

固定化酵母の熱量計 による解析

古賀 邦正*

1. はじめに

生体の反応機構の利用によるバイオリクターの研究は遺伝子工学や細胞工学の進歩と相俟って、近年、急激な進歩をとげており、反応に利用する固定化酵素も酵素や微生物からさらに動・植物、オルガネラに拡大しつつある¹⁻³⁾。

中でも固定化酵素、固定化微生物の手法については多くの検討がなされており、酵素や微生物を固定化することによって、もとの酵素や微生物と比べつぎのような利点が生じることが明らかになりつつある³⁾。(a)酵素の安定性を増す、(b)利用目的に適した性質、形状の固定化標品が調製できる、(c)酵素の再利用ができる、(d)反応の連続化ができる、(e)反応装置が占めるスペースが小さい、(f)反応生成物の純度および収率が高くなる、(g)資源エネルギー、環境問題の点でも有利である。

このような固定化生体触媒の種々の特性を生かして、特異性の高い固体触媒として非常に多くの利用法が報告されている。このうち、固定化微生物の手法は固定化された微生物が死滅している状態で利用する方法と、生きたままの状態を利用する固定化増殖微生物と称せられる手法に大別される。死滅した状態で固定化微生物を利用する方法は微生物の酵素を一段階の反応に関与させるもので、工業レベルでも、L-アスパラギン酸、L-リンゴ酸の製造に利用されている³⁾。一方、固定化増殖微生物の手法は、1970年代の後半から急激に研究が進められるようになった。これは、微生物を生存状態に保ち、ATP、酸化還元系、あるいは補酵素の再生系などを必要とする多段階の酵素反応に利用しようとするものである。

この固定化増殖微生物の活性は固定化担体内の微生物の挙動と密接に関係していると考えられる。固定化の操作が微生物の生理状態に及ぼす影響や固定化担体内での微生物の挙動があきらかにできれば、今後、益々、この手法の適用される領域が拡大されてゆくものと期待される

が、固定化されたままの状態の微生物の挙動を定量的に把握できる手法の少ないのが現状である。

一方、微生物系の熱測定は、1933年に田宮先生が試みられて以来⁴⁾、多くの検討がなされ⁵⁻⁷⁾、定量的な扱いが可能となっており、そのままの状態での微生物の代謝に伴う熱変化の測定ができることは大きな利点のひとつであることが明らかになってきた。また、熱測定の装置そのものも多くの改良が加えられ、効率性・安定性が向上している⁸⁾。このような状況を鑑みて、著者らは、熱分析の手法を用いることによって固定化されたままの状態での微生物の挙動を定量的に把握できるのではないかと考えて検討を試みたので以下にその経緯を述べる⁹⁻¹¹⁾。

2. 固定化酵母の増殖サーモグラム

実験に供した醸造用酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (IFO 0234) を常法に従って¹⁾ 2% アルギン酸カルシウムを用いてビーズ状に包括固定化したのち培養して、担体内に酵母が充分生育した時の担体内部の様子と固定化直後の状態とを比較したのが Fig. 1 である。

ビーズ1個の大きさは直径約4mmであり、ビーズの表層付近を中心に高密度に酵母が生育している様子がよく知られよう¹²⁾。前述したように、固定化すると微生物の菌体密度は非常に上昇し、このことが固定化増殖微生物の手法の利点のひとつと考えられるが、固定化された酵母が高密度に生育するまでの増殖過程、糖の資化性、酵素の誘導性、増殖に伴う発熱量等について熱量計を用いて検討を行なった。

測定に用いた微生物用熱量計(日本医科器械社製)の構造を Fig. 2 に示した。中心のコントロールセルを基準にして、周囲6個の培養セル中で各々生じる熱変化を示差的に検出することによって6個のサンプルを同時に測定できるように設計されている。この培養セルの中で固定化酵母を培養して発生した熱量の経時変化すなわち増殖のサーモグラムを測定した。センサーとしてサーモジュールを用いている。培養セルは微生物用熱量計のために特別に設計されており、とくに(1)繰り返しの熱殺菌が可能なこと、(2)熱伝導性に大きな相違がないこと、(3)菌の接種などの操作が熱量計に培養セルをセットした後でも容易なこと等について配慮した。測定時間は熱安定に10時間、実際の測定に約30時間を要するが同時に6個のサンプルが測定可能であり、従来に比較すれば効率性は非常に上昇している。熱量計の詳細については高橋らの報告がある⁶⁾。

