

[J. Ferment. Technol., Vol. 49, No. 7, p. 581~586, 1971]

## 石油化学製品の醗酵に関する研究

(第 1 報) Isopropyl alcohol 資化性細菌の同定について

上山 英夫・山内 慶仁\*・津木 憲紘\*・富金原 孝

(理化学研究所醗酵工学研究室)  
(\*鐘淵紡績株式会社中央研究所)

## Studies on the fermentation of Petrochemicals

(I) Taxonomic Studies on *Arthrobacter* sp. Isolated from SoilHideo Ueyama, Yoshihito Yamauchi,\* Norihiro Tsugi\* and  
Takashi Fukimbara(The Institute of Physical and Chemical Research. Wako-shi,  
Saitama; \*Kanegafuchi Spinning Co. Ltd., Osaka)

Taxonomic study was performed on a strain of soil bacteria which could grow in the medium containing isopropyl alcohol as a sole source of carbon.

Although this strain is considered to be belonged to the genus *Arthrobacter* by description of Bergey's manual (7 th ed.), it does not fit in any species of *Arthrobacter* with respect to no liquefaction of gelatin, production of urease, inability to hydrolyze starch and production of non-diffusible reddish pigment. Taxonomic character of this strain is, however, almost consistent with that of *A. rufescens* Akiba, Ueyama, Seki *et* Fukimbara which was reported by the same authors previously. Therefore, this strain is considered to be a species closely related to *A. rufescens*.

This strain assimilates various alcohols except methyl alcohol, glycols except ethylene-glycol and n-paraffinic hydrocarbons ( $C_{10}$  to  $C_{17}$ ).

## 緒 言

近年, 炭化水素醗酵に関する研究は多数報告されているが, 炭化水素誘導体と考えられる低級アルコール類を炭素源とする醗酵に関する研究もかなりある。

Harrington and Kallio<sup>1)</sup>, Johnson and Quayle<sup>2)</sup>, 沢田ら<sup>3)</sup>は methyl alcohol 資化性細菌について, 緒方ら<sup>4)</sup>は methyl alcohol 資化性酵母について, 大亦ら<sup>5)</sup>, Mor and Fiechter<sup>6)</sup>は ethyl alcohol 資化性酵母について報告し, Murooka and Harada<sup>7)</sup>は ethyl alcohol, n-propyl alcohol および n-butyl alcohol を炭素源として発育する土壌細菌について報告している。

著者ら<sup>8)</sup>は前報において土壌中より methyl alcohol, ethyl alcohol, n-propyl alcohol および n-butyl alcohol

を炭素源として発育する細菌を分離し, その 2, 3 の性質を検討した。この際, 同時に分離した isopropyl alcohol を炭素源として発育する細菌の分類上の諸性質を検討したので, これらの結果について報告する。

## 実 験 方 法

本実験において使用した菌株は Table 1 に示す Medium-1 の培地を径 24 mm 試験管に 10 ml 注加し, 120°C, 10 分間の加圧殺菌後冷却して炭素源である isopropyl alcohol を無菌的に 1 vol % 添加し, 土壌塊を少量投入して 30°C, 初発 pH 7.5 で試験管振盪機(振巾 4 cm, 250 r.p.m.) により 3~5 日間培養し, 常法により平板培養を Medium-1 の寒天培地でおこない分離した。

Table 1. Composition of basal media.

| Medium-1                                            |         | Medium-2                                             |               | Medium-3                             |         |
|-----------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------|---------------|--------------------------------------|---------|
| Carbon source                                       | 10 ml   | Carbon source                                        | 0 —10 g or ml | NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>      | 1.0 g   |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>     | 1.5 g   | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | 1.5 g         | Yeast extract                        | 5 mg    |
| (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO                  | 1.5     | (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO                   | 3.0           | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 1.0 g   |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 1.5     | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 1.5           | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0.5     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 1.5     | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | 1.5           | pH                                   | ca. 7.5 |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | 1.5     | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 0.3           | Total volume                         | 1000 ml |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 0.3     | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                 | 0.01          |                                      |         |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 0.01    | FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 0.01          |                                      |         |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 0.01    | NaCl                                                 | 0.5           |                                      |         |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 0.01    | Yeast extract                                        | 0.5           |                                      |         |
| MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 0.01    | pH                                                   | ca. 7—8.5     |                                      |         |
| Yeast extract                                       | 0.001   | Total volume                                         | 1000 ml       |                                      |         |
| pH                                                  | ca. 7   |                                                      |               |                                      |         |
| Total volume                                        | 1000 ml |                                                      |               |                                      |         |

