

ジャーファーマンターによる 好熱性細菌の増殖及び酵素生産特性に関する研究

上村 芳三・轟木 周作・甲斐 建一*・
村山 敬一*・幡手 泰雄
(受理 平成6年5月31日)

Characterization of Growth and Protease Production of *Bacillus Stearothermophilus* YG185 in Jar Fermenter

Yoshimitsu UEMURA, Shusaku TODOROKI, Ken-ichi KAI,
Keiichi MURAYAMA, and Yasuo HATATE

Bacillus Stearothermophilus YG185, which produced a highly thermostable neutral protease, was cultured in a Jar fermenter. The effect of oxygen partial pressure and culture medium conditions on the growth protease production of the strain YG185 were investigated.

The protease activity showed convex dependency on oxygen partial pressure having maximum value using air as supplying gas. No effects of culture medium conditions on protease production and growth of YG185 were observed.

緒 言

好熱性細菌(好熱菌)とは、一般に55℃以上の高温下で生息できる細菌の事を言い、自然界では主に温泉、火山周辺地域などに分布する。この微生物は、その耐熱機構の化学構造的な研究や、進化、環境適応機構といった従来の生化学・生態学的興味に加え、近年生物工学的な応用面で注目を集めている。

この好熱菌の生産する酵素は常温菌に比べて高い耐熱性を持ち、また有機溶媒や化学的変性剤に対しても安定であることから、発酵工業や化学工業、医学などの幅広い分野での利用が期待されている。

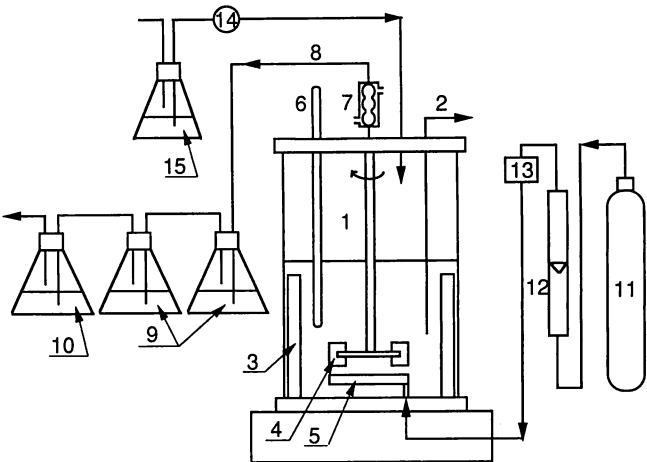
本研究では、まず亜硫酸酸化法による酸素移動速度の測定を行いフラスコとジャーファーマンターの通気攪拌効果を比較した。その結果をもとに、好熱性細菌 *Bacillus stearothermophilus* YG185株を用いて、ジャーファーマンター培養とフラスコ培養を行い菌の増殖と酵素生産特性の比較を行った。また好熱菌の増殖および酵素生産特性を向上させるために、供給酸素

分圧による影響および培地組成に変更を加えた場合の影響について検討した。

1. 実 験

1. 1 実験装置

図1にジャーファーマンターの概略図を示す。ジャーファーマンター本体としては、容量2.5ℓ、温度、攪拌調節機能の付いた丸菱バイオエンジニアリング製ジャーファーマンターを用いた。空気、酸素及び窒素酸素はボンベにより供給した。また培養実験では、培養中の発泡によるトラブルを防ぐために消泡剤を添加した。使用した消泡剤は、信越シリコーン(株)製KM-70で、5%水溶液にして添加した。フラスコ実験には、容量500mlの邪魔板(3ヶ所)付きガラス製三角フラスコを用いた。仕込み量は、亜硫酸酸化法の実験および培養実験ともにジャーファーマンターが1500ml、フラスコが100mlである。

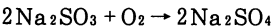


Schematic flow diagram of jar fermenter system.
(1) Jar fermenter; (2) Sampling site;
(3) baffle; (4) Agitation blade;
(5) Sparger; (6) Thermometer;
(7) Condenser; (8) Exhaust site;
(9) 6N-NaOH; (10) Distilled water;
(11) Air or oxygen; (12) Flow meter;
(13) Filter; (14) Micro pump;
(15) Antifoaming agent

