假性酸化細菌に就て (第1報) 新しい酸化細菌の選擇

池 田 庸 之 助 (東京大學農學部農藝化學科)

昭和 25 年 2 月 15 日 受理

Studies on the Pseudooxidative Bacteria. Part 1. Selection of New Oxidative Bacteria

By Yonosuke IKEDA (Dept. of Agr. Chem., University of Tokyo)

從來酸化細菌と云われていたものは主として醋酸菌, グルコン酸菌であつたのであるが, 最近これらの他に *Pseudomonas*, *Phytomonas* 屬細菌等が糖類やアルコール類を酸化する能力のある事がソ連の PERVOZVANSKII⁽¹⁾⁽²⁾ やアメリカの LOCKWOOD⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾ 等により發見され, その生産物の中には 2-ケトグルコン酸, α -ケトグルタル酸, ラクトビオン酸等の有用なものも含まれている. 著者も 1945 年來この方面の研究に従事し, 菌學的生理的性質を検討した結果, 最近これらの菌を在來の醋酸菌, グルコン酸菌と對比し得るようになったので以下數報に互り報告する. 尙標題の假性酸化細菌 (*Pseudooxidative bacteria*) とは新しく登場した *Pseudomonas*, *Phytomonas*, *Serratia* 屬菌等を在來の醋酸菌, グルコン酸菌と區別するため著者が採用した名稱であつて詳細は後報で觸れることとする.

1. 醋酸菌, グルコン酸菌以外の酸化細菌の選擇

酸化細菌の酸化を廣い意味にとれば非常に多くの範圍に及ぶが, こゝでは在來の慣習に従い第一次乃至第二次酸化生産物として有用な生産物を比較的多量につくる菌として選擇を行つた. 従つて生産物の分離確認を行い, 酸化生産物に該當する物質を生成する菌を酸化細菌とした.

實 験 の 部

供試菌株としては東大坂口研究室保管の菌株 38 株 (いずれも好氣性乃至偏性好氣性菌), 傳研 遠山博士より譲與された 1 株 (*Ps. oryzae*), 著者分離の 1 株 (*Ps. gluconicum*), 併せて 40 株を用いた.

實驗方法は基質として 2% のグルコース, グルコン酸石灰, マンニット, エタノールを選び, 窒素源としては 0.5% の酵母水 (N 含量 100cc 中 0.0625g) を用い, 液層 0.7~0.9 cm (100cc 容三角壺に 20cc, 又は 300cc 容三角壺に 50cc), 25~30°C, 14 日間培養し, グルコース及びエタノールからは酸の生成の有無を, グルコン酸石灰, マンニットからはケトン化合物生成の有無を先ず検討した. 次にこの條件に適するものより生成酸量及び生成ケトン量最も多いものを選び, これらに就き酵母水の濃度をかえて酸化生産物生成の條件を知り, 最後に好適條件下で培養し生産物の分離證明を行つた. 第 1 表には豫備選擇の結果を示す.

Table 1. Selection of Oxidative Bacteria

Substrate Organism	Glucose		Ca gluconate		Mannitol		Ethanol	
	pH	Acidity*	pH	Reducing power**	pH	Reducing power**	pH	Acidity*
<i>B. aquatilis subtilus</i>	6.3	-0.04	6.3	4.3	6.6	9.3	6.6	-0.06
<i>B. aroidae</i> Kyodai	4.1	0.44	6.4	0	4.6	0	5.6	0.03
<i>B. carotovorus</i> Helf	5.1	0.08	6.2	0			5.9	-0.06
" " Johns	4.3	0.46	6.6	0	4.5	0	5.0	0.28
" " Kyodai	4.6	0.48	6.6	0	4.6	0	5.0	0.14
<i>B. denitrificans</i>	5.2	0.06	6.3	0	7.5	0	6.2	-0.06
<i>B. communis coli</i>	4.0	0.84	4.8	0	7.1	0	6.0	-0.03
<i>B. fitchii</i>	5.1	0.12	6.4	0	7.5	0	6.2	-0.04
<i>B. mycoides</i> (249)	5.4	0.06	6.2	0	6.5	0	6.2	0.04
" " <i>roseus</i>	5.4	-0.04	6.6	0	6.3	17.1	6.5	-0.08
<i>B. mesentericus fuscus</i>	5.2	0.06	6.6	0	4.8	5.7	6.5	0

