

〔醸酵工学会誌 第70巻 第5号 395-404. 1992〕

総合論文

流加培養系の最適化とその実現に関する研究

(平成3年度 日本醸酵工学会照井賞受賞)

塩 谷 捨 明

大阪大学工学部応用生物工学科
〒565 吹田市山田丘2-1

Optimization and control in fed-batch cultures. —Monograph— SUTEAKI SHIOYA (*Department of Biotechnology, Osaka University, Suita, Osaka 565*) *Hakkokogaku* 70: 395-404, 1992.

A method for obtaining maximum production of the bioproduct in fed-batch cultures is explained, and its validity is demonstrated by experimental data. The approach is based on a model which describes the relationship between the specific production rate, ρ , and specific growth rate, μ . Using a mathematical model, an optimal profile of the specific growth rate could then be obtained easily by the Maximum Principle. Finally, the optimal profile was realized by changing the feed rate of the substrate in a practical fed-batch culture. Practical examples of bioproduction, such as histidine, lysine, and glutathione, as well as production of an enzyme, showed that the two-stage production process could be realized experimentally, thus demonstrating the validity of the method.

1. はじめに

培養系では一般に基質阻害などのために回分培養よりも濃度を低いレベルで一定に保てる流加培養が多く使われている。この培養系の最適化、たとえば最大生産の方策を考えてみよう。最適化は Fig. 1 に示すように培養系のモデリング—最適政策の計算—その実現、というステップをとって実現される。しかし、ここでこれらのいくつかのステップで問題がおこりうる。まず第一に実験結果とモデリングの間には避け難い誤差—モデリングは一般に構造を仮定し、データに合うようにパラメータ推定されるがこのようなモデリングをいかに巧みに行っても避け難い誤差—が生じ、現象の本質をついていないようなモデルではより大きな誤差を生ずることになる。

一方、モデルをもとに最適政策を計算する段階でも困難が生じる。すなわち、複雑なモデルであればあるほど最適解を求めるのに時間がかかったり、計算には困難性がともなう。次に得られた最適解を実現する段

階にも問題がある。この段階においてもモデルが真のものとは異なっていたり、また、初期条件がずれたりすればもはや最適解ではなくなってしまふ。したがって、モデル化の段階からこの点を考慮しておく必要がある。そして、明らかにこのモデル化はモデルを同定する目的に依存している。

本論文の目的は流加培養系の最適化を念頭においたモデル化の一方法を提案し、その最適解を与えることであり、またそれを実現するための方策を示すことである。それは簡単にまとめてしまえば、複雑な対象をモデル化することの困難さ・不確定性を制御技術でカバーしようというアプローチである。また具体例とし

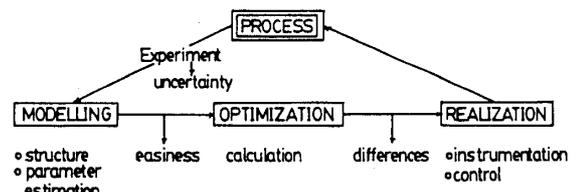


Fig. 1. Three steps for optimal production in a process.

て菌体内生産物であるグルタチオンの生産および菌体外生産物としてのヒスチジン生産をとりあげて本方法論の有効性を論じ、リジン生産系において、モデル誤差の影響を検討する。

2. 比増殖速度をもとにした流加培養系の最適化

2.1 流加培養系の最適化の一方法 流加培養系による代謝産物の最大生産を考えた場合、Fig. 2 下段に示すように一般に反応槽内の環境濃度と生産や増殖を特徴づける単位菌体あたりの生産物生成速度（比生産速度 ρ ）や菌体増殖速度（比生成速度 μ ）とを関係づける数式モデルを作りこの数式モデルを基に最適な基質添加量すなわち最適な環境濃度パターンを求めることにより解くことができる。しかし、数値計算で求めた最適解は必ずしも現実に最適ではない。というのは、初期条件を数値計算に用いた値に揃えるのが困難であったり、簡単なモデルで複雑な現象を表現するため、モデル化が容易でなく、非常な労力をかけてモデルを作り上げてもモデルパラメータがしばしば変化し、場合によってはモデル構造自身も変わってしまうような多くの不確実性を含む。したがって、現に運転中の現象に対してその操作が最適である保証は一般にないからである。

モデル化の困難性は主に反応槽内環境濃度変化を記述しようとしたことに起因するので、我々はまったく違った観点から最適化の実現をはかろうとしている。すなわち、Fig. 2 上段に示すように、最適な環境濃度パターンを実現するのではなく、培養状態を表現する状態量として比増殖速度 μ や比生産速度 ρ をとり、これらの量を被制御量や操作量などの変数にとらえていこうというのが我々の基本的な考え方である。¹⁻³⁾ 現実には反応速度 μ や ρ の最適なパターンを求め、これを培地添加量変化によって実現していこうとするものである。

2.2 流加培養系のモデル化 さて以上で提案したモデルを数式で表現すると

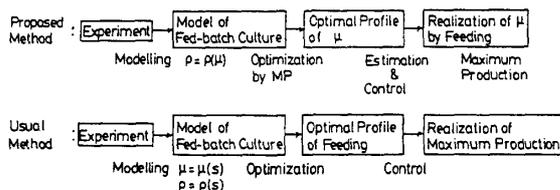


Fig. 2. Procedures for maximum production in a fed-batch culture by usual method and proposed method.

