

炭化水素資化菌に関する研究

小 原 国 彦
玉 置 ミヨ子

緒 言

最近、炭化水素を唯一の炭素源として成育する炭化水素資化性菌及びその利用に関する研究が盛んに行われ、その菌体及び代謝産物に関する報告^{1) 2) 3) 4) 5)}が近年盛んに見られる。筆者等はさきに大阪周辺の土から分離した炭化水素資化性酵母 KY-11 について報告⁶⁾し、更にこれを、変敗油を唯一の炭素源とする培地に培養したところ、著明な増殖を見、変敗油を食用資源である酵母菌体として再利用出来ることの可能性を見出して報告^{7) 8)}したが、その他の酵母及びバクテリアの分離をも試み、既知の微生物もあわせ、炭化水素を唯一の炭素源とする培地に於ける生育の状態を検討した。なおバクテリアが炭化水素から何を作るかについての知見は未だ少なく、石油を食べ物にする為の菌体利用と併せて代謝産物の探究については大きな期待がよせられている。筆者等は分離した各種の菌及び既知の菌について、菌体収量並びにその代謝結果について若干の考察を加えたので報告する。

実 験 の 部

I 実 験 方 法

(1) 炭化水素資化性菌の分離

1) 酵母菌の分離

土から酵母菌の分離に使用した培養基及び、分離の方法については、前報における KY-11 の場合と同じである。

2) バクテリアの分離

大阪周辺の土を各種集め、Tab. 1. の如き組成を持つ培地に、前報同様に培養して、純粋分離をなした。即ち、培地各 50 ml を注入した 500 ml 肩付きフラスコに綿栓をして、常法の如く、蒸気殺菌後、採取した土 1 g を、それぞれに投入し、30°C で往復動 (115/min)、しんとう培養を 5 日間行い、あらかじめ第 1 表組成の培地 10 ml を注入殺菌した試験管に、各培養液からそれぞれ 1 白金耳を移植して、前同様の条件下に、

炭化水素資化性菌に関する研究

2日間しんとう培養の後、寒天20%を添加して調整した固体培地充填の試験管に45°Cで、1白金耳移植し、順次第2、第3の試験管に1白金耳づつとって希釈後、平皿培養にかけ、出現した各コロニーから拘鈎して、これを再び、液体培地に移植、2日間しんとう培養の後、再び扁平培養にかけ、この操作をくり返して Purity test を経、Stock culture となした。Purity test で不十分と認めた場合は再び Shaking culture 以下の操作をくりかえして Purity Test の後 stock culture とした。尚、同定は酵母菌について行ない、その同定では、Spore formationの有無及び、Slide culture による Pseudo mycellium, True mycellium 形成の有無を見た。なお Slide culture は次の如くして調整した。

即ち

Slide cultures (Media)

Potato agar is Prepared in the following way:

100g washed, peeled and thoroughly ground potatoes are soaked in 300cc tap water for several hours in a cold place. (Cellar, refrigerator).

The mass is filtered through a cloth and and autoclaved for one hour at 120°C.

For the preparation of the agar to 230cc of this liquid is added: 770cc tap water. 20g glucose and 20g agar.

The final medium is sterilized for 15 minutes at 120°C.

Table 1. 細菌用培地の組成

Kerosene	35.0 g
Liquidparaffin	35.0 g
NH ₄ NO ₃	5.0 g
K ₂ HPO ₄	2.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0 g
Tween-20	0.5 g
Tapwater	1.0 l
PH	7.0

(2) 既知の微生物の培養

下記の各種菌を、1白金耳とって、それぞれ滅菌水で希釈後、その1白金耳を Tab. 2. の如き組成の培地に移植し、前同様、30°Cで5日間しんとう培養した。

Strains

Candida tropicalis 0589

Candida tropicalis 1070

Candida tropicalis 0007

Candida tropicalis 0587

Candida tropicalis 0006

Geotrichum candidum 6454

Table 2. 酵母用培地の組成

Kerosene	35.0 g
Liquidparaffin	35.0 g
NH ₄ NO ₃	5.0 g
KH ₂ PO ₄	2.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0 g
Tween-20	0.5 g
Tapwater	1.0 l
pH	5.0

