



Title	工業微生物の対酸素挙動の解析
Author(s)	金野, 範之
Citation	大阪大学, 1961, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28328
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	金 野 範 之 こん の のり のき
学 位 の 種 類	工 学 博 士
学 位 記 番 号	第 200 号
学位授与の日付	昭 和 36 年 3 月 23 日
学位授与の要件	工 学 研 究 科 醗 酵 工 学 専 攻 学位規則第5条第1項該当
学 位 論 文 題 目	工業微生物の対酸素挙動の解析
	(主 査) (副 査)
論 文 審 査 委 員	教 授 照 井 堯 造 教 授 寺 本 四 郎

論 文 内 容 の 要 旨

この論文は好気性工業微生物の生理におよぼす分子状酸素の影響について2つの範疇, すなわち既成細胞の代謝におよぼす影響と微生物細胞形成におよぼす影響とについて醗酵生理学的観点から解析したものである。前者に関しては微生物懸垂液の溶存酸素の減少を Polarography によって追求し得られた減少曲線の解析式を誘導し溶存酸素濃度 $[O_2]$ と呼吸速度との関係が Michaelis 函数にかなりよく一致していることを認め, その Michaelis 恒数 K_m を求めた。これは反応速度論的には細胞準位の分子状酸素と酸素末端酵素系との複合体の解離恒数と見做されるものであって, 酸素の菌体内取込みに対し1つの示唆を与えるものである。後者に関しては種々なる酸素濃度(あるいは分圧)における微生物の培養過程を解析した。酸素適応については比増殖率 $\mu > 0$ なる状態における比酸素適応速度 S_r の解析に関する理論式を導き, S_r と $[O_2]$ との関係を Lineweaver-Burk 方式のプロットよりその K_s (Saturation constant) を求めた。これは適応機作に対する酸素の役割を示すものであり単に dQ_{O_2}/dt のみをもって適応を論ずることは妥当性を欠くものであることを指摘した。同時に比酵素生成率との関係をも検討し, 前述の S_r との関係と共に工業微生物の各培養 phase における $[O_2]$ 準位の設定に対する基礎概念の把握に役立つものである。

第1章では酵母の対酸素挙動に関する問題を取上げ K_m 値は $10^{-7} \sim 10^{-6} M/L$ の order にあり著しく高い親和性を示すことを認めた。Sacch.cerevisiae (F) の酸素適応における oxygen inducer としての濃度効果を示すものとして $4 \times 10^{-5} M/L$ の K_s 値を得た。さらに連続培養法の実験から μ に対しこの菌株では $1.16 \times 10^{-4} M/L$ に最適酸素濃度現象が認められるが Candida utilis では存在せずその要因について代謝活性と関連して検討を加えた。

第2章では Asp.oryzae の表面および液内発育細胞の呼吸の特性差を追求し液内発育細胞は溶存酸素に対し高い親和性(液内性)を持っているのに比し表面発育細胞ではガス状酸素に対する親和性が強いもの

である（表面性）ことが認められた。これは各培養方式にしたがって発育する菌体の対酸素挙動の差が発育環境における酸素の状態差に著しい対応性があることを示すものである。表面膨化胞子の呼吸や表面発育菌体抽出液の酸素摂取における K_m は 2 重性格 ($K_{m1}: 10^{-6} \text{M/L}$ の order ; $K_{m2}: 3 \times 10^{-4} \text{M/L}$) を示すことが認められ、これらの結果と両種発育細胞の酸素末端因子の分析、阻害剤に対する影響から液内発育細胞では Cytochrome 系の呼吸が支配的であるが表面発育菌体では Flavin 呼吸の関与もまた考慮しなければならないとの見解を持つに至った。

