

II-177

代謝経路の増幅によるフェノール分解菌の活性強化に関する研究

大阪大学工学部

（学生員） 岡田 博
（正員） 池 道彦

（正員） 藤田 正憲
様原 直規

1. はじめに

演者らは、廃水処理においてより効率的に難分解性物質を除去するため、高い分解活性を持つ菌株の育種を行っている。この際、微生物による難分解性物質の分解速度は、その代謝経路上の律速反応に依存して決まるため、分解速度の向上を図る上では、一連の分解酵素によって触媒される反応の中から、最も反応の遅い経路を

同定し、その分解酵素活性を増強することが必要である。本研究では、図-1に示すような概念に基づき、フ

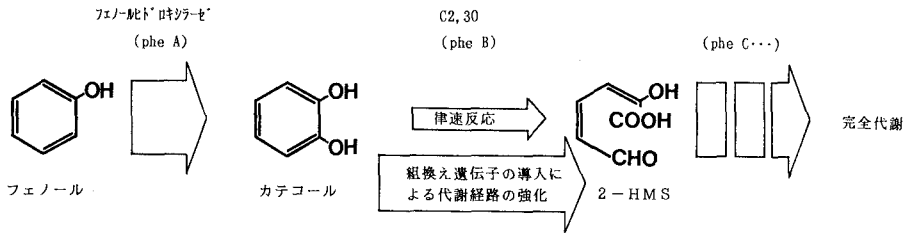


図-1 中間代謝経路の強化によるフェノール分解活性増強の概念

フェノール分解菌による一連の代謝経路の中で律速となっていると考えられる反応（カテコールから2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドへの変換；カテコール2,3オキシゲナーゼ（C2,3O）により触媒される）を組換えプラスミドを導入することによって増幅し、分解活性の強化を試みた。

1. 実験材料並びに方法

○ 菌株： 遺伝子増幅の対象菌株としてフェノール分解菌 *Pseudomonas putida* BH株を用いた。遺伝子組換え株は、BH株の染色体よりクローニングされたC2,3O遺伝子（pheB）を広宿主域ベクターpKT230に挿入して構築した組換えプラスミドpBH500をBH株に導入して作成した（BH（pBH500）株）。

○ 培地： 菌体の増殖にはL培地（Peptone 10g, Yeast extract 5g, NaCl 5g /L: pH=7.2）及びプラスミド脱落防止のための選択圧としてストレプトマイシンを100mg/Lになるように添加したLS培地を使用した。フェノール分解試験には、無機塩培地（ K_2PO_4 1g, $(NH_4)_2SO_4$ 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, $FeCl_3$ 0.02g, NaCl 0.1g, $CaCl_2$ 0.1g /L: pH=7.2）にフェノールを100, 200, 300, 400mg/Lになるように添加したフェノール培地を用いた。

○ フェノール分解試験： L及びLS培地でそれぞれ前培養したBH株及びBH（pBH500）株の培養液を、500mL容の三角フラスコに分注した200mLのフェノール培地にそれぞれ0.5mLずつ植菌し、30℃、160rpmで回転振盪培養した。サンプリングは経時的に行い、菌体濃度（OD₆₀₀）及びフェノール濃度、TOC濃度を測定した。

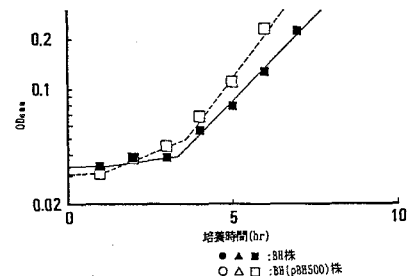
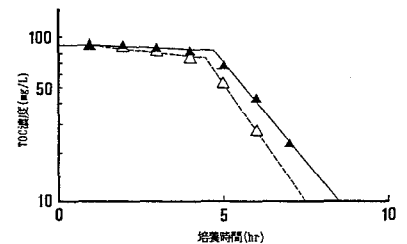
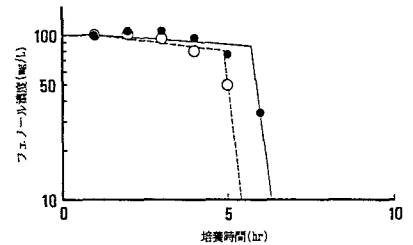


図-2 フェノール分解試験におけるOD₆₀₀、TOC濃度及びフェノール濃度の経時変化（初期フェノール濃度=100mg/Lの場合）

3. 実験成績並びに考察

図-2にフェノール分解試験におけるOD₆₀₀、TOC濃度及びフェノール濃度の経時変化の例（初期フェノール濃度100mg/Lの場合）を示した。BH株、BH（pBH500）株とも約1～3時間のラグの後増殖を始め、フェノール及びTOCをほぼ完全に分解除去したが、特に初期フェノール濃度が100mg/Lでは組換え株の方が元株よりも速く増殖し、また速く基質を除去した。この傾向は、200,300mg/Lではさほど明確ではなかったが、やはりややBH（pBH500）株の増殖及びフェノール除去がBH株よりも速かった。一方、400mg/Lではこの傾向が逆転した。

