報 文

[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol. 56, No. 1, pp. 1~5, 1982]

細菌による 5,5' デヒドロジバニリンの代謝について

岩原章二郎, 山本桂子, 桑原正章*, 樋口隆昌**
(香川大学農学部農芸化学科, *同食品学科, **京都大学木材研究所)

昭和 56 年 4 月 24 日 受理

Bacterial Metabolism of 5,5'-Dehydrodivanillin

Shojiro IWAHARA, Keiko YAMAMOTO, Masaaki KUWAHARA*
and Takayoshi HIGUCHI**

Department of Agricultural Chemistry and *Department of Food Science,
Faculty of Agriculture, Kagawa University, Kagawa-ken

**Wood Research Institute of Kyoto University, Kyoto

Four strains of bacteria grew in medium containing 5,5'-dehydrodivanillin as the sole source of carbon. They were isolated from natural materials by an enrichment culture method, and two metabolites were isolated from the culture filtrates. The one isolated from strain D 2-1 was identified as 5,5'-dehydrodivanillic acid semialdehyde, and the other isolated from strain D 7-2 was identified as 5,5'-dehydrodivanillic acid.
(Received April 24, 1981)

緒 言

ビフェニール構造は針葉樹リグニンで約 25%, 広葉樹リグニンで約 10% 含まれている。一般にリグニンは生分解を受けにくい物質であるが、とくにリグニン中に含まれているビフェニール構造は分解されにくい成分である。微生物によるビフェニール構造の分解については 5,5' デヒドロジバニリン酸が二、三の細菌によって分解されることが報告されているにすぎない。福住⁽¹⁾は *Pseudomonas putida* FK-2 が 5,5' デヒドロジバニリン酸を基質とする培養で 5' カルボキシバニリン酸を生成することを報告している。杉崎ら⁽²⁾は *Pseudomonas ochracea* 類似菌株が 5,5' デヒドロバニリン酸を分解することを認めている。川上ら⁽³⁾は *Aeromonas* spp. が 5,5' デヒドロジバニリンを炭素源として資化しリグニン中のビフェニール構造を分解することを認めている。しかし

分解機構については不明の点が多い。

本研究はリグニンの微生物分解に関する研究の一環として行ったものである。本実験においては、5,5' デヒドロジバニリンを単一炭素源として生育する細菌を分離しその代謝について検討した。その結果、5,5' デヒドロジバニリンはまず 5,5' デヒドロジバニリン酸へ酸化されることが明らかとなったので報告する。

実験材料および方法

1. 培地組成および菌の培養 菌の培養は下記の組成の培地を用いて行った。試験管 (18×180 mm) に培地 4 ml を分注し、殺菌後種菌を 1 白金耳接種して、試験管振とう機上 (180rpm) で 28°C において一定時間培養した。代謝産物を分離する場合には、培地 50 ml を含む 500 ml 容三角フラスコで回転振とう機上 (200rpm) で 28°C において一定時間培養した。培地組成は 5,5' デヒ

ドロジバニリン 2g, NH_4NO_3 1g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, KCl 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mg, 酵母エキス 0.5g, イオン交換水 1l, pH 9.0 である。なお、集積培養は酵母エキス無添加培地を用いて行った。また実験目的に応じてグルコース、ペプトンなどを添加した培地も用いた。

2. 5,5' デヒドロジバニリン資化性菌の分離 本学部周辺の土壌、腐朽木、汚水などの試料 (50 点) 約 1g に殺菌水 10ml を加えて分散させ、培地 4ml に各試料の分散液 1 滴を接種した。これを試験管振とう機上で約 1 週間 28°C において培養した。微生物の生育が認められたものを新しい培地に移植して培養を続けて生育良好な微生物を集積した。これらの培養液から寒天平板法により菌の分離を行った。その結果、細菌 4 菌株を得て実験に供した。

3. 紫外外部吸収スペクトルの測定ならびに代謝産物等の定量 培養液の紫外外部における吸光度の測定は遠心分離により菌体を除去したのち、0.1M ammonia buffer (pH 8.0) で適当に希釈して行った。基質および代謝産物の分別定量はペーパークロマトグラフィーにより分離し各スポットを切り取り 0.1M ammonia buffer (pH 8.0) で溶出して、基質は 320nm, A 区分は 330nm, B 区分は 250nm における吸光度を測定して行った。基質および単離した代謝産物等の紫外外部吸収スペクトルの比較は 0.1N NaOH 溶液で行った。

4. クロマトグラフィー 薄層クロマトグラフィーは Kiesel gel 60 F₂₅₄ (メルク社製) を用いて行った。展開溶媒として *n*-プロパノール:28% アンモニア水 (7:3, v/v) を用い室温下で上昇法により展開した。ペーパークロマトグラフィーは東洋濾紙 No. 53 を用い上記と同様の展開溶媒を用いて行った。クロマトグラム上の物質スポットは紫外線ランプにより検出した。液滴向流クロマトグラフィーは東京理化 DCC-S 型 (2φ×400 mm, 300 本連結) を用い、*n*-ブタノール-*n*-プロパノール-0.28% アンモニア水 (2:1:3, v/v/v) の下層部を固定相とし上層部を移動相として 2ml/hr の流速で行った。溶出液 10ml ずつを分取した。

