

氏 名	井 口 喬 い ぐち たかし
学 位 の 種 類	工 学 博 士
学 位 記 番 号	論 工 博 第 278 号
学位授与の日付	昭 和 44 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	炭化水素の微生物利用に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 福 井 三 郎 教 授 宍 戸 圭 一 教 授 野 崎 一

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は「炭化水素の微生物利用に関する研究」と題し3部12章より成る。第1部では自然界より多数の炭化水素資化性微生物を分離し、とくに酵母について菌学的性質と炭化水素資化性との関係を調べ、また炭化水素の種類ならびに石油の各沸点留分と被資化性との関係を検討して、炭化水素を炭素源とする酵母菌体の製造に基礎的知見を与えている。第2部は細菌による炭化水素からのL-グルタミン酸の生成に関するもので、有機栄養源に富んだ培地にペニシリンを添加して培養することにより、短時間で著量のL-グルタミン酸が培養液中に蓄積することを発見している。第3部は本研究者の分離した細菌に紫外線照射を行なうことにより得られた人工変異株を用いて、炭化水素よりイノシン、ヒポキサンチンの如き核酸関連物質を好収率で生成せしめることに成功した成績を述べたものである。内容の詳細は次の通りである。

第1部第1章では、重油、軽油、灯油を唯一の炭素源とした合成培地を用いて自然界より多種類の炭化水素資化性微生物を分離し、菌学的に性質を調べた。分離された微生物は細菌、*Nocardia*、酵母に大別されたが、その自然界における分布は石油を含む土壤に限らず、田畑、山林、路地の土壤や河川、下水、果実などに広く分布していることが明らかにされ、通常の微生物と大差のないことが示された。

第2章では、得られた炭化水素資化性酵母約180株の中、形態学的観察、寒天平板培地上の集落の性状および炭化水素化資化の三点で異なる代表的な七株について菌学的諸性質を調べた。これらの菌株はいずれも *Cryptococcaceae* に属する無孢子酵母で、四株は *Candida*、一株は *Torulopsis*、他の二株は *Brettanomyces* に同定された。これはいずれも新菌種であることが確認された。

第3章では上記の七株について直鎖飽和炭化水素の炭素数と資化性の関係が調べられた。*Candida* と *Torulopsis* に属する菌株は C10~C22 のアルカンを資化し、とくに C14, C15, C16 の資化性が高いことが認められた。一方 *Brettanomyces* に属する菌株は C10~C22 のアルカンを同程度に資化することが見出された。

第4章では *Torulopsis* の1株を用いてカフジ原油留分の資化性を検討した結果、沸点250~360°の留分が特異的に資化されやすいことが認められた。この留分を炭素源とし、尿素、コーン・スチープ・リカー、塩類より成る培地を用いた10ℓジャー・フェーマンターによる培養実験では、30時間目に添加炭化水素にたいし約70%の収率の乾燥菌体が得られた。

第2部第1章では、第1部で得られた炭化水素資化性菌のうちL-グルタミン酸生成能の高い1株の菌学的性質を調べて新菌種であることを確認し *Corynebacterium petrophilum* nov. sp. と命名した。

第2章ではペニシリン添加による炭化水素からのL-グルタミン酸生成の増加を示した。すなわち、著者の分離した20数種の細菌は普通の炭化水素培地では0.1~0.5mg/mlのL-グルタミン酸を生成するにすぎないが、著者は炭化水素の種類、天然栄養源、培養条件などの効果を検討し、さらに培養中の適当な時間に25~100単位/mlのペニシリンを添加することにより、三日目には最高13mg/mlのL-グルタミン酸が培地中に蓄積することを発見した。ペニシリンの効果は著者の分離した菌種のうちグラム染色陽性ならびに陰性の細菌、および *Nocardia* でも認められ、広範囲の細菌に応用しうることが明らかにされた。

第3章では炭化水素資化性菌によるグルタミン酸生成がペニシリンにより促進される機構について検討し、ペニシリン効果がこれらの微生物の細胞壁の網目構造を疎にして菌体内で生合成されたグルタミン酸を細胞外へ漏出させ、その結果細胞内グルタミン酸濃度の上昇による「最終生成物阻害」が起こらなくなるためであることを証明した。またペニシリン以外の細菌細胞壁合成阻害剤も有効であることが確認された。

第3部第1章では、炭化水素発酵による核酸関連物質の生成を目的として、*Corynebacterium petrophilum* nov. sp. Sb 4082のアデニン要求株を紫外線照射で取得した。取得方法としては常法である Lederberg らの方法では適当な変異株が得られなかったので、この方法にペニシリン濃縮 recycling 法を併用することによって成功した。

