

# 微生物によるフタル酸, イソフタル酸及び テレフタル酸の利用

小 岩 成 次  
五十嵐 辰 夫

## Utilization of Phthalic, Isophthalic, and Terephthalic Acids by Soil Bacteria

Seizi KOIWA  
Tatsuo IGARASHI

Seven strains of soil bacteria have been isolated and identified, which are able to utilize phthalate, isophthalate, or terephthalate as the sole source of carbon. *Alcaligenes* P3 grew well on phthalate, terephthalate, and *m*- or *p*-hydroxybenzoates. *Alcaligenes* P12 and *Corynebacterium* P49 grew on phthalate and *p*-hydroxybenzoate; the former organism was also able to grow on benzoate and *m*-hydroxybenzoate. *Arthrobacter* IP3 and TP2 grew well on isophthalate, terephthalate, and *p*-hydroxybenzoate; gentisic acid was also a substrate for the latter organism. *Corynebacterium* IP4 grew on phthalate, isophthalate, and *p*-hydroxybenzoate; the principal metabolites of phthalate identified were 3-hydroxyphthalic acid and protocatechuic acid. *Corynebacterium* IP5 grew well on isophthalate, but showed poor growth on *m*- and *p*-hydroxybenzoates. A new pathway for the metabolism of phthalic acid has been proposed.

フタル酸及びジメチルフタル酸が *Gibberella fujikuroi* により生産されることが知られており<sup>1)</sup>, 又三好, 原田らは最近, *Fusarium merisomoides* var. *actilereum* B11 が2-ブチン-1, 4-ジオールからジメチルフタル酸及びフタル酸を生成することを見出した<sup>2), 3), 4)</sup>. しかしながらフタル酸の異性体である, イソフタル酸やテレフタル酸が微生物によって生産されるという報告は, まだなされていない。

Ribbons 等<sup>5)</sup>は, フタル酸が *Pseudomonas* 属の微生物によって, 4, 5-ジヒドロキシフタル酸, プロトカテキユ酸を経て代謝されていくことを報告しているが, イソフタル酸や, テレフタル酸に対する微生物の作用については, まだ報告された例はない。従って, ここでは, フタル酸, イソフタル酸, あるいは, テレフタル酸を唯一の炭素源として生育する菌を分離し, これら分離した菌株による二塩基性酸ベンゼン化合物及び他の芳香族化合物の利用を調べる一方, 分離した菌株によるフタル酸からの生産物の同定を行った。

### 1. 実験方法

#### [1] 使用菌株

菌は, 集積培養法により分離した。分離用培地は, 水 100 ml 中に  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.15 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  NaCl それぞれ 1 mg と, 炭素源として, フタル酸, イソフタル酸あるいは, テレフタル酸 2 g を含む培地を pH 7.0 に調製して用いた。

#### [2] 生育培地

水 100 ml に分離用培地と同じ組成の無機塩に,  $\text{CaCl}_2$  1 mg,  $\text{ZnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  7 mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  5 mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2 mg,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1 mg, を加え, 炭素源を 0.25~1 g を含む培地を pH 7.0 に調製して用いた。

培養は, 5 ml の上記培地で, 前培養した種培養液を 95 ml の生育培地を含む, 500 ml 振とうフラスコに接種し, 4日間, 30°C で振とう培養した。

#### [3] 分析方法

##### (1) 生成菌体量の測定

培養液を10分間、8000 rpm で遠心分離し水洗後、アセトンで脱水し、減圧下、一夜乾燥し菌体重量を測定した。

### (2) 薄層クロマトグラフィー

Merk 社製の紫外線吸収剤を含む厚さ 0.1 mm のシリカゲルクロマトグラムを用い、検出は、紫外線ランプを用いて行った。展開溶媒は、*n*-ブタノール：酢酸：水 (4:1:1 v/v) を用いた。

### (3) ペーパークロマトグラフィー

東洋汙紙 No. 52 を用い下降法により行った。

展開溶媒は、(2)と同じものを用いた。

酸性化合物は、プロモクレゾールグリーン、フェノール性化合物は、 $\text{FeCl}_3\text{-K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  での呈色により、検出した。

### (4) 赤外線吸収スペクトル、紫外線吸収スペクトル及び、質量分析スペクトル

赤外線吸収スペクトルは、Japan Spectroscopic 社製、IR—S 型で KBr を用いて測定し、紫外線吸収スペクトルは、日立紫外線分光光度計 124 型を用い、質量スペクトルは、日立 RMV—6 型で、イオン化エネルギー 80 eV で測定した。

