

[J. Ferment. Technol., Vol. 47, No. 8, p. 470~477, 1969]

微生物による炭化水素の利用

(I) 数種細菌による *n*-パラフィンの資化とビタミン B₁₂ 生産性

森川 治記・上久保 正

(広島大学工学部醸酵工学科)

Utilization of Hydrocarbons by Microorganisms

(I) Utilization of *n*-Paraffins and Vitamin B₁₂ Production by Several Kinds of Bacteria

Haruki Morikawa and Tadashi Kamikubo

(Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Hiroshima University, Sendamachi, Hiroshima)

Pseudomonas (*Ps.*) *aureofaciens*, *Ps. ovalis* and *Ps. aeruginosa* were studied on their utilization of *n*-paraffins as well as vitamin B₁₂ production in comparison with *Nocardia gardneri* and *Mycobacterium smegmatis* already reported. It seems difficult to correlate the types of microorganisms and those of *n*-paraffins tested (in regard to the hydrocarbon utilization and vitamin B₁₂ production). It was found that the majority of vitamin B₁₂ existed in the culture fluid when cultured on a simple *n*-paraffin medium. More detailed investigations were made on the effects of culture conditions using *Ps. aeruginosa*. The addition of an appropriate nitrogen source, especially a natural one such as casamino acid, polypeptone, or yeast-extract, or ammonium acetate promoted the utilization of *n*-paraffins and vitamin B₁₂. Substitution of *n*-paraffin as a single carbon source in the medium for a *n*-paraffin mixture resulted in a higher hydrocarbon utilization and vitamin B₁₂ production. The addition of one of certain non-ionic detergents promoted the vitamin production, but it had no effect on the retention of the vitamin in the cells. Cobalt sulfate and 5, 6-dimethylbenzimidazole were effective as precursors of the vitamin.

緒 言

炭化水素を資化利用する微生物については多数の報告があるが、そのビタミン B₁₂ (以下 B₁₂ と略称) 生産性については福井ら^{1,2)} の報告があるくらいで、一方炭化水素についての検討も充分とはいえない。

そこで著者らは石油炭化水素資化性および B₁₂ 生産性をあわせてもつことが期待される *Pseudomonas aureofaciens*, *Ps. ovalis*, *Ps. aeruginosa* を主試験微生物とし、福井らの検討した *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia gardneri* を対照として、*n*-decane

から *n*-octadecane までの *n*-パラフィンをそれぞれ単一の炭素源としたばあいの炭化水素資化性と B₁₂ 生産性を系統的に検討した。さらに、これらの菌株のうち B₁₂ 生産力もすぐれ、その大部分を培養液中に排出した *Ps. aeruginosa* について、炭化水素資化性と B₁₂ 生産性に及ぼす窒素源、界面活性剤、その他の添加物の影響を検討した。

実験方法

1. 供試菌株、培地ならびに培養方法 財団法人発酵研究所より分譲いただいた *Ps. aureofaciens* IFO

3521, *Ps. ovalis* IFO 3738, *Ps. aeruginosa* IFO 3080, *Mycobacterium smegmatis* IFO 3083, *Nocardia gardneri* IFO 3385 を供試した。

培地組成は原則として Table 1 のものを使用し、変法その他添加物についてはそれぞれの箇所で示した。殺菌は炭化水素と他の成分溶液を別個に 15lb で10分間行なった。

Table 1. Composition of hydrocarbon medium.

(NH ₄) ₂ SO ₄	1.32g	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
(NH ₄) ₂ CO	0.60	MnSO ₄ ·4H ₂ O	2
KH ₂ PO ₄	2.00	CoSO ₄ ·7H ₂ O	1
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3.00	pH	7.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20		
Na ₂ CO ₃	0.10	Tap water	1l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10mg	Hydrocarbon	1.0% (v/v)

