

*Pseudomonas*属細菌によるエチレングリコール ドデシルエーテルの生分解

市川吉夫*・森 祐次郎*・北本 豊*・細井 登*

昭和54年7月31日受付

Degradation of Ethylene Glycol Dodecyl Ether by a Pseudomonad

Yoshio ICHIKAWA*, Yujiro MORI*, Yutaka KITAMOTO*
and Noboru HOSOI*

The enzyme activity for the degradation of mono-ethylene glycol dodecyl ether was found in the resting cells of a pseudomonad grown on the medium containing hepta-ethylene glycol dodecyl ether as a sole carbon source. A simultaneous disappearance of mono-ethylene glycol dodecyl ether and liberation of ethylene glycol was observed from the results of the gas-liquid chromatography of the reaction mixture. The cleavage of the ether linkage of the substrate was strongly suggested.

The formation of ethylene glycol-liberating enzyme(s) might be inducible by poly-ethylene glycol alkyl ether type of detergents. Lauryl alcohol, lipophilic moiety of the detergent and most favorable carbon source for the bacterial growth, strikingly repressed the formation of ethylene glycol-liberating enzyme(s) when it co-existed with hepta-ethylene glycol dodecyl ether in the culture medium. The enzyme activity of the resting cells was also investigated. Optimal ranges for the enzyme(s) were found to be at a temperature of 25 - 30°C and a pH of 5 - 7. The cleavage of the ether linkage might not be a hydrolytic reaction, because the remarkable liberation of ethylene glycol was observed only when a large amount of oxygen was supplied into the reaction mixture.

緒 言

酸化エチレン重合体を親水基とする非イオン界面活性剤の生分解に関する検討は、アルキルベンゼンスルホン酸型陰イオン界面活性剤の生分解性の検討と共に古くからおこなわれてきた¹⁾。この種の非イオン界面活性剤中、高級アルコールを疎水基とするものはノニルフェニルエーテル型のものに比べて、はるかに容易に分解されることが指摘されている²⁾。その理由は高級アルコールのポリエチレングリコールエーテルにおいては、疎水基、親水基間のエーテル結合の加水分解によって急速に界面活性

が失われるのに対して、後者の場合は疎水基または親水基末端からの分解が徐々に進行することによるためとされている³⁾。しかしこれらの研究は、河川水あるいは活性汚泥を微生物源として用いたものであり、基質として使用されている界面活性剤も親水基の鎖長、疎水基の構造等を異にする混合物である場合が一般であって、界面活性剤の構造と微生物種の分解特性の関係を明確に指摘することは困難である。

われわれは単一構造を示す界面活性剤を基質とし、分離菌株による分解試験をこころみることによって、界面活性剤の生分解機構の解明をおこなうことを目的として、

* 鳥取大学農学部農芸化学科農産製造学研究室

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tottori University

ペンタエチレングリコールドデシルエーテル(EO(5) dodecyl ether)を唯一の炭素源として添加した無機塩培地中で増殖し得る *Pseudomonas* 属菌株を分離した⁴⁾。本菌株はエチレングリコール鎖長1~7のドデシルエーテル類のいずれをも単一炭素源として利用しうるが、ポリエチレングリコールノニルフェノール類は利用し得ない。また、ラウリルアルコール、ラウリン酸は好適な炭素源となり得たが、ポリエチレングリコール、エチレングリコールの資化能は全く認められず、本菌はEO(5) dodecyl ether の疎水基、親水基間のエーテル結合を開裂することによって界面活性を急速に低下し、遊離する疎水基部分を消費して増殖するものと推論した⁴⁾。

本報では静止菌体をモノエチレングリコールドデシルエーテル (EO(1) dodecyl ether) に作用させて生成するエチレングリコール量を測定することによって、本菌のもつ分解酵素系の諸特性ならびに酵素系の生成に関する検討をおこなった結果を報告する。