分離菌株の同定は Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (7th Ed.) に準じておこない、特に、糖の酸酵性および酸化的分解については Hugh and Leifson の培地<sup>9)</sup>を使用して検討し、生理学的性質は常法により試験した。

分離された菌株の培養は Table 1 の Medium-1 について、主として窒素源を検討してえた Medium-2 を使用し、これを 300 ml 容三角フラスコに 50 ml、あるいは、径 24 mm 試験管に他の有機化合物の資化性を検討するために調製した Medium-3 を 10 ml 分注して、120 °C、10 分間殺菌後、前培養により得た菌体を接種し、30 °C、pH 8 近辺で 200 r.p.m. の rotary shaker、あるいは、試験管振盪機で培養した。

菌体量の測定は日立分光光度計 EPU-2A により 1 cm のセルを使用して 610 mμ の吸収を測定しておこなった。吸光度と乾燥菌体量の関係は 0.1 OD = 0.025 mg/ml のようになる。

pH はガラス電極法により測定した。

### 結果ならびに考察

**1. 分離菌株の同定** 本研究において使用した菌株の分類学的性質を Table 2 に示す。本菌株の形態的特徴を要約すると次のようになる。分離菌株は多形態的であり、若い細胞は桿状であり、培養が古くなるにしたがって短桿状の細胞が増加し、球形細胞も現われてくる。肉汁寒天培地に 18 hr 程度培養した菌体の顕微鏡写真は Photo 1 のとおりであり、細胞の多形態なる様相を示している。電子顕微鏡写真を示すと Photo 2 のようになり、細胞の分裂様式としての snapping が

明らかに観察される。本菌株はグラム陽性菌であり、運動性なく、胞子の形成を行なわない。菌体の色調は橙赤色であり、色素を培地中に拡散しない。本菌株の生理的性質は次のように要約できる。硝酸還元を行ない、methyl red 試験、Voges-Proskauer 試験、indol の生成、および、澱粉の加水分解は陰性であり、NH<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>S、urease および catalase の生産を行なう。

Cellulose は分解しない。さらに、硝酸塩およびアンモニウム塩を唯一の窒素源として利用し、また、クエン酸を炭素源として利用しうる。これらの形態的、ならびに、生理的性質を考慮すると土壌起源の Coryneform bacteria に属するものと考えられ、その中でも Bergey's Manual (7th Ed.) 記載の Arthrobacter 属にその類似性を多数認めることができる。特に、*A. grobiformis* (Conn) Conn et Dimmick, *A. pascens* Lochhead et Burton, *A. simplex* (Jensen) Lochhead, *A. oxydans* Sgueros, *A. aurescens* (Clark) Phillips および *A. ureafaciens* (Krebs et Eggleston) Clark にその比較を求めることができる。分離菌株を上記の既知菌株と比較するとき、形態、ならびに、生理的諸性質は次の諸点を除きほぼ一致すると考えられる。すなわち、分離菌株は培地中に拡散しない橙赤色色素を生産すること、gelatin 液化性のないこと、urease 生産性を有すること、澱粉の加水分解性のないこと (*A. simplex* (Jensen) Lochhead は澱粉の加水分解性がないと記載されている。) などの相異がみうけられる。

分離菌株を前報<sup>9)</sup>で報告した *Arthrobacter rufescens* Akiba, Ueyama, Seki et Fukimbara と比較する

Table 2. Description of *Arthrobacter* sp. isolated from soil

1. Morphological characters.  
Rods: 0.5 to 0.7 by 1.0 to 3.5  $\mu$ ; in young cultures, V-form is observed, on nutrient agar slant; in older cultures, small rods to coccoid; branching is not found; pleiomorphic; non-motile; Gram-positive; spore is not formed.
2. Culture characters.  
Nutrient agar colonies: Circular; smooth; convex; entire; reddish pink; opaque.  
Nutrient agar slant: Growth abundant; spreading; entire; reddish pink; soft; viscous.  
Nutrient broth: Membranous; reddish pink; fluid turbid; sediment.  
Gelatin stab: No liquefaction; good growth at surface.  
Potato plug: Growth abundant; reddish pink; spreading.  
Litmus milk: Slight alkaline; not peptonized.
3. Physiological characters.  
Reduction of nitrate to nitrite: Positive.  
Methyl red test: Negative.  
Voges-Proskauer test: Negative.  
Indol production: Negative.  
Hydrolysis of starch: Negative.  
Ammonia production from peptone: Positive.  
Production of hydrogen sulfide (lead acetate paper): Positive.  
Urease: Positive.  
Catalase: Positive.  
Ammonium salt and nitrate were utilized as source of nitrogen.
4. Cleavage of carbohydrates.  
Aerobically acid without gas from glucose, fructose, glycerine, and mannitol after 4 days and more; neither acid nor gas from arabinose, xylose, galactose, mannose, maltose, sucrose, lactose, raffinose, trehalose, starch, inuline, and glycogen.  
Cellulose not attacked.  
Anaerobically acid without gas from glucose after 2 weeks and more.
5. Assimilation of acids.  
Formic, acetic, propionic, lactic, succinic, fumaric, and citric acids are assimilated.
6. Temperature for growth.  
Good growth at 25 to 37°C.

