

醸酵工学への新たな期待

大阪大学工学部醸酵工学科教授 田 口 久 治

1. まえがき

抗生物質、ビタミン、ホルモンなどの生理活性物質の生産、アミノ酸、ヌクレオチドなどの調味料の生産、有機酸製造、未来食飼料としての石油酵母の生産など微生物利用工業の領域は既存の醸造食品工業と相まって近年ますます拡大され、また微生物を包含する一般の生物活性を産業廃水、下水処理に応用し、さらに鉱物、鉱石からの有用金属の溶出にも一部微生物の利用をみるなど、現在醸酵工学が関連する分野は人類の福祉に直結するものとしてその重要性はいよいよクローズアップされてきている。しかも微生物を生体触媒として利用する醸酵工業には他の化学工業では予期しえないほど未知の因子が多く、生物化学、醸酵生理学、微生物遺伝学などを通じてこれからの生体触媒の機能と反応機構を研究する過程において、従来予想もしなかった新しい有用生産物を対象とする工業が誕生する可能性を十分に有している。すなわちこの領域には新しい醸酵生産物の種類も無限というほど未開拓の余地を残しており、高い水準の研究開発能力と研究者の多数である点から本邦で開発される醸酵技術に対する国際的な期待も非常に大きい。日本醸酵工学会と日本学会議の共催による第4回醸酵国際会議が本年3月京都で開催されるにいたった由縁もここにあると考えられる。勿論特異的な機能を有する微生物を自然界から分離し、その生産機構を解明するとともに研究室内で新規有用物質の生産の可能性を確認できたとしても、これが直ちに工業化へ結びつくことは困難であり、微生物が演ずる多種多様な生理活動を工業的規模において実施させる場合にも醸酵工学の果たすべき役割は非常に大きいものがある。この観点からすれば

生物が直接、間接的に関与するプロセスや操作を対象とする化学工学の一領域として発展しつつある生物化学工学が醸酵工学の一方の基盤となっていることは当然である。

したがって醸酵工学の研究者は最近の生化学、生物物理化学、遺伝生化学における諸成果を微生物利用工業に関する応用研究発展の過程に有機的に導入するとともに、醸酵プロセスの工業的確立とその合理化において必要な生物化学工学の発達に寄与すべき責を負っていると考えられる。

ここでは上記の観点から醸酵工学が関与する微生物利用工業における最近の動向と今後に期待される研究内容の紹介を行ない、さらに醸酵工学と生物化学工学との関連を筆者らが行なっている研究例を挙げて解説させていただく。

2. 微生物利用工業の展望

(i) 代謝制御による醸酵生産

新しい醸酵生産を開発するには特異な生合成能を有する新しい微生物を自然界から分離探究する方法とは別に栄養要求変異株を既存の菌株から人工的に造成し、図1に示すごとき代謝のfeed-back調節の障壁を排除して目的代謝物を蓄積せしめる方法がある。例えば代謝物Dを目的とする場合にはD→Eのプロセスに働く

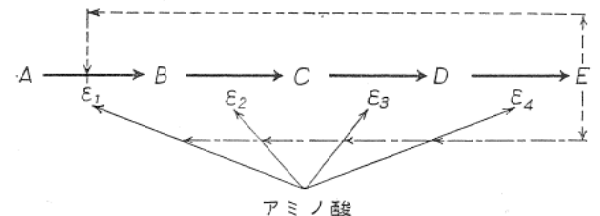


図1 生合成経路の代謝調節

A～B：代謝生産物（Eは最終生産物），
 $e_1 \sim e_4$ ：それぞれのステップの反応を司る酵素
 →：生合成経路，→：各酵素の生成，
 ---→：Eによる e_1 の活性阻害
 -→：Eによる $e_1 \sim e_4$ の生成阻害

