

微生物工学

大阪大学工学部 合葉修一

まえがき

発酵工業プロセスは菌株の保存・改良、菌の大量培養、目的生産物の培養液からの分離・精製、さらに各工程で発生する廃液の処理を含む。微生物工学では培養槽および各工程中の装置機器類の最適な設計と操作条件の設定にとどまらず総合的な見地から工業プロセスとしての発酵収率と生産性の増大を計り生産原価の削減に寄与することを目標としている。この分野は戦後いちはやく米国から導入されたペニシリソの工業的生産法をわが国で実施、改良し始めた1947年ごろに芽生えている。

ペニシリソ工業の出現は大型培養槽（深部培養法）の普及、工場規模の無菌装置・操作の研究と開発、希薄かつ不安定な生産物の回収・精製装置を始め多数の機器の改良・開発の端緒を開き、エタノール発酵、アセトント・ブタノール発酵で代表される戦前の発酵工業の姿を一新するのに足るものであった。その後、1956年ごろまでにストレプトマイシンなどの新規抗生物質の工業生産開始、L-グルタミン酸発酵技術の工業化が続き、発酵プラント中の主要装置機器類の設計・操作仕様の多くは1947～1960年の期間に開発されこれらはいずれも現今的基本型となっている。

今日のいかなる発酵プロセスも菌株の改良、安価な発酵原料の選択、発酵収率の改善など各工程の効率向上を目指した数多くの技術者、研究者の不断の努力のたまものである。たとえば戦前のアミロ法による生甘藷からのエタノール生産は細菌アミラーゼを液体麹酒母法と併用する仕込み式に切り換え、さらに適切な雑菌汚染防止策を講じた結果、1960年代の初期にはエタノール1kl当たりの生甘藷使用量、石炭使用量は戦前の77%、50%にそれぞれ減少している。現在では発酵収率は94%に達し完成した技術となっている。

上述の例のような特定の発酵生産物を列挙し、その工業プロセスに関しここ40年間の不断で連続的な微生物

工学上の進歩の軌跡を記述するのは各論的すぎてその全体像はかえって不鮮明となろう。したがってここでは発酵プロセスの多くに共通した話題、すなわち（i）工業規模の無菌装置・操作法の開発（1964年）、（ii）固定化酵素の工業的利用（1969年）および（iii）コンピュータによる培養管理（1970年代後半）を選びそれぞれが発酵工業プロセスに不連続的な格段の進歩を招來した足跡を略述することで微生物工学の回顧に代えたい。また、（iv）遺伝子操作と発酵プロセス（1980年以降）に関して一私見を述べ微生物工学の来世紀への展望とするつもりである。

I. 回顧

1. 無菌装置・操作

エタノール発酵工業では雑菌汚染対策の一環として早くからフィルターで雑菌を除去した（と思われる）空気を培養槽へ供給していた。このフィルターは綿を円筒状容器に詰めたごく簡単な装置であるが、除菌したと思われるといったのは当時（1947年ごろ）、繊維充填層における空気流の圧力損失とか除菌効率などフィルターの最適設計・操作に関する基礎資料は皆無だったからである。

その後、空気流に対する抵抗が綿よりも小さく、また、除菌効率も綿に比肩するガラス繊維が綿に代って順次採用されるようになった（1950年代）。しかし、ガラス繊維は繰返しのステム殺菌・乾燥でもろくなりその微細片が新品との交換時に飛散するなどの欠陥があって、現在では後述するPVAフィルターや焼結素材を円筒状に成型したフィルターなどが多く用いられ、フィルターの寸法は旧来のそれに比べると著しく小型となっている。

