

〔生物工学会誌 第73巻 第5号 413-424. 1995〕

---

 総合論文
 

---

## 放線菌による新規含リン除草剤ビアラホスの工業的生産

(平成6年度 日本生物工学会技術賞受賞)

 武部 英日<sup>1\*</sup>・蛭田 修<sup>1</sup>・佐藤 篤行<sup>1</sup>  
 片岡 廣<sup>2</sup>・田中 秀夫<sup>2</sup>
明治製菓株式会社薬品技術研究所, 1 筑波大学応用生物化学系<sup>2</sup><sup>1</sup>〒250 神奈川県小田原市栢山788<sup>2</sup>〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1

## Studies on the Industrial Production of Bialaphos —Monograph—

 HIDEHI TAKEBE,<sup>1</sup> OSAMU HIRUTA,<sup>1</sup> ATSUYUKI SATOH,<sup>1</sup> HIROSHI KATAOKA,<sup>2</sup> and HIDEO TANAKA<sup>2</sup>  
 (Pharmaceutical Technology Laboratories, Meiji Seika, Ltd., 788 Kayama, Odawara, Kanagawa 250<sup>1</sup> and  
 Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305<sup>2</sup>) Seibutsu-  
 kogaku 73: 413-424, 1995.

A breeding study was performed from the viewpoint of biochemical engineering to obtain strains of microorganisms which produce bialaphos (a herbicide) efficiently (high productivity and high yield) from inexpensive substrates under low oxygen concentration conditions, with good filtration efficiency and easy downstream treatment. The strain obtained was found to produce about six-hundred times higher product concentration than the wild strain. With this new strain, it was also possible to use an inexpensive carbon source and to produce bialaphos under low oxygen concentration conditions, with good filtration efficiency. The activities of the tricarboxylic acid cycle enzymes of the new strain were lower than those of the wild strain, while the activities of the glyoxylic acid cycle enzymes of the new strain were higher than those of the wild strain. When the scale-up was based on power consumption (for agitation) per unit volume of the reactor, bialaphos production in the 300 kl fermentor was 50% of that obtained with the 3 l jar fermentor. When the scale-up was based on the DO concentration and the DO concentration at the middle of the 300 kl fermentor was controlled at 0.5 ppm (optimum DO concentration for bialaphos production in the 3 l fermentor), bialaphos production was increased to 85% of that obtained with the 3 l jar fermentor. Taking the DO concentration gradient in the 300 kl fermentor into consideration, the DO concentration at the bottom of the fermentor was maintained at 0.5 ppm. This resulted in a successful scale-up and bialaphos production increased to 96% of the maximum production in the 3 l jar fermentor. In bialaphos fermentation, production of bialaphos is greatly reduced when the partial pressure of oxygen is increased. Methylation at the final step of the biosynthetic process of bialaphos was not induced under high partial pressure, resulting in a low bialaphos concentration due to the accumulation of the demethylated derivatives.

[**Key words:** bialaphos, herbicide, microorganism metabolite, breeding, industrial production, TCA enzyme activity, oxygen supply, scale-up, DO concentration gradient]

## はじめに

近年, 環境問題への関心が高まり農業による環境汚

染についても種々論じられている。このような中で、化学合成で得られる非選択性茎葉処理型除草剤は、毒性、土壌残留から社会問題化しつつあり、これらの問題を引き起こす心配のない農業が求められている。微生物代謝産物は天然物の一種であり、自然界における

\* 連絡先, Corresponding author.

物質循環の中で容易に代謝、分解されるので、これらの要求にかなったものである。

*Streptomyces hygroscopicus* の生産するピアラホスは、非選択性茎葉処理型除草剤で殺草スペクトラムが広く、生育中の作物の根から吸収されて薬害作用を示すことがなく、また土壌中で容易に代謝、分解されるので土壌残留の問題を引き起こす心配がない。このような安全性の高い除草剤の創出は高い社会的貢献度をもつものである。本研究は、初めての微生物除草剤であるピアラホスの工業生産を確立することを目的とし、変異処理株からの優良菌株の効果的な選別法と、ピアラホスの生合成を促進的に進めるメカニズムの解明、さらにピアラホスの生産菌の液内培養の際に起こる酸素阻害が問題とならないように考慮したスケール・アップ法について検討したものである。

### 1. 工業生産に適した優良菌株の育種<sup>2)</sup>

微生物代謝産物を工業として確立するためのもっとも重要な要因は、使用する菌株の性質と能力であるといえる。これには優良菌株の育種が不可欠である。これまで、多くの企業がアミノ酸発酵、核酸発酵、抗生物質発酵など多くの物質の工業化に成功したが、これはやはり菌株の改良により達成したものである。

微生物代謝産物の菌株育種については、これまでは生産性に関する報告が主であり、経験的あるいは試行錯誤的な変異処理が一般であり、合目的的なアプローチに欠けた面は否めないことも事実である。このような場合、取得した菌株がフラスコなど小規模な培養装置では高い生産を示すが、大規模な培養装置ではなかなか再現性が得られない場面や、ろ過・精製工程での収率に問題を生じたり、廃水処理にコストがかかったりする事実も多く聞かれ、微生物代謝産物の工業化を短時間に効果的に成功させるにはかなりの不確実性がある。

工業化を短時間に効果的に成功させるためには、培養プロセスおよびダウンストリームプロセスを含む工業生産プロセスに強く影響を及ぼす要因をあらかじめ考慮し、菌株選別を進める必要がある。我々は、この菌株の選別に関しては、生産プロセスにおける技術的問題の中から、経済性に強く影響を与える要因に着眼し、効果的かつ大量に処理可能な菌株選別システムの開発と、工業的に適合した高生産能株を分離することを目的とした。

#### 1.1 野生株の親株が抱えている技術的諸問題

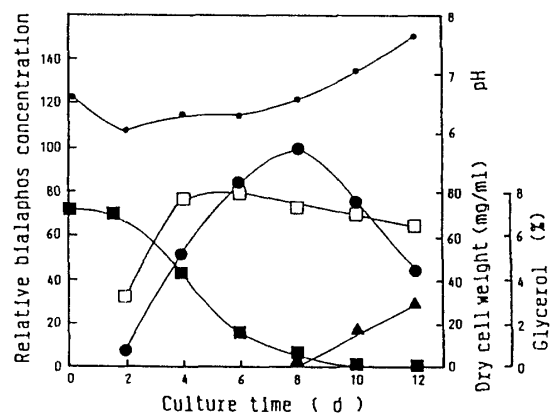
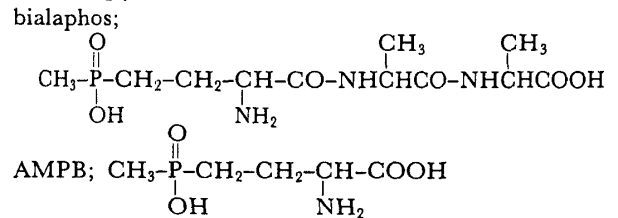


Fig. 1. Time course of bialaphos fermentation by the wild strain in P-1 medium with glycerol. Symbols: ●, bialaphos; ▲, AMPB; •, pH; □, dry cell weight; ■, glycerol.



