

好気性細胞と嫌気性細胞の新しい
混合培養システムの開発とその利用

1988年

黒澤 尋

筑波大学
平成 年 月 日
黒澤 尋 氏

好気性細胞と嫌気性細胞の新しい
混合培養システムの開発とその利用

筑波大学 農学研究科
(バイオテクノロジー学際カリキュラム)

黒 澤 尋

目 次

第1章	緒 論	1
第2章	既往の研究	4
2-1	ゲル包括法による固定化細胞の問題点	4
2-2	固定化ゲル内の物質移動	7
2-3	混合培養および2つの触媒作用を持つ固定化生体触媒の開発	9
第3章	好気性細胞を固定化したゲルビーズ内への酸素供給の 定量的検討	13
3-1	序	13
3-2	実験材料および方法	13
3-3	実験結果および考察	20
3-3-1	アルギン酸ゲルビーズ内の酸素の拡散移動	20
3-3-2	ゲルビーズ内の細胞分布と酸素濃度分布	25
3-4	第3章の結論	29
補 遺		31
記号一覧		34
第4章	好気性菌(<u>Aspergillus awamori</u>)と嫌気性菌(<u>Zymomonas mobilis</u>) の混合固定化菌体によるデンプンからのエタノール生産	35
4-1	序	35
4-2	実験材料および方法	36

4-3	実験結果および考察	41
4-3-1	<u>Aspergillus awamori</u> と <u>Zymomonas mobilis</u> の単一固定化培養	41
4-3-2	<u>Aspergillus awamori</u> 胞子 と <u>Zymomonas mobilis</u> 細胞の 混合比の検討	46
4-3-3	混合固定系によるデンプンからのエタノール生産	51
4-3-4	混合固定系の培養における振盪条件の検討	54
4-3-5	混合固定系と他の混合培養システムとのエタノール生産性の 比較	58
4-4	第4章の結論	60
第5章	混合固定系による乳酸の連続生産	62
5-1	序	62
5-2	実験材料および方法	62
5-3	実験結果および考察	64
5-3-1	フラスコによる回分培養	64
5-3-2	ジャーフェーマンターによる連続培養	67
5-3-3	ゲルビーズ内の細胞分布	67
5-4	第5章の結論	70
第6章	好気性菌と通性嫌気性菌からなる混合固定系による物質生産	73
6-1	序	73
6-2	実験材料および方法	73
6-3	実験結果および考察	76
6-3-1	単一培養	76
6-3-2	混合培養	76

6-3-3	微生物細胞に及ぼす Vantocil IB の影響	8 1
6-3-4	Vantocil IB を用いた混合固定系の培養	8 9
6-3-5	連続培養	9 2
6-4	第6章の結論	9 5
第7章	総括	9 7
文 献		1 0 3
付 記		1 0 6
謝 辞		1 0 7

第 1 章 結 論

固定化細胞は、発酵生産プロセスを効率化する有力な手段として近年注目されており、細胞の固定化法の中では、細胞をそのまま高分子素材を用いて包み込む包括法が、固定化操作が容易なために、これまでもっとも広く用いられている。この方法によく使用されている高分子素材としては、寒天、アルギン酸、カラギーナンなどの天然高分子、ポリアクリルアミド、光硬化性樹脂、ポリウレタンなどの合成高分子があげられる。特に天然高分子は、ゲル化条件が穏やかであることから微生物のみならず、動・植物細胞の固定化にも広く用いられている。

しかし、包括法による細胞の固定化は、固定化担体であるゲルそのものが物質の移動抵抗となると考えられており、そのために、固定化細胞の反応速度が制限されるといわれている。栄養源物質のうちとりわけ酸素は液中への溶解度が低いので、好気性細胞を固定化して発酵生産に用いる場合は、ゲル内の酸素移動速度が発酵速度の重要な制限因子になると考えられている。例えば担体の形状がビーズ状の場合、ゲルビーズ内の細胞濃度が低いときはすべての細胞に十分な酸素が供給されるが、ゲルビーズ内の細胞濃度が高くなるとゲル内の酸素の拡散速度よりも細胞による酸素消費速度が上回り、結果的にゲルビーズの中心付近に存在する細胞への酸素供給が不足し、期待通りの生産性が得られないことになる。しかしながら、生細胞を含むゲルビーズ内での酸素の拡散移動に関する基礎的検討は、これまで十分になされておらず、ゲルビーズ内への酸素供給が不足する主な原因が、ゲルにおける酸素の物質移動抵抗によるものであるのか、液中への酸素溶解度が低いためであるのかについては、いまだ明確にされていない。また、ビーズ内の細胞に十分な酸素供給を行うには、どのような酸素供給条件を設定すれば良いかなどの問題はほとんど検討されていない。

固定化細胞への酸素供給法を改善する方法は既にいくつか提案されている。最

も一般的な方法は、純酸素の供給や、高圧をかけることによって飽和溶存酸素濃度を高めるといったものである。Osugaら⁶⁾は、純酸素を供給して飽和溶存酸素濃度を 38ppm に高めることによって κ -カラギーナンゲルビーズで固定化した Acetobacter acetii の細胞増殖や酢酸の生産性を増大させることに成功した。しかし、細胞のゲルビーズ内での増殖はゲル表層部の 150 μm から 200 μm の範囲に限られ、依然として酸素が酢酸生産の制限因子になっていると述べている。このほかにも、ゲルビーズの粒径を小さくしたり、酸素溶解度の高い物質を固定化細胞への酸素運搬体として用いるなどの試みが行われている。しかし、いずれの方法を用いても、固定化細胞への酸素供給は依然として不十分であり、まして経済的な問題を考慮するまでには至っていない。

好氣的発酵生産においては、固定化細胞への酸素供給不足の問題が指摘される一方で、Hartmeierら²⁴⁾は固定化細胞の新たな利用法を提案している。彼らは生細胞と酵素を同一ゲルビーズ内に包括固定化して、生細胞と酵素による反応の2段階から成る連続反応を1つの反応槽で同時に行える固定化生体触媒の開発に成功している。例えば、酵母と β -グルコシダーゼをアルギン酸カルシウムゲルで同時に包括した系を用いて、セロビオースから直接エタノールを生産することに成功している。さらに、2つの触媒の組み合わせとして生細胞と生細胞、酵素と酵素、死細胞と生細胞というように多数考えられ、種々の発酵生産に応用可能であると述べている。しかし、Leeら²⁵⁾や Damronglerdら²⁶⁾の研究に代表されるように、報告されている研究の多くは生細胞と酵素を組み合わせたものであり、生細胞と生細胞の組み合わせに関する報告は1、2例を見るにすぎず、しかも、良好な結果が得られていないのが現状である。

本研究では、ゲルビーズ内への酸素供給不足が問題とならずに、2種の生細胞の同時固定化培養を効率良く行える新しい混合培養システムの開発とその利用について検討することにした。はじめに、固定化担体として一般に用いられている

アルギン酸カルシウムゲル内における酸素の拡散移動に関する基礎的検討を行った。生細胞を含むゲルビーズ内の酸素の有効拡散係数 (D_e) を測定し、水中における酸素の D_e と比較することにより、ゲルビーズ内への酸素供給不足の直接の原因がゲルにおける酸素の物質移動抵抗ではないことを明らかにした。さらに、求めた D_e を用いて、酸素供給不足がどの程度のものなのかを定量的に検討した。その結果、通常の酸素供給条件ではもちろん、空気に純酸素を混合した高い酸素供給条件においてさえも、生細胞を含むゲルビーズ全体に十分な酸素供給を行うことは難しく、ゲルビーズ内に酸素の存在しない嫌氣的な部分が必然的に生じてしまうことが明らかとなった。これらの知見をふまえ、ゲルビーズ内への酸素供給を改善するよりは、ゲルビーズ内の嫌氣的な部分をそのまま嫌氣的に利用した方がよいであろうという考えに至った。そのような考えに基づいて検討した末、同時固定化する2種類の生細胞として酸素要求性の異なる2菌株（好気性菌と嫌気性菌）を取り上げ、ゲルビーズ表層の好氣的な部分には好気性菌を、ゲルビーズ内部の嫌氣的な部分には嫌気性菌を自然にすみ分けさせた新しい混合培養システムの開発を試みた。さらに、開発した新培養システムが有する好氣的代謝と嫌氣的代謝を同時に利用することの発酵生産上の有効性を明らかにするとともに、そのシステムの応用性についても論じた。

第 2 章 既往の研究

本研究は、1) ゲル包括法による固定化細胞の問題点、2) 固定化ゲル内の物質移動、3) 混合培養および2つの触媒作用を持つ固定化生体触媒の開発、に関する既往の知見を踏まえて遂行されたものである。本章では、これらに関する代表的な既往の研究を述べ、本研究の意義を明らかにすることを目的とした。

2-1 ゲル包括法による固定化細胞の問題点

ゲルにより包括された固定化細胞は、発酵生産を効率化するための有力な手段であり、包括法による固定化細胞に関連する報告は数多くなされている。しかし、一方では、栄養源物質や酸素の移動がゲルによって妨げられると考えられており、それによって固定化細胞の総括反応速度が制限を受けるといわれている。特に、固定化好気性細胞では、固定化ゲルビーズ内への酸素供給が不足し、期待通りの生産性が得られないことが問題となっている。

ゲル内の固定化細胞の酸素消費に対して酸素供給が不足する原因として、

1) ゲルの物質移動抵抗 および 2) 液中への酸素の溶解度が小さいことによる低い供給酸素濃度のいずれか一方、またはそれらの両方が考えられる。ここで、ゲルの物質移動抵抗とは、ゲルの網目構造（ゲルの細孔径）、ゲルの親水性度・疎水性度、ゲルのイオンの性質などのゲルの性質が、移動物質に対して単独もしくは複合的に影響を及ぼすことにより、ゲル内の物質の拡散移動が液中のそれよりも低下することを意味するものと定義する。すなわち、ゲル内における物質の有効拡散係数が液中における物質の有効拡散係数よりも小さい場合、ゲルの物質移動抵抗が生じていることになる。

これまでにも、固定化細胞の反応効率が、酸素の供給不足によって低下したという報告が多くなされているが、その原因についての検討はいまだ十分になされ

ていない。また、ゲルの物質移動抵抗という言葉も、その定義を明確にすることなく用いられているのが現状である。 Wadaら¹⁾は、 κ -カラギーナンで包括した *Serratia marcescens* が、固定化しない細胞に比べ酸素不足に陥り易く、呼吸活性および L-イソロイシンの生産活性が低下すると述べており、その理由はゲルが酸素移動の抵抗になるためであろうと考察している。 またShinmyoら²⁾は、 κ -カラギーナンで固定化した *Bacillus amyloliquefaciens* による α -アミラーゼの生産について検討している。ゲル内の細胞数が最大に達したときでも、細胞が増殖したのはゲル内表層部の $50\mu\text{m}$ の範囲であったこと、固定化細胞の比呼吸活性は固定化していない細胞の1/2、増殖速度はその1/5 から1/10 にそれぞれ低下したことを認め、それらの原因は、ゲル内に包括されている細胞への酸素移動がゲルによって妨げられたためであろうと考察している。 El-Sayedら³⁾は、アルギン酸カルシウムゲルで固定化した *Penicillium chrysogenum* によるペニシリン発酵を検討している。ペニシリンの生産は主にゲルビーズ表層に発達した菌糸によって行われ、ゲルビーズ中心部に包括された小菌糸塊による生産は微量であり、小菌糸塊は最終的に自己分解により消失したと述べている。その自己分解が生じた原因は、ゲルビーズ中心部への酸素供給不足であろうと考察している。 さらに Gosmannら⁴⁾は、アルギン酸カルシウムゲルで包括した *Pseudomonas putida*, *Saccharomyces cerevisiae*, および *Aspergillus awamori* の固定化細胞の比酸素消費速度について検討している。彼らは、固定化細胞の比酸素消費速度は、ゲルビーズ内の細胞数が増加するのに伴って低下したと述べている。その原因は、ゲル内の細胞濃度が増加すると、ゲル内の酸素の拡散移動速度よりも細胞による酸素消費速度が上回るため、ゲル中心部近くに存在する細胞への酸素供給が不足し、細胞が失活してしまうためであろうと考察している。しかし、これらの考察は、定性的な検討や、ゲルビーズ内の細胞分布の観察結果に基づくものであり、酸素供給不足の原因の定量的な検討は行われていない。した

がって、酸素供給不足の原因がゲルにおける酸素の物質移動抵抗にあるのか、液中における酸素の低溶解度にあるのか、またはそれらの両方にあるのかは明確にされていないのが現状であり、ゲルにおける酸素移動についての基礎的検討が必要である。

一方、ゲル内に固定化されている細胞の酸素要求を満たすために、ゲル内への酸素供給法を改善するための方法がいくつか提案されている⁵⁻⁹⁾。最も一般的な方法は、高圧をかけたり、純酸素を利用して液中の溶存酸素濃度を高めるといふものである。Fujimura ら⁵⁾はκ-カラギーナンに固定化した Serratia marcescens の増殖菌体を用いた L-アルギニンの生産で、空気の代わりに酸素富化ガスを供給することによってゲル内細胞濃度を 5 倍に、L-アルギニンの生産性を 4 倍に改善できることを明らかにした。また Osuga ら⁶⁾は、κ-カラギーナンに固定化した Acetobacter aceti を用いた流動層型バイオリアクターで酢酸発酵を行い、純酸素ガスを供給して溶存酸素濃度の飽和値を 38ppm に高めることによって菌体量および酢酸生成量を増大させ、空気を供給した場合のおよそ 4 倍 (40.1 mg/ml-gel·h) の酢酸の生産を可能にした。しかしながら、高価な純酸素を供給した場合でも、好気性菌が生育できるのはゲルビーズ表層部に限られ、ゲルビーズ内部の大部分は依然として嫌気的な状態であったことから、溶存酸素濃度を高めるだけでは、固定化細胞への酸素供給の改善は十分でないと思われる。

これに対し、酸素の発生源を添加することにより、間接的に固定化ゲル内への酸素供給を高めるという発想からの研究例もいくつかみられる。Adlercreutz ら⁷⁾は、Gluconobacter oxydans と光合成を行い酸素を発生する藻類、Chorella pyrenoidosa を同時にアルギン酸カルシウムゲルで固定化し、光照射下でグリセロールからジヒドロキシアセトンの転換反応を行い、G. oxydansのみを固定化した時のおよそ 9 倍の生産性が得られたと述べている。Holst ら⁸⁾は過酸化水素を酸素供給源に利用して、アルギン酸カルシウムに固定化した G. oxydans へ

の酸素供給の改善を試みている。充填塔型バイオリアクターを用いた連続生産で、過酸化水素を利用することによりリアクター当たりの生産性を 20 倍に高めることができたと報告している。また Adlercreutzら⁹⁾は酸素溶解度の高い過フッ化化合物を液中に添加することによって、同様に固定化した *G. oxydans* への酸素供給を改善している。しかし、これらの酸素供給法は、いまだモデルケースの段階にあり、応用範囲は極めて限られ実用性に乏しい。実用的な固定化細胞への酸素供給法を開発するためには、実際にどの程度の酸素供給を行えば固定化細胞の酸素供給を十分に満たせるのかを計数的に予測した上で、効率的な酸素供給法を考える必要がある。

2-2 固定化ゲル内の物質移動

ゲル包括法による固定化細胞は、ゲルが物質移動障害になると考えられており、それによって反応速度が制限を受けることが問題となっている。反応速度に及ぼすゲル内の物質移動の影響を論じるには、ゲル内物質移動に関する基礎的知見が重要であり、近年、主要な基質のゲル内での拡散移動に関する研究が多数報告されている。

Todaら¹⁰⁾は寒天ゲル中のサッカロースの有効拡散係数を測定した。寒天ゲルを円柱状に成形し、サッカロース溶液と寒天円柱の一端との界面からサッカロースが浸透する過程を実験的に測定し、有効拡散係数を $6.7 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$ (47.5℃) と決定した。この値は、寒天ゲル中でのサッカロースの拡散移動が、水中のそれのおよそ 70% に相当することを示している。これより、寒天ゲルが物質移動抵抗になることが推察される。Tanakaら¹¹⁾はアルギン酸カルシウムゲルビーズ中の、グルコースとタンパク質の拡散移動を非定常法で測定している。完全混合が与えられている回分式の測定容器にゲルビーズを投入し、ゲルビーズ外部の液中の物質の濃度変化を測定して有効拡散係数を決定した。その結果、分子量

が30万のタンパク質でもゲル内を移動できること、グルコースのゲル内での拡散移動は水中のそれとほぼ等しく、有効拡散係数は $6.8 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$ (30℃)であることを明らかにしている。Marchantら¹³⁾もまた、アルギン酸カルシウムゲル内のグルコースの有効拡散係数を測定している。彼らは、放射性同位体を標識とした非定常法を用い、グルコースの有効拡散係数が $6.62 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$ (30℃)であることを明らかにしている。Tanakaら および Marchantらの測定値はほぼ一致しており、これらの結果よりアルギン酸カルシウムゲルは、グルコースの移動抵抗にならないことが示唆された。また、Nguyenら¹²⁾はκ-カラギーナンについて Tanakaらと同様の検討を行い、グルコースの有効拡散係数が $4.8 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$ (30℃)であり、水中のそれのおよそ 70% であることを報告している。以上の研究のように、細胞を含まないゲルを用いての有効拡散係数の測定では、妥当性の高い測定値が得られており、研究者らの見解も概ね一致している。しかし、細胞を含むゲルを用いての検討では一致した見解は得られておらず、とりわけ有効拡散係数に及ぼすゲル内細胞濃度の影響に関する結果は、研究者によってかなり異なっている。

Furusakiら¹⁵⁾は Saccharomyces cerevisiae の生細胞を含むアルギン酸カルシウムゲルビーズにおいて、酵母が資化しないキシロースの有効拡散係数を非定常法で測定し、拡散移動に及ぼすゲル濃度および細胞濃度の影響を検討している。キシロースの拡散移動はゲル濃度に影響されず、細胞を含まないゲルにおけるキシロースの有効拡散係数は $6.4 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$ であることを明らかにした。また、ゲル内細胞濃度が高まるにつれてその値は低くなり、200 g/L-gel の細胞が存在するときには、キシロースの拡散移動が 50% に低下すると述べている。Furuiら¹⁴⁾は失活させた細胞を包括したポリアクリルアミドとκ-カラギーナンで2つの小室に仕切った測定容器を用い、定常状態において有機酸やアミノ酸のゲル内の有効拡散係数を測定した。その結果、これらの有効拡散係数が溶質の濃

度、ゲルの濃度、ゲル内の細胞濃度、および温度によって影響されると述べている。Furusakiらと Furuiらの見解は、ゲル内の物質の拡散移動が細胞の存在によって低下するという点では一致している。これに対し Hannounら¹⁶⁾は、失活した Saccharomyces cerevisiae を含むアルギン酸ゲルにおいて、グルコースの拡散移動に及ぼすゲル内細胞濃度の影響を検討した結果、グルコースの拡散は細胞濃度を 200g-cell/L-gel に高めても影響を受けず、有効拡散係数は $6.1 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$ で一定であったと述べている。また Satoら¹⁸⁾は、失活させた Candida lipolytica を固定化したアガーゲルプレート内の酸素の有効拡散係数を定常法で求めている。固定化する細胞濃度を 8.3 g-cell/L-gel まで変化させたが、細胞濃度の影響はみられず、有効拡散係数は $1.9 \times 10^{-9} \text{m}^2/\text{s}$ で一定であり、水中での酸素の拡散係数の 70% であったと述べている。これらの結果は Furuiら および Furusakiらの結果と大きく異なっている。さらに Hiemstraら¹⁷⁾は、有効拡散係数がゲル内の細胞濃度に影響されないことを前提として、アルギン酸バリウムゲル内の酸素の有効拡散係数を求め、その値が水中での値の 25% であることを報告している。以上のように有効拡散係数に及ぼすゲル内細胞濃度の影響に関する報告は、研究者によってかなり異なっているため有効拡散係数の測定法の妥当性について再検討が必要であろう。また、これまでに報告された有効拡散係数のほとんどは、細胞を含まないゲルか、死細胞を包括したゲルを用いて測定したものが大部分であるので、これらの有効拡散係数は、生細胞を含むゲルビーズ内の物質移動を必ずしも反映していないと思われる。したがって、培養中の固定化細胞への物質移動を論じるには、実際の培養条件に近い測定条件で、すなわち生細胞がゲル内に含まれている条件で、有効拡散係数を求めるべきであろう。

2-3 混合培養および2つの触媒作用を持つ固定化生体触媒の開発

デンプンやセルロース等の高分子基質を、はじめにグルコースのような多くの

微生物にとって利用しやすい形に分解して、次にエタノール、乳酸などの目的生産物をつくるというような2段階反応を1つの反応槽で同時に行わせる発酵法の研究は、これまでも多数報告されている。古くは日本酒の醸造の際に行われる並行複発酵に代表される混合培養であるが、近年では遺伝子操作や細胞融合によって細胞そのものに新しい能力を付加したり、複数の触媒作用を持つ固定化生体触媒の開発などが試みられている。

Dostàlekら¹⁹⁾は、アミラーゼを生産する好気性の酵母 (Saccharomycopsis fibuliger) とエタノールを生産する嫌気性の細菌 (Zymomonas mobilis) の混合培養を行い、デンプンからのエタノール生産を試みた。彼らは2つの培養細胞のグルコースに対する競争関係を、酸素移動速度 (OTR) によって制御した。すなわち、培養の前半は OTR を高めてデンプンの糖化に適する好氣的培養条件に、後半は OTR を低くしてアルコール発酵に適する嫌氣的培養条件に設定し、30g/L のデンプンから 9.7 g/L のエタノールを生産することができたと報告している。また、Häggströmら²⁰⁾は同様の混合培養を好気性の酵母 (S. fibuliger) と嫌気性の乳酸菌 (Streptococcus lactis) についても行い、2つの培養細胞の挙動に与える酸素供給の影響を明らかにし、デンプンから乳酸をはじめとする有機酸が若干量生産されたことを報告している。Abouziedら²¹⁾は Aspergillus niger と Saccharomyces cerevisiae の混合培養を行い、ジャガイモのデンプンから直接エタノールを生産している。混合培養した2菌株が協調的に働いた結果、アミラーゼ活性、デンプンの利用効率およびエタノール収率は、Asp. niger を単一培養した場合に比べて3~4倍に高められたと述べている。

以上のような混合培養に対して伊藤ら²²⁾は、デンプンを発酵できない酵母の Saccharomyces cerevisiae に別の酵母 Saccharomyces diasticus のグルコアミラーゼ遺伝子を導入し育種した S. cerevisiae によって、デンプンから直接エタノールを生産させる試みを行っている。また井上ら²³⁾は、Saccharomycopsis

fibuliger のアミラーゼ生産能をプロトプラスト融合によって、Saccharomyces cerevisiae に導入することを試みている。これらの遺伝子操作や細胞融合は、1つの細胞に2つの細胞の役割を担わせようとするものであるが、いずれの方法も操作が手軽に行えないこと、導入した形質が不安定であるなどの問題を抱えており、いまだその問題は解決されていない。

遺伝子操作や細胞融合は、細胞そのものに新しい機能を付け加えるものであるが、Hartmeierら²⁴⁾は細胞そのものではなく、細胞を包括している固定化担体にもう一つの機能を付加することを試み、2つの触媒作用を持つ固定化生体触媒を開発した。彼らは Saccharomyces cerevisiae とラクターゼ (β -ガラクトシダーゼ) を同時にアルギン酸カルシウムゲルで包括した固定化生体触媒を用いて、ラクトースからのエタノール生産を行っている。同様に S. cerevisiae とセロビアーゼ (β -グルコシダーゼ) を同時固定化して、セロビオースからのエタノール生産も行っている。このとき、セロビアーゼの作用でセロビオースから生じたグルコースは、すみやかに酵母によってエタノールに転換されるためにグルコースの蓄積は起こらず、グルコースによるセロビアーゼ阻害が除かれるという利点があると述べている。また Leeら²⁵⁾は、concanavalin A - Sepharose に固定化した β -グルコシダーゼをさらに Zymomonas mobilis と共にアルギン酸カルシウムゲルで同時包括し、セロビオースから直接エタノールを生産している。さらに Damronglerdら²⁶⁾は、S. cerevisiae とグルコアミラーゼを同時固定化してデンプンからのエタノール生産を試み、酵母と酵素を別々に固定化したときに得られた生産性のおよそ 2.5 倍 (9.0 g-ethanol/L·h) が、同時固定化によって達成されたと述べている。

以上に述べた2つの触媒作用を持つ固定化生体触媒に関する報告では、生体触媒として生細胞と酵素が取り上げられているが、この他にも、生細胞と生細胞、死細胞と生細胞、酵素と酵素など種々の組み合わせが考えられる。しかし、報告

されているものの多くは生細胞と酵素の組み合わせであり、特に生細胞と生細胞を組み合わせた例は少ない。Martinら²⁷⁾は、Gluconobacter melanogenus と Pseudomonas syringae の生細胞を同時にポリアクリルアミドゲルで包括した混合固定化菌体を用いて、L-sorbose が L-sorbosone をへて 2-keto-L-gulonic acid になる転換反応を行った。しかし、それぞれの転換反応に関与する酵素の最適温度が異なるので、2つの菌を別々に固定化して別々の反応槽で培養したほうが、生産性が高かったと述べている。このように生細胞は種類によって最適な温度、pH、酸素要求性、栄養要求性等が異なるので、2種の生細胞を同一ゲル内に包括固定化して良好な生産性を上げることは難しく、これまでの研究で成功した例はみあたらない。

第 3 章 好気性細胞を固定化したゲルビーズ内への酸素供給の 定量的検討

3-1 序

ゲル包括法による固定化好気性細胞では、ゲルビーズ中心付近に存在する細胞への酸素供給が不足し、期待通りの生産性が得られないという問題が生じている。ゲルビーズ内に存在する細胞への酸素供給が不足することは、これまで、定性的検討やゲルビーズ内の細胞分布を観察することによって明らかにされてきたが、酸素供給不足の程度を定量的に明らかにしている研究は少ない。また、ゲルビーズ内への酸素供給が不足する主な原因が、ゲルにおける酸素の物質移動抵抗なのか、酸素の液中への溶解度が低いためであるのかは、十分に検討されていないのが現状である。

本章では、混合培養システムの開発に関する検討を行うのに先だち、酸素が供給不足になる原因と、酸素の供給不足の程度を定量的に把握することを目的として、生細胞を含有するゲルビーズ内の酸素の有効拡散係数 (D_e) を測定し、ゲルビーズ内の酸素移動に関する基礎的検討を行った。

3-2 実験材料および方法

使用菌株と種菌培養：Saccharomyces cerevisiae IF0 0309 は Y-M 寒天培地で保存培養を行い、4 °C で冷蔵保存した。保存期間は2か月以内とし、順次継代した。細胞増殖は、3% glucose, 0.8% yeast extract, 0.8% KH_2PO_4 , 0.4% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の組成の増殖培地 (pH 5.5) で行った。Pseudomonas ovalis sp. は肉汁寒天培地で保存培養を行い、上記と同様に保存した。これを 1% beef extract, 1% peptone, 0.5% NaCl を含む肉汁培地 (pH 7.2) に接種し、

細胞を増殖させた。いずれも、培養液 100ml の坂口フラスコを用い、30 °C で 16 時間の往復振盪培養を行った。Aspergillus awamori Nakazawa IFO 4033 は、ポテトデキストロース寒天培地で 30 °C, 5 日間培養し、胞子を形成させ、胞子懸濁液として実験に供した。

固定化法：3種類の微生物細胞、S. cerevisiae, P. ovalis, Asp. awamori、をアルギン酸カルシウムゲルビーズに固定化した。アルギン酸ナトリウム（和光純薬）の 2.5% 溶液をオートクレーブで殺菌（121 °C, 10 min）した。アルギン酸溶液中に懸濁細胞を混ぜ、この混液をマイクロピペットのチップ（1 mm I.D.）から 0.1 M の CaCl₂ 溶液中に滴下してゲルビーズを作った。Aspergillus awamori の菌糸はゲルビーズ中に均一に分散させるのが難しいので、胞子の形で固定化した。形成されたゲルビーズの直径は 3 mm で、アルギン酸の濃度は 2% である。

固定化細胞の培養装置：Asp. awamori の胞子を固定化したアルギン酸カルシウムゲル（胞子濃度 1.25×10^9 spores/L-gel）400 g を仕込み量 2 L のジャーフェンター（MB-C type, Iwashiyama, Bio-science, Co.,Ltd.）で培養した。装置の概略を Fig. 3-1 に示す。このフェンターは、Tanakaら^{28, 29}）によって剪断応力に弱い細胞の培養用に開発された変形パドル型攪拌翼、および 3 枚の小型邪魔板を装着している。用いた培地の組成は、2% glucose, 0.5% peptone, 0.2% yeast extract, 0.1% MgSO₄·7H₂O, 0.1% KH₂PO₄, 0.001% FeSO₄·7H₂O, 0.2% CaCl₂·2H₂O である。pH は pH controller (Marubishi, Co.,Ltd.) によって随時 0.5 M の NaOH 溶液を加えて、5.0 に維持した。攪拌速度は 260rpm とした。胞子の発芽前は 0.5 vvm の通気速度で空気を供給したが、発芽後は DO controller (Able, Co.,Ltd.) に連動した流量制御弁を通じて純酸素を供給し、溶存酸素濃度を 0.218 mmol/L (7 ppm) に維持した。

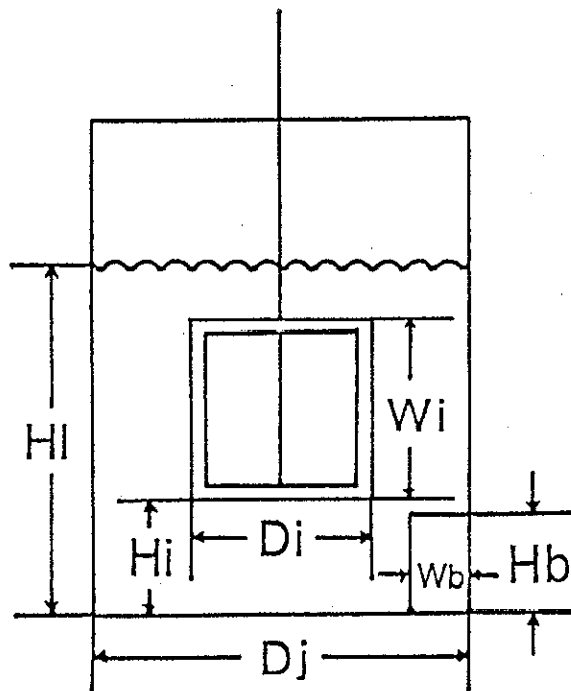


Fig. 3-1. Diagram of jar fermentor: D_t , diameter of jar fermentor (130 mm); D_i , diameter of impeller (70 mm); W_i , width of impeller (70 mm); H_L , depth of liquid (150 mm); H_i , distance of impeller from bottom of jar fermentor (30 mm); H_b , height of baffle plate (30 mm); W_b , width of baffle plate (15 mm).

