

〔醸酵工学 第58巻 第6号 431-434. 1980〕

連続培養法による *Clostridium butyricum* Miyairi の孢子生産

石井 賢治・上山 英夫・吉益 龍行*・堀越 弘毅

理化学研究所微生物生態学研究室, *ミヤリサン株式会社

Production of spores of *Clostridium butyricum* Miyairi by the continuous culture.

ISHII, K., H. UYAMA, *T. YOSHIMASU, and K. HORIKOSHI (Laboratory of Bacteriology and Ecology, The Institute of Physical and Chemical Research, Wako-shi, Saitama 351; *Miyarisan Co., Ltd., Togura-machi, Hanishina-gun, Nagano 2352) Hakkokogaku 58: 431-434. 1980.

Production of spores of *Clostridium butyricum* Miyairi 642 was investigated in two-stage continuous cultivation. The medium was composed of corn starch, amino acids mixture and calcium carbonate. In the first vessel, the optimal dilution rate was 0.50—0.60 hr⁻¹ for vegetative cell formation, and the cell count reached 1.0—1.1 × 10⁹ ml⁻¹.

This count was greater than that in batch culture (specific growth rate=0.85 hr⁻¹, maximal cell count=3.7×10⁸ ml⁻¹). In the second vessel, better spore formation was observed when dilution rate was less than 0.075 hr⁻¹. The maximal spore count was 4.0×10⁸ ml⁻¹. The spore formation of *C. butyricum* Miyairi 642 in the continuous culture did not depend on dilution rate of the first vessel, but on that of the second vessel.

Clostridium butyricum Miyairi は、全く毒素を生産しないことが宮入¹⁾により報告され、現在整腸剤製造の目的で培養されているが、本菌株の孢子形成の生理学的な諸条件は、まだ明らかにされていない。これは *Clostridium* 属が偏性嫌気性菌であり *Bacillus* 属と異なり取り扱いが煩雑なためと考えられる。²⁾ *Clostridium* 属は栄養要求が一般的に複雑で、栄養細胞が増殖しても孢子が形成されない場合があり、本菌株もその例にもれない。孢子形成の要因については多くの報告があるが、それぞれの菌種により異なり、Knaysi³⁾ は栄養細胞の増殖が停止し飢餓状態になると孢子形成を開始するとし、また Spudich⁴⁾ は栄養細胞の構成成分の一部が分解され、その分解産物から新たに孢子形成に必要な物質が合成されるとしている。

大規模な菌体生産には連続培養法は有効な手段であり、Dawes,^{5,6)} Humphrey,⁷⁾ Kerraval⁸⁾ らは *Bacillus* 属の連続培養法による孢子生産の条件を検討している。著者らも孢子の大量生産を行う必要から本菌株の連続培養法について検討し、回分培養との比較を試み、二、三の知見を得たので報告する。

実験方法

供試菌株 本実験に用いた菌株は、*Clostridium butyricum* Miyairi 642 である。

回分培養法 回分培養には、Fig. 1 の第1槽と同様の装置を用いた。培地としてはコーンスターチ 2% (w/v)、アミノ酸混合液（直分解味液、脱脂大豆の塩酸加水分解物、味の素）2% (v/v)、炭酸カルシウム 0.75% (w/v) より成る組成のものを用い、加圧殺菌後約 80°C に冷却して、前培養液を 3% 接種し、発酵槽内に CO₂ ガスを 0.05~0.1 vvm で通じ、かつ 100 rpm でかくはんしながら 37°C で培養した。⁹⁾ なお、前培養は、上記の回分培養と同様な培地を用い、これに加圧殺菌後約 80°C で本菌株保存用砂培地を接種し、37°C で 40時間静置培養した。

連続培養法 連続培養には、Fig. 1 に示す装置を用いた。まず前培養として第1槽および第2槽で上記の回分培養を行い、第1槽の栄養細胞数が所定の値に達した時、培地の供給を開始して連続培養に切り換えた。この際の培地は、コーンスターチ 2% (w/v)、

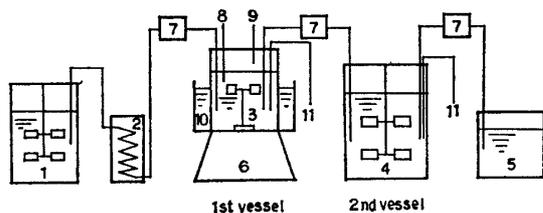


Fig. 1. Schematic diagram of apparatus for spore production by continuous cultivation.

