



Title	微生物生細胞および酵素の活性変化におよぼす水の活量の影響について
Author(s)	高野, 光男
Citation	大阪大学, 1970, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/29958">https://hdl.handle.net/11094/29958</a>
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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>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)	高野 光男
学位の種類	工学博士
学位記番号	第 2027 号
学位授与の日付	昭和 45 年 3 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	微生物生細胞および酵素の活性変化におよぼす水の活量の影響について
論文審査委員	(主査) 教授 照井 勇造 (副査) 教授 芝崎 勲 教授 田口 久治 教授 原田 篤也

## 論文内容の要旨

水は生体成分の大部分を占め溶媒として増殖、代謝など生体内化学反応の場として働くのみならず、生命の維持に関与する生体高分子の複雑な構造の維持と機能の発現に役割を果している。また、その特異な熱的特性のために細胞の温度制御にも貢献している。

凍結乾燥は溶媒として働きうるすべての水を化学的要因なしに、かつ、低温で凍結、昇華を通じて系外にとり出す点で、上にのべた水の役割を研究する上で有利な方法であるのみならず、微生物株や活性物質の保存法としてそれ自身解決すべき多くの問題点を含んでいる。凍結乾燥にはその時間経過よりみて凍結、氷の昇華による脱水の 1 次乾燥過程と、その後の脱水の 2 次乾燥過程が含まれるが、本論文ではとくにこの 2 次乾燥過程をとりあげ、低含水度の微生物細胞、酵素の活性の変化をそのときの水の存在状態や脱水機構と関連させて第 1 章から第 5 章までにおいて論じた。

第 1 章においては連続的に脱水しつつ平衡水蒸気圧 ( $P_e$ ) を測定しうるような Taylor の方法を用い、各種微生物、凍結乾燥用添加保護物質について各温度、含水度で  $P_e$  を測定した。同一含水度、温度の  $P_e$  は試料により、またその履歴により著しく差があり、その等温吸着曲線に対しては既往の吸着論は適用できなかった。試料中水分は約 15 Kcal/mole の反応熱で化学結合に関与するものであり、しかもこれは含水度によって連続的に変化し 2 次乾燥過程で不連続点を見出しえなかった。これらのことからこの過程の試料の水の活量を代表しうるものは  $P_e$  のみであり、自由水、結合水に類する固定した水分を活量の指標とすることが不適当であることを示した。

第 2 章においては各種測定法で測定される含水度とその意味について検討した。従来凍結乾燥試料で常用されている低温での重量減少法は恒量に達するに一般に著しい時間を要し、一定時間

内の脱水率は試料によって著しい差があり、バラツキも大で不適当であることを指摘した。高温（105°C）での方法は Karl-Fischer 法など化学的方法とほぼ一致し水として抽出されうる水分を測定しうる方法と考えられた。

第3章においては微少密閉空間内で蒸気圧の時間的変化の測定から Pe の変化を無視しうる範囲の2次乾燥過程試料の脱水が一分子反応的に起ることを認め、その平衡達成速度と Pe から各種試料について、各温度、Pe における即時的な脱水速度を計算した。密閉空間での生細胞の脱水による死滅（第4章）、同様条件での  $\alpha$ -amylase などの D-ribose 共存下での失活（第5章）が共に一分子反応的であり、その速度恒数、活性化エネルギーなどの比較から、これらが同じある種の化学反応によって律速されるものと推定した。その活性化エネルギーは約 15 Kcal/mole であり、活性化エントロピーは負（約 -30 e.u.）であった。このことから一般に加熱などでみられる蛋白変性の場合と全く異なり、また吸着水の単なる離脱でもなく、分子内または分子間結合の生成によって水を放出する反応と推定された。

生体試料内で起る可能性あるかかる化学反応として従来比較的高水分の乾燥試料の保存中で起ることが認められていたアミノカルボニル反応について、それが2次乾燥過程でおこる可能性を第4章、第5章で検討した。すなわち、充分に窒素飢餓した細胞は2次乾燥過程で敏感に死滅すること、このときアミノ酸を添加すれば死滅を防止できること、カルボニル化合物の細胞への結合が細胞の死滅と相關することなどの結果はこの仮説をうらづけた。また、結晶  $\alpha$ -amylase など各種 amylase, cellulase などを単独で乾燥するときは全く失活はおこらないが、糖類など各種カルボニル化合物を多量に共存させると2次乾燥過程で著しく失活すること、対応する糖アルコールは失活効果がないこと、アミノ酸の同時添加は失活を防止すること、カルボニル化合物の酵素蛋白への結合が失活と併行することなどを明らかにした。この場合の失活は蛋白の高次構造の変化を伴うが、失活酵素を低温でアルカリ溶液中に長時間置くことにより結合カルボニルが遊離して活性が一部回復した。各種 protease にはカルボニル化合物の結合は起るが失活しない。amylase の活性基を基質などで保護しつつカルボニル化合物を結合することによって、乾燥工程を利用して活性の異なる酵素を容易にうる方法が2、3の例で示唆された。以上の結果から微生物細胞、酵素などの凍結乾燥において留意すべき諸点をあけた。

第6章においては増殖、代謝活性発現のための水の活量管理について取扱った。この研究対象としては水分を必要最少限度保持しつつ増殖発育する固体培養法、とくに高層堆積培養法における湿度管理の問題をとりあげた。各種麹の Pe、麹堆積層中における空気の強通空気の湿度変化、各種湿度空気の脱熱効果、発芽、発育に必要な湿度、酵素生産におよぼす湿度の影響、低湿による活性低下とその後の高湿下での回復などをしらべた。その結果湿度管理の要点として培養の初期は高湿の空気（RH 95% 以上）を連続的に必要最少限度送ること、発熱旺盛な培養の中後期では多少低湿であっても脱熱効果のよい通気条件にすること、ただし、この場合通気方向の転換を高頻度に行なうことなどをあげることができた。

## 論文の審査結果の要旨

この論文は工業微生物の取扱いにおいて水の活量の管理が特に重要な関係をもつ過程を中心として物理化学的、ならびに生化学的解析を行ったものである。その主なる成果は第1に微生物の凍結乾燥過程における平衡水蒸気圧の変化に着目し、その脱水の速度論的ならびに熱力学的解析を行ない、この2次乾燥過程は約 15 Kcal/mole の反応熱を有する脱水反応が中心であることを示し、第2にその過程は酵母試料などの2次乾燥における死滅過程ならびに  $\alpha$ -amylase などの酵素がカルボニル化合物共存のもとで脱水される過程での失活に対応するものであり、いずれもアミノカルボニル反応が中心的役割を演じていることを明らかにし、アミノ化合物による保護作用、失活防止の方法を確立し、第3に工業的固体培養における関係湿度の管理について培養の生理に対応する有益な指標を与えたものであって醸酵工学に貢献するところ大である。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。