

PSII-19 *Rhodotorula*属酵母におけるphenolの分解経路

山梨大学工学部 正会員 平山けい子

1. はじめに

Phenolは有害物質の一つであり、phenol含有廃水の処理法のうち生物化学的処理法としては活性汚泥法が多く用いられている。微生物によるphenolの分解に関しては、*Acinetobacter*, *Pseudomonas*および*Geotrichum*属の細菌において、また*Candida*, *Rhodotorula*(以下Rh.) および*Tricosporon*属の酵母において報告されている。しかしながらphenolの分解経路に関しては主に細菌において研究されており、酵母については*Tricosporon*属においてのみ報告されている。今回、Rh.属酵母におけるphenolの分解経路について検討を行い、二、三の知見が得られたので以下報告する。

2. 実験方法

本実験においてはRh. *rubra* IFO 0892および1101株を使用した。これら菌株は京都大学農学部発酵生理学研究室より御分与戴いたものである。保存菌株は、酵母エキス4g、麦芽エキス10g、glucose 4gを含む水道水 1ℓ かなる寒天スラントを用いて30℃で培養した。培地のpHは6.0に調整した。供試菌株は、200mlの三角フラスコに200mg/ℓ phenolを含む50mlの培地を入れ、フラスコ1本あたり1白金耳植菌し、30℃のロータリーシェーカーで48時間培養を行った。集菌洗浄した菌体を200ml三角フラスコ中の200mg/ℓ phenolを含む蒸留水50mlに懸濁し30℃のロータリーシェーカーで40時間培養した。遠心分離後の上清を0.45μmメンブランフィルタにてろ過しphenol中間代謝物の分析に用いた。また、培養前後の吸収スペクトルを測定した。

Phenol中間代謝物は、三次元HPLCおよびGC-MSにより分析した。HPLC用の試料は、培養後のろ液をそのまま用いた。GC-MS用の試料は、N,O-ビストリメチルシリルアセトアミドによりTMS誘導体化して用いた¹⁾。HPLCによる分析条件は次の通りである。カラム, HITACHI #3056 gel φ4mm x 150 mm; 流速, 1 ml/min; 溶離液, methanol/water=50/50; 検出器, HITACHI L-3000 Photo Diode Array Detector and DAD manager。GC-MS分析はMS部に日本電子製JMS-AX505Wを使用した。GCの分析条件は次のとおりである。カラム, DB-5 (5%フェニルメチルシリコン)、φ0.25mm x 12.5m, 膜厚0.25μm (J&B社製); カラム温度, 50℃ 1 min, 50-140℃ (25℃/min), 140-250℃ (5℃/min)の2段昇温; 注入口温度, 200℃。MSの分析はEI法でイオン化電圧70V, スキャンレンジ50-500M/Z, スキャン速度1秒の条件で行った。Phenol hydroxylase活性は、Neujahrらの方法により測定した²⁾。

3. 結果および考察

Fig. 1にRh. *rubra* IFO 0892および1101株の培養前後の吸収スペクトルを示した。培養後に、波長235nm付近の吸収が増加しており、phenolがcatecholを経てcatechol 1,2-dioxygenaseによりオルト開裂し、cis,cis-muconic acidおよびmuconolactoneが生成している可能性が示唆された。

Table 1に、phenol酸化に伴うNADPHの減少により測定したRh. *rubra* IFO 0892および1101株のphenol hydroxylase 活性を示した。測定値は菌体による内生のNADPHの減少を差し引いて補正した。Phenol hydroxylase 活性が確認されたことにより、phenolがcatecholを経て分解されるものと考えられた。Phenolを培地に添加せずに培養した菌体によるNADPHの減少はRh. *rubra* IFO 0892株で0.038/hr、1101株で0.027/hrとphenolを添加して培養した菌体より、若干少なかった。

Fig. 2にRh. *rubra* IFO 0892 および1101株におけるphenol中間代謝物のHPLCクロマトグラムと、波長 220-360nmにおける等高線プロットを示した。HPLCクロマトグラムの各ピークおよび等高線プロットはphenol, catechol およびcis,cis-muconic acid の標準物質のピークおよび等高線プロットと

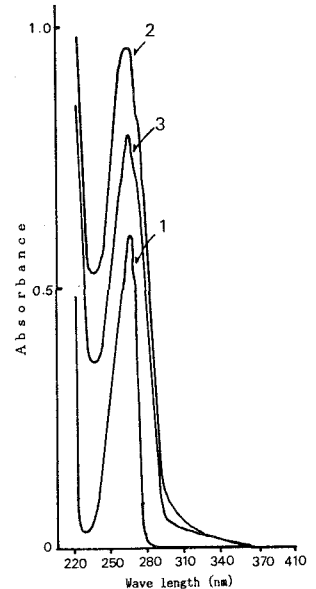


Fig.1 Absorption Spectra of Culture Broth (Incubation time:1, 0hr; 2, Rh. *rubra* IFO 0892 40hr; 3, Rh. *rubra* IFO 1101 40hr)

Table 1 Disappearance of NADPH, Specific Cosubstrate of Phenol Hydroxylase in the Phenol-Grown Cells of *Rhodotorula rubra*

Strain	Decrease in absorbance at 340 nm / h
<i>Rhodotoeula rubra</i>	
IFO 0892	0.051
1101	0.036

