

学位論文題名

# L-MALIC ACID PRODUCTION BY FUNGI

（真菌類によるリンゴ酸生産に関する研究）

## 学位論文内容の要旨

リンゴ酸は食品、飲料の酸味剤、化学品合成の中間体、薬剤等として利用されている重要な有機酸の一つである。リンゴ酸の製造には、化学合成、酵素法、及び直接発酵法がある。直接発酵法は、(1)安価で再生産可能な資源を原料とする。(2)天然物に対する要望が強い中で、発酵製品が好まれている。(3)天然型（L-型）が医薬あるいは高分子化学の分野で要望されている。などの今日的要望に応えることができる唯一のものである。しかしながら、現在の生産コストは、その他の方法よりも高く、より安価な生産方法が求められている。特に再生産可能な資源に恵まれている東南アジアにおける生産を考慮すると直接発酵法の開発はきわめて重要なものである。本研究では、東南アジアでの生産をも考慮にいて、高温域での発酵生産を目指して37℃以上で生育可能な真菌類を対象として検索を行った。高温域での発酵は温度調節のための冷却水の減少、雑菌汚染の危険性も減少できる可能性も高くなる。また更に、これまで東南アジアにおいて古くから食品の製造に使用されてきた安全性が証明されている微生物を対象として検索を行い、*Monascus araneosus* AHU9087がこれらの要件に叶う微生物として選択された。この菌をもとにして培養条件及び生産能力の改良を行い、効率のよい生産方法を確立し、本方法によるリンゴ酸直接発酵の実生産の可能性を開いたものである。また更に優良生産菌の生産機構を明らかにしたものである。

本研究の結果を要約すると、

1. 新たに東南アジア各地で単離した高温真菌類94種と純粋分離保存株25種について有機酸の生産能及びリンゴ酸量を検討した。有機酸としては最高42 g/lであったが、主なる有機酸はクエン酸で、リンゴ酸は最高5 g/lであった。一方、東南アジア各地及び北海道大学応用菌学講座（AHU）で保存してきたモナスクス属の糸状菌21種及び新たに分離した未同定のモナスクス属の糸状菌19種について同様に検討し、*Monascus araneosus* AHU9087が最も好適な菌株で、リンゴ酸を主なる有機酸として生産し、最高28.9 g/lのリンゴ酸を37

℃, 7日間の振とう培養で生産するものとして選別した。

2. *M. araneosus* AHU9087の生産条件の最適化を行い、種培地として、酵母エキス 3 g / 1, 麦芽エキス 3 g / 1, ポリペプトン 5 g / 1, グルコース 10 g / 1 にガラスビーズを入れたものを用いて 3 日間培養し、これを 3 % の割合でグルコース (100 g / 1), 硝酸アンモニウム (1 g / 1), 磷酸一カリウム (1 g / 1), 硫酸マグネシウム (0.5 g / 1), 炭酸カルシウム (30 g / 1), ポリペプトン (0.25 g / 1) を含む発酵培地に加え、37℃, 5 日間の振とう培養でリンゴ酸を 30 g / 1 生産できることを示した。
3. *M. araneosus* AHU9087を親株としてアルビノ株 (白色変異株) の誘導を紫外線及びニトロソグアニジンを変異原として行った。生残率 3 % の処理条件で効率よく変異株が出現した。一度の変異処理では変異が固定されなかったため、更に二度目の変異処理を行い安定したアルビノでしかもリンゴ酸を高生産する株 ST92 が得られた。これは、赤色色素を全く生産せず、しかも親株より優れたリンゴ酸生産を示した。2. に示した培地に増殖中の菌のペレット化を防ぐために寒天 1 g / 1 を添加し、更に生産される酸を中和すると同時に炭素源を炭酸ガスとして供給するために炭酸カルシウムの濃度を 150 g / 1 とすることによって 37℃, 7 日間の振とう培養で 49 g / 1 のリンゴ酸を生産した。
4. リンゴ酸の生産を向上させるために ST92 株を親株としてグルコース及びコハク酸の類似体 (アナログ) であるデオキシグルコースとジメチルコハク酸の耐性及び感受性株をそれぞれ造成した。デオキシグルコース耐性株はクエン酸生産菌において生産速度の増大効果があることが報告されているが、リンゴ酸生産においてもここで得られた耐性株の一つの DGRB-4 株は親株よりもリンゴ酸生産速度が速まっており、培養 5 日目に親株よりも優れた 53 g / 1 のリンゴ酸生産を示した。一方、酵母においてリンゴ酸生産の増強に効果が示されているように、ジメチルコハク酸感受性株 DMS-1 は培養日数は短縮されなかったが、60 g / 1 のリンゴ酸生産を示した。これらはいずれも 3. に示した条件で培養した結果である。
5. これまでに得られたリンゴ酸生産優良株について、リンゴ酸生合成に関与する酵素活性を検討した。親株 (AHU9087) にはコハク酸脱水素酵素活性の存在が検出されたが、リンゴ酸高生産株ではコハク酸脱水素酵素活性がほとんど検出されなかった。これはリンゴ酸が TCA サイクルでコハク酸から生産されていないことを示しており、またこれらの株はコハク酸をほとんど副生しないこともよく一致する。リンゴ酸脱水素酵素活性についてみると、リンゴ酸の生産時期にはリンゴ酸を合成する反応 (オギザロ酢酸からリンゴ酸に至る酵素反応) は約 50 % 増加するが、リンゴ酸を消費する反応 (リンゴ酸からフマル酸に至る酵素反応)

