

パーソナルコンピュータを用いた 微生物培養装置の開発とその応用

村 山 敬 一
竹 本 久 雄

Development and Application of a Computer-aided Laboratory Fermentation System

Keiichi MURAYAMA
Hisao TAKEMOTO

A computer-aided laboratory fermentation system has been developed. This system is composed of personal-computer, fermentor, and auto-analyzer systems. Environmental conditions such as temperature, pH, and dissolved oxygen concentration are controlled by a direct digital control system based on PID control strategy. A prototype auto-analyzer system based on ultrafiltration is employed for on-line analysis of culture broth.

Estimation of cell concentration and RQ control of the culture broth for baker's yeast production have been successfully carried out with the use of this system, thus proving its usefulness for microbial culture experiments.

1. はじめに

近年、ライサイエンスと呼ばれる学問分野の発展により、その成果を工業的に応用しようという、いわゆるバイオテクノロジーと呼ばれる技術分野が台頭してきた。

微生物の工業的な応用については、従来から発酵工業として、化学工業の一翼を担っており、日本は、世界でもトップクラスの技術レベルを有する。

バイオテクノロジーの工業化にあたっては、この発酵技術及びその応用技術が重要な役割りを果たすと考えられる。その意味で、発酵技術あるいは、微生物培養技術は、バイオテクノロジーの基幹技術のひとつであると言える。

発酵プロセスの中心をなす、微生物の反応は、一連の生化学反応の結果であり、その反応系は、生体細胞の生育・維持に対し合目的性をもった自己制御系であるといえる。そのため、栄養源・生産物・環境条件（温度・pH・溶存酸素等）など反応に影響する因子が多く、相互に関連しているため、系の解析や制御が困難であった。

従来は、研究開発の段階でも、定性的かつ経験的・試行錯誤的な方法により条件検討・スケールアップ等を行ってきた。

また、実験室での検討と工業化にあたっての検討との間のギャップも大きかった。

最近、発酵プロセスの計測制御にコンピュータを導入する研究が進展してきており¹⁾²⁾、工業化にあたってコンピュータを導入するという姿勢は、いまや常識化しつつある。

そのため、発酵技術の研究開発にあたっては、研究の早い時期から積極的にこうしたことを意識した体制をととのえなければならない。

また、最近のマイクロエレクトロニクスの驚異的な発展とその大衆化に伴ない、研究開発の分野にコンピュータを導入し、実験の自動化、効率化をはかる、いわゆるラボラトリーオートメーションの分野も進展してきた。

しかしながら、化学工業における実験室でのラボ・オートは、分析機器の自動化を除くと、まだまだ十分普及しているとは言えず、特に反応実験をコンピュータ化するという分野は、一部を除いてこれからという段階であ

る。

以上のことから、我々は、発酵技術の研究開発におけるラボラトリーオートメーションを目標として、微生物培養装置の計測制御及びデータ処理をパーソナルコンピュータを用いて行うシステムを開発した。

こういったシステムについては、最近味の素社を始め³⁾いくつかの報告例があるが、ハード・ソフトの開発ともまだ十分確立されたものとはいえない。

とりわけ、基質や生産物のオンライン分析については報告例が少なく、この方面の技術開発が望まれている。

我々は、限外ろ過膜による培養液ろ過システム等で構成された、汎用性のオンライン分析システムを開発し、培養装置の計測制御システムと合わせ、微生物培養研究における CAE (Computer Aided Experiments) をめざし広範囲な実験に応用できるシステムの確立について検討した。

本報告では、開発したシステムの概要と、それを用いた種々の実験例について報告する。

2. 微生物培養計測制御装置とその機能の概要

Fig. 1 に装置の概要を図示した。

基本となる培養槽は、米国 NBS 社製マイクロファーマンター MF114 (14ℓ 容量) である。

本システムは、Fig. 1 に示したように、培養液温度、

pH、酸化還元電位、溶存酸素濃度、培養槽内圧力、循環水温度、攪拌速度、攪拌トルク、通気量、排気ガス中の酸素分圧および炭酸ガス分圧をモニターすることができる。消泡は、消泡剤を用い、泡接触検知センサーによる自動消泡を行うようになっており、添加量の経時変化を記録することができる。

さらに、本研究において、我々は、先に述べたように培養液の自動分析システムを同時に開発したが、このシステムは、限外ろ過装置による除菌及びろ過の定量サンプリングを行う部分、希釈・送液を行う部分、分析を行う部分とそのデータ処理装置からなり、各工程をシーケンスコントローラにより自動的に制御するものである。

以下、代表的な機能について説明する。

〔1〕 環境因子の計測制御

pH の計測は、発酵用 pH 電極 (インゴルド社製 熱殺菌可能) を用いて行い、酸・アルカリ添加により制御を行った。

温度の計測は、測温抵抗体を用いて行い、循環水の温調用ヒータの出力と冷却水電磁弁の開閉により制御を行った。

溶存酸素濃度の計測は、発酵用溶存酸素電極 (オリエンタル電気製 ガルバニックセル式隔膜電極 熱殺菌可能) を用い、通気量・攪拌数を操作量として制御を行った。通気量の計測制御は、サーマルマスフローコントローラ (上島製作所製) を用いて行った。