生産株の育種に当たって、野生株の親株が抱えている生産プロセスにおける技術的問題を調べた。Fig. 1は野生株 (*Streptomyces hygroscopicus* ATCC 21750) によるピアラホスの発酵経過を示したものであるが、この実験より次のような解決すべき多数の問題が観察された。まず、ここに示した野生株の培養は高価なグリセロールを炭素源基質として用いているが、このグリセロールを安価なグルコースに替えた場合にはピアラホス生産はほとんど見られないこと、またグリセロールを使用した場合でもピアラホスの生産量が数十単位と低い割にはグリセロールの消費速度が高く、菌体濃度もきわめて高いなどの現象が観察された。すなわち、野生株は生産物蓄積に対する基質効率の低いことなど典型的な Carbon Catabolite Regulation を受けていることが分かった。また、野生株は形成される菌体量が高いため、醗の粘性が著しく高められ、この結果液内培養には高い酸素供給を必要とすることや、培養ろ液の回収およびろ過速度が低いことなどの問題が生じた。さらには、培養後期にグリセロールが消失するとともに pH が上昇し、いったん生成したピアラホスの分解がみられ、アラニン 2 分子が外れた分解副産物 AMPB が蓄積するなどの問題点が観察された。

1.2 育種の着眼点 このように種々の問題点を有する野生株の育種について、工業的生産の見地から

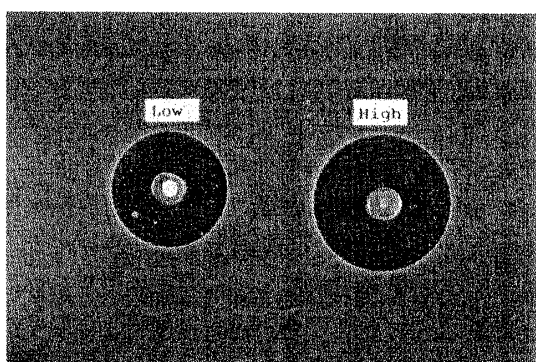


Fig. 2. Typical inhibition zones of low (left) and high (right) productive strains.

望まれる育種着眼点と、その結果期待される効果をまとめた。

(a) コロニー形成の小さい株では、単位細胞あたりの生産性の高いこと、ろ過収率が高まること、また酸素供給量が少なく済む。

(b) 炭素源や窒素源の Catabolite Regulation の解除株では、培地コストの低減が可能となる。

(c) 分解活性の低い株では、生産濃度の向上と再現性が高まる。

(d) 緩やかな振盪条件で高い生産を示す株は、酸素供給が少なく済む。

1.3 菌株選別システム 上記の4つの育種着眼点に基づき、ビアラホス生産に適合した菌株選別システムを開発した。

菌株の選別に先立ち、アガー・ピース法<sup>3)</sup>がビアラホスの高生産株を選別する効果的な手法であるかどうかを検討した。阻止円径の大小の相違、すなわち高生産株と低生産株のアガー・ピース選別系における相違を Fig. 2 で示した。写真の右の菌株は左の菌株に比べビアラホスの生産性が高く、阻止円径が大きい。

次に、アガー・ピース阻止円径、すなわち寒天培養系のビアラホス生産と液内培養系のビアラホス生産との関係を調べた結果、寒天培地と液体培地の生産濃度に良い相関関係が認められた。これによりアガー・ピース法がビアラホスの高生産株の選別手法として採用することの妥当性が確認された。なお、アガー・ピースの検定菌としては、ビアラホスのみに感受性を示すが分解副産物 AMPB には感受性を示さない *Proteus* sp. MB-838 を用いた。

コロニー形成の小さい株の採取 コロニー形成の小さい株では、単位細胞あたりの生産性の高いこと、ろ過収率が高まること、また酸素供給量が少なく済

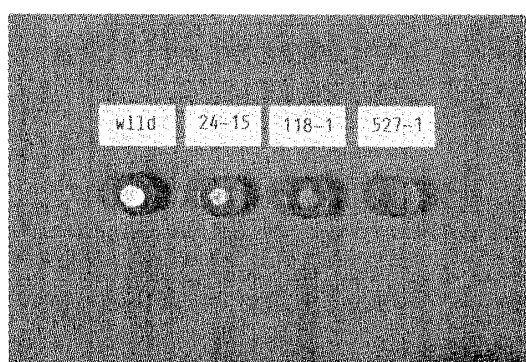


Fig. 3. Colony types of strains with progress in breeding (from right to left). As breeding progressed, colonies tended to become smaller.

むなどが期待できる。上述のアガー・ピース法による選別法に基づいて、小さなコロニーで大きな阻止円を示す菌株の選別を検討した。Fig. 2 の写真の右に示したようなアガー・ピース上のコロニーの形成が小さく、かつ阻止円径の大きい菌株の選別を繰り返し実施した。育種の経過を Fig. 3 に示したが、左から右へ育種が進むにつれコロニーが小さくなり、孢子形成能を失ったタイプになってゆく様子が認められた。

Catabolite Regulation 解除株の選別 炭素源の Catabolite Regulation の解除株では、培地コストの低減が期待できる。すなわち、Glucose Catabolite Regulation 解除株の選別により、高価なグリセロールを用いずとも安価なグルコースでの生産が可能となる。

Glucose Catabolite Regulation 解除株の選別は、アガー・ピース培地の炭素源をグリセロールからグルコースに替えることでコロニー形成が小さく、かつ阻止円径の大きい菌株の選別を実施した。その結果は得られた Glucose Catabolite Regulation 解除株は、液内培養系で菌体形成量が著しく減少したこと、またグルコースを基質とした場合の生産性が飛躍的に向上するなど、Catabolite Regulation を受けにくい菌株に改良された。

生産物分解抑制株の採取 液内培養の培養後期にビアラホスの生成が減少し、分解産物 AMPB が増加することが見いだされた (Fig. 1)。この現象は pH コントロール、培地培養条件および攪拌条件など培養面から分解活性を若干抑えることもできるが、根本的には菌株面からの改善が望ましい。そこで、生産物分解の少ない菌株の選別を検討した。この場合菌株の優劣をはっきり区別させる目的で、アガー・ピース培養系でビアラホスが分解しやすい条件 (塩化カルシウム

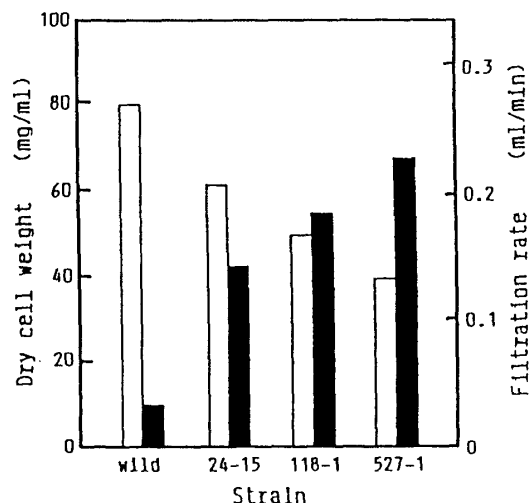


Fig. 4. Comparison of the wild strain with the improved strain with respect to filtration rate in P-1 medium with glucose. Symbols: □, dry cell weight; ■, filtration rate.

