

[J. Ferment. Technol., Vol. 54, No. 11, p. 782~788, 1976]

Corynebacterium glutamicum 変異株による安息香酸 よりのカテコールの蓄積*

桑 原 正 章・辻 正 男

香川大学農学部食品学科

Accumulation of Catechol from Benzoic Acid by a Mutant Induced from *Corynebacterium glutamicum**

Masaaki Kuwahara and Masao Tsuji

Department of Food Science, Kagawa University, Miki-cho, Kagawa

Mutant bM 9 which was induced from *Corynebacterium glutamicum* (AKU 509) by nitrosoguanidine mutagenesis accumulated catechol in a medium containing benzoic acid. Accumulation of catechol in the medium reached maximum 10-15 hr after inoculation and accumulated catechol was degraded rapidly on successive incubation. Maximal accumulation of catechol was achieved by the addition of 0.5% benzoic acid to the medium which was adjusted to pH 7.0 or 8.0. Yeast extract was a suitable nitrogen source for the catechol production and addition of glucose into the medium stimulated the production. Feeding of benzoic acid at 2.5 hr intervals in the course of the culture proved favorable for catechol production by bM 9.

結 論

安息香酸をはじめとする芳香族有機酸の微生物分解については詳細な研究が行われている。しかし、安息香酸を微生物により変換し、有用な生産物を蓄積させようとする試みは少ない。われわれはこの点に着目し、安息香酸からのカテコールの生産について検討した。カテコールの微生物による生産については、根井ら¹⁾が酵母を用いてフェノールからの生産を試みた例を除いて報告はない。本報では、安息香酸からのグルタミン酸の生成が知られている *Corynebacterium glutamicum*²⁾ から安息香酸の代謝系が変化したと思われる変異株を得、この変異株を用いて安息香酸からのカテコールの

蓄積について検討した結果について述べる。

実 験 方 法

カテコール蓄積性変異株の誘導 本実験では *Corynebacterium glutamicum* (AKU 509) を変異株誘導の親株として用いた。ニトロソグアニジン処理による変異株の誘導は Adelberg の方法³⁾ を参照して行った。まず、Table 1 に示す 5 ml の培地 A で対数増殖期 (30°C, 10 hr) にいたるまで生育させた親株菌体をメンブランフィルターを用いてろ過集菌し、クエン酸緩衝液 (pH 6.0) で洗浄した後、菌体を 20 ml 同緩衝液に懸濁した。この懸濁液 4.0 ml にニトロソグアニジン溶液 (0.5 mg/ml) 0.2 ml を加え、10 分間保持した後、メンブランフィルターを用いてろ過集菌し、Davis⁴⁾ の最小塩溶液 4.0 ml に懸濁した。ついで懸濁液 0.5 ml を安息香酸を 0.25% 含む最小塩溶液に添加し、37°C に 1 時間保持した後、ペニシリン溶液を 100 units/ml となるよう

* 細菌による安息香酸よりのカテコールの生産 (第 1 報)
Bacterial Production of Catechol from Benzoic Acid (I)

Table 1. Culture media for *Corynebacterium glutamicum*.

Medium A (g/l)		Medium B (g/l)	
Benzoic acid	5.0	Benzoic acid	5.0
Peptone	10.0	Peptone	1.0
Yeast extract	5.0	Yeast extract	0.5
NaCl	10.0	NaCl	1.0
Medium C (g/l)		Medium D (g/l)	
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	5.0	Benzoic acid	5.0
Peptone	10.0	Yeast extract	3.4
Yeast extract	5.0	K ₂ HPO ₄	3.0
NaCl	10.0	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5

pH of each medium was adjusted to 7.0 with 10% NaOH.

に加え, さらに 37°C に 3 時間保持した. このペニシリン処理をさらに 1 回行い, メンブランフィルターを用いてろ過集菌, 洗浄した後, *p*-ヒドロキシ安息香酸 0.25% を含む最小塩溶液 5.0 ml に懸濁した. この懸濁液を寒天を 2.0% 添加した培地 B 平面上に塗布し, 37°C で 24 時間生育させた. コロニーが生じた後, 培地上からアルカリ性フロログルシン溶液 (5% NaOH に 0.5% 溶解) を噴霧し, 周辺部が緑色を呈したコロニーを直ちにバイヨン寒天斜面に移植し, これを変異株とした.