<i>B. mesentricus ruber</i>	5.1	0.08	6.4	0	5.3	trace	6.2	-0.02
" " <i>vulgatus</i>	5.3	0.04	6.4	0	5.5	22.8	5.5	-0.02
" " Piokowsky	4.9	0.08	6.0	0	5.2	21.0	6.4	-0.08
<i>B. megatherium</i> De Bang	5.3	0.04	6.4	0	5.5	15.3	6.4	-0.08
" " <i>pumulus</i>	5.3	0.06	6.4	0.8	6.6	0	6.2	0.02
" " <i>roseus</i>	5.0	0.12	6.4	0	5.5	14.9	6.0	0
" " <i>saufelice</i>	5.4	0.02	6.3	0	5.4	0	6.4	-0.04
<i>B. milletiae</i> b	5.3	0.10	6.3	0	5.4	24.3	6.1	-0.04
<i>B. muscos capsulatus</i>	5.4	0	6.0	0	5.9	12.8	5.6	0.06
<i>B. neopoliticus</i>	4.3	0.20	6.3	0	6.2	0	6.4	-0.04
<i>B. oxaliticus</i>	5.4	0.10	6.6	0	5.6	9.8	6.3	-0.06
<i>B. proteus</i> Hauser	5.6	0	6.2	0	5.6	8.7	6.3	0.06
<i>B. subtilis</i> 106	5.6	-0.08	6.3	3.6	7.4	0	5.6	0
" " Hannover	5.1	0.06	6.1	0	7.5	0	6.2	-0.02
<i>B. tumefaciens</i>	5.4	-0.02	6.4	0	5.7	18.0	6.4	-0.02
<i>B. urea</i>	5.2	0.18	6.4	0	4.8	trace	5.0	0.06
<i>B. fuchsini</i> Weizmann	4.7	0.68	6.4	25.4	4.6	4.7	4.6	0.78
<i>B. prodigiosus</i> 1	4.6	0.36	5.9	95.7	4.5	3.2	5.0	0
" " 2	3.6	0.82	5.7	60.0	4.4	0	5.4	0.26
" " 3	3.4	1.30	6.0	26.8	4.5	0	4.3	1.20
" " 85	3.7	0.96	5.9	51.2	4.8	3.3	4.1	1.44
<i>Ps. gluconicum</i>	4.0	0.33	6.3	0	7.3	0	5.5	-0.06
<i>Ps. fluorescens</i> liq.	4.4	0.16	6.6	107.2	6.5	0	6.0	0.08
" " non liq.	5.2	0.04	6.4	0	5.6	0	5.6	0.02
<i>Ps. cyanogenes</i>	5.0	0.10	6.4	0	5.3	29.3	6.4	-0.08
<i>Ps. pyocyaneus</i>	5.3	0.04			6.1	5.4	6.4	0.02
<i>Ps. oryzae</i>	4.5	0.22	6.1	0	6.3	0	4.0	1.16
<i>A. suboxydans</i>			6.0	2.79***	4.8	32.5	6.6	0.08

