

〔醸酵工学 第66巻 第1号 25-30, 1988〕

シクロヘキシル酢酸資化性菌の分離と培養条件

吉迫 文紀^{*1}・中鉢 光雄¹・西村 篤夫¹・上野 照雄²大阪府立放射線中央研究所¹ 鳥取大学農学部²

Isolation and Cultural Conditions of Cyclohexylacetic Acid Using Bacterium. FUMIKI YOSHIZAKO,^{*1} MITSUO CHUBACHI,¹ ATSUO NISHIMURA¹ and TERUO UENO² (*Radiation Center of Osaka Prefecture, Shinke-cho, Sakai, Osaka 593, Japan*¹; *Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tottori, Tottori 680, Japan*²)
Hakkokogaku 66: 25-30. 1988.

A bacterium, RCO-4M, that can grow on cyclohexylacetic acid as the sole carbon source was isolated from soil by enrichment cultures. The isolate was identified as a species of the genus *Micrococcus* by taxonomic studies.

The optimal culture conditions of this organism were as follows: the growth medium consisted of cyclohexylacetic acid 0.15%, KNO₃ 0.25%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.002%, FeCl₃·6H₂O 0.005%, CaCl₂·2H₂O 0.002%, and yeast extract 0.01%, pH 8.0. The culture was incubated at 30°C for 3-7 days on a shaker.

Strain RCO-4M grew on a number of types of alicyclic compounds. Among the alicyclic carboxylic acids tested, cyclohexylacetic acid and cyclohexylbutyric acid were the best substrates. The organism grew on cyclohexylpropionic acid, and grew a little on both cyclohexanecarboxylic acid and cyclopentanecarboxylic acid.

This isolate also grew on cyclohexanone and cyclohexanol.

Strain RCO-4M grew well on all of the *n*-alkylcyclohexanes having 6-14 carbon atoms in the *n*-alkyl group, after a long lag time.

微生物にとって難分解物質の1つであるシクロヘキシル-*n*-アルカンは、側鎖がβ酸化を受けて代謝される。その際、側鎖の炭素数が奇数のものはシクロヘキサノカルボン酸に、側鎖の炭素数が偶数の場合は、シクロヘキシル酢酸(C₆AA)になり代謝される。¹⁾しかしながら、側鎖の炭素数が偶数の場合、単独菌による完全分解の報告はなく、培地中にC₆AAなどを蓄積するため、混合培養によってはじめて環開裂を受けアジピン酸へと代謝される。²⁻³⁾そこで、著者らは、側鎖に偶数の炭素数をもつシクロヘキシル-*n*-アルカンの単独菌による完全分解の可能性や代謝中間体の有効利用をはかる観点から、土壌よりC₆AA資化性菌の分離を試み、得られた菌株について菌学的性質、培養条件および各種基質の資化性等を検討したのでそれらの結果を報告する。

実験方法

分離用培地 C₆AA資化性菌を選択培養するため、NH₄NO₃ 1.0 g, KH₂PO₄ 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.02 g, FeCl₃·6H₂O 0.05 g, CaCl₂·2H₂O 0.02 g, 酵母エキス 0.1 g を 1 l の蒸留水に溶解した無機塩培地にC₆AAを1 g添加し、そのpHを7.0に調整したものを分離用培地として用いた。また分離用培地に寒天2%を添加した固体培地も使用した。

シクロヘキシル酢酸資化性菌の分離 試験管(22 mm×200 mm)に分離用培地7 ml および供試土壌0.1 gを入れ、30°C, 72時間振盪培養を行い菌の集殖を行った。分離菌の純化は常法どおり平板、振盪培養を繰り返して行った。分離菌は固体培地に移植し、5°Cで保存した。

分離菌の同定 分離菌の菌学的性質の検討は、Cowan と Steel の Manual for the Identification of

* 連絡先, Correspondence author

Medical Bacteria (1970)⁴⁾ 記載の方法に準じて行い、同定は、同書および Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986)⁵⁾ によった。

