

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

フェノールをはじめとする芳香族化合物の分解に関与する、多くの微生物が分離され研究されてきている。しかしながら、ほとんどの報告は細菌によるもので、酵母によるフェノール類の分解に関する報告例は少ない。酵母は、細胞自体が大きく固液分離が比較的容易であること、低pH域においてもよく生育することなどいくつかの利点をもっている。前報(1,2)において演者らは、*Rhodotorula*属酵母がフェノール分解性を有すること、および*R. rubra* IFO 0892および1101株（以下、0892株、1101株）におけるフェノールの代謝経路を明かにした。今回、0892株および1101株の無細胞抽出液によるプロトカテク酸(PCA)から、 β -ケトアジピン酸の生成ないし本酵母における芳香環の代謝経路について検討したので以下報告する。

2.実験方法

0892株および1101株を200mg/lフェノールを含む培地(1)で48時間培養した後、集菌洗浄した菌体(0.1g)を200ml三角フラスコ中の200mg/l PCA溶液50mlに懸濁した。30°C、130rpmのロータリーシェーカにて培養し、PCA、DOC濃度を経時的に測定した。また、超音波破砕器にて調製した無細胞抽出液を用いて、PCAから β -ケトアジピン酸の生成を確認する実験を行なった。PCAおよび β -ケトアジピン酸は、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-ジニトロフェニルヒドラジン(2,4-DN)により誘導体化した試料を用いた。GC/MS分析においては、N,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミドによりトリメチルシリル(TMS)誘導体化(1)して測定を行なった。

3.結果および考察

Fig. 1に、PCAの分解に伴うDOC濃度の経時変化を示した。48時間の培養期間中、PCAは0892株において220mg/lから8.4mg/lに減少した。また、DOCは、107.2mg/lから23.4mg/lに減少した。一方、1101株において、PCA, DOCの減少は、0892株よりも顕著であった。DOCの減少は、C源とし

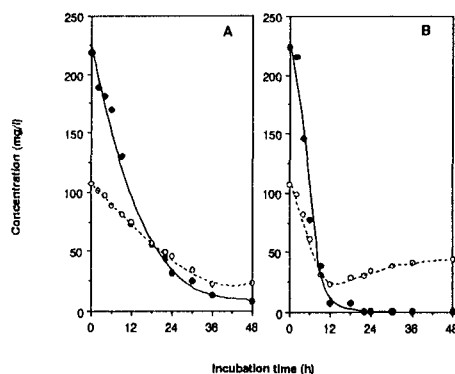


Fig. 1 Time course of the degradation of PCA by the cells of *Rhodotorula rubra* IFO 0892 (A) and 1101 (B). ●, PCA ○, DOC

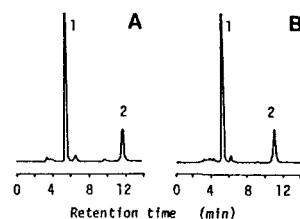


Fig. 2 Typical HPLC chromatograms at a wave length of 350nm of 2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives of the PCA metabolites by the crude cell extract of *R. rubra* IFO 0892 (A) and 1101 (B).

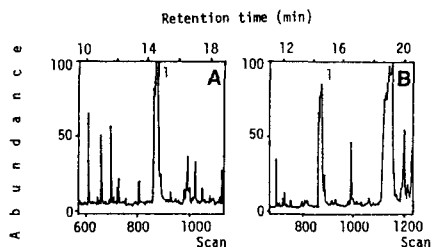
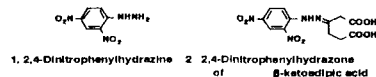


Fig. 3 Part of total ion chromatograms of the TMS derivatized ethyl acetate extracts of the PCA metabolites by the crude cell extracts of *R. rubra* IFO 0892 (A) and 1101 (B). 1. β -Ketoadipic acid (enol form)

