

KAKEN
05650796

図 本館

微生物の高密度連続培養に関する研究

(課題番号 05650796)

平成6年度科学研究費補助金 (一般研究C)

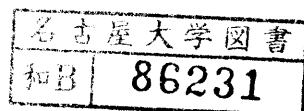
研究成果報告書

平成7年3月

研究代表者

山根恒夫

(名古屋大学農学部教授)



研究組織

研究代表者： 山 根 恒 夫 （名古屋大学農学部）

研究分担者： 上 田 俊 策 （宇都宮大学農学部）

研究経費

平成5年度	1 2 0 0 千円
平成6年度	8 0 0 千円
計	2 0 0 0 千円

研究発表

(1) 学会誌等 なし

(2) 口頭発表

福永正明、上田俊策、山根恒夫：

「*Alcaligenes latus* を用いた高密度流加培養および高密度連続培養による生分解プラスチック生産」

平成5年度日本生物工学会大会、平成5年12月9日

(3) 出版物 なし

第 1 章 はしがき

微生物反応（発酵）はバイオテクノロジーの中核をなし、来るべき 21 世紀のハイテク技術の 1 つとして大いにその発展が期待されている。しかしながら、工業的プロセスとして見た場合、微生物反応は、一般の化学反応に較べて生産性（容積基準の生産性、すなわち空間時間収率、S T Y。単位容積当たり単位時間当たりの目的生成物の生成量）が低いことが最大の欠点である。

ところで、微生物によって合成される有用物質はその存在場所によって菌体内蓄積型物質と菌体外分泌型物質とに大別される。前者の場合、目的代謝産物の含量が可能な限り高い菌体をできるだけ短時間にできるだけ高濃度に培養すれば生産性は向上することは明らかである。そして、高濃度培養、言い換えると、高密度培養、を達成する従来技術としては流加培養（fed-batch culture）が知られている。しかしながら、高密度流加培養では、菌体濃度の増加にはそれだけ長い時間を要すること、栄養源溶液の流加のため培養液が増加しついに培養継続不能となること、ダウンタイム（洗浄、滅菌、移送植菌、収穫、などに要する時間の総和）が存在すること、などのためその生産性向上には限界がある。連続培養はこの点をブレイクスルーできる可能性を持っている。一般に、連続培養による菌体内蓄積型代謝産物の生産性は、

$$\text{生産性} = (\text{希釈率}) \times (\text{菌体濃度}) \times (\text{含量})$$

で与えられるので、菌体濃度を高めればそれに比例して生産性は向上する。

ところで、従来の連続培養に関するあらゆる文献を調べても菌体濃度はせいぜい 10 g 乾燥菌体 / L 程度であり、高密度流加培養で達成できる 100 g 乾燥菌体 / L 以上という値とは比較にならないほど低い。そこで、連続培養において高密度をめざす研究を行うこととした。高密度連続培養を達成するためには、ただ単に増殖制限基質の濃度のみが考慮されている従来の理論（ケモスタット理論）では不十分であり、総ての栄養源について検討を加えた新しい理論の構築が必要

と思われる。

本研究では、最近、地球環境保全の観点から注目されている生分解プラスチックを菌体内蓄積型有用代謝産物の一例として取り上げ、高密度連続培養の理論の確立とその実験的検証を行い、その有効性を実証せんとした。結論としては、その可能性は示すことができたが、より確実な技術とするためにはさらに実験が必要である。

第2章 実験方法

2. 1 使用菌株、実験材料及び培地組成

2. 1. 1 使用菌株

Alcaligenes latus DSM 1123を用いて実験を行った。

2. 1. 2 実験材料

Yeast Extract : DIFCO LABORATORIES

Polypepton : 日本製薬 (株)

寒天 : 和光製薬 (株)

ネスラー試薬 : 米山薬品工業 (株)

Sucrose : 伊藤忠製糖 (株)

他の試薬はすべて市販の特級品を使用した。

2. 1. 3 培地組成

合成培地1 : 表2.1に示す組成のものを合成培地1とした。

表2.1 合成培地1 (前培養)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	9.0 g/l	H_3BO_4	0.3mg/l
KH_2PO_4	1.5 g/l	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2mg/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0 g/l	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g/l	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	30.0 μ g/l
$\text{FeCl}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	60.0mg/l	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	30.0 μ g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10.0mg/l	$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	28.0 μ g/l
Sucrose	20.0 g/l	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10.0 μ g/l

Sucroseは最終培地組成の10倍濃度の溶液を別に調製し、別滅菌した。

合成培地2：表2.2に示す組成のものを合成培地2とした。

表2.2 合成培地2 (M100)

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	10.3 g/l	H ₃ BO ₄	15.5 mg/l
KH ₂ PO ₄	1.5 g/l	CoCl ₂ · 6H ₂ O	1.7 mg/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.7 g/l	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	5.5 mg/l
FeCl ₂ · nH ₂ O	790.3mg/l	MnCl ₂ · 4H ₂ O	10.8 mg/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	35.0mg/l	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.28mg/l
		NiSO ₄ · 7H ₂ O	6.0 mg/l
		CuSO ₄ · 5H ₂ O	2.0 mg/l

合成培地3：表2.3に示す組成のものを合成培地3とした。

表2.3 合成培地3 (M100)

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	10.3 g/l	H ₃ BO ₄	15.5 m g/l
KH ₂ PO ₄	1.50 g/l	CoCl ₂ · 6H ₂ O	1.69 m g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.66 g/l	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	5.49 m g/l
Ammonium Iron (3) Citrate, Brown	1.39 g/l	MnCl ₂ · 4H ₂ O	10.8 m g/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	35.0m g/l	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.28 m g/l
		NiSO ₄ · 7H ₂ O	6.0 m g/l
		CuSO ₄ · 5H ₂ O	2.0 m g/l

流加培養、連続培養実験において100g/lの乾燥菌体重量を達成するのに必要量の栄養分を含む合成培地2および3を基本培地とし、その濃度が60%の培地をM60、200%の培地をM200とした。

合成培地2及び3においてSucroseは高濃度溶液を調製し、別滅菌した。Sucrose及び窒素源の濃度は各実験において異なるが、実験結果の図と対応して、一括して表2.4に示す。

表2.4 Sucrose濃度及び窒素源の種類と濃度

実験	Sucrose濃度 (g/l)		窒素源濃度		
			(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)		28%NH ₄ OH
	Initial*	Feed	Initial	Feed	Feed
図3. 1	10	30	1.0	2.5	—
図3. 2	10	50	1.0	4.0	—
図3. 3	10	50	1.0	4.0	—
図3. 4	10	50	1.0	4.0	—
図3. 5	10	50	1.0	4.0	—
図3. 6	10	65	1.0	5.0	—
図3. 7	10	80	1.0	7.5	—
図3. 8	10	80	1.0	9.5	—
図3. 9	10	80	1.0	9.5	—
図3. 10	10	100	1.0	15	—
図3. 11	10	50	1.0	4.0	—
図3. 12	10	130	1.0	30	—
図3. 13	10	50	1.0	8.0→9.5 →10.5	—
図3. 14	10	50→70	1.0	4.0→15	—
図3. 15	10	100	1.0	10→18	—
図3. 16	10	1.0, 900	1.0	1.0	○
図3. 17	10	30, 900	1.0	—	○
図3. 18	10	150	1.0	—	○

*最終濃度を表す。別滅菌時はこれより高濃度である。

保存用スラント培地：保存用スラントには表2.5に示す培地を用いた。

表2.5 保存用スラント培地 pH7.0

Polypepton	5.0g/l
Yeast Extract	5.0g/l
Sucrose	5.0g/l
Agar	1.5%(w/v)

2. 2 培養の装置及び方法

2. 2. 1 振盪培養

前培養は合成培地1を4ml含む試験管に保存用スラントから一白金耳接種し、30℃で24時間振盪した。本培養には100mlの合成培地1を含む500ml容量の枝付き坂口フラスコに、前培養菌液1.0mlを接種し、30℃で振盪した。菌濃度の経時変化は富士光電光度計（富士工業株式会社）により測定した。

2. 2. 2 連続培養装置 1 を用いた連続培養

(窒素制限によるケモスタット)

流加培養で一定の菌体濃度まで菌を生育させた後、図 2. 1 に示す装置を用いて培養液を一定流量で供給し、連続培養を行った。培養中、泡の影響により培養液液面が一定とならないため、培養液の抜き取りは電子上皿天秤によりジャーフェーマンターごと重量を測定し、その重量変化に従って行った。pH調節には 5 N KOHを用いた。aerationは、0.5vvmで一定とし、DOの維持は攪拌速度と、O₂の供給流量により行った。

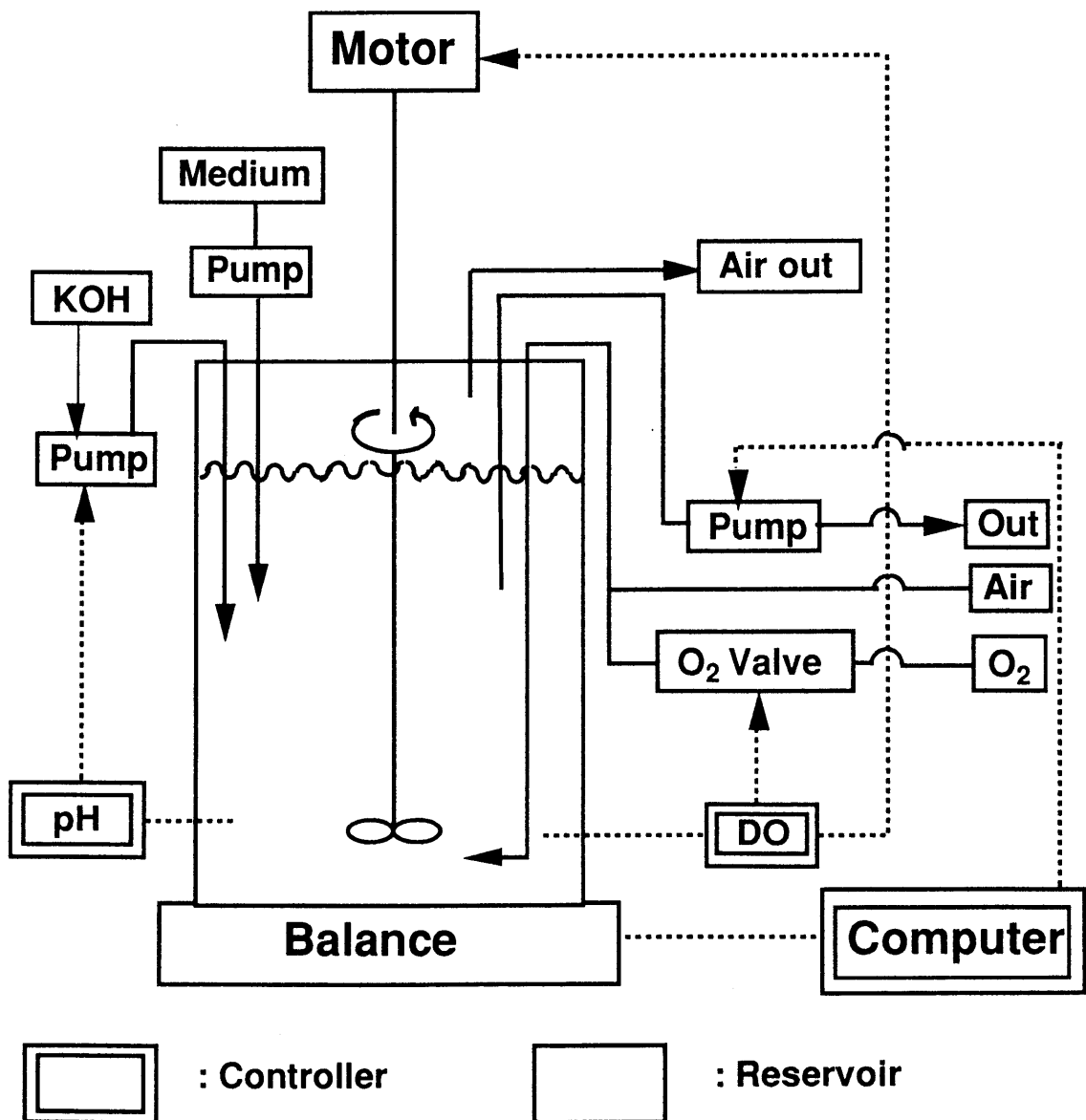


図 2. 1 連続培養装置 1

2. 2. 3 連続培養装置 2 を用いた連続培養

(濃度勾配を用いたケモスタット)

2. 2. 2 に述べた方法での連続培養において、窒素源に関する菌体収率が大きく変化することがわかったため、供給培地の濃度を図 2. 2 に示す装置を用いて濃度勾配をかけながら連続培養を行った。pH調節には 5 N KOHを用いた。aerationは、0.5vvmで一定とし、DOの維持は攪拌速度と、O₂の供給流量により行った。