1, Feed vessel of medium; 2, medium cooler; 3, 3-l mini jar fermentor (first vessel); 4, 20-l jar fermentor (second vessel); 5, harvest vessel; 6, magnetic stirrer; 7, variable flow pump; 8, CO₂ gas inlet; 9, CO₂ gas outlet; 10, constant temperature bath; 11, sample line.

アミノ酸混合液 4% (v/v), 炭酸カルシウム 0.75% (w/v) から成るものとし, 雑菌汚染を防ぐため培地貯留槽を 80°C に保ち, 冷却後第 1 槽に供給した. CO₂ ガスは, 第 1 槽のみに通じ第 2 槽では菌体により生成される CO₂ ガスにより嫌気状態を維持した.

測定法 栄養細胞および孢子数の測定には, トーマの血球計算板を使用した.¹⁰⁾ 糖濃度はフェノール硫酸法¹¹⁾により, pH は日立-堀場 M-7 pH メーターを用いて測定した.

実験結果および考察

回分培養 回分培養の経過を Fig. 2 に示したように, この培養条件下では約 10 時間で増殖を停止し

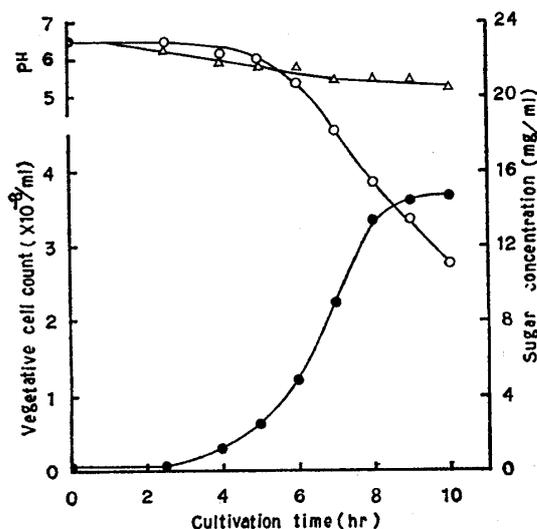


Fig. 2. Time course of batch culture of *C. butyricum* Miyairi 642 in 2-l fermentor. ● growth, ○ residual sugar, △ pH.

内生孢子を形成した. *Clostridium* 属の孢子形成の最適 pH は, *C. sporogenes* では pH 7.0~8.0,¹²⁾ *C. thermosaccharolyticum* では 5.0~5.5¹³⁾ という報告があるように菌種により異なる. 本菌株は, pH 5.0~5.5 で良好な孢子形成を示した. 一般に孢子形成は炭素源のグルコースが過剰な状態では阻害されるが,¹⁴⁾ 本菌株では炭素源濃度の高い状態でも栄養細胞の増殖が停止すれば孢子は形成された.

本菌株の回分培養における最大比増殖速度および孢子形成率は, それぞれ 0.85 hr⁻¹ および 80% 以上であった.

連続培養 本菌株は回分培養では, 生産物の蓄積, 増殖制限因子の濃度低下, pH 等の影響により栄養細胞の生育が抑制されると孢子が形成されるようになるものと考えられる. 連続培養の場合は, 第 1 槽で回分培養の log phase 後期に相当する栄養細胞の生産を行い, 第 2 槽は孢子の形成される stationary phase とすれば効率のよい孢子生産が可能であると考え, その操作条件を検討した.

Fig. 3 に示すように, 第 1 槽の栄養細胞数は, 回分培養の結果から予想される値よりも大きく, 希釈率の増大に伴い増加した. その原因は, 比較的希釈率の大きなところでは新しい培地の供給により, 代謝生産物に由来する生育阻害因子が希釈されることにあると考えられる. また, 回分培養での最大比増殖速度は 0.85 hr⁻¹ であり, 培地供給量の上限はこの値により制限さ

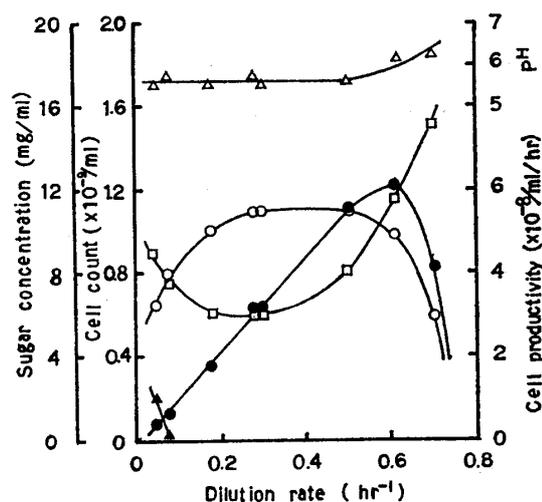


Fig. 3. Steady-state relationship in continuous culture (first vessel).

