総 説

石 油 発 酵

中 原 忠 篤

東京大学農学部農芸化学科 (東京都文京区弥生 1-1-1)

Petroleum Fermentation

Tadaatsu NAKAHARA

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo
(1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo)

1 は じ め に

石油発酵という言葉は言葉の使い方の善悪は別として、石油系炭化水素および広く石油化学製品を原料とする発酵という意味で使われている。本小文でも、これに従っておもに炭化水素を原料とする発酵についてすでに明らかにされてきたこととこれからの問題点について述べてみたいと思う。炭化水素と微生物のかかわり合いは、19 世紀末にさかのぼるが、微生物が炭化水素を炭素源として利用することを明確にしたのは Söhngen によるメタン酸化性菌の分離であった。その後、多くの炭化水素酸化性菌 (炭化水素を炭素源として利用し生育する微生物) が見いだされ、多くの情報が蓄積されてきた。しかしながら、これらの研究が応用的な研究に結びつくには、1963 年 Société Française de Pétrole BP の Champagnat らによって発表された gas oil の脱ロウと同時に微生物菌体を製造するという研究を待たねばならなかった。これを契機にして炭化水素を菌体製造の原料にしようという試みが世界各国において開始されることになった。これは当時から憂慮されていた世界の食糧危機特にタンパク質不足を克服する手段として多くの人々の注目を集め、非常に魅力的な研究テーマとなった。日本においても同様に、大学、公立研究機関、民間企業において精力的な研究が行なわれ、炭化水素を原料とする菌体の製造は企業化の寸前までいったのである。しかしながら御承知のように安全性の問題で日本における企業化はストップして現在に至っている。食飼料の安全性に関する問題は非常にむずかしい問題であるが根本的な問題であるので、十分な科学的検討を行なう必要がある。微生物利用学にたずさわる著者としては、安全性の問題が解決されて、微生物菌体が飼料あるいは食糧の給源に利用され、世界の食糧危機の解決策の一助となる

ことを期待したい。

以上述べたように、石油発酵においては微生物菌体に関する研究が世界的な流れであった。一方日本においては、微生物菌体の製造に加えて炭化水素を各種の代謝生物を製造するための原料にしようという意識が強く、したがって石油発酵は従来の糖質を原料とする発酵 (糖質発酵) に対する原料転換という観点では握られている。このことは日本における石油発酵の研究を多彩なものにした。すなわち、アミノ酸、核酸、ビタミン、抗生物質、酵素の生産などに (いずれも糖質を原料として発酵生産が行なわれているが)、炭化水素を利用することが試みられている。

原料転換の対象となる原料の備えるべき条件としては、① 微生物によって利用されやすいこと、② 安価であること、③ 供給が安定していることなどがあげられるが、食飼料を目的とする場合さらに重要なのは④ 毒性がないかあるいは製品に毒性が残らないことである。鎖状炭化水素の場合、①～③ の条件は良く満足するものの④ の条件にいくらか問題があるという指摘がなされている。これは原料中に微量混在する多環芳香族物質の問題で、この点についての議論は別の機会に譲りたい。

次に原料転換という立場からでなく、原料の特徴を発酵生産に利用しようという考え方がある。

たとえば、鎖状炭化水素をとりあげると、鎖状炭化水素はまずメチレン鎖の末端が酸化されて対応するカルボン酸が生成してくる。これらのカルボン酸は糖質から生産させることは困難であり、原料に対応した特殊な生産物であるといえよう。また各種芳香族炭化水素からはそれぞれ異なった代謝中間体が生成してくるので、これもまた原料の特徴を生かした利用法であり、この分野の研究には大きな期待が寄せられている。

以上は石油発酵を応用的な観点から見たものである

が、基礎的研究の対象としても石油発酵は興味ある問題を提供する。たとえば、短鎖の炭化水素を原料とすると、それはガス状であるので、ガス発酵という研究分野が生じる（技術的には好気培養における酸素の供給問題と同様に扱われる）。長鎖の炭化水素を原料とすると、これらは水不溶性であるので、従来の水溶性の糖質を原料とする発酵と異なる種々の問題が生じる。一般に微生物は水層中で生育するから、水不溶性の炭化水素がいかにして微生物にとり込まれ代謝されていくか非常に興味ある問題である。また炭化水素は分子中に酸素原子を含まないので、菌体やその他の代謝生産物を生成するために必要な酸素量は糖質発酵よりはるかに多い。

著者らの研究グループは炭化水素の微生物への取り込みについて重点的に研究しているので、炭化水素の酸化および代謝、発酵生産物などに関し述べた後、本問題につきいくらかふれたいと思う。

石油発酵に関する成書としては「石油発酵」²⁾、「発酵と微生物Ⅲ」³⁾、「Petroleum Microbiology」⁴⁾など、雑誌としては「石油と微生物」(石油発酵研究会発行)があり、その他多くのすぐれた総説が書かれている。

