

糖化と発酵の機能を持つ遺伝子組換え菌の育種とバイオプロセスの研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16693

氏名	小林 史 尚
生年月日	
本籍	京都府
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	博乙第 277 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	論文博士（学位規則第 4 条第 2 項）
学位授与の題目	糖化と発酵の機能を持つ遺伝子組換え菌の育種とバイオプロセスの研究
論文審査委員(主査)	中村 嘉利（工学部・助教授）
論文審査委員(副査)	清水 宣明（自然計測応用研究センター・教授）中本 義章（工学部・教授） 瀧本 昭（工学部・教授）民谷 栄一（北陸先端科学技術大学院大学・教授）

学 位 論 文 要 旨

Abstract: Though pollutant of toxic materials is usually kept under the allowable contaminant levels in Japan, the pollutant of organic materials such as starch, cellulose, and lignin does not satisfy. From the viewpoint of energy conversion of biomass, starch is the most utilizable resource in plant biomass and can be hydrolyzed enzymatically into fermentable sugar available to microorganisms. However, the practical application of energy conversion of starch is not easy now because its efficiency is low i.e. 0.5-1.3. The purpose of this work is to achieve high efficiency on the bioprocess producing ethanol from starch. The simultaneous saccharification and fermentation of liquefied potatoes using mixed microorganisms, *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces cerevisiae*, was studied and it found that ethanol production rate increased but ethanol yield hardly increased. For the increase of ethanol yield, recombinant yeast having saccharification and fermentation activities was investigated. *S. cerevisiae* SR93 was bred by integrating a glucoamylase-producing gene (*STA1*) into the chromosome of *S. cerevisiae* SH1089. The ethanol yield using the recombinant yeast was higher than that using mixed microorganisms. *S. cerevisiae* SR96 was bred by inactivating the *MAT* locus repressed the repression of the glucoamylase gene (*STA1*) of *S. cerevisiae* SR93, and the direct ethanol conversion gave the highest ethanol production rate in the various incubation systems. A mathematical model for the direct ethanol conversion from starch was proposed and analyzed using the recombinant yeast for more efficient conversion. This model consisted of the reaction rate equations for glucoamylase synthesis in the recombinant yeast, starch degradation by a glucoamylase, cell growth, production of glucose, and production of ethanol. The calculated values were in satisfactory agreement with the experimental data in a batch culture using *S. cerevisiae* SR93 and SR96. As an analysis, the stabilities of steady states in continuous ethanol production from starch were investigated using this model with *S. cerevisiae* SR93 and SR96. The continuous ethanol production using *S. cerevisiae* SR96 was more stable than that using *S. cerevisiae* SR93. As an application of bioreactor, a mathematical model of direct ethanol production from starch in immobilized recombinant yeast culture was developed using *S. cerevisiae* SR96. By comparing the ethanol productivity and the dilution rate of washout in an immobilized cell with those in a free cell culture, it was confirmed that the immobilized cell culture had a higher ethanol productivity than the free cell culture and produced ethanol continuously with a dilution rate of 0.5 h^{-1} , i.e. about 10 times that of washout in a free cell culture.

1. 緒論

デンプン質物質は、一般家庭の台所、デンプン製造業、蒸留酒・混成酒製造業、ぶどう糖・水あめ製造業などを起源とする生活雑排水や食品工業・醸造業・医薬品工業などの事業場排水に多く含まれ、BODの汚濁負荷割合が高く、排水処理法の開発が急務となっている¹⁾。また、食品の製造、流通、消費から生ずる加工残さ、食べ残し等の厨介廃棄物にもデンプン質物質が多く含まれ、わが国で年間1,100万トンも排出されているが、現在その大部分が焼却・埋め立て処理されている状況にある^{1,2)}。

一方、デンプン質物質は、植物性バイオマスの中で最も豊富に存在する再生可能な生物資源であり、その資源化について種々研究が行われている^{3,4)}。ブラジルではキャッサバ等、アメリカではトウモロコシ等を原料にしてエタノールを生産し、ガソリンに添加することによって燃料として用いている³⁾。しかしながら、現在のデンプンからのエタノール変換システムでは、生産エネルギーと消費エネルギーの比が0.5から1.3と低く⁴⁾、迅速かつ高効率なバイオプロセスの開発が期待されている。

