炭化水素発酵，最近の進歩について

児 玉 徹*

Recent Progress in Hydrocarbon Fermentation.

Tohru KODAMA*

Since 1960's, many kinds of microorganisms have been reported which are able to utilize various kinds of hydrocarbons and their derivatives. These microorganisms have been considered to be useful for their abilities of not only decomposing various organic pollutants in natural environment but also producing cellular materials and metabolites.

Recently, however, decreased number of the reports appear to be published on the fermentations performed with hydrocarbons as substrate, mainly because of the elevated cost of those substrates.

Thus, the investigations of hydrocarbon fermentation are now focused on the products which are formed from hydrocarbons in preference to conventional substrates such as carbohydrates, and some of them, for example, the production of long chain dicarboxylic acids are already industrialized.

In this review, recent papers on the microbial utilization of gaseous hydrocarbons, long chain aliphatic and isoprenoid hydrocarbons and their derivatives are summarized, especially from the applied point of view.

1. はじめに

炭化水素を発酵の基質とする試みは，人口増と蛋白質不足を背景として，特に食糧と競合しない原料である利点から，1960年代にはなやかな脚光を浴びて登場してきた。以後十数年にわたって *n*-アルカン，*n*-アルケン，芳香族炭化水素，脂環式炭化水素およびそれらの誘導体を基質として多くの研究が行われてきたのは周知の通りである。それらのいわゆる炭化水素発酵は，原料転換の見地から微生物蛋白 (SCP, single cell protein) その他の有用物質生産を目標として行われたのみならず，炭化水素基質特有の生産物をもそのねらいとしていた。しかしながら，石油ショックに伴う炭化水素価格の高騰などが原因となって，最近では一部の国における *n*-パラフィンからの SCP 生産を除いては一時ほどの華々しさは見られない。現在では一般的には，むしろ天然ガスを

原料としたメタノールが価格，扱い易さの面から有望視されるようになっているが，一方，前述のように炭化水素基質には特有の生産物が期待できるなどの利点もあって，地道な研究は行われており，中には工業的生産に至った例も見られるようになっている。そこで，ここでは多くの研究を網羅することは不可能でもあるので避けることとし，特に1980年代に入ってから報告を中心にして成果の一部のみを重点的に紹介することにしたいと思う。また，内容的にはなるべく発酵生産を目的としたものを選んだため，特にその方面の研究が盛んなわが国における研究例紹介の比重が高くなったことをあらかじめお断りしておく。

2. 直鎖状炭化水素および関連化合物の微生物変換

直鎖状炭化水素の中でも，短鎖の気体状のものは物性などが異なるために微生物の対応が違っているが，液状 *n*-アルカンや *n*-アルケンは炭素骨格をほとんど変えることなく生産物の一部としてとりこまれたり，部分的に酸化されることにより生産物に移行することがよく知られている。このような生産物は炭水化物を基質としては生成されないか，生成されてもプロセスとして不利であ

* 東京大学農学部農芸化学科 ()

* Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo ()

るため、炭化水素発酵の目標物質として有望視される^{1,2)}。中でも実働の段階に入った *n*-パラフィンからの長鎖ジカルボン酸の生産(日本鉱業)はこのような分野での成功例として、同じ原料からの微生物蛋白、クエン酸の生産とは別の意味で特筆に値する。

長鎖ジカルボン酸はその特殊な用途として、付加価値の高い香料への利用が知られており、微生物による *n*-アルカンからの対応するジカルボン酸への転換は、すでに Uchio ら(味の素)が *Candida cloacae* 310 株³⁾ およびその変異株^{4,5)} を用いて成功していた。この度の工業化はそれらの基礎技術をもとにして、同じ *Candida* 属酵母を用いて *n*-パラフィンから C_{18} -ジカルボン酸を 70% 以上の収率で生産するというものである。生産されたジカルボン酸はエチレンブシレート用として使われ、ジャコウの香りを有する、いわゆる大環状 musk として、現状でも世界市場の半分を供給する能力をもっているといわれる。

上記の長鎖ジカルボン酸の大量生成は、*n*-アルカン資化性酵母から *n*-アルカンおよび目的ジカルボン酸の資化能をともに欠失させた変異株を誘導することによって成り立ったのであるが、Kaneyuki らはナイロン原料として用いられるセバシン酸(C_{10} ジカルボン酸)を *n*-デカンから生成させることを目的として同様の手法を酵母 *Torulopsis candida* 99 株に適用した⁶⁾。83 時間培養で収率を約 37% まで上げており、このような手法により各種の鎖長のジカルボン酸を生成させることが可能と思われる。