実験方法

1. 供試菌の培養と静止菌体の調製 実験にはさきに分離したEO(5) dodecyl ether資化性をもつ *Pseudomonas* 属菌株を用いた。500ml容振とうフラスコに、炭素源0.2%, NH₄Cl 0.3%, K₂HPO₄ 0.1%, KCl 0.025%, MgSO₄·7H₂O 0.025%, FeSO₄·7H₂O 0.0002%, ペプトン 0.1% (pH 7.0)の培地100mlを分注し、25℃で約30時間振とう培養した。種菌には、EO(5) dodecyl ether を炭素源とする培地で同様の条件で培養した培養液 0.5mlを添加した。培養後、4℃で速心集菌し、0.3%KCl溶液で洗浄して菌体懸濁液を調製した。

2. 菌体量の測定 660nmにおける菌液の濁度を測定し、別に作成した検量線によって乾燥菌体重量を求めた。

3. 酵素活性の測定 0.2Mりん酸塩緩衝液(pH 6.7) 2ml, 0.2%EO(1) dodecyl ether 1ml, 静止菌体懸濁液 1ml (乾燥菌体重量として2~4mg)を混合し、300rpmの往復式振とう機上ではげしく攪拌しつつ30℃で反応を継続した。30分間反応をおこなった後、反応液を適宜稀釋して0~15μg/mlのエチレングリコール(EG)を含有する試料 2mlを採取し、West-Rapoport⁵⁾の方法に従ってクロマトローブ法によるEGの定量をおこない、その生成量をもって酵素活性を比較した。

ポリエチレングリコールドデシルエーテル類を基質とした場合は、遊離するポリエチレングリコール (PEG)を定量する適当な方法を見出し得なかつたため⁴⁾、同様の条件で分解反応をおこなったのち、残存する界面活性劑

量を Greffら⁶⁾の方法にしたがいコバルトチオシアン酸アンモニウム複合体として定量することによって酵素活性を測定する方法をとった。

4. EO(1) dodecyl ether, EGのガスクロマトグラフィー TenaxGCを充填材として、EO(1) dodecyl ether の場合はステンレスカラムによる200~300℃, 10℃/minの昇温, EGの場合はガラスカラムによる150℃の定温ガスクロマトグラフィーをおこなった。その他の操作条件は前報⁴⁾に記載したとおりである。

結果と考察

1. 分離細菌によるEO(1) dodecyl etherの分解

Table 1にEG鎖長を異にする若干のドデシルエーテル類を炭素源として分離菌の培養試験をおこなった結果を

Table 1 Cultivation of the test bacterium on the various EO(n) dodecyl ether mediums

Substrate as carbon source	Substrate consumed (%)
EO(1) dodecyl ether	65.9
EO(3) dodecyl ether	86.7
EO(5) dodecyl ether	99.5
EO(7) dodecyl ether	99.5

Culture medium consisted of 0.1% EO(n) dodecyl ether, 0.3% NH₄Cl, 0.1% K₂HPO₄, 0.025% KCl, 0.025% MgSO₄·7H₂O, 0.0002% FeSO₄·7H₂O (pH 7.0). Cultivation was carried out at 25℃ for 24 hours on a reciprocal shaker. EO(n) dodecyl ether in the culture filtrate was measured colorimetrically as the ammonium cobalt thiocyanate complex.⁶⁾

示した。本実験に用いた培地はJIS非イオン界面活性剤生分解度試験方法(K 3364-1975)指定の基礎培地中より酵母エキスを除去し⁴⁾、それぞれのドデシルエーテル類を0.1%の割合に添加したものである。Pattersonら³⁾は、ポリエチレングリコールアルキルエーテル類の生分解性は親水基を構成するエチレンオキシドの重合度が增大するに伴って低下することを報告しているが、表示の結果ではEO(1), EO(3) dodecyl etherの分解率がより長鎖の親水性基をもつものに劣る。良好な分解率を示したEO(7) dodecyl ether 培地より分離した菌体を酵素源としてEO(1) dodecyl etherの接触分解をこころみたと、Fig. 1に示したようにEO(1) dodecyl etherの分解は速かに進行し、その消失に対応して反応液中にEGが

