

## 植物病原細菌の生理に関する研究

### 第3報 *Erwinia milletiae* によるD-ガラクトン酸、 2-ケト-D-ガラクトン酸およびペントン酸の生成

内 田 綱 ・ 鈴 木 幸 雄

さきに SUZUKI and UCHIDA(1965) は, *Erwinia amylovora* 群細菌が D-グルコースより多量の 2-ケトグルコン酸を生成蓄積することを認めて報告した. また *Erwinia carotovora* 群細菌が, D-グルコースより 2-ケトグルコン酸を生成せずに  $\alpha$ -ケトグルタル酸を生成することを認め, 糖代謝系が *Erwinia amylovora* 群細菌のそれとは相違していることを指摘した. また鈴木・内田(1965) は両群細菌の培養的, 生理的性質における類似点および相違点をも比較検討した. 本報では *Erwinia amylovora* 群の 1 細菌である *Erwinia milletiae* が D-ガラクトースより D-ガラクトン酸および 2-ケト-D-ガラクトン酸, L-アラビノースより L-アラボン酸, D-キシロースより D-キシロン酸, をそれぞれ生成することを認めたので報告する. *Erwinia* 属菌によるこれら有機酸の生成についてはいまだ報告がない.

本研究に際して, 赤外線吸収スペクトルの測定をしていただいた元岡山大学農学部の中村幸人氏に深謝する. また本研究を進めるにあたって, ご便宜を計ってくださった本研究所の小沢潤二郎教授および本研究にご協力くださった味野愛子氏に厚くお礼申し上げる.

### 実 験 方 法

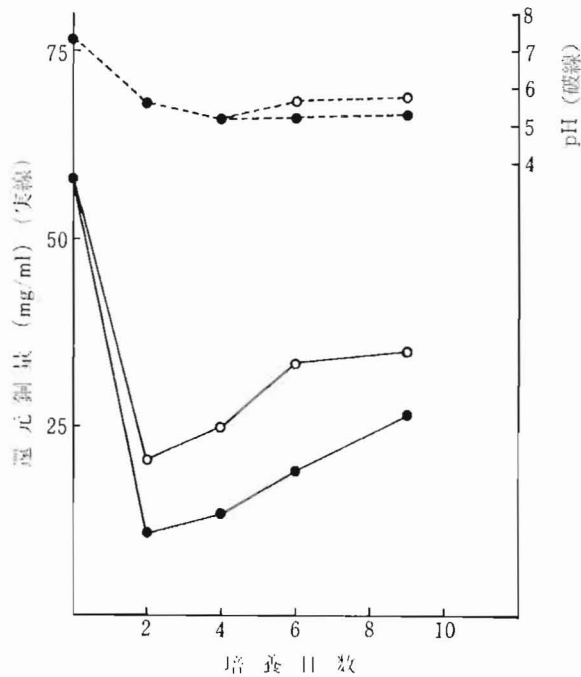
供試菌株としては SUZUKI and UCHIDA (1965) が藤の木のガン腫より分離した *Erwinia milletiae* No. 1 菌株を用いた. 糖の定量はベルトラン法によった. pH は日立-堀場 M-4 形 pH メーターを用いて測定した. 比旋光度は島津光電分光光度計付偏光測定装置を用いて測定した. D-ガラクトースおよび D-キシロースは半井化学薬品, D-アラビノースおよび L-アラビノースは Merck, D-アラボン酸カルシウムおよび L-アラボン酸カルシウムは K & K, のそれぞれ特級試薬あるいはそれに準ずるものを使用した. 生菌体懸濁液は, 以下のようにして調製した. すなわち D-グルコース 10%, ポリペプトン 0.3%, 酵母エキス 0.05%, リン酸水素二カリウム 0.1%, 塩化ナトリウム 0.2%, 硫酸マグネシウム 0.04%, および硫酸第一鉄 0.005% を含む培地を 500 ml 容振とうフラスコ 10 本にそれぞれ 100 ml ずつ分注して滅菌し, これに別に乾熱滅菌した対糖 40% 相当の炭酸カルシウムを無菌的に加え, さらに *Erwinia milletiae* の種菌 (スクロースを 2% の割合で加えたバレイショ汁 10 ml に *Erwinia milletiae* を 1 白金耳接種して, 28°C で 2~3 日間振とう培養を行なった発酵液) 2 ml を接種して 4 日間 28°C で振とう培養した. 培養後発酵液を低速で遠心分離して残存炭酸カルシウムを除去し, 得られた上層液を 10,000×g,

