

Aerobacter aerogenesによるイソアミラーゼの生成

藤尾, 雄策
九州大学農学部微生物工学教室

<https://doi.org/10.15017/23138>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 27 (3/4), pp.175-187, 1973-07. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：



Aerobacter aerogenes によるイソアミラーゼの生成

藤 尾 雄 策

九州大学農学部微生物工学教室

(1972年3月12日受理)

Isoamylase Formation by *Aerobacter aerogenes*

YUSAKU FUJIO

Laboratory of Biochemical Engineering, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka

緒 言

多糖類の α -1.6 グルコシッド結合分解酵素であるイソアミラーゼに関しては、その自然界における発見、研究の歴史は古い (Pringsheim und Fuchs, 1923; 西村, 1930)。しかしながらバクテリアの生産物としてのイソアミラーゼの歴史は浅く、Wallenfels *et al.* (1966) によつて *Aerobacter aerogenes* の生成するイソアミラーゼ (Bender and Wallenfels, 1961) が発見されて以来のことである。その後、イソアミラーゼ生成を行なう微生物が数種 (Ueda and Nanri, 1967; Walker, 1968; Harada *et al.*, 1968; Ueda *et al.*, 1971) 発見された。これらのうち、*Aerobacter aerogenes* の生成するイソアミラーゼは工業的に大量生産できる可能性をもっており、しかも酵素化学的性質の解明 (Wallenfels *et al.*, 1966; Mircier *et al.*, 1972; Eisele *et al.*, 1972) も進んでいる。

本研究においてはイソアミラーゼの工業的生産を目的として菌株のスクリーニングを行なつて得られたイソアミラーゼ生成能をもつ *Aerobacter aerogenes* sp. No. 105 について研究を行なつた。この菌株は培地組成中の窒素源に酢酸アンモニアを用いると培養液中にイソアミラーゼ活性を示すが、硫酸アンモニアを用いると菌体内に殆んどイソアミラーゼ活性が認められるという特異的な性質をもっている。*Aerobacter aerogenes* のイソアミラーゼが培養条件によつて菌体内、又は菌体外に生成する事実についてはすでに認められている (Wallenfels *et al.*, 1966)。しかしこの場合は炭素源の相違によるものであり、本菌株の場合

は全く異なつたものである。分離した菌株の大量培養によるイソアミラーゼ生産を考える場合、培養時間の短かさ、生成したイソアミラーゼ分離の容易さなどからして菌体内にイソアミラーゼを生成させる培養方法が有利と考えられる。この菌株について、振とう培養により菌体内、菌体外にイソアミラーゼ生成を行なわせた場合についてそれぞれ検討を行なつた。菌体内生成の場合における、回分通気培養、流加法による培養、連続培養を行ない、それらの方法とイソアミラーゼ菌体内生成との関連について検討を行なつた。

実 験 方 法

(1) 菌株と培地組成

使用した菌株は藤尾によつて分離されたイソアミラーゼ生成能をもつ *Aerobacter aerogenes* sp. No. 105 である。後述するようにこの菌株は同一炭素源を使用しても窒素源の相違によりイソアミラーゼを菌体内、又は菌体外に生成する。培養に用いる培地組成は菌体外にイソアミラーゼ生成を行なう組成を (A)、菌体内に行なう組成を (B) として Table 1 に示し

Table 1. Mediums composition used.

Composition (A)	Composition (B)
Soluble starch 1.0%	Soluble starch 1.0%
CH ₃ COONH ₄ 0.8	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.8
K ₂ HPO ₄ 0.1	K ₂ HPO ₄ 0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.05	MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.05
KCl 0.05	KCl 0.05
FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01	FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01
Pepton 0.05	Pepton 0.05
	CaCO ₃ * 0.7

* CaCO₃ was added if necessary.

た。ここで (B) 組成中の炭酸カリシウムは pH 調整を行わない培養のときに、pH 低下を防ぐため添加されるもので、通気培養において pH を調整しながら培養する場合には添加する必要はない。

(2) 炭素源の定量

(A), (B) 組成の培地はともに炭素源として可溶性澱粉を用いるが、この定量にあつては分析試料を 1-N 塩酸を用いて沸とう水浴中で 3 時間加水分解を行なつた後、炭酸ナトリウムで中和し、これをマイクロベルトラン法にて還元糖として定量して可溶性澱粉量とした。なお、培養液の場合には菌体を除去するため 6000 rpm で遠心分離した後、その上澄を分析試料とした。

(3) 菌体量の定量

あらかじめ適当な濃度とした菌体懸濁液について 660 m μ における Optical density (OD と略称) と 105°C で恒量とした乾燥菌体重量との相関を前もって測定し、標準曲線を作成した。この結果を Fig. 1 に示す。Fig. 1 の直線の傾きは 0.504 であり、乾燥菌体重量濃度を C_x (mg/ml) とすると次の関係が成立する。

$$C_x = 0.504 \times (\text{OD}) \times (\text{希釈倍率})$$

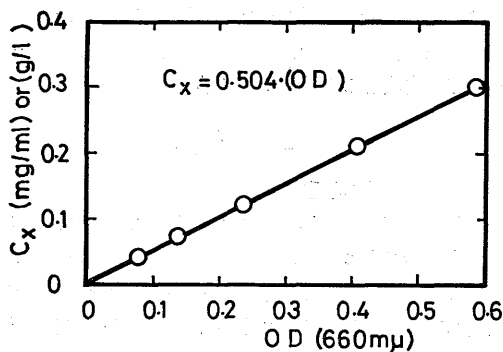


Fig. 1. Standard curve for quantitative analysis of cell concentration.

ここで希釈倍率の項は培養液を標準曲線の範囲内に希釈した場合の倍率である。なお、(B) 組成の培地で炭酸カルシウムを添加して培養した場合には、OD 測定に際して 0.1-N 塩酸で希釈、溶解させた。測定には HITACHI PERKIN-ELMER 139 型分光光度計を使用した。

(4) 培養液より酵素液の調整

(A), (B) 組成の培地による培養液について、菌体内、菌体外のイソアミラーゼ活性を測定するが、菌体外酵素液は培養液を遠心分離し菌体を除去した上澄と

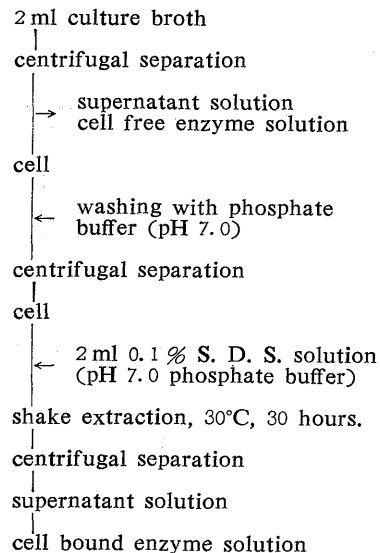


Fig. 2. Preparation of enzyme solution.

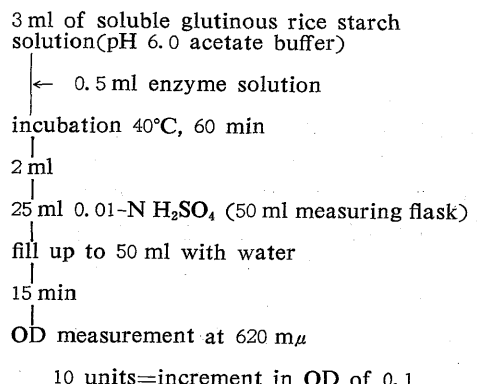


Fig. 3. Assay of isoamylase activity and definition of activity unit.

