

酵母による菌体外蛋白質生産に関する研究 *Trichosporon* sp. X-19 の大量培養

赤木 盛郎・西田 淑男・久松 眞・山田 哲也

Studies on Extracellular Protein Production by Yeast

Cultural Conditions for Mass Cultivation of *Trichosporon* sp. X-19

Morio AKAKI, Yoshio NISHIDA, Makoto HISAMATSU
and Tetsuya YAMADA

緒 言

微生物による蛋白質生産は高等植物のそれと異なり工業的手段で行えることから将来の蛋白質資源取得の一方として積極的に研究が進められ、特に酵母培養による菌体が Single Cell Protein として既に実用化の段階にある。この菌体そのものの利用に対し菌体から体外に蛋白質を分泌させ、この蛋白質を取得する研究が細菌を対象として鶴高ら¹⁻¹⁴⁾によりなされたが、この蛋白質生産を醗酵食品として古くから人類になじみの深い酵母に置き換えた方が安全性の上でより有利であるし、又菌体のはるかに大きいことから培養後の分離も容易であるとの見地から酵母による菌体外蛋白質 (Extracellular protein, ECP) の生産を検討した。先に著者の一人赤木が自然界から分離したキシロース資化性の X-19 号菌を、有望株として選択し *Trichosporon* sp. に属する新種と同定し¹⁵⁻¹⁸⁾、この有望株 *Trichosporon* sp. X-19 による菌体外蛋白質生産について、培地条件、培養条件等種々検討を行った¹⁹⁻²¹⁾。しかし、その培地組成は YM 培地を使用したため、さらに実用性に富む安価で入手し易い培地の検討を行い大量培養を試みた。

実験方法及び結果

1. 各種アミノ酸の影響

1) 培地組成

前報^{18, 20)}のようにこの酵母による ECP 生産は YM 培地で初発 pH を 3 にした時のみなされる。YM 培地に

代わる簡単な培地として Czapek-Dox 培地を採用したが、本培地の窒素源である NH_4NO_3 では本菌の生育が見られなかったため、これをアミノ酸に置き換え窒素含有率を一定比率とし又グルコースは 3% とした。Table 1 に Czapek-Dox 改良培地の組成を示した。

Table 1. Czapek-Dox 改良培地

グリシン	0.3 (%)
K_2HPO_4	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
KCl	0.05
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.001
グルコース	3.0
pH	3

2) 培養条件

新鮮な斜面培養から一白金耳をとり、100 ml 容三角フラスコ中の YM 培地 25 ml に接種し、30°C, 24時間、回転振盪機 (135 rpm) で前培養後、その 0.2 ml を 100 ml 容三角フラスコ中の Czapek-Dox 改良培地 25 ml に接種し、30°C, 48時間同一振盪条件で培養した。

3) 蛋白質の抽出と定量

培養終了後培養液を遠心分離機で菌体と上澄液に分離し、菌体は 0.05N NaOH 25 ml を加え攪拌後、遠心分離 (12000 rpm, 5 min) してアルカリ洗浄液を得た。これと上澄液にそれぞれトリクロル酢酸 (TCA) を 7% になるように加え生じた沈澱を遠心分離で集めてさらに 5% TCA で洗浄した後、この沈澱を 0.1N NaOH 25 ml に溶解し、マイクロビュレット法²²⁾で蛋白質の定量を行った。

