

培養槽のスケールアップ—攪拌と酸素供給—

神田 彰久

日本では古くから酒、醤油など微生物の力を利用して造られた醸造食品になじみがあることから醸造工学が発展し、本誌も大阪醸造学会の『醸造学雑誌』として創刊され、その後、『醗酵工学雑誌』『醗酵工学会誌』『生物工学会誌』と名前を変えて引き継がれている。バイオテクノロジーの発展に伴い、本会の対象はiPS細胞などを用いた細胞医療の分野にまで広がっており、近年、隆盛を極めて人工知能の領域においても、バイオインフォマティクスとして対象を先取りしていたように思われる。

一方、それら先端的な技術に対して、基本的な微生物の培養技術については、体系的に教えられる機会も減っているようである。ジャーファーメンター（小型培養装置）の取り扱いに始まり、微生物の特性を調べて最終的な製品の製造にどのようにつなげるかは経験がないとわからないことも多い。企業での研究はなかなか開示されないため、学生が興味を持って学ぶのは難しい。そこで本稿では、微生物培養のスケールアップの基礎的な事項と、いくつかの検討例について紹介する。

なお、実験室での基礎から微生物培養を体系的に学ぶための教科書としては、『実践 有用微生物培養のイロハ』¹⁾をおすすめしたい。

醗酵工学の発展

微生物を培養してものづくりを行うプロセスは、20世紀に入って、パン酵母の培養や、アセトンブタノール醗酵の開発などに伴い発達してきた。大量生産するために、大容量培養槽を殺菌し、内部を無菌的に保つための技術や、エアスパージャーにより酸素供給不足を解消する方法が開発された²⁾。

その後、アオカビを用いたペニシリン生産や、微生物による酵素やタンパクの生産、アミノ酸の生産などに適用範囲を広げ³⁾、最近では生分解性のバイオプラスチック⁴⁾など、幅広い製品が作られている。

基本的な培養槽

培養槽が備えておかなければならない特性として、まずは次の点があげられる。

- ・殺菌ができ、培養中も目的微生物以外の侵入が抑えられること。
- ・培地の添加や培養液の抜き出しが適切に行えること。
- ・通気攪拌により酸素供給が行えること（好気培養の場合）。
- ・pHや温度など、微生物生育に適した環境に制御できること。
- ・これらを適切なコストで実施できること。

併せて洗浄性も重要であり、わずかの隙間や溜まりが雑菌汚染の原因となる。測定機器や、培地の添加抜出用ノズルの個数や配置、配管の傾斜や繋ぎ目、バルブの種類や位置など、設備の設計には注意すべきことが多い。さらにこれらの日常の管理もきわめて重要である⁵⁾。

酸素供給と k_La

好気培養は好気性微生物の生育や物質生産を速めることから広く用いられており、装置の酸素供給能力は実質的な生産性を決定するため、きわめて重要な因子である。微生物の酸素の消費は、気泡から液中への酸素の溶解、溶解した酸素の菌体の摂取という流れで行われるが、通常、この前者が律速となるため、酸素移動速度（oxygen transfer rate: OTR [$\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$])を次式で表し、酸素移動容量係数 k_La [s^{-1}]を、装置の重要な指標としてスケールアップを行う。

$$\text{OTR} = k_La (C^* - C)$$

C^* : 気泡の酸素分圧と平衡的な溶存酸素濃度 [$\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$]

C : 培養液中の溶存酸素濃度 [$\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$]

理論と計算方法は本コーナーでも紹介されたことがあるため、詳しくはそちらを参照されたい⁶⁾。

k_L は酸素の気相から液相への移動抵抗の逆数 [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]、 a は単位体積当たりの気泡の界面積 [m^{-1}]であるが、別々に測定することは難しく、これを掛け合わせたものを指標として用いている。

