

## フタル酸利用菌の分離とその性質

太田 欽 幸 ・ 松 下 義 孝

広島大学水畜産学部食品工業化学科

1978年4月25日受理

### Isolation and Characterization of Phthalic Acid Utilizing Bacteria

Yoshiyuki OHTA and Yoshitaka MATSUSHITA

*Department of Food Chemistry and Technology,  
Faculty of Fisheries and Animal Husbandry,  
Hiroshima University, Fukuyama*

(Figs. 1-2; Tables 1-8)

フタル酸はそのエステルとして、プラスチックの可塑剤あるいは合成樹脂の原料として多量に用いられている。現在、このフタル酸エステルによる環境汚染が問題になっている。<sup>1)</sup> フタル酸エステルの微生物による分解はフタル酸を経て代謝される<sup>2)</sup>と報告されている。しかし、フタル酸の微生物による分解代謝については RIBBONS と EVANS<sup>3)</sup> および HARADA と KOIWA<sup>4)</sup> の研究があるにすぎず、未解決の問題が多く残されている。

本報ではフタル酸を唯一の炭素源として生育する細菌を分離して、その菌学的性質、フタル酸の利用性を高めるための培養条件、および他の芳香族化合物の利用性について検討しその結果を得たので報告する。

### 実 験 方 法

**試薬** フタル酸、イソー、およびテレフタル酸、ならびにその他の試薬は市販一級品を用いた。

**培地および培養方法** フタル酸利用菌の分離と培養条件の検討に用いた培地は、フタル酸、1 g; 1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8), 67 ml; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.2 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.04 g; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 mg; 酵母エキス, 0.2 g をそれぞれ蒸留水に溶解し、1 l にして調製した。固体培地はこの培地に粉末寒天 15 g を入れて固化させたものである。殺菌はいずれの場合も 120°C, 15 分間で行なった。培養は 500 ml 容の肩付振とうフラスコに 100 ml の液体培地を入れて、30°C で往復振とう (120 r. p. m) して行なった。

**フタル酸利用菌の分離と保存** フタル酸分解菌の分離は集積培養法により行ない、分離された菌株は 0.1% のフタル酸を含む斜面培地に 30°C, 4 日間培養後、5~6°C に保存した。

**分離菌株の同定** 種々の菌学的性質の検討は Manual for the Identification of Medical Bacteria<sup>5)</sup>に記載されている方法に準拠し、同定は Bergey's Manual of Determinative Bacteriology<sup>6)</sup>に従って行なった。

**フタル酸酸化活性の測定** ワールブルグ検圧計(三田村製, 30 R-15型)を用いて行なった。培地 100 ml 中, 30°C で往復振とう培養によって得られた菌体を遠心分離 (17,000×g, 5分) で集め, 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) で 2 回洗浄し, この菌体を 50 ml の同様のリン酸緩衝液 50 ml に懸濁させて, 500 ml 容の肩付振とうフラスコに入れ 30°C で 2 時間飢餓培養を行なった。その後, 再び遠心分離 (17,000 × g, 5分) を行なって集菌し, 20 mM リン酸緩衝液 1 ml 当り乾燥菌体量として 1 mg になるように懸濁し, 菌体浮遊液を調製した。この菌体浮遊液 0.2 ml, 20 mM リン酸緩衝液 1.0 ml, および蒸留水 0.4 ml をワールブルグフラスコの主室に, 40 mM 基質 0.2 ml を側室に, また 20% KOH 水溶液 0.2 ml を副室にそれぞれ入れて, 30°C で酸素消費量を 20 分毎に 80 分間測定した。なお, 基質を入れないで測定した自家呼吸の値は差し引いて表示した。

**各種分析法** 生育度は培養液の 660 nm における吸光度から, 検量曲線を用いて計算した乾燥菌体重量として表示した。フタル酸は 272 nm における吸光度を測定して定量した。

## 実験結果および考察

**フタル酸利用菌の分離** 静岡県小笠郡内の田, 畑, および山林の 50 種類の土壌をそれぞれ生理食塩水に懸濁させ 10 分間放置後, その上清液 1 滴をそれぞれのフタル酸異性体 0.1% を唯一の炭素源とする培地 7 ml を入れた試験管に採り, これを試験管振とう機 (240 r. p. m.) で 30°C, 24 時間振とう培養した。そ

Table 1. Utilization of phthalic acid isomers by strains isolated from soil.

