

II-PS12

Rhodotorula 属酵母によるフェノールおよび モノクロロフェノールの分解

山梨大学工学部 正 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 平山公明

1.はじめに

演者らはすでに、*Rhodotorula* (*R.*) 属酵母が、フェノール分解能力を有すること、および、*R. rubra*におけるフェノールの代謝経路を明かにした^{1,2)}。今回新たに強力なフェノール分解能力を持つ*R.*属酵母を見だし、フェノールおよびモノクロロフェノール(CP)の分解について検討を行なったので以下報告する。

2.実験方法

本研究においては、*R. glutinis* ATCC 28052株(以下、28052株)を使用した。50mlの基本培地¹⁾に1白金耳植菌し、130rpm、30°Cのロータリーシェーカーにて48時間培養した菌体および基本培地に1mMフェノールないし0.2mM各CPを添加した培地にて培養した菌体を実験に用いた。フェノール類の分析はHPLC、DOCの分析はTOCアナライザ、代謝物の分析はGC/MS、塩素イオンの分析はイオンクロマトグラフによった。

3.結果

28052株をフェノール0、1、2mM添加培地で培養したところ、菌体量は概ね同一であった。本酵母は、培地中へのフェノール添加によりフェノールの分解性が増加した。本酵母を1mMフェノール添加培地にて培養した菌体(0.1g)を5mMフェノール溶液50mlに懸濁し経時的にフェノールおよびDOC濃度を測定した。フェノール濃度は、8時間後に約0.002mM、18時間後に0mMとなった。18時間後には、添加したフェノール量に相当するDOC濃度の減少が観察された。続いて、フェノール濃度が5mMとなるよう1日1回の割合で5回連続して投入する実験を行なったところ、5回とも培地中に残存するフェノール濃度は、ほぼ0mMとなり添加したフェノール量に相当するDOC濃度の減少が観察された(Fig. 1)。

基本培地にて培養した菌体(control)、1mMフェノールないし0.2mM各CP添加培地にて培養した菌体(0.1g)を50mlの0.5mM各CP溶液に懸濁して経時的に各CPおよび塩素イオン濃度を測定した(Fig. 2)。2-CPの分解はいずれの培養菌体においても低かった。3-CPと4-CPの分

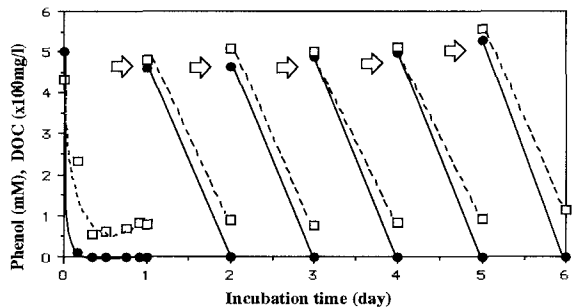


Fig. 1 Time course of the degradation of phenol by the cells of *R. glutinis* ATCC 28052. ◻; administration of phenol ●; phenol (mM) ◻; DOC (x100mg/l)

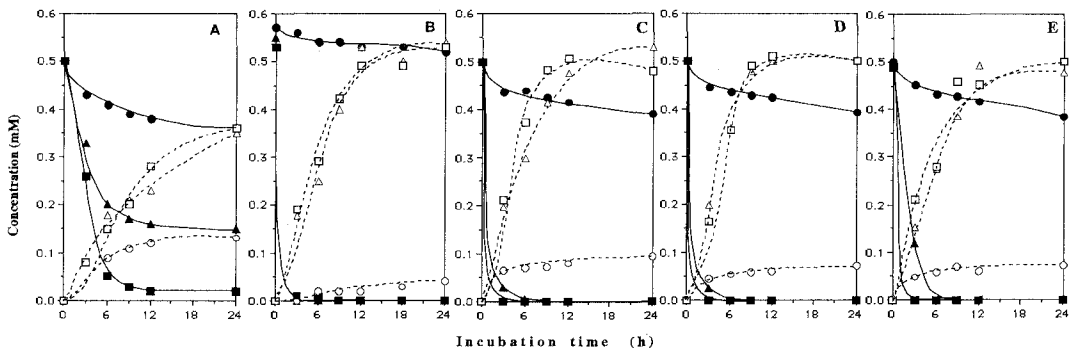


Fig. 2 Time course of the degradation of monochlorophenols and release of chloride ion from monochlorophenols by the control (A), phenol-grown (B), 2-CP-grown (C), 3-CP-grown (D) and 4-CP-grown cells of *Rhodotorula glutinis* ATCC 28052.