などの添加)を構築し、一定量のビアラホスを添加し、阻止円の大きい(ビアラホス残存量の多い)菌株を低分解活性変異株として分離した。

ビアラホス分解促進アガー・ピースで阻止円を大きく示した改良株は、培養8日目以降もまったく分解物AMPBを生成せず、ビアラホスの分解が完全に抑止されていることを確認した。本菌株はビアラホス分解酵素の欠損、あるいは分解活性の抑制された変異株のいずれかと考えられる。

液内培養系での選別 上述の寒天培養系での選別手法を繰り返しあるいは組み合わせで実施し、得られた菌株からさらに液内培養で緩やかな振盪条件、すなわち低酸素供給条件で高い生産性を示す菌株を選別した。また、同時に液内培養系では培養プロセスをろ紙ろ過し、ろ過速度の高いかつ清澄なる液が得られることも菌株選別の判断に採用した。

Table 1. Properties of a strain improved from the biochemical engineering viewpoint.<sup>a</sup>

| Property                       | Wild strain           | High productive strain (527-1) |
|--------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Relative product concentration | 1                     | 500~600                        |
| Carbon source                  | Glycerol              | Glucose                        |
| Oxygen supply ( $k_La$ )       | 200 h <sup>-1</sup>   | 50~100 h <sup>-1</sup>         |
| Filtration                     | 20 l/h/m <sup>2</sup> | 410 l/h/m <sup>2</sup>         |

<sup>a</sup> A 600 l tank using commercially available natural organic substances.

Fig. 4に歴代株のフラスコ液内培養での菌体形成量およびろ紙ろ過によるろ過速度について示したが、野生株に比べ育種が進むにつれ菌株の菌体形成量が著しく減少していること、これとは逆にろ過速度は高くなるなどのすぐれた特徴を有していた。

1.4 優良菌株の総合評価 最優良菌株の性質をパイロットタンクで調べた(Table 1)。改良株は、野生株に比べ安価な基質(グルコース)の使用が可能となったこと、生産性はおよそ500~600倍まで増大していること、酸素供給量が少なく済む容易な環境下で培養が可能なこと、さらにろ過速度がおよそ20倍向上し、また副成分の生成がないなどのすぐれた性質を有しており、十分に工業生産に適合した菌株であることが確認された。

## 2. 高生産株における代謝の調節機構<sup>4)</sup>

ビアラホスの生合成は、グルコースからホスホエノールピルビン酸(PEP)を経てC-P結合を形成し、さらにアセチル CoA による酢酸付加およびアミン付加を経て行われる。<sup>5)</sup>このことからグルコース代謝とビアラホス生成とに因果関係があるものと考え、低生産株と高生産株の糖代謝と、これに関連するTCAサイクルの酵素活性を調べ、高生産株における代謝の調節機構を検討した。その結果、高生産株は低生産株に比べ、糖の消費が緩慢で形成される菌体量が少ないことが知られた。一方、高生産株のTCAサイクルの酵素活性は低生産株のそれに比べ低いこと、逆にグリオキシル酸サイクルの酵素活性は高いことが明らかとなった。これらの知見から、高生産株ではグルコース代謝を効率的にビアラホス生合成に向けている仕組みが明らかになった。

## 3. スケール・アップに関する検討<sup>6)</sup>

3.1 攪拌消費動力を指標にしたスケール・アップ 微生物細胞を用いる液内培養のスケール・アップ法に関して、従来からもっとも重要視されていたことは、いかにして効率よく酸素供給を行うかということであり、スケール・アップ基準として、酸素移動容量係数( $k_La$ )あるいは単位液量あたりの攪拌消費動力( $P/V$ )を用いる方法が広く採用されている。

明治製菓においても、これらのスケール・アップ基準を採用してストレプトマイシン、ペニシリン、カナマイシン、ミデカマイシンなど多くの抗生物質発酵の大型槽へのスケール・アップに成功している。ビアラ

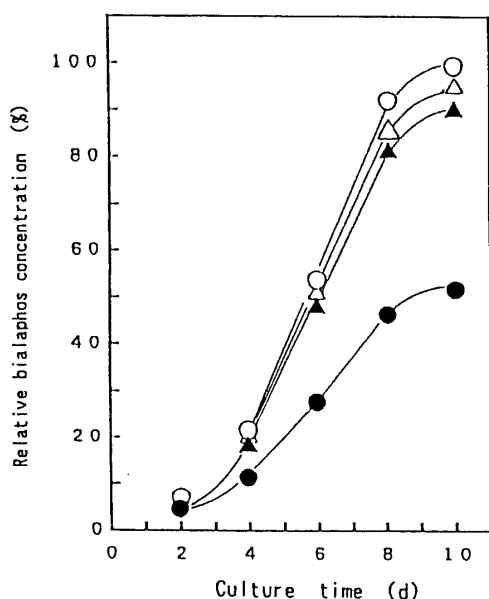


Fig. 5. Bialaphos production in various fermentors at constant  $k_{La}$  and power consumption per unit volume ( $P_g/V$ ). Symbols:  $\circ$ , 3 l (750 rpm,  $k_{La}=135 \text{ h}^{-1}$ );  $\triangle$ , 2 kl (200 rpm,  $k_{La}=135 \text{ h}^{-1}$ ,  $P_g/V=2.5 \text{ kW/kl}$ );  $\blacktriangle$ , 10 kl (170 rpm,  $P_g/V=2.5 \text{ kW/kl}$ );  $\bullet$ , 300 kl (95 rpm,  $P_g/V=2.5 \text{ kW/kl}$ ).  $k_{La}$  was determined by the static gassing-out methods. The amounts of bialaphos produced were expressed as percentage of the value obtained in 3 l jar fermentor.

ホス発酵においても、これら抗生物質の例にならって、3 l ジャーから 2 kl 槽へのスケール・アップは酸素移動容量係数 ( $k_{La}$ ) を指標に、また 2 kl 槽から 10 kl 槽および 300 kl 槽へのスケール・アップは単位動力あたりの攪拌消費動力 ( $P/V$ ) を指標に実施した。

結果は Fig. 5 に示したが、これまでの抗生物質の経験とは反して、3 l ジャーのビアラホス生産に比べ 2 kl 槽の生産は 94% であり、また 2 kl 槽の生産に比べ 300 kl 槽では約 50~60% と著しく低い結果に終わった。ビアラホス生産量は、大型槽になるほど生産量の低下は大きく、またグルコースの消費が速く、菌体濃度が高まることが観察された。このようにビアラホス発酵では、 $k_{La}$  や単位動力あたりの攪拌消費動力を指標にスケール・アップした場合には、小型槽と大型槽の発酵経過を同一とすることは困難であり、酸素供給以外の別の律速因子を発見することが必要となった。小型槽と大型槽での発酵経過不一致の原因としては、a) 翼径などの物理的因子 (剪断応力) の相違、および b) 大型槽内での液深に付随する環境因子 (圧力、炭酸ガス濃度、溶存酸素濃度) の相違が考えられた。

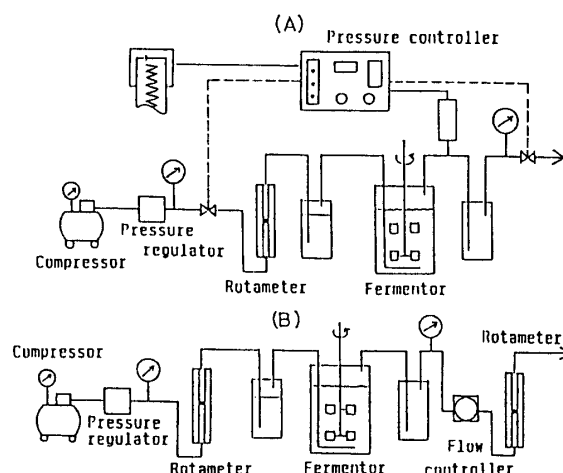


Fig. 6. Schematic flow diagram of the pressurized fermentation system. (A) Cyclic pressurized culture, and (B) constant pressurized culture.