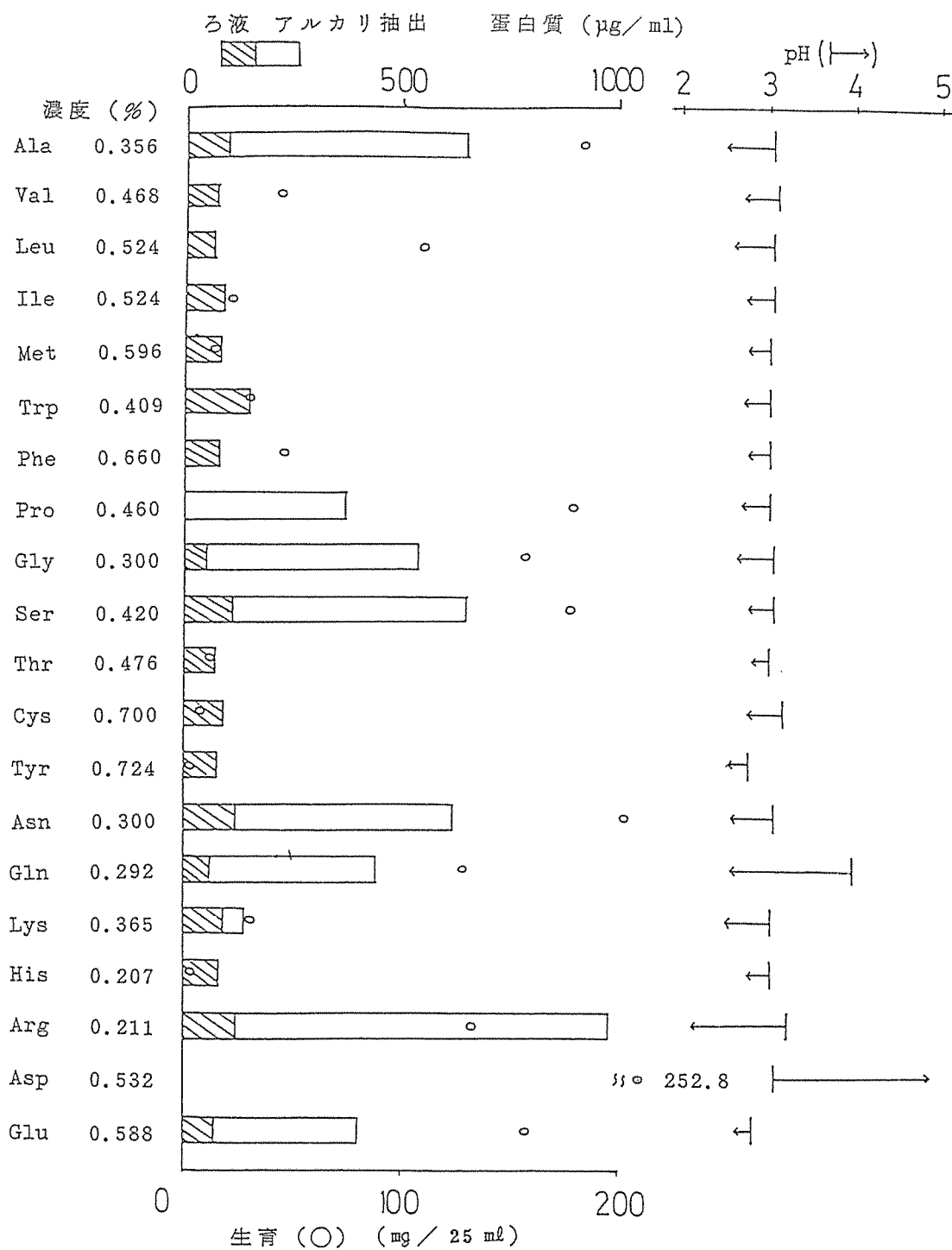


Fig. 1. 各種アミノ酸の蛋白質生産に与える影響

4) 培養結果

各種アミノ酸を窒素源として用いた培養結果を Fig. 1 に示した。アミノ酸の種類により ECP の生産性に大差のあることが判明した。

2. アルギニンの影響

1) アルギニン培地における培養経過

実験 1 の結果でアルギニンが ECP 生産性が最も高かったのでアルギニン培地での培養経過を実験 1 と同一条件で調べた。その培養結果を Fig. 2 に示した。この結果他のアミノ酸にみられない特徴が見られた。即ち、アルギニン培地では ECP 生産が 36 時間以降保持されたままであり、又 pH も 2 前後で維持されていることが分った。

