

氏名(本籍)	北 <sup>きた</sup> 本 <sup>もと</sup> 大 <sup>だい</sup> (神奈川県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博乙第860号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	STUDIES ON THE PRODUCTION OF MANNOSYLERYTHRITOL LIPIDS AS BIOSURFACTANTS BY <i>CANDIDA ANTARCTICA</i> ( <i>Candida antarctica</i> によるマンノシルエリスリトールリピッドの生産に関する研究)
主査	筑波大学教授 農学博士 中原 忠 篤
副査	筑波大学教授 理学博士 新井 勇 治
副査	筑波大学教授 農学博士 山口 彰
副査	筑波大学助教授 農学博士 祥 雲 弘 文

## 論 文 の 要 旨

微生物の生産する糖脂質は生体由来の界面活性剤（バイオサーファクタント）である。従来、動物性の界面活性剤、例えばセッケンやレシチン、サポニン等が産業に利用されてきたが、生産の安定性や効率性に問題があり、合成界面活性剤の普及に伴い、その消費は減少し続けてきた。一方、化学合成品の増加と共に環境汚染が表面化し、バイオサーファクタントのような生分解性、安全性に優れた製品の開発が望まれるようになった。バイオサーファクタントの特徴としては、化学合成品に比べ、1) 複雑な構造を持つ、2) 生分解性、安全性が高い、3) 生物活性を示す等の特徴がある。この様な特徴に基づき、次世代の機能性界面活性剤として化学工業や食品・薬品工業等の諸分野への応用が考えられている。

本研究では、微生物の変換プロセスを用いて、天然再生資源である油脂類から糖脂質の一種、マンノシルエリスリトールリピッド (MEL) の生産を試みた。すなわち、MEL生産菌の検索と同定、物理化学的性質、生理機能、生産条件、代謝経路等に関し検討を加えた。

まず、油脂資化性でかつ生育中に油を良好に乳化できる微生物を検索するために、大豆油を唯一の炭素源とする選択培地を用いて200種以上の天然サンプルを対象にスクリーニングを行った。その結果、多くの油脂資化性菌を得たが、4種の菌のみが強い乳化力を示し、バイオサーファクタントを菌体外に生産し得た。その内、3種は細菌であり、その生産物は既知のトレハロースリピッドであった。他の1種 (T-34株) は酵母であり、新規のバイオサーファクタントと考えられる糖脂質

を多量に蓄積した。形態や生理学的性質から、本酵母は *Candida antarctica* (Goto et al.) Kurtzman et al. と同定された。

T-34株の生産するバイオサーファクタントは、極性の低い2種を主成分とする4種のMELの混合物であった。これらのMELを分離精製した後、各種機器分析により構造解析を行った結果、2種の主成分は4-O-(di-O-acetyl-di-O-alkanoyl-β-D-mannopyranosyl)-erythritolと4-O-(mono-O-acetyl-di-O-alkanoyl-β-D-mannopyranosyl)-erythritolと同定された。いずれも新規物質であることが判明した。本MELは臨界ミセル濃度で非常に大きな表面張力低可能(28.4mN/m)および界面張力低下能(2.1mN/m, n-テトラデカン)を有し、また細菌類に対して強い抗菌活性を示した。これらの数値は、ショ糖脂脂肪酸エステル等の糖脂質型合成界面活性剤の性能を上回るものであり、用途開発のために効率的生産法の確立が望まれた。

*Candida antarctica*におけるMEL生産能が一般的かどうか明らかにするため、3株の標準保存株、*Candida antarctica* CBS 5955, 6678, 6621を用いて生産性を調べたところ、全ての菌株が大豆油からT-34株と同一のMELを生産した。MEL生産能は、T-34株が最も高く、本株について培養条件を検討した結果、大豆油以外の種々の油脂類(ベニバナ油、綿実油、パーム油など)からも多量のMELが得られたが、糖類からはほとんど生産しえなかった。本菌は生育にチアミンを要求し、0.1%の酵母エキスの添加により収率が著しく増加した。なお、米糖やコーンステープリカーも糖脂質生産を促進したが、ポリペプトンと肉エキスは生育だけを促進した。最適条件下において、8日間のフラスコ培養で40g/lのMELを蓄積させることができた。また、生産の効率化を目的として静止菌体による生産を試み、炭酸源のみを含む反応液から、6日間で47g/lのMELを得た。さらに、炭素源を間欠的に与える逐次添加法により、21日間で100g/l以上の生産が可能であった。静止菌体の調製には、水溶性(糖類)、非水溶性(油脂類)炭素源のいずれを用いてもよく、最終的なMELの収率には影響しなかった。

