

醗酵工業における連続培養 (上)

大阪大学工学部 岡 崎 光 雄

はじめに

今日、醗酵工業において、連続培養法がその目的物質の生産力および工業の自動制御化の面より重要視されて来ている。連続培養と云っても別に特殊な培養形態ではなく、自然界の生物はほとんど連続培養系にある、と云っても過言ではないと思われる。むしろ生物は連続培養系の中で淘汰され、進化して来たわけである。またこの連続培養法は古くから人類により用いられ、たとえば、牧場の牛もその柵の内(系)で、牧草を食んで生育しつつ草に滋養を与え、子牛を生み、またミルクを生産し、あるいはその系(柵内)より選択的に生長した牛肉をわれわれに提供するみごとな連続培養系である。これは一つの柵内(槽型)の連続培養法であり、この場合エネルギーは太陽より供給されている。また腸内細菌のように、長い腸内での細菌の増殖は一つの管型の連続培養系とも考えられ、さらに胃袋から腸へと増殖する細菌群は槽型と管型をうまく組合せた連続培養系であり、この場合細菌の食餌(培地)は牛の食べた牧草により供給され、この牧草を細菌が分解し、吸収され易くなったその分解産物を牛が吸収して、ここにおいてもまた共存しているわけである。

このように生物の自己増殖型の連続反応(培養)系においては、生物とその食餌との間にはいわゆるフィードバックシステムなる因果律により結ばれている。すなわち牧場内の牛とその牧草、あるいはよく云われる鯨とプランクトンの関係はこの典型的な例であろう。すなわちプランクトンが鯨に食われて激減すると、鯨は遂に食餌がなくなるのでその数が減ってしまう。そうすると再びプランクトンの数が増してくる。このような因果関係は互に影響が直接的である場合に起るのであって、図1に示すようにループを形成することになり、したがって生物の連続培養は自己制御系であるわけである。

このように連続培養法の原理は、自然界ではごく当たり前に行なわれており、別に特殊な系であるわけではない。一方人類が微生物を利用しだしたのは非常に古く、遠い神代の時代、あるいは人類が地球上に現われる以前より

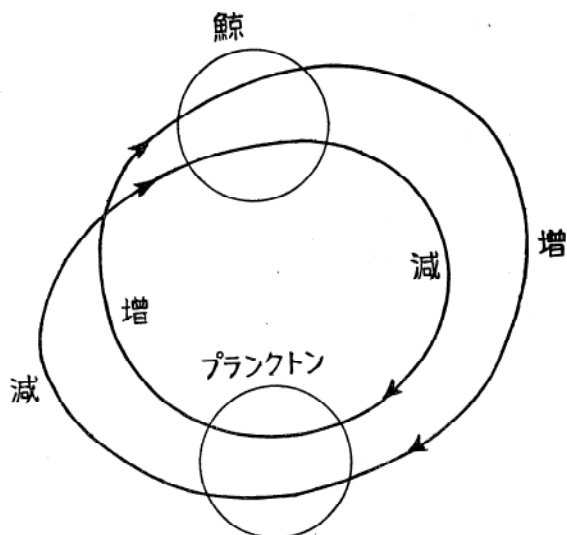


図1 鯨とプランクトンの関係

(サルにより?) 酒と云われる形で利用されて来たわけであるが、人間が微生物を用いて積極的に連続培養を試みたのは比較的新しく、この研究において画期的な業績をあげたのは、1950年になって行なわれた Monod¹⁾ と Novick^{2)~5)} による基礎研究である。その後 Bryson⁶⁾, Finn⁷⁾, Maxon⁸⁾, Deindorfer⁹⁾ および Ueda^{11)~13)}, その他多数の研究者により研究され、急速に発展し、現在カナダにおけるビール工業の連続醗酵をみるに至っている。

