

〔醸酵工学 第59巻 第6号 525-537. 1981〕

総 説

メタノールからの菌体生産に関する培養工学的研究*

(昭和55年度 日本醸酵工学会照井賞受賞)

五 嶋 慎 治

三楽オーシャン(株)中央研究所**

1. は じ め に

微生物タンパク(SCP)の生産技術は近年の加速度的人口増加に伴う食糧事情の切迫に対処する究極の方法の1つとして盛んに研究が行われ、さらに新しい発展が期待されている。¹⁾ 1963年 Champagnant ら²⁾ は原油中沸点留分のガスオイル中の脱ろうを行うと同時に飼料として栄養価値の高い酵母を製造する技術を発表して以来、石油および天然ガス資源を原料とした SCP の研究が盛んに行われている。メタノールを原料とする SCP の研究も数多く報告されているが、これらの発表の多くはメタノール資化性微生物の分離および同定に関する報告、³⁻¹²⁾ あるいはこれら微生物によるメタノール代謝経路に関する報告¹³⁻¹⁷⁾ がほとんどであり、メタノールからの SCP 生産に関して工業化を指向した生物化学工学的研究は少ない。^{18,19)} メタノールは SCP 原料として次のような数多くの利点を有している。(1)常温で液体であり、水と完全に混合する。従って、培養液中において基質の菌体への物質移動が容易に行われる。(2)メタンや *n*-パラフィンのような炭化水素化合物に比べて菌体生産量当たりの酸素の必要量が少ない。また、発熱量も比較的に少ないので冷却水量も少なくすむ。²⁰⁾ (3)蒸留などの方法により高純度に精製されるため基質として安全性が高い。すなわち、基質に混存する不純物による発がん性等の問題が

極めて起こりにくい。(4)沸点が比較的低いので乾燥工程で残留メタノールは菌体から容易に除去されうる。以上のように、メタノールは SCP 原料として優れた特性をもつことから、原料としての経済性と生産される菌体の安全性が確立されれば今後ますます注目されるものと考えられる。

本稿はメタノールを原料とする SCP の生産に関し、著者らの行ってきた生物化学工学的アプローチに基づいた開発研究をまとめたものである。

2. メタノール資化性細菌の分離と最適培地組成²¹⁾

(1) メタノール資化性細菌のスクリーニング 自然界から工業的連続生産に適するメタノール資化性細菌をスクリーニングする基本的設定因子として i) 菌体収量 (Y_G) が良く、かつタンパク含有量が高いこと、ii) 増殖速度が速く、かつ連続培養系で安定であること、iii) 培養温度が高いこと(最適培養温度が40℃以上)を考慮し、効率的にスクリーニングするため Fig. 1 に示した土壌カラムを装着した2段連続集積培養装置を新規に考案した。第1集積培養槽(第1槽)である1 l ミニジャーに土壌サンプルを100~300点詰めた土壌カラムを取り付け、好氣的に Table 1 に示す Medium A をカラムの上から連続的に流入した。第1槽の培養液を第2槽に送り、Table 1 に示す Medium B を連続的に送り2段集積を行った。第1槽および第2槽の希釈率、 D はそれぞれ0.1および0.3 hr⁻¹ に設定し、温度は共に40℃に保ち、pH は第2槽のみ7.0にコントロールした。国内各地より集めた1960点の土壌サンプルにつき8回集積培養を行い、Table 2 に示したごとく50菌株のメタノール資化性細

* Bioengineering studies on biomass production from methanol.—Monograph—Goto, S. (Central Research Laboratories, Sanraku-Ocean Co., Ltd., Fujisawa, Kanagawa 251)

**Present address (Yatsushiro Factory, Sanraku-Ocean Co., Ltd., Yatsushiro, Kumamoto 866)

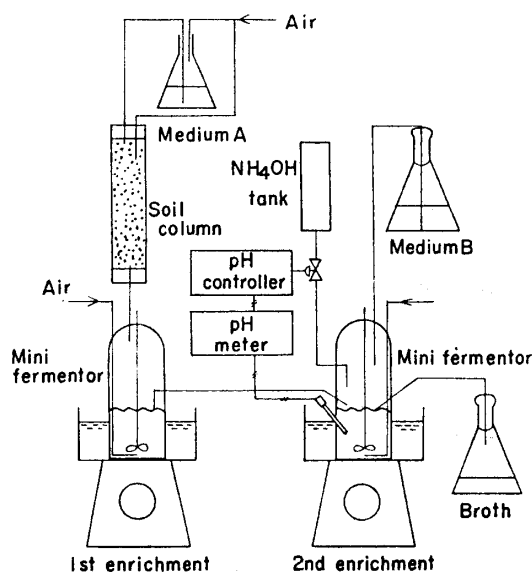


Fig. 1. Schematic diagram of continuous enrichment culture system.

Table 1. Medium for isolation and flask experiments.

Component	Medium	
	A	B
Methanol	5 g	20 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g	3 g
KH ₂ PO ₄	1 g	2 g
K ₂ HPO ₄	3 g	7 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g	0.5 g
Fe ²⁺	2 mg	2 mg
Mn ²⁺	2 mg	2 mg
Biotin	10 μg	10 μg
Thiamine	100 μg	100 μg
Yeast ext.	0.1 g	0.1 g
Tap water	1,000 ml	1,000 ml

pH was adjusted to 7.0.

菌を分離した。この50菌株はメタノールあるいはメタノールとメチルアミンを唯一の炭素源として生育し、グラム陰性、好気性である等の生理学的知見および単一の鞭毛を持ち、胞子を形成しない等の形態学的観察により、すべて *Methylobacter* 属に属するものと考えられた。これらの菌株のうち、増殖特性値が良い *Methylobacter* sp. C-1012 菌株を選択し、以後の研究に使用した。

(2) 最適培地組成 *Methylobacter* sp. C-1012 菌株は炭素源であるメタノール以外の有機栄養源を要

Table 2. Isolation of methanol-assimilating bacteria by continuous enrichment culture.

