

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	通気攪拌培養法によるバクテリアセルロースの生産に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	幸田 徹
Author(English)	
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:乙第3197号, 授与年月日:1998年6月30日, 学位の種別:論文博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:乙第3197号, Conferred date:1998/6/30, Degree Type:Thesis doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

通気攪拌培養法による
バクテリアセルロースの生産に関する研究

幸田 徹

通気攪拌培養法によるバクテリアセルロースの生産に関する研究

目次

第1章 緒論

1-1. バクテリアセルロースとは	1
1-2. バクテリアセルロースの生産方法	4
1-3. バクテリアセルロース通気攪拌培養に関する既従の研究	6
1-4. バクテリアセルロース培養液のレオロジー	8
1-5. 非ニュートン性の高粘度液の混合	10
1-6. 高粘度液での酸素移動速度係数の測定	11
1-7. 酸素分圧がバクテリアセルロースの生産性に及ぼす影響	12
1-8. 研究の目的	13
1-9. 各章の概要	13

第2章 非ニュートン性を示すバクテリアセルロース培養液の混合について

2-1. 緒言	20
2-2. 実験方法	21
2-2-1. 混合装置	21
2-2-2. 脱色法	22
2-2-3. 混合時間及び混合遅れ時間	23

2-2-4. バクテリアセルロース懸濁液の調製	24
2-2-5. レオロジーの測定	25
2-3. 実験結果	25
2-3-1. バクテリアセルロース懸濁液のレオロジー	25
2-3-2. バクテリアセルロース懸濁液の混合	26
2-3-3. 混合特性の比較	26
2-3-4. 無次元化混合時間と混合遅れ時間の関係	27
2-4. 考察	28
 第3章 攪拌羽根形状の培養への影響	
3-1. 緒言	38
3-2. 実験方法	39
3-2-1. 攪拌羽根	39
3-2-2. 混合遅れ時間の測定	40
3-2-3. 酸素移動速度係数の測定	40
3-2-4. 菌株、培地及び培養条件	41
3-2-5. 分析方法	41
3-3. 実験結果	42
3-3-1. 混合遅れ時間の測定	42
3-3-2. Static gassing out 法による酸素移動速度係数の測定	43

3-3-3. 培養によるバクテリアセルロース生産	43
3-3-4. 排ガス法による酸素移動速度係数の測定	44
3-4. 考察	44
3-4-1. 攪拌所要動力と $K_L a$ の関係	44
3-4-2. 攪拌羽根形状の影響	46
3-4-3. 酸素移動速度の生産性への影響	47
3-4-4. 酸素移動速度係数の測定方法による差異	48
 第4章 バクテリアセルロースの生産性への酸素及び二酸化炭素分圧の影響	
4-1. 緒言	59
4-2. 実験方法	60
4-2-1. 培養装置	60
4-2-2. 菌株及び培養方法	61
4-2-3. 酸素、二酸化炭素濃度の高い空気の調製	62
4-2-4. 分析方法	62
4-3. 実験結果	63
4-3-1. 気相中の酸素濃度の BC 生産速度と攪拌所要動力への影響	63
4-3-2. 酸素供給に必要な攪拌所要動力に対する酸素分圧の影響	63
4-3-3. バクテリアセルロース生産への二酸化炭素分圧の影響	64
4-4. 考察	65

第5章 二酸化炭素によるバクテリアセルロース生産阻害の解析

5-1. 緒言	72
5-2. 実験方法	73
5-2-1. ATP 測定方法	73
5-2-2. その他の実験方法	73
5-3. 結果	74
5-3-1. バクテリアセルロース生産と生産菌の生育	74
5-3-2. バクテリアセルロースの生産速度	75
5-3-3. 酸素消費速度、ATP 含量とバクテリアセルロース生産速度の関係	75
5-4. 考察	76

第6章 各章の概要と結論および今後の展望

6-1. 各章の概要と結論	84
6-2. 今後の展望	87
6-2-1. スケールアップ	87
6-2-2. バクテリアセルロース生産のモデル化	89
6-2-3. 攪拌動力の低減	90
6-2-4. 生産物の物性への影響	90

参考文献	92
本論分に関連する研究論文	101
本論分に関連する研究発表	102
謝辞	104
付録 数値計算によるバクテリアセルロース培養液の流動状態の予測と検証	

第 1 章． 緒論

1-1． バクテリアセルロースとは

地球上に最も多く存在する天然の有機化合物はセルロースである。人類が利用しているセルロースのほとんどは高等植物により生産されているが、一部の無脊椎動物（ホヤ）やバクテリアもセルロースを生産する。バクテリアにより生産されたセルロースをバクテリアセルロース（またはバイオセルロース）と呼ぶ。バクテリアセルロース（以下、BC）の一次構造は β -1,4 グルカンで植物の生産するセルロースと変わらないものの、重合度や結晶化度、繊維の太さなどの構造上の特徴を有し、これらに由来する繊維の剛直性や保水性、吸着性などの物理化学的な性質が植物のセルロースとは異なる。このため、BC は新素材としての有用性が期待され、用途や生産方法に関して研究されている (1, 2)。

BC は最近「ナタデココ」として良く知られるようになったが、「酢ゴンニャク (vinegar plant)」としても一部では古くから知られていた。ナタデココはフィリピンの伝統的なデザートであり、この 0.5-1% を占める主成分が BC である。一方、酢ゴンニャクは静置培養法による食酢製造工程に混入した雑菌により培養液の表面に形成されるゲル状の塊である。微生物が生産するある種のゲル状の塊（ペリクル）がセルロースであることは、1886 年に Dr. Brown (3) により報告されている。当時、生産菌は *Bacterium xylinum*（現在は *Acetobacter xylinum*）と分類されている。種名の *xylinum* は繊維をあらわすラテン語 *xylus* に由来していると言われている。BC は酢酸菌 *Acetobacter*

属の他に *Agrobacterium* 属、*Rhizobium* 属、*Pseudomonas* 属、*Achromobacter* 属、*Alcaligenes* 属、*Aerobacter* 属、*Azotobacter* 属、*Zoogrea* 属、*Sarcina* 属のバクテリアのなかにも生産する菌株があることが知られている(4)。

BC の生合成に関する研究は主に植物セルロースの研究者によって進められている(5)。BC は植物とは異なりリグニンやヘミセルロースを副生せずに生合成されて、植物でのセルロース生合成研究のモデルとして適しているためである。図 1-1 に BC の生合成経路(2)を示す。BC は菌体に取り込まれた糖からリン酸化を経て UDP-Glucose を前駆体としてセルロース合成酵素により生合成される。生合成経路は植物のセルロースと同様である。図 1-2 に生合成酵素の制御系の概念図(6)を示す。BC の合成酵素を活性化する c(cyclic)-di-GMP(pGpG)は Mg イオンにより活性化される Diguanylate cyclase により 2 分子の GTP から合成される。また、c-di-GMP は Ca イオンにより活性化される PDE (phosphodiesterase) により分解されて 2 分子の 5'GMP になり、c-di-GMP の減少により BC 合成酵素は不活化される。生合成酵素の働きやセルロースの結晶化の工程には不明な部分も残されているが、細胞の表面で合成されたセルロースが結晶化してミクロフィブリルを形成し、これが束になってリボンを形成していることを示す写真が報告されている(7)。また、電子顕微鏡では菌体の表面に一行にならんだおよそ 50 の合成サイトと考えられる穴が観察されており、セルロースの合成と結晶化に関係していると考えられている(8)。この穴の直径は 120-150 オングストロームで開口部は 35 オングストロ

ームであった (9) 。また、コロニー形態のことなる変異株 (10) 及び BC 非生産変異株 (11) の遺伝子を比較・解析することにより、BC の生合成に関係する遺伝子が同定されている。

BC の化学組成はコットンのセルロースと同じである。これはアシル化、アセチル化物の比較により確認され、さらに X 線回折や固体 NMR の解析により詳細な結晶及び繊維の構造が研究されている (12) 。BC の構造がコットンなどの植物セルロースと異なる特徴のひとつとして重合度が高いことがあげられる。重合度が高いため、ヤング率として表される繊維の剛直性も高く、繊維中の音速は高くなる。このため、静置培養法で生産された BC のフィルムは、音響振動板として優れた特徴を有しスピーカーのコーン紙に商品化されている (13) 。

BC は重合度や結晶化度などのミクロな構造の特徴だけではなく、繊維の幅や形状などのマクロな構造の特徴も植物セルロースと異なっている (14) 。BC 繊維の幅は約 $0.1 \mu\text{m}$ で、代表的な植物セルロースであるコットンの繊維の約 100 分の 1 の幅であり、この細い繊維が網目状の構造（ネットワーク）を形成している。このマクロな構造の特徴により、BC は特徴的な物理化学的性質を持った素材として工業的に利用されようとしている。例えば、BC は填料歩留まり向上剤として有効である (15) 。製紙工業ではパルプに炭酸カルシウムなどの填料を加えた紙を製造している。填料は紙を不透明にし、薄い紙の裏映りを防ぐ効果がある。しかも、填料を増やすことができれば使用するパルプの量を減らせ、結果的に森林の伐採を減らすことができる可能性がある。通常、填料を多く添加しただけでは填料の比率を高くすることはできないが、パルプに 1~5% 程度

の BC を添加することにより填料の歩留まりが向上し、高填料紙を製造することができる。一方、BC の懸濁液は高い粘度と吸着性を示す。このため、食品に添加する増粘剤や乳化安定剤としての効果もある (16)。乳化された水-油分散系の中で BC は油滴の表面に網目状に付着し、水と油滴との界面を安定に保持していると考えられている。その他、石炭を懸濁して輸送するとき (coal-water mixture) の流動化安定剤としての効果もある。

このように、BC は従来から工業的に用いられてきたコットンやパルプの代替としてではなく、広い工業分野での添加剤として使用されることが期待されている。しかし、広い分野で用いられるためには、大量にしかも、安価な製造コストで生産する必要がある。このため、BC の製造プロセスの構築に向けた生産方法の研究が必要である。

1-2. バクテリアセルロースの生産方法

BC は従来、静置培養法で、主にナタデココとして食用に生産されてきた。BC の静置培養法とは、静置した培養液の表面 (気液界面) での生産菌の増殖にともない生産された BC が液の表面に浮遊しゲル状のペリクルを形成する培養方法である。表面にまた、先に述べたように音響振動板に用いられることにより優れた性質を有する新素材として工業的に利用される可能性を示すことになったシート状の BC も静置培養で生産されたものである (13)。

BC 生産の培地・培養条件に関する研究も主に静置培養法で行われてきた。静置培養法において、培地中の栄養成分の BC 生産性に対する影響が検討され、6

単糖やこれに転換できる糖類が基質となりキシロースのような 5 単糖からは生成されないこと、単糖類ではフラクトース、グルコース、ガラクトースの順に高い収率を示しグリセロールからも高い収率を示すこと、2 糖類や多糖類からの生産性は低いこと、エタノールがセルロース収率を向上することなどが見いだされている。さらに、廃糖蜜を含む糖源や、硫酸アンモニウムやアミノ酸などの窒素源に関する研究では、一般の菌体外多糖では糖濃度が高く窒素濃度が制限されているときに生産が促進されるのに対し、BC の場合には促進されないことが見いだされている (17)。また、気相中の高濃度の酸素が生産性を促進するにもかかわらず、さらに酸素移動を向上させようと攪拌するとセルロースが凝集して生産性が低下すること、また非生産菌が出現すること (18)、さらに酸素がないとセルロースは生産されないことが報告されている (19)。また、気相中の高濃度の酸素が生産性を低下させるとの報告もある (20)。一方、非生産菌の出現に関しては酢酸菌の遺伝的不安定性に関係しているトランスポゾンが影響している (21) と報告されている。

このように BC 培養に関する研究は静置培養法で進められてはいるが、工業的に大量に生産するには静置培養法は不適當である。なぜなら、静置培養法で生産される BC はペリクルと呼ばれるゲル状の膜になって培養液の表面に浮遊するために生産性は培養液の表面積に依存し、しかも、ペリクルの BC 含量は 0.5~1%に過ぎないため大きな設備でも生産量が少ないからである。大量生産のために広い表面積を必要とする静置培養法の不都合を解消するために、酸素透過膜を用いてその表面にペリクルを形成させ、ペリクルの生産面積を向上させ

る方法も研究されている(22)。しかしこの方法でも、BC 生産速度が低いため生産コストを下げることは難しいと考えられる。

1-3. バクテリアセルロース通気攪拌培養に関する既従の研究

通気攪拌培養法は微生物による工業規模での物質生産に主に用いられている方法である。この方法は槽内に連続的に酸素（空気）を供給し攪拌することにより、微生物を生育させると共に目的の物質を生産させる方法であり、アミノ酸、核酸、抗生物質、酵母菌体など、発酵生産物の多くがこの方法で工業的に生産されている(23)。

通気攪拌槽による BC の初めての培養は 1960 年に Dudman により報告されている(18)。当時の生産性は低かったが、通気攪拌培養の可能性と共に BC の凝集による生産性の低下という大量培養への課題を示した。これまでに、工業化の可能性を明らかにする目的で、生産菌株の遺伝的性質の改変やプロセスの改良が検討されている。ウェアハウザー社はシータス社との協力において菌株の改良を行い、変異による改良とスクリーニングにより生産性を上げ、副生物であるグルコン酸を減少させた(4)。一方、ICI 社では基質（グルコース）濃度を低く維持するフェドバッチ培養により副生物であるグルコン酸を減少させる方法などを検討している(4)。

一方、BC の通気攪拌培養では酢酸菌の遺伝的不安定性のために非生産菌が出現することが問題であったが、自然界から通気攪拌培養に適した菌株をスクリーニングすることにより、通気攪拌培養でも安定に生産できる菌株が得られ

ている(24)。ここで得られた菌株 BPR2001 株は *A. xylinum* subsp. *sucrofermentans* (subsp. nov) と同定され(25)、その後、サルファグアニジン耐性(26)やピロロキノリンキノン(PQQ)欠損(27)などの性質が変異処理により付与され、生産性の高い菌株に改良されている。また、寒天プレート上に形成されるコロニーの形態は生産される BC や副生する水溶性の多糖に影響されると考えられ、これを指標としたスクリーニングにより BPR2001 株から変異育種された BPR3001A 株(28)は水溶性多糖の副生が少なく高い生産性を示した。また、BPR2001 株ではホストベクター系が構築され、生産性の向上を目的とした遺伝子組換えの可能性が示されている(29)。

BC の生産性を向上するためには培地条件の改良も重要である。これまでの合成培地を用いた BC 生産研究から、メチオニンと乳酸が生産性の向上に影響していることが報告されている(30)。また、培養液中に失活したセルラーゼや低濃度セルラーゼ(31)を添加することにより、またはカルボキシメチルセルロースの Na 塩溶液(CMC)などの高粘性物質を添加することにより生産性を高める方法が報告されている。これらのメカニズムについては不明であるが、培養中の BC の凝集を防ぐことにより生産菌の生育を促進し、結果的に BC の生産性を向上させている可能性がある。

通気攪拌培養では、生産性だけでなく生産された BC の重合度についても研究されている。通気攪拌培養により生産された BC の重合度は静置培養のそれよりも低く(32)、この違いに BC 生産菌が生産するセルラーゼ活性が関係していると考えられている(33)。このセルラーゼ活性は BC の生産物量を減らすほど

ではないものの部分的に分解して重合度を低下させる。これに対し、培養中の pH をセルラーゼ活性の高い 5.0 から 4.0 に変えることにより、生産性は低下するものの重合度の高い BC が生産されている (34)。

このように、BC 生産菌の開発や培地条件については多くの研究がなされているが、BC 培養の最大の特徴である培養液の高粘度に由来する種々の課題に対する研究はこれまでに発表されていない。BC 通気攪拌培養の工業化に向けては、BC 培養液のレオロジーが攪拌による混合と物質移動に、さらには BC の生産性へどのように影響しているのかを詳細に検討しなければならない。

1-4. バクテリアセルロース培養液のレオロジー

通気攪拌培養の培養液は粒状のまたは繊維状の BC を含む非ニュートン性の高粘度懸濁液になる。図 1-4 に偏光顕微鏡で観察した培養液中の BC を示す。粒の長径は 0.1~0.5mm である。菌体外多糖（プルラン、キサントガム、ポリグルタミン酸など）や糸状菌や放線菌の培養液は高粘度になり、そのレオロジーに関して多くの報告がある (35、36) が、BC の通気攪拌培養では報告されていない。

一般に菌体外多糖を含む培養液や糸状菌、放線菌の培養液は非ニュートン性の流体となり、低分子の水溶液やグリセリンのようなニュートン性の流体とは異なった流動特性を示す (37, 38)。非ニュートン流体においては剪断速度と共に粘度が変化し、剪断速度が高いと粘度は低く、剪断速度が低いと粘度は高い。非ニュートン流体は、剪断速度に対する粘度の変化から、降伏値を持ち剪断速

度に対し剪断応力が直線的に増加するビンガム塑性、剪断速度の指数乗に剪断
 応力が比例する擬塑性、降伏値を持ちながら剪断速度の増加と共に見掛け粘度
 の低下するキャッソン体に分類される。各々の流体における剪断速度と剪断応
 力の関係は以下の式で示される。

$$\tau = \tau_0 + \eta \cdot \dot{\gamma} \quad \dots \quad (\text{ビンガム塑性})$$

$$\tau = K \cdot (\dot{\gamma})^n \quad \dots \quad (\text{擬塑性})$$

$$\tau^{1/2} = \tau_0^{1/2} + K_c \cdot \dot{\gamma}^{1/2} \quad \dots \quad (\text{キャッソン体})$$

τ 、剪断応力； τ_0 、降伏値； η 、剛性率； $\dot{\gamma}$ 、剪断速度； K 、粘稠度
 (consistency index)； n 、流動指数 (non-dimensional power law
 index)； K_c 、キャッソン指数

レオロジー特性を見極めるためには回転式粘度計で広い剪断速度の範囲で
 測定すべきである。しかし、これまでの主流である一定の剪断速度に対する応
 力を測定する静的な方法では、剪断により構造が変化してレオロジーが変化す
 るような対象を測定することは困難である。BC の場合にも測定中に一定の速度
 で剪断を続けると BC 繊維の凝集が起こる。これに対し、動的な測定法では剪断
 による構造の変化を小さくして測定できる。しかし、動的な粘弾性測定法の研
 究はまだ始まった段階であり、培養液のような複雑な系、特に繊維が絡み合っ
 た BC のような培養液に適用できる理論は構築されていない。

糸状菌と放線菌の培養液のレオロジーも多くの研究者により測定されてき
 た。しかし、これまでの報告の多くは高粘度培養液のレオロジーを測定した結
 果を示しているに過ぎず(39)、また、高粘度培養液は固体と気体を含むレオロ

ジータに複雑な系であるため測定結果を解析できていない。

糸状菌の培養において高粘度の原因となる菌糸が繊維状であるところは BC 培養の場合と似ている。放線菌の培養でも同様である。また糸状菌や放線菌においては、培養や攪拌の条件によりペレット状になったり、繊維状になったりする。この現象も、BC の培養と似ている。しかし、糸状菌や放線菌の菌糸の太さが $1\sim 10\ \mu\text{m}$ であるのに対し、BC の繊維の太さは $0.1\ \mu\text{m}$ 程度と細い。このため、BC の培養液の粘度は同じ濃度の菌体を含む糸状菌や放線菌の培養液の粘度よりも高い。さらに糸状菌や放線菌の培養では攪拌による剪断力により菌糸が破損され、これが生産性に影響することが知られている。BC の場合には生産菌がグラム陰性の短桿菌であるため、剪断による菌体へのダメージは小さいと考えられるが、剪断が物質移動や生産された BC の物性にどのように作用するのかは不明である。

1-5. 非ニュートン性の高粘度液の混合

非ニュートン性の高粘度液の場合、均一に混合することは難しい。しかし、培養液の混合が不均一だと基質や酸素の供給が難しくなると同時に pH や温度の制御ができなくなる。そこで、高粘度液の混合に関しては、混合状態の評価方法や良好に混合できる攪拌羽根の改良が研究されている(40)。

混合状態の評価方法のため、混合時間(41, 42)、流動領域(cavern)の大きさ、トレーサーを用いた循環時間分布(43)などが測定されている。混合時間

とは全体が均一になるまでに要する時間と定義されているが、混合が不均一な系では測定箇所による差がでやすい。また、混合時間だけでは非ニュートン流体の混合に特徴的な部分的な混合の遅れを示すことができない。これに対し、cavern は非ニュートン挙動を示す高粘度液に特徴的な、周辺の非流動領域と明確な境界を有する流動領域であり、この領域の可視化により非ニュートン流体に特有の流動状態を観察することができる。可視化の方法としては色素を添加する方法、ヨウ素の還元を見る方法(44)、pH 指示薬の変色を見る方法がある。また、可視化には対象となる流体が無色かつ透明または半透明でない場合には槽内に多くの電極を挿入し、電導度などの変化を測定する方法もある。混合状態を向上するために攪拌羽根を改良しようとした場合には、非ニュートン流体における可視化された混合状態を定量的に比較できる指標を定めることが重要と考えられる。

攪拌羽根の改良は水溶性多糖類や糸状菌の培養で検討されている(45)。この場合、攪拌羽根の評価には混合状態だけでなく酸素供給能力も重要である。キサントガムでは混合状態と供給された空気による混合への影響を考慮して cavern の大きさと非通気時と通気時の動力比を指標に攪拌羽根を検討している(46)。BC 培養の場合にも、生産菌は好気性の酢酸菌で短時間の酸素欠乏により死滅する(47)ため、槽内全体へ均一に酸素を供給できる攪拌羽根が有効であろうと考えられる。

1-6. 高粘度液での酸素移動速度係数の測定

培養液へ酸素を供給する培養装置の能力は酸素移動速度係数(K_La)であらわされる。 K_La は static gassing out 法, dynamic gassing out 法、排ガス(gas balance)法で測定できる(48)。高粘度培養液では液中の溶存酸素濃度の変化をもとに計算される gassing out 法に比べ排ガス法が優れているとされている(49)。しかし、排ガス法では菌種、培地、培養条件や培養液の粘度により測定範囲が限定され、測定条件は培養中に変化する。Dynamic gassing out 法は培養液の K_La 測定に広く用いられているが、高粘度培養では生産物や菌体濃度の上昇に伴う粘度増加と菌体量増加に伴う酸素要求量の増加により測定できる攪拌条件の範囲は狭く、さらに培養液中の微泡の影響を受けるため測定し難い(50)。また、高粘度培養では粘度の上昇とともに酸素移動に対する抵抗が増大し、 K_La は粘度の 1/2 乗に反比例すると言われている。BC 培養液での酸素移動について検討するには、測定された K_La の妥当性を評価すると共に、酸素供給と BC 生産性との関係を明らかにする必要がある。

1-7. 酸素分圧がバクテリアセルロースの生産性に及ぼす影響

培養液中での酸素移動速度は主に K_La と酸素分圧に依存する。一般に K_La は攪拌所要動力に依存するため、酸素移動速度を高めるために K_La を大きくすると、大きな攪拌所要動力が必要になる。高粘度培養では特に大きな攪拌所要動力が必要になると考えられる。

これに対し、酸素分圧を高くすると、比較的小さな K_La の攪拌条件でも酸素移動速度を大きくすることができる。即ち、工業規模での BC 培養においても酸素分圧を高くすることにより攪拌所要動力を低減できる可能性がある。ただし、攪拌は培養液の混合にも影響するため、混合状態が良好に保たれる条件で攪拌所要動力の低減を検討すべきである。また、酸素分圧が BC の生産性に及ぼす影響を精査する必要がある。酸素分圧は気相中の酸素濃度と圧力（内圧）に依存するため、高濃度の酸素の添加及び内圧の上昇により高めることができる。しかし、内圧を上げた場合、圧力及びこれと共に高くなる二酸化炭素などの分圧の影響についても精査する必要がある。

1-8. 研究の目的

本研究は通気攪拌培養法で BC を工業規模で大量に生産するための培養工学の基礎を確立することを目的としている。BC の通気攪拌培養における培養工学においては、まず以下の課題に対する研究が必要である。

(i) BC を含む培養液がどのようなレオロジーになり、どのように混合を難しくしているのか(第 2 章)。

(ii) BC 培養液の混合及び酸素移動にはどのような攪拌方法及び攪拌条件が適しているのか、また、それはなぜか(第 3 章)。

(iii) 工業的に生産する場合、どうすれば効率的に酸素供給ができるのか、また、これにともなう問題点はどうすれば解決できるのか(第 4 章)。

(iv) 内圧にともない上昇する二酸化炭素分圧はどのように BC 生産性に影響するのか(第 5 章)。

1-9. 各章の概要

以上の課題に対応する研究の内容を 2 章から 5 章で検討した。

第 2 章では、通気攪拌培養槽内での BC の混合特性について述べる。BC の通気攪拌培養液と BC 懸濁液のレオロジーを調べるとともに、タービン羽根を備えた培養槽での混合特性を検討し、カルボキシメチルセルロース (CMC) 溶液中の混合と比較した。pH 指示薬 (フェノールフタレイン) の脱色過程を測定できる画像解析装置を用い、BC 懸濁液と CMC 溶液中での脱色過程から混合時間と混合遅れ時間を求め、BC 懸濁液のレオロジーが混合に与える影響について検討した。

第 3 章では、BC の培養における攪拌羽根形状の生産性への影響について述べる。1% BC 懸濁液を模擬液とし、種々の攪拌羽根を備えた通気攪拌培養槽における混合遅れ時間と $K_L a$ を測定すると共に、培養での BC 生産性を評価した。培養の結果から、BC 生産に適した攪拌羽根の形状を選定するとともに BC 生産性と酸素移動速度との関係を検討した。

第 4 章では、バクテリアセルロースの通気攪拌培養における酸素と二酸化炭素分圧の影響について述べる。BC の生産性を向上するには高い酸素供給能力が必要であり、これには高い攪拌所要動力を必要とする。気相中の酸素分圧を高くすると小さな攪拌所要動力でも高い酸素移動速度が得られ、結果的に高い生産性が得られると考え、高濃度酸素の添加と内圧を高くすることによる攪拌

所要動力と BC 生産速度への影響を調べ、この影響を解析した。

第 5 章では、二酸化炭素により BC の生産が抑制される原因を解析した結果を述べる。内圧の上昇に伴う生産性低下の原因と考えられた二酸化炭素の分圧による阻害的作用を調べるため、50 l ジャーで 10% (v/v) の二酸化炭素を含む空気を通気して培養した。BC の生産性と酸素消費速度及び ATP 含量との関係を調べ、二酸化炭素が BC 生産性の低下にどのように影響しているのかを考察した。

第 6 章では、結論を述べると各章の結果をまとめ、残された課題について考察した。

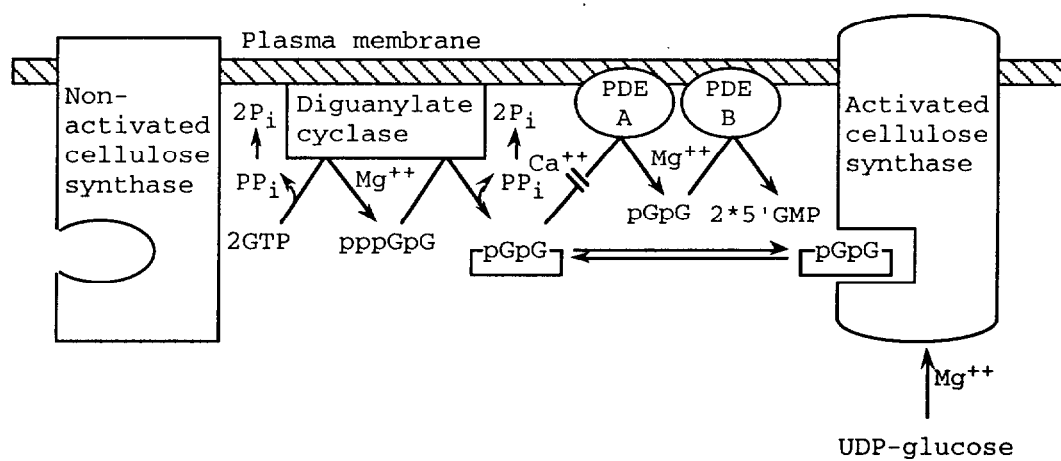


図 1-2 セルロース合成の制御システム

PDE:phosphodiesterase
 pppGpG:5'triphosphate dimer
 pGpG:3',5'-cyclic diguanylic acid