カテコール蓄積性変異株の培養 *p*-ヒドロキシ安息香酸を含む Nutrient broth (培地 C) で前培養を行った後, その一定量を安息香酸を含む培地 D に植菌し, 30°C で振とう培養を行い, 経時的に培養を停止(試験管培養), あるいは培養液の一定量を抜き取り(フラスコ培養) 成分および菌体生育度を測定した. 変異株の培養においては培地が著しく褐変した. そのため生育度の測定は, 培養液の一定量を遠心分離して得た菌体を一定量の水に懸濁し, その 600 nm における吸光度を計測することによって行った.

分析 カテコールの比色定量は Arnow らの方法⁵⁾によって行った. 安息香酸は, 培地の一定量を東洋ろ紙 No. 53 にスポットし, *n*-プロパノール-アンモニア (7:3) 系で展開し, クロマトグラムより相当する紫外吸収部分を切りとり, 50% エタノールで抽出した後, 225 nm の吸光度を測定することにより定量した. 紫外吸収の測定には日立分光光度計 139 型および 124 型を用い, 赤外吸収スペクトルの測定には日立赤外分光光度計 R-215 型を用いた.

実験結果

カテコールの単離と同定 ニトロソグアニジン処

理により得られたカテコール蓄積性と思われる変異株のうち bM 9 を用いて以下の実験を行った. 本菌株を培地 A 寒天平面上で培養すると, 親株と異なり, 4~5 日間の培養でコロニーの周辺が著しく褐変した. また, 培地 B での 8 時間培養液の上澄のクロマトグラフィーでは, カテコールと同 *R_f* 値部分に紫外吸収を示し, 2,6-ジクロロキノニミドクロリドで青紫色を呈する物質が検出され (Fig. 1), bM 9 がカテコールを培地中に蓄積するものと推定した.

ついで生産物の単離を試みた. 培地 D 100 ml を含む 500 ml フラスコ 3 個に前培養液をそれぞれ接種して 14 時間振とう培養した後培養液を合し, 遠心分離上

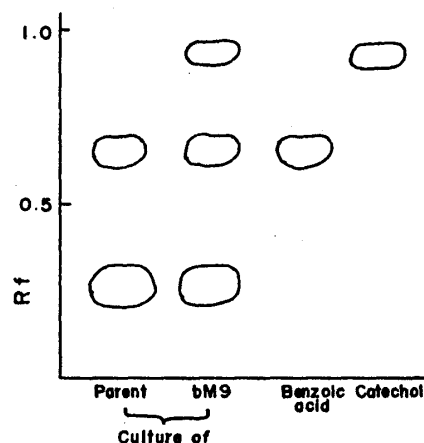


Fig. 1. Accumulation of catechol by bM 9. Parent and bM 9 were cultured on Medium B at 30°C for 8 hr. An aliquot of each cultured broth was spotted on a filter paper and developed with *n*-propanol-ammonia (7:3) as solvent. Substrate and product were located with a uv lamp. The spot of catechol turned blue by spraying 2,6-dichloroquinone-chloroimide and ammonia successively.

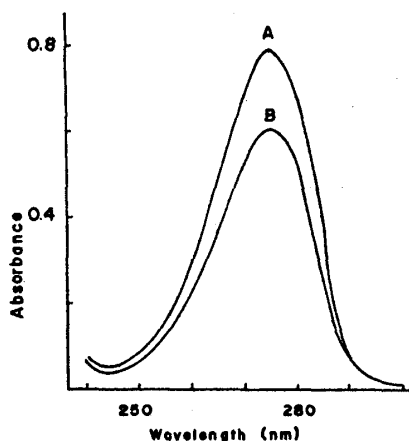


Fig. 2. uv spectra of catechol and crystal isolated from culture of bM 9.

A, Authentic catechol, B, Isolate.

