

JAERI-M

9794

親水性担体を用いた放射線重合法による  
酵母の固定化

1981年11月

藤村 卓・嘉悦 勲

この報告書は、日本原子力研究所が JAERI-M レポートとして、不定期に刊行している研究報告書です。入手、複製などのお問い合わせは、日本原子力研究所技術情報部（茨城県那珂郡東海村）あて、お申しこしください。

JAERI-M reports, issued irregularly, describe the results of research works carried out in JAERI. Inquiries about the availability of reports and their reproduction should be addressed to Division of Technical Information, Japan Atomic Energy Research Institute, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken, Japan.

親水性担体を用いた放射線重合法による酵母の固定化

日本原子力研究所高崎研究所開発試験場

藤村 卓・嘉悦 敷

(1981年10月21日受理)

酵母の固定化に高分子の放射線による重合法を応用した。この放射線重合法に必要な酵母に対する照射の効果，冷却の効果，放射線重合性モノマーの効果調べ，これらの効果が，作用を受けた酵母を好氣的に培養することによって，完全に回復し得ることを見出した。固定化した酵母のエタノール生産能力は，固定化物を好氣的に培養する時間の増加と共に増大した。このことから，固定化酵母を好氣的に培養することによって，固定化物内部で酵母が増殖することが明らかとなった。固定化増殖酵母におけるエタノール生産能力の最大値は，固定化物と同様に好氣的に培養することによって増殖させた，固定化しない酵母の生産能力の約3倍に達した。

Immobilization of Yeast Cells with Hydrophilic Carrier  
by Radiation-Induced Polymerization

Takashi FUJIMURA and Isao KAETSU  
Pilot Scale Research Station,  
Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment,  
JAERI

(Received October 21, 1981)

Radiation-induced polymerization method was applied to the immobilization of yeast cells. The effects of irradiation, cooling and monomer, which are necessary for polymerization, were recovered completely by subsequent aerobical incubation of yeast cells. The ethanol productivity in immobilized yeast cells increased with the increase of aerobical incubation period. The growth of yeast cells in immobilized yeast cells was indicated. The maximum ethanol productivity in immobilized yeast cell system was around three times as much as that in free yeast cell system.

Keywords: Radiation-Induced, Polymerization, Yeast, Immobilization, Cell, Radiation, Effect, Hydrophilic, Carrier

## 目 次

1. 序 論 .....	1
2. 材料と方法 .....	1
2.1 微 生 物 .....	1
2.2 固定化の一般的方法に準じた放射線による固定化 .....	1
2.3 放射線重合を用いた固定化増殖酵母 .....	2
2.4 分析方法 .....	2
3. 結果と議論 .....	2
3.1 酵母の放射線照射効果 .....	2
3.2 酵母の冷却効果 .....	3
3.3 酵母に対するモノマーの効果 .....	3
3.4 放射線によるポリマーの重合反応進行度 .....	3
3.5 総合的な固定化条件の検討 .....	4
3.6 放射線重合を用いた固定化増殖酵母 .....	4
4. 結 論 .....	5
文 献 .....	6

## Contents

1.	Introduction .....	1
2.	Materials and Methods .....	1
2.1	Microorganisms .....	1
2.2	Immobilization of Yeast Cells by Radiation- Induced Polymerization According to Traditional Immobilization Method .....	1
2.3	Immobilized Growing Cells by Radiation-Induced Polymerization .....	2
2.4	Analytical Method .....	2
3.	Results and Discussion .....	2
3.1	The Effect of Irradiation on Yeast Cells up to Various Dosage at Some Temperatures .....	2
3.2	The Effect of Cooling on Yeast Cells .....	3
3.3	The Effect of Monomers on Yeast Cells .....	3
3.4	The Degree of Polymerization by Irradiation up to Various Dosages .....	3
3.5	General Investigation for Immobilization Condition .....	4
3.6	Immobilized Growing Cells by Radiation-Induced Polymerization .....	4
4.	Conclusion .....	5
5.	References .....	6

## 1. 序 論

固定化微生物が有用な化合物を作り出すのに有益であることが明らかになってきた。<sup>1)</sup> また燃料用エタノールを得ることを目的として、酵母の固定化について多くの研究がなされて来た。<sup>2),3)</sup> 酵母を固定化することにより、発酵によるエタノール製造プロセスを連続化することができ、プロセス全体のコストを低減できる。最近、千畑らはカラギーナンを担体とする固定化増殖酵母を報告した。彼らは、極めて少量の酵母を担体に固定化した。この固定化物を完全培地で培養すると、液体培地内での固定化しない通常の酵母よりも、より密に酵母が増殖することを彼らは明らかにした。

我々は先に放射線重合法が光によって水を分解し、水素ガスを得るプロセスの一部として用いられる葉緑体の固定化に応用できることを示した。<sup>5-8)</sup> 葉緑体において最も失活しやすい活性である、光化学系Ⅱの酸素発生の活性が、固定化葉緑体において、固定化しない葉緑体にくらべて約20倍も長く維持されることがわかった。この放射線重合法を、他の微生物や、<sup>9)</sup> 酵素を固定化するのにも用いた。<sup>10)</sup>

酵母は、この放射線重合法で固定化することができると思われる。この放射線重合法によれば、固定化物の担体の性質、例えば、弾性、構造等を比較的容易に変えることができる。従ってこの放射線重合法は、担体の性質と酵母の増殖に最適な条件との関係を明らかにするための手がかりとして用いることが可能である。放射線照射によって、酵母の一部は損傷を受けるであろうが、生き残った酵母は担体内において増殖すると予想される。