した。菌体内酵素液は遠心分離した菌体に分析試料とした培養液と同容の 0.1% S.D.S. (Sodium dodecyl sulfate, リン酸緩衝液で pH 7 に調整) を加え、30°C にて 30 時間振とう抽出を行ない、遠心分離した上澄を用いた。これらの方法を Fig. 2 に示す。

(5) イソアミラーゼの活性測定

Kobayashi (1955) に基づいて、もち米澱粉を基質とする方法によつた。分析手順を Fig. 3 に示す。ここでイソアミラーゼ活性の単位を反応液と盲検液との OD の差、0.1 をもつて 10 単位とした。基質として用いたもち米澱粉は佐藤 (1944) の方法に従つて調製した。このもち米澱粉を 1.0% として水浴上で溶解し、濾過した後濾液 500 ml に 100 ml の 0.5 M, pH

6 の酢酸緩衝液を加えて反応基質とした。活性測定は基質 3 ml, 酵素液 0.5 ml を 40°C で 60 分間反応させた後, 25 ml の 0.01 N 硫酸中に 2 ml を入れて反応を停止させる。これに 0.01 N 沃度液 2 ml を加え, 全体を 50 ml として 610 m μ にて OD を測定した。盲検液は 3 ml の基質を 40°C で 60 分間放置した後酵素液 0.5 ml を添加してその直後に反応を停止させる。この操作は反応液と並行して行なつた。

(6) 振とう培養法

保存菌株から斜面培地 (組成は Czapek-Dox) に接種し, 30°C にて 24 時間の前培養を行なう。500 ml 容振とうフラスコに培地を 100 ml 宛入れ, 0.5 atm, 30 分間オートクレーブにて殺菌した。これに前培養した斜面より 1 白金耳を接種し, 振とう培養を行なつた。培養は 30°C で行ない, 使用した振とう機は pitch 50 mm, 140 strokes/min の往復動型である。分析試料のサンプリングは適当な時間々隔においてフラスコ各 2 本を採取しこれを合せて分析した。

(7) 回分培養法

通気培養にはパイレックス製, 全容 1.0 l, 培養液量 0.5 l の培養槽を用いた。この装置はマグネチックスターラによる攪拌, 温度制御は恒温水槽によるものである。付属装置として, 通気装置, pH 自動調整装置, 溶存酸素濃度測定, 記録装置を取付けた。

回分培養実験では組成 (B) の培地のみを用いて菌体内にイソアミラーゼが生成する条件で培養を行なつた。ただし, 培地組成中の炭素源を検討する目的で可溶性澱粉の他に, グルコース, マルトース, プルランも使用した。pH 自動調整装置によつて培養中の pH を一定に保ちながら培養する場合には炭酸カルシウムは添加しない。ここで用いたプルランは *Pullulalia pullulans* s-1 を用いて上田 (1964) の方法に従つて調整した。培地は培養槽に 475 ml を入れ, 0.5 atm, 30 分間オートクレーブを行なつた。種菌液は振とう培養で 15~18 時間培養したものを用い, 種菌量は 25 ml (全培養液量に対して 5%) とした。炭素源について検討を行なつた培養では pH 7.0, 30°C, 通気量 1.5 vvm の条件で培養した。

(8) 溶存酸素濃度を制御した回分培養

この培養で用いた培養装置は (7) の装置とほぼ同一であるが, 培養液の溶存酸素濃度を一定値に制御するため, 酸素分析計で検出した測定値を指示調節計を通じて通気空気量を制御する装置を取付けた。指示調節計の設定値, および通気量を調節することによつて培養液の溶存酸素濃度は設定値に対して ± 0.1 ppm 以

内に制御することができた。種菌液の調製, 培養の手順は回分培養と全く同一である。pH は 7.0, 温度 30°C 一定として培養液溶存酸素濃度を 5.0~0.1~0.2 ppm の範囲内で 0.5 ppm 毎に 10 段階に変えて培養をそれぞれ行なつた。

(9) 流加法による培養

培養装置は (8) で用いた装置に加えて流加用定量ポンプと流加培地貯槽を設けた。培養の条件は pH 7, 溶存酸素濃度は 1.0 ppm, 温度 30°C とした。流加培養の手順は初発炭素源 (可溶性澱粉) 1.0% の培地 500 ml で回分培養を行なう。回分培養において炭素源の資化が終り菌体の増殖が停止すると同時に炭素源濃度 10% の流加用培地を定量ポンプによつて一定流速で流加する。ここで回分培養から流加培養に移行する時期については, この菌株が炭素源の資化を行なっているときと, 炭素源が資化されつくして菌体の増殖が停止した状態のときとは pH の低下, 酸素要求の急激な減少など現象の変化が顕著であり, この変化を流加開始の判断をする基準とした。流加培養の期間は, 先ず菌体濃度が回分培養において得られる値の 2 倍程度を目標とした。流加培養においてパラメタは流加速度とし, 2800, 4400, 8000 (mg/l-hr) の流加速度について実験を行なつた。ここで流加速度の単位として, 可溶性澱粉濃度を還元糖として分析し, 培養液 1 l 当りの還元糖 mg 数で示した。流加を行なうことによつて生じる培養液量の増加は 20% 以内, すなわち 100 ml までとし, 分析値にたいしては計算上の補正を行なつた。

(10) 連続培養法

連続培養に用いた培養槽はパイレックス製で全容 2.0 l, 培養液量 1.5 l である。この培養装置では, 培養液溶存酸素濃度の制御方式として酸素分析計の測定値を指示調節計によつて通気空気流路の ON-OFF 制御と, 更に培地流入ポンプの ON-OFF 制御の 2 つの系統を設けた。培養液の温度調節は恒温水槽を用い, pH の測定制御機構は指示調節計と連動したポンプを用いる方法によつた。連続培養時における培養液量は培養槽上部より一定位置になるように流出用パイプを取付け, 液面を一定にする方法を用いた。

培養する液量は 1.5 l とし, 振とう培養で調製した種菌液を回分培養と同様に 5% 接種した。先ず回分培養を行ない, 菌体濃度が所定濃度に達してから培地の供給と流出を開始した。供給培地の炭素源 (可溶性澱粉) の濃度を培養実験のパラメタとし, 1.0, 2.0, 3.0% の場合についてそれぞれ実験を行なつた。また

炭素源濃度を2.0%として希釈率をパラメータとした培養実験も行なった。いずれの場合にも全培養経過に亘って温度 30°C, pH 7.0, 溶存酸素濃度 1.0 ppm の条件を保った。

実験結果および考察

(1) 振とう培養における結果

(a) (A)組成の培地を使用した培養

(A) 組成の培地を使用した培養経過を Fig. 4 に示す。ここで C_x は菌体濃度, C_s は可溶性澱粉濃度, E_1 , E_2 はそれぞれ菌体外および菌体内イソアミラーゼ活性単位を示す。Fig. 4 の経過について, 炭素源が資化されつくして最大菌体濃度に達するまでにほぼ 25 時間を必要とした。この時点では, 菌体内, 菌体外イソアミラーゼ活性は共に低く, 菌体外イソアミラーゼ活性が最大値に達するには 90~100 時間を要した。このとき, 菌体内イソアミラーゼ活性は培養液 1 ml 当り 10 単位前後であり, 菌体外の値が培養液 1 ml 当り 500 単位前後であることからして無視することができる。pH については培養初発点においては 6 前後であるが, 培養の進行とともに高くなり, 最終的には 7.5~8 の値となった。

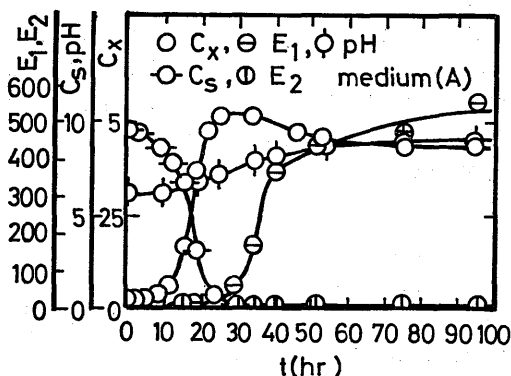


Fig. 4. Time course of isoamylase formation.

