

Penicillium sp.によるベラトル酸の代謝

バニリン酸およびバニリンの生成

上野照雄*・駄場邦子**・森嶋伊佐夫**

平成4年6月30日受付

Metabolism of Veratric Acid by *Penicillium* sp.

Formation of Vanillic Acid and Vanillin

Teruo UENO*, Kuniko DABA**, Isao MORISHIMA**

The microbial transformation of veratric acid into vanillin was investigated. Among the organisms isolated from soil and our laboratory stock cultures, 19 strains of fungi, 1 strain of yeast and 2 strains of bacteria were selected as vanillic acid producers, and a strain KF04 isolated from soil was specially selected as a vanillin producer. The KF04 strain was identified as a *Penicillium* by the morphological characteristics.

The metabolites of veratric acid produced by KF04 strain were vanillic acid, vanillin, vanillyl alcohol and protocatechuic acid, and the main metabolite was vanillin. Optimal pH and concentration of vanillic acid for vanillin production were 5.5 and 0.1%, respectively. An addition of yeast extract to the medium stimulated the production of vanillin. Xylose and maltose were more effective than glucose as a carbon source for the production of vanillin.

緒 言

微生物による変換反応は、基質特異性、変換過程の簡便さから実用価値の高い化合物や化学的に合成が困難な化合物の生産に利用されるとともに、廃液や害毒物など廃棄資源の分解処理、またはこれらの再利用などにも利用されている¹⁾。パルプ廃液中に多量存在するリグニン

は芳香族化合物の資源として有望視されているが、リグニン関連化合物はメトキシル基をもつものが多く、微生物による分解、変換が困難なもののひとつとされている。著者らは、リグニンの有効利用をはかる目的で、リグニン関連化合物であるベラトル酸を基質として用い、微生物による変換反応を利用して、香料や医薬品素材として有用な物質であるバニリンの生産を試み、バニリン生成

* 鳥取大学大学院連合農学研究科

United Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University

** 鳥取大学農学部農林総合科学科生物資源科学講座

Department of Bio-Resource Science, Faculty of Agriculture, Tottori University

菌を見出すとともに、その菌のベラトル酸代謝ならびにバニリン生成条件について検討したのでその結果を報告する。

実験方法

1. 使用菌株

2,6-ジメトキシフェニル酢酸の脱メチル能をもつ菌として当研究室において土壌より分離、選択した22株、および研究室保存の *Aspergillus niger*, *A. japonicus*, *Mucor racemosus*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* を実験に用いた。

2. 培地および培養方法

生育および代謝産物検索用培地として、0.5%グルコース、0.1%ベラトル酸、0.3%(NH₄)₂SO₄、0.1%Na₂HPO₄·12H₂O、0.05%KH₂PO₄、0.05%MgSO₄·7H₂O、0.001%FeSO₄·7H₂O、0.05%酵母エキスを蒸留水に溶かし、pHを5.5としたものを使用した。分離菌の保存には、生育培地に寒天2%を添加した固体培地を用いた。100ml溶三角フラスコ中の生育培地30mlに保存斜面培養より1白金耳接種し、細菌は24時間、酵母は48時間、糸状菌は120時間30°Cで回転振とう培養(200rpm)を行った。

3. 洗浄菌体反応

生育培地で培養した菌体を集菌し、0.067Mリン酸緩衝液(pH7.0)で数回洗浄した。洗浄菌体反応には0.1%基質、0.05%MgSO₄·7H₂Oを含む0.067Mリン酸緩衝液(pH5.5)を用い、洗浄菌体とともに30°Cで一定時間回転振とうした。

4. 無細胞系での実験

1) 粗酵素液の調製

生育培地で5日間培養して得た洗浄菌体に、5mMメルカプトエタノールと2mM EDTAを含む3倍量(v/w)の50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5)を加え、ガラスホモジナイザーでホモジナイズ後、10,000rpmで30分間遠心分離し、得られた上澄み液を粗酵素液とした。なお、菌体採取後の操作は水中で行った。

2) 反応液の組成と反応条件

無細胞系で使用した反応液は50mM Tris-HCl(pH7.5) 1ml, 3mM NADPH 0.1ml, 3mM ATP 0.1ml, 3mM MgCl₂ 0.1ml, 3mM 基質0.1ml, 粗酵素液0.4mlに蒸留水を加え全量3.0mlとし、この反応液を30°Cに10~30分間保持して反応させた。