培養はすべて28℃で振盪培養法によった。まず、大型試験管 (2×15 cm) に炭化水素を1.0% (v/v) 含む上述の培地10 ml を分注し、保存培養から種菌を1白金耳接種し、4日間振盪培養 (振巾2.2 cm, 190往復/分) 後遠心分離 (3000 rpm, 10分) により集菌し、生理的食塩水で1回洗浄遠沈後、生理的食塩水で原容積にし、これを接種菌液とした。本培養は500ml 容坂口フラスコに培地95ml を入れて殺菌し冷却後、上記接種菌液を5 ml ずつ接種し振盪培養 (振巾6.5 cm, 115往復/分) を行ない最大増殖時 (通常約10日) を培養最終点とした。

培養終了後培養液を遠心分離 (6000 rpm, 30分) し

て菌体と上清に分け、菌体量測定および B₁₂ 分析に供した。得られた湿菌体の水分は約82%であった。

2. B₁₂ の抽出と定量 上述の操作で得られた菌体および上清中の B₁₂ は常法^{3,4)}により *Escherichia coli* 215 による微生物定量法を採用した。

実験結果

1. 数種細菌による炭化水素質化と B₁₂ 生産 3 種 *Pseudomonas* 属細菌, *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia gardneri* による、炭素数10~18の *n*-パラフィンの質化性と B₁₂ 生産をブドウ糖 (炭化水素の代わりに1% (w/v) 添加) 培地を対照として検討した。

A. *Ps. aureofaciens* のばあい Table 2 から明らかなように、C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₆, C₁₇ の *n*-パラフィンでは菌体収量, B₁₂ ともに良好で、B₁₂ についてはケロシン、ブドウ糖よりもすぐれている。菌体量では C₁₁, B₁₂ では C₁₂ の *n*-パラフィンが特に良好である。菌体収量と B₁₂ 生成量との間に近似的な相関性が認められる。また *n*-パラフィンの種類によって異なるが、菌体外すなわち培養液中への多量の B₁₂ の排出が認められる。

B. *Ps. ovalis* のばあい Table 3 より、C₁₀ すなわち *n*-decane のばあい B₁₂ 生成は顕著でその半量以上は培養液中に存在し、炭素数の増加とともに B₁₂ 生成は低下することが認められる。一方菌体収量は C₁₅~18 の *n*-パラフィンのばあいブドウ糖より良好である。

C. *Ps. aeruginosa* のばあい Table 4 より、この

Table 2. Utilization of hydrocarbons and vitamin B₁₂ production by *Ps. aureofaciens*.

Carbon sources 1%(v/v)	Cell yields (dry basis) (g/100 ml)	Vitamin B ₁₂ in	
		Cells (μg/100 ml)	Supernatant (μg/100 ml)
<i>n</i> -Decane	0.330	1.20	0.61
<i>n</i> -Undecane	0.408	0.90	1.19
<i>n</i> -Dodecane	0.198	1.55	2.10
<i>n</i> -Tridecane	0.103	0.56	0.30
<i>n</i> -Tetradecane	0.103	0.33	0.42
<i>n</i> -Pentadecane	0.214	0.25	0.32
<i>n</i> -Hexadecane	0.268	0.69	1.19
<i>n</i> -Heptadecane	0.344	0.49	0.94
<i>n</i> -Octadecane	0.334	0.62	0.26
Kerosene	0.073	0.76	0.57
Glucose	0.532	0.73	0.30

Table 3. Utilization of hydrocarbons and vitamin B₁₂ production by *Ps. ovalis*.

Carbon sources 1%(v/v)	Cell yields (dry basis) (g/100 ml)	Vitamin B ₁₂ in	
		Cells (μ g/100 ml)	Supernatant (μ g/100 ml)
<i>n</i> -Decane	0.306	3.62	4.00
<i>n</i> -Undecane	0.357	1.14	0.39
<i>n</i> -Dodecane	0.215	1.72	0.72
<i>n</i> -Tridecane	0.272	0.70	0.45
<i>n</i> -Tetradecane	0.205	0.71	0.39
<i>n</i> -Pentadecane	0.783	0.31	0.36
<i>n</i> -Hexadecane	0.912	0.53	0.36
<i>n</i> -Heptadecane	0.724	0.29	0.31
<i>n</i> -Octadecane	0.565	0.36	0.28
Kerosene	0.046	0.12	0.10
Glucose	0.505	0.23	0.32

Table 4. Utilization of hydrocarbons and vitamin B₁₂ production by *Ps. aeruginosa*.

