

石油炭化水素と微生物

大阪大学工学部 箕浦久兵衛

まえがき

クレオソートをぬった枕木や電柱に撰択的に生えるカビに“Creosote fungi”といわれるものがある。また製油所附近の土や油でよごれた海岸から油分が速かに減少したり、殺菌した土壌や海底堆積物では油がいつまでも残るのに、木処理のものでは徐々に減少する事実などは、大部分炭化水素酸化菌の作用によるものと考えられる。これらのことから、微生物の代謝様式の多様性ならびに高度の適応能と炭化水素の多様性とを適当に組み合わせると、一般に安定と考えられる炭化水素も微生物を介してより高度に利用できる可能性が期待される。とくにじゅうらい、醗酵工業における炭素源として用いられてきた各種炭水化物は人畜の食糧としてせり合う宿命だけでなく、成分的にも炭素当りに換算すると炭化水素のそれに較べはるかに高価である。これらの点に着目した石油炭化水素の微生物学利用の問題は、ここ数年来興味ある研究対象として各国でとりあげられてきた。

そもそもパラフィンに生える微生物についてはじめて報告したのは三好博士で、前世紀末葉のことである。それ以来石油と微生物に関連した多くの研究は、おもに産出量の大きい米・ソにおいて、石油の精製、石油タンクやパイプの腐蝕、爆発事故など各種障害の防除、油田地帯の探索などのほかは学問的興味に重点をおいて行なわれ、醗酵工業などへ積極的に利用しようと企画されたものはなかった。しかし最近菌体成分の食糧化をめざし、あるいはアミノ酸の醗酵生産のほか、汚水処理とも関連して活発な研究がなされるようになり新聞紙上などで紹介されているが、過去数十年の間にあげられてきた研究成果を概説しようと思う。

1. 炭化水素酸化菌の分布

当然予想されるように、石油のしみた土、原油や石油製品の貯蔵タンクなどの底の水が菌の分離試料として最も適当であるが、石油分離槽や沈澱池の水ならびに沈渣、油井や天然ガスかん水、海水や海底の堆積物、泥炭、アスファルト、硫黄泉の水、枯草、糞さらに普通の庭土などその分布は広い。その程度の例として、石油分

離槽の水では100万/ml、庭土で5~20万/g、溝の水から3000/ml程度の酸化菌が得られている。それらの大半は*Pseudomonas*属菌で*P. aeruginosa*(緑膿菌)や*P. fluorescens*で代表され、ついで*Mycobacterium*(結核菌の仲間)、*Actinomyces*や*Micromonospora*などの放線菌、*Micrococcus*、*Desulfovibrio*、*Alcaligenes*、*Flavobacterium*、*Brevibacterium*、*Corynebacterium*などの細菌類、酵母ならびに糸状菌(*Aspergillus*、*Penicillium*)などが多い。保存菌株で調べられた例では*Pseudomonas*のうち95%はケロシン培地に生え、炭化水素利用性はこの菌群の一般的特徴とも考えられる。また*Mycobacterium leprae*(ライ菌)、*M. phlei*、*M. smegmatis*も重油、ケロシン $C_{10}H_{22}$ ~ $C_{16}H_{34}$ 、パラフィン・ワックスを利用し、*M. tuberculosis*(結核菌)のうちヒト型とウシ型は炭化水素を利用しないが、トリ型はゆっくり発育する。

2. 炭化水素酸化菌の栄養要求

前述の試料より集殖、分離した菌による炭化水素の酸化は一般に簡単な培地で、しかも広範囲の条件下で行なわれる。すなわち基本培地である塩類溶液が生理的に手衡を保ち、アンモニアか硝酸のような窒素源と酸素が共存し、pHが中性附近であればよい。しかし多くのばあい、酸化に伴って酸ができるので、緩衝能をもった炭酸塩や磷酸塩の共存が望ましい。

