

## 5-ヒドロキシメチルフルフラールをフランカルボン酸に変換する微生物の分離

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 寺沢, なお子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/509">http://hdl.handle.net/2297/509</a>

# 5-ヒドロキシメチルフルフラールをフランカルボン酸に変換する微生物の分離

寺沢 なお子

## Isolation of a Microbe Converting 5-Hydroxymethylfurfural into 5-Hydroxymethyl-2-furancarboxylic Acid

Naoko TERASAWA

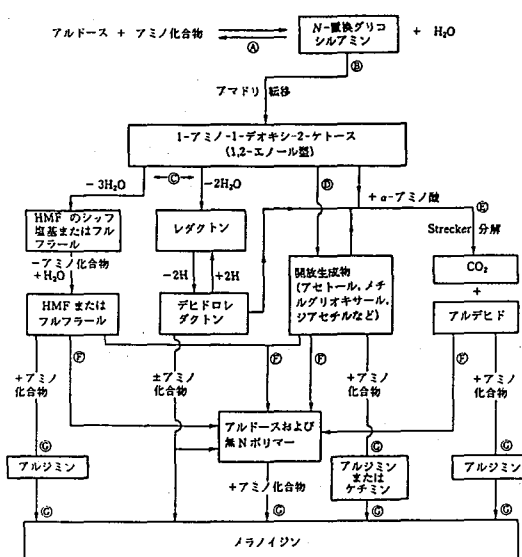
### Abstract

A microbe, S4-17, which was isolated from soil, converted 5-hydroxymethylfurfural into 5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid. The strain was a Gram-negative, aerobic rod, and identified as *Pseudomonas* sp. S4-17. The chemical structure of the converted product was identified on the basis of its mass spectra,  $^1\text{H-NMR}$ , and  $^{13}\text{C-NMR}$ . The yield of 5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid was 99%. This strain decomposed furfural (46%), furfuryl alcohol (34%), but did not decolorize caramel pigment.

### 緒言

食品の褐色色素は、食品成分の様々な相互作用により形成される。この褐変色素の主なものは、糖の加熱重合により生成するカラメル系色素、糖とアミノ酸の重合によるアミノカルボニル（メイラード）反応系色素、フェノール類の酸化重合によるフェノール系色素がある。これらの色素は不均一高分子で、その構造は未決である。1912年 L.-C. Maillard<sup>1)</sup>によって糖-アミノ酸などカルボニル化合物とアミノ化合物の非酵素的化学反応が初めて明らかにされて以来、この反応機構についての研究もこれまで多く行われ、Hodge<sup>2)</sup>によってまとめられた基本的な反応経路が現在も広く指示されている。

(Scheme 1<sup>3)</sup>)。またこのようなアミノカルボニル反応は、食品の着色やフレーバーの生成・



Scheme 1 Nonenzymatic Browning

変化だけでなく、生体内タンパク質でも生じ、糖尿病に伴う白内障や動脈硬化にも関わっている可能性があることがわかっている<sup>4)</sup>。

一方これら褐色色素は食品加工工場などにおける排水処理問題にも関わるため、筆者らは褐色色素を分解、脱色する微生物の検索を行い、現在までにモデルメラノイジン、カラメルなどを脱色する放線菌 *Streptomyces werraensis* TT 14<sup>5)</sup>、またコーヒー、紅茶などフェノール系色素を特異的に脱色する糸状菌 *Paecilomyces canadensis* NC-1<sup>6)</sup>を分離した。一方 *Coriolus versicolor* IFO 30340<sup>7)</sup>はメラノイジンをはじ

めメイラード反応系色素全般を脱色した。これら3菌株による各種モデル褐色色素、市販食品褐色色素の脱色率は有意に差があり<sup>8)</sup>、これらを組み合わせることにより様々な色素が混合した排水の処理にも有効と考えられる。また上記の結果より、化学的に識別困難な由来の異なる褐色色素を、これらの微生物による資化性を用いることによって分類できる可能性が示唆された<sup>8)</sup>。

一方褐色色素や褐変中間体は、食品の貯蔵中に増加し品質劣化の原因にもなるため、今回我々は新たにメイラード反応生成物やその中間体、または類似の構造をもつ化合物の分解微生物を土壤中より検索し、その結果5-ヒドロキシメチルフルフラール (5-hydroxymethylfural,

