The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Mortierella alpinaによるアラキドン酸生産の培養工学的研究
Author(s)	東山, 堅一
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/42729
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Mortierella alpina によるアラキドン酸生産の培養工学的研究

２０００年

東 山　堅 一

Mortierella alpina によるアラキドン酸生産の培養工学的研究

目次

緒論 1

第１章　培地組成の検討

第１節　緒言 7

第２節　実験材料および方法 8

第３節　結果 11

第４節　考察 21

第２章　菌形態変化の解析

第１節　緒言 23

第２節　実験材料および方法 24

第３節　結果 27

第４節　考察 32

第３章　誘電計測による菌体内脂肪酸含量の推定

第１節　緒言 35

第２節　理論的背景 36

第３節　実験材料および方法 38

第４節　結果および考察 41

第４章　溶存酸素の影響解析

第１節　緒言 47

第２節　実験材料および方法 48

第３節　結果 50

第４節　考察 57

第５章　工業規模培養槽を用いたアラキドン酸生産
第１節　緒言 60
第２節　実験材料および方法 62
第３節　結果および考察 64

総括 72

引用文献 74
本論文に関する報文 84
謝辞 85

緒論

微生物による脂質生産

脂質は、糖質、蛋白質、核酸と並ぶ生体成分の１つであり、生物のエネルギー源として、また生体膜の主要成分として細胞構造の維持に重要な役割を果たしている。核酸、蛋白質、糖質がバイオテクノロジーの進展にともない、それぞれ「遺伝子工学」、「蛋白質工学」、「糖鎖工学」として取り組まれ、著しく発展してきたのに対して、脂質は疎水性であるため、その分離・精製、分析が難しい等の理由により研究が遅れていた。しかし近年、リノール酸やαリノレン酸から哺乳動物によって生合成される高度不飽和脂肪酸（Polyunsaturated fatty acid, PUFA）が、細胞膜の主要構成成分として膜の流動性に関与したり、体内の代謝で様々な機能を示すことなどから、脂質の機能が次第に注目されてきている。

微生物が脂質を蓄積することは古くから知られており、酵母、糸状菌、微細藻類の中には 50%近くもの著量の脂質を蓄積するものがある。微生物が生産する脂質の利用は今から 120 年前に Nagele および Loew によるパン酵母の脂質研究から始まった。商業的な生産の試みは第一次大戦中ドイツにおいて人口の増加に対応すべく検討が行われたのが最初であろう。1940 年頃からは動植物油脂に代わる新たな油脂資源の開発として *Lipomyces* 属などの油脂蓄積酵母の研究も盛んに行われてきた。だが、植物による油脂の生産にはコストで太刀打ちできず、いまだ工業規模での生産にはいたっていない(Ratledge, 1997)。

ところが、植物からは得られない脂質や、高価な魚油由来の脂質にさまざまな生理機能が見出されてくるようになると、PUFA に代表されるようなこれら脂質の微生物生産が再びクローズアップされるようになってきた。特に、γリノレン酸（GLA; C18:3, n-6）、ジホモγリノレン酸(DGLA; C20:3, n-6)、アラキドン酸(AA; C20:4, n-6)、ミード酸(MA; C20:3, n-9)、ドコサヘキサエン酸(DHA; C22:6, n-3）、イコサペンタエン酸(EPA; C20:5, n-3）などがその代表的な PUFA である(Certik and Shimizu, 1999)。これら PUFA の微生物生産は、鈴木ら(1981)が *Mortierella isabellina* や *Mucor* 属の糸状菌を用いて GLA の生産を行ったのが始めであろう。そして、Yamada ら(1987)の見出した *Mortierella* 属による AA 生産、微細藻類 *Crypthecodenium* 属（Beach et al., 1973; 上原ら, 1996）や海洋性卵菌 *Shizochytrium* 属(Yaguchi et al., 1997)による DHA の生産研究など近年数多くの研究が行われるようになってきた。

アラキドン酸の機能研究

アラキドン酸（AA）は細胞膜の主要成分であると同時に 2 シリーズのプロスタグランジンや 4 シリーズのロイコトリエンなどエイコサノイドの前駆物質でもある。しかし、AA の生理機能評価のための十分な供給源が存在しなかったことにより、その生理機能の解明は十分とはいえない。現在、明らかにされている作用として、胃粘膜保護作用(Hollander et al.,1982; Doyle et al., 1989)、皮膚の乾癬治療効果(Hebborn et al.,1988)、脂肪肝予防などの肝臓保護効果(Goheen et al., 1980)、癌細胞に対する殺細胞効果(Canuto et al., 1991)、肝硬変における脂質代謝異常改善(Okita et al., 1993)、胎児の身体や脳の発育における重要性(Carlson et al., 1993a; Lanting et al., 1994)などが報告されている。さらに、母乳の成分として乳児の発育に役立っているとの報告(Carlson et al., 1993b)もある。また最近の研究では、AA とエタノールアミンのアミド結合体であるアナンダミド(Devane et al., 1992)が、マリファナの神経活性物質の本体であるカンナビノイドに特異的な受容体に対して結合親和性を示すことが報告され、PUFA の新たな生理機能として注目されている。

上述の生理機能に加えて、食品としての AA の摂取を考えた場合は、摂取している脂肪酸が 1 種類だけということはあり得ず、そのバランスを考えなくてはいけない。PUFA の摂取においては、AA などの n-6 系脂肪酸と、EPA や DHA などの n-3 系脂肪酸の比率が問題とされ、研究者の考え方によりかなり意見の分かれるところであるが、日本人の栄養所要量（第五次改訂）の脂質摂取についての項目の脂肪酸摂取量で、「n-6 系脂肪酸と n-3 系脂肪酸との摂取比率について一定した見解は得られていない。日本人の栄養調査からおおよそ 4:1 程度の比率で摂取している者が多いことが示されており、現段階ではこの程度の比率が適当であると思われる。」と記載されている（厚生省保健医療局, 1994）。AA を含めて PUFA の生理機能についてはまだ未知の部分も多く、特に脂肪酸バランスを考えた上での機能解明についてはさらに検討が加えられる必要がある(Gill and Valivety, 1997)。

アラキドン酸の生産研究

AA の供給源としては、魚油、レバー、卵黄等が従来より知られていたが、これらの AA 含量は何れも非常に少ないことから安定的な大量供給源とは成り得ていない。また近年は環境汚染による天然の油脂資源自体の汚染も問題になりつつある。Shinmen ら(1989)は、新たな AA 供給源として微生物に着目、探索した結果、高い AA 蓄積能を持つ糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 を単離し、その基本的な培養条件について報告した。さらに、様々な研究グループによって AA の微生物生産が試みられてきたが、Table 1 に示すように大部分の研究者が *M. alpina* を優れた AA 生産菌として選択し、その培養方法について報告している。

培養方法として大きく 2 つの方法、①液体培養法、②固体培養法が報告（Table 1）されているが、AA の大量生産を目的とする場合は、液体培養法がより有利と考えられる。理由は、①培養及び菌体回収のスケールアップによる実用化が液体培養法の方が容易である、②固体培養法で報告されている AA 収量がそれほど高くなく、かつ培養日数を要している（増殖速度が遅い）ことである。液体培養による高濃度培養の報告例としては、Singh および Ward(1997)によって 11.1 g/L の高 AA 収量が報告されており、*M. alpina* の AA 生産能力の高さがフラスコ培養で示されている。また、Cheng ら(1999)は、植物油脂製造の副産物を基質とし利用できる可能性を示した。しかし、通気攪拌培養槽を用いた報告では、Li ら(1995)による AA 収量 5.5 g/L、Shinmen ら(1989)による 2 kL へのスケールアップが各々収量、培養槽規模の最大値であり、培養工学的な検討の余地はまだ十分にあるものと考えられる。以上のように、様々な研究例が報告されているものの、AA は菌体内生産のため高収率達成には高濃度培養が必要であること、加えて、菌形態変化を伴う糸状菌培養特有の難しさが、大規模での高濃度培養達成を困難にしていると思われる。AA の生産に際しては、上述のような生産性に基づいた経済性の追求だけでなく、微生物生産の特性上その安全性についても十分に配慮せねばならないが、近年、*M. alpina* の菌自身ならびに得られた AA 含有油脂の安全性が多くの研究者によって報告されてきている(Hempenius et al., 1997; Koskelo et al., 1997; Streekstra et al., 1997; Burns et al., 1999)。

Table 1. Previous reports on arachidonic acid production.

Microorganism	AA yield /cultivation period	Scale	Ref.
Submerged culture			
Mortierella alpina UW-1	5.5 g/L/6d	20 L fermentor	(a)
M. aplina ATCC 32222	11.1 g/L/11d	250 mL flask	(b)
M. alpina Wuji-H4	3.9 g/L/5d	250 mL flask	(c)
M. alpina CBS 343.66	1 g/L/8d	5 L fermentor	(d)
M. alpina 1S-4	3 g/L/10d	2 kL fermentor	(e)
M. alpina ATCC 42430	4.1 g/L/6d	20 L fermentor	(f)
M. schmuckeri S12	2.3 g/L/3d	14 L fermentor	(g)
M. sp. S-17	0.96 g/L/7d	1 L flask	(h)
Pythium irregulae ATCC 10951	3.1 g/L/8d	250 mL flask	(i)
Solid state culture			
M. alpina IFO 8568	13.1 g/kg-medium/20d		(j)
M. alpina CCF 185	36 g/kg-medium/21d	300 mL flask	(k)

References: (a), Li et al., *Can. J. Chem. Eng.*, 73:135-139 (1995); (b), Singh & Ward, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48:1-5 (1997); (c), Chen et al., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74:569-578 (1997); (d), Lindberg & Molin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39:450-455 (1993); (e), Shinmen et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31:11-16 (1989); (f), Kyle, PCT patent, publication no.WO96/21037 (1996); (g), W. Berkeley, Japanese patent, publication no.H8-214893 (1996); (h), Sajbidor et al., *Biotechnol. Lett.*, 12:455-456 (1990); (i), Cheng et al, *Bioresource Technol.*, 67:101-110 (1999); (j), Totani et al., *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 36:328-331 (1987); (k), Stredanska et al., *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 9:511-513 (1993).

本研究の目的

本研究の目的はAAの経済的な生産を達成することであり、そのためには培養から精製までを総合的に検討、評価する必要があるが、工程期間、作業効率、設備規模の面を考慮すると、培養工程の改善が大きな進展に繋がるものと考えられる。培養工程の経済性を向上させるべく、その原価構成について解析した結果、培養バッチ当たりのAA収量を上げることが最優先課題であると考えられた。

糸状菌による物質生産として従来報告されているものは、その大部分が菌体外生産物である。一般に菌体外生産の場合は、栄養源が枯渇せず、菌の活性が持続し、かつ分泌物が増殖や生産に悪影響をおよぼさない限りは、物理的限界まで生産物濃度を上げることが可能である。また、分泌物等が低濃度で増殖や生産を阻害する場合には、濾液のみを連続的に抜き取るリアクターを構築する等の可能性も考えられる。しかし、AAのような菌体内産物の場合、生産物収量は菌体量と菌体内含量の積となるため、菌体内含量を生理学的に蓄積できる限界まで上げると同時に、その菌体量も増加させる必要がある。即ち、高濃度培養の実現は高収量獲得のために避けることはできない。糸状菌を液体培養する際には様々な菌形態を示すため、粘度等の培養液物性に影響することが知られており、高濃度培養の場合はその影響が顕著である(Olsvik and Kristiansen, 1994)。従って、本論文では、菌形態制御によって高濃度培養を実現し、高AA収量を得ることを目的として、培養工学的な検討を行った。

緒論では微生物による脂質生産の歴史、微生物油脂の一つとして注目されているAAの生体内での機能、その微生物生産を行う場合の問題点と、経済生産に向けての開発の方向性を示した。

第1章では、より高いAA生成量を得る方法として培地への無機塩類添加を挙げ、その添加濃度の影響について検討した結果について述べた。結果の評価指標としては、AA生成量だけでなく菌形態への影響に関しても併せて採り入れた。そして、無機塩類添加濃度の調整によって、ある程度の菌形態制御が可能であることを示すと同時に、高AA生成量を得るのに適した無機塩類組成を明らかにした。

第2章では、培養中における菌形態変化とAA生産性の関係を、画像処理技術を援用することによって詳細に解析した結果を述べた。さらに、培養液の篩い分け法を採用することによって、数ミクロン単位のフィラメントから数ミリ単位のペレットまでの広範囲で菌形態変化を解析することができた。また、培養初期の綿状ペレットから後期は滑状ペレットへと変化すること、さらに、ペレットで存在する菌糸の方がフィラメントに

比べて AA 含量が高いことを確認した。

第 3 章では、脂肪酸生産のモニタリングシステムの開発を目指して、誘電計測による脂肪酸含量の推定を試みた結果について述べた。誘電率の周波数特性データを楕円体細胞モデルに基づいて解析することによって、細胞質導電率を推定した。その結果、従来法で分析した菌体当り脂肪酸含量と細胞質導電率の間にはほぼ直線の関係が得られた。さらにこの相関関係は、菌形態が異なっても変化しないことを確認した。これらの結果から、誘電計測によって、脂肪酸含量を簡便かつ非破壊的に推定できることを明らかにした。

第 4 章では溶存酸素(DO)濃度の影響について解析した。酸素富化空気法および加圧培養法を用いて様々な酸素分圧条件を作り、3-50 ppm の範囲で実験した。その結果、DO 濃度 10-15 ppm が AA 生産に最も適していること、その範囲以下では AA 生産は低下するが菌形態への影響は殆ど無いことを確認した。また、富化空気法で DO 濃度 20 ppm 以上に維持した場合、AA 生産は著しく低下し、菌形態も滑状ペレットに変化する現象が認められた。さらに、フィラメント状の菌糸に高濃度酸素を通気した場合には、菌体内脂肪酸が β 酸化されて含量が低下することを明らかにした。

第 5 章では、工業規模培養槽へのスケールアップならびに、収率の考察を行った。50 L 培養槽の結果に基づいて、酸素移動容量係数基準則を適用して、10 kL 培養槽までスケールアップした場合には、同等の AA 生産が得られることを実験的に明らかにした。さらに、対培地基質当たりの各種収率について考察した結果、DO が 10 ppm という最適濃度よりも低い範囲では、増殖収率にはあまり影響しないが、AA および総脂肪酸(FA)収率は大きく低下することを明らかにした。

総括では、本論文の各章の結果を総括すると共に、さらに生産性を向上させるために必要な研究開発の方向について言及した。

第 1 章　培地組成の検討

第 1 節　緒言

優れたアラキドン酸(AA)生産菌として *Mortierella alpina* 1S-4 株が Shinmen ら(1989)によって単離され、AA 生産に適した培地成分について報告された。窒素源としては酵母エキス、炭素源としてはグルコースが適しており、さらに、増殖阻害を回避するため初発グルコース濃度を低く抑えた上で、グルコースを流加することが AA 生成量を増大させる上で重要であることが報告された。我々は、さらに AA 生成量を上げるべく、無機塩類に着目し、その添加条件の検討を試みた。培地への無機塩類添加は多くの微生物培養で実施されているが、中でも、リン酸、カリウム、イオウ、カルシウム、ナトリウム、およびマグネシウムは、糸状菌の主な無機成分である（合葉ら, 1973）ことから、これらの添加は最適な濃度で行なわれることが重要であると考えられる。そこで、これら無機塩類添加の AA 生産に及ぼす影響について検討した。

一般に糸状菌の培養では、無機塩類の添加は菌への栄養補給の役割に加えて副次的な作用として菌形態に影響することが知られている(Whitaker and Long, 1973)。菌形態は培養液の物理的性質に強く影響するため、特に大型培養槽においては、ガス分散、物質移動、熱移動への影響は十分に検討される必要がある(Varder, 1983)。また一般に糸状菌の好気培養では、十分な酸素供給を行うことが高生産の達成に必要である。物質生産に適した菌形態は、使用菌株や生産物によって様々であり、例えば、*Aspergillus niger* によるクエン酸生産（Clark, 1962）、*Aspergillus terreus* によるイタコン酸生産（Metz et al., 1979）、*Penicillium citrinum* による pravastatin 前駆体生産(Hosobuchi et al., 1993）にはペレット状が望ましいと報告されており、一方、*Penicillium chrysogenum* によるペニシリン生産（Smith et al., 1990）、*Rhizopus arrhizus* によるフマル酸生産（Byrne and Ward, 1989）、*Aspergillus niger* による酵素生産(Calam, 1976; MacKenzie et al., 1994)にはフィラメント状の菌形態が望ましいと報告されている。高度不飽和脂肪酸(PUFA)である AA 生産についても、菌形態と生産性の関係を明らかにすることは重要であると考えられるが、これに関する報告は非常に少ない。本章では無機塩類組成の AA 生産および菌形態への影響を検討し、AA 生産に適した培地組成を探索することを目的とした。

第 2 節　実験材料および方法

2・1　　使用菌株および保存方法

土壌から分離した糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株(Shinmen et al., 1989)を使用した。種菌は Czapek 寒天培地スラント上で 28℃、10 日間増殖させた後、5℃で保存した。培養実験の際は、滅菌水 10 mL をスラント試験管に加えてボルテックスを用いて混合したものを接種用胞子液とした。

2・2　　フラスコ培養実験

2 mL の液体培地を 10 mL 容三角フラスコに調製した。0.1 mL の胞子液を接種の後、28℃、往復振とう速度 150 rpm で 7 日間培養した。

培地組成

グルコース	4%
大豆タンパク	1.5%
pH	6.0
その他	塩類等は実験結果のところにその都度記述した

2・3　　通気攪拌培養実験（10 L 容培養槽）

前培養は、100 mL 液体培地を 500 mL 容三角フラスコに調製し、0.1 mL の胞子液を接種の後、28℃、往復振とう速度 100 rpm（振幅 7 cm）で 3 日間行った。

前培養の培地組成

グルコース	1.8%
酵母エキス	1%
pH	6.0

本培養は、5 L の液体培地を 10 L 容培養槽に調製し、100 mL の前培養液を接種の後、28℃、攪拌回転数 300 rpm、通気量 5 L/min で培養を開始した。グルコースの枯渇を防ぐためにグルコース流加を行った。0.9%グルコースを培養 1、2、3、4、5 および 6 日目に添加し、7 日間または 8 日間培養を行った。

本培養の初発培地組成

グルコース	1.8%
大豆油	0.2%
pH	6.0
その他	窒素源、無機塩類は実験結果のところにその都度記述した

2・4　通気攪拌培養実験（50 L 容培養槽）

前培養は、100 mL 液体培地を 500 mL 容三角フラスコに調製し、0.1 mL の胞子液を接種の後、28℃、往復振とう速度 100 rpm（振幅 7 cm）で 3 日間行った。

前培養の培地組成

グルコース	1.8%
酵母エキス	1%
pH	6.0

本培養は、25 L の液体培地を 50 L 容培養槽に調製し、125 mL の前培養液を接種の後、26℃、攪拌回転数 100 rpm、通気量 25 L/min、槽内圧 200 kPa で培養を開始した。グルコース濃度を 0-3.2%に維持するよう、グルコース流加を行った。また、溶存酸素濃度（DO）を 10-15 ppm に維持するよう、攪拌回転数を調節しながら、7 日間培養を行った。

本培養の初発培地組成

大豆タンパク	3.1%
グルコース	1.8%
大豆油	0.1%
pH	6.0
その他	無機塩類は実験結果のところにその都度記述した

2・5　分析方法

2・5・1 乾燥菌体濃度

培養液を濾紙で吸引濾過して得られた湿菌体ケーキを、105℃で 2 時間乾燥した。乾燥菌体の秤量値と、濾過前の培養液量より乾燥菌体濃度(X)を求めた。

2・5・2 脂肪酸組成および生成量

Shimizu ら(1988)の方法に従った。約 20 mg の乾燥菌体をネジ口試験管に精秤の後、ジクロロメタン/塩酸メタノール溶液で 50℃、3 時間反応させ、メチルエステル化処理を行った。メチルエステルをヘキサン抽出、濃縮の後、ガスクロマトグラフィーで定量した。

2・5・3 菌形態評価（篩い分け法）

目の開きが 4 mm、2 mm、1 mm の 3 種類の篩を重ねた上に、純水で約 10 倍希釈した培養液を供給した。さらに、脈動水圧流発生装置(Model WP-30J; Teledyne Water Pik 製)で発生させた流量 36 mL/min の蒸留水を流すことによって、4 mm を通過し 2 mm 上に残ったもの(2-4 mm)、2 mm を通過し 1 mm 上に残ったもの(1-2 mm)、1 mm の篩を通過したもの（0-1 mm）、に篩い分けした。この後、各区分の乾燥菌体量、脂肪酸含量を求めた。

2・5・4 見かけ粘度

培養液を 500 mL ビーカーに約 500 mL 採取し、B 型回転式粘度計を用いて見掛け粘度を測定した。

2・5・5 核酸漏出量

攪拌によって菌糸に与えられる衝撃強さの指標として、田中ら(1975)の方法で核酸漏出量を測定した。培養濾液を蒸留水で 10 倍希釈した後、吸光光度計を用いて波長 260 nm の吸光度を測定した。得られた吸光度(A260)を乾燥菌体濃度(X)で除することによって、菌体当たりの核酸漏出量(A260/X)とした。

第 3 節　結果

3・1　　フラスコ培養による塩類添加の検討

Fig.1-1 に示すように、無機塩類の種類及び添加濃度がアラキドン酸(AA)生産に及ぼす影響をフラスコ培養で調べた。その結果、Na_2SO_4 0.05%、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.025%、$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.025%を添加した場合、AA 生成量が無添加に比べて、各々1.3 倍、1.6 倍、1.3 倍増加した。一方、NaCl、KCl、K_2SO_4 の添加は AA 生成量への顕著な効果は無く、逆に NaCl の過剰添加は AA 生産を低下させる可能性が認められた。乾燥菌体(*X*)濃度に関しては何れの塩類を添加しても顕著な影響は認められなかった。

3・2　　10 L ジャー培養による塩類添加の検討

上記結果に基づいて、Na_2SO_4 0.05%、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.025%、および $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.025%の塩類混合物を次の実験に供した。さらに、これら塩類に加えて、リン酸塩の影響について検討した。培養実験は 10 L ジャーを用いて行った。Fig.1-2 の結果が示すように、KH_2PO_4 無添加および0.1%添加の場合は AA 生成量および乾燥菌体(*X*)濃度の増加は認められなかったが、KH_2PO_4 を 0.3%添加した場合は、培養 8 日目の AA 生成量および *X* 濃度が塩類無添加に比べて各々1.5 倍、1.4 倍増加した。従って、Na_2SO_4、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ および $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ に加えて KH_2PO_4 0.3%添加が生産性向上に必要であることが明らかとなった。

つぎに、Na_2SO_4、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$、および $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ の添加濃度を 2 倍に強化した場合について検討した。その結果、Fig.1-3 が示すように、AA 生成量および *X* 濃度は殆ど影響を受けなかった。しかし、培養液の観察結果では、Na_2SO_4、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$、および $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 強化培地の方が流動状態が良好であった。培養液は、2 種類の菌形態、即ちフィラメントとペレットの混合状態であったが、塩類強化培地の方がペレット割合が多く観察された。Fig.1-3 の実験においては、何れの条件も通気攪拌による培養液の流動、酸素供給は十分であったものと考えられるが、さらに菌体濃度の高い条件や大型槽での培養では、良好な流動性を確保するためにペレット割合が多い方が有利であると考えられた。従って、次の塩類組成、Na_2SO_4 0.1%、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.05%、$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.05%および KH_2PO_4 0.3%が AA 生産に適していると考えられた。

次いで培地窒素源の影響として、酵母エキスと大豆タンパクの比較検討を行った。その結果、Fig.1-4 に示すように塩類無添加の場合は、酵母エキスの場合の方が AA 生成量、*X* 濃度ともに大豆タンパク培地より優れていた。しかし、上述の塩類を添加した場合、

大豆タンパク培地では塩類添加によって、培養 8 日目で 1.7 倍の AA 生成量増加、酵母エキス培地では塩類添加で 1.4 倍の増加であり、大豆タンパクの方がより顕著に塩類添加効果が認められた。

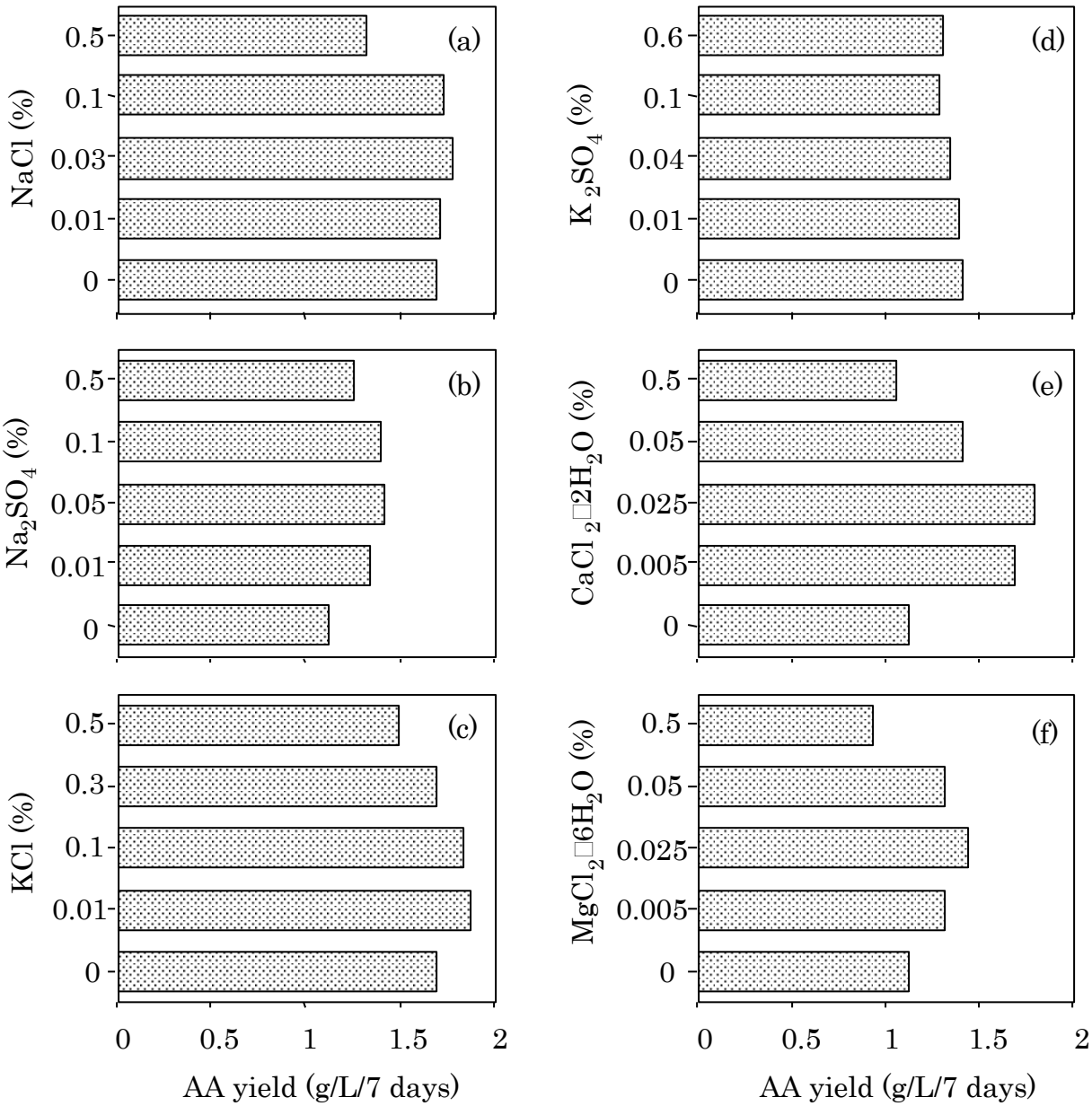

Fig. 1-1.