### (5) 試薬

全ての試薬は、入荷可能な最上級のものを用いた。

## 2. 実験と結果

### [1] バクテリアの分離

微生物 P3, P12, P49 株は、フタル酸を、IP3, IP4, IP5 株は、イソフタル酸を、TP2 株は、テレフタル酸をそれぞれ唯一の炭素源として含む培地から分離した。

これらの菌株についてバーjeeズマニアル<sup>6)</sup>により、その形態及び生理学的性質により同定を行った。

P49, IP4, IP5 株は、それぞれ胞子を作らず、鞭毛を持たず、グラムポジティブな非運動性の桿菌で大きさは、 $0.4\sim 0.5\times 0.6\sim 2.0\ \mu\text{m}$  であった。これら菌株は棒状であったり、V字型に分裂したりするのが見られた。栄養寒天培地でのコロニーの形状は、円形で凸円状で色は、黄白色である。静置液体培養では、菌環を作り、IP4 株は、粘質性の沈澱を P49, IP5 株は、緻密な沈澱を作る。リトマスミルクは、変化せず、硝酸塩は、P49 株によって還元されるが、IP4, IP5, は還元しない。インドールは、P49, IP4 株で生成し、IP5 株は生成しない。

これら菌株は、いずれもカタラーゼを生成するが、ゼラチンを液化することはできずグルコースからのガス及び酸の発生は見られず、かつ好氣的である。以上の知見から、これら菌株は、*Corynebacterium* 属に属するものと推定した。

P3, P12 株は、胞子を作らずグラムネガティブな大きさ  $0.4\sim 0.6\times 1.3\sim 3.3\ \mu\text{m}$  の桿菌であり鞭毛を持たず非運動的であり、色素を生成しない。栄養寒天培地上でのコロニーの形状、P3 株は円形で中心凸状、P12 株は凸円状で全縁である。静置液体培養では、菌環を作り P3 株は、にごり、P12 株は、緻密な沈澱を生じた。リトマスミルクは、変化せず、硝酸塩は、還元されない。インドールは P3 株で生成し両菌株ともカタラーゼを生成し好氣的でありゼラチンを液化しない。さらに、グルコースからのガスや酸の生成は見られない。以上によりこれら菌株は、*Alcaligeus* 属に属すると推定した。

IP3, TP2 株は胞子を作らず鞭毛を持たず非運動性で培養初期はネガグラムタイプで、培養後期はグラムポジティブであった。

栄養寒天培地でのコロニー IP3 株は、乱糸状クッション状で、波状であり、TP2 株は円形で凸円状全縁であった。静置液体培養では、TP2 株は、にごり、IP3 株は、わずかに沈澱を生じ、TP2 は緻密な沈澱を生じた。

リトマスミルクは変化せず、硝酸塩は還元されず、インドールも生成しなかった。これらは、カタラーゼを生成し、好氣的であった。

グルコースからは、酸もガスも生成せずセルロースも分解しなかった。以上の結果から、これら菌株は、*Arthrobacter* 属に属するものと推定した。

### [2] 生育実験

P3, P12, P49, IP3, IP4, IP5, TP2 の各菌株について唯一の炭素源としてフタル酸、イソフタル酸、テレフタル酸あるいは、その他の芳香族化合物を用い、その生育について、調べた。

Table 1 にフタル酸培地から分離した菌株についての結果を示した。P3, P49 株は、P12 株よりも良くフタル酸培地で生育する。

P3 株のみが、フタル酸と同じようにテレフタル酸を利用できるが、イソフタル酸はいずれの菌株によっても利用されない。又、P3 株はプロトカテュ酸、ゲンチジン酸を利用できる。安息香酸は、P12 株だけが利用でき、*m*-ヒドロキシ安息香酸は、P3, P12 株により利用されるが、サリチル酸は、どの菌株も利用できなかった。Table 2 には、イソフタル酸及び、テレフタル酸から分離した菌株についての結果を示した。

IP3 株は、テレフタル酸も良く利用しフタル酸は、IP4 株によってのみわずかに利用されている。TP2 株は、テレフタル酸と同じように、イソフタル酸でも良く生育する。

