[農化 第 43 卷, 第 11 号, p.739~746, 1969]

微生物によるレブリン酸の代謝 (第1報)

レブリン酸資化性細菌の検索

原田倫夫, 重田敏右, 上野喬宏
(キッコーマン醤油株式会社関西工場)

昭和 44 年 1 月 22 日 受 理

Metabolism of Levulinic Acid by Microorganisms Part I. Isolation and Identification of Levulinic Acid-utilizing Bacteria

By Michio HARADA, Shosuke SHIGETA and Takahiro UENO
Kansai Factory of Kikkoman Shoyu Co., Ltd.

On the utilization of levulinic acid by microorganisms, only a few studies using yeasts have been reported. So we studied the isolation of levulinic acid-utilizing microorganisms. About 200 strains of bacteria and 4 strains of yeasts were isolated from 300 kinds of samples such as soils, sewages and foods by enriched culture in the media containing levulinic acid as a sole source of carbon. Stock cultures of Noda Industrial Science Laboratory (NISL) were also tested. Bacteria which can utilize levulinic acid efficiently were identified with *Corynebacterium equi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas desmolytica* and *Brevibacterium linens*.

The capacity of utilization of levulinic acid were examined for some bacteria stocked in Institute of Applied Microbiology (IAM) and Institute for Fermentation (IFO), in which *Arthrobacter simplex* IAM 1650, *Corynebacterium equi* IAM 1038, *Pseudomonas aeruginosa* IAM 1007, *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3080, *Pseudomonas desmolytica* IAM 1508, and *Pseudomonas desmolytica* IFO 12570 were found to utilize levulinic acid as a sole source of carbon.
(Received January 22, 1969)

緒 言

各種調味料の製造に際し, 炭水化物を含む原料を酸によって加熱分解して得られる酸分解液を使用する場合, 炭水化物の過分解によって分解液中に多量のレブリン酸, 蟻酸等が生成する。これらの有機酸は酵母等の醗酵を阻害し⁽¹⁾, 香味に悪影響を与えるので, 分解液よりこれらの好ましくない成分を除去することは調味料の品質改良の有効な手段であると考えられる。レブリン酸含有物よりレブリン酸の除去方法は種々考えられるが, 著者らは微生物による方法を取り上げ, レブリン酸資化性菌の検索を行ない, 微生物によるレブリン酸代謝の検討を

行なった。

微生物のレブリン酸資化性に関しては, 1948 年, Wickerham, Burton⁽²⁾ は酵母の分類にあたって, レブリン酸を唯一の炭素源として資化する菌株がまれに検出されることを初めて指摘したが, レブリン酸代謝を本格的にとりあげたのは, ごく最近, 山口ら⁽³⁾が新たに分離した *Rhodotorula*, *Cryptococcus* 等のレブリン酸資化性酵母についてその代謝研究を報告しているにすぎない。しかも, これらはすべて酵母に関する知見であって, レブリン酸資化性細菌については未だ報告がない。著者らは広く保存株, 土壌, 汚水, 食品等各種試料より

レブリン酸資化性を有する微生物を検索し、酵母のみならず細菌にもレブリン酸資化能を有する菌株が存在することを見いだした。本報では、これらレブリン酸資化性菌のうち、とくに細菌の分離検索とその同定の結果を報告する。

実験および結果

A. 分離検索法

微生物を各種試料から分離するにあたって Table I に示す組成の培地を分離用培地とした。すなわち、レブリン酸を唯一の炭素源とし、窒素源、無機塩類のほか、細菌分離用培地 (pH 7.0) にはカビサイジン、酵母分離用培地 (pH 5.0) にはクロラムフェニコールをそれぞれ添加してある。これらの抗生物質を用いることにより、それぞれの酵母、細菌の生育をほぼ完全に抑制し目的の達成を容易にすることができた。平板培養、斜面培養に用いる固体培地には Table I に示す培地に寒天末 1.5% を添加した。分離方法を Fig. 1 に示した。すなわち分離用液体培地 10 ml を試験管に分注し、試料約 0.1~0.5 g を接種し、30°C 3~5 日間静置培養して、レブリン酸資化性菌の集殖を計る。これを分離用固体培地によって常法どおり平板培養し、30°C 3~5 日間で平板上に形成された細菌または酵母の集落を鉤菌して斜面培養に移し、第1次保存菌株とした。

Table I. Composition of Medium (for isolation)

Levulinic acid	1.0%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	0.2
KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.05
Kabacidin*	0.01
Chloramphenicol**	0.002
pH	7.0*
	5.0**

* for bacteria ** for yeast

Fig. 1. Isolation Method.