Medium was used composition (A) for cell free isoamylase formation.

(b) (B)組成の培地を使用した培養

(B) 組成の培地を使用した培養経過を Fig. 5 に示す。ここで Fig. 5 の記号は Fig. 4 の場合と同一である。(B) 組成の培地を使用した培養での特徴として, 菌体増殖に必要な時間が短かく, 培養開始より 16 時間程度で最大菌体濃度に達する。pH は培養の初発点で 7~7.5 であるが, 菌体増殖の進行と共に 7~10 時間までは低下し, その値は 5.5~6 程度まで低下

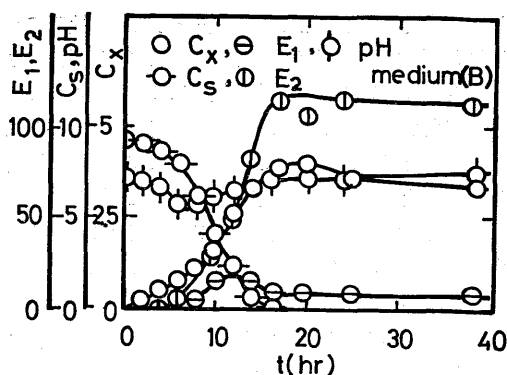


Fig. 5. Time course of isoamylase formation.

Medium was used composition (B) for cell bound isoamylase formation.

する。以後は上昇して最終的には 6.5~7 となった。(B) 組成でのイソアミラーゼ生成は, 菌体増殖と並行して菌体内に行なわれ, その最大値は菌体濃度が最大となる時期と全く一致した。菌体外イソアミラーゼ活性は培養液 1 ml 当り約 10 単位であり, Wallenfels *et al.* (1966) の報告にあるグルコース, マルトースを混合して炭素源とした場合に似ている。培養液 1 ml 当りの菌体内イソアミラーゼ活性は 120 単位前後であった。ここで (B) 組成の培地では (A) 組成における窒素源の相違の他に炭酸カルシウムが添加されているが, この点について検討した結果 pH の低下を防止する以外の効果は認められなかった。

(c) 菌体生成と炭素源消費

培地組成中の炭素源濃度がほぼ一定, また培養条件

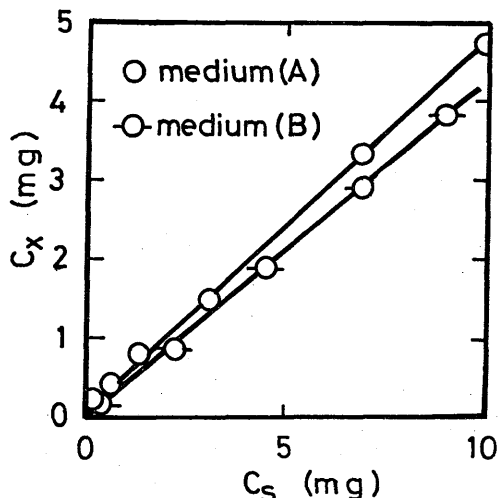


Fig. 6. Cell yield constant for medium (A) and (B).

が一定とみなされる場合には、資化炭素源量に対して生成する菌体量はほぼ一定値となる。この炭素源消費量と生成菌体量の比は対炭素源菌体生成定数である。この菌株について、(A),(B) 組成の培地を使用した培養により菌体生成定数を求めると、Fig. 6 に示すようにそれぞれ 0.50, 0.74 であつた。

(d) 菌体内イソアミラーゼ生成と菌体増殖との相関

(B) 組成の培地を使用して培養を行なうと菌体生成と並行して菌体内にイソアミラーゼが生成される。ここで生成した菌体とイソアミラーゼ活性との相関関係を知るため、 C_x を菌体濃度、 E_2 を培養液 1 ml 当りの菌体内イソアミラーゼ活性として培養経過に従つて Fig. 7 に示す。培養初期の段階を除けば、生成菌体量と生成イソアミラーゼ量との間には正比例関係が認められる。この関係はこの菌株を用いて連続培養等による菌体内イソアミラーゼ生成が比較の簡単な方法でできる可能性を示している。

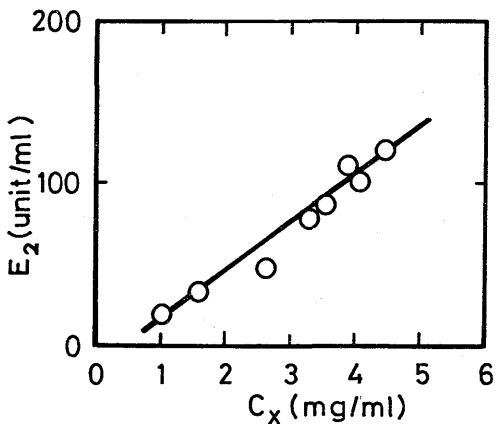


Fig. 7. Isoamylase activity per unit broth during culture.

(e) 粗酵素液を使用したイソアミラーゼの至適 pH と温度

この菌株の生成する菌体内、菌体外のイソアミラーゼの性質を酵素化学的に決定するためには第一に酵素の精製を行なう必要がある。本研究では大略の性質と、酵素活性測定条件の可否を知るために粗酵素液を用いて至適 pH、温度について検討を行なつた。それぞれの結果を Figs. 8, 9 に示す。これらの結果から、菌体内、菌体外に生成するイソアミラーゼは共に同一の至適温度、pH をもつものと考えられる。その至適温度は 46°C、pH は 5.0 であつた。ここで用いたイソアミラーゼ活性測定の条件は妥当な条件であつ

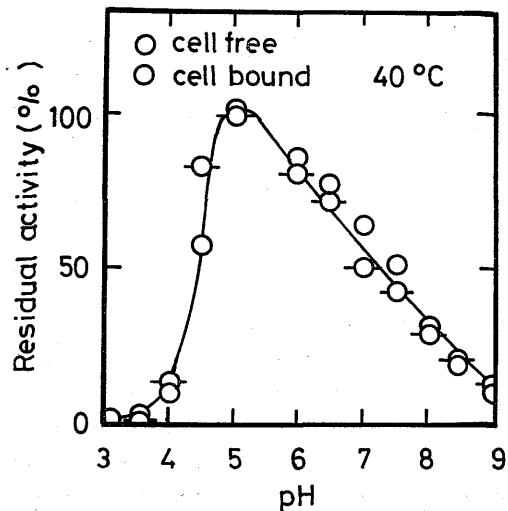


Fig. 8. pH-activity curve of cell free and cell bound isoamylase of *Aerobacter aerogenes*.

pH 3-6: Acetate buffer, pH 6-9: Phosphate buffer.

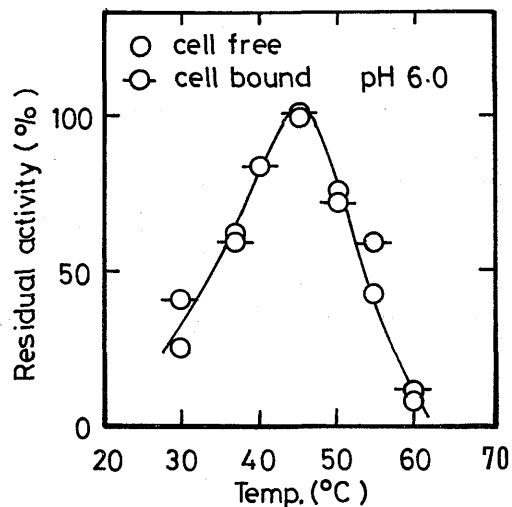


Fig. 9. Temperature activity curve of cell free and cell bound isoamylase of *Aerobacter aerogenes*.

