

フェノール資化性酵母に関する研究

フェノール定量法の検討

赤木盛郎・井上文夫*

山田哲也**・吉田弘一***

Studies on Phenol Metabolizing Yeasts Quantitative Analysis of Phenol

Morio AKAKI, Fumio INOUE*,

Tetsuya YAMADA** and Hirokazu YOSHIDA***

緒言

フェノールやシヤンは毒性が強く、通常、微生物は生存が困難である。これらの物質が汚水や廃水の生物学的処理系（活性汚泥法、散水汙床法）に混入した場合には、処理能力の低下をきたし、はなはだしきは処理不能となり、重大な問題となる。生物に対し有毒な物質を微生物により分解処理することは、微生物のもつ特殊性を利用したものであり実用的にもきわめて重要である。

フェノールについてはおもに細菌による研究¹⁾が多く、酵母については、根井ら²⁻⁸⁾により、*Rhodotorula glutinis*, *Candida tropicalis* を用いた研究が、伊藤ら⁹⁻¹⁶⁾により *Trichosporon cutaneum* を用いた研究が報告されており、清水ら^{17,18)}、正田ら¹⁹⁻²¹⁾の報告も見られる。これらは酸化活性からみた培養条件の検討やフェノール類縁物質の酸化についておもに報告されたものである。

赤木ら²²⁻²⁴⁾は、フェノールを唯一の炭素源として生育する酵母菌株の検索、選択を行い、種種検討を行なっている。本報では、従来からフェノール資化性菌に関する研究に用いられてきたフェノール定量法の問題点を解決するために、培養中のフェノールを迅速に定量できる新しい試みとして高速液体クロマトグラフィーの適用を検討した。

*サントリー株式会社
**三重大学
***松阪大学

実験の部

1. 実験方法

フェノール資化性酵母の研究を行なうにあたり、必要なフェノールの定量法については、Folin法²⁵⁾、4-アミノアンチピリン法²⁶⁾を用いた報告が見られる。Folin法は培養中の他の成分による影響が考えられ、検討の結果、フェノール定量に対してかなりプラスの誤差を生ずることが分った。4-アミノアンチピリン法では、操作手順中に蒸留が含まれており、多数の試料を短時間に分析することが難しかった。以上のことから多数の試料を短時間に分析でき、かつフェノール以外の成分による影響の少ない定量法として高速液体クロマトグラフィーの適用を試みた。

1・1 高速液体クロマトグラフィーの条件

高速液体クロマトグラフには日本分光工業のTRL ROTARを用い、検出には回析格子紫外分光光度計 UVIDECを使用した。分析に適した条件は次の如くであった。

カラムの大きさ：4.6mm ϕ \times 250mm

固定相：HITACHI Gel

移動相：80%メタノール水溶液

送液圧，流量：20kg/cm²，1.5ml/min

検出：270nmにおける紫外線吸収

試料注入料：10 μ l

カラムの温度：室温

チャートスピード：5mm/min

1・2 試料の調製

酵母培養前の培地中に含まれるフェノールの定量については、Table 1 に示した各種培地を用いて検討した。

Table 1. Composition of Medium Tested in Quantitative Analysis of Phenol by High Pressure Liquid Chromatograph.

P.	: 0.1 % Phenol
P. I.	: 0.1 % Phenol + Inorganic compound*
P. I. Y.	: 0.1 % Phenol + Inorganic compound* + 0.1 % Yeast extract
YM. P.	: YM medium** + 0.1 % Phenol
pH 6.5	
*Inorganic compound	: NH ₄ NO ₃ 0.2 %
	KH ₂ PO ₄ 0.25 %
	MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.05 %
	CaCl ₂ · 2H ₂ O 0.005 %
**YM medium	: Glucose 1.0 %
	Peptone 0.5 %
	Malt extract 0.3 %
	Yeast extract 0.3 %

培養液に含まれるフェノールの定量については、赤木らにより検索同定されたTable 2に示した酵母菌株を用い、酵母エキス0.1%を含有した0.12%フェノール無機塩培地 (P.I.Y.)

Table 2. Phenol-Assimilating Yeasts Tested.

<i>Candida tropicalis</i>
X-12 strain (xylose-assimilating)
N-13 strain (isolated from salted vegetables)
S-IV-1 strain (isolated from stillage)

These were selected by M. Akaki et al..

