

第 3 日 (10月15日)

第 2 会場 (13.00~16.00)

## — 生物化学工学シンポジウム (醗酵動力学) —

## 221. 微生物の動特性に関する研究

(第2報) 定常域における希釈率, 制限基質の代謝活性におよぼす影響

合葉 修一・永井 史郎・西沢 義矩・小野寺正幸

(東京大学応用微生物研究所)

## 緒 言

微生物が環境変化にどのように適応するかということは微生物生理の立場からも, また微生物利用の立場からも非常に興味のある問題である。この問題に対して生化学の分野では shift up とか shift down とかの方法がとられ<sup>1,2)</sup>, 一方工学的立場からは連続培養による定常, 非定常の状態を利用する方法が主として用いられているようである。

我々はこの問題を検討するために連続培養系を用い, 定常状態にある微生物系に外乱として希釈率を変えることにより強制的に環境変化を与え, 微生物がどのような代謝過程を経て新しい環境に適応して行くかを追跡することを目的とした。

その手段となる連続培養に関する研究は, Monod<sup>3)</sup>, Novick<sup>4)</sup> らによって導入され, その後 Herbert<sup>5)</sup> らによって理論的に展開されて来た。さらに Finn<sup>6)</sup>, Fuld<sup>7)</sup> らは dynamics の立場から微生物の適応性についての実験結果を報告している。

我々は微生物の動力学的な挙動を調べるのに観点を細胞内に進め, 微生物が環境に適応する際の代謝活性の変化を細胞内の核酸レベル (RNA, DNA, 核酸プール等) で検討を加えようとするものである。同様な立場で Schulze<sup>8)</sup>, Herbert<sup>9)</sup>, Tempest<sup>10)</sup> らは定常状態での酸素消費速度, RNA および DNA 量と希釈率, 制限基質濃度, あるいは pH 値, 温度などの関係について報告している。

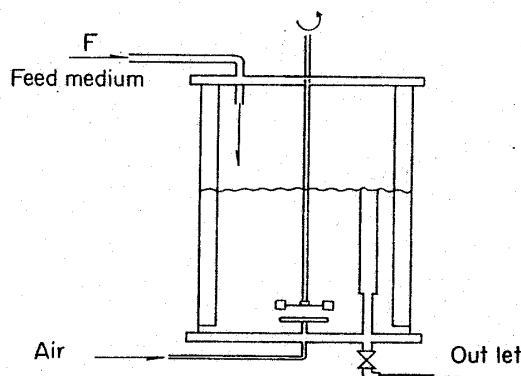
一方, 微生物の環境変化に対する応答を見るためには, まずその微生物系を安定な代謝を維持している状

態に保たねばならない。そこでその手段として連続培養での定常状態, いわゆる chemostatic な系を導いた。本報ではまず比増殖速度に対応する希釈率を種々変化させた場合に得られるそれぞれの定常状態において, 制限基質濃度とか微生物の代謝活性が希釈率との関連性のもとにどのように結びつくかを検討した。

## 実験方法

使用菌株は東大応微研保存の *Azotobacter vinelandii* IAM 1078 (ATCC 9046), 培養は 30l ジャーフェーメンター (実容 13l) での単槽連続培養系, 温度は 30°C 通気量は 2 vvm, 標準型タービン羽根の回転数は 750 rpm 容量調節は over flow type で行なった (第1図)。培地は炭素源を制限基質としてグルコースに置きかえた Burk の組成を使用した (第1表)。

菌体量は Optical density の読みから乾燥菌体量 (mg/ml) に換算し, 残糖量は Somogyi 法によった。



第1図. 単槽オーバーフロー型装置。

第1表. 培地組成.

	g/l
Glucose	5.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	0.2
Na-citrate	0.05
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.005
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> · 3H <sub>2</sub> O	0.005
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.001
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.01
Top water	1000ml

pH=7.0~7.2

また RNA, DNA および核酸プールは Schmidt-Tannhauser-Schneider 法 (STS 法) による細胞内全量として求めた. なお RNA, DNA などの測定は培養液を 0°C に急冷し遠心分離後ドライアイスで低温にした (-20°C) アセトンで凍結乾燥した粉末状の菌体を試料とした. この方法で試料を調製しておけば比較的保存が容易であり幾つかの試料について同時に核酸の分析に供せる利点がある.

結果および考察

単槽連続培養系においては菌体量, 基質濃度についての物質収支から次の式が成立する.

$$\frac{dx}{dt} = \left(\frac{dx}{dt}\right)_{\text{growth}} - Dx = (\mu - D)x \dots\dots\dots(1)$$

