

流動層型バイオリアクター

Fluidized Bed Bioreactor with Urethane Foam

技術開発本部

小林 哲 男
Tetsuo Kobayashi

A behavior of a new fluidized bed bioreactor for effective cultivation of fungi, adhered on the urethane foam particles, has been investigated. This new culture method enabled that fungi were cultivated on urethane foam's surface with little leakage cells into the broth and oxygen transfer rate was significantly accelerated. As a result, higher productivity of penicillin was achieved by *P. chrysogenum* than by the conventional method. The 160 liters pilot plant has been installed for confirming the application to industrial fermentation.

流動層型バイオリアクターは、理化学研究所化学工学研究室と共同で研究開発された新しいバイオリアクターである。このたび、160 l の流動層型バイオリアクターを主体とする、プロトタイプのパイロットプラントを完成させた。

本稿では、流動層型バイオリアクターの概要説明、および、パイロットプラントの紹介を行う。

まえがき

バイオリアクターは、微生物、動・植物細胞、あるいはそれらの細胞から単離した酵素などの種々の生体触媒を用いて、原料を目的生産物質に変換させる反応器である。

このような生物変換をつかさどるバイオリアクターは、近年、生体触媒機能を効率良く発揮させ、生産性の向上、操作の安定性が求められ、さらに目的生産物質と生体触媒の分離機能を付加することが要求されてきている。すなわち、高分子、セラミックス、金属またはそれらの複合材料を素材として成形した膜、発泡体、多孔質管など多孔質材料を装置の主要部分に組み込み、一つの装置内で生物反応と生産物の分離を同時に、あるいは交互に行うことを目的とした分離型反応器¹⁾が求められている。

ここでは、これらの要求にこたえるべく研究開発された発泡体を用いた流動層型バイオリアクターの研究内容として、ペニシリン生産を例としたシェーカ・フラスコ培養実験および、流動層型バイオリアクターを用いた培養実験の概要報告、ならびにパイロットプラントの紹介を行う。

1. 発泡体を用いた流動層型バイオリアクター

カビや放線菌を深部培養すると菌糸が絡み合って球体を形成するペレット増殖と、菌糸が一様に絡み合ってパルプ状ないしは糊状となり、培養液の粘度が著しく高くなるバルビー増殖の2つの増殖形態が見られる。ペレット増殖した場合には、栄養物質や酸素がペレット内部まで十分に供給されず、またバルビー増殖すると、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やすく発酵生産に影響を及ぼす。また、攪拌所要動力が著しく高く、生産物質と菌体の分離に多大な設備や運転費用がかかったり、また、pHや溶存酸素濃度測定用センサー表面が菌糸によって被覆され、正しい計測・制御が困難となる恐れがある。このように、菌体への栄養物質や酸素の物質移動過程がカビや放線菌を用いた発酵生産では重要な課題となっている²⁾。

そこで、このようなカビ類の培養に対して「発泡体を用

いた新しい培養法」を試みた。すなわち、発泡体を添加して培養することにより菌糸を発泡体表層に生物膜の形態で増殖させる方法を採用し、その結果、発酵生産過程や生産物質の分離過程に多くの利点があることを見いだした³⁾。

1.1 シェーカ・フラスコによる予備実験

ペニシリン生産菌 (*P. chrysogenum*, JCM 2056 Q 176) を例としたシェーカ・フラスコを用いた振盪回分培養の予備実験で以下の項目を検討した⁴⁾⁵⁾。

発泡体は人工土壌用のウレタンフォーム (日東電気工業 (株)製) を使用し、培養液量は100 ml (フラスコは300 ml 容を使用)、振盪回転数は250 rpm、温度は24 °C とし、基本培地組成として第1表に示したものをを用いた。総括酸素物質移動容量係数 k_{La} は亜硫酸ソーダ法により求めた。

1) 発泡体の大きさと添加量の関係

発泡体の大きさ(2.5~10 mm の立方体に切断加工)にかかわらず培養液1 lあたり比表面積が約3000 cm²以上となるように発泡体添加量を調整すれば、カビが培養液中で増殖せずに発泡体表層に十分付着して増殖することがわかった。