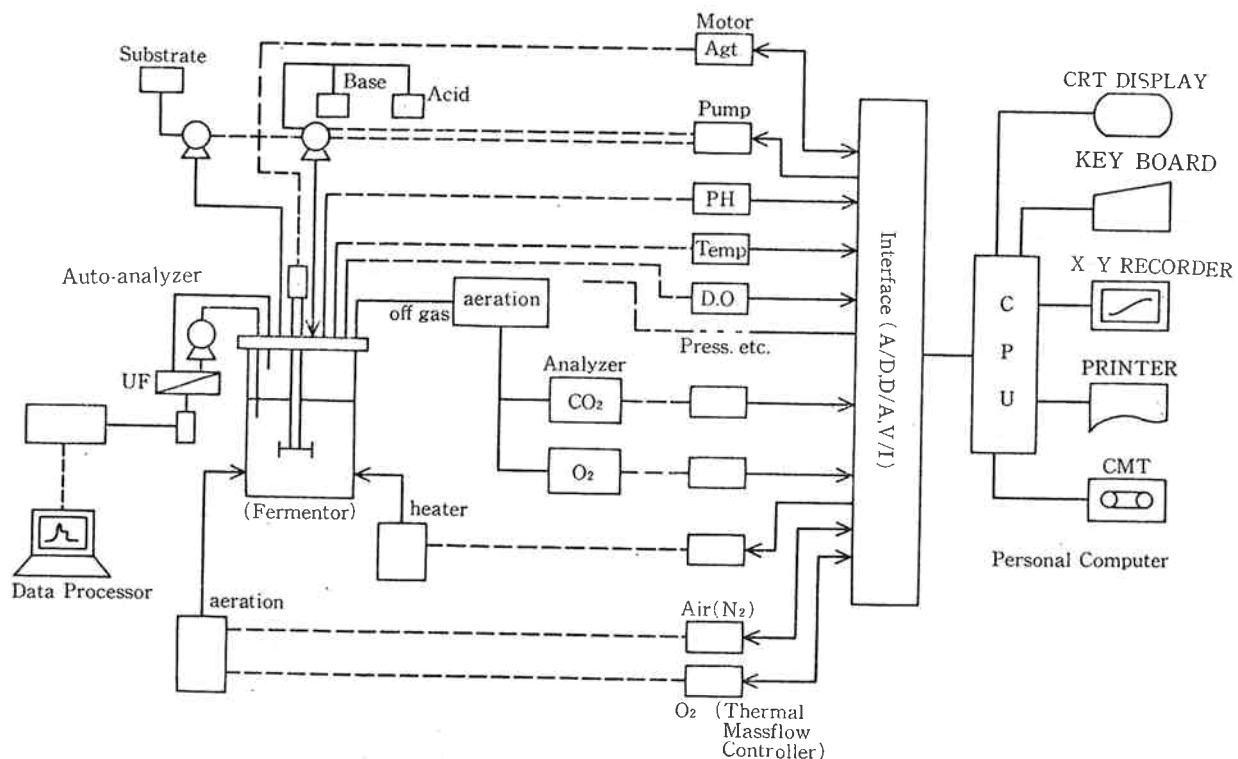


Fig. 1 Schematic diagram of computer control system

通気は、空気のみでなく、酸素との混合通気も可能であり、その場合、それぞれの通気量をマスフローコントローラで制御して混合することができる。

発酵排ガスは、除湿・除塵等の処理をした後、赤外式ガス分析計（富士電機製）により炭酸ガス分圧、磁気式酸素分析計により酸素分圧を測定した。

〔2〕 パーソナルコンピュータによる計測制御

先に述べた計測制御は、パーソナルコンピュータによる DDC (Direct Digital Control) 制御により行った。

パーソナルコンピュータは、パナファコム社製 C-15E を用い、プログラミングは BASIC 言語を用いた。

制御用 BASIC 言語を用いることにより、アセンブラ言語等に比べ、容易にプログラムの作成・変更を行うことができる。

また、DDC 制御方式を採用したことにより、単なる定値のフィードバックコントロールのみでなく、プログラムコントロール、フィードフォワードコントロール等系の特性、実験の目的にあわせて自由自在に制御方式の決定・変更を行うことが可能である。

(1) 計測制御機器とコンピュータとのインターフェース
センサー・分析計からの信号は、一度 4-20 mA の計装用電流信号にして転送する方式をとっているため、雑音に対しても強く、遠距離への転送も可能である。

機器とコンピュータとの信号の伝送は、パラレル DI/O 方式であり、入力信号は、A/D 変換器・マルチプレクサー等のインターフェース類を通して CPU (計算機中枢部) に入力され、CPU からの制御信号は、D/A 変換等を行って、攪拌モータやヒータの出力等になる。

(2) コンピュータシステムの機能

本システムは、計測制御のみならず以下の機能を有す

る。すなわち、データの保存・打ち出しとパラメータの設定・変更及び経時変化の表示等のマン・マシンコミュニケーション機能である。

データの保存は、カセット磁気テープ装置を用い、実験終了後、保存したデータを D/A 変換して X-Y レコーダで記録することができる。

この方式は、時間軸を自由に変更できるのみならず、保存したデータを自由に加工することができ、(例えば時間に対して積分したり、差分をとるといった計算を CPU において行うことができる) 加工したデータを打ち出すことができる。さらに、各変数の時間変化のみならず、プロセス変数相互の関係も図示することが可能である。

以上により、従来の実験室で行われていたアナログの記録方式に比べ、非常に幅の広い解析方法が使える、結果を迅速・簡便に表示することが可能となった。また、生データをテープに保存することにより、後日新しい解析手段を採用した場合にも過去のデータの再計算が容易となる。

