



技術解説

微生物培養におけるファジィ制御の応用

塩谷捨明*

Application of Fuzzy Theory to Fermentation Processes

Key Words : Fuzzy Control, Maximum Production, Fed-Batch Culture, Glutathione

1. はじめに

私たちは古くから酒・ビール・ワイン・醤油などの醸造に微生物を利用してきた。ここでは微生物の生育に酸素を必要としない嫌気発酵が主流だった。しかし、1940年代になって、ペニシリンなどの抗生物質やグルタミン酸などのうまみ成分アミノ酸が酸素を必要とする好気培養で大量に作られるようになると、微生物を利用した発酵工業は急速な進歩を遂げるにいたり、今では発酵食品はもとより医薬品、アミノ酸、酵素など様々なものが作られ、私たちの生活に役立っている。

さて、これら微生物にはもともと私たちの欲しい物質を大量に作ってきたのであろうか。自然界の(微)生物は本来、自己の生存のために有利な仕組みを備えてきたのである。しかし私たちは、この仕組みを知ることによって、微生物の持つ様々な性質や機能を都合のよいように改造してきた。例えばアミノ酸発酵にその典型的な例をみることができる。微生物は、菌体構成成分であるアミノ酸を生育に必要な量以上に合成しないような仕組みを備えているので、アミノ酸を沢山作らせるにはその仕組みを何らか

の手段によって変えることが必要である。そこで、ある種の薬品を使って性質を変え、それらの菌の中から種々の手段を使って都合の良い仕組みの菌だけをスクリーニングし育種してゆくことが考えられた。さらに最近ではこれらのものを作るのに必要な遺伝情報を本来の菌から取りだし、加工し、他の(微)生物に移植するいわゆる試験管内での遺伝子組換え技術や、細胞融合などによる細胞内遺伝子組換え法による生産性の高い菌株が作られ、工業化されている。今日このように菌株の改変・改良・育種によって、改造された微生物を使って工業生産がおこなわれているのである。

さて、工業的生産に大事な、「最も効率よく、発酵生産を行うため」に、「育種」の他に忘れてならないことは、「培養環境を好適に保つこと」である。どのように高生産性の菌株を得ても、それを大量に好適な環境で培養できなければ、その発酵プロセスの工業化は成功しないであろう。すなわち、菌株の改変・育種と好適な培養環境の維持は、どちらも重要なことである。この意味からタンクの中で微生物の能力を最大限に発揮させることが、発酵槽の運転にとっての最大目標となる。本文ではこの点に焦点を絞って話を進め、特にファジィ制御がどのように培養制御に応用されているかについて述べたい。

2. 微生物培養プロセスの制御

まず、この育種された菌を大量に増やし、また有用物質を生産する工程、すなわち培養プロ

*Suteaki SHIOYA

1945年2月16日生

昭和46年京都大学大学院工学研究

科博士課程衛生工学専攻中退

現在、大阪大学工学部応用生物工

学科、教授、工学博士、生物プロ

セスシステム工学、生態工学

TEL 06-877-5111 (内線 4386)



セスの概略についてみておきたい。

微生物の培養工程は原料調整工程、目的生産物を生産する保存菌株をフラスコ小規模培養槽などによる種母培養をへて主培養槽に接種し微生物の増殖生産を行わせる培養工程と、培養液からの生産物の分離回収工程、という段階からなっている。培養工程の中心となる主培養は(半)回分操作と連続操作に大別され、この主培養に使われるタンク(培養槽)にも高酸素移動効率を考慮した種々のタイプのものがある。