Carbon sources 1%(v/v)	Cell yields (dry basis) (g/100ml)	Vitamin B ₁₂ in	
		Cells (μ g/100ml)	Supernatant (μ g/100ml)
<i>n</i> -Decane	0.200	0.18	4.50
<i>n</i> -Undecane	0.204	1.38	2.50
<i>n</i> -Dodecane	0.076	0.50	2.40
<i>n</i> -Tridecane	0.043	0.45	1.75
<i>n</i> -Tetradecane	0.059	0.55	2.70
<i>n</i> -Pentadecane	0.089	0.55	1.48
<i>n</i> -Hexadecane	0.066	0.79	2.05
<i>n</i> -Heptadecane	0.079	1.00	2.00
<i>n</i> -Octadecane	0.357	2.80	4.00
Kerosene	0.073	0.62	1.48
Glucose	0.472	0.82	4.00

菌のばあい一般的にいて菌体量は低いが B₁₂ 量が高く, 特に *n*-decane と *n*-octadecane のばあい顕著であること, および生成 B₁₂ の大部分が培養液中に存在することが注目される。また菌体収量と B₁₂ 量との間にはば相関性が認められる。

D. *Myc. smegmatis* のばあい Table 5 より, B₁₂ については, C₁₀, C₁₃, C₁₆ の *n*-パラフィンが良好で大部分菌体中に存在することが認められる。一方, 菌体収量は *n*-octadecane を除き全般的に良好であることから, この菌の炭化水素資化性の良好であること

がうかがえる。

E. *Nocardia gardneri* のばあい Table 6 より, B₁₂ については C₁₀~₁₂, C₁₆ の *n*-パラフィンが良好であるが相当量培養液中に存在することが認められる。さらに, 炭素数が偶数の *n*-パラフィンのばあい, 奇数のばあいより良好な傾向がみられる。資化性すなわち菌体量の点では特に顕著な傾向は認められない。

Table 5. Utilization of hydrocarbons and vitamin B₁₂ production by *Mycobacterium smegmatis*.

Carbon sources 1%(v/v)	Cell yields (dry basis) (g/100ml)	Vitamin B ₁₂ in	
		Cells (μ g/100ml)	Supernatant (μ g/100ml)
<i>n</i> -Decane	0.463	2.50	0.38
<i>n</i> -Undecane	0.498	0.43	0.11
<i>n</i> -Dodecane	0.472	0.62	0.30
<i>n</i> -Tridecane	0.805	2.35	0.29
<i>n</i> -Tetradecane	0.499	0.34	0.52
<i>n</i> -Pentadecane	0.406	0.55	0.51
<i>n</i> -Hexadecane	0.608	1.32	0.22
<i>n</i> -Heptadecane	0.469	0.57	0.37
<i>n</i> -Octadecane	0.244	0.31	0.47
Kerosene	0.076	0.59	1.10
Glucose	0.469	0.82	0.40

Table 6. Utilization of hydrocarbons and vitamin B₁₂ production by *Nocardia gardneri*.

Carbon sources 1%(v/v)	Cell yields (dry basis) (g/100ml)	Vitamin B ₁₂ in	
		Cells (μ g/100ml)	Supernatant (μ g/100ml)
<i>n</i> -Decane	0.258	4.30	2.10
<i>n</i> -Undecane	0.281	0.91	3.16
<i>n</i> -Dodecane	0.152	0.73	3.02
<i>n</i> -Tridecane	0.178	0.41	0.36
<i>n</i> -Tetradecane	0.344	0.13	1.00
<i>n</i> -Pentadecane	0.334	0.90	0.50
<i>n</i> -Hexadecane	0.529	2.18	2.20
<i>n</i> -Heptadecane	0.095	0.72	0.56
<i>n</i> -Octadecane	0.257	1.25	1.01
Kerosene	0.095	0.13	0.41
Glucose	0.281	0.55	0.73