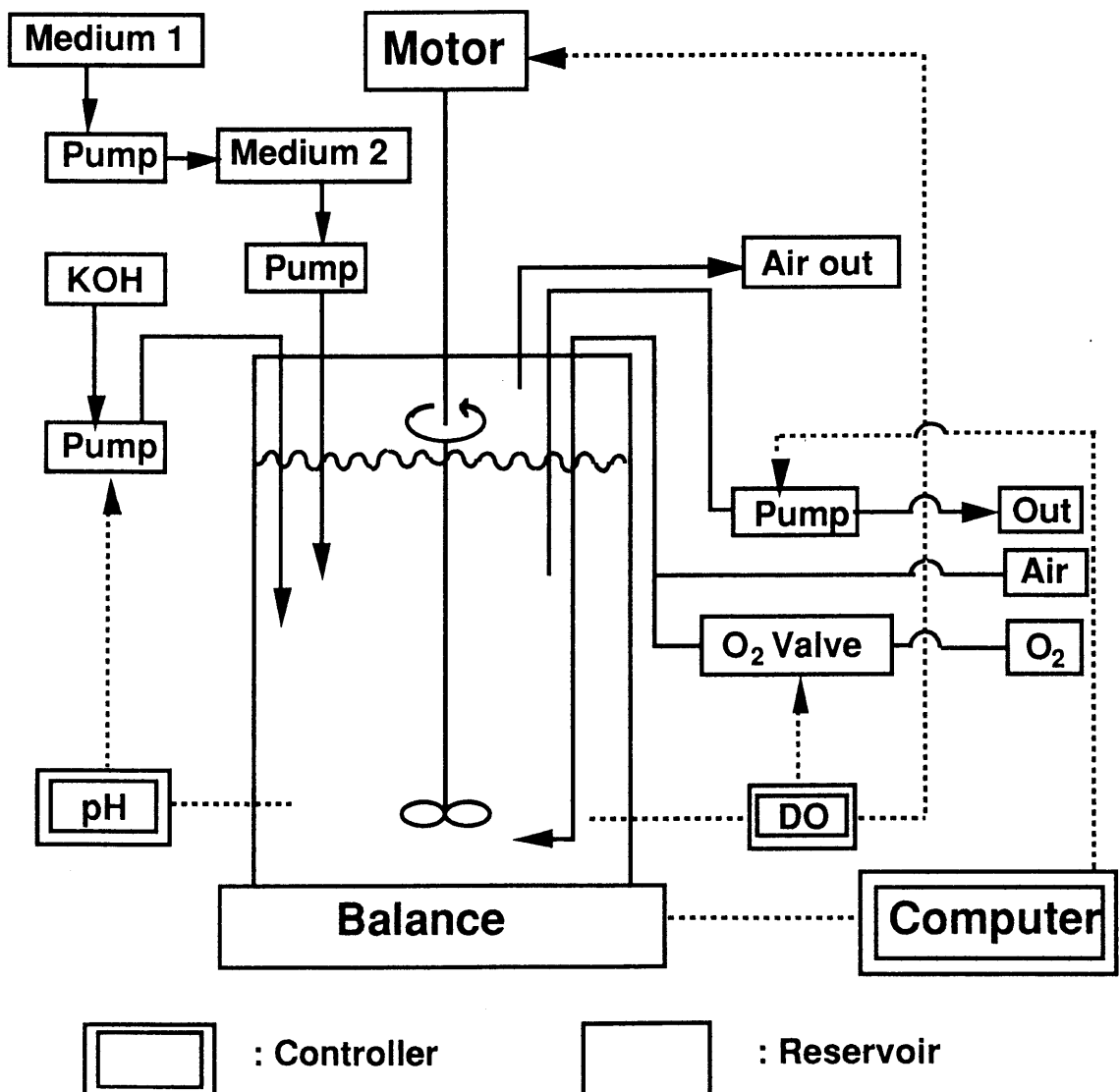


図 2. 2 連続培養装置 2

2. 2. 4 連続培養装置 3 を用いた連続培養

(pH Auxostat 1)

2. 2. 2 に述べた方法での連続培養において、菌体内の PHB 含率の著しい低下がみられた。この培養中、pH 制御に用いている 5 N KOH が大量に入るため、これが菌の生育に悪影響を与えていると考え、pH 制御に 28% アンモニア水を用い、それと連動させて Sucrose (濃度 900g/l) を流加することで窒素源ならびに炭素源の供給を行った。その他の無機元素は一定の流量 (D_m) で供給し、希釈率 (D_t) は一定時間に重量変化に従って出口液として抜き取った培養液を実測して算出した (図 2. 3)。aeration は、0.5vvm で一定とし、DO の維持は攪拌速度と、 O_2 の供給流量により行った。

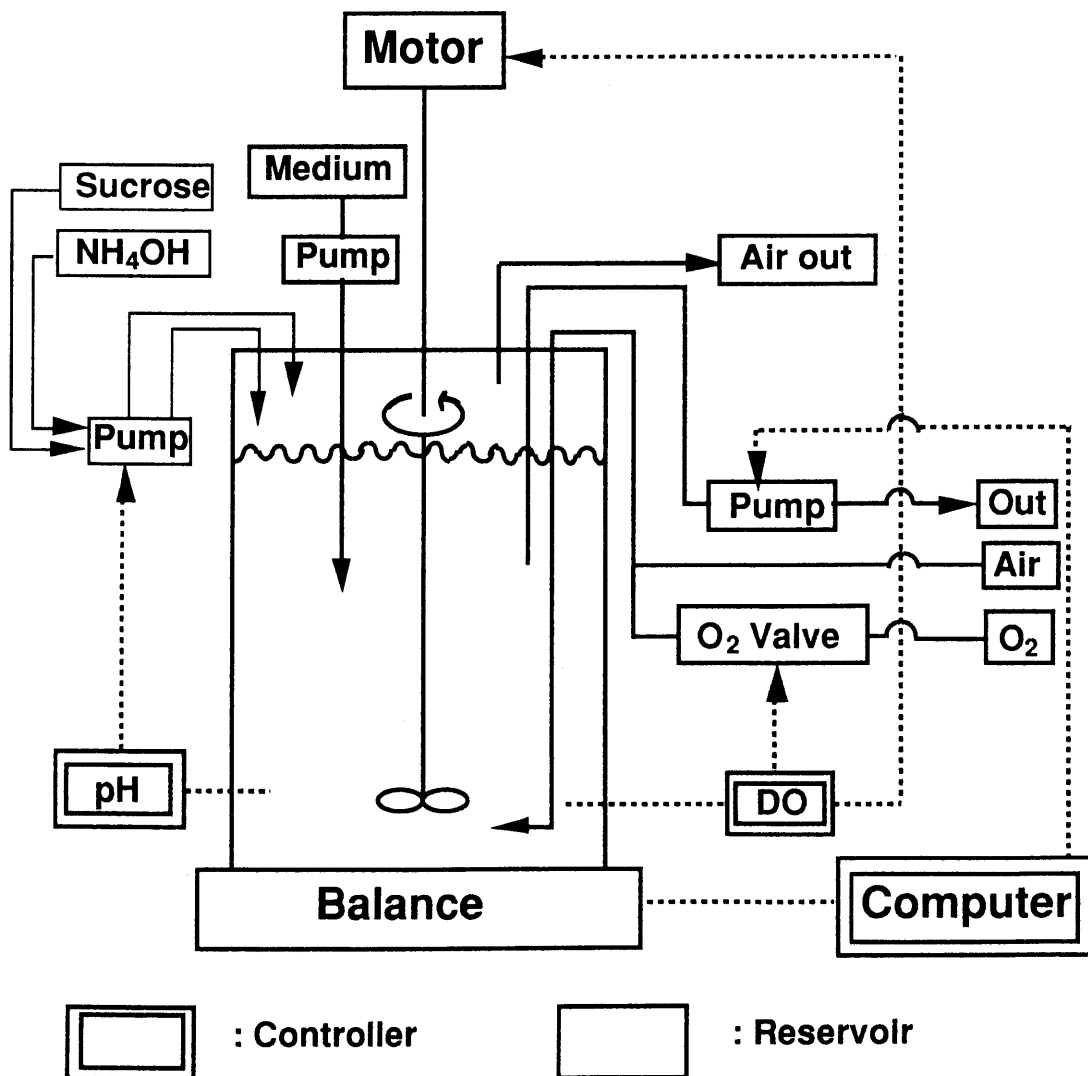


図 2. 3 連続培養装置 3

2. 2. 5 ジャーファーマンターによる高密度連続培養

(pH Auxostat 2)

図 2. 3 に示した装置を用い pH 制御に 5 N KOH の代わりに 28% アンモニア水を用い、窒素源の供給を行った。その他の無機元素および Sucrose (濃度 150g/l) はまとめて 1 つの溶液にして一定の流量で供給し、希釈率は一定時間に重量変化に従って出口液として抜き取った培養液を実測して算出した。aeration は、0.5 vvm で一定とし、DO の維持は攪拌速度と、O₂ の供給流量により行った。

2. 3 菌体濃度の測定

2. 3. 1 乾燥菌体重量(DCW)の測定

合成培地 1 を用いた培養で得られた培養菌液を適当に水で希釈して濃度の異なるサンプルを用意し、600nm で濁度、OD₆₀₀ を測定した。それから一定量の希釈前の培養液を遠心分離(15000rpm、5min)し、水で 3 回洗浄した後 60℃ で 24 時間乾燥させて DCW を求めた。希釈したサンプルの DCW については希釈前の培養菌液の DCW を希釈倍率で割って求めた。これ以降は、OD₆₀₀ を測定してこの標準線に基づいて DCW を求めた。

2. 3. 2 高菌体濃度での乾燥菌体重量(DCW)の測定 2

2. 3. 1 で述べた方法で測定した高菌体濃度の培養液の乾燥菌体重量は測定に誤差が大きく生じるため、培養液を 10 ml 抜き取り、あらかじめ乾燥させて重量を測定した遠沈管に入れ、遠心分離(15000rpm、3min)し、水で 3 回洗浄した後 105℃ で 24 時間乾燥させてその重量を測定した。

2. 4 培地の各種成分濃度の分析法

2. 4. 1 アンモニウムイオン濃度の分析 (ネスラー法)

培地中のアンモニウムイオン濃度はネスラー法により定量した¹⁾。培養液を遠心分離(15000rpm、2min)にかけ、上清をアンモニウムイオン濃度が 1~25mg/l となるように希釈し、その 3ml にネスラー試薬 60 μl と 10%(w/v)酒石酸カリウムナトリウム溶液 30 μl を加え、OD₄₂₀ を測定し

た。検量線は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を用いて作成した。

2. 4. 2 Sucroseの定量法

2. 4. 2. 1 アンスロンー硫酸法によるSucroseの定量²⁾

蒸留水100mlに濃硫酸250mlを冷却しながら加えたもの100mlにアンスロン0.20gを溶かしてアンスロンー硫酸試薬を調製した。培養液を遠心分離(15000rpm、2min)し、上清を適当に希釈したものを試料溶液とした。試料溶液0.5mlに氷水中でアンスロンー硫酸試薬を2.5ml管内壁に沿って静かに加えて十分冷却した後よく混合し、煮沸湯浴中で正確に10分間加熱後冷水で約3分間冷却し、 OD_{620} を測定した。

2. 4. 2. 2 Abbe'の屈折計によるSucroseの定量法

高密度培養実験に移行してからはSucrose濃度のより迅速な分析法が必要となったため、Abbe'の屈折計(株式会社アタゴ社製 TYPE 3)を用い、Sucroseを加える前の培地をブランクとしてSucrose濃度を測定した。

2. 5 ガスクロマトグラフィーを用いたP(3HB)の定量 (内部標準法)

菌体内のポリエステルは、Brauneggらの方法³⁾に従ってメチルエステル化後ガスクロマトグラフィーにより分析した。約20mgの乾燥菌体を入れたスクリーキャップ付き試験管にクロロホルムと内部標準入りメタノール硫酸混液{内部標準 安息香酸184mg/100ml硫酸3.5%(V/V)}各1mlを加えて121℃、90分間のオートクレーブによってポリエステルのメチルエステル化を行った。その後水を0.5ml加え、Vortexで2分間激しく攪拌後下層のクロロホルム層を回収し、ガスクロマトグラフィー用サンプルとした。メチルエステル化反応で生成した3HBの定量には、島津製作所(株)製のGC-7AG型を使用し、以下の条件で分析した。

N_2 : 0.6kg/cm²、Air: 0.5kg/cm²、インジェクション温度: 250℃、カラム温度: 160℃、カラム: 1.6mガラスカラム、充填剤: Reoplex 400 ChromosorbG AW-DMCS 10% 60~18 mesh。サンプル濃度は(1)式より算出した。

$$\text{サンプル濃度} = K \times \frac{A_p}{A_s} \times C_s \quad (1)$$

A_p : 測定物質のピーク面積

A_s : 内部標準物質のピーク面積

C_s : 内部標準物質の濃度

3HB: $K=2.5$

2. 6 μ_{max} および $Y_{x/s}$ の算出法

1 L 容量のジャーファーメンターを使用して合成培地 4 を用いて菌の回分培養、サンプリングを行った。このサンプルを用いて DCW、Sucrose 濃度の経時変化を求めた。指数増殖期の DCW の値と (2) 式より μ_{max} を求めた。

$$\mu_{max} = \frac{\ln(X_2 / X_1)}{T_2 - T_1} \quad (2)$$

また、 $Y_{x/s}$ は (3) 式より算出した。

$$Y_{x/s} = \frac{X_{st} - X_0}{S_0 - S_{st}} \quad (3)$$

S_0 : 初発 Sucrose 濃度 (g/l)

X_0 : 初発菌体濃度 (g/l)

S_{st} および X_{st} : 静止期の Sucrose 濃度および 菌体濃度 (g/l)

2. 7 pH 連動方式による Sucrose とアンモニア、無機元素の自動流加法

2. 7. 1 計算式の導出

培地中の炭素源または窒素源が消費され、微生物の菌体生産に利用されるのに伴い、無機元素も比例的に消費されるものと思われる。従って培養液中の窒素源濃度が一定に保たれていれば、アンモニア水の供給と連動して Sucrose、無機元素類を供給することにより培養液中の Sucrose、無機元素濃度も一定に保つことができると思われる。その際の Sucrose、無機元素類供給の基礎式は培養槽内の物質収支を考慮して次のように求

められる。

窒素源に関する収支式

$$C_N f_N \Delta T = \gamma_N (\Delta X \cdot V) \quad (4)$$

C_N : N原子としての濃度 (g/l)

f_N : アンモニア水の流量 (ml/min)

γ_N : 乾燥菌体中の窒素原子含有率

炭素源に関する収支式

$$Y_{X/S} C_S f_S \Delta T = \Delta X \cdot V \quad (5)$$

C_S : Sucrose濃度 (g/l)

f_S : Sucrose溶液の流量 (ml/min)

ある金属元素に関する収支式

$$C_m f_m \Delta T = \gamma_m \Delta X \cdot V \quad (6)$$

C_m : ある金属原子としての濃度 (g/l)

f_m : 無機元素溶液の流量 (ml/min)

γ_m : 乾燥菌体中のある金属原子含有率

(4)、(5)、(6)式より次式が成立する。

$$\frac{C_N \cdot f_N}{\gamma_N} = \frac{Y_{X/S}}{1} = \frac{C_m f_m}{\gamma_m} = \Delta X \cdot V \quad (7)$$

これより

$$C_S = \frac{1}{\gamma_N Y_{X/S}} \times \frac{f_N}{f_S} \times C_N \quad \text{or} \quad f_S = \frac{1}{\gamma_N Y_{X/S}} \times \frac{C_N}{C_S} \times f_N \quad (8), (9)$$

(8)、(9)式より、

$$C_m = \frac{\gamma_m}{\gamma_N} \times \frac{f_N}{f_m} \times C_N \quad \text{or} \quad f_m = \frac{\gamma_m}{\gamma_N} \times \frac{C_N}{C_m} \times f_N \quad (10), (11)$$