30分間遠心分離して菌体を集めた。菌体を0.9%塩化ナトリウム水溶液に懸濁し、1夜28°Cで振とう後遠心分離し、集めた菌体を純水で3回洗浄したのち純水に懸濁した。これを生菌体懸濁液(乾燥重量50 mg/ml)として使用した。

## 実験結果と考察

### I. D-ガラクトン酸および2-ケト-D-ガラクトン酸の生成

第1図に示すように、還元力は培養初期に急速に低下し、その後再び増加した。このような還元力の変化は、窒素源濃度が0.1%および0.5%のいずれの場合においても認められた。pHは培養2日目以降、5から6の間にあった。培養終了後分析を行なったところ、揮発酸量は酢酸として1 mg/ml以下であり、添加した炭酸カルシウムは明らかに溶



酵母エキス 0.1% : —●—●—, —●—●—  
 酵母エキス 0.5% : —○—○—, —○—○—

D-ガラクトース 3%, D-グルコース 0.1%, 酵母エキス 0.1% あるいは 0.5%, リン酸水素二カリウム 0.1%, 塩化ナトリウム 0.2%, 硫酸マグネシウム 0.04%, および硫酸第一鉄 0.005% を含む培地を 500 ml 容振とうフラスコ 10 本にそれぞれ 100 ml ずつ分注して滅菌し、これに別に乾熱滅菌した炭酸カルシウム 600 mg を無菌的に加え、さらに *Erwinia milletiae* の種菌 (スクロースを 2% の割で加えたバレイショ汁 10 ml に *Erwinia milletiae* No.1 菌株を 1 白金耳接種して、28°C で 2 日間振とう培養した発酵液) 2 ml を接種して 9 日間 28°C で振とう培養した。培養開始時、培養 2 日目、4 日目、6 日目、および 9 日目にそれぞれ振とうフラスコを 2 本ずつ採って分析に供した。

第1図 *Erwinia milletiae* による D-ガラクトースの酸化発酵の経過

解していた。また還元性物質はエーテル可溶部にほとんど見受けられず、エーテル不溶部に認められた。これらの結果および本菌がD-グルコースから多量の2-ケトグルコン酸を生成蓄積する事実から推測して、第1図における還元力が最低の時期(培養2日目)にD-ガラクトン酸、還元力が再増加した時期(培養9日目)に2-ケト-D-ガラクトン酸がそれぞれ蓄積していると考えられるので、各時期に培養を中止して発酵液からそれぞれの酸の単離を試みた。

#### (1) D-ガラクトン酸カルシウムの単離, 同定:

第1図に示した酵母エキスを0.1%含むD-ガラクトース(3%)培地を500ml容振とうフラスコ8本に100mlずつ分注, 滅菌し, これに *Erwinia milletiae* の種菌を2ml接種し, 炭酸カルシウムを添加後28°Cで振とう培養を行なった。培養2日後振とうフラスコ8本の発酵液を集め, 遠心分離して菌体および残存炭酸カルシウムを除去した。得られた上澄液の還元力は培養開始時(初糖)の19.0%であった。上澄液から第2図に示す方法により, 白色柱状の結晶G<sub>1</sub>を得た(収量5.99g)。結晶G<sub>1</sub>の一部をとって, 70°Cで24時間10<sup>-3</sup>mmHgのもとで乾燥後カルシウム量を求めた。

Found: Ca, 9.13%

Calcd. for (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>Ca: Ca, 9.31%

また結晶G<sub>1</sub>の赤外線吸収スペクトルは, Kiliani and Kleeman (1884)の方法によりD-ガラクトースを臭素酸化して調製したD-ガラクトン酸カルシウムの結晶標品(カルシウム含量: 9.15%)のそれとよく一致した(第3図)。また結晶G<sub>1</sub>の水溶液に, 計算量よりやや過剰のシュウ酸水溶液を加えて沸騰水浴上で3時間加熱後, 生じたシュウ酸カルシウムの沈殿物を除き, 上澄液をエーテル抽出にかけて過剰のシュウ酸を抽出, 除去し, ついでエーテル不溶部を炭酸カリウム水溶液で中和して減圧濃縮し, 濃縮液にエタノールを加えて白濁させ, 氷室に放置して結晶G<sub>2</sub>[mp: 147~150°C(分解発泡),  $[\alpha]_D^{20} = -9.1^\circ$  (c=9.0, 水)]を得た。別に合成D-ガラクトン酸カルシウムから同じ操作により調製したD-ガラクトン酸カリウムの結晶標品[mp: 148~150°C(分解)]は, 結晶G<sub>2</sub>と混融しても融点の降下を示さなかった。

