

琉球大学学術リポジトリ

2-フランカルボン酸資化性細菌の分離とその性質(農芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 当山, 清善, 宮里, 興信, 外間, 芳子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4428

2-フランカルボン酸資化性細菌の分離とその性質

当山清善* 宮里興信* 外間芳子**

Seizen TOYAMA, Koshin MIYAZATO and Yoshiko HOKAMA: Isolation and some properties of a 2-furoic acid assimilating bacterium

I 緒 言

フラン環を有する化合物はリグニンなどの構成成分として自然界に広く存在するとともに、動物における炭水化物の代謝産物として生成される。一方、溶剤などの原料として利用されているフルフラールは古くからペントザン含有植物原料を酸分解して生産されている。フランカルボン酸はフルフラールから化学的に合成されるが、フルフラールの酵母による醗酵過程においても生産されることが報告されている(3)。このようなフラン環を有する化合物の生体内における代謝についての研究はこれまでほとんどなかったのであるが、1964年、Kakinumaら(2)は、2-フランカルボン酸含有培地に生育してグルタミン酸を生成蓄積する細菌を分離した。1967年、Jonesら(1)は細菌における2-フランカルボン酸の代謝について報告している。しかし、フラン環含有化合物の微生物による詳細な分解過程についてはまだ解明されていない。

本研究は、微生物におけるフラン化合物の代謝過程を調べることを主な目的としているが、本報においては2-フランカルボン酸を含む培地に生育する細菌を分離するとともに、分離菌の生育条件など2, 3の性質を検討したので報告する。

II 実 験 方 法

1. 培地組成と培養法: 細菌の培養に使用した基本培地は、2-フランカルボン酸1.0%, 硝酸ナトリウム0.1%, リン酸第一および第二カリウム各0.1%, 硫酸マグネシウム0.01%, 肉エキス0.01%および水道水の組成(pH7.2)である。培養は、上記培地を試験管(培地5ml)または振とうフラスコ(培地, 100ml)に入れて常法通り殺菌後菌株を接種し、30°C, 30時間振とうして行なった。なお、かびの培養に当たっては同じ組成の培地を用い、pHを5.4に調節したものである。

2. 2-フランカルボン酸を含む培地に生育する細菌のスクリーニング: 2-フランカルボン酸を含む上記基本培地を用いて、沖縄本島中南部地域の砂糖きび畑土壌などの試料から集殖培養の後平板培養を次のように行なって生育菌のスクリーニングを行なった。すなわち、上記液体培地を入れた試験管に土壌試料約0.1gを加え、集殖培養を3回くり返した後常法通り生育菌の純粋分離を行なった。分離された細菌は2-フランカルボン酸を含む寒天斜面培養基に採り保存した。

* 琉球大学農学部農芸化学科

** 現在、沖縄県庁企画部統計課

3. 分析方法：菌体の生育度は日立分光光度計 (UV139) の $610m\mu$ における吸光度を測定して示すか、または別に作成した検量線で吸光度から換算した乾燥菌体重量を算出し、培養液 $1ml$ 当りの mg 数で示した。培養液のpHの測定はpH試験紙またはpHメーターによって行なった。培養液中のグルタミン酸の測定は、Sodaら(4)の方法に従い円形濾紙クロマトグラフィーで分離した後ニンヒドリン呈色によって定量して行なった。2-フランカルボン酸の定量は、実験結果の項で示すように $245m\mu$ における吸光度を測定して行なった。

4. 休止菌体細胞懸濁液の調製：休止細胞液は、2-フランカルボン酸を含む培地に生育した菌体を遠心分離して集め、 0.85% の食塩水で3回洗浄した後 $0.01M$ リン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁して調製した。

III 実験結果

1. 2-フランカルボン酸の吸収スペクトルならびに検量線

2-フランカルボン酸の吸収スペクトルはFig. 1に示すとおりである。図から明らかなように本物質は紫外部に吸収があり、吸収極大は $245m\mu$ にある。図に示した結果は本物質を蒸留水に溶解した場合