資化性の検索は次のとおりである。Table I の培地から抗生物質を除き、酵母エキスを 0.02% を添加した液体培地を資化試験培地とした。この液体培地 8 ml を直径 22 mm の大型試験管に分注、殺菌後、供試菌を 1 白金耳接種し、30°C 3 日間往復振盪培養装置 (振幅 20 mm, 回転数 300) により好気培養を行なった。菌の生育度は肉眼的観察または 660 mμ における吸光度を測定し、レブリン酸は培養液の遠心上澄液をバニリン-濃硫酸法⁽⁴⁾、ヒドラジン法⁽⁵⁾によって定量した。

B. 自然界におけるレブリン酸資化性菌の分布状態

上記手法により、保存株、土壌、汚水、食品等 300 種の試料より約 200 株のレブリン酸資化性細菌と、4 株のレブリン酸資化性酵母が得られた。一般に、これらレブリン酸資化能を有する微生物は広く天然に分布するが、レブリン酸が存在すると思われる脱脂大豆酸分解作業場のようなところに、とくに多く分布するということとはなかった。

レブリン酸資化能を有する細菌は比較的広範囲に分布し容易に分離されるが、これに反して酵母の検出頻度はきわめて少なかった。

C. 各種細菌のレブリン酸資化性試験

資化性試験は Table II に示す A, あるいは B 培地 50 ml を 500 ml 容振盪フラスコにとり、あらかじめブイヨン液体培地にて 14~16 時間振盪培養した供試菌 1.0 ml を接種し、往復振盪培養装置 (振幅 70 mm, 回転数 150) にて好気培養を行なった。分離菌の一部、および東京大学応用微生物研究所、財団法人醸酵研究所より分譲された細菌数株のレブリン酸資化性試験の結果を Table III に示した。

D. 分類同定

上記資化性試験の結果、強い資化能を示した細菌 19 株について、その菌学的性質を Manual of Microbiological Methods⁽⁶⁾、細菌学実習提要⁽⁷⁾、実験農芸化学⁽⁸⁾、

Table II. Composition of Medium (for assimilation test)

Medium A		Medium B	
Levulinic acid	1.0%	Levulinic acid	2.0%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5	K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.05	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.05
Yeast extract	0.1	Yeast extract	0.3
pH	7.2	pH	7.2

Rods, 0.5 to 0.8 by 1.0 to 1.5 microns. Non-mo-

Fig. 2. Electron Micrograph of Strain 13-9.
(grown on nutrient agar at 30°C for 18 hr)

Fig. 4. Electron Micrograph of Strain M-21-1.
(grown on nutrient agar at 30°C for 18 hr)

Fig. 3. Electron Micrograph of Strain D-87-11-2.
(grown on nutrient agar at 30°C for 18 hr)

Fig. 5. Electron Micrograph of Strain M-101-1-1.
(grown on nutrient agar at 30°C for 18 hr)

tile. Spore not formed. Gram-positive.

Nutrient agar colony: Circular (Variation: Strains of A-33-10-1 and D-89-5; rosolate colony), smooth (Variation: Strain of A-33-6; moderately rugose, strains of A-33-10-1 and D-89-5; rugose), entire to undulated, capitate, glistening (Variation: Strains of A-33-10-1 and D-89-5; dull), pale pink, medium unchanged.

Nutrient agar slant: Growth moderate (Variation: Strains of D-61-3-2, D-61-11 and D-87-1; scanty growth), filiform, butyrous (Variation: Strains of A-33-10-1 and D-89-5 brittle).

Nutrient broth: Membranous, slightly turbid, abundant sediment.

Glutamate agar slant: Good growth.

Levulinic acid agar slant: Good growth.

Nutrient gelatin stab: No liquefaction.

Action on milk: Alkaline (Variation: Strain of E-76-6; no action), no peptonization.

Action on nitrate: Reduced to nitrite (Variation: Strains of D-61-3-2, D-61-11 and E-76-6; no action).

Hydrogen sulfide: Produced.

Indole: Not produced.

Voges-Proskauer test: Negative.

Methyl-red test: Negative.

Starch: Not hydrolysed.

Cellulose: Not hydrolysed.

Acid and gas production from carbohydrate: Nei-

ther acid nor gas from glycerol, xylose, galactose, glucose, maltose, lactose, sucrose, mannitol and starch.

