

硬化病菌(紫赤きょう菌)による代謝生産物について

誌名	蠶絲試験場報告 = Bulletin of the Imperial Sericultural Experiment Station
ISSN	03712931
著者名	島,万治郎 鈴木,誠
発行元	農林省蠶絲試験場
巻/号	15巻10号
掲載ページ	p. 587-593
発行年月	1960年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



硬化病菌(紫赤きょう菌)による代謝 生産物について

農林技官 嶋 万治郎

農林技官 鈴木 誠

目 次

	頁
I. 緒 言	587
II. 実験の部	588
1. 蚕体, 絹糸腺を用いた場合の生成物	588
(1) 培養液の調製並びに培養	588
(2) 醱酵生産物の分離	588
A. エーテル可溶部	
B. エーテル不溶部	
(3) 性 状	588
a. エーテル可溶部 (反応, ペーパークロマトグラム, 融点, 元素分析値)	
b. エーテル不溶部 (反応, ペーパークロマトグラム, 融点, 元素分析値)	
2. 合成培養液を用いた場合の生成物	590
(1) 培養液の調製並びに培養	590
(2) 醱酵生産物の分離	590
A. エーテル可溶部	
B. エーテル不溶部	
(3) 性 状	590
a. エーテル可溶部 (反応, ペーパークロマトグラム, 融点, 元素分析値)	
b. エーテル不溶部 (反応, 融点, 旋光度, 元素分析, 誘導体)	
III. 総 括	592
IV. 文 献	592
<i>Résumé</i>	593

I. 緒 言

著者らはさきに硬化病菌について種々の培地を用いたときの代謝生産物を検索し紫赤きょう菌はシュウ酸以外の物質を生産することを報告した。紫赤きょう菌の酵素作用が強力であることを知り得たので今回この菌について蚕体, 絹糸腺及び合成培養基を使用して代謝生産物の検索を行った。その結果は蚕体, 絹糸腺の内容物の分解によるコハク酸及び各種アミノ酸の集積を認め, また合成培養基からはコハク酸並びに多量の D-マンニット

を生成することを認めたのでその結果を報告する。また清酒酵母によりシヨ糖を炭素源として D-マンニットを生産したとの報告¹⁾がある。なお D-マンニットについては多数の報告がある。

II. 実験の部

1. 蚕体 (本報告においては蚕体から消化液, 体液, 絹糸腺を除いた残部を蚕体とする), 絹糸腺を用いた場合の生成物

蚕に寄生する硬化病菌のうち紫赤きょう菌はシュウ酸以外のものを生成すると考えられるので健康な蚕を使用しこれを殺菌し無菌の条件のもとに紫赤きょう菌を接種培養しその分解生産物について実験を行なった。すなわち 5 齢 3 日目 (日 112 号×支 110 号) の蚕を用い蚕体及び絹糸腺について紫赤きょう菌を接種しその代謝生成物の検索を行なった。

(1) 培養液の調製並びに培養

蚕体培養液: 蚕体 25 頭を殺菌した 200 cc 容三角フラスコに 2 本ずつとり井水 50 cc を添加する。

絹糸腺培養液: 絹糸腺を 2 回蒸留水で洗浄し, 殺菌した 1 l 容の広底三角フラスコ 7 本におのおの 50 頭分の絹糸腺をとり蒸留水 500 cc を添加する。

培養: 培養液は 120°C で 40 分間殺菌した後, 紫赤きょう菌 1 白金耳を接種し 27~31°C で 30 日間培養した。

なお蚕体培養液の培養前の pH は 5.2, 培養後の pH は強アルカリ性, 絹糸腺培養液は培養後 pH 8.2 であった (pH は 東洋濾紙水素イオン紙による)。

(2) 醗酵生産物の分離

A. エーテル可溶部: 醗酵液を濾過して菌蓋を分け菌蓋は熱水にて数回水洗し洗液は母液と合併する。これを減圧蒸留により濃縮し 1:1 の硫酸にて硫酸酸性とし液体浸出器を用いエーテル抽出を長時間行なう。しかる後エーテルを駆逐すると油状質とともに結晶体が得られる。この結晶は水にやや難溶性であるが, 熱水に容易に溶けるから熱水に溶解し粗脂肪を濾別し, 再度湯煎上にて濃縮すると結晶が析出する。

この結晶を集め, 水に溶解し少量の活性炭を加え脱色を行なうと無色板状の結晶が得られる。収量は蚕体培養液から粗結晶約 0.06 g, 絹糸腺培養液からは微量であった。

