〔農化 第 37 卷, 第 8 号, p. 464~468, 1963〕

微生物による没食子酸の代謝に関する研究 (第 1 報)*

Aspergillus niger による没食子酸の資化について

渡 辺 章 (九州大学農学部農芸化学教室)

昭和 38 年 3 月 27 日 受 理

糸状菌類が生産するタンナーゼによってガロタンニンを加水分解する没食子酸 (GA) の製法は古くから知られている。先に Friedlich⁽¹⁾ はガロタンニンを含む培地に *Aspergillus niger* を培養すると、ガロタンニンは GA とグルコースに加水分解され、培養液中にはしだいに GA が蓄積されるが、その後一度蓄積された GA がしだいに減少することをみとめ、*Asp. niger* による GA の中間代謝の研究を行なったが、分解機構を示す中間代謝物は全く捕捉されず、その代謝機構は全く知られていない。

一般にフェノール性物質の代謝については、*Pseudomonas* に属する細菌が多くの芳香族化合物を適応的に酸化して、芳香族化合物としての最終的代謝物質としてカテコールを形成することが Stanier⁽²⁾ によって明らかにされ、さらにカテコールのベンゼン核はこれら細菌の適応酵素によって酸化開裂されることが早石⁽³⁾, Stanier⁽²⁾ らによって明らかにされた。それ以来、各種細菌、動物等を酵素源として、プロトカテキン酸⁽⁴⁾, ホモプロトカテキン酸⁽⁵⁾, ゲンチジン酸⁽⁶⁾, ホモゲンチジン酸⁽⁷⁾, 3-オキシアントラニル酸⁽⁸⁾等を酸化して、それらのベンゼン核を開裂する oxygenase の研究が相ついで詳細に行なわれ、有馬⁽⁹⁾, 照井⁽¹⁰⁾ らによって行なわれた微生物による芳香族化合物の水酸化反応の研究と相まって、これらの 1 価あるいは 2 価フェノール類を中間代謝物とする多くの芳香族化合物の代謝がかなり明らかにされてきた。

糸状菌類による代謝については、フェニル酢酸^(11~13), プロトカテキン酸^(14~16), サリチル酸⁽¹⁷⁾等のベンゼン核開裂、資化について研究が行なわれ、プロトカテキン酸の分解の場合に β -カルボキシムコン酸の生成が認められているが、その酵素抽出が困難であることなどのため代謝機構についてはほとんど知られていない。

ベンゼン核の酵素的開裂においてはフェノール性水酸基が重要な役割をもっていることはすでによく知られており、1 価あるいは 2 価フェノール類については以上のように多くの研究が行なわれているが、3 価フェノール類の開裂については未だ報告されたものがない。そこで植物成分として広く分布し、茶のタンニン構成成分としてわれわれが日常摂取している GA について微生物による代謝を検討した。

その結果、GA 資化力をもつ細菌は見出されなかったが、糸状菌類によって特異的に資化されることをみとめ、資化力の強い 1 株 *Asp. niger* (S-21) を用いて GA が酸化開裂をうけることを明らかにしたのでその結果について報告する。

実 験 及 び 考 察

1. 資化菌の検索

(1) 培地 : GA を唯一の炭素源とした、GA 2g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2.5g, KH_2PO_4 1.5g, NaCl 5.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, 井水 11 の組成の培地 [I] を細菌用培地、GA 2g, NaNO_3 2g, KH_2PO_4 1g, KCl 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, FeSO_4 0.01g, 井水 11 の組成の培地 [II] を糸状菌用培地とした。これを 5ml ずつ小試験管に分注して 120°, 15 分加圧殺菌を行なった。

(2) 細菌の検索 : 約 50 箇所より採集した土壌、特に茶、ヌルデ、カン等のタンニン類を含有する植物が生育している樹下の腐植土 4~5g ずつを 10ml の殺菌水に懸濁して、その上澄液 0.2ml 宛を培地 [I] の小試験管に加え、30° で 7 日間培養を行なった。また数箇所の皮革製造工場より入手した皮なめしに用いられたタンニン液、その他芳香環の開裂酵素の研究に用いられた数株の *Pseudomonas* 属の菌株を接種して同様に培養を行ない、混濁を生じて増殖がみとめられたものについて継代培養を試みたが、供試した土壌及び菌株中には

* Studies on the Metabolism of Gallic Acid by Microorganisms. Part I. Assimilation of Gallic Acid by *Aspergillus niger*.

