

Title	エタノール流加によるグルタミン酸醗酵の最適化
Author(s)	岸本, 通雅
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1533
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

エタノール流加による グルタミン酸醗酵の最適化

昭和56年1月

岸 本 通 雅

目次

緒論	1
第1章 エタノール流加によるグルタミン酸醗酵の 培養特性	4
第1節 緒言	4
第2節 実験方法	4
第3節 実験結果及び考察	9
1. エタノール濃度を一定に維持した流加培養 の経時変化	10
2. 菌体増殖に与えるエタノール濃度の影響	12
3. グルタミン酸生産開始時期及び生産継続時 間に与えるエタノール濃度の影響	12
4. エタノール濃度の段階的増加を行った流加 培養	14
第4節 要約	18
第2章 回帰分析を用いた流加培養のシミュレーシ ョン	19
第1節 緒言	19
第2節 流加培養の数式的表現	21
第3節 アルゴリズム	27
第4節 シミュレーション結果	29
第5節 考察	30
第6節 要約	32

第3章	動的計画法による最適化アルゴリズム	34
第1節	緒言	34
第2節	理論	35
第3節	アルゴリズム	37
第4節	計算結果	39
第5節	考察	41
第6節	要約	44
第4章	オンライン最適制御システム	45
第1節	緒言	45
第2節	計算方法	45
第3節	実験方法	49
第4節	実験結果	52
第5節	考察	54
第6節	要約	55
総括		56
使用記号説明		60
引用文献		62
本論文に関係ある報告		67
謝辞		68

緒 論

流加培養の利点は、ある培地成分の濃度が菌体増殖や代謝産物生成速度に著しく影響を及ぼす場合に、培養液中の供給基質濃度を任意に制御出来る点にある。例えば、パン酵母製造において醗酵を抑え増殖収率を上げるため、低糖濃度を維持するように糖を逐次添加する方法¹⁾や、ペニシリン醗酵においてエネルギー源であるグルコースやラクトースと、ペニシリンの前駆体であるフェニル酢酸を逐次添加する方法²⁾がある。今日では工業的培養において栄養物を途中で添加することは、各種の醗酵で行なわれている。

山根³⁾によると流加培養はフィードバック制御の有無によって分別され、フィードバック制御のない流加培養には、定流量流加培養、指數的流加培養、最適化流加培養があり、フィードバック制御があるものとして、間接的制御のある場合と直接的制御のある場合とに分類される。このうち実験に基づく代表的報告例として間接的フィードバック制御の範ちゅうに属するもので、 $RQ^{4,5)}$ や $D.O.^{6\sim 10)}$ 等を制御の指標とする方法がある。しかしこれらの指標に基づく制御は菌体生産等では行われるが、二次代謝産物の生産等では指標を見出すことが困難なため簡単には適用できないと思われる。

このように流加培養において最も重要な工学的問題は適切な基質の流加方式を探索することである。それには動的システムを対象とする最適化手法を適用することが考えられる。従来流加培養の最適化に関する報告として、最大

原理¹¹⁾を用いた Fishman¹²⁾，および Yamane¹³⁾による報告と，グリーン¹⁴⁾の定理を用いる Ohno¹⁴⁾の報告がある。しかし以上の最適化手法はいずれも実験によってその効果が示されるにはいたっていない。

最適制御の研究が重要な課題であるにもかかわらず報告例が少ない理由としては次のように考えられる。まず流加培養は本質的に非定常な系であり，かつ複雑な微生物反応を含んでいるため，簡単な微分方程式による数式モデルで系を記述することが困難である。つぎに非定常プロセスの最適化計算法の中で，最大原理¹¹⁾ないしは動的計画法¹⁵⁾以外に，流加培養の最適化に有効な方法はほとんどなく，これらの方法ともモデル式が複雑であったり，高次元の場合，解析解はもとより数値解をうることもさへ非常な困難を生ずる。さらに流加培養では操作変数である基質流加速度の項が基質消費のモデル式に線形で組み込まれることとなり，特異制御の問題が生じやすく，この場合最大原理では原理的には解けないことになる。¹⁶⁾

本研究では，流加培養の最適化について，汎用性の高い工学的手法を提案し，さらにこの最適化計算法をオンライン最適制御へ展開し，実験的にこの手法の有効性を検討した。

以下に本論文の概要を示す。

まず第1章では *Brevibacterium divaricatum* NRRL 2311 を用いエタノール流加によるグルタミン酸生産について，その培養特性 特^にエタノール濃度が菌体増殖，グルタミン酸生産に及ぼす影響について検討した。さらにエタノール

濃度を培養初期には低く保ち途中で高濃度にシフトする流加方式がグルタミン酸生産に有利であることを示した。

第2章では培養経過のシミュレーション方法について検討した。すなわち培養のモデル式中物質収支等簡単な数学的取り扱いのみでは容易に決定されない変数、比増殖速度、エタノール比消費速度、グルタミン酸比生産速度、炭酸ガス比生成速度の時間的变化率の値を、培養データを用いて得られる回帰方程式によって推定し、Runge-Kutta-Gill法と組み合わせて培養経過をシミュレートした。

第3章では前章で述べたシミュレーション方法と動的計画法とを組み合わせた汎用性の高い最適化アルゴリズムを誘導し、計算例を提示し、実験データと矛盾しない計算結果がえられたことを示した。

第4章ではオンライン制御に用いる醗酵槽付設制御用計算機の負担を軽減するために、前章の最適化計算プログラムを分割して修正した。その計算方法に基づいてオンライン制御の実効性を検討するための模擬実験を行い、このオンライン最適化アルゴリズムが流加培養の最適化に有効であることを示した。

第1章 エタノール流加によるグルタミン酸醗酵の培養特性

第1節 緒言

近年、エタノールを原料とした種々のアミノ酸醗酵が研究されている¹⁷⁾。しかし高エタノール濃度では菌体増殖が阻害されるため、回分培養によるアミノ酸生産は低く抑えられる。従ってエタノールを培養経過中追加する流加培養の有利性が考えられる。

従来、流加培養においてエタノール濃度のアミノ酸醗酵に対する影響を直接検討した報告はなく、わずかに還元糖を用いた培養でアルコールを添加する効果について検討した河野ら¹⁸⁾の報告が参考となるのみである。

従ってこの章ではエタノールを炭素源とした流加法によるグルタミン酸生産の培養特性を詳細に検討した。すなわち各流加培養において培養液中のエタノール濃度を一定に制御し、菌体増殖及びグルタミン酸生産に対する影響を調べ、これらの結果からグルタミン酸生産を増大せしめると予想されるエタノール濃度の制御方式、すなわち培養初期はエタノール濃度を低く保ち、途中でエタノール濃度を増加する方式で制御した。以上の制御方式によるとグルタミン酸生産が増大したので、その現象について二三の考察を加えた。

第2節 実験方法

1. 供試菌株：三榮オーシャン株式会社から分譲され

た *Brevibacterium divaricatum* NRRL 2311 を用いた。

本菌株は奥村ら¹⁹⁾により自然界から分離されたもので、ビオチン要求性でありエタノールからグルタミン酸を生産することが可能であると沖ら²⁰⁾により報告されている。

2. 培地組成: 本培養には、沖ら²¹⁾が用いた Table 1 に示すグルタミン酸生産用基本培地を用い、アルコール濃度は適宜設定した。

Table. 1. Composition of basal culture medium.

