微生物による炭化水素の利用に関する研究 (第 8 報)

アルカン資化性カビのスクリーニングとカビによるアルカンの酸化生成物

山田 浩一, 鳥越 靖 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 41 年 4 月 19 日 受理

Studies on the Utilization of Hydrocarbons by Microorganisms

Part VIII. Screening of Alkane-Assimilating Molds and their Oxidative Products from Alkanes

By Koichi YAMADA and Yasushi TORIGOE

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
The University of Tokyo

Many reports have already been published about the studies on the utilization of hydrocarbons by microorganism. However, most of them were concerned with bacteria or yeasts and we have only a few reports concerned with molds in this field, so we were much interested in the study on hydrocarbon-utilizing mold. We have isolated 380 strains of molds from 230 kinds of samples (soil, water, vegetables, etc.) by repeating alternately accumulation culture and plate culture techniques in the media containing alkanes and mineral salts. In addition to these 380 strains, 70 strains already stocked in our laboratory as the hydrocarbon-utilizing molds were examined if any organic acids of economic value can be produced by these hydrocarbon utilizers. Stable cultures of these molds were carried out in the medium containing 3.0% of alkanes and mineral salts, and we found that 10 strains out of 450 strains of molds produced organic acids in their broths.

The main acids produced from alkanes were the mono- and diterminal carboxylic acids (e.g., pelargonic and azelaic acids from *n*-nonane, and capric and sebacic acids from *n*-decane). We thought it very interesting that we could demonstrate the fact that the mono- and diterminal oxidations take place during the early oxidative steps of alkanes by molds. One of these acid-producing molds numbered S 547 was classified into the genus *Botrytis* of Imperfect Fungi.

(Received April 19, 1966)

I. 緒 言

多くの微生物が炭化水素を唯一の炭素源として生育し得ることは古くから知られており, ここ数年来, 種々の炭化水素の微生物による醗酵転換に関する研究も数多く報告されている。パラフィン系炭化水素を基質としてのアミノ酸醗酵⁽¹⁻³⁾, 有機酸醗酵, ナフタレンを基質としてのサリチル酸醗酵⁽⁴⁾, パラサイメンを基質としてのクミン酸醗酵⁽⁵⁾, パラフィン系炭化水素を基質としての酵母菌体の生産⁽⁶⁻⁸⁾等がその主なものであるが, これら諸報告の大部分は, 細菌, 酵母に関するものであって, カビに関するものは非常に数少なく, 生産物の記載のあるものはアルカンを基質としての *Penicillium* 属によるジピコリン酸醗酵⁽⁹⁾, *Gibberella fujikuroi* によるジベレ

リン酸醗酵⁽¹⁰⁾, および宮本らの研究⁽¹¹⁾が主なものであって, 他は単にカビの生育を記載⁽¹²⁾した程度に留まっている。われわれはこの点に着目し, 直鎖状飽和炭化水素を唯一の炭素源として生育し得るカビを自然界より分離し, これらの代謝生成物に関して検討を行なったので, その結果を報告する。

II. 炭化水素資化性カビの分離

1. 分離用培地

分離用培地としては, Table 1 に示す組成のものを用いた。炭素源となる炭化水素としては, 従来の諸報告によって, 微生物によって比較的資化され易いと考えられるパラフィン系炭化水素の中から, *n*-nonane から *n*-octadecane までの 10 種のアルカンの等容量混合物を用

いた。窒素源としては、アンモニア態窒素と硝酸態窒素を共に有する硝酸アンモニウムを用いた。Tween-20 は、これを添加することによって、液体培地中における炭化水素の分散を助け、炭化水素の水層との接触面積を大きくし、微生物による利用度を大きくするのに有効であると考えられる。また、

本実験の目的の微生物はカビであるので、分離源として用いた試料中に存在する細菌の生育を抑制するために、クロラムフェニコール 0.002% (w/v) を添加した。これによって細菌の生育はほぼ完全に抑えることができた。平板培養および斜面培養に用いる固体培地においては、Table I の組成のものに寒天 2% (w/v) を添加し、殺菌固化後、あらかじめ別に殺菌しておいた上記の炭化水素混合物に浸した濾紙を固体培地上に置き、濾紙面より生ずる炭化水素のガスによってカビを生育させた。培地の殺菌は、液体、固体両培地共 115°, 10 分間で行なった。

