

[J. Ferment. Technol., Vol. 52, No. 3, p. 177~184, 1974]

キシロースの加熱による抗菌性物質の生成

加藤 信行・芝崎 勲

大阪大学工学部醸酵工学教室

Production of Antimicrobial Substances by Heat
Treatment of Xylose Solution

Nobuyuki Kato and Isao Shibasaki

Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering
Osaka University, Yamada-kami, Suita-shi, Osaka

The production of antimicrobial substance(s) was investigated by heating a xylose-amino compound mixture in alkaline solution. However it was found that the presence of amino compounds under these condition were not necessary for the production of antimicrobial substance(s). It was also found that the antimicrobial substance(s) was produced by the reaction with other sugars, such as hexose (e.g., glucose, galactose, mannose) and pentose (ribose, arabinose). When a relatively low alkaline pH value was maintained during the heat treatment, high antimicrobial activity was obtained in the reaction mixture.

The antimicrobial substances in the reaction mixture, obtained by heating the xylose solution (0.3 M) in 1 M carbonate buffer (pH 10.6) at 120°C for 20 min, were separated by solvent extraction and liquid chromatography. Four phenolic compounds were isolated and identified as catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol and methylhydroquinone. Antimicrobial activity by the other non-identified compound(s) in the reaction mixture was still observed.

緒 言

食品中に普遍的な成分として存在する糖類とアミノ酸とが非酵素的に反応して褐変物質を生成することは、古くよりマイラード反応あるいはアミノ・カルボニル反応として知られている。これは食品加工あるいは食品貯蔵上からみて重要な現象である。この反応はきわめて複雑であるが、近年かなりその反応機構が明かにされてきた。¹⁻⁶⁾

一方この反応は食品の香気に著しい影響のあることが認められると共に、酸化防止にも役立つことが明らかにされ、有効物質の単離が試みられている。⁷⁻¹⁰⁾ さらに培地の加熱殺菌においてマイラード反応による乳酸菌などの増殖阻害が認められている。¹¹⁻¹³⁾ 逆にカラメル物質が *Bacillus subtilis* 胞子の発芽を促進するこ

と、¹⁴⁾ マイラード反応物質の添加により *Aspergillus awamori* var. *fumeus*, *B. subtilis* のアミラーゼ生産性が向上することも見出されている。¹⁵⁾ 最近桑原、清水、矢嶋¹⁶⁾ はマイラード反応によって広い範囲の微生物に対して抗菌性を示す物質の生成することを報告している。

著者らはマイラード反応による生理活性物質の生産についての研究を企図し、すでにキシロース・グルタミン酸反応による抗菌性物質生産の最適条件を決定し、抗菌性物質の分離、精製を試みている。¹⁷⁾ 本報ではこの反応をさらに検討した結果、抗菌性物質は糖単独の加熱により生成されることを認めると共に、抗菌性物質としてカテコール、3-メチルカテコール、4-メチルカテコールおよびメチルヒドロキノン単離、同定することができたのでその結果を報告する。

実験方法

糖あるいは糖・アミノ化合物水溶液の加熱 糖として、キシロース、リボース、アラビノース、グルコース、マンノース、フラクトースを、アミノ化合物として、グルタミン酸、グリシン、バリン、リジン、メチルアミン、ジメチルアミンおよびアンモニアを用いた。これらの糖およびアミノ化合物を一定のモル比となるように緩衝液に溶解し、オートクレーブまたは油浴を用いて所定温度で一定時間加熱処理した。この場合、緩衝液としては、1 M 炭酸緩衝液 (pH 10.6) および各種 pH の M/2 リン酸緩衝液を用いた。また反応液の pH を苛性ソーダを用いて調節した場合もある。

反応液の着色度ならびに抗菌作用力の測定 上述のようにして調製した反応液の着色度は、水で適当に希釈した後、101形日立製分光光度計 (1 cm セル) を用い、波長 470 nm での吸光度を測定した。

