

9034 高塩濃度下における糸状菌の抗酸化物質生産について

石川 行弘(鳥取大学)

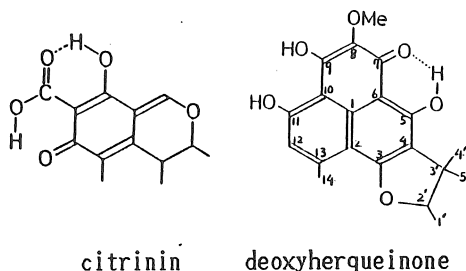
1. 研究目的: 優れた抗酸化剤でトコフェロール(Toc)と高い相乗性を示す新規物質を開発するため, その起源を微生物に求めた. 高塩濃度環境下で分離された糸状菌を対象としてスクリーニングを行い, 高い活性を示す菌株から有効成分の単離, 同定を試みた.

2. 研究方法: 野生株を単離するため, 無菌水 5mlに土壌粒約 1gを加え, 分離用培地(麦芽エキス 2%, ポリペプトン 0.1%, ブドウ糖 2%, 食塩 10%, 寒天 2%, 硫酸ストレプトマイシン 0.01%を含む)に白金耳で塗布して24°Cで培養した. 生育したコロニーを保存培養したのち培養用培地に植菌し, 24°Cで2週間静置培養して菌体のアセトン抽出物およびろ液の酢酸エチル抽出物を得た.

3. 研究結果 (1) 野生株(N4-1S)の生産する相乗性物質: 培養用培地に種々の濃度の食塩を添加して静置培養すると, 10~15%では生育がやや不良となり, 20%では生育不良で菌体がわずかに認められるのみであった. 食塩の濃度が高くなるにつれて菌体とろ液の抽出物量が少なくなった. Tocとの相乗効果は食塩 2~10%で培養したろ液抽出物で最高となり, また, 有効成分は菌体抽出物中にはほとんど含まれないことが分かった. ろ液抽出物をメタノールに溶解し黄色結晶と可溶部に分け, 可溶部はゲルクロマトで繰り返し精製した. メタノールから再結した黄色結晶(N4-1B)の¹H-NMRスペクトルデータを既知物質のデータと比較して, N4-1Bはcitrininと同定した.

(2) 野生株(N21)の生産する相乗性物質: ろ液抽出物をシリカゲルクロマトにかけて得られた有効成分を含む各画分をメタノールから再結して黄色の粉末状の結晶(N21B)を得た. CI-MS(20eV) m/z 388(M⁺). ¹H-NMR(DMSO-d₆/CDCl₃, δ) 1.07(3H, s), 1.14(3H, s), 2.17(3H, s), 2.54(3H, s), 3.85(3H, s), 4.81(1H, s), 6.23(1H, s), 7.62(1H, s), 13.86(1H, chelated, s); ¹³C-NMR(DMSO-d₆/CDCl₃, δ) 19.7, 21.4, 27.5, 54.9, 58.9, 84.3, 98.3, 109.6, 111.3, 113.3, 128.9, 136.5, 144.5, 160.2, 167.7, 172.0, 191.0, 196.6, 209.4. 本物質のNMRデータは, 我々が既に報告した物質(19B)と極めて類似性が高く, N21Bは19Bの位置異性体のキサントン誘導体と考えられる.

黄褐色の菌体抽出物に少量のアセトンを添加して不溶部を得た. このメタノール可溶部を濃縮した後, 順次ゲルクロマトにかけ黄色結晶(N21M)を単離した. 本物質のNMRデータを文献値と比較し, deoxyherqueinoneと同定した.