N-12, N-13 and S-IV-1 strains were identified as *Candida tropicalis* by M. Akaki et al.

25ml, 30℃で回転振とう培養 (135回転/分) し、適宜時間ごとに培養液 1 ml を採取した。採取液にメタノール 4 ml を加え、遠心分離 (10000rpm, 10分) により菌体を除き、その上澄液 (培養液) 2 ml に対して特級塩酸0.025ml を滴下し、酸性条件にして高速液体クロマトグラフィーの試料とした。

2. 実験結果

2・1 培養前の培地中のフェノール定量

種類の培地の高速液体クロマトグラムをFig. 1に示した。

培地の種類により保持時間 2 分付近のピークに差が見られた。フェノール水溶液のクロマトグラムおよび後述の培養液のクロマトグラムパターンの時間的変化から、保持時間 4 分付近のピークがフェノールであり、培地成分が変わってもフェノールのみを定量することができた。

用いたフェノールは特級試薬で純度99%以上であった。

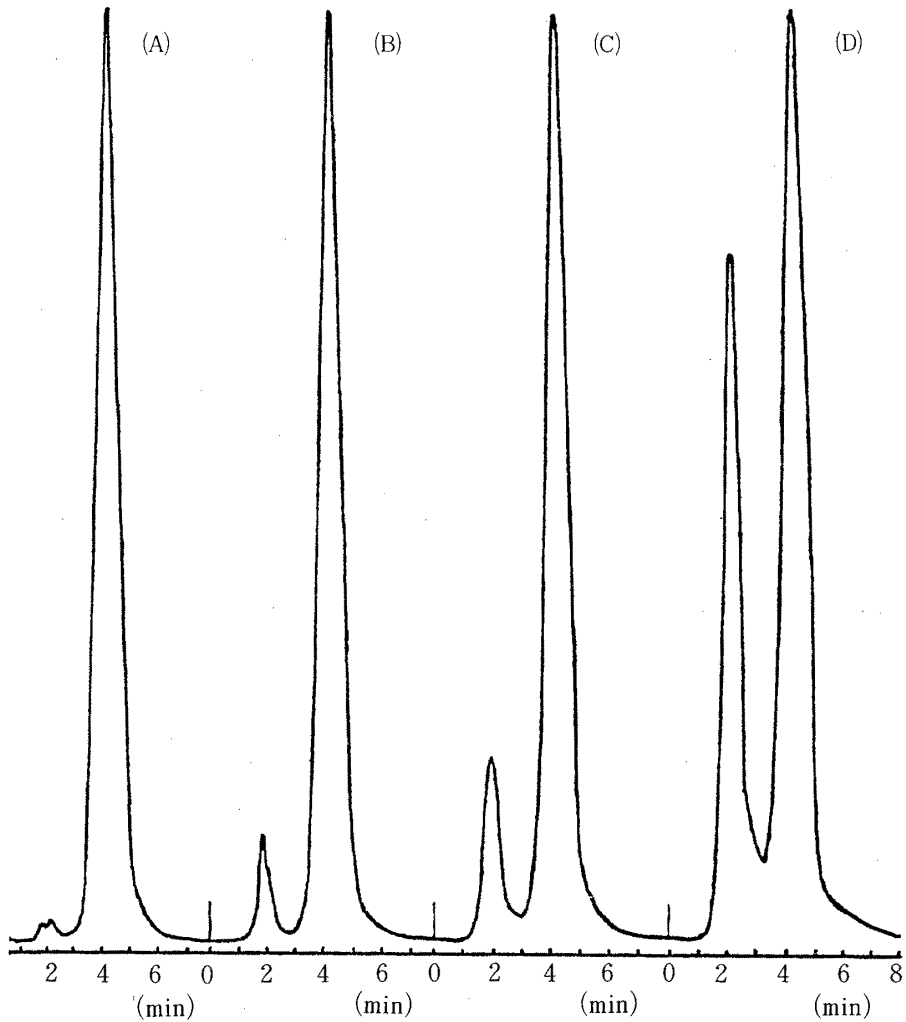


Fig. 1. High Pressure Liquid Chromatogram of Each Medium.