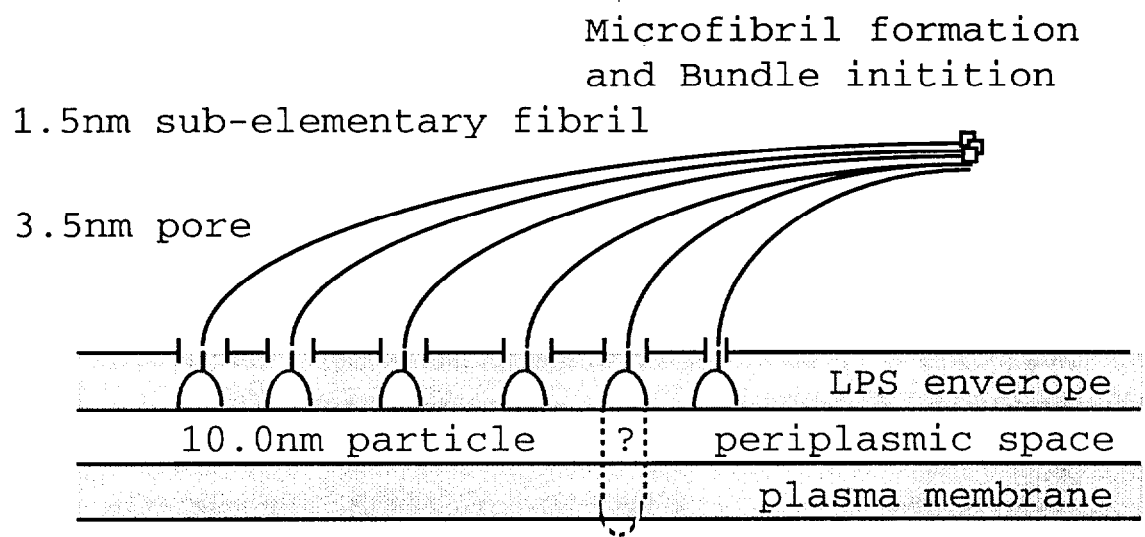


図 1-3 セルロース合成の排出システム



図 1-4 通気攪拌培養で生産されたバクテリアセルロースの光学顕微鏡写真

第2章 非ニュートン性を示すバクテリアセルロース培養液の混合について

2-1. 緒言

本章では BC を通気攪拌培養法で生産するために実用上重要な、BC の混合特性について述べる。BC が通気攪拌培養で生産される場合、BC の蓄積の増加と共に粘度が上昇し、培養液の均一性が低下し、さらに溶存酸素濃度が低下して生産性を抑制すると考えられる。このため、BC 培養における生産性を向上するためには、混合の状態を把握しなければならない。しかも、BC 培養液は高粘度であるため、混合を検討する場合の実験条件は、通気条件や培養液のレオロジーなど、実際の培養条件に近似したものでなければならない。これまでに、高粘度流体の混合に関して多くの研究がなされている (41, 42) が、非ニュートン性の培養液の通気攪拌状態における混合に関する研究 (40) は少なく、BC 培養液の混合に関するデータは発表されていない。

本章の目的は、BC 懸濁液と CMC 溶液の混合特性を比較することにより、培養液の非ニュートン性に由来し BC 培養の生産性に影響すると考えられる、培養液の混合における不均一性を特徴づけることにある。非ニュートン流体の混合特性を調べるためには混合状態を観察できる脱色法が優れている (44)。一般にはヨウ素の還元による脱色が用いられるが、ヨウ素は CMC など流体のレオロジーを変えることがある。そこで、pH 指示薬を用い pH 変化による脱色を観察し、同時に画像処理装置を用いて定量する方法を用いた。

BC 懸濁液の混合実験では、混合され難い部分があることが見いだされている。一般に混合の評価には混合時間を測定するが、非ニュートン流体の混合評価には部分的な混合の差を測定することが重要であると考えられる。そこで我々は槽内の複数箇所で混合の過程を測定し、各部分で混合される時間の差を混合遅れ時間として提案し、これを用いて混合特性を特徴づけた。混合遅れ時間が大きくなることは、混合の均一性が低下することを表している。混合時間と混合遅れ時間により BC 懸濁液と CMC 溶液の混合特性を比較し、この違いをレオロジーと関連づけて考察した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 混合装置

混合の研究に用いた装置の概略を図 2-1 に示す。実験装置は攪拌槽と画像解析装置からなる。実容量 1.8 l、直径 130mm の攪拌槽は 2 段のラシュトン型タービン羽根（上段は 4 枚羽根、下段は 6 枚羽根）と槽径の 1/10 幅の 3 枚のバッフルとリングスパージャーを備え、温度計と pH 電極が付けられている。全てのテストにおいて、槽内の流体の温度はジャケット内に温調水を循環することにより 30℃に維持した。通気速度は 0.5 vvm である。攪拌羽根は速度可変式 DC モーターで回転され、回転数はタコメーター式指示計で測定された。攪拌所要動力はインライントルクメーター（小野測器 TS-200）を用いて測定した。全ての動力測定値はベアリングで発生するトルクを考慮し、攪拌羽根で消費さ

れる正味の動力に補正した値である。実験した攪拌回転数の範囲は 500～1100 rpm である。

2-2-2. 脱色法

実験に用いた模擬液は 1% (w/w) BC 懸濁液と 2% (w/w) CMC 溶液である。0.001% (w/w) のフェノールフタレインを含み 4 N NaOH で pH 10 に調整された各々の模擬液は紫色を呈するが、これを設定した回転数で攪拌しながら 4 N H_2SO_4 を添加すると NaOH が H_2SO_4 で中和され紫色は脱色される。添加位置は液面での流速が大きい軸近傍が良いと考えられたが、軸や槽壁へ酸が付着するのを避けるため、軸と壁の中間に添加した。脱色の経時変化は CCD ビデオカメラで記録し、液部分で異なった 6 点の明るさを 0.5 秒毎に画像処理装置（ハマホト Argus-50）を用いて測定した。測定位置を図 2-1 に示す。測定位置は軸方向と周方向での流動の違いを検出するため、隣り合った 2 点を液面から 40, 80, 120mm の深さに設定した。各々の測定箇所の pH 10 (紫色) の色度の測定値を 0 に、pH 6 (無色) の測定値を 1.0 になるように標準化された測定値を脱色率 (Dc) とした。Dc は式 (2-1) で定義した。

$$Dc = (V - V_{10}) / (V_6 - V_{10}) \quad (2-1)$$

V はその時点の測定値、 V_{10} は pH 10 での測定値、 V_6 は pH 6 での測定値である。pH 10 (紫色) の Dc は 0、pH 6 (無色) の Dc は 1.0 になる。測定終了後の模擬液は、液のレオロジーが変化しないかぎり、再度 pH を調整した後に次の測定に繰り返し用いた。

混合時間が中和に用いられる酸や塩基の投入量と反応モル比によって変わることが知られている(51, 52)ため、硫酸の添加量と D_c の関係を調べた。 D_c は pH 10 に調製した BC 懸濁液に硫酸を加えて、混合が十分行われるよう攪拌回転数 800 rpm で 2 分間攪拌し、pH の変化がなくなってから測定した。図 2-2 に pH と D_c の関係を示す。NaOH と H_2SO_4 のモル比が 2:1 の時に模擬液は中和され脱色されるが、実験の再現性のために、脱色されるのに必要な量の 1.5 倍量の硫酸を添加することにより中和点付近における D_c の変動を抑制した。添加硫酸量と pH 及び D_c の関係は直線的ではなかったが、均一に混合されたかどうかの判定には十分であると考え、 D_c を混合の指標とした。

2-2-3. 混合時間及び混合遅れ時間

図 2-3 は脱色の経時変化の概念図である。混合時間と混合遅れ時間を図中に示した。混合時間は混合を開始し 4 N H_2SO_4 を注入してから最後に脱色された部分の D_c が 0.90 に達するまでの時間とした。無次元化混合時間 (Nt_m) は式(2-2)で定義した(41)。

$$Nt_m = N * t_m \quad (2-2)$$

N は攪拌回転数、 t_m は混合時間である。

槽内の混合しやすい箇所と混合しにくい箇所での混合の違いを表すため、図 2-3 に示すように最初に脱色された部分の D_c が 0.5 に達してから、最後に脱色された部分の D_c が 0.5 に達するまでの時間を混合遅れ時間 (t_{md}) とし、式(2-3)で定義した。

$$t_{md} = T_f - T_i \quad (2-3)$$

T_i は硫酸を添加してからいずれかの部分の D_c が 0.5 に達するまでの時間、
 T_f は全ての部分の D_c が 0.5 に達するまでの時間である。

2-2-4. バクテリアセルロース懸濁液の調製

BC 懸濁液は *A. xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR2001 株 (25) を 72 時間、30 ℓ ジャーファーマンターで培養した培養液から調製した。培養には CSL-Fru (29) 培地を用いた。CSL-Fru 培地は 1 ℓ 中に以下の成分を含む。
 フラクトース 40 g, CSL (corn steep liquor, 日本澱粉工業株式会社) 20 ml, KH_2PO_4 1.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g, $(NH_4)_2SO_4$ 3.3 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 3.6 mg, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.5 mg, $Na_2MoO_2 \cdot 2H_2O$ 2.4 mg, $ZnSO_2 \cdot 7H_2O$ 1.7 mg, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 1.4 mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.05 mg, inositol 2.0 mg, nicotinic acid 0.4 mg, pyridoxine $\cdot HCl$ 0.4 mg, thiamine $\cdot HCl$ 0.4 mg, pantothenic acid Ca salt 0.2 mg, riboflavin 0.2 mg, p-amino-benzoic acid 0.2 mg, folic acid 0.002 mg, biotin 0.002mg, 及び消泡剤 (KM-72, 信越ポリマー株式会社) 0.5ml。培養中の pH は 5.0 に、温度は 30℃に維持した。培養液から遠心分離により沈殿としてえられた粗 BC から水と 0.1 N NaOH で洗浄して残留培地成分と菌体を除去したものを BC 懸濁液として用いた。BC の濃度は 80℃で減圧乾燥した精製 BC の重量から求めた。

2-2-5. レオロジーの測定

粘度特性は定常流 (Static shear rate sweep 法) で 30 °C において直径 50mm の平行円板を備える粘弾性測定装置 (RFS-II, Rheometrics Co., Ltd.) を用いて測定した。測定結果は式 (2-4) に示す指数モデルに適用させた。

$$\eta = K \cdot \dot{\gamma}^{(n-1)} \quad (2-4)$$

η は見かけ粘度、 $\dot{\gamma}$ は剪断速度、 K は粘稠度、 n は流動指数である (39)。 n は測定値を指数モデルに当てはめたときに K の標準偏差が最小になるように計算した。

2-3. 実験結果

2-3-1. バクテリアセルロース懸濁液のレオロジー

BC 通気攪拌培養での混合特性を評価するために用いた BC 懸濁液と培養液のレオロジーを比較した。図 2-4 は BC 培養液、BC 懸濁液及び CMC 溶液での剪断速度に対する見かけ粘度の変化を示す。いずれも非ニュートン流体であり、指数モデルで近似した。いずれの液でも pH 6 から 10 の範囲で pH を変えてもレオロジーは変わらなかった。1%BC 懸濁液のレオロジーは同じ濃度の BC を含む培養液と同じレオロジーを示した。この結果から BC 懸濁液のレオロジーは BC 培養液に正確に似ており、また、培養液中に含まれている BC 以外の菌体や培地成分、水溶性の多糖類はレオロジーに影響していないことが示された。

式から求めた BC 懸濁液の n は $0.13 \sim 0.14$ で CMC 溶液の n 0.82 に比べて小さく、BC 懸濁液は CMC 溶液に比べて剪断速度低下に対する見かけ粘度の増加が大きいことを示している。

2-3-2. バクテリアセルロース懸濁液の混合

混合実験での D_c の測定例を図 2-5 に示す。1%BC 懸濁液において攪拌回転数 1000 rpm で測定した各々の位置の D_c を測定時間に対してプロットしてある。脱色は図 2-1 に示す槽の中ほどの測定箇所 3 と 4 で進行が速く、ついで測定箇所 1 と 2 で進行し、槽の底に当たる測定箇所 5 と 6 では進行が遅かった。この場合、 T_f は測定箇所 6 で T_i は測定箇所 4 で計測した。測定箇所 3 と 4 の D_c は最初急激に 0.75 まで増加し、その後緩やかに増加した。これに対し、測定箇所 5 と 6 の D_c は最初徐々に 0.25 まで増加し、それから急激に増加した。この結果は、液面に注入された酸が最初、槽の中ほどで混合され、次に槽の上部で混合され、最後に槽の底部で混合されたことを示している。また、横に並んだ 2 点の測定点で D_c の変化に差が小さかったことから周方向の流速は軸方向の流速よりも大きいことが示された。

2-3-3. 混合特性の比較

BC 懸濁液の混合特性を明らかにするため、 Nt_m と t_{md} を測定し、CMC 溶液と比較した。図 2-6 に BC 懸濁液と CMC 溶液での混合実験の結果から測定された各々の Nt_m を N に対してプロットしたものを示す。CMC 溶液の Nt_m は測定範囲

内で一定であった。これに対し、BC 懸濁液の Nt_m は 900 rpm 以上の高撹拌条件では CMC 溶液の値より小さく一定であったが、900 rpm 以下の低撹拌条件では N の減少と共に増加した。一般に層流で均一に混合されている条件では Nt_m は N が変化しても一定であるといわれている (41)。すなわち、 Nt_m が一定なら槽内の混合は均一になり、 Nt_m が一定でない条件では槽内の混合は不均一であると示唆される。BC 懸濁液で 900 rpm 以下の低撹拌条件では、 Nt_m が撹拌回転数の低下と共に増加することから、槽内の混合は不均一である。

図 2-7 に各々の模擬液での t_{md} を N に対してプロットしたものを示す。CMC 溶液での t_{md} は測定範囲において一定であった。BC 懸濁液の t_{md} は 900rpm 未満の撹拌条件では N の増加と共に減少し、900 rpm 以上の高撹拌条件で最小値となった。BC 懸濁液の t_{md} は 900 rpm 以上では CMC 溶液と同等であり、この撹拌条件では槽内の混合の程度に部分的な差は小さい。900 rpm 未満で N の低下と共に t_{md} が増加したことは N の低下と共に槽内の混合の部分的な差が大きくなることを示している。

2-3-4. 無次元化混合時間と混合遅れ時間の関係

図 2-6、2-7 に示したように、900 rpm 未満において BC 懸濁液の Nt_m と t_{md} が N の低下とともに増加したことから、 Nt_m と t_{md} の間になんらかの関係がある可能性が示唆された。図 2-8 に BC 懸濁液と CMC 溶液での t_{md} に対する Nt_m を示す。CMC 溶液では撹拌回転数が変化しても Nt_m も t_{md} も変化しなかったためプロットはほぼ 1 点に集中したが、BC 懸濁液では Nt_m と t_{md} は撹拌回転数とともに

変化し、これらの間には正の相関関係が認められた。この結果は、BC 懸濁液では Nt_m が t_{md} に依存することを示している。

BC 懸濁液の混合特性を Nt_m と t_{md} を CMC での値と比較することにより特徴付けた。図 2-8 に示すように BC 懸濁液で CMC 溶液と同等の Nt_m (約 450) が得られる各々の攪拌回転数でも、 t_{md} は CMC 溶液より大きい。この結果は、同等の混合時間が得られる攪拌回転数においても BC 懸濁液では CMC 溶液より部分的な混合の差が大きいことを示している。一方、BC 懸濁液の t_{md} が CMC と同等 (約 30) の値となる攪拌回転数において、 Nt_m は CMC での値より大きかった。この結果は、同等の t_{md} が得られる各々の攪拌回転数においては、BC 懸濁液では CMC 溶液よりも混合時間が短いことを示している。

2-4. 考察

BC 懸濁液の Nt_m が t_{md} に依存し低攪拌数で大きくなることは、図 2-4 に示した BC 懸濁液と CMC 溶液でのレオロジーの違いに関係していると考えられる。BC 懸濁液における n は CMC 溶液に比べて小さいことから、BC 懸濁液では CMC 溶液よりも剪断速度の増加に対する見かけ粘度の低下が大きい。このため、低攪拌条件では BC 懸濁液の粘度は高いものの、高攪拌条件における BC 懸濁液の粘度は CMC 溶液よりも低くなりうる。図 2-6 に示したように 900rpm 以上で BC 懸濁液の Nt_m が CMC 溶液での値よりも小さくなったのは、高剪断条件で BC 懸濁液の粘度が低下したためであると考えられる。BC 培養液では剪断速度の低下により粘度が増加するから、攪拌羽根から離れた部分で粘度は高くなる。低攪拌

条件で BC の混合が不均一になる原因は攪拌羽根から離れた粘度が高いところで混合が遅延するためと考えられる。

BC 懸濁液での攪拌条件と混合状態との関係を CMC 溶液の場合と比較した場合、CMC 溶液では測定範囲内で均一な混合が得られたが、BC 培養液を均一に混合するには高い攪拌回転数が必要であった。しかしながら、均一な混合のために攪拌羽根の回転数を高くすると攪拌所要動力が大きくなると予想される。通気攪拌培養のスケールアップに適した攪拌条件を検討するためには、非ニュートン流体の混合に特徴的な t_{md} を測定し、小さな攪拌所要動力でも t_{md} が小さい攪拌羽根を選定しなければならない。第 3 章で t_{md} を指標にした攪拌羽根の評価について述べる。

また、非ニュートン性の高粘度液においては、スケールアップにより混合特性が大きく変化する可能性がある。本章で測定した混合遅れ時間は部分的な混合の遅れにより混合の不均一性をあらわすものであるが、スケールアップではさらに詳細な流動状態を把握することが重要と考えられる。しかしながら、大型の培養槽における細部の流動を実際に測定することは難しい。これに対し、コンピュータを用いた数値計算により細部の流動状態を予測できる可能性がある。ただし、BC 培養液のような非ニュートン性の高粘度液で通気状態でも予測できるかどうか、また予測された状態が実際の流動をあらわしているのか、確認する必要がある。数値計算による流動状態の予測と検証について検討した結果を付録に添付した。

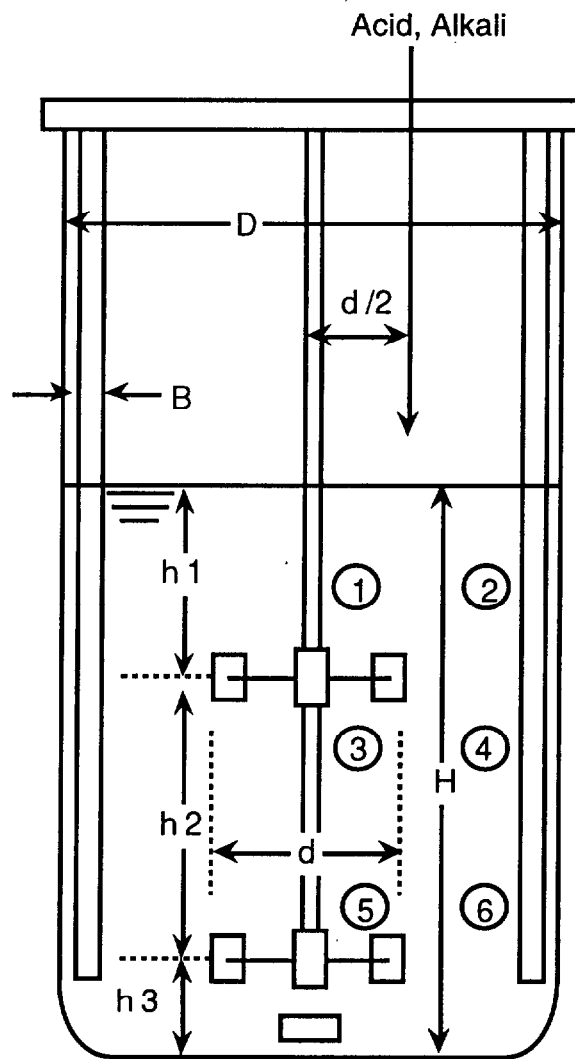


図 2-1 混合実験に用いた装置の概略図

図中の数字の入った○は D_c の測定点を示す。

バッフル ($B/D = 0.1$), Rushton-タイプタービン羽根 ($d/D = 0.33$, 4-bladed and 6-bladed), リング・スパージャー (8 holes), $D = 130$ mm, $H = 145$ mm, $H/D = 1.1$ (2 l), $h_1 / H = 0.35$, $h_2 / H = 0.55$, $h_3 / H = 0.1$, 通気量: 0.5 vvm.

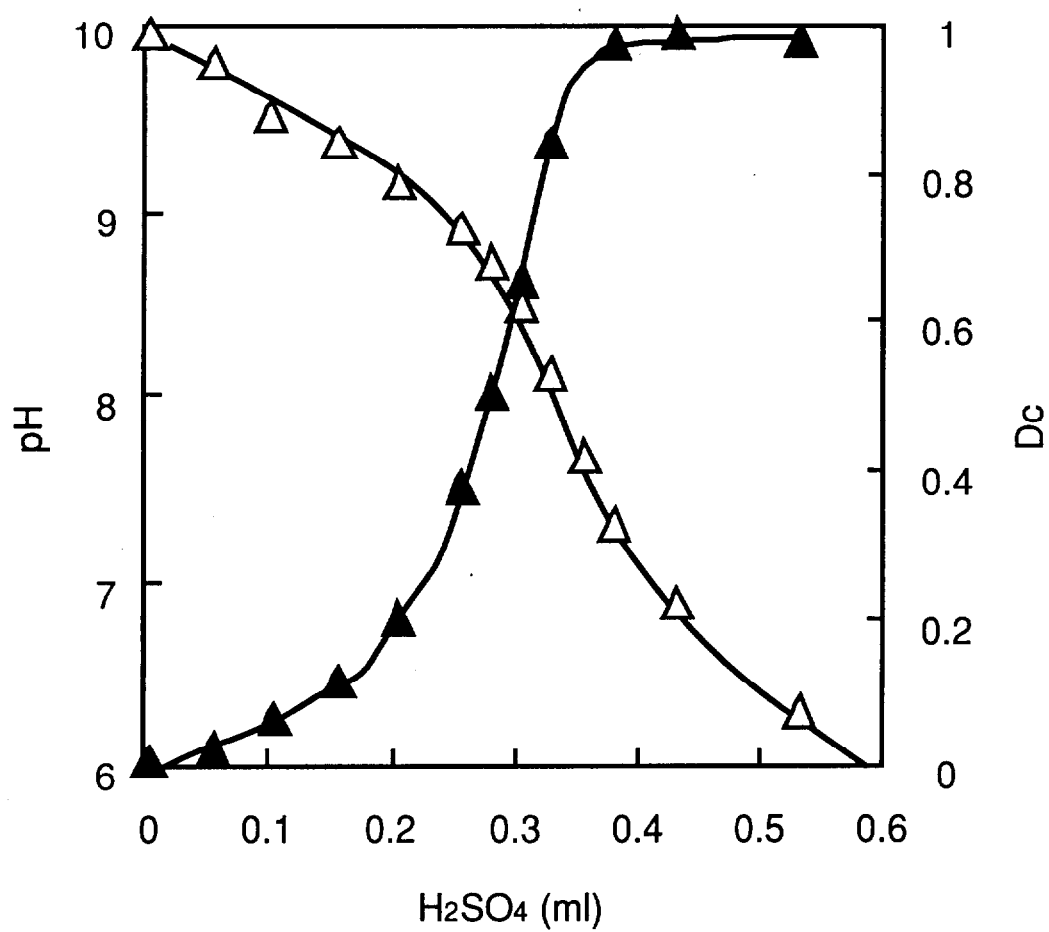


図 2-2 4 N H₂SO₄ の添加量に対する脱色率 (Dc) と pH の変化

記号: ▲, Dc; △, pH.

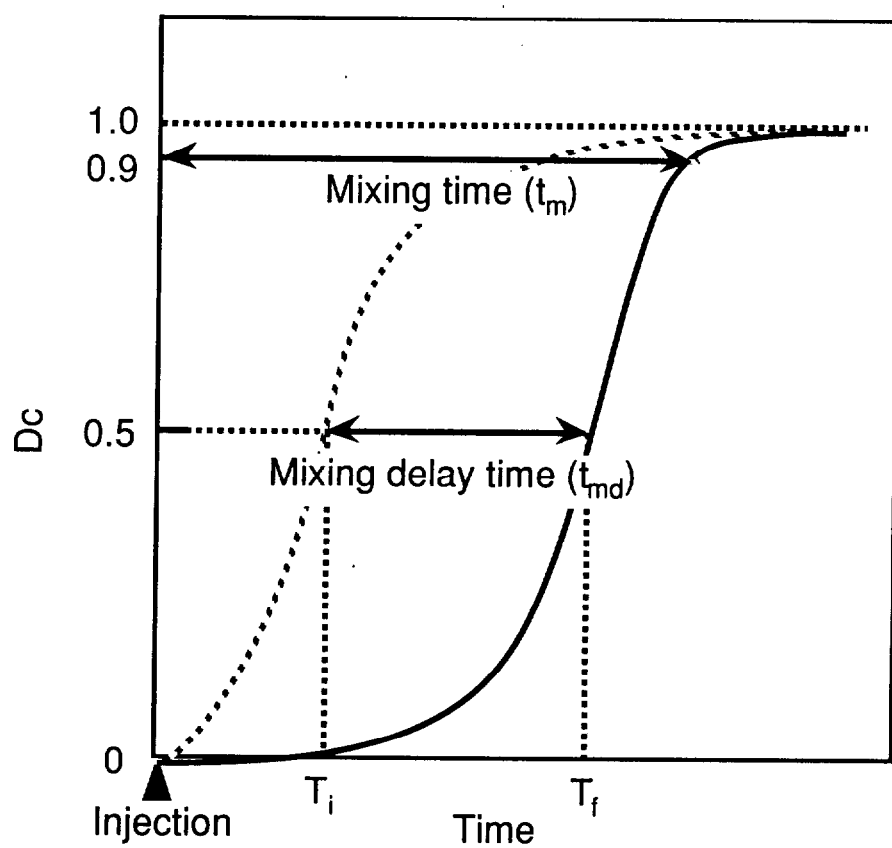


図 2-3 脱色率 (D_c) の経時変化と混合時間及び混合遅れ時間の測定方法 .

点線：最初に脱色された部分での D_c ； 実線：最後に脱色された部分での D_c

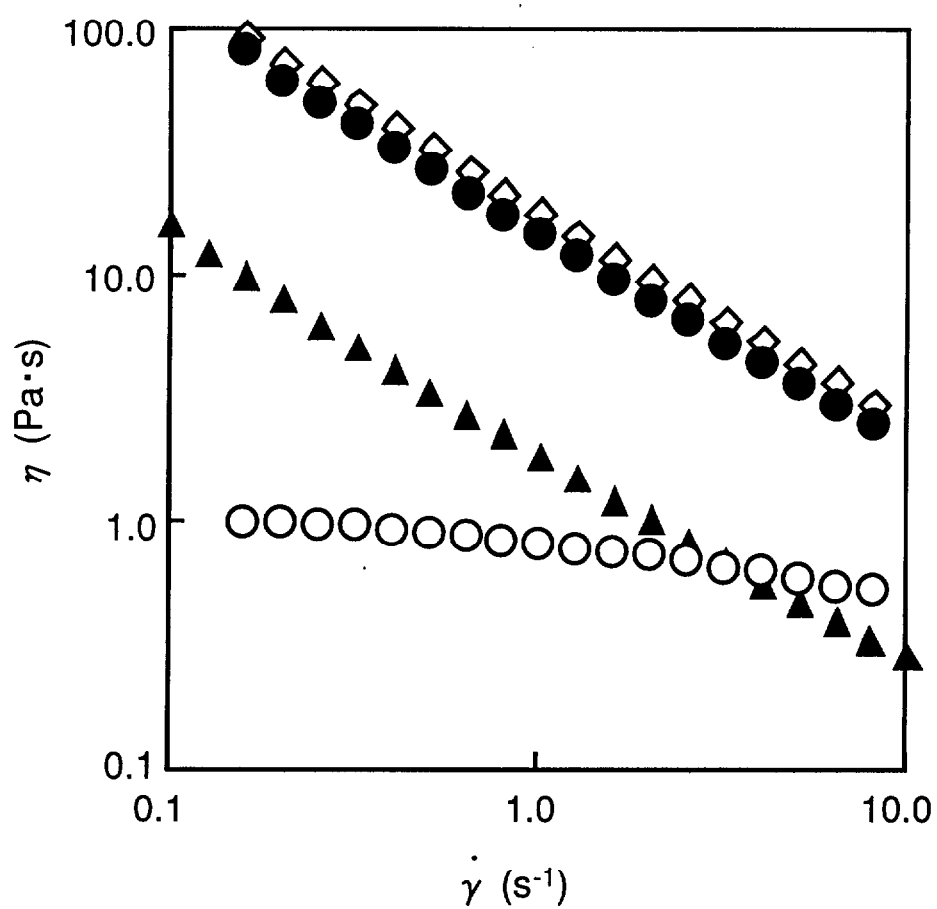


図 2-4 剪断速度に対する見かけ粘度

記号: ◇, 1% (w/w) BC 培養液 ($n = 0.14$, $K = 9.89$); ●, 1% (w/w) BC 懸濁液 ($n = 0.14$, $K = 9.92$); ▲, 0.5 % (w/w) BC 懸濁液 ($n = 0.13$, $K = 1.94$); ○, 2% (w/w) CMC 溶液 ($n = 0.82$, $K = 0.74$).

