

流動層型バイオリクターによるペニシリンの半連続発酵生産

Fermentation of Penicillin by Semi-continuous Fluidized Bed Bioreactor System

技術開発本部
小林 哲 男
Tetsuo Kobayashi

Some useful compounds have been already produced by using immobilized microorganisms. A new semi-continuous fluidized bed bioreactor system with urethane foam carriers has proved its effectiveness in operation. As a result of pilot test, 30 times as much penicillin could be produced as is obtainable by conventional cultivation methods.

まえがき

微生物をはじめとする生体触媒の物質変換機能を利用して有用物質を生産するバイオリクターには、近年、有用物質生産、あるいは培養液と生体触媒の分離機能を付加することが求められてきている。最近、比表面積が大きく、かつ軽量であることなどの特色を持つ種々の材質からなる発泡体が開発されてきており、このような発泡体に生体触媒を固定、あるいは付着させ、これらを充填、浮遊させて生体触媒反応を行わせるバイオリクター、およびその操作方法が急速に開発されつつある。

われわれはウレタンフォーム（以下発泡体という）を付着担体としたカビ類の新しい培養方法を試み、培養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だし、これまでにペニシリン生産を例としたシェーカ・フラスコによる予備実験として、

(1) 培養液中で浮遊菌体が増殖せずに発泡体内に付着増殖させる発泡体の添加条件

(2) ペニシリン収量に及ぼす影響因子（酸素の物質移動容量係数 k_{La} 、培地組成、胞子植菌濃度、pH、および温度）

などを検討し、発泡体を添加しない場合と比較してペニシリン収量が15倍になることを明らかにしてきた¹⁾²⁾。さらに、0.8 l, 8 l 流動培養槽および160 l 流動層型バイオリクターのパイロットを制作し、流動化条件、物質移動特性を評価、および回分培養操作を行い、ペニシリン収量が発泡体添加量、浮遊菌体量、消泡剤添加量などの効果を考慮した修正 k_{La} で評価できることを明らかにした³⁾⁴⁾。

本稿では、これらの知見をもとに流動層型バイオリクターでペニシリンの半連続発酵生産を行ったので、その操作方法、実験結果および従来法との比較などについて報告する。

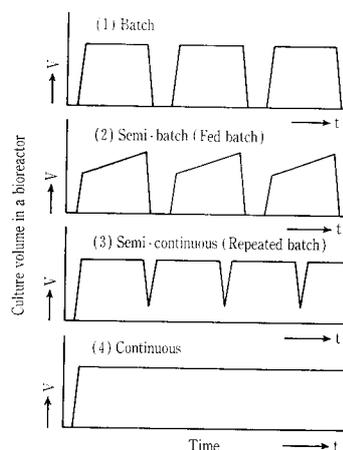
1. 抗生物質の発酵生産

生物反応操作には、大きくわけて回分操作と連続操作の二つの操作方法があるが、回分操作には半回分操作（流加操作）が含まれ、回分操作と連続操作との中間に位置するような半連続操作として反復回分操作などが開発

されてきている。第1図に微生物反応プロセスの各種操作方法として、発酵槽内の培養液量の時間的変化の概念図を示す。回分操作(1)の工程を大別すると

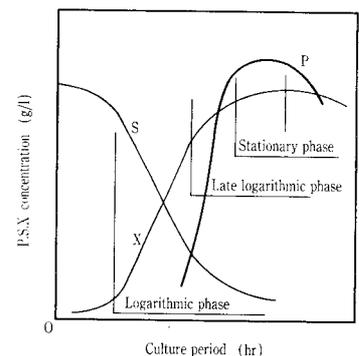
- (1) 発酵槽の洗浄、殺菌、培地の仕込み、植菌という立ち上がり工程
- (2) 培養（発酵）期間
- (3) 生産物収穫（集菌）期間