第 3 章では *Bs. amylosolvens* の水解酵素生産過程における溶存酸素の影響を検討した。Sr と $[\text{O}_2]$ 準位との関係は Michaelis 函数にしたがい、 $7 \times 10^{-5} \text{M/L}$ O_2 の K_s 値を得た。水解酵素比生成率と $[\text{O}_2]$ との関係から 0.05mM/L の $[\text{O}_2]$ 準位であれば増殖期の酵素生成機構の形成を induce するのに充分であり、培養後期の酵素生産に対してはかなり低準位でも差支えないことを認めた。増殖期と酵素生成期の細胞呼吸の解析と酸素末端酵素の分析より前期菌体の呼吸は単一因子 (Cytochrome 系) によって支配されるが後期菌体のものは親和力の異なる 2 つの因子 (Cytochrome 系の外に Flavin 系) によって行なわれていると云う根拠を得た。

第 4 章は *Asp. niger* の深部培養法による糖化酵素生産に関するものであり、培地組成 pH 条件や feeding などを検討するとともに生産過程における溶存酸素の影響について調べたものである。 K_m 値は培養過程を通じて $3 \times 10^{-6} \text{M/L}$ の order であり Sr と $[\text{O}_2]$ の関係は Michaelis 函数的挙動を示すが、後期の酵素生産においては依存の度合はかなり低いものである。 $[\text{O}_2]$ と比酵素生成率との関係では最適濃度 (0.1mM/L) が認められ、酵素生成と他代謝との細胞内貯蔵物質の利用の均衡の差にもとづくとの見解を支持するものであった。

第 5 章は深部培養装置の酸素溶解速度に関する問題である。亜硫酸ソーダ法と Polarograph 法 (gassing out 法) とを比較すると共に酵母生菌体を含む状態において振動白金電極を用いて酸素のガス状態から生菌体摂取までの overall transfer について若干の理論的根拠を得た。

微生物におよぼす酸素の影響として間接的に重要な問題は呼吸醗酵両種代謝の相関性であり、第 6 章では清酒酵母についてこの関係をそれぞれ生体維持ならびに生体合成反応を含む状態において種々の阻害剤を用いて検討し、好氣的発育菌体における酸素の醗酵力阻止現象は呼吸、醗酵両経路の intermediate shunt および好氣的磷酸化に帰因するとの結論を得た。

論文の審査結果の要旨

この論文は好気性工業微生物の対酸素挙動を解析するにあたり、2 つの観点、すなわち既成細胞の呼吸や酵素生産などの生理的活性の対酸素挙動と細胞構成における対酸素依存性との両面から追求することにより、好氣的培養とくに深部培養における酸素供給の実際問題にかんし生理学的基礎を築こうとしたもので緒論、実験装置の説明、本文 6 章および総括より成っている。

緒論は、既往諸研究を引用し、この研究における問題の取扱いや追求の重点などを述べ、ついで実験装置にかんしては、この研究全体を通じて用いた Jar fermenter および溶存酸素準位の保持ならびに測定

方法を述べている。

第1章は酵母の酸素適応速度および代謝に及ぼす酸素濃度の影響を研究したもので、まず *Saccharomyces* の酸素適応の過程において、各段階における増殖や呼吸の様相と適用酸素濃度との関係を調べ、既成細胞の呼吸速度と溶存酸素濃度 $[O_2]$ とは Michaelis 函数とよく一致する関係を保つことを明らかにし、各種酵母についてその K_m 値は $10^{-6} \sim 10^{-7} M/L$ の範囲にあり、著しく高い対酸素親和性を持つことを示した。酸素適応を速度論的に解析するには、増殖系に適用すべき関係式を用い、比適応率 S_r を、 Q_{O_2} 増加速度と比増殖率 μ との函数として表わし、実験結果にあてはめ、さらに S_r と $[O_2]$ との関係を Lineweaver-Burk のプロットによって検査した結果 Michaelis 函数への適合性を明らかにした。

その飽和恒数 (Saturation Constant) K_s は酸素の末端酵素系に対する、Inducer としての濃度効果を示す値であるが、*S.cerevisiae* について $4 \times 10^{-5} M/L$ なる値を得た。

このことは充分なる酸素適応により高い呼吸活性を育て、したがって高い増殖力を裏づけ得るような細胞を形成するためには、既成細胞の呼吸を充たす酸素濃度よりも1桁以上高い濃度を適用しなければならない事を示している。