Group	Strain No.	Substrate*	Growth on		
			Phthalate	Isophthalate	Terephthalate
I	3-19	Phthalate	+++	-	-
	3-31	Phthalate	+++	-	-
II	1-6	Isophthalate	-	+++	-
	1-19	Isophthalate	-	+++	-
	1-32	Isophthalate	-	+++	-
III	2-6	Terephthalate	-	-	+++
	2-19	Terephthalate	-	-	+++
IV	1-14	Isophthalate	+	+++	-
V	1-31	Isophthalate	-	+++	+++
	2-5	Terephthalate	-	++	++
VI	2-13	Terephthalate	+++	-	+++
	2-23	Terephthalate	+++	-	+++
VII	2-29	Terephthalate	+	+	++
	2-30	Terephthalate	+	+	+

\*Growth substrate (0.1 %) used in isolation medium consisting of one of phthalic acid isomers, 1 g; 1 M phosphate buffer (pH 6.8), 67 ml; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.2 g; MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 10 mg; yeast extract, 0.2 g; distilled water, 933 ml. This medium was used throughout the present experiment. Enrichment culture was on a test tube shaker at 30°C for 2 days. Symbols: +++, excellent growth; ++, good growth; +, fair growth; -, no growth.

の後、良好に生育した培養液1滴を上記と同組成の培地7mlに添加し、上記と同様に培養した。そして、良好に生育した培養液について、それぞれのフタル酸異性体0.1%を唯一の炭素源とする平板培地に塗抹し、30℃で2日間培養した。その後、単集落を釣菌し上記と同じ組成の平板培地に塗抹し同様に培養した。この操作を3回繰り返してフタル酸利用菌を分離した。その結果、14菌株が得られ、これらの菌株はフタル酸の異性体に対する利用性の相違から7群に分けることができた (Table 1)。3種類の異性体を全て良好に利用する菌は2株にすぎず、他の菌株は異性体のうちの1つかまたはいずれか2つを利用した。この結果は HARADA と KOIWA<sup>4)</sup>の結果とはほぼ一致した。すなわち自然界ではフタル酸のそれぞれの異性体を分解する菌がそれぞれ存在し、フタル酸の異性体の分解代謝を行なっていると考えられる。

本報では、フタル酸の異性体の中で最も多量に使用されているフタル酸を最も良好に分解するNo.3-31株を用いて以下の実験を行なった。

**No.3-31株の菌学的性質** 本菌株はグラム陰性で0.8~1.0×1.5~2.0 μmの桿菌で運動性があり、カタラーゼおよびオキシターゼ反応は共に陽性で、ペプトンを含む培地で糖から酸を産生しなかった。これらの性質から *Alcaligenes* 属の細菌と同定された (Table 2)。この菌株は RIBBONS と EVANS<sup>3)</sup> が用いた *Pseudomonas* 属の細菌および HARADA と KOIWA<sup>4)</sup> の分離した *Micrococcus* 属の細菌とは明らかに性質を異にする細菌である。

Table 2. Characteristic description of strain No.3-31

- 
1. Morphological characters:  
Shape and size: Cells occurring single, straight rods, having 0.8-1.0 by 1.5-2.0 μm, motile.
  2. Cultural characters:  
Nutrient agar colony: 1.5-2.0 mm in a diameter, convex, circular, smooth, entire, yellowish, opaque.  
Nutrient agar slant: growth abundant, yellowish, opaque.  
Nutrient broth: turbid with sediment.
  3. Physiological characters:  
Gram stain: negative.  
Strictly aerobic.  
O-F test: negative.  
Catalase test: positive.  
Oxidase test: positive.  
Acid production from glucose: negative.
  4. Assimilation of substrate:  
Glucose, phthalate, resorcinol, orcinol, catechol, protocatechuic acid.
  5. Temperature for growth:  
Good growth at 30°C.
  6. pH value for growth:  
Good growth at pH 6.8.
- 