菌体量

$$\frac{dVX}{dt} = \mu VX \quad (1)$$

生産物生成速度

菌体内生産

$$\frac{dVpX}{dt} = \rho(\mu) VX \quad (2a)$$

菌体外生産

$$\frac{dVP}{dt} = \rho(\mu) VX \quad (2b)$$

培養液量変化

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (3)$$

のように表現できる。比増殖速度によって比生産速度が近似的に近似できるという系に対し、このようなモデルの表現は非常に簡単であり、後に示すようにある程度広い対象にうまく適用できるものと思われる。しかし、ペニシリンに代表されるような2次代謝産物の生産にはこのままでは適用できないと思われる。

なお、 μ および ρ が糖濃度 s の関数で表現されている場合でも、最適解探索の手段⁴⁾として s を消去して μ と ρ の対応関係を用いることも考えられる。

2.3 最適化 ここで「運転時間 t_f と初期条件が与えられたとき、得られる生産量を最大にすること」を考える。すなわち、評価関数 J を

$$J = VP(t_f) - VP(0)$$

または

$$= VpX(t_f) - VpX(0) \quad (4)$$

と定義し、この J を最大にすることを考える。この場合 Eq. (5) のような

$$Z = VX \quad (5)$$

変数変換をすると菌体内生産物の生産であろうと菌体外であろうと最適問題として同じ表現が可能である。

すなわち Eq. (6) の J

$$J = \int_0^{t_f} \rho(\mu) Z dt \quad (6)$$

を最大にするような $\mu(t)$ を求める問題となる。ただし Z は次式

$$\frac{dZ}{dt} = \mu Z \quad (7)$$

を満たし μ には Eq. (8) の制約があるものとする。

$$\mu_{\min} \leq \mu \leq \mu_{\max} \quad (8)$$

この問題は $\rho(\mu)$ が与えられれば最大原理⁵⁾によって簡単に解くことができる。ここでは後で用いる μ の形として Fig. 3 に示す $\rho(\mu)$ が μ_c で最大となりその両側で直線で近似できる場合をまず考える。

2.4 最適解

A. 直線近似でできる場合 最大原理による最適解は次のように与えられる。ハミルトニアン H を次のように

$$H \triangleq \rho Z + \lambda \mu Z \triangleq \phi \mu + \Psi \quad (9)$$

定義する時、最適な μ は H を最大にするように求められる。ただし λ は次を満たす。

$$\frac{d\lambda}{dt} = -\frac{\partial H}{\partial Z} = -\rho - \lambda \mu \quad (10)$$

$$\lambda(t_f) = 0 \quad (11)$$

いま $\rho(\mu)$ が Fig. 3 に示すごとく両側直線近似できる場合を考える。すなわち、 $\rho(\mu)$ が次のように与えられるとする。

$$\rho(\mu) = \begin{cases} a_1 \mu & \mu_{\min} \leq \mu \leq \mu_c \\ -a_2 \mu + b & \mu_c \leq \mu \leq \mu_{\max} \end{cases} \quad (12)$$

このとき Eq. (9) の ϕ は次で与えられる。

$$\phi = \begin{cases} (a_1 + \lambda)Z & \mu_{\min} \leq \mu \leq \mu_c \\ (-a_2 + \lambda)Z & \mu_c \leq \mu \leq \mu_{\max} \end{cases} \quad (13)$$

また、 ϕ は次に示す性質をもつ。

$$\frac{d\phi}{dt} = \begin{cases} 0 & \mu_{\min} \leq \mu \leq \mu_c \\ -bZ < 0 & \mu_c \leq \mu \leq \mu_{\max} \end{cases} \quad (14)$$

一方、Eq. (11) の関係から

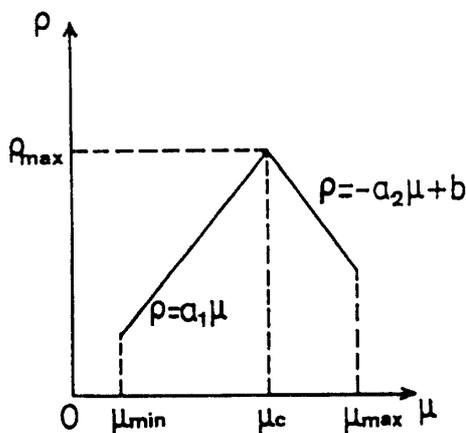


Fig. 3. Mathematical model of specific production rate ρ by specific growth rate μ .

$$\phi(t_f) = \begin{cases} a_1 Z > 0 & \text{for } \mu_{\min} \leq \mu \leq \mu_c \\ -a_2 Z < 0 & \text{for } \mu_c \leq \mu \leq \mu_{\max} \end{cases} \quad (15)$$

すなわち $t = t_f$ で、 $H(\mu)$ を μ に対してその関係を模式的に描いてみると Fig. 4 の (c) のようになり、Eq. (14) を考慮すると一般には $H(\mu)$ は Fig. 4 の (a) \rightarrow (b) \rightarrow (c) のように変化しているものと考えられる。そこで最適な μ_{opt} はハミルトニアン H を最大にすることから次のような境界操作 (bang-bang 操作) で与えられる。

$$\mu_{opt} = \begin{cases} \mu_{\max} & \text{for } 0 \leq t \leq t_c \\ \mu_c & \text{for } t_c \leq t \leq t_f \end{cases} \quad (16)$$

