

ハンドタオルの異臭の原因となる揮発性物質を産生するクレブシエラ属細菌の 単離と同定

金田一秀

(令和 6 年 9 月 18 日 受理)

Isolation and identification of the *Klebsiella* sp. producing a volatile substance that causes the specific odor from a hand towel

Kazuhide KANEDA

Summary

The microbe was isolated from a hand towel to elucidate the foreign odor ingredients. The volatile component causing the foreign odor produced by the microbe was then identified. The volatile components in the culture medium gas phase were sampled using the MonoTrap method and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. Microbial identification was performed by morphological observation, sequence analysis, and monad dendrogram of the 16S rRNA gene. We successfully isolated *Klebsiella* sp. and identified 2-methyl-1-butanol as the volatile component. 2-Methyl-1-butanol is derived from plants and has a natural fruit-like flavor. The structural analysis of another unidentified volatile component will be performed in future studies.

Keywords: Volatile substance, MonoTrap, GC/MS, *Klebsiella* sp.

要 旨

ハンドタオル由来の異臭成分を明らかにするために、ハンドタオルから微生物の単離を行い、微生物が産生する異臭の原因となる揮発性成分の同定を行う。MonoTrap 法を用いて培地気相中の揮発性成分の捕集を行い、ガスクロマトグラフィー質量分析法による解析を行った。微生物の同定は、形態的観察と 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析と分子系統樹により解析を行った。ハンドタオルからクレブシエラ属に属する真正細菌を得ることに成功し、揮発性成分として、2-メチル-1-ブタノールを産生していることを明らかにした。今後未同定の揮発性成分について、構造解析を行う予定である。

キーワード: 揮発性物質、MonoTrap、ガスクロマトグラフィー質量分析法、クレブシエラ属

連絡責任者 Corresponding author, E-mail: k-kaneda@thcu.ac.jp

東京医療保健大学 (154-8568 東京都世田谷区世田谷 3-11-3)

Division of Medical Nutrition, Faculty of Healthcare, Tokyo Healthcare University, 3-11-3
Setagaya, Setagaya, Tokyo 154-8568, Japan

緒 言

衣類の生乾きは、竹内らの研究によると中鎖アルデヒド、中鎖アルコール、ケトンなどの「カビ様の臭い」、短鎖脂肪酸、中鎖脂肪酸などの「酸っぱい臭い」、窒素化合物などの「生臭い臭い」および硫黄化合物からなる複合臭であることが報告されている。生乾き臭の指標物質として4-メチル-3-ヘキセン酸を含む数種類の脂肪酸が提案¹⁾されており、部屋干し洗剤の開発に応用されている。河村らは、4-メチル-3-ヘキセン酸生産菌として、生乾き臭のついた衣類からモラクセラ属菌を単離同定している²⁾。細菌が作る生乾き臭成分に関しては、これまでほとんど研究されておらず、微生物が産生する異臭成分と細菌との関係については、不明な部分が多く残されているのが現状である。

このような背景の下で、ヘッドスペース法を用いたガスクロマトグラフィー質量分析法(GC/MS)による特異な培養気相成分を産生する細菌に関する研究³⁾に注目した。その後検出感度の高いMonoTrap法とGC/MSを組み合わせた方法を検討した。ハンドタオルから異臭を産生する微生物を単離し、MonoTrap-GC/MS法を用いた培養気相中の揮発性成分分析と微生物の同定を行ったので報告する。

実験方法

1. ハンドタオルからの微生物の単離

1) 実験試料

身近な臭気成分と臭気成分を産生する微生物について調べることで、微生物の増殖や臭気の発生を抑えることができるのではないかと考え、特異な臭いを有する台所と洗面所の台拭き用途のハンドタオルを実験試料とした。タオルの色から台所の緑のチェックハンドタオルをG系統とし、洗面所の桃色チェックのハンドタオルをP系統として、実験に供した。

2) 集積培養と培養条件の検討

実験に用いた培地として、普通ブイヨン培地ならびに標準寒天培地(栄研化学)を用いた。実験試料のハンドタオルPおよびGを滅菌したハサミで5 cm×5 cmに切断し、普通ブイヨン培地20 mLに入れ、インキュベーター内で25℃、24時間倍した。特異な臭いを指標として、滅菌したタオル片を入れた培地に繰り返し継代することにより、6日間培養を行った。