5. 代謝生成物の分離と確認

1) 代謝生成物の抽出

培養ろ液または反応液を塩酸でpH2に調整し、等量の酢酸エチルで2回抽出した。酢酸エチル層を液相分離ろ紙(Whatman 1PS)で分離した後、ロータリエバポレーターで濃縮乾固した。

2) 薄層クロマトグラフィー(TLC)による代謝精製物の検出および確認

濃縮乾固した抽出物を少量の酢酸エチルに溶解し、TLCに供した。TLCプレートはガラス板(20×20cm)にKieselgel 60Gを0.75mmの厚さに塗布し、風乾後110°C、60分間活性化したものを用いた。溶媒として、ベンゼン：メタノール：酢酸=45：8：4(v/v)を用い、展開後、室温で風乾し、ニトロソナフトール試薬⁹⁾で各スポットの検出を、また、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試薬⁹⁾でバニリンの検出を行い、標準物質と比較して確認した。

3) ガスクロマトグラフィー(GC)による代謝生成物の検出および確認

濃縮乾固した抽出物にN-O-bis-(trimethylsilyl)-acetamideの25%アセトニロリル溶液を添加してTMS化した試料をGCに供した。島津ガスクロマトグラフGC-4B, 検出器FID, カラムSE-54を用い、カラム温度120~220°C, 毎分6°Cで昇温, キャリアガスN₂, 流速毎分30mlの条件で各生成物を分離、検出した。各生成物の確認は既知試料との共クロマトグラフィーにより行った。

6. 走査型電子顕微鏡試料の作成

生育培地に寒天2%を含む平板培地上に滅菌したろ紙(Toyo No.2, 5×5mm)を乗せ、この上を同組成の固体培地(厚さ1mm以内)で覆い、これに菌を接種し30°Cで5日間培養した。生育した菌体の一部を取り、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で2~3回洗浄し、2.5%グルタルアルデヒド溶液中に1時間放置し前固定を行った。1%オスミウム酸で固定、エタノールで脱水し、酢酸イソアミルに浸し日立HCP-2で臨界点乾燥後、EIKOUX-10Aマルチコーターで白金蒸着を行い標本を作成した。これを日立X-650走査型電子顕微鏡で観察した。

結 果

1. ベラトル酸代謝能をもつ菌の選択

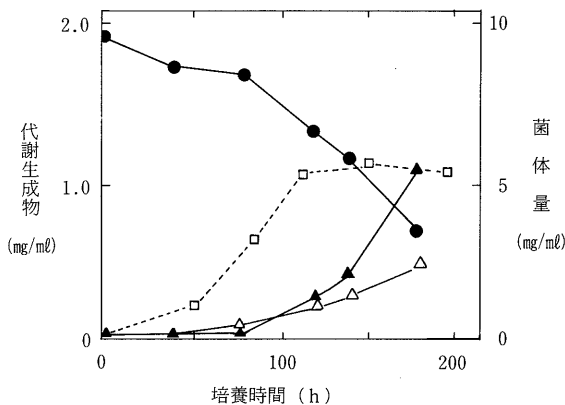
土壌中より分離した糸状菌18株、酵母1株、細菌3株の計22株および当研究室保存菌5株を用い、代謝産物検索用培地で培養し、培養ろ液についてTLCにより代謝産物を検索してベラトル酸代謝能をもつ菌の選択を行った。ベラトル酸(3,4-dimethoxybenzoic acid)を脱メチルしてバニリン酸(3-methoxy-4-hydroxybenzoic

acid)を生成する菌として、分離菌より糸状菌15株、酵母1株、細菌2株、保存菌では*A. niger*, *A. japonicus*, *M. racemosus*および*F. solani*の計22株が得られた。さらに、これらの菌についてGCで生成物を分析したところ、バニリン酸の生成能の強い菌として*A. niger*を含む糸状菌5株が得られた。その中で、分離糸状菌のKF04菌はバニリン酸のほかに、バニリン (3-methoxy-4-hydrobenzaldehyde), バニリルアルコール (3-methoxy-4-hydrobenzyl alcohol), プロトカテク酸 (3,4-dihydroxybenzoic acid)を生成していた。

そこで、以後の実験はKF04株を用いて行った。なお、菌によってはバニリン酸とともに、イソバニリン酸 (3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid) またはプロトカテク酸を生成するもの、バニリン酸を生成しないで、イソバニリン酸を生成するものもあった。