本研究においては、放射線重合法による酵母の固定化の研究の第一歩として、酵母に対する放射線の効果を調べ、次に、固定化のための一方法について検討した。

## 2. 材料と方法

### 2.1 微生物

酵母は *Saccharomyces formosensis* を用いた。酵母を好氣的条件、30℃で、1%グルコース、0.1%糖蜜、0.5%ペプトン、0.3%酵母エキス、0.3%麦芽エキスを含む前培養培地 (pH 5.0) で24時間前培養した。

### 2.2 固定化の一般的方法に準じた放射線による固定化

巻いたガーゼを滅菌し、酵母の前培養液に浸した。この酵母の付着した巻ガーゼを濾過滅菌したメトキシポリエチレングリコールメタアクリレート (M-23G) または、ポリエチレングリコールジメチルアクリレート (14G) と前培養培地の混合物 (モノマー濃度10%) に浸し

## 1. 序 論

固定化微生物が有用な化合物を作り出すのに有益であることが明らかになってきた<sup>1)</sup>。また燃料用エタノールを得ることを目的として、酵母の固定化について多くの研究がなされて来た<sup>2),3)</sup>。酵母を固定化することにより、発酵によるエタノール製造プロセスを連続化することができ、プロセス全体のコストを低減できる。最近、千畑<sup>4)</sup>らはカラギーナンを担体とする固定化増殖酵母を報告した。彼らは、極めて少量の酵母を担体に固定化した。この固定化物を完全培地で培養すると、液体培地内での固定化しない通常の酵母よりも、より密に酵母が増殖することを彼らは明らかにした。

我々は先に放射線重合が光によって水を分解し、水素ガスを得るプロセスの一部として用いられる葉緑体の固定化に応用できることを示した<sup>5-8)</sup>。葉緑体において最も失活しやすい活性である、光化学系Ⅱの酸素発生の活性が、固定化葉緑体において、固定化しない葉緑体にくらべて約20倍も長く維持されることがわかった。この放射線重合法を、他の微生物や、酵素<sup>9),10)</sup>を固定化するのにも用いた。

酵母は、この放射線重合法で固定化することができると思われる。この放射線重合法によれば、固定化物の担体の性質、例えば、弾性、構造等を比較的容易に変えることができる。従ってこの放射線重合法は、担体の性質と酵母の増殖に最適な条件との関係を明らかにするための手がかりとして用いることが可能である。放射線照射によって、酵母の一部は損傷を受けるであろうが、生き残った酵母は担体内において増殖すると予想される。

本研究においては、放射線重合法による酵母の固定化の研究の第一歩として、酵母に対する放射線の効果を調べ、次に、固定化のための一方法について検討した。

## 2. 材料と方法

### 2.1 微生物

酵母は *Saccharomyces formosensis* を用いた。酵母を好氣的条件、30℃で、1%グルコース、0.1%糖蜜、0.5%ペプトン、0.3%酵母エキス、0.3%麦芽エキスを含む前培養培地 (pH 5.0) で24時間前培養した。

### 2.2 固定化の一般的方法に準じた放射線による固定化

巻いたガーゼを滅菌し、酵母の前培養液に浸した。この酵母の付着した巻ガーゼを濾過滅菌したメトキシポリエチレングリコールメタアクリレート (M-23G) または、ポリエチレングリコールジメチルアクリレート (14G) と前培養培地の混合物 (モノマー濃度10%) に浸し

た。試料に無菌条件下で $^{60}\text{Co}$ からの $\gamma$ 線を $1 \times 10^6 \text{ rad/h}$ の線量率で1時間照射して固定化した。

固定化された酵母を、10%グルコース、1%糖蜜、0.15%酵母エキス、0.25% $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.55% $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1% $\text{NaCl}$ 、0.001% $\text{CaCl}_2$ および0.3%乳酸を含む完全培地(pH 5.0)で良く洗浄した。洗浄した固定化酵母を完全培地を用いてゆっくりと振盪しながら培養して、生成したアルコール濃度を定量した。一定期間培養した後、固定化物を良く洗浄し、固定化物と等体積の完全培地を加えて、 $30^\circ\text{C}$ で1時間、ゆっくりと振盪して、生成したエタノールを定量した。

### 2.3 放射線重合を用いた固定化増殖酵母

少量の酵母を含む前培養培地に巻きガーゼを浸した。この酵母の付着した巻きガーゼを、 $M-23G$ または $14G$ と前培養培地の混合物(モノマー濃度10%)に浸し、 $0^\circ\text{C}$ または $25^\circ\text{C}$ で $5 \times 10^4 \text{ rad}$   $\gamma$ 線を照射した。固定化担体中に残存しているモノマーをとり除くために、完全培地で良く洗浄した。固定化された酵母を、滅菌した三角フラスコに移し、完全培地中で急速に振盪しながら好氣的条件下で $30^\circ\text{C}$ で培養した。

### 2.4 分析方法

生成したエタノールは、アルコールデヒドロゲナーゼ<sup>11)</sup>を用いて定量した。対照実験に用いた固定化しない酵母の数は、drop-plate method によって計数し、液体培地 $1\text{ml}$ 当りの酵母数として表わした。