細胞量の測定：アルギン酸カルシウムゲルビーズ 500 個を 2% のクエン酸ナトリウム溶液 100 mL で溶解したのち、細胞を遠心分離した。分離した細胞は蒸留水で洗滌し、再び遠心分離した。洗滌-遠心分離の操作をもう一度繰り返し、細胞を 105 °C で 24 時間乾燥させた。デシケーター内で冷却の後、乾燥重量を測定した。今後、特にことわらないかぎり細胞重量は乾燥重量で表すものとする。

顕微鏡によるゲルビーズ内の観察：顕微鏡によるゲルビーズ切片の観察は、El-Sayed ら³⁾の方法に従って行った。カミソリの刃で、ゲルビーズから円盤状の薄片を切りだし、位相差顕微鏡で直接観察した。

酸素の有効拡散係数 (De) の測定：生細胞を含有するアルギン酸カルシウムゲル内の酸素の有効拡散係数 (De) は、補遺 (p.31) に示した理論に基づき決定した。De を求めるのに必要な各定数は、以下の方法で決定した。

[呼吸の動力学定数] 微生物細胞の最大比増殖速度 (Q_{O_2max}) とミカエリス定数 (K_m) を決定した。微生物細胞による酸素消費を、Fig. 3-2 に示す装置を回分反応槽として用い、測定した。測定容器の実容量は 130 mL で、全体を 30 °C に保持した。容器内の液はマグネチックスターラーで完全混合し、ゲル-液間および電極-液間の液境膜抵抗を小さくした。ここに細胞懸濁液を入れて、溶存酸素濃度の経時変化をレコーダーで記録した。

細胞による酸素消費速度は、細胞濃度を X とおくと次式で表される。

$$-\frac{dC}{dt} = \frac{V_m C}{K_m + C} \quad (1)$$

初期条件： $t=0$ において $C=C_0$ 。

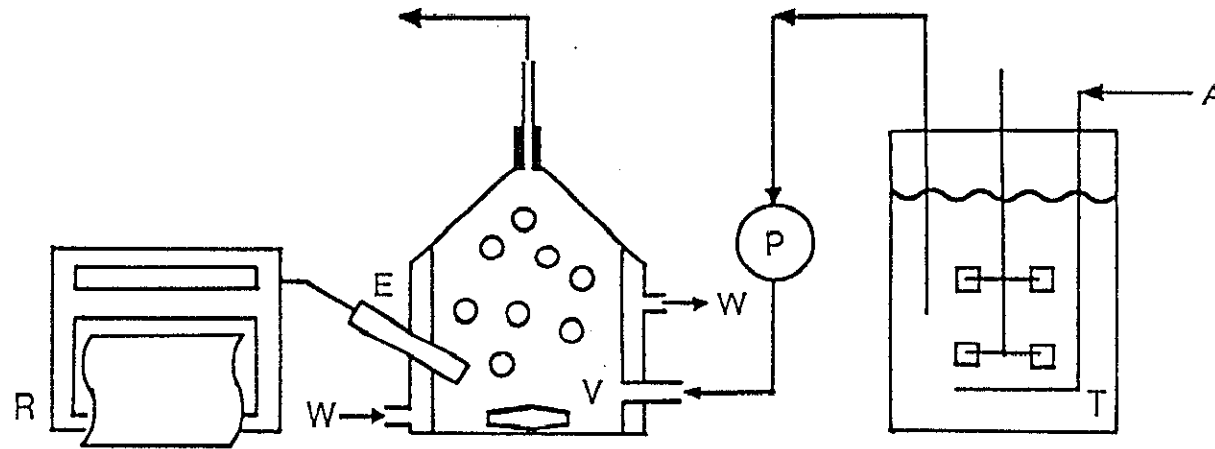


Fig. 3-2. Experimental set-up for measuring effectiveness factor:
T, feed tank; P, peristaltic pump; V, vessel; E, DO electrode;
R, recorder; W, water; A, air.

ここで V_m は最大呼吸速度を表し、 $V_m = Q_{O_2max} \cdot X$ で定義される。t は測定時間、C は時間 t における溶存酸素濃度、 C_0 は初めの溶存酸素濃度、 K_m はミカエリス定数を表す。 V_m はチャート用紙に記録された溶存酸素濃度変化の、初期の直線部分の傾きから決定した。 Q_{O_2max} は V_m の定義から求めた。(1) 式を V_m 一定のもとで積分すると、(2) 式が得られる。

$$\ln(C_0/C) = \frac{1}{K_m} [V_m t - (C_0 - C)] \quad (2)$$

K_m は $\ln(C_0/C)$ 対 $[V_m t - (C_0 - C)]$ のプロットで得られる直線の傾きから決定できる。

[有効係数] Fig. 3-2 に示した装置を連続反応槽として用い、有効係数 (η) を測定した。生細胞を含む 500個のゲルビーズを測定容器に入れ、酸素飽和した培地を一定流速 (16 - 18 mL/min) で供給した。ゲル内の細胞濃度を 3 から 30 g/L-gel の範囲で変化させて、それぞれの場合の有効係数を測定した。測定に用いた培地の組成は、酸素以外の成分が細胞の呼吸速度を律速することのないよう、炭素源や窒素源を十分に与えたものとした。細胞が *S. cerevisiae* の時は、2% glucose, 0.5% peptone, 0.2% yeast extract, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% KH_2PO_4 , 0.001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (pH 5.5) である。細胞が *P. ovalis* の時の培地組成は、1% beef extract, 1% peptone, 0.5% NaCl (pH 7.2) である。測定容器内の溶存酸素濃度の変化を、定常状態が得られるまで記録した。培地を流し始めてから 15 分から 20 分で定常状態が得られ、溶存酸素濃度は一定となった。すみやかに定常状態が得られるので、測定中のゲルビーズ内の細胞増殖は無視できるものとした。

有効係数は、ゲルビーズ全体の最大酸素消費速度とゲルビーズ表面からの酸素吸収速度の比として (3) 式で定義できる。

$$\eta = \frac{4\pi R^2 De (dC_A/dr)_R}{\frac{4}{3}\pi R^3 \frac{V_m C_{As}}{K_m + C_{As}}} \quad (3)$$

ここで De は酸素の有効拡散係数、 C_A はゲルビーズ内の酸素濃度、 C_{As} はゲルビーズ表面における酸素濃度、 R はゲルビーズ半径、 r は半径距離、 V_m は最大呼吸速度、そして K_m はミカエリス定数である。

固定化細胞によるゲルビーズ表面からの酸素の取り込み速度は、以下の仮定のもとで、(4) 式のように表される。

- 1) 液とゲルビーズ表面間の酸素の分配係数は 1.0 である。
- 2) 液とゲルビーズ表面の間に境膜抵抗が存在しない。

$$4\pi R^2 n De (dC_A/dr)_R = F(C_{Al}^* - C_{AL}) \quad (4)$$

ここで F は培地の供給速度、 C_{Al}^* は測定容器入り口での溶存酸素濃度、 C_{AL} は定常状態における溶存酸素濃度、 n はゲルビーズの数である。ゆえに (3) 式は、(5) 式のように書き換えられる。

$$\eta = \frac{F(C_{Al}^* - C_{AL})}{\frac{4}{3}\pi R^3 n \frac{V_m C_{AL}}{K_m + C_{AL}}} \quad (5)$$

したがって、各測定値を (5) 式に代入することによって、有効係数 η を求めることができる。ただし、ゲル-液間の酸素の分配係数が 1.0 であるので、(5) 式において、 $C_{AL} = C_{As}$ である。

また、有効係数 η は、酸素の拡散移動速度と細胞による酸素消費速度の比として定義される無次元数 ϕ [$\equiv (V_m \cdot R^2 / De \cdot K_m)^{1/2}$] との間に、曲線で表される相関関係を持つことが知られている。したがって、 η が明らかにされればそれに対応する ϕ を相関曲線から求めることができ、さらに ϕ の定義から有効拡散係数 (De) を決定することができる。

3-3 実験結果および考察

3-3-1 アルギン酸ゲルビーズ内の酸素の拡散移動

生細胞を含有するゲルビーズ内の酸素の有効拡散係数 (D_e) を求めるに当たり、本章で用いる微生物細胞の呼吸に関する動力学定数 (Q_{O_2max}, K_m) を実験的に決定した。その結果は、Table 1 に示した通りである。

有効係数 (η) を測定する際に得られる定常状態の溶存酸素濃度 (C_{AL}) と先に決定した Q_{O_2max}, K_m を用いて、ある値の C_{AL} および K_m において、 η と ϕ の関係を求めた。いくつかの計算例を Fig. 3-3 に示す。この関係曲線から、(5) 式で与えられた η に対応する ϕ を読み取ることができる。 ϕ に含まれる定数 V_m, K_m , および R は既知であるので、 ϕ から有効拡散係数 D_e を求めることができる。

Table 2 に有効係数の測定値と有効拡散係数の計算値をまとめて示す。また Fig. 3-4 には有効拡散係数に及ぼすゲル内細胞濃度と細胞の種類の影響を示す。Fig. 3-4 から、酸素の拡散移動は細胞濃度 (0 ~ 30 g/L) や細胞の種類に影響されないことが明らかになった。*S. cerevisiae* と *P. ovalis* の生細胞を含むゲルビーズを用いて測定した酸素の有効拡散係数は、 $2.08 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ から $2.53 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ の範囲に分散し、その平均値は $2.35 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ であった。この値は、純水中での酸素の拡散係数 ($2.56 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$)³⁰⁾ のおよそ 92% に相当するが、液中に塩や糖が溶け込むと、拡散係数が小さくなることが知られている。Ju と Ho^{31, 32)} は、培地成分として用いられている塩類や糖類が、液中の拡散係数をどれ程低下させるのかを検討している。彼らの結果を参考にして、ここで用いた培地中の酸素の拡散係数を推定したところ、酸素の拡散係数は、純水中の 90% 前後に低下することがわかった。以上のことから、細胞濃度が 3% 程度までの生細胞を含むアルギン酸カルシウムゲル内の酸素の拡散移動

Table 3-1. Kinetic parameters of respiration.

Microorganisms	K_m [mmol/L]	Q_{O_2max} [mmol/g-cell·h]
<u>S. cerevisiae</u>	0.0048	3.5
<u>P. ovalis</u>	0.0190	13.3
<u>Asp. awamori</u>	0.0240	2.5

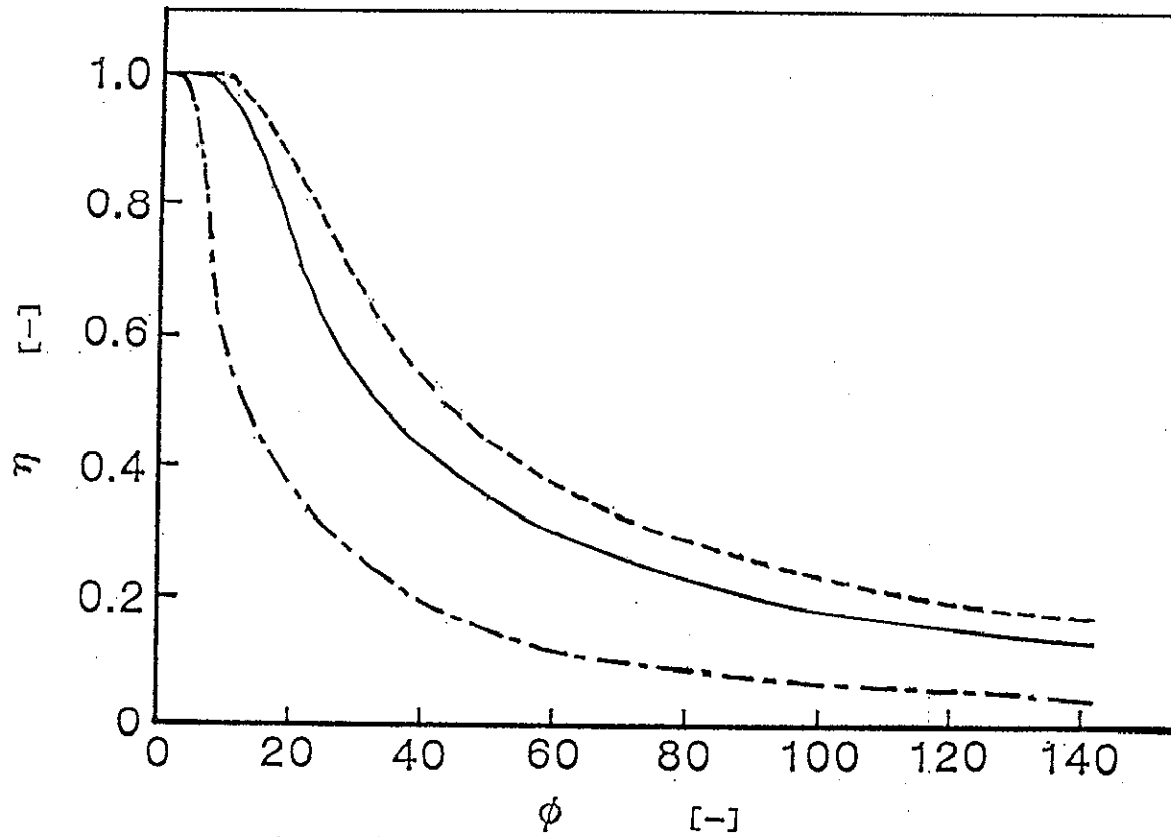


Fig. 3-3. Relationship between η and ϕ .

- $C_{AS} = 0.164$ mmol/L, $K_m = 0.0048$ mmol/L, S. cerevisiae.
- $C_{AS} = 0.107$ mmol/L, $K_m = 0.0048$ mmol/L, S. cerevisiae.
- · - · - $C_{AS} = 0.063$ mmol/L, $K_m = 0.0190$ mmol/L, P. ovalis.

Gel beads have a radius of 1.5 mm.

Table 3-2. Dependence of De on microorganisms and cell density entrapped in Ca-alginate gel bead.

Microorganisms	Cell density [g/L-gel]	C _{AL} [mmol/L]	η [-]	ϕ [-]	De [m ² /s x 10 ⁹]
	2.7	0.164*	0.77	23.5	2.22
	5.1	0.138	0.61	31.5	2.35
	14.4	0.107*	0.36	50.0	2.42
<u>S. cerevisiae</u>	18.4	0.093	0.32	53.0	2.44
	21.6	0.084	0.25	68.0	2.14
	27.4	0.078	0.24	68.5	2.44
	30.0	0.0775	0.20	77.8	2.08
	4.1	0.106	0.33	27.0	2.47
<u>P. ovalis</u>	9.0	0.075	0.20	40.5	2.39
	13.3	0.083*	0.155	48.0	2.53

* Calculation examples are shown in Fig. 3-4.

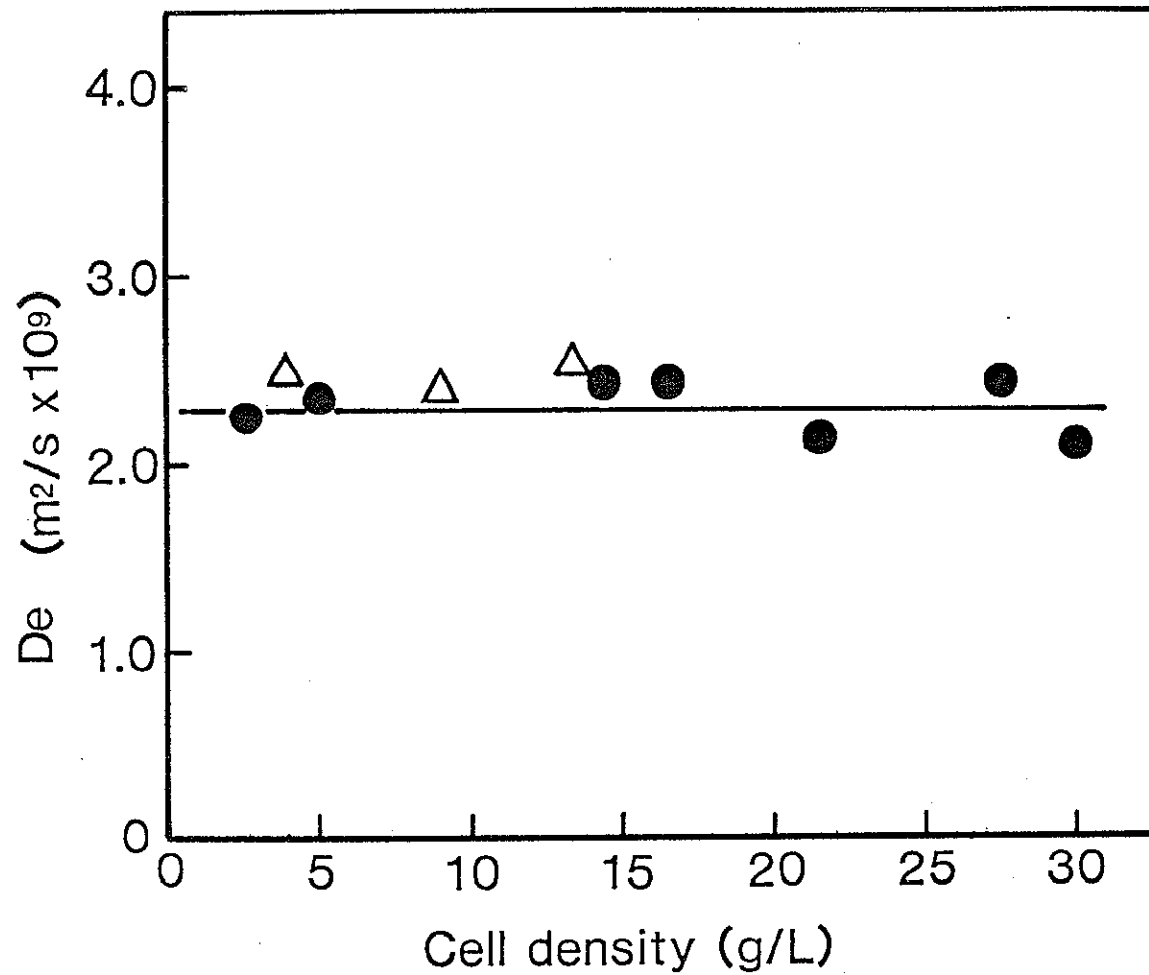


Fig. 3-4. Effect of cell density on De in Ca-alginate gel beads entrapping *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas ovalis*:
 ●, *S. cerevisiae* in Ca-alginate; Δ, *P. ovalis* in Ca-alginate;

は、ゲルビーズを取り巻く液中での酸素の拡散移動とほぼ同じであることがわかった。したがって、アルギン酸カルシウム(2%)のゲルマトリックスは酸素の物質移動抵抗とはならないと考えられる。

以上の結果より、固定化好気性細胞への酸素供給の不足は、ゲルビーズにおける酸素の物質移動抵抗が直接の原因ではなく、ゲルビーズ内での酸素移動が分子拡散のみに支配されているために、乱流拡散が生じる液中での酸素移動に比べて移動速度が遅くなること、および酸素の液中への溶解度が低いことなどが原因となって起こることが明らかになった。すなわち、これらの原因が複合的に影響するために、ゲルビーズ内での酸素移動速度が制限を受け、ゲルビーズ内に高密度に存在する細胞による酸素消費速度が酸素供給速度を上回るために酸素供給不足が起こると考えられる。したがって、固定化好気性細胞の培養において酸素が供給不足とならないようにするための方法としては、ゲルビーズ内の細胞濃度を低く抑えることによって酸素消費速度を小さく保つ、ゲルビーズの径を小さくする、液中の溶存酸素濃度を高めるなどが考えられるであろう。

3-3-2 ゲルビーズ内の細胞分布と酸素濃度分布

ここで得られた有効拡散係数 D_e を用いて、固定化 Asp. awamori ゲルビーズ内の酸素濃度分布を推算し、実際に培養して得られた固定化増殖細胞の細胞分布と比較した。

Asp. awamori を固定化したアルギン酸カルシウムゲルビーズを、酸素富化ガスを供給することによって、液中の酸素濃度を空気を供給した場合の飽和溶存酸素濃度に相当する 0.218 mmol/L (7 ppm) に維持しつつ培養した。グルコースが菌体増殖の制限因子にならない36時間後、ゲルビーズを培養槽から取り出し、細胞分布を顕微鏡で観察した。ゲル切片の顕微鏡写真を Fig. 3-5 に示す。写真から明らかのように、酸素を取り込み易いゲルビーズ表層に菌糸層が形成された。菌

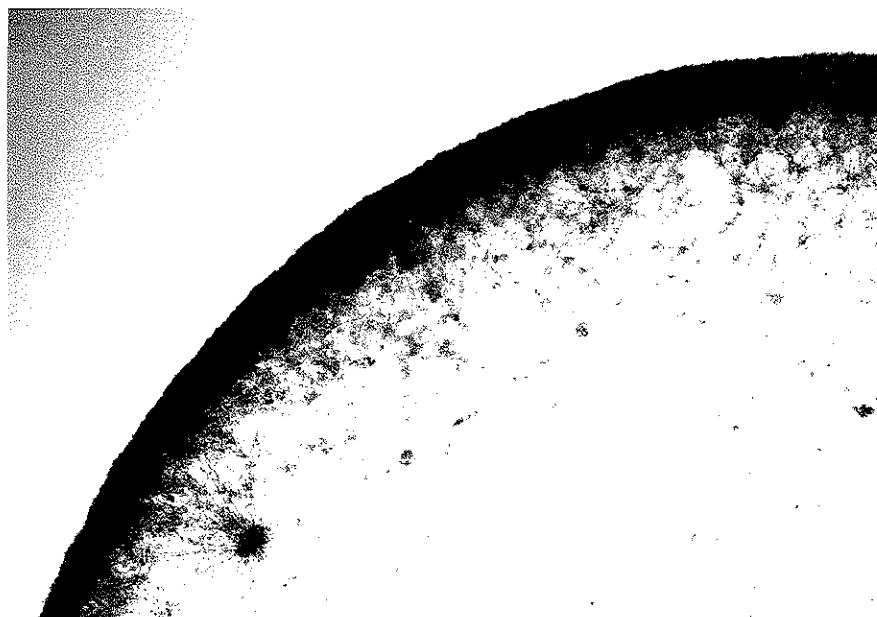


Fig. 3-5. Microphotograph of growing immobilized Aspergillus awamori after 36 hours incubation.

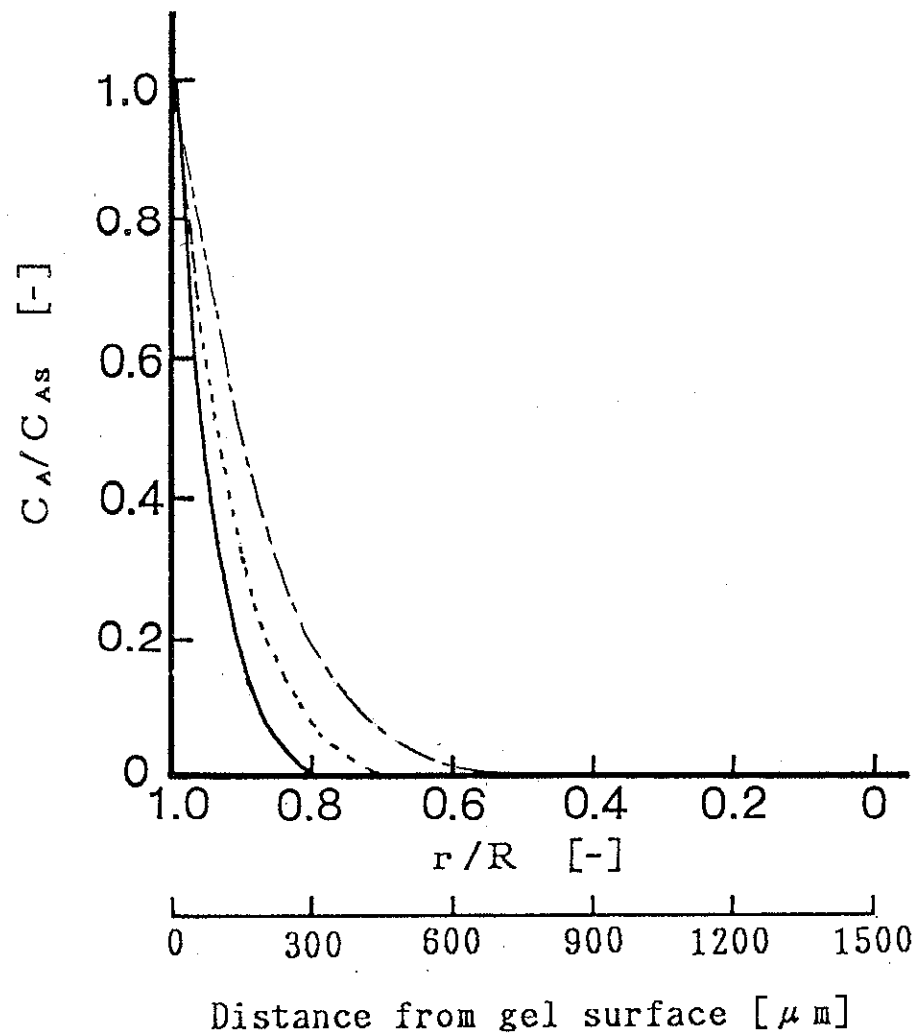


Fig. 3-6. Oxygen concentration profile in Ca-alginate gel bead entrapping *Aspergillus awamori*.