Effects of mineral addition, (a) NaCl, (b) Na_2SO_4, (c) KCl, (d) K_2SO_4, (e) $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, and (f) $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, on AA production by *M. alpina* 1S-4 in flask-cultures.

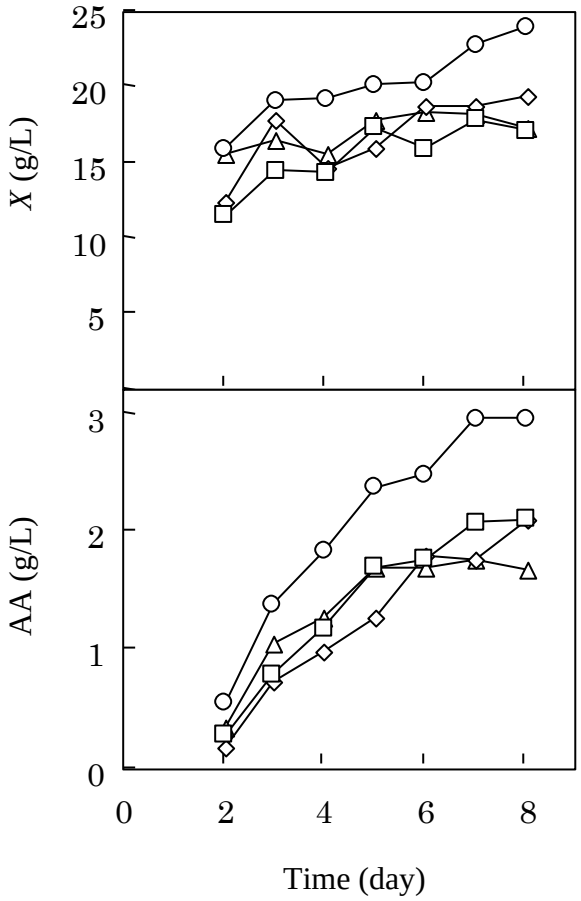

Fig. 1-2.

Time course of AA production by *M. alpina* 1S-4 cultivated in a 10-L jar-fermentor for 8 d. Medium composed of 1.5% soy flour, 1.8% glucose, and 0.2% soybean oil, pH 6.0, with the addition of each of the indicated minerals, was used. Symbols: □ (no addition of minerals); ◇ (KH_2PO_4, Na_2SO_4, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0, 0.05, 0.025, 0.025%); △ (0.1, 0.05, 0.025, 0.025%); ○ (0.3, 0.05, 0.025, 0.025%).

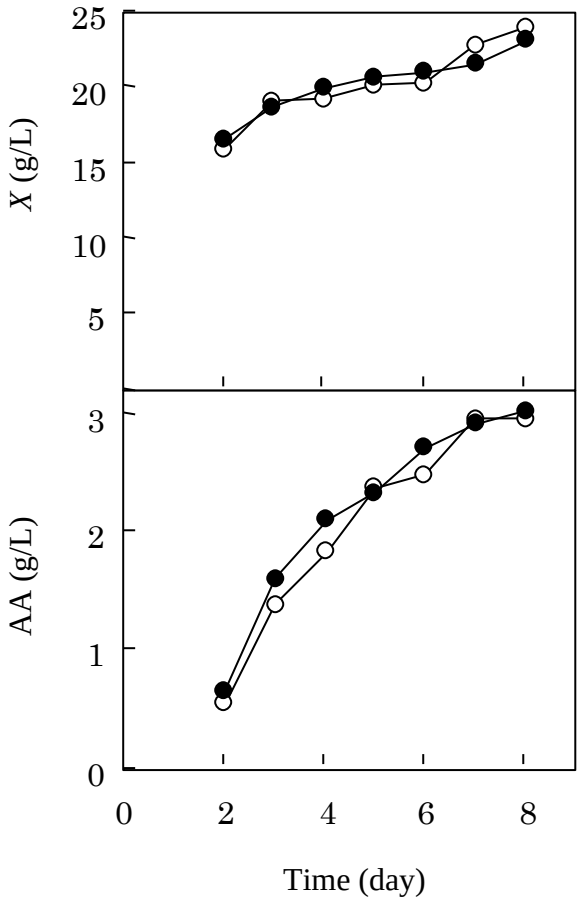

Fig. 1-3.

Time course of AA production by *M. alpina* 1S-4 cultivated in a 10-L jar-fermentor for 8 d. Medium composed of 1.5% soy flour, 1.8% glucose, and 0.2% soybean oil, pH 6.0, with the addition of each of the indicated minerals, was used. Symbols: ● (KH_2PO_4, Na_2SO_4, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0.3, 0.1, 0.05, 0.05%); ○ (0.3, 0.05, 0.025, 0.025%).

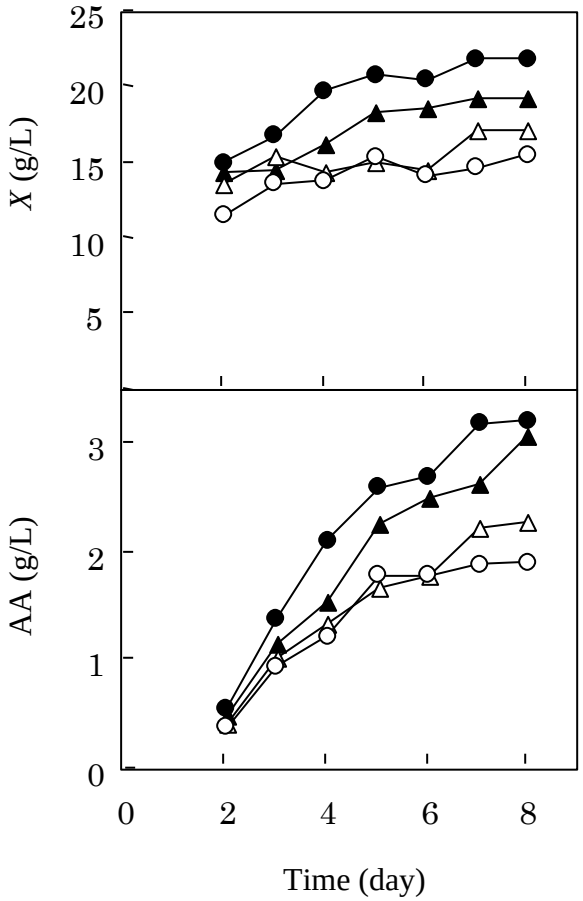

Fig. 1-4.

Time course of AA production by *M. alpina* 1S-4 cultivated in a 10-L jar-fermentor for 8 d. Medium composed of 1.5% soy flour (circles) or 1% yeast extract (triangles), 1.8% glucose, and 0.2% soybean oil, pH 6.0, with the addition of each of the indicated minerals, was used. Symbols: ○ and △ (no addition of minerals); ● and ▲ (KH_2PO_4, Na_2SO_4, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0.3, 0.1, 0.05, 0.05%).

3・3　　10 L ジャー培養（pH スタット法）による pH の影響検討

無機塩類は pH の緩衝効果を有するため、上述の AA 生成量増加は pH が影響した可能性が考えられる。大豆タンパク培地で塩類無添加の場合、培養 2 日目までは pH が 6.0 から 5.8 に低下し、その後、pH6.2 まで上昇した。一方、塩類を添加した場合は、培養 2 日目まで pH 変化が殆ど無く、その後、pH6.5 まで上昇した。そこで、pH の影響を明確にすべく、pH4.6、5.1、5.6、6.1、6.6、7.1、7.6 および 8.1 で pH 一定培養を行った。その結果、Fig.1-5 が示すように、pH6.1-6.6 が AA 生産および菌体増殖に適していることが確認された。また、pH5.6 の場合に比べて、pH6.1-6.6 の場合は 1.25 倍の AA 生成量が得られたが、この生成量増加率は塩類添加/無添加に比べて低いことから、塩類添加の影響は pH 変化によるものだけではないと考えられた。尚、pH5.1-6.6 に制御した場合、培養中の NaOH および H_2SO_4 の総滴下量は共に培養液当り濃度として 1 mM 以下であったことから、これら滴下イオン濃度の影響は無視できると考えられた。

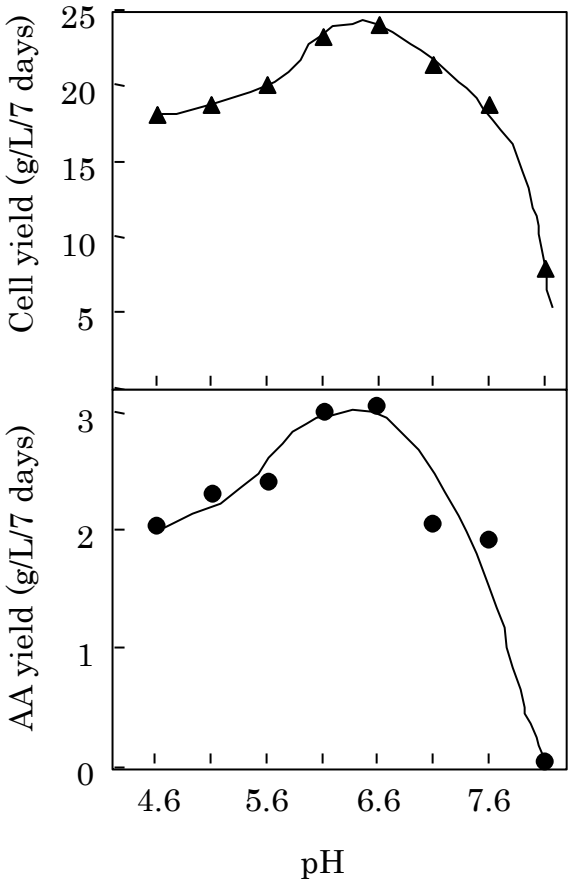

Fig. 1-5.

Effects of pH on the AA yield and cell (*X*) yield of *M. alpina* 1S-4 cultivated in a 10-L jar-fermentor for 7 d. Medium composed of 1.5% soy flour, 1.8% glucose, 0.2% soybean oil, 0.3% KH_2PO_4, 0.1% Na_2SO_4, 0.05% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ and 0.05% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ was used. The pH was maintained constant at values (within ±0.15) of 4.6, 5.1, 5.6, 6.1, 6.6, 7.1, 7.6, and 8.1 throughout the cultivation by titration with NaOH and H_2SO_4.

3・4　　50 L ジャー培養による高濃度培養

先の 10 L ジャー培養実験で、KH_2PO_4 の添加でよりフィラメントの割合が多くなり、Na_2SO_4、$MgCl_2$ および $CaCl_2$ の添加でペレットの割合が多くなる現象が観察された。また、より高い AA 生成量を得るには高濃度培養の達成が必要であるため、菌形態の培養液物性への検討は重要である。そこで、大豆タンパク濃度を約 2 倍の 3.1%に高濃度化した条件で、塩類添加が AA 生産および菌形態におよぼす影響について調べた。

次の 3 条件、条件 A : 上記塩類 4 種添加、条件 B : Na_2SO_4、$MgCl_2$ および $CaCl_2$ 添加、条件 C : KH_2PO_4 添加、で培養を行った。Fig.1-6 に培養経時変化を、Table 1-1 に各条件での篩い分けによる菌形態評価、培養液粘度および核酸漏出量の結果を示す。

条件 A で AA 生成量および *X* 濃度ともに最も高く、7 日間の培養で、AA 生成量 9.8 g/L、*X* 濃度 51.1 g/L に達した。小型ペレット（篩サイズ;1-2 mm）が 52.7%と他の条件に比べて最も高く、最高攪拌回転数 400 rpm で 8 ppm 以上の DO 濃度が確保できた。また、攪拌による菌糸への衝撃強さの指標(田中ら, 1975)として菌体当り核酸漏出量（A260/*X*）を測定した結果、0.323 ([abs.]/[g/L])であった。

条件 B の場合は、AA 生成量および *X* 濃度ともに条件 A より低く、主な菌形態は大型ペレット（篩サイズ;2-4 mm）であった。DO 濃度 8 ppm 以上を確保するための最高攪拌回転数は 300 rpm であった。また、見かけ粘度および菌体当り核酸漏出量は Table 1-1 に示すように 3 条件間で最も低かった。

条件 C では、AA 生成量および *X* 濃度が条件 A よりも低く、主な菌形態はフィラメント状（篩サイズ;0-1 mm）であった。DO 濃度 8 ppm 以上を確保するために最高攪拌回転数は 500 rpm まで上げることが必要であり、菌体当り核酸漏出量や見かけ粘度は Table 1-1 に示すように 3 条件間で最も高かった。

次に、菌形態と AA 生産性の関係を調べるために、篩で分けた菌体の AA 含量を測定した。その結果、Fig.1-7 に示すように、3 条件の何れにおいても、小型ペレット（篩サイズ;1-2 mm）の菌体の AA 含量が最も高いことが確認された。

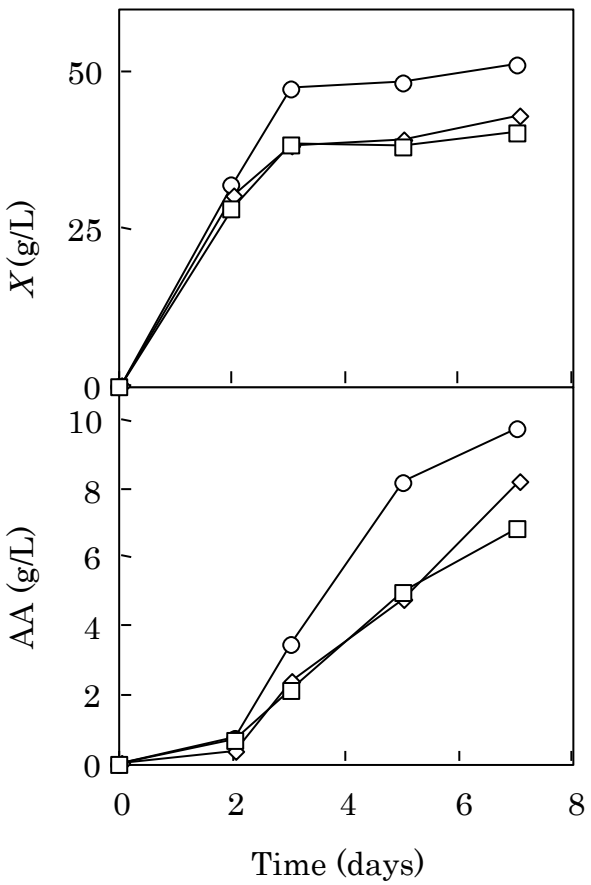

Fig. 1-6.

Time course of AA production by *M. alpina* 1S-4 cultivated in a 50-L jar fermentor for 7 d. Condition A, symbol ○ (KH_2PO_4, Na_2SO_4, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0.3, 0.1, 0.05, 0.05%). Condition B, symbol ◇ (0, 0.1, 0.05, 0.05%). Condition C, symbol □ (0.3, 0, 0, 0%).

Table 1-1.

Effects of mineral addition on morphology, apparent viscosity, and nucleotide leakage.[a]

Conditions [b] ([abs.]/[g/L])	*X* of each fraction in whole broth (%)			Apparent viscosity (cp)	A260/X
	Sieve size				
	0-1 mm	1-2 mm	2-4 mm		
A	47.3	52.7	0	550	0.323
B	12.4	40.8	46.8	30	0.280
C	60.8	39.2	0	2240	0.415

[a] Culture broth on the 7th day of a 50-L jar fermentation was used for analysis.

[b] Condition A, (KH_2PO_4, Na_2SO_4, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0.3, 0.1, 0.05, 0.05%). Condition B, (0, 0.1, 0.05, 0.05%). Condition C, (0.3, 0, 0, 0%).

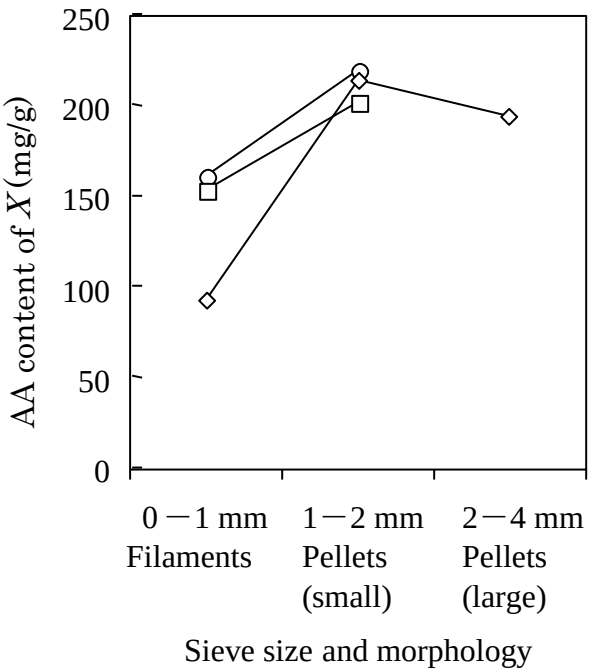

Fig. 1-7.

Relationship between the AA content and morphology. Culture broth on the 7th d of a 50-L jar fermentation study was used for analysis. The symbols are the same as in Fig. 1-6

第４節　考察

無機塩類（組成 : KH_2PO_4 0.3%、Na_2SO_4 0.1%、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.05%、$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.05%）の添加によって AA 生成量が 1.5-1.7 倍増加すること、およびその効果が pH 変化だけによるものでないことが明らかとなった。培養の原価構成の中で、無機塩類は培地費用の約 10%を占めているに過ぎないことから、無機塩類添加による AA 生成量増加は、製造コスト削減に十分に貢献するものと考えられる。

既往の PUFA 生産研究において、多くの報告で無機塩類を培地に添加しているが、本研究で見出したような高濃度の添加は殆ど報告されていない。ウィリアム・バークレイ(1996)は AA 生産培地に $MgSO_4$ を 0.01％添加しており、Mg は低い方が望ましいと述べている。また、リン酸塩添加の AA 生産への影響は様々な研究例(キール, 1994; Lindberg and Mollin, 1993; Chen et al., 1997)が報告されているが、リン酸に加えて Ca、Mg、Na を全て添加した試みは実施されていない。また我々の実験においても、KH_2PO_4 0.3%のみの添加では、AA 生産に効果が得られなかった。Sajabidor ら(1990)は Czapek 塩類を AA 生産に使用しているが、Ca が無添加である。また、Hansson ら(1989)がγ-リノレン酸生産に用いた培地はリン酸、Na、Ca、Mg の全塩類が添加されているものの、Ca の添加濃度が極めて少ない。

窒素源の影響検討において、塩類添加大豆タンパク培地の方が、塩類添加酵母エキス培地よりも高い AA 生成量が得られた。しかし、窒素源自身に含まれている無機塩類は、大豆タンパクの方が酵母エキスよりも高かった。このことから、塩類添加は単なる栄養素補助としてではなく、他成分との相乗効果として AA 生産に効いているものと推測された。しかし、窒素源と無機塩類との相乗効果のメカニズムについては未解明であり、さらなる検討が必要である。

pH 一定培養において、pH6.1-6.6 が最適であることが判明した。キール(1992)や Lindberg および Molin(1993)は、AA 生産には高 pH が、菌体増殖には低 pH が適していると述べている。加えて、Bajpai ら(1991)は、AA 生産および菌体増殖に適した pH は 6.0-6.7 であると述べている。我々が行った酸・アルカリ自動添加による pH 一定条件下での検討は、本研究が最初の試みであり、pH の影響がより明確になったものと考えられる。

50 L ジャー培養実験において、KH_2PO_4、Na_2SO_4、$CaCl_2$、および $MgCl_2$ の菌形態への影響が明らかになると共に、単一培養液内でも、Fig. 1-7 に示すように菌形態の違いに由来する AA 生産性の分布が存在することが示された。糸状菌の菌形態と生産性の関係

は様々な研究例がレビュー（Braun and Vecht-Lifshitz, 1991）されているが、大部分が菌体外生産であるために、本研究のような単一液内の生産性分布を評価した例は殆ど無い。培養液を篩い分けによって、小型ペレット（篩サイズ:1-2 mm）、大型ペレット（篩サイズ:2-4 mm）およびフィラメント（篩サイズ:0-1 mm）の各画分に分けた後、乾燥菌体重量と各画分菌体の AA 含量を測定することによって、菌形態の定量評価と併せて AA 生産性の分布を調べた結果を Table 1-1 および Fig. 1-7 に示した。これらより、AA 含量が小型ペレットで最も高いこと、及び見かけ粘度がフィラメント量に伴って増加することが明らかになった。

KH_2PO_4 のみの添加では、より多くのフィラメントが形成され、見かけ粘度が上昇したため十分な DO 確保に高攪拌（max 500 rpm）が必要となり、高攪拌条件が菌糸に損傷を与えて AA 生産性を低下させたものと考えられた。一方、Na_2SO_4、$CaCl_2$ および $MgCl_2$ を添加した場合は、大型のペレットが形成され、見かけ粘度が低下した結果、DO 確保に必要な攪拌速度は max 300 rpm で十分であったが、Kobayashi ら(1973)も報告しているようにペレット粒子内部への物質移動が制限された結果、AA 生産性が低下したものと考えられた。一方、4 種類の無機塩類全てを添加した場合には、小型ペレットが多く形成されたために、目的の DO を維持するために必要な攪拌速度が低く抑えられ、高攪拌による物理的ストレスが緩和されたこと、およびペレット粒子内の基質及び酸素濃度分布による影響が低く抑えられたことが、高 AA 生成量が得られた原因と考えられた。

上記の、無機塩類による菌形態への影響のメカニズムは、その大部分が未知であるが、菌形態形成には、生化学的因子と物理化学的因子の双方が影響していると考えられる。KH_2PO_4 を添加した場合、培養液の観察結果において、初期の増殖速度が無添加に比べて若干増加したが、この速い増殖速度が、より菌糸の伸長を促進し、結果として攪拌によって切断された菌糸断片数が増加、それがフィラメント状の菌形態の原因になったと推測している。Na_2SO_4、$CaCl_2$ および $MgCl_2$ 添加で、より多くのペレットが形成された一因として、培地のイオン強度が考えられた。Braun および Vecht-Lifshitz(1991)は、 Ca イオンおよびポリカチオンが菌糸の集合を促すとの報告をしている。菌形態の制御には、菌糸の分散と集合の双方について物理化学的および力学的に十分に考慮する必要があると考えられるが、本研究で、無機塩類の添加条件である程度の菌形態制御が可能であることが示唆された。

