

## ワサビ墨入病の黒色物質に関する研究 (第4報)

バレイシヨ培養基の変色に関する二, 三の知見について

曾 我 治  
(島根大学文理学部化学教室)  
(1970.9.12受理)

Studies on the Blackish Substances found in *Eutrema Wasabi* afflicted with Black Leg Disease.

### IV.

Some Knowledges concerning the Colour Change of the Culture Medium of Potato

Osamu SOGA

### ABSTRACT

*Phoma Wasabiae* was inoculated on the culuture solution of potato which contained 20% of glucose, and incubated in static state at 25°C.

The process of colour change of the culture medium was studied with regard to the change of composition of medium and separation of polyphenol from the coloured culture medium.

1) The colour of the culture medium changes gradually to a reddish orange colour from the surface of medium with the growth of *Phoma Wasabiae*. The colour changes blackish during 3 or 4 weeks. And then, the absorbance of a visible light at 412 or 413 m $\mu$  increases gradually.

2) Under an ultraviolet ray of the wavelength 365 m $\mu$  the culture medium has a blue-white fluorescence, and it changes to a deep green colour with colouring of the medium.

3) Polyphenols were extracted with ethyl acetate from the precipitate which separated from the coloured culture medium with lead acetate solution. The result of study by the use of paper chromatography on the extract, the existence of an yellowish orange coloured substrate was proved. Moreover, it was recognized that when excess petroleum ether was added to the concentrated ethyl acetate extract, an orange-yellow substrate was deposited. Upon recrystallization from aqueous methanol it gave red needles. It was found that the crystal had a trihydroxy-1, 4-naphthoquinone structure, therefore the author proposes the name, "wasabiquinone", for the pigment because of a metabolic product of *Phoma Wasabiae*. The structure of wasabiquinone will be described in forthcoming reports.

## 1 緒 言

サツマイモ黒斑病菌 (*Ceratostomella fimbriata*) に侵された黒斑病甘藷については久保田による一連の化学的研究,及び瓜谷による詳細な病理化学的研究がなされている。

瓜谷<sup>1), 2)</sup>は病傷害植物の緑かっ変の機構を明らかにした。すなわち、植物が罹病したり機械的の傷害を受けたりすると、その組織部やごく近くの隣接部にコーヒ酸、クロロゲン酸などのポリフェノール類が増大し、同時にポリフェノールオキシダーゼ活性の増大することを発見した。そしてこれら両者の接触によりポリフェノールが酸化され、生成した酸化物の重合、あるいは、その酸化物がタンパク質、アミノ酸などと結合してそれぞれ凝固性タンパク質、メラニンよう物質を形成するのだらうと推定している。しかし、未だこれらポリフェノール類の酸化物の性質は明らかにされておらず<sup>1)</sup>、かつまた、メラニンよう色素についてもほとんど研究されていない。

筆者の研究は墨入病に罹病したワサビの黒色物質の本体並びにその生成機構を明らかにする目的で行なわれているが、<sup>3)</sup>特異な環境で生育するワサビを研究の材料にすることは、現在はまだ困難であるので、入手しやすいバレイショを研究材料にすることにした。このバレイショの煎汁培養基に墨入病菌を接種し、定温器中に放置すると培養基が黒色ように変色することが認められ、第2報でこの黒色溶液より酸性物質、フェノール性物質、着色物質などの代謝産物の究明を目的とした分離について報告した。<sup>4)</sup>したがってこの研究は人工的につくられたバレイショ煎汁培養基の黒変現象の解明とその代謝産物の研究にあることを改めて明記しておく。

墨入病菌がポリフェノールオキシダーゼをもつことは、ほぼ確実であるので、<sup>3), 5)</sup>培養基の黒色化も菌のポリフェノールオキシダーゼ活性によるものと推定される。