さて、培養槽と微生物が与えられた時、これを用いていかに能力を最大限に発揮させるかを流加培養について考えてみよう。なお流加培養とは菌体の培養、生産物の生産に必要な基質を培養経過に応じて槽内に流加はするが、流出はしない操作をさし、半回分操作ともいう。(微)生物はそれ自体、菌独自の形態で増殖し、また改造され、飼い慣らされた、プログラムに従って私たちにとって有用なものを生産する。しかし、この増殖・生産は栄養源濃度やpH、温度、DO(溶存酸素濃度)などの条件に大きく左右される。パン酵母などは適当に糖濃度を調節しないとエタノールを生産したり、また自分自身生産したエタノールを資化するし、必要な溶存酸素濃度も大きな操作因子となる。つまり加えた糖質を効率よく菌体に変換するには、絶えず糖濃度を一定の値に保つように、酵母によって取り込まれた分をちょうどよいように補給する必要がある。また、ある場合には充分エネルギー源を与えておいて菌体量を増やした後、条件を変えて一気に「生産物」を生産させるような操作法をとることがある。このように私たちはタンクの中の微生物をうまく操ることによって、その能力を最大限に発揮させている。そこで必要となるのは培養制御という操作である。

制御は、対象の将来を予測して加える操作(フィードフォワード制御)と、対象の状態を計測してその計測値にもとづき加える操作(フィードバック制御)に、大別できる。どちらにも一長一短があり、一般に原因から結果までの応答に時間がかかる場合にはフィードフォワードが、またすぐ応答するような場合にはフィードバック制御が適している。フィードフォワード制御

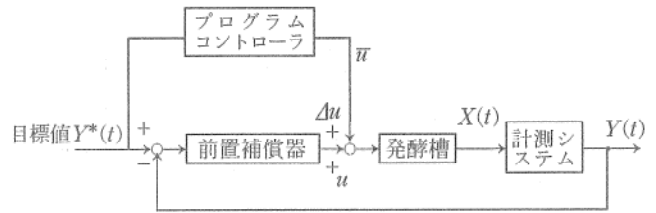


図1 フィードフォワード・フィードバック制御

をするには、対象がどんな応答をするか詳しく知っておく必要があり、これが欠点となる。フィードバック制御は応答が遅い系には適していない欠点がある反面、対象の概要が分かれば使える便利さがあり、応答をみながら徐々に対応してゆけるような柔軟性をもたせられるので一般に広く使われている。ただ流加培養系のように糖流加量を変更してもなかなかタンクの中の環境がすぐには変らない(応答の遅い)対象にはこれらの併用型が好ましいことが知られている。この併用型を情報の流れに注目して図1の様に書くことができる。プログラムコントローラ部分がフィードフォワード入力となり、これは、例えば菌体の増加する速度(比増殖速度)を目安に、これに必要な栄養源の量(基質量)を計算して決められる。(比増殖速度一定では菌体量は指数関数的に増加するので、加える必要基質量も指数関数となる。)

この図にある、前置補償量の設計が次節で考える一つの主題となる。すなわち制御理論やファジィ制御により補償量を決め、希望の状態を保つことができる。以下ではこのことについて説明しよう。

3. ファジィ制御の概念

最近、洗濯機や掃除機に使われているなどと、ファジィ制御という言葉をよく耳にしたり目にしたりする。ファジィ制御はもともと1965年、Zadeh教授の提唱したファジィ集合という概念を出発点としている。しかしここ数年言語記述によるあいまいさをとり扱える利点を活かされて応用面で脚光を浴びるようになり、特に日本では「ファジィ」という言葉が流行語となっている。残念ながら限られた紙数でその全貌を明らかにすることは無理なので、先達の参考書に譲ることにし、ここではほんの概念のみを紹介

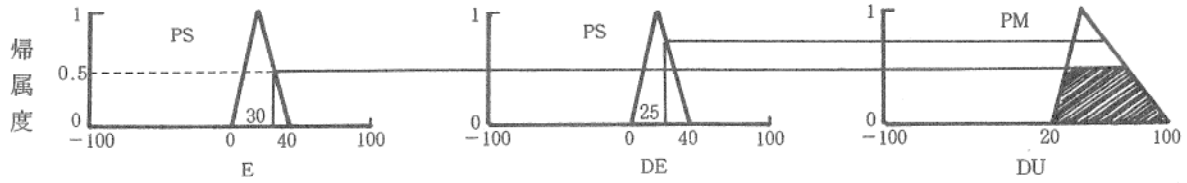


図2 ファジィ集合, メンバーシップ関数と推論結果
 ルール: IF E=PS & DE=PS THEN DU=PM (E=30, DE=25)