なお、 t_c は Eq. (13) に $\phi(t_c) = 0$ を代入すると

$$\lambda(t_c) = a_2 \quad (17)$$

であり Eq. (10) を積分して Eqs. (11), (17) を満たすように t_c を求めると

$$t_c = t_f - \ln \left(1 + \frac{a_1}{a_2} \right) / \mu_c$$

または

$$= t_f - \ln \left(\frac{b}{b - a_2 \mu_c} \right) / \mu_c$$

または

$$= t_f - \ln (b / \rho_{\max}) / \mu_c \quad (18)$$

別の表現として、

$$t_s \triangleq t_f - t_c = \ln (b / \rho_{\max}) / \mu_c \quad (19)$$

ここで注意すべきは、Eq. (16) の解釈として、最適操作は最初 $\mu = \mu_{\max}$ を維持する増殖期間と、それにつづく $\mu = \mu_c$ を持続する生産期間と区別でき、二段培養が最適であると解釈できることである。また、 $\mu = \mu_c$ を持続する生産期間 $t_s = (t_f - t_c)$ は t_f や初期条件に依存せず $\rho(\mu)$ の形によって決まっていることも興味ある結果である。

さて補足として、 $t_f < t_s$ の場合には最初から $\mu = \mu_c$ を続けるのが最適である。なお、特異制御すなわち $\phi \equiv 0$ が最適解となる可能性は $\lambda \equiv -a_1 < 0$ しかないが

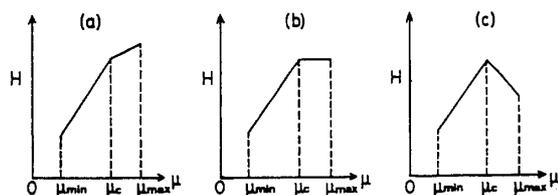


Fig. 4. The relationship between Hamiltonian H and μ .

これは Eq. (11) を満たさず、あり得ないことがわかる。B. $\rho(\mu)$ が極大値を持つ場合 $\rho(\mu)$ が μ に関して上に凸の関数で与えられる場合、 $\partial H/\partial \mu = 0$ を満たす μ 、すなわち $\mu_{\min} \leq \mu \leq \mu_{\max}$ の間に H を最大にする μ が存在することに注意しなければならない。この条件から H を最大にする μ の条件として

$$\frac{\partial \rho}{\partial \mu} = -\lambda(t) \quad (20)$$

が導ける。したがって、最適操作は

$$\mu_{\text{opt}} = \begin{cases} \mu_{\max} & 0 \leq t \leq t_h \\ \mu_h & t_h \leq t \leq t_f \end{cases} \quad (21)$$

となる。ただし、 μ_h は Eq. (20) を満たす μ であり $\lambda(t)$ は、Eqs. (10), (11) を満たす。具体的には Eq. (10) を Eq. (11) の初期条件のもとで次の Eq. (22)

$$\mu_h(t) = \mu_c \quad (22)$$

の条件および Eq. (20) で与えられる μ_h を用いて逆時間方向に解くことができる。すなわち t_h はちょうど Eq. (20) で与えられる μ_h が μ_{\max} になる時刻といえる。

たとえば ρ が具体的に次式のように μ の 2 次関数

$$\rho = -\frac{\rho_{\max}}{2(\mu_c)^2} (\mu - 2\mu_c)\mu \quad (23)$$

で与えられる場合には Eq. (20) から

$$\mu_h = \frac{(\mu_c)^2}{\rho_{\max}} \lambda + \mu_c \quad \text{for } t_h \leq t \leq t_f \quad (24)$$

と求まる。一方 Eq. (10) より、その区間で $\lambda(t)$ は次を満たすことも明らかである。

$$\left(t - t_f + \frac{2}{\mu_c}\right) \left(\frac{(\mu_c)^2}{\rho_{\max}} \lambda + \mu_c\right) = 2 \quad (25)$$

ちょうど $t = t_h$ のとき $\mu_h = \mu_{\max}$ となるから、この式から

$$t_f - t_h = 2 \left(\frac{1}{\mu_c} - \frac{1}{\mu_{\max}}\right) \quad (26)$$

となることがわかる。この場合も $(t_f - t_h)$ は初期条件や t_f には依存しないことがわかる。

他の場合、すなわち $\rho(\mu)$ が μ に関して単調増加の場合には $\mu = \mu_{\max}$ を操作時間中続けることが最適であることが自明であり、また $\rho(\mu)$ が μ に関して単調減少の場合は、B の場合とほぼ同じ結果になるが $\mu = \mu_c$ を有限時間持続させる時期が存在する。

3. 流加培養系の制御

3.1 制御系の役割 さて、流加培養系において以上のように求まった比増殖速度 μ の最適なパターンは、

基質流加などによって実現されねばならない。よく知られているように比増殖速度を一定に保つ糖流加方法は、対糖菌体収率が変化しなければ指数流加となる。

したがって、 μ の境界操作 (bang-bang 操作) は、 μ の切り替え時点を除いては指数流加の組合せを用いて実現できそうである。事実、後述の応用例のいくつかは、この指数流加の組合せによるフィードフォワード制御で実現しようとし、また一定の成果をあげた。

しかし、この指数流加を成就させるには、収率の値を適切に選定することの他に、初期菌体濃度を精度よく与える必要がある。これらパラメータの他に、予期せぬ外乱が入ったときには、このようなフィードフォワード的制御ではなく、情報をフィードバックさせ、流加量を変更させる、フィードバック制御が必要となる。このとき、目標値は比増殖速度であるがこれは直接測定できないのでなんらかの手段により推定する必要がある。

3.2 カルマンフィルターによる比増殖速度の推定 比増殖速度 μ は、マクロな物質収支の関係や pH 制御に要した酸やアルカリの量から算出しカルマンフィルターなどの雑音除去フィルターを用いることにより推定できることがある。以下、pH 制御を利用することができる具体例^{3,6,7)}を示そう。