(3) 酵母菌体収量の比較

培養後、培養液を遠心沈澱管に移し、フラスコの内壁を数回水洗後、洗液をも沈澱管に移し、フラスコに附着する炭化水素は、エーテルで洗浄後、洗液を合一して、1分間3,500回転にて、10分間遠心沈澱した。上澄液を捨て、エーテルで菌体を洗って後、水を加えて秤量ビン内に流出させ蒸発乾固して秤量し、菌体量を重量として求めた。なお分離した酵母菌の菌体収量は遠心沈澱した結果、菌体の占める容積を測定して比較した。

(4) バクテリアの培養と培地の検討

純粋分離した炭化水素資化性細菌を、それぞれ50mlの培養液を注入し調整してある培地に無菌的に移植し、30°Cで前同様しんとう培養し、その培養結果について、肉眼的所見を見るとともに培養液を高速冷却遠心用遠心管にとり1分間11,000回転の速度で10分間遠心沈澱させて菌体を除き培養液をフラスコにとってこれにEtherを加え、分液ロートに移してEther可溶部と水層部とに分離した。同時に一方では、菌を移植することなく培養の方法等は、全く同一に行って、比較対照用とするものも準備した。

1) Ether可溶部の検討

Ether可溶部に、無水硫酸ナトリウムを入れて、放置脱水後、Etherを留去し、これをハクソウクロマトグラフィー及び逆相法によるペーパークロマトグラフィにかけて、対照用のEther可溶部と比較し、バクテリアの存在による差異の有無を検討した。尚、このものについて、酸価(A.V)を測定し、対照用との差の有無を調べ、ケン化した場合の両者の差の有無を検討した。A.V.測定にあたっては、1/100NのKOH/Alcohol Solを用いた。

2) 水層部の検討

水層部を減圧濃縮後、ペーパークロマトグラフィーにて検討し、対照用水層部との差異の有無、バクテリアによる影響の有無を見た。尚、水層部については、それぞれpHを見た。

(5) カラムクロマトグラフィによる油の検討

培養基の中からエーテル抽出後常法の如く抽出した油をベンゼン、石油ベンゼン(1:1)の液にとかして後、カラムクロマトグラフ用シリカゲルを充填したカラムに通し20%メタノー

ル・ベンゼン溶液で固定後石油ベンジン、2%メタノールベンゼン、エーテルで展開し、滴下液 5 mlづつについて N/100 NaoH/Aleohue 溶液で中和滴定した。指なお示系は0.5%フェノールフタレンを使用した。なお、無移植のものについても同様に行なった。

II 実験結果

(1) 炭化水素資化性菌の分離と菌体収量

1) 酵母の分離

分離の結果、培養所見の異なる二つの菌、KY-9, KY-10を得た。両者とも、Spore formation を見ず、しかも、Slide cultureの結果、Pseudo mycellium 及び、True mycellium を形成したので、両者とも、Cryptococcaceae に属する *Candida* と推定している。更に詳しい同定は、今後行う計画である。

2) バクテリアの分離

純粋分離の結果、三種類のバクテリアKB-1, KB-2, KB-3, を得た。KB-1は、濃厚な黄色色素を生産し、KB-2は赤色色素を生産し、KB-3は、色素を生産しなかった。それぞれ菌体収量は酵母菌の場合より著しく僅少で問題にならない。