する。

まず例として目標値からのずれを「誤差」と定義し, この「誤差が小さい」という集合を考えてみる。「誤差が小さい」という概念は例えば誤差の変動幅が与えられ, その変動幅の±20%以内なら小さいといえるだろうか. 30%では小さいといえないのだろうか. このように言語の中にははなはだあいまいで主観的な概念をもつものがある。

そこで「誤差が正で小さい (positive small: SM)」という集合を考えたとき+30%の誤差は5割ぐらゐはこの集合に属しているというきわめて自然な感覚を認めようというのがファジィ集合の概念である. 5割ぐらゐは属しているのを定量的に表現するため「メンバーシップ関数 (帰属度関数)」を図2のように導入する. ここで帰属度1では完全にその集合に属し0では属さないことを, その中間の値で帰属度の割合を表現する. つまりファジィ集合は「正で小さい」と「正で小さくない」集合の境界をあいま

いにすることを許しているのである. 結局30%の誤差のときはどちらの集合にも属していることになるのである。

さて, このようなファジィ集合を使うことによって, 言語表現された規則を意志決定に利用することができ, 特に制御系などによく利用されている. 以下, ファジィ制御の一つの利用法について説明する. 「もし誤差 (E) が正で小さく (PS) また誤差の時間微分 (DE) が正で小さいなら (PS), 操作量の変更量 (DU) は正で中程度 (PM) である」というルールから, 操作量の変更量 (DU) を決めることができる. このようなルールをテーブルの形でまとめたのが表1である. 規格化されたEおよびDEの台変数 (ここでは-100~+100) に対してそれぞれ7つのファジィ集合を考え, それぞれのファジィ集合の組合せに対して一つの規則を与えること

表1 ファジィPI制御ルールテーブル

DE \ E	NB	NM	NS	ZE	PS	PM	PB
NB	NB	NB	NB	NB	NM	NS	ZE
NM	NB	NB	NB	NM	NS	ZE	PS
NS	NB	NB	NM	NS	ZE	PS	PM
ZE	NB	NM	NS	ZE	PS	PM	PB
PS	NM	NS	ZE	PS	PM	PB	PB
PM	NS	ZE	PS	PM	PB	PB	PB
PB	ZE	PS	PM	PB	PB	PB	PB

- NB : Negative big
- NM : Negative medium
- NS : Negative small
- ZE : Zero
- PS : Positive small
- PM : Positive medium
- PB : Poaitive big

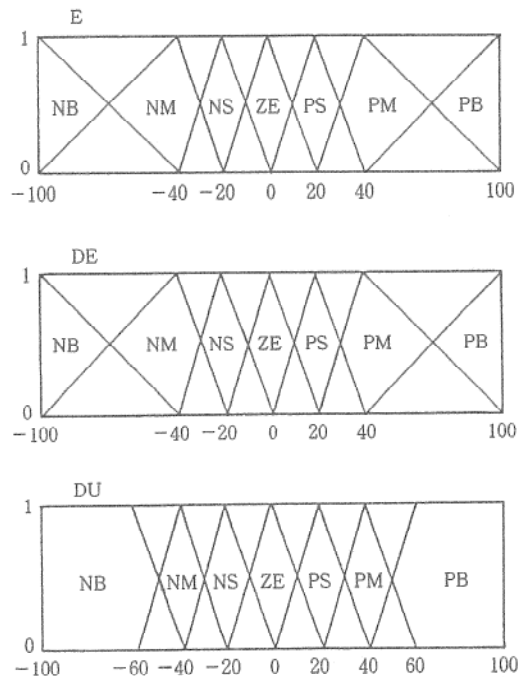


図3 ファジィPI制御のメンバーシップ関数

を表の形で表している。結局EとDEの7通りずつの集合に対し都合 $7 \times 7 = 49$ の組合せに対するルールを考える。尚、それぞれのファジィ集合に対するメンバーシップ関数は図3のように与えている。