○ total cells (spore + vegetative cells), ▲ spore, ● cell productivity, □ residual sugar, △ pH.

れる。

回分培養の結果より、孢子形成を抑制する1つの要因として、比増殖速度の増大が考えられる。従ってFig. 3に示すように、希釈率が 0.1 hr^{-1} 以上の領域では孢子形成能が低下して栄養細胞の生育は旺盛になり、菌体数は回分培養から予想される最大値よりも多くなったものと考えられる。また Fig. 3 を考慮すれば、第1槽の希釈率が 0.1 hr^{-1} 以上にならないようにすれば孢子形成が起こり、栄養細胞の生産量は減少する。第1槽における最大の菌体数は、希釈率が $0.18 \sim 0.60 \text{ hr}^{-1}$ において $1.0 \sim 1.1 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ であり、最大菌体生産能は希釈率が 0.60 hr^{-1} で $6.3 \times 10^8 \text{ ml}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ であった。

第2槽における本菌株の孢子形成は、Fig. 4に示すように希釈率と密接な関係があり、希釈率の大きな範囲では孢子形成能が低い。回分培養において比増殖速度の低下する時期から孢子形成が開始することを考慮すれば、第2槽の操作条件としては低い希釈率が好ましい。そこで第2槽における孢子形成に及ぼす希釈率の影響を検討したところ、Fig. 4に示すように第1槽の希釈率の値にかかわらず、第2槽の希釈率により孢子形成能が支配されることが明らかとなった。すなわ

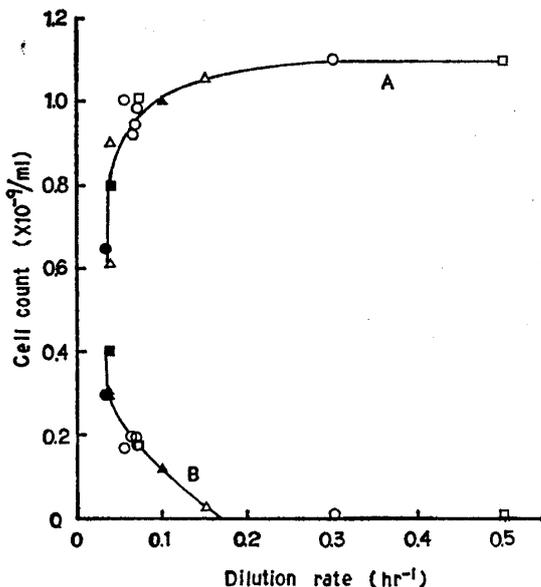


Fig. 4. Steady-state relationship in continuous culture (second vessel).

Dilution rates of the first vessel were 0.05 hr^{-1} (●), 0.18 hr^{-1} (▲), 0.28 hr^{-1} (■), 0.30 hr^{-1} (△), 0.50 hr^{-1} (○), 0.60 hr^{-1} (□). A, Total cells (spores + vegetative cells); B, spores.

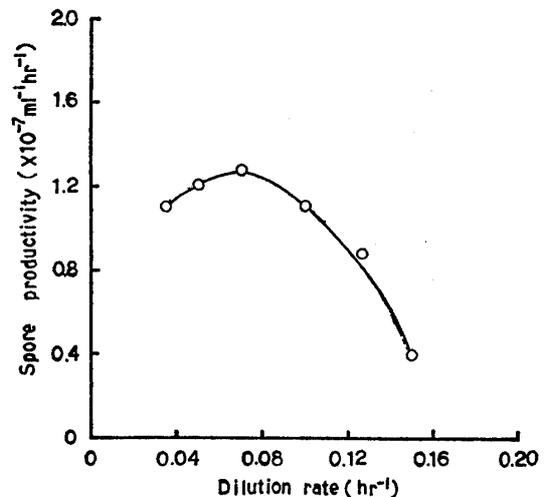


Fig. 5. Relationship between dilution rate and spore productivity in the second vessel of the continuous culture of *C. butyricum* Miyairi 642.

