

炭化水素醗酵の生物化学工学的研究

(旭化成工業(株) 食品工場) 三村精男

この研究は炭化水素醗酵のうち n -ヘラフィンを基質として、酵母を培養するプロセスを対象とし、新しい基質の採用にともなう醗酵挙動の変化について検討したものである。すなわち連続培養による酵母の生産性を決めるものとして、比増殖速度および菌体濃度があるが、これは酵母による酸素の摂取と培養系への酸素の供給、ならびに水に不溶な炭化水素の乳化状態により規制される。こうした要因について、炭化水素醗酵系に特徴的な現象に着目し炭化水素醗酵のプロセス特性を明らかにすることを主眼としたものである。

1. 炭化水素質化性酵母の酸素要求性 炭化水素醗酵は基質分子中に酸素を含まないことより培養においては、糖質に比較して多量の酸素を必要とする理論的推察を実験により証明し、炭化水素質化性酵母のもつ酸素要求性の特徴について、次の結果を得た。

Candida petrophilum の最大酸素要求量として $10 \text{ m-mol/g-cell}\cdot\text{hr}$ を確認した。この値より連続培養によって菌体を生産するとき、酸素供給が培養系の律速因子になりやすいことを考察した。菌体生成反応に必要な酸素の量は n -ヘキサデカンを基質とした場合100gの菌体生成に対して194gであるが、グルコース基質では68gとなり、炭化水素は高い値を示しほぼ理論推定値と一致した。本菌は炭化水素の炭素1モルの消費に対し0.7~0.8モルの分子状酸素を要求することを基礎として、酸素要求量を表わす実験式を導びいた。

Candida petrophilum の炭化水素酸化酵素系は constitutive な性質をもち、炭化水素の炭素数については基質特異性は認められなかった。

2. 酵母培養系の溶存酸素の影響 通気操作の目的は培養系への溶存酸素の供給であるとの観点から、溶存酸素の諸代謝に及ぼす影響を検討し、溶存酸素の最適値および臨界値を決めた。酸素摂取速度に対しては、溶存酸素 $4\sim 6 \text{ mg/L}$ で培養した菌体については、臨界溶存酸素濃度は 1.0 mg/L 付近であるが、溶存酸素 0 mg/L で培養したものについては、明瞭な値は認められなかった。この点については3.で詳細に検討した。炭化水素の酸化を示すと考えられる培養系のpH低下速度は $0.5\sim 0.7 \text{ mg/L}$ に臨界濃度が認められた。しかし炭酸ガスの放出速度は溶存酸素には影響されなかった。比増殖速度 μ は溶存酸素 $4\sim 6 \text{ mg/L}$ に最適値が認められ、最大 μ に達するまでの μ の変化は Michaelis-Menten 型の関係が成立した。さらに菌体中の蛋白質、核酸、脂質、ステロール、呼吸酵素系成分に対する溶存酸素の効果を検討し、酵母菌体生産における溶存酸素の重要性を論じた。

3. 炭化水素質化性酵母の対酸素挙動の解析 酵母による溶存酸素の摂取および、対酸素酵素系の親和性について照井らの半減期解析法を用いて検討した。

Candida petrophilum が n -ヘラフィンに好気発育するとき、酸素摂取速度と溶存酸素濃度との間には Michaelis-Menten の関係が成立した。本菌の K_m 値には二重性が認められ、下位の K_{m1} は $1\sim 2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ にあり、上位の K_{m2} は $2\sim 3 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ のレベルのものであった。 K_{m1} の値は他の微生物で報告された値よりも、やや高いが、テトクローム系、オキシゲネース系