Acid and gas production from carbohydrate according to Hugh and Leifson's method: Neither acid nor gas from glucose and lactose (Variation: Strains of D-62-3, D-89-5 and E-75-8; produced acid from glucose aerobically).

Relation to pH: Growth in range of 5.5~9.5.

Relation to temperature: Good growth at 42°C.

Relation to NaCl: Slight growth at 7%.

Relation to free oxygen: Aerobic of facultative anaerobic.

Catalase: Positive.

Urease: Negative (Variation: Strains of D-62-3 and D-86-1; positive).

Source: From soil.

これらの菌株はグラム陽性で運動性なく、胞子を形成せず、snapping division の結果、特徴的な V 字形をとる。

生活環に伴って明らかな pleomorphism を示し、大きさは定常期には $0.5 \sim 0.8 \times 1.0 \sim 1.5 \mu$ の小桿状であるが、対数生育期には $0.5 \sim 0.8 \times 5.0 \sim 30.0 \mu$ の伸長状を呈する。またメチレンブルー染色により明らかに metachromatic granule が認められる等より *Corynebacterium* に属する。炭水化物より酸・ガスの生成なく、硝酸塩から亜硝酸塩を生成し、硫化水素を生成し、インドールの生成なく、ゼラチンを液化せず、ミルクをペプトン化せずアルカリ性を呈し、肉汁寒天上で Tan, Yellow, Pink の非水溶性色素を生成する等の点より、各菌株の細目については 2~3 の相違点があるが、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology⁽¹⁰⁾ に対比すれば、*Corynebacterium equi* に編入するのが妥当であると考える。

(2) *Brevibacterium linens* BREED

Strains: D-87-11-2, E-8-1-1, E-17-1 and E-94-1.

Typical strain: *Brevibacterium linens* D-87-11-2.

Rods, 0.5 to 0.8 by 1.0 to 1.5 microns. Non-motile.

Spore not formed. Gram-positive.

Nutrient agar colony: Circular, smooth, entire, pulvinate, glistening, opaque, yellowish white, medium brownish (Variation: Strain of E-94-1; medium unchanged).

Nutrient agar slant: Growth moderate, filiform, butyrous.

Nutrient broth: No surface growth, moderately turbid, slight sediment.

Glutamate agar slant: Scanty growth.

Levulinic acid agar slant: Good growth.

Nutrient gelatin stab: Slow liquefaction.

Action on milk: Alkaline, slow peptonization.

Action on nitrate: Reduced to nitrite (Variation: Strain of E-8-1-1; no action).

Hydrogen sulfide: Produced.

Indole: Not produced.

Voges-Proskauer test: Negative.

Methyl-red test: Negative.

Starch: Not hydrolysed.

Cellulose: Not hydrolysed.

Acid and gas production from carbohydrate: Neither acid nor gas from glycerol, xylose, arabinose, mannose, galactose, glucose, fructose, maltose, sucrose, lactose, rhamnose, raffinose, mannitol, sorbitol and galactitol.

Acid and gas production from carbohydrate according to Hugh and Leifson's method: Neither acid nor gas from glucose and glucose.

Relation to pH: Growth in range of 5.5~9.5.

Relation to temperature: Good growth at 37°C.

Relation to NaCl: Good growth at 12%.

Relation to free oxygen: Aerobic or facultative anaerobic.

Urease: Negative (Variation: Strain of E-17-1; positive).

Catalase: Positive.

Source: From soil.

これらの菌株はグラム陽性、卵型ないし短桿菌で運動性なく、胞子を形成しない。対数生育期にわずかに伸長状 ($0.5 \sim 0.8 \times 2.0 \sim 3.0 \mu$) を呈するが、分枝状細胞を示さず、その異型化は *Corynebacterium* のように明確でない。培地を茶ないし茶褐色化し、糖、糖アルコール、炭水化物より酸、ガスの生成なく、ゼラチンの液化、ミルクのペプトン化は緩慢で (7~10 日目頃から始まる) アルカリ性を呈する。食塩 12% 含有肉汁中で生育良好等の点より *Brevibacterium linens* に編入するのが妥当

であると考ええる。

(3) *Pseudomonas desmolytica* GRAY and THORNTON

Strains : D-39-1 and M-21-1.

Typical strain : *Pseudomonas desmolytica* M-21-1.

Rods, 0.6 by 1.0 to 3.5 microns. Motile with 2 to 10 flagella (Variation : Strain of D-39-1 ; 1 to 3 flagella). Spore not formed. Gram-negative.