2. 基質の消費と代謝物生成の経時的変化

ペラトル酸 (0.2%) を基質とした生育培地でKF04菌を培養し、基質の消費とバニリン酸、バニリンの生成について経時変化を調べた。一定時間毎に採取した試料をGCで分析し、既知量の標準物質との面積比より生成物の定量を行った。菌体はろ過後、ろ紙で水分を十分吸取り湿重量を測定した。結果は第1図に示すごとく、対数増殖期 (80時間) までは基質のペラトル酸の消費は少なかったが、対数増殖期後期 (100時間) を過ぎたところから



第1図 KF04菌によるペラトル酸からのバニリン酸とバニリンの生成

生育培地：ペラトル酸基質
 ●—● ペラトル酸
 △—△ バニリン酸
 ▲—▲ バニリン
 □----□ 菌体量 (湿重量)

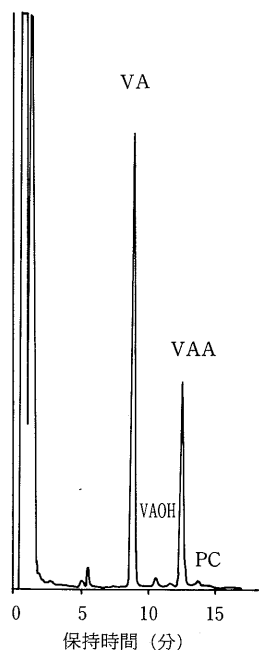
基質の消費が大となり、バニリン酸、バニリンの生成も認められた。両者の生成割合は、最初はバニリン酸の方がバニリンよりもやや多い蓄積を示したが、定常期 (180時間) ではバニリンの方がバニリン酸よりも蓄積量は大きであった。

バニリンを基質とした場合、KF04菌の生育は不良であり、バニリンの残存が著しかった。バニリルアルコールは少量であるが生成が認められた。

プロトカテク酸を基質として用いた時は、KF04菌の生育が認められ、基質の減少に伴って培地が紫色になった。

3. バニリン酸よりバニリンの生成

生育実験より、KF04菌はペラトル酸からバニリンを生成することが判明したのでバニリンの生成経路を調べるため、バニリン酸を基質とし、洗浄菌体反応および無細胞系の反応により、バニリンの生成について検討した。洗浄菌体反応は生育培地で5日間培養して得たKF04菌の洗浄菌体を、基質としてバニリン酸を含む洗浄菌体反



第2図 KF04菌によるバニリン酸の代謝生成物 (TMS誘導体) のガスクロマトグラム

洗浄菌体反応：反応時間100h
 VA :バニリン
 VAOH :バニリルアルコール
 VAA :バニリン酸
 PC :プロトカテク酸

応液にけん濁し、30°Cで4日間回転振とうした。無細胞系で反応は実験方法に記載した方法で行い、基質としてバニリン酸を使用した。洗浄菌体反応で、バニリン、バニリルアルコール、プロトカテク酸の生成を認め(第2図)、無細胞系の反応ではバニリンの生成を確認した。しかし、第2図に示すごとくバニリンに比べてバニリルアルコールとプロトカテク酸の蓄積量は少なかった。

4. バニリン生成条件の検討

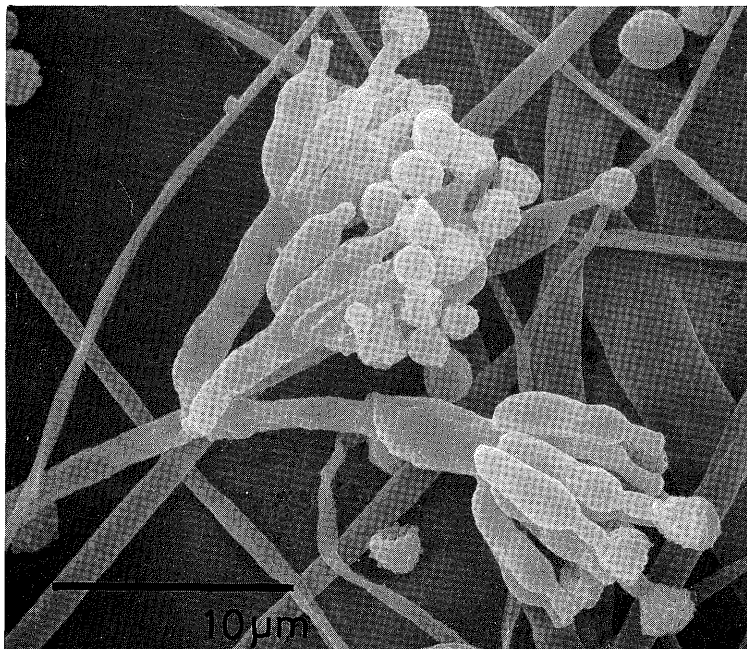
バニリンはバニリン酸の還元により生成することが判明したので、バニリン酸からのバニリン生成条件を検討した。洗浄菌体反応において、基質濃度(0.1~0.5%)、pH(5.0~7.5)をそれぞれ変化させ、バニリン酸のバニリンへの変換を検討したところ、基質濃度0.1%、pH5.5のとき最適であった。培地組成とバニリン生成との関係につき、生育培地のグルコースと酵母エキスの効果について検討した。生育培地の基質をバニリン酸0.1%として培養し、生成したバニリン量よりバニリン変換率を算出し菌体重量1g当たりの変換率として比較した。完全培地における変換率を100とすると、グルコース欠除時は