増殖サーモグラム測定の際の基本的な実験条件を Table 1 に記した。

* サントリー(株)酒類研究所：大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1 〒618

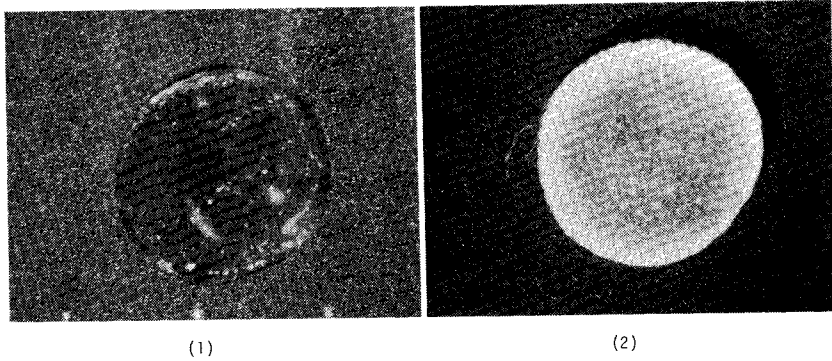


Fig. 1 Photographs of gel bead slices entrapping cells.
 (1) Before incubation.
 (2) After incubation.

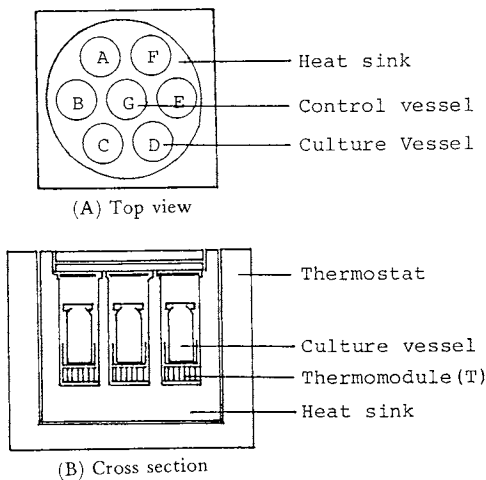


Fig. 2 Scheme of the microcalorimeter.

実験の再現性を確認するために、6個の培養セルとも同一条件にて固定化酵母を培養した際の増殖サーモグラムをFig. 3に示した。増殖サーモグラムから求められるパラメーターを併せて記しており、サーモグラムの面積から増殖に伴う発熱量(ΔQ)、ピークの立ち上がりの時間(T_0)、発熱量が最大となるのに要する時間(T_m)、発熱が終了した時間(T_e)、最大熱流量(H_f)を求めることができる。各サーモグラムからパラメーターを求めて結果をTable 2に記した。固定化方法、培養条件を厳密に設定することによって再現性の良いサーモグラムを得られることが知られよう。

固定化酵母を培養した際のサーモグラムと固定化担体内酵母数及び培地中の糖濃度とアルコール濃度の経時変化を示したのがFig. 4である。制限基質であるグルコースの消費に伴って固定化酵母数が増加し、わずかである

Table 1. Experimental Condition.

Culture medium	20 cm ³
Yeast extract	1 %
Poly peptone	2 %
Glucose	2 %
Inoculum size	10 cm ³
Immobilized yeast cell	1 × 10 ⁶ cells/cm ³ of gel
Free yeast cell	1 × 10 ⁶ cells/cm ³ of 0.8 % NaCl solution
Culture temperature	26 °C
Yeast strain	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

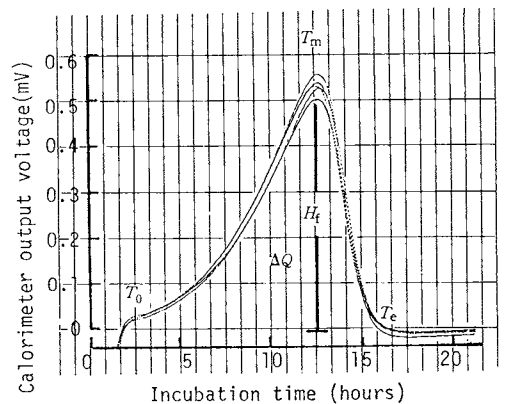


Fig. 3 Growth-thermograms of immobilized yeast cells.

Table 2. Reproducibility of Thermograms.

