

学位論文題名

ロドコッカス属菌の変異株による
不飽和脂肪酸の生産に関する研究

学位論文内容の要旨

アルカン資化性菌は n -パラフィン等の直鎖飽和炭化水素を資化する微生物の総称であり、また、アミノ酸、核酸、ビタミン、界面活性物質、有機酸、香料、抗生物質、長鎖ジカルボン酸等、数多くの有用物質を生産することも知られている。一方、不飽和脂肪酸およびその誘導体は、香料、薬剤、塗料、界面活性剤、化粧品等として広く利用されている。しかし、天然の動植物油を原料として製造されているため鎖長あるいは不飽和度および二重結合の位置に偏りがあり、たとえばヒト皮脂に特異的に含まれ加齢とともに減少が報告されている皮膚科学的に極めて興味深い *cis*-6-ヘキサデセン酸は一般動植物油にはあまり含まれていないため入手は困難である。

本研究の目的は、微生物の持つアルカン代謝機能を利用して有用物質を生産することであり、特に、アルカン資化性菌の変異株の有する不飽和化反応を利用して、現在入手が困難なヒト皮脂の主要構成脂肪酸であり化粧品原料として応用が期待される *cis*-6-ヘキサデセン酸エステルを生産することである。

1. アルカン資化性菌の取得および育種

アルカン資化性菌として、 n -ヘキサデカン(n -C₁₆)を炭素源として利用できる菌株をスクリーニングした結果、約 6,000 株を得た。それらの菌株の中で、1-クロロヘキサデカン(CL-C₁₆)の資化性および香料原料となる末端酸化物である ω -クロロ脂肪酸の生産性から KSM-B-3 株を選択した。形態学的、生理学的、生化学的な解析(菌体脂肪酸組成、細胞壁組成、メナキノタイプ、リボソームDNA配列)からロドコッカス(*Rhodococcus*)属と判定した。 ω -クロロ脂肪酸の生産性向上を目的としてこの菌株から得られた CL-C₁₆ 非資化性変異株(KSM-B-3M)は、意外にも、休止菌体反応によって基質である CL-C₁₆ を末端酸化物ではない未知の生産物に変換した(10.0 g/L/3日)。この生産物は、有機分析(¹H-NMR、IR、GC-MS)による構造決定の結果、主として二重結合(*cis*体)を7位に持つ1-クロロヘキサデセン(1-Cl-*cis*-7-hexadecene)であることがわかった。この変異株は n -C₁₆も不飽和化し、同様に主に7位に二重結合を導入した。その他、パルミチン酸エステル等の長鎖アルキル化合物を不飽和化することがわかった。

2. 不飽和化合物生産条件の最適化

化粧品原料であるパルミチン酸イソプロピル(IPH)から *cis*-6-ヘキサデセン酸イソプロピル(IP- Δ 6-H)を生産する反応に着目し検討を行った。生産性を向上させるため、KSM-B-3M 株を紫

外線処理し、エステラーゼ欠損を指標に高生産性変異株を取得した。IP- Δ 6-H 生産性が親株の約1.3倍高いKSM-MT66株を取得した。この二次変異株を用いて、菌体反応条件を最適化した。菌体反応には、空気(酸素)が必要であり、反応温度は26°C、pHは7、添加菌体濃度は5%、IPHは20%がそれぞれ至適であった。さらに、1.0%グルタミン酸ナトリウム(Glu)、2 mM チアミン、2 mM MgSO₄の添加により生産性が飛躍的に向上した。最適化された反応条件でKSM-MT66株はIP- Δ 6-Hを3日間で50 g/L以上生産した(平均生産速度:0.8 g/L/hr、反応収率:26.5%)。

