

流加培養による酵母の生産

 長森 英二^{1*}・並木 健²

酵母菌体の製造

酵母はもっとも古くから発酵食品に利用されてきた微生物の一つであり、微生物の存在が知られる以前から酒類やパン製造などに用いられてきた。酵母は真核単細胞性であり、その優れた増殖速度、耐酸性、耐糖性から、これまでに各種有機酸や機能性糖質、油脂、ビタミン類、異種タンパク質、さらには未利用バイオマスを原料としたバイオ燃料などの多岐にわたる有用物質の効率的生産プラットフォームとして活用されている。酵母菌体そのものを大量増幅する技術の進歩に大きく影響を与えた技術・事柄としては、1) 1860–70年代に通気培養によって収率が大幅に増大し、それまでアルコール発酵の副産品として利用されてきた酵母菌体が積極的に生産されるようになったこと、2) 19世紀末期から20世紀初頭にかけて穀類の代替として廃糖蜜 (molasses) が栄養源として検討され、良質な酵母の生産が可能であることがわかったこと、3) 1910–20年代に酵母の増殖に合わせて指数的に栄養源を流加する指数流加培養法が開発され、さらなる収率の増大が達成されたこと、4) 好気発酵などの酵母の生理・代謝に関する理解が進むとともにオンライン式のアルコールセンサーや代謝ガス分析計が登場し、コンピューターを用いたアルコール制御や呼吸商 (RQ) 制御といった基質流加量制御技術 (1970年代) が工業規模で実装されたこと、などがあげられる¹⁻³⁾。本稿では、流加培養技術の工業化適用例としてもっとも知られるこの古典的プロセスを題材として、流加培養の理論やその制御技術を振り返り、これを応用した近年の適用例にも触れたい。

流加培養

回分培養において、培地を抜き出すことなく、培地を連続的ないしは間欠的に培養槽に供給する培養法が流加培養法と定義される (図1)。時間経過とともに培養液量は増大する。産業上の流加培養法の利点は、培養液中の基質濃度を低く保つことで、高い基質濃度による基質消費あるいは物質生産、菌体増殖に対する抑制 (リプレッション) の解除が可能となる事である。

菌体増殖工程における流加培養では、培地中の基質枯渇状態をスタートとして、菌体の指数増殖により見込まれる量の基質を指数的に流加する指数流加培養が行われる。この指数流加培養において、経時的に指数増加する培地流加速度 F [$L h^{-1}$] は、以下の式 (1) で算出される。

$$F = \frac{\mu V_0 X_0}{Y_{X/S} S_F} \exp(\mu t) \quad (1)$$

ここで、

V_0 : 流加開始時の培養液量 [L]

X_0 : 培養開始時の菌体濃度 [g-cell L^{-1}]

$Y_{X/S}$: 菌体収率 [g-cell g-substrate⁻¹]

S_F : 流加培地の基質濃度 [g L^{-1}]

μ : 比増殖速度 [h^{-1}]

t : 培養時間 [h]

である。たとえば一時間毎に、流加量を段階的に指数増加させる方法はステップ制御などと呼ばれる。また、この際の培養液量 V [L] の経時変化は以下の式 (2) で算出される。

$$V = V_0 + \frac{V_0 X_0}{Y_{X/S} S_F} \{\exp(\mu t) - 1\} \quad (2)$$

以上の2式の導出過程は、成書に詳細に記載されている^{4,5)}。上記式は理論的な経時変化を示しており、実際には培地の流加に加えて、サンプリングや通気に伴う蒸発による培養液の減量、pHの維持に用いる酸やアルカ

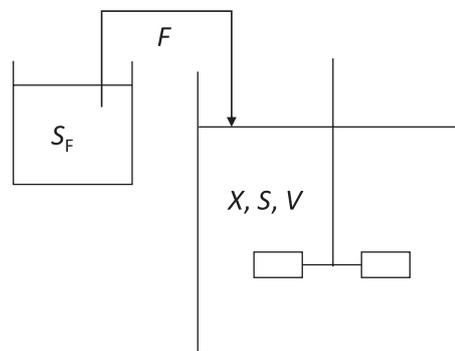


図1. 流加培養

* 著者紹介 ¹大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物工学コース (講師) E-mail: nagamori@bio.eng.osaka-u.ac.jp
²サントリーグローバルイノベーションセンター