反応液の抗菌作用力は常法による希釈法によった。ただし供試菌はすべて当教室保存菌株であり、検定および前培養用培地としては、細菌に対しては肉エキス 0.5%, ペプトン 1%, 食塩 0.5% (pH 7.0) 培地を、かび、酵母に対しては Czapek-Dox 培地に酵母エキス、ペプトンをそれぞれ 0.25% 添加した培地を用いた。前培養は主として振盪培養 (適温, 24時間) によったが、かびでは寒天斜面上, 30°C, 72 時間培養したものをを用いた。検定培地への試験菌 (かびの場合は孢子) の接種量は約 10^3 cells/ml とし、反応液の pH 調節には 10 N 硫酸, 2 N 苛性ソーダ溶液を用いた。

抗菌性物質の精製 反応液は Fig. 1 に示すごとく、ロータリーエバポレーターを用いて水分を蒸発除去し、これにアセトンを添加し、アセトン還流下で抗菌性物質を抽出した。この抽出操作を 2 回繰り返した後、アセトン抽出液にベンゼンを加えこれに可溶な部分を分取し、溶媒を除去して抗菌活性を有する区分を得た。

液体クロマトグラフィーは充填剤としてシリカゲル (Wakogel C-200), 溶媒系としてベンゼン・アセトン, ベンゼン・エーテル, クロロホルム・酢酸エチル, シクロヘキサン・アセトンを使用した。

ガスクロマトグラフィーは 063 形日立製ガスクロマトグラフを用いたが、充填剤として Silicone SE-30 を用い、1 m カラム, カラム温度は 100°C より 200°C まで (10°C/min で昇温), 試料注入温度 230°C, 検出器温度 250°C, キャリヤーガス He (20 ml/min) の条件で行った。

赤外吸収スペクトルは 215 形日立製赤外分光光度計により測定し、元素分析, 質量スペクトル, 核磁気共鳴スペクトルは大阪大学工学部分析センターに依頼して測定した。

薄層クロマトグラフィーは吸着剤として Kieselgel HF₂₅₄ を用い、展開溶媒としてベンゼン・アセトン・酢酸を、発色剤としては塩化第二鉄のアルコール溶液を用いた。

実験結果

さきにえた最適条件は反応物質 (キシロース・グル

Table 1. Effect of amino compounds on the production of antimicrobial substances in xylose solution.

Amino compound	Antibacterial activity*
Glutamate	8
Glycine	8
Valine	8
Lysine	8
Methylamine	8
Dimethylamine	8
Ammonia	4
Not added	8

Reaction mixture (xylose 0.3 M + amino compound 0.3 M) was heated at 120°C for 20 min in 1 M carbonate buffer solution (pH 10.6).

* indicated as maximum dilution for complete inhibition of growth of *Bacillus subtilis*.

Maximum dilution was determined under the following conditions: Nutrient broth (meat extract 0.5, peptone 1.0, NaCl 0.5% (pH 7.0) medium), 37°C, 24 hr.

タミン酸)の濃度 0.3 M, 加熱条件 120°C, 20分, 緩衝液として 1 M 炭酸緩衝液 (pH 10.6) である.¹⁷⁾ しかしこの反応は非常に複雑なので, 抗菌性物質単離のためにはより簡単な系が望ましいと考え以下検討を加えた.

反応条件と抗菌性物質の生成 まず糖としてはキシロースのみを使用し, アミノ化合物添加の影響を検討した. その結果は Table 1 に示したが, 供試条件下ではアミノ化合物の種類をかえても反応液の抗菌力はほとんど変化が認められず, またキシロース単独でもほぼ同等の抗菌力を示した. キシロース単独の場合とキシロースにグルタミン酸を添加した場合の両反応液については, 抗菌力のみならず, 反応後の pH, 着色度を比較検討したが, ほとんど変化を見出すことはできずほぼ同等の値がえられた. したがってキシロースのアルカリ溶液中での加熱による抗菌性物質の生成には糖のみが関与しているものと推測した. すなわちこの場合の抗菌性物質はマイラード反応により生成する

のではなく, 糖の加熱により生成すると推定することができる. そこで以下の検討にはキシロースのみを用いた.

なお Table 2 にキシロース以外の糖単独について, 同様な条件で反応させた場合の着色度と反応液の抗菌力を示した. キシロース以外の五単糖, または六単糖でも反応液の抗菌力および着色度はほぼ同程度であった.