- : $C_{AL} = 0.218$ mmol/L (7 ppm)
- : $C_{AL} = 0.436$ mmol/L (14 ppm)
- - - - : $C_{AL} = 1.188$ mmol/L (38 ppm)

糸の生育範囲は、ゲルビーズ表面より $300\mu\text{m}$ 内側のところまでで、それより内側では、ほとんど菌糸の生育は認められなかった。またゲルビーズ表面から $150\mu\text{m}$ の範囲では、特に濃い菌糸層が形成された。ゲルを溶かして求めた細胞重量と写真観察から、濃い菌糸層部分の細胞濃度は約 44 g/L-gel と推定された。

ゲルビーズ内の酸素濃度分布を推算するために、ゲルビーズ内には細胞が 44 g/L-gel の濃度で均一に分散しているものと仮定した。計算に用いた De は、ここで測定された値の平均値 $2.35 \times 10^{-9}\text{ m}^2/\text{s}$ とした。ゲル内の細胞濃度が 3% 以上であるので、 De の値が $2.35 \times 10^{-9}\text{ m}^2/\text{s}$ より小さくなることも予測されるが、 44 g/L-gel 程度の細胞濃度が De に与える影響は小さいものと判断し、先に求めた De をそのまま採用した。ゲルビーズを取り巻く液中の溶存酸素濃度が、 0.218 mmol/L に保たれているときの酸素濃度分布の計算結果を Fig. 3-6 に示す。Fig. 3-6 より、酸素はゲルビーズの表面から $300\mu\text{m}$ 内側までしか到達しないことがわかった。これより、酸素が到達した相対距離はゲルビーズ半径のおよそ 20% であった。また、 0.0313 mmol/L (1.0 ppm) 以上の酸素濃度が維持されるのは、ゲル表面からの距離が $150\mu\text{m}$ のところまでであることがわかった。このときの固定化細胞の酸素呼吸に関する有効係数 (η) は、(3) 式より 0.33 と計算された。このことは、ゲルビーズ内に固定化されている細胞のうち 33% だけしか十分な酸素呼吸を行うことができないことを示している。これらの計算結果は、顕微鏡による観察とよく対応していた。

以上の結果より、溶存酸素濃度を、空気を供給した場合に得られる酸素の飽和溶存酸素濃度 (0.218 mmol/L) に維持して培養したとしても、酸素はゲルビーズ表層部に高密度 (44 g/L-gel) に存在する細胞によって消費されてしまい、ゲルビーズの中心付近は嫌気的な空間になってしまうことが明らかになった。また溶存酸素濃度を、空気を供給して得られる飽和溶存酸素濃度の 2 倍 (0.436 mmol/L , 14 ppm)、および純酸素を供給したときの飽和酸素濃度 (1.188 mmol/L , 38 ppm) に維

持した場合を仮定しても、酸素はゲルビーズ全体に十分に供給されるまでには至らず、ゲルビーズの中心付近は依然として嫌気的な状態であった。

3-4 第3章の結論

本章では、好気性細胞を固定化したゲルビーズ内への酸素供給が不足する原因と、酸素供給がどの程度不足するのかを定量的に明らかにするために、ゲルビーズ内の酸素移動に関する基礎的検討を行った。はじめに、生細胞を含有するゲルビーズ内の酸素の有効拡散係 (D_e) を測定し、アルギン酸カルシウムゲル内の D_e が、 $2.35 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ で、液中での値にほぼ等しいことがわかった。したがって、ゲルビーズ内への酸素供給不足は、ゲルにおける酸素の物質移動抵抗が直接の原因ではなく、ゲルビーズ内での酸素移動が分子拡散のみに支配されているために、乱流拡散が生じる液中での酸素移動に比べて移動速度が遅くなること、および酸素の液中への溶解度が低いことなどが原因となって起こることが明らかになった。すなわち、これらの原因が複合的に影響するために、ゲルビーズ内での酸素移動速度が制限を受け、ゲルビーズ内に高密度に存在する細胞による酸素消費速度が酸素供給速度を上回るために酸素供給不足が起こると考えられる。

次に、ここで求めた D_e を用い、ゲルビーズ内の酸素濃度分布を計算によって推定した。Asp. awamori の固定化菌体を、通常の酸素供給条件では得られないような高い溶存酸素濃度 ($0.218 \text{ mmol/L} = 7 \text{ ppm}$) 下で培養しても、酸素が到達できるのは、ゲルビーズの表面から $300 \mu\text{m}$ のところまでであることが明らかになった。細胞増殖は、酸素を取り込みやすいゲルビーズ表層部に限られ、酸素が到達しないゲルビーズの内部では菌の生育はほとんどみられず、有効利用されない空間になってしまうことが、定量的に確認された。また溶存酸素濃度を、純酸素を供給した場合の飽和溶存酸素濃度 ($1.188 \text{ mmol/L} = 38 \text{ ppm}$) に高めた場合でも、ゲルビーズの全体に十分な酸素供給を行うことはできず、ゲルビーズの中

心付近は依然として嫌気的な状態であった。このことから、単に液中の溶存酸素濃度を高めるだけでは、固定化好気性細胞への酸素供給不足の問題は解決されないことが示唆された。

補 遺

「ゲルビーズ内の酸素の拡散移動理論と酸素の有効拡散係数 (D_e) の決定法」

生細胞を含有するゲルビーズにおける酸素の有効拡散係数 (D_e) の決定は、以下に示した酸素の拡散移動理論に基づき、ここで新たに提案した方法を用いて行った。

解析を容易にするため、次の各条件を満たすような反応をとまなう拡散物質移動のモデルを想定した。

- 1) ゲルビーズは球形である。
- 2) 細胞はゲルビーズ内に均一に分布している。
- 3) 酸素だけが制限基質である。
- 4) 細胞による酸素消費はミカエリス-メンテン型である。
- 5) ゲルビーズ内の酸素の拡散は一様で、拡散速度は Fick の法則に従う。以上のようなモデルが仮定されるとき、ゲルビーズ中の酸素の物質収支式は定常状態において (1) 式のように表される。

$$D_e \left(\frac{d^2 C_A}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC_A}{dr} \right) - \frac{V_m C_A}{K_m + C_A} = 0 \quad (1)$$

境界条件: $r=0$ において $dC_A/dr=0$, $r=R$ において $C_A=C_{As}$

ここで D_e は酸素の有効拡散係数、 C_A はゲルビーズ内の酸素濃度、 C_{As} はゲルビーズ表面における酸素濃度、 R はゲルビーズ半径、 r は半径距離、 V_m は最大呼吸速度、そして K_m はミカエリス定数である。

無次元項、 $C^*=C_A/C_{As}$, $r^*=r/R$, および $\phi=(V_m R^2/D_e K_m)^{1/2}$ で (1) 式を無次元化すると、(2) 式が得られる。

$$\frac{d^2 C^*}{dr^{*2}} + \frac{2}{r^*} \frac{dC^*}{dr^*} - \phi^2 \frac{C^*}{1 + C^*(C_{As}/K_m)} = 0 \quad (2)$$

境界条件： $r^*=0$ において $dC^*/dr^*=0$ ， $r^*=1$ において $C^*=1$

また、有効係数 η を、固定化細胞の反応効率に及ぼすゲル内物質移動の影響を表すための指標として用いた。有効係数 η は、遊離細胞による酸素消費速度と固定化細胞の酸素消費速度との比で定義される。定義に従うと、酸素取り込みの有効係数 η は (3) 式で与えられ、その無次元化式は (4) 式で与えられる。よって η を得るためには、ゲルビーズ表面における酸素濃度勾配 $(dC^*/dr^*)_{r^*=1}$ を知らなければならない。

$$\eta = \frac{4\pi R^2 De (dC_A/dr)_R}{\frac{4}{3}\pi R^3 \frac{V_m C_{As}}{K_m + C_{As}}} \quad (3)$$

$$\eta = \frac{3 (dC^*/dr^*)_{r^*=1} [1 + (C_{As}/K_m)]}{\phi^2} \quad (4)$$

$(dC^*/dr^*)_{r^*=1}$ は、(2) 式を解いて求めることができる。数値積分を実行し易くするために、ゲルビーズ内の酸素濃度勾配 dC^*/dr^* を新変数 Z^* で置き換えて (2) 式を 1 階の連立常微分方程式に変形した。

$$\begin{cases} \frac{dZ^*}{dr^*} = -\frac{2}{r^*} Z^* + \phi^2 \frac{C^*}{1 + C^*(C_{As}/K_m)} \\ \frac{dC^*}{dr^*} = Z^* \end{cases} \quad (5)$$

境界条件： $r^*=0$ において $Z^*=0$ ， $r^*=1$ において $C^*=1$

Runge-kutta-Gill法を用いて (5) 式を数値積分すると、ゲルビーズ内の酸素濃度分布が求められる。

媒介変数 C_{As}/K_m および ϕ が与えられれば、有効係数 η は、(5) 式から得られたゲルビーズ表層における酸素濃度勾配、 $(dC^*/dr^*)_{r^*=1}$ を (4) 式に

代入して求めることができる。その結果、任意の C_{As}/K_m において、 η と ϕ の関係を得ることができる。もし、実験的に固定化細胞の η を測定できれば、

(4) 式と (5) 式から求めた η と ϕ 関係から、実験値の η に対応する ϕ を知ることができ、さらに ϕ の定義から De を決定できる。

記 号 一 覧

D_e	酸素の有効拡散係数 [m^2/s]
C_A	ゲルビーズ内の酸素濃度 [$mmol/L$]
C_{As}	ゲルビーズ表面における酸素濃度 [$mmol/L$]
C^*	無次元化した酸素濃度 ($\equiv C_A/C_{As}$) [-]
C_{AL}	定常状態における液中の酸素濃度 [$mmol/L$]
C_{AL}^*	供給液中の酸素濃度 [$mmol/L$]
R	ゲルビーズの半径 [mm or m]
r	半径距離 [mm or m]
r^*	無次元化した半径距離 ($\equiv r/R$) [-]
Z^*	酸素濃度勾配 ($=dC^*/dr^*$) [-]
Q_{O_2max}	最大比呼吸速度 [$mmol/g-cell \cdot h$ or $mmol/g-cell \cdot s$]
V_m	最大呼吸速度 [$mmol/L \cdot h$ or $mmol/L \cdot s$]
K_m	ミカエリス定数 [$mmol/L$]
F	液の供給速度 [L/s or L/h]
n	ゲルビーズの数
ϕ	シーレモジュラス { $\equiv (V_m \cdot R^2 / D_e \cdot K_m)^{1/2}$ } [-]
η	(3) 式で与えられる係数 [-]
t	測定時間 [s or h]
C	時間 t における溶存酸素濃度 [$mmol/L$]
C_0	初めの溶存酸素濃度 [$mmol/L$]
X	細胞濃度 [g/L or $g/L-gel$]

第 4 章 好気性菌(Aspergillus awamori)と嫌気性菌(Zymomonas mobilis) の混合固定化菌体によるデンプンからのエタノール生産

4-1 序

好気性菌の固定化培養では、ゲルビーズ内への酸素供給が反応速度の制限因子となるため、固定化細胞による好気性発酵の生産性は必ずしも十分なものとはいえない。好気性菌は酸素を取り込み易いゲルビーズ表層部に集中して生育し細胞層を形成するが、酸素が不足しがちなゲルビーズ中心部では、細胞の生育はほとんどみられないことが第3章で確認された。また、ゲルビーズ内の酸素移動に関する検討から、ゲルビーズ内に包括固定化した好気性細胞のすべてに十分な量の酸素を供給することは難しいことが明らかになった。そこでここでは、酸素が不足するゲルビーズ中心部への酸素供給を高めるのではなく、ゲルビーズの嫌気的な部分を嫌気性菌の生育の場として積極的に利用するという発想のもとに、同一ゲルビーズ内での好気性菌と嫌気性菌の混合培養を行った。すなわち、2菌株の酸素要求性の違いを利用し、増殖に酸素を必要とする好気性菌をゲルビーズ表層部に、増殖に酸素を必要としない嫌気性菌をゲルビーズ中心部にすみ分けさせることを試みた。ここではその一例として好気性のアミラーゼ生産菌でデンプンを分解する Aspergillus awamori と酸素によって増殖が阻害される嫌気性のエタノール生産菌でデンプン直接利用できない Z. mobilis (酸素によって増殖が阻害されるので本論文では偏性嫌気性菌として取り扱うものとする) を選択し、これらの混合固定系をつくり、そのシステムによってデンプンからエタノールの生産を行うことを試みた。

好気性の Asp. awamori と嫌気性の Z. mobilis を同一のアルギン酸カルシウムゲルビーズ中に混合固定化し、好气的条件下で培養するとゲルビーズ内の菌体は、酸素要求性の違いからFig. 4-1に示したモデルのように分布を示すものと

推測された。このモデルは Asp. awamori が酸素を取り込み易いゲルビーズ表層部に、Zymomonas mobilis が嫌氣的なゲルビーズ中心部に同時に生育し、かつデンプンから直接エタノールを生産することが可能であることを示唆するものである。ここでは今後、このモデルを混合固定系とよぶことにする。

もしこの混合固定系が理想的に機能するならば、系内の2菌株の相互作用は、Fig. 4-2 に示すように概略できると推測される。初めに Asp. awamori が生産する酵素の作用でデンプンが加水分解されてグルコースを生じる。生じたグルコースは Z. mobilis によってすみやかにエタノールに転換されるため、グルコースによるデンプンの加水分解阻害は除かれることになる。ただし、グルコースの一部は Asp. awamori にも利用されるので、Asp. awamori 菌体の過剰な生育はエタノール生産性の低下を招くと考えられる。したがって、混合固定系の能力を最大限に発揮させるには、混合する2菌株の活性の均衡をどのような状態に保つかが問題となる。活性の均衡は、初めに固定化する Asp. awamori 胞子と Z. mobilis 細胞の混合割合によって強く規定されると考えられるので、本章では酸素要求性の異なる2菌株を同時固定化して、2段階からなる反応を1つの反応槽で同時に行うことができる新しい混合培養法の開発を目的とし、2菌株間の相互作用が協調的に働き、物質生産が効率よく行われるための最適菌体混合比および培養条件について検討した。

4-2 実験材料および方法

使用菌株と種菌培養：デンプン加水分解酵素を生産する菌として、好気性のカビ Aspergillus awamori IF0 4033 を用いた。ポテトデキストロース寒天培地に植菌し、30℃ で5日間培養して胞子を形成させた後、4℃ で冷蔵保存した。エタノール生産菌として、偏性嫌気性細菌 Zymomonas mobilis IF0 13756 を用いた。Z. mobilis を偏性嫌気性菌に分類することについての明確な根拠はない

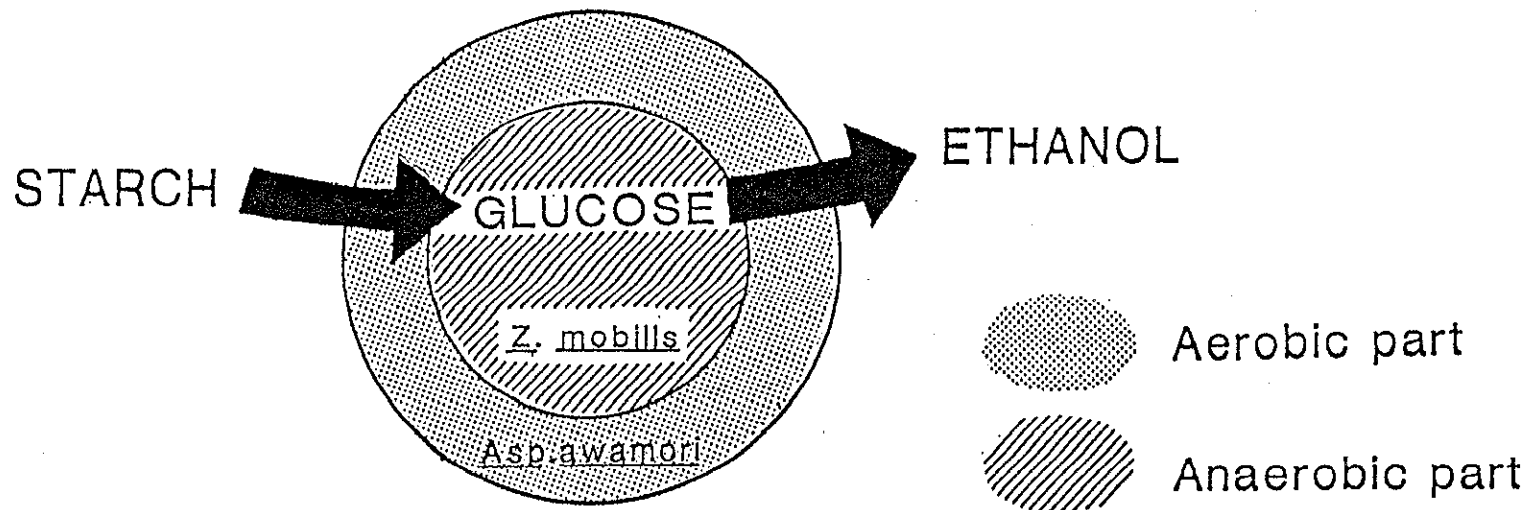


Fig. 4-1. Schematic diagram of coimmobilized mixed culture system of Aspergillus awamori and Zymomonas mobilis in Ca-alginate gel beads.

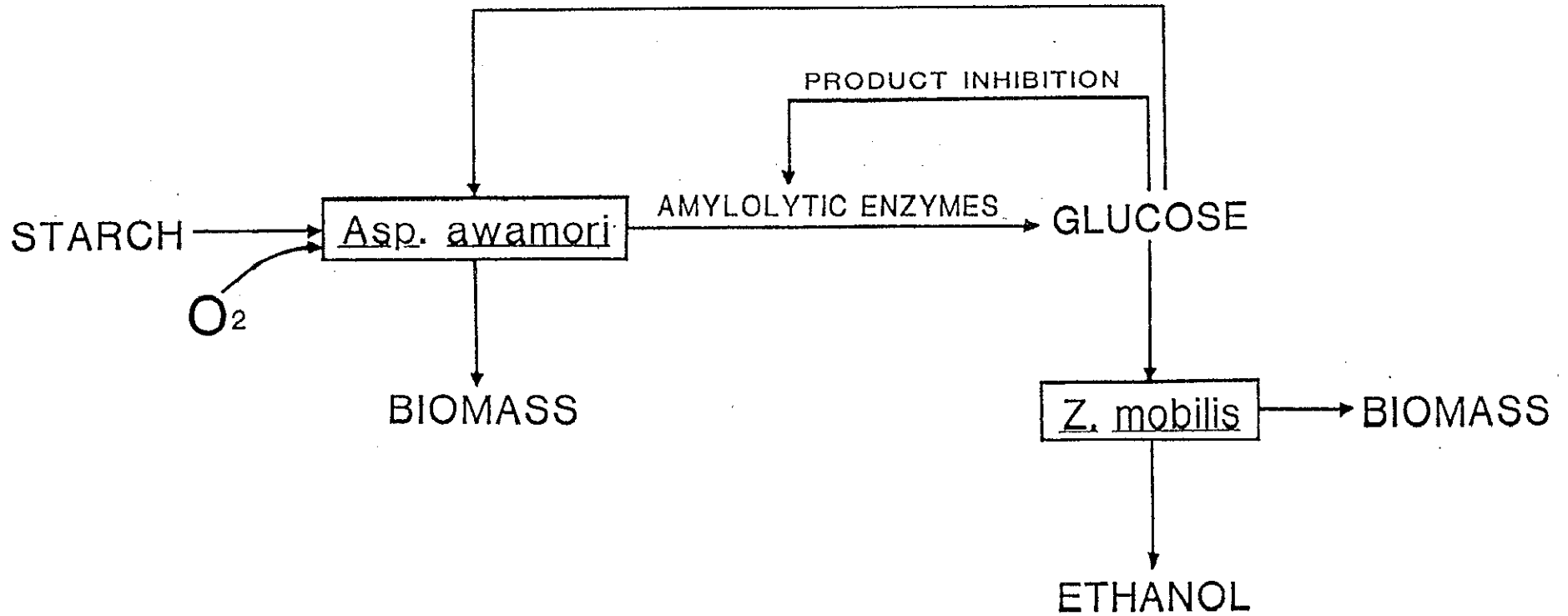


Fig. 4-2. Scheme for a correlation of metabolisms between Aspergillus awamori and Zymomonas mobilis in coimmobilized mixed culture system.

が、*Z. mobilis* が酸素によって増殖阻害を受けることから、本論文では便宜上 *Z. mobilis* を偏性嫌気性菌に分類した。*Z. mobilis* は、1% glucose, 0.5% yeast extract, および 0.2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ からなる保存用液体培地 (pH 6.8) で維持培養を行い、4 °C で保存した。いずれの菌も、1 か月ごとに継代した。

Asp. awamori は孢子懸濁液として実験に供した。*Z. mobilis* は 10% glucose, 1% yeast extract, 0.1% KH_2PO_4 , 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を含む増殖培地 (pH 5.0) 中で、30 °C、16 時間の静置培養を行い細胞を増やした後、遠心分離によって細胞を集め実験に供した。

固定化法： *Asp. awamori* の孢子と *Z. mobilis* の細胞の固定化は、アルギン酸カルシウムゲルを用いた包括法で行った。アルギン酸ナトリウム (和光純薬) を蒸留水に溶かし、2.5% のアルギン酸ナトリウム水溶液とした。この溶液をオートクレーブで 121 °C で 10 分間殺菌した。単一固定化培養のときは、アルギン酸溶液 50 mL に *Asp. awamori* の孢子と *Z. mobilis* の細胞を別々に加えた。混合固定化培養のときは、2 菌株を同時に加えてよく混合した。細胞を含むアルギン酸溶液をペリスタポンプで送液し、内径 1 mm のマイクロピペット用チップから 0.1 M の CaCl_2 溶液 150 mL 中に滴下した。 CaCl_2 溶液を緩やかにマグネチックスターラーで攪拌し、アルギン酸カルシウムゲルビーズを作り上げた。このゲルビーズを 0.1 M の CaCl_2 溶液中に約 1 時間保持し、十分にゲル化させた。最終的に得られたゲルビーズのアルギン酸濃度は 2%, 直径は 3 mm であった。また、固定化細胞濃度は、*Asp. awamori* 孢子の場合には 6.25×10^6 から 6.25×10^9 spores/L-gel を変化させ、*Z. mobilis* 細胞の場合には 0.125 から 2.0 g/L-gel の間を変化させた。

培養方法： 培養は 500 mL 容のエrlenマイヤーフラスコまたは同フラスコに 2 枚の邪魔板 (たて 20mm, よこ 14mm) を付けたものを用いて行った。培地量を

200 mLとし、ここに 40g のゲルビーズを入れてロータリーシェーカーで振盪培養した。振盪速度は 100rpm または 220rpm とし、温度は 30℃ に保持した。

Asp. awamori の単一固定化培養と Asp. awamori と Z. mobilis の混合固定化培養に用いた培地組成は、2%, 10%, または 20% starch, 0.5% peptone, 0.2% yeast extract, 0.1% KH_2PO_4 , 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, および 0.2% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH 5.5) である。この培地をデンプン培地と呼ぶことにする。Z. mobilis の単一固定化培養に用いた培地組成は、炭素源を 2% glucose としたこと以外は上記と同様である。この培地をグルコース培地と呼ぶことにする。培地に用いたデンプンは、バレイショ由来の可溶性デンプン（和光純薬）で、培地はオートクレーブで 121℃, 15 分間の殺菌を行った。

2 菌株の混合比の検討：Asp. awamori 胞子を 1.25×10^9 spores/L-gel で一定とし、これに混合する Z. mobilis 細胞を 0.125, 0.5, および 1.0 g/L-gel と変化させて、混合比の異なるゲルビーズを作製した。このゲルビーズ 40g を、2% のデンプン培地 200mL を含むエルレンマイヤーフラスコ中で培養した。振盪速度は 100 rpm とした。

混合培養システムの比較：2つの単一培養システムと3つの混合培養システムについて、エタノールの生産性を比較した。単一培養は Z. mobilis の懸濁培養と Z. mobilis の固定化培養の2つである。混合培養は Asp. awamori と Z. mobilis の懸濁混合培養、固定化 Asp. awamori と固定化 Z. mobilis の混合培養、および Asp. awamori と Z. mobilis の混合固定系の3つである。単一培養は、2% グルコース培地を用い、振盪条件を静置、100rpm、および 220rpm と変化させて行った。混合培養では、2% デンプン培地を用い、振盪条件は 100 rpm および 220rpm とした。振盪速度は酸素供給を変える目的で変化させた。いずれの培養も 500 mL容のエルレンマイヤーフラスコを用いた。フラスコ当たりの

Asp. awamori 胞子は 5.0×10^7 個、Z. mobilis 細胞は 20 mg となるように接種した。この接種量は混合固定系の最適混合比に相当するものである。

分析方法：培養液中のエタノール濃度は、FID(flame ionization detection) を装備したガスクロマトグラフ (Yanaco G180) を用いて測定した。n-プロパノールを内部標準として、サンプルを Chromosorb 105 (60 - 80 mesh) を充填したカラム (5 mm i.d. \times 2 m) に直接注入した。オーブンの温度は 200°C 一定に保持した。グルコースの定量はムタロターゼ・GOD 法 (グルコース-C-テスト、和光純薬) を用いて行った。全糖量は、M. Duboisら³³⁾ に従いフェノール硫酸法で測定した。ここで得られた全糖量値からグルコース量を差し引いたものを非グルコース糖量とした。菌体細胞量は乾燥重量で表した。ゲルビーズ 500 個を 2% のクエン酸ナトリウム溶液 100mL で溶解したのち、細胞を遠心分離した。分離した細胞は蒸留水で洗滌し、再び遠心分離した。洗滌・遠心分離の操作をもう一度繰り返し、細胞を 105°C で 24 時間乾燥させた。デシケーター内で冷却の後、乾燥重量を測定した。本章では、特にことわらないかぎり細胞重量は乾燥重量で表すものとする。

4-3 実験結果および考察

4-3-1 Aspergillus awamori と Zymomonas mobilis の単一固定化培養

はじめに固定化 Asp. awamori によるデンプンの加水分解とグルコースの蓄積について検討した。固定化する Asp. awamori の孢子数を 6.25×10^6 から 6.25×10^9 spores/L-gel の範囲で変化させたゲルビーズを 100rpm の振盪速度で培養し、それぞれの培養経過を比較した。固定化孢子数が増加するにしたがい加水分解速度が増大する傾向がみられたが、その一方でゲルビーズから遊離して培養

液中で増殖する菌糸が増加するようになった。よって、遊離菌糸が少なく、デンプンの加水分解が比較的すみやかに行われる孢子数 1.25×10^9 spores/L-gel を最適固定化孢子数と定め、以降の実験はすべて最適孢子数で行った。

最適固定化孢子数のゲルビーズを2%のデンプン培地で培養したときの、細胞増殖、糖量の変化等を Fig. 4-3 に示す。デンプンの加水分解は培養開始から12時間目に始まり、48時間目で終了した。この間に、細胞増殖とグルコースの蓄積がみられた。グルコースは12時間目から蓄積をはじめ、36時間目に最大蓄積量(7.5g/L)となり、72時間目には全てのグルコースが消費された。ここで得られた固定化細胞による培養経過は、固定化しない細胞の培養経過とほぼ一致した。ただし、固定化するしないにもかかわらず、デンプンは完全には分解されず、全糖量の20%が培養液中に残存した。これは Asp. awamori が生産するアミラーゼの性質に起因するものである³⁴⁾。すなわち、Asp. awamori が生産するアミラーゼはデンプンを80%までしか分解できないため、全糖量の20%が糖化されずに残ったものと考えられる。

次に固定化 Zymomonas mobilis を2%グルコース培地で培養したときのエタノール生産について検討した。初発のゲル内の細胞濃度が0.25g/L-gel、振盪速度が100rpmの条件で培養したときの経過を Fig.4-4 に示す。固定化 Z. mobilis によるグルコースの消費には誘導期がみられず、直線的なグルコース消費経過とエタノール生産経過が得られた。最終的なエタノール生成濃度は8.0g/Lであり、エタノールの対糖収率($Y_{P/S}$)は0.47であった。固定化する細胞濃度を変えても直線的な培養経過が得られたが、グルコース消費速度には差異が生じた。固定化細胞濃度とグルコース消費速度の関係を Fig.4-5 に示す。図より明らかのように、細胞濃度が0.125から1.0 g/L-gelの範囲では、細胞量が増加するにしたがってグルコース消費速度も増大したが、1.0 g/L-gel以上ではグルコース消費速度にほとんど変化がみられなかった。

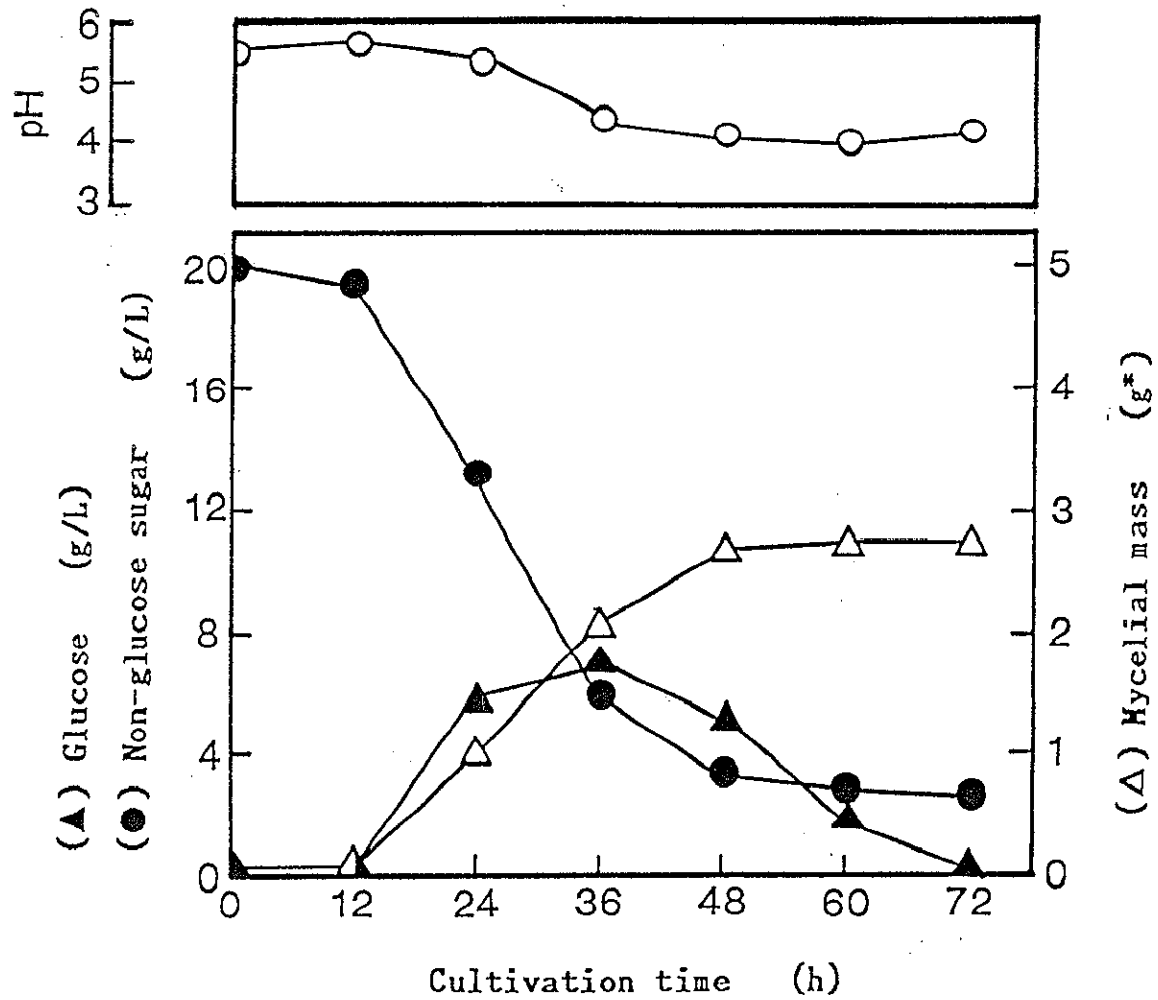


Fig. 4-3. Hydrolysis of starch by immobilized Aspergillus awamori.
 Density of Asp. awamori spores in gel beads: 1.25×10^9 spores/L-gel
 g*: g-cell/40g of gel beads