バイオプロセスにおいては、たとえば、菌体が増殖や生産物生成をおこなって pH が変化する場合や、加水分解反応を触媒する酵素反応が進行して pH が変化する場合には、至適な pH の値に保つために、随時、酸や塩基を適当量添加する必要がある。このとき添加した酸や塩基の量から発酵プロセスにおける菌体の増殖速度、生産物生成速度、酵素活性などを知ることができる。

ある場合には以下で利用するように、pH 制御よりアンモニア消費速度が推定できる。アンモニア消費速度 $R(k)$ が正確に求めれば菌体の増殖速度 $R_x(k)$ は、

$$R_x(k) = (MW/\delta)R(k) \quad (27)$$

と求まる。ここで、 (MW/δ) はアンモニア消費 1 mol に対する菌体の増殖量である。推定された増殖速度を拡張カルマンフィルターの観測値として用い、比増殖速度および菌体濃度をオンライン推定することができる。

カルマンフィルターとは、観測およびシステムに含まれる雑音を除去し、もっとも確からしい値を推定する一連の手続きのことである。⁸⁾カルマンフィルタリ

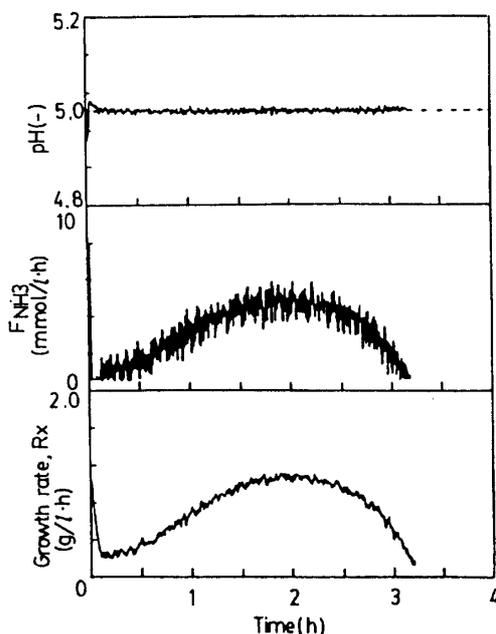


Fig. 5. The result of pH control and estimation of the growth rate.

ングに含まれる可変なパラメータに適当な値を入れてチューニングし、もっとも望ましいフィルターを構成することができる。推定した結果菌体濃度のオンライン推定値とオフライン測定値は良好な一致を示し、菌体濃度および菌体比増殖速度を正確に推定できていることがわかった。^{3,7)} 推定結果の一例を Fig. 5 に示す。

3.3 PF システム さて、 μ の推定が可能としてこれを基質流加量で制御する問題を考えてみる。これはバッチプロセス制御の一種と考えられ次のような特徴を持つ。⁹⁾

バッチプロセス制御の特徴は、i) 連続プロセスの制御が定常点からのずれを問題にしているのに対し、バッチプロセスの制御は目標値が1つのパターンになっていることが多く、ii) 入出力関係が非線形であり、そのダイナミクスは平均的にいえば、連続プロセスがステップ入力に対し定形であるのに対し、バッチプロセスは原点に極を持つ無定形または原点に零点を持つ定常ゲイン0となるような応答を示すものが多い。iii) 操作時間が比較的短いため、定常特性よりも過渡特性が問題となる。また、iv) 同じような操作がバッチごとに繰り返し行われる反復操作の形態が多い。

ここでii) の特徴は際だっており、たとえ目標値が一定であり、外乱の存在を無視してもこれを実現する操作量は一定とならないことを意味する。これは時変形システムとして捉えることができるし、また、プロ

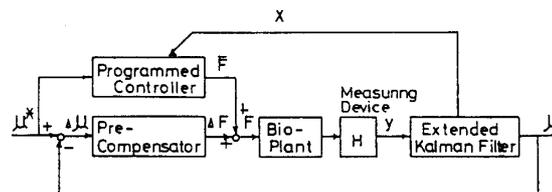


Fig. 6. PF system with extended Kalman filter.

セス制御でよくやられる定常点回りの線形化という概念が定常点が存在しないか存在しても意味がないため、そのままでは使えないともいえる。

上で述べた特徴を持つバッチプロセス制御に対し、いろいろな制御系の応用が考えられてきた。しかしこれらの制御系構成上の目的は極言すれば、目標パターンを達成できる操作量を生成する逆システムを、近似的にしかできないにしろ、いかに構成するかという点に集約できるように思われる。このとき制御対象の数式モデルを利用しようというのが Fig. 6 に示す PF システム^{10,11)} である。

Fig. 6 のプログラム制御と呼んでいるフィードフォワード入力部分はモデルを用いた目標パターンからの操作量が算出され、ここが逆システムになっている。したがって完全な目標入力を与えるのが困難な場合も存在する。また、フィードバック回路(前置補償器)により外乱やモデル誤差の修正をはかろうとしている。本制御系では、フィードフォワード部分が支配的でありこのモデルさえ正確に与えられれば、前置補償器には必ずしも高性能の制御を要求せず、PI 制御でも十分と考えられる。