DNA の分離精製と塩基組成の測定 集菌した対数増殖期の湿菌体 (約 3 g) を 20 ml の 15% ショ糖-0.02 MEDTA-0.03 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、リゾチームを 600 µg/ml になるように加え、37°C で60分間保存し、スフェロプラストをつくり、以下、Marmur⁶⁾ の方法に準じて DNA を分離精製した。DNA の塩基組成は Tm 法⁷⁾ により測定した。

生育度の測定 生育度は、Coleman Junior Spectrophotometer Model 6 D により 550 nm における濁度 (OD₅₅₀) で示した。

培養方法 分離した C₆AA 資化性菌の培養条件の検討に当たって、500 ml 容肩付き培養フラスコに分離用培地を 80 ml ずつ分注したものに定常期の菌懸濁液を 1 ml ずつ接種し、必要に応じて培地組成、pH、温度等の諸条件を適宜変化させ、30°C、72時間振盪培養 (130 rpm, 7 cm) を行った。各種基質の資化性を検討するにあたり、生育培地 (Table 1) の C₆AA をシクロヘキシルプロピオン酸、シクロヘキシル酪酸、シクロヘキシルカルボン酸、シクロヘキサノールおよびシクロヘキサノンにそれぞれ置き換え (0.15%)、高圧蒸気滅菌 (121°C, 10分) を行い培地を調製した。他の基質の場合は、C₆AA を除いた生育培地を高圧滅菌後、無菌的に0.15%濃度になるよう添加し、培地を調製した。

シクロヘキシル酢酸の定量 培地中に残存する C₆AA は、塩酸性にした培地を等量のエチルエーテルで抽出し、Blakley の方法⁸⁾ に準じて TMS 化した後、FID ガスクロマトグラフ (日立 023型) で定量した。ガスクロマトグラフの条件は、ステンレススチールカラム (内径 3 mm, 長さ 2 m), 充填剤 OV-17 0.5% [Chromosorb G (AW-DMCS)] であり、カラム温度 107°C, インジェクション温度 105°C, N₂ 流量 30 ml/min, 内部標準物質としてシクロヘキシルプロピオン酸を用いた。

実験結果および考察

シクロヘキシル酢酸資化性菌の菌学的性質 各地の土壌 20点より C₆AA 資化性菌とし1株を得た。C₆AA を含む分離用固体培地上で、オレンジ色のコロニーを形成し、その形状は円形、表面隆起は突円状で

あり、周縁は全縁を呈した。本菌はグラム陽性の単一または対をなす球菌 (直径 0.5 µm) で運動性は認められなかった。さらに、好氣的に生育し、孢子形成はなく、カタラーゼ、ウレアーゼ活性は共に陽性であり、オキシダーゼ活性は陰性であったものの Benzidine 試験は陽性を示し、かつ、グルコースから酸およびガスの生成は認められず、硝酸塩の還元は陽性であった。また、FTO 寒天培地および 7.5% nutrient 寒天培地上で生育したが、Simons citrate 寒天培地上では生育は認められなかった。本菌の DNA の GC 含量を Tm 法により測定したところ、70% mole であった。また、25-30°C で良好な生育を示し、至適 pH は 7-12 であった。

これらの諸性質から、本菌は Bergey's Manual や Cowan と Steel の鑑別表によると、Micrococcaceae 科の Micrococcus 属に属するものと判断し、Micrococcus sp. RCO-4M と命名した。Fig. 1 に分離した菌の電子顕微鏡写真を示す。

シクロヘキシル酢酸資化性菌の培養条件

a) 基質濃度の影響 分離用培地の C₆AA の濃度を 0.05-0.25 % (w/v) の範囲で変化させた時の菌の生育度を比較した (Fig. 2)。C₆AA の濃度が0.15%までは生育度の増加が認められるが、0.15%を越えると急激な生育低下を示した。C₆AA の最適濃度を0.15%と