ち第2槽の希釈率が 0.03 hr^{-1} , 0.07 hr^{-1} 近辺, 0.15 hr^{-1} の場合、孢子形成はそれぞれ $3.0 \sim 4.0 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$, $1.0 \sim 2.0 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$, $0.3 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ 以下であった。これは回分培養において比増殖速度が培地中の生育基質の低下、代謝産物の蓄積および pH の影響を受けて減少し、孢子の形成能が増大する現象と対応するものと考えられる。また Fig. 5 に示すように、孢子生産に最も効率のよい第2槽の希釈率は、 0.07 hr^{-1} 付近にあると考えられる。

以上の結果より第1槽での孢子生産は、希釈率の影響をあまり受けないことから、栄養細胞が最大値になる希釈率 0.60 hr^{-1} を選択すべきであろう。ただし、実際の操作では安定な定常状態を維持するために、安全側の希釈率 0.50 hr^{-1} を選んだ。第2槽は最大孢子生産能を示す希釈率 0.07 hr^{-1} を採用した。しかし栄養細胞は、比較的高い比増殖速度を維持した状態で代謝産物と接触すると、形態ならびに代謝が変化する場合のあることが知られている。¹⁵⁾ 事実、本菌株でも長時間の連続培養において正常な孢子形成能は次第に低下し、140時間以上の操作は困難であった。現在、これらの問題を解決する培養法ならびに代謝産物の被毒を受けないような菌株の選択を試みている。

要 約

Clostridium butyricum Miyairi 642 の孢子生産について検討し、次のような結果を得た。

1. 回分培養における最大比増殖速度は 0.85 hr^{-1} , 最大菌体数は $3.7 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ であった。本培養条件では10時間で増殖を停止し、内生孢子を形成した。

2. 連続培養における第1槽の菌体数は、希釈率が0に近づくと回分培養での最大値に近づき、希釈率が 0.75 hr^{-1} で洗い出しが起こり、回分培養より推察した値とほぼ一致した。また希釈率が $0.18 \sim 0.60 \text{ hr}^{-1}$ 範囲では、回分培養における菌体数を上回る $1.1 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ の菌体数が得られた。しかし希釈率が小さいと孢子形成が起こり菌体数が減少するので、第1槽の栄養細胞の生産のためには、希釈率が $0.50 \sim 0.60 \text{ hr}^{-1}$ が最適であろう。

3. 第2槽の孢子形成は第1槽の希釈率にあまり依存せず、第2槽の希釈率に左右されることがわかった。第2槽においては希釈率が 0.15 hr^{-1} 以下の場合に孢子生産が認められたが、最大孢子生産能が可能な希釈率 0.075 hr^{-1} を選択するのがよいと考えられる。

本研究を行うにあたりご鞭撻を賜った名古屋市立大学蜂須賀養悦教授、東海大学小沢敦教授、ミヤリサン御宮入雄吾社長ならびに森茂行氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 宮入：千葉医学会誌, **13**, 9 (1935).
- 2) 蜂須賀, 堀越：耐久型細胞, p. 398, 岩波書店, 東京 (1976).
- 3) Knaysi, G. : *Bacteriol. Rev.*, **12**, 19 (1948).
- 4) Spudich, J. A., Kornberg, A. : *J. Biol. Chem.*, **243**, 4600 (1968).
- 5) Dawes, I. W., Mandelstam, J. : *J. Bacteriol.*, **103**, 529 (1970).
- 6) Dawes, I. W., Key, E. : *J. Gen. Microbiol.*, **56**, 171 (1969).
- 7) Humphrey, A. E., Kitami, A. : 醸工, **44**, 283 (1966).
- 8) Kerravala, Z. J., Srinivasan, V. R. : *J. Bacteriol.*, **88**, 374 (1964).
- 9) Bester, B. H., Claassens, J. W. : *Phytophylactica.*, **2**, 237 (1970).
- 10) 柳田：微生物学実験法, p. 133, 講談社, 東京 (1976).
- 11) 福井：還元糖の定量法, p. 145, 東京大学出版会, 東京 (1973).
- 12) Brown, W. L., Ordal, Z. J. : *Appl. Microbiol.*, **5**, 156 (1957).
- 13) Pheil, C. G., Ordal, Z. J. : *Appl. Microbiol.*, **15**, 893 (1967).
- 14) Nasuno, S., Asai, T. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **6**, 71 (1960).
- 15) Silman, R. W., Rogovin, P. : *Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 23 (1972).

(昭55. 4. 14受付)