	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	Ave.
$\Delta Q/kJ$	0.21	0.21	0.21	0.20	0.21	0.20	0.21
T_0^0/h	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
\bar{T}_m/h	12.6	12.6	12.6	12.4	12.6	12.6	12.6
T_e/h	17.3	17.3	17.3	17.5	17.3	17.3	17.3
H_f/mV	0.52	0.52	0.54	0.53	0.52	0.54	0.53

Yeast strain ; *Sacchromyces cerevisiae*

Medium ; Yeast extract 1%, Poly pepton 2%, Glucose 2%

Temperature ; 26°C

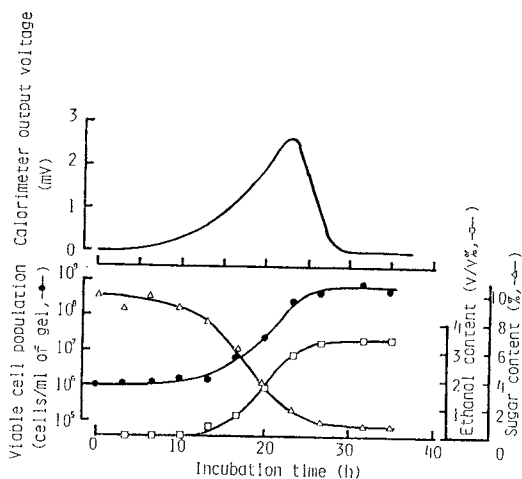


Fig. 4 Growth-thermogram of immobilized yeast cells and changes in ethanol content, sugar content and cell population.

がエタノールの生成が観察され、サーモグラムは固定化酵母の挙動をよく反映したものであることが理解される。中でも、サーモグラムと固定化酵母の増殖カーブと比較すると、立ち上がりの時間(T_i)及び終了の時間(T_e)はよく一致しており、サーモグラムのピークは増殖カーブの対数増殖期に相当しており、サーモグラムが主に固定化酵母の増殖に起因していることが知られる。

高橋らは、固定化していない遊離の状態の酵母の増殖サーモグラムを詳細に検討し、増殖サーモグラムを $g(t)$ 、微生物培養用セルの熱伝導度定数を k とすると(1)式に従って真の温度変化 $f(t)$ を求めることができる。ま

$$f(t) = g(t) + k \int g(t) dt \quad (1)$$

た、こうして求めた真の温度変化 $f(t)$ は、酵母の増殖カーブとよく一致していることが確認されている⁷⁾。そこで、固定化酵母についても、実際に測定した増殖サーモグラムから(1)式に従って真の温度変化 $f(t)$ を求め、その際の実際に測定した固定化酵母の増殖カーブと比較

したところ両者はよく一致することが確認された(Fig. 5)。

さらに、菌体数を $f(t)$ で示すと、対数増殖期には比増殖速度 μ との間には(2)式の関係が成り立つ。この式か

$$f(t) = A \exp(\mu t) + B \quad (2)$$

A, B は定数。

ら、グーゲンハイムの式(3)が導きだされる。(3)式に従って、実際に測定

$$\log \{f(t + \Delta t) - f(t)\}$$

$$= \frac{\mu}{2.303} t + \log A(e^{\mu \Delta t} - 1)$$

(3)

した増殖サーモグラムから $\log \{f(t + \Delta t) - f(t)\}$ を求めて培養時間 t に対してプロットしたのが Fig. 6 であり、図の直線の勾配から固定化酵母の比増殖速度 μ を求めることができる。

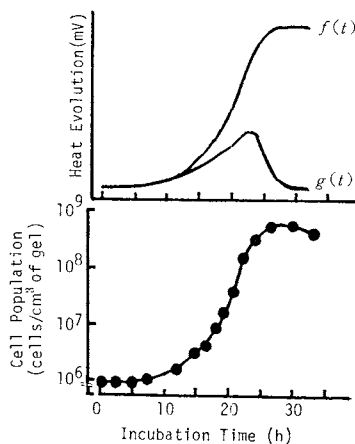


Fig. 5 Heat evolution ($f(t)$) obtained from growth-thermogram of immobilized yeast.

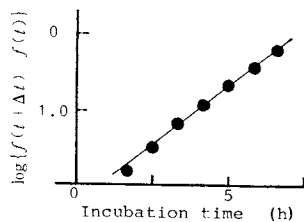


Fig. 6 Guggenheim plots of the heat evolution curve ($f(t)$) with growth of immobilized yeast.

