤変区においては、赤変が僅かに認められる頃の培養初期に最高の酵素活性を示した。

甘蔗梢頭部から根茎に至る各茎の酵素活性はほとんど一定であった。また含有糖分とも無関係であった。

5章では、phenol性化合物の同定と、その生化学的反応を*in vitro* で実施したものである。即ち、甘蔗中にはphenol性化合物として、phenol、ferulic acid、*p*-coumaric acid のほかに痕跡程度の3未確認化合物が存在すること、およびこれらのうち生体内赤変反応に関与するものは、phenolと ferulic acid（あるいは、これに極めて近縁なもの）だけであることを明らかにした。

phenolと甘蔗peroxidase、phenolとHMF、ferulic acidと peroxidase はそれぞれ反応して異なる褐変色素を生じるが、前二者の反応は甘蔗赤変に関与していることが推論された。

第6章では、赤変色素の抗菌活性等を検討した。その結果、何れも若干の抗菌力、魚毒性をもっていた。従って赤変色素は甘蔗における1種のphytoalexinではないかと推察される。

総　　括

本研究の結果から、甘蔗の赤変機構を考察すると下記の通りである。

a.　甘蔗中にはもともと何か発色する precursor が存在する。このprecursorはphenol、ferulic acid（あるいは近縁のもの）、*p*-coumaric acid の如きものであると思われるが、あるいはこれらが他の物質例えば糖などと結合した型で存在するのかも知れない。

b.　甘蔗生体に微生物が働くか、あるいは損傷などを受けて組織が破かいされると甘蔗中の酵素が precursorに働く。

c.　この precursor と甘蔗組織の酵素との反応から生ずる初期生成物 pre-coloring substances が縮合、重合等により発色する。

d. 甘蔗組織において invertase が働いて生ずる frutose も pre-coloring substance の生成に多少関係があるかも知れない。これ等の見解をまとめたものを第56図に示す。

本論文の骨子を更に要約すると、*P. tucumanesis* の感染が原因でおこるとされている赤腐病とその他の原因でおこる甘蔗の赤変現象とは本質的に相違はないものである。