Acetate buffer: pH 6, 1 hour.

た。ここで、Bender and Wallenfels (1961) の報告に示されている至適温度、pH はそれぞれ 47.5°C, 5.0 であり、この点に限れば本菌株の生成するイソアミラーゼもほぼ同一の性質を示した。

(f) 分離菌株の菌体内、菌体外イソアミラーゼ生成に関する比較検討

分離した菌株、すなわち *Aerobacter aerogenes* sp. No. 105 は培地組成中の窒素源のみの相違によつて

Table 2. Cultures with (A) and (B).

Medium Composition	(A)	(B)
Nitrogen source	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Yield cell (mg/ml)	5	5
Isoamylase	Cell free	Cell bound
E (unit/ml-broth)*	500	120
Final pH	7.5-8.0	6.5-7.0
T (hour)**	90-100	16-18

* Isoamylase activity defined by Fig. 2.

** Time required for isoamylase formation.

菌体増殖速度、イソアミラーゼ生成の経過が全く異なるという興味ある結果を示した。振とう培養において得られたこれらの相違点を Table 2 に示す。(B) 組成の培地による菌体内イソアミラーゼ生成の場合には菌体増殖と並行してイソアミラーゼが生成し、しかも生成体量と生成イソアミラーゼ量との間には定量的な正比例関係が認められる。培養時間が短いこととあわせて考えると、(B) 組成の培地を使用して菌体内イソアミラーゼ生成を行なわせる培養方法は (A) 組成の培地を使用する場合よりも有利と考えられる。

(2) 回分培養での基礎的検討

(a) 炭素源についての検討

振とう培養の結果から、以後の本研究においては (B) 組成の培地を使用した菌体内イソアミラーゼ生成についてのみ研究を行なった。本菌株がイソアミラーゼを生成する炭素源としては可溶性澱粉、マルトース、プルランがあり、またイソアミラーゼは生成しないがグルコースも資化する。炭素源をプルランとした場合は、培地の粘度が高くなりこのために 0.3% 程度の炭素源濃度でしか培養できない。炭素源としてマルトースを用い、培養条件として pH 7.0、温度 30°C 通気量 1.5 vvm の培養経過を Fig. 10 に示す。この

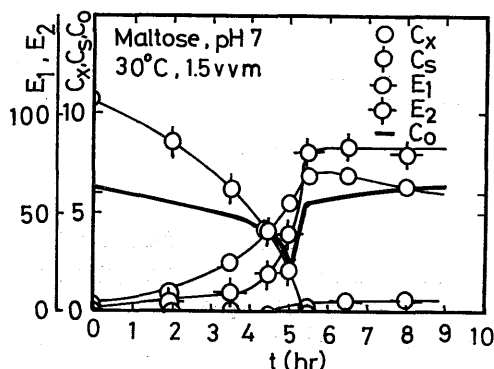


Fig. 10. Time course of isoamylase formation and cell growth by culture using maltose.

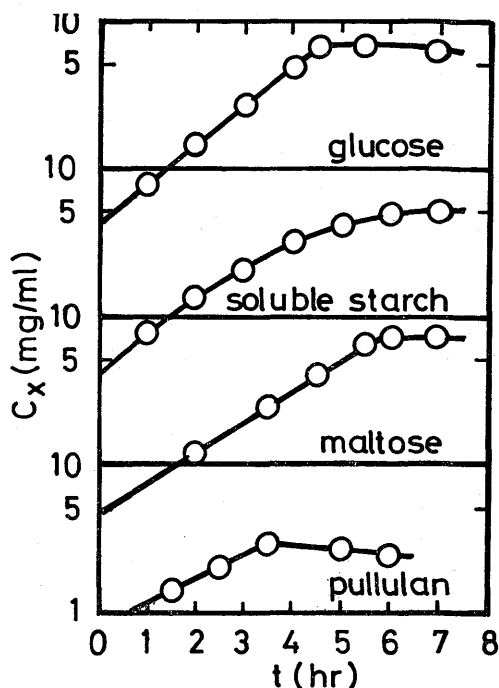


Fig. 11. Effect of various carbon sources on cell growth under the conditions of pH 7, 30°C and 1.5 vvm.

他の炭素源の場合にも培養の条件は同一とした。なお、この場合に使用した培養装置は実験方法の第 (7) 項に示した 500 ml 通気培養槽である。Fig. 10 において、 E_1 , E_2 はそれぞれ培養液 1 ml 当りの菌体外、菌体内のイソアミラーゼ活性値である。 C_x , C_s , C_o はそれぞれ菌体濃度、炭素源濃度、溶存酸素濃度である。ここでそれぞれの炭素源を使用した培養についてその菌体増殖経過を Fig. 11 に示す。グルコース、マルトース、プルランはほぼ対数的に増殖を行なう。しかしながら可溶性澱粉の場合には菌体増殖速度が培養初期と末期とは異なり、培養経過全体については対数増殖とはいえない。この理由は可溶性澱粉が単一成分の炭素源ではなく、いろいろな大きさの分子量の炭水化物の混合物であることに由来するものであろう。増殖速度についてはグルコースの場合が最も早く、次に可溶性澱粉、マルトース、プルランの順であった。対炭素源菌体生成定数は C_s を消費炭素源量、 C_x を生成菌体量として Fig. 12 のプロットより計算した。結果はいづれの炭素源についても約 0.5 であり、有意差は認められない。Fig. 13 にマルトース、プルラン、可溶性澱粉を使用して培養したときに生成する菌体内イソアミラーゼ活性を単位菌体量当り、す

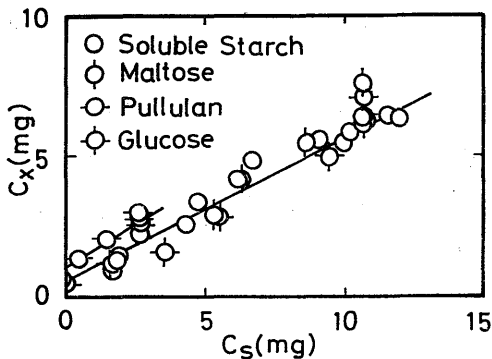


Fig. 12. Correlation of used carbon sources and yield cell.

Cell yield constant; $m = 0.50$.

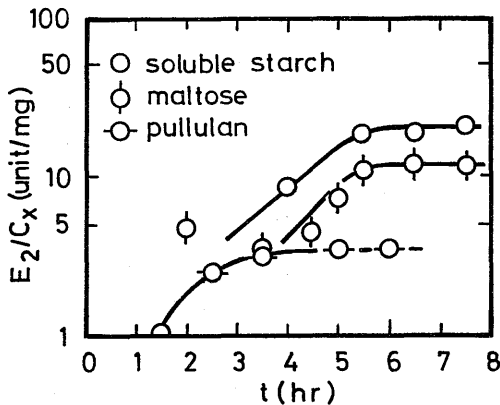


Fig. 13. Effects of various carbon sources on isoamylase formation.

Soluble starch; $E_2/C_x = 25$, maltose; $E_2/C_x = 11$ and pullulan; $E_2/C_x = 3$ (unit/mg).