回分培養実験における菌体増殖特性を表す比増殖速度 μ (1/hr)は、 $\mu=(1/S) \cdot (dS/dt)$ で表される。但し、 S :菌体濃度 (mg/L)、 t :培養時間 (hr)。一方、フェノール分解速度は、分解速度係数 K_p によって次式で表される。 $(dPhe/dt)=-K_p \cdot Phe$ 。但し、 Phe :フェノール濃度 (mg/L)。また、TOC除去速度もフェノール分解速度と同様の式で表される（分解速度係数 K_T ）。この μ 及び K_p 、 K_T は、図-2に示した片対数プロットの勾配として求められるが、図より、菌体の増殖及びフェノール除去は、2段階の対数的増加及び対数的減少区間に分けて考えることができた。前期は、フェノールによる宿主の分解酵素の誘導が徐々に起こり始める期間（適応期間）と考えられ、後期は、完全な誘導状態に達した後の期間（適応後の期間）と考えられたので、 μ 値及び K 値をそれぞれ適応期間（ μ_1, K_{p1}, K_{T1} ）及び適応後（ μ_2, K_{p2}, K_{T2} ）について求め、表-1、2及び3に示した。表から、初期フェノール濃度100mg/LにおけるBH（pBH500）株の適応期間での増殖、基質除去特性値 μ_1, K_{p1}, K_{T1} は、BH株の1.3倍、2.5倍、3.3倍と高い値となり、分解活性増強の効果が確認された。初期フェノール濃度が増大するにつれてその差は減少し、400mg/Lでは逆にBH株の

表-1 各フェノール分解試験におけるBH株及びBH(pBH500)株の比増殖速度

初期フェノール濃度 (mg/L)	BH株		BH (pBH500) 株	
	μ_1	μ_2	μ_1	μ_2
100	0.0959	0.1644	0.1264	0.2637
200	0.0952	0.2730	0.1087	0.2506
300	0.0832	0.2769	0.0956	0.2912
400	0.0897	0.2533	0.0658	0.2089

表内の数値の単位は(1/hr)

表-2 BH株及びBH(pBH500)株のフェノール分解速度係数

初期フェノール濃度 (mg/L)	BH株		BH (pBH500) 株	
	K_{p1}	K_{p2}	K_{p1}	K_{p2}
100	0.0200	0.9401	0.0505	0.9044
200	0.0181	1.0538	0.0202	1.0263
300	0.0090	1.0786	0.0087	1.0692
400	0.0078	0.9943	0.0101	0.9287

表内の数値の単位は(1/hr)

表-3 BH株及びBH(pBH500)のTOC除去速度係数

初期フェノール濃度 (mg/L)	BH株		BH (pBH500) 株	
	K_{T1}	K_{T2}	K_{T1}	K_{T2}
100	0.0119	0.2382	0.0391	0.2872
200	0.0087	0.3028	0.0239	0.3267
300	0.0163	0.3736	0.0203	0.3415
400	0.0142	0.2823	0.0076	0.2244

表内の数値の単位は(1/hr)

μ_1, K_{p1}, K_{T1} が高くなる傾向が見られた。また、適応後については、 μ_2, K_{T2} についてさほど顕著ではないものの同様の傾向が示されたが、 K_{p2} についてはほとんど差がなかった。フェノール濃度が低い培養の適応期間に、組換え株BH（pBH500）の増殖及び基質分解が元株BHを上回ったことは、BH株のフェノール分解では低濃度での誘導期に、カテコールから2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドへの変換反応が律速となっており、BH（pBH500）株ではpbeB遺伝子の増幅によりこの律速反応が取り払われたことを示唆している。一方、フェノール濃度が200、300mg/Lになると、100mg/Lの場合に比べ誘導物質としてのフェノール濃度が高いためにC2,30活性が比較的高いレベルにまで誘導されたため、pBH500によるC2,30活性増強の効果が薄れたと考えられる。さらに、フェノール濃度400mg/Lでは、高濃度のフェノールによる阻害が、プラスミド保持という負担を持つBH（pBH500）株に大きく影響したと思われる。

以上のように、組換え株BH（pBH500）は、フェノール濃度が低い（100mg/L）場合の特に誘導期においてフェノール分解活性が強化され、増殖速度が増大することが示された。BH（pBH500）株が持つこの特徴は、比較的希薄な基質が流入し、しかもその濃度が変動する廃水処理系において非常に有効であると考えられる。