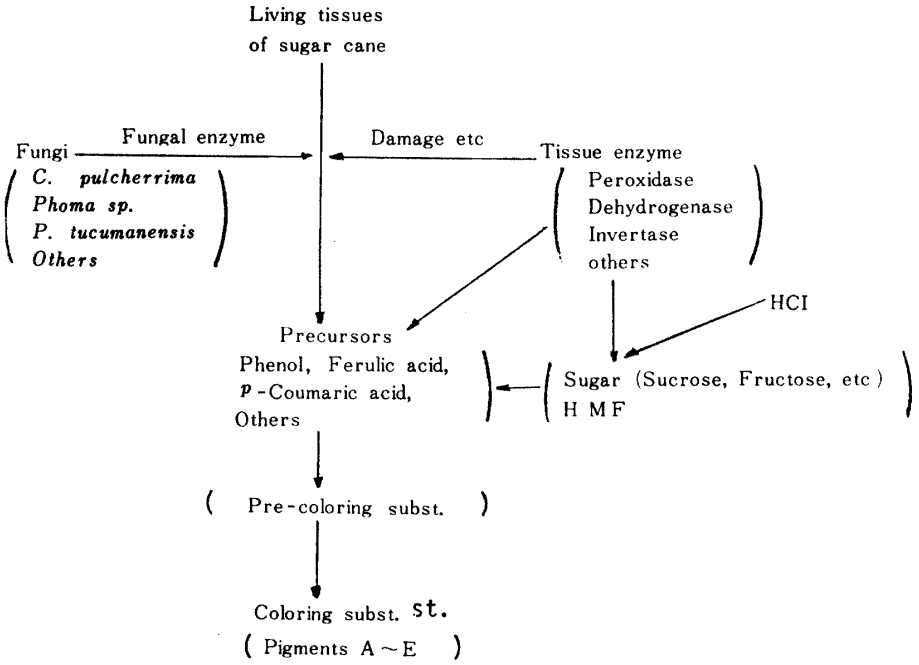

Fig. 56. Supposed mechanism of sugar cane reddening

謝　　辞

本研究を行うにあたり、懇切なる御指導を賜わり、また本論文の校閲をいただいた九州大学前川一之教授、江藤守総助教授に深謝する。

また本研究に関して、種々御指導御鞭撻いただいた本学鎮西忠茂教授並びに学科の皆様にあつく御礼申しあげる。

菌の同定に際して、御協力して下さった本学宮里助教授並びに琉球農試病理昆虫研究室津止健市氏に深謝する。

本研究に使用した甘蔗試料を提供していただき、また種々便宜をはかって下さった本学農場仲間操助教授に感謝する。

文　　献

1. Abbot, E. V. 1938 Red rot of sugar cane, U. S. Dept. Agr., Tech. Bull., **641**: 96pp. 〔C. A. **34**: 3753〕
2. 赤堀四郎 1956 酵素研究法Ⅱ，327～336朝倉書店
3. Alexander, A. G. 1966 Oxidizing enzymes of sugar cane, Agr. Univ. Puertrico, **50**:

36～52 〔C. A. **64**: 100loe〕

4. Chiranjivi, R. K., Krishnamurty, T. N., Lalitha, E. and Rajalakshmi, 1968 Phenols in relation to resistance of sugar cane varieties, Curr. Sci., **37**: 532～534 〔C.A., **70**:945g〕
5. Edgerton, C. W. and Christopher, W. W. 1927 The red stripe disease of sugar cane, Planter sugar Mfr., **79**: 63 〔C. A., **22**: 1869〕
6. Edgerton, C. W. 1958 Sugar cane and its diseases, 69～80, Louisiana State Uiversity Press
7. Graig, N. 1927 Soil activity and root diseases of sugar cane, Rev. Agr. Maurice, **4**: 336～338 〔C.A., **22**: 1491〕
8. Fawcett, G. L. 1928 Leaf reddenig in some varieties of sugar cane, Rev. ind. agr. Tucnman **3～4**: 104～105 〔C.A., **23**: 2315〕
9. Grenchushnikov, A. J, and Yakovleva, N. N. 1949 Peroxidase in potato infected with *Synchytrium* Doklady, Akad. Nauk. S. S. S. R., **69**: 55～57 〔C. A., **44**: 2087〕
10. Honig, J. A. 1960 製糖化学汎論1，253～255 三日会輪講会訳編
11. 外間宏一 1962 泡盛醪醗酵期間中における還元性糖類消費に関する研究，琉大農学報 **14**: 214
12. 外間宏一，宮城好弘 1967 糖蜜培地における酵母の増殖と精消費について，琉大農学報 **14**: 156
13. 植浦誠 1966 植物病菌類解説，342pp，養堅堂
14. Hill, H.C. 1967 質量スペクトルの有機化学への応用，136pp，東京化学同人
15. 今原広次，中浜敏雄 1962 絹糸紡績原料の醗酵精練（第10報），農化，**36**:331
16. 飯塚広，後藤昭二 1969 酵母の分類同定法183pp，東京大学出版会
17. Kuyper, J. 1923 Root rot In Java, particulary in connection with cane variety E28, Arch. Suikerind. **31**, Medeol. Proefstation Java-Suikerind. (4): 117～161 〔C. A., **17**: 2792〕
18. 鍬塚昭三 1962 稲ポリフェノールの化学的研究，133pp 九州大学農化
19. Lee, H. A., Barnum, C. C. and Jennings, W. C. 1926 Combating red stripe disease, sugar, **28**: 474～476 〔C. A., **21** : 1557〕
20. Lipetz, J. and Garro, A. J. 1965 Ionic effects on lignification and peroxidase in tissue culture. J, Cell Biol., **25**: 109～116
21. Lodder, J, and Kerger-Van Rij 1967 The Yeasts, 484～491, North-Holland Publishing Company Amsterdam
22. 宮地憲二 1947 応用黴菌学，186，岩波書店
23. 中西香爾 1960 赤外吸収スペクトル定性篇，26～56，南江堂
24. 大島康義，山本亮 1938 紅薫の色素，農化 **14**: 392
25. 奥田譲，片井喜久太郎，日比俊夫 1938 煙草モザイク病に関する生化学的研究（第4報）農化 **14**: 1386
26. Pastac, I. 1941 Anthraquinone pigments in fungi, Chem Zentr. **1**: 1303 〔C.A., **37**: 1740〕
27. Pastuska, G. 1961 Die Kieselgelschicht - Chromatographie von Phenolen und Phenolcarbonsauren, Z. Anal. Chem., **179**: 355
28. Rao, C. I. D., Walawalkar Da G. and Srikantan B. S, 1938 Anthocyanin pigment in

the rind of sugar cane (purple mauritius) , J. Indian Chem. Soc., **15**: 27～30 〔C. A. **32**: 5031〕

