Candida tenuis による *n*-パラフィンからの アングリセリン酸の生産

明生 誠一*, 田淵 武士

(東京教育大学農学部)

昭和 50 年 2 月 17 日 受理

Production of Anglyceric Acid from *n*-Paraffins by *Candida tenuis*

By Sei-ichi MEIKI* and Takeshi TABUCHI

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Education,
Komaba, Meguro-ku, Tokyo

A stock culture of *Candida tenuis* Diddens et Lodder was found to be productive of *d*-anglyceric acid as a metabolite of *n*-paraffins in shake culture. The acid was produced approximately in a yield of 25% on the basis of *n*-paraffins supplied by its mutant.

(Received February 17, 1975)

* Present address: Kawasaki-Shyogyo High School

緒 言

酵母の好氣的な物質代謝による有機酸の生産性⁽¹⁻⁵⁾について検索している過程で, *Candida tenuis* Diddens et Lodder に所属する 1 保存酵母株が, *n*-パラフィン混合物から, やや多量のクエン酸とともに, 不明の有機酸を微量ではあるが生成する事実が見いだされた。そこで, まずこの不明の酸の単離に先立ち, その生成量を増加させる目的で変異株の誘導を試みた結果, 目的にかなう変異株を容易に造成し得た。ついで, この変異株の培養物から不明の酸を単離し, その理化学的諸性質を調べた結果, 本酸は *d*-anglyceric acid であることが判明した。本酸は, 変異株によって添加 *n*-パラフィン混合物当り約 25% の収率で生産された。

実験方法

(1) 供試菌株ならびに変異株の誘導方法 財団法人発酵研究所より分譲いただいた *Candida tenuis* IFO 1303 株, ならびにこれから誘導され, 不明の有機酸を最も多量に生産しうる変異株として選択された No. 61 株とを主として用いた。

* 現在, 神奈川県川崎市立商業高等学校。

変異株の誘導は, つぎの方法によって実施した。すなわち, 親株を 5% ブドウ糖含有酵母水培地に移植し, 26°C のもと 24 時間振盪培養後, 得られた菌体を遠沈, 集菌し, 1 回これを殺菌水で洗浄した。この菌体を 0.1 M トリス緩衝液 (pH 7.0) 中 $10^7 \sim 10^8$ cells/ml に懸濁し, これに変異剤 *N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン⁽⁶⁾を最終濃度が 0.02% になるように加えて, 30 分間室温下に反応させた。この処理菌体を遠沈, 集菌後 1 回洗浄した。これを希釈したのち, 炭酸カルシウム 0.5% を含むブドウ糖酵母水平板培地上に塗布し, 26°C のもと 3~4 日間培養した。出現した集落のうちから, 炭酸カルシウムを溶解し, 有機酸生産能が高いと思われるものを選択し, ポテト・ブドウ糖寒天斜面培地に釣菌した。

(2) 培養法 分離変異株による不明の酸の生産性は, つぎのようにして調べた。するわち, 培地には *n*-パラフィン混合物 ($C_{12} \sim C_{18}$) 5 ml/dl のほか, $(NH_4)_2SO_4$ 0.4%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, 酵母エキス 0.1%, Span 80 0.05% の組成の水道水溶液 30 ml ずつを 300 ml 容三角フラスコに入れ, 殺菌後, これに殺菌炭酸カルシウム 0.5 g ずつを加えたものを用いた。これらに, 分離菌株のポテト・ブドウ糖斜面培地から 5

白金耳ずつを接種したのち、26°C のもと 220 rpm の回転式振盪機上で7日間培養後に、それぞれの培養物について生成有機酸を後述のペーパークロマトグラフィーによって調べた。

また、不明の酸を多量に採取する目的で培養を行なった場合にも、種母培養および本培養ともに上記の組成の培地を用いた。これらの培地に、変異株 No. 61 株のポテト・ブドウ糖寒天斜面培養から5白金耳ずつを接種し、上記の振盪培養条件のもとで3日間振盪したものを種母培養とし、その2ml ずつを本培養用フラスコのおおのに接種し、同じ条件のもとで通常7日間培養した。

なお、各種の培養試験も、それぞれの図表に記載したように、培地の組成のみを変え、その他の条件は上記の場合とほぼ同様にして実施した。

(3) 分析法 ペーパークロマトグラフィーによる有機酸の検出は、展開溶剤として、酢酸エチル：酢酸：水 (50:12:10) の混合液を用い、これまでと同様の方法⁽⁴⁾によって調べた。さらに、生成不揮発性有機酸の推定ならびに定量は、ガスクロマトグラフィー⁽⁶⁾によって実施した。乾燥菌体量は、既報⁽⁷⁾の方法に準じて測定した。

残存 *n*-パラフィン量は培養物をそのまま *n*-ヘキサンで2度抽出し、ヘキサン層を合併、濃縮し、105°C に1

Fig. 1. Isolation Procedure of the Product from the Culture Broth of *Candida tenuis* No. 61 Grown on *n*-Paraffins.