n-アルカンあるいは脂肪酸を基質として特異的に生成されることが見いだされた物質のもう一つの例は界面活性性を有するいろいろの糖脂質である。各種の微生物が *n*-アルカンのような水不溶性の基質を資化するためには、まず基質をとりこみ易くするように菌自身が界面活性物質を生成することは知られていたが、最近 *n*-アルカン資化性酵母による大量生成が報告された。Ito ら^{7,8)} は *Torulopsis bombicola* が培地中に大量に生成する sophorolipids (図1) が C_{10} ~ C_{20} の *n*-アルカンに生育する時に限って生育促進作用をもつこと、この物質が類縁酵母である *Candida* や *Pichia* などの菌には無効が阻害を与え、*Torulopsis* 属の生育に特異的であることを示した。一方、Nakahara ら^{9,10)} は *Candida* sp. B-7 株が C_7 ~ C_{14} のアシル基をもつ mannosylethritol lipid (図2) を *n*-アルカンまたはトリアシルグリセロールを基質とした時にのみ培地中に大量に蓄積することを認めた。いずれの糖脂質も生成のためのアシル基の供給源としては、*n*-アルカンよりもパーム油、大豆油などの

Fig. 1 Structures of major components of sophorolipids produced by *T. bombicola*⁸⁾.

Fig. 2 Structure of mannosylethritol lipid¹⁰⁾.
 R_1 and R_2 ; fatty acid residues ($C_7 - C_{14}$)

植物油の方がすぐれていることが知られ、特に sophorolipids の場合には培地中蓄積濃度を 100 g/l 以上にも上げることに成功したため、保湿剤などとしての用途で工業化するに至っている。この場合は、結果的には炭化水素発酵とは言えないが、技術開発の段階での寄与は大きいものがあると言えよう。なお、以上の他に炭化水素発酵において最近発表された界面活性物質としては、細菌では *Nocardia erythropolis*¹¹⁾, *Corynebacterium faciens* CF 15 株¹²⁾ の生成する中性脂質、酵母では *Candida lipolytica* の蛋白質、脂質、炭水化物から成るポリマー¹³⁾ がある。

n-アルケンの微生物変換も α -オレフィンの酸化を中心として研究が続けられている。 α -オレフィンは原料として *n*-アルカンより割高であるため、従来は発酵原料としてあまりとりあげられなかったが、エポキシドなどの部分酸化物質を目的とするときには光学純度の面からも有利であることから、発酵生産の可能性が考えられるに至ったものである¹⁴⁾。 α -オレフィンからエポキシドを生産する微生物としては、従来から知られている *Pseudomonas* 属および *Coryne-form* の細菌、*Candida* 属酵母などの主として *n*-パラフィン資化性菌のほか、後に述べるメタン資化細菌の独特の能力も知られるようになってきた。最近、Furuhashi らはプロピレンを唯一

炭素源として生育する微生物の中から選択, 同定した放線菌 *Nocardia corallina* B-276 株がエチレンからブタジエンに至る各種のガス状炭化水素のみならず, $C_{13} \sim C_{18}$ の n -アルケンに生育可能で, 対応する 1,2-エポキシドを生成することを報告した¹⁵⁾。特に C_3 , C_4 および $C_{13} \sim C_{18}$ の α -オレフィンのエポキシ化能がすぐれており, 1,2-エポキシテトラデカンの生産性についてさらに検討が加えられた。図3に示されているように, この場合は培養初期にはいわゆる増殖関連型の生産物生成が見られ, 培養 pH は無調整の方が生産能が大であった。培地条件などの検討の結果, エポキシドの生産量は大幅に上昇し, 図4のように1-テトラデセンから6日間の培養で約 80 g/l の 1,2-エポキシテトラデカンを生産することができたという。また, 同じ菌株をグルコースで生育させ洗浄した休止菌体として, ガス状炭化水素であるプロピレンからプロピレンオキシドの生成を試みた¹⁴⁾。無機塩にプロピレンのみを加えた反応液に通気して反応させた状態では, 休止菌体の触媒としての活性は約 10 時間程度で最大に達し, 以後急速に低下するのに反し,

Fig. 3 Accumulation of 1,2-epoxytetradecane in exponential growth phase by *N. corallina* B-276. Cultivation was made in 3 l jar fermentors¹⁴⁾. Culture with pH maintained at 7.0: cells, ●; product, ▲. Culture with uncontrolled pH: cells, ○; product, △.

