[農化 第 51 卷, 第 9 号, p.569~571, 1977]

デヒドロ酢酸分解細菌の分離と
その代謝生成物について江藤義春*, 西岡茂子*, 堀津浩章**
友枝幹夫**

(*中京女子大学家政学部食品・栄養学科,

**岐阜大学農学部農芸化学科)

昭和 52 年 3 月 2 日 受 理

Isolation of Dehydroacetic Acid Degrading
Bacteria and Metabolic Products from
Dehydroacetic Acid

Yoshiharu ETO,* Shigeko NISHIOKA,*

Hiroyuki HORITSU** and Mikio TOMOYEDA**

*Department of Food and Nutrition, Faculty of
Home Economics, Chukyo Women's
University, Ohbu, Aichi**Department of Agricultural Chemistry,
Faculty of Agriculture, Gifu University,
Kakamigahara, Gifu

Four kinds of bacteria, which metabolized dehydroacetic acid, were isolated from mid-air and soil using enrichment cultivation containing dehydroacetic acid in the medium as a sole source of carbon. Among those bacteria, two kinds of bacteria, C-5-1 from mid-air and M-1 from soil, were designated as *Pseudomonas* sp. C-5-1 and *Pseudomonas* sp. M-1, respectively. It was found that degradation of dehydroacetic acid by *Pseudomonas* sp. C-5-1 was more rapid than that of *Pseudomonas* sp. M-1.

The metabolic pathway of dehydroacetic acid by both strains was assumed as follows: dehydroacetic acid → triacetic acid lactone → triacetic acid → acetic acid → TCA cycle. Furthermore, the accumulation of triacetic acid by *Pseudomonas* sp. M-1 was strongly affected by the presence of ammonium nitrate in culture medium, but with *Pseudomonas* sp. C-5-1 such an effect was not observed.

(Received March 2, 1977)

デヒドロ酢酸 (以下 DHA と略記) の微生物分解に関する研究は非常に少なく^(1,2), また, その分解系につい

ても完全には解明されていない。そこで本報告では空気中および土壌中から DHA 資化性細菌 4 菌株を分離すると同時に, そのうち 2 菌株について DHA 代謝生成物を検討したので報告する。

DHA 資化性細菌の分離は, Table I に示した DHA 炭素源培地 (medium A) を用いて, 空中落下細菌および土壌約 60 試料について, 30°C で集殖培養を行なった。そのなかでとくに発育の強いものについて同固体培地を用い, 平板塗抹法により, 資化性細菌を純粋分離した。DHA および triacetic acid lactone (以下 TAL と略記) の定量は 308 nm および 284 nm での紫外吸収法により, また, triacetic acid (以下 TAA と略記) は, Witter ら⁽³⁾ の *o*-フェニレンジアミン法により, さらに DHA および TAL 代謝生成物の分析は液体クロマトグラフィー (日本電子製, 3 BC, 樹脂, JEOL-LCR-3) によって行なった。分離の結果, C-5-1, C-5-2, B-4 (以下空中落下菌) および M-1 (土壌細菌) の 4 菌株が得られた。また, これらの菌株による DHA の分解については C-5-1, C-5-2 および B-4 菌株では培養 48 時間後にいずれも 80% 以上の分解がみられたが, M-1 菌株では 96 時間後でも約 30% の DHA が残存した。つぎに, これら 4 菌株の中でとくに DHA 分解能の高いものと低いものの代表菌, C-5-1 菌株と M-1 菌株の 2 菌株について, その細菌学的性質⁽⁴⁻⁶⁾を検討した結果, 両菌株ともに孢子を形成せず, グラム陰性の桿菌で, C-5-1 菌株では単極毛, 運動性が認められたが, M-1 菌株では認められなかった (Fig. 1)。また, 両菌株ともにゼラチン液化能を有し, インドールの生成がなく, MR-テストおよび VP-反応ともに陰性で, 3% 以上の食塩濃度では発育できず, ブドウ糖, アラビノース, キシロース, ショ糖その他の糖を酸化的に分解し (ガスの生成なし), さらにエタノールからの酢酸生成が認められず, ペプトン寒天培地での蛍光性色素の生成や駒形⁽⁶⁾の *p*-hydroxy benzoate の資化性をふくめた *Pseudomonas* 属菌検索用培地のいずれに

Table I. Composition of Media

	Medium A ^{a)}	Medium B ^{b)}
DHA-Na·H ₂ O	0.10%	0.20%
NH ₄ NO ₃	0.10%	0.10%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%	0.05%
KH ₂ PO ₄	0.10%	0.10%
pH	7.0	7.0

^{a)} for isolation; ^{b)} for degradation.

Fig. 1. Electron Micrographs of the Isolated Bacteria.

