■ 純 粋 培 養 法

1. 回 分 培 養*

岡 崎 光 雄**

は じ め に

微生物を取扱う場合、その体系の複雑性と多様性よりいろいろな観点、いろいろなレベルで観察されるべきものとする。しかしその現象の再現性、特に定量的な再現性には常に悩まされる問題である。またどのような観点からどのようにしたら、観察したい現象を引き出すことができるであろうか。非常に難しい問題である。

ここでは主に著者らの行なったカビの回分培養における増殖非連動型の酵素生産を一例にとり、この研究プロセスを追いつながり、回分培養における微生物の取り扱いについて、述べたいと思う。

1. 増殖非連動型の培養

微生物による發酵型式を分類した場合、種々の観点よりいろいろな分類が提唱¹⁻³⁾ されているが、菌体の増殖に関連させて分けた場合、大きく二つの型に分けることができる。一つは増殖速度と目的物質の生産速度がほぼ一致する増殖連動型であり、他は増殖期における目的物質の生産は抑制されており、増殖が衰えるころより生産が活発になる増殖非連動型である。

ここで例にあげたカビ (*Aspergillus niger*) の菌体外酵素 (アミラーゼ) 生産は典型的な増殖非連動型を示す。このような生産型の培養においては、増殖を何によって制限するかがまず問題となる。一つの合目的な考え方として、炭素源や窒素源を増殖制限基質にすると、増殖停止期の酵素生産期におけるエネルギー源や目的生産物中の材料が不足となり、不適当と考えられる。そこで菌体構成成分の一つと考えられる核酸 (アデニン) 要求性⁴⁾ にして、これを増殖制限基質にしてやれば、増殖停

止期においても、目的物質の活発な生産が期待できる。図1は野性株とそのアデニン要求株⁴⁾ における窒素源およびアデニンを増殖制限基質にした場合の酵素生産性を示したものである。図より明らかなように、アデニン要求株においては、アデニン欠乏に基づく比増殖速度 ($\mu = 1/X(dX/dt)$, X : 菌体濃度) の低下した増殖制限下において、高い比酵素生産速度 ($\varepsilon = 1/X(dE/dt)$, E : 酵素濃度) の持続が現われている。この場合培地条件は、多少の変動に対しても現象の再現性に影響が現れないように、増殖制限基質を除いては、すべて過剰の条件にしてある。また、この酵素は誘導酵素であり、誘導物質としてのデンプンがなくなると脱誘導現象を来たし、酵素生産が衰えるので、デンプンを大過剰にしてあ

増殖制限基質: (A) 窒素源, (B) アデニン

図1 *Aspergillus niger* の野性株 (A) およびアデニン要求株 (B) によるグルコamilラーゼ生産

表1 グルタミン酸生産菌の環境要因による酵転換

制御因子	酵 酵 転 換
NH_4^+	$\alpha\text{-ケトグルタル酸} \rightarrow \text{グルタミン酸} \rightarrow \text{グルタミン}^{1-3)}$ (欠乏) (適量) (過剰)
リン酸	バ リ $\rightarrow \text{グルタミン酸}^{9)}$ (高濃度) (適量)
ビオチン	乳酸またはコハク酸 $\rightarrow \text{グルタミン酸}^{10)}$ (飽和) (欠乏)
酸素	乳酸またはコハク酸 $\rightarrow \text{グルタミン酸}^{11)}$ (欠乏) (過剰)
pH	$N\text{-アセチルグルタミン} \rightarrow \text{グルタミン酸}^{12)}$ (酸性) (中性~微アルカリ性)

* 昭和48年6月7日受理

** Mitsuo Okazaki (正会員) 大阪大学薬学部 製薬化学科

図2 比増殖速度 (μ) と増殖制限基質濃度 (S) (アデニン) の逆数プロット

る。しかし一般には、生産された酵素により誘導物質が分解され、その分解物が酵素生産を抑制するいわゆる catabolite repression の現象、すなわちグルコースなどの存在で酵素生産が抑制される現象を示す場合もあり、また一例として表1に示すように、グルタミン酸醗酵における培養条件による醗酵転換現象もあるので、制限基質を除いてすべて過剰ならばよいとすることには注意を要する。なお、微生物の代謝制御機構を応用して変異株を用いた醗酵生産については成書¹³⁾を参照されたい。

