

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月3日現在

機関番号：33302

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580094

研究課題名（和文）糸状菌の界面科学的機能制御に関する研究

研究課題名（英文）Research for the functional control of fungal cells located on an interface

研究代表者

小田 忍 (ODA SHINOBU)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授

研究者番号：00503963

研究成果の概要（和文）：液体培地／糸状菌-中空微粒子マット／疎水性有機溶媒よりなる抽出液面固定化システム及び液-液界面バイオリクターについて、アニオン交換樹脂及び疎水性樹脂微粒子を中空微粒子層に配合することで界面物性（界面荷電状態、界面疎水性）を変動させて、糸状菌の形態、増殖性、生化学的性質の変化の度合いを調べた。その結果、カチオン交換樹脂及びキレート樹脂の配合系で糸状菌に対する著しい増殖阻害が認められたのに対し、アニオン交換樹脂配合系では増殖性の向上、胞子形成の抑止、二次代謝物の発酵能並びにアルカン水酸化活性の著しい向上等の諸現象が認められた。また、ポリテトラフルオロエチレンやポリメチルメタクリレート等の疎水性微粒子配合系では、糸状菌の増殖性には影響が認められなかったものの、配合樹脂の疎水性に比例してアルカン水酸化活性が向上することも見出した。

研究成果の概要（英文）： In an extractive liquid-surface immobilization system and a liquid-liquid interface bioreactor, the effects of ion-exchange and hydrophobic resin microparticles on morphological, physiological, and biochemical properties of fungal cells located on an aqueous-organic interface were investigated. While the addition of cation-exchange and chelating resin microparticles into a ballooned polyacrylonitrile microsphere layer strongly inhibited the fungal growth, fermentation and hydroxylation activities, the addition of anion-exchange resin microparticles significantly increased growth, fermentation and hydroxylation activities and decreased of spore formation. Furthermore, the addition of hydrophobic resin microparticles also increased alkane-hydroxylation activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：微生物機能

キーワード：糸状菌、界面、マイクロスフェア、発酵、微生物変換

1. 研究開始当初の背景

ゲノムサイズが大きく、さらには属種の多様性が広い糸状菌は、食品や醸造等の伝統的

な産業においてのみでなく、産業用酵素の生産、医薬品原料や化粧品原料等の工業生産にとっても非常に有用な微生物である。しかし

ながら、糸状菌の工業利用をタンク培養で行う際には、菌形態の制御という非常に重要かつ困難な問題に直面することになる。タンク培養において糸状菌は、高速攪拌や酸素不足といった過酷な環境下に曝され続けることになり、フィラメント状、クランプ状、あるいはペレット状といったカビ本来の形態とは大きく異なる菌形態を強いられることになり、糸状菌が本来持っている有用な能力を十分に発揮できているとは言い難いのが現状である。したがって、自然に近い形態分化を可能とし、なおかつ、糸状菌が有している有用な能力を十二分に発揮させ得る新規な培養システムの構築と、その学術的裏付けが、強く望まれている。

2. 研究の目的

上記のような糸状菌の菌形態を自然に近い状態、すなわち、形態分化を促進して糸状菌本来のマット状の菌形態に制御することが可能な培養システムとして、筆者らは液面固定化システムを開発した。また、このシステムのカビマット上に疎水性有機溶媒を重層して、脂溶性二次代謝物の発酵生産を行わせる「抽出液面固定化システム」(図1)と、疎水性有機溶媒中に高濃度で添加した脂溶性基質を効率的に微生物変換に供することが可能な「液-液界面バイオリクター」(図2)を開発した。本研究では、これら両システムにおいて糸状菌細胞が固定化されている中空微粒子層に対して、イオン交換樹脂及び疎水性樹脂微粒子を配合することでその物性(荷電状態、疎水性)を変動させることで、糸状菌の形態分化や増殖性、さらには発酵能や微生物変換能がどのように変化するかを解明することを目的とした。