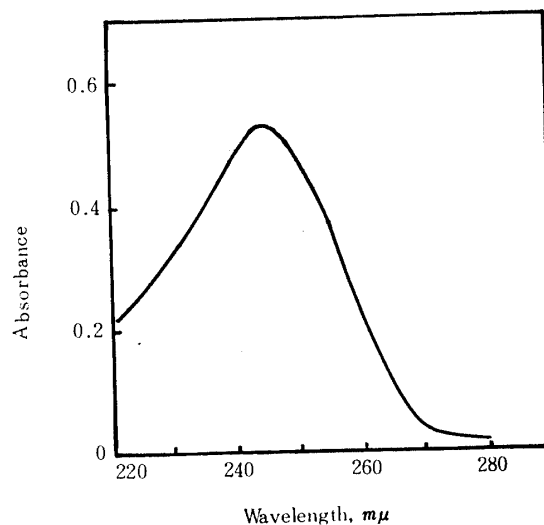


Fig. 1. Absorption spectrum of 2-furoic acid

のスペクトルであるが、各種pH (3~8) の $10^{-2}M$ クエン酸緩衝液中においても吸収極大は変化しなかった。従って、本物質を含む培養液の吸収スペクトルを調べることによりその濃度を測定することができる。Fig. 2は2-フランカルボン酸の濃度と $245m\mu$ における吸光度との関係を調べた結果である。本物質の濃度と吸光度の間で直線関係が得られる。本実験における培養液あるいは反応液中の2-フランカルボン酸の量はこのように作成した検量線から算出した。

2. 2-フランカルボン酸培地における細菌の生育

土壌などの試料から 1.0% の2-フランカルボン酸を含む培地に生育する微生物のスクリーニングを行なった結果、細菌およびかびが分離された。しかし、分離されたもので最も生育がよいのは細菌類に属するものであった。Table 1は、分離された細菌類の中で比較的良好的な生育を示す6菌株と保存菌株の生育と培養後のpHを示した結果である。土壌から分離された6菌株は比較のために採用した保存菌株よりも2-フランカルボン酸培地に生育が良好であることを示している。生育度が高い値を示す菌株

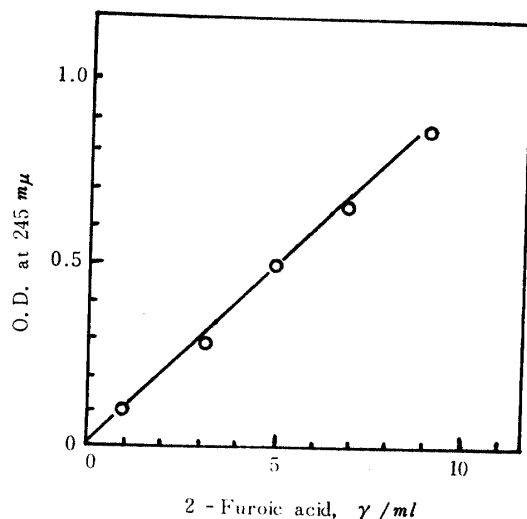


Fig. 2. Relationship between 2-furoic acid concentrations and absorbance values

2-Furoic acid was dissolved in water and the absorbance at 245 $m\mu$ was determined

Table 1. Growth of various bacteria in the medium containing 2-furoic acid

Strains	Final pH	Growth (O.D)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> IAM 1006	7.0	0.044
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ICR 304	7.0	0.046
<i>Escherichia coli</i> IAM 1239	7.2	0.080
<i>Aerobacter aerogenes</i> IAM 1063	7.0	0.045
<i>Bacillus subtilis</i> IAM 1069	7.0	0.055
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> IAM1641	7.0	0.050
<i>Achromobacter superficialis</i> ICR 89	7.0	0.048
<i>Gluconobacter roseus</i> IAM 1838	7.0	0.044
<i>Acetobacter aceti</i> IAM 1802	7.0	0.046
Isolated F-17	9.2	0.530
F-18	8.8	0.803
F-53	8.8	0.623
F-64	9.2	1.050
F-65	8.4	0.710
F-72	9.0	0.820

The medium was composed of 1.0% 2-furoic acid, 0.1% sodium nitrate, 0.1% potassium dihydrogen phosphate, 0.1% dipotassium phosphate, 0.01% magnesium sulfate and 0.01% meat extract, and pH was adjusted to 7.0. Bacteria were grown at 30°C for 20 hrs. with reciprocal shaking. Bacterial growth was represented by the optical density (O.D) at 610 $m\mu$. The strains newly isolated from soil samples were given the symbol F.

