Specific odor component produced by *Mycobacterium lepraemurium* on Ogawa yolk medium.

¹Tatsuo Mori and ²Tetsuo Aishima

(¹National Institute for Leprosy Research, ²Kikkomann Corp, R & D)

(Received for publication : June 12, 1992)

Key Words : *M. lepraemurium*, odor component, phenyl acetic acid

When *Mycobacterium lepraemurium* is grown on the 1% Ogawa yolk medium, it produces a specific odor. This odor was not observed in other easily cultivable acid-fast bacilli. Therefore, identification of the components responsible for the specific odor produced by *M. lepraemurium* was attempted.

The odor components were extracted for overnight with sterilized and distilled water from the Ogawa yolk medium on which *M. lepraemurium* had been cultivated for two months. The odor components in the extract were adsorbed on refined charcoal. After washing with distilled water for three times, the charcoal was dried. Then the odor components were eluted from the charcoal with ethanol

and the eluate was condensed under nitrogen gas flow at 40°C. The condensate was analyzed by Gas-Chromatography-Mass-Spectrum (GC-MS). Phenyl-ethanol and phenylacetic acid were identified as major odor components. A mixture of authentic phenylacetic acid, its methyl and ethylesters, smelled similar to the odor of cultivated medium of *M. lepraemurium*. Thus, phenylacetic acid was identified as the key odor component produced by *M. lepraemurium*.

When initial isolation culture of *M. lepraemurium* from murine leproma was cultivated on the Ogawa yolk medium by adding phenylacetic acid, growth inhibition was brought by the compound.

小川卵黄培地に増殖したネズミライ菌の 産生する特徴香成分について

¹森 龍 男 ²相 島 鐵 郎

¹元国立多摩研究所 ²キッコマン研究本部

キーワード : ネズミライ菌, 香成分, phenylacetic acid

実験方法

1 特徴香成分の抽出：ネズミライ菌の増殖した小川卵黄培地(通常2ヶ月培養)に滅菌蒸留水5mlを加え斜めに保って一夜放置後、この抽出液を濾紙を用いて濾過した。濾液を12000rpmで20分間遠心して除菌、その上澄液約1lを得た。濃塩酸と濃硝酸により洗浄後、蒸留水で十分洗浄し、

燐酸緩衝液でpH6.1に調整した精製活性炭2gを上記上澄液に加え十分攪拌後、濾過した。匂い成分を吸着した活性炭を蒸留水により3回濾過洗浄後、42°Cで乾燥した。乾燥した活性炭からエタノールにより匂い成分を溶出した。エタノール抽出液は乾燥窒素気流により40°Cで濃縮した。

2 匂い成分の分析：GC-MS分析はガスクロマ

トグラフHP5980Aと直結したHP5971A質量分析計 (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA) により行った。カラムはDB-WAX (crosslinked polyethylene glycol, J & W Scientific, Inc., Rancho Cordova, CA) を液層膜厚0.25 μm に塗布した長さ30m, 内径0.25mmのフューズドシリカキャピラリーカラムを用いた。キャリアガスはHeを用い流速を1 ml/分に設定した。試料は1 μl を注入し, スプリットレス (purge on time: 0.75分) モードで分析した。注入口温度230 $^{\circ}\text{C}$, 初期温度50 $^{\circ}\text{C}$, 昇温速度8 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で220 $^{\circ}\text{C}$ まで昇温しそのまま25分間保った。質量分析はイオン化電圧70eVのEIモードでイオン化, 質量範囲35–400amuを1.5/秒でスキャンした。各ピークのマススペクトルとデータベース中の標準スペクトルとの比較により匂い成分を同定した。

3 phenylacetic acidの生物学的作用: 段階的に異なる濃度のphenylacetic acidを滅菌した1%小川卵黄培地の基礎培地に加え, pHを5.1に調整して卵黄培地を作成した。すなわち培養には1%小川卵黄培地を対照とし, 1 mM/ml, 3.3 mM/ml, 10 mM/ml phenylacetic acidを含む3種類の1%小川卵黄培地を用いた。接種材料としては(1) 1 gのネズミライ結節を磨碎し乾燥後, 1 mlの1 N NaOHを加えて乳液とし, その1白金耳を培地中央においた群, (2)(1)の乳液1 mlに4 mlの0.1 N NaOHを加えて希釈し, その0.05 mlを接種した5倍希釈群, (3)(2)の1 mlに4 mlの0.1 N NaOHを加えて希釈して, その0.05 mlを接種した25倍希釈群, (4)(3)の1 mlに3 mlの0.1 N NaOHを加えて希釈した0.05 mlを接種した100倍希釈群を調整し33 $^{\circ}\text{C}$ で3ヶ月間培養した。

結 果

ネズミライ菌増殖培地の水抽出液中に含まれる匂い成分は活性炭に吸着した。濾別して水で十分洗浄後, 乾燥した活性炭からのエタノール溶出液を窒素気流下で濃縮すると, メズミライ菌培養時に生成する特有の匂い成分が濃縮できた。Fig. 1はGC-MS分析の総イオンモニターから得られた濃縮液のガスクロマトグラムを示す。主要な22ピークについてマススペクトルを