B. エーテル不溶部: 絹糸腺培養液の場合のエーテル不溶部はエーテルを駆逐後, 炭酸カルシウムを加え中和し硫酸カルシウムを除き, 濾液は減圧濃縮し, 再び析出する硫酸カルシウムの沈澱を除き, 濾液に塩基性酢酸鉛及び酢酸鉛を加え蛋白質その他の夾雑物を除き, その濾液に硫化水素を通じ硫化鉛を除いた濾液は淡黄色にして減圧濃縮シロップ状とする。数日間放置し結晶の析出するのをまったが結晶が現われなかったから冷凍乾燥すると甘味を有する淡黄色の粉末が得られ, この物質は非常に吸湿性に富み収量約 10 g である (蚕体培養液については追求しなかった)。

(3) 性状

a. エーテル可溶部の結晶についてその性状を分析した結果は次の通りである。

反応: 本物質は塩化鉄により褐色の沈澱を生じ, アンモニヤを加え乾燥するまで加熱蒸発し塩酸にて湿ったマッチ棒を挿入すれば紅色を与える。冷水にやや難溶なれど熱すれば

容易に溶解し快酸味を有す。

ペーパークロマトグラム：東洋濾紙 No. 50 を用い溶媒として *n*-ブタノール，ギ酸，蒸留水を 4:1.5:1 の割合に混合し，水層を除去した溶液を用いる。

検体の水溶液を原点にうち上昇法により約 30 cm 展開した後，風乾 0.1% ブロームフェノールブルーの酒精溶液を吹きつけ発色検出すると次の結果が得られる。

エーテル可溶部から得られる物質の R_f 値

培養液の種類	R_f 値
蚕体培養液からの検体	0.78
絹糸腺培養液 //	0.74

また標準としてコハク酸を用いた場合の R_f 値は 0.73 であった。

融 点：

蚕体培養液からの検体の融点	181~182°C
混融点	183°C

また標準としてコハク酸を用いた場合の融点は 185°C であった。文献²⁾によれば 185~187°C で検体の融点とほぼ一致する（未補正以下同様。絹糸腺の場合は僅少につき測定しない）。

元素分析値

蚕体培養液のエーテル可溶部から得られた結晶の元素分析の結果は次の通りである。

供試量	CO ₂	H ₂ O	C	H
1.919 mg	2.804 mg	0.880 mg	39.85%	5.130%
1.120	1.638	0.480	39.89	4.795
平均			39.87	4.962
C ₄ H ₆ O ₄ としての計算値は			40.66	5.12

b. エーテル不溶部：絹糸腺培養液のエーテル不溶部から得られた物質についてその性状を分析した結果は次の通りである。

反応：甘味を有し吸湿性に富み，クロロホルム，酒精等に溶解せず，硫酸アンモニヤにより沈澱を生じない。フェーリング液によって紫赤色に変ず。またビューレット，ニンヒドリン反応は陽性である。

ペーパークロマトグラム：東洋濾紙 No. 50 を用い溶媒としてフェノール 0.1%，アンモニヤ水 85:15 の混合液を用い検体の水溶液を原点にうち上昇法により約 30 cm 展開した後風乾し *n*-ブタノールの飽和溶液にて 2 次元展開を行ない風乾後 0.2% ニンヒドリンの *n*-ブタノール溶液を吹きつけ発色検出すると次のような結果が得られた。

アミノ酸の R_f 値

溶媒	フェノール (第 1 次元)	<i>n</i> -ブタノール (第 2 次元)
アミノ酸		
アスパラギン酸	0.14(±)	0.02
グルタミン酸	0.24(+)	0.06
ゼ リ ン	0.30(卍)	0.04
グ リ シ ン	0.41(卍)	0.04
ア ラ ニ ン	0.65(卍)	0.05
チ ロ シ ン	0.61(卍)	0.13
バ リ ン	0.78(卍)	0.15
フェニールアラニン	0.87(+)	0.26
ロ イ シ ン	0.83(+)	0.36

注. ±, +, 卍, 卍は呈色程度を示す

アスパラギン酸, グルタミン酸, セリン, グリシン, アラニン, チロシン, バリン, フェニールアラニン, ロイシン等 9 種のアミノ酸及び未知の 2 種の黄色のスポットが得られた。絹糸腺培養液のエーテル不溶部から得られた物質は多くの夾雑物を含有している。

2. 合成培養液を用いた場合の生成物

蚕体及び絹糸腺培養液の分解から得られる物質はコハク酸及びアミノ酸の集積を認めたので, 合成培地を使用してこれら以外の物質が得られるものと考え, 次のような培養条件のもとで試験を行なった。