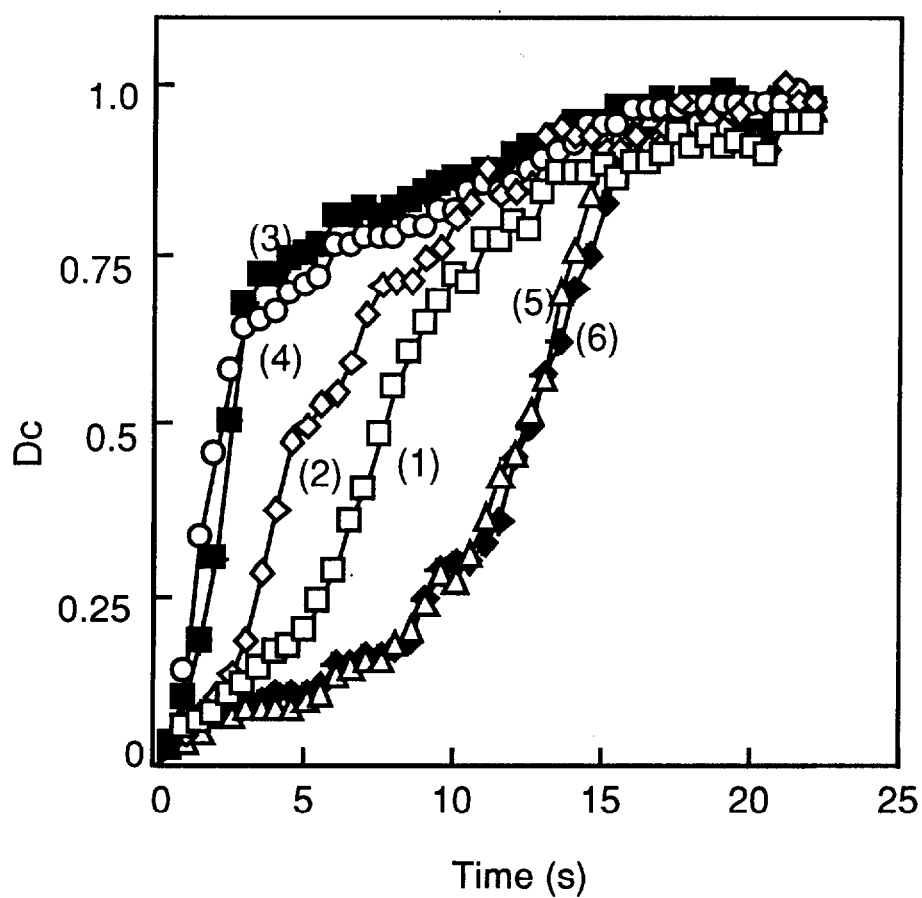


図 2-5 混合実験での脱色率 (Dc) の経時変化

1% BC (w/w) 懸濁液、攪拌回転数 900 rpm、通気量 0.5 vvm

記号: □, point 1; ◇, point 2; ○, point 3; ■, point 4;

△, point 5; ◆, point 6. 各々の番号は図 2-1 の○数字に相当する。

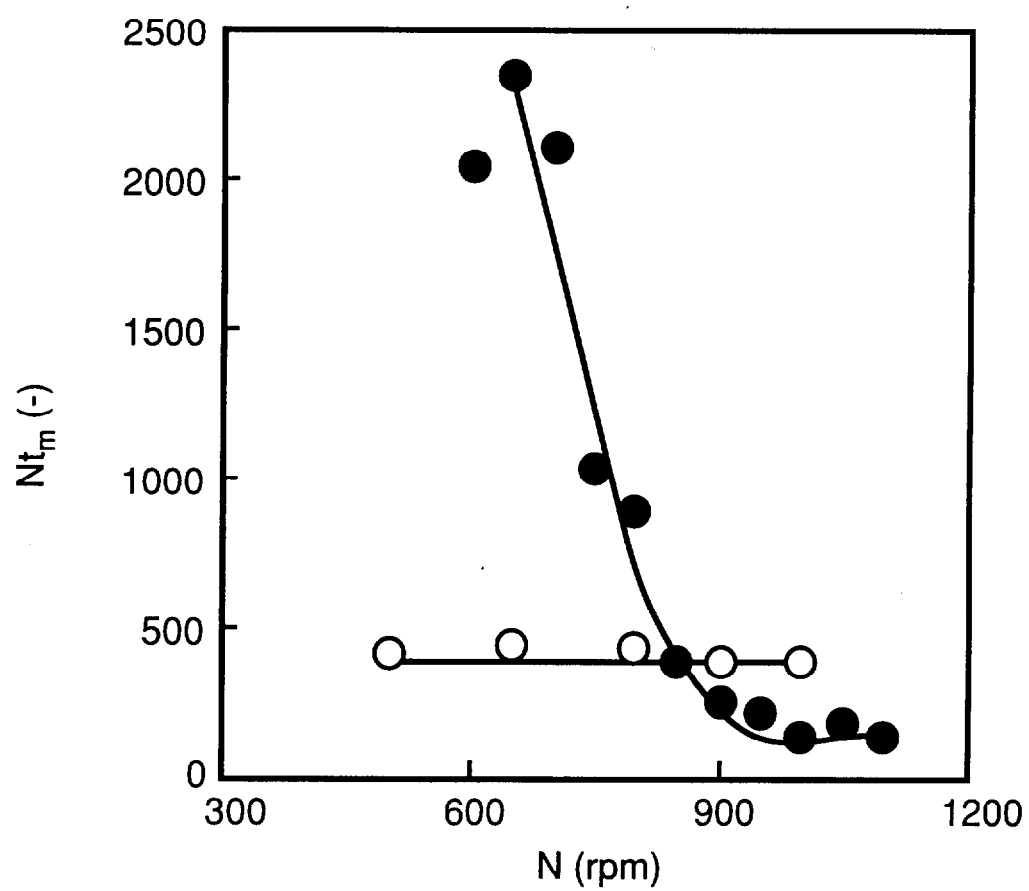


図 2-6 攪拌回転数に対する無次元化混合時間 (Nt_m)

記号: ●, 1% (w/w) BC 懸濁液; ○, 2% (w/w) CMC 溶液

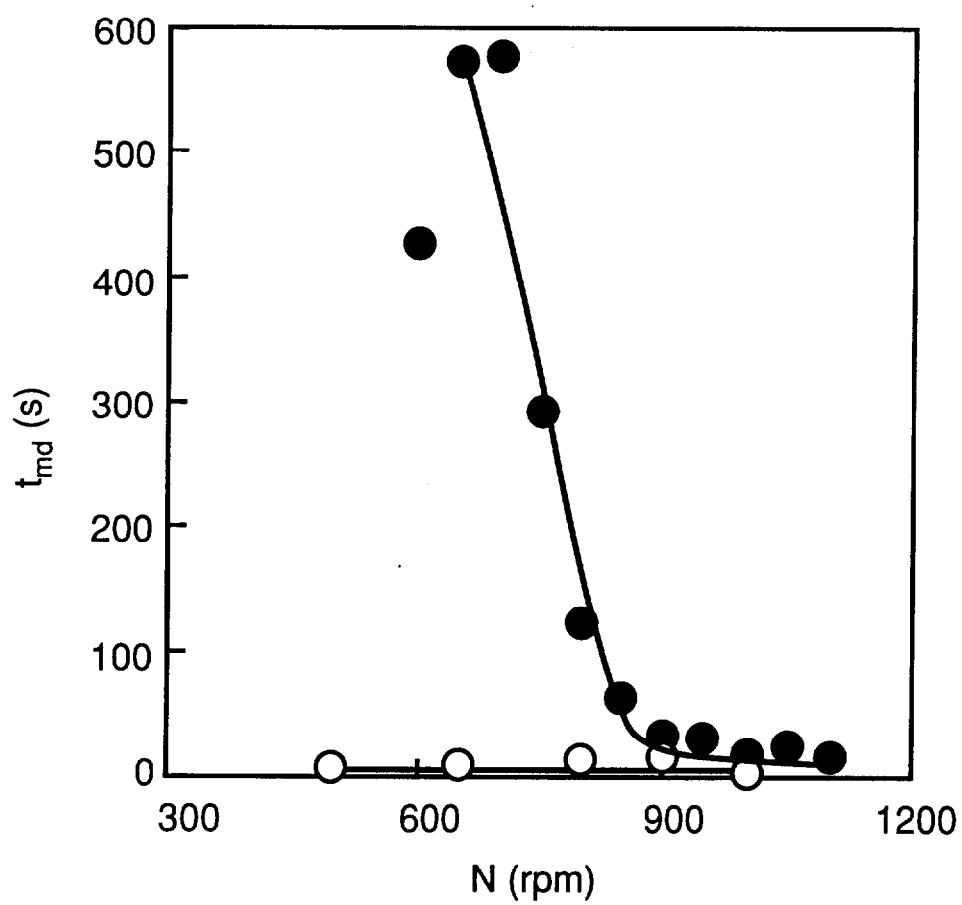


図 2-7 攪拌回転数に対する混合遅れ時間 (t_{md})

記号: ●, 1% (w/w) BC 懸濁液; ○, 2% (w/w) CMC 溶液.

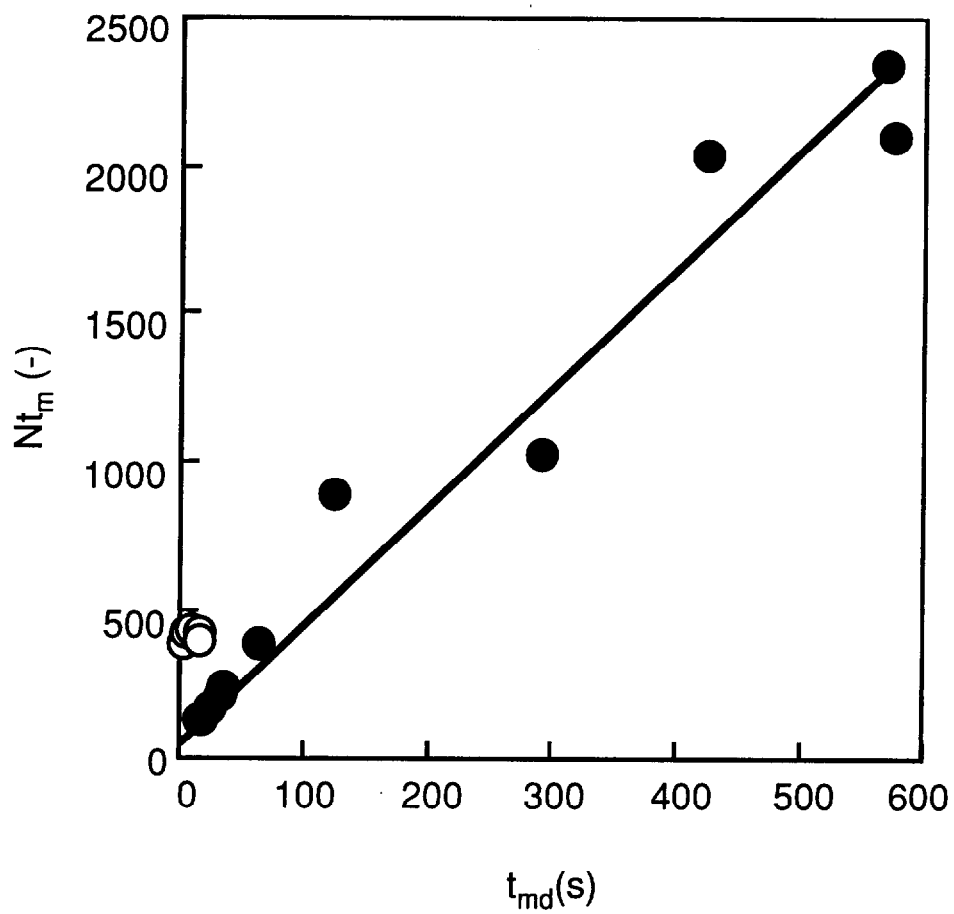


図 2-8 混合遅れ時間 (t_{md}) に対する混合時間 (Nt_m)

記号: ●, 1% (w/w) BC 懸濁液; ○, 2% (w/w) CMC 溶液

第3章 バクテリアセルロースの生産性への攪拌羽根形状の影響

3-1. 緒言

本章では、高い生産性を達成できるような攪拌羽根形状について検討した結果を述べる。BC の培養液は第2章で示したように非ニュートン性の高粘度液となるため、一般的なタービン羽根を用いて BC 生産菌を培養した場合、BC 濃度が増加すると流動しにくい部分が生じる。流動しにくい部分では pH や溶存酸素濃度が制御できず、高い生産性を得ることはできない。したがって、高粘度培養で生産性を向上させるには、全体が良好に混合できるような攪拌条件の改良が必要である。羽根形状の改良によりキサントガムの生産性が向上した例も報告されている(40)ので、BC の培養においても攪拌羽根形状を改良することにより BC の生産性を高くできると考えた。

通気攪拌培養による BC の生産に適した攪拌羽根の形状は、混合と酸素供給能力という2つの性能を満たさなければならない。

混合の評価には種々の方法があるが、第2章で述べた非ニュートン流体の混合における不均一性の指標である混合遅れ時間(t_{md})を採用し、低い攪拌所要動力で良好に混合できる攪拌羽根形状を検討した。

装置の酸素供給能力は K_La (48)で評価した。 K_La は static gassing out 法, dynamic gassing out 法、排ガス法(gas balance method)で測定できる。本章では培養条件に影響されず、広い攪拌回転数範囲で測定できる static gassing out 法を採用し、培養液とレオリジーが近似している BC 懸

濁液で測定した。また、種々の攪拌羽根で攪拌所要動力と K_La の関係を調べ、特性の違いを比較した。ただし、培養液と似たレオロジーの BC 懸濁液で K_La を測定すると、微泡などの影響を受けて正しく測定できない可能性がある。このため、Static gassing out 法により測定した K_La を、培養時に排ガス法で測定した K_La と比較して測定方法による差の有無及びその原因を考察した。本章では Static gassing out 法により測定した K_La を $K_{La_{st}}$ と、培養中に排ガス法で測定した K_La を $K_{La_{gb}}$ と表記する。

3-2. 実験方法

3-2-1. 攪拌羽根

槽、液量、通気量は第 2 章と同じである。図 3-1 に実験に用いた攪拌羽根を示す。また、攪拌羽根とスパージャーのサイズ及び位置を表 3-1 に示す。槽には温度センサーと pH センサーを取付け、温度は循環水で 30℃に維持した。攪拌羽根は速度可変の DC モーターで駆動し、攪拌回転数はタコメーターで測定した。攪拌所要動力の測定にはインライン・トルクメータを用いた。トルクは軸のフリクションを差し引いた実トルクである。攪拌所要動力は式 (3-1) に従い求めた。

$$P_v = 2 \pi N T / V_L \quad (3-1)$$

P_v は攪拌所要動力 ($w \cdot l^{-1}$)、 N は攪拌回転数 (rpm)、 T はトルク ($w \cdot \text{min}^{-1}$)、 V_L は液量 (l) である。

3-2-2. 混合遅れ時間の測定

混合遅れ時間は第 2 章の実験で用いた培養槽に図 3-1 に示す攪拌羽根を取付けて測定した。ただし、Maxblend には同じ容量の専用の槽を用いた。いずれの攪拌羽根でも脱色率 (Dc) は図 2-1 に示した 6 点で測定し、式 (2-1) に従い計算した。各々の測定箇所の液深は培養液の静止水面からの液深 145mm に対し 40, 80, 120mm である。各々の箇所で測定した Dc から式 (2-3) に従い τ_{md} を計算した。

3-2-3. 酸素移動速度係数の測定

Static gassing out 法での $K_L a$ ($K_L a_{st}$) の測定には 1%BC 懸濁液を用い、窒素で脱酸素した後に空気で 0.5vvm で通気して測定した。1%BC 懸濁液は第 2 章で述べた方法で調製した。槽内の液深の異なる 3 箇所に設置した溶存酸素電極 (ガルバニ式、Able 社製 AN 型) を溶存酸素の計測に用いた。各々の電極の液深は培養液の液深 145mm に対し 40, 80, 120mm である。このセンサーの 100% 応答速度は 20 秒以下である。 $K_L a_{st}$ は式 (3-3) で計算した。

$$dC_L/dt = K_L a_{st} (C^* - C_L) \quad (3-2)$$

C^* は気相中の酸素濃度と平衡状態にある飽和溶存酸素濃度、 C_L は 3 点で計測した溶存酸素濃度の平均値である。

培養実験中には $K_L a$ は排ガス法で測定し、 $K_L a_{gb}$ と表記した。排ガス法では、酸素・二酸化炭素分析計 (Able 社製) を用い、排気中の酸素濃度を測定した。

植菌前の排気中の酸素濃度を給気中の酸素濃度と見做して式(3-4,3-5)で計算した。

$$K_L a_{gb} = OTR / (C^* - C_L) \quad (3-3)$$

$$OTR = k (Q_i P_i Y_i / t_i - Q_o P_o Y_o / t_o), \quad (3-4)$$

ただし、OTR は酸素移動速度、 k は定数 (7.32×10^2 , $(60 \text{ min} \cdot \text{h}^{-1})$ $[\text{mol}/22.4 \text{ l (STP)}] (273.15^\circ \text{ K} / 1 \text{ atm})$)、 Q は通気流量 ($\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$)、 P は圧力 (atm)、 t は絶対温度 ($^\circ \text{ K}$)、 y は酸素分圧 (atm) である。ただし、下付き文字の i は給気 (inlet) の o は排気 (outlet) の値を示す。

3-2-4. 菌株、培地及び培養条件

培養実験には、*A. xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR2001 株 (25) から変異処理により改良された BPR3001A 株 (28) を用いた。この菌株は入手しうる中で最も高い BC 生産速度を示した。CSL-Fru 培地で培養したが、BPR3001A 株の培養ではフラクトース濃度を $70 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 、CSL 濃度を $40 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ とした。培養中の pH は 5.0 に温度は 30°C に維持した。空気はリングスパージャーから 0.5vvm で通気した。培養中の C_L が C^* の 10% になるよう攪拌回転数を制御した。

3-2-5. 分析方法

培養液中の BC 濃度は、培養液から培地成分や菌体などの不純物を温水及び 0.1 N NaOH で除いて精製 BC を得て、これを 80°C の減圧乾燥機で乾燥させた重

量から計算した。菌体量は、50℃で2時間セルラーゼ（セルクラスト，Novo）で処理した培養液を適当な比率で希釈した液の600nmでの濁度であらわした。培養液中のフラクトース濃度はHPLCで測定した。カラムは逆相シリカゲル（Asahipak，NH₂P-50，4E，Shodex，Tokyo）、溶離液は水性アセトニトリル（アセトニトリル：水=75：35 v/v）、流速1.0ml・min.⁻¹、示差屈折計で検出した。BCの生産速度は1時間当りのBC濃度の変化として、BC収率は消費された糖に対する生産されたBCの重量%として定義した。

3-3. 実験結果

3-3-1. 混合遅れ時間の測定

図3-2に攪拌回転数と単位容積当りの P_v に対する t_{md} を示す。タービン羽根では1000rpm以上で t_{md} は最小となった。これに対し、タービン付き門型羽根とMaxblendでは500rpm以上で t_{md} は最小となった。ヘリカルリボンでは t_{md} は小さかったが攪拌回転数が100rpm以上に高くなるとボルテックスが大きくなった。内筒付きスクリーウ羽根の t_{md} は250rpm以上におけるすべての測定範囲で他の攪拌羽根の値よりも小さかった。タービン羽根で t_{md} を最小とするには $1.5 \text{ w} \cdot \text{l}^{-1}$ 必要であった。これに対し、 t_{md} を最小とするのに必要な P_v はタービン付き門型羽根とMaxblendでは $1.0 \text{ w} \cdot \text{l}^{-1}$ 、内筒付きスクリーウ羽根では $0.5 \text{ w} \cdot \text{l}^{-1}$ で、内筒付きスクリーウ羽根の P_v が最も小さかった。

3-3-2. Static gassing out 法による酸素移動速度係数の測定

タービン付き門型羽根、Maxblend、内筒付きスクリー羽根を用いて良好に混合される攪拌回転数の範囲内で $K_L a_{st}$ を測定した。図 3-3 に攪拌回転数と P_v に対する $K_L a_{st}$ を示す。タービン付き門型羽根、Maxblend での攪拌回転数の増加に対する $K_L a_{st}$ の増加に比べて、内筒付きスクリー羽根では $K_L a_{st}$ の増加は小さかった。内筒付きスクリー羽根では高回転で P_v が大きくなるにもかかわらず $K_L a_{st}$ の増加は小さかった。

3-3-3. 培養によるバクテリアセルロース生産

図 3-4 に BC 生産、菌体の生育、糖消費の経時変化を示す。Maxblend またはタービン付き門型羽根を 1200 rpm で攪拌した条件では培養 42 時間で全ての糖が消費された。Maxblend またはタービン付き門型羽根を 800 rpm で攪拌した条件では培養 60 時間で全ての糖が消費された。内筒付きスクリー羽根で 600 rpm で攪拌した条件では培養 70 時間でも残糖が $40\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 残った。 $K_L a_{st}$ が大きくなるような攪拌条件で糖消費が速く、BC 濃度と菌濃度が高かった。

培養 42 時間までの平均の BC 生産速度と糖消費収率を計算し、1% BC 懸濁液で測定した $K_L a_{st}$ および培養中の OTR の最大値との関係を調べた。図 3-5 に $K_L a_{st}$ および OTR に対する BC 生産速度を、図 3-6 に $K_L a_{st}$ および OTR に対する BC 収率を示す。 $K_L a_{st}$ および OTR が大きくなると BC 生産速度、BC 収率共に高くなった。 $K_L a_{st}$ が 4 倍高くなると、BC 生産速度も 4 倍増加し、収率は 2 倍増加

した。

3-3-4. 排ガス法による酸素移動速度係数の測定

図 3-7 に static gassing out 法で測定した $K_L a_{st}$ と排ガス法で測定した $K_L a_{gb}$ の関係を示す。 $K_L a_{gb}$ は培養液のレオロジーが 1%BC 懸濁液のレオロジーとほぼ同じである時に計測した。 $K_L a_{gb}$ は $K_L a_{st}$ に比例し、 $K_L a_{st}$ の 2 倍高い値を示した。

3-4. 考察

3-4-1. 攪拌所要動力と $K_L a$ の関係

$K_L a$ は一般に攪拌所要動力の累乗に比例し、この関係は液の性状や攪拌羽根の形状に依存すると考えられている。Linek らは各種の測定方法及び測定条件における $K_L a$ を比較し、高粘度液でも粘度や拡散係数などを考慮することにより攪拌所要動力から $K_L a$ を推定できるとしている (53)。非ニュートン流体においては Vlaev らが α -アミラーゼ培養液の模擬液において攪拌所要動力と $K_L a$ の関係を調べている (54)。通気量を一定にした場合、 $K_L a$ は以下の式 (3-5) であらわされる。

$$K_L a = i P_v^j \quad (3-5)$$

ただし、 P_v は単位体積当りの攪拌所要動力 ($W \cdot L^{-1}$)、 i, j は培養液と通気条件により定まる定数である。 i は主に $K_L a$ の大きさに影響し、 j は攪拌所要動

力に対する K_La の増加率に影響することになる。

図 3-3 に示した結果を式 (3-5) で近似した場合、タービン付き門型羽根や Maxblend を用いて 1%BC へ酸素移動した場合の i, j は 35, 0.6 であり、内筒付きスクリューを用いて 1%BC へ酸素移動した場合の i, j は 10, 0.5 であった。ただし、タービン付き門型羽根や Maxblend の 700rpm 以下では混合が不均一であると考えられたので、その測定結果を除いて近似した。いずれの場合も、相関係数 (r^2) は 0.9 以上であった。攪拌所要動力と K_La の累乗に比例関係が認められたことから、攪拌所要動力から K_La を推定できると考えられるが、正確に推定するには Linek ら (53) の示した方法に従い、非ニュートン性を考慮して攪拌条件と粘度の関係、拡散係数などを調べる必要がある。

一方、Vlaev らの報告では、剪断速度に対する粘度の変化を指数モデルで近似させた場合の粘稠度が 1%BC 懸濁液に近い α -アミラーゼ培養液の模擬液における i, j は、100, 0.8 であった。この結果は、1%BC 懸濁液をタービン付き門型羽根や Maxblend で攪拌した場合の K_La は、 α -アミラーゼ培養液の模擬液をタービン羽根で攪拌した場合より、絶対値において小さく、攪拌所要動力の増加に対する K_La の増加も小さいことを示している。また、1%BC 懸濁液を内筒付きスクリューで攪拌した場合の K_La や攪拌所要動力の増加に対する K_La の増加はさらに小さかった。すなわち、1%BC 懸濁液では同等の粘稠度を示す α -アミラーゼ培養液相当の模擬液よりも酸素移動に対する障害が大きく、タービン付き門型羽根や Maxblend を用いても攪拌所要動力の増加に対する K_La の増加は小さかった。前者は BC 懸濁液の流動指数 (0.13) が α -アミラーゼ培養液

(0.3) に比べて小さいために、BC 懸濁液では剪断速度の低い部分で粘度が高くなるためと考えられる。後者は攪拌羽根形状の違いに関係している可能性がある。タービン付き門型羽根や Maxblend は BC 懸濁液での混合性能を重視して選定された攪拌羽根であるため、攪拌所要動力に対する酸素移動の効率が低かった可能性もある。この結果は、酸素移動に関してはタービン羽根の攪拌効率が高く、 P_v に対する K_La が高いことをしめしている。しかしながら、BC 培養液においては混合が不均一になると生産性が低下するばかりでなく、培養の諸因子が生産性に及ぼす影響の解析が困難になるため、良好に混合され高い K_La を実現できるタービン付き門型羽根や Maxblend が適していると考えられる。

3-4-2. 攪拌羽根形状の培養への影響

BC 培養液が非ニュートン性であるため、羽根から離れた部分では粘度が高くなり混合は難しくなる。タービン羽根の場合、攪拌羽根から離れた培養液の部分が多いため、混合しにくい。たとえ羽根の近傍では高い K_La が得られても混合がされない部分での K_La は低い。これに対し、Maxblend やタービン付き門型羽根では攪拌羽根から離れた培養液の部分が比較的少ない。このため、これらの攪拌羽根はタービン羽根よりも良い混合を示す。内筒付きスクリュウ羽根は最もよい混合を示しながら、気泡の大部分が内筒の外側を通過し、攪拌羽根の剪断により微細化されないために K_La は小さかったと考えられる。

BC 培養に適した攪拌羽根は Maxblend とタービン付き門型羽根であると結論した。これらは共に門型の羽根であり、混合と K_La の特性も似ている。しか

し、これらはスパージャーの近傍の構造に違いがある。Maxblend は槽の底と攪拌羽根の下端の間で気泡を微細化したのに対し、タービン付き門型羽根はタービン羽根の先端で気泡を微細化した。

BC 培養に適した攪拌羽根の構造は、以下のように要約される。培養液のいずれの部分でも攪拌羽根との距離が小さいこと、これは剪断速度の低下に伴う粘度の上昇を小さくするために重要である。攪拌羽根はスパージャーの近傍に高剪断領域をもつこと、これは気泡の微細化により K_La における気泡の比表面積 a を高めるために重要である。スケールアップにおいてはここで示したような特徴を持つ攪拌羽根を使用すべきである。なぜなら、通気攪拌培養における BC の生産においては混合と酸素移動が共に重要だからである。

3-4-3. 酸素移動速度の生産性への影響

グルコースを基質として BPR3001A 株を培養すると、基質が直接に酸化されグルコン酸が生成するが、主たる糖源はフラクトースなので直接の酸化による酸の生成は認められなかった。それゆえ、消費された酸素の多くは呼吸などのエネルギー獲得に用いられたと考えられる。ここでは、酸素消費と BC の生産速度、収率との関係を考察した。図 3-5 に示すように BC 生産速度は OTR に比例した。培養中の C_L は C^* の 10% に制御されているので、培養液中での酸素の消費速度、すなわち酸素消費速度 (OCR) は OTR に等しい。すなわち、BC の生産速度と収率は OCR にほぼ比例して増加するが、これは BC 生産が呼吸に依存しているためと考えられる。この考察から BC 生産が呼吸により生産される菌体内の高

エネルギー化合物に依存する可能性が示された。この関係については第 5 章で詳細に検討する。

3-4-4. 酸素移動速度係数の測定方法による差異

攪拌羽根の酸素供給能力を特徴づけるために、数種類の攪拌羽根を用いて BC 懸濁液中で $K_L a_{st}$ を測定した。Dynamic gassing out 法や培養中の排ガス法では培養液中の菌体により酸素消費がおこるため測定できる攪拌回転数の範囲や攪拌羽根の形状が制限されるが、Static gassing out 法では菌体の影響を受けないので、広い攪拌回転数範囲と多種の攪拌羽根で測定できる。また、測定にはレオロジーが培養液に近い BC 懸濁液を用いたので、測定結果から培養液における酸素供給能力を推定できると考えた。

一方、 $K_L a_{st}$ を $K_L a_{gb}$ と比較した結果においては、両者は相間関係を示しながらも絶対値には差があった。その差には BC 懸濁液中の小さな気泡が原因している可能性がある。 $K_L a_{st}$ の測定の前には BC 懸濁液中の気泡は除かれるべきであるが、種々試みても完全に除くことはできなかった。高粘度液中の小さな気泡が $K_L a$ 測定に影響することは Tuffile らにより報告されている (51)。彼らは $K_L a_{gb}$ は $K_L a_{st}$ の 2 倍高く、この違いは高粘度液中に残留した小さな気泡によるものであるとしている。この高粘度液中の小さな気泡が dynamic gassing out 法において $K_L a$ 測定へ影響することは Heijnen らによっても報告されている (49)。Heijnen らは小さな気泡がどのように $K_L a$ 測定に影響するかを以下のように説明している。小さな気泡の分散した系は均一な系と見做すことができ