2 炭化水素の代謝

2.1 鎖状炭化水素の酸化

2.1.1 *n*-パラフィン

n-パラフィンは図-1に示すように、通常 terminal oxidation を受け、アルコール、アルデヒドを経て脂肪酸となり、ATP、CoA の関与により acetyl CoA が生成し、ついで β 位置の脱水素による β 酸化がおき、 C_2 unit が acetyl CoA としてとれて鎖が短くなって行く。この acetyl CoA は TCA 回路 (tricarboxylic acid cycle) に入り、さらに酸化されて最終的には炭酸ガスと水になるが、この間にエネルギーを獲得したり菌

図-1 *n*-パラフィンの代謝経路

体成分生合成のための代謝中間体が生成する。

terminal oxidation には monoterminial oxidation, diterminial oxidation および subterminial oxidation がある。多くの微生物では monoterminial oxidation によりモノカルボン酸が生じ、 β 酸化を受け酸化されていく経路が、主経路であろうと考えられているが、diterminial oxidation もしばしば見受けられ、特に *Candida* 属の酵母では β 酸化経路を細くすることによりジカルボン酸が著量蓄積してくる⁵⁾。このようなことから diterminial oxidation も微生物にとって重要な反応であると考えられる。本反応は酵母だけでなく細菌（たとえば *Corynebacterium*⁶⁾ や *Pseudomonas*⁷⁾）やカビ（たとえば *Botrytis*⁸⁾）でも観察されている。

subterminial oxidation の例は少なく、*Pseudomonas methanica*⁹⁾、*Mycobacterium smegmatis*¹⁰⁾ あるいは *Brevibacterium* sp¹¹⁾ など知られている。本反応は図-2に示すように α 位置の炭素が酸化されケトン化合物ができる反応であるが、多くの場合、短鎖の炭化水素を基質にしたときに見いだされている。長鎖炭化水素を基質にしたときの例としては、*Arthrobacter* 属の菌がペプトンあるいは酵母エキスの存在下で *n*-ヘキサデカンから 2-, 3-, 4-ヘキサデカノンを生じたという報告がある¹³⁾。

図-2 *Mycobacterium* によるプロパンの酸化¹²⁾

2.1.2 イソパラフィンの酸化

イソパラフィンは *n*-パラフィンに比較して微生物により酸化されにくい。末端に長い直鎖をもつものは比較的酸化されやすいが、側鎖の多いものは非常に酸化されにくいとされている。イソパラフィンを最もよく利用できる菌としては *Nocardia* が知られ、本菌はヘプタメチルノナン、スクレレン (2, 6, 10, 15, 19, 23-ヘキサメチルテトラデカン) やプリスタン (2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン) など利用できる。

2.1.3 オレフィン

オレフィンの酸化経路はパラフィンの場合ほど明らかにされていない。これまでの研究は末端に二重結合のある α -オレフィンの酸化に集中している。Klug ら¹⁴⁾は、*Candida lipolytica* を用い、 α -オレフィンの酸化を検討し図-3に示すように三つの経路を推定した。

図-3 *Candida lipolytica* による α -オレフィンの酸化¹⁴⁾

- ① メチル基の酸化
- ② 二重結合の酸化
- ③ subterminal oxidation

2.2 鎖状炭化水素の初発酸化の機構

炭化水素の初発酸化は次の酸化型式によって行なわれる。

- ① Monooxygenase による酸素添加反応 (oxygenation)

生体における oxygenation は早石らによって最初に発見されたもので、このときの基質は芳香族化合物であった。oxygenation に関与する酵素は Oxygenase と称され、Monooxygenase と Dioxygenase がある。現在までに多くの Oxygenase が単離精製され、それらの反応機構が詳細に検討されつつあるが、鎖状炭化水素の酸化に関与する Oxygenase の研究はまだ緒についばかりで不明な点が多い。

Peterson¹⁵⁾, Kusunose ら¹⁶⁾は *Pseudomonas oleovorans* および *P. desmolytica* を用い、炭化水素からアルコールを生成することのできる無細胞抽出液を得て検討した結果、*n*-パラフィンの水酸化と電子伝達系との関連を図-4 のように推定した。

- ② 脱水素反応による α -オレフィンの生成

(dehydrogenation)

図-4 *n*-パラフィンの水酸化¹⁵⁾

本反応は Azoulay ら¹⁷⁾および飯塚ら¹⁸⁾により、*P. aeruginosa*, *Candida tropicalis* および *C. rugosa* を用いて実証されたもので、補酵素として NAD が必要である。脱水素反応であるから最初の生成物は α -オレフィンであり、次に加水されてアルコールが生成してくる。したがって分子状の酸素の添加はおこらない。

2.3 芳香族炭化水素の酸化

芳香族炭化水素は鎖状炭化水素に比較して、微生物により酸化されにくく、したがって単なる炭基源としての発酵生産への利用という観点から見た場合メリットは少ないと考えられるが、その構造と種類および代謝経路が多様であることから、何か新しくてもおもしろい発酵生産物が発見される可能性があり、注目されている研究対象の一つである。