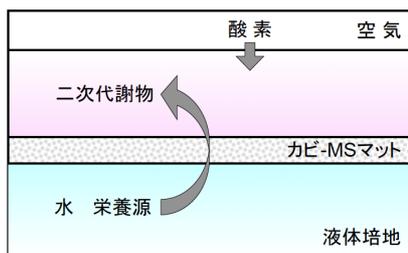


図1. 抽出液面固定化システムの原理
MS, 中空微粒子

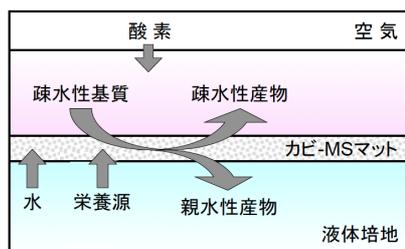


図2. 液-液界面バイオリクターの原理

3. 研究の方法

【界面荷電状態の発酵能に対する影響】

5種類のアニオン交換樹脂、2種類のカチオン交換樹脂、1種類のキレート樹脂をポリアクリロニトリル製中空微粒子に対し、重量比で1:5の割合でそれぞれ配合した。液体培地15 mlに対して樹脂微粒子180 mg、糸状菌(*Trichoderma atroviride*)培養液225 μ lの組成で液面固定化システムを構築し、25°Cで3日間前培養した。その後、低沸点ジメチルシリコンオイル3 mlをマット上に重層して抽出液面固定化システムを構築した。所定時間静置培養後、本株が発酵生産する抗真菌性香料原料である6-ペンチル- α -ピロンをガスクロマトグラフィーにより定量した。アニオン交換樹脂の交換容量と発酵能との相関、増殖性と菌形態(孢子形成能)に対する影響、アニオン交換樹脂微粒子の粒径と配合比の影響についても検討を加えた。

【界面荷電状態の水酸化能に対する影響】

5種類のアニオン交換樹脂、2種類のカチオン交換樹脂、1種類のキレート樹脂をポリアクリロニトリル製中空微粒子に対し、重量比で1:5の割合でそれぞれ配合した。液体培地15 mlに対して樹脂微粒子180 mg、糸状菌(*Monilliera* sp.)培養液225 μ lの組成で液面固定化システムを構築し、25°Cで3日間前培養した。その後、*n*-デカン3 mlをマット上に重層して液-液界面バイオリクターを構築した。所定時間静置培養後、本株が生産する(-)-4-デカノールと4-デカノンを経験により定量した。アニオン交換樹脂の交換容量と水酸化活性との相関、イオン交換樹脂微粒子の粒径並びに配合量の影響、培地pHの影響、イオン交換樹脂微粒子の菌体増殖・形態分化に対する影響についても検討を加えた。

【界面疎水性の水酸化能に対する影響】

ポリテトラフルオロエチレンやポリメチルメタクリレート等の疎水性樹脂微粒子(50 μ mメッシュパス)8種類をポリアクリロニトリル製中空微粒子に対し、重量比で1:5の割合でそれぞれ配合した。液体培地15 mlに対して樹脂微粒子180 mg、糸状菌(*Monilliera* sp.)培養液225 μ lの組成で液面固定化システムを構築し、25°Cで3日間前培養した。その後、*n*-デカン3 mlをマット上に重層して液-液界面バイオリクターを構築した。所定時間静置培養後、本株が生産する(-)-4-デカノールと4-デカノンをガスクロマトグラフィーにより定量した。各樹脂の疎水性(接触角を指標に設定)と水酸化活性との相関、疎水性樹脂微粒子配合量の影響、ポリメタクリレート側鎖種の影響の影響や、菌体増殖に対する疎水性樹脂微粒子の影響についても検討を加えた。

4. 研究成果

【界面荷電状態の発酵能に対する影響】

オルガノ(株)製の252等のカチオン交換樹脂とキレート樹脂 IRC748 が *T. atroviride* の増殖を強く阻害したのに対し、IRA98 等のアニオン交換樹脂は *T. atroviride* の増殖を促進し、6-ペンチル- α -ピロンの生産を有意に亢進した(図3)。非常に興味深い現象として、発酵能が大きく亢進した IRA98、IRA910CT、IRA958 では胞子の形成が劇的に抑制されており、発酵生産能と胞子生産能との間に逆の関係があることが確認できた。