なお酸素適応過程における酸素末端酵素系の消長についても興味ある知見を得た。また連続培養法により μ の酸素濃度依存性を検討したところ、*S.cerevisiae* では $1.16 \times 10^{-4} M/L$ 附近に最適があることが判明した。ただし、このような最適現象は *Candida utilis* では認め得ず、両種酵母のこのような相違の要因について二、三の考察を行なっている。

第2章は *Aspergillus oryzae* の表面培養および深部培養における生育細胞の酸素呼吸上の特性差を追求し、前者は気中酸素に対し、後者は溶存酸素に対し、それぞれより高い親和性を示し、またこのような特性差は既に孢子発芽の初期に現われるという興味ある事実を認めた。また表面膨化孢子は溶存酸素に対し K_m 値の2重性を示し、末端酸素系の2重性(サイトクローム系とフラビン系)を暗示しており、さらに、表面培養菌体と液内培養菌体とは主要酸素末端酵素としてそれぞれフラビン系+サイトクローム系およびサイトクローム系を持つことを、菌体抽出液の K_m 値ならびに阻害像などより推論した。

第3章は細菌アミラーゼおよびプロテアーゼ生産菌として工業的に使用されている *Bacillus amylolvens* の対酸素挙動を取扱い、呼吸速度の対酸素 K_m は培養前期では酵母の場合と相似でサイトクローム系が主要末端系となり、培養後期の酵素生成期において、フラビン系の役割が大になることを明らかにし、 S_r と $[O_2]$ については酵母とかなりよく似た結果で、 $K_s = 7 \times 10^{-5} M/L$ を得ている。

また比酵素生成率(酵素生成系の比生成率と解すべきもの)は $[O_2]$ $5 \times 10^{-5} M/L$ 以上あれば一定の高位を示すことを認めた。かくして培養前期ではかなり高準位の $[O_2]$ を保持することは、酵素生産活性の高い菌体の多量を十分な速度で得るのに必要であることになるが、一たんこのような菌体が得られれば、酵素分泌の旺盛な培養後期では著しく低位の $[O_2]$ で十分な成績が収められることを実験的に示した。

第4章は糖化アミラーゼ生産菌として有望な *Aspergillus niger* の1株の液内培養について、前同様の検討を進めたもので、既成細胞の呼吸速度の対酸素 K_m は 3×10^{-6} で、酵素生産培地における培養期間中殆ど変化せず比酸素適応率 S_r は 6×10^{-5} 、比酵素生成率については $10^{-4} M/L$ において最適酸素濃度現象

を示した。培養前期と後期における〔O₂〕の要求関係は、*B. amylosolvens* の場合と近似する結果を得た。

第5章は深部培養装置を用いて酸素溶解速度の問題を亜硫酸ソーダ法および呼吸を伴う場合のポーラログラフ法について比較検討し、菌体ならびに菌体模型の影響について少しく調査し、さらにサンプリング法を改良したポーラログラフによる実際の Kd 測定法について述べた。

第6章は清酒酵母の対酸素関係を検討したもので呼吸と醗酵との相関関係を検討し、好気的および嫌氣的培養菌体の糖代謝中間体などの分析、阻害剤に対するガス代謝の挙動などを調べているが、この章の研究からは何等重要な結論が得られず、たんに Pasteur 反応とその関連機構における構成代謝の重要性を幾分浮び上がらせたに過ぎないものである。

最後に総括において主要結果をまとめその生理学的および工学的意義を論じている。

以上を要するにこの研究は好气的培養、とくに深部培養における酸素供給の問題を物理学的側面から解析し、従来ただ漠然と取扱われていた酸素要求像の構成を明らかにし、この要求に対し従属的關係に立つところの供給方法にかんして重要な示唆を与えており、微生物対酸素生理を深く掘り下げた論文として学問的に高く評価されるのみならず、工業的意義もまた大なるものがある。よってこの論文は博士論文として価値あるものと認める。