

連続培養による *Bacillus caldolyticus* の α -アミラーゼの生産

鄭 智元・矢部 勇・戸田 清*

東京大学応用微生物研究所

(平成元年9月7日受付 平成2年3月27日受理)

α -Amylase production by *Bacillus caldolyticus* in a cell-recycling fermentor with membrane filtration. CHU-YUAN CHENG, ISAMU YABE, and KIYOSHI TODA* (Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Bunkyo-ku Yayoi 1-1-1, Tokyo 113) Hakkokogaku 68: 367-373, 1990.

The productivity of α -amylase in cell-recycling continuous culture of *Bacillus caldolyticus* strain SP using a fermentor with a hollow fiber membrane filter module was investigated in comparison with that in batch and chemostat cultures. When the medium of the original concentration was fed at a constant flow rate, α -amylase activity in the effluent was the same as that in the batch culture (100 U/ml). When the medium concentration was increased five-fold, α -amylase activity increased only 2.9 times even though the viable cell concentration increased about ten-fold. When the medium concentration was increased exponentially in accordance with the increase of the cell concentration, α -amylase activity reached 713 U/ml at a dilution rate of 0.17 h^{-1} ; 898 U/ml at 0.24 h^{-1} .

連続培養槽の流出培養液から菌体を回収し培養槽に戻す操作により菌体濃度を高め生産速度を向上させるいわゆる過培養が微生物およびその他の生物細胞による代謝産物の生産の効率化に有効であると考えられ、多くの研究者技術者の関心を集めている。過培養の効用は：(1)増殖阻害物質の除去により、流加培養の場合より菌体濃度を高めることが可能であること、(2)高濃度菌体により物質生産効率が増加すること、(3)菌体を系外へ流出させないため、菌体の分離回収プロセスが不要となり、培養液中の生産物(酵素)の回収、精製プロセスの簡略化が可能であること、の3点が挙げられる。

過培養の原型は Herbert¹⁾ によって考案され、研究室レベルで実際に運転したのは Pirt²⁾ が最初と考えられる。1980年代から、ホローファイバー膜を濾材とする過培養モジュールを用いた細胞高密度過培養の研究が盛んになったが、嫌気性発酵が主で、たとえばパン酵母、³⁾ *Kluyveromyces fragilis*、⁴⁾ *Zymomonas mobilis* と *Saccharomyces cerevisiae*、⁵⁾ *Pachysolen tannophilus*⁶⁾ などによるア

ルコール発酵、*Streptococcus cremoris*⁷⁾ による乳酸発酵が挙げられる。これらの研究によれば高濃度菌体によりエタノールおよび乳酸など一次代謝生産物の生産性が向上することが報告されている。たとえば、*Saccharomyces cerevisiae* を用いたエタノールの生産速度は回分培養に比べて20倍、連続培養に比べて12倍向上した。³⁾ *Zymomonas mobilis* の場合は回分培養に比べて17.6倍向上した。⁵⁾ *Streptococcus cremoris* による乳酸の生産速度は回分培養に比べて6.8倍向上した。⁷⁾

しかしながら過培養による菌体外酵素の生産に関する研究はほとんど行われていない。好気性細菌の高濃度培養が技術的に困難であることの他に、菌体外酵素の生産が増殖非連動型であることが多く、菌体の高濃度化が酵素生産速度の向上に結びつかないことがその理由として挙げられる。たとえば *Bacillus* 属細菌の菌体を担体に固定化して α -アミラーゼ生成について調べた報告はいくつかある。^{8-11),13,14)} その中で、 α -アミラーゼ活性が増加した例は1報告⁸⁾ だけであり、向上率は2倍にすぎない。ゲル包括法の場合はゲル内の酸素などの拡散抵抗が増殖活性ならびに酵素生産活性の促進の妨げになっているものと考えられる。本研究

* 連絡先, Corresponding author.