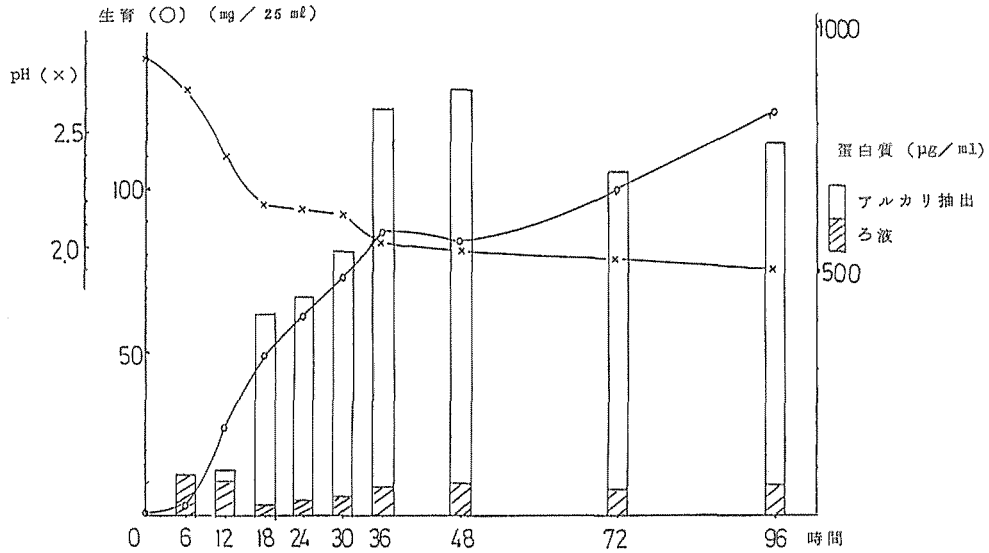


Fig. 2. アルギニンを窒素源にした時の時間経過

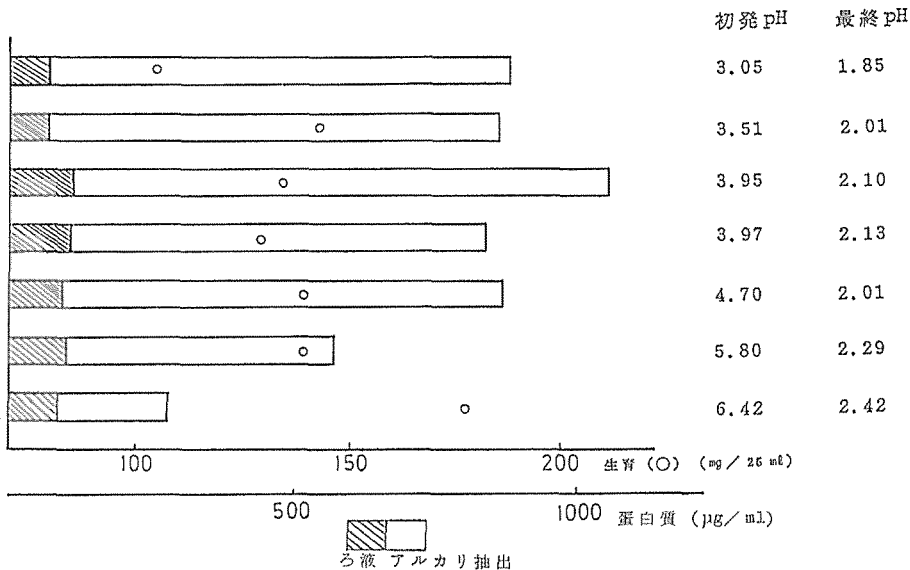


Fig. 3. 初発 pH の蛋白質生産に与える影響

2) アルギニン培地での初発 pH の影響

アルギニン培地での培養経過が他のアミノ酸とは異なっていることから、初発 pH を変化させて ECP の生産性を見た結果を Fig. 3 に示した。

初発 pH 7 では ECP の生産はほとんど見られなかったが pH 6 以下で生産が見られ pH 5 付近では pH 3 と変わらない生産性が得られることが判明した。又、ECP 生産時に必ず見られる菌糸の特異的肥大細胞が pH 3 と pH 5 の培養で Photo. 1, 2 に示したように同じ程度見られた。



Photo 1. *Trichosporon* sp. X-19 の細胞(初発 pH 3.05)

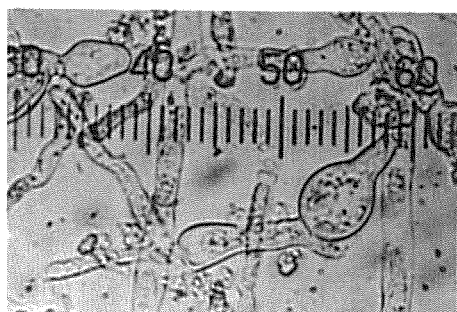


Photo 2. *Trichosporon* sp. X-19 の細胞(初発 pH 4.70)