る。気相中の酸素濃度は溶存酸素の 32 倍大きいので、小さな気泡の分散した系全体の見かけの酸素溶解度は高い。このため、gassing out 法で $K_L a$ を測定した場合、液中で酸素が消費されても溶存酸素濃度の変化率は小さく、結果的に $K_L a$ も小さくなる。

この説に従い、小さな気泡と液中での物質移動を考慮し、BC 懸濁液においてなぜ $K_L a_{st}$ が $K_L a_{gb}$ より小さくなるのかを考察した。BC 培養液や BC 懸濁液は通気を止めた後にも小さな気泡を含んでいる。 $K_L a_{gb}$ を測定するときの培養液に含まれる小さな気泡中の酸素濃度は溶存酸素濃度と平衡状態にあると考えられるが、 $K_L a_{gb}$ の測定では通気と排気中の酸素濃度の差から計算するため、小さな気泡の影響を受けない。これに対し、気泡を含む BC 懸濁液中で $K_L a_{st}$ を測定する場合には、通気された気泡から液中に移動した酸素の一部は、BC 懸濁液中に残存している窒素を多く含み酸素濃度の低い気泡中へも移動する。このため、液中の C_L の変化 dc_L/dt は残留した気泡が無い場合よりも小さくなり、結果的に $K_L a_{st}$ は $K_L a_{gb}$ より小さくなるのである。以上の結果と考察から、 $K_L a_{st}$ は培養液中の実際の酸素供給能力を示すのではないにしても、static gassing out 法は広い範囲で測定でき $K_L a_{st}$ が $K_L a_{gb}$ と比例関係にあるので、攪拌羽根の形状や攪拌条件の検討には有効であると考えられる。

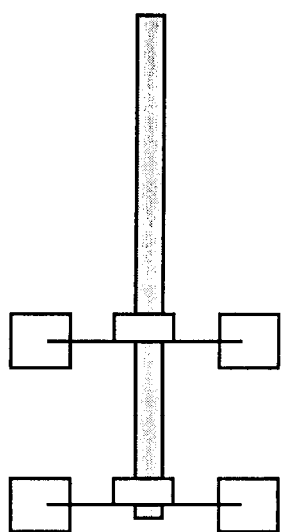
BC 生産性の向上には、高い酸素供給能力を達成するために高い P_v が要求される。しかしながら、高い P_v はコストを高めるため、攪拌培養のプロセスのスケールアップでは避けるべきである。酸素分圧を高めて酸素供給に必要な P_v を抑制することが考えられるが、その場合は酸素分圧が BC の生産性に及ぼす影響

を精査する必要がある。酸素分圧は気相中の酸素濃度と圧力（内圧）に依存するため、高濃度の酸素の添加及び内圧の上昇により高めることができる。しかし、内圧を上げた場合、圧力及びこれと共に高くなる二酸化炭素などの分圧の影響についても精査する必要がある。

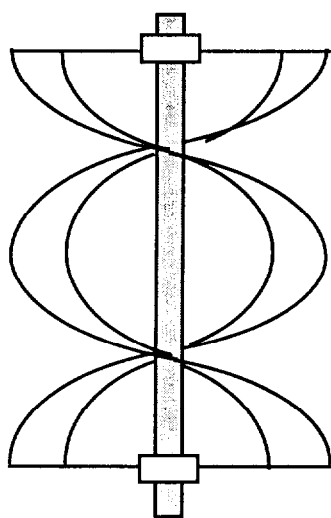
表 3-1 攪拌羽根とスパージャーの大きさと位置

攪拌羽根	d/D	h	L or L'	d_s	h_s
	(-)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
タービン	0.5	15	80	30	5
ヘリカル・リボン	0.9	20	240	30	5
内筒付きスクリュー	0.5	15	100	70	15
タービン付き門型羽根	0.5	15	135	30	5
Maxblend	0.5	5	145	70	10

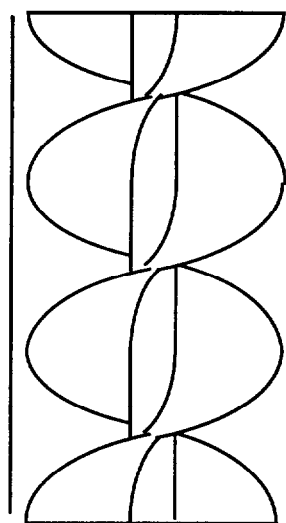
d/D , 槽の内径 (D) に対する羽根の径または幅 (d) の比率; h , 羽根の下端と槽の底の距離; L , 攪拌羽根の高さ; L' , タービン羽根の間の距離; d_s , スパージャーの直径; h_s , 槽の底とスパージャーの距離.



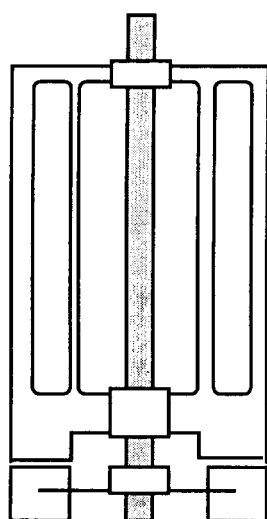
2段タービン羽根



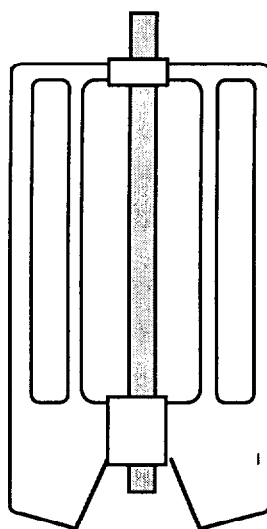
ヘリカルリボン



内筒付き
スクリュー



タービン付き
門型羽根



Maxblend

図 3-1 攪拌羽根の形状

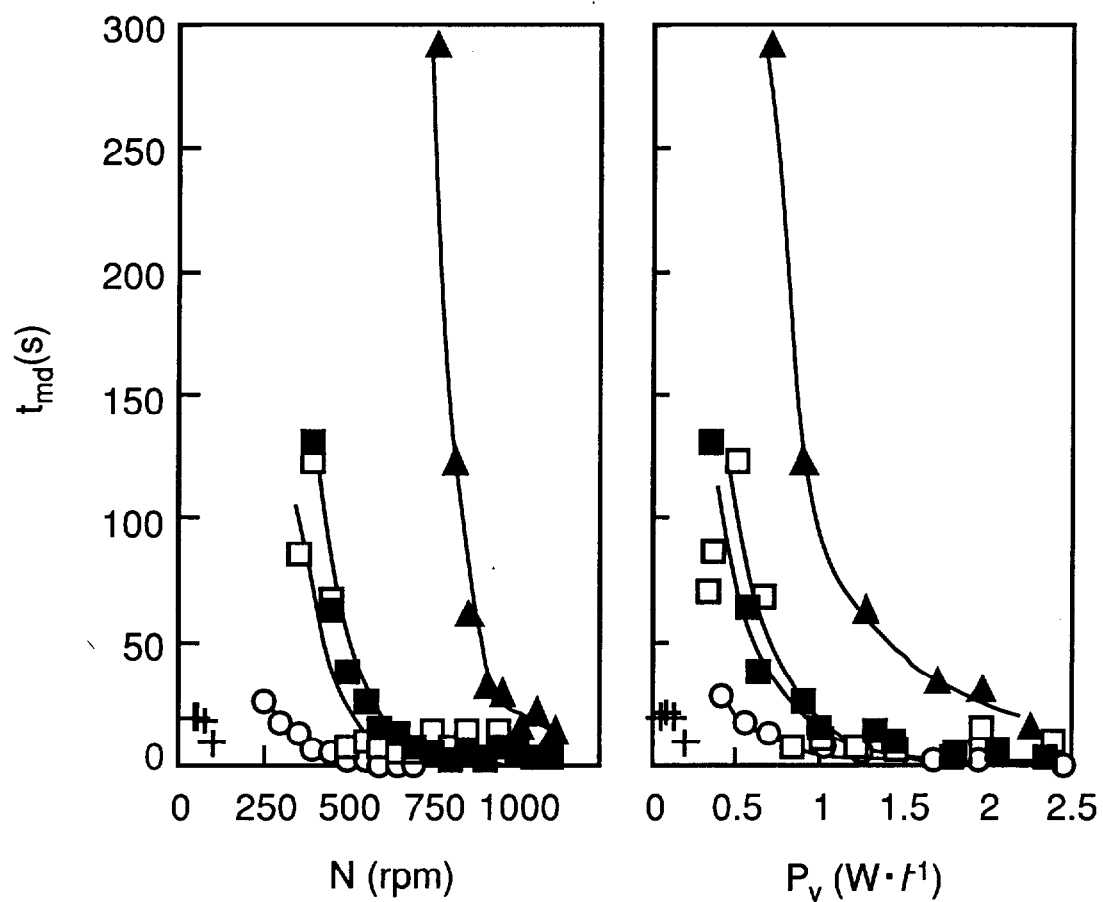


図 3-2 攪拌回転数 (N) と攪拌所要動力 (P_v) に対する混合遅れ時間 (t_{md})

1% BC (w/w) 懸濁液、通気量 0.5 vvm

記号: ■, タービン付き門型羽根; □, Maxblend; ▲, タービン;

○, 内筒付きスクリュー; +, ヘリカル・リボン

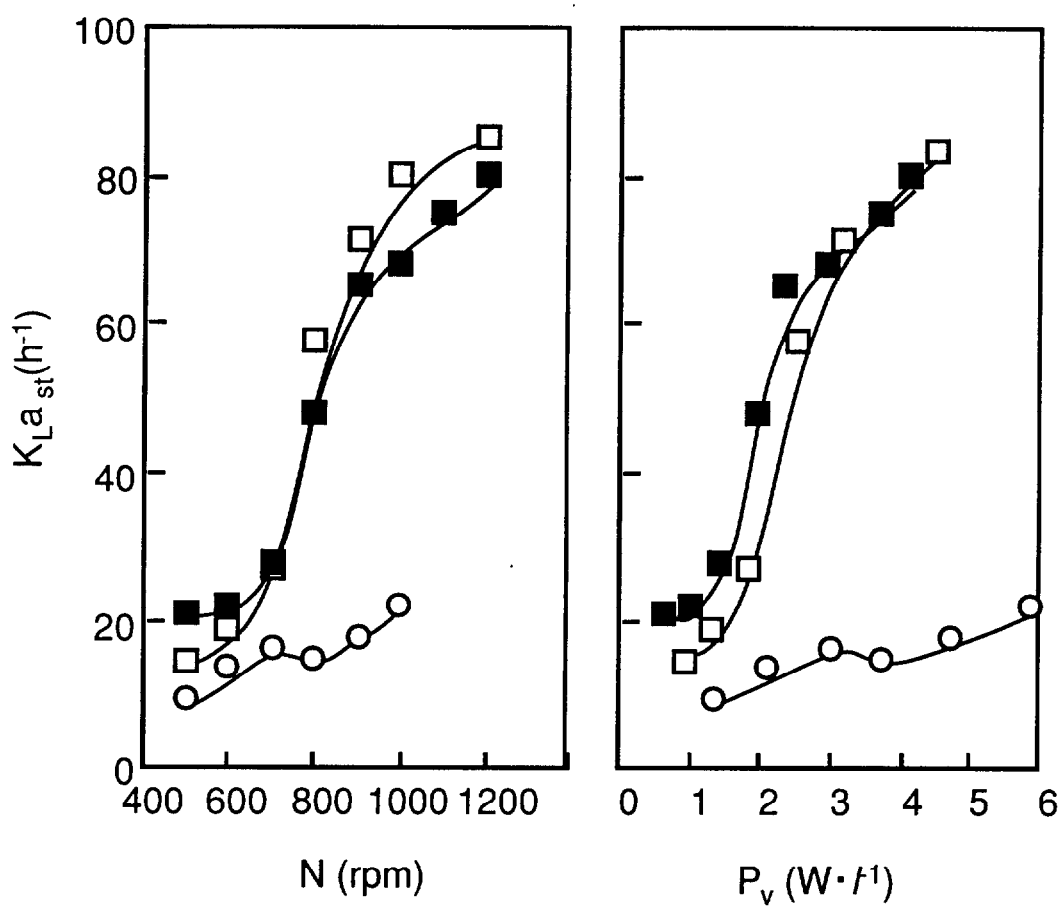


図 3-3 攪拌回転数 (N) と攪拌所要動力 (P_v) に対する $K_L a_{st}$

1% BC (w/w) 懸濁液、通気量 0.5 vvm

記号: ■, タービン付き門型羽根; □, Maxblend; ○, 内筒付きスクレー

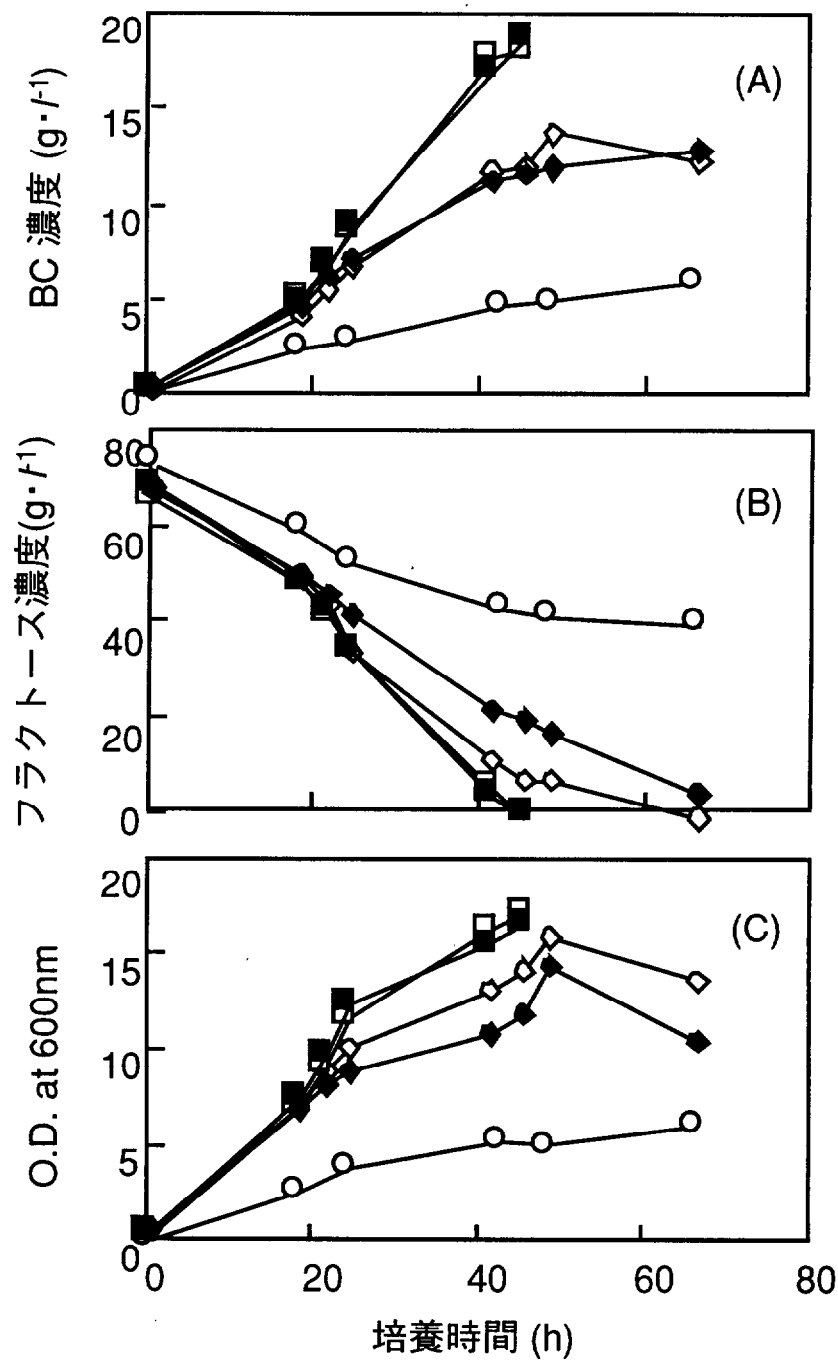


図 3-4 バッチ培養における BC 濃度 (A), フラクトース濃度 (B) と菌濃度 (C)

記号: ■, タービン付き門型羽根/1200 rpm ($K_La=80$); ◆, タービン付き門型羽根/800 rpm ($K_La=50$); □, Maxblend/1200 rpm ($K_La=86$); ◇, Maxblend/800 rpm ($K_La=60$); ○, 内筒付きスクリー/600 rpm ($K_La=15$)

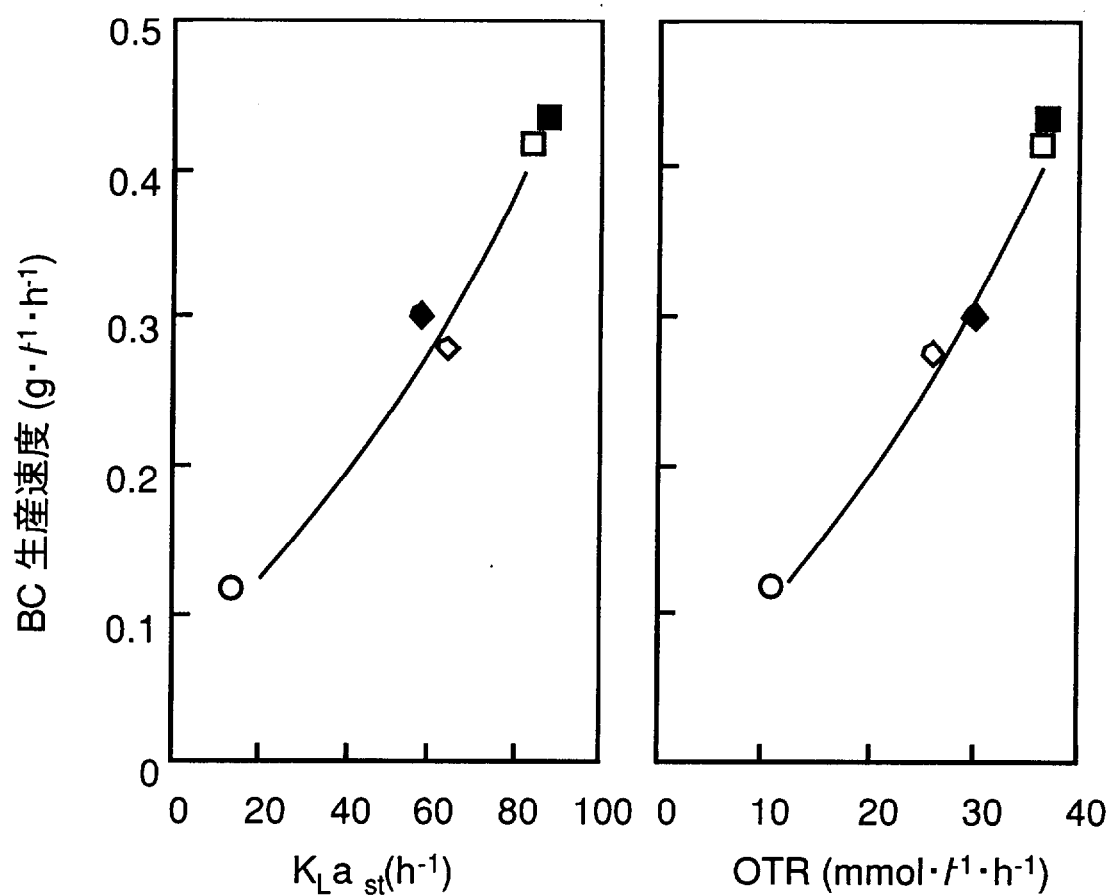


図 3-5 Static gassing out 法による $K_L a_{st}$ と OTR に対する

BC 生産速度の関係

記号: ■, タービン付き門型羽根/1200 rpm; ◆, タービン付き門型羽根

/800 rpm; □, Maxblend/1200 rpm; ◇, Maxblend/800 rpm;

○, 内筒付きスクリュース/600 rpm

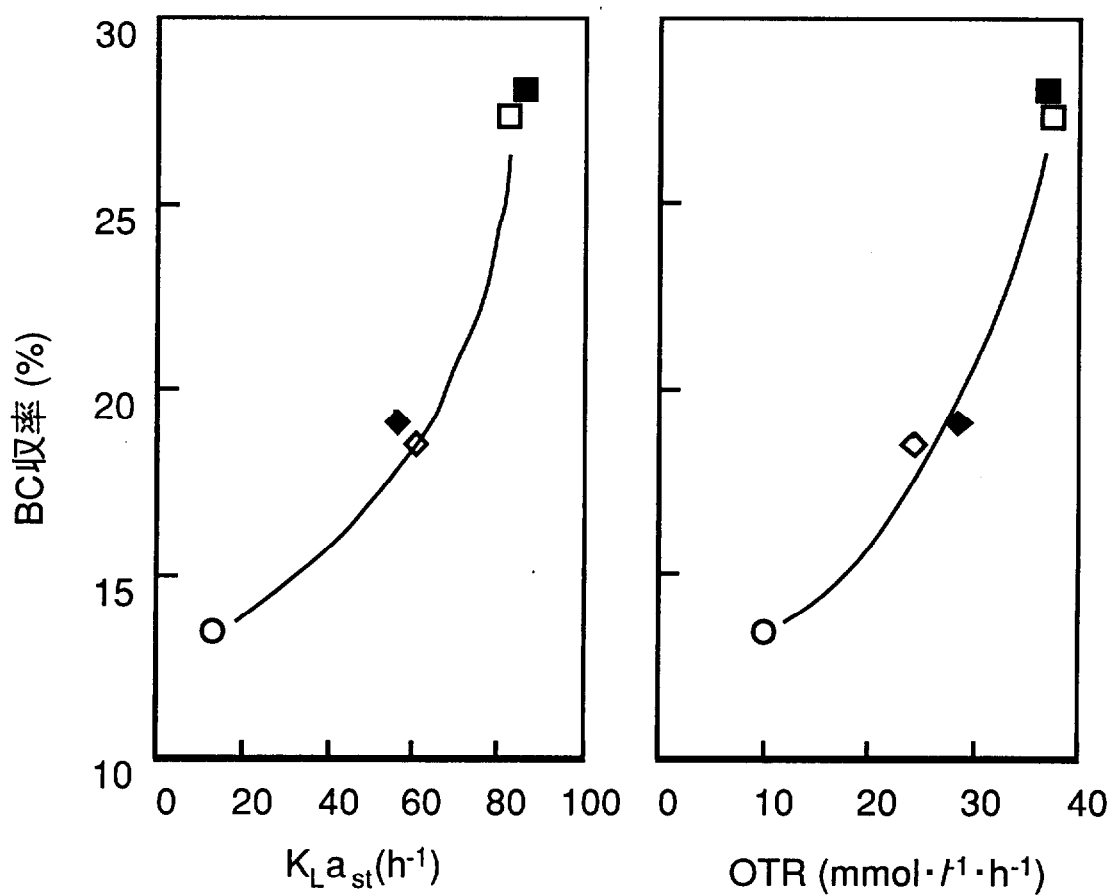


図3-6 Static gassing out 法による $K_L a_{st}$ と OTR に対する BC 収率の関係

記号: ■, タービン付き門型羽根/1200 rpm; ◆, タービン付き門型羽根

/800 rpm; □, Maxblend/1200 rpm; ◇, Maxblend/800 rpm;

○, 内筒付きスクリー/600 rpm

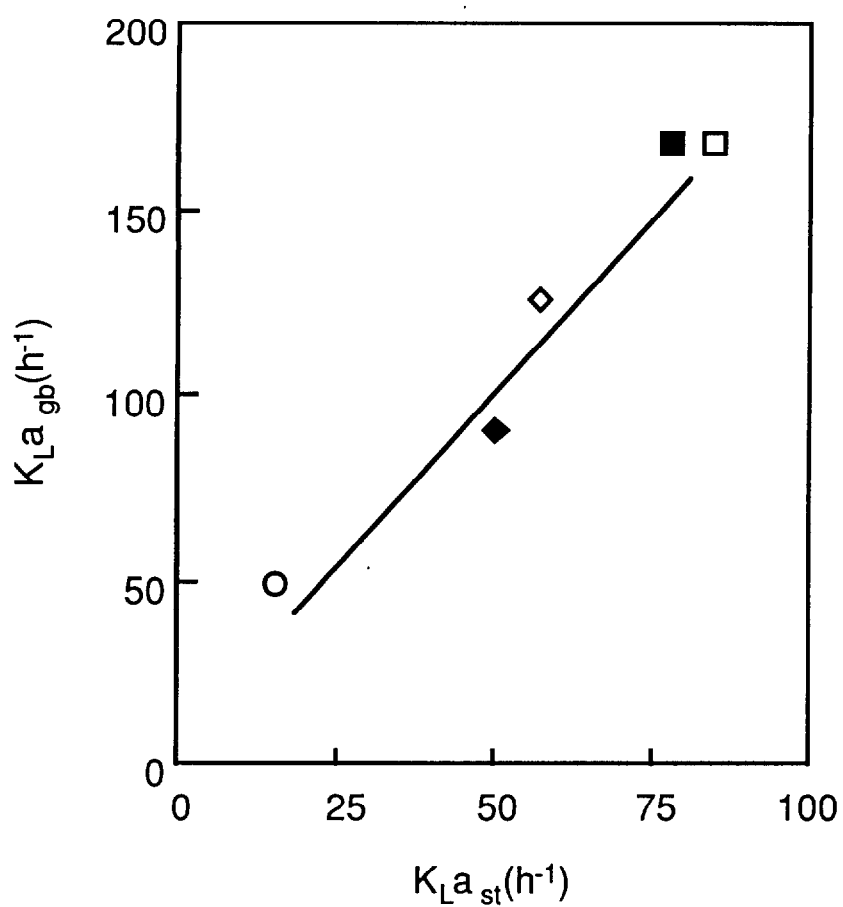


図 3-7 Static gassing out 法で測定した $K_{La_{st}}$ と

排ガス法で測定した $K_{La_{gb}}$ の関係

記号: ■, タービン付き門型羽根/1200 rpm; ◆, タービン付き門型羽根

/800 rpm; □, Maxblend/1200 rpm; ◇, Maxblend/800 rpm;

○, 内筒付きスクリー/600 rpm

第4章 バクテリアセルロース生産への酸素及び二酸化炭素分圧の影響

4-1. 緒言

本章では BC 通気攪拌培養における効率的な酸素供給の方法について述べる。BC 通気攪拌培養において酸素供給効率について研究することは以下の理由のため、実用的に重要である。

まず、第2章に示したように、培養液が非ニュートン性の高粘度流体であり、これに酸素を均一に移動させることが難しいからである。さらに、第3章に示したように、BCの生産速度と収率が共に酸素消費速度と K_La に依存するからである。第3章で述べた種々の形状の攪拌羽根を用いた混合、酸素移動及び培養の実験から2種類の攪拌羽根 Maxblend 及びタービン付き門型羽根が BC 生産に適していることがわかっている。しかし、 K_La を大きくするには高い攪拌回転数が必要になり、培養液中の BC 濃度が高くなると粘度が高くなり攪拌トルクは大きくなる。攪拌所要動力は攪拌回転数と攪拌トルクに比例するので、BC の生産性を高くするために BC 濃度と K_La を高くすると、結果的に攪拌所要動力は大きくなる。しかし、攪拌所要動力を大きくすると大型のモーターが必要になりエネルギーコストが高まるのみならず、剪断による発熱がともなう。スケールアップにおいては高い攪拌所要動力は避けるべきである。

一方、酸素分圧を高くすると攪拌回転数を高くせずに酸素供給を向上することができる。酸素移動速度は、高濃度酸素の添加または内圧（発酵槽内の気相中の圧力）の上昇により高くなる酸素分圧によって大きくすることができるが、

これにともない二酸化炭素の分圧も高くなる。

高い内圧 (55, 56) や高濃度の酸素及び二酸化炭素分圧 (57, 58) が生育や例えばアミノ酸の生産などの物質生産を阻害する例が報告されているが、BC の通気攪拌培養では酸素濃度や圧力により生産が影響を受けた報告はない。そこで本章では、内圧、酸素濃度及び二酸化炭素分圧の酸素移動速度と BC 生産速度への影響を調べた。

4-2. 実験方法

4-2-1. 培養装置

培養実験には図 4-1 に示す 50 l 容のステンレス製ファーマンターを用いた。50 l ファーマンターは直径 320mm で張り込み容量 30 l、攪拌羽根と 3 枚のバッフル、リングスパージャーを備え、内圧を 1.0~2.5 atm に上げて培養できる。槽内の圧力は非加圧状態を 1 atm (大気圧) として表示した。第 3 章で述べたように Maxblend とタービン付き門型羽根を用いた場合に高い BC の生産性が得られるが、ここでは、より形状が簡素で BC の羽根への付着が少ない Maxblend を用いた。槽内の圧力は排気弁により調節し、空気、酸素及び二酸化炭素の流量はフローメータかマスフローコントローラーで調節した。培養時の pH は pH センサーで測定し、硫酸またはアンモニアガスを添加して調節した。溶存酸素はポーラロ式 DO センサー (Ingold, USA) で測定した。