反応液中にプロピレンの他にグルコースを添加すると最大活性が 100 時間以上持続した。これはプロピレンからプロピレンオキシドへの酵素的酸化が補酵素を必要としているためと考えられ, 補酵素を酸化型から還元型に再生するためのエネルギー源としてグルコースなどの炭素源が使われているようである。このような例は後述のメタンモノオキシゲナーゼの場合にも見られるが, 二つ以上の反応系を組み合せねばならないことはこの発酵プロセスにとって不利な点であることは否みがたい。

なお, プロピレンオキシド生産に関しては, 開発中止が伝えられるためいささか旧聞に属するが, Cetus 社が発表した固定化酵素法もある¹⁶⁾。これはプロピレンを haloperoxidase の作用でプロピレンクロヒドリンにしたのち, halohydrin epoxidase によりプロピレンオキシドに導くものであるが, 前者の段階で過酸化水素の供給が必須である。これをグルコースの酵素酸化で得ることにしたため, 副産物としてプロピレンオキシドと等

Fig. 4 1,2-Epoxytetradecane production by *N. corallina* B-276 in 3 l jar fermentor under an optimized condition¹⁴⁾. Cultivation was carried out at 800 rpm agitation and 1 vvm aeration. 1,2-epoxytetradecane, ●; cells, ○; 1-tetradecene, ▲; pH, △.

モルの果糖を生ずることになったところにこの方法の難点があったといわれる。

クエン酸はかなり古くから糸状菌により糖質から発酵生産されており、近年に至っては *n*-パラフィンからも高収率で酵母により生成されることが知られて、わが国の技術により数年前にイタリアで洗剤用ビルダーとして大量生産されるに至ったが、その後も炭化水素を原料とする生産研究は続けられている¹⁷⁻¹⁹⁾。Terasawa ら¹⁹⁾ は *n*-パラフィンのみならず α -オレフィンからも *Candida* 属酵母がクエン酸を生成することを見だし、その代謝様式について考察するとともに、界面活性剤の効果について検討し、6日培養で 15 g/l のクエン酸を蓄積せしめている。

次に、炭化水素類緑化合物の微生物変換についても少し触れておきたい。Yamada らは猛毒性を有し難分解性であるが、有用物質への変換も可能なニトリル化合物に着目し、それらの微生物分解²⁰⁻²²⁾ および物質生産への可能性について検討した。ニトリル化合物の分解には、加水されて直接カルボン酸とアンモニアを生成するニトリラーゼとよばれる酵素が存在することが知られていたが、中間体としてアミドを経由する下式のような酵素系の可能性も示唆されていた。

彼らはアセトニトリル分解細菌 *Arthrobacter* sp. J-1 株から第一段階の反応、すなわちニトリルからアミドを生成する反応を行う新たな酵素を精製することに成功し、ニトリルヒドラターゼと命名した。この酵素は、程度の差はあるが $\text{C}_2 \sim \text{C}_5$ の低級脂肪族ニトリル化合物から対応するアミドを生成した。

種々のアミドのうち、アクリルアミドは数々の用途をもつので、ニトリルヒドラターゼをその生産に適用することが試みられた。アクリルアミド分解能を欠くイソプロチロニトリル資化菌を選ぶという巧妙なスクリーニング法を用いて *Pseudomonas chlororaphis* B 23 株を選び、菌体濃度を 20 g/l とした反応系にアクリロニトリルを逐次添加することにより、7.5 時間反応で図 5 のように収率 99% 以上、400 g/l のアクリルアミドが生産された^{23,24)}。この菌のニトリルヒドラターゼがイソプロチロニトリル、アクリロニトリルともに作用する一方、第二段階のアミダーゼがイソブチルアミドには働かず、アクリルアミドには働かないことを利用した結果、大量蓄積に結びついたもので極めて意義深い成果である。なお、類似の方法を用いて *Brevibacterium* 属細菌により、収

Fig. 5 Time course of acrylamide production with *P. chlororaphis* B23 cells²³⁾.

量はあまり多くないがプロピオンアミド、イソブチルアミドを生産したことも報告されている²⁵⁾。

また、筆者の所属する研究室の Niimura らは、やはり生分解による環境問題の改善と有用物質への変換を目標にして、両末端に官能基をもつアルカン誘導体、特に長鎖ジアミノアルカンの微生物分解について検討した²⁶⁾。1,12-ジアミノドデカンをも唯一炭素源とする培地で分離された細菌群は基質からアミノ基を脱離して、12-アミノドデカン酸、12-ヒドロキシドデカン酸、1,10-デカンジカルボン酸などを生成、特に前二者の蓄積が顕著であった。この反応に関与する重要な酵素と考えられるア

Fig. 6 Proposed role of amine dehydrogenase and transaminase on the metabolism of aliphatic diamines by *Pseudomonas* K-95²⁶⁾.

