

II-PS19

Rhodotorula 属酵母における
フェノール中間代謝物

山梨大学工学部 正会員 平山けい子
山梨県衛生公害研究所 飛田 修作
山梨大学工学部 正会員 平山 公明

1. はじめに

前報¹⁾において、演者らは、*Rhodotorula* (Rh.)属酵母がphenol分解能力を有すること、*Rh. rubra* IFO 0892および1101株によるphenolの分解がcatechol経由であり、catecholのオルト開裂によりcis,cis-muconic acidが生成されることを明らかにした。今回、phenol中間代謝物としてmuconolactone、 β -keto-adipate enol-lactone、およびmuconolactoneから β -keto adipic acidの生成をGC/MS、HPLCにより分離、同定し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(以下、0892株、1101株)を使用した。200mg/l phenolを含む培地¹⁾で、48時間培養を行ったのち、集菌洗浄した菌体(0.1g)を200ml三角フラスコ中の200mg/l phenol溶液50mlに懸濁し30℃、130rpm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0.45 μ m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、菌体(0.1g)を50mg/l phenol溶液にて同様に培養し、DOC、phenol中間代謝物濃度を経時的に測定した。一方、超音波破碎器を用いて調製した cell-free extract を用いて muconolactone から β -keto adipic acid の生成を確認する実験を行った。Phenol中間代謝物は、HPLCおよびGC/MSにより分析した。HPLC分析には培養後のろ液を無処理、ないし2,4-dinitrophenylhydrazine(2,4-DNPH)により誘導体化²⁾した試料を用いた。GC/MS分析においては、N,O-bis(trimethylsilyl)-acetamideによりTMS誘導体化¹⁾して測定を行った。

3. 結果及び考察

Fig.1aおよび1bにphenol分解に伴うDOCおよびphenol中間代謝物の経時的变化を示した。4日間の培養期間中 phenolは、0892株において44.5mg/l (0.47mM)から0.32mg/l(0.03mM)に減少した。また、DOCは、52.1mg/lから36.2mg/lに減少した。DOCの減少はC源としてのphenolの利用に由来するものと推察された。1101株においても同様の傾向が観察された。一方、培地中にphenolを添加せずに培養した菌体を用いて同様の実験を行ったところ、両菌株とも、DOC、phenolの減少量、phenol中間代謝物濃度全般において低かったことから、phenol代謝にかかわる酵素に誘導型の酵素が存在する可能性が考えられた。

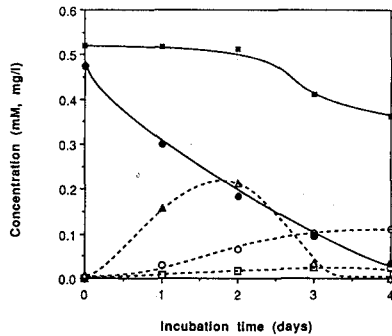


Fig. 1a Time course of degradation of phenol by the phenol-grown cells of *Rhodotorula rubra* IFO 0892.

□ Muconolactone (mM), ○ cis,cis-Muconic acid (mM), △ Catechol (mM)
● Phenol (mM), ■ DOC (x100 mg/l)

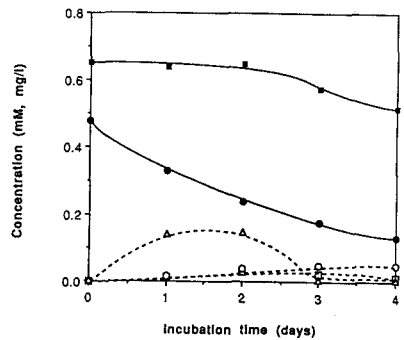


Fig. 1b Time course of degradation of phenol by the phenol-grown cells of *Rhodotorula rubra* IFO 1101.

□ Muconolactone (mM), ○ cis,cis-Muconic acid (mM), △ Catechol (mM)
● Phenol (mM), ■ DOC (x100 mg/l)

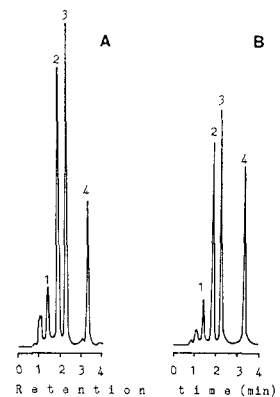


Fig. 2 Typical HPLC chromatograms at a wave length of 230nm of phenol metabolites in *Rh. rubra* IFO 0892 (A) and 1101 (B). 1. muconolactone 2. cis,cis-muconic acid 3. catechol 4. phenol

Fig. 2に 0892および1101株におけるphenol中間代謝物のHPLCクロマトグラムを示した。各ピークのRTは、catechol, cis, cis-, muconic acid, muconolactoneの各標準物質のRTと一致していた。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。Fig. 3に 0892および1101株のcell-free extractによりmuconolactoneから生成された β -keto adipic acidを、2,4-DNPHにて誘導体化し測定したHPLCクロマトグラムを示した。Fig. 3中のピーク2のRTは、 β -keto adipic acid 標準品の2,4-dinitrophenylhydrazonesのRTと一致しており、co-HPLCにおいても同一のピークを示した。