培養槽は微生物の酸素消費速度に対して十分な酸素供給能力を持つ必要があるが、過剰の能力は設備や運転の

コストアップにもつながるとともに、剪断に弱い菌では、たとえば攪拌回転数を上げることによって、目的の生産性が得られなくなることさえある。そのため、微生物の酸素要求量の見積もりと、 k_La 測定はきわめて重要である。

k_La の測定法

亜硫酸ソーダ法 銅触媒下では酸素が亜硫酸の酸化に速やかに使われることから、系内に亜硫酸ソーダを仕込み、通気攪拌を行った時に亜硫酸酸化速度と酸素移動速度が等しくなることを利用したものである。

本法は簡便で、培養を伴わない系で測定できることから、装置同士の比較を行うのに適している。一方、実際の培養では、液の物性も気泡の大きさも異なるため、本法の数値でのみ判断することはできない。

Gassing out法 系を窒素で置換した後、酸素を通気したときの酸素濃度の上昇カーブから k_La を求めるstatic法と、実際の培養中に酸素供給を停止し、直線的に下がる溶存酸素濃度から微生物の呼吸速度を求め、酸素供給を回復させたときの昇カーブから k_La を求めるdynamic法がある(図1)。Static法では、実際の培地に近い組成の液を用いることができ、亜硫酸ソーダ法より適切な k_La を求めることができる可能性がある。またdynamic法は、培養中に用いることでさらに現実的な値を求めることが可能である。ただし、いずれの方法も溶存酸素を測定する電極の応答性能が計測条件に対して十分に高いことが要求される。

排気ガス分析法 排気ガス中の酸素濃度が分析可能な場合は、その酸素濃度と通気量から微生物の酸素消費速度を求め、溶存酸素濃度とのバランスから k_La を求めることができる。ただし、培養槽が大きくなると、空気の入口と出口での気相中の酸素濃度が変化することや、液深による影響を考慮する必要がある。

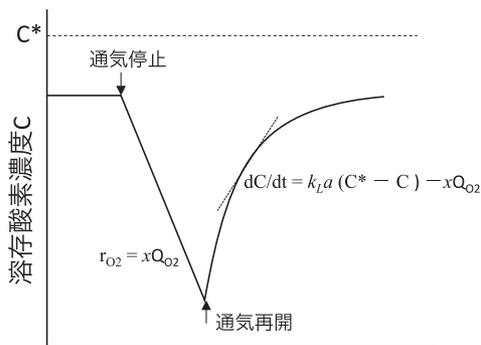


図1. dynamic法における酸素濃度変化. r_{O_2} : 呼吸速度 [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$], Q_{O_2} : 比呼吸速度 [$\text{mol} \cdot \text{kg} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$], x : 菌体濃度 [$\text{kg} \cdot \text{cell} \cdot \text{m}^{-3}$]

培養槽の設計

培養槽の構成 代表的な培養槽の構成は図2のようなものである。好気培養の場合、攪拌翼には、平羽根タービン翼が用いられることが多い(図3左)。気泡の分散性が良く、培養液の混合も確保できるからであり、壁面に邪魔板を設置して上下混合を促進する。大型培養槽になると、タービン翼は、複数個用いられることもある。スパージャーは通常、培養槽の最下部に設置される。

ただし、タービン翼を複数設置した場合は、翼と翼の間隔に注意が必要とされる。翼の間隔を S 、翼の直径を d としたとき、 S/d はおおよそ1.5前後が適切とされ、これより小さいと、それぞれの翼の吐出流が合一するなど、攪拌や分散の効率が悪くなる。一方、広がりすぎても、全体の混合性が悪化する。

いろいろな攪拌翼 平羽根タービン翼は、それぞれの周辺の混合性は非常に良いが、翼間の物質移動は悪くなり、翼周辺での状況に槽の上下で差が生じる。Manfrediniらは、工業規模の 112 m^3 槽(平羽根タービン翼4段設置)において、物質移動とガス移動を考慮した槽内酸素濃度分布について検討している⁷⁾。

また、スパージャー近くの翼周辺では、気泡が滞留し、十分は分散性能を得られないことがある。そのため、種々の翼が検討され、平板の代わりに円管を半分に割った形状のコーンケープ翼(図3右)や、佐竹化学機械工業で開発されたHS-100翼⁸⁾など、高通気条件でも、優れた気泡分散性を発揮できるものがある。