なわち E_2/C_x として示す。この結果からすると、イソアミラーゼ生成のための炭素源としては可溶性澱粉が最もすぐれていた。通気培養においても、振とう培養と同様に生成菌体量と生成イソアミラーゼ量は正比例することを認めた。

(b) 培地初発炭素源濃度の影響

通気培養において炭素源を検討した結果、菌体内イソアミラーゼ生成を目的とする限り可溶性澱粉が最もすぐれた炭素源であった。この結果から以後の研究においては可溶性澱粉のみを炭素源として培養を行なった。(a) においては培地初発炭素源濃度は 1.0% としたが、ここでは培地初発炭素源濃度を検討するため、これを 0.5~6.0% の範囲で変えて培養実験を行なった。この場合の培地組成は炭素源濃度を基準として (B) 組成の培地と同一比となるように他の成分を加えた。培養経過については、1.0% の場合には培養中

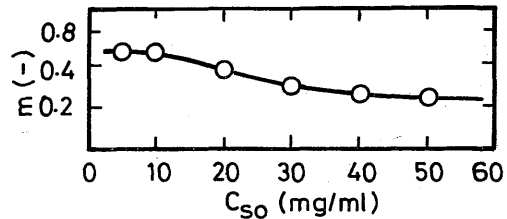


Fig. 14. Effect of soluble starch concentration on cell yield constant.

に溶存酸素濃度が 0 となることはなかったが、2.0% 以上の培養では菌体濃度が 5~6 (mg/ml) まで増加すると培養液溶存酸素濃度は 0 となった。この場合には培養液の酸素消費速度が大きくなり、培養装置の酸素供給速度が追いつかない状態と考えられ、酸素の供給が菌体増殖を支配している状態と考えた。それぞれの炭素源濃度における培養について、対炭素源菌体生成定数を m として計算し、初発炭素源濃度を C_{s0} として Fig. 14 に示す。単位菌体量当りの菌体内イソアミラーゼ活性も炭素源濃度 1.0% の場合が 25 単位で最も良い結果を示した。これらの結果からして、酸素の供給が消費に追いつかない状態、すなわち培養液の溶存酸素濃度が 0 となるような状態での培養では、対炭素源菌体生成定数、菌体内イソアミラーゼ活性、共に大巾に減少することが認められた。

(c) 溶存酸素濃度をパラメタとした培養

菌体生成、イソアミラーゼ生成に関する溶存酸素濃度の影響を知る目的で培養中の溶存酸素濃度を一定値に制御した回分培養を行なった。培養の方法は実験方法の項 (8) に示したとおりである。培養中の溶存酸素濃度設定値は 5.0 から最低 0.1~0.2 ppm とした。ここで 3.0 ppm 以上の設定値では培養の末期、すなわち菌体濃度が 5 (mg/ml) 付近まで高くなると培養液の酸素消費は急激に高まり、溶存酸素濃度設定値を保ちつづけることはできなかった。しかしその期間は全培養経過時間 10~12 時間に対して 20~30 分間であり、また溶存酸素濃度が 0 となることはなかった。培養経過の一例を Fig. 15 に示す。Fig. 15 の培養は溶存酸素濃度 2.5 ppm で行なった結果であり、上部に示してある溶存酸素濃度の記録から示されるように、設定値 2.5 ppm に対して ± 0.1 ppm 以内で制御が可能であった。この培養経過については、最大菌体濃度 6 (mg/ml)、菌体内イソアミラーゼ活性 E_2 は培養液 1 ml 当り 170 単位、菌体外活性 E_1 は 7 単位であった。溶存酸素濃度設定値が 2.5 ppm 以外の場合もほぼ同様の結果を得、この結果は通気量を一定と

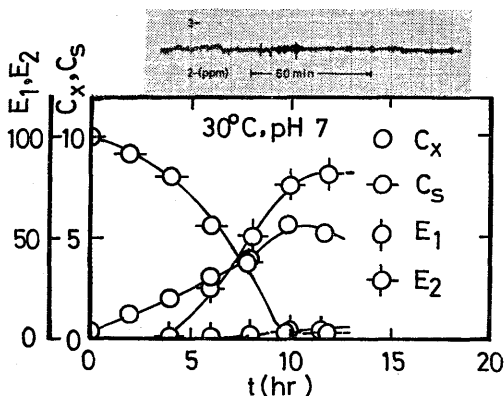


Fig. 15. Time course of the isoamylase formation in batch cultivation with the constant (2.5 ppm) of dissolved oxygen concentration.

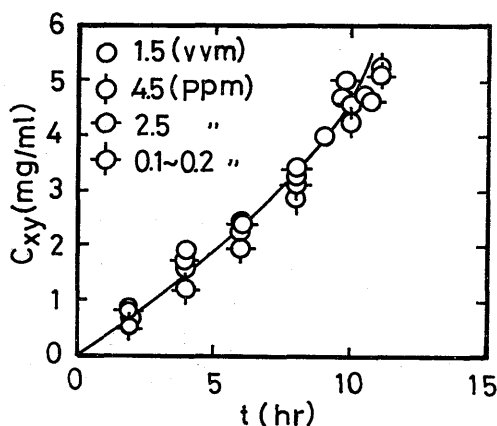


Fig. 16. Effect of various dissolved oxygen concentration on cell yield.

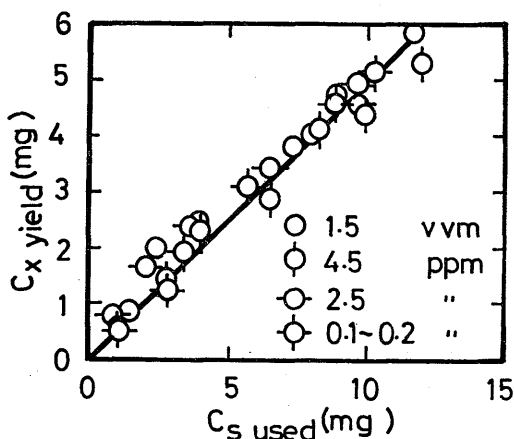


Fig. 17. Correlation between cell yield and carbon source used at various dissolved oxygen concentration.

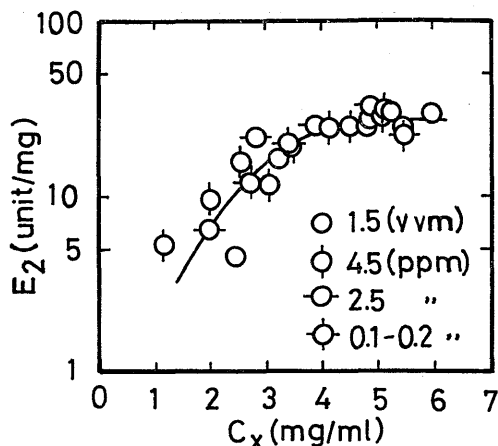


Fig. 18. Cell bound isoamylase formation per unit cell weight during the cultivation of cells in various different dissolved oxygen concentration of batch culture.

して行なつた回分培養の結果と同一であつた。各溶存酸素濃度についての培養結果から代表的な 4.5, 2.5, 0.1-0.2 ppm の結果について菌体増殖の経過を Fig. 16 に示す。ここで比較のために溶存酸素濃度の制御を行なわず、通気量 1.5 vvm 一定で培養した結果もあわせて示してあるが、これらの間に差は認められない。Fig. 17 に生成菌体量と消費炭素量との相関を示す。この場合にも通気量 1.5 vvm の結果をあわせて示したが、差は認められず対炭素源菌体生成定数 m の値は 0.5 であつた。培養経過中の菌体濃度に対する単位菌体量当り生成した菌体内イソアミラーゼ活性を E_2/C_x として培養液菌体濃度 C_x に対して示す。Fig. 18 から、菌体濃度が 4~5 (mg/ml) に達すると溶存酸素濃度には関係なく菌体 1 mg 当り 25 単位の菌体内イソアミラーゼ生成が認められる。この結果は通気量一定とした回分培養での結果と同様であり、特に溶存酸素濃度 0.1-0.2 ppm の低い値での培養においても同様な結果を得ることからして、この菌株は培養装置から培養液への酸素供給が菌体増殖を支配しない限り培養経過中の溶存酸素濃度が培養経過に影響することはない。

(3) 流加法による培養結果

(a) 培養経過

この菌株は培養装置の酸素供給が培養の制限因子とならない限り生成菌体量に比例して菌体内イソアミラーゼを生成する。しかしながら培養装置の酸素供給能力には物理的な限界が存在し、回分培養では菌体濃

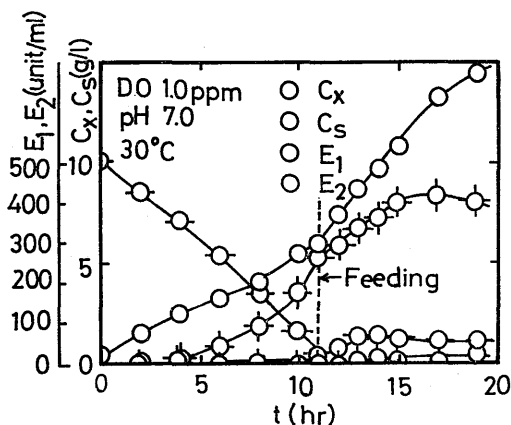


Fig. 19. Time course of feeding culture. Feeding rate: 2800 (mg/l-hr), dissolved oxygen concentration: 1.0 ppm, temperature: 30°C and pH: 7.0.