がんらい炭化水素は好気性、嫌気性いずれの菌によっても酸化される。好気性菌のばあい0.1~0.3 mg/Lの酸素では同程度によく生えるが、酸化的代謝は酸素の存在により影響されるので、たとえばナフタリンでのある培養では通気したものと通気しないもので3~4倍の差が認められている。また嫌気条件下にある油井かん水中で酸化菌が働くのは、これらの菌の中に硝酸塩や硫酸塩を水素受容体として利用できるものがあるためである。

窒素源としてはアンモニウム塩で十分で、硝酸塩を利用するものも多い。メタン酸化菌のばあい、塩化アンモン、硝酸カリのいずれも0.0025~0.3%の間ではほとんど同程度に発育する。第2磷酸カリは0.1~0.5%が適当であるが、極端な例として、ある種の*Corynebacterium*は

磷酸塩がなくても酸化能に影響しなかったという報告もある。その他の塩類としては少量の硫酸マグネシウムが必要で、菌種によりカルシウム、銅、鉄、亜鉛、マンガンなどに促進効果の認められる例がある。塩類濃度についてはかなり鈍感なものがあり、30%という高濃度の油井かん水も、その中にいる酸化菌の培養に十分用い得るといわれ、死海から分離された細菌はクロシンや石油を加えた25%食塩溶液で発育したという。

ペプトンや炭水化物のような利用され易いものが共存すると炭化水素利用能を完全に失うものがあるほか、これらがさきに利用されて生じた酸化生成物が酸素分圧を下げ、酸化還元電位を下げるので、炭化水素の同化は妨げられる傾向はあるが必ずしもそうとは限らない。たとえば栄養豊富な培地に長い間培養した *B. aliphaticum* は炭化水素を加えた無機培地に保ったものより、炭化水素をはるかに利用しにくかったり、メタン酸化菌もこれらの培地に保つとメタン酸化能を失う傾向がある。他方、有機、無機のいずれの培地にもよく生える *Methanomonas methanica* の例では0.5%のアスパラギンや1%のペプトンの存在がパラフィン・ワックスの酸化に影響しなかったとか、ナフタリンが有機物の少い土壌より多い土壌で速かに消滅したという報告もある。要するに1mg/L以下の低濃度の有機物は一般に菌の増殖を促し、菌による炭化水素の同化を促進するものらしい。さらに有機物の酸化によって生じた炭酸ガスは炭化水素酸化菌の活性が出はじめののに有利で、そのほか酵母エキス、ニコチン酸アミド、ビタミン B₁、B₂、B₆、C などの単独または混用が有効なばあいもある。

3. 分散媒

石油炭化水素を菌の培養に用いるばあい、ガス状のものはその分圧によって調整できるが、事実上水にとけない液状または固形のものは培地中に分散させるのに特殊な方法が必要となる。固形パラフィンについて実験された例では、培養にさらされるパラフィンの表面積と酸素消費量との間には直接関係があり、油のばあいも大体同様である。固形パラフィンの添加法として、実験的には溶けたものを培地に加えるとか、マイクロームで薄片にして表面積を大きくしたり、ガラス粉とまぜて培地の底へ沈ませる方法などが採られているが実際的ではない。液状のものは、その30gに硫酸カルシウム20g、炭酸カルシウム20g、カオリン100gの割合でねり合せた塊を同量の塩類溶液とまぜる方法が考案されており、これによれば加圧殺菌しても油分を分離しない。また不活性な固体表面に分散させることも有効で、それには土壌、珪素、酸化鉄のほかアスベスト、グラスウールなどが適