Urea	2.5 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0 g/l
KH_2PO_4	2.0 g/l
K_2HPO_4	7.0 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 g/l
Mi-eki	12 ml/l
Yeast extract	0.3 g/l
Biotin	0.5 $\mu\text{g/l}$
Thiamine HCl	100 $\mu\text{g/l}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7 mg/l
pH	7.5

なお、前培養培地では基本培地のうちビオチン 2.0 $\mu\text{g/l}$ としエタノールは 12 g/l を加えた。

3. 培養方法: 前培養は 500 ml 容三角フラスコに前培養

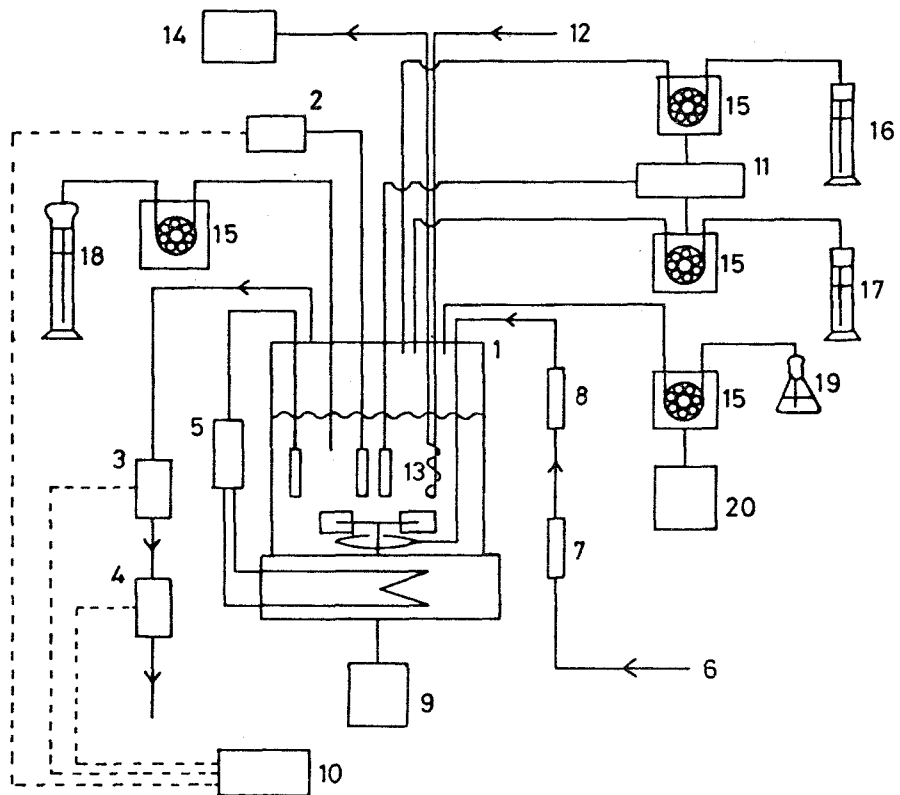


Fig. 1. Schematic diagram of experimental apparatus.

- | | |
|-----------------------------|------------------------|
| 1. Fermentor | 11. pH controller |
| 2. D.O.analyzer | 12. Carrier gas 2 |
| 3. CO ₂ analyzer | 13. Porous teflon tube |
| 4. O ₂ analyzer | 14. Gas chromatograph |
| 5. Temperature controller | 15. Tubing pump |
| 6. Air | 16. 1N HCl |
| 7. Rotameter | 17. Ammonia(12.5%) |
| 8. Air filter | 18. Ethanol(75%v/v) |
| 9. Motor | 19. Antifoam |
| 10. Recorder | 20. Timer |

培地 50 ml を加え、保存用スラントより *B. divaricatum* を一白金耳植菌し、28°C で 180 rpm の回転式振とう機を用いて行なった。本培養の実験装置は Fig. 1 に示すように容量 10 l の醗酵槽 (丸菱理化製 MD 500 型) を用い、初発培養液量は 5 l とした。前培養液 250 ml を植菌し、通気量 5 l/min, 温度 28°C, 攪拌速度 300~500 rpm の条件で培養した。pH 制御には、1 N 塩酸と 12.5% アンモニア水あるいは 5 N 水酸化ナトリウムを用い、培養液中の NH_4^+ が過剰にならないよう pH を 7.5~7.9 の範囲に維持した。培地中のエタノール濃度の制御はエタノール供給用ポンプの流量を手動で調節することにより行った。消泡剤はアデカール LG 109 (旭電化製) を用い、タイマーに連結されたポンプで注入した。

4. 測定方法: エタノール濃度は多孔性テフロンチューブ法²²⁾により測定し、検出はガスクロマトグラフで行った。Fig. 2 にエタノール濃度の測定システムを示した。まず一次側キャリアガスを一定流量 (約 30 ml/min) で培養液

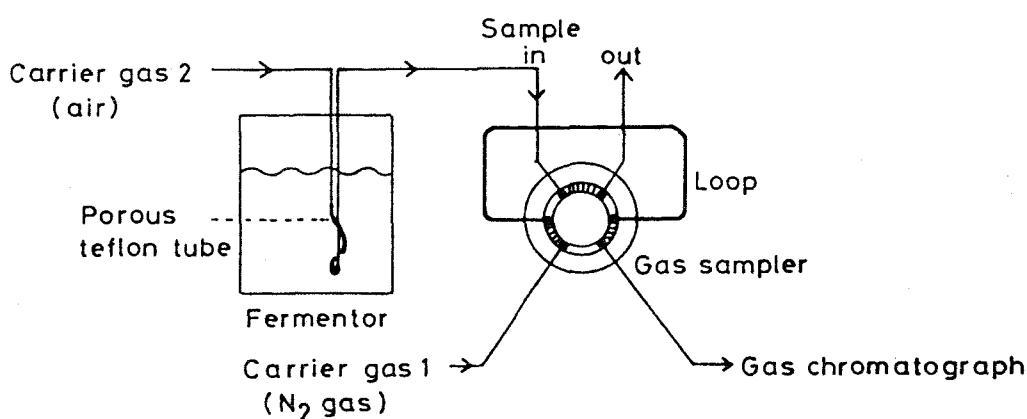


Fig. 2. A system for measurement of ethanol concentration.

中に浸した多孔性テフロンチューブ中を通過させると、培養液中のエタノール蒸気がチューブの内側を拡散し、キャリアガスと混合され、ガスサンプラーへ移動する。ガスサンプラーではエタノールを含んだ一定量の一次側キャリアガスが、コックの操作により二次側キャリアガスと置換され、ガスクロマトグラフに注入される。用いた多孔性テフロンチューブは孔径 $0.45\mu\text{m}$ 、内径 3.0mm 、外径 4.0mm 、長さ約 10cm （住友電気化学工業製チューブ型）である。またテフロンチューブからガスクロマトグラフまでのキャリアガス流路は常に $40\sim 60^\circ\text{C}$ に保温した。使用したガスクロマトグラフは日立製作所製 164 形で検出器は FID（水素炎イオン化ディテクター）である。カラム充填剤は PEG 400（ガスクロ工業製）を用い、カラム温度 90°C 、インジェクター温度 110°C に設定した。

グルタミン酸濃度の測定は *E. coli* の L-グルタミン酸脱炭酸酵素によるワールブルグ検圧法²³⁾によるものと、グルタミン酸 F キット（ベーリンガー・マンハイム社製）による方法²⁴⁾とを併用した。なお菌体内グルタミン酸濃度の定量は吉井ら²⁵⁾の方法に従い、菌体を 5% 食塩水で 2 回洗浄後、 100°C 、15 分間熱水抽出し、グルタミン酸 F キットにより定量した。

酢酸及びクエン酸濃度はそれぞれ酢酸 F キット、クエン酸 F キット（ベーリンガー・マンハイム社製）^{26, 27)}により測定した。

排ガス中の炭酸ガス分圧および酸素ガス分圧はそれぞれ携帯用赤外線分析計（富士電機製造社製 ZFO 型）および磁

気式酸素分析計（三鷹工業社製SH631型）を用いて測定した。

バイオケン濃度は *Lactobacillus plantarum* IFO 3070 によるバイオアッセイ²⁸⁾により測定した。菌体内バイオケンの抽出方法は Takeinami ら²⁹⁾の報告によった。