が約90%減少することを示し、これらがリンゴ酸高生産に至る機構の一つであることを証明した。

以上のように、*Monascus araneosus* を用いる新しいリンゴ酸の直接発酵法を開発し、その生産レベルを60 g / l にまで高めて実生産の可能を示した。またその蓄積機構を関連する酵素活性の挙動から解明した。

## 学位論文審査の要旨

主査	教授	富田	房男
副査	教授	匂坂	勝之助
副査	教授	飯塚	敏彦
副査	助教授	横田	篤

本論文は英文136頁、図20、表21、引用文献101、総論、5章、総括からなり、ほかに参考論文12編が付されている。

リンゴ酸は食品、飲料の酸味剤、化学品合成の中間体、薬剤等として利用されている重要な有機酸の一つである。リンゴ酸の製造には、化学合成法、酵素法、及び直接発酵法がある。直接発酵法は、(1)安価で再生産可能な資源を原料とする。(2)天然物に対する要望が強い中で、発酵製品が好まれている。(3)天然型(L-型)が医薬あるいは高分子化学の分野で要望されている。などの今日的要望に応えることができる唯一のものである。しかしながら、現在の生産コストは、その他の方法よりも高く、より安価な生産方法が求められている。特に再生産可能な資源に恵まれている東南アジアにおける生産を考慮すると直接発酵法の開発はきわめて重要なものである。本研究では、東南アジアでの生産をも考慮にいれて、高温域での発酵生産を目指して37℃以上で生育可能な真菌類を対象として検索を行った。また更に、これまで安全性が証明されている微生物を対象として検索を行い、*Monascus araneosus* AHU9087がこれらの要件に叶う微生物として選択された。この菌をもとにして培養条件及び生産能力の改良を行い、効率のよい生産方法を確立すると共に、優良生産菌の生産機構を明らかにしたものである。

第二章、総論では、リンゴ酸の利用状況、生産状況、生産方法の現状、真菌類によるリンゴ酸生産の研究、リンゴ酸生合成経路、モナスクス属の菌の特徴についてそれらの研究史が述べられ

ている。

第三章では、新たに東南アジア各地で単離した高温真菌類及び東南アジア各地及び北海道大学応用菌学講座 (AHU) で保存してきたモナスクス属の糸状菌及び新たに分離した未同定のモナスクス属の糸状菌についてそれらの有機酸及びリンゴ酸生産能をそれぞれ47°Cと37°Cにおいて試験した。その結果高温真菌の内最も生産性のよかつたものは4.5 g / lのリンゴ酸を生産したのに対して *Monascus* 属では20 g / l以上のリンゴ酸を生産した。中でも *Monascus araneosus* AHU9087が最も好適な菌株で、最高28.9 g / lのリンゴ酸を37°C、7日間の振とう培養で生産できるものとして選別された。

第四章では *M. araneosus* AHU9087の生産条件の最適化を行い、グルコース (100 g / l)、硝酸アンモニウム (1 g / l)、磷酸-カリウム (1 g / l)、硫酸マグネシウム (0.5 g / l)、炭酸カルシウム (30 g / l)、ポリペプトン (0.25 g / l) を含む培地で37°C、5日間の振とう培養でリンゴ酸を30 g / l生産できることを示した。

第五章では、*M. araneosus* AHU9087を親株としてアルビノ株 (白色変異株) の誘導を紫外線及びニトロソグアニジンを変異原として行った。その一株 ST92は、赤色色素を全く生産せず、しかも親株よりも優れたリンゴ酸生産を示した。第三章に示した培地に増殖中の菌のペレット化を防ぐために寒天 1 g / l を添加し、更に生産される酸を中和すると同時に炭素源を炭酸ガスとして供給するために炭酸カルシウムの濃度を150 g / l とすることで最高50 g / l のリンゴ酸を生産した。

第六章では、更にリンゴ酸の生産を向上させるためにグルコース及びコハク酸の類似体 (アナログ) であるデオキシグルコースとジメチルコハク酸の耐性及び感受性株をそれぞれ造成した。デオキシグルコース耐性の DGRB-4 株及びジメチルコハク酸感受性株 DMS-1 はそれぞれ53 g / l、60 g / l のリンゴ酸生産を示した。

第七章では、これまでに得られたリンゴ酸生産優良株について、リンゴ酸生合成に関与する酵素活性を検討し、リンゴ酸高生産株ではコハク酸脱水素酵素活性がほとんど検出されないこと、またリンゴ酸脱水素酵素活性についてはリンゴ酸の生産時期にはリンゴ酸を合成する反応 (オキサロ酢酸からリンゴ酸に至る酵素反応) は約50%増加するが、リンゴ酸を消費する反応 (リンゴ酸からフマル酸に至る酵素反応) が約90%減少することを示し、これらがリンゴ酸高生産に至る機構の一つであることを証明した。

以上のように、*Monascus araneosus* を用いる新しいリンゴ酸の直接発酵法を開発し、その生産レベルを60 g / l にまで高めて実生産の可能を示した。またその蓄積機構の解明に関しても

基礎的な貢献を果たした。

よって、審査員一同は別に行った学力確認試験の結果と併せて、本論文の提出者サイサモン・ルムヨングは博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。