

[J. Ferment. Technol., Vol. 47, No. 5, p. 291~296, 1969]

微生物による炭化水素の利用に関する研究

(第 5 報) 炭化水素を原料とする α -ケトグルタル酸の発酵生産

田中 勝宣・木村 一雄・鈴木 武夫・山口 健・木下 祝郎

(協和醸酵工業株式会社東京研究所)

Studies on the Utilization of Hydrocarbons by Microorganisms

(V) Fermentative Production of α -Ketoglutaric Acid from Hydrocarbons

Katsunobu Tanaka, Kazuo Kimura, Takeo Suzuki, Ken Yamaguchi, Shukuo Kinoshita

(Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.,
Asahimachi 3-6-6 Machida-shi, Tokyo)

Among the hydrocarbon utilizing bacteria previously reported by the authors to be capable of producing amino acids, several strains were found to be richly productive of α -ketoglutaric acid from *n*-alkanes. The yield of the acid by these strains was more than 40% of the consumed hydrocarbons. Particularly, *Corynebacterium* sp. (KY 4439) was the highest in productivity. Additions of corn steep liquor and thiamine at suboptimal concentrations together with appropriate amounts of Fe^{++} and trace metal ions were effective for the production of α -ketoglutaric acid. To keep the pH under control between 6.7 and 7.0 by feeding NH_4OH was also contributive. The production ratio to the consumption hydrocarbons was increased by the lowering of the concentration of hydrocarbons in the medium. With an addition of 8.7% (v/v) of *n*-paraffins the acid yield reached as high as 85.5%.

緒 言

近年、各種炭化水素の微生物による利用が広く研究されており、なかでも従来の糖質に代り、より安価で且つ豊富、安定した発酵原料としての利用に関心が集まっている。われわれは先に *n*-アルカンからの優良なアミノ酸生産菌の分離選択について報告したが¹⁾、これらの生産菌のなかに *n*-アルカンから収率よく α -ケトグルタル酸を生成蓄積するものを多数認めた。

すでに炭化水素からの α -ケトグルタル酸の生産については細菌を用いた今田ら²⁾ および酵母を用いた都河ら³⁾ の報告があるが、一般に炭化水素発酵では炭素源の溶解度、分散などに糖質原料の発酵にはなかった新しい問題点があるが、他方この発酵は一種の酸素固定発酵であり、対炭素源収率の面では糖質原料の場

合に比して遥かに有利になることが予想され、すでに酵母菌体の生産において、*n*-パラフィンから約 1 対 1 の重量比で菌体が生産されることが実証されている⁴⁾。菌体外生産物の発酵についてもこれらのことは興味ある点であるが、本報ではこの点を α -ケトグルタル酸の生産について検討したので、その結果について報告する。

実験方法

1. 使用菌株 *Arthrobacter paraffineus* KY 4303 (ATCC 15591) およびその他の炭化水素資化性菌多数を使用した。
2. 培養方法 プイヨン培地に 30°C、24 時間振盪培養した種培養を 5% の割合で坂口フラスコに用意した発酵培地に植菌し、30°C で振盪培養を行なった。発

酵培地の組成は別記した以外は次の通りである。n-パラフィン混合物 5~10% (v/v), NH_4NO_3 2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.002%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002%, CSL 0.01~0.02%, サイアミン-HCl 0~2 γ /l, CaCO_3 2%, フェノールレッド 0.001%, pH 7.2, この中, n-パラフィン, NH_4NO_3 , CaCO_3 は別殺菌して添加し, n-パラフィン以外の全容を 20 ml とした。培養中の pH は 20% $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 5% 尿酸混合液にて 7.0~7.5 に調節した。5 l-jar fermentor による培養の種培地および発酵培地の組成は上記フラスコの発酵培地と同じである。ただし CSL 0.05%, サイアミンおよびフェノールレッドは無添加。pH 6.7, 培養温度 30°C, 攪拌 800 rpm, 通気 3 l/min.

