糸状菌増殖の循環モデルによる検討

向 高 祐 邦・片 岡 広
高 橋 稔 二

東京教育大学農学部 生物化学工学科*

糸状菌の培養では、攪拌作用が低下すると菌体増殖速度および基質消費速度が減少することがよく知られている。本報告では、この現象を前報で提案した循環モデルを用いて説明した。

あらかじめ実験的に決定した酸素存在下における菌体増殖、基質消費および呼吸についての各速度式と、さらに槽内の総括比呼吸速度を算出するための循環モデルを用いて、各攪拌培養条件下での *Penicillium chrysogenum* の増殖および基質消費の時間的変化を求めた。これによって得られた結果は、攪拌所要動力の減少とともに低下する菌体増殖、基質消費の実験結果とほぼ一致した。

緒 言

糸状菌の培養では、攪拌作用によって菌体増殖速度および基質消費速度が著しく影響されることが知られている^{1,3)}。この現象はおもに菌体への酸素移動に起因した総括比呼吸速度の変動によるものと思われる。本報告ではこの糸状菌培養について、槽内に溶存酸素の不足している領域が存在する場合の実験結果が、酸素存在下における速度式と前報⁵⁾で提案した循環モデルを用いて説明できることを示した。

1. 実験装置および方法

供試菌株および培地は前報⁵⁾と同じ *Pen. chrysogenum*, グルコース・ペプトン培地をそれぞれ用いた。また、培養装置も前報と同じ攪拌槽(内径 134 mmφ, 液量 1.7 l, 羽根径が槽径の 1/3 の櫓型 2 枚羽根, 孔径 1 mmφ の単孔ノズル)を用いたが、本実験ではさらに、羽根径が槽径の 1/2 の 6 枚平羽根タービンをも使用した。

Pen. chrysogenum の孢子を孢子濃度が $(1.5 \sim 2) \times 10^8$ spores/ml になるように 500 ml 坂口フラスコ中のグルコース・ペプトン培地(液量 100 ml, pH 5.6)に接種し、30°C, 振幅 7 cm, 振盪速度 120 1/min の条件下で 28~30 時間培養した。これを攪拌槽に移して所定の操作条件下でさらに培養を継続し、菌体濃度、グルコース濃度、総括比呼吸速度などの時間的変化を測定した。なお、500 ml 坂口フラスコによる培養は、液量 2 l に相当する本数分行った。また攪拌槽における培養温度は 30°C, 通気量は 350 ml/min とした。

菌体濃度は培養液 50 ml 中の菌体を汙過してこれを水で洗浄したのち、105°C で恒量になるまで乾燥して秤量し、乾燥菌体濃度として表した。グルコース濃度は菌体

を汙別した汙液について Somogyi 氏変法²⁾で測定した。総括比呼吸速度は攪拌槽入口および出口における空気中の炭酸ガス濃度の測定から得られる槽内炭酸ガス生成量を、同培養液について別に測定した呼吸商(本実験では 1.0)をもとに酸素消費量に換算して求めた。炭酸ガス濃度の測定にはガスクロマトグラフを用いた。さらに、攪拌所要動力はトルクメータで、また溶存酸素濃度は DO メータ(東芝ベックマン 777 型)により測定し、電極は攪拌羽根の高さで羽根先端と槽壁との中間の位置に設置した。

2. 実験結果および考察

2・1 速度式

速度式を求める実験では、槽内の溶存酸素濃度をできるだけ一様にするため、特に羽根径が槽径の 1/2 の 6 枚平羽根タービンを使用した。この攪拌羽根を用いた場合、攪拌所要動力は羽根径が槽径の 1/3 の櫓型 2 枚羽根を用いる場合に比べて高くなるが、比較的低い回転速度で高い溶存酸素濃度が維持できる。したがって、6 枚平羽根タービンを用いて高い溶存酸素濃度を維持しながら菌体を培養し、このときの菌体濃度、グルコース濃度および呼吸速度の時間的変化から酸素が十分存在する場合の各比速度を求めた。なおこの実験では、液の混合状態が最も悪いと考えられる邪魔板の裏側で溶存酸素濃度を測定し、この位置でも全培養期間をとおして高い溶存酸素濃度が維持されていることを確認した。

菌体濃度の時間的変化から酸素存在下での比増殖速度 μ_{O_2} を求め、グルコース濃度 C_s との関係を検討した結果、Eq. (1) で表される Monod の式⁴⁾が適用できることが認められた。

$$\mu_{O_2} = \mu_m C_s / (K_s + C_s) \quad (1)$$

上式の μ_m と K_s は定数で、本実験ではそれぞれ $\mu_m =$

* 〒153 目黒区駒場 2-19-1

Fig. 1 Comparison of experimental results and calculated values ($N=900$ rpm)