T-34株によるMELの菌体外生産は、非水溶性の炭素源を用いた場合に限定され、糖類などの水溶性炭素源の場合はみられなかった。糖類を炭素源とした時は、MELの代わりに少量の有機酸と糖アルコールが培養液中に認められた。また、顕微鏡観察により、菌体内に多量の油滴が形成されていることが確認され、菌体内脂質を分析したところ、トリグリセライドと共にMELが多量に蓄積していることが判明した。この時の総油脂量は油脂酵母における含量に相当しており、MELの蓄積量は乾燥菌体重量の10%以上に達していた。MELの細胞内含量は菌体の生育に連動してトリグリセライド含量と同様に経時的に変化した。以上の実験結果より、MELは単に非水溶性基質により誘導される界面活性物質ではなく、細胞内において構成的に生産される一種のエネルギー貯蔵物質であると推定された。

続いて、MELの生成経路を明らかにするため、直鎖状脂肪酸やアルコールなど、種々の基質を用い、これら基質の脂肪酸構造と生産物の脂肪酸構造を比較検討した。その結果、偶数個の鎖長をもつ基質からは偶数個の鎖長をもつ生産物が、奇数個の鎖長をもつ基質からは奇数個の鎖長をもつ生産物が得られた。生産物の脂肪酸の鎖長はすべて用いた基質の脂肪酸の鎖長より偶数個短いもので

あることが判明した。以上の実験事実から、生産物中の脂肪酸は基質の $\beta$ -酸化中間体であることが推定された。従来、生体内における脂質化合物の脂肪酸は、デノボ合成経路、直接導入経路および鎖長伸長経路の3種の経路のいずれかに由来するとされてきた。しかしながら、MELの場合のように $\beta$ -酸化中間体が直接脂質化合物に導入されることはこれまで報告されていない。このような鎖長短鎖化経路は上記の3経路とは明らかに異なる経路であり、新規の脂肪酸代謝であると考えられた。

## 審 査 の 要 旨

本研究は、バイオサーファクタントの一つである新規のマンノシルエリスリトールリピッド (MEL) の生産について、発酵生産学および発酵生理学的観点から検討したものである。

最初に、油脂資化性でかつ油の乳化力を有する微生物を自然界から探索した結果、酵母の1種、T-34株が新規のバイオサーファクタントと考えられる糖脂質を菌体外に多量蓄積することを見出した。形態学および生理学的性質から、本酵母は*Candida antarctica*と同定された。T-34株の生産する糖脂質を分離・精製した後、化学分析および各種機器分析により構造解析を行い、主成分が新規のMELであることを明らかにした。また、その性質として表面張力低下能および抗菌活性を有することも見出している。次に生産条件を検討し、菌体法により3週間で100g/l以上の生産量を得た。反応時間が長いことに難点があるが、高濃度の糖脂質を蓄積しえたことは注目に値する。

さらに、発酵生理学的にも研究が進められた。糖類を炭素源とした場合、MELの菌体外生産は行われず、菌体内に多量蓄積した。このことからMELは一種のエネルギー貯蔵物質と推定している。続いてMELの生成経路を調べるため、基質の脂肪酸構造と生産物の脂肪酸構造を比較した。その結果、生産物中の脂肪酸は基質脂肪酸の $\beta$ -酸化中間体であることを明らかにし、それに基づき新しい鎖長短鎖化経路を提唱している。

以上の研究は、新規の糖脂質 (MEL) を多量に生産する酵母の探索に成功し、MELの諸性質や生産条件を明らかにすると共に脂肪酸代謝に関し新しい基礎的知見を加えており、基礎・応用の両面から高く評価できる。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。