ではホローファイバーモジュールを培養槽に付設したメンブレンバイオリアクターを用いて *Bacillus caldolyticus*^{12,15,16} の汙過培養を行い、菌体の高濃度化による α -アミラーゼの生産速度の改善を中心に検討を行った。

実験方法

使用菌株 *Bacillus caldolyticus* SP 株.¹² 回分培養において α -アミラーゼ生成の誘導物質としてマルトースを必要とする。

使用培地 回分および連続培養においては通常濃度のマルトースカシトン培地¹²を用いた。その組成 (g/l) は以下のようなものである。カシトン 2, マルトース 1, KH_2PO_4 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1, MnCl_2 0.001. 初発 pH は 1% (W/V) KOH により 7.2 に調節した。汙過培養では通常濃度, 5 倍濃度のマルトースカシトン培地を用いたほか, 菌体濃度の増加に応じて指数的に培地濃度を増加させる場合は 13.1 倍濃度のマルトースカシトン培地と滅菌水を用いた。

培養方法 回分および連続培養の実験方法は既法¹²と同じである。pH 制御は行わなかった。連続培養においても、汙過培養においても実験に用いた希釈率では培養液の pH は 8 に近い値でほぼ同じ pH 条件になっていた。汙過培養に用いた装置の概略図を Fig. 1 に示す。ミニジャーフェメンターにホローファイバー膜汙過モジュール (三菱レイヨン製 STN0134T 公称孔径 $0.34 \mu\text{m}$, 汙過面積 0.3 m^2) を付設したもので、培養液量 800 ml, 培養液循環速度 22.5 l/h の条件で汙過培養を行った。実験に用いたホローファイバー

モジュールの最大汙過速度は 200 ml/h で、汙過速度をこれ以上にセットすると、短時間に目詰まりがおきて、安定した操作条件が得られなかった。回分培養から汙過培養に切り替える時期については、回分培養の増殖停止期に切り替えた場合と、回分培養を行った後で低い希釈率で 1~2 晩連続培養を行った後で切り替えた場合の二種の実験を行った。後者の実験で回分培養と汙過培養との間にケモスタット培養を行った理由は、回分培養で増殖した SP 株を α -アミラーゼ生産活性の高い変異株 (以後 M 株と書く) に転換させるためである。既報の研究¹²)において、SP 株 (回分培養において α -アミラーゼの誘導物質としてマルトースを必要とする) は連続培養によりほぼ全菌数が M 株 (回分培養において培地にマルトースを添加しなくても充分 α -アミラーゼを構成的に生産する変異株で、マルトース添加培地を供給するケモスタット培養において比較的高い α -アミラーゼの生産性を示す) に変換することを確かめている。

培地供給法 一定濃度の培地を用いる場合は培地貯蔵槽からベリスタ式ポンプを用いて培養槽へ直接供給した。菌体濃度の増加に応じて、培地濃度を指数的に増加する場合は以下のような手順で行った。

1) 増殖制限基質の質量供給速度の決定: 培養槽中の菌体の比増殖速度および培養液の基質濃度が一定であると仮定して、基質および菌体の物質収支を取ると (1) 式になる。

$$F_s = \frac{V}{Y} \mu X_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

F_s : 基質供給速度 (g/h), V : 培養槽の液容積 (l), Y : 増殖

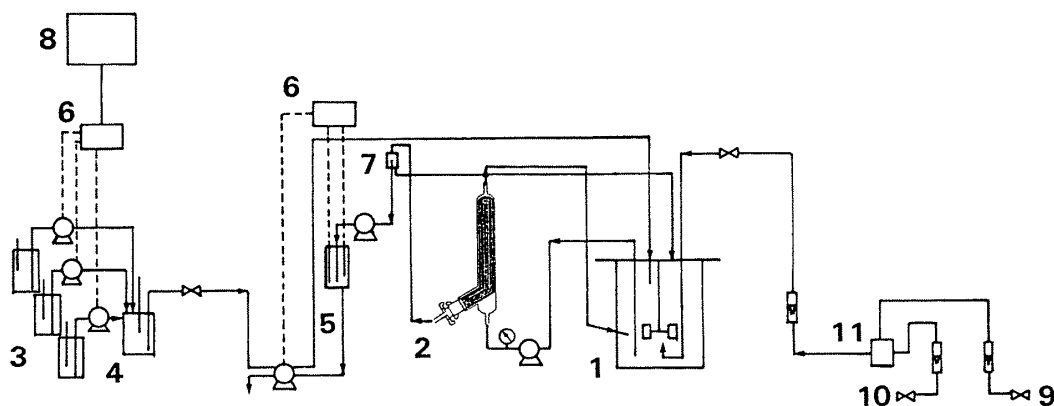


Fig. 1. Schematic diagram for cell-recycling fermentor with hollow fiber membrane system. 1, fermenter; 2, hollow fiber membrane filtration module; 3, medium component vessels; 4, medium mixing vessel; 5, level controller; 6, relay; 7, filtrate recycle portion; 8, micro computer (NEC PC-8801); 9, oxygen concentrator; 10, air compressor; 11, gas mixing chamber.

