氏名	南（みなみ） 清司（きよし）
学位の種類	工学博士
学位記番号	論工博第1300号
学位授与の日付	昭和55年5月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Studies on single cell protein production from methanol and on methods and apparatus for cultivation of methanol-utilizing yeasts （メタノールからの菌体生産とメタノール利用菌を培養するための方法，装置に関する研究）
論文調査委員	（主査）教授 福井三郎　教授 橋本健治　教授 河西三省

論文内容の要旨

メタノールを原料として微生物菌体の工業的生産を行うためには，使用菌の培養上の性能や培養技術に未解決な問題が残っている。これらは，(1)高い培養温度での増殖能の優れたメタノール資化性酵母が珍しいこと，(2)そのような酵母の能率的な分離・選択の方法が確立されていないこと，(3)増殖速度の大きい条件で培養可能な高い物質移動容量係数，K_Laを持つ発酵槽がないこと，(4)基質生育阻害を起させずにメタノールを供給するのに充分便利な方法や装置がないこと，(5)回分培養での生育曲線や連続培養中の定常状態などを自動的にモニターする方法や装置がないことなどである。本論文はこのような重要な問題を解決するために行われた研究結果をまとめたもののであって，内容は2編6章から成っている。

第一編では高温で大きい増殖速度を示すメタノール資化性菌の分離・選択法と，優れた性能を持った取得菌の菌学的諸性質，および工業的生産面からの性能に関する研究をまとめている。第1章では，メタノール資化性酵母の能率の良い分離・選択法について研究し，次の3点が重要であることは見い出した。即ち，(1)高温性の菌を得るためには，高温多湿の熱帯地方から採取した土壌を用いることが能率的であり，(2)集積培養には通常の試験管集積培養法が良く，(3)高増殖性菌の選択には，回分培養での比増殖速度に基づく選択法は不適当で，連続培養による生育速度の比較で選択する方が良いことなどを明らかにし，その結果既知酵母以上の性能を持つ21株の酵母を得た。

第2章は，これらの21株の菌の菌学的諸性質を調べ，分類学上の帰属位置を示した。これらの酵母は，*Pichia*, *Hansenula*, *Torulopsis* の3属に属し，*Hansenula polymorpha* に属した2株を除き，既知菌と同定できず，新菌種に属するとみられた。そこで，*Pichia* 属に属する1株を *P. methanothermo*, *Hansenula* 属に属した未同定の11株を生理的な性質の相異から2種に分け *H. thermophila* と *H. thailandia* に，また *Torulopsis* 属に属する7株をやはり2種に分け，*T. thermophila* と *T. thailandia* とそれぞれ命名した。これらの高温性，高増殖性の酵母の培養上の諸性質をあげると，最適生育温度は35～42.5℃，最適pH は4～6であり，生育因子としてビオチン単独，又はビオチンとチアミンを要求した。

第3章では，工業的な生産条件と同様な条件でこれらの酵母の培養性能を確認した。即ち，メタノール培地を用いた40℃の培養条件では，すべての供試菌が目標とした生産速度，$4.0\,g\cdot l^{-1}\cdot h^{-1}$ を充分に達成する優れた菌であることが明らかとなった。また，高温性，高増殖性のメタノール資化性酵母の対基質収率は36.6～39%で，粗タンパク質含有量は47.2～56.2%であった。

第二編では，培養技術上未解決な2，3の問題にたいする実施可能な具体的解決方法とその装置に関する研究成果を述べている。第1章では，圧力をかけなくても高い K_La を持つ新しい型の発酵槽を開発し，その性能について報告している。この発酵槽は，特徴として，多数の細孔を有する球型スパージャーと消泡のための高速回転翼を備えたもので，K_La として $1,864\sim3,108\,h^{-1}$ を示し，実際の培養では生産速度として $4.0\,g\cdot l^{-1}\cdot h^{-1}$ をほぼ常圧下で達成できる高性能のものであった。