酵素 ϵ_4 を欠失した変異株を造成すれば良いことになる。この場合菌株はEを合成する能力を失っているので阻害量よりも少量のEを添加してfeed-back阻害をのがれながらDの蓄積を達成せしめねばならない。このような代謝制御によって生産物をうる例としてはリジン醗酵(*Corynebacterium glutamicus*のホモセリン要求株使用)、イノシンヌクレオチド醗酵(s-AMP合成酵素の欠失したアデニン要求変異株使用)などが挙げられる。さらにアミノ酸、ヌクレオチド蓄積の要因をもつ菌株においても透過性の障壁によって細胞外に目的生産物を分泌蓄積しない場合には細胞膜透過性を変化せしめる調整法が試みれる。たとえば工業用培地のピオチン含量が多くて障害となっているグルタミン酸醗酵ではペニシリンその他の薬剤あるいは界面活性剤を用いて細胞外への排出を良好にしている。アミノ酸、核酸醗酵のみならず他の有益物

質を特異的に醗酵生産させるには、上記のごとくその代謝制御機構を十分解明し、適切な培養管理を行なうことが必要であり、微生物利用工業の将来はこのような代謝制御機構の把握に一つの大きな鍵があるといっても過言ではない。

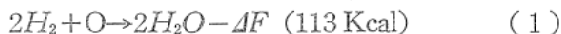
(ii) 未利用資源を基質とする醗酵生産

従来醗酵工業の炭素源は糖質基質に依存してきた。糖質源料は主として農産物に負うものであり、生産量と価格の変動、価格の漸騰、生産量の増加が望みえないなどの欠点がある。この欠点を補うものとして軽油を原料とする食飼料用酵母製造が最近脚光を浴び、基質としての対象はしだいに石油化学の二次製品、一般炭化水素におよび、さらに非糖質全般にまで拡大されるにいたっている。石油系物質の微生物利用に関する研究をまとめたものを表1に示す。すなわち食飼料用の菌体製造のみならず付価値の大きいアミノ酸、ビタミン、有機酸、抗生物

表1 石油化学製品の微生物による利用

原 料	微 生 物	生 産 物
n-パラフィン	<i>Candida, Pseudomonas</i> <i>Nocardia</i> <i>Alcaligenes, Corynebacterium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Arthrobacter</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Candida</i> <i>Brettanomyces</i> <i>Arthrobacter</i> <i>Arthrobacter</i> <i>Candida</i> <i>Arthrobacter</i> <i>Corynebacterium</i>	} 菌体タンパク 収率 100% } 菌体中 50~60% } イノシン酸 (調味料) 菌体中 } グアニル酸 5~6% L-グルタミン酸 1~2 g/dl アミノ酸類 ビタミンB ₁₃ 5 mg/l 他のビタミン類 油 脂 菌体中 50% リパーゼ 1 unit/ml 糖 類 1 g/dl クエン酸 } α -ケトグルタル酸 5 g/dl
メ タ ン	<i>Pseudomonas, Bacillus</i>	菌体タンパク 収率 70~80%
パラ・キシレン	<i>Nocardia</i>	2,5-ジメチルムコン酸 15g/l
ナフタリン	<i>Pseudomonas</i>	サリチル酸 15g/l
プロピレングライコール エチレングライコール	<i>Succinogligenes Yeast</i>	菌体および多糖類
酢 酸	<i>Brevibacterium</i>	L-グルタミン酸 > 5 g/dl
エタ ール	<i>Brevibacterium</i>	L-グルタミン酸 > 5 g/dl
エタノールアミン	Non-sporeforming <i>Bacteria</i>	グリシン
アセトニトリル	<i>Corynebacterium</i>	菌体タンパク
グリセリン	<i>Aspergillus</i>	ジハイドロキシアセトン収率80%