9034 高塩濃度下における糸状菌の抗酸化性物質生産について

石川 行弘(鳥取大学)

1. 研究目的

食生活の大きな変革の中で油脂を含む食品の摂取量が増大しているが、その酸化的劣化を防止して品質の保持、改善を行うため種々の物理的、化学的手段が施されている。一方では、このような食生活の変化によってガン、心臓病という成人病などの退行性疾患が目立っていることも事実である。必須脂肪酸やエイコサペンタエン酸などは栄養的、生理的重要性が認められるものの、その酸化は食品の品質劣化をもたらす。また、それらの多量摂取によって生体内で活性酸素やラジカル性物質が発生することは、発ガン性や変異原性の原因ともなる。抗酸化剤の生体内外における利用価値を高めるためには、それ自身強力な酸化防止効果を示すか、天然抗酸化剤であるトコフェロール(Toc)と顕著な相乗効果を示し、かつ安全であることが前提であるが、「SOD様作用食品」¹⁾という考えに見られるように、活性酸素関連疾患の防止などに役立つことも考慮されるべきである。また、抗酸化性食品素材として利用できれば老化制御機能性食品との関連で注目される。このように、脂質の酸化に深く関わる活性酸素種のスクベンジャー、クエンチャー機能を有する全く新しい抗酸化剤や相乗剤の開発が望まれている。

今までに安全性の高い抗酸化剤およびTocとの相乗性を示す新規の物質を保存株や野生株の微生物、特に糸状菌に起源を求めてスクリーニングを行っているが、通常の麦芽培地をベースとした系で選択される糸状菌は、強力な抗酸化剤として同類の物質を生産する確率が高くなり、しかも全く同一の物質である場合も多い。従って、新規の構造を有する物質を探索するためには、特異環境で生育する糸状菌のスクリーニングを行ってみる必要がある。本研究においては、高塩濃度環境下で分離された糸状菌を対象としてスクリーニングを行い、高い活性を示す菌株から有効成分を単離、同定した。

2. 研究方法

2.1 培地の調製

分離用培地の組成は麦芽エキス 2%, ポリペプトン 0.1%, ブドウ糖 2%, 食塩 10%,

寒天 2%である。オートクレーブで滅菌したのち、硫酸ストレプトマイシン 0.01%を添加しペトリ皿（内径 86mm）に分注した。保存用培地は分離用培地からストレプトマイシンを除いたものである（場合によっては、食塩も添加しなかった）。

また、培養用培地の組成は、麦芽エキス 2%、ポリペプトン 0.3%、ブドウ糖 3%で、必要に応じて食塩を添加した。

2. 2 野生株の単離、保存

無菌水 5mlに土壌粒約 1gを加え、ミキサーで振盪した後、分離用培地に白金耳で塗布し、24℃で培養した。成育した糸状菌のコロニーは保存用培地に移した。

2. 3 糸状菌の培養および代謝産物の抽出

培養用培地を三角フラスコ(500ml)に 200ml宛分注して滅菌した後、植菌し、24℃で 2週間静置培養した。減圧ろ過して菌体とろ液に分け、菌体は真空乾燥させた後、アセトンで抽出し、アセトンを留去して菌体抽出物を得た。ろ液は酢酸エチルで抽出し、酢酸エチルを蒸留水で洗浄した後、酢酸エチルを留去してろ液抽出物を得た。

2. 4 抗酸化性試験

AOM（活性酸素法）の改変法によった。試験管（内径 17.5mm）にラード 7g（0.04% ミックス Toc含有）を取り、抽出物を添加して 100℃に保持した。空気を 30ml/分の割合で吹き込んで酸化させたラードの POV（過酸化価）を測定し、その値が 100に至るまでに要する時間数を誘導期とした。

2. 5 NMRスペクトル

JEOL JNM-GX270型の高分解能核磁気共鳴装置を使用し、¹H-NMRは 270 MHz、¹³C-NMRは 56.0 MHzにおいて測定した。内部基準物質はテトラメチルシランを用いた。溶媒は重水素化クロロホルム(CDCl₃)とジメチルスルホキシド(DMSO-d₆)を用いた。