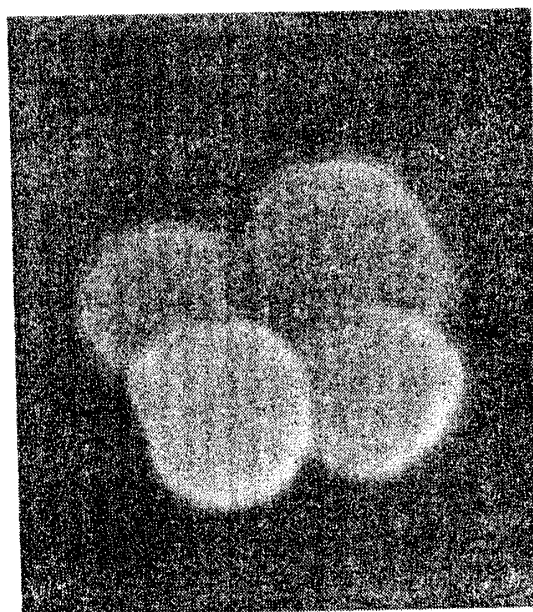


Fig. 1. Scanning electron micrograph of strain RCO-4M. Strain RCO-4M was grown on the growth medium for 3 days at 30°C (×31000). Bar denotes 0.97 µm.

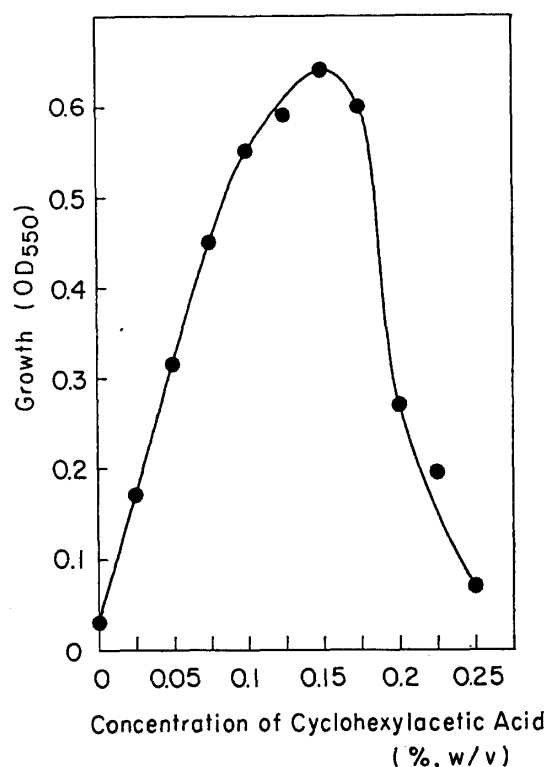


Fig. 2. Effects of cyclohexylacetic acid concentration on growth of cyclohexylacetic acid-using bacterium.

The bacterium was grown for 72 h at 30°C in the mineral salts medium supplemented with cyclohexylacetic acid at the concentration indicated.

した。

b) 窒素源の影響 分離用培地の硝酸アンモニウムを他の5種類の窒素源で置き換え、各々の濃度はNとして0.035%に統一し、菌の生育状況を比較した (Fig. 3). 尿素および硝酸カリウムは硝酸アンモニウムに匹

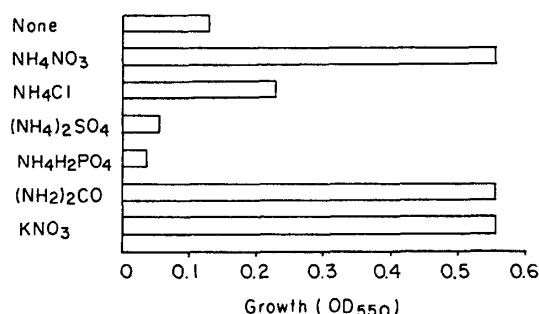


Fig. 3. Effects of various nitrogen sources on growth of cyclohexylacetic acid-using bacterium. The bacterium was grown for 72 h at 30°C in the mineral salts medium containing cyclohexylacetic acid (0.1%) and a nitrogen source (0.035 N%).