連続培養の形式

上述したように、連続培養と云っても別に特殊な培養形態ではなく、自然界ではごく当たり前に行なわれているものである。

まず微生物の連続培養をその目的より大別してみると、

- 1) 微生物の生理や変異など基礎研究を目的とするもの
- 2) 工業的培養を目的とするもの

となるが、この2つは明瞭に区別され得ない場合も多い。

はじめに少しふれたように、微生物は自律的な自己増殖系であり、環境に対して選択的な半封鎖系として存在するので、回分培養においては、これらの環境資材を利

用して増殖しつつ、かつ自から環境に与えた変化の影響を受けて、培養系が時間と共に変化していく。一方連続培養の定常状態においては環境条件を時間に無関係に固定し得るわけで、1)の目的のように微生物生理の研究には非常に有意義な手段である。また微生物の変異性を利用して、優良菌株の選択にもこの連続培養法はすぐれた手法である。たとえば石油資化性優良菌株の選別には、石油を単一炭素源とした培地を用いて、後述する turbidostat 型（供給培地の流速を自動的に変化せしめて、菌体濃度を一定にする方法で比増殖速度の高い所で制御する方法）を用いれば、石油資化性のより良好菌株が培養槽内に残存して行くわけである。この場合微生物変異促進手段（変異促進試薬、紫外線、X線など）を併用すればさらに良い結果が得られるわけである。

一方連続培養法は工業的培養法としてもすぐれた利点をもっており、後述するように、回分式培養と比較して、時間当りの生産力の増加、および生産量当りの容器容積の減少、設備費の低下、人件費の低下、ならびに培養に関連する他の操作の連続化と併用して運転経費の減少など多くの利点がある。また自動制御方式が有効に活用されることおよび培養系の相特性に応じた適切な制御を比較的容易に行ない得る利点がある。

次に連続培養をその操作の面より分類すると、

- 1) 制御面より
 - a) chemostat
 - d) turbidostat
- 2) 装置面より
 - a) 槽型 (tank type)
 - d) 管型 (tubular type)
 - c) 槽管混合型 (tank and tubular mixed type)
- 3) 操作面より
 - a) 循環式 (recycle system)
 - d) 中間補給式
 - c) 分流式
 - d) 合流式

などが考えられる。

まず制御の面より chemostat と turbidostat の相違を比較してみよう。chemostat とは Novick ら^{2)~4)}により提唱されたもので、これは Monod¹⁾の述べた *bactogen* と同一で、培地供給比速度（希釈率） D に比増殖率を従属させたものである。したがってこれは external control method とも云われている。これに対して、turbidostat は Bryson⁶⁾により開発されたもので、菌体量を一定するように希釈率 D を自動的に変化せしめる方法であり、普通菌体量測定に濁度計を使用するので、turbidostat と云われている。これは inter-

nal control method である。少しわかり難いと思われるので、連続培養系を定式化して説明しよう。

微生物を純粋培養したことのある人は誰でも経験することであるが、その微生物が培養器より溢れて増殖することなく、ある一定の菌体濃度 (X) になるともはや増殖しなくなってしまう。これは別に微生物自身が産児制限をしているのではなく、多くの場合培地中の増殖制限基質の消費によるものと考えられる。一般にこの増殖制限基質 S が菌体構成代謝物質¹⁴⁾の場合、菌体増殖速度はこの基質消費速度に比例し、

$$\frac{dX}{dt} = -Y \frac{dS}{dt} \quad (1)$$

(Y : 定数(収率))

と表わし得る。また Monod¹⁵⁾によると比増殖率 $\mu (=dX/Xdt)$ と S とは、多くの場合酵素反応にみられるのと同じく Michaelis-Menten 型の関数となり、すなわち、

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K+S} \quad (2)$$

(μ_m : 最大比増殖率, K : 定数(飽和))

なる関係にある。

今図2に示したような連続槽型直列培養系を考えてみよう。ただし各槽は瞬間完全混合槽とする。

第 n 槽における菌体量の物質収支より、

$$V_n \frac{dX_n}{dt} = FX_{n-1} - FX_n + V_n \mu_n X_n \quad (4)$$

(F : 培地供給速度, V : 槽内培養液容積)

$$\therefore \frac{dX_n}{dt} = D_n X_{n-1} - D_n X_n + \mu_n X_n \quad (4')$$

(D : 希釈率 ($=F/V$))

定常状態においては $dX_n/dt=0$ であるから、

$$X_n = \frac{D_n X_{n-1}}{D_n - \mu_n} \quad (n \neq 1) \quad (5)$$

$$\mu_1 = D_1 \quad (n=1) \quad (5')$$

(ただし, $X_0=0$)