学会賞受賞講演

のものと考えられ、 K_{m2} はフラビン系のものに近い値であった。本菌をグルコースで培養すると、 μ -パラフィンで発育した菌体よりも、幾分小さい K_{m1} の値を示すことから、先に示した K_{m1} には μ -パラフィンのオキシゲネース系が混合していることが考えられたので、両系を分離して、親和性を検討した。 NaN_3 感受性のチトクローム系を阻害すると、グルコース基質では、 NaN_3 不感受性のフラビン系と考えられる K_{m2} のみが残るが、 μ -パラフィン基質では、 $5 \sim 7 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ の K_{m1} が K_{m2} と共に残ることより、 K_{m1} 相当因子は μ -パラフィンのオキシゲネース系のものであることを考察した。*Candida petrophilum* に含まれる3つの対酸素酵素系の親和性は、チトクローム系、オキシゲネース系、フラビン系の順に低くなることを示した。また溶存酸素 0 mg/L で培養した菌体から出発した酸素適応について検討し本菌の酸素適応の面からの最低溶存酸素濃度は、少なくとも 1 mg/L 以上必要であることを考察した。

4. 水-油系における酸素移動 酸素供給の面から、炭化水素醗酵の特徴を検討するに当り、先づ、細胞を含まない水-油系をモデルとし、気泡から水相への酸素移動に対する共存油の効果を観察した。水相に亜硫酸ソーダ溶液を用い、振盪培養の条件で $K_L a/H$ を測定したところ、ケロシンを添加することで $K_L a/H$ が著しく増大することを発見した。たとえば振盪フラスコ全液量が 100 ml の場合で、ケロシンの比率 85% では $K_L a/H$ は実に $29 \times 10^{-6} \text{ mol/ml} \cdot \text{atm} \cdot \text{min}$ の値を示した。水-油系の酸素移動速度係数は次式で示すことができた。

$$\frac{K_L a}{H} = 5.4 \times 10^{-5} V a^{-0.56} + 10^{-6} \exp 3.3 \left(\frac{V a}{V_t} \right)$$

ただし $V a$ は水相の容量、 V_t は水と油の総容量である。この現象は *Aerobacter aerogenes* をケロシン含有グルコース培地で培養し、その発育速度の増大からも証明した。これらの結果より、油存在下の気相から水相への酸素移動現象について考察を加え、油のもつ、酸素溶解のヘンリー係数および、微細化された油滴のもつ広い接触面積の効果が重要な要因になっていることを考察した。

5. 水-油-細胞系における酸素移動 細胞の存在する水-油-細胞系の酸素移動現象について、総括酸素移動容量係数 $K_L a$ を対象に検討した。水-油-細胞系は炭化水素質化性酵母のもつ強い親油性により、4.で述べた水-油系とは著しく異なる系であることが判明した。*Candida petrophilum* を通気攪拌培養する場合、細胞によって、油が乳化されるにつれて、 $K_L a$ および気泡ホールドアップは低下し、最も低い phase では、初発の $1/4 \sim 1/6$ のレベルであった。このような $K_L a$ の低下現象は単細胞微生物では認められておらず、炭化水素醗酵系に特徴的な現象であった。 $K_L a$ の低下の原因には、菌体濃度の増加による油の乳化と関連し、菌体のもつ強い親油性により、気泡の状態を変化させるためである。 $K_L a$ の低下した時の気泡は、周囲に酵母細胞を密に吸着し、酸素の溶解に重要な気液接触面積を著しく減少させていることが特徴である。気泡への細胞の吸着は油の存在においてのみ可能であった。 $K_L a$ の低下は炭化水素醗酵に問題を提起するが、これを防止するためには、気泡に細胞を吸着させないことであり、シリコーン消泡剤が効果を示した。細胞は気泡に吸着しているため、気泡より"いわゆる水相"を経由しないで気泡周囲の liquid film を介して、

反応吸収的に liquid film 中の溶存酸素を直接摂取していることが観察された。気泡から"いわゆる水相"への酸素溶解の $K_L a$ が低下している phase では、全酸素消費量の 90% が反応吸収的に liquid film を介して摂取されていた。このような検討により、実際の醗酵系の酸素移動現象を明らかにした。