敵する生育を示した。しかし、アンモニウム塩型の窒素源では生育が悪く、硝酸アンモニウムは NO₃ が利用されているものと考えられる。尿素は加圧滅菌で分解する煩わしさから、硝酸カリウムを窒素源として選定した。そこで、硝酸カリウムの濃度を 1.3-15 g/l (0.018-0.21 N %) の範囲で変化させ、菌の生育におよぼす窒素濃度の影響について検討した。その結果、いずれの濃度においても 550 nm における OD による生育の差が認められなかったため窒素源として 0.25 g/l (0.035 N %) の硝酸カリウムを用いることとした。

c) 水素イオン濃度の影響 分離用培地の pH を 5-13 に調整し、生育度を検討したところ最適 pH は 7-12 と非常に広い範囲を示した (Fig. 4).

d) 温度の影響 培養の温度範囲を 20-37°C に設定し、菌の生育度を比較したところ、37°C ではほとんど生育は認められず、最適温度は 25-30°C であった (Fig. 5).

e) 最適培養条件の設定 以上の結果より、C₆AA 資化性菌の最適培養条件を決定した (Table 1). この条件下で、生育培地 80 ml を 500 ml 容肩付きフラスコ

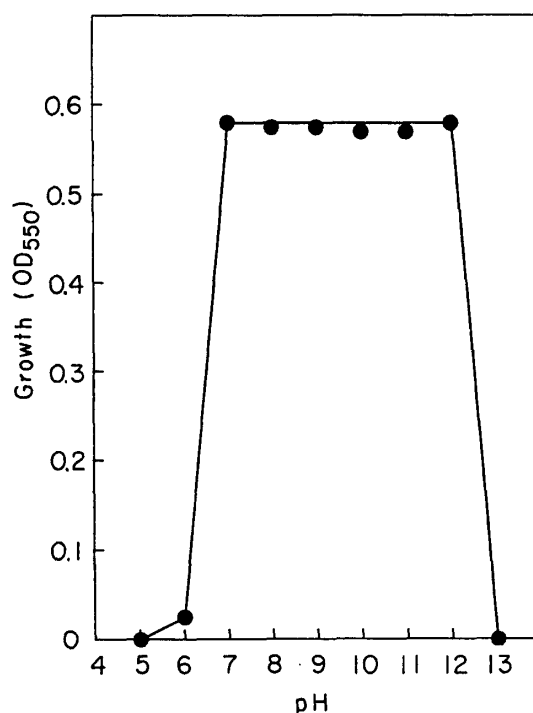


Fig. 4. Effects of pH on growth of cyclohexylacetic acid-using bacterium.

The bacterium was grown for 72 h at 30°C in the isolation medium.

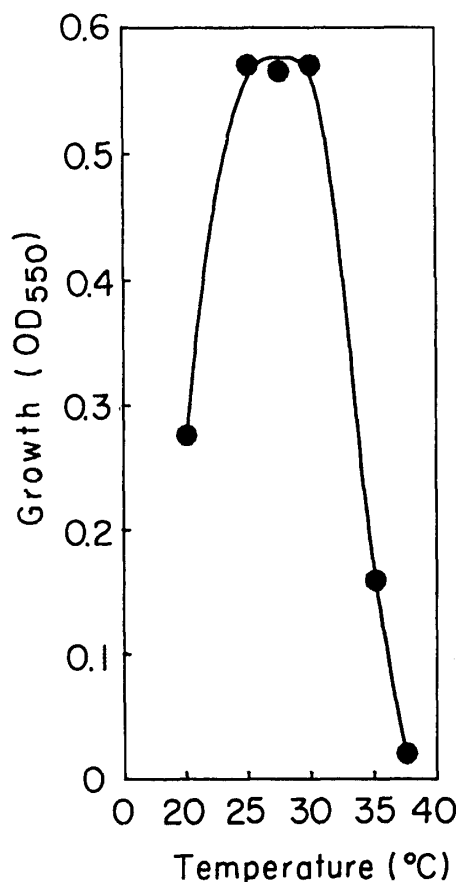


Fig. 5. Effects of temperature on growth of cyclohexylacetic acid-using bacterium.

The bacterium was grown for 72 h at 30°C in the isolation medium.