#### (2) 2-ケト-D-ガラクトン酸カリウムの単離, 同定:

第1図に示した酵母エキスを0.5%含むD-ガラクトース(3%)培地に *Erwinia milletiae* を接種して9日間振とう培養を行なった。培養後振とうフラスコ20本の発酵液を集めて遠心分離した。得られた上澄液の還元力は初糖の60.3%であった。上澄液から第2図に示した方法により柱状の粗結晶を得た(収量23.7g)。この結晶を純水に溶解後活性炭を加えて脱色し, エタノールを加えて結晶を析出させ, 再結晶を2回くり返して白色柱状の結晶G<sub>3</sub>を得た。結晶G<sub>3</sub>はフェーリング溶液を還元し, その融点は138~140°C(分解)で2-ケト-D-ガラクトン酸カリウムの融点の文献値[朝井・相田・上野(1952)]と一致した。また結晶G<sub>3</sub>の一部をとって, 室温で24時間10<sup>-3</sup>mmHgのもとで乾燥後, 元素分析を行なった結果は, C, 28.92; H, 4.00; K, 15.95% (Calcd. for KC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>: C, 31.01; H, 3.91; K, 16.84%)であり,  $[\alpha]_D^{20} = -6.7^\circ$  (c=1.2, 水)であった。別にD-ガラクトン酸カリウムをRegna and Caldwell (1944)の方法により酸化して, 2-ケト-D-ガラクトン酸カリウムの合成産物を調製した。この合成産物の融点は138~140°C(分解)であり, 結

発酵液

—遠心分離して菌体および残存炭酸カルシウムを除去

上澄液

—4倍量のエタノールを添加  
—1週間氷室中に放置後遠心分離

沈殿物

—冷80%エタノールで洗浄後、減圧硫酸デシケーター中で乾燥

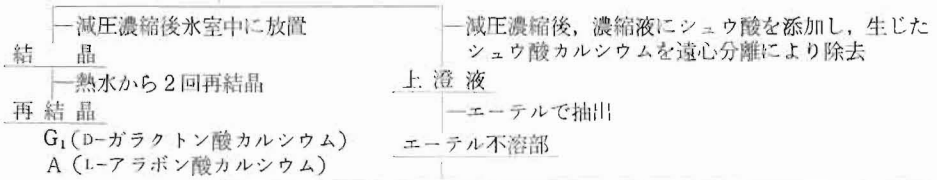
乾燥物

—熱水に溶解（不溶物は遠心分離により除去）

上澄液

—活性炭を加えて脱色

脱色液



—炭酸バリウムで中和後、3倍量のエタノールを添加

沈殿物

—水に溶解後、活性炭を加えて脱色

脱色液

—イオン交換樹脂アンバーライト CG-120 タイプ II(H<sup>+</sup>) のコラムに通過

通過液

—炭酸バリウムで中和後、濾過

濾液

—3倍量のエタノールを添加

沈殿物

—エタノールで再沈殿をくり返す

精製沈殿物

X<sub>1</sub> (D-キシロン酸バリウム)

—炭酸カリウムで中和

中和液

—イオン交換樹脂アンバーライト CG-400 タイプ II (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) コラムに吸着  
—N炭酸アンモニウムで溶出