第2章では、上記のアデニン要求株の1株が炭化水素培地においてイノシン様物質を培養上清中に蓄積することを観察し、この物質を単離してイノシンであることを同定した。

第3章では、この菌株によるイノシン生成の発酵条件を検討し、培地中の有機窒素源としてはアデニン10mg%、酵母エキス0.5%、無機窒素源として塩化アンモニウムまたは硫酸アンモニウム1%の添加がよく、炭素源としてC12~C16のノルマン・パラフィンを用いると、イノシン生成に良好な結果が得られることを示した。この場合、培地中に添加するアデニンは、代謝調節機構の観点から、菌の増殖とイノシンの生成にもっとも重要な因子となるものであるから、濃度、他の窒素源との併用、培地の炭素と水素の比率などについて詳細な検討を加えた。

第4章では、上述の菌がグルコースを炭素源とした培地ではイノシンを培養上清中に蓄積しないことを確かめ、その原因を調べた。炭化水素培地に生育した細胞にくらべてグルコース培地に増殖した細胞の膜透過性は著しく低いことが証明され、グルコース培養では菌体内に生成したイノシン酸がイノシンとして菌体外へ漏出せず菌体内の核酸前駆物質濃度が高く保たれ、その結果プリン・ヌクレオチドによる「最終生成物阻害」が起こるものと結論した。

第5章では、イノシン生成アデニン要求株におけるアデニンとプリン代謝調節の関係を調べた。本菌は

生育にアデニンを必要とするが、アデニン添加量25mg/ℓ以上で生育の阻害が起こった。この阻害は通常知られているビタミンB₁、ヒスチジン添加により回復されず、グアニンの添加によりはじめて回復されることが明らかになった。この結果より、本菌における過剰量のアデニンによるイノシニカーゼ生成のレプレッションが起こり、細胞の生育に必要な5'-グアニル酸の供給が不足するためであると推定した。

総括では本研究で得られた成績をまとめ、炭化水素を発酵原料とする工業の意義と将来の展望について論述している。

論文審査の結果の要旨

本論文は炭化水素を発酵原料として工業的に有利な生産物を製造するための基礎的研究を3部12章にまとめたもので、目的に適した菌株の取得とグルタミン酸とイノシンの生産方式の設定よりなる。

第1部では広く自然界より炭化水素資化能を有する微生物約400株を分離し、菌学的性質と自然界における分布を調べた。分離された微生物は細菌、*Nocardia*、酵母に属するものであったが、従来考えられていたように石油を含む土壤に限らず、通常の微生物と同様に田畑、山林、路地などの土壤や河川、下水、果実などの広い範囲に分布することを示した。この結果はわが国において炭化水素資化性菌を探索するための指針を与えたものである。つぎに *Torulopsis* に属する新菌株がとくに炭化水素資化性のすぐれていることを認め、カフジ原油の沸点250~350° 留分を炭素源として菌体生産を行なった結果、使用した炭化水素にたいし最高70%の収率で乾燥菌体を得られた。近來石油留分や炭化水素を炭素源として酵母たん白を製造する計画が内外で注目されているが、本研究の成績はすぐれたものの一つであると評価することができる。

第2部では著者の新しく分離した細菌、*Corynebacterium petrophilum* の一菌株を用いて、有機栄養源に富む培地にペニシリンを添加して培養すれば、これまでに知られていた炭化水素培地におけるL-グルタミン酸生成量の約20倍にあたる13g/ℓの高い蓄積量を得られることを示した。ペニシリン添加の効果は、他の細菌や *Nocardia* でも認められ、またペニシリン以外の細菌細胞壁合成阻害剤も有効であることを観察した。炭水化物からのグルタミン酸生産菌において、必須増殖因子であるビオチンが充分量存在する場合にペニシリンの添加によりグルタミン酸が細胞外へ漏出することが知られているが、著者は性質の異なる炭化水素資化性菌にたいしてもペニシリンが有効であることをはじめて証明したものであり、この事実はその後広く応用されている。

第3部では *Corynebacterium petrophilum* に紫外線照射を行なったのちペニシリン濃縮 recycling 法により、アデニン要求変異株を得て、この変異株を炭化水素培地にアデニンを25mg/ℓ程度添加して培養すれば、培養上清中にイノシンが16g/ℓという高度で蓄積することが見出された。この発見は炭化水素発酵菌による核酸関連物質の大量生成の最初のものである。著者はこの変異株における代謝調節をしらべアデニンの作用について考察を加えている。

これを要するに本論文では、自然界を広範囲に探索してすぐれた性質の炭化水素資化性菌を分離し、さらに人工変異により目的に適した変異株を取得したのち、L-グルタミン酸とイノシンのような調味料原料を炭化水素発酵により好収率で生産する方式を設定して、工業化への資料を与えたものであって、工業

上もまた学術上も貢献するところが少なくない。よって本論文は工学博士の学位論文として価値あるものと認める。