4. 応 用 例

4.1 流加培養によるヒスチジンの最大生産
Brevibacterium flavum を用いたヒスチジン生産を考える。生産株はヒスチジン生産を高めるため、ウラシル要求性でありまたヒスチジンアナログ耐性株として選択されたものである。この株における培養条件を検討の結果：(1) 代謝系として等モルのグリシン副生は避けられないこと、(2) ウラシルは流加培養中 $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上存在すれば増殖、生産両方とも影響はないこと、(3) 溶存酸素は 4 ppm 以上でないこと、他のアミノ酸を副生成すること、(4) 炭素源として酢酸およびグルコースの両者とも不可欠であること、(5) その最適なモル比は 2.3 程度、等が判明している。¹²⁾ そこでこれらの溶存酸素濃度、培地条件を固定し、指数流加速度を変えて、流加培養実験した結果 Fig. 7 のようなデー

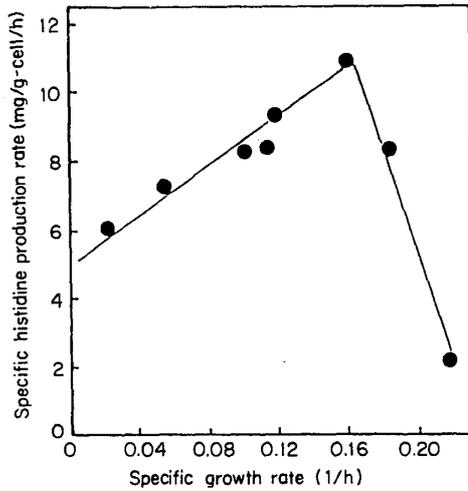


Fig. 7. The relationship between specific histidine production rate ρ_H and specific growth rate μ .

タを得た。すなわち、 $\mu_c = 0.16 \text{ h}^{-1}$ を境にヒスチジン比生産速度 ρ_H は直線的に単調増加し、また、 $\mu > \mu_c$ では ρ_H は直線的に減少することがわかる。²⁾

この関係は、前節 A で議論した場合に相当する。したがって、最大生産のための最適政策は $\mu = \mu_{\max}$ から $\mu = \mu_c$ への bang-bang 操作、すなわち Eq. (16) で与えられる境界操作、二段培養が最適となる。なお、 t_c は 7.3 h と求まる。

いま $t_f = 10 \text{ h}$ としてこの最適政策を実施した結果を Fig. 8 に示す。この場合は次節で述べる方法と同じく指数流加を基本としているが適宜指数流加速度の初期

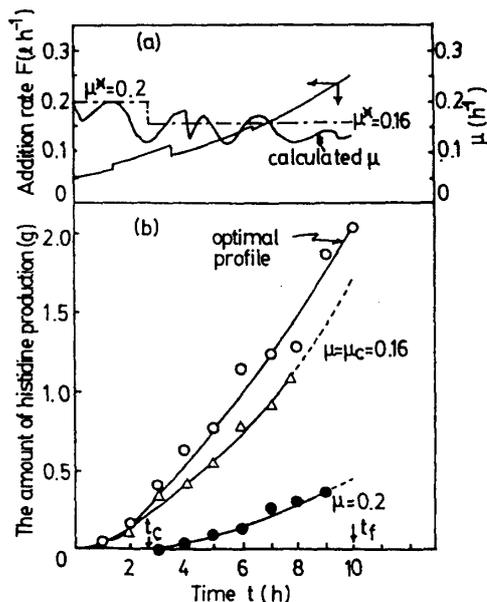


Fig. 8. The result of maximum histidine production in fed-batch culture.

値を変えている。この結果 μ は Fig. 8a に示すごとく変化しており、やや不満はあるものの μ の希望のパターンに追従しているといえる。なお、このときの基質流加速度も図中に示す。 μ の制御についてはもう少し改良すべき点が残されていると思われる。次節で述べるような、たとえばアルカリ量からの μ の推定機構の開発が行えれば、 μ の推定にもとづく制御が行え、この点は改良されると期待される。

このときの評価関数 J の値は Fig. 8b に示すごとく経時変化している。対照のため $\mu = 0.2 \text{ h}^{-1}$ 、 0.16 h^{-1} のときの J の値も示している。これらの実験は操作時間が 7 h だったり 9 h だったりするため完全な比較はできないが、図中の点線で示すような挙動をとるものと予想される。また初期菌体量の各実験間の差をなくすため初期菌体量を最適政策実験の場合に相当するよう換算率をかけて規格化して表示している。

この結果から明らかなように、 μ の制御はやや不十分ながら $\mu = \mu_{\max}$ や $\mu = \mu_c$ と一定に保つような制御よりも十分生産量は大きく、 μ を指標とするモデル化、最適化と実現というここで提案する方法の有効性を示すものといえる。

4.2 流加培養によるグルタチオン生産のモデル化と最大生産の実現

4.2.1 流加培養系のモデル化 *Saccharomyces cerevisiae* を用いたグルタチオン (GSH と略す) 生産を考える。グルタチオンはアミノ酸のトリペプチドで医薬として用いられている。この系において、3 l-Jar-fermentor を用いたグルコースを炭素源とする指数流加培養実験から比増殖速度 μ と比グルタチオン生産速度 ρ_{GSH} との関係が Fig. 9 のように得られた。³⁾ なお、この GSH