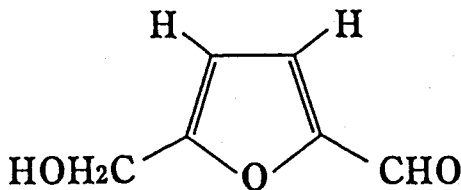


Fig. 1 Structure of HMF

fural, 以下 HMF (Fig. 1)) の構造を変化させる微生物が得られたため、その微生物の生物学的特徴と変換生成物の構造について調べた。

## 実験方法

### 1. 微生物の分離

Pridham培地の炭素源を変えた6種類の培地 (Table 1) の平板を作成した。

Table 1 Composition of Media

Pridham Medium		
C source	0.2%	C source
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2	① Ascorbic acid
CaCO <sub>3</sub>	0.2	② Xylose-glycine melanoidin
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1	③ Glucose-lysine melanoidin
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1	④ HMF
NaCl	0.1	⑤ 5-Hydroxy-2-hydroxymethyl-4-pyron
Agar	1.2	⑥ 3-Hydroxy-2-methyl-4-pyron

pH 7.0

東京都内各所から採取した土壌 0.1g を滅菌水10mlに懸濁し、超音波洗浄器中で30秒間発振させた後しばらく放置し、上澄 0.2ml を上記平板上に塗布し27℃で2~7日間静置培養した。

### 2. スクリーニング

分離微生物は、Davis培地 (組成 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1%, Sodium citrate 0.05%, Glucose 0.2%) 3mlで種培養 (27℃, 1~2日間) し、この0.2mlをDavis培地 (グルコースを除く) 3mlに植え継いだ。このDavis培地中に、分離培地 (Table 1) のアスコルビン酸, Xyl-Glyメラノイジン<sup>8)</sup>, Glc-Lysメラノイジン<sup>8)</sup>, HMF, 5-ヒドロキシ-2-ヒドロキシメチル-4-ピロン, 3-ヒドロキシ-2-メチル-4-ピロン (水溶液を濾過滅菌) をそれぞれ最終濃度 0.1%になるように添加した。またアスコルビン酸添加培地で得られた微生物に対しては、アスコルビン酸の代わりにGlc-Lysメラノイジンを同様に添加し培養した。

これを27℃で3日間振盪培養 (120往復/分, 5cm幅, 以下同様) した後、遠心分離 (3500回転, 10分) により得られた上澄の吸光度 (①, ②, ③, 500nm, ④, 280nm, ⑤, 268nm, ⑥, 320nm) を測定し、脱色率または分解率を求めた。

また分解率が高い培養液は、薄層クロマトグラフィー (TLC) により分解生成物または変換物の有無を確認した。条件は以下のとおりである。

#### 薄層プレート

Merck 社製, DC-Alufolien Kieserger  
60F<sub>254</sub> Art. 5554, 厚さ 0.2mm

#### 展開溶媒

n-ブタノール : 酢酸 : 水 = 3 : 1 : 2

#### 検出

硫酸 : エタノール : 水 = 8 : 1 : 1

### 3. 微生物の分類

顕微鏡 (オリンパス, VANOX model AHB-LB) により細胞形態, 運動性を観察した。またグラム染色, 空気存在下での生育, O-Fテストを行った。

### 4. 有望菌株の培養経過

Davis培地 3 mlで種培養 (27°C, 1~2日間) を行い, この全量を Davis培地 (グルコースを除く) 100mlに加えた。濾過滅菌したHMFを最終濃度 0.1%になるように添加し, 坂口フラスコ (500ml容) で27°Cで振盪培養した。6時間ごとに培養液 3 mlを採取し, 吸光度 600nm (濁度), 遠心分離後の上澄の吸光度 280nm, 250nmを測定した。

### 5. HMF変換物の分取と構造決定

4と同様に坂口フラスコで2日間微生物を培養した後, 培養液 100mlから遠心分離 (3500回転, 10分) により菌体を除去した。この上澄を濃縮し, Amberlite IR-120 [H<sup>+</sup>] イオン交換カラム (φ13×150mm) にかけて, 再蒸留水で溶出した。得られた変換物の画分を濃縮し, Sephadex G-10 (φ8×120mm) にかけて精製した後, 減圧乾固した。

得られたサンプルをNMRとMS分析に供した。条件は以下のとおりである。

#### NMR分析

機器 : JEOL LNM-GSX 270  
FT NMR spectrometer  
溶媒 : 重水  
標準 : <sup>1</sup>H-NMR 重水 (4.65ppm)  
<sup>13</sup>C-NMR 1,4-ジオキサン (66.5ppm)  
積算回数 : <sup>1</sup>H-NMR 16回  
<sup>13</sup>C-NMR 20,000回