本報ではこの培養基の黒色化する過程について得られた二、三の見解について報告する。

## 2 実験と結果

### 2・1 培養基の組成変化

#### 1) 培 養 基

培養基は第2報<sup>4)</sup>で報告したように調製したが、煎汁をさらは10分間、10,000 rpm で遠心分離したものを使用した。pH を7.0に調節したのち煎汁 1000 ml に対し20 gのグルコースを加え、300 mlのエrlenマイヤーフラスコに100 ml づつ分注し120°Cで15分間滅菌した。

#### 2) 実験方法と測定項目

培地に菌を接種後、25°C定温器内に静置し1週間ごとにとり出して吸引口過し、口液ををさらに10分間、10,000 rpm で遠心分離して得られた透明な溶液を試料液とした。なお、第1週目はフラスコ2個分を合わせ1組として2組について測定し、2週以後はフラスコ3個について別々に測定した。

測定項目は菌体量、pH、試料液の乾燥重量、吸光度、グルコース、デンプン、粗タンパク質、エーテル抽出量である。pH、吸光度を除く他の項目のものはすべて試料液 100 ml 当りの重量で表示した。以下各項目について概要を述べる。

- i) 菌体量 試料液調製のとき得られた菌体を蒸留水500 ml で洗い100°C で乾燥した。
- ii) 乾燥量 試料液10 ml を秤量びんにとり100°C で乾燥した。
- iii) 吸光度 試料液の着色度を比較するため可視部の吸収を測定した結果、412~414 m $\mu$  に吸収の極大が認められるので、412 m $\mu$  の吸光度を測定した。試料液はすべて40倍に稀釈し蒸留水を対照に測定した。測定器は島津分光光度計 QR-50 型を用いた。
- iv) グルコース 試料液を200倍に稀釈してその 1 ml について Nelson 法<sup>6)</sup> により測定した。
- v) デンプン 試料液20 ml を塩酸加水分解法によりグルコースを求め、前記の遊離グルコースを差引き、その値に0.9を乗じてデンプン量とした。
- vi) 粗タンパク質 試料液 10~20 ml をケルダールフラスコにとり、硫酸を加え酸性にしたのち、蒸発乾固してセミマイクロケルダール法により窒素を求め、6.25を乗じて粗タンパク質とした。
- vii) エーテル抽出量 試料液 40 ml を用いてソックスレーで16時間抽出し、抽出液を100°C で乾燥した。
- viii) pH 試料液調製後直ちに測定した。

### 3) 実験結果

実験結果を表1、図1、2に示す。図には表1に示す値の平均値をプロットした。

培養基の pH は菌の生長と共に弱酸性から弱アルカリ性となる。同時に 412 m $\mu$  の吸光度も増し、かつエーテル抽出量もふえる。それに反し、乾燥量、グルコース、デンプン、粗タンパク質は減少する。培養基の黒色化は3週~4週間で完成する。

表1 バレイショ煎汁培養基の組成変化

試料	pH	吸光度	菌体量 g/100 ml	乾燥量 g/100 ml	グルコース g/100 ml	デンプン g/100 ml	粗タンパク質 g/100 ml	エーテル抽出量 g/100 ml
培養基	5.92	0.019	0	—	2.44	0.531	2.389	—
1 週	5.84	.019	0.032	2.683	2.44	.478	1.995	0.003
	6.38	.019	.037	2.712	2.38	.473	2.086	.004
2 週	6.69	.151	.215	2.116	1.90	.383	1.065	.025
	6.80	.187	.198	2.083	1.94	.417	1.083	.022
	6.68	.144	.237	2.058	1.85	.370	1.128	—
3 週	7.40	.818	.352	1.412	1.45	.135	0.449	.029
	7.40	.646	.406	1.320	1.20	.117	0.407	.029
	7.30	.588	.439	1.260	1.08	.158	0.427	.029
4 週	7.42	1.100	.536	0.661	0.35	0	0.419	.046
	7.42	0.840	.536	0.781	0.70	0	0.452	.046