の培養液はアルカリ性となり、pHが9.0付近まで上昇した。同じように保存菌株の*Rhizopus*属 (5株) および *Aspergillus*属 (15株) についても調べたが、良好な生育を示す菌株はなかった。以下の実験においては、Table 1で最も高い生育度を示すF-64菌株 (未同定) を採用した。

3. F-64菌株の生育培地組成の検討

土壌から分離されたF-64菌株は2-フランカルボン酸を含む培地で良好な生育を示したので、以下本菌の生育に及ぼす培地組成の濃度およびpHの影響を調べた。

(1) 生育に及ぼす培地中の2-フランカルボン酸の影響：窒素源として0.1%硝酸ナトリウムを含む基本培地を用い、各種濃度の2-フランカルボン酸を含む培地におけるF-64菌株の生育とpHの変化を調べた。その結果はFig. 3に示す。本菌の生育は培地の2-フランカルボン酸の濃度が増すに従い増大し、最高の生育は0.9~1.0%の付近である。1.2%以上の濃度では生育が急激に低下し始め、1.5%では全く生育がみられない。従って培地に加える2-フランカルボン酸の最高濃度は1.0%である。Fig. 1から明らかなように、菌株が生育するに伴ってpHは上昇し、最高の生育を示す時pH9.8に達した。なお後に述べるように、本菌の生育培地に窒素源として尿素を使用する場合には、培地に加える2-フランカルボン酸の濃度は1.5%まで生育が良好で、2%以上では生育が完全に阻害された。

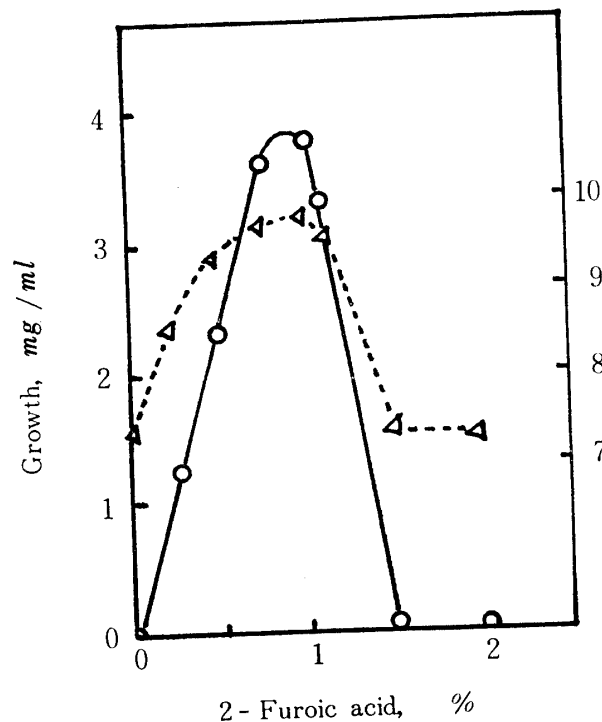


Fig. 3. Effects of varying concentrations of 2-furoic acid in the medium on the growth of F-64 strain

The composition of growth medium and culture conditions are the same as shown in Table 1 except the indicated concentrations of 2-furoic acid. The growth was expressed as *mg* of dried cells per *ml* of the culture fluid.

Growth (○—○), pH (△—△)

(2) 生育に及ぼす培地中の硝酸ナトリウムの濃度

炭素源として1.0%の2-フランカルボン酸を含む基本培地を用いて各種濃度の硝酸ナトリウムを含む培地におけるF-64菌株の生育とpHの変化について調べた結果がFig. 4である。最高の生育を示す濃度は0.1~0.2%の範囲で、濃度が高いと生育が阻害される。培地のpHは7.2から10.0まで上昇した。硝酸ナトリウム以外の窒素源について調べた結果、後に述べるように (Fig. 8) 尿素が比較的良好な生育を示すことがわかった。

