基質の切り換えによる *Bacillus* sp. P 77 の増殖の動的挙動と ジオキシモデル式によるシミュレーション[†]

中村嘉利・沢田達郎

金沢大学工学部 物質化学工学科^{††}

鈴木基之

東京大学 生産技術研究所^{†††}

混合基質の微生物処理における増殖特性が、基質を切り換えることによって研究された。ある炭素源から別の炭素源へ切り換えることによる *Bacillus* sp. P77 の実験が回分培養で行われ、ジオキシ増殖の数式モデルがシミュレーションに用いられた。グルコースとマルトースで培養を切り換える種々の実験から、次のことがわかった。(i) グルコースの分解はマルトースの分解機構と本質的に異なった。グルコースの分解酵素は環境条件にかかわらず常に合成されるが、マルトースの分解酵素は培地中にグルコースがほとんどないかわずかに含まれるマルトースの培地においてのみ合成された。(ii) マルトースの分解酵素は、グルコースの存在下でも活性であった。(iii) ジオキシ増殖の数式モデルは培養を切り換える実験をシミュレーションでできた。

緒 言

多種類の混合基質を単一菌で効率よく処理するには、まず最初に種々の培養条件下における菌の増殖特性が明らかにされなければならない。混合基質を単一菌で分解すると、ある基質のみが優先的に分解し、他の基質はその基質がほとんど無くなるまで分解しないことが多い。たとえば、亜硫酸パルプ廃液中の糖類を微生物分解する場合や糖処理後の廃液をオゾンで処理し、生成した酢酸やシュウ酸などを微生物分解する場合にもこのようなことが起る⁸⁾。菌体内の酵素は、菌の代謝状態にかかわらず菌体内に十分に含まれる構成酵素と外部環境に応じて合成される誘導酵素の2つから成る。そこで、構成酵素によって分解される基質 S_1 と誘導酵素によって分解される基質 S_2 の2種類の基質を含む微生物培養では、微生物はまず最初に S_1 を分解し、 S_1 がほとんど無くなると誘導酵素を合成して S_2 を分解するジオキシ増殖を示す。Jacob ら⁴⁾ がグルコースとラクトースの混合基質を *Escherichia coli* で培養したときのジオキシ現象の報告以来、*Escherichia coli* のラクトース遺伝子の発現、すなわちラクトー

ス分解酵素(β -ガラクトシダーゼ)の合成などのジオキシ現象に関する生化学的検討が種々報告されている^{1,3,5,6,7,11)}。著者らは前報²⁾で *Escherichia coli* のラクトース遺伝子の発現に関する仮説にもとづいた Fig. 1 のようなジオキシ現象のモデル式を提出した。誘導酵素 y は誘導遺伝子上のオペレータとプロモータが共に活性化されることによって合成される。オペレータは基質 S_2 によって活性化され、プロモータはコファクタ z によって活性化される。コファクタはコファクタの前駆物質 z' から合成され、その合成酵素 w は基質 S_1 の存在によって不活性化される。したがって、誘導酵素の合成は S_1 によって阻害され、 S_2 によって促進される。ここで、 E_{pr} , E_{op} , ϕ_y , ϕ_z , ξ_y はそれぞれプロモータの活性度、オペレータの活性度、プロモータ活性化反応の平衡定数、合成酵素 w の不活性化反応の平衡定数、オペレータ活性化反応の平衡定数である。図中に示したモデル式中の C_x , C_{s1} , C_{s2} , C_y , C_z はそれぞれ菌体、基質 S_1 、基質 S_2 、誘導酵素 y 、コファクタ z の濃度であり、その他はすべて増殖に関するパラメータである。

本研究では、ある基質による培養から別の基質に移し換える培養を種々の基質あるいは混合基質について実験し、増殖の動的挙動に及ぼす基質の影響について検討した。ジオキシ現象を構成酵素と誘導酵素の合成の面から考察するとともに前報²⁾で提出したジオキシモデル式の