さて、ある種類の繊維を一定の空間にいかに高密度、不規則に充填しても圧送される空気流の通過孔径は繊維

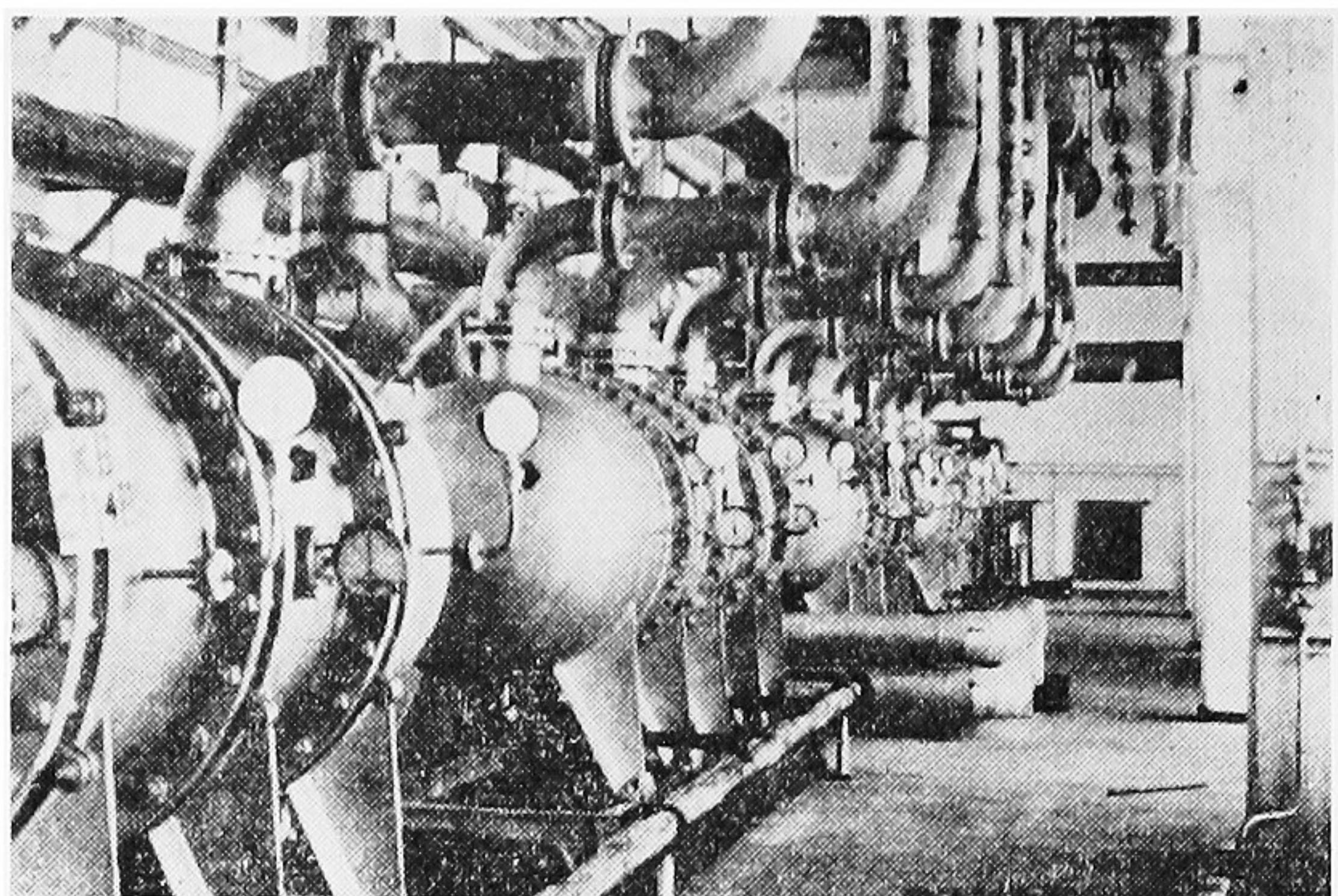


図 1 SCP プラントにおける大量無菌空気製造用 PVA フィルター群
(エイコー・フィルター(株) 提供)

の太さの程度 ($10\sim20 \mu\text{m}$) であり $1 \mu\text{m}$ ほどの雑菌よりもはるかに大きい。雑菌よりも小さい孔径のフィルター (除菌効率 $\eta=100\%$) は空気の処理量が小さく圧力損失は大で工業的に使用できない前提のもとでなお、 $\eta=100\%$ の繊維層の設計を迫られその矛盾を解決するのに 1950 年代の後半多くの時間を費やした。その結果、繊維層フィルターの η はその最適設計・操作によって限りなく 100% に近づくがけつして $\eta=100\%$ とならないこと、フィルターの出口から無作為的かつ間欠的に出る雑菌の時間的な漏出間隔 (統計的平均値) が除菌効率を規定することなどが明らかとなった。今日、発酵工場で広く使用されている小型のエアフィルターは 1960 年前後の理論・開発研究の成果である。