図1 装置概略図

1. 2 亜硫酸酸化法による酸素移動速度の測定

この方法は、発酵液を使用しない間接法であり、Cooper らによって通気攪拌槽の性能を比較するのに提案されたものである¹⁾。Cu²⁺ または Co²⁺ の触媒存在下で亜硫酸ソーダの酸素による酸化速度は0次で進行する。即ち0.015mol 以上の SO₃²⁻ 濃度に無関係に SO₄²⁻ に酸化され、酸素移動速度は亜硫酸ソーダの消費速度に比例する。



以下に実験方法および操作条件を表1、2に記す。
ジャーフェメンター及びフラスコに、10⁻³M の Cu²⁺ イオンを加えた0.1M の亜硫酸ソーダ液を張り込み、一定の速度で通気攪拌する。一定時間おきにサンプリング（3ml）を行い、直ちに0.1M ヨウ素溶液（5ml）を加え、未反応の亜硫酸をヨウ素と反応させ、0.1M チオ硫酸ソーダで逆滴定して滴定量により発酵槽内の亜硫酸濃度を計算する。求めた亜硫酸濃度を時

表1 フラスコ実験

温 度	50℃
攪拌速度	150rpm

表2 ジャーフェメンター実験

温 度	50℃
攪拌速度	300~600rpm
空気流量	1.2~3.0 ℓ/ml

間に対してプロットし、その勾配から酸素移動速度を求め、次に示す式により容量係数を求めた。

$$N_o = -1/2 [d \text{Cso}_3^{2-} / dt] = K_d \cdot p^*$$

No : 酸素移動速度 [mol/ℓ・min]
Cso₃²⁻ : 亜硫酸イオン濃度 [mol/ℓ]
K_d : 容量係数 [mol/ℓ・min・atm]
p* : 気泡内の酸素分圧 [atm]

1. 3 培養実験

1. 3. 1 培地の調製

培養に用いた培地は、前々培養、前培養にはL培地、ジャーファーマンター培養には、WSG培地を用いた。また菌体密度測定の際には、LC寒天培地を用いた。

L培地は、窒素源としてミルクカゼインタンパクの加水分解物であるトリプトンを主成分とし、WSG培地は、脱脂大豆、カゼインといった固体タンパク質を主成分としている。またLC寒天培地は、L培地にカゼイン、寒天を加えたものである。

表3、4及び5にL培地、WSG培地及びLC寒天培地の培地組成を示す。

1. 3. 2 培養方法

培養実験は、安定した菌体を得るために、フラスコ培養およびジャーファーマンター培養の前に前々培養、前培養の2段階の培養を行った。図2に培養実験の概略を示す。

ジャーファーマンター培養では、前々培養は、菌体

表3 L培地（蒸留水1ℓに対し）

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
(NaOHでpH7.0に調整)	

表4 LC寒天培地（蒸留水1ℓに対し）

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
Casein	10 g
Agar	20 g

表5 WSG培地（蒸留水1ℓに対し）

小麦粉	30 g
脱脂大豆	15 g
Glucose	10 g
Casein	4.0 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.5 g
CaCl ₂ ・2H ₂ O	0.2 g
(NaOHでpH7.5に調整)	

保存用のL寒天斜面培地（スラント）からL培地5mlの入った試験管に1白金耳接種し、50℃、10時間の振盪培養を行った。前培養においては、前々培養液をL培地18ml入った試験管へ0.3ml接種し、50℃、10時間の振盪培養を行った。前培養終了後、その培養液15mlをWSG培地1500ml仕込んであるジャーファーマンターに接種し培養実験を開始した。

フラスコ培養においては、前々培養、前培養ともにL培地5mlを使用して振盪恒温槽中（150 rpm）50℃で各々10時間の振盪培養を行った。前々培養においてはスラントから1白金耳接種し、前培養においては前々培養液0.1mlを接種した。そして本培養にはWSG培地100mlの仕込んであるフラスコに前培養終了液1mlを接種しこれを本培養とした。

