

〔醸酵工学会誌 第70巻 第3号 205-216. 1992〕

 総 合 論 文

電気透析培養による回分培養の高速化に関する研究

(平成3年度日本醸酵工学会照井賞受賞)

野 村 善 幸

熊本工業大学工学部応用微生物工学科
〒860 熊本市池田4-22-1

An approach to high-speed batch culture by built-in electro dialysis culture. —Monograph—
YOSHIYUKI NOMURA (*Department of Applied Microbial Technology, The Kumamoto Institute of
Technology, Ikeda 4-22-1, Kumamoto 860*) *Hakkokogaku* 70: 205-216, 1992.

In various fermentations there is an inhibitory effect caused by the product, such as lactic acid, acetic acid and amino acids. If the inhibiting end-product dissociates in the culture broth, it is possible to remove the inhibitor continuously by electro dialysis, thereby reducing the concentration of the product in the broth. Electro dialysis culture was applied to acetic acid and lactic acid fermentation to reduce end-product inhibition. In the case of acetic acid fermentation, the continuous supply of ethanol and concentrated nutrient solution to the electro dialyzed culture allowed the production of acetic acid to continue for 30 days compared with only 2 days without the electro dialysis system, with or without pH control. During electro dialysis culture, 2,221.9 g of acetic acid was produced and the maximum rate of production was 5.5 g/h, which was about 1.7 times higher than the rates obtained in cultures without the electro dialysis system. In the case of lactic acid fermentation, the addition of an electro dialyzer and microfiltration module increased the lactic acid production rate, and the fermentation was completed within 31 h compared with 85 h for the control. The dry cell weight (2.9 g/l) and the number of viable cells (4.8×10^9 /ml) in the electro dialysis system were about 1.8 and 1.6 times more than those of the control culture after 31 h of cultivation. Thus, very high viability was maintained, resulting in high lactate dehydrogenase activity, a high lactic acid production rate and a short fermentation time. It was proved that the intracellular lactate concentration, as well as the lactate concentration in the broth, was reduced by electro dialysis. Thus, electro dialysis linked with microfiltration reduced end-product inhibition and stimulated the lactic acid production rate in a high-speed batch fermentation.

はじめに

発酵の中には、たとえばアルコール発酵^{1,2)} アセトン・ブタノール発酵³⁻⁵⁾ 酢酸発酵⁶⁻⁸⁾ 乳酸発酵⁹⁻¹²⁾ アミノ酸発酵^{13,14)} など最終生産物による発酵阻害が認められているものがある。その阻害を軽減するために、パーバレーション^{15,16)} 抽出^{17,18)} 透析^{9,19-21)} などの分離操作の研究が行われている。最近では、酢酸菌や乳酸菌をろ過培養することによって、得られたろ液量に相当する容量の新鮮培地を連続的に供給し、培養液

の生産物濃度を希釈することにより生産速度を向上し、高濃度の菌体が得られている。²²⁻²⁵⁾

しかし、現在でも、工業上依然として、回分培養が重要な位置を占めている。代謝生産物を目的とする回分培養はほとんどが最終生産物による阻害を受け、これが原因で回分培養の最大速度を長時間維持することができない。より効率の高い回分培養は、最終生産物阻害を解除もしくは軽減し、高い発酵速度を長時間維持することによって可能となる。そこで、最終生産物による発酵阻害を軽減するために、イオン交換膜を使

用した電気透析装置を培養システムに組み込んだ電気透析培養法を考案した.^{26,27)} この電気透析培養を好気培養として酢酸発酵, また嫌気培養として乳酸発酵に応用し, 生産物の荷電を利用して, 最終生産物を連続的に培養系外へ除き, 培養液中の生産物の濃度を低く保つことによって, 最終生産物による発酵阻害を軽減することを目的として実験を行った.

1. 電気透析装置

酢酸発酵では, 徳山曹達株式会社製の電気透析装置 (TS-2 型) を使用した. その模式図を Fig. 1 に示す. 各部屋はイオン交換膜 (有効膜面積: 205 cm²) によって仕切られている. 陽極にはプラチナをコーティングしたチタン板 (有効面積: 193 cm²), 陰極には sus-316 ステンレス板 (有効面積: 193 cm²) が用いられている. アノライトとして 0.1 N H₂SO₄, カソライトとして 0.1 N NaOH をそれぞれ I と V の部屋に循環し, II の部屋に水道水を, III の部屋に培養液を通し通電すると, マイナスに荷電した酢酸イオンは陰イオン

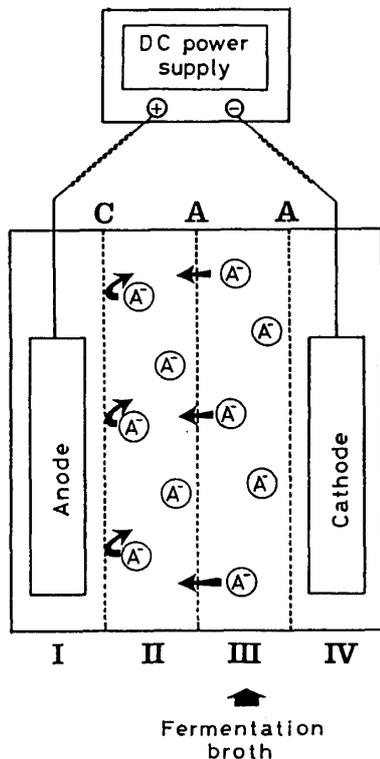


Fig. 1. Schematic diagram of the electro-dialyzer for the acetic acid fermentation. A⁻, Acetate ion; C, cation-exchange membrane; A, anion-exchange membrane; I, anode compartment; II, concentrating compartment; III, dialyzing compartment; IV, cathode compartment; DC, direct current.

交換膜 (A) を通り, 陽極槽 (I) の方に引き付けられるが, 陽イオン交換膜 (C) を透過しにくいので, 最終的に II の部屋に蓄積してくる. 酢酸発酵では, この 4 槽タイプと陽イオン交換膜と陰イオン交換膜をそれぞれ 1 枚ずつ増やした 6 槽タイプを使用した. 陽イオン交換膜はネオセプタ CM-1 (徳山曹達株式会社), 陰イオン交換膜はネオセプタ AM-1 を使用した.