By Akira WATANABE (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Kyushu)

GA 資化能をもつ細菌類は見出すことができなかった。

(3) 糸状菌の検索：すでにタンナーゼ生産菌である *Asp. niger* が GA 資化能をもつことが知られている。そこで一般にタンナーゼ生産力強いことが知られている *Aspergillus* 属及び *Penicillium* 属菌の中で入手し得た 20 株について、培地 [II] を用いて 30° で 7 日間培養を行なった。その結果、供試したいずれの菌株も増殖を示し資化能をもつこと及び *Aspergillus* 属菌の中に比較的資化力が大きいものがあることを認めた。

第 1 図 没食子酸の比色定量法における標準曲線

- (a) *Asp. niger* による分解
(b) *Asp. batate* による分解
(c) *Asp. aureus* による分解
(d) *Asp. awamori* による分解
(e) *Asp. luckuensis* : (1) } による分解
 Asp. oryzae : (2) }

第 2 図 *Aspergillus* 属菌による振盪培養中の GA 分解

2. *Aspergillus* 属菌の GA 資化力 以上の検索の結果から資化力がすぐれていることを認めた *Aspergillus* 属の菌株について、培養液中の GA の減少を測定してその資化力を比較した。培養液中の GA の定量は大島⁽¹⁸⁾の方法の改良法によって比色定量を行なった。

(1) 培養液中の GA の定量：GA 濃度 0.1~0.3 mg/ml に適宜稀釈した培養濾液 1 ml をとり、これに 5% 燐モリブデン酸水溶液 1 ml 及び飽和重炭酸ソーダ水溶液 1 ml を加えてよく混合する。これに蒸留水 10 ml を加えて稀釈し、発現した青色を 20 分以内に Beckman Spectrophotometer によって 720 mμ で比色定量を行なった。検量曲線を第 1 図に示す。呈色は室温においてはかなり安定であるが、発色後 30°, 30 分間で 5~7% の褪色が認められる。

培養基に含まれる共存物の影響としては、M/15 磷酸塩緩衝液 (pH 5.5) の共存下で 4% 程度の過大呈色を示すほかは、Fe⁺⁺その他の金属イオン等による影響は一般の培養液中に存在すると考えられる程度の濃度においてはまったく認められなかった。

(2) *Aspergillus* 属菌の GA 資化力の比較 そこで検索した *Aspergillus* 属菌を前記培地 [II] を用いて振盪培養を行ない、培地中の GA 減少を経時的に測定することによりその資化力の比較を試みた。試験培地に直接胞子を接種して振盪培養を行ない消費された GA を測定する方法は、胞子の接種量の多少、振盪培養中の菌体の分散状態の良否等によって菌の増殖が影響をうけるため菌体量が不均一となり、同一菌株についても GA 消費速度の変動が大きい。また培養初期には GA 消費量は非常に少ないので比較した結果は不正確とな

った。そこで 0.2% の GA を添加した Czapek 培地 100 ml ずつを 500 ml 容振盪フラスコに分注殺菌し、それぞれ 5 本ずつ各菌株の胞子を接種して 30° で 72 時間振盪下に第 1 次培養を行ない、良好な菌体の増殖を示したものを選り、速やかに菌体を濾別し、水洗した後充分圧搾する。この圧搾菌体をそれぞれ 5 g ずつとり、これを前記の培地〔Ⅱ〕を 150 ml ずつ分注殺菌した振盪フラスコ中に懸濁させてよく分散させた後、30° で振盪培養を行ない、培養濾液について培養中の GA の減少を測定した。