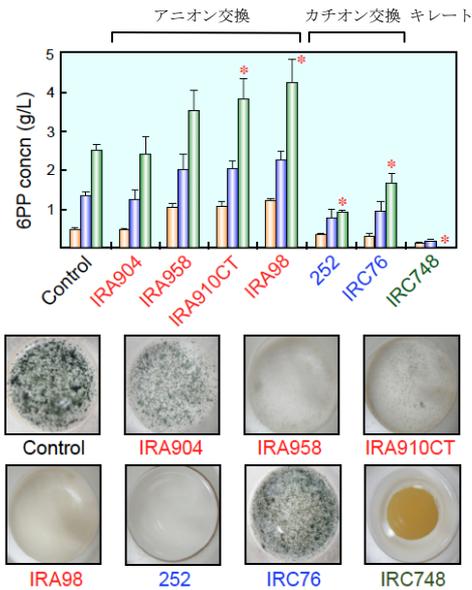


図3. 界面荷電状態と6-ペンチル- α -ピロン発酵能、胞子形成能との関係

【界面荷電状態の水酸化能に対する影響】

上述の *T. atroviride* による6-ペンチル- α -ピロンの発酵生産と同様に、*Monilliera* sp. による *n*-デカンの位置・立体的水酸化に関しても、カチオン交換樹脂微粒子とキレート樹脂微粒子の添加は、糸状菌の増殖能と水酸化活性を著しく阻害した。これに対し、IRA910CT や IRA958 等のアニオン交換樹脂微粒子を添加することにより、増殖能と *n*-デカン水酸化活性の両者が著しく亢進することを明らかにした。交換容量が最も大きな IRA958 を除き交換容量 1.0 meq/g-resin までは、交換容量が大きい樹脂ほど水酸化活性の亢進効果が大きく、両者の間に強い相関関係が認められた(図4)。また、イオン交換樹脂微粒子の粒径並びに配合量の影響を調べた結果、交換容量の効果に同様の閾値があることを確認した。以上の結果より、アニオン交換樹脂は *Monilliera* sp. に対しても増殖亢進活性があること、また、二次代謝物の発酵能と同様に水酸化活性に対しても亢進活性があることが結論として導かれた。一方で、

Monilliera sp. による水酸化活性の亢進には、適度な交換容量(閾値)が存在することも結論として導かれた。

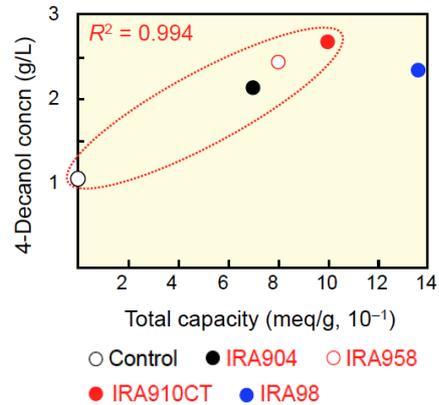


図4. アニオン交換容量と *n*-デカン水酸化活性との関係

【界面疎水性の水酸化能に対する影響】

接触角 50° のポリアクリロニトリル微粒子に対し、粒径 50 μ m メッシュパスの疎水性樹脂微粒子(接触角 75~117°)を重量比 1:5 で配合し、*Monilliera* sp. の増殖・形態分化並びに *n*-デカン水酸化活性に対する影響を調べた。接触角 117° のポリテトラフルオロエチレン(PTFE)配合系で本株の増殖が亢進することが確認されたが、他の樹脂配合系では有意な効果は認められなかった。しかしながら、*n*-デカン水酸化活性に対しては、疎水性樹脂微粒子の配合は有意な亢進効果をしめし、樹脂の接触角と水酸化活性の間に適度な相関関係が認められた(図5)。

なお、アニオン交換樹脂微粒子と疎水性樹脂微粒子の併用効果についても検討を加えたが、両者の高配合に難があり、予想した併用効果を確認するには至っていない。今後のより詳細な検討を計画している。

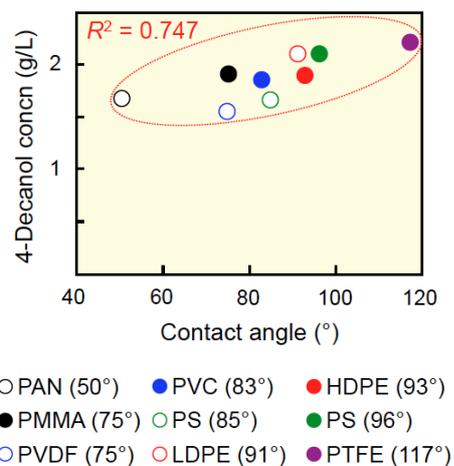


図5. 疎水性樹脂の接触角と *n*-デカン水酸化活性との関係

【まとめ】

以上述べてきたように、ポリアクリロニトリル製中空微粒子とともに液体培地と疎水性有機溶媒との液-液界面に位置する糸状菌は、該界面における荷電状態と疎水性の影響を強く受けることを見出した。以下に研究成果として得られた知見を列挙する。

