

Pseudomonas putida R1によるレゾルシンの分解

太田欽幸・小岩井健司

広島大学水産学部食品工業化学科
1978年10月20日 受理

Degradation of Resorcinol by *Pseudomonas putida* R1

Yoshiyuki OHTA and Kenji KOIWA

Department of Food Chemistry and Technology, Faculty of Fisheries and Animal Husbandry,
Hiroshima University, Fukuyama 720.

(Figs. 1-2; Tables 1-6)

フェノール化合物の微生物による分解については数多くの研究がある¹⁾が、その中でレゾルシニリックな化合物の微生物分解については数少ない。われわれは、オルシンおよびレゾルシンの微生物分解について研究を進めてきた。オルシンを唯一の炭素源として生育するが、レゾルシンを分解できない *Pseudomonas putida* O1のオルシンの分解代謝²⁾、さらにオルシンおよびレゾルシンの両方をそれぞれ唯一の炭素源として生育する *Ps. putida* ORC のオルシンおよびレゾルシンの代謝経路を明らかにした。³⁾ 本報では、レゾルシンを唯一の炭素源として生育する微生物を分離し、その菌の性質およびレゾルシン酸化活性 (ROA) を高める培養条件、ついでレゾルシンの分解代謝系を誘導する方法について検討しその結果を得たので報告する。

実験方法

供試菌 レゾルシン分解菌は福山市内の土壌から分離した。

試薬 レゾルシンおよびその他の試薬は市販の一般品を使用した。

培地および培養 レゾルシン分解菌の分離と培養条件の検討に用いた培地組成は、炭素源としてレゾルシンを用いた以外は前報⁴⁾に準じた。殺菌はいずれの場合も 120°C、15分間で行った。ただし、レゾルシンと無機塩類とはそれぞれ別途に殺菌し、冷却後レゾルシンを 0.1%濃度になるように無機塩類培地に加えた。レゾルシン分解菌の分離検索には 20 ml 容の試験管に 7 ml の培地を入れ試験管振とう機 (240 rpm, 高崎製) を、培養条件の検討には 500 ml 容の肩付振とうフラスコに 100 ml の培地を入れ往復振とう機 (120 rpm, 高崎製) をそれぞれ用いて 30°C で行った。

レゾルシン分解菌の分離と保存 レゾルシン分解菌の分離は集積培養法により行い、分離された菌株は斜面培地に 30°C、2日間培養後、5~6°C に保存した。

分離菌の固定 菌学的性質の検討は Manual for the Identification of Medical Bacteria⁵⁾に記載されている方法に拠り、同定は Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (第8版)⁶⁾に従って行った。

レゾルシン酸化活性の測定 基質として 40 mM レゾルシンを用いた以外は前報⁴⁾に準じて行った。

各種分析 生育度は培養液の660nm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。レゾルシンの濃度と272nmにおける吸光度との間に比例関係があったので、272nmにおける吸光度を測定してレゾルシンの定量を行った。

実験結果および考察

レゾルシン分解菌の分離 福山市内の田畑および山野から採取した200種類の土壌をそれぞれ生理食塩水に懸濁し20分間放置後、その上清液の1滴をパスツールピペットで0.1%のレゾルシンを唯一の炭素源とする無機塩類培地7mlを入れた試験管に採り、これを試験管振とう機で30°C、4日間培養した。その後、生育の良好な培養液を1白金耳採り、上記と同様の培地の平板に塗抹し30°C、3日間培養した。その後、生育の良好な集落を釣菌し、さらに平板培地に塗抹し同様に培養した。この操作を3回くり返して、レゾルシン分解菌を分離した。その結果、細菌5株が得られ、その内で最も生育の旺盛なNo.138株を選択し以下の実験に供した。

No.138株の菌学的性質 本菌株はグラム陰性の0.8~1.1×2.0~2.5μmの大きさの好気性の桿菌で、運動性があり、カタラーゼおよびオキシダーゼ反応は共に陽性で、糖を酸化的に分解し、ガスを産生しない性質から *Pseudomonas* 属の細菌と判別された。さらに、蛍光のある色素を産生し、ゼラチン液化力が無く、30°Cでは良く生育するが、41°Cでは生育できなく、Table 1 に示すような基質の利用性から、*Ps. putida*