質など糖質醗酵の領域に近似しつつある。さらにメタノール資化性菌、メタンガス資化性菌についての開発研究にも著しい進展がみられる。特に天然ガスから安価に製造されるメタノール醗酵は有望で阪大で分離されたメタノール資化性菌は発育速度も大きく、生成菌体は栄養価も高く、トリプトファン、リジン、リボフラビン、V. B₆、V. B₁₂ が豊富であることが報告されており、糖質にて生産したものを石油系原料におきかえるのみでなく、石油系物質を基質としなければ生産不可能のもの開発にまで進むのが究極の目標と考えられる。炭酸ガス利用微生物の研究も今後期待される所が大きい。即ち多くの有機酸が炭酸固定反応を経て合成される経路が解明され、炭酸固定反応を利用する有機酸の醗酵生産の理論的可能性ができたものであり、炭酸固定で生成する有機酸は合成経路上、アミノ酸、核酸塩基および糖などの前駆物質ともなりうるので、この方式による有機酸醗酵の道はこれら有機酸以外の炭酸固定による醗酵生産の道にも通じる。また水素細菌 (*Hydrogenomonas*) を利用して飼料を製造することも全く夢ではない。この場合 H₂ を多量に要することが問題となるが、炭素源として CO₂ を用いるので回収 CO₂ からの資源再成という課題に対して一つの示唆を与えるものである。本菌は CO₂ と H₂ と空気を用いて培養する。その機構は (1) 式のごとく H₂ の呼吸的酸化によって代謝、合成に必要なエネルギーをえて、(2) 式のごとく CO₂ を同化し増殖をとげることになる。



効率の良い菌の場合のガス消費率は H₂:O₂:CO₂=6:2:1 とされている。

(iii) 化学反応工程への微生物の応用

有機化学工業、製薬工業その他の化学反応プロセスで純化学的手法では複雑すぎたり、多工程を要するものに微生物の生化学反応を利用しはるかに効率を上昇せしめ、反応を促進することができる。たとえばステロイドからコルチゾン生産、後述するビート製糖工程でのラフィ

ノース分解への醗酵利用、アンドロステロンからテストステロン、天然の藍の還元なども工業的に利用されている例である。その他 L-アミノ酸、コルチゾンなどの製造にも化学的生産プロセスへの生物機能の応用が考えられる。

(iv) 廃液処理における微生物利用

微生物の物質を分解、合成ならびに集積する機能が下水処理に利用されてきていることは活性汚泥法、メタン醗酵の例をあげるまでもなく、最近の公害問題に関して多くの紹介があり、公害の克服手段に微生物の人為的制御による管理が大きく貢献している。しかし希薄廃水処理の効率化、廃水微生物の生態と浄化機作の解明、活性汚泥の回収など今後急速に解決を要する課題も多い。特に有毒物質の生物処理は石油化学工業、有機合成工業、メッキ工業、石炭その他の鉱業、農薬の使用などについて期待されている。たとえばシアン濃度 1000ppm、フェノール濃度 2000ppm でも十分発育しかつこれらを分解する能力を発揮する菌株が報告されており、水銀、フッ素、イオウ、アルキルベンゼンスルホン酸などに対しても微生物の特異的な機能が判明している。また廃水処理を徹底し、微生物処理によって浄水化を行えば、工業用水として回収でき、産業用水の不足に対処して大きな解決法にもなる。

(v) その他

石油の脱硫、脱パラフィン、産業廃棄物から銀、水銀などの回収、海水からの微量貴重成分の回収、ウラン、チタニウム含有の低品位鉱などの精錬、宇宙における人間の生存環境調整、油田鉱脈などの探査などに微生物を応用することも、今後開発されるであろう。また微生物の培養工学的知見は藻類、光合成細菌、植物カサスの培養の研究に大きな貢献をしており、農産物、薬用植物をタンク内で製造しうることが可能となる日も近い。

