

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：33302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07678

研究課題名(和文) 界面固定化放線菌、細菌及び酵母の生理生化学的、工学的研究

研究課題名(英文) Physiological, biochemical and engineering study of immobilized actinomycetes, bacteria, and yeasts

研究代表者

小田 忍 (Oda, Shinobu)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授

研究者番号：00503963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：3種の新規な界面バイオプロセス、粘着型液面固定化システム(LSItac)、粘着型抽出液面固定化システム(Ext-LSItac)、および粘着型液/液界面バイオリアクター(L-L IBRtact)を開発した。これらのシステムは「いずれも、増殖速度の遅いカビや放線菌、さらには細菌や酵母などの単細胞微生物に適用可能であった。浮上性微粒子の粘着には、carboxymethyl celluloseやpolybutyral樹脂のような粘着性微粒子を用いた。本システムにおける微生物の生理生化学的性質を詳しく調べるとともに、微生物変換ならびに発酵生産に本システムを適用し、それらの工学的特徴を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筆者らが開発してきた界面バイオプロセス群は水に難溶性生成物の高濃度生産に威力を発揮してきたが、適用できる微生物は増殖速度の速いカビに限られてきた。このような限界に対し、本課題研究で構築したシステム群は適用可能な微生物種を飛躍的に拡大することができ、バイオプロセスによる物質生産を推進するうえで大きな社会的意義があると考えられる。今後、これらの新規な界面バイオプロセス群が有用物質の探索や生産に貢献していくことを期待したい。

また、界面微生物学や微生物生理学、生化学、培養工学などの諸分野において、特に界面という特殊な環境下での重要な知見を多々得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Three types of novel interface bioprocesses, tacky liquid-surface immobilized system (LSItac), tacky extractive liquid-surface immobilization system (Ext-LSItac), and tacky liquid-liquid interface bioreactor (L-L IBRtact) were developed. These systems were applicable to low-growing fungi and actinomycetes, and unicellular microorganisms such as bacteria and yeasts by using tacky micro-pieces such as carboxymethyl cellulose and polybutyral resin. The physiological and biochemical properties of the microorganisms immobilized on a surface, and engineering characteristics of the systems were clarified.

研究分野：応用微生物学

キーワード：界面微生物学 界面バイオリアクター 液面固定化システム 発酵 微生物変換 糸状菌 マイクロスフェア

1. 研究開始当初の背景

微生物を用いた非天然物の変換技術である微生物変換法は、有機合成法に代替可能な環境調和型物質生産技術として期待されて久しいが、コスト面での制約が大きく、未だその活用は不十分である。この制約の主因として、基質と生成物の水に対する難溶性と微生物毒性の発現が挙げられる。基質の難溶性の問題は反応速度の低下を、基質・生成物の毒性発現は、投入できる基質ならびに蓄積できる生成物の濃度の引き下げを招来するため、生産コストの大幅な増加をもたらすことになる。微生物変換法の応用をさらに拡大するためには、このような基質・生成物の難溶性の問題と微生物毒性の問題の両者を克服しなければならない。

このような観点より、筆者らはかつて、寒天平板のような親水性担体と *n*-paraffin のような疎水性有機溶媒との固/液界面に増殖する微生物を生体触媒とし、有機層中に溶解させた疎水性基質を微生物変換する固/液界面バイオリクター (S-L IBR) を開発し、数多くの微生物変換に適用してきた。S-L IBR では、固/液界面における毒性緩和現象に基づいて、投入できる基質と蓄積できる生成物の濃度を飛躍的に向上させることができる。また、生成物の回収が容易であること、基質は反応溶媒中に溶解している上に大量の酸素が有機層中に溶解しているため、静置培養で十分なことなどの長所も併せ持ったシステムである。

しかしながら S-L IBR には、担体ゲル中への栄養源の追加が困難であること、担体中の水層の pH 制御が困難であること、酢酸エステルの加水分解で生じる酢酸のような有害物質の担体中への蓄積を回避できないことの 3 つの短所が認められた。これらの短所は S-L IBR の担体中の水層を操作できないことに起因するものである。