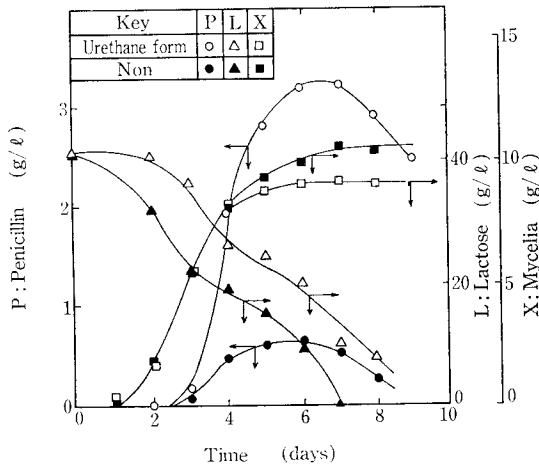
2) ペニシリン生産量と操作条件の関係

ペニシリン生産量は総括酸素物質移動容量係数 k_{La} で関係づけられ、 k_{La} が100 hr⁻¹以上となる発泡体の添加条件を与えれば、酸素の物質移動過程がペニシリン生産に律速とならず最大生産量を得ることがわかった。この条件下での培養結果と発泡体を添加しない従来の培養結果との比較を第1図に示す。発泡体を添加しない場合よりペニシリン生産量は5~6倍と生産性の向上がみられた。

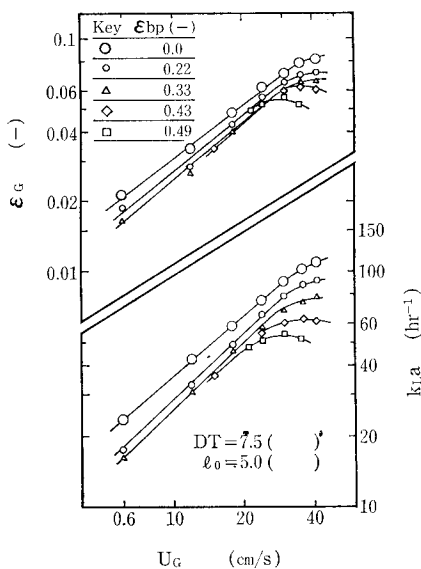
3) 培地組成、胞子植菌濃度の影響

培地組成中のラクトース/コーンステープリカーの比率が60/30~80/40 g/lの範囲で基本培地組成のときの約2.5倍のペニシリン生産量を示した。この値は従来の培養法と比較して約15倍である。また、胞子植菌濃度を変えると発

Lactose	40 g	第1表 基本培地組成 Table 1 Composition of culture medium
Corn-steep-liquor	20 g	
NaNO ₃	3 g	
KH ₂ PO ₄	0.5 g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25 g	
Distilled water	1.0 l	
Initial pH	3.9[-]	



第1図 回分培養結果
Fig. 1 Result of batch culture



第2図 ϵ_G , k_{La} と U_G の関係
Fig. 2 Relationship of ϵ_G , k_{La} and U_G

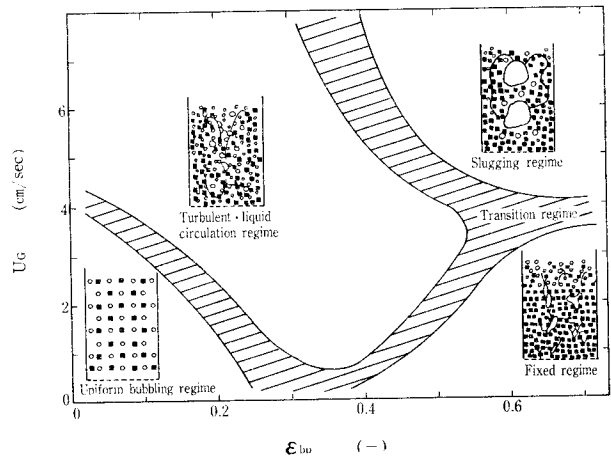
泡体表面の生物膜の厚みも変化し、培地組成比率および添加泡体の比表面積と密接な関係があることがわかった。

1. 2 流動層型バイオリアクターによる実験

前述した検討項目に加え、培養液量が0.8 l, 8 l, 150 l (150 l容の装置はアクリル製)の流動層型バイオリアクターの実験装置を製作し以下の項目について検討した⁶⁾。ここでは泡体の添加量として、泡体ホールドアップ ϵ_{bp} を操作因子として用いた。 k_{La} は N_2 ガスパーシ法より求めた。培養実験はシェーカ・フラスコの場合と同じ基本培地組成を用いて実施した。