Mutant bM 9 was cultured on 100 ml of Medium D in 500 ml flasks with shaking at 30°C. Fourteen hr after inoculation, 3 cultures were combined and cells were removed by centrifugation. Lead acetate (6g) was added to the supernatant solution and the white precipitate was collected by filtration and suspended in 100 ml of water. Then 4 ml of acetic acid was added to the suspension to recover catechol and the supernatant solution was obtained by centrifugation. Further 2.5 ml of acetic acid was added to the undissolved precipitate to dissolve unrecovered catechol and the supernatant solution was obtained in the same manner. These supernatant solutions were combined and 3N H₂SO₄ was added to remove lead. Catechol in the solution was extracted with 100 ml of ethyl ether and the ether layer was evaporated to dryness. The residue of catechol was dissolved in hot *n*-hexane and recrystallized from the same solvent. The yield of catechol was 402 mg.

The uv spectra of the aqueous solutions of the crystals (60 mg/ml) and authentic catechol (80 mg/ml) were measured.

澄を得た (カテコール量 558 mg). この上澄に酢酸鉛粉末 6g を徐々に添加し, 生じた白色沈でんを水 100ml に懸濁した後, 酢酸 4 ml を加えて溶解し, 遠心分離上澄を得た. 遠心分離沈でん物には再び酢酸 2.5 ml を加え, その遠心分離上澄を前記上澄に合した. この液に 3N H₂SO₄ を新たな硫酸鉛の沈でんが生じなくなるまで加えた後, 遠心分離して上澄を得た. この上澄中のカテコールをエーテル 200 ml で抽出し, ロータリーエバポレーターで濃縮乾固した. 生じた残渣を熱 *n*-ヘキサンに溶解し, 再結晶を行い, 結晶 402 mg を得た.

この結晶の水溶液の紫外吸収スペクトルを Fig. 2 に, また KBr 錠剤法による赤外吸収スペクトルを Fig. 3 に示した. いずれも標準のカテコールと一致した. 以上のように, 生成物がカテコールであることを確認した.

カテコール蓄積の経時的変化 培地 D を 6 ml 含む各試験管に前培養液の一定量を接種して 30°C で振とう培養を行った. 経時的に培養を停止し, カテコールの蓄積, 安息香酸の減少, 菌体の生育を分析した結果を Fig. 4 に示した. 親株では安息香酸の分解と, 良好な菌の生育がみられたが, カテコールの蓄積は全く認められなかった. 一方, bM 9 では 10 時間目で 1.6 mg/ml のカテコールが蓄積し, 以後カテコールは減少した. このことは bM 9 がカテコール以後の代謝系を完全に欠損した変異株ではなく, 一種の leaky mutant であることを示している. また, この実験から, bM 9 の安息香酸の分解は特にカテコール蓄積時に高いことが示された.

カテコール蓄積に及ぼす諸条件の影響 培地 D における安息香酸の濃度を種々変化させ, カテコール蓄積におよぼす影響を検討した結果を Fig. 5 に示した. bM 9 はカテコール分解能を完全には欠損していない

