

糸状菌 *Scedosporium* sp. A-4 による短鎖炭化水素及び第二 アルコールの酸化について

小野寺正幸*

(平成9年10月31日受理)

Oxidation of Short-chain Hydrocarbons and Secondary Alcohols by *Scedosporium* sp. A-4.

Masayuki Onodera*

Scedosporium sp. A-4 used gaseous hydrocarbons as a sole source of carbon and energy, and oxidation of short-chain hydrocarbons and secondary alcohols was studied with propane grown resting mycelia of this organism. The short-chain *n*-alkanes (C_2 to C_6) were oxidized to their corresponding primary alcohols and secondary alcohols by the resting mycelia. Methane and *n*-Hexane were not oxidized. Secondary alcohols (C_3 to C_{10}) were oxidized to their corresponding methylketones by the resting mycelia, but 3-pentanol and 3-hexanol were not oxidized.

Key words: *Scedosporium* sp. A-4, short-chain hydrocarbons, secondary alcohols

1. はじめに

炭化水素とは、炭素と水素から成る化合物の総称であり、石油や天然ガスの主成分として、また、動植物に常在成分として存在している。炭化水素は、構造の最も簡単なメタンから複雑で常温では固体のものまで多種多様存在している。微生物による炭化水素の分解に関する研究は、1895年三好がブドウ果表皮のパラフィン糸状菌の一種が分解することを観察したことから始まった。¹⁾その後、石油タンパクの研究が盛んとなり、炭化水素資化性の酵母や細菌が多く単離された。その多くは長鎖炭化水素を炭素源としたものであった。^{2,3)}微生物による炭化水素利用の工業的見地からガス状炭化水素は、他の液体、固体の炭化水素と比べると、その産出量が豊富で高純度のものが手に入り易い、常温で気体であるため残余の炭化水素の除去が容易、比較的 low cost などの有利な点がある。そこで、ガ

* 物質生物システム工学科 助教授

ス状炭化水素の工業的利用の基礎研究として、その酸化機構が重要視され、多くの研究がなされた。そのような状況の中で、1970年に小笠原らにより新潟県内の土壌より天然ガスを唯一の炭素源並びにエネルギー源として数種の糸状菌が単離された。⁴⁾さらに、生育の良好であった A-4 株について、分類上の所属が検討され、光学顕微鏡及び走査電子顕微鏡により分生孢子並びにその形成器管の形態を調べたところ、本菌が *Scedosporium* 属に所属することが確立した。⁵⁾また、本菌はエタンから *n*-ペンタンまでの直鎖のアルカンを酸化すること、プロパンを炭素源とした場合はアセトン、*n*-ブタンを炭素源とした場合はメチルエチルケトンそれぞれ培養液に蓄積することが明らかとなった。⁶⁾

そこで本論文では、*Scedosporium* sp. A-4 のプロパン生育休止菌体と短鎖炭化水素及び第二アルコールの酸化について検討した。

2. 実験方法

2. 1 使用菌株及び使用培地

ガス状炭化水素酸化性糸状菌 *Scedosporium* sp. A-4 を使用した。使用培地は前報に準じた。⁶⁾

2. 2 培養方法

プロパンを唯一の炭素源並びにエネルギー源として、2.5L 容ミニジャーファメンター(東京理化学器械株式会社製 M-100 型)を用いて通気攪拌培養した。培養温度は 30°C とした。

2. 3 休止菌体による基質の酸化

対数期中期 (45 から 48hr) の菌体を集菌、脱イオン水にて洗浄したものを休止菌体とした。全容 10ml、φ 13.5mm の小試験管に湿重 0.1g の休止菌体と 0.1M リン酸緩衝液 2ml を注入し、ブチルゴム製ダブルラバーストッパーにて密栓した。基質が炭化水素の場合、反応液にアルコールを蓄積させる目的でアルコール脱水素酵素の阻害剤であるピラゾールを 10mM となるように加えた。ガス状炭化水素の場合、小試験管の気相を混合ガス (ガス状炭化水素 : 酸素 = 7 : 3) と置換し、液状炭化水素の場合、気相はそのままマイクロシリンジにて 4μl 注入した。第二アルコールの場合、気相はそのままマイクロシリンジにて 2μl 注入した。30°C、120rpm で反応させ、反応液を GC 及び GC-MS にて分析した。