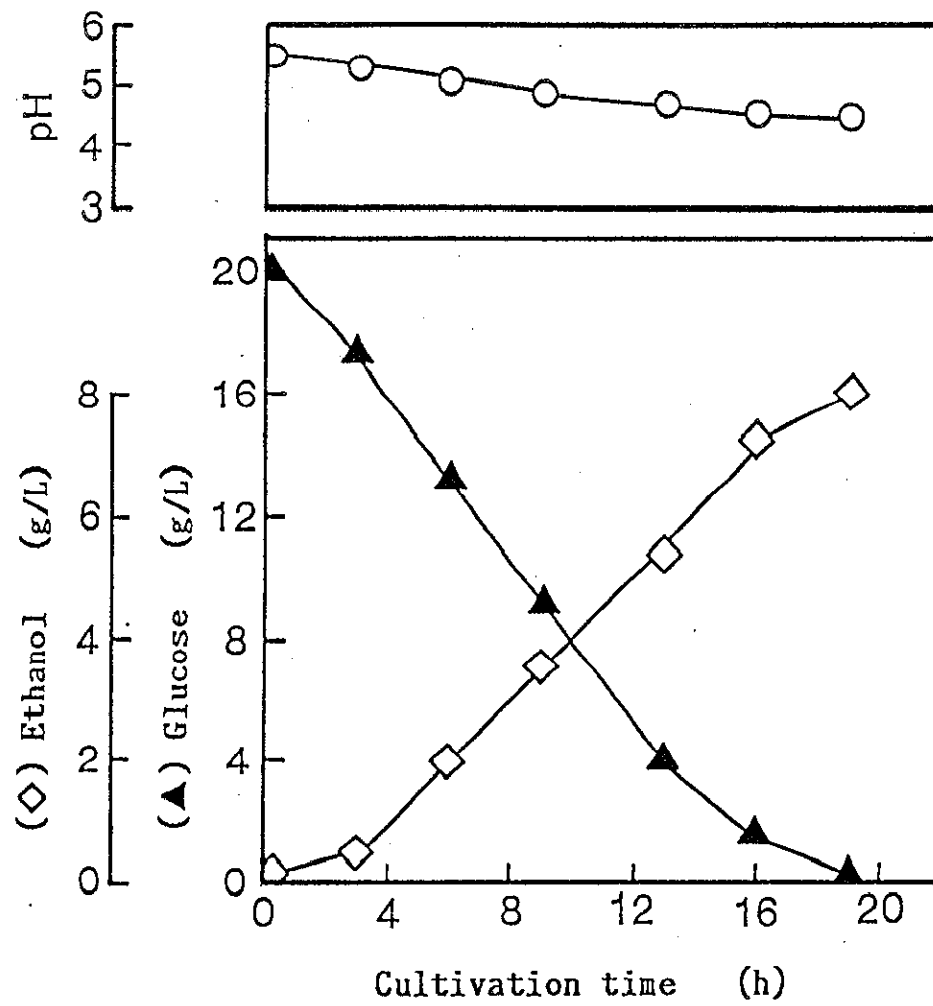


Fig. 4-4. Ethanol production from glucose by immobilized Zymomonas mobilis.

Density of Z. mobilis cells in gel beads: 0.25 g/L-gel

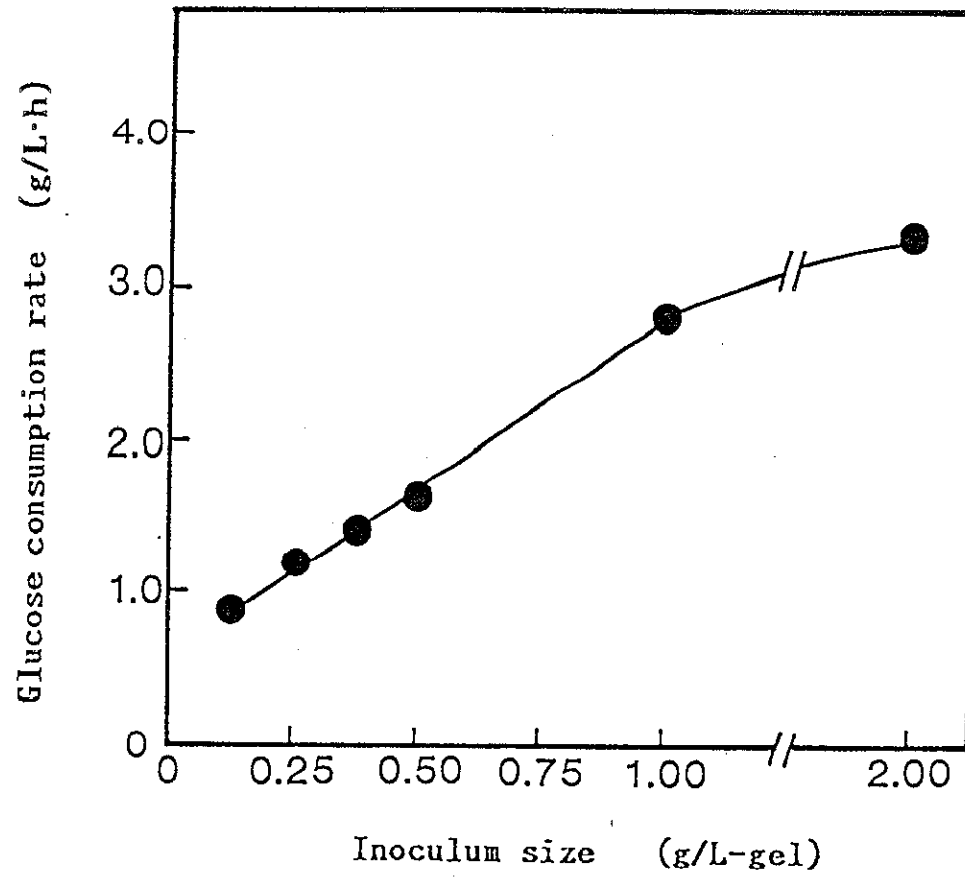


Fig. 4-5. Relationship between glucose consumption rate and inoculum size in ethanol fermentation by immobilized Zymomonas mobilis.

4-3-2 Aspergillus awamori 胞子と Zymomonas mobilis 細胞の混合比の検討

エタノールを効率よく生産できる混合固定系を確立するために、単一固定化培養の結果を参考にして、混合固定化する2菌株の混合比について検討した。

Asp. awamori の胞子数を単一培養での最適胞子数 (1.25×10^9 spores/L-gel) とし、これに混合する Z. mobilis の細胞濃度を 0.125, 0.5, および 1.0 g/L-gel に変化させ、混合比の異なるゲルビーズを作製した。これら混合比の異なるゲルビーズを 2% のデンプン培地中で 100rpm の回転振盪を与え培養したところ、Fig.4-6-a,b,c に示したような培養経過が得られた。Fig.4-6 から明らかなように、混合比の違いによって菌体の増殖やエタノール生産等の培養経過に差異が生じた。Z. mobilis の細胞濃度が 0.5 g/L-gel のとき (Fig.4-6-b) に両菌株の活性の均衡が最もよく保たれ、グルコースの蓄積もほとんどなく、最も高いエタノール生産性が得られた。その生産性は、生成エタノール濃度で 6.7g/L、対糖収率 ($Y_{P/S}$) で 0.40であった。この値は、Z. mobilis の単一固定化培養でグルコースを基質として得られた収率の 85% に相当した。またこのとき、Asp. awamori 菌糸の過剰な生長はみられず、pH も Z. mobilis の最適範囲である pH 4.5 から 5.0³⁵⁾ に維持された。Z. mobilis の細胞濃度を 0.125g/L-gel としたとき (Fig.4-6-a) は Asp. awamori の活性が強く、菌糸がゲルビーズ表面を覆うように過剰に生育し、培地中にグルコースを蓄積した。炭素源の多くが Asp. awamori の菌体増殖のために消費されたために、エタノール生産性は3条件のうちで最も低く、生成濃度で 3.0g/L、 $Y_{P/S}$ が 0.18であった。またこのときの pH の低下は著しく、Z. mobilis の最適範囲よりも低くなった。一方、Z. mobilis の細胞濃度を 1.0 g/L-gel としたとき (Fig.4-6-c) には Asp. awamori のゲルビーズ表面での生育、グルコースの蓄積は全くみられなかった。エタノール生成濃度は 4.5g/L、 $Y_{P/S}$ は 0.30 となり、Z. mobilis の細胞濃度が 0.5g/L-gel のときよりも低くなった。ただし pH は、4.5 から 5.0 の範囲に維持された。

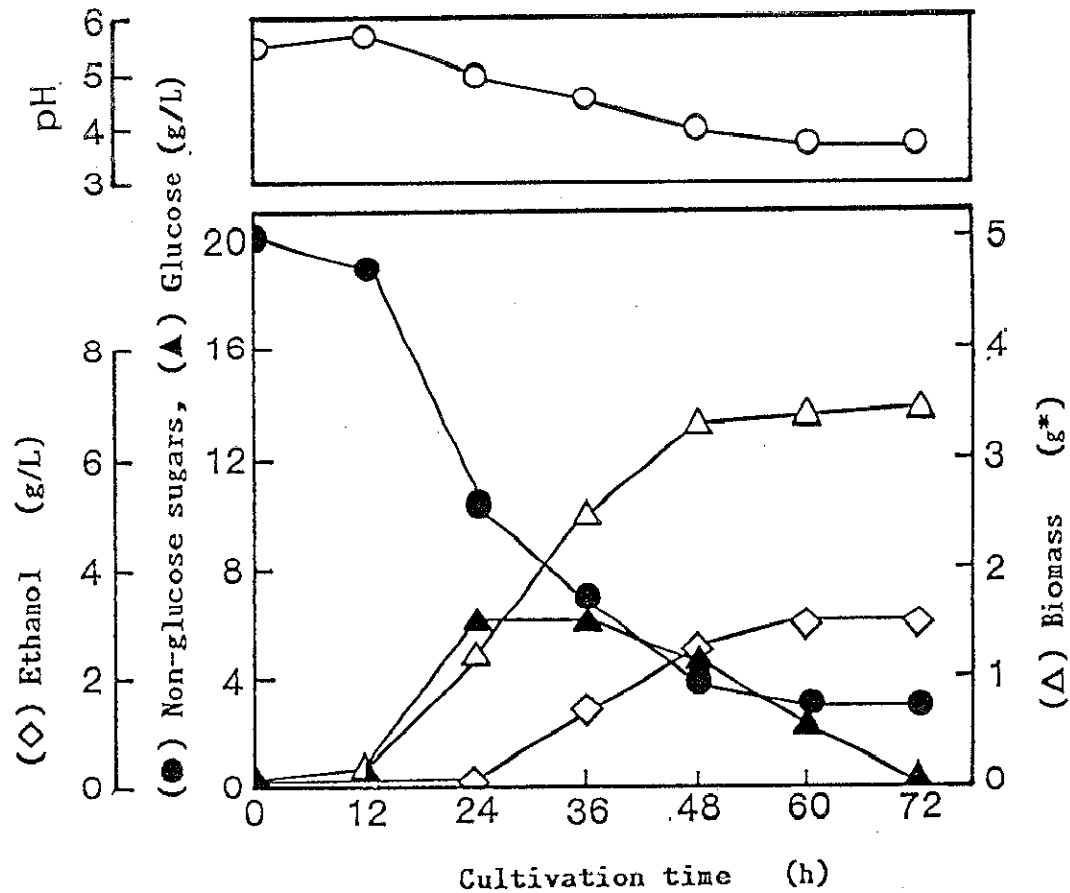


Fig. 4-6-a. Ethanol production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis*.
 Density of *Asp. awamori* spores in gel beads: 1.25×10^9 spores/L-gel
 Density of *Z. mobilis* cells in gel beads: 0.125 g/L-gel
 g*: g-cell/40g of gel beads

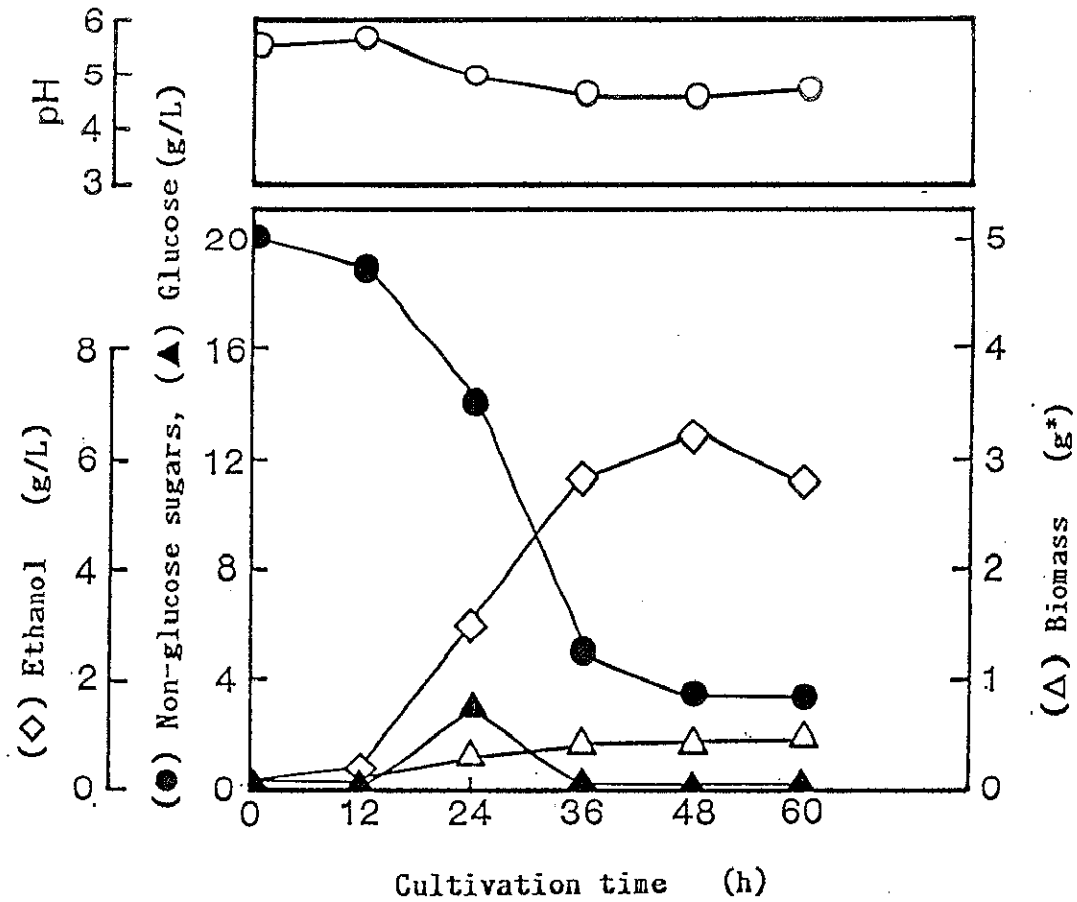


Fig. 4-6-b. Ethanol production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis*.

Density of *Asp. awamori* spores in gel beads: 1.25×10^9 spores/L-gel

Density of *Z. mobilis* cells in gel beads: 0.50 g/L-gel

g*: g-cell/40g of gel beads

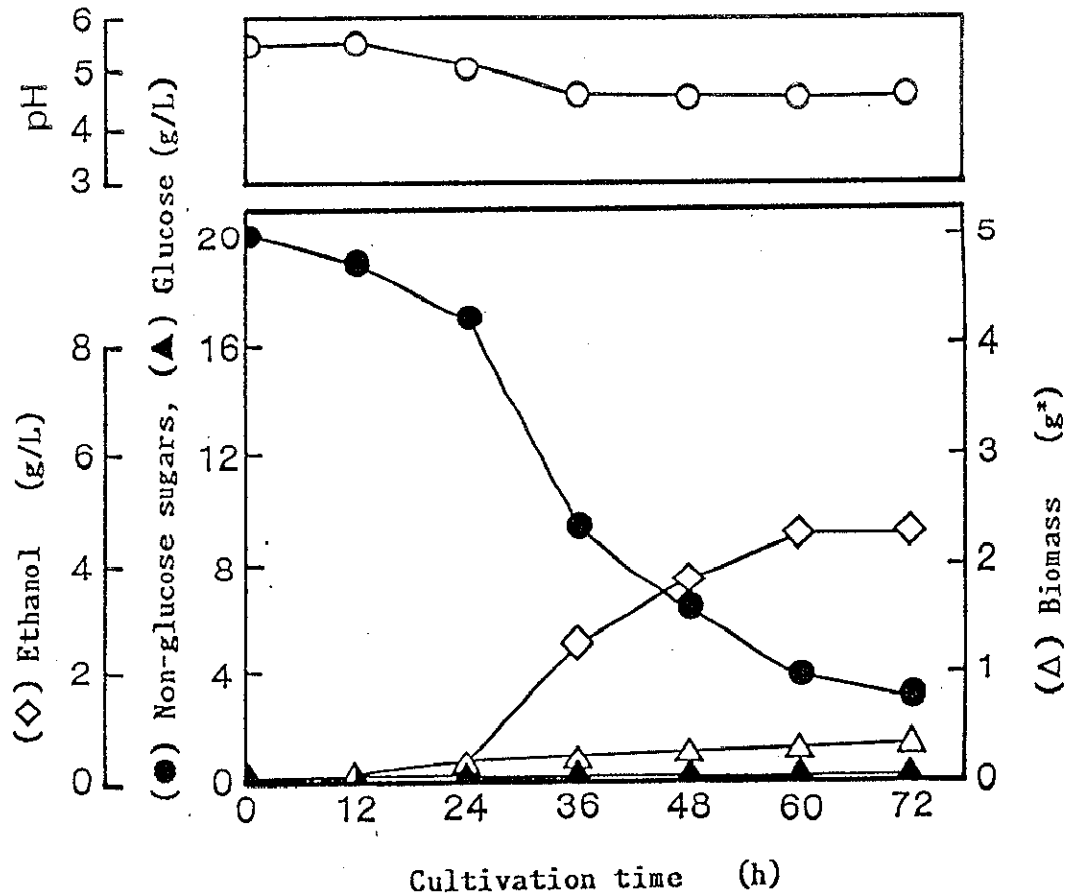


Fig. 4-6-c. Ethanol production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis*.

Density of *Asp. awamori* spores in gel beads: 1.25×10^9 spores/L-gel

Density of *Z. mobilis* cells in gel beads: 1.0 g/L-gel

g*: g-cell/40g of gel beads.

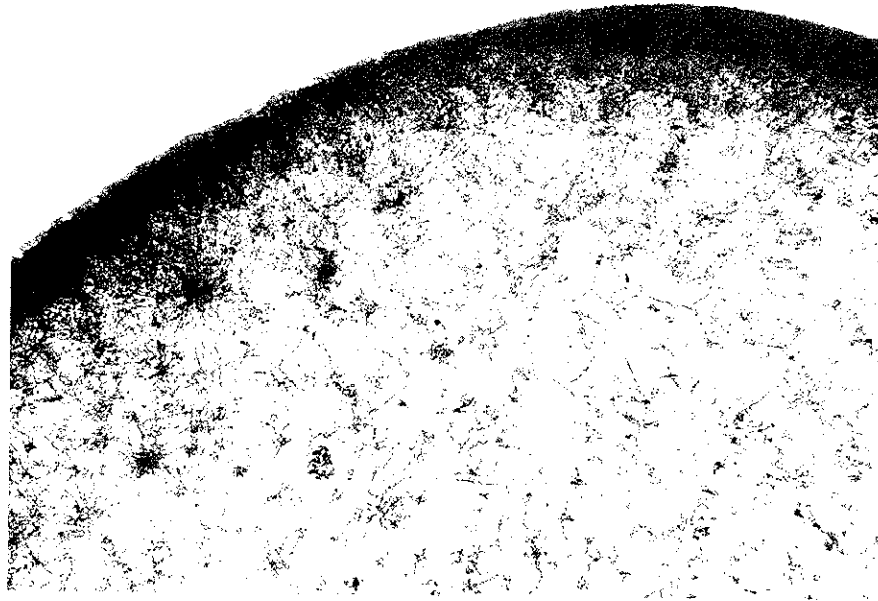


Fig. 4-7. Microphotograph of coimmobilized mixed culture system of Aspergillus awamori and Zymomonas mobilis.

以上の結果より、他に比べて高いエタノール生産性が得られた混合比、Asp. awamori の孢子 1.25×10^9 spores/L-gel に対して Z. mobilis の細胞 0.5 g/L-gel、を最適混合比とした。Fig.4-7 の顕微鏡写真は、最適混合比のときのゲルビーズ内（培養 24 時間目）の 2 菌株の分布を示している。ゲルビーズ表層部には主として Asp. awamori が、ゲルビーズ中心部には主に Z. mobilis が生育しており、ほぼ Fig.4-1 に示したモデルどおりの混合固定系が形成されたことが明らかになった。また混合固定系では、すみ分けの結果、ゲルビーズ中心部で生育する Z. mobilis の細胞漏出は起こりにくく、通常の固定化細胞の培養の際にしばしば生じる細胞の漏出は、ほとんど問題とならなかった。よって以降の混合固定系はすべて最適混合比で作製した。

4-3-3 混合固定系によるデンプンからのエタノール生産

混合固定系が持つエタノール生産能を明らかにするために、比較的高濃度のデンプン培地を用いてエタノール生産を行った。まず、混合固定系を 2%-デンプン培地中で 48 時間前培養した。振盪速度は 100rpm とした。前培養を行い活性化した混合固定系を培養液から分離し、2%、10%、および 20% (w/v) のデンプン培地に移し、100rpm の振盪速度で培養した。これらの培養結果を Fig.4-8 に示す。いずれの培養経過にも誘導期がみられず、培養開始時からデンプンの加水分解とエタノールの生産が行われた。生成されたエタノールの濃度および収率 ($Y_{P/S}$) は、2%-デンプン培地の 12 時間目において 7.2g/L ($Y_{P/S} = 0.42$)、10% デンプン培地の 36 時間目において 22g/L ($Y_{P/S} = 0.33$)、さらに 20%-デンプン培地の 84 時間目において 34g/L ($Y_{P/S} = 0.27$) となった。生成エタノール濃度はデンプン濃度が高くなるにつれて増大するが、収率は逆に減少した。Asp. awamori の菌糸は、デンプン濃度が高くなるほど過剰に生育する傾向にあった。10% および 20%-デンプン培地で培養した場合は、Fig.4-9 に示したようなフェルト状の厚い

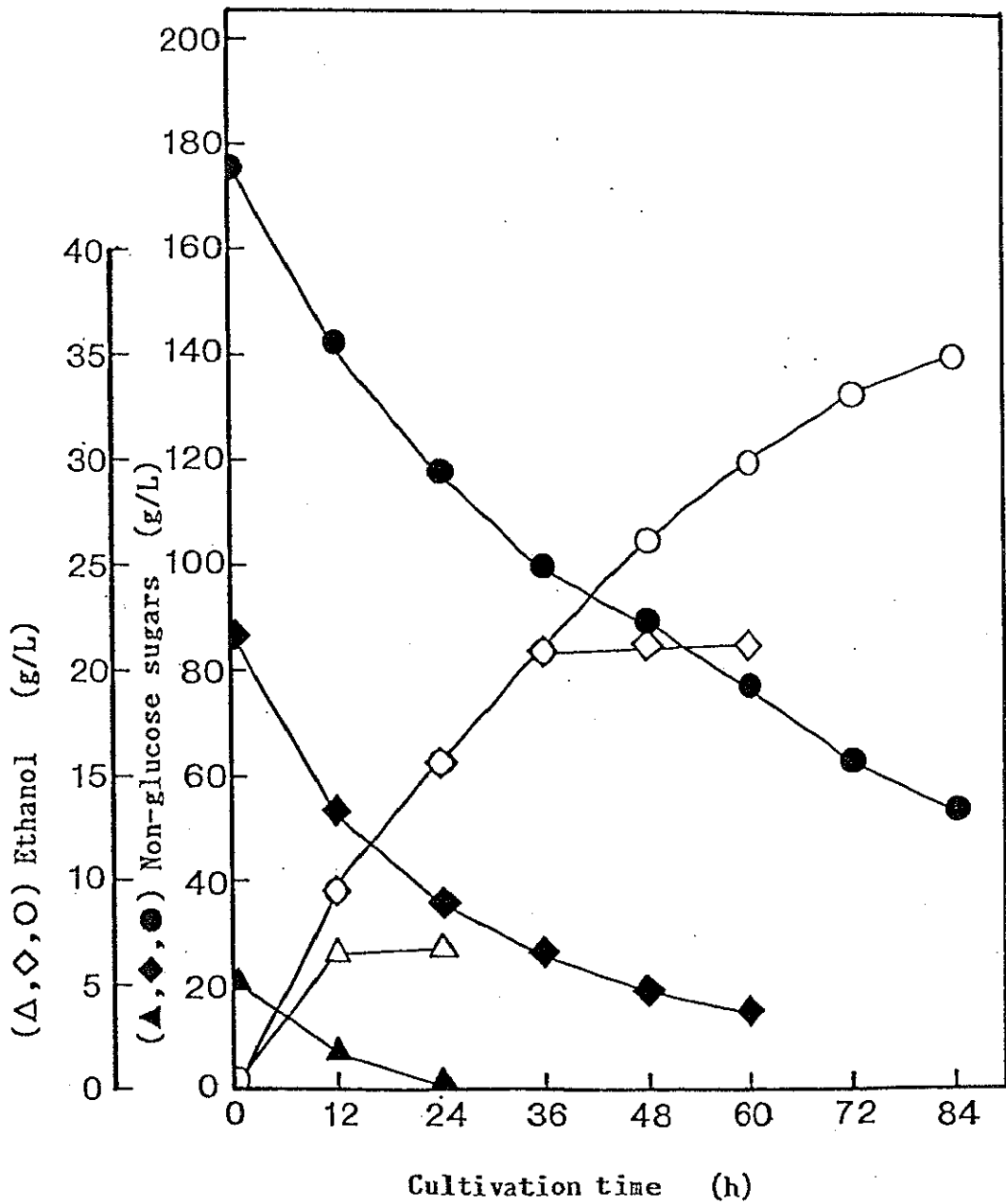


Fig. 4-8. Ethanol production from various concentration of starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis*.

Initial concentration of starch: ($\blacktriangle, \triangle$) 20 g/L; (\blacklozenge, \lozenge) 100 g/L; (\bullet, \circ) 200 g/L.