3. 分析方法 α -ケトグルタル酸は Friedemann Haugen 法⁵⁾, L-グルタミン酸は *E. coli* の L-グルタミン酸脱炭酸酵素⁶⁾ により測定した。クエン酸は Perlman, Lardy, Johnson 法⁷⁾ により定量した。

使用した n-パラフィンは関東高压化学の製品で主として炭素数 12, 13, 14, 15 の n-パラフィンの等容混合物を用いた。

残存 n-パラフィンの定量には CaCO_3 を溶解した発酵液 2 ml を遠心分離管にとり, エタノール 4 ml, n-ヘキサン 2 ml を添加し十分攪拌した後, 3000 rpm 20分遠心分離し, n-ヘキサン層について熱電導度型検出によるガスクロマトグラフィ法により分析し, 各 n-アルカンの重量の総和で表わした。

実験結果

1. 発酵生産物の同定 発酵液中には通常著量の α -ケトグルタル酸と少量の L-グルタミン酸およびクエン酸が検出された。 α -ケトグルタル酸は 2,4ジニトロフェニールヒドラゾンとし, 50% メタノール溶液から結晶化し, 標準品と融点, 種々の展開剤を用いるペーパークロマトグラフィにおける R_f 値, 元素分析値, その他を比較し, 完全に一致することを確認した。

2. 優良菌株の選定 実験に使用した菌株は *Arthrobacter paraffineus* KY 4303 を始め, 前報¹⁾において α -ケトグルタル酸の生成能の良好であった細菌数株であり, これらの生産能を比較した結果, 対消費 n-パラフィン収率として α -ケトグルタル酸が 40%以上, また α -ケトグルタル酸と L-グルタミン酸の和として 50% 以上生産するものが多数認められた (Table 1)。収率はいずれも対消費パラフィンとして表わしてある。これらの中, 最も優良なものは *Corynebacterium* sp. KY 4439 で, 以後これについて実

Table 1. Productivity of α -ketoglutarate of various strains.

Strains	Conversion yield (%)		
	α -KGA	L-GLU	Total
<i>Arthrobacter paraffineus</i> KY 4303	43.7	6.5	50.2
<i>Corynebacterium hydrocarboclastus</i> KY 4309	41.0	11.0	52.0
<i>Corynebacterium</i> sp. KY 4439	45.0	14.0	59.0
<i>Corynebacterium</i> sp. KY 4442	34.0	9.3	43.3
Unidentified strain KY 4433	22.5	10.0	32.5
Unidentified strain KY 4449	38.5	11.7	50.2

n-Paraffin: 5% (v/v), Exp. with 500 ml flask, Culture time: 72 hr.

験した。

3. 生産条件の検討

A. 炭素数の影響 炭素数 11 から 18 に至る各単一の n-パラフィンを炭素源として生産能をしらべた結果, いずれのものからも著量の α -ケトグルタル酸が生産されたが, 特に C_{13} からの生産が最も良好であった。L-グルタミン酸の生産についても同様な傾向が認められた (Table 2)。

Table 2. Effect of carbon numbers of n-paraffins.

Carbon sources	Conversion yield (%)		
	α -KGA	L-GLU	Total
n-Undecane	19.5	9.4	28.9
n-Dodecane	16.3	10.3	26.6
n-Tridecane	32.3	13.1	45.4
n-Tetradecane	25.0	10.3	35.0
n-Pentadecane	23.7	11.8	35.5
n-Hexadecane	21.8	10.6	32.4
n-Heptadecane	20.1	10.2	30.3
n-Octadecane	23.7	6.2	29.9

Used strain: *Corynebacterium* KY 4439

n-Paraffin: 10% (v/v),

Culture time: 72 hr, Exp. with 500 ml flask

B. 窒素源の影響 無機窒素源として硫酸, 硝安, 塩安を比較したがいずれの窒素源とも大差は認められなかったが, α -ケトグルタル酸の生産には硝安が若干好結果であり, L-グルタミン酸の生産には塩安がや

や良好であった (Table 3).

また, 硝安について濃度の影響を検討した結果, α -ケトグルタル酸の生産に対しては 1.5 ないし 2.0% が最適であった. L-グルタミン酸の生産は NH_4^+ の増加と共に若干上昇する傾向を示した (Table 4).

Table 3. Effect of inorganic nitrogen sources.

Nitrogen sources (%)	Conversion yield (%)			
	α -KGA	L-GLU	Total	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	31.0	1.5	32.5
	2	33.5	0.7	34.2
	3	37.5	0.2	37.7
NH_4NO_3	1	37.0	2.2	39.2
	2	39.5	1.2	40.7
	3	28.0	1.2	29.3
NH_4Cl	1	26.0	2.5	28.5
	2	28.0	2.5	30.5
	3	31.5	4.2	35.7

n-Paraffin: 5% (v/v), Culture time: 72 hr.