3) アルギニン高濃度培地における培養

アルギニンを窒素源とすると ECP の生産が広い pH 範囲で可能となることから、アルギニンが菌体の膜構造に影響を与え ECP の生産を促進しているのではないかと考えられたので、アルギニンの高濃度培地でこの生産性を調べた。

結果を Table 2 に示した。予期に反して高濃度では生産性が見られず、菌体も ECP 生産時に見られる肥大化が全く検出されなくなった。

3. ジャーファメンターによる予備培養実験

タンク培養による大量培養の前段階として、30 l 容

Table 2. アルギニン高濃度の影響

アルギニン濃度	初発 pH	最終 pH	培養液の蛋白質量	アルカリ洗浄液の蛋白質量
0.211(%)	5	2.1	205 (μg/ml)	1726 (μg/ml)
1	5	6.8	430	591
3	5	7.3	—	21
5	5	7.0	—	30

ジャーファメンターを用い窒素源の比較を行った。

アミノ酸を窒素源とする場合、グリシンのみが光学異性体を持たないため合成も容易で安価であるので実用化に有利である。又 Fig. 1 に示したようにグリシンは生産性も高い。グリシンを無機窒素源に置換した場合、フラスコ規模の実験で $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.26%), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0.46%), $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (0.12%) でかなり良好な結果が得られ、特に $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 培地ではグリシン培地の約70%程度の ECP 生産が見られた。

以上の点より、実用化の基礎実験として培地は Czapek-Dox 改良培地で窒素源としてグリシン、アルギニン、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ の3種をそれぞれ採用し、生産性を比較した。本培養には 30 l 容ジャーファメンターを用い培地は 20 l で行った。本実験の培養条件と結果を Fig. 4 に示した。グリシンを窒素源とした場合菌体収量は良いがアルギニンの方が ECP 生産性により優れており、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ はアルギニンの 50% 程度の ECP 生産であった。

4. *Trichosporon* sp. X-19 のタンク培養と ECP の抽出

1) タンク培養

実用化の最終段階での基礎実験として 800 l 容培養タンクを用いて培地 500 l での培養を試みた。培地は実験 3 の結果より ECP 高生産性と培養管理の容易さの点よりアルギニン培地を用いた。結果を Fig. 5 に示した。

培養の経過はほぼジャーファメンターによる培養に類似しており ECP 生産性も同様であった。

2) ECP の抽出

ECP は Fig. 5 に見られるように培養液中に全量の約 30% 程度生産されたがこの回収は大規模培養では困難であるので、本研究では菌体表面に蓄積された ECP のみ抽出回収の対象とした。即ち ECP は酸性蛋白質である