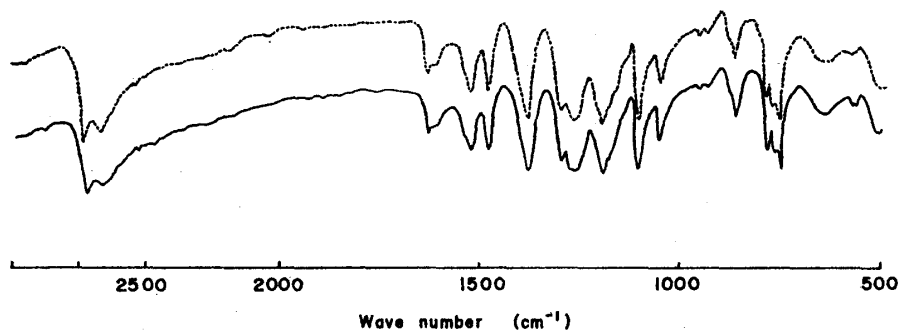


Fig. 3. IR spectra of catechol and isolate.
..... authentic catechol, — isolate

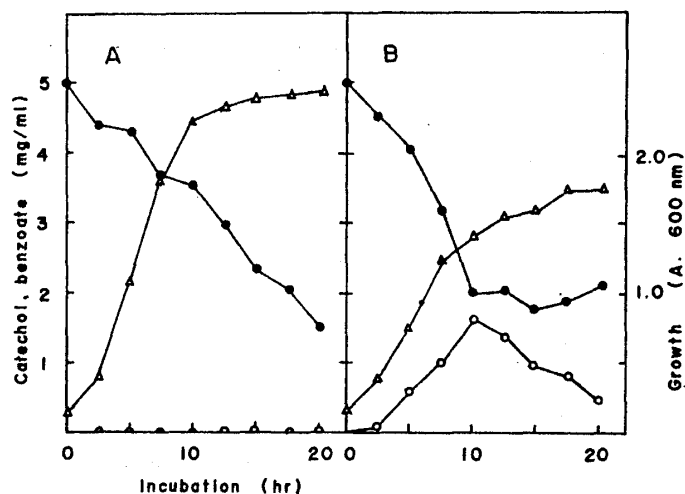


Fig. 4. Growth and catechol accumulation of parent strain and bM 9.
A: Parent, B: bM 9

Parent strain and mutant bM 9 were subcultured on 6 ml of medium C for 8 hr at 30°C. Aliquots (0.15 ml) of this culture were inoculated to 6 ml of medium D in test tubes. The cultures, which were shaken at 30°C, were stopped at 5 hr interval. Cells in the culture (6 ml) were precipitated by centrifugation and suspended in water followed by measuring the absorbance of suspension at 600 nm. Catechol in the supernatant solution was determined photometrically and benzoic acid was analyzed after chromatographic separation (see the text).

—○— catechol, —●— benzoic acid, —△— growth

ため, 0.1%添加ではカテコールの蓄積はわずかであった. 一方高濃度添加 (1.0%) では蓄積の遅れが認められた. 培地 D を基本培地として用いた場合, 安息香酸 0.5% が最適条件であり, 10 時間目において 1.5 mg/

ml の蓄積がみられ, 安息香酸のカテコールへの変換率は 30% であった.

初発 pH の影響については Fig. 6 に示した. 初発 pH が低い場合, カテコールの蓄積はまったく認めら

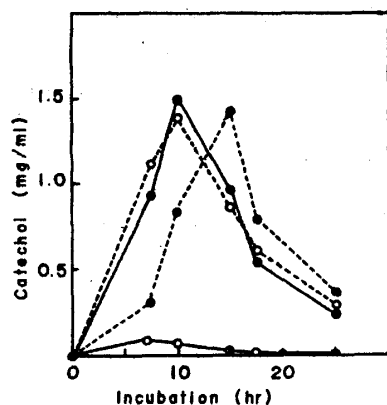


Fig. 5. Effect of benzoic acid concentration on accumulation of catechol.

Mutant bM 9 was subcultured on 6 ml of medium C for 8 hr at 30°C. Aliquots (0.1 ml) of this culture were inoculated into 6 ml of medium D containing indicated concentration of benzoic acid in test tubes. The cultivation was carried out at 30°C with shaking.

—○— 0.1%, —□— 0.3%, —●— 0.5%,
—■— 1.0%

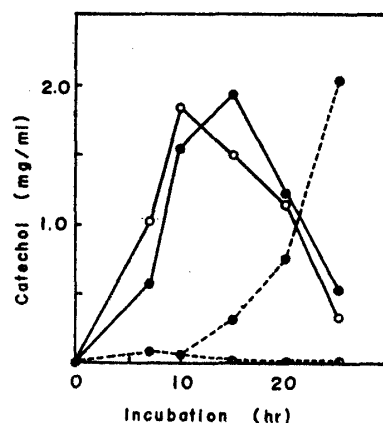


Fig. 6. Effect of initial pH on accumulation of catechol.

Mutant bM 9 was subcultured on 6 ml of medium C for 7 hr at 30°C. Aliquots (0.1 ml) of this culture were inoculated into 6 ml of medium D which were adjusted to indicated pH in test tubes. The cultivation was carried out at 30°C with shaking.

—○— pH 5.0, —●— pH 6.0, —■— pH 7.0,
—□— pH 8.0

Table 2. Effect of volume of culture medium on catechol accumulation.