n-パラフィンを炭素源とする飼料酵母 (*Candida paraffinica*) 製造工場 (在ルーマニア、SCP 年産 6×10^4 t) で稼働中の PVA フィルターを図 1 に示した。長さ約 $8\text{ m}\times$ 高さ $2\text{ m}\times$ 幅 1.3 m の横型円筒罐体の 4 個のフランジ間にそれぞれ $1,100\text{ mm}\phi\times$ 厚さ 14 mm の円板状 PVA フィルターを挿み 2 枚 1 組、計 2 組の PVA で、直列に連結した 2 基のエアリフト型連続培養槽 (それぞれの寸法: 直径約 $7\text{ m}\times$ 高さ約 33 m ; $1,260\text{ m}^3$; 実容量 550 t) に毎時間 (h^{-1}) $44,000\text{ nm}^3$ の無菌空気を $2\sim6$ カ月間連続的に供給している。2 基の培養槽 (1 セット) の年生産能力は $1.5\times10^4\text{ t}$ 、工場には 4 セットの培養槽があり、設置された PVA フィルター用罐体は 4 基である (図 1)。

ここでポリビニールアルコールを原料とする PVA フィルターの製造・加工法の詳細を述べる余裕はない。ただ付言したいことは (i) スチームによる繰返しの殺菌・乾燥に耐えひび割れを生じないような加工法の完成には予想以上の年月を要したこと、(ii) 旧来の繊維充

填層型式のフィルターで前述のような大量の無菌空気を製造するには膨大な容器を要し非現実的で、小型化フィルターによって初めてこれが実行可能となったこと、である。

空気の除菌と同様に培地の殺菌は発酵工場の円滑な運転上重要な操作であるが、装置の進歩は除菌フィルターほどは目立たない。しかし、1960 年ごろからは大量の培地を短時間に殺菌する連続殺菌装置が多量の固形物を含む培地などの場合を除き広く採用されている。培地中の雑菌胞子の熱失活速度を死滅定数 $k (\text{h}^{-1})$ を持つ一次反応で表す、連続殺菌装置の最適設計・操作 (滞留管の寸法、殺菌温度などの決定) の理論はほぼ完成し活用されている。

ある温度に対する胞子の耐熱寿命 (h) 分布の最も現れやすい型は指数関数であることを理論的に導出し、上述の k はこの耐熱寿命分布の平均値の逆数に等しいことを見出した。この理論は (i) 胞子が凝集すると凝集胞子の耐熱寿命が見掛け上顕著に増大 (k 値が低下) するから、ある胞子の死滅速度定数を測定するにはよく分散した胞子を用いる必要があるとする古くからの経験則の根拠を解明した、(ii) 回分・連続のいかんを問わず培地の熱殺菌装置の設計・操作の基本を確立した (1960 年代前半) といえる。

無菌接種法、無菌サンプリング装置および培養槽の攪拌軸の無菌軸承装置は、それぞれペニシリソ生産の工業化当時と原理的には同じである。要約すれば (i) (スチームによる) 殺菌部分は単独で殺菌できる設計、(ii) 無駄な空間の排除と簡潔な設計、(iii) 接続部分のスチーム・シール化など、が培養装置に付属する機器の雑菌汚染対策の基本的事項である。しかし、機器類の品質向上、とくに近年の高性能ダイアフラム弁、攪拌軸承部の材質や部品の進歩は培養槽をめぐる雑菌汚染の防止をいっそう確実にしている。

