

# 微生物によるエーテル化合物の利用 (第1報)

長 島 靖 臣  
五十嵐 辰 夫

## Utilization of Alkylether Compounds by Soil Bacteria (Part 1)

Yasuomi NAGASHIMA  
Tatsuo IGARASHI

We have isolated four strains of bacteria, capable of utilizing various alkylether compounds as the sole source of carbon. *Alcaligenes* MC11 and TE8 grew well on ethylene glycol monoethyl ether and tri-, tetra- and poly-ethylene glycols and ethylene glycol monomethyl ether was also a good substrate for the former organism. *Alcaligenes* PE18 which could not grow in glucose medium, only exhibited good growth with tri-, tetra- and poly-ethylene glycols. Of the ether compounds tested *Corynebacterium* OEH8 utilized only *O*-ethylhomoserine. The products from ethylene glycol monomethyl and monoethyl ethers were identified as methoxy- and ethoxy-acetic acid, respectively.

現在、大量にアルキルエーテル化合物であるエチレングライコール-モノメチルエーテル、-モノエチルエーテル、ジ-、トリ-、ポリ-エチレングライコールが生産され使用されている。特にエチレングライコール-モノメチルエーテル、-モノエチルエーテルは、溶媒、溶剤として大量に使用されている。

エチレングライコールの微生物による分解は、いくつかわかっている<sup>1)2)</sup>。しかし、これらのエーテル化合物のエーテル結合は、化学的又は微生物による処理で、分解しにくいことが知られている。従ってこれらエーテル化合物の廃棄処理は、非常に困難と考えられる。以上のことより、有能な微生物によるエーテル結合の分解について研究を進めることは、大変重要なことであろう。

先に、Fincher<sup>3)</sup>等は、土壤中より0.25%のトリエチレングライコールを含む培地で生育する菌を分離した。この菌は、グラムネガティブな桿菌であり、分子量600までのポリエチレングライコールに生育した<sup>4)</sup>。従って自然界には、さらに重合度の高い高分子物質に生育する菌が、存在する可能性がある。また唯一の炭素源として低分子のエーテル化合物を含む培地で分離した菌と、高分子のエーテル化合物を含む培地で分離した菌とでは、性質が種々異なることが予想される。従って菌分離用炭素源としてエチレングライコールモノメチルエーテル、トリエチレングライコール、ポリエチレングライコール-400、ポリエチレングライコール-1000(数字は分子量を示す)の合成エーテル化合物を用い、生育する

菌の分離を試みた。

一方、自然界より生産されるアルキルエーテル化合物としては、エーテル結合を含む脂肪<sup>5)</sup>と原田<sup>6)</sup>等の見出した*O*-アルキルホモセリンの一種、*O*-エチルホモセリンを唯一の炭素源として生育する菌を分離し、先の合成エーテル化合物で分離した菌との菌の性質を比較することは、非常に興味深いことである。

### 1. 実験方法

#### 〔1〕 使用菌株

菌は、集積培養法により分離した。分離用培地は、水道水 100ml 中に  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.15g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05g,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   $\text{NaCl}$  それぞれ 1mg と、炭素源としてエーテル化合物を含んだ。

#### 〔2〕 生育培地

分離用培地と同じ組成の培地を用いた。5ml 同じ培地で前培養した種培養液を、95ml 生育培地を含む 500ml 振とうフラスコへ接種し、5日間 30°C で振とう培養した。

#### 〔3〕 分析法

培養液を10分間 8000rpm で遠心分離し、培養液から菌を分離した。得られた菌は、水洗され次にアセトン洗浄された。それから 40°C で減圧下一夜乾燥し、菌体重量を測定した。ペーパークロマトグラフィーは、展開剤(A)として、*n*-ブタノール：酢酸：水(4:1:1v/v)で、東洋河紙 No.-52 を用い下降法により行なった。