Run no.	Area	Number of samples	Number of strains isolated
1	Izu, Hakone	420	10
2	Chiba	215	2
3	Odawara	85	8
4	Kyushu	300	7
5	Shikoku	450	5
6	Kyushu, Amami	200	11
7	Kanto	100	5
8	Nagano	200	2
Total.....		1960	50

求しないこと、および培地中の無機塩濃度は低い方が Y_G が高いことから、菌体の構成成分比に比例させて組み立てた最小培地を設定した。 Y_G を最大とする最適培地を求めるため、Fig. 2に示したごとく、この最小培地を用いた連続培養系において成分濃度を段階的に変化させたときの Y_G を最大にし得る培地組成を決定した。このようにして決定した最適培地の組成比を Table 3に示す。この最適培地は Y_G を最大とするため最小培地に比べて Fe, Zn および Mn の量を若干多く必要とするが、他の成分は減らすことができ、Kim ら²²⁾の最適培地に比べて K, P, S の量が大幅に少なく、かつメタノール以外の有機栄養源を必要とし

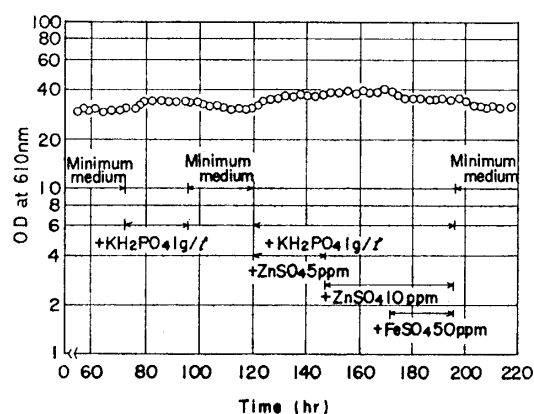


Fig. 2. An example of continuous culture with sudden changes of components in minimum medium.

←→: intervals during which the minimum medium or the minimum medium supplemented with the components shown was fed.

Table 3. Comparison of medium compositions relative to the concentration of methanol.

Element	This work		Other ²²⁾
	Optimum medium	Basal medium	
Methanol	100	100	100
N	0.53*	7.95	4.87
K	1.08	1.43	47.89
P	2.04	2.32	21.97
S	1.06	9.76	5.90
Mg	0.32	0.49	0.25
Fe	0.045	0.032	0.0026
Mn	0.012	0.0062	—
Zn	0.011	0.0057	—
Cu	0.0038	0.0032	—
Ca	0.027	0.027	—
Na	0.0045	0.045	—
Mo	0.00019	0.00019	—
B	0.00066	0.00066	—
(Yeast ext.)	—	—	(0.77)

* Nitrogen was continuously supplied in 1N NH₄OH solution to control pH at 7.0.

ない。また、この最適培地のすべての成分はほとんど完全に消費しつくされるという利点がある。

3. 菌体構成成分に与える環境因子の影響²³⁾

ジャーフェーマンターを用いた連続培養系において、*D*, pH, 温度, 酸素供給および供給空気中の CO₂ 濃度等の環境因子の *Methylomonas* sp. C-1012 の菌体構成成分, 特に SCP の目的物であるタンパク含有量, あるいは核酸含量や呼吸活性 (*Q*_{O₂}) 等に与える影響について調べた。Y_G およびタンパク含量を最大とするには *D* を 0.3 hr⁻¹, pH を 7.0, 温度を 40°C で培養する必要があった。基質律速と酸素律速との培養条件における菌体構成成分に与える影響を Table 4 に示した。基質律速で *X*, Y_G, タンパク含量が共に高い数値が得られ, それらと逆比例して *Q*_{O₂} あるいは炭酸ガス発生量 (*Q*_{CO₂}) は小さく, SCP 生産にとって基質律速で培養を行うことが不可欠な要素であることが判明した。また, 培養液中の可溶性タンパク, 菌体の自己消化と関連があると考えられる 259 nm の OD 値, および多糖類の生産と関連のある APS (anthrone-positive-substances) はいずれも基質律速の方が高く, 菌体生産と密接な関係があると考えられた。Table 5 は菌体構成成分への供給空気中の CO₂ 濃度の影響について示しているが, CO₂ 濃度の影響はほとんどなく, 塔型

Table 4. Influence of carbon substrate and O₂ limitation on cell structural constituents.

Item	Unit	Carbon substrate limitation	O ₂ limitation
Air supplied	l/min	18	11
Dissolved O ₂	ppm	1.48	0
CH ₃ OH in medium	g/l	34.85	34.76
CH ₃ OH in broth	g/l	<0.001	0.0095
OD at 610 nm	—	28.0	24.0
Dry cell weight	g/l	14.99	12.80
Growth yield	%	43.0	36.8
Crude protein content	%	72.1	66.4
True protein content	%	56.7	50.3
RNA content	%	16.1	16.6
Soluble protein	mg/l	318	265
OD at 259 nm	—	3.61	2.88
APS* in whole broth	g/l	2.27	2.46
APS* in broth sup.	g/l	0.38	0.17
<i>Q</i> _{O₂}	g·O ₂ /g·cell·hr	0.300	0.378
<i>Q</i> _{CO₂}	g·CO ₂ /g·cell·hr	1.50	1.90

* APS : anthrone-positive substance.

Table 5. Influence of CO₂ concentrations in air supplied on cell structural constituents.

Item	Unit	CO ₂ conc. in air supplied (%)		
		0.03(Air)	3.01	10.47
CH ₃ OH in medium	g/l	34.36	34.71	34.68
CH ₃ OH in broth	g/l	<0.001	<0.001	<0.001
OD at 610 nm	—	28.0	29.0	28.0
Dry cell weight	g/l	14.46	15.51	15.09
Growth Yield	%	42.1	44.7	43.5
Crude protein	%	69.1	68.9	69.6
True protein	%	58.3	58.7	58.7
RNA/X	%	16.47	15.79	16.95
DNA/X	%	3.45	3.68	3.78
Soluble protein	mg/l	303	280	330
OD at 259 nm	—	3.10	2.64	3.48
APS* in whole broth	g/l	2.24	1.98	2.29
APS* in broth sup.	g/l	0.13	0.15	0.27

* APS : anthrone-positive substance.

式の発酵槽の利用が可能であることがわかった。^{23,24)} Fig. 3 および4は D , Temp., pH の CP (crude protein) と TP (true protein) および RNA と DNA contents への影響を示し, 特に RNA content は D が大となると著しく多くなった. SCP は TP の生産に着目しなければならないが, タンパクの合成は RNA 合成と密接に関係があるため, TP の合成速度 (V_P) と RNA の合成速度 (V_R) との相関を行ったところ, Fig. 5 に示すように(1)式で表された. ただし, α , β は定数である.

$$\frac{1}{V_P} = \alpha \frac{1}{V_R} + \beta \quad (1)$$

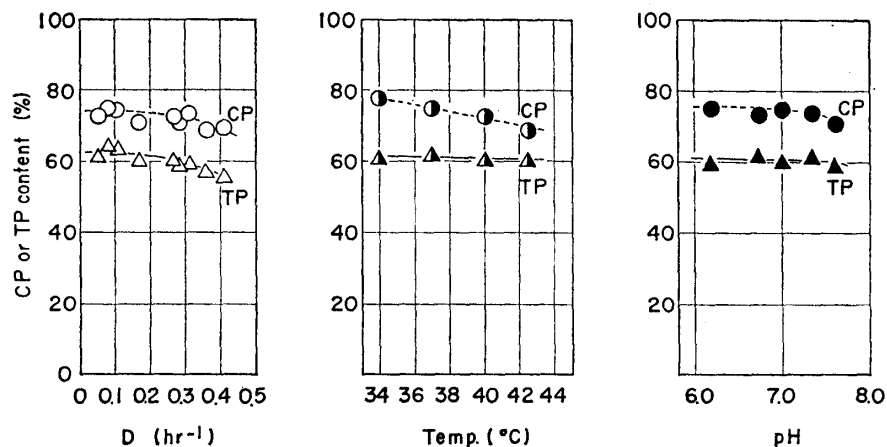
(1)式は(2)式のごとく書き表され, $k_1(=1/\beta)$ および $k_2(=\alpha/\beta)$ の値はそれぞれ 5.68(g/l/hr) および 0.693(g/l/hr) と算出された.