2. 分離方法

分離源試料またはその懸濁液の平板培養による従来一

Table I. THE COMPOSITION OF ISOLATION MEDIUM

Hydrocarbon*	10	g
NH ₄ NO ₃	1.0	"
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.2	"
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0.005	"
KH ₂ PO ₄	4.7	"
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	0.3	"
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0.01	"
MnSO ₄	0.002	"
Ashed yeast ext.	0.008	"
Chloramphenicol	0.02	"
Tween-20	0.05	"
Dist. water	1,000	ml
pH		

* Equal volume mixture of alkanes from *n*-nonane to *n*-octadecane.

般的な分離方法と、既に山田ら⁽¹³⁾によって炭化水素資化性微生物の分離に有効であると報告されている集積培養法とを併用した。集積培養法による分離手順を Fig. 1 に示す。なお、分離源が土壌である場合は、これをそのまま試料とし、果実、野菜等の天然有機物である場合は、これらを滅菌水 100 ml を含む 500 ml の肩つきフラスコに各々約 5 g 入れ、20 時間振とうした後の懸濁液を試料として用いた。集積培養において、初め振とう培養を行なったところ、酵母の生育がカビのそれに比較して優勢となり、カビの分離方法として不適当であると考えられたので、静置培養を行なった。静置培養においてはカビの生育が酵母のそれに優り、良好な結果で得られた。

a) 分離用液体培地 40 ml を 300 ml のエルレンマイヤーフラスコに入れ、試料約 0.5 g を接種し、30° で 7~10 日間静置培養して炭化水素資化性カビを集積させる。
b) これを分離用固体培地によって常法どおり平板培養を行なう。30° で 5~7 日間で平板上にカビの集積が認められるようになる。これらの集落のうち、異種のカビと考えられるものについて、それぞれ a) と同様の方法にて集積培養を行なった後、分離用固体培地を用いて再び平板培養を行なう。c) 平板上に生じた各集落のうち、異種のカビと考えられるものを各々、分離用固体培地によって斜面培養を行ない、第 1 次保存菌株とする。これら菌株をさらに分離用固体培地によって平板培養を行ない、純粋であるか否かを検討し、純粋であると認められたものは、固体培地で斜面培養を行ない第 2 次保存菌株とし、純粋でないとも認められたものについては、再び分離用固体培地で平板培養を繰返す。以下の実験にはすべて第 2 次保存菌株を使用した。

3. 炭化水素資化性カビの分布

上記の手順によって、油浸土壌、市街地、畑、水田土壌、汚泥、河川水、果実、野菜等の天然有機物等 230 の試料より、380 株の炭化水素資化性カビが得られた。これらの炭化水素資化性カビの分布は、精油所付近等の炭化水素を含む土壌中に偏在することなく、広く一般の畑、水田土壌、果実等に存在していることが認められた。

III. 有機酸生成カビの検索

上に得られた 380 株のカビ、および既に炭化水素資化性カビとして当教室に保存されている 70 株のカビの個個について、その有機酸生成能をペーパークロマトグラフィ (PPC) [展開剤: ブタノール、酢酸、水 (4:1.5:1), BCG 発色] によって検討を行なった。この際初めに

Fig. 1. Isolation Method.

使用した培養液は、炭化水素 (*n*-nonane から *n*-octadecane までの10種のアルカンの等容量混合物) を3% (v/v), yeast extract 灰化物の代りに CSL 100 mg/l 添加, クロラムフェニコール無添加とした以外は, Table I の組成と同一のものである. この培養液 40 ml を 300 ml のエルレンマイヤーフラスコに入れ, 30° で 22 日間静置培養を行ない, その間 2 日おきにサンプリングを行ない, 上記の PPC によって有機酸生成の検討を行なったが, このときまでに使用した 50 株のカビすべてにおいて培養液の pH の低下が認められ, カビの生育も悪く, 有機酸の生成はいずれの株においても認められなかった. これは, 窒素源として用いた硝酸アンモニウムのアンモニア態の窒素が優先的にカビによって利用され, 残った硝酸イオンの影響で培養液の pH が低下し, カビの生育も悪く, 有機酸の生成も行なわれないものと考えられたので, 窒素源として硝酸アンモニウムの代わりに尿素 0.75 g/l を用いることにして, 再び上の約 50 株について有機酸の生成能を検討し直したところ, この中の 2 株において有機酸の生成が認められたので, 以後の実験においては窒素源として尿素を用いることにした. なお, この際, 培養液は尿素溶液を 110°, 瞬間で殺菌したものを, あらかじめ別殺菌しておいた培養液(窒素源を含まない)に無菌的に添加することによって調製した. その結果, 検討を行なった 450 株のカビより Table II に示すごとく 10 株の有機酸生成能を有するカビが得られた. 10 株すべてに共通するものは, 上記の展開剤における PPC の R_F 値が 1.0 の BCG 発色性物質で, このものは 10 株すべてにおいて再現性もよく, 他の R_F 値を示す物質と比較しても PPC 上でのスポットの強度も強い. これに反し