3. 固定化酵母と遊離酵母の増殖サーモグラムの比較

固定化酵母と遊離酵母とを同一条件下で培養した際の増殖サーモグラムをFig. 7に比較して示した。(1)が固定化酵母、(2)が遊離酵母の増殖サーモグラムである。総発熱量と立ち上がりの時間に関しては、両者で差は認められないが、最大熱流量は固定化酵母の方が高く、発熱も遊離酵母に比較して早く終了している。このことから固定化酵母と遊離酵母とは異なった増殖経過をたどっているものと推察される。(1)式に従って各々の増殖経過を求めてFig. 8に比較して示した。増殖前期では両者に差は認められないが、後期になると差を生じ、遊離酵母では増殖速度が低下するが、固定化酵母ではその様なことが認められない。Figs. 7, 8から得られた各パラメーターをTable 3にまとめた。このことから、酵母を固定化しても比増殖速度(μ)には変化は認められず、基質・生産物・酵素などの拡散が早く、固定化担体内外での物質の出入りが速やかに行なわれるものと推察される。この結果は電顕による観察結果とよく一致している¹³⁾。

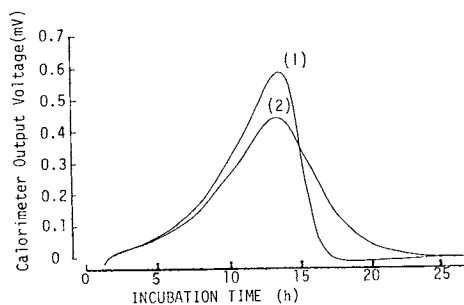


Fig. 7 Growth-thermogram of immobilized yeast and free yeast cells.

- (1) Immobilized yeast cells.
(2) Free yeast cells.

4. 糖の資化性と増殖サーモグラム

制限基質である糖の種類をグルコース、フラクトース、ガラクトース、シュクロース、マルトース、ラフィノースと変えて酵母を培養し、糖の資化性の差が増殖サーモグラムにどのような影響を及ぼすかという点を検討した。Fig. 9は遊離酵母の増殖サーモグラムである。各々の糖に応じた特徴のある増殖パターンが得られ、これは糖の資化性の差が増殖サーモグラムに反映されているものと考えられる。中でも、ラフィノースは誘導酵素によって資化されるために大きく遅れており、また、この酵母はガラクトースを資化しないので発熱も認められない。

固定化酵母による糖の資化性の差をみたのがFig. 10である。遊離酵母に比較して、最大熱流量が大きく発熱の終了も早い現象が、グルコースに限らず他の糖質を基質にした場合にも観察された。また、ラフィノースを基質とした時は増殖が大きく遅れ、ガラクトースは資化されず、糖の資化能の基本的な性質には遊離酵母と固定化酵母とで大きな差がないことが確認された。ラフィノースを資化する際、サーモグラムの立ち上がり時間に差が認められず、酵素の誘導に要する時間にも大きな違いが

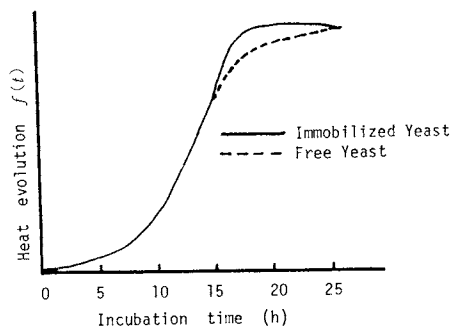


Fig. 8 Time dependence of heat evolution ($f(t)$) obtained from growth thermograms of immobilized yeast and free yeast cells.

Table 3. Comparison of Parameters from Growth Thermograms of Immobilized and Free Yeast Cells.