攪拌回転数はタコメータで測定し、攪拌トルクは攪拌用モータに付属するインバータの出力周波数から求めた。トルクは軸のフリクションを差し引いた実トルクである。攪拌所要動力はトルクと攪拌回転数から式(3-1)で求めた。

4-2-2. 菌株及び培養方法

菌株は BPR3001A 株(28)を用いた。内圧、酸素分圧及び二酸化炭素分圧の影響は以下の方法で培養して検討した。まず、凍結保存菌液 1ml を $40\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ のフラクトースと $20\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$ の CSL を含み 115°C で 15 分間オートクレーブで殺菌された CSL-Fru 培地を 100ml 張り込んだ Roux フラスコに植菌し、静置培養で 3 日間培養した。静置培養で培養液表面に形成されたペリクルから固着した菌体を Roux フラスコを手で振盪して遊離させた後にペリクルを除いて菌液を得た。この菌液 12.5ml を同じ CSL-Fru 培地を 112.5ml 張り込んだバッフル付き三角フラスコに植菌し回転振盪しながら 3 日間培養した。次に、中に含まれる凝集した BC をブレンダーで高剪断処理して分散させた培養液を 50 l 容ジャーファーマンターに張り込んだ $70\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ のフラクトースと $40\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$ の CSL を含み槽内で蒸気殺菌した CSL-Fru 培地に植菌して種培養した。さらに、この対数増殖後期の培養液 3 l を 50 l 容ジャーファーマンターに張り込んだ $70\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ のフラクトースと $40\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$ の CSL を含み槽内で蒸気殺菌した CSL-Fru 培地に植菌し培地中のフラクトースがすべて消費されるまで培養した。ジャーファーマンターの培養は、pH 5.0 に硫酸及びアンモニアガスで制御し、温度 30°C に温調水を循環して制御した。培養中の溶存酸素は飽和溶存酸素濃度の 10% (59) に

維持できるよう攪拌回転数を変えて制御した。

4-2-3. 酸素、二酸化炭素濃度の高い空気の調製

気相中の酸素分圧と二酸化炭素分圧の BC 生産速度への影響を調べるため、通気する空気の酸素濃度と二酸化炭素濃度を変化させて培養した。酸素濃度は空気と酸素富化空気を混合して調整した。酸素富化空気は PSA (pressure swing adsorption) で調製し、その出口酸素濃度は 90%以上であった。二酸化炭素濃度は空気と二酸化炭素ガスを混合して調整した。二酸化炭素ガスはボンベで供給し、この二酸化炭素濃度はほぼ 100%であった。混合空気の酸素及び二酸化炭素の濃度は式 (4-1, 4-2) から求めた。

$$pO_2 = (21 V_a + cO v_o) / (V_a + v_o) / 100 \quad (4-1)$$

$$pCO_2 = (0.035 V_a + 100 v_c) / (V_a + v_c) / 100 \quad (4-2)$$

ただし、 pO_2 は通気中の酸素分圧 (atm)、 pCO_2 は通気中の二酸化炭素分圧 (atm)、 V_a は空気の流速 ($l \cdot \text{min}^{-1}$)、 cO は酸素富化空気の酸素濃度 (%)、 v_o は酸素富化空気の流速 ($l \cdot \text{min}^{-1}$)、 v_c は二酸化炭素ガスの流速 ($l \cdot \text{min}^{-1}$)、 $V_a + v_o$ は通気流速 ($l \cdot \text{min}^{-1}$) である。 V_a と v_o はマスフローメータで制御した。大気中の酸素濃度は 21%、二酸化炭素濃度は 0.035%とした。

4-2-4. 分析方法

培養液中の BC の濃度及び糖濃度は、第 3 章の方法で分析した。生菌数はコロニーカウント法で測定し、1ml 中のコロニー形成ユニット ($c.f.u \cdot \text{ml}^{-1}$) で示

した。約 0.5 g の培養液を 10 倍容量の 100mM 酢酸ナトリウム緩衝液で希釈し、この希釈液に 1 ml のセルラーゼ（20%セルクラスト，Novo）を加え 30℃で 2 時間振盪しながら反応した。この液を 100mM 酢酸ナトリウム緩衝液で希釈して CSL-Fru 培地の寒天平板上に塗布し、28℃で 5 日間培養した後のコロニー数を測定した。一般的なコロニーカウントの方法では菌体が BC に吸着されバラツキが大きい(60)。しかし、われわれの方法では良い再現性が得られた。セルラーゼ処理時間を 2 時間と 4 時間としたときの生菌数に差が認められなかったことから、セルラーゼ反応中の生菌数の変化は無視できると考えられた。

4-3. 実験結果

4-3-1. 気相中の酸素濃度の BC 生産速度と攪拌所要動力への影響

図 4-2 に内圧 1.5 atm、通気量 0.5 vvm で培養したときの経時変化を示す。42 時間の培養で生菌数が 20 倍、BC 濃度が 40 倍に増加する間に攪拌所要動力は初期の 50 倍高くなった。

4-3-2. 酸素供給に必要な攪拌所要動力に対する酸素分圧の影響

酸素富化空気を通気して溶存酸素濃度を一定に制御する培養では攪拌回転数が低下した。内圧 1.5 atm で空気を通気したときの攪拌回転数が 360rpm であったのに対し、50%の酸素を含む空気を通気した場合には 240rpm であった。

図 4-3 に酸素富化空気及び内圧により気相中の酸素濃度を高くした培養の気相

中の酸素分圧に対する BC 生産速度と攪拌所要動力の変化を示す。各々の攪拌所要動力は培養中の最大値である。酸素分圧が高くなるといずれの場合にも溶存酸素濃度の制御に必要な攪拌所要動力は小さくなった。しかしながら、酸素富化空気により酸素分圧をあげた場合には BC 生産速度は影響を受けなかったのに対し、内圧を高くした場合には BC 生産速度は低下した。

4-3-3. バクテリアセルロース生産への二酸化炭素分圧の影響

二酸化炭素分圧は内圧に比例して高くなり、微生物の代謝により発生した二酸化炭素は通気により槽外へ排出されるため、通気量を増大すると低下する。すなわち、微生物の代謝による二酸化炭素の発生量が一定ならば、内圧が高く通気量の少ない条件で二酸化炭素分圧が高くなる。図 4-4 に通気量を 0.25vvm から 1.0vvm の範囲で、内圧を 1 atm から 2.5 atm の範囲で変えた培養実験における BC 生産速度を槽内気相中の二酸化炭素分圧の培養中の最大値に対してプロットした。各々の培養で通気量と内圧以外の設定条件は同じである。二酸化炭素分圧が低い条件では BC 生産速度は高く、二酸化炭素分圧が高い条件では BC 生産速度は低かった。

表 4-1 に酸素分圧、二酸化炭素分圧及び BC 生産速度に対する通気量の影響を示す。示された酸素分圧と二酸化炭素分圧は培養中の 30 分毎に測定した最大値であり、BC 生産速度は培養中の平均の生産速度である。通気量が増えると二酸化炭素分圧は低下し、BC 生産速度は向上した。酸素分圧と攪拌所要動力 (14 - 15 $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}$) は影響されなかった。

BC 生産速度と二酸化炭素分圧との関係を明らかにするため、内圧を一定 (1.5 atm) に保って二酸化炭素濃度の高いガスを通気することにより気相中の二酸化炭素のみの分圧を高めて培養した。表 4-2 に異なった通気中の二酸化炭素濃度における BC 生産速度と糖消費速度、酸素消費速度を示す。二酸化炭素濃度の高い空気を通気すると、BC 生産速度、糖消費速度、酸素消費速度は小さくなった。

4-4. 考察

本章の実験結果から、(1) 酸素分圧を高くすると溶存酸素濃度を制御するために必要な攪拌所要動力は小さくなる、(2) 二酸化炭素分圧が高いと BC 生産速度が小さくなる、(3) 通気量をあげると二酸化炭素分圧による阻害が解除されることが明らかになった。

一般に高粘度培養液への酸素供給は困難である。高い粘度のために気液界面での酸素移動が抑制される一方、キサントガムの培養では生産性が剪断力に依存し、菌体周辺のキサントガムによる高粘度領域での物質移動が剪断に影響されると報告されている (61)。このため、第 3 章で示したように BC の生産性は $K_L a$ に依存するものの、 $K_L a$ は攪拌回転数に依存するため、BC の生産性が酸素供給速度ではなく攪拌による剪断の効果に依存している可能性も考えられる。しかし、本章の結果で、高濃度酸素を通気して酸素分圧を高めた場合に攪拌回転数は低下するものの BC 生産速度は低下しなかった (図 4-3) ことから、BC 生産速度は攪拌による剪断には依存しないと考えられる。この結果は、通気

攪拌培養における BC 生産速度が菌体周辺の物質移動には制限されていないことを示している。これは BC は非水溶性であるために、菌体周辺の物質移動の低下が小さいためであろうと考えられる。以上の比較から、BC 生産性が K_La に依存するのは攪拌による剪断によって菌体周辺の物質移動速度が向上したためではなく、剪断による微細化と気泡の分散により気相から液相への酸素移動が向上したからであると結論できる。

酸素移動の速度、すなわち OTR を大きくするために気相中の酸素分圧を上げるには (1) 高濃度酸素の添加、(2) 内圧の上昇、の方法がある。工業的には内圧による方法が実用的でかつ経済的であるが、本章での結果は、内圧を高くすると二酸化炭素分圧の上昇により BC 生産速度が低下することを示している (図 4-3, 4-4)。一方、二酸化炭素分圧による阻害は、通気量を上げることで換気の効果により二酸化炭素を排出し、二酸化炭素濃度を下げることでも解除された (表 4-1)。一般には通気量を上げることは酸素供給に効果的であるが、BC 通気攪拌培養では通気量を上げてても溶存酸素濃度を制御するために必要な攪拌所要動力は減らなかったため、酸素供給そのものは向上しなかったと考えられる。これは高粘度な培養液に過剰に通気しても空気が微細にならず、大きな気泡になって通り抜けるためと考えられる。

高い二酸化炭素分圧は、表 4-2 に示すように BC の生成だけでなく、糖消費や酸素消費をも抑制したことから、作用機構は複雑であると考えられる。二酸化炭素分圧が BC の生産性にどのように影響しているのか、良く調べる必要がある。

表 4-1. 二酸化炭素分圧と BC 生産速度への通気量の影響

通気量 (vvm)	0.25	0.5	1.0
酸素分圧 (pO_2) (atm)	0.315	0.315	0.315
二酸化炭素分圧 (pCO_2) (atm)	0.10	0.05	0.03
平均の BC 生産速度 ($g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)	0.41	0.45	0.47

表 4-2. 通気中の二酸化炭素分圧の影響

二酸化炭素分圧 (pCO_2) (atm)	0.0005	0.075	0.12
BC 生産速度 ^a ($g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)	0.7	0.5	0.3
フラクトース消費速度 ^b ($g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)	2.9	2.5	2.0
酸素消費速度 ^c ($mmol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)	47	43	37

a 6 時間毎に測定した BC 生産速度の最大値

b 6 時間毎に測定したフラクトース消費速度の最大値

c 溶存酸素濃度を一定に保った培養で 30 分毎に測定した OTR に等しい

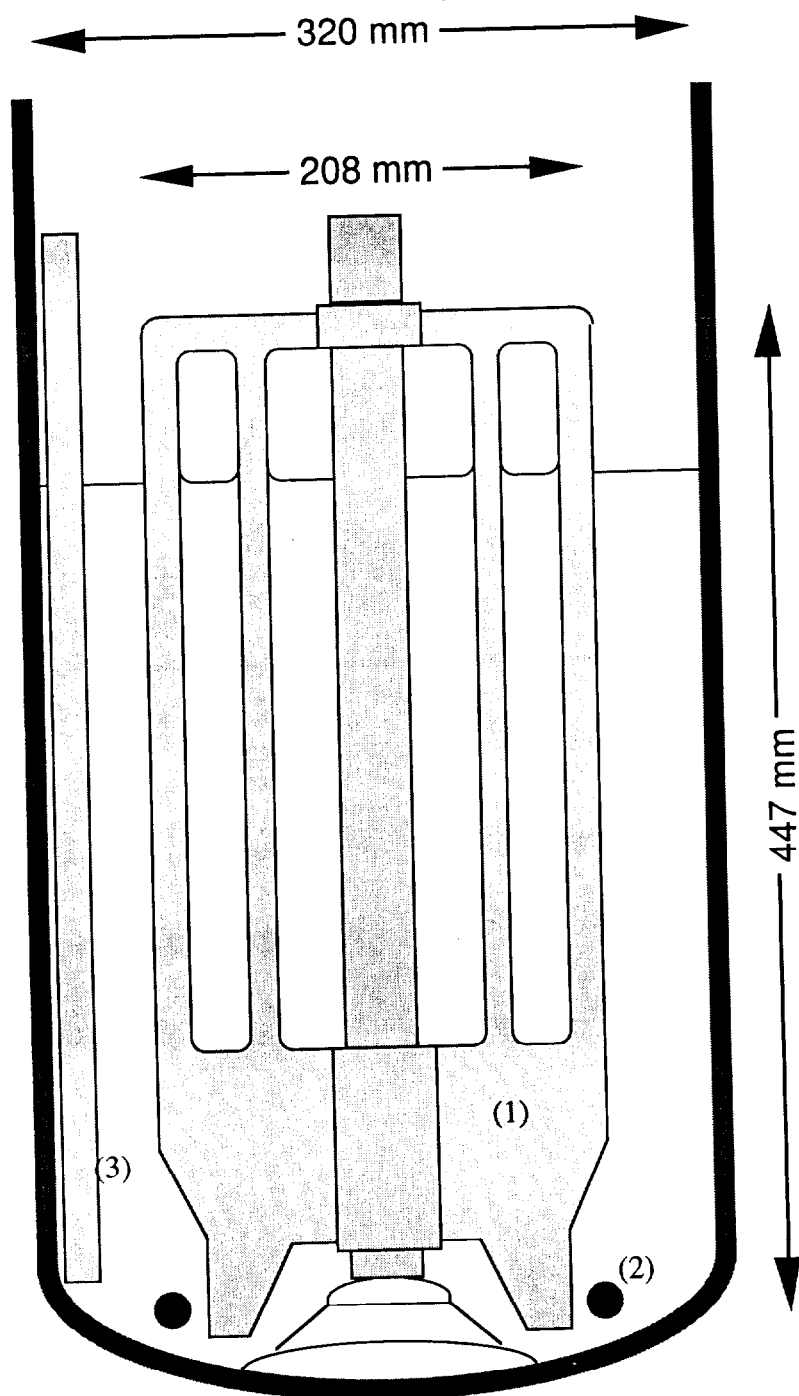


図 4-1 Maxblend 攪拌羽根を備えた 50 l ファーマンター
1, 攪拌羽根; 2, スパージャー; 3, バッフル.

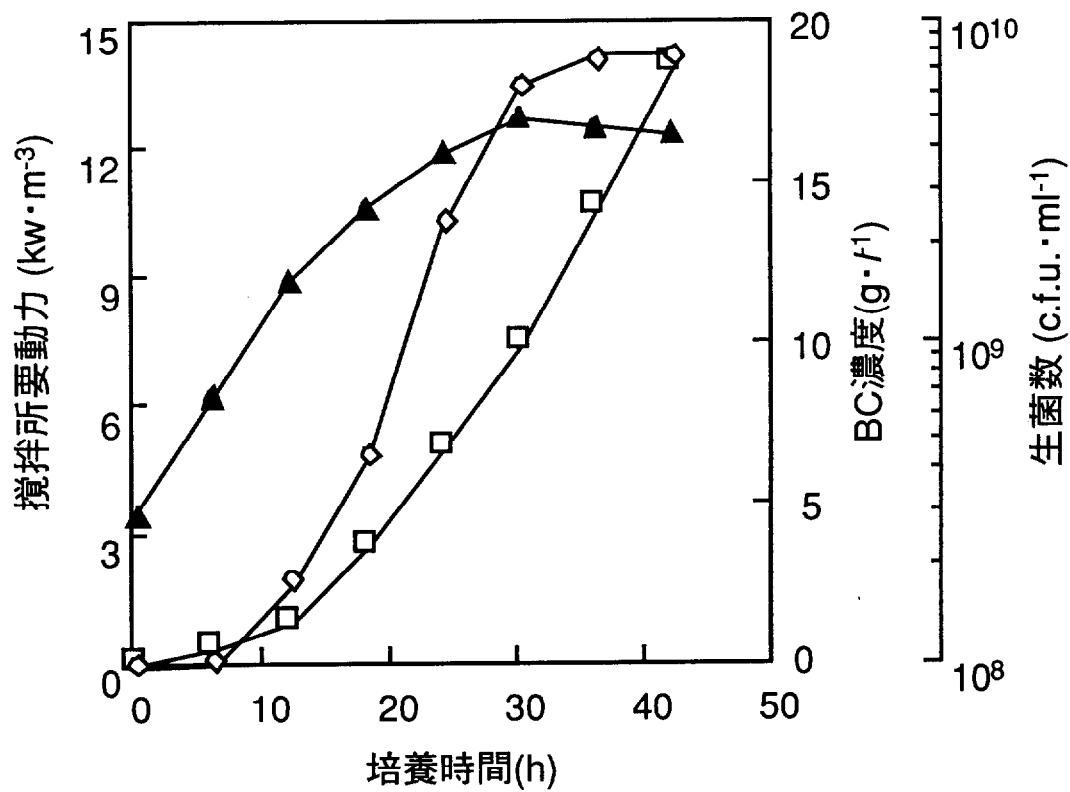


図 4-2 通気量 0.5 vvm、内圧 1.5 atm での撹拌所要動力、
BC 濃度、生菌数の経時変化

記号：◇，撹拌所要動力 (P_v)；□，BC 濃度；▲，生菌数

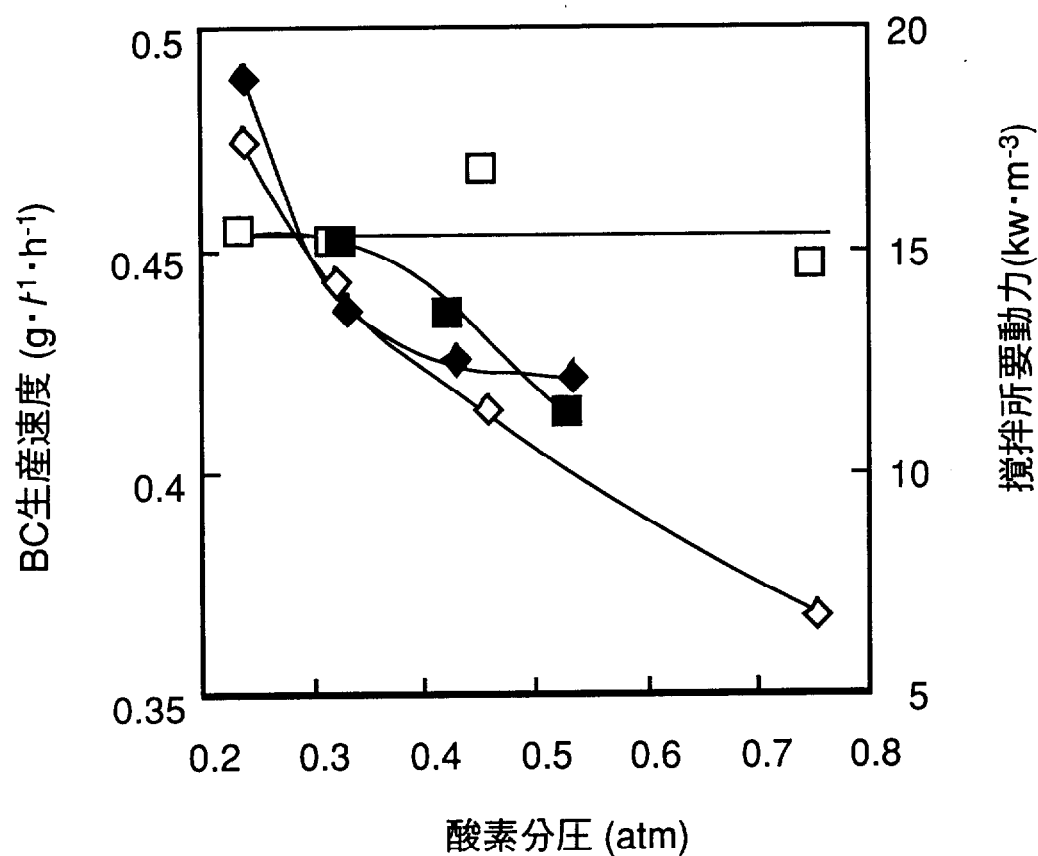


図 4-3 酸素分圧の変化に対する BC 生産速度と攪拌所要動力の変化

記号：(□, ■) BC 生産速度；(◇, ◆) 攪拌所要動力 (P_v)。

白, 酸素富化空気；黒, 内圧

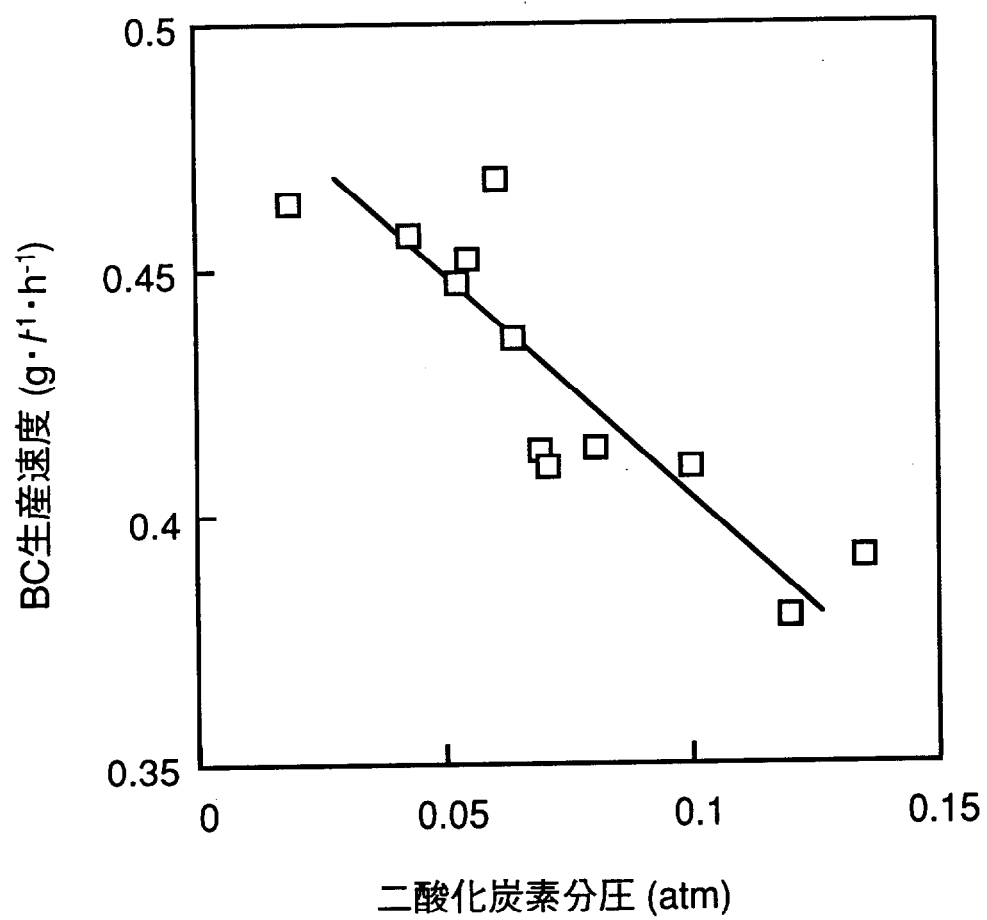


図 4-4 排気中の二酸化炭素分圧に対する BC 生産速度

第5章 二酸化炭素によるバクテリアセルロース生産阻害の解析

5-1. 緒言

本章では高い二酸化炭素分圧により BC 生産速度が低下した原因を解析した結果について述べる。第4章で述べたように、酸素移動速度を高めるために内圧を高くして酸素分圧を上げた場合、内圧に伴って二酸化炭素分圧が高くなると BC 生産速度は低下した。このことから生産スケールの大型の発酵槽においては液深による水圧や内圧により高められた二酸化炭素分圧が BC 生産速度を低下させる可能性がある。このため、生産スケールでも BC 生産速度を低下させないためには、二酸化炭素分圧による阻害について詳細に知らなければならない。

二酸化炭素分圧は微生物の生育や種々の物質の生産を阻害すると報告されている(56, 62)。二酸化炭素は主に呼吸により生成されるので、阻害のターゲットが呼吸に関係している可能性がある。実際、高い二酸化炭素分圧により呼吸速度が低下したという報告もある(57, 63)。BC 生産速度は酸素消費速度に依存するため、BC 生産菌の呼吸が阻害されれば BC 生産速度は低下することになる。

一方、BC は菌体外多糖 (extra-cellular polysaccharide, EPS) の一種である。EPS を高速度で生産するには相応する ATP 生産が必要であり(64)、過剰な ATP の浪費により EPS が生産される(65)とも考えられている。もし、ATP の浪費により BC が生産されると仮定すれば、高い二酸化炭素分圧により BC 生産速度が低下したときには ATP 含量が減少している可能性がある。

そこで、二酸化炭素分圧がどのようなメカニズムで BC 生産速度に影響しているのかを明らかにするため、通気中の二酸化炭素濃度を高めた空気を通気した培養実験における BC 生産速度と酸素消費速度及び ATP 含量を測定し、これらの関係を調べた。

5-2. 実験方法

5-2-1. ATP 測定方法

ATP 濃度は ATP 測定キット（マイクロテック・ニチオン）を用いて測定した。0.5g の培養液を氷冷した滅菌生理食塩水で 40ml に希釈後 Physcotron（NS-310E, マイクロテック・ニチオン）で 1 分間処理し分散させた。この希釈液 0.2ml に HEPES 緩衝液 0.2ml を加え、これを Auto Luminometer (NU-1422E, マイクロテック・ニチオン) で分析した。Auto Luminometer ではこれに フォスファターゼ阻害剤入りの ATP 放出試薬を 0.2ml 加え、60 秒後にルシフェラーゼ 0.2ml を加えて蛍光を 30 秒間積算して測定した。ATP 試薬を HEPES 緩衝液で希釈したものを標準液として用いた。こうして求められた培養液中の ATP 濃度を生菌数濃度で割った値を ATP 含量 ($\text{mg} \cdot \text{cell}^{-1}$) と定義した。ATP は菌体内にのみ存在し、ATP 放出試薬で完全に放出されたものとした。

5-2-2. その他の実験条件

培養装置、菌株、培養条件は第 4 章で述べた方法を用いた。実験に用いた 50

1 培養装置の構成を図 5-1 に示す。酸素移動速度は第 3 章に示した方法で計算した。

BC 生産及び酸素消費の速度は容積当りの速度と生菌当りの速度で示した。容積当りの速度を生菌数濃度で割った値を生菌当りの速度 (specific rate) と定義した。

5-3. 実験結果

5-3-1. バクテリアセルロース生産と生産菌の生育

二酸化炭素富化空気及び通常空気を通気した培養での BC 濃度、フラクトース濃度と生菌濃度を調べた。二酸化炭素富化空気を通気した培養中の二酸化炭素分圧は 0.15-0.20 atm で、通常空気の培養では 0-0.05 atm であった。図 5-2 に BC とフラクトース濃度 (A) と生菌濃度 (B) への二酸化炭素分圧の影響を示す。二酸化炭素富化空気を通気した培養の培養時間は通常空気の場合よりも長かった。0-12 時間の対数増殖期に測定した世代時間は二酸化炭素富化空気では 7.0 時間、通常空気では 3.6 時間であった。二酸化炭素富化空気では BC 濃度と生菌濃度が低かった。糖消費量が同じで BC 蓄積が低かったため、BC 収率も二酸化炭素富化空気では 24% と通常空気の 28% より低かった (表 5-1)。これらの結果から、二酸化炭素により BC の生産と菌の生育は遅延するだけでなく、抑制されていることが示された。

5-3-2. バクテリアセルロースの生産速度

図 5-3 に容積当りの BC 生産速度 (A) と生菌当りの BC 生産速度 (B) の経時変化を示す。容積当りの BC 生産速度は 21 時間まで増加し、21 時間に最大となり徐々に低下した。二酸化炭素富化空気を通気すると、容積当りの BC 生産速度は通常空気を通気したときよりも低かった。生菌当りの BC 生産速度は培養時間と共に減少したが、二酸化炭素富化空気を通気した場合の方が高い値を示した。これらの結果から、0.15-0.20 atm の二酸化炭素分圧により容積当りの BC 生産速度は低下するものの、生菌当りの BC 生産速度は向上することが示された。

5-3-3. 酸素消費速度、ATP 含量とバクテリアセルロース生産速度の関係

二酸化炭素分圧による生菌当りの BC 生産速度の向上を解析するため、生菌当りの酸素消費速度と ATP 含量を調べた。図 5-4 は二酸化炭素富化空気及び通常空気を通気して培養した場合の、生菌当りの酸素消費速度 (A) と菌体内の ATP 含量 (B) の経時変化を示す。生菌当りの酸素消費速度と菌体内の ATP 含量は共に、培養中に培養開始時の 1/10 にまで低下した。それらは通常空気の場合よりも二酸化炭素富化空気を通気したときに高かった。この結果は、酸素消費速度と ATP 含量は共に 0.15-0.20atm の二酸化炭素により高められることを示している。