第 2 章　菌形態変化の解析

第 1 節　緒言

前章において、培養液内の比較で、小型ペレット（篩径 1-2 mm）のアラキドン酸(AA)含量が最も高く、フィラメント状の菌糸の AA 含量は低いことを明らかにした。酸素・栄養源の物質移動の観点から考えると、外部からの物質移動が制限される可能性の高いペレットよりも、それが無いフィラメント状の方が生産に適していると推測できるが、逆に、物理的ストレスに晒される頻度を考慮するとペレット内部の菌糸は外部の物理的ストレスに晒される機会が少ないため AA 生産に適している可能性も考えられる。従って、菌形態と AA 生産性の関係の経時変化についてより詳細に解析し、形態に依存した生産性の違いが生じた原因について調べることが、さらなる効率生産のために重要であると考えた。

近年の計算機の発達に伴って、画像処理技術の糸状菌培養への援用が注目されつつあり、Park(1998)によってレビューされているように、①菌糸形態、ペレットやフィラメントの大きさの解析、②菌糸の増殖についての動力学的モデル構築、③菌体内の生理学的研究を始めとして、様々な目的で応用されてきている。画像解析を用いて、菌形態と生産性の関係について検討した例としては、*Streptomyces* (Yang et al., 1996; Tamura et al., 1997)、*Aspergillus* (Johansen et al., 1998; Carlsen et al., 1996)、および *Penicillium* (Vanhoutte et al., 1995; Paul and Thomas, 1996; Justen et al., 1998; Harvey et al., 1998)の培養で報告されているが、油脂生産菌の培養については未だ研究例が殆ど無い。さらに、培養液内における菌形態の違いによる生産性の違いに関しては殆ど報告されておらず、この理由としては、糸状菌の生産物は大部分が菌体外産物であるためその評価が困難であるためと考えられる。また、従来報告されている菌形態の解析は、フィラメントのみ、またはペレットのみを扱ったものであり、数ミクロン単位のフィラメントから数ミリメートル単位のペレットまで含む広い範囲で解析した例は殆ど無い。

本章では、菌形態の変化を篩い分けと画像解析を用いて客観的に評価すると共に、ペレットとフィラメントの AA 含量を経時的に調べ、単一培養液内の AA 生産性の分布の原因を考察することを目的とした。

第 2 節　実験材料および方法

2・1　　使用菌株および保存方法

第 1 章で用いた糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株を使用した。詳細は第 1 章(2・1)に記す。

2・2　　通気攪拌培養実験（10 kL 容培養槽）

前培養は、30 L の液体培地を 50 L 容培養槽にて調製し、第 1 章(2・3)に記載の方法で調製したフラスコ培養液を接種の後、28℃、攪拌回転数 200 rpm、槽内圧 150 kPa、通気量 30 L/min の条件で 2 日間行った。

前培養の培地組成

グルコース	1.8%
酵母エキス	1%
大豆油	0.1%
pH	6.0

本培養は、6,000 L の液体培地を 10 kL 容培養槽にて調製し、30 L の前培養液を接種の後、26℃、通気量 360 m^3/h、槽内圧 200 kPa で培養を開始した。グルコース濃度を 1-2.5%に維持するよう、グルコース流加を行った。また、溶存酸素濃度（DO）を 10-15 ppm に維持するよう、攪拌回転数を調節しながら、8 日間培養を行った。

本培養の初発培地組成

大豆タンパク	5.0%	グルコース	1.8%
大豆油	0.1%		
KH_2PO_4	0.3%	Na_2SO_4	0.1%
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.05%	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.05%
pH	6.0		

2・3　分析方法

2・3・1 乾燥菌体濃度

第 1 章(2・5・1)に記載の方法で乾燥菌体(*X*)濃度を測定した。

2・3・2 脂肪酸組成および生成量

第 1 章(2・5・2)に記載の方法で脂肪酸を測定した。乾燥菌体濃度(*X*)より、総脂肪酸生成量(FA)を差し引いた値を実質の菌体構成成分と考え、脂質フリー菌体濃度(*X*-FA)を求めた(Granger et al., 1993)。菌体増殖の評価は脂質フリー菌体濃度(*X*-FA)で行った。

2・3・3 菌形態評価（篩い分け法）

目の開きが 0.5 mm の篩を用いて、第 1 章(2・5・3)に記載の方法で篩い分けを行なった。第 1 章では篩サイズ 1 mm 以下をフィラメントとして評価したが、この篩を通過した画分に少量混入する非常に小さなペレットが、顕微鏡観察のためのスライド作成を困難にすることから、本章では 0.5 mm の篩を用いた。篩を通過した画分をフィラメント画分(F-fraction)、通過しなかった画分をペレット画分(P-fraction)とした。F-fraction および P-fraction の、乾燥菌体量および菌体当たり脂肪酸含量を上記方法で測定した。

2・3・4 見かけ粘度

第 1 章(2・5・4)に記載の方法で見かけ粘度を測定した。

2・3・5 画像解析

実体顕微鏡（SZX12、オリンパス製）、CCD カメラ（KY-F55MD、ビクター製）、パーソナルコンピュータ（OptiPlex、Dell 製）およびソフトウェア（Image-Pro Plus、メディア・サイバネティックス社製）から構成されるシステムで画像解析を行った。まず F-および P-fraction を純水にて約 100-500 倍に希釈した後、顕微鏡倍率 32 倍(F-fraction)および 3.5 倍(P-fraction)で約 15-30 フレーム（画素数 480 x 640/ﾌﾚｰﾑ）撮影した。24 ビット/画素の RGB デジタルデータを顕微鏡にマウントした CCD カメラより PC へ伝送し、ソフトウェア上で 256 階調のグレースケールに変換した(Fig. 2-1 (a)(d))。次いで、画像を 2 値化した後(Fig. 2-1 (b)(e))、各オブジェクトの投影面積(projected area)および周囲長(perimeter)を画素数から求めた。コントラスト不足に起因する小塊や、撮影フレームに

掛かったオブジェクトを除去した後(Fig. 2-1 (c)(f))、100 個以上のオブジェクトについて、2 つのパラメータ（*Area* および *Roughness*）で評価した。*Area* および *Roughness* は次の計算式(Tucker et al., 1992)より求めた。

Area = 投影面積

Roughness = (周囲長)^2／投影面積

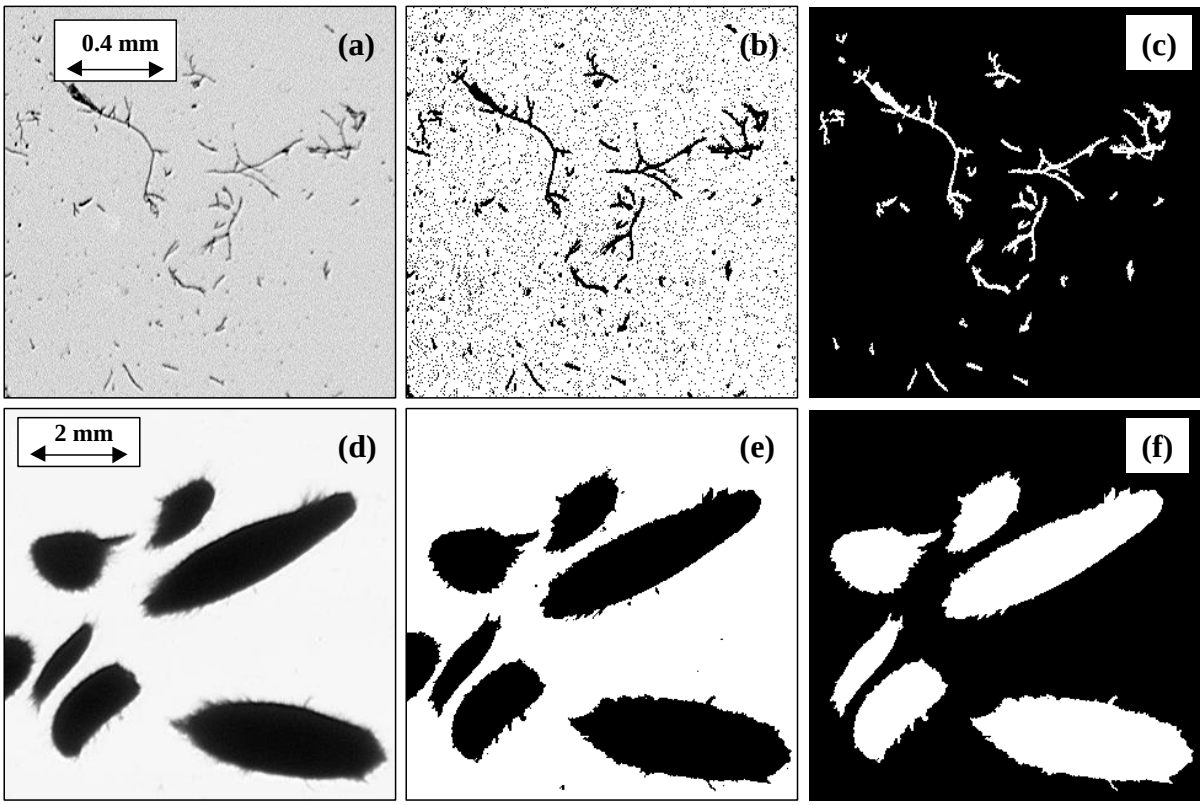

Fig. 2-1.

Morphology of *M. alpina* 1S-4 in a 10-kL fermentor. (a)-(c), and (d)-(f) were magnified 32x (2.9 μm/pixel) and 3.5x (27 μm/pixel), respectively. (a) and (d) show original captured images with gray scale of 256 levels of F- and P-fractions, respectively; (b) and (e), binary images of F- and P-fractions, respectively; and (c) and (f), binary images of F- and P-fractions, respectively, after elimination of small debris and objects lying across the picture frame.

第3節　結果

3・1　培養経時変化

Fig. 2-2 に 10 kL 培養における経時変化を示す。乾燥菌体(*X*)濃度、総脂肪酸(FA)生成量、アラキドン酸(AA)生成量は、Fig. 2-2(a)に示すように、8 日間の培養で、各々61.6 g/L、24.2 g/L、11.0 g/L であった。AA 組成比（AA/FA）は培養 8 日目で 45.6%に達した。培養開始から 2 日目までは、脂質フリー菌体(*X*-FA)濃度は増加したが、その後、8 日目までは殆ど変化しなかった。即ち、培養 2 日目までの増殖期と、それ以降の脂肪酸蓄積期に分かれていることが確認された。さらに、培養液をフィラメント画分（F-fraction）とペレット画分（P-fraaction）に分離した後、各々の菌体当り AA 含量を測定した結果、Fig. 2-2(d)に示すように培養中を通じて P-fraction の方が高い AA 生産能を持つことが確認された。

F-fraction と P-fraction の比率については、Fig. 2-2(c)に示すように、脂肪酸蓄積期を通じてほぼ一定であり、P-fraction は培養中を通じて約 80%であった。

みかけ粘度は、Fig. 2-2(b)に示すように培養 2 日目で最も高く、以降は低下傾向であった。また同培養液の濾液の粘度を測定した結果、3-4 cp であった。これらの結果より、*X*-FA 濃度、F/P-fraction 比は一定であるにも拘わらず、培養液の見かけ粘度は低下していることから、見かけ粘度にはペレットの形態的特徴が関係しているものと推測した。*Roughness* 等のペレットの形態的特徴が培養液の粘性に影響するとの報告は、*Aspergillus niger* (Olsvik et al., 1993)や *Streptomyces fradiae* (Choi et al., 1998)の培養においても報告されている。

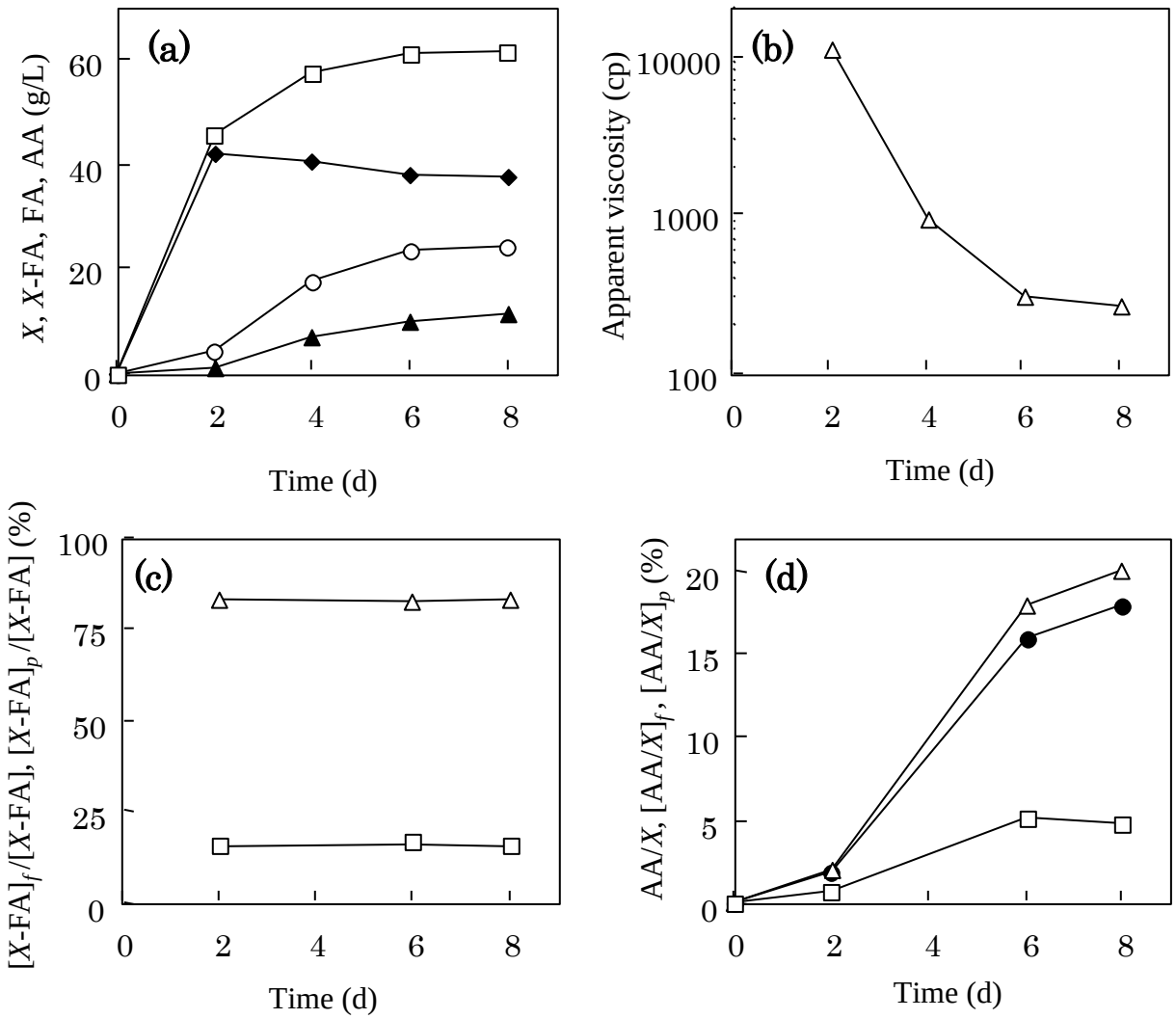

Fig. 2-2.

Time course of AA production by *M. alpina* 1S-4 in a 10-kL fermentor. (a) Dry cell weight (*X*, □), total fatty acid (FA, ○), AA (▲), and fat-free biomass (*X*-FA, ◆); (b) apparent viscosity (△); (c) percentage of fat-free biomass of P-fraction (X-FA$_p$/X-FA, △), and F-fraction (X-FA$_f$/X-FA, □); and (d) AA content in mycelia (AA/X, ●), P-fraction (AA/X_p, △), and F-fraction (AA/X_f, □).

3・2　画像解析による形態変化解析

脂肪酸蓄積期（培養 2 日目～8 日目）において、F-fraction と P-fraction の間に顕著な AA 生産量の差が認められたが、この現象の原因を考察すべく菌形態の経時変化を解析した。解析パラメータ *Area*（＝[投影面積]）は撮影対象物（F-fraction の場合は分散した菌糸またはそれらが絡まったもの、P-fraction の場合は多数の菌糸より構成されたペレット）の大きさの指標である。一方、*Roughness*（＝[周囲長]^2/[投影面積]）は撮影対象物の形状の複雑さ（F-fraction の場合は分枝度および菌糸同士の絡まり度、P-fraction の場合はペレット形態の特徴）を表す無次元数である。この両パラメータを用いて、菌形態変化を定量的に解析することを試みた。

Fig. 2-3 は F-fraction の画像解析結果であり、*Area* および *Roughness* の頻度分布をヒストグラムで示している。培養 2 日目においては、0.001-0.0015 mm^2 の *Area*、および 40-50 の *Roughness* を形態的特徴とする菌糸が多くを占めていた。そして、脂肪酸蓄積期の間に、より大きい *Area* と *Roughness* へと変化する現象が確認された。この結果より、F-fraction の菌糸は集合または絡まってそのサイズが徐々に大きくなったことが推測された。

Fig. 2-4 は P-fraction の画像解析結果であり、*Area* および *Roughness* の頻度分布をヒストグラムで示している。*Area* のヒストグラムに同等頻度の左右二つのピーク（左側、*Area*=0.02-0.1 mm^2; 右側、*Area*=1-10 mm^2）が認められたことから、大型（右側ピーク）と小型（左側ピーク）のペレットがほぼ同数存在していたと考えられた。従って、P-fraction 中の体積頻度としては、大型ペレット（右側ピーク）の方が圧倒的に多くを占めていたと考えられることから、右側ピークが P-fraction のペレットの形態的特徴を代表しているものと考えた。脂肪酸蓄積期の間に、右側ピークの *Area* が 3-6 mm^2 から 1.5-5 mm^2 へと若干低下したことから、P-fraction のペレットの一部が脂肪酸蓄積期の間に破断されたものと考えられた。*Roughness* に関しては、培養 2 日目には 20-200 付近の値で分布していたのが、培養時間の経過に伴って値が小さく、かつ分布幅が小さく変化したことが確認された。この結果より、*Roughness* の高い綿状ペレットが *Roughness* の低い滑状ペレットへと変化したものと考えられた。

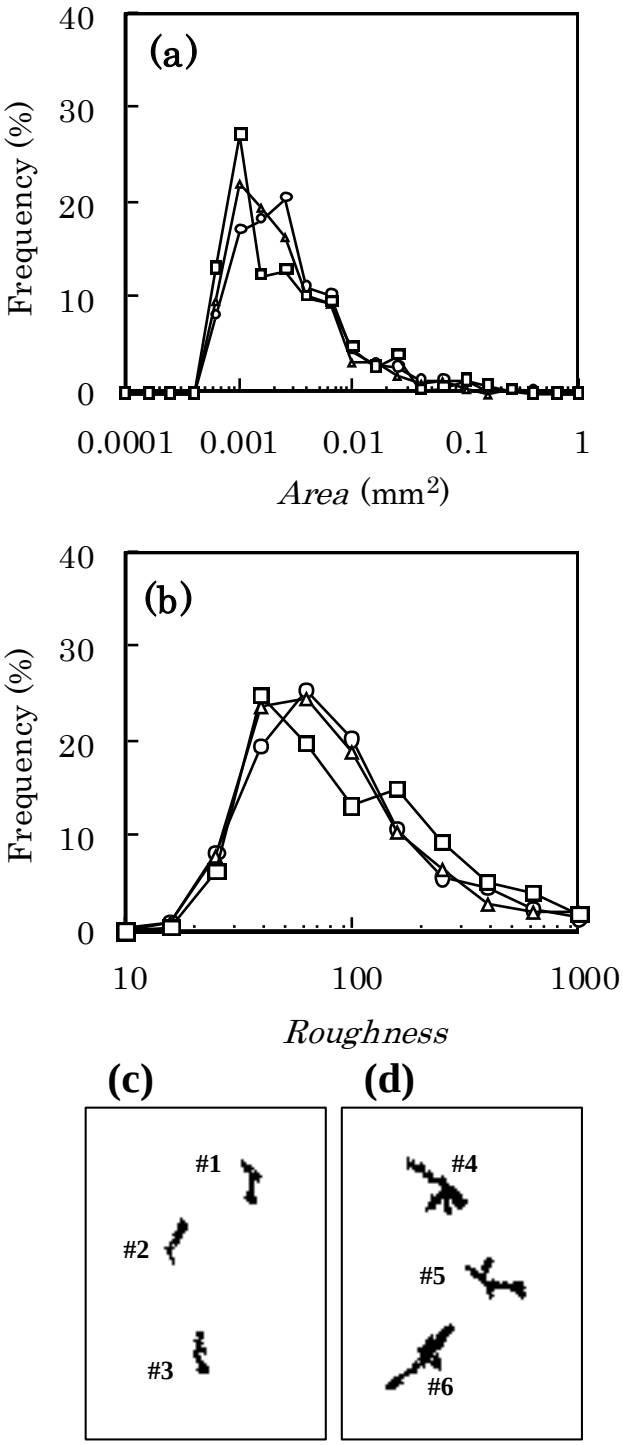

Fig. 2-3.

Frequency distribution of *Area* (a) and *Roughness* (b) of the F-fraction on the 2nd (□), 6th (△), and 8th (○) days. Binary images of the F-fraction, *Area* (mm^2) and *Roughness*, (c) were 0.00134 and 42.7 (#1), 0.00117 and 45.5 (#2), and 0.00127 and 43.4 (#3) on the 2nd day; and (d) 0.00348 and 77.7 (#4), 0.00258 and 67.1 (#5), and 0.00363 and 75.6 (#6) on the 8th day, respectively.

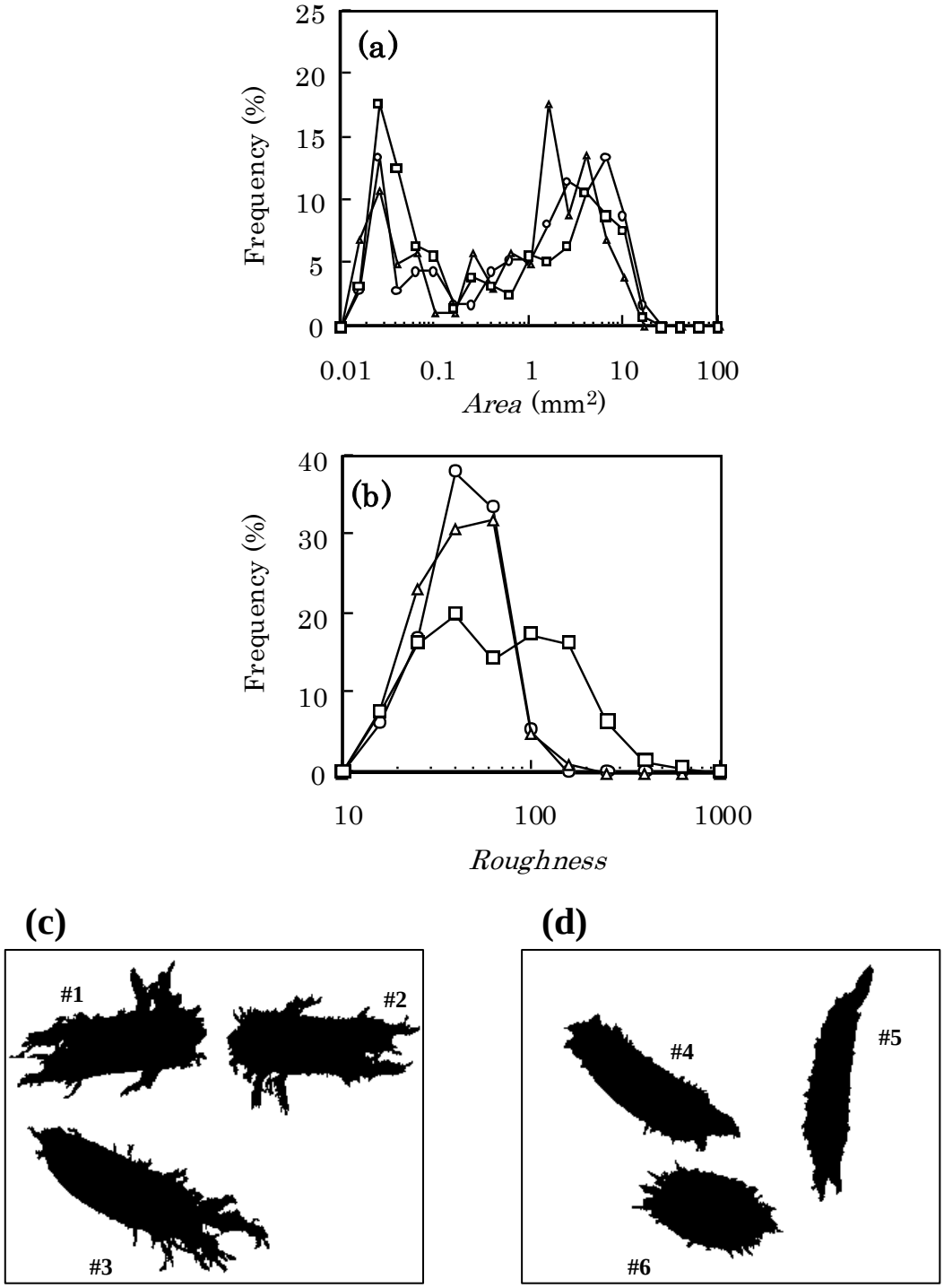

Fig. 2-4.