その培養上清100 µLを、滅菌試験管内の普通ブイヨン培地10 mLに接種し、25℃で振盪培養を行った。1時間ごとに培養液の濁度OD660を測定し、菌の増殖性について調べた。得られた粗培養液の保存は、10%グリセロール含有普通ブイヨン培地を用いて、-80℃で保存した。

2. 培養気相成分のMonoTrap-GC/MS分析

ヘッドスペース法において確認できたピークの検出感度は低く、より詳細な分析を行うためMonoTrap(GLサイエンス社製)を用いた抽出法(MonoTrap法)による捕集濃縮を行ったうえでGC/MS分析(MonoTrap-GC/MS分析法)を行った⁴⁾⁵⁾。捕集剤としては、捕集能力が高いとされているシリカモノリス活性炭含有タイプ(MonoTrap DCC18:MonoTrapディスク)を使用した。

表1 GC/MS測定条件

GC	
キャリアガス	ヘリウムガス 1.72 mL/min
注入モード	スプリット
スプリット比	10.0
注入量	5 µL
検出器	MS
カラム	DB-5
カラムオープン温度プログラム	
	30℃(1分) → 昇温5℃/min → 100℃
	→ 昇温10℃ → 280℃
MS	
気化室温度	250℃
イオン源温度	200℃
インターフェース温度	250℃
スキャン範囲	30 ~ 200 m/z

P系統ならびにG系統由来粗培養液100 µLを滅菌したヘッドスペース用バイアル内の普通ブイヨン培地10 mLに接種し、25℃、1週間振盪培養した。MonoTrapディスク1個を取り付けたMTホルダーを、ヘッドスペース用スクリーバイアル内に差し込み再度キャップした。80℃、1時間加温捕集を行った。室温まで冷却後、MonoTrapディスクを取り出し、ジクロロメタン400 µLで5分間超音波を照射することでMonoTrapディスクから、揮発

性成分を溶媒抽出した。その溶媒抽出液を測定試料としてGC/MS(Shimadzu GC-2010、GCMS-QP2010)に供して、表 1 の分析条件に従い分析を行った。得られた化合物の相同性検索は、リファレンシャルデータベース NIST を用いて行った。

3. ギ酸エステルの合成

市販されているギ酸エステルとして、ギ酸イソアミル(>95.0%(GC), 東京化成工業)とギ酸アミル(>95.0%(GC), 東京化成工業)を使用した。市販されていないギ酸エステルの合成は、以下の方法で行った⁶⁾。試薬として、ギ酸(98.0%, Wako)、(±)-2-メチル-1-ブタノール(>98%, Wako)と3-メチル-2-ブタノール(>98.0%, Wako)を用いた。アルコール2 mL、ギ酸20 μ L、濃硫酸200 μ Lと無水硫酸ナトリウム2 gを共栓付き試験に入れ、アルミブロックヒーター上で、80℃、1時間乾留して、ギ酸エステルを合成した。冷却後、水5 mLとn-ヘキサン5 mLを加えてはげしく振盪し、ヘキサン層への抽出を行った。化合物の同定は、GC/MSにて確認した。

4. 微生物の単離

G 系統由来粗培養気相から得られたピークの化合物を産生する菌の単離を行い、その菌の性状分析を行う。合わせて、P 系統由来粗培養についても同様に行った。

滅菌生理食塩水を用いて、P 系統およびG 系統由来粗培養液の10 倍、 10^2 倍、 10^3 倍ならびに 10^4 倍希釈液を作成した。各希釈液を普通寒天培地(各希釈3 枚)に画線塗抹を行い、25℃、5 日間培養を行った。P 系統およびG 系統から単一と思われるコロニーを20 個選び、釣菌後普通ブイヨン培地3 mLに接種し、25℃、2 日間単離培養した。培養した菌の性質を調べた。性状解析としてコロニーの形・表面の状態・色を観察し、顕微鏡を用いて微生物のグラム染色と運動性を観察した。