* cc. of 1/10 N NaOH for 10 cc. of the sample

** Reduced Cu (of the FEHLING's solution) in mg for 2 cc. of the sample

*** Ca-5-keto gluconate crystallized.

(1) グルコースの酸化

i. 豫備選擇：グルコースの酸化生産物としてはグルコン酸が當然豫想されるので炭酸石灰を加えない培地と加えた培地の兩方でグルコン酸生成の有無をみた。第1表第1欄は炭酸石灰を加えない場合の酸度を示す。炭酸石灰を加えたものに對しては少時加熱後濾過、約半量に濃縮して後、等量の95% エタノールを加え、石灰鹽の析出の有無をみた。その結果明らかに甘藍狀の結晶の析出したのは *Ps. gluconicum* だけであつた。*B. prodigiosus* (*Serratia marcescens*)に於て生産される酸に就ては其後精査の結果乳酸及びケトグルコン酸であつた(後報参照)。

ii. *Ps. gluconicum* によるグルコン酸生成の證明：グルコース 5%, 酵母水濃度 0.5% なる培地を 300 cc 容エルレンマイヤーフラスコに 100cc づつ容れ、殺菌後別に殺菌した炭酸石灰を 1% 加え、之に白堊麴寒天の斜面培養から *Ps. gluconicum* 菌體を1白金耳とり接種、30° で 17 日培養した。分析は 40~50% アルコール不溶の石灰鹽を精製後 100~110° で恒量になるまで乾燥し(收量 100 cc より 1.2 g) 次の如く定性確認を行つた。この石灰鹽は β-ナフトールと濃硫酸で螢光ある青色を與え、石灰含量は次の如くグルコン酸石灰 1 水分の計算値に一致する。

供試料 0.2543g , CaSO_4 0.776 , 實驗値 Ca 8.97%

計算値 $[(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2\text{Ca} \cdot \text{H}_2\text{O}]$ として Ca 8.93%

又蓚酸で石灰を除き過剰の蓚酸をエーテルで除いた遊離酸は舍利別狀で爽快な酸味を有し、之を鹽酸フェール

ヒドラジン及び醋酸ソーダと作用させてつくつたフェニルヒドラジッドは融點 199° (文獻によるグルコン酸のフェニルヒドラジッドの融點は 198~200°) で電解酸化法によるグルコン酸石灰より同様の方法でつくつたグルコン酸のフェニルヒドラジッドと混融するも融點降下は認められなかつた。

iii. グルコン酸の生成條件: *Ps. gluconicum* のグルコン酸石灰生成條件を炭酸石灰存在の有無及び窒素源の濃度の面から検討した。基質 2%, 14 日培養の時の結果は第2表の如くで、グルコン酸の生成には炭酸石灰の添加が必要で、然も窒素源濃度は低い方がよかつた。即ちこの菌の酸化能は窒素源濃度の小時顯現する。最大收量 76%。

Table 2. Production of Gluconic Acid
from 2% Glucose by *Ps. gluconicum*

Conc. of yeast ext. (%)	CaCO ₃ added		CaCO ₃ not added	
	pH	Ca gluconate (g in 100 cc)	pH	Ca gluconate (g in 100 cc)
4.0	7.4	0	3.8	0.21
2.0	7.0	1.11	3.6~3.8	0.36
1.0	6.2~6.4	1.79	3.8	0
0.5	5.8	1.68	4.0	0
0.2	5.6~5.8	1.97	4.2~4.4	0

(2) グルコン酸石灰の酸化

i. 豫備選擇: グルコン酸菌によるグルコン酸石灰の酸化物としては5-ケトグルコン酸、2-ケトグルコン酸、アルデヒドグルコシ酸等が知られ、之等はいずれもフェーリング液を還元するので、先づグルコン酸石灰よりフェーリング液還元性物質をつくるものを選択した。その結果は第1表第2欄の如くでフェーリング液還元性の最も強い