### 3.2 スケール・アップ因子の検討

**翼先端周速度の影響** 攪拌速度 ( $N$ ) および攪拌翼径 ( $D_i$ ) をそれぞれ変化させて剪断応力 (翼先端周速度,  $\pi ND_i$ ) のビアラホス生産に及ぼす影響を調べた。攪拌速度および攪拌翼径いずれを変化させた場合も、ビアラホス生産には変化は認められず、また菌体濃度および液粘度の変化もみられなかった。すなわち、剪断応力はビアラホス生産に影響を及ぼさないことが知られた。

**加圧変動培養におけるビアラホス生産** 大型槽の水圧勾配に関連する環境を小型槽で再現するための圧力可変培養装置を作製し (Fig. 6), 液深 10 m の大型槽内を微生物が循環する環境を設定 (本装置を周期的に 1,013~1,994 HPa) させたところ、ビアラホスの生産量は 300 kl 大型槽と同じく低い結果となった (Fig. 7)。また、周期的な変動圧力の平均圧力 (1,503 HPa) でもまったく同じ現象が観察された。

このことから、液深に付随する環境因子がビアラホス生産を阻害していることが明らかとなった。この環境因子として、a) 圧力そのもの、b) 溶存炭酸ガスおよび c) 溶存酸素が挙げられる。

**圧力の影響** 小型槽にガス富化装置を設置し、酸素分圧を一定に設定した条件下で圧力そのもの影響を調べた。まず、空気に窒素ガスを 1 対 1 の比率で混合したガスを 1,994 HPa の加圧下で供給することで、加圧下でありながら常法培養とおなじ酸素分圧を設定した (窒素富化加圧培養)。次に、空気に酸素ガスを 3 対 1 の比率で混合したガスを供給することで、空気

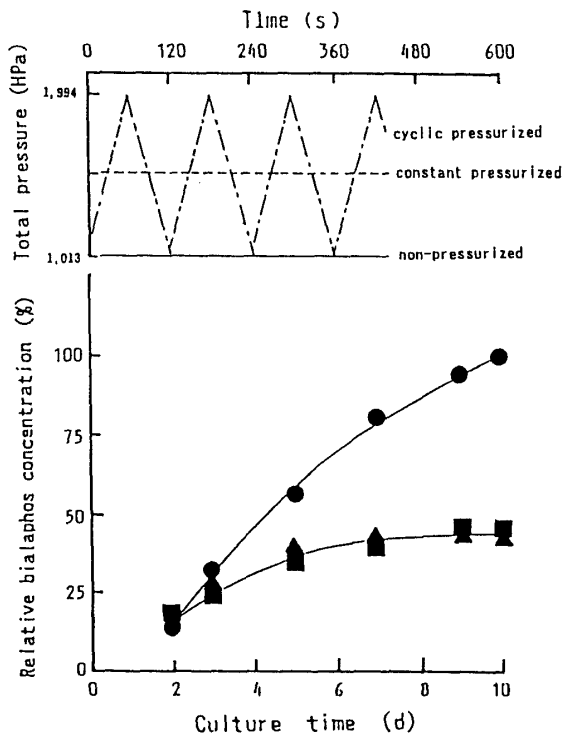


Fig. 7. Effect of pressure on bialaphos production. Symbols: ●, non-pressurized culture (1,013 HPa); ▲, cyclic pressurized culture (1,013~1,994 HPa); ■, constant pressurized culture (1,503.5 HPa). The amounts of bialaphos produced were expressed as percentage of the value obtained in 3 l fermentor at 1,013 HPa.

を 1,994 HPa の加圧下で供給した加圧培養と同じ酸素分圧を設定した (酸素富化常圧培養)。その結果、窒素ガス富化加圧培養と常法培養が、また酸素富化常圧培養と加圧培養とがそれぞれまったく同じビアラホス生産量を示した (Table 2)。すなわち、同じ酸素分圧の下ではビアラホスの生産量は総圧力に関係なく、同じであった。

Table 2. Effect of O<sub>2</sub> partial pressure on bialaphos productivity.

| Inlet gas (l/min) |                               | Total pressure (HPa) | O <sub>2</sub> partial pressure (atm) | Relative productivity (%) |
|-------------------|-------------------------------|----------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| air               | N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |                      |                                       |                           |
| 2.0               | — —                           | 1,994                | 0.42                                  | 53                        |
| 1.0               | 1.0 —                         | 1,994                | 0.21                                  | 105                       |
| 1.5               | — 0.5                         | 1,013                | 0.408                                 | 56                        |
| 2.0               | — —                           | 1,013                | 0.21                                  | 100                       |

The amounts of bialaphos produced were expressed as percentage of the value obtained when air was used for aeration at 1,013 HPa.

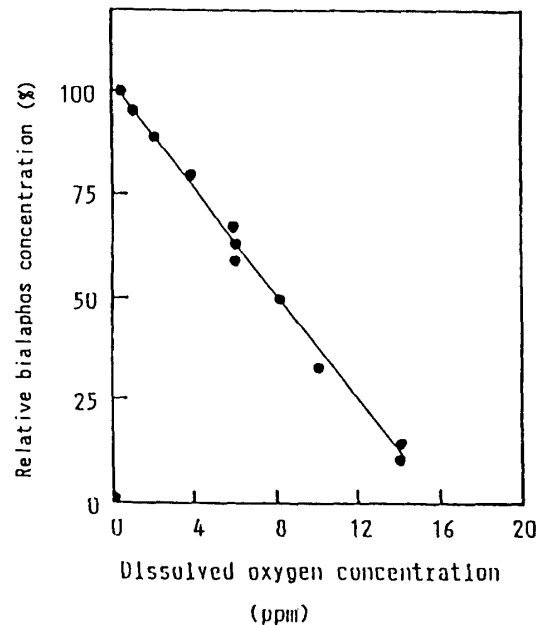


Fig. 8. Effect of dissolved oxygen concentration on bialaphos production. The amounts of bialaphos produced were expressed as percentage of the value obtained in 3 l jar fermentor when the DO concentration was controlled at 0.5 ppm.