溶出液

—イオン交換樹脂アンバーライト CG-120 タイプ II(H<sup>+</sup>) コラムに通過

通過液

—炭酸カリウムで中和後、濾過

濾液

—シラップ状にまで減圧濃縮後、濃縮液にエタノールあるいはアセトンを添加して氷室中に放置

結晶

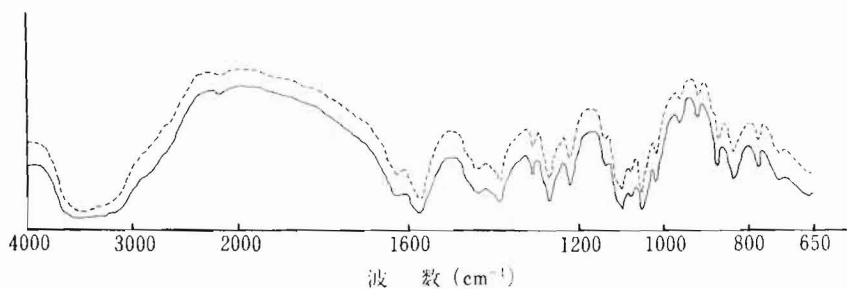
—水に溶解後、活性炭を加えて脱色  
—脱色液をシラップ状にまで減圧濃縮後、濃縮液にエタノールあるいはアセトンを加えて再結晶をくり返す

再結晶

G<sub>3</sub> (2-ケト-D-ガラクトン酸カリウム)

X<sub>2</sub> (還元性物質)

第2図 酸化発酵生成物の単離方法



— : 結晶標品 G<sub>1</sub>  
 - - - : 合成した D-ガラクトン酸カルシウムの結晶標品  
 第3図 D-ガラクトン酸カルシウムの赤外線吸収スペクトル (臭化カリウム錠剤)

晶 G<sub>3</sub> と混融しても融点の降下を示さなかった。また結晶 G<sub>3</sub> に計算量の硫酸を加えて減圧濃縮し、濃縮液にジオキサンを加え、生じた硫酸カリウムの沈殿物を除き、滲液を減圧濃縮して氷室に放置したところ、柱状結晶が析出した。この結晶を純水に溶解後活性炭を加えて脱色し、脱色液を減圧濃縮して氷室に放置し白色柱状の結晶を得た。本結晶の融点は 169~171°C であり、2-ケト-D-ガラクトン酸の融点の文献値 [朝井・相田・上野 (1952) ; Regna and Caldwell (1944)] と一致した。

以上の諸結果から結晶 G<sub>1</sub> および G<sub>3</sub> をそれぞれ D-ガラクトン酸カルシウム および 2-ケト-D-ガラクトン酸カリウムと同定した。

## II. L-アラボン酸の生成

第4図に示すように、L-アラビノースを炭素源とした場合には、還元力は培養2日後に初糖の1.7%にまで激減し、その後培養日数が経過しても還元力の増加はほとんど見られなかった。また添加した炭酸カルシウムは溶解し、酸の生成が見られた。L-アラビノースの代わりに D-アラビノースを炭素源とした場合には、還元力の減少は微弱であった。

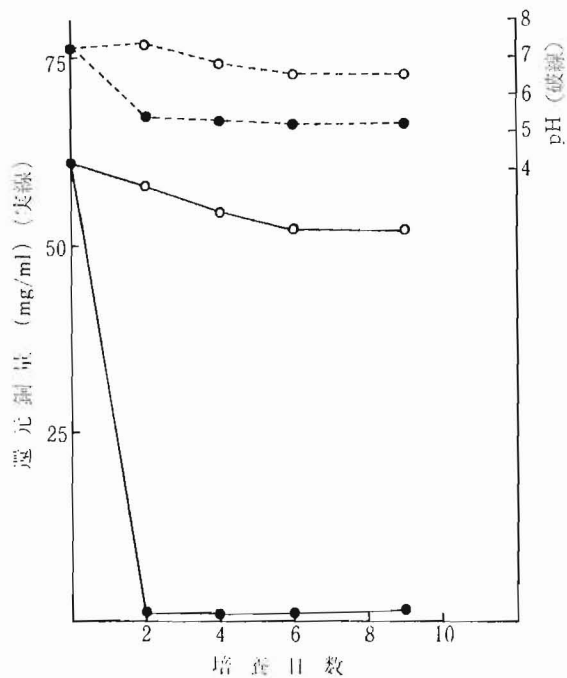
### L-アラボン酸カルシウムの単離、同定：

第4図に示した酵母エキスを0.5%含むL-アラビノース(3%)培地に *Erwinia milletiae* を接種して、2日間振とう培養を行なった。培養後振とうフラスコ3本の発酵液を集めて遠心分離した。得られた上澄液から第2図に示した方法により、針状の粗結晶を得た(収量3.96g)。この結晶を集めて熱水から2回再結晶をくり返し、白色針状結晶Aを得た。結晶Aの一部をとって、10<sup>-3</sup>mmHgの減圧下に70°Cで24時間乾燥後カルシウム量を求めた。