培養中一定時間ごとにサンプリングを行い、採取した培養液より菌体密度、酵素活性の測定を行った。

1. 3. 3 分析

(a) 菌体密度の測定

（前々培養及び前培養）

試料液を生理食塩水で10倍に希釈し、分光光度計（日本分光㈱製 UVIDEC α-1 型）により660nmにおける吸光度を測定した。

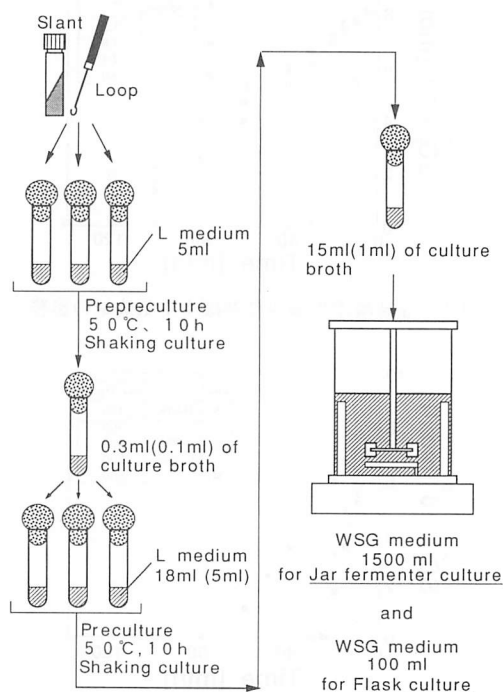


図2 培養方法

(ジャーファーマンター培養)

希釈した試料液をLC寒天プレート上に塗抹し、プレート上に生成したコロニー数を数えることにより算出した。

(b) 酵素活性の測定

培養液上清(15000rpmで5分間遠心分離)の希釈試料とハマルステン氏法カゼインとのタンパク質分解反応による遊離チロシン量を、チロシン溶液を基準としたOD₂₇₅(275nmにおける吸光度)の検量線により決定した。

酵素活性の定義: 37℃で1分間に1μgのチロシンを遊離させる酵素(プロテアーゼ)量を1U(ユニット)と定義。

2. 結果及び考察

2. 1 亜硫酸酸化法による酸素移動速度の測定

図3, 4に亜硫酸濃度の経時変化を示す。攪拌速度を一定にして空気流量を変化させた場合を図3に、空気流量を一定にして攪拌速度を変化させた場合を図4にまとめた。

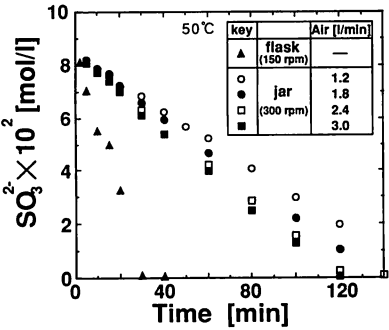


図3 亜硫酸濃度減少に及ぼす空気流量の影響

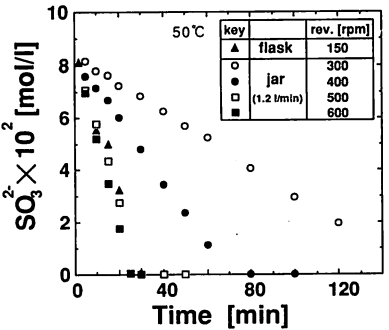


図4 亜硫酸濃度減少に及ぼす攪拌速度の影響

空気流量を変化させた場合、フラスコの亜硫酸濃度の変化に比べて空気流量を変化させてもフラスコと同等の亜硫酸濃度の変化は見られなかった。一方、空気流量を一定にして攪拌速度を変化させた場合、グラフをみて分かるとおり500rpmまたは600rpmでフラスコと同等の亜硫酸濃度の減少がみられた。これらの亜硫酸濃度の減少から傾きを求め、容量係数を求めたところ、表6のようになった。

この表により、フラスコと同等の増殖及び酵素生産を得るための操作条件として、ジャーファーマンターの培養条件を温度50℃、空気流量1.2l/min、攪拌速度500rpmと決定した。

2. 2 培養実験

2. 1の結果より得られた条件で、実際に好熱製細菌を用いてジャーファーマンター培養とフラスコ培養を行い菌の増殖特性及び酵素生産特性を比較した。菌体密度の経時変化を図5に、酵素活性の経時変化を図6