## 3. 結果と議論

### 3.1 酵母の放射線照射効果

放射線重合法による酵母の固定化の可能性を確認するために、各種温度での酵母に対する照射効果を調べ、図1に示した。前培養培地中で50時間、次に完全培地中で46時間、 $30^\circ\text{C}$ で培養した。酵母の数を培養時間に対してプロットし図1に示した。照射直後には、 $25^\circ\text{C}$ 、 $0^\circ\text{C}$ 、 $-24^\circ\text{C}$ の各温度で照射した試料中の酵母の数は、未照射の対照試料における酵母の数に比べて、ずっと少ない。しかし、培養時間と共に、照射した試料中の酵母数は増加する。96時間培養すると、照射試料中の酵母数は、対照試料中の酵母数とほぼ等しくなる。

照射した酵母の形の変化を光学顕微鏡で連続的に観察した。その一部の写真を図2に示す。照射直後には、酵母の一部の形は異常な形をしていたが、他は正常な形であった(図2(a)参照)。照射した酵母を $30^\circ\text{C}$ で培養すると、正常な酵母の割合は急速に増加した。96時間培養後には、照射したすべての酵母の形は完全に正常となった(図2(b)参照)。

た。試料に無菌条件下で $^{60}\text{Co}$ からの $\gamma$ 線を $1 \times 10^6$  rad/hの線量率で1時間照射して固定化した。

固定化された酵母を、10%グルコース、1%糖蜜、0.15%酵母エキス、0.25%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.55%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.025%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1%  $\text{NaCl}$ 、0.001%  $\text{CaCl}_2$  および0.3%乳酸を含む完全培地(pH 5.0)で良く洗浄した。洗浄した固定化酵母を完全培地を用いてゆっくりと振盪しながら培養して、生成したアルコール濃度を定量した。一定期間培養した後、固定化物を良く洗浄し、固定化物と等体積の完全培地を加えて、30°Cで1時間、ゆっくりと振盪して、生成したエタノールを定量した。

### 2.3 放射線重合を用いた固定化増殖酵母

少量の酵母を含む前培養培地に巻きガーゼを浸した。この酵母の付着した巻きガーゼを、M-23Gまたは14Gと前培養培地の混合物(モノマー濃度10%)に浸し、0°Cまたは25°Cで $5 \times 10^4$  rad  $\gamma$ 線を照射した。固定化担体中に残存しているモノマーをとり除くために、完全培地で良く洗浄した。固定化された酵母を、滅菌した三角フラスコに移し、完全培地中で急速に振盪しながら好氣的条件下で30°Cで培養した。

### 2.4 分析方法

生成したエタノールは、アルコールデヒドロゲナーゼ<sup>11)</sup>を用いて定量した。対照実験に用いた固定化しない酵母の数は、drop-plate methodによって計数し、液体培地1ml当りの酵母数として表わした。

## 3. 結果と議論

### 3.1 酵母の放射線照射効果

放射線重合法による酵母の固定化の可能性を確認するために、各種温度での酵母に対する照射効果を調べ、図1に示した。前培養培地中で50時間、次に完全培地中で46時間、30°Cで培養した。酵母の数を培養時間に対してプロットし図1に示した。照射直後には、25°C、0°C、-24°Cの各温度で照射した試料中の酵母の数は、未照射の対照試料における酵母の数にくらべて、ずっと少ない。しかし、培養時間と共に、照射した試料中の酵母数は増加する。96時間培養すると、照射試料中の酵母数は、対照試料中の酵母数とほぼ等しくなる。

照射した酵母の形の変化を光学顕微鏡で連続的に観察した。その一部の写真を図2に示す。照射直後には、酵母の一部の形は異常な形をしていたが、他は正常な形であった(図2(a)参照)。照射した酵母を30°Cで培養すると、正常な酵母の割合は急速に増加した。96時間培養後には、照射したすべての酵母の形は完全に正常となった(図2(b)参照)。

照射した酵母の数と形が回復することが明らかになった。しかし、照射直後の酵母の数は、対照の未照射試料にくらべて、約 $1/10$ であった。照射直後の酵母の数を増加させるために、より少ない照射線量における酵母の照射効果を検討し、表 I に示した。照射線量が $10^6$  rad から $10^5$  rad までは照射した酵母の数は対照の未照射試料の $1/10$ 以下であった。しかし、 $5 \times 10^4$  rad 以下の照射線量では、照射した酵母を $30^\circ\text{C}$ で24時間培養すると、対照の未照射試料における酵母の数とほぼ同数となった。一方図 1 で示したように、 $10^6$  rad 照射の場合には、照射した酵母の数が、対照試料における酵母の数と同数になるには96時間を要した。 $5 \times 10^4$  rad 以下の照射線量では、未照射試料と同数まで回復するのに要する時間が $1/4$ であることがわかる。このように $5 \times 10^4$  rad 以下の照射線量の場合、酵母の数の回復が顕著であることがわかった。これらの結果は、放射線照射による酵母の固定化の可能性を開くものである。

### 3.2 酵母の冷却効果

酵母に対する冷却の効果と、冷却後の $30^\circ\text{C}$ における培養による回復を表 II に示す。前培養培地中の酵母を $0^\circ\text{C}$ に1時間冷却し、次に $30^\circ\text{C}$ で培養した。18時間培養後に冷却した酵母の数は、対照の試料である冷却しない酵母の数の約半分であった。24時間培養すると、冷却した酵母の数は冷却しない酵母の数とほぼ同数となった。これらの結果は、 $0^\circ\text{C}$ 冷却した酵母の冷却による損傷が、 $30^\circ\text{C}$ 培養によって回復することを示している。