Volume (ml)	Incubation					
	for 10 hr			for 15 hr		
	Catechol (g/l)	Cells (B) (g/l)	A/B	Catechol (g/l)	Cells (B) (g/l)	A/B
50	1.40	1.50	0.93	2.20	2.63	0.83
100	1.08	1.00	1.08	1.99	1.78	1.12
150	0.86	1.15	0.74	1.97	1.58	1.24
200	0.53	1.03	0.51	1.46	1.30	1.12
250	0.38	0.87	0.45	1.26	1.20	1.05

Mutant bm 9 was cultured on indicated volume of medium D in a 500 ml flask at 30°C with rotary shaking.

れないか (pH 5.0) あるいは蓄積速度が著しく低下した (pH 6.0). 初発 pH としては 7 あるいは 8 が適当と思われる。しかし、培養が進むにつれ、培地の pH は 8.5~9.0 に上昇し、培養液は著しく褐変した。これはアルカリ条件下でカテコールが一部化学変化を受けたためと思われる。初発 pH と同様、培養中の pH 調節についても考慮する必要があることを示唆している。

Table 2 は 500 ml フラスコ内の培養液量を変化させ、通気量の変化による培養液、あるいは生育菌体あたりのカテコール生成量を検討した結果を示す。通気の最も多いと思われる 50 ml の培養では、液量 1 ml あたりのカテコール生成量は最大であったが、菌体 1 mg あたりのカテコール生成量は 150 ml 培養において最高値を示した。また、この実験はカテコール蓄積時に (15 時間付近) における通気量は菌体生育が旺盛な時期

(10 時間まで) におけるよりも少ない方がカテコール蓄積に好適であることを示している。

窒素源および補助炭素源の影響 カテコールの蓄積は Table 2 にも示したように菌体の生育度によっても影響を受けることが予想される。そのため、窒素源さらに菌体の生育を促す目的で加える補助炭素源の影響を検討した。窒素源として NH_4Cl 、酵母エキス、グリシンを用い、培地の窒素含量は NH_4Cl を用いる場合に一致させた。また、補助炭素源としてグルコースおよびグリセロールを用いた。Table 3 には各条件でのカテコールの最高蓄積量を記した。菌体の生育はグルコースと酵母エキス添加の場合に特に良好で、カテコールの蓄積も 2.6 g/l と最高値を示し、変換率 50% であった。窒素源としての NH_4Cl あるいはグリシン、補助炭素源としてのグリセロールの添加効果は顕著で

Table 3. Effects of carbon and nitrogen sources on catechol accumulation by mutant bm 9.

C-Source	Conc. (%)	N-Source	Conc. (%)	Maximal production of catechol	
				Time (hr)	Amount (g/l)
Glucose	0.2	NH_4Cl	0.2	24	0.98
		Yeast ext.	0.34	16	2.45
		Glycine	0.28	16	0.37
Glycerol	0.2	NH_4Cl	0.2	24	0.83
		Yeast ext.	0.34	16	1.80
		Glycine	0.28	—	trace
None		Yeast ext.	0.34	10	1.70

Carbon and nitrogen sources were added to the basal medium containing benzoic acid 5 g/l, K_2HPO_4 3 g/l and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l and pH was adjusted to 7.0.

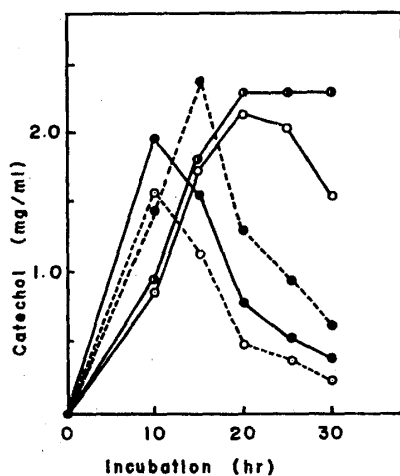


Fig. 7. Effect of glucose concentration on accumulation of catechol.

Mutant bM 9 was subcultured on 6 ml of medium C for 8 hr at 30°C. Aliquots (0.1 ml) of this culture were inoculated into 6 ml of medium D containing indicated concentration of glucose in test tubes. The cultivation was carried out at 30°C with shaking.