りの流入による培養液の増量が無視できない場合が多く、定期的に培養液量の実測値を得て流加量を調整することが好ましい。

好気発酵による菌体収率の低下

酵母菌体の製造においても、式(1)に従い、 F を経時的に変化させていけば、理論上は、菌体は指数的に増殖し、培養槽中の基質濃度は低濃度に保たれるはずである。しかしながら、実際には理論上の F と実際に菌体が要求する F に差異が生じ、特に基質供給量が要求量よりも過剰となった時に好気発酵と呼ばれる現象が現れ、菌体収率を大幅に低下させることが問題となる。工業規模で正確な V を得ることや、 F を精密に制御することには困難さがあり、また高細胞濃度では酸素供給が律速に達することで設計式通りの μ で菌体が増殖しないなどの事柄もこの差異の原因となりうる。

パスツール効果 (Pasteur effect) は、嫌気状態でアルコール発酵を営んでいる酵母に酸素を供給すると発酵が抑制され、糖の消費速度が減少するとともに酸素呼吸が促進され、高い μ と $Y_{X/S}$ が得られる現象である⁶⁾。対して、好気状態にも関わらず一定濃度以上のグルコースの存在(110 mg/L以上)⁷⁾によって酸素呼吸が抑制されアルコール発酵が起き、 μ と $Y_{X/S}$ の低下する現象は、発見者にちなみクラブトリー効果 (Crabtree effect)、または、好気発酵として知られる(図2)⁸⁾。

(注：酵母の中でも、クラブトリー効果を示す(クラブトリー効果陽性)種として*Saccharomyces cerevisiae*, *Scizosaccharomyces pombe*, *Torulopsis glabrata*などが、クラブトリー効果陰性種として*Candida utilis*, *Kluveromyces marxianus*, *Hansenula nonfermentans*などが存在する。)

好気発酵を抑制する流加速度制御

収率低下を招く好気発酵を避けるためにもっとも簡単な方法は、式(1)において酵母の実際の μ より低めの値を採用し、つまりは基質をゆっくりと流加する事である。しかしながら工業的にはできるだけ短い時間で生産