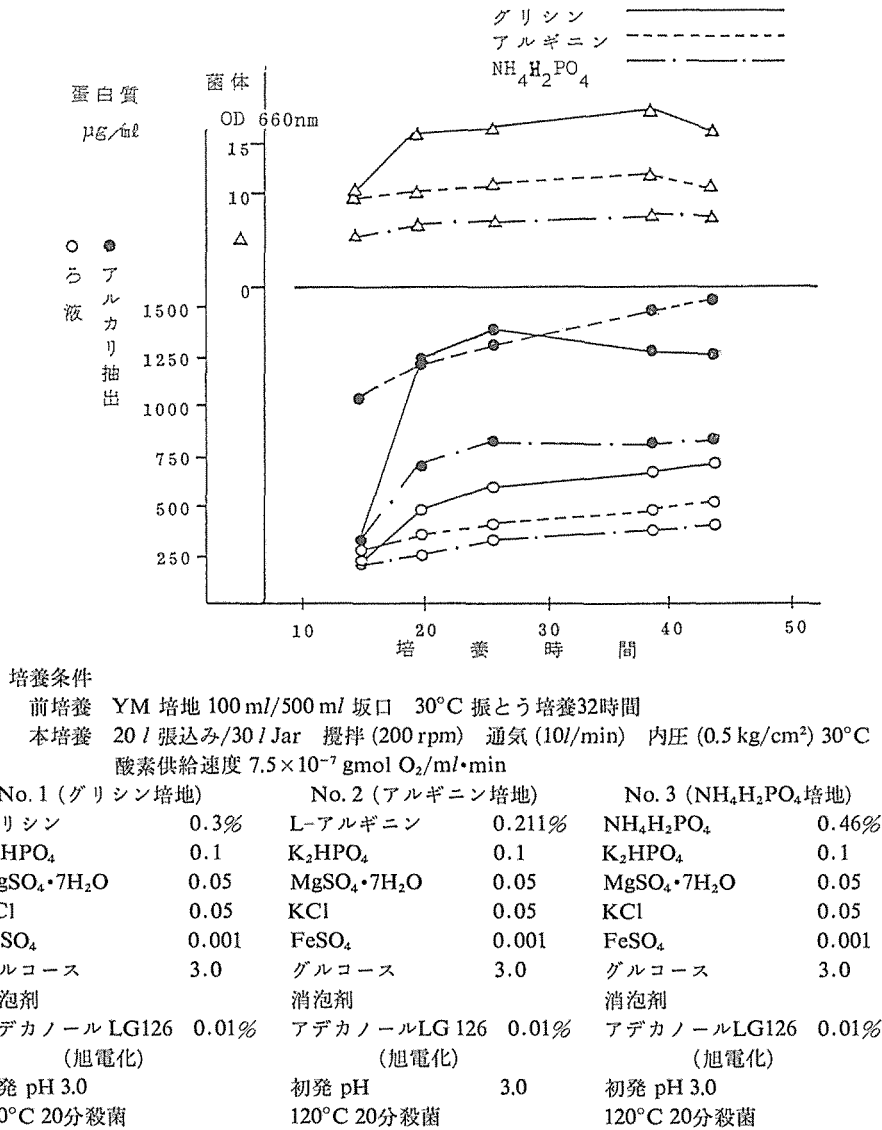


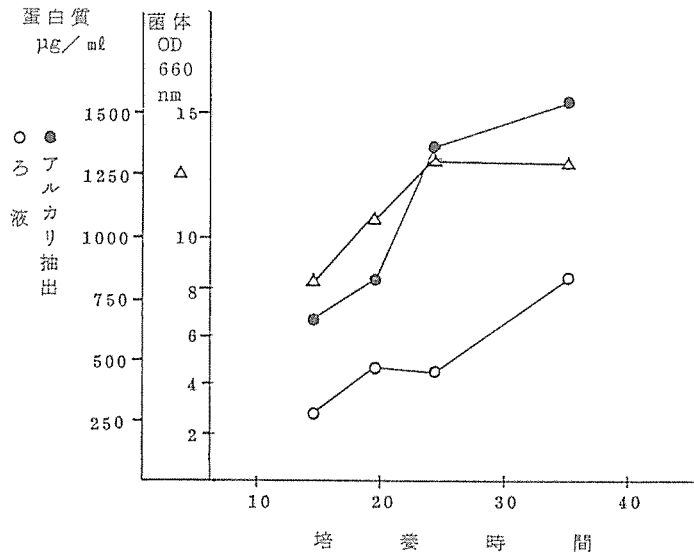
Fig. 4. ECP 生産における窒素源の相違

ため稀アルカリに易溶であり酸性側で直ちに沈澱する性質を利用し, Fig. 6 に示す操作で回収し, 実験1)のタンク培養により ECP を 1380 g, 乾燥菌体を 1920 g 得た。

考 察

前述のように現段階では *Trichosporon* sp. X-19 による ECP 生産は窒素源を別にしてグルコースを除けば無機塩を添加するだけの簡単な培地で可能となっており, ディスク電気泳動の結果から窒素源を変えてもその

ECP の蛋白質組成には殆んど変化がないことを確認した。本菌はキシロース資化性菌として自然界より分離され, 当研究室で *Trichosporon* に属する新種と 同定された株である¹⁸⁾ がガラクトース, マンノースも極めて良く資化し, これを炭素源として ECP 生産も行うことを確認している。従って実用化に際しては安価な無機窒素源 (この場合 NH₄H₂PO₄) と非食料源であるヘミセルロースを組合せた培地の検討が経済的効果の面から必要であろう。