#### MS分析

理化学研究所植物生活環制御研究室に依頼した。

E I

機器 : Hitachi M80

#### GC/MS

機器 : JEOL AutoMass JMS  
-AM 150

キャピラリーカラム : TC-1 (0.25  
mm×15m)

昇温 : 80°C (1 min) から 30°C/min

サンプル : トリメチルシリル (TMS)  
化した

### 6. フラン環を有する化合物の分解率測定

フルフラール, フルフリルアルコール, 2-フランカルボン酸, 2-アセチルフラン, 2-アセチル-5-メチルフランについて, 最終濃度0.1%になるように Davis培地 (グルコースを除く) に添加し, 2と同様に培養した。培養液の遠心上澄の吸光度を, 各化合物の極大吸収波長について測定し, 分解率を求めた。

## 実験結果

### 1. 微生物の分離

分離した微生物数を Table 2 に示す。バクテリアが93株, 放線菌が28株得られたが, ②, ④, ⑤の各培地で生育数が少なかった。

Table 2 Number of Isolated Soil Microbes

Medium	①	②	③	④	⑤	⑥	Total
Bacteria	25	10	21	11	3	23	93
Actinomycetes	12	5	11	0	0	0	28

### 2. スクリーニング

①②③培地から分離した菌株からは高いメラノイジン脱色能を有するものは得られなかったが, ④⑤⑥培地から分離した菌株からは添加化合物を90%以上分解するものがそれぞれ1株, 1株, 8株得られた。

これらの菌の培養液についてTLCで観察した結果, 新たなスポットが見られたのは④培地からの分離菌 S4-17 の培養液のみであった (Fig. 2)。

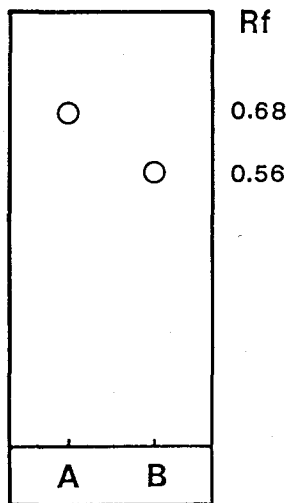


Fig. 2 Thin Layer Chromatography of HMF and Strain S4-17-treated HMF  
Sample A, HMF; sample B, fermented broth by strain S4-17

### 3. 微生物の分類

観察の結果を Table 3 に示す。本菌はグラ

Table 3 Characteristics of Strain S4-17

Cell shape	rod
Gram staining	negative
Growth under air	+
Motility in liquid media	+
O-F test	O

ム陰性の好気性桿菌で、運動性あり、O-Fテストは酸化型であった。この結果から S4-17菌は *Pseudomonas* 属と考えられ、*Pseudomonas* sp. S4-17 とした。

### 4. S4-17 株による HMF 変換の培養経過

培養経過を Fig. 3 に示す。HMF は 280 nm, 変換物の生成は 250 nm で測定した。HM

F の分解はほぼ 1 日で終わり、変換物も HMF の減少に伴って増加するが、菌体量 (600 nm で測定) はほとんど増えなかった。培地の pH にも大きな変化はみられなかった。また HMF の分解の濃度依存性を調べたところ、HMF 添加量最終濃度 0.1% までは 1 日の培養で約 99% の分解率を示したが、0.2% では約 13% に下がった (データは示していない)。