が成立し、これらの式をもとにしてアンモニア水の供給と連動して流加

するSucrose、無機元素溶液の濃度、供給流量を決定した。計算に必要な γ_N 、 γ_m の値としては福永正明の名古屋大学農学部食品工業化学科学部卒業論文に記載されている実測値を用いた。

第3章 実験結果及び考察

3. 1 培養条件の検討

3. 1. 1 消泡剤濃度の菌の生育に与える影響

消泡剤として用いているアデカノールの濃度が菌の生育に影響を与えていることが示唆されたため、坂口フラスコで振盪培養を行いその阻害濃度を調べた(図3. 1)。その結果、やはりアデカノールが菌の生育を阻害することが確かめられた。また、アデカノール濃度の高い培養ほど、菌体内のP(3HB)含率が低くなる傾向がみられた。消泡効果とあわせて検討し、以後の培養ではアデカノール濃度は0.02%とした。

3. 1. 2 温度、pHの菌の生育に与える影響

菌の増殖速度を高めるため、培養温度ならびにpHについて検討を行った。pHについては、pH=7.0、6.5、6.0でそれぞれジャーファーマンターを用いて流加培養を行い、その指数増殖期における比増殖速度定数(μ_{max})を比較した(図3. 2)。その結果、pH=6.5での培養の比増殖速度定数が最も大きい値となり、ついでpH=7.0での比増殖速度定数が大きかった。

温度については、30℃、33℃、37℃でそれぞれ流加培養を行った(図3. 3)。その結果、33℃での培養の比増殖速度定数が最も大きい値となった。以後、培養条件をpH=6.5、温度33℃とした。

3. 1. 3 アンモニウムイオン、Sucroseの菌の生育に与える影響

菌の生育に、アンモニウムイオンとSucroseの濃度が大きく影響することが、培養の際にわかった(data not shown)。連続培養の際のそれぞれの濃度を決定するために坂口フラスコで回分培養を行い、一定時間後に集菌し菌濃度およびP(3HB)含量を測定した(図3. 4、図3. 5)。アンモニウムイオンに関しては硫酸濃度3.0g/l(815.7mg NH_4^+ /ml)を超える濃度で著しい生育阻害が認められた。Sucroseに関しては20g/lを超える濃度で著しい生育阻害が見られ、また、Sucrose濃度が高くなるほど菌体内のP(3HB)含量が低下する傾向が見られた。

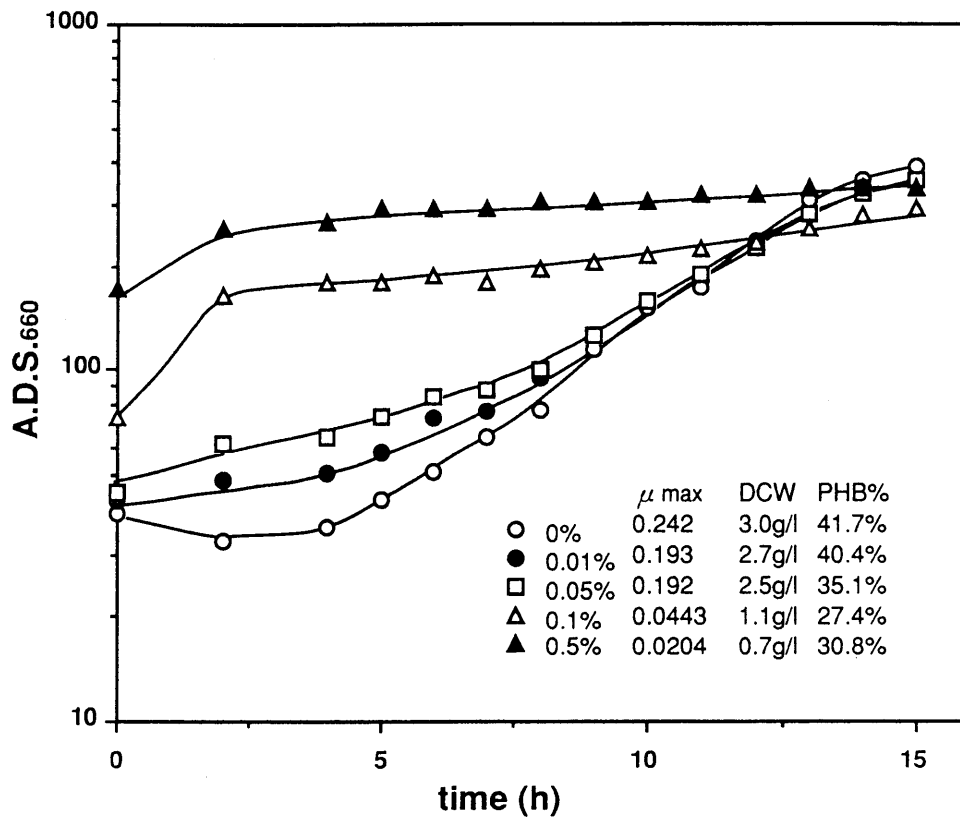


図 3. 1 消泡剤の菌の生育に与える影響

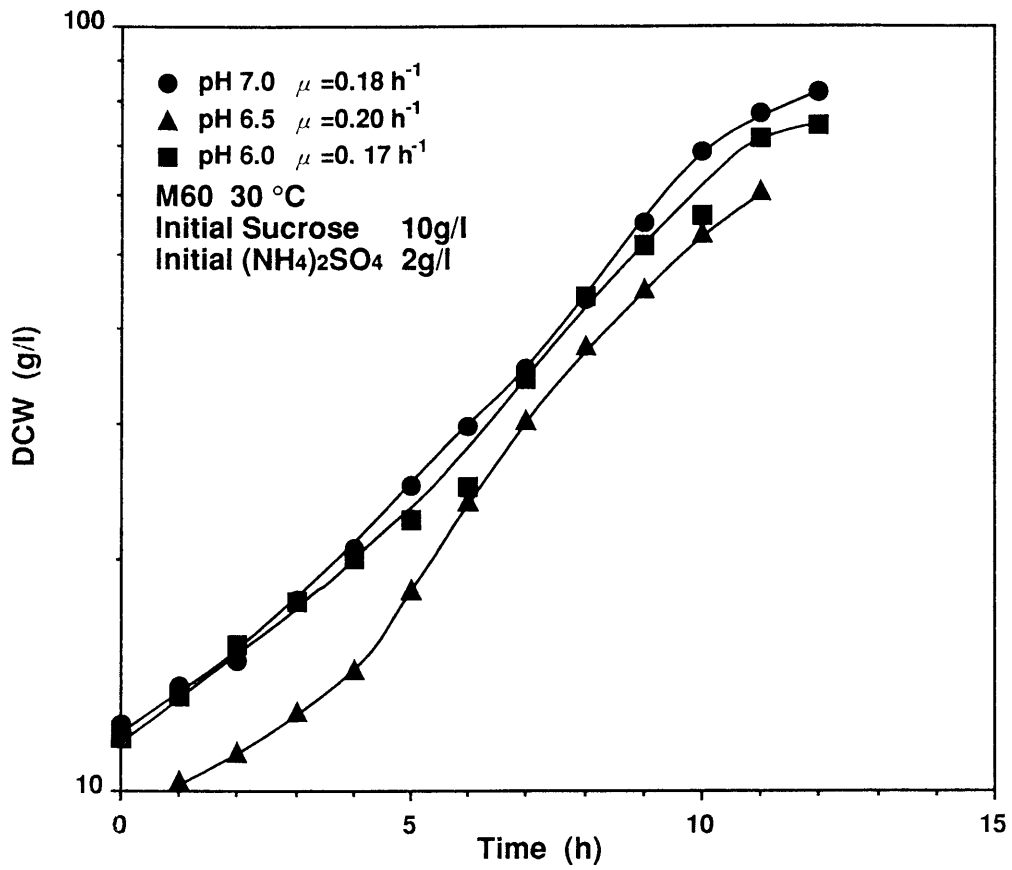


図 3. 2 増殖に及ぼす pH の影響

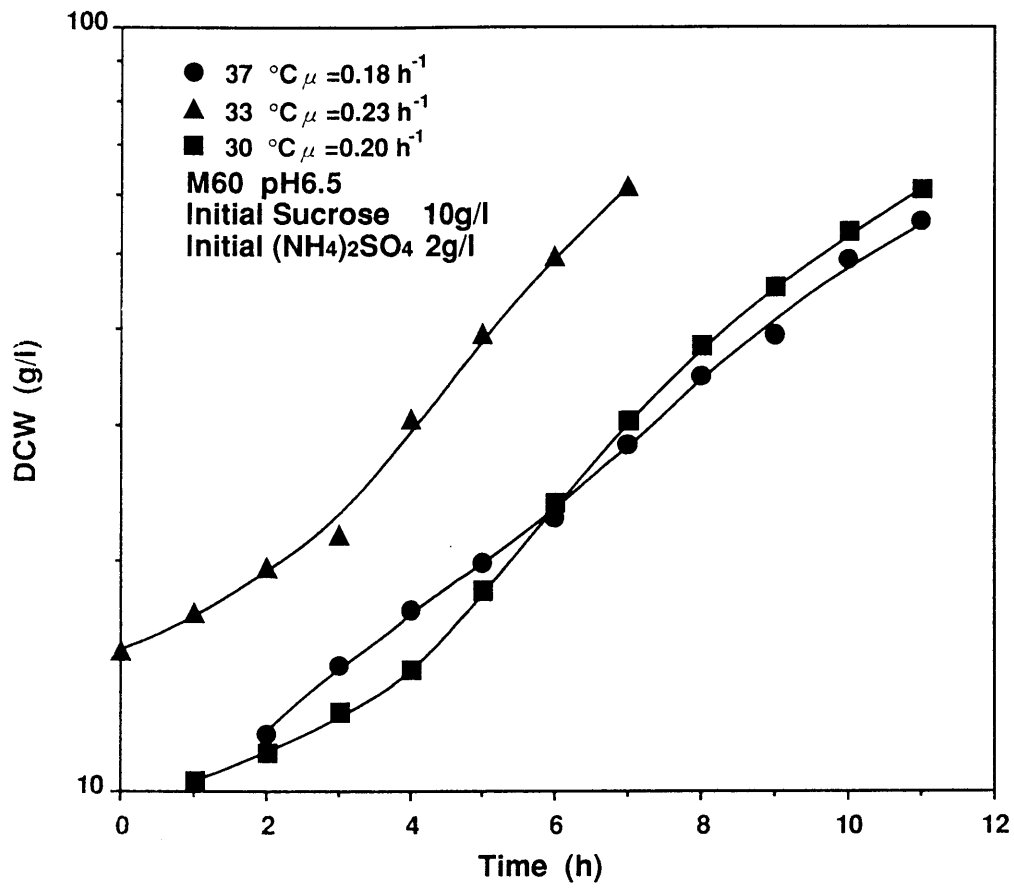
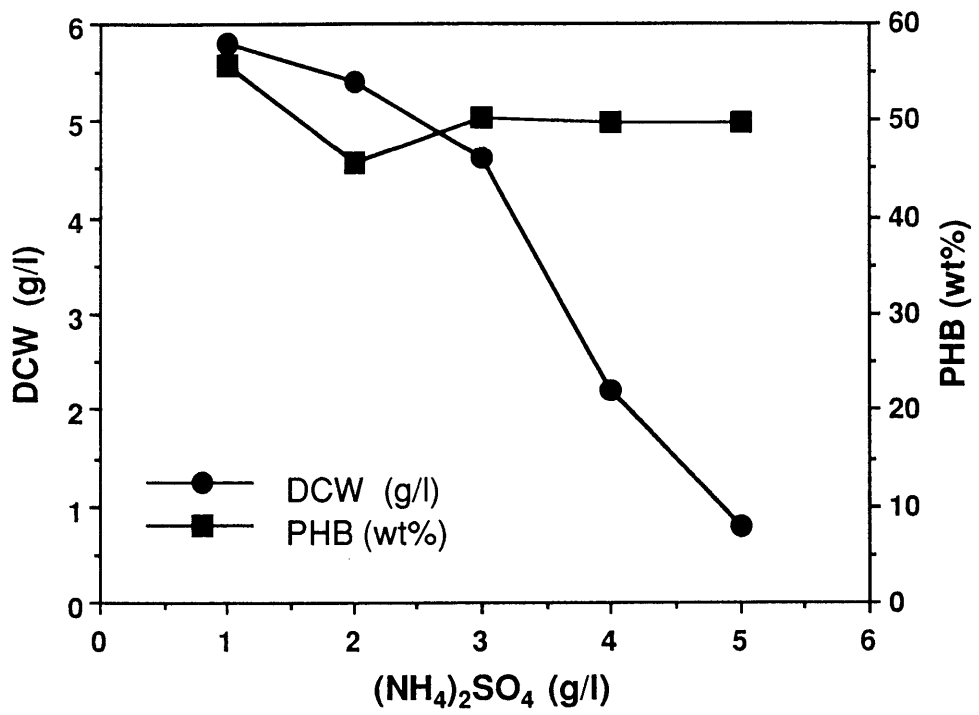