5. スペクトル分析 UV スペクトル分析は日立自記分光光度計 200 型, NMR 分析は日立核磁気共鳴装置 R-22 型, IR スペクトル分析は日立赤外分光光度計 EPI-G-2 型を用いて行った。

実験結果および考察

1. 分離菌による 5,5' デヒドロジバニリンの分解

分離した菌株による 5,5' デヒドロジバニリンの分解について検討し Table I に示す結果を得た。Table I に示すように、10 日間の培養において 320nm における吸光度の減少率は高いもので約 65% であった。グルコース添加培地では菌の生育は良好であったが、基質の分解は微弱であった。一方、ペプトン添加培地では菌の生育も良好で基質の分解も良好であった。これらの 4 菌株のうちで D2-1 および D7-2 菌株が良好な分解を示したので、以後の実験においてはこの 2 菌株を用いて行った。

2. D2-1 および D7-2 菌株の諸性質

D2-1 および D7-2 菌株ともにグラム陰性の桿菌で単極べん毛で運動性であった。カタラーゼおよびオキシダーゼはともに陽性であった。これらの結果から、両菌株ともに *Pseudomonas* 属であろうと推定されるが、菌学的諸性質についてはさらに検討する必要がある。両菌株の電子顕微鏡写真を Fig. 1 に示した。なお、両菌株ともに分離時には 5,5' デヒドロジバニリンを唯一の炭素源とする培地に良好な生育を示したが、継代培養を続けると生育が悪くなる傾向が認められた。

3. 代謝産物の分離・同定 ペプトン (1%) 添加培地で D2-1 および D7-2 菌株を 10 日間培養し、培養液の紫外外部吸収スペクトルを調べた。Fig. 2 に示すように、両菌株において紫外外部吸収スペクトルが著しく変化していることが明らかとなった。

培養液を薄層クロマトグラフィーにより分析した結果、Fig. 3 に示すように、5,5' デヒドロジバニリンは、主として A および B の 2 成分に変化していることが明らかとなった。D2-1 菌株においては、その主成分は A 成

Table I. Effect of Glucose and Peptone on the Metabolism of Dehydrodivanillin by Isolated Bacteria (10-days culture)

Strain tested	Decrement of absorbance at 320nm (%)		
	Addition		
	None	Glucose (1%)	Peptone (1%)
D2-1	22.4	0.0	44.8
D6	12.9	0.0	13.8
D7-1	14.1	12.0	12.6
D7-2	63.5	21.7	83.9

Fig. 1. Electron Micrograph of Isolated Strains ($\times 5000$).

Fig. 2. UV-Spectra of the Culture Filtrates (10-days culture). —, uninoculated control; ---, strain D2-1; ·····, strain D7-2.

Fig. 3. Thin-Layer Chromatography of the Culture Filtrates (10-days culture). I, uninoculated control; II, strain D2-1; III, strain D7-2.

Fig. 4. Droplet Counter Current Chromatography of the Culture Filtrates (10-days culture). —, strain D2-1; ·····, strain D7-2.

分であり、B成分は微量であった。一方、D7-2菌株においてはB成分が主成分であり、A成分は微量であった。そこで、A成分をD2-1菌株の培養液から、B成分をD7-2菌株の培養液から、以下に示すような方法で単離して、それらの化学構造を明らかにした。D2-1およびD7-2菌株をそれぞれ5,5'-デヒドロジバニリン1.4gを含むペプトン(1%)添加培地700mlに接種し、10日間振とう培養した。それぞれの培養液を遠心分離して菌体を除去した。上澄液を約50mlに濃縮し、pH9.0に調整後n-ブタノール-n-プロパノール-0.28%アンモニア水(2:1:1.5, v/v/v)で抽出した。水相区分を濃縮し液滴向流クロマトグラフィーにより各成分を分離した。Fig.4に示すように、両菌株ともに2成分から成っているが、D2-1菌株の場合にはA区分、D7-2菌株の場合にはB区分が主成分であった。それぞれの成分をさらに分離用薄層クロマトグラフィーにより精製し、A区分800mg、B区分650mgを得た。