3. 研究結果および考察

3. 1 糸状菌のスクリーニング

鳥取、岡山県内、四国、九州地方の表面土壌から 82株を分離した。食塩含有培地に生育してコロニーを形成する菌株は無塩培地に比較して極めて少なかった（前もって、10種程度の土壌について、食塩無添加、5%と 10%食塩含有培地を用いてコロニーの生育度合を観察し、10%食塩含有培地を用いることにした）。また、鳥取大学農学部より与された菌

株 73株と合わせて培養用培地 (10 %食塩) を用いて 24℃で 2週間静置培養した。それらの菌体抽出物およびろ液抽出物について AOM改変法により抗酸化性 (相乗性) 試験を行った。加えた抽出量は 10mgとし、それに満たないものは全量使用した。

糸状菌の抽出物の相乗効果は菌株によって異なり、同じ菌株でも菌体とろ液の抽出物では誘導期がかなり違うものもあった。しかし、ほとんどのものは多少の時間差はあるものの一致した。含塩培地で培養した糸状菌の菌体抽出物は、リン脂質を多く生産するためか粘稠な油状物質を多く含むのが特徴であった。活性の認められる菌株について無塩と含塩培地で培養すると、概して無塩培地での生育が明らかに優れており、代謝産物の抽出量は無塩培地で培養した方が多く、菌体抽出物中の油状物質の生産量も少なかった。

3. 2 野生株 (N4-1S) の生産する相乗性物質

スクリーニングの結果、本菌のろ液抽出物のAOM時間はコントロール 36hに対して 243hであった。種々の食塩濃度で培養した場合の菌体の生育と抗酸化剤の生産性について調べるとともに、大量培養して活性の強いろ液抽出物中の有効成分の単離、同定を試みた。

3. 2. 1 食塩濃度と菌体の生育

培養用培地に種々の濃度の食塩を添加し、それぞれの濃度につき 2本 (400ml) 宛、24℃で2週間静置培養した。菌株は 10 %食塩含有スラントに生育したものをを用いた。

菌体の生育状況は、食塩含量 0~5 %で良好であった。0 %では菌体はウグイス色を呈し、胞子形成はほとんど認められなかった。5 %では菌体は灰緑色を呈して胞子が形成されていた。10~15 %では生育がやや不良となり、菌体が培地の表面全体を覆うことはなかった。また、20 %では生育不良で菌体がわずかに認められるのみであった。

本菌を種々の食塩濃度で培養し、抽出物量と相乗効果の関係を検討した結果を Fig.-1に示す。

食塩の濃度が高くなるにつれて菌体とろ液の抽出物量が少なくなった。ろ液抽出物は無塩培地では粘稠な油状であったが、食塩を添加すると褐色~黄褐色の結晶質の物質を含むようになった。菌体抽出物はいずれも油状であった。Tocとの相乗効果は食塩 2~10 %で培養したろ液抽出物で最高となり、有効成分は菌体抽出物中にはほとんど含まれないことがわかった。

これらのことから、食塩の濃度は 2~10 %が菌体の発育に適していることがわかった。それ故、食塩濃度 0 %と 5 %で培養した抽出物を TLC (Kieselgel F₂₅₄, Merck; 酢酸エチル-アセトン=6:4) にかけてみたところ、パターンが多少異なっており、0 %区に紫外線ランプの下で青色蛍光物質の存在が特徴的であった。有効成分の Rf値は 0.2であった。それぞれ大量培養し有効成分の生産量を比較した。有効成分の抽出物量が最も高い食塩濃度は何%であるかは調べてないが、食塩の添加によって明らかに増加しており、菌の代謝作