度を 5~6 (mg/ml) 以上に高めることはできない。培養装置の酸素供給能力の範囲内で培養液の菌体濃度を高める方法として流加法による培養を行なった。その培養方法は実験方法一(9)に示した方法で行なった。結果の一例として炭素源流加速度 2800 (mg/l-hr) の培養経過を Fig. 19 に示す。培養条件は溶存酸素濃度 1.0 ppm, 温度 30°C, pH 7.0 にそれぞれ回分培養の開始から流加培養の終りまで一定値に制御した。流加時における菌体増殖は菌体濃度 12~13 (mg/ml) までは炭素源の流加に従って直線的に増加した。菌体濃度 13 (mg/ml) 以上の濃度では炭素源流加速度が一定であるにもかかわらず菌体増殖速度が減少する傾向がある。培養液 1 ml 当りの菌体内イソアミラーゼ活性最大値は 420 単位に達した。菌体外イソアミラーゼ活性は菌体濃度の増加と共に次第に増加する傾向があるが、培養液 1 ml 当り最大 20 単位以下である。流加法による培養は Fig. 19 に示した 2800 (mg/l-hr) の他、4400, 8000 (mg/l-hr) の場合についても行なった。これらの結果について検討してみると、菌体濃度 6 (mg/ml) 程度の培養液に流加を開始した場合、この培養液の流加炭素源を資化する能力は流加速度 4400 (mg/l-hr) が限界であった。流加速度 8000 (mg/l-hr) の流加では、培養液中に次第に炭素源が蓄積した。このような状態で菌体濃度が高くなると酸素の消費は急激に増加し、ここで使用した培養装置では酸素の供給が不足して培養液の溶存酸素濃度を 1.0 ppm に保つことはできなかった。この理由から、8000 (mg/l-hr) の実験結果は他の場合と同一条件とみなすことはできない。

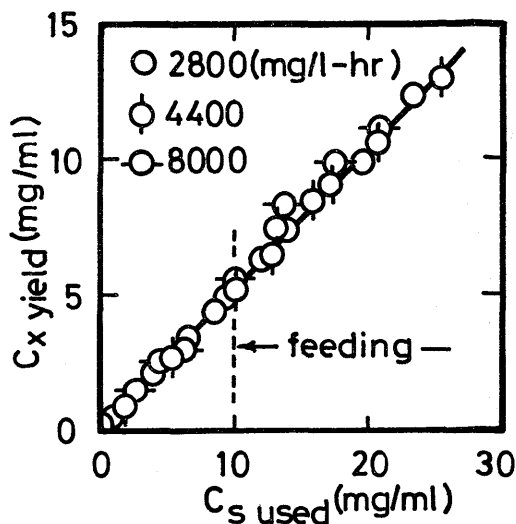


Fig. 20. Correlation between cell yield and carbon source used in the feeding cultivation with the constant dissolved oxygen (1.0 ppm).

Feeding rates: 2800, 4400 and 8000 (mg/l-hr).

(b) 流加時における菌体生成定数

Fig. 20 に生成菌体量と資化された炭素源量をそれぞれ C_x yield と C_s used として回分培養の開始から流加培養の終りまで全体の経過に亘って示す。溶存酸素濃度が菌体増殖の制限因子とならない場合の流加法では回分培養と全く同一の菌体生成定数が得られる。この場合の菌体生成定数 m の値は 0.5 であった。この結果からすれば、酸素の供給が菌体増殖の制限因子とならない限りこの菌株はかなり高い菌体濃度まで炭素源資化量に比例して増殖することが認められた。

(c) 流加法での菌体内イソアミラーゼ生成

Fig. 21 に流加速度 2800, 4400 (mg/l-hr) の流加速度で培養を行なった場合について、培養液 1 ml 当りと、菌体 1 mg 当りに生成した菌体内イソアミラーゼ活性を培養液の菌体濃度に対して示した。培養液 1 ml 当りの活性は菌体濃度が 13 (mg/ml) のとき最大で、その値はいづれの流加速度の場合にも 420 単位であった。この値は回分培養のみで得られる値の約 2.5 倍であり、(A) 組成の培地を使用して菌体外イソアミラーゼを生成させた場合とほぼ同一である。流加法で得られた特徴のある結果は、菌体 1 mg 当りのイソアミラーゼ活性、 E_2/C_x が 35~40 単位と大巾に増加したことである。これまで振とう培養、回分培養によつて得られた値、25~27 単位と比較して 40% 以上も高い値である。菌体内イソアミラーゼ生成に関して得

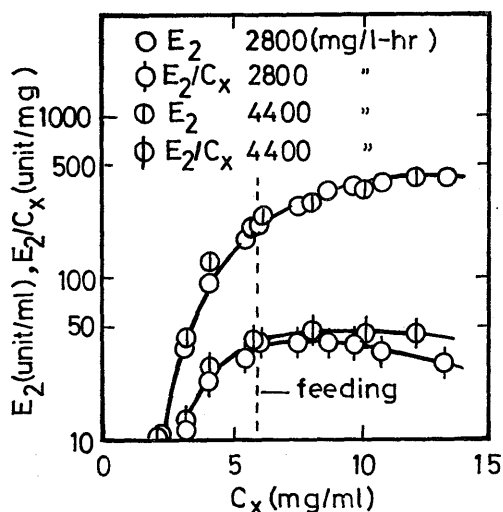


Fig. 21. Cell bound isoamylase formation per unit cell weight or volume of broth during the cultivation with the constant dissolved oxygen (1.0 ppm).

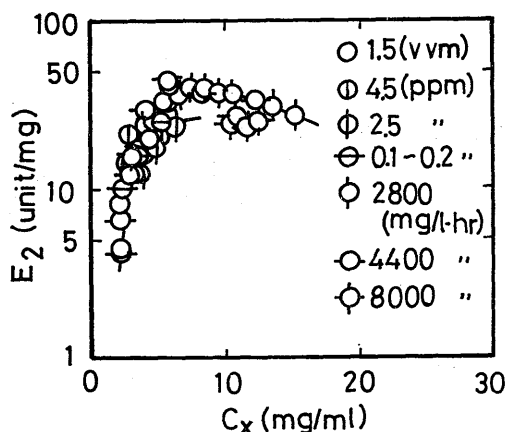


Fig. 22. Comparison of cell yield and the activity of cell bound isoamylase between the batchwise cultivation with 1.5 vvm aeration or with constant dissolved oxygen concentration (4.5, 2.5, or 0.1-0.2 ppm), and the feeding rates (2800, 4400 or 8000 (mg/l-hr)) at the constant dissolved oxygen concentration.