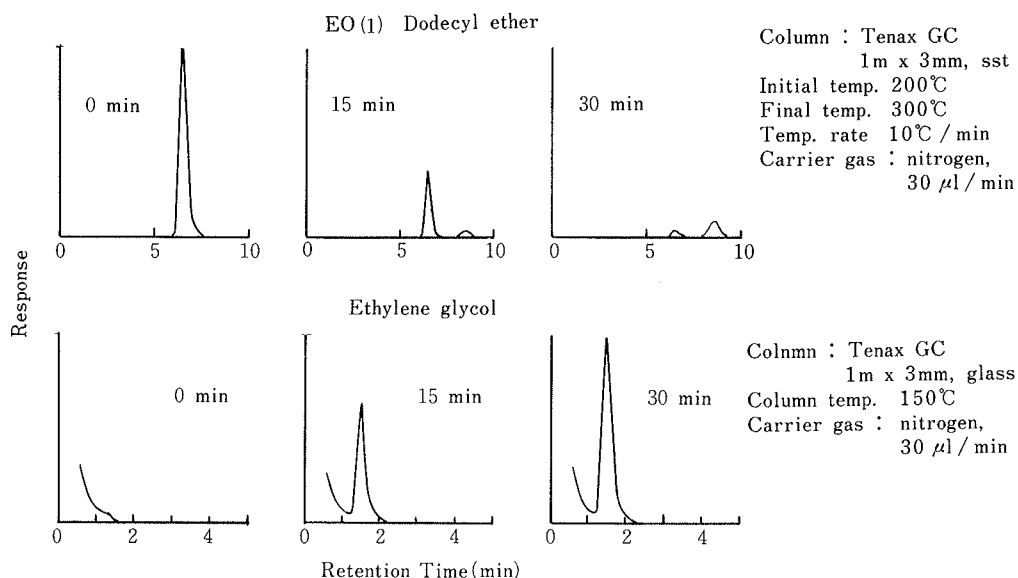


Fig. 1 Gas-liquid chromatograms for the decomposition of EO(1) dodecyl ether and the formation of ethylene glycol by the resting cells.

生成蓄積することが認められた。上述の培養試験においては、Pattersonらの実験に比較して著しく高濃度の界面活性剤を培地中に添加したため、EO(1), EO(3) dodecyl etherのごとき親水性の弱い界面活性剤添加培地では、ミセル形成その他の理由によって、その消費と菌の増殖とが制約されたものと思われる。

Fig. 1 に示したEO(1) dodecyl ether 分解のガスクロマトグラムに、より高温域に新しい未知物質が少量検出された。過量の菌体の使用による菌体成分の漏洩、親水基転移のごとき副反応の進行等の可能性も考えられるが、培養試験におけるEO(5) dodecyl ether の分解パターン⁴⁾との本質的な相違は認められず、この場合にも基質の疎水基、親水基間のエーテル結合の開裂が想定される。EG生成能の測定による本分解酵素系の検討はこの種の界面活性剤の生分解機構の解明に有用な知見を与え得るものと考えた。

2. 菌体の調製とEO(1) dodecyl ether 分解酵素系の諸性質

前報⁴⁾に述べたように、肉汁培地における本菌の最適増殖温度は35℃附近に、至適pH域は7.5附近にあって、これより高温側、アルカリ側の条件では培養成績は急激に低下する。Table 1 に示した培養条件では界面活性剤濃度を1%としても生育は可能であり、またNH₄Clの増量あるいはアミノ酸類の添加によって増殖が促進されたので、本実験に使用する菌体の調製にはEO