Nutrient agar colony : Circular, contoured (Variation : Strain of D-39-1 ; smooth), entire, flat (Variation : Strain of D-39-1 ; capitate), glistening, translucent, pale olive, medium unchanged.

Nutrient agar slant : Growth abundant, filiform, butyrous.

Nutrient broth : No surface growth, strongly turbid, moderate sediment.

Glutamate agar slant : Good growth.

Levulinic acid agar slant : Good growth, slightly greenish fluorescence.

Nutrient gelatin stab : No liquefaction.

Action on milk : Alkaline, no peptonization.

Action on nitrate : Reduced to nitrite.

Hydrogen sulfide : Produced.

Indole : Not produced.

Voges-Proskauer test : Negative.

Methyl-red test : Negative.

Starch : Not hydrolysed.

Cellulose : Not hydrolysed.

Acid and gas production from carbohydrate : Acid but no gas from glucose and arabinose (Variation : Strain of D-39-1 ; neither acid nor gas from arabinose), neither acid nor gas from glycerol, xylose, mannose, galactose, fructose, maltose, sucrose, lactose, rhamnose, raffinose, mannitol, sorbitol and galactitol.

Acid and gas production from carbohydrate according to Hugh and Leifson's method : Acid but no gas from glucose aerobically, neither acid nor gas from lactose.

Relation to pH : Growth in range of 4.80~10.0.

Relation to temperature : Good growth at 37°C but no growth at 42°C.

Relation to NaCl : Good growth at 5% but slight growth at 7%.

Relation to free oxygen : Aerobic.

Catalase : Positive.

Urease : Negative.

Source : From sewage.

これらの菌株はグラム陰性、極毛を有する桿菌で胞子を形成せず、エタノールから酢酸を生成せず、培地中に淡緑色の蛍光性水溶性色素を生成することより *Pseudomonas* に属する。肉汁寒天、グルコース-グルタミン酸培地では水溶性色素を生成しないが、レブリン酸培地では淡緑色の蛍光性水溶性色素を生成する。ゼラチンの液化、ミルクのペプトン化はなく、アルカリ性を示し、グルコースより酸を生成する等より *Pseudomonas desmolytica* に近縁の菌とするのが妥当であると考えられる。

(4) *Pseudomonas aeruginosa* MIGULA

Strain : M-101-1-1.

Rods, 0.6 by 1.0 to 2.0 microns. Motile with monotrichous flagellum. Spore not formed. Gram-negative

Nutrient agar colony : Irregular, smooth, undulated, flat, glistening, translucent, dark brown, medium brownish.

Nutrient agar slant : Growth abundant, filiform, butyrous.

Nutrient broth : Ring or membranous, strongly turbid, slight sediment.

Glutamate agar slant : Good growth.

Levulinic acid agar slant : Good growth, strongly greenish fluorescence.

Nutrient gelatin stab : Rapid liquefaction.

Action on milk : Alkaline, rapid peptonization.

Action on nitrate : Reduced to nitrite.

Hydrogen sulfide : Produced.

Indole : Not produced.

Voges-Proskauer test : Negative.

Methyl-red test : Negative.

Starch : Not hydrolysed.

Cellulose : Not hydrolysed.

Acid and gas production from carbohydrate : Acid but no gas from glucose, neither acid nor gas from

glycerol, xylose, arabinose, mannose, galactose, fructose, maltose, sucrose, lactose, rhamnose, raffinose, mannitol, sorbitol and galactitol.

Acid and gas production from carbohydrate according to Hugh and Leifson's method: Acid but no gas from glucose aerobically, neither acid nor gas from lactose.

Relation to pH: Growth in range of 4.80~10.0.

Relation to temperature: Good growth at 42°C.

Relation to NaCl: Good growth at 5% but no growth at 7%.

Relation to free oxygen: Aerobic.

Catalase: Positive.

Urease: Negative.

Source: From sewage.

