

氏名(本籍)	黒 ^{くろ} 沢 ^{さわ} 尋 ^{ひろし} (茨城県)
学位の種類	学術博士
学位記番号	博甲第635号
学位授与年月日	平成元年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	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
主査	筑波大学教授 農学博士 田 淵 武 士
副査	筑波大学教授 工学博士 片 岡 廣
副査	筑波大学助教授 工学博士 田 中 秀 夫
副査	筑波大学助教授 理学博士 山 下 魏

論 文 の 要 旨

固定化細胞は、従来の浮遊細胞による発酵生産プロセスを効率化する方法として近年注目をされており、これまで、固定化細胞に関する多くの研究が行われてきた。しかしながら、固定化細胞が実際の発酵工業に利用された例は少なく、特に、固定化好気性細胞による利用例は皆無といえてよい。

本研究では、細胞の固定化操作が容易なために、現在最も広く用いられている高分子ゲル担体による包括細胞固定化法に注目し、固定化される細胞として好気性細胞が適していない原因を明らかにするとともに、好気性細胞の有効な固定化法として、好気性細胞と嫌気性細胞の混合培養システム（混合固定系）の開発を行い、その利用を試みたものである。本研究の内容は以下のような項目にまとめられる。

- ①細胞固定化ゲルビーズ内の酸素移動に関する基礎検討
 - ②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
 - ③混合培養システムの利用
- ④細胞固定化ゲルビーズ内の酸素移動に関する基礎検討

包括細胞固定化法の欠点として、包括固定に用いられるゲル担体そのものがしばしば栄養源物質の移動抵抗となり、発酵速度を律速する点にあるといわれているが、その基礎的検討はこれまでほとんどなされていない。好気性細胞の包括固定化に関しては、培養液において溶解度の低い酸素の移動速度が、発酵生産の律速因子となるのではないかと考え、検討を行った。まず、高分子ゲル担体として最も一般的に用いられているアルギン酸カルシウムゲルを選択し、好気性細胞を含むゲル

ビーズ内の酸素の有効拡散係数 (D_e) を測定した結果、この D_e は、ゲル内に含まれる細胞濃度に影響されず、ゲルをとりまいてある培養液中の分子拡散係数とほぼ等しいことが明らかとなった。次に、培養液中における好気性細胞 (濃度として 30~50 g dry weight/l gel) を含むゲルビーズ (半径 1.5mm) 内の酸素濃度分布を、先に得られた D_e と好気性細胞の酸素消費速度から推定した結果、通常の好氣的培養では得られない高い溶存酸素濃度 (7~14ppm) を維持して培養する場合を仮定しても、酸素はゲルビーズ表面から、わずか 0.3mm (半径の約 20%) 程度しか到達できず、ゲルビーズの大部分は酸素供給不足となることが明らかとなった。したがって、好気性細胞の包括固定化法では、通常の好気培養条件下で、酸素移動速度が発酵生産速度の律速因子となり、その結果好気性細胞の生産活性が十分に発揮できないことが示唆された。

②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

通常の好氣的培養条件下で必然的に生じる嫌氣的なゲルビーズの中心部を、嫌気性細胞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、同一ゲルビーズ内に、好気性細胞と嫌気性細胞を自然にすみ分けさせ、両細胞の代謝を同時に利用する新しい混合培養システム (混合固定系) の開発を行った。ここでは、その一モデルとして、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偏性嫌気性菌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* を選択した。それらを混合固定化し、好氣的条件下で培養を行った結果、酸素を取り込み易いゲルビーズ表層に好気性細胞が生育し、酸素が消費されて嫌氣的なゲルビーズの中心部に嫌気性細胞が生育した。しかも、両細胞の協調的な代謝作用により、デンプンから直接エタノールが高収率で生産されることが明らかとなった。

③混合培養システムの利用

嫌気性菌は、酸素によって増殖が阻害される偏性嫌気性菌のほかに、酸素が増殖に何ら影響を与えない耐性嫌気性菌と、酸素が存在すれば利用して増殖する通性嫌気性菌の 3 種に大別される。本研究で開発した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と好気性菌と通性嫌気性菌の組み合わせの 2 種類の混合固定系を作成し、それらによる物質生産を行った。まず、好気性菌の *Asp. awamori* と耐性嫌気性菌の乳酸菌でデンプンを直接利用できない *Streptococcus lactis* を用いて、混合固定系を作成し、好気培養を行った結果、*Asp. awamori* と偏性嫌気性菌 (*Z. mobilis*) の混合固定系に比べて、両菌株のゲルビーズ内のすみ分けは十分ではなかったが、デンプンから直接乳酸を高収率で得ることができた。次に、好気性菌の *Asp. awamori* と通性嫌気性菌でデンプンを直接利用できない酵母、*Saccharomyces cerevisiae* の混合固定系を作成し、好気培養を行った結果、ゲルビーズ内で両菌株は全くすみ分けができず、デンプンからエタノールの生産は低いものであった。そこで、2 菌株のうち、*S. cerevisiae* のみに増殖阻害効果を示す殺菌剤 (Vantocil IB) を選択し、この殺菌剤存在下で混合固定系を作成して、好気培養を行った結果、これらの 2 菌株の酸素取り込みに関する競争は緩和され、ゲルビーズ内での 2 菌株のすみ分けが生じ、デンプンから直接エタノールが多量に生産された。

これらの結果は、2 菌株間の競争を抑制し、ゲルビーズ内の細胞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が問題とならず、好気性細胞と嫌気性細胞の同時固定化による発酵生産を効率よく行うことができる、新しい混合培養システムであるといえる。

審 査 の 要 旨

本論文は、好気性細胞を固定化して培養した場合に、通常用いられる好気培養条件下では、酸素移動速度が発酵生産速度の律速因子になる可能性が大きいことを、固定化ゲルビーズ中の酸素移動に関する詳細な検討を通して明らかにし、更に、好氣的細胞の有効な固定化法として、好氣的細胞と嫌氣的細胞を同じゲルビーズ中に混合固定する新しい混合培養システムの開発を行い、その広範囲の利用性を明らかにしたものである。

まず、本研究で確立した方法により、これまで知られていなかった、固定化好気性細胞のゲルビーズ中における酸素濃度分布や、細胞の増殖状態を推定することが可能となった点は評価できる。次に、好気条件下でも必然的に生じるゲルビーズ中心部の嫌氣的な部分を、嫌気性細胞に生育させ、好氣的なゲルビーズ表層に好気性細胞を生育させるという発想と、ゲルビーズ中の両細胞のすみ分けを、自然のすみ分けという単純で、しかも確実な技術で行った点は、本研究のすぐれた特徴であろう。また、混合固定系の確立により、好気性細胞と嫌気性細胞の代謝を同時に単一培養槽内で行わせることが可能な、新しい発酵生産法が確立したことになり、混合固定系を用いる発酵生産法は、遺伝子工学や細胞融合技術により新しい能力を有する細胞を育種し、発酵生産を行わせる方法と比較しうる、大きな可能性を含有している点で高く評価できる。

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。