2. *Ps. aeruginosa* による B₁₂ 生産におよぼす諸条件の影響 上記 5 種の供試菌を試験条件で培養したばあい生成 B₁₂ の相当量が培養液中に存在した。特に顕著であった *Ps. aeruginosa* について *n*-decane を炭素源としたばあい、諸種の条件の菌体収量および生成に及ぼす影響を検討した。

A. 培養時間と B₁₂ 生成 炭化水素培地で生成した B₁₂ の相当量が培養液中に排出された。その原因の 1 つとして、炭素源としての炭化水素の利用に時間がかかるため、すなわち培養期間が長いと菌体内で生

成した結合型 B₁₂ が菌体蛋白質の変性その他の原因で結合が切れて培養液中に排出されたと推測されるので、B₁₂ 生成の時間的経過を検討した。

Fig. 1 より、すでに培養の初期より培養液中に存在するが培養時間の経過とともに B₁₂ 生成が高まるほど培養液中への高い分布が認められる。

B. 窒素源の効果 窒素源として一般に用いられる無機のアンモニウム塩のほか、有機の窒素源を加え 9 種類について 0.1%, 0.5% (w/v) の 2 種類の添加量で 7 日培養 (増殖最大) で検討した。酢酸アンモニウ

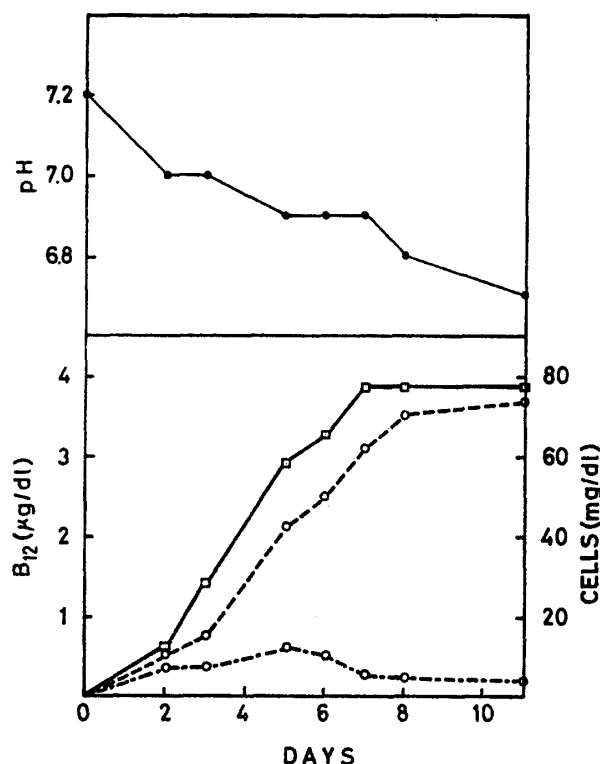


Fig. 1. Time course of vitamin B₁₂ formation by *Ps. aeruginosa*.

—●— pH; —□— Cells;
 ---○--- Total vitamin B₁₂;
 ---○--- Vitamin B₁₂ in the cells.

ム, ポリペプトン, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 以外の窒素源のばあい0.5%添加で特に効果は認められなかったので0.1%のばあいの結果を Table 7 に示した。

0.1%添加では NH_4NO_3 , 尿素, カザミノ酸, ポリペプトンが良好であった。 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 酢酸アンモニ

Table 7. Effects of various nitrogen sources on the utilization of *n*-decane and vitamin B₁₂ production by *Ps. aeruginosa*.

Nitrogen sources 0.1%(w/v)	Cell yields (dry basis) (g/100ml)	Vitamin B ₁₂ in	
		Cells (µg/100ml)	Supernatant (µg/100ml)
(NH_4) ₂ SO ₄	0.016	0.092	0.94
NH ₄ NO ₃	0.018	0.032	1.57
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.018	0.027	0.86
NH ₄ Cl	0.011	0.010	1.25
(NH ₂) ₂ CO	0.011	0.014	2.10
CH ₃ COONH ₄	0.018	0.050	1.05
Casamino acid	0.036	0.064	1.88
Polypepton	0.021	0.215	1.68