### 3.3 酵母に対するモノマーの効果

酵母を放射線重合によって固定化する際に用いる最も良いモノマーを見出すために、酵母に対するモノマーの効果調べ、結果を表 III に示した。前培養培地中の酵母にモノマーを加えた後、酵母を $30^\circ\text{C}$ で24時間培養した。24時間培養した後には、M-23Gまたは2-ヒドロキシメタクリレート (HEMA) を加えた試料中の酵母の数は、対照のモノマーを加えない試料中の酵母の数とほぼ同じであった。

### 3.4 放射線によるポリマーの重合反応進行度

放射線による酵母の損傷は、完全培地と共に好氣的培養することによって回復可能であるが、放射線量が少ない程より望ましいことは3.1の結果から明らかである。このため、低線量での放射線重合反応の反応の完結度を調べた。結果を表 IV に示す。 $5 \times 10^4$  rad 以下では酵母の放射線照射効果が少ないことが3.1からわかったが、 $5 \times 10^4$  rad では放射線重合は完結はしないが、半分程度進んでいる。本研究の場合、親水性の担体を用いて、構造物とし、その表面または表面近くに酵母をしみこませ、その上からポリマーで被覆方法をとっているため、重合が完結せず、担体をゆるやかな状態で被覆方が目的にかなって好都合である。残存モノマーは完全培地で洗浄することにより除去できる。

### 3.5 総合的な固定化条件の検討

前節までの固定化のための諸条件の検討をふまえて、固定化増殖酵母法で固定化するための最も良い固定化条件を見出すために、酵母を、これまでに良く行われてきた方法に準じた放射線による固定化法で酵母の固定化を行った（実験方法の詳細は2.2参照）。放射線照射して固定化した後、固定化酵母を完全培地と共に滅菌した三角フラスコに移し、極めてゆっくりと振盪しながら30°Cで培養した。対照試料として、固定化に用いた酵母と同数の酵母も、固定化酵母と同じ方法で培養した。24時間極めてゆっくりと振盪しながら培養した後の結果を表Ⅰに示す。この方法で固定化した酵母において、24時間の培養中に生成されたエタノールの量は対照の固定化しない酵母によって生成されたエタノールの量の半分以上であった。この場合、担体内で酵母は増殖しておらず、最初に固定化された酵母のみがエタノールの生成に寄与していると考えられる。このため固定化物で得られたエタノール濃度は固定化しない酵母にくらべてそれ程高くない。この点を改善するために、次に固定化増殖酵母法を検討した。

### 3.6 放射線重合法を用いた固定化増殖酵母

少量の酵母を固定化した固定化担体を、好氣的条件で激しく振盪しながら、成長に必要な栄養分を含む完全培地中、30°Cで培養した。24時間ごとに完全培養液を交換した。

各種の長さの好氣的培養期間(A)の後、固定化酵母の一部を、別の滅菌した三角フラスコに移し、完全培地で良く洗浄した。これは好氣的条件で培養した時に副成的に生成したアルコールを取り除き、また、固定化物表面に付着している酵母を除去するため、完全培地を3回換えて、固定化酵母を良く洗浄した。洗浄した固定化物のアルコール生産能力を試験するために、固定化物と同体積の完全培地と共に、30°Cで1時間、ゆっくりと振盪した。1時間ゆっくりと振盪した後、生成したアルコール濃度(B)を定量した。1時間の培養で生成したアルコールの濃度(B)と激しく振盪する好氣的条件下での培養時間(A)との関係を調べた。結果を図3に示す。

好氣的条件下での培養時間が0の場合、1時間培養で生成するエタノール濃度(B)は、極めて低かった。(図3の最初の点を参照)しかし、図3からわかるように、好氣的条件下での培養時間(A)が増加すると、1時間の培養で生成するエタノール濃度(B)は急速に増加した。72時間好氣的培養した後には、1時間培養で得られるエタノール濃度は、約1%に達した。この場合、1時間培養のエタノール生成中に、固定化物の表面から激しい炭酸ガスの発生が観察された。

対照試料として、固定化する際に用いた少量の酵母と同数の酵母を、滅菌した三角フラスコに移し、完全培地を用いて、固定化物と同じ方法で好氣的条件下で培養し、24時間ごとに培養液を交換した。好氣的に激しく振盪しながら、ある一定期間(A)培養した後、酵母を含む完全培地を別の滅菌した三角フラスコに移し、同体積の新しい完全培地と共に1時間ゆっくりと振盪した後、エタノール濃度(B')を定量した。好氣的に激しく振盪した期間(A')と固定化しない酵母によって生成したエタノール濃度(B')との関係を図3に示した。この固定化しない酵母

の場合は、好氣的培養による酵母数の変化も調べ図4に示した。

図3に示すように、固定化しない酵母において1時間培養後のエタノール濃度は、72時間の好氣的な激しい振盪培養後に、最大値0.3%に達した。この固定化しない酵母の場合、好氣的培養時間の变化に対してエタノール濃度は、あまり変化しない。一方固定化しない酵母の数は、図4に示したように、72時間の好氣的培養後、完全培地1ml当たり $1.5 \times 10^9$ ヶという明らかな最大値を示す。図3に示したように、固定化酵母を用いて1時間培養でエタノールを生産させると1%のエタノール濃度が得られた。この値は固定化しない酵母の値、0.3%の約3倍である。