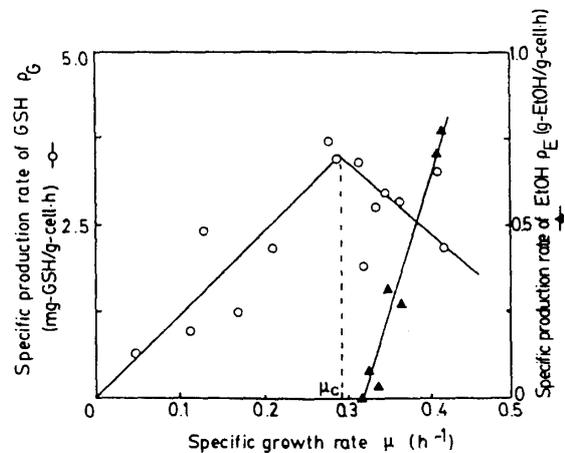
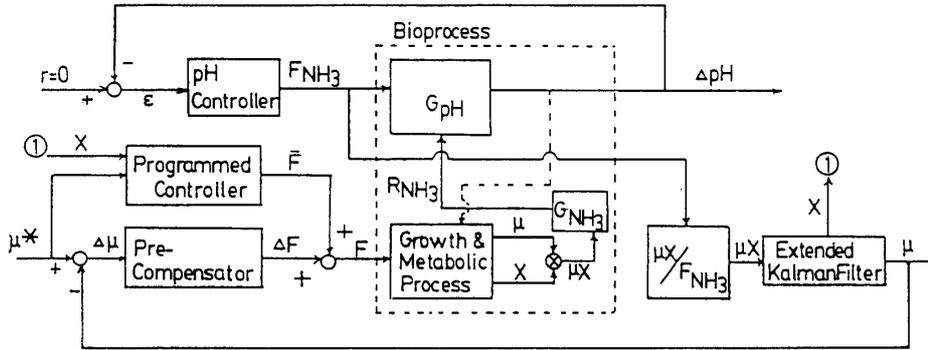


Fig. 9. The relationship between specific GSH production rate ρ_{GSH} and specific growth rate μ .

Fig. 10. Estimation and control system for specific growth rate μ .

は菌体内に蓄積されるので Eq. (2a) の式のように書いている。このようにある μ の値, μ_c を境に ρ_{GSH} が減少するのは糖の過剰流加による Crabtree 効果によってエタノールが生成することと関連していると思われる。図中にエタノール生産速度と μ の関係も示した。Fig. 9 の関係は μ が十分大きくても時間がそれほど経過しない範囲, すなわちエタノールが培地中に 1% 以下しか蓄積していないような範囲では十分成立することが確認された。

また, これら比生産速度は図中の直線で近似できるものとした。なお, この図から菌体内 GSH 含量 p は次のように求められる。物質収支から

$$\frac{dp}{dt} = \rho_{GSH} - \mu p \quad (28)$$

と書けるので, 一定となる GSH 含量は $dp/dt=0$ とおいて

$$p = \rho_{GSH} / \mu \quad (29)$$

すなわち, ある与えられた μ に対して求まる ρ_{GSH} の点へ原点から引いた直線の傾きで与えられることがわかる。このことから $\mu \leq \mu_c$ では GSH 含量は一定であり, $\mu_c \leq \mu$ では含量はこの値より小さくなることがわかる。

4.2.2 最大生産の実現 さて, Fig. 9 のような関係が与えられたとき, 最大生産を与える μ はすでに議論したように $\mu_{max} \rightarrow \mu_c$ への bang-bang 制御, 二段培養となる。次のステップはこの理論的に求められた μ のパターンを基質流加によって実現することである。このためには μ を何らかの方法で推定し, この μ を理想のパターンにトラッキングさせる方策が必要である。このような μ の推定と制御についてはすでに提案してきた Fig. 10 に示すようなシステムを構築した。まず, 拡張カルマンフィルタを利用して pH 一定制御

のためのアンモニア流加速度から μ を推定する。³⁾ この方法によって少なくとも本培養系では十分な精度で推定できることが実証されている。³⁾

一方, 制御系としてはフィードフォワード/フィードバック制御系の 1 種である PF (programmed/feed-back control システム¹⁰⁾) を用いる。ここで, プログラム入力としては理想的に与えられる μ のパターンから変動がないとして計算される流加量である。feedback control としてはいわゆる比例+積分 (PI) 制御系を用いた。Fig. 11 に GSH 最大生産の実験結果を示す。

いま Eq. (18) に従うと $t_s=2.0$ h であり, 本実験では $t_s=6$ h ととっている。Fig. 10 のシステム構成による μ

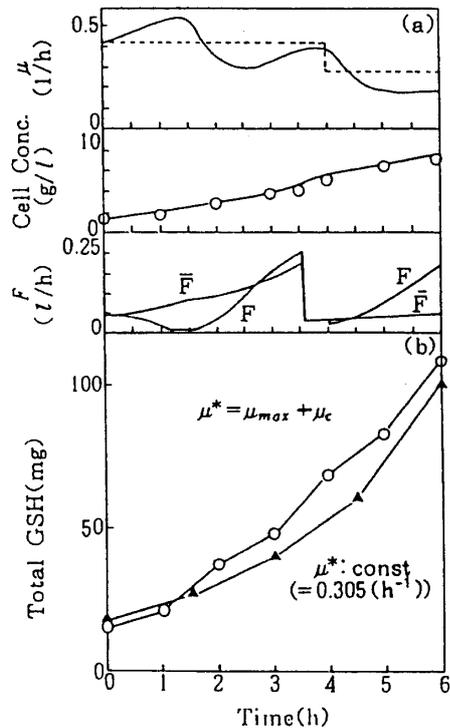


Fig. 11. The result of maximum GSH production in fed-batch culture by the proposed method.

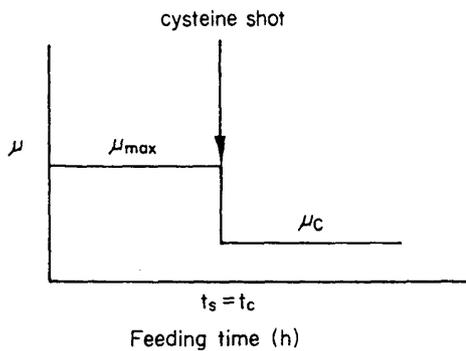


Fig. 12. Scheme of optimal strategy for maximum GSH production in fed-batch culture with cysteine shot.