芳香族化合物は種類が多く、またその代謝経路は微生物の種類によっても異なるので、本文ではそれらのいくつかの例について記述することにとどめる。

微生物による芳香族炭化水素の代謝に関しては van der Linden の総説¹⁹⁾など多くのすぐれた総説^{20)~22)}があるので興味のある読者はそれらを参照されたい。

2.3.1 ベンゼン

ベンゼンはカテコールにまで酸化された後環が開裂し代謝されるが、カテコールへ至る経路に関してまだ不明な点が多い。図-5 にベンゼンの酸化経路を示す。ベンゼン資化性菌としては *Pseudomonas aeruginosa*²³⁾, *P. putida*²⁴⁾, *Mycobacterium rhodochrous*²⁵⁾, *Micrococcus sphaeroides*²³⁾, *Nocardia* sp.²⁵⁾ などが知られ

図-5 ベンゼンの代謝経路

図-6 トルエン酸化の推定経路

ている。

2.3.2 トルエン

トルエンの酸化経路としては *P. aeruginosa*²⁶⁾, *P. putida*²⁷⁾ などの菌を用いて 図-6 に示すような経路が推定されている。

2.3.3 アルキルベンゼン

n-アルキルベンゼンの酸化は、まず側鎖のアルキル基が酸化を受け、ついで環の開裂がおこるが、代謝中間体としてベンゼン核を有する種々の有機酸が生成してくる。これらの有機酸は側鎖のCの数が奇数か偶数かによって異なっている。またCの数が2~5の場合、単一基質として微生物を培養し有機酸の生成を報告した例はな

図-7 アルキルベンゼンの酸化²²⁾

図-8 ナフタリンの酸化²²⁾

く、Co-oxidation によってこれらの基質の酸化が行われる。Co-oxidation とは単独では酸化を受けない化合物が微生物の生育基質を共存させることにより酸化される現象をいう。

図-7 にアルキルベンゼンの酸化生成物をまとめる。

2.3.4 ナフタリン

ナフタリンは *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia*, *Bacillus* 属の細菌などによって酸化分解される。酸化経路としては 図-8 に示すように 1,2-dihydroxynaphthalene を経て環が開裂し、サリチル酸、カテコールを経て TCA サイクルに入るという経路が提示されている。

3 発酵生産物について

はじめに述べたように gas oil からの菌体生産に関する研究を契機として始まった石油発酵は日本において各種の発酵へ応用され、グルタミン酸をはじめとする各種アミノ酸、核酸関連物質、有機酸、脂肪酸、ビタミン、抗生物質、糖類など多くの発酵生産物が得られ、その中のあるものは工業的な段階まで研究が進んでいる。これら各種発酵生産物については多くのすぐれた総説が書かれているので本文では工業的に有望と考えられている生産物について簡単に記述したい。

3.1 菌体の生産

微生物菌体の生産の目的はおもにタンパク質源の確保にあるが、菌体はタンパク質のほか、脂質、炭水化物、ミネラル、ビタミンその他微量元素を含み、栄養的にも相当な価値があるといえよう。しかしながら核酸含量がかなり多いことや消化率の悪さあるいは安全性の問題など克服すべき問題点が残っており、今後の地道な研究がますます望まれる。

炭化水素を原料とする菌体生産菌には、酵母では *Candida* 属、細菌では *Pseudomonas* 属に優秀な菌が多い。またメタノール資化性菌としては *Kloeckera* sp., *Torulopsis methanovascense*, *T. glabrata*, *Candida methanolica*, *Pseudomonas* sp. などが得られているが、現在工業的に使用されようとしている菌は酵母である。表-1 および表-2 に生産菌の代表例を一覧する。

これらの表から微生物の生産性 (productivity) は他

表-1 生産菌の代表例

菌 名	基 質	菌 体 収 率 (g. 菌体/g. 基質)	比増殖速度(hr ⁻¹) (doubling time, hr)	粗タンパク含量 (%)	文 献
<i>Candida lipolytica</i>	<i>n</i> -パラフィン	0.85~1.0	0.2 ~0.35 (3.5~2)	47~60	(28)(29)
<i>Candida petrophilum</i>	"	1.0	0.32 (2.2)	50~56	(30)
<i>Micrococcus cerificans</i>	"	1.1 ~1.3	0.7 ~0.9 (1~0.8)	---	(31)
Mixed culture (Bacteria)	メ タ ン	0.6 ~0.7	0.11~0.198 (6.3~3.5)	---	(32)
<i>Torulopsis glabrata</i>	メ タ ノ ール	0.57	0.19 (3.6)	---	(33)
<i>Pseudomonas</i> sp.	"	0.52	0.52 (1.3)	86.5	(34)