図 3. 3 増殖に及ぼす温度の影響



15時間培養

図3. 4 菌の生育に与える
アンモニウムイオン濃度の影響

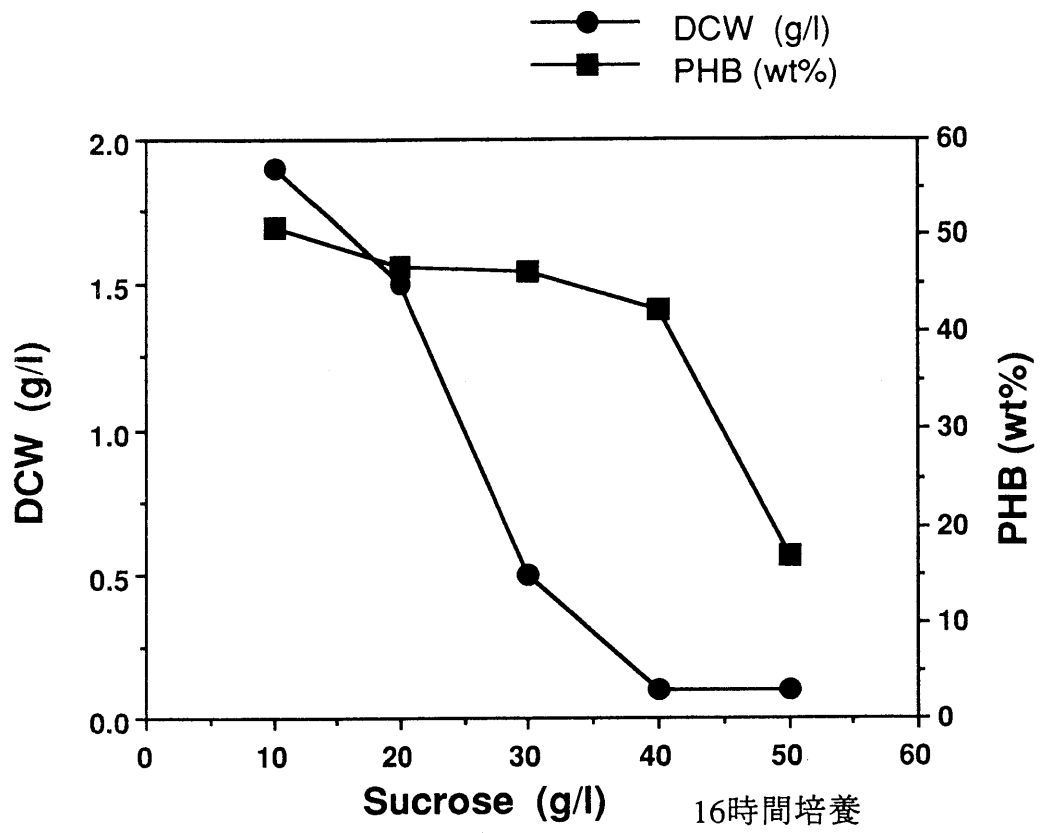


図3. 5 菌の生育に与える
 Sucrose濃度の影響

3. 2 菌体収率の培養中における変化

流加培養において窒素源であるアンモニア水と、炭素源であるSucroseを一定の比率で流加しているにもかかわらず培養後期には培養液中のSucrose濃度が急激に減少するため、窒素源、または炭素源に関する菌体収率 ($Y_{X/S}$) が培養中に変化していると考え、窒素源、炭素源に関する菌体収率を測定した。その結果を図3. 6から図3. 8に示す。Sucroseに関しては培養の間中ほぼ一定で $Y_{X/S} = 0.369 \text{gDCW} / \text{gSucrose}$ であった。一方、窒素源に関する菌体収率 ($Y_{X/N}$) は培養後約5時間の時点から変化していた。

培養開始5時間までは

$$Y_{X/N} = 8.80 \text{gDCW} / \text{gNH}_4^+ \{ = 2.39 \text{gDCW} / \text{g} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \}$$

で、培養開始5時間以降は

$$Y_{X/N} = 18.77 \text{gDCW} / \text{gNH}_4^+ \{ = 5.1 \text{gDCW} / \text{g} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \}$$

であった。この値に基づいてSucroseとアンモニア水の流量の比率を決定した。

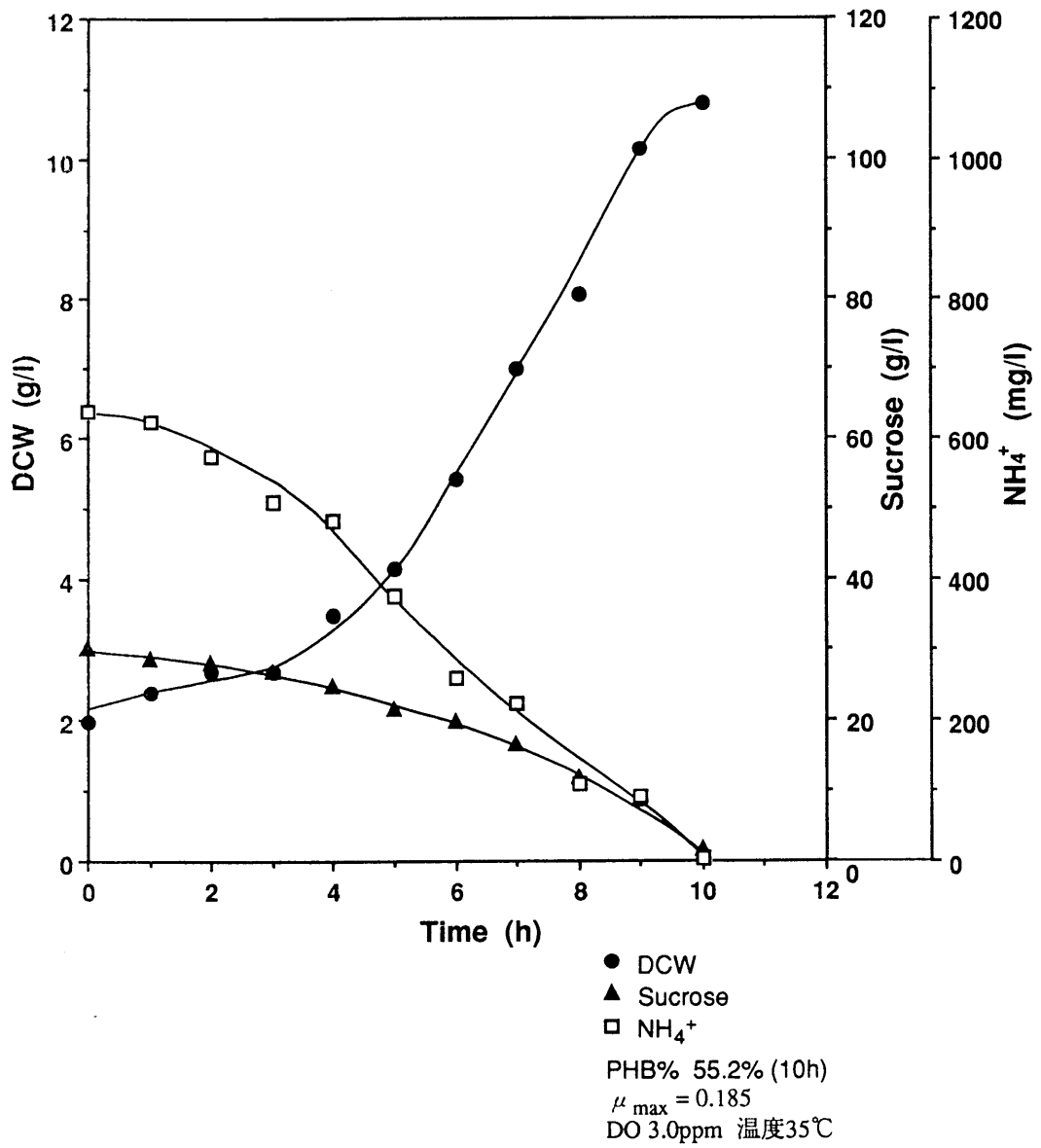


図3. 6 $Y_{X/S}, Y_{X/N}$ 測定のための回分培養

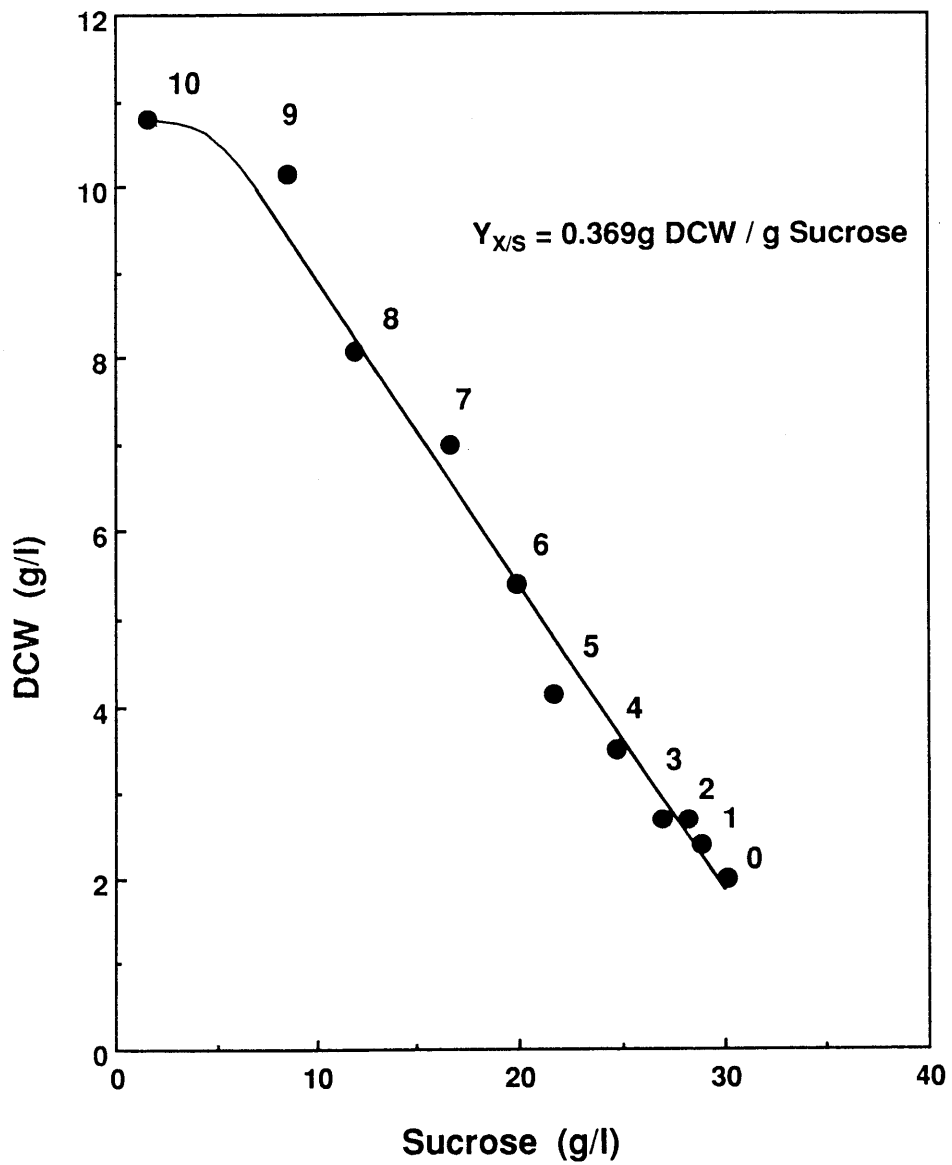


図 3. 7 炭素源に関する菌体収率 ($Y_{X/S}$)の実測値
 グラフ上の数字は培養開始後の時間を示す

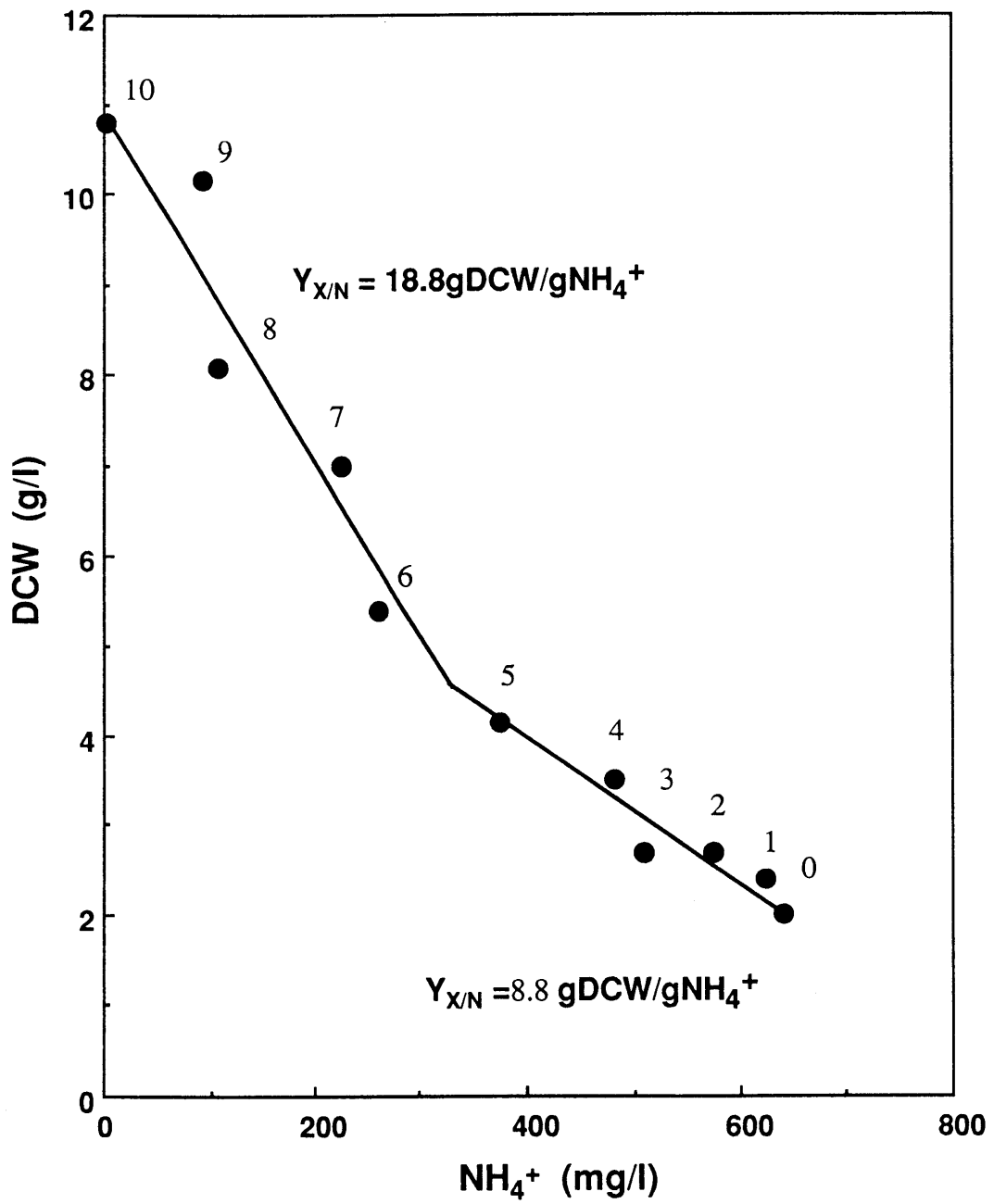


図 3. 8 窒素源に関する菌体収率 ($Y_{X/N}$)の実測値

グラフ上の数字は培養開始後の時間を示す

3. 3 連続培養

3. 3. 1 連続培養装置 1 を用いた連続培養

(窒素源制限によるケモスタット)

