



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Enhanced Production of Kojic Acid by *Aspergillus oryzae*

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 二村, 孝文 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2615">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2615</a>

氏名(本国籍)	二村孝文(福岡県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第274号
学位授与年月日	平成14年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学位論文題目	Enhanced Production of Kojic Acid by <i>Aspergillus oryzae</i> ( <i>Aspergillus oryzae</i> による麴酸の高収率生産)
審査委員会	主査 静岡大学教授 岡部満康 副査 静岡大学教授 朴龍洙 副査 岐阜大学教授 河合啓一 副査 信州大学教授 柴井博四郎

## 論文の内容の要旨

環境にやさしい化学工業(グリーンケミストリー)の構築に向けた研究を進めているが、その一環として、麴酸の、微生物による効率的な生産プロセスの開発に関する研究をおこなった。

工業的に目的物を高収率で得るには、醗酵産物の場合、生産菌の生産能力の高いこと、生産能力を発揮し得る培地培養法であること、しかも安価で環境への負荷も低い技術であることが求められる。本論文ではこれらの要件を満たした生産プロセスの確立に関する研究を論じた。

- (1) コウジ酸高収率菌株の育種
- (2) 培地培養条件の検討
- (3) エアリフト型培養槽での高収率生産

(1) 96穴マイクロプレート上で増殖させた NTG 変異処理菌株を 96 ウェルマイクロプレートを利用した新しいスクリーニング法により、麴酸生産能の優れた突然変異株 *Aspergillus oryzae* MK107-39 を分離した。本菌はグルコース・ポリペプトン培地において 28 g/l の麴酸を生産した。このときの対菌体当たりおよび対グルコース当たりの麴酸収率は、親株と比較して 9.8 ならびに 6.0 倍それぞれ高い値を示した。本菌の糖類と有機酸に対する資化性が親株と異なっており、炭水化物に対する代謝経路に何らかの変異を受けているものと推定した。

(2) フラスコ振盪ならびに 3 l ジャーファーマンターを用いて培地組成、溶存酸素濃度、pH などの最適条件の検討をおこない、glucose/wheatgerm 培地(GM1medium)にグルコース流下で 110 g/l の麴酸が生産を得た。600 l のパイロットスケールの通気攪拌槽へのスケールアップを試みたところ、ジャーファーマンターでの結果が再現され、100g/l を越える麴酸が生産された。本実験における対グルコース当たりの

麴酸収率  $Y_{P/S}$  は 0.43 (g/g) に達した。

(3) 通気攪拌式の培養槽において高い生産性が得られた glucose/wheatgerm 培地(GM1medium)を省エネルギー型のアリフト型培養槽に適用した結果、得られた生産性は極めて低いものであった。その原因は GM 培地を用いると培養液中の溶存酸素が確保出来ないことによる。そこで各種の原材料を試験し、菌体量は低く且つ高い生産性を与える培地として、硝酸で加水分解したコーンスターチを炭素源とし、少量の CSL(コンステイプリカー)を添加した培地(SM1)を選別した。SM1 培地を用いると、アリフト型培養槽で菌体量は 5g/l 以下に抑えられ、40g/l のコウジ酸生成が得られた。これは、グルコース流下のない 3 l ジャーファーマンターで GM 培地が生産した量と同レベルであった。窒素源の制限が菌体量の抑制という効果をもたらし、炭素源を効率よくコウジ酸生成に向かわせたものと考えられる。アリフト型培養槽の最適な通気条件は工業レベルの 2.0 VVM であった。アリフト型培養槽に用いた SM1 培地のコストはジャーファーマンターに用いた GM 培地のコストの 40% に減じた。更に SM1 培地を用いたアリフト型培養のエネルギーコストは、GM 培地を用いたジャーファーマンター培養の 1/4 であった。

多大なエネルギーを必要としないアリフト型培養槽へ適用させる上で、濃厚な培地からシンプルな無駄のない培地への変更できた。このことは培養後のダウンストリーム(回収精製)を容易にするばかりでなく、環境への負荷も低減させる効果を持つ。国際的な競争に立ち向かうには、この様に製造トータルのコストをみて技術を開発することが大事である。本麴酸生産プロセスの開発で示した事例は、今後海外にも広く通用する技術の拡大に繋がるものと思われる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

石油を使用しない、環境にやさしい化学工業(グリーンケミストリー)の構築に向けた研究を進めているが、その一環として極めて反応性に富み、プラスチックあるいは生分解性プラスチックの原料になりうる麴酸の微生物による効率的な生産プロセスの開発に関する研究をおこなった。工業的に目的物を高収率で得るには、醗酵産物の場合、生産菌の生産能力の高いこと、生産能力を発揮し得る培地培養法であること、しかも安価で環境への負荷も低い技術であることが求められる。本論文ではこれらの要件を満たした生産プロセスの確立に関する研究を論じた。

96 穴マイクロプレート上で増殖させた NTG 変異処理菌株を 96 ウェルマイクロプレートを利用した新しいスクリーニング法により、麴酸生産能の優れた突然変異株 MK107-39 を分離した。