- ① 界面にカチオン交換樹脂並びにキレート樹脂を存在させると、供試2株の増殖能・発酵能・水酸化能が大きく阻害された。
- ② 界面にアニオン交換樹脂を存在させると、供試2株の増殖能・発酵能・水酸化能は有意に向上した。
- ③ ②のアニオン交換樹脂の効果では、交換容量に閾値が認められ、1.0 meq/g-resinまでは、交換容量と水酸化能との間に強い正の相関関係が認められた。
- ④ 界面にアニオン交換樹脂を存在させると、*Trichoderma atroviride*の形態分化が大きく変化し、孢子形成が著しく抑制された。
- ⑤ 界面に疎水性樹脂を存在させると糸状菌の水酸化活性は有意に向上したが、増殖能並びに形態分化はさほど影響を受けなかった。疎水性樹脂の接触角と水酸化能との間に適度な正の相関関係があることも明らかにした。

今後は、界面糸状菌に関して得られた上記のような学術的・実用的知見をベースとして、糸状菌細胞と界面との関係について更に深く学術的・実用的なアプローチを図っていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計10件)

- ① Oda S, Sakamoto N, Horibe H, Kono A, Ohashi S. Relationship between interfacial hydrophobicity and hydroxylation activity of fungal cells located on an organic-aqueous interface. *J Biosci Bioeng* 2013;115:544-546. (査読有)
- ② Oda S, Sakamoto N, Horibe H, Kono A, Ohashi S. Enhancement of *n*-decane hydroxylation activity of *Monilliera* sp. NAP 00701 in a liquid-liquid interface bioreactor by mixing of anion-exchange resin microparticles. *Process Biochem* 2012;47:2494-2499. (査読有)
- ③ Oda S, Michihata S, Sakamoto N, Horibe H, Kono A, Ohashi S. Enhancement of 6-pentyl- α -pyrone fermentation activity in an extractive liquid-surface immobiliza-

tion (Ext-LSI) system by mixing anion-exchange resin microparticles. *J Biosci Bioeng* 2012;596-599. (査読有)

- ④ Oda S, Araki H, Ohashi S. Derepression of carbon catabolite repression in an extractive liquid-surface immobilization (Ext-LSI) system. *J Biosci Bioeng* 2012; 113:742-745. (査読有)
- ⑤ Ozeki K, Kondo K, Nakagawa H, Ozeki K, Oda S, Ohashi S. Production of β -glucosidase by a transformant of *Aspergillus oryzae* RIB40 in a liquid-surface immobilization (LSI) system. *J Biol Macromol* 2011; 11:23-30. (査読有)
- ⑥ Oda S, Fujinuma K, Inoue A, Ohashi S. Synthesis of β -caryophyllene oxide via regio- and stereoselective endocyclic epoxidation of β -caryophyllene with *Nemania aenea* SF 10099-1 in a liquid-liquid interface bioreactor (L-L IBR). *J Biosci Bioeng* 2011;112:561-565. (査読有)
- ⑦ Oda S, Wakui H, Ohashi S. Efficient hydrolytic reaction of an acetate ester with fungal lipase in a liquid-liquid interface bioreactor (L-L IBR) using CaCO₃-coated ballooned microsphere. *J Biosci Bioeng* 2011;112:151-153. (査読有)
- ⑧ 小田忍. 中空微粒子を用いた糸状菌のスクリーニング、物質生産システム. *日菌報* 2012;53:47-55. (査読なし)
- ⑨ 小田忍. 界面バイオリクターによる有用物質の微生物生産. *バイオサイエンスとインダストリー* 2012;70:124-127. (査読なし)
- ⑩ 小田忍・尾関健二・大箸信一. カビを用いた新規な微生物変換・発酵生産システム. *化学工業* 2010;2010:409-417. (査読なし)

〔学会発表〕(計19件)