このような S-L IBR の短所を克服する界面バイオプロセスとして、液/液界面バイオリクター (L-L IBR) が登場した。L-L IBR では、液体培地の液面に形成された浮上性微粒子 (MS) 層にカビの菌体をトラップして増殖させることで、液体培地液面に強固なカビ/MS 複合マットを形成することができる。このカビマット上に基質を含む疎水性有機溶媒を重層して培養することで、微生物変換を効率的に進行させることができる。高濃度の基質・生成物濃度が達成できること、静置培養可能なこと、生成物の回収が容易であることなど、S-L IBR で認められた多くの長所を併せ持っているうえに、S-L IBR の 3 つの短所を全て解決することができる。

しかしながらこの L-L IBR にも、大きな欠点がある。それは、増殖速度の遅いカビや放線菌、および単細胞微生物である細菌や酵母には適用困難なことである。これらの微生物の菌体/MS 層は物理的に脆弱であり、わずかな衝撃や有機溶媒の重層により容易に崩壊してしまう (図 1)。したがって、さらに界面バイオプロセスの適用範囲を拡大するためには、これら増殖速度の遅い微生物や単細胞微生物にも適用可能なシステムへと再構築する必要性があった。

2. 研究の目的

従来の L-L IBR では、カビの栄養菌糸が MS を取り込む形でカビ/MS 複合マットを形成するが、増殖速度の遅い微生物や単細胞微生物ではそれができないために、微生物/MS マットが崩壊してしまう。したがって、MS 同士を粘着させるバインダー材 (BM) を添加することで、微生物/MS マットの崩壊を抑止できると考えられた。そのための BM が備えるべき条件としては、(1) 長期に渡って MS 層に強度を持たせるため、BM は水には不溶であること、(2) 疎水性有機溶媒に接触してもそれに溶解しないこと、(3) 表面が水和して粘着性を発揮すること、(4) 人体に対して悪影響を及ぼさないこと、(5) 廉価であることなどが想定された (図 1)。

本研究の目的はまず、上記の条件を全て満たす BM を見出すこととした。そのために、BM の水に対する溶解性や MS との浮上速度などの諸因子の評価を行い、それらの結果を総合して最適な BM 種を選定することとした。

次に、選定された BM を液面固定化システム (LSI)、抽出液面固定化システム (Ext-LSI)、液/液界面バイオリクター (L-L IBR) に適用し、菌体捕集率などの菌体/BM/MS 複合層の特性を詳細に解析することとした。

さらに、BM を併用した上記

3 システム (LSI_{tac}、Ext-LST_{tac}、L-L IBR_{tac}) を用いて有用物質の発酵生産と微生物変換試験を行い、これらのシステムにおける放線菌、酵母の生理生化学的特性と、各システムの工学的特性を明らかにすることを目的とした。

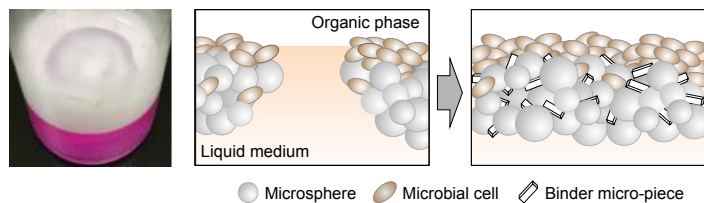


図 1. BM の配合による菌体/MS 層崩壊抑止の原理

3. 研究の方法

3.1. BM の選定

BM 候補として、starch、sodium alginate、polyvinyl alcohol、carboxymethyl cellulose (CMC)、polyvinyl acetal を選び、それらの水、有機溶媒に対する溶解性を顕微鏡観察で調べた。次に、各種 BM/MS 層を振盪させ、液面に形成された BM/MS 複合層の安定性を評価した。さらには、選定された CMC 系 BM 2 種について、MS 配合時の浮上速度を濁度測定によって評価した。

3.2. MS による菌体捕集効率の評価

2 種の MS (polymethyl methacrylate 製多孔質タイプ、polyacrylonitrile 製中空タイプ) について、

懸濁液中の菌体(細菌2種、酵母2種)の捕集率をコロニー数の計測により評価した。菌体/BM/MS 複合層の最終的な特性評価は、以下に述べる発酵並びに微生物変換試験により評価した。