[†] 1987年12月8日受理；化学工学協会第52年会（名古屋，1987年4月）にて発表

^{††} 〒920 金沢市小立野2-40-20

^{†††} 〒106 東京都港区六本木7-22-1

Fig. 1 Mathematical model for diauxic growth

適用性を種々の培養の実験結果について確めた。

1. 実験

1.1 使用菌株と培地組成

菌株として集積培養 (enrichment culture) により土壌から分離した *Bacillus* sp. P77 菌を用いた。培養実験には、3g/l KH_2PO_4 、7g/l K_2HPO_4 、0.5g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ から成る基本培地に炭素源としてグルコースあるいはマルトースを加えた培養液が使用された。

1.2 培養方法

グルコース最小培地で一晚振とう培養した菌を新鮮培地 10ml に接種し、L 型培養管で前培養をした。吸光度が 0.2 に達したときの培養液を新鮮培地 100ml が入っている T 型培養管に注入して培養を継続した。採取した培養液から遠心分離器で分離された菌をグルコース培地、マルトース培地、グルコースとマルトースの混合基質培地にそれぞれ移して培養し、グルコース分解酵素やマルトース分解酵素の合成などを調べた。なお、培養はすべて pH 7、温度 37°C で行った。

1.3 測定方法

任意の時間間隔で 2~3ml の培養液を採取し、吸光度、菌数、糖濃度などを測定した。吸光度は分光光度計 (島津製 UV-120-02) の波長 660nm で測定し、菌数は寒天二重層法によって計測した。低い糖濃度のときの比増殖速度を測定する場合、糖濃度の変化が測定の間無視できるように菌濃度を 10^7 cells/l 以下に保つようにした⁹⁾。グルコース濃度はムタローゼ GOD 法 (Glucose C-Test, 和光純薬製) で測定し、マルトース濃度は Somogyi-Nelson 法¹⁰⁾ で測定した金還元糖量からグルコース量を差し引いて求めた。グリセロール濃度はガスクロマトグラフィーによって測定した。マルトース分解活性は、トルエンで処理した菌に 2×10^{-3} M の p-Nitrophenyl- α -D-glucoside を添加した後、pH 7.3、温度 37°C のときの

Fig. 2 Time courses of cell and sugar concentrations after transfer of culture from the maltose medium into the medium containing glucose or maltose: (a) glucose, (b) maltose

0.15 M のリン酸緩衝液で 30 分間反応して生成する p-Nitrophenol 量を 420nm の吸光度で測定して求めた。

2. 結果と考察

Bacillus sp. P77 菌のジオキシン増殖が、構成酵素で分解されるグルコースと誘導酵素で分解されるマルトースの 2 つの炭素源基質を切り換える培養実験によって検討された。また、ジオキシモデル式の計算には前報²⁾ の Table 1 の値と 660nm の吸光度で測定した菌の OD の増加量を基質濃度の減少量で除した値を収率としてグルコースを基質としたとき $y_1 = 0.83$ l/g、 $y_2 = 0.93$ l/g を用いた。

Fig. 2 はグルコースで培養した菌をグルコース培地とマルトース培地にそれぞれ移したときの増殖を示す。グルコース培地に移した場合には基質の切り換えによる菌

Fig. 3 Time courses of cell and sugar concentrations after transfer of culture from the maltose medium into the medium containing glucose or maltose: (a) glucose, (b) maltose

Fig. 4 Time courses of cell and sugar concentrations after transfer of culture from the glucose and maltose medium into the medium containing glucose or maltose: (a) glucose, (b) maltose.

