[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol.63, No.6, pp.1103~1107, 1989]

Co-oxidation によるジエチレングリコールから β -ヒドロキシエトキシ酢酸への変換と蓄積

本 松 成 和

(工業技術院微生物工業技術研究所)

昭和 63 年 10 月 12 日 受 理

Co-oxidative Conversion of Diethylene Glycol into β -Hydroxyethoxy Acetic Acid

Shigekazu MOTOMATSU

Fermentation Research Institute, Higashi 1-1-3, Tsukuba 305

The applicability of co-oxidation technique was investigated in a propylene glycol-diethylene glycol cultivation system inoculated with bacterium isolated from soil. Diethylene glycol, which could not be utilized for growth by the microorganism, was converted β -hydroxyethoxy acetic acid in the presence of propylene glycol as a substrate for growth.

The cultivation was carried out in a 10-liter jar fermenter with 5 liters of the mineral medium containing propylene glycol (1.0%), diethylene glycol (2.0%) and yeast extract (0.01%) at 30°C. Under these co-oxidation culture conditions, 100% of the molar conversion ratio of diethylene glycol into β -hydroxyethoxy acetic acid was obtained after 3 days of cultivation. The maximum conversion rate to β -hydroxyethoxy acetic acid was approximately 0.7 g/liter·hr.

(Received October 12, 1988)

緒 言

土壌から分離された細菌 B-009 株は、プロピレングリコール (PG) に生育し、1,5-ペンタンジオール (1,5-PD) が共存した培養では、生育基質として利用できない 1,5-PD の片末端を酸化し、5-ヒドロキシ吉草酸を蓄積する⁽⁶⁾。この co-oxidation の培養系で、小型培養槽による 5-ヒドロキシ吉草酸の取得を目的として得た培養の特性を報告した⁽⁷⁾。また、同じ B-009 株を用いて、PG とジエチレングリコール (DEG) を共存させた co-oxidation 培養において、DEG の片末端の酸化された β -ヒドロキシエトキシ酢酸 (β -HEA) が生成蓄積された。上述の PG, 1,5-PD の培養系と PG, DEG 培養系を比べると、生育阻害の有無とともに、一度蓄積した片末端酸化物の両末端酸化物への移行の有無に違いがあることを認めた⁽⁸⁾。

この報告では、添加した基質の全量の変換が期待できる co-oxidation による物質生産の例として、PG と DEG の培養系での β -HEA の生成蓄積について定量的

検討より得られた知見を報告する。

実 験 方 法

1. 供試菌株 土壌から分離された既報の細菌 (B-009 株) を YM 斜面培地 (pH 7) で継代培養し、種菌として供試した。

2. 培地組成 基本組成は、NaNO₃, 1 g; KH₂PO₄, 2 g; K₂HPO₄, 1 g; MgSO₄·7 H₂O, 100 mg; CaCl₂·2 H₂O, 10 mg; FeSO₄·7 H₂O, 10 mg; MnSO₄·nH₂O, 10 mg; ZnSO₄·7 H₂O, 10 mg; CuSO₄, 0.2 mg; CoCl₂·6 H₂O, 0.2 mg; Na₂MoO₄·2 H₂O, 0.2 mg; H₃BO₃, 0.2 mg; Yeast Extract (Difco), 100 mg; PG; DEG; 蒸留水, 1000 ml; pH 6.8 である。実験目的に応じて PG と DEG 量を変えて添加し、さらに CaCO₃ を植菌時添加した。

3. 培養法 フラスコ培養は、500 ml 容屑付フラスコに培地 100 ml を入れ、30°C で往復振とう培養を行った。

小型培養槽による培養は、10 l 容培養槽を使用し、培

地 5 l を張り込み、30°C、1000 rpm、通気量 1vvm の条件で行った。pH はアンモニア水で7に維持した。消泡は東京化成アビセル 83 を用いた。植菌は、PG (0.5%) だけで4日間培養したフラスコ培養液 400 ml を添加して行った。

4. 菌体量の測定 島津スペクトロニックス 20 型比色計を使用、660 nm での OD 値で表示した。

5. PG, DEG, β -HEA の検出と定量 島津 GC-14 A 型ガスクロマトグラフを使用、FID 検出、充てん剤クロモソルブ 101 (60/80)、ガラスカラム 3 mm $\times$ 2 m、カラム温度 230°C、キャリアガス N_2 50 ml/min の条件で測定した。分析は、遠心分離で除菌した培養液 1 ml に、2 N HCl 液 (内部標準物質として 1,3-ブタンジオールを 1 v/v% 含む) を 0.2 ml 加えた調整試料 2 μ l を直接ガスクロマトグラフに導入した。この分析条件で、生育基質の PG、内部標準物質の 1,3-ブタンジオール、変換基質の DEG、取得目的とした β -HEA の順で検出され、関係する物質の同時定量が可能であった。検量線の作成には、PG は和光純薬工業製 (特級)、DEG は関東化学製 (特級) を使用した。 β -HEA については、前報⁽⁸⁾の培養法より得た試料を基に調整した遊離の β -HEA を用いた。表示は、PG と DEG については、初め