当である。しかしペントナイト、タルクのような微粉は不適当で、とくに細菌々体より小さい粒子ではかえって害作用が認められる。

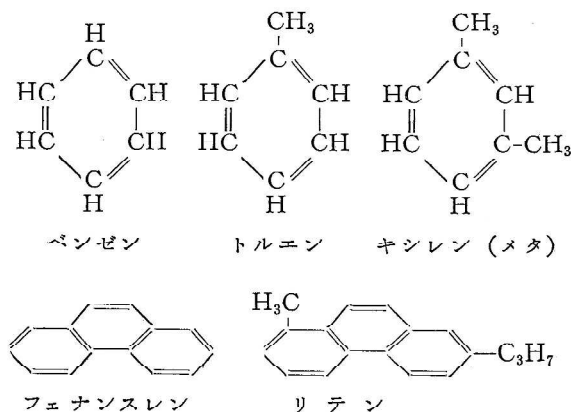
もっと簡単には炭化水素と塩類溶液を Waring blender でまぜ、数回ホモゲナイザーを通すがよく、菌によってほとんど利用されないアラビヤゴムを少量添加するのも安定剤として効果がある。また Tween 等の表面活性剤の微量の添加もかなり有効である。

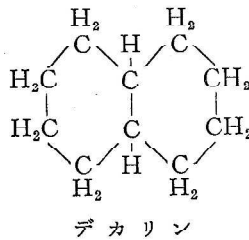
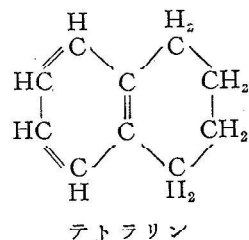
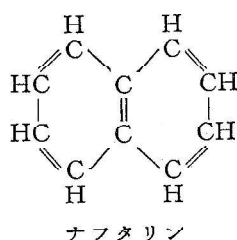
4. 微生物によつて利用される炭化水素

石油エーテル、クロシン、アスファルト、原油、天然ならびに人造ゴム、そのほか種々の化学的に純粋な炭化水素が種々の微生物によって酸化される。

まず脂肪族炭化水素についていえば、一般に分子量が大きいほど、直鎖の長いほど、さらに飽和度の高いほど酸化され易い傾向がある。すなわちメタン、エタン、プロパンなどは割に少数の菌によって、ゆっくり利用されるにすぎないが、大部分が C₂₀H₄₂ ないし C₄₀H₈₂ から成るパラフィン・ワックスは多くの菌によって利用される。たとえば *Bacterium aliphaticum liquefaciens* はペンタン以下を利用しないのに、これ以上デカンまではすべて酸化し、またヘキサデカン C₁₆H₃₄ 以下は利用できなくてもトリアコンタン C₃₀H₆₂、テトラトリアコンタン C₃₄H₇₀ やパラフィン油を酸化するものが知られており、さらにある種の *Pseudomonas* や *Mycobacterium* はパラフィン・ワックスではクロシンより、クロシンでは石油エーテルよく生えることが知られている。しかしこれとは逆に、石油エーテル、クロシンなどで発育しながら、パラフィン油やパラフィン・ワックスに生えない *Pseudomonas* もまれにある。

つぎに芳香族炭化水素は核が開裂されにくいために微生物の酸化を受けにくい傾向はあるが、かなり多くの菌がベンゼンやその誘導体を破壊する。すなわち *Bacillus hexacarbovorum* や *Bacterium benzoli* は、培地中に 1/10,000 以上あれば有害とされるベンゼン、トルエン、キ





シレンなどを利用し、バクテリアの油田地帯から得られた *Bacterium naphthalenicus* などにはナフタリンを酸化し、油のしみた土から分離された *Bacillus phenanthrenicus bakiensis* はほかの炭化水素とともにフェナンスレンを利用し、さらにある種の硫酸還元菌はナフタリン、フェナンスレン、リテン（メチルイソプロピルフェナンスレン）を徐々に分解することが知られている。放線菌の1群である *Micromonospora* や海洋性好気性菌もトルエンやナフタリンを酸化し、ある種の土壌菌ではナフタリンのほかチフェニール、アトロリン、デカリンなどの酸化が認められている。

