

Simple is best そして 攪拌速度によりpH制御する？

大阪大学名誉教授
崇城大学生物生命学部 教授
日本生物工学会 会長
塩谷 捨明

1. はじめに

今日では、人間の体内で作られる生理活性物質はもちろんのこと、新しい機能を持つ自然界には存在しなかったタンパクすら作ることができるようになってきました。しかし、工業生産に大事な「最も効率よく、満足すべき品質のもの」を作るには、このような「生産株をいかに改変し、育てていくか」と同時に「生産環境を好適に保つ」ことが必要です。この意味から、(微)生物の能力をどのように最大限に発揮させるかが問題であり、本稿ではその一・二つの例を紹介します。

我々は、古くから微生物を中心に、また最近では動物や植物細胞などの生物を利用して様々な有用物質を生産し、利用してきました。このような生物を利用したプロセスを工業化するには、生物機能を最大限に発揮させる最も経済的な方法が必要です。そのため、1) 菌株・細胞株のスクリーニング、改良、改変、育種と、2) 培養環境を好適に保つことが大切です。前者は、より良い生産株を発見、改良してゆくことであり、組み換えDNA法や細胞融合など分子育種による生産性の高い株を得ることであり、後者は、生物プロセスの設計に課せられている目標であり、生物化学工学の目指す目標の一つで、本稿で論ずる話題です。本稿では、まず最大生産を達成できる理論解が、増殖・生産期からなる二段培養に帰着されることを示し、

ついて 乳酸菌・酵母の共培養系が効率的なシステムであり、pH制御が攪拌回転数の変化で実現できることを示します。

2. 二段培養の合理性： Simple is best

2-1 最大生産量問題

与えられた操業時間内で、いかに大量の製品を生産するかは、工業生産の目標の一つです。ここでは「運転時間 t_f と初期条件が与えられたとき、得られる生産量を最大にすること」を考えます。すなわち、評価関数 J を

$$J = \{t_f \text{ における反応器中の全生産物量} - \text{生産物量の初期値}\} \quad (1)$$

と定義し、この J を最大にすることを考えます。この場合
生産物の生産速度は

$$\text{生産物生産速度} = \text{比生産速度} (\rho(\mu)) \times \text{菌体量} \quad (2)$$

と書けます。反応速度が全て菌体量に比例するのが微生物反応の特徴です。また菌体増殖速度は菌体量と比増殖速度に比例します。さて、(1) 式の J は (2) 式の定積分値になるので、これを改めて書き直せば

$$J = \int_0^{t_f} \text{比生産速度} \times \text{菌体量} dt \quad (3)$$

この積分値を考えると、比生産速度や菌体量は大きいほど有利なことがわかります。この問題を解く従来法は、比生産速度や比増殖速度を環境濃度（例えば制限基質濃度）の関数と表現し、流加速度を操作量に望ましい環境濃度（パターン）を実現するよう求めるものです。しかし、この解は、それぞれの関数を表現するため実験データから求められる多くの未知パラメータを含むことが多いです。ここで多くのパラメータを含めば含むほど最適解が本当に現実の解となるか疑問となり、信頼度が下がってきます。すなわち、モデルと実プロセスとのギャップが問題となります。

モデル化の困難性は、主に反応槽内環境濃度変化を記述しようとしたことに起因

するので、我々はまったく違った観点から最適化の実現をはかろうとしました。すなわち、培養状態を表現する状態量として比増殖速度 μ や比生産速度 ρ をとり、これらの量を被制御量や操作量などの変数と捉えていこうというのが基本的な考え方です¹⁾。結局、最適な環境濃度パターンを実現するのではなく、反応速度 μ や ρ の最適なパターンを求め、これを培地流加量変化によって実現していこうとするものです。