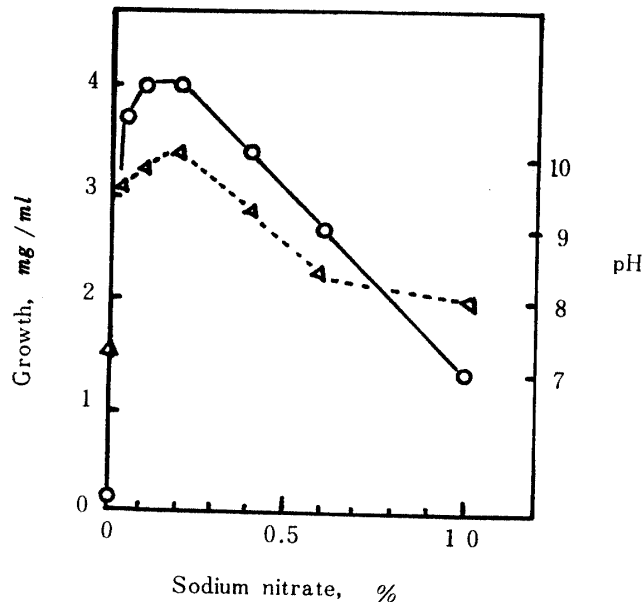


Fig. 4. Effects of varying concentrations of sodium nitrate in the medium on the growth of F-64 strain

The medium contains 1.0% 2-furoic acid as carbon source and the indicated concentrations of sodium nitrate. Other conditions are the same as shown in Fig. 3.

Growth(○—○), pH(△—△)

炭素源として2-フランカルボン酸1.0%、窒素源として硝酸ナトリウム0.15%を含む培地を用いてF-64菌株の生育に及ぼす無機塩類の影響を調べた。その結果、第一リン酸カリウムおよび第二リン酸カリウムの最適濃度はそれぞれ0.2%および0.1%であった。また、硫酸マグネシウムの最適濃度は0.05%であった。基本培地組成から肉エキスを除くと菌株の生育はやや低かった。

(3) 生育におよぼすpHの影響

上記のように設定した培地組成を用いて、各種pHの培地におけるF-64菌株の生育について調べた結果はFig. 5に示す如くである。図から明らかなように、本菌株はpH 6.5以下では全く生育しない。また、pH 9.0から生育が低下し、pH 11.0では全く生育がみられない。本菌株の生育最適pHは7.0から8.0の範囲にあり、以下の実験において培地のpHは7.2に設定した。

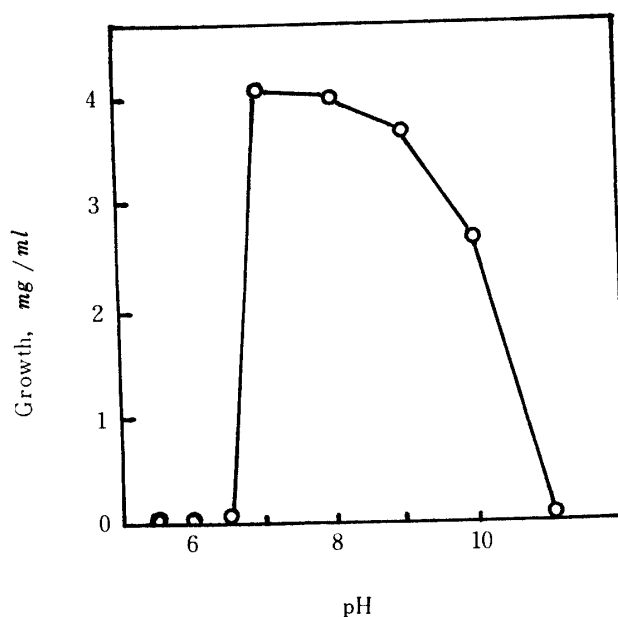


Fig. 5. Effect of initial pH in the medium on the growth of F-64 strain

The medium contained 1.0% 2-furoic acid, 0.15% sodium nitrate, 0.2% potassium dihydrogen phosphate, 0.1% dipotassium phosphate, 0.01% magnesium sulfate and 0.01% meat extract, and its pH was adjusted with sodium hydroxide.

