

【21】

氏 名 (本 籍) <sup>かわ</sup>川 <sup>しま</sup>島 <sup>ひで</sup>英 <sup>き</sup>城 (群馬県)

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 博 甲 第 173 号

学 位 授 与 年 月 日 昭和58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 応用生物化学研究科

学 位 論 文 題 目 **Fermentative production of a mannosylerythritol lipid**  
(マンノシルエリスリトール脂質の発酵法による生産)

主 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 今 川 弘

副 査 筑波大学教授 農学博士 安 井 恒 男

副 査 筑波大学教授 農学博士 佐 藤 昭 二

論 文 の 要 旨

自然界から酵母を効率よく分離する集積培地を工夫して田淵らは、熱帯および亜熱帯地域から多くの酵母を分離した。そして、これらの分離酵母の 1 株が、グルコースを炭素源としてイタコン酸を多量に生産することを見だし、菌学的諸性質の検討の結果、本酵母が *Candida* 属に所属することを明らかにした。さらに優良変異株の造成および培養条件の検討を行い、最適条件下で対糖収率 35% のイタコン酸を生産させることができていた。しかし、この酵母 *Candida* sp. S-10 株による液状 *n*-アルカンからのイタコン酸性産性が調べられたが、振盪培養条件下ではこの酵母による液状 *n*-アルカンの資化能は著しく弱いことが判明していた。

本研究は、この液状 *n*-アルカン資化能の弱い酵母株から *n*-アルカン資化能の向上した変異株を造成することを目的として始められた。その結果、新たに考案した集積培養法によって液状 *n*-アルカン資化能の向上した多数の変異株をまず取得した。ついで、これらの変異株で *n*-アルカンの資化能が向上した原因を調べた結果、培地中に *n*-アルカンを強く乳化する界面活性物質が多量に生産されていることを明らかにした。さらに、この界面活性物質を単離精製し、その構造は 4-*O*-(2', 6'-di-*O*-acyl- $\beta$ -D-mannopyranosyl)-D-erythritolであることを確定した。また、このマンノシルエリスリトール脂質を、*n*-アルカン類および各種の油脂類から多量に生産する条件についても調べた。

(1) 液状 *n*-アルカンの資化能が強化された酵母変異株の誘導方法と得られた変異株の諸性質

グルコースからイタコン酸を生産しうる酵母 *Candida* sp. S-10 株は、液状 *n*-アルカン資化能

が振盪培養条件下では、著しく弱かった。そこで、その資化能が強化された変異株の造成を試み、新しく考案した集積培養法によって目的の変異株を得ることができた。変異株の造成の概略は以下の通りであった。イタコン酸生産性酵母 *Candida* sp. S-10 株を常法に準じてニトロソグアニジンで処理し、その洗浄菌体やや多量を、炭素源に約 10% の液状 *n*-アルカンを使用した培地を含む多数の L 字型試験管に移植し、26°C のもと、3～7 日間モノ型振盪機上で培養した。L 字型試験管を静置して、油—水界面に生育した菌体が多量に認められた場合に、この菌体をキャピラリーで取り、新鮮な同培地に移して同様な培養を続けた。同じ操作を 3～5 回繰返した後、エマルジョン化が著しく認められる L 字型試験管の菌体を平板培養して、目的の変異株を 16 菌株得ることができた。これらの変異株は、いずれも中和剤存在下でグルコースからイタコン酸を生産することができたが、*n*-アルカンからは、イタコン酸の代りに、リンゴ酸とコハク酸とを生産した。

得られた変異株が振盪培養条件下で *n*-アルカンを効率良く資化できるようになった理由について、液状 *n*-アルカンでの生育が最も良好な B-7 株を主として用いて検討した。変異株 (B-7) のみでなく、親株 (S-10) も静置培養で *n*-アルカン ( $C_{11}$ - $C_{17}$ ) が気体として供給された場合には良好な生育が認められた。したがって、親株も *n*-アルカンの酸化能のあることが推定された。しかし、振盪培養条件下、*n*-アルカンが液状で与えられた場合には、変異株のみが良好な生育を示した。変異株の細胞表層が変異していることが予測されたが、調べた結果、変異株の細胞表層の液状 *n*-アルカンに対する親和性は、親株の性質と差異が認められぬことが判明した。