86、酵母エキス欠除時は60、両者を除いた場合は24であった。これらの結果よりバニリン生成にはグルコース、酵母エキス両者の存在が必要であることが判明した。

次に、糖源としてグルコース、マルトース、キシロース、サッカロースの4種類について検討した。菌体量を一定にしてバニリン変換率を比較すると、グルコース47.3%、マルトース61.5%、キシロース81.0%、サッカロース30.5%であ、グルコースよりもキシロース、マルトースの方が変換率は高かった。

5. KF04菌の形態学的性質

KF04菌の走査型電子顕微鏡写真像を第3図に示した。本菌は菌糸に隔壁をもち、分生芽胞柄の先端は筆状または帚状に配列した梗子となっており、そこから連鎖状に分生芽胞を分生していた。また、分生芽胞柄を中心に左右均斉に分岐しており、さらに分岐の様子は双輪生状であった。分生芽胞は球形で表面に少し凸凹があり、緑色を呈していた。以上の結果よりKF04菌は*Penicillium*に属するものと思われる。



第3図 バニリン生成菌KF04株の走査電子顕微鏡写真

培地：生育培地
 培養温度：30°C
 培養日数：5日間

考 察

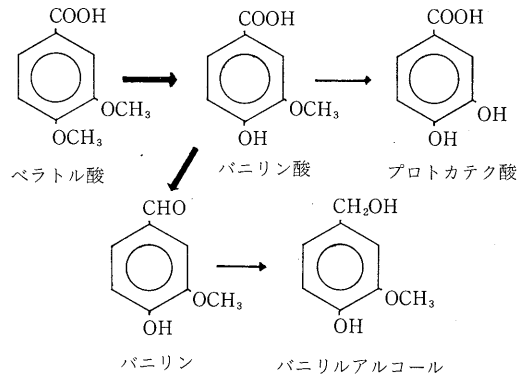
芳香族化合物の資源として有望なリグニンは、関連化合物にメトキシル基をもつものが多い。メトキシル基のようなエーテル結合をもった化合物は一般に微生物離分解性であるが、DONNELLYとDAGLEY²⁾の報告に見られるように、その分解、変換の過程では、第一段階として脱メチル反応が関与していると言われている。

われわれは、微生物変換によるリグニン関連化合物の有効利用をはかる目的で、まず、ベラトル酸脱メチル能をもつ菌を選択し、バニリン生成菌(KF04菌)を見出した。次いで、バニリンの生成条件を検討し、微生物によるバニリン生産の可能性を指摘した。なお、選択した脱メチル菌の大半はベラトル酸の4位のメトキシル基に作用してバニリン酸を生成したが、3位を脱メチルしてイソバニリン酸を生成する菌株(糸状菌)も存在した。これは、菌株により選択的に脱メチル反応が行われることを示している。

生育培養の実験より、KF04菌のベラトル酸代謝産物としてバニリン酸、バニリン、プロトカテク酸、バニリルアルコールの生成が認められ、また、バニリンを基質とした時は生育不良であったがバニリルアルコールが生成した。代謝生成物の経時的変化、洗浄菌体反応および無細胞系の反応より、ベラトル酸は脱メチルされてバニリン酸を生成し、バニリン酸はさらに還元されてバニリンに変換するとともに、一部は脱メチルされてプロトカテク酸を生成することが判明した。