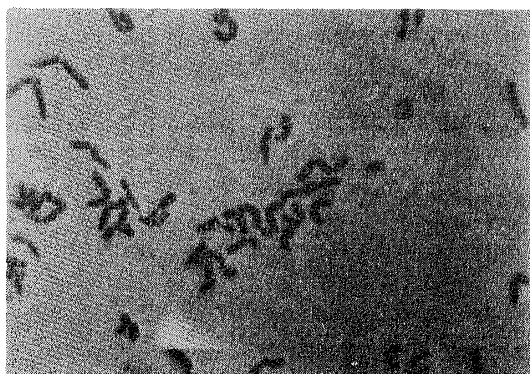


Photo. 1. Photomicrograph of *Arthrobacter* sp. isolated from soil (ca.  $\times 1500$ ).  
Grown on nutrient agar slant for 18 hr at 30 °C

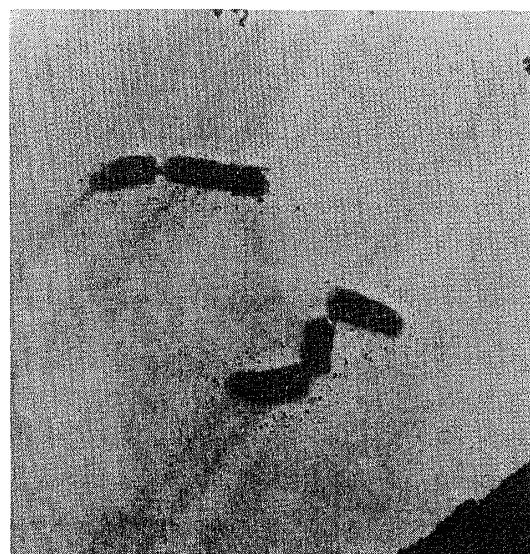


Photo. 2. Electron micrograph of *Arthrobacter* sp. (ca.  $\times 6000$ ).  
Grown on nutrient agar slant for 18 hr at 30 °C

と、分離菌株はリトマスミルクに対する反応がアルカリ性であること、澱粉の加水分解性のないこと、なら

Table 3. Assimilation of alcohols by *Arthrobacter* sp. isolated from soil

| Substrate                | Microbial growth (OD at 610 m $\mu$ ) Culture periods |         |
|--------------------------|-------------------------------------------------------|---------|
|                          | 72 hrs                                                | 300 hrs |
| Methyl alcohol           | 0.4                                                   | 0.4     |
| Ethyl alcohol            | 8.7                                                   |         |
| <i>n</i> -Propyl alcohol | 16.0                                                  |         |
| Isopropyl alcohol        | 12.4                                                  |         |
| <i>n</i> -Butyl alcohol  | 0.4                                                   | 12.3    |
| Isobutyl alcohol         | 0.7                                                   | 8.7     |
| sec-Butyl alcohol        | 0.4                                                   | 0.6     |
| <i>n</i> -Amyl alcohol   | 0.1                                                   | 0.2     |
| Isoamyl alcohol          | 0.1                                                   | 3.5     |
| <i>n</i> -Octyl alcohol* | 0.3                                                   | 0.2     |
| sec-Octyl alcohol*       | 0.1                                                   | 0.1     |
| <i>n</i> -Decyl alcohol  | 0.3                                                   | 1.8     |
| <i>n</i> -Tetradecanol   | 3.7                                                   | 13.7    |
| Cetyl alcohol            | 3.3                                                   | 11.4    |
| Stearyl alcohol          | 2.1                                                   | 5.5     |
| Non-substrate            | 0.3                                                   | 0.5     |

Initial pH: 8.0

Initial microbial density (OD at 610 m $\mu$ ): 0.11

Substrate concentration: 1.0%, (\*: 0.5%)