Frequency distribution of *Area* (a) and *Roughness* (b) of the P-fraction on the 2nd (□), 6th (△), and 8th (○) days. Binary images of the P-fraction, *Area* (mm^2) and *Roughness*, (c) were 4.41 and 120 (#1), 4.17 and 138 (#2), and 4.84 and 157 (#3) on the 2nd day; and (d) 3.49 and 44.5 (#4), 2.79 and 54.5 (#5), and 2.92 and 57.9 (#6) on the 8th day, respectively

第 4 節　考察

画像解析を援用した糸状菌の形態変化解析は様々な研究者により報告（Park, 1998）されているが、その大部分はフィラメントのみ、あるいはペレットのみについての解析であり、狭い大きさの範囲内で行われている。本実験では、篩い分けを併用することによって、約 3.5 μm（菌糸の幅）から約 5 mm（ペレットの長軸）に及ぶ広範囲のサイズで解析することができた。

菌形態と生産性の関係については、従来より多くの報告が行なわれてきた(Braun and Vecht-Lifshitz, 1991)。しかし、それらの大部分は様々な菌形態を得るべく異なった条件で培養し、それら培養条件間－interculture－で評価した結果である。一方、単一培養液内－intraculture－における菌形態の違いに基づく生産性の違いについて評価した結果については殆ど報告されていない。我々の知る限りにおいて、本研究が intraculture による菌形態と生産性を経時的に評価した始めての試みであろう。従来、intraculture による評価が成されなかった理由は、糸状菌による物質生産の多くは菌体外生産であるため、その評価が不可能または非常に困難であったことによると思われる。

菌形態および AA 生産の経時変化結果より、培養過程における現象を以下述べるように推測した。まず、培養 2 日目までの間、即ち菌体増殖期の間には、接種された前培養液の菌糸が一旦分散した後に、分散した菌糸が核となって徐々に成長しペレットが形成された。形成されるペレットの大きさや、P/F-fraction 比は、培地の塩類組成によってある程度制御可能であり、第 1 章で見出した培地組成を採用することによって、約 1-2 mm の小ペレットを高い割合で形成させることが出来た。また、この期間における AA 生産速度は低い結果であった。窒素源の枯渇が脂肪酸蓄積を高めることが報告(Ratledge., 1997)されているが、本研究においても、窒素源が残存している間は増殖による菌形態形成が、そして窒素源枯渇後には脂肪酸生合成が行なわれ、増殖期と脂肪酸蓄積期に分かれていた。

菌体増殖期から脂肪酸蓄積期へ移行する段階である培養 2 日目の時点においては、高い *Roughness* を特徴とする綿状ペレットが培養液の大部分を占め、培養液の物性は高い粘度を示した。

培養 2～8 日目の脂肪酸蓄積期における菌形態変化は、Fig. 2-5 に示すモデルを考えた。培養 2 日目には、綿状ペレットが P-fraction に多く存在していたが、その後、綿状ペレットの表面菌糸が培養時間と共に切断されて滑状ペレットへと変化するとともに、

切断されたペレット表面菌糸片は遊離菌糸として F-fraction の成分となったと考えられた。F-fraction の菌糸は培養時間に伴って集合または絡まり合ってサイズが大きく変化し、その一部は P-fraction の成分になったと考えられた。脂肪酸蓄積期における AA 生産性は、Fig. 2-2(d)に示すように、脂肪酸蓄積期間中を通じて P-fraction の方が F-fraction より高かったが、この原因としては、F-fraction の菌糸が培養中に切断された履歴を持つためと推測した。本研究と同様に、*Aspergillus* においてもペレット表面の菌糸が切断される現象が報告されている(Cui et al., 1997)。Fig. 2-5 のモデルが示すように、F-fraction の菌糸は脂肪酸蓄積期の間にペレット表面から切断され、それら菌糸の主な代謝は AA 生合成に代わって細胞膜・細胞壁を修復するための維持代謝へと変化したために AA 生産速度が低下したか、あるいは死滅したために AA 生合成能を殆ど失ったと考えられた。

以上の考察より、AA 生産をさらに上げるためには、菌体増殖期である培養 2 日目までに、P-fraction 比率を出来る限り上げることが重要であると考えられる。本研究においては、塩類添加によってある程度まで制御できることを明らかにしたが、理想状態である 100%の P-fraction 達成にはさらなる検討が必要であると考える。

P-fraction 比率が高い状態でも、*Roughness* の高い綿状ペレットが多くを占めていれば、高い培養液粘度を示すことが確認された。従って、培養 2 日目までに滑状ペレットを形成させることができれば、培養中を通じて低い粘度を維持できる可能性がある。一方、フラスコ培養において培地窒素源が菌形態および AA 生産に及ぼす影響を検討した結果(Park et al., 1999)、酵母エキス、グルテンミール、コーンスティープリカーを用いた場合は滑状ペレットが形成されて AA 生産性は低く、Pharmamedia、魚粉、大豆タンパクを用いた場合には綿状ペレットが形成されて AA 生産性は高いことが明らかとなった。即ち、綿状ペレットを形成することと高い AA 生産性を示すことは生理学的な因果関係があることを示唆していると考えられる。従って、滑状ペレットを形成させれば粘度は下がり、培養液の混合攪拌は有利になるが、培地組成の生理学的影響によって AA 生産性が下がる可能性がある。以上の考察を総合すると、高粘度の培養液を十分に攪拌混合できる装置を備えた上で、綿状ペレットを出来る限り多く形成させることが、高 AA 生成量を得るために適した手段であると考えられる。

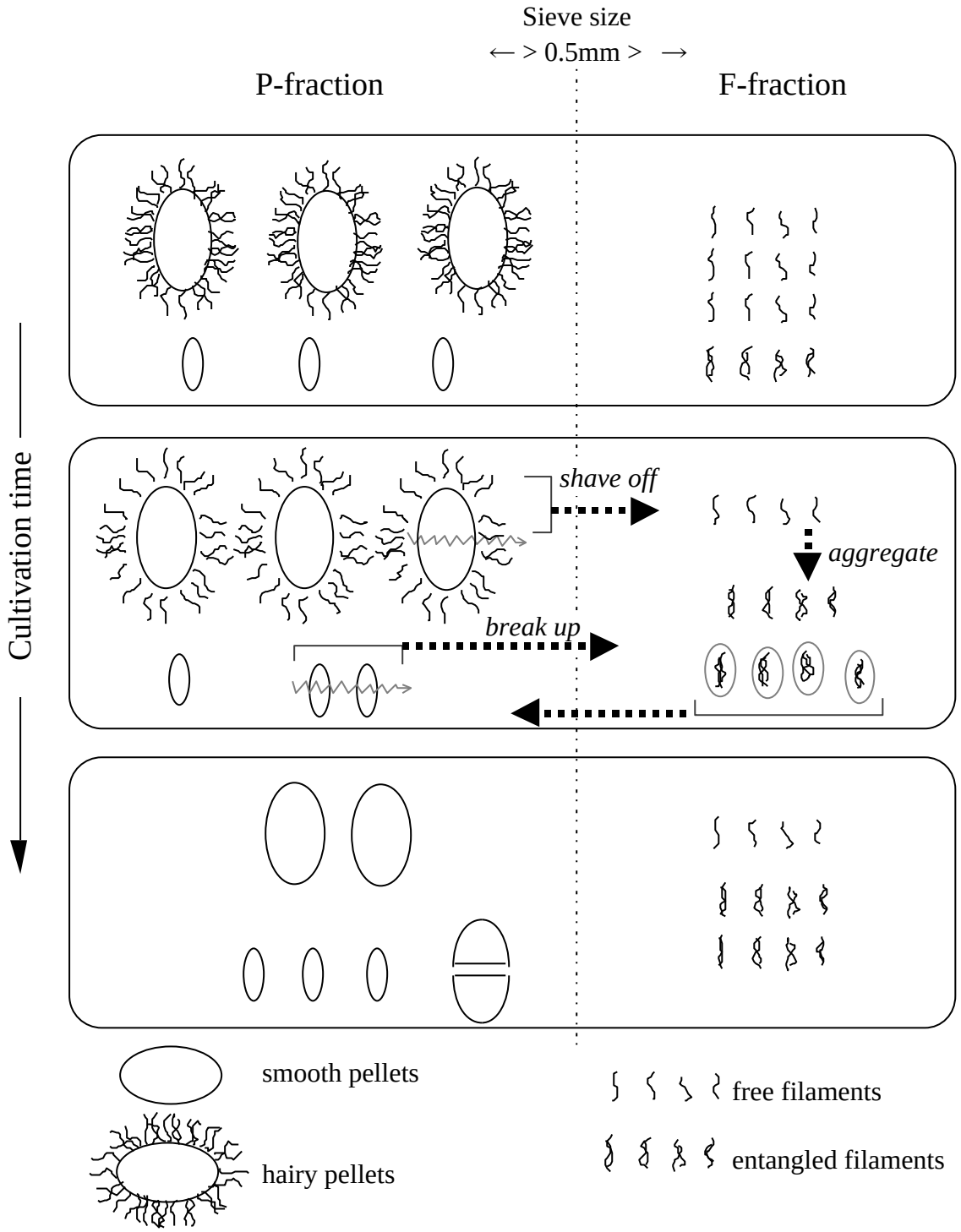

Fig. 2-5.

Schematic diagram of the morphological changes of *M. alpina* 1S-4

第 3 章　誘電計測による菌体内脂肪酸含量の推定

第 1 節　緒言

本論文緒論において述べたごとく、糸状菌 *Mortierella* は様々な PUFA の生産菌として多くの報告で取り上げられている (Certik and Shimizu, 1999)。PUFA 生産において、菌体内に蓄積された脂肪酸の分析は、溶媒抽出の後にクロマトグラフィーや重量秤量等の非常に手間のかかる従来法で実施されているのが現状であり、簡便に菌体内蓄積脂肪酸を測ることのできるセンサーが開発されれば、それは培養工程の制御・管理や工程改善だけでなく、脂肪酸生産の生化学的な知見を深める上で有意義な情報が得られるものと考えられる。

誘電計測は非破壊的に生細胞の電気的性質を検出する手法であり(Schwan, 1957)、次のような優れた特徴を持っている。①測定が容易であり、連続自動測定ができる、②光学測定では難しい濁った試料や、着色試料についても測定できる、③細胞濃度を直接的に測定しているため、代謝量からの間接測定に比べて精度が高い、④細胞膜のイオンに対するバリアー能を利用しているので生細胞のみを測定している（浅見, 1995）。これら特徴から、誘電計測は細菌(Asami et al, 1980b; Davey et al., 1992)、酵母(Asami and Yonezawa, 1995a, b; Harris et al., 1987)、糸状菌(Krairak et al., 1999)、動植物細胞(Matanguihan et al., 1994)、固定化菌体(Mishima et al., 1991)の培養のみならず、廃液処理（三島ら, 1992）における菌体濃度のモニターに利用されている。さらなる応用例として、細胞の溶菌や損傷をモニターする試み（Morita et al., 1999）や、細胞内の情報を得る目的としては、酵母の液胞体積の変化を捉える試み(Asami and Yonezawa, 1995a)が報告されている。このような多くの実用例があるにも拘わらず、細胞内に蓄積される生産物含量の測定を試みた報告はみあたらない。

脂肪酸生産微生物の培養においては、細胞内の脂肪酸含量増加に伴って、細胞質の導電率が低下することが予想される。そこで、細胞質導電率を測定することによって脂肪酸生産をモニターできる可能性に着目し検討を行った。本章では、*Mortierella alpina* の菌体内脂肪酸蓄積量を誘電計測で推定することを目的とした。

第 2 節　理論的背景

殻つき楕円モデル(Asami et al., 1980a, b)を基に、非球形細胞の希薄懸濁液における誘電挙動のモデル式(Asami and Yonezawa, 1995b)が導かれた。同モデルより、偏長楕円型細胞は二つの誘電緩和（低周波緩和、高周波緩和）を示すことが予測できるが、本章では高周波緩和を取り扱う。Fig. 3-1 に示すような偏長楕円型細胞の高周波緩和に関して、その緩和幅($\Delta\varepsilon$)および特性周波数(f_c)は、(3-1)式および(3-2)式で与えられる。

$$\Delta\varepsilon = \frac{16P\overline{R}C_m}{9\varepsilon_0(1-\alpha)(1+\alpha)^2} \tag{3-1}$$

$$\frac{1}{2\pi f_c} = \frac{2\overline{R}C_m}{3}\left(\frac{1}{(1-\alpha)\kappa_i} + \frac{1}{(1+\alpha)\kappa_a}\right) , \tag{3-2}$$

この式において、

$$\overline{R} = 3\left(\frac{1}{R_x} + \frac{1}{R_y} + \frac{1}{R_z}\right)^{-1} , \tag{3-3}$$

$$\alpha = -\frac{1}{q^2-1} + \frac{q}{(q^2-1)^{3/2}}\ln\left\{q + (q^2-1)^{1/2}\right\} . \tag{3-4}$$

P は細胞の体積率（懸濁液に占める細胞の体積割合）、C_m は細胞膜の静電容量、ε_0 は真空の誘電率(ε_o=0.08854 pF/cm)、κ_i は細胞質の導電率、κ_a は培地の導電率、R_k は k 軸方向の楕円半径、α は depolarization factor、q は楕円の長短径比($=R_z/R_x=R_z/R_y$)を表す。

糸状菌の場合は、菌糸長は菌糸幅に比べて十分に長い、即ち、$R_Z >> R_x = R_y$、と考えられるので、(3-3)式および(3-4)式は次のように表せる。

$$\overline{R} = 3\left(\frac{2}{R_x} + \frac{1}{R_z}\right)^{-1} \approx \frac{3}{2}R_x \tag{3-5}$$

$$\alpha << 1 \tag{3-6}$$

(3-5)式および(3-6)式を用いて、(3-1)式および(3-2)式は次の近似式に変形できる。

$$\Delta\varepsilon \approx \frac{8PR_xC_m}{3\varepsilon_0} \tag{3-7}$$

$$\frac{1}{f_c} \approx 2\pi R_x C_m\left(\frac{1}{\kappa_i} + \frac{1}{\kappa_a}\right) \tag{3-8}$$

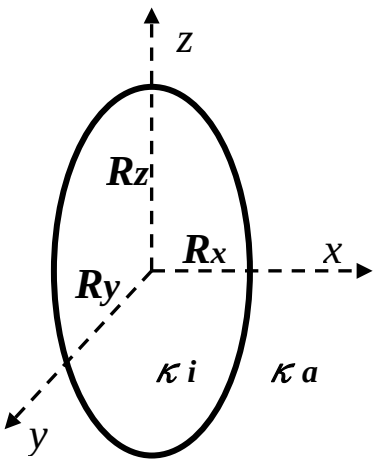

Fig. 3-1.

A shell-ellipsoid model for biological cells (Asami and Yonezawa, 1995b). R_x, R_y, and R_z are the semiaxes of the shell-ellipsoid. κ_i and κ_a are conductivities of cytoplasm and medium, respectively.

第 3 節　実験材料および方法

3・1　　使用菌株および保存方法

糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株(Shinmen et al., 1989)および、*Mortierella alpina* SAM2104 株を使用した。1S-4 株は第１、２章でも用いた土壌より分離した野生株であり、SAM2104 株は 1S-4 株を親株とする変異株である。保存法の詳細は第 1 章(2・1)に記す。

3・2　　通気攪拌培養実験（10 kL 容培養槽）

M. alpina 1S-4 株の培養方法は、第 2 章（2・2）に記載した通りである。

M. alpina SAM2104 株の培養方法として、前培養は 30 L の液体培地を 50 L 容培養槽に調製し、第 1 章（2・3）に記載の方法で調製したフラスコ培養液を接種の後、28℃、攪拌回転数 200 rpm、槽内圧 150 kPa、通気量 30 L/m の条件で 2 日間行った。

前培養の培地組成

グルコース	1.8%
酵母エキス	1%
オリブ油	0.1%
pH	6.0

本培養は、4,000 L の液体培地を 10 kL 容培養槽に調製し、30 L の前培養液を接種の後、24℃、通気量 120 m^3/h、槽内圧 200 kPa で培養を開始した。グルコース濃度を 1-2.5%に維持するよう、グルコース流加を行った。また、溶存酸素濃度（DO）を 10-15 ppm に維持するよう、攪拌回転数を調節しながら、15 日間培養を行った。

本培養の初発培地組成

大豆タンパク	3.1%	グルコース	1.8%
オリブ油	0.1%		
KH_2PO_4	0.3%	Na_2SO_4	0.1%
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.05%	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.05%
pH	6.0		

3・3　分析方法

3・3・1 乾燥菌体濃度

第 1 章(2・5・1)に記載の方法で乾燥菌体(X)濃度を測定した。

3・3・2 脂肪酸組成および生成量

第 1 章(2・5・2)に記載の方法で脂肪酸を測定した。そして、第 2 章（2・3・2）に記載している方法で脂質フリー菌体濃度(X-FA)を求め、菌体増殖の指標とした。

3・3・3 誘電計測

計測は Colloid Dielectric Probe（試作品）、LCR メータ（HP4285A、日本ヒューレットパッカード製）および制御用コンピュータから構成されたシステムで行った。計測の原理、詳細は Asami ら(1996)、小柳および米澤の報告(1996)に示す通りである。

培養液を 500 mL ビーカーに採取、攪拌の後、測定電場が均一になるように液中心へプローブを入れて、交流周波数 100 kHz から 30 MHz の範囲で誘電率と導電率を計測した。

低周波数から高周波数へ移るに従って、誘電率が低下する現象（誘電緩和現象）が観測された。*Mortierella* の場合は、二つの緩和が確認された。即ち一つは低周波緩和（特性周波数 : 10 kHz 以下）、他方は高周波緩和（特性周波数 : 100 kHz～10 MHz）である。本研究では高周波緩和を計測対象とし、ColeCole 式(Cole and Cole, 1941)（(3-9）式）を適用して解析した。

$$\varepsilon = \varepsilon_h + \mathrm{Re}\left\{\frac{\Delta\varepsilon}{1+(jf/f_c)^{\beta}}\right\} \qquad (3\text{-}9)$$

ここで、ε は誘電率、ε_h は ε の高周波収束値、$\Delta\varepsilon$ は緩和幅、f は交流周波数、f_c は特性周波数、β は Cole-Cole パラメータ、そして j は虚数単位（=√-1）を表す。誘電パラメータ（f_c, $\Delta\varepsilon$, ε_h, β）を求めるために、400 kHz～30 MHz 範囲の誘電率データに(3-9)式を非線型最小自乗法によって曲線合わせを行った。その例を Fig. 3-2 に示す。400 kHz より低周波数域のデータは誘電パラメータの算出に用いなかったが、その理由は、低周波側のデータは、もう一方の緩和（低周波緩和）の影響を受けるためである。また、培地の導電率（κ_a）は、低周波側の導電率収束値で近似できる(Asami and Yonezawa, 1995a)ことから、100 kHz における導電率を培地導電率 κ_a として用いた。

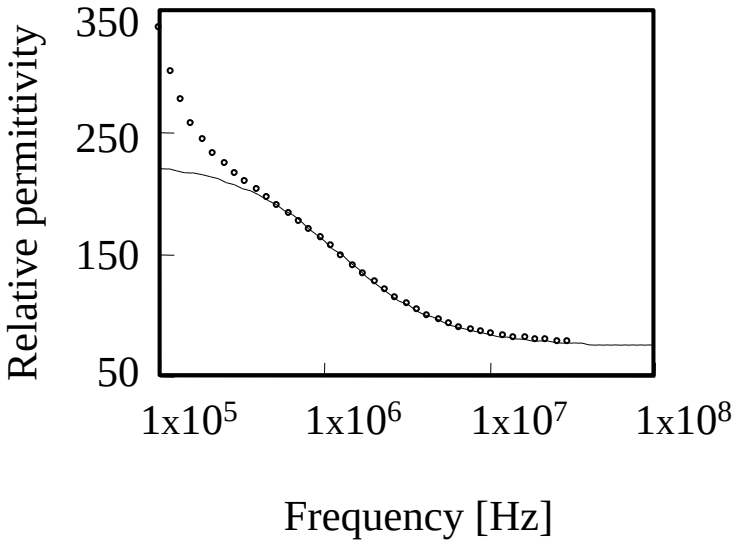

Fig. 3-2.

Frequency dependence of relative permittivity of the culture broth of *M. alpina* SAM2104. Symbols (○), relative permittivity data on the 7th day of cultivation. Thin line (－), fitted curve using the Cole-Cole equation. The parameters were as follows: f_c, 1215 kHz; $\Delta\varepsilon$, 153; ε_h, 74.4; and β, 0.832.

第 4 節　結果および考察

4・1　*M. alpina* SAM2104 株の培養経時変化

Fig. 3-3(a)が示すように、15 日間の培養で到達乾燥菌体(X)濃度は 41.3 g/L、総脂肪酸(FA)生成量は 17.9 g/L であった。脂質ﾌﾘｰ菌体(X-FA)濃度を見ると、培養 2 日目までは大きく増加したが、その後は微増であったことから、菌体増殖期と脂肪酸蓄積期に分かれていたと考えられた。脂肪酸蓄積期の間に、菌体当たり脂肪酸含量(FA/X)は 9.2%から 43.4%まで増加した。

誘電緩和幅($\Delta\varepsilon$)は、Fig. 3-3(b)が示すように脂肪酸蓄積期の間に徐々に増加した。また、顕微鏡観察の結果、菌糸径（≒$2R_x$）は培養中を通して殆ど一定であったこと、細胞膜静電容量(C_m)は殆ど不変と考えられること(Davey et al., 1992)、及び(3-7)式から考察すると、$\Delta\varepsilon$ の増加は脂肪酸蓄積による培養液中の菌の体積率 P の増加を反映しているものと考えられる。そして、体積率 P の増加は主として R_z の増加によるものと推測された。

特性周波数(f_c)と培地導電率(κ_a)は、Fig. 3-3(c), (d)が示すように培養 5 日目まで低下し、それ以降は大きな変化は無かった。κ_a の低下は、培地ミネラル濃度が菌による消費で低下したのが原因と考えられる。f_c 変化の原因は、κ_a または細胞質導電率(κ_i)が変化したためと(3-8)式より予測できる。しかし、目的とする κ_i はこの結果だけでは求められない。そこで、κ_i 推定のために、次に述べる新たな実験系の開発を試みた。

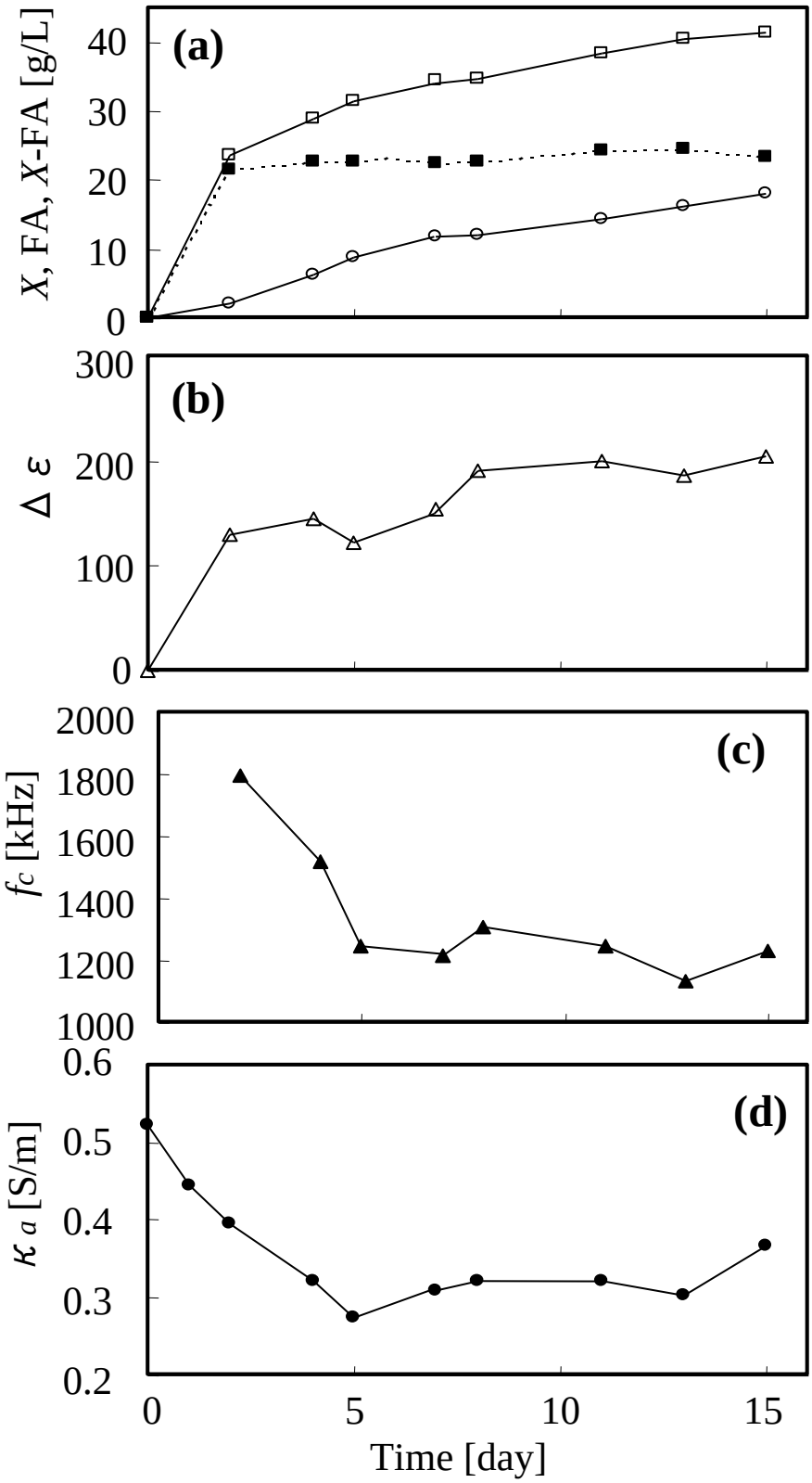

Fig. 3-3.　Time course of fatty acid production by *M. alpina* SAM2104 in a 10-kL fermentor. (a) Dry cell weight (X, □), total fatty acid (FA, ○), fat-free biomass (X-FA, ■); (b) amplitude of dielectric relaxation (Δε, △); (c) characteristic frequency (f_c, ▲); (d) conductivity of the medium (κ_a, ●).