ミンデヒドロゲナーゼおよびトランスアミナーゼの直鎖ジアミン分解における役割を検討し、図6のように鎖長により関与する酵素が異なることを明らかにしたが、これらの酵素は種々のアミノ化合物に対して広い基質特異性を示したため、有用物質変換への応用の期待がもたれている。

3. ガス状炭化水素の微生物利用

炭素数1~4のガス状の n -アルカン、 n -アルケン、液状 n -アルカンと比較して価格が安く、資源として豊富に存在し、不純物が混入する危険性が少ないため発酵原料としてすぐれていると思われる。

これらのガス状炭化水素からの発酵生産物としてまず考えられたのは微生物蛋白(SCP)であった。特にメタンは天然ガスの主成分であるため、Shell Researchの研究者などにより早くから着目され、多くの報告が出されてきているが、まだ工業的に実働の段階には至っていない。ただし、後に述べるようにメタンを資化する酵母の発見や、メタン資化細菌の酵素の応用、菌体外生産物生成など新たな知見は加わりつつある。

プロパンについては、水素をエネルギーとして炭酸固定を行ういわゆる水素細菌との関連性で、以前から多くの資化細菌が知られていたが、Houらは多くのプロパン資化菌²⁷⁾および $C_2 \sim C_4$ の n -アルカン資化菌²⁸⁾の各種物質酸化能力について報告した。彼らによれば、前者に属する *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* などの菌群が短鎖のアルケンを酸化して対応する1,2-エポキシドを生成した。中でもプロピレンからプロピレンオキシドへの反応速度が最大であったが、この反応に関与する酵素はプロパンの水酸化を行うものと同じプロパンモノオキシゲナーゼであることが示された。ただし、この場合に生成されたプロピレンオキシドがさらに代謝されること、二重結合のみならずメチル基も攻撃されて3-ヒドロキシ-1-プロペンも生成されることなどはプロピレンオキシド生産の面からは問題である。

一方、 $C_2 \sim C_4$ の n -アルカンに生育する微生物もほぼ上記と同じ属に属する細菌群であるが、これらは $C_3 \sim C_6$ の2-アルカノールから対応するメチルケトン菌体外に生成蓄積した。中でもアセトン、2-ブタノンの生成速度が大きく、この酵素は熱安定で60℃が反応適温であり、無細胞系でのこれらメチルケトン生産の可能性が示された。

ブタンに関しては、メタンより微生物によって資化さ

れ易く、菌体収率、培養液への移動速度の面でもすぐれていることが確実視されるため高い菌体生産性が期待できることから新たに菌体蛋白生産が試みられた。Takahashiら²⁹⁾はブタンを唯一炭素源として生育する新種の細菌を分離し、*Pseudomonas butanovora*と命名したが、この菌株は C_2 以上の多くの n -アルカン、中でも微生物が資化し難いとされている $C_6 \sim C_9$ の n -アルカンをかなりよく資化する点に特徴をもっている。この菌株を培地成分を補充しながら培養することにより、図7に示すように3日間で50 g/lの乾燥菌体(蛋白含量73%)を得た^{30,31)}。さらに供給するブタン-空気混合ガスの圧力を徐々に4気圧まで上昇させる加圧培養法を採用することにより、菌体の生産性およびブタンの利用効率をともに上げることができた。また、この菌は菌体増殖に伴って、菌体量の約10%に達する菌体外蛋白質を蓄積することも見いだされており³²⁾、ブタンからの菌体外生産物としてのみならず、その生理的意義にも興味もたれる。

メタンを基質とした最近の研究成果の中で学問的に興味深いものは、メタン資化酵母の発見³³⁾であろう。同じ C_1 化合物でもメタノールに関しては、すでに10年以上前にOgataらにより資化性酵母が発見されて以来、多くの菌株が次々と報ぜられているにもかかわらず、メタンに関しては報告が見られなかったものである。これらのメタン資化酵母は、それぞれ *Sporobolomyces*

Fig. 7 Growth of *Pseudomonas butanovora* on n -butane³¹⁾.

- Cellular growth, with feed of aqueous ammonia containing mineral salts.
- Cellular growth, with feed of aqueous ammonia free from mineral salts.

Table 1 Examples of biotransformations effected by resting whole organism suspensions of *Methylosinus trichosporium* OB 3b⁽⁷⁾.

Type of reaction	Compound	Products	Type of reaction	Compound	Products
Oxidation	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}_2$	$\text{CH}_3\text{CH}-\text{CH}_2$ Propene oxide			$\text{O}=\text{C}-\text{C}_6\text{H}_{13}$ 1-oxo-1-phenylheptane
	Propene				$\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ COOH Cinnamic acid Benzoic acid
	Benzene	Phenol			
Oxidation and degradation	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{OH}$ Hexadecan-1-ol	Oxidation and dechlorination	CH_3 m-Chloro-toluene	CH_2OH $\text{H}_2\text{C}-\text{O}^*$ Benzyl alcohol Benzyl epoxide
	Toluene	CH_3 COOH p-Hydroxy-toluene Benzoic acid		CH_3 m-Chloro-toluene	CH_2OH m- or p-methyl-benzyl alcohol
	Ethylbenzene	C_2H_5 OH C_2H_5 OH o-Hydroxy-ethylbenzene p-Hydroxy-ethylbenzene	Oxidation and condensation	OH m-Chloro-phenol	OH $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{COOH}^*$ Hydroxyphenyl-heptanoic acid
		$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 2-Phenyl-ethanol		CH_3 m-Cresol	CHO CHO m- and p-hydroxybenzaldehyde
		CH_2COOH COOH Phenyl acetic acid Benzoic acid	Oxidation and rearrangement	CH_3 o-Cresol	CH_3 5-Methyl-1,3-benzenediol
		$\text{HO}-\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{CHO}$ 1-Hydroxy-1-phenylheptane 1-Phenyl-heptan-7-al			