3) 既知の微生物の培養

前期各種の菌を第2表の如き、組成の培地に移植、しんとう培養した結果、各種菌の菌体収量は、Fig. 1 の如くである。

Strain	菌体収量 mg/50ml
<i>Candida tropicalis</i> 0589	11.7
<i>Candida tropicalis</i> 1070	6.2
<i>Candida tropicalis</i> 0007	5.1
<i>Candida tropicalis</i> 0587	4.9
<i>Candida tropicalis</i> 0006	2.7
<i>Geotrichum candidum</i> 6454	1.5

Fig. 1. 各種StrainsのKesosene, Liquidparaffin 培地に於ける収量

4) 分離した炭化水素資化性酵母菌体収量の比較

KY-9, KY-10 をしんとう培養及び静置培養後、得た菌体収量は、Fig. 2 の如くであり、Fig. 3 の如く前報KY-11と比較すると、少々収量が異なっている。

炭化水素資化性菌に関する研究

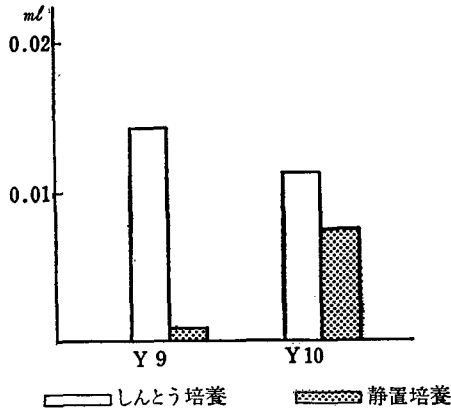


Fig. 2. Y9, Y10菌体収量の比較(72hs)

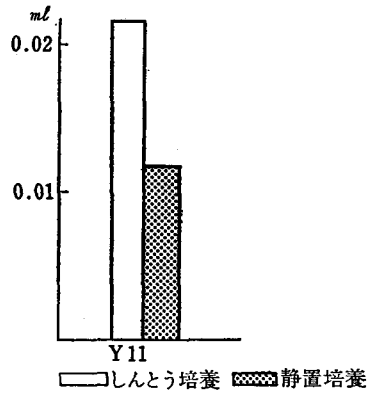


Fig. 3. Y11の菌体収量(24hs)

(2) 培養結果の検討

1) バクテリア培養結果の肉眼的所見,

分離したKB-1の培養結果, 培地は頗る大きい粘性があり, 前記の如く, 濃原な黄色を呈した。KB-2の培養結果は培地が赤色を呈したが, 培養液の粘性は, KB-1の場合に較べてはるかに低く, 粘性が生じたと思われる程度である。KB-3の培養結果は培地も着色せず, 粘性も見られなかった。

2) バクテリア培養結果の検討

i) Ether 可溶部の検討

a) ハクソウクロマトグラフィにかけた場合の検討

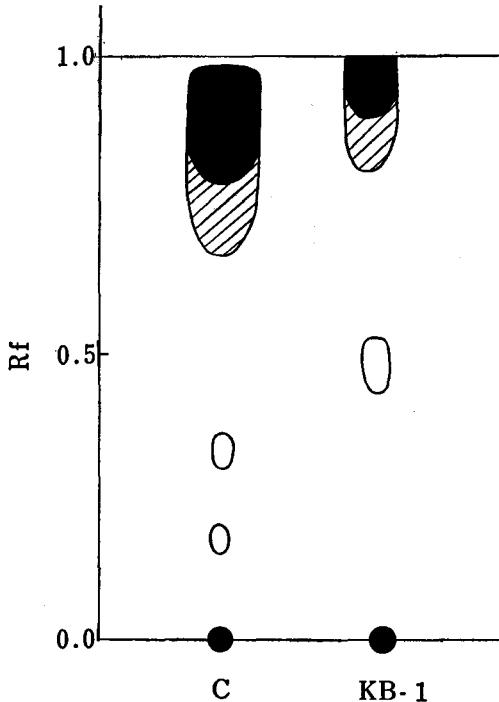


Fig. 4. Thin layer chromatography of products.