乳酸発酵で使用した電気透析装置を Fig. 2 に示す. この装置はアクリル板で作製した. 本装置は二つの陽極槽 (I と V), 二つの濃縮槽 (II と IV) と陰極槽 (III) の 5 つの部屋からなる. それぞれの部屋は陽イオン交換膜 (ネオセプタ CM-1) と陰イオン交換膜 (ネオセプタ AM-1) で仕切られている. イオン交換膜の有効膜面積は 75 cm² で, 陰極と陽極には, いずれも白金板 (陰極 25 cm², 陽極 12.5 cm²) を使用した. 陰極では, 還元反応がおこり, そのために培養液は還元状態 (乳酸発酵では嫌気状態) を維持できる. したがって, 乳酸菌は嫌気性菌であるため, 培養液の嫌気性を保つために, 培養液は III の陰極槽を通した. アノライトとして, 0.1 N H₂SO₄ を I と V に循環し, 水道水を II と

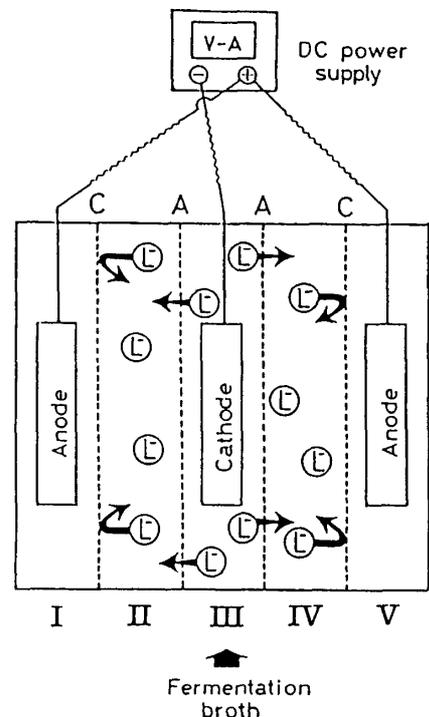


Fig. 2. Schematic diagram of the electro-dialyzer for the lactic acid fermentation. L⁻, Lactate ion; C, cation-exchange membrane; A, anion-exchange membrane; I and V, anode compartment; II and IV, concentrating compartment; III, cathode compartment; DC, direct current.

Ⅳに循環して通電すると、マイナスに荷電している乳酸イオンは陰イオン交換膜を通り、ⅠとⅤの陽極槽の方に引き付けられるが、陽イオン交換膜を透過しにくいので、最終的に乳酸はⅡとⅣの部屋に蓄積してくる。

このようにして、培養液から連続的に酢酸や乳酸を除くことができ、培養液中の生産物の濃度を低く保つことにより、最終生産物による発酵阻害を軽減できると考えられる。

2. 酢酸発酵への応用

2-1 電気透析培養システム 酢酸発酵における培養液のpHとエタノール濃度の制御システムをFig. 3に示す。エタノールセンサーとして簡易型ガスセンサー（フィガロガスセンサー No. 812; 共立電子産業株式会社）を使用した。pH電極やガスセンサーからの電圧信号を増幅器で増幅し、その信号をA/Dコンバーター (Remote TE-801S; Taisei Electric Co., Ltd) でデジタル信号に変換し、マイクロコンピュータ (PC-8801mkII; NEC) に入力した。マイクロコンピュータからの情報はコンバーターでアナログ信号に変換され、リレー回路に送られる。そのリレー回路では、100ボルトの電源のスイッチをオン・オフ制御し、電気透析装置に接続した定電圧定電流電源 (MPO 35-2; 高砂製作所) の作動制御とエタノール供給用ポンプ（ペリスタポンプ SJ1211L; アトー株式会

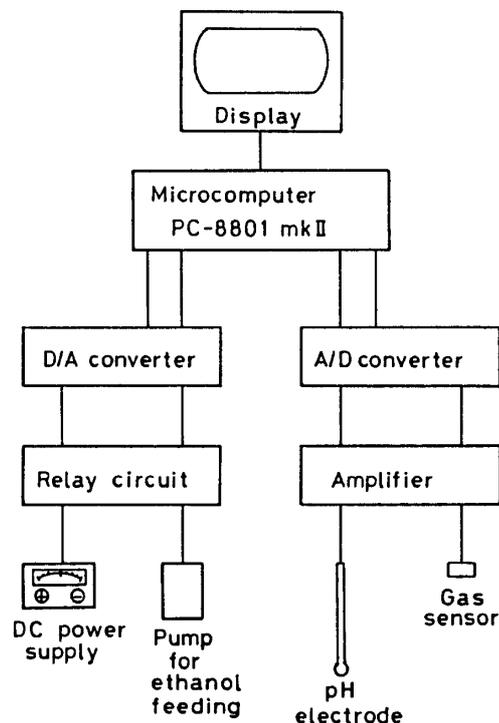


Fig. 3. Schematic diagram of the system for the control of pH and the concentration of ethanol in the fermentation broth of the acetic acid fermentation.

社) および培地供給用ポンプ (マイクロチューブポンプ MP-3; 東京理化器械株式会社) の作動制御が行われる。酢酸発酵に用いた電気透析培養システムの模式

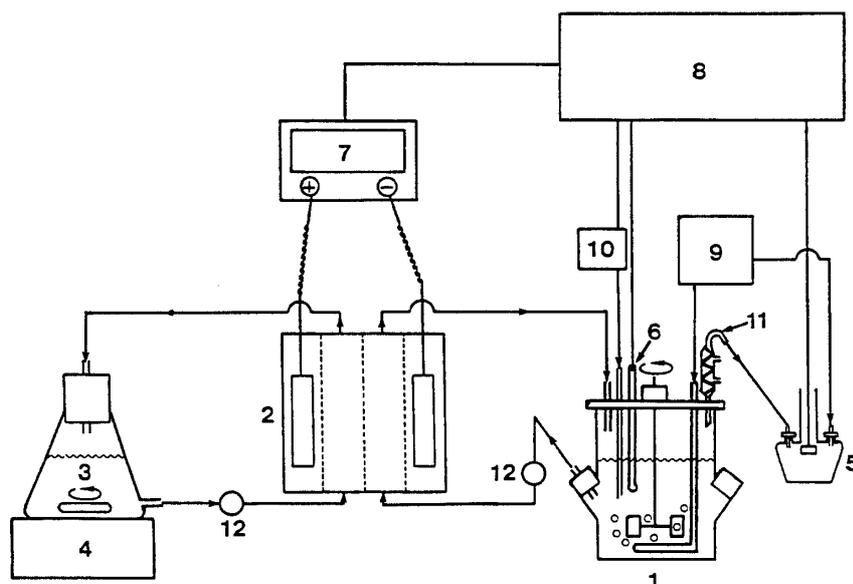


Fig. 4. Schematic diagram of the electro dialysis culture system for the acetic acid fermentation. 1, 2-l miniature fermentor; 2, electro dialyzer; 3, concentrating fluid reservoir; 4, magnetic stirrer; 5, gas sensor; 6, pH electrode; 7, direct current power supply; 8, control system (see Fig. 3); 9, air pump; 10, pump for supplying ethanol; 11, gas outlet; 12, recirculation pump.

図を Fig. 4 に示す. ジャーフェーマンター (液量, 1 l), 電気透析装置, 濃縮液 (水道水, 1 l), ガスセンサー, pH 電極, 定電圧定電流電源, エタノールおよび培地供給用ポンプ, エアーポンプを図のように接続した. 酢酸が生産され培養液の pH が設定値よりも低くなると, リレー回路に接続した定電圧定電流電源のスイッチが入り, 電気透析装置が作動する. 培養液中の酢酸が除かれ, 培養液の pH が設定値以上になるとリレー回路が作動し, 電源のスイッチが切れる仕組みである. このようにして生産された酢酸は連続的に培養液から除かれ, 培養液の pH を一定に保ち, また, 培養液中の酢酸の濃度も低く保たれる. また, エタノールにつ

いても同様に, 培養液中のエタノール濃度が設定値以下になると, リレー回路が作動しエタノール供給用ポンプのスイッチが入り, エタノールが供給される (0.23 ml/min). エタノール濃度が設定値以上になると, ポンプのスイッチが切れ, 培養液中のエタノール濃度は一定に保たれる. なお, 用いたガスセンサーの感度が高く, ミニジャーフェーマンター内の気相中のエタノール濃度を直接測定できなかったため, ミニジャーフェーマンターからの排気ガス中のエタノールを空气中で10倍に希釈して, 30°C で測定した. 培養液と濃縮液は 183 ml/min (Master Flex Pump; Cole-Parmer Instrument Co.) で循環した. 培養液の pH は3.8に, エタノール濃度は1%になるように制御した.

