

論文の要約

報告番号	甲 乙	第 号	氏名	村川 直美
学位論文題目	フザリウム属糸状菌を活用した水酸化脂肪酸生産に関する研究			
<p>現在、石炭や石油などの化石燃料に代わる持続可能なエネルギー資源としてバイオディーゼルなどのバイオ燃料が注目されている。しかし、バイオディーゼルは製造過程において大量の廃グリセロールを排出するため、これらの有効な活用法が希求されている。そこで本研究では、廃グリセロールを炭素源とした微生物の発酵生産を目指した。</p> <p>徳島県内からサンプリングした土壌や汚水の試料から、廃グリセロール資化性に優れた糸状菌 D2 株を単離した。ITS-5.8S rDNA 配列による簡易同定の結果、D2 株は <i>Fusarium solani</i> であると推測された。D2 株は廃グリセロールを炭素源とした培地（CG 培地）で培養した場合、10-ヒドロキシ-<i>cis</i>-12-オクタデセン酸（HYA）、10-ヒドロキシオクタデカン酸（HYB）、10-オキソオクタデカン酸（KetoB）を蓄積した。D2 株の HYB 生産量は培地中の廃グリセロール濃度に依存し、8%の廃グリセロールを含む CG 培地で培養すると 2.20 g/L（総脂肪酸の 40%）に達した。廃グリセロールには総脂肪酸の内、オレイン酸（C18:1ω9）が 53.8%、リノール酸（C18:2ω6）が 29.4%の割合で含まれているが、CG 培地で培養した D2 株の菌体内脂質からは C18:1ω9 が 3.2%しか検出されなかった。このことから、D2 株は C18:1ω9 を効率よく HYB に変換していると考えられた。さらに対照株として用いた <i>F. solani</i> fsp. <i>pisi</i> NBRC 9975 株も D2 株と同様に C18:1ω9 を HYB に変換したことから、<i>F. solani</i> の多くは C18:1ω9 への水和反応により HYB を生成することが示唆された。また、D2 株を 6%の廃グリセロールを含む CG 培地で 4 日間振とう後、3 日間静置培養することで微好気条件における水酸化脂肪酸生産への影響を評価した。その結果、HYB の収量は 7 日間振とう条件の 2.2 倍に相当する 1.19 g/L に達し、総脂肪酸の 53% を占めた。</p> <p>D2 株の水酸化脂肪酸が廃グリセロールに含まれる脂質の代謝産物であると推察し、トリアシルグリセロール、脂肪酸メチルエステル、遊離脂肪酸をそれぞれ外部添加した結果、いずれの構造脂質を用いた場合も同程度の水酸化脂肪酸生産性を確認したが、CG 培地による水酸化脂肪酸生産性に及ばなかった。このことから、CG 培地の構成要素である廃グリセロールに水酸化脂肪酸生産を向上させる因子が含まれていることが推測された。</p> <p>次に、HYB や HYA 生産性バクテリアの知見を基に、水酸化脂肪酸生産に関与するオレイン酸水和酵素を推定し、大腸菌による異種発現を行った。さらに、精製した推定オレイン酸水和酵素（D20hy2）について至適 pH と至適温度を検討した結果、pH 5.0、45°C で最も高い活性を示した。これらの至適条件は既報のバクテリア由来水和酵素に比べて至適 pH は低く、至適温度は高いことが分かった。また、D20hy2 における基質特異性について検討したところ、長鎖脂肪酸である C18:1ω9 に対する基質特異性が非常に高いだけでなく、パルミトレイン酸（C16:1ω7）やリシノール酸 [12(OH) ω9-18:1] にも比較的高い水和活性を示した。以上のことから D20hy2 はバクテリア由来の酵素とは異なる性質を持つことが示唆された。</p> <p>本研究において、D2株が水酸化脂肪酸であるHYBとHYA、オキソ脂肪酸であるKetoBを生産し、脂肪酸水和酵素D20hy2の諸性質を解明した。これらの成果は糸状菌では新たな知見である。</p>				