さらに、全体混合性を重視するのであれば、下部のスパージャー近傍には気泡分散を重視した翼、上部には、

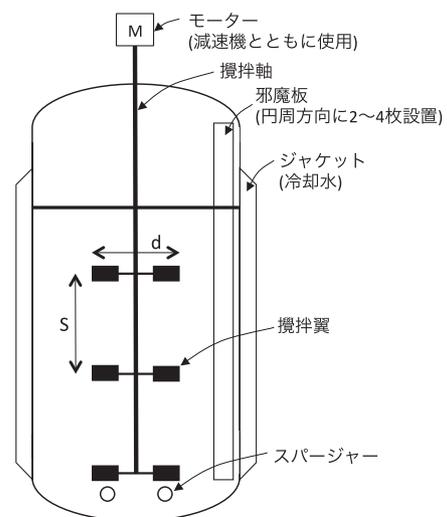


図2. 培養槽の構成例

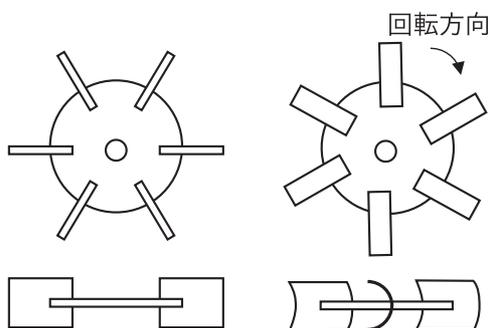


図3. 平羽根タービン翼（左）とコーンケープ翼（右）

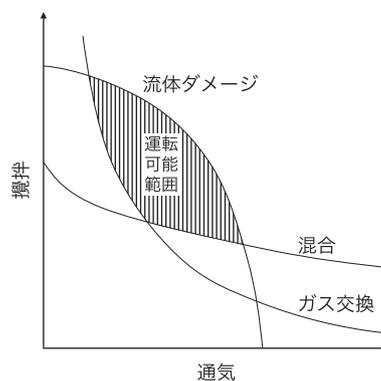


図4. 培養槽の運転可能範囲の概念

軸流タイプの、上下流を生じさせる翼の設置を行うことも提案されている。必要な k_La と混合性とのバランスに応じて、適切な構成が選択されるべきである。

一定以上の大型培養槽では、設置面積を小さくできることや、製作地からトレーラーなどで現地工場まで運搬する場合に直径を抑える必要があることから、縦長形状になることが多い。この場合、スケールアップでは、上下方向が不均一になることを考慮に入れておく。

スケールアップの指針 微生物培養のスケールアップにおいては、先に述べた微生物の酸素要求量が非常に重要である。まずは、ジャーフェーマンターによって、その培養の呼吸速度から、必要な k_La を設定する。装置設計でさらに重要なのは除熱能力である。小さい装置であれば、装置壁面に冷却水を通す、いわゆるジャケットを設置すれば足りるが、大きな装置では、壁面からだけでは冷やしきれなくなる。体積は長さの3乗で増えるのに対して、面積は2乗でしか増えないためである。

発熱量の多いプロセスでは、内部にコイル状の配管を設置するか、培養液を抜き出して外部の熱交換機で冷やすなどの対応が必要である。通常は、酸素消費量に比例して発熱量も増えるため、その意味でも、酸素消費の少ない菌株を選択することが経済性に大きく影響する。除熱も含めた培養槽の新規設計指針は、たとえば日立製作所のホームページに示されている⁹⁾。

動力基準のスケールアップ スケールアップによく使われるのは、幾何学的相似な形状としたうえで、必要な k_La を与える単位体積当たりの動力 P_v を求める方法である。たとえば、 P_v とガス空塔速度 U_g （断面積当たりの通気量）には次の関係があるとされている¹⁰⁾。前述の条件から、適切な攪拌翼形状、通気量、除熱方式を選定し、小スケールにてこれらの定数を求めたうえで、 k_La に対する、実装置での必要動力を計算する。詳細な計算例は『新生物化学工学（第3版）』¹¹⁾に詳しく説明されている。