3.3. バインダー材併用式液-液界面バイオリクター(L-L IBR_{lac})の構築と応用

細菌 *Rhodococcus hoagii* NBRC 3730 を用いた3種の微生物酸化反応と、酵母 *Candida viswanathii* NBRC 203221 を用いた酸化反応、酵母 *Pichia kluyveri* NBRC 1165 を用いたアセチル転移反応に本システムを適用し、その生理生化学的並びに工学的特性把握と有効性を検証した。

3.4. バインダー材併用式液面固定化システム(LSI_{lac})の構築と応用

放線菌 *Streptomyces chattanoogensis* NBRC 12754 を用いた抗生物質 natamycin の生産と、*Saccharopolyspora erythraea* NBRC 13426 による抗生物質 erythromycin の生産試験を通じて、その生理生化学的並びに工学的特性把握と有効性を検証した。

4. 研究成果

4.1. バインダー材微粒子(BM)の選定

上記の BM 候補材のうち、starch、sodium alginate、polyvinyl alcohol の三者は水に溶解してしまうため、最初の時点で脱落した。BM は長期に渡って MS 同士を粘着させておく必要があるため、水に不溶であるがその表面が水和して粘着性を発揮する性質を有している必要がある。この要件を満たす BM 材として、まずは表 1 に示す 2 グループの材料に絞り込んだ。

両グループの懸濁液の粘度を比較した場合、CMC 系の Sunrose の方が高く、より粘着性が強いと判断されたため、候補 BM 材を SLD-F1 と FM の 2 種に絞り込んだ。

次に、両候補 BM を MS (polymethylmethacrylate 系 Advancel HM-2051) 層に取り込む形で液面に BM/MS 層を形成させ、振盪条件下でその崩壊試験を実施した。その結果、*n*-decane 重層下で 60 rpm で 24 時間振盪させた場合、両 MS とも、300 mg/7.1 cm² の MS 当たりわずか 5 mg の添加で有効であることが確認された。さらに、これら両 MS 材は 10 分間の強攪拌/4 日間の室温保存においても溶解せず、その水不溶性も確認された(図 2)¹⁾。

さらなる検討として、MS (HB-2051) の浮上に伴う F-1 と FM の捕集を、濁度測定法で継続的に追跡した。その結果を図 3 に示す。SLD-F1 は SLD-FM よりも MS の浮上に伴う浮上速度が若干速かったものの、その粒径は FM の 15–25 μm に対して 50–60 μm と大きく(表 1)、粘着ポイントの観点より、より粒径の小さい Sunrose SLD-FM を最終的に BM として選定した¹⁾。

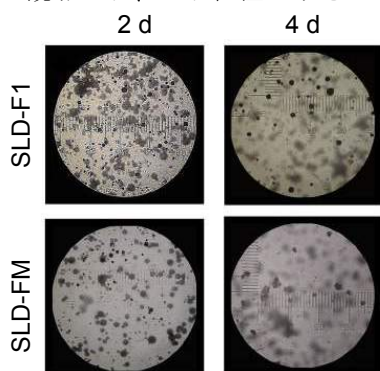


図 2. BM 候補材の水溶性試験

表 1. 一次スクリーニングで候補となった BM 材

	ブチラール樹脂			カルボキシメチルセルロース	
	S-LEC BL-1	S-LEC BL-1H	S-LEC BL-S	Sunrose SLD-F1	Sunrose SLD-FM
形状	白色粉末	←	←	←	←
平均粒径 (μm)	—	—	—	50–60 μm	15–25 μm
計算分子量	1.9 × 10 ⁴	2.0 × 10 ⁴	2.3 × 10 ⁴	2.3 × 10 ⁴	2.3 × 10 ⁴
エーテル化度	63 mol%	69 mol%	74 mol%	20–30 mol%	20–30 mol%
見掛け比重	0.20–0.40	←	←	—	—
粘度 (mPa·s)	10–30 ^{a)}	←	←	50–150 ^{b)}	←
水溶性	不溶	←	←	←	←
メーカー名	積水化学	←	←	日本製紙	←

