

| | | | | | |
|---------|---------------------|------|----|-----|-------|
| 氏名(本籍) | 寺 | 澤 | 真 | 人 | (茨城県) |
| 学位の種類 | 農 | 学 | 博 | 士 | |
| 学位記番号 | 博 | 甲 | 第 | 131 | 号 |
| 学位授与年月日 | 昭 | 和 | 57 | 年 | 3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第1項該当 | | | | |
| 審査研究科 | 農学研究科 応用生物化学専攻 | | | | |
| 学位論文題目 | 酵母によるオレフィンの代謝に関する研究 | | | | |
| 主査 | 筑波大学教授 | 農学博士 | 高 | 橋 | 穰 二 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 農学博士 | 田 | 淵 | 武 士 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 農学博士 | 清 | 水 | 寛 一 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 農学博士 | 安 | 井 | 恒 男 |

論 文 の 要 旨

微生物によるn-パラフィンの利用に関しては多くの研究がなされているが、 α -オレフィンについてはその代謝およびそれからの発酵生産物に関する知見はきわめて少い。しかし、 α -オレフィンはワックスの熱分解によって容易に得られ、n-パラフィンよりも安価であることが期待されるので、新しい発酵原料として極めて有望であると考えられる。

本研究は、 α -オレフィンの発酵原料としての利用という観点から、その基礎的知見を得るために、 α -オレフィンの代謝およびそれからのクエン酸(クエン酸とイソクエン酸)の生産について検討したものである。

第1部では、*Candida*属酵母による α -オレフィンおよびn-パラフィンからのクエン酸生産についての比較検討を行い、*Candida tropicalis*は α -オレフィンからもn-パラフィンからもほぼ同様にクエン酸を生産するのに対し、n-パラフィンからのクエン酸生産菌としてよく知られた*Candida lipolytica*は α -オレフィンからほとんどクエン酸を生産しないという顕著な相異を明らかにした。

さらに第2部では、上記の相異を解明すべく、両菌株による α -オレフィンの代謝機構の面から検討を加え、*C. lipolytica*が α -オレフィンを充分資化するにもかかわらずクエン酸を生産しないのはその代謝速度が著しく小さいためであることを明らかにした。

第3部では、*C. tropicalis*による α -オレフィンからのクエン酸の生産性を更に向上させるべく生育因子、界面活性剤などの諸因子の影響について検討し、それらの効果について考察を加えた。

以下に本論文の概要を述べる。

1. 1-テトラデセンおよびn-テトラデカンからのクエン酸生産

α -オレフィンとしては1-テトラデセンを、またn-パラフィンとしてn-テトラデカンをそれぞれ単一炭素源として*C. tropicalis*と*C. lipolytica*の培養を行い、それらの資化性ならびにクエン酸の生産性を比較検討した。その結果、*C. tropicalis*は1-テトラデセンもn-テトラデカンもほぼ同様に資化し、クエン酸の生産性にも大差は認められないのに対し、*C. lipolytica*はn-テトラデカンからは著量のクエン酸を生産するが、1-テトラデセンからは、それを資化するにもかかわらずクエン酸を生産しないという顕著な相異を見出した。

従来、 α -オレフィンからの代謝生産物としては、n-パラフィンからの場合とほぼ同一のものが得られるものと考えられていたが、上記の結果は、微生物の種類によってn-パラフィンと α -オレフィンとの間に代謝機構の面においてかなりの相異があることを示すものであり非常に興味ある問題である。

2. 1-テトラデセンの代謝機構とクエン酸生産

*C. lipolytica*と*C. tropicalis*による前述のようなクエン酸生産性の相異を解明するために、両菌株による1-テトラデセンの初期酸化経路についてまず比較した。

*C. lipolytica*による1-テトラデセンの代謝中間体として検出されたものは、2-テトラデカノール、 α -ヒドロキシミリスチン酸およびトリデカン酸であり、*C. tropicalis*の場合にも、2-テトラデカノールとトリデカン酸が検出された。さらに、これらの1-テトラデセンの代謝中間体を基質とした酸素吸収速度と生産物についても検討した結果、*C. lipolytica*と*C. tropicalis*との間には1-テトラデセンの代謝経路に差異は認められず、いずれも1,2-エポキシドを経由する既知の経路と、2-テトラデカノールを経由する新しい経路との存在が認められた。