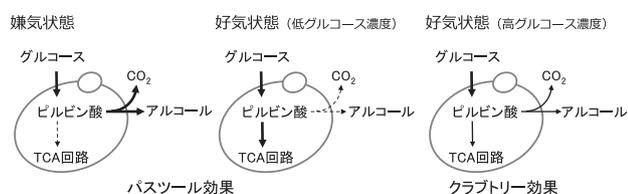


図2. パスツール効果とクラブトリー効果

を終えることが望ましいため、できるだけ高い μ 値を設定したい。では実際には、どれだけ高い μ 値を設定できるだろうか。図3に、好気条件においてグルコースを増殖制限基質とした*S. cerevisiae*の連続培養(グルコースケモスタット)した際の、 μ (=希釈率 D) [h^{-1}]と菌体濃度 X [g-cell L^{-1}], $Y_{X/S}$, O_2 消費速度 Q_{O_2} [$\text{mmol g-cell}^{-1} \text{h}^{-1}$], CO_2 生成速度 Q_{CO_2} [$\text{mmol g-cell}^{-1} \text{h}^{-1}$], 呼吸商($\text{RQ} = Q_{\text{CO}_2}/Q_{\text{O}_2}$)の関係を示す⁹⁾。図中において、 $\mu = 0.25 \text{ h}^{-1}$ 以下では $Y_{X/S} = 0.5$ と一定で、 $\text{RQ} = 1$ に保たれているのが分かる。一方、 $\mu = 0.25 \text{ h}^{-1}$ 以上では好気発酵に伴う Q_{CO_2} の上昇と Q_{O_2} 低下により、 RQ 値は急激に上昇し、 $Y_{X/S}$ は低下している。これらの知見を活用し、*S. cerevisiae*の指数流加培養プロセスにおいて、式(1)の μ と $Y_{X/S}$ をそれぞれ 0.25 h^{-1} , 0.5 と設定して流加培養を開始させた上で、 RQ 値を一定の範囲($1.0 < \text{RQ} < 1.2$)に保つよう F を制御(RQ 値が 1.2 以上では F を減じ、 1.0 以下では F を増加)し、好気発酵の発生を抑制するのが、合業らにより開発された RQ 制御と呼ばれる方法である(図4)¹⁰⁾。培養初期の菌体濃度が薄い段階では、排ガス中における O_2 濃度や CO_2 濃度の変化が微量すぎるため、センサー感度の問題などから RQ 値の信頼性が乏しくなる。このような菌体濃度領域においては、 X と好気発酵を起こしていない状態に相応する Q_{CO_2} 値から排ガス中の然るべき CO_2 濃度をあらかじめ推算し、 CO_2 濃度が高くなり過ぎないように F を制御する方法が採られ、 CO_2 制御と呼ばれる。排ガス中のアルコール濃度を測定する半導体センサーを用い、培養液中のアルコール濃度を推定し、 F の制御を行う方法はアルコール制御と呼ばれ、工業的に実装可能なセンサーの登場によって実現された。実際のプロセスでは、これらの方法が適材適所に組み合わせられ利用されている。

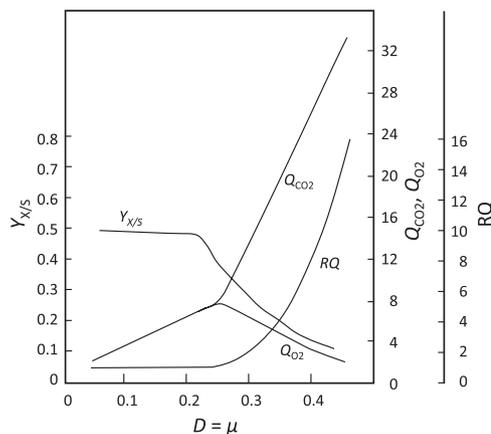


図3. グルコースを制限基質とした*S. cerevisiae*のケモスタット(文献9を改変)

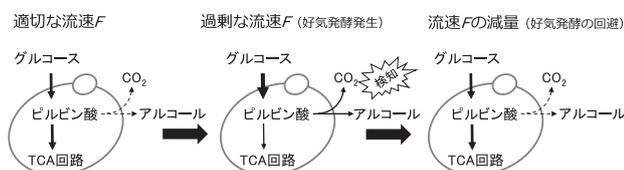
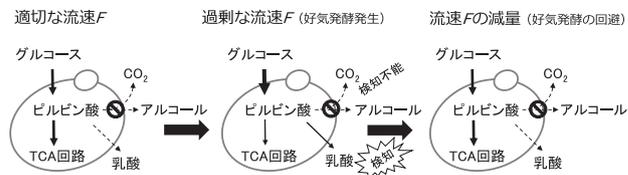
図4. 好気発酵を検知して基質流速 F を制御する