本研究では、迅速かつ高効率なデンプンからのエタノール変換システム(バイオプロセス)の開発を目的として、混合菌による同時糖化発酵、遺伝子組換えによるアミラーゼ生産酵母の育種、数式モデルの表示とその連続エタノール生産における解析、バイオリクターの開発としての固定化菌培養法の応用と解析を検討した。

2. 糖化プロセスによるデンプンの分解と発酵プロセスによるエタノール生産

厨介廃棄物・排水に多く含まれるデンプンの加水分解とそのエタノール変換についてジャガイモを用いて試みた。水蒸気爆砕によって加水分解された液化ジャガイモのpH、粘度、成分について明らかにした。糖化菌である *Aspergillus awamori* と発酵菌である *Saccharomyces cerevisiae* の混合菌による液化ジャガイモの同時糖化発酵が行われ、その回分培養、連続培養、流加培養について検討された。混合菌を用いた同時糖化発酵は、逐次発酵に比べてエタノール生産速度が速くなったが、エタノール収率ではあまり高くならなかった。この理由は、エタノールを生産しない糖化菌(*A. awamori*)がその増殖のためにデンプンを消費するためであると考えられる。

3. 遺伝子組換えによるグルコアミラーゼ生産酵母の育種

混合菌を用いた同時糖化発酵における低いエタノール収率の問題を解決するために、発酵酵母にアミラーゼ遺伝子を組込んだアミラーゼ生産酵母を育種し、単一菌によるデンプンからの直接エタノール変換が試みられた。遺伝子組換え酵母、*S. cerevisiae* SR93 はデンプン資化性酵母 *S. diastaticus* 由来のグルコアミラーゼ遺伝子(*STA1* 遺伝子)を発酵酵母 *S. cerevisiae* SH1089 の染色体に相同性組換え法を用いて組込むことによって育種された。さらにグルコアミラーゼ生産速度を増加させるために、*S. cerevisiae* SR96 の育種は、*S. cerevisiae* SR93 のグルコアミラーゼ遺伝子(*STA1* 遺伝子)のリプレッサーである *MAT* 遺伝子を不活性化することによって行われた。図1はグルコアミラーゼ遺伝子(*STA1* 遺伝子)の挿入と *MAT* 遺伝

子不活性化の確認のために行われた遺伝子組換え酵母染色体のサザンブロット分析の結果を示す。*STAI* 遺伝子をプローブとした場合は、宿主である SH1089 株にバンドが検出されず、SR93 株と SR96 株に検出されたことから、組換え酵母にはグルコアミラーゼ遺伝子が挿入されていることが確認された。*MAT* 遺伝子不活性化に用いられた *LEU2* 遺伝子をプローブとした場合は SH1089 株と SR93 株には従来から存在する *LEU2* 遺伝子 1 本、SR96 株には不活性化のために挿入された *LEU2* 遺伝子 2 本が検出されたことから、SR96 株はグルコアミラーゼ遺伝子のリプレッサー遺伝子である *MAT* 遺伝子が不活性化されたことが確認された。