キシロース溶液の加熱時の pH ならびに緩衝液の種類は抗菌性物質生成に対する重要な影響因子と予想されるので, 1 M 炭酸緩衝液を標準としてリン酸緩衝液, 苛性ソーダの影響を検討した. その結果が Table 3 である. M/2 リン酸緩衝液の場合, 初発 pH が高いほど反応液の抗菌力は大であったが, 反応中の pH がアルカリ性に保持されない条件の場合抗菌力は小であった. 糖をアルカリ条件で加熱するとき酸性物質が多量生産するが, 炭酸緩衝液を用いた場合のように pH が反応中はほぼ一定に保たれるとき高い抗菌力を得た. し

Table 2. Antibacterial activities of various sugar solutions (0.3 M) heated at 120°C for 20 min in 1 M carbonate buffer solution (pH 10.6).

Sugar	Optical density at 470 nm	Antibacterial activity*
D-Xylose	18.5	8
D-Ribose	18.4	8
D-Arabinose	18.7	8
L-Arabinose	18.3	8
D-Glucose	21.8	8
D-Galactose	21.0	8
D-Mannose	21.7	8
D-Fructose	20.3	8

* Maximum dilution against *B. subtilis*.

Table 3. Effect of pH on the production of antimicrobial substances in 0.3 M xylose solution heated at 120°C for 20 min.

Buffer	pH		OD ₄₇₀	Antibacterial activity*	
	initial	final		24 hr	48 hr
1 M Carbonate	10.6	9.7	17.3	8	4
M/2 Phosphate	10.6	7.1	13.1	8	2
M/2 Phosphate	9	6.9	9.7	4	2
M/2 Phosphate	7	6.6	6.6	4	<2
M/2 Phosphate	5	5.0	0.63	2	<2
NaOH solution**	11	5.2	0.74	4	2
NaOH solution	9	4.9	0.03	<2	<2

* Maximum dilution against *B. subtilis*.

** pH of xylose solution was adjusted by 1N NaOH.

かし pH が12以上になると（例えばキシロースを 1N 苛性ソーダに溶解させた場合）抗菌力はいかえって低くなる傾向を示すことを認めた。

次にキシロース濃度をかえた場合の反応液の抗菌力の変化を検討した。Table 4 に示すように、キシロース濃度の増加と共に抗菌力の上昇が認められたが、キシロース当りの抗菌力は 0.3–0.5 M 程度の濃度が最適である。

抗菌性物質の分離精製 上述の実験結果により設定した反応条件、すなわちキシロースを 0.3M になるよう 1 M 炭酸緩衝液に溶し、120°C、20分加熱する条件を用いて抗菌性物質の単離を試みた。

まず反応液のアルコール（メタノールはエタノール）添加法、活性炭処理法（バッチ法又はクロマトグラフ法）、溶媒抽出法、水蒸気蒸留法、第4級アンモニウム塩処理法およびイオン交換樹脂法について検討を加えたが良好な再現性のある結果は得られなかった。

そこで反応液を Fig. 1 に示したように減圧濃縮後、アセトン可溶区分をとり、これにベンゼンを加え生成

する黒色油状物を除去した。この区分（S 区分）より溶媒を溜去し反応液 1l 当り油状物 1g を得た。この方法により反応液の抗菌力の損失がほとんどなくて、

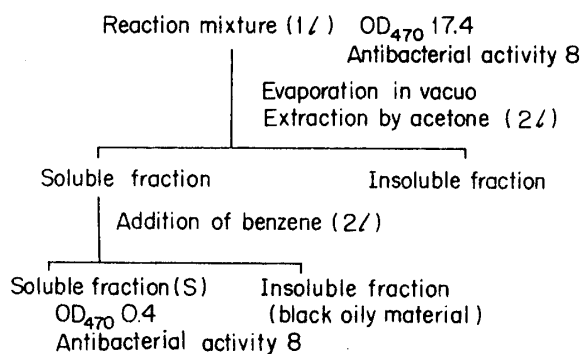


Fig. 1. Fractionation of antimicrobial substances from xylose solution (0.3 M) heated at 120°C for 20 min in 1 M carbonate buffer (pH 10.6).

Optical density at 470 nm and antibacterial activity were corrected to the volume of original reaction mixture (1l).