表-2 微生物菌体の化学成分と必スアミノ酸組成*

研 究 場 所	BP Laveria**	BP Grangemouth	Esso	Shell	京大農学部
菌	酵 母 (<i>Candida</i>)	酵 母 (<i>Candida</i>)	細 菌	細 菌 (<i>Methylococcus capsulatus</i>)	酵 母 (<i>Kloeckera</i> sp.)
基 質	ガスオイル	<i>n</i> -パラフィン	<i>n</i> -パラフィン	メタノール	メタノール
水 分 (%)	5.0	5.0	—	—	4.0
粗 タ ン パ ク (%)	66	60	62~73	55	45.3
脂 質 (%)	0.5	8	10~15	—	5.2
炭 水 化 物 (%)	—	—	10	22.8	4.8
灰 分 (%)	10	6	6~12	—	6.9
必 ス ア ミ ノ 酸 (タンパク質当り%)					
Leu.	8.1	7.3	5.6	6.4	7.1
Ile.	5.4	4.7	3.6	4.1	5.1
Val.	5.7	5.6	4.5	5.4	5.3
Thr.	5.2	4.9	4.0	4.0	5.1
Met.	1.7	1.8	2.0	1.8	0.9
Cys.	0.9	1.1	0.6	—	Tr.
Lys.	7.7	7.1	6.5	4.1	7.5
Phe.	4.6	4.7	2.9	3.9	4.0
Try.	1.3	1.5	0.9	—	—

* 山田浩一, 石油と石油化学, 12, 41 (1968) から引用した表にいくつか書き加えた。

** ヘキサンで洗浄した菌体

の生物に比べて著しく大きいことがわかるであろう。なお種々の生物の増殖率（基準として重量が2倍になる時間をとる）はカビ、クロレラで 2.0~6.0 hr, 高等植物で 144~288 hr, ニワトリで 288~576 hr, ブタ, ウシで 672~1,440 hr といわれている。

3・2 アミノ酸の生産³⁵⁾

現在, L-グルタミン酸, L-リシン, L-スレオニンなど多くのアミノ酸が発酵法によって工業生産され, 発酵工業における一大部門を占めている。

炭化水素からアミノ酸を生産しようとする試みは, 山田, 飯塚らの両研究グループにより, まず L-グルタミン酸を蓄積させることから開始され, 現在ではほとんどのアミノ酸が炭化水素から生産されることが明らかになっている。収量についても研究初期のころに比較すると飛躍的に増加し, L-グルタミン酸は 84 g/l (対基質収率 84%) と著しく高収量で得られるようになった。

また炭化水素からばかりでなく, エタノールやメタノールなどの低級アルコール類からも L-グルタミン酸は著量生成する。

このような石油発酵による

アミノ酸生産の進展は, 従来の糖質利用のアミノ酸発酵における経験を背景にして生まれたものである。L-グルタミン酸発酵を例にして考えてみると, ペニシリン添加, 脂肪酸および界面活性剤の添加あるいは変異株の取得など従来の経験が縦横に駆使され, 収量の増加や発酵時間の短縮など好結果が得られている。しかしながら, 炭化水素利用のアミノ酸生産は糖質や酢酸を原料とした場合に比較し, 発酵時間が長くまた生産物の回収に問題点があるために工業化までにはいたっていない。

表-3 に炭化水素から生産されるアミノ酸を示す。

3・3 有機酸の生産

表-3 炭化水素からのアミノ酸の生産

アミノ酸	炭 素 源	収 量 (g/l)	生 産 菌
L-グ ル ミ ン 酸	グルコース	50~100	<i>Brev., Arth., Cory.</i>
	酢 酸	70~100 (50%)	<i>Brevibacterium</i> etc.
	エタノール	59 (66%)	<i>Brev. sp.</i>
	メタノール	10.5(11%)	<i>Methanomonas methylovora</i>
	安息香酸	80 (80%)	<i>Brevibacterium sp.</i>
	<i>n</i> -パラフィン	84 (84%)	<i>Cory. hydrocarboclastus</i> (Penicillin resistant)
L-リ シ ン	<i>n</i> -パラフィン	34 (34%)	<i>Nocardia sp.</i>
L-ト レ オ ニ ン	"	15	<i>Arthrobacter paraffineus</i>
L-イ ソ ロ イ シ ン	"	1.6	<i>Micrococcus paraffinolyticus</i>
L-ホ モ セ リ ン	"	12	<i>Corynebacterium sp.</i> (Thr. 要求株)
L-チ ト ル リ ン	"	9.5	<i>Arth. paraffineus</i> (Arg. 要求株)
L-チ ロ シ ン	"	18	<i>Arth. paraffineus</i> (Phe. 要求株)
L-フェニルアラニン	"	15	<i>Arth. paraffineus</i> (Tyr. 要求株)

表-4 炭化水素からの有機酸の生産

有機酸	収量 (g/g-基質)	生産菌
クエン酸	0.56 (28 g/l)	<i>Arthrobacter paraffineus</i> ³⁶⁾
	1.40 (84 g/l)	<i>Candida lipolytica</i> ³⁷⁾
	1.05~1.18	<i>Penicillium janthinellum</i> ³⁸⁾
α -ケトグルタル酸	0.86	<i>Corynebacterium</i> sp. ³⁹⁾
	0.9	<i>Candida lipolytica</i> ³⁰⁾
コハク酸	23.6 g/l	<i>Candida brumptii</i> ⁴¹⁾
フマル酸	0.84	<i>Candida hydrocarbofumarica</i> ⁴²⁾
L-リンゴ酸	0.7	<i>Candida hydrocarbofumarica</i> ⁴³⁾ + <i>Candida utilis</i> or <i>Pichia membranaefaciens</i>
	13 g/l	<i>Candida brumptii</i> ⁴⁴⁾