In reference to figure (b)
 ---; curves calculated from Eqs. (1)~(3), where the dissolved oxygen was assumed to be sufficient in whole culture system
 —; curves corrected by using Eqs. (4)~(11) based on the circulation flow model in which the local deficiency of oxygen was taken into consideration

0.40 1/hr, $K_s=14.0$ g/l であった。

グルコースの比消費速度 μ_{O_2} および菌体の比呼吸速度 r も増殖速度と同様に、長い培養の過程では物質代謝、活性などの変化にともなって徐々に変化する。培養過程におけるこれらの変化は、Nagai ら⁶⁾ および Pirt⁷⁾ によって導かれている Eq. (2) および Eq. (3) がそれぞれ適用できた。

$$\mu_{O_2} = (1/Y_a)\mu_{O_2} + m \quad (2)$$

$$r = (1/Y_{a,O_2})\mu_{O_2} + m_{O_2} \quad (3)$$

Y_a および m はそれぞれ基質に対する増殖収率定数および菌体維持定数、 Y_{a,O_2} および m_{O_2} はそれぞれ酸素に対する増殖収率定数と菌体維持定数であり、本実験における各定数はそれぞれ $Y_a=8.7 \times 10^{-1}$ g-mycelium/g-glucose, $m=5.0 \times 10^{-2}$ g-glucose/g-mycelium·hr, $Y_{a,O_2}=1.11 \times 10^2$ g-mycelium/g-mol O_2 , $m_{O_2}=2.20 \times 10^{-5}$ g-mol O_2 /g-mycelium·min であった。

2・2 菌体増殖に及ぼす攪拌の影響と循環モデルによる検討

羽根径が槽径の 1/3 の櫛型 2 枚羽根を用い、回転速度が 900 および 1,100 rpm、通気量は 350 ml/min で一定

Fig. 2 Comparison of experimental results and calculated values ($N=1,100$ rpm); dotted lines and solid lines in figure (b) are the same as in Fig. 1

として菌体を培養したときの培養経過を Fig. 1 および Fig. 2 にそれぞれ示した。これらの図における (a) 図は攪拌所要動力 P と溶存酸素濃度 C_{O_2} の時間的変化を、(b) 図の各実測値は菌体濃度 C_x 、グルコース濃度 C_s 、および総括比呼吸速度 R_{O_2} の各時間的変化をそれぞれ示したものである。(b) 図における各破線は、Eqs. (1)~(3) の各比速度式を用いて数値計算によって得た酸素が十分存在する場合の計算値である。Figs. 1, 2 の (b) 図における各破線と実測値との比較から明らかのように、櫛型羽根を用いて培養した場合の菌体増殖速度は Eqs. (1)~(3) の速度式で計算した場合に比べて低下し、特に回転速度の低い 900 rpm の場合にその低下は著しい。このことは、総括比呼吸速度も菌体増殖と同様に低下していることから考えて、これらの培養条件では槽全体について酸素が均一に分散せず、一部に溶存酸素の不足している領域が生じていることを示すものと思われる。

Fig. 1 および Fig. 2 にみられるように、槽内に溶存酸素の不足している領域が存在していると思われる場合の菌体増殖について、次に循環モデルを用いて検討した。

Figs. 1, 2 において総括比呼吸速度の低下と菌体増殖速度の低下とがよく対応していることから、菌体増殖速度を求めるためには、まず総括比呼吸速度について検討する必要があると思われる。総括比呼吸速度については、著者らは前報²⁾で提案した循環モデルにおいて、菌体の

比呼吸速度 r を任意の培養時刻について溶存酸素の存在下で酸素濃度に無関係に一定と仮定した場合、次式で表されることを示した。

$$R_{O_2} = \frac{r}{\theta_r} \left\{ \int_0^{\theta_r} \theta_r E(\theta_r) d\theta_r + \int_{\theta_r}^T \theta_r' E(\theta_r) d\theta_r \right\} \quad (4)$$