2. バイオリアクター

酵素または微生物菌体を固定化して触媒に使用する反応装置、いわゆるバイオリアクターは工業装置として種々な物質の大量生産に使用されている。これは

(i) 固定化によって酵素または微生物の活性が安定化し装置の長期間にわたる連続操作が可能で物質の生産原価の削減に寄与すること、

(ii) 化学工業における固体触媒の反応装置と同様な取扱いができること、

(iii) その装置上の開発と利用のみならず生物反応自体にも広く化学工学的な関心を集め、その立場からの研究・開発の対象となっていること、

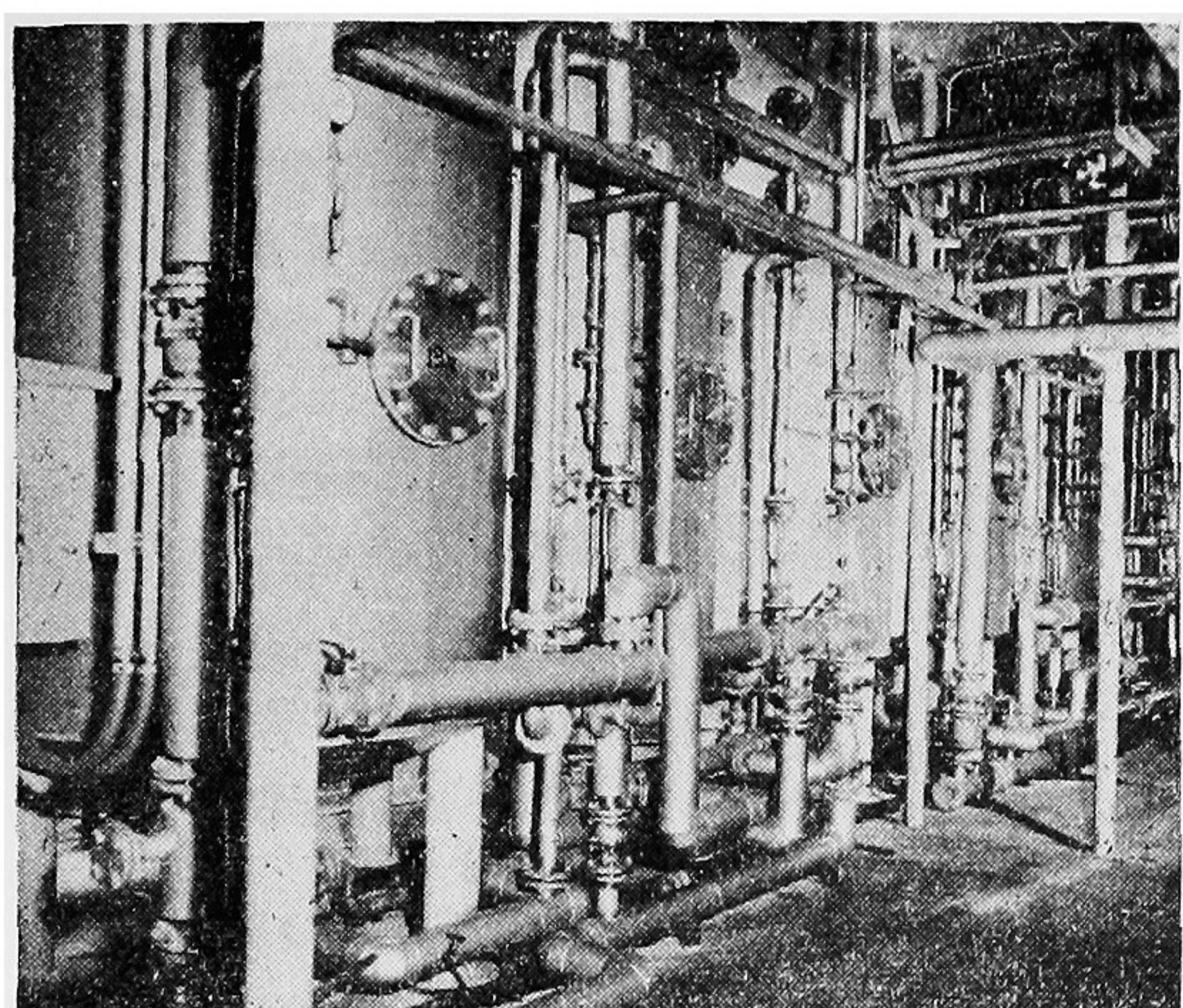


図 2 異性化糖液製造用バイオリアクター群
(日本澱粉工業(株) 提供)

のゆえに微生物工学の発展を支える一つの柱である。

バイオリアクターという言葉が広く浸透、普及した1970年後半よりもはるか以前に千畠一郎氏らが固定化酵素(アミノアシラーゼ)を用いL-アミノ酸の連続製造法をわが国で工業化したこと(1969年)、また同氏らが固定化菌体(*E. coli*)によるL-アスパラギン酸の連続生産を工業化したこと(1973年)は将来ますますその応用範囲を拡大するであろうバイオリアクターの草分けとしてそれぞれ広く知られている。

これらの先駆的な研究・開発の詳細はすでに随所で紹介されていることであるから省略しここでは異性化糖の工業生産におけるバイオリアクターを説明しよう。図2はグルコースイソメラーゼ(GI)を充填したリアクター群(各装置の寸法:直径1.4mφ×高さ3.05~4.50m;計15基)の一部である。