千畑<sup>4)</sup>らは彼らの固定化増殖酵母が、固定化しない酵母の生産するエタノール濃度の10倍の濃度のエタノールを生産することを報告した。彼らの固定化増殖酵母においては、酵母の $10^8$ ヶ当りのエタノールの比生産能力( $\text{mg alcohol}/10^8 \text{ cells/h}$ )は、固定化しない酵母の能力とほぼ同じであった。彼らの結果は、担体中の酵母の比生産能力が完全に用いられていることを示している。すなわち固定化酵素などでよくあるように、担体で囲まれているために、基質との反応が多少妨げられて、酵母の生産能力が低下することがない。

我々の現在の仕事においては、固定化した酵母におけるエタノール濃度は、固定化していない酵母における濃度の約3倍であった。エタノール生産能力は、酵母 $10^8$ ヶ当りの比生産能力と酵母の数との積に比例する。固定化した酵母の比生産能力は、固定化しない酵母の能力より高くなることはない。本研究において、固定化した酵母では、基質との反応が、担体によって妨げられて、比生産能力が固定化しない酵母の能力より少ないことも有り得る。従って、本研究の固定化酵母における一定体積内の酵母の数は、固定化しない系における同体積内の酵母の数の3倍に等しいか、または、それ以上であると考えることが妥当である。これらの結果は、本研究においても、担体の中で酵母が固定化しない酵母よりも密に増殖していることを示している。

#### 4. 結 論

放射線照射によって酵母の一部は、損傷を受けるが、その後の好氣的培養によって回復しうることがわかった。放射線重合法を用いて酵母が固定化でき、その酵母が担体内において、固定化しない場合の3倍またはそれ以上の密度で増殖することが明らかとなった。また、密に増殖した固定化増殖酵母は、固定化しない酵母にくらべて約3倍のエタノール生産性を示した。このような固定化増殖酵母に関する報告は、千畑らの報告に続き二番目のものである。

我々の現在の結果はさらに改善することができるであろう。なぜならば、放射線重合法によれば、担体の性質を他の方法によるよりも、より自由に変えることができるからである。改善した方法での検討結果を近い将来示すことができると思われる。

固定化増殖酵母を用いることにより、グルコースを酵母を用いた発酵反応によりエタノールを生産するプロセスを連続化でき、またエタノール生産能力を高めることができる。これまでの発酵反応は1回毎の培養反応で行われてきたが、連続化、生産性の向上により、エタノール

の場合は、好氣的培養による酵母数の変化も調べ図4に示した。

図3に示すように、固定化しない酵母において1時間培養後のエタノール濃度は、72時間の好氣的な激しい振盪培養後に、最大値0.3%に達した。この固定化しない酵母の場合、好氣的培養時間の変化に対してエタノール濃度は、あまり変化しない。一方固定化しない酵母の数は、図4に示したように、72時間の好氣的培養後、完全培地1ml<sup>4)</sup>当り  $1.5 \times 10^9$  ケという明らかな最大値を示す。図3に示したように、固定化酵母を用いて1時間培養でエタノールを生産させると1%のエタノール濃度が得られた。この値は固定化しない酵母の値、0.3%の約3倍である。

千畑らは彼らの固定化増殖酵母が、固定化しない酵母の生産するエタノール濃度の10倍の濃度のエタノールを生産することを報告した。彼らの固定化増殖酵母においては、酵母の  $10^8$  ケ当りのエタノールの比生産能力 ( $\text{mg alcohol} / 10^8 \text{ cells} / \text{h}$ ) は、固定化しない酵母の能力とほぼ同じであった。彼らの結果は、担体中の酵母の比生産能力が完全に用いられていることを示している。すなわち固定化酵素などでよくあるように、担体で囲まれているために、基質との反応が多少妨げられて、酵母の生産能力が低下することがない。

我々の現在の仕事においては、固定化した酵母におけるエタノール濃度は、固定化していない酵母における濃度の約3倍であった。エタノール生産能力は、酵母  $10^8$  ケ当りの比生産能力と酵母の数との積に比例する。固定化した酵母の比生産能力は、固定化しない酵母の能力より高くなることはない。本研究において、固定化した酵母では、基質との反応が、担体によって妨げられて、比生産能力が固定化しない酵母の能力より少ないことも有り得る。従って、本研究の固定化酵母における一定体積内の酵母の数は、固定化しない系における同体積内の酵母の数の3倍に等しいか、または、それ以上であると考えることが妥当である。これらの結果は、本研究においても、担体の中で酵母が固定化しない酵母よりも密に増殖していることを示している。

#### 4. 結 論

放射線照射によって酵母の一部は、損傷を受けるが、その後の好氣的培養によって回復しうることがわかった。放射線重合法を用いて酵母が固定化でき、その酵母が担体内において、固定化しない場合の3倍またはそれ以上の密度で増殖することが明らかとなった。また、密に増殖した固定化増殖酵母は、固定化しない酵母にくらべて約3倍のエタノール生産性を示した。このような固定化増殖酵母に関する報告は、千畑らの報告に続き二番目のものである。

我々の現在の結果はさらに改善することができるであろう。なぜならば、放射線重合法によれば、担体の性質を他の方法によるよりも、より自由に変えることができるからである。改善した方法での検討結果を近い将来示すことができると思われる。

固定化増殖酵母を用いることにより、グルコースを酵母を用いた発酵反応によりエタノールを生産するプロセスを連続化でき、またエタノール生産能力を高めることができる。これまでの発酵反応は1回毎の培養反応で行われてきたが、連続化、生産性の向上により、エタノール

