

特別講演抄録

＝新しいバイオリアクターについて＝

On A New Bioreactor



講師 理化学研究所 化学工学研究室
主任研究員
遠藤 勲
Dr. I. Endo Head of Chemical
Engineering Laboratory,
Institute of Physical and
Chemical Research
抄録 技術開発本部
小林 哲男
Tetsuo Kobayashi

This is a summary of the special invitation lecture presented by Dr. I. ENDO, the head of chemical engineering laboratory, the Institute of Physical and Chemical Research. In his lecture, he emphasized as follows: The role of chemical engineers becomes more and more significant in the field of biotechnology. Because they can not only design a new bioreactor and establish a bioprocess operation but also evaluate the whole bioprocesses from the up-stream to the downstream taking into account of economics. Specially he introduced his idea of developing a new bioreactor, fluidized bed of bioreactor, for the effective cultivation of fungi or that of mycelia, which are thought to be beyond the technology so far.

1986年4月1日、(株)神戸製鋼所本社特別応接室にて、約50名の技術担当者各位の参加のもとに、特別講演会を技術開発本部の主催で行った。

本講演会において、バイオテクノロジー分野に最も力を注がれ、ご活躍中の理化学研究所 化学工学研究室 遠藤勲主任研究員をお招きし、首記演題にてご講演頂いた。本稿は、このご講演内容の要旨をまとめた。

1. バイオテクノロジーの概論

バイオテクノロジーは、小量多品種で高付加価値のある製品を生み出すということで、現在、特に医療、医薬品の分野で注目されている。第1図はバイオプロダクト量に対する製品価格を示すものである。人成長ホルモン、インシュリンといったニューバイオテクノロジーの産物は少量でも高価であるが、かつては高付加価値製品であったペニシリンは、バイオテクノロジーの発展とともに、アルコール、クエン酸といったコモディティケミカル製品と同様に、安価となってきていることを示している。このようにバイオテクノロジーの発展は、より高付加価値の製品を創生しつつ、その一方で既存の産物の生産ラインを確立し、市場価格を安価な方向に向けている。そのような流れの中で、どのような装置が設計されなければならないか、また操作が考えられなければならないかを研究することは、本質的な課題となっており、われわれ化学工学者の果すべき役割は極めて大きい。

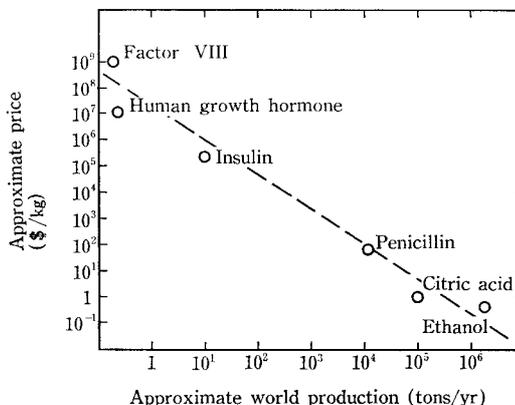
さて、バイオテクノロジーとは「生物、あるいはその構成要素、さらにそれを修飾したもの、およびそれらの機能を利用する技術である」¹⁾といわれている。この概念を簡単な図で説明しようとするれば、第2図を得る²⁾。図の左端がインプットである原料・エネルギー・情報である。右端はアウトプットで、バイオテクノロジーによって創出されるバイオプロダクトであり、他の学際領域へのインパクト

も表示してある。

バイオテクノロジーが利用する生物、その構成要素である酵素や生体膜、あるいはそれらを修飾した人工細胞や人工酵素などを(○)で囲って示している。一方、バイオテクノロジーの要素技術は(□)で示している。この要素技術は

- 1) 生物機能の改質技術(遺伝子組み換え, 細胞融合など)
- 2) スクリーニング技術
- 3) 生物機能の発現・増幅技術(大量培養, 育種, 育苗など)
- 4) 分離・精製技術
- 5) 固定化技術
- 6) バイオリアクター技術
- 7) バイオプロセスの評価技術(計測と制御)などがある。

ここで図の矢印で示したように、インプットからアウト



第1図 バイオプロダクトの生産量と価格
Fig. 1 Price versus production volume for some biotechnical products

プットへ物やエネルギー、情報が移動していくと考えれば、要素技術は生産工程における要素プロセスに置きかえて考えることができる。要素プロセスの集合をバイオプロセスという。

新しい製品（生化学物質）が開発され、生産に移されて市場に出されるまでには、多くの要素プロセスを経て行く必要がある。それゆえ組み合わせDNA技術や細胞融合技術といった、生物機能の改質技術の革新と同時に、バイオプロセス・エンジニアリングの開発が大切である。

ここでは、特に生産に直接かかわるバイオリアクター（広義には大量培養装置などを含む）、分離・精製技術を中心として化学工学的見地より話を進め、次に理化学研究所での研究内容の一端を紹介することにする。