Found: Ca, 10.42%

Calcd. for (C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>6</sub>)<sub>2</sub>Ca: Ca, 10.82%

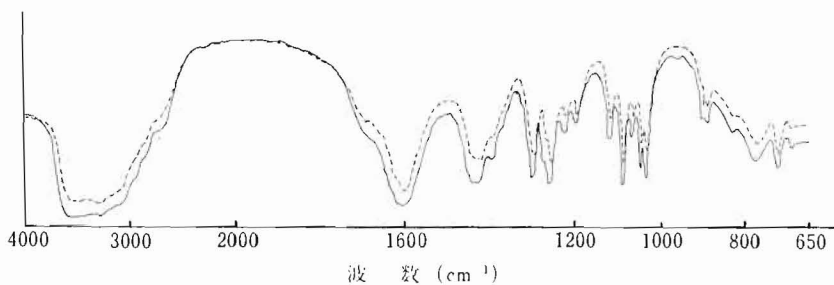
また結晶Aの赤外線吸収スペクトルは、市販のL-アラボン酸カルシウムを熱水より2回再結晶して得た結晶標品(カルシウム含量:10.34%)のそれとよく一致した(第5図)。また結晶Aを純水に溶解してアンバーライトCG-120(H<sup>+</sup>型)カラムに通過させ、通過液を炭酸カリウム水溶液で中和したのち東洋濾紙No.5cで自然滲過し、滲液をシラップ状にまで減圧濃縮した。濃縮液にエタノールを加えて粉末化したのち、減圧硫酸デシケーター中で乾燥した。この乾燥物を60%熱エタノールに溶解し、不溶物を滲過して除去したの



D-アラビノース：—○—○—  
 L-アラビノース：—●—●—

D-アラビノースあるいはL-アラビノース3%、D-グルコース0.1%、酵母エキス0.5%、りん酸水素二カリウム0.1%、塩化ナトリウム0.2%、硫酸マグネシウム0.04%、および硫酸第一鉄0.005%を含む培地を殺菌し、これに別に乾熱殺菌した炭酸カルシウムを0.6%加えたのち *Erwinia milletiae* を接種して28°Cで9日間振とう培養した。

第4図 *Erwinia milletiae* によるD-アラビノースおよびL-アラビノースの酸化発酵の経過



— : 結晶標品 A  
 - - - : 市販のL-アラボン酸カルシウムの結晶標品

第5図 L-アラボン酸カルシウムの赤外線吸収スペクトル (臭化カリウム錠剤)

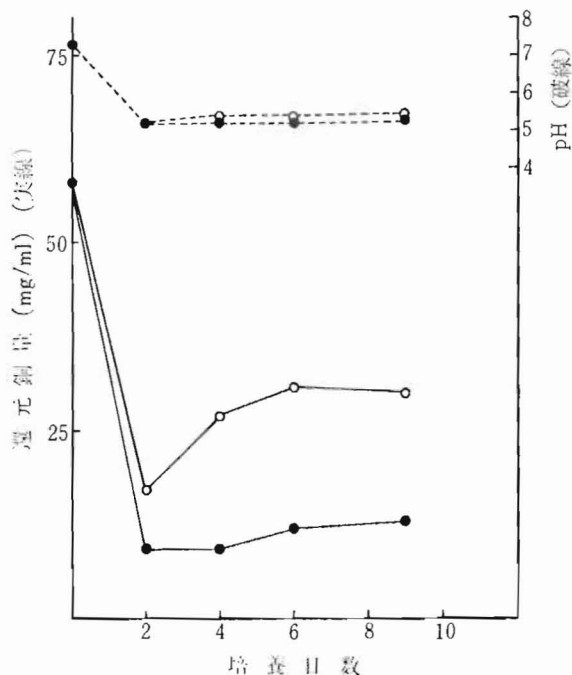
ち、滷液を氷室に放置して針状結晶を得た。この結晶を集め、60%エタノールから再結晶した。本結晶は mp 210~212°C (分解),  $[\alpha]_D^{20} = +4.9^\circ$  ( $c = 5.9$ , 水) であった。別に市販のL-アラボン酸カルシウムから同じ操作により調製したL-アラボン酸カリウムの結晶