さて具体的に $E = 30\%$ 、 $DE = 25\%$ という数値が与えられたものとする。このとき図3からわかるようにEはPSとPMの要素でありDEも同じくPSとPMの要素となるので、49のルールのうち具体的に適用されるべきものはEとDEのそれぞれの場合の組合せ、すなわち4つのルールが適用される。例えば「 $E = PS \& DE = PS$, THEN, $DU = PM$ 」というルールを用い一つの推論法に従うと $E = 30$ 、 $DE = 25$ に対するそれぞれのメンバーシップ関数の小さい方の値(この場合0.5になる)でDUに対するPMの集合をカットし、これがこのルールからの推論結果となる(図2の斜線部)。そして残りの3つのルール、例えば「 $E = PM \& DE = PS$, THEN, $DU = PB$ 」などでも同様の操作をし推論された集合を重ね合せ、図4に示すようにEとDEの台変数に対するメンバーシップ関数の大きい方をとった集合を導く。破線で囲んだ部分がこれら4つのルールを適用した推論結果となるがこれを具体的な操作量に変えるため(脱ファジィ化)この図形の重心をとって $DU = 62.3\%$ というのがここでの推論結果となる。これはあくまで1つの推論法でありMin May重心法とよばれている。要するに測定値をファジィ集合の要素とみなし(ファジィ化)いくつかのルールを適用して推論し、操作量にもどす(脱ファジィ化)操作をおこなっているのである。

この手続きからもわかるように標準的なファジィ制御を使うには次の3つを決めておく必要がある。

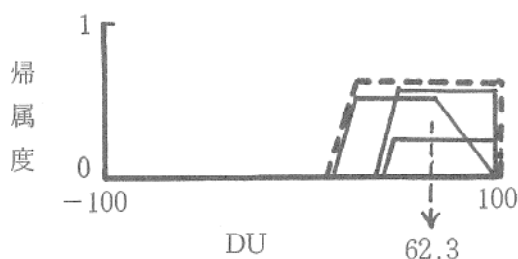


図4 ファジィ推論結果 $E = 30$, $DE = 25$

- (1) IF, THEN という型のプロダクションルールで書かれたルールがあること。
- (2) 言語表現されたファジィ集合に対するメンバーシップ関数を定義してあること。
- (3) 推論方法が与えられていること。

具体的問題に適用する上で最も重要なことは確立されたルールがあることで、従来から職人技のような技術で支えられてきた操作を自動化したいというようなときには、そのまま移植できるという利点がある。これは清酒醸造における杜氏の役割を彼等の後継者不足という点から自動化したいという試みのなかに、実現されつつある。

そこでは、エキスパートの確立した操作方法から如何にルールを抽出し、ファジィ集合で表現してゆくかが、ファジィ制御に置き換える時に残された課題である。これらがうまく行えれば職人技を受けついでファジィ制御が実現できる。また、ファジィ制御の特徴は、多くの情報をそのまま組み込める点や、特に非線形なシステムに有効に使える点である。この特徴から、必ずしも経験の豊富でない(エキスパート経験則が確立されていない)系に対しても応用が試みられ、その特徴が生かされているのである。

4. ファジィ推論・制御による培養操作

さて、ここではファジィ制御がどのように菌の能力を最大限に引出す培養制御に使われているかを一、二の例で説明しよう。

ある種の酵母はグルタチオンという3つのアミノ酸からなる物質を比較的高濃度に蓄積することが知られている。このグルタチオンはその解毒作用のために医薬品、特に肝臓薬として使われている。さてこのグルタチオンを流加培養で作ることを考える。最も効率的な方法は、最初酵母を沢山作っておいて(増殖速度最大期)、次にこの酵母にグルタチオンをどっと作らせる(比生産速度最大期)ような培養法であることが、私たちの過去の研究からわかっている¹⁾。