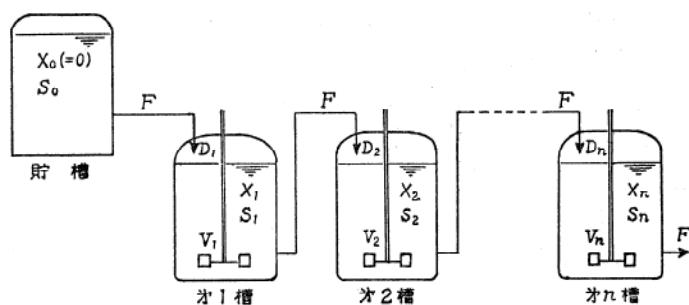


図2 連続槽型直列培養系

X : 菌体濃度, S : (増殖制限) 基質濃度
 F : 培養供給速度 V : 培養容積 D : 希釈率 ($=F/V$)

したがって、

$$\begin{aligned} X_n &= \left(\frac{D_n}{D_n - \mu_n} \right) X_{n-1} \\ &= \left(\frac{D_n}{D_n - \mu_n} \right) \left(\frac{D_{n-1}}{D_{n-1} - \mu_{n-1}} \right) X_{n-2} = \dots \\ &= \prod_{i=1}^n \left(\frac{D_i}{D_i - \mu_i} \right) X_1 \end{aligned} \quad (6)$$

基質濃度変化も同様にして、

$$\frac{dS_n}{dt} = D_n(S_{n-1} - S_n) + \left(\frac{dS_n}{dt} \right)_{\text{consumption}} \quad (7)$$

定常状態において $dS_n/dt=0$ であり、また(1)式を代入すると、

$$S_n = S_{n-1} - \frac{\mu_n X_n}{Y D_n} \quad (8)$$

$$= S_0 - \frac{X_1}{Y} - \sum_{i=2}^n \left\{ \frac{\mu_i}{Y D_i} \prod_{j=2}^i \left(\frac{D_j}{D_j - \mu_j} \right) \right\} X_1 \quad (8')$$

ここで簡単にするために、第1槽のみを考えてみよう。

(8)式および(5)式より、

$$S_1 = S_0 - \frac{X_1}{Y} \quad (9)$$

$$\therefore X_1 = Y(S_0 - S_1) \quad (10)$$

$$\text{or } \frac{X_1}{X_m} = 1 - \frac{S_1}{S_0} \quad \left(\because \frac{X_m}{S_0} = Y \right) \quad (10')$$

また(2)式および(5')式より、

$$S_1 = \frac{K \mu_1}{K_m - \mu_1} = \frac{K D_1}{K_m - D_1} \quad (11)$$

$$\text{or } \frac{S_1}{S_0} = \frac{\frac{K}{S_0} \frac{D_1}{\mu_m}}{1 - \frac{D_1}{\mu_m}} \quad (11')$$

(5)式、(5')式、(8)式および(8')式などにみられるように、希釈率 D に比増殖率 μ を従属させた自己制御系にあることがわかる。

上述の関係、すなわち X_1/X_m および S_1/S_0 を D_1/μ_m に対してプロットすると、Herbert⁹⁾¹⁶⁾¹⁷⁾らにより詳述されているように、図3のようなになる。ここで相対希釈率 D_1/μ_m に対する相対菌体濃度 X_1/X_m (あるいは相対基質濃度 S_1/S_0) の曲率は K/S_0 値により異なってくるが、一般に $K/S_0 \approx 10^{-2}$ ぐらいの数値であり、これより大きいと、 X_1/X_m の曲線は実線より下側になり、 $K/S_0 < 10^{-2}$ となるとこの曲線は実線より上側の破線のようなになる。この場合、菌体の完全な洗い出し (Wash-out) の起る相対希釈率 $D_w/\mu_m = 1/(1 + K/S_0)$ なることがわかる。また $K/S_0 \ll 1$ の場合、 D_1/μ_m の小さな所 (菌体の洗い出しが現れない所) では、 $X_1/X_m \approx 1$ になり、ほぼ一定であり、 D_1/μ_m が1に近づくとき X_1/X_m は急激に減少する。したがって、 D に μ を従属させた