3. 結果と考察

3. 1 炭化水素の酸化

Table 1 に示すように、エタンから *n*-ペンタンまでは第一及び第二アルコールに酸化された。しかし、メタン及び *n*-ヘキサン以上の長鎖のアルカンは酸化されなかった。プロピレンは、プロピレンオキサイドとアリルアルコールに酸化された。*n*-ペンタンは 1-ペンタノールと 2-ペンタノールへ酸化されたが、3-ペンタノールへの酸化は認められなかった。

これらのことから、本菌の直鎖炭化水素への酸化は末端及び末端のとなりの炭素原子を酸化でき、第三位の炭素原子は酸化しないことが明らかとなった。

Table I. Oxidation of *n*-alkanes and propylene by resting mycelia of *Scedosporium* sp. A-4.

Substrate	Product	Conversion rate*
Metane	—	—
Ethane	Ethanol	0.379
Propane	1-Propanol	0.297
	2-Propanol	0.139
<i>n</i> -Butane	1-Butanol	0.499
	2-Butanol	0.109
<i>n</i> -Pentane	1-Pentanol	0.087
	2-Pentanol	0.084
<i>n</i> -Hexane	—	—
Propylene	Propylene oxide	0.063
	Allyl alcohol	0.188

* μ mol/hr per mg of dry mycelia.

さらに、気相の酸素を窒素と置換したところ、炭化水素の酸化は認められず、本菌の炭化水素の酸化に酸素添加酵素の関与が示唆された。また、本菌のグルコース生育休止菌体には炭化水素酸化能は認められず、炭化水素酸化に関与する酵素系は誘導酵素であると考えられる。

真核細胞での短鎖炭化水素の酸化に関しては、ほとんど報告が無く興味深い分野であるため、本菌の無細胞系での炭化水素の酸化についてプロパンを基質として補酵素 (NADH 及び NADPH) 存在下反応を試みたが、現在のところ、酸化生成物質は認められず今後さらなる検討が必要となるであろう。

3. 2 第二アルコールの酸化

本菌のプロパン生育休止菌体による第二アルコールの酸化は2-プロパノールから2-デカノールまで調べた。Table IIに示すように、2-プロパノールから2-デカノールまでの第二アルコールは、それぞれ対応するメチルケトンに酸化された。3-ペンタノール及び3-ヘキサノールは酸化されなかった。メチルケトン反応基質した場合の還元反応は認められなかった。また、気相を窒素で置換したところ、炭化水素の酸化と同様に第二アルコールは

酸化されず、休止菌体による第二アルコールの酸化にも酸素の必要性が明らかとなった。

Table II. Oxidation of secondary alcohols by resting mycelia of *Scedosporium* sp. A-4.

Substrate	Conversion rate*
2-Propanol	3.60
2-Butanol	3.37
2-Pentanol	3.58
2-Hexanol	3.35
2-Heptanol	3.46
2-Octanol	2.66
2-Nonanol	0.71
2-Decanol	0.31

* $\mu\text{mol/hr}$ per mg of dry mycelia.

4. まとめ

ガス状炭化水素資化性糸状菌 *Scedosporium* sp. A-4 による短鎖炭化水素及び第二アルコールの酸化について検討した。直鎖アルカンでは、エタンから *n*-ペンタンまでを酸化し、メタン及び *n*-ヘキサン以上の長鎖のアルカンは酸化しないこと、さらにその酸化が第一位及び第二位の炭素原子に限定されることが明らかとなった。第二アルコールの酸化は、2-プロパノールから 2-デカノールまで調べたが、いずれも対応するメチルケトンに酸化された。今後は、無細胞系での炭化水素酸化を検討していきたい。

文献

- 1) M. Miyoshi, *Jaharb. Wiss. Botan.*, 28, 269 (1895).
- 2) 石油発酵研究会 編 石油発酵 幸書房 (1970).
- 3) 榊田淑郎 著 微生物タンパクの開発 講談社 (1981).
- 4) 星野純、小笠原長宏、田中啓達、昭和 48 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、1B-4 (1973).
- 5) 小笠原長宏、椿啓介、内山武夫、昭和 56 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、1E-25 (1981).
- 6) M. Onodera, Y. Endo and N. Ogasawara, *Agric. Biol. Chem.*, 53, 1431 (1989).