酸は、プロモクレゾールグリーンで検出した。赤外線吸収スペクトルは、島津自記赤外線分光光度計 1R-27C型で、KBr を用い測定した。

#### 〔4〕 試 薬

O-エチル-L-ホモセリンは、Murooka<sup>7)</sup>等の方法により合成された。全ての他の試薬は、入手可能な最上級のものをを用いた。

## 2. 実験と結果

### 〔1〕 バクテリアの分離

微生物 MC-11, TE-8, PE-18, OEH-8 は、土壌から (MC-11, TE-8, OEH-8) また活性汚泥から (PE-18) 分離された。これらの菌は、それぞれ1% エチレングライコールモノメチルエーテル, 3% トリエチレングライコール, 3% ポリエチレングライコール-400, 0.2% O-エチルホモセリンを唯一の炭素源として含む培地より分離された。ポリエチレングライコール-1000の培地からは、分離することができなかった。

菌株 MC-11, TE-8, PE-18 は、それぞれ胞子を作らず、鞭毛を持たず非運動性でグラムネガティブな桿菌であった。静置培養では、被膜を作ることなく培養液はにごった。ゼラチンは、液化しなかった。寒天培地上での

生育では、色素を生産しなかった。リトマスミルクは、アルカリ性となった。ガスや酸は、糖-ペプトン-イーストエキス培地では、検出されなかった。菌株 PE-18 は唯一の炭素源としてグルコースで生育できなかった。

菌株 MC-11, TE-8, PE-18 はそれぞれ5% エチレングライコールモノメチルエーテル, 10% トリエチレングライコール, 15% ポリエチレングライコール-400で生育した。

これらの結果から3菌株は、バージーズ マニュアル (7巻)<sup>8)</sup>に運動性または非運動性と記されているアルカリジエネス属に、属すると推定した。


菌株 OEH-8 は、グラムポジティブで孢子形成のない桿菌であった。鞭毛を持たず、運動性はなかった。

時々、スナッピングディビジョンによる菌の配列が見られた。寒天培地上でコロニーは、球形、滑らか、光沢を以て薄黄色を示した。静置培養で、被膜形成はなかった。以上よりこの菌株は、コリネバクテリウム属に、属すると考えられる。

### 〔2〕 生育実験

唯一の炭素源としてエーテル化合物を含む培地を用いた種々なエーテル化合物に対する菌株 MC-11, TE-8, PE-18, OEH-8 の生育が検討された (Table 1)。

Table 1 Utilization of various ether compounds

Carbon source 1%	Structural formula	Dried cells formed (mg/100ml)			
		MC-11	TE-8	PE-18	OEH-8
Ethylene glycol	HO-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -OH	136	47	0	0
Ethylene glycol monomethylether	CH <sub>3</sub> O-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -OH	66	1	0	0
Ethylene glycol dimethylether	CH <sub>3</sub> O-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -OCH <sub>3</sub>	0	0	0	0
Ethylene glycol monoethylether	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -OH	21	74	0	0
Ethylene glycol diethylether	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	7	3	0	0
Ethylene glycol monopropylether	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -OH	0	0	0	0
Ethylene glycol monophenyl ether	 -O-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -OH	0	0	0	0
Diethylene glycol	HO-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O) <sub>2</sub> H	42	80	0	0
Diethylene glycol monomethylether	CH <sub>3</sub> O-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O) <sub>2</sub> H	0	0	0	0
Diethylene glycol dimethylether	CH <sub>3</sub> O-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0	0	0	0
Diethylene glycol monoethylether	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O) <sub>2</sub> H	7	4	0	0
Diethylene glycol diethylether	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0	0	0	0
Triethylene glycol	HO-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O) <sub>3</sub> H	160	95	106	0
Tetraethylene glycol	HO-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O) <sub>4</sub> H	81	78	71	0
Tetraethylene glycol dibutylether	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O) <sub>4</sub> C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0	0	0	0
Polyethylene glycol-400	HO-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O) <sub>n</sub> H	66	69	80	0
O-Ethylhomoserine	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CHNH <sub>2</sub> COOH	0	0	0	71
*Methoxy acetic acid	CH <sub>3</sub> OCH <sub>2</sub> COOH	20	0	0	0
*Ethoxy acetic acid	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OCH <sub>2</sub> COOH	31	4	0	0