その後、この考え方はもっと一般化されて、我々のグループでは最大生産量問題に広く応用してきたので、少し紹介しようと思います。

2-2 二段培養

この問題の理論解は最大原理を用いて解けるが、詳細は別稿¹⁾に譲るとして、結果だけを紹介します。いま、 $\mu - \rho$ 平面において、右下がりの傾向を持つデータがあったとしましょう。このような状況にはしばしば遭遇します。例えば、菌体生産に適した条件と生産物生産に適した条件は異なるのが普通であります。すなわち、比生産速度最大を与える μ_c と、比増殖速度最大を与える μ_{max} が異なって存在する場合には (3) 式 被積分項の要素、比生産速度と 菌体濃度 を両者とも最大にする μ は存在しません。

結局、この場合の結論、理論解は、培養前半は $\mu = \mu_{max}$ 、培養後半は $\mu = \mu_c$ の二段切り替え培養が最適であることになります¹⁾。培養前半は菌体増殖が最大、すなわち増殖フェーズ、培養後半は生産速度最大、すなわち生産フェーズと名付け、最大生産の最適解は増殖フェーズ+生産フェーズの二段培養と結論づけることができます。非常に単純な答えであり、また美しい答えでもあります。「simple is best」ともいえ、正解は単純であるという、科学の法則を実感します。

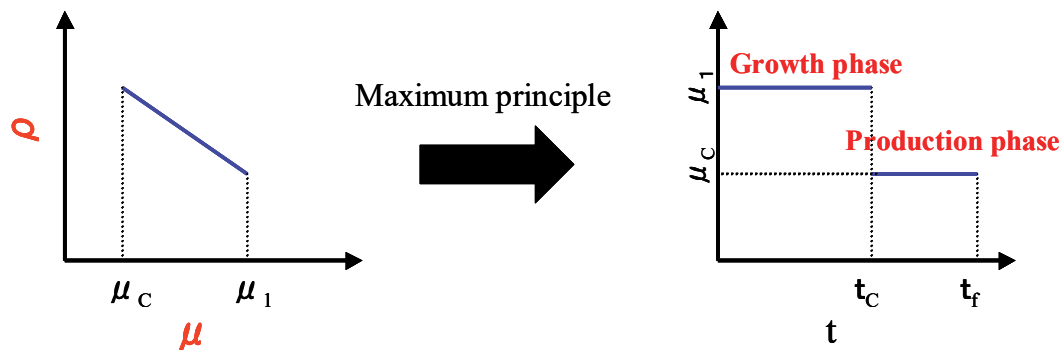


図1 最大生産は二段培養で実現される

この理論解は、 $\mu - \rho$ 平面において、上に凸な多面体のようなデータが与えられる場合にも拡張でき、一般解が求められます。このとき、多面体の端点を次々と採る操作が最適となり¹⁾、最終は $\mu = \mu_c$ で終わるのであります。また、この直線上を連続的に移動できる操作方法がなくても良いことに注意しましょう。全く種類の異なる操作で多面体の端点から端点に飛ばせられれば最適解という点では何の問題もありません。したがって、 ρ を μ の線形関数で近似するという概念はどこにも使っていないのであります。

2-3 具体例

このような最適化のアプローチは、グルタチオン発酵、ヒスチジンやリジンなどのアミノ酸発酵、生分解性ポリマーPHAs生産などに適用され、成果を上げています。また必ずしも流加培養系だけではなく、温度感受性遺伝子組み換え酵母を用いたイネ由来 α -アミラーゼ生産の回分発酵における最適温度政策の決定にも、有効に利用されています。

1.) 流加培養によるグルタチオン最大生産

以上のアプローチに基づく最適生産の例として *Saccharomyces cerevisiae* を用いたグルタチオン(GSH と略す)生産をあげましょう。GSH はアミノ酸のトリペプチドで医薬として用いられています。指数流加培養実験から比増殖速度と比グルタチオン