2-2 エタノールのみ供給した酢酸発酵²⁸⁾ 菌株は *Acetobacter aceti* IFO 3281 を使用した. 2-l 容ミニジャーフェーマンター (MB タイプ; いわしや) を用い, 酢酸生産用培地 1 l を張り込んで, 通気量 200 ml/min,

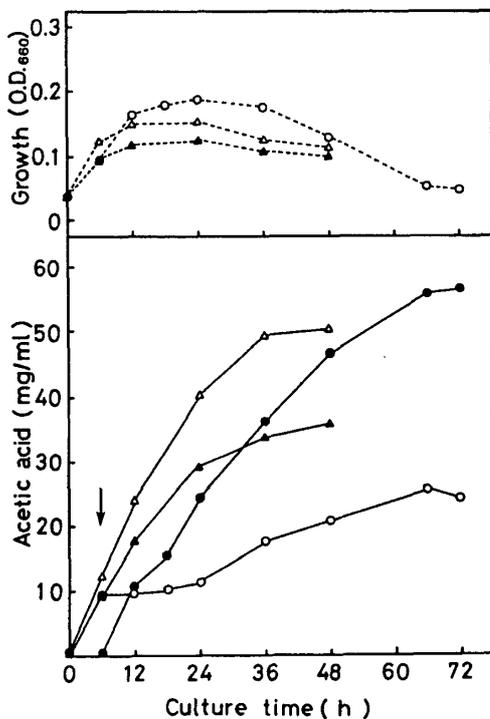


Fig. 5. Time course of the production of acetic acid by electrodiagnosis culture. Cultures were conducted in 2-l fermentors which contained 1 l of production medium at 30°C with agitation at 700 rpm and an air flow rate of 200 ml/min. Ethanol (1% v/v) was added to the medium at the time of inoculation and maintained at 1% by supplying ethanol during the fermentation. The pH of the culture broth was maintained at 3.8 in the electrodiagnosis culture and the pH-controlled without electrodiagnosis. The electric current was maintained at 1.0 ampere. The arrow shows the start of electrodiagnosis. Lines and symbols: —, acetic acid; ----, cell growth; ▲, non-pH-controlled; △, pH-controlled with 5 N NaOH; ○, culture broth in electrodiagnosis; ●, concentrating fluid in electrodiagnosis. OD₆₆₀, Optical density at 660 nm.

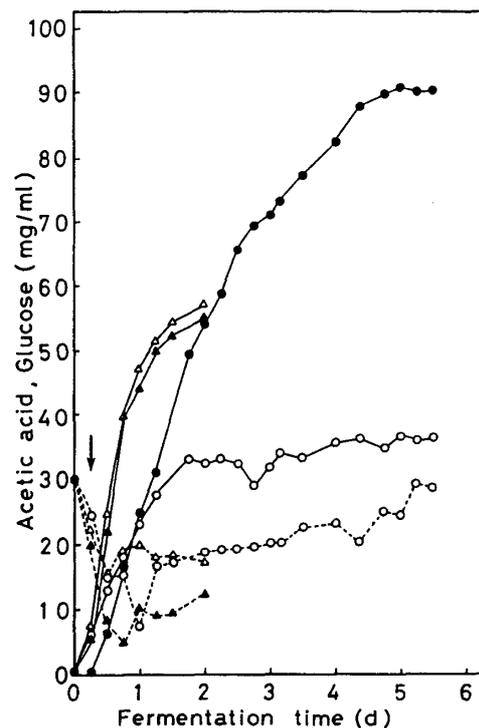


Fig. 6. Time course of the production of acetic acid by electrodiagnosis. Five-fold concentrated fresh medium was supplied to the culture broth. The other culture conditions were the same as those described in the legend to Fig. 5. The arrow shows the start of electrodiagnosis. Lines and symbols: —, acetic acid; ----, residual glucose; △, non-pH-controlled; ▲, pH-controlled; ○, culture broth in electrodiagnosis; ●, concentrating fluid in electrodiagnosis.

攪はん数 700 rpm の条件で培養を行った。エタノールはメンブランフィルターでろ過したものを使用した。電気透析培養での通電条件は 1 アンペアで行った。エタノールのみを供給した発酵での酢酸生産の経時変化を Fig. 5 に示す。図には示していないが、いずれの発酵もエタノール濃度は 1% に保たれていた。pH を制御しない発酵では、菌の生育は悪く、酢酸濃度が 3% 近くになると酢酸生産活性の低下が認められ、48 時間で発酵は終了した (pH 3.1)。また、5 N NaOH で pH 3.8 に制御した発酵では、pH を制御しなかった発酵に比べて、菌の生育もよく生産速度も速くなった。しかし、pH を制御しなかった場合と同様に 24 時間目以降に、生産活性の低下が認められた。いずれの発酵も 48 時間で終了し、pH を制御しなかった発酵で 40.1 g、pH 3.8 に制御した発酵で 58.5 g の酢酸を生産した。一方、電気透析培養を行った発酵では、菌の生育は他の 2 つの発酵よりも良くなり、24 時間を過ぎても酢酸生産活性の低下は認められず、発酵は 72 時間続いた (酢酸生産量 97.6 g)。電気透析培養を行った発酵では、培養液の酢酸濃度は約 2% と低く保たれていたにもかかわらず、発酵は 72 時間で終了した。培養 12 時間目のグルコース濃度は 0.5% 以下であり、酢酸発酵は増殖連動型であるので、グルコースおよび培地成分が不足したために、酢酸生産活性の低下が生じたものと考えられた。

2-3 エタノールおよび新鮮濃縮培地の供給²⁹⁾
エタノールを供給するシグナルを利用して、5 倍に濃縮した新鮮培地 (グルコース 150 g/l、肉エキス 50 g/l、ペプトン 50 g/l、pH 7.0) を供給 (0.53 ml/min) して培養を行った。その経時変化を Fig. 6 に示す。pH を制御しなかった発酵と pH を 3.8 に制御した発酵は、いずれも酢酸濃度が 4% 近くになる 24 時間目から生産速度の低下が認められ、発酵は 2 日で終了した。一方、電気透析培養を行った発酵では、他の 2 つの発酵より生産活性は長く持続したが、発酵は 5.5 日で終了した。この原因として、培養液中の酢酸濃度が 3% 近くでは発酵阻害があると考え、イオン交換膜の面積を増やし、電流も 1 アンペアから 1.5 アンペアに上げて培養を行った。その経時変化を Fig. 7 に示す。電気透析を行うと電気浸透³⁰⁾のために、濃縮液は増加し、逆に培養液は減少する。したがって、濃縮液は 5, 12, 18, 24, 29 日に水道水 1 l と交換した。図には示していないが pH は 3.8 に、またエタノール濃度も 1% に維持されていた。また、培養液は電気浸透で減少する容量に等しい容量のエタノール (約 2.5 l) と新鮮培地 (約 4.1 l) の供給により、ほぼ 1 l に保たれていた。培養液中の酢酸は約 2% と低く保たれており、菌体量は培養日数と共に増加し、OD₆₆₀ で 12 近くまで増加しており、前の電気透析発酵 (Fig. 6; OD=2.64) の約 5 倍に相当する高い値が得られた。また、高い酢酸生産活性が 30 日間