このことは、本システムがラボラトリーオートメーションのひとつとして、研究開発のシステム化・効率化の手段として非常に有効であることを示すものである。

さらに、マン・マシンコミュニケーション機能としては、CRT ディスプレイ上への培養経時変化の表示及びキーボード・パネルスイッチを用いた、制御条件・パラメータの初期設定・途中変更を行うことができる。

〔3〕 培養液の自動分析

Fig. 2 にシステムの概要を図示した。

サンプリングポンプにより抜き出された培養液は①の限外ろ過装置を通して循環し、培養液中の菌体がろ過

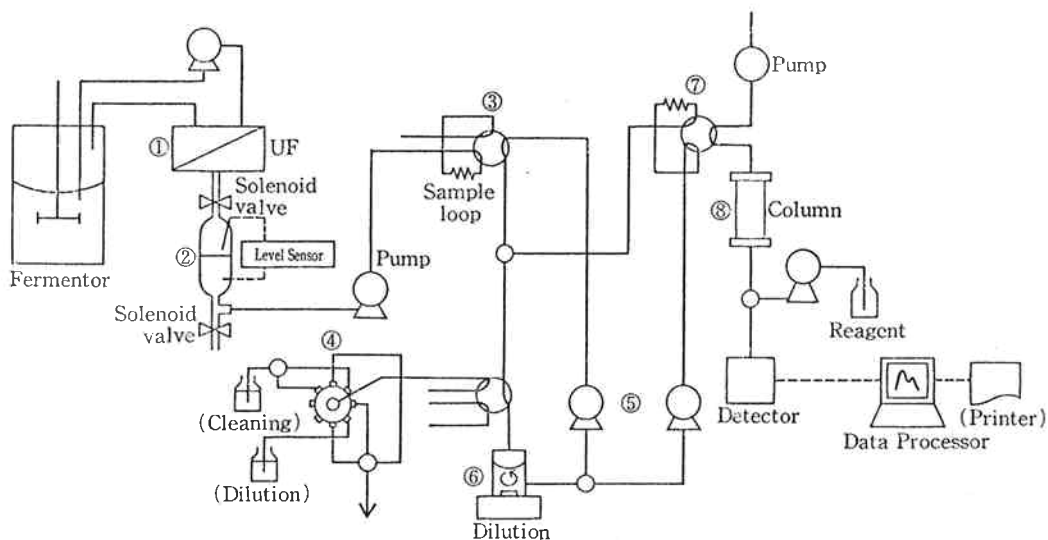


Fig. 2 On-line autoanalysis system of culture broth

され、ろ液がサンプリングされる。

限外ろ過のろ液流量の変動を考慮し、ろ液を一定量サンプリングするために②のろ液保持部を設け、その液面を検出することにより等量のろ液をサンプリングする方法を採用した。液面の検出は、接触センサあるいはフォトトランジスタによる光電式位置検出器を用いた。

一定量サンプリングされたろ液は、ポンプにより抜き出され、次のラインに送られる。③の六方バルブ（レオダイナ製）の切り換えにより、バルブのサンプルループの容量分が希釈・送液ラインに注入される。

希釈ラインは、④の八方バルブの切り換えにより、希釈液・洗浄液が注入され、⑤のポンプの回転方向の切り換えにより排液を行えるようになっている。

以上により希釈・送液ラインでは、注入されたサンプルを⑥の希釈槽において定量的に希釈し、⑦の六方バルブの切り換えにより分析ラインに注入される。

また、ラインの洗浄・排液によりサンプル間の汚染やラインの汚れの蓄積を防ぐことができる。

分析ラインでは、種々の分析方法が採用できるが、高速液体クロマトグラフ（例えば、東洋曹達製 HLC）や固定化酵素カラムを用いて成分分析を行い、検出されたピーク面積をデータプロセッサ（東洋曹達 CP8-model III）により計算することができる。

3. 微生物培養計測制御システムの応用

前章で紹介したシステムを用いて行った実験例について述べる。

微生物培養における重要な因子である溶存酸素の制御に関して、培養系の酸素移動容量係数 k_{La} の自動計測・評価と溶存酸素の PID 制御の例について述べる。

次に、計算機制御の一例として、排ガス分析に基づくパン酵母の流加培養制御について述べる。

最後に、自動分析システムを利用した、グルコース濃度の分析について述べる。

[1] k_{La} の自動計測・評価

培養液への酸素移動の指標である酸素移動容量係数 k_{La} (k_L : 気液界面における物質移動係数 a : 気泡の表面積) の測定については、通気・攪拌のステップ変化（停止状態からのステップ変化）に対する溶存酸素濃度の時間的変化を溶存酸素電極で測定することにより求める方法がある。（実際の培養系では、通気停止時の微生物による呼吸速度を求めて補正を行う—ダイナミック法⁴⁾）しかしながら、本法では酸素系の応答特性を考慮する必要があり、合葉らによると⁵⁾、酸素計が一次応答を示すとすると、酸素計の指示値に対応する溶存酸素濃度の値 \bar{C} の時間的変化は、次のようになる。

$$\bar{C} = C^* \left\{ 1 + \frac{k_{La}}{k_p - k_{La}} \exp(-k_p t) - \frac{k_p}{k_p - k_{La}} \exp(-k_{La} t) \right\} \quad (1)$$