菌体内ATP含有量はATP photometer (JRB Inc. USA) により測定した。

第3節 実験結果及び考察

まず *B. divaricatum* によるエタノールからのグルタミン酸

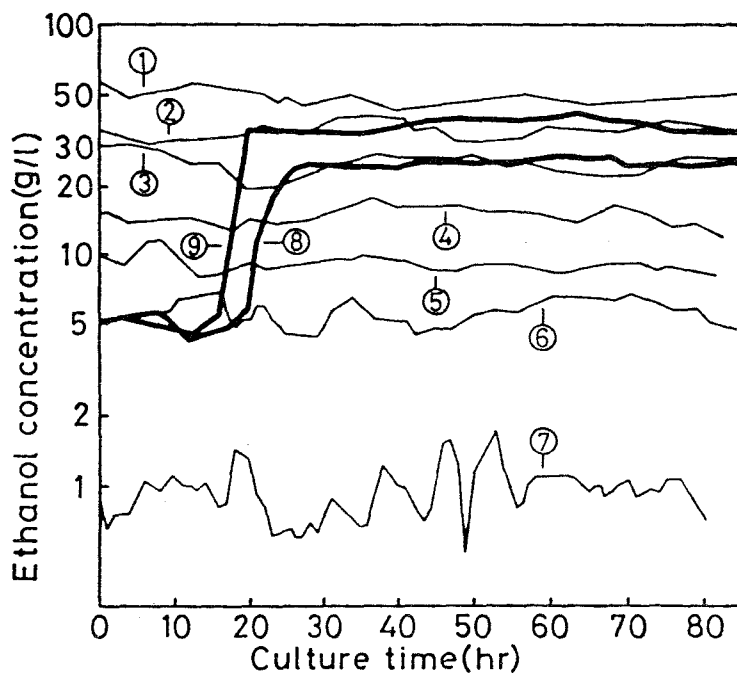


Fig. 3. Time course of ethanol concentration.

The intended ethanol concentration were as follows;

1: 50 g/l, 2: 35 g/l, 3: 25 g/l, 4: 15 g/l,

5: 10 g/l, 6: 5 g/l, 7: 1 g/l,

8: 5 → 25 g/l, 9: 5 → 35 g/l.

生産についてその培養特性を把握するためエタノール濃度を各レベルで培養時間中一定に維持する流加培養を行い、次にエタノール濃度を培養途中で変化させる実験を行った。Fig.3に各流加培養におけるエタノール濃度の経時変化を片対数プロットした。この図はエタノール濃度が、ほぼ設定濃度近傍に維持されたことを示している。なお図中の太線はエタノール濃度を培養途中で5g/lから25g/lないしは35g/lにシフトするよう設定したものである。

1. エタノール濃度を一定に維持した流加培養の経過

Fig.4はエタノール濃度一定値10g/lに維持した場合の培養経過を示したものである。グルタミン酸生産は増殖非運動型を示し、生産活性が低下し始めた時期からクエン酸

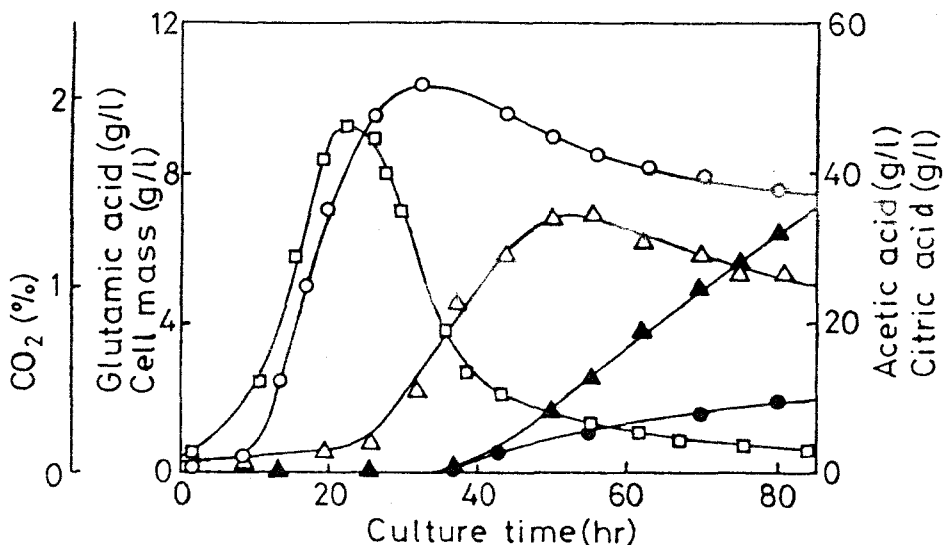


Fig. 4. A typical time course of the fed-batch culture at constant ethanol concentration of 10 g/l.

Δ: Glutamic acid, ▲: Acetic acid,
○: Cell mass, □: CO₂, ●: Citric acid.

、酢酸が蓄積され始めた。さらにこの時期において Q_{CO_2} の低下が観察されているので奥村¹⁷⁾の提案するエタノールからグルタミン酸に至る代謝経路に従えば、TCAサイクルやグリオキシル酸サイクルの代謝機能が低下したためグルタミン酸生産が不活発になったと推測される。

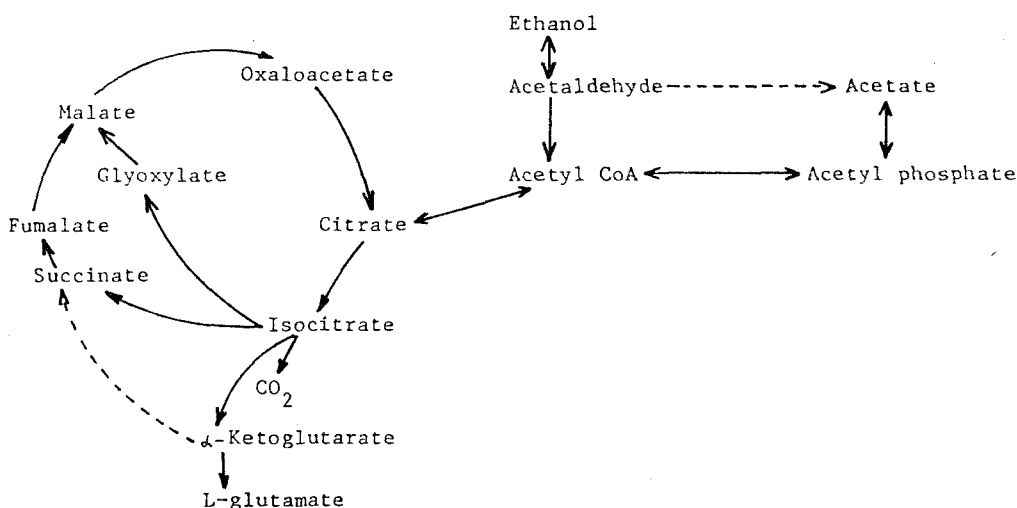


Fig. 5. The metabolic pathway from ethanol to L-glutamate.
 (From Okumura, S.: *Hakko Kyokai shi*, 33, 185(1975))

Fig. 6 に菌体内及び菌体外ビオケン含有量の経時変化を示した。菌体外ビオケンは培養開始後10時間以内の増殖初期において、ほとんど菌体内に取り込まれている。この現象は炭素源がグルコースである *Brevibacterium lactofermentum* の培養で菌体内外のビオケン含有量を測定した Takinami²⁹⁾ の報告においても示されている。従って単位菌体当りのビオケン含量はその時点の菌体濃度の逆数に相関すると考えられる。

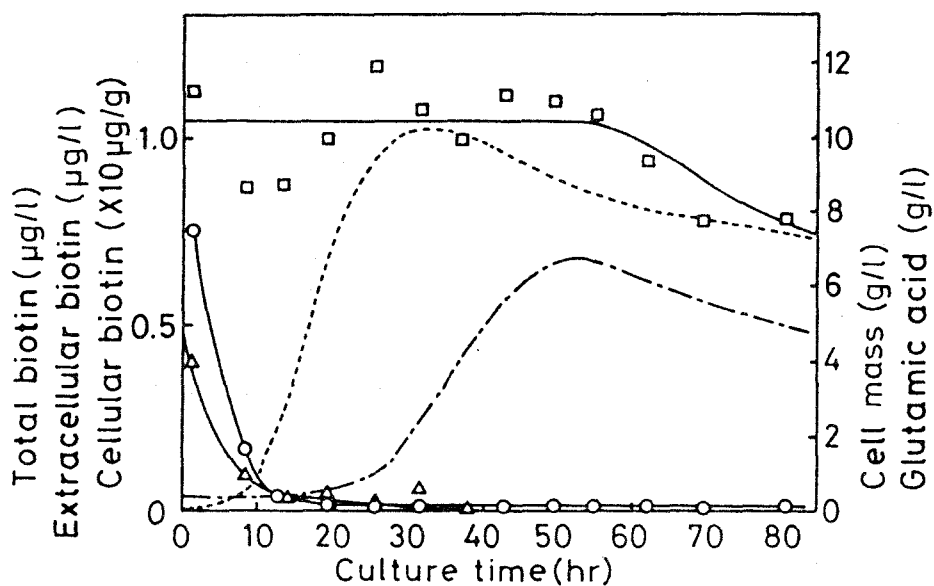


Fig. 6. Time course of biotin concentration in the same culture shown in Fig. 4.