に分注し、72時間振盪培養を行った菌の生育の経時変化を Fig. 6 に示す。培養初期の C₆AA (0.12 g/80 ml) は約39時間後にはほぼ全量が消費され、比増殖度は $\mu_{\max}=0.15 \text{ h}^{-1}$ であった。

各種基質の資化性 Table 2 に示す各種脂環化合

Table 1. Growth medium.

Cyclohexylacetic acid	1.5 g
KNO ₃	2.53 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.05 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02 g
Yeast extract	0.1 g
Distilled water	1000 ml
pH	8.0
Temperature	30°C

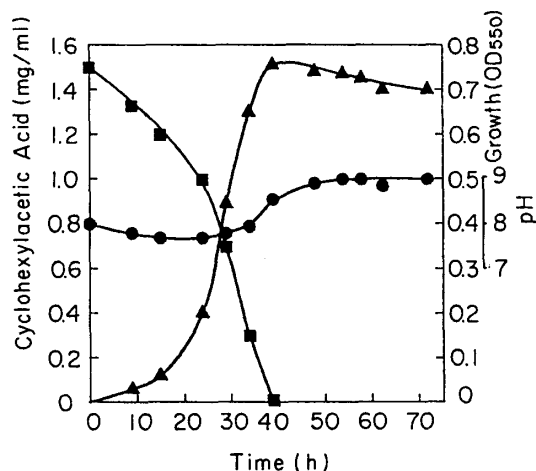


Fig. 6. Growth curve of cyclohexylacetic acid-using bacterium with cyclohexylacetic acid.

The growth was done under optimal culture conditions: 80 ml of the growth medium in a 500 ml flask, 30°C for 72 h with shaking.

—▲— Optical density at 550 nm.

—■— Concentration of cyclohexylacetic acid in the growth medium.

—●— pH of the growth medium.

物を唯一の炭素源とし生育培地にそれぞれ0.15%添加し、資化能を検討した。資化能は、全ての脂環化合物において認められたが、シクロヘキサンカルボン酸とシクロペンタンカルボン酸では生育は不良であった。最も良好な生育が認められたのは、*n*-デシルシクロヘキサンで、次いで C₆AA、シクロヘキサン酪酸であった。6-14個の炭素数を側鎖に持つシクロヘキサン類は、長い誘導期の後、高い生育を示した。また、C₆AA の代謝中間体と考えられるシクロヘキサノン⁹⁾には比較的良好な生育 (OD₅₅₀ 0.55) を示したものの、シクロヘキサノンの代謝中間体と考えられる ϵ -カプロラクトンやアジピン酸⁹⁻¹²⁾ の場合の生育度は、Table 2 に表示していないがどちらも0.02と非常に低く生育は認められなかった。しかし、C₆AA からの培養生成物を検索するため、培養ろ液を常法どおり2,4-ジニトロフェニルヒドラジン処理し、ベンゼン：ジオキサン：酢酸 (90：20：4)を用いた TLC を行ったところ、標準試料のシクロヘキサノンと同じ R_f 値 (0.58) を持つスポットが確認された。さらに、塩酸酸性にした C₆AA 培養ろ液をエーテル抽出し、エーテル層を N₂ 気流中で留去後、Metcalf¹³⁾ の方法によりメチル化し、標準試料のアジピン酸ジメチルエステルとの GC-MS 分析による比較を行った。親イオンピーク (*m/z* 174) は認

Table 2. Growth of cyclohexylacetic acid-using bacterium on alicyclic compounds.

Substrates (0.15%)	Growth at OD ₅₅₀		
	72 h	120 h	148 h
Cyclohexylacetic acid	0.71		
Cyclohexylpropionic acid	0.32		
Cyclohexylbutyric acid	0.68		
Cyclohexanecarboxylic acid	0.14		
Cyclopentanecarboxylic acid	0.08		
Cyclohexanol	0.31		
Cyclohexanone	0.55		
<i>n</i> -Hexylcyclohexane*		0.43	
<i>n</i> -Heptylcyclohexane*		0.43	
<i>n</i> -Octylcyclohexane*		0.61	
<i>n</i> -Nonylcyclohexane*		0.54	
<i>n</i> -Decylcyclohexane*		0.77	
<i>n</i> -Undecylcyclohexane*			0.51
<i>n</i> -Dodecylcyclohexane*			0.56
<i>n</i> -Tetradecylcyclohexane*			0.56

* After each culture, the medium was centrifuged and the pellet obtained was resuspended in 80 ml of distilled water. The growth was measured by the OD at 550 nm of a 5 or 7 day culture.