Table 1. Characteristic description of strain No. 138

1. Morphological characters:
Shape and size: cells occurring in single, straight rods, having 0.8-1.1 x 2.0-2.5μm, motile.
2. Cultural characters:
Nutrient agar colony: 1.5-2.1 mm in a diameter, convex, circular smooth, entire, fluorescent, opaque.
Nutrient agar slant: growth abundant, opaque.
Nutrient broth: turbid with sediment.
3. Physiological characters:
Gram stain: negative.
Strictly aerobic.
Fluorescent pigments: positive.
Oxidase reaction: positive.
Catalase reaction: positive.
O-F test: Oxidative.
Hydrolysis of gelatin and starch: negative.
4. Assimilation of substrates:
Glucose, 2-Ketogluconate, L-Valine, β-Alanine, Arginine, Resorcinol.
5. Growth temperature:
Good growth at 30°C, no growth at 41°C.
6. pH value for growth.
Good growth at pH 6.8.

であると同定される。また、レゾルシンを唯一の炭素源として生育できる性質からこの菌株を *Ps. putida* R1 と命名した。本菌株は *Ps. putida* O1²⁾ および *Ps. putida* ORC³⁾ とは異なりオルシンを分解できなかった。

培養条件の検討 No.138株のROAを高めるための培養条件を検討した。培地中に窒素元素として21.2mg/100mlに相当する各種窒素源をそれぞれ添加して、30°Cで24時間培養し、得られた菌体についてROAを

調べた。その結果、無機態の窒素源では硝酸アンモニウム生育菌体が最も高い ROA を有していた (Table 2)。また、酢酸アンモニウムおよびクエン酸アンモニウムに生育した菌体も高い ROA を持っていたが、こ

Table 2. Effect of nitrogen form on production of resorcinol oxidizing activity by *Pseudomonas putida* R1.

Mitrogen source (21.2 mg N/100 ml)	cell yield* (mg/ml)	Resorcinol oxidizing activity** O ₂ uptake (μl/mg of cells/hr)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.35	56
NH ₄ Cl	0.51	129
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.29	29
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.28	13
NH ₄ NO ₃	0.45	155
KNO ₃	0.41	110
NaNO ₃	0.41	92
(NH ₂) ₂ CO	0.37	0
CH ₃ COONH ₄	0.83	193
HCOONH ₄	0.53	71
(NH ₄) ₂ HC ₆ H ₅ O ₇	0.53	267

* Cell yield obtained after 24 hr-cultivation at 30°C in 500 ml-shaking flask containing 100 ml of mineral salt-medium with each indicated nitrogen source.

** Oxygen uptake was determined manometrically with a respirometer for 60 min. at 30°C, using cells grown on resorcinol for 24 hr. at 30°C.

これらの窒素源は窒素源と同時に炭素源としても利用されている可能性があったので以後使用しなかった。しかし、尿素生育菌体には ROA は全く見られず、この菌株は尿素を窒素源と同時に炭素源として利用し、レゾルシンを全く分解せず、その結果 ROA が無いものと考えられる。

一般に芳香族炭化水素の分解酵素系には鉄イオンが関与しているものが多いことが明らかにされている⁷⁾ので培地中の鉄イオン濃度による本菌体の生育およびその菌体の ROA への影響を検討した。その結果、菌体量は鉄イオンの添加の有無にかかわらず一定であり、しかも鉄イオン無添加の培地で生育した菌体は FeSO₄·7H₂O を 0.01 ~ 0.1 g/ℓ 添加した培地で生育したそれと同等の ROA を有していた (Table 3)。逆に

Table 3. Effect of iron ion concentration on production of resorcinol oxidizing activity by *Pseudomonas putida* R1.

Iron ion concentration (mg of FeSO ₄ 7H ₂ O/ml)	Resorcinol oxidizing activity * O ₂ uptake (μl/mg of cells/hr)
0	132
0.01	130
0.05	120
0.1	130
0.2	85
0.5	15

* Oxygen uptake was determined by the method given in Table 2.