に加えた基質量を 100% とし、分析時の各基質量を残存率で示した。 β -HEA については、1 ml の DEG (比重 1.118) が 100% 変換されると、 β -HEA が 1266 mg 生成するとして各分析時に得た β -HEA 量を初めに加えた DEG 量の変換率で示した。

6. 全有機炭素の定量 島津全有機炭素計 TOC-500 型を使用した。分析は、遠心分離で除菌した培養液を蒸留水で 100 倍に稀釈した試料を測定し ppm C で表示した。

実験結果

1. $CaCO_3$ 添加の有無による添加基質の経時変化

PG と DEG を共存させたフラスコ培養において、前報⁽⁸⁾で示したように生成した β -HEA による pH の低下がみられたので、PG (0.2%) と DEG (0.5%) の培養系で $CaCO_3$ 添加の有無による差異をガスクロで検討し、その結果を Fig. 1 に示した。培養3日目において $CaCO_3$ 添加の培養では、変換基質の DEG が消失しているのに対して、無添加の培養では DEG の残存が認められた。 $CaCO_3$ を添加した培養の経時変化では、培養1日目に残存している PG は、培養2日目で消失するとともに、 β -HEA の生成蓄積がみられた。DEG から β -HEA

Fig. 1. Effect of $CaCO_3$ Addition on Conversion of DEG. Cultivation was carried out in a 500 ml flask with 100 ml of the medium containing 0.2% PG and 0.5% DEG at 30°C. In case of $CaCO_3$ addition, $CaCO_3$ (0.4 g) was added into 100 ml of the broth at the inoculation time. A, PG; B, 1,3-butanediol; C, DEG; D, β -HEA.

への変換反応は3日間の培養で終了し、蓄積した β -HEA の量は8日間の培養時まで消失することなく維持されていた。培養8日目の pH は 5.2 であった。CaCO₃ を添加しない培養では、PG の消失がみられた培養の2日後、DEG から β -HEA への変換反応は進行せず同量で推移していると判断した。培養8日目の pH は 3.9 であった。

2. フラスコ培養での基質・生成物の定量的経時変化

ガスクロマトグラフィーによって、生育基質 (PG), 変換基質 (DEG), 生成物質 (β -HEA) の同時検出が可能であること、さらに CaCO₃ の添加の必要を前述した。PG (0.2%) と DEG (1.0%) の培養系で 0.8 g の CaCO₃ を植菌時添加した場合のガスクロによる経時変化

Fig. 2. Time Course of Substrate Utilization and β -HEA Formation. Cultivation was carried out in a 500 ml flask with 100 ml of the medium containing 0.2% PG and 1.0% DEG at 30°C. CaCO₃ (0.8 g) was added into 100 ml of the broth at the inoculation time. ●, PG; □, DEG; △, β -HEA.

Table I. Time Course of DEG Conversion. Cultivation was carried out as described in Fig. 2.

Incubation time (hr)	0	36	48	54	60	72	96
Residual ratio of DEG (%)	100	81	64	52	34	15	2

Table II. β -HEA, Cell Growth and TOC in 15 Days Culture Broth. Cultivation was carried out in a 500 ml flask with 100 ml of the medium containing 0.1% PG and 1~6% DEG. CaCO₃ (0.8~4.8 g) was added into 100 ml of the broth at the inoculation time.

Initial DEG concentration (%)	1	2	3	4	5	6
1 Peak area ratio (β -HEA/butanediol)	1	1.9	3.2	3.9	4.6	5.9
2 Cell growth (OD at 660 nm)	0.9	1.1	0.9	1.2	0.8	1.1
3 TOC (ppm C)	46	96	141	179	220	262

の結果を Fig. 2 で示した。

PG の挙動については、培養1日目では初めの添加量の約 25% が残存し、培養 36 時間後には消失した。変換基質 DEG から β -HEA への変換反応については、培養1日目には変換は認められなかった。36 時間の培養で約 20% の DEG から β -HEA への変換が生じ、引き続いて DEG の減少とともに対応した β -HEA の生成蓄積がみられた。培養4日目に変換反応は終了し、このときに蓄積されている β -HEA の量は、培養を止めた8日目まで同じ量を維持していた。

Table I は、同じ実験で培養液 1 ml に、内部標準物質 1,3-ブタンジオールの 1% 水溶液を 0.2 ml 加えた試料からの DEG のピーク値を、無植菌培地からのそれを残存率 100% として示したものである。Fig. 2 で示した DEG の各分析時の残存率と一致することから、DEG から β -HEA への変換反応に限るなら、塩酸酸性にすることなく DEG の量を測定することで培養の経過を追えると判断した。