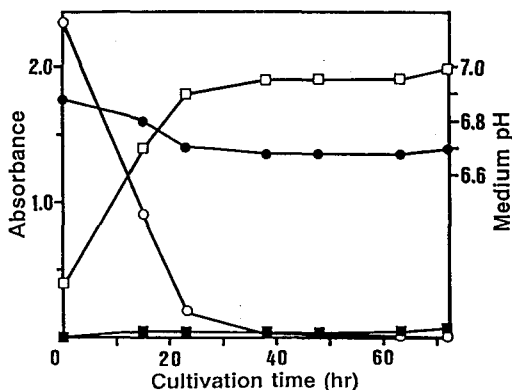


Fig. 3 Time Course for the Decomposition of HMF by *Pseudomonas* sp. S4-17

○—, 280 nm; □—, 250 nm; ■—, 600 nm; ●—, pH

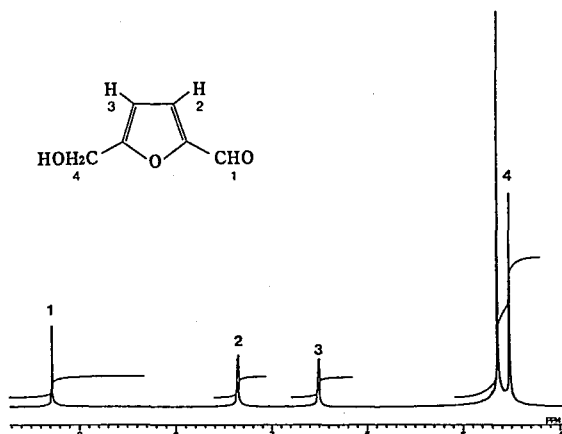
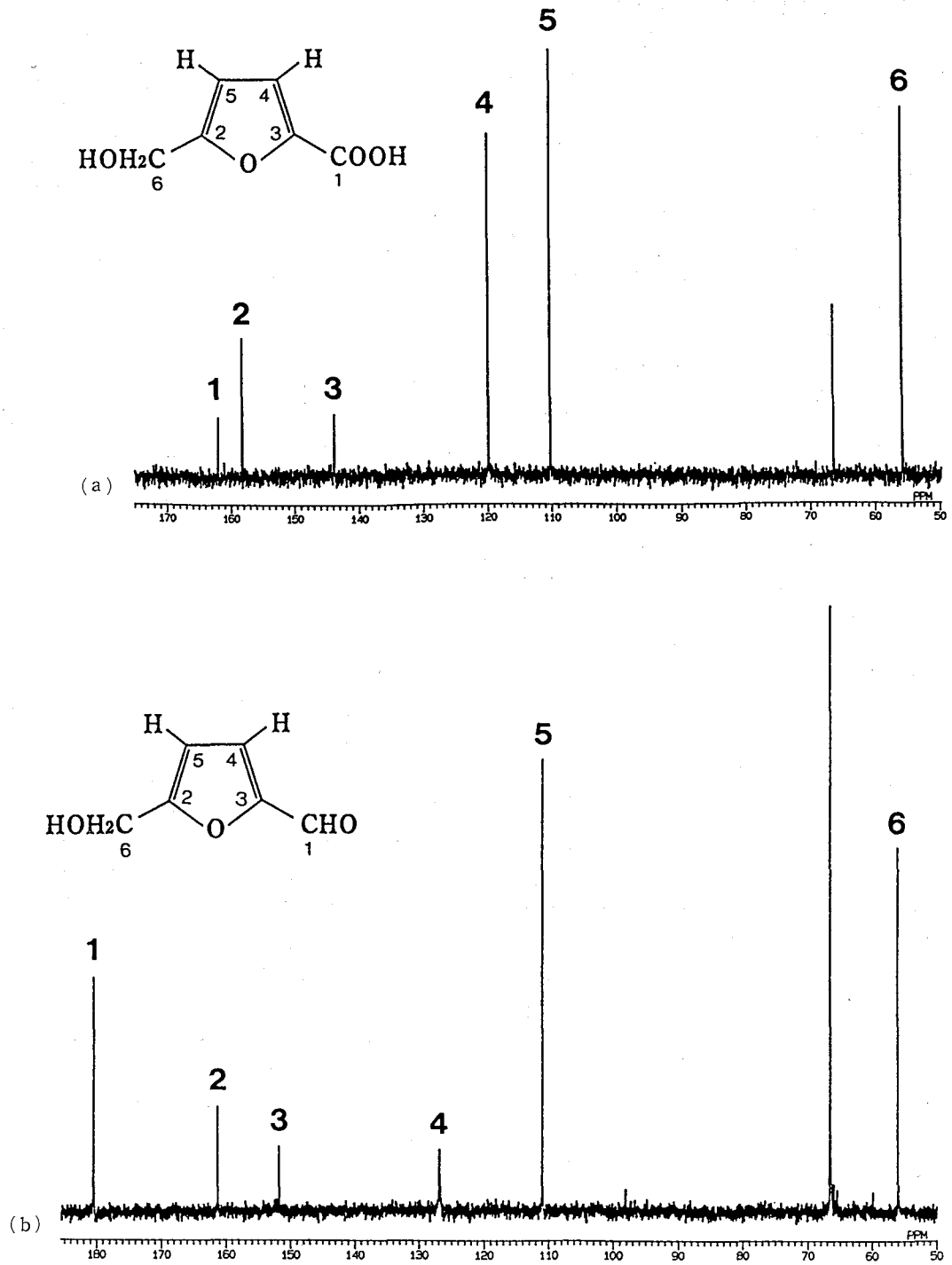