びに、好氣的にガス発生を伴わないで glucose および glycerine から酸を生産するという点で相異しているのみで、これら 2, 3 の点を除くと *A. rufescens* Akiba, Ueyama, Seki et Fukimbara に一致するものと考えられる。したがって、分離菌株を *A. rufescens* Akiba, Ueyama, seki et Fukinbara の類縁菌と認めることが妥当と思われる。

2. 有機化合物の資化性について 本菌株は多数の有機化合物を資化しうる。本実験においては、主として

Table 4. Assimilation of glycols by *Arthrobacter* sp. isolated from soil

| Substrate          | Microbial growth (OD at 610 m $\mu$ ) Culture periods |         |
|--------------------|-------------------------------------------------------|---------|
|                    | 72 hrs                                                | 300 hrs |
| Ethylene glycol    | 0.2                                                   | 0.2     |
| 1,2-Propane diol   | 7.8                                                   |         |
| 1,3-Butane diol    | 0.3                                                   | 0.4     |
| 2,3-Butane diol    | 6.1                                                   |         |
| 1,4-Butane diol    | 0.3                                                   | 0.4     |
| 1,2,4-Butane triol | 0.4                                                   | 0.3     |
| 1,6-Hexane diol    | 0.3                                                   | 0.7     |
| Non-substrate      | 0.3                                                   | 0.5     |

Initial pH: 8.0

Initial microbial density (OD at 610 m $\mu$ ): 0.11

Substrate concentration: 1.0%

Table 5. Assimilation of alcohols by *Arthrobacter* sp. isolated from soil

| Substrate               | Microbial growth (OD at 610 m $\mu$ ) Culture periods |            |             |            |            |             |
|-------------------------|-------------------------------------------------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|
|                         | 70 hrs                                                |            |             | 240 hrs    |            |             |
|                         | 1 mg/10 ml                                            | 5 mg/10 ml | 10 mg/10 ml | 1 mg/10 ml | 5 mg/10 ml | 10 mg/10 ml |
| Methyl alcohol          | 0.10                                                  | 0.09       | 0.08        | 0.06       | 0.06       | 0.06        |
| Isopropyl alcohol       | —                                                     | —          | 2.15        | —          | —          | —           |
| <i>n</i> -Butyl alcohol | —                                                     | 1.00       | —           | —          | —          | —           |
| Isobutyl alcohol        | —                                                     | 0.90       | —           | —          | —          | —           |
| sec-Butyl alcohol       | —                                                     | 0.86       | —           | —          | —          | —           |
| Isoamyl alcohol         | —                                                     | 2.10       | 2.15        | —          | —          | —           |
| <i>n</i> -Hexyl alcohol | —                                                     | 1.43       | —           | —          | —          | —           |
| <i>n</i> -Octyl alcohol | —                                                     | 0.08       | 0.05        | 0.23       | 0.22       | —           |
| <i>n</i> -Undecanol     | 0.09                                                  | 0.35       | —           | 0.10       | —          | —           |
| Lauryl alcohol          | —                                                     | —          | —           | —          | 1.47       | —           |
| Tridecyl alcohol        | —                                                     | 0.30       | —           | —          | —          | —           |
| Non-substrate           | 0.08                                                  | 0.08       | 0.08        | 0.08       | 0.08       | 0.08        |

Initial pH: 8.0

Initial optical density (OD at 610 m $\mu$ ): 0.06

—: not determined.

Table 6. Assimilation of glycols by *Arthrobacter* sp. isolated from soil

| Substrate          | Microbial growth (OD at 610 m $\mu$ ) Culture periods |            |            |            |
|--------------------|-------------------------------------------------------|------------|------------|------------|
|                    | 72 hrs                                                |            | 240 hrs    |            |
|                    | 1 mg/10 ml                                            | 5 mg/10 ml | 1 mg/10 ml | 5 mg/10 ml |
| Ethylene glycol    | 0.07                                                  | 0.08       | 0.04       | 0.05       |
| 1,3-Propane diol   | 0.10                                                  | 0.06       | 0.16       | 0.02       |
| 1,3-Butane diol    | 0.31                                                  | 0.87       | —          | —          |
| 1,4-Butane diol    | 0.25                                                  | 0.15       | 0.40       | 1.38       |
| 1,2,4-Butane triol | 0.09                                                  | 0.08       | 0.11       | 0.16       |
| 1,5-Pentane diol   | 0.20                                                  | 0.27       | 0.28       | 0.68       |
| 1,6-Hexane diol    | 0.22                                                  | 0.22       | —          | 0.26       |
| 1,10-Decane diol   | 0.54                                                  | 1.12       | —          | —          |
| Non-substrate      | 0.08                                                  | 0.07       | 0.08       | 0.07       |

Initial pH: 8.0

Initial optical density (OD at 610 m $\mu$ ): 0.06

—: not determined.