用に食塩が影響していることがわかった。

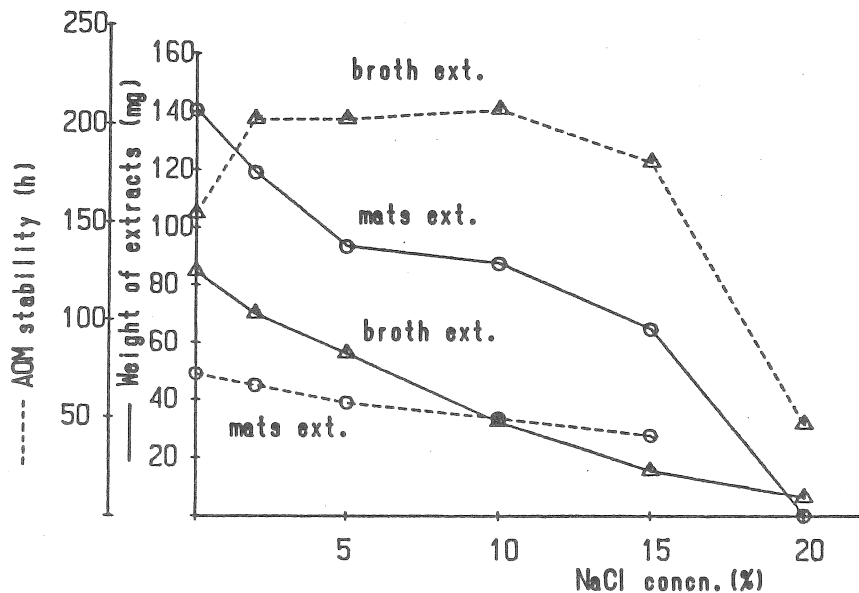


Fig.-1. Effects of Sodium Chloride Concentration on the Changes in the Amounts of Extracts and Their Synergistic Activities with Tocopherol.

3. 2. 2 有効成分の単離, 同定

食塩 0%と 5%を添加した培地 (6L) で培養し, それぞれのろ液抽出物 1.6126gおよび 1.0002gを得た。ろ液抽出物はメタノールに溶解した後, 黄色結晶物質と可溶部に分け, 可溶部はセファデックスLH-20 (メタノール) を用いるゲルクロマトで繰り返し精製した。食塩 0%区の方が抽出物量は多いが, 回収された黄色結晶は約 350mgであり, 食塩 5%区では約 540mgであった。

黄色結晶 (N4-1B) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータは次のようである。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 /CDCl $_3$, δ) 1.24(3H, d), 1.34(3H, d), 2.02(3H, s), 3.09(1H, q), 4.91(1H, q), 8.40(1H, s), 15.28(1H, bs), 16.10(1H, bs)

この結果を既知物質のスペクトルデータ²⁾³⁾と比較検討して, N4-1Bはシトリニンと同定した。シトリニンは Fig.-2に示すように平衡状態で存在し, 抗酸化性を示すという事実は抗酸化性試験の条件において平衡状態が右側に傾き, 分子の立体構造の変化によって, カ

ルボキシル基中の OH基が遊離することに基づくことが考えられる^{4) 5)}。

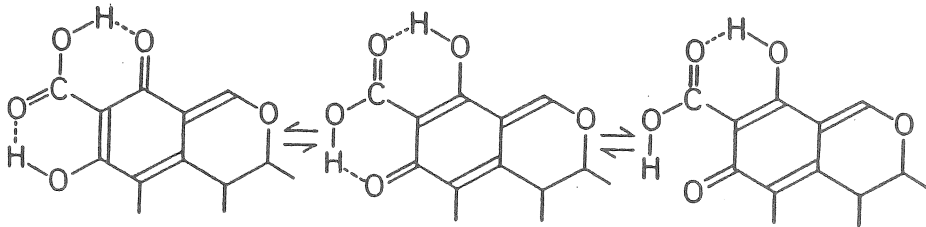


Fig.-2. Structures of Citrinin.