4・2　　細胞質導電率(κ_i)の推定

(3-8)式は次のように書き換えられる。

$$\frac{1}{f_c} = A\left(\frac{1}{\kappa_i} + \frac{1}{\kappa_a}\right) \qquad (3\text{-}10)$$

ここで、

$$A = 2\pi R_x C_m \qquad (3\text{-}11)$$

菌糸径（=2R_x）および C_m は菌株に特有の値であり、培養中はほぼ一定とみなすことができる(Davey et al., 1992)。従って、使用菌株の A 値(=2$\pi R_x C_m$)を求められれば、実測値である f_c、κ_a を用いて、(3-10)式より κ_i を求めることができる。一方、κ_i が一定であれば、1/f_c と 1/κ_a は比例関係になるのでその傾きから A 値を求めることができる。

C_m（又は A）を求める目的で、培養液 500 mL に 25%KCl 水溶液 0.5-3 mL を添加して κ_a のみを変化させた時の f_c の変化を測定した。その結果、Fig. 3-4 に示すように 1/κ_a と 1/f_c の間に直線の関係が得られ、その傾きの値は培養中を通して殆ど変化しなかった。そして、傾きの平均値は 1.35x10^{-7} F/m（＝A）であった。菌糸径（=2R_x）は顕微鏡観察より 3.5 μm と求められ、これを先の A 値に代入した結果、C_m は 1.2 μF/cm^2 と求められた。特殊な細胞を除いて、通常の細胞の C_m は 0.5-2 μF/cm^2 の範囲であるが(浅見, 1995)、本実験で求められた値も同範囲内であった。このことから、我々が新たに試みた KCl 添加実験系で得られた値は妥当な結果であると考えられた。

以上の実験から推定した κ_i 値と、従来法で得られた FA 含量の関係をプロットした結果、Fig. 3-5 の○印が示すように両者の間には直線の相関関係が得られたことから、菌体内脂肪酸含量を誘電計測によって推定できると考えられた。

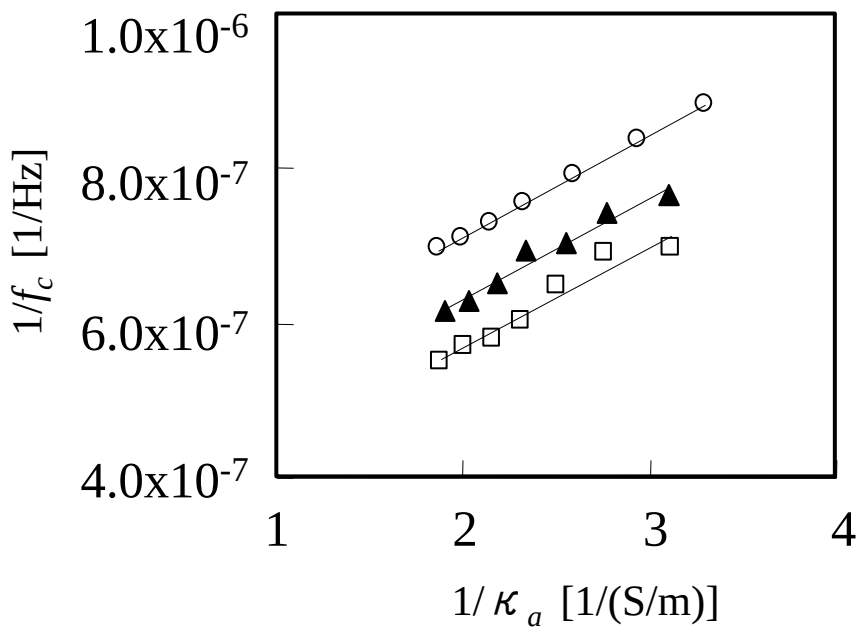

Fig. 3-4.

Relationship between κ_a^{-1} and f_c^{-1} for the KCl-addition experiment. Culture broths on the 4th day (□), the 8th day (▲), and the 13th day (○) were used for measurement.

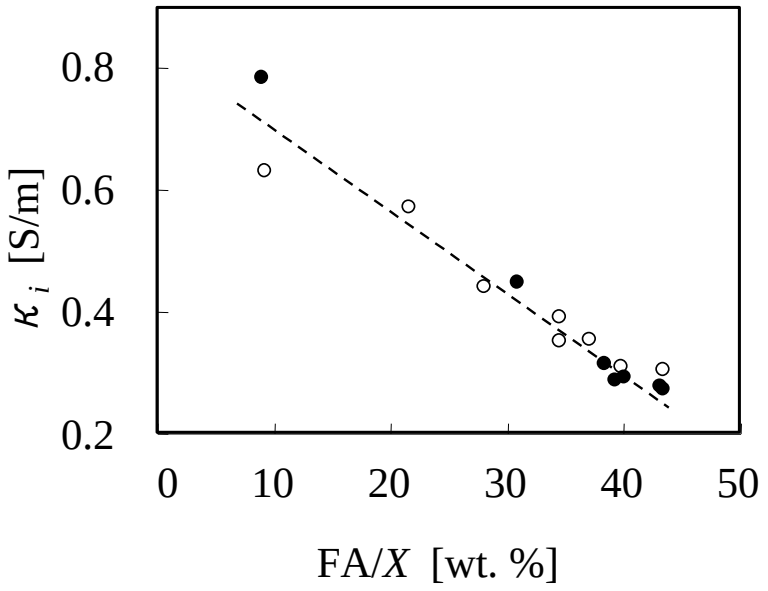

Fig. 3-5.

Relationship between κ_i and oil content in the mycelia (FA/X). Symbols (○), *M. alpina* SAM2104 and (●), *M. alpina* 1S-4. Correlation coefficient including both symbols was 0.947.

4・3　　*M. alpina* 1S-4 株の培養経時変化

第 1 章､2 章で述べたように､*Mortierella* は培養条件によって様々な菌形態を呈する。上記 4・2 で得られた κ_i と FA 含量の関係が、菌形態が変化した場合にも適用できるか否かを調べる目的で、*M. alpina* 1S-4 株を培養し、同様の計測および解析を行った。培養経時変化の詳細は、第 2 章で述べた通りであり、本菌株は主としてペレット形態を示す。一方、上記 4・2 で培養した *M. alpina* SAM2104 株は 1S-4 株に比べてフィラメント形態を示す傾向があり、その形態の比較写真を Fig. 3-6 に示す。10 kL 槽で培養した場合の､培養 8 日目の見かけ粘度は､1S-4 株および SAM2104 株で各々260 cp および 580 cp であったが、これは菌形態の違いを定量的に裏付けている結果と考えられた。*M. alpina* 1S-4 株の κ_i と FA 含量の関係を先と同様に調べた結果、Fig. 3-5 の●印で示される関係が得られた。菌形態の異なる両株で、同等の相関関係が得られたことから、たとえ形態が異なっても FA 含量が約 9-45%の範囲であれば κ_i から同含量を推定できることが明らかとなった。

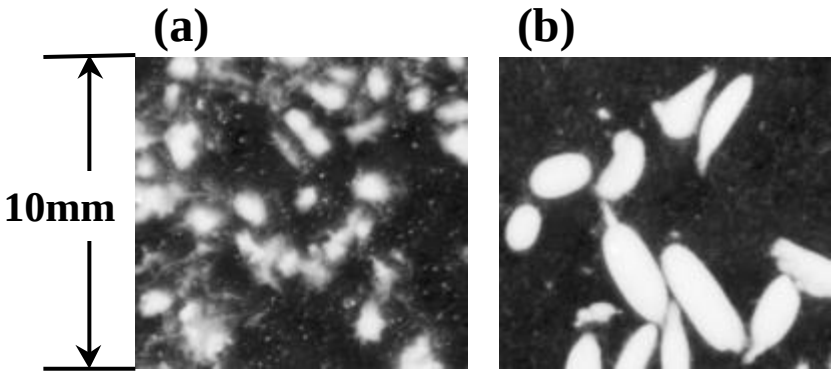

Fig. 3-6.

Morphology of (a) *M. alpina* SAM2104 and (b) *M. alpina* 1S-4 when cultivated in a 10-kL fermentor.

誘電挙動が菌形態に依存しないことは、理論面からも推察できる。非球形細胞の誘電挙動モデル式((3-1)～(3-8)式)より、高周波緩和は菌糸太さに依存すること、一方、低周波緩和には菌糸長さが大きく影響することが予測できる。従って、ここで得られた結果は理論的背景からも理にかなったものであると考えられた。

FA 含量 9%以下の場合の相関について検討を試みたが、*Mortierella* は非常に脂肪酸蓄積能が高いため、低脂肪酸含量条件の計測をするには培養初期のサンプルを採取する必要があった。しかし、培養初期は菌体濃度も非常に低いために小さい緩和幅しか得られず、そのために正確な f_c 算出が困難であった。一方、FA 含量 45%以上の場合は、含量 50%以上の高い FA 蓄積能を持つ微生物は殆ど知られていないため、その検証は困難である。従って、本研究の計測の実用的な利用を考えた場合には、FA 含量 9-45%の範囲は、利用価値として十分な範囲であると考えられた。

4・4　結論

誘電計測で *Mortierella* 菌糸内の脂肪酸含量を推定できることが示された。本計測法は簡便かつ迅速な方法であること、さらに培養液を直接モニターできる可能性があることから、培養工程の制御や菌体増殖および脂肪酸生産の解析に有益な手段であると考えられる。また、*Mortierella* の細胞膜静電容量が、一般微生物の値と同等であったことから、本計測法は *Mortierella* 以外の脂肪酸生産微生物に適用可能であると考えられる。

第 4 章　溶存酸素の影響解析

第 1 節　緒言

アラキドン酸（AA）を始めとする高度不飽和脂肪酸（PUFA）はグルコース等の炭素源から鎖長延長と不飽和化を経て菌体内で生合成されるが、不飽和化反応は酸素添加反応による好気的不飽和化であることから（Ratledge, 1992）、溶存酸素（DO）濃度は PUFA 生産における重要な因子と考えられる。

糸状菌の培養においては、高い菌体濃度および/又はフィラメント状の菌形態に起因する培養液粘性増加が、酸素や栄養源の供給を困難にすることは一般に知られている。さらに PUFA の場合は、菌体内産物であることから高い生産物生成量を得るためには高濃度培養は必須であり、DO 濃度の影響を詳細に検討することは非常に重要であると考えられる。

PUFA 生産に及ぼす DO の影響としては、Kendrick および Ratledge(1992)によって DO 濃度 2-3 ppm の条件下における検討が報告されている。また、PUFA 生産において DO 濃度をモニターしながら、DO 濃度低下を攪拌回転数制御によって防ぐ試みは、様々な研究者によって行われてきた(Nakaharaet al., 1992; Du Preez et al., 1997； Hanssonet al., 1989; Emelyanova, 1997; Totani et al., 1992)。しかし、一般に糸状菌は攪拌による物理的ストレスに弱いことから、撹拌回転数の操作範囲は制限される。これを回避するために、攪拌翼形状を変える試みがγリノレン酸生産で報告されているが(Hiruta et al., 1997)、工業規模への適用を考えた場合には実用面の課題が残る。また、低温培養によって飽和 DO 濃度を上げる手段も考えられるが、培養温度は脂肪酸組成に大きく影響するため(Lindberg and Molin, 1993, Shimizu et al., 1988)、その手法の適用範囲は制限される。

上記 PUFA 生産研究は全て、常圧下、通常空気（酸素濃度 21%）供給下において実施されたものであり、攪拌強度を上げる手段を用いることなく、代わる手段として酸素分圧を上げることによって飽和 DO 濃度を高め、より高い DO 濃度条件で PUFA 生産を試みた報告は殆ど成されていない。

本章では、AA 生産、増殖、および菌形態に及ぼす DO 濃度の影響について検討することを目的とした。

第 2 節　実験材料および方法

2・1　　使用菌株および保存方法

糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株を使用した。詳細は第 1 章(2・1)に記す。

2・2　　通気攪拌培養実験（50 L 容培養槽）

25 L の液体培地を 50 L 容培養槽に調製し、第 1 章(2・3)に記載の方法で調製したフラスコ培養液 500 mL を接種の後、28℃、攪拌回転数 200 rpm で培養を開始した。通気ガス組成（酸素濃度）、槽内圧、通気量は実験結果に併記する。グルコースの枯渇を防ぐためにグルコース流加を行った。0.9%グルコースを培養 1、2、3、4 および 5 日目に添加し、7 日間培養を行った。

本培養の初発培地組成

酵母エキス	1%
グルコース	1.8%
大豆油	0.1%
pH	6.0

2・3　　酸素供給法と計測法

通常空気（酸素濃度 21vol.%）供給、通気量 1 vvm および槽内圧 150 kPa を標準条件とした。

溶存酸素(DO)濃度を高める手段の一つとして、酸素富化空気を通気した（富化空気法、Oxygen-enrich method; OE method）。酸素発生装置(Air Sep Corp.製)で得られた酸素濃度 90vol.%のガスと通常空気を予め所定の割合で混合し、培養槽に通気量 1 vvm、槽内圧 150 kPa で供給した。

もう一つの手段として、培養槽ヘッドスペースを加圧する方法を試みた（加圧培養法、Pressurization method; PR method）。加圧培養法の場合は、通常空気（酸素濃度 21vol.%）を通気量 1vvm で供給し、排ガスラインのバルブ開度調整によって所定の内圧に保持した。

DO 濃度を低く維持する場合は、通常空気を槽内圧 150 kPa 条件下で供給し、通気量を操作することによって、目的の DO 濃度に制御した。

DO 濃度は DO 電極（Ingold 社製）を用いてモニターした。また、培養中に 24 時間間隔で DO 濃度を記録し、その相加平均値を平均 DO 濃度とした。

2・4　分析方法

2・4・1 乾燥菌体濃度

第 1 章(2・5・1)に記載の方法で乾燥菌体(*X*)濃度を測定した。

2・4・2 脂肪酸組成および生成量

第 1 章(2・5・2)に記載の方法で脂肪酸を測定した。そして、第 2 章（2・3・2）に記載している方法で脂質フリー菌体濃度(*X*-FA)を求め、菌体増殖の指標とした。

第3節　結果

3・1　加圧培養法または富化空気法による検討

Fig. 4-1 の凡例に記した条件で酸素供給を行って培養した。通気ガス酸素濃度 21vol.%（通常空気）、通気量 1 vvm、槽内圧 150 kPa の条件（以後、標準条件と記す）で培養した結果、培養 2 日目までは溶存酸素(DO)濃度がいったん低下し、その後は徐々に増加した。24 時間毎に記録した DO 濃度の平均値は 7.3 ppm であった。7 日間培養の結果、脂質フリー菌体濃度(*X*-FA)は 10 g/L、総脂肪酸(FA)生成量は 6.7 g/L、アラキドン酸(AA)生成量は 2.6 g/L に達した。また、AA 組成比(AA/FA, Table 4-1)は 40%まで上昇した。

次に低 DO 濃度における培養を試みた（Fig. 4-1、◇印）。培養 2 日目までは標準条件と同様に DO 濃度が 3 ppm まで低下した。その後、培養 7 日目までは通気量を自動操作しながら、DO 濃度を 3 ppm に維持した。培養の結果、FA、および *X*-FA 濃度は標準条件と同等の経時変化を示したが、AA 生成量および AA 組成比(Table 4-1)は低かった。

次に通気ガスの酸素濃度を上げて DO 濃度をより高く維持しながら培養を行った（富化空気法、Oxygen-enrich method; OE method）。通気ガス酸素濃度 29vol.%、37vol.%、および 73vol.%で培養した結果、Fig. 4-1(d)に示すように、平均 DO 濃度は、各々14.5 ppm、19.8 ppm および 41.1 ppm であった。酸素濃度 29vol.%の場合（Fig. 4-1、▼印）、培養 7 日目における AA 生成量は標準条件に比べて 1.5 倍に、FA 生成量は 1.4 倍に増加した。しかし、*X*-FA 濃度は標準条件と同等の収量であった。酸素濃度 37vol.%の場合（Fig. 4-1、○印）培養 2 日目までの FA、AA 生成速度は標準条件よりも優れていたが、培養 2 日目以降は低下した。酸素濃度 73vol.%の場合は（Fig. 4-1、◆印）培養 3 日目までは *X*-FA 濃度、FA 生成量、AA 生成量の経時変化は標準条件よりも下回ったが、その後、生成速度が増加し、培養 7 日目におけるこれらの収量は標準条件と同等であった。AA 組成比(Table 4-1)に関しては、酸素濃度 29-37vol.%の場合は標準条件と同等であったが、酸素濃度 73vol.%の場合に、標準条件よりも下回った。

培養槽内の加圧によってより高い DO 濃度を維持する試み（加圧培養法、pressurization method; PR method）を行った。槽内圧 340 kPa で培養した場合、平均 DO 濃度は 21 ppm であった（Fig. 4-1、△印）。培養 7 日目における AA 生成量、FA 生成量は共に標準条件に比べて 1.3 倍に増加した。しかし、*X*-FA 濃度、および AA 組成比(Table 4-1)は標準条件と同等の値であった。

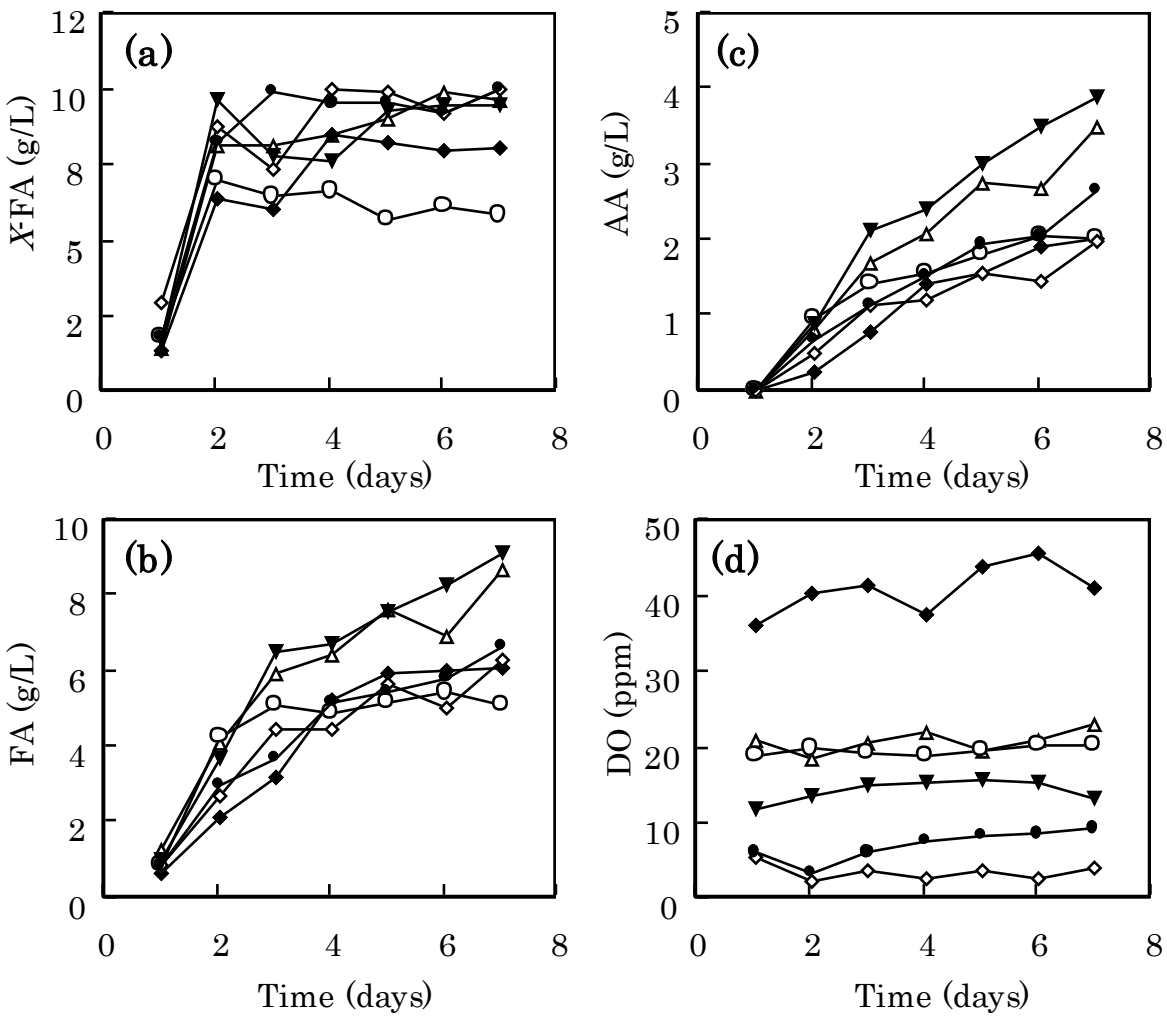

Fig. 4-1.

Time course of AA production by *M. alpina* 1S-4 cultivated in a 50-L jar fermentor: (a) *X*-FA, (b) FA, (c) AA, and (d) DO. Symbols: ● (conditions for (i): headspace pressure [kPa], oxygen concentration of inlet gas [%], aeration rate [vvm], 150, 21, 1); ◇ ((ii): 150, 21, 0.05-1); ▼ ((iii): 150, 29, 1); ○ ((iv): 150, 37, 1); ◆ ((v): 150, 73, 1); △ ((vi): 340, 21, 1).

Table 4-1.

Comparison of the fatty acid compositions obtained after cultivation for 7 days.

Culture condition [a]	(i)	(ii)	(iii)	(iv)	(v)	(vi)
Fatty acid composition [b] (%)						
16:0	12.0	16.1	10.6	10.8	10.3	12.1
18:0	7.0	7.3	7.3	6.6	5.6	7.0
18:1	10.4	13.2	9.3	10.6	12.1	9.8
18:2	13.1	17.1	12.0	13.2	19.5	12.4
18:3	3.8	3.0	3.5	3.2	2.7	3.6
20:3	6.0	3.3	5.5	6.9	5.5	6.3
20:4	40.0	31.5	42.0	39.3	33.3	40.3
24:0	4.6	4.5	5.3	5.1	5.8	4.9
others	3.1	4.0	4.5	4.3	5.2	3.6

[a] See Fig. 4-1 caption for culture conditions (i)-(vi).

[b]16:0, palmitic acid; 18:0, stearic acid; 18:1, oleic acid; 18:2, linoleic acid; 18:3, γ-linolenic acid; 20:3, dihomo-γ-linolenic acid; 20:4, arachidonic acid; 24:0, lignoceric acid.