Table 4. Effect of concentration of xylose on the production of antimicrobial substances in 1 M carbonate buffer solution (pH 10.6) heated at 120°C for 20 min.

Concentration of xylose (M)	pH (final)	Antibacterial activity*	
		24 hr	48 hr
0.1	10.0	4	<4
0.3	9.8	8	4
0.5	9.5	16	8
1	9.0	16	8
2	8.5	32	8
5	7.7	32	16

* Maximum dilution against *B. subtilis*.

Table 5. Antimicrobial spectrum of S fraction.

Microorganism	MIC (μg/ml)*
<i>Staphylococcus aureus</i>	300
<i>Bacillus subtilis</i>	300
<i>Escherichia coli</i>	600
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	600
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	300
<i>Candida utilis</i>	600
<i>Aspergillus niger</i>	>1,000

* Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined under the following conditions.

Nutrient broth, 37°C, 48 hr for bacteria; Czapek-Dox's medium + peptone 0.25% + yeast extract 0.25%, 30°C, 48 hr for yeast and mold.

着色物質, 無機塩の大部分を除去することができた。このS区分の抗菌スペクトラムをみると Table 5 のようになり, グラム陽性細菌に対して強く, グラム陰性

細菌, 酵母はこれにつぎ, かびに対しては微弱である。

このS区分について液体クロマトグラフィーによって, 数種の抗菌性物質の存在を認めると共に, Fig. 2 に示したようにガスクロマトグラムからも多種類の物質の存在が示された。そこで溶媒としてベンゼン・エーテル系を用いた液体クロマトグラフィーによって, 主たる抗菌性物質として4種類 (M_1 , M_2 , M_3 および M_4) の物質を単離し, 融点, 元素分析, 赤外吸収スペクトル, 質量スペクトル, 核磁気共鳴スペクトルによってこれらの構造決定を行なった。

M_1 物質は融点 $100-101^\circ\text{C}$, 質量分析 (Fig. 3), 元素分析 (Table 6) の結果より $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ の実験式を得た。 M_1 は塩化鉄反応が陽性であるからフェノール性物質であると考え, 融点, 赤外吸収スペクトルの結果を中心に検討した結果カテコールであると同定した。Fig. 4 には単離精製した M_1 とカテコール標品 (融点 105°C) の赤外吸収スペクトルを示す。両者は完全に一致した。同様の手法を用いて, M_2 物質は3-メチル

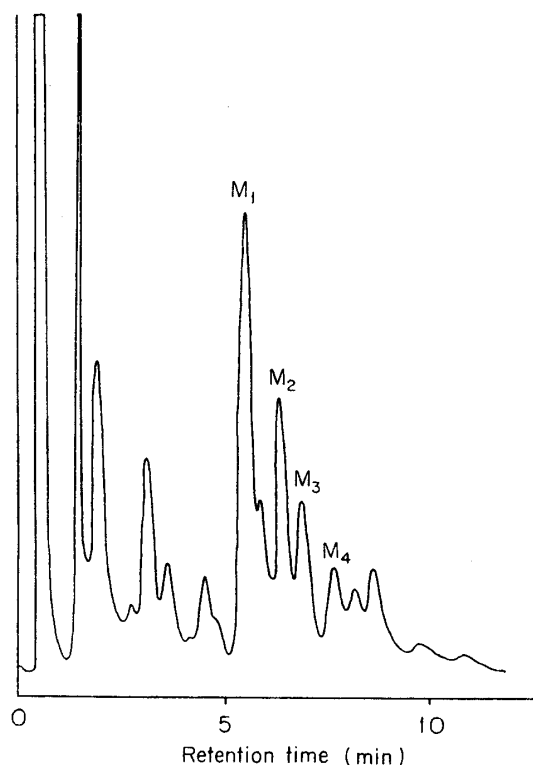


Fig. 2. Typical gas chromatogram of S fraction.
Column : Silicone SE-30 (1 m)
Column temp. : from 100 to 200°C ($10^\circ\text{C}/\text{min}$)
Carrier gas : He $20\text{ ml}/\text{min}$

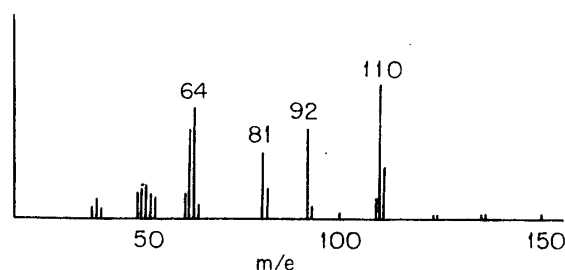


Fig. 3. Mass spectrum of M_1 substance.

