

氏名(本籍)	ひるた 蛭田	おさむ 修 (栃木県)
学位の種類	博士(農学)	
学位記番号	博乙第1,325号	
学位授与年月日	平成9年10月31日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
審査研究科	農学研究科	
学位論文題目	糸状菌 <i>Mortierella ramanniana</i> による γ -リノレン酸の生産とその利用に関する生物化学工学的研究	
主査	筑波大学教授	工学博士 田中秀夫
副査	筑波大学教授	農学博士 中原忠篤
副査	筑波大学教授	工学博士 向高祐邦
副査	筑波大学教授	農学博士 柿 真

論文の内容の要旨

γ -リノレン酸 (GLA) は必須脂肪酸の一種として知られており、生体内でリノール酸から Δ 6-デサチュラーゼによって生成される。プロスタグランジン合成の前駆物質として種々の生理活性に関与し、健康食品、医薬品としての期待も高い。微生物由来のGLA含有油脂は、植物由来のものに比べて、リノール酸の含有量が少ないため酸化安定性と熱安定性に優れており、また品質面だけでなく供給面からも安定しているという特徴を有していることから、微生物による効率的なGLA生産プロセスの確立が囑望されていた。

本研究は、*Mortierella ramanniana* var. *angulispora* に属する糸状菌を用いて、高濃度のGLAを含有する油脂を効率よく大量に生産するシステムを構築することを目的として実施された。その結果、高生産株を取得し、ペレット形成を指標にGLA生産を大型槽へスケールアップするとともに、細胞壁溶解酵素を用いた効率的な菌体油脂抽出法を構築することによって、大量の高GLA含有油脂製造システムを確立することに成功した。さらには、GLAの高付加価値化を目的として、水-有機溶媒2相酵素反応系を用いた効率的なGLA誘導体の製造システムをも構築することに成功した。

低温生育変異株の育種及びその脂質特性： γ -リノレン酸 (GLA) 高生産菌である *Mortierella ramanniana* var. *angulispora* IFO 8187株について、菌体脂質中のGLA含有量を高めるためには、低温での生育性を指標とした菌株育種が有効であることを明らかにし、高GLA生産変異株 *Mortierella ramanniana* var. *angulispora* MM 15-1株 (以下 MM 15-1株) を得た。MM 15-1株は低温でも親株である IFO 8187株に比べ明らかに高い生育を示した。MM 15-1株の菌体脂質中のGLA含有量は16.5%と IFO 8187株に比べ約2倍に向上していた。また、脂質中では特にリン脂質画分、中でもフォスファチジルエタノールアミンと、フォスファチジルイノシトール中のGLA含有量が高まっていた。600-ℓ発酵槽においても、MM 15-1株はGLA含有量18.3%の脂質を生産し、IFO 8187株に比べて約2倍のGLA含有量及び、収量を示した。

γ -リノレン酸高含有油脂生産株 MM 15-1株の培養及びスケールアップ：MM 15-1株を用いたGLA生産において、初発培地のグルコース濃度を高めることで菌体脂質中のGLA含有量がさらに向上する知見を得た。また、ペレット状の菌体では菌体脂質中のGLA含有量が高いことを明らかにし、ジャーフェーマンターを用いてペレットの形成条件を求めた。さらに、ペレット形成を指標とすることによってGLA生産に関してスムーズに10ℓ生産槽へのスケールアップを行うことに成功した。次に、マックスブレンド翼を発酵槽 (MBF) に応用するこ

とを試み、培養槽としての基本性能を明らかにするとともに、その特徴を生かして GLA 生産への利用を試みた。その結果、MBF は混合性能が高く、培養液の粘性の上昇に対しても k_{La} の低下が少ない特徴を示した。GLA の培養においては、槽内の均一な hydrodynamic stress により、低動力でも均一な小型のペレットを形成し、効率よく高 GLA 含有油脂を生産する可能性が得られた。

キトサナーゼ生産菌の探索と GLA 生産への応用：菌体内に蓄積される GLA 含有油脂を効率よく抽出するため、接合菌の細胞壁を分解する酵素であるキトサナーゼを生産する菌を探索し、*Bacillus pumilus* BN 262株を取得した。*Bacillus pumilus* BN 262株の生産するキトサナーゼ BN 262はエンド型にキトサンを加水分解し、また、効率よく MM 15-1株の細胞壁を溶解した。菌体からの油脂の抽出工程において、キトサナーゼで細胞壁を溶解処理することで、機械的な菌体破碎工程を省略することが可能であることを示した。機械的破碎に比べキトサナーゼによる抽出法はスケールアップに有利と言える。

大豆リポキシゲナーゼによる水-ヘキサン 2 相反応系での9-ヒドロペルオキシ- γ -リノレン酸の生産：GLA のヒドロペルオキシド化反応を行い、13-ヒドロペルオキシ- γ -リノレン酸 (13 GOOH) と9-ヒドロペルオキシ- γ -リノレン酸 (9 GOOH) の生成を認めた。pH 6.5では、陰イオン性界面活性剤を添加したとき選択的に9 GOOHのみを高効率で蓄積する事を明らかにし、LG 1 及び LG 2 の反応特異性からこの理由を考察した。特に、9 GOOH はプロスタグランジン合成のスタート物質としての利用が期待できる。

審査の結果の要旨

本研究は、必須脂肪酸（ビタミンF）として、また、プロスタグランジンの合成の前駆物質として知られている γ -リノレン酸（GLA）の高含有油脂を大量に効率よく生産し、回収する製造システムを開発し、実生産の基礎を確立することを目的とした研究である。その結果、低温生育を指標として高 GLA 生産変異株 *M. ramaniana* MM 15-1株を取得し、また、高 GLA 含有油脂を生産するためには菌糸がペレットを形成することが必須であることを明らかにし、これを指標として、研究室規模の生産を実生産規模の10kl生産槽へのスケールアップに成功した。さらに菌体からの GLA の抽出法としてキトサナーゼを利用する大量で効率的抽出法を確立することにも成功した。以上の結果より、本研究の目的は達成された。その上、GLA の高付加価値化を目的とした、水-ヘキサン 2 相酵素反応系を用い、高効率で GLA 誘導体の製造が可能なシステムの構築にも成功した。本研究は GLA の大量生産および抽出回収に関して初めてなされたものであり、研究において用いられた考え方および手法において随所に独創性が認められる。また、本研究が研究室規模の基礎研究から実生産規模の生産までの一連の研究であり、その成功例として、応用微生物研究者や生物化学工学研究者に多くの示唆を与える広がりのある研究として高く評価できる。

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。