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の添加量が 0.2 g/l の培地で生育した菌体の ROA は低かった。また、鉄イオン無添加培地で生育した菌体はクリーム色で遠心分離 ($17,000 \times g$, 5分) を行なうと沈殿性が悪く、また実験操作中に壊れやすかった。一方、鉄イオン添加培地で生育した菌体は淡黒褐色で沈殿性が良かった。それで、上述したように、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を $0.01 \sim 0.1 \text{ g/l}$ 添加しても無添加の場合と ROA は変らなかったの、以後の実験では分離用培地と同様に $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を 0.1 g/l 添加して培養した。

レゾルシン分解の経時的変化 0.1%のレゾルシンを唯一の炭素源として、鉄イオン添加と無添加培地で No. 138株を 30°C で振とう培養し、菌体の生育度、ROA、およびレゾルシンの消費の過程を調べた。その結果、鉄イオン添加培地では、菌体量は、培養6時間目頃から増加し始め、培養18時間で最高 (0.65 g/l) となり、それ以後減少した。菌体の ROA は培養12時間目の菌体が最も高く、その後減少し30時間目で最高時の20%まで減少した。また、レゾルシンは菌体の生育につれ消費され、培養18時間目で完全に無くなった

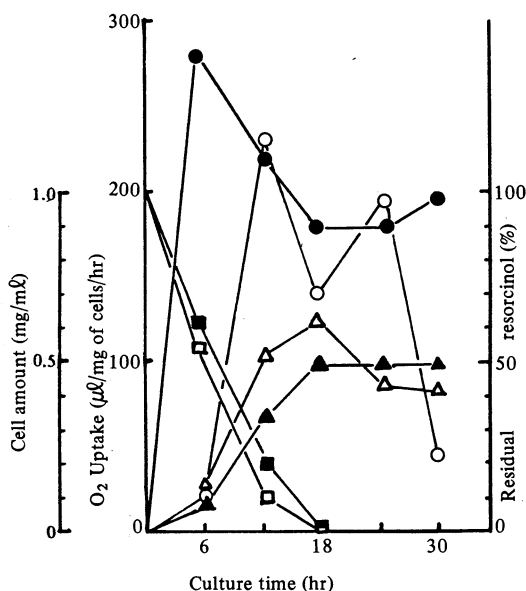


Fig. 1. Time course of growth and production of resorcinol oxidizing activity of *Pseudo monas putida* R1. The strain was cultivated in the mineral salt-medium with (open symbols) or without (closed symbols) addition of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1 mg/ml). Symbols: Δ , growth; \circ , resorcinol oxidizing activity; \square , residual resorcinol.

(Fig. 2)。一方、鉄イオン無添加の培地では菌体の生育は培養18時間目で最高 (0.5 g/l) となり、その後ほとんど減少しなかった。また、ROA は培養6時間目の菌体が $300 \text{ O}_2 \mu\text{l}/\text{mg}$ of cells/hr で最も高く、その後 $200 \text{ O}_2 \mu\text{l}/\text{mg}$ of cells/hr に減少した。しかし、この活性は培養30時間目でも保存されており、鉄イオン添加の場合のように急激に減少しなかった。また、レゾルシンは鉄イオン添加培地の場合と同様に培養18時間目で完全に消費された。培養時間にかかわらず高い ROA を有する菌体を得るには、鉄イオン無添加の培地で培養した方がよい。

レゾルシン酸化活性の誘導 No. 138株を 0.1%のレゾルシンおよび 0.5%のグルコースをそれぞれ唯一

の炭素源として、30°C、24時間培養後、それぞれの菌体について ROA を調べた。その結果、レゾルシン生育菌体は ROA は高かったが、グルコース生育菌体はレゾルシンを全く酸化することができなかった (Fig. 2)。この結果から、レゾルシン分解系は誘導的に生成されるものと考えられる。

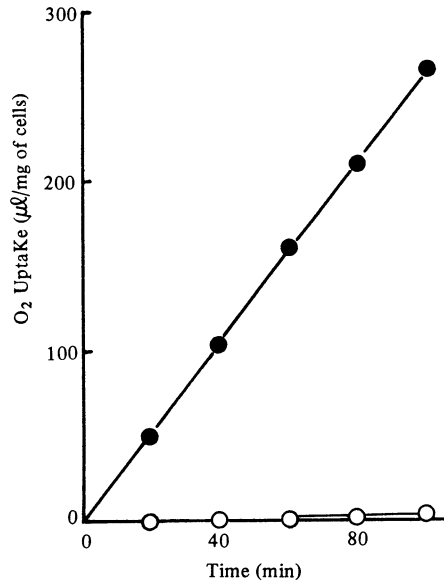


Fig. 2. Induction of resorcinol oxidizing activity of *Pseudomonas putida* R1. Cells grown for 24 hr, at 30°C, in mineral salt-medium containing 0.1% of resorcinol or 0.5% of glucose as a sole carbon source. Symbols: ●, cells grown on resorcinol; ○, cells grown on glucose.