29. Sakuma, I. and Momose, I. 1935 The coloring subtances of cane sugar, J. Soc. Chem. Ind., Japan **38**, suppl. binding: 161～163
30. ——— and ——— ——— Anthocyanin and tannin ——— : 224～225
31. Stodola, F. H., Wachtel, J. L., Mayer, A. J. and Coghill, R. D. 1945 Penitric acid, a new pigment from *Penicillium notatum*, J. Biol. Chem., **159**: 67～70 〔C. A., **39**:4645〕
32. Sokolov, A. M. and Byvshikh, N. A. 1935 The part played by catalase and peroxidase in the resistance of fruit bearing plants to diseases and other damaging factors, Inst. im. Michua, **8**: 321～330 〔C. A., **51** : 13031〕
33. Stevevens, R. 1959 Phenolic constituents of sugar cane, Inten. Sugar J., **61**:199 〔C. A., **54**:934〕
34. Obata, Y. Senba, Y. anb Koshiba, M. 1963 Detection of phenolic compounds by chromatography in beet sugar molasses, Agr. Biol. Chem., **27**: 340
35. Silverstein, R. M. and Clayton G. 1966 有機化合物のスペクトルによる同定法, 183pp, 東京化学同人
36. Tonekha, E. F. 1936 The biochemistry of virus diseaes of potatos, Bull. Applied Botany, Genetics Plant Breeding (U. S. R.) **14**: 53～67 〔C. A., **31**:5840〕
37. 東京大学農芸化学教室 1963 実験農芸化学上巻, 191～192, 朝倉書店
38. Tanaka, H., Wang P., Yamada, O. and the late Tamura, T. 1966 Yellow pigments of *Aspergillus niger* and *Asp awamori*, Agr. Biol. Chem., **30**: 107, 683
39. 津止健市, 東清二 1971 沖縄におけるサトウキビの病害虫, 植物防疫, **25**: 435～442
40. Van Derbijl, P. A. 1922 Some fungi from the air of sugar mills and their economic importance to the sugar industry, S. African J. Sci., **18**: 232～233 〔C. A., **17**: 1557〕
41. Viswa, B. 1937 Anthocyanin pigments in the rind of sugar canes, Nath. Sci. Repps. Imp. Agr. Reesarch Inst., New Delki, 1937～38: 85～104 〔C. A., **34** : 563〕
42. Verma, A. K., Jaiswal, S. P., Bajai K. L. and Bhatia I. S. 1971 A study of polyphenols in sugar cane in relation to red rot disease present in the stem of sugar cane uarieties, Sugar Y Azucar, December 1971: 11～13
43. Willstaedt, H. 1937 Coloring matter in fungi. Ⅲ. Carotenoid in *Catharellus*, Svensk Kem. Tid., **49**: 318～323 〔C. A., **32**:2090〕
44. Willstaedt, H. 1940 Coloring matter in fungi. lv. The constitution of lactaroviolin, Atti Xe Congr. inten. Chim. , **3**: 390～397 〔C. A., **34**: 3758〕
45. Wang, S. C. and Tsai, T. K. 1950 Studies on red rot of sugar cane in Taiwan, Report of the Taiwan Sugar Experimentation, **6**: 99～109
46. Wolfrom, M. and Binkley, W. W. 1953 Composition of cane juice and cane final molsses, 11, Sugar Rearch Foudation, Inc. New York
47. Yamafuji, K., So, K. and Nagano, K. 1943 Respiration and catalase activity in sugar cane affected by virus, Biochem. Z., **315**: 405～410 〔C. A., **38**: 2362〕
48. Yu, Y. , Tamura, G. , Takahashi, N. and Arima, K. 1967 Asperyellone, a new yellow pigment of *Aspergillus awamori* and *Aspergillus niger*, Agr. Biol. Chem. , **31**: 831～836

Summary

1) Pigments A ($C_{18}H_{24}O$), B ($C_{22}H_{22}O_9$ or $C_{22}H_{22}O_{10}$), D ($C_9H_8O_4$) and E (molecular formula unknown) were isolatated from the paperchromatograms of naturally reddened sugar cane and pigment C was from the artificially reddened sugarcane and they were purified by recrystallization from ethylacetate.