	Immobilized Yeast			Free Yeast		
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
$\Delta Q/kJ$	0.23	0.22	0.22	0.22	0.22	0.21
T_0/h	1.6	1.5	1.5	1.5	1.5	1.6
T_m/h	13.7	13.5	13.8	13.7	13.7	13.7
T_e/h	18.7	18.5	18.5	25.7	25.6	25.7
H_f/mV	0.49	0.49	0.51	0.41	0.39	0.39
μ/h	0.35	0.34	0.33	0.35	0.36	0.34

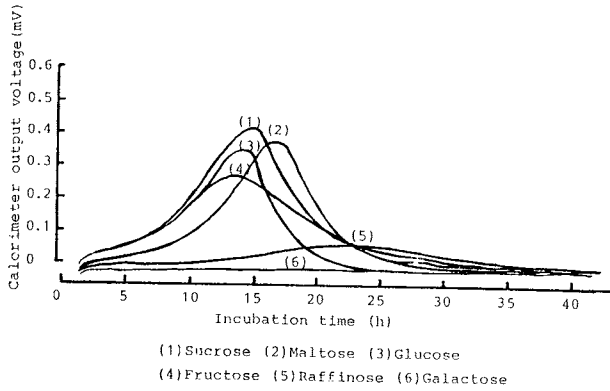


Fig. 9 Growth-thermograms of free yeast in the medium of different sugars.

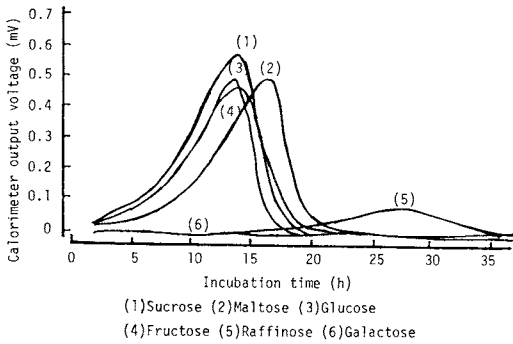


Fig. 10 Growth-thermograms of immobilized yeast in the medium of different sugars.

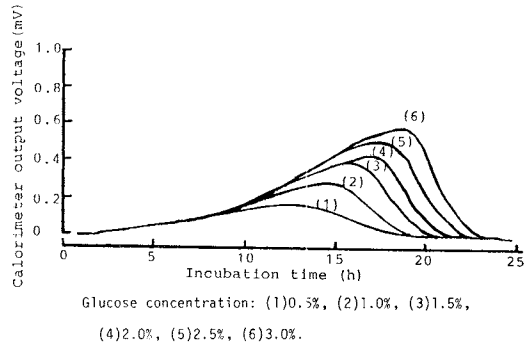


Fig. 11 Growth-thermograms of immobilized yeast in the medium of different glucose concentrations.

Glucose concentration:

- (1) 0.5% (2) 1.0% (3) 1.5%
(4) 2.0% (5) 2.5% (6) 3.0%

ないことが知られる。

5. 糖類のちがいと発熱量

培地のグルコース濃度を 0.5% から 3.0% まで種々変化させて固定化酵母を培養した際の増殖サーモグラムを Fig. 11 に示した。グルコース濃度に比例して、増殖サーモグラムの面積から求められる総発熱量も増大している。

フラクトース、マルトース、シュクロース、ラフィノースと糖の種類を変えて同様の実験を行ない、各々の糖について糖を資化した際の総発熱量と資化した糖の量との関係を Fig. 12 に示している。発熱量と糖消費量との間には一次の比例関係が認められ、この直線の勾配から酵母が糖 1 モルを資化した際の発熱量を直接求めることができる。

グルコース、フラクトースの単糖類とマルトース、シュクロースの 2 糖類とでは、2 糖類の勾配の方が大きく、分子量が大きくなるとモル当たりの発熱量もそれだけ増加していることが容易に理解される。3 糖類のラフ

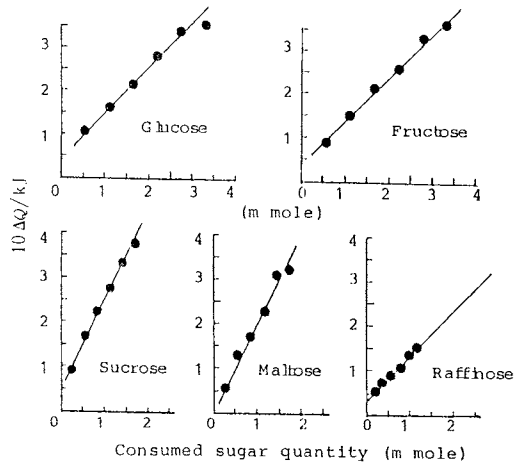


Fig. 12 Relationship between heat and consumed sugar quantities during growth of immobilized yeast in various sugar media.

Table 4. Growth Energy of Free and Immobilized Yeast.