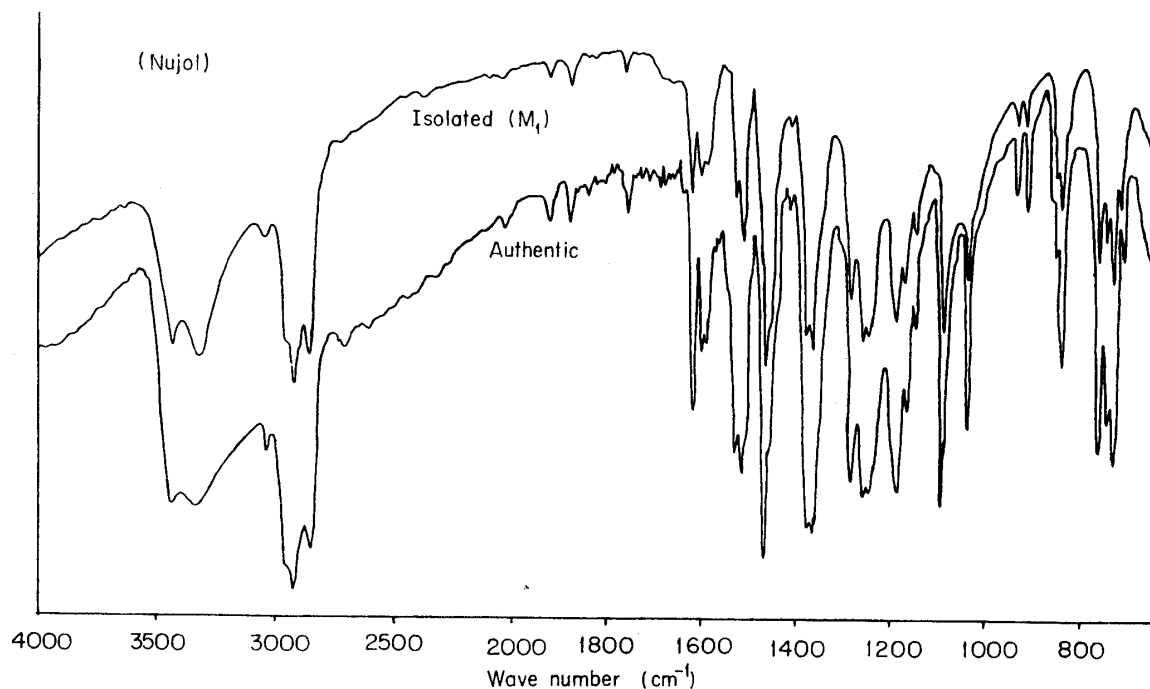


Fig. 4. Infrared spectra of M_1 substance and catechol.

カテコール, M_3 物質は 4-メチルカテコールおよび M_4 物質はメチルハイドロキノンと同定した。これら 4 物質の反応液 1 l あたりの生成量はガスクロマトグラムよりそれぞれ約 M_1 : 100 mg, M_2 : 50 mg, M_3 : 20 mg, M_4 : 10 mg と推定した。Table 7 はこれら 4 物質および類縁のフェノール性物質の *B. subtilis* に対する抗菌力を比較したものである。4 種の物質は 200-400 $\mu\text{g/ml}$ の最小発育阻止濃度を示したが、フェノールおよびレゾルシンは 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 以上の値であった。また 4 物質を生成比に従って混合した場合、150 $\mu\text{g/ml}$ の最小発育阻止濃度を示し、これらは互に相乗的に働いていることがわかる。さらに 4 者の組み合わせをかえて抗菌力を比較した結果、カテコールとメチルカテコールの間には相乗効果は認められず、カテコールあるいはメチルカテコールとメチルハイドロキノン間に著