6. 炭化水素醗酵の乳化現象 炭化水素醗酵の第2の特徴である基質の水不溶性に由来する乳化分散の問題を、主として炭化水素質化性酵母のもつ親油性の面から検討した。炭化水素質化性酵母は非質化性酵母に比較して、強い親油性を示したが、質化性酵母の中にも、菌株によって親油性に差が認められた。この相違により、発育速度、界面活性剤に対する挙動に変化が表われるものと考察した。菌体より親油性を示すリピッド成分を抽出して性質を調べた。少量でオktan以上の炭化水素を水に乳化し、乳化作用は二価金属イオンで阻害された。油の乳化作用における生体内リピッドの働きについての見解を述べた。細胞は親油的性質によって、油を乳化分散し、細胞と油滴の接触面積を大きくするが、発育に最適な細胞と油滴の関係は、両者が緻密に吸着している状態であることを示し、このような状態を *biologically active emulsion of hydrocarbon* として、単なる油滴の乳化状態と区別した。このような状態は合成界面活性剤により破壊されるため、親油性の低い株、例えば *Pichia miao*, *Candida guilliermondii* などは、発育が阻害される。一方親油性の強い株、例えば *Candida petrophilum* は界面活性剤によって油滴と細胞が分離しても、発育は盛んである。レシチン、セフィリン、寒天末、*Candida petrophilum* の菌体より抽出したりピッドなどの天然産界面活性物質は、細胞の親油性を抑えることなしに、油を乳化分散するので、特に親油性の低い株の発育を促進した。合成界面活性剤の諸性質のうち HLB と化学構造が発育に影響を与えた。エーテル結合をもつ界面活性剤は炭化水素のとりこみ反応に悪影響を与えることが観察された。これらの諸検討より、炭化水素質化性酵母の親油性の本質的考察を行なった。

7. 炭化水素醗酵系の発育速度について 比増殖速度に関し特徴的な現象を論じた。炭化水素を基質とした時には、糖質基質より誘導期が長い、これは油の乳化分散に必要な界面活性物質の産生と培地への漏洩、細胞内リピッドの生成に要する時間であるとの見解を得た。対数的増殖期では、基質の水不溶性に由来する新しい現象を認めた。グルコース基質では μ は菌体濃度には無関係で、培地中の基質濃度のみ依存するが、*n*-ヘキサデカン培地では、菌体濃度が増すにつれて μ は低下した。これは制限基質濃度に関する Monod の法則が、そのままの形では成立しないものと解される。 μ に対しては、単位菌体量当りの基質量が重要な要因となった。振盪培養では 10 g-oil/ g-cell のレベルが μ の最大値を維持する最少濃度でありこの値を、臨界基質供給値 *Critical value of substrate supply* として提案した。この概念の理論的根拠を述べ、細胞径と油滴径の比率が重要であるとの結論を得た。

8. 炭酸ガス放出と菌体生成効率 菌体生成反応の炭素バランスより、菌体収率係数について論じた。炭化水素中の炭素は、炭酸ガスと菌体に 90~95% が回収され、菌体 100 g 生成において、炭酸ガス 100~140 g 放出されることが判明した。炭素の利用効率は 50% であ

学会賞受賞講演

った。菌体収率を論ずるにあたり、酵母による炭素の assimilation 活性と、dissimilation 活性の比率 λ をパラメータとし、菌体収率係数 γ を表わす理論式を導びき、実験値と比較した。炭化水素酵母菌体の生成反応は $\lambda : 0.5 \sim 1.0$, $\gamma : 0.8 \sim 1.2$ の範囲に入った。またこの反応はエネルギー利用率から見ると、グルコース基質に比較して低いものと評価をした。実験的な最低の入値より、最大収率係数は $1.1 \sim 1.2$ であることを考察した。以上、この研究は新しい基質を利用する炭化水素醗酵において、その生産効率を高め、合理的なスケールアップを行なうに必要な諸要因に関し、酵母による炭化水素醗酵のプロセス特性を追求したものであり、醗素要求と供給の面、基質供給の面、さらに菌体収率の面にわたり検討を加えたものである。

終りに本研究を行なうに当り、終始御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学田口久治教授に深謝いたします。また研究に当って有益な助言と御鞭撻下さった旭化成工業(株)技術研究所前所長、若狭良一博士、同鈴木明博士、同所生物化学研究室長、武田勲博士、また食品醗酵化学事業部長、岡本担三取締役、同部大沢浩氏、大沢岳義食品工場長の諸氏に感謝いたします。