	ΔQ (kJ/mol)		Combustion heat (kJ/mol)	Growth energy (kJ/mol)	
	Free	Immo.		Free	Immo.
Glucose	100	108	2831	2731	2723
Fructose	102	108	2840	2738	2732
Maltose	195	197	5675	5480	5478
Sucrose	201	194	5675	5474	5481
Raffinose	102	100	8492	2715	2717
Melibiose			5675		

イノース (Gal-Gul-Fru) の場合には、メリビオース (Gal-Gul) を培地に蓄積してフラクトースのみを資化することが知られており、そのために単糖類 (フラクトース) とほぼ同じ勾配を示しているものと考えられる。

固定化酵母及び遊離酵母が、グルコース、フラクトース、マルトース、シュークロース、ラフィノースを資化した際の発熱量を糖 1 モルあたりについて各々求めたのが Table 4 である。単糖類は 100~108 kJ/mol, 2糖類は 194~201 kJ/mol であり、単糖類の約 2 倍に相当する発熱量である。ラフィノースの資化については前述した通りであり、フラクトースとほぼ同じ値であることが確認された。固定化酵母と遊離酵母とでは、各糖を資化した際の発熱量に大きな差は認められない。

6. 固定化担体内酵母密度と増殖サーモグラム

固定化担体内の酵母密度を 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 cells/cm³ of gel と変化させて、固定化酵母を培養した際の増殖サーモグラムを Fig. 13 に示した。酵母密度が低下するに従ってサーモグラムの立ち上がりの時間 (T_0) が遅れるが、サーモグラムのかたちには大きな差は認められない。このことから、固定化担体内の酵母密度が低下すると酵母が増殖を開始するまでの lag time

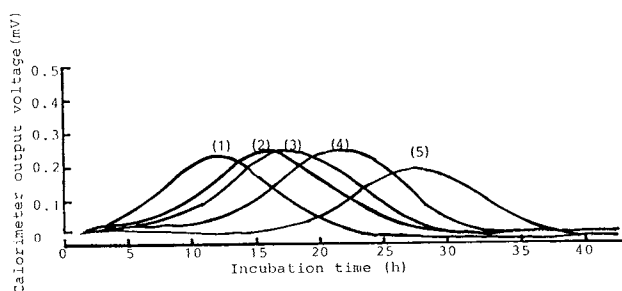


Fig. 13 Growth-thermograms of various cell populations of immobilized yeast.

Cell population in gel (cells/cm³ of gel):

- (1) 10^8 , (2) 10^7 , (3) 5×10^6 , (4) 10^6 ,
and (5) 10^5 .

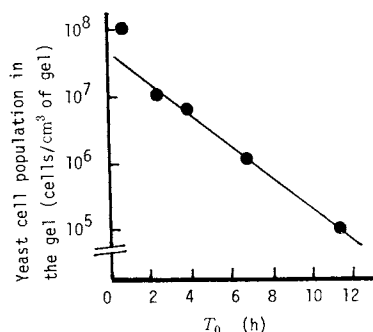


Fig. 14 Relationship between yeast cell population in gel and T_0 .

Immobilized yeast in the volume of 0.36 cm³ were inoculated into 20 cm³ medium.

が延長するが、増殖が開始すると担体内の酵母密度に関係なく同じような増殖経過をたどっているものと推察される。

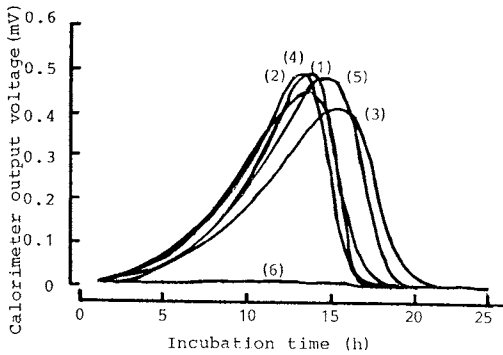
Fig. 14 に、サーモグラムの立ち上がりまでに要する時間と培養開始時の担体内酵母密度との関係を示した。両者には、1 次の直線関係が認められ、固定化酵母の増殖サーモグラムを測定することによって得られる lag time の長さから担体内酵母密度を推察することが可能である。この実験で用いている担体は、 κ -Car, Alg-Ca であり、担体内の微生物の様子を検討しようとするれば、担体を溶解することによってある程度可能である。しかし、光架橋性樹脂などのように一度固定化してしまうと、温和な条件ではゾル化ができない担体も多くあり、そのような固定化担体中の菌体密度を把握するのにこの知見は役立つものと考えられる。