収率 (g/g), X_0 : 汙過培養初期の菌体濃度 (g/l), t : 培養時間. (1)式より, Y, μ, X_0, t などが決まれば, 所定の培養時間における基質の供給速度が求められる. 増殖収率 Y は通常濃度の培地を用いて行ったケモスタット培養において得られた最大菌体濃度を供給培地の炭素源(マルトース)濃度で割った値 0.33 g/g を用いた. 2) 培地供給濃度の制御: (1)式より求めた基質の供給速度 (F_s) を培養槽への培地の体積供給速度 (F_v) で割った値が供給培地の基質濃度 ($S_i(t)$) になる.

$$S_i(t) = F_s / F_v \quad (2)$$

通常培地の13.1倍濃度の濃厚培地と水とを混合することにより基質濃度を調節した. 濃厚培地の沈殿を防ぐために培地成分をカントン, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KOH およびマルトース, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MnCl_2 の二群に分けて, それぞれの溶液を同一流量で培地混合槽へ送りこみ, さらに滅菌蒸留水で希釈して培地濃度を調節した後培養槽へ供給した. 三者混合液の培地濃度の調節は, 13.1倍濃厚培地を輸送するポンプと蒸留水を輸送するポンプ流量を同一とし, 1 min にそれぞれのポンプを作動する時間間隔 (両者あわせて 1 min とした) をマイクロコンピュータ (NEC PC-8801) を用いてプログラム制御することにより行った. 培地供給ポンプの作動時間を短くし, 蒸留水供給ポンプの作動時間を長くすれば供給培地濃度が薄くなり, この逆にすれば, 供給培地濃度が濃くなる. (1)式をもとにして各培養時間における基質供給速度を求めて濃厚培地の体積供給速度に換算し, 各ポンプの作動時間を決めた.

酸素供給方法 培養槽への酸素の供給は通常濃度の培地を用いた場合は直接空気を送り, 供給培地が5倍濃度の場合は酸素富化装置 (TEIJIN 製 ハイサンソ TO 90)により酸素分圧を 0.6 atm に高めた空気を送り, 培地濃度を指数的に制御した場合はエアコンプレッサーの空気と酸素富化装置の高酸素濃度空気を混合し, 菌体濃度に応じて, 酸素分圧を段階的に高めた空気を供給した. DO は 2 ppm に保って酸素欠乏にならない条件を維持した.

測定方法 培養液の α -アミラーゼ活性, 生菌数濃度, 乾燥菌体濃度, マルトース濃度の測定方法は既報¹²⁾と同じである.

実験結果および考察

1. 培地成分の供給速度を一定にした汙過培養

Bacillus caldolyticus SP 株の連続培養に関する既往の研究¹²⁾において回分培養から連続培養に切り替えることによって α -アミラーゼ活性が回分培養の数倍に向上することを報告し, 接種菌の SP 株が構成性変異株の M 株に転換することと対応していることを指摘した. 汙過培養などの方法により M 株の細胞濃度を高密度に保つことができれば α -アミラーゼ生産速度がさらに向上するものと期待される. しかしながら, 前報¹⁵⁾において報告したように, SP 株の汙過培養実験において充分時間が経過した後 (90 h) の菌体濃度は回分培養の最大値の2倍に濃縮できたが, 培養液の α -アミラーゼ活性は 200 U ml^{-1} に留まり同じ条件 ($D=0.19 \text{ h}^{-1}$) の連続培養で達成された活性 (400 U ml^{-1}) の半分の値しか得られなかった. この実験は回分培養から直接汙過培養に移行して培養系中に SP 株を封じ込めて増殖させたにもかかわらず, 大部分の細胞は接種菌の SP 株から構成性 α -アミラーゼ生産変異株に転換していた. しかしこの変異株と親株の SP 株の増殖特性の差は不明であり, 開放系の連続培養において SP 株との増殖競争に勝って優占種となった M 株と同じではない可能性がある. このような理由から, 今回の研究では回分培養と汙過培養の間に一定期間連続培養を行った.