問題は比生産速度最大期の制御方法で、比生産速度を最大に保つには適当な糖(グルコース)濃度に保つ必要がある。幸いなことにこの糖濃度はちょうど流加培養のところで説明したよ

生産と技術

うな、エタノールを生成し始める濃度に一致している。糖濃度がこの値より高ければエタノールを生成し、逆にこの値より低ければ酵母がエタノールを取り込んで資化していく。従って、適正な糖濃度を保つことと、エタノールの生成、資化がないのでエタノール濃度を一定に保つこととは同じ意味をもつことになる。尚、糖濃度を直接制御することも考えられるが、センサーなどの問題からここでは考えないことにする。

かくしてエタノール濃度を一定とするように流加量を操作することを考える。このときの制御はすでに述べたようにフィードフォワード・フィードバック制御を用い(図1), この前置補償器のところにファジィ制御を用いてみよう。すなわち、あらかじめ実験から予想されるエタノール濃度一定のための流加量(フィードフォ

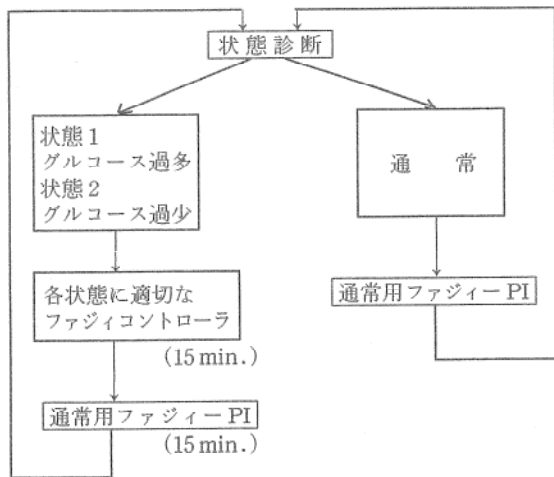


図5 状態診断にもとづくファジィ制御

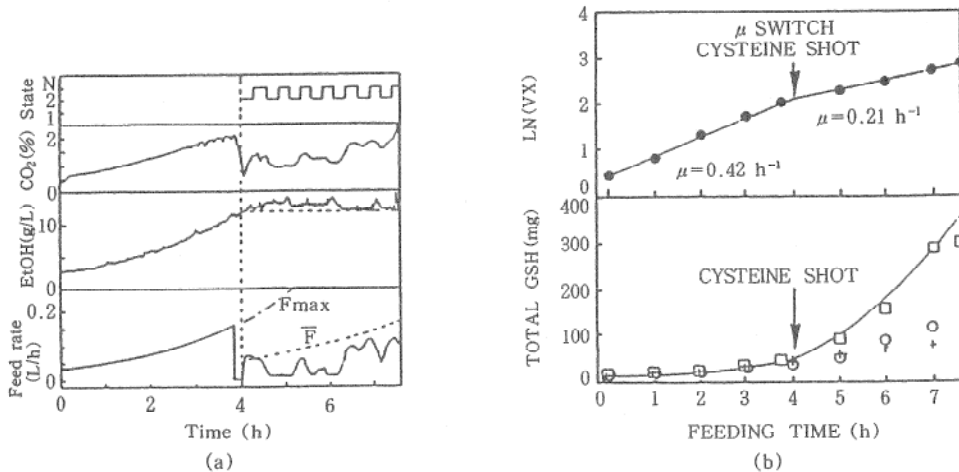


図6 ファジィ制御によるグルタチオン最大生産
ファジィ制御(□), 他の政策(O, +)

ワード量)を与えておき、エタノール濃度を測定しながら、一定にならない時にフィードバック制御としてのファジィ制御によって流加量に修正を加えてゆくことを考える。

さて、ここで用いるルールは表1に示すように測定値エタノールの目標値からの「ずれ(E)」とこの「ずれの時間的变化(DE)」の大小によって流加量の修正量を49通り与えている。またこのときのメンバーシップ関数は図3に示すようにそれぞれ三角や台形として与えている。なお、この図は横軸を標準化して書いているので、実際使う時には適正な値を掛けて用いる。また推論はMix-Max-重心法をとった。