□: Total biotin, △: Extracellular biotin,
 ○: Cellular biotin, ----- : Cell mass,
 -.-.- : Glutamic acid.

2. 菌体増殖に与えるエタノール濃度の影響

Fig. 7にエタノール濃度を一定に維持した各流加培養における菌体濃度の経時変化を片対数プロットした。

エタノール濃度を1g/lに維持したとき，最大菌体濃度は約17g/lに達しているのに対し，エタノール濃度35g/lの場合は5.8g/l，エタノール濃度50g/lの場合は0.4g/lと著しく低下しており，エタノール濃度を高く維持するほど，菌体増殖は抑制される。

3. グルタミン酸の生産開始時期及び生産継続時間に与えるエタノール濃度の影響

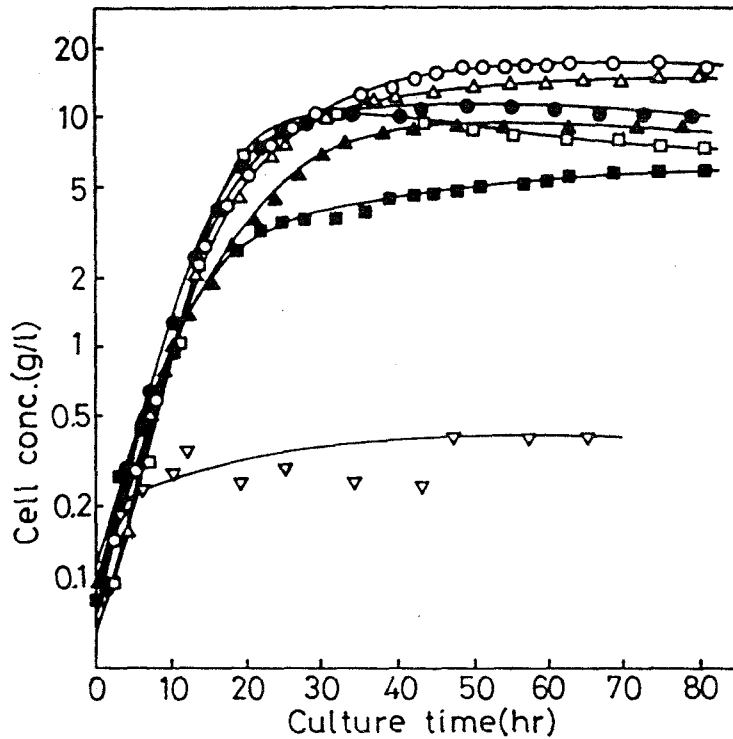


Fig. 7. Effect of ethanol concentration on the cell growth
 ○: 1 g/l, △: 5 g/l, □: 10 g/l, ●: 15 g/l,
 ▲: 25 g/l, ■: 35 g/l, ▼: 50 g/l.

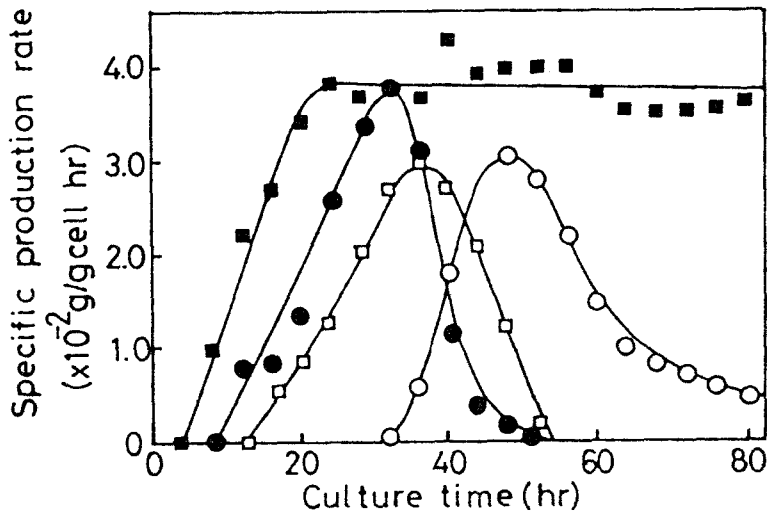


Fig. 8. Effect of ethanol concentration on the specific production rate of glutamic acid.

○: 1 g/l, □: 10 g/l, ●: 15 g/l, ■: 35 g/l.

Fig. 8 に、各エタノール濃度における、グルタミン酸の比生産速度の経時変化を示した。その結果、エタノール濃度を高く維持した培養ほど、グルタミン酸生産の開始時期が早くなることが判明した。またエタノール濃度が 25 g/l, 35 g/l と高いときは、濃度が低いときと比して、かなり長時間生産が続行した。しかし高濃度下では菌体増殖が抑制されるのでグルタミン酸生産量は少なく、エタノール濃度を 35 g/l に維持した培養では 80 時間目で 11.6 g/l であった。

4. エタノール濃度の段階的増加を行った流加培養

Fig. 7, Fig. 8 の結果から、グルタミン酸生産を増加させるためには、培養初期 エタノール低濃度にて増殖を行わせ、菌体濃度があるレベルに到達した後、エタノール濃度を増加し生産を開始させるべきであると考えられる。

Fig. 9 は、斜線の部分でエタノール濃度を 5 g/l から 25 g/l にシフトした培養の経時変化を示す。比較のためエタノール濃度 5 g/l で一定に維持された培養の経時変化を Fig. 10 に示す。エタノール濃度 5 g/l の培養ではグルタミン酸生産は培養開始後 80 時間で 8.5 g/l であった。それに対し Fig. 9 でエタノール濃度を途中でシフトした場合にはグルタミン酸生成量は培養開始後 80 時間で 17.7 g/l に達し、さらに生産が継続した。すなわちエタノール濃度を一定に保った場合の約 2 倍のグルタミン酸生産量かえられた。

Fig. 11 では、エタノール濃度を 5 g/l から 35 g/l にシフトした流加培養の経時変化を示す。5 g/l から 25 g/l にシフトした培養と同様グルタミン酸生産はエタノール濃度一定の培養に比べてかなり増大しているが、約 40 時間目ごろから

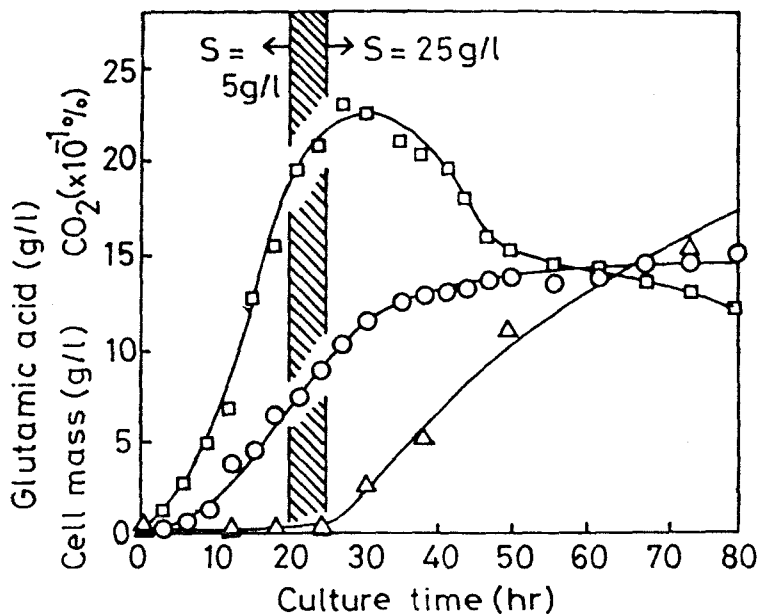


Fig. 9. Time course of shift-up fed-batch culture. Ethanol concentration was increased from 5 g/l to 25 g/l in the shaded period.