\*The concentrations used were 0.2%

菌株 MC-11 の生育は、エチレンジグリコールモノメチルエーテル、 $\gamma$ -モノエチルエーテル、ジ-, トリ-, ポリ-エチレンジグリコールで良く生育した。またエチレンジグリコール-, ジエチレンジグリコール-モノメチルエーテルで、わずかに生育した。菌株 MC-11 は、エチレンジグリコールモノメチルエーテルで生育する以外は、TE-8 に似ている。菌株 MC-11 の生育は、エチレンジグリコールモノメチルエーテルの方が、エチレンジグリコールモノエチルエーテルの場合よりも、良かった。しかし、菌株 TE-8 は、エチレンジグリコールモノエチルエーテルでは良く生育したが、エチレンジグリコールモノメチルエーテルでは生育しなかったことは、興味を引く点である。

菌株 PE-18 のエーテル化合物類での生育は、MC-11 や TE-8 とは異なり、トリ-, テトラ-, ポリ-エチレンジグリコールで良く生育したが、他の基質では、0.1% 濃度でも生育は見られなかった。菌株 PE-18 がエチレンジグリコールで生育できなかったことは、少なくとも PE-18 においては、ポリマーが利用される際にモノマーであるエチレンジグリコールに分解されてから利用されるのではないことを、意味している。

菌株 OEH-8 は、*O*-エチルホモセリンで生育するのみで、他の3菌株とは非常に異なった。反対に、他の3菌株は、*O*-エチルホモセリンを唯一の炭素源として生育できなかった。

エチレンジグリコール-, ジエチレンジグリコール-ジメチルエーテル, ジエチレンジグリコールジエチルエーテル, テトラエチレンジグリコールジブチルエーテルのような2個の末端エーテル結合をもつ化合物には、菌株 MC-11 と TE-8 が、エチレンジグリコールジエチルエーテルにわずかに生育したのみで、他は生育することが

できなかった。

菌株 MC-11, TE-8, PE-18, OEH-8 の生育の度合いが唯一の炭素源として種々なアルコール, 有機酸を含む培地で検討された (Table 2)。

Table 2 Utilization of various carbon sources

Carbon Source 1%	Dried Cells Formed mg/100ml		
	MC-11	TE-8	PE-18
Methanol	0	0	0
Ethanol	190	142	0
Ethylene glycol	136	47	0
Propanol	124	160	0
1,2-Propane-diol	47	11	0
1,3-Propane-diol	0	3	0
Glycerol	170	276	116
Formate	2	3	0
Acetate	76	32	85
Glycolate	20	36	56
Propionate	11	66	0
Succinate	280	226	180
Fumarate	76	186	118
Citrate	38	44	10
Glucose	53	72	0

菌株 MC-11 と TE-8 の生育への基質特異性は、非常に似ていた。菌株 PE-18 は、グルコースを利用できない点で非常に特殊な菌であった。また菌株 PE-18 は、エタノール, プロパノール, 1-2-プロパンジオールとプロピオン酸に生育できない点で、菌株 MC-11 および TE-8 と異なった。

〔3〕 生育に及ぼす因子

Table 1, Table 2 で得た結果は、唯一の炭素源とし

Table 3 Effects of some compounds on growth

	Additives 0.2%	Carbon compounds 1%	Growth mg/100ml
<i>Alcaligenes</i> TE-8	None	HO(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O) <sub>3</sub> H	90
	Casamino acids	HO(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O) <sub>3</sub> H	242
	Glutamate	HO(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O) <sub>3</sub> H	216
	Asparaginate	HO(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O) <sub>3</sub> H	174
	Succinate	HO(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O) <sub>3</sub> H	176
	Casamino acids		40
	<i>Alcaligenes</i> MC-11	None	HO(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O) <sub>3</sub> H
Casamino acids		HO(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O) <sub>3</sub> H	190
<i>Alcaligenes</i> PE-18	None	HO(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O) <sub>n</sub> H	87
	Casamino acids	HO(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O) <sub>n</sub> H	100

て基質のみを含む培地で得たものであった。分離した菌の生育に及ぼす因子について検討した (Table 3)。

ビタミンフリーのカザミノ酸は、菌株 MC-11, PE-18 の生育に対しては、あまり効果を示さなかったが、菌株 TE-8 の生育に対しては、効果を示した。従ってこのことより、菌株 TE-8 に対してアミノ酸の効果が考えられその中でも、グルタミン酸が最も良い効果を示した。