標品の融点は 209~211°C であり、結晶 A から得たカリウム塩の結晶標品と混融しても、融点の降下は認められなかった。

以上の諸結果から、結晶 A を L-アラボン酸カルシウムと同定した。

### III. D-キシロン酸および還元性物質の生成

第 6 図に示すように、窒素源濃度が 0.1% の場合には、還元力は培養初期に激減したのち、培養日数とともに微弱ながら上昇した。窒素源濃度が 0.5% の場合には、還元力は培養初期に激減したのち再増加した。窒素源濃度が 0.1% および 0.5% のいずれの場合においても、添加した炭酸カルシウムは溶解し、酸の生成が見られた。*Erwinia milletiae* を D-ガラクトース培地に振とう培養すると、還元力が最低の時期に D-ガラクトン酸、還元力が再増加した時期に 2-ケト-D-ガラクトン酸がそれぞれ生成蓄積した。前述の実験結果から推測して、D-キシロース培地に *Erwinia milletiae* を培養した場合には、還元力の最低および再増加時にそれぞれ D-キシロン酸および 2-ケト-D-キシロン酸が生成蓄積していると考えられるので、各時期に培養を中止してそれぞれの酸の単離を試みた。



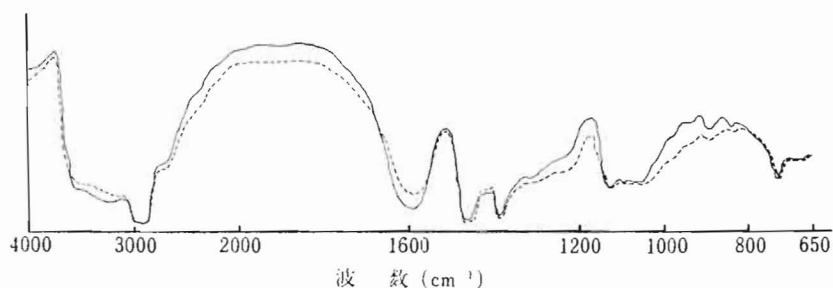
酵母エキス 0.1% : ●—●—●—, ●—●—●—  
 酵母エキス 0.5% : ○—○—○—, ○—○—○—

D-キシロース 3%, D-グルコース 0.1%, 酵母エキス 0.1% あるいは 0.5%, リン酸水素二カリウム 0.1%, 塩化ナトリウム 0.2%, 硫酸マグネシウム 0.04%, および硫酸第一鉄 0.005% を含む培地を殺菌し、これに別に乾熱殺菌した炭酸カルシウムを 0.6% 添加したのち *Erwinia milletiae* を接種して 28°C で 9 日間振とう培養した。

第 6 図 *Erwinia milletiae* による D-キシロースの酸化発酵の経過

### (1) D-キシロン酸バリウムの単離, 同定:

第6図に示した酵母エキスを0.1%含むD-キシロース(3%)培地に *Erwinia milletiae* を接種して, 2日間振とう培養を行なった. 培養後振とうフラスコ10本の発酵液を集めて遠心分離した. 得られた上澄液の還元力は初糖の15.5%であった. 上澄液から第2図に示した方法により白色粉末  $X_1$  を得た(収量7.26g).  $X_1$  は  $[\alpha]_D^{20} = +10.0^\circ$  ( $c = 4.5$ , 水)であった. また  $X_1$  の赤外線吸収スペクトルは, Kiliani and Kleeman (1884) の方法によりD-キシロースを臭素酸化して調製したD-キシロン酸バリウムのそれと一致した(第7図). また  $X_1$  の水溶液をアンバーライトCG-120 ( $H^+$ 型) カラムに通過させ, 通過



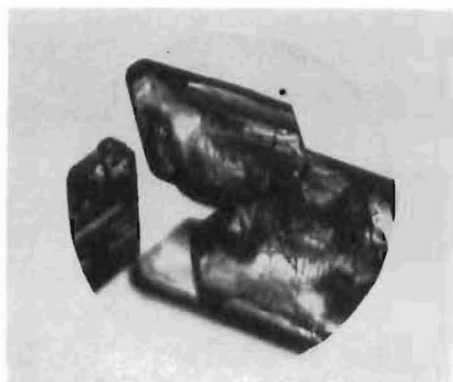
第7図 D-キシロン酸バリウムの赤外線吸収スペクトル (Nujol)