**培養条件の検討** No.3-31株のフタル酸酸化活性を高めるための培養条件を検討した。まず、培地中に窒素元素として21.2 mg/100 mlに相当する各種の窒素源をそれぞれ添加して、30℃で16時間培養した。その結果、硝酸カリウムおよび硝酸アンモニウムに生育した菌体が高いフタル酸酸化活性を有していた (Table 3)。概して、硝酸態窒素に生育した菌体の方がアンモニア態窒素に生育した菌体よりも高い活性を有していた。そこで菌体の生育が良くしかもフタル酸酸化活性の高かったのは硝酸アンモニウムに生育した菌体であったので、以後の実験では窒素源として硝酸アンモニウムを用いた。

芳香族炭化水素の代謝系には鉄イオンを含む酵素が関与しているので、培地中の鉄イオン濃度とフタル酸酸化活性との関係を、各濃度の FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O を添加した培地でNo.3-31株を30℃で振とう培養して

Table 3. Effect of nitrogen form on phthalate oxidizing activity of strain No. 3-31.

Nitrogen source (21.2 mg N/ 100 ml)	Cell yield* (mg/ml)	Phthalate oxidizing activity** O <sub>2</sub> uptake ( $\mu$ l/mg of cells/hr)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.20	275
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.24	220
NH <sub>4</sub> Cl	0.28	260
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.27	303
KNO <sub>3</sub>	0.16	375

\* Cell yield obtained after 16-hr culture in phthalate-mineral salt medium at 30°C.

\*\* The amount of O<sub>2</sub> uptake was determined with a Warburg's respirometer for 60 min at 30°C, using cells grown on phthalate for 16 hr at 30°C.

Table 4. Effect of iron concentration on phthalate oxidizing activity of strain No.3-31.

Concentration of ferrous ion (mg of FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O/ 100 ml)	Phthalate oxidizing activity* O <sub>2</sub> uptake ( $\mu$ l/mg of cells /hr)
0	315
0.5	400
1.0	385
2.0	365
5.0	335
10	230
15	200

\* Cells obtained after 16-hr culture in phthalate-mineral salt medium with various concentrations of FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O.

Table 5. Effect of metal ions on growth of strain No. 3-31.

Metal ions (1 mM)	Cell yield* (mg/ml)	Consumption of phthalate (%)
None	0.23	45.8
Li <sup>+</sup>	0.19	36.8
Mn <sup>2+</sup>	0.20	40.0
As <sup>5+</sup>	0.19	34.4
Al <sup>3+</sup>	0.11	17.8
Ba <sup>2+</sup>	0.12	17.7
Pb <sup>2+</sup>	0.14	22.7
Fe <sup>2+</sup>	0.12	17.7
Cu <sup>2+</sup>	0	0
Co <sup>2+</sup>	0	0
Ni <sup>2+</sup>	0	0
Ag <sup>2+</sup>	0	0
Hg <sup>2+</sup>	0	0

\* Cell yield obtained after 16-hr culture in phthalate-mineral salt medium with indicated metal ions at 30°C.

得た菌体について検討した。その結果、培地100 ml当り0.5~1.0 mgの $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を添加した培地では無添加のものより20~30%活性が高かったが、逆に10 mg以上になると阻害的となった (Table 4)。鉄イオン無添加の場合でも活性が高いのは用いた0.02%の酵母エキス中に微量の鉄イオンが含有されていたためであると考えられる。以上の結果から、鉄イオンは $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ として培地100 ml当り0.5 mg添加すれば良い。

つぎに、金属イオンのNo.3-31株の生育に及ぼす影響について、培地に1 mMの各種金属イオンを添加して、30°Cで16時間培養した。その結果、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ は50%、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^+$ 、および $\text{Hg}^{2+}$ は完全にNo.3-31株の生育を阻害した。その他の金属イオンは生育に影響を与えず、また生育を促進するものは見い出せなかった (Table 5)。これらの結果は、上記の金属イオンが存在しない培地で30°C、16時間培養した菌体を用いフタル酸酸化活性の測定反応液に上記のそれぞれの金属を入れて、酸化活性への影響を検討すると、生育への影響の結果と全く一致した。生育に阻害的な金属イオンはフタル酸の酸化酵素系に阻害的に作用し、その結果フタル酸を利用して本No.3-31株は生育できないと考えられる。