菌株 TE-8 は、コハク酸によっても生育を促進させられたが、このように有機酸によって生育が促進させられることは、Hijikata<sup>9)</sup> 等による酢酸菌の研究においても報告されている。

#### 〔4〕 エチレンジライコールモノメチルエーテル、 -モノエチルエーテルからの生産物

種々なエーテル化合物で生育を検討中、酸性スポットが、菌株 MC-11 のエチレンジライコールモノメチルエーテルとエチレンジライコールモノエチルエーテルでの培養液からも検出された。酸性生産物の分離は、次のようにして行なった。

菌株 MC-11 を好氣的にエチレンジライコールモノエチルエーテル (10g) と無機塩培地を含む培地 (1ℓ) で、5日間培養した。菌体を遠心分離して除き、上澄液を得た。上澄液を減圧下 40°C 以下で 100ml に濃縮し、硫酸で pH 2.0 と酸性にし、40時間エーテルで連続的に抽出を行なった。この抽出液を蒸発乾固し、乾固した物質を水 5ml に溶かし、カラム (5×10cm) の Dowex 2(-OH 型) にアプライした。

最初、カラム中の残存エチレンジライコールモノエチルエーテルを除くため、1ℓ の水を流した。

次に、2NHCl (50ml) で溶出させ、酸性生成物を含むフラクション (20ml) は、減圧下で濃縮され、80mg の油状物となった。この油状物は、ペーパークロマトグラフィーで展開剤 (A) により、Rf 0.87 の単一スポットを示した。Prigot と Pollard<sup>10)</sup> の方法により得た油状物のピペラジン誘導体は、純品エトキシ酢酸のピペラジン誘導体と同じ m·p (120~121°C) を示した。また油状物の IR スペクトルも、エトキシ酢酸のそれに一致した。

元素分析値	理論値	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> : C, 46.1 : H, 7.7
	実験値	C, 45.5 : H, 7.8

これらのデータは、得られた油状物がエトキシ酢酸であることを示している。エチレンジライコールモノエチルエーテルに対するグルコノバクター スポキシダンス菌による酸化で活性は弱い、エトキシ酢酸が生成物として、Hromatka と Plesofsky<sup>11)</sup> により同定された。

前者と同じ方法により、エチレンジライコールモノメチルエーテル (10g) での MC-11 菌の培養液より油状物

(50mg) が分離された。この無色油状の物質は、展開剤 (A) を用いてのペーパークロマトグラフィーにより、Rf 0.81 を示した。この油状物のピペラジン誘導体は、純品メトキシ酢酸のピペラジン誘導体と同じ m·p (156~157°C) を示した。

元素分析値	理論値	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> : C, 40.0 : H, 6.6
	実験値	C, 39.8 : H 6.8

この油状物の IR-スペクトルは、メトキシ酢酸のそれと一致した。これらのデータは、この油状物がメトキシ酢酸であることを示している。

エチレンジライコールモノメチルエーテルは、グルコノバクター スポキシダンス菌<sup>12)</sup> により 1 モルにつき酸素 1 モルをすみやかにとり込むことは知られていたが、生成物は知られていない。

### 3. 考察とまとめ

この研究で種々なエーテル化合物を唯一の炭素源として含む培地で生育する 4 菌株 MC-11, TE-8, PE-18, OEH-8 を分離した。これらの菌は、エーテル化合物をエネルギー源としてまた細胞への基質として利用しているのでエーテル結合は、これらの菌により分解されているに違いない。しかし、エーテル結合の分裂が、末端水酸基の脱水素の前に起るのか後に起るのか明らかではない。

生産物としてエチレンジライコールモノメチルエーテルよりメトキシ酢酸、エチレンジライコールモノエチルエーテルよりエトキシ酢酸を検出した。これら 2 個の酸はいずれもエーテル結合を保持している。

また Table 1 に示したように菌株 MC-11 と TE-8 は、エトキシ酢酸に生育した。これらのことよりエーテル結合がこわれる前に脱水素反応が起り、さらにエーテル結合が、分裂するものと考えられる。