生産コストを大きく引き下げることができるであろう。このことはエネルギー源としてのエタノール生産をより容易にすることを意味する。

## 文 献

- (1) I. Chibata, Immobilized Enzymes, John Wiley and Sons, Inc. New York, (1978).
- (2) M. Kierstan and C. Buck, Biotechnol. Bioeng. 19, 387 (1977).
- (3) J. M. Navarro and G. Durand, Eur. J. Appl. Microbiol. 4, 243 (1977).
- (4) M. Wada, J. Kato and I. Chibata, Eur. J. Appl. Microbiol. 10, 275 (1980).
- (5) T. Fujimura, F. Yoshii, I. Kaetsu, Y. Inoue and K. Shibata, Z. Naturforsch. 35c, 477 (1980).
- (6) I. Kaetsu, F. Yoshii and T. Fujimura, Z. Naturforsch. 35c, 1052 (1980).
- (7) T. Fujimura, F. Yoshii and I. Kaetsu, Plant Physiol. 67, 351 (1981).
- (8) F. Yoshii, T. Fujimura and I. Kaetsu, Biotechnol. Bioeng. 23, 833 (1981).
- (9) M. Kumakura, M. Yoshida and I. Kaetsu, J. Appl. Microbiol. Biotech. 6, 13 (1978).
- (10) I. Kaetsu, M. Kumakura and M. Yoshida, Biotechnol. Bioeng. 21, 847 (1979).
- (11) R. Bonichsen, in "Method of Enzymatic Analysis", H. U. Bergmeyer, Ed. (Academic Press, New York, 1971) p. 285.

生産コストを大きく引き下げることができるであろう。このことはエネルギー源としてのエタノール生産をより容易にすることを意味する。

## 文 献

- (1) I. Chibata, Immobilized Enzymes, John Wiley and Sons, Inc. New York, (1978).
- (2) M. Kierstan and C. Buck, Biotechnol. Bioeng. 19, 387 (1977).
- (3) J. M. Navarro and G. Durand, Eur. J. Appl. Microbiol. 4, 243 (1977).
- (4) M. Wada, J. Kato and I. Chibata, Eur. J. Appl. Microbiol. 10, 275 (1980).
- (5) T. Fujimura, F. Yoshii, I. Kaetsu, Y. Inoue and K. Shibata, Z. Naturforsch. 35c, 477 (1980).
- (6) I. Kaetsu, F. Yoshii and T. Fujimura, Z. Naturforsch. 35c, 1052 (1980).
- (7) T. Fujimura, F. Yoshii and I. Kaetsu, Plant Physiol. 67, 351 (1981).
- (8) F. Yoshii, T. Fujimura and I. Kaetsu, Biotechnol. Bioeng. 23, 833 (1981).
- (9) M. Kumakura, M. Yoshida and I. Kaetsu, J. Appl. Microbiol. Biotech. 6, 13 (1978).
- (10) I. Kaetsu, M. Kumakura and M. Yoshida, Biotechnol. Bioeng. 21, 847 (1979).
- (11) R. Bonichsen, in "Method of Enzymatic Analysis", H. U. Bergmeyer, Ed. (Academic Press, New York, 1971) p. 285.

Table I. Effect of irradiation on yeast cells at lower dosage.

Irradiation condition		Living cells (No x 10 <sup>-7</sup> /ml)
dosage (rad)	temperature (°C)	
control(without irradiation)		125
10 <sup>6</sup>	-24	5
	0	2.5
10 <sup>5</sup>	-24	10
	0	12.5
	25	10
5 x 10 <sup>4</sup>	0	50
	25	100
10 <sup>4</sup>	0	65
	25	150
5 x 10 <sup>3</sup>	0	87.5
	25	60

One ml of precultured yeast cells were irradiated and incubated with 10 ml of preculture medium at 30°C for 24 h.

Table II. Effect of cooling on yeast cells.

Cooling temperature	Number of yeast cells (No x 10 <sup>-7</sup> /ml)		
	original number	incubation time	
		18 h	24 h
control (30°C)		150	150
0°C		75	140
	12		
-24°C		150	150
-78°C		50	150

One ml of precultured yeast cells were cooled down to various temperatures for 1 h and warmed up to 30°C rapidly and incubated at 30°C with 10 ml of complete medium.

Table III. Effect of monomer on yeast cells.

Monomer	Living cell (No x 10 <sup>-7</sup> /ml)
control (without monomer)	80
HEMA	62
HEA	30
M-23G	78

Ten ml of precultured yeast cells were incubated with 0.1 ml of various monomers at 30°C for 24 h.

Table IV. Degree of polymerization progress by irradiation up to various dosages.

Monomer (concentration)	Polymerization condition		Degree of polymerization progress
	temperature (°C)	dosage (rad)	
M-23G (10 %)	0	$5 \times 10^3$	less than half
		$1 \times 10^4$	less than half
		$5 \times 10^4$	half
		$7 \times 10^4$	complete
	25	$5 \times 10^3$	less than half
		$1 \times 10^4$	less than half
		$5 \times 10^4$	half
		$1 \times 10^5$	complete
$^{14}\text{G}$ (10 %)	0	$1 \times 10^4$	less than half
		$5 \times 10^4$	half
		$1 \times 10^5$	complete
	25	$1 \times 10^4$	less than half
		$5 \times 10^4$	half
		$7 \times 10^4$	complete

Table V. Ethanol production by homogeneously immobilized yeast cells.

Immobilization condition			Ethanol concentration (%)
irradiation dose (rad)	irradiation temperature (°C)	monomer concentration (%)	monomer concentration (%)
$5 \times 10^4$	25	N-23G 10	2.7
$1 \times 10^5$	0	14G 10	4.53
Free cells <sup>a</sup>			5.19

The batch production of ethanol was carried out by homogeneously immobilized yeast cells using complete medium with shaking at 30°C for 24 h.