Ps. fluorescens liq. (螢光菌) 及び *B. prodigiosus* (靈菌) を選び更に検討した。

ii. *Ps. fluorescens* 菌による 2-ケトグルコン酸生成の證明: 中型フェルンバツハコルベンにグルコン酸石灰 5%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.01% なる組成の培地 250cc づつ容れたものを2個用意し、之に同様の組成の試験管培養 24 時間後のものを 10cc づつ接種し 30° で 51 日間培養した結果は pH 5.2, フェーリング液還元力は 1cc 當り 45.5mg Cu であつた。依て殘部に少量の醋酸鉛を加えて菌體を落し硫化水素で鉛を除き 40° で減壓濃縮し、之に計算量より稍過剰の蓆酸を加えて石灰を除き、過剰の蓆酸をエーテルで浸出し、不溶部を炭酸加里で中和、再びシラップにまで濃縮し3倍量の 95% アルコール及び著者⁸⁾が先に得た 2-ケトグルコン酸の加里鹽の微量を加え攪拌すれば白色の結晶が析出する。依て之を水及びアルコールから再結し約 7.1g の美麗な白色結晶を得た。この結晶は加里鹽でフェーリング液を還元し且微弱なセリワノフ反應を與える。融點 154~6° (文獻⁹⁾による 2-ケトグルコン酸加里鹽の mp. 152°) で著者が前回得た結晶と混融するも融點降下はない。又この結晶 0.7g に脱水メタノール 8cc, conc. H₂SO₄ 0.1cc を加えて4時間還流冷却器の下で熱し、熱時濾過して冷後析出する白色結晶を再結する。融點 171~172° (文獻⁹⁾による 2-ケトグルコン酸メチルエステル mp. 172°)。又この結晶を前に得た 2-ケトグルコン酸加里からつくつたメチルエステル (mp. 172°) と混融するも融點降下はない。以上によりグルコン酸石灰の酸化により生成された還元性物質は 2-ケトグルコン酸に間違いなく、回收量は還元力より計算した數値に對し約 70% であつた。

iii. 2-ケトグルコン酸生成條件: 基質 2% で窒素源の濃度を變えた結果は第3表の如くで低濃度に於て還元銅量は多く、他の場合に 107.2mg に達したことがある。

iv. *B. prodigiosus* によるアセトイン生成の證明: グルコン酸石灰 2%, 酵母エキス 0.2% なる組成の培地を 500cc 容エルレンマイヤーフラスコに 100cc づつ注加し、之に一白金耳を接種し 30° で 14 日間培養後分析に供した。pH は 6.4~6.6。フェーリング液還元力は 5cc 當り 20.0 mg Cu。この 10cc をとり鹽化第二鐵及び醋酸で酸化し蒸溜液に就き Ni-dimethylglyoxim 法を試るにダイアセチルの反應陽性、又 Sulfanyl-NO₂ 反應も陽性である。又原液から蛋白を除き、p-nitrophenylhydrazine と醋酸を作用させると赤色の結晶析出するのでピリジン-醋酸より再結する。針狀結晶で 321° で分解する。このものについては特に合成アセトインから導いてみなかつたが、アセトインの p-nitrophenylosazone の融點が 316° 又は 328° であることより培養液中に於てフェーリング液を還元する物質の大部分はアセトインであることは明らかである。但し還元力から計算したアセトインの量は 100cc 中 0.150 g, Ni-dimethylglyoxim 法による時は 0.044g で比較的大きな差を示したが他の場合でよい一致を示した例もある。アセトイン以外の還元性物質として 2-ケトグルコン酸が生成さ

れることは後に判つたが次報で述べる。

v. アセトイン生成条件：第3表に見る如く低酵母水濃度に於て最大を示した。0.2% の場合の還元力はアセトインとして 100cc 中 0.720g に相當する（實際には 2-ケトグルコン酸も含まれている）。

(3) マンニットの酸化

i. 豫備選擇：マンニットからの酸化生産物としてはフラクトース、マンノースのような還元性物質の生成が考えられるので、先ずマンニットからフェーリング液還元性物質生成の有無を検討した。その結果は第1表第3欄の如くで *Ps.*