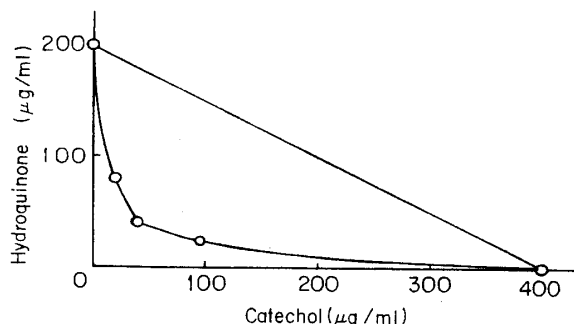


Fig. 5. Synergistic effect between catechol and methylhydroquinone for antibacterial activity against *B. subtilis*.

Antibacterial activity in a combination of two phenolic compounds or alone was indicated by MIC.

Table 6. Elemental analysis of M_1 substance.

	C%	H%	O%
Found	65.41	5.35	
Calc. as $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$	65.44	5.49	29.6

Table 7. Comparison of antibacterial activity of four identified substances and related phenolic compounds.

Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$)*
Catechol (M_1)	400
3-Methylcatechol (M_2)	300
4-Methylcatechol (M_3)	400
Methylhydroquinone (M_4)	200
$M_1 + M_2 + M_3 + M_4$ (10 : 5 : 2 : 1)	150
Phenol	1,250
Resorsine	5,000
Hydroquinone	400

* *B. subtilis*, 48 hr.

Table 8. Antimicrobial spectra of four identified substances.

Microorganism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	Catechol	3-Methylcatechol	4-Methylcatechol	Methylhydroquinone
<i>S. aureus</i>	400	400	800	400
<i>B. subtilis</i>	400	300	400	200
<i>E. coli</i>	400	800	800	400
<i>Ps. aeruginosa</i>	800	800	800	800
<i>Sacch. cerevisiae</i>	400	400	400	400
<i>Can. utilis</i>	1,600	400	800	400
<i>Asp. niger</i>	>1,600	800	800	1,600

しい相乗性のあることを見出した. Fig. 5 には両者の組み合わせ効果例を示した.

Table 8 には4種のフェノール性物質の種々の微生物に対する抗菌スペクトルを示したが, Table 5 と大体同様な傾向であった.

キシロース反応液のS区分には Fig. 2 に示したガスクロマトグラムや薄層クロマトグラフィーによって上記4物質以外にフェノール性物質, その他の物質の存在が認められるが, これらについては別の機会に発表する予定である.

考 察

近年マイラード反応について反応機構の研究の進展と共に数多くの生成物が示されてきた. この反応の有用な面としては食品の香気への貢献であり, 油脂の酸化防止効果であって, すでに有効物質の単離精製が進められている. 一方マイラード反応で生成する生理活性物質(抗菌性,^{11-13, 16} 細菌胞子の発芽促進,¹⁴ アミラーゼ生産性の向上¹⁵等)についての報告があるが, いずれの場合も活性物質は単離されていない.

著者らの研究室ではかねがねマイラード反応による生理活性物質の生産について注目し, とくに抗菌性物質の生成について検討を加えてきた. 本研究は著者の研究室での過去の結果¹⁷) および桑原らの結果¹⁶) を基礎として, 抗菌性物質の単離を試みた. その結果, 採用した加熱条件のもとでは, アミノ化合物の共存によって抗菌力の上昇は認められず, キシロースのアルカリ性での加熱による抗菌性物質生成におけるアミノ化合物の影響はきわめて少ないことがわかった. またキシロース以外の単糖類でもほぼ同様の結果を得た. キシロース以外の糖の場合, その中に含まれる抗菌性物質がキシロースの場合と同様であるか否かは今後検討の予定である. また抗菌性に対するアミノ化合物の影響, あるいは糖の種類による抗菌力の変化について桑原らの報告¹⁶)との相違についてはさらに検討の余地がある.