ここで本菌の回分培養における基本操作について少し触れておく。本菌の培養は、三角フラスコに培地を容積の1/10~1/5入れ、植菌したのちに、ペレット形成および壁面増殖などの防止のため、回転振盪培養にて行なった。一般には目的にあった容器(試験管、肩付フラスコなど)で往復振盪でもよく、また簡単にはフラスコを恒温槽に入れ、マグネットスターラーで撹拌してもよい。要は酸素供給をよくしてやればよいわけである。通常の振盪培養では酸素移動係数が $k_{La} \approx 20 \sim 100/\text{hr}$ 、菌体の酸素消費速度が $Q_{O_2} \approx 100 \sim 500 \mu\text{l}/\text{mg}/\text{hr}$ なので菌体濃度は低めの方がよい。この場合綿栓が酸素供給律速になるとの報告^{14~16)}もあり注意を要する。通常の操作範囲ではジャーフェーマンターの方が酸素移動はよいが、カビの場合はあまり撹拌を強くするとペレットの形成および菌糸の切断などが起る。植菌は同培地で1.5~2 daysの培養菌体を約5%植えているが、これも前培養時間によりあまり影響を受けない増殖停止期の菌体を用いるためである。一般には観察点をどこにおくかで異なるが、植菌量は最大増殖の2~5% (4~6世代) ぐらいが普通であり、接種菌体も対数増殖期か増殖静止期のものを用いた方が、回分培養の経時変化を調べるためには再現性がよい。

2. 増殖と生産

増殖制限基質と比増殖速度 (μ) とは、連続培養では Monod により行なわれた chemostat による方法¹⁷⁾、また回分培養では、初発基質濃度を変えて初期の増殖の平均比増殖速度を測定する方法により、わりに簡単に求め得る。カビ(アデニン要求株)におけるアデニン濃度と μ の関係¹⁾を図2に示す。 $1/\mu$ と $1/S$ をプロットするとほぼ直線関係が得られ、Monod の式¹⁷⁾で表現される。

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S}$$

ここで S ; アデニン濃度 (μM)、 K_s ; 飽和定数 ($37 \mu\text{M}$)、 μ_m ; 最大比増殖速度 (0.32 hr^{-1})

このように微生物の複雑な反応の結果としての増殖が、基質濃度との間に割合に簡単な関係で表現されるのは、基質資化のある酵素反応が律速段階(酵素反応における Michaelis-Menten 式)となっているためである。これはアデニンの取り込み(active transport)反応によるものと考えられる。この実験では、いかに低菌体濃度で増殖を観察するかということはいうまでもないが、植える菌体の phase にとくに注意を要する。すなわち、対数増殖期の菌体はすでにアデニンを相当量(2~3倍の菌体増加量)菌体内に持ち込んでいるのに反して、増殖停止期の後期の菌体は菌体内アデニン含量が極度に欠乏しているので、低濃度のアデニンでは増殖が観察されないほどである¹⁸⁾。このような実験では、増殖停止直後の菌体を注意深く取ってくる必要がある。上述の現象は、菌体の微量成分を制限基質とした場合、かなり一般的な現象である。

つぎに酵素生産の kinetics を行なう目的で、増殖と生産の関係について調べた。この場合、回分培養の経時変化における比増殖速度 (μ) と比酵素生産速度 (ϵ) との相関を調べるとほぼ負相関になる。しかし、増殖の前期においては菌体濃度が少なく、酵素生産速度も小さいので、両者の関係は非常にわかり難い。そこで種々の増殖期にある菌体を洗浄後、制限基質としてのアデニンや誘導物質を含まない培地(炭素源としてソルビトール含有)へ置換培養(shift-down)し、その直後の平均の μ ($\bar{\mu}$) と平均の ϵ ($\bar{\epsilon}$) を観察した。この場合増殖初期の菌体濃度の低い phase のものは濃縮して shift した。このときの挙動を図3に示す。shift 後の増殖および酵素生産はともにわずかの間だけ直線的な変化を示した。そのときの菌体の増加率 ω ($\omega = (X_m - X_p)/X_p$; X_p ; shift 時の菌体濃度、 X_m ; shift 後の最大菌体濃度)をパラメータとして表わせば、図4のように $\bar{\mu}$ も $\bar{\epsilon}$ もほ

ば直線で相関される。すなわち、増殖期においては $\epsilon \approx A - b\mu$ の関係にある。これはある時点で菌体の持っている増殖と酵素生産のポテンシャルを実験的に引き出したことになる。このような実験は、shift 時の菌体への影響をなるべく少なくするため、洗浄は置換培地で行ない、温度変化は少なくして、なるべく短時間に行なうことが大切である。この場合は filter による汙過法を用いた。