Fig. 2 は, 培地の供給速度を一定に維持した条件で行った汙過培養の結果である. 回分培養 10 h の間に菌濃度を約10倍に増加させた後で, $D=0.21 \text{ h}^{-1}$ の条件で連続培養を 40 h 行った. 培養液の α -アミラーゼ活性は回分培養末期で 60 U ml^{-1} であったが, 連続培養開始後直線的に増えて, 20 h (約4サイクル) 後に 520 U ml^{-1} に達した. この連続培養の期間に菌体濃度ならびに生菌濃度は減少しているので細胞あたりの α -アミラーゼ生産活性は高まっている. この活性の高い細胞の濃度を汙過操作により増加させることにより α -アミラーゼ生産速度が向上するものと考えて, Fig. 2 の 50 h の時点から汙過培養を開始した. しかし, OD_{660} で表した菌体濃度および生菌濃度の向上は認められたが α -アミラーゼ活性は減少し続け汙過培養開始後 120 h で連続培養の約1/5 の 100 U ml^{-1} に低下し α -アミラーゼ生産性の向上は実現しなかった. 生菌数は汙過後 20 h まで増加したがその後は約 $3 \times 10^8 \text{ cell ml}^{-1}$ の値を示し, 基質の添加が行われているにもかかわらず生菌数が増加する傾向は認められなかった. その理由は, 汙過操作により細胞濃度が増加するが, 培地栄養分の供給速度を一定に据え置いたため栄養源