体増殖の時間おくれは見られなかった。このことは、グルコースによる培養から再びグルコースによる培養に移し換えた場合には、グルコース分解酵素が最初の培養ですでに合成されていたといえる。一方、マルトース培地へ移し換えたときには菌の増殖に約0.5hのおくれが見られた。マルトースの消費にもほぼ同じ時間のおくれが見られたことから、マルトースを分解する酵素はグルコースのみの培地では合成されず、マルトース培地中で初めて合成されることがわかった。このような実験結果を、Fig. 1 に示した誘導酵素の合成機構で説明することができる。グルコースのみの培地では菌体内のプロモータは活性化されていないばかりかマルトースが存在しないためにオペレータも不活性である。したがって、グルコースのみの培地では誘導酵素のマルトース分解酵素が全く合成されない。図中の実線はモデル式による計算値であるが、実験値をよく表示することがわかった。

Fig. 3 はマルトースで培養したときの菌をグルコース培地とマルトース培地にそれぞれ移した時の増殖を示す。グルコースあるいはマルトースのいずれの培地へ移した場合にも菌はほとんど時間おくれなしに対数増殖した。これは、マルトース培地で培養されているために菌が移し換えられた時にすでにマルトースを分解する酵素が合成されていたので、マルトースに切り換えた後も時間おくれが起らなかったと考えられる。培養液にグルコースが含まれていなかったにもかかわらずグルコース培地に移し換えたときに増殖の時間おくれが起らなかったのは、グルコースを分解する酵素がマルトースの培地で合成されていたことになる。このことから、マルトースを基質として培養すると、菌体内で構成酵素と誘導酵素の両方が合成されることがわかった。また、図中の実線で示したマルトースからグルコース、マルトースからマルトースに基質を移し換えたときの増殖の計算値は実験値によ

Fig. 5 Time courses of cell and sugar concentrations after transfer of culture from the glycerol medium into the medium containing glucose or maltose: (a) glucose, (b) maltose

く一致した。

Fig. 4 はグルコースとマルトースの混合基質培地で培養した後、菌をグルコースあるいはマルトース培地に移し換えたときの増殖を示す。グルコース培地に移したとき、菌は時間おくれをもたずにそのまま増殖してグルコースを分解したことから、グルコース分解酵素が菌体内で合成されていたといえる。一方、マルトース培地に移したとき、菌の増殖とマルトースの分解に時間おくれが見られた。すなわち、培地中にグルコースが含まれていると、Fig. 1 に示したプロモータが不活性になるためにマルトースの分解酵素が合成されなかったといえる。実線で示したモデル式による計算値は実験値をよく表わすことがわかった。

次に、グルコースもマルトースも含まない培地で培養したとき、菌体内でグルコースやマルトースを分解する酵素が合成されるかどうかについて考える。Fig. 5 はグ

Fig. 6 Time courses of cell and sugar concentrations in the glycerol and maltose medium

リセロールで培養した後、菌をグルコースあるいはマルトース培地に移し換えたときの増殖を示す。グルコースに切り換えたとき、菌は時間おくれをもたずにそのまま増殖し、グルコースもそのまま分解したことから、グリセロールの培養でグルコース分解酵素が合成されたといえる。一方、マルトースに切り換えたとき、菌は約40 min おくれて増殖し、マルトースもほぼ同じ時間だけおくれて分解した。これはグリセロールで培養してもマルトースを分解する酵素が合成されなかったと考えられる。なお、図中の実線はモデル式による計算値であるが、実験値とよく一致した。

Fig. 6 はグリセロールとマルトースの混合基質培地で培養した菌を新たなグリセロールとマルトースの混合基質培地に移したときの増殖を示す。菌は対数増殖し、グリセロールとマルトースはほぼ同時に分解した。グルコースとマルトースの混合基質培地で培養したとき、グルコースが含まれるために菌体内にマルトースが分解する酵素が合成されなかったが、グリセロールとマルトースの混合基質培地ではグリセロールが含まれていてもマルトースを分解する酵素が合成されることがわかった。これはグルコースとグリセロールの本質的な違いであり、グルコースは分解酵素の合成を抑制するが、グリセロールは抑制しないといえる。また、基質をこのように切り換えた培養でもモデル式の計算値と実験値はよく一致した。