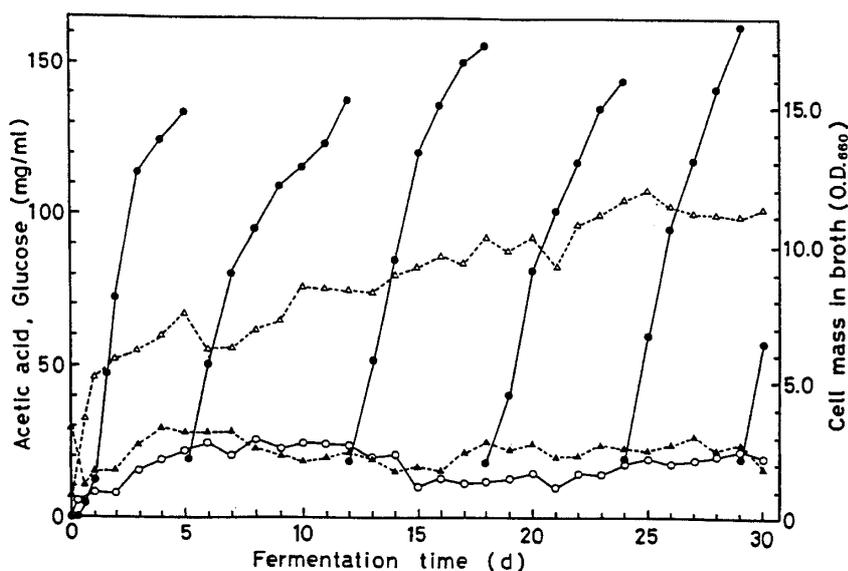


Fig. 7. Continuous production of acetic acid by the electrolysis culture system. The six-compartment electrolyzer was used and electric current was maintained at 1.5 ampere. The other culture conditions were the same as those described in the legend to Fig. 5. Lines and symbols: \circ —, acetic acid in the culture broth; \bullet —, acetic acid in concentrating fluid; Δ —, cell growth; \blacktriangle —, residual glucose.

Table 1. Production of acetic acid by electro dialysis culture system.

	Acetic acid produced (g)			
	Without electro dialysis system		With electro dialysis system	
	Non-pH-controlled	pH-controlled with 5 N NaOH	Four-compartment apparatus ^a	Six-compartment apparatus ^b
Culture broth	77.3	80.2	55.0	31.7
Concentrating fluid	—	—	124.6	2110.0
Anolyte	—	—	20.9	80.2
Total	77.3 ^c	80.2 ^d	200.5 ^e	2221.9 ^f
Maximum productivity (g/h)	3.2	3.2	3.2	5.5
Yield (%)	91	91	88	85

Culture conditions were the same as described in the legends to Fig. 6 and Fig. 7.

^a Available area of anion-exchange membrane was 205 cm², and the electric current was maintained at 1.0 A.

^b Available area of anion-exchange membrane was 410 cm², and the electric current was maintained at 1.5 A.

^c Produced from 65.1 g of ethanol.

^d Produced from 67.4 g of ethanol.

^e Produced from 174.7 g of ethanol.

^f Produced from 1991.6 g of ethanol.

持続し、また、酢酸生産活性の低下は認められなかったが、培養液を循環するチューブの破れのために培養を停止した。以上の結果を Table 1 に示す。電気透析培養を行わない発酵では、pH を制御しなかった発酵、pH を 3.8 に制御した発酵、いずれも酢酸生産量はほとんど変わらず、それぞれ 77.3 g, 80.2 g であった。一方、4 槽タイプの電気透析装置を用いた電気透析培養では、200.5 g の酢酸を生産したが、酢酸生産活性は長時間維持することができなかった。イオン交換膜の面積を増やした 6 槽タイプの電気透析装置を用いた電気透析培養では、発酵は 30 日持続し、2221.9 g の酢酸を生産した。また、この時の最大酢酸生産速度は 5.5 g/h と高く、他の発酵の約 1.7 倍であった。酢酸の収率は、エタノール、酢酸いずれも揮発性物質であるため、長時間続いた電気透析培養では 85% と他の発酵より低くなった。

以上のことから、電気透析培養を行うことにより、酢酸を連続的に培養液から除いたために、培養液中のその濃度を低く保つことができ、発酵阻害を軽減することにより、高い酢酸生産速度が長時間持続しており、また、高い生産速度を維持することができた。このように、電気透析培養を酢酸発酵に応用することにより、電気透析培養の有効性を認めることができた。

3. 乳酸発酵への応用

3-1 電気透析培養システム 使用した菌株は L-乳酸生産菌で、最適温度 37°C, 最適 pH 6.0 のホモ

乳酸菌である *Lactococcus lactis* IO-1 を用いた。本菌株は生産物である乳酸による発酵阻害が認められ、その阻害様式は不拮抗阻害であることは既に報告されている。^{11,12)} この阻害を軽減するために、電気透析培養を乳酸発酵に応用した。その培養システムの模式図を Fig. 8 に示す。750 ml 容ジャーフェンター (液量: 500 ml), 電気透析装置 (Fig. 2 参照), pH 制御装置 (モデル HDC-1; 東亜電波工業株式会社), 定電圧定電流電源 (TMO 35-2; 高砂製作所), 濃縮液 (水道水: 500 ml) を図のように連結した。アノライトとして

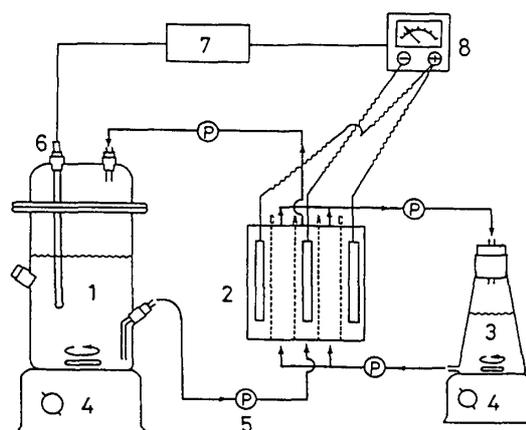


Fig. 8. Schematic diagram of the electro dialysis culture system for the lactic acid fermentation. 1, 750-ml fermentor; 2, electro dialyzer; 3, concentrating fluid reservoir; 4, magnetic stirrer; 5, recirculation pump; 6, pH electrode; 7, pH controller; 8, direct-current power supply.

