

氏名(本籍)	石川英律(鹿児島県)
学位の種類	学術博士
学位記番号	博甲第857号
学位授与年月日	平成3年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	通性嫌気性細菌 <i>Zymomonas mobilis</i> の対酸素挙動とアセトアルデヒド生産に関する培養工学的研究
主査	筑波大学教授 工学博士 片岡 廣
副査	筑波大学教授 農学博士 中原 忠 篤
副査	筑波大学助教授 理学博士 山下 魏
副査	筑波大学助教授 工学博士 田中 秀 夫

論 文 の 要 旨

醗酵工業において、酸素の存在の有無にかかわらず生育できる通性嫌気性菌の役割は近年増大しつつあるが、通性嫌気性菌の対酸素挙動は複雑なために定量的検討はこれまでほとんどなされていない。

一方、好気培養におけるフラスコからジャーフェーマンター（以下ジャーと略称）へのスケール・アップ法は、一般に酸素移動速度を指標として行われてきたが、必ずしも両培養装置において同一な結果が得られているとはいえない。その主な原因は、両培養装置間での気相部の換気効果の相違にあるのであろうと推定されているが、培養装置における換気効果の定量化がなされていないために、その推定は実証されていない。

このような状況において、本研究では、通性嫌気性菌に属する *Zymomonas mobilis* の対酸素挙動の定量的な検討を行い、そのメカニズムの全体像を明らかにするとともに、培養装置における換気効果の定量化を行い、*Z. mobilis* によるアセトアルデヒド生産を対象にして、換気効果に基づいたスケール・アップ法を試みている。本研究の内容は以下のような項目にまとめられる。

- ① *Z. mobilis* の対酸素挙動の定量的検討
 - ② *Z. mobilis* の対酸素挙動のメカニズムの解明
 - ③ 揮発性阻害物質を生産する培養系のスケール・アップの問題点
 - ④ アセトアルデヒド生産に関するフラスコ培養からジャーフェーマンター培養へのスケール・アップと高濃度生産
- ① *Z. mobilis* の対酸素挙動の定量的検討

回分培養における本菌の対酸素挙動に関して、初発の酸素移動容量係数 ($k_L a^0$) および最大酸素移

動速度 (OTR_{max}) の両者を用いて定量的に検討した。代謝活性への影響について検討したところ、酸素供給量が増加するに従い、細胞の持つ増殖活性およびエタノール生産活性はともに直線的に減少した。この際、エタノール生産活性の方が増殖活性よりも酸素供給に伴う影響が大きかった。ついで物質収支への影響について検討したところ、酸素供給量が増加するに従い、最終細胞量及びエタノール生産量は減少し、アセトアルデヒドや酢酸等の副産物の生産量が増加した。酸素供給は細胞形態にも影響を与え、酸素供給量が増加するに従い細胞形態は長くなった。また、代謝活性及び物質収支とともに、培養時に得られる溶存酸素濃度の定常値がゼロか否かにより著しく変化することが見出された。以上の結果により、本菌の代謝活性が酸素供給条件の変化に対してきわめて敏感に反応することを明らかにした。

② *Z. mobilis* の対酸素挙動のメカニズムの解明

本菌の対酸素挙動は同じ k_{La} 値であっても、通気速度により著しく異なることが見出された。副産物であるアセトアルデヒドには、本菌の増殖活性を著しく減少させる効果が認められた。アセトアルデヒドの蓄積は、培養初期から認められ、酸素供給量にはほぼ比例してその蓄積速度は早くなった。エタノールとアセトアルデヒドの生産割合は、溶存酸素濃度がゼロか否かにより逆転した。低下したエタノール生産は、酸素供給量を下げることによりほぼ回復したが、アセトアルデヒドにより低下した増殖活性はほとんど回復しなかった。アセトアルデヒドはまた本菌の持つ酸素消費活性も阻害することが見出された。これらの結果および既往の研究結果より、本菌の対酸素挙動のメカニズムは、本菌が持つ4つの代謝活性である増殖活性、基質消費活性、エタノール生産活性および酸素消費活性に対する副生したアセトアルデヒドの蓄積阻害によりほぼ説明できることを明らかにした。