液をエタノールに溶解した8%ブルシン溶液で中和し, 中和液中の過剰のブルシンをクロロホルムで除去したのち, 得られた水層をシラップ状にまで沸騰水浴上で濃縮し, 濃縮物を熱エタノールに溶解して氷室に放置したところ, 針状結晶が析出した. この結晶を集めて熱エタノールから再結晶を2回くり返して, 白色結晶 ( $mp: 172\sim 174^\circ C$ ) を得た. 本結晶を室温で24時間,  $10^{-3} mmHg$  のもとで乾燥後元素分析を行なった. 元素分析値: C, 59.01; H, 6.71; N, 4.88% (Calcd. for  $C_5H_{10}O_6 \cdot C_{23}H_{26}O_4N_2$ : C, 59.99; H, 6.47; N, 5.00%). 以上の諸結果から,  $X_1$  をD-キシロン酸バリウムと同定した.

### (2) 還元性物質の単離:

第6図に示した酵母エキスを0.5%含むD-キシロース(3%)培地に *Erwinia milletiae* を接種して6日間振とう培養を行なった. 培養後振とうフラスコ10本の発酵液を集めて遠心分離した. 得られた上澄液の還元力は初糖の52.6%であった. 上澄液から第2図に示した方法によりアンバーライトCG-120 ( $H^+$ 型) カラムの通過液を得, 炭酸カリウム水溶液で中和後, 中和液を東洋濾紙 No. 5c を用いて自然濾過し, 濾液を減圧濃縮した. 濃縮物に4倍量のアセトンを加え, 生じた沈殿物を濾別して集め, 純水に再溶解後活性炭で脱色し, 4倍量のアセトンを加えて再沈殿させる操作を2回くり返し, ついでアセトンをわずかに白濁するまで加えて氷室に約6カ月間放置したところ, 白色柱状の結晶  $X_2$  を得た.  $X_2$  はフェーリング溶液を還元した. 現在  $X_2$  の同定を進めている. 上述の諸結晶の写真を第8図に示す.