0.1 N H_2SO_4 (500 ml) を用いた。菌が嫌気性菌であるため、培養液は陰極槽に通した。乳酸が生産されて、培養液の pH が設定値以下になると、pH 制御装置が作動し、定電圧定電流電源にスイッチが入り、電気透析装置が作動する。乳酸が除かれて培養液の pH が設定値以上になると、pH 制御装置が作動し電源のスイッチは切れる。このようにして、乳酸は連続的に培養液から除かれ、培養液中の乳酸濃度を低く保つことができる。リン酸塩溶液 (KH_2PO_4 10 g/l, K_2HPO_4 10 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l) を供給する場合は、そのポンプの電源を pH 制御装置と連結し、電気透析装置が作動する期間中、リン酸塩溶液 (200 ml) を供給した。pH は 6.0 に制御し、電流は 0.2-0.7 アンペアと可変した。対照の発酵は 2 N NaOH で pH 6.0 に制御した。

3-2 電気透析培養による回分発酵³¹⁾ 8.5% のグルコースを含む培地を使用した発酵の経時変化を Fig. 9 に示す。図 A は実測値で示し、図 B の方は、対照の培養では NaOH を添加しており、また電気透析培養では、電気浸透により液量に変化するので液量を補正した値を示している。対照の発酵では、乳酸が培養液中に蓄積してきて、2% 位から生産速度の低下が認められる。一方、電気透析培養では、培養液中の乳酸は培養期間中約 1% に保たれており (Fig. 9 の A)、また、

図には示していないが pH は 6.0 に保たれていた。電気透析培養の方では乾燥菌体重量が低くなっているが (Fig. 9 の B)、これは陰イオン交換膜に菌が付着したためである。対照の発酵は約 85 時間で終了したのに対し、電気透析培養では 60 時間で終了し、25 時間培養時間が短縮された。しかし、50 時間目までは対照の発酵の方が糖の消費、乳酸の生産速度が優っている。これは電気透析することにより、乳酸と同じくマイナスに荷電したイオン特にリン酸イオンが培養液から除かれ、不足したためと考えられた。実際測定すると、対照の発酵の方では 1.5 mmol/l 存在したのに対し、電気透析培養では 10 時間目では検出されなかった。したがって、以後の実験では、pH 制御装置にマイクロチューブポンプを接続し、リン酸 1 カリウムとリン酸 2 カリウムをそれぞれ 1% ずつ含む溶液を、電気透析装置が作動する期間中供給 (0.17 ml/min) した。

3-3 リン酸塩溶液を供給した電気透析培養³¹⁾ 8.5% グルコース培地を使用し、リン酸塩溶液を供給した発酵の経時変化を Fig. 10 に示す。A は実測値、B は補正值で表している。リン酸塩溶液を供給しなかった前の図 (Fig. 9) で認められた差がなくなり、リン酸塩を供給することにより、電気透析培養では、発酵時間がさらに短縮され 50 時間で終了した。

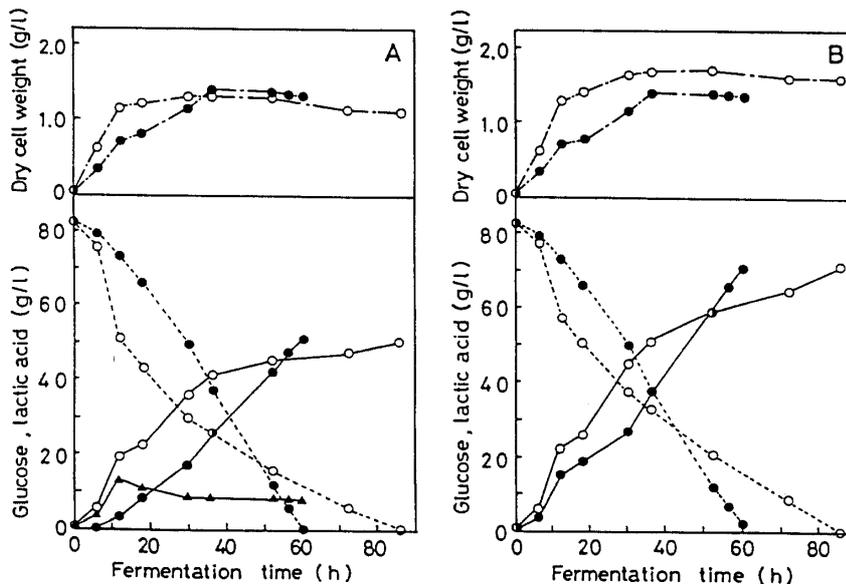


Fig. 9. Time courses of fermentations with 85 g/l glucose medium. A: analytical value, B: compensated value. Fermentations were conducted in a 750-ml fermentor at 37°C with gentle stirring (170 rpm). pHs of the broth in the ED-F and the control fermentation were regulated at 6.0. After 6 h of cultivation, electro dialysis was started. Lines: —, lactate; ---, residual glucose; - - -, dry cell weight. Open symbols indicate the control fermentation. Closed symbols indicate ED-F. In graph A, ●, lactate in concentrating fluid; ▲, lactate in fermentation broth.

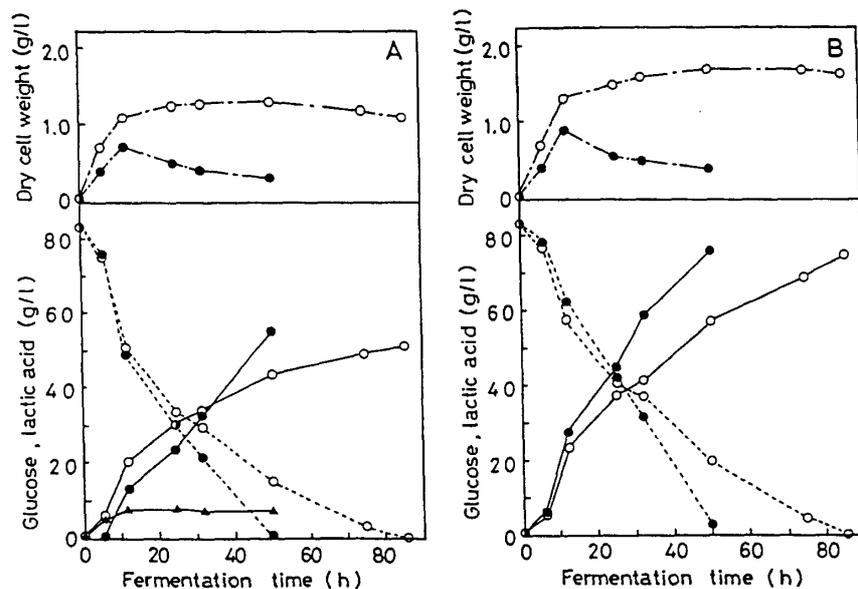


Fig. 10. Time courses of fermentations with 85 g/l glucose medium supplemented with phosphate solution. A: analytical value, B: compensated value. Two hundred ml of phosphate solution (KH_2PO_4 10 g/l, K_2HPO_4 10 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l) was supplied to the fermentation broth using the signal for pH control. The other culture conditions were the same as those described in the legend to Fig. 9. Lines and symbols are the same as in Fig. 9.