Fig. 4に0892株と1101株におけるTMS誘導体化したphenol代謝物のトータルイオンクロマトグラム(TIC)を示した。Fig. 4中のピーク2は、muconolactone標準品のTMS誘導体のRTおよびマススペクトル(MS)に一致していた。 β -keto adipate enol-lactoneは、調製・保存共に困難なため³⁾ 標準品と比較することはできなかったが、Fig. 4のピーク4のMS中のM⁺イオン (m/z 286)とM - CH₃ (m/z

271)は、 β -ketoadipate enol-lactone (enol form)のTMS誘導体の存在を示唆するものと考えられる。Fig. 5は両菌株のcell-free extractによるmuconolactone代謝物のTICを示したものである。Fig. 5中のピーク2は β -ketoadipic acid標準品のTMS誘導体(enol form)のRT, MS共に一致していた。尚cell-free extract中には内生の β -ketoadipic acidは検出されなかった。また、whole cellによるphenol培養ろ液中には、 β -ketoadipic acidは検出されなかった。従って、両菌株においては、 β -ketoadipate enol-lactoneが細胞外において生成された後に細胞内に取り込まれ続いて脱ラクトン化酵素により β -ketoadipic acidが生成されるものと推察された。

今回の実験において、*Rh. rubra* IFO 0892及び1101株におけるphenol中間代謝物としてmuconolactone, β -keto adipate enol-lactone, β -keto adipic acidが同定された。両菌株におけるphenol分解経路を推定し、Fig. 6に示した。

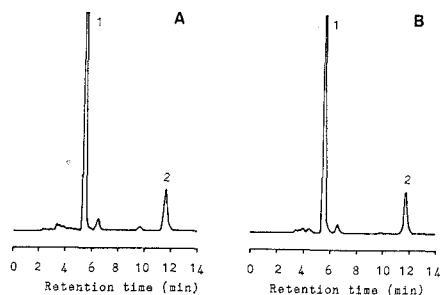


Fig. 3 Typical HPLC chromatograms at a wave length of 350nm of 2,4-dinitrophenylhydrazone of β -ketoadipic acid in muconolactone metabolites by *Rh. rubra* IFO 0892 (A) and 1101 (B).

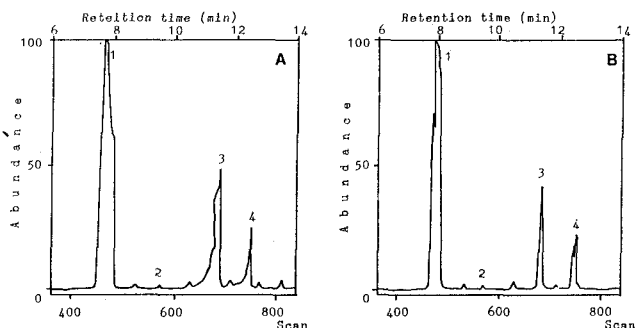
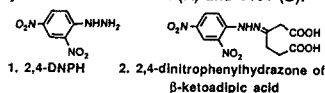


Fig. 4 Part of total ion chromatograms of TMS derivatized ethyl acetate extracts of phenol metabolites by *Rh. rubra* IFO 0892 (A) and 1101 (B). 1. catechol 2. muconolactone 3. cis,cis-muconic acid 4. β -ketoadipate enol-lactone (enol form)

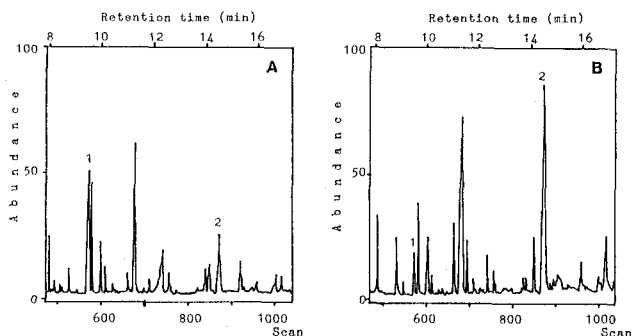


Fig.5 Part of total ion chromatograms of TMS derivatized ethyl acetate extracts of muconolactone metabolites by *Rh. rubra* IFO 0892 (A) and 1101 (B).
1. muconolactone 2. β -ketoadipic acid (enol form)

参考文献

- 1) J. Gen. Appl. Microbiol., 37, (2), 1991 in press
- 2) 有機化合物の確認法 I, pp.244, 1967 
- 3) Methods in Enzymology, 17A, 546. 1970 Phenol

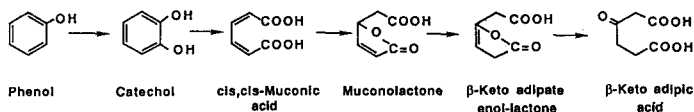


Fig.6 Proposed metabolic pathway for the phenol degradation by *Rh. rubra*.