前述したように、鉄イオン無添加培地で生育した菌体の ROA は培地中のレゾルシンが消費され尽し、培養時間が経過しても減少しなかった。しかし、この菌体は取扱い操作中に壊れやすいので、鉄イオン添加培地で生育し、かつ ROA の高い菌体を得る目的で、前報⁴⁾ でフタル酸利用菌が集菌前に少量のフタル酸を添加し、その後集菌すると高いフタル酸酸化活性のある菌体を得られたという結果と、レゾルシン分解酵素系は誘導的に生成されるという前項の結果とから、培養 23.5 時間目に 0.05 % のレゾルシンを加え、その後 0.5 時間後に集菌しその菌体の ROA を検討した。その結果、集菌前にレゾルシンを添加して得た菌体の重量は無添加の場合と変らなかったが、ROA は再添加して得た菌体の方が無添加で得た菌体より約 3 倍高かった。次に、再添加の量を検討するためにレゾルシンの再添加量を培地当たり 0.01, 0.05, 0.1 および 0.2 % にして、添加 30 分後 (全培養時間 24 時間) に集菌し、その活性を検討した。その結果、0.2 % の添加で阻害的となった。結局、培地当たり 0.01 ~ 0.1 % 添加すれば、無添加の場合より 2 ~ 3 倍の ROA の高い菌体を得られた (Table 4)。この結果はフタル酸利用菌について得られたそれと良く一致した。ついで、再添加の時間を検討するために、培養時間 5, 11, 17, 18, および 29 時間目に培地当たり 0.05 % のレゾルシンを添加し、その 1 時間後に集菌し、得られた菌体について ROA を検討した。その結果、再添加することにより、全培養時間にわたりそれぞれの菌体の ROA は無添加で得られた菌体のそれよりも高められ、特に 24 時間目の ROA は再添加することにより、無添加の菌体のそれより 2.6 倍高くなった (Table 5)。培養 6 および 12 時間目で再添加してもその効果が低いのは培地中に未利用のレゾルシンが存在しているためであると考えられる。レゾルシンが完全に消費されてから 8 時間以内に再添加すればその添加効果は高くなるが、8 時間以上

Table 4. Enhancement of resorcinol oxidizing activity of *Pseudomonas putida* R1 by feeding resorcinol before harvest of cells.

Feeding amount of resorcinol (mg/ml)	Resorcinol oxidizing activity * O ₂ uptake (μl/mg of cells/hr)
0	75
0.01	190
0.02	210
0.05	200
0.1	198
0.2	156

Indicated amounts of resorcinol were added 30 min before harvest of cells.

* Oxygen uptake was determined by the method given in Table 2.

Table 5. Feeding time of resorcinol before harvest of cells of *Pseudomonas putida* R1.

Culture time (hr)	Resorcinol oxidizing activity * O ₂ uptake (μl/mg of cells/hr)		(a)/(b)
	fed (a)	not fed (b)	
6	176	230	1.3
12	134	220	1.7
18	94	206	2.2
24	68	173	2.6
30	44	84	1.9

Fifty mg of resorcinol per 100 ml was fed 30 min. before each indicated culture time.

* Oxygen uptake was determined with the method given in Table 2.

経ち、レゾルシンの代謝系がほとんど無くなっている時点では、その効果は少ない。しかし、さらに長時間培養すればレゾルシン代謝系はさらに再誘導されるものと考えられる。つぎに、レゾルシンの類似化合物であるオルシノール、*m*-クレゾール、カテコール、およびフルオログルシンを集菌前に培地当り 0.05% 添加し、その添加効果を検討したが ROA は再誘導されなかった。

洗浄菌体によるレゾルシン酸化活性の誘導 0.1% のレゾルシンを唯一の炭素源とする 100 ml の無機塩類培地で 30°C、24 時間培養後集菌し、生理食塩水で 2 回洗浄し、その菌体を 50 ml の 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) に懸濁した。そして、30°C で 2 時間飢餓培養を行った。その後、その菌体を遠心分離で集め、100 ml の 20 mM リン酸緩衝液に懸濁し、50 mg のレゾルシノールを添加して 2 次培養液を作製した。同様に洗浄飢餓菌体懸濁液に 50 mg のレゾルシンおよび 72 mg の NH₄NO₃ を入れた 2 次培養液、さらに同様に作製した菌体懸濁液 100 ml 当り 50 mg のレゾルシン、72 mg の NH₄NO₃ および 50 mg の MgSO₄・7H₂O を添加して 2 次培養液をそれぞれ作製した。この 3 種類の 2 次培養液に Na 138 株を接種して 30°C で 1 時間振とう培養後、それぞれの菌体について ROA を検討した。その結果、レゾルシンのみを入れた培地で 2 次培養をした菌体は単なる洗浄菌体より ROA は 1.6 倍増加した。さらにレゾルシンの他に NH₄NO₃ を添加すると ROA は 3 倍に増強されたが、菌体量は増加しなかった。つぎに、レゾルシン、NH₄NO₃ および MgSO₄・7H₂O を添加した 2 次培養培地で生育した菌体の ROA は 4 倍に増強され、菌体量も増加していた (Table 6)。このことは、レゾ