酸素消費速度、ATP 含量と BC 生産速度の関係を解析するために、生菌当りの酸素消費速度 (A) と生菌当りの BC 生産速度 (B) を ATP 含量に対してプロットし

た結果を図 5-5 に示す。図 5-5 (A) に示すように ATP 含量は生菌当りの酸素消費速度に対して直線的に増加した。また、生菌当りの酸素消費速度に対する ATP 含量の比率は、通常空気の場合と二酸化炭素富化空気の場合で同じであった。この結果は、ATP 含量は生菌当りの酸素消費に比例し、この関係が二酸化炭素分圧により影響されないことを示している。一方、図 5-5 (B) に示すように生菌当りの BC 生産速度も ATP 含量とともに増加したが、直線的には増加しなかった。ATP 含量が高い条件では生菌当りの BC 生産速度の増加は小さかった。また、ATP 含量に対する生菌当りの BC 生産速度の比率は、通常空気の場合と二酸化炭素富化空気の場合で同じであった。したがって、生菌当りの酸素消費、ATP の含量及び生菌当りの BC 生産速度の関係は、0.15-0.20atm の二酸化炭素分圧に影響されないことになる。

5-4. 考察

二酸化炭素分圧の BC 生産速度への影響に関して、本章の結果(図 5-3)から 0.15-0.20atm の二酸化炭素分圧により容積当りの BC 生産速度は抑制されるものの、生菌当りの BC 生産速度は向上されることが示された。この結果は 0.15-0.20atm の二酸化炭素分圧による BC 生産速度の低下が BC 生合成の阻害ではなく、生菌濃度の低下、すなわち生産菌の生育抑制によるものであることを示しているが、二酸化炭素が生育を抑制する原因はわかっていない。一般には二酸化炭素は呼吸を阻害することにより生育を抑制すると考えられている(57,63)が、*Acetobacter* の場合、図 5-4 に示したように酸素消費速度や呼

吸により生成され则认为られる ATP 含量がともに 0.15-0.20atm の二酸化炭素分圧により高められていることから、呼吸は阻害されていないと认为られる。0.15-0.20atm の二酸化炭素分圧が *Acetobacter* の生育を抑制する機構についてはさらに研究が必要である。

BC の生産速度は菌濃度に依存し、生育の促進により向上すると報告されている (60)。この章で示した結果も 0.15-0.20atm の二酸化炭素分圧により容積当りの BC 生産速度は菌濃度の減少とともに低下しているので、その結果と合致するように見える。しかし、図 5-2 (B) に示したように 0.15-0.20atm の二酸化炭素分圧により生菌数は減少したものの、図 5-3 (B) に示したように生菌当りの BC 生産速度は向上したので、生菌当りの BC 生産速度は菌の生育には依存していないことになる。

さらに、図 4-5 (B) に示したように生菌当りの BC 生産速度は ATP 含量に依存した。従って、BC 生産速度は菌濃度だけでなく、各々の菌体内の ATP 含量にも依存していることになる。この BC 生産速度の ATP 含量への依存性は、BC 生産に ATP のような高エネルギー化合物を必要としているためと认为られる。また、ATP 生産を増強した変異株において菌体内の ATP 含量の増加し、BC の生産が促進されることが示唆されている (66)。セルロース合成の前駆体である UDP-glucose (6) の生成に高エネルギー化合物を必要とするためであろう。また、BC 生合成酵素を活性化させる c-di-GMP の生合成に高エネルギー化合物を必要とすることも影響している可能性がある。

次に、0.15-0.20 atm の二酸化炭素分圧により BC 収率が低下した原因について考察した。図 5-4 (B) に示したように、二酸化炭素富化空気の場合には通常空気の場合より菌体内の ATP 含量が高く維持されており、これが生菌当りの BC 生産速度を高めた原因と考えられる。一方、図 5-5 (A) に示したように、高い ATP 含量のためには高い酸素消費速度が必要であり、ATP が主に呼吸により生成されるとすると、酸素消費速度に比例して高い糖消費速度が必要になると考えられる。ところが、ATP 含量が高い培養区間においては ATP 含量に対する生菌当りの BC 生産速度の比率は低い。これは ATP 含量が高い培養区間において糖消費速度に対して BC 生産速度が低いことを意味している。BC 収率は糖消費速度に対する BC 生産速度の比率に等しいため、二酸化炭素富化空気の場合には BC 収率が低いことになる。言い換えると、高い二酸化炭素により過剰な ATP 生成に糖が必要以上に浪費された結果、BC 収率は低下したことになる。

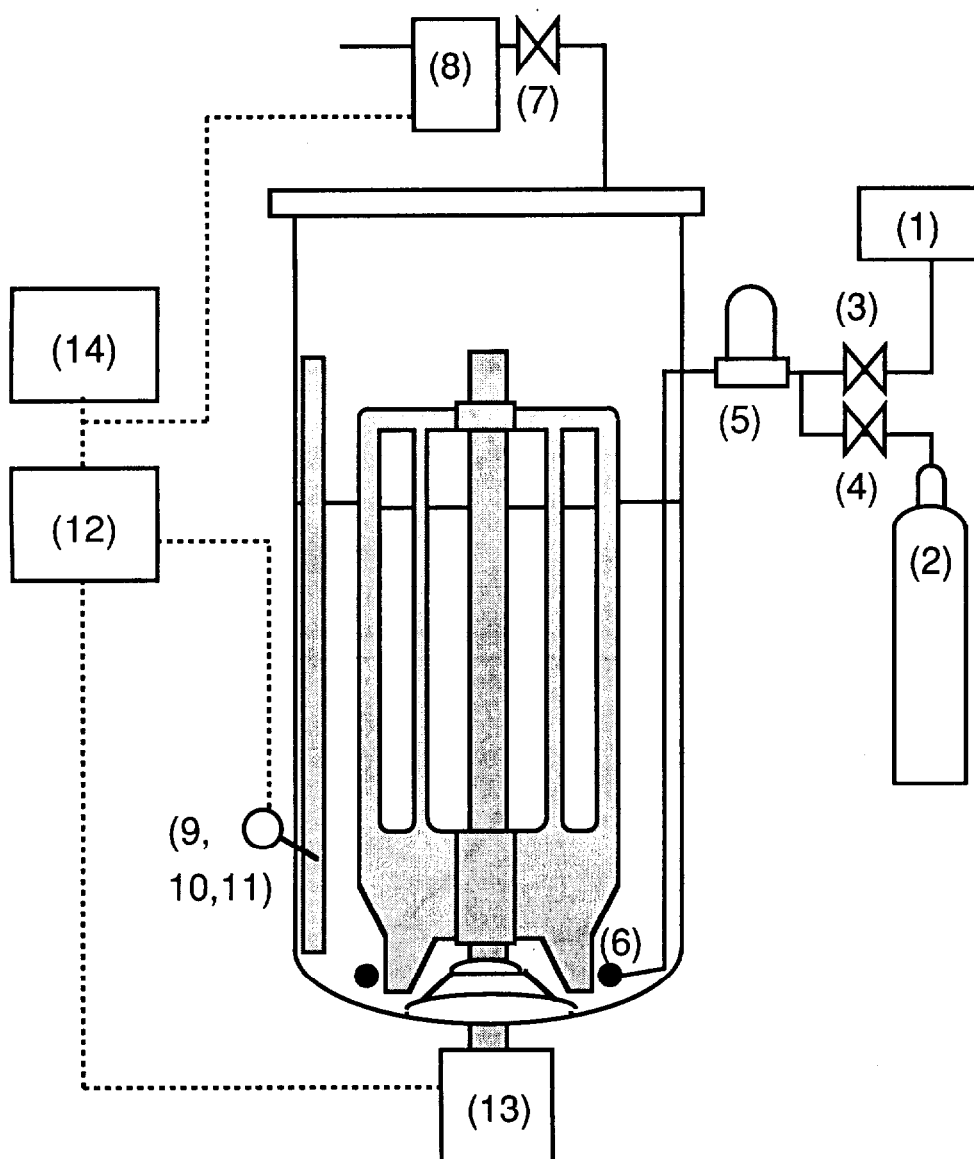


図 5-1 培養装置図

1、コンプレッサー；2、二酸化炭素ボンベ；3、通常空気の流量調整弁；4、二酸化炭素富化空気の流量調整弁；5、エアフィルター；6、スパージャー；7、排気弁；8、酸素二酸化炭素分析計；9、pH 電極；10、溶存酸素電極；11、熱電対；12、制御装置；13、インバーター付き攪拌モーター；
14、データ記録用ワークステーション

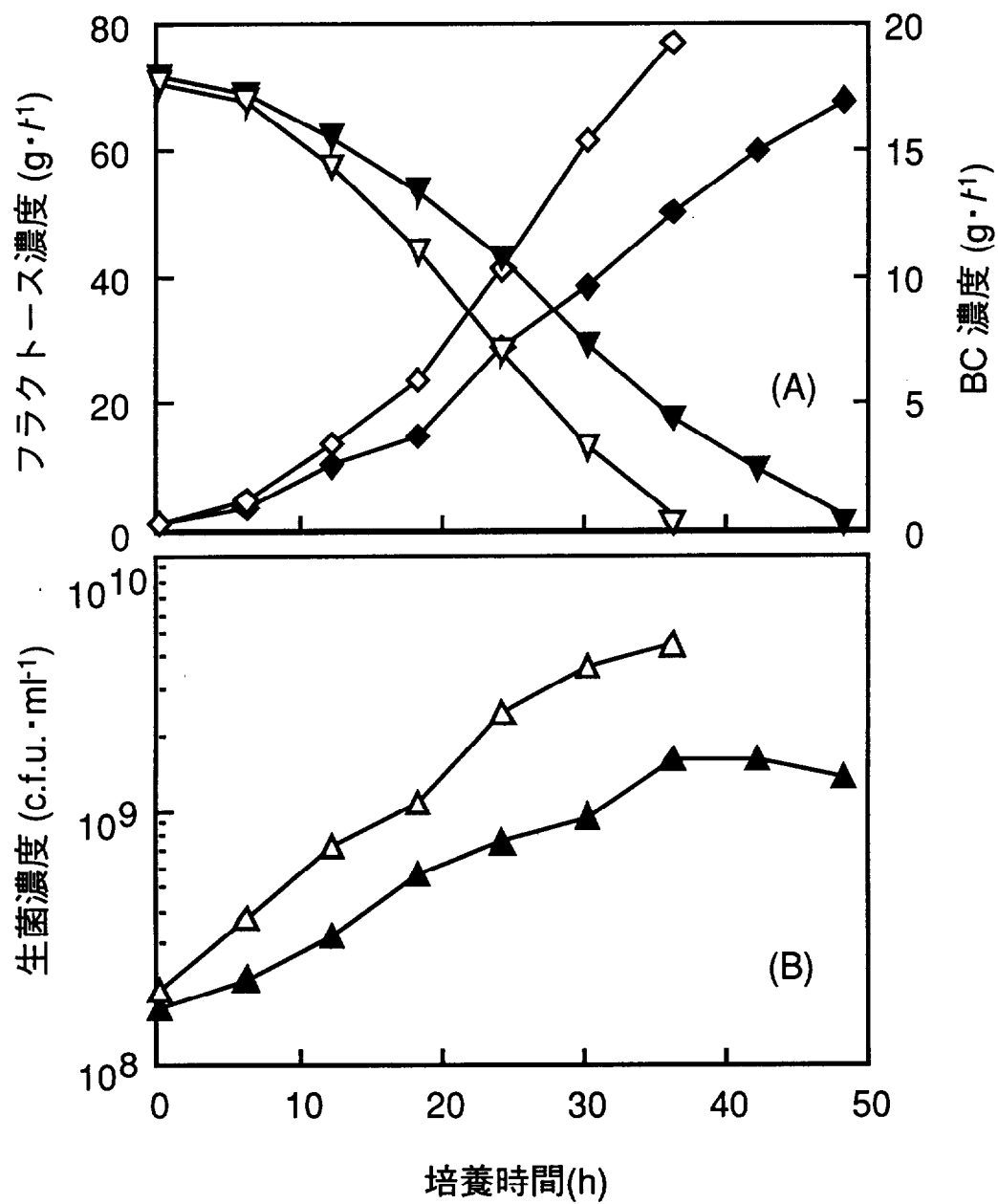


図 5-2 BC とフラクトース濃度 (A)、生菌濃度 (B) の経時変化

記号：◇, BC 濃度；▽, フラクトース濃度；△, 生菌濃度；

白, 通常空気；黒, 二酸化炭素富化空気

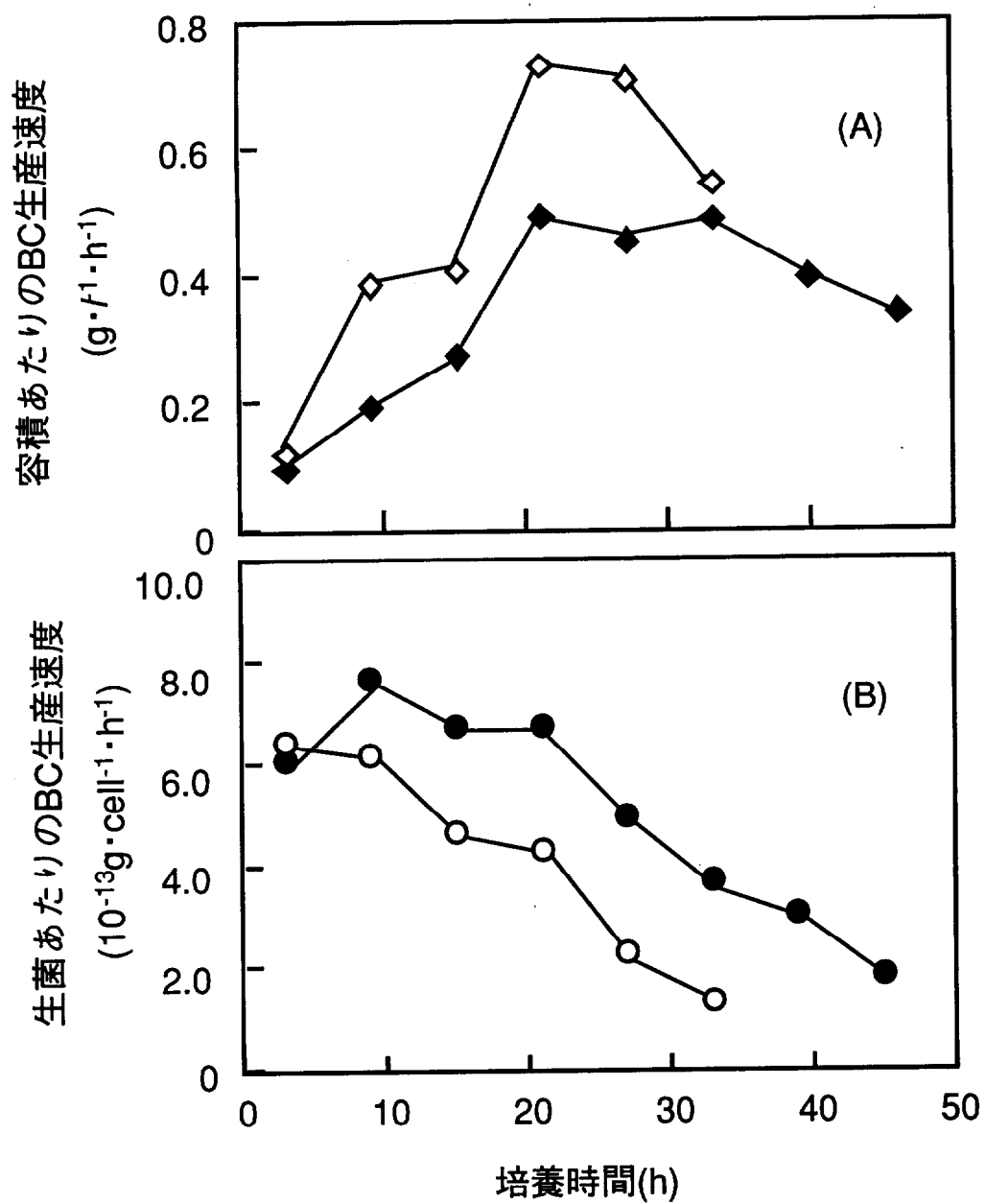


図.5-3 容積当りの BC 生産速度 (A) と生菌当りの BC 生産速度 (B)

記号：◇，容積当りの BC 生産速度；○，生菌当りの BC 生産速度；

白，通常空気；黒，二酸化炭素富化空気

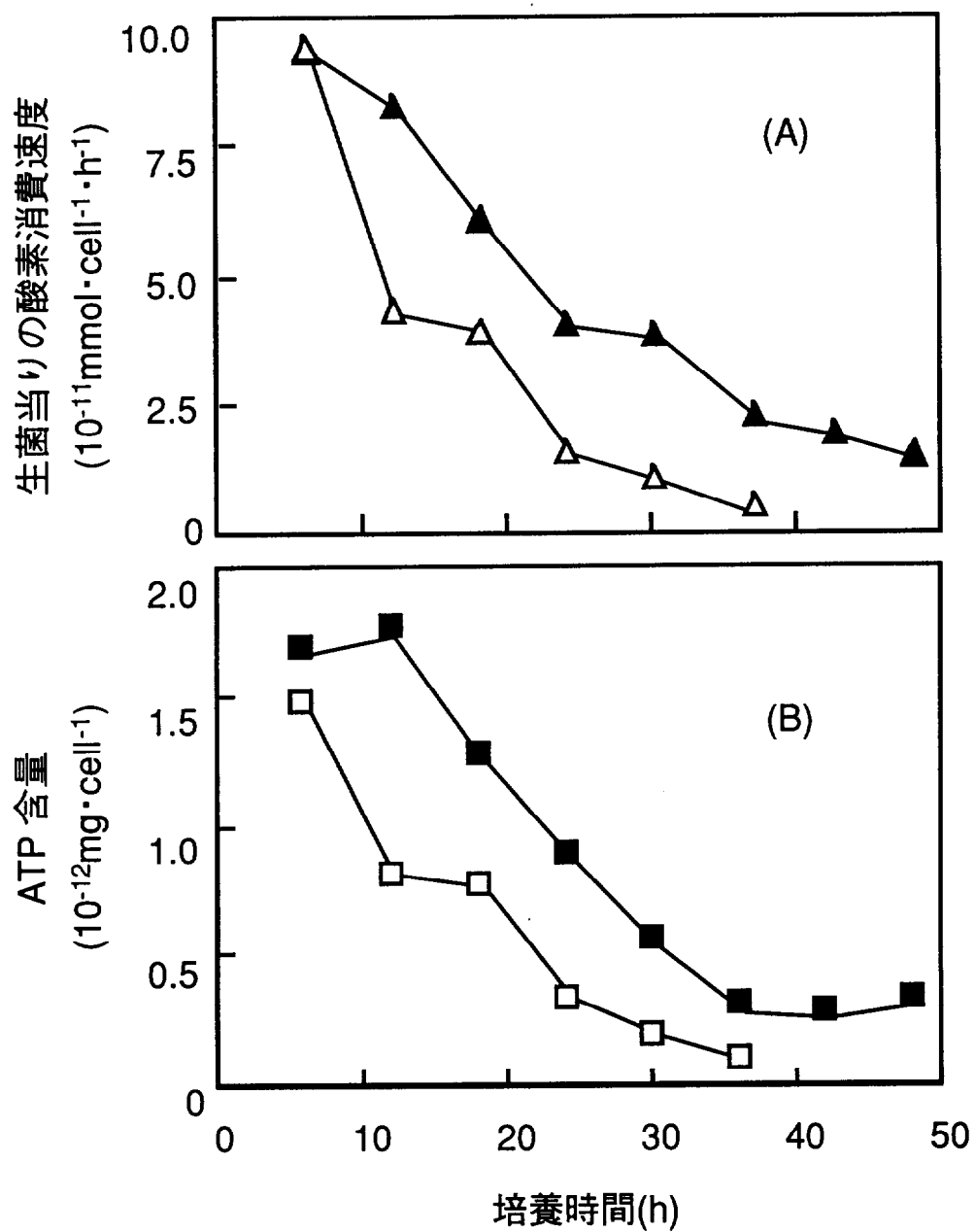


図5-4 生菌当りの酸素消費速度 (A) と ATP 含量 (B) の経時変化

記号：△，生菌当りの酸素消費速度；□，ATP 含量；

白，通常空気；黒，二酸化炭素富化空気

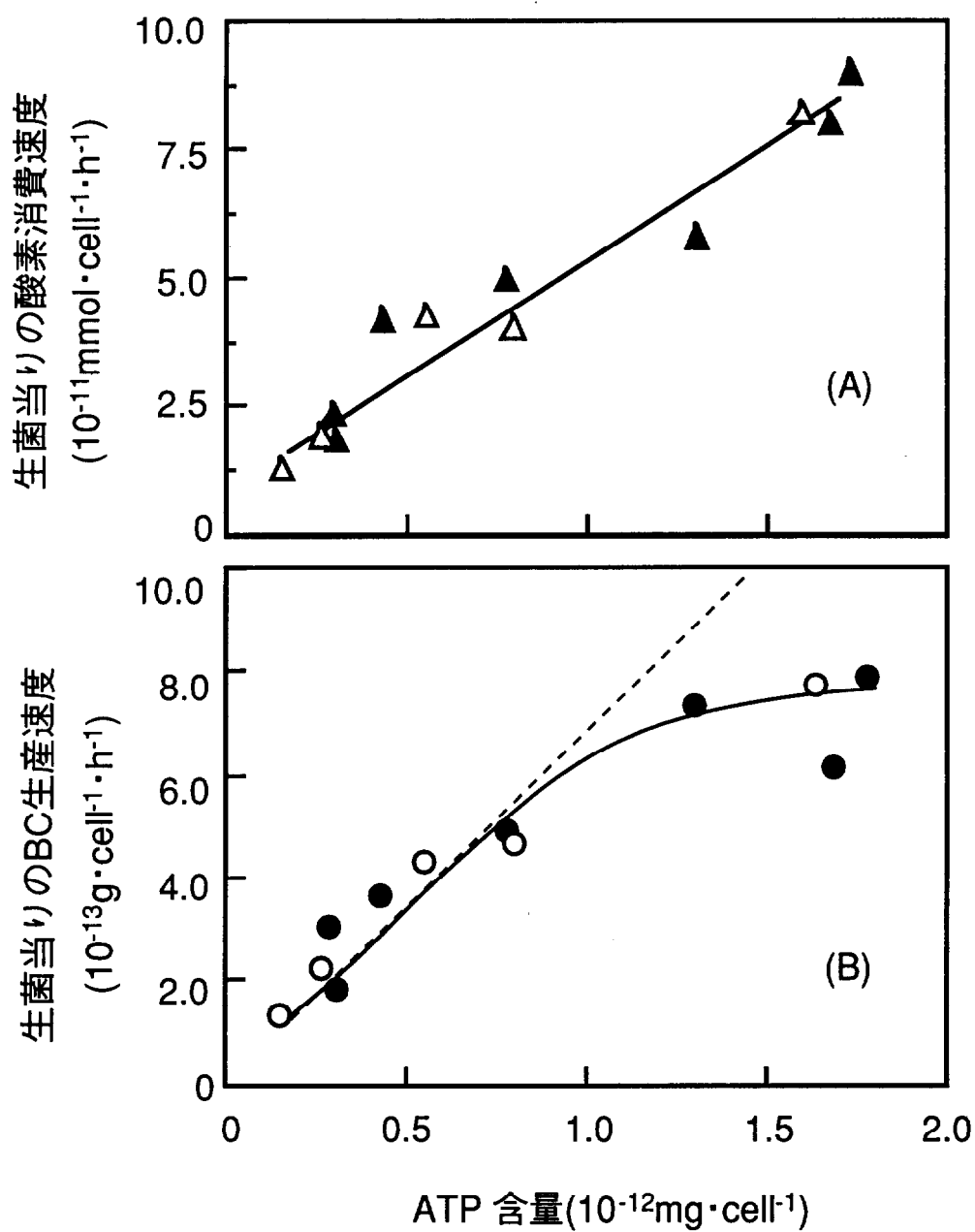


図 5-5 生菌当りの酸素消費速度 (A), 生菌当りの BC 生産速度 (B) と

ATP 含量の関係

記号: Δ , 生菌当りの酸素消費速度; $\circ$, 生菌当りの BC 生産速度;

白, 通常空気; 黒, 二酸化炭素富化空気

第 6 章 各章の概要と結論および今後の展望

6-1. 各章の概要と結論

本章では 5 章までの結果をまとめ、これより導かれる結論を述べると共に、本研究における今後の課題について述べる。

本論文の目的は、酢酸菌により生産され特徴的な物理化学的性質を有するために新素材として開発が期待されているバクテリアセルロースを工業的に生産するための培養プロセスを確立することにある。なお、培養には 3 l 及び 50 l 容の培養槽を、菌株は *Acetobacter xylinum* subsp. *sacrofermentans* BPR3001A 株を使用した。

以下に、各章の概要を述べる。

第 2 章では、通気攪拌培養槽における BC の混合特性を検討した。BC 培養の生産性に影響すると考えられる培養液の混合特性を評価するために、培養液とレオロジーに近い 1% BC 懸濁液の流動における pH 指示薬の脱色過程を画像解析装置で測定し、流動の特性を調べ、2% カルボキシメチルセルロース (CMC) 溶液の流動と比較した。CMC 溶液では測定した攪拌回転数の範囲内で均一に混合されたが、BC 懸濁液では 900 rpm 以下の低攪拌条件で部分的に混合が遅延したため混合は均一でなかった。BC 懸濁液における低攪拌条件での混合の不均一性は、剪断速度の低下と共に粘度が大きくなる非ニュートン性を示すレオロジーが原因であると考えられる。

第 3 章では、BC の培養における生産性を向上するため、攪拌羽根の形状を検討した。BC 培養液は非ニュートン性を示す高粘度液になるため、均一には混合しがたい。1% BC 懸濁液における均一な混合と高い K_La を指標に攪拌羽根を選定し、培養実験で生産性を評価した。培養における BC 生産速度と BC 収率は混合が良好で K_La が大きくなるような攪拌羽根を備えた場合に高くなった。タービン付き門型羽根と Maxblend は小さな攪拌所要動力で K_La を大きくすることができ、static gassing out 法で測定された K_La は培養中の最大酸素消費速度及び排ガス法で測定した K_La に比例した。よって、(1)BC の通気攪拌培養にはタービン付き門型羽根と Maxblend が適している、(2) BC 生産速度と BC 収率は K_La と酸素消費速度に依存する、(3) static gassing out 法で測定した K_La は攪拌条件と攪拌羽根形状を評価するのに有効である、と結論した。

第 4 章では、通気攪拌培養における酸素供給の効率を向上するため、酸素分圧と二酸化炭素分圧の影響を調べた。高濃度酸素の添加、或いは内圧を高くすることにより酸素分圧を高くすると、酸素を充足させるのに必要な攪拌所要動力を低く抑えることができた。しかし、高濃度酸素を添加した場合には BC 生産速度は低下しなかったものの、内圧を高くすると BC 生産速度は低くなった。BC 生産速度の低下は通気量を上げることによる換気効果で解除され、通気中の二酸化炭素濃度を高くした培養において BC 生産速度が低下したことから、高い内圧による生産速度の低下は、内圧により上昇した二酸化炭素分圧によるものであると結論した。

第 5 章では、BC 生産に対する二酸化炭素分圧の阻害作用を解析するため、50 l ジャーで 10% (v/v) の二酸化炭素を含む空気を通気して培養し、BC 濃度と酸素消費速度、生菌濃度及び ATP 含量を測定した。高い二酸化炭素分圧 (0.15-0.20 atm) により容積当りの BC 生産速度及び生菌濃度は低下し、BC 収率も低下した。しかし、培養経時で比較した生菌当りの酸素消費速度と ATP 含量は高く、生菌当りの BC 生産速度も高かった。すなわち、二酸化炭素分圧による BC 生産速度の低下は、BC 生合成の阻害ではなく生菌数の減少によるものである。また、二酸化炭素分圧は生菌当りの酸素消費速度、ATP 含量及び生菌当りの BC 生産速度の相互の関係に影響しなかった。BC 収率の低下は、基質である糖が高い二酸化炭素分圧による過剰な ATP 生成に浪費されたためと考えられる。

各章の結果より以下に示す結論が得られ、通気攪拌培養法により BC を工業的に生産する基本的培養プロセスが構築できた。

- (i) 非ニュートン性の高粘度液となる BC 培養液の混合は、その特徴的なレオロジーのため、同じく非ニュートン性となる CMC 溶液と比較して不均一になりやすく、部分的な混合の遅れ (混合遅れ時間) が大きかった。
- (ii) BC 培養にはタービン付き門型羽根と Maxblend が適していた。これらの攪拌羽根では混合が均一になり易く、高い K_La が得られるからである。BC の生産速度と収率は、 K_La ・酸素移動速度に依存した。
- (iii) BC 培養において、酸素充足に必要な攪拌所要動力は気相中の酸素分圧を高めることで低減できた。ただし、内圧を上げると二酸化炭素分圧の上昇に