この最適化された条件で、KSM-MT66株のアルカン、アルキルクロライド、脂肪酸エステルに対する基質特異性を調べた。飽和脂肪酸(C₁₄-C₁₇)のエチルエステル、パルミチン酸プロピル、およびイソブチルエステル、 μ -アルカン(C₁₃-C₁₉)やアルキルクロライド(C₁₆, C₁₈)のアルキル鎖を不飽和化し、対応する不飽和化合物を生産した。反応生成物の解析(IR、¹H-NMR、GC-MS)を行った結果、アルカンやアルキルクロライドの不飽和化位置は、主として末端メチル基から9位であり、パルミチン酸のエチル、プロピル、イソプロピル、イソブチルエステルでは、主としてカルボニルから6位であった。

3. 不飽和脂肪酸製造システムとしてのバイオリアクターの開発

IP- Δ 6-Hを効率的に連続生産させる目的で、バイオリアクターでの生産研究を行った。本反応系は、気体(空気) - 液体(水) - 液体(油) - 固体(菌体)からなる多相系であり、多相系因子相互間の物質移動が重要であると考えられたため、リアクターは遊離菌体を用いる膜分離型とした。生産性の確保と生産物を含む油相の疎水性膜からの回収を容易にするため、O/W型エマルジョンで反応を行い、W/O型エマルジョンで油相を排出する転相膜透過型反応方式を開発した。本方式は、回分反応をくり返し行い高生産性を確保すると共に、回分反応終了後、水層を静置分離により抜き出し、油相分率を上げることによってエマルジョンをO/W型からW/O型に転相させて、生産物(IP- Δ 6-H)を含む油相を疎水性膜により分離・排出する方式である。反応液の転相挙動については、油相分率に応じてO/W→W/OおよびW/O→O/Wの変化が起こることを電導度測定および顕微鏡観察によって確認した。W/O型エマルジョンの疎水性膜からの油相の透過流速はO/W型の数十倍であった。リアクターによる連続反応の液組成を検討した結果、チアミン、Mg²⁺に菌体寿命を延長する効果が認められた。リアクターによる連続反応時のIP- Δ 6-H生産性は、Glu添加量に大きく影響されることがわかり、Gluの添加パターンを最適化した結果、平均生産速度約19 g/L/日で、300時間の反応を行うことができた。さらに、リアクターにおける反応系のパラメーターの自動測定を行うオンラインモニタリングシステム、および、反応油相からのIP- Δ 6-Hの精製方法(純度97%)を確立し、不飽和脂肪酸製造プロセスとしてのバイオリアクターによるトータルシステムを完成させた。

今回の研究による、ロドコッカス属菌の変異株によるクロロアルカン、飽和脂肪酸エステルからの不飽和化合物への変換反応は新発見であり、これら細菌の代謝メカニズムの解明に大きく貢献するものと考えられる。また、不飽和脂肪酸エステルの生産量は工業生産レベルに達しているものと考えられ、たとえば化粧品等の製品開発に大きく貢献するものと考えられる。さらに、新たに開発したエマルジョンの転相という界面化学的手法を用いた水・油系リアクターシステムは他の二相系反応システム(たとえばパーゼ反応)にも貢献するものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男
副 査 教 授 松 井 博 和
副 査 教 授 横 田 篤

学 位 論 文 題 名

ロドコッカス属菌の変異株による 不飽和脂肪酸の生産に関する研究

本論文は、4章からなり、図58、表8、文献209を含む総頁数168の日本語論文である。別に参考論文21編が付されている。

アルカン資化性菌は n -パラフィン等の直鎖飽和炭化水素を資化する微生物の総称であり、ジカルボン酸等、数多くの有用物質を生産することが知られている。一方、不飽和脂肪酸およびその誘導体は、塗料、界面活性剤、化粧品等として広く利用されている。しかし、天然の動植物油から製造されているため、鎖長や不飽和度、二重結合の位置に偏りがあり、たとえばヒト皮脂に特異的に含まれる *cis*-6-ヘキサデセン酸の入手は困難である。

本研究の目的は、微生物の持つアルカン代謝機能を利用して有用物質を生産することであり、特にアルカン資化性菌の変異株の有する不飽和化反応を利用して化粧品原料として応用が期待される *cis*-6-ヘキサデセン酸エステルを生産することである。