*p*-ヒドロキシ安息香酸は、全ての菌株で利用されるが、サリチル酸は利用されない。*m*-ヒドロキシ安息香酸

は、IP4 株以外の菌株で利用され、安息香酸は、IP5 株以外の菌株で利用され、ゲンチジン酸は、TP2 株によってのみ利用されることがわかる。

〔3〕 ペーパークロマトグラフィーによる生産物の検出

IP4, P3, IP3, TP2, IP3, TP2 株によるフタル酸、イソフタル酸、テレフタル酸培地からの生産物をペーパークロマトグラフィーで調べた結果を Table 3 に示した。IP4 株によるフタル酸からの生産物、Rf 値 0.78, 0.71 の A, B の化合物について分離同定を試みた。

Table 1 Utilization of carboxylic benzene and phenolic compounds by strains isolated from phthalate medium

Substrate (1%)	Dried cells formed (mg/100 ml)		
	P3	P12	P49
Phthalic acid	98	30	111
Isophthalic acid	0	0	0
Terephthalic acid	114	0	0
Benzoic acid	0	17**	0
Salicylic acid	0	0	0
m-Hydroxybenzoic acid	114	16**	0
p-Hydroxybenzoic acid	135	12	15**
2, 3-Dihydroxybenzoic acid	0	0	0
2, 4-Dihydroxybenzoic acid	0	0	0
Protocatechuic acid	94*	0	0
Gentisic acid	81**	0	0
Di-n-Butylphthalate	0	3	0
Pyrocatechol	0	0	0
Resorcinol	0	0	0
Hydroquinone	0	0	0

\*The concentration used was 0.5%

\*\*The concentration used was 0.25%

〔4〕 化合物 A, B の分離

化合物 A の分離は、次のようにして行なった。

IP4 株をフタル酸 10 g を含む 1 l の培地で好氣的に 20 時間培養した。培養後、遠心分離によって菌体を除き硫酸で培養液を pH 2 にした後、エバポレーターにより 1/10 迄濃縮した。濃縮液をエーテルで抽出し抽出液を乾固した。

この乾固物を 3 ml のメタノールに溶解し、この溶液をシリカゲル薄層(厚さ 2 mm)に塗布し展開を行った。

生産物 A のスポットを 5 枚のプレートからスパチュラ

Table 2 Utilization of carboxylic benzene and phenolic compounds by strains isolated from isophthalate or terephthalate medium

Substrate (1%)	Dried cells formed (mg/100 ml)			
	IP3	IP4	IP5	TP2
Phthalic acid	0	16	0	0
Isophthalic acid	164	181	75	161
Terephthalic acid	212	0	0	227
Benzoic acid	79**	84**	0	85**
Salicylic acid	0	0	0	0
m-Hydroxybenzoic acid	69**	0	8**	82**
p-Hydroxybenzoic acid	210	186	31*	214
2, 3-Dihydroxybenzoic acid	0	0	0	0
2, 4-Dihydroxybenzoic acid	0	0	0	0
Protocatechuic acid	0	0	0	0
Gentisic acid	0	0	0	52**
Di-n-Butylphthalate	0	0	0	0
Pyrocatechol	0	0	0	0
Resorcinol	0	0	0	0
Hydroquinone	0	0	0	0

\*The concentration used was 0.5%

\*\*The concentration used was 0.25%

Table 3 Paper chromatography of the products

Strain	Substrate	Rf value of products	
		Bromocresol-green	FeCl <sub>3</sub> -K <sub>3</sub> Fe (CN) <sub>6</sub>
IP4	Phthalic acid	0.67 <sup>W</sup> , 0.71, 0.78 <sup>S</sup>	0.39 <sup>W</sup> , 0.71, 0.78 <sup>S</sup> , 0.88
P3	Terephthalic acid	0.41, 0.75	0.40, 0.80 <sup>W</sup>
IP3		—	0.71, 0.79 <sup>W</sup>
TP2		—	0.71
IP3	Isophthalic acid	0.70, 0.78 <sup>W</sup> , 0.81	0.31 <sup>W</sup> , 0.41 <sup>W</sup> , 0.59, 0.78
TP2		0.69 <sup>W</sup> , 0.78	0.62, 0.78 <sup>W</sup>

S ; strong, W ; weak

で、かき取った。これをエーテルで抽出し乾固して粗結晶を得た後、熱水で再結晶し化合物A約100 mgを得た。

化合物Bの分離は、次のようにして行った。

IP4株にフタル酸70 gを含む培地7 lを好氣的に10 lジャーファメンターで、20時間培養した。菌体の除去やエーテル抽出などは、化合物Aの場合と同様に行った。化合物Bの水溶液10 mlを、Dowex 1-X8(Cl型)3×30 cmのカラムにかけ、0.5M NaCl溶液で溶出した。化合物Bを含む220~340 mlのフラクションを取り再び酸性下エーテル抽出した後、乾固し、粗結晶を得た。これをメタノール-クロロホルム(1:19)で再結晶し約10 mgの化合物Bを得た。

