

深層学習を活用したヒアルロン酸発酵生産の効率化

北見工業大学工学部・教授 小西 正朗

■ 目的

ヒアルロン酸(HA)は優れた保湿性や高い粘弾性、粘膜接着性を有しており、点眼薬、変形関節症治療薬などの医薬品、化粧品、健康食品等に利用されている。現在主流の HA 発酵生産には莢膜中に多量の HA を生産する *Streptococcus zooepidemicus* やその変異株が用いられている。一般的に発酵生産コストは固定費の割合が大きいため、HA 発酵生産をさらに効率化するためには、体積あたり生産性(g/L/h)を最大化する培養方法を開発する必要がある。本研究では、課題提案者らが開発した AI を活用した培地最適化方法を *S. zooepidemicus* による HA 生産に適用し、HA の生産性を最大化する初発培地の設計ならびに流加培養方法を提案することを目的とした。

■ 方法

AI 支援培地最適化

(1)学習データ収集

Streptococcus zooepidemicus ATCC 39920 株を用いた。前培養は Brain Heart Infusion 培地を用いた震盪フラスコ培養を用いた。学習データ収集用培地組成は 30 g/L glucose, 15 g/L Tryptone, 20 g/L Yeast extract, 2.5 g/L KH₂PO₄, 2.0 g/L KH₂PO₄, 2.0 g/L NaCl, 1.5 g/L MgSO₄ 7H₂O を基準として、× 0.5、× 1.0、× 2.0 の 3 水準とする直交計画により、18 条件を設定した。ディープウェルマキシマイザーを用いて、37°C、1,500 rpm で培養した。

(2)AI 予測モデルの構築および最適値探索

既報に準じて、学習用データセットを用いて培地組成を説明変数、HA 生産量を応答変数とする AI 学習済みモデルを構築した。構築した AI モデルおよび最適化アルゴリズムにより予測 HA 生産量が高い組成を 54 種類を算出した。

(3)AI が予測した最適培地の性能試験

AI 予測モデルにより推定した 54 種類の最適培地の性能試験は学習データ収集と同様の培養方法で実施した。

通気攪拌槽による培養試験

2.5 L 容量のジャーファーマンターに 1 L の培地を仕込んで培養した。培養温度は 37°C、通気量は 1 vvm とし、DO ≥ 20% 飽和を維持するように攪拌回転数を 300 ~ 1,000 rpm までで制御した。pH は 7.0 とし、pH 調整剤は 5 mol/L NaOH を使用した。流加培地組成は 250 g/L glucose, 72 g/L Tryptone, 96 g/L Yeast extract, 48 g/L K₂HPO₄, 24 g/L KH₂PO₄, 7.2 g/L MgSO₄ 7H₂O とし、培養開始 7.5 時間目から 17.5 時間目まで 0.8 mL/min で流加した。HA の測定には cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) を用いた比濁法を用いた。Glucose 量測定には、グルコース II-テストワコー(和光純薬)もしくは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法を用いた。

■ 結果および考察

直交計画した 18 種類ならびに標準培地で HA 生産したところ、0.32 ~ 1.39 g/L HA 生産量を示し、HA 生産量が顕著に変化した。学習済み AI モデルにより HA 生産量は 1.77 ~ 2.88 g/L が予測されたが、検証培養における HA 生産量は 0.13 ~ 1.66 g/L と予測より少ない生産量であった。検証培養の結果、学習データを上回る優れた培地組成(26.1 g/L glucose, 7.5 g/L Tryptone, 10 g/L Yeast extract, 5.0 g/L KH₂PO₄, 4.0 g/L KH₂PO₄, 4.0 g/L NaCl, 0.75 g/L MgSO₄ 7H₂O)を見出すことができた。

見出した培地を通気攪拌槽で再評価したところ、HA 生産量は 8 時間で 3.4 g/L に達し、生産性は 0.425 g/L/h に達した。本研究で見出した培地を用いた培養は、既報と比べて HA 生産量で 1.7 倍程度であることがわかった。また、HA 対糖収率が 20 ~ 30% の向上が認められた。この培地はリン酸塩以外の成分を抑制気味に添加した培地になっており、初発の比増殖速度(約 1.1/h)を維持しつつも、培養後半で増殖が抑えられる傾向があった。

さらに初発培地組成を考慮した流加培地を設計し、流加培養での HA 生産性を検証したところ、10 時間の培養で、5.2 g/L_{-initial}(初発培地体積基準)の HA を生産できた。初発培地体積を基準とした体積当たり生産性は 0.52 g/L_{-initial}/h に達している。HA 対糖収率も 0.1 g/g を維持した。

■ 結語

AI を活用した培地最適化手法は HA 微生物生産に適用可能であり、効率的に適切な培地を探索できることがわかった。