実験方法 2. 2. 3 に述べた方法に従って連続培養を行った。まず、低菌体濃度で連続培養を行い、培養装置、培養条件の構築をした (図 3. 9)。培養中、泡の発生が激しく、排気口からの培養液の流出が見られたため、菌の生育に影響しない DO 値の下限を調べ、1.5ppm から 0.5ppm にまで DO 値を下げた (data not shown)。さらに泡の発生を抑えるために、air の流量を 1.0vvm から 0.5vvm にまで下げた。これにより、泡の発生はかなり抑えられるようになった。図 3. 9 の培養では約 15gDCW/l で定常状態となり、培養の間中 PHB 含率は約 50% で一定であった。次に限界稀釈率を求めるために、稀釈率を 0.05 h^{-1} から 0.15 h^{-1} まで変えて培養を行った (図 3. 10 ~ 図 3. 13)。その結果、稀釈率が 0.1 h^{-1} までの培養では、菌体濃度約 10.0g/l で定常状態となったが、それ以上の稀釈率では、wash out してしまった。

ここで 3 つの問題が生じてきた。1 つ目は図 3. 9 の培養時より、アンモニウムイオン濃度、Sucrose 濃度がともに高いにも関わらず、定常状態での菌体濃度が低くなっている点、2 つ目は、連続培養開始後 10~20 時間後以降に P (3HB) の菌体内含量が急速に低下している点である。そして、3 つ目はポリサッカライドと思われる粘性物質の発生である^{4), 5)}。これにより、培養液の粘度が大幅に上昇し、DO 値の維持が困難になった。図 3. 10 および図 3. 11 を見ると、連続培養に移行後、アンモニウムイオン濃度は低濃度に維持されているが、Sucrose 濃度が徐々に増加してきている。このことから、定常状態での菌体濃度が低下する原因として 3. 2 に示したように、窒素源に関する菌体収率が変化しているということが考えられた。また、Sucrose 濃度の増加により、菌がポリサッカライドを生成し始めるのではないかと考えた。そこで、硫酸濃度の比率を高くして Sucrose 濃度の増加を抑えて連続培養を行った (図 3. 14 ~ 図 3. 17)。その結果、定常状態での菌体濃度は上昇した。しかし、P (3HB) の菌体内含量の低下及びポリサッカライドの発生はこの培養でもみられた。P (3HB) の菌体内含量の低下は、P (3HB) 合成酵素に必須の金属元素が連続培養用培地中の沈殿のためにうまく供給されていないため起こるのではないかと考え、培地濃度を上げた培養 (M100) なら

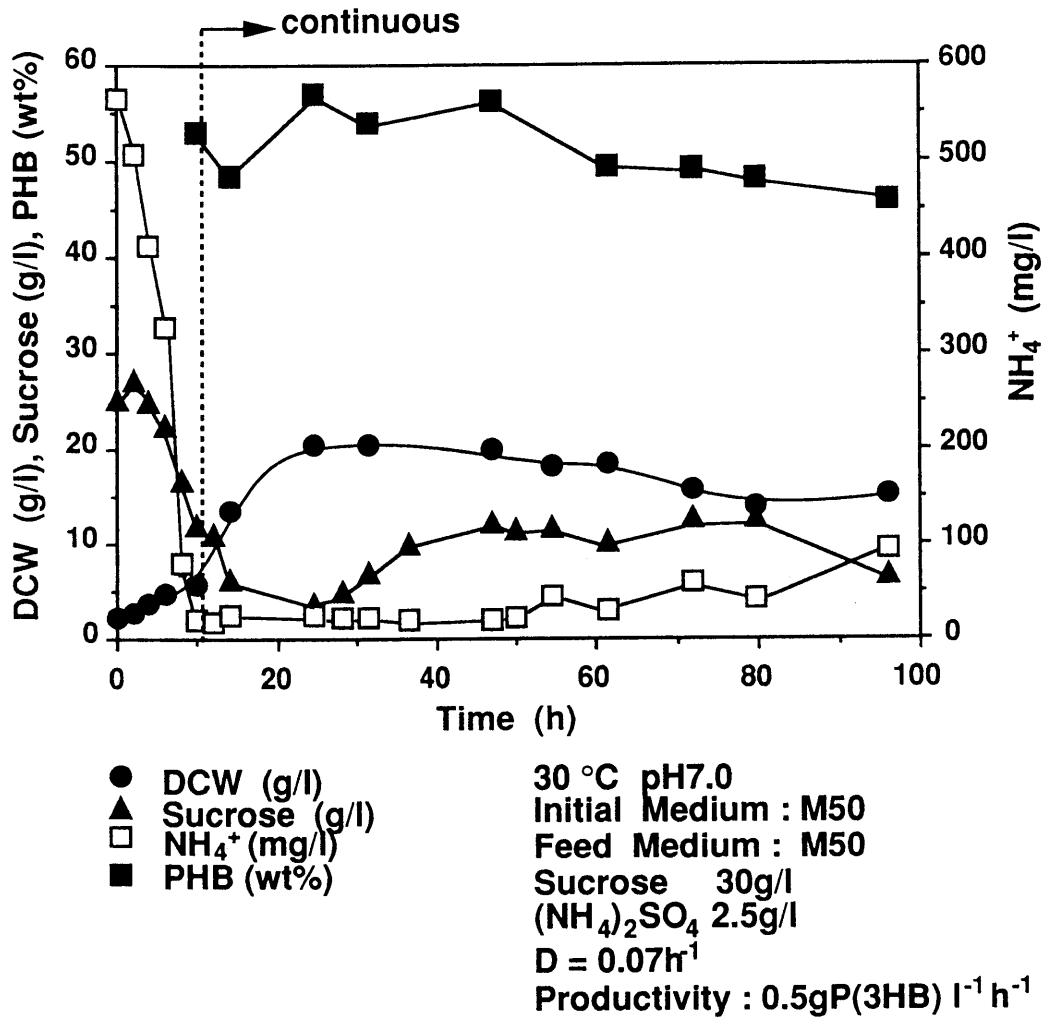
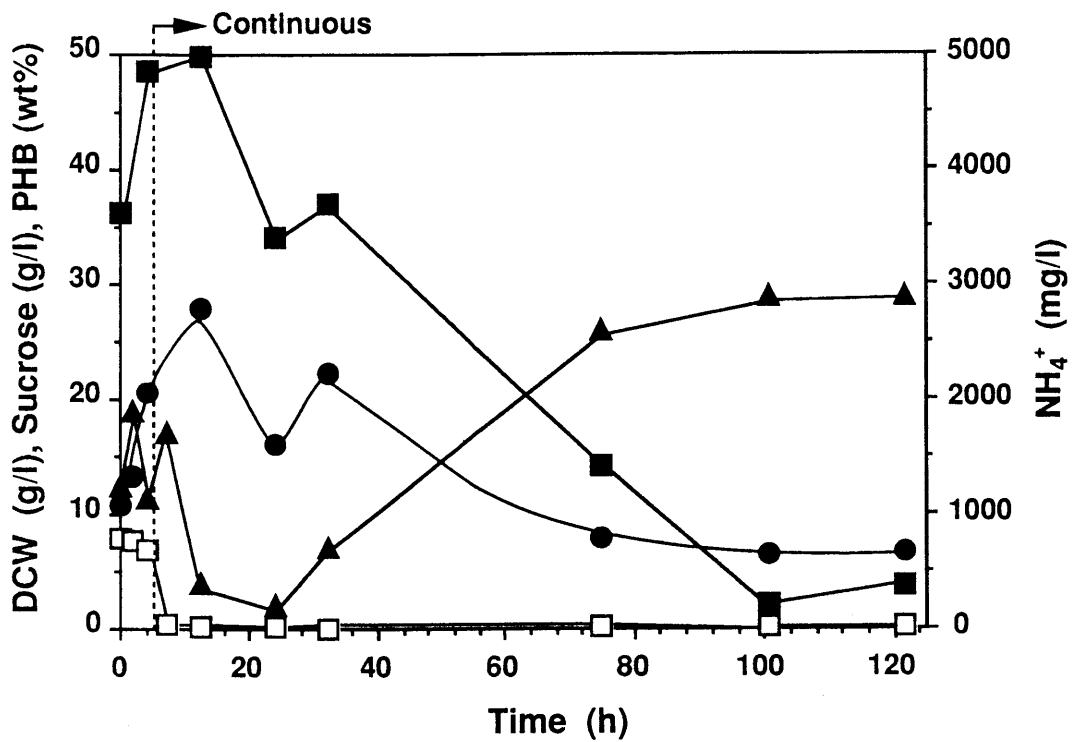


図 3. 9 連続培養 1 — 1



● DCW (g/l) 30°C pH6.5
 ▲ Sucrose (g/l) Initial Medium : M50
 □ NH₄⁺ (mg/l) Feed Medium : M50
 ■ PHB (wt%) D = 0.05h⁻¹
 Sucrose 50g/l
 (NH₄)₂SO₄ 4g/l