の推定制御結果は、Fig. 11a に示す。なお、図中にはこのときの流加量、 μ から計算される菌体濃度および実測値を示す。この計算値と実測値の一致性から μ の推定はほぼ満足すべきものといえる。一方、 μ の推定はともかく、 μ の制御にはやや不満の残る結果となったが流加量変化と μ の応答間に無駄時間が含まれるため、この程度の制御結果になったものと考えられる。

また、Fig. 11b には J の経時変化を示し、また対照として $\mu = \mu_c$ を維持したときの J の値も示した。この図から一応 μ の推定・制御を行うことにより $\mu = \mu_c$ を保つよりも生産量は高くなり、本論で展開した方法論の有効性が確認された。

なお、この系へのシステイン添加により生産速度、菌体内含量の顕著な上昇がみられシステイン添加時

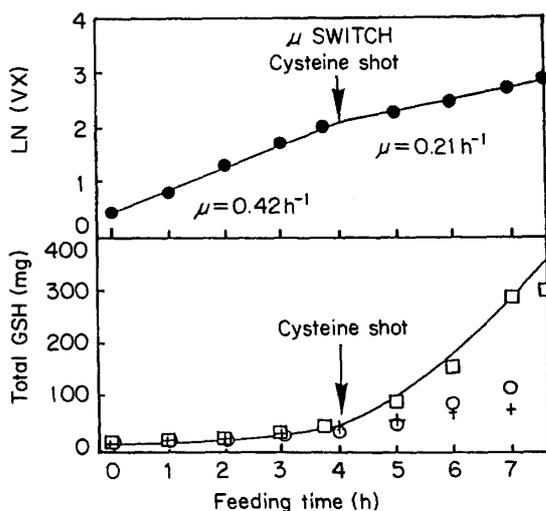


Fig. 13. Actual specific growth rate in the realization experiment and total GSH production of the optimal strategy in comparison to constant control of μ_{\max} or μ_c .

期、 μ の切り替え時期について最適化したところ、Fig. 12 に示すパターンが最適であることがわかった。¹³⁾ また、この系を実験により実現すると、Fig. 13 に示すように $\mu = \mu_c$ を保つ場合よりも生産量は、約 1.6 倍に上昇した。

5. モデル誤差の評価

5.1 モデル誤差と最適性 以上で展開した方法論は、比増殖速度と比生産速度が Fig. 3 に示すように環境濃度や他の変数を介さず直接対応しているというモデルを基本にしている。これらのデータは、指数流加培養実験から得られており、比増殖速度 μ はほぼ一定の擬定常状態となっている。一方、流加量を変化させてこの μ を実現しようとするとき流加量変化と μ の変化の間には、動的な遅れが必ず存在する。この遅れは糖濃度等の環境濃度のモデルを考慮して最適操作を求めたときと、考慮しないときの最適操作の違いとして現われる。そこで、ここで用いた擬定常状態モデルとそうでないモデルとのモデル誤差の最適性に与える影響をリジン発酵でのデータをもとに検討した。

5.2 リジン生産におけるモデル誤差と最適性 さて、*Corynebacterium glutamicum* によるリジン発酵について実験データを見てみよう。 μ と ρ の関係は、Fig. 14 に示すように与えられ^{14,15)} このデータをもし直線で近似する時（これを Model-1 とする）は、上で求めたような境界操作が最適となる。しかし、これを Table-1 に示すような主要酵素濃度まで取り込んだ少し詳しいモデル（Model-2 とする）を用いて擬定常状態を作り、表現すると図中の曲線のようになる。

どちらがデータによく合っているか何ともいえないがここでは、仮に Model-2 が正しいとしよう。いま、

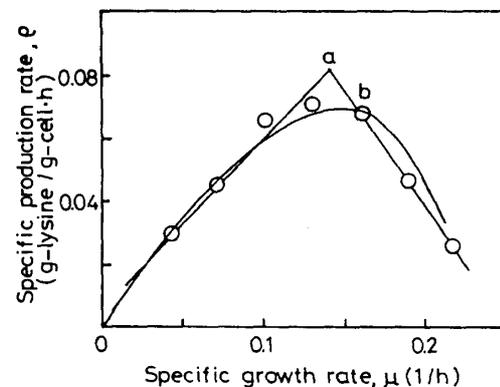


Fig. 14. Comparison of Model-1 (straight line) and Model-2 for prediction of ρ from μ at a quasi-steady state. Symbol: \circ , experimental data.

Table 1. System equation of Model-2.