鎖状炭化水素から生産される有機酸はほとんど TCA 回路上の有機酸に限定されている。これまでに著量蓄積に成功したものとしては、表-4 に示すようにクエン酸、イソクエン酸、 α -ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸がある。また芳香族炭化水素からも種々の有機酸が生産される。たとえばナフタリンからサリチル酸、*p*-キシレンから *p*-トルイル酸、*p*-シメンからクミン酸、アルキルベンゼンからケイ皮酸、フェニル酢酸などが報告されている。

以上の有機酸の中で最も工業化の可能性の強いクエン酸について略述する。

クエン酸は果実やソ菜中に広く分布し、酸味の主体をなすもので、主に清涼飲料水、果実カン詰などの酸味剤として使用されている。現在、その生産量は世界で年間 10 万 t、日本で約 7,500 t に達し、発酵工業においては生産量の多いものの一つである。

クエン酸はキレート力が強いので、洗剤ビルダー用に使用されているトリポリリン酸ナトリウムの代替物としての用途が期待されており、さらに排煙中の亜硫酸ガスを除去するための吸脱着剤としての用途も考えられている。もしそのような新用途が開発されれば、クエン酸の生産量は飛躍的に増大するであろう。

炭化水素からクエン酸が著量生成することを最初に見いだしたのは田淵ら³⁷⁾である。使用した菌は *Candida lipolytica* であった。その後多くの菌がクエン酸を蓄積することが明らかにされ、また生産量も飛躍的に増大した。酵母を用いた場合にはイソクエン酸が副生してくるが、イソクエン酸の副生はクエン酸の収量を低下させるばかりでなく、クエン酸の回収精製を妨害するのでできるだけ低レベルに抑えなければならない。

田淵らは培地中の鉄イオン濃度を低く保つことによりイソクエン酸の副生を抑制したが⁴⁵⁾、実際の発酵生産において鉄イオン濃度を 1 ppm 以下に制御することはなかなか困難である。またアコニターゼの阻害剤であるモ

ノフルオロ酢酸の添加もイソクエン酸の生成を抑制するが、クエン酸が食品添加剤として使用されることを考慮すれば、このような阻害剤を使うことは好ましくない。そこで、この問題を解決するために秋山ら⁴⁶⁾はアコニターゼ活性の弱い変異株を誘導することを試み、イソクエン酸の副生を抑制することにみごとに成功した。

3.4 脂肪酸の生産

炭化水素の特徴を生かした発酵生産物としては鎖状炭化水素からの脂肪酸および芳香族炭化水素からの各種有機酸がある。これまでに得られている脂肪酸にはモノカルボン酸とジカルボン酸があるが、高分子物質あるいは香料の原料としての用途がある長鎖ジカルボン酸の微生物による著量蓄積は注目に値する。

ジカルボン酸は先にも述べたように *n*-パラフィンの diterminal oxidation により生成される。最初 Foster によって *Corynebacterium* 属の細菌がジカルボン酸をかなり蓄積することが報告された⁴⁷⁾。その後内尾ら⁴⁸⁾によって精力的に研究が進められ、*Candida* 属の酵母が原料炭化水素に対応するジカルボン酸を生産することが明らかにされた。さらに、かれらは優秀な生産菌である *Candida cloacae* 310 よりジカルボン酸資化能欠損変異株および *n*-アルカン資化能欠損変異株を誘導し、種々の培養条件の検討の結果、*n*-ヘキサデカン 10% (vol/vol) より最高 55.2 g/l の C_{16} -ジカルボン酸を得た。

以上、現在工業的に可能性のある発酵生産物について簡単に述べたが、抗生物質などの生理活性物質、ビタミン、核酸およびその関連物質など興味ある発酵生産物が

表-5 炭化水素からの各種生産物

生産物	生産菌
ビタミン、補酵素 ⁵⁰⁾	
ビタミン B ₂	<i>Pichia guilliermondii</i>
B ₆	<i>Pichia guilliermondii</i>
B ₁₂	<i>Rhodopseudomonas spheroides</i>
ビオチン	<i>Pseudomonas</i> sp.
Coenzyme A	<i>Candida tropicalis</i>
Coenzyme Q	<i>Candida tropicalis</i>
チトクローム c	<i>Candida lipolytica</i>
カロチノイド	<i>Brevibacterium</i> sp.
エルゴステリン	<i>Candida tropicalis</i>
核酸および関連物質	
イノシン ⁵¹⁾	<i>Corynebacterium petrophilum</i>
DNA ⁵²⁾	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
FAD ⁵³⁾	<i>Bacterium anitratum</i>
抗生物質	
クロラムフェニコール ⁵⁴⁾	<i>Corynebacterium</i> sp.
類似物質	
糖類	
グルコース	<i>Arthrobacter paraffineus</i>
トレハロース	"