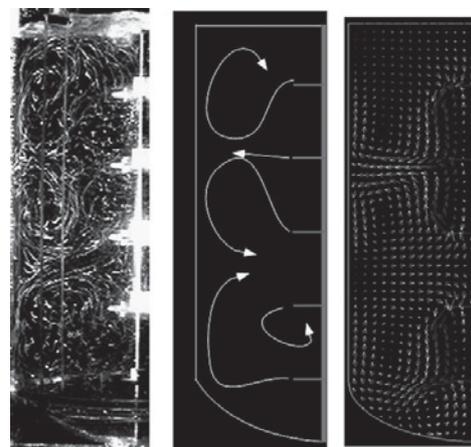


図5. 平羽根タービン翼5段設置時の流線。左：レーザーシート光による透明アクリル槽での流線の可視化。中：流れの模式図。右：CFDにより計算した結果のベクトル図。

$$k_La \propto P_v^X \cdot U_g^Y \quad (X, Y \text{は定数})$$

この際、培養槽内のガス交換や混合性、微生物に与えるダメージなどを微生物に適した範囲にする必要があるが、それらの限界を通気量と攪拌回転数に対して示したものをスケールアップウィンドウ（図4）と呼び¹²⁾、スケールが大きくなるにつれ狭くなる傾向にある¹³⁾。攪拌回転数を上げすぎると、酸素供給は良くなるがダメージが増えるなど、トレードオフがあるためである。大量生産を行うには、そのウィンドウを広げるための育種、培養方法、装置設計を総合的に考える必要がある。

シミュレーションの利用 コンピュータの能力向上により、数値流体解析（computational fluid dynamics: CFD）による攪拌槽のシミュレーションが発展し、培養槽においてもその活用が進んできている。

図5には、CFDによる計算の例を示す¹⁴⁾。この例では、翼間隔と翼径の比が1.0と小さいため、前述の通り、流れが偏る結果となり、CFDもそれをよく反映している。

k_La をCFDで正確に導くことは現状では難しいが、気泡径を仮定して、気泡分散と流動を合わせて解くことは可能である。また、剪断力について計算で求め、細胞へのダメージを予測することも行われている。

工業規模の装置になると、事前の予測も、槽内の流動状態の直接観察も難しいため、CFDは広く使われており、装置メーカーは積極的に活用している^{8,9,15)}。

培養槽のスケールアップ例 工業規模での培養槽設計やスケールアップについての発表例は多くはないが、村上らは、日立製作所で製作した培養槽480基について統計的に分析しており、標準的な仕様として、高さ/直径は1.8、伝熱面積/仕込液量は 5 m^{-1} （大容量では $1\sim 2\text{ m}^{-1}$ ）、攪拌動力は 6 kW/m^3 （大容量では 2 kW/m^3 ）、翼間距離/翼径 (S/d) は1.4などの分析結果を示している¹⁶⁾。

武部らは除草剤ピアラホスの工業生産において、生産に及ぼす溶存酸素の影響を明らかにするため、大型槽の水圧勾配環境を再現する圧力可変培養装置を用いた検討を行ったうえで、最適な溶存酸素濃度を決定し、300 kL培養槽での制御手法を提案している¹⁷⁾。

また、培養槽内上下で大きく異なる条件を再現するため、スケールダウンモデルとして、異なる環境の攪拌槽を2槽繋いで、培養液を循環させた小型装置での検討を行い、CFDとの組合せで、スケールアップの確度を上げる試みも行われている¹⁸⁾。

ものづくりと廃水処理

微生物培養によるものづくりの最終段階では、残渣の処理プロセスが必要となるため、設備上も、コスト上も、必ず考慮に入れなければならない。また、廃水処理に用いられる活性汚泥処理や、メタン発酵処理は、微生物の能力を最大限に生かしたプロセスであり、まさに培養槽の一種である。

