

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	WU CHANG-YU
論文題目	Isolation and characterization of <i>Aurantiochytrium</i> species useful for ω -3 fatty acids production (オメガ3脂肪酸生産に有用な <i>Aurantiochytrium</i> 属微生物の単離と解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>オメガ3高度不飽和脂肪酸 (ω3-PUFA) であるドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) は、脳の発育や心血管疾患のリスク低減など様々な生理活性を示す機能性化合物であり、医薬品や機能性食品などに利用されている。加えて海水性魚類の必須栄養素として養殖飼料にも利用されることから、近年急速に需要が拡大している。しかしながら、ω3-PUFAの供給源は魚油に依存しており、純度、安定性、持続的供給の観点で課題があった。また、ω3-ドコサペンタエン酸 (ω3-DPA) は、EPAやDHAと同様の多様な機能性を有することが期待されるものの、天然では希少であるため機能解析が進んでいなかった。このような背景のもと、多様なω3-PUFAの供給を目指し、魚油を代替しうる生産技術の開発が活発化しており、特に油糧微生物を活用した発酵生産プロセスに期待が寄せられている。本論文では、希少脂肪酸であるω3-DPAの発酵生産法の確立、ならびに、利用拡大が期待されるDHAの効率生産法の確立に取り組んだものである。</p>			
1. ω 3-DPA生産株 <i>Aurantiochytrium</i> sp. T7の単離と解析			
<p>ω3-DPAはω3-PUFAの一種であり、有用な生理活性を有することが期待されている。しかしながら、適当な供給源が存在せず、生理機能の解析はほとんど進んでいない。本論文では、ω3-DPAの生産菌として<i>Aurantiochytrium</i> sp.と同定されたT7株を汽水域から単離し、本菌が2%グルコース、1%酵母エキス、18 g/L人工海水を含む培地を用いた酸性範囲 (pH <5.5) の培養条件下において、総脂肪酸の23.5%、164 mg/Lのω3-DPAの生産性を示すことを明らかにした。また、培養後期のグルコースの枯渇後に有意にω3-DPAの蓄積量が増加したこと、加えて、一旦蓄積したDHAなどの脂肪酸の減少にともないω3-DPAが生成したことから、これらの脂肪酸を基質とする反応を経てω3-DPAが合成されることが予想された。</p>			
2. <i>Aurantiochytrium</i> sp. 6-2を用いる ω 3-PUFA生産における脱脂大豆の活用			
<p>DHAは魚油に含まれるω3-PUFAであり、海水性魚類の生育に必須な栄養素である。持続可能な養殖業への転換には、魚油に替わる安価な代替供給源が不可欠である。本論文では、沿岸部より単離した<i>Aurantiochytrium</i> sp. 6-2を用い、植物残渣である脱脂大豆を活用するDHAの効率生産を検討した。<i>Aurantiochytrium</i> sp. 6-2株は六炭糖と様々な有機窒素源を資化でき、海水の1/4~2倍濃度の人工海水塩を含む培地を用いた初期pH範囲6~9の培養条件下において旺盛な生育を示したが、脱脂大豆を直接資化することはできなかった。脱脂大豆の活用に向けた処理法を検討した結果、麹菌による発酵処理を施した脱脂大豆 (発酵脱脂大豆) が本菌により資化されることを見出した。発酵脱脂大豆の窒素源としての最適濃度は20%であり、その際の総脂肪酸の生産量は47.7 g/Lに達し、DHA生産量は12.2 g/Lであった。以上のように、<i>Aurantiochytrium</i> sp. 6-2株</p>			

は、安価な発酵脱脂大豆を窒素源として ω 3-PUFAを効率生産でき、養殖飼料の提供に有用な株であることを明らかにした。

3. *Aurantiochytrium*属微生物を用いる ω 3-PUFAの効率生産プロセスの開発

養殖飼料用の魚油代替油脂生産における固体発酵プロセスの導入は、菌体の回収、乾燥および脂質抽出プロセスの省略を可能とし、大幅なコストの低減を実現する。本論文では、生産コストの削減や脂肪酸生産性の向上を目指し、*Aurantiochytrium*属微生物を用いる固体発酵による ω 3-PUFA生産を効率化すべく、前培養液体培地の組成検討、ならびに、固体発酵への適用を評価した。