1) 泡体添加量が k_{La} 及び流動状態に及ぼす効果

第2図に泡体添加系と無添加系における空塔線速度 U_G に対する k_{La} とガスホールドアップ ϵ_G の関係の一例を示す。泡体の添加量、すなわち泡体ホールドアップ ϵ_{bp} が小さい場合は無添加系と等しい傾きで U_G の増加と共に k_{La} , ϵ_G は増大するが、 ϵ_{bp} が大きい場合には U_G の増加につれて k_{La} , ϵ_G も増大するが、その傾きは次第に減少しつつある極大値を示す傾向となった。これは槽内の流動化



第3図 発泡体流動様式、 U_G と ϵ_{bp} の関係
Fig. 3 Patterns of fluidized urethane foam, relationship of U_G and ϵ_{bp}

状態に左右されると考えられる。第3図に槽内の流動化状態の一例を示す。 U_G , ϵ_{bp} が共に小さい場合は均一気泡流動の挙動を示し、 U_G , ϵ_{bp} の増加にしたがって攪乱・液循環流動が支配的となり、さらに ϵ_{bp} を増加させると大気泡が発生するスラギング流動、または、発泡体が流動しない停滞領域が形成される。発泡体を用いた流動層型バイオリアクターにおいては、発泡体が培養液中で十分に流動混合され、気・液・固3異相間の物質移動が促進されることが重要となる。物質移動が効果的に作用する領域はスラギング流動領域に近い攪乱・液循環流動領域であった。さらに、酸素の供給条件によってペニシリン生産量が変動することに着目し、流動層内の k_{La} に影響を及ぼす3つの効果について評価した。すなわち、泡体ホールドアップ ϵ_{bp} 、漏出菌体濃度 X_L 、添加消泡剤濃度 C_A が泡体を添加しない系(気泡塔)の基準 k_{La} に及ぼす効果を検討した。これらの効果は相乗的に作用することがわかり、これらの効果によって得られた k_{La} を $k_{La}(\epsilon_{bp}, X_L, C_A)$ と表示して評価した。

2) ペニシリン生産に関する操作因子

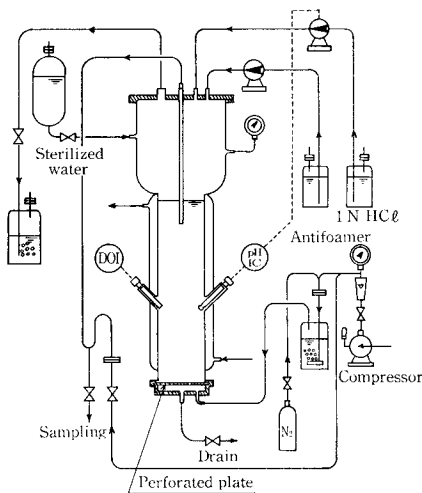
発泡体の大きさ、添加量および通気線速度を種々変化した回分培養実験を行った。実験装置のフローシートを第4図に示す。ペニシリン生産、ラクトース消費経過はシェーカ・フラスコ培養の場合とほぼ等しく培養開始後6日後で最大ペニシリン生産量に達した。ペニシリン生産量と前述した $k_{La}(\epsilon_{bp}, X_L, C_A)$ に対して整理すると第5図に示すように一本の相関線を得た。

以上の実験結果より、発泡体を用いた流動層型バイオリアクターによるペニシリン生産量は ϵ_{bp} , X_L , C_A の効果を考慮して導入された $k_{La}(\epsilon_{bp}, X_L, C_A)$ を操作因子として評価できることがわかった。

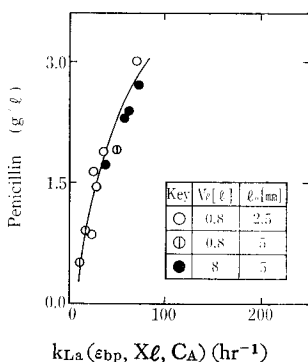
現在、これらの知見に基づき半連続培養操作による研究開発をすすめている。

2. 流動層型バイオリアクターのパイロットプラント

今度、完成させたパイロットプラントは、理化学研究所化学工学研究室で考案された「発泡体を用いた新しい培養



第4図
フローシート
Fig. 4
Flow sheet



第5図 ペニシリン生産濃度と
 k_{La} (ϵ_{bp} , X_l , C_A) の関係
Fig. 5 Concentration of penicillin production and
 k_{La} (ϵ_{bp} , X_l , C_A)