このような制御は(DE, Eが比例(proportional)積分(integral)に対応することから)ファジィPI制御と呼ばれている。まず最初にこのファジィPI制御を用いてみた。よく用いられている従来型の制御系よりは良い性能を示したが、出発点での目標値からのずれが大きい時は満足すべき結果は得られなかった。これは槽内糖濃度の変化がエタノールの生成成分、資化に表われるには大きな時間遅れがあるためと考えられた。そこで、糖濃度が充分高くてもまだエタノールを沢山生成していない時期か、糖濃度がかなり低くても菌の調子が悪くてエタノールを生成しているかなどの、酵母の状態を判断しながら適切な手を打つことを考えた。これは図5に示すような状態診断にもとづき、それぞれの状態に対してルール変更などにより適切なファジィ制御を与えることになる。このような改良

の結果図6aに示すようにうまくエタノール濃度を一定に保つことができ、このような制御をかけない場合に比較して図6bに示すようにグルタチオン生産量を倍加することができ、酵母の調子をみながらファジィ制御することの成功例²⁾をここにみるができる。

他の応用例として清酒醸造への応用について簡単にふれておきたい。清酒醸造は精米、原料処理、蒸し、製麴、酒母、主発酵(もろみ)、ろ過など多くの工程からなっており、エキスパート(杜氏)の巧みな技術にも支えられてきた伝統的な発酵製品である。しかし近年、年間を通じて製造可能な四季醸造への移行や杜氏の後継者不足によるプロセスの自動化の必要性にせまられている。そこで清酒醸造工程の自動化、特に清酒の品質に大きく影響を与えられている主発酵(もろみ発酵)にファジィ制御を応用した例がいくつか報告されている。酒づくりには杜氏(エキスパート)のもつ経験則(ルール)の言語記述により伝承されてきたわけだから、これはファジィ制御が応用できる典型的な例と言える。

さて主発酵では発酵温度の管理(制御)が具体的な操作であるが、これをファジィ制御で達成するため、今安らの報告³⁾によると糖濃度に対応するボーメ度の理想的な経時的変化の目標パターンを設定し、これに添わせるようにエタノール濃度、ボーメ度、またピルビン酸濃度のデータにもとづき、エキスパートからの情報をもとに設定発酵温度をファジィ推論により計算させている。彼らはメンバーシップ関数を、発酵開始からの経過時間によって変えている点や、アルコール濃度のデータによってルールを変えているのが特徴である。これらファジィ制御の結果、発酵18日後、希望の品質の原酒が得ら

れ杜氏によって作られた清酒に劣らないうまい酒が作られたと報告されている。もちろん、この制御系を組み上げるのにも工夫がなされているのであるが、ファジィ制御がうまく機能したのは、エキスパートによる長年の経験則(ルール)があったからであり、これをファジィ制御という「道具」によってうまくコンピュータに移植できたからといえよう。

5. おわりに

ファジィ制御について、それがいかに(微生物の機能を最大限に発揮するために利用され得るかということについて述べてきた。そしてファジィ推論制御がいかに有用であるかを知った。しかし大事なことはファジィ制御はあくまで道具の一つであることである。確かに便利な道具であるが、使い方がまずいと良い結果がないし、調整すべきパラメータ(メンバーシップ関数)や採用すべきルールなど、使用者の決定にまかされている部分も多いので道具として使いこなすことが必要である。またオールマイティでないことも確かなので、いくつかある道具の一つとして、とらえておくことが必要であろう。

参考文献

- 1) Shimizu H., Araki K., Shioya S. and Suga K., *Biotechnol. Bioeng.*, Vol.38, pp.196-205 (1991)
- 2) Alfafara C., Miura K., Shimizu H., Shioya S. and Suga K., *Biotechnol. Bioeng.*, Vol.41, pp.493-501 (1993)
- 3) 今安聡, 杉並孝二, 阿部康久, 川戸章嗣, 大石薫, *生物工学誌*, 第71巻, 29-41頁 (1993)