本研究によって, キシロースのアルカリ性のもとでの加熱反応により生成する抗菌性物質はフェノール性物質が主体をなしていると考えられる. すなわち著者らの分離同定した4種の物質(カテコール, 3-メチルカテコール, 4-メチルカテコールおよびメチルヒドロキノン)で反応液の抗菌力の約1/3を占めること, さらに多数の未同定フェノール性物質の存在を薄層クロマトグラムで認めている. これらの諸物質は必ずしも強力な抗菌力をもっているとはいえないようである

が, 適当な組み合わせによりかなりの相乗性が期待できる結果が得られた. 糖の加熱処理における生成物の検討についてはいくつか報告があり,¹⁸⁻²¹⁾ フェノール性物質としてフェノール, カテコール, メチルカテコール, レゾルシン, ハイドロキノン認めている. 一方アルカリ条件下での加熱について Shaw らが報告しているが,^{22, 23)} 生成物として有機酸, フラン化合物, ラクトン, 各種ケトン認めている. また最近 Kato らは蔗糖, ブドウ糖および果糖の苛性ソーダ水溶液中での加熱によりメチルベンゾキノン, カテコールおよびメチルカテコールを得ている.²⁴⁾

要 約

マイラード反応による抗菌性物質の生成について検討し, キシロース 0.3 M, 1 M 炭酸緩衝液 (pH 10.6), 120°C, 20分の反応条件では, 抗菌力の出現に対して必ずしもアミノ化合物の共存効果は認めず, さらにまたキシロース以外の糖でもほぼ同程度の抗菌力がえられた. そしてキシロースのアルカリ性での加熱処理によって生成する抗菌性物質としてカテコール, 3- および 4-メチルカテコール, メチルヒドロキノンの4種のものを単離同定した. またカテコールとメチルヒドロキノンの間に顕著な相乗性を認めた.

本研究の大部分は昭和48年度日本醸酵学会大会で発表した.

文 献

- 1) Reynolds, T. M.: *Adv. Food Res.*, **12**, 1 (1963).
- 2) Reynolds, T. M.: *Adv. Food Res.*, **14**, 167 (1965).
- 3) Koehler, P. E., Mason, M. E., Newell, J. A.: *J. Agr. Food Chem.*, **17**, 393 (1969).
- 4) Ferretti, A., Flanagan, V. P. Ruth, J. M.: *J. Agr. Food Chem.*, **18**, 13 (1970).
- 5) Shigematsu, H., Kurata, T., Kato, H., Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1631 (1972).
- 6) Kato, H., Shigematsu, H., Kurata, T., Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1639 (1972).
- 7) 藤巻, 倉田: 化学と生物, **9**, 85 (1971).
- 8) Kato, H., Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 287 (1968).
- 9) 山口, 藤巻: 食品工, **17**, 136, 142 (1970).
- 10) 山口, 藤巻: 食品工, **20**, 485, 507 (1973).
- 11) Lankford, C. E., Ravel, J. M., Ramsey, H. H.: *Appl. Microbiol.*, **5**, 65 (1957).
- 12) Jemmali, M.: *J. appl. Bacteriol.*, **32**, 151 (1969).
- 13) Rosen, B., Christiansen, L. N., Busta, F. F.: *Appl. Microbiol.*, **20**, 113 (1970).
- 14) Hachisuka, Y., Kato, N., Asano, N., Kuno, T.: *J. Bacteriol.*, **69**, 407 (1955).
- 15) 北田, 上山, 富金原: 醸工, **44**, 509 (1966).

- 16) 桑原, 清水, 矢嶋: 農化, **46**, 89 (1972).
- 17) 渡辺, 福井, 俵谷, 芝崎: 農芸化学会大会要旨集, p. 152, (1972).
- 18) Heyns, K., Stute, R., Paulson, H.: *Carbohydrate Res.*, **2**, 132 (1966).
- 19) Walter, R. H., Fagerson, I. S.: *J. Food Sci.*, **33**, 294 (1968).
- 20) Johnson, R. R., Alford, E. D., Kinzer, G. W.: *J. Agr. Food Chem.*, **17**, 22 (1969).
- 21) 清水, 松任, 水沼, 岡田: 食品工, **17**, 391 (1970).
- 22) Shaw, P. E., Tatum, J. H., Berry, R. E.: *J. Agr. Food Chem.*, **16**, 979 (1968).
- 23) Shaw, P. E., Tatum, J. H., Berry, R. E.: *J. Agr. Food Chem.*, **17**, 907 (1969).
- 24) Kato, H., Mizushima, M., Kurata, T., Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 2677 (1973).

(昭和48.12.6受付)