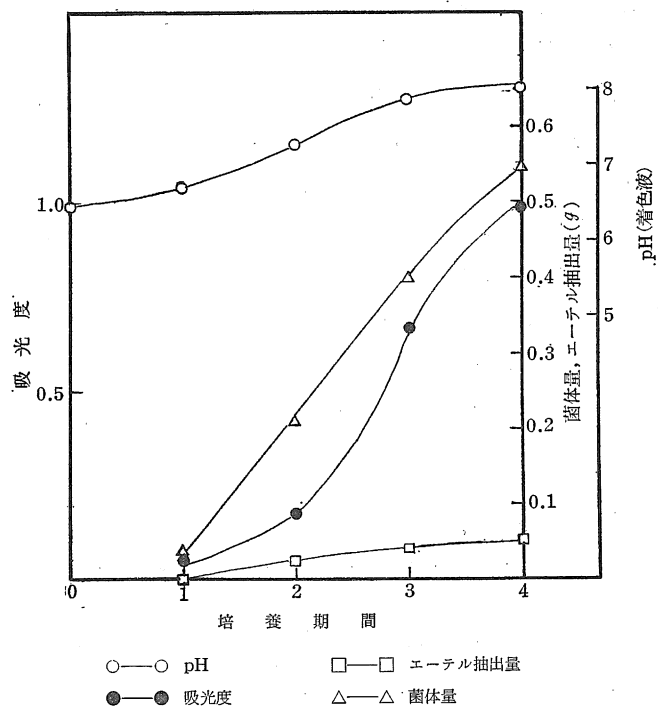


図1 培養基の組成変化 (1)

グルコース、粗タンパク質、乾燥量 (g)

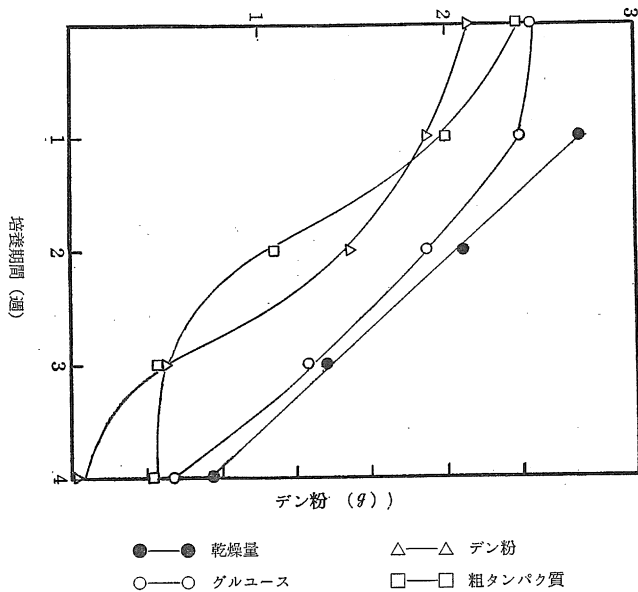


図2 培養基の組成変化 (2)

## 2・2 培養基の pH と菌体量, 吸光度

日数の経過に伴ない 412 m $\mu$  の吸光度が増し, かつ pH が上昇するのを認めたので, 培養基の pH と菌体量, 着色度との関係を知るためにつぎの実験を行なった。

1) 培養基の pH を 4, 5, 6, 7, 8, 9 とし, 300 ml のエルレンマイヤーフラスコに 50 ml の培養基を入れたものに菌を接種し, 18日間 25°C の定温器に静置した。培養基の調製法, 菌体および着色液の処理は 2.1 に準じた。測定にはフラスコ 2 個分を合わせ測定した。実験に先立ち, 滅菌した培養基の pH を測定した結果, 表 2-1 に示す通り滅菌後の培養基の pH は最初調節した pH 値と異なり, 弱酸性の培養基は上昇し, アルカリ性の培養基は弱酸性の方に下降していた。したがって実験に使用した培養基の実際の pH は中性もしくは弱酸性であって, それぞれの培養基の pH の差はあまり認められない。実験の結果を表 3 に示す。