このことから、クエン酸生産に関する両菌株の相異は代謝経路の相異にもとづくものではないことが知られた。

次に、1-テトラデセンとその代謝中間体を基質とした場合の両菌株でのクエン酸生産量と酸素吸収速度(Q_{O_2})との関連を調べた結果、*C. lipolytica*による1-テトラデセンでの Q_{O_2} は*C. tropicalis*のその1/3にすぎず、またn-テトラデカンでの Q_{O_2} のほぼ半分であることが明らかとなり、*C. lipolytica*が1-テトラデセンからほとんどクエン酸を生産しないのは、1-テトラデセンの代謝速度が著しく小さいことと関係のあることが示唆された。そこで、炭化水素の代謝速度をあげるのに有効であるとされている数種の界面活性剤を添加してクエン酸の生産性を検討したところ、いずれの界面活性剤の存在下でも11~15 g/lのクエン酸の蓄積が確認され、1-テトラデセンの代謝速度の増加がクエン酸生成のために必要な一因子であることが明らかにされた。

3. *C. tropicalis*による1-テトラデセンからのクエン酸生産に影響を及ぼす2, 3の因子

1) チアミン；*C. tropicalis*による1-テトラデセンからのクエン酸生産において、チアミンは生育因子ではないが正クエン酸とイソクエン酸との生成量に大きく影響することを明らかにした。すなわち、チアミン無添加での正クエン酸とイソクエン酸の蓄積量はそれぞれ22 g/lおよび13 g/l

ℓであるのに対し、チアミン存在下ではそれぞれ 17 g/ℓ および 22 g/ℓ となり、イソクエン酸量の増加が認められた。

2) 界面活性剤；用いた界面活性剤のうち Emulgen 430, Sophorolipid および Rhamnolipid などには生育阻害が認められ、クエン酸生産量の大幅な減少が認められた。一方、Tween 80 や Span 80 などのソルビタン系の界面活性剤を添加した場合には、クエン酸の生成は無添加の場合と変わらないが、イソクエン酸の生成が抑えられる傾向が認められた。以上の結果から、界面活性剤の添加によるクエン酸の生成促進効果は、基質の代謝速度がおそい場合には認められるが、この場合のようにその代謝速度が充分速い場合には認められず、かえって生育阻害をまねくことがあることが明らかにされた。

審 査 の 要 旨

従来、*n*-パラフィンの利用について多くの研究がなされ、特に *C. lipolytica* による *n*-パラフィンからのクエン酸の生産についてはすでに工業化されていると言われているが、 α -オレフィンの代謝およびそれからの生産物に関する研究はほとんど見あたらない。

本研究では、ワックスの熱分解により得られる液状の α -オレフィンに着目し、それが *n*-パラフィンよりも安価であることから、発酵原料としての利用について検討を加え有望な発酵原料になり得ることを明らかにした。

すなわち、*Candida tropicalis* が α -オレフィンから著量のクエン酸を生産できることを明らかにすると同時に、従来 *n*-パラフィンからのクエン酸生産菌として用いられている *Candida lipolytica* が、 α -オレフィンからはそれを資化するにもかかわらずクエン酸を生産しないという事実をも見出した。この現象は炭化水素の微生物代謝に関して極めて興味ある問題であるが、著者はこの現象を解明するために、 α -オレフィンの代謝機構の面から検討を加え、クエン酸生産に関する上述の相異が両菌株による α -オレフィンの代謝経路の相異に起因するものではなく、*C. lipolytica* による α -オレフィンの代謝速度が極めておそいことにもとづくものであることを結論づけた。

α -オレフィンからのクエン酸生産に関する上記の一連の検討を通して、発酵原料としての α -オレフィンの有用性を立証し、さらにクエン酸の生成機構に関して基質の代謝速度との関係を明確に示したことは応用微生物分野における大きな貢献と認めることができる。

よって、著者は農学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。