(7) dodecyl ether濃度を0.2%とし、さらに0.1%のペプトンを添加したpH7.0の培地を用いて25℃で培養をおこなった。Fig. 2に培養の経過を示した。24~48時間の培養によって0.5mg/ml前後の乾燥菌体収量を示したが、

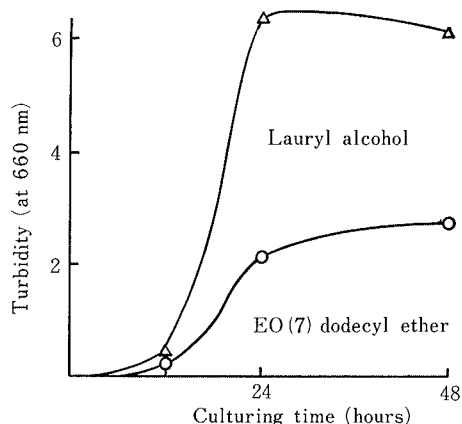


Fig. 2 Time courses of the bacterial growth on the medium containing EO(7) dodecyl ether or lauryl alcohol as carbon source. Culture medium consisted of 0.2% carbon source, 0.3% NH₄Cl, 0.1% K₂HPO₄, 0.025% KCl, 0.025% MgSO₄·7H₂O, 0.0002% FeSO₄·7H₂O and 0.1% peptone. Cultivation was carried out at 25°C on a reciprocal shaker.

図中に併示したようにラウリルアルコールをEO(7) dodecyl etherにかえて用いると、培養経過は遥かに良好であって、EO(7) dodecyl ether を炭素源とした場合には疎水基、親水基間のエーテル結合の開裂反応が増殖の律速因子となっていることが考えられる。なお、ラウリルアルコールを炭素源とする培地で培養した菌体ではEO(1) dodecyl etherの分解活性はきわめて微弱であった。

EO(7) dodecyl ether 培地より得た菌体から粗酵素液を調製する目的で、菌体の磨砕、凍結融解、乾燥などの処理をこころみたが、何れの方法を用いても酵素活性が失われたため、洗浄菌体の懸濁液をそのまま酵素源として用いることとした。Fig. 3に0.05%のEO(1) dodecyl ether を含む0.1Mりん酸塩緩衝液(pH6.7)中のEG生成量を経時的に測定した結果を示した。乾燥菌体1mg当りのEG生成量は反応開始後約30分間はほぼ直線的に増大することが認められた。EG生成量を測定することによって、酵素活性に及ぼす反応条件の影響を検討した。Fig. 3の結果から反応の継続時間は30分とした。

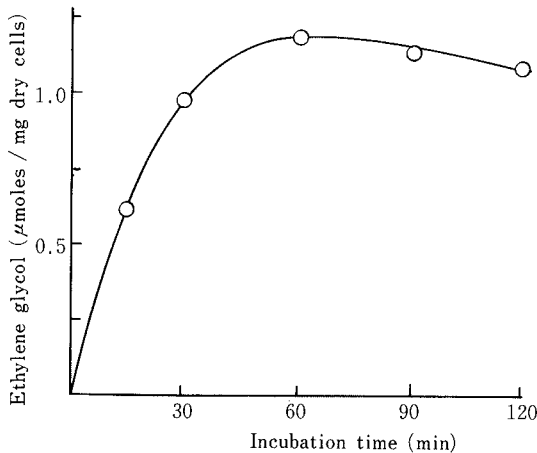


Fig. 3 Time course of the liberation of ethylene glycol from EO(1) dodecyl ether by the resting cells. Enzyme activity was determined under the standard assay conditions (Reaction mixture consisted of 0.2M phosphate buffer (pH 6.7) 2ml, 0.2% EO(1) dodecyl ether 1 ml and cell suspension 1 ml. Incubation was carried out at 30°C for 30 min under shaking). The incubation time was changed as indicated.