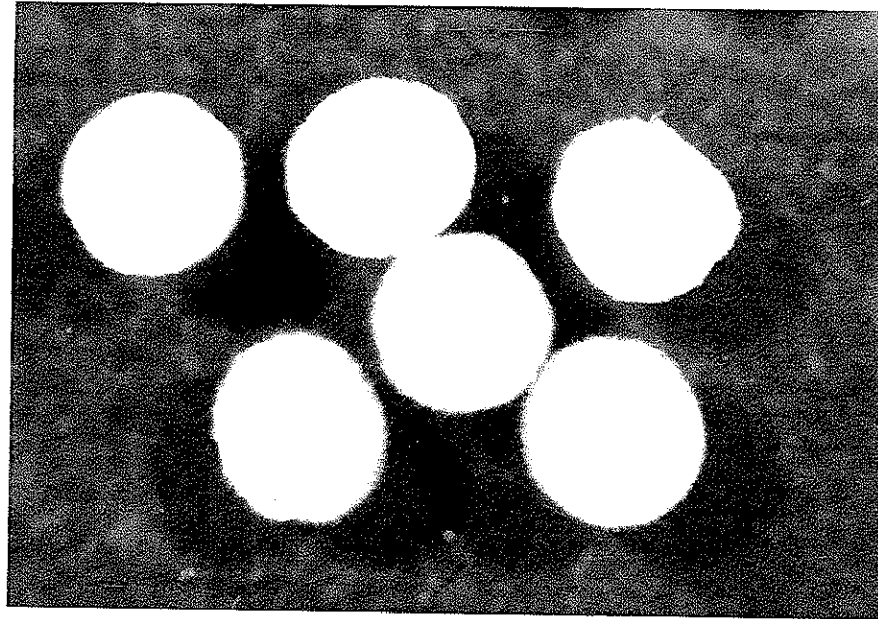


Fig. 4-9. Excess mycelial growth on the surface of gel beads in production medium containing 10% starch.

菌糸層がゲルビーズ表面を覆うように形成された。またこのとき、培養液中への菌糸の遊離も顕著であった。

以上のことから、デンプン濃度の増大にともなうエタノール収率の低下は、デンプンの分解によって生じたグルコースの多くが、Asp. awamoriの菌体増殖のために消費されたことが原因であると思われる。また、デンプンが高濃度になるほどpHの低下も著しく、Z. mobilisの活性が阻害された。このことはAsp. awamoriの過剰生長を促す一因となっていると思われる。しかし、混合固定系によってデンプンからおおよそ3%のエタノールが生産されたことも事実である。この値はエタノール発酵としては決して高いものではないが、混合固定系を用いた物質生産の一例としては十分なものであると思われる。

4-3-4 混合固定系の培養における振盪条件の検討

混合固定系を高い濃度のデンプン培地中で培養すると、培養時間が長くなり、Asp. awamoriの菌糸がゲルビーズ表面を厚く覆い、かつ菌糸の培養液中への遊離が顕著となった。このことから、これまで用いてきた培養条件では、混合固定系の長期利用が困難であることが示唆された。ここでは、混合固定系のAsp. awamori菌糸の過剰な生長を抑制し、エタノール生産性と長期利用性の向上を目的とした。従来より、糸状菌の生育が培養時の攪拌に伴って生じる剪断応力によって阻害されることが知られており、攪拌が糸状菌の生育に及ぼす影響に関して多くの研究がなれている³⁶⁻³⁸⁾。これらの研究は剪断応力によるストレスを軽減し、糸状菌の生育を促すことを目的としているが、ここではむしろ剪断応力を積極的に利用することによって、菌糸の過剰生育を抑制することにした。

ゲルビーズの表面に生じる菌糸にかかる剪断応力を変化させるために、以下の3つの振盪条件を設定した。

(1) 通常の500mL容のエrlenmeyerフラスコで、100rpmの回転振盪培養。

(2) 通常の 500mL容のエrlenマイヤーフラスコで、220rpmの回転振盪培養。

(3) 2枚の邪魔板を内壁にもつ 500mL容のエrlenマイヤーフラスコで、
220rpmの回転振盪培養。

いずれも前培養は行わず、10%のデンプン培地 200mL 中で、直接混合固定系を培養した。結果を Fig.4-10 に示す。デンプンの加水分解経過には、振盪条件の影響はほとんどみられなかったが、エタノール生産および混合固定系の形態には差異が生じた。上記(1)の条件では、培養後期になるとゲルビーズ表面が菌糸で覆われはじめ、一部の菌糸は培養液中に遊離するようになった。このときの生成エタノールは 21g/L($Y_{P/S} = 0.33$)であった。これに対し上記(2)の条件では Fig.4-11 から明らかのように、ゲルビーズ表面での菌糸の生育および菌糸の遊離はほとんどみられず、剪断応力による菌糸の生育抑制効果が顕著に現れた。このときのエタノール生産は、25g/L($Y_{P/S} = 0.38$)であった。上記(3)の条件においても同様に菌糸の生育が抑制されたが、多量のグルコース (15 から 20 g/L) が培養液中に蓄積し、エタノール生産は3つの条件のうちで最も低く、15g/L($Y_{P/S} = 0.12$)となった。

以上の結果より、適切な強度の剪断応力を Asp. awamoriの菌糸に与えることによって、混合固定系の菌糸の生育を制御できることが明らかになった。特に上記(2)の条件では、菌糸の生育抑制およびエタノール生産性に関して良好な結果が得られた。これは、剪断応力によって菌糸の過剰生育が抑制された結果、Asp. awamoriの菌体増殖のために消費されるグルコースが減少し、Z. mobilisによってエタノールに転換されるグルコースが増加したためであると考えられる。また、Fig.4-11 に示したように混合固定系は形態的に安定していた。ここには示さなかったが、この条件で回分反応を繰り返しても不都合は起こらなかったことから、長期の連続培養に耐えうることが示唆された。これに対して上記(3)の条件でエタノール生産性が低下したのは、強すぎる剪断応力によって菌

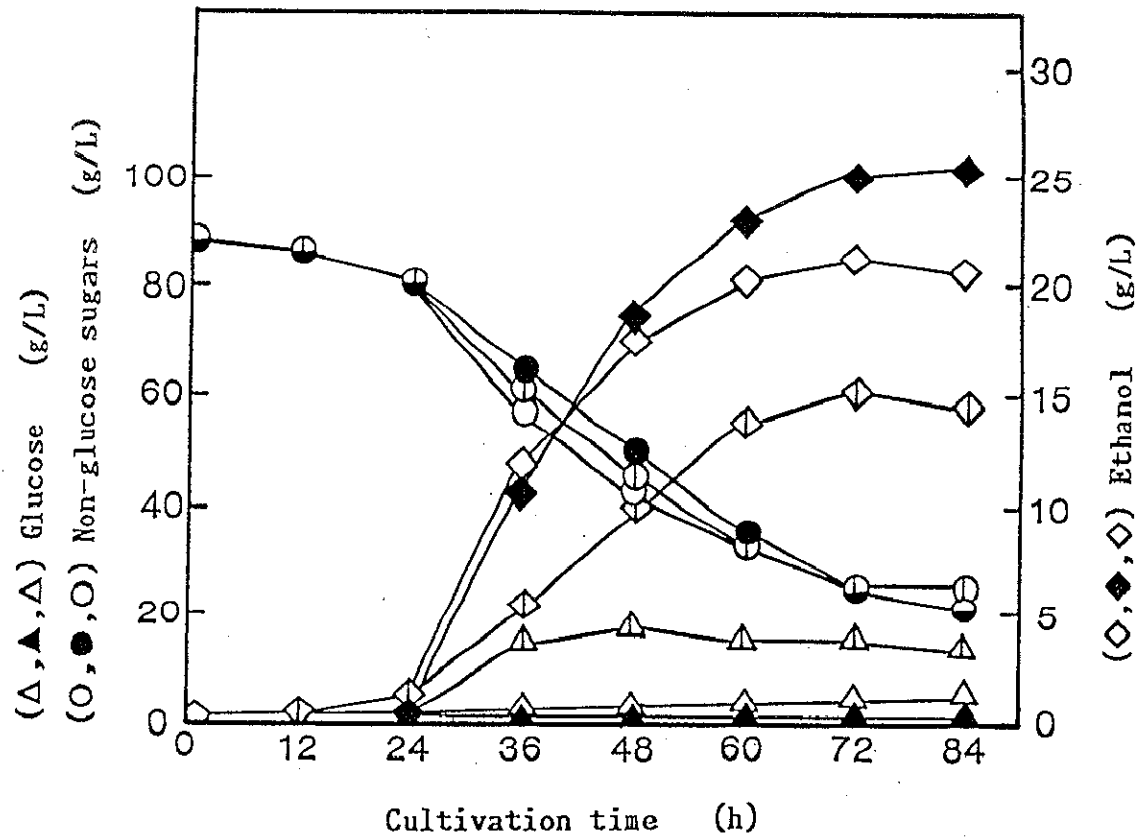


Fig. 4-10. Ethanol production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis* under various shaking conditions.

Shaking speed in 500-mL Erlenmeyer flask: (O, Δ, ◇) 100 rpm; (●, ▲, ◆) 220 rpm. Shaking speed in 500-mL Erlenmeyer flask with two baffle plates: (⊙, ⊕, ⊞) 220 rpm.

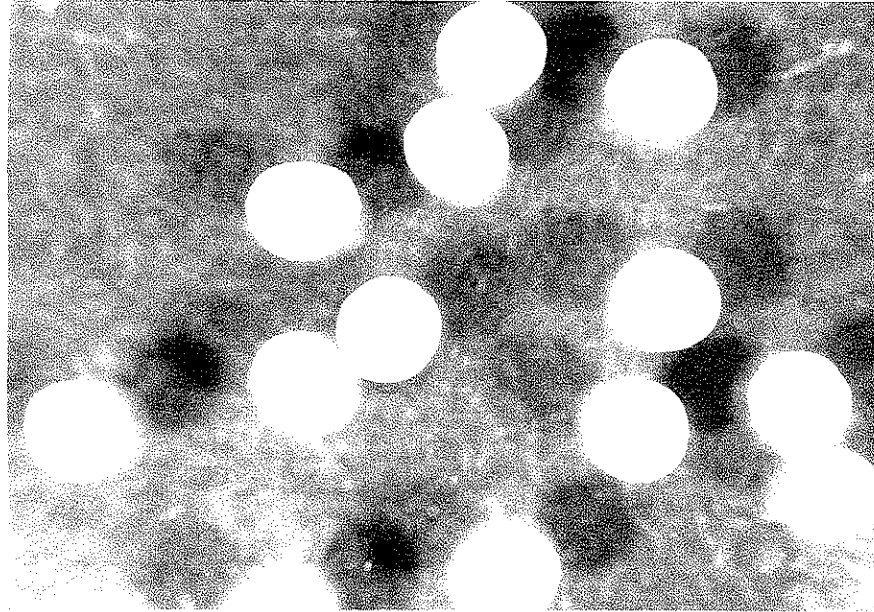


Fig. 4-11. Suppression of excess mycelial growth on the surface of gel beads by shear stress.

系に必要以上のストレスがかかってしまったこと、邪魔板の効果によって生じる高い好気条件下に偏性嫌気性菌の *Z. mobilis* がさらされ、エタノール発酵が律速となったことなどが原因として考えられる。

4-3-5 混合固定系と他の混合培養システムとのエタノール生産性の比較

他の混合培養システムとエタノール生産性を比較することによって、混合固定系の特性を明らかにした。比較した混合培養システムは、*Asp. awamori* と *Z. mobilis* の懸濁混合培養、固定化 *Asp. awamori* と固定化 *Z. mobilis* の混合培養、および *Asp. awamori* と *Z. mobilis* の混合固定系の3種類である。対照として、*Z. mobilis* の単一培養を固定化培養と懸濁培養で行った。それぞれの培養システムが持つエタノール生産性を、培養終了時の生成エタノール濃度で表し、Table 4-1 にまとめて示した。

まず、2%グルコース培地で行った *Z. mobilis* の単一培養について比較した。懸濁培養の場合は、培養条件が好氣的になるにしたがってエタノール生産性が顕著に低下した。静置培養では 11.0 g/L のエタノールを生産したが、220rpm では 4.2 g/L しか生産されなかった。*Z. mobilis* のエタノール生成経路は、好氣的条件下では働かなくなり、有機酸等の副生産物を生成するようになるためにエタノール生産が低下すると考えられている³⁹⁾。これに対し固定化培養の場合はほとんど振盪の影響を受けず、好氣的条件下でも良好なエタノール生産性を示した。静置培養において 8.2 g/L, 220rpm においても 7.0 g/L のエタノールを生産した。固定化細胞では、ゲルビーズ表層の細胞によって酸素が消費されてしまうために、酸素はゲルビーズの中心部付近には到達しにくいことが第3章の結果から推定される。このため、固定化細胞ではゲルビーズ表層の細胞は酸素の影響を受けるが、ゲルビーズ中心付近に存在している細胞は酸素によって影響されないため、エタノール生産性は低下しないと考えられる。これに対して懸濁培養細胞

Table 4-1. Ethanol productivities from glucose or starch by various culture systems.

carbon source	culture system (microorganisms)	ethanol productivity* (g/L)		
		static	100 rpm	220 rpm
glucose	submerged (<u>Z. mobilis</u>)	11.0	8.0	4.2
	immobilized (<u>Z. mobilis</u>)	8.2	7.0	7.0
starch	submerged mixed (<u>Z. mobilis</u> , <u>Asp. awamori</u>)	no data	4.2	4.2
	immobilized mixed (<u>Z. mobilis</u> , <u>Asp. awamori</u>)	no data	4.2	4.5
	coimmobilized mixed (<u>Z. mobilis</u> , <u>Asp. awamori</u>)	no data	6.8	8.6

* Ethanol concentration at the end of the culture.

は、培養液中の酸素濃度の影響を直接受けてしまうので、エタノール生産性が低下したと考えられる。

次に、混合培養システムについて比較した。懸濁混合培養ではいずれの振盪条件においても、生産されたエタノールは 4.2 g/L ($Y_{P/S} = 0.26$)であったのに対し、混合固定系では 6.5 g/L ($Y_{P/S} = 0.40$)のエタノールが得られた。2種類の菌を別々に固定化した混合培養で得られたエタノール生成量は、懸濁混合培養とほぼ等しい値となり固定化したことによる効果は現れなかった。混合固定系ではゲルビーズ表層部に生育した好気性菌によって酸素が積極的に消費されるので、ゲルビーズ内部はより嫌氣的に保たれていると考えられる（第3章 Fig.3-6 参照）。このため、2種類の菌を別々に固定化した混合培養よりも混合固定系の生産性が高くなったと考えられる。

4-4 第4章の結論

好気性菌と嫌気性菌のように酸素要求性の異なる2菌株を同時固定化して、2段階からなる反応を1つの反応槽で同時に行うことができる新しい混合培養システムである混合固定系を開発した。本章では一例として、アミラーゼを生産する好気性菌の Aspergillus awamori とエタノールを生産する偏性嫌気性細菌の Zymomonas mobilis を選択し、それらの混合固定系をつくり、それによってデンプンからエタノールの生産を行うことを試みた。その結果、これら2菌株の混合比を制御することによって、理想的な共生関係をゲルビーズ内に形成することができた。好気性菌の Asp. awamori は酸素を取り込み易いゲルビーズ表層部に生育し、デンプンをグルコースに分解した。一方、ゲルビーズ表層部の Asp. awamori によって酸素が消費されてしまい嫌氣的になるゲルビーズ中心部には、嫌気性菌の Z. mobilis が生育し、グルコースをすみやかにエタノールに転換した。そのため、培地中でのグルコースの蓄積はみられず、グルコースによってデ

ンプンの加水分解が阻害されることはなかった。混合固定系のエタノール生産性と長期利用性は、ゲルビーズ表面における Asp. awamori の菌糸の過剰な増殖を攪拌に伴い生じる剪断応力を利用して制御することで高めることができた。最適な培養条件では、デンプンの分解によって生じたグルコースは直ちにエタノールに転換されるため、培養液中にグルコースの蓄積はみられず、10%-デンプン培地で培養した場合に 25 g/L ($Y_{P/S} = 0.38$) のエタノールを得ることができた。この収率は、Z. mobilis の単一固定化培養で 2%-グルコースから得られた収率 ($Y_{P/S} = 0.47$) の 80% に相当した。デンプンの一部が Asp. awamori の増殖のためにも消費されていることを考慮するならば、混合固定系のエタノール収率は妥当な値であると思われる。なお、このエタノール収率は、Asp. awamori と Z. mobilis の懸濁細胞の混合培養 や、2 菌株を別々に固定化した固定化細胞の混合培養によって得られた収率よりも高いものであった。以上のことから、混合固定系が酸素要求性の異なる 2 菌株の混合培養に適したシステムであることが明らかになった。また混合固定系は、好気性菌の固定化培養で生じるゲルビーズ内の酸素供給不足の空間を嫌気性菌の生育の場として積極的に利用し、ゲルビーズ内の酸素不足の問題を克服している点でも注目されるべき技術であろう。

第 5 章 混合固定系による乳酸の連続生産

5-1 序

前章において確立した Aspergillus awamori (好気性菌) と Zymomonas mobilis (偏性嫌気性菌) の混合固定系では、2 菌株間の対酸素挙動の差が明確であったために、理想的な共生関係が成立した。すなわち、増殖に酸素を必要とする Asp. awamori が好氣的なゲルビーズ表層部で生育し、酸素によって増殖が阻害される Z. mobilis がゲルビーズの中心部に生育した。このように 2 菌株がゲルビーズ内にすみ分けることによって、菌間の競争が緩和され、良好なエタノール生産性を得ることができた。すみ分けのようなゲルビーズ内での共生関係は、2 菌株の対酸素挙動の差が大きいほど成立しやすいと考えられるが、混合固定系の混合培養法としての利用性を広げる上では、種々の菌の組み合わせに応用できることが望ましい。

本章では混合固定系の利用範囲を広めるために、好気性菌の Asp. awamori と細胞増殖が酸素によって何ら影響されない耐性嫌気性菌の Streptococcus lactis を用いて、デンプンからの乳酸の生産を試みた。また、混合固定系の連続培養を行い、混合固定系の長期利用性を明らかにした。

5-2 実験材料および方法

使用菌株と種菌培養：デンプン加水分解酵素を生産する菌として、好気性菌の Aspergillus awamori IFO 4033 を用いた。ポテトデキストロース寒天培地に植菌し、30℃ で 5 日間培養して胞子を形成させた後、4℃ で冷蔵保存した。Asp. awamori は胞子懸濁液として実験に供した。乳酸を生産する菌として、耐性嫌気性細菌でデンプンを直接利用できない Streptococcus lactis IFO 12007 を用いた。GAM 寒天培地 (日水製薬) で穿刺培養 (30℃) し、4℃ で冷蔵保存した。これ

らの菌は1月ごとに植え替えた。S. lactisを賦活するために、2% glucose, 0.5% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.1% casamino acid, 0.25% K₂HPO₄, 0.25% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, および2% MES(Dotite, Co.,Ltd.)からなる増殖培地(pH 6.5) 10mL に保存培養から移して 30℃ で 24 時間培養した。つぎにこの培養液を200mLの増殖培地に移し、30℃ で静置培養し、16 時間後に集菌した。

固定化法：Asp. awamoriの胞子と S. lactisの細胞の固定化は、第4章-2に前述した方法にしたがい、アルギン酸カルシウムゲルを用いた包括法で行った。固定化する細胞の濃度は、Asp. awamoriの胞子が 1.25×10^9 spores/L-gel、S. lactis の細胞が乾燥重量で 4g/L-gelとした。混合固定化の場合は、上記の細胞濃度の割合で混ぜて固定化した。

フラスコ培養：40g のゲルビーズを、200mLの生産培地を含む500mL容のエrlenmeyerフラスコで培養した。生産培地の組成は、2,5,または7.5% soluble starch (potato), 0.5% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.1% casamino acid, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O である。S. lactis の単一培養では、上記の生産培地においてデンプンの代わりにグルコースを用いた。いずれも、培地中にCaCO₃ を 3g 添加して、pH を5.0に維持した。振盪速度はロータリーシェーカーによる 200rpm、培養温度は30℃ とした。

ジャーファーマンターによる連続培養：第3章-2に前述した培養装置を使って連続培養を行った。仕込み量は 2L とし、400g のゲルビーズを 5%のデンプンを含む生産培地中で培養した。培養温度は 30℃ とした。通気速度は 0.5vvm とし、溶存酸素濃度をおよそ 1 ppm に保つために攪拌速度を自動的に変化させた。生産培地はペリスタポンプを用いて希釈率 0.043 h^{-1} で連続供給し、同時に同じ

速度で培養液を排出した。

分析方法およびゲルビーズ内の顕微鏡観察：L-乳酸の定量は酵素法 (L-lactate dehydrogenase kit, Boehringer Mannheim, Germany) で行った。その他の定量は、第4章-2に前述した方法にしたがった。また、第3章-2に前述した El-Sayedら³⁾の方法にしたがい、ゲルビーズ内の細胞分布を位相差顕微鏡で観察した。

5-3 実験結果および考察

5-3-1 フラスコによる回分培養

混合固定化する Asp. awamori の孢子と S. lactis の細胞の最適混合比を求める基礎実験を行った。その結果、Asp. awamori の孢子 1.25×10^9 spores/L-gel に対して S. lactis の細胞 4 g/L-gel (乾重) の割合が、混合固定系を作製する条件として適当であることが明らかになった。この混合比で構成した混合固定系を、2% のデンプンを含む生産培地で培養したところ、Fig.5-1 に示すような培養経過が得られ、デンプンの加水分解に伴い、乳酸が生産された。このとき、グルコースの蓄積はみられなかった。最終的な乳酸の生成量は 8.5g/L で、消費糖当たりの生産収率 ($Y_{P/S}$) は 0.47 であった。

デンプンの濃度を 5% と 7.5% に高めて培養した結果を Fig.5-2 に示す。Fig. 5-2 から明らかなように、いずれのデンプン濃度においても生成された乳酸は 25g/L であった。ただし収率には差がみられ、5% のデンプンを含む生産培地においては $Y_{P/S}$ は 0.66 であったが、7.5% デンプンのときは $Y_{P/S}$ は 0.47 であった。この結果より、7.5% のデンプンを含む生産培地では、生成された乳酸によって S. lactis が阻害されることが推測された。Fig. 5-2 の結果より、乳酸の濃

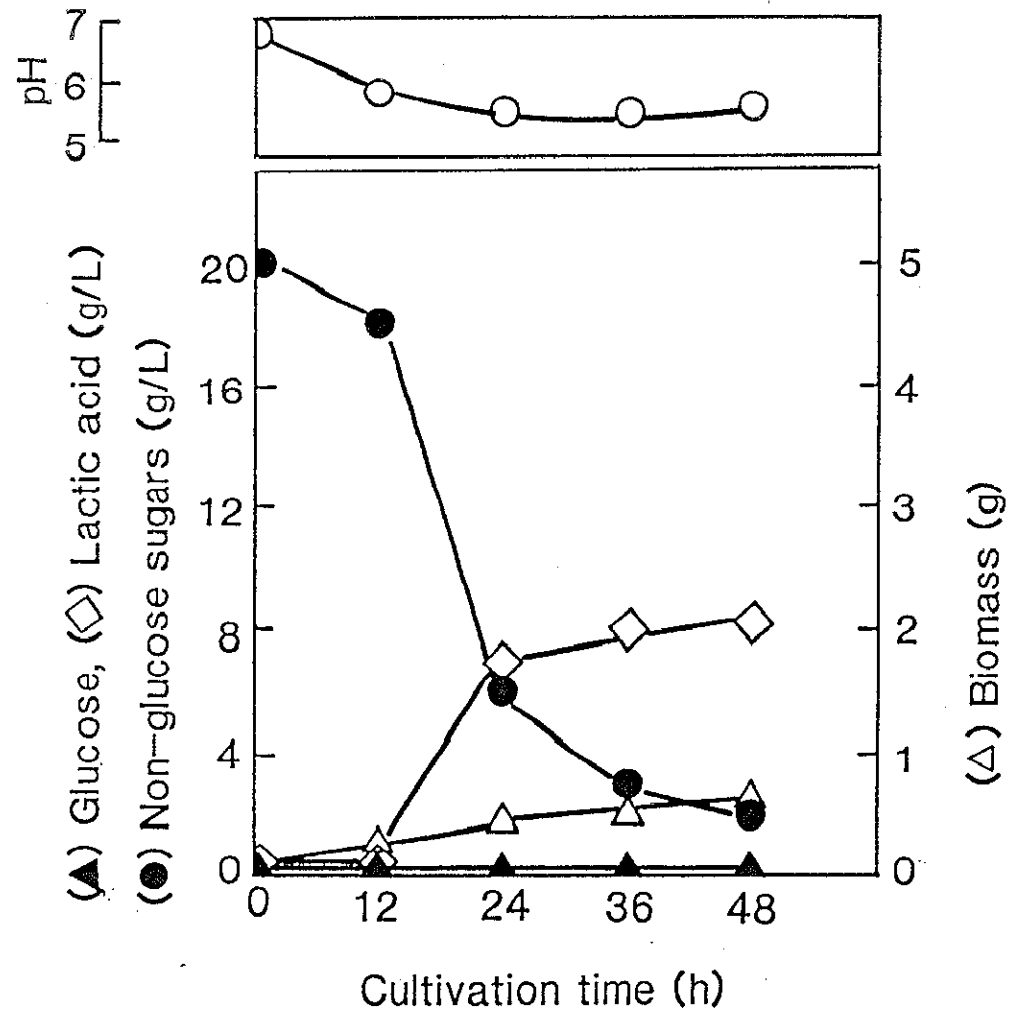


Fig. 5-1. Lactic acid production from 2% starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*.

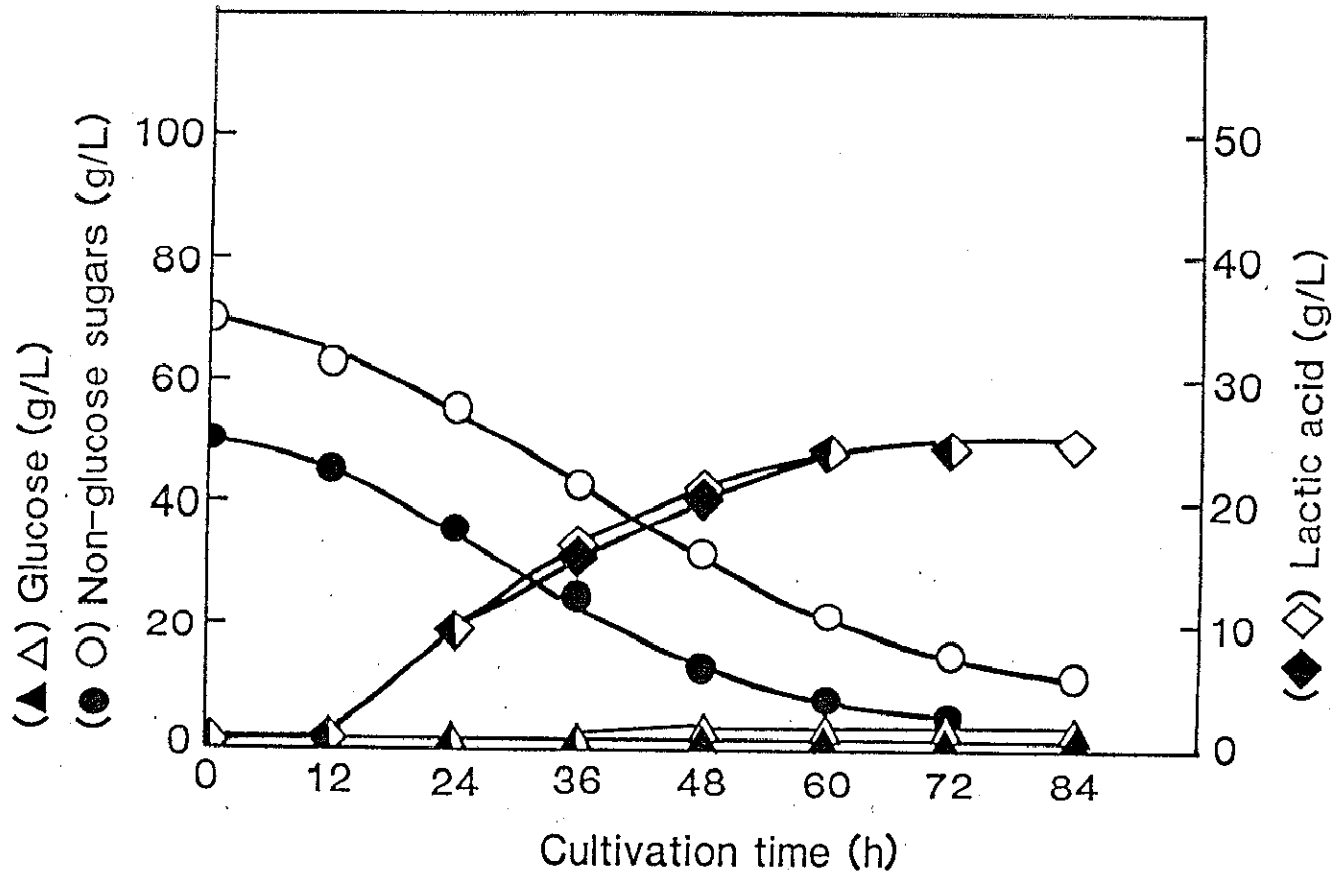


Fig. 5-2. Lactic acid production from 5% starch (●,▲,◆) and 7.5% starch (○,△,◇) by coimmobilized mixed culture system of Aspergillus awamori and Streptococcus lactis.