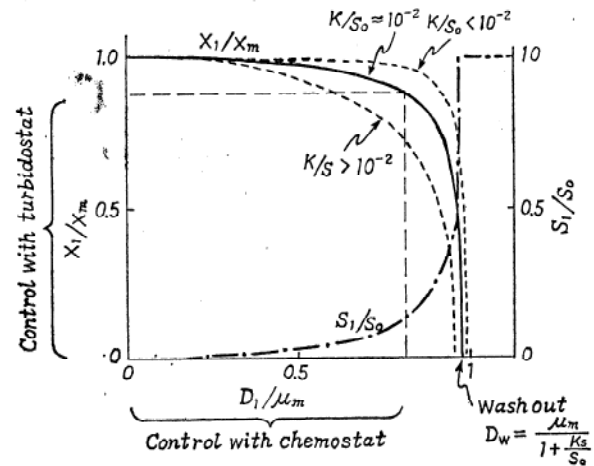


図3 連続槽型培養における菌体濃度および基質濃度と希釈率との関係

chemostat による制御は、 D が比較的小さな所で行うべきである。もし菌体の洗い出しの起る附近の D で chemostat による制御を試みると、系が常に洗い出しの危険にさらされ、またわずかな D のふれに対しても菌体濃度は大巾に変動し、定常状態が非常に不安定になり、また定常状態が得られない結果にもなる。これに対して菌体濃度を一定にするような turbidostat は D が μ_m に近い菌体洗い出し点附近で行うべきものである。すなわちわずかな D の変動に対して菌体濃度が大巾に変わるため、制御し易い。 D が小さな所で turbidostat で制御しようとしても、菌体濃度はほとんど変化せず、制御不可能となる。以上の制御範囲を図3に示しておく。ただし上述の議論は(1)式(2)式が成立し、かつ $K/S_0 \ll 1$ という仮定のもとにあることは注意しなければならない。とくに(1)式における収率定数 Y において、一般に増殖制限基質が力源代謝基質¹⁴⁾のときには一定値にならぬ場合が多い。

少し廻り道をしたが、次に槽型 (tank type) と管型 (tubular type) 連続培養について比較してみよう。

まず連続槽型培養系について述べる。いま単槽型の培養槽において反応がない場合、すなわち菌による基質消費がない場合を考えて、時間 $\theta=0$ に流入した物質が時間 θ 後に流出する確率は $De^{-D\theta}$ となり、近路現象により未反応のまま流出する基質が必ず存在するわけである。この問題は、とくに醗酵産物をそのまま口にする場合、たとえば醗酵飲料などでは、回分培養生産物があまりにもわれわれの口に慣れ過ぎているため、重要な問題となろう。この近路現象は槽数を増すことにより、良好な方向へと移るが、実際の連続槽型培養においては、当然槽数には限度があり、微妙な醗酵飲料では問題となろう。

つぎに微生物は化学反応と比較して環境に対する応答が遅く連続槽型培養の槽移動の際に生じる環境変化により、微生物自身に shock などが起り、相当の時間遅れ (time lag) が存在し、実際の生産力を低下させる大きな原因となっている場合もある。この問題については次報で詳述する。

これに対して連続管型培養系では、微生物の環境に対する経時変化は回分式培養と同一であり、上述の槽型での欠点は取除ける。しかし好気培養のように通気を必要とする場合は、装置的に相当困難であり、また実際には back mixing が起り、その解析を困難なものにしている。さらに単管式の場合は培地供給口附近より菌体洗い出しが起り、これを避けるためには常に新しい菌体を植菌するか、または菌体の再循環方式をとらねばならない。

上述の槽型と管型連続培養の欠点をうまく補ったのが、槽管混合型連続培養法である。これは図4に示すよ

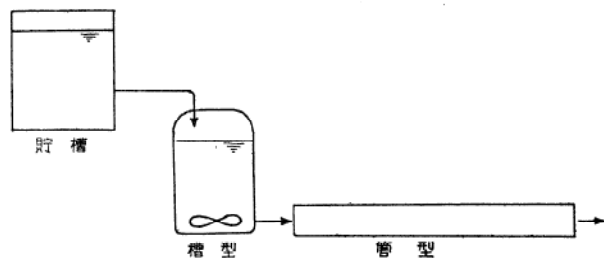


図4 連続槽管混合型培養系模図

うに、前装置に槽型を、後装置に管型を連結したもので、管型のみによる菌体の洗い出しの危険がなくなり、また連続多段槽型培養の槽間移動の際に起る菌体の shock もなくなり、さらに基質などの近路現象も妨げる利点がある。なお管型における通気の問題も、一般に増殖後期（とくに後述する nongrowth associated type の生産）では、前期の増殖期に比して通気量が非常に少なくてよく、工業的連続培養には多くの利点を含み、今後の研究に大きな期待がよせられる。