Table 4. Effect of NH_4NO_3 concentration.

Conc. of NH_4NO_3 (%)	Conversion yield (%)		
	α -KGA	L-GLU	Total
0.2	14.7	1.3	16.0
0.5	11.2	2.0	13.2
1.0	16.7	4.1	20.8
1.5	29.5	4.9	34.4
2.0	23.7	4.4	28.1
3.0	15.0	5.1	20.1

n-Paraffin: 10% (v/v), Culture time: 72 hr.

C. 有機栄養源およびサイアミンの影響 有機栄養源として corn steep liquor の濃度の影響をしらべてみると, CSL 0.02~0.05% とかなり低い濃度のところが最適であり, 0.2% 以上になると生育は増加するが α -ケトグルタル酸の生産は著しく低下した (Table 5).

使用菌は生育にサイアミンを要求することが判っており²⁾, CSL の影響はサイアミンの効果と予想されたので, 次にサイアミンの濃度について検討した. この場合の CSL の濃度は 0.01% である.

生育量はサイアミン濃度の増加に伴い増大したが, α -ケトグルタル酸の生産にはサイアミン 2 γ/l 附近

Table 5. Effect of CSL concentration.

Conc. of CSL (%)	Conversion yield (%)		
	α -KGA	L-GLU	Total
0	9.9	3.6	12.8
0.02	23.7	4.4	28.1
0.05	28.5	2.6	31.1
0.1	19.1	3.0	22.1
0.2	12.8	3.1	15.9
0.5	3.9	1.5	5.4

n-Paraffin: 10% (v/v), Culture time: 72 hr.

Table 6. Effect of thiamine concentration.

Conc. of thiamine-HCl (γ/l)	Conversion yield (%)		
	α -KGA	L-GLU	Total
0	23.7	4.4	28.1
2	31.0	6.0	37.0
10	19.0	5.0	24.0
200	0.0	0.3	0.3
2000	0.0	0.1	0.1

n-Paraffin: 10% (v/v), CSL: 0.01%

Culture time: 72 hr.

が最適であった. サイアミンの濃度 10 γ/l 以上では α -ケトグルタル酸の生産は著しく低下した. L-グルタミン酸の生産に対しても同様な傾向が認められた (Table 6).

サイアミンのこのような効果は *n*-パラフィンからの L-グルタミン酸の生産および α -ケトグルタル酸の生産について他の研究者ら^{2,3)} によっても広く認められている.

D. 金属イオンの影響 次に金属イオンとして Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} および trace metal ions の影響について検討した.

Table 7 に示すように, α -ケトグルタル酸の生産には Fe^{2+} の濃度を高くし, trace metal ions を若干添加することが好結果を与えた.

n-パラフィンからの α -ケトグルタル酸発酵における Fe^{2+} の必須性およびそれが必要とされる過程については今田らの詳しい報告²⁾ がある.

次に CaCO_3 の添加効果について検討したところ, Table 8 に示したように CaCO_3 を添加しない場合には α -ケトグルタル酸も L-グルタミン酸の生産も著しく低かった. Jar fermentor を用い NH_4OH で pH

Table 7. Effect of various metal ions.

Conc. of metal ions	Conversion yield (%)			Conc. of metal ions	Conversion yield (%)				
	α -KGA	L-GLU	Total		α -KGA	L-GLU	Total		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.002%	22.4	3.3	25.7	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1%	25.0	4.6	29.6
	0.01	23.6	3.6	27.2		0.2	25.6	4.3	29.9
	0.02	27.5	4.4	31.9		0.3	25.6	4.0	29.6
	0.05	31.0	4.8	39.8		0.4	23.8	4.0	27.8
	0.1	27.5	4.8	32.3		0.5	26.8	4.0	30.8
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.002%	26.6	4.0	30.6	Trace metal solution*	0 ml/l	27.3	4.1	31.4
	0.01	22.8	3.9	26.7		0.5	28.5	4.8	33.3
	0.02	21.0	4.3	25.3		1.0	38.7	4.5	43.2
	0.05	21.7	4.4	26.1		5.0	21.0	4.5	25.5
	0.1	20.5	3.6	24.1		10.0	17.2	4.8	22.0

*Na₂B₄O₇·10H₂O 88 mg/lZnSO₄·7H₂O 10 mg/lNa₂MoO₄·2H₂O 40 mg/lCoCl₂·6H₂O 10CuSO₄·5H₂O 300*n*-Paraffin: 10% (v/v)

を 7.5 に control しながら検討した結果, CaCO₃ の存在は必須条件ではなく, フラスコ実験における CaCO₃ の効果は大部分 pH の調節作用にあると理解されたが, なお CaCl₂ の添加に見られるように Ca⁺⁺ は α -ケトグルタル酸の生産を若干促進することが認められた (Table 9).