第2章では，基質による生育阻害を阻止するようなメタノールの供給方法と装置について研究し，3種の実用上有効な装置を開発した。フラスコ内の培養で生育阻害を起させないためには，フラスコ中に小容器を吊るし，この中へメタノールを浸ませた脱脂綿を入れ，そこから基質を培地中へ蒸気で供給する方法が，メタノール資化性菌の生育阻害防止に顕著であった。一方，発酵槽中での生育阻害を減少するためには，2種類の方法を考案した。その一つは，発酵槽に導く空気の一部をメタノールで濡れたろ紙の筒中に導き，空気が基質のメタノール蒸気を同伴して発酵槽に導入される方法であり，他方は，メタノールをON-OFF の繰返し動作で少量ずつポンプで発酵槽へ供給するタイマーと，その供量を徐々に指数関数的に増加させるタイマーを組合せたプログラマーを用いる方法である。これらの装置を用いた実際の培養での生育を，供給基質濃度を一定に保って基質を加える通常の培養法のそれと比べると，生育阻害は大幅に減少することを認めた。

第3章は，回分培養における生育曲線や連続培養での定常状態をモニターできる新規方法とその装置の適用に関する研究である。この方法は，pH 自動制御装置で pH を一定に保つ場合に，そのアルカリ供給ポンプの積算作動期間が培養液中の菌体濃度に比例するという観察に基づいたものである。この作動期間を同期モーター，減速機，回転抵抗機，定電圧装置および計録計からなる装置で積分，記録できるようにした。本装置を用い，実際の培養の時間的経過をモニターすると，記録計上に記録される電圧変化は，培養液中の菌体濃度変化と良く一致していた。また，連続培養中の培養状態を本装置でモニターした場合においても，連続培養中に故意に起こす反応速度の変化状態や，定常状態の異常などが，モニターのためのサンプリング操作なしに肉眼で確認や察知ができることを証明した。

論文審査の結果の要旨

メタノールを原料として微生物活体を生産しタンパク質などの有用菌体成分を製造する計画は，地球的規模で見た場合近い将来に到来することが危惧される食糧不足に対処する有力な方法として国際的に熱心な研究が行われている。

本論文は，工業的にメタノールを原料として酵母菌体を生産するために重要な問題点，すなわち比較的に高い培養温度で良く増殖し栄養学的に優れた菌体を与える優良菌株を天然界より分離することと，この酵母を基質のメタノールによる増殖阻害を防ぎつつ大きい増殖速度で培養する装置に関するものである。

得られた成果を以下に列記する。

(1) 優秀な酵母菌株を分離・選択するための基本方法を設定し，それに基づいて，タイ国土壌より生育温度40℃前後で高い増殖能を持つ *Hansenula*, *Pichia* および *Torulopsis* 属の酵母21菌株を取得した。

(2) 上記の酵母を培養するために，多数の細孔を有する球型スパージャーと消泡のための高速回転翼を備え，物質移動容量係数 K_La として 1,864～3,108 h^{-1} を示す新型発酵槽を開発した。

(3) 基質メタノールによる酵母増殖阻害の問題を解決するために，供給空気中にメタノール蒸気を含有させる方法と，菌体の指数的増殖に応じてメタノールを供給する半回分操作とを採用したところ良好な結果が得られた。

(4) pH 自動制御装置で pH を一定に保つために必要なアルカリの積算消費量，すなわち一定流量で操作されているアルカリ供給ポンプの積算作動期間が菌体濃度に比例する事実に基づいて，回分培養における生育曲線や連続培養における定常状態をモニターする装置を考案した。

(5) 以上のような優良菌株と新型発酵槽の採用によって，40℃の培養温度での生産速度 4 $g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$ の目標を達成した。その場合の酵母の対基質収率は36.6～39%，粗タンパク質含有量は47～56%で，工業的実施の可能性が示された。

以上を要するに，本論文は安価な炭素源であるメタノールを用いて，酵母菌体を工業的規模で生産するための基礎的研究に成功した内容を述べたものであり，学術上ならびに工業上寄与するところが少なくない。

よって，本論文を工学博士の学位論文として価値あるものと認める。