pHの影響：酵素活性とpHとの関係をFig. 4に示した。りん酸塩緩衝液中ではpH5~7の広い範囲で高い酵素活性が認められた。至適pHは6.7附近にあった。

温度の影響：酵素活性と反応温度との関係をFig. 5に

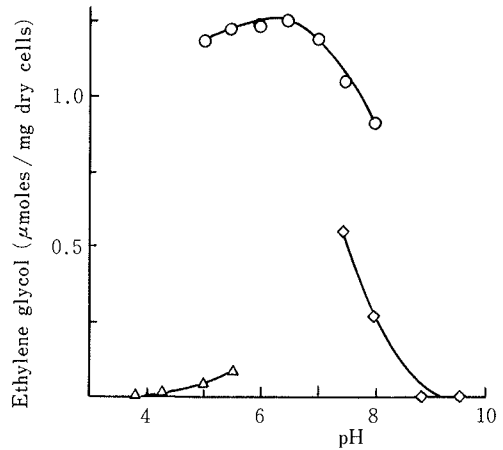


Fig. 4 Effect of pH on the enzyme activity of the resting cells.

Enzyme activity was determined under the standard assay conditions except that the pH of the phosphate buffer (—○—), acetate buffer (—△—) and Tris-HCl buffer (—◇—) were changed as indicated.

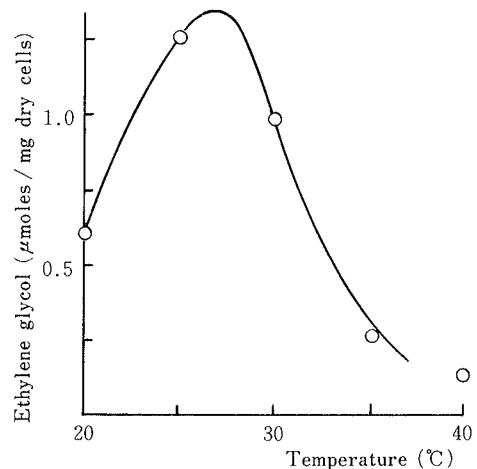


Fig. 5 Effect of temperature on the enzyme activity.

Enzyme activity was determined under the standard assay conditions except that the temperature was changed as indicated.

示した。EG生成量は25~30°Cの比較的低い温度域で最高の値が得られた。

基質濃度の影響：酵素活性と基質濃度との関係をFig. 6に示した。EG生成量は0.5mg/ml以上の基質濃度ではほ

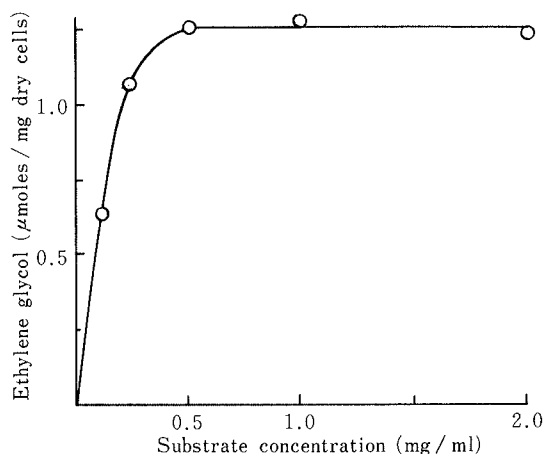


Fig. 6 Effect of the substrate concentration on the enzyme activity.

Enzyme activity was determined under the standard assay conditions except that the substrate concentration was changed as indicated.