生産速度との関係が得られます 2)。なお、GSH は菌体内に蓄積されます。ある比増殖速度の値 μ_c を境に比生産速度が減少するのは、糖の過剰流加による Crabtree 効果によってエタノールが生成することに起因するものと考えられています。さて、この酵母の培養では、糖濃度を変化させることによって、データ点間を移動させることができるので、GSH 最大生産のためには μ を μ_{max} から μ_c へと変化させるのが最適なことは今までの議論から明らかでしょう。

2.) 遺伝子組み換え酵母によるイネ α -アミラーゼの生産

培養温度による組み替え遺伝子の発現制御を可能にした株では、培地中の無機リン酸濃度が非常に低い (P 枯渇) 状態で温度を下げることによってイネアミラーゼ遺伝子が発現され、生産されます。この系で、色々な培養温度とリン酸濃度の状態で回分培養した実験データを μ - ρ 平面にプロットしたのが、図 2 です。P の十分な存在下で温度を変えたデータ (黒丸) と P 枯渇下で温度を変えた実験データ (白丸) をプロットしています。この図から、わずかな差ではあるが、2回の切り替えが厳密に最適であることがわかります 3)。

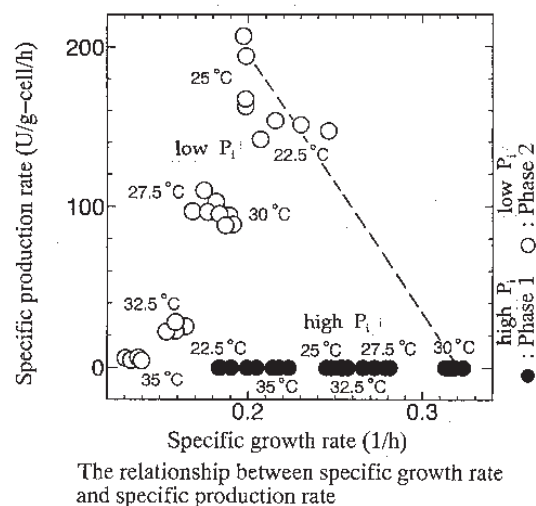


図2 比増殖速度と比生産速度の関係

3. 微生物共培養系の利用: 攪拌回転数でpH制御?

我々が古くから発酵食品として利用してきた系では、乳酸菌と酵母の組み合わせは普遍的に見られるものです。我々の研究室ではこのような組み合わせ、特に共生系に興味を持ち、改めて解析し、積極的に利用できないかと考えています。本稿では、これまでに行った乳酸菌 *Lactococcus lactis* sub. *Lactis* と酵母 *Kluyveromyces marxianus* の共培養によるナイシン生産系⁴⁾および、乳酸菌 *Lactobacillus kefiranofaciens* と酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の共培養によるケフィラン生産系⁵⁾の検討結果をまとめ、それぞれ問題点を整理しました。

3-1 共培養によるナイシン生産系

ナイシンは *Lc. lactis* が生産する代表的なバクテリオシンで、培養においての問題点は、乳酸生成およびpH低下による増殖阻害、生産阻害です。我々は、生成乳酸を資化するような微生物との共培養により、どの程度この問題点が解決可能かの検討を進め、副生する乳酸を酵母によって資化させ、ナイシン生産性の向上をはかりました。乳酸菌と酵母が正の双利共生関係にあるような系を人工的に組み上げようとするとき、まず、それぞれの微生物の糖資化性が問題になります。そこで、乳酸菌の糖源として添加するマルトースを資化しない *K. marxianus* を用いました。次に、好気か嫌気かといった培養条件が問題となります。酵母が乳酸を資化する際には酸素が必要ですが、*Lc. lactis* の場合は、好気条件下でも十分増殖でき、ナイシンを生産しました。また、このとき酢酸、アセトインを副生します。*Lc. lactis* の好気系での代謝において、酸素はNADHとNAD⁺の均衡を図るため、NADHの酸化に必要と考えられます。(図3 参照) 事実、生成乳酸・酢酸量もしくはアセトイン・二酸化炭素量、消費マルトース・酸素量から計算したNADHとNAD⁺の量は釣り合っていることが証明されました。