7. 固定化担体のちがいと増殖サーモグラム

固定化担体の中での微生物の生育のしやす

さは固定化増殖微生物の基本的な条件のひとつであり、固定化担体を選択する際の評価基準のひとつであると考えられる。担体内部での微生物の生育のしやすさは担体内部への基質の入りやすさ、生産物の拡散のしやすさ、増殖阻害物質が蓄積しやすいかどうか、固定化担体と微生物のなじみ易さ等々の多くの要因が考えられる。熱測定的手法ではこれら個々の要因の寄与を把握することはできないが、個々の要因の寄与の結果を増殖サーモグラムを介して総合的に評価できるという利点がある。

Fig. 15 にアルギン酸カルシウム、アルギン酸アルミニウム、 κ -カラギーナン、寒天、ペクチン、アクリルアミドの各固定化担体に酵母を固定化して、その増殖サーモグラムを測定した結果を示している。図から明らかなく、各々用いた担体に応じて異なったサーモグラムが得られ、酵母が生育しやすい寒天、 κ -カラギーナン、アルギン酸カルシウム、やや生育が遅れるペクチン、アルギン酸アルミニウム、生育が非常に遅れるアクリルアミドと分けられることが知られる。



(1) κ -Car, (2) Alg-Ca, (3) Alg-Al, (4) Agar, (5) Pectin, and (6) Acrylamide

Fig. 15 Growth-thermograms of immobilized yeast in the different immobilizing gels.

固定化増殖微生物を連続反応等に使用する際には、固定化担体の強度、われにくさ、遊離菌体の程度なども重要な問題であり併せて考慮に入れる必要があるが、固定化された微生物がよく生育する条件にあるかどうかという点は基本的な評価項目のひとつであり、このことが熱分析の手法を用いることによって容易に知られることの意義は大きいと考えられる。

8. 固定化酵母の比増殖速度と担体内酵母分布

一方、同じ固定化担体を用いても、微生物の種類を変えて増殖サーモグラムを測定するとその微生物の増殖速度に応じたサーモグラムが得られる。固定化増殖微生物

の場合、その微生物の固定化担体内部における菌数分布は基質の内部拡散速度と微生物の増殖速度とのバランスで決まるので、そのバランスを考慮すると異なった特徴を有する反応素子としての固定化微生物を調製することが可能であると期待される。

その例として、醸造用酵母(ρ^+)とそれを親株として得た変異株・呼吸欠損酵母(ρ^0)の場合について検討した。Fig. 16 に固定化した ρ^+ 酵母と ρ^0 酵母のサーモグラムを示している。このサーモグラムから増殖カーブを求めて、各々の比増殖速度(μ)を求めたところ 0.56 h^{-1} 、 0.30 h^{-1} であった。この担体に ρ^+ 酵母、 ρ^0 酵母を各々包括固定化して培養させた際の固定化ゲルビーズ内部の酵母分布を比較した結果をFig. 17に示している。Fig. 17のグラフの縦軸に酵母密度、横軸にビーズの中心からの距離をとることによってゲルビーズの中心から表層までの酵母分布を示している。

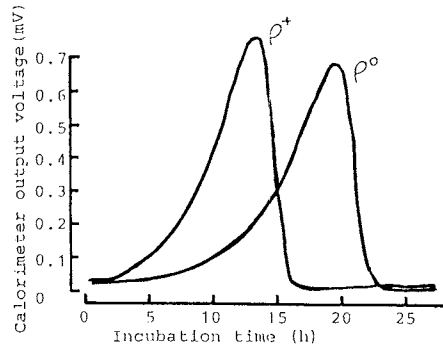


Fig. 16 Growth-thermograms of immobilized ρ^+ and ρ^0 yeast cells.

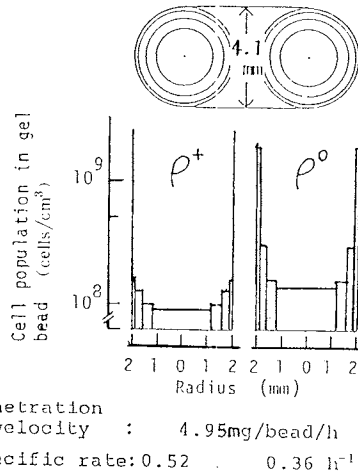


Fig. 17 Comparison of yeast cell distribution in gel bead between ρ^+ and ρ^0 .