k_p は酸素計の応答係数で C^* は飽和酸素濃度を示す。

我々は、 \bar{C} の時間的変化の計測結果を入力し、実測値によく合う k_{La} の値を試行錯誤によって求めた。

実験系としては、まず、窒素通気で酸素を追い出し、空気の通気及び攪拌を再開し、酸素計の出力値をコンピュータに入力する。

入力したデータに基づいて(1)式を計算し、 k_{La} の値を推定した。

以上の操作は、本システムにおいては、窒素置換時からデータの計算まで、人手をわずらわすことなく自動的に行うことができた。

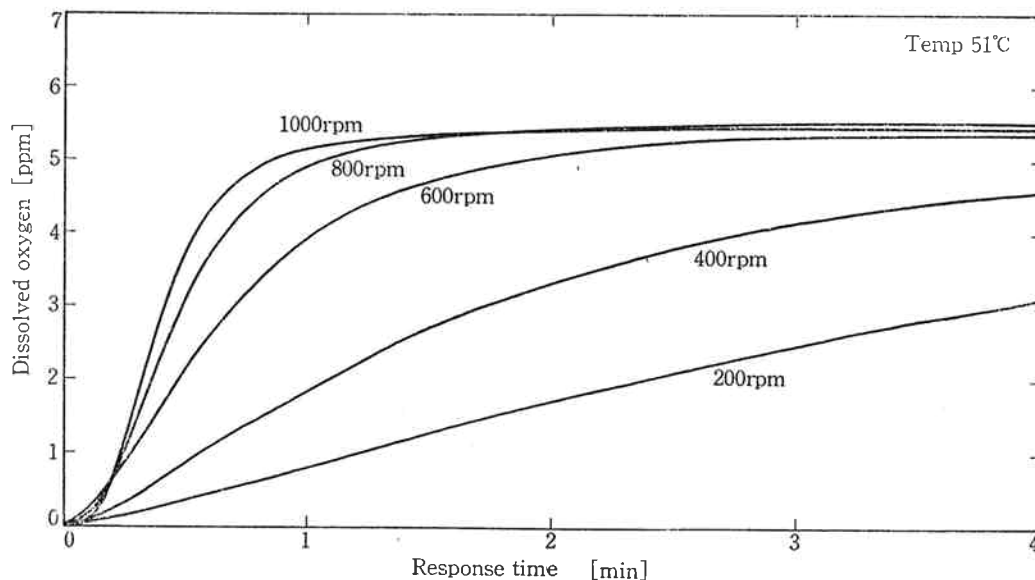


Fig. 3 Step response of D. O. to step change of Agitation

Fig. 3 に、溶存酸素の応答を X-Yレコーダに打ち出した結果を示した。

〔2〕 溶存酸素濃度の PID 制御

微生物の培養において、溶存酸素は、重要な制御因子であるにもかかわらず、pH・温度に比べると十分な制御が行われているとは言い難い。

最近、殺菌可能で精度安定性のよい溶存酸素計の開発とコンピュータの導入により、溶存酸素の制御技術が進歩してきているが、操作量が撹拌数と通気量、場合によっては、通気ガス組成と多様なこともあり、制御方式も十分なものとはいえない。

我国では、小林、矢野らにより、撹拌・通気の変動にステップ幅を設け、溶存酸素の変化に追従して段階的に撹拌・通気を変えることにより、溶存酸素の制御をパーソナルコンピュータを用いて行う方法が報告されるなど⁶⁾、この方面の研究が、発酵工学及び生物化学工学の分野で注目されてきている。

我々は、本システムを用い、通気量・撹拌速度を操作量として PID 制御方式を採用することにより、精度のよい溶存酸素濃度の制御を行うことができた。

撹拌速度及び通気量のステップ変化に対する溶存酸素の過渡応答とセンサの特性を求めると、ジグラー・ニコルスの限界感度法により、比例ゲイン、微分及び積分時間等の制御パラメータを求めることができる。

デジタル制御の場合、アナログ制御と異なり、サンプル値制御であるため、アナログ制御を基準としたジ-

グラー・ニコルスの方法により求めたパラメータを採用する際には考慮を要する。

溶存酸素濃度を C 、設定値を C_P 、操作量である撹拌速度及び通気量を y とすると PID 制御の式は、差分式を用いて、 t から Δt 秒間の操作量の変動を次のように表わすことができる。(ここでは、速度型を用いた。)

$$y_{t+\Delta t} = y_t + \Delta y \tag{2}$$

$$\Delta y = K_P(C_t - C_{t-1}) + K_I(C_t - C_P) + K_D(C_t - 2C_{t-1} + C_{t-2}) \tag{3}$$

となる。

以上のような方法で、培養系の溶存酸素の制御を行った結果を Fig. 4 に示した。

実験に供試した菌株は、*Bacillus stearothermophilus* に属する菌株である。

炭酸ガスの濃度で微生物の増殖速度を表わしてあるが増殖速度に応じて撹拌速度・通気量が連続的に変化し、溶存酸素濃度が精度よく一定に保たれていることがわかった。

以上により、本システムを用い、撹拌速度・通気量を操作量とした PID 制御を行うことにより、溶存酸素濃度を精度よく制御できることがわかった。

〔3〕 排ガス分析に基づくパン酵母の流加培養制御と菌体量のオンライン推定

パン酵母の菌体生産は、以前より流加培養法が行われているが、近年、排ガス分析により、RQ 値(炭酸ガス発生速度と酸素消費速度の比=呼吸商)をもとに、糖の流加量を効率的に制御し、好気発酵によるエタノールの