—○— 0%, —●— 0.1%, —●— 0.2%,
—○— 0.5%, —●— 1.0%

はなかった。

次に、補助炭素源として加えるグルコースの最適条件を検討した。結果を Fig. 7 に示す。グルコース 0.5% までは菌体の生育は増加したが、カテコールの蓄積は 0.2% が最適であった。このように、カテコールの蓄積には菌体の生育だけでなく、培地の pH や、通気量などの他の要因も影響を与えるものと思われる。

安息香酸の逐時添加条件下におけるカテコールの蓄積 これまでに述べてきたように、カテコール蓄積は通常 10~15 時間で最高となり、以後急激に減少する。したがって、カテコールの減少が起こる直前に新たに基質安息香酸を添加すれば、さらにカテコールの蓄積量が増加すると考えられる。本実験では、500 ml フラスコに培地 D を 100 ml 入れ、前培養液 6 ml を接種し、培養 10 時間目より 2.5 時間毎に培養液 20 ml を抜きとり、これと同量の pH 5.0 に調節した安息香酸 0.3% 含有の培地 D を添加するという培養を行った。結果を Fig. 8 に示した。カテコールへの変換は培養 12.5~22.5 時間で極めて効率よく行われ、逐次添加した安息香酸のほとんど全部がカテコールへ変換された。22.5 時間以降はカテコールの変換能は低下したが、これは培地 pH の上昇による菌体のカテコール生産能の低下によるものと思われる。なお、25 時間目までのカテコールの生産量 (Fig. 8 中の Total catechol で示す) は

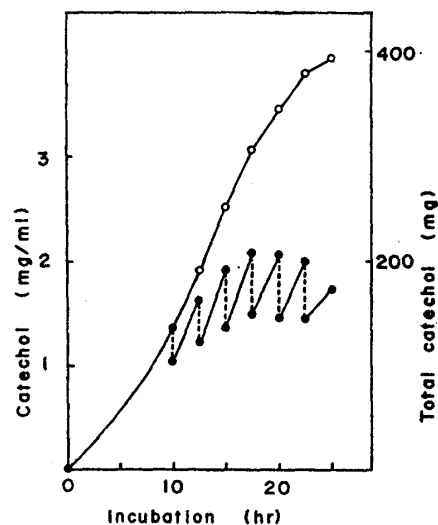


Fig. 8. Accumulation of catechol by bM 9 with interval feeding of benzoic acid.

bM 9 was cultured on 100 ml of medium D. After 10 hr incubation, 20 ml aliquots of the cultured broth were taken from the culture at intervals of 2.5 hr and 20 ml portions of medium D containing 0.3% benzoic acid and adjusted to pH 5.0 were fed to the culture.

—●— catechol in the culture (mg/ml)
—○— total catechol production (mg)

394 mg であり、添加安息香酸総量 860 mg に対し 46% という高い収量を与えた。

窒素源、補助炭素源の検討あるいは培地 pH の適切な調節が行われることにより安息香酸逐次添加によるカテコールの蓄積はさらに増加すると思われる。

考 察

安息香酸は一般的にはカテコール、シス・シス・ムコン酸、 β -ケトアジピン酸などを経る、いわゆる β -ケトアジピン酸経路により代謝される。この経路は *Pseudomonas putida*,⁶⁾ *Micrococcus urea*,⁷⁾ あるいは *Alcaligenes cutrophus*⁸⁾ などにおいて詳細に検討されている。本実験で用いた *Corynebacterium glutamicum* も β -ケトアジピン酸経路を有することが推測される。⁸⁾

安息香酸からカテコールを蓄積させる場合、カテコールの分解に関与する catechol oxygenase (EC 1.13.1.1) あるいは代謝経路上この酵素より下位にある酵素を欠損した変異株を用いる方法が考えられる。本実験では、ニトロソグアニジン処理とペニシリン濃縮法により、カテコール蓄積性変異株を得ることができた。ペニシリン濃縮後、平面培地上でフルオログルシンに対して強い陽性を示すコロニーは、コロニー 2,000 個

に対し1個程度であり、出現の頻度は高いとはいえないが、カテコール分解能の変異した菌株以外の変異株も誘導された可能性がある。このようにして得たフルオログルシン陽性菌は、いずれも液体培地中に安息香酸からカテコールを蓄積したが、本実験で主として用いた bM 9 をはじめとして、いずれの菌株においても培養時間の延長にしたがい、蓄積されたカテコールが減少することが認められた。このことは、得られた変異株がカテコール分解能をまったく欠損したものではなく、一種の leaky mutant であると考えた方が妥当と思われる。