表 2-1 培 養 基 の pH

滅菌前	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00
滅菌後	4.26	5.15	5.67	5.84	5.96	6.10

表 3 の結果より明らかなように pH 8.0 の培養基がもっとも着色し, かつ菌体量は少なかった。そこで, さらにこの関係を見るために実験を行なった。

表 3 培養基の pH と着色液\*2の pH, 吸光度, 菌体量

培養基の pH*1	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00
着色液の pH	5.88	7.56	7.82	7.84	8.04	7.91
着色液の吸光度	1.42	1.44	1.00	0.99	1.50	1.04
菌体量 (g)	0.292	0.291	0.265	0.252	0.234	0.246

\*1 滅菌前の pH

\*2 着色した培養基より菌体を除去した液

2) 培養基の pH を 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 とし, 接種後 1, 2, 3, 4 週ごとに着色液の pH, 吸光度, 菌体量との関係を追究した。滅菌後の培養基の pH を表 2-2 に示す。1 回の測定にはフラスコ 2 個分を別々に測定しその平均値を求め, 図 3 に表示した。

表 2-2 培 養 基 の pH

滅菌前	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00	11.00
滅菌後	3.15	4.12	5.05	5.72	6.10	6.32	6.35	5.70	5.86

滅菌後の培養基の色は pH 11 のものももっとも顕著な橙色を示しているのに, 念のため可視部の吸収を測定したが, なら特別な吸収を示さなかった。したがって, 412 m $\mu$  の吸収は培養基の着色に伴うものであることが明らかである。pH 3 の培養基では菌糸は生育せず, pH 4