*Tentative identification.

gracilis, *S. roseus*, *Rhodotorula glutinis*, *R. rubra* と同定された³⁴⁾が、生育速度はメタンを唯一エネルギー源とする場合には極めて遅く、応用上の観点からはその能力はまだ未知数である。

それに反して比較的早くから存在が知られているメタン資化細菌の中には、通常の糖質資化菌と匹敵する生育

速度を示すものもあり、応用的な研究も少なくない。ただし、従来メタン資化細菌は仲々純粋分離が困難で、多くの場合メタノール資化細菌やその他の heterotrophic な菌と共存した状態で培養系が安定に保たれていた。そのため、前述の Shell Research での SCP 生産の研究例でも、とりたててメタン資化菌のみを純粋に分離する

ことなく, 混合培養として4種の細菌の存在比の安定した培養系(メタン酸化菌が約95%)を確立していた。SCP生産に関しては, 存在する各細菌の安全性, 栄養価などが確認されていれば特に問題を生じないが, 菌体外物質の生産やメタン酸化菌特有の酵素利用を目指す場合には純粋分離が前提となる。

最近, 純粋性の確実なメタン酸化菌による一連の炭化水素酸化についての報告が出されている。これは, 生育基質になり得ない炭化水素などの酸化を, メタン酸化菌の主としてメタンモノオキシゲナーゼに行わせる一種のco-oxidationであり, *n*-アルカンの水酸化³⁵⁻³⁹⁾, とケトン化⁴⁰⁾, *n*-アルケンのエポキシ化⁴¹⁻⁴⁵⁾, 二級アルコールからのメチルケトン生成⁴⁶⁾および枝分れのある炭化水素や芳香族炭化水素, 炭化水素誘導体などの酸化^{47,48)}など極めて多岐にわたっている。その反応の例を表1に, 単純な反応系および補酵素 NADH₂ 再生を伴った反応系での反応の比活性の例をそれぞれ表2, 3および表4, 5に示した。NADH₂の再生にはギ酸のみならず, 2-ブタノールを用いることもでき, 表に示されているように, 反応生成物の生成速度はかなり向上する。ただ, ギ酸の場合は酸化物が二酸化炭素であるが, 2-ブタノールの場合には2-ブタノールが副生する点が異なっている。

このメタンモノオキシゲナーゼという酵素は上記のように, 極めて基質特異性が広い点で特殊な存在であるが, 反応速度は基質によってかなり差がある。菌株によって若干の違いは認められるがエチレン, プロピレン, 1-

ブテン, ブタジエンなどのエポキシ化活性が最も強いようである。これらのエポキシ化物や合成化学的に収率の低い種々の酸化反応の実用化の可能性を求めて現在研究が続けられている。

筆者らもメタン酸化菌についての研究を行っているが,

Table 3 Epoxidation of alkenes by soluble methane monooxygenase from *Methylobacterium* sp. CRL-26⁴⁴⁾.

Substrate	Product	Specific activity (nmol/min/mg of protein)
Ethylene	Ethylene oxide	55
Propylene	Propylene oxide	100
But-1-ene	1,2-Epoxybutane	87
Butadiene	1,2-Epoxybutene	75
Isobutylene	1,2-Epoxy-2-methylpropane	95
But-2-ene	2,3-Epoxybutane	22
	2-Buten-1-ol	15
		25
		18
2-Methyl-1-butene	ND	42
2-Methyl-2-butene	ND	16
1-Bromo-1-butene	ND	83
2-Bromo-2-butene	ND	30
Isoprene	1,2-Epoxy-2-methyl-3-butene	38

Table 4 Hydroxylation of alkanes by soluble methane monooxygenase from *Methylobacterium* sp. CRL-26 using NAD⁺-linked formate dehydrogenase to regenerate NADH₂⁴⁴⁾.

Substrate	Product	Specific activity (nmol/min/mg of protein)
Methane	Methanol	125
Ethane	Ethanol	147
Propane	{ 1-Propanol	62
	{ 2-Propanol	112
Butane	{ 1-Butanol	160
	{ 2-Butanol	100
Pentane	{ 1-Pentanol	84
	{ 2-Pentanol	180
2-Methylpropane	{ 2-Methyl-1-propanol	78
	{ 2-Methyl-2-propanol	112
Nitroethane	ND	42
2-Bromobutane	ND	40

Table 2 Hydroxylation of alkanes by soluble methane monooxygenase from *Methylobacterium* sp. CRL-26⁴⁴⁾.