記録した。主要な4ピークのマススペクトルをFig. 2に示した。データベース中に含まれる標準化合物のマススペクトルとの類似度に基づくデータ検索から化学構造が推定された化合物をTable 1に示した。主要なピーク成分は17.02分に溶出するmethyl 3-hydroxy-hexanoate, 17.37分のphenylethanol, 25.92分のphenylacetic acidなどである。40.77分に溶出するピーク成分としては2-amino-phenylethanol, 1-phenyl-phenolなどの可能性は示唆されたものの, 同定には不十分な類似度であった。

市販のphenylacetic acid及びそのメチルエステルとエチルエステルであるmethyl phenylacetate及びethyl phenylacetateを混ぜた匂いは, ネズミライ菌培養培地の水抽出液の濃縮液と極めてよく似た匂いであった。

phenylacetic acidを含む小川卵黄培地でネズミライ菌の初代分離培養を接種菌の濃度を変えて行ったが, phenylacetic acidがネズミライ菌の初代分離培養を阻害する傾向は見られたものの, 培養の促進活性は全く観測されなかった。

考 察

長期にわたるネズミライ菌のエネルギー代謝に関する研究から著者の一人(森)は, ネズミライ菌が容易に培養できる他の抗酸菌とは異なる代謝系を有すると考え, ネズミライ菌が培養時に呈する特有の匂い成分に注目していた。phenylethanolは酵母発酵を利用する酒類や醤油, 味噌などに大量に含まれているので¹⁾, ネズミライ菌もアミノ酸発酵に類する代謝系でエネルギーを産生している可能性がある。容易に培養できる他の抗酸菌にはphenylacetic acid臭を産生する菌株は見いだされていない。つまりphenylacetic acidを産生するのがネズミライ菌の特徴であって, ネズミライ菌の特殊なチトクローム系²⁾とエネルギー産生系³⁾とに関連があると推察している。今後, phenylacetic acid産生に関連するネズミライ菌代謝に関する詳細な研究が必要である。

活性炭を利用した匂い成分の処理法と培地の影響もあるであろうが, 他の微生物に比べベンゼン環を含む化合物が量, 種類共に著しく多いことがネズミライ菌代謝産物の大きな特徴といえる。

なお40.78分に溶出するピークは全体の43%に及ぶ含有量であるが、ピーク形状などから真の匂い成分と言うより二次的な生成物の可能性が高い。

phenylethanolやphenylacetic acidのような成分は植物や微生物の最終代謝産物として体内に蓄積されるもので、特別の成長促進因子的な意義や活性はないと思われるが、その生成過程が特殊で興味深いものがある。将来、ネズミライ菌のチトクローム系とエネルギー産生系が似ているライ菌⁴⁾が培養できたとき、ライ菌が果たしてphenylacetic acidを産生するか否かは興味深い問題である。

文 献

- 1) 新版醸造成分一覽, (財) 日本醸造協会, 1977.
- 2) Mori, T., Kohsaka, K. and Dohme, K. Terminal electron transport system of *M. lepraemurium*. Int. J. Lepr. **39**, (1971) 813-828.
- 3) Mori, T., Kohsaka, K. and Tanaka, Y. Tri-carboxylic acid cycle in *M. lepraemurium*. Int. J. Lepr. **39**, (1971) 796-812.
- 4) Mori, T., Miyata, Y., Kohsaka, K. and Makino, M. Respiration in *Mycobacterium lepraemurium*. Int. J. Lepr. **53**, (1985) 600-609.

Table 1 Prospective compounds of odor component in cultivation of *M. lepraemurium*

peak No	retention time (min)	area (%)	name of compounds
1	12.66	0.33	methyl 2-methylbutanoate
2	14.62	0.26	m/z 43 84 101 57 154
3	15.12	0.63	methyl phenylacetate
4	15.50	1.08	ethyl phenylacetate
5	16.80	0.71	benzyl alcohol
6	17.02	5.04	methyl 3-hydroxy-hexanoate
7	17.37	10.17	phenylethanol
8	17.55	0.28	3-methyl-phenylethanol
9	18.51	0.77	phenol
10	18.93	2.30	1, 5-heptadiene-3, 4-diol
11	22.57	2.16	1, 2, 3-propanetriol
12	22.63	1.42	4-methoxy-6-methyl-2H-pyran-2-one
13	23.91	3.95	benzoic acid
14	25.24	1.00	m/z 95 124 54 42 86
15	25.92	8.65	phenylacetic acid
16	27.94	2.10	m/z 87 55 39 140 122
17	28.93	4.37	dibutyl 1, 2-phenyldicarboxylate
18	30.70	1.19	m/z 105 77 51 136 109?
19	32.44	5.05	m/z 112 144 140 172 84
20	34.79	2.07	methyl 4-hydroxy-phenylacetate
21	35.62	3.33	hexadecanoic acid
22	40.78	43.04	m/z 107 77 138 51 91

Fig. 1 Gas-chromatography of volatile components in metabolites in *M. lepraemurium*

Fig. 2 Mass-spectrums of main four peaks