N4-1S菌株のように、シトリニン生産菌は高濃度の食塩存在下でも比較的生育が良好であり、スクリーニングによって分離した他の高い相乗効果を示す菌株についても有効成分を調べたところシトリニンが多く認められた。従って、スクリーニングに際して培地の選択などを工夫する必要があると思われる。

3. 3 野生株 (N21)の生産する相乗性物質

N21菌の抽出物のAOM時間はコントロール 36hに対し菌体抽出物 433h, ろ液抽出物 468hで、両者とも顕著な相乗効果を示した。本菌を大量培養(6L)し、菌体抽出物 9.41gおよびろ液抽出物 3.50gを得た。

3. 3. 1 ろ液抽出物中の有効成分

シリカゲルクロマト(25倍量)にかけて得られた各溶出画分を TLCで追跡したところ、ベンゼン-酢酸エチル(1:1)、酢酸エチルおよびアセトン画分に有効成分のスポット(エメリー・エンゲル(E・E)試薬によって暗緑色を呈する)が認められた。それ故、各画分を再クロマトし、TLCによってE・E試薬陽性の部分を回収した。この物質をメタノールから再結して黄色の粉末状の結晶(N21B)を得た。この結晶の純度は HPLC (LiChrosorb RP-18, MeOH:H₂O(8:2), 280nm)によって確認し、保持時間 1.48分にシングルピークが認められた。

機器分析の測定結果は次のようである。

Analysis calculated for C₂₀H₂₀O₈: C, 61.85; H, 5.19. Found: C, 55.91; H, 4.88. CI-MS(20eV) m/z 388(M⁺). ¹H-NMR (DMSO-d₆/CDCl₃, δ) 1.07(3H, Al-CH₃, s), 1.14(3H, Al-CH₃, s), 2.17(3H, Ar-CH₃, s), 2.54(3H, Ar-CH₃, s), 3.85(3H, -OCH₃, s), 4.81(1H, tert-OH, s), 6.23(1H, Ar-OH, s), 7.62(1H, Ar-H, s), 13.86(1H, Ar-OH (chelated), s); ¹³C-NMR (DMSO-d₆/CDCl₃, δ) 19.7(Al-CH₃), 21.4(Ar-CH₃), 27.5(Ar-CH₃), 54.9(>C-OH), 58.9(O-CH₃), 84.3, 98.3, 109.6(>C=), 111.3(=C-H),

113.3, 128.9(>CH₃), 136.5(>CH₃), 144.5, 160.2(O-C=), 167.7(-C-O-CH₃), 172.0, 191.0(C=O), 196.6, 209.4

プロトン数は 19 であるが、測定されないプロトンが 1 個存在するものと思われる。無水酢酸-ピリジンでアセチル化すると 2.42(6H, s)と 2.84ppm(3H, s)に新しいピークが認められた。それにともなって、6.23(1H, s)と 13.86ppm(1H, s)のピークが消失した。この事実は、測定されないプロトンはフェノール性 OH基であり、分子内に 3個のフェノール性OH基(キレートしたカルボキシル基の OH基も含めて)が存在することを示している。また、重水処理すると 4.81ppm(1H, s)のピークは消失するため、アルコール性(三級) OH基と思われる。また、スペクトルで認められる炭素数は 19であるが、19.7ppmのピークは 2本のピークが重なったもので、炭素数は 20である。INEPTスペクトルも測定し、各ピークの帰属を行った。

本物質の NMRスペクトルは、以前、我々が報告した物質(19B, 最終的な構造は未決定であるが、現在X-線回折法で検討中である)のスペクトルと極めて類似性が高いため、N21Bは 19Bの位置異性体と考えられる。その推定構造式を Fig.-3に示す。

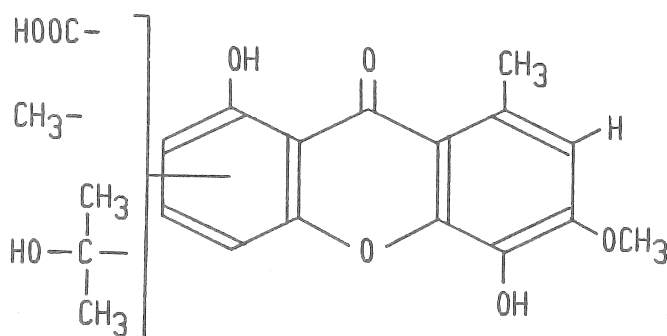


Fig.-3. Partial Structure of N21B.