られた結果は回分培養では検討できないものであり、この菌株の菌体内イソアミラーゼ生成に対する至適条件が培養液菌体濃度、または炭素源資化速度に関係していることを示している。ここで回分培養と流加培養でそれぞれ生成した菌体内イソアミラーゼを比較すると、Fig. 22 に示すように流加法による培養がすぐれた結果を得た。

(4) 連続培養での至適条件

(a) 連続培養での菌体生成

本菌株が連続培養に適したものであれば、(3)における流加法と同様の培養条件を満足させる連続培養によつて高いイソアミラーゼ活性をもつた培養液が効率良く得られることが期待される。ここで行なつた連続培養の方法は実験方法の項(10)に示した方法で行なつた。そして供給した培地の炭素源は完全に資化される状態で培養を行なつた。従つて、培養液の菌体濃度は供給培地の炭素源濃度に依存する。供給培地炭素源濃度を 26.8, 19.7, 11.6 (g/l) とした場合の菌体生成経過を Fig. 23 に示す。この場合はいずれの炭素源濃度についても同程度の希釈率とした。ここで D は希釈率である。溶存酸素濃度は 1.0 ppm, 温度 30°C, pH 7.0 というれも全培養経過に亘つて一定値に制御した。菌体は連続培養においても回分培養、流加培養と同様に安定して生成した。炭素源濃度をほぼ一定値、すなわち 19.7, 23.0, 23.6 (g/l) とし、希釈率を 0.07, 0.21, 0.31 と変えた培養の経過を Fig. 24

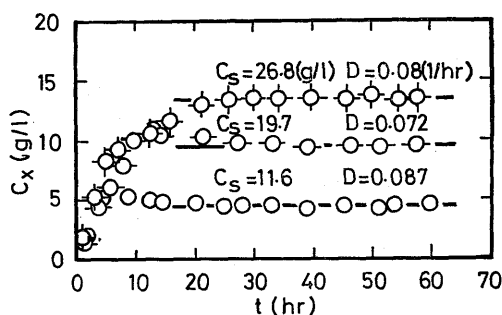


Fig. 23. Effect of cell growth on the soluble starch concentration in feed.

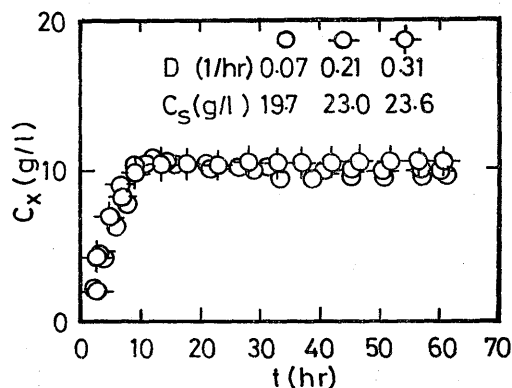


Fig. 24. Effect of cell growth on dilution rates.

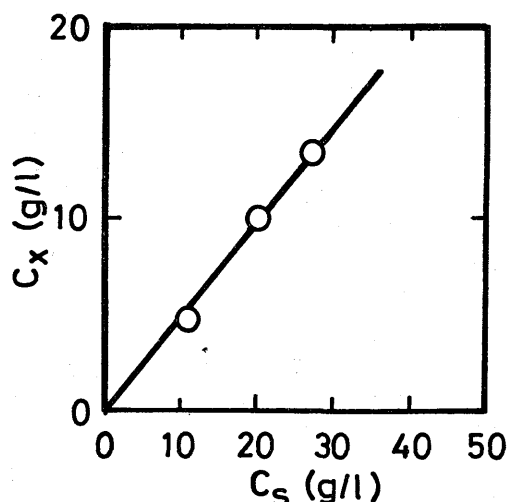


Fig. 25. Correlation between cell concentration and soluble starch concentration of feed during continuous cultivation.

に示す。この場合にも安定して菌体は生成し、この菌株は連続培養時にも安定して増殖することを認めた。

(b) 連続培養での菌体生成定数

ここで行なった連続培養について、それぞれの分析結果から供給培地中の炭素源はほぼ完全に資化されていることが認められた。従つて連続培養の定常状態では供給培地中の炭素源濃度と培養液菌体濃度とは正比例関係でなければならない。同時に各々の値の比は対炭素源菌体生成定数の値となる。この関係を Fig. 25 に示す。Fig. 25 の直線の傾きは連続培養における対炭素源菌体生成定数 m の値となり、その値は 0.46 であった。この値は回分培養、流加培養において得られる値、0.5 と比較して約 10% 低い値を示した。

(c) 供給培地炭素源濃度と菌体内イソアミラーゼ生成

供給培地炭素源濃度を 11.6, 19.7, 26.8(g/l) として行なった培養によつて生成した菌体 1 g 当りの菌体内イソアミラーゼ活性を Fig. 26 に示す。ここで希釈率、 D はそれぞれ 0.087, 0.072, 0.080 (l/hr) である。またそれぞれ生成した菌体は 4.6, 9.8, 13.5 (g/l) であった。菌体内イソアミラーゼ生成に関しては、菌体濃度 4.6 (g/l) の場合が菌体 1 mg 当り 27 単位で、この値は回分培養で得られる値と一致した。しかしながら 9.8, 13.5 (g/l) の菌体濃度においては約 17~20 単位であり、回分培養と比較して約 20% 低い値となつた。この結果はこの菌株のイソアミラーゼ生成が菌体濃度を高めるのみでは増加しないことを示

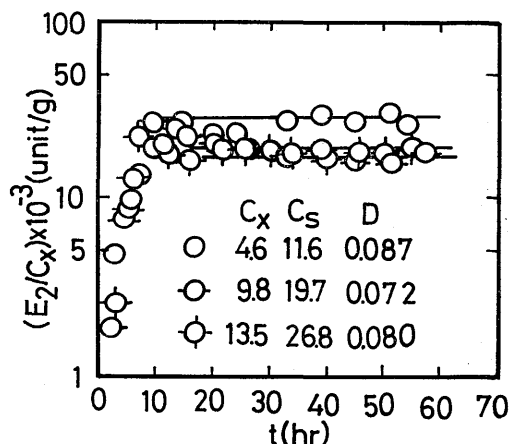


Fig. 26. Time course of cell bound isoamylase formation at a small dilution rates.

すものであり、連続培養では菌体濃度と共に希釈率もまた菌体内イソアミラーゼ生成に関係することを示している。これらの場合の菌体外イソアミラーゼ活性は培養液 1 ml 当り 30~35 単位であり、培養液菌体濃度には無関係であつた。この値は回分培養の場合と比較すると約 3 倍である。

(d) 希釈率と菌体内イソアミラーゼ生成

ここでは流加法での実験結果を考慮した上で、菌体濃度を 10 (g/l) 付近とし、希釈率をパラメタとして培養実験を行ない、菌体内イソアミラーゼ生成についての検討を行なった。菌体濃度を 9.8, 10.5, 10.6 (g/l) とした培養結果を Fig. 27 に示す。希釈率 0.21, 0.31 (l/hr) の培養では菌体内イソアミラーゼ活性が菌体 1 mg 当り 40~45 単位生成した。この値

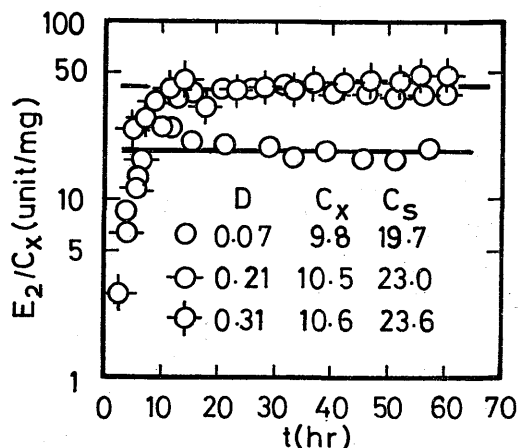


Fig. 27. Effect of dilution rates on cell bound isoamylase formation.