活性汚泥処理は、廃水中に溶解した有機物を CO_2 に変換、またはリンや窒素とともに微生物菌体に固定化して取り除く技術であるが、好気プロセスであり、大量の通気が必要である¹⁹⁾。一方、メタン発酵は、嫌気条件下で廃水中の有機物をメタンガスとして回収することができる。UASB (upflow anaerobic sludge bed) 法が良く知られているが、霧島酒造では、鹿島建設の固定床式高温メタン発酵システム「メタクレス」を用いて、芋焼酎のカスをメタンガス化してエネルギー回収している²⁰⁾。この装置は高効率の固定化バイオリアクターであり、固形分が多い場合に、より性能を発揮できる。

今後の発展

最近では動物細胞培養によるバイオ医薬生産や、iPS細胞培養などのスケールアップの必要性も増している²¹⁾。これらの細胞は微生物よりも剪断に弱いため、大型翼でゆるやかに攪拌することが多く、焼結金属や膜を用いた微細気泡の供給も行われる。本稿では触れなかったが、シングルユースリアクターなどを含めた、これらの動物細胞用培養装置の工学的研究の重要性も高まっている。

これまで、微生物の培養技術は化学工学的な解析により発展してきたように見えるが、一方では、酸素のような水に溶けにくいものをわざわざ高動力をかけて溶かすプロセスが本当に適切か、という視点で考えると、まだまだ大きな技術革新の余地があるように思える。スマートセルプロジェクトにおいて、ゲノム編集技術を用いた細胞の改変が積極的に行われるようになることに呼応した、新しい培養技術開発とともに、微生物を用いたものづくりの産業がますます発展していくことが期待される。

文 献

- 1) 片倉啓雄ら：改訂増補版 実践有用微生物培養のイロハ、エヌ・ティー・エス (2018)。
- 2) Stanbury, P. F. and Whitaker, A. (石崎文彬 翻訳)：発酵工学の基礎, p. 119, 学会出版センター (1988)。
- 3) 木下祝郎：発酵工業, 大日本図書 (1970)。
- 4) 科学技術振興機構：JSTnews (2014年10月号), p. 8 <https://www.jst.go.jp/pr/jst-news/backnumber1410.html>
- 5) 佐久間英雄：生物工学, **93**, 91 (2015)。
- 6) 黒澤 尋：生物工学, **91**, 646 (2013)。
- 7) Manfredini, R. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 3115 (1983)。
- 8) 佐竹化学機械工業株式会社：http://satake.co.jp/product/catalog/data/20_bioreactor/book/html5.html#page=15 (2018/7/31)。
- 9) 株式会社日立製作所：http://www.hitachi.co.jp/products/infrastructure/product_site/ip/element_technology/culture_simulation.html (2018/7/31)。
- 10) 株式会社神鋼環境ソリューション：https://www.kobelco-eco.co.jp/product/process/mixing/mixing_003.html (2018/10/20)
- 11) 岸本通雅ら：新生物化学工学 (第3版), 三共出版 (2017)。
- 12) Fox, R. I.: *Proc. 1st Eur. Cong. Biotechnol.*, **1**, 80 (1978)。
- 13) 村上 聖, 渋谷啓介：生物工学, **89**, 295 (2011)。
- 14) 神田彰久：化学工学会誌, **81**, 381 (2017)。
- 15) 株式会社IHIプラントエンジニアリング：http://www.ipecc-ihj.jp/business/bio/process.html (2018/7/31)。
- 16) 村上 聖ら：化学工学論文集, **26**, 557 (2000)。
- 17) 武部英日ら：生物工学, **73**, 413 (1995)。
- 18) Delvigne, F. et al.: *Microb. Biotechnol.*, **10**, 1267 (2017)。
- 19) 池 道彦：生物工学, **89**, 683 (2011)。
- 20) 鹿島建設株式会社：https://www.kajima.co.jp/tech/g_warming/metakles/index.html (2018/7/31)。
- 21) 天野 研ら：日立評論, **89**, 418 (2007)。