このことから、圧力そのものは、ビアラホス生産阻害に影響を及ぼさないことが明らかとなった。一方、酸素分圧は著しくビアラホスを阻害しており、ビアラホス生産を阻害している環境因子は溶存酸素濃度であることが明らかとなった。

**溶存炭酸ガスの影響** 液深に不随して変化する他の因子としては、溶存炭酸ガスの影響が考えられる。空気と20%炭酸ガスを9対1の比率で混合したガスおよび空気と50%炭酸ガスを9対1の比率で混合したガスをそれぞれ供給して炭酸ガス富化培養を実施した。なお、pHの変動を避けるため培養液は、NaOH 溶液で pH 6.5 に制御した。これらの炭酸ガス富化培養は通常培養に比べ、溶存炭酸ガス濃度は6~20倍高いにもかかわらずビアラホス生産の阻害は見られなかった。

以上のことから、小型発酵槽と大型発酵槽での発酵経過の不一致の原因は液深によって高められる溶存酸素濃度が原因であることが明らかとなった。

**3.3 ビアラホス発酵における最適溶存酸素濃度** 溶存酸素濃度の設定については、攪拌回転数をオートマチックに制御することで培養全期間を一定濃度に推移させた。高溶存酸素濃度域については酸素ガスを富化させ、また低酸素濃度域では窒素ガスを富化させそ

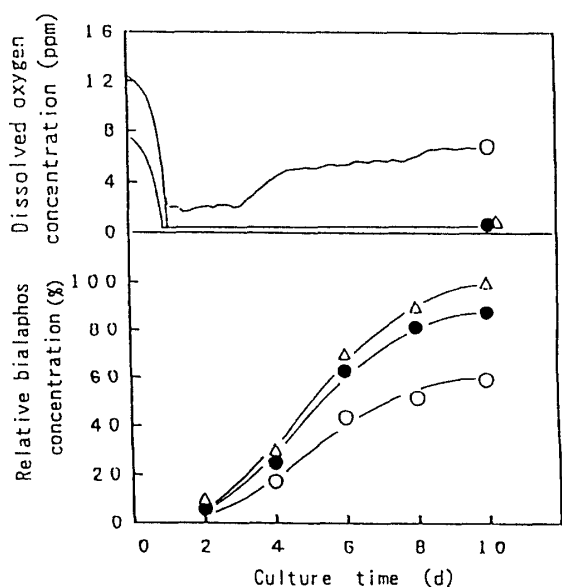


Fig. 9. Scale-up of bialaphos production on the basis of DO concentration. Symbols:  $\Delta$ , 3 l jar (DO=0.5 ppm);  $\circ$ , 300 kl tank ( $P_g/V=2.5$  kW/kl, without DO control);  $\bullet$ , 300 kl tank (DO=0.5 ppm). The amounts of bialaphos produced were expressed as percentage of the value obtained in 3 l jar fermentor when the DO concentration was controlled at 0.5 ppm.

それぞれの水準を維持させた。結果は Fig. 8 に示したが、ビアラホス発酵では溶存酸素濃度と生産とは負の相関関係があり、溶存酸素濃度を低く保つ発酵方式が望ましく、その最大生産を与える溶存酸素濃度は 0.5 ppm であった。また、溶存酸素濃度 0.25 ppm 以下ではビアラホス生産は完全に停止した。

3.4 溶存酸素濃度を合致させたスケールアップ  
 小型発酵槽の実験で得られた最大生産を与える溶存酸素濃度 (0.5 ppm) を大型槽 300 kl に再現させることを試みた。なお、溶存酸素センサーの飽和濃度のキャリブレーションは、3 l ジャーファメンターでは 7.6 ppm, 300 kl 槽では、内圧 0.2 kg/cm<sup>2</sup> を保持しセンサー取り付け位置が液深の中心部 (液面から 5 m) であることを考慮し 12.9 ppm とした。その結果を Fig. 9 に示したが、300 kl 大型槽のビアラホス生産は小型槽のそれに比べ 85% であった。溶存酸素濃度を 0.5 ppm に制御しない場合 (消費動力を指標にした場合、溶存酸素濃度 2~6 ppm) の生産 (60%) に比べては著しくビアラホス生産は向上したがまだ小型槽のそれには及ばない。このことは溶存酸素濃度の不均一性が微生物細胞に種々の悪影響を与えるようなビアラホス発酵につい

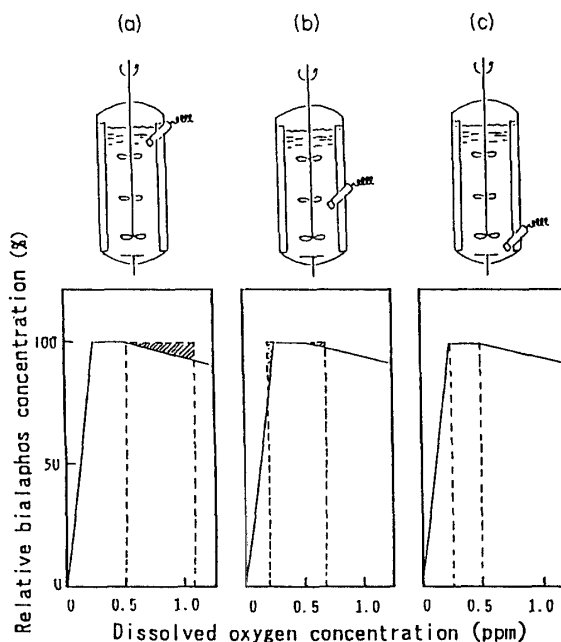


Fig. 10. Effect of DO concentration gradient on the scale-up of bialaphos production. The left and right broken lines represent the DO concentrations near the liquid surface and near the bottom of the fermentor, respectively. The shadowed portion shows the reduction in product due to the DO concentration gradient in the fermentor. The amounts of bialaphos produced were expressed as percentage of the value obtained when the DO concentration was controlled between 0.25 and 0.5 ppm.

ては、小型発酵槽の実験で得られた最大生産を与える溶存酸素濃度を大型槽全体に再現させることができないことを意味している。

3.5 溶存酸素濃度の分布を考慮した新しいスケール・アップ法  
 従来のスケール・アップは、大型槽内環境は小型槽内環境と同じく均一なものとして捉え取り扱われてきた。しかしながら、実際には槽内は液深により水圧勾配を形成し、溶存酸素濃度 (DO) の勾配が形成されている。<sup>7,8)</sup> 溶存酸素濃度の不均一性が細胞に種々の悪影響を与えるようなビアラホス発酵については、従来の槽内環境が均一であるとするスケール・アップ法は必ずしも十分であるとは言えない。すなわち、本研究のように溶存酸素濃度が生産に影響を与える発酵の場合には、大型槽のセンサー位置に小型槽の最大生産を与える溶存酸素濃度を代表させることは好ましくなく、大型槽内の溶存酸素濃度の分布の幅を考慮に入れた新しいスケール・アップ法が必要と考える。