**フタル酸酸化活性の誘導** No.3-31株を0.1%のフタル酸およびコハク酸をそれぞれ唯一の炭素源として、30°Cで16時間培養後、その菌体のフタル酸酸化活性を調べた。その結果、コハク酸生育菌体は、フタル酸をほとんど酸化することはできなかった (Fig 1)。この結果から、フタル酸代謝系は誘導的に生成されるものと考えられる。そこで菌体の生育と生育基質であるフタル酸の消費およびフタル酸酸化活性の関係について検討した。菌体の生育は接種後12時間頃から開始され、これと同時にフタル酸が消費され始めた。一方、菌体当りの活性は、培養12~18時間が最も高いが、18時間を過ぎると急激な菌体の生成およびフタル酸の消費につれて低くなった。培地中のフタル酸の消費と共に菌体当りの活性が減少するので、菌体当りの活性が高くしかも多量の菌体を得るには、フタル酸の酸化活性を再度高めることが必要であると考え、培養12、18、24、30、および36時間目のそれぞれ1時間前にフタル酸を培地量に対して0.05%再添加し、そして各時間毎に集菌した。菌体量は最初培地に添加したフタル酸が残存する間は増加しないが、そのフタル酸が消費され尽した24時間目で、再添加しない場合と比較して、約0.1 mg/mlの菌体の増加が認められた。一方、フタル酸酸化活性は、最初添加したフタル酸が残存する間は再添加すると阻害的となったが、最初に添加したフタル酸が消費され尽す24時間目に再添加すると活性が高まり、菌体当りの活性は最高になった (Fig 2)。しかし、再添加による活性の増加率は再添加しない場合の活性との比が最高である3.15となった培養30時間目であった。このことから、フタル酸の酸化活性が高い菌体を得るには培養24時間の

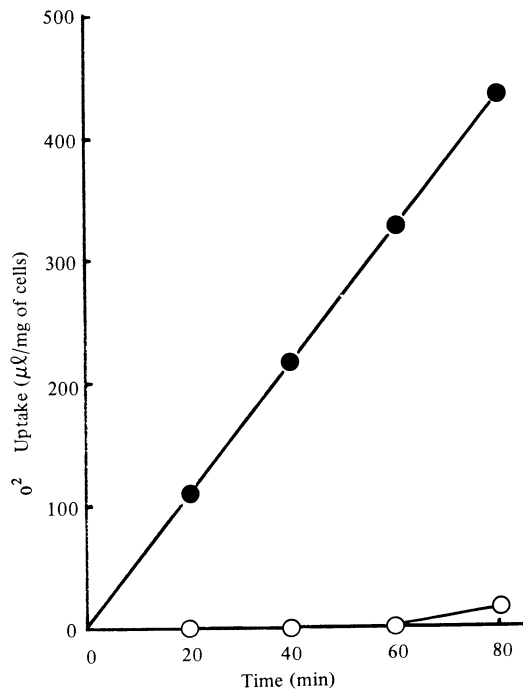


Fig. 1. Induction of phthalate oxidizing activity of strain No.3-31. Cells grown for 16 hr, at 30°C, in mineral salt medium containing 0.1% of phthalate or succinate as a sole carbon source. Symbols: ●, cells grown on phthalate; ○, cells grown on succinate.