また *Bacterium aliphaticum* はヘキサンからテトラトリアコンタンにいたる脂肪族炭化水素を定量的に分解できても、芳香族ならびにナフテン系炭化水素を利用し得ないのにならば *Bacterium aliphaticum liquefaciens* は脂肪族ならびにナフテン系炭化水素を定量的に利用して芳香族炭化水素のみを残すなど、同じ系統の菌種においても作用様式の多様性は著しい。この両菌種はいずれもオクタタンよりカプリレンやオクテンによく生えて、不飽和型が飽和型より利用され易い傾向があり、同じような例はペンテンを利用するのにペンタンを酸化できない *Mycobacterium*、テトラリンよりナフタリンを、またデカリンよりテトラリンをよく利用するある種の土壌菌にも認められる。

ノルマル・オクタタン $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$

イソ・オクタタン $(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$

オクテン $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$

これら炭化水素の微生物による酸化の難易にたいする側鎖の影響については、断片的なデータはあるが菌種によりまちまちである。たとえばイソ・オクタタンよりノルマル・オクタタンを容易に利用するものと、これと全く反対のものが知られていたり、*Bacterium aliphaticum liq.* のようにテトラヘキサンより、そのジメチルおよびトリメチル誘導体をよく利用し、さらにセチルベンゼンを破壊してもベンゼン、トルエン、エチルおよびブチルベンゼンを利用できないものが知られている。これと関連して、一般にベンゼン核にメチル基をいれると菌によって酸化され易くなるといわれ、ベンゼンよりトルエン、

キシレンさらにフェノールを容易に酸化する *Bacterium benzoli* が知られ、またベンゼンやトルエンでは全々生えないのにノルマルブチル、イソブチル・ベンゼンさらに第3級ブチルベンゼンによく生える土壌菌が知られている。

しかし反対にトルエンやエチルベンゼンよりベンゼンを容易に酸化するものとして *Bacillus toluolicum* が報告されている。

5. 酸化生成物

炭化水素が微生物によって酸化されると、つねに炭酸ガスが生じ、ほかに脂肪酸、アルコールおよびエステルなどの中間代謝物と菌体を得られる。たとえば *Methanomonas methanica* によるメタンの酸化では約半分が炭酸ガスとなり、また *Aspergillus flavus*（米麹菌の野生種）は12週間の培養で、消費したパラフィンの53%が菌体に変わり、約10%が高級アルコールのエステルなど不揮発性産物となったという。いずれにしても *Aspergillus* や *Penicillium* によるパラフィンの酸化で得られるエネルギーのかなりの量が熱として失われる。

ガス状の炭化水素を *B. methanicus* や *B. ethanicus* などの細菌によって、沸点の低いアルコールから蠟状の酸、アルコール、エステルなど広範囲の酸化物に変える方法が開発されており、たとえばブタンのようなより重い炭化水素は、高分子量のものに重合される不飽和化合物に変えられ易いといわれる。

Pseudomonas aeruginosa などによるケロシンの酸化によつては酢酸、乳酸のほか、メタン、エタン、アセトアルデヒドの形成が認められており、最近 *Corynebacterium* の1種によるグルタミン酸の工業生産も可能といわれる。

またパラフィン油にある種のカビが生えるとエルゴステリンやコレステリンが蓄積され、*Corynebacterium* や *Mycobacterium* が働くとβ-カロチン、アスタシンなど2、3のカロチノイド色素を造り、ときに培地が橙色を呈することがある。また酵母とカビの混合培養でイソプロパノールのような揮発性アルコールも認められており、テトラヘキサンに *Pseudomonas* が働くと吉草酸が得られている。

さらに *B. benzoli* はベンゼンからヒドロキノンそのほか種々の有機酸を造るし、トルエンからも酸を造る。またフェナンスレンやリテンに硫酸還元菌が働くとオキシフェノール化合物が、ナフタリンに *Pseudomonas* や *B. naphthalenicus* が働くとオルトサリチル酸が生じ、あ