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= \left(\mu - \frac{F}{V}\right) X, & \mu &= \frac{\mu_{\text{MAX}} S}{K_S + S} \frac{L}{K_L + L} \\ \frac{dS}{dt} &= -v_G X + \frac{F}{V} (S_F - S), & v_G &= m + \frac{1}{Y_{X/S}} \mu + \frac{1}{Y_{P/S}} \rho \\ \frac{dL}{dt} &= -v_L X + \frac{F}{V} (L_F - L), & v_L &= m + \frac{1}{Y_{X/L}} \mu \\ \frac{dP}{dt} &= \rho X - \frac{F}{V} P, & \rho &= \frac{\alpha_{\text{MAX}} S}{K_a + S} E \\ \frac{dE}{dt} &= K_M \mu - \mu E - K_D E, & K_M &= A_1 + \frac{A_2}{1 + A_3 L^n} \end{aligned}$$

Model-2をもとに最終生産量を最大にする流加量のパターンをシミュレーションから求めると Fig. 15 の下段のように求まる。ただし、流加量のある時刻での上・下限は μ の上・下限に対応するように与えた。図から明らかのように Model-1 と Model-2 では最初 μ が最大で後で μ_c に近い値とするような傾向は似ているものの若干の差はあるようである。しかし、評価関数値の差は、約 5% とほぼ近似としては問題ないと思われる。すなわち、この例ではダイナミクスを無視することによる差は、実用上は問題ない程度であり、ここで展開した方法論は、実用的に用いられるものと考えられる。

6. おわりに

比増殖速度 μ を指標とする流加培養系でのモデル化、最適化またその実現という方法論を展開し、その有効性を一、二の培養系に実際に適用して確認した。本方法論は回分培養系や連続培養系にも拡張できるものと思われる。回分培養ではすでに、培養温度による発現調節が可能な遺伝子組み替え菌の培養で、最適培養温度切り替え問題に適用可能なことを示した。¹⁶⁾ 本方法論では現実の操作量である基質流加速度と比増殖速度 μ の間の関係のモデル化を最適化のための道具としては用いておらず、制御によって、できるだけ理想のものに近づけることとしている。そして、現実的にはこの方法論で十分であると思われる。すなわち、本方法では従来法のモデル化に含まれる不確定性の最適解に及ぼす影響を、理想の μ と制御結果としての μ とのギャップに押し込めようとしており、多くの場合この方が、従来のモデル化にもとづく動的最適化より簡便で実用的な方法だと考えられる。また、この方法でまとめきれない場合、すなわち μ と ρ の間にそれほど強い関係がないような場合、たとえば抗生物質の

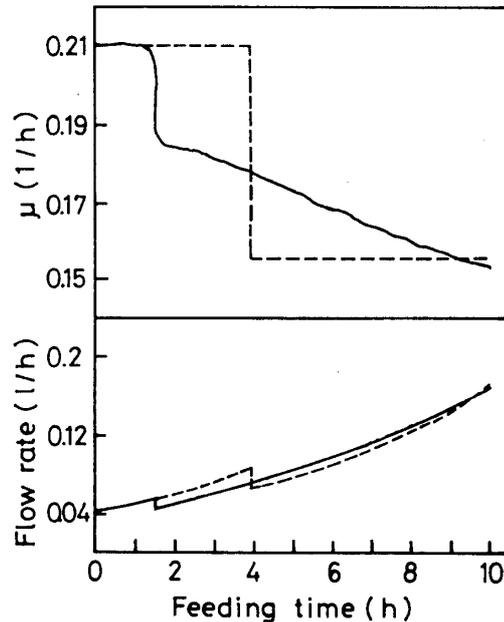


Fig. 15. Optimal policies calculated from Model-1b (----) and Model-2 (—).

ように増殖段階と生産段階には直接的な相関を見いだしにくい場合については今後に残された課題である。

本研究は、大阪大学工学部応用生物工学科において行われたもので、終始、適切なるご助言を下さいました菅健一教授に深くお礼申し上げます。また、共同研究者として多大なご協力をいただきました菅研究室の教職員、卒業生、在学生諸氏、および貴重な実験材料をご提供いただいた皆様に深く感謝致します。今回の受賞は我々のグループで行われた研究に対して与えられたものと考えており、筆者がその代表として光栄に浴したものと思っております。ここに深く感謝します。

文 献

- 1) 塩谷捨明, 清水 浩, Chim-anage, P., 菅 健一: 化学工学論文集, **18**, 572-578 (1991).
- 2) Chim-anage, P., Shioya, S., and Suga, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 176-190 (1991).
- 3) Shimizu, H., Araki, K., Shioya, S., and Suga, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 196-205 (1991).
- 4) Yamane, T., Kume, T., Sada, E., and Takamatsu, T.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 587-598 (1977).
- 5) Pontoryagin, L. S.: *The Mathematical Theory of Optimal Processes* (English translation by Trirogoff, K. N.) Wiley-Interscience, New York (1962).
- 6) Shioya, S.: *Computer Application in Fermentation Technology* (Eds. Fish, N. M.), Elsevier Sci., 15-22 (1989).
- 7) Shimizu, H., Shioya, S., and Suga, K.: *Process Control and Quality*, **2**, 177-186 (1992).
- 8) Shimizu, H., Shioya, S., Suga, K., and Takamatsu, T.: *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 354-364 (1989).
- 9) 塩谷捨明: 化学工学, **54**, 897-901 (1990).

- 10) Takamatsu, T., Shioya, S., and Okada, Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1675-1686 (1985).
- 11) Shimizu, H., Shioya, S., Suga, K., and Takamatsu, T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 276-282 (1989).
- 12) Chim-anage, P., Shioya, S., and Suga, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 386-391 (1990).
- 13) Alfafara, C., Miura, K., Shimizu, H., Shioya, S., and Suga, K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 583-540 (1992).
- 14) Shioya, S.: *Proc. of ICCAFT5/IFAC-BIO2*, Keystone (1992).
- 15) Shioya, S., Yang, Y. K., Omasa, T., Suga, K.: *Biochemical Engineering for 2001* (Eds. Furusaki, S. et al.) Springer-Verlag, 669-672 (1992).
- 16) 神田彰久, 塩谷捨明, 菅 健一, 原島 俊, 大嶋泰治: 第23回化工秋期大会要旨集, 第4分冊, p. 122 (1990).