その結果、*Asp. niger*, *Asp. batatae* 等が資化力が強いことを認めた。第 2 図(a)~(e) に示す。そこで以後これらの中の 1 株 *Asp. niger* (S-21) [第 2 図(a)の 4] を用いて研究を行なった。

Asp. niger (S-21) の胞子を培地〔Ⅱ〕に接種して振盪培養を行なうと、培地中の GA は約 90 時間で消費しつくされる。対照として、胞子を接種しない無菌培地を同様 30° で振盪を行なったものでは GA の減少はほとんど認められず、培地の液性 pH 5.5 においては培地中に共存する金属イオン等の触媒的な作用による非酵素的な空気酸化はほとんど認められなかった。第 3 図に示す。

したがって、GA を唯一の炭素源として培養を行なった場合に生成される菌体量は、同じ量のグルコースを炭素源とした場合に生成される菌体量に比べてはるかに少なく、資化され難いものと考えられるが、培養中の GA の減少は明らかに菌が資化することによってのみおこるものであることを示している。

3. *Asp. niger* (S-21) の GA 資化とベンゼン核の開裂

(1) GA 分解と酸素吸収：GA が好気的条件下のもとに資化される現象は、多くの oxygenase の場合と比較して、当然空気中の分子状酸素による酸化開裂反応⁽¹⁹⁾ が予想されるので、ワールブルグ検圧計によって開裂反応中における酸素吸収の有無を測定した。

すなわち、培地〔Ⅱ〕を用いて振盪培養した *Asp. niger* (S-21) の菌体を濾取、水洗し、蔗糖のみを成分から除いた Czapek 培地中にいれて 30° で 5 時間振盪を行ない、菌体を濾取し、水洗後圧搾して得た休止菌体を用いて、30° で GA 分解を行なった場合の

第 5 図 *Asp. niger* (S-21) による GA 分解液の紫外吸収曲線

第 3 図 *Asp. niger* (S-21) による GA の分解

(1): *Asp. niger* による分解曲線 (振盪培養)
(2): 同一培地を無菌的に振盪

第 4 図 *Asp. niger* (S-21) の resting cell による GA 分解と酸素吸収

(1)		(2)	
主 室	{ 休止菌体 5% 懸濁液 0.6 ml M/15 磷酸緩衝液 (pH 5.5) 2.0 ml Cz(-S)* 0.2 ml }	対照	
側 室	{ 10 ⁻² M GA 液 0.2 ml }	側室の基質を	
副 室	{ 15% KOH 0.2 ml }	除いた自家呼	
		吸測定用	

(*) Cz(-S): Czapek 培地成分より蔗糖を除いたもの

第 1 表 *Asp. niger* (S-21) による GA 分解と紫外外部吸収曲線の変化

反応時間 (hrs)	比色定量値 GA (mg/ml)	258 mμ に おける吸光 度 (%)	紫外外部吸 収曲線 No.
0	1.08	100	1
20	0.91	83	2
35	0.64	59	3
45	0.36	33	4
65	0.04	3.5	5
75	0.00	0	6
85	0	0	7
90	0	0	8

第 6 図 GA 及びピロガロールの
紫外外部吸収曲線

$\lambda_{\max}$ 265 mμ に極大吸収が現れることもなく, *Asp. niger* の場合においてはピロガロールの蓄積も認められない。紫外外部吸収曲線の経時変化は明らかに GA のベンゼン核の減少を示しており, 258 mμ における吸光係数の減少は GA のベンゼン核の開裂によってのみおこるものであることがわかる。したがって, GA が好氣的に資化される事実と考え併せて, *Asp. niger* による GA の資化はベンゼン核の開裂をとまて行われるものであること, また培地中の GA の比色定量によって GA のベンゼン核開裂の進行度を測定しうることを認めた。

要 約

(1) GA 資化能をもつ微生物の検索を行った結果, 資化細菌は見出すことができなかったが, 供試した *Aspergillus* 属, *Penicillium* 属の糸状菌類は一般に資化能をもつことを認めた。