以上のようなある混合基質培地から別の混合基質培地に移し換える培養実験によって基質と酵素の合成の関係が種々得られ、培地中に含まれるグルコースがマルトース分解酵素の合成を抑制することがわかった。そこで、マルトース分解酵素の合成に及ぼすグルコースの影響を

Fig. 7 Relationship between maltose-dependent growth rate and glucose concentration

明らかにするために種々の濃度のグルコースが含まれているときのマルトース分解酵素の合成について考える。

Fig. 7 は、グルコースとマルトースの混合基質培地を用いた培養でマルトースを分解するときの菌の比増殖速度 μ_2 に及ぼすグルコースの初期濃度 C_{S10} の影響を示す。図中の各線はマルトースの初期濃度 $C_{S20} = 10^{-4}, 5 \times 10^{-4}, 10^{-3}, 5 \times 10^{-3}, 10^{-2} \text{ g/l}$ のときの μ_2 の値である。 μ_2 の値は、グルコースとマルトースの混合基質培地で得られた比増殖速度からグルコースのみの比増殖速度を減じて求めた。 μ_2 はグルコースの初期濃度 C_{S10} の増加とともに急激に減少し、 $C_{S10} \geq 5 \times 10^{-4} \text{ g/l}$ ではマルトースの初期濃度 C_{S20} に関係なくほとんど 0 になった。このことから、培地中にグルコースがごく少量含まれていてもマルトース分解酵素は合成されるが、グルコースの量が増加するとマルトース分解酵素の合成は著しく減少することがわかった。このようなことを Fig. 1 で考えると、培地中のグルコース濃度が非常に低いとき菌体内に取り込まれるグルコース量も少なくなり、グルコースによって合成される酵素 w は不活性化されにくくなる。その結果、合成されたコファクタ z によってプロモータがある程度まで活性化されるので、マルトース分解酵素が合成される。次に、任意のグルコースの初期濃度 $C_{S10} = 1.25 \times 10^{-4} \text{ g/l}$ のときの μ_2 の値は $C_{S10} = 0$ のときのそれぞれの μ_2 の値の約 1/2 になった。すなわち、マルトース分解酵素の合成に及ぼすグルコースの抑制作用はマルトースの濃度に関係しなかった。このことから、マルトース分解酵素の合成に及ぼすグルコースの抑制機構は、マルトース分解酵素の合成に及ぼす促進機構と重複しないと考えられる。すなわち、マルトース分解酵素の合成は、抑制機構に関与するプロモータと促進機構に関与するオペレータの個々の制御機構によって調整されているといえる。また、 μ_2 の値は初期マルトース濃度とともに増加して、 10^{-3} g/l 以上になるとマルトース濃度にかかわらずほとんど一致したことから、 $C_{S20} \div 10^{-3} \text{ g/l}$ はマルトース

Fig. 8 Growth profile of cells precultured in the glucose medium

Table 1 The periods of growth phases in diauxic growth.

C_{S10} [g/l]	C_{S20} [g/l]	t_1 [h]	t_2 [h]	t_L [h]
0.3	0.7	3.2	1.5	0.8
0.5	0.5	3.8	0.9	0.8
0.7	0.3	4.1	0.6	0.8