活性アルミナおよび樹脂でGI生産菌体(*Streptomyces*や*Bacillus coagulans*)を包括固定して粒状に成型したと思われる市販の固定化GIを用い、各リアクター内におけるその充填容積=2.20m³。澱粉をα-アミラーゼで糊化液化し、次いで60°C付近まで冷却してからグルコアミラーゼを添加、48~72hの糖化後の液(グルコース(G)94%以上)をこのバイオリアクターへ供給する。各リアクターへの供給速度=2.2m³·h⁻¹、供給糖液の充填層内平均滞留時間=1h。3塔直列を1セットとする連続操作では反応温度約60°C、pH8.0~8.2、GIの安定剤として硫酸マグネシウム0.1Mおよび重炭酸ソーダ0.1Mを添加、反応時間≈3h、異性化率:フルクトース当量(FE)=38~44%である。

なお、本工場では1セットのバイオリアクターでえたFE=42%の異性化原液を14.3m³·h⁻¹、pH4.5~5.0

でCa²⁺結合イオン交換樹脂塔(10m³×4基/セット×2セット)のF/G分画を行う。分画後、廃糖区分はリサイクルし、FE=88~90%の画分はFE=42%のものと混合してFE=55%の糖液(高フルクトースショップ)を生産している。

このほか、κ-カラギーナンで*Pseudomonas dacunhae*(L-アスパラギン酸β-脱炭酸酵素)を固定化しこのリアクターによるL-アスパラギン酸からのL-アラニンの製造、固定化*Brevibacterium ammoniagenes*(フマラーゼ)(ポリアクリルアミドゲル包括)によるフマル酸からのL-リンゴ酸の製造、さらにポリアクリルアミドゲル包括*E. coli*(ペニシリニアミダーゼ)を用いペニシリングからの6-アミノペニシリシン酸の生産などが工業化されている。

3. コンピュータ

1) 経緯

微生物の比増殖速度(μ)、その最大値(μ_{\max})、基質の飽和定数(K_s)、基質の比消費速度(v)など微生物の培養でその経過を定量的に表す尺度として今ではごく普通に使われているものも、これらの概念が提出され実際に使われ始めた経緯をたどるとそれは欧米各国やわが国で抗生物質工業(微生物の大量培養)が盛んになった1950年前後あたりからでさほど古くはないことにむしろ驚く。微生物の μ を制限基質濃度(S)の関数として2個のパラメータ(K_s, μ_{\max})を用いたいわゆるMonod式が提案された1949年以来、数多くの増殖速度式や代謝反応速度式が学会誌等に報告されてきたが、微生物の反応速度をめぐりその挙動を定量的に表現すること(定式化)がコンピュータ利用の前提だと考えると、発酵工業でのコンピュータ利用の成果が認識され始めたのはせいぜい1970年前後からであることもうなづける。

ここで思い出すのは山下直氏によるグルタミン酸発酵生産プラントへのシーケンス制御の導入や生産菌の回分培養経過へのコンピュータ・シミュレーションの適用からDDC(Direct Digital Control)を用いた最適制御への示唆に至る先駆的な研究である(1968年、第3回国際発酵会議(New Brunswick, N.J.))。その後、コンピュータを軸とした計測・制御技術の飛躍的な展開・進歩によってベンチおよびパイロット規模の培養槽ではコンピュータを含む計装が一般的となっている。他方、発酵工場の生産プラントでも生産工程の管理に、またその一部では培養の制御にコンピュータを応用している。これらの現況に戦後から1950年代に至る期間の培養槽の計装などを回顧して今昔の感がある。

2) シミュレーション

前出のμやν、さらに生産物生成の比速度などに関する連立微分方程式（非線形）の数値解で培養経過を再現（予測）しようとする、前掲のコンピュータ・シミュレーションは非線形関数の選定方法、前述の K_s , μ_{\max} のほか多くのパラメータ値の推定方法、さらに数値解法を含め細胞レベルでの方法論はほぼ確立している。細胞レベルとは関数型に経験式としての Monod 型を採用したり、生産物による増殖阻害の型式に、細胞内分子レベルの複雑多岐にわたる連鎖反応が微生物反応の背後にあるにもかかわらずあたかも单一酵素における阻害型式を適用するなど、現象論的な取扱いをさしている。別の表現をかりれば現象論的にはいかなる培養経過もコンピュータで再現できるということである。