ρ^+ 酵母, ρ^0 酵母いずれもビーズ表層付近を中心に高密度に菌体が生育しているが, ρ^0 酵母の場合は, 固定化担体内部の酵母密度が ρ^+ 酵母より高く, ゲルビーズ内部にもよく生育していることが知られよう。

この場合の固定化担体ゲル (κ -カラギーナン) への基質の拡散速度は実際の測定から 0.24 mg/bead/h であることが知られている¹⁴⁾。固定化担体内部への基質の浸透の程度, それに伴う菌体密度のちがいは基質の拡散速度と固定化酵母の比増殖速度とのバランスで決まっており, ρ^+ 酵母は ρ^0 酵母に比較して増殖速度が早いために基質の担体内部への拡散がおさえられ, その結果, 固定化担体内部での酵母密度の低下に反映しているものと考えられる。

現在, われわれは, この固定化酵母を用いて連続発酵を行っており, この素子としての特性が連続発酵においてどのような特徴をうむかという点を中心に検討を進めているのでその結果については別の機会に述べたい。

9. おわりに

以上述べた様に, 熱測定からの情報と他の測定結果とを組み合わせることによって固定化微生物・固定化担体の評価が可能であり, さらには反応素子の多様化をはかることもできると考えられる。

今後, この固定化増殖微生物の手法は, バイオリアクターの研究とともに一層開発されてゆくものと考えられる。アルコール発酵に関しても多くの研究者の精力的な研究によって, この手法が少なくともエタノール生産の面から見れば多くの利点をもつ有力なものであるという評価が得られつつある¹⁵⁻¹⁷⁾。

しかし, 一方で, 生産システムの開発研究に比較すると固定化担体内の微生物がどのような状態にあり, どのような挙動をとっているかという基礎的な検討が少ないことも否めない。

今後, この手法が古い伝統をもつ醸造工業とのつながりをもつためには, 固定化酵母の挙動を明確に把握して従来の発酵法における酵母の挙動との比較を行ない, 固

定化酵母をコントロールすることが必要となろう。

そういう意味では, 今回, 検討した熱測定の手法は, 固定化担体内の微生物の挙動を定量的に把握できる有力な手法のひとつであろうと考えている。

文 献

- 1) 千畑一郎編, 固定化酵素, 講談社サイエンティフィック (1982).
- 2) 七字三郎, 微生物工学の応用, 共立出版 (1981).
- 3) 日本醗酵工学会編, 微生物工学, --基礎と応用-- 産業図書 (1983).
- 4) H. Tamiya and A. Yamamoto, *Acta Phytochim.* 7, 245 (1933).
- 5) J. P. Belaich, J. C. Senez and M. Murgier, *J. Bacteriol.* 95, 1750 (1968).
- 6) T. Kawabata, H. Yamano and K. Takahashi, *Agr. Biol. Chem.* 47, 1281 (1983).
- 7) M. Hashimoto and K. Takahashi, *Agr. Biol. Chem.* 46 (6), 1559 (1982).
- 8) T. Fujita and K. Nonomura, "Application of Calorimetry in Life Science" ed. by I. Lamprecht and B. Schaarschmidt, Walter de Gruyter, New York, 1977.
- 9) 興水精一, 安井浩司, 古賀邦正, 昭和 57 年度日本醗酵工学会大会講演要旨.
- 10) 安井浩司, 興水精一, 岡崎昌子, 古賀邦正, 昭和 58 年度日本農芸化学会講演要旨
- 11) 古賀邦正, 岡崎昌子, 昭和 59 年度日本農芸化学会講演要旨
- 12) M. Wada, J. Kato, I. Chibata, *J. Ferment. Technol.* 58, 327 (1980).
- 13) 山田直子, 岡崎昌子, 古賀邦正, 大隅正子, 昭和 59 年度日本電顕学会.
- 14) 岡崎昌子, 古賀邦正, 未発表.
- 15) M. Wada, J. Kato, and I. Chibata, *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotech.* 10, 275 (1980).
- 16) 八木佳明, 発酵と工業 41, 728 (1983).
- 17) 長島 實, 東 真幸, 野口貞夫, 大塚恵一, バイオマスとバイオテクノロジー '84, 日本能率協会 (1984).