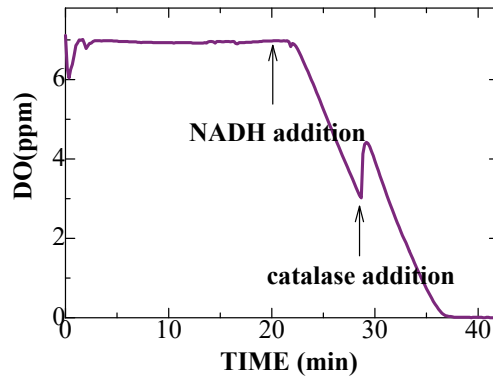


図3 NADHオキシダーゼの存在

この系において、pHを制御するには乳酸菌による乳酸生産を、酵母により資化するその資化速度を制御すれば良いのです。図4には酵母の培養における溶存酸素（DO）濃度と乳酸資化速度の関係を示します。この図からDO濃度を操作することにより乳酸資化速度をある範囲の中で制御できることがわかります。乳酸資化速度を制御できれば、乳酸濃度を制御できることもわかります。

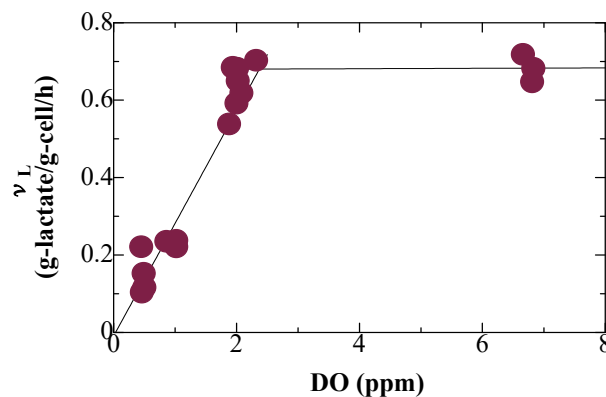


図4 DO濃度と乳酸取り込み速度との関係

図5にこの考え方によるpHのカスケード制御系の構成図を示します。pH制御はDO目標値設定変更を介して行うことができ、DO制御はジャーフェンターの攪拌回転数操作によって実現できます。すなわち、動作だけに着目すれば、「攪拌速度によってpH制御が出来ている」こととなります。「風が吹けば桶屋が儲かる....」ような話に聞こえれば、なんで？ と興味も湧いてくるでしょう。