3・2　DO 濃度と AA 生成量、$Y_{FA/Glc}$、$Y_{(X\text{-}FA)/Glc}$ の関係

上記 3・1 の実験（計 6 バッチ）の他に、一連の追加実験を、標準条件および富化空気法として酸素濃度 25vol.%、27vol.%、55vol.%、90vol.%で、加圧培養法として内圧 180 kPa、225 kPa、300 kPa、380 kPa で行った。これら一連の実験結果をまとめたのが Fig. 4-2 であり、Fig. 4-2(a)は平均 DO 濃度と培養 7 日目の AA 生成量、(b)は対グルコース消費量当たり FA 収率（g-FA/g-glucose）、$Y_{FA/Glc}$、(c)はグルコース消費量当たり *X*-FA 収率 (g-*X*-FA/g-glucose)、$Y_{(X\text{-}FA)/Glc}$、の関係を示す。

Fig. 4-2(a)が示すように、高い AA 生成量を得るのに適した平均 DO 濃度範囲は 10-15 ppm であることが確認された。さらに、この最適 DO 範囲内では加圧培養法と富化空気法の間に AA 生成量の差は認められなかった。しかし、20 ppm 付近では両培養法の間に顕著な AA 生成量の差が認められた。富化空気法の場合は、20-50 ppm でほぼ同等の

AA 生成量が得られたが、$Y_{(X\text{-}FA)/Glc}$ と $Y_{FA/Glc}$ は、Fig. 4-2(b)(c)が示すように、DO 濃度増加に伴って 20-30 ppm で極小値を示した後、40-50 ppm で標準条件と同等の値に回復した。この結果より、DO 濃度 20-30 ppm では、グルコースがエネルギー代謝により多く消費されたものと考えられた。

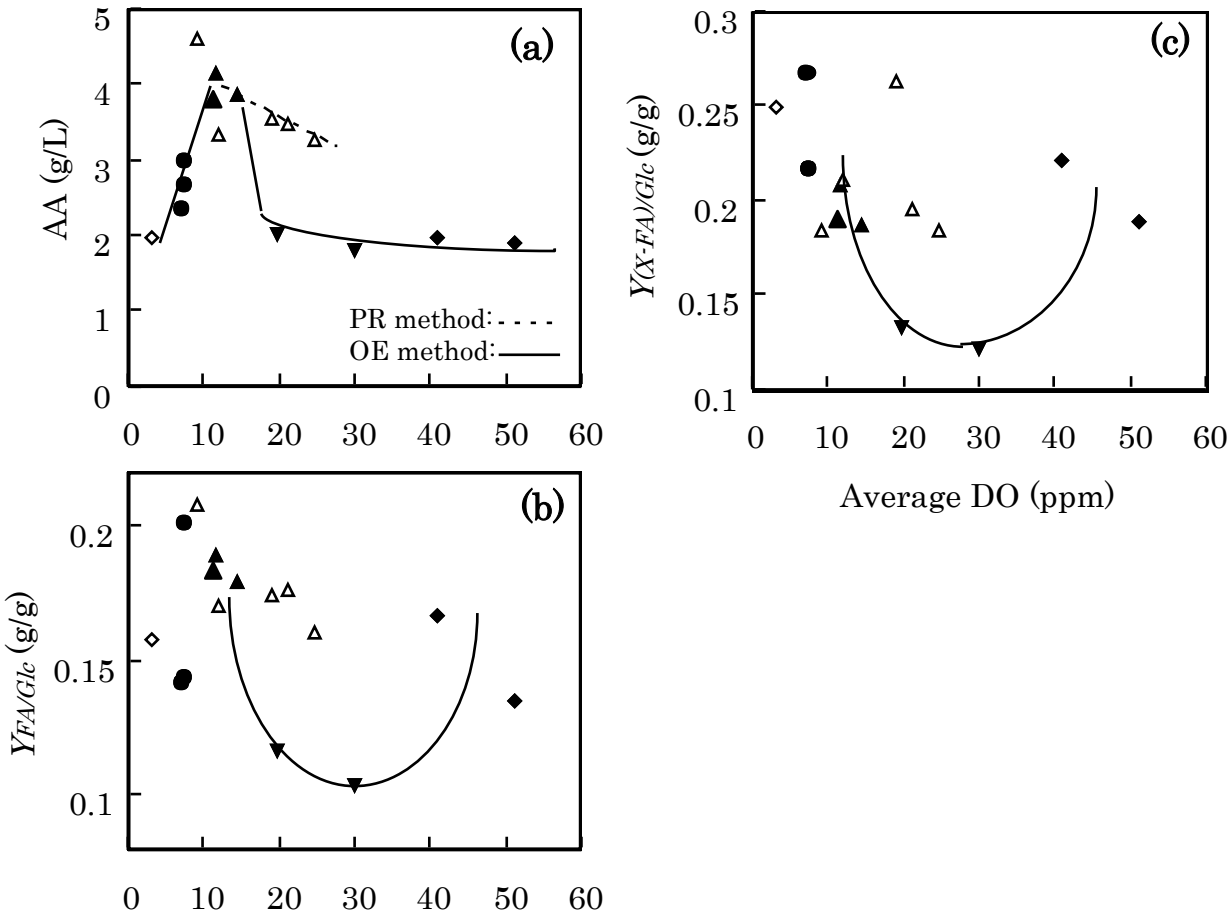

Fig. 4-2.

Effects of the average DO concentration on (a) AA yield, (b) $Y_{FA/Glc}$, and (c) $Y_{(X\text{-}FA)/Glc}$. Symbols: ● (conditions for A: headspace pressure [kPa], oxygen concentration of inlet gas [%], aeration rate [vvm], 150, 21, 1); ◇ (B: 150, 21, 0.05-1); △ (C: (180, 21, 1), (225, 21, 1), (300, 21, 1), (340, 21, 1), (380, 21, 1)); ▲ (D: (150, 25, 1), (150, 27, 1), (150, 29, 1)); ▼ (E: (150, 37, 1), (150, 55, 1)); ◆ (F: (150, 73, 1), (150, 90, 1)).

3・3　DO 濃度とその維持方法が菌形態に及ぼす影響

攪拌条件は菌形態に大きな影響を及ぼすが、本章では全て同一条件(200 rpm)で行った。従って、以下述べる菌形態の違いは DO 濃度および／又は通気酸素濃度の影響によるものと考えられる。

酸素濃度 21-29vol.%のガスが通気された場合は菌形態はフィラメントおよび小型で不定形の綿状ペレットの混合状態であった。富化空気法で酸素濃度 37-55vol.%（平均 DO 濃度 20-30 ppm）の場合は、DO 濃度上昇に伴って球形の綿状ペレットの割合が増加した。さらに、酸素濃度を 73-90vol.%（平均 DO 濃度 40-50 ppm）まで高めると、菌形態は大型で球形の滑状ペレットへと急激に変化した。

菌形態のサイズと AA 生産性の関係を調べるために、培養液を篩分けした後、分けた各画分の菌体量と菌体当たり AA 含量を調べた。その結果、Table 4-2 が示すように、形態サイズが小さいほど AA 含量が高いことが確認された。

Table 4-2.

Relationship between AA productivity and morphological size. [a]

Size [b] (mm)	AA content of *X* (%)	AA content of FA (%)	*X* of each fraction in whole broth (%)
<1.7	18.4	38.4	76.4
1.7-2.0	17.4	35.0	13.5
2.0-5.0	16.7	34.0	10.1

[a] Culture broth obtained on the 5th day of cultivation using the OE method in the presence of 55% oxygen was analyzed.

[b] Sieve aperture size used for separation.

3・4　　通気酸素濃度シフト実験

富化空気法で酸素濃度 73-90vol.%の場合は、球形の滑状ペレットが形成され、ペレット壁が物質移動の律速になっている可能性が示唆された。そこで、フィラメント形態の菌糸を高酸素濃度に晒した場合の菌形態と AA 生産性の変化について検討した。

対照実験としては富化空気法、通気酸素濃度 27vol.％条件で培養し（Fig. 4-3、○印）酸素シフト法としては培養 2 日目に酸素濃度を 27vol.%から 90vol.%へシフト（Fig. 4-3、◇印）、そして 4 日目に 27vol.%から 90vol.%へシフト（Fig. 4-3、▼印）する場合の、計 3 条件で培養した。

培養の結果、何れの条件でも、菌形態はフィラメントと不定形の綿状ペレットの混合状態を示し、酸素濃度シフトの後でも菌形態の変化は認められなかった。対照実験では、*X*-FA 濃度、FA および AA 生成量は培養中を通じて増加した。一方、酸素シフト法では酸素濃度シフトの後でも、*X*-FA 濃度は対照実験と同等あるいは若干下回っただけであったが、FA および AA 生成速度は大きく低下した。

培養 4 日目に酸素シフトした実験で、培養 7 日目に 0.5%の酵母エキスを添加して、さらに培養を 10 日目まで続けた結果、球形の滑状ペレットが形成されていることを確認した。即ち、上述の培養 4～7 日目の間に菌形態が変化しなかったのは窒素源が枯渇していたのが原因と考えられた。高酸素条件下で窒素源が存在していれば、滑状ペレットを形成することによって自らを酸素障害から守る機能が働き、一方、窒素源が存在しない場合はそれに代わる機能として脂肪酸代謝を変化させたと考えられた。

以上まとめると、酸素濃度が一定濃度以上のガスを通気することは、菌形態変化または代謝変化から推察されるように菌に対してストレスを与えることになり、生産性向上への貢献は見出せなかった。

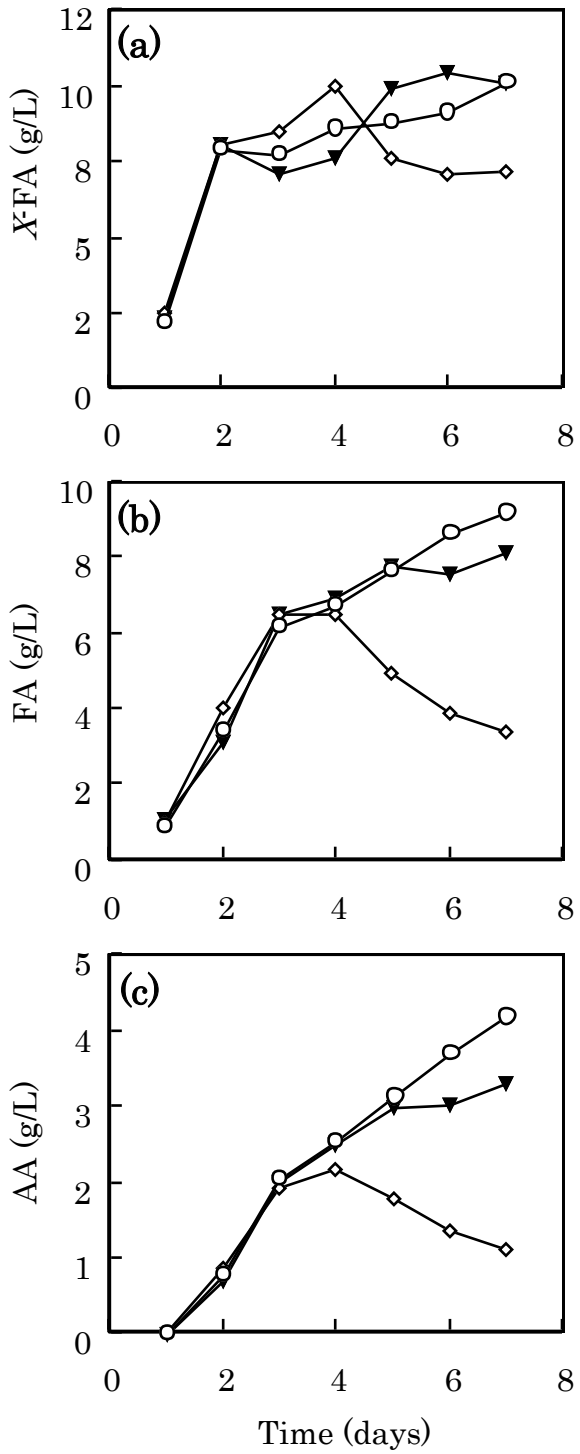

Fig. 4-3.

Time course of AA production by *M. alpina* 1S-4 cultivated in a 50-L jar fermentor at 150 kPa headspace pressure and 1 vvm aeration rate: (a) *X*-FA, (b) FA, and (c) AA. The oxygen concentration of the inlet gas was (○) 27% throughout the fermentation, (◇) shifted from 27% to 90% on the 2nd day, and (▼) shifted from 27% to 90% on the 4th day.

第 4 節　考察

AA 生産に適した DO 範囲は 10-15 ppm であることが確認され、この範囲内では加圧培養法と富化空気法の間に AA 生産性および菌形態の差は認められなかった。

富化空気法で DO 濃度 20-30 ppm に維持した場合、加圧培養法によって同等の DO 濃度に維持した場合に比べて AA 生成量が大きく減少した。酸素供給法が DO 濃度以外に影響を及ぼす要因の中で菌への悪影響が予測されるものとしては、富化空気法の場合は通気ガス酸素濃度に伴って上昇する気相中の酸素組成が、加圧培養法の場合は圧力に伴って上昇する溶存 CO_2 濃度が考えられる。従って、同等の DO 濃度であるにも拘わらず、富化空気法で AA 生成量が低下した原因は、気相中のガス組成と推測された。他の実験系であるが、寒天培地による固体培養で酸素富化空気下で増殖させたところ、増殖の遅れが観察されたが、この現象は先の推測を裏付けるものと考えられる。また、福島ら(1991)によれば、*Aspergillus oryzae* によるプロテアーゼ生産において、DO 濃度が空気飽和の 340%までは生産が阻害されなかったが、純酸素を通気した場合は 340%以下でも生産が阻害されたと報告されており、この結果は、酸素による阻害は DO 濃度よりもむしろ気相中のガス組成に影響されやすいことを示唆していると考えられる。$Y_{FA/Glc}$ および $Y_{(X\text{-}FA)/Glc}$ の低下は、佐藤(1990)も述べているように、高酸素濃度に馴化するためにエネルギー代謝量が増えたためと推測された。

富化空気法で DO 濃度 40-50 ppm に維持した場合は球形滑状ペレットが形成されたが、このペレット壁が物質移動の律速となり、AA 生成量を低下させたと考えられる。また直径約 2 mm 以上の滑状ペレットの中心には空洞が観察されたが、これは Metz ら(1977)の報告にもあるように、酸素・栄養分の枯渇が自己消化を引き起こした結果と考えられた。さらに、この DO 範囲では $Y_{FA/Glc}$ および $Y_{(X\text{-}FA)/Glc}$ は、20-30 ppm の場合に比べて高く、標準条件と同等であった。この現象の理由としては、高酸素に晒されるペレット表面積は滑状ペレット形成によって減少し、酸素に晒されなかったペレット内菌糸の割合が増加したためと考えられた。

上記結果に加えて、球形ペレットが形成された場合の菌糸を顕微鏡観察した結果、フィラメント状で増殖した場合に比べて、菌糸の分枝度が高いことが確認された。ペレット壁を形成するためにより高い分枝度で増殖し、結果、形成されたペレット壁がペレット内の菌糸を酸素による障害から守る役割を果たしたものと考えられた。ペレット形成においては、菌増殖はペレット表面の部分に制限されたため全体として増殖速度を低下

させたものと考えられた。Byrne ら(1989)、ならびに Whitaker および Long(1973)によっても、ペレット形成の場合に増殖速度が低いことが報告されている。

糸状菌培養における菌形態と生産性の相関に関しては、Braun および Vecht-Lifshitz(1991)のレビューに記されているように菌株や培養条件によって様々である。本研究では、それだけでなく、篩い分け法を併用することによって、同一培養系内における菌形態の違いによる生産性の分布について確認した。さらに、本実験結果より、物質移動律速が AA 生産に影響していることが示唆された。

酸素濃度シフト実験において、高酸素濃度にフィラメント状菌糸が晒されると菌糸内に蓄積された脂肪酸が酸素シフトの 1～2 日後から減少し始めることが確認された。この原因については、①脂肪酸の酸化劣化による減少、②代謝（脂肪酸のβ酸化）による減少の 2 つが考えられた。しかし、原因①であるとすれば、より不飽和度の高い脂肪酸から減少すると考えられるが、脂肪酸組成の変化は、飽和脂肪酸が減少し不飽和脂肪酸が増加する結果であったことから、原因②の方が理にかなったものと考えられた。脂肪酸のβ酸化が起きた理由としては、フィラメント状の菌糸は高酸素に晒されると通常の代謝を維持できず、高酸素濃度に馴化するために多くのエネルギーを要求したためと考えられた。そして、大きな発エルゴン反応である脂肪酸のβ酸化で ATP 生産を補ったものと推測される。通常の条件下では、*Mortierella* は ATP 生成のために脂肪酸よりもグルコースを消費するが、その原因の一つの可能性として、グルコース酸化の方が脂肪酸酸化に比べて酸素要求量が少ないこと(Grynberg and Demaison, 1996)が挙げられる。しかし、高酸素に菌糸を晒した場合には酸素取り込みは律速にはならないこと、脂肪酸酸化の方がより多くのエネルギーを獲得できることから、代謝経路が大きく変化したものと推測される。

加圧培養法の場合においては、DO 濃度が最適範囲を超えると AA 生産性が緩やかに低下した。本研究の実験範囲（380 kPa 以下）では、圧力そのものの影響は、微生物の耐圧性に関する従来の報告(Thom and Marquis, 1984; ZoBell and Hittle, 1967)と比較した結果、影響の無い範囲であると考えられた。AA 生産性低下の原因は溶存炭酸ガス濃度によるものと推測される。加圧培養法、条件 200 kPa の場合、排ガス中の炭酸ガス濃度が最高 2%まで上昇することを別の実験において確認したが、この程度の炭酸ガス濃度が増殖を抑えるとの報告(McIntyre and McNeil, 1997)がなされていることからも、その影響は無視できないと考えられる。

脂肪酸の不飽和化のための酸素要求性は、菌体増殖や脂肪酸生合成のための要求性よりも高いと考えられる。裏付ける結果としては、最適 DO 濃度範囲（10-15 ppm）において AA 生産性は増大したものの、*X*-FA 濃度は標準条件と同等であったこと、加えて、3 ppm の低 DO においては FA 生成量と *X*-FA 濃度は標準条件と同等であったが AA 生成量のみが低下したことが挙げられる。Thomas ら(1998)や Davies ら(1990)によっても、脂肪酸の不飽和度と酸素消費の間に正の相関があることが報告されていることは、我々の推測を裏付けるものであると考えられる。

第 5 章　工業規模培養槽を用いたアラキドン酸生産

第 1 節　緒言

酵素や有機酸をはじめとする様々な物質生産が糸状菌による発酵法で盛んに行われているが、その大部分は通気攪拌槽を用いた好気液体培養であり、アラキドン酸(AA)生産に関しても既往の報告の多くは液体培養で行われている。一部では固体培養による AA 生産の試みも実施されているが、液体培養法に比て菌体回収の難しいこと、増殖速度が低いこと、大量生産のためには広大な面積が必要なことを総合的に考慮すると、液体培養法が有利であると考えられる。通気攪拌槽を用いて工業規模での培養を実現するには、第 1 章、第 4 章で行ったような培養条件の検討も重要であるが、それに加えてスケールアップの達成が不可欠である。特に、AA 生産の場合、第 4 章で明らかになったように高い溶存酸素濃度が必要であること、菌体内産物であるため高収量を得るには菌体の高濃度化が必要であること、さらに第 1 章及び第 2 章で述べたように菌形態変化が培養液物性に大きく影響することから、スケールアップが極めて重要な課題である。

好気培養のスケールアップにおいては、様々な基準が提唱されており、例えば、単位液量当たり攪拌所要動力を基準にする方法(Maxon, 1959)、攪拌翼先端速度を基準にする方法(Midler and Finn, 1966)、レイノルズ数を基準にする方法(Rushton, 1951)、混合時間を基準にする方法(Norwood and Metzmer, 1960)、酸素移動を基準にする方法(Hsieh et al., 1969; Taguchi and Humphrey, 1966)、酸化還元電位を基準にする方法(Berovic, 1999)、攪拌慣性力を基準にする方法（添田ら, 1998）、流動分布近似法による方法(Tsujimura et al., 1994)、および溶存酸素濃度をモニタリングしながら攪拌回転数を制御する方法(Okabe et al., 1992; Jain et al., 1988)などを始めとして、多くの研究者が取り組んできている課題である。しかし、万能のスケールアップ則はないのが現状であり(Humphrey, 1998)、特に糸状菌の場合は剪断力の影響が起こること、ならびに培養液が非ニュートン流体になりうることから難しい課題である。このような状況の中で、前章で示したように AA 生産に溶存酸素濃度が重要であることから、我々はまず酸素移動を基準とする方法に着目した。さらに、攪拌翼先端速度は液の代表流速であり剪断力と相関があること、剪断力が菌形態に影響すること、さらに工業用醗酵槽において同基準則が多用されているとの調査報告（Einsele, 1978）から、翼先端速度基準則に着目した。

さらに、大規模培養槽による醗酵生産においては、経済性の検討は必須であり、中で

も培地原料費が製造原価に占める割合は大きいことから、対培地あたりの生産物収率を評価することは重要であると考えられる。

本章では、AA の経済生産を達成すべく、工業規模培養槽においてジャー培養と同等の高い AA 生成量を得ることを目的に検討を行い、さらに工業規模培養における収率についての考察を行った。

第 2 節　実験材料および方法

2・1　使用菌株および保存方法

糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株を使用した。詳細は第 1 章(2・1)に記す。

2・2　通気攪拌培養実験（50 L 容培養槽）

25 L の液体培地を 50 L 容培養槽に調製し、第 1 章（2・3）に記載の方法で調製したフラスコ培養液 125 mL を接種の後、通気量 25 L/m、培養温度 26℃、槽内圧 200 kPa で培養を開始した。攪拌回転数は実験結果に併記する。またグルコース流加を行ない、グルコースの枯渇を防ぎながら、7 日間培養を行った。

本培養の初発培地組成

グルコース	1.8%
大豆油	0.1%
その他	窒素源および無機塩類は実験結果にその都度記述
pH	6.0

2・3　通気攪拌培養実験（10 kL 容培養槽）

6,000 L の液体培地を 10 kL 容培養槽に調製し、第 2 章(2・2)に記載の方法で調製した前培養液 30L を接種の後、通気量 360 m^3/h、培養温度 26℃、槽内圧 200 kPa で培養を開始した。攪拌回転数は実験結果に併記する。また、グルコース流加を行ない、グルコースの枯渇を防ぎながら、7 日間または 10 日間培養を行った。

本培養の初発培地組成

グルコース	1.8%
大豆油	0.1%
その他	窒素源および無機塩類は実験結果にその都度記述
pH	6.0

2・4　分析方法

2・4・1 乾燥菌体濃度

第 1 章(2・5・1)に記載の方法で乾燥菌体(*X*)濃度を測定した。

2・4・2 脂肪酸組成および生成量

第 1 章(2・5・2)に記載の方法で脂肪酸を測定した。そして、第 2 章（2・3・2）に記載している方法で脂質フリー菌体濃度(*X*-FA)を求め、菌体増殖の指標とした。

第 3 節　結果および考察

3・1　　10 kL 培養槽へのスケールアップ

50 L 培養槽を用いて、大豆タンパク濃度 2.3%の条件で 7 日間の培養を行った。この培養における攪拌回転数は、培養初期は蛋白成分による激しい発泡を抑えるため 100 rpm の低回転数で開始し、培養後期は菌体濃度増加による酸素消費速度増加に見合った酸素供給を行うため 300 rpm まで攪拌回転数を増加させた。その結果、Fig. 5-1 が示すように、培養 7 日目でアラキドン酸(AA)生成量 7.4 g/L および脂質フリー菌体(*X*-FA)濃度 16.7 g/L が得られた。*X*-FA の経時変化において、培養 2 日目~7 日目に若干の濃度低下傾向が認められたが、これはグルコース流加培養法を行ったことによる流加希釈率の影響であり、実質の菌対量（*X*-FA 濃度×液量）は培養 2 日目以降は殆ど変化が無かった。このことから、培養 2 日目までは菌体増殖期、以降は脂肪酸蓄積期であったと考えられた。

次に 50 L 培養の攪拌条件および槽幾何形状(Table 5-1)を基に、10 kL 培養の攪拌条件を検討した。本章緒言で述べた背景により、攪拌翼先端速度基準則および酸素移動容量係数基準則を適用した場合の攪拌回転数を求めた。まず攪拌翼先端速度基準側の場合、Table 4-1 に示すように両培養槽の攪拌翼径比が約 4 であることから、50 L 培養槽の 100～300 rpm に相当する 10 kL 培養槽攪拌回転数は 25～75 rpm と求められた。次に、酸素移動容量係数基準則では次に示す Cooper ら(1944)の関係式（(5-1)～(5-3)式）を用いて推算した。

$$k_{La} = C\left(P_g / V\right)^{0.95} v_s^{\ 0.67} \qquad (5\text{-}1)$$

(k_{La}, volumetric oxygen transfer coefficient; C, constant; P_g power absorption under aeration; V, liquid volume; v_s, superficial air velocity)

$$P/V = \frac{\rho N_P n^3 d^5}{V} \qquad (5\text{-}2)$$

(P, power absorption under ungassed condition; ρ, density of liquid; N_P, power number; n, agitation rate; d, diameter of impeller; V, liquid volume

$$v_S = \frac{F}{\pi (D/2)^2} \qquad (5\text{-}3)$$

(v_s, superficial air velocity; F, flow rate of air; D, diameter of tank)

推算の手順としては、まず(5-2)式によって無通気攪拌動力を求め、得られた値に通気動力／無通気動力比(=P_g/P)を乗じて通気条件下における単位液量当り攪拌所要動力を求めた。また、通気量は 50 L 培養槽、10 kL 培養槽共に 1 vvm として空塔速度 v_s を求めた。50 L 培養槽および 10 kL 培養槽は凡そ幾何学的相似と考えられることから、(5-1)式の定数 C は両培養槽で同一と仮定した。計算の結果、50 L 培養槽における 100～300 rpm に相当する 10 kL 培養槽の攪拌回転数は 34～103 rpm と求められた。

Table 5-1.　Comparison of geometrical dimension of fermentors.