5. 微生物の同定

単一に得られた菌株のうち保持時間3.8 分のピークが検出されたW203 株について、16S rRNA 遺伝子の全長約1.5 kb のシーケンス解析を行った。分子系統解析は、MEGA11 ソフトウェアを使用し、系統樹の推定は近隣結合法、塩基置換モデルは、

kimura-2-parameter、系統樹の信頼性評価は、ブートストラップ法(1000 回反復)にて行った。

実験結果

1. 粗培養気相成分のMonoTrap-GC/MS 分析

シリカモノリス捕集剤を用いたMonoTrap 法に変更したことにより、検出強度を高めることに成功し、P 系統由来とG 系統由来培養気相中に保持時間3.8 分のピークが検出された(図 1)。

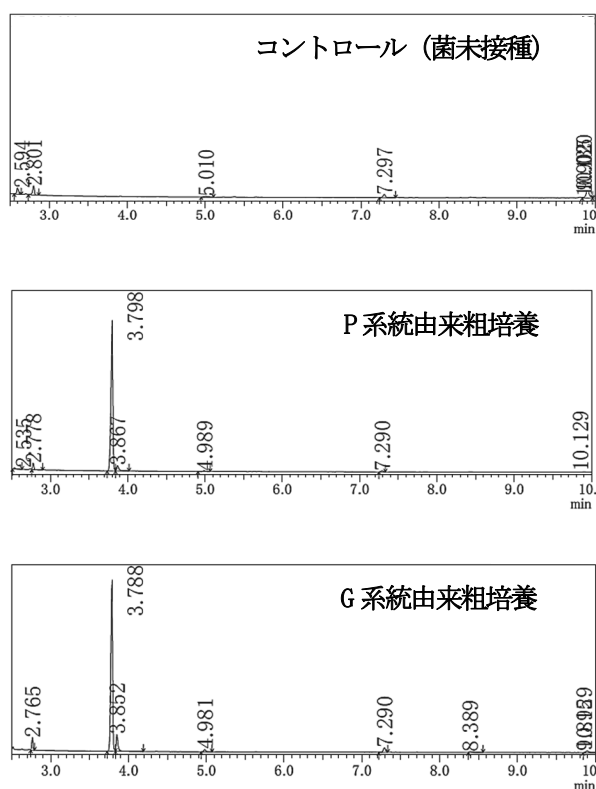


図1 MonoTrap-GC/MS 分析結果

2. 特異な臭いを産生する微生物の単離

G 系統粗培養液から微生物の単離を試みた。その結果、検出されたピークを指標として、ハンドタオルG 系統からNo. 9, 10, 11, 17, 19, 20 を分離した(表 2)。P 系統については、今後さらなる単離を進める予定である。

G 系統において、保持時間3.8 分のピーク面積が最も大きいNo. 9 とNo. 20 について、再単離を繰り返し、No. 9 とNo. 20 からそれぞれ、W904-1 株(No. 28)とW203 株(No. 30)を単一に得ることに成功した。W203 株とW904-1 株のコロニーの色は乳白色

と黄色を示し、ともにグラム陰性であった。

表2 微生物の性状とピークの有無

No	菌株	グラム染色	ピーク面積
7	G-07	+	-
8	G-08	-	-
9	G-09	-	++++
10	G-10	-	+++
11	G-11	-	+++
12	G-12	-	-
15	G-15	-	-
16	G-16	+	-
17	G-17	-	++++
18	G-18	-	-
19	G-19	-	++++
20	G-20	-	+++
28	W904-1	-	++++
30	W203	-	+++

ピーク面積 +++ 10⁷以上、++ 10⁶以上、+ 10⁵以上

3. G 系統由来ピーク化合物の同定

単一に得られた W203 株と W904-1 株について、MonoTrap-GC/MS 分析を行ったところ、ピーク A (保持時間 3.946 分) とピーク B (保持時間 3.4004 分) が得られた (図 2)。