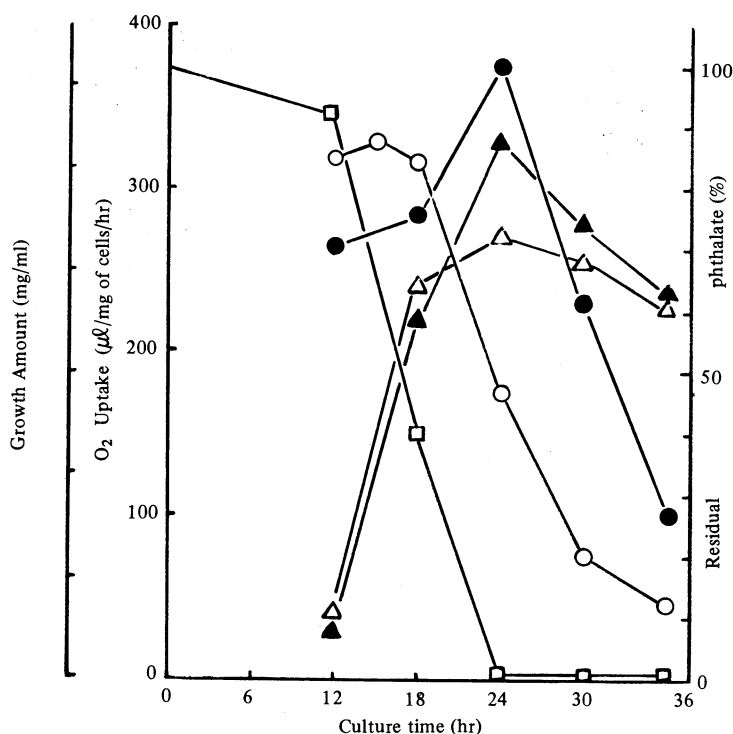


Fig. 2. Production of cells with high phthalate oxidizing activity of strain No.3-31. Cells grown in phthalate-mineral salts medium were harvested after 12, 18, 24, 30, and 36 hr-cultivation. Symbols: □, residual phthalate; ○, phthalate oxidizing activity of cells without feeding phthalate; △, cell yield obtained without feeding phthalate; ●, phthalate oxidizing activity of cells harvested after 1 hr after the time having fed 0.05% phthalate to the culture at 11, 17, 23, 29, and 35 hr; ▲, cell yield obtained after feeding 0.05% phthalate as given above.

Table 6. Enhancement of phthalate oxidizing activity of strain No. 3-31 by feeding phthalic acid before harvest of cells.

Feeding amounts of phthalate (g/100 ml)	Phthalate oxidizing activity ratio*
0	1.00
0.005	1.18
0.010	1.84
0.020	2.31
0.050	2.45
0.075	2.50
0.100	2.52

\* Ratio of the activity of cells harvested after 1 hr from the time having fed indicated amounts of phthalate of the 29-hr culture of strain No.3-31, to that of cells of 30-hr culture without feeding.

1時間前に0.05%のフタル酸を再添加し集菌すれば良い。このことは、本酵素系は誘導的であるので培地中に基質が無くなるとそれに伴い生成されていた酵素系が消滅するので、集菌前に再び基質を添加し本酵素系を再び誘導し高めておいて集菌の方が菌体当りの活性が高くしかも多量の菌体が得られる。また、その再添加の時間は初め存在していた最高の活性が50%程度減少した時期が良く、それ以上減少した時点では総活性は高くない。ついで、再添加の添加量を、再添加して残存活性との

比が最高となった培養 30 時間前 1 時間に種々の濃度のフタル酸を添加した。その結果、0.02% 程度の添加量で十分であり、高濃度の基質を再添加する必要はなかった (Table 6)。

**基質利用性** 固体培地に各種の芳香族化合物をそれぞれ 0.1% 宛添加して、No.3-31 株を塗抹し 30°C

Table 7. Utilization of substrates by strain No.3-31.

Substrate	Growth
Phthalate	+++
Isophthalate	-
Terephthalate	-
Orcinol	++
Resorcinol	-
Catechol	++
<i>p</i> -Hydroxybenzoate	+
Benzene	-
Toluene	-
Aniline	-
<i>m</i> -Cresol	-
Phenol	-

Grown on plates of mineral salt agar medium containing indicated aromatic compounds (0.1 %) at 30°C, for 4 days. Symbols are given in Table. 1.

Compounds	Relative activity
Phthalate	100
Isophthalate	0
Terephthalate	0
<i>m</i> -Hydroxybenzoate	0
<i>p</i> -Hydroxybenzoate	0
Catechol	2.5
4-Methylcatechol	5.5
4-Chlorocatechol	3.6
Protocatechuate	0
Dioctylphthalate	0

\* Cells obtained after cultivation for 16 hr at 30°C in phthalate-mineral salt medium.