		Jar fermentor*	Industrial fermentor*
Nominal volume (m^3)		0.05	10.0
D	(m)	0.33	1.8
d	(m)	0.14	0.6
V	(m^3)	0.025	6.0

D, diameter of tank; d, diameter of impeller; V, working volume.

* Two Rushton type turbines with six blades are equipped.

培養の結果、Fig. 5-1 に示すように、酸素移動基準則でスケールアップした場合に 50 L 培養と同等の AA 生産性および菌体増殖が認められた。一方、先端速度基準則でスケールアップした場合は、AA 生産及び菌体増殖共に 50 L 培養の値を大きく下回った。

より高い AA 生成量を得るために、培地窒素源（大豆タンパク）濃度を 4%まで増量して、上記と同様に酸素移動容量係数基準則を用いて 10 kL 槽へのスケールアップを行った。その結果、Fig. 5-2 に示すように 10 日間の培養で AA 生成量 13.5 g /L、総脂肪酸生成量 27.0 g/L、X-FA 濃度 34.4 g/L が得られ、総脂肪酸中の AA 組成は 50%に達した。

また、第 2 章と同様の篩い分け法で菌形態を評価した結果、培養 7 日目時点のペレット画分（P-fraction; >0.5 mm）割合が 91.7%と高く、尚且つ培養液見かけ粘度は 200 cp と比較的低い値であったため、良好な通気攪拌が行われた。

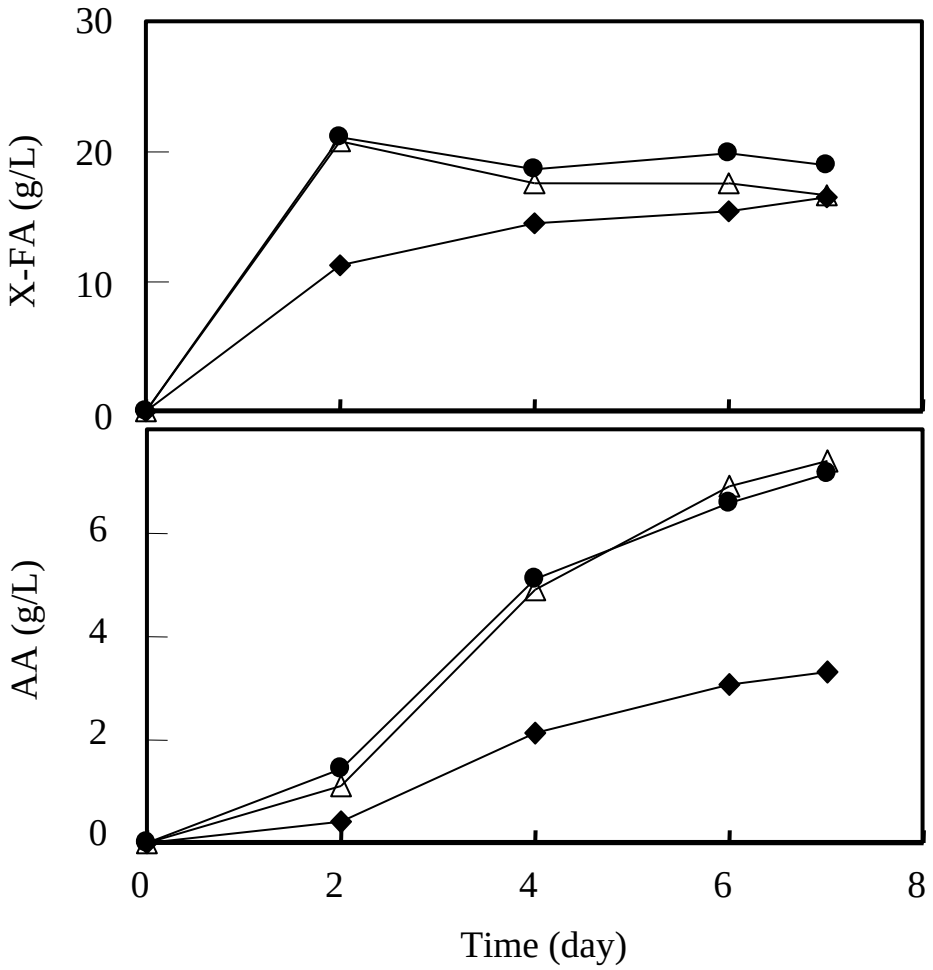

Fig. 5-1

Time course of AA production by *M. alpina* 1S-4 cultivated in a 50-L and a 10-kL fermentor for 7 days at temperature of 26℃ and headspace pressure of 200kPa. Medium composed of 2.3% soy flour, 1.8% glucose, 0.1% soybean oil, 0.3% KH_2PO_4, 0.1% Na_2SO_4, 0.05% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, and 0.05% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ was used. Symbols: △ (fermentor size, agitation rate; 50L, 100-300rpm); ◆ (10kL, 25-75rpm); ● (10kL, 34-103rpm).

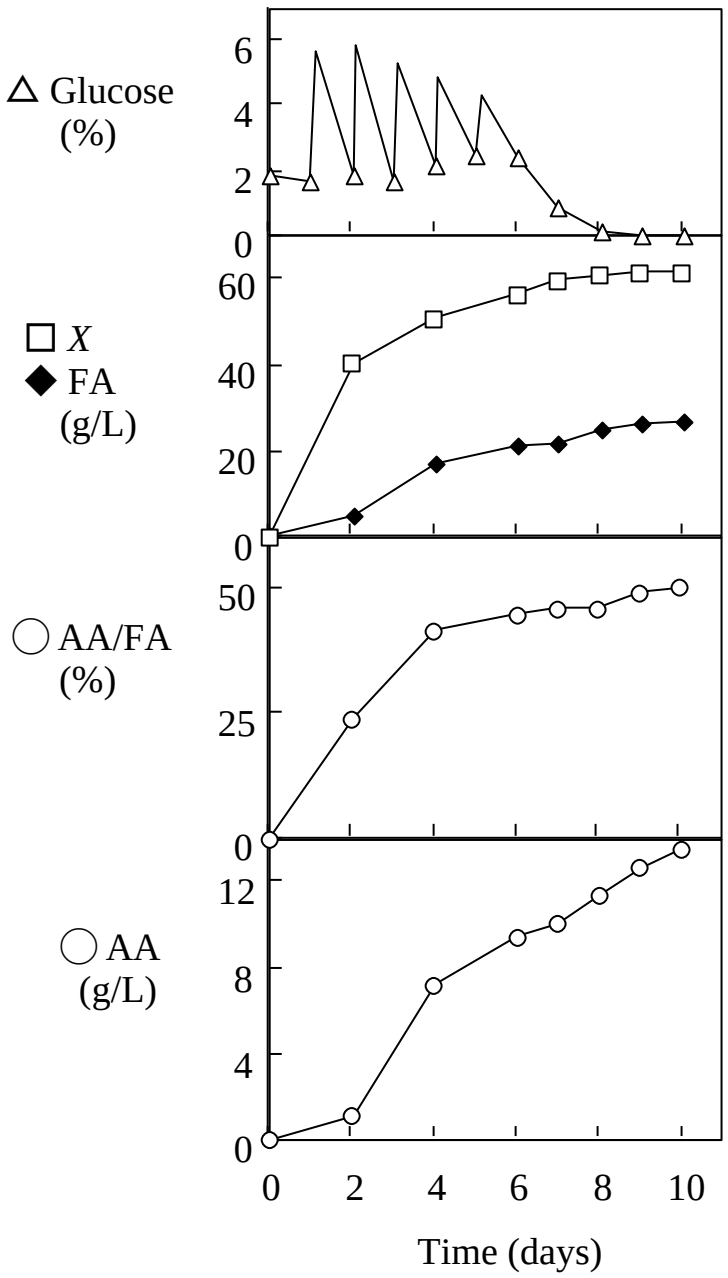

Fig. 5-2

Time course of AA production by *M. alpina* 1S-4 cultivated in a 10-kL fermentor for 10 days at temperature of 26℃ and headspace pressure of 200kPa. Medium composed of 4% soy flour, 1.8% glucose, 0.1% soybean oil, 0.3% KH_2PO_4, 0.1% Na_2SO_4, 0.05% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, and 0.05% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ was used.

3・2　　10 kL 培養における対基質当たり収率

上記 3・1 の 2 バッチを含めて、様々な培地炭素源濃度および窒素源濃度で 10 kL 培養を行った。一連の結果のまとめを対基質当たり収率として Fig.5-3 および Fig.5-4 に示す。Fig.5-3 および Fig.5-4 の横軸（nitrogen source, carbon source）の値は流加による希釈率を下式で換算した値であり、縦軸は採取した培養液の実測値である。

$$Nitrogen_Source[\%] = \frac{\text{初発窒素源（大豆タンパク）}[g] - \text{残存窒素源}[g]}{\text{培養液採取時の培養液量}[L]} \times 0.1$$

$$Carbon_Source[\%] = \frac{\text{総炭素源（初発及び流加グルコース）}[g] - \text{残存炭素源}[g]}{\text{培養液採取時の液量}[L]} \times 0.1$$

Fig.5-3 および Fig.5-4 の白抜きシンボルは、酸素移動容量係数基準則でスケールアップを行い、DO 濃度が良好に維持できた場合を示し、一方、黒塗りのシンボルは、翼先端速度基準則でスケールアップを行い、DO 濃度が高く維持できなかった場合を示す。尚、DO 濃度が良好に維持できた場合とは脂肪酸蓄積期における平均 DO 濃度が 10 ppm 以上、維持できなかった場合とは同濃度が 10 ppm 未満であった場合である。

Fig.5-3(a)および Fig.5-4(a)が示すように、*X*-FA 濃度と窒素源濃度の間、および *X*-FA 濃度と消費炭素源濃度の間に比例関係が認められたことから、培養中にある程度 DO が不足しても、窒素源および炭素源の消費による菌体増殖は同等の収率で行われたと考えられた。また、窒素源が、ほぼ全て消費されていたことは、代表サンプルについて、菌体外の培地中の残存窒素量を実測し、培養中期以降は殆んど検出されなかったことによって確認した。

Fig.5-3(b)(c)および Fig.5-4(b)(c)が示すように、AA および FA 生産に関しては、必ずしも対基質当たり収率は一定ではなく、DO が良好に維持できなかった場合は、収率低下が起こった。特に、AA 収率低下が FA 収率低下に比べて著しい結果であったことから、AA 生産のほうが FA 生産に比べて DO 濃度に大きく依存することが判り、このことは第 4 章の考察とも一致する。また収率の培養日数依存性に関してであるが、窒素源濃度が約 2.5%以上または消費炭素源濃度約 10%以上では培養日数に依存する傾向が認められ、特に AA 収率の方がその傾向が著しかった。この原因は、グルコースから FA の生合成に比べて、鎖長延長と不飽和化による AA の生合成の方が時間を要した結果と思われる。また、炭素源消費量が変わらずに（即ち、炭素源が枯渇後も）培養日数と共に

AA 濃度が増加する現象が Fig.5-2 及び Fig.5-4(b)で認められたが、これは、グルコース消費が行われなくても、既に生合成されたパルミチン酸等の脂肪酸前駆体から AA が鎖長延長と不飽和化によって生合成されたためと考えられた。

3・3　まとめ

このように、AA 生成量および FA 生成量を高濃度培養によって上げ、尚且つ同等の収率を保つことが DO 濃度の維持によって達成された。これは、製造原価に占める培地原材料費の額が、培養の高濃度化に伴って変化しない、即ち、生産物濃度の増加に反比例して固定費の占める額を削減できることを示しており、AA 含有油脂の経済生産に大きく貢献する知見が得られたものと考える。但し、同等の収率とはいえ、高濃度化に伴って培養日数が 7 日間から 10 日間へと長期化した。従って、短期間で同等の収率を得るべく、AA 生成速度および FA 生成速度を上げるための条件検討、さらに、同等の収率を維持しつつ、より高濃度培養を達成するための検討が今後の課題であると考えられた。

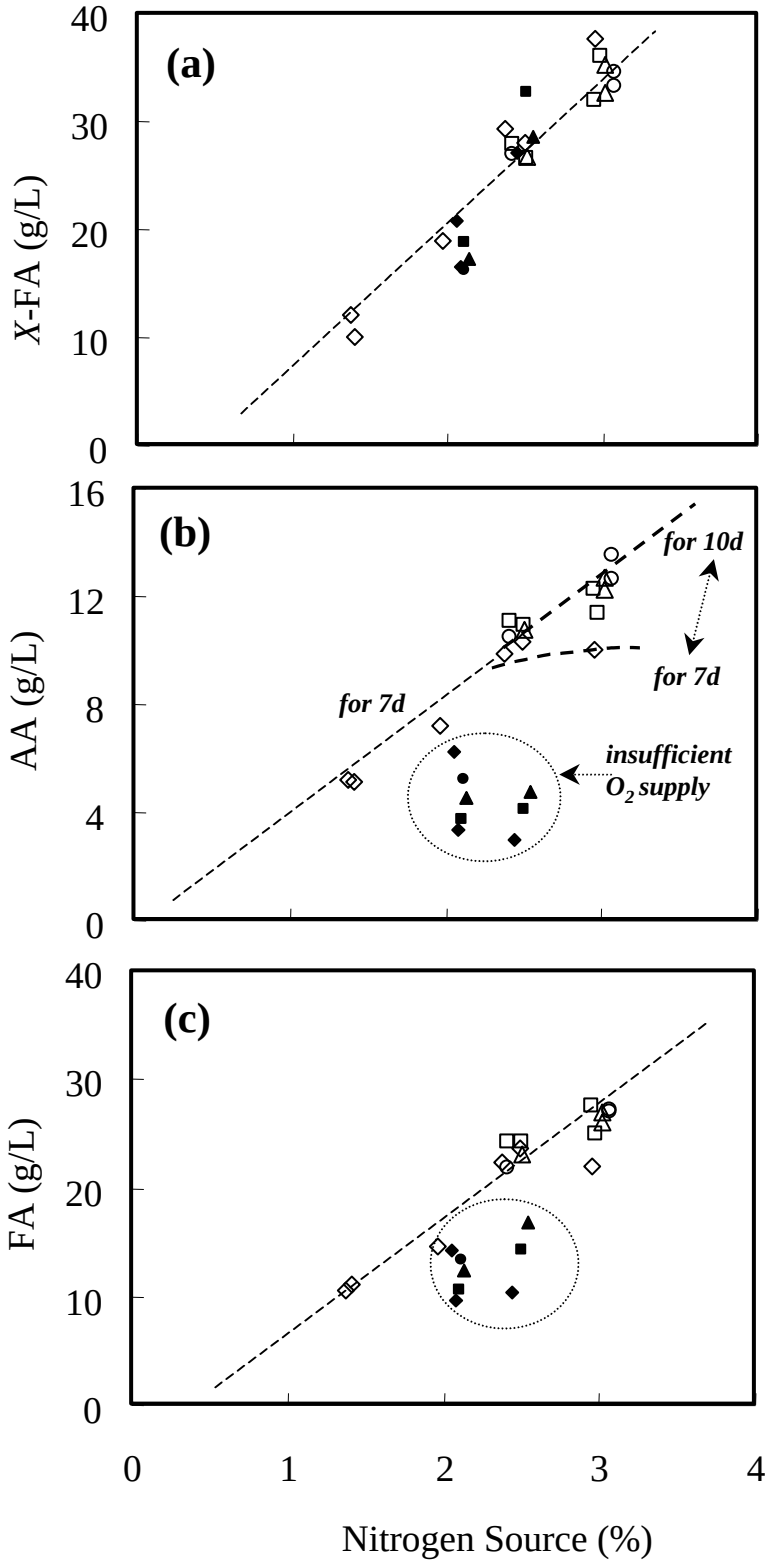

Fig. 5-3. Relationships between nitrogen source (soy flour) concentration and (a) X-FA concentration, (b) AA concentration, and (c) FA concentration. Symbols: ◇ and ◆, concentration on the 7th day of the cultivation; □ and ■, on the 8th day; △ and ▲, on the 9th day; and, ○ and ●, on the 10th day. Open symbols, scale-up based on the oxygen transfer coefficient; and closed symbols, based on the impeller tip speed

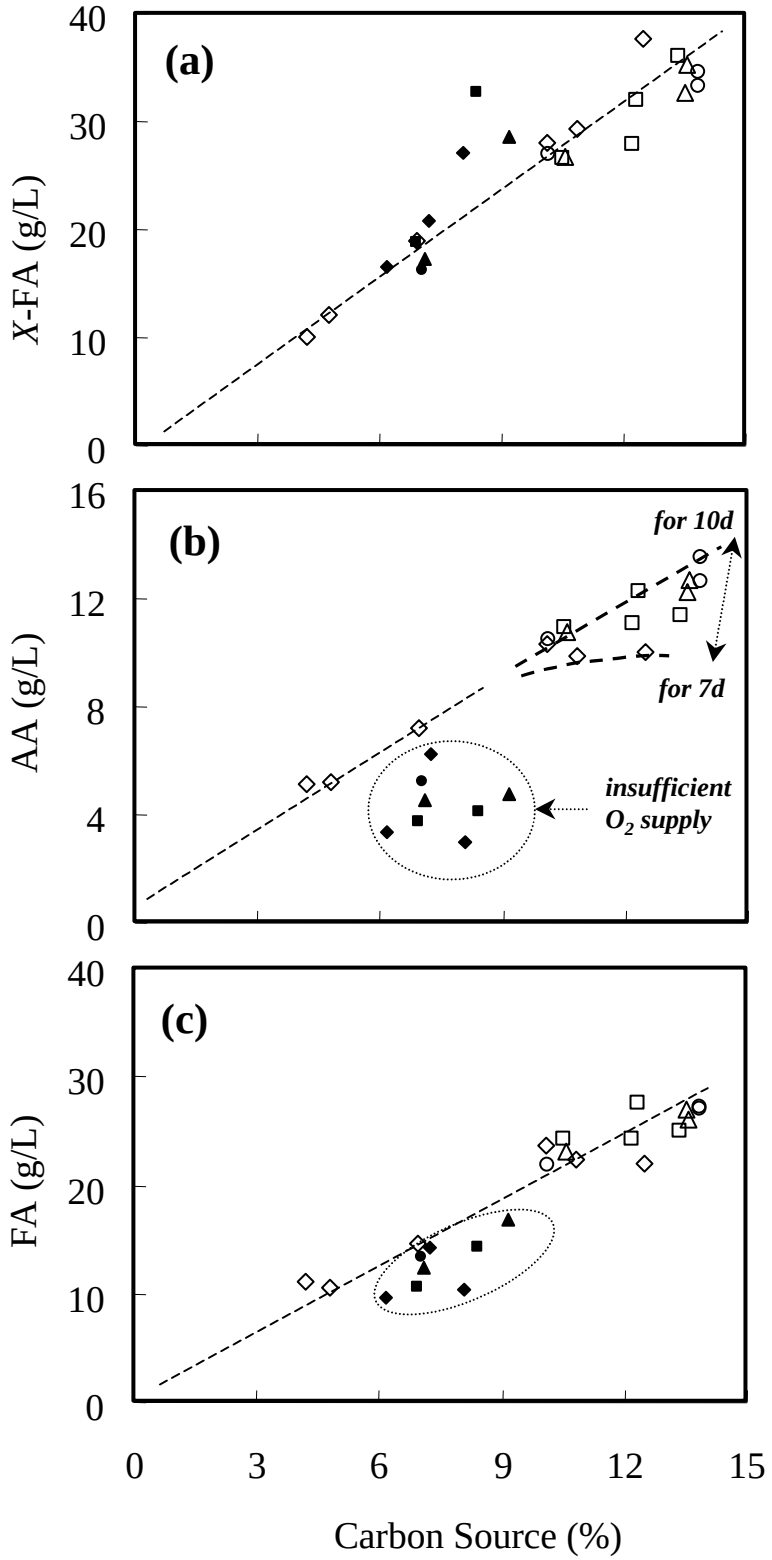

Fig. 5-4. Relationships between consumed carbon source (glucose) concentration and (a) X-FA concentration, (b) AA concentration, and (c) FA concentration. Symbols: ◇ and ◆, concentration on the 7th day of the cultivation; □ and ■, on the 8th day; △ and ▲, on the 9th day; and, ○ and ●, on the 10th day. Open symbols, scale-up based on the oxygen transfer coefficient; and closed symbols, based on the impeller tip speed.

総括

アラキドン酸（AA）をはじめとする高度不飽和脂肪酸（PUFA）の生理機能が注目されてきているが、PUFA は天然由来の供給油脂資源が乏しかったことから、その機能解明は充分とは言えない。そこで、PUFA の新たな供給源として、微生物による醗酵生産の試みがなされつつあり、中でも、糸状菌 *Mortierella* は優れた PUFA 蓄積能を有する微生物として様々な研究者によって培養法の検討が実施されている。しかし、菌体内産物であること、および菌形態変化に代表される糸状菌特有の難しさが、高濃度培養による経済生産を困難にしている。そこで本研究では、AA の経済生産の達成を目的として、培養工学的側面からの検討を行った。

第 1 章では、AA 生産に適した培地成分、特に無機塩類添加条件の検討を行った。そして、KH_2PO_4、Na_2SO_4、$CaCl_2$ および $MgCl_2$ の添加によって AA 生成量が増大すること、およびこれら塩類が菌形態に及ぼす影響を明らかにした。KH_2PO_4 添加がフィラメント化に、Na_2SO_4、$CaCl_2$ および $MgCl_2$ の添加がペレット化に、そして 4 種類全ての添加が、より小型のペレット形成に効くことが判り、同一培養液内において小型ペレットの菌体当たり AA 含量が最も高く、フィラメントの菌体当たり AA 含量は低いことを見出した。

第 2 章では、画像解析技術と篩い分け法を用いて、脂肪酸蓄積期中の菌形態変化について解析した。その結果、培養 2 日目には綿状ペレットが形成され、その後、綿状ペレットの表面菌糸が培養時間と共に切断されて、滑状ペレットへと変化することが判った。同一培養液中において、ペレットの方がフィラメントよりも菌体当たり AA 含量が高かった理由として、フィラメント菌糸がペレット表面より切断された履歴を持つことを考えている。さらに、培養液粘度の評価結果より、ペレット／フィラメント割合とペレットの形態的特徴（滑状 or 綿状）の両方が粘度に影響することが明らかとなり、たとえペレット割合が多くても綿状の形態的特徴を有する場合は滑状の場合に比べて非常に高い粘度を示すことが確認された。

第 3 章では、脂肪酸生産のモニターを目指して、誘電計測による脂肪酸含量の推定を試みた。培養液の誘電率を 100 kHz~30 MHz の範囲でオフラインで経時的に計測し、その計測データから求められた特性周波数および培地導電率を基に、細胞質導電率の推定を行った。その結果、細胞質導電率と、従来法で分析した脂肪酸含量の間には良好な相関が認められ、さらにその相関は菌形態に依存しないことがわかった。この技術によって脂肪酸含量の簡便な推定が可能になった。

第 4 章では溶存酸素(DO)濃度の影響について解析した。酸素富化空気法および加圧培養法を用いて様々な酸素分圧条件を作り、DO 濃度 3-50 ppm の範囲で実験した。結果、DO 濃度 10-15 ppm が AA 生産に最も適していること、およびその範囲以下では DO による菌形態への影響は殆ど無いことを確認した。加圧培養法では 15-20 ppm で極端な AA 生産低下や菌形態変化は起こらなかったが、富化空気法では、大きな AA 生産低下と菌形態の変化（ペレット化）が認められた。これは、高濃度酸素ガスによる障害から自らを守るために菌形態をペレットへと変化させたと考えられ、さらにフィラメント状の菌糸に高濃度酸素を通気した場合、菌体内脂肪酸含量が低下する現象が見られたが、この現象は高酸素に馴化するため脂肪酸を β 酸化した結果と推測された。

第 5 章では、工業規模培養槽へのスケールアップならびに、収率の考察を行った。50 L 培養槽から 10 kL 培養槽へのスケールアップ法を検討した結果、酸素移動容量係数基準則を用いた場合に、高い DO 濃度が維持できスケールアップが達成された。そして、大豆タンパク濃度 4%仕込みの条件において、10 日間培養で AA 生成量 13.5 g/L の高生産が達成された。また、対培地基質当たりの収率について考察した結果、たとえ DO が高く維持できなくても増殖収率にはあまり影響しないこと、一方、AA および FA 収率には DO 濃度が影響することが明らかとなった。DO 濃度を高く維持すれば、培養の高濃度化に伴って同等の収率は得られるものの、そのためにはより長期の培養日数が必要であったことから、AA 生産速度を高めるような条件検討の必要性が示唆された。

以上のように、本論文では AA 生産性向上、FA 生産モニターの可能性だけでなく、糸状菌特有の菌形態に関しても併せて検討した。AA 生産に適した培地条件、攪拌条件、DO 濃度が明らかになっただけではなく、それら条件に依存する菌形態の変化についても解析し、工業規模培養槽での高生産を実現できた。しかし、形態変化の詳細なメカニズムや、それらを考慮したスケールアップ則に関しては、完全に解明できたとは言い難く、本論文で取り上げることの出来なかった菌の生理学的条件や、培養液の物理化学的要素が複雑に絡み合っているため、今後、これら関連分野の知見が統合される必要があると思われる。糸状菌による有用物質生産の可能性は無限である一方で、菌形態の多様性、そしてスケールアップの問題が多くの研究者を悩ませている。本論文が、これら問題の解決、さらには普遍的法則解明の一助になれば幸甚である。

引用文献

1. Asami K., Hanai T., and Koizumi N. (1980a) Dielectric approach to suspensions of ellipsoidal particles covered with a shell in particular reference to biological cells. *Jpn. J. Appl. Phys.* 19:359-365.
2. Asami K., Hanai T., and Koizumi N. (1980b) Dielectric analysis of *Escherichia coli* suspensions in the light of the theory of interfacial polarization. *Biophys. J.* 31:215-228.
3. Asami K., and Yonezawa T. (1995a) Dielectric analysis of yeast cell growth. *Biochim. Biophys. Acta* 1245:99-105.
4. Asami K, and Yonezawa T. (1995b) Dielectric behavior of non-spherical cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 1245:317-324.
5. Asami K., Yonezawa T., Wakamatsu H., and Koyanagi N. (1996) Dielectric spectroscopy of biological cells. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 40:141-145.
6. Bajpai P. K., Bajpai P., and Ward O. (1991) Production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* ATCC 32222. *J. Industrial Microbiol.* 8:179-186.
7. Beach D. H., and Holz G. G. Jr. (1973) Environmental influences on the docosahexaenoate content of the triacylglycerols and phosphatidylcholine of a heterophic, marine dinoflagellate *Crypthecodinium cohnii. Biochim. Biophys. Acta* 316:56-65.
8. Berovic M. (1999) Scale-up of citric acid fermentation by redox potential control. *Biotechnol. Bioeng.* 64:552-557.
9. Braun S., and Vecht-Lifshitz S. E. (1991) Mycelial morphology and metabolite production. *Trends Biotechnol.* 9:63-68.
10. Burns R. A., Wibert G. J., Diersen-Schade D. A., and Kelly C. M. (1999) Evaluation of single-cell sources of docosahexaenoic acid and arachidonic acid: 3-month rat oral safety study with an in utero phase. *Food Chem. Toxicol.* 37:23-36.
11. Byrne G. S., and Ward O. P. (1989) Effect of nutrition on pellet formation by *Rhizopus arrhizus. Biotechnol. Bioeng.* 33:912-914.
12. Calam C. T. (1976) Starting investigational and production cultures. *Process Biochem.* 11(3):7.
13. Canuto R. A., Muzio G., Biocca M. E., and Dianzani M. U. (1991) Lipid peroxidation in

rat AH-130 hepatoma cells enriched *in vivo* with arachidonic acid. *Cancer Res.* 51:4603-4608.