(Oil soluble matters)
 C.....Control
 KB-1.....Yellow colored medium
 ● strong ● Medium ○ Weak
 Developing solvent.
 Ether-Benzene-Ethanol-Acetic acid (40:50:2:0.2)
 Color reagent. 50% H₂SO₄

炭化水素資化成菌に関する研究

本液を吸着させて後, Ether : Benzene : Ethanol : Acetic acid (40 : 50 : 2 : 0.2) の割合に混合した展開剤で展開後, 風乾し, 50%硫酸を噴霧して加温した場合, それぞれ出現した spot は第3図の如くである。

b) 逆相法によるペーパークロマトグラフィーにかけた場合。

Stationary Solvent として Kerosene (b.p. 185~215°C) を噴霧した逆相法によるペーパークロマトグラフィーの結果では, Methanol-Acetic acid-Kerosene (10 : 2 : 1) で展開した場合, Spot は原点から移動していないが対照よりも培養の方が大きな Spot である。この Spot は炭化水素, カロチノイド, ステリンエステル, トリグリセリドのいずれかがある可能性を示しているが, 更に検討の要がある。

c) 酸価 (A.V.) の検討

対照用 Ether 抽出物の酸価 (A.V.) は0.38, KB-1株培養の場合は, 0.48 を示し, 培養した方は, 酸価0.10の増加即ち約17%の増加を示し同様に, KB-2 Fig. 5 に見られる如く対照よりは26%の増加を示している。

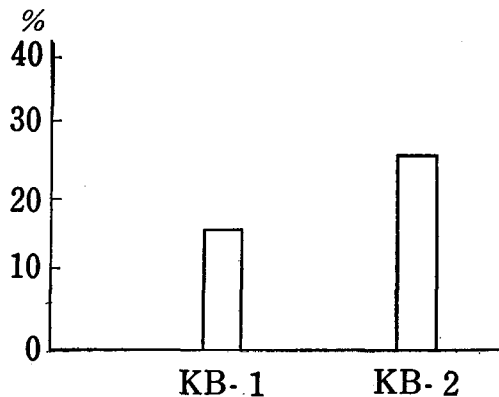


Fig. 5. 培養による酸価の増加率

d) ケン化の結果

ケン化価を測定した場合, 対照用のケン化価は 0, KB-1株培養の場合は 2.1 で大差は見られないがしかし, 興味ある差はその物質の性状を示唆している。

e) カラムクロマトグラフィの結果

展開後, 溶出液について対照とKB-1株のものについて比較した結果, 大差は見られない。カラムクロマトグラフィによる結果は Fig (7) の如くである。

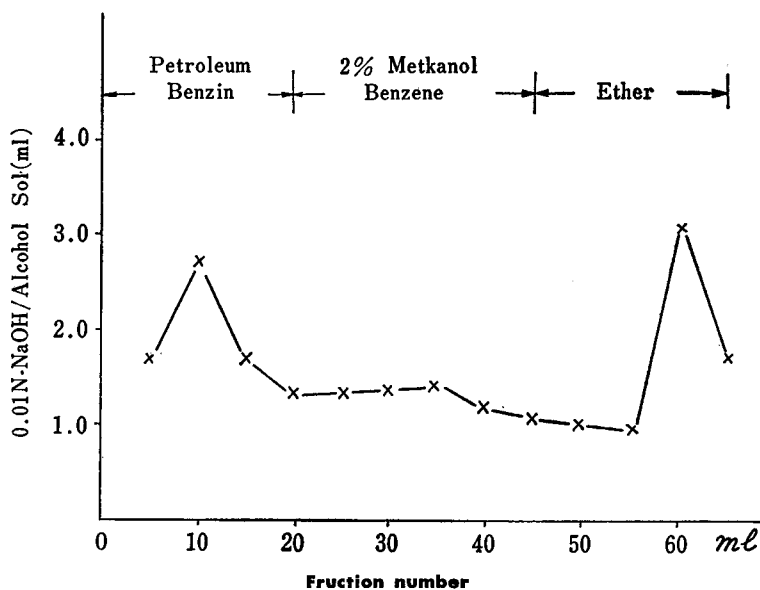


Fig. 7. Column Chromatography of the oi in the broth. (KB-1)
Column.....Silica Gel. for Chromatography.