図 3. 1 0 連続培養 1—2

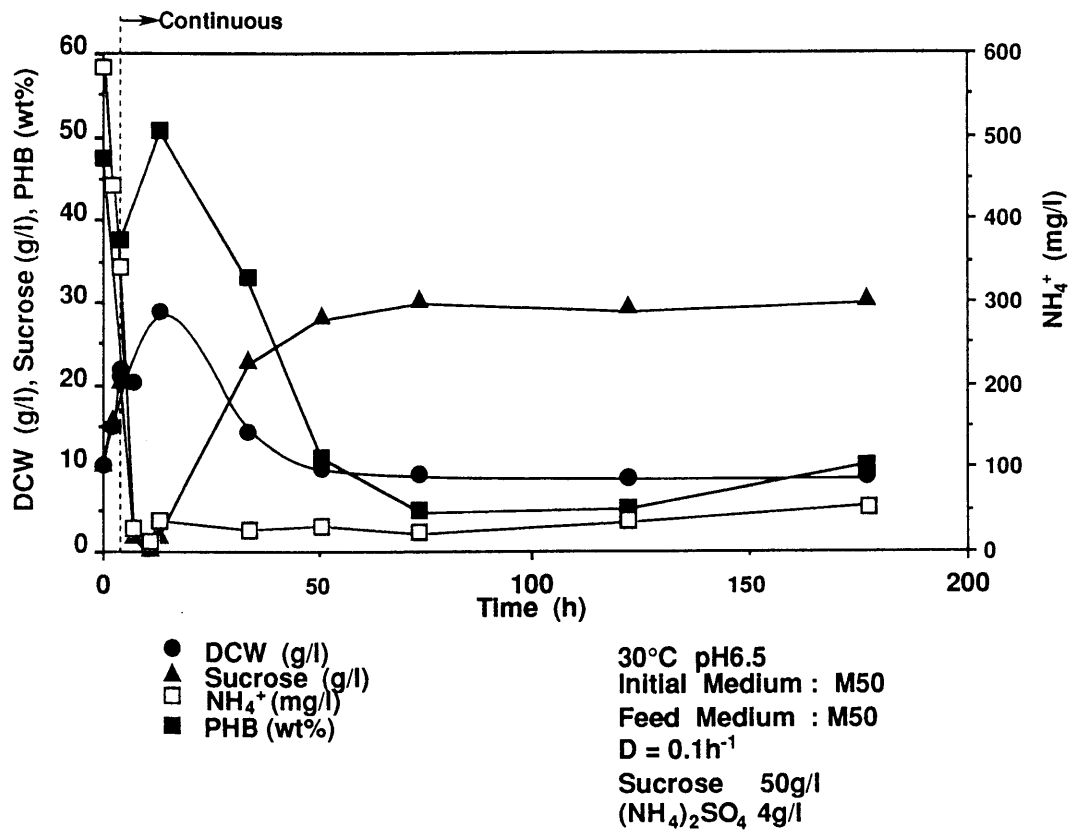


図 3. 1 1 連続培養 1—3

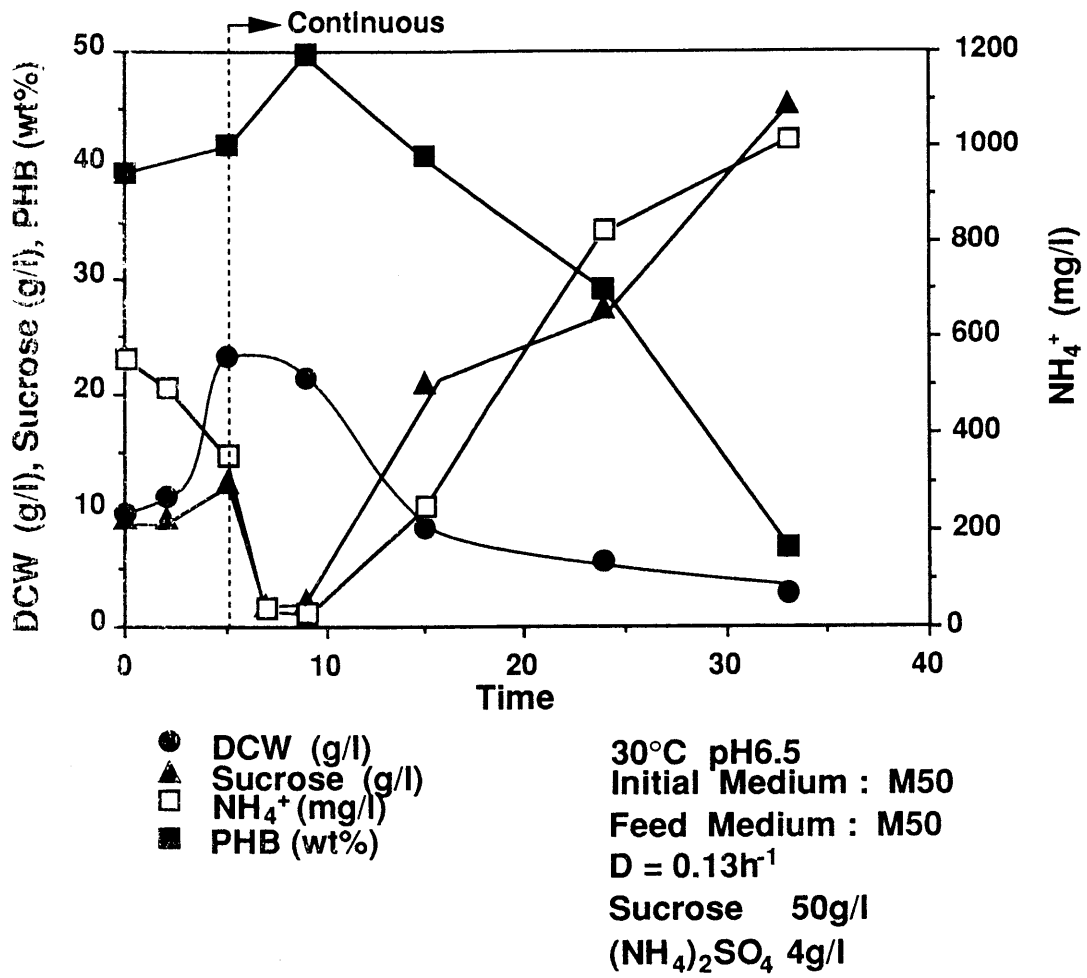


図 3. 1 2 連続培養 1—4

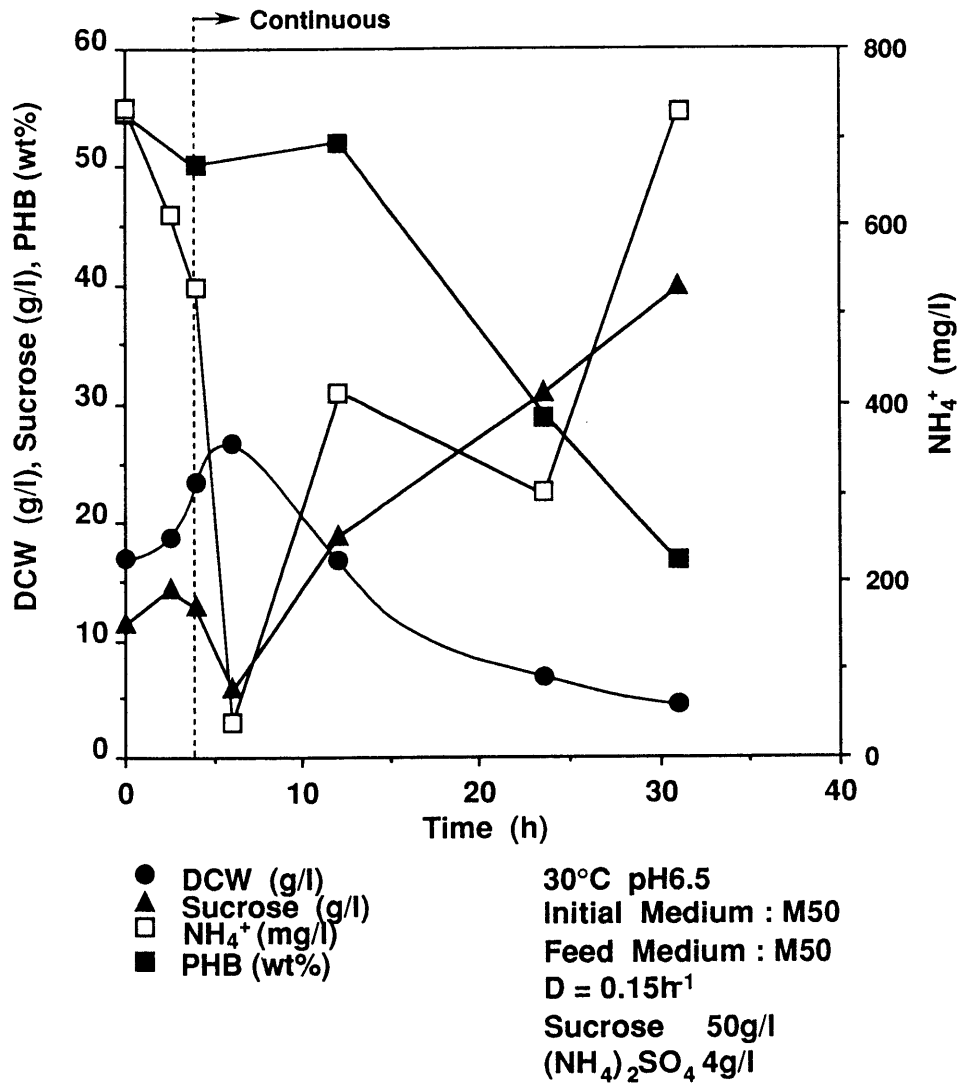
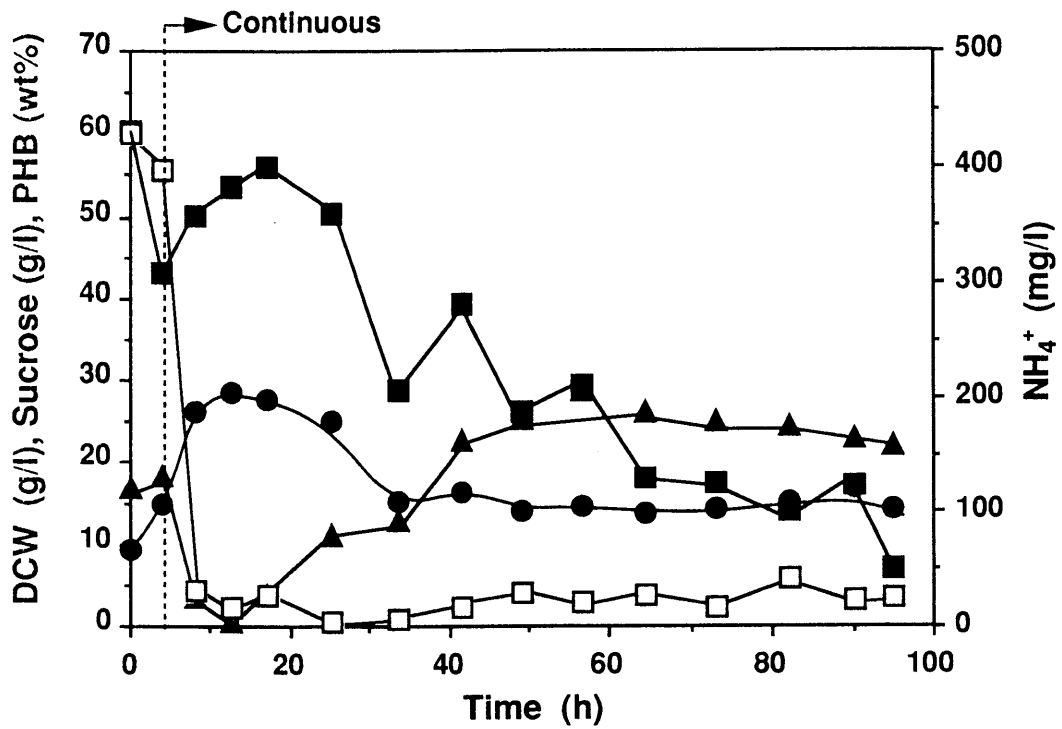
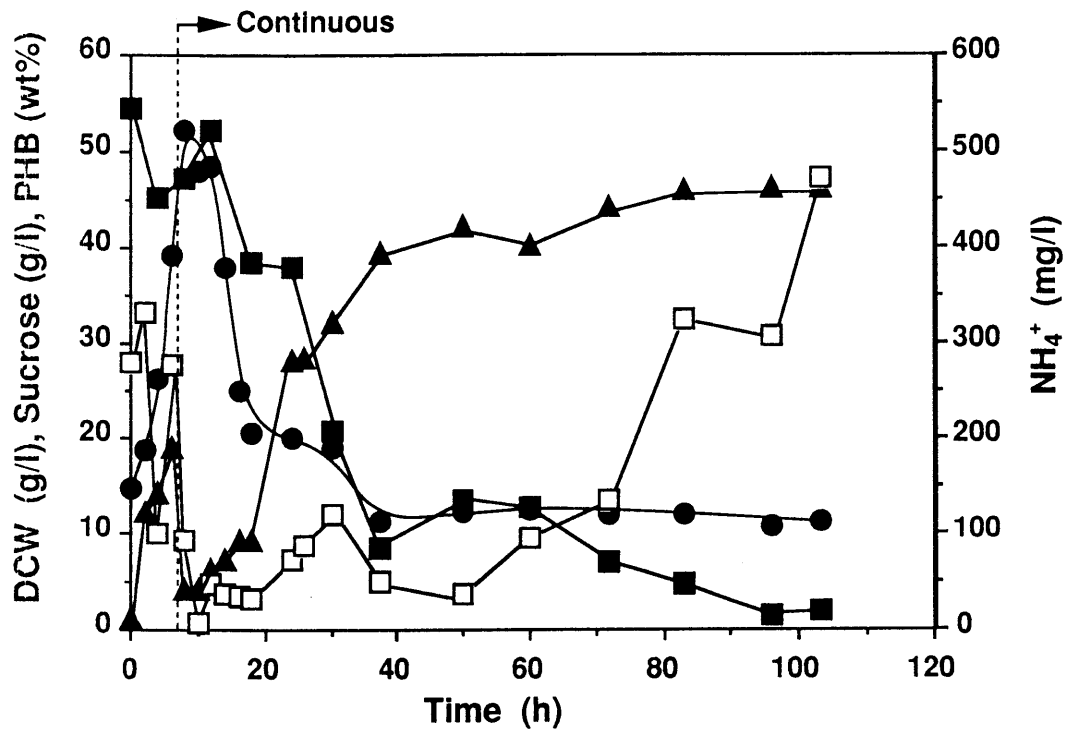


図 3. 1 3 連続培養 1—5



● DCW (g/l) 30°C pH7.0
 ▲ Sucrose (g/l) Initial Medium : M50
 □ NH₄⁺ (mg/l) Feed Medium : M50
 ■ PHB (wt%) D = 0.08h⁻¹
 Sucrose 65g/l
 (NH₄)₂SO₄ 5.0g/l

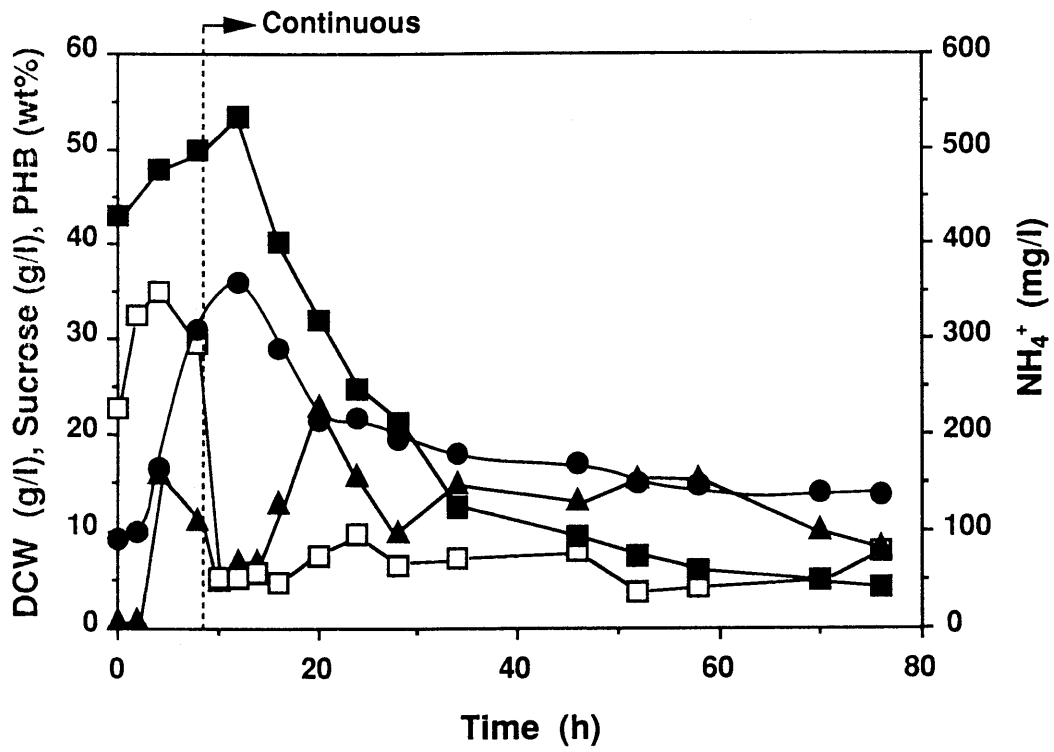
図 3. 1 4 連続培養 1—6



● DCW (g/l)
 ▲ Sucrose (g/l)
 □ NH₄⁺ (mg/l)
 ■ PHB (wt%)

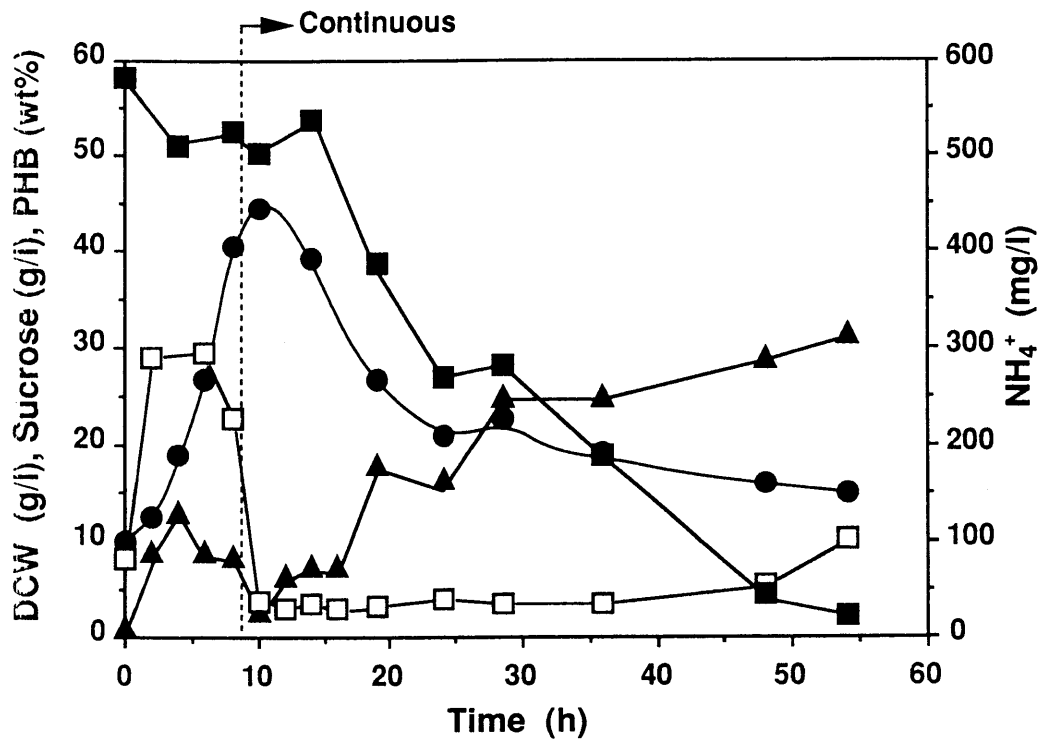
30°C pH7.0
 Initial Medium : M60
 Feed Medium : M60
 D = 0.1h⁻¹
 Sucrose 80g/l
 (NH₄)₂SO₄ 7.5g/l