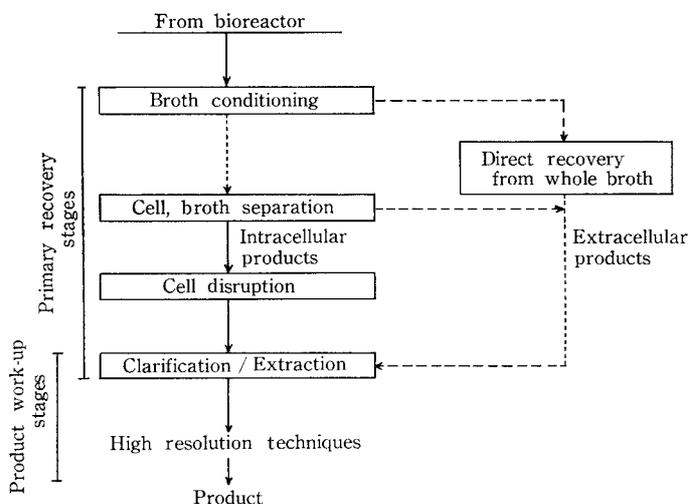
2. 分離・精製

バイオプロダクトを生み出すプロセスに欠かせないのが、ダウンストリームプロセス（またはリカバリプロセス）である。その意味で現在最も話題をさらっている。このプロセスの一例を第3図に示す。バイオリアクターで生産されてきた少量の生成物を、培地や菌体などからいかに効率よく分離（または菌体破砕後に分離）し、精製、抽出して目的生成物を回収するかが、このプロセスの課題である。第1表にこの有用生成物を回収する個々の技術を示す。表に示すように種々の方法があるが、それぞれの生化学物質に対して最も効率の高い方法を選択し、また組み合わせていくかが重要であり、技術開発の課題となっている。バイオインダストリーにおける分離・精製技術とは、大量の水処理をどのように考えるかということである。そのように考えるならば、この分離・精製プロセス以前のプロセスにおいて、すなわち生物機能の発現・増幅技術や生体触媒の固定化技術、バイオリアクター技術の各プロセスに

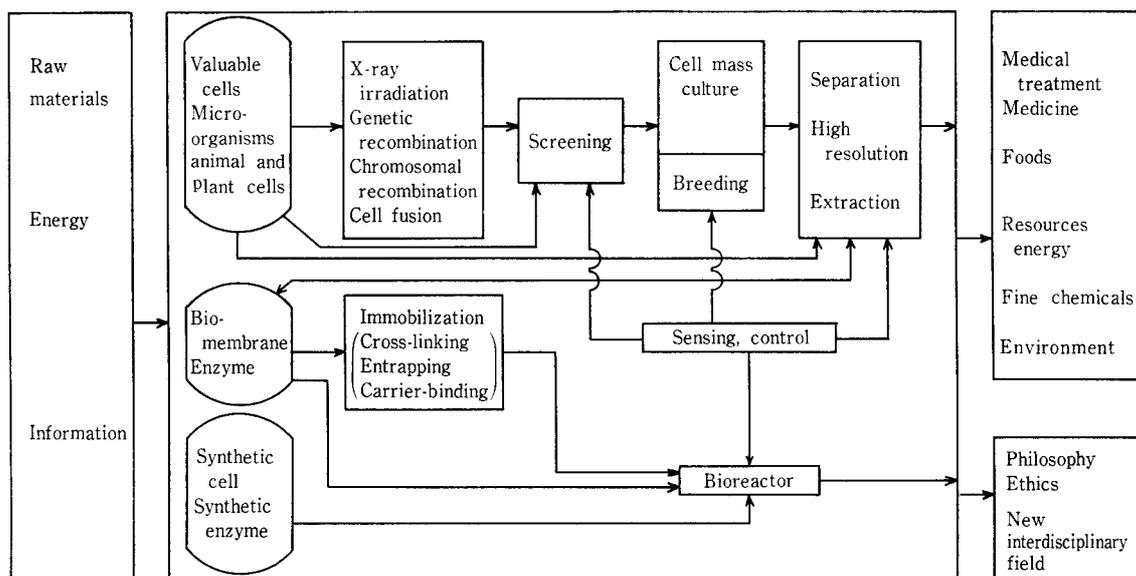
おいて、生産物を少しでも分離・濃縮し、ダウンストリームプロセスを支援することは工学的に極めて意義がある。すなわち、分離・精製技術を支援する意味で、生物機能を高め、生物反応と分離を同時に行えるバイオリアクターを開発して行くことは、重要であると私は考える。このような要素技術の開発こそ、化学工学に従事する者が中心となつてすべき課題といえないであろうか。