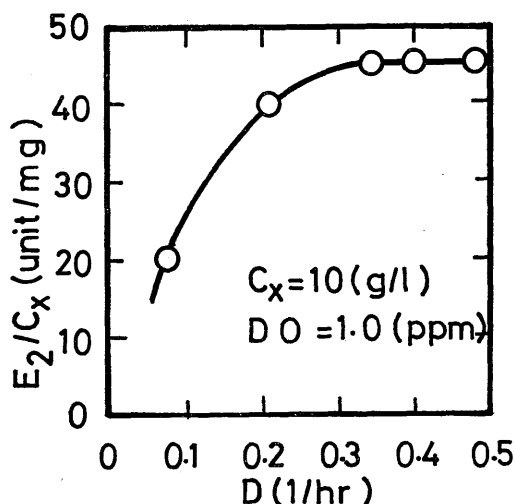


Fig. 28. Effect of the dilution rates on the cell bound isoamylase formation.

は流加法による培養と同程度かまたはそれ以上の値であり、この結果からこの菌株は連続培養において、培養液の菌体濃度が同じであったとしても希釈率によってイソアミラーゼ生成量は大幅に変化することが認められた。更に多くの希釈率で培養した場合の結果をFig. 28に示す。希釈率 0.3 (l/hr) 前後からは菌体内イソアミラーゼ生成量は安定して 45 単位程度生成することが認められた。この値は回分培養で得られる値の 1.6 倍以上であり、また流加法で得られる値より更に高い値である。菌体外イソアミラーゼ活性は (c) と同様に培養液 1 ml 当り 30~35 単位であった。この値は菌体濃度 10(g/l)、希釈率 0.3 (l/hr) 以上での連続培養において生成する菌体内イソアミラーゼ活性と比較して約 7% の値となる。

要 約

(1) イソアミラーゼ生成能をもつ *Aerobacter aerogenes* sp. No. 105 を分離し、その性質を精査したところこの菌株は培地組成中の窒素源の相違によってイソアミラーゼ生成状態が全く異なる興味ある結果を得た。振とう培養においてこの相違を検討したが、主な相違点を次に示す。

培地組成	(A)	(B)
窒 素 源	CH ₃ COONH ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄
菌体生成時間	25(hr)	16~18(hr)
イソアミラーゼ生成	菌体外	菌体内
イソアミラーゼ生成時間	90~100(hr)	16~18(hr)
生成イソアミラーゼ活性	500 単位/ml	120 単位/ml

培養終了 pH	7.5~8.0	6.5~7.0
生成イソアミラーゼ至適温度	46°C	46°C
生成イソアミラーゼ至適 pH	5.0	5.0

(2) 本菌株は通気培養で安定して増殖することが認められた。培養方法として流加法による培養を行なうと、単なる回分培養と比較して単位時間、単位菌体量当りの菌体内イソアミラーゼ生成に関して約 2.5 倍効率よく培養することができた。同時に、この菌株の菌体内イソアミラーゼ生成に対する至適条件は培養液菌体濃度が関係していることが認められた。

(3) 流加法において用いた培養条件を満足する連続培養を行なった結果、菌体内イソアミラーゼ生成は菌体 1 mg 当り 46 単位に達し、この値は流加培養法における値よりも更に高い値であった。この場合、希釈率は 0.3 (l/hr) 以上が必要であり、菌体濃度は 10 (g/l) であった。連続培養の結果から、ここで分離した菌株が安定して増殖し、イソアミラーゼ生産に適當であることが認められた。

参 考 文 献

- Bender, H. and K. Wallenfels, 1961 Untersuchungen an Pullulan. *Biochemische Z.*, 334: 79-95
- Eisele, B., I. R. Rached and K. Wallenfels, 1972 Molecular Characterization of Pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. *Eur. J. Biochem.*, 26: 62-67
- Harada, T., K. Yokobayashi and A. Misaki, 1968 Formation of Isoamylase by *Pseudomonas*. *App. Microbiol.*, 16: 1439-1444
- Kobayashi, T., 1955 Studies on Isoamylase. *Bull. Agr. Chem. Soc.*, 19: 163-166
- Mercier, C., B. M. Frantz and W. J. Whelan, 1972 An Improved Purification of Cell-Bound Pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. *Eur. J. Biochem.* 26: 1-9
- 西村資治, 1930 澱粉合成酵素について。日農化, 6: 160-167
- Pringsheim, H. und W. Fuchs, 1923 Über ein Komplement der Amylasen. *Ber.*, 56: 1762-1769
- 佐藤静一, 1944 米澱粉に関する研究。大雅堂, 京都, 8-9頁
- Ueda, S. and N. Nanri, 1967 Production of Isoamylase by *Escherichia intermedia*. *App. Microbiol.*, 15: 492-496
- Ueda, S., M. Yagisawa and Y. Sato, 1972 Production of Isoamylase by *Streptomyces* sp. No. 28. *J. Ferment. Technol.*, 49: 552-558
- Wallenfels, K., H. Bender and J. R. Rached, 1966 Pullulanase from *Aerobacter aerogenes*.

Biochemical and Biophysical Research communications, **22**: 251-261

Walker, G. J., 1968 Metabolism of the reserve

Polysaccharide of *Streptococcus mitis*. *Biochem. J.*, **108**: 33-40

Summary

For the purpose of industrial production and application of isoamylase, the author carried out screening tests, and as a result, a strain of *Aerobacter aerogenes* sp. No. 105 was isolated. Isoamylase formation by this strain has been investigated by means of shake culture, batch culture under aeration, feeding culture and continuous culture. As the interesting property of isolated strain, isoamylase activity in the culture filtrate was about 500 units per ml of broth after 100 hours of cultivation using $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ as a nitrogen source. While, by using $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ instead of $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, isoamylase formation and cell growth proceeded simultaneously, but almost all isoamylase activity formed was a cell-bound type after 16-18 hours of cultivation. Its activity was shown to be 120 units per ml of the culture broth (27 units per mg of cell weight). So, the isolated strain was considered to hold two different isoamylase formation mechanisms representing either way according to the type of the nitrogen sources used.

In aerated batch cultivation using 1000 ml jar fermentor, some experiments were performed in order to compare various carbon sources in regard to the quantitative relationship between cell growth and isoamylase formation under the limited condition of cell-bound isoamylase formation. As the results of batch culture, isolated strain showed the suitable property for aerated culture, and cell-bound isoamylase formed quantitatively 25 units per mg of yield cell. However, when cultivation was carried out under the condition of oxygen limiting for cell growth, yield cell per unit consumed carbon source and isoamylase activity per mg of yield cell showed lower numerical values in comparison with another cases.

In feeding cultivation based on aerated batch cultivation, the cultivation with a constant level (1.0 ppm) of dissolved oxygen concentration in the broth was carried out to obtain the higher cell concentration in broth. As the results, feeding cultivation in this work was able to produce 12-13 mg per ml of the broth, and isoamylase activity per mg of cell and ml of cultured broth were 35 units and 420 units respectively. Thus, the feeding culture achieved about 2.5 times of the final yield of isoamylase in the conventional batchwise culture.

In order to obtain higher isoamylase activity per unit cell weight, a cell concentration of more than 10(g/l) in the fermentated broth was needed. The presence of an excess carbon source in broth having over 5-6(g/l) of cell concentration caused an oxygen deficiency. Continuous cultivation with control of dissolved oxygen concentration in the broth was used for cell-bound isoamylase formation of isolated strain by regulating the rate of aeration and feed. The cell growth and cell-bound isoamylase formation were stable during continuous cultivation and the carbon source in the feed medium was completely consumed by cells. With respect to cell-bound isoamylase activity, the continuous culture gave the same or more numerical value as in the feeding culture.