(A): P., (B): P. I., (C): P. I. Y., (D): Y.M. P.

2. 2 培養液中のフェノール定量

メタノール処理後の試料の中には、Fig. 1に示したようなクロマトグラムパターンが見られないものがしばしば現われ、定量が不可能となった。Fig. 2に定量に不適当なクロマトグラムを示した。この現象は試料のpHに関係したものであることが分かったので、メタノール処理後の試料を塩酸酸性にすることにした。

培養液中のフェノールを定量し、培養時間にもなった各菌株ごとのクロマトグラムの変化をFig. 3に示した。

4 菌種の場合とも培養時間の経過とともにフェノールのピーク高さが減少し、それにもない代謝物と思われるピーク高さが増加し、やがて減少するという変化が見られた。

これらの結果から、培養時間の経過にもないフェノールの減少を追いながら、フェノールのみを1試料7分という短時間で定量できることが判明した。

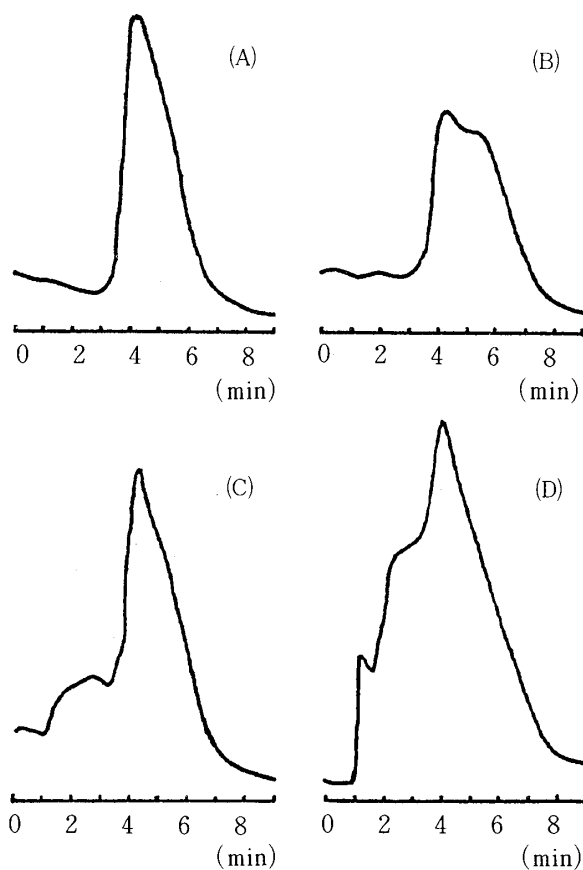


Fig. 2. Unsuitable Chromatogram for Quantitative Analysis of Phenol.

(A): P. , (B): P. I.

(C): P. I. Y., (D): YM. P.