Table II. STRAINS OF ORGANIC ACIDS PRODUCERS AND R_F VALUES OF PRODUCED ORGANIC ACIDS FOUND ON PPC*

Strain No.	R_F Value	Day of cultivation
N 19	0.46, 1.0	18
N 27	0.32, 1.0	20
N 39	0.23, 0.31, 1.0	20
N 69-2	0.36, 1.0	23
N 72	0.59, 1.0	20
S 401-2	0.27, 1.0	12
S 417-1	0.74, 0.90, 1.0	21
S 455-1	1.0	12
S 494	1.0	12
S 547	1.0	16

* Solvent: butanol, formic acid, water (4:1.5:1)

TABLE III. COMPARISON OF TWO CULTURAL METHODS ON STRAIN S 547

Cultural method	Day of cultivation				
	7	10	13	16	19
Stationary	—	—	+	++	+
Shaking	++	+++	++	+	

—: spot of organic acid was not detected.

+: spot of organic acid was detected.

#: strong spot of organic acid was detected.

###: very strong spot of organic acid was detected.

R_F 値 1.0 以外の数種の BCG 発色性物質は, 培養期間中その消長が不安定で, かつ再現性にも乏しいものであった. なお, これら 10 株のうち, S 547 株と名づけた株のみが振とう培養が可能であり, かつ Table III に示すように, 振とう培養の方が静置培養に優るので以後の実験では S 547 株については振とう培養を行なった. 条件は 30°, 振とう数 126 r. p. m., 10 日間培養とした. 他の 9 株についてはすべて静置培養の結果である.

IV. 易資化性炭化水素

以上の実験は, 炭素源炭化水素として *n*-nonane から *n*-octadecane までのアルカンの等容量混合物を使用した結果であるが, 有機酸生成能を有するこれら 10 株のカビが, 果してこれらの諸アルカンを無差別に, 同程度に資化しているものか否かを検討するために, 上記の炭化水素等容量混合物で培養したものについて得た Fig. 2 の C 区分を無水硫酸ナトリウムで脱水後, エーテルを溜去し, 残渣をガスクロマトグラフィー (GLC) にかけた結

Fig. 2. Fractionation Procedure of Broth.

Fig. 3. Gas Liquid Chromatogram of Residual Alkanes obtained from the Broth of Strain S 547.
Column: Thermol-3, Shimadzu Seisakusho Ltd., 2.5m×1/4 in. O.D., 48 cc of He per min., temp. 203°C.

Fig. 4. Gas Liquid Chromatogram of Alkanes recovered from Medium after Autoclaved and Stood at 30°C for 22 Days.
Column: Same as in Fig. 3, 45 cc of He per min., temp. 203°C.

果の 1 例を Fig. 3 に示す. Fig. 3 に示したものは S 547 株における 1 例であるが, 他の 9 株についても全くこれと同様の結果が得られた. この対照実験として, 上記の炭化水素混合物を培養液に添加し, 同条件で殺菌後, 30° に 22 日間放置した後, 同様に Fig. 2 の C 区分を得, 同様にして GLC にかけ結果を Fig. 4 に示す. この結果からこれら 10 株の炭化水素資化性カビは, *n*-nonane, *n*-decane をよく資化し, ついで *n*-undecane, *n*-dodecane あたりまでを資化し, *n*-tridecane 以上のものはほとんど資化しない. すなわち, 炭素鎖の短いもの (低沸点のもの) ほど良く資化する傾向にあると考えられる. なお, 本実験に使用したカビの培養日数が一般的に長く, かつ静置培養であるために, 経時的に炭化水素を添加することが煩雑, 困難であるので, 現在までのところ *n*-octane 以下の低沸点アルカンについてはデータを得ていない.