3. バイオリクター技術

ここで改めて言うまでもないが、バイオリアクターとは、酵素、微生物、動植物組織細胞などの生体触媒を何らかの手段で固定化し、それらを浮遊または充填して生物変換を行う装置である。広義には、従来からの発酵装置、あるいは大量培養装置もバイオリアクターと言える。第4図は、種々の生体触媒とバイオリアクターの操作方法に関する



第3図 ダウンストリームプロセスの分類
Fig. 3 Classification of downstream processing



第2図 バイオテクノロジーの概念
Fig. 2 Conceptual diagram of biotechnology

第 1 表 生化学物質の回収法

Table 1 Recovery methods of biochemical products

Equilibrium separation	Formation of different phase from homogeneous phase	Liquid-Solid	Crystallization (optical resolution) Salting out Organic solvent precipitation, Isoelectric point precipitation
	Contact, equilibrium of multiphase	Liquid-Liquid Liquid-Solid	Extraction, Partition Adsorption Ultra critical gas extraction
Velocity gradient separation	Centrifugal force	Liquid, Solid	Ultra centrifugal separation Density gradient centrifugal separation
	Electric force Electric force+biological affinity	Liquid	Electrophoresis Cell sorter
	Concentration difference	Liquid	Countercurrent distribution
Interruption	Concentration gradient Pressure gradient Electric force		Gel chromatography, Dialysis Reverse osmosis, Ultrafiltration Ion exchange chromatography, Gel electrophoresis, Electric dialysis
	Electric force+concentration (pH)		Ion exchange chromatography gradient elution Disk gel electrophoresis, Chromatofocussing Gel isoelectric point electrophoresis Isokinetic electrophoresis Immuno-electrophoresis
	Hydrophobic force		Hydrophobic chromatography Affinity chromatography, Affinity elution Immune affinity chromatography

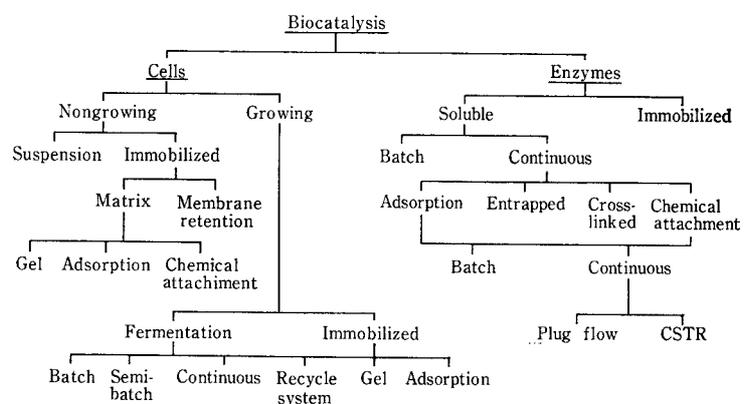
る選択肢を示したものである³⁾。図に示されるように取り扱う生体触媒の種類(酵素あるいは、微生物、それともバクテリアや酵母か、カビや放線菌なのか、動植物組織細胞か)や形態(固定化されたものか、そうでないか)によってバイオリアクターの操作方法(回分, 半回分, 連続)や, リアクターの型式を選択する必要がある。

バイオリアクターの代表的な型式としては、
1) 通気攪拌型 2) エアーリフト型 3) 流動層型 4) 固定層型 5) 管型などが知られている。生体触媒の固定化法の代表的なものとしては、
1) 担体結合法 (共有結合法, 物理吸着法, イオン結合法, 生化学的特異結合法)
2) 架橋法
3) 包括法 (格子型, マイクロカプセル型など)

4) 複合法 (1) から 3) の複数の結合固定化法) などの 4 つの方法が知られている。この固定化法の重要なことは、生体触媒を長期的・安定的に使用可能とし、かつ、生体触媒の機能を阻害 (固定化調整時の酵素の失活など) させないようにそれぞれの生体触媒の種類、および用いるバイオリアクターの型式に対応させて選択しなければならないことである。

このようにバイオリアクターの設計、スケールアップも含めて、操作上いろいろと検討しなければならない制約条件、工学的に解析を必要とする事柄は多い。

いま、物質移動過程に着目して考えて見る。第 5 図は、一般に知られている好気発酵を例にとった場合の物質移動



第 4 図 生体触媒とバイオリアクターの操作方法に関する選択肢
Fig. 4 Decision tree for selecting biocatalysts and bioreactor operation mode

過程の模式図である⁴⁾。図に示すように、微生物培養系は、気・液・固 3 異相反応系である。酸素、基質および生成物の移動過程を気相から液相、液相から固相(微生物)そして固相から液相へと、細かく分けると 7 つの過程が存在する。バイオリアクターを設計、操作するためには、これらの過程を正しく定量的に把握しなければならない。生体触媒を固定化すれば、さらに物質移動過程は複雑となる。例えば固定化担体材料における物質移動抵抗、固定化解媒の形状、反応速度と物質移動抵抗との関係などである。

