

氏名(本籍)	水沼誉人(東京都)		
学位の種類	博士(生物工学)		
学位記番号	博甲第4350号		
学位授与年月日	平成19年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<b>Fermentation Performance of Immobilized <i>Aspergillus niger</i> using Polyelectrolyte Complex</b> (高分子電解質複合体に固定化した <i>Aspergillus niger</i> の発酵特性)		
主査	筑波大学教授	工学博士	國府田 悦 男
副査	筑波大学教授	農学博士	佐 藤 誠 吾
副査	筑波大学教授	工学博士	王 碧 昭
副査	筑波大学教授	農学博士	馬 場 忠

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

微生物を用いた有用物質の生産では、反応触媒となる菌体の濃度を高めることが、生産性を向上させる有効な手段である。しかし、糸状菌の場合は10g/l程度の濃度が培養の上限である。その原因は、菌体が糸状に増殖するため、高菌体濃度では培養液の見かけ粘度が上昇し、酸素や基質が糸状菌へ移動し難くなるためである(拡散阻害効果)。本研究では、高分子電解質複合体を利用することにより、全く新しい糸状菌固定化方法を開発し、糸状菌の培養で問題となる物質移動の低下を解決し、高菌体濃度培養の達成に成功した。

具体的な固定化方法は、アニオン性ポリマーであるポリビニル硫酸カリウムとカチオン性ポリマーであるトリメチルグリコールキトサンを菌懸濁液に添加して、菌糸の一部を高分子電解質複合体で結束させるアイデアに基づく。事実、両ポリマーを同量ずつ添加した場合に、菌糸間の強い凝集が認められ、高分子電解質複合体が菌体を部分的に固定化していることを顕微鏡観察により明らかにした。菌体量に対するポリマーの最適添加量は、固定化菌体の沈降速度を測定することにより決定した。すなわち、菌体とポリマーの重量比が1:0.5までは、ポリマーの添加により沈降速度の上昇が認められたことから、この値を最適添加量とした。なお、沈降速度の増加は、糸状菌の高密度培養の障害である“菌糸の広がり”を本固定化により抑制できたことを示している。

次に本固定化法の長所である“物質移動の障害回避”と“せん断耐性”を明確にするために、ジャーフェーメンターを用いたグルコン酸生産を行なった。遊離菌体、固定化菌体の両者とも菌体濃度40g/lまで培養することはできたものの、遊離菌体と固定化菌体のグルコン酸の生産性を比較すると、菌体濃度20g/l以上の高濃度培養では、固定化菌体の方が生産性が上回っていた。特に、40g/lと非常に高い菌体濃度では、固定化菌体の生産性は、遊離菌体の約1.5倍に達した。さらに攪拌速度1000rpmでも本固定化担体の破壊は認められなかった。これらの事実により、本固定化法は、糸状菌を高濃度培養し、生産性を向上させるために、有効な手段であることが実証された。

最後に、遊離菌体系および固定化菌体系の物質移動を比較することにより、生産性向上のメカニズムを解明した。生産性が増加するためには物質移動の増加が必須である。そこで、最初に、発酵生産の物質移動の

指標となる  $k_{1a}$  を Dynamic Method により測定したが、遊離菌体系および固定化菌体系による差異は認められなかった。次に、B 型粘度計およびトルク測定により見かけ粘度も測定したが、やはり両培養系で差異は認められなかった。これらの結果は、培養系を巨視的に見た場合、基質であるグルコースや酸素は培養液中に十分に存在し、生産の律速過程ではないことを示している。そこで、菌体近傍の物質移動を微視的に調べるために、Time Lag Method により菌体近傍の基質の拡散係数を測定した。この結果、本固定化菌体は、遊離菌体と比較して基質の拡散係数が約 1.4 倍大きいことが分かった。すなわち、遊離菌体は菌糸どうしが接触して物質の移動を妨げている部分があるが、本固定化菌体は菌糸の間にポリマー（高分子電解質複合体）が挟まり、このポリマー部分を通して物質が容易に移動できる構造となっていることを明らかにした。

## 審査の結果の要旨

微生物を用いる有用物質の工業生産では、触媒である微生物の探索、改良や育種、培養装置の開発とその最適操作条件の決定などを行わなければならないが、生産性向上のためには高濃度培養技術の開発が重要な課題である。これに関しては、細菌を用いた場合 190 g/l、酵母を用いた場合には 260 g/l に達する非常に高い菌体濃度培養が報告されている。しかし、糸状菌の場合は 10~20 g/l 程度が限界であると考えることが常識となっている。その理由は、糸状菌の増殖では菌糸が伸長して互いに絡み合うため、培養液の見かけ粘度が増加し、菌体への物質移動速度が低下するためである。今迄に、この問題を解決し、高濃度培養を行うための手段として、菌糸をアルギン酸カルシウムゲルで包括固定化する方法、多孔質セラミックへの吸着固定化する方法などが研究されてきた。これらの固定化法は、見かけ粘度を低下させるのに有効であったが、固定化菌体への物質移動速度が低下し、基質が不足する固定相内部では菌体が十分な活性を發揮できない問題があった。さらに、従来の固定化担体は、せん断応力に弱いものが多く、通気攪拌槽などせん断応力が大きいリアクターでは使用できないことから、工業生産に耐え得る糸状菌の高濃度培養技術とはなっていなかった。

本論文の著者は、強電解質型ポリアニオンとポリカチオンからなる高分子電解質複合体で、菌糸の一部を結束させ菌体を固定化しているが、このような手法は従来の固定化技術には無い斬新な発想である。本固定化法では、菌糸の絡み合いが防止できるために、糸状菌の高濃度培養が可能であり、今迄に報告例が無い 40 g/l と非常に高い菌体濃度下での培養に成功している。本研究で用いている高分子電解質は、従来の固定化担体とは異なり、物質移動抵抗が極めて少ない固定化菌体の調製を可能にした。これは、基質の拡散係数の測定から明らかで、本固定化菌体のグルコン酸生産性が、遊離菌体と比較して 1.5 倍大きい理由である。さらに、本固定化法により得られた固定化菌体は、強いせん断応力でも破壊されないことから、大半の発酵工業で用いられている通気攪拌培養槽でも使用可能と考えられる。以上の理由から、本研究の独創性と新規性は十分に評価できる。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。