

Title	黒カビ糖化酵素生産の生理学的研究とその多段連続培養への応用
Author(s)	岡崎, 光雄
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/28959
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	岡崎光雄 おか ざき みつ お
学位の種類	工学博士
学位記番号	第 9 2 6 号
学位授与の日付	昭和 41 年 3 月 28 日
学位授与の要件	工学研究科醸酵工学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	黒カビ糖化酵素生産の生理学的研究とその 多段連続培養への応用
論文審査委員	(主査) 教授 照井 堯造 (副査) 教授 寺本 四郎 教授 芝崎 勲

論 文 内 容 の 要 旨

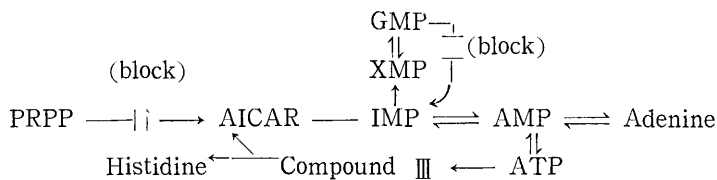
発育に必要な因子があり、目的とする生産物の直接の基質とはならず、かつその培地中での欠乏においてもかなりの生産が行なわれ得るような場合には、preferential synthesis の合目的な制御手段として活用し得るとの考え方がこの研究の第 1 の出発点であり、第 2 にこのような preferential synthesis においては、培養の各 phase の菌体生理に最適な条件を与え、かつ目的生産物を最大に発揮し得るような異なった制御方式を設定することができる筈で、したがってこの要因を明らかにすると共に、動力学的立場より検討し、この特徴を最大に発揮し得ると考えられる多段連続培養への応用を試みたものである。

糖化酵素生産が典型的な preferential synthesis 型とみなされるアデニン要求株 *Aspergillus niger* U20-2-5 を研究材料として、preferential synthesis の要因を増殖期および酵素生成期について検討した結果、酵素生成期の菌体および培地条件は、増殖期の菌体および培地より酵素生産に適していることが認められた。培地の要因としては、酵素生成期には増殖制限基質（アデニン系基質）の欠乏は無論、inducer として有効なマルトースが多量に存在すること、核酸物質の内グアニン系物質のみが残存し、糖化酵素生成の preferential synthesis を強化していること、および pH も酵素生産に最適な pH 3 附近になっていることを示した。菌体自身も酵素生成期においては derepression されていること、糖化酵素の messenger RNA の安定性、および増殖静止期における RNA の代謝回転に起因して maturation していることを明らかにした。すなわち菌体内既存の糖化酵素単位は僅微であり、EDTA、トルエンおよび RNase などによる分泌の促進作用もなく、エネルギー共役の uncoupler および酸素呼吸阻害剤の添加ならびに嫌気条件での糖化酵素の分泌はほとんどなく、またアミノ酸アナログおよび核酸アナログにより糖化酵素生成が著しく抑制されることより、

糖化酵素の precursor は実際上存在しなく、さらに増殖静止期のもとで、 ^{14}C -アミノ酸が短時間（2時間以内）に糖化酵素に組込まれることより、増殖静止期に菌体より分泌する糖化酵素も de novo 合成であることを明らかにした。つぎに actinomycin D により RNA 合成が完全に抑制された後も糖化酵素生成は持続し、この際 ^{14}C -アミノ酸の糖化酵素への組込みが認められることより、糖化酵素の messenger RNA はかなり安定であることを明らかにした。さらにアデニン系物質以外の基質では増殖が起こらない条件で、菌体内に取込まれた μ に貢献する制限基質を、アデニン不台培地へ置換したときの菌体増量の限度（比最大増量 $\omega = (X_m - X)/X$; X: 菌体量）により代表せしめ、比増殖率 $\mu = A \cdot \omega$, 比酵素生成率 $E = E_m - B \cdot \omega$ なる関係を明らかにし、したがって $E = E_m - C\mu$ なる repression を受ける。また増殖静止状態の酵素生成期において、 ^{14}C -グアニンの RNA への取込みを示し、この際 DNA への取込みはなく、また増殖静止期の uninduced mycelia が inducer 添加により induction されること、inducer 欠乏に基づく deinduction 現象より、増殖静止期においても糖化酵素の messenger RNA の特異的な合成が行なわれていることを示唆した。

以上のことより糖化酵素の preferential synthesis の要因は、主に糖化酵素の messenger RNA の安定性、増殖静止期におけるこの messenger RNA の特異的な合成、および repression に起因しているものと考えられる。

供用菌株 *Asp. niger* U20-2-5 のプリン要求像は下記のごとくであり、使用菌株の preferential synthesis の合目的性を明らかにした。



グアニンは特に酵素生成期においてこの preferential synthesis の著しい促進効果を示し、その作用はアデニン節約効果ならびに GTP として ribosome レベルで酵素の release に作用していることを示唆した。また増殖制限基質としてのアデニン濃度 S と比増殖率 μ とは Monod の関係式 $\mu = \mu_n \cdot S / (K_s + S)$ に適合し、多段連続培養において増殖槽の管理指標を示した。