$$\theta_r' = C_{O_2,s}(0)(a/r) \quad (5)$$

ここに、 θ_r および θ_r' はそれぞれ循環時間および平均循環時間であり、また $E(\theta_r)$ は循環時間分布である。Eq. (4) の積分上限の T は、循環時間分布の測定結果から数分の値で十分である。 θ_r' は循環モデルで定義した分離液内の溶存酸素が消費される時間であり、これは Eq. (5) のように循環開始点での溶存酸素濃度 $C_{O_2,s}(0)$ と単位菌体量あたりの分離液量 a および比呼吸速度 r によって与えられる。Eq. (4) における循環時間分布と Eq. (5) における単位菌体量あたりの分離液量については、前報で操作条件との関係を実験的に検討し、次のような実験式を得ている。循環時間分布については Eq. (6) で表される対数正規分布ではほぼ近似できることがわかり、その特性を示す幾何平均循環時間 $\theta_{r,g}$ および幾何標準偏差 σ_g についてそれぞれ実験式として Eq. (7) および Eq. (8) が得られた⁵⁾。

$$E(\theta_r) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \theta_r \ln \sigma_g} \exp \left\{ -\frac{1}{2} \left(\frac{\ln \theta_r - \ln \theta_{r,g}}{\ln \sigma_g} \right)^2 \right\} \quad (6)$$

$$\theta_{r,g} = AP^{-\alpha} \quad (7)$$

$$\sigma_g = BP^{-\beta} \quad (8)$$

A, B, α, β は菌体濃度によって異なる実験定数で、本実験に用いた菌体については $C_X \leq 5.9 \text{ g/l}$ では $A=10.3$, $\alpha=0.283$, $B=4.69$, $\beta=0.10$ 。また $5.9 < C_X \text{ g/l}$ では $A=5.9 \times 10^{-4} C_X^{5.5}$, $\alpha=3.2 \times 10^{-2} C_X^{1.2}$, $B=1.89 \times 10^{-5} C_X^{7.0}$, $\beta=8.2 \times 10^{-2} C_X - 0.37$ で与えられる。

分離液量については、菌体濃度に無関係に次式が得られた。

$$a = 5.0 \times 10^{-3} P^{0.66} \quad (9)$$

次に、菌体増殖速度と基質消費速度について考える。好気性菌の増殖は酸素の有無によってきわめて大きな影響を受けるので、槽内に溶存酸素のない領域がある場合について、菌体が循環流に同伴されて酸素のある領域に滞留している間は Eqs. (1)~(3) の速度式が適用でき、また溶存酸素のない領域に滞留している間は菌体増殖および基質消費は無視できるとすれば、このときの槽内の平均の比増殖速度 μ_{av} および基質比消費速度 ν_{av} は次のように表される。

$$\mu_{av} = \mu_{O_2} (R_{O_2}/r) \quad (10)$$

$$\nu_{av} = \nu_{O_2} (R_{O_2}/r) \quad (11)$$

これらの式で (R_{O_2}/r) は酸素のある領域に存在する菌体の槽内全菌体に対する分率を表す。

Eqs. (10), (11) における μ_{O_2}, ν_{O_2} および r については、本実験では Eqs. (1)~(3) がそれぞれ適用できるとする。Eqs. (1)~(3) から明らかなように μ_{O_2}, ν_{O_2} および r はいずれも基質濃度のみの関数である。また R_{O_2} は、Eqs. (4), (5) では $r, E(\theta_r), a$ および $C_{O_2,s}(0)$ の関数であるが、このうち $E(\theta_r)$ は攪拌所要動力および菌体濃度、 a は攪拌所要動力の関数としてそれぞれ与えられている。したがって、菌体濃度と基質濃度以外の未知の変数は攪拌所要動力と循環開始点での溶存酸素濃度だけとなるので、この両者については各培養条件下で実測される値を用いれば、Eqs. (1)~(11) から数値計算によって菌体濃度と基質濃度の時間的変化を求めることができる。このようにして求めたそれぞれの計算結果を Fig. 1 および Fig. 2 の各 (b) 図に実線として示した。循環モデルを用いた数値計算から得られた Figs. 1, 2 における (b) 図の各実線をそれぞれの実測値と比較した場合、酸素が十分存在しているとして計算した破線に比べて実測値に近い計算結果を与えている。これは、槽内に溶存酸素が不足している領域がある場合の糸状菌増殖の時間的変化が、循環モデルを用いて説明できることを示したものと云えよう。

結 言

Pen. chrysogenum の増殖速度および基質消費速度に及ぼす攪拌回転速度の影響を実験的に検討した結果、回転速度が低いほど総括比呼吸速度が低下し、これに対応して増殖速度、基質消費速度も低下した。