このような物質移動過程で重要な物理的制約条件の一つに粘度がある。発酵生産における培地中の粘度が種々のプ

プロセスにおよぼす因果関係を第6図に示す⁵⁾。図より明らかなように、粘度が物質移動過程、微生物による変換過程(発酵生産過程)、生産物の分離・精製・回収過程にどのように影響をおよぼすか、また、その効果によって反応プロセスや分離・精製プロセスが設計されるかという因果関係を正しく定量的に把握することは重要である。発酵培養過程中の粘度の変化、すなわち増殖過程で微生物の形状やフロック形成(増殖形態)の度合が変化し、増殖と同時に生産される、多糖類や生産物による培養液中のpHの変化も粘度に影響を与える。カビや放線菌の場合事態はもっと複雑である。菌糸が絡み合ってパルピー状になる場合(顕微的な非ニュートン流動を示す)と、ペレット状になる場合(ニュートン流動を示す)とがある。前述したように、パルピー増殖をした場合には、生産物を培養液から分離することは極めて困難となり、物質移動過程の観点からみても悪くなる。

繰り返して述べることになるが、バイオプロセスを設計していく場合、種々の生体触媒の反応過程を重視すると共に、増殖形態を考慮した培養方法あるいは固定化方法を検討する必要がある。その一つの帰結として、生産物と培養液を容易に分離できる分離型バイオリアクターが今後益々開発されなければならない。

次に、私共の研究室で実施している研究の一端を紹介することとする。本研究は従来の培養技術の問題点を解決していく方向で設定されたものである。

4. 発泡体を用いた新しい培養法

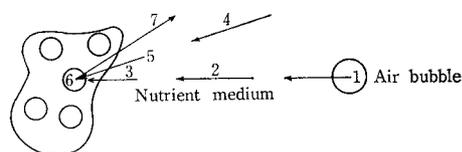
カビを深部培養すると2種類の増殖パターンが観察できる。ペレット増殖と呼ばれ、菌糸が絡み合って球体(ペレット)を形成する場合と、他の一つは、菌糸が一様に絡み合って、パルピー状ないしは糊のように増殖し、培養液の粘度が著しく高くなる増殖形態がある。この2つの増殖形態は、微生物の種類にもよるが、バイオプロセス上では植菌量や培地組成、培養途中のpHの変化などによって何時でも現れる分岐現象である。第7図は実験に用いたカビ(ペニシリン生産菌: *Penicillium chrysogenum*, JCM 2056)の孢子植菌濃度(X_0)を変化させた場合の深部培養時の増殖形態およびペニシリンの生産収量の比(発泡体添加時の基本培地における生産収量を1とした収量比)、とペレット径(dp)を示したものである。このように、培養液に植菌する孢子数の少しの違いで増殖形態が異なり、ペレット径も異なる。その結果としてペニシリンの生産収量に大きく影響してくることがわかる。ペレット増殖すると栄養物質や酸素がペレット内部まで充分供給されず、発酵生産に影響がでる。このためペレット径を数mmと小さくなるようコントロールする必要がある。一方、パルピー状に増殖すると液混合が悪くなり、栄養物質や溶存酸素濃度が不均一となり易く、発酵生産に影響をおよぼす。さらに、液の攪拌所要動力が高くなり、かつまたpHや各種センサー表面が菌糸によって被覆されてしまう恐れがある。目的生産物の培養液との分離も著しく困難となる。

このように、酸素や栄養物質の移動過程がカビなどを用いたバイオプロセスでは重要なポイントとなる。

そこで、私共はウレタンフォームのような発泡体に生物膜を形成させることを考えた。すなわち、ペレットやパルピー増殖とは違った増殖形態のもとに、発酵生産反応を促進させて生産収量を高めることと、生産物と菌体を分離することを同時に一つの培養装置で行わせるという新しいカビ類の培養技術について検討することである。