△ : Glutamic acid, ○ : Cell mass, □ : CO₂.

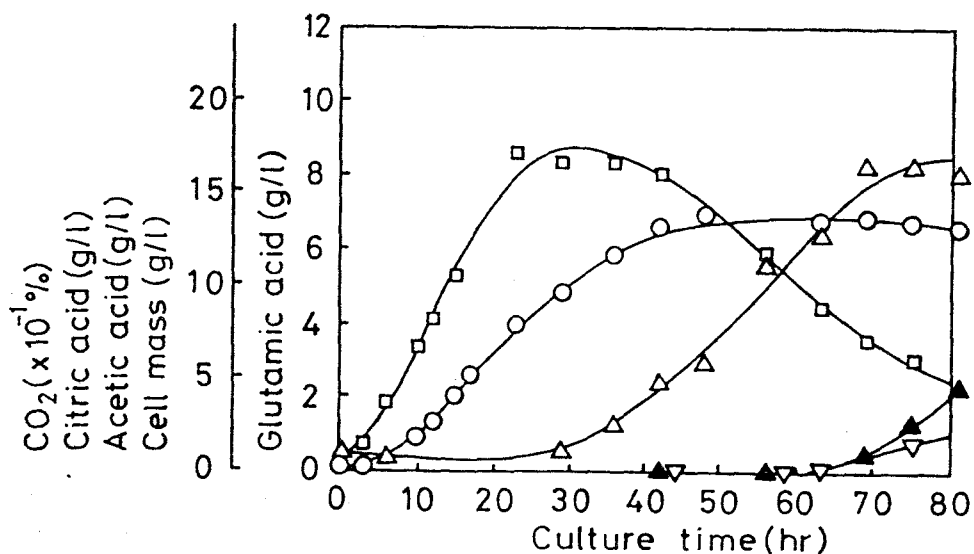


Fig. 10. Time course of the fed-batch culture in which ethanol concentration was kept constant at 5 g/l.

▽ : Citric acid, ▲ : Acetic acid, ○ : Cell mass, □ : CO₂, △ : Glutamic acid.

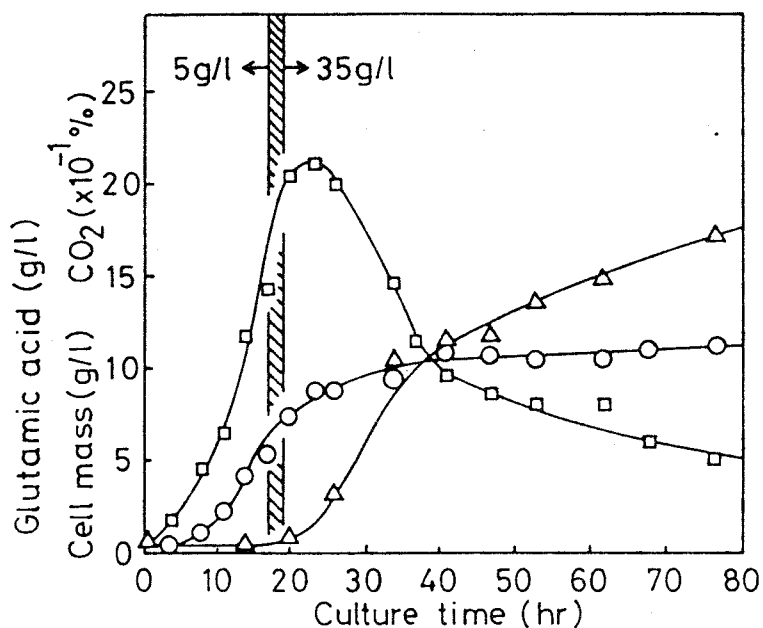


Fig. 11. Time course of shift-up fed-batch culture. Ethanol concentration was increased from 5 g/l to 35 g/l in the shaded period.

△: Glutamic acid, ○: Cell mass, □: CO₂.

生産活性は低下している。エタノール濃度を 35 g/l にシフトした直後の生産速度はかなり高いが、その後 Q_{CO_2} が比較的早く低下し、グルタミン酸生産が不活性化することからエタノール濃度が高すぎるとグルタミン酸生産活性に悪影響を及ぼすものと推察される。

Fig. 12 には エタノール濃度を 5 g/l から 30 g/l にシフトしたときの菌体内及び菌体外グルタミン酸濃度の経時変化を示した。この図は、エタノール濃度をシフトした直後、菌体内グルタミン酸が急激に低下し、菌体外にグルタミン酸が蓄積され始めることを示している。河野¹⁸⁾ は Brevi-

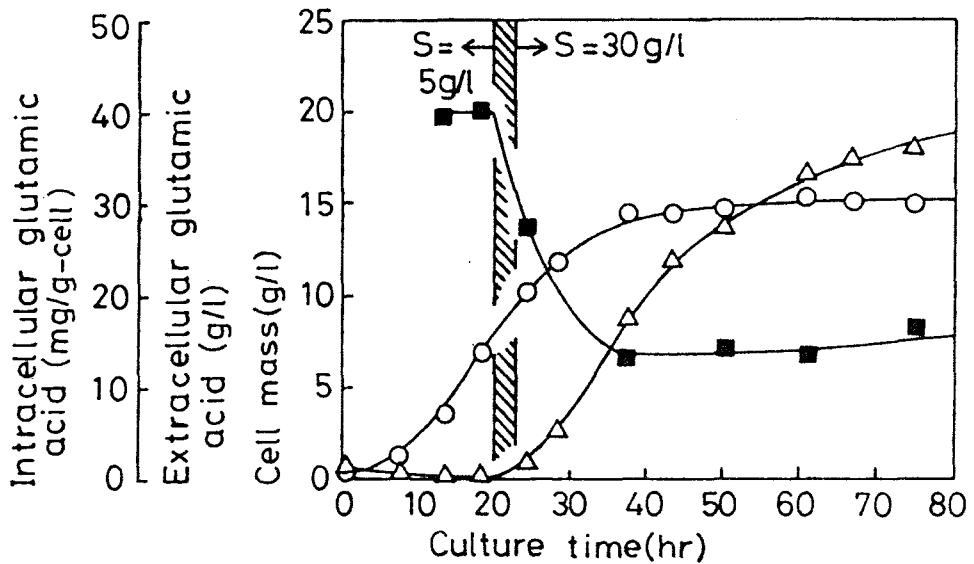


Fig. 12. Time course of intracellular and extracellular glutamic acid concentration.

Ethanol concentration was increased from 5 g/l to 30 g/l in the shaded period.

