



混合培養の生物化学工学的研究

田 口 久 治*

自然環境には衆知のごとく数多い種類の微生物が生存している。その分布は環境の変化によって著しく影響を受ける。何故なら微生物は広範囲のそれぞれ異なった栄養要求性を有しており、PH、温度、イオン強度などの外部条件の差で異なった増殖速度を示し、ある時には不適当な環境に耐え、環境良化に伴なって激しく増殖を再開する。即ち特異な物理的、化学的または栄養条件は微生物集団の異なった分布を誘発し、その環境に適した微生物集団が優勢となる。この適応現象は自然環境における微生物工学研究の一つの鍵であり、混合培養系を用いた集団動力学、微生物間相互の関係などに関する研究は微生物利用プロセスの人為的制御に対し重要な課題である。

例えば廃水処理法として現在最も普遍的な活性汚泥法は各種の細菌、原生動物、後生動物などから成るフロック状の集合体を廃水と混合し、曝気を行い、廃水中の有機物質を酸化分解し、つぎに沈澱槽で増殖した活性汚泥を沈降分離後一部曝気槽に返送しつつ連続処理を行うものである。従って有機物質の分解と同時に生成した活性汚泥が十分な凝集性と良好な沈降性を有していることが肝要である。ただ活性汚泥法は汚泥中の微生物集団が環境変化に呼応して変化し、系が不安定になる欠点がある。この微生物集団の変動がある限界を越えるとプロセスの変調をきたすことになり、典型的な例が膨化現象の発生である。膨化現象の中でも最も多く発生するのは糸状性細菌の異常増殖、凝集性微生物の減少などによって、沈降性、凝集性が低下し、終局的には汚泥の wash out をもたらすものである。従って膨化現象の発生機構の解明は活性汚泥法の正常運転を維持するために緊急を要する問題となっている。

一方清酒醸造の酒母熟成経過における定型は順序よい硝酸還元菌、乳酸菌の発育に続いて優良健全な清酒酵母が育成されるものである。亜硝酸の消長、乳酸の生成によって雑菌の発育が抑制され、良好な酵母増殖が誘発される混合培養系の制御例と言い得る。更に澱粉を分解しブドウ糖を生成する 酵素生産能の高い *Endomycopsis sp.* と飼料酵母として性質の優れている *Candida utilis* との混合連続培養も澱粉含有廃水処理を兼ねて飼料酵母生産を試みるプロセスとして大型化されるに到っている。

上記の数例は混合培養に関する生物化学工学的研究の重要性を明白に示している。このため混合培養の機構解明などに対し、系のモデル化、コンピュータ利用による解析を含め種々のアプローチが行われつつあるが、いづれも比較的単純な系のみを取扱っており、2種類の微生物、1種類の基質を対象とする、拮抗、捕食、共生、相利共生、抗生などの現象が解析されているに過ぎない。複数の基質、複雑な食物連鎖を対象とした混合培養系の検討を通して、微生物生態学の分野で新しい工学的知見を集積し、微生物利用プロセスの制御に貢献し得るには可成りの日数を必要とする段階である。

混合培養系における微生物集団と外部環境の関係についての解析は次の手順に従うべきと考える。1) 系の境界条件決定 2) 主反応の明確化 3) 系に関与する微生物の定性的同定と主要微生物の定量的把握 4) 主要微生物の関与する反応の解明 5) 主反応の動力学と物質収支 6) 集団動力学と生化学的反応との関係確立 7) 系の変数に対する環境因子の影響。筆者らは最近、この手順に従い活性汚泥法における膨化現象の発生機構解明を目的として研究を進めている。得られた結果を簡単に紹介する。