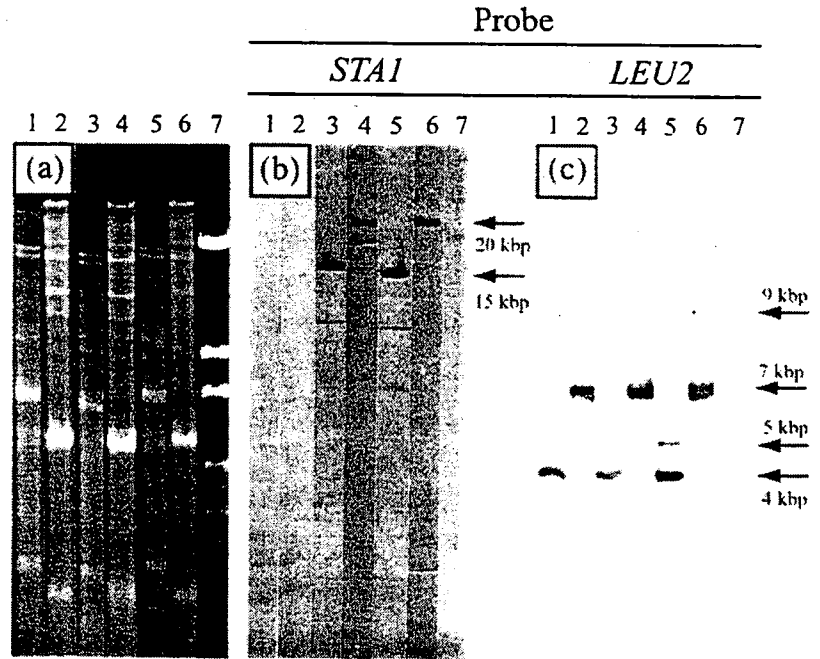


図1 遺伝子組換え酵母のサザンブロット分析

4. 数式モデルの提出とパラメータの推算

遺伝子組換えによるアミラーゼ生産酵母を用いたデンプンからのエタノール変換の効率化のために、数式モデルを提出し、そのパラメータ推算と妥当性の検討を行った。数式モデルは組換え酵母におけるグルコアミラーゼ合成速度式、合成されたグルコアミラーゼによるデンプン分解速度式、菌体増殖速度式、グルコース生産速度式、エタノール生産速度式からなり、特にグルコアミラーゼ合成速度式はジオキシモデル、デンプン分解とグルコース生産速度式はデンプン構造変化を考慮して表示された。グルコアミラーゼ mRNA 合成速度式、グルコアミラーゼ合成速度式、デンプン分解速度式、菌体増殖速度式、グルコース生産速度式、とエタノール生産速度式は、それぞれ式(1)から(6)のように表される。

$$\frac{d\Phi_{Gm}}{dt} = \phi_{Gm} \left\{ \frac{1}{1 + (C_{GL}/\eta_{GL})^{n_{GL}}} \right\} \left(\frac{C_{ST}}{C_{ST} + C_{ST}^0} \right) C_X - \psi_{Gm} \Phi_{Gm} \quad (1)$$

$$\frac{dC_{GA}}{dt} = \phi_{GA} \Phi_{Gm} - \psi_{GA} (1 + \psi_{ET} C_{ET}^{n_{ET}}) C_{GA} \quad (2)$$

$$\frac{dC_{ST}}{dt} = - \frac{\{ (AC_{ST}/C_{ST} + B)k_{ST6} + (1 - AC_{ST}/C_{ST} - B)k_{ST4} \} \exp(aC_{ST}/C_{ST} + b) C_{ST} C_{GA}}{[\{ (AC_{ST}/C_{ST} + B)K_6 + (1 - AC_{ST}/C_{ST} - B)K_4 \} (cC_{ST}/C_{ST} + d) + C_{ST}] \{ 1 + (C_{ET}/H_{ET})^{n_{ET}} \}} \quad (3)$$

$$\frac{dC_X}{dt} = \frac{\mu_{max} C_{GL}}{(K_X + C_{GL}) \{ 1 + (C_{ET}/H_{ET})^{n_{ET}} \}} C_X \quad (4)$$

$$\frac{dC_{GL}}{dt} = \frac{\{ (AC_{ST}/C_{ST} + B)k_{GL6} + (1 - AC_{ST}/C_{ST} - B)k_{GL4} \} \exp(aC_{ST}/C_{ST} + b) C_{ST} C_{GA}}{[\{ (AC_{ST}/C_{ST} + B)K_6 + (1 - AC_{ST}/C_{ST} - B)K_4 \} (cC_{ST}/C_{ST} + d) + C_{ST}] \{ 1 + (C_{ET}/H_{ET})^{n_{ET}} \}} - \frac{1}{Y_X} \frac{\mu_{max} C_{GL} C_X}{(K_X + C_{GL}) \{ 1 + (C_{ET}/H_{ET})^{n_{ET}} \}} \quad (5)$$

$$\frac{dC_{ET}}{dt} = k_{EA} \frac{C_{GL} C_X}{(K_X + C_{GL}) \{ 1 + (C_{ET}/H_{ET})^{n_{ET}} \}} + k_{EB} \frac{C_{GL} C_X}{K_X + C_{GL}} \quad (6)$$