培養条件

第1次前培養 YM 培地 100 ml/500 ml 坂口 2 本 30°C 振とう培養 28 時間

第2次前培養 YM 培地 20 l/30 l Jar 200 rpm 0.5 vol 0.5 kg/cm² 30°C 28 時間

pH OD

0 時間 6.22

19 時間 5.80

24 時間 7.70 15.74

本 培 養 アルギニン 0.211% 培地 500 l/800 l Tank × 2 基

消泡剤 アデカノール 0.05% 添加……ポリオキシアルキレン系

操作条件 攪拌 通気 酸素供給速度 内圧 温度

150 rpm 100 l/min 8.45 × 10⁻² g/mol/ml・min 0.5 kg/cm² 30°C

接種量 第2次前培養液 (28時間) を 2× 接種する。

Fig. 5. パイロットプラントにおける ECP の生産

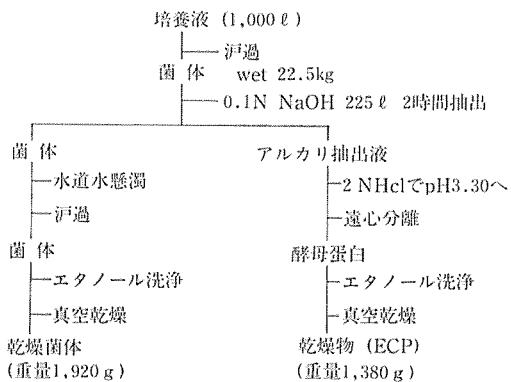


Fig. 6. ECP 及び菌体回収

本実験により生産した ECP, 菌体を用いての栄養評価実験については既に報告したが²³⁻²⁶⁾, このラット飼育試験に於てもアミノ酸分析のアミノ酸スコアから直ちに

予測されたように, 一般の酵母蛋白に見られる傾向と同じくメチオニン, システイン等の含硫アミノ酸が少ないことによる生育不良が見られたが, メチオニンを少量添加することでカゼイン並みに改善された。しかし将来的には ECP 単独でも蛋白質として評価を得る必要があるため, トウモロコシ蛋白質の高リジン蛋白質への変換方法と同様に ECP 中の高含硫アミノ酸蛋白質成分の増大化を何んらかの方法ではかることは, 高生産性と共に本 ECP 生産実用化の一課題と考える。

要 約

先の報告で, 菌体外に蛋白質を生産する酵母の選択を行い, キシロース質化性菌として著者の一人赤木が分離した X-19 号菌を選択し, その菌学的性質を調べ同定を行い, *Trichosporon* 属の新種であることを報告した。

本報告では、選択された酵母 *Trichosporon* sp. X-19 株の大量培養について検討した。

Czapek-Dox 改良培地がこの酵母の ECP 生産に有用であり、培地の窒素源として試験した20種類のアミノ酸の中、グリシン、アルギニン、アスパラギンが ECP 生産に良好であった。アルギニンを窒素源とした場合は、中性に近い培養でも ECP を生産した。

30 l 容ジャーファメンターを用いて、3 種類の窒素源について ECP 生産の比較を行った。グリシンはアルギニンとはほぼ同量の ECP を生産したが、磷酸アンモンでは約 $\frac{1}{2}$ の収量であった。

増殖用タンクの全容量 800 l の中間工業試験用培養装置を用いて、運転容量 500 l で大量培養を 2 回行い、1.3 kg の ECP と 1.9 kg の乾燥菌体を得た。

ECP の栄養価については、他の報告で述べた。

本研究の一部は、昭和54年10月20日日本農芸化学会関西支部・中部支部合同大会及び、昭和57年4月1日日本農芸化学会大会において発表した。なお、本実験中タンク培養は天野製薬㈱のパイロットプラントを使用させていただいた、御協力いただいた関係者に感謝します。