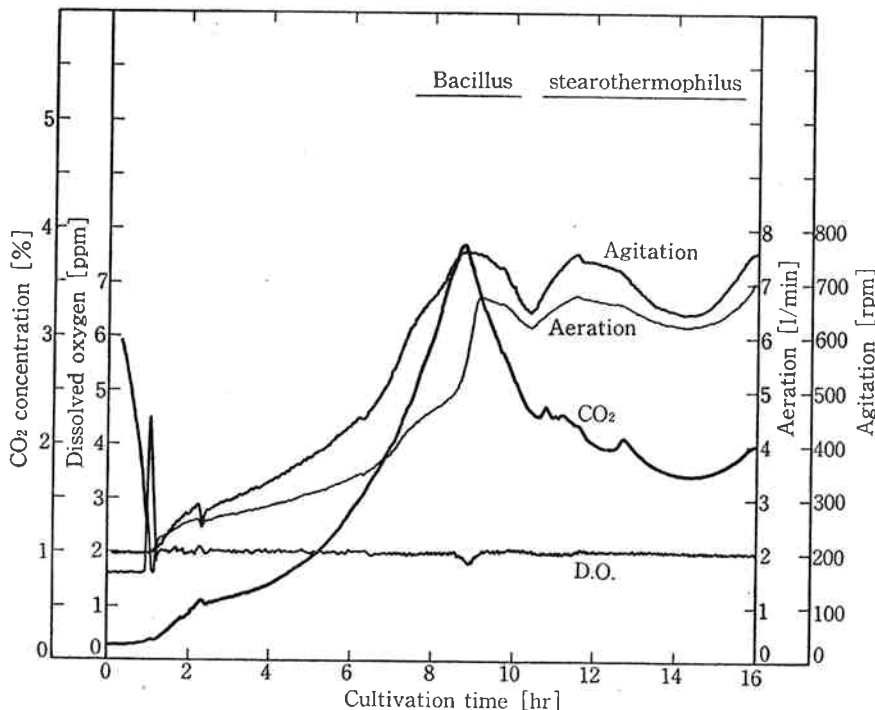


Fig. 4 D. O. control of microbial culture

生成を最小に抑え菌体生産効率を上げる方法が合衆らにより⁷⁾ 開発されて以来、コンピュータ技術の進展によりコンピュータによる流加培養制御の研究が種々行われている⁸⁾。

我々は、先に述べたシステムの応用例として、排ガス分析に基づくパン酵母の流加培養制御をとりあげた。

基本となるのは、RQ 値を1.0の近辺に保つよう糖の流加量を制御することであるが、RQ 値と糖の添加量をもとに、酵母菌体量のオンライン推定を行い、菌体の増殖に応じた糖の供給を行う方式を併用した。

(1) 理論

1) 酵母の糖代謝と菌体生産

パン酵母の生産は、糖質を主原料として、通気攪拌培養において酵母菌体を生育させるプロセスである。

酵母の糖代謝を考えると、EMP 経路によるピルビン酸への分解に始まり、発酵によるエタノールの生成、あるいは、好気条件でのピルビン酸の酸化(アセチル CoA の生成を経て、TCA 回路での代謝による炭酸ガスへの完全酸化=呼吸)によって糖が代謝され、生成した ATP は、酵母菌体の増殖に使われる。

呼吸によるグルコースの完全酸化の量論式は、次のように表わされる。



発酵によるエタノール生成の量論式は



のように表わされる。

(4)、(5)式を比べてみればわかるように、エタノール発酵に比べ、呼吸での ATP 生成効率は非常に大きく、消費されたグルコースに対する生成した菌体の収率は、呼吸のほうがだんぜん大きい。

そのため、グルコースからの菌体生産においては、基質であるグルコースが完全に酸化されることが、菌体の収率を上げるために不可欠である。

一般に、パスツール効果により、酸素存在下では、発酵が抑制され、呼吸が行われるが、グルコースの代謝速度が大きくなれば、クラブトリー効果により、好気条件下でも発酵がおこって、菌体の収率が低下する。

そのため、パン酵母菌体生産においては、最初から高濃度に仕込むことはせずに、糖を連続的に添加していくいわゆる流加培養(半回分培養)が行われている。

従来は、経験的な方法で流量等を決めていたが、酵母の増殖代謝の知識をもとに、定量的に流加量を制御する研究が行われており、前述の合衆らによる RQ に基づく制御を始めとして、Wang, Cooney らによる、物質収率式に基づく制御⁸⁾、大塚らによるエタノールセンサーを用いた制御⁹⁾等各種の研究が行われ成果を上げてい

る。

その中で、排ガス分析による RQ 制御は、代表的なものであり、研究例も多い。

2) 培養制御の問題点

RQ の値は、呼吸と発酵の割合を示すものであり、菌体量や増殖速度の項は、消去されたかっこうになっている。

実際に制御を行うにあたっては、分析計の精度や安定性の問題等も含めて、制御幅や操作量のゲインの決定をどうするかといった問題がおこる。

半回分培養であるので、対象とする系の動特性や安定性は、時間とともに変化するが、増殖速度や菌体量の影響が大きいと考えられる。

本研究では、オンラインで菌体量を推定し、RQ の値と菌体量をモニタして糖の流加量を制御する方式を採用した。

3) RQ の値と菌体収率

酸素呼吸による炭酸ガス発生を $Q_{CO_2(ox.)}$ [mole $CO_2/hr/g$ cell], 酸素消費を Q_{O_2} [mole $O_2/hr/g$], 発酵による炭酸ガス発生を $Q_{CO_2(Ferm.)}$ [mole $CO_2/hr/g$] とする。

酸素呼吸のみの場合は

$$Q_{CO_2(ox.)}/Q_{O_2} = RQ \quad (\text{Respiratory Quotient} = \text{呼吸商}) \\ = 1 \quad (6)$$