4.1 カビの増殖形態およびペニシリン収量におよぼす効果

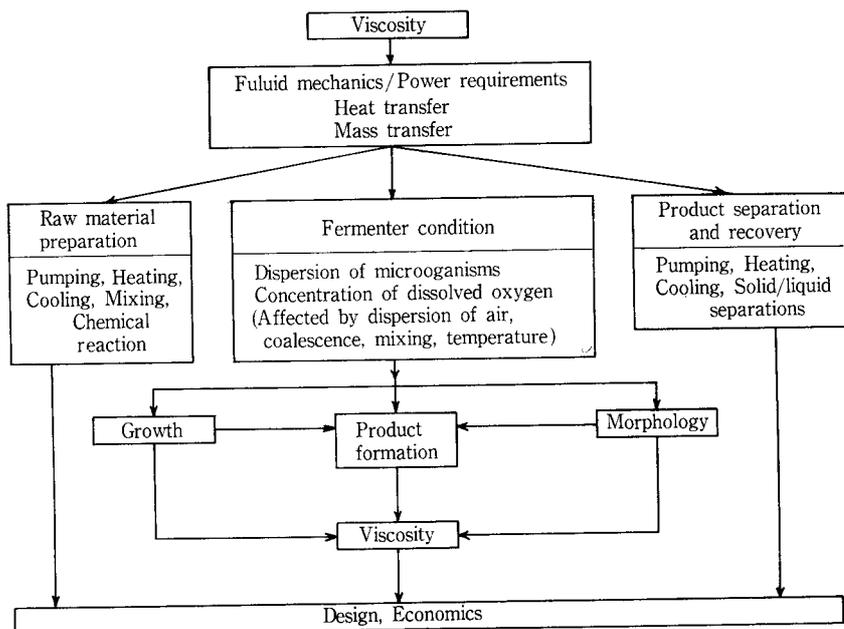
ペニシリン収量におよぼす発泡体の添加効果をみるため



- 1 Oxygen absorbed by aqueous phase
- 2 Oxygen transferred through the aqueous phase
- 3 Oxygen absorbed by and transferred through intercellular gel to reaction zone
- 4 Organic substrate transferred through aqueous phase
- 5 Organic substrate absorbed by and transferred through intercellular gel to reaction zone
- 6 Microbial reaction zone
- 7 Products transferred from reaction site into aqueous phase

第5図 好気発酵槽内の物質移動過程

Fig. 5 Transport processes in aerobic fermentation

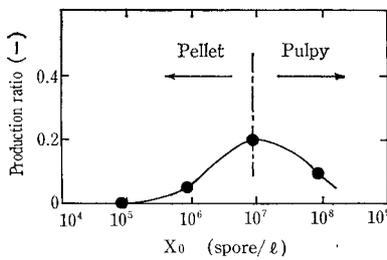
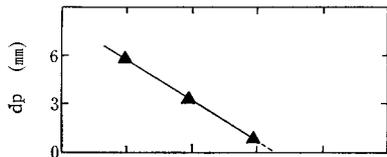


第6図 各プロセスにおよぼす粘度の因果関係

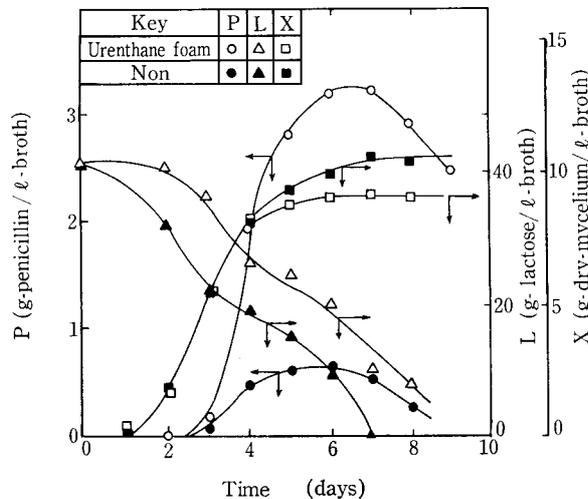
Fig. 6 Schematic representation of the effect of viscosity on various processing steps

に、ウレタンフォームを添加した場合と、添加しない場合について回分培養を行い比較した。その結果を第8図に示す。発泡体添加系では培養液中には菌糸は見られず、発泡体の表層に様な生物膜が形成され、無添加系ではペレット増殖をすることが観察できた。ペニシリンの収量は添加系では無添加系に比較して、5~6倍に増大することも確認できた。これは、発泡体表層に生物膜として増殖させた場合、前節で述べた2種類の増殖形態と異なり、基質や酸素の物質移動過程が改善された結果であると考えられる。これを溶存酸素濃度レベルで、この3種類の増殖形態を比較すれば第9図となる。図に示したように、バルブー増殖では液中への酸素の移動量が少く、溶存酸素濃度は0に近くなることが予想され、ペレット増殖では、ペレット表層までは溶存酸素濃度は到達するが、内部までは十分に酸素が移動しないと考えられる。一方、発泡体に付着させた場合、発泡体表層の生物膜の厚みは、後述するように0.4~0.5 mmの範囲(培養終了時に発泡体を薄く切り、断面の顕微鏡写真より厚さを測定)と薄く、酸素は十分発泡体内部まで到達すると考えることができる。

次に、発泡体を添加した培養系では、どのような因子が作用して、ペニシリン収量が増大するのか、また、培養液中に菌糸を存在させることなく、発泡体表層に生物膜を形成させるのかを検討した。すなわち、次のような検討項目をシェーカー・フラスコ実験および気泡塔型流動培養装置



第7図 ペニシリン収量比、ペレット径と孢子植菌濃度
Fig. 7 Penicillin production ratio, diameter of pellet and concentration of spore inoculation