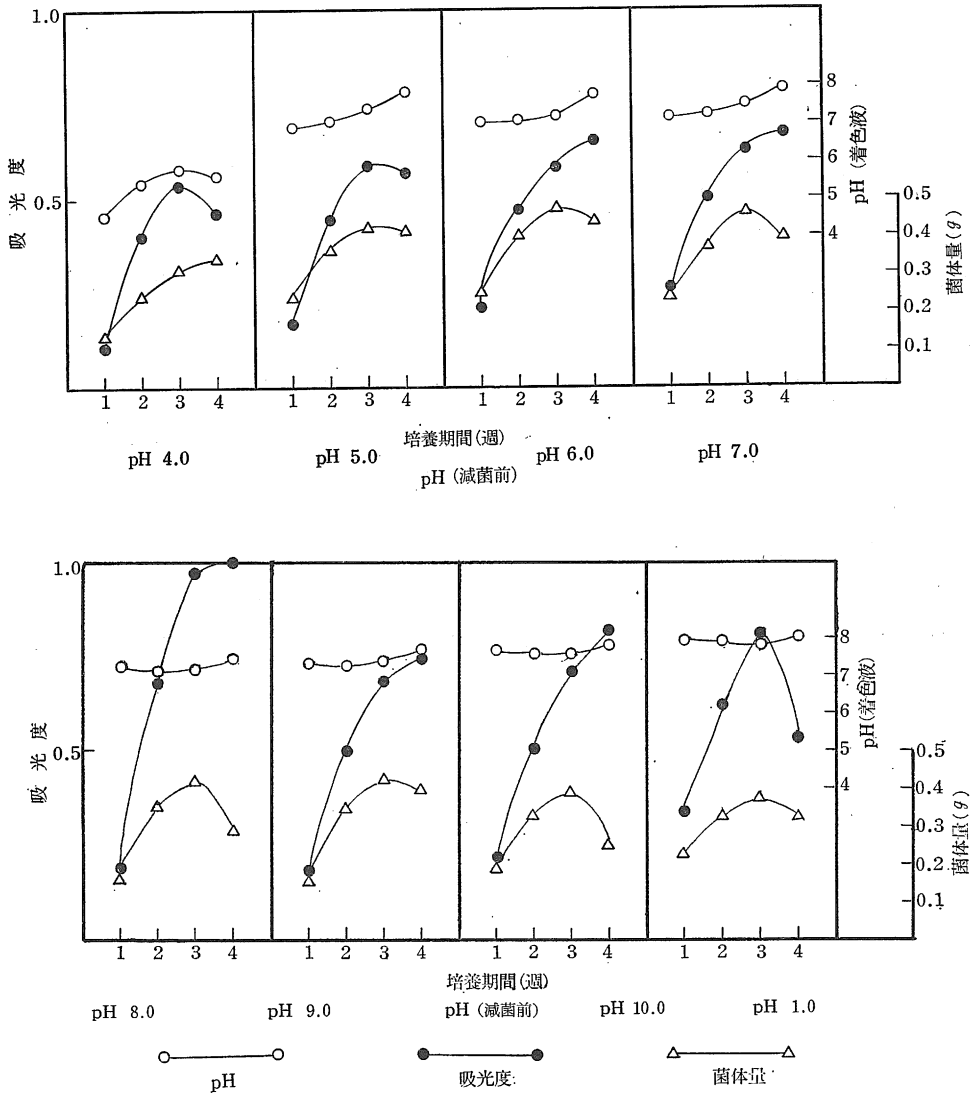


図3 培養基の pH と菌体量, 吸光度

の培養基では着色の速度が遅かった。菌体量については一般に3週目が最大で、4週目は自己消化のためか減少している。吸光度については pH 4, 5, 11 の培養基が3週目で最高を示し、pH 6, 7, 8, 9, 10 の培養基は4週目においてもわずかに増加する傾向を示した。そして pH 8 の培養基が最大であった。3週目にかぎってみると、吸光度が最大である pH 8 の培養基の菌体量は他のものと比較して少ないことが判明した。しかし、着色液の pH に関しては表3に示す結果と異なり、pH 8 の培養基のものが pH 4 のものを除いて他のものよりわずかに小さい値を示した。

培養基の pH と菌体量, 吸光度との関係は特に一定したような結果は得られなかったが、

一般につきのようなことが云える。すなわち、菌が生育するにつれ培養基の pH は上昇し、次第に着色して 412 m $\mu$  の吸光度が増加する。着色は 3 週間でほぼ最大となり、菌体量は 3 週目を頂点に次第に減少する傾向がある。pH 8 の培養基の吸光度が特に高い原因は不明であるが、グルコース含有のバレイシヨ煎汁培養基を高圧滅菌した場合に、pH を 8 に調節した培養基に菌の代謝を盛んにするような物質が多く生産するからではないかと推定される。

### 2・3 培養基の変色

バレイシヨ煎汁培養基の変色はつきのような過程がみられる。すなわち、接種後 25°C の定温器内に静置すると 3 日目頃から菌が生育しはじめ、1 週目にはフラスコの内壁に沿って菌が密集し、次第に繁殖して 2 週目にはほぼ全面に菌糸が生育する。菌糸が生育するにしたがい培養基の表面が赤橙色に変化し、次第にその変化は内部に進行し、3 週目には溶液全体が黒色化してくる。紫外線 (365.0 m $\mu$ ) 下では、培養基は青白色を呈するも、溶液が着色してくるにしたがい、その青白色の蛍光は消失し青緑色から深緑色になる。そして菌糸は非常に鮮明な青白色の蛍光をしめす。<sup>\*1</sup>

#### 1) 培養基中のポリフェノールと着色液中の着色物質の反応性

バレイシヨが病原体におかされた場合に、ポリフェノールとしてクロロゲン酸、コーヒー酸が生成することはすでに報告されており、<sup>8), 9)</sup> かつ一般的に機械的な傷害によってもポリフェノールが生成することから、実験に使用したバレイシヨ煎汁培養基にも当然ポリフェノール