ここで、 Φ_{Gm} , C_{GA} , C_{ST} , C_X , C_{GL} はそれぞれグルコアミラーゼ mRNA 濃度、グルコアミラーゼ濃度、デンプン濃度、菌体濃度、グルコース濃度である。その他の記号はそれぞれの速度式におけるパラメータである。式(1)から(6)において用いられたパラメータは組換え酵母を用いた種々の回分培養実験から求められた。グルコアミラーゼ mRNA 合成速度定数 (ϕ_{Gm}) は *S. cerevisiae* SR93 と SR96 で唯一異なるパラメータであり、*S. cerevisiae* SR93 は 7.74 h^{-1} 、*S. cerevisiae* SR96 は 13.7 h^{-1} であった。図2は *S. cerevisiae* SR93 (a)

とSR96 (b)を用いた時のデンプンからのエタノール変換における計算値と実験値の比較を示す。図中の破線は式(1)から(6)と求められたパラメータを用いた計算値を示す。*S. cerevisiae* SR96の最大エタノール濃度は*S. cerevisiae* SR93のそれとほぼ同じであったが、*S. cerevisiae* SR93の最大エタノール濃度に達する時間が100 hであったのに比べて*S. cerevisiae* SR96は約70 hと短かった。*S. cerevisiae* SR96のグルコアミラーゼ mRNA 合成速度定数は*S. cerevisiae* SR93よりも約1.8倍大きいので、デンプン分解速度、エタノール生産速度などが急激に増加したためと考えられる。これらの結果から、本研究で提出した数式モデルは遺伝子組換え酵母を用いたデンプンからの直接エタノール変換に適用できることがわかった。

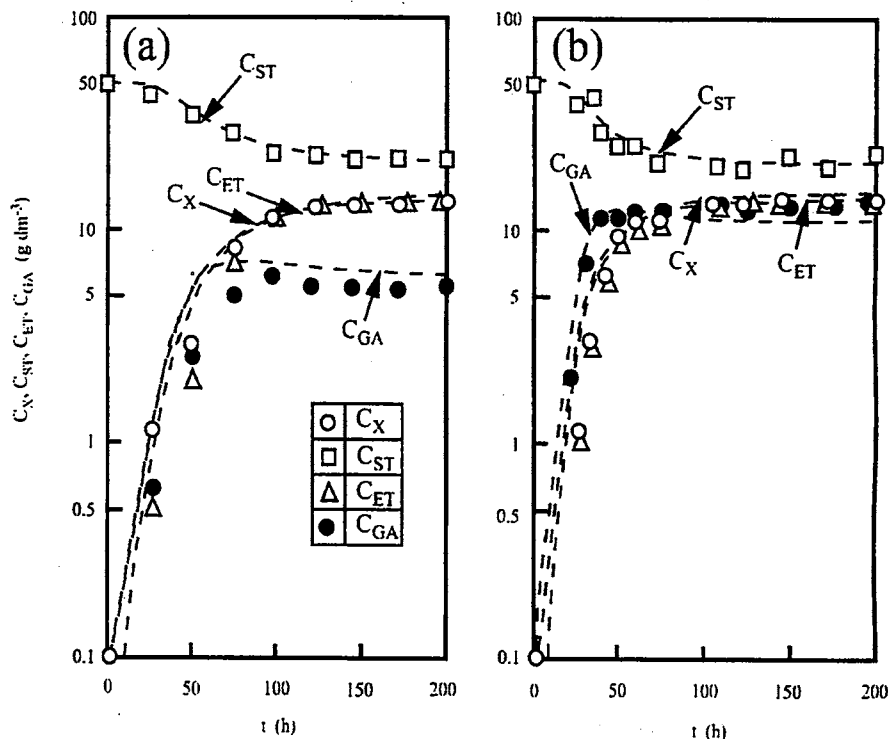


図2 計算値と実験値の比較

5. 連続培養におけるエタノール生産と培養操作

先に提出した数式モデルを応用して連続培養におけるデンプン分解、菌体増殖とエタノール生産の動的挙動を検討し、*S. cerevisiae* SR93とSR96の2種の組換え酵母を用いたデンプンからの直接エタノール変換の連続培養における定常状態の安定性解析を試みた。まず最初に、定常値が計算された。定常値は連造培養の物質収支式の左辺である蓄積速度が0のときであるから、これを代入した非線形6元連立微分方程式を解くことによって、それぞれの希釈率と供給デンプン濃度における定常値を求めた。定常状態の安定性は以下のように特異点近傍における線形微分方程式によって解析された。定常状態の微小変動変数 $x_1, x_2, x_3, x_4, x_5,$ と x_6 は、一次近似の原理によって線形化すると、微小変動に対する線形微分方程式、式(7)または(8)が導出される。