バニリン酸の代謝物としてはバニリンが主生成物であり、バニリルアルコールとプロトカテク酸の生成割合は小さかった。バニリルアルコールの蓄積が少なかったのは、KF04菌はバニリン資化能が低いため、バニリンからバニリルアルコールへの変換も少なかったのではないかと考えられる。プロトカテク酸については、大森ら³⁾が、*Pseudomonas* sp.によるプロトカテク酸の環開裂物質として4-カルボキシムコン酸の生成を認め、その際、培地の色が紫色に変化したことを報告している。

KF04菌もプロトカテク酸を基質として培養した時、基質の減少とともに培地が紫色となったことを考えると、本菌はプロトカテク酸環開裂酵素系をもっており、バニリン酸より生成したプロトカテク酸は環開裂して代謝されて行くことが考えられる。しかしながら、洗浄菌体反応では反応液の紫変は見られず、プロトカテク酸の蓄積も少なかったことより、本菌はバニリン酸よりプロトカテク酸を生成する酵素系が微弱ではないかと思われる。



第4図 *Penicillium* sp. KF04によるベラトル酸の代謝経路

ベラトル酸の代謝経路については、酵素化学的検討により確認する必要があるが、生育培養および洗浄菌体反応の実験より、KF04菌は第4図に示した経路でベラトル酸を代謝するものと考えられる。

バニリン酸からのバニリン生成条件について検討したところ、pH5.5、基質濃度0.1%が最適であった。

培地成分としてはグルコースと酵母エキスをそれぞれ単独に添加した場合よりも、両者を併用した場合の方が単位菌体量当たりのバニリン変換率は高かった。これは共代謝によるものではないかと思われる。

無細胞系でのバニリン酸からのバニリンの生成反応では、*Nocardia asteroides*による安息香酸からベンズアルデヒドへの還元反応⁴⁾を参考にして反応液組成を設定した。*Nocardia*の場合、基質である安息香酸は最初ATPと反応してベンゾイルアデニル酸を生成し、それがNADPHと反応してベンズアルデヒドを生成した。KF04菌では、ATPの有無によりバニリン収量に差が認められ、ATPがバニリン酸の還元に関与していることは考えられるが、*Nocardia*におけるような2段階反応によるものかどうかは不明である。

要 約

リグニン関連化合物の有効利用をはかるため、微生物を用い、ベラトル酸をバニリンに変換させる実験を行い以下の結果を得た。

1) 土壌よりの分離菌および当研究室保存菌の中で、ベラトル酸よりバニリン酸を生成する菌として、糸状菌19株、酵母1株、細菌2株を選択し、さらにこれらのうち、バニリン生成能の強い菌株としてKF04菌を得た。形

態観察より、本菌は*Penicillium*に属する糸状菌であると判明した。

2) KF04菌のベラトル酸代謝生成物として、バニリン酸、バニリン、バニリルアルコール、プロトカテク酸を検出した。主生成物はバニリンであった。

3) バニリン酸からのバニリンの生成条件としては、反応pH5.5、基質濃度0.1%が最適であり、バニリン生産培地として糖源、窒素源、無機塩のほかに酵母エキスが必要であった。糖源としてはグルコースよりキシロース、マルトースの方が有効であった。

文 献

- 1) Ceriotti, G. and Spandrio, L.: Colorimetric determination of tyrosine. *Biochem. J.* **66**, 607-610 (1957).
- 2) Donnelly, M.I. and Dagley, S.: Bacterial degradation of 3,4,5-trimethoxycinnamic acid with production of methanol. *J. Bacteriol.* **147**, 471-476 (1981).
- 3) Gross, G.G.: Formation and reduction of intermediate acyladenylate by arylaldehyde. NADP oxidoreductase from *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* **31**, 585-592 (1972).
- 4) Kato, N., Joung, E.H., Yang, H.C., Masuda, M., Shimao, M. and Yanase, H.: Purification and characterization of aromatic acid reductase from *Nocardia asteroides* JCM-3016. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 757-762 (1991).
- 5) Omori, T., Hatakeyama, K. and Kodama, T.: Protocatechuic acid production from transferulic acid by *Pseudomonas* sp. HF-1 mutants defective in protocatechuic acid catabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 497-500 (1988).
- 6) Skryabin, G.K. and Golvera, L.A.M.: 微生物による有機化合物の変換, 福井三郎監訳, 学会出版センター, 東京 (1980) pp. 115-145, 333-338.