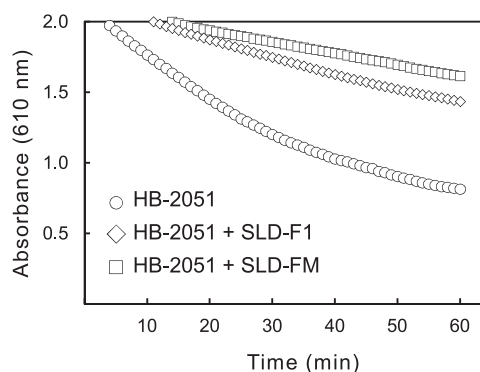
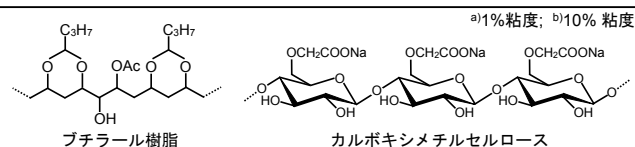


図 3. BM 候補材の浮上性試験

4.2. MS による菌体捕集効率の評価

MS の浮上に伴い、BM とともに菌体も効率的に MS 層中に捕集する必要がある。そこで、汎用されてきた polyacrylonitrile 製で CaCO₃ 表面コートタイプの MFL-80GCA とノンコートの polymethylmethacrylate 製 Advancel HB-2051 について、*Staphylococcus epidermidis* NBRC 12993、*Pseudomonas putida* NBRC14164、*Candida viswanathii* NBRC 10321、*Pichia kluyveri* NBRC 1165 の捕集率を評価した。評価法としては、水層中の菌体数をコロニーカウント法で測定した。

その結果、比重 0.5 の HB-2051 に対して比重 0.2 と軽い 81GCA でより多くの菌体捕集率が得られた。*P. putida* に対しては HB-2051 による捕集率は若干低かったものの、他の 3 株では 90% を超える捕集率が得られた。両 MS の粒径はともに約 20 μm と差がないため、より速く浮上する 81GCA で多くの菌体が MS 層中に捕集できたと思われる。

しかしながら、MFL-81GCA はその表面を CaCO₃ でコートされているため、菌種によっては好ましくない場合がある。HB-2051 も徐々に使用実績が上ってきているため、適宜 MS 種を選

定することが好ましい。

4.3. バインダー材併用式液-液界面バイオリクター(L-L IBR_{lac})の構築と応用

前節までに述べたように、最適なBM種をSunrose SLD-FMに選定することができた。MS種に関しては菌種によって適合性が異なるため、適宜選定する必要がある。HB-2051は81GCAと比較して菌体の捕集率は低くなる傾向にあるが、これまでの使用実績より十分に利用できるMS種である。そこで次に、SLD-FMをBMとしたL-L IBR_{lac}を図4に示す微生物変換に適用することで、本システムの有効性を確認することとした。

その結果、*R. hoagii* NBRC 3730を用いた citronellol、2-methylcyclohexanol、2-octanolの酸化については、液体培養と水-有機溶媒二相系反応法を凌ぐ好成績が得られ、その有効性を確認することができた。液体培養系では強い基質阻害が発現し、二相系では過剰酸化(Baeyer-Villiger酸化)が進行した。なお、いずれの反応系においても菌体/BM/MS層の崩壊は認められなかった(図5)¹⁾。