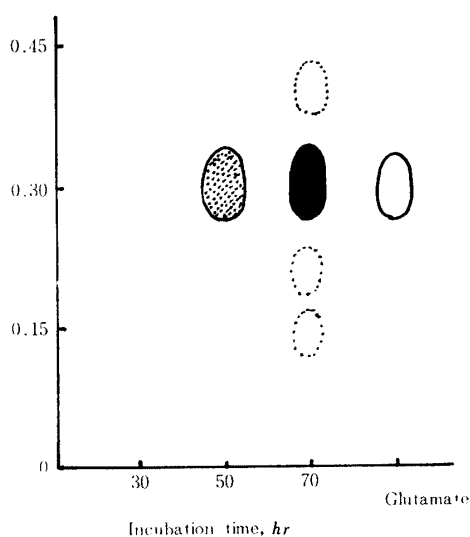


Fig. 6. Paper chromatography of amino acids of the culture fluid

The composition of the growth medium (pH 7.2) was the same as described in Fig. 5. The bacterium (F-64 strain) was grown for the indicated times. After cells of the culture fluid were removed by centrifugation, an aliquot of the supernatant was chromatographed by the ascending technique on Toyo filter paper No. 51 using butanol-acetate-water (4-1-1) as the solvent. The amino acids were visualized with ninhydrin.

4. 培養液中のアミノ酸のクロマトグラフィー

2-フランカルボン酸を唯一の炭素源とした培地においな分離菌F-64菌株が生育した場合の生成物を調べた。使用した培地は硝酸ナトリウム0.15%および2-フランカルボン酸1.0%を含む上記のように設定した組成のものである。培養は30, 50および70時間行ない、遠心分離による除菌後の培養液のアミノ酸のペーパークロマトグラフィーを行なった。Fig. 6は、各時間の培養液の一定量をブタノール-酢酸-水(4:1:1)の展開溶媒系を用い上昇法によってペーパークロマトグラフィーを行なった結果である。図から明らかなように、培養30時間では全くアミノ酸のスポットは認められないが、培養50時間目からグルタミン酸のスポットが現われ始める。培養70時間目になるとグルタミン酸のニンヒドリン発色が濃くなり、グルタミン酸以外に薄い3スポットが認められた。このような結果から、F-64菌株の培養液中にはグルタミン酸が主として生成蓄積されることが明らかになった。

5. F-64菌株によるグルタミン酸の生産

F-64菌株は培養液中にグルタミン酸を生成蓄積することがわかったので、次に培養におけるグルタミン酸生産の経時的变化と生産条件を調べた。Fig. 7は、基本培地組成の窒素源として硝酸ナトリウム0.15%を含む培地における菌株の生育、2-フランカルボン酸の消費、pHの変化およびグルタミン酸の生産について調べた結果である。生育度は培養50時間目で最高に達しそれ以後急激に減少する。生育に伴って2-フランカルボン酸は消費され、最高の生育を示す50時間目でほとんど消失してくる。培地のpHは菌体生育とともに上昇してpH9.6に達した後一定となる。一方、グルタミン酸は培養50時間目あたりから生産され始め75時間目で最高となった。本培地におけるグルタミン酸の生産量は0.1mg/mlである。

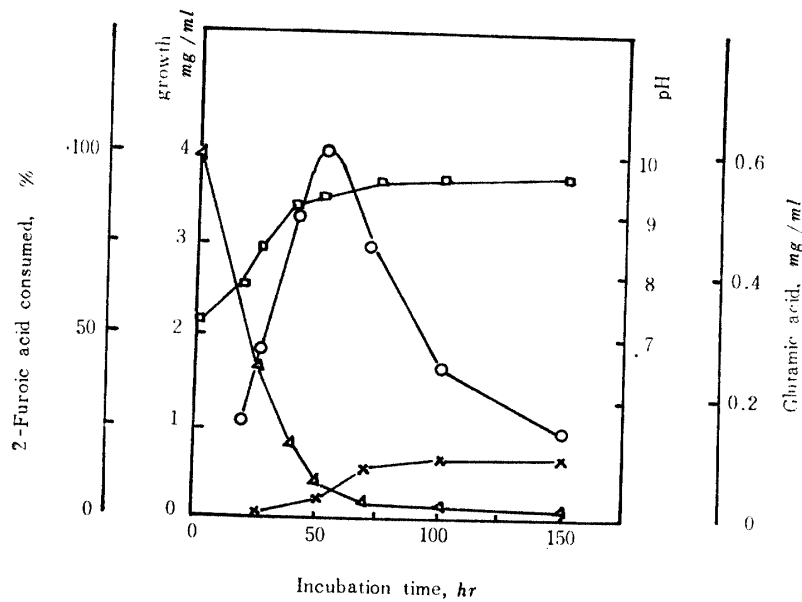


Fig. 7. Production of glutamic acid by F-64 strain during growth

The composition of the growth medium(pH 7.2)was the same as described in Fig. 5. Growth(0—0) , 2-Furoic acid consumed(Δ—Δ) , pH(□—□) , Glutamic acid(x—x)