<sup>a</sup> Same number of free yeast cells as that of yeast cells homogeneously immobilized were suspended in the complete medium.

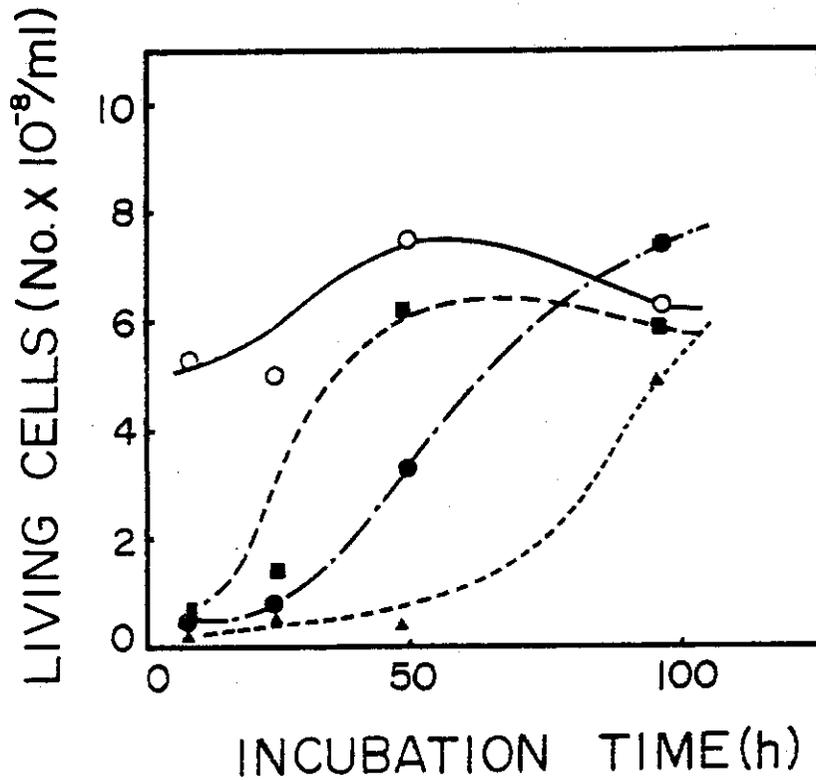
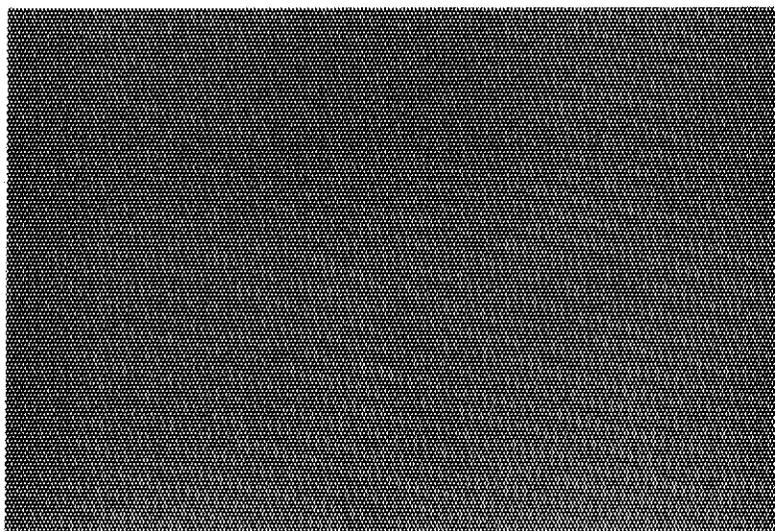


Fig. 1 Effect of irradiation at various temperatures on yeast cells. The precultured yeast cells was irradiated up to 1 Mrad at various temperatures. Irradiated yeast cells were incubated at  $30^\circ\text{C}$  in preculture medium for 50 h and then in complete medium for 46 h. (o) control, (■)  $-24^\circ\text{C}$  irradiation (●)  $0^\circ\text{C}$  irradiation, (▲)  $25^\circ\text{C}$  irradiation.

(a)



(b)

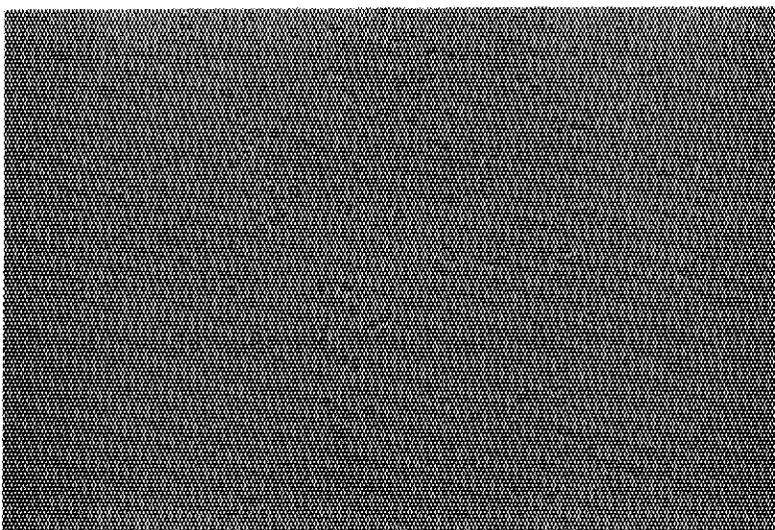
  
50 $\mu$ m

Fig. 2 (a) Precultured yeast cells were irradiated at 0°C up to 1 Mrad. Irradiated yeast cells were incubated at 30°C in preculture medium for 24 h. (b) The sample treated as (a) was incubated at 30°C in preculture medium for 26 h and then in complete medium for 46 h.