発酵のみの場合は

$$RQ = Q_{CO_2(Ferm.)}/Q_{O_2} (\equiv 0) = \infty \quad (7)$$

呼吸と発酵が同時におこっている場合は

$$1 < RQ \left(= \frac{Q_{CO_2(ox.)} + Q_{CO_2(Ferm.)}}{Q_{O_2}} \right) < \infty \quad (8)$$

というふうに表わされる。

呼吸による収率を $Y_{Ox.}$ 、発酵による収率を $Y_{Ferm.}$ とすると、ATP 生成効率より ((1), (2)式参照)

$$Y_{Ferm.} \equiv Y_{Ox.}/19 \quad (9)$$

呼吸と発酵が同時におこっている場合の収率 Y は

$$Y = \left(Y_{Ox.} + \frac{Q_{CO_2(Ferm.)} \cdot 3Y_{Ferm.}}{Q_{O_2}} \right) / \\ \left(1 + \frac{Q_{CO_2(Ferm.)} \cdot 3}{Q_{O_2}} \right) = \frac{Y_{Ox.} + 3Y_{Ferm.}(RQ-1)}{1+3(RQ-1)} \\ = \frac{\left(\frac{16}{19} + \frac{3}{19}RQ \right) Y_{Ox.}}{3RQ-2} \quad (10)$$

$Y_{Ox.} \equiv 0.5$ とすると

$$Y = \frac{1}{38} \cdot \frac{16+3RQ}{3RQ-2} \quad (11)$$

収率 Y と RQ の関係を Fig-5 に示した。RQ の上昇に伴い収率が急激に低下していくのがわかる。

この Y の値と添加した糖の量から菌体量を推定する。ある時刻 t における菌体濃度を $X[g/\ell]$ 、初発菌体濃

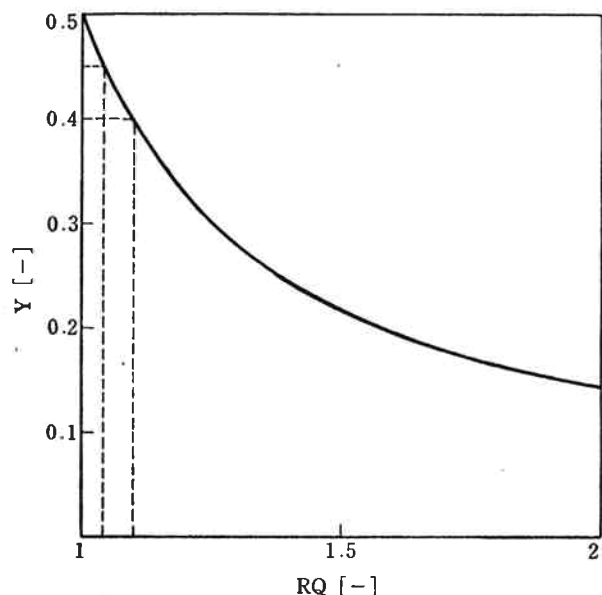


Fig. 5 Estimation of Y value from RQ value (Theoretical curve)

度を X_0 [g/l], ポンプ流量を F [l/hr], 添加液中の糖濃度を S_f [g/l], 培養液中の残存糖濃度を S_R [g/l], 初発液量を V [l] とすると

$$X = X_0 + \int_0^t \frac{Y (FS_f - S_R(V + F \int_0^t dt))}{(V + F \int_0^t dt)} dt \quad (12)$$

$S_R \approx 0$ とすると

$$\begin{aligned} X &= X_0 + \int_0^t (YFS_f / (V + F \int_0^t dt)) dt \\ &= X_0 + \sum_{k=1}^N \left\{ \left(\frac{1}{38} \cdot \frac{16 + 3RQ}{3RQ - 2} \cdot FS_f \right) / (7 + F \Delta t_k) \right\} \end{aligned} \quad (13)$$

(2) パン酵母の培養制御

1) 菌株・培地組成

菌株は, *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) IFO 2044 培地組成は, グルコース 10 (g/l) に対して, 硫酸アンモニウム 2 (g/l), リン酸 1 カリウム 1 (g/l) の割合で加えたもので, その他, 硫酸マグネシウム, 塩化カルシウム, 微量元素, ビタミン類を含む。微量元素・

Table 2 Medium composition of baker's yeast culture

Glucose	10 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
NaCl	0.1 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1 g
Inositol	100 μg
Ca-Pantothenate	100 μg
Nicotinic acid	100 μg
Biotin	50 μg
Folic acid	10 μg
Pyridoxine	20 μg
p-amino benzoic acid	10 μg
Riboflavin	10 μg
Thiamine-HCl	20 μg
H ₃ BO ₃	100 μg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	10 μg
KI	10 μg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	50 μg
MnSO ₄ ·H ₂ O	100 μg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	50 μg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	50 μg
Distilled water	1 l
pH	5.0

Table 1 Effect of medium composition on yeast growth (Variance analysis)

	D. F.	Square	Variance	Ratio	%
Total	26	7.25			
Glucose C	2	0.53	0.26	3.15	4.96
(NH ₄) ₂ SO ₄ N	2	0.17	0.08	1.01	0.03
KH ₂ PO ₄ etc.	2	0.45	0.22	2.69	3.89
Metal ion	2	0.09	0.05	0.55	-1.04
Inositol	2	0.05	0.02	0.27	-1.68
Pantothenic acid, N. A.	2	1.60	0.80	9.59	19.81
Biotin, Folate	2	3.07	1.54	18.36*	40.07
Piridoxin, PABA	2	0.25	0.13	1.52	1.20
Riboflavin, Thiamin	2	0.37	0.18	2.20	2.77
C×N	4	0.41	0.10	1.20	1.09
error e			$V_e = 0.0836$		