窒素源として硝酸ナトリウムを含む培地にF-64菌株を生育させた場合、培養液中に生産されるグルタミン酸の量は極めて少ない。グルタミン酸の生産を高めるために培地に加える窒素源の種類を検討した結果、尿素がグルタミン酸の生産に有効であることがわかった。尿素0.35%を含む基本培地におけるグルタミン酸の生産について調べた結果はFig. 8 に示す如くである。菌体の生育は40時間目で最高に達

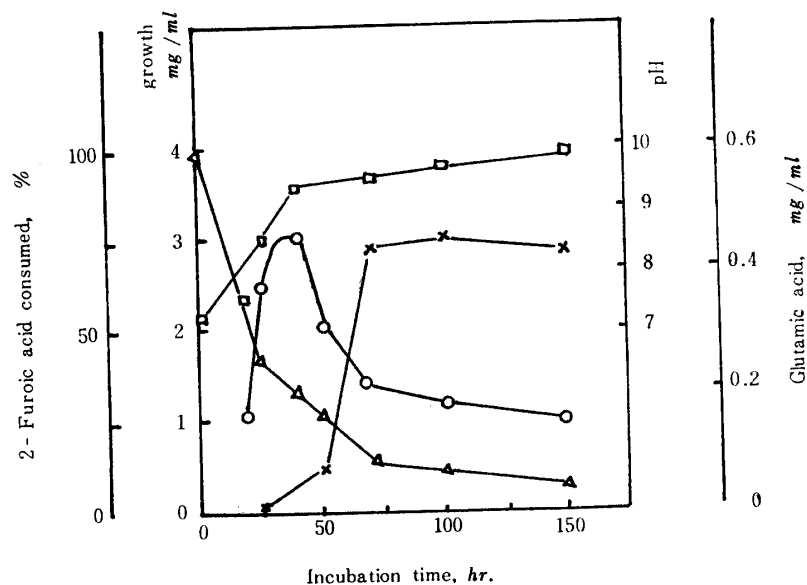


Fig. 8. Production of glutamic acid by F-64 strain during growth

The composition of the growth medium was the same as shown in Fig. 7 except that urea (0.35%) was added in stead of sodium nitrate as nitrogen source.

Growth(○—○), 2-Furoic acid consumed(△—△) pH(□—□), Glutamic acid (×—×).

し、2-フランカルボン酸は生育とともに減少するが、硝酸ナトリウムを含む培地に比較して減少率は低い。培養50時間目からグルタミン酸が生産され、70時間で最高の生産量を示す。窒素を含む培地におけるグルタミン酸の生産量は 0.43mg/ml に達し、硝酸ナトリウムを含む培地における生産量の4倍になる。両培地における菌体の生育には大きな差異はないが、グルタミン酸の生産量は著しく異なることが明らかになった。

6. 菌体懸濁液による2-フランカルボン酸の分解

土壌から分離したF-64菌株は2-フランカルボン酸を資化分解し、培養液中にグルタミン酸を生成蓄積することがわかった。次に、本菌株の洗浄菌体懸濁液によって2-フランカルボン酸が分解されるかどうかを調べた。使用した菌体は2-フランカルボン酸および硝酸ナトリウムを含む基本培地で25時間培養して得られた菌体を洗浄したものである。反応混液の組成は2-フランカルボン酸500 μg 、洗浄菌体10mg(乾燥重量として)およびリン酸緩衝液(pH8.0)100 μmoles 、総量5.5mlとし、反応は37°Cでゆるやかに振うとして行なった。反応混液中の2-フランカルボン酸の測定は、反応混液を希釈してFig. 1およびFig. 2に従って行なった。Fig. 9は反応開始時および反応180分後の2-フランカルボン