夜放置後の残留物の重量を測定して求めた。

(4) 有機酸の分離 目的の有機酸は、*n*-パラフィン混合物を炭素源とした変異株 No. 61 株の培養物から、Fig. 1 に示した方法によって分離した。すなわち、培養終了後に合併した培養物2立分を、ケイ藻土を濾過助剤として吸引濾過し、沈殿を少量の温水で洗浄した。濾液、洗液を合併し、減圧下に約200ml にまで濃縮した。この濃縮物に、かきまぜながら4N 硫酸溶液を加えてpHを1.8にしたのち、沸騰湯浴上で約10分間加熱した。生じた硫酸カルシウムの沈殿を熱時に濾別し、沈殿を少量の熱水で洗浄した。濾液、洗液を合併し、減圧下にシラップ状にまで濃縮した。このシラップは温酢酸エチルでくりかえし抽出し、酢酸エチル可溶部を集めた。酢酸エチル留去後の残留シラップを少量の水に溶かし、その可溶部について、液体連続エーテル抽出器を用いて約20時間エーテル抽出を行なった。得られたエーテル可溶部からは、無水芒硝で脱水後にエーテルを留去して、固形残留物約8gが得られた。

実験結果

(1) 分離有機酸の理化学的諸性質

目的の有機酸の粗結晶を少量の酢酸エチルに溶解させ混濁が生じるまでクロロホルムを加え、1夜氷室に放置したところ、無色プリズム状の結晶が析出した。mp 100°C, $[\alpha]_D^{25} + 3.8^\circ$ ($c=5.0$, H₂O) を示した。元素分析の結果は例示のとおりで、分子式は C₆H₁₀O₄ に相当した。Found: C, 44.60; H, 7.44. Calcd. for C₆H₁₀O₄: C, 44.77; H, 7.52%. その水溶液は pKa=3.8, 中和当量138 (計算値134) の1塩基性酸として滴定された。また、本酸を1Nの塩酸溶液、あるいはカ性ソーダ溶液に溶解し、これを100°Cのもと1時間加熱後にペーパークロマトグラフィーで調べてみたが、全くその *R_f* 値には変化が認められなかった。Fehling 試薬、過マンガン酸カリ溶液、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試薬などとの反応はいずれも陰性であったが、過ヨウ素酸カリによって容易に酸化をうけることから、 α -グリコールの存在が推定された。その赤外吸収スペクトルは、つぎのとおりである。 $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3340, 1060 (水酸基), 1710 (カルボキシル基)。

また、NMR (60 MHz) スペクトルはつぎのとおりである。 $\delta_{\text{TMS}}^{\text{D}_2\text{O}}$: 1.30 (3H, d, $J=6.0$ Hz), 1.56 (3H, s), 4.06 (1H, q, $J=6.0$, $J=13.0$ Hz)。

以上の理化学的諸性質から、本酸は 2-methyl-2,3-dihydroxybutyric acid であることが、まず明らかになった。この酸には 2 個の不斉炭素が含まれるので、4 個の異性体が存在するが、アンゲリカ酸の過マンガン酸カリ酸化生成物であるアングリセリン酸⁽⁸⁾のうちの右旋性酸⁽⁹⁻¹¹⁾と、本酵母株の生産した有機酸との理化学的諸性質が全く一致していた。

(2) 培養上の諸性質

アングリセリン酸が供試酵母株によって、どのような状況のもとに、どの程度まで生産されるか、また関連した生産物も培地中に見出されるのか、などについて若干検討してみた。

a) 生育に対するビタミン要求性：当初の実験では、便宜上ビタミン源として酵母エキスを_usingしてきた。*Candida tenuis* のビタミン要求性に関してビオチンのほか、多くの菌株ではチアミンによっても生育が促進されることが記載されている⁽¹²⁾。そこで、親株およびアングリセリン酸生産性優良菌株として選択された変異株 No. 61 の生育に対するビタミン要求性を調べてみた。その結果、両菌株ともにビオチンのみによって生育は促進され、チアミン添加の影響を全く受けないことが知られた。また、酵母エキスの代りにビオチンを補った純合成培地を使用しても、アングリセリン酸がほぼ同様の成績で生成されることも確認された。

b) 親株およびその変異株 No. 61 による *n*-パラフィン混合物からの不揮発性有機酸の生産性の比較：優良変異株の選択に際しては、約 150 株の菌株の培養物をペーパークロマトグラフィーに展開後、 $R_f=0.65$ にあらわれたスポットの大きさから目的の酸の生成量を推定し、No. 61 株を生産性優良変異株として選定した。親株と本変異株とを、炭素源に *n*-パラフィン混合物を用いて培養した場合の培養物中に存在する不揮発性有機酸のガスクロマトグラムの一例を、それぞれ Fig. 2 に示した。すなわち No. 61 株のアングリセリン酸生成能は、親株にくらべ約 30 倍に高まっていることが確認された。なお、クエン酸、イソクエン酸などのほか、コハク酸、シトラマール酸、リンゴ酸、アコニット酸⁽⁵⁾、メチルイソクエン酸⁽⁴⁾などが、いずれも微量ながら生産されている事実も推定された。