第8図 回分培養結果
Fig. 8 Result of batch culture

を用いた実験で検討した^{6),7),8)}。

- 1) 発泡体の材質
- 2) 発泡体の大きさ, 発泡体の仕込み濃度
- 3) 孢子植菌濃度
- 4) 培養条件(pH, 温度, 培地組成(基本培地は第2表))
- 5) 空塔速度(線速度), 塔径, 塔高
- 6) 通気中の酸素分圧
- 7) 消泡剤の添加量

以上枚挙した項目のうち、主要な項目についての実験結果を以下に紹介する。

4.2 シェーカー・フラスコによる予備実験

4.2.1 発泡体の材質

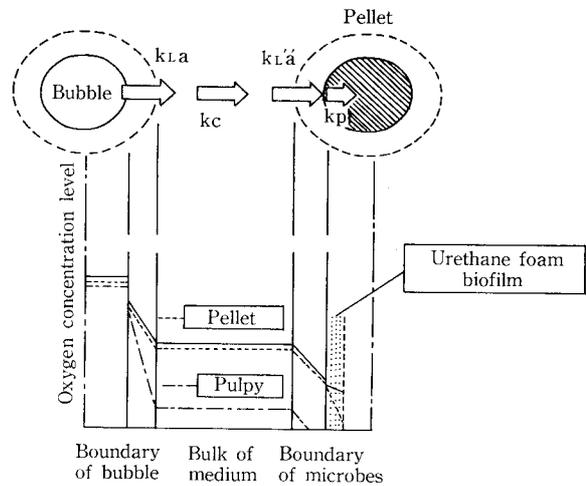
付着担体として、菌体の付着性とか、付着形態が重要となるが、ここでは、第10図に示すような人工土壌用に開発された特殊なウレタンフォームを使用することとした。

4.2.2 発泡体の大きさ, 発泡体の仕込み濃度の影響

発泡体の大きさとして、1辺の長さ(l_0)が2.5~10 mmとした立方体に切断加工して、それぞれの大きさの影響をみた。大きさは、発泡体の表面積を規定することになる。第11図は添加発泡体の表面積に対して、発泡体表層に増殖した菌糸(付着菌体濃度: X_c)が、全て生物膜として付着する必要面積を示したものである。発泡体の大きさにかかわらず、比表面積(A)が3000 cm²/ℓ以上あれば、培養液中で菌糸(浮遊菌体濃度: X_L)が増殖しないことがわかった。

4.2.3 孢子植菌濃度の影響

第12図に孢子植菌濃度に対するペニシリン収量および付着膜厚(l_f)を示す。発泡体を添加すれば、幅広い孢子植



第9図 溶存酸素濃度の移動過程の模式図
Fig. 9 Schematic transport process of dissolved oxygen concentration

Lactose	40g
Corn-steep-liquor	20g
Na ₂ NO ₃	3g
KH ₂ PO ₄	0.5g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25g
Distilled water	1.0ℓ
Initial pH	3.9[—]

第2表
基本培地組成
Table 2
Composition of culture medium

菌濃度に対しても、ペニシリン醗酵生産できることがわかり、増殖形態の違いによる効果が出ている。

また、生物膜厚さが0.4~0.5 mmの範囲で、ペニシリン収量が高くなることがわかった。なおこの実験結果は、培養条件の検討結果を踏まえて、最大ペニシリン収量が得られる培地組成で実施したものである。その結果、前述した第8図に示したより2.5倍程増大し、無添加系より15倍程度高くペニシリンが得られた。

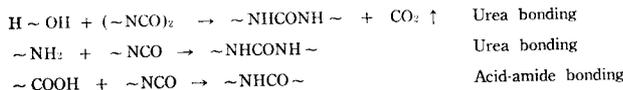
そこで、発泡体添加効果を酸素の総括物質移動容量係数 k_{La} に着目して整理すると第13図となる。この図は発泡体添加重量(W)、大きさ(ℓ_0)、比重(ρ_0)から比表面積(A)、発泡体容積(v)が、それぞれ k_{La} におよぼす効果($\alpha(v)$)、菌体を漏出させない効果($\beta(X_L)$)で表示される $k_{La}(v, X_L)$ を導入するチャートを示すものである。これより得られた $k_{La}(v, X_L)$ に対するペニシリン収量との相関を示したのが第14図である。図に示すように、 $k_{La}(v, X_L)$ が $100 \text{ (hr}^{-1}\text{)}$ 以上になると、発泡体を添加することによって物質移動過程が律速とならないように培養できることがわかった。

4.3 流動層による実験

培養液量が0.8ℓ, 8ℓ, 150ℓの3種類の流動層を用い(うち、150ℓ容量の装置は、アクリル円筒製)、前述したシェーカー・フラスコで得られた知見を、工業規模に近い形状の装置で検討した。第15図に実験装置のフローシートを示す。すでに述べたように発泡体の大きさ、添加量、およびカビの付着による発泡体の比重の変化、菌体の漏出効果、さらに、消泡剤添加量に対する k_{La} の影響などを検討している。この流動培養装置において重要なことは、発泡体が培養液中で十分に流動混合するかである。その結果の