Fig. 10 に大型槽の種々の位置に DO センサーを取

り付けて、それぞれの位置で溶存酸素濃度を小型槽の最大生産を与える溶存酸素濃度に設定した場合の生産量の差異を示した。すなわち、a)は液面付近、b)はセンター付近、c)はボトム付近にそれぞれ DO センサーを設置し小型槽の最大生産を与える溶存酸素濃度 0.5 ppm に制御した。破線で示される部分が、大型発酵槽内（液深 10 m）の溶存酸素分布の幅で、また斜線であらわされる部分は、小型槽より生産が減じている部分を示している。このことから、生産量を最大にするには、従来の発酵槽の中心にある DO センサーに小型槽の最大生産を与える溶存酸素濃度を合わせるより、タンクの下層部分付近に小型槽の最大生産を与える溶存酸素濃度を合わせる方が有利であることが説明できる。

この考えを実際のビアラホス生産の大型槽に適用した結果、すなわち 300 kl 大型槽のボトムに DO センサーを取り付け、溶存酸素を 0.5 ppm に制御した場合には、小型槽の最大生産量の96%まで再現することが可能となり工業生産の実用化に成功した（300 kl 槽のセンターと液面付近で、溶存酸素濃度を 0.5 ppm に制御した場合は、それぞれ小型槽の最大生産量の 85~90%と80~85%であった）。このように、溶存酸素濃度が細胞に種々の悪影響を与えるような発酵については、大型槽内での水圧勾配により形成される溶存酸素濃度の不均一性を無視することはできないことがわかった。

#### 4. ビアラホス生合成に及ぼす酸素濃度の影響<sup>9)</sup>

培養時期に酸素分圧を種々変化させた場合の影響フラスコ内の酸素分圧を変える手段は Fig. 11 に示した装置を用い実施した。酸素分圧がビアラホス生成に影響を及ぼすことを上述したが、どの時期にもっとも酸素分圧の影響を受けるかを調べた。増殖期(0~2 d)、生産前期(2~4 d) および生産後期(4~6 d)のそれぞれの時期の酸素分圧を変化させたが、いずれの時期でも酸素分圧を低下させると、ビアラホスの生成は増大されること、またその期間が長ければ長いほどビアラホスの生成は増大することが判った。逆に、いずれの時期においても、酸素分圧を増大させるとビアラホスの生産は抑制された。このことから、ビアラホス発酵に関してはすべての期間を通して低い酸素分圧を保つことが望ましいことが分かった。

##### 4.1 TCA サイクル酵素活性に及ぼす酸素濃度の影響

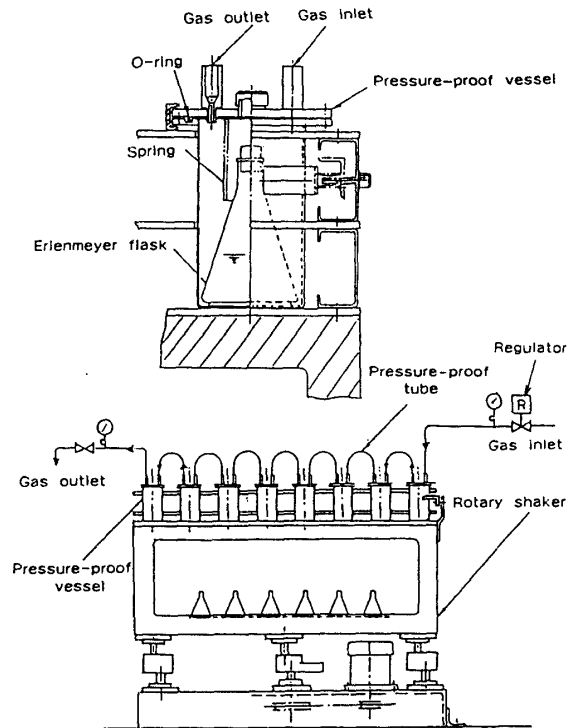


Fig. 11. Equipment for varying oxygen partial pressure in shake-culture.

TCA サイクルの酵素活性 糖代謝に関連する TCA サイクルの酵素活性と酸素分圧との関係を Table 3 に示した。低生産株(24-15)では、酸素分圧を変えても増殖期と生産期を通してこれらの酵素活性の変化はまったく見られない。高生産株(527-1)株の場合は、Citrate synthase を除いたすべての酵素活性は、増殖期と生産期を通して、通常酸素分圧下(0.21 atm)に比べ低酸素分圧(0.105 atm)下では相対的に低い。

グリオキシル酸サイクルの酵素活性 TCA サイクル酵素とは逆に、酸素分圧を下げると増殖期と生産期を通して、酵素活性は相対的に増大し、酸素分圧を高める酵素活性は低下した。この現象は低生産株に比べ高生産株でより顕著であった(Table 4)。

以上のことから、高生産株では、酸素分圧を下げると、TCA サイクルの酵素が抑制化されると同時に、グリオキシル酸サイクルの運行が活性化されることが明らかとなった。すなわち、ビアラホスの生合成の形式を Fig. 12 に示したが、ビアラホスの生合成は、グルコースからホスホエノールピルビン酸を経て C-P 結合形成、アセチル CoA による酢酸付加およびアラニン付加を経て行われるが、高生産株では酸素分圧を下げると、TCA サイクルの運行が抑制され、ビアラ



Table 3. Effect of oxygen partial pressure on TCA cycle enzyme activities in strains 24-15 and 527-1.

| Strain | Enzyme                   | Oxygen partial pressure |                  |              |                  |              |                  |
|--------|--------------------------|-------------------------|------------------|--------------|------------------|--------------|------------------|
|        |                          | 0.10 atm                |                  | 0.21 atm     |                  | 0.42 atm     |                  |
|        |                          | Growth phase            | Production phase | Growth phase | Production phase | Growth phase | Production phase |
| 24-15  | Citrate synthase         | 2.6                     | 2.3              | 2.4          | 2.3              | 2.5          | 2.1              |
|        | Aconitate hydratase      | 683                     | 375              | 667          | 368              | 647          | 348              |
|        | Isocitrate dehydrogenase | 8.5                     | 3.0              | 8.4          | 2.9              | 9.9          | 7.2              |
|        | Malate dehydrogenase     | 25.1                    | 34.2             | 24.4         | 34.3             | 22.4         | 35.9             |
|        | (Relative productivity)  | (108)                   |                  | (100)        |                  | (83)         |                  |
| 527-1  | Citrate synthase         | 1.1                     | 0.8              | 1.1          | 0.8              | 0.9          | 0.7              |
|        | Aconitate hydratase      | 350                     | 108              | 405          | 134              | 448          | 192              |
|        | Isocitrate dehydrogenase | 2.2                     | 1.1              | 2.6          | 1.3              | 3.2          | 1.6              |
|        | Malate dehydrogenase     | 8.4                     | 9.5              | 14.4         | 18.7             | 24.9         | 49.8             |
|        | (Relative productivity)  | (720)                   |                  | (498)        |                  | (186)        |                  |

Enzyme activity:  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein.

Amount of bialaphos expressed in values relative to a culture by low producing strain 24-15 of ordinary partial pressure of 0.21 atm (0.44 g/l=100).