アングリセリン酸が他の酵母株によっても生成されているかどうかを知るため、手持ちの保存酵母菌株のうち約 20 株の培養物について同様にガスクロマトグラフィー

Fig. 2. Gas Chromatograms of Methyl Esters of Polybasic Acids Produced by *Candida tenuis* IFO 1303 (A) and its Mutant No. 61 (B) from *n*-Paraffins.

Conditions: A column (3 mm×1 m) packed with 15% DEGS on Chromosorb W (AW, 60~80 mesh). Column temperature, 90~190°C (programme rate: 5°C/min). Flow rate (N₂), 50 ml/min. The components are as follows: 1, fumarate; 2, succinate; 3, anglycerate; 4, citramarate; I.S., internal standards (pimelate); 5, malate; 6, aconitate; 7, citrate; 8, methylisocitrate lactone; 9, isocitrate lactone.

ーによって調べてみたが、いずれの菌株においてもこの酸が生産されている事実は確認しえなかった。

c) 窒素源濃度の影響：変異株によって、*n*-パラフィンからどの程度までアングリセリン酸が蓄積されるかについて検討してみた結果、窒素源の濃度によって有機酸生成が著しく影響されることがわかった。すなわち一例として、Fig. 3 に示したように、アングリセリン酸は硫酸アンモニウムとして 0.6~0.8%，すなわち通常の有機酸発酵の場合にくらべると、やや高い窒素源濃度の場合に多量に生成された。一方、併産されるクエン酸の生成量は、窒素源濃度が増すにつれて著しく減少した。微量ながら生成される 2-メチルイソクエン酸、イソクエン酸なども、クエン酸と同じ傾向を示した。

d) 培養経過：*n*-パラフィン混合物からアングリセリン酸が生成される状況を経時的に調べ、その結果を

Fig. 3. Effect of Different Concentrations of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on Anglyceric and Citric Acids Production by *Candida tenuis* No. 61.

The strain was incubated at 26°C for 6 days on a rotary shaker in 300-ml Erlenmeyer flasks containing 30 ml of the medium composed of a mixture of *n*-paraffins 4% (w/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (amounts indicated in the figure), KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, biotin 5 $\mu\text{g}/\text{dl}$, Span 80 0.05%, CaCO_3 2% and tap water.

—●— anglyceric acid, —○— citric acid.

Fig. 4. Time Course of Anglyceric Acid Production from *n*-Paraffins by *Candida tenuis* No. 61.

Culture conditions were the same as in Fig. 3 except that the medium used contained $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in a concentration of 0.7%.

—●— anglyceric acid, —○— citric acid,
—▲— dry cell weight, —△— *n*-paraffins.

Fig. 4に示した。すなわち、この培養の場合には窒素源添加量がやや多いので、酵母菌体の増殖は基質 *n*-パラフィンがほとんど消失するまで続き、一方アングリセリン酸も、やや遅れはしたが、ほぼ菌体増殖に平行して生成された。これに対して、クエン酸は酵母菌体量の増加

率がやや低下した頃から生成され始めた。なお、アングリセリン酸は培養物 1 ml 当り約 10 mg 近く生産されたが、これは仕込み *n*-パラフィン当り約 25% の収率に相当した。

考 察

2-methyl-2,3-dihydroxybutyric acid に相当する立体異性体として、tiglic acid の酸化生成物である tiglyceric acid⁽⁸⁾ (low-melting racemic acid)⁽⁹⁾ ならびに angelic acid の酸化生成物である anglyceric acid⁽⁹⁾ (high-melting racemic acid)⁽⁹⁾ とが、それぞれラセミ酸として知られている。*d*-アングリセリン酸は、*Veratrum viride* に含まれるアルカロイドである neoprotoveratrine⁽¹¹⁾, germbudine その他⁽⁹⁾ の加水分解生産物中から、それらの構成有機酸として分離されている。また、Whiting ら⁽¹⁰⁾ は、この酸がリンゴ果汁およびリンゴ酒中には 0.05 mg/ml の割合で含有されていたことを報告している。ただし、そのリンゴ酒の作用酵母に関する明確な記載は見られない。*Candida tenuis* の培養物中から分離された有機酸の融点、ならびに施光度は、*d*-アングリセリン酸に関する記載と全く一致した。

