

紅麴菌の液体培養における培養菌体の形態とモノコリンK生産性の関係

三宅剛史・張明永*・産本弘之

Tsuyoshi MIYAKE, Ming-Yong ZHANG and Hiroyuki SAMMOTO

キーワード 紅麴菌/培養菌体の形態/モノコリンK生産性

KEY WORDS *Monascus* /pellet morphology / monacolin K productivity

1 はじめに

紅麴菌はモノコリンKや赤色色素などの有用な二次代謝産物を生産することから注目されており、その生産性を論じることは重要である。糸状菌の液体培養では、様々な培養条件や環境（主に物理的）の影響により様々な培養菌体の形態を示し、これが二次代謝産物などの生産性に影響をおよぼしているという知見が散見されている。ここでは、紅麴菌の液体培養における培養菌体の形態とモノコリンK生産性との関係について、我々が得た示唆を紹介する。

2 方法

2.1 菌株と培養

Monascus pilosus NBRC4520 株の胞子を含む懸濁液を 200ml 三角フラスコに入れた 75ml の GGP 培地(7% glycerol, 3% glucose, 3.8% peptone, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2% $NaNO_3$)に接種し、25°C で振とうもしくは静置培養を行った。また必要に応じて適時、フラスコに手による不連続な振とうを加えた。これらの培養条件のとき、ほぼ 14 日までにバイオマスは形成される。

2.2 モノコリンKの測定

採取した培養液のフィルター(0.45 μ m)ろ過液を試料とし、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)を用い次の条件において237nmの吸光を測定することにより行った。なお、モノコリンKのピークはマススペクトルにより同定確認した。液体クロマトグラフ(LC)は、Agilent 1100 system を用い、カラム: COSMOSIL 5C18-MS (4.6 \times 150mm)、移動相: 60%アセトニトリル(0.1%ギ酸)から 100%(20分)のリニアグラジエント、流速: 0.5ml/分、カラム温度: 40°C、注入量: 10 μ l の各条件で行い、質量分析(MS)は JEOL 社製の JMS-T100LC を用い、イオン化モード: ESI+、ニ

*独立行政法人日本学術振興会

ードル電圧: 2000V、オリフィス 1 電圧: 70V、オリフィス 2 電圧: 5V、リングレンズ電圧: 10V、脱溶媒温度: 250°C、分析時間: 20 分の各条件で行った。

3 結果

糸状菌の液体培養における培養菌体の形態は、同一の培養条件でも不均一になることを実験上しばしば経験する。これは、振とうにより液体培地上面とフラスコが接する部分に付着しながら増殖する菌体の状態(量や落下の有無)に一部よっていると経験上理解した。すなわち、あまり科学的かつ定量的なやり方ではないが、培養開始から日々これらの付着菌体を丁寧に振り落としているとほぼ糸状のバイオマスが形成され培養後期を迎える(図1の1)。一方、付着菌体が少しそのまま増殖するように1日おき程度で培養初期から振り落とすとほぼ小ペレット状になる(図1の2)。さらに、培養中期くらいまで付着菌体をそのまま増殖させ振り落とすと菌体は不揃いで大きくなる(図1の3)。これらの後しばらく培養を継続し(一般的な特性として二次代謝産物はバイオマス形成後に生産される)、モノコリンK生産の有無を調べたところ、培養菌体の形態が小ペレット状になっている時のみバイオマス形成後にモノコリンKが生産されていることが判った(図1)。

次に、増殖菌体に物理的な外力をより積極的に加える目的で、振とうを高回転にし、境界面に生じる付着菌体を日々丁寧に振り落としながら、培養菌体の形態とモノコリンKの生産を観察した。すると糸状性の増殖によるバイオマス形成後もしばらく形態は糸状のままであったが、ほぼ21日目以降、小ペレット状に形態が変化した。そして、それ以降モノコリンKが生産された(図2)。

さらに興味深いことに、静置培養を行うと菌体は培地液面に膜状の増殖によるバイオマスを形成し、上部には気菌糸の形成が見られた。そして、このときモノコリンKも生産されていた(図1の4)。

なお、培養菌体の形態は接種する孢子や菌糸の状態(培養時期、濃度など)には依存しなかった(データは示さない)。

4 考察とまとめ

今回の観察結果を踏まえ、培地中におけるそれぞれの培養菌体の形態の特性を考慮すると、その一つに培養菌体への酸素供給の違いが考えられる。つまり、形態が糸状の時は、ほぼすべての菌糸が培地に接しているものの、培地の流動性が大きく低下することで、たとえ振とうによっても培地中(すなわち菌体)への酸素の供給が妨げられているような状態にあるものと考えられる。また、一つの菌体が大きかったりすると、培地の流動性(これによる溶存酸素)は確保されるものの、菌体内部への酸素の供給が十分でなくなっていることが考えられる。これに対し、小ペレットの時は、培地の流動性と菌体への酸素供給が十分に確保されている状態になっているのであろうと考えられる。さらには、

静置培養により形成される気菌糸は菌体へ十分な酸素を供給する役割を果たしているであろう。従って、このような酸素供給レベルの違いがモノコリンKの生産性へ影響を及ぼし、菌体への酸素供給が十分なときに限りモノコリンKが生産されたものと推察される。同様の現象(培養菌体の形態が、糸状より小ペレット状のほうがモノコリンKの生産性が高い)が、他の糸状菌(*Aspergillus terreus*)においても報告されている¹⁾。そこでは、特にグルコースのような易発酵性の炭素源が豊富に存在すると菌糸の伸張が早いと、糸状のままバイオマス形成され、これにより培地の流動性が低下し、菌体への酸素供給が不足となり、モノコリンKの生産性が極端に低下すると結論している。これらの考察から、酸素がモノコリンK(炭素、水素、酸素で構成)の生産性を高めるため(おそらく材料として)の重要な制御(律速)因子の一つであると考えられる。従って、培養菌体の形態と酸素の供給を適切に制御することにより、モノコリンKの生産性向上が期待できるといえる。

参考文献

- 1) Kumar *et al.* *Process Biochem.*, 36, 363 (2000)

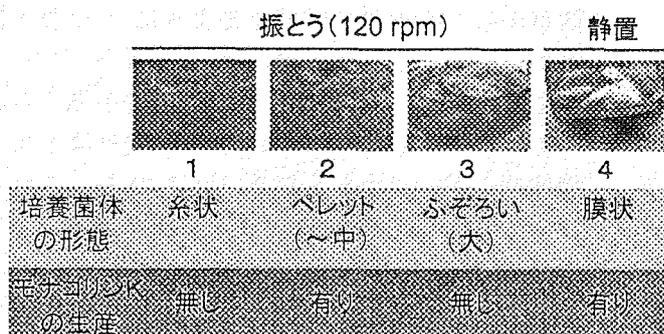


図1 培養菌体の形態とモノコリンK生産性の関係

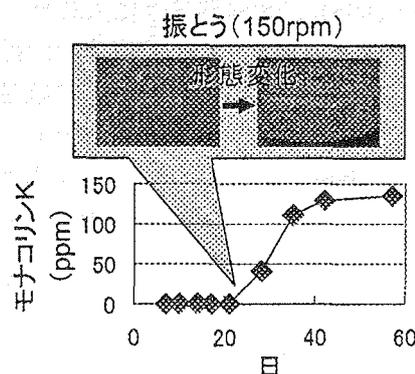


図2 高回転液体培養における培養菌体の形態変化とモノコリンK生産