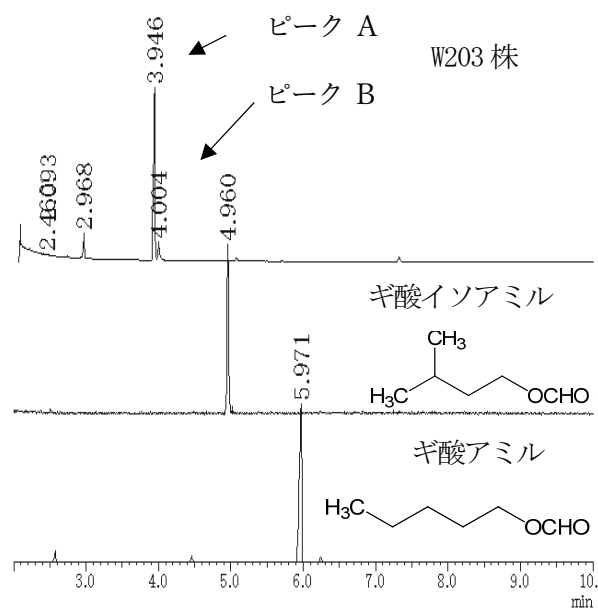
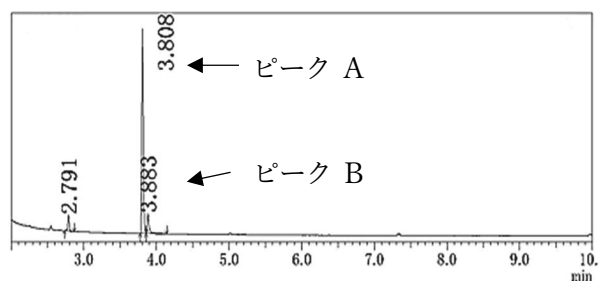


図2 W203 株と市販ギ酸エステルとの GC 結果

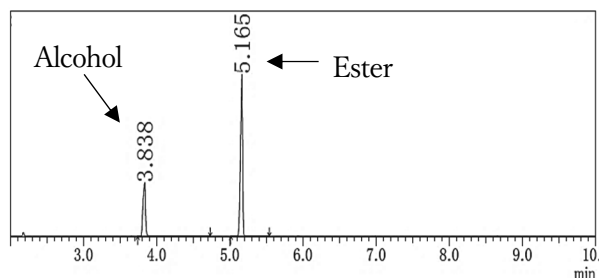
リファレンシャルデータベース NIST による化合物相同性の検索結果、ピーク A、ギ酸 3-メチル-1-ブチル、ギ酸イソアミルとギ酸アミルにおいて、それぞれ、90%と 88%の相同性を示したことから、ギ酸エステルの可能性が高いと予想された。しかしながら、ガスクロマトグラフィーの保持時間は、W203 株、市販されているギ酸イソアミルおよびギ酸アミル間で異なっていた。

ギ酸イソアミルとギ酸アミルのその他構造異性体である可能性が考えられたので、ギ酸エステルの合成を行い、ギ酸 2-メチル-1-ブチルならびにギ酸 3-メチル-2-ブチルを合成し、その保持時間の比較を行った (図 3)。

A) W203 株



B) ギ酸 2-メチル-1-ブチル



C) ギ酸 3-メチル-2-ブチル

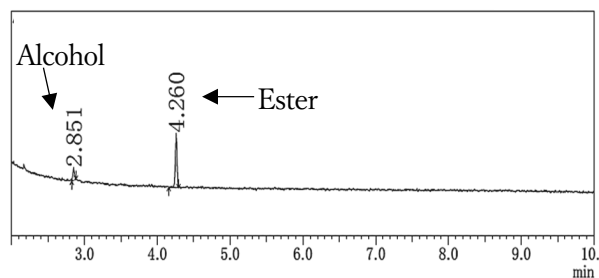


図3 W203 株と合成ギ酸エステルとの GC 結果

保持時間を比較したところ、W203 株のピーク A はギ酸イソアミル(4.96 分)とギ酸アミル(5.971 分)とも一致していなかったことから、ギ酸イソ

アミルおよびギ酸アミルでないことが判明した。そこで、リファレンシャルデータベース NIST に登録されていない炭素数 6 のギ酸エステル $C_6H_{12}O_2$ の構造異性体のうちギ酸 3-メチル-2-ブチルとギ酸 2-メチル-1-ブチルを合成し、保持時間の比較を行った結果を図 3 に示した。