しかし、この変異株は *n*-アルカンを炭素源として振盪培養した場合、界面活性作用を持つ代謝産物を培地中に多量に生産、分泌していることが判明した。しかも、単離した代謝産物を微量に培地中に添加すると親株も振盪培養で良好に生育してきた。このことから、変異株で振盪培養条件下に *n*-アルカン資化能が高まっていたのは、*n*-アルカンから界面活性物質が生産され、水不溶性の *n*-アルカンが十分乳化されて菌体との接触機会が増大したことによるものであると推定された。

## (2) *Candida* 属酵母の一変異株による *n*-アルカンおよび油脂類からのマンノシルエリトリール脂質の多量生産

イタコン酸生産性酵母としてさきに分離し、振盪培養条件下で *n*-アルカン資化能が強化された変異株 (B-7) が培地中に多量に生産していた界面活性作用を示す代謝産物を単離、精製し、その化学構造を調べてみた。本物質は、糖脂質であることが容易に推定された。糖脂質の構成糖は常法に従って調べられた。すなわち、糖脂質のケン化、酸加水分解、スミス分解あるいは  $\alpha$ -および  $\beta$ -マンノシダーゼによる加水分解後に得られたそれぞれの生産物を、ペーパークロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィーで調べた。その結果、糖脂質は、D-マンノース、*meso*-エリトリールおよび直鎖脂肪酸からなり、それらのモル比は 1:1:2 であること、さらにその糖部分の構造は、4-*O*- $\beta$ -D-mannopyranosyl-D-erythritol であることが判明した。

また、脂肪酸の結合部位を推定するために、糖脂質を混合有機溶媒中でスミス分解して得た酸化生成物をケン化後にガスクロマトグラフィーで調べた結果、生成物は、1:1:1 のモル比のエチ

レングリコール、グリセロールおよびグリセロアルデヒドからなることが判明した。これらの結果から、本糖脂質の構造は、4-*O*-(2', 6'-di-*O*-acyl- $\beta$ -D-mannopyranosyl)-D-erythritolと固定された。

糖脂質の構成脂肪酸の鎖長はC<sub>7</sub>からC<sub>14</sub>であったが、それらの含有比率は、振盪培養に用いた炭素源に依存して変化することも判明した。

ついで、糖脂質の多量生産のための培養条件について検討した。炭素源に糖を使用した場合には、ほとんどこの糖脂質は生産されず、水不溶性の*n*-アルカン類、各種油脂類を使用した場合にはのみ生産された。炭素源としては大豆油が最も良好であった。窒素源、リン酸塩、酵母エキスおよび培地液量などの影響についてもややくわしく調べた結果、最適培養条件も一応選定された。最適培地組成は0.2%NaNO<sub>3</sub>, 0.01%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02%MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0.05%酵母エキスであった。培地液量は少ない方が良く、好氣的な条件が良好であった。以上の結果から、炭素源に*n*-アルカン類を用いた場合に培地1リットル当り25g、大豆油を用いた場合に培地1リットル当り36gの収量で生産され、添加基質重量当りの収率はそれぞれ55および66%に相当した。

## 審 査 の 要 旨

本研究は、水不溶性の*n*-アルカン、油脂類を原料とした酵母変異株による新規界面活性物質を発酵法で生産する方法の開発に関するものである。

すなわち、水不溶性基質を同化する能力が不良であった酵母株から、新たに考案した技法で、その同化能力の高まった変異株を造成することにまず成功し、その変異株の*n*-アルカン資化能力が高まった理由を明らかにした。さらに、造成された変異株が、水不溶性基質を強力に乳化する界面活性物質を培地中に多量に生産していることを明らかにした。ついで、代謝産物である界面活性剤の化学構造を調べて、4-*O*-(2', 6'-di-*O*-acyl- $\beta$ -D-mannopyranosyl)-D-erythritolと固定した。また、界面活性物質生産条件についても詳しく検討した結果、培養物質1リットル当り36gにも及ぶ収量が得られることを明らかにした。

これらの研究成果は、*n*-アルカン、油脂類を原料として新規界面活性物質の多量発酵生産法を新たに開発したものであり、応用微生物学に新分野を付加したものとして高く評価できる。

これまで、水不溶の油脂を発酵の原料として使用した研究例は皆無に等しかった。東南アジアでは、ゴム栽培に代ってパーム油などの栽培が急速に伸びてきており、洗剤などの工業用原料として輸出されているが、将来、供給過剰になるとも予想される。本研究は、油脂が発酵原料としてすぐれたものであることを明らかにしたばかりでなく、今後も新規の油脂発酵が開発される可能性をも示唆しており、応用微生物学発展のために意義は大きい。

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。