5.0% グルコース培地を用い、リン酸塩溶液を供給した発酵の経時変化を Fig. 11 に示す。電気透析培養では、培養液中の乳酸濃度は1%前後に保たれている。一方、対照の発酵では、培養液の乳酸濃度が2%位から乳酸生産速度の低下が認められる (Fig. 11A)。対照の発酵と電気透析培養、いずれもまったく同じ挙動を示しており、どちらも30時間で発酵は終了した。電気透析培養の期間中、培養液の乳酸濃度は約1%に保っていたにもかかわらず、5.0%のグルコースを含む培地では、電気透析培養の効果は顕著には認められなかった。

5.0%および8.5%グルコース培地でリン酸塩溶液を供給した発酵における比乳酸生産速度を、対照の発酵と電気透析培養で比較した (Fig. 12)。5.0%のグルコースを含む培地の場合、対照の発酵、電気透析培養、いずれの比乳酸生産速度はほとんど同じ経時変化を示しているが、電気透析培養では20時間すぎに比生産速度が低下していない。8.5%のグルコースを含む培地の場合、20時間過ぎに電気透析培養の比乳酸生産速度は上昇し、30-40時間で定常状態に達している。すなわち、電気透析培養では、20時間過ぎに乳酸による発酵阻害が軽減されたことを示唆している。ところで、本菌の回分培養における乳酸による阻害は不拮抗阻害であり、^{11,12)} 比乳酸生産速度は次式で表される。¹²⁾

$$\mu_L = \frac{31.5(S_b)}{6.3 + \{1 + 1.15(L_b)\}(S_b)}$$

ここで、 S_b は培養液のグルコース濃度、 L_b は培養液の乳酸濃度を表す。この式を用いて、電気透析培養

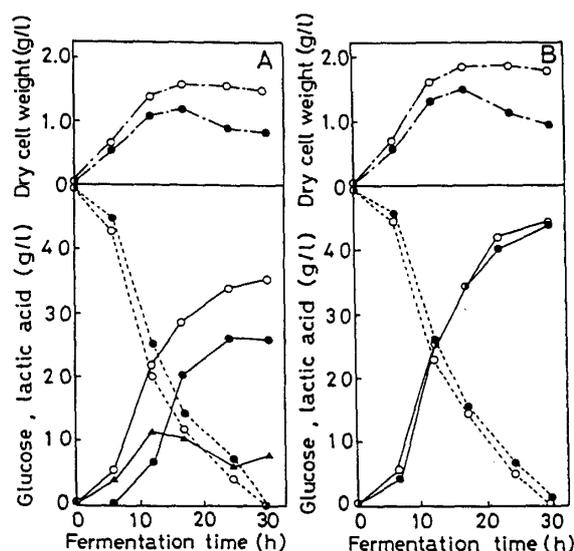


Fig. 11. Time courses of fermentations with 50 g/l glucose medium supplemented with phosphate solution. A: analytical value, B: compensated value. Culture conditions were the same as described in the legend to Fig. 10. Lines and symbols are the same as in Fig. 9.

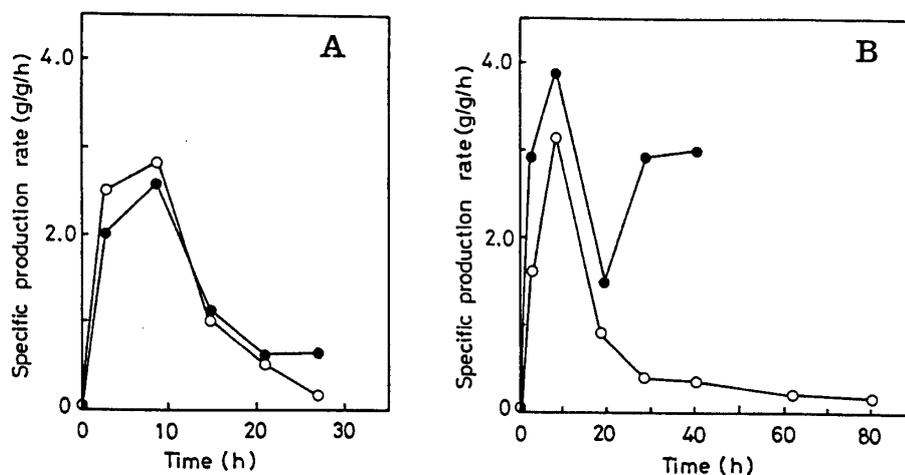


Fig. 12. Profile of the specific production rate of the ED-F in comparison with the control fermentation. A: Medium including 50 g/l glucose, B: medium including 85 g/l glucose. Open symbols indicate the control fermentation. Closed symbols indicate the ED-F. Culture conditions for the media with 50 g/l glucose or 85 g/l were the same as those described in the legend to Fig. 11 and Fig. 10, respectively.

での41時間目の比乳酸生産速度を計算すると、 μ_L は3.08 g/g/hとなる ($S_b=17.7$ g/l, $L_b=7.7$ g/l)。一方、実験で得られた比乳酸生産速度は2.98 g/g/hであり、ほとんど同じであった。すなわち、電気透析培養でも上記の式が有効であることを示す。そこで、同じ時間で乳酸濃度が2%であったと仮定すると、比生産速度は1.29 g/g/hとなり、培養液の乳酸濃度が高くなると比乳酸生産速度は低下する。このことから、電気透析によって培養液の乳酸濃度を低く保つたために、20時間以降に発酵阻害が軽減され、比乳酸生産速度が上昇したものと見える。

BrinkとKoningsは*Streptococcus cremoris*を回分培養した場合に、菌体内乳酸と培養液の乳酸の濃度勾配があることを報告している。³²⁾そこで、電気透析培養における、乳酸による発酵阻害の軽減を、5.0%と8.5%のグルコースを含む培地について、以下のように推察した。8.5%グルコースを含む培地の場合、培養前半では濃度勾配が存在し、菌体内乳酸濃度の方が菌体外乳酸よりも高く、培養後半ではその濃度勾配はなくなり平衡状態になる(対照の発酵)。一方、電気透析培養では、培養液の乳酸濃度を約1%と低く保つことによって、菌体内乳酸濃度を対照の発酵のものより低く保つことができ、乳酸による発酵阻害を軽減できた。一方、5.0%のグルコースを含む培地の場合、電気透析培養では、培養液中の乳酸濃度を1%に保つても、電気透析培養の効果が現れる前に培養が終了した。すなわち、電気透析培養での菌体内乳酸の濃度を対照の

発酵のものより、低く保つ前に発酵は終了したと推察した。

3-4 菌体内乳酸の経時変化³³⁾ 電気透析培養では、培養液の乳酸濃度を低く保つことができたが、菌体内の乳酸濃度が低く保たれているかが問題である。そこで、菌体内乳酸をBrinkとKoningsの方法³²⁾を改変して測定した。すなわち、遠心チューブに比重1.54の過塩素酸、比重1.07のシリコンオイル、培養液を比重の大きい順に加え、遠心分離(18,000×g, 30 min)を行った。この操作で培養液中の菌体のみが過塩素酸層に移り、直ちに溶菌され、以後の代謝が停止する。また、菌体がシリコンオイル層を通るときに、菌体表面の付着水は除かれる。したがって、過塩素酸中に含まれる乳酸が菌体内乳酸であると考えてさしつかえない。この過塩素酸中の乳酸は炭酸ナトリウムで中和してからラクテートアナライザー(YSI model 23L, YSI Co., Ltd.)で測定した。8.5%のグルコースを含む培地を用いた培養における菌体内乳酸濃度の経時変化をFig. 13に示す。電気透析培養では、培養後約10時間目から対照の発酵の菌体内乳酸より、かなり低い水準を維持している。しかし、電気透析培養によって菌体内乳酸濃度を低く保つても、発酵速度は期待したほど改善されていない。そこで、乳酸生成のキーエンザイムであるラクテートデヒドロゲナーゼ(LDHと略)活性を、ラクテートデヒドロゲナーゼC II-テストワコー(和光純薬工業株式会社)を用いて測定した。