3. 3. 2 菌体抽出物中の有効成分

黄褐色の抽出物をシリカゲルクロマトにかけたところ、はじめに黄色物質、次いで赤色物質が溶出した。その後、カラムが濃緑青色に変化した。これはシリカゲルによって物質が変質し artifactになるとと思われるため、精製は溶媒分別とゲルクロマトによって行った。まず、菌体抽出物を乾固した後、少量のアセトンを添加して不溶部A(2.57g, AOM 213h)、不溶部B(0.58g, AOM 445h)、可溶部C(16.02g, AOM 230h)の3画分に分別した。活性の強い不溶部Bについて有効成分を精製を試みた。メタノールを添加して再度ろ別し、不溶部B1、不溶部B2、可溶部B3とした。活性の高いB1画分をゲルクロマトにかけ、赤色

物質と黄色物質を得た。赤色物質は HPLCで確認した限りでは多くの成分の混合物であることがわかった。再度ゲルクロマトで精製し、純度はそのつど HPLCや TLCで確認したが、この物質の溶解度は低く精製効率が悪いので、さらに検討する必要がある。また、黄色物質はTocとの相乗効果を示し、比較的純度が高い物質として得られるが、放置すると青変し分解し易い物質と思われる。シリカゲルクロマトを行うとカラムが青変する原因は、この物質の存在によるものと思われる。

不溶部Aにメタノールを添加し、不溶部（赤色物質）と可溶部に分別した。不溶部をシリカゲルクロマトにかけると緑変した。この画分を酢酸エチルで分別すると不溶部（赤色物質）と可溶部（黄色物質）に大別することが出来るが、不溶部は多くの物質の混合物であり、可溶部は緑変した。メタノール可溶部は濃縮したのち順次ゲルクロマトにかけ、画分 A～Fに分画した。画分 Aの物質は白色結晶として得られるが、¹H-NMRスペクトルから判断して炭化水素と思われる。画分 Cを濃縮して得られる沈澱をメタノールから再結すると黄色結晶(N21M)が得られた。この物質の Tocとの相乗効果はコントロール 36hに対して 120hであったので同定を試みた。

本物質の ¹H-NMRを測定した結果を Table-1に示す。1.48(d)と 4.67ppm(q)のピークの存在は、この物質が herqueinone関連物質であることの特徴を示している。それ故、この物質のスペクトルデータを文献値と比較すると、Table-1に示すように、deoxyherqueinone (DH)⁶⁾と herqueichrysin(HC)⁷⁾のデータと極めて良く類似しており、N21-Mは DHであるように思われる。

Table-1. ¹H-NMR Data for N21-M in CDCl₃/DMSO-d₆ °

N21-M	DH*	HC**	Assignment
1.32	1.32	1.34	Al-CH ₃ (s)
1.48	1.47	1.56	Al-CH ₃ (d, J=6.7)
1.56	1.56	1.64	Al-CH ₃ (s)
2.82	2.82	2.89	Ar-CH ₃ (s)
3.96	4.12	3.99	-OCH ₃ (s)
4.67	4.66	4.80	Al-H (q, J=6.7)
6.80	6.85	6.70	Ar-H (s)

a: δ_H in ppm(J in Hz); s=singlet; d=doublet; q=quartet

*: deoxyherqueinone

** : herqueichrysin

^{13}C -NMRスペクトルデータを DH^{a)}および HC⁷⁾と対比して Table-2に示す. N21-Mのスペクトルのノイズが大きいため, 明確な炭素ピークは 15であった.