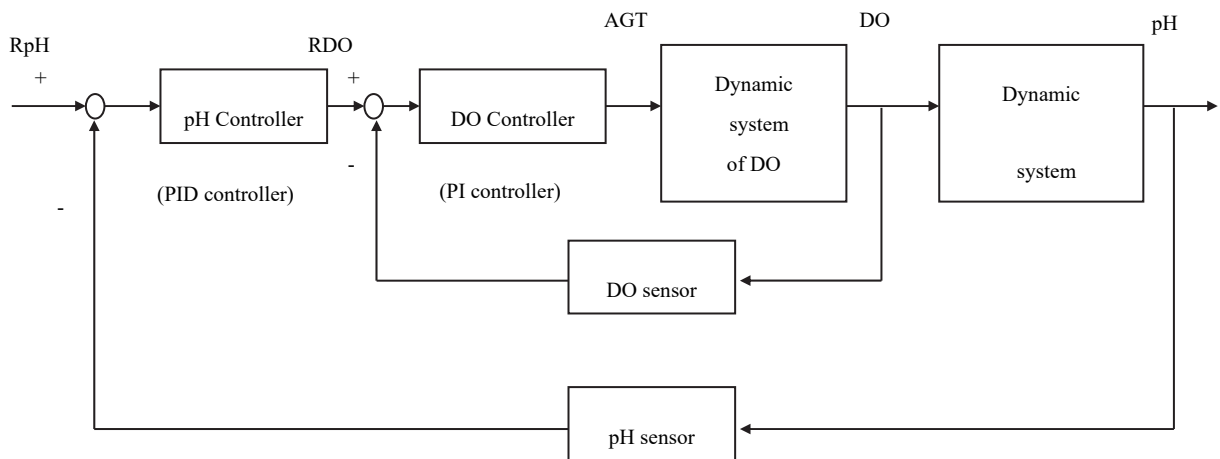


図5 カスケードpH制御

さて図6 に示すように、共培養によって乳酸濃度は低く保たれ、培養後半のナイシン生産性の低下が改善されました。しかし、更なる生産性向上の道はないか、検討の余地は残っています。

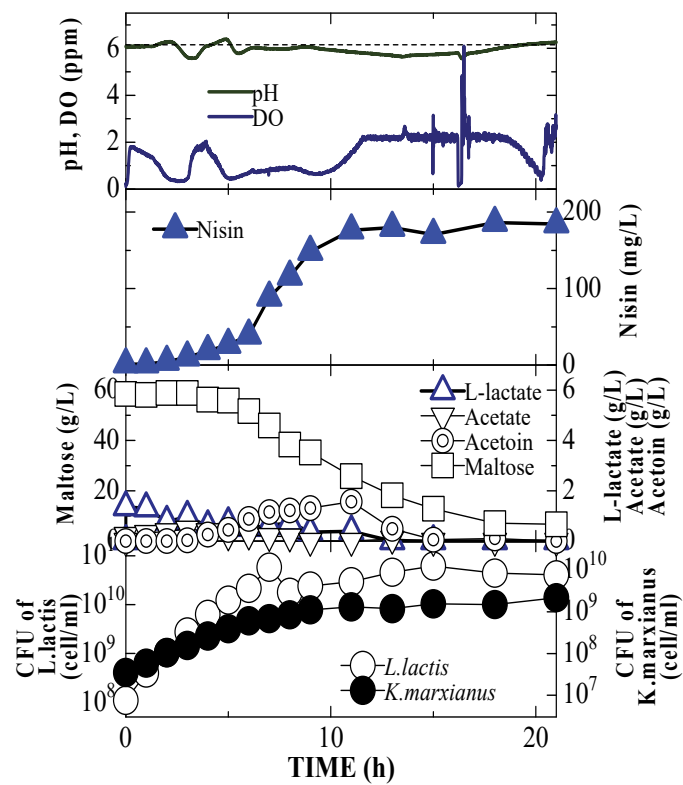


図6 ナイシン生産系におけるpH制御

3-2 共培養によるケフィラン生産系

乳酸菌 *Lb. kefiranofaciens* が生産する天然多糖ケフィランには薬理作用があり、保湿剤、増粘剤として化粧品に用いられるため、工業的に生産されています。ケフィランを生産する乳酸菌は、自然界でケフィール粒内に他の乳酸菌、酢酸菌、酵母などと共存しています。そこで、乳酸菌の増殖およびケフィラン生産を阻害する乳酸を、酵母との共培養によって除去し、ケフィラン生産性の向上を試みました。また、共培養におけるケフィラン生産菌と酵母間の相互作用解明のための様々な検討を行ったところ、この系では、乳酸除去以外の効果のあることが判明しました。すなわち酵母と乳酸菌がそれぞれの表層にある多糖マンナンやタンパク質と接着し影響し合っていることが、示唆されています。

参考文献

- 1) 塩谷捨明：計測と制御, **34**, 11-17 (1995)
- 2) Shimizu, H. *et al.*, *Biotechnol. & Bioeng.*, **38**, 196-205 (1991)
- 3) Uchiyama, K. *et al.*, *Biotechnol. Progress*, **11**, 510-517 (1995)
- 4) Shimizu, H. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3134-3141. (1999)
- 5) Cheirsilp, B. *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 279-284. (2003)