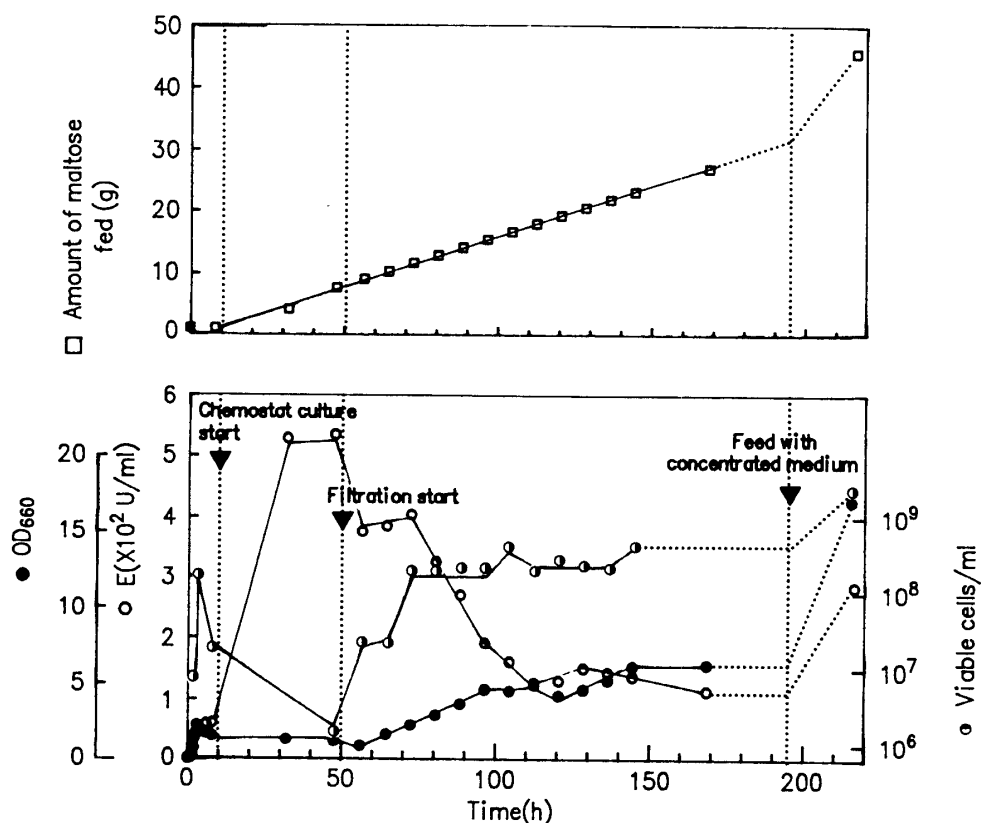


Fig. 2. Cell-recycling continuous culture of *B. caldolyticus* strain SP with constant feed rate of nutrients after batch and continuous cultures. (○), α -amylase activity in culture; (●), viable cell concentration; (●), optical density measured at 660 nm; (□), amount of maltose fed (The dilution rate of continuous culture was 0.2 h^{-1} and the culture with cell recycling was 0.21 h^{-1}).

が欠乏し一部菌体の胞子化および自己消化を引き起こし、その結果 α -アミラーゼ生産活性の低下を招いたものと考えられる。実際に、本研究に用いた *Bac. caldolyticus* SP 株は栄養源が不足になると細胞が胞子化する傾向があった。たとえば、ケモスタット培養において (SP 株は M 株に転換している) 胞子化した細胞の割合は希釈率 0.2 h^{-1} 以上ではほぼ 0% であるのに対して 0.1 h^{-1} では 5%, 0.07 h^{-1} では 10% と希釈率がある限界以下に低下すると胞子化率が増加した。

基質の供給不足を改善する目的で汙過培養開始後 140 h から培地の濃度を 5 倍に高めまた酸素濃度を 60% に高めた酸素富化空気を供給し DO を 2 ppm に保った。その結果、予期した通り生菌数、 OD_{660} および酵素活性を 20 h 汙過培養の間にそれぞれ数倍に増加させることができた。しかし、それでも、得られた培養液の α -アミラーゼ活性は汙過培養を開始する直前の活性 (520 U ml^{-1}) を下回る 290 U ml^{-1} にしか達さなかった。培養液中のマルトース濃度は通常培地を供給した場合も濃厚培地を供給した場合もほとんど

検出できなかったため、5 倍濃度の培地でもまだ栄養源の供給が不十分であったと考えられる。

2. 供給培地濃度を制御した汙過培養

基質供給速度が一定の汙過培養においては基質供給の不足が懸念されたので菌体増殖に応じて基質供給速度を変化させる方法を考案した。この方法によりマルトース濃度が不足あるいは過剰にならないように酵素生産にとって最適な環境条件を維持しながら、菌体濃度を増やし、高い α -アミラーゼ生産速度を得ることが期待できる。

希釈率を 0.17 h^{-1} に設定し、供給培地濃度を上記の目的に沿うように制御して行った汙過培養の結果を Fig. 3 に示す。図の上側にマルトースの供給量を示した。培養液のマルトース濃度は検出限界値以下であった。培養液の α -アミラーゼ活性はまず回分培養から連続培養 ($D=0.18 \text{ h}^{-1}$) に切り替えると増加し、30 h (約 5.4 サイクル) 後に 440 U ml^{-1} に達した。この時点で供給培地の濃度を指数的に増加させる方式の汙過培養に切り替えたところ培養液の α -アミラーゼ活性