度が 25g/L 以上になると S. lactis が阻害を受けると考えられたので、培地中のデンプン濃度は 5% が適当であることがわかった。

5-3-2 ジャーファーマンターによる連続培養

ジャーファーマンターを用いて混合固定系の連続培養を行った。培養は初め回分操作で行い、乳酸の生産速度が最大 (0.40 g/L·h) となる培養 48 時間目から連続操作を開始した。生産する培地のデンプン濃度を 5% とし、希釈率 0.043 h^{-1} で供給した。この希釈率は、最大生産速度が保たれる値として、回分培養の結果から推算して求めたものである。Fig. 5-3 から明らかなように、連続操作開始後 24 時間目から定常状態が得られ、5日間維持された。この間、乳酸の生産速度は 0.34 から 0.43g/L·h の間に保たれた。この乳酸の生産速度は、定常状態の生成乳酸濃度 (8 - 10g/L) と希釈率 (0.043 h^{-1}) から算出したものである。また、この培養期間中、混合固定系の形態とゲル強度は一定に保持されていた。

5-3-3 ゲルビーズ内の細胞分布

3種類 of ゲルビーズ切片の顕微鏡写真を Fig. 5-4-a, b, c に示す。(a) は Asp. awamori の単一固定化ゲルビーズ、(b) は S. lactis の単一固定化ゲルビーズ、(c) は Asp. awamori と S. lactis の混合固定化ゲルビーズをそれぞれ示している。写真から明らかなように、Asp. awamori は酸素を取り込み易いゲルビーズ表層部に生育し、酸素が不足するゲルビーズ中心部にはほとんど生育しなかった (Fig. 5-4-a)。これに対して S. lactis はゲルビーズ全体に生育した。ただし、ゲルビーズ表層付近での細胞増殖は、他の部分よりも幾らか顕著であった (Fig. 5-4-b)。この現象は S. lactis が酸素による阻害を受けないこと、ゲルビーズの表層に近い細胞ほど栄養源の取り込みに有利であるなどの理由で生じたと思われる。混合固定系では、Fig. 5-4-a, b, c から判断すると、Asp. awamori は好氣的

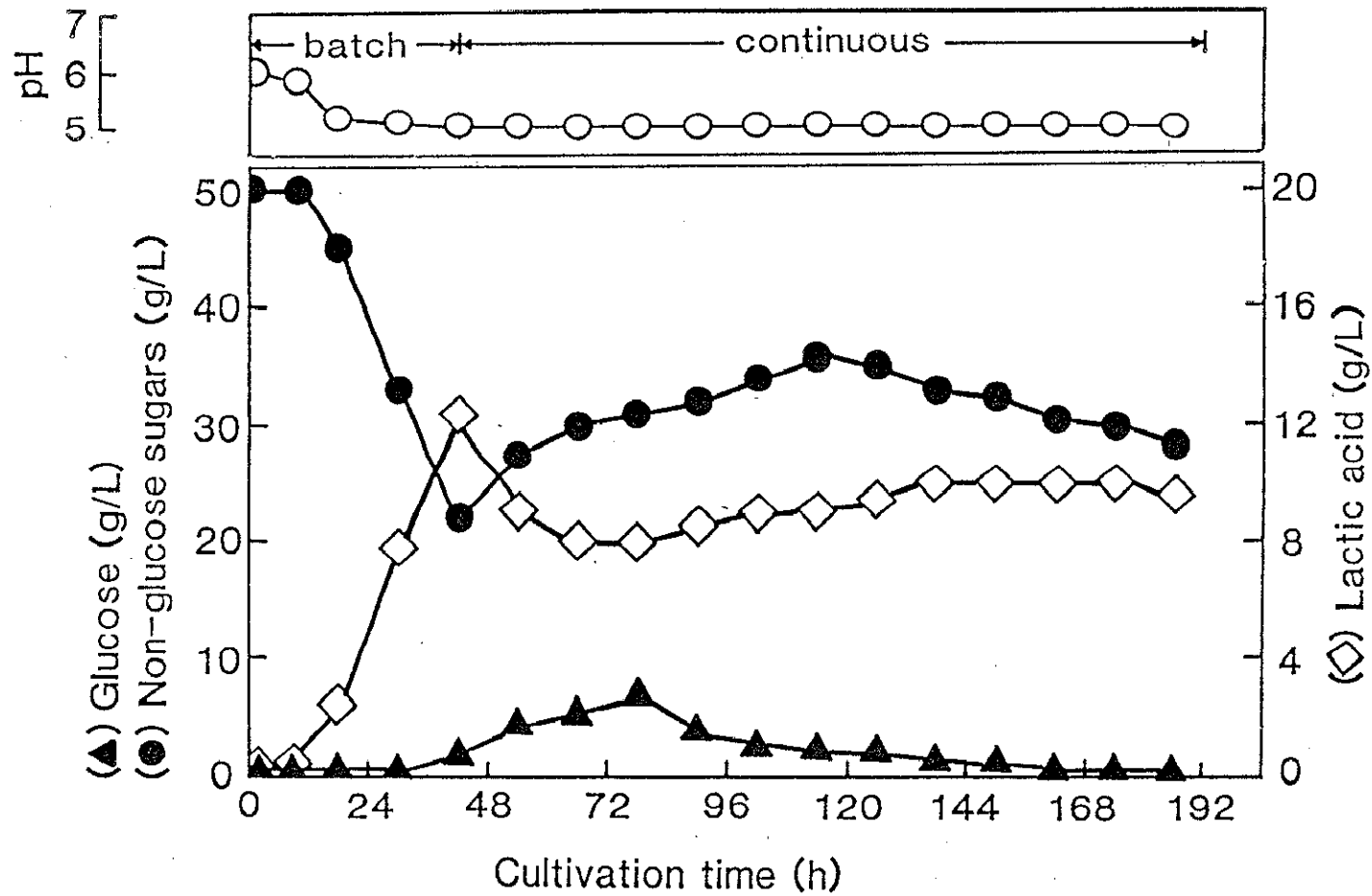


Fig. 5-3. Lactic acid production from 5% starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis* in continuous culture.

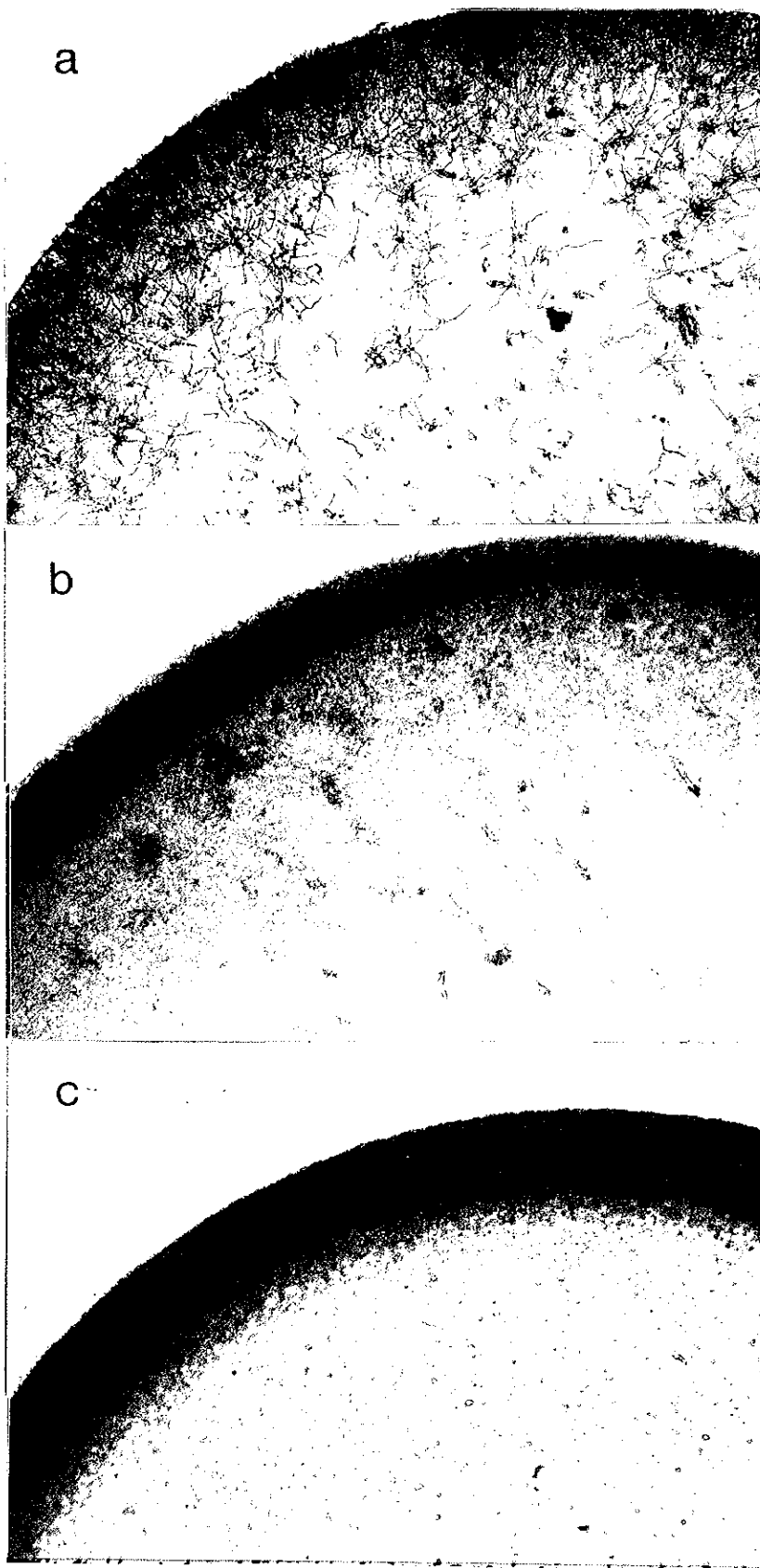


Fig. 5-4-a,b,c. Microphotographs of sectioned gel beads growing Aspergillus awamori and Streptococcus lactis inside the gel:
a, immobilized Asp. awamori; b, immobilized S. lactis;
c, coimmobilized mixed culture system of Asp. awamori and S. lactis.

なゲルビーズ表層部に生育しているが、S. lactis はゲルビーズ全体に生育していると思われる。これより、Asp. awamori と S. lactis のゲルビーズ内でのすみ分けは、起こりにくいことが推測された。しかし、酸素を取り込みやすいゲルビーズの表層部には主に Asp. awamori が、嫌気状態のゲルビーズ中心部には主に S. lactis が生育し、2菌株間の競争は少なく、2菌株はゲルビーズ内ではほぼ共生関係になっていると考えられる。2菌株の代謝作用は乳酸の生産に関して協調的に働き、デンプンから直接乳酸を生産することができたことから、混合固定系は好気性菌と耐性嫌気性菌による乳酸発酵にも応用可能であると考えられた。

5-4 第5章の結論

好気性菌の Asp. awamori と耐性嫌気性の乳酸菌でデンプンを直接利用できない S. lactis の混合固定系を作製し、それを用いてデンプンから直接乳酸を生産することができた。S. lactisが耐性嫌気性菌であるために、Asp. awamori との対酸素挙動の差は比較的小さく、Asp. awamoriと Z. mobilis の間で見られたようなゲルビーズ内でのすみ分けは明確には現れなかった。しかし、2菌株は競争することなくゲルビーズ内に共存し、回分培養において、5%のデンプン培地から 25g/L ($Y_{P/S} = 0.66$)の乳酸を生産することができた。この収率は、S. lactis の単一固定化培養によってグルコースから得られる収率 ($Y_{P/S} = 0.88$) の 75%であった。Asp. awamori による糖消費を考慮するならば、混合固定系によって得られた乳酸の収率は妥当なものであると思われる。したがって、Fig. 5-5 に示すような系内の2菌株の相互代謝作用が、乳酸の生産に関して良好に機能していると考えられる。さらに連続培養において 8 から 10g/L の乳酸を定常的に5日間生産することができ、この間混合固定系の形態と強度がともに安定していたことから、Asp. awamori と S. lactis の混合固定系が、長期の連続使用

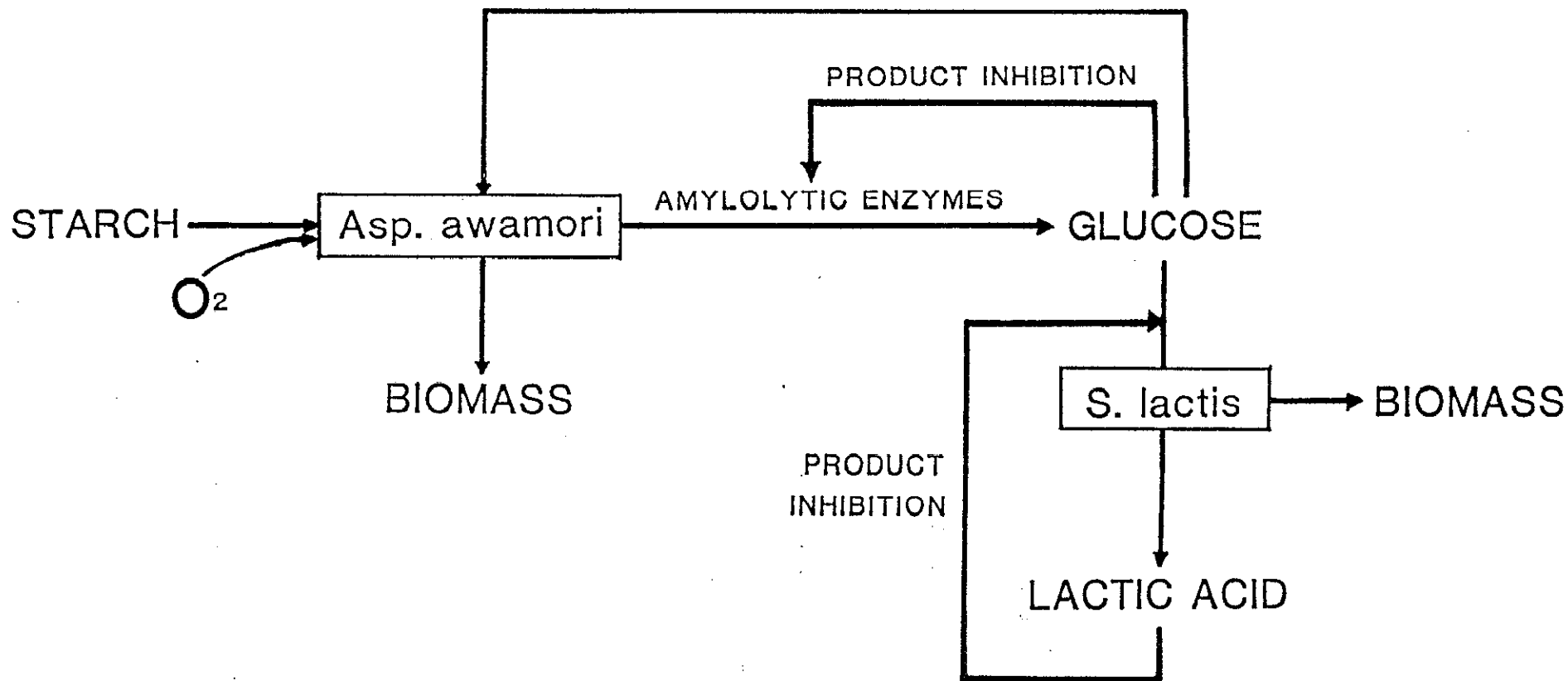


Fig. 5-5. Scheme for correlation of metabolisms between Aspergillus awamori and Streptococcus lactis in coimmobilized mixed culture system.

に耐えうることが示唆された。以上のことから、混合固定系はエタノール発酵のほかに乳酸発酵にも応用できること、また混合固定系は好気性菌と偏性嫌気性菌の組み合わせだけでなく、好気性菌と耐性嫌気性菌の組み合わせにも利用できることが明らかになった。このことは、混合固定系が、好気性菌と嫌気性菌を組み合わせで行うことのできる種々の発酵生産に、広く利用可能であることを示唆している。

第 6 章 好気性菌と通性嫌気性菌からなる混合固定系による物質生産

6-1 序

これまでに良好な結果が得られた混合固定系は、同時に固定化する 2 菌株間に酸素の取り込みに関する競争がみられない場合に限られている。例えば、酸素によって増殖が阻害される偏性嫌気性菌 (*Zymomonas mobilis*) と好気性菌 (*Aspergillus awamori*) の組み合わせや、増殖に酸素を必要としない耐性嫌気性菌 (*Streptococcus lactis*) と好気性菌 (*Asp. awamori*) の組み合わせにおいて、それぞれ妥当なエタノール生産性および乳酸生産性を得ることができた。しかし、酸素の存在下では酸素を利用して増殖することができる酵母のような通性嫌気性菌と好気性菌を組み合わせた場合には、2 菌株の酸素要求性が近似しているために酸素の取り込みにおいて競争が生じてしまい、期待したような混合固定系は形成されず、良好な生産性を得ることができないものと予測される。本章では、混合固定系を広い範囲の 2 菌株の混合培養に応用できるようにするために、好気条件下での酸素要求性が近似している *Asp. awamori* と *Saccharomyces cerevisiae* の混合固定系によるデンプンからのエタノール生産をモデルケースとして取り上げ検討した。はじめに、第 4 章で確立した *Asp. awamori* と *Z. mobilis* の混合固定系との比較を行い、*Asp. awamori* と *S. cerevisiae* を組み合わせた混合固定系の問題点を明らかにした。次に、問題点を克服して混合固定系を広い範囲の 2 菌株に適用可能にするための 1 つの改善方法を提案した。

6-2 実験材料および方法

使用薬品類： アルギン酸ナトリウムは、和光純薬（株）から購入した。Vantocil IB は花王-アトラス（株）から入手した。Vantocil IB は広い抗菌スペクトルを持つ塩化ビグアニド系の殺菌剤で、その主成分は polybiguanide

hydrochloride である。この殺菌剤は、食品工業の機械や容器の消毒、殺菌に用いられており、ホ乳類に対する毒性は非常に低いことが確かめられている。その他の化学薬品はすべて試薬を用いた。

使用菌株と種菌培養：デンプン加水分解酵素を生産する菌として、好気性菌の Aspergillus awamori IFO 4033 を用いた。エタノール生産菌として、通性嫌気性菌でデンプンを直接利用できない Saccharomyces cerevisiae IFO 0309 を用いた。また、比較するために偏性嫌気性菌の Zymomonas mobilis IFO 13756 も用いた。Asp. awamori と Z. mobilis の保存培養と種菌培養は、第4章-2に前述した方法に従った。S. cerevisiae は 1% glucose, 0.5% peptone, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 1.5% agar からなる Y-M 寒天培地で保存培養した。保存菌を増殖培地(100mL)に植菌し、坂口フラスコを用い 30℃で 16 時間の往復振盪培養を行い、菌細胞を増殖させ実験に供した。増殖培地の組成は、3% glucose, 0.8% KH_2PO_4 , 0.2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.8% yeast extract である。

固定化法：各々の菌の単一固定化および混合固定化は、第4章-2に前述した方法に従い行った。単一固定化の場合は、Asp. awamoriの胞子、S. cerevisiae および Z. mobilisの細胞を別々に 50mLのアルギン酸ナトリウム溶液に混合した。混合固定化の場合は、Asp. awamoriの胞子と S. cerevisiaeの細胞、または Z. mobilisの細胞を同時に 50mLのアルギン酸ナトリウム溶液に混合した。これらのアルギン酸溶液を 150mLの 0.1M の CaCl_2 溶液中に滴下、攪拌してゲルビーズを作製した。出来上がったゲルビーズのアルギン酸濃度は 2%、ビーズの直径は 2.8 mm であった。ゲルビーズに含まれる細胞濃度は、Asp. awamoriの胞子が 1.25×10^9 spores/L-gel、S. cerevisiae と Z. mobilis の細胞がいずれも 0.5g/L-gelとなるようにした。

培養方法：Asp. awamoriの単一培養と混合培養は、デンプンを炭素源とした生産培地で行った。その培地組成は、2%, 5% starch, 0.5% peptone, 0.2% yeast extract, 0.1% MgSO₄·7H₂O, 0.1% KH₂PO₄, 0.001% FeSO₄·7H₂O, 0.2% CaCl₂·2H₂O (pH 5.5)である。これらの培地を今後、2% デンプン培地および 5% デンプン培地と呼ぶことにする。S. cerevisiaeと Z. mobilis の単一培養には、炭素源を 2% glucoseにした以外は上記と同じ組成の生産培地を使用した。この培地を 2% グルコース培地とした。これらの生産培地 200mLにゲルビーズ 40g を入れて培養した。固定化していない細胞の場合は、生産培地 200mL に対して S. cerevisiae または Z. mobilis の細胞を乾重で 20mg、Asp. awamoriの胞子で 5.0×10^7 個を接種した。Vantocil IB を添加する場合は、培地中での濃度が 0.1, 0.2, および 0.5% となるように必要に応じて添加した。培養は 500mL容のエルレンマイヤーフラスコを用いて温度 30℃、振盪速度 220rpm で行った。

Asp. awamoriと S. cerevisiae の混合固定系の連続培養は、第5章-2に前述した方法で行った。400g のゲルビーズを 0.2%の Vantocil IB を含有する 2 Lの 5% デンプン培地中で培養した。2% の Vantocil IB を含有する 5% デンプン培地を、希釈率 0.043 h^{-1} で連続的に供給し、同じ速度で培養液を排出した。通気速度を 0.5vvm とし、溶存酸素濃度を 1 ppm に維持するために攪拌速度を自動的に変化させた。温度は 30℃ に保持した。

分析方法およびゲルビーズ内の顕微鏡観察：糖濃度、エタノール濃度、および菌体量の測定は、第4章-2に前述した方法にしたがって行った。また、第3章-2に前述した El-Sayedら³⁾の方法に従い、ゲルビーズ内の細胞分布を位相差顕微鏡で観察した。

6-3 実験結果および考察

6-3-1 単一培養

初めに *Z. mobilis* と *S. cerevisiae* の懸濁細胞の単一培養を行い、2菌株の増殖を、培養条件が好氣的な場合(振盪培養 220rpm)と嫌氣的な場合(静置培養)とで比較した。実験から得られた最大比増殖速度(μ_{max})と最終菌体濃度(X)を Table 6-1 に示す。*Z. mobilis* の μ_{max} と X は、好氣的培養条件よりも嫌氣的培養条件のほうが高い値を示した。これに対して *S. cerevisiae* の場合は、いずれの値も好氣的条件のほうが嫌氣的条件よりも高い値を示した。

次に、*Z. mobilis* と *S. cerevisiae* の固定化細胞を好氣的条件下で培養し、培養終了時のゲルビーズ内の細胞分布を観察した。ゲルビーズ切片の顕微鏡写真を Fig. 6-1 に示す。*Z. mobilis* はゲルビーズ全体に均一に生育した(Fig. 6-1-a)。このことは、Groteら⁴⁰⁾も確認している。一方 *S. cerevisiae* は、ゲルビーズ表層部の限られた範囲に高濃度に生育し、ゲルビーズ中心部分に生育する細胞は少なかった(Fig. 6-1-b)。

6-3-2 混合培養

2つのタイプの混合固定系を作製した。1つは *Asp. awamori* と *Z. mobilis* の組み合わせからなる Asp-Z系で、もう1つは *Asp. awamori* と *S. cerevisiae* の組み合わせからなる Asp-S系である。2菌株の混合比は、第4章-3で明らかになった *Asp. awamori* と *Z. mobilis* の最適混合比とした。これらの混合固定系を 2% デンプン培地中でフラスコを用い培養した結果を Fig. 6-2 に示す。図から明らかなように、Asp-Z系で生産されたエタノールは 6.6g/Lであったのに対し、Asp-S系ではわずかに 2.0g/Lのエタノールが生産されたにすぎなかった。また Asp-S系では、ゲルビーズからの細胞漏出が顕著で、漏出細胞は培養液中で増

Table 6-1. Maximum specific growth rate and cell mass of microorganisms at the end of cultivation under aerobic and anaerobic culture conditions in 2%-glucose medium.

microorganisms	culture condition	maximum specific growth rate (h^{-1})	cell mass (g/L)
<u>Z. mobilis</u>	aerobic (220 rpm)	0.25	0.7
	anaerobic (static)	0.33	0.9
<u>S. cerevisiae</u>	aerobic (220 rpm)	0.58	3.1
	anaerobic (static)	0.25	2.1

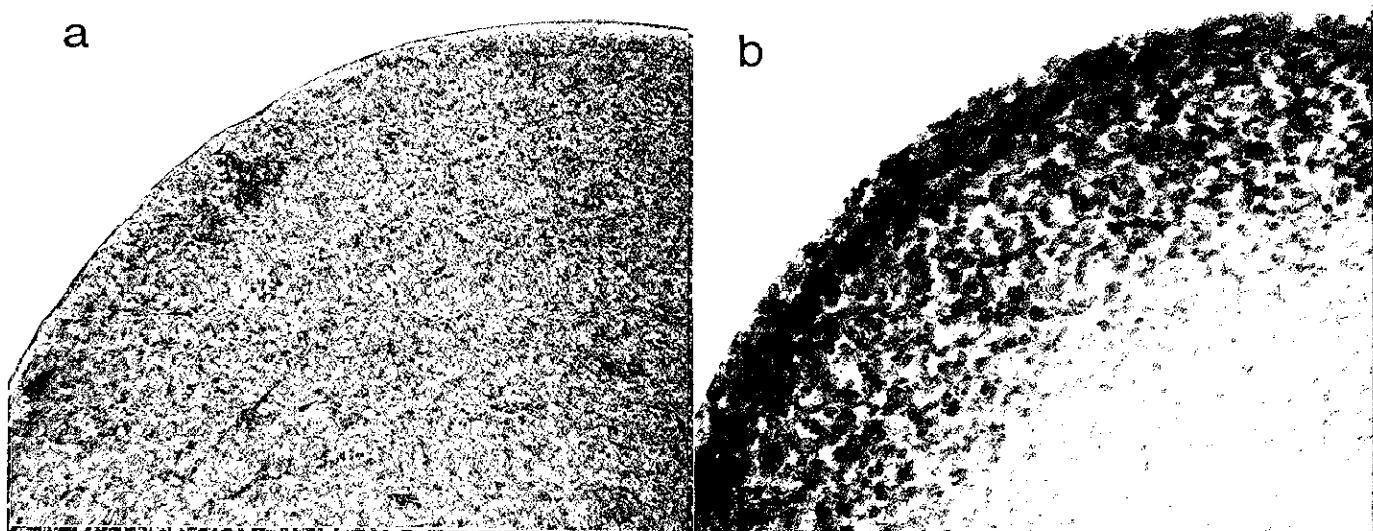


Fig. 6-1. Microphotographs of sectioned gel beads(mono-immobilization) after 8 h of incubation: a, Z. mobilis; b, S. cerevisiae.

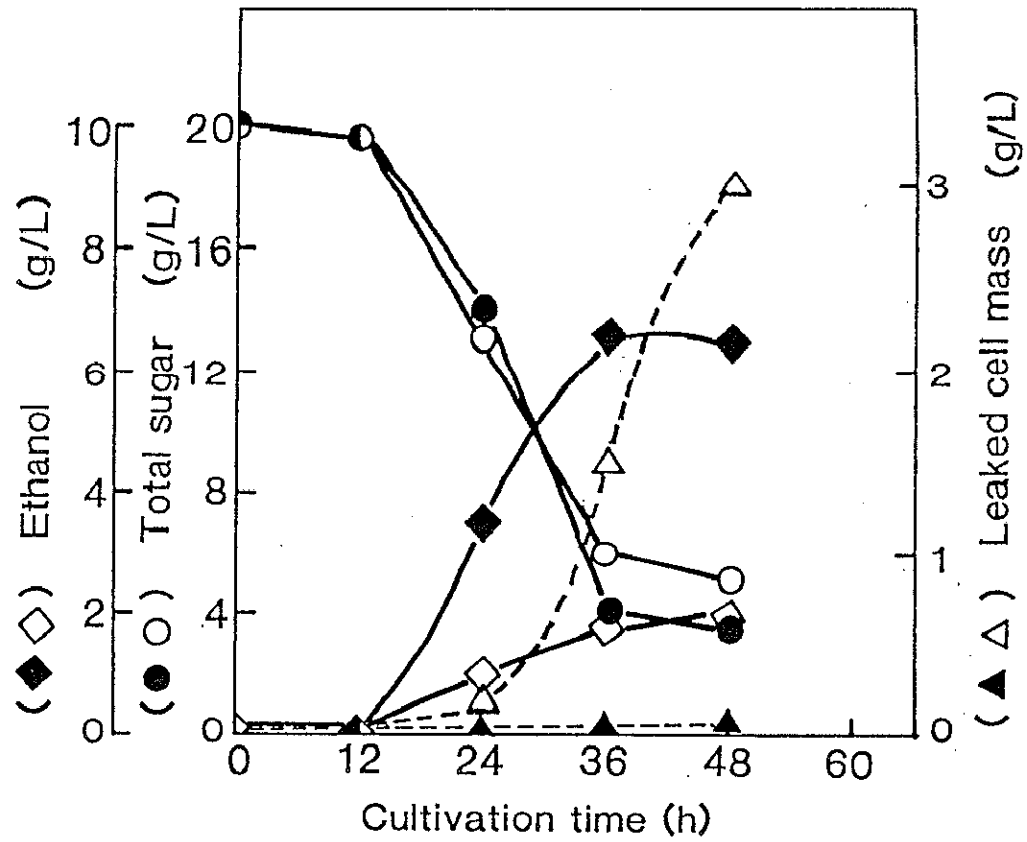


Fig. 6-2. Comparative cultivation of Aspergillus-Zymomonas system (●,◆,▲) and Aspergillus-Saccharomyces system(O,◇,△) in 2%-starch medium.