Fig.5にA区分およびB区分のメチル化物のNMRスペクトルを示した。Fig.5に示すように、A区分のNMR(d_6 acetone/ d_6 DMSO) δ (ppm): 4.00(3H, s, $-\text{OCH}_3$), 4.04(3H, s, $-\text{OCH}_3$), 7.41(2H, s, arom-H), 7.50(2H, s, arom-H), 9.67(1H, s, $-\text{CHO}$)で、9.67ppmにアルデヒドのプロトンに由来するシグナルが認められ、各シグナルの面積比および基質のNMRスペクトルとの比較から、アルデヒド基は1個と判断される。B区分のNMR(d_6 acetone/ d_6 DMSO) δ (ppm): 3.86(6H, s, $-\text{OCH}_3$), 7.43(4H, s, arom-H)でアルデヒドに由来するシグナルは全く認められなかった。さらに、B

区分をジアゾメタンでメチル化し分析した結果, NMR (CDCl_3) δ (ppm): 3.66(6H, s, $-\text{COOCH}_3$), 3.82(6H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.88(6H, s, $-\text{OCH}_3$), 7.40(2H, d, $J=2$, arom-H), 7.46(2H, d, $J=2$, arom-H) (Fig. 5), $\text{IR}_{\text{max}}^{\text{CH}_2\text{Cl}_2}$ cm^{-1} : 1728($-\text{CO}-\text{OCH}_3$), MS(70eV), m/z : 390(M^+)であった.

また, 0.1N NaOH 溶液中における紫外吸収スペクトルを比較すると, 基質は 360nm に吸収極大を示し, バニリンと類似した吸収スペクトルを示すが, A区分は

360nm と 300nm に吸収極大を示し, バニリンとバニリン酸の混合物と類似したスペクトルを示した. このことは分子内にアルデヒド基とカルボキシル基が存在することを示すものである. B区分は 360nm には全く吸収を示さず, 300nm 付近にバニリン酸に類似したスペクトルを示した. このことは分子内にバニリン型の構造をもっていないことを示すものである.

以上の実験結果から, A区分は基質のアルデヒド基が1個酸化された化合物であり, B区分は2個のアルデヒ

Fig. 5. NMR Spectra of Isolated Compounds. (a), fraction A; (b), methyl ester of fraction B.

Fig. 6. Accumulation of the Metabolites from Dehydrodivanillin by Strains D2-1 and D7-2. ●, dehydrodivanillin; ○, dehydrodivanillic acid semialdehyde; ◐, dehydrodivanillic acid.

ド基が酸化された 5,5' デヒドロジバニリン酸であると結論される。

4. 5,5' デヒドロジバニリンの培養経過に伴う変化

D2-1 および D7-2 菌株をペプトン (1%) 添加培地で培養し、培養の経過に伴う基質ならびに代謝産物の変化について検討した。Fig. 6 に示すように、D2-1 菌株においては基質の減少に伴い、主として 5,5' デヒドロジバニリン酸セミアルデヒドが増大した。5,5' デヒドロジバニリン酸の蓄積量は微量であった。一方、D7-2 菌株の場合には主に 5,5' デヒドロジバニリン酸が蓄積した。5,5' デヒドロジバニリン酸セミアルデヒドは培養初期に

少量蓄積したが、最終的には蓄積量は微量であった。また、D7-2 菌株においては、いったん蓄積した 5,5' デヒドロジバニリン酸は徐々に減少した。Fig. 3 に示すように、両菌株の培養液中には本研究で明らかにした化合物以外にも、中間代謝産物と考えられる物質が認められた。以上の実験結果から、5,5' デヒドロジバニリンは下記に示すような経路で分解されるものと考えられる。最終的には芳香環が開裂して分解されるものと推察されるが、開裂反応は微弱であると考えられる。この点については今後さらに検討する必要がある。

要 約

集積培養法により、5,5' デヒドロジバニリンを唯一の炭素源とする培地に生育する細菌 4 菌株を得た。これらの細菌のうちの 2 菌株 (D2-1 および D7-2) が 5,5' デヒドロジバニリンを代謝し、2 種の間代謝産物を蓄積することが明らかとなった。D2-1 菌株が蓄積する中間代謝産物の主成分は 5,5' デヒドロジバニリン酸セミアルデヒドであり、D7-2 菌株が蓄積する主成分は 5,5' デヒドロジバニリン酸であることが明らかとなった。

5,5' デヒドロジバニリンの合成と代謝産物の分析に協力いただいた京都大学木材研究所リグニン化学部門、中坪文明博士ならびに棚橋光彦博士に感謝の意を表する。

本報告の一部は、日米合同微生物学会議(ハワイ, 1979 年)において発表した。

なお、本研究の費用の一部は、昭和 52 年度文部省特定研究費補助金によったことを記し、謝意を表する。

- (1) T. Fukuzumi: "Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry, and Potential Applications," ed. by T. K. Kirk, T. Higuchi and H. M. Chang, Vol. II, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980, p. 73.
- (2) 杉崎祐司, 菊池泰弘, 山崎真狩, 福住俊郎, 片山義博, 田村学造: 昭和 54 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1979, p. 8.
- (3) H. Kawakami and T. Ohyama: The ACS/CSJ Chemical Congress, Abstr. CELL-133, Honolulu, Hawaii, 1979.