分解の比増殖速度の最大値を与えると思われる。

菌体内に含まれるマルトース分解酵素量は培養したときの培地組成に非常に関係することがわかったので、菌体内にマルトース分解酵素が全く含まれていない場合と十分に含まれている場合について考える。Fig. 8 は、グルコースのみで培養した菌をグルコースとマルトースの濃度比を種々変えた混合基質培地に移し換えたときの増殖の実験値と計算値である。基質濃度にかかわらず、菌はグルコースの分解とともに増殖した後、40~50min の時間おくれをもって菌はマルトースの分解とともに増殖する典型的なジョキシ現象を示した。新しい培地に移し換える前の培地はグルコースのみなので、菌体内にはグルコース分解酵素のみが含まれていたはずである。新しい培地に移し換えるとその中に含まれていたマルトースによってオペレータは活性化されるが、グルコースも含まれるためにプロモータは不活性になる。その結果、マルトースを含む新しい培地に移し換えてもマルトース分解酵素は直ちに合成されず、グルコースがほとんど無くなった時にプロモータが活性化されてマルトース分解酵素が合成される。モデル式による計算値は時間おくれの部分を含めた実験値によく一致した。Table 1 は、Fig. 8 に示したグルコースとマルトースの濃度比を種々変えた混合基質培地の中で初期菌体濃度 $C_x = 0.01$ の菌が増殖したときの第 1 対数期の経過時間 t_1 、第 2 対数期の経過時間 t_2 、ジョキシ増殖の時間おくれ t_L を示す。2 つの対

Table 2 Specific growth rate in the glucose and maltose medium.

C_{S10} [g/l]	C_{S20} [g/l]	μ_1 [h^{-1}]	μ_2 [h^{-1}]	$\mu_1 + \mu_2$ [h^{-1}]	μ_0 [h^{-1}]
1	1	1.09	1.04	2.13	2.13
5	5	1.05	1.02	2.07	2.06
10	10	0.99	0.97	1.96	1.95
50	50	0.50	0.58	1.08	1.09

Fig. 9 Growth profile of cells precultured in the maltose medium

数期の経過時間 t_1 と t_2 は基質の濃度によって著しく変化した、 t_L は基質濃度に関係なく一定となった。このことから、基質の分解に要する時間は基質濃度によって決まるが、マルトースを分解するための誘導酵素の合成に要する時間は基質濃度に関係ないことがわかった。Fig. 9 は、マルトース分解酵素が菌体内に十分に蓄えられた菌の培養の例として、マルトースを基質として培養した菌をグルコース 0.3g/l とマルトース 0.7g/l の混合基質培地に移し換えたときの増殖の実験値とモデル式による計算値である。混合基質培地に移してから約 15min はグルコースとマルトースが同時に分解し、比増殖速度はグルコースの比増殖速度とマルトースの比増殖速度の和の $2.13h^{-1}$ になった。しかしながら、マルトース分解酵素は培地中にグルコースが存在するために菌体で合成されないで、比増殖速度は時間とともに低下してグルコースを基質としたときの比増殖速度 $1.09h^{-1}$ に近づいた。グルコースが分解してから約 20min の時間おくれの後に再び増殖を開始し、マルトースを基質としたときの比増殖速度 $1.04h^{-1}$ に達した。次に、グルコースが存在したときマルトース分解酵素の活性がどのように影響されるかを検討する。図中にマルトースの分解酵素の活性 E_y と混合基質培養を開始したときのマルトース

分解酵素の活性 E_{y0} の比を示す。 E_y/E_{y0} の値は培養を開始してから約 1.5h まではほぼ一定であり、その後はマルトースの分解とともに増加した。 E_y/E_{y0} の値がグルコースの存在にもかかわらず一定となったのは、菌体内にすでに含有されていたマルトース分解酵素によってマルトースが分解したためと考えられる。したがって、マルトース分解酵素の活性はグルコースの存在下でも十分に維持されるが、マルトース分解酵素の合成はグルコースの存在によって抑制されることがわかった。また、モデル式による計算値は実験値によく一致した。次に、誘導酵素を十分に含有している菌を用いて混合基質培地で培養したときの比増殖速度 μ_0 、グルコースのみの培地で培養したときの比増殖速度 μ_1 、マルトースのみの培地で培養したときの比増殖速度 μ_2 の関係について考える。Table 2 は、マルトースで培養した菌をグルコースとマルトースを種々の濃度比で混合した培地に移し換えたときの μ_0 、 μ_1 、 μ_2 の値を示す。その結果、菌体内にマルトース分解酵素を十分含有している菌の比増殖速度 μ_0 は基質の濃度にかかわらず $\mu_0 = \mu_1 + \mu_2$ と表わされることがわかった。