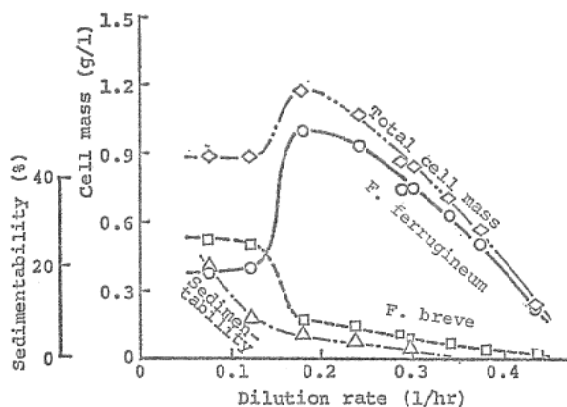
A) 凝集性細菌、糸状性細菌の分離と培養特性

* 田口久治 (Hisaharu TAGUCHI), 工学部, 醸酵工学科, 教授, 工博

尿処理場より採取した正常な活性汚泥を合成下水を用いて負荷量 $0.5 \text{ kg BOD/kg MLSS/day}$ で十分馴養し、汚泥から約50株の微生物を分離し、濃度も高く、純粋培養においても良好な凝集性を示す一菌株を選定した。本菌は乳糖から酸を形成する点が相異なるのみで *Flavobacterium breve* と同定された。一方合成下水の負荷量を $1.5 \text{ kg BOD/kg MLSS/day}$ に上昇し人為的に膨化を誘発せしめた系の優勢菌で糸状性を示す細菌はゼラチンを液化しない点が相異しているが *Flavobacterium ferrugineum* と同定された。合成下水の BOD を $500 \sim 20000 \text{ ppm}$ の範囲で変更しても *F. breve* の沈降性、凝集性は変化せず、SVI 値は $20 \sim 60$ であった。炭素源としては澱粉を用いた場合、最良の凝集性と沈降性を示したので以下の連続培養には澱粉を炭素源とする培地を使用した。*F. ferrugineum* の増殖速度は Monod 型で示され、最大増殖速度は 0.59 hr^{-1} 、飽和定数は 1.82 g/l であることが判明した。一方 *F. breve* は澱粉を 60% 程度しか資化せず連続培養では 0.3 hr^{-1} の稀釈速度で wash out した。

B) *F. breve* と *F. ferrugineum* の混合培養と両菌の関係

操作容量 1 l の小型醸酵槽の稀釈速度を変更しつつ行った連続混合培養の実験結果を図1に示した。即ち稀釈速度 0.12 hr^{-1} を境に *F. breve* と *F. ferrugineum* のポピュレーションが反転し、特に反転直後の *F. ferrugineum* の菌体量は急激に増加し、膨化と類似の現象が再現された。沈降性も当然低下した。なお *F. breve* は

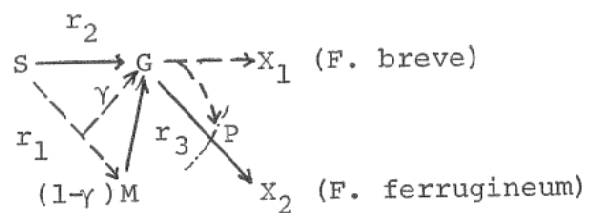


第1図 凝集性細菌と糸状細菌の混合培養

稀釈速度 0.45 hr^{-1} で wash out した。これは純粋培養時の wash out が 0.3 hr^{-1} で起きることと比較すれば、*F. ferrugineum* による澱粉分解物の一部を *F. breve* が利用していると考えられる。次に *F. breve* の回分培養の培養濾液を適当に稀釈し、培地成分を添加した培地で *F. ferrugineum* の培養を検討した結果、*F. breve* は *F. ferrugineum* の増殖阻害物質を生産していることが明白となった。阻害物質の生成速度は *F. breve* の増殖速度に比例することも判明した。

C) 混合培養系の数学モデルとシミュレーション

上記の培養諸特性を考慮すると第2図に示すとき混合培養系のモデルが誘導できる。ここで S は澱粉、G はブドウ糖、M は澱粉の一部分



第2図 混合培養モデル

解物、 r_1 、 r_2 、 r_3 はそれぞれ分解速度、 r は *F. breve* の澱粉分解速度に対するブドウ糖生成速度の比率である。実線は *F. ferrugineum*、破線は *F. breve* のそれぞれ基質分解経路、増殖経路を示している。また P は *F. breve* が生産する *F. ferrugineum* の増殖阻害物質である。次に S、M、G、ならびに P に対する物質収支式と、Michaelis-Menten 型の基質分解速度式さらに Monod 型の増殖速度式から連立する数学モデルを誘導し、計算機によって図1に示すとき混合培養系のシミュレーションに成功した。従ってこの数学モデルを用い数値解析によって混合培養系の安定性を検討し得る段階である。しかしこのモデルは非線形連立方程式であるので解析解を得ることは困難と考えている。

D) *F. breve* と *Sphaerotilus natans* の混合培養

従来から実際の処理槽で発生する膨化時に優

勢菌となるとされている *Sphaerotilus natans* 52株と凝集性細菌 *F.breve* の混合培養も検討している。*S.natans* は澱粉を制限基質とする場合、最大比増殖速度は 0.42 hr^{-1} 、飽和定数は 1.33 g/l であり、一方 *F.breve* の見掛けのこれらの値は 0.17 hr^{-1} 、 17 mg/l であるので、澱粉を基質とする混合培養では両菌が共棲する定常状態を得ることはできなかった。しかし流入基質として澱粉と *S.natans* が資化し得ないガラクトースを併用した混合培養実験では稀釈速度 0.12 hr^{-1} 以上で *F.breve* が減少し、糸状性細菌 *S.natans* が急激に優勢とな

り、膨化と類似の現象をこの系においても観察し得た。なおこの系では阻害物または増殖高揚物質の生産は両菌について観察されなかった。現在数学モデルの誘導とシミュレーションを検討中である。

廃水における膨化現象の多様性を考えると、その発生機構の一義的な解明は困難としても、上記のごとき混合培養の系統的な研究の積み重ねによってのみ複雑とされている処理プロセスの制御法の確立が期待できるとともに、その他の混合培養利用プロセスに対して適用し得る知見が与えられると信ずる。