Table 6. Induction of resorcinol oxidizing activity in washed cells of *Pseudomonas putida* R1.

Additives (per 100 ml)	None	Resorcinol (50 mg)	Resorcinol (50 mg) NH ₄ NO ₃ (72 mg)	Resorcinol (30 mg) NH ₄ NO ₃ (72 mg) MgSO ₄ (50mg)
Relative cell yield	1.0	0.92	0.92	1.09
R.O.A. *	50	80	183	200

The cells grown on resorcinol in 100 ml of mineral salt-medium for 24 hr at 30°C were washed twice with 0.9 % saline solution and suspended in 100 ml of 20 mM phosphate buffer (pH 6.8). Then, indicated additives were added and the 2nd culture was on a reciprocal shaker for 1 hr at 30°C.

* Resorcinol oxidizing activity (O₂ uptake, μl/mg of cells/hr).

ルシンが存在すれば菌体内でその酵素が合成され、さらに窒素源が存在するとその合成は一層高められる。しかし、菌体の生成にはさらにMgSO₄が必要であった。

要 約

福山市内の土壌から集積培養法によってレゾルシンを唯一の炭素源として生育する細菌5株が分離された。その中でレゾルシンに最も良好に生育するNo.138株は*Pseudomonas putida*と同定された。

レゾルシン酸化活性の高い菌体は硝酸アンモニウムを窒素源とした時に得られた。本菌株のレゾルシン代謝系は誘導的であり、鉄イオン添加培地で生育した菌体は培地中のレゾルシンが消費されるとレゾルシン酸化活性は急激に減少した。しかし、鉄イオン無添加培地生育菌体はレゾルシン消費後でもその活性は保持されたが、その菌体は壊れやすかった。鉄イオン存在下でレゾルシン酸化活性の高い安定した菌体は、集菌30分前に0.05%程度のレゾルシンを再添加して集菌することにより得られた。本菌株の洗浄菌体のレゾルシン代謝系はレゾルシンと窒素源存在下で誘導された。

引 用 文 献

- 1) 早石 修・野崎光洋・山本尚三：酸素添加酵素（早石 修・野崎光洋編），pp. 29-35，東京大学出版会，東京（1973）。
- 2) OHTA, Y., HIGGING, I. J. and RIBBONS, D. W.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 3814-3825 (1975).
- 3) OHTA, Y. and RIBBONS, D. W.: *Eur. J. Biochem.*, **61**, 259-269 (1976).
- 4) 太田欽幸・松下義孝：広大水畜産学部紀要，**17**, 63-70 (1978).
- 5) COWAN, S. T. and STEEL, K. J.: *Manual of the Identification of Medical Bacteria*. Cambridge Univ. Press, London (1967).
- 6) BUCHANAN, R. E. and GIBBONS, N. E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1974).
- 7) NOZAKI, M.: *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation* (HAYAISHI, O. ed.) pp. 135-162, Academic Press, New York (1974).

SUMMARY

Five bacterial strains capable of growing at the expense of resorcinol as a sole carbon source were isolated from soil by means of the enrichment culture method. Strain No. 138 with an ability to grow most abundantly on resorcinol was tentatively identified as *Pseudomonas putida* R1. Ammonium nitrate enhanced the production of cells with high resorcinol oxidizing activity. This activity did not decrease in the medium without addition of ferrous ion, even when the resorcinol was consumed completely. Enzymes to metabolise resorcinol in the strain were inducible. It was necessary to add 0.01 – 0.05% resorcinol before harvest in order to obtain a large amount of cells with high activity sufficient to oxidize the resorcinol. The resorcinol oxidizing system in the washed cells of the strain was induced in the presence of resorcinol and ammonium nitrate.

(Received October 20, 1978)