上述のような μ と ϵ の相関が菌の本質として持っているものか否かを確かめるため、別の面すなわち増殖停止期の酵素生産の活発な phase に、制限基質であるアデニンを添加する shift-up 実験を行なった。その結果から μ と ϵ との間には同様な負相関があることを確かめた¹⁸⁾。このような shift-up, shift-down 実験で説明した過渡応答は、微生物の挙動さらには履歴をさぐる有力な手段であり、連続培養の非定常の解析とともによく用いられる手段である。

3. 増殖停止期における酵素生産

上述したように、カビのアミラーゼ生産は増殖停止期になって活発に生産される増殖非連動型を示す。この要因は何によるものであろうか。細胞内の挙動を外部よりさぐる一つの有力な手段として、代謝に特有に作用する阻害剤を使用する便利な方法がある。図5に示すように酵素生成期に RNA 合成阻害剤として知られる actinomycin D を添加して RNA 合成を阻害しても、かなり長時間のアミラーゼ生産が認められた。この場合菌体内蛋白合成は阻害されていた。なお、蛋白合成阻害剤であるアミノ酸アナログ(5-fluoro tryptophan など)や puromycin によってはアミラーゼ生産が阻害された。

このことより、アミラーゼに特有な messenger RNA (mRNA) はかなり安定であると推定される¹⁹⁻²⁰⁾。このような阻害剤の使用に際しては、阻害剤の1次作用点で観察することが大切であり、高濃度および長時間の観察においては、阻害の2次作用が出てくるので注意を要する。したがって、最小阻害濃度で観察する必要があるため、その作用点での阻害が実際に起っているか否かのチェックも大切である。このような細胞内の挙動を追跡するには、放射性前駆体の使用など割に便利な方法である。

図3 Shift-down 培養による増殖と酵素生産 (Shift-down 培地では増殖制限基質 (アデニン) と酵素誘導物質 (デンプン) を除いた)

図4 Shift-down 後の菌体増加率 (ω) をパラメータとした μ と ϵ の関係

図5 Actinomycin D 添加による RNA 合成阻害下における酵素生産

図6 酵素生産におよぼす温度の影響
(温度シフトは増殖制限下および脱誘導下にて行なった)

図7 メッセンジャー RNA の1分子の分解速度定数 (k) と ϵ_0 の Arrhenius プロット

生体内反応のように複雑な系でその要因を観察する場合、他の異なった観点からのアプローチが望ましい。すなわち、上述のような mRNA の安定性を問題とする場合、脱誘導後の酵素生成、同調培養による対照酵素 (phosphatase) の階段的生成に対するアミラーゼの累積的生成など、別の観点で観察する必要もある²¹⁻²²⁾。とくに生物系の観察では対照を入れると結果が明白になり、また再現性などの問題に対しては、常に対照ではさみ込むように実験系を組むことが大切である。

以上の μ と ϵ の負相関性およびアミラーゼの mRNA の安定性の現象より、この mRNA をパラメータとしてアミラーゼ生産の kinetics について少し考えてみよう。

一般に、体蛋白質や増殖にともなって増加する酵素の

大部分は、

$$\epsilon \cong a\mu$$

によって代表される増殖連動型と考えられ、これは著しく不安定な mRNA に関係しているとみなされる。この理由として、 μ によって代表される生成活性は細胞単位当りの mRNA (r) の上昇に貢献し、一方 r の分解は1分子的に進行するとみなせば (その速度定数: k),

$$\frac{dr}{dt} = a'\mu - kr \quad \text{or} \quad \frac{d\epsilon}{dt} = a'\mu - k\epsilon$$

また上述のアミラーゼ生産において実験的に

$$\epsilon = A - b\mu$$

上式を包含させて表わせば、

$$\frac{d\epsilon}{dt} = a\mu - b\left(\frac{d\mu}{dt}\right) - k\epsilon$$

この式は種々の酵素生産によく適合する。この生理的意義など詳細については報告²³⁻²⁸⁾を参照されたい。

このようなモデルの妥当性をチェックするには、別の観点たとえば温度に対する挙動よりゆずって試みるのが大切である。図6は温度に対するアミラーゼ生産の挙動をみたものである。この場合系をなるべく簡単にするため、増殖停止期で、さらに新たな mRNA の合成が入らないように、温度 shift と同時に脱誘導も行なった。これより ϵ の減少は各温度で1分子的であり、その分解速度定数は Arrhenius の関係に従うことが見られる (図7)。

4. 見掛けの増殖非連動型

上述のようなカビの増殖停止期 (DNA の新たな合成がみられない) においても、増殖制限基質 (アデニン) を菌体増加が認められないほど微量に逐次添加を行なえば、酵素生産速度の高度な持続が認められる¹⁸⁾。このような微量逐次添加培養による生産活性の持続効果はしばしば認められる現象である²⁹⁻³⁰⁾。