文 献

- 1) 鶴高重三・斉藤静子：昭和48年度日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 311 (1973).
- 2) 釈 政雄・鶴高重三：日本農芸化学会 中部支部 第59回例会講演要旨集，p. 4 (1973).
- 3) 釈 政雄・鶴高重三：昭和49年度日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 181 (1974).
- 4) 鶴高重三：日本農芸化学会 中部支部 第61回例会講演要旨集，p. 2 (1974).
- 5) UDAKA, S.: Agric. Biol. Chem., **40**, 523, 1976.
- 6) 宮代重誠・江井 仁・広瀬義夫・鶴高重三：昭和51年度日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 124 (1976).
- 7) 土田隆康・宮代重誠・江井 仁・鶴高重三：昭和52年度日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 207 (1977).
- 8) 宮代重誠・江井 仁・滝浪 弘一・広瀬義夫・土田隆康・鶴高重三：昭和52年度日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 207 (1977).
- 9) 田川宗数・鶴高重三：昭和52年度日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 208 (1977).
- 10) 山岡智之・鶴高重三：昭和53年度日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 263 (1978).
- 11) 田川宗数・鶴高重三：昭和53年度日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 274 (1978).
- 12) 鶴高重三・山岡智之・土田隆康：昭和53年度日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 549 (1978).
- 13) SHAKU, M., S. KOIKE and S. UDAKA: Agric. Biol. Chem., **44**, 99, 1980.
- 14) MIYASHIRO, S., H. ENOI, Y. HIROSE and S. UDAKA: Agric. Biol. Chem., **44**, 105, 1980.
- 15) 赤木盛郎・中世古幸信・山田哲也：昭和53年度日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 263 (1978).
- 16) AKAKI, M., Y. NAKASEKO and T. YAMADA: Agric. Biol. Chem., **42**, 2391, 1978.
- 17) 赤木盛郎・中世古幸信・山田哲也：昭和54年度日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 136 (1979).
- 18) 赤木盛郎・中世古幸信・山田哲也：三重大農学報，第58号，123 (1979).
- 19) 赤木盛郎・桑山 豊・山田哲也：日本農芸化学会関西支部中部支部合同大会講演要旨集，II-5 (1979).
- 20) 赤木盛郎・中世古幸信・山田哲也：化学と生物，**18** (9), 607 (1980).
- 21) AKAKI, M., Y. NAKASEKO and T. YAMADA: The Bulletin of the Faculty of Agriculture, Mie Univ., **64**, 51, 1982.
- 22) ITZAHAKI, R. F. and D. M. GILL: Anal. Biochem., **9**, 401, 1964.
- 23) 古市幸生・金田久代・高橋孝雄・山田哲也・赤木盛郎・大矢隆一：昭和58年度日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 284 (1983).
- 24) 古市幸生・高橋孝雄・赤木盛郎・山田哲也：栄食誌，**37** (1), 45 (1984).
- 25) 古市幸生・有田健一・高橋孝雄・山田哲也・赤木盛郎・大矢隆一：昭和59年度日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 26 (1984).
- 26) FURUICHI, Y., T. TAKAHASHI, T. YAMADA and M. AKAKI: Nutr. Reports Intern., **31** (2), 329, 1985.

Summary

In the previous papers,^{16, 18, 21)} we have reported on the selection of yeast strain producing extracellular protein (ECP), and morphological and physiological characteristics of the selected strain. The selected yeast, X-19 strain, which had been isolated as a xylose utilizer by M. Akaki, one of the authors, produced appreciable amount of protein in YM medium, and this strain proved to be a new species belonging to the genus *Trichosporon*.

In this paper, we have discussed large scale production of ECP by the selected strain, *Trichosporon* sp. X-19.

Instead of YM medium, Czapek-Dox medium modified (glycine 0.3%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%,

KCl 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, glucose 3.0%) proved to be useful for ECP production. Among twenty kinds of amino acid used as nitrogen source in the culture medium, glycine, arginine and asparagine gave good ECP production. Also it was shown that arginine has special properties to allow production of ECP by the yeast even at neutral conditions of the culture.

Comparison of ECP production by yeast, using jar fermentor with three kinds of nitrogen source, i.e., glycine, arginine and ammonium phosphate monobasic, was made. The full capacity of the fermentor used was 30 liters, and normal operating volume was 20 liters. As a result, glycine gave nearly the same ECP yield as arginine, and ammonium phosphate monobasic gave half the same ECP yield.

Large scale cultivation with this yeast was carried out twice by using pilot plant cultivation equipment, and 1.3 Kg of ECP and 1.9 Kg of dry cell were recovered. The full capacity of propagation tank was 800 liters and normal working volume was 500 liters.

Nutritional evaluation of the ECP was discussed in the other papers.^{24, 26)}