③ 揮発性阻害物質を生産する培養系のスケール・アップの問題点

換気効果の定量的指標として揮発速度定数 k_v を提案し、揮発性物質の1つである2-オクタノールを用いジャーにおける k_v を測定した結果、ジャーでの換気効果は通気速度と攪拌速度の関数であり、特に前者により大きく影響されることが見出された。ついでモデルの培養系を用い、揮発性物質が培養の律速因子となる場合の培養に際しては、揮発性物質の換気効果が重要な因子となることを定量的に明らかにした。ここで綿栓をした従来のフラスコにおける2-オクタノールの k_v を測定した結果、綿栓フラスコでは換気効果がほとんど認められず、ジャーと同じ換気効果を得ることは不可能であることが見出された。本研究ではその解決策として強制換気が可能なフラスコ（通気フラスコ）を考案した。本フラスコとジャーの換気効果 (k_v) を一致させることにより、換気効果を考慮しない従来法では不可能であった本モデル系のスケール・アップがはじめて可能となった。これらの結果により、本研究で提案した換気効果を考慮した新しいスケール・アップ法の有用性を明らかにした。

④ アセトアルデヒド生産に関するフラスコ培養からジャーフェルメンター培養へのスケール・アップと高濃度生産

フラスコ培養での *Z. mobilis* による揮発性物質アセトアルデヒドの生産は、先に考案した通気フラスコを用いることにより初めて可能となった。ジャーにおけるアセトアルデヒドの換気効果は、通気速度にのみ影響された。本培養系の通気フラスコからジャーへのスケール・アップを試みた結果、

k_{La}^0 のみを基準とした従来法では事実上不可能であり、 k_{La}^0 と k_v の両者を基準とした新規法でのみ可能であった。これにより、先にモデル系を用いて開発した新規スケール・アップ法が、実際の培養系においても適用でき、きわめて有効であることを明らかにした。また、これまでの検討結果を踏まえ、ジャーにおける最適通気攪拌条件を決定し培養を行った結果、著しい増殖阻害を認めることなく、これまで報告されている最大生産量の約1.6倍に相当する $6.64 \text{ g} / \ell$ (収率：27%)のアセトアルデヒドを得ることができた。

以上のように本研究は、従来ほとんど検討されていなかった通性嫌気性菌 *Z. mobilis* の特異的な対酸素挙動を定量的に明らかにするとともに、揮発性阻害物質が培養の律速因子となっている培養系のための新規フラスコ培養法および新規スケール・アップ法を提案し、それらの実際の培養への適用性を示したものである。

審 査 の 要 旨

本論文では、まず通気嫌気性菌 *Z. mobilis* の複雑な対酸素挙動を定量的に検討し、そのメカニズムを明らかにしており、今後工業的に重要性を増しつつある通性嫌気性菌全般の対酸素挙動の解明に当り、有益な知見を得ている。また、本菌は現在工業的なエタノール生産菌として注目されており、その最適生産条件の設定や制御を行うための基礎的な知見を与える点で評価できる。次に、培養装置の換気効果の定量化および高い換気効果を有する通気フラスコの開発は、これまでフラスコ培養では困難であった、炭酸ガスや揮発性阻害物質が律速因子となる培養系のフラスコ培養を可能にしたばかりでなく、フラスコ培養からジャーフェーマンター培養へのスケール・アップも可能にした点で評価できる。さらに、本研究で対象としたアセトアルデヒドは有力なバイオフィレーバーの1つであり、ここで得られたアセトアルデヒドの高生産量は、開発された生産法が実際のアセトアルデヒドの工業的生産法として用いられる可能性を示唆するものであり、高く評価できる。

よって、著者は学術博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。