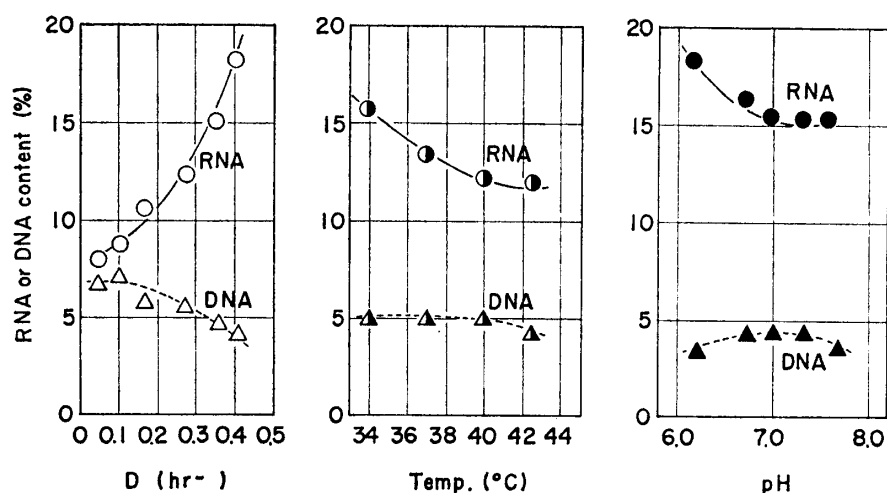
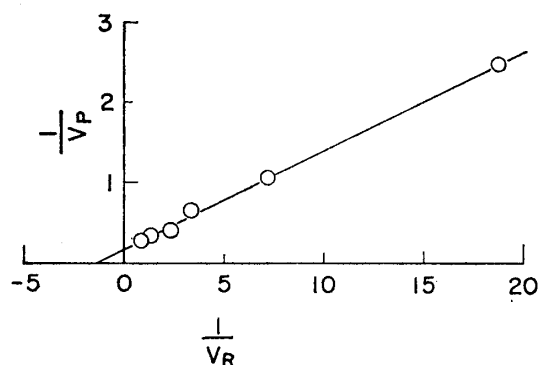
$$V_P = \frac{d[TP]}{dt} = \frac{k_1 \cdot V_R}{k_2 + V_R} \quad (2)$$

すなわち, タンパク合成速度は V_R が増すと急激に増大し, 最大値 5.68 g/l/hr に達することがわかった.

4. 二流体ノズルを装着した塔型発酵槽の開発²⁵⁾

塔型発酵槽は消費動力が少なく, かつ比較的高い酸素移動速度 (OTR) が得られるために SCP 生産への

Fig. 3. Influence of D , temperature and pH on crude protein (CP) and true protein (TP) contents.

Fig. 4. Influence of D , temperature and pH on RNA and DNA contents.Fig. 5. Lineweaver-Burk Plot of $\frac{1}{V_P}$ vs. $\frac{1}{V_R}$.

開発が活発である。^{18,26,27)} 高い生産性を有する塔型発酵槽を開発するためには、まず、高い OTR を与える塔型発酵槽の開発が必須であり、この目的のために著者らは新規に Fig. 6 に示した二流体ノズルを装着した塔型発酵槽を試作し、OTR を実測すると共に流動特性についても検討を加え、メタノールからの SCP の連続生産用発酵槽としての応用を試みた。塔型発酵槽の本体部分は北井ら^{26,28)}により開発された多孔板段塔を基本とし、本研究では飛躍的に OTR を高め、かつ SCP 生産に適する流動特性を得る目的で塔頂より塔底部へ循環流を設け、この循環流へ供給空気を吹き込むための二流体ノズルを装着した。Fig. 7 に実験に用いた 3 つのタイプの二流体ノズルを示している。

(1) 必要な酸素移動速度の推算 培養における第 1 段階の酸素の移動は気・液界面を通じて行われ、OTR は次式で表すことができる。

$$r_d = k_G a (p_i - p_G) = k_L a (c_i - c_L) \quad (3)$$

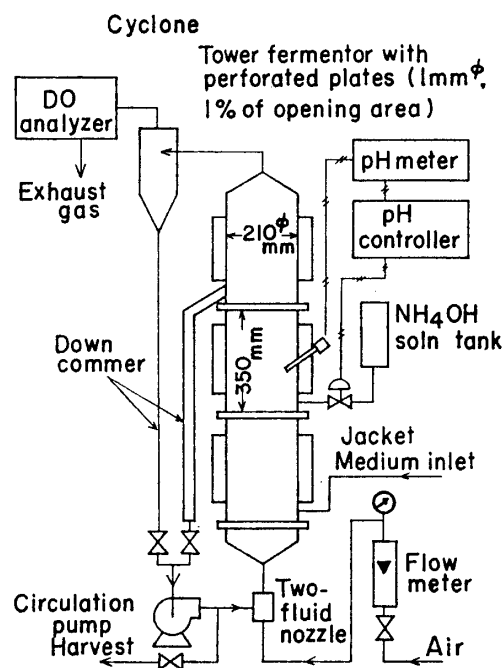


Fig. 6. Schematic diagram of tower type fermentor with two-fluid nozzle.

いま、気相側の抵抗が無視できるとすると $p_i = p_G$ および $k_L a = K_L a$ となり、(3)式は(4)式のごとく書き表せる。

$$r_d = K_L a (c^* - c_L) = k_d (p_g - p^*) \quad (4)$$

ここに、 $c^* = H p_g$ および $c_L = H p^*$ 。

液中の溶存酸素の微生物による吸収速度 r_r は次式によって表される。

$$r_r = k_r C_m \quad (5)$$

定常状態と $c_L \approx 0$ とを仮定すると次式が成立する。

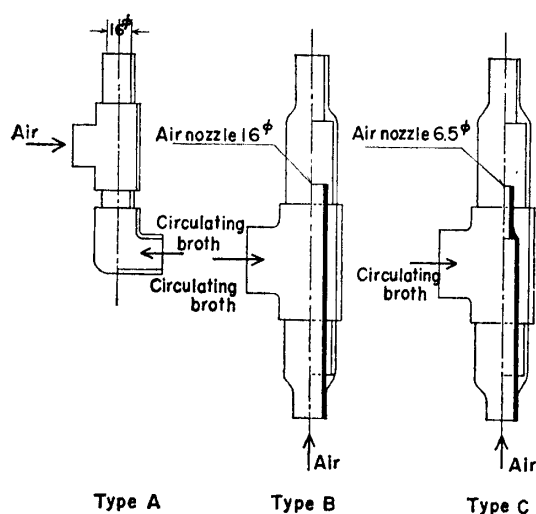


Fig. 7. Details of three types of two-fluid nozzle apparatus.