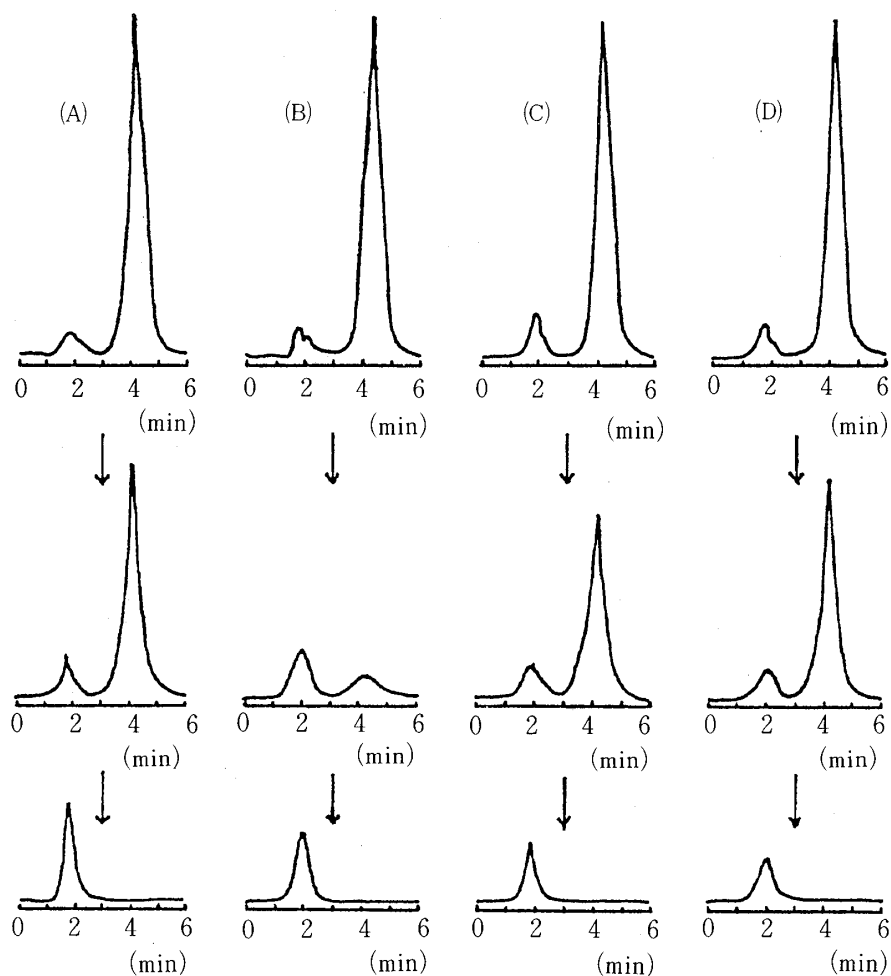


Fig. 3. High Pressure Liquid Chromatogram of Culture Filtrates of Each Yeast.

(A) : *Candida tropicalis* , (B) : X-12 Strain
 (C) : N-13 Strain, (D) : S-IV-1 Strain

考 察

本研究に用いた固定相は、スチレンージビニルベンゼン共重合体で全多孔性の吸着クロマトグラフィーである。表面が疎水性であるので、溶媒の選択は逆相クロマトグラフィーの要領で行なった。移動相溶媒としてまず100%メタノールを用いた。ところが、培養物を遠心分離した後の上澄液を直接100%メタノールで高速液体クロマトグラフィーを行なうと、カラムの目詰りをきたし送液圧力が急上昇し、運転が不可能となった。その原因としては、培地成分の不溶化が考えられた。これらの点を考慮して、培養物をメタノールで前処理した試料を80%メタノール水溶液溶媒の高速液体クロマトグラフィーに供した。

クロマトグラフィーを行なう場合には、常に試料と固定相と溶離液との関係を考慮しなければならない。疎水性の固定相とメタノール/水の溶離液を用いた逆相クロマトグラフィーでは、親水性の物質から先に溶出してくる。溶離液の水の比率を上げると疎水性物質の溶出時間が長くなる。物質の見かけの分子量も溶出時間に関係し、見かけの分子量が大きいほど溶出時間が

短くなる。以上のような諸因子の兼ね合いにより溶出順序、溶出時間が決定される。以上の諸点から考えてFig. 2のクロマトグラムでは、保持時間2分付近のピークは、フェノールが自然酸化分解されて生じたフェノール由来の不純物、あるいは培地の種類によってそのピーク高さが異なることから培地中の成分によるものと思われた。

Fig. 3のクロマトグラムでは、保持時間2分付近のピークは、フェノールの代謝生産物または培地成分と考えられた。フェノールの中間代謝生産物としては普通カテコールが考えられており、この物質はフェノールよりも保持時間が短くなるので、保持時間2分付近のピークはカテコールの可能性が考えられる。しかし、根井ら⁸⁾、伊藤ら¹⁵⁾は *Candida tropicalis* や *Trichosporon cutaneum* を通気振とう培養すると、培養中にはその中間代謝生産物であるカテコールは確認できず、フェノールがカテコールに変化すると速かに環の開裂が起こっていることが示唆され、また、カテコールの培地中への生成を確認するためには、低温での培養や静置培養を行なわねばならぬと報告している。従って、Fig. 3のクロマトグラムでは保持時間2分付近のピークをカテコール以外の代謝生産物または培地成分と考えるのが妥当ではないかと考えられる。微生物によるフェノールの代謝生産物についての検討は、重要かつ興味深い今後の問題である。

本研究で用いたクロマトグラフは再現性が良く、ピーク高さからのフェノール定量の可能性が示され、Fig. 2に示したような定量不可能なクロマトグラムパターンも試料を酸性条件にすることで解決できた。これはpHによるもので、フェノールの解離型が定量をさまたげており、非解離型にすることが望ましいと考えられる。