3. 醗酵工学と生物化学工学の関係

機械、電気、電子、冶金、土木、化学工業等に関する工学に対して生物化学工学が関与する醗酵工学、衛生工学、食品工学、生体医学に關す

る工学など直接，間接，生物に関係する工学には前述のごとく未知の因子が多く，それも生物自身の問題に起因することが多い。すなわち物理，化学に関する工学に対し「一般性」という根拠で現象を論ずることが生物界では困難な段階にあるといえよう。生物化学工学は生物現象について工学的素材の蓄積を行ない，その定量的把握すなわち定式化を通じて積極的に一般性を求めることを目的としている。しかも生物化学工学は醸酵工業を母体としてその合理化の必要に応じて生長してきた経緯をもつものである。微生物が直接，間接を問わず介入する技術的諸分野においてその活用が発展するであろう生物化学工学の学問としての体系化に醸酵工学が寄与すべき責の大きいのも当然である。醸酵工業を対象とした生物化学工学の研究領域は大雑把に分類すれば生物反応に関する部門と生物反応とは直接無関係であるが醸酵プラントの一要素として重要な装置，操作に関する部門とに分けうる。

以下醸酵工業を対象とした場合の生物化学工学の主な課題について略述する。

(i) 微生物ならびに培養液の物性

微生物細胞の密度，比熱，熱伝導率，表面電位，培養液の粘性などの諸物性は菌体の機械的分離，熱処理の実施，分散の制御など醸酵工業の重要な操作ならびに装置設計の基本となるものであるが，従来これらの測定値ならびにその測定法には多くの問題点があり，今後その解明がまたれる。

(ii) 生物反応の定式化

微生物反応についての模型を立てこれを定式化すること，生物現象に何らかの法則性を見出すための確率統計論的な解析，ならびに計算機を利用しての計算，さらに計算結果と実験結果との隔たりの原因の検討と計算の基礎となった仮定の修正などを集積して微生物に関する未知の因子を工学的立場から解明することは醸酵プロセスのスケールアップと管理に対し有効な手段となる。これに関連し以下，当研究室で検討中の微生物の α -ガラクトシダーゼの生産に関する定式化を例として説明する。 α -ガラクトシダ

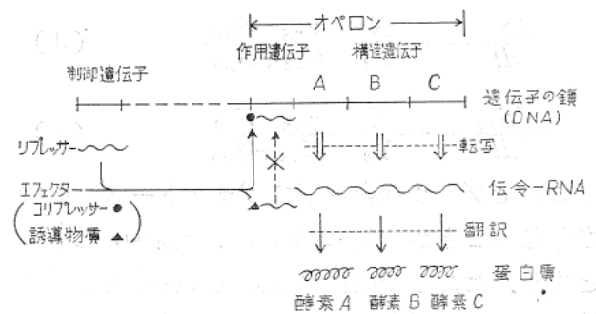


図2 酵素合成機構のモデル

リプレッサーは(コリプレッサーと結合して)作用遺伝子の働きをとめるが，誘導物質と結合すると作用遺伝子へのかかわりがなくなり酵素合成が起る。

ーゼはビート糖蜜中のラフィノーズを分解し蔗糖を回収するための酵素で，蔗糖の結晶化を促進する。

*Monascus purpureus*の生産するこの酵素はガラクトースの存在下で誘導的に生産される特長を有している。しかしガラクトースは高価であるので比較的安価でかつ比増殖速度も大なるブドウ糖を発育培地に使用し，適当な時期にガラクトースを添加することによって酵素を誘導する方式，またはブドウ糖，ガラクトースを初期から混在せしめる方式が考えられる。後者の場合ブドウ糖の消費後ガラクトースの消費と酵素生産が開始される。この場合 Monod による微生物の増殖モデル式および m-RNA (伝令-RNA) とリプレッサー濃度に関する Novick のモデルを用いると下記のごとき増殖，酵素生産の模型が組立てうる。なお m-RNA，リプレッサーなどが細胞内の酵素合成に関与する機構は図2を参照していただきたい。