14. Carlsen M., Spohr A. B., Nielsen J., and Villadsen J. (1996) Morphology and physiology of an α-amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnol. Bioeng.* 49:266-276.
15. Carlson S. E., Werkman S. H., Peeples J. M., Cooke R. J., and Tolley E. A. (1993a) Arachidonic acid status correlates with first year growth in preterm infants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1073-1077.
16. Carlson S. E., Werkman S. H., Peeples J. M., Cooke R. J., Koo W. W. K., and Tolley E. A. (1993b) The effect of marine oil-supplemented formulas with and without eicosapentaenoic acid on the n-3 and n-6 fatty acid status and growth of premature infants. In: T. Yasugi, H. Nakamura, and M. Soma (eds.), *Advances in polyunsaturated fatty acid research* , Elsevier Science Publishers B. V., The Netherlands, p 261-264.
17. Certik M., and Shimizu S. (1999) Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J. Biosci. Bioeng.* 87:1-14.
18. Chen H. C., Chang C. C., and Chen C. X. (1997) Optimization of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* Wuji-H14 isolate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74:569-578.
19. Cheng M. H., Walker T. H., Hulbert G. J., and Raman D. R. (1999) Fungal production of eicosapentaenoic acid and arachidonic acid from industrial waste streams and crude soybean oil. *Bioresource Technol.* 67:101-110.
20. Choi D. B., Park E. Y., and Okabe M. (1998) Improvement of tylosin production from *Streptomyces fradiae* culture by decreasing the apparent viscosity in an air-lift bioreactor. *J. Ferment. Bioeng.* 86:413-417.
21. Clark D. S. (1962) Submerged citric acid fermentation of ferrocyanide treated beet molasses: morphology of pellets of *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.* 8:133-136.
22. Cole K. S., and Cole R. H. (1941) Dispersion and absorption in dielectrics, I. Alternating current characteristics. *J. Chem. Physics* 9:341-351.
23. Cooper C. M., Ferstrom G. A., and Miller S. A. (1944) Performance of agitated gas-liquid contactors. *Ind. Eng. Chem.* 36:504-509.
24. Cui Y. Q., van der Lans R. G. J. M., and Luyben, K. C. A. M. (1997) Effect of agitation

intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 55:715-726.

25. Davey C. L., Davey H. M., and Kell D. B. (1992) On the dielectric properties of cell suspensions at high volume fractions. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 28:319-340.
26. Davies R. J., Holdsworth J. E., and Reader S. L. (1990) The effect of low oxygen uptake rate on the fatty acid profile of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33:569-573, with an erratum at *ibid.* (1991) 34:832-833.
27. Devane W. A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R. G., Stevenson L. A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., and Mechoulam R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949.
28. Doyle M. J., Nemeth P. R., Skoglund M. L., and Mandel K. G. (1989) *In vivo* assessment of precursor induced prostaglandin release within the rat gastric lumen. *Prostaglandins* 38:581-597.
29. Du Preez J. C., Immelman M., Kock J. L. F., and Killian S. G. (1997) The effect of acetic acid concentration on the growth and production of gamma-linolenic acid by *Mucor circinelloides* CBS203.28 in fed-batch culture. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 13:81-87.
30. Einsele A. (1978) Scaling up bioreactors. *Process Biochem.* 13(7):13-14.
31. Emelyanova E. V. (1997) Lipid and γ-linolenic acid production by *Mucor inaquisporus. Process Biochem.* 32:173-177.
32. Gill I., and Valivety R. (1997) Polyunsaturated fatty acid, part 1: occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol.* 15:401-409.
33. Goheen S. C., Larkin E. C., Manix M., and Rao G. A. (1980) Dietary arachidonic acid reduces fatty liver, increases diet consumption and weight gain in ethanol-fed rats. *Lipids* 15:328-336.
34. Granger L.M., Perlot P., and Pareilleux A. (1993) Efficiency of fatty acid synthesis by oleaginous yeasts: prediction of yield and fatty acid cell content from consumed C/N ratio by a simple method. *Biotechnol. Bioeng.* 42:1151-1156.
35. Grynberg A., and Demaison L. (1996) Fatty acid oxidation in the heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Suppl.* 1:11-17.
36. Hansson L., Dostalek M., and Sorenby, B. (1989) Production of γ-linolenic acid by

fungus *Mucor rouxii* in fed-batch and continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31:223-227.

37. Harris C. M., Todd R. W., Bungard S. J., Lovitt R. W., Morris J. G., and Kell D. B. (1987) Dielectric permittivity of microbial suspensions at radio frequencies: a novel method for the real-time estimation of microbial biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 9:181-186.
38. Harvey L. M., McNeil B., Berry D. R., and White S. (1998) Autolysis in batch cultures of *Penicillin chrysogenum* at varying agitation rates. *Enzyme Microb. Technol.*, 22:446-458.
39. Hebborn P., Jablonska S., Beutner E. H., Langer A., and Wolska H. (1988) Action of topically applied arachidonic acid on the skin of patients with psoriasis. *Arch. Dermatol.* 124:387-391.
40. Hempenius R. A., Van-Delft J. M., Prinsen M., and Lina, B. A. (1997) Preliminary safety assessment of an arachidonic acid-enriched oil derived from *Mortierella alpina*: summary of toxicological data. *Food Chem. Toxicol.* 35:573-581.
41. Hiruta O., Yamamura K., Takebe H., Futamura T., Iinuma K., and Tanaka, H. (1997) Application of Maxblend® fermentor for microbial process. *J. Ferment. Bioeng.* 83:79-86.
42. Hollander D., Tarnawski A., Ivey K. J., Dezeery A., Zipser R. D., Mckenzie W. N., and Mcfarland W. D. (1982) Arachidonic acid protection of rat gastric mucosa against ethanol injury. *J. Lab. Clin. Med.* 100:296-308.
43. Hosobuchi M., Fukui F., Matsukawa H., Suzuki T., and Yoshikawa H. (1993) Morphology control of preculture during production of ML-236B, a precursor of pravastatin sodium, by *Penicillium citrinum*. *J. Ferment. Bioeng.* 76:476-481.
44. Hsieh D. P. H., Silver R. S., and Mateles R. I. (1969) Use of the glucose oxidase system to measure oxygen transfer rates. *Biotechnol. Bioeng.* 11:1-18.
45. Humphrey A. (1998) Sake flask to fermentor: what have we learned. *Biotechnol. Progress* 14:3-7.
46. Jain D., and Buckland B. C. (1988) Scale-up of the efrotomycin fermentation using a computer controlled pilot plant. *Bioprocess Eng.* 3:31-36.
47. Johansen C. L., Coolen L., and Hunik J. H. (1998) Influence of morphology on product formation in *Aspergillus awamori* during submerged fermentations. *Biotechnol. Progress* 14:233-240.

48. Justen P., Paul G. C., Nienow A. W., and Thomas C. R. (1998) Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol. Bioeng.* 59:762-775.

49. Kendrick A., and Ratledge C. (1992) Lipid formation in oleaginous mold *Entomophthora exitalis* growth in continuous culture: effects of growth rate, temperature and dissolved oxygen tension on polyunsaturated fatty acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:18-22.

50. Kobayashi T., VanDedem G., and MooYoung M. (1973) Oxygen transfer into mycelial pellet. *Biotechnol. Bioeng.* 15:27-45.

51. Koskelo E. K., Boswell K., Carl L., Lanoue S., Kelly C., and Kyle D. (1997) High levels of dietary arachidonic acid triglyceride exhibit no subchronic toxicity in rats. *Lipids* 32:397-405.

52. Krairak S., Yamamura K., Nakajima M., Shimizu H., and Shioya S. (1999) On-line monitoring of fungal cell concentration by dielectric spectroscopy. *J. Biotechnol.* 69:115-123.

53. Kyle D. J. (1996) Arachidonic acid and methods for the production and use thereof. PCT patent, publication no.WO96/21037.

54. Lanting C. I., Fidler V., Huisman M. Touwen B. C. L., and Boersma E. R. (1994) Neurological defferences between 9-year-old children fed breast-milk or formula-milk as babies. *Lancet* 344:1319-1322.

55. Li Z. Y., Lu Y., Yadward V. B., and Ward O. P. (1995) Process for production of arachidonic acid concentrate by a strain of *Mortierella alpina*. *Can. J. Chem. Eng.* 73:135-139.

56. Lindberg A. M., and Molin G. (1993) Effect of temperature and glucose supply on the production of polyunsaturated fatty acids by fungus *Mortierella alpina* CBS343.66 in fermentor cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:450-455.

57. MacKenzie D. A., Gendron L. C. G., Jeenes D. J., and Archer D. B. (1994) Physiological optimization of secreted protein production by *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 16:276-280.

58. Matanguihan R. M., Konstantinov K. B., and Yoshida T. (1994) Dielectric measurement to monitor the growth and the physiological states of biological cells. *Bioprocess Eng.*

11:213-222.

59. Maxon W. D. (1959) Aeration-agitation studies on the novobiocin fermentation. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* 1:311-324.
60. McIntyre M., McNeil B. (1997) Dissolved carbon dioxide effects on morphology, growth and citrate production in *Aspergillus niger* A60. *Enzyme Microbial. Technol.* 20:135-142.
61. Metz B., and Kossen N. W. F. (1977) The growth of molds in the form of pellets. *Biotechnol. Bioeng.* 19:781-799.
62. Metz B., Kossen N. W. F., and Van Suizdum J. C. (1979) The rheology of mold suspensions. *Adv. Biochem. Eng.* 11:103.
63. Midler M. J. R., and Finn R. K. (1966) A model system for evaluation shear in the design of stirred fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* 8:71-84.
64. Mishima K., Mimura A., Takahara Y., Asami K., and Hanai T. (1991) On-line monitoring of cell concentrations by dielectric measurements. *J. Ferment Bioeng* 72:291-295.
65. Morita S., Umakoshi H., and Kuboi R. (1999) Characterization and on-line monitoring of cell disruption and lysis using dielectric measurement. *J. Biosci. Bioeng.* 88:78-84.
66. Nakahara T., Yokochi T., Kamisaka Y., and Suzuki O. (1992) Gamma-linolenic acid from genus *Mortierella*. In: D. J. Kyle, and C. Ratledge (eds.), *Industrial applications of single cell oils*, AOCS Press, p 61-97.
67. Norwood K. W., and Metzmer A. B. (1960) Flow patterns and mixing rates in agitated vesels. *A. I. Ch. E. Journal* 6:432-437.
68. Okabe M., Kuwajima T., Satoh M., Kimura K., Okamura K., and Okamoto R. (1992) Preferential and high-yield production of a cephamycin C by dissolved oxygen controlled fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* 73:292-296.
69. Okita M., Miyamoto A., Wakabayashi Y., and Watanabe A. (1993) Improvement of polyunsaturated fatty acid deficiency in decompensated cirrhotic patients by arachidonic acid-rich oil capsules. In: T. Yasugi, H. Nakamura, and M. Soma (eds.), *Advances in polyunsaturated fatty acid research* , Elsevier Science Publishers B. V., The Netherlands, p 241-242.
70. Olsvik E., Tucker K. G., Thomas C. R., and Kristiansen B. (1993) Correlation of *Aspergillus niger* broth rheological properties with biomass concentration and the shape of

mycelial aggregates. *Biotechnol. Bioeng.*, 42:1046-1052.

71. Olsvik E., and Kristiansen B. (1994) Rheology of filamentous fermentations. *Biotech. Adv.* 12:1-39.
72. Park E. Y. (1998) Application of image analysis for efficient cultivation of microorganisms. *Recent Res. Devel. in Biotechnol. Bioeng.* 1:37-58.
73. Park E. Y., Koike Y., Higashiyama K., Fujikawa S., and Okabe M. (1999) Effect of nitrogen source on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina*. *J. Biosci. Bioeng.* 88:61-67.
74. Paul G. C., and Thomas C. R. (1996) A structured model for hyphal differentiation and penicillin production using *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* 51:558-572.
75. Ratledge C. (1992) Microbial lipids: commercial realities or academic curiosities. In: D. J. Kyle, and C. Ratledge (eds.), *Industrial applications of single cell oils*, AOCS Press, p 1-15.
76. Ratledge C. (1997) Microbial lipids. In: H. Kleinkauf, and H. von Dohren (eds.), *Biotechnology, 2nd, completely revised edition*, Volume 7, Products of secondary metabolism, Germany: VCH, p 133-197.
77. Rushton J. H. (1951) The use of pilot plant mixing data. *Chem. Eng. Progress* 47:485-488.
78. Sajbidor J., Dobronova S., and Certik M. (1990) Arachidonic Acid Production by *Mortierella* SP. S-17. *Biotechnol. Lett.* 12:455-456.
79. Schwan H. P. (1957) Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Adv. Biol. Med .Phys.* 5:147-209.
80. Shimizu S., Kawashima H., Shinmen Y., Akimoto K., and Yamada H. (1988) Production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella* fungi. *J. Am. Oil Chem.* Soc. 65:1455-1459.
81. Shinmen Y., Shimizu S., Akimoto K., Kawashima H., and Yamada H. (1989) Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi: selection of a potent producer and optimization of culture conditions for large-scale production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31:11-16.
82. Singh A., and Ward O. P. (1997) Production of high yields of arachidonic acid in a fed-batch system by *Mortierella alpina* ATCC 32222. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48:1-5.
83. Smith J. J., Lilly M. D., and Fox R. I. (1990) The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* 35:1011-1023.

84. Stredanska S., Slugen D., Stredansky M., and Grego J. (1993) Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* grown on solid substrates. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 9:511-513.

85. Streekstra H. (1997) On the safety of *Mortierella alpina* for the production of food ingredients, such as arachidonic acid. *J. Biotechnol.* 56:153-165.

86. Taguchi H., and Humphrey A. E. (1966) Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient systems. *J. Ferment. Technol.* 44:881-889.

87. Tamura S., Park Y., and Okabe M. (1997) Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 83:523-528.

88. Thom S. R., and Marquis R. E. (1984) Microbial growth modification by compressed gases and hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:780-787.

89. Thomas K., Rutter A., Suller M., Harwood J., and Lloyd D. (1998) Oxygen induces fatty acid (n-6)-desaturation independently of temperature in *Acanthamoeba castellanii. FEBS Lett.* 425:171-174.

90. Totani N, Watanabe A, and Oba K. (1987) An improved method of arachidonic acid production by *Mortierella alpina. J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 36:328-331.

91. Totani N., Someya K., and Oba K. (1992) Industrial production of arachidonic acid by *Mortierella*. In: D. J. Kyle, and C. Ratledge (eds.), *Industrial applications of single cell oils*, AOCS Press, p 52-60.

92. Tsujimura H., Takaya M., Katano K., Matsumoto N., Park Y. S., and Okabe M. (1994) Scaleup of peroxidase production by *Arthromyces ramosus* based on analysis of fluid velocity distribution. *J. Ferment. Bioeng.* 77:650-654.

93. Tucker K. G., Kelly T., Delgrazia P., and Thomas C. R. (1992) Fully-automatic measurement of mycelial morphology by image analysis. *Biotechnol. Prog.* 8:353-359.

94. Vanhoutte B., Pons M. N., Thomas C. R., Louvel L., and Vivier, H. (1995) Characterization of *Penicillium chrysogenum* physiology in submerged cultures by color and monochrome image analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 48:1-11.

95. Vardar F. (1983) Problems of mass transfer and momentum transfer in large fermenters. *Process Biochem.* 18 (5):21-23.

96. Whitaker A., and Long .P. A. (1973) Fungal pelleting. *Process Biochem.* 8(11):27-31.

97. Yaguchi T., Tanaka S., Yokochi T., Nakahara T., and Higashihara T. (1997) Production of high yield of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74:1431-1434

98. Yamada H., Shimizu S., and Shinmen Y. (1987) Production of arachidonic acid by *Mortierella elongata* 1S-5. *Agric. Biol. Chem.* 51:785-790.

99. Yang Y. K., Morikawa M., Shimizu H., Shioya S., Suga K., Nihira T., and Yamada Y. (1996) Image analysis of mycelial morphology in virginiamycin production by batch culture of *Streptomyces virginiae*. *J. Ferment. Bioeng.* 81:7-12.

100. ZoBell C. E., and Hittle L. L. (1967) Some effects of hyperbaric oxygenation on bacteria at increased hydrostatic pressure. *Can. J. Microbiol.* 13:1311-1319.

101. 合葉修一、A・ハンフリー、M・ミリス (1973) 「生物化学工学　第 2 版」、東京大学出版会、p 27-32.

102. 浅見耕司 (1995) 誘電スペクトロスコピーによるコロイド分散系の評価、日本ヒューレットパッカード、アプリケーション・ノート 380-3.

103. ウィリアム・R・バークレイ (1996) アラキドン酸の生成方法、特開平 8-214893

104. 上原健一、飯塚時男、武内大造 (1996) 海洋性微細藻類のシード培養方法、特開平 8-294384.

105. キール・デイビッド・J (1994) アラキドン酸その製造方法及び使用、特表平 6-505384.

106. 小柳尚彦、米澤岳志 (1996) 誘電率と導電率の同時測定が可能な誘電体プローブ、計装、39(3):51-55.

107. 厚生省保健医療局健康増進栄養課 (1994) 「第 5 次改定　日本人の栄養所要量」、第一出版、p 56-58.

108. 佐藤誠吾 (1990) 高酸素濃度下における発酵生産と微生物増殖の制御、醗工、68: 411-421.

109. 鈴木修、横地俊弘、山科孝雄 (1981) 糸状菌による脂質の生産に関する研究(第 2 報)接合菌類けかび目糸状菌(6 種)の脂質組成、油化学、30:863-868.

110. 添田愼介、明石健志、前田清、川北毅. (1998) タクロリムスの工業化研究、生物工学、76:389-397.

111. 田中秀夫、高橋譲二、上田清基 (1975) 菌糸懸濁液における菌糸に与える衝撃の強さを表す基準について、醗工、53:18-26.

112. 福島弥一、岡田王春、伊藤晴通、深瀬哲朗、茂田井宏 (1991) *Aspergillus oryzae* の連続培養によるプロテアーゼの生産:菌糸の形態変化に伴う攪拌に対する抵抗力の変化、醗工、69:441-446.

113. 三島健、三村精男、高原義昌 (1992) 懸濁液中の菌体量の計測方法、特公平 4-25800.

本論文に関する報文

1. Higashiyama K., Yaguchi T., Akimoto K., Fujikawa S., and Shimizu S.

Enhancement of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4.

Journal of American Oil Chemist' Society 75:1501-1505 (1998).

2. Higashiyama K., Yaguchi T., Akimoto K., Fujikawa S., and Shimizu S.

Effects of mineral addition on the growth morphology of and arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4.

Journal of American Oil Chemist' Society 75:1815-1819 (1998).

3. Higashiyama K., Murakami K., Tsujimura H., Matsumoto N., and Fujikawa S.

Effects of dissolved oxygen on the morphology of an arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4.

Biotechnology and Bioengineering 63:442-448 (1999).

4. Higashiyama K., Fujikawa S., Park E. Y., and Okabe M.

Image analysis of morphological change during arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4.

Journal of Bioscience and Bioengineering 87:489-494 (1999).

5. Higashiyama K., Sugimoto T., Yonezawa T., Fujikawa S., and Asami K.

Dielectric analysis for estimation of oil content in the mycelia of *Mortierella alpina*.

Biotechnology and Bioengineering 65:537-541 (1999).

6. Park E. Y., Koike Y., Higashiyama K., Fujikawa S., and Okabe M.

Effect of nitrogen source on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina*.

Journal of Bioscience and Bioengineering 88:61-67 (1999).

謝辞

私が生物化学工学の分野に進む契機と、終始暖かい御指導、御激励を賜り、本論文の主査を担当して頂きました大阪大学大学院工学研究科教授 菅健一 先生に心から感謝致します。副査を担当して頂き、有益な御指導を賜りました大阪大学生物工学国際交流センター教授 吉田敏臣 先生、大阪大学大学院工学研究科教授 塩谷捨明 先生に心から感謝致します。

本研究の遂行に当たり、終始適切な御指導を賜りました、京都大学大学院農学研究科教授 清水昌 先生、静岡大学農学部教授 岡部満康 先生、静岡大学農学部教授 朴龍洙 先生、京都大学化学研究所助教授 浅見耕司 先生にに深く感謝致します。

本研究の機会を与えられ、本稿の発表をお許し頂きました、サントリー株式会社代表取締役社長 鳥井信一郎 氏、取締役基礎研究所長 田中隆治 氏、商品開発研究所専任部長 永見憲三 氏に厚く御礼申し上げます。そして、本研究の遂行に際し、常に叱咤、激励いただき、適切な御指導を賜りました、サントリー株式会社ブレンダー室部長 松元信也 氏、健康食品開発部長 辻村英雄 氏、基礎研究所主席研究員 藤川茂昭 氏に心から感謝致します。また、本研究の共同研究者として御指導、御協力いただきました、サントリー株式会社 村上克之 氏、秋元健吾 氏、米澤岳志 氏、杉本武司 氏、矢口敏昭 氏、静岡大学農学部 小池康寿 氏に深く感謝するとともに、本研究開発において多くのご助力を賜りましたサントリー技術開発センターの皆様に厚くお礼申し上げます。

本論文は、以上に顕称した方々のお力添えがなければ、到底、著し得ないものでした。改めて、皆様に心より感謝致します。