窒素源は硝酸アンモニウムが良く、鉄イオン濃度は FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O として 0.5 mg/100 ml 程度が良かった。重金属により本菌株の生育およびフタル酸酸化活性が完全に阻害された。

本菌株のフタル酸代謝系は誘導的であり、培地中にフタル酸が無くなると、その代謝活性は急激に減少した。高活性の菌体を多量に得るには、集菌 1 時間前に 0.05% 程度のフタル酸を再添加して集菌すれば良い。

本菌株は生育基質として種々の芳香族化合物を利用したが、フタル酸生育菌体は、フタル酸、カテコールおよびその誘導体のみを利用した。プロトカテキン酸を利用できないので従来提示されているプロトカ

で 4 日間培養した。その結果、フタル酸以外にオルシノール、カテコール、*p*-オキシ安息香酸、プロトカテキン酸およびシクロヘキササンに生育したが、その他の化合物には生育できなかった (Table 7)。No.3-31 株はかなり広く芳香族化合物を利用できる菌株であると考えられる。

つぎに、0.1% のフタル酸を唯一の炭素源として 30°C で 16 時間 No.3-31 を培養し、遠心分離 (17,000 × *g*, 5 分) して得られた菌体の基質の利用性について検討した。その結果、このフタル酸生育菌は、イソおよびテレーフタル酸を利用できなかった。フタル酸のカルボキシル基の代わりに水酸基が置換されたカテコールは、フタル酸に対する活性を 100% とすると 2.5% 利用され、またその 4 位の炭素に塩素あるいはメチル基が置換された化合物をそれぞれ 3.6 および 5.5% 利用した。しかし、プロトカテキン酸、*p*-オキシ安息香酸およびシクロヘキササンは利用できなかった (Table 8)。プロトカテキン酸が利用されないことは RIBBONS と EVANS<sup>3)</sup> および HARADA と KOIWA<sup>4)</sup> がそれぞれ提示しているプロトカテキン酸を経る分解経路とは異なった経路で本菌株はフタル酸を代謝していると考えられる。

### 要 約

集積培養法によって土壌からフタル酸、イソおよびテレーフタル酸を唯一の炭素源として生育する 14 株が得られた。これらの菌株はフタル酸異性体の利用性の相違に基づき、7 群に分けられた。このうちで、フタル酸に最も良く生育した No.3-31 株を用いて実験を行なった。

フタル酸酸化活性の高い菌体を得るには、培地の

テキン酸を経る代謝系とは異なる経路で本菌株はフタル酸を代謝分解していると推測された。

### 引 用 文 献

- 1) 武田 寧：生体濃縮（早津彦哉編），p. 98～105，講談社，東京（1975）。
- 2) 倉根隆一郎，鈴木智雄，高原義昌：日本農芸化学会大会要旨集，p. 356（1976）。
- 3) RIBBONS, D. W. and EVANS, W. C. : *Biochem. J.* **76**, 310–318 (1960).
- 4) HARADA, T. and KOIWA, S. : *J. Ferment. Technol.*, **55**(2), 97–102 (1977).
- 5) COWAN, S.T. and STEEL, K. J. : *Manual of the Identification of Medical Bacteria*. Cambridge University Press, London (1967).
- 6) BUCHANAN, R. E. and GIBBONS, N.E. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore (1974).
- 7) 野崎光洋：酸素添加酵素（早石 修，野崎光洋編），p. 49～68，東京大学出版会，東京（1973）。

### SUMMARY

Fourteen strains capable of growing on phthalic acid, iso- and/or tere- phthalic acids as a sole carbon source respectively, were isolated from soil with enrichment culture method. Strain No. 3–31 with an ability to grow on phthalic acid abundantly was selected for further experiments. Ammonium nitrate and ferrous sulfate enhanced the production of cells with high phthalic acid oxidizing activity. Enzymes to metabolise phthalic acid in this strain was inducible. It was required to add 0.05 % phthalic acid before harvest to obtain the large amount of cells with high activity to oxidize phthalic acid. Since cells grown on phthalic acid could not oxidize protocatechuic acid, a new pathway to metabolise phthalic acid was estimated.