Fig. 4  $^1\text{H-NMR}$  Spectrum of HMF

Fig. 5  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectrum of the Purified Microbial-treated HMF (SS4-17) (a) and HMF (b)

## 5. HMF変換物の分取と構造決定

培養液 100ml (HMF 100mg 添加) より 40 mg のHMF変換物 (以下 SS4-17 とする) が白色粉末として得られ, 収率は40%であった。変換物はTLC上でワンスポットであった ( $R_f$  0.56)。

SS4-17 の $^1\text{H-NMR}$ 結果は, ケミカルシフト  $\delta_H$  (ppm) 7.10 (1H, d, 3.66Hz), 6.38 (1H, d, 3.36Hz), 4.45 (2H, s) ppm であり, HMFの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (Fig. 4) にみられる 9.28 ppm (1H, s) のピークが消失していた。このピークはHMFのアルデヒド基の位置のHに相当する。また, SS4-17 の $^{13}\text{C-NMR}$ の結果は, ケミカルシフト  $\delta_C$  (ppm) 162.1 (s, C-1), 158.3 (s, C-2), 143.9 (s, C-3), 120.0 (s, C-4), 110.3 (s, C-5), 55.8 (s, C-6) (Fig. 5(a)) であり, HMFのスペクトル (Fig. 5(b)) と比較すると 1, 3, 4のピークが高磁場側にシフトしている。これらのことから, SS4-17 はHMFのアルデヒド基がカルボン酸に変化した5-ヒドロキシメチル-2-フランカルボン酸と推定した。

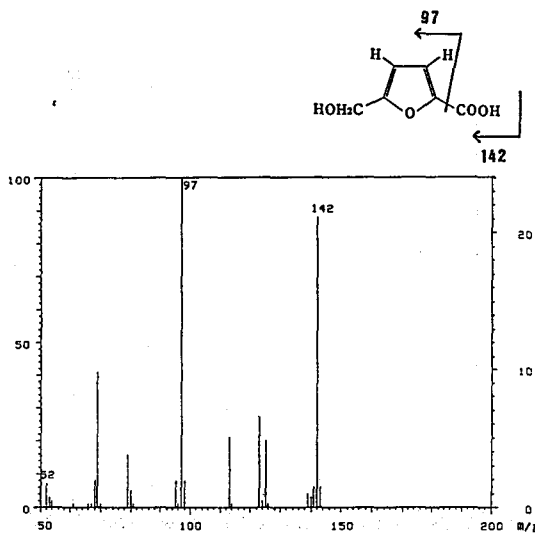


Fig. 6 EI MS Spectrum of the Purified Microbial-treated HMF (SS4-17)

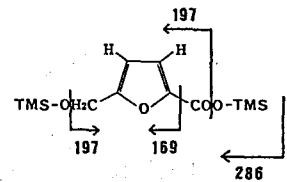


Fig. 7 GC/MS Spectrum of SS4-17-2TMS

これを確かめるために, SS4-17 をMS分析した結果, 5-ヒドロキシメチル-2-フランカルボン酸に相当する  $m/z$  142 の親ピークと, COOH が取れたと思われる  $m/z$  97 のピークが観測された (Fig. 6)。さらにTMS化しGC/MSで分析した結果 (Fig. 7),  $m/z$  286 が現れており, これは推定構造式の分子量  $142 + \text{TMS} \times 2$  と一致した。また, 各フラグメントイオンピークを見ると  $m/z$  197 は -OTMS がはずれたもの,  $m/z$  169 は -COOTMS がはずれたものと考えられる。以上の結果より, SS4-17 は5-ヒドロキシメチル-2-フランカルボン酸 (Fig. 5(a)) と結論づけた。

## 6. フラン環を有する化合物の分解率測定

フルフラールは46%, フルフリルアルコールは34%の分解率を示したが, その他の化合物の分解率は小さかった (Table 4)。またフルフラールとフルフリルアルコールは培養後TLC上に新たなスポットを生じた。いずれもフランカルボン酸と推定される。