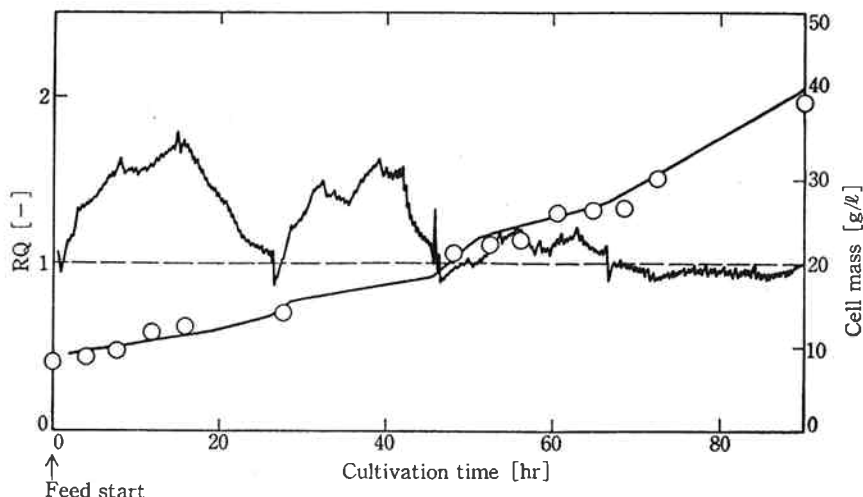


Fig. 6 Fed-batch culture of Baker's yeast

ビタミンの添加量については、Wickerham の培地組成を基本として、実験計画法による因子分析を行って（実験は、フラスコ実験で、濁度によって菌体量を測定した）決定した。

$L_{27}(3^{18})$ 型直交表を用いて、実験条件の割付を行った。結果の解析は、分散分析によって行った。

分散分析表を Table 1 に示した。

その結果、本菌株は、増殖促進因子としてビオチンを要求することがわかった。

以上に基いて、培地組成の決定を行った。

培地組成を Table 2 に示した。

2) 実験条件

コンピュータ制御システムを用い、温度 30°C 、pH 5 に制御し 14 l 培養槽での通気攪拌培養を行った。

基質であるグルコースを（その他、硫酸、リン酸 1 カリを含む）ペリスタポンプで添加していく流加培養を行った。

3) 流加培養制御の方法

排ガス分析での炭酸ガス濃度と酸素濃度及び通気量から、炭酸ガス発生速度 I_{CO_2} と酸素消費速度 I_{O_2} を求め、 $RQ = I_{\text{CO}_2}/I_{\text{O}_2}$ を計算した。さらに、 RQ の値から菌体収率 Y を求める。あらかじめ設定入力してあるポンプ流量とポンプ作動時間から添加糖量を求め、それと Y の値から菌体量 X を計算した。