ii) 水層部の検討

a) ペーパークロマトグラフィーによる比較検討

対照用のものとKB-1株のものについて比較対照した結果は、第6図の如くで培養したものと同対照とのあいだに明かな差が見られる。展開溶液はブタノール、酢酸、蒸留水、(4:1:2)で呈色試薬は2% $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{Sol}$ 及び、ニンヒドリンのブタノール溶液であるが、加温によってニンヒドリンの場合は Spot は黒変し、2% $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{Sol}$ の場合は脱色された白い Spot が得られた。

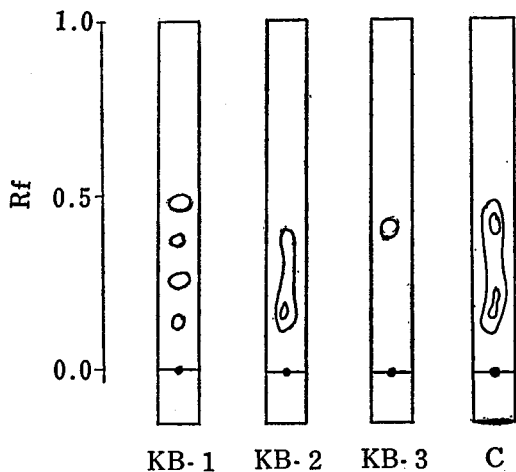


Fig. 6. Paper chromatography of products
(Water soluble matter)

KB-1...Yellow colored medium
KB-2...Red colored medium
KB-3...Colorless medium
C Control
Developing solvent
Buthanol-Acetic acid-Distilled
water (4:1:2)
Color reagent
1% Ninhydrin Buthanol solution
0.2% Na_2CO_3 solution

d) pH の測定

培養後、水層部の pH は対照用の場合も含めてすべて同一で、それぞれの間に何の変化も見られなかった。

考 察

(1) 菌の分離と菌体収量

酵母菌 KY-9, 10は両者とも *Candida* に属するものであり、相当な炭化水素資化能力が見られるが前報の KY-11 には及ばない。すなわちその間に資化能力の大きな差がみられる。バクテリア KB-1, 2, 3の炭化水素資化能力も大きい、その育成状況は **Lag Phase** が酵母の場合よりも長く菌体収量は酵母より僅少であって、もっぱら代謝産物のみに期待がかけられる。既知の酵母菌では *Candida tropicalis* 0589 の資化能力が最も大きい。

(2) 培養結果の検討

1) Ether 抽出部に於ける変化

TLCに見られる如く、対照用のスポットに対し、KB-1培地の Ether 抽出物は、異なった Spot を示している。これは、展開溶媒を更に、工夫し、二次展開することによって Spot をより小さく、細分することが出来るであろうし、逆相用ペーパークロマトグラフィーにて両者の間に差が出ていないが、これは培養によって本法では上昇成分の無いことを物語ってはいるが、更に適切な処理をすればこの溶媒下では原点付近にとどまっている成分が更に組分される可能性もある。ついで、エーテル層から得た物質の、酸価(A.V.)を測定した結果、対照用に比して、KB-1培養液中の Ether 抽出部はA.V.が、僅少なから増加していることは、本菌が **Kerosene, Liquid Paraffin** から有機酸、脂肪酸等を、生産したのではないかと推測される。