さらに、W203 株のピーク B と 2-メチル-1-ブタノールの質量スペクトルが一致したことから、W203 株が産生する揮発性成分の一つとして、2-メチル-1-ブタノールと同定した(図 4)。

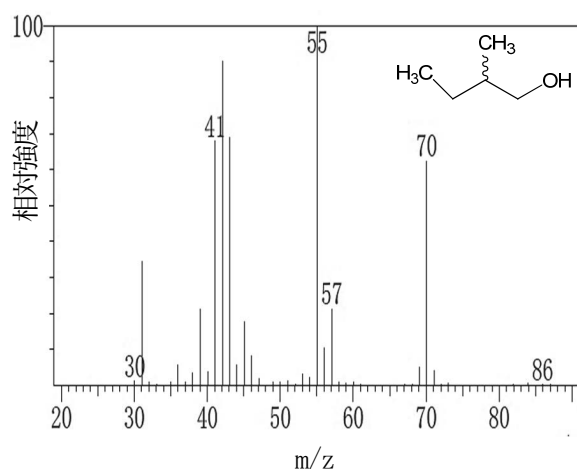


図4 W203 株由来化合物の質量マススペクトル

ピーク A は、リファレンシャルデータベース NIST による化合物相同性の検索結果よりギ酸イソアミルとギ酸アミルと、それぞれ 90%と 88%を示したが、保持時間で異なっていた。

4. 特異な臭いを産生する微生物の分子系統解析

W203 株と W904-1 株について、16S rRNA の約 1.5 kb 全長の塩基配列と分子系統解析を行った(図 5)。その結果、W203 株と W904-1 株の 16S rRNA 塩基配列は完全に一致していた。BLAST 検索を行った結果、W203 株と相溶性が高い順に、*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* JCM 1662 株 (AB004753) 99.4%、*K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* 01A030 株 (HG933296) と *K. pneumoniae* subsp. *similipneumoniae* 07A044 株 (HG933295) と *K. variicola* subsp. *variicola* F2R9 株 (AJ783916) 99.3%、*K. africana* SB5857 株 (MK040622) と *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* ATCC 13884 株 (AF130983) 99.2%、*K. variicola* subsp. *tropica* SB5531 株 (MK040621) 99.1%、*K. aerogenes* NBRC 13534 株 (AB680425) 98.5%、*Enterobacter soli* LF7 株 (GU814270) 98.2%を示した。分子系統樹解析の結果を図 5 に示した。

分子系統樹解析の結果、W203 株と W904-1 株は、*K. pneumoniae*, *K. variicola*, *K. quasipneumoniae*, *K. africana* の 4 菌種からなる *Klebsiella pneumoniae* complex 内に帰属され、*K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* とクラスターを形成していることが示唆された。クラスターを形成した *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* と W203 株・W904-1 株間においても分子系統的に距離があることから、クレブシエラ属に帰属すると考えられるが、種の同定は 16S rRNA 塩基配列からのみでは困難であると判断した。