る種の土壌菌はフェノールを造る。

6. 石油から蛋白ビタミン濃縮物の生合成

石油炭化水素の微生物的利用については、さきにもふれたように、アミノ酸やホルモンの醗酵生産が報告されているが、ここでは食糧化について述べる。

ベントザンなど比較的資化されにくい炭水化物をもった各種廃液に雑食性酵母を培養して食糧化しようとする試みは、廃液処理の問題とも関連して第1次大戦当時から研究され、1部で実施されている。ところで、前述のパラフィン系炭化水素資化性菌に着目した Société Française des Pétroles BP 一派は、寒冷時に析出するうれいのある石油中のパラフィンを微生物化して除こうと、2、3年前からパイロット・プラントによる基礎研究を行っており、A. Champagnat らの最近の報告を紹介しておく。

一般に菌体が質的に動物蛋白と同様にすぐれていることは古くから知られている事実で、彼らの用いた菌種は明らかにされていないが、菌体成分の一般分析結果を表

表1 菌体成分 (%)

水分	7.03
乾燥物	92.97
全窒素	6.92
蛋白質	43.6
脂質	18.5
炭水化物	21.9
灰分	4.43

と較べるとつぎのようである。

表2 蛋白ならびに必須アミノ酸組成 (乾物, %)

	小麦粉	牛肉	牛乳	Torula 酵母	BP菌体
蛋白質	13.2	59.4	33.1	44.4	43.6
必須アミノ酸					
ロイシン	7.0	8.0	11.0	7.6	7.0
イソロイシン	4.2	6.0	7.8	5.5	3.05
バリン	4.1	5.5	7.05	6.0	8.4
スレオニン	2.7	5.0	4.7	5.4	9.1
メチオニン	1.5	3.2	3.2	0.8	1.2
シスチン	1.9	1.2	1.0	1.0	0.1
リジン	1.9	10.0	8.7	6.8	11.6
アルギニン	4.2	7.7	4.2	4.1	8.0
ヒスチジン	2.2	3.3	2.6	1.7	8.1
フェニルアラニン	5.5	5.0	5.5	3.9	7.9
トリプトファン	0.8	1.4	1.5	1.6	1.17

表3 水溶性ビタミン含量 (mg/kg)

B ₁	B ₂	ニコチン酸	パントテン酸	B ₆	B ₁₂
1~3	2	40~100	7~21	1~4	
5~10	16	75~275	30~60	5	8
0.3~0.7	1~3	1~5	1~4	1~3	
0.5~7	1~1.5	10~30	5~20	3~6	
4~14	3~10	10~250	12~50		
2~20	30~60	200~500	30~200	40~50	
3~16	75	180~200	150~192	23	0.11

成人1日の動物蛋白所要量は約 30g で、妊婦、授乳中の婦人や子供では 70~100g が必要とされ、この程度の要求を十分満たすには世界で年に 300 万トンの動物蛋白が不足する。これを牛肉で補給するとすれば、新たに放牧地を拓くなどのために約40年の才月を必要とし、1方その間に現在30億の人口は倍加する計算となり、要求を充たすことはできない。

ところでこの計算の基礎となった 500 kg の牡牛は最適条件でも1日に 0.5 kg の蛋白を合成するにすぎないのにならして、同じ 500 kg の生菌を窒素、燐酸、カリなどを補った炭化水素培地で通気下に連続培養すると、1日で 2,500 kg の菌体を実験的に得られ、これは1,250 kg の蛋白ビタミン濃縮物に相当し、牛を飼うばあいに較べて2500倍の合成力に相当する。

1方パラフィンからの菌体収量は原料とほぼ同量で45%程度の蛋白を有するので、年産10億トンの原油に7億トンのパラフィンが含有され、その1%を利用したとしても700万トンの菌体、すなわち蛋白として300万トンに相当し、上記の不足量を満たしうることになる。しかもこのプラントの建設には1~2年で足りるという。

む す び

以上炭化水素を利用する微生物について、現在まで数十年間に知られたことのあらましを述べたが、全般を通じて懸念されることは、じゅうらいの炭水化物を炭素源としたばあいに較べて、菌の培養にあまりにも長時間を要していることであって、これが工業化における難点となるように思われる。しかし最近における石油化学のめざましい発達と、微生物学ならびに醗酵技術の進歩によってこれらが解決され、脚光をあびる日も遠くないものと考ええる。