ホスの基質となるアセチル CoA やピルビン酸が二次代謝に有効に利用されるため、ビアラホス生成が増大するものと判断した。酸素制限下、TCA サイクルの運行がある程度抑制された際に最大生産を示す代謝物については *Bacillus subtilis* が生産するアセトインおよび2,3-ブチレングリコール発酵<sup>10)</sup>やフェニールアラニン、バリン、ロイシンのアミノ酸発酵<sup>12,13)</sup>などが報告されており、これらの代謝物がいずれもピルビン酸もしくはホスホエノールピルビン酸を基質素材にしている点はビアラホス発酵と共通しており興味深い。

#### 4.2 メチル化ステップに及ぼす酸素濃度の影響<sup>13)</sup>

高酸素分圧下におけるビアラホス生合成中間体の蓄積について 高生産株は高酸素分圧下ではビアラホス生産は著しく低下する。この高酸素分圧下での生産阻害の現象を解明するため、高酸素分圧下で培養を実施し、その培養ろ液をアミノ酸アナライザーにより分析した結果、一つはビアラホスのデメチル体 (MP-102)、他の一つは AMPB (ビアラホスの脱アラニンされた) のデメチル体 (MP-101) であることが明らかとなった。このようにデメチル体のビアラホス生合成中間体が蓄積していることから、高酸素分圧下ではメチル化のステップが抑制されていることが示唆された。

Table 4. Effect of oxygen partial pressure on glyoxylic acid cycle enzyme activities in strains 24-15 and 527-1.

| Strain | Enzyme                  | Oxygen partial pressure |                  |              |                  |              |                  |
|--------|-------------------------|-------------------------|------------------|--------------|------------------|--------------|------------------|
|        |                         | 0.10 atm                |                  | 0.21 atm     |                  | 0.42 atm     |                  |
|        |                         | Growth phase            | Production phase | Growth phase | Production phase | Growth phase | Production phase |
| 24-15  | Isocitrate lyase        | 3.8                     | 3.8              | 3.3          | 3.6              | 1.2          | 1.2              |
|        | Malate synthase         | 2190                    | 2080             | 1960         | 1980             | 1810         | 1650             |
|        | (Relative productivity) | (108)                   |                  | (100)        |                  | (83)         |                  |
| 527-1  | Isocitrate lyase        | 8.4                     | 7.9              | 5.2          | 4.9              | 1.1          | 1.4              |
|        | Malate synthase         | 2580                    | 5160             | 2320         | 4490             | 2050         | 1050             |
|        | (Relative productivity) | (720)                   |                  | (498)        |                  | (186)        |                  |

Enzyme activity:  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein.

Amount of bialaphos expressed in values relative to a culture by low producing strain 24-15 of ordinary partial pressure of 0.21 atm (0.44 g/l=100).

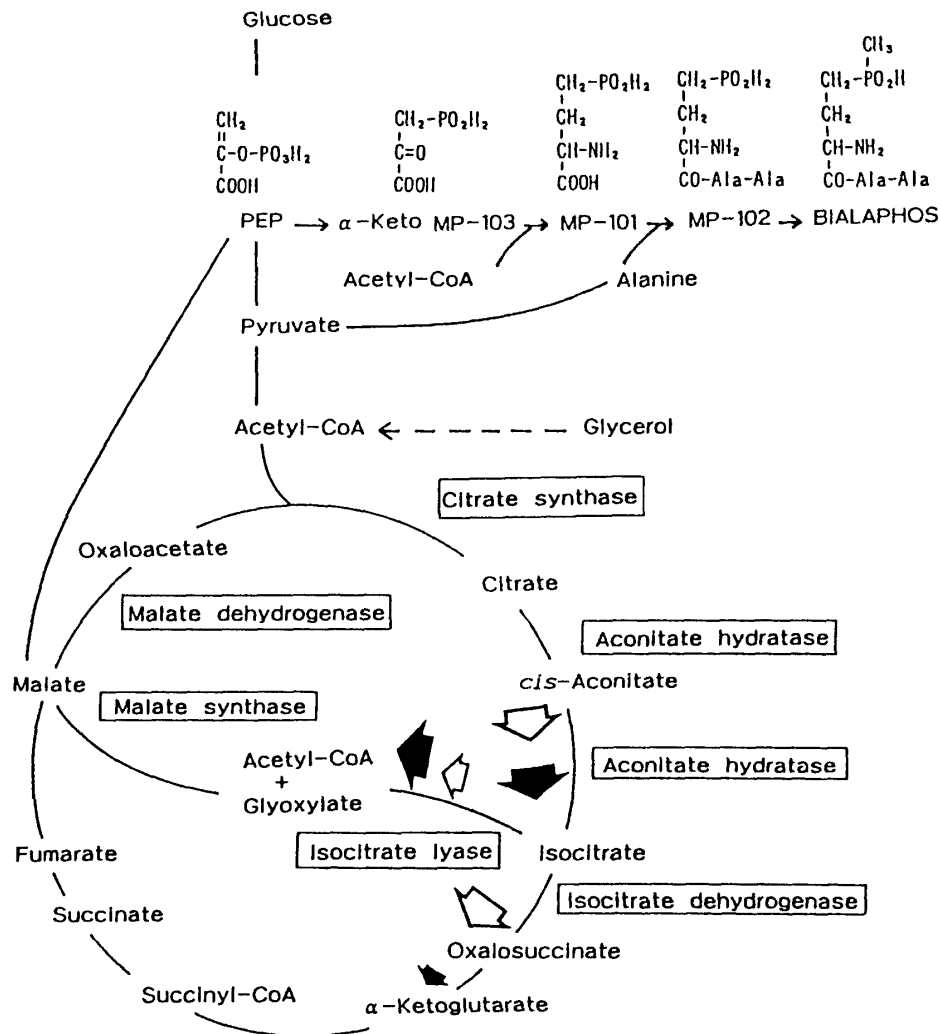


Fig. 12. Scheme of bialaphos biosynthesis by *S. hygrosopicus*. Arrows:  $\leftarrow$ , low oxygen partial pressure;  $\rightleftharpoons$ , high oxygen partial pressure.

生合成中間体からのピアラホスへの変換 高酸素分圧下でメチル化のステップが抑制されることを明らかにするため、洗浄菌体系を用い検討した。各種生合成中間体からピアラホスへの変換に及ぼす酸素分圧の影響を調べた (Table 5)。その結果、MP-101 および MP-102 を基質にした場合には酸素分圧が高まるにつれピアラホスへの変換が抑制されたが、AMPB を基質にした場合には酸素分圧が高まっても変換は進んだ。このことから、ピアラホス生合成に参与するアミノ化およびアラニル化は酸素分圧の影響を受けないが、メチル化は明らかに酸素分圧の影響を受けることが判明した。さらに、高酸素分圧がメチル化を進行させない原因としては次のことが考えられる。酸素分圧が高まると、a) メチル化関連酵素 (補酵素) の酸化による活性の低下、b) 培養中のメチル化関連酵素の

生成が減少、c) メチル化酵素を阻害する物質の生成、および d) メチルドナーの供給が抑止されるなどである。しかし、酸素分圧を下げるとただちにピアラホスの生産が開始される事実からみて、a), b), c) については要因としないと考えることが妥当であろう。