E. pH control の影響 Jar fermentor を用い pH

Table 8. Effect of CaCO₃.

Conc. of CaCO ₃ (%)	Conversion yield (%)		
	α -KGA	L-GLU	Total
0	1.0	2.5	3.5
2.0	37.5	11.2	48.7
3.0	35.1	10.6	45.7
5.0	25.3	13.7	39.0

n-Paraffin: 10% (v/v), Exp. with 500 ml flask, Culture time: 72 hr.

Table 9. Effect of calcium ion.

Ca ⁺⁺	Conversion yield (%)		
	α -KGA	L-GLU	Total
None	44.0	16.3	60.3
CaCO ₃ 2%	46.2	19.8	66.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.1%	48.3	19.8	68.1

n-Paraffin: 18.7% (v/v), Culture time: 69 hr, Exp. with 5l-jar fermentor.

を NH₄OH または 5N NaOH で 6.7 に control しながら発酵を行なった結果, pH control は α -ケトグルタル酸の生産に有効であり, 特に NH₄OH による control が良好であった.

α -ケトグルタル酸の生産に対して最適の pH は 6.7~7.0 であり, L-グルタミン酸の生産には 7.0~7.5 が良好であった (Table 10).

NH₄OH の feeding を行なっても好収率で α -ケトグルタル酸が生成することは興味深い.

Table 10. Effect of pH control by NH₄OH.

pH	Conversion yield (%)		
	α -KGA	L-GLU	Total
6.0	48.4	5.7	54.1
6.7	52.8	18.9	71.7
7.0	54.5	19.9	74.4
7.5	45.5	20.3	65.8

n-Paraffin: 18.7% (v/v), Culture time: 69 hr, Exp. with 5l-jar fermentor.

4. 発酵収率

A. サイアミン濃度の影響 本発酵において主な発酵生産物は α -ケトグルタル酸と L-グルタミン酸のほかに細菌々体であるとし, 細菌々体生成のために消費される炭素源を差し引いて発酵収率を計算し直してみると, Table 11 に示したようになる.

この場合, 乾燥菌体 1g は *n*-パラフィン 1g から

Table 11. Effect of thiamine concentration on productivity.

Conc. of thiamine-HCl (γ/l)	Conversion yield (%)			Corr. Calc. $\times 100$ (%)
	Observed	Corrected	Calculated	
0	75.1	95.0	172	55.2
10	68.1	91.5	"	53.2
100	46.3	66.5	"	38.7
1000	5.0	7.1	"	4.1

n-Paraffin: 18.7% (v/v), Culture time: 69 hr, Exp. with 5 l-jar fermentor.

Assumptions:

- (1) *n*-Paraffin 1 g \rightarrow Dry cells 1 g
- (2) $6 C_n H_{2n+2} \rightarrow 3n$ Acetate $\rightarrow n$ α -KGA or L-GLU

生成されるとする酵母についての実験結果⁴⁾をそのまま仮定し、発酵中に増殖した菌体量と同量の *n*-パラフィン差引いて対消費パラフィン収率を示すと、 α -ケトグルタル酸の収率は 95% にも及ぶことが明らかになった。

また *n*-パラフィンは β 酸化を受けて酢酸に分解された後、3 分子の酢酸から 1 分子の α -ケトグルタル酸が生成すると仮定した場合の対 *n*-パラフィンの理論収率は C_{14} についていえば 172% となる。このように計算した理論収率に対する実際の発酵収率は 55.2% となる。

B. *n*-パラフィン濃度の影響 次に *n*-パラフィンの濃度について検討を加えた結果、濃度の低い方が収率がよく、*n*-パラフィン 8.7% からは対 *n*-パラフィン収率 85.5% ときわめて高い収率の発酵が進行することが認められた (Table 12).

Table 12. Effect of concentration of carbon source.