高速液体クロマトグラフィーは物質中の成分の分離確認に広く利用されてきている。ワイン中のフェノール性物質の分析²⁷⁾もその一つの例であり、その利用が拡大されている。ところが、フェノール資化性の酵母や細菌に関する研究に必要なフェノールの定量に高速液体クロマトグラフィーを適用する試みは見当たらない。

フェノール資化性酵母の研究にあたり、必要なフェノール定量を高速液体クロマトグラフィーの適用で成功したのは始めてであり、今後フェノールのみならずフェノール類縁物質の分別定量やフェノール類の代謝生産物の検討などへの応用の道が期待される。

要 約

フェノール資化性酵母の研究を進展させるにあたり、フェノールの定量法について検討した。フェノール資化性酵母や細菌に関連する報告で用いられた従来からのフェノール定量法には、問題点が多いので、フェノールのみを迅速に定量可能な方法として高速液体クロマトグラフィーの適用を考え、フェノールのみを迅速に定量することが可能となった。

文 献

- 1) 三上栄一, 福岡誠一, 小野英男, 江藤穂積: 醸工, 44, 405 (1966)
- 2) 根井仁三郎: 醸工, 49, 655 (1971)
- 3) 根井仁三郎: 醸工, 49, 852 (1971)
- 4) 根井仁三郎: 醸工, 50, 536 (1972)
- 5) 根井仁三郎, 江夏敏郎, 照井堯造: 醸工, 51, 1 (1973)
- 6) 清水達雄, 秋田谷一康, 福地学, 根井仁三郎, 市川邦介: 醸工, 51, 803 (1973)
- 7) 清水達郎, 宇野勉, 団泰司, 根井仁三郎, 市川邦介: 醸工, 51, 809 (1973)
- 8) 根井仁三郎, 田中義博, 高田信男: 醸工, 52, 28 (1974)
- 9) 伊藤昌雄, 亀山涼子, 藤川昇: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.187 (1969)
- 10) 伊藤昌雄, 亀山涼子, 藤川昇: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.203 (1974)
- 11) 伊藤昌雄, 岩田博, 羽多野哲: 日本農芸化学会中部支部第62回例会講演要旨集, p.4 (1975)
- 12) 金子安之, 伊藤昌雄: 昭和50年度文部省特定研究, 微生物による環境浄化研究報告, p.330 (1975)
- 13) 金子安之, 伊藤昌雄: 昭和51年度文部省特定研究, 微生物による環境浄化研究報告, p.107 (1976)
- 14) 伊藤昌雄, 藤川昇, 亀山涼子, 羽多野哲: 農化, 53, 329 (1979)
- 15) 伊藤昌雄, 藤川昇: 醸酵工学, 57, 454 (1979)
- 16) 伊藤昌雄, 川口正展, 藤川昇: 醸酵工学, 57, 429 (1979)
- 17) 清水祥一, 平井整, 大宮邦雄: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.190 (1977)
- 18) 清水祥一, 松岡信: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.287 (1978)
- 19) 正田誠, 塚腰哲也: 日本醸酵工学会大会講演要旨集, p.190 (1975)
- 20) 鵜高重三, 正田誠: 昭和51年度文部省特定研究, 微生物による環境浄化研究報告, p.35 (1976)
- 21) 正田誠, 鵜高重三: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.287 (1978)
- 22) 赤木盛郎, 井上文夫, 河合照光, 山田哲也: 日本農芸化学会中部支部第73回例会講演要旨集, p.2 (1978)
- 23) 赤木盛郎, 井上文夫, 倉田育子, 山田哲也: 日本農芸化学会関西支部・中部支部合同大会講演要旨集, p.10 (1979)
- 24) 赤木盛郎, 森幸彦, 山田哲也, 中尾孝子: 本誌, 11, 99 (1991)
- 25) FOLIN, O., CIŌCALTCAU, V.: *Biol. Chem.*, 73, 627 (1927)
- 26) 日本工業標準調査会: 工業排水試験法, JIS K0102, p.57
- 27) 岡村成通, 渡辺正澄: 農化, 53, 165 (1979)