より BC 生産速度は低下した。

- (iv) 高い二酸化炭素分圧による BC 生産速度の低下は BC 生合成が阻害されるためでなく、生産菌の生育が阻害されるためであった。また、生菌当りの BC 生産速度は菌体内の ATP 含量に依存し、この関係は二酸化炭素分圧の影響を受けなかった。

6-2. 今後の展望

本研究において、BC を工業的に生産する基本的培養プロセスが構築できたが、工業生産における生産性や製品としての BC の付加価値を高めるためには、以下に述べるような研究が重要であろうと考える。

6-2-1. スケールアップ

工業規模において高い生産性で BC を大量に生産するには、求められる装置性能を満たした装置の設計が必要である。BC 培養においては BC 生産速度と BC 収率は酸素消費速度に依存するため、 K_La が重要な設計指標となる。ただし、全体の均一な混合は必要条件であり、部分的に混合が遅延するとその部分で酸素移動速度が低下し、結果的に生産性も低下すると考えられる。しかしながら、非ニュートン性の高粘度培養液の場合、工業規模の装置でどのような流動状態になるかは予測できない。一般には Metzner, A. B. and Otto, R.E. (42) の方法に従い、ニュートン流体との比較により攪拌羽根の特性値 (K) を定めて作成する動力線図からスケールアップでの攪拌所要動力と流動状態を予測するが、

この方法を BC 培養へ適用できるかどうか検討が必要である。

攪拌所要動力と混合状態の関係は第 3 章で検討されているが、非ニュートン性の高粘度液になる BC 通気攪拌培養液では、スケールアップにより同等の攪拌所要動力でも混合状態が変化する可能性がある。第 4, 5 章の実験に用いた 50 l 培養装置と幾何学的に相似形の 1000 l 培養装置を用いて培養での攪拌所要動力と生産性を比較した。両者において、攪拌所要動力と生産性は同等であった。従って、50 l ジャーから 1000 l ジャーへのスケールアップにおいては、混合や酸素移動に及ぼす流動状態と攪拌所要動力との関係は、生産性に影響するほどには変化していないと考えられる。ただし、細部における混合の状態は比較していない。50 l ジャーに比べ 1000 l ジャーでは攪拌羽根の周速度は高くなっているものの、攪拌羽根と槽壁との距離は大きくなっているため槽壁付近での混合状態は低下している可能性もあるが、確認されていない。

生産規模の設備へのスケールアップでは、設備の大型化や多大なエネルギー消費を避けるため、より小さな攪拌所要動力で高い生産性の得られる攪拌条件を検討すべきである。第 2 章で考察したように攪拌所要動力と $K_L a$ の関係は培養液の性状と攪拌羽根の形状により変化すると考えられる。生産規模の設備においては目的とする生産性に対し、必要な混合状態が得られ、攪拌所要動力に対する酸素移動の効率の高い攪拌羽根の形状を選択する必要がある。このためにも、スケールアップでの攪拌所要動力と流動状態を予測する手法が必要になる。

一方、数値計算により攪拌所要動力と流動状態を予測する方法(67)が研究されている。この方法は低粘度のニュートン流体では工業的にも適用されている

が、高粘度の非ニュートン流体、しかも通気条件においてはこれまでに報告はない。BC 培養液でも数値計算により流動状態を予測しうるか検討するため、予備的に計算すると共に検証を試みたが、計算値と実測値との間には大きな隔たりがあった。この原因には、レオロジーの設定の難しさ、計算式と計算機的能力不足、及び培養液中で生成する大きな気泡が影響している可能性がある。この検討の結果を付録に添付した。

このうち、レオロジーの測定方法については以下のような課題がある。高粘度の通気攪拌培養において流動や物質移動の状態を数値計算で予測するためにはレオロジーを正確にあらわす必要がある。現時点では回転粘度計を用いた定常流での静的な測定が一般的ではあるが、繊維状の菌体または生産物を含む系においては構造変化を避けるため、動的な測定が不可欠である。ただし、培養液のような複雑な系の動的な測定結果を解析する方法は確立されていない。今後はまず、培養液中の BC をマクロ及びミクロに観察し、特徴的な構造変化を動的なレオロジーと比較、検討することが重要であろう。

6-2-2. バクテリアセルロース生産のモデル化

本研究では BC 生産速度が酸素消費速度及び菌体内の ATP 含量に依存することを示したが、菌体内での代謝に関する研究は充分ではない。今後、BC の生合成や基質である糖の取り込みに関わる代謝経路など生化学的な研究を進め、BC 生産をモデル化して量論的な解析を行うことにより、生産性を向上できる可能性がある。さらに、BC 生産のモデルを流動状態の予測から推定される槽内での基

質及び酸素濃度の分布と組み合わせることにより、スケールアップでの生産性を予測するとともに生産性向上のための課題を明確化にできると考えられる。

6-2-3. 攪拌所要動力の低減

本研究における攪拌羽根形状や酸素分圧に関する研究の結果、比較的低い攪拌所要動力で高い生産性を得ることのできる通気攪拌培養方法が確立されたが、その攪拌所要動力は一般の発酵工業のレベルより高いため、工業規模での生産においてはさらに動力を低減することが望まれる。これに対するひとつの可能性が連続培養法 (E, F) であろう。連続培養法では、比較的低い BC 濃度でも高い生産速度で培養できるため、攪拌所要動力を低減できる可能性がある。もうひとつの可能性はエアリフト型培養装置 (G) である。この装置は通気により混合と酸素供給を行うため、攪拌所要動力は不要になる。また、攪拌機を必要としない通気攪拌培養法より大規模で生産できる可能性がある。ただし、高粘度液の場合、通気だけで十分な混合と酸素供給が達成できるかどうか検討し、培養条件を最適化する必要がある。

6-2-4. バクテリアセルロースの物性に及ぼす影響

本研究では生産性を BC 生産速度と BC 収率の観点からとらえてきたが、工業製品としての付加価値を高めようとした場合、生産物の物理化学的特性が重要になる。これまでに、BC のシートの剛性に関係する重合度については培養方法や条件が影響することが知られている (33, 34) が、その他、攪拌による剪断な

どで μ オーダーの構造が変化することも観察されている。BC の工業化には、培養中のどのような作用により構造が変化するのか、そのような構造の変化が BC のどのような物理化学的性質に影響するのか、研究することが必要と考えられる。

参考文献

1. **Yoshinaga, F., Tonouchi, N., and Watanabe, K.** : Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 219-224 (1997).
2. **Ross, P., Mayer, R., and Benziman, M.** : Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.*, **55**, 35-58 (1991).
3. **Brown, A. J.** : On acetic fermentation which forms cellulose. *J. Chem. Soc. Lond.*, **49**, 432-439 (1886).
4. **Byron, D.** : Microbial cellulose in "Biomaterials", ed. by Byron, D., p.263-284, Stockton press (1991)
5. **Delmer, D.P.** : Cellulose biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **38**, 259-290 (1987).
6. **Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohara, P., et al** : Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanilic acid. *Nature*, **325**, 279-281 (1987).
7. **Haigler, C. H. and Benziman, M.** : Biogenesis of cellulose I microfibrils occurs by cell-directed self-assembly in *Acetobacter xylinum*. in "cellulose and other natural polymer systems", ed. Brown, R. M. Jr., p.273-297, Plenum NY (1982).
8. **Brown, R. M., Jr., Willison, J. H. M., and Richardson, C. L.** : Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum* : Visualization of the site of synthesis and direct

- measurement of the in vivo process. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **73**, 4565-4569 (1976).
9. **Zaar, K.:** Visualization of pores (export sites) correlated with cellulose production in the envelope of the gram-negative bacteria *Acetobacter xylinum*. J. Cell Biol., **80**, 773-777 (1979).
 10. **Saxena, I. M. and Brown, R. M., Jr.:** Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: A genetic approach in "Cellulose and wood: Chemistry and technology. ed. by Schuerch, C., p.537-557., Wiley, New York (1989).
 11. **Valla, S., Coucheron, D. H., Fjaervik, E., Kjosbakken, J., Weinhouse, H., Ross, P., Amikam, D., and Benziman, M.:** Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: complementation of cellulose-negative mutants by the UDPG pyrophosphorylase structure gene. Mol. Gen. Genet., **217**, 26-30 (1987).
 12. **French, A.D.:** Physical and theoretical methods for determining the supermolecular structure of cellulose. In "Cellulose chemistry and its application", ed. by Horwood, p.84-111, Chichester UK (1985).
 13. **Nishi, Y., Uryu, M., Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., and Mitsunashi, S.:** The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. J. Mater. Sci., **25**, 2997- (1990).
 14. **Yamanaka, S. and Watanabe, K.:** Applications of bacterial

- cellulose in "Cellulosic polymers, blends and composites",
ed. by Gilbert, R. D., p.207-215, Carl Hanser Verlag (1994).
- 15.火置 信也,堀 禎憲,渡部乙比古,森永 康,吉永 文弘,日比野 良彦,小倉 利允: バクテリアセルロースの紙添加剤としての特性、紙パ技協誌, **49**, 718-723 (1995).
- 16.Ougiya, H., Watanabe, K., Morinaga, Y., and Yoshinaga, F.: Emulsion-stabilizing effect of bacterial cellulose. Biosci. Biotech. Biochem., **61**, 1541-1545 (1997).
- 17.Yoshino, T., Asakura, T., and Toda, K. : Cellulose production by *Acetobacter pasteurianus* on silicone membrane. J. Ferment. Bioeng., **81**, 32-36 (1996).
18. Dudman, W. F.: Cellulose production by *Acetobacter* strains in submerged culture. J. Gen. Microbiol., **22**, 25-30 (1956).
19. Hestrin, S. and Schramm, M.: Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Biochemical J., **58**, 345-352 (1954).
20. Schramm, M. and Hestrin, S.: Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of *Acetobacter xylinum*. J. Gen. Microbiol., **11**, 123-129 (1954).
- 21.Watanabe, K. and Yamanaka, S.: Effect of oxygen tension in the gaseous phase on production and physical properties of bacterial cellulose formed under static culture condition. Biosci. Biotech. Biochem., **59**, 65-68 (1995).
- 22.Coucheron, D. H.: An *Actobacter xylinum* insertion sequence element associated with inactivation of cellulose production., J. Bacterol., **173**, 5723-5731 (1991).

23. **P.F.Stanbury, A. Whitaker**, 発酵工学の基礎、学会出版センター (1984).
24. **Toyosaki, H., Naritomi, T., Seto, A., Matsuoka, M., Tsuchida, T., and Yoshinaga, F.**: Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for agitated culture. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1498-1502 (1995).
25. **Toyosaki, H., Kojima, Y., Tsuchida, T., Hoshino, K., Yamada, Y., and Yoshinaga, F.**: The characterization of an acetic acid bacterium useful for producing bacterial cellulose on agitation cultures: the proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans* subsp. nov.. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **41**, 307-314 (1995).
26. **Ishikawa, A., Matsuoka, M., Tsuchida, T., and Yoshinaga, F.** : Increase in cellulose production by sulfaguanidine-resistant mutants derived from *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2259-2262 (1995).
27. **Takemura, H., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Matsushita, K., and Adachi, O.**: Prosthetic group of aldehyde dehydrogenase in acetic acid bacteria not pyrroloquinoline quinone. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2082-2083 (1994).
28. 竹村 浩ほか: セルロース生産菌 *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR2001 からのビンガム性多糖副生変異株の育種、日

本農芸化学会大会講演要旨集 p.288(1996).

29. **Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Horinouchi, S., and T.Beppu,** : A host-vector system for a cellulose-producing *Acetobacter* strain. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1899-1901 (1994).
30. **Matsuoka, M., Tsuchida, T., Matsushita, K., Adachi, O., and Yoshinaga, F.** : A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sacrofermentans*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 575-579 (1996).
31. **Tonouchi, N., Tahara, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Beppu, T., and Horinouchi, S.**: Addition of a small amount of an endoglucanase enhance cellulose production by *Acetobacter xylinum*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 805-808 (1995).
32. 田渕 真理ほか: バクテリアセルロースの重合度分布. 日本高分子学会講演要旨集, p.668(1994).
33. **Tahara N., Yano, H., and Yoshinaga, F.**: Two type of cellulase activity produced by a cellulose-producing *Acetobacter* strain. *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 389-392 (1997).
34. **Tahara, N., Tabuchi, M., Watanabe, K., Yano, H., Morinaga, Y., and Yoshinaga, F.**: Degree of polymerization of cellulose from *Acetobacter xylinum* BPR2001 decreased by cellulase produced by the strain. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1862-1865 (1997).

35. **Lapasin, R., Pricl, S., Bertocchi, C., Navarini L., Cesaro, A., and Philippis, R.:** Rheology of culture broths and exopolysaccharide of *Cyanospira capsulata* at different stages of growth. Carbohydrate Polymers, **17**, 1-10 (1992).
36. **Olsvik, E. S. and Kristiansen, B.:** On-line rheological measurements and control in fungal fermentation. Biotechnol. Bioeng., **40**, 375-387 (1992).
37. **Metz, B., Kossen, N. W. F., and Van Suijdam, J. C.:** Rheology of mould suspension. Adv. in Biochem. Eng., **11**, 103-156 (1979).
38. **Casson, N.:** Rheology of disperse systems. Pergamon Press, Oxford (1959).
39. **Pedersen, A.G., Nielsen, M.B., Nielsen, J., and Villadsen, J.:** Rheological characterization of media containing *Penicillium chrysogenum*. Biotechnol. Bioeng., **41**, 162-164 (1993).
40. **Nienow, A. W.:** Agitators for mycelial fermentation. Trends Biotechnol., **8**, 224-233 (1990).
41. **Saito, F. and Kamiwano, M.:** An extended technique for predicting the mixing times of highly viscous liquid in a mixer mixing systems with molecular diffusion of solute and reaction of solute. J. Chem. Eng. Jap., **23**, 222-227 (1989).
42. **Metzner, A. B. and Otto, R.E.:** Agitation of non-Newtonian fluids. AIChE J., **3**, 3-10 (1957).
43. **Funahashi, H., Harada, H., Taguchi, H., and Yoshida,**

- T. :** Circulation time distribution and volume of mixing regions in highly viscous xanthan gum in a stirred vessel. J. Chem. Eng. Japan, **20**, 277-282 (1987).
44. **Carreau, P.J., Patterson, I., and Yap, C.Y.:** Mixing of viscoelastic fluids with helical ribbon agitators. Can. J. Chem. Eng., **54**, 135-142 (1976).
45. **Buckland, B. C. , Gbewonyo, K., DiMasi, D., Hunt, G., Westerfield, G., and Nienow, A.W.:** Improved performance in viscous mycelial fermentation by agitator retrofitting. Biotechnol. Bioeng., **31**, 737-742 (1988).
46. **Galindo, E. and Nienow, A. W. :** Mixing of highly viscous simulated xanthan fermentation broths with Lightnin A-315 impeller. Biotechnol. Prog., **8**, 233-239 (1992).
47. **Mesa, M. M., Caro, I., and Cantero, D.:** Viability reduction of *Acetobacter aceti* due to the absence of oxygen in submerged cultures. Biotechnol. Prog., **12**, 709-712 (1996).
48. **Riet, K. V. :** Review of measuring methods and results in non-viscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels. Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev., **18**, 357-364 (1979).
49. **Tuffile, C. M. and Pinho, F. :** Determination of oxygen transfer coefficients in viscous streptomycete fermentations. Biotechnol. Bioeng., **12**, 849-871 (1970).
50. **Heijnen, J. J., Riet, K. V., and Wolthuis, A. J. :** Influence of very small bubbles on the dynamic $K_L a$ measurement in viscous gas-liquid system. Biotechnol. Bioeng. **22**,

1945-1956 (1980).

51. 上和野 満雄ほか:混合・攪拌, p. 104-123. 化学プロセス機器設計・操作のためのデータの取り方使い方, 化学工学社 (1970).
52. **Godleski, E. S. and Smith, J. C.:** Power requirements and blend times in the agitation of pseudoplastic fluids. *AIChE J.*, **8**, 617-620 (1962).
53. **Linek, V., Vacek, V., and Benes, P.:** A critical review and experimental verification of the correct use of the dynamic method for the determination of oxygen transfer in aerated agitated vessels to water, electrolyte solutions and viscous liquids. *Chem. Eng. J.*, **34**, 11-34 (1987).
54. **Vlaev, S. D. and Valeva, M.:** Rheology and oxygen transfer in starch suspensions during high temperature (35°C) α -amylase fermentation. **44**, B51-B55 (1990).
55. **Yabannavar, V., Singh, V., and Schaefer, E.:** Effect of pressure on aminoglycoside fermentation mediated by dissolved oxygen. *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 66-69 (1992).
56. **Dufresce, D., Tubault, J., Leduy, A., and Lencki, R.:** The effect of pressure on the growth of *Aureobasidium pullulans* and the synthesis of pullulan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 526-532 (1990).
57. **Gill, C. O. and Tan, K. H.:** Effect of carbon dioxide on growth of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 237-40 (1979).

58. **Akashi, K., Shibai, H., and Hirose, Y.:** Inhibitory effects of carbon dioxide and oxygen in amino acid fermentation. *J. Ferment. Technol.*, **57**, 317-320 (1979).
59. 豊崎 宏ほか: 溶存酸素濃度制御によるバクテリアセルロース生産収率の向上、日本農芸化学会大会講演要旨集, p.334(1997).
60. **Marx-Figini, M. and Pion, B. G.:** Kinetics investigation on biosynthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **338**, 382-393 (1974).
61. **Funahashi, H., Maehara, M., Taguchi, H., and Yoshida, T.:** Effects of agitation by flat-bladed turbine impeller on microbial production of xanthan gum. *J. Chem. Eng. Japan*, **20**, 16-22 (1987).
62. **Jones, R. P. and Greenfield, P. F.:** Effects of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 210-223 (1992).
63. **King, A. D. Jr. and Nagel, C. W.:** Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Food Sci.*, **40**, 362-366 (1975).
64. **Jarman, T. R. and Pace, G. W.:** Energy requirements for microbial exopolysaccharide synthesis. *Arch. Microbiol.*, **137**, 231-235 (1984).
65. **Linton, J. D.:** The relationship between metabolite production and the growth efficiency of the producing organism., *FEMS Microbiol. Rev.*, **75**, 1-18 (1990).

- 66.石川 篤ほか：サルファグアニジン耐性とバクテリアセルロース生産性の関係についての解析、日本農芸化学会大会講演要旨集，p.284(1996)。
- 67.**Bird, R. B.:** The equations of change for isothermal systems in "Transport phenomena", Wiley international edition.

本論文に関連する研究論文

- A. **Kouda, T., Yano, H., Yoshinaga, F., Kaminoyama, M. and Kamiwano M. :** Characterization of non-Newtonian behavior during mixing of bacterial cellulose in a bioreactor. J. Ferment. Bioeng., **82**, 382-386 (1996).
- B. **Kouda, T., Yano, H., and Yoshinaga, F.:** Effect of agitator configuration on bacterial cellulose productivity in aerated and agitated culture. J. Ferment. Bioeng., **83**, 371-376 (1997).
- C. **Kouda, T., Naritomi, T., Yano, H., and Yoshinaga, F. :** Effects of oxygen and carbon dioxide pressures on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in aerated and agitated culture. J. Ferment. Bioeng., **84**, 113-116 (1997).
- D. **Kouda, T., Naritomi, T., Yano, H., and Yoshinaga, F. :** Inhibitory effect of carbon dioxide on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in agitated culture. J. Ferment. Bioeng.**85**, 318-321(1998).

以下、共著論文

- E. **Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., and Yoshinaga, F.** :Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. J. Ferment. Bioeng., **85**, 89-95 (1998).
- F. **Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., and Yoshinaga, F.** :Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. J. Ferment. Bioeng., inpress.
- G. **Chao, Y.-p. Sugano, Y., Kouda, T., Yoshinaga, F., and Shoda, M.** : Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* with an air-lift reactor. Biotechnol. Techniq., **11**, 829-832 (1997).

本論文に関連する学会発表

1. 幸田 徹、矢野 壽人、吉永 文弘、上ノ山 周、上和野 満雄 : バクテリアセルロース通気攪拌培養液の塑性流動特性、化学工学会大会(1995)。
2. 幸田 徹、矢野 壽人、吉永 文弘 : バクテリアセルロースの通気攪拌培養において培養装置の混合特性・酸素供給能力が生産性に及ぼす影響、農芸化学学会大会(1996)。
3. 幸田 徹、成富 隆昭、矢野 壽人、吉永 文弘 : バクテリアセルロースの通気攪拌培養における酸素供給方法の検討、生物工学会大会(1996)。
4. 成富 隆昭、窪田 みち、幸田 徹、矢野 壽人、吉永 文弘 : 連続培養によるバクテリアセルロース生産、生物工学会大会(1996)。

5. 成富 隆昭、幸田 徹、矢野 壽人、吉永 文弘：連続培養によるバクテリアセルロース生産におけるエタノールの影響、農芸化学会大会(1997)。
6. 豊崎、小島、幸田、土田、吉永：溶存酸素濃度制御によるバクテリアセルロース生産収率の向上、農芸化学会大会(1997)。
7. **Tohru Kouda, Takaaki Naritomi, Hisato Yano, and Fumihiko Yoshinaga** :Mixing and oxygen transfer on bacterial cellulose production in agitated culture, European congress on biotechnology(ECB8), Hungary(1997)。
8. **Takaaki Naritomi, Tohru Kouda, Hisato Yano, and Fumihiko Yoshinaga** : Bacterial cellulose production in continuous culture, European congress on biotechnology(ECB8), Hungary(1997)。
9. 幸田 徹、吉永 文弘：バクテリアセルロースの培養工学とその特性、第38回酵素工学会研究会講演会(1997)。
10. 幸田 徹、成富 隆昭、矢野 壽人、吉永 文弘：バクテリアセルロース生産に対する二酸化炭素の阻害作用、生物工学会大会(1997)。
11. 趙 雅蘋、菅野 靖史、幸田 徹、吉永 文弘、正田 誠：エアリフト型リアクターによるバクテリアセルロースの生産特性、生物工学会大会(1997)。

謝辞

本研究に関して、重要な示唆をいただくとともに常に励ましてくださった、バイオポリマー・リサーチ研究所長 吉永 文弘様と前社長 明石 武和様に感謝いたします。また、研究の推進に協力をいただいた、バイオポリマー・リサーチ 矢野 壽人様、成富 隆昭様、久米 協様、山下 義男様、窪田 みち様、他皆様に感謝いたします。

本研究を完成させるため、常にご助言をいただくとともに論文を批評していただいた資源化学研究所 教授 正田 誠様と、ご助言をいただいた同研究室助手 菅野 靖史様 他、正田研究室の皆様には感謝いたします。

また、本論文の攪拌及び混合の研究において重要な示唆をいただいた横浜国立大学工学部物質工学科 教授 上和野 満雄様と助教授 上ノ山 周様に感謝いたします。

さらに、本論文の審査を担当していただいた、資源化学研究所 教授 仲 勇二様、大学院総合理工学研究科化学環境工学専攻 教授 中野 義夫様、工学部化学工学科 教授 太田口 和久様、資源化学研究所 助教授 阿野 貴司様に感謝いたします。

最後に、論文の作成にあたり支援してくれた家族に感謝します。

付録

数値計算によるバクテリアセルロース培養液の流動状態の予測と検証

要旨

バクテリアセルロースの通気攪拌培養をスケールアップする場合には、培養液の非ニュートン性により混合が不均一になりやすいため、細部の流動状態を予測することが重要である。本研究ではまだ研究段階にある数値計算による流動状態の予測がどの程度有効なのかを検討するために、数値計算による流動状態を 50L ジャーでの実測値と比較することにより、計算結果の妥当性を評価した。流動状態は Maxblend 羽根を備えた 50L 培養槽での水及び 2%の BC を含む培養液で計算及び実測し、攪拌所要動力と 3 次元電磁流速計で測定した流速で比較した。

水の場合には数値計算で予測された流動状態と実測値はほぼ一致したが、BC 培養液の場合には一致しなかった。この原因として、1. 計算でレオロジーの設定が不十分なこと、2. 計算で定常状態が達成されていないこと、3. 大きな気泡の存在を実測及び計算できないこと、が考えられる。

生産設備スケールでの流動状態を予測するには、レオロジーの異なる他の流体との比較から BC 培養液のレオロジーの流動への影響を明らかにすること、計算機能力の向上、気泡の大きさの分布を実測する方法及び計算できるソフトウェアが必要である。

1. 緒言

バクテリアセルロース（以下、BC）の通気攪拌培養において槽内の流動性が悪く混合が不均一な状態での生産性は低い。本論文の第 3 章で述べたタービン付き門型羽根や Maxblend 羽根では混合状態が改善され生産性は向上したが、一般に非ニュートン性の高粘度液においてはスケールアップに伴う混合状態の変化が大きいと言われている。本論文では第 2 章に述べたように非ニュートン性の高粘度液に特有の混合の不均一性を定量的に示したが、BC 培養のスケールアップにおける混合状態を予測するためには、細部の混合に影響する流動状態をより詳細に予測することが重要と考えられる。

従来、化学工学の分野では小さなスケールでの混合実験による流動状態の可視化や混合時間の測定、及びこの定式化、動力線図(レイノルズ数に対する動力数の関係)を調べることなどにより、大きなスケールでの流動状態を予測してきた。しかし、予測できる結果は槽内の平均値であり、非ニュートン流体で問題となる細部の流動を予測することはできない。

これに対し、数値計算により細部の流動を予測できる可能性がある。数値計算では槽内を多くのセルに分割し、質量の保存を拘束条件として羽根の回転によるモーメントのセル間での移動を計算する。非ニュートン高粘度液及び通気条件では計算が困難であるとされているが、AEA (U.K. の原子力公社から派生したシミュレーション・ソフトの製作・販売会社で、依頼により数値計算を実施する) では高粘度・非ニュートン・通気条件でも種々の計算式を組み合わせる

ことにより計算を行っている。ただし、数値計算により予測された流動状態はあくまで計算結果に過ぎない。特に、高粘度・非ニュートン・通気条件での数値計算による流動状態の予測は研究の初期段階にあり、実用化されてはいない。このため、数値計算により予測された流動状態が適切なものであるか、実際の流動状態と比較して検証しなければならない。

2. 実験方法

2-1. 計算方法

Computational Fluid Dynamics Services (CFDS, AEA, UK) と Computational dynamics software (CFX, AEA, UK) を用いて流動状態を計算した。

この計算では、(1)液面を自由界面とし、(2)非ニュートン流体の特性を指数モデルで表し、(3)通気状態で（気泡の直径は一定 0.1mm とした）の流動を予測した。

流動状態の計算とは、槽内を小さな体積（セル）に分割し、各々のセル毎に質量の保存を基本とする連続の式を拘束条件として運動量の保存を基本とする流れの式を解くことである(1)。ここでは、気相と液相の均質な二相において計算している。式(1)に連続の、式(2)に流れの式を示す。

$$\partial \rho / \partial t + \nabla \cdot (\rho \mathbf{U}) = 0 \quad (1)$$

$$\partial (\rho \mathbf{U}) / \partial t + \nabla \cdot (\rho \mathbf{U} \mathbf{U}) = \rho \mathbf{B} - \nabla p + \nabla \cdot \boldsymbol{\tau}$$

$$+C_{ab}(U_b-U_a) \quad (2)$$

ただし、 r は容積、 ρ は密度、 U は速度、 $r_i \nabla \cdot \tau$ は速度の拡散をあらわす粘性項、 $**$ はダイアド (dyadic product、テンソル表記の一種)、 B は体積力 (重力項)、 ∇ は空間勾配をとるための微分演算子、 p は圧力、 c_{ab} は二相 (液相と気相) 間の相互作用をあらわす。下付き文字 i の a は BC 懸濁液を b は空気 (気泡) をあらわす。

すなわち、式 (1) は各々のセル全体における質量の時間変化がセルの各面を通して流入・流出する単位時間あたりの正味の質量変化に等しいことをあらわし、式 (2) は各々のセルの運動量の時間変化は体積力と圧力の空間勾配変化の間の差に粘性項と相間のインタラクションを足したものに等しいことを示している。一言で言うと、セル毎の質量を保存させながら、流動 (運動) により発生するモーメントも保存されるように 3 次元方向流動の速度を計算するのである。

また、気泡の運動に関しては式 (3) に従い計算した。

$$\delta \Phi / \delta t + \nabla \cdot U' \Phi = 0 \quad (3)$$

ただし、 Φ は気泡の体積、 U' は各々の気泡に働く圧力バランスを考慮して計算された気泡の速度である。すなわち、式 (3) は各々のセルにおける気泡体積の輸送方程式にほかならない。

また、攪拌所要動力は式 (4, 5, 6) で計算した。

$$\Gamma = \Upsilon * F \quad (4)$$

$$P = \omega \int_S \Gamma \cdot ds \quad (5)$$

$$\mathbf{F} = \eta \nabla \mathbf{U} \cdot \mathbf{s} - p \mathbf{S} \mathbf{n} \quad (6)$$

ただし、 Γ はトルク、 $\mathbf{r}$ は位置ベクトル、 $\mathbf{F}$ はセル表面での流体力、 P は攪拌
 所要動力、 ω は攪拌数(rps)、 $\int_S$ は攪拌羽根表面での積分、 η は粘度、 $\mathbf{U}$ は流
 速度、 p は圧力、 $\mathbf{S} \mathbf{n}$ はセル表面での標準のベクトルである。すなわち、攪拌羽
 根の面に作用する積分されたトルクと攪拌数の積から所要動力を求めている。