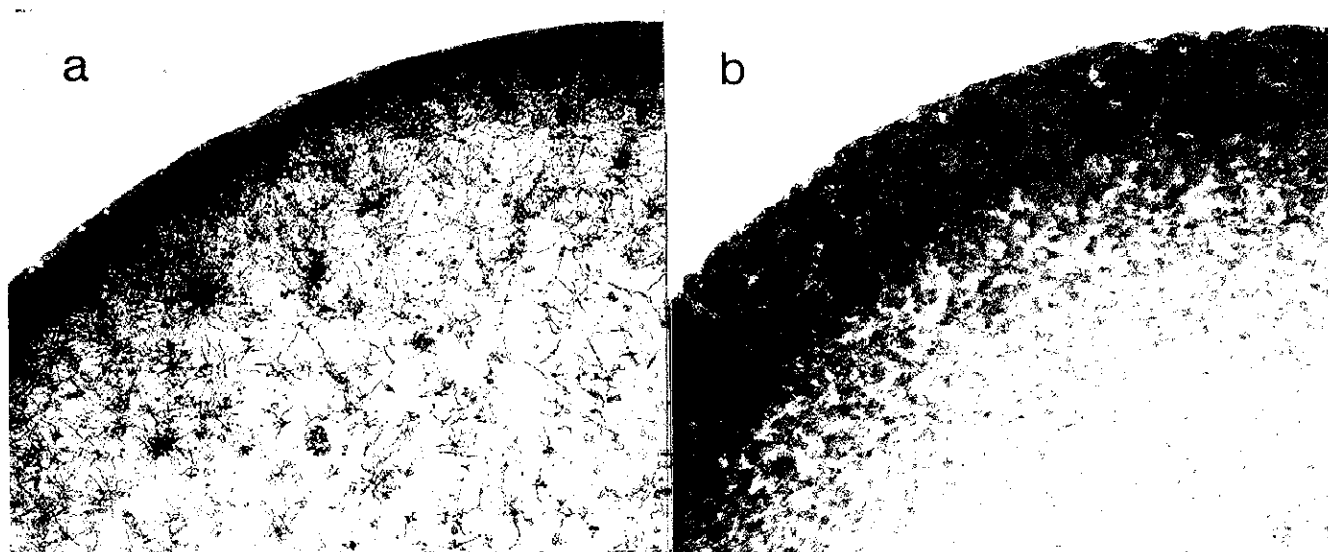


Fig. 6-3. Microphotographs of sectioned gel beads (coimmobilization) after 24 h of incubation: a, Aspergillus-Zymomonas system; b, Aspergillus-Saccharomyces system.

殖した。ゲルビーズ外で増殖した細胞の量は、最終的におよそ 3g/L にまで達した。Asp-Z系では細胞漏出はほとんどみられなかった。Asp-S系でエタノール生産性が低かったのは、大部分の基質が漏出細胞によってエタノール生産を伴うことなく好氣的に代謝されたためであると思われる。

2種の混合固定化ゲルビーズ内の培養 24 時間目における細胞分布の写真を Fig. 6-3 に示す。上記の結果と Fig. 6-3-a から、Asp-Z系では Asp. awamori が好氣的なゲルビーズの表層部に、Z. mobilis が酸素が不足するゲルビーズの中心部に主に生育していると判断された。これに対して Asp-S系では、酸素を取り込み易いゲルビーズの表層部において2菌株が競争的に増殖していることが、これまでの結果と Fig. 6-3-b から推察された。

Asp-S系のエタノール生産性を高めるために、Asp. awamori と S. cerevisiae の混合比、培地組成、および固定化法の工夫などを試みたが、エタノールの生産性は改善されなかった。

6-3-3 微生物細胞に及ぼす Vantocil IB の影響

Asp-S系のエタノール生産性は、2菌株間の競争を抑制し、ゲルビーズ内での2菌株の細胞分布をすみ分けの状態に近づけることによって改善できると考えられた。Asp-Z系では2菌株の酸素要求性の違いから2菌株のゲルビーズ内の細胞分布に差が生じ、自然にすみ分け状態が形成された。しかし、Asp-S系では2菌株の酸素要求性が類似しているため、自然な形でのすみ分けは期待できない。ここでは殺菌剤が微生物細胞に及ぼす影響の違いを利用して、強制的に2菌株の増殖を制御してすみ分け状態を形成させることにした。殺菌剤は食品工業において用いられている Vantocil IB を使用した。

初めに S. cerevisiae に対する Vantocil IB の抗菌活性を調べた。S. cerevisiae の懸濁培養と固定化培養を Vantocil IB を含む 2% グルコース培地

で培養した。Vantocil IB の添加濃度は 0.1, 0.2, 0.5% として、フラスコを用いて培養した。対照として、Vantocil IB を含まないときの培養も行った。ゲルビーズ内の細胞量を測定するのは簡単でないので、細胞増殖に密接に関連しているグルコース消費を細胞増殖の指標として測定した。懸濁細胞と固定化細胞によるグルコースの消費経過をそれぞれ Fig. 6-4 と Fig. 6-5 に示す。懸濁細胞の場合 (Fig. 6-4) は、Vantocil IB を添加しないとグルコースは 8 時間で完全に消費され、3.1g/L の細胞増殖がみられた。しかし、Vantocil IB を添加した場合はグルコースの消費、細胞の増殖ともに、ほとんどみられなかった。固定化細胞の場合 (Fig. 6-5) は、Vantocil IB が添加されているにもかかわらず、グルコースは完全に消費された。ただし Vantocil IB の添加濃度が増加するにしたがって、培養時間は長くなった。Fig. 6-6 は 0.2%-Vantocil IB を含む培地中で 10 時間培養したゲルビーズ内の顕微鏡写真である。写真から、*S. cerevisiae* が高密度に分布しているのはゲルビーズ表層部ではなく、いくらか内側の部分であることがわかった。このゲルビーズ内の細胞分布は、Vantocil IB を添加しないで培養したときの細胞分布 (Fig. 6-1-b) とは明らかに異なっていた。

次に、*Asp. awamori* に対する Vantocil IB の抗菌活性を調べた。2% デンプン培地中で *S. cerevisiae* の場合と同様の検討を行った。懸濁培養のときの加水分解経過を Fig. 6-7 に示す。0.1 から 0.2% の Vantocil IB が存在しても、菌糸の増殖とデンプンの加水分解が行われた。このことは、Vantocil IB の抗菌作用が、カビの *Asp. awamori* に対しては弱く、*S. cerevisiae* に対しては強く働くことを示している。ただし Vantocil IB の添加濃度が増加するにしたがって培養時間が長くなり、0.5%-Vantocil IB の存在下では 84 時間経ってもデンプンは分解されなかった。固定化細胞の場合は 0.5%-Vantocil IB が存在する場合を除いて、ほとんど Vantocil IB の影響を受けなかった。Fig. 6-8 に示すように、Vantocil IB を添加しないときの培養経過と 0.1, 0.2%-Vantocil IB を

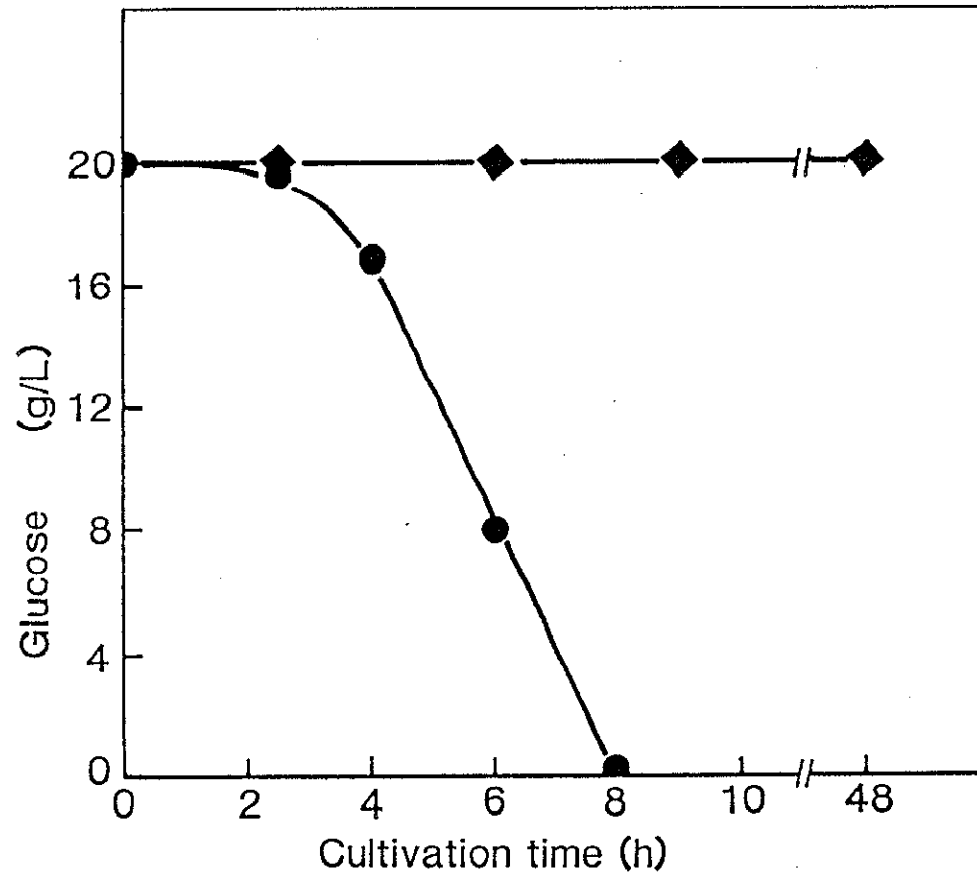


Fig. 6-4. Effect of Vantocil IB on glucose consumption of free *Saccharomyces cerevisiae*: ●, without Vantocil IB; ◆, with 0.1, 0.2, and 0.5%-Vantocil IB.

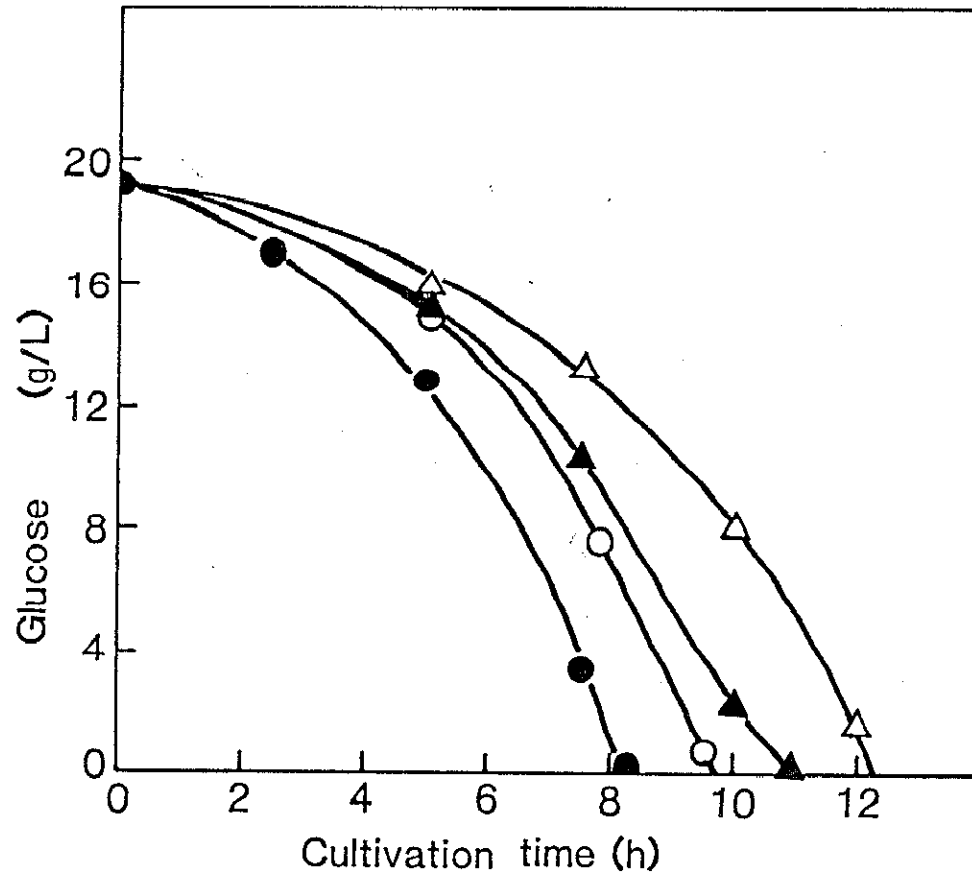


Fig. 6-5. Effect of Vantocil IB on glucose consumption of immobilized *Saccharomyces cerevisiae*: ●, without Vantocil IB; ○, with 0.1% Vantocil IB; ▲, 0.2% Vantocil IB; △, 0.5% Vantocil IB.

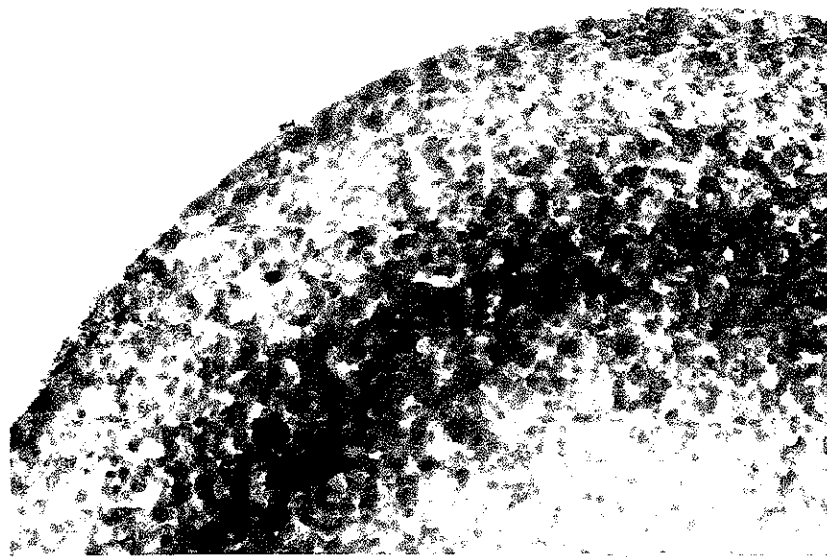


Fig. 6-6. Microphotograph of sectioned gel beads(immobilized S. cerevisiae) incubated for 10 h in medium with 0.2%-Vantocil IB.

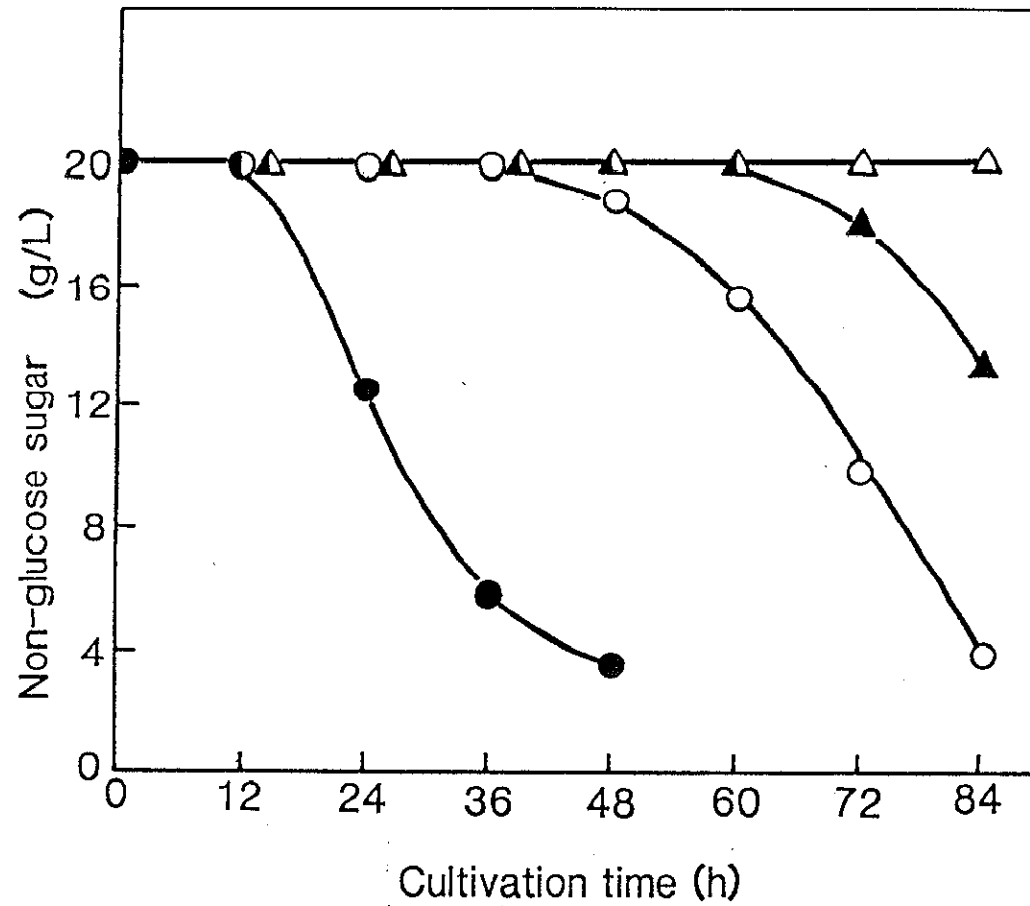


Fig. 6-7. Effect of Vantocil IB on free *Aspergillus awamori*:
 ●, without Vantocil IB; ○, 0.1%-Vantocil IB; ▲, 0.2%-Vantocil IB;
 △, 0.5%-Vantocil IB.

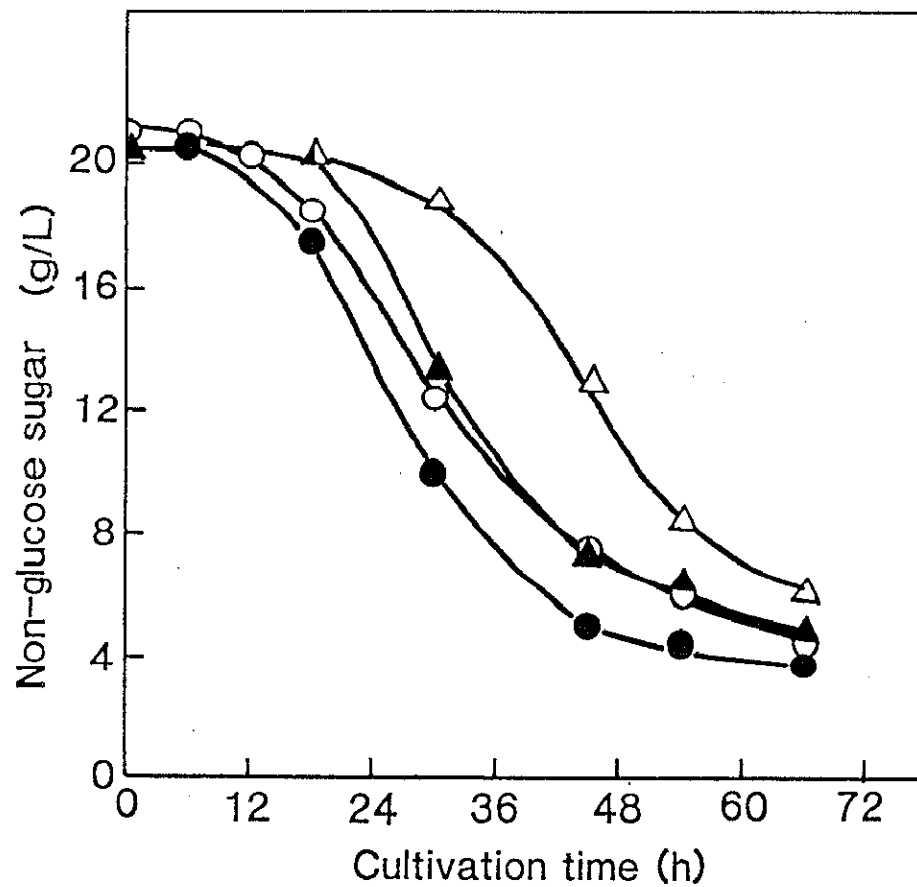


Fig. 6-8. Effect of Vantocil IB on immobilized Aspergillus awamori:
 ●, without Vantocil IB; ○, 0.1%-Vantocil IB; ▲, 0.2%-Vantocil IB;
 △, 0.5%-Vantocil IB.

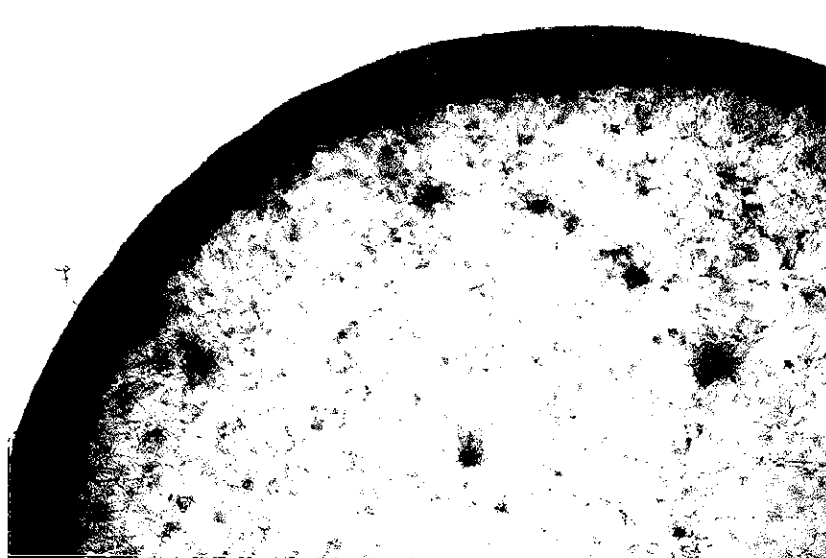


Fig. 6-9. Microphotograph of sectioned gel beads (immobilized Asp. awamori) incubated for 48 h in medium with 0.2% Vantocil IB.

含有するときの培養経過はほぼ一致した。ゲルビーズ内での菌糸の生育は、Fig. 6-9 に示すようである。0.2%のVantocil IBが存在する場合でも、Asp. awamoriの菌糸はゲルビーズの表層部に生育して、濃い菌糸層を形成した。

以上の結果から、Vantocil IBの殺菌作用は、S. cerevisiaeに対して強く、Asp. awamoriに対して弱く働くこと、また Vantocil IB はアルギン酸カルシウムゲルで包括されている細胞には作用しにくいことが明らかになった。固定化細胞に Vantocil IB が作用しにくい理由は、Vantocil IB の物質移動がゲルによって妨げられたか、Vantocil IB がゲルに吸着されたためであると推察される。

6-3-4 Vantocil IB を用いた混合固定系の培養

Asp-S系を 0.1, 0.2, および 0.5% の Vantocil IB を含む 2% デンプン培地中で培養した。エタノールの生産経過と残糖量の変化を Fig. 6-10 に示す。0.1 および 0.2% の Vantocil IB を含む場合は、48 時間で 16g/L のデンプンが消費され、4.5g/L のエタノールが生産された。エタノールの対糖収率($Y_{P/S}$)は、0.28 であった。Vantocil IB を添加したときのエタノール収率は、Vantocil IB を添加しないときのおよそ 2 倍であった。S. cerevisiaeの単一培養での収率($Y_{P/S} = 0.4$)と Asp. awamoriによる糖の消費を考慮するならば、このエタノール収率は妥当なものであると思われる。さらに Vantocil IB を添加した場合には、S. cerevisiaeの細胞漏質はほとんどみられなかった。ただし 0.5% の Vantocil IB を含有する培地中で培養したときは、培養時間が長くなり、生成エタノール濃度は 3.6g/L にすぎなかった。Fig. 6-11 は、0.2% の Vantocil IB を含有する培地中で培養した混合固定系内での 2 菌株の細胞分布を示した顕微鏡写真である。写真からは 2 菌株のすみ分けは、明瞭には確認されなかった。しかし、前述の結果と写真(Fig. 6-6, 9, 11)から、Asp. awamoriの菌糸が主に生育

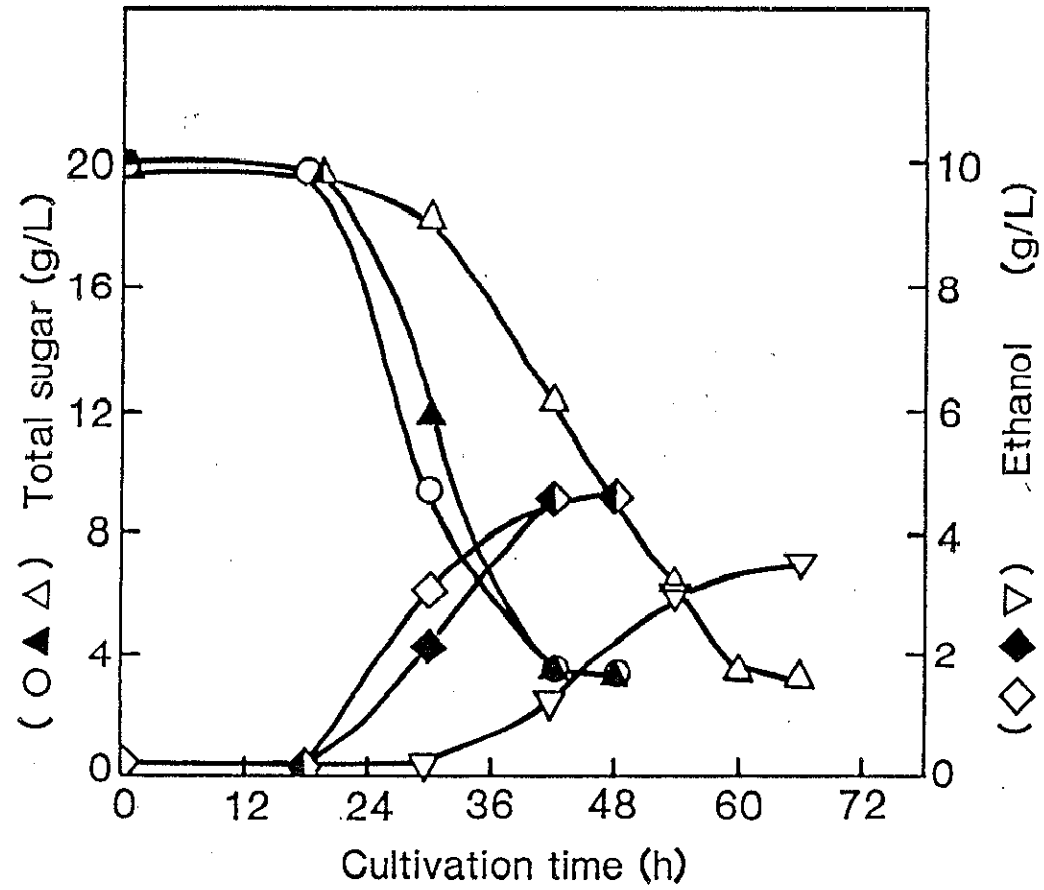


Fig. 6-10. Ethanol production from 2% starch by Aspergillus-Saccharomyces system with Vantocil IB: O, 0.1%-Vantocil IB; ▲, 0.2%-Vantocil IB; △, 0.5%-Vantocil IB.

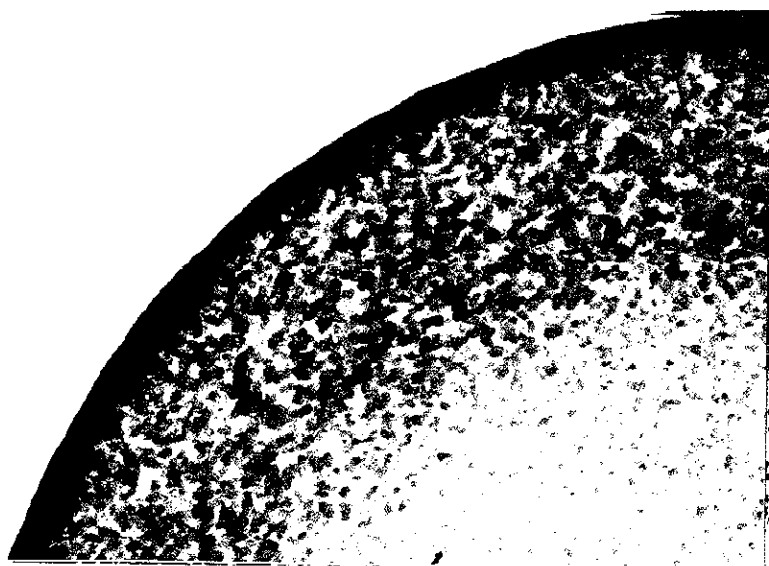


Fig. 6-11. Microphotograph of sectioned gel beads(Aspergillus-
Saccharomyces system) incubated for 48h in medium with 0.2%-Vantocil IB.