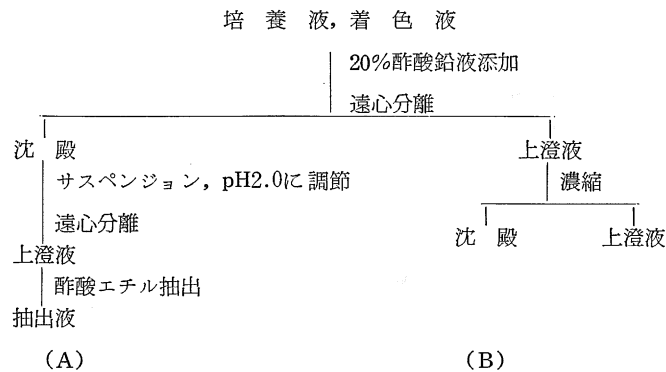


図4 ポリフェノールの分離

が存在すると考えられるので、文献<sup>10)</sup>を参考にして、酢酸鉛による培養基中のポリフェノールの分離をこころみた。(図4) すなわち、培養基<sup>\*2</sup>調製後72時間経過した培養基 100 ml に20% 酢酸鉛溶液を 3 ml のわりに加え 1 時間冷所に放置後遠心分離して、得られた沈殿に少量の水を加えてサスペンションとなし、これを20%硫酸で pH 2.0 に調節し、遠心分離を行ない得られた淡黄色の上澄液を同量の酢酸エチルで 5 回抽出した。これを(A)とする。一方沈殿を除いた上

<sup>\*1</sup> 筆者はこの菌糸の蛍光物質の一つとしてステロイド化合物を分離した。<sup>7)</sup>

<sup>\*2</sup> この培養基は煎汁を口過したのみで遠心分離は行っていない。また7.0に pH を調節して滅菌した。実際に使田した煎汁液は800mlである。

澄液はさらに濃縮して少量となし、この際得られた沈殿も同様に処理して酢酸エチルで抽出した。これを(B)とする。(A), (B)をそれぞれ濃縮して後述するペーパークロマトグラフィーにより検討した結果、同一のクロマトグラムが得られたので、(A), (B)を合わせ、これをポリフェノール含有試料とした。なお、菌接種後1週間、2週間、3週間経過した着色液についても同様に処理した。これらの酢酸エチル抽出液をつぎの条件でペーパークロマトグラフィーを行なった。展開剤として、*n*-ブタノール：酢酸：水=4：1：5を用い室温で上昇展開し、紫外線照射、試薬の噴霧などによりポリフェノールの存在を調べ、かつ着色物質の展開状態およびその反応性について調べた。接種後、1週間経過したものはフラスコの内壁に沿って菌糸が生育しているが、培養基の色の変化は認められず、培養基と同一の紫外線下著明な青色～青白色のスポットのあることが判明した。2週間以上経過した培養基(着色液)のクロマトグラムでは黄橙色のスポットが認められ、3週間以上経過したものは原点より淡かっ色の物質がティリングしていることが判明した。(図5)

検出はつぎに示す試薬の噴霧による呈色反応によった。(1)紫外線下青色～青白色を示すスポットにアンモニアガスをあて、黄色～赤橙色の反応があるかどうかをみる。(2) pauli 試薬, (3) 1%塩化第2鉄溶液, (4) ブロムフェノールブルー指示薬, (5) アンモニア性硝酸銀, (6) 瓜谷<sup>11)</sup>により試みられた試薬, すなわち0.2モルリン酸塩緩衝液に0.5%になるように赤血塩を溶解した第1液を噴霧し、5分後に第2液として稀リン酸に2.5%になるように硫酸第2鉄を溶解させた液を噴霧し、プルッシャンブルーの反応をみる。