1. アルカン資化性菌の取得および育種

アルカン資化性菌として、 n -ヘキサデカン (n -C₁₆) を資化できる菌株をスクリーニングし、約 6,000 株を得た。それらの菌株の中で、1-クロロヘキサデカン (CL-C₁₆) の資化性および ω -クロロ脂肪酸の生産性から *Rhodococcus* sp. KSM-B-3 株を選択した。この菌株から得られた変異株 (KSM-B-3M) は、休止菌体反応によって CL-C₁₆ を *cis* 体の二重結合を主として7位に持つ 1-Cl-*cis*-7-hexadecene に変換した。この変異株は n -C₁₆ も同様に不飽和化した。その他、パルミチン酸エステル等も不飽和化することがわかった。

2. 不飽和化合物生産条件の最適化

化粧品原料であるパルミチン酸イソプロピル(IPH)から *cis*-6-ヘキサデセン酸イソプロピル (IP- Δ 6-H) を生産する反応に着目し検討を行った。KSM-B-3M 株を紫外線処理し、IP- Δ 6-H 生産性の高い (50 g/L/3 日以上) KSM-MT66 株を取得した。菌体反応条件を最適化した。菌体

反応には、空気（酸素）が必要であり、反応温度は 26℃、pH は 7、添加菌体濃度は 5%、IPH は 20% がそれぞれ至適であった。さらに、グルタミン酸ナトリウム(Glu)、チアミン、MgSO₄ の添加により生産性が飛躍的に向上した。

KSM-MT66 株の基質特異性を調べた結果、飽和脂肪酸(C₁₄-C₁₇)のエチルエステル、パルミチン酸のエチル、プロピル、イソプロピル、イソブチルエステルでは不飽和化位置が主としてカルボニルから 6 位であり、*n*-アルカン(C₁₃-C₁₉)やアルキルクロライド(C₁₆, C₁₈)では不飽和化位置が主として末端メチル基から 9 位であった。

3. 不飽和脂肪酸製造システムとしてのバイオリアクターの開発

IP-Δ6-H を効率的に連続生産させる目的で、バイオリアクターでの生産研究を行った。本反応系は多相系（気体（空気）－液体（水）－液体（油）－固体（菌体））であり、因子相互間の物質移動が重要であるため遊離菌体を用いる膜分離型リアクターとした。生産性の確保と生産物を含む油相の回収を容易にするため、新たに転相膜透過型反応方式を開発した。本方式は、O/W 型エマルジョンで回分反応をくり返し行い高生産性を確保し、回分反応終了後、水層排出・油相分率上昇により反応液を W/O 型エマルジョンに転相し、生産物を含む油相を疎水性膜により分離・排出する方式である。反応液が油相分率に応じて転相が起こることを電導度測定等によって確認した。菌体寿命延長には、チアミン、Mg²⁺に効果があった。反応時の Glu 添加量を最適化した結果、300 時間の連続反応が可能となり、平均生産速度約 19 g/L/日を達成した。反応系のパラメーターの自動測定を行うシステム、反応油相からの IP-Δ6-H の精製方法（純度 97%）を確立し、不飽和脂肪酸製造プロセスとしてのバイオリアクターシステムを完成させた。

今回の申請者の研究による、ロドコッカス属菌の変異株によるクロロアルカン、飽和脂肪酸エステルからの不飽和化合物への変換反応は新発見であり、これら細菌の代謝メカニズムの解明に大きく貢献するものと考えられる。また、不飽和脂肪酸エステルの生産量は工業生産レベルに達しているものと考えられ、たとえば化粧品等の製品開発に大きく貢献するものと考えられる。さらに、新たに開発したエマルジョンの転相という界面化学的手法を用いた水・油系リアクターシステムは他の二相系反応システム（たとえばリパーゼ反応）にも貢献するものと考えられる。

よって審査員一同は、小池謙造が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。