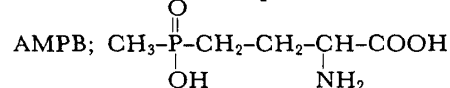
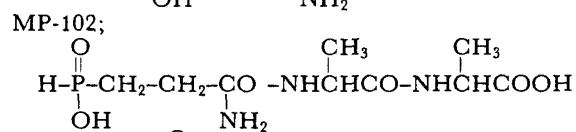
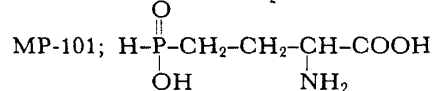
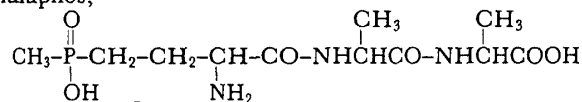
各種メチル関連物質の添加 上述のように、酸素分圧が高いとメチルドナーの供給が抑止されることが考えられる。そこで、培養液にビタミン B<sub>12</sub> (シアノコバラミン)、メチルコバラミン、メチオニン、およびベタインなどのメチル化関連物質を添加し、高酸素分圧 (0.42 atm) 下の暗所でピアラホスの生産を調べた。Table 6 にその結果を示したが、ベタインおよびメチオニンを添加した場合、高酸素分圧 (0.42 atm) 下でのピアラホスの生産は回復していることが判った。すなわち高酸素分圧下でもメチルドナーの供給が満た

Table 5. Effect of the partial pressure of oxygen on the conversion from various biosynthetic intermediates, MP-101, MP-102 and AMPB to bialaphos using washed cell system of the non-producing strain (NTG-213).

| O <sub>2</sub> partial pressure (atm) | Bialaphos concentration (μg/ml) |        |      |
|---------------------------------------|---------------------------------|--------|------|
|                                       | MP-101                          | MP-102 | AMPB |
| 0.10                                  | 290                             | 365    | 325  |
| 0.21                                  | 220                             | 270    | 320  |
| 0.31                                  | 170                             | 205    | 310  |
| 0.42                                  | 95                              | 130    | 328  |
| 0.84                                  | trace                           | trace  | 300  |

Thirty ml of 50 mM phosphate buffer (pH 6.5) containing 3.1 mM of intermediate and 900 mg (dry weight) of mycelia was introduced into the Erlenmeyer flask, and incubated on a rotary shaker at 32°C for 24 h.

bialaphos;



されれば、ビアラホス生産が低下しないことが示された。以上のことから、高酸素分圧下でビアラホス生産低下が起こる理由としてメチルドナーの供給が律速となっていることが示唆された。この高酸素分圧下でメチルドナーの供給が抑止されるメカニズムの解明についてはさらに一歩突っ込んだ研究が必要であり現在検討中であるが、ビアラホス発酵では酸素分圧が一次代謝、二次代謝のいずれにも影響を及ぼすこと、すなわち、酸素分圧が高まると TCA サイクルの運行が活発となりビアラホスの生合成に係わる基質が菌体生成に盛んに流れ、さらにメチルドナーの供給が抑止されビアラホス生合成の最終ステップのメチル化が進まずビアラホスの生産が低下することが明らかとなったことは、ビアラホスの工業的培養法を設定するうえで充分価値のある知見となった。

#### おわりに

工業的な製造技術を完成させるためには、多くの失

Table 6. Effects of various methylation agents on bialaphos production by the highly productive strain (527-1) under high oxygen partial pressure in P-1 medium.

| Methylation agent                               | Relative bialaphos concentration |          |
|---|----------------------------------|----------|
|   | 0.21 atm                         | 0.42 atm |
| None  | 100                              | 62       |
| Betaine (1 mg/ml)                               | 99                               | 93       |
| Methionine (1 mg/ml)                            | 92                               | 73       |
| Vitamin B <sub>12</sub> (5 μg/ml)               | 108                              | 55       |
| Methylcobalamin (5 μg/ml)                       | 107                              | 57       |
| CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (50 μg/ml) | 102                              | 57       |

Bialaphos production was expressed as a relative value for control where the partial pressure of oxygen was 0.21 atm without the addition of methylation agent.

敗例を開発段階で有することが必要であると考えている。フラスコ培養で優良と認められた菌株が、まったくオリバーフィルタによるろ過が不可であったり、また大型槽へのスケールアップ実験で生産量が目標の50%しか達成できなかったことなど著者らも苦い思いをしている。しかし、こうした中から大きく飛躍するヒントを得たのも事実である。

本研究においては、大型槽での失敗を小型槽で再現させるため、大型槽内の環境を実験室レベルで再現させることが重要であった。著者らが使用した圧力可変の培養装置や、耐圧で送気可能な密閉型振盪培養装置は、大型槽の環境を一部有するものであり、大型槽で細胞が影響を受けるであろう諸因子について、それらの影響を事前に知ることができ、大型槽の運転条件を決める有効な武器となった。

一方、大型槽の水圧により高められる酸素分圧およびその酸素分圧の不均一勾配を考慮したスケール・アップを提案したが、この概念は、これまでスケール・アップが困難で問題を残していた微生物代謝産物の工業生産への再考のチャンスを与えることとなり、さらに溶存酸素制御培養法の精度アップや再構築などに役立つものと考えている。また、これらの概念が微生物代謝産物の大量培養成功の一端を担うことを期待したい。

本研究の機会を与えて戴き、御激励を賜った弊社専務取締役岡田明氏、常務取締役本部長故深津俊三博士に謹んで御礼を申し上げます。また、実験に御協力下さった弊社および筑波大学の研究員の皆様に厚く御礼を申し上げます。

## 文 献

- 1) Tachibana, K., Kaneko, K.: *J. Pesticide Sci.*, **11**, 297-304 (1986).
- 2) Takebe, H., Imai, S., Ogawa, H., Satoh, A., and Tanaka, H.: *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 226-232 (1989).
- 3) Ichikura, T., Date, M., Ishikura, T., Ozaki, A.: *Folia Microbiol.*, **16**, 218-224 (1971).
- 4) Takebe, H., Matsunaga, M., Hiruta, O., Satoh, A., and Tanaka, H.: *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 110-113 (1991).
- 5) Seto, H., Imai, S., Tsuruoka, T., Satoh, A., Kojima, M., Inoue, S., Sasaki, T., and Otake, N.: *J. Antibiot.*, **35**, 1719-1721 (1982).
- 6) Takebe, H., Takane, N., Hiruta, O., Satoh, A., Kataoka, H., and Tanaka, H.: *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 93-99 (1994).
- 7) Manfredini, R. and Cavallera, V.: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 3115-3131 (1983).
- 8) Takamatsu, T., Shioya, S., and Nakatani, H.: *J. Ferment. Technol.*, **59**, 287-294 (1981).
- 9) Takebe, H., Matsunaga, M., Hiruta, O., Satoh, A., and Tanaka, H.: *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 283-287 (1993).
- 10) Shibai, H., Ishizaki, A., and Hirose, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2083-2088 (1973).
- 11) 明石邦彦, 柴井博四郎, 広瀬義夫: 発酵と工業, **37**, 321-330 (1979).
- 12) 明石邦彦, 柴井博四郎, 広瀬義夫: 発酵と工業, **40**, 518-526 (1982).
- 13) Takebe, H., Hiruta, O., Matsunaga, M., Satoh, A., and Tanaka, H.: *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 433-435 (1991).