(1) 培養液の調製及び培養

合成培養液: グルコース 100g, 第一リン酸カリ, 第二リン酸カリ 0.15g, 硫酸マグネシウム, 塩化カリ 0.1g, 塩化鉄, 食塩痕跡, ペプトン 10g に蒸留水を加え 1l に満たす。この培養液を殺菌した広底三角フラスコに 300cc ずつ 2本に分注する (培養液の組成: 培養前 pH 5.5, グルコース 9.15% : 培養後 pH 4.4, 残糖分 2.21%)。

培養液は 120°C で 40 分間殺菌した後紫赤きょう菌を 1 白金耳ずつ接種し, 27~31°C で 30 日間培養した。

(2) 醱酵生産物の分離

A. エーテル可溶部: エーテル可溶部の分離は 1. (2) A. の場合と同様の操作により結晶体が得られる。

B. エーテル不溶部: エーテル不溶部はエーテルを駆逐後炭酸カルシウムで中和し硫酸を除き減圧濃縮し, 再度析出する硫酸カルシウムを除去し濃縮シロップ状とする。濃縮シロップに少量の水を加え溶解し計算量の酒精を加え 80% に調製する。良く攪拌し一夜放置し 80% 酒精のみを集める。80% 酒精部はさらに新しい同濃度の酒精にて洗浄し液は合併し濃縮シロップ状とし, 少量の水を加え溶解し不溶部を除き濾液に活性炭を加え, 酒精濃度 80% に調製し良く攪拌した後, 冷蔵庫に 1 夜放置すると絹糸光沢を有する白色針状の結晶が析出する。この結晶を集め冷酒精にて洗い乾燥したものについて分析を行なった。収量約 5g である。

(3) 性 状

a. エーテル可溶部: エーテル抽出より得られたエーテル可溶部の結晶についてその性状を分析した結果は次の通りである。

反応: 本物質は 1. (3) と全く同様な反応を示した。

ペーパークロマトグラム: 1. (3) と同様な方法によって得られる物質の R_f 値は 0.74, また標準としてのコハク酸の R_f 値は 0.73 でよく一致する。

融 点:

エーテル可溶部の検体の融点	176~178°C
混融点	178~179°C

また標準としてのコハク酸の融点は 185°C であった。

元素分析値

供試量	CO ₂	H ₂ O	C	H
3.372 mg	4.943 mg	1.532 mg	39.98%	5.083%

3.460	5.026	1.502	39.61	4.857
平均			39.79	4.970
C ₄ H ₆ O ₄ としての計算値			40.66	5.12

b. エーテル不溶部：エーテル不溶部より得られた物質についてその性状を分析した結果は次の通りである。

反応：本物質は甘味を有し，水，酒精に可溶，フェーリング液を還元しないが，硝酸をもって酸化したものは還元する。燃焼により灰分なく白色針状の結晶である。

融点：

エーテル不溶部の検体の融点	166°C
混融点	165°C

また標準としてメルク製 D-マンニットを用いた場合の融点は 165~166°C である。また Braham⁶⁾ 氏 166.05°C, Favre⁴⁾ 氏 166°C で検体の融点と全く一致する。

旋光度の測定

マンニットには D-, L-, DL-, マンニットが存在するが Vignon⁵⁾ 氏によれば水 100 部，マンニット 10 部，ホウ砂水溶液 12.8 部の水溶液にて D-マンニットは $[\alpha]_D^{20} = +22.5^\circ$ である。また S. Edition⁶⁾ 氏は 10 g のマンニットール，12.8 g のホウ砂及び水で 1 時間後 24° で $[\alpha]_D^{20} = +23^\circ$, E. Fischer⁷⁾ 氏は $[\alpha]_D = +28.3^\circ$ であると，測定値はいろいろである。著者らは日本工業標準規格，薬品分析法 JISK⁸⁾ 8882, (1957) に準じて旋光度を測定した。

検体 1.50 g をホウ砂の結晶 1.92 g とともに水に溶かし 25 cc となし 1 時間後 20 cm 測定管を用いて測定した。ただし温度は 20°C，液層 20 cm とする。

$$\alpha = +2.45$$

$$[\alpha]_D^{20} = + \frac{100 \times 2.45}{2 \times 6.00} = +20.4^\circ$$

また標準としてメルク製 D-マンニット 2.00 g を用いて測定した場合の旋光度は

$$\alpha = +3.49$$

$$[\alpha]_D^{20} = + \frac{100 \times 3.49}{2 \times 8.00} = +21.8^\circ$$

にして実験数は D-マンニットにほぼ一致する。

元素分析値

無水リン酸中で恒量にいたるまで乾燥したのものについて元素分析を行なった結果は次の通りである。

供試量	CO ₂	H ₂ O	C	H
2.577 mg	3.765 mg	1.592 mg	39.85%	6.912%
2.109	3.080	1.375	39.83	7.130
平均			39.84	7.021
C ₆ H ₈ (OH) ₆ としての計算値			39.54	7.75