3. PG と DEG の量比に関する検討

単位量の PG が、どのくらいの量の DEG を変換できるか調べるために、生育基質の PG 量を 0.1% に固定して、DEG の量を 1, 2, 3, 4, 5, 6% の 6 通りに変量した培養系での変換反応をみた。CaCO₃ については、1% の DEG 量に対して 0.8 g の割合で植菌時に添加した。なお、予備実験において、DEG 添加量 6% では生育阻害はみられなかった。5 日ごとにガスクロ分析で変換反応を追い、すべての系で DEG から β -HEA への変換反応が終了した培養 15 日後の分析値を Table 2 にまとめた。1 の欄は、各系の β -HEA と内部標準 1,3-ブタンジオールのガスクロピーク比を、PG (0.1%) と DEG (1%) のそれを 1 として表示したものである。初めに加えた DEG の量に対応した β -HEA 量が各系で蓄積していると判断した。2 の欄は、培養液中に残存する CaCO₃ を塩酸酸性として溶かした後の菌体量を OD 値で示したものである。得られた OD 値は、初めに加えた生育基

Fig. 3. Time Course of Cell Growth, Substrate Utilization and β -HEA Formation. Cultivation was carried out in a 10-liter jar fermentor with 5 liters of the medium containing 1.0% PG and 2.0% DEG at 30°C. O, Cell growth; ●, PG; □, DEG; Δ, β -HEA.

質 PG の 0.1% 量を反映していると判断できる値を示した。3 の欄は、培養液を蒸留水で 100 倍希釈した試料の TOC 値である。得られた各試料の TOC 測定値は、初めに加えた DEG の量から計算した値と良い一致をみた。Table II の結果を総合して、すべての系で、DEG から β -HEA への全量の変換蓄積が起きていると判定した。

4. 培養槽での PG (1%) と DEG (2%) 系の培養経過

Fig. 3 は、10 l 容培養槽での PG (1%) と DEG (2%) を共存させた培養の経時変化である。植菌後約 25 時間の培養で、DEG の減少とその減少量に対応した β -HEA の生成蓄積が始まった。培養 30 時間目で生育基質の PG は消失した。植菌後約 55 時間 (変換開始時より 30 時間) で DEG は消失し、このときに蓄積している β -HEA 量は、72 時間目まで同量を維持していた。菌体量についても、生育基質の PG が消失したときの OD 値を 72 時間目まで維持していた。変換反応の開始時から終了時までの平均の変換速度は 0.67 g/l·hr であった。

考 察

生育基質と変換基質 (生育基質にならない) を共存させる co-oxidation を利用した培養方式による物質生産

の可能性を PG と DEG の培養系で検討した。この点については、生育基質 (変換反応の酵素源) としての 0.1 ml の PG によって、6 ml (6.7 g) の DEG が 7.6 g の β -HEA に変換でき、小型培養槽で DEG の変換速度として 0.7 g/l·hr の値を得たことから、引き続き β -HEA の高生産性を目的とした試験・検討を進めたい。

Fig. 1 で示した CaCO_3 無添加の培養で、培養 2 日目の β -HEA 量が 8 日目まで同量で推移したことと 8 日目の pH との関係から、この変換反応が pH に敏感であると推察した。

生育基質としての PG の 60 倍量の DEG が β -HEA に変換されたこと、さらに Fig. 2, Fig. 3 で PG の存在と変換蓄積の進行度に着目すると、変換反応は PG の消失後に進行していることからみて、この変換反応の機作の解明は興味ある課題である。

微生物の培養自体を利用する物質生産法として可能性を持つとともに、自然界での物質の動きの理解に貢献すると考えられる co-oxidation あるいは co-metabolism の研究は、今後とも幅広く行われる必要があろう。

要 旨

Co-oxidation を利用した物質生産の可能性を検討し

た。すなわち、土壌から分離された既報の細菌 (B-009 株) を使い、生育基質となる PG と変換基質としての DEG (生育基質とならない) の 2 種の基質を共存させた培養方式において、DEG の片末端が酸化された β -HEA の取得を目的に定量的検討を加えた。結果として、この PG と DEG の培養系が典型的な co-oxidation の事例となることを確認した。

PG と DEG の量比に関しては、PG (0.1%) と DEG (6%) の系において、15 日間の培養で DEG の全量が β -HEA に変換した。また、小型培養槽での PG (1%) と DEG (2%) の系で、DEG の変換速度 0.7 g/l·hr を得た。

- (1) E. R. Leadbetter and J. W. Foster : *Arch. Microbiol.*, **35**, 92 (1960).
- (2) R. S. Horvath and M. Alexander : *Can. J. Microbiol.*, **16**, 1131 (1970).
- (3) G. K. Skryabin and L. A. M. Golovleva (福井三郎監訳) : 「微生物による有機化合物の変換」, 学会出版センター, 1980, p.126.
- (4) J. Deley and K. Kersters : *Bacteriol. Rev.*, **28**, 181 (1964).
- (5) K. Kersters and J. Deley : *Biochim. Biophys. Acta*, **71**, 311 (1962).
- (6) 本松成和 : 微工研研究報告, **65**, 81 (1986).
- (7) 本松成和 : 微工研研究報告, **65**, 89 (1986).
- (8) 本松成和 : 農化, **63**, 1099 (1989).