この要因として制限基質の極度の欠乏に基づく目的生産物の合成系の活性低下防止などもあるが、他の要因としては酵母によるトリプトファン醗酵³²⁾およびカビによるリボフラビン生産³³⁻³⁴⁾で認められたように、回分培養において見掛け上増殖非連動型の挙動を示すが、本質的には増殖連動型であり、見掛けの増殖停止期においては、lysis する細胞とそれを資化して増殖する細胞の不均一な細胞集団となっていることであり、それは DNA 合成阻害剤である hydroxyurea による生産阻害、放射性前駆体 (^{14}C -アデニン) の DNA への取り込み (増殖制限基質はイノシトール) 実験より明らかとなった。この場合の逐次添加培養による生産の向上例を図8, 9に示す。リボフラビン生産は炭素源としてのグル

図8 リボフラビン生産 (*Eremothecium ashbyii*) における微量逐次添加培養 (↓印で添加)

コースと増殖制限基質としてのイノシトールの両者を同時に微量逐次供給することにより、その生産は単一基質の供給よりさらに著しく向上することが認められる (図8)。なおこの場合大量の添加は生産を抑制する。図9はトリプトファン生産例で、溶存酸素 (D.O.) レベルが約 2×10^{-4} M でその生産活性が最大になること、および一定通気下において、炭素源消費による D.O. 増大現象を利用した自動基質供給装置を用いて、トリプトファン生産収率のよいアルコール (炭素源) と前駆体であるアントラニル酸およびアンモニアを供給した場合の生産向上を示したものである。このように微生物の生理活性を高度に発揮させるために微量逐次供給培養は有効な方法である。しかし阻害物質を蓄積するような系で、実験室レベルでは、半連続培養法がしばしば用いられる。図10はカビのアミラーゼ生産の多段連続培養系における増殖槽 (第1槽) の菌体が生産槽 (第2槽) に流入したときの挙動を調べるために行なった実験である³⁵⁻³⁷⁾。すなわち、第1槽の菌体を第2槽の培養液で半連続培養 (一定時間ごとに培地のみを交換した培養) で調べたものである。回分培養系のように菌体の生理活性と培養の環境条件 (培地条件) が時間とともに刻々と変化して行く系においては、半連続培養は環境変化を少なくして、簡単にチェックする有効な手段である。この半連続培養は実際の工業レベルではよく用いられる方法である。上述の菌体を槽内に残存させて、栄養物の連続供給および代謝生産物の連続除去を目的として行なう別の方法に透析培養法があり、これは主に組織培養、とくに動物の器官培養においてよく用いられている方法である。

図9 トリプトファン産生 (*Hansenula anomala*) における逐次供給培養 (アルコール、アントラニル酸およびアンモニアを溶存酸素計により自動供給した)

図10 半連続培養による酵素生産活性の変化 (*Asp. niger* の3槽連続培養における第1槽菌体を第2槽培養液で一定間隔 (6~9 hr) ごとに置換した)

おわりに

回分培養による微生物の取扱ひ法として、基本操作をおり込みながら、置換培養、半連続培養、逐次供給培養などを一つの実験プロセスを通して説明してみたが、かえってわかり難くなったのではないかと心配する。