一致していた。また、標準物質とのco-HPLCクロマトグラムにおけるピークも一致していた。この時の各成分の濃度は、*Rh. rubra* IFO 0892株でphenol 140.0, catechol 40.3, cis,cis-muconic acid, 13.4mg/ℓ, IFO 1101株でphenol 155.4, catechol 35.9, cis,cis-muconic acid 7.1mg/ℓであった。一方、RT

0.6min付近にmuconolactoneと考えられるピークが観察されたが今回の実験では、分離には至らなかった。

Fig. 3に、*Rh. rubra* IFO 0892および1101株におけるTMS誘導体化したphenol中間代謝物のGC-MSトータルイオンクロマトグラムを示した。各ピークは、それぞれcatechol, cis,cis-muconic acid, muconolactoneの標準物質のTMS誘導体のRTおよびマススペクトルに一致しており、中間代謝物として、catechol, cis,cis-muconic acid, muconolactoneが同定された。

以上の結果から、*Rh. rubra* IFO 0892および1101株におけるphenol分解経路は、phenolが酸化されcatecholとなり、次いでベンゼン環がオルト開裂して、cis,cis-muconic acidを生じさらにmuconolactoneとなり、β-keto-adipate pathwayを経て分解されるものと推定された。

参考文献

- 1) 飛田ら, 山梨衛公研年報, 第32号, (1988) 42-47
- 2) Neujahrら, *Eur. J. Biochem.*, 13, (1970) 37-44

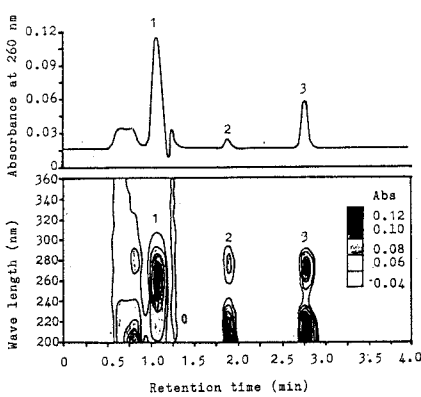


Fig.2-1 Contour plot and a typical HPLC chromatogram at a wave length of 260 nm of phenol metabolites in *Rhodotorula rubra* IFO 0892.

1: cis-cis muconic acid 2: catechol 3: phenol

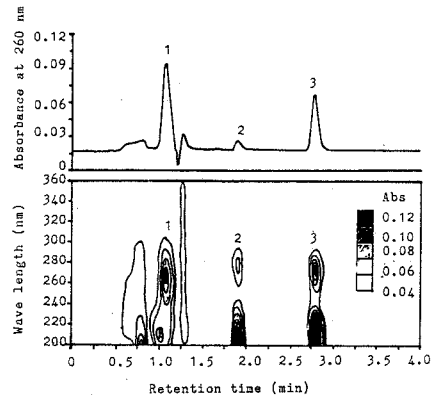


Fig.2-2 Contour plot and a typical HPLC chromatogram at a wave length of 260 nm of phenol metabolites in *Rhodotorula rubra* IFO 1101.

1: cis,cis-muconic acid 2: catechol 3: phenol

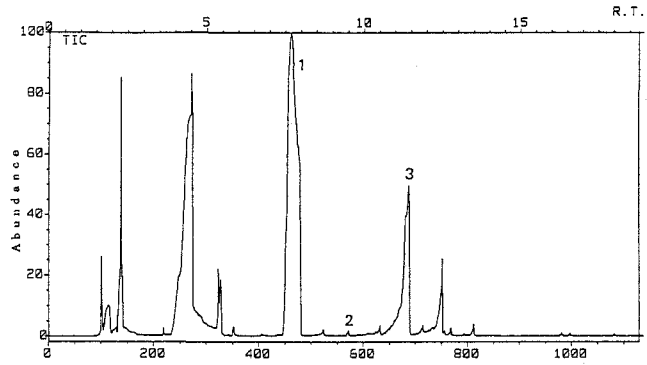


Fig. 3-1 Total Ion Chromatogram of Phenol Metabolites by the Phenol-Grown Cells of *Rh. rubra* IFO 0892 (1, catechol ; 2, muconolactone ; 3, cis,cis-muconic acid)

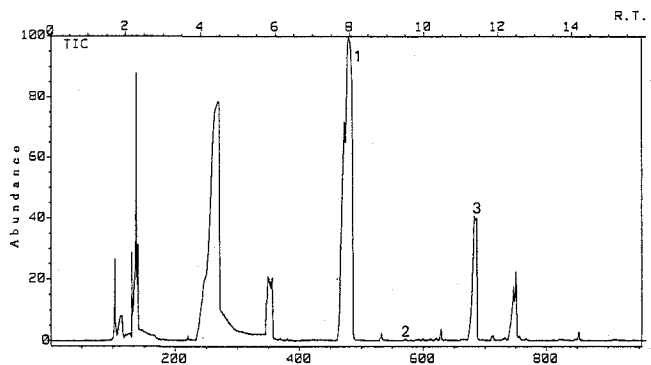


Fig. 3-2 Total Ion Chromatogram of Phenol Metabolites by the Phenol-Grown Cells of *Rh. rubra* IFO 1101 (1, catechol ; 2, muconolactone ; 3, cis,cis-muconic acid)