D-マンニットの誘導体

ヘキサアセチルマンニット：検体を等量の無水酢酸と溶融した塩化亜鉛の小片を加え温

めて溶解し冷却後エーテルを注ぎ酢酸エステルの析出する結晶を集める。この結晶は無色斜方形結晶にして融点は $122\sim 123^{\circ}\text{C}$ で FRANCHIMONT⁹⁾ 氏の融点 120°C とほぼ一致する。

トリベンデルマンニット：検体を少量の濃塩酸に溶解し振盪しつつベンデルアルデヒドを少量加えると白色の結晶が析出する。この結晶は温酒精に可溶性であるから温酒精に溶解し冷却再結すると白色針状の結晶が得られる。この誘導体は水、酒精、酸及びアルカリに不溶である。この誘導体の融点は $218\sim 222^{\circ}\text{C}$ で E. FISCHER, I. W. FAY¹⁰⁾ 氏らの融点 $218\sim 222^{\circ}\text{C}$ に一致する。

元素分析値、融点及び誘導体その他の性質を考慮するとエーテル可溶部及びエーテル不溶部からの結晶はコハク酸 D-マンニットによく一致する結果が得られ、メルク製品のコハク酸、D-マンニットと比較対照して全く一致した結果が得られた。

III. 総 括

硬化病菌の 1 種紫赤きょう菌の代謝生産物の検索を行なった結果を総括すると次の通りである。

1. 紫赤きょう菌は蚕体培養液、絹糸腺培養液及び合成培養液の醱酵生産物としてエーテル可溶部より収量の差はあるがコハク酸を生成する。

2. 絹糸腺培養液の醱酵生産物としてエーテル不溶部から夾雑物を含むが絹糸腺内容物の分解による各種のアミノ酸の集積を認める。エーテル可溶部からは結晶析出するも定性のみにとどめた。

3. 合成培養液の醱酵生産物としてエーテル不溶部から多量の D-マンニットを生成することを認めた。

終りにのぞみ硬化病菌株をご恵与下さった 病理部青木 清博士と 元素分析を担当していただいた神戸文子氏に深謝いたします。

IV. 文 献

- 1) 大崎 正雄 (1938): 醸造学雑誌, 16, 598.
- 2) Sixth. Edition (1952): The Merk index, 914.
- 3) BRAHAM (1919): Am. Soc., 41, 1709.
- 4) FAVRE (1844): Ann. Chem. phys., 11, 71.
- 5) VIGNON (1893): Beilstein Handbuch der Organischen Chemie B. 1, 184.
- 6) Sixth. Edition (1952): The Merk index, 602.
- 7) FISCHER, E. (1890): Ber., 23, 385.
- 8) JISK (1957): 8882.
- 9) FRANCHIMONT (1879): Ber., 12, 2059.
- 10) FISCHER, E. & I. W. FAY (1895): Ber., 28, 1979.

Résumé

On the Metabolic Products of Muscardine (*Spicaria rubido-purpurea* AOKI).

By

Manjiro SHIMA and Makoto SUZUKI

1. The current work was carried out to elucidate metabolic products of *Spicaria rubido-purpurea* AOKI, one of the muscardines, which was cultured on the silkworm body, the silk glands including the silk-substance and the artificial culture fluid (glucose 100 g, peptone 10 g, KH_2PO_4 0.15 g, K_2HPO_4 0.15 g, MgSO_4 0.1 g, CaCl_2 0.1 g, KCl 0.1 g and a bit of FeCl_3 and NaCl in 1l H_2O).

2. Succinic acid was always isolated from the ether extract of the fermentation fluid that the fungi was cultured on the silkworm body, the silk glands including the silk-substances or the artificial culture fluid, but its amount varied with the culture mediums.

3. Many kinds of the amino acid were isolated from the non ether extracts of the fermentation fluid that the fungi was cultured on the artificial culture fluid, showing that the amino acids were probably derived from the silk-substances.

4. A larger amount of D-mannit was isolated from the non ether extracts of the fermentation fluid that the fungi was cultured on the artificial culture fluid.

(*The Sericultural Experiment Station, Suginami-ku, Tokyo*)