においても発育が認められることから, Bergey's manual 第7版⁽⁶⁾によると両菌株とも *Pseudomonas* sp. と考えられるが, M-1菌株は前述のごとく運動性がなく, さらに硝酸還元能が強い点などで C-5-1 菌株とは明らかに異なるので, C-5-1および M-1 菌株をそれぞれ *Pseudomonas* sp. C-5-1 株および *Pseudomonas* sp. M-1 株とした。

1) 両菌株による DHA の分解条件について

Table I の medium B を用いてまず, 培地中の pH の影響について検討した結果, DHA 分解と菌の発育はともに比例的な関係が認められ, 両株ともに pH 7.0 および 9.0 での分解が著しかった。DHA 濃度との関係は 0.05~0.3% の間ではいずれも濃度増加とともに DHA 分解速度および菌の発育速度の低下が認められたが, その傾向はとくに *Pseudomonas* sp. M-1 株において著しかった。

2) 両菌株による DHA 代謝生成物について

Table I の medium B を用いて 30°C で静置培養を行い, 経時的にサンプリングして分析した結果, Fig. 2 および Fig. 3 に示すように *Ps.* sp. C-5-1 株と *Ps.* sp. M-1

Fig. 2. Liquid Chromatograms of Samples from Culture Broth by *Pseudomonas* sp. C-5-1.

The conditions for liquid chromatography: resin, LCR-3; column bed, 0.8×65cm; flow rate, 0.84ml/min; detection, 215 nm. The cultivation time: (A), in 24 hr; (B), in 48 hr; (C), in 72 hr; (D), in 96 hr. The broken line in (A) represents the results of no cultivation.

株のクロマトグラムはかなり異なっており, *Ps.* sp. C-5-1 株の場合ではピーク 5 (DHA) の急激な減少にともなってピーク 1 (未同定), 3 (酢酸) および 7 (TAL) の新しい生成物が認められ, さらにピーク 3 と 7 は培養経過とともに減少しているが, ピーク 1 のみは 96 時間後でもなお, 増加の傾向を示している。しかし, *Ps.* sp. M-1 株の場合は DHA の分解もきわめて遅く, TAL の蓄積はほとんどみられないが, 硝酸の減少と同時に亜硝酸および retention time 約 60 分後に溶出されるピークその他, TCA サイクル関連の有機酸と思われる数種類のピークが検出され, 両菌株間での顕著な差異が認められた。

3) 洗滌菌体による DHA および TAL 代謝生成物について

両菌株の代謝生成物のなかで, とくに *Ps.* sp. M-1 株では TAL の蓄積がほとんどみられなかったことから,

Fig. 3. Liquid Chromatograms of Samples from Culture Broth by *Pseudomonas* sp. M-1.

The experimental conditions and the notation were the same as those in Fig. 2.

つぎに両菌株の 48 時間静置培養菌体を用いて, DHA および TAL の分解を行ない, 経時的に生成物の分析を行った結果, DHA および TAL 代謝生成物ともに両菌株の間ではほとんど差がみられず, DHA 分解物としては TAL および酢酸のピークが, また, TAL 分解物としては酢酸の他に約 60 分後に溶出される triacetic acid と思われるピークがいずれも認められた。

4) 洗滌菌体による DHA 代謝におよぼす硝酸アンモニウムの影響

M-1 株の場合, 培養液中に検出されなかった TAL の蓄積が洗滌菌体において認められた理由として, 培養液中の硝酸アンモニウムの影響が考えられることから, 洗滌菌体を用い DHA の分解ならびにその生成物におよぼす硝酸アンモニウムの影響について検討した。その結

果, DHA 分解力に対しては両菌株ともに硝酸アンモニウムの影響はほとんどみられなかったが, TAL および TAA 蓄積量に対しては両菌株の間で著しい差がみられた。すなわち, *Ps.* sp. C-5-1 株の場合, TAL および TAA の蓄積量は硝酸アンモニウムの有無によってほとんど変化を受けないのに対し, *Ps.* sp. M-1 株の場合は硝酸アンモニウムが存在することにより, TAL 蓄積量の減少とともに著しい TAA 蓄積量の増加が認められた。

5) 洗滌菌体による DHA, 酢酸および TCA サイクル関連有機酸の酸素吸収

以上のごとく, 両菌株による DHA の代謝は TAL から TAA について酢酸を経て行なわれるものと考えられることから, さらに酢酸の代謝が TCA サイクルにもとづくものかどうかを明らかにするために洗滌菌体による TCA サイクル関連有機酸の酸素吸収能について検討した結果, 両菌株ともに DHA をはじめ供試したすべての基質に対して酸素吸収が認められたことから, 両菌株の代謝系としての TCA サイクルの関与が示唆された。

終りにのぞみ, 実験の一部を担当された近藤百合子および高宮城初代の諸嬢に対し厚く感謝すると同時に電子顕微鏡写真の撮影をお願いした名古屋保健衛生大学衛生学部, 高木勇教授に対して深く感謝いたします。また, TAL 標品のご恵与をいただいた大阪府立大学農学部, 野々村誠一助教授に対しても厚くお礼申し上げます。

- (1) 野本正雄, 並木満夫, 並木和子: 農化, **28**, 732 (1954).
- (2) 小谷 隆, 野々村誠一, 辰己忠次: 農化, **38**, 585 (1964).
- (3) R. F. Witter and J. Snyder: *J. Biol. Chem.*, **176**, 493 (1948).
- (4) 東京大学農芸化学教室編: 実験農芸化学(上巻), 朝倉書店, 1960, p. 186.
- (5) 駒形和男: 農化, **35**, 981 (1961).
- (6) "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology," 7th Ed, ed. by R. S. Breed, E. G. O. Murray and N. R. Smith, The Wilkins Co., Baltimore, 1957.