ウムのばあい0.5%添加で生成 B₁₂ 量は2倍以上に, ポリペプトンのばあいそれに近い増加を示した。

Ps. aeruginosa のアミノ酸あるいはビタミン要求性は明らかでないが天然の窒素化合物が有効 (Table 7) であったので, さらに酵母エキスについて比較検討したところ, 生成 B₁₂ 量には特に顕著な影響はないが菌体増殖の促進と生成 B₁₂ の菌体内保持に効果のあることが認められた。酵母エキス添加量と菌体収量および生成 B₁₂ との関係を Table 8 に示した。0.1%添加で上記の効果が顕著である。

次ぎに炭素源としての *n*-decane の代わりに3種類の *n*-パラフィン混合物 P-4 (三井石油化学), P-10 (三井石油化学), KN-1 (鐘淵化学) を用いたばあいの酵母エキスの効果を検討した。Table 9 に示したように P-4, P-10, KN-1 のいずれも菌体収量, B₁₂ 量に顕著な効果が認められ, 一方酵母エキスの存在はそのいずれにも特に効果は認められないが生成 B₁₂ の菌体内保持には有効と認められる。

C. 界面活性剤の効果 基質の炭化水素は水に対しほとんど溶解性をもたないから界面活性剤の使用による乳化促進で炭化水素の資化速度の増大が期待される。そこで非イオン性ならびにイオン性界面活性剤11種類について検討した。添加量が多いばあい (0.1%) 菌の増殖抑制が認められた。0.05%添加のばあいの結果を Table 10 に示した。

一般的に, 非イオン界面活性剤は適当な添加量では菌体増殖には有効と考えられるが B₁₂ 生成にはあまり顕著な効果は期待できない。

D. 硫酸コバルトの効果 B₁₂ 生成に培地中のコバルト含量が影響をおよぼすことが当然考えられる。

Table 8. Effects of yeast extract on the utilization of *n*-decane and vitamin B₁₂ production by *Ps. aeruginosa*.

Yeast extract (mg/100ml)	Cell yields (dry basis) (g/100ml)	Vitamin B ₁₂ in	
		Cells (µg/100ml)	Supernatant (µg/100ml)
0	0.087	0.18	1.69
10	0.080	0.71	1.19
50	0.118	1.45	0.40
100	0.129	1.74	0.10
250	0.159	1.39	0.33
500	0.237	1.18	0.27

Table 9. Effects of yeast extract on the utilization of hydrocarbon mixtures and vitamin B₁₂ production by *Ps. aeruginosa*.

Carbon sources 1%(v/v)	Yeast ext. (%)	Cell yields (dry basis) (g/100ml)	Vitamin B ₁₂ in	
			Cells (μg/100ml)	Supernatant (μg/100ml)
<i>n</i> -Decane	0	0.087	0.22	1.59
	0.1	0.129	1.50	0.20
P-4 ¹⁾	0	0.509	11.0	0.25
	0.1	0.762	12.2	0.14
P-10 ²⁾	0	0.369	7.5	0.22
	0.1	0.599	9.5	0.07
KN-1 ³⁾	0	0.558	8.7	1.45
	0.1	0.654	9.0	0.28

1) P-4 contains mainly *n*-tridecane (40—50%) and *n*-tetradecane (30—42%).

2) P-10 contains mainly *n*-undecane (40—50%) and *n*-dodecane (25—35%).

3) KN-1 contains mainly *n*-tridecane (29%), *n*-tetradecane (28%), *n*-pentadecane (14%), and *n*-dodecane (13%).

Table 10. Effects of various detergents on the utilization of *n*-decane and vitamin B₁₂ production by *Ps. aeruginosa*.

Detergents 0.05%(v/v)	Cell yields (dry basis) (g/100ml)	Vitamin B ₁₂ in	
		Cells (μg/100ml)	Supernatant (μg/100ml)
Control	0.086	0.22	1.40
Emanon 3115	0.150	0.55	1.61
Nonion S-6	0.119	0.41	1.45
Nonion O-6	0.093	0.20	1.66
Nonion ST-221	0.100	0.40	1.58
Naimin S-215	0.062	0.19	1.69
Cation PB-40	— ²⁾	—	—
Emal 0	0.119	0.27	1.58
C. T. A. C. ¹⁾	—	—	—
Tween 20	0.086	0.22	1.50
Tween 60	0.140	0.32	1.65
Tween 80	0.134	0.21	1.55

1) C. T. A. C. : Cetyl trimethyl ammonium chloride.