ば一定となり, Lineweaver-Burk⁷⁾の方法によって求めた見かけ上の K_m の値は約 0.5×10^{-3} M (0.12mg/ml)であった。

酸素供給の影響: Table 2に反応中における振とう速度の影響を検討した結果を示した。気相を窒素置換した場合, 高速で振とうしてもEG生成量が微量にとどまったことは, 静止菌体による分解の進行にも大量の溶存酸素

の供給を必要とすることを示しており, EO(1) dodecyl etherのエーテル結合の開裂にも酸素分子が直接反応に関与する可能性を示唆している。

Table 2 Effect of shaking of the reaction mixture on the decomposition of EO(1) dodecyl ether

Shaking speed (rpm)	Ethylene glycol formed (μmoles/mg dry cells)
0	0.15
50	0.18
100	0.23
300	1.47
300, under N ₂	0.16

3. 増殖の基質と酵素生成の制御

Table 3に, 供試界面活性剤と類縁の構造をもつ若干の炭素源を用いて本菌の培養をおこない, それぞれの培地から得た菌体の呈するEO(1) dodecyl ether分解活性を測定した結果を示した。EO(5) dodecyl etherはEO(7) dodecyl ether同様, 分解酵素系の産生に好適な炭素源である。本菌がEO(1) dodecyl ether培地にも生育が可能であることから, EO(n) dodecyl ether型界面活性剤に生育した菌体には等しくEO(1) dodecyl etherからEGを遊離する酵素系が存在するものと考えられる。

Table 3 EO(1) dodecyl ether degradation activities of the resting cells cultivated in various carbon sources

Carbon source for cultivation	Yield of the cells (mg dry weight / ml)	Specific activity* (nmoles / min / mg dry cells)
EO(5) dodecyl ether, 0.2%	0.54	44.6
EO(7) dodecyl ether, 0.2%	0.48	46.9
Lauryl alcohol, 0.2%	1.15	6.2
Lauric acid, 0.2%	1.26	8.5
Ethylene glycol, 0.2%	0.10	—
PEG 400, 0.1%	0.08	—
EO(7) dodecyl ether, 0.1% + Lauryl alcohol, 0.1%	1.26	0
EO(7) dodecyl ether, 0.1% + Ethyl alcohol, 0.1%	0.63	38.8
EO(7) dodecyl ether, 0.1% + Acetic acid, 0.1%	0.45	36.6

* Specific activities were determined by measuring the amount of ethylene glycol liberated.

Table 4 Degradation of the various polyethylene glycol dodecyl ethers by the resting cells cultivated in EO(7) dodecyl ether

Substrate	Specific activity * (nmoles / min / mg dry cells)
EO(3) dodecyl ether	21.1
EO(5) dodecyl ether	17.3
EO(7) dodecyl ether	15.8

* Specific activities were determined by measuring the amount of EO(n) dodecyl ethers degraded under the standard assay conditions.

Table 4 にはEO(7) dodecyl ether 培地より得た菌体による、EO(3)、EO(5)ならびにEO(7) dodecyl ether 類に対する分解能を検討した結果を示した。表示の比活性値は基質の分解量をチオシアン酸コバルト法で測定した結果から算出したものであって、Table 3 に示したEO(1) dodecyl ether 分解活性の測定値とは直接対比し難いがEO(7) dodecyl ether を炭素源として得られた静止菌体によってEO(1)~EO(7) dodecyl ether類が等しく分解されることが認められた。これらの結果から、本菌は親水基鎖長に対する特異性の小さいエーテル結合開裂酵素を産生し、これら一連の界面活性剤を共通の酵素系によって分解する特性をもつことが推論されるが、この点に関しては、なお酵素の単離と精製酵素による検討が必要である。

一方、供試界面活性剤の疎水性基の構成成分であるラウリルアルコールは菌の増殖にはきわめて有効であるが、これを炭素源とする培地より得た菌体にはEO(1) dodecyl ether 分解活性をほとんど指摘し得なかった。さらにEO(7) dodecyl ether とともにラウリルアルコールを炭

素源として共存させることによって、EO(1) dodecyl ether 分解酵素系の生成がうまく抑制される実験結果が得られた。Table 5 に示した静止菌体によるEO(5) dodecyl ether の分解試験においても同様の傾向があきらかに認められた。