V. カビによるアルカンの mono-, diterminal oxidation

以上の結果から, *n*-nonane, および *n*-decane を各々唯一の炭素源として, 上記の 10 株を培養した後, 各々から Fig. 2 の A 区分を得, この区分に含まれる物質を薄層クロマトグラフィー (TLC) によって検討した結果の 1 例を Table IV に示す. Table IV に示したものは S 547 株における 1 例であるが, 他の 9 株においても同様の結果が得られた (Table IV に示された R_F 値のスポット以外に他の R_F 値の微弱なスポットを与えたものもある). 3 種の溶媒系における TLC の結果から, これら 10 株すべてが *n*-nonane から nonanoic acid (ペラルゴン酸), nonane dioic acid (アゼライン酸) を, および *n*-decane から decanoic acid (カプリン酸), decane dioic acid (セバシン酸) を生成していることが認められる. その他の R_F 値を与えるスポットは, すべて微弱

Table IV. IDENTIFICATION OF ORGANIC ACIDS PRODUCED BY STRAIN S 547

Solvents	R_F values of organic acids found on TLC							
	S-1*	S-2**	Capric acid	Pelargonic acid	Caprylic acid	Enanthic acid	Azelaic acid	Sebacic acid
Benzene, Dioxane, Acetic acid (90 : 25 : 4)	0.40	0.42						
	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.40	0.42
	1.0	1.0						
Ethanol, Ammonia water (50 : 1)	0.03	0.03					0.03	0.03
	0.45	0.42	0.42	0.45	0.48	0.50		
	1.0	1.0						
Ether	0.03	0.03					0.03	0.03
	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65		
	1.0	1.0						

* A-fraction of broth cultured on *n*-nonane as a sole carbon source.** A-fraction of broth cultured on *n*-decane as a sole carbon source.

Fig. 5. Infrared Spectra of the Product. (solvent : Nujol)

A : Authentic nonanoic acid B : Product

Fig. 6. Infrared Absorption Spectra of the Product. (solvent : Nujol)

A : Authentic nonane dioic acid B : Product

でまた再現性にも乏しいので、現在のところ未同定である。S 547 株の *n*-nonane を唯一の炭素源とした培養液より得た Fig. 2 の A 区分の TLC より、nonanoic acid

および nonane dioic acid に相当する R_F 値の区分を各各切りとり、これを各々 99.5% アルコールで抽出して得られた物質の赤外線吸収スペクトルは、Fig. 5, Fig. 6

に示すとおり, 各々市販の nonanoic acid および nonane dioic acid の再結晶品とよく一致した吸収スペクトルを示している. 以上の結果から, 既に細菌において Foster ら⁽¹⁴⁾により確認されている alkane の mono- および diterminal oxidation, および酵母において有馬ら⁽¹⁵⁾により確認されている alkane の diterminal oxidation と同様に, カビにおける alkane の酸化過程においても mono- および diterminal oxidation の存在する事実が確認された. なお, 上記 10 株各々の Fig. 2 の B 区分の TLC においても, 同 A 区分の TLC と全く同様の弱いスポットが得られたが, これは A 区分の物質の混入したものと考えられる.

VI. S 547 株における有機栄養源添加の影響

n-Nonane を唯一の炭素源として S 547 株を 10 日間, 30° で振とう培養して得られる nonanoic acid, および nonane dioic acid の生成量に対し, casamino acids (DIFCO 製の Vitamin free casamino acids 1g につき, トリプトファン, シスチン, アスパラギン酸を各々 20 mg 添加したもの) が 20 mg/l 添加時において若干の効果を示した (Fig. 7) が, その他の有機栄養源である CSL, Vitamin mixture (チアミン, リボフラビン, ビリドキシン, 葉酸, PABA, ニコチン酸, パントテン酸, ビオチン) および酵母エキスを添加効果が認められなかった. なお, 酸の定量は Fig. 2 の A 区分を N/200 NaOH で滴定することによって行なった (上記のように TLC によると nonanoic acid および nonane dioic acid に相当しない R_F 値を示すスポットが得られるが, これらはこの両酸のスポットに比較して常に微弱であるので, このアルカリ滴定値はほぼ両酸の量の和に相当すると考えられる).