2-2. 計算の前提、槽・羽根の形状、レオロジー

計算の前提として槽と羽根の形状及び培養液のレオロジーを定めた。図 1 に攪拌羽根とバッフル部分に相当するグリッドを示す。グリッドとは槽内を小さなセルに分割した際の境界を表す。攪拌羽根の 1 周は 24 個のセルに分割され、槽内は合計 13752 のセルに分割されている。攪拌羽根は Maxblend 羽根、バッフルは 3 枚である。

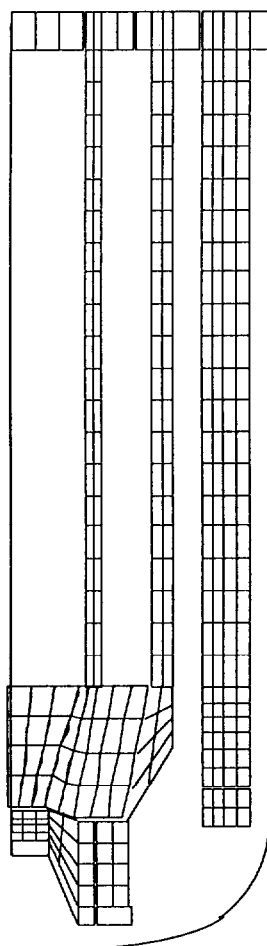


図1 攪拌羽根及びバッフルの形状とグリッド

レオロジーは 2%の BC を含む BPR3001A 株の培養液をレオメトリックス RFS-II で定常流で測定した結果を指数モデルによる式(7)で近似させた。K 及び n は 80、0.1 になった。

$$\eta = K \cdot \gamma^{(n-1)} \quad (7)$$

ただし、 η は見かけ粘度 (Pa·s)、K は粘稠度、 γ は剪断速度 (s⁻¹)、n は流動指数である。K が大きいほど粘度が高く、n が小さいほど剪断速度に対する粘度変化が大きく、顕著な非ニュートン挙動を示すことになる。

2-3. 検証の方法

2-3-1. 攪拌所要動力の測定

攪拌所要動力は以下の式に従い計算した。

$$P_v = 2 \pi N T / V_L \quad (8)$$

ただし、 P_v は単位体積あたりの攪拌所要動力 (w·l⁻¹)、 N は攪拌数 (rpm)、 T は攪拌トルク (w·分)、 V_L は培養液の液量 (l) である。攪拌トルクはインバーター出力から計算し、無負荷時のトルクを差し引いて求めた。

2-3-2. 流速の測定

流速の測定にはアレック電子に特注した 3 次元電磁流速計を用いた。この装置は河川の流れを測定する場合に用いられてきたものである。直径 20mm の樹脂性のボールの中に 2 本のコイルが直交して入っていて、水が周囲を移動したと

きに発生する起電力から x, y, z 3 方向の流速を測定する原理である。培養槽に取付けるためセンサー部分を特注したがセンサー部分に耐熱性がないため、殺菌はできない。培養液を模擬液とし、センサーを取付けた培養槽に入れて各々の攪拌数での流速を測定した。測定した値は約 0.5 秒毎にコンピュータに記録した。図 2 に 3 次元電磁流速計の測定位置を示す。2 本のセンサーは槽のセンサー孔を用いてとりつけた。流動には槽壁との距離や槽内のバッフルの位置が影響すると考えられるので、図 2 中に槽壁との距離とバッフルとの相対位置を示した。攪拌羽根の周端と槽壁の距離は 56mm である。センサー部分の直径は 20mm である。センサーと槽壁との距離は 10mm、センサーと攪拌羽根の周端との距離は 26mm となった。

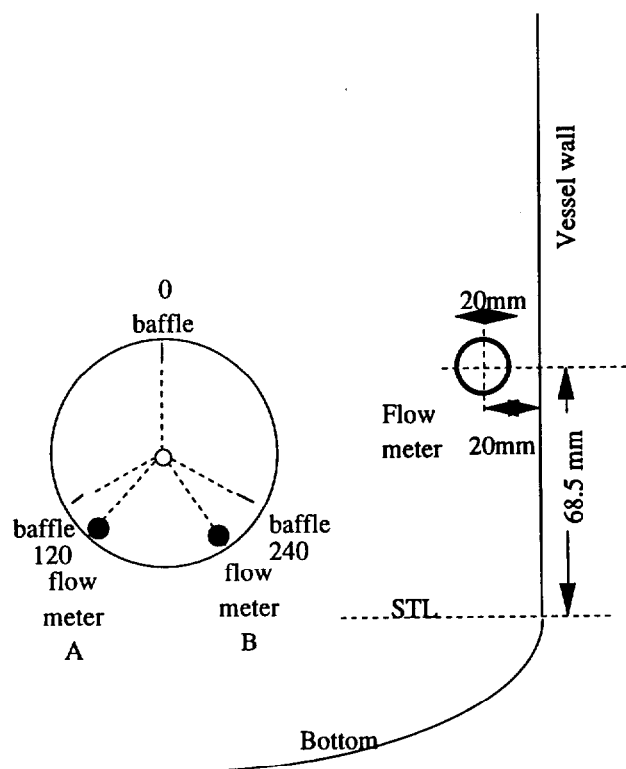


図2 流速計の位置

3. 結果

3-1. 流動状態の計算結果

3-1-1. 数値計算での槽内の流動状態

図3 に数値計算による攪拌数 200rpm での槽内の流速の分布を示す。図 3-1 は攪拌羽根の平行な面での流速、図 3-2 は攪拌羽根に直交する面での流速を示す。矢印の大きさは紙面に投影された速度の成分に比例している。パドル部分での液の吐出が強く、吐出された液は上昇流となった。しかし、攪拌羽根部分に比べ、槽壁付近では流速が低かった。

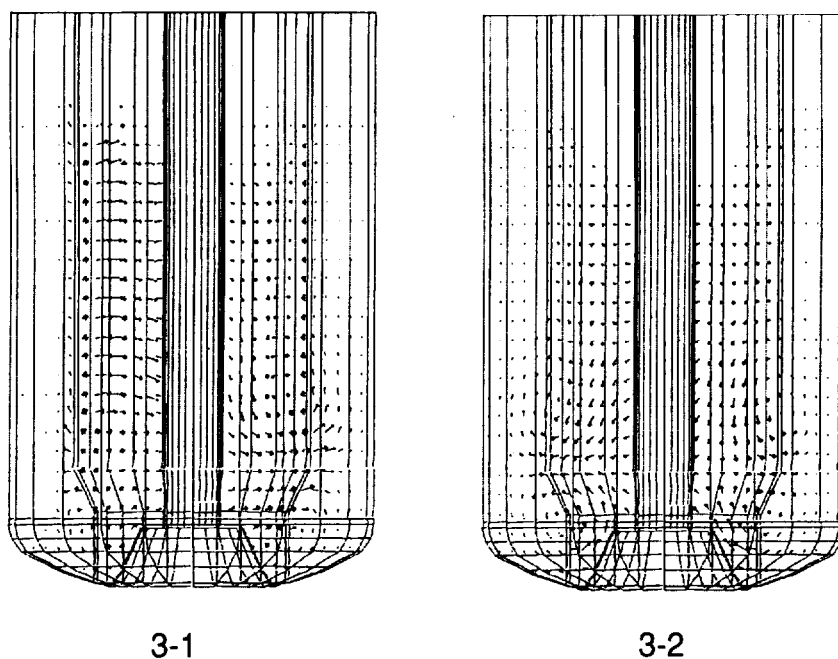


図3 数値計算による槽内の流速の分布
3-1：羽根に平行な面での流速
3-2：羽根に直交した面での流速

図 4 に槽内の縦方向での数値計算による粘度の分布を示す。粘度は槽壁に接触したセルの一周の平均値である。300-500rpm では槽内下部の粘度は低いものの、攪拌数が低くなると上部の粘度は高くなった。200rpm では上部でも下部でも粘度は高かった。粘度は剪断速度の 0.9 乗に反比例すると設定されているため、粘度の大きな部分では剪断速度、即ち、流速が低いことになる。

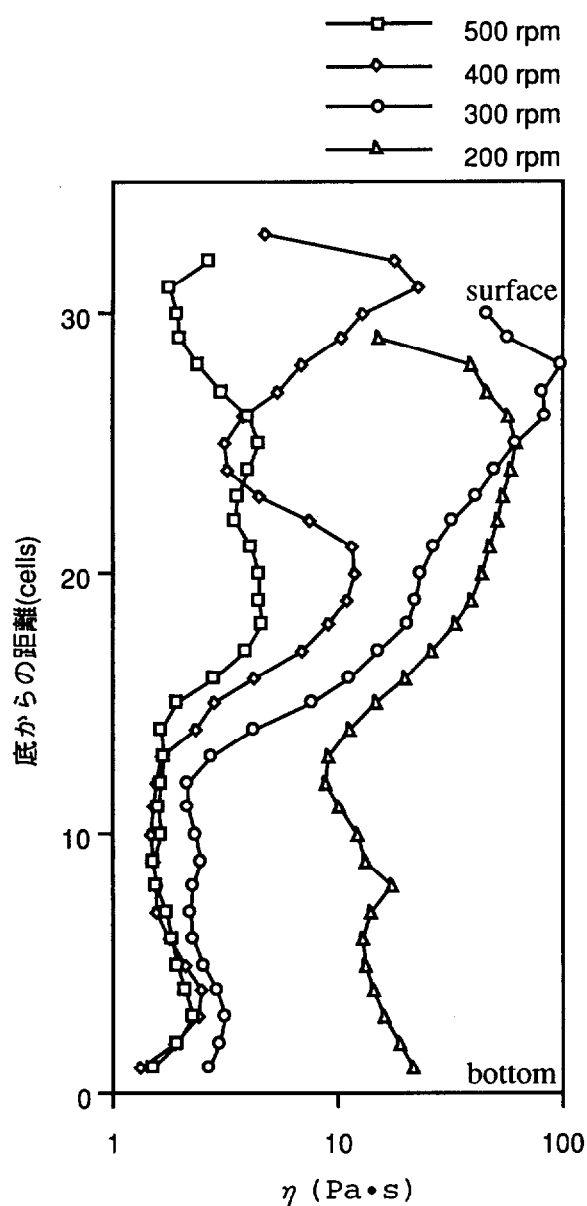


図4 槽内の縦方向の粘度分布
(1周の平均値)

3-1-2. 数値計算での攪拌所要動力、攪拌履歴による所要動力の変化

図 5 に数値計算による攪拌数と攪拌所要動力の関係を示す。以降の数値計算は 200、400、500rpm での値である。水でも培養液でも攪拌数の増加と共に攪拌所要動力は高くなった。計算結果では培養液の攪拌所要動力は水の場合の 5 倍大きかった。

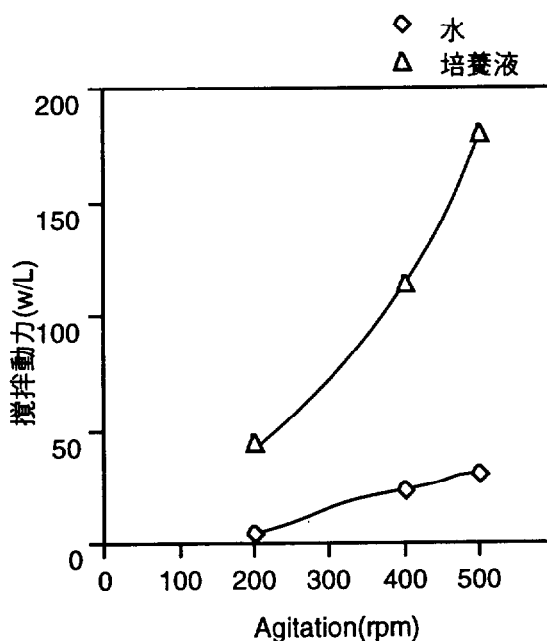


図5 攪拌数と攪拌動力（計算値）の関係

さらに、5 倍の違いが妥当なものであるか調べるため、計算の過程での攪拌の履歴による攪拌所要動力の変化を調べた。図 6 に数値計算での攪拌所要動力を測定するまでの回転数と計算された攪拌所要動力の関係を示す。図中の点線は推測値を示す。2、4、6 回転後の攪拌所要動力は徐々に低下した。この結果は、攪拌が開始されて直後の流動していない非ニュートン性の液では粘度が高いため、これを流動させるために大きな攪拌所要動力が必要になるが、攪拌を続けると攪拌所要動力は低下することを示している。攪拌を続けると更に低下する

ことが推測されたが、どの程度まで低下するのかは実際に計算を続けないとわからない。しかし、計算には長時間を要するので、6回転後の槽内の粘度分布から定常状態の平均粘度を 0.1kg/m と予測し、この補正した条件での攪拌所要動力を計算した。

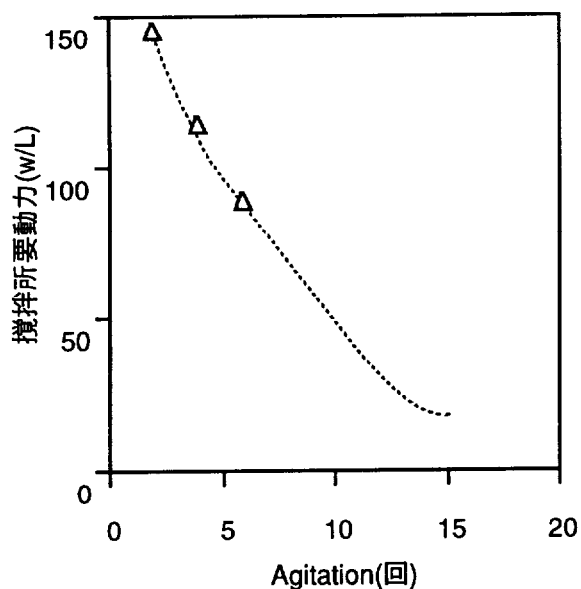


図6 攪拌回転数と攪拌所要動力（計算値）の変化

図7に数値計算での攪拌数と補正した攪拌所要動力との関係を示す。4回転後の培養液の粘度を 0.1kg/m に固定することにより計算値は小さくなった。初期の非定常な攪拌状態を補正した場合の培養液での攪拌所要動力は、攪拌数により水と同等から1.5倍大きかった。

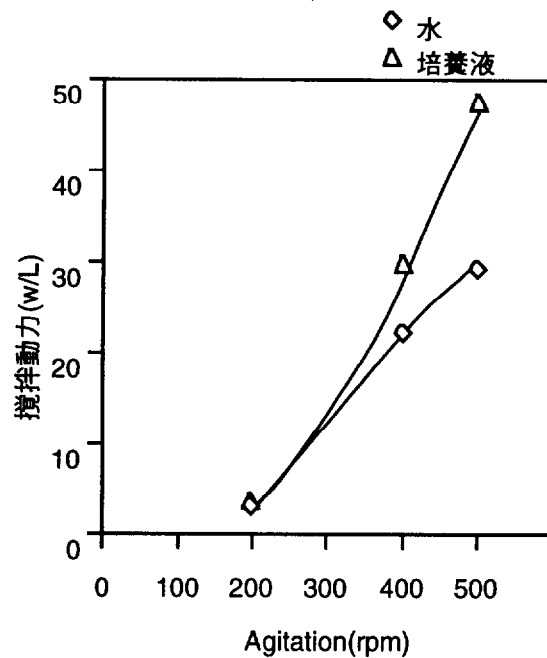


図7 攪拌数と攪拌動力（補正值）の関係

3-2-3. 数値計算での流速の分布

計算結果を実測値と比較するため、実測値の測定部分に相当するセルでの流速を計算した。図 8 に数値計算で流速測定までの回転数と計算された流速（周方向）の関係を示す。200rpmでの計算では 1.2 秒で 4 回転に相当する。この計算に 33 時間を要した（Indigo, Silicon graphic 社製を使用）。流速は最初の 1 回転で大きく上昇し、4 回転（1.2s）以内に一定になった。流速の周期的変動は攪拌羽根が測定部分相当セルを通過するときに流速が大きくなるためである。

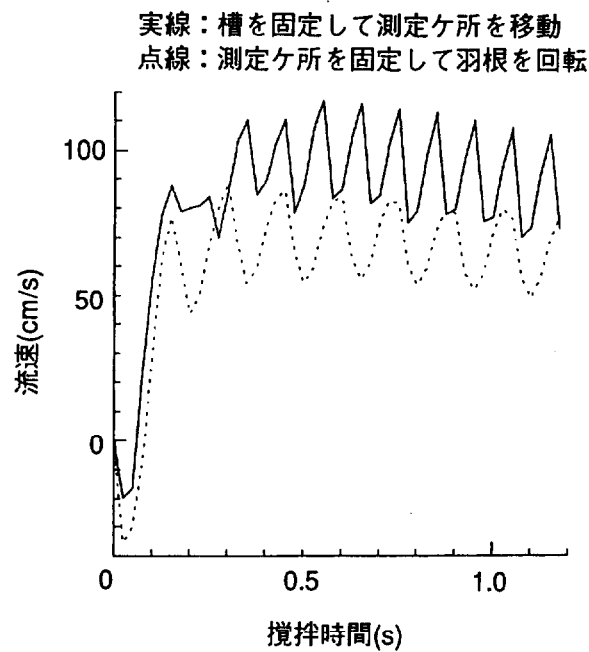


図8 攪拌履歴による流速の変化
(0.3秒で1回転)

図 9 に数値計算での攪拌数と流速の関係を示す。計算結果では、水でも培養液でも攪拌数と共に流速は大きくなり、大きさもほぼ同じであった。

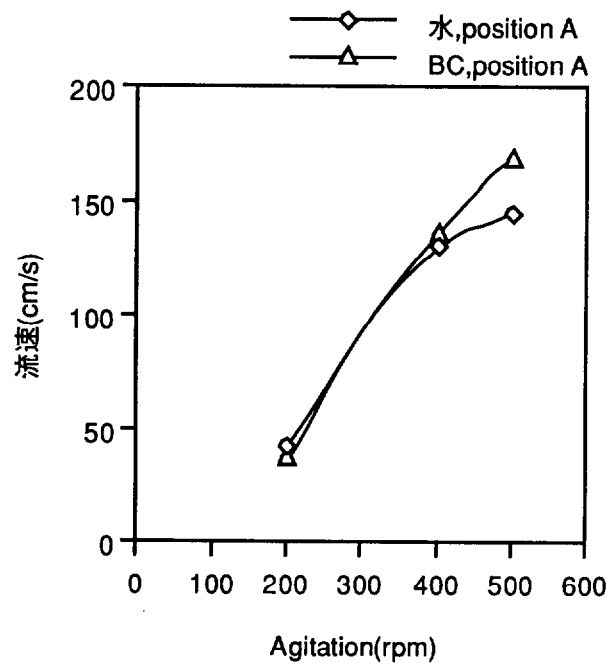


図9 攪拌数と流速（計算値）の関係

図 10 に攪拌数と数値計算した x-y 平面での流速の関係を示す。水でも培養液でも同様の傾向を示し、400rpm までは x 軸、y 軸ともに大きくなったが、500rpm では y 軸方向の流速が小さくなった。計算結果では、x-y 方向の流速は水でも培養液でも同じように変化し、流速の大きさもほぼ同じであった。

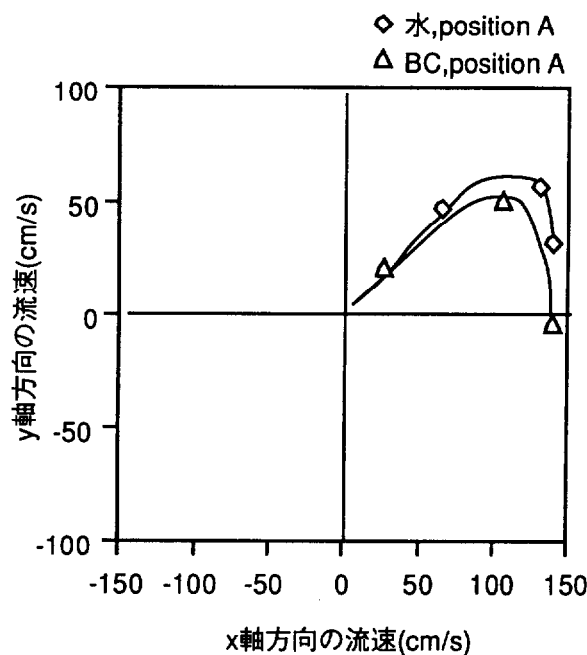


図10 x-y平面での流速（計算値）

3-2. 攪拌所要動力による計算結果の評価

図 11 に水と培養液での攪拌所要動力の実測値（点）と計算値（点と実線）を比較した結果を示す。水の場合には実測値と計算値が近似しており、計算結果は実際の攪拌所要動力を良好に予測していると言える。しかし、培養液の場合には、攪拌を開始してから初期の非定常な攪拌を考慮して粘度を固定しても、計算値と実測値の間には最大で 2 倍の差があった。この結果は、現状の数値計

算では培養液の攪拌所要動力を正しく予測できないことを示している。

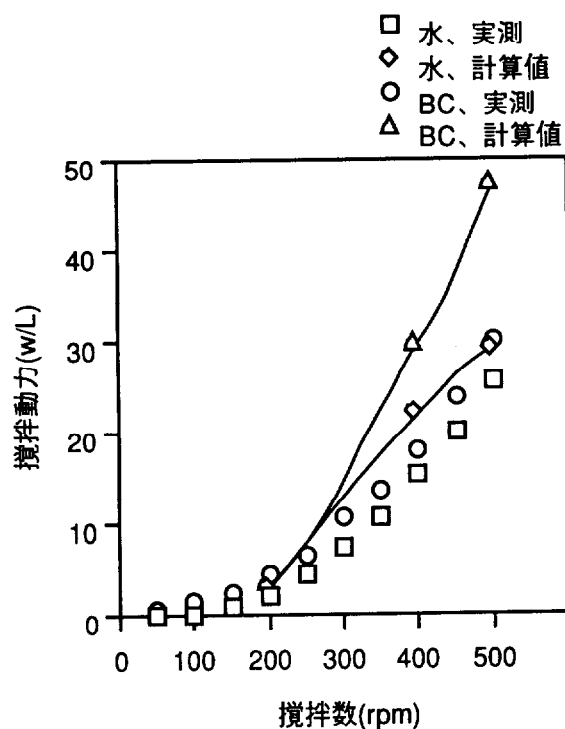


図11 攪拌動力での実測値と計算値の比較

3-3. 流速による計算結果の評価

図 12 に水と培養液での流速の実測値と計算値を比較した結果を示す。水の場合には低攪拌条件では差があるものの、実測値と計算値は近似しており、計算結果は実際の流速を良好に予測していると言える。しかし、培養液の場合には、計算値と実測値は全く異なり、その傾向にも類似性は認められなかった。実測値の場合、培養液では 200rpm までの流速は極めて小さかったが、300rpm 以上で急激に増加した。急激な流速の増加は 300rpm に相当する剪断応力が培養液の降伏値に相当するためであろう。この結果は、現状の数値計算では培養液の流速を正しく予測できないことを示している。

数値計算の結果と実測値が一致しない原因は考察で述べる。

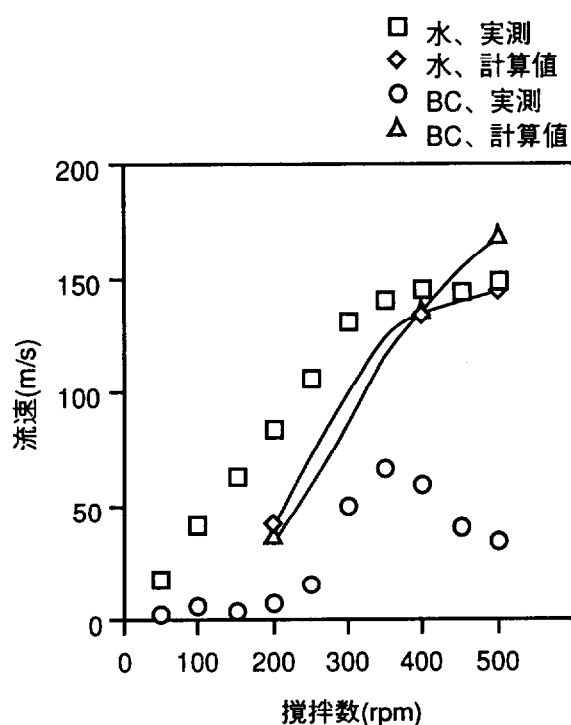


図12 流速での実測値と計算値の比較

4. 考察

4-1. レオロジーの流動状態への影響

水の場合には攪拌所要動力でも流速でも、計算値と実測値ではほぼ良好な近似が得られてのに対し、培養液の場合には計算値と実測値は全く異なった。もっとも大きな違いは、培養液での実測値より計算値は攪拌所要動力が大きく、流速が小さいことである。この原因のひとつとしてレオロジーの問題がある。数値計算ではレオロジーの実測値が近似した指数モデルで計算したが、実際のBC培養液は降伏値を持つ流体である。低剪断条件でのレオロジーの違いが攪拌所要動力に影響した可能性も考えられる。より正確にレオロジーを設定すると共

に、ビンガム流体など降伏値を持つ流体でも流動を予測しうるようなアルゴリズムの開発が必要であると考える。

4-2. 非定常の流動状態が攪拌所要動力に及ぼす影響

実際の攪拌槽においても、攪拌の起動動力は定常状態での動力より大きい。計算においても起動時の攪拌所要動力は大きく、攪拌初期の攪拌所要動力は大きくなる。図 9 に示したように、計算でも攪拌を続けると攪拌所要動力は低下してゆく。攪拌所要動力が実測値と大幅に異なった第 1 の理由は、定常状態に達していない状態で攪拌所要動力を計算し、定常状態で攪拌所要動力を測定したためであると考えている。しかし、計算では数回転に 1 日以上を要するため、定常状態まで待つて攪拌所要動力を計算することはできなかった。定常状態を確認するには 1 条件でも 1 週間程度の計算時間が必要になるであろう。今回の計算では攪拌が定常になる状態での粘度を予想し固定して計算することにより計算時間を短縮しているが、実際の混合では剪断速度に分布があり、粘度にも分布があるはずである。粘度を固定したことによる影響がどのようなものか、確認されていない。将来、コンピュータの処理能力が大幅に向上すれば定常状態での攪拌所要動力を計算できるようになるであろう。

4-3. 培養液中の大きな気泡の流動状態への影響

今回の計算では攪拌羽根の周辺にあると考えられる大きな気泡の存在を考慮していない。気泡の挙動や大きさが定量的に把握できないため、及び数値計算

に長い時間を要するためである。しかし、模擬槽での培養液の流動実験でも大きな気泡があることは観察されている。図 13 に培養液中の大きな気泡の概念図を示す。大きな気泡は攪拌による吐出で減圧状態になった攪拌羽根の周辺に通気された気泡が滞留して形成され则认为られる。

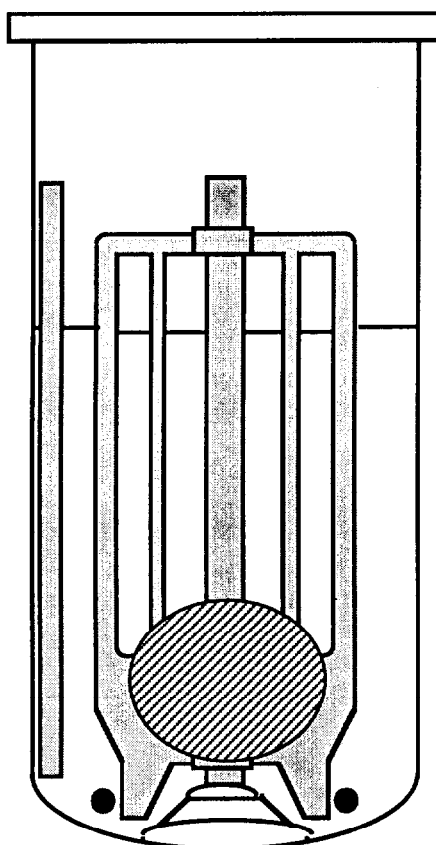


図13 BC培養中の大きな気泡の存在(概念図)
斜線の部分が大きな気泡の位置を示す

攪拌羽根の周囲に大きな気泡が存在すると、攪拌羽根が空回りして攪拌所要動力が消費されず、しかも、羽根による吐出が弱くなるために流速が小さくなると考えられる。BC 培養液で実測された攪拌所要動力が同じ回転数の水の場合に比べ、さほど大きくなかったことはこの原因によるものと考えられる。また、培養液での攪拌所要動力や流速の実測値が数値計算による値より小さかったこ

とも同じ理由で説明できるであろう。同様に、図 12 に示した計算と実測での流れの向きが異なったことも、吐出の強いバッフル部分に大きな気泡が形成されやすいために上向きの流れが弱くなったことと関係していると考えられる。以上の考察から、BC 培養液での流動状態を数値計算で予測するには、計算方法の改良とともに、大きな気泡の挙動を測定する手段が必要であるといえる。また、大きな気泡は流動に強く影響すると考えられるため、スケールアップにおいては小さな気泡が合一し大きな気泡に形成される過程を精査することが重要であろう。

5. 参考文献

- (1) R. Byron Bird, : Trasnport fenomena, in "The eqations of change for isothermal systems. Wiley international edit.