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ x_4 \\ x_5 \\ x_6 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & a_{14} & a_{15} & a_{16} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & a_{24} & a_{25} & a_{26} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & a_{34} & a_{35} & a_{36} \\ a_{41} & a_{42} & a_{43} & a_{44} & a_{45} & a_{46} \\ a_{51} & a_{52} & a_{53} & a_{54} & a_{55} & a_{56} \\ a_{61} & a_{62} & a_{63} & a_{64} & a_{65} & a_{66} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ x_4 \\ x_5 \\ x_6 \end{bmatrix} \quad (7)$$

$$\dot{\mathbf{x}} = \mathbf{A}\mathbf{x} \quad (8)$$

定常状態の局所安定性は式(9)の特性行列式 \mathbf{A} から決定される。

$$\det(\lambda\mathbf{E} - \mathbf{A}) = 0 \quad (9)$$

ここで \mathbf{E} は単位行列であり、 λ は固有値である。固有値実部全てが負のとき、定常状態は安定であるが、固有値実部が正のとき、定常状態は不安定である。固有値の単根の実数部が0と等しいとき、定常状態は安定であり、固有値の重根の実数部が0と等しいとき、定常状態は不安定である。図3はそれぞれ*S. cerevisiae* SR93 (a)とSR96 (b)を用いて種々の希釈率と供給デンプン濃度でデンプンを

エタノール変換した連続培養における定常状態の安定性解析結果を示す。図中の領域Iは全定常点数が3、安定な定常点数が1(エタノールを生産する安定な定常点)を、領域IIは全定常点数が3、安定な定常点数が2(エタノールを生産する安定な定常点と washout)を、領域IIIは全定常点数が1、安定な定常点数が1(washout)を示す。たった1つのエタノールを生産する安定な定常点が存在する領域Iの場合は、比較的大きな外乱でも非常に安定であると思われ操作しやすいと考えられる。2つの安定な定常点(エタノールを生産する安定な定常点と washout)が存在する領域IIの場合は、washoutを避けるために速度定数に影響を及ぼす温度や pH といった操作条件も制御することや適した希釈率と供給デンプン濃度を選択することが必要である。領域IIIの場合は、washout という非常に好ましくないシステムになることが明らかになった。それぞれの領域の面積を *S. cerevisiae* SR93 と SR96 の間で比較した結果、*S. cerevisiae* SR96 の領域 I の面積は *S. cerevisiae* SR93 の約 1.2 倍であった。*S. cerevisiae* SR93 の領域 III の面積は *S. cerevisiae* SR96 の約 2.5 倍であった。これらの結果から、リプレッサー遺伝子の不活性化はエタノールを生産する安定な定常状態が存在する操作領域を増加させるこ