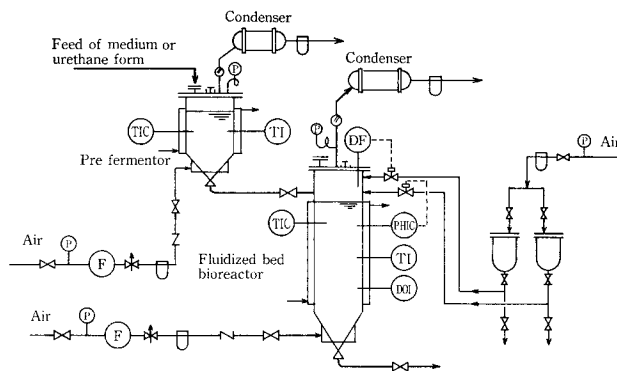
法」に基づき、前述の研究開発で得た知見をベースとして設計され、稼動液量 160 ℓ の流動層型バイオリアクターを主体とした実験装置である。

2. 1 パイロットプラントの構成

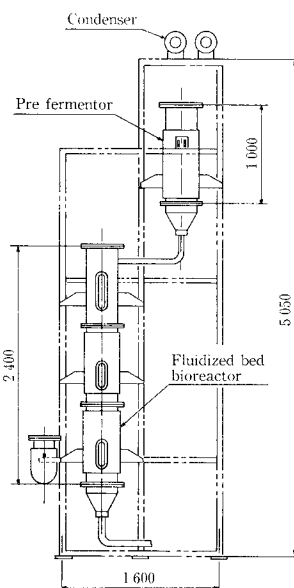
装置の構成は、発泡体の流動混合が均一となるような散気装置を有する流動層型バイオリアクター本体と発泡体、培地などの供給を行う前培養槽、消泡剤タンク、酸タンク、サンプリング装置、コンデンサー、無菌フィルター、流量計などで構成され、流動層型バイオリアクターには、pH、DO、温度測定センサーおよび泡検知器が設けられている。第6図にパイロット装置のフローシート、及び、第7図に組立略図を示す。このパイロットプラントは、半連続培養操作が可能となるように設計されており、主要部分は独立して蒸気殺菌することができる。

2. 2 流動層型バイオリアクターの特長

流動層型バイオリアクターは、発泡体を担体として発泡体表面に細胞を高密度に付着培養させ、効率的な流動状態を与え栄養物質や酸素などの物質移動過程を促進させることによって高い生産効率を得、細胞と有用な目的生産物質のクルードな分離を一つの装置内で可能とする分離型バイオリアクターの特長を有するものである。また、培養特性に応じて、発泡体に付着した細胞を利用した連続培養操作による効率的な発酵生産が可能なプロセスを設計することができる。用途として、微生物、特に、カビや放線菌などの糸状菌、または、動・植物細胞などを高密度培養し、各種の抗生物質、酵素、蛋白質、多糖類、生理活性物質、動・



第6図 パイロットプラントのフローシート
Fig. 6 Flow sheet of pilot plant



第7図 パイロットプラントの概略組立図
Fig. 7 Outline of pilot plant

植物ホルモンなどの有用物質の生産に有用と考える。

むすび

本稿では、発泡体を用いた流動層型バイオリアクターに関し、研究内容の概要、および、これらの成果として製作したパイロットプラントの紹介をした。現在、このパイロットプラントによる実用化実験をすすめている。当社では、これらの結果を踏まえ、ユーザ各位のご希望にこたえるべく各種細胞の培養、発酵生産に適用できるよう努力する所存である。最後に、本研究開発にご指導頂いた理化学研究所 化学工学研究室 遠藤勲主任研究員、長棟輝行研究員および関係各位の皆様に感謝の意を表する次第である。

【参考文献】

- 1) 遠藤 勲他編著：生物反応プロセスシステムハンドブック、(1985)、サイエンスフォーラム社
- 2) 遠藤 勲：化学工学協会第51年会、大阪、講演要旨集【研究講演】(1986)、p. 376.
- 3) 遠藤 勲ほか：化学工学、Vol. 49、(1985)、p. 293.
- 4) 加藤尚樹ほか：化学工学協会第51年会講演要旨集、大阪、(1986)、p. 379.
- 5) 西村 実ほか：化学工学協会第51年会講演要旨集、大阪、(1986)、p. 380.
- 6) 小林哲男ほか：化学工学協会第51年会講演要旨集、大阪、(1986)、p. 381.