Conc. of <i>n</i> -paraffin (% v/v)	Conversion yield (%)			Corr. Calc. $\times 100$ (%)
	Observed	Corrected	Calculated	
8.7	85.5	120	172	69.9
15.3	76.9	111	"	64.5
18.7	67.4	88.1	"	51.2
22.0	60.5	75.5	"	43.8

Culture time: 69 hr, Exp. with 5 l-jar fermentor.

C. 通気攪拌の影響 このような好収率の発酵が行なわれるためには十分な酸素の供給が必要とされる。そこで攪拌の影響を検討したところ、Table 13 のよ

うになり、攪拌数 600~800 rpm での差はほとんど認められなかった。

Table 13. Effect of agitation.

Agitation (rpm)	K_{La}	Conversion yield (%)			Corr. Calc. $\times 100$ (%)
		Observed	Corrected	Calculated	
500	320	63.3	72.5	172	41.9
600	363	71.8	85.6	"	49.5
700	470	69.4	85.5	"	49.5
800	550	69.0	87.3	"	50.5

n-Paraffin: 18.7% (v/v), Culture time: 69 hr, Exp. with 5 l-jar fermentor.

考 察

上述したように、*n*-パラフィンを原料とする α -ケトグルタル酸発酵は発酵収率の面で、炭水化物を原料とした場合⁹⁾に比して遥かに有利であることが示され、炭化水素発酵がいわば一種の酸素固定発酵であり、対炭素源当りの発酵収率は炭水化物の場合を凌駕するであろうという予想を実証したものと云えよう。

炭化水素の添加濃度が発酵収率に及ぼす影響は、Table 12 に示した通りであるが、水に対する溶解度の微小な炭化水素の微生物への取り込み機構⁹⁾や分散、通気効果と関連し、今後検討されるべき興味ある問題であろう。

NH_4^+ の過剰条件下でもグルタミン酸の生産量が低く主として α -ケトグルタル酸が生産されたことは糖質からのグルタミン酸発酵の場合¹⁰⁾と比較して興味深い。

要 約

1. アミノ酸生産能の良好な炭化水素資化性菌のなかから、 α -ケトグルタル酸と L-グルタミン酸の生産総量が消費 *n*-パラフィンの 50% 以上に及ぶもの数株を選択した。
2. これらの中、最も優良であった *Corynebacterium* sp. KY 4439 を用いて、 α -ケトグルタル酸の生産条件について検討を加え、CSL, サイアミン, それぞれの suboptimal 濃度の添加, および Fe^{2+} , trace metal ions の添加が α -ケトグルタル酸の生産に有効なことを認めた。
3. NaOH または NH_4OH による pH control が有効であり、 α -ケトグルタル酸の生産には pH 6.7 ないし 7.0 control が至適であった。
4. *n*-パラフィンの添加濃度は低い方が発酵収率は

よく, *n*-パラフィン 8.7% (v/v) 添加における α -ケトグルタル酸の生成収率 (w/w) は 85.5% に達した。

5) 攪拌の影響を検討した結果, 600~800 rpm (K_{La} 363~550) で大差は認められなかった。

文 献

- 1) 田中, 木村, 山口, 木下: *Amino Acid. Nucleic Acid*, **17**, 136 (1968).
- 2) 今田, 山田: 昭和42年度農化大会 講演要旨集, p. 217 (1967).
- 3) 都河, 中瀬, 小林, 山下, 奥村: 昭和43年度 農化大会講演要旨集, p. 369 (1968).
- 4) Champagnat, A., Vernet, C., Lainé, B., Filosa, J.: *Nature*, **197**, 13 (1963).
- 5) Friedemann, T. E., Haugen, G. E.: *J. Biol. Chem.*, **147**, 415 (1943).
- 6) Cohen, P. P.: *Manometric Techniques*, (Umbreit, W. W. *et al.*) p. 207, University of Wisconsin, Madison (1957).
- 7) Perlman, D., Lardy, H. A., Johnson, M. J.: *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **16**, 515 (1944).
- 8) 朝井, 相田: 微生物工学講座, **6**, 62~80 共立出版, 東京 (1956).
- 9) Johnson, M. J.: *Chemistry and Industry*, p. 1532 (1964).
- 10) 田中, 岩崎, 木下: 農化, **34**, 593 (1960).

(昭44. 2. 28 受付)