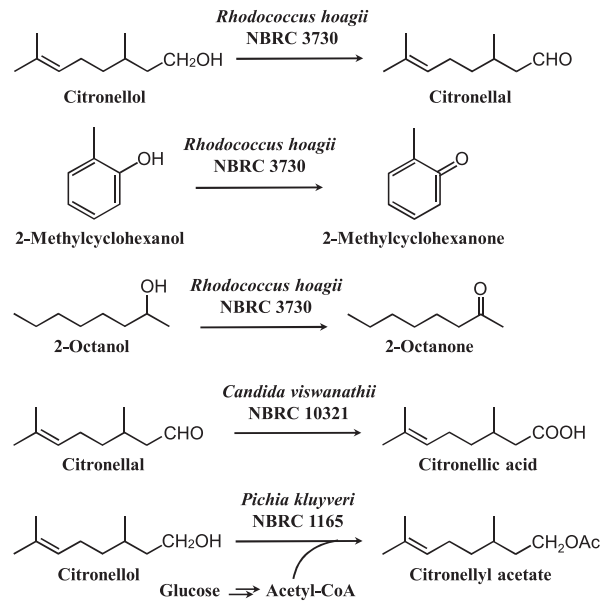


図4. L-L IBR_{lac}の各種微生物変換への適用

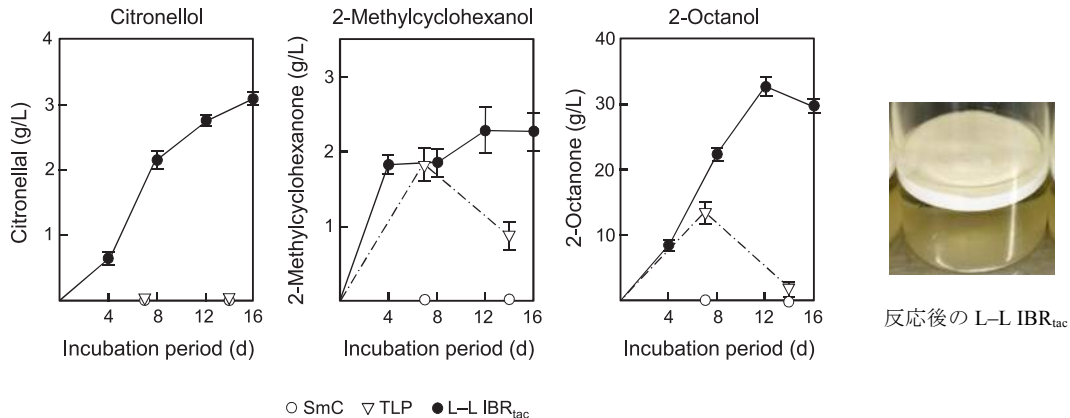


図5. 液体培養系、水-有機溶媒二相系、L-L IBR_{lac}間での微生物酸化反応の比較

一方、S-L IBR との比較を *C. viswanathii* NBRC 20321 による citronellal の酸化をモデルに検討した。その結果、S-L IBR には若干劣る成績ではあったが、大量の citronellic acid を生産できた。本反応系についても菌体/BM/MS層の崩壊はなかった¹⁾。

さらに、*P. kluyveri* NBRC 1165 による acetyl-CoA から citronellol へのアセチル転移反応に適用したところ、S-L IBR 系に比べて citronellyl acetate の生産量は半分程度に止まった。しかしながら、10%もの citronellol/KF-96L-1CS 溶液を重層しても 3 g/L もの citronellyl acetate が蓄積できており、液体培養系を大きく上回る生産性が確認できた¹⁾。

4.4. バインダー材併用式液面固定化システム(LSI_{lac})の構築と応用

次に、BM添加液面固定化システムとして、*S. chattanoogensis* NBRC 12754 を用いた抗生物質 natamycin の生産へ適用した。その結果、①BM材をメッシュパスしてさらに粒径を小さくすることで菌体/BM/MS層の強度と natamycin 生産量が向上すること、②HB-2051を用いた場合は菌体捕集率が89.5%と低くなるが、natamycin の生産量は菌体捕集率99.8%の81GCAを上回ること(81GCAから溶出してくるCa²⁺が菌体に悪影響を及ぼすと考えられた)、③BM材由来の両親媒性物質(PVA系添加剤)が菌体からの natamycin の分泌を亢進させ得ること、④培地を最適化することにより、初期条件の3倍、液体培養系の1.7倍の natamycin 生産が得られること、⑤増殖期の培地に有機態窒素源である Soypro を添加して菌体量を引き上げた後、生産期には Soypro を含まない培地(窒素源はNH₄Cl)に置換することで、natamycin の生産量を大きく向上させ得る(320 mg/L)こと(図6)など、多くの重要な知見が得られた。