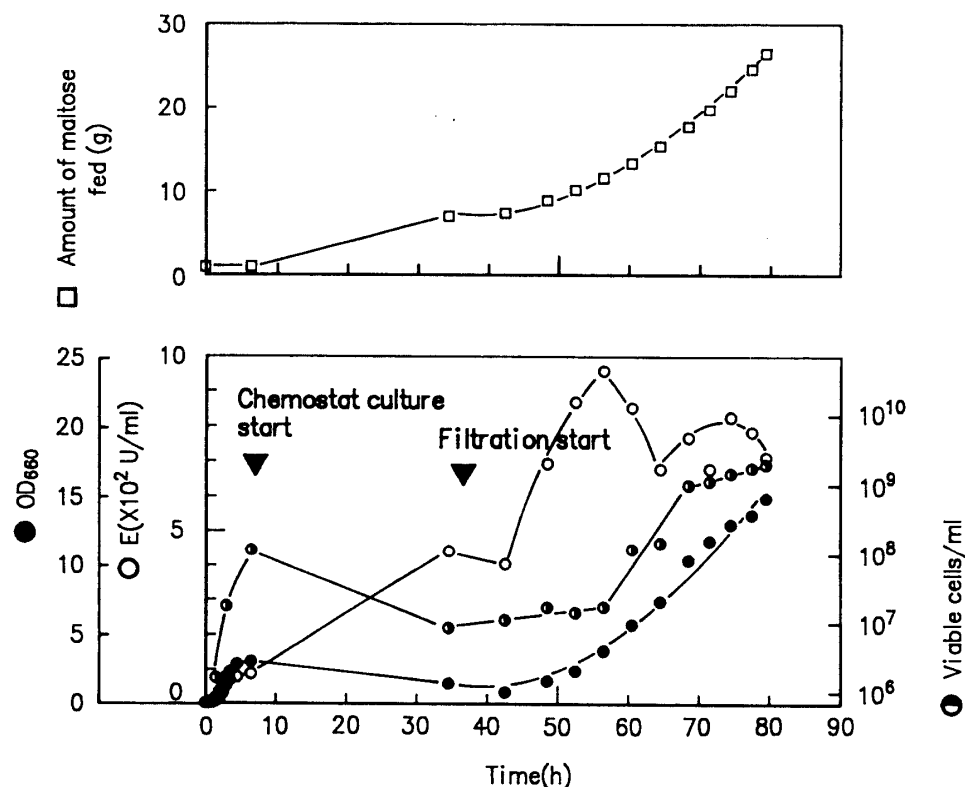


Fig. 3. Cell-recycling continuous culture of *B. caldolyticus* strain SP with nutrient feed rate changing exponentially after batch and continuous cultures. Symbols are the same as those in Fig. 2 (The dilution rate of continuous culture was 0.18 h^{-1} and the culture with cell recycling was 0.17 h^{-1}).

は、濾過開始後約7hの誘導期の後で急激に増加しはじめ、濾過開始後73hで 958 U ml^{-1} に達した。しかし、その後活性が減少した後増加し、最終的に 713 U ml^{-1} になった。生菌数は最終的に $4.6 \times 10^9 \text{ cells ml}^{-1}$ となり、ケモスタット連続培養終期(34h)の数100倍の値に達したが、培養液の α -アミラーゼ活性は1.6倍にしか増加しなかった。

濾過培養の希釈率を濾過モジュールの流速の限界である 0.24 h^{-1} まで上昇させて行った実験結果を Fig. 4 に示す。図の上側にマルトースの添加量を示す。培養液の α -アミラーゼ活性は連続培養($D=0.22 \text{ h}^{-1}$)で 487 U ml^{-1} に達した。濾過を始めると α -アミラーゼ活性は7hの誘導期の後でマルトースの添加に応じて増加し、最終的に 897.6 U ml^{-1} (回分培養の約9倍)になった。Fig. 3の実験結果のような不安定な状態は観察されなかった。 α -アミラーゼの生産速度を調節する物質の供給がFig. 3の実験におけるよりも適切に行われたことを示唆する。生菌数は濾過後44hに $9 \times 10^9 \text{ cells ml}^{-1}$ に達し、その後一定値に維持された。生菌濃度は連続培養の133倍になったが、培養液の α -アミラーゼ活性は1.8倍にしか増加しなかった。

以上の結果をまとめて Table 1. に示す。 α -アミラーゼ活性および生産速度は指数式的基質供給で行った濾過培養がすぐれているが、 α -アミラーゼの比生産活性および生産収率はケモスタット培養がすぐれている。前述したように α -アミラーゼの生産を濾過培養法で行った例がないので、本研究の結果を文献値と比較することができない。膜濾過以外の方法で *Bacillus* 属細菌を培養槽に封じ込めた状態で培養を行い、 α -アミラーゼの生産の研究を行った例は下記の報告が挙げられる。菌体をポリアクリルアミド⁹⁾あるいは κ -カラギナン¹⁰⁾に包括；イオン交換樹脂に吸着¹¹⁾；ポリエチレングライコール(PEG)とデキストランを添加した水性二相分配系で培養^{8,13,14)}これらの研究の着想は、菌体を含まない培養液だけを系外に取り出すため菌体の分離回収プロセスが不要となり、培養液中の酵素を回収するプロセスの簡略化が可能であることにもとづいている。しかし、いずれの研究でも固定化細胞による α -アミラーゼの生産は回分培養に比べて低い α -アミラーゼ活性しか得られていない。その原因は菌体を固定する担体の内部における基質および酸素などの物質移動過程が律速となり、細胞の α -アミラーゼ生産