$$r_d = r_r = K_L a c^* = K_L a H p_g = k_d p_g \quad (6)$$

Cooney²⁹⁾ はメタノール酸化性細菌の増殖に要する酸素要求量を化学量論的に検討し、物質収支と菌体の成分とから次式のごとく導いている。

$$\left(\frac{\text{g O}_2}{\text{g cell}} \right) = \frac{1.5}{Y_G} - 1.6 \quad (7)$$

メタノール酸化性細菌の酸素要求量を(7)式に基づき計算すると共に、連続培養系における OTR あるいは $K_L a$ の値を(6)式によって計算して Table 6 に示し

た。また、*Methylobacter* sp. C-1012 菌株の連続培養系の実測値も同表中に示した。実測値と推算値とは良く一致し、5.65 g cell/l/hr の生産性を得ようとする OTR として 8.65 g O₂/l/hr, $K_L a$ 値としては 1,070 hr⁻¹ が必要である。さらに、10 g cell/l/hr の生産性を得ようとする 17.33 g O₂/l/hr の OTR, 2,140 hr⁻¹ の $K_L a$ が必要であり、高い生産性を得るためにはこのように高い OTR を有する発酵装置の開発が不可欠である。

(2) OTR および $K_L a$ の測定 二流体ノズルを装着した塔型発酵槽につき、二流体ノズルの種類 (Fig. 7), 供給空気および液循環流量の条件を変えて亜硫酸ソーダ系で OTR あるいは $K_L a$ を実測し、結果を Table 7 に示した。液循環がなく V_s が 3.02 cm/sec のときの $K_L a$ は 145 hr⁻¹ と実測された。この値は Kitai²⁶⁾ の多孔板段塔発酵槽の $K_L a$ 値とほぼ同じであった。Fig. 8 に V_s で相関した結果を気泡塔についての他の研究者ら^{26,30-32)} による報告も加えて示した。本装置の高い $K_L a$ あるいは OTR の操作領域は F_c を多くし、二流体ノズルへの供給空気量を増さなければならぬが、二流体ノズルへの空気吹込圧 (P_r) の効果も大であった。また、二流体ノズルのタイプによる影響はほとんどなかった。さて、前述のメタノール酸化性細菌を連続生産するのに必要な $K_L a$ 値の推算において、5.65 g cell/l/hr の生産性を得ようとする

Table 6. Estimations of oxygen demand for the growth of bacteria on methanol and oxygen transfer rate required.

	Unit	Experimental ²⁸⁾	Calculation of oxygen demand and OTR coefficients required		
Productivity	g cell/l/hr	5.65	(5.65)	(8.0)	(10.0)
Y_G	g cell/g methanol	0.480	(0.480)	(0.45)	(0.45)
Oxygen demand	g O ₂ /g cell	1.54	1.53	1.73	1.73
r_r	g O ₂ /g cell/hr	0.478	—	—	—
OTR*	g O ₂ /l/hr	8.70	8.65	13.87	17.33
$K_L a^{**}$	1/hr	—	1070	1717	2141
	1/min	—	17.8	28.6	35.6
k_d^{**}	kgM O ₂ /m ³ /hr/atm	—	1.28	2.06	2.57
	gM O ₂ /ml/min/atm	—	21.4×10^{-6}	34.3×10^{-6}	42.8×10^{-6}

() : values inside parenthesis were assumed.

* OTR=oxygen transfer rate.

** $r_d(\text{OTR}) = K_L a c^* = k_d p_g = K_L a H p_g$

where $p_g = 0.21$ atm (in air) and $H = 1.2 \times 10^{-3}$ g mole O₂/l/atm were assumed.

Table 7. Measurement of K_{La} or oxygen transfer rate in tower fermentor with three types of two-fluid nozzle.

Run no.	Type of nozzle	Aeration			Liquid circulation		OTR	K_{La}
		Q	V_s	P_r	F	P_c		
1	—	60.5	3.02	0.1	0	0	1.17	145
2	A	56.8	2.73	0.1	500	0.5	1.73	215
3	A	66.8	3.22	0.3	1000	0.6	5.04	625
4	A	77.0	3.71	0.5	1500	1.0	11.1	1380
5	A	86.8	4.18	0.7	2000	1.3	14.6	1810
6	A	100.0	4.81	0.4	1000	0.7	9.8	1220
7	A	121.5	5.85	0.7	1500	1.1	14.3	1770
8	A	129.0	6.21	0.8	2000	1.4	18.9	2450
9	A	134.0	6.45	0.3	500	0.6	7.20	893
10	A	164.0	7.90	0.6	1000	0.9	14.6	1810
11	A	194.0	9.34	0.9	1500	1.3	19.3	2390
12	A	214.0	10.30	1.1	2000	1.6	28.2	3500
13	B	60.9	2.93	0.3	1500	0.9	8.86	1100
14	B	105.0	5.06	0.5	1500	1.1	12.8	1590
15	B	150.0	7.22	0.6	1500	1.15	17.6	2180
16	B	219.0	10.5	0.8	1500	1.2	20.8	2500
17	B	70.2	3.38	0.5	2000	1.2	21.5	2670
18	B	120.0	5.78	0.7	2000	1.3	24.5	3040
19	C	72.5	3.49	0.5	1500	1.0	10.7	1330
20	C	124.0	5.97	0.7	1500	0.9	15.7	1950
21	C	180.0	8.67	0.8	1500	1.2	21.3	2710
22	C	84.0	4.04	0.7	2000	1.3	18.0	2230
23	C	139.0	6.69	0.9	2000	1.4	23.8	2950
24	C	210.0	10.1	1.1	2000	1.5	29.9	3710
25	C	98.0	4.72	1.0	2500	1.5	23.5	2920
26	C	165.0	7.94	1.2	2500	1.75	29.5	3660

Q : aeration rate (NI/min), V_s : air linear velocity (cm/sec), P_r : air pressure to the nozzle (kg/cm²G), F : flow rate of liquid circulation (l/hr), P_c : pressure of circulating liquid (kg/cm²G), OTR: oxygen transfer rate (g O₂/l/hr) calculated as $K_{La} c^*$ ($=K_{La} H p_g$) where $H=1.2 \times 10^{-3}$ gM O₂/l/atm was assumed, K_{La} : overall mass transfer coefficient (hr⁻¹).