てのPCAの利用に由来するものと推察された。Fig.2に、0892株および1101株の無細胞抽出液によりPCAから生成されたβ-ケトアジピン酸を、2,4-DNにて誘導体化して測定したHPLCクロマトグラムを示した。Fig.2中のピーク2のRTは、β-ケトアジピン酸の標準品の2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの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. 3に0892株と1101株におけるTMS誘導体化したPCA代謝物のトータルイオンクロマトグラムを示した。Fig. 3中のピーク1は、β-ケトアジピン酸標準品のTMS誘導体(エノール型)のRT、マッススペクトル[m/z 376 (M⁺), 361 (M-CH₃), 286, 169, 147], (Fig. 4)共に一致していた。PCAの他の中間代謝物は、今回の実験では確認されなかった。HPLCおよびGC/MS分析において、無細胞抽出液中に内生のβ-ケトアジピン酸は測定されなかった。また、菌体によるPCA培養ろ液中には、β-ケトアジピン酸は測定されなかった。

前報(1,2)からの一連の実験において、0892株および1101株がフェノール分解能力を有することが明らかとなった。フェノールのみを基質として培養したところ、培地中にカテコール、cis,cis-ムコン酸、ムコノラクトンおよびβ-ケトアジピン酸エノールラクトンが測定された。また、無細胞抽出液を用いた実験において、ムコノラクトンおよびPCAから、β-ケトアジピン酸の生成が確認された。これらの実験結果に基づき、*R. rubra*における芳香環の分解経路を推定し、Fig.5に示した。すなわち、フェノールは開裂前に酸化され、カテコールが生成される。カテコールはオルト開裂してcis,cis-ムコン酸を生じ、次いでラクトン化されムコノラクトンとなる。ムコノラクトンはβ-ケトアジピン酸エノールラクトンに異性化され、続いて脱ラクトン化してβ-ケトアジピン酸が生ずる。一方、PCAからβ-ケトアジピン酸への酸化が認められたことから、*R. rubra*には、カテコールおよびPCAの両方を経由するβ-ケトアジピン酸経路が存在するものと推定された。

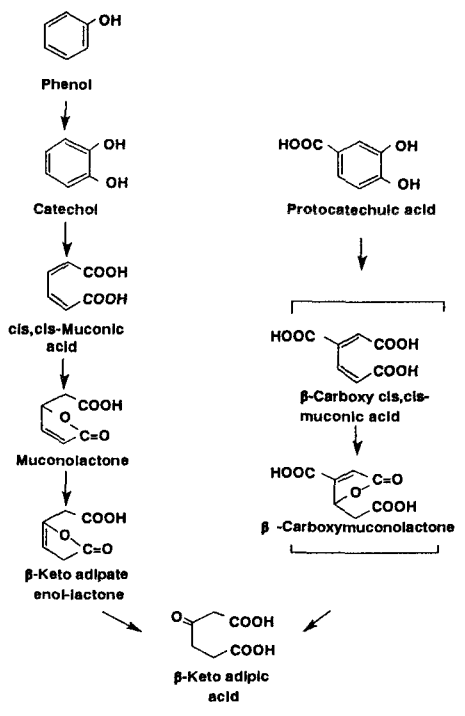
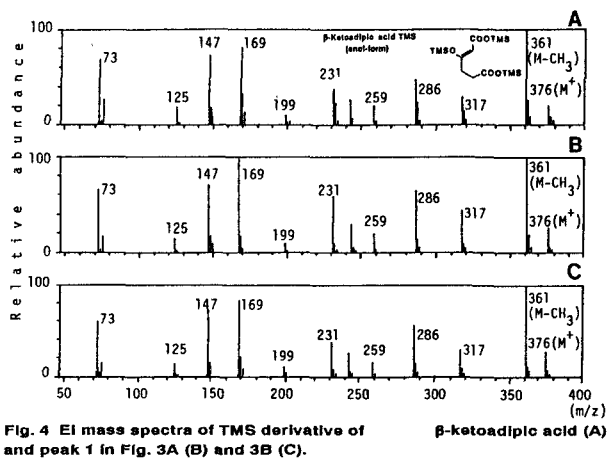


Fig. 5 Proposed metabolic sequence for the aromatic degradation in *Rhodotorula rubra*.

参考文献 1) J. Gen. Appl. Microbiol., **37**, 147-156, 1991 2) *ibid*, in press