●; 2-CP ▲; 3-CP ■; 4-CP ○; Cl- ion from 2-CP △; Cl- ion from 3-CP ◻; Cl- ion from 4-CP

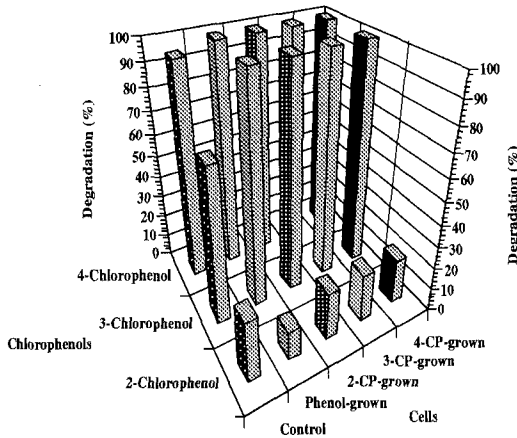


Fig. 3 Degradation % of monochlorophenols after 24 hours of incubation by the cells of *Rhodotorula glutinis* ATCC 28052.

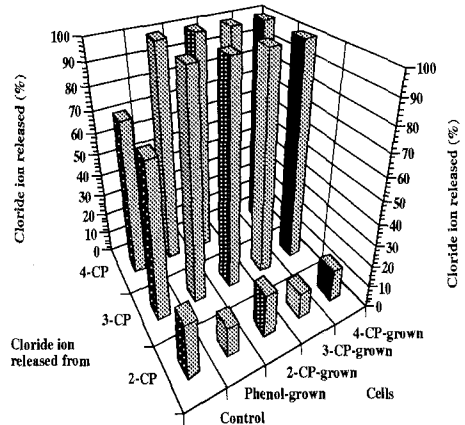


Fig. 4 Chloride ion released % from monochlorophenols after 24 hours of incubation by the cells of *Rhodotorula glutinis* ATCC 28052.

解は、フェノールないし各CPを菌体培養時に添加することにより、controlと比較して、3時間後の3-CP分解率が約33%から100%へ、4-CP分解率が約48%から100%へと増加した。24時間後の分解率は、3-CPがcontrolで69.4%、そのほかの培養菌体で100%、4-CPは、controlで96%、そのほかの培養菌体で100%であった(Fig.3)。塩素イオンの遊離はいずれの培養菌体においても、CPの分解より遅れて生じていた(Fig. 2)。24時間後の3-CPと4-CPからの塩素イオン遊離率は、3-CPでcontrolが約71%、そのほかの培養菌体が100%、4-CPでcontrolが約72%、そのほかの培養菌体が100%であった(Fig. 4)。

5mMフェノールと0.5mM 3-CPまたは4-CPを含む溶液50mlに、1mMフェノール添加培地にて培養した菌体(0.1g)を懸濁して経時的にフェノール、各CP、塩素イオンおよびDOC濃度を測定した。フェノール濃度は、6時間後に0mM、3-CP濃度は、9時間後に0mM、4-CP濃度は6時間後に0mMに減少した。18時間後には、添加したCP濃度に相当する塩素イオンの遊離が認められた。また、9時間後には添加したフェノールおよびCP量に相当するDOC濃度の減少が観察された(Fig. 5)。

菌体による培養濾液のGC/MS分析により、3-CPと4-CP代謝生成物として4-クロロカテコールに相当すると考えられるマススペクトルが検出されたことから、脱塩素は4-クロロカテコール以降に生ずるものと考えられた。今回の実験では、4-クロロカテコール以降に生成される中間代謝物として報告されている³⁾、3-クロロ-*cis,cis*-ムコン酸、ムコナクトンに相当するマススペクトルは検出されなかった。また、4-クロロカテコールの最終産物の一つとして報告されている2-hydroxy-5-chloromuconic semialdehyde⁴⁾に相当するマススペクトルは検出されなかった。

いずれの培養菌体においても、2-CP<3-CP<4-CPの順で分解性が高く、CP中のOH基とClとの位置関係がphenolhydroxylaseの基質特異性に関与しているものと推察された。

本研究の一部は、平成3年度文部省科学研究費補助金（課題番号03454031）を受けて行なわれたことを記し、深謝いたします。

参考文献 1) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **37**, 147-156, 1991 2) *ibid.*, **37**, 379-388, 1991 3) *Science*, **228**, 135-142, 1985 4) *J. W. P. C. F.*, **63**, 838-847, 1991

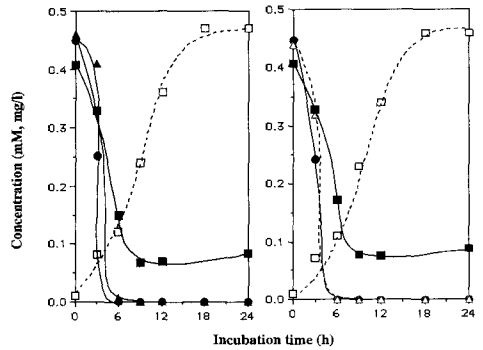


Fig. 5 Time course for the degradation of phenol, 3-chlorophenol and 4-chlorophenol by the phenol-grown cells of *Rhodotorula glutinis* ATCC 28052.

● ; phenol (x10mM) ▲ ; 3-chlorophenol (mM)
△ ; 4-chlorophenol (mM) □ ; chloride ion (mM)
■ ; DOC (x100mg/l)