1,070 hr⁻¹ の K_{La} が必要であるが、本装置では最高の K_{La} 値として 3,710 hr⁻¹, OTR として 29.9 g O₂/l/hr に達し、十分な能力を有することがわかった。

また、 K_{La} の実測値を P_r で両対数紙上に相関させると Fig. 9 のごとくなり、次式に示す実験式が得られた。

$$K_{La} = \gamma \cdot P_r^{1.12} \quad (8)$$

ここに、 γ は定数で 2,800 である。

(3) 流動特性⁸⁸⁾ 二流体ノズルを装着した3段塔

発酵槽についての液側の流動特性を液循環のある逆混合モデル^{84,85)}で表し、模式的に Fig. 10 に示した。このモデルにつき、(i)多孔板を介しての逆混合はない。^{86,87)} (ii)各段は同一容量で continuous stirred tank reactor (CSTR) として機能する⁸⁷⁾ という仮定をおいて第一段に δ -関数的にトレーサーを与えた場合の塔流出液中のトレーサー濃度を追跡するシミュレーション解析を行った。各段のトレーサー濃度(C)についての物質収支式を示す。

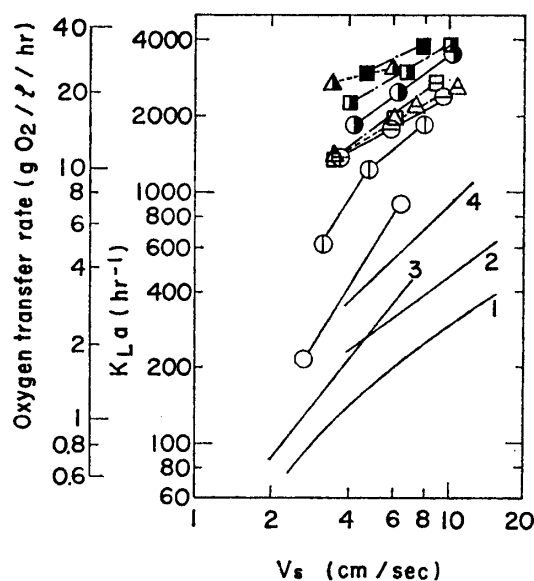


Fig. 8. Effect of types of two-fluid nozzle and flow rate of broth circulation on K_La compared with other works.

Symbol	Type of nozzle	$F_c(l/hr)$
○	A	500
⊙	A	1000
⊖	A	1500
●	A	2000
△	B	1500
▲	B	2000
□	C	1500
■	C	2000
■	C	2500

1: Yoshida *et al.* (Ref. 30) Bubble column of 7 cm dia.

2: Odawara *et al.* (Ref. 31) Column with perforated plate cylinder of 50 cm dia.

3: Kitai *et al.* (Ref. 26) Perforated plate column of 14.5 cm dia.

4: Kuraishi *et al.* (Ref. 32) Column with draft tube of 45 cm dia.

$$\frac{dC_1}{d\theta} = RC_3 - (1+R)C_1 \quad (9)$$

$$\frac{dC_2}{d\theta} = (1+R) \cdot (C_1 - C_2) \quad (10)$$

$$\frac{dC_3}{d\theta} = (1+R) \cdot (C_2 - C_3) \quad (11)$$

ここに, $C_n = c_n/c_{10}$, $\theta = t/(V_n/F)$, $R = F_c/F$ である。初期条件を次式のごとく与える。

$$C_1 = 1, C_2 = C_3 = 0 \quad \text{at } \theta = 0$$

これらの連立微分方程式をルンゲ-クッタ法によりコンピューター (IBM, Call, TSS) を用いて解析し

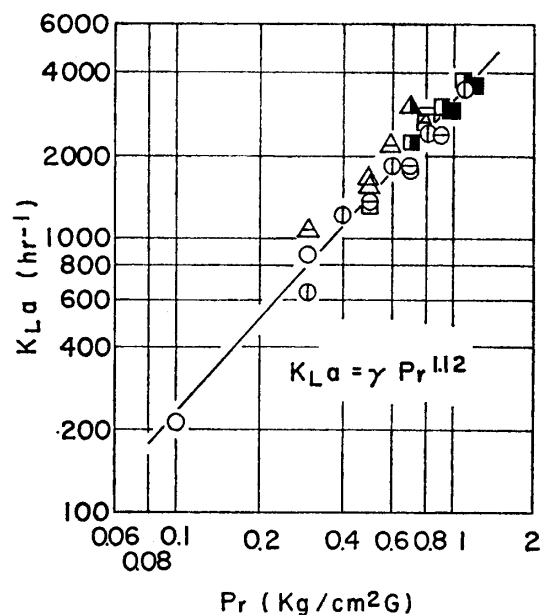


Fig. 9. Relationship between overall mass transfer coefficient, K_La , and air pressure of two-fluid nozzle, P_r .

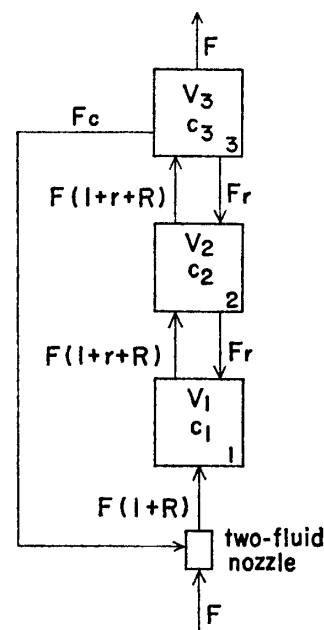


Fig. 10. Schematic flow diagram of 3-stage tower type fermentor with two-fluid nozzle in back flow model with liquid circulation.

た結果を Fig. 11 に示した。

多孔板段塔発酵槽は本来多段化する目的で開発された発酵槽であるが, 二流体ノズルを装着した塔型発酵槽の流動特性値は F_c を増すと急速に CSTR の理論曲線に近づくことがわかる。一般に, 連続培養におい

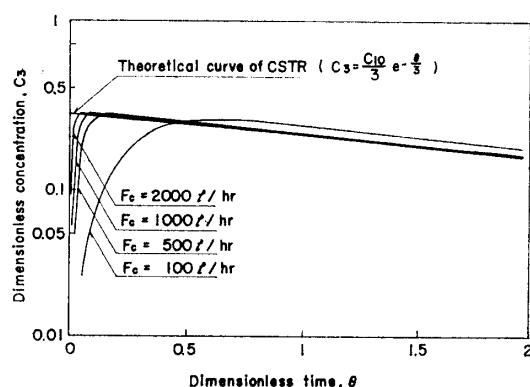


Fig. 11. Flow characteristic simulation on the outlet stream from the tower type fermentor with two-fluid nozzle operated with various flow rates of liquid circulation.