#### i) 培養基

培養基は Rf 0.85, 0.63, 0.60

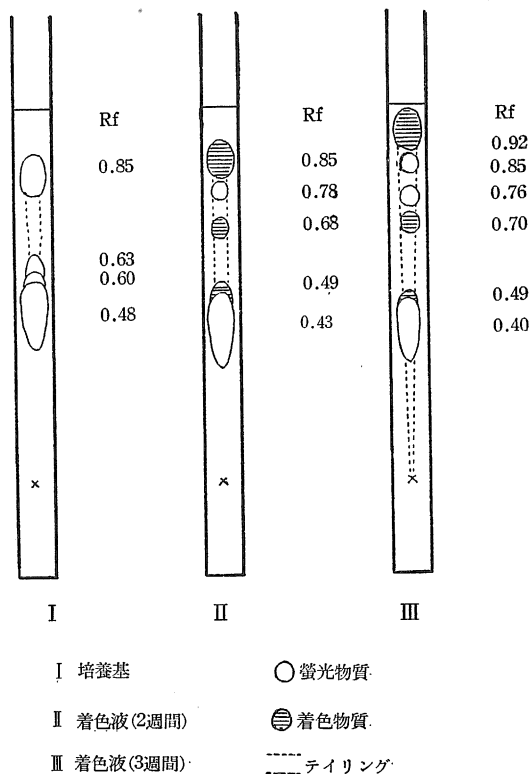


図5 培養基, 着色液のペーパークロマトグラム

が青白～青白色の蛍光を示し、0.85のスポットはアンモニアガスで黄色の反応を示さず、それに反し、0.63, 0.60のスポットは黄色の反応を示した。既知のコーヒー酸、クロロゲン酸を試料に添加して展開した結果、コーヒー酸は0.85を、クロロゲン酸は0.63を示したので、それらのスポットはコーヒー酸、クロロゲン酸であると推定したが、Rf 0.85のスポットは既知の



コーヒー酸のように、アンモニアガスで黄色を示さず、かつまた、Pauli 試薬、塩化第 2 鉄溶液によっても反応が鋭敏でなく、わずかにもっとも鋭敏なプルッシャンブルーの青色の反応のみが認められることから、これらのスポットを切り取り 75%メタノール液で溶出し、それぞれの紫外吸収スペクトルを測定したが、既知コーヒー酸、クロロゲン酸の吸収を示さなかった。したがって、これらの蛍光物がコーヒー酸、クロロゲン酸であるとの証明は出来なかったが、別の形をして存在することも考えられるので、この点に関しては現在研究中である。

#### i) 着色液

a) 2 週間経過した着色液のペーパークロマトグラムで、もっとも顕著なことは Rf 0.85 近くは存在する黄橙色のスポットである。このスポットは展開剤の蒸発につれ赤橙色に変化し、アンモニアガスにより赤紫色となり、時間の経過もともに赤橙色に復元する。酸性では黄色となる。また、Pauli 試薬で茶色に、塩化第 2 鉄液で黒かっ色となる。Rf 0.49 以上のクロマトグラムは淡かっ色にティリングしておりフェノール検出試薬と反応する。

b) 3 週間以上経過したものは先端に黄橙色のスポットが認められるとともに、原点より淡かっ色の物質がティリングしており、これらはフェノール検出試薬と反応することからフェノール性水酸基をもつ重合物と思われる。その他、培養基、着色液ともに Rf 0.40~0.48 にカルボン酸の反応をしめす物質が検出される。とくに培養基は顕著である。

#### 2) 結果の考察

以上の実験結果より培養基が変色する現象はつぎのように考えられる。バレイショ煎汁培養基に存在するポリフェノール、とくに *o*-ジフェノール類（コーヒー酸、クロロゲン酸であることの証明は出来なかったが）に対し、墨入病菌が作用し、その菌のポリフェノールオキシダーゼにより、これらのジフェノール類が酸化されて、まず最初に黄色~黄橙色の着色物質を形成し、これから種々な重合物が形成されるであろう。

2 週間以上経過した着色液から認められる黄橙色の物質は第 2 報<sup>4)</sup>で報告した 5%酸性炭酸ナトリウム抽出液にも明らかに存在するが、前記酢酸エチル抽出液に過剰の石油エーテルを添加すると黄色~赤かっ色の物質が沈殿し、これから赤色針状結晶を含水メタノールにより求めることが出来た。

この結晶はその後の研究により、トリオキシ-1,4-ナフトキノンの構造をもっていることが明らかになったので、ワサビキノンと呼ぶことにする。ワサビキノンの構造、性状についてはのちに報告する。