- : Intracellular glutamic acid, ○: Cell mass,
 △: Extracellular glutamic acid.

bacterium saccharolyticum による還元糖を炭素源とした培養において、アルコール添加の影響を調べているが、イソブタノールを添加した培養では菌体内のグルタミン酸濃度が低く菌体外にグルタミン酸が蓄積されたことを報告している。さらにイソブタノール添加により、細胞膜透過性が変化してグルタミン酸の菌体外への分泌が盛んになると推論している。本培養系もこの推論に従うことが培養経過より示唆される。

第5節 要約

エタノールからグルタミン酸を生産する *Brevibacterium divaricatum* NRRL 2311 について エタノールを流加して培養実験を行い以下の結果をえた。

エタノール濃度が高い場合ほど、菌体増殖は抑えられ、グルタミン酸生産の開始時期が早くなった。エタノール濃度を培養途中で低濃度から高濃度へシフトした結果、エタノール濃度を一定に維持した培養と比較して、グルタミン酸生産は著しく増大し、5g/l から 25g/l へとエタノール濃度を変化させた培養ではグルタミン酸生産は80時間目で17.7g/l に達した。また5g/l から30g/l へとエタノール濃度を変化させた実験から、シフトした直後菌体内グルタミン酸濃度は低下し菌体外にグルタミン酸が蓄積された。

第2章 回帰分析を用いた流加培養のシミュレーション

第1節 緒言

第1章で述べた如く、*B. divaricatum* によるエタノールからのグルタミン酸生産において、培養初期にはエタノール濃度を低く保って菌体増殖を活発に行わせ、次にエタノール濃度を増加させてグルタミン酸を生産させる流加方式が有利である結果がえられたので、エタノール流加方式の最適化計算を行うには動的システムにおける最適制御問題を解く手法を使う必要があると考えられる。

さて 吉田ら³⁰⁾によると培養の挙動を示す数学的モデルは、*sub-culture model*、*sub-cellular model* 及び *sub-molecular model* に分類され、この分類を最適制御の面から考察するとつぎのごとくである。

まず *subculture model* は微生物系を均一系として取り扱ったもので、モデル式の形が他の場合より単純であるので最適化計算に最も適したモデルと考えられる。例えば Monod のモデル³¹⁾ や Logistic law モデル³²⁾ 及び Leudeking モデル³³⁾ 等がある。

次に *subcellular model* は菌令分布等、培養系を異なった性質を有する微生物の集団として捕えたモデル式であり、Shu³⁴⁾ らの菌令を考えたモデルや Blanch³⁵⁾ らの菌体集団を "mature" グループと "immature" グループに分けてモデル化した例がある。Fishman ら¹²⁾ は菌令分布を考慮に入れたモデル式により最大原理を使って流加培養による

ペニシリン生産の最適化を行っている。

sub-molecular model は生体内の反応に基づいたモデルであり、例として Jacoby ら³⁶⁾による酵素生成の調節機構を記述するオペロン説に基づくモデル式^{37, 38)}等がある。しかしこの様式のモデルは複雑な生体反応にまで立ち入ってモデル化するためモデル式は複雑となり、培養系の挙動はより正確に記述できたとしても最適化計算は非常に困難となる。

さらに Tsuchiya³⁹⁾らの分類によると確率論的モデルとして分類されているものがあるが、確率過程として取り扱わねばならず最適化計算は困難となる。

以上のごとく培養系におけるモデル式は非常に多種多様な形で提出されているが動的な系における最適化計算に適したモデルは限定される。

動的計画法を採用する場合、状態変数の数が多く高次元のモデルでは、いわゆる次元ののろい⁴⁰⁾が生じて、現在の計算機容量では必要メモリーと計算時間の点で計算不可能となる。また最大原理を用いる場合、複雑なモデルでは、2点境界値問題を解かねばならず⁴¹⁾収束が困難となる場合や、特異制御^{42, 43, 44)}なるばに極値が複数個存在するいわゆる多峰性問題がこの方法の弱点となる場合がある。

以上の考察によって最適化計算が容易なモデル式としては次の条件を満たすことが望ましい。

- 1) 状態変数の数が少なく、モデル式の次元が低い。
- 2) モデル式の形が単純である。
- 3) モデル式中の状態変数が測定可能である。これは4章で述べるオンライン最適制御を遂行するためには特に重要

である。

従って上述のモデル式の分類中 *sub-culture model* が最適化計算に最も適していると考えられるが、本培養系では増殖ならびに生産のモデル式をたてることが困難であった。さらにここで注目すべきことは現在までのところ回分ないしは流加培養に関して、上述のモデル式を用いて最適化計算を行い、その効果を実験によって確認できたものは、ほとんど報告されていない⁴⁵⁾ことである。それはモデルの再現性ならびに状態変数の可測性の欠除によるものと考えられる。

また指数的流加法における感度解析の研究報告⁴⁶⁾によるとモデル式中のパラメータ推定に誤差が生じた場合状態変数に対する影響が時間とともに拡大されてしまう場合もあり、この点から上記の数式モデルを使って精度のよい制御を行うことは困難であると推測される。従って培養の制御に適したシミュレーション法の研究が重要となる。

本章では培養プロセスの動的制御のための最適化計算を容易ならしめ、精度のよい実用的なシミュレーション法を開発することを目的として、決定論的モデルに依存せず重回帰分析^{47, 48)}を応用した新しいシミュレーション法を検討した結果について述べる。

第2節 流加培養の数式的表現

一般に培養系のモデル式は物質収支等簡単な数学的取り扱いにより容易に誘導される部分と、微生物種あるいは培養条件等によって変化し、培養系ごとに実験的手法ないし

は生物学的考察等によって決定される速度論的關係を示す部分，例えば比増殖速度，基質の比消費速度，生産物比生成速度と基質濃度などの状態変数との間の關係式がある。そして後者のモデル化が最も困難であり，プロセスモデルの良否を決定するのもこの部分である。本培養系では後者のモデル化について従来の決定論的モデル式の誘導およびその使用をさけ，実験データに基づき後者の關係式を以下に紹介する如く回帰分析により推定する手法を採用した。まず本培養系における各状態変数の変化速度式を示す。

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{F}{V} X \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F(S_0 - S)}{V} - \nu X - G^* S^* \quad (2)$$

$$\frac{dQ}{dt} = \kappa \quad (3)$$

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (4)$$

$$\frac{dG}{dt} = \rho X - \frac{F}{V} G \quad (5)$$

ここで状態変数 X, S, Q, V, G はそれぞれ菌体濃度，エタノール濃度，炭酸ガス比生成速度 (Q_{CO_2})，培養液量，グルタミン酸濃度である。 S_0 は流加培地中のエタノール濃度であり， F は流加速度， G^* は通気量， S^* は排ガス中のエタノール濃度で 培養液中のエタノール濃度に対して平衡関

係にあると仮定した。また μ , ν , κ および ρ はそれぞれ菌体比増殖速度, エタノール比消費速度, Q_{CO_2} の変化速度およびグルタミン酸比生産速度である。

微生物の性質に依存する μ , ν , κ および ρ の値を推定するための決定論的モデル式が存在しないので, 回帰方程式を作成することとした。これらの変数の値に影響する状態変数, すなわち回帰方程式中の独立変数の選択について考察する。まず炭素源としてのエタノールは高濃度基質阻害を有し, 律速基質であるから, 上記の回帰方程式中の独立変数として選択すべきである。

B. divaricatum はビオチン要求性であり, ビオチンを制限した培地で増殖させた場合, 単位菌体量当りに含有されるビオチン量は菌体の生理状態に影響すると考えられる。前章で Fig. 5 の結果について考察したごとく, ビオチンは培養開始後 10 時間以内に菌体に取り込まれてしまうので菌体内ビオチン含有量は増殖と共に低下し, 菌体濃度の逆数に相関していると考えられる。さらに Yamashita ら⁴⁹⁾も菌体内ビオチン含量は, 初発に投入されたビオチン量をその時点の菌体濃度で割った値に等しいと仮定し, 比増殖速度が X の関数になることを認めている。従って本プロセスにおいても菌体濃度 X を S と同様に回帰方程式中の独立変数とすべきであると考えた。

さてグルタミン酸の比生産速度 ρ は菌体濃度 X , エタノール濃度 S のみでは推定できないことが判った。すなわち培養後期において X と S に変化がなくともグルタミン酸生産が低下する状況を説明できないためである。ところで,