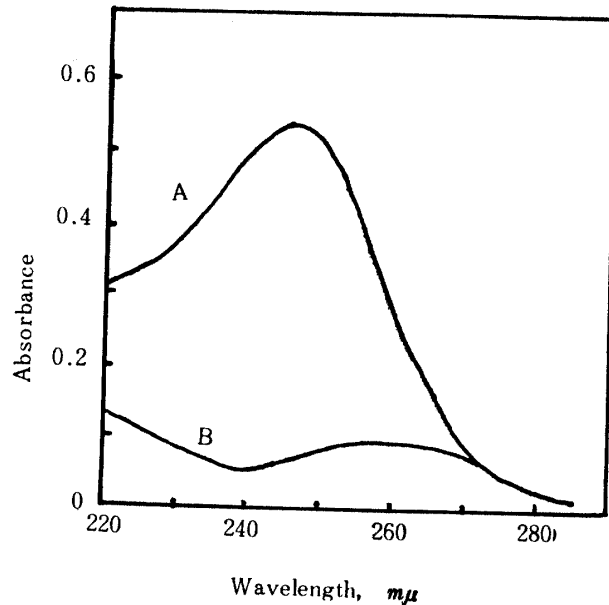


Fig. 9. Decomposition of 2-furoic acid by the cell suspension of F-64 strain

The bacterium was grown in the medium (pH 7.2) as described in Fig. 5 for 20 hr. The cells were harvested by centrifugation and were washed. Reaction mixture contained 500 γ 2-furoic acid, 100 μ moles of potassium phosphate buffer (pH 8.0), and cell suspension (10mg, dried weight) in a final volume of 5.0ml. Incubation was carried out at 37°C for 180 min. The absorption spectrum of 2-furoic acid in the reaction mixture was determined. A: 0 time, B: after incubation for 180 min.

酸の吸収スペクトルを測定した結果である。2-フランカルボン酸は245 $m\mu$ に吸収極大を有するスペクトルを示すが、反応後はこの吸収が消失する。このことは反応混液中の2-フランカルボン酸が洗浄菌体によって分解されていることを示している。炭素源として2-フランカルボン酸の代りにグルコースを含む培地から得た洗浄菌体による分解は極めて低かった。

Fig.10は、2-フランカルボン酸を含む培地で25、50および70時間培養して得られた洗浄培体を用い2-フランカルボン酸の分解の経時的変化を示したものである。反応混液中の2-フランカルボン酸の量はFig.2の検量線によって測定してその減少率を算出し分解率とした。図から明らかなように、分解率は培養25時間の菌体が最も高く、50および70時間と培養時間が長くなるに従って分解率は低下した。培養25および50時間目の菌体は、反応120分まで2-フランカルボン酸をほぼ直線的に分解している。以上のような結果から、2-フランカルボン酸はF-64菌株の洗浄菌体によっても分解されることが明らかとなった。

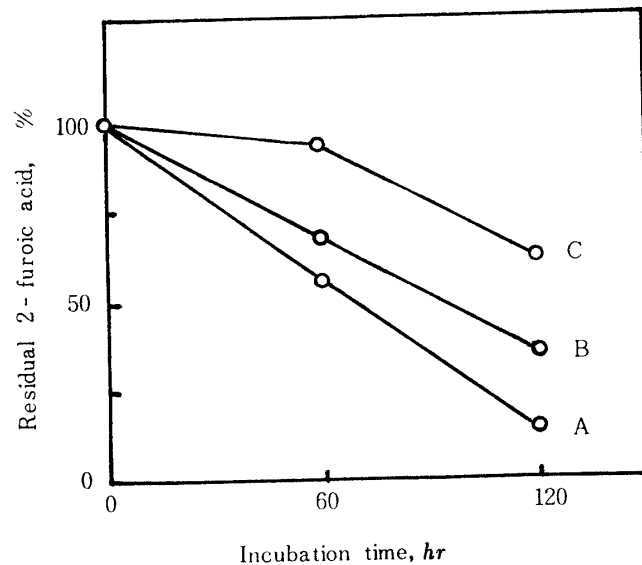


Fig. 10. Effects of various grown cells on the decomposition of 2-furoic acid

The bacterium (F-64 strain) was grown for 25, 50 and 70 hrs, and cells were harvested. Reaction mixture and other conditions are the same as shown in Fig. 9. 2-Furoic acid in the reaction mixture was determined at 245 $m\mu$ as shown in Fig 2. A; 25 hrs. grown cells, B; 50 hrs. grown cells, C; 70 hrs. grown cells.