2) — : No growth.

コバルト塩として $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の種々の添加量について検討したところ, *Ps. aeruginosa* のばあい Table 11 に示したように 0.1 mg/100 ml 添加のとき B_{12} 生成量は最も高く, それ以上では菌体増殖ならびに B_{12} 生成に阻害が認められる。

Table 11. Effects of cobalt sulfate on the production of vitamin B_{12} by *Ps. aeruginosa* in *n*-decane medium.

$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mg/100ml)	Cell yields (dry basis) (g/100ml)	Vitamin B_{12} in	
		Cells ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	Supernatant ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)
0.01	0.726	3.3	0.17
0.1	0.758	12.2	0.14
1.0	0.628	9.5	0.15
10	0.237	3.0	0.80

E. 5,6-Dimethylbenzimidazole の効果 炭水化物培地での B_{12} 生合成に 5,6-dimethylbenzimidazole (DBI と略称) が有効であることは, 佐橋ら⁵⁾の *Streptomyces* sp., Janicki ら⁶⁾の *Propionibacterium shermanii* による実験で確認されているが, 炭化水素培地のばあい報告がない。そこで 0.1~2.5 mg/100 ml の添加量について検討した。Table 12 に示したように 1.0 mg/100 ml のばあい, かなりの効果が認められた。

Table 12. Effects of 5,6-dimethylbenzimidazole on the vitamin B_{12} production by *Ps. aeruginosa* in *n*-decane medium.

DBI ¹⁾ (mg/100ml)	Cell yields (dry basis) (g/100ml)	Vitamin B_{12} in	
		Cells ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	Supernatant ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)
0	0.758	12.2	0.14
0.1	0.775	13.8	0.17
1.0	0.807	15.3	0.25
2.5	0.758	13.1	0.20

1) DBI : 5,6-Dimethylbenzimidazole.

考 察

既報^{1,2)}の *Nocardia gardneri*, *Mycobacterium smegmatis* を対照として, *Pseudomonas* 属の3菌種の, 炭素数10~18の *n*-パラフィンの資化性と B_{12} 生産性を検討した。検討の条件としては, 緒言に記述の観点から培地組成, 培養条件など, できるだけ簡単な

ものを採用した。したがって得られた結果は必ずしもそれぞれの微生物にとって最適条件下でのものとはいえず, 条件の改良によりさらに結果の向上が期待できる。

5種の供試微生物による, 炭素数10~18の *n*-パラフィンの資化性について一般的な規則性を結論づけることは困難であるが, *n*-decane, *n*-undecane, *n*-hexadecane は比較的良好で, *n*-tridecane, *n*-pentadecane, *n*-heptadecane も微生物によっては資化良好のばあいもある。

現在では, 微生物により生合成された B_{12} は菌体内でいわゆる補酵素型(結合型)として存在することが認められている。ところが炭化水素培地では, 従来の炭水化物培地のばあいと異なり, 試験したどの菌種についても生成した B_{12} のかなりの部分が培養液中に存在した。この傾向は福井らの結果とも一致する。この原因の1つとして, 培地に添加された炭化水素の資化利用に長時間を要すること, さらに比較的簡単な培地組成による不十分な栄養条件のため増殖に時間を要することなどのため, 菌体内で生成した補酵素型 B_{12} の結合が切れて培養液中に移行したものと推測される。菌体内の B_{12} の形態については補酵素型検討の常法⁷⁾に従って抽出, 精製後, ろ紙電気泳動法 (pH 2.5, 7.5, 11.0) で分画後, 微生物法 (*E. coli* 215) で検出し cobalamin coenzyme と推定した。