2) Any of pigments A, B, C and D was aromatic compounds, of which A was phenol compond containing butenyl group, B flavonol derivative, C and D were spposed to have not only one phenolic oxygen, but also ether or methyledioxide type oxygen.

3) Sugar cane reddening needed sufficient amount of water and little amount of sugar, but not oxygen.

4) The pigments interested in sugar cane reddening were brought about not only by the infection with *P. tucumanensis* into the sugar cane tissues, but also mixed with the pigments occurring from other various cases.

5) As a result of the investigations of the ealy stage of red rot diseases of sugar cane, as well as the tolerably developing one, it was found that the concentrations of sugar were slightly reduced in spite of an increase in pigment concentration and a decrease in pH.

6) In the reddening sugar cane slice formed by an acid treament, the pignemt concentration increaed with time and reached finally after 11 days about twice as much as that after 4 days.

7) The sugar cane juice treated with acids changed from pink-brown to brown with an increase in concentration, of which hydrochloric acid contributed to form pignemt extremly much more than other acids.

8) However, the pigments formed according to the above mentioned paragraphs (4) and (5) were different from those of the naturally reddened sugar cane.

9) The fungus B which produced red pigments and pinkish yeast A were separated from the sugar cane infected with red rot disease and the former was supposed to be *Phoma sp.*, and the latter to be *Candida pulcherrma*.

10) The fact that sugar cane of dead tissue didn't redden but rotted indicates that the appearance of red rot disease was closely related with the condition of the sugar cane tissue, i. e. living and dead.

11) Judging from the facts that the pigments of red rot disease fungi themselves were completely different from those formed in sugar cane tissue by them and that the sugar cane slices inoculated with them reddened more rapidly than those not inoculated, it was found that they didn't take direct part in the formation of pigments and only contribute to promote it.

12) The optimum pH and temperature of sugar cane peroxidase were 7.8 and 50° C respectively. EDTA, ammonium oxalate and potassium cyanide were used as inhibitor against the emzyme activity. The unexpected activiation by the former two agents seemed to be due to the removal of metals acting as inhiditors. The latter inhibitted the

activity completely. The effects of Ag^{+}, K^{+}, Mg^{2+}, Na^{+} on the enzyme activity were found slighty, Ca^{2+}, Fe^{3+}, Zn^{2+} moderately, and Cu^{2+}, Fe^{2+}, Pb^{2+} remarkably.

13) The enzyme activity of each part of sugar cane was almost unchanged and not affected by the existing sugars.

14) The enzyme activities in naturally reddend sugar cane formed small peaks even after 4 days, whereas the artificially reddened a giant maximum peak after 2 days from the cultiavation.

15) Phenol, ferulic acid, *p*-coumaric acid and other three phenolcarboxylic acid were found as phenolic compounds in the sugar cane tissue, of which phenol and ferulic acid were found to be related in forming the pigments.

16) The paperchromatograms of pigments formed by the autooxidation of phenol were much the same as ones formed by the action of peroxidase on phenol, of which some were identified as the components of artficially or naturally reddened sugar cane.

17) The direct relationship among pigments formed by the action of peroxidae on ferulic acid and red sugar cane pigments was not observed.

18) The main component of pigments formed by the reaction of phenol with H M F (5-hydroxymethylfurfural) was suppose to be analogous to pigment C ($C_9H_8O_3$) isolated from the artificially reddened bagasses.

19) The difference in piscicidal activity among the pigments isolated was not evident, but it was rather clear in case of antimicrobial activity. Namely, the antimicrobial activity of pigmment B and C was so strong that no colonies were formed even after 72 hours.

（本論文の要旨は1972年度日本農芸化学会西日本支部大会で発表した）