3-5 菌体内LDH活性³³⁾ 電気透析培養の菌体

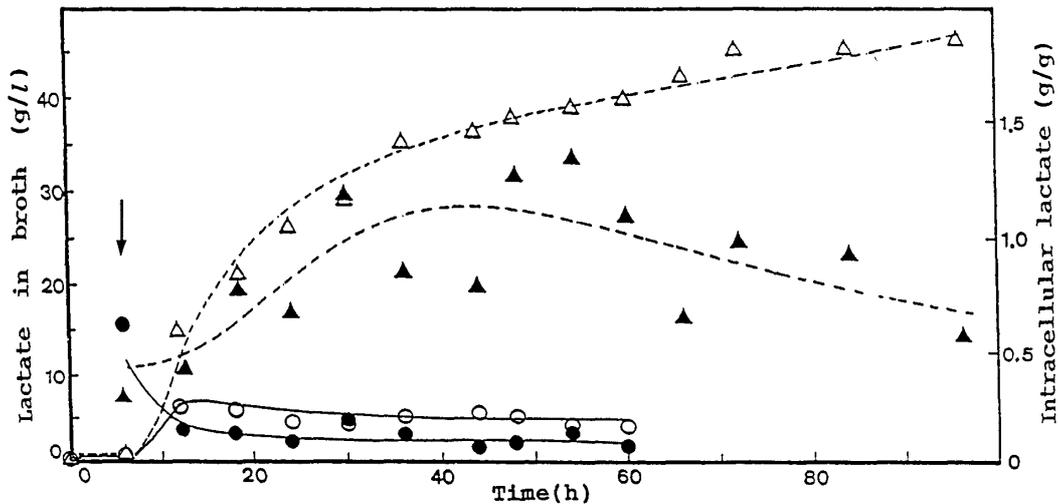


Fig. 13. Time courses of intracellular lactate concentration for the ED-F and control fermentation. Medium including 85 g/l glucose was used. Culture conditions were the same as those described in the legend to Fig. 10. The arrow shows the start of electro dialysis. Lines: —, ED-F; ---, control fermentation. Open symbols indicate lactate concentration in broth. Closed symbols indicate intracellular lactate concentration.

内 LDH 活性と、対照の発酵の菌体内 LDH 活性の経時変化を Fig. 14 に示す。培養液単位体積あたりの菌体内 LDH 活性 (IU/l) と乾燥菌体重量あたりの LDH 活性 (IU/g) で表している。単位体積あたりの菌体内 LDH 活性は電気透析培養の方が低い値を示している。しかし、電気透析培養では、菌体がイオン交換膜に付着²⁶⁾するために培養液中の菌体量は減少し、そのために、LDH 活性が低くなったものと考えられる。

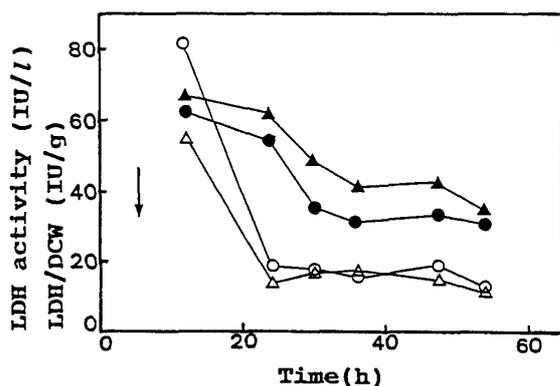


Fig. 14. Profiles of lactate dehydrogenase activity in the ED-F and control fermentation. Culture conditions were the same as those described in the legend to Fig. 10. The arrow shows the start of electro dialysis. Open symbols indicate values for ED-F. Closed symbols indicate values for the control fermentation. Symbols: Δ , (IU/l) for LDH activity per volume of the culture broth; \circ , (IU/g) for LDH activity per dry cell weight.

したがって、乾燥菌体重量あたりの LDH 活性を測定した。しかし、20時間目以降に、電気透析培養の LDH 活性は急激に低下している。したがって、電気透析によって LDH の失活が生じていることが認められた。

3-6 クロスフローろ過モジュールを使用した電気透析培養³³⁾ 電気透析培養において、イオン交換膜に付着した菌の99.9%は死滅していた。これは、培養液を陰極槽に通しているため、菌体は陰極での電気化学反応を受け、また、陰極槽で脱塩された液はアルカリ性になっているために死滅したものと考えられた。したがって、この問題を解決するために、電気透析装置に培養液を通す前に、クロスフローろ過モジュール (MICROZA PSP-103, 旭化成工業株式会社) に通し、菌体は培養槽へ戻し、得られたろ液を電気透析装置に通した。培養液は 170 ml/min (Master Flex Pump) の速度で循環し、得られたろ液を 18 ml/min で電気透析装置に通して循環した。使用したクロスフローろ過モジュールは孔径 0.1 μm 、膜面積は 0.2 m^2 である。8.5% のグルコースを含む培地を用いて、クロスフローろ過モジュールを組み込んだ電気透析培養の経時変化を Fig. 15 に示す。グラフは補正值で表した。電気透析培養では、対照の発酵に比べ約 3 分の 1 の培養時間で短縮され、31時間で培養は終了した。電気透析培養の乾燥菌体重量は対照の発酵のものより低くなっているが、これは菌体がろ過モジュールの中に付着したため

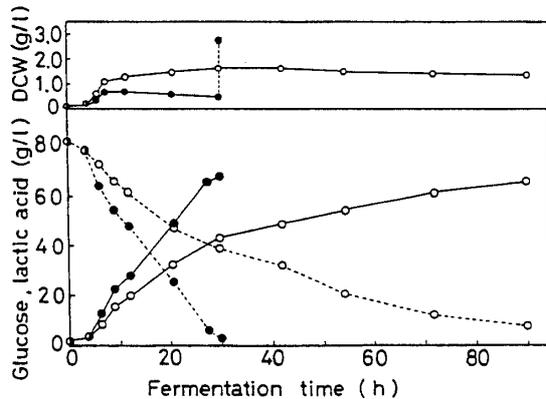


Fig. 15. Time course of the ED-F with a microfiltration module using 85 g/l glucose medium. Culture conditions were the same as those described in the legend to Fig. 10. The graph is shown with compensated values (see Fig. 9). Open symbols indicate the control fermentation. Closed symbols indicate ED-F with microfiltration module. Lines: —, dry cell weight (upper graph) and lactate produced (bottom graph); ---, residual glucose. Broken line in the upper graph indicates dry cell weight withdrawn from the fiber tubes, after ED-F was completed.