表6 実験結果

Flask (50℃, 150rpm)	1.08×10 ⁻¹¹ [mol/m ³ ·Pa·s]
Jar fermenter (50℃, 150rpm)	
1.2	2.11×10 ⁻¹³
1.8	2.45×10 ⁻¹³
2.4 [ℓ/min]	2.48×10 ⁻¹³ [mol/m ³ ·Pa·s]
3.0	2.80×10 ⁻¹³
Jar fermenter (50℃, 1.2ℓ/min)	
400	4.65×10 ⁻¹³
500 [rpm]	1.12×10 ⁻¹¹ [mol/m ³ ·Pa·s]
600	1.34×10 ⁻¹¹

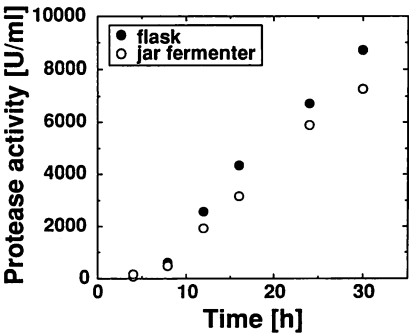


図5 培養実験結果(菌体密度)

に示す。

グラフより菌体の増殖，酵素生産性はフラスコ培養とほぼ同等となった。この結果，亜硫酸酸化法での発酵槽の通気攪拌効果の評価は本研究において有効であっ

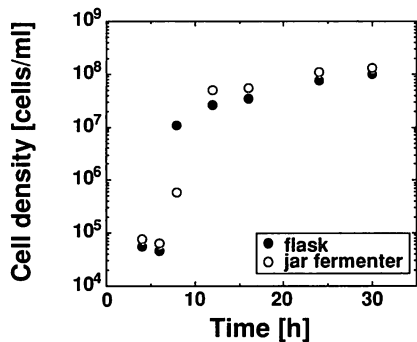


図6 培養実験結果（酵素活性）

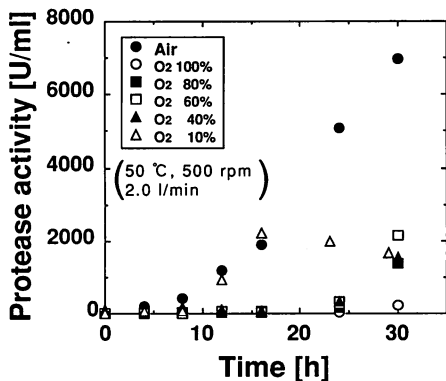


図7 菌の増殖に及ぼす供給酸素分圧の影響 (N₂ + O₂)

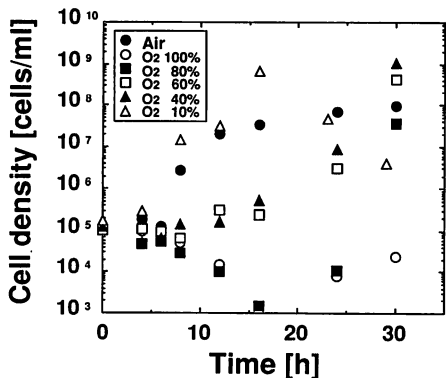


図8 酵素活性に及ぼす供給酸素分圧の影響 (N₂ + O₂)

たといえる。

2.3 供給酸素分圧の影響

対数増殖期後の培養液の溶存酸素濃度は0になっていることから，供給酸素分圧を上げることによって好熱菌の増殖および酵素生産特性を向上させることが可能ではないかと考えた。そこで，供給酸素分圧を変化させた場合の影響について検討してみた。その結果を図7～10に示す。図7，8は供給ガスを酸素ボンベと窒素ボンベで調整した場合，図9，10は供給ガスを空気ボンベと酸素ボンベによって調整した場合の結果である。

供給ガスを窒素と酸素で調整した場合，酸素分圧40%以上のとき菌の増殖は極端に阻害された。また80%，100%のときには培養開始から16時間まで菌体密度が減少していた。これにより酸素分圧が高すぎると菌に悪影響を及ぼすことが分かる。酵素活性については酸素分圧40%以上の場合まったく増加しなかった。酸素分圧10%のとき菌は空気中で培養した場合と同じように