培地中のブドウ糖，ガラクトース濃度を S_{A0} ， S_{B0} ，細胞内のそれらを S_A ， S_B とし，菌体濃度を X ，リプレッサー濃度を R ，m-RNA 濃度を M ，酵素量を E ，さらに各反応速度定数を $k_1 \sim k_7$ ，最大比増殖速度を μ_m ，飽和定数を K_s ，菌体の対糖収率を Y とし，添字 A ， B はそれぞれブドウ糖，ガラクトースに関するものを示すとする。

菌体増殖は次式で示される

$$\frac{dX}{dt} = X \left\{ \frac{\mu_{mA} S_{A0}}{K_{sA} + S_{A0}} + \frac{\mu_{mB} S_{B0}}{K_{sB} + S_{B0}} \right\} \quad (3)$$

基質消費については

$$\frac{dS_{A0}}{dt} = -\frac{X}{Y_A} \frac{\mu_{mA} S_{A0}}{K_{SA} + S_{A0}} \quad (4)$$

$$\frac{dS_{B0}}{dt} = -\frac{X}{Y_B} \frac{\mu_{mB} S_{B0}}{K_{SB} + S_{B0}} \quad (5)$$

ここでブドウ糖存在下でガラクトースが消費されないことから $S_{A0} > 0$ の時, $\mu_{mB} = 0, G_B = 0$ とする。ただし細胞内の糖濃度は細胞膜の透過性によって支配されるが一応細胞外の濃度に比例すると考えて次式のごとくおく。

$$S_A = G_A S_{A0} \quad (6)$$

$$S_B = G_B S_{B0} \quad (7)$$

菌体内ではリプレッサーはブドウ糖濃度に比例して合成され1分子的に分解し, またガラクトースと結合して複合体 (その濃度を C_{RSB} とする) を形成するとすると。

$$\frac{dR}{dt} = k_1 S_A - k_2 R - k_3 R S_B + k_4 C_{RSB} \quad (8)$$

m-RNA 合成はリプレッサー濃度と一次の逆比例関係があるという Novick のモデルを用い, 一方1分子的に分解するとして

$$\frac{dM}{dt} = k_5 \frac{K}{K+R} - k_6 M \quad (9)$$

酵素生産は m-RNA 濃度に比例し, かつ実験結果から本酵素は安定であるので, 分解はないとすれば,

$$\frac{dE}{dt} = k_7 M \quad (10)$$

またリプレッサーとガラクトースの複合体については,

$$\frac{dC_{RSB}}{dt} = k_3 R S_B - k_4 C_{RSB} \quad (11)$$

なお基質が完全に消費されるとヌクレオチドプールが消失し, m-RNA の合成が停止すると考えると $S_{A0} + S_{B0} = 0$ の時 $k_5 = 0$ となる。

生産される全酵素量 E_{total} は次式で示される。

$$E_{total} = XE$$

アナログ計算機により上述の酵素生産のモデルの解析を行なったものが図3である。すなわち糖消費, 菌体増殖および酵素生産について実験結果と同様な経過を示す結果が得られ, リプレッサーを考慮したこのモデルで α -ガラクトシダーゼの生産過程を模擬できることが判明した。しかしこの結果は計算の一例を示したもの