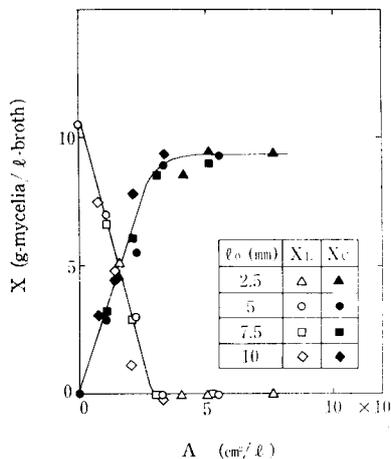
PM urethane foam For artificial soil (made by Nitto Electrical Industrial Co., Ltd.)

Peptide aqueous solution + Isocyanate compound
Solubilizing collagen TDI (Toluenediisocyanate compound)
Geratin
Albumin



第10図 PMウレタンフォームの構造

Fig. 10 Structure of the PM urethane foam



第11図 菌体濃度と発泡体比表面積

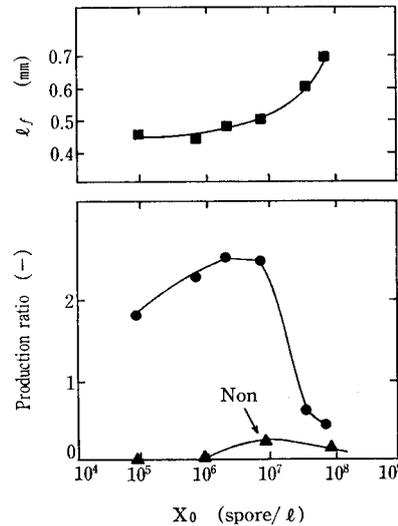
Fig. 11 Mycelium mass concentration and specific surface area of urethane foams

一例を第16図に示す。図に示すように、発泡体を用いた流動培養装置では、物質移動が最も効果的に作用する攪乱・液循環流動領域で操作することが必要で、空塔速度(U_G)が3~5(cm/sec)、発泡体添加容積比(ϵ_{bp})が0.35~0.45(一)の範囲で、前述の第14図で示したシェーカー・フラスコ実験で得られるのと同様にペニシリン収量が得られることがわかった。

現在、回分反応操作で実験を行っているが、今後、連続操作にもっていきたいと考えている。また、より大きな工業規模でも応用し得る装置の開発研究もすすめている。

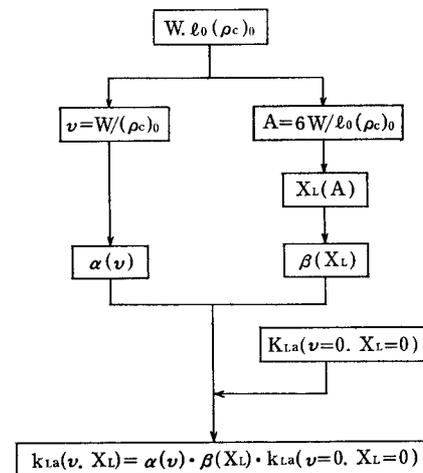
以上のように、発泡体を用いた培養法では、物質移動過程を従来の培養法に比較して向上させることとなり、結果として、目的生産物の収量を大幅に増大させることができ、かつ、目的生産物を菌体と容易に分離して得ることが可能であることがわかった。

再掲することになるが、この新しい技術と従来技術との比較および期待される成果を整理したものを右に示す。最後に、本技術が、カビ類以外の培養にも、また、廃水処理技術にも応用されていくことを期待している。



第12図 ペニシリン収量比、生物膜厚さと孢子植菌濃度

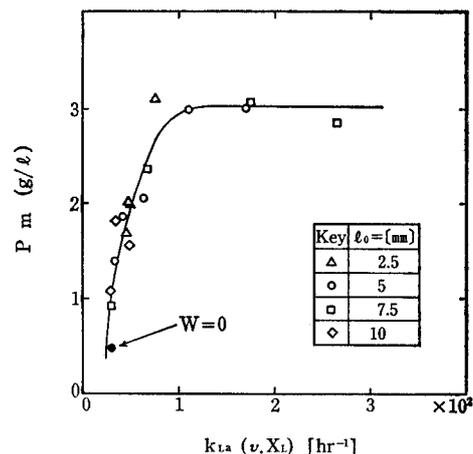
Fig. 12 Penicillin production ratio, thickness of biofilm and concentration of spore inoculation



