

氏名(本籍)	オボンナ ジェームス チュクマ (ナイジェリア)
学位の種類	農学博士
学位記番号	博甲第853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	DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF A SYSTEM FOR IMMOBILIZATION OF AEROBIC MICROBIAL CELLS IN MICRO GEL BEADS (微小ゲルビーズを用いた好気性微生物固定化システムの開発とその最適化)

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	農学博士	柿 寫 眞
副査	筑波大学助教授	工学博士	松 村 正 利
副査	筑波大学助教授	工学博士	向 高 祐 邦

## 論 文 の 要 旨

本研究は好気性発酵のための微生物固定化システムの開発を目的としている。

微生物の固定化は、アルコール発酵など嫌気性発酵においてはすでに実用化の段階に達しており、好気性発酵においてもその利用が強く望まれている。これを実現するためには、ゲルビーズ内部への酸素供給速度を増大させて、発酵が酸素によって律速されないよう新たな固定化培養システムを構築することが必要である。通常のゲルビーズ（直径2.0mm以上）を用いた好気性発酵では、酸素供給不足が問題となり、固定化微生物はゲルビーズの表面でだけに増殖し、中心付近では微生物はほとんど増殖できない。

この問題の解決策として、微小ゲルビーズに微生物を固定化する装置を開発した。ゲル化剤（塩化カルシウムまたは塩化ストロンチウム水溶液）を入れた円筒を回転することによって、ゲル化剤のヴォルテックスを形成させる。高速で回転する円盤上に菌体を懸濁した担体水溶液を供給して、これを遠心力で微粒化して、ゲル化剤の中に飛散させ、凝固させる。担体の供給流速が低いときには、液滴状分裂が起り、流速が増加すると、液滴状分裂からヒモ状分裂への移行が見られた。ヒモは担体流速が大きくなるほど長くなり、その先端から液滴が生成する前にヴォルテックスに達して固化するためゲルビーズ状にならない。したがって、ゲルビーズの作製速度はヴォルテックスの直径によっても律速される。ゲルビーズの生成速度は直径22.0cmのヴォルテックス、直径6cmの円盤と $18.5\text{s}^{-1}$ の円盤回転速度の条件下で一時間あたり約3ℓの微小ゲルビーズを作製することができた。さらに高速で

作製する場合にはヴォルテックスの直径を大きくし、多段円盤を用いることが必要である。

塩化カルシウム水溶液で調整したゲルビーズはナス形であった。しかし、0.5% tween 20を添加して、表面張力を $72\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ から $36.8\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ に下げた場合は、ゲルビーズは球形となった。粒子径の極微小なゲルビーズも見られた。ゲルビーズの粒子径の分布は、粒子数を基準にした場合、極微小ゲルビーズを含む二つのピーク、即ち極微小粒子とより大きな粒子が確認された。担体の供給流速の増加または円盤の回転速度の減少に伴って、極微小ゲルビーズの数が増大した。しかし極微小ゲルビーズの容積は小さく、体積を基準にした場合、極微小ゲルビーズの分布は無視できる割合であった。

作製した微小ゲルビーズ（直径 $0.2\sim 1.2\text{mm}$ ）の体積平均直径と操作条件及び液物性との関係はWeber, Reynolds 及び Ohnesorge 数を用いて無次元式で相関された。従って、この装置を用いて、最適な円盤回転速度または担体流速を選択し、必要とする均一の大きさの微小ゲルビーズを迅速大量に作製することができる。

次に、ゲルビーズ内への酸素（またはグルコース）の移動に及ぼすゲルビーズ径及びゲルビーズ周辺部の溶存酸素（またはグルコース）濃度の影響について、理論解析と実験的検証を行った。パン酵母を微小ゲルビーズ（直径 $0.5\text{mm}$ ）に固定化し、通常大きさ（直径 $3.2\text{mm}$ ）のゲルビーズと酸素消費速度を比較した。その結果、溶存酸素濃度（DO）が $0.022\text{mol}/\text{m}^3$ のとき、微小ゲルビーズの酸素消費に関する有効係数は通常大きさゲルビーズに比べて6倍増加し、見掛けの $k_m$ 値は50%減少した。また、様々な溶存酸素濃度やゲルビーズ周辺グルコース濃度に対して、それぞれの有効係数はゲルビーズの大きさが小さくなるほど増加し、ゲルビーズ内の基質濃度勾配が減少した。固定化細胞の有効係数とゲルビーズ内の基質濃度分布を考慮することで、好気性または嫌気性発酵における最適なゲルビーズ径を計算することができた。

一般にゲルビーズは物理的衝撃に弱く、ゲルビーズを用いる発酵では気泡塔型のリアクターが利用されてきた。しかし、このタイプのリアクターの酸素移動容量係数は低く、固定化菌体を用いた酸素要求の高い発酵には不適である。微小ゲルビーズは、従来の大きなゲルビーズに比べ物理的衝撃に強いが、酸素容量係数の高い攪拌型リアクターを利用するためには、ゲルビーズの強度を一層改善することが必要である。ゲルビーズの強度はゲル化剤の種類によって異なることは既に知られている。しかし、固定化微生物を好気性発酵に利用する際には、強度のみならず酸素やグルコースの拡散係数及びゲルビーズからの細胞の漏出またはゲル化剤の毒性についても配慮することが必要である。