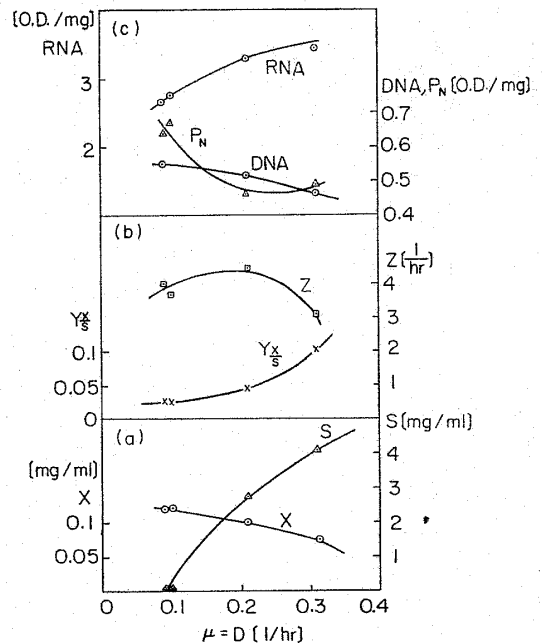
$$\frac{ds}{dt} = D(S_0 - S) - \left(\frac{ds}{dt}\right)_{\text{consumption}} = D(S_0 - S) - \frac{1}{Y_x/s} \mu x \dots\dots\dots(2)$$

- $x$  : 菌体量 [mg/ml]
- $S$  : 制限基質濃度 [mg/ml]
- $S_0$  : 流入培地中の制限基質濃度 [mg/ml]
- $\mu$  : 比増殖速度 [1/hr]
- $D$  : 希釈率 [1/hr]
- $t$  : 時間 [hr]
- $Y_x/s$  : 収率因子 [-]

定常状態においては,

(1)式より  $\mu = D \dots\dots\dots(3)$

(2), (3)式より  $Y_x/s = \frac{x}{S_0 - S} \dots\dots\dots(4)$



第2図. 希釈率と菌体量, 制限基質濃度, 収率因子, 比消費速度, および核酸との関係.

また制限基質の消費に対して菌体量当たりの効率を考えると比消費速度を  $z$  [1/hr] とすれば(2)式よりつぎのごとく表わされる.

$$z = \frac{1}{x} \left(\frac{ds}{dt}\right)_{\text{consumption}} = \frac{D(S_0 - S)}{x} = \frac{D}{Y_x/s} \dots\dots(5)$$

希釈率と制限基質濃度および菌体濃度との関係は第2図(a)に示す. 図からわかるようにいわゆる Monod の式に基づいて収率因子を一定とした場合の関係図とはかなり異なった様相を呈しているがこれは用いた *Az. vinelandii* の収率因子が希釈率の変化に伴って大きく変わること, 制限基質濃度と比増殖速度 (定常状態では希釈率に等しい) との関係が Monod の式とずれて来ることなどから当然の結果とも考えられ, Ierusalimsky<sup>11)</sup> からも *Az. vinelandii* を用いた実験で同様な結果を報告している.

第2図(b)に希釈率と収率因子および比消費速度との関係を示す. 収率因子に関しては従来より一定値を保持するものではなく希釈率が変われば変化するといわれており本実験に使用した *Az. vinelandii* では収率因子の値は非常に小さいが希釈率が大きくなるに従って大幅に大きくなる傾向が認められた. 一方比消費速度から見ると希釈率が 0.2 あたりを境にして両端で小さくなっているが希釈率が大きい場合には少ない消費量で効率よく増殖しており逆に希釈率が小さい場合には維持代謝の方に利用されているように考えられる.

第2図(c)に希釈率と RNA, DNA, および細胞内核酸プールと考えられる冷酸可溶画分との関係を示す。DNA および核酸プールについては希釈率の変化に対してはほぼ一定の値を保つようであるが, RNA については希釈率が大きくなるにつれて増加する傾向が見られる。核酸プールの値が一定を保ちながら RNA 量が大きくなって行くことから具体的な値は不明としても希釈率が大きくなるに従って核酸プールにおける代謝活性が増大していることがわかる。

#### 文 献

- 1) Kjeldgaard, N. O., Maaløe, O., Schaechter, M. : *J. Gen. Microbiol.*, **19**, 607 (1958).
- 2) Neidhardt, F. C., Magasanik, B. : *Biochim. Biophys. Acta*, **42**, 99 (1960).
- 3) Monod, J.: *Ann. Inst. Pasteur*, **79**, 390 (1950).
- 4) Novick, A., Szilard, L.: *Proc. Nat Acad. Sci.*, **36**, 708 (1950).
- 5) Herbert, D. : S. C. I. Monograph, No. 12 p. 21 (Soc. Chem. Industry), London (1961).
- 6) Finn, R. K., Wilson, R. E. : *Agr. Food Chem.*, **2**, 66 (1954).
- 7) Fuld, G. J., Mateles, R. I., Kusmierck, B. W. : S. C. I. Monograph, No. 12 p. 54 (Soc. Chem. Industry), London (1961).
- 8) Schulze, K. L., Lipe, R. S. : *Arch. Mikrobiol.*, **48**, 1 (1964).
- 9) Herbert, D. : In Microbial Reaction to Environment. Symp. Soc. Gen. Microbiol., **11**, 391 (1961).
- 10) Tempest, P. W., Herbert, D. : *J. Gen. Microbiol.*, **41**, 143 (1965).
- 11) Ierusalimsky, N. D. Zaizeva, G. N., Khmel, I. A. : *Mikrobiologia*, **131**, 415 (1962).