化合物A, Bは、プロモクレゾールグリーン及びFeCl<sub>3</sub>-K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>で呈色しペーパークロマトグラフィーでのR<sub>f</sub>値は、0.78(A), 0.71(B), 薄層クロマトグラフィーでのR<sub>f</sub>値は、0.71(A), 0.52(B)であり、化合物Bは、紫外線指示薬で呈色した。

#### [5] 化合物Aの同定

化合物Aの元素分析値は、実験値C, 53.27%, H3.16%で分子式C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>(理論値C52.7%, H3.30%)と一致する。

又、融点は、195~200°C、紫外線吸収は210, 260, 311 nmで最大吸収を示し、これらの値は、いずれもプロトカテキ酸標準試薬と一致する。さらにFig. 1に示したように、赤外線吸収スペクトルもやはり標準試薬と一致した。これらの結果から化合物Aは、プロトカテキ酸と同定した。

#### [6] 化合物Bの同定

化合物Bの元素分析値は、C53.27%, H3.16%で分子式C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>(理論値C52.7%, H3.30%)と一致する。融点は163~165°Cで、210 nm, 260 nm, 311 nmで紫外線最大吸収を示す。Fig. 2に赤外線吸収スペクトルを示した。

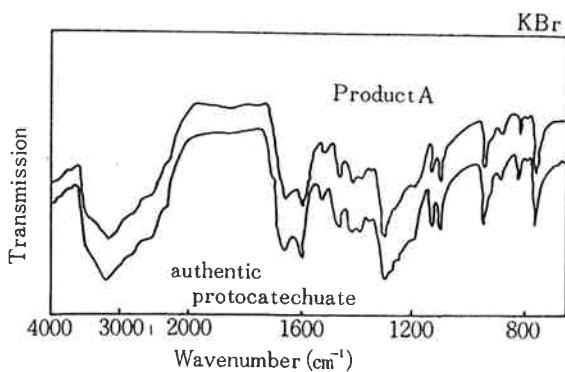


Fig. 1 Infrared absorption spectrum of product A

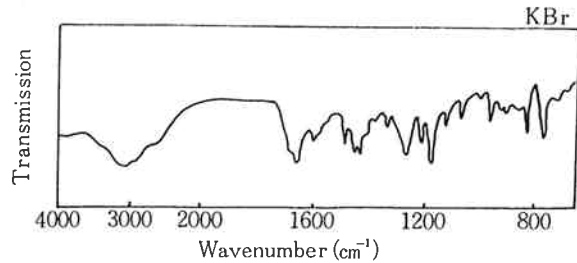


Fig. 2 Infrared absorption spectrum of product B

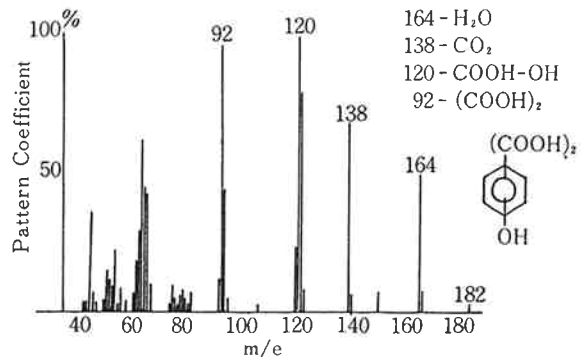


Fig. 3 Mass spectrum of product B

1680 cm<sup>-1</sup>の吸収はカルボキシル基の存在を、770 cm<sup>-1</sup>と830 cm<sup>-1</sup>の吸収はベンゼン環の存在を示唆している。

Fig. 3に質量スペクトルを示した。親イオンピークは、m/e 182でこの値は、分子式C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>と一致した。又、各フラグメントイオンは、m/e 164は脱水したものの(M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O), m/e 138は脱炭酸したものの(M<sup>+</sup>-CO<sub>2</sub>), m/e 120はカルボキシル基とヒドロキシル基がはずれたものの(M<sup>+</sup>-COOH-OH), m/e 92は、二つのカルボキシル基がはずれたものの(M<sup>+</sup>-(COOH)<sub>2</sub>)でありこれらのことから化合物Bはモノヒドロキシジカルボキシンベンゼン化合物であることがわかる。