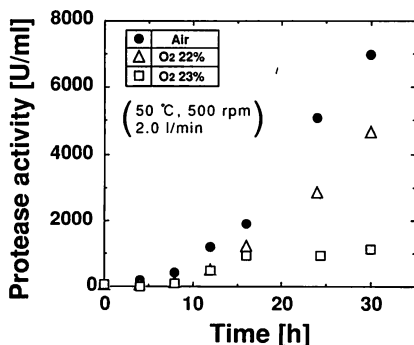


図9 菌の増殖に及ぼす供給酸素分圧の影響 (Air + O₂)

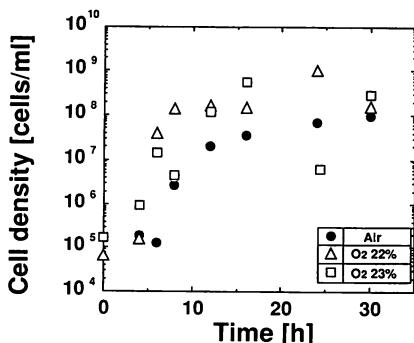


図10 酵素活性に及ぼす供給酸素分圧の影響 (Air + O₂)

増殖したが、酵素活性については培養開始から16時間までは増加したが、それ以降は一定となった。

供給ガスを空気と酸素で調整した場合、菌体密度については空気の場合と同様に増殖したが、酵素活性は酸素分圧23%のときに極端に低下した。この結果により酸素分圧を変化させても菌の増殖及び酵素生産特性に悪影響を及ぼすだけであることが分かった。

2.4 培地条件の影響

対数増殖期後の菌対密度を向上させる目的で2.3

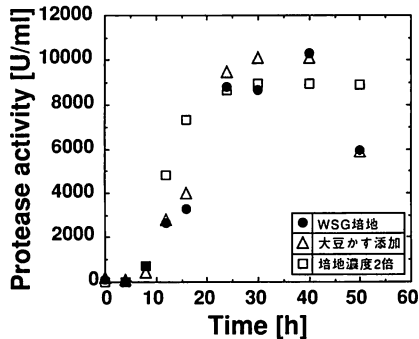


図11 菌の増殖に及ぼす培地条件変更の影響

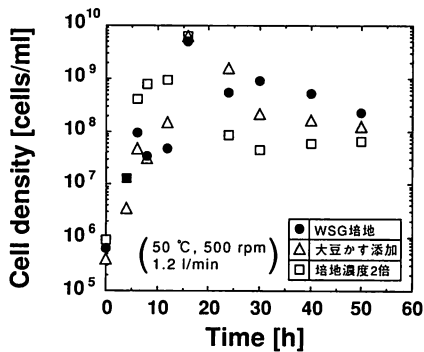


図12 酵素活性に及ぼす培地条件変更の影響

では酸素分圧を変化させたが、それによる菌対密度及び酵素活性値の向上は認められなかった。そこで通常のWSG培地に栄養素を加えた場合の影響について検討してみた。検討項目を下に示す。

1) 脱脂大豆添加の影響

2) 培地濃度の影響

1)については、脱脂大豆を12時間後と24時間後に仕込量の1/2ずつ加え、最終的には脱脂大豆が通常のWSG培地より2倍になっている。また加えた脱脂大豆は滅菌処理(オートクレーブ)が施してある。

2)については、WSG培地調製時に濃度を2倍にして培養を行った。その結果を図11, 12に示す。菌体密度については16時間で全てほとんど同じ最大値を示した。また酵素活性も同様であった。

結 言

- 1) 亜硫酸酸化法による酸素移動速度の測定により、ジャーフェーマンター培養でフラスコ培養と同等の菌の増殖及び酵素生産を得ることができた。
- 2) 供給酸素分圧を変化させると、菌の増殖及び酵素生産は低下した。
- 3) 培地濃度を2倍にしたり脱脂大豆を分割添加しても、菌の増殖及び酵素生産性に変化は認められなかった。

引用文献

- 1) 安藤浩毅：“枯草菌によるプロテアーゼ生産培養に関する研究”，鹿児島大学卒業論文（1989）。
- 2) 大島泰郎：“好熱性細菌”，東京大学出版会（1978）。
- 3) 久保 幹・肥後裕仁：東ソー研究報告，第33巻，第2号（1989）。
- 4) P. F. Stanbury, A. Whitaker 著，石崎文彬訳：“発酵工学の基礎”，学会出版センター（1988）。