Table-2. ^{13}C -NMR Data for N21-M in $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$ ^a

N21-M	DH ^a	HC ^{**}	No. of C
14.1	14.3	14.0	1'
20.1	20.4	21.0	4'
23.2	23.2	24.9	14
25.2	25.3	25.5	5'
42.8	42.8	43.1	3'
59.7	59.8		15
90.5	90.6	92.5	2'
104.9	104.7	97.9	6
104.9	104.7	109.2	10
?	107.1	111.8	2
115.8	115.8	120.1	12
118.1	118.2	118.7	4
125.6	126.2	126.6	1
134.0	133.1	146.7	13
145.5	145.1	132.9	8
?	159.6	171.4	11
?	163.5	177.0	9
164.8	164.7	157.7	3
?	170.0	160.6	5
?	171.4	155.2	7

a: δ_{H} in ppm

*: deoxyherqueinone

** : herqueichrysin

N21Mの ^{13}C -NMRデータは DHとよく一致しており, ^1H -NMRデータと合わせて, N21Mは DHと同定された. DHおよび HCの構造式を Fig.-4に示す.

3. 4 野生株 (N22-3)の生産する相乗性物質

本菌の生産する抗酸化性物質は多種の物質の混合物であり, 現在単離同定を行っている. 今までに得られた 1物質 (N22-3B) の NMRデータは N21Bと一致した. N21Bと N22-3Bの

IRスペクトル (KBr) を Fig. -5に示す. 両者のスペクトルはよく一致するため同一質であることが分かった. また, 紫外可視吸収スペクトル (エタノール) を測定するとよく一致し, 吸収極大は 241, 273, 391 nmに認められた.

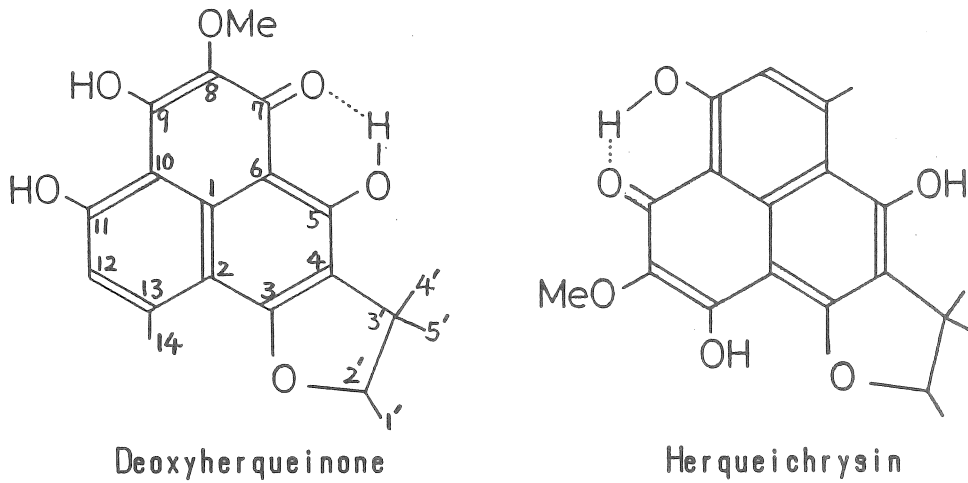
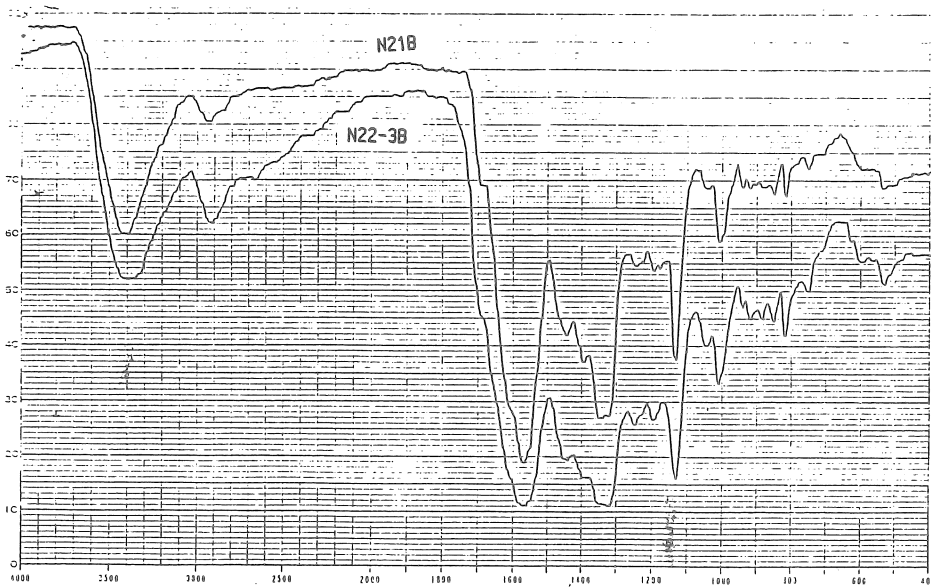