て菌体生産と連動しない発酵生産物、例えば抗生物質のような二次代謝産物には多段連続培養が適し、菌体または菌体生産と連動している発酵生産物には単槽連続培養が適していることが理論解析されている。³⁴⁾ 高い菌体生産性を得ようとするとき OTR を高くしなければならないが、例えば KLa を $1,000 \text{ hr}^{-1}$ 以上とするためには F_c を $1,000 \text{ l/hr}$ 程度以上は必要であり、このような操作領域では本装置はほぼ CSTR として機能し、流動特性からも菌体生産の発酵槽として適していると考えられる。

4) 連続培養 本装置を用いてメタノール酸化性細菌、*Methylomonas* sp. C-1012 の連続培養試験を行い、6つの定常状態値を得、結果を Table 8 に示した。D を増すと X, DX, Y_G とも増大し、 $D=0.350$

hr^{-1} でそれらの値は最大となり、 $DX=6.93 \text{ g}\cdot\text{cell}/\text{l}\cdot\text{hr}$, $Y_G=0.445 \text{ g}\cdot\text{cell}/\text{g}\cdot\text{methanol}$ という高い値が得られ、この時 Y_o も最大値、 $0.340 \text{ g}\cdot\text{cell}/\text{g}\cdot\text{O}_2$ となった。また、微生物の呼吸活性から求めた培養系での OTR(r_r) はその同じ装置操作条件における亜硫酸ソーダ系から求めた OTR の約 1/2 の数値であり、培養系での酸素の移動は亜硫酸ソーダ溶液系に比べて 1/2 となることがわかった。さらに、塔内の各段の菌体濃度は各定常状態時で同じ数値を示し、流動特性のシミュレーションの結果とも一致した。従って、本装置は高い酸素移動速度を有する単槽連続培養槽として機能し、菌体の連続培養に適する発酵槽であることが確認された。

5. 膜ろ過による菌体分離とリサイクル培養³⁸⁾

メタノール酸化性細菌の培養液を膜ろ過で菌体を濃縮する一方、SCP 生産プラントの廃液処理設備の軽減を目的としてろ過液をリサイクルする閉鎖系の培養方法について検討した。Fig. 12 に実験装置の概略を示した。膜ろ過装置に培養液を入れ、 N_2 ガスで $3.0 \text{ kg}/\text{cm}^2$ の圧力をかけてろ過した場合の濃縮液と透過液との物質収支を Fig. 13 に示した。濃縮液の容量は 1/10 となり、菌体濃度 (OD) は約 10 倍に濃縮され、かつ培養液中の可溶性タンパクもすべて濃縮され、SCP 生産の面から非常に効率的であることがわかった。^{39,40)} 一方、透過液は菌体はもちろん、不溶性物質および可溶性タンパクをも含まず、全乾燥物は可溶性

Table 8. Continuous culture of *Methylomonas* sp. C-1012 in tower type fermentor with two-fluid nozzle.

Run no.	Aeration condition				F_c	S_F	D	S_R	X	DX	r_r^{**}	Y_G	Y_o
	Q ($\frac{\text{N l}}{\text{min}}$)	V_r ($\frac{\text{cm}}{\text{sec}}$)	P_r ($\frac{\text{kg}}{\text{cm}^2\text{G}}$)	OTR^* ($\frac{\text{g O}_2}{\text{l hr}}$)									
1	107	5.15	0.9	24.8	2000	44.8	0.161	<0.001	14.3	2.29	14.5	0.319	0.158
2	203	9.77	1.1	28.5	2000	43.7	0.203	<0.001	14.2	2.88	15.6	0.325	0.185
3	218	10.49	1.1	29.0	2000	45.2	0.273	<0.001	15.9	4.34	14.7	0.418	0.295
4	105	5.05	0.9	27.0	2500	44.7	0.318	<0.001	18.7	5.95	18.0	0.445	0.331
5	165	7.94	1.2	35.6	2500	44.5	0.350	0.054	19.8	6.93	20.3	0.445	0.340
6	180	8.66	1.2	38.3	2500	43.0	0.412	3.3	16.2	6.67	19.8	0.377	0.337

* OTR: Oxygen transfer rate calculated as $KLaC^*$ ($=KLaH p_a$).

** r_r : oxygen uptake rate by microorganisms ($=\text{OTR in culture system}$).

F_c : flow rate of broth circulation, S_F : methanol concentration in supply medium, S_R : residual methanol concentration in broth.

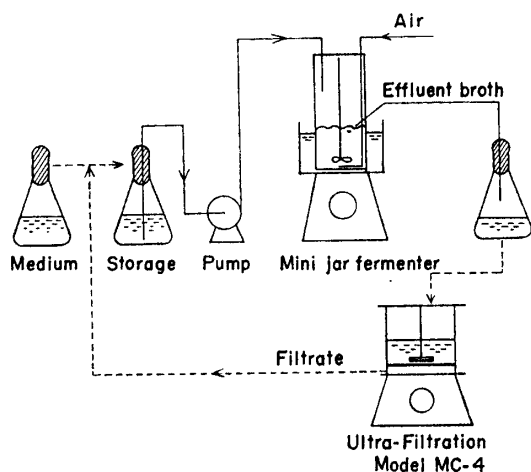


Fig. 12. Schematic continuous culture system with recycled UF filtrate.

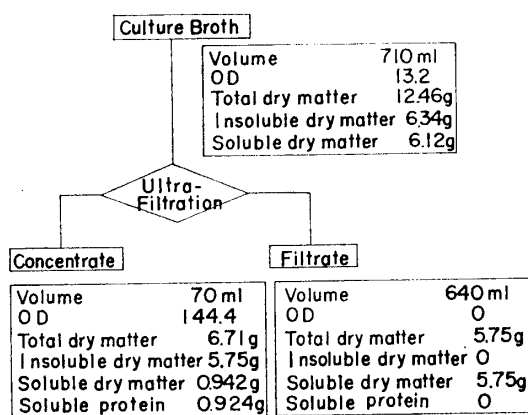


Fig. 13. Mass balance on membrane filtration.

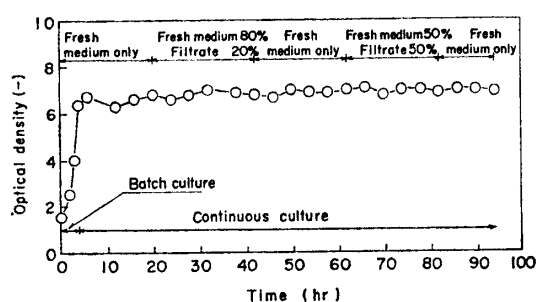


Fig. 14. Continuous culture with filtrate recycled.