Table 7. Assimilation of *n*-paraffinic hydrocarbons by *Arthrobacter* sp. isolated from soil

| Substrate<br>(1.5 vol. %) | Cell yields in dry weight |     |
|---------------------------|---------------------------|-----|
|                           | (g/l)                     | pH  |
| <i>n</i> -Heptane         | 0.28                      | 7.7 |
| <i>n</i> -Octane          | 0.25                      | 7.7 |
| <i>n</i> -Nonane          | 0.19                      | 7.7 |
| <i>n</i> -Decane          | 0.88                      | 7.6 |
| <i>n</i> -Undecane        | 0.86                      | 7.2 |
| <i>n</i> -Dodecane        | 2.15                      | 4.6 |
| <i>n</i> -Tridecane       | 2.27                      | 4.5 |
| <i>n</i> -Tetradecane     | 3.19                      | 4.4 |
| <i>n</i> -Pentadecane     | 2.91                      | 4.2 |
| <i>n</i> -Hexadecane      | 3.58                      | 4.3 |
| <i>n</i> -Heptadecane     | 5.11                      | 4.2 |
| Kerosene                  | 1.12                      | 7.0 |

Initial pH: 8.0

Culture periods: 90hrs.

Initial optical density (OD at 610 m $\mu$ ):

0.12=0.3 mg/l

alcohol 類, glycol 類, ならびに, *n*-paraffin 系炭化水素についてその資化性を検討した。Table 1 の Medium-2 の培地で基質濃度 1 vol %, または, 1 wt % として検討した結果を示すと Table 3 および 4 のようになるが, ここで結果の明確でないもの, および, 資化性を示さないものについては基質濃度を低下させて Medium-3 の培地を使用し, 基質濃度を 1.5 および 10 mg/ml として径 24 mm 試験管で液量 10 ml として

ゴム栓を綿栓に代替してその資化性を検討した。この結果を Table 5 および 6 に示す。*n*-paraffin 系炭化水素の資化性については Table 7 のようになる。alcohol 類は毒性の著しいものは別として methyl alcohol 以外はすべて資化しうる。glycol 類については ethylene glycol の資化性が認められない。また, *n*-paraffin 系炭化水素は本菌株の炭素源となりうることが認められた。

### 要 約

土壌中より isopropyl alcohol を炭素源として発育する細菌を分離し, 同定をおこなった結果, 本菌株は *Arthrobacter* 属に属し, 前報<sup>2)</sup>で報告した *Arthrobacter rufescens* Akiba, Ueyama, Seki et Fukimbara の類縁菌と認めることが妥当と思われる。

本菌株の基質資化性は広く, methyl alcohol 以外の alcohol 類, ethylene glycol 以外の多数の glycol 類, *n*-paraffin 系炭化水素を資化しうることが認められた。

本研究に関して多大なご助言をいただきました東京大学応用微生物学研究所駒形和男博士に深謝いたします。

本報告は昭和44年度日本醗酵工学会大会(昭和44年11月, 大阪)で発表した。

### 文 献

- 1) Harrington, A. A., Kallio, R. E.: *Canad. J. Microbiol.*, **6**, 1 (1960).
- 2) Johnson, P. A., Quayle, J. R.: *Biochem. J.* **95**, 859 (1965).

- 3) 沢田・高田・照井：昭和45年度日本醸酵工学会  
大会（昭和45年11月，大阪）講演要旨集，p.83.
- 4) 緒方・西川・大杉・栃倉：本誌，**48**，389，470  
(1870).
- 5) 大亦・村尾・寺島：醸協，**26**，313 (1968).
- 6) Mor, J. R., Fiechter, A.: *Biotech. and Bioeng.*  
**10**, 159 (1968).
- 7) Murooka, Y., Harada, T.: *Agr. Biol. Chem.*,  
**31**, 1035 (1967).
- 8) Akiba, T., Ueyama, H., Seki, M., Fukimbara,  
T.: *J. Ferment. Technol.*, **48**, 323 (1970).
- 9) Hugh, R., Leifson, E.: *J. Bacteriol.*, **66**, 24  
(1953).

(昭46.1.28受付)