である。したがって、培養終了後、ろ過モジュール内の菌体を戻して乾燥菌体重量を測定すると、約 2.9 g/l と高い値を示し、同じ時間の対照の発酵の約 1.8 倍であった。また、生菌数は 4.8×10^9 /ml で、同じ時間の対照の発酵の約 1.6 倍であった。クロスフローろ過モジュールを組み込んだ電気透析培養の終了時に菌体を回収し、その LDH 活性を測定し、乾燥菌体あたりの LDH 活性で表すと、対照の発酵やろ過モジュールを用いなかった電気透析培養では、LDH 活性は失活していくのに対し、クロスフローろ過モジュールを組み込んだ電気透析培養の LDH 活性は、67 IU/g と高い値を維持しており、これは同じ時間の対照の発酵、ろ過モジュールを組み込まない電気透析培養のそれぞれ、約 2 倍と 4 倍という高い活性であった。したがって、電気透析培養にクロスフローろ過モジュールを組み込んだシステムにより、電気透析による菌の死滅や LDH の失活を防ぎ、そのうえ、最終生産物による阻害も軽減したものと考えられる。5.0% のグルコースを含む培地を用いたクロスフローろ過モジュールを組み込んだ電気透析培養の経時変化を Fig. 16 に示す。グラフは補正值で表した。対照の発酵は 30 時間で終了したのに対し、電気透析培養は 9 時間短縮し、21 時間で終了した。このように電気透析による菌の死滅や、酵素の失活といったことも非常に大きな問題であり、

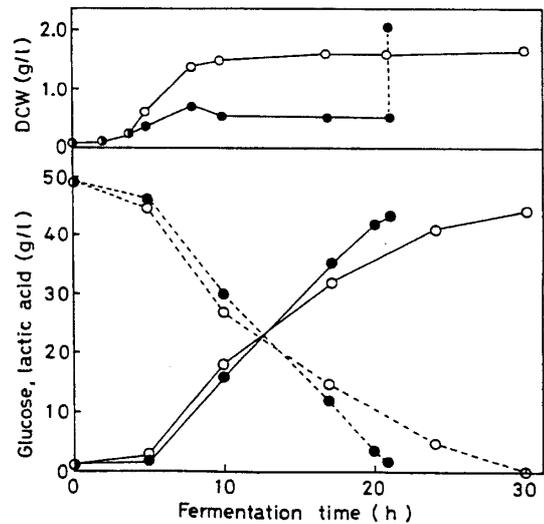


Fig. 16. Time course of the ED-F with a microfiltration module using 50 g/l glucose medium. Culture conditions were the same as those described in the legend to Fig. 10. Lines and symbols are the same as in Fig. 15.

この問題は電気透析培養に精密ろ過などの除菌装置を組み込むことによって解決ができることが示された。以上述べたように、クロスフローろ過モジュールを組み込んだ電気透析培養によって回分培養の高速化が可能であることを実証した。

おわりに

本稿で示したように、電気透析培養法は

- (1) 阻害をおこす生産物の荷電を利用し、電気透析培養によって、連続的に培養液から除くことができる。
- (2) 培養液から生産物を除くことによって、培養液中の生産物濃度を低い水準に維持でき、生産物による阻害を軽減できる。
- (3) 電気透析培養によって菌の最適 pH を維持することができる。
- (4) 菌の延命効果と高い生産活性を長時間維持できる。
- (5) 回分培養の高速化を可能にする。

などの特長をもつ培養法であると言える。しかし、生産物と同じ荷電を持ったイオン（特にリン酸イオン）も除去され、発酵に影響を及ぼすことも認められた。この問題を解決するためには、目的の物質を選択的に分離できるようなイオン交換膜の開発が期待される。

今後、電気透析培養の応用は乳酸、酢酸などの有機酸発酵に限らず、アミノ酸発酵、核酸発酵などの発酵に応用されることが期待される。

本研究を遂行するに際し、御懇篤なご指導ご鞭撻を賜った、恩師であり熊本工業大学名誉学長の本江元吉先生、並びに九州大学農学部教授、石崎文彬先生に厚く御礼申し上げます。また、共同研究者の熊本工業大学教授、岩原正宜先生に深謝致します。共同研究者である九州大学農学部大学院生、小林元太君、山本興君および熊本工業大学応用微生物工学科応用微生物学講座の卒業生諸君に感謝します。

文 献

- 1) Aiba, S., Shoda, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 845-864 (1968).
- 2) Brown, S. W., Oliver, S. G., Harrison, D. E. F., Righelato, R. C.: *Eur. J. Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 151-155 (1981).
- 3) Lin, Y. L., Blaschek, H. P.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 966-973 (1983).
- 4) Hermann, M., Fayolle, F., Marchal, R., Podvin, L., Sebald, M., Vande-Castelle, J. P.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 1238-1243 (1985).
- 5) Jones, D. T., Woods, D. R.: *Microbiol. Rev.*, **50**, 484-524 (1986).
- 6) 森 明彦, 金野範之, 照井堯造: *醸工*, **48**, 203-212 (1970).
- 7) 森 明彦, 吉川博治, 照井堯造: *醸工*, **50**, 518-527 (1972).
- 8) Muraoka, H., Watabe, Y., Ogasawara, N.: *J. Ferment. Technol.*, **60**, 171-180 (1982).
- 9) Friedman, M. R., Gaden, E. L. Jr.: *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 961-974 (1970).
- 10) Keller, A. K., Gerhardt, P.: *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 997-1018 (1975).
- 11) Ishizaki, A., Ohta, T.: *J. Ferment. Technol.*, **67**, 46-51 (1989).
- 12) Ishizaki, A., Ohta, T., Kobayashi, G.: *J. Ferment. Technol.*, **68**, 123-130 (1989).
- 13) Shiio, I., Miyajima, R.: *J. Biochem.*, **65**, 849-859 (1969).
- 14) 野村善幸, 岩原正宜, 本江元吉: *農化*, **61**, 957-962 (1987).
- 15) Groot, W. J., Schoutens, G. H., Beelen, P. N., van den Over, C. E., Kossen, N. W. F.: *Biotechnol. Lett.*, **6**, 789-792 (1984).
- 16) Larrayoz, M. A., Puigianer, L.: *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 692-696 (1987).
- 17) Taya, M., Ishii, S., Kobayashi, T.: *J. Ferment. Technol.*, **63**, 181-187 (1985).
- 18) Evans, P. J., Wang, H. Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1662-1667 (1988).
- 19) Gerhardt, P., Gallup, D. M.: *J. Bacteriol.*, **86**, 919-929 (1963).
- 20) Abbott, B. J., Gerhardt, P.: *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 577-589 (1970).
- 21) 野村善幸, 岩原正宜, 本江元吉: *農化*, **61**, 957-962 (1987).
- 22) Taniguchi, M., Kotani, N., Kobayashi, T.: *J. Ferment. Technol.*, **65**, 179-184 (1987).
- 23) Hatanaka, H., Wang, E., Taniguchi, M., Iijima, S., Kobayashi, T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 470-473 (1988).
- 24) Park, Y. S., Ohtake, H., Toda, K., Fukaya, M., Okumura, H., Kawamura, Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 918-923 (1989).
- 25) Park, Y. S., Ohtake, H., Fukaya, M., Okumura, H., Kawamura, Y., Toda, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 315-319 (1989).
- 26) Hongo, M., Nomura, Y., Iwahara, M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 314-319 (1986).
- 27) Nomura, Y., Iwahara, M., Hongo, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 788-793 (1987).
- 28) Nomura, Y., Iwahara, M., Hongo, M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 137-142 (1988).
- 29) Nomura, Y., Iwahara, M., Hongo, M.: *J. Biotechnol.*, **12**, 317-326 (1989).
- 30) 八幡屋正: *エンジニアのためのイオン交換膜*, p. 27, 共立出版株式会社 (1982).
- 31) Ishizaki, A., Nomura, Y., Iwahara, M.: *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 108-113 (1990).
- 32) Brink, B. T., Konings, W. N.: *J. Bacteriol.*, **152**, 682-686 (1982).
- 33) Nomura, Y., Yamamoto, K., Ishizaki, A.: *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 450-452 (1991).