僅か50mlの培地について、5日間のしんとう培養による結果の生産量であるが故に、A.V.は小さいが、更に培養を継続し、量を大量化することによってより多くの酸を、生成するものであろうと考える。KB-1株は、純粋分離に際し、コロニーの発生の非常に遅れた菌であり、従って **Lag phase** の長い菌であり、更に培養を継続した場合の生産量を今後検討したい。尚、この酸が何であるかは未同定であるが、カラムクロマトグラフィーの結果は特異な性状を示し、対照用と全く異なったカーブをえがいている。今後その探索に期待がよせられる。即ち、炭化水素から酸の生成の可能性が見出された。この酸以外に更に、脂肪は、生成されないものかとの予想のもとに、ケン化価(S.V.)を検討したが、顕著な結果は見出し得なかった。今後、更に多量培養、長期間培養によって、検討を続けたい。

2) 水層部に見られる変化

水層部の濃縮液についてペーパークロマトグラフィーを行なった結果、対照用に現れ

炭化水素資化性菌に関する研究

たSpotと培養液について現れた Spot の間には、明らかな差が現れている。すなわち対照用には長い連続した Spot が現れているが培養結果では Spot の数が減少している。これは、菌がこの成分を消費したか、あるいは、菌がこの成分を、揮発性成分として、空气中に逃がしたものと見做せるがこの消失した成分の同定は大きな意義を持つものであると思われる。尚 pH が対照用その他、全て同一であることは水層部に酸は、蓄積されされないことを示している。又菌が培養基中の特殊成分を、消費した為に、酸根が残っても、これを中和すべき何物かを生じているか、又は、酸根、アルカリ根を同様に消費しているのではないかと思われる。

要 約

炭化水素資化性菌として、酵母及びバクテリアが上からそれぞれ数株得られたが、これは特有の土からのみ得られる特有の菌であると考えよりも、炭化水素を資化し得る能力を持つ菌は、どこにでも存在するものであり、炭化水素の存在下で得られる適応性、即ち、適応する能力の大小が、資化性菌となるか、なり得ないかの違いとなるのではなからうかと考える。そして酵母では、Candida が、その能力が大きく、又同じく Candida に属するものでも炭化水素資化能力には、それぞれ差があることがうかがわれる。そして、いわゆる石油を食べ物にする目的で、菌体成分として利用する場合は、酵母菌が最適であると思われる。バクテリアは、培地から菌体の分離が困難である。しかし、代謝産物を利用する立場から、細菌は頗る興味に満ちたものではないだろうかと思われる。炭化水素を炭素源として生育するバクテリアから、赤い色素、黄色い色素が、生産されること自身、意味深い事であり、殊に培養結果、炭化水素に各種の影響が与えられることも炭化水素資化に対する無限の期待を可能ならしめている。筆者等は、炭化水素資化性の微生物に無限の能力を期待したい。炭化水素から各種の産物が得られるであろう。

エーテル抽出部、水層部に見られる性状の僅かな変化もその可能性を充分示唆している。

文 献

- 1) Raymond, R.L. and Davis, J.B.: Appl. Microbiol., 8, 329 (1960)
- 2) Shio, I., Otsuka, S., Ishii, R., Katsuya, N. and Iizuka, H.: J. Gen. Appl. Microbiol., 9, 23 (1963)
- 3) Kimura, Otsuka: Agr-Biol. Chem., 31, 441 (1967)
- 4) F. H.Shar, M. H.Sedt and T. H.Sheikh.: Aqr. Biol. Chem., 31, 645 (1967)
- 5) Takahashi Iguchi, Riyoji Kodaira and Isao Takeda.: Aqr. Biol. Chem., 31, 885 (1967)
- 6) 小原・玉置 日本家政学会第18回総会研究発表要旨集 p.22(1966)
- 7) 小原・玉置 相愛女子大学研究論集p.83 (1967)
相愛女子短期大学
- 8) 小原・玉置 日本家政学会第19回総会研究発表要旨集 p.12(1967)