物質であり、そのほとんどは無機物質であった。この透過液は無機塩のみしか含まないことから基質メタノールと不足分の無機塩を補充した培地を調製してリサイクル使用する閉鎖系としてのリサイクル培養を行い、その結果を Fig. 14 に示した。連続培養の定常状態において透過液を50%リサイクルしても定常状態値を乱

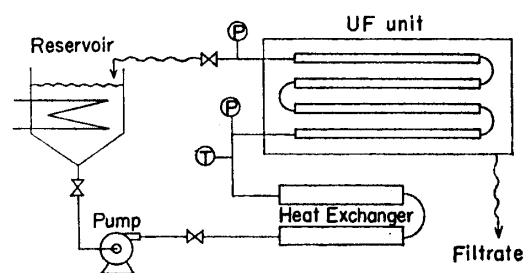


Fig. 15. Scheme of bench-scale ultrafiltration unit.

Ⓟ : pressure gauge, Ⓣ : thermometer

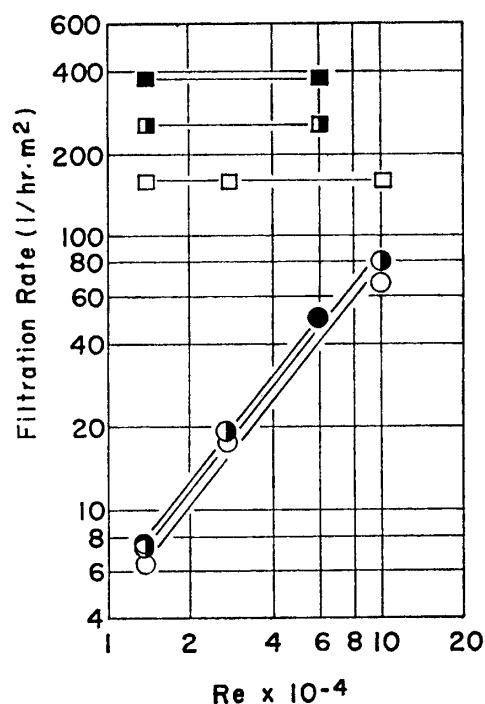


Fig. 16. Influence of Reynolds number and pressure on filtration rate.

Symbol	Fluid	Pressure(kg/cm²G)
□	Water	1
■	Water	2
■	Water	3
○	Broth	1
●	Broth	2
●	Broth	3

すことがなく、少なくとも透過液を50%リサイクルさせることができ、閉鎖系としての培養法実現の可能性が示唆された。次に、Fig. 15 に模式的に示したベンチスケールの管型膜ろ過装置を用いて培養液のろ過速度を水を対照として測定し、 R_e に対して両対数紙上にプロットすると、Fig. 16 のとき P をパラメータ

一とする直線関係が得られた。水のろ過速度 (F_w) は R_e に無関係に P に対して一定値を示したが、培養液の場合は P に対してはほとんど影響を受けず、 R_e に大きく影響を受け、 R_e が増すとろ過速度が大となり、 2 kg/cm^2 の圧力で R_e が 10^5 のとき、培養液のろ過速度 (F_b) は $80 \text{ l/m}^2/\text{hr}$ であった。Fig. 16 の直線関係から F_b および F_w の実験式はそれぞれ次式のごとくなる。

水の場合：

$$F_w = k R_e^0 P^{0.75} \quad (12)$$

培養液の場合：

$$F_b = k' R_e^{1.2} P^{0.15} \quad (13)$$

ここに、 k , k' は定数である。

培養液のろ過速度が R_e に大きく影響され、 R_e の1.2乗に比例することは水の場合と異なり、培養液中の種々の物質が膜周辺で濃度差を生じるためであると考えられる。

6. おわりに

メタノールを原料とする SCP 生産に関し、工業化を想定した SCP 製造プロセスの開発を行うことを目的として、生物化学工学的アプローチを主眼に研究を行った。まず、工業生産に適するメタノール資化性細菌を得る目的で、新規に土壌カラムを装着した二段連続集積培養法を試作して分離を行い、増殖速度が速く、菌体収量が良く、かつ 40°C を適温とするメタノール資化性細菌、*Methylomonas* sp. C-1012 菌株を得ることができた。本菌の最適培地は、菌体の構成成分比に比例させて組み立てた最小培地を基本にして菌体収量を最大とする培地組成を決定した。本最適培地は基質メタノール以外の有機栄養源を含まず、ほとんどの成分は消費し尽されるため経済的である以外に、菌体収得後の培養液の廃液処理の負荷が軽減される利点がある。また、本菌について種々な環境因子の菌体構成成分に与える影響を調べた。次に、メタノール資化性細菌の連続菌体生産に適する発酵槽として、二流体ノズルを装着した塔型発酵槽を試作し、亜硫酸ソーダ溶液系での OTR 測定、流動特性のシミュレーションおよび連続培養試験を行った。本装置は高い OTR が得られ、菌体生産に適する単槽連続培養槽として機能し、生産性の高い発酵槽であることが確認された。最後に、培養液からの菌体の分離について膜ろ過法を検討し、効率良く菌体が濃縮され、かつ透過液は SCP 生産プ

ラントの廃液処理の負荷の軽減を目的としてリサイクルさせることができ、いわゆる閉鎖系の SCP 生産が可能となるであろうことがわかった。

記号

- a : interfacial area of bubbles, cm^2
- c : tracer concentration
- C : dimensionless concentration, c/c_{no}
- c_i : dissolved oxygen concentration at the gas-liquid interface, $\text{g O}_2/\text{l}$
- c_L : dissolved oxygen concentration in the fluid bulk, $\text{g O}_2/\text{l}$
- c_m : dry cell weight, g cell/l
- c_{no} : tracer concentration at n -th stage at $t=0$
- C_{no} : dimensionless concentration at n -th stage at $t=0$
- D : dilution rate, hr^{-1}
- F : flow rate of liquid supply, l/hr
- F' : back-flow rate of liquid through plate holes, l/hr
- F_b : filtration rate of the culture broth, $\text{l/m}^2/\text{hr}$
- F_c : flow rate of liquid circulation, l/hr
- F_w : filtration rate of water, $\text{l/m}^2/\text{hr}$
- H : Henry's law constant, $\text{g O}_2/\text{l/atm}$
- k_a : volumetric oxygen transfer coefficient, $\text{g O}_2/\text{l/hr/atm}$
- k_G : gas film mass transfer coefficient, $\text{g O}_2/\text{hr/cm}^2/\text{atm}$
- k_L : liquid film mass transfer coefficient, $1/\text{hr/cm}^2$
- k_r : specific oxygen uptake rate by microorganisms, $\text{g O}_2/\text{hr/g cell}$
- K_{La} : overall mass transfer coefficient, hr^{-1}
- p_G : partial pressure of oxygen in the gas bulk, atm
- p_i : partial pressure of oxygen at the gas-liquid interface, atm
- P_r : air pressure to the nozzle, kg/cm^2
- P : pressure of membrane filtration, kg/cm^2
- r : back-flow ratio defined as F'/F , —
- r_a : oxygen transfer rate, $\text{g O}_2/\text{l/hr}$
- r_r : oxygen uptake rate by microorganisms from liquid, $\text{g O}_2/\text{l/hr}$
- R : liquid circulation ratio defined as F_c/F , —