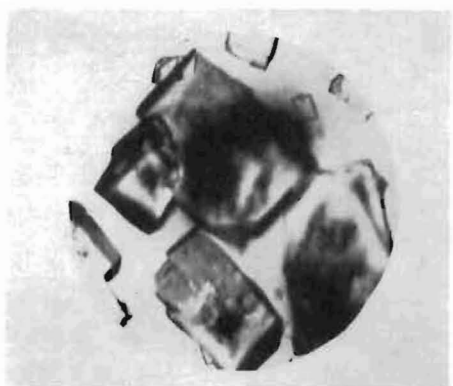




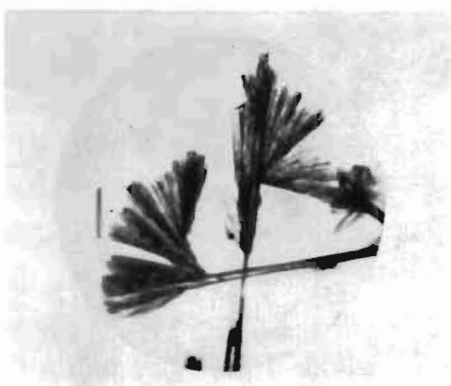
D-ガラクトン酸カルシウム



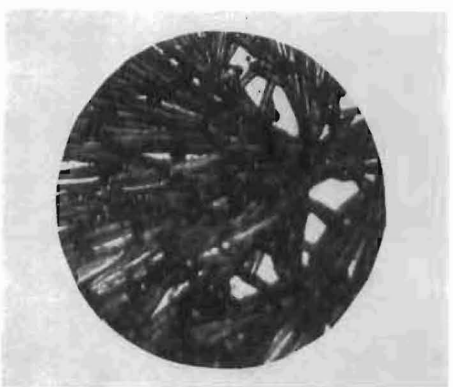
2-ケト-D-ガラクトン酸



2-ケト-D-ガラクトン酸カリウム



L-アラボン酸カルシウム

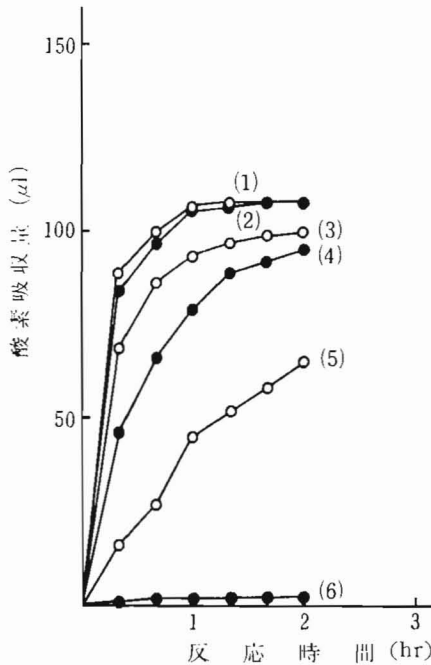


D-キシロースから生成した還元性物質

第8図 各種の酸化発酵生成物の結晶の写真

#### IV. 生菌体による各種の糖類の酸化

生菌体懸濁液による各種の糖類の酸化をワールブルグ検圧計を用いて調べた。第9図に示すように、D-ガラクトース、D-キシロース、L-アラビノース、D-ガラクトン酸カルシウム、およびD-キシロン酸バリウムを基質とした場合には酸素吸収が起こったが、D-アラビノース、D-アラボン酸カリウム（市販のD-アラボン酸カルシウムより調製）、L-アラボン酸カリウム、2-ケト-D-ガラクトン酸カリウム、およびD-キシロースから得た還元性物質からは酸素吸収が認められなかった。



ワールブルグ検圧計のフラスコ主室に基質（糖類）5あるいは10μmoles、りん酸緩衝液（pH 6.0）50μmoles、硫酸マグネシウム 2.5μmoles；フラスコ側室に *Erwinia milletiae* の生菌体懸濁液 0.5ml；フラスコ副室に 15% 水酸化カリウム 0.2ml をそれぞれ入れ、全量を 2.6ml とした。フラスコをつけたマンオメーターを 30°C の恒温水槽中で 15 分間振とうし、恒温水槽の温度と平衡になった後、基質と生菌体懸濁液を混合して、30°C の空气中で反応した。測定値から自家呼吸量を差引いた値を酸素吸収量とした。

- (1) D-キシロース (5μmoles)
- (2) D-ガラクトース (5μmoles)
- (3) L-アラビノース (10μmoles)
- (4) D-ガラクトン酸カルシウム (10μmoles)
- (5) D-キシロン酸バリウム (10μmoles)
- (6) D-アラビノース、D-アラボン酸カリウム、L-アラボン酸カリウム、2-ケト-D-ガラクトン酸カリウム (10μmoles) および D-キシロースから生成した還元性物質 (2.0 mg)

第9図 *Erwinia milletiae* の生菌体による各種の糖類の酸化

#### 要 約

藤の木のガン腫より分離した植物病原細菌 *Erwinia milletiae* が、振とう培養においてD-ガラクトースよりD-ガラクトン酸および2-ケト-D-ガラクトン酸、L-アラビノースよりL-アラボン酸、D-キシロースよりD-キシロン酸および酸性的還元性物質、をそれぞれ生成することを認めた。

#### 文 献

- 朝井勇寛・相田 浩・上野靖博. 1952. 酸化細菌に関する研究. 第5報 Galactose より 2-Keto-galactonic Acid の生成に就て. 農化誌. 26: 625—630.
- Kiliani, H. and Kleeman, S. 1884. Ber. 17: 1296. Green, J.W. 1948. The Halogen Oxidation of Simple Carbohydrates, Excluding the Action of Periodic Acid. Advances

- in Carbohydrate Chemistry 3: 129—184.
- Regna, P. P. and Caldwell, B. P. 1944. The Preparation of 2-Ketopolyhydroxy Acids. J. Amer. Chem. Soc. 66: 243—244.
- SUZUKI, Y. and UCHIDA, K. 1965. Microbiological Studies on Phytopathogenic Bacteria. Part I. On 2-Ketogluconic Acid Fermentation by the Bacteria belonging to the *Erwinia amylovora* Group. Agr. Biol. Chem. 29: 456—461. Part II. Comparative Studies on Oxidative Fermentation by Various Species of the Genus *Erwinia*. Agr. Biol. Chem. 29: 462—470.
- 鈴木幸雄・内田 綱. 1965. 植物病原細菌の生理に関する研究. *Erwinia* 属細菌の分類と酸化的糖代謝. 農学研究 51: 9—22.