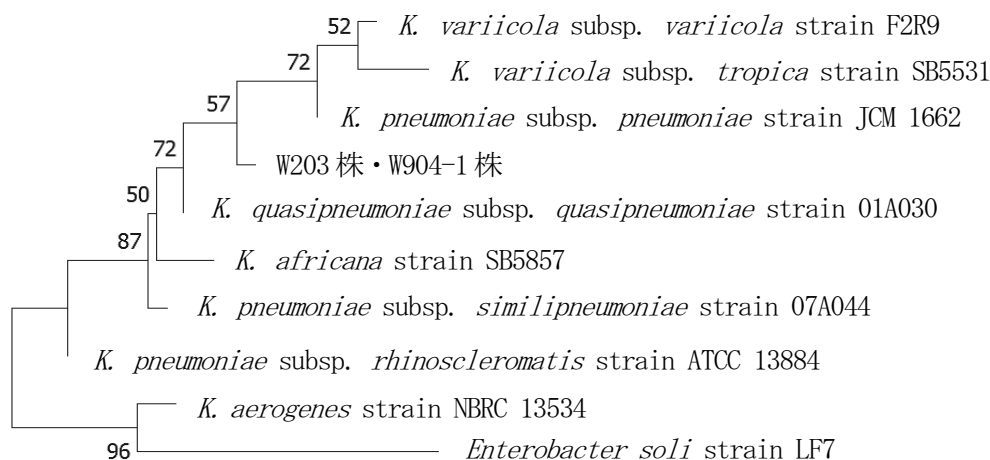


図5 W203 株および W904-1 株の分子系統樹解析結果

考 察

特異な臭いを有する台所と洗面所の台拭き用途のハンドタオルを実験試料として、MonoTrap 法により微生物が作る揮発性化合物を検出することができた。この化合物の産生を指標とした単離培養を行い単一の微生物を得ることに成功した。

ハンドタオルから得られた微生物由来培養気相成分の MonoTrap-GC/MS 分析とリファレンシャルデータベース NIST の相同性検索により、当初ギ酸イソアミルと高い相同性を示したが、GC における保持時間は異なる結果となった。ギ酸イソアミルとギ酸アミルとの保持時間の比較から、両化合物ともに W203 株と W904-1 株由来化合物（ピーク A）と異なることが明らかとなった。ギ酸イソアミルとギ酸アミルを除く、その他のギ酸エステルの可能性を検討するために、市販されていないギ酸エステル化合物を合成し、保持時間ならびにマススペクトルパターンの比較を行う過程の中で、ピーク B は 2-メチル-1-ブタノールであることが明らかとなり、その産生菌としてクレブシエラ属の一菌種であることを明らかにした。クレブシエラ属は、土壌や水中に存在するグラム陰性通染嫌気性ならびに非運動性の真正細菌として知られている。本実験において単離した W203 株と W904-1 は *Klebsiella pneumoniae* complex 内に位置しており、ヒトならびに植物からの単離が多く報告されている。

2-メチル-1-ブタノールは、フルーツ様またはワイン様の香気を有し果実等の食品に天然に含まれている成分として知られており、バイオ燃料として、組み換え大腸菌や *Corynebacterium glutamicum* による代謝工学的な生産法が研究されている化合物として注目されている⁷⁾。

今後培養条件や生産条件の検討、MonoTrap 法を用いて捕集濃縮することにより、培養気相成分の検出に成功したが、さらなる培養条件ならびに捕集濃縮条件の検討が必要であると考えている。

W203 株が産生するピーク A 化合物の構造解析、培地気相成分の臭いとの比較と生合成経路について検討していく予定である。

謝 辞

本研究の一部は卒業研究として実施したものであり、石橋麗奈さんに心から感謝いたします。

文 献

- 1) 竹内浩平, 長谷川義博, 小島みゆき, 桜井尚枝. 衣類の生乾き臭の解析, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 日本農芸化学会(東京), 149(2010)
- 2) Kubota H., Mitani A., Niwano Y., Takeuchi K., Tanaka A., Yamaguchi N., Kawamura Y and Hitomi J., *Moraxella* Species are primarily responsible for generating malodor in laundry. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**:9, 3317-3324(2012)
- 3) Collin M. T., Evan P. L., Amanda E., Ray M. and David K., Direct Growth of Bacteria in Headspace Vials Allows for Screening of Volatiles by Gas Chromatography Mass Spectrometry, *Frontiers in Microbiology*, **9**, 1-11(2019)
- 4) 中川勝彦博, 田中幸樹, 宮川治彦, -特集-異臭に関する最近の動向 GC-MS を用いた異臭分析について, におい・かおり環境学会誌, **44**:1, 28-37(2013)
- 5) 松岡伊織, 笠松政正昭, 坂宮裕実, 鈴木康弘, MonoTrap を用いた可燃性液体の法科学的分析とその評価, 日本法科学技術学会誌, **27**:2, 177-184(2022)
- 6) 山下市二, 飯野久栄, 吉川誠次, イチゴ果実におけるエステル生合成反応の基質特異性 イチゴ果実の香気成分の生成に関する研究 (第 7 報), 日本食品工業会誌, **26**:6, 256-259(1979)
- 7) Anthony F. C. and James C. L., Production of 2-methyl-1-butanol in engineered *Escherichia coli*, *Appl Microbiol Biotechnol*, **81**:1, 89-98(2008)