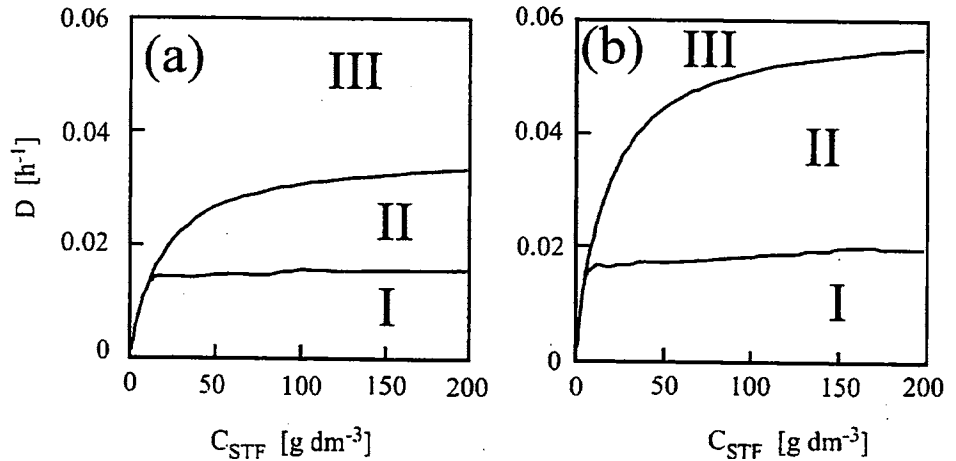


図3 定常状態の安定性解析

とが明らかになった。

6. 実用化のためのバイオプロセスの応用

実用化のためのバイオプロセスの応用として、アルギン酸ナトリウムによる包括法を用いた固定化菌培養を試みた。先に提出した数式モデルを固定化菌培養に拡張し、固定化遺伝子組換えアミラーゼ生産酵母を用いたデンプンからのエタノール生産を表示した。ゲルビーズ内において、グルコアミラーゼ mRNA、グルコアミラーゼ、と菌体が拡散によって移動できず、デンプン、グルコース、とエタノールが拡散によって移動できると仮定すると、それぞれのゲルビーズ内濃度の速度式は先に提出した浮遊懸濁菌の回分培養における式(1)から(6)より式(10)から(15)によって表すことができる。

$$\frac{\partial \Phi_{BGM}}{\partial t} = \phi_{Gm} \left\{ \frac{1}{1 + (C_{BGL}/\eta_{GL})^{\eta_{GL}}} \right\} \left(\frac{C_{BST}}{C_{ST} + C_{BST}} \right) C_{BX} - \psi_{Gm} \Phi_{BGM} \quad (10)$$

$$\frac{\partial C_{BGA}}{\partial t} = \phi_{GA} \Phi_{BGM} - \psi_{GA} (1 + \psi_{ET} C_{BET}^{n_{ET}}) C_{BGA} \quad (11)$$

$$\frac{\partial C_{BX}}{\partial t} = \frac{\mu_{max} C_{BGL}}{(K_X + C_{BGL}) \{1 + (C_{BET}/H_{ET})^{n_{ET}}\}} C_{BX} \quad (12)$$

$$\frac{\partial C_{BST}}{\partial t} = \psi_{ST} \left(\frac{\partial^2 C_{BST}}{\partial r^2} + \frac{2\partial C_{BST}}{r\partial r} \right) - \frac{\{(AC_{ST}/C_{ST0} + B)k_{ST6} + (1 - AC_{ST}/C_{ST0} - B)k_{ST4}\} \exp(\alpha C_{ST}/C_{ST0} + b) C_{BST} C_{BGA}}{\{[(AC_{ST}/C_{ST0} + B)K_6 + (1 - AC_{ST}/C_{ST0} - B)K_4] (c_{ST}/C_{ST0} + d) + C_{BST}\} \{1 + (C_{BET}/H_{ET})^{n_{ET}}\}} \quad (13)$$

$$\frac{\partial C_{BGL}}{\partial t} = \psi_{GL} \left(\frac{\partial^2 C_{BGL}}{\partial r^2} + \frac{2\partial C_{BGL}}{r\partial r} \right) + \frac{\{(AC_{ST}/C_{ST0} + B)k_{GL6} + (1 - AC_{ST}/C_{ST0} - B)k_{GL4}\} \exp(\alpha C_{ST}/C_{ST0} + b) C_{BST} C_{BGA}}{\{[(AC_{ST}/C_{ST0} + B)K_6 + (1 - AC_{ST}/C_{ST0} - B)K_4] (c_{ST}/C_{ST0} + d) + C_{BST}\} \{1 + (C_{BET}/H_{ET})^{n_{ET}}\}} - \frac{1}{Y_X} \frac{\mu_{max} C_{BGL} C_{BX}}{(K_X + C_{BGL}) \{1 + (C_{BET}/H_{ET})^{n_{ET}}\}} \quad (14)$$

$$\frac{\partial C_{BET}}{\partial t} = \Psi_{ET} \left(\frac{\partial^2 C_{BET}}{\partial r^2} + \frac{2\partial C_{BET}}{r\partial r} \right) + k_{EA} \frac{C_{BGL}}{(K_X + C_{BGL}) \{1 + (C_{BET}/H_{ET})^{n_{ET}}\}} C_{BX} + k_{EB} C_{BX} \frac{C_{BGL}}{K_X + C_{BGL}} \quad (15)$$