- ① 小田忍・坂本直樹・道島さゆ美・堀邊英夫・河野昭彦・大箸信一. 糸状菌の生化学的性質に対する界面電荷、界面疎水性の影響. 2013年度日本農芸化学会大会. (2013.03.25). 東北大学.
- ② 小田忍・坂本直樹・道島さゆ美・大箸信一. 糸状菌の生化学的性質に対する界面物性の影響. 第16回生体触媒化学シンポジウム. (2012.11.30). 富山県民会館.
- ③ 飛坂未緒・小田忍・大箸信一. 液-液界面バイオリクターによる11 α -hydroxyprogesteroneの合成. 第16回生体触媒化学シンポジウム. (2012.11.29). 富山県民会館.
- ④ 山下晃・加藤大豊・小田忍・大箸信一. 液-液界面バイオリクター (L-L IBR) によるlimonene oxideの合成. 第16回生体触媒化学シンポジウム. (2012.11.29). 富山県民会館.
- ⑤ 尾崎友洋・荻野貴大・根木大輔・塩田智

也・小田忍・大箸信一. 界面バイオリアクターによる光学活性アルカノールの高生産. 2012年度日本生物工学会大会. (2012.10.25). 神戸国際会議場.

⑥ 小田忍・野口奈津貴・大箸信一. 抽出液面固定化システムを用いたメバスタチンの発酵生産. 2012年度日本農芸化学会大会. (2012.03.23). 京都女子大学.

⑦ 小田忍. 糸状菌による特異な界面発酵・微生物変換プロセス. 2011年度日本菌学会・ミニシンポジウム「カビ・キノコによる物質変換」(2011.09.30). 大阪市立自然史博物館.

⑧ 小田忍. 液-液(水-有機溶媒)界面に増殖する糸状菌を用いた物質生産システム. 2011年度日本生物高分子学会大会. (2011.09.16). 金沢工業大学.

⑨ 坂本直樹・道島さゆ美・小田忍・堀邊英夫・河野昭彦・大箸信一. 界面物性変動による糸状菌の機能性向上に関する研究. 2011年度日本生物高分子学会大会 (2011.09.16). 金沢工業大学.

⑩ 菅原慧・小田忍・大箸信一. 抽出液面固定化システムにおける二次代謝物の多様性. 2011年度日本生物工学会大会. (2011.09.27). 東京農工大学.

⑪ 坂本直樹・小田忍・大箸信一. 液-液界面バイオリアクターにおける界面物性の変動効果. 2011年度日本生物工学会大会. (2011.09.27). 東京農工大学.

⑫ 尾崎友洋・塩田智也・根本大輔・小田忍・大箸信一. 液-液界面バイオリアクターによる中鎖アルカンの高選択的亜末端水酸化. 2011年度日本生物工学会大会. (2011.09.27). 東京農工大学.

⑬ 小田忍・荒木祐美・大箸信一. (抽出)液面固定化システムにおけるカタボライト抑制の回避効果. 2011年度日本生物工学会大会. (2011.09.27). 東京農工大学.

⑭ 長谷川大・小田忍・大箸信一. クロロペルオキシダーゼの新規な生産システムの開発. 2011年度日本生物工学会大会. (2011.09.26). 東京農工大学.

⑮ 塩田智也・尾崎友洋・小田忍・大箸信一. 液-液界面バイオリアクター(L-L IBR)による中鎖アルカン類に高選択的亜末端水酸化. 2011年度日本農芸化学会大会. (2011.03.27). 京都女子大学.

⑯ 小田忍・荒木祐美・大箸信一. 液面固定化(LSI)、抽出液面固定化(Ext-LSI)システムにおける catabolite repression 抑制効果. 2011年度日本農芸化学会大会. (2011.03.27). 京都女子大学.

⑰ 長谷川大・小田忍・大箸信一. 液面固定化(LSI)システムによるクロロペルオキシダーゼの効率的生産. 2011年度日本農芸化学会大会. (2011.03.26). 京都女子大学.

⑱ 長谷川大・小田忍・大箸信一. Chloroper-

oxidase の高濃度生産システムの開発. 第64回酵素工学会研究会講演会. (2010.11.19). 東京大学.

⑲ 小田忍. 界面バイオリアクターを基幹とする抗菌物質の創製戦略. 平成22年度北陸合同バイオシンポジウム. (2010.11.12). あわら市芦泉荘.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 物質変換方法、バイオリアクターの製造方法、バイオリアクター

発明者: 小田忍・堀邊英夫

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2012-038438

出願年月日: 平成24年2月24日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://s-oda.kit.labos.ac/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田忍 (ODA SHINOBU)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授

研究者番号: 00503963

(2) 研究分担者

堀邊英夫 (HORIBE HIDEO)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授

研究者番号: 00372243