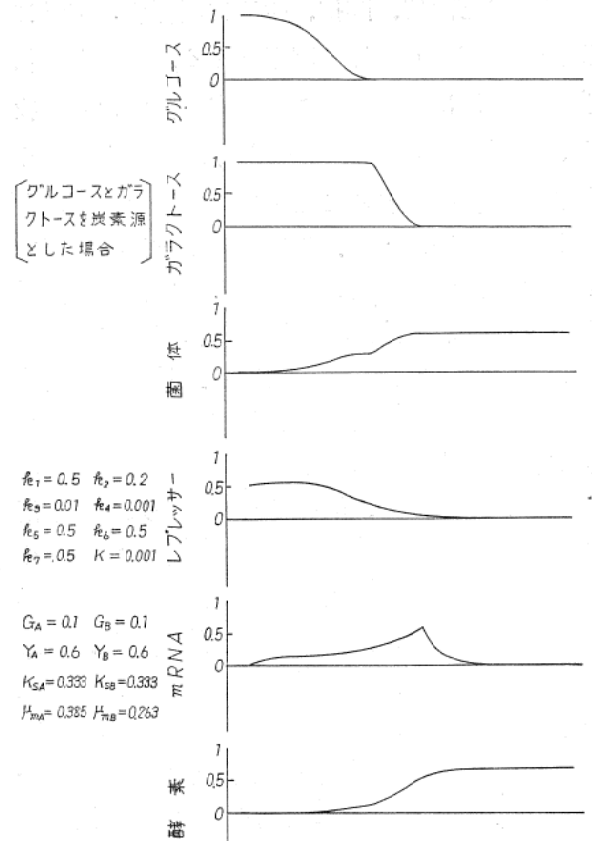


図1 アナログ計算機による酵素生産モデルの解析

であって, リプレッサーの合成速度定数など現在の実験技術では測定不可能な定数がいくつもあり, 計算に当たって用いた推定値が必ずしもすべて適確であったとはいえない。しかし今後, 初期条件を変えた回分, 連続培養系における菌体, 糖, 酵素などの変化についての実験結果とモデルによる計算結果が符合すれば, これら測定不可能な諸係数のより適確な値を推定でき, ひいては最適培養方式と最適操作条件を求めることができることになる。たとえば回分培養と単槽連続培養の実験をもとにして, 2槽 (第1槽で菌体増殖, 第2槽で酵素誘導と生産), 3槽 (第2槽で誘導, 第3槽で酵素生産) の連続培養, 菌体再使用系連続培養など複雑な系での酵素の生産性をモデルにもとづいて計算機によって比較することも可能となる。

(iii) 通気, かくはん槽のスケールアップ。

好氣的な液内培養において微生物の発育代謝に影響を与える因子としては培地組成, 温度, 中間生産物, 溶存酸素, 溶存炭酸ガス, 消泡

剤、混合強度などが考えられるが、酸素は溶解性が低く、濃度勾配が小となるので微生物の酸素要求を満たすのに必要な酸素供給速度をうるためには容量係数をかなり大にすることが肝要であり、培養系の物質移動のうちでも特に関心が持たれ、多くの場合、醗酵槽のスケールアップの基準となっている。すなわち酸素移動を効率よく行ないうる醗酵装置の選定ならびに開発のための基礎研究が必要である。特に醗酵工業では醗酵液が高粘性を示し、しかも非ニュートン性の流動を示す場合が多い。したがって酸素移動を基準とする醗酵槽の設計と培養管理のためにより適確な知見をうるには醗酵液の物性、流動、気泡の挙動、物質移動などの各要因と装置の幾何的因子、通気かくはんに関する操作変数との関係を総括した酸素需給の解析が期待される。これには個々の気泡のもつ物理量のかくはん槽内における相互関係を示しうるポピュレーションバランスに基づく基礎的解明が肝要となるであろう。さらに前述したごとく基質として非炭水化物が使用される場合は醗酵液の物性が一層複雑となるので、これに付随した新た

な通気・かくはんに関する問題点が発生しており、培養系のマイクロ混合の問題とともにこの分野でも解明をまたれる課題が多い。

(iv) 無菌操作

一般化学工業でみられない特色を醗酵工学に求めるとすれば、その一つは多くの醗酵工業が無菌操作を必要とすることである。大量培地の殺菌法およびその連続化、大量の通気のための無菌空気を供給する装置ならびに操作法、管路の殺菌法などに関する操作、装置の開発に果した生物化学工学の役割ならびに将来演ずるであろう役割もまた大きいものがある。

4. 結 言

今後開発するであろう微生物利用工業を展望するとともに、工業化の基盤となる生物化学工学の内容を紹介し、この分野において醗酵工学に期待される研究の動向について記述した。拙文のため題名に沿わぬ箇所も多いと考えられるが諸賢の御意見、御叱正いただければ幸いである。