Substrate	Product	Specific activity (nmol/min/mg of protein)
Methane	Methanol	93
Ethane	Ethanol	64
Propane	1-Propanol	15
	2-Propanol	22
Butane	1-Butanol	43
	2-Butanol	25
Pentane	1-Pentanol	21
	2-Pentanol	45
Hexane	1-Hexanol	39
	2-Hexanol	21
Heptane	1-Heptanol	12
	2-Heptanol	50
Octane	1-Octanol	2.5
	2-Octanol	17

Table 5 Epoxidation of alkenes by soluble methane monooxygenase from *Methylobacterium* sp. CRL-26 using NAD⁺-linked formate dehydrogenase to regenerate NADH₂⁴⁴⁾.

Substrate	Product	Specific activity (nmol/min/mg of protein)
Ethylene	Ethylene oxide	145
Propylene	Propylene oxide	267
1-Butene	1,2-Epoxybutane	200
Butadiene	1,2-Epoxybutene	180
2-Methylpropene	1,2-Epoxy-2-methylpropane	190
2-Methyl-1-butene	ND	75

基質供給、反応速度などの面から考えて有利と思われる高温性菌に着目してスクリーニングを行った結果、従来 *Methylobacterium* と称されている細菌と類縁と思われる新菌株 H-2 を得た⁴⁹⁾。この菌は生育適温が 50℃ である点に特徴を有するが、さらにメタン資化菌の純粋培養系では初めて菌体外生産物を生成することが認められた⁵⁰⁾。その生産物は二種の酸性多糖で高い粘度をもつが、図 8 に示すように菌体の増殖に伴って培養液中に蓄積する。

C₁ 化合物ではメタノールを基質とした場合に多糖が生成することはすでによく知られているが、メタンからの生成は例がない。この多糖は糖類のほかに蛋白質を含んでいるためその生理的意義に興味をもたれる。またこの菌については、その高温性から想像されるように、メタンモノオキシゲナーゼも温度特性が高温側にかたよっているため、前述の各種の酸化反応への応用の可能性についての検討も進めている。

Fig. 8 Time courses of polysaccharide production by H-2 and the growth⁵⁰⁾.

3. その他の炭化水素および類縁化合物の微生物変換

n-パラフィンやα-オレフィンのような比較的単純な形の炭化水素に対して資化能を有する微生物は自然界に広く分布し研究例が多いが、多数のメチル側鎖をもつイソプレノイド炭化水素類、イソパラフィン類である squalene や pristane (2,6,10,14-tetramethylpentadecane) などの資化性についてはあまり報告が多くない。しかし、これらの物質の酸化生成物には香料や生理活性物質の類縁体があり、利用の期待がもてるものがある。

中島らは pristane を資化する *Rhodococcus* sp. (*Nocardia* sp.) BPM 1613 株を主として用い、pristane, squalene, squalane などの資化性の比較、酸化生成物について検討した⁵¹⁾。その結果、pristane では片末端酸化が起り pristanol, pristanic acid が生成したのに対し、squalene では両末端酸化により squalenedioic acid を、また二重結合をもたない squalane からは酸化生成物ができず、構造の違いにより代謝のパターンがかなり異なることが示された。pristane から得られる上記酸化

Fig. 9 Pathway for pristane metabolism by *Rhodococcus* sp. BPM 1613⁵³⁾.

生成物の最大蓄積量は合せて使用基質の約 29% であったが, これらはビタミン E, K₁ の化学合成原料として有用と考えられている⁵²⁾。ただし, 使用菌は代謝中間体としてこれらの物質を蓄積するが, さらに一旦生成したこれらの物質をも資化するため, 大量生成にはまだ問題点が残されている。なお, *Rhodococcus* sp. BPM 1613 株における pristane の代謝経路は図 9 のように考えられている⁵³⁾。また, 同じ菌株による合成オリゴマーの微生物変換の研究も行われているが, 2,4-dimethyl-1,4-nonadiene からは 4,6-dimethyl-3,6-heptadienoic acid が生成⁵⁴⁾, 3-methylundecane から 3-methylpentanoic acid と 3-hydroxy-3-methylpentanoic acid, 2-methyl-2-nonanol から 8-hydroxy-8-methylnonanoic acid が生成した⁵⁵⁾。これらの酸化生成物は香気味改良剤, 生長阻害物質などとしての用途が期待されているが, その蓄積のメカニズムとしては, まずメチル側鎖から遠い末端が酸化され, 3-methylundecane の場合はひき続いて β 酸化が進むが, 3 位のメチル側鎖の存在によってそれから先の β 酸化が抑えられるためであり, 2-methyl-2-nonanol の場合は β 酸化が進まないためと考えられている。後者の場合は, この菌が 2-methyl-2-nonanol を唯一の炭素源として生育できないことからもうなずける。