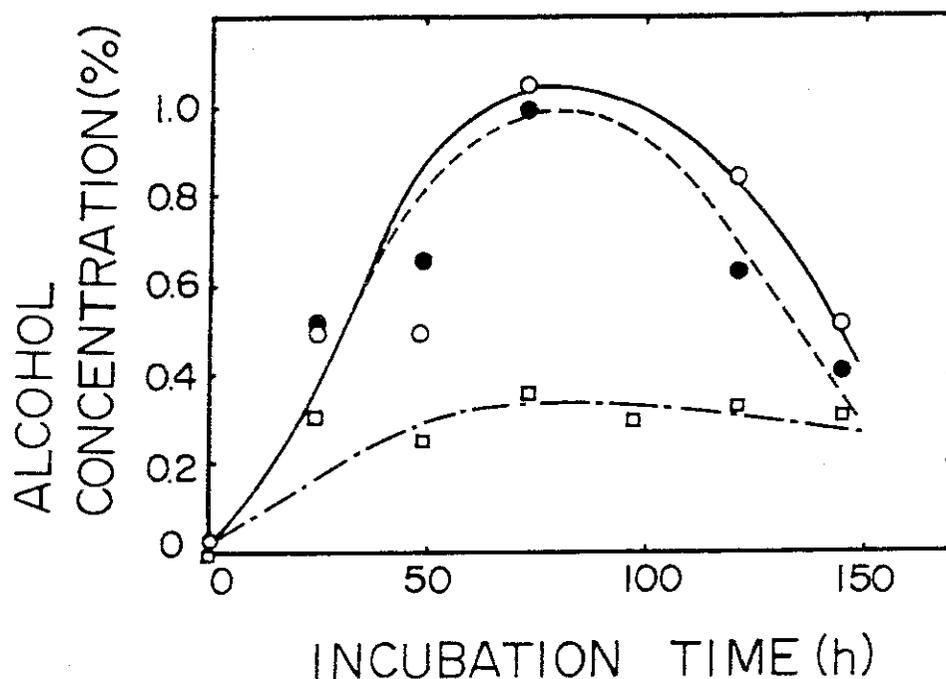


Fig. 3 The change of ethanol concentration for 1 h batch production of ethanol in immobilized growing yeast cells system. Carrier matrix trapped a small number of yeast cells was incubated aerobically at 30°C for various periods(A). Immobilized yeast cells were washed well with complete medium. One hour batch ethanol production was carried out by using these immobilized yeast cells, and ethanol concentration(B) was measured. The relation between A and B is shown in this figure. As a control, free cells were incubated aerobically for various periods(A'). Alcohol concentration(B') after 1-h ethanol production was measured under the same conditions as immobilized yeast cells as described in text precisely. Irradiation conditions and monomer concentration;  
 (○)  $5 \times 10^4$  rad, 25°C, 10% M-23G; (●)  $5 \times 10^4$  rad, 25°C, 10% 14G  
 (□) free yeast cells.

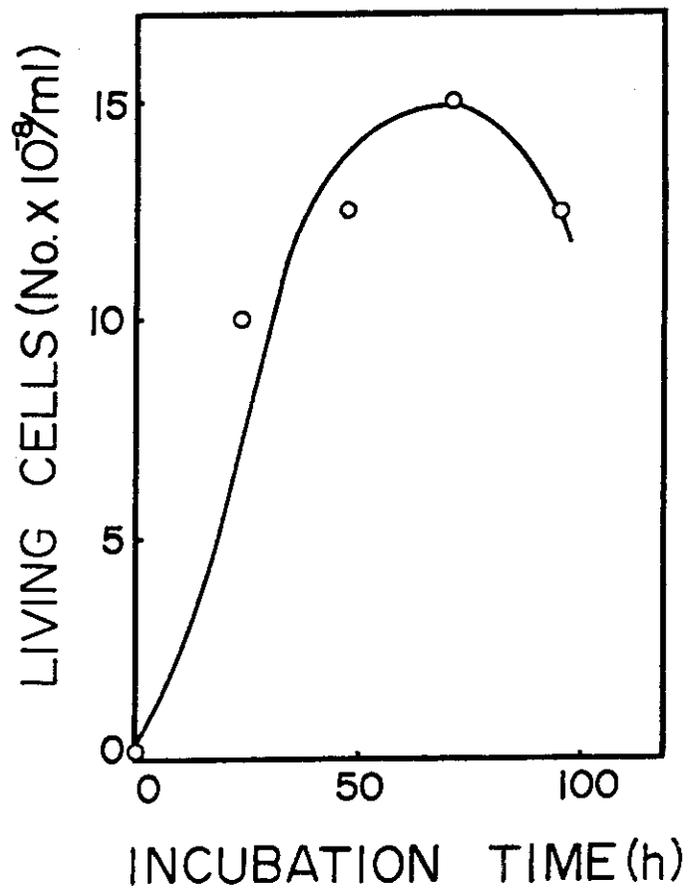


Fig. 4 The change in number of free yeast cells. The number of free cells incubated aerobically shown in Fig. 3 was plotted against incubation time.