そこで、アルギン酸ナトリウム、 $\kappa$ -カラギーナンを固定化担体とし、Ca, Ba, Sr, Znなどでゲル化させたゲルビーズの強度、酸素およびグルコースの拡散係数、菌体の漏出、毒性などを検討した。BaCl<sub>2</sub>で調製したアルギン酸ゲルビーズ内のグルコース拡散係数はCaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, またはSrCl<sub>2</sub>で調製したアルギン酸ゲルビーズより低い値であった。また $\kappa$ -カラギーナンのゲル化剤として汎用されているKClで調製されたゲルビーズの酸素、グルコース拡散係数は、その他のゲル化剤で調製したゲルビーズの値に比べて低いことが明らかとなった。ZnCl<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub>及びBaCl<sub>2</sub>は細胞に対して毒性を示した。以上の結果とゲルビーズからの菌体漏出、 $\kappa$ -カラギーナンゲルビーズの熱安定性について検討した結果、アルギン酸のみならず $\kappa$ -カラギーナンに対してもSrCl<sub>2</sub>が最も適切なゲル化剤であった。

好気性発酵における微小ゲルビーズの有用性を示すために、アルギン酸ストロンチウム微小ゲルビーズ（直径0.5mm）に固定化した *Corynebacterium glutamicum* を攪拌槽（400rpm）で220h培養したところ、物理的衝撃の影響は認められなかった。このシステムでは、ゲルビーズ表面から中心への酸素濃度勾配が低くなり、中心でも高い菌体濃度が認められた。この菌体はグルタミン酸と同時にグルタミンも生産する。微小ゲルビーズを用いた2%塩化アンモニウム培地では、ほぼ同量のグルタミンとグルタミン酸が生産されたが、培地中の塩化アンモニウム濃度を5%に上げることによって、グルタミンの生産のみが飛躍的に促進された。

グルコースに対するグルタミンの収率は、通常のゲルビーズ（直径3.2mm）を使用した場合と遊離細胞のみの場合と比較すると、それぞれ3倍と2倍に増加した。大きなゲルビーズの場合、酸素の移動が律速となったため、微小ゲルビーズと比較し、24倍以上の有機酸が生成した。5  $\mu\text{g}/\ell$  ビオチンと2.5  $\text{g}/\ell$  肉エキスを含んだ培地では、細胞の増殖が抑えられ、定常状態のグルタミン濃度は25  $\text{g}/\ell$  であったが、100時間の安定な発酵であった。100  $\mu\text{g}/\ell$  のビオチン培地では、定常状態でのグルタミン濃度は20  $\text{g}/\ell$  であったが220時間以上の連続生産が可能であった。流加培養の場合には、79  $\text{g}/\ell$  の高濃度のグルタミンを生産することができた。

大きなゲルビーズに固定化した微生物を用いての好気性発酵では、酸素によって生産性が律速されることが知られている。しかし、微生物を大量に、微小ゲルビーズに固定化する方法がなかったため、大きなゲルビーズが今まで利用されてきた。本研究によって、回転円盤システムによる微小ゲルビーズが、容易にかつ効率良く生産できることが明らかとなった。また、固定化ゲルビーズが物理的衝撃に弱いので気泡塔型リアクターにのみ使用できると考えられていたが、ゲル化剤として  $\text{SrCl}_2$  を使用することによって、微小ゲルビーズの強度は高くなり攪拌型リアクターにも利用することができた。したがって、酸素供給の問題を改善し、リアクターの生産性を向上させることが可能である。

好気性発酵の一つの例として、グルタミン発酵を行ったが、以上の利点は他の好気性発酵についても適用できる。また解決的検討の結果から、微小ゲルビーズは嫌気性発酵の生産性の改善にも有効であることが明らかである。

## 審 査 の 要 旨

既存の方法で好気性微生物を固定化して発酵を行った場合、ゲル粒子が大きいと粒子内部は酸素供給不足となり、微生物は中心部まで生育できないという難点があった。

本論文では、この問題を解決するため、微小ゲルビーズを迅速、大量に作製できる微小ゲル製造装置を考案した。また、ゲル粒子径について、担体の物性と操作条件からなる無次元実験式を導き、粒径が0.2~1.2mmまでの任意の大きさで、大量に作製できることが可能となった。

次いでゲル内における酸素およびグルコースの移動現象について理論解析を行い、微小ゲルビーズの場合には、各成分がゲル中心部まで供給できることを明らかにした。

好気性発酵への適用例の一つとして、微生物を固定化し、グルタミン酸発酵を行った。グルコース

に対するグルタミン収率は、通常のゲルビーズ、および遊離細胞に比較して、数倍に増加することが実験によって明らかにされ、極めて有益な知見が得られている。

これらの結果は、微生物のみならず生体触媒の新しい固定化法として広範な応用が可能であり、発酵工業の今後の発展に貢献するところ大である。

よって、著者は農学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。