Squalene の酸化に関しては, さきに Yamada らが *Arthrobacter* 属細菌により真中から酸化切断されて geranylacetone 2 分子を生ずることを認めていたが, 彼らはさらに別の細菌, *Corynebacterium* sp. S-401 株を分離した⁵⁶⁾。この菌の場合には squalene は炭素鎖を切断されずに 1~5 個所を水酸化された hydrated squalene に変換された。この反応は自然界に多量に存在するテルペノイド類の微生物分解の観点から興味深い。また, この菌の静止菌体はオレイン酸をも立体特異的に水酸化して (–)-10*R*-hydroxyoctadecanoic acid を 22% 以上の収率で生成し, さらに酸化された 10-oxooctadecanoic acid をも生成することが知られた。

一方, 脂環式炭化水素および類縁体もタールサンドの成分としての重要性からその変換が注目されている。シクロヘプタノン資化菌として分離された *Nocardia* 属菌は, シクロヘプタノンを 1-オキサ-2-オキソシクロオクタン, 7-ヒドロキシヘプタン酸を経由して, 同炭素数の直鎖ジカルボン酸であるピメリン酸まで酸化した。さらにシクロヘキサノン, シクロヘキサンカルボン酸をもよく資化したが, この時にも同様の代謝経路を経ていると思われる。

4. おわりに

以上, アルカン, アルケンおよびそれらの誘導体の微生物変換についての最近の進歩を概観した。しかし, ここでは代謝産物の生成についての報告に重点をおいて独断的に選んだため, 特に基礎的な研究では洩れているものも多いことをお許しいただきたい。

いずれにせよ, 近年の炭化水素の微生物による資化や変換に関する研究は, 従来の糖質発酵では見いだされなかった新しい微生物の能力を, 基質の化学的・物理的な差異の故につぎつぎに明らかにしてきた。それに伴って一時はかなり多くの発酵生産物が種々の炭化水素を原料として報告された。しかし, それらは必ずしも炭化水素を基質とした時のみに得られる生産物とは限らなかったために, 炭化水素の安価な原料としての利点が失われるとともに顧みられることが少なくなった。そのような背景のもとに, 1980 年代に入ってから fine chemicals に限らず commodity chemicals においても, 炭化水素あるいはその誘導体を原料とすることによってのみ有利に得られる代謝産物に研究の重点がおかれているように思えるが, これは当然の動きであるし, 今後もその傾向は続いて行くであろう。また, すでにいくつかの例に見られるように微生物反応の特異性と化学合成の利点をうまく組み合わせた反応プロセスの開発もこれからますます重要性を帯びることになる。

(昭和 59 年 1 月 13 日受理)

文 献

- 1) 田中渥夫, 福井三郎, 有合化, **38**, 33 (1980)
- 2) S. Fukui, A. Tanaka, "Advances in Biochemical Engineering", **17**, 1 (1980)
- 3) I. Shiio, R. Uchio, *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 2033 (1971)
- 4) R. Uchio, I. Shiio, *ibid.*, **36**, 1169 (1972)
- 5) R. Uchio, I. Shiio, *ibid.*, **36**, 1389 (1972)
- 6) H. Kaneyuki, H. Deno, J. Hiratsuka, T. Mitsuyoshi, T. Furukawa, *J. Ferment. Technol.*, **58**, 405 (1980)
- 7) S. Ito, M. Kinta, S. Inoue, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2221 (1980)
- 8) S. Ito, S. Inoue, *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1278 (1982)
- 9) T. Nakahara, H. Kawashima, T. Sugisawa, U. Takamori, T. Tabuchi, *J. Ferment. Technol.*, **61**, 19 (1983)
- 10) H. Kawashima, T. Nakahara, M. Oogaki, T. Tabuchi, *ibid.*, **61**, 143 (1983)
- 11) C. R. McDonald, D. G. Cooper, J. E. Zajic,

- Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 117 (1981)
- 12) D. G. Cooper, J. Akitt, N. Kosarig, *J. Ferment. Technol.*, **60**, 19 (1982)
- 13) A. Pareilleux, *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 91 (1979)
- 14) 古橋敬三, 発酵と工業, **39**, 1029 (1981)
- 15) K. Furuhashi, A. Taoka, S. Uchida, I. Karube, S. Suzuki, *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 39 (1981)
- 16) S. L. Neidleman, *Hydrocarbon Processing*, **59**, 135 (1980)
- 17) T. Furukawa, T. Ogino, T. Matsuyoshi, *J. Ferment. Technol.*, **60**, 281 (1982)
- 18) T. Furukawa, T. Ogino, *ibid.*, **60**, 377 (1982)
- 19) M. Terasawa, J. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2433 (1981)
- 20) H. Yamada, Y. Asano, T. Hino, Y. Tani, *J. Ferment. Technol.*, **57**, 8 (1979)
- 21) Y. Asano, Y. Tani, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2251 (1980)
- 22) Y. Asano, K. Fujishiro, Y. Tani, H. Yamada, *ibid.*, **46**, 1165 (1982)
- 23) Y. Asano, T. Yasuda, Y. Tani, H. Yamada, *ibid.*, **46**, 1183 (1982)
- 24) 谷 吉樹, 浅野泰久, 山田秀明, 発酵と工業, **41**, 382 (1983)
- 25) K. Bui, A. Arnaud, P. Galzy, *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 195 (1982)
- 26) Y. Niimura, Q. Yinbo, S.-J. Lee, T. Omori, Y. Minoda, *Appl. Environ. Microbiol.*, (投稿中)
- 27) C. T. Hou, R. Patel, A. I. Laskin, N. Barnabe, I. Barist, *ibid.*, **46**, 171 (1983)
- 28) C. T. Hou, R. Patel, A. I. Laskin, N. Barnabe, I. Barist, *ibid.*, **46**, 178 (1983)
- 29) J. Takahashi, Y. Ichikawa, H. Sagae, I. Komura, H. Kanou, K. Yamada, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1835 (1980)
- 30) J. Takahashi, *Adv. Appl. Microbiol.*, **26**, 117 (1980)
- 31) Y. Ichikawa, S. Sato, J. Takahashi, *J. Ferment. Technol.*, **59**, 269 (1981)
- 32) 高橋穰二, 発酵と工業, **39**, 412 (1981)
- 33) H. J. Wolf, R. S. Hanson, *J. Gen. Microbiol.*, **114**, 187 (1979)
- 34) H. J. Wolf, R. S. Hanson, *FEMS Microbiology Letters*, **7**, 177 (1980)
- 35) H. Dalton, *Adv. Appl. Microbiol.*, **26**, 71 (1980)
- 36) R. N. Patel, C. T. Hou, A. I. Laskin, A. Felix, P. Derelanko, *J. Bacteriol.*, **139**, 675 (1979)
- 37) R. N. Patel, C. T. Hou, A. I. Laskin, A. Felix, P. Derelanko, *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 720 (1980)
- 38) C. T. Hou, R. N. Patel, A. I. Laskin, I. Marczak, N. Barnabe, *Can. J. Microbiol.*, **27**, 107 (1981)
- 39) C. T. Hou, R. N. Patel, A. I. Laskin, I. Marczak, N. Barnabe, *Dev. Ind. Microbiol.*, **22**, 467 (1981)
- 40) R. N. Patel, C. T. Hou, A. I. Laskin, A. Felix, P. Derelanko, *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 727 (1980)
- 41) C. T. Hou, R. N. Patel, A. I. Laskin, N. Barnabe, *ibid.*, **38**, 127 (1979)
- 42) C. T. Hou, R. N. Patel, A. I. Laskin, *Adv. Appl. Microbiol.*, **26**, 41 (1980)
- 43) C. T. Hou, R. N. Patel, A. I. Laskin, N. Barnabe, *FEMS Microbiology Letters*, **9**, 267 (1980)
- 44) R. N. Patel, C. T. Hou, A. I. Laskin, A. Felix, *J. Appl. Biochem.*, **4**, 175 (1982)
- 45) C. T. Hou, R. N. Patel, A. I. Laskin, N. Barnabe, I. Barist, *Dev. Ind. Microbiol.*, **23**, 477 (1982)
- 46) C. T. Hou, R. N. Patel, A. I. Laskin, N. Barnabe, I. Marczak, *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 135 (1979)
- 47) I. J. Higgins, D. J. Best, R. C. Hammond, *Nature*, **286**, 561 (1980)
- 48) R. N. Patel, C. T. Hou, A. I. Laskin, A. Felix, *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 1130 (1982)
- 49) G.-J. Shen, T. Kodama, Y. Minoda, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 191 (1982)
- 50) K. Chida, G.-J. Shen, T. Kodama, Y. Minoda, *ibid.*, **47**, 275 (1983)
- 51) 中島健二, 佐藤昭雄, 御園光信, 飯田武夫, 農化, **55**, 1187 (1981)
- 52) H. Kuriyama, K. Nakajima, Y. Takahara, *J. Ferment. Technol.*, **60**, 493 (1982)
- 53) 中島健二, 佐藤昭雄, 農化, **57**, 299 (1983)
- 54) 中島健二, 佐藤昭雄, 高原義昌, 保坂隆雄, 谷口政信, *ibid.*, **54**, 27 (1980)
- 55) 中島健二, 東原孝規, 佐藤昭雄, 福岡誠一, 谷口政信, 保坂隆雄, *ibid.*, **56**, 1149 (1982)
- 56) C. W. Seo, Y. Yamada, N. Takada, H. Okada, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2025 (1981)