しかしながら、再現と培養経過の予測とはおのずから異なる。経験式のみに基づくシミュレーションは現象の予測にはつながりにくいからである。これら両者の大きな隔たりを埋めるには統計的な手法は有効と思われる一方、たとえば微生物細胞内でその培養条件によってある酵素が誘導または抑制される普遍的な現象をオペロン説の定式化を通して一般化する手法のように分子生物学にその理論的な根拠をもつアプローチも有力である。それはともかく、あらゆる培養に関しその経過を予測し培養の最適制御を生産プラントで実行するには現在、なおほど遠いといってよく、微生物工学の立場からも分子生物学関連分野の急速な進歩・展開の内容を理解し検討することの重要性を自戒するゆえんである。

3) 培養のオンライン制御

コンピュータが、ある微生物の培養中、培養槽に設置した各種センサーから時々刻々に届くデータを記憶かつ演算しその結果、この代謝活性の状態を判断して当該微生物に所定の挙動をとるよう、たとえば通気量など操作上の変更を指令する方式の制御を生産プラントで具体化している例は現在未だ数多くはないようである。

このなかで、パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の呼吸商 (RQ) をその代謝活性の指標として、培養中 $RQ = 1.0$ になるよう、糖蜜の流加速度を常時コンピュータで調節する方式いわゆる RQ 制御（一種の定值制御）の模様（1981 年以来）を簡単に説明しよう。結果的には単純に見える RQ 制御であるが、このパン酵母について