しているのはゲルビーズの表層部であるが、*S. cerevisiae* が最も高密度に生育しているのはゲルビーズの表層よりもいくらか内側の部分であることが推定された。この現象は 0.1%-Vantocil IB 添加のときよりも 0.2%-Vantocil IB 添加の時のほうが明瞭に現れた。

0.2% の Vantocil IB を含む 5% デンプン培地においても同様の培養を試みた。Fig. 6-12 に示されるように、5% デンプン培地においても Vantocil IB は適切な活性を示し、Vantocil IB を添加しないときよりも良好なエタノール生産性を得ることができた。Vantocil IB 無添加で生産されたエタノールは 5.2g/L であったが、Vantocil IB 添加のときは 12.3g/L のエタノールが生産された。

以上のことから、*Asp. awamori* と *S. cerevisiae* からなる混合固定系においては、Vantocil IB が高い安定性と生産性を得るための重要な要因になっていることがわかった。Vantocil IB の働きは、ゲルビーズ内での 2 菌株の増殖制御という点で、ちょうど *Asp*-Z 系における酸素の働きに相当していると思われる。

6-3-5 連続培養

Asp. awamori と *S. cerevisiae* からなる混合固定系の連続培養における安定性を検討した。およそ 400g のゲルビーズを 0.2% の Vantocil IB を含む 5% デンプン培地で培養した。初め培養は回分操作で行ったが、エタノール生産速度が最大(0.45g/L·h)になった時点(42時間後)から連続操作を開始した。0.2% の Vantocil IB を含む 5% デンプン培地を希釈率 0.043 h^{-1} で供給した。得られた結果を Fig. 6-13 に示す。連続操作は 6 日間行い、この間 7 から 9 g/L のエタノールを定常的に生産することができた。この間、ゲルビーズの形態および強度ともに安定しており、ゲルビーズからの細胞漏出はほとんどみられなかった。さらに Vantocil IB の抗菌活性の働きで、おおまかな無菌操作でも雑菌汚染は全く起こらないという実験操作上の利点もあった。

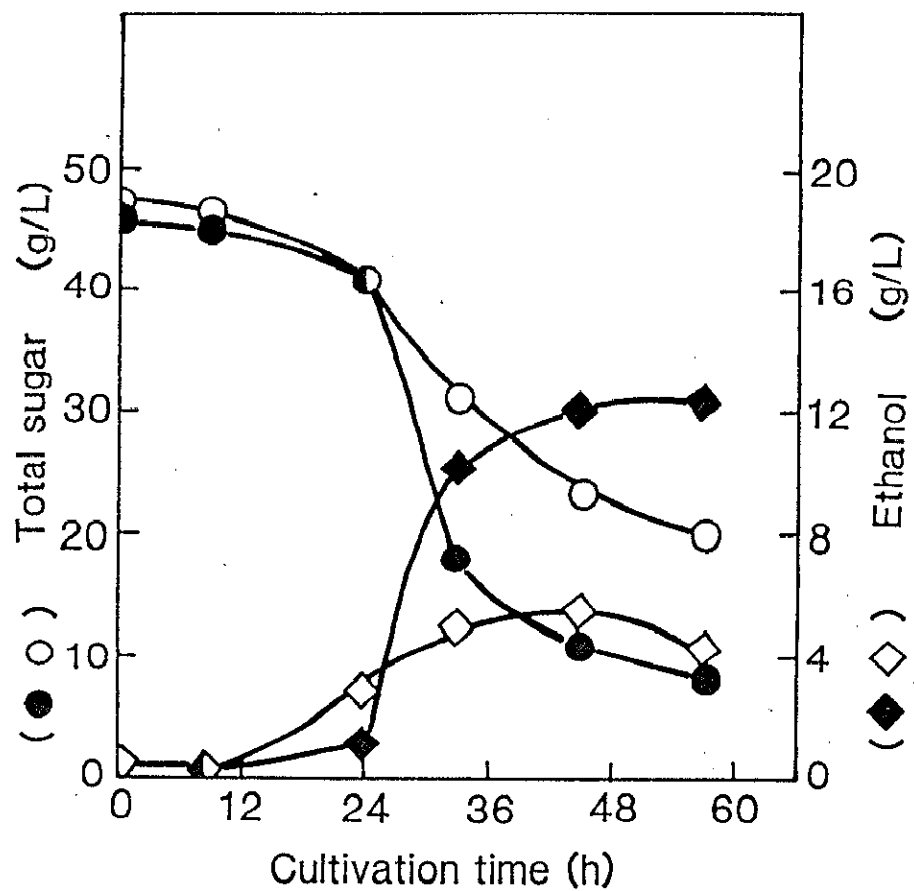


Fig. 6-12. Comparative cultivation of Aspergillus-Saccharomyces system in 5%-starch medium with and without Vantocil IB: (○,◇) without Vantocil IB; (●,◆) with 0.2%-Vantocil IB.

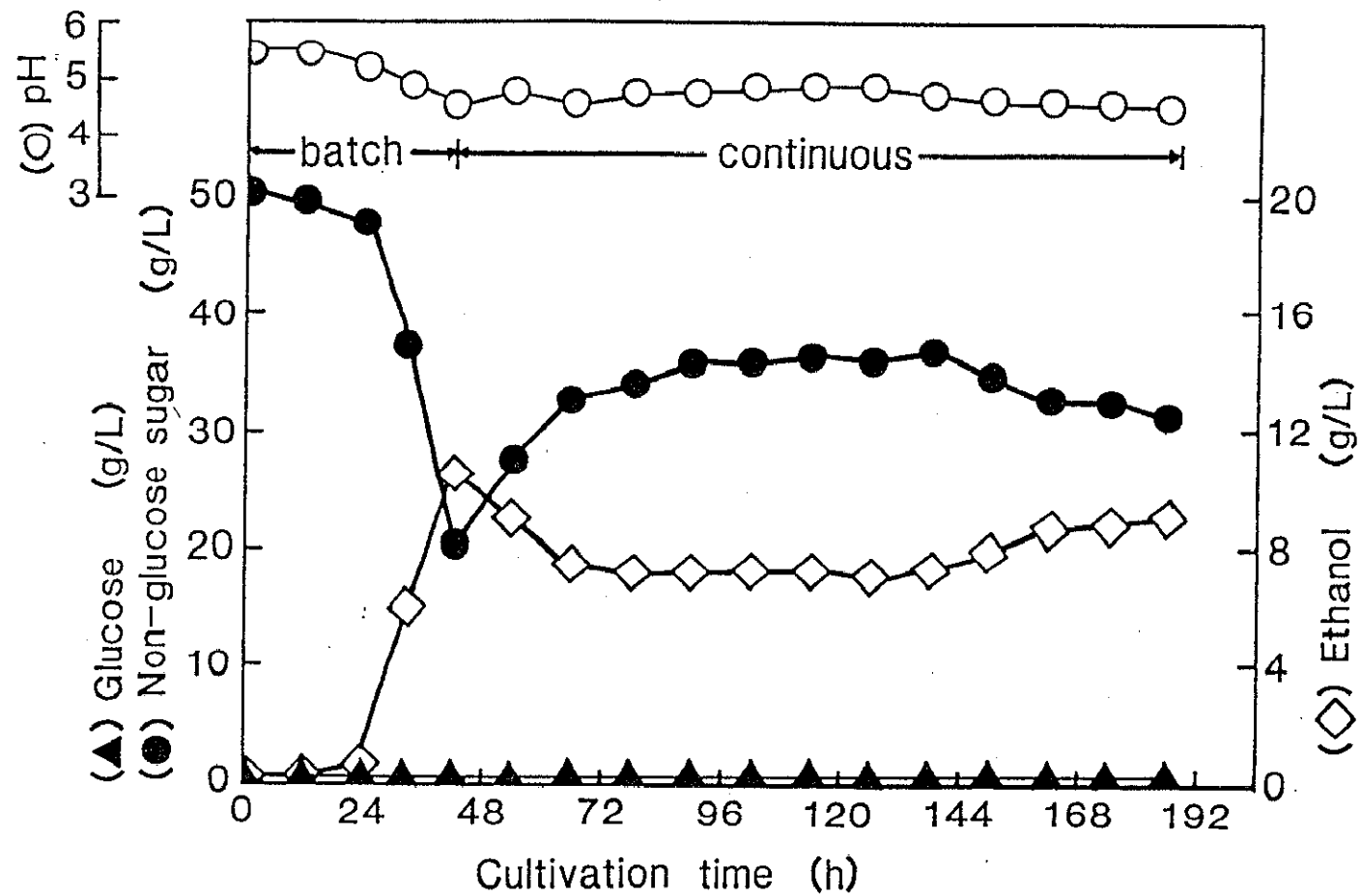


Fig. 6-13. Continuous ethanol production from 5% starch by Aspergillus-Saccharomyces system with 0.2% Vantocil IB.

6-4 第6章の結論

混合固定系は、2菌株間の酸素要求性の差を利用してゲルビーズ内に2菌株をすみ分けさせ、共生による協調的代謝関係を物質生産に応用したものである。この新しい混合培養システムは、1つのゲルビーズに2つの生細胞の機能をもたせることに成功しただけでなく、好気性菌の包括固定化で問題となるゲルビーズ中心部への酸素供給不足を、むしろ逆の発想で積極的に利用したという点でも画期的なものである。しかし、混合固定系が効率よく機能するのは2菌株の対酸素挙動に明確な差がある場合であり、酸素に対して似た挙動を示す菌どうしの組み合わせでは、系内の協調関係は成立しない。したがって、混合固定系が自然な形で適用できるのは、混合する2菌株間に酸素の取り込みに関する競争がみられない場合に限られるであろう。

本章では酸素の取り込みに関して競争が起こる Asp. awamori と S. cerevisiae の混合固定系を敢えて検討した。この2菌株の場合には、酸素要求性に応じたすみ分けは望めないため、酸素に代わって2菌株の増殖を制御する因子として、殺菌剤の Vantocil IB を選択した。Asp. awamori と S. cerevisiae に対して Vantocil IB は異なった影響を与えるために、Vantocil IB を含む培地中で混合固定系を培養すると、ゲルビーズ内での2菌株の細胞分布に差異が生じた。即ち、ゲルビーズの表層部には Vantocil IB の影響を比較的受けにくい Asp. awamori が主に生育し、菌糸層を形成した。一方ゲルビーズの中心部付近には、Vantocil IB の影響を受け易い S. cerevisiae が生育した。これは酸素要求性の違いを利用する自然なすみ分けに対して、強制的なすみ分けといえるであろう。これによって、2菌株間の競争が緩和され、エタノール生産性が Vantocil IB を添加しない場合の2倍以上にまで高められた。以上の結果は、2菌株間の競争を抑制し、ゲルビーズ内の菌を強制的にすみ分けさせるための因子を適切に選択することによって、混合固定系が種々の菌の組み合わせによって行われる広

い範囲の発酵生産に利用可能になることを示唆している。

第 7 章 総 括

本研究では、2種類の生細胞の同時固定化菌体の培養を効率よく行うことができ、好気性細胞の固定化培養の際に起こるゲルビーズの中心部への酸素供給不足が問題とならないように考慮した、新しい混合培養システムの開発について検討したものである。

第1章では、本研究の目的と方針を述べた。

第2章では、ゲル包括法による固定化細胞の問題点、固定化ゲルビーズ内の物質の拡散移動、混合培養および2つの触媒作用を持つ固定化生体触媒の開発に関する既往の研究を紹介し、本研究の意義を明らかにした。

第3章では、好気性細胞を固定化したゲルビーズ内への酸素供給が不足する原因と、酸素供給不足の程度を定量的に明らかにするために、ゲルビーズ内の酸素移動に関する基礎的検討を行った。はじめに、生細胞を含有するアルギン酸ゲルビーズ内の酸素の有効拡散係数 (D_e) を測定した。 D_e の値は、 $2.35 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ で、ゲルを取り巻いている液中の酸素の拡散係数にほぼ等しかったことから、ゲルビーズ内の酸素供給不足の原因は、ゲルにおける酸素の物質移動抵抗によるものではないことがわかった。次に、ここで求めた D_e を用いて、好気性細胞を含有するゲルビーズ内の酸素濃度分布を計算によって推定し、酸素がゲルビーズのどれだけ内部まで拡散可能かを定量的に明らかにした。一例として Asp. awamori (44 g/L-gel) を固定化したアルギン酸カルシウムゲルビーズ (半径1.5 mm)内の酸素濃度分布を推定した。Asp. awamoriの固定化菌体を、通常の酸素供給条件では得られないような高い溶存酸素濃度(0.218 mmol/L = 7 ppm)下で培養した場合でも、酸素が到達できるのはゲルビーズの表面から 300 μm 内部までであることがわかった。この範囲は実際に培養して得られた固定化 Asp. awamori のゲルビーズ内の生育範囲にほぼ一致していた。これらのことから、好気性菌の

増殖は、酸素を取り込み易いゲルビーズ表層部に限られ、酸素が到達しないゲルビーズの中心部は、菌の生育の場として有効に利用されないことが定量的に確認された。また溶存酸素濃度を、純酸素を供給した場合の飽和溶存酸素濃度(1.188 mmol/L = 38 ppm)に高めた場合でも、ゲルビーズの全体に十分な酸素供給を行うことはできず、ゲルビーズの中心付近は依然として嫌気的な状態であった。このことから、単に酸素供給を高めるだけでは、固定化好気性細胞への酸素供給不足の問題は容易には解決されないことが示唆された。

第4章では、酸素が不足するゲルビーズ中心部への酸素供給を高めるのではなく、ゲルビーズの嫌気的な部分を嫌気性菌の生育の場として積極的に利用するという発想のもとに、同一ゲルビーズ内での好気性菌と嫌気性菌の混合培養を行った。すなわち、2菌株の酸素要求性の違いを利用し、増殖に酸素を必要とする好気性菌をゲルビーズ表層部に、増殖に酸素を必要としない嫌気性菌をゲルビーズ中心部にすみ分けさせることを試みた。ここでは好気性のアミラーゼ生産菌でデンプンを分解する *Aspergillus awamori*と、酸素によって増殖が阻害される偏性嫌気性のエタノール生産菌でデンプンを直接利用できない *Zymomonas mobilis* をモデル菌株として選択し、それらを同一ゲルビーズ内に混合固定化し、その混合固定化菌体によってデンプンからのエタノール生産を行うことを試みた。その結果、これら2菌株の混合比を制御することによって、理想的な共生関係がゲルビーズ内に形成された。*Asp. awamori* は酸素を取り込みやすいゲルビーズ表層部に生育し、デンプンをグルコースに分解した。一方、*Asp. awamori* によって酸素が消費されてしまい嫌気的になるゲルビーズ中心部には、*Z. mobilis* が生育しグルコースをエタノールに速やかに転換した。このために培地中でのグルコースの蓄積はみられず、グルコースによってデンプンの加水分解が阻害されることはなかった。ここでは、このような混合培養システムを混合固定系と呼ぶことにした。混合固定系のエタノール生産性と長期利用性は、ゲルビーズの表面にお

ける *Asp. awamori* 菌系の過剰な増殖を抑制することによって高めることができた。菌系の過剰生育は、攪拌に伴い生じる剪断応力を利用して適度に抑制することができ、10%-デンプン培地で培養した場合に 25g/L ($Y_{P/S} = 0.38$) のエタノールを得ることができた。この収率は、2%-デンプン培地において得られた値 ($Y_{P/S} = 0.40$) よりは若干低いものの、*Z. mobilis* の単一固定化培養でグルコースから得られた収率 ($Y_{P/S} = 0.47$) の 80% に相当した。デンプンが分解されて生じたグルコースが *Asp. awamori* の増殖のためにも消費されていることを考慮するならば、混合固定系のエタノール収率は妥当な値であると思われる。なお、混合固定系で得られたエタノール収率は、*Asp. awamori* と *Z. mobilis* の懸濁培養の混合培養や、2 菌株を別々に固定化した固定化細胞の混合培養によって得られた収率よりも高いものであった。以上のことから、混合固定系が酸素要求性の異なる 2 菌株の混合培養に適したシステムであることが明らかになった。

混合固定系は酸素要求性の異なる好気性菌と嫌気性菌の混合培養に適したシステムであることがわかった。しかし、嫌気性菌として一括される菌であってもその酸素要求性はさまざまで、対酸素挙動の違いから、酸素によって増殖が阻害される偏性嫌気性菌、酸素が増殖に何ら影響を与えない耐性嫌気性菌、酸素を利用して増殖できる通性嫌気性菌の 3 種におおまかに分類されている。すでに対酸素挙動の違いが大きい好気性菌と偏性嫌気性菌を組み合わせた混合固定系に関しては、良好な結果が得られているが、さらに混合固定系の利用範囲を広げるために、好気性菌と耐性嫌気性菌の組み合わせ、および好気性菌と通性嫌気性菌の組み合わせに関して混合固定系を作製し、それらによる物質生産を行うことを目的とした。

第 5 章では、好気性菌の *Asp. awamori* と耐性嫌気性の乳酸菌でデンプンを直接利用できない *Streptococcus lactis* を用いて、混合固定系によるデンプンからの乳酸の生産を試みた。耐性嫌気性菌は偏性嫌気性菌のように酸素によって増

殖が阻害されることがないので、2菌株間の対酸素挙動の差は Asp. awamori と Z. mobilis の混合固定系の場合よりも小さく、ゲルビーズ内でのすみ分けは起こりにくいことが推定された。しかし、酸素を取り込みやすいゲルビーズの表層部には主に Asp. awamori が、嫌気状態のゲルビーズ中心部には主に S. lactis が生育し、2菌株間の競争は少なく、2菌株はゲルビーズ内でほぼ共生関係にあることが認められた。2菌株の代謝作用は乳酸の生産に関して協調的に働き、デンプンから直接乳酸を生産することができた。回分培養において 5% デンプン培地から 25g/L ($Y_{P/S} = 0.66$) の乳酸を生産することができた。この収率は、S. lactis の単一固定化培養によってグルコースから得られる収率 ($Y_{P/S} = 0.88$) の 75% であった。なお、Asp. awamori による糖消費を考慮するならば、この混合固定系によって得られた乳酸の収率は妥当なものであると思われる。さらに 5% のデンプン培地を連続的に供給した場合でも、8 から 10g/L の乳酸を定常的に 5日間生産することができた。この間、混合固定系の形態と強度はともに安定していたことから、Asp. awamori と S. lactis の混合固定系が、長期の連続使用に耐えうることが示唆された。以上のことから、混合固定系はエタノール発酵の他に乳酸発酵にも応用できること、好気性菌と偏性嫌気性菌の組み合わせだけでなく、好気性菌と耐性嫌気性菌の組み合わせにも利用できることが明らかになった。

これまでに良好な結果が得られた混合固定系は、同時に固定化する 2菌株間に酸素の取り込みに関する競争がみられないか、またはその競争が少ない場合に限られており、酸素を利用して増殖する酵母のような通性嫌気性菌と好気性菌の組み合わせのように、好気条件下において両菌株が酸素の取り込みに関して競合する場合には、ゲルビーズ内の 2菌株間に共生関係が成立せず、良好な生産性を得ることは難しい。

第6章では、好気条件下で酸素要求性が近似している 好気性の Asp. awamori

と通性嫌気性の酵母でデンプン直接利用できない Saccharomyces cerevisiae の混合固定系によるデンプンからのエタノール生産をモデルケースとして取り上げ、混合固定系が通常の形で適用できる限界を明らかにするとともに、限界を越えて混合固定系を活用するための1つの改善方法を提案した。 S. cerevisiae は酸素を利用して活発に増殖するので Asp. awamori と S. cerevisiae の混合固定系では、酸素要求性に応じたゲルビーズ内でのすみ分けは期待できない。そこで、酸素の代わりに2菌株の増殖を制御する因子として、塩化ビグアニド系の殺菌剤である Vantocil IB を用いた。 Vantocil IB の殺菌作用は S. cerevisiae に対して強く、 Asp. awamori に対して弱く働くので、 Vantocil IB を含む培地中で混合固定系を培養すると、ゲルビーズ内の2菌株の細胞分布には違いが生じることになる。すなわち、ゲルビーズの表層部には Vantocil IB の作用を受けにくい Asp. awamori が主に生育し、菌糸層を形成した。一方、ゲルビーズの中心部付近には、 Vantocil IB の作用を受けやすい S. cerevisiae が生育した。これは酸素要求性の違いを利用する自然なすみ分けに対して、微生物細胞に対する殺菌作用の違いを利用した強制的なすみ分けといえるであろう。これによって、2菌株間の競争が緩和され、エタノール生産性が Vantocil IB を添加しない場合の2倍以上にまで高められた。これらの結果は、2菌株間の競争を抑制し、ゲルビーズ内の菌を強制的にすみ分けさせる因子を適切に選択することによって、混合固定系が広い範囲の発酵生産プロセスに応用可能であることを示唆している。

以上の結果より、本研究で開発した混合固定系は、固定化好気性細胞における酸素供給不足の問題を解消し、かつ、2種類の生細胞の同時固定化培養による発酵生産を効率よく行うことができる新規の混合培養システムであることが明らかになった。特に混合固定系は、酸素要求性の異なる2種類の生細胞（好気性菌と嫌気性菌）の混合培養において有効であった。同一ゲルビーズ内に包括固定化さ

れた2菌株は、対酸素挙動の違いから、好氣的なゲルビーズ表層部と嫌氣的なゲルビーズの内部に自然にすみ分け、酸素の取り込みと物質生産において理想的な共生関係を形成した。この混合固定系を用いることによって、デンプンの糖化と発酵生産のような連続する2段階の反応を1つの培養槽内で同時に行うことが可能となり、発酵生産プロセスを簡素化できることが示唆された。また、混合固定系が長期の連続使用が可能であること、広範囲の好氣性菌と嫌氣性菌の組み合わせに応用できることなどから、菌の組み合わせを工夫することによって、さらに有用な物質を高収率で得ることも期待できる。したがって、本研究で開発した新しい混合培養システムは、種々の発酵生産に応用されていくであろうと思われる。

文 献

- 1) M. Wada, T. Uchida, J. Kato, and I. Chibata, *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 1175 (1980)
- 2) A. Shinmyo, H. Kimura, and H. Okada, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14, 7 (1982)
- 3) A-H.M.M. El-Sayed and H.J. Rehm, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 89 (1986)
- 4) B. Gosmann and H.J. Rehm, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 163 (1986)
- 5) M. Fujimura, J. Kato, T. Tosa, and I. Chibata, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 79 (1984)
- 6) J. Osuga, A. Mori, and J. Kato, *J. Ferment. Technol.*, 62, 139 (1984)
- 7) P. Adlercreutz, O. Holst, and B. Mattiasson, *Enzyme Microb. Technol.*, 4, 395 (1982)
- 8) O. Holst, S-O. Enfors, and B. Mattiasson, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14, 64 (1982)
- 9) P. Adlercreutz and B. Mattiasson, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 165 (1982)
- 10) K. Toda and M. Shoda, *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 481 (1975)
- 11) H. Tanaka, M. Matsumura, and I.A. Veliky, *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 53 (1984)
- 12) A-L. Nguyen and J.H.T. Luong, *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1261 (1986)
- 13) F.J.A. Merchant, A. Margaritis, J.B. Wallace, and A. Vardanis, *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 936 (1987)
- 14) M. Furui and K. Yamashita, *J. Ferment. Technol.*, 63, 167 (1985)
- 15) S. Furusaki and M. Seki, *J. Chem. Eng. Japan*, 18, 389 (1985)
- 16) B.J.M. Hannoun and G. Stephanopoulos, *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 829 (1986)

- 17) H. Hiemstra, L. Dijkhuizen, and W. Harder, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 189 (1983)
- 18) K. Sato and K. Toda, *J. Ferment. Technol.*, 61, 239 (1983)
- 19) M. Dostàlek and M.H. Häggström, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 269 (1983)
- 20) M.H. Häggström and M. Dostàlek, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 12, 216 (1981)
- 21) M.M. Abouzied and C.A. Reddy, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 1055 (1986)
- 22) 伊藤哲也、山下一郎、福井作蔵、日農化大会講演要旨、東京、p.81 (1984)
- 23) 井上浩明、坂井拓夫、日農化大会講演要旨、東京、p.80 (1984)
- 24) W. Hartmeier, *Process Biochemistry*, February p.40 (1984)
- 25) J.M. Lee and J. Woodward, *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 2441 (1983)
- 26) S. Damronglerd, P. Apiluktivongsa, T. Yamashita, N. Nilubol, S. Kinoshita and H. Taguchi, *Microbial Utilization of Renewable Resources*, 3, 245 (1983)
- 27) C.K.A. Martin and D. Perlman, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 3, 91 (1976)
- 28) H. Tanaka and K. Ueda, *J. Ferment. Technol.*, 53, 143 (1975)
- 29) H. Tanaka, *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 1203 (1981)
- 30) D.F. Othmer and M.S. Thakar, *Ind. Eng. Chem.*, 45, 589 (1953)
- 31) Lu-K. Ju and C.S. Ho, *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 1495 (1985)
- 32) C.S. Ho, Lu-K. Ju, and Cha-T. Ho, *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1086 (1986)
- 33) M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith, *Anal. Chem.*, 28, 350 (1956)
- 34) 福本寿一郎、*化学*、17, 136 (1961)

- 35) W. Grote and P.L. Rogers, *J. Ferment. Technol.*, 63, 289 (1985)
- 36) W.M. Dion, A. Carrilli, G. Sermoniti, and E.B. Chain, *Rend. Ist. Super. Sanita.*, 17, 187 (1954)
- 37) 田中秀夫、上田清基、*醸工*、53, 27 (1975)
- 38) 田中秀夫、宮川博、上田清基、*醸工*、52, 652 (1974)
- 39) T. Karsch, U. Stahl, and K. Esser, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 387 (1983)
- 40) W. Grote, S. Kouprach, W.N.E. Robinson, and P.L. Rogers, *Biomass*, 9, 75 (1986)

付 記

本論文は下記の誌上に発表した研究報告を中心にまとめたものである。

- 1) Hideo Tanaka, Hiroshi Kurosawa, Hiroshi Murakami,
"Ethanol Production from Starch by a Coimmobilized Mixed Culture
System of *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis*"
Biotechnology and Bioengineering, **28**, 1761-1768 (1986).
(本文の第4章に相当する。)

- 2) Hiroshi Kurosawa, Hidenori Ishikawa, Hideo Tanaka,
"L-Lactic Acid Production from Starch by Coimmobilized Mixed Culture
System of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*"
Biotechnology and Bioengineering, **31**, 183-187 (1988).
(本文の第5章に相当する。)

- 3) Hiroshi Kurosawa, Noboru Nomura, Hideo Tanaka,
"Ethanol Production from Starch by Coimmobilized Mixed Culture
System of *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces cerevisiae*"
Biotechnology and Bioengineering, accepted as BB-87-368, (1988)
(本文の第6章に相当する。)

- 4) Hiroshi Kurosawa, Masatoshi Matsumura, Hideo Tanaka,
"Oxygen Diffusivity in Gel Beads Containing Viable Cells"
Biotechnology and Bioengineering, in press (1989).
(本文の第3章に相当する。)

謝 辞

本研究は、終始、筑波大学応用生物化学系教授 田淵 武士 博士、同助教授 田中 秀夫 博士のご指導のもとに行われたものであり、その間適切なご助言とご教示を賜り、心から感謝の意を表します。また、同大学同学系講師 松村 正利 博士には懇切なご助言とご教示をいただき深く感謝致します。また、本研究の前半は、環境科学研究科において行われたものであり、その間適切なご助言とご教示をいただいた、同大学同学系教授 中村 以正 博士、同助教授 国府田 悦男 博士に深く感謝の意を表します。

研究成果の論文としてのまとめるに当たりましては、同大学同学系教授 片岡 廣 博士、同大学生物科学系助教授 山下 魏 博士に多大なご教示を賜りました。ここに厚くお礼申し上げます。

また、本論文を提出するにあたり、いろいろと便宜を図っていただきました、同大学応用生物化学系教授 高橋 穰二 博士、同教授 安井 恒男 博士、同大学生物科学系教授 岡田 益吉 博士に深く感謝致します。

本研究における諸実験の遂行にあつたては、培養工学研究室の学生 村上 洋司 氏（現・加商(株)）、石川 英律氏（現・筑波大農学研究科）、野村 登 氏（現・野村エステート）にお手伝いいただきました。ここに深謝申し上げます。

筑波大学附属図書館



業務用

本学関係