結 言

グルコース、マルトースあるいはグリセロールを含む混合基質培地を用いて炭素源基質を切り換える種々の培養から以下の知見を得た。

- (1) グルコースを分解する酵素は培地組成にかかわらず合成されたが、マルトースを分解する酵素は基質としてマルトースが存在するときのみ合成された。
- (2) マルトース培地中に $5 \times 10^{-4}g/l$ 以下の低濃度のグルコースが含まれていてもマルトースを分解する酵素は合成され、グルコースの濃度が低いほどその量は増加した。
- (3) マルトースを分解する酵素の活性はグルコースの存在下においても影響を受けなかった。
- (4) 提出したモデル式の計算値は、炭素源基質を切り換えた培養実験のジオキシン増殖を非常によく表示した。

Nomenclature

C = concentration per unit culture volume [g/l]

E = activity	[-]	x = cell mass
k = rate constant	[h ⁻¹]	z = cofactor
n = order of reaction	[-]	0 = at time 0
t = time	[h]	1 = glucose
t _L = lag time	[h]	2 = maltose
y = yield of cell growth	[l/g]	3 = glycerol

α = saturation constant	[g/l]
β, r = parameters for inhibition of substrate uptake at higher concentration of S ₁ and S ₂ , respectively	[(g/l) ^{-1.5}]
η = efficiency of reaction	[-]
μ = specific growth rate	[h ⁻¹]
μ_m = maximum specific growth rate	[h ⁻¹]
ζ = equilibrium constant	[g/l]
ϕ = equilibrium constant	[g/l]
<Subscripts>	
op = operator	
pr = promotor	
S = substrate	
w = enzyme for z synthesis	

Literature cited

- 1) Beckwith, J.R.: *Science*, **156**, 579 (1967).
- 2) Chohji, T., T.Sawada, Y.Nakamura and S.Kuno: *J. of Chem. Eng.*, **17**, 485 (1984).
- 3) Gilbert, W. and B. Muller-Hill: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **56**, 1891 (1966).
- 4) Jacob, F. and J. Monod: *J. Mol. Biol.*, **3**, 38 (1961).
- 5) Lee, S.B. and J.E. Bailey: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1383 (1984).
- 6) Malan, T.P. and W.R. McClure: *Cell*, **39**, 173 (1984).
- 7) Pastan, I. and R. Perlman: *Science*, **169**, 339 (1970).
- 8) Sawada, T.: *Chemical Engineering*, **30**, 70 (1985).
- 9) Sawada, T., T. Chohji and S. Shimada: *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **4**, 372 (1978).
- 10) Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952).
- 11) Yamakawa, A. and S. Kuno: *J. Biochem.*, **93**, 281 (1983).

Dynamic Behavior of Bacillus sp. P77 Growth by Exchange of Substrates and Simulation by Diauxic Model

Yoshitoshi Nakamura and Tatsuro Sawada

Dept. of Chem. Eng., Univ. of Kanazawa, Kanazawa 920

Motoyuki Suzuki

Inst. of Ind. Sci., Univ. of Tokyo, Tokyo 106

Key Words : Biochemical Engineering, Bacterial Growth, Diauxic Growth, Enzymatic Induction

The growth property in biological treatment of mixed substrates was studied by exchange of substrates. Experiments with Bacillus sp. P77 by change from one carbon source to another were carried out in a batch culture and the mathematical model for diauxic growth was used in a simulation. The following points were confirmed by a series of transfer experiments using cultures with glucose and maltose. (i) The degradation of glucose was essentially different in mechanism from the degradation of maltose. The enzyme for glucose utilization was synthesized constantly, regardless of environmental conditions, while the enzyme for maltose utilization was synthesized only in a medium of maltose containing little or no glucose. (ii) The enzyme for maltose utilization was active even in the presence of glucose. (iii) The mathematical model for diauxic growth could simulate the experiments in culture transfer.