### 3 総 括

20%のグルコース含有のバレイショ煎汁培養基に墨入病菌を接種し、25°Cの定温器内に静置して、培養基の組成変化および変色の過程を研究した。培養基は主として pH 7.0 で 15 分間滅菌したものを使用した。

1) 培養基は菌の生長につれ表面から赤橙色に変化し、ついで次第にその色調を濃くし、3

～4週間で全溶液が黒色ようになる。その着色液の可視部の吸収極大は412～413 m $\mu$ である。

2) 紫外線下、培養基は青白色の螢光を示めすが、赤橙色に着色するにしたがい消失して青緑色から深緑色に見えるようになる。また菌は鮮明な青色の螢光を示す。

3) 菌の生長とともに培養基の pH は弱酸性から弱アルカリ性に変化する。また粗タンパク質、グルコース、デンプ粉等は減少するが、菌体量、エーテル抽出量は増加し、412 m $\mu$ の吸光度も3～4週間で殆んど最高値を示す。

4) pHを8.0に調節した培養基がもつとも著しく着色した。

5) 培養基中に存在すると推定されるポリフェノールを分離するため、培養基100 mlに20%酢酸鉛溶液を3 mlのわりに加えて得られた沈殿に少量の水を加えてサスペンションをつくり、硫酸で pH を2.0としこれを酢酸エチルで抽出した。この濃縮液についてペーパークロマトグラフィーを行なった結果、二、三の青色～青白色の螢光物質のあることが判明した。これらのスポットはフェノールの反応を示すが、コーヒール酸、クロロゲン酸であることの確認は出来なかった。

6) 着色した培養基も同様に処理した。このペーパークロマトグラムは黄橙色のスポットが Rf 0.85 付近に認められた。このスポットはフェノール検出試薬に陽性でアンモニアアルカリで赤紫色となり、酸で黄色となる。なおまた、この着色液の酢酸エチル抽出液に石油エーテルを過剰に加えると黄色～赤かっ色の沈殿が生成し、これから赤色の結晶が含水ナタノールにより得られた。

この結晶はその後の研究により、トリオキシート-1,4-ナフトキノンの構造をもっていることが判明した。この色素をワサビキノンと呼ぶことにする。その詳細についてはのちに報告する。

この研究を行なうにあたり、終始お励みをいただいた京都大学名誉教授後藤良造先生に深い謝意を表するとともに、この論文のご校閲を賜わった大阪市立大学教授久保田尚志先生に心から御礼を申し上げる。なお、実験に協力いただいた祖田茂樹、竹内光、森本直知理学士に感謝する。

## 文 献

- 1) 瓜谷郁三, 科学の領域増刊, **74**, 175 (1966).
- 2) I. Uritani, Biochemische Probleme der kranken Pflanze. Vorträge eines Symposiums. Aschersleben. (1964), P. 201.
- 3) 曾我治, 島根大学論集 (自然科学), 第16号, 90 (1966).
- 4) O. Soga, *Mem. Fac. Lit. & Sci., Shimane Univ., Nat. Sci.*, **1**, 30 (1968).
- 5) 曾我治, 島根大学文理学部紀要, 理学科篇 **2**, 22 (1969).
- 6) N. Nelson, *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944).
- 7) O. Soga, A. Takuwa, *Mem. Fac. Lit. & Sci., Shimane Univ., Nat. Sci.*, **3**, 63 (1970).
- 8) J. Kuć, *Phytopathology*, **47**, 676 (1957); *Chem. Abstr.* **52**, 3928c (1958).
- 9) G. Johnson, L. A. Schaal, *Am. Potato J.*, **34**, 200 (1957); *Chem. Abstr.*, **51**, 18132d (1957).
- 10) K. Tomiyama, R. Sakai, Y. Otani, T. Takamori, *Plant & Cell Physiol.*, **8**, 1 (1967).
- 11) 瓜谷郁三, 農化, **27**, 165 (1953).