つぎに、連続培養の操作の面より循環式（主に菌体再利用式）中間基質補給式、分流式および合流式（混合培養の可能性も含めて）など考えられるが、この問題については次の機会に譲りたい。

回分培養と比較した連続培養の得失

まず回分培養と連続培養における単位時間、単位容積当りの菌体量の生産力を比較してみよう。

まず単槽型連続培養の菌体生産速度 $r_{cont.}^{(9)(19)(20)}$ は、

$$r_{cont.} = D_1 X_1 \quad (12)$$

と表わし得る。また(10)式および(11)式より、

$$r_{cont.} = Y D_1 \left(S_0 - \frac{D_1 K}{\mu_m - D_1} \right) \quad (13)$$

$r_{cont.}$ が最大になる D は、 $d(r_{cont.})/dD=0$ であるから、したがって(13)式より、

$$D_{1m} = \mu_m \left(1 - \sqrt{\frac{K}{K+S_0}} \right) \quad (14)$$

また、(10)式、(11)式および(14)式より、

$$X_{1m} = Y \{ (S_0 + K - \sqrt{K(K+S_0)}) \} \quad (15)$$

したがって、最大菌体生産速度 $(r_{cont.})_m$ は

$$\begin{aligned} (r_{cont.})_m &= D_{1m} X_{1m} \\ &= Y \mu_m S_0 \left(\sqrt{\frac{K+S_0}{S_0}} - \sqrt{\frac{K}{S_0}} \right)^2 \end{aligned} \quad (16)$$

ここで、一般に $K \ll S_0$ であるから、

$$(r_{cont.})_m \doteq Y \mu_m S_0 \quad (16')$$

一方回分培養における一回の操作時間 t_{batch} は

$$t_{batch} = \frac{1}{\mu_m} \ln \frac{X_m}{X_0} + t_l \quad (17)$$

で表わし得る。ここで右辺の第1項は、菌体が最大比増殖率で初期菌体濃度 X_0 から最大菌体濃度 X_m に到達するのに用する時間であり、第2項の t_l は回分培養の全体の「遅れ時間」である。すなわち、植菌時の菌体増殖遅れ、培養後期の増殖減衰による遅れ、培養液取出し時間および次の培養への準備時間を含んだものである。

ここで(1)式より

$$X_m - X_0 = Y S_0 \quad (18)$$

したがって、回分培養における平均菌体生産速度 r_{batch} は、

$$r_{batch} = \frac{Y S_0}{\frac{1}{\mu_m} \ln \frac{X_m}{X_0} + t_l} \quad (19)$$

したがって、回分培養に対する連続培養の生産力比 R は、

$$\begin{aligned} R_{cont./batch} &= \frac{(r_{cont.})_m}{r_{batch}} \\ &\doteq \ln \frac{X_m}{X_0} + t_l \mu_m \end{aligned} \quad (20)$$

となる。図5はこの(20)式をパラメータとして比植菌量 X_0/X_m と doubling time g を用いて表わしたものである。たとえば doubling time $g=0.5$ hr、回分培養遅れ時間 $t_l=10$ hr および比植菌量 $X_0/X_m=0.05$ とすると、図に破線で示したように $R=18$ となり、生産力は連続培養の方が回分培養に比して18倍の能力があることがわかる。

また連続槽型培養系で菌体を再循環する場合、菌体の再利用率 ϕ とすると、

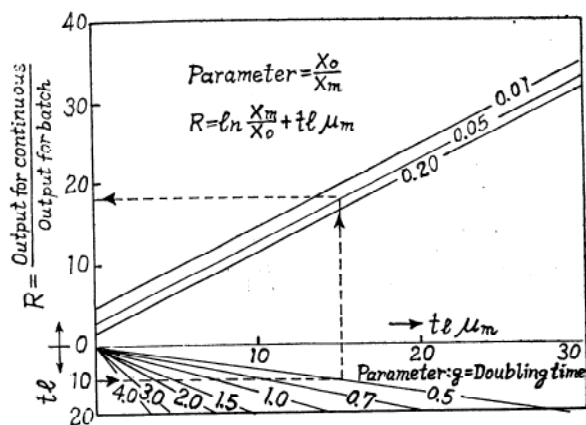


図5 回分培養と連続（槽型）培養の生産力の比較

$$\frac{dX_1}{dt} = \mu_1 X_1 - D_1 X_1 (1 - \phi) \quad (21)$$

定常状態では、

$$D_1 = \mu_1 \frac{1}{1 - \phi} = \mu_m \frac{S_1}{K + S_1} \cdot \frac{1}{1 - \phi} \quad (22)$$