(i) 呼吸と発酵（グルコース効果）を定量的に評価することで、糖液の流加速度 (F) を菌の呼吸速度 (I_{O_2}) および RQ の関数として表すこと、

(ii) I_{O_2} および RQ 測定用には高性能で信頼性が高いガス分析計を設置すること、

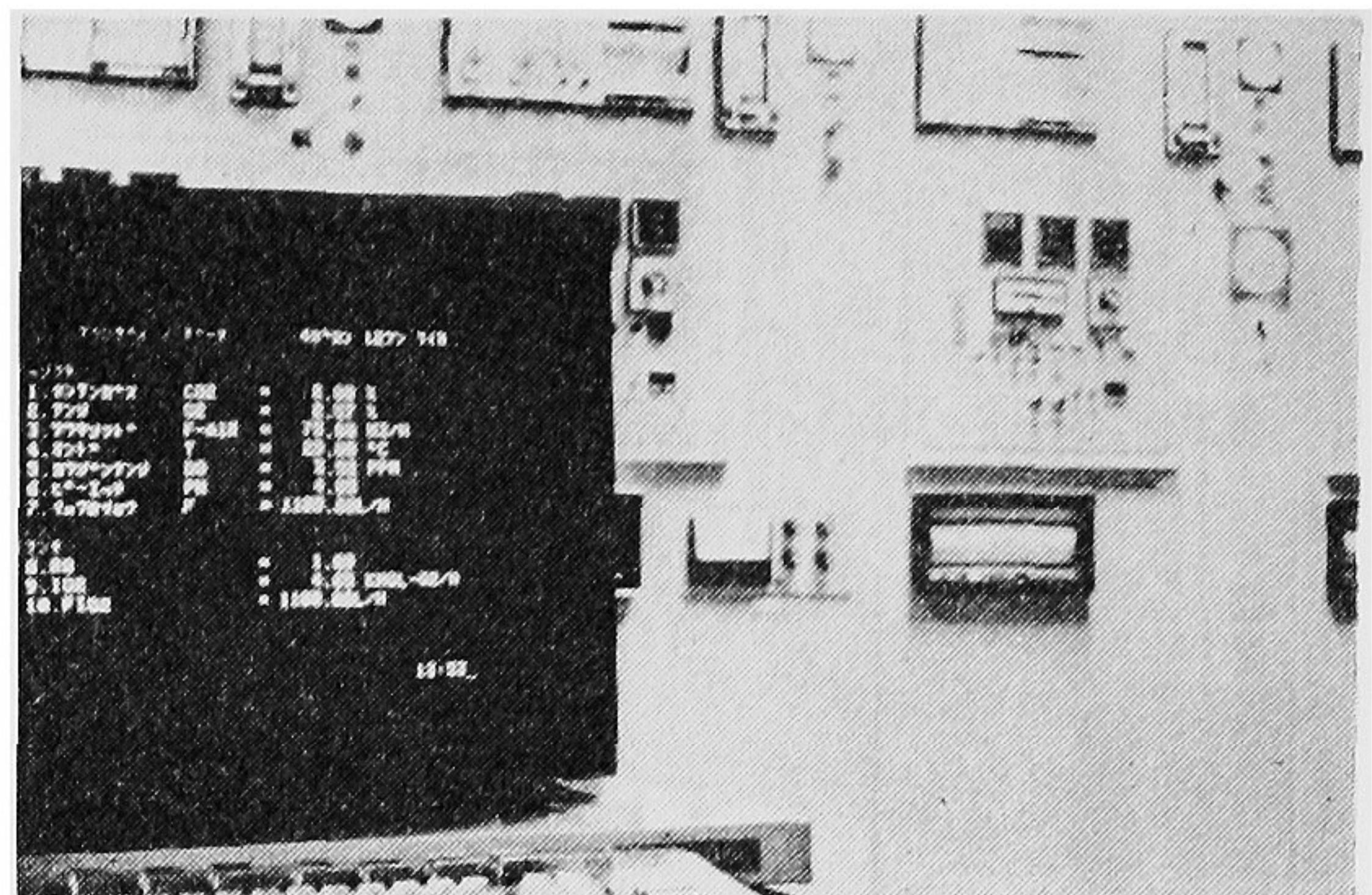


図 3 パン酵母製造の RQ 制御
(オリエンタル酵母工業(株) 提供)

が要点である。

図 3 は 100 m^3 培養槽における流加培養例で培養を開始、4 時間 (h) 12 分 (min) 経過後である（仕込液約 40 m^3 ）。実測値中、質量分析計で測定した CO_2 , O_2 の濃度差（排ガス中の濃度と入口空気中の濃度との差）は便宜上 4 記号を省略して表し、また、通気速度 ($\text{m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$; 一定)、温度（定値に制御）、DO および pH が記録されているが、この時点での糖蜜（30%）液の流加速度 $F = 1105.00 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ である。一方、 RQ , I_{O_2} から算出した流加速度の計算値 $F_{I_{O_2}} = 1108.00 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ で、 $F_{I_{O_2}}$ と F とはほぼ一致しこの RQ 制御はその設定値 ($1.10 \leq RQ \leq 1.15$) 内で正常に働いている。この例では糖蜜の流加をさらに続け（約 10 h）、培養終了時の仕込量約 70 m^3 となる。このような RQ 制御は糖蜜消費量の節減、酵母品質の向上などに役立っている。

II. 展望

無菌装置・操作の確立、固定化酵素・微生物（バイオリアクター）の普及、さらにコンピュータ利用の一般化という節目およびそれに連なる広い裾野を見渡しこれらが戦後 40 年、微生物による有用物質生産の工業化に貢献してきた事実を踏まえると、微生物工学、生物化学工学、培養工学、…と名称はともあれ、“微生物利用”に関する工学は研究・教育の場で順次、その体系を整えてきたといえる。

しかしながら、この工学体系は最近 10 年来、遺伝子組換えを中心とする遺伝子操作技術、細胞融合や組織培養技術がそれぞれ、広く浸透しつつ大型化することでその内容の充実と細分化の時代を迎えようとしている。内容の充実とは微生物の培養をめぐる増殖・代謝反応につき従来とかく経験論かつ現象論に過ぎたマクロ的なアプローチに、その理論的な背景をミクロのレベルに求めよ

うとする夢であり具体的には方法論として根拠薄弱な現在の培養のスケール・アップ法に新しい概念を導入しようとする願望である。それには遺伝子操作を駆使した新しい菌株の造成などを通じてミクロのレベルを工学的視点で会得することは有意義と考えている。体系の細分化とは既述の3つの節目に連なる裾野の拡大という意味からの細分化のほかに、動植物細胞の大量培養に付隨するであろう諸問題や超微量物質の工業的分離・回収など既存の工学を越えた要請への対応からくる細分化である。

いずれにせよ、遺伝子操作などの普及が前述の3つの節目に続く微生物工学発展上の第4の節目になることは明らかであるが、その節目を支える裾野が発酵工業プロセス上にどのような具体的な成果をあげつつ展開するかは21世紀を目前に今後によろしくお待ちである。

本稿のため写真と仕様を提供されたエイコー・フィルター(株)、日本澱粉工業(株)およびオリエンタル酵母工業(株)に謝意を表します。