cyanogenes と *B. mesentericus vulgatus* が還元性が強かつたので之等に就き生産物の證明並に生成条件の検討を行った。

ii. *Ps. cyanogenes* によるマンニットよりアセトイン生成の證明：マンニット 2%, 酵母エキス 1% の培地 100cc で 30°, 14 日間培養した結果は pH 5.4~5.6, フェーリング液還元力は 5cc 當り 52.7mg Cuであつた。依つてこれに對しては前實驗 *S. marcescens* で行つた如く Ni-dimethylglyoxim の反應, Sulfanyl-NO₂ 反應を試み且 p-nitrophenylosazone をつくりアセトインであることを證明した。但しこの場合還元力から計算したアセトインの量は 100cc 中 0.385g, Ni-dimethylglyoxim 法で測つた結果は 0.306g であつて、マンニットから生成される還元性物質の殆ど大部分がアセトインであるとして差支えない。

iii. *Ps. cyanogenes* によるアセトイン生成条件：前實驗の如く酵母水の濃度をかえた實驗結果は第4表の如くで 2.0% で最高を示した。この時のアセトインの量は還元力から計算すると 100cc 中 0.734g に相當する。

iv. *B. mesentericus vulgatus* によるアセトイン生成の證明：前と同様に證明した。pH=5.4, 還元力は 5cc 當り 84.2mg Cu, これをアセトインに換算する時 100cc 中 0.612g に相當する。Ni-dimethylglyoxim法による時は 0.597mg. 即ちこの場合の還元性物質は全部アセトインであることが判つた。尙 PÉRE⁽¹⁰⁾ は 1896 年 *B. mesentericus vulgatus* がマンニットからマンノースをつくる旨報告しているのでフェールヒドラジンを作用させたが mp. 210° のオサゾンは得られず、又 α-メチルフェニルヒドラジンを作用させたが mp. 154° のフラクトース-α-メチルフェニルオサゾンは得られず、mp. 97° の黄色結晶が得られた。このものはアセトインのメチルフェニルオサゾンと思われが未だ文獻にその例を見ない。

v. *B. mesentericus vulgatus* によるアセトイン生成条件：第4表の如くで酵母水濃度 0.5~1.0% にあるものと思われる。

(4) エタノールの酸化

i. 豫備實驗：炭酸石灰を加えない培地で行つた結果は第1表第4欄の如くで *B. carotovorus*, *B. prodigiosus* 及び *Ps. oryzae* に於て酸の生成が見られたが詳しい實驗は *B. prodigiosus* と *Ps. oryzae* に就てのみ行つた。

ii. *B. prodigiosus* と *Ps. oryzae* による醋酸生成の證明：エタノール 2%, 酵母水 0.5%, CaCO₃ 少量の培地 100cc で 25°, 14 日培養し、水蒸氣蒸溜に附し醋酸の定性を行つたが、硫酸銅法、鹽化鐵法、銀鹽生成

Table 3. Production of 2-Ketogluconic Acid by *Ps. fluorescens liq.* and Production of Acetoin by *B. prodigiosus* No.1 from 2% Gluconic Acid.

Conc. of yeast ext. (%)	<i>Ps. fluorescens liq.</i>		<i>B. prodigiosus</i> No. 1	
	pH	Reducing power (Cu mg/5cc)	pH	Reducing power* (Cu mg/5cc)
4.0	8.6	0	8.2	0
2.0	8.2	trace	7.0~7.2	0
1.0	8.2	17.7	7.0	0
0.5	6.4	25.4	6.0	47.2
0.2	6.6	32.5	6.0	99.2

* Beside acetoin, 2-ketogluconic acid was produced. This was identified later.

Table 4. Production of Acetoin from 2% Mannitol by *Ps. cyanogenes* and *B. mesentericus vulgatus*

Conc. of yeast ext. (%)	<i>Ps. cyanogenes</i>		<i>B. mesentericus vulgatus</i>	
	pH	Reducing power (Cu mg/5cc)	pH	Reducing power (Cu mg/5cc)
4.0	5.0~5.2	16.7	8.0~8.2	0
2.0	5.4~5.6	101.1	7.8	0
1.0	5.2	50.9	—	—
0.5	4.8~5.0	19.1	5.0~5.2	37.6
0.2	4.8	5.7	5.0	16.7