この化合物の融点は4-ヒドロキシフタル酸(204°C)とは異なり、3-ヒドロキシフタル酸と一致している<sup>7)</sup>。

これらの結果から化合物Bは3-ヒドロキシフタル酸と同定した。

### 3. 考 察

この研究では、IP4株がフタル酸培地で培養した時3-ヒドロキシフタル酸とプロトカテキ酸を蓄積することを明らかにした。イソフタル酸では、良く生育しフタル酸では、わずかししか生育しない(Table 2)にもかかわらず上記のような化合物をフタル酸培地から蓄積することは興味ある現象である。おそらく、この菌株はフタル酸を炭酸ガスと水とに分解する活性が弱いと考えられる。

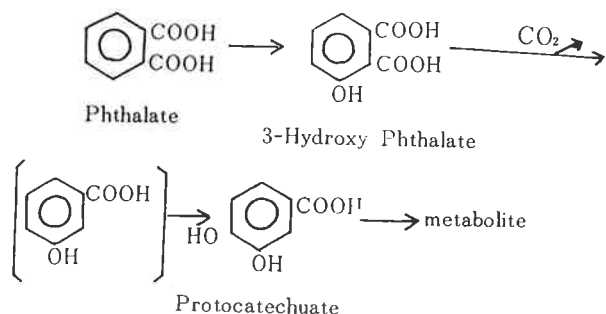


Fig. 4 Proposed metabolic pathway of phthalic acid by *Corynebacterium* IP4

Fig. 4に実験結果から得られたフタル酸の代謝系について示した。しかしながらこの菌株はプロトカテキユ酸の濃度が、0.25%以上では、プロトカテキユ酸を利用できず0.1%で、わずかに生育を示すのみである。一方、IP4株をイソフタル酸あるいは、*p*-ヒドロキシ安息香酸で生育させた菌体を用いて、プロトカテキユ酸で生育試験を行ったところ、0.25%の濃度でも生育した。これら理由について明らかではない。

Ribbons等<sup>5)</sup>は、*Pseudomonas*に属する一菌株がフタル酸培地からプロトカテキユ酸を蓄積することを見出し菌体抽出液がフタル酸、4, 5-ジヒドロキシフタル酸、プロトカテキユ酸、*cis-cis*- $\beta$ カルボキシムコン酸、3-オキシアジピン酸に変化させることを報告し、4, 5-ジヒドロキシフタル酸と菌体抽出液を好氣的条件で反応させた時、等モルの炭酸ガスとプロトカテキユ酸が生成することからフタル酸は、4, 5-ジヒドロキシフタル酸を経て、プロトカテキユ酸に変化することを報告している。

IP4株は、Ribbons等の菌株とは異なった経路でフタル酸を代謝していくものと考えられるが、酵素的な研究を行うことにより明確なるものと考えられる。又、グル

コース培地で分離した菌株すべてについて、フタル酸、イソフタル酸あるいは、テレフタル酸のCo-oxidationについて調べたが、いずれの場合にも、プロモクレゾールグリーンや、 $FeCl_3-K_3Fe(CN)_6$ で、発色するような化合物は検出されなかった。

本研究は、大阪大学産業科学研究所、原田研究室で、原田教授の指導のもとに行ったものであり、ここに終始御指導いただきました原田篤也教授に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

[本論文は、Utilization of Phthalic Acid and Iso-and Terephthalic Acids by Soil Bacteria.

J. Ferment. Technol., 55, 97 (1977) に発表したものである。]

- 1) Gross, B. E., Galt, R. H. B., Hanson, J. R., Curtis, P. J.; *J. Chem. Soc.*, 2937 (1963).
- 2) Miyoshi, T., Harada, T.; *Biochem. Biophys. Acta*, 222, 684 (1970).
- 3) Miyoshi, T., Sato, H., Harada, T.; *Agr. Biol. Chem.*, 38, 1935 (1974).
- 4) Tubaki, K., Booth, C., Harada, T.; *Transactions of the British Mycological Society*, 66, 355 (1976).
- 5) Ribbons, D. W., Evans, W. C.; *Biochem. J.*, 83, 482 (1962).
- 6) Buchanan, R. E., N. E.; *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore (1974).
- 7) *Beilstein Handbuch Der Organischen Chemie* 4 Auflage, Band X, S, 2189-2190.