図 3. 1 5 連続培養 1—7



● DCW (g/l) 30°C pH7.0
 ▲ Sucrose (g/l) Initial Medium : M60
 □ NH₄⁺ (mg/l) Feed Medium : M60
 ■ PHB (wt%) D = 0.07 h⁻¹
 Sucrose 80g/l
 (NH₄)₂SO₄ 9.5g/l

図 3. 1 6 連続培養 1—8



● DCW (g/l) 30 °C pH7.0
 ▲ Sucrose (g/l) Initial Medium : M60
 □ NH₄⁺ (mg/l) Feed Medium : M60
 ■ PHB (wt%) D = 0.1h⁻¹
 Sucrose 80g/l
 (NH₄)₂SO₄ 9.5g/l

図 3. 1 7 連続培養 1—9

びに、培地中に沈殿を生じないクエン酸鉄アンモニウムを用いた培地による培養を行った（図3. 18、図3. 19）。培地濃度M100を用いた培養ではやはりP（3HB）の菌体内含量の減少は著しかったが、クエン酸鉄アンモニウムを培地に用いた培養ではP（3HB）の減少はやや抑えられた。この培養でもP（3HB）の菌体内含量は低下しているが、これは、3. 1. 3で示したように、培養液中の高いSucrose濃度が原因であると考えられる。また、ポリサッカライドの生成とP（3HB）の菌体含率の低下が連続培養後の同じ時期から見られ始めた（Data not shown）。このことからポリサッカライドの生成も、P（3HB）の菌体含率の低下に関係があるのではないかと考えられた。また、この培養では、培地濃度、希釈率ともにwash outの起きない範囲で培養を行ったにもかかわらずwash outしてしまった。以後、鉄源としてクエン酸鉄アンモニウムと塩化鉄を平行して用いて実験を行うこととした。

次に定常状態での菌体濃度を上げるために硫安、Sucrose濃度を上げて培養を行った（図3. 20）。しかし、連続培養の初期から、高い硫安濃度を用いると培養液中のアンモニウムイオンが高濃度となり、培養が不安定で、wash outしてしまった。そこで、連続培養の途中で硫安濃度を徐々に上げ、窒素源に関する菌体収率の変化にあわせることとした。まず、連続培養中に不足しているのがアンモニウムイオンのみなのかどうかを調べるために、連続培養中に連続培養用の培地に硫安を加えて、菌体濃度の変化を調べた（図3. 21）。この培養では、硫安濃度を上げるとそれに伴って菌体濃度も上昇した。このことから連続培養中に硫安濃度を徐々に上げることが菌体濃度を高めるのに有効であると考えられた。

3. 3. 2 連続培養装置2を用いた連続培養

（濃度勾配を用いたケモスタット）

連続培養装置2を用い、連続培養用の培地中の硫安濃度を徐々に上げながら連続培養を行った（図3. 22、図3. 23）。しかし、濃度勾配をかけるタイミングや濃度勾配が菌の窒素源に関する菌体収率の変化に対応させるのが難しく、アンモニウムイオン、Sucrose濃度が上昇し、wash outしてしまった。またこの培養においても、ポリサッカライドの分泌が見られ、さらに塩化鉄を用いた培地の培養では、P（3HB）の菌体内含量の低下も見られた。

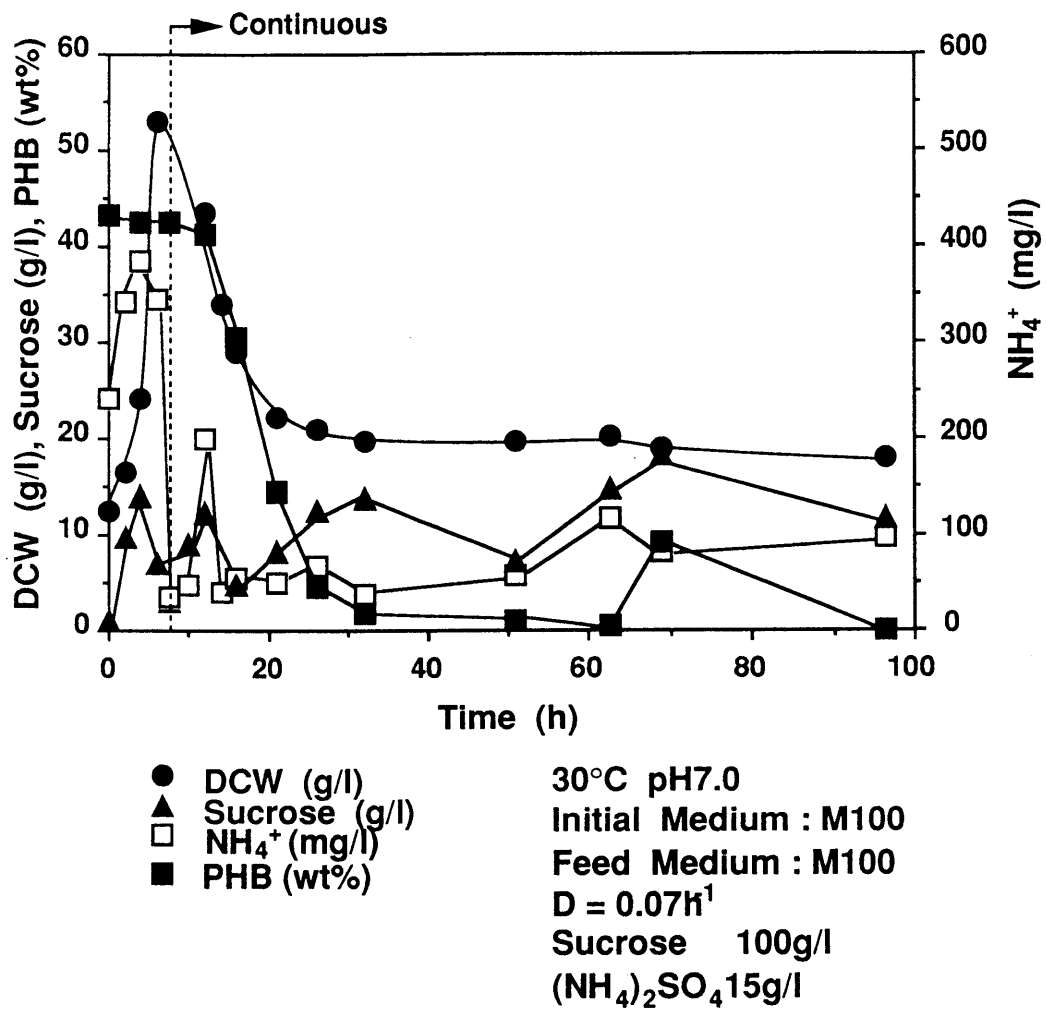
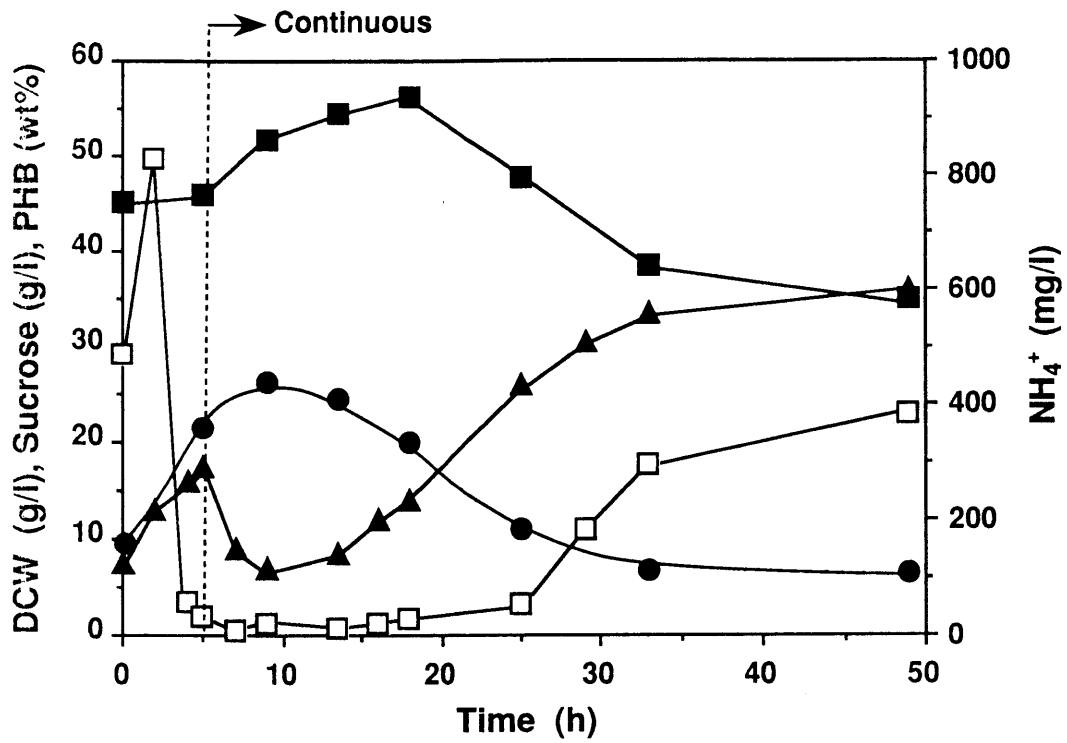
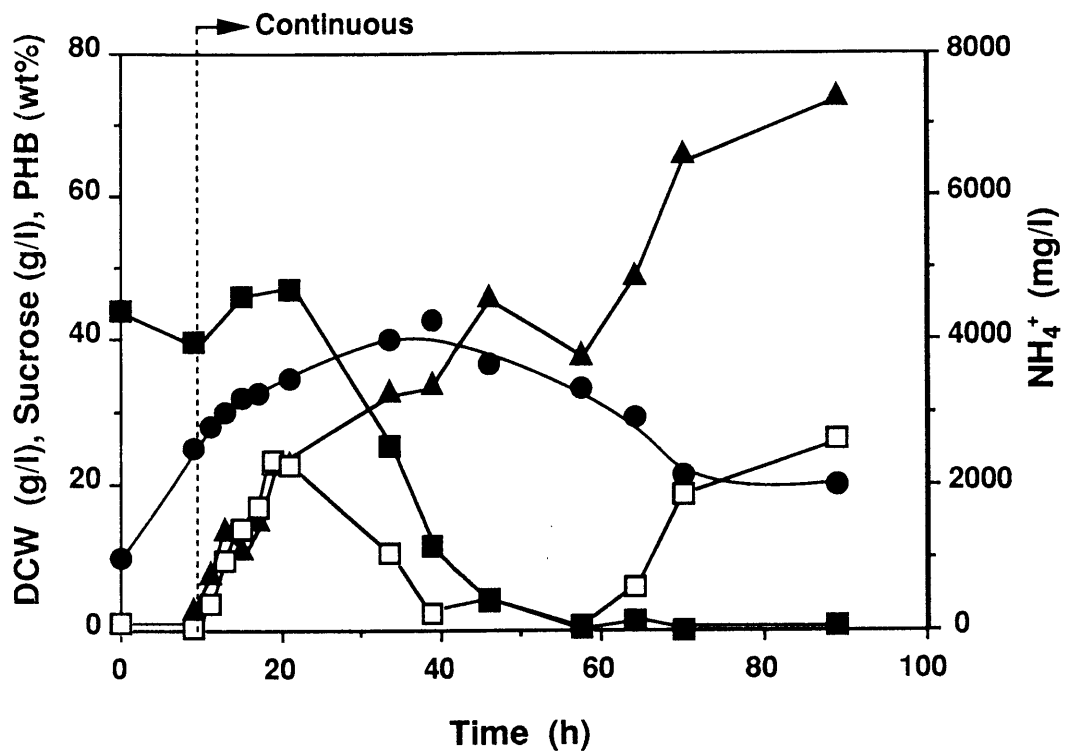


図 3. 1 8 連続培養 1—1 0



● DCW (g/l) 33 °C pH6.5
 ▲ Sucrose (g/l) Initial Medium : M50
 □ NH₄⁺ (mg/l) Feed Medium : M50
 ■ PHB (wt%) (クエン酸鉄アンモニウム)
 D = 0.1h⁻¹
 Sucrose 50g/l
 (NH₄)₂SO₄ 4.0g/l

図 3. 1 9 連続培養 1—1 1



● DCW (g/l) 30°C pH7.0
 ▲ Sucrose (g/l) Initial Medium : M60
 □ NH₄⁺ (mg/l) Feed Medium : M60
 ■ PHB (wt%) D = 0.07h⁻¹
 Sucrose 130g/l
 (NH₄)₂SO₄ 30g/l