この酸が、どのような経路を経て生成されるのかは全く不明である。本菌株の培養物中には、アングリセリン酸のほかにもコハク酸、シトラマール酸、リンゴ酸、アコニット酸、クエン酸、2-メチルイソクエン酸、イソクエン酸などの不揮発性酸の存在が推定されたが、アングリセリン酸に近縁すると考えられる不揮発性有機酸は検出し得なかった。

アルカロイド類は、アミノ酸およびそれらの関連物質から主として生成されることは周知のとおりであるが、前述のように本有機酸が二、三のアルカロイド類の構成酸として分離されている事実から、本有機酸もアミノ酸の関連物質であることが考えられる。この推定は、窒素源添加量を増した場合に本有機酸が本酵母株によって多量に生成され、また菌体の増殖にほぼ並行して生成される事実などとも符合しよう。アミノ酸代謝に関連する場合には、Fig. 5 に示したように、バリンの生合成経路に結びつけて考えることができる。すなわち、この場合の中間体である α -アセト乳酸は、そのメチル基が転移することなしにそのまま還元されるのであれば、アングリセリン酸となる。しかし、 α -アセト乳酸を α -ケトイソバレリアン酸に変換し得る *Saccharomyces cerevisiae*

Fig. 5. Acids Related to Anglycerate.

のセルフリー系では、アングリセリン酸はその中間体となり得ないことが、Strassman ら⁽¹³⁾によって報告されている。また、近縁化合物であるチグリン酸、アングリカ酸は古くから植物成分として知られているが、最近 Nyhan ら⁽¹⁴⁾は、プロピオン酸血症の小児患者の尿中からチグリン酸を検出している。

これまでに著者らは、好気的な培養条件下に酵母がクエン酸⁽¹⁾、イソクエン酸⁽²⁾、アコニット酸⁽⁵⁾、 α -ケトグルタル酸⁽¹⁵⁾、メチルイソクエン酸類^(4,6)、ならびにロイシン生合成の前駆体である α -ケトイソカプロン酸⁽³⁾などを多量に蓄積しうる事実について報告してきた。アングリセリン酸の生成経路、ならびにその生理的な意義は全く不明であり、今後の課題である。

要 約

Candida tenuis IFO 1303 株が、*n*-パラフィン混合物を含む純合成培地から *d*-anglyceric acid を生産する事を見出した。その変異株 No. 61 によって、この酸は

窒素源濃度が比較的高い場合に、仕込み *n*-パラフィン当り約 25% の収率で生成された。

本研究の一部は、アミノ酸・核酸集談会研究奨励金によりました。また、シトラマル酸を恵与くださった朝日麦酒株式会社斎敏行博士に謝意を表します。

- (1) 田淵武士, 田中優行, 阿部又三: 農化, **42**, 440 (1968).
- (2) M. Abe and T. Tabuchi: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 392 (1968); 阿部又三, 田淵武士, 田中優行: 農化, **44**, 493 (1970).
- (3) 田淵武士: 農化, **47**, 611 (1973); *Amino Acid and Nucleic Acid*, No. 29, 35 (1974).
- (4) T. Tabuchi and S. Hara: *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 1105 (1974); 田淵武士, 原 誠五: 農化, **48**, 543, 549 (1974).
- (5) T. Tabuchi, N. Serizawa and S. Ohmomo: *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 2565 (1974).
- (6) T. Tabuchi and N. Serizawa: *ibid.*, **39**, 1049 (1975).
- (7) 田淵武士: 農化, **47**, 479 (1973).
- (8) R. Fittig and M. Penschuck: *Ann.*, **283**, 109 (1894).
- (9) G. S. Meyers, P. Morozovitch, W. L. Glen, R. Barber, G. Papineau-Couture and G. A. Grant: *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 3348 (1955).
- (10) G. C. Whiting: *Chem. Ind.*, **1958**, 720; G. C. Whiting and R. A. Coggins: *J. Sci. Food Agric.*, **11**, 337 (1960).
- (11) M. W. Klohs, R. Arons, M. D. Draper, F. Keller, S. Koster, W. Malesh and F. J. Petracek: *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 5107 (1952).
- (12) "The Yeasts, A Taxonomic Study," ed. by J. Lodder, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1970, p. 1057.
- (13) M. Strassman, J. B. Shotton and S. Weinhaus: *J. Biol. Chem.*, **235**, 700 (1960).
- (14) W. L. Nyhan, T. Ando, K. Rasmussen, W. Wadlington, A. W. Kilroy, D. Cotton and D. Hull: *Biochem. J.*, **126**, 1035 (1972).
- (15) 田淵武士, 田中優行, 田原康孝, 阿部又三: 農化, **44**, 562 (1970).