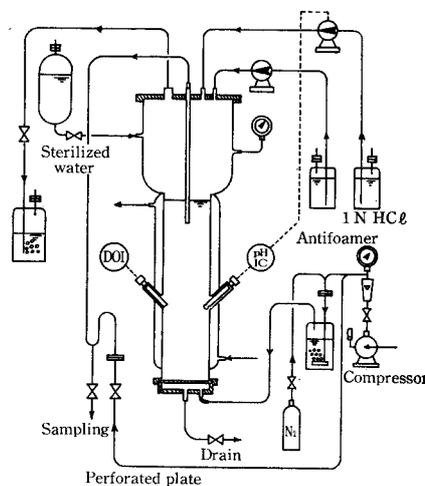
第13図 $k_{La}(v, X_L)$ のフローチャート

Fig. 13 Flow chart of $k_{La}(v, X_L)$

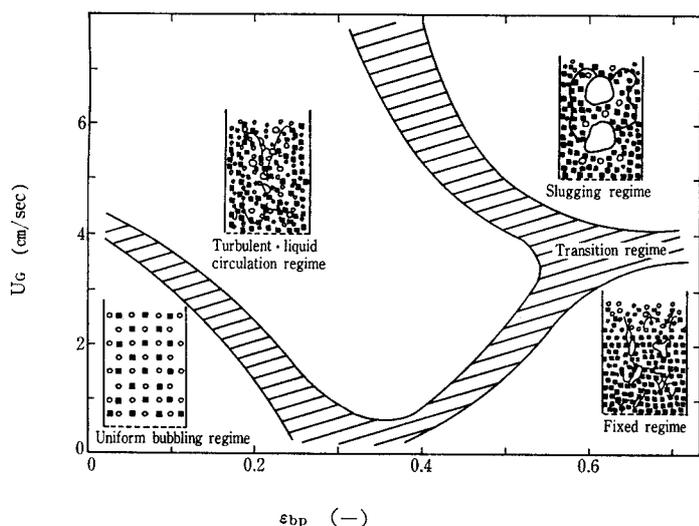
	従来技術	新しい技術	期待される成果
発酵プロセス	1) 粘度が増し、液の混合状態が悪い。 2) 有用物質生産に必要な酸素の供給が悪い。	1) 微生物が発泡体さい片、内部および表面に付着して増殖するため、左記のことは弊害が起こらない。 2) 微生物に栄養分、酸素が十分いきわたるため、発酵生産時間が従来法に比較して20~30%短縮される。	オペレーションコストが大幅に節約できる。
分離プロセス	培養液中の有用生産物と微生物とを分離するために多大な労力を要するか、多量のろ過助剤を要する。	1) 発泡体さい片だけを取り除けば良いため、有用物質の分離が極めて容易である。 2) 培養装置の洗浄も容易。 3) 分離された発泡体さい片は、また培養に使える。	1) 発酵プロセスとクルードな生産物の分離プロセスとを同一装置内で行える。 2) 設備費が大幅に軽減される。
計測と制御	1) 培養液が良く混合されないため、正しい計測ができない。したがって制御もままならない。 2) 計測用センサー表面を著しく汚すか、ときには微生物が被覆してしまうため、計測できなくなる。	発泡体さい片以外の液はさらさらしているため、計測用センサーは汚されることはない。逆に、さい片によって常にセンサー表面は洗われている。	発酵過程を正しく計測、制御できる。
装置	通気攪拌が主である。	通気攪拌以外に、流動層、気泡塔、充填塔など種々考えられる。	装置の型式が多様化される。
微生物探索技術	これまでの抗生物質二次代謝物質生産菌は深部培養用が主としてスクリーニングされてきた。	発泡体に付着しやすい菌であれば何でも良い。	有用な二次代謝物質が多量に生産される。



第14図 ペニシリン収量と $k_{La}(v, X_L)$
Fig. 14 Amount of penicillin production and $k_{La}(v, X_L)$



第15図 フローシート
Fig. 15 Flow sheet



第16図 発泡体流動様式、 U_G と ϵ_{bp} の関係
Fig. 16 Patterns of fluidized urethane foams, relationship of air superficial velocity and volume fraction of bulk urethane foams

【参考文献】

- 1) 福井三郎：“バイオテクノロジーの新展開”，化学同人(1984)，p.1.
- 2) 遠藤勲ほか：“最近の化学工学37 バイオテクノロジー”化学工学協会編，学会出版センター(1985)，p.2.
- 3) C. L. Cooney：Science, Vol. 219 (1983)，p. 728.
- 4) B. Atkinson：“Biochemical Reactors”，Pion Ltd., London (1974)，p. 46.
- 5) B. Atkinson et al.：“Biochem. Eng. and Biotechnol. Handbook”，MacMillan Pub. Ltd. (1983)，p. 672.
- 6) 加藤尚樹ほか：化学工業協会第51年会，大阪，講演要旨集 (1986)，p.379.
- 7) 西村実ほか：同上，p.380.
- 8) 小林哲男ほか：同上，p.381.