次々に見いだされており、今後の研究がおおいに期待される。表-5 に種々の発酵生産物を一覧する。

4 微生物による炭化水素の取込み 機構へのアプローチ

炭素数が 10 以上の比較的鎖の長い *n*-パラフィンの微生物による取込み問題について述べる。

C_{10} 以上の *n*-パラフィンに水にほとんど不溶性であるために、その取込み様式は糖質などの水溶性基質の場合と異なっていると考えられ、培養上種々の問題を提示する。応用的には基質炭化水素の微生物への取込み速度が微生物の生育の律速段階にならなければ良いのであって、*n*-パラフィンをいかにしてよく分散させるか、またどの程度まで分散させれば良いかなどが当面の問題としてとり上げられてきた。

炭化水素を乳化分散させる方法としてはかくはんなどによる機械的分散法と界面活性剤添加による分散法があるが、界面活性剤の添加は菌の種類によってはむしろ阻害的に働く場合も多く、またコストの面からも望ましくない。そこで機械的かくはんと炭化水素の分散および微生物の生育の関係をj知ることが重要となってくる。一方炭化水素資化性菌は菌自身が炭化水素を乳化する力を持っていることが観察されており、単なる工学的なアプローチのみではこの問題の解明は困難であろう。

まず微生物により取り込まれる際の炭化水素の状態について考察してみよう。

これまでに提案された仮説を整理してみると図-9 に示すような三つの考え方がある。

図-9 微生物による炭化水素の取込みに関する作業仮説

第1の見解は水に溶解した炭化水素の取込みが支配的であるという説で、この説は炭化水素の溶解度の点から否定的である。

McAuliffe⁵⁵⁾ のデータを用いて計算すると *n*-dodecane 以上の炭化水素の溶解度は 10^{-2} mg/l 以下である。

Johnson⁵⁶⁾ は炭化水素の溶解度が小さいことを考慮して次のような考察をしている。炭化水素資化性菌の炭化水素に対する親和性が強い(ミハエリス常数が非常に小さい)ならば基質の溶解度が小さくても充分な生育が期待できるが、たとえミハエリス常数が0であっても拡散現象の律速を受けるので、実際の培養でみられるような生育は望めない。このような理由をもって第1の見解を否定した。Humphrey⁵⁷⁾ もまた同様な見解を述べており、さらに合衆⁵⁸⁾ はいくつかの仮定の下に数値計算

を行ない、水に溶解した炭化水素のみを利用して生育した菌の炭化水素消費量は全量の0.9%を越えないことを示し、Johnson や Humphrey の説を支持した。

現在では炭化水素の取込みは炭化水素油滴と菌の直接接触によって行なわれる、すなわち図-9 の case 1 と case 2 の場合が支配的であろうと考えられている。しかしながら case 1 と case 2 のどちらが支配的であるかについてはまだ不明な点が多く今後の問題であるが、この点に関しては菌の性質が密接に関係しており、菌の種類によってそれぞれ異なっているともと思われる。

たとえば *Candida guilliermondii* では accommodation 状態の油滴(長時間放置しても水から分離せず、光学顕微鏡では判別できない程の微小油滴)が利用されるであろうと考察されており、また *Candida petrophilum* では菌が油滴のまわりに付着し、flock 状態を形成しているときに生育が速いという観察⁵⁹⁾から、かなり大きな油滴もよく利用されると推論されている。Bakhuis⁶⁰⁾ は colloid mill を用いて種々の平均粒径を有する乳化基質を調整し、*Candida tropicalis* について調べた結果、油滴の平均粒径が 20~25 μ のとき増殖速度は最低になることを認めた。

著者らが使用している菌、*Pseudomonas aeruginosa* S₇B₁ は case 2 の場合、すなわち微小油滴が菌にとって最適である場合に相当するようであり、いくつかの興味ある現象も見いだされているので、本菌について以下に簡単に述べてみたい。

著者らは菌体生産菌として土壌より分離された *P. aeruginosa* S₇B₁ が界面活性剤の添加によって生育が著しく促進されることを認め、また菌の表面状態が比較的親水性であることを観察した⁶¹⁾。このことから本菌が炭化水素油滴を利用する場合、できるだけ接触面積が大きくなるように菌自身が何か乳化物質を分泌している可能性があると考えた。この考えに基づいて久塚^{62), 63)} は本菌の培養液から界面活性力を有しかつ菌の生育を促進させ、また呼吸活性を増加させるような物質を検索し、糖脂質である rhamnolipid とタンパク質様の高分子物質を単離精製した。

rhamnolipid は図-10 に示すように rhamnose 2 分

図-10 Rhamnolipid の構造

子と β -hydroxy decanoic acid 2 分子から構成されており、本物質の添加効果は *Pseudomonas aeruginosa* に特異的で、またグルコースや脂肪酸を基質にした場合は見られず、炭化水素を基質にしたときのみ著しかった。したがって rhamnolipid の添加効果は炭化水素のような難溶性基質の場合のみに特異的に見られる現象であると考えられる。

rhamnolipid はまた強い乳化力を有し、そのエマルションは非常に安定であった。

さらに超音波処理によってあらかじめ乳化した基質を用いた実験の結果から、rhamnolipid の添加効果はその乳化作用に基づくものであり、炭化水素-水界面の界面面積を広げるばかりでなく、炭化水素油滴のサイズを小さくするためであろうと考察している。