IV 考 察

2-フランカルボン酸を唯一の炭素源として生育する細菌としては、これまで *Pseudomonas* に属するものが報告されている(1, 2)。本実験において検索された F-64 菌株は、形態的あるいは 2, 3 の生理試験の結果、*Pseudomonas* に属する細菌と推定されるが目下同定中である。F-64 菌株の生育は培地中の 2-フランカルボン酸によって阻害され、この阻害は培地中の窒素源の種類および濃度によって異なる。従って、培地中の 2-フランカルボン酸の初発濃度を 0.9~1.0% にして細菌の培養を開始し、培養途中でさらに 2-フランカルボン酸を添加あるいはフィードすることにより生育を高めることができる。

Kakinuma ら (2) は *Pseudomonas* 属細菌が 2-フランカルボン酸を含む無機塩培地に生育して L-グルタミン酸を生成蓄積することを報告している。F-64 菌株についてもアミノ酸の生成をペーパークロマトグラフィーにより調べた結果、グルタミン酸を生成することがわかった。グルタミン酸の生成量は培地中の窒素源によって異なり、尿素を用いることによりその生成量が高められた。F-64 菌株の培養途中で 2-フランカルボン酸をフィードすると生育は高められるが、グルタミン酸の生成量の増大はあまりみられなかった。生成されたグルタミン酸の光学活性については調査中である。

最近、Trudgill ら (5, 6) は 2-フランカルボン酸が *Pseudomonas* 属細菌の洗浄菌体によって酸化分解され α -ケトグルタル酸が生成されることを報告し、さらに本菌の無細胞抽出液が α -ケトグルタル酸の生成反応を触媒することを明らかにした。本実験において、F-64 菌株の洗浄菌体が 2-フランカルボン酸を分解し、分解産物としてグルタミン酸の生成が認められた。しかし、分解産物としての α -ケトグルタル酸は単離、同定することができなかった。2-フランカルボン酸の微生物における代謝過程において、フラン環の開裂反応およびグルタミン酸の生成反応に関与する酵素系が存在

するものと考えられるので、今後分離菌のF-64菌株を用いて検討したい。

V 要 約

1. 炭素源として2-フランカルボン酸を含む培地に生育する細菌F-64菌株が土壌から分離された。培地に1.0%以上の2-フランカルボン酸が存在すると本菌の生育は阻害された。
2. 分離されたF-64菌株が2-フランカルボン酸培地に生育すると培養液中にグルタミン酸を生成蓄積した。培地に窒素源として硝酸ナトリウムの代わりに尿素を加えるとグルタミン酸の生成が高められた。
3. 2-フランカルボン酸は2-フランカルボン酸培地で生育したF-64菌株の洗浄菌体によっても分解された。

本研究に際し、御助言をいただいた京都大学農学部緒方浩一教授ならびに同化学研究所左右田健次助教授に感謝します。

文 献

1. Jones, H. and Trudgill, P.W. 1967 The metabolism of 2-furoic acid by a *Pseudomonas fluorescens* Biochem. J. **105**: 31P
2. Kakinuma, A. and Yamatodani, S. 1964 L-Glutamic acid fermentation from 2-furoic acid by soil bacterium, Nature, **201**: 420~421
3. 森本茂美, 平島達司, 大橋先代 1968 微生物のアルデヒド代謝に関する研究, 醗工 **45**: 276~287
4. Soda, K., Tochikura, T. and Katagiri, H. 1961 Studies on transamination in microorganisms, Agr. Biol. Chem., **25**: 811~819
5. Trudgill P. W. 1968 The metabolism of 2-furoic acid by *Pseudomonas fluorescens* F 2, Biochem J. **109**: 7 P
6. Trudgill P. W. 1969 The metabolism of 2-furoic acid by *Pseudomonas* F 2, Biochem. J. **133**: 577~587

Summary

Bacteria which can grow in the medium containing 2-furoic acid as a sole source of carbon, were isolated from soil samples. Some properties of the strain F-64, a bacterium of the isolated, were studied.

1. The bacterium could not grow in the presence of 2-furoic acid concentration above 1.0% in the growth medium.
2. When the bacterium grow in the medium containing 2-furoic acid, glutamic acid was produced in the growth medium. The production was enhanced considerably by addition of urea instead of sodium nitrate as nitrogen source.
3. 2-Furoic acid was also degraded by the cell suspension of the bacterium grown in the medium containing 2-furoic acid.