図5. 遺伝子組換え乳酸生産酵母の流加培養における制御

遺伝子組換え乳酸生産酵母の指数流加培養制御

豊田中央研究所とトヨタ自動車、東京大学により開発された遺伝子組換え乳酸生産酵母 (*S. cerevisiae*) は、発酵性プロモーターであるピルビン酸デカルボキシラーゼ (PDC) プロモーターの制御下で乳酸脱水素酵素 (LDH) を発現する点が特徴的である^{11,12)}。パスツール効果に従い、好気条件では菌体増殖を優先し、嫌気状態では乳酸生産を優先するため、通気条件によって増殖と生産の明確な切替えが可能である。このような特徴は、菌体増殖工程では廃糖蜜などの混雑物が多いものの低コストである培地を使用する一方、発酵工程にはある程度純度が高い糖を原料に用いることで乳酸精製工程への負荷を軽減する事も可能と推測される。菌体増殖のための指数流加培養に話を戻すと、この遺伝子組換え酵母では副生成物であるアルコールの生成は大幅に低減されているため、指数流加培養プロセスにおいては前述したRQ制御、CO₂制御、アルコール制御は使用することが原理的に難しくなる(好気発酵をCO₂やアルコールの発生によって検知することができない)。そこで、好気発酵によって培地中に生成する乳酸によるpHの低下をpHセンサーで検知し、 F を制御する方法が開発されている(図5)¹³⁾。実際にpHの低下をモニタリングすることによって、RQ値の上昇をモニタリングする場合よりも、早期に(高感度に)好気発酵を検知し高い $Y_{X/S}$ が実現されたことが示されており、新しい物質生産系のデザインに古典的な指数流加培養制御法の理論をシンプルに適用した興味深い例である。

工業的な酵母生産に用いる培地原料の注意点

最期に補足として、酵母を工業規模で生産する際の、培地原料に関する注意点を少しだけ述べたい。酵母菌体を効率よく工業的に製造するにあたり、原料の特性が製品の品質に大きく影響を及ぼすことは十分理解すべきである。たとえば、酵母製造に用いられる主原料である廃糖蜜は、寒冷地作物である甜菜大根より得られる甜菜糖

蜜と、亜熱帯作物である砂糖キビより得られる甘蔗(かんしょ)糖蜜の2種類に大別される。元原料のみならず、その製造プロセスも大きく異なるため、糖組成に加えて窒素やリンといった、菌体構成に必要な成分の含有量には大きな違いが生じる。この組成差は製品である酵母菌体の活性や保存性といった特性に影響を及ぼすことが知られる。また、酵母の増殖には鉄や亜鉛、銅、マンガンなどの微量元素に加え、ビタミン類も必要となる。微量元素類は基本的には糖蜜に含まれる量で十分に賄えるのに対し、ビタミン類でも特に酵母の増殖に律速的な因子となるケースが多いビオチンに関しては、とりわけ甜菜糖蜜中の含有量は非常に低く、これを用いる場合にはビオチン補給を目的として、甘蔗糖蜜を適宜混合して使用する方法も取られる¹⁴⁾。さらに、廃糖蜜の原料は農作物であるため、品種や産地、その収穫時期により成分値が大きく変動することが知られており、特に工業的生産を行う上で培地原料の組成・特性を把握することは重要なポイントとなる。

文 献

- 1) 橋谷義孝編：酵母学，p. 488，岩波書店(1967)。
- 2) 石川 尊：生物反応プロセスシステムハンドブック，p. 238，サイエンスフォーラム(1985)。
- 3) Kulp, K. and Lorenz, K.: Handbook of Dough Fermentations, p. 102, Marcel Dekker, Inc. (2003)。
- 4) 日本生物工学会編：基礎から学ぶ生物化学工学演習，p. 90，コロナ社(2014)。
- 5) 片倉啓雄ら監修：有用微生物培養のイロハ，p. 169，エヌティーエス(2014)。
- 6) Pasteur, L.: *Compt. Rend.*, **52**, 1260 (1861)。
- 7) Nanba, A. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **59**, 383 (1981)。
- 8) Crabtree, H. G.: *Biochem. J.*, **22**, 1928 (1929)。
- 9) von Meyenburg, H. K.: *Arch. Microbiol.*, **66**, 289 (1969)。
- 10) Aiba, S. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1001 (1976)。
- 11) Saitoh, S. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2789 (2005)。
- 12) Ishida, N. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1964 (2005)。
- 13) Nagamori, E. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 193 (2013)。
- 14) 田中康夫，松本博編：製パンの科学II 製パン材料の科学，p. 80，光琳(2004)。