本菌はEO(n) dodecyl ether 型界面活性剤の疎水基、親水基間の結合を開裂し、遊離する疎水基成分を急速に消費して増殖する性質を有するものと考えているが、⁴⁾疎水基成分と類縁の構造をもつ n-ドデカン⁵⁾は菌の生育には利用されず、ラウリン酸は好適な炭素源となり得るが、EO(1) dodecyl ether 分解酵素系の産生には寄与し得ない。また分子内にフェニルエーテル結合を有するポリエチレングリコール/ニルフェニルエーテル類も本菌の増殖に対する炭素源としての効果が認められなかった。⁴⁾これらの事実は本分解酵素系がアルキルエーテル型非イオン界面活性剤を炭素源とする培地中で誘導的に生成される可能性を示すものであり、ラウリルアルコールの添加による酵素系の生成に対する抑制効果は、きわめて好適な炭素源であるこの物質が、菌の増殖に際して選択的に消費されることに起因するcatabolic repression⁸⁾によるものと推論される。

要 約

さきにわれわれの分離したアルコールエトキシレート型非イオン界面活性剤資化性細菌を、EO(7) dodecyl ether 培地に培養して得られた静止菌体によって、EO(1) dodecyl etherからのEG生成が認められた。EGの生成は基質のエーテル結合の開裂によるものであって、増殖試験において炭素源として用いたEO(5) dodecyl ether の消費と同様の反応形式をとることが、ガスクロマトグラフィーの結果を比較することによって推定された。

本EO(1) dodecyl ether 分解酵素系は上記の非イオン

Table 5 Effect of addition of lauryl alcohol on the induction of the degradation activity for EO(5) dodecyl ether by the resting cells

Carbon source for cultivation	Yield of the cells (mg dry cells / ml)	Specific activity * (nmoles / min / mg dry cells)
EO(7) dodecyl ether, 0.2%	0.44	11.6
Lauryl alcohol, 0.2%	1.31	0.1
EO(7) dodecyl ether, 0.1% + Lauryl alcohol, 0.1%	1.26	0.8

* Specific activities were determined by measuring the amount of EO(5) dodecyl ether degraded.

界面活性剤を炭素源とする培地中で誘導的に産生されるものであって、親水基鎖長を異にするこの種の非イオン界面活性剤に一樣に作用して、疎水基、親水基間のエーテル結合を開裂する性質をもつものと思われる。供試した界面活性剤の疎水性部分を構成するラウリルアルコールは、本菌の増殖に好適な炭素源となり得るが、EO(1) dodecyl ether 分解酵素系の産生に寄与し得ぬばかりではなく、これを界面活性剤培地に共存させることによって顕著な酵素生成阻害がおこることが認められた。

静止菌体によるEO(1) dodecyl ether 分解の最適条件は、pH 5～7、反応温度25～30℃附近にあるが、反応の進行には大量の空気を反応液中に継続的に供給する必要がある。このことから、エーテル結合の開裂には酸素分子が直接反応に関与する可能性が考えられ、上記の親水基鎖長の相違に関する基質特異性の問題とともに、精製酵素による検討が残された課題である。

文 献

- 1) Swischer, R. D. : *Surfactant Biodegradation*, Marchel Decker Inc., New York (1970) p. 496
- 2) Garrison, L. J. and Matson, R. D. : *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **41** 799 (1964)
- 3) Patterson, S. J., Scott, C. C. and Tucker, K. B. E. : *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **44** 407 (1967)
- 4) Ichikawa, Y., Kitamoto, Y. and Hosoi, N. : *J. Ferment. Technol.*, **56** 503 (1978)
- 5) West, C. D. and Rapoport, S. : *Proc. Soc. Exp. Med.*, **70** 141 (1949)
- 6) Greff, R. A., Setzkorn, E. A. and Leslie, W. D. Jr. : *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **42** 180 (1965)
- 7) Lineweaver, H. and Burk, D. : *J. Am. Chem. Soc.*, **56** 658 (1934)
- 8) Clark, P. H. and Lilly, H. D. : *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, **19** 113 (1969)