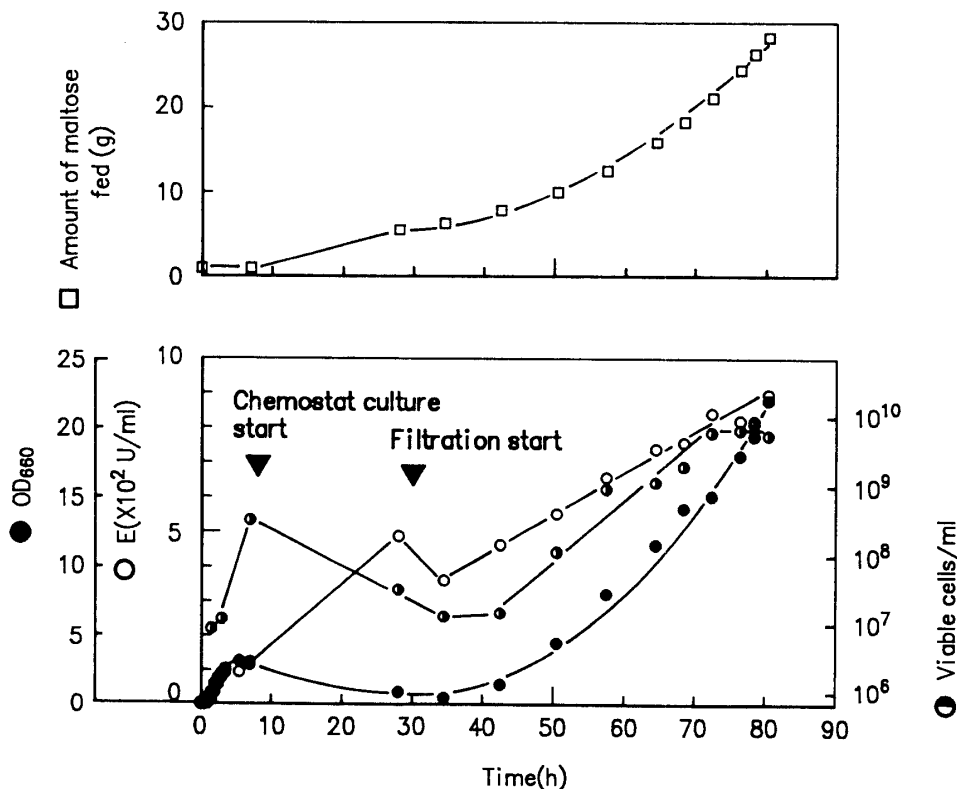


Fig. 4. Cell-recycling continuous culture of *B. caldolyticus* strain SP with nutrient feed rate changing exponentially after batch and continuous cultures. Symbols are the same as those in Fig. 2 (The dilution rate of continuous culture was 0.22 h^{-1} and the culture with cell recycling was 0.24 h^{-1}).

活性が低下するためであると考えられる。本研究の場合は、物質移動過程が律速になることが少ないホローファイバー膜濾過モジュールを用いた濾過培養を行ったため、酵素の活性の最大値が回分培養の9倍にも達することができたものと考えられる。この結果より、好気性菌の高細胞密度培養による酵素生産の効率化に関してホローファイバー膜を利用した濾過培養法が有望であることが確かめられた。しかし最高13.1倍濃度の濃厚培地を用いながら、通常濃度の培地を供給して

行ったケモスタット培養で達成した α -アミラーゼ活性 (487 U ml^{-1}) の1.8倍の活性しか得られなかったことは、生産収率の点で好ましくない。濾過培養による細胞濃度の高濃度化が α -アミラーゼの生産速度の向上に寄与するためにはなお検討すべき要因が残されている。たとえば、Fig. 2 から Fig. 4 の実験において認められるように OD_{660} と生菌数濃度がかなりしも対応していない。これは回分培養、連続培養、濾過培養の培養方法の違いおよび培地供給方法により生菌と

Table 1. Comparison of α -amylase production in batch and continuous cultures and continuous culture with membrane filtration.