ここで、 Ψ_{ST} 、 Ψ_{GL} 、と Ψ_{ET} はそれぞれゲルビーズにおけるデンプンの拡散係数、グルコースの拡散係数、とエタノールの拡散係数を示す。式(10)から(15)を初期条件と境界条件を与えて計算することによって、それぞれの濃度の経時変化がシミュレートできる。固定化された *S. cerevisiae* SR96 を用いたデンプンからの直接エタノール変換の回分培養と連続培養において計算値と実験値がほぼ一致し、固定化数式モデルの妥当性が確認された。図4は *S. cerevisiae* SR96 を用いてデンプンから連続エタノール生産するシミュレートしたときの定常値における浮遊懸濁菌培養(a)と固定化菌培養(b)の比較を示す。浮遊懸濁菌培養は希釈率約 0.05 h^{-1} 以上で washout するのに対し、固定化菌培養ではその 10 倍の 0.5 h^{-1} でも washout しなかった。また、最大エタノール生産性は浮遊懸濁菌培養において 0.02 h^{-1} で $0.43 \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ 、固定化菌培養において 0.4 h^{-1} で $3.5 \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ であり、効率的にエタノールを生産できることが明らかになった。

7. 結論

糖化と発酵の機能を持つ遺伝子組換え酵母を用いたバイオプロセスの効率化の研究から以下の知見を得た。

- (1) 混合菌を用いた同時糖化発酵は逐次培養よりも迅速にデンプンからエタノールを生産できた。
- (2) 糖化と発酵の機能を持つ遺伝子組換え酵母を用いたデンプンからのエタノール生産は混合菌を用いた同時糖化発酵よりも迅速かつ高効率にエタノールを生産できた。
- (3) 組換え酵母におけるグルコアミラーゼ合成速度式、デンプンの構造変化を考慮したデンプン分解速度式、菌体増殖速度式、グルコース生産速度式、エタノール生産速度式からなる数式モデルを表示し、求められたパラメータを用いた計算値は実験値とよく一致した。
- (4) 提出された数式モデルを用いて連続培養における安定性解析を検討した結果、リプレッサー遺伝子を不活性化させた組換え酵母 (*S. cerevisiae* SR96) は不活性化しない組換え酵母 (*S. cerevisiae* SR93) よりも定常状態の安定性が増加し効率的にエタノールを生産することが明らかになった。
- (5) *S. cerevisiae* SR96 の固定化菌を用いたデンプンからのエタノール生産は、浮遊懸濁菌培養よりも 10 倍以上も効率的にエタノールを生産できることがわかった。

Nomenclature

A 特性マトリックス [-]: A 式(3)の定数 [-]: a 式(3)の定数 [-]: B 式(3)の定数 [-]: b 式(3)の定数 [-]: c 式(3)の定数 [-]: d 式(3)の定数 [-]: C 濃度 [g dm^{-3}]: D 希釈率 [h^{-1}]: E 単位マトリックス [-]: H 菌体増殖の阻害定数 [g dm^{-3}]: I 酵素反応の阻害定数 [g dm^{-3}]: K 飽和定数、Michaelis 定数 [g dm^{-3}]: k 速度定数 [h^{-1}]: N ゲルビーズの数 [-]: n 合成または分解反応次数 [-]: r ゲルビーズの中心からの距離 [dm]: R ゲルビーズの半径 [dm]: t 時間 [h]: V 容積 [dm^3]: $x_1, x_2, x_3, x_4, x_5, x_6$ 定常状態の微小変動変数: Y 収率 [-]: α 菌体増殖の