Fig.-4. Structures of Deoxyherqueinone and Herqueichrysin.



4. 今後の課題

糸状菌のスクリーニングにおいて、10%食塩を分離用培地に添加すると無塩培地に比較して、約 10^{-4} オーダーでコロニーの発生が減少するようである。実際に分離された菌株は必ずしも好塩菌ではなく、抗酸化性物質生産条件も無塩培地の方が望ましい場合が多いように思われる。今回、高塩濃度下で分離した菌株がどのような優れた特長を示しているのか定かではないが、分離条件をさらに検討し、高塩濃度のもつ選択的条件を生かすようにしたい。N21Bは新規物質の可能性もあり、さらに新しい物質の探索と、それらの安全性と生体モデル系における抗酸化性、Tocとの相乗効果、さらにはスクャベンジャーやクエンチャー活性等についても検討したい。

5. 引用文献

- 1) 伊藤, 丹羽, "フリーラジカルの臨床", 近藤監修, 日本医学館, Vol. 1, pp. 103~110 (1987).
- 2) D. W. Mathieson and W. B. Whalley, *J. Chem. Soc.*, 1964, 4640.
- 3) T. Aoyama, Y. Nakakita, M. Nakagawa, and H. Sakai, *Agric. Biol. Chem.*, 46, 2369 (1982).
- 4) U. Sankawa, Y. Ebizuka, H. Noguchi, Y. Ishikawa, S. Kitagawa, T. Kobayashi, and H. Seto, *Heterocycles*, 16, 1115 (1981).
- 5) S. Kovac, P. Nemeč, and J. Balan, *Nature*, 190, 1004 (1961).
- 6) N. Narasimhachari, *J. Antibiotics*, 25, 155 (1972).
- 7) T. J. Simpson, *J. C. S. Perkin I*, 1979, 1233.
- 8) T. Suga, T. Yoshioka, T. Hirata, and T. Aoki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 56, 3661 (1983).

On the Production of Antioxidants by Fungi Isolated in the
Presence of Higher Amounts of Salt

Yukihiro ISHIKAWA

(College of Education, Tottori University)

S u m m a r y

Many fungi were isolated from soil samples using a malt extract medium containing 10 % of salt. They have been screened for the production of antioxidants synergistic with tocopherol(Toc), and two strains were investigated.

One of them has grown on a malt extract medium containing various concentration of salt. The presence of 2~10% amounts of salt helped to attain to higher synergism between ethyl acetate(EA) extract of culture broth and Toc. However, salt concentrations more than 20 % completely halted the growth of the strain. The EA extract was gel-chromatographed on Sephadex LH 20(methanol) to give yellow substance which, upon recrystallization, produced needles from methanol. This compound was identified to be citrinin by NMR data.

The other has grown on a malt extract medium and culture broth and mycelial mats were extracted with EA and acetone(Ac), respectively. The EA extract was chromatographed on silica gel, using benzene-EA (1:1), EA and Ac, to give yellow substance, which was recrystallized from methanol. The results of elementary analysis and spectral data suggest that this compound is a derivative of some xanthenes. The Ac extract was partitioned with Ac and methanol. Acetone-insoluble and methanol-soluble portion was gel-chromatographed to give yellow crystals. This compound was determined to be deoxyherqueinone by NMR data.