図 3. 20 連続培養 1—1 2

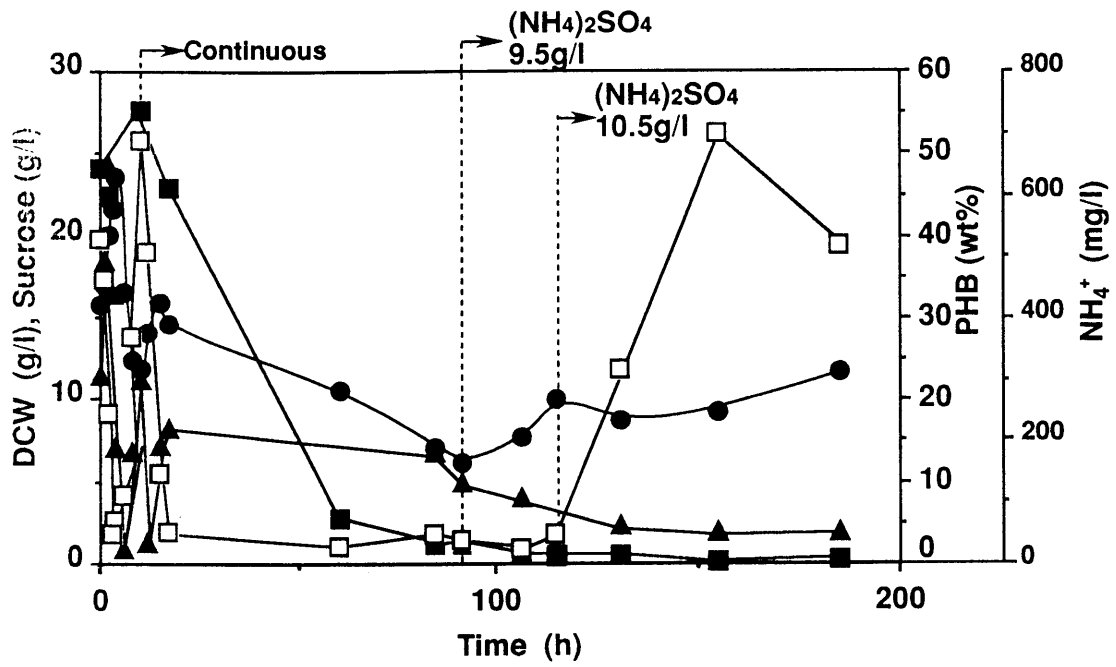


図 3. 2 1 連続培養 1—1 3

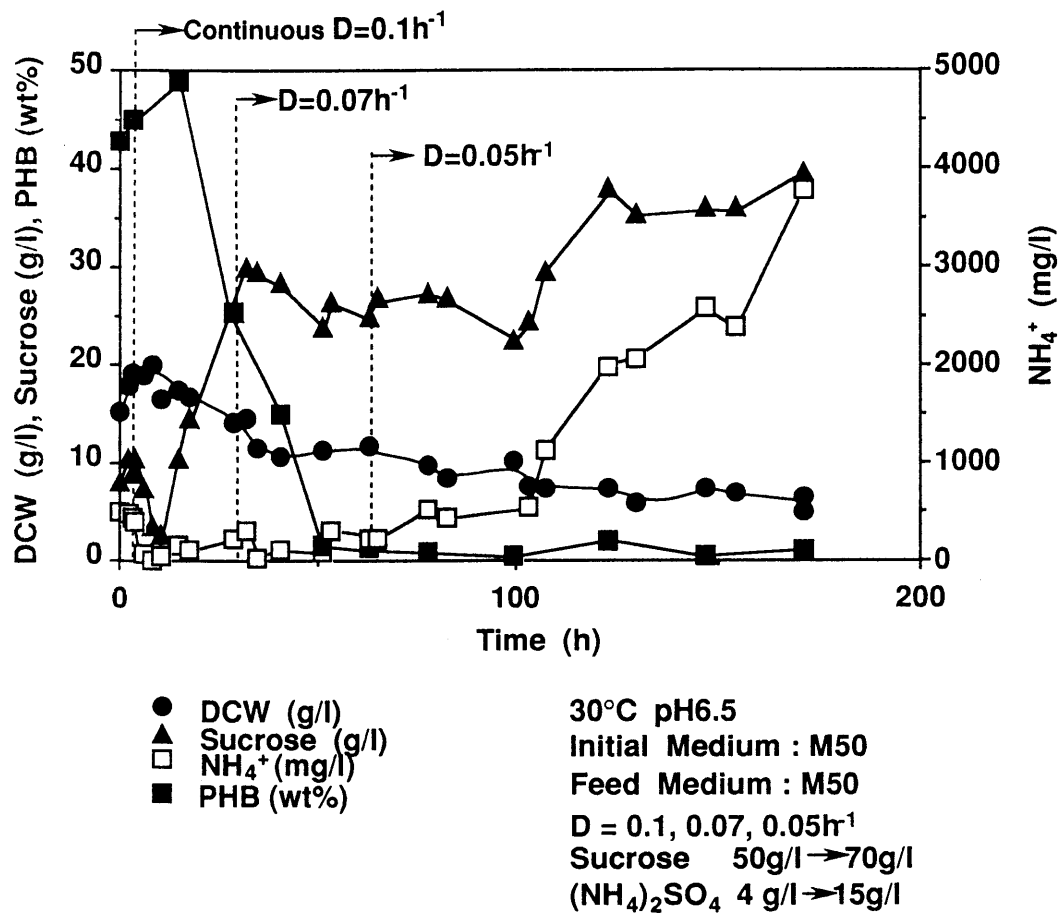


図 3. 2 2 連続培養 2-1

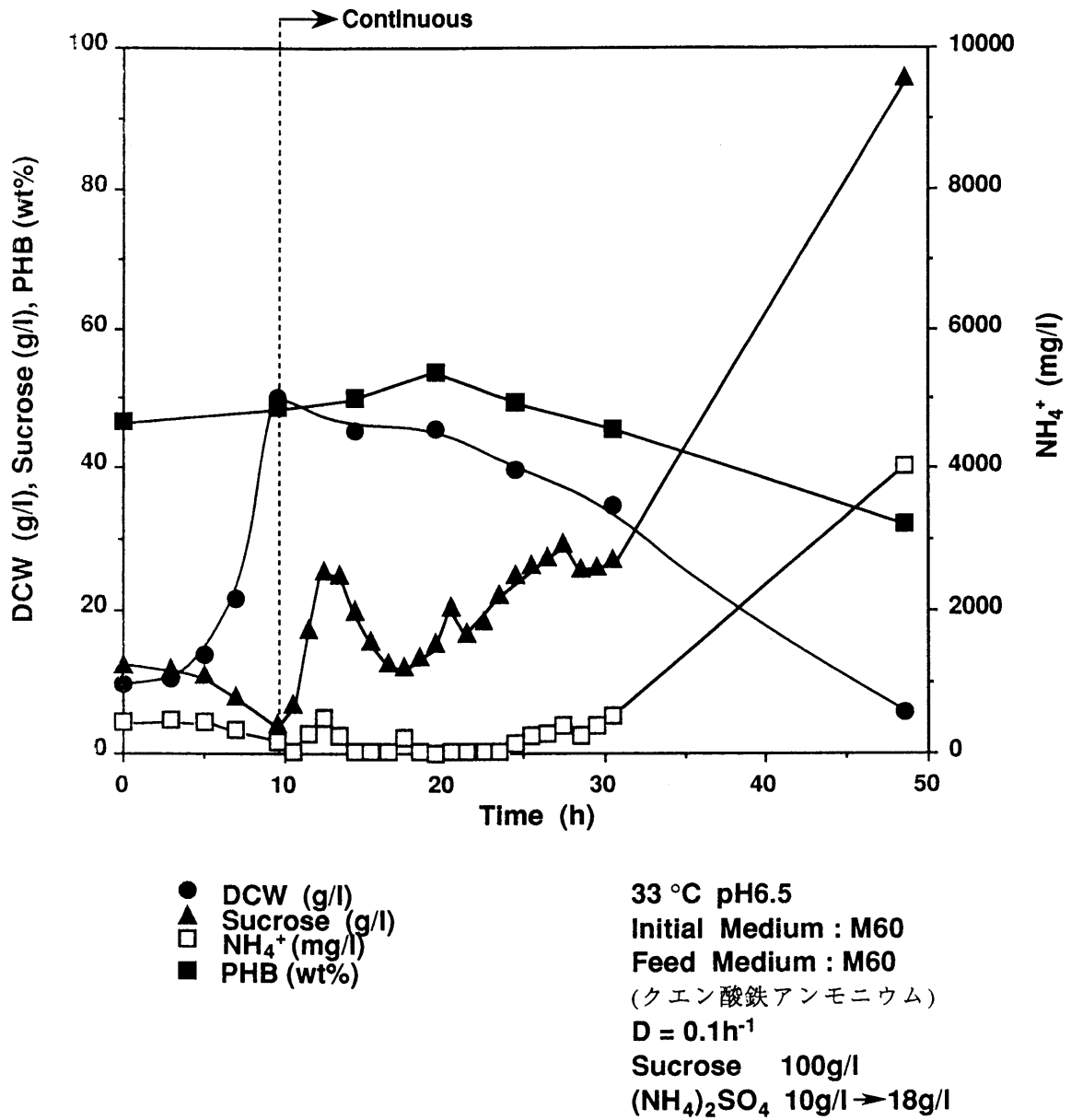


図 3. 2 3 連続培養 2—2

3. 3. 3 連続培養装置3を用いた連続培養 (pH Auxostat 1)

これまでの連続培養では、pHの制御に5 N KOHを用いていた。この5 N KOHが連続培養の間、1.5~2.0ml/hの流量で加えられていた。この大量に加えられている5 N KOHが菌の生育に影響を与えていると考え、流加培養時と同様にpHの制御に28%アンモニア水を用いそれと連動させてSucroseを加える pH Auxostatに培養方法を変更した(図3. 24、図3. 25)。この方法により、高希釈率、高菌体濃度での培養が可能になり、また、P(3HB)の菌体内含量の低下及びポリサッカライドの発生も抑えられた。この培養中、徐々にアンモニウムイオン、Sucrose濃度が低下し、これを抑えるためにpH値を上げながら培養を行った。しかし、アンモニウムイオン、Sucrose濃度を一定に保つことができずwash outしてしまった。

この培養で菌の生育にはSucrose濃度の増減が大きく影響することがわかった。

3. 3. 4 高密度連続培養 (pH Auxostat 2)

2. 2. 7に示した方法に従って培養を行った(図3. 26)。この培養でもアンモニウムイオン濃度の低下が見られ、pH値を徐々に上げながら培養を行ったが、pH7.0で一定となった。これによりアンモニウムイオン濃度、Sucrose濃度ともに低濃度に保つことができ、ポリサッカライドの分泌が抑えられた。また、P(3HB)の菌体内含量の低下も見られなかった。この培養では希釈率 0.18 h^{-1} で定常状態となり、菌体濃度は約70g/l、P(3HB)の菌体内含量は約50%であった。これにより生産性は $5.9\text{ gP(3HB)l}^{-1}\text{ h}^{-1}$ となった。ここに本研究の流加培養による生産性と連続培養による生産性を表3. 1に示す。

表 3. 1 培養法の違いによる生産性の違い

培養法	生産性 [gP(3HB)l ⁻¹ h ⁻¹]
高密度流加培養 1 a)	1.7
高密度流加培養 2 b)	3.0
高密度流加培養 3 c)	3.8
連続培養 1 - 1 d)	0.5
pH Auxostat 2 - 1 e)	5.9

a) $\mu_{\max} = 0.16\text{h}^{-1}$ 、最終菌体濃度 $X = 64.6\text{gDCW/l}$ 、

P (3HB) の菌体内含量 45.4%

b) $\mu_{\max} = 0.18\text{h}^{-1}$ 、最終菌体濃度 $X = 82.1\text{gDCW/l}$ 、

P (3HB) の菌体内含量 38.0%

c) $\mu_{\max} = 0.19\text{h}^{-1}$ 、最終菌体濃度 $X = 142.4\text{gDCW/l}$ 、

P (3HB) の菌体内含量 53.0%

d) $D = 0.07\text{h}^{-1}$ 、定常状態での菌体濃度 $\bar{X} = 15.0\text{gDCW/l}$ 、

P (3HB) の菌体内含量 46.0%

e) $D = 0.18\text{h}^{-1}$ 、定常状態での菌体濃度 $\bar{X} = 70.0\text{gDCW/l}$ 、

P (3HB) の菌体内含量 56.2%

高密度流加培養では $3.8\text{gP(3HB)l}^{-1}\text{h}^{-1}$ が最高の値であった。この値はかなり高いものであるが、流加培養では培養時間の延長が難しく、この培養では培養開始から18時間後に集菌を行った。これに対し連続培養は長期にわたって培養を続けることができ、その間ずっと表に示した生産性で生産物を得ることができる。これが流加培養に連続培養が勝っている点である。また、同じ連続培養でも、高い菌体濃度、高い稀釈率で培養を行うことによりその生産性を高めることができる。表3. 1の連続培養1-1とpH Auxostat 2-1では定常状態での菌体濃度、稀釈率がそれぞれ 15.0g/l 、 70g/l 、 0.07h^{-1} 、 0.18h^{-1} であった。その差がそのまま生産性に反映していることがこの表から良く分かる。

第4章 総括及び今後の課題

本研究において、高密度連続培養の培養方法の検討を行った。

ケモスタットとpH auxostatを組み合わせた方法により、約70g/lの菌体濃度、希釈率 0.18 h^{-1} での培養に成功した。これにより、生産性は大きく向上した（約 $6\text{ g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ ）。今後、さらに高い菌体濃度、希釈率での連続培養が期待される。

高菌体濃度での連続培養の問題点としては、泡の発生、DO値の維持、培養液中の老廃物等による菌の生育阻害などが挙げられる。泡の発生を抑えながらのDO値の維持には、 O_2 の流量を増やすことが有効であるが、airに対する O_2 の混合比が高くなると菌の生育が阻害されるということが考えられるため、この点についても検討が必要である。老廃物の問題については、高い希釈率で培養を行うことが可能になれば大きな問題にはならないだろう。今まで問題となっていた多糖類の分泌であるが、これはアンモニウムイオンが不足し、かつSucrose濃度が高い場合に見られた現象であった。また、多糖類の分泌が無い場合には窒素源に関する菌体収率の大きな変化は見られなかった。以上のことより、窒素制限によるケモスタット法はこの菌の連続培養には不適當である。さらに、pHの制御を5N KOHからアンモニア水に変えたところ、高菌体濃度での連続培養が可能になった。このことからpHの制御にはアンモニア水を用いることが有効である。しかし、このpH auxostatの際にアンモニウムイオンの減少が見られたが、この減少が窒素源に関する菌体収率の変化によるものなのか、または他の原因によるものなのかを検討し改良する必要がある。

pH auxostat 2の方法により、高菌体濃度での連続培養に成功した。しかし、P(3HB)の菌体内含量は40~50%とpH auxostat 1の培養の際より10~20%低かった。これはこの培養でSucroseを制限基質としたことが原因と考えられる。より高い、P(3HB)の菌体内含量を得るためには、Sucrose濃度は10g/l以上が望ましいと思われる。

そこで、今後の高密度連続培養方法としては、pH auxostat 1が高菌体濃度、高希釈率、高いP(3HB)の菌体内含量を得られる最も有効なものであると考えられる。この培養法の問題点であるアンモニア水とSucroseの

供給比率の変動を克服することが今後の最大の課題であろう。

引用文献

- 1) 京都大学農学部農芸化学教室編：農芸化学実験書 第1巻、産業図書、p.131 (1978).
- 2) 東京大学農学部農芸化学教室編：実験農芸化学 下巻、第6版、朝倉書店、p.415、(1966).
- 3) G. Braunegg, B., Sonnleitner and R. M. Lafferty: *Eur. J. Appl. Microbiol.*、6、29-32、(1978).
- 4) Kurane, R., Nohara, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*、58(2), 235-238(1994).
- 5) Nohata Y., Kurane R. : *J. Ferment. Bioeng.*、77(4)、390-393、(1994).