RQ の値が $1.0 + \alpha$ (α は、制御幅で、例えば 0.05) になるまでポンプを作動させて、糖を添加する。

計算した X の値に比例してポンプの作動時間を増加させ、菌体量に応じて糖の添加量が制御できるようにした。

培養初期には、増殖を継続させるために、菌体量あたりの増殖速度が一定の値以下にならないように糖を添加

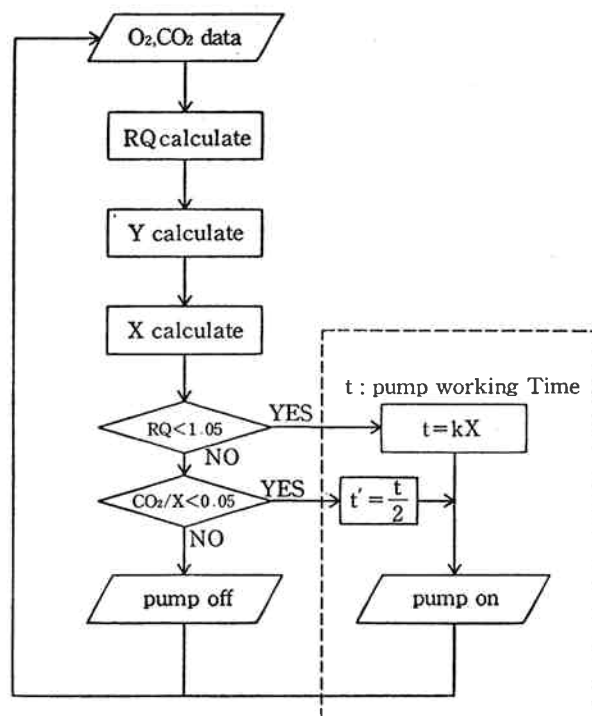


Fig. 7 Flow-chart for RQ control

していく必要がある。

以上の動作をフローチャートで示したものが Fig. 7 である。

実際に培養を行った結果を Fig. 6 に示した。

流加培養初期においては、 RQ の値は変動しているが菌体量が大きくなると安定した値が得られた。

また、直線で示した推定菌体量と、実際に測定した菌体量（濁度を測定し、乾燥菌体重量に換算した値）とはよく一致した。

〔4〕自動分析システムによるグルコース濃度の分析
前章で説明した、培養液の自動分析システムを用い

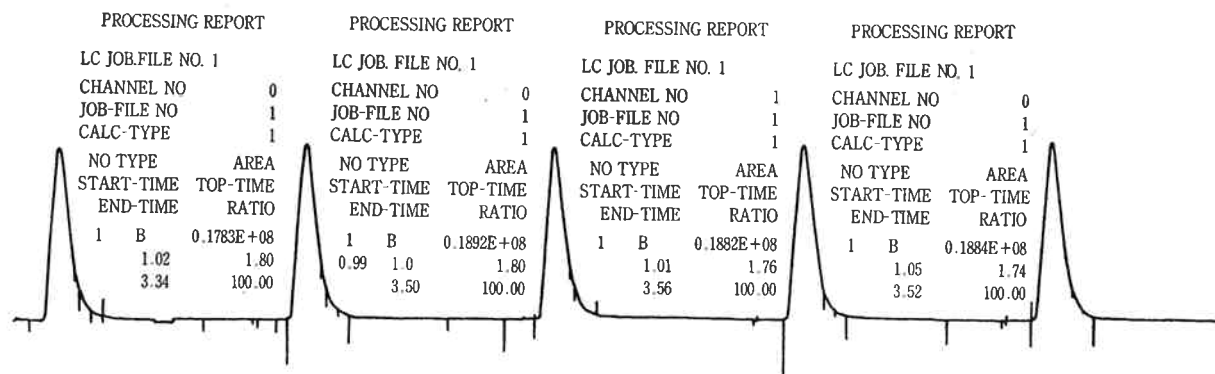


Fig. 8 Auto-analysis of glucose

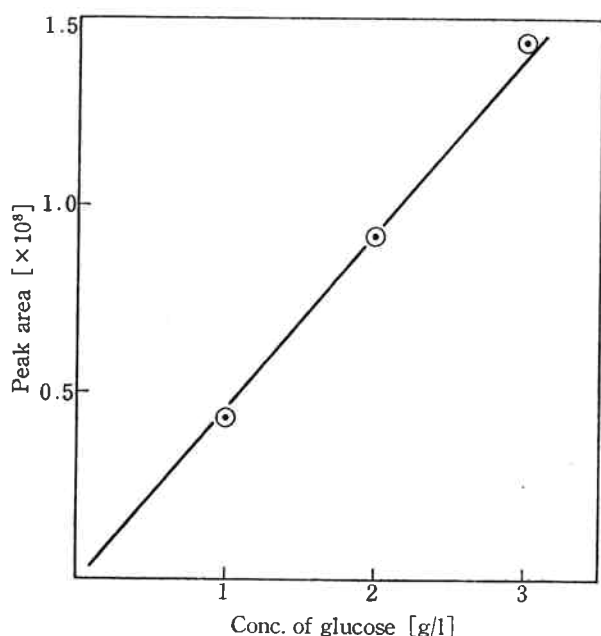


Fig. 9 Auto analysis of glucose

て、グルコース濃度の自動分析を行った。

このシステムは、先に述べたように、培養液のサンプリングから、ろ過、希釈、分析、データの処理を、シーケンスクントローラとパーソナルコンピュータを用い、自動的に行おうとするものである。希釈ラインについては、液の排出やラインの洗浄工程により、ラインの汚れなく一定量が希釈され、分析されることにより再現性のよいデータが得られると考えられる。

我々は、固定化酵素カラムを用いたグルコースの分析について、本システムによる自動化を行った。

使用した固定化酵素カラムは、グルコースオキシダーゼを固定化したもので、生じた過酸化水素をパーオキシダーゼ存在下、4-アミノアンチピリンの発色により検出した。ピークの面積は、データプロセッサ（東洋曹達製 CP8-model III）で計算し、用紙に印字される。

分析システムの概要は Fig. 2 に図示したとおりであ

り、本実験では、⑧に固定化酵素カラムを使用した。

同一サンプルの繰り返し測定の実験について検討した結果を Fig. 8 に示した。図は、検出されたピークとデータプロセッサにより計算され、出力されたピーク面積を示したものである。

ピーク面積値の平均が 0.187×10^8 に対して、標準偏差が 0.00594×10^8 であり、同一サンプルの繰り返し測定について、満足いく再現性が得られた。

また、グルコースの標準液 (1 g/l ~ 3 g/l) の分析を行った結果について Fig. 9 に示した。これによると、グルコース濃度とピーク面積の間には、きれいな直線関係が得られた。

4. おわりに

我々は、発酵研究における CAE をめざし、パーソナルコンピュータを用いて微生物培養システムのコンピュータ化を行った。

開発したシステムを種々の実験例について適用した。

今後は、こういった研究はますます一般化してくると考えられ、そのための使いやすかつ高精度で信頼性の高いシステムが開発されるであろう。

文 献

- 1) Humphrey A. E.; *Process Biochem.*, 12, 19 (1977).
- 2) Jefferis R. P. III; *Workshop Computer Appl. Ferm. Technol.* 1976, Verlag Chemie, 21 (1977).
- 3) 小花春夫; "化学工学", 42(9), 37 (1978).
- 4) Taguchi H., Humphrey A. E.; *J. Ferm. Technol.*, 44, 881 (1966).
- 5) Aiba S., Humphrey A. E., Millis N. F.; *Biochemical Engineering 2nd ed.*, University of Tokyo Press, 1973.
- 6) Yano T., Kobayashi T., Shoichi S.; *J. Ferm. Technol.*, 59, 295 (1981).

- 7) Aiba S., Nagai S., Nishizawa Y.; *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1001 (1976).
- 8) Wang H. Y., Cooney C. H., Wang D. I. C.; *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 975 (1979).
- 9) Dairaku K., Izumoto E., Morikawa H., Shioya S., Takamatsu T.; *J. Ferment. Technol.*, **61**, 189 (1983).