比増殖率 μ と比酵素生成率 ϵ を用いて、菌令を表わし得ることを示し、また微量のアデニンを連続補給することにより、菌体の老化を防止し得ることを明らかにした。

以上の結果を基にして、nongrowth-associated 型の生産に関する多段連続培養の解析について理論的な考察を行ない、*Aspergillus niger* U20-2-5 の糖化酵素生産の3段連続培養を行ない、槽間移動における菌体活性 $f(\theta)$ の lag あるいは tailing に槽内滞留令分布 $(dY_D/d\theta)$ を導入し、滞留令-活性分布関数 $G = \int_0^\theta f(\theta) \cdot (dY_D/d\theta) d\theta$ を用いて、実際の連続培養の解析を行ない得ることを明らかにした。すなわち槽数が数個（2～4槽）以内に制限される限り、菌体の槽間移動による前槽の生産活性発現の lag および前槽の生産活性の持続を示す tailing 現象は、一般にさげられないものと考えられる。

この際菌体に与えられる条件変化は不連続となり、回分培養の場合のように環境と菌体とが交互作

用しつつ連続的に変化する動力学をそのまま連続化の上に投影することが出来ないことを示した。使用菌株の糖化酵素生産において第1槽（増殖槽）から第2槽（生産槽）に流入した菌体活性の lag は1分子自触反応的に進行し、第2槽から第3槽（熟成槽）へ移行した菌体活性は tailing 現象を呈し、逆シグモイド様に減少（1分子自触反応式の適用可）することを示し、これと槽内滞留分分布関数を用いて遷移状態および定常状態について算出し、実際の3段連続培養の実験値と一致することを示した。また第2槽より第3槽への菌体の移行の際における活性の tailing による生産物濃度の利得は、第1槽から第2槽への移行した場合の lag 損失を補なって余りあることが認められ、このような *Asp. niger* U20-2-5 の生産する糖化酵素の連続化において、3段連続培養で十分に目的生産物が期待出来ることを示した。

論文の審査結果の要旨

本論文は *Aspergillus niger* のアデニン要求性変異株を用い、その糖化アミラーゼ生産が増殖負相関型であることに着目し、培地中のアデニン系発育物質濃度を規制して増殖と酵素生産との相関を生理学的に解明しこれを基礎として多段連続培養のプロセス設計に必要な動力学的研究を進めたものであって、緒論、本文5章ならびに総括および結論よりなっている。

緒論では本研究の方針と重点とを述べている。

第1章は糖化酵素生産について環境とくに栄養的条件の影響と種々の条件で生育した菌体の生理について取扱い、preferential synthesis の要因としての induction, repression の模様を培養水準において把握したものである。なお、マルトースは inducer として極めて有効であることを見出している。

第2章は供用菌株のプリン関連物質に対する要求像より、プリン系物質の代謝経路における欠失の段階を推定したものである。この結果、本菌は GPM→IMP および PRPP→AICAR の反応が欠失しているものと認められた。また比増殖率 (μ) とアデニン濃度 (S) との間には Monod 式によって示される関係があり、さらに S と最大増殖量との間に比例関係を認めた。なお、単独では発育効果を示さないグアニンは、アデニン節約効果と、酵素生産促進効果とを示す原因について生化学的考察を加えている。

第3章は、第1には本菌糖化酵素の生産は、真の preferential synthesis であり、あらかじめ形成された不活性蛋白の活性化や既成酵素の分泌のおくれによるものではないことを種々の角度から確認したものである。すなわち菌体内酵素保有量、生産に対するエネルギー代謝の要求性、アミノ酸アナログ、核酸塩基アナログなどによる酵素生産の阻止、増殖静止下に与えた ^{14}C -アミノ酸の糖化酵素への組込み試験などの諸結果は著者の結論を支持している。第2に本酵素の preferential synthesis の要因として、前章で述べた repression の関係の他に、特異的 m-RNA の安定性が重要であることを指摘している。すなわち actinomycin D により RNA 合成を阻止し ^{14}C -アデニンの RNA への組込みが停止した後も酵素生産はかなりの期間継続し、本酵素への ^{14}C -アミノ

酸の組込みが行なわれる事を証明した。なお通常の培養において増殖静止後の酵素生産に際し、DNA の増加ならびに代謝回転のない状態での RNA の代謝回転があることを ^{14}C -グアニンの組込み実験によって確認し、これが増殖静止後の induction を可能ならしめる事実に対応することを述べている。

第4章は μ と比酵素生成率 (ϵ) とによって生理的菌令を代表せしめることの妥当性につき実験的に検討したものである。回分式培養の各時相の菌体につき置換培養法を適用し、 μ と ϵ の間の関係式を求め、かつ菌体の未熟の度合ならびに over-ageing の度合を表わす適当な示式を行ない、さらにアデニンの逐次添加あるいは連続流加の速度を規制することにより、培地アデニンをほぼゼロの水準に保ちながら、最大の熟度を持続せしめる方法を確立している。

第5章は発育負相関型の醗酵生産に連続培養法を適用する場合、多段方式が必要であるが本研究では3段連続培養を適当と認め、既往の諸結果に基づいて動力的考察を行なうと共に、小型装置による連続培養を実施したものである。とくに注目すべき点は槽間移動における菌体活性の lag および tailing 現象を菌体滞留令分布関数と結びつけ、lag 損失、tailing 利得ならびに定常状態生産速度を算出し得るように定式化し、これと実験結果との一致を認めたことである。

総括および結論では以上の諸結果を要約して論述している。

本論文は以上のように黒カビの糖化酵素生産の生理を解明するに当り、発育制限基質の種類を限定するためアデニン要求株を用い、preferential synthesis の要因を究明し、とくに induction の生理ならびに糖化酵素に対する m-RNA の安定性など基礎的知見に多大の寄与をなし、一方において酵素生産活性の発現と維持にかんする動力的解析を遂げ、進んで多段連続培養のプロセス設計の基礎として重要な滞留令活性分布式を確立し、これを導入した連続培養収支式の適合性を立証したもので、醗酵工学上貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。