前章で、Fig. 4の結果について考察したようにグルタミン酸生産が低下する時期にクエン酸が生産され始め Q_{CO_2} も低下しているので、TCAないしはグリオキシル酸経路の代謝機能が低下してきていると推察した。したがってグルタミン酸比生産速度を推定するための独立変数として、菌体濃度、エタノール濃度の他に、菌の生理活性の示す指標となる測定値を用いて、回帰式をたてることが考えられる。さらにオンライン制御を目的とするなら、その独立変数は容易に測定可能であるものが望ましいので、呼吸能 Q_{O_2} 、炭酸ガス比生成速度 Q_{CO_2} 、菌体内ATP含有量について検討した。エタノール濃度を10g/lに維持した培養における、 Q_{O_2} 、 Q_{CO_2} 、菌体内ATP含有量の経時変化をFig. 13に示す。菌体内ATP含有量および Q_{O_2} はグルタミン酸の生産停止時期の前後で変化せず、比生産速度推定の独立変数として採用できなかった。すなわちFig. 4で示したようにこの時期に酢酸が蓄積されていることから、エタノールから酢酸に至る経路が活発化し、TCAサイクルないしはグリオキシル酸サイクルの活性の低下にもかかわらず酸素消費およびATP生成が持続したと考えられる。一方グルタミン酸蓄積の停止する時期において Q_{CO_2} は低下し続け 0.06×10^{-2} mmole/mg cell/hr 以下になるとグルタミン酸が生産されていないという実験結果から、グルタミン酸の比生成速度推定のための独立変数として、 Q_{CO_2} の採用が最も適切であると考えた。

以上の考察結果から、 μ 、 ν および k は X と S の関数とし P のみは X 、 S および Q の関数とした。

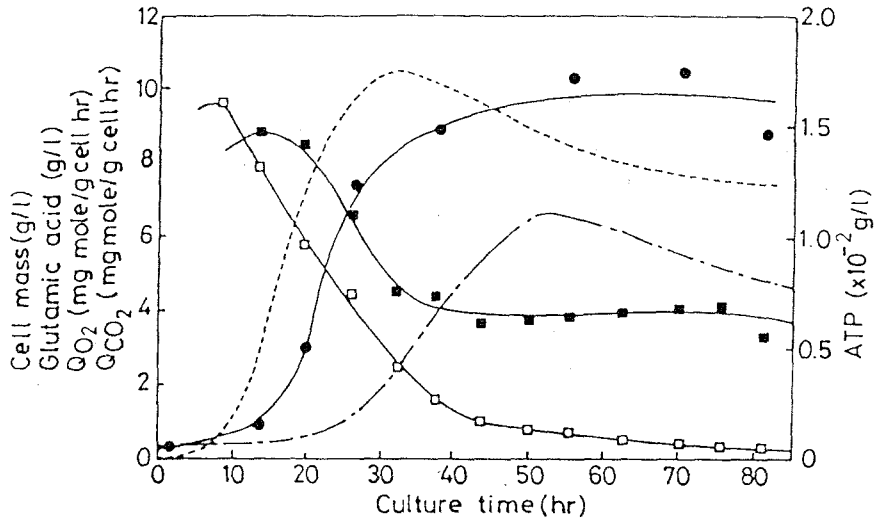


Fig. 13. Changes in specific oxygen uptake, specific carbon dioxide evolution rate and intracellular concentration of ATP in the batch run shown in Fig. 4.

■ : Q_{O_2} , □ : Q_{CO_2} , ● : ATP,
 ---- : Cell mass, - - - : Glutamic acid.

μ , ν , κ および ρ の関数形が独立変数 X , S および Q についてたとえ非線形であっても, X , S および Q を座標軸とする状態空間上において非常に狭い領域では線形近似が可能と考えられる。したがって μ , ν , κ および ρ の値を推定するには状態空間において, 推定の対象となっている状態点に対し, 近傍の位置にある実験データを選び出し, それらの実験データから以下に示す如く重回帰分析^{47,48)}により線形近似式を導き出してその点における μ , ν , κ および ρ の値を推定すればよい。

回帰分析に用いる実験データの選定基準を述べる。

1. シミュレーションの対象としている培養時間に対し,

時間的に近傍の位置にある実験データを選ぶこと。

2. 実験データの状態点が状態空間上において、シミュレーションの対象とする状態点に近い位置にあること。換言すれば(6)式で定義した実験データの状態点と計算上の状態点との間のユークリッド距離⁵⁰⁾の値が小さいことである。

本プロセスのシミュレーションでは以上の基準に従って16の状態点を選択した。なおユークリッド距離は次式で示される。

$$D = \{(X_e - \bar{X}) / \sigma(X_e)\}^2 + \{(S_e - \bar{S}) / \sigma(S_e)\}^2 + \{(Q_e - \bar{Q}) / \sigma(Q_e)\}^2 \quad (6)$$

ここで σ は(7)式で定義される標準偏差である。

$$\sigma(X_e) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_e - \bar{X}_e)^2}{n-1}} \quad (7)$$

n はデータの数であり、上に $-$ を付けた変数は、それぞれの算術平均値を示す。添字 e は実験データであることを示す。

次に μ , ν , k および ρ の値をもとめるための回帰式を示す。

$$\mu = \bar{\mu}_s + a_1(X - \bar{X}_s) + a_2(S - \bar{S}_s) \quad (8)$$

$$\nu = \bar{\nu}_s + b_1(X - \bar{X}_s) + b_2(S - \bar{S}_s) \quad (9)$$

$$\kappa = \bar{\kappa}_s + c_1(X - \bar{X}_s) + c_2(S - \bar{S}_s) \quad (10)$$

$$\rho = \bar{\rho}_s + d_1(X - \bar{X}_s) + d_2(S - \bar{S}_s) + d_3(Q - \bar{Q}_s) \quad (11)$$

添字 s は集合 $\{X_e\}$ の中から前頁の基準に従って選ばれた実験データの値であることを示す。 $a_1, a_2, b_1, \dots, d_2, d_3$ は偏回帰係数であり最小二乗法に従って決定した。⁴⁸⁾

決定された重回帰方程式を用いて、その状態に対する $\mu, \gamma, \kappa, \rho$ の値を求め(1)~(5)式に代入し、Runge-Kutta-Gill法で数値計算するのである。

第3節 アルゴリズム

Fig. 14 に前節で説明した回帰分析をとり入れたシミュレーションのためのフローチャートを示す。なおこのシミュレーションは操作変数として流加速度 F の代わりにエタノール濃度を採用しているが、これはエタノール濃度をシフトした時の培養実験の経時変化をシミュレートするためである。

以下フローチャートによってシミュレーションアルゴリズムを説明する。

Step 1: 回帰分析の基礎となる実験データ (即ち X_e, S_e, Q_e, V_e, G_e とそれらの時間微分) 及びシミュレーションの初期値さらに制御変数としてエタノール濃度の経時変化を読みとる。

Step 2: 培養開始時刻をセットする。

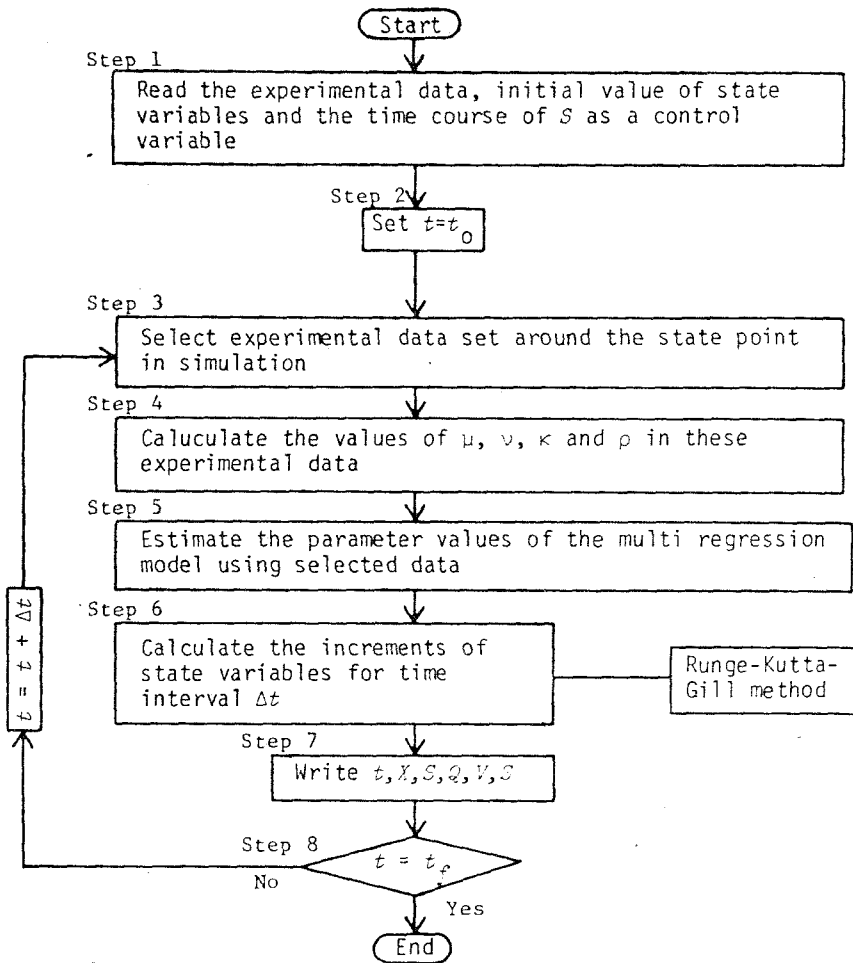


Fig. 14. Flow diagram for simulation.