このような乳化力を有する糖脂質は表-6 に示すように rhamnolipid 以外にも二、三単離されている。

表-6 微生物により生成される乳化物質⁵⁴⁾

乳 化 物 質	菌	文 献
Trehalose lipid	<i>Arthrobacter</i> <i>Brevibacterium</i> <i>Nocardia</i> etc.	T. Suzuki <i>et al.</i> (1969)
Sophorose lipid	<i>Torulopsis</i> <i>magnoliae</i> <i>T. groenqieseri</i>	A.P. Tulloch <i>et al.</i> (1962) D.F. Jones <i>et al.</i> (1968)
Rhamnolipid	<i>P. aeruginosa</i>	K. Hisatsuka <i>et al.</i> (1971)
Peptide lipid	<i>Candida</i> <i>petrophilum</i>	T. Iguchi <i>et al.</i> (1969)

次にタンパク様高分子物質についてであるが、本物質は rhamnolipid の呼吸活性に対する作用を調べている間に新たに培養液中から呼吸活性を促進する物質として分離されたもので、硫酸アンモニウム塩析、各種クロマトグラフィーにより単離精製され、種々の呈色反応、UV 吸収スペクトル、アミノ酸分析、熱安定性などの結果から本物質がタンパク質であることが明らかにされた。

本物質もまた図-11 に見られるように、炭化水素を基質とした場合にのみ特異的な効果を持ち、rhamnolipid との間に相乗的な交互作用がある。

本物質の作用のメカニズムはまだ不明な点が多いが、EDTA によって処理された *P. aeruginosa* の呼吸活性と rhamnolipid および本物質の添加効果の検討から、本物質が炭化水素油滴を 0.22μ 以下に細粒化していることが推定された。

余語ら⁶⁴⁾はあらかじめふり分け油滴径をある程度そろえたワックスエマルションを調整し、油滴径と *P. aeruginosa* の呼吸活性との関係を調べ、油滴径が小さいほど基質として利用されやすいことを認めた。これら

図-11 各種基質の酸化に対する精製タンパク様活性化因子の影響

の結果から *P. aeruginosa* においては油滴径が小さい方が利用されやすく、油滴径を小さくするために rhamnolipid やタンパク様高分子物質を分泌していることが考察される。

5 お わ り に

石油発酵について応用的および基礎的な両面から略述してきたが、これから解明していかなければならない問題点が山積していることを痛感する。今後、界面化学、油脂関係の研究にたずさわっている研究者の協力を得て本分野の研究がますます進展することを望みたい。

(昭和 48 年 9 月 11 日受理)

文 献

- 1) A. Champagnat, C. Vermet., B. Laine, J. Filosa., *Nature*, **197**, 13 (1963)
- 2) 石油醗酵研究会編“石油醗酵”, (1970), 幸書房, 東京
- 3) 植村, 相田編, “発酵と微生物” 第三巻, (1971), 朝倉書店, 東京
- 4) J.B. Davis, “Petroleum Microbiology”, (1967), Elsevier Publishing Co.
- 5) R. Uchio, I. Shio, *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 426(1972)
- 6) A.S. Kester, J.W. Foster, *J. Bact.*, **85**, 859 (1973)
- 7) M.Y. Ali Khan, A.N. Hall, D.S. Robinson, *Nature*, **198**, 289 (1963)
- 8) 山田, 鳥越, 農化, **40**, 364 (1966)
- 9) M. Dworkin, J.W. Foster, *J. Bact.*, **72**, 646 (1956)
- 10) H.B. Lukins, J.W. Foster, *J. Bact.*, **85**, 1074 (1963)
- 11) J.R. Vestal, J.J. Perry, *J. Bact.*, **99**, 216 (1969)
- 12) 石油醗酵研究会編“石油醗酵” p. 298 (1970), 幸書房, 東京
- 13) D.A. Klein, F.A. Henning, *Appl. Microbiol.*, **17**, 676 (1969)
- 14) M.J. Klug, A.J. Markovetz, *J. Bact.*, **93**, 1847(1967)
- 15) J.A. Peterson, M. Kusunose, E. Kusunose, M.J. Coon, *J. Biol. Chem.*, **242**, 4334 (1967)
- 16) M. Kusunose, E. Kusunose, M.J. Coon, *J. Biol. Chem.*, **239**, 1374 (1964)

