

Title	2段発酵によるD - グルコースから2 - ケト - L - グロン酸の生産
Author(s)	園山, 高康
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/36751
DOI	
Rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<http://ir.library.osaka-u.ac.jp/dspace/>

氏名・(本籍)	その 園	やま 山	たか 高	やす 康
学位の種類	工	学	博	士
学位記番号	第	8773	号	
学位授与の日付	平成元年6月28日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	2段発酵によるD-グルコースから2-ケト-L-グルロン酸の生産			
論文審査委員	(主査)			
	教授	岡田	弘輔	
	(副査)			
	教授	大嶋	泰治	教授 山田 靖宙 教授 菅 健一
	教授	吉田	敏臣	

論文内容の要旨

アスコルビン酸の工業的製造法における最終中間体である2-ケト-L-グルロン酸の発酵法による製法を研究し、D-グルコースを *Enterobacteriaceae* 科の細菌を用いて2,5-ジケト-D-グルコン酸に酸化し、続いて *Corynebacterium* sp. を用いて2-ケト-L-グルロン酸に還元する2段発酵法を考案している。

高濃度D-グルコースから2,5-ジケト-D-グルコン酸を生産する細菌を検索し、30% (W/W) のD-グルコースから70モル%以上の高収率で2,5-ジケト-D-グルコン酸に酸化する能力を有する細菌42株を分離している。これらの菌株はすべてグラム陰性、無孢子、通性嫌気性の短桿菌で分類学的に3つのグループに分けられる。その代表株は *Enterobacteriaceae* 科に属する細菌と同定され、D-グルコースからD-グルコン酸、2-ケト-D-グルコン酸を経て、2,5-ジケト-L-グルロン酸を生成し、この酸化に関与する脱水素酵素の大半は菌体破碎液中の顆粒区分に検出される。

続いて、2,5-ジケト-D-グルコン酸化を2-ケト-L-グルロン酸に還元する微生物を検索し、17属の細菌群、放線菌およびカビを得ている。高い還元能力を有する微生物は *Coryneform* 細菌群に集中しており、代表株は *Corynebacterium* sp. と同定している。

Corynebacterium sp. 株は2,5-ジケト-D-グルコン酸を資化して2-ケト-L-グルロン酸を培地中に蓄積する。酵素的にこの株は2-ケト-D-グルコン酸を経由してD-グルコン酸に、また2-ケト-D-グルコン酸、L-イドン酸、5-ケト-D-グルコン酸を経由してD-グルコン酸に変換する2経路を有している。この代謝経路を考慮して作成したブロック変異株は、D-グルコース添加下で2,5-ジケト-D-グルコン酸から2-ケト-L-グルロン酸のみを90モル%以上の高収率で蓄積した。

この菌株は五炭糖径路、解糖径路およびD-グルコースからD-グルコン酸への直接発酵の径路を有するので、2,5-ジケト-D-グルコン酸の還元に要するNADHはこれらの3径路を通じて供給されるとしている。

Corynebacterium sp. の2,5-ジケト-D-グルコン酸還元酵素を分離精製して、分子量の異なるアイソザイム、酵素I(分子量29,000)と酵素II(分子量34,000)が存在し、2,5-ジケト-D-グルコン酸に対する親和性は酵素Iの方が強い。

10^m発酵槽を用いて変異株によるD-グルコースから2-ケト-L-グロン酸の生産を実施している。D-グルコースから2,5-ジケト-D-グルコン酸の生産は *Enterobacteriaceae* 科細菌を用い9.45モル%進行し、続いて、2,5-ジケト-D-グルコン酸から2-ケト-L-グロン酸への還元は *Corynebacterium* sp. によって9.25モル%で進行した。水素供与体として原料の20重量%のグルコース添加が必要である。

論文の審査結果の要旨

本論文は発酵法によるアスコルビン酸製造の最終中間体、2-ケト-L-グロン酸の生産株育種と、それを用いた工業生産を取扱ったもので次のような重要な結果を得ている。

- (1) 現在行なわれている Reichstein-Grüssner 改良法ではD-グルコースを出発原料として1発酵工程と4から5の化学工程によって2-ケト-L-グロン酸を生産しており収率も50モル%程度であるが、本論文で提唱している方法ではD-グルコースから2,5-ジケト-D-グルコン酸への酸化発酵と、生産物の2-ケト-L-グロン酸への還元発酵の2段発酵によって85モル%の収率でD-グルコースより2-ケト-L-グロン酸を得ている。
- (2) 以上の生産系を作成するために、D-グルコースより2,5-ジケト-D-グルコン酸生産菌を検索し、高濃度(30W/W%)のD-グルコースから70モル%以上の高収率で2,5-ジケト-D-グルコン酸を生産する菌株を取得し、生産菌は *Enterobacteriaceae* 科に集中していることを明らかにしている。代謝はD-グルコース、D-グルコン酸、2-ケト-D-グルコン酸を経て2,5-ジケト-D-グルコン酸に変換されること、関与する脱水素酵素は顆粒区分に存在していることを推定している。
- (3) 続いて2,5-ジケト-D-グルコン酸から2-ケト-L-グロン酸生産菌を検索し、高能力株は Coryneform 細菌群に集中していることを示している。その生産代謝経路を推定し、突然変異によるブロック株を取得し、2,5-ジケト-D-グルコン酸から90モル%以上で2-ケト-L-グロン酸のみを生産する菌株の育種に成功している。
- (4) *Corynebacterium* sp. には、2,5-ジケト-D-グルコン酸還元酵素が2種類存在し、基質親和性に差があることを認めている。
- (5) 10^mの発酵槽でパイロット生産を行い、D-グルコースから2,5-ジケト-D-グルコン酸への

変換は94.5モル%、2,5-ジケト-D-グルコン酸から2-ケト-L-グルロン酸への変換は92.5モル%を得ている。

以上のように本論文はアスコルビン酸製造の中間体2-ケト-L-グルロン酸の生産について多くの基礎ならびに応用に関する知見を与えており、発酵工学に貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。