Parameter/culture	Batch	Continuous	Continuous with filtration	
			Constant feed	Exponential feed
Dilution rate (h^{-1})		0.22	0.21	0.24
α -Amylase activity in culture (U/ml)	116.2	487.5	115.5	897.6
α -Amylase production rate (U/ml/h)	16.6	107.3	24.3	197.5
Specific rate of α -amylase production (U/mg-cell/h)	13.7	268.1	9.9	23.0
Product yield (U/mg-maltose)	116.2	1329.8	200.7*	243.6*
No. of figure	Fig. 4	Fig. 4	Fig. 2	Fig. 4

* Average over total time of an experiment.

死菌の割合が変動するためであることから、生菌率を高水準に保ちながら細胞の高密度化を行うことのできる条件を検索する必要がある。また α -アミラーゼの誘導あるいは抑制に関与する物質を特定し、その濃度を最適値に制御するための方法を開発することが必要であると考えられる。

要 約

好熱性細菌 *Bacillus caldolyticus* SP 株を用いて、培養槽に中空糸繊維膜濾過装置を付設した系で連続菌体培養を行い、 α -アミラーゼの生産性について調べた。培養槽への栄養分の供給を一定濃度の培地組成で一定流量で行った場合、濾過液の α -アミラーゼ活性は回分培養の最終活性とほぼ同じであった。培地の濃度を5倍に高めた場合、生菌数が通常濃度の培地を用いた場合の10倍になったが、 α -アミラーゼ活性は2.9倍 (290 U ml^{-1}) にしか増加しなかった。菌体濃度の増加に応じて供給培地濃度を指数的に増加した場合、希釈率が 0.17 h^{-1} において α -アミラーゼ活性は回分培養の7倍に相当する 713 U ml^{-1} に達した。希釈率を 0.24 h^{-1} に高めると、 α -アミラーゼ活性は 898 U ml^{-1} に達し、回分培養の9倍に相当する値が得られた。

文 献

- Herbert, D. A.: Theoretical analysis of continuous culture system. P. 21-53 Continuous Culture, monograph No. 12, London: Society of Chemistry and Industry. (1961).
- Pirt, S. J. and Kurowski, W. M.: *J. Gen. Microbiol.*, **63**, 357-366 (1970).
- Nishizawa, Y., Mitani, Y., Tamai, M. and Nagai, S.: *J. Ferment. Technol.*, **61**, 599-605 (1983).
- Janssens, J. H., Bernard, A. and Bailey, R. B.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1-5 (1984).
- Khorakiwala, K. H., Cheryan, M. and Mehaia, M. A.: *Biotechnol. Bioeng. Sym.*, No. 15, 249-261 (1985).
- Chung, I. S. and Lee, Y. Y.: *Biotechnol. Bioeng. Sym.*, No. 7, 391-400 (1986).
- Wang, E., Hatanaka, H., Iijima, S., Takebayashi, T., Shi, Z., Shimizu, K., Matsubara, M. and Kobayashi, T.: *J. Chem. Eng. Jpn.*, **21**, 36-40 (1988).
- Andersson, E., Johansson, A. and Hahn-Haegerdal, B.: *Enzyme Microbiol. Technol.*, **7**, 333-338 (1985).
- Kokubo, T., Karube, I. and Suzuki, S.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **5**, 233-240 (1978).
- Shinmyo, A., Kimura, H. and Okada, H.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 7-12 (1982).
- Groom, C. A., Daugulis, A. J. and Bradley, N. W.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 8-13 (1988).
- Cheng, C. Y., Yabe, I., and Toda, K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 125-129 (1989).
- Andersson, E. and Hahn-Haegerdal, B.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 329-336 (1988).
- Ramgren, M., Andersson, E., and Hahn-Haegerdal, B.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 337-340 (1988).
- 鄭 智元, 矢部 勇, 戸田 清: 醸工, **67**, 91-97 (1989).
- Cheng, C. Y., Yabe, I., and Toda, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 176-181 (1989).