Pane と Todd<sup>13)</sup> は、トリエチレンジライコールのエーテル結合の分裂が、脱水素より前に起るか後に起るか明らかにできなかった。

シュードモナス アエルギノーザ菌の O-デメチラーゼ<sup>14)</sup> により、パニリン酸のメトキシ基からフォルムアルデヒドが、形成されると報告された。私共の菌で、フォルムアルデヒド、アセトアルデヒドは、それぞれエチレンジライコールモノメチルエーテル、-モノエチルエーテルより形成されるだろう。

菌株 MC-11, TE-8, PE-18 菌は、グリコール酸、酢酸に生育した。また菌株 MC-11 と TE-8 は、ギ酸にわずかに生育した。しかし、エーテル結合の分裂の機構に関しては、情報は得られなかった。

Table 1 は、唯一の炭素源としてのエーテル化合物の利用を示しているが、エーテル結合の分裂についての能力を示しているのではない。種々なエーテル化合物のエーテル結合を分裂するこれらの菌のその能力を明らかにし、そのエーテル結合分裂酵素が、いかなるものであるかを検討することは、重要なことである。

自然界からのエーテル化合物 O-エチルホモセリンを唯一の炭素源として生育しうる菌 OEH-8 は、合成エーテル化合物に生育することが、できなかつた。また他の3菌株は、O-エチルホモセリンを唯一の炭素源として生育することができなかつた。合成エーテル化合物を炭素源として分離した菌株 MC-11, TE-8, PE-18 は、グラムネガティブであり、反対に菌株 OEH-8 は、グラムポジティブであった。

種々なエーテル化合物を資化しうる菌を分離したが、菌によるエーテル結合の分裂様式については、ほとんど解っていない。将来、有機合成において分解させにくい位置にあるエーテル結合を菌の生産する酵素により分解させるという方法で、このような酵素が役立つようになるであろう。このような意味においても、興味あるテーマとして研究は、発展して行くであろう。

現在、エーテル化合物脱水素酵素、分解酵素について詳しく検討中である。

本研究は、大阪大学産業科学研究所原田研究室で、原田教授の指導のもとに行なったものです。ここに終始御懇篤な御指導を頂きました原田篤也教授に、厚く御礼申し上げます。また研究の発表のお許しを頂きました上司の方々に、深謝の意を表します。

[本論の一部は、Utilization of alkylether compounds by soil bacteria. *J. Ferment. Technol.*, 53, 218(1975)

に発表したものです]。

### 参 考 文 献

- 1) Harada, T., Yoshimura, T.; *J. Ferment. Technol.*, 42, 615 (1964).
- 2) Gonzales, C. F., Taber, W. A., Zeitoun, M. A.; *Appl. Microbiol.*, 24, 911 (1972).
- 3) Fincher, E. L., Payne, W. J.; *Appl. Microbiol.*, 10, 542 (1962).
- 4) Payne, W. J.; *Biotechnol. Bioeng.*, 5, 355 (1963).
- 5) Thompson, Jr., G. A., Lee, P.; *Biochim. Biophys. Acta*, 98, 151 (1965).
- 6) Murooka, Y., Harada, T.; *J. Bact.*, 96, 314 (1968).
- 7) Murooka, Y., Harada, T., Izumi, Y.; *Bull. Chem. Soc. Japan*, 41, 633 (1968).
- 8) Breed, R. S., Murray, E. G. D., Smith, N. R. (ed.); *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 11th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1952).
- 9) Y. Hijikata, H. Okumura and G. Terui; *J. Ferment. Technol.*, 50, 7 (1972).
- 10) Prigot, M., Pollard, C. B.; *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 2758 (1948).
- 11) Hromatka, O., Polesotvsky, W.; *Enzymologia*, 24, 372 (1962).
- 12) Kersters, K., De Ley, J.; *Biochim. Biophys. Acta*, 71, 311 (1962).
- 13) Payne, W. J., Todd, R. L.; *J. Bact.*, 91, 1533 (1966).
- 14) Ribbons, D. W.; *FEBS Letters*, 8, 101 (1970).