(2) 培地中の GA の比色定量によって供試糸状菌類の GA 資化力を比較し, *Asp. niger* (S-21) が強力であることを認めた。合成培地中に添加した 0.2% の GA は, *Asp. niger* (S-21) の胞子を接種して 30° で振盪培養を行なうことによって 50 時間でその約 90% が分解された。

(3) GA を加えた培地中に生育した *Asp. niger* (S-21) の resting cell は明らかに気相中からの酸素吸収をとまて GA を資化することが認められた。

(4) 比色定量法によって測定した培養中における培地中の GA 減少量が紫外外部吸収曲線によって示されるベンゼン核をもつ物質の減少とよく一致し, 高い相関関係を示すので, GA は *Asp. niger* (S-21) によって核開裂をうけて資化されるものであること, 及び GA の減少を比色定量することによって核開裂反応の進行を間接的に測定しうることを認めた。

本研究に当り終始御指導を賜った九州大学大島康義教授, 菌株を御分与いただいた九州大学本江元吉教授, 大阪大学須田正己教授, 常に御鞭撻をいただいた田辺製薬株式会社平林忠雄専務, 藤沢正男研究室長, 杉本典夫大阪研究所長の各位に深く感謝する。

(本報告の要は昭和 35 年 4 月, 日本農芸化学会大会で講演した。)

(1) H. Friedlich: <i>Arch. für Microbiol.</i> , 25 , 297 (1956).	(1955).
(2) R. Y. Stanier, B. P. Sleeper, M. Tsuchida, D. L. MacDonald: <i>J. Bact.</i> , 59 , 137 (1950).	(6) 有馬 啓, 駒形和男, 杉山晋一, 風間政二, 矢野啓二, 田中啓達: <i>生 化</i> , 28 , 43 (1956).
(3) O. Hayaishi, R. Y. Stanier: <i>ibid.</i> , 62 , 691 (1951).	(7) M. Suda, Y. Takeda: <i>J. Biochem.</i> , 37 , 375, 382 (1950).
(4) R. Y. Stanier, J. L. Ingraham: <i>J. Biol. Chem.</i> , 210 , 799 (1954).	(8) A. H. Mehler: <i>J. Biol. Chem.</i> , 218 , 241 (1956).
(5) N. Kunita: <i>Med. J. Osaka Univ.</i> , 6 , 697	(9) 有馬 啓, 駒形和男, 蓑田成彦: 本誌, 28 , 629 (1954); 矢野啓二, 横関源延, 山野井照

- 雄, 有馬 啓: 昭和 33 年度日本農芸化学会
大会講演要旨, p. 98.
- (10) 照井堯造, 有馬 啓: 昭和 33 年度日本農芸
化学会大会講演要旨, p. 97.
- (11) K. Singh, M. J. Johnson: *J. Bact.*, **56**,
339 (1948).
- (12) D. J. Hockenhull, A. D. Walker, G. D. Wil-
kin, F. G. Wilder: *Biochem. J.*, **50**, 605
(1952).
- (13) 磯野正雄: 本誌, **27**, 255, 260 (1953).
- (14) G. Terui, T. Enatsu: *Tech. Report, Osaka
Univ.*, **6**, 203 (1956).
- (15) C. J. Shepherd, J. R. Villanueva: *J. Gen.
Microbiol.*, **20**, 5 (1959).
- (16) S. R. Gross, R. D. Gafford, E. L. Tatum:
J. Biol. Chem., **219**, 781 (1956).
- (17) G. Terui, T. Enatsu, H. Tokaku: *Tech.
Reports, Osaka Univ.*, **2**, 283 (1952).
- (18) 大島康義, 中林敏郎: 本誌, **29**, 897 (1955).
- (19) O. Hayaishi, M. Katagiri, S. Rothberg:
J. Biol. Chem., **229**, 905 (1957).
- (20) 西羅 寛, 麦林檎太郎: 兵庫大学, *Science
Report*, **2**, 1 (1955).
-