この菌株はグラム陰性、極単毛を有する桿菌で孢子を形成せず、エタノールから酢酸を生成せず、培地中に暗緑色の蛍光性水溶性色素を生成することより *Pseudomonas* に属する。ゼラチンの液化、ミルクのペプトン化は非常にすみやか (24 時間程度) で、アルカリ性を呈し、42°C での生育が良好なる点等より、*Pseudomonas aeruginosa* とするのが妥当であろうと思われる。

考 察

山口ら⁽⁹⁾の報告によれば、酵母によるレブリン酸の資化はかなり困難のようで、分離酵母による資化率は 2% レブリン酸含有培地、30°C、4 日間の培養で 60% 前後にとどまっている。細菌の場合はレブリン酸資化能を有するものが広く天然に分布しており、分類するとほとんど *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Brevibacterium* に属し、培地中のレブリン酸はほとんど完全に資化される。

Brevibacterium linens と同定した D-87-11-2, E-8-1-1, E-17-1, E-94-1 等の菌株はレブリン酸資化能を有するが、保存株である *Brevibacterium linens* IFO 12141 にはレブリン酸資化能が認められなかった。今回、レブリン酸資化性試験に供した *Pseudomonas desmolytica* IAM 1508, *Pseudomonas desmolytica* IFO 12570 の両菌株は、レブリン酸含有培地で培養すると淡緑色の蛍光性水溶性色素を生成した。この菌株は Bergey の分類⁽¹⁰⁾、Iizuka ら⁽¹¹⁾によれば、Achromogenic group に編入されている。このように培地条件の違いにより蛍光性色素を生成することがあるので、分類に際しては注意

を要する。脱脂大豆等蛋白質原料の酸による加水分解液中のレブリン酸を樹脂を用いて除去することが報告⁽¹²⁾されているが、これらレブリン酸資化性菌を用いて除去する方法については次報にゆずる。

要 約

(1) 保存株および土壌、汚水、食品等よりレブリン酸を唯一の炭素源として資化する能力を有する菌株を検索し、酵母 4 株、細菌約 200 株が得られた。

(2) 高い頻度で検出されたレブリン酸資化能の強力な細菌について同定を行なった結果、13-9, A-33-6, A-33-10-1, A-33-16, D-61-3-2, D-61-11, D-62-3, D-86-1, D-87-1, D-89-5, E-75-8, E-76-6 株を *Corynebacterium equi*, D-87-11-2, E-8-1-1, E-17-1, E-94-1 株を *Brevibacterium linens*, D-39-1, M-21-1 株を *Pseudomonas desmolytica*, M-101-1-1 株を *Pseudomonas aeruginosa* と同定した。

(3) 各種保存菌株につきレブリン酸資化能力を検討した結果、前項と同様に *Corynebacterium equi*, *Pseudomonas desmolytica*, *Pseudomonas aeruginosa* のほかに、*Arthrobacter simplex* にも資化能力が認められた。

(4) 分離されたレブリン酸資化性細菌のレブリン酸資化能力は強く、ほとんど完全に資化された。

終りにのぞみ、菌を分譲していただいた東京大学応用微生物研究所飯塚廣教授、財団法人醸酵研究所長長谷川武治博士、終始御指導、御鞭撻いただいた財団法人野田産業科学研究所専務理事茂木正利博士、当社中央研究所長横塚保博士、菌の同定に際し御指導、有益な御助言をいただいた野田産業科学研究所杉崎善治郎博士、電子顕微鏡写真を撮影していただいた当社中央研究所北原成之氏、分析の一部を担当された杉本洋子氏、ならびに本報告の発表を許可された当社役員各位に深甚なる謝意を表する。

本報の一部は昭和 43 年 4 月 1 日、日本農芸化学会大会において発表した。

- (1) 上野喬宏: 農化, **35**, 1184 (1961).
- (2) L. J. Wickerham and K. A. Burton: *J. Bact.*, **56**, 363 (1948).
- (3) 山口和夫, 相田徳二郎: 昭和 42 年度日本農芸化学会関東支部大会講演要旨集, p. 4.
- (4) 野村囃夫, 上原潤二郎, 飯倉善一郎, 横塚 保: 農化, **40**, 331 (1966).
- (5) W. L. Shilling and B. T. Hunter: *Anal.*

- Chem.*, **37**, 1420 (1965).
- (6) Society of American Bacteriologists: Manual of Microbiological Method, McGraw-Hill Book Co., Inco., New York, Toront, London (1957).
- (7) 医科学研究所学会編: 細菌学実習提要, 丸善 (1968).
- (8) 東京大学農芸化学教室編: 実験農芸化学(上巻), 朝倉書店 (1960).
- (9) 飯塚 廣, 瀬戸尚典: 醸協誌, **20**, VII-14 (1962).
- (10) R. S. Breed, E. G. D. Murray and N. R. Smith: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th Ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore (1957).
- (11) H. Iizuka and K. Komagata: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **9**, 73 (1963).
- (12) 田中武治, 副島正美, 青山虎彦, 八木 晃: 農化, **42**, 49 (1968).
-