本実験ではカテコール蓄積能のすぐれた菌株として bM 9 を用いた。この菌株を用いた場合、一旦蓄積したカテコールが分解を受けること、培養の経過にともない培地の pH が上昇してカテコール蓄積が停止することが問題となった。カテコール蓄積量を増大させるため、カテコール蓄積が極大に達する以前に基質安息香酸を逐次添加し、菌体の増殖と基質濃度の保持をはかり、また、添加する安息香酸培地の pH を低く (pH 5.0) することにより培養液全体の pH を調節することが有効と考えられた。実験このような処理によりカテコールへの変換率および蓄積量を増大させることができた。

カテコール蓄積量を増加させるためには、根井ら¹⁾が試みた α, α' -ジピリジル等の catechol oxygenase 阻害剤の利用が考えられる。bM 9 培養中において 2 mM までの範囲において添加量、添加時期等の検討を行ったが、顕著な効果がみられなかった。しかし、このような阻害剤の使用についてさらに検討が必要と考えられる。

bM 9 による安息香酸のカテコールへの変換には菌体の生育をとまなう。菌体の増殖を増加させるため、安息香酸にさらに補助的に炭素源を加える方法を検討し、グルコースの効果を認めた。一般に、分解酵素の誘導はグルコースの添加により抑制されるとされているが、bM 9 では抑制は認められず、むしろカテコールの蓄積量が増加した。このことは、bM 9 が親株とは異なった遺伝生化学的性質を有していることを示していると考えられる。グルコースの影響については次報において検討を加える。

bM 9 は leaky mutant と考えられるが、カテコール蓄積量をさらに増加させるためには catechol oxygenase 活性のさらに低下した変異株の誘導が必要で

あろう。また、本実験で用いた手法により、カテコールの次の中間体であるシス・シスームコン酸などのような、さらに化学的反応性に富む物質を蓄積させることが可能であろう。また、 β -ケトアジピン酸経路を有する微生物全般にわたって、このような手法を用いることが可能と考えられる。

要 約

1. *Corynebacterium glutamicum* AKU 509 から、ニトロログアニジン処理により、カテコール蓄積性変異株 bM 9 を得た。本菌の安息香酸添加培養液から、生産物であるカテコールを結晶状に単離した。
2. bM 9 によるカテコールの蓄積は、通常 10~15 時間で最大に達し、以後急激に減少した。このことから bM 9 は一種の leaky mutant であると考えられる。
3. カテコール蓄積に対する種々の条件を検討した。初発安息香酸濃度 0.5%, pH 7 あるいは 8, 培養液量 100~150 ml で蓄積は良好であった。また、窒素源として酵母エキス、補助炭素源としてはグルコースの添加が有効であった。カテコール蓄積の最高は 2.6 g/l で変換率は 52% であった。
4. 安息香酸の逐次添加を試みた。この方法では、カテコール蓄積の最盛時において追加安息香酸の 100% 近くがカテコールに変換された。培養液全体では 46% がカテコールに変換された。

文 献

- 1) 根井, 田中, 高田: 醸工, **52**, 28 (1974).
- 2) Yamamoto, M., Nishida, H., Inui, T., Ozaki, A.: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 876 (1972).
- 3) Adelberg, E. A., Mandel, M., Chen, G. C. C.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **18**, 788 (1965).
- 4) Davis, B. D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 4267 (1948).
- 5) Arnow, L. E.: *J. Biol. Chem.*, **118**, 531 (1937).
- 6) Hegenan, G. D.: *J. Bacteriol.*, **91**, 1140 (1966).
- 7) Ichikawa, A., Adachi, K., Hosokawa, K., Takeda, Y.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 2296 (1962).
- 8) Johnson, B. F., Stanier, R. Y.: *J. Bacteriol.*, **107**, 468 (1971).
- 9) Yamamoto, M., Nishida, H., Inui, T., Ozaki, A.: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 884 (1972).

(昭51. 6.17受付)