められず、ベースピークは m/z 59 であり、確認された主なピークとして m/z 143 (M-31) (28%), m/z 114 (M-31-29) (70%), $C_6H_7O_2$ を示す m/z 111 (40%) や $C_6H_9O_2$ を示す m/z 101 (38%) が確認できた。これら主なピークのマスマスペクトルと相対強度は標準のアジピン酸ジメチルエステルと良く一致していた。また、Blakley⁹⁾ の方法により TMS 化し GC-MS 分析を行った場合も同様な結果がえられた。このように C_6AA からアジピン酸の生成が確認されたことおよび偶数の炭素数を側鎖に持つシクロヘキサン類に良好な生育が認められたことは、単一菌による偶数の炭素数を側鎖に持つシクロヘキサン類の完全分解の可能性を強く示唆している。

要 約

土壌中よりシクロヘキシル酢酸 (C_6AA) 資化性菌を分離し、その菌学的性質を調べると共に、培養条件の設定や各種脂環化合物の資化性について検討した。

1. 分離菌は、*Micrococcus* に属する細菌であると同定した。

2. 最適培養条件として、 C_6AA 0.15%, KNO_3

0.25%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002%, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.005%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.002%, 酵母エキス 0.01%, pH 8.0 の組成の培地を、500 ml 容肩つきフラスコに 80 ml 分注し、30°C、72時間振盪培養した。

3. 脂環性カルボン酸の資化性については、 C_6AA が最も生育が良好であり、シクロヘキシル酪酸も資化性が高かった。しかし、シクロヘキサンカルボン酸やシクロペンタンカルボン酸は生育が不良であった。

4. 6-14個の炭素数を側鎖に持つシクロヘキサン類では長い誘導期の後、高い生育が認められた。なかでも *n*-デシルシクロヘキサンが最も生育が良好であった。

DNA の分離精製に関して有益な助言を賜りました京都大学理学部、山岸秀夫博士ならびに当研究所放射線医学班の諸氏に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Beam, H. W., Perry, J. J.: *J. Bacteriol.*, 118, 394-399 (1974).
- 2) Feinberg, E. L., Ramage, P. I. N., Trudgill, P. W.: *J. Gen. Microbiol.*, 121, 507-511 (1980).
- 3) Beam, H. W., Perry, J. J.: *J. Gen. Microbiol.*,

- 82, 163-169 (1974).
- 4) Cowan, S. T., Steel, K. J.: *Manual for the Identification of Medical Bacteria*, Cambridge University Press, London (1970).
- 5) Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams and Wilkins Co., Baltimore (1986).
- 6) Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, 3, 208-218 (1961).
- 7) Marmur, J., Doty, P.: *J. Mol. Biol.*, 5, 109-118 (1962).
- 8) Blakley, E. R.: *Anal. Biochem.*, 15, 350-354 (1966).
- 9) Ougham, H. J., Trudgill, P. W.: *J. Bacteriol.*, 150, 1172-1182 (1982).
- 10) Norris, D. B., Trudgill, P. W.: *Biochem. J.*, 121, 363-370 (1971).
- 11) 田中秀和, 小幡 斉, 徳山 泰, 上野照雄, 吉迫文紀, 西村篤夫: 醸酵工学, 55, 62-67 (1977).
- 12) Donoghue, N. A., Trudgill, P. W.: *Eur. J. Biochem.*, 60, 1-7 (1975).
- 13) Metcalfe, L. D., Schmitz, A. A.: *Anal. Chem.*, 33, 363-364 (1961).

(昭62. 9. 7受付)