3-1.発酵脱脂大豆を用いる前培養（液体培養）培地の最適化

Aurantiochytrium sp. 6-2株の脂肪酸生産性を指標に、発酵脱脂大豆を用いる前培養（液体培養）条件の最適化を行った。その結果、未滅菌脱脂大豆、発酵処理用乾燥米麴、イオン交換水を1.0 : 1.2 : 2.4 (w/w) の比率で混合した液体培地が最適であると判明した。本培地を用いた40°C、7日間の発酵では、*Aurantiochytrium* sp. 6-2株、D36株およびD40株は、それぞれ46.7 g/L、60.7 g/Lおよび55.1 g/Lの脂肪酸生産、ならびに、12.8 g/L、20.8 g/Lおよび16.1 g/LのDHA生産を示した。

3-2.固体発酵プロセスにおけるDHA生産性の評価

上述の液体培地を用いて前培養に適した条件（28°C、4日間培養）にて調製した培養液と脱脂大豆を2 : 1 (w/w) の比率で混合し、さらに15%グルコースとミネラル成分を添加した固体培地を用い、28°C、湿度100%にて3日間培養を行った。その結果、*Aurantiochytrium* sp. D13、D37ならびにD40株の脂肪酸総生産量は前培養時からさらに14~36%増加した。以上の成果は、植物残渣を活用した ω 3-PUFA高含有固体発酵物の養殖飼料等への用途拡大の可能性を示すものと考えられた。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400~1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500~2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

オメガ3高度不飽和脂肪酸 (ω 3-PUFA) は健康増進に資する生理活性を有し、医薬品、食品添加物、飼料原料として産業的に広く利用されているが、供給源を海洋資源に依存していること、特に、天然に希少な ω 3-PUFAについてはその供給源が限られていることが課題であることから、新たな生産技術が求められていた。従って、多様な ω 3-PUFAを高純度で安定的に供給しうる発酵生産プロセスに高い期待が集まっている。本論文は、希少な ω 3-PUFAの一種である ω 3-ドコサペンタエン酸 (ω 3-DPA) の生産株の単離、ならびに、 ω 3-ドコサヘキサエン酸 (DHA) の生産株の単離、くわえて、安価な植物残渣である脱脂大豆を活用したDHA生産技術の開発を通して、 ω 3-PUFAの産業利用を拡張する基盤を構築したものであり、評価すべき点として以下の3点があげられる。

1) ω 3-DPA生産株として*Aurantiochytrium* sp. T7を見出した。最適条件下、 ω 3-DPA生産量は164 mg/Lとなり、総脂肪酸の23.5%を占めた。また、 ω 3-DPAが一旦蓄積したDHAなどの脂肪酸から誘導される可能性を示した。

2) DHA生産株として*Aurantiochytrium* sp. 6-2を見出した。また、脱脂大豆を窒素源として活用可能とする脱脂大豆の発酵処理技術を構築した。至適培養条件のもと、グルコース15%、発酵脱脂大豆20%を含む培地を用いた液体培養にて、総脂肪酸の生産量は47.7 g/Lに達し、DHAの生産量は12.2 g/Lを示した。

3) DHA生産性を指標に、脱脂大豆の発酵処理プロセスの最適化を行った。DHA生産株として単離した*Aurantiochytrium* sp. D36株は、最適液体培養条件下、60.7 g/Lの総脂肪酸生産、20.8 g/LのDHA生産を示した。また、液体培養後の培養液を植菌源として、脱脂大豆を用いる固体発酵の最適化を行った結果、種々の*Aurantiochytrium*属微生物の脂肪酸生産を液体培養時からさらに14~36%増加させることができた。

以上のように、本論文は、*Aurantiochytrium*属微生物による ω 3-DPAの発酵生産技術を構築するとともに、一旦蓄積した前駆脂肪酸から ω 3-DPAが生成するという新たな生合成経路を示した。また、植物残渣である脱脂大豆の発酵処理による資化性向上と固体発酵技術の導入により、低環境負荷で経済性をともなったDHA生産の基盤技術を構築したものである。これらの成果は、 ω 3-PUFA発酵生産における微生物生理の理解を深めるとともに、 ω 3-PUFAの養殖飼料等への利用拡大を促進するものであり、応用微生物学、発酵生理学、制御発酵学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和4年2月9日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：2022年6月23日以降(学位授与日から3ヶ月以内)