## 考察

Table 4 Decomposition Rate of Fran Ring Compounds by *Pseudomonas* sp. S4-17

Fran ring compounds	Maximal absorbance (nm)	Decomposition rate (%)
Furfural	277	45.8
Furfuryl alcohol	216	34.4
2-Furancarboxylic acid	245	-7.5
2-Acetylfrfan	275	9.5
2-Acetyl-5-methylfuran	290	1.4

HMFのアルデヒド基を酸化してカルボン酸（5-ヒドロキシメチル-2-フランカルボン酸）にする微生物を土壤中より得、*Pseudomonas* sp. S4-17とした。このような変換をおこす微生物の報告は今までにない。

今回データは示さなかったが、本菌はカラメル（カラメル特有の香気にフルフラール類がある）を脱色せず、逆に着色した。このときカラメル中の吸光度 280nm（HMFの極大吸収）は減少し、250nm（5-ヒドロキシメチル-2-フランカルボン酸の極大吸収）は増加した。このカラメルの着色は、フランカルボン酸等の低分子化合物の増加とその反応性に関係すると考えられる。一方HMFと同様フラン環をもつ化合物について同様に本菌による分解を調べた結果、フルフラールとフルフリルアルコールが高い割合で分解され、TLC上に新たなスポットを生じたが、これらの化合物も2-フランカルボン酸の構造をもつ物質に変化したと考えられる。

HMFは褐変反応の初期生成物のひとつで、糖の分解やアミノカルボニル反応により生成し、香气成分に関与する。いずれの場合も、ワイン、ウィスキー、ラムなどの酒類、濃縮果汁、味噌など多くの食品中に生成し、一般に貯蔵温度が高いほど増加してフレーバー劣化の指標となる。オレンジ果汁では、フルフラール含量が55 $\mu$ g/L以上になるとオフフレーバーの識別が可能という報告がある<sup>9)</sup>。一方 Haas ら<sup>10)</sup>、Wahhab<sup>11)</sup>、および Stadtman<sup>12)</sup>は、50~57 $^{\circ}$ Cに加熱した乾燥アンズ中にHMFと少量のフルフ

ラール類を検出した。さらに加藤らは、濃縮レモンジュースを室温に2年7カ月貯蔵し褐変した試料を分析し、44mg%のHMFを検出した<sup>13)</sup>。また同様に食品の品質管理の面で、焼酎でフルフラールの測定が滴定法で行われている<sup>14)</sup>。本菌はフルフラール類を特異的に酸化すると考えられるため、食品中HMFの簡便な定量に用いることができると予想される。

### 謝辞

本研究を遂行するに当たり、多々ご協力、ご助言を賜りましたお茶の水女子大学本間清一教授、村田容常助教授、杉山亜希子さんに深く感謝申し上げます。またMS分析にご協力下さいました理化学研究所植物生活環境制御研究室の藤岡昭三様に厚くお礼申し上げます。

### 参考文献

- 1) Maillard, L.-C.: *C. r. Seances Acad. Sci.*, **154**, 66-68, 1912
- 2) Hodge, J. E.: *J. Agr. Food Chem.*, **1** (15), 928-943, 1953
- 3) 並木満夫：食品の品質と成分間反応（並木満夫、松下雪郎編），講談社，p. 10, 1990
- 4) 並木満夫，林建樹：化学と生物，**21** (6)，368-380, 1983
- 5) MURATA, M., TERASAWA, N., and HOMMA, S.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56** (8), 1182-1187, 1992
- 6) TERASAWA, N., MURATA, M., and HOMMA, S.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58** (11), 2093-2095, 1994
- 7) AOSHIMA, I., TOZAWA, Y., OHMOMO, S., and UEDA, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **49** (7), 2041-2045, 1985
- 8) TERASAWA, N., MURATA, M., and HOMMA, S.: *J. Food Sci.*, **61** (4), 669-672, 1996
- 9) 果汁・果実飲料事典，日本果汁協会，p. 387, 1978
- 10) Haas, V. A., Stadtman, E. R., Stadtman, F. H., and Mackinney, G.: *J. Am. Chem. Soc.*, **70** (11), 3576-3579, 1948

- 
- 11) Wahhab, A.: *J. Am. Chem. Soc.*, **70** (11), 3580-3582, 1948
- 12) Stadtman, F. H.: *J. Am. Chem. Soc.*, **70** (11), 3583-3586, 1948
- 13) 加藤博通, 市畑均, 藤卷正生: *農化* **37** (4), 220-225, 1963
- 14) 国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会, p. 40-41, 1987