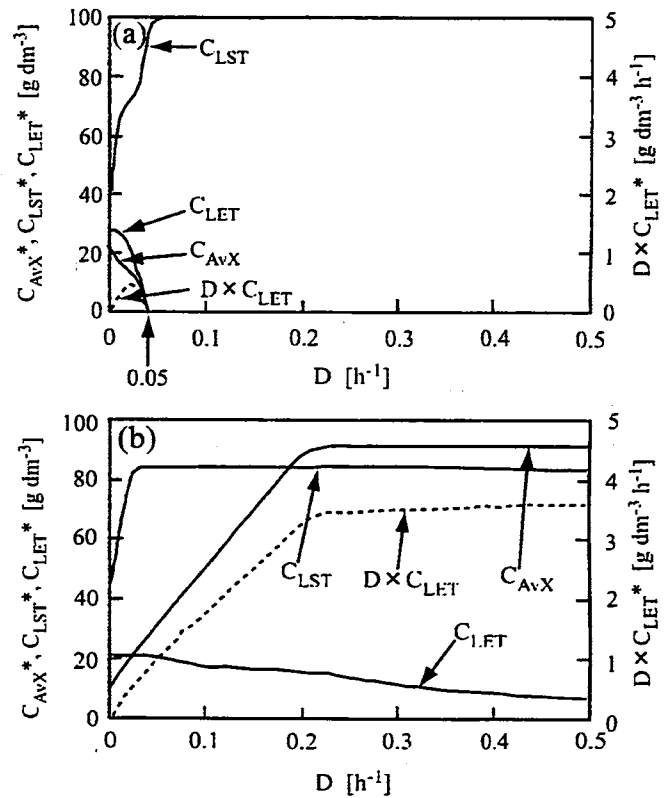


図4 定常値における浮遊懸濁菌培養と固定化菌培養の比較

阻害反応次数 [-]: β 酵素阻害反応次数 [-]: η 反応活性 [g dm^{-3}]: λ 固有値 [-]: μ 比
増殖速度 [h^{-1}]: ξ 平衡定数 [g dm^{-3}]: Φ 細胞内濃度 [g dm^{-3}]: ϕ 細胞内速度定数 [h^{-1}]:
 ψ 細胞内崩壊定数 [h^{-1}]

(Subscripts)

B ゲルビーズ: ET エタノール: EA 菌体増殖によるエタノール生成: EB 菌体維持代謝によるエタノール生成: GA グルコアミラーゼ: GL グルコース: Gm グルコアミラーゼの mRNA: L
液体培地: max 最大: ST デンプン: X 菌体: 0 初期: 6 α -1,6-グルコシド結合: 4 α -1,4-
グルコシド結合: * 定常状態

Literature cited

- 1) 環境庁; 環境白書 平成 13 年度版、ぎょうせい、東京 (2002)
- 2) 坂 志郎; バイオマス・エネルギー・環境、アイピーシー、東京 (2001)
- 3) 日本エネルギー学会; バイオマスハンドブック、オーム社、東京 (2002)
- 4) 鈴木 修一; バイオマスエネルギー変換、講談社、東京 (1983)

学位論文審査結果の要旨

平成 15 年 11 月 27 日に口頭発表及び第 1 回学位論文審査委員会を行い、審査方針を決定するとともに、論文の内容について検討した。さらに、平成 16 年 1 月 15 日に口頭発表及び第 2 回学位論文審査委員会を開催し、以下の通り判定した。

本論文は、植物性廃棄物や食品残渣物から迅速かつ高効率で有用物質を生産するための遺伝子組換え菌の育種とバイオプロセスに関する工学的研究である。グルコアミラーゼ遺伝子である *STAI* 遺伝子をアルコール発酵酵母の染色体に組み込み、新規の遺伝子組換えアミラーゼ生産酵母を育種した。さらに、グルコアミラーゼ遺伝子の発現を抑制する *MAT* 遺伝子を不活性化し、アミラーゼを大量に生産できる遺伝子組換え酵母も育種した。遺伝子発現メカニズムを考慮に入れた増殖モデル式を提出し、遺伝子組換え酵母の実験値との比較によりモデル式の妥当性を立証した。次に、連続培養の定常状態の安定性をモデル式によって解析し、エタノールを高効率で生産する定常状態の安定性に及ぼす抑制遺伝子 (*MAT* 遺伝子) の影響を明らかにした。また、デンプン物質から高濃度エタノールを連続生産するために遺伝子組換え酵母をアルギン酸カルシウムゲルビーズに固定化したバイオリクターを開発した。以上のように、本論文は遺伝子組換え菌の育種とそのバイオプロセスに関する新展開として価値ある知見の提出と早急な実用化が待たれる高レベルの研究成果であり、博士 (工学) 論文に値すると判定した。