生物のような複雑な系を取り扱う場合、系をいかに簡単に、観察したい現象をいかに引き出すかにあると思う。多少なりとも参考になれば望外の幸せである。

引用文献

- 1) Gaden, E. L. Jr.: *J. Biochem. Microbiol. Tech. and Eng.*, **1**, 413 (1959)
- 2) Deindoerfer, F. H.: *Adv. Appl. Microbiol.*, Ed. Umbreit, W. W., **2**, 321 (1960) Academic Press, N. Y.
- 3) Monod, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 682 (1952)
- 4) Okazaki, M., G. Terui: *J. Ferment. Technol.*, **41**, 266 (1963)
- 5) Neidhardt, F. C., B. Magasanik: *J. Bact.*, **73**, 253 (1957)
- 6) Englesberg, E., J. A. Watson, P. A. Hoffee: *Cold Spring Harbor Symp. Quantit. Biol.*, **26**, 261 (1961)
- 7) Oishi, K., K. Aida, T. Asai: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **7**, 213 (1961)
- 8) 角田, 土屋, 木下, 川本: 農化, **35**, 275 (1961)
- 9) 高村, 角藤, 藤井, 植村: *Amino Acids*, **5**, 53 (1962)
- 10) 田中, 秋田, 木村, 木下: 農化, **34**, 600 (1960)
- 11) 岡田, 亀山, 奥村, 角田: *Amino Acids*, **3**, 26 (1961)
- 12) 勝坂, 石田: *Amino Acids*, **1**, 59 (1963)
- 13) 植村, 相田: 醗酵と微生物, **1** (1971) 朝倉書店
- 14) Schultz, J. S.: *Appl. Microbiol.*, **12**, 305 (1964)
- 15) Hirose, Y.: *Agri. Biol. Chem.*, **30**, 49 (1966)
- 16) 矢野: 醗酵誌, **24**, 232 (1966)
- 17) Monod, J.: *Ann. Review of Microbiol.*, **3**, 371 (1949)
- 18) Okazaki, M., A. Shinmyo, G. Terui: *J. Ferment. Technol.*, **43**, 582 (1965)
- 19) Okazaki, M., G. Terui: *J. Ferment. Technol.*, **44**, 276 (1966)
- 20) Okazaki, M., G. Terui: *J. Ferment. Technol.*, **44**, 287 (1966)
- 21) Terui, G.: *Inst. Appl. Microbiol. Symp.*, Tokyo, No. 8, 142 (1967)
- 22) Kinoshita, S., H. Okada, G. Terui: *J. Ferment. Technol.*, **46**, 427 (1968)
- 23) Terui, G., M. Okazaki, S. Kinoshita: *J. Ferment. Technol.*, **45**, 497 (1967)
- 24) Kinoshita, S., H. Okada, G. Terui: *J. Ferment. Technol.*, **45**, 504 (1967)
- 25) Okazaki, M., G. Terui: *J. Ferment. Technol.*, **45**, 1147 (1967)
- 26) Shinmyo, A., M. Okazaki, G. Terui: *J. Ferment. Technol.*, **46**, 733 (1968)
- 27) Shinmyo, A., M. Okazaki, G. Terui: *J. Ferment. Technol.*, **46**, 1000 (1968)
- 28) Shinmyo, A., M. Okazaki, G. Terui: "Ferment. Advances", p. 337 (1969), Academic Press Inc., N. Y.
- 29) Shio, I., K. Mitsugi, T. Tsunoda: *J. Biochem.*, **46**, 1665 (1959)
- 30) 沖, 佐山, 西村, 尾崎: *Amino Acid and Nucleic Acid*, **17**, 188 (1968)
- 31) 沖, 佐山, 西村, 尾崎: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 119 (1968)
- 32) Terui, G., H. Niizu: *Biotech. Bioeng. Symp.*, No. 1, 33 (1969)
- 33) Kojima, I., H. Yoshikawa, M. Okazaki, G. Terui: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 716 (1972)
- 34) Yoshikawa, H., I. Kojima, M. Okazaki, G. Terui: *J. Ferment. Technol.*, in Press
- 35) Terui, G.: *Inst. Appl. Microbiol. Symp.*, Tokyo, No. 5, 159 (1963)
- 36) Terui, G., N. Konno, M. Okazaki: *Appl. Microbiol. Symp.*, Tokyo, No. 5, 259 (1963)
- 37) Terui, G., M. Okazaki: *J. Ferment. Technol.*, **42**, 320 (1964)

2. 連続培養*

遠 藤 勲**

はじめに

連続培養は、酢やパン酵母の生産、また下水処理などに古くから応用されてきた技術ではあるが、装置設計や操作基準の理論が提案されたのは比較的最近である。回分培養とくらべて最も異なる点は、連続培養では微生物の培養や代謝生産に関して定常状態が得られることである。その結果、pH、栄養分濃度、溶存酸素などを一定に保つことができ、かつ系の外部からこれらの値を任意に設定、制御できる。

連続培養の方法を整理すれば表1を得る。表で一樣、非一樣とは混合状態を指し、開放、密閉とは微生物が系

外に出るか出ないかを意味する。また、循環とは微生物を回収するかしないかをいう。実験室スケールでは後述するように単槽攪拌型反応器が普通用いられ、一樣、非循環、開放系で連続培養が行なわれている。

つぎに、連続培養の利点、欠点を装置、操作、生産性および生物の各項に分けて整理すれば表2を得る。ここでとくに生物という項を設けたのは、他の工業的化学反应に比較し、生物反応特有の問題が含まれているからである。

冒頭にあげた二、三の例を除いて、微生物の連続培養が工業的に実現されていない理由は、表2に指摘した微生物の生理(変異も含めて)、生態(雑菌の汚染も含めて)、および反応機構に関する知見が不足しているためである。逆説的ではあるが、工業的規模で連続化を行なう足

* 昭和48年6月4日受理

** Endo Isao (正会員) 理化学研究所