したがって、菌体を再利用する場合は $D_1 > \mu_m$ なる状態で操作し得る。また上述と同様にして最大生産速度を求めることも出来る。

菌体再循環を用いて、槽型と管型連続培養の比較については Grieves ら²¹⁾により論じられているのでそれを参照されたい。

さらに、回分培養と比較した連続培養の利点は、他のプロセスの連続化に伴ったシステムの自動化であろう。これによる運転経費の低下については、申すまでもないことと思う。

一方連続培養の工業化に当り、回分培養に比して不利な点は、取り扱っているものが生物であるため、変異に基づく目的生産物の低下は避けられない。したがって連続培養の運転期間は自ずから制限されることになる。また雑菌による培養系の汚染は、回分培養よりもさらに深刻な問題となる。この汚染の問題は、菌の変異の問題と共に Powell²²⁾により詳細に解析されている。上田ら²³⁾はグルタミン酸の連続培養において、薬剤を使用して雑菌防止を試みている。さらに環境変化に基づく微生物の挙動については多くの未知なものがあり、また目的産物が菌体でない場合、とくに目的産物が nongrowth-associated 型の場合には、定量的な取り扱いがほとんど行われていない。

次回には nongrowth-associated 型の生産の一例とし

て、クロカビによる糖化酵素生産の連続培養について説明しよう。

記号

X: 菌体濃度 S: 基質濃度 V: 培養容積
F: 培地供給速度 D: 希釈率 (=F/V) R
: 生産力比 Y: (収率) 定数 K: (飽和)
定数 t: 時間 r: 菌体生産速度 g: 世代
時間

ギリシャ文字

μ : 比増殖率
 θ : 滞留時間
 ϕ : 菌体再利用率

添字

1, 2, ... i ... k ... n: 第1, 2 ... i ... k ... n 槽
o: 貯槽 (或いは初発)
m: 最大
l: 遅れ
w: 洗い出し

文 献

- 1) Monod, J.: Ann. Inst. Pasteur, **79**, 390 (1950)
- 2) Novick, A., Szilard, L.: Proc. Nat. Acad. Sci., **36**, 708 (1950)
- 3) Novick, A., Szilard, L.: Science, **112**, 715 (1950)
- 4) Novick, A., Szilard, L.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **16**, 343 (1951)
- 5) Novick, A.: Recent Progress Microbiol., 403 (1958) (Almquist & Wicksell, Stockholm)
- 6) Bryson, V.: Science, **116**, 48 (1952)
- 7) Finn, R. K., Wilson, R. E.: J. Agr. Food Chem., **2**, 66 (1954)
- 8) Maxon, W. D.: Appl. Microbiol., **3**, 110 (1955)
- 9) Herbert, D., Elsworth, R., Telling, R. C.: J. gen. Microbiol., **14**, 601 (1956)
- 10) Deindorfer, F. H., Humphrey, A. E.: Ind. Eng. Chem., **51**, 809 (1959)
- 11) 上田: 日農化, **30**, 335 (1956)
- 12) 上田ら: 醸工, **41**, 148, 450, 645 (1963)
- 13) 上田ら: 醸工, **43**, 558 (1965)
- 14) 照井: 工化, **67**, 714 (1964)
- 15) Monod, J.: Ann. Review Microbiol., **3**, 371 (1949)
- 16) Herbert, D.: S.C.I. Monograph, No 12, p. 21 (1961) (Soc. Chem. Industry, London)
- 17) Herbert, D.: Recent Progr. Microbiol., 381 (1958) (Symp. Held at the VII International Congress for Microbiol., Stockholm)
- 18) 上田: 農化, **32**, 26 (1958)
- 19) Gerhardt, P., Bartlett, M. C.: Adv. Appl. Microbiol., **1**, 215 (1959)
- 20) Maxon, W. O. Adv. Appl. Microbiol., **2**, 335 (1950)
- 21) Grieves, R. B., Pipes, W. O., Milburg, W. F., Wood, R. K.: J. appl. Chem., **14**, 478 (1964)
- 22) Powell, E. O.: J. gen. Microbiol., **18**, 259 (1958)
- 23) 上田, 高橋, 小熊: 東大応微研シンポ, 第5集, 232 (1963)