- 17) J. Chouteau, E. Azoulay, J.C. Senez, *Nature*, **194**, 576 (1962)
- 18) 飯田, 飯塚, 醱工, **47**, 442 (1969)
- 19) A.C. van der Linden, G.J.E. Thijssse, *Adv. Enzymol.*, **27**, 469 (1965)
- 20) E.J. McKenna, R.E. Kallio *Ann. Rev. Microbiol.*, **19**, 18 (1965)
- 21) 小林, 山田, 醱協誌, **21**, 453 (1963)
- 22) 大森, 石油と微生物, (5), 10 (1971)
- 23) E.K. Marr, R.W. Stone, *J. Bact.*, **81**, 425 (1961)
- 24) D.T. Gibson, J.R. Koch, R.E. Kallio, *Biochem.*, **7**, 2653 (1968)
- 25) T. Wieland, G. Griss, B. Haccius, *Arch. Mikrobiol.*, **28**, 383 (1958)
- 26) M. Kitagawa, *J. Biochem.*, **43**, 553 (1956)
- 27) D.T. Gibson, M. Hensley, H. Yoshida, T.J. Marby, *Biochem.*, **9**, 1626 (1970)
- 28) S.V. Chepigo *et al.*, 7th World Petrol. Congr., April (1967), Mexico
- 29) C. Gatellier, G. Glikmans, D. Ballerini, IFP Report, No. 15038, September (1967)
- 30) 城田, 早川, 渡辺, 井口, 武田, 日本農芸化学会大会講演, 昭和 44 年 4 月
- 31) K.R. Guenther, M.B. Perkins, *South African Patent*, Appl. No. 642075 (1964)
- 32) P.S. Vary, M.J. Johnson, *Appl. Microbiol.*, **15**, 1473 (1967)
- 33) H. Asthana, A.E. Humphrey, V. Moritz., *Biotech. Bioeng.*, **13**, 923 (1971)
- 34) 沢田, 沢田, 高田, 照井, 日本農芸化学会大会講演, 昭和 46 年 4 月 (東京)
- 35) 奥村, 石油と微生物, (7), 36 (1972)
- 36) 協和醱酵工業 (株), 日本特許公報, 昭 43-13677 (1968)
- 37) 田淵, 田中, 阿部, 農化, **43**, 154 (1969)
- 38) 木村, 田中, 日本農芸化学会大会講演, 昭和 45 年 4 月 (福岡)
- 39) 田中, 木村, 鈴木, 山口, 木下, 醱工, **47**, 291 (1969)
- 40) R. Tsugawa, T. Nakase, T. Kobayashi, K. Yamashita, S. Okumura, *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 158 (1969)
- 41) M. Sato, T. Nakahara, K. Yamada, *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1745 (1972)
- 42) K. Yamada, T. Furukawa, T. Nakahara, *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 670 (1970)
- 43) T. Furukawa, T. Nakahara, K. Yamada, *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1833 (1970)
- 44) 佐藤, 佐藤, 中原, 養田, 山田, 日本農芸化学会大会講演, 昭和 48 年 4 月 (東京)
- 45) 田淵, 田中, 田原, 阿部, 農化, **44**, 562 (1970)
- 46) S. Akiyama, T. Suzuki, Y. Sumino, Y. Nakao, H. Fukuda, *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 339 (1972)
- 47) J.W. Foster, 日本特許公告, 昭 38-15608 (1963)
- 48) R. Uchio, I. Shiio, *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1169, 1389 (1972)
- 49) S. Fukui, A. Tanaka, 8th World Petroleum Congress, 1971, (Moscow)
- 50) T. Iguchi, I. Takada, *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 709 (1966)
- 51) 富田, 鈴木, 日本農芸化学会大会講演, 昭和 46 年 4 月 (東京)
- 52) 西村, 飯塚, 農化, **46**, 639 (1972)
- 53) T. Suzuki, H. Honda, R. Katsumata, *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 2223 (1972)
- 54) 中原, 石油と微生物, (8), 33 (1972)
- 55) C. McAuliffe, *J. Phys. Chem.*, **70**, 1267 (1966)
- 56) M.J. Johnson, *Chem. Ind.*, September 5, 1532 (1964)
- 57) A.E. Humphrey, *Biotech. Bioeng.*, **9**, 3 (1967)
- 58) S. Aiba, K.L. Haung, V. Moritz, J. Someya, *J. Ferment Technol.*, **47**, 211 (1969)
- 59) A. Mimura, S. Watanabe, I. Takeda, *J. Ferment. Technol.*, **49**, 255 (1971)
- 60) E. Bakhuis, P. Bos, Antonie van Leeuwenhoek, 35, Supplement, Yeast Symposium. F 47 (1969)
- 61) 中原, 久塚, 唐木, 佐野, 山田, 日本醱酵工学会大会講演, 昭和 44 年 11 月 (大阪)
- 62) K. Hisatsuka, T. Nakahara, N. Sano, K. Yamada, *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 686 (1971)
- 63) K. Hisatsuka, T. Nakahara, K. Yamada, *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1361 (1972)
- 64) 余語, 中原, 養田, 日本醱酵工学会大会講演, 昭和 48 年 11 月 (大阪)