Step 3: Euclid 距離を基準として計算上の状態点に近い位置にある実験データを 16 セット選び出す。

Step 4: 選ばれた実験データ X_s から, μ , ν , κ および ρ の各データに対する値を計算する。

Step 5: 実験データについて重回帰分析を行い, 各変数の平均値および回帰係数の値を決定する。

Step 6: 推定されたパラメータを前節の (1) 式から (5) 式

に代入し Runge - Kutta - Gill 法により微小時間 Δt 後の状態を推定する。

Step 7: t, X, S, Q, V, G を書き出す。

Step 8: 最終時点まで計算を続行する。

第4節 シミュレーション結果

Fig. 15 はエタノール濃度を一定に維持した流加培養実験 (エタノール濃度 1g/l, 5g/l, 10g/l, 15g/l, 25g/l, 35g/l

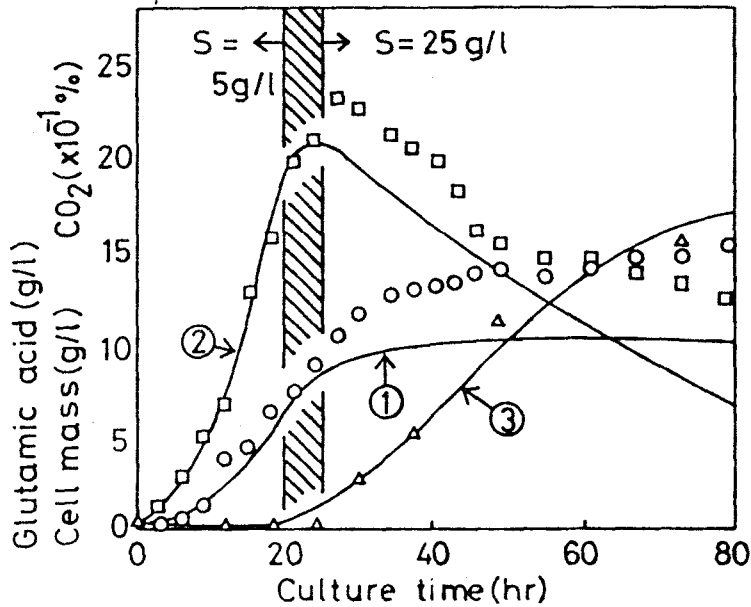


Fig. 15. A simulated result of a shift-up culture (1)
Data used for multiple regression: Constant ethanol concentration.

Symbols represent experimental data, and calculated values are drawn with solid lines; ① Cell concentration; ② CO₂; ③ Glutamic acid concentration.

△: Glutamic acid, ○: Cell mass, □: CO₂.

50 g/l) のデータのみを使用して、エタノール濃度を 5g/l から 25g/l にシフトしたときの流加培養の経時変化をシミュレーションした結果である。エタノール濃度を培養途中で低濃度から高濃度に急激に増加させることによってグルタミン酸生産がエタノール濃度を一定に維持した流加培養実験に比べ大巾に増大する現象はシミュレートできたが、菌体濃度や排気ガス中の炭酸ガス濃度の経時変化の計算値は実測値から大きく偏倚している。この原因として、回帰分析に使用するため準備された培養データの中で、シミュレーション上の培養状態に対し状態空間上で近傍の位置にある実験データがなかったため、回帰分析から生じた誤差が大きくなったと推測される。

Fig. 16 ではシミュレーションの対象となっている培養条件に比較的近いと考えられる 5g/l から 30g/l にシフトした流加培養実験のデータを追加して計算した結果を示す。各状態変数の計算値と実測値の良好な一致がみられた。このことからシミュレーションを正確に行うためには、シミュレーション上の培養状態に対し状態空間上で近傍の位置にある実験データを回帰分析に用いる必要があると考えられる。

第5節 考察

本章に示した回帰分析を応用する方法によると、対象とする培養系における実験データが適当数存在するなら、少数の独立変数の選定によって、シミュレーションが可能であり、従来のモデル式作成に基づくシミュレーションに比べ、非常に簡便である。

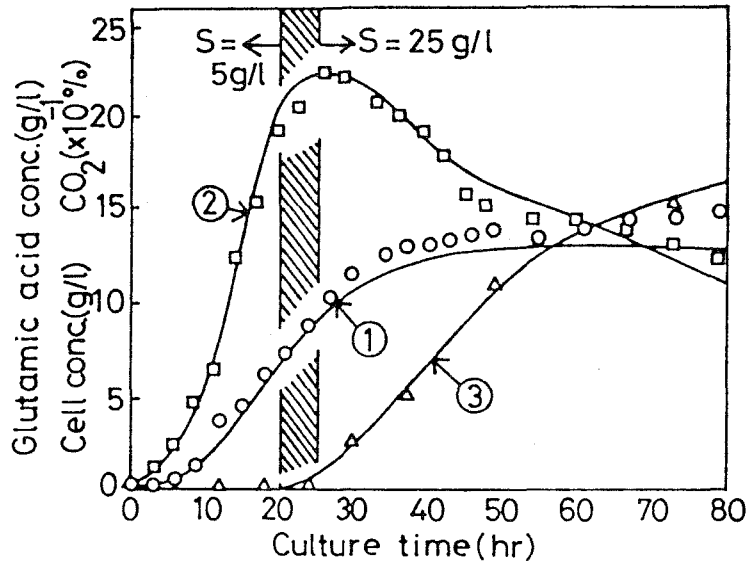


Fig. 16. A simulated result of a shift-up culture (2) Symbols and lines were used in the same way in Fig. 15. Data used for multiple regression: Constant and changed ethanol concentration (5 → 30 g/l).

△: Glutamic acid, ○: Cell mass, □: CO₂.

従来回帰分析は決定論的微分方程式中のパラメータに対する pH や 温度 の 影響 を 示 す た め に 用 い ら れ て お り、^{51), 52)} 例 え ば cherry ⁵¹⁾ は エ リ ス ロ マ イ シ ン 生 産 に お い て pH や 温 度 の 各 種 パ ラ メ ー タ に 対 す る 影 響 を 示 す 回 帰 式 を F 検 定 や t 検 定 に よ っ て 検 討 し た。

と ころ が 本 法 の 回 帰 分 析 は 微 生 物 の 挙 動 に 関 す る 速 度 論 的 関 係 そ の も の を 定 式 化 す る た め に 用 い る も の で あ り、上 述 の 回 帰 分 析 の 応 用 方 法 と は 全 く 異 な っ て い る。

さ て 前 節 の 計 算 結 果 は、回 帰 分 析 を 使 っ た シ ミ ュ レ ー シ ョ ン に よ る 培 養 経 過 の 予 測 が 可 能 で あ り、かつ 精 度 を 高

めるためにはシミュレーション上の状態点近傍に実験データの状態点が数多く存在することが望ましいことを示している。この精度の上昇を統計学的手法を用いて定量的に裏付けることは、重要であるが、対象が動的システムでありかつ回帰分析により決定される関係式は状態空