R_e : Reynolds number, —
 t : time, hr
 V : liquid volume, l
 V_p : synthesis rate of true protein, g/l/hr
 V_R : synthesis rate of RNA, g/l/hr
 V_s : air linear velocity, cm/sec
 X : cell concentration, g cell/l
 Y_G : growth yield, g cell/g methanol
 Y_O : oxygen yield, g cell/g O_2
 θ : dimensionless time defined as $t/(V_n/F)$
 subscripts : 1, 2, 3=1st, 2nd and 3rd stages,
 respectively

本研究を遂行するにあたって、共同研究者でもあります
 三楽オーシャン(株)中央研究所、岡本主任研究員、山本主任
 研究員、岡部研究主任、桑島研究主任、土屋および近藤両
 研究員に負うところが大きかったので深く感謝致しま
 す。また、厳しい中にも温かくご指導、ご鞭撻を賜りまし
 た広島大学教授、永井史郎先生、三楽オーシャン(株)取締役
 高松常務、取締役伊藤開発部長、現八代工場長乾博士、お
 よび中央研究所長石倉博士、また、種々有益なアドバイス
 を賜りました尾崎博士、並びに北井博士に厚くお礼申し上
 げます。

文 献

- 1) Yamada, K. : *Hakkokyokaishi*, **32**, 219 (1974).
- 2) Champagnat, A., Vernet, C., Laine, B., Filosa, J. : *Nature*, **197**, 13 (1963).
- 3) Ogata, K., Nishikawa, H., Ohsugi, M., Tochikura, T. : *J. Ferment. Technol.*, **48**, 389 (1970).
- 4) Oki, T., Kouno, K., Kitai, A., Ozaki, A. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **18**, 295 (1972).
- 5) Asthana, H., Humphery, A. E., Moritz, V. : *Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 923 (1971).
- 6) Levine, D. W., Cooney, C. L. : *Appl. Microbiology*, **26**, 982 (1973).
- 7) Dworkin, M., Foster, J. W. : *J. Bacteriol.*, **72**, 646 (1956).
- 8) Kaneda, T., Roxburgh, J. M. : *Can. J. Microbiol.*, **5**, 87 (1959).
- 9) Peel, D., Quayle, J. R. : *Biochem. J.*, **81**, 465 (1961).
- 10) Johnson, P. A., Quayle, J. R. : *Biochem. J.*, **93**, 281 (1964).
- 11) Haggstrom, L. : *Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 1043 (1969).
- 12) Kouno, K., Ozaki, A. : *Microbial Growth on C₁-Compounds*, 11 (1975).
- 13) Kemp, M. B., Quayle, J. R. : *Biochem. J.*, **99**, 41 (1966).
- 14) Large, P. J., Quayle, J. R. : *Biochem. J.*, **87**, 386 (1963).
- 15) Lawrence, A. J., Quayle, J. R. : *J. Gen. Microbiol.*, **63** (1970).
- 16) Kaneda, T., Roxburgh, J. M. : *Can. J. Microbiol.*, **5**, 187 (1959).
- 17) Davies, S. L., Whittenbury, R. : *J. Gen. Microbiol.*, **61**, 227 (1970).
- 18) Gow, J. S., Littlehales, J. D., Smith, S. R. L., Walter, F. B. : *2nd Int. Confer. on S. C. P.*, May 29-31, USA (1973).
- 19) Kuraishi, M., Matsuda, N., Terao, I., Kami-bayashi, A., Tonomura, K., Fujii, T. : *Microbiol Growth on C₁-Compounds*, p. 231, The Society of Fermentation Technology, Japan, Osaka (1975).
- 20) Cooney, C. L., Lavine, D. W. : *Adv. Appl. Microbiol.*, **15**, 337 (1972).
- 21) Goto, S., Yamamoto, M., Tsuchiya, M., Kondo, O., Okamoto, R., Takamatsu, A. : *J. Ferment. Technol.*, **56**, 516 (1978).
- 22) Kim, J. H., Ryu, D. Y. : *J. Ferment. Technol.*, **54**, 427 (1976).
- 23) Goto, S., Kondo, O., Okamoto, R., Takamatsu, A. : *J. Ferment. Technol.*, **57**, 39 (1976).
- 24) Andrew, S. P. S. : *The Chemical Engineer*, March, 140 (1970).
- 25) Goto, S., Kuwajima, T., Okabe, M., Okamoto, R., Takamatsu, A. : *J. Ferment. Technol.*, **57**, 341 (1979).
- 26) Kitai, A., Goto, S., Ozaki, A. : *J. Ferment. Technol.*, **47**, 348 (1969).
- 27) Schugerl, K., Lucke, J. : *Adv. Biochemical Eng.*, **8**, 63 (1978).
- 28) Kitai, A., Tone, H., Ozaki, A. : *J. Ferment. Technol.*, **47**, 333 (1969).
- 29) Cooney, C. L. : *Microbial Growth on C₁-Compounds*, p. 183, Soc. Ferment. Technol.,

- Japan, Osaka (1975).
- 30) Yoshida, F., Akita, K. : *A. I. Ch. E. Journal*, **11**, 9 (1965).
- 31) Odawara, Y., Yamaguchi, T., Ichihashi, I., Sugenuma, Y. : (Abstr.) *Annual Meeting of Soc. Ferment. Technol., Japan*, p. 318 (1977).
- 32) Kuraishi, M., Matsuda, N., Terao, I., Kami-bayashi, A., Tonomura, K., Fujii, T. : *Micro-bial Growth on C₁-Compounds*, p. 231, Soc. Ferment. Technol., Japan, Osaka (1975).
- 33) Goto, S., Okamoto, R., Inui, T. : *J. Ferment. Technol.*, **59**, 73 (1981).
- 34) Malek, I., Fenel, Z. : *Theoretical and Metho-dological Basis of Continuous Culture of Microorganisms*, 22, Academic Press (1966).
- 35) Kitai, A., Goto, S., Ozaki, A. : *J. Ferment. Technol.*, **47**, 356 (1969).
- 36) Kitai, A., Goto, S., Ozaki, A. : *J. Ferment. Technol.*, **47**, 340 (1969).
- 37) Goto, S., Kitai, A., Ozaki, A. : *Kagaku Ko-gaku*, **35**, 197 (1971).
- 38) Goto, S., Kuwajima, T., Okamoto, R., Inui, T. : *J. Ferment. Technol.*, **57**, 47 (1979).
- 39) Labuza, T. P., Santos, D. B., Roop, R. N. : *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 123 (1970).
- 40) Labuza, T. P., Le Roux, J. P., Fan, T. S., Tannenbaum, S. R. : *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 135 (1970).

(昭56. 8. 31 受付)