本菌はグルコース・ポリペプトン培地において親株である *Aspergillus oryzae* ATCC 22788 の生産性の 7.7 倍に当たる 28 g/l の麴酸を生産した。またこの時の対菌体当たりおよび対グルコース当たりの麴酸収率は、親株に比較して 9.8 ならびに 6.0 倍それぞれ高い値を示した。本菌の糖類と有機酸に対する資化性が親株と異なっており、炭水化物に対する代謝経路に何らかの変異を受けているものと推定した。

フラスコ振盪ならびに 3 l ジャーファーマンターを用いて培地組成、溶存酸素濃度、pH などの最適条件の検討をおこない、最終的にグルコース流下で 110 g/l の麴酸が生産を得た。600 l のパイロットスケールの通気攪拌槽へのスケールアップを試みたところ

ろ、ジャーファーマンターでの結果が再現され、100 g/l を越える麴酸が生産された。本実験における対グルコース当たりの麴酸収率  $Y_{P/S}$  は 0.43 (g/g) に達した。

通気攪拌式の培養槽において高い生産性が得られた glucose/wheatgerm 培地 (GM1medium) を省エネルギー型のアリフト型培養槽に適用した結果、得られた生産性は極めて低いものであった。その原因は GM 培地を用いると培養液中の溶存酸素が確保出来ないことによった。そこで各種の原材料を試験し、菌体量は低く且つ高い生産性を与える培地として、硝酸で加水分解したコーンスターチを炭素源とし、少量の CSL(コンステイプラー) を添加した培地(SM1)を選別した。(SM1)培地を用いると、アリフト型培養槽で菌体量は 5g/l 以下に抑えられ、40g/l のコウジ酸生成が得られた。これは、グルコース流下のない 3 l ジャーファーマンターで GM 培地が生産した量と同レベルであった。窒素源の制限が菌体量の抑制という効果をもたらし、炭素源を効率よくコウジ酸生成に向かわせたものと考えられる。アリフト型培養槽の最適な通気条件は 2.0 VVM (superficial linear velocity ( $V_s$ ) 0.66cm/sec) であった。アリフト型培養槽に用いた (SM1) 培地のコストはジャーファーマンターに用いた GM 培地のコストの 40% に減じた。更に (SM1) 培地を用いたアリフト型培養のコストは、GM 培地を用いたジャーファーマンター培養のコストの 1/4 であった。多大なエネルギーを必要としないアリフト型培養槽へ適用させる上で、濃厚な培地からシンプルな無駄のない培地への変更できた。このことは培養後のダウンストリームを容易にするばかりでなく、環境への負荷も低減させる効果を持つ。有機酸などのバルク化成品を安価に製造する上では、上に述べた生産性、ランニングコスト以外にも醗酵槽の建設費の有利さ等、製造トータルのコストをみて技術を開発することが大事である。

結論として、まだスケールアップや回収精製などの問題は残されているが、国際的に十分対抗可能な麴酸生産プロセスの開発が可能なが本研究によって明らかとなった。今後海外にも広く通用する技術の拡大につながるものと思われる。

よって審査委員は全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものとして認めた。

## 学位論文の基礎となる学術論文

- 1) Futamura, T., Okabe, M., Takayoshi, T., Toda, K., Matsunobu, T., and Park, Y-S.: Improvement of production by a mutant strain *Aspergillus oryzae* MK107-39. J. Biosci. Bioeng., 91, 272-276 (2001).
- 2) Futamura, T., Ishihara, H., Tamura, Yasutake, T., Huang, G., Kojima, M., and Okabe, M.: Kojic Acid Production in an Airlift Bioreactor Using Partially Hydrolyzed Raw Corn Starch. J. Biosci. Bioeng., 92 (4), 360-365 (2001).

- 1) T. Tanaka, T. Yaguchi, O. Hiruta, T. Futamura, K. Uotani, A. Satoh, M. Taniguchi, and S. Oi: Screening for Microorganisms Having Poly ( $\gamma$ -glutamic acid) Endo-hydrolase Activity and the Enzyme Production by *Myrothecium* sp. TM-4222. Biosci. Biotech. Biochem., **57** (10), 1809-1810 (1993).
- 2) T. Tanaka, O. Hiruta, T. Futamura, K. Uotani, A. Satoh, M. Taniguchi, and S. Oi: Purification and Characterization of Poly ( $\gamma$ -glutamic acid) Hydrolase from a Filamentous Fungus, *Myrothecium* sp. TM-4222. Biosci. Biotech. Biochem., **57** (12), 2148~2153 (1993).
- 3) O. Hiruta, Y. Kamisaka, T. Yokochi, T. Futamura, H. Takebe, A. Satoh, T. Nakahara, O. Suzuki:  $\gamma$ -Linolenic Acid Production by a Low Temperature-Resistant Mutant of *Mortierella ramanniana*. J. Ferment. Bioeng., **82** (2), 119~123 (1996).
- 4) O. Hiruta, T. Futamura, H. Takebe, A. Satoh, Y. Kamisaka, T. Yokochi, T. Nakahara, O. Suzuki: Optimization and Scale-Up of  $\gamma$ -Linolenic Acid Production by *Mortierella ramanniana* MM 15-1, a High  $\gamma$ -Linolenic Acid Producing Mutant. J. Ferment. Bioeng., **82** (4), 366~370 (1996).