これらの実験結果に対して、前報で提案した循環モデルによる検討を行った。各培養条件下で測定される攪拌所要動力と攪拌羽根の先端近くの溶存酸素濃度に対し、循環モデルとあらかじめ実験的に求めた酸素存在下での菌体増殖、基質消費および呼吸についての各比速度式を用い、それぞれの培養条件下での総括比呼吸速度、菌体濃度および基質濃度の時間的変化を求め、これらと実測値とを比較した。計算結果はほぼその培養経過を表し、循環モデルを用いて糸状菌増殖の時間的変化が説明できることが明らかになった。

【謝 辞】 本研究に関し終始適切なるご指導をいただきました筑波大学小林次郎教授ならびに東京工業大学資源化学研究所井隆教授に深謝いたします。

Nomenclature

A	= constant in Eq. (7)	[sec·(G-cm/sec) ^α]
a	= segregated liquid volume per unit mycelial mass	[l/g]
B	= constant in Eq. (8)	[(G-cm/sec) ^β]
C_{O_2}	= concentration of dissolved oxygen	[g-mol/l]

$C_{O_2,s}$ = concentration of dissolved oxygen in segregated liquid [g-mol/l]
 C_s = concentration of substrate (glucose) [g/l]
 C_x = concentration of mycelium [g/l]
 $E(\theta_r)$ = distribution of circulation time [1/sec]
 K_s = saturation constant [g/l]
 m = maintenance coefficient for growth [g-substrate/g·hr]
 m_{O_2} = maintenance coefficient for respiration [g-mol/g·min]
 N = agitator speed [rpm]
 P = power consumed by impeller [G-cm/sec]
 R_{O_2} = over-all specific rate of respiration in the whole culture system [g-mol/g·min]
 r = specific rate of respiration [g-mol/g·min]
 T = maximum circulation time [sec]
 t = culture time [hr]
 Y_G = true growth yield [g/g-substrate]
 Y_{G,O_2} = true growth yield for respiration [g/g-mol]
 α = constant in Eq. (7) [—]
 β = constant in Eq. (8) [—]
 θ_r = circulation time [sec]
 θ_r = mean circulation time [sec]
 $\theta_{r,g}$ = geometric mean circulation time [sec]
 θ' = time required for consumption of the dissolved oxygen in segregated liquid [sec]

μ_m = maximum specific rate of mycelial growth [1/hr]
 μ_{av} = mean specific rate of mycelial growth in the whole culture system [1/hr]
 μ_{O_2} = specific rate of mycelial growth in the presence of dissolved oxygen [1/hr]
 ν_{av} = mean specific rate of substrate consumption in the whole culture system [g-substrate/g·hr]
 ν_{O_2} = specific rate of substrate consumption in the presence of dissolved oxygen [g-substrate/g·hr]
 σ_g = geometric standard deviation [—]

Literature cited

- 1) Barthromew, W. H., E. O. Karow and M. R. Sfat: *Ind. Eng. Chem.*, **42**, 1810 (1950)
- 2) Kobayashi, T. and T. Tabuchi: *J. Agri. Chem. Soc., Japan*, **28**, 171 (1954)
- 3) Maxon, W. D.: *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.*, **1**, 311 (1959)
- 4) Monod, J.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **3**, 371 (1949)
- 5) Mukataka, S., H. Kataoka and J. Takahashi: *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **3**, 416 (1977)
- 6) Nagai, S. and S. Aiba: *J. Gen. Microbiol.*, **73**, 53 (1972)
- 7) Pirt, S. J.: *Proc. Roy. Soc.*, **B163**, 224 (1965)

(1977 年 6 月 27 日受理)

Studies on Mycelial Growth in Submerged Mold Culture Use of the Circulation Flow Model

Sukekuni Mukataka, Hiroshi Kataoka and Joji Takahashi

Dept. of Biochem. Eng., Tokyo Univ. of Educ., Tokyo 153

It is well known that in a submerged mold culture the rates of mycelial growth and substrate consumption decrease with a decrease in agitation. In this paper, this phenomenon is explained by using the circulation flow model proposed in a previous paper.

The time courses of mycelial growth and substrate consumption of *Penicillium chrysogenum* in a stirred fermenter were predicted for various agitator speeds by using the circulation flow model, which was used to estimate the over-all specific respiration rate in the whole culture system, and the rate equations for mycelial growth, substrate consumption and respiration in the presence of oxygen. The results thus predicted agreed approximately with experimental results in which the rates of mycelial growth and substrate consumption of *P. chrysogenum* decreased as power consumption decreased.