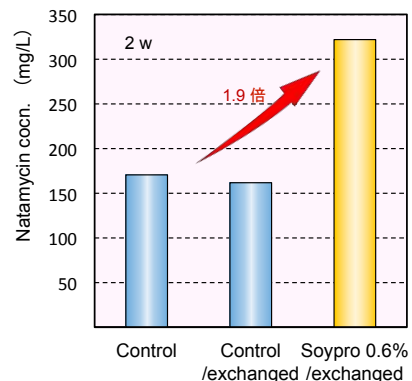


図6. Natamycin 生産に対する培地交換の効果

以上の結果より、BM 材を配合することで単細胞微生物並びに低増殖性微生物に好適な界面バイオプロセスを構築することができた。それに付随して、界面微生物学上有益な知見を多々得ることもできた。

上述のように、抽出液面固定化システム(Ext-LSI)と液/液界面バイオリアクター(L-L IBR)は、カビを用いた水難溶性物質の生産に威力を発揮する。また、液面固定化システム(LSI)は、特に酵素生産に威力を発揮するが²⁾、いずれのシステムも増殖の速いカビへの適用に限られてきた。

これに対して、本課題研究で構築に成功した BM 併用式のバイオプロセス群(LSI_{lac}、Ext-LSI_{lac}、L-L IBR_{lac})は、増殖速度の遅いカビはもちろん、放線菌、さらには細菌や酵母などの単細胞微生物にも適用可能なシステムであることが証明できた。今後、これら第二世代の界面バイオプロセス群の適用を通じて、バイオ生産がさらに振興してくることを期待したい。

<引用文献>

- 1) Oda S, Nakanishi M, Ishikawa A, Baba T. *Process Biochem.*, **80**, 1–8 (2019).
- 2) Oda S, *J. Oleo Sci.*, **66**, 815–831 (2017).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Oda S, Nakanishi M, Ishikawa A, Baba T. Modified liquid–liquid interface cultivation system with floating microspheres and binder micro-pieces for slow-growing or unicellular microorganisms: Application to interfacial bioconversions with an actinomycetes and yeasts. *Process Biochem.*, **80**, 1–8 (2019).
- ② Oda S, Production of valuable lipophilic compounds by using three types of interface bioprocesses: Solid–liquid interface bioreactor, liquid–liquid interface bioreactor, and extractive liquid-surface immobilization system. *J. Oleo Sci.*, **66**, 815–831 (2017).
- ③ 小田忍. 新薬創成の可能性を秘めたカビの界面培養法. *化学経済*, **2016(4)**, 72–77 (2016).

[学会発表] (計 8 件)

- ① 小田忍. 界面バイオプロセスによる医薬品原料の高生産システム. 第 10 回医工連携フォーラム(2019.02.23). 金沢工業大学.
- ② 小田忍. 界面バイオプロセスを用いた化粧品原料の探索と高生産. 化粧品開発展示会. (2019.01.31). 幕張メッセ.
- ③ 小田忍・杉本恭子・北川友理・村川穂奈美・中川愛美. 界面培養法による抗真菌物質生産株のスクリーニングとアザフィロン類の高生産. 第 62 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会. (2018.10.14). 長崎大学.
- ④ 窪木遥・小田忍. 単細胞微生物用界面バイオプロセスの特徴化と抗生物質生産への応用. 2018 年度日本放線菌学会大会. (2018.09). 武蔵野大学.
- ⑤ 窪木遥・小田忍・大箸信一. 単細胞微生物用界面バイオプロセスの特徴化と物質生産への応用. 2018 年度日本農芸化学会大会. (2018.03.16).
- ⑥ 小田忍・新家一男・加賀谷紀貴・河原哲平. 天然物創薬を志向した界面スクリーニングシステムの開発と応用. 第 9 回医工連携フォーラム. (2018.02). 金沢医科大学.
- ⑦ 石川麻子・小田忍・大箸信一. 微粒子層補強型液/液界面バイオリアクターによるテルペン系微生物変換. 2016 年度日本生物環境工学会大会. (2016.09). 金沢工業大学.
- ⑧ 石川麻子・小田忍・大箸信一. 単細胞微生物用液/液界面バイオリアクターによるシトロネロールの変換. 第 68 回日本生物工学会大会. (2019.06). 富山国際会議場.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://kitnet.jp/laboratories/lab00167/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：なし