Fig. 7. Effect of Casamino Acids on Nonanoic Acids and Nonane Dioic Acid Production.

VII. S 547 株の形態的特徴

上記の有機酸生成能を有する 10 株のカビのうち, 振とう培養によっても有機酸を生成する唯一のものである S 547 株を麴寒天培地, およびツァペック-ドックス氏寒天培地にて 30° で培養したものの形態的特徴を以下に記す.

Mycelium: not coenocytic, with frequent septa, rhizoid absent.

Conidiophores: present, distinct from conidia, not united into sporodochia or synnmata, mostly branched (not verticillate, irregular), hyaline.

Conidia: present, not coiled, globose to oval, 1-celled, attached singly on short sterigmata, not in chains, abundant in loose clusters, not in

Fig. 8. Photomicrograph of Strain S 547.

Fig. 9. Photomicrograph of Conidial heads of Strain S 547.

slime drops, dry.

これらの形態的特徴を, Barnett (Illustrated Genera of Imperfect Fungi, Second edition, 1960), および Clements and Shear (The Genera of Fungi, 1957) の分類法を参照して検討した結果, 本株は不完全菌の *Botrytis* 属に属するものと考えられる.

要 約

(1) *n*-Nonane から *n*-octadecane までの 10 種のアルカンの混合物を炭素源とする合成培地を用いて, 230 の土壌, 天然有機物等の試料より, 炭化水素資化性カビ 380 株を得た.

(2) これらの炭化水素資化性カビは, 精油所付近等の炭化水素を含む土壌中のみならず, 広く一般の畑, 水田, 市街地土壌, 果実等に一樣に存在している.

(3) 新たに分離した 380 株, および当教室に既に保存されていた 70 株の炭化水素資化性カビ中より, 10 株の有機酸生成能を有するカビを得た.

(4) これら 10 株のカビによって生成される有機酸の主体をなすものは, 基質アルカンの一端または両端がカルボキシル化された, モノおよびジカルボン酸である. すなわち, カビによるアルカンの酸化過程には, mono- および diterminal oxidation の段階が存在する.

(5) これら 10 株のカビのうち, 振とう培養によっても生酸能を有する唯一の株である S 547 株は, その形態的特徴から不完全菌の *Botrytis* 属に属するものと考えられる.

- (1) J. Takahashi, K. Kobayashi, Y. Imada, K. Yamada : *Appl. Microbiol.*, **13**, 1 (1965).
- (2) T. Iguchi, I. Takeda, S. Seno : *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 589 (1965).
- (3) 井口 喬, 早川司郎, 武田 勲 : 本誌, **40**, 26 (1966).
- (4) 石倉知之, 西田浩史, 丹野和信, 宮地 昇, 尾崎浅一郎 : 日本農芸化学会昭和 40 年度大会講演要旨集, p. 200.
- (5) K. Yamada, S. Horiguchi, J. Takahashi : *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 943 (1965).
- (6) 高橋穰二, 川端康郎, 山田浩一 : 発酵と代謝, **10**, 91 (1964).
- (7) A. J. Markovetz, R. E. Kallio : *J. Bact.*, **87**, 968 (1964).
- (8) K. Arima, S. Ogino, K. Yano, G. Tamura : *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 1004 (1965).
- (9) P. H. Hodson, W. A. Darlington : *J. Bact.*, **88**, 803 (1964).
- (10) O. Hitzman, M. Mills : U. S. P., 3, 084, 106 (1963).
- (11) 宮本義男 : 日本農芸化学会昭和 40 年度大会講演要旨集, p. 198.
- (12) R. S. Flippin, C. Smith, M. N. Mikelson : *Appl. Microbiol.*, **12**, 93 (1964).
- (13) 山田浩一, 高橋穰二, 小林加悦, 今田幸男 : 発酵と代謝, **7**, 79 (1963).
- (14) A. S. Kester, J. W. Foster : *J. Bact.*, **85**, 859 (1963).
- (15) K. Arima, S. Ogino, K. Yano, G. Tamura : *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 1009 (1965).