生成した B_{12} の菌体内と培養液中における分布状況は微生物と *n*-パラフィンの種類によって異なり明確な関係を引き出すことは困難である。全 B_{12} 量と菌体収量の2点から考えると *Ps. aureofaciens* のばあいは *n*-decane, *n*-undecane, *n*-dodecane, *n*-hexadecane が, *Ps. ovalis* では *n*-decane, *n*-dodecane が, *Ps. aeruginosa* では *n*-decane, *n*-undecane, *n*-octadecane が良好な炭素源と考えられる。*Nocardia gardneri*, *Mycobacterium smegmatis* のばあい福井らの結果と必ずしも一致しないが, これは種々の条件の相違によるものと考ええる。

検討した5種の微生物のうち *Ps. aeruginosa* は二, 三の炭化水素のばあいを除き菌体収量は最少であるのに対し, B_{12} は最良で, しかも大部分培養液中に存在する。そこで種々の添加物, 培養条件の改良による菌体収量の増加と生成 B_{12} の菌体内保持を検討した。まず窒素源として試験した9物質のうち尿素, カザミノ酸, ポリペプトンは添加量0.1%で B_{12} 生成に有効であったが添加量0.5%ではポリペプトンで増大した効果が認められたほか酢酸アンモニウム (0.1%添加未検討) に著効が認められた。前者について0.01~1.0

%の各種添加量について検討したところ 0.5 %で最高の菌体収量と B₁₂ 量を得た。 *Ps. aeruginosa* は炭素源として酢酸をも利用できることから、酢酸アンモニウムが炭素源および窒素源として利用されたものと推測される。有機天然窒素源としてカザミノ酸 (0.1%), ポリペプトン (0.5%), のほか酵母エキス (0.1%) が菌体増殖ならびに B₁₂ 生成に著効を示し、しかも生成 B₁₂ の大部分が菌体内に保持されることは注目に値する。

界面活性剤については検討した範囲内では期待した効果は得られなかった。

n-パラフィン源として石油化学工場で副生される *n*-パラフィン混合物について検討したところ、P-4 のばあい菌体、B₁₂ 生成に著効があった。主成分の *n*-パラフィン (および含有量) そのものの効果か他の少量、あるいは微量成分の影響によるのかは不明である。

硫酸コバルト、DBI の B₁₂ 生成への効果は他の B₁₂ 生産微生物のばあいと同様、当然考えられるところであろう。

総 括

3 種の *Pseudomonas* 属細菌の *n*-パラフィン資化性と B₁₂ 生産性を既報の *Nocardia*, *Mycobacterium* のそれぞれ 1 菌種を対照として検討した。微生物の種類と *n*-パラフィンの間に資化性と B₁₂ 生産について相関々係は認められないが、簡単な *n*-パラフィン培地では生成された B₁₂ の大部分は培養液中に移行し存在することが認められた。 *Ps. aeruginosa* について

さらに詳細な検討を行なった結果、適当な窒素源、特に天然物窒素源のカザミノ酸、ポリペプトン、酵母エキス、および酢酸アンモニウムの効果は顕著であった。界面活性剤については特に期待した結果は得られなかった。純 *n*-パラフィンの代わりに混合物を使用し好結果が得られた。コバルト塩および DBI も B₁₂ の前駆体として B₁₂ 生産に有効であった。

本研究の要旨は日本ビタミン学会第20回大会 (昭和43年4月、高知市) で発表した。本研究に供試した5種の微生物を分譲くださった財団法人発酵研究所、および *n*-パラフィン混合物をご供与いただいた三井石油化学工業株式会社ならびに鐘淵化学工業株式会社に感謝します。

文 献

- 1) 藤井, 清水, 福井: 本誌, **44**, 185 (1966).
- 2) Fukui, S., Shimizu, S., Fujii, K.: *J. Ferment. Technol.*, **45**, 530 (1967).
- 3) 池田: ビタミン, **10**, 268 (1956).
- 4) 上久保: ビタミン, **11**, 43 (1956).
- 5) Sahashi, Y., Mikata, M., Sakao, H.: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **23**, 247 (1950).
- 6) Janicki, J., Pawelkiewicz, J.: *Acta Biochem. Polon.*, **1**, 307 (1954).
- 7) Kato, K., Hayashi, M., Kamikubo, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **165**, 233 (1968).

(昭44.5.12 受付)