Table 5. Production of Acetic Acid from Ethanol by *B. prodigiosus* and *Ps. oryzae* (CaCO₃ was added)

Conc. of yeast ext. (%)	<i>B. prodigiosus</i> No. 85		<i>Ps. oryzae</i>	
	pH	Acetic acid (g in 100cc)	pH	Acetic acid (g in 100cc)
4	8.0	0	8.2~8.4	0.036
2	8.2	0.134	6.6	0.084
1	6.2~6.4	0.134	6.6	0.134
0.5	6.4	0.272	6.4	0.060
0.2	6.2	0.198	5.8~6.0	0.020

法等いずれも陽性であつた。

iii. 醋酸生成条件：第5表に見る如く炭酸石灰添加に於て醋酸の集積が行われた。醋酸生成量の最も多かつたのは *Ps. oryzae* で酵母水濃度 2.0%，炭酸石灰添加の時で、収量は理論量の約 32% であつた。

考 察

以上の実験は基質を 2%，酵母水濃度を 0.5%，温度を 25~30°，培養日数を 14 日と決めての結果であつて、果してこの方法で酸化細菌を満足に選

擇し得るか疑問ではあるが、實驗結果から考察される處を次に述べる。

(1) *Pseudomonas* 及び *Serratia* 屬菌の中に酸化細菌に該當する菌を 2, 3 見出した。之を基質別に見ると

- i) グルコースを酸化してグルコン酸をつくるもの……*Ps. gluconicum*
- ii) グルコン酸を酸化して 2-ケトグルコン酸をつくるもの……*Ps. fluorescens liq.* (この他に *S. marcescens* も同様の酸化を行うことが後に判つた。次報参照)
- iii) エタノールを酸化して醋酸をつくるもの……*Ps. oryzae*, *S. marcescens*, *B. carotovores*. (*Ps.* 菌によるエタノールの酸化がその後米國¹¹⁾で發表された)

(2) マンニットを酸化して相當する酸化生産物をつくる菌は見出せなかつた。即ちこの場合相當多量のフェーリング液還元性物質をつくる菌はあるが、これはアセトインと見て差支えなく、その量が基質の 30% に及ぶことがある。

(3) 應用の面から興味あるのは *Ps. fluorescens* による 2-ケトグルコン酸の生成及び *B. mesentericus* によるアセトインの生成であるので、之等に就てはグルコースを基質にして再検討を行つた。(次報参照)。

- 1) PERVOZVANSKII and IVASHKEVICH *Microbiology*, 8, 149 (1939)
- 2) PERVOZVANSKII : *ibid.*, 8, 915 (1939)
- 3) LOCKWOOD, TABENKIN and WARD *J. Bact.*, 42, 51 (1941)
- 4) STUBBS, LOCKWOOD, ROE, TABENKIN and WOOD : *Ind. Eng. Chem.*, 31, 1318 (1940)
- 5) LOCKWOOD and STODOLA *J. Biol. Chem.*, 164, 81 (1946)
- 6) STODOLA and LOCKWOOD *ibid.*, 171, 213 (1947)
- 7) 朝井, 池田 : 農化, 22, 50 (1947)
- 8) BERNHAUER and GÖRLICH : *Biochem. Z.*, 280, 367 (1935)
- 9) OHLE *Ber.*, 70, 2153 (1937)
- 10) PÉRÉ *Ann. Inst. Pasteur*, 10, 417 (1896)
- 11) STANIER : *J. Bact.*, 54, 191 (1947)

Summary

Among 38 bacteria tested, (1) *Ps. gluconicum* oxidized glucose to gluconic acid, (2) *Ps. fluorescens* and *S. marcescens* (*B. prodigiosus*) oxidized gluconic acid to 2-ketogluconic acid (3) *Ps. oryzae*, *S. marcescens* and *B. carotovorus* oxidized ethanol to acetic acid. Besides them, *B. mesentericus* produced more than 30% acetoin (acetylmethylcarbinol), but not mannose, as formerly reported, from mannitol.