という操作が含まれ、合計が1回分操作期間となる。連続操作(4)の工程は、植菌操作までは回分操作と等しく、菌体の増殖期間を経て定常状態に到達すると、培地の供給・引き抜きを連続して行い、培養液量は一定で操作される。半回分操作（流加操作）(2)は、特定の培地を培養終了後まで供給するが途中で引き抜かない回分操作である。半連続操作（反復回分操作）(3)は、操作として回分操作と同等であるが、培養終了後培養液量を全て引き抜かないで一部を次の培養の種菌として再使用し、新鮮無菌培地を供給し再び回分操作を行う操作方法である。生産工程的に言えば、連続操作は生産性が高く、回分操作は最も低いといえることができる。これらの操作方は取り扱う生体触媒の種類（酵母、バクテリア、カビ、放線菌など）や形態（浮遊菌体か



第1図 微生物反応プロセスの各種操作方法

Fig. 1 Operational modes of cultivation process



P: Concentration of secondary metabolite
S: Concentration of substrate
X: Concentration of cells

第2図 培養期間と二次代謝産物の関係

Fig. 2 Relationship between culture period and secondary metabolite

固定化されたもの), および, その培養特性によって選択されるが, それを可能とさせるバイオリアクターの型式の選定も極めて重要となる。

ペニシリンを始めとする抗生物質のような二次代謝産物の生合成は, 第2図に示したように多くの場合菌体の増殖後期, 基質の消費過程の後期に始まることが知られている。したがって, このような二次代謝産物の培養操作方法として連続操作によって生産することは困難であるため, 従来法では回分操作または流加操作などが採用されていた。すなわち, 生体触媒である菌体を高密度にリアクター内に保持させ, 代謝産物を分離させてリアクターの外へ回収するという操作を連続的に行うためには, どのようにして菌体をリアクター内に閉じ込め, 代謝産物の生産活性を維持するのかが問題となっていた。

そこで, われわれは発泡体を用いた流動層型バイオリアクターによる培養方法の特長のもう一つに, 増殖した菌体を発泡体内に付着固定することによって, 菌体をリアクター内に保持させたまま生産物質を含む培養液を分離して引き抜くことができるという利点に着目し, 発泡体に付着増殖させた菌体を再利用して連続的にペニシリンの発酵生産することを実験的に検討した⁵⁾。

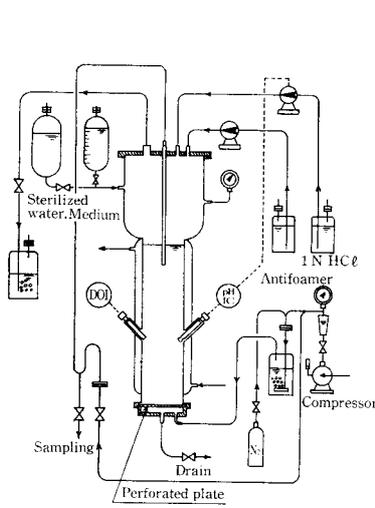
2. 流動層型バイオリアクターを用いたペニシリンの半連続的発酵生産

2.1 実験方法

1) 使用菌株

Lactose	40 g
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表
基本培地組成
Table 1
Basal medium
composition



第3図 フローシート
Fig. 3 Flow sheet of bench testor

Penicillium chrysogenum, JCM 2056 (Q176)

2) 培地組成

第1表に示したものを基本培地として用いた。

3) 発泡体

人工土壌用ウレタンフォーム(日東電気工業(株)製)を4~6 mmの立方体に裁断加工したものをを用いた。

4) 分析方法

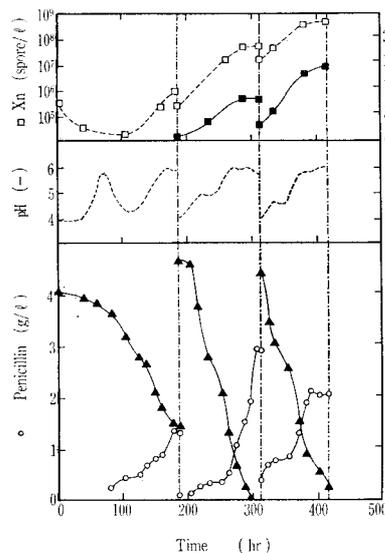
ペニシリン, ラクトース濃度は高速液体クロマトグラフィーで測定し, その抗菌力価は *Staphylococcus aureus* ATCC 653 P によって求めた。

5) 操作方法

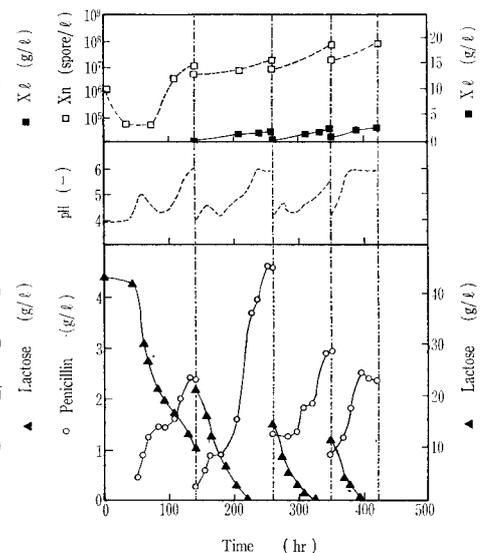
流動層型バイオリアクターの概略培養フローを第3図に示す。所定の発泡体, 基本培地をリアクターに投入し, 滅菌, 冷却後孢子植菌を行い培養を開始して, 発泡体に菌体を付着増殖させた。ペニシリン生産量が最大に到達した後, 培養液を引き抜き, 新しい滅菌済み培地を投入交換し, 繰り返し培養を行った。最初に培養液を引き抜くまでは, 回分培養操作と同様で, ここでは繰り返し培養期間と区別して初期回分培養期間と言うことにする。交換培地条件として, 組成を基本培地組成と等しくし, 濃度を高くした場合(RUN-1), 濃度を低くした場合(RUN-2), およびコンスティープ・リカーをカットした場合(RUN-3)について繰り返し培養を行った。

2.2 実験結果および考察

第4図に交換培地濃度を高くした場合(RUN-1), 第5図に同濃度を低くした場合(RUN-2)の培養経過の一例を示す。図中には, pH, 浮遊菌体濃度 X_t , 培養液中の孢子濃度 X_n もそれぞれ示した。RUN-1では, 交換後のペニシリン生産濃度 P (g/l) は大きくなる傾向を示したが繰り返し回数の増加とともに急激に減少した。また, 培地交換後 X_t (g/l) が次第に増加し, X_n (spores/l) も増加する傾向を示した。図は X_t の増加による発泡が著しくなるまで



第4図 半連続培養結果 (RUN-1)
Fig. 4 Time course of semi-continuous cultivation (RUN-1)



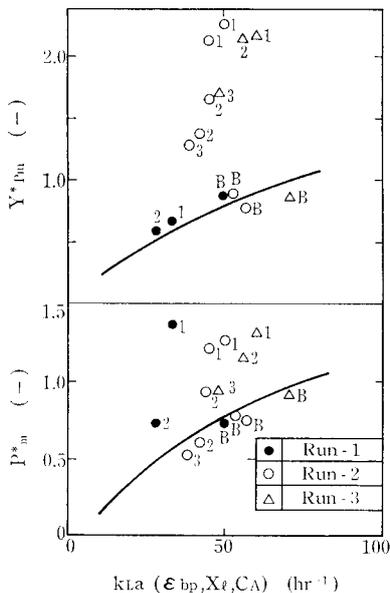
第5図 半連続培養結果 (RUN-2)
Fig. 5 Time course of semi-continuous cultivation (RUN-2)

の結果を示した。培養液中の X_t の増加が繰り返し培養におけるペニシリン生産に影響を及ぼしたと考えられる。RUN-2では、交換培地濃度を低くしても交換培地濃度に比例する傾向でペニシリン生産量が高く得られた。また、 X_t の増加は低く維持され、 X_n の増加も抑えられる傾向を示した。RUN-3の場合もほぼRUN-2の培養経過と等しい結果が得られたが、 X_n が比較的大きく増加する傾向を示した。いずれの場合においても、培地交換後の繰り返し培養期間は3日程度と初期回分培養期間より短時間で最大ペニシリン生産濃度に到達し、RUN-1の条件の場合を除き初期回分培養と同等またはそれ以上のペニシリン生産濃度を繰り返し培養することによって得ることができた。

ペニシリン収量は初節で述べたように、発泡体添加効果、浮遊菌体効果、消泡剤添加効果を考慮した修正 k_{La} に相関づけられる。第6図に繰り返し交換後の最大ペニシリン収量 $P_m^*(-)$ (シェーカ・フラスコ発泡体添加系培養時の基本培地による最大収量を1とした相対値で表示)、および基質(ラクトース基準)に対するペニシリン収率 $Y_{Pm}^*(-)$ (P_m^* と同様の相対値)と前述した修正 k_{La} との関係を示す。同図には回分培養操作単独で実施した結果を実線で表記してある。また、図中、B表記は初期回分培養結果、数表記は繰り返し培養回数を示す。図に示すように、交換培地濃度が基本培地濃度と同程度と高い場合には、ほぼ回分培養の収率と等しい結果を示し(RUN-1)、交換培地濃度が低い場合には、 k_{La} の減少にもかかわらず、初期回分培養時より2~3倍の収率が得られた(RUN-2, 3)。これは、交換培地濃度を低くした場合、菌体の増殖が抑制され、ペニシリン生産が優位となるように代謝が調整されたものと考えられる。浮遊菌体の増加による k_{La} の減少を避ける意味でも、交換培地濃度を低くしたほうが好ましいと考えられた。

2.3 半連続操作の効果

われわれが用いた操作方法は、初期回分培養終了後、発泡体に付着増殖した菌体をリアクター内に保持し、培地の引き抜き交換を繰り返して行う方法で、繰り返し培養ごとに植菌操作をする必要はない。その意味で反復回分操作と



第6図 P_m^* , Y_{Pm}^* と修正 k_{La} の関係
Fig. 6 Relationship between P_m^* , Y_{Pm}^* and modified k_{La}

言え、回分操作、あるいは連続操作よりも高い生産性をあげることが可能となる。流動層型バイオリアクターを用いた半連続的操作法による生産性を P_R 、回分操作法の実産性を P_B とし、培養終了時のペニシリン濃度 P を一定として次式によってそれぞれ定義する。

$$P_R = P[f \cdot V(n-1) + V] / [t_b + (n-1)(t_p + t_d) + t_s]V \quad (1)$$

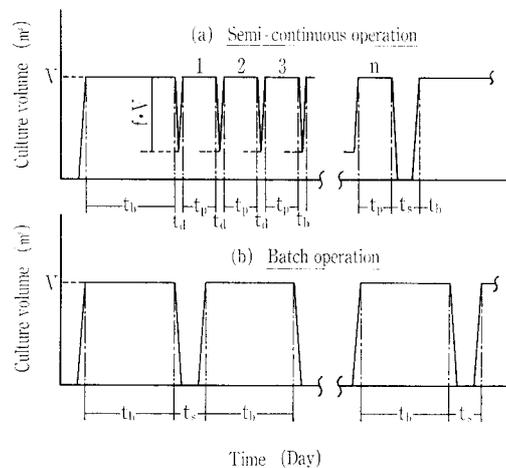
$$P_B = P \cdot V / (t_b + t_d)V \quad (2)$$

ここで、 n は繰り返し培養回数、 V は初期仕込み培養液量、 f は引き抜き培地交換率で、 t_b は初期回分培養時間、 t_p は繰り返し培養時間、 t_d は繰り返し交換引き抜き時間、 t_s は培地投入・洗浄・滅菌・冷却・植菌・引き抜き時間を示す。これらの関係を第7図に培養経過モデルとして示した。ここで、 V が等しいリアクターを用いて、 f を0.75、 n を6回とし、培養経過時間をそれぞれ $t_b=8$ 、 $t_p=3$ 、 $t_d=0.1$ 、 $t_s=2$ の日数がかかるとして導入すると、生産比 (P_R/P_B) は約1.9倍となる。これは、前述したように、発泡体を添加しない従来法の通気攪拌槽による回分操作と比較して、発泡体を用いた流動層型バイオリアクターによる回分操作で、15倍のペニシリン収量を得ることから、半連続的操作を行うことによって約30倍もの生産性が得られることを示している。また、本法の場合、繰り返し培養時の基質濃度は回分培養の場合より低い濃度で操作することが可能となるので、収率の面でもさらに生産性は高くなるといえる。

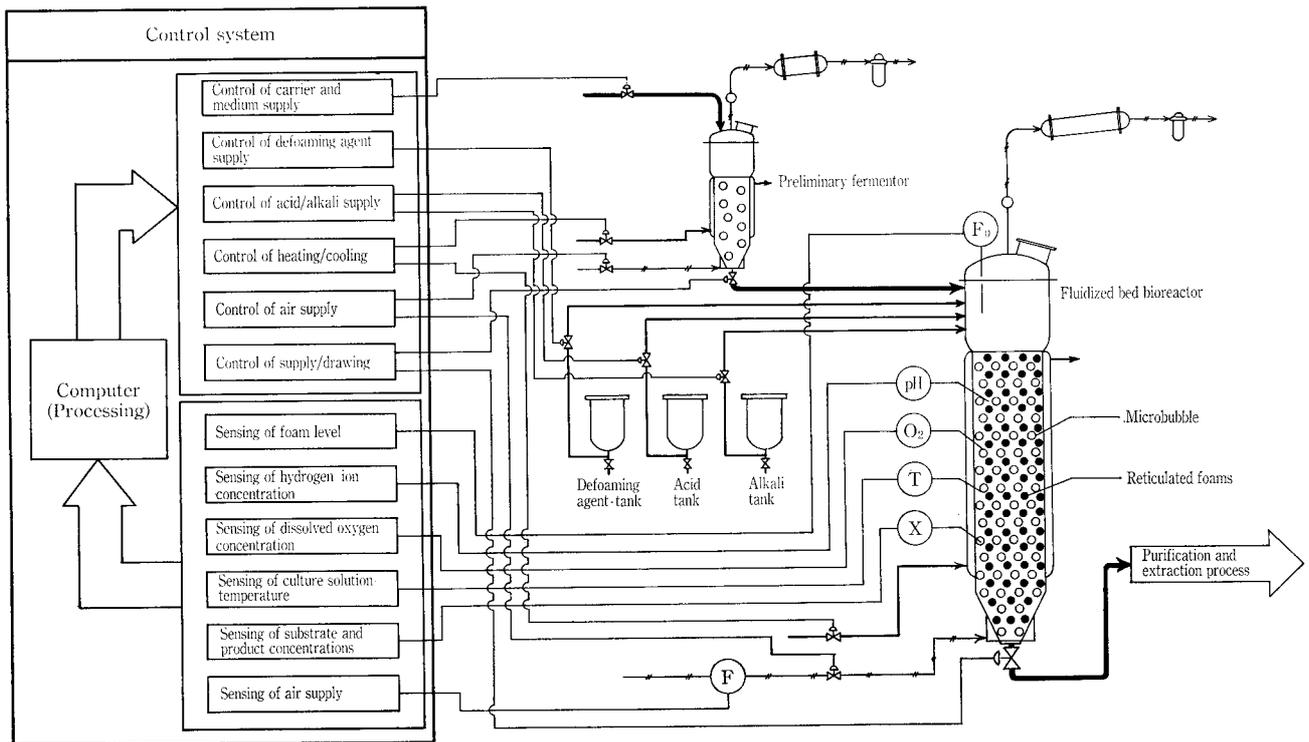
これらの情報をもとに、160 l の流動層型バイオリアクターによるペニシリンの半連続発酵生産を実施し、繰り返し培養回数が6回の半連続操作に成功し、発泡体を用いた流動層型バイオリアクターによって高い生産性が得られることを実証している。

3. 流動層型バイオリアクターによる半連続生産プロセス

上述してきたように、抗生物質のような二次代謝産物は菌体の増殖活性が低下した培養後期に生産されるので、植菌操作のたびに菌体の増殖期間を設定する必要のある回分



第7図 半連続操作(a)と回分操作(b)の操作概念図
Fig. 7 Operational modes of semi-continuous(a) and batch(b)



第8図 流動層型バイオリクターのフローチャート
Fig. 8 Flowchart of fluidized bed bioreactor

操作では、代謝産物の生産性は低くなる。われわれが開発してきた半連続生産プロセスは、代謝産物の生産終了後に代謝産物を含む培養液をリアクター下部（あるいは中間部）より、多孔板を介して発泡体に付着固定した菌体と分離（一部の発泡体を引き抜く場合がある）し、代謝産物の生産活性を有する菌体をリアクター内に残留させ、引き続き新鮮な無菌培地を供給して、菌体の増殖期間を経ることなく代謝産物を生産させる方法で、生産期間の短縮、高い生産活性の維持によって生産性を高めるバイオプロセスである。本操作方法において重要なことは、リアクター内に保持された菌体の代謝産物の生産活性を保持することと新しく更新させて行くことであり、その意味で、繰り返し交換培養する場合の交換培地が代謝産物の生産を促進させる培地（濃度、組成）であること、また、菌体量に合わせた培地量とするなど培養特性に応じた引き抜き交換条件を設定することが重要となる。このため、菌体が付着固定した発泡体の一部を培養液と共に引き抜く操作を必要とする場合もある。

本操作法の実用的な発酵生産プロセスとして、第8図に流動層型バイオリクターを用いたフローチャートを示す。前述した操作方法を可能とするシステムとして、本発酵プロセスは、初期植菌操作および繰り返し培養時に必要とする交換培地（一部発泡体の添加する場合もある）を供給するための前培養槽および本培養槽の2つの流動層型バイオリクターをメインとして、pH、DO、温度センサー、オンラインによる基質、生産物濃度測定装置などの情報を処理して培養過程を監視し、培地（一部の発泡体）を引き抜き交換するためのコントロールシステム（当社開

発のプロセス監視システム「プロセスモニタ」⁶⁾組み込みから構成される。このように発泡体を用いた流動層型バイオリクターは、従来の通気攪拌槽による回分操作による発酵生産とは異なり、菌体の培養特性に応じて連続的発酵生産を可能とする生産性の高いバイオプロセスを設計することができる。⁷⁾

むすび

本稿では、発泡体を用いた流動層型バイオリクターによるペニシリンの半連続的発酵生産について、実験結果概要、発酵プロセスの概要を紹介した。当社では、これらの知見をもとに、ユーザー各位のご希望にお応えできるよう抗生物質の生産菌であるカビ、放線菌類を始めとする各種細胞の培養、発酵生産に流動層型バイオリクターの開発を進めている。

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へ感謝の意を表します。

【参考文献】

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 神鋼ファウドラ-技報Vol. 31, No. 1 (1987/3), p. 14
- 5) 小林哲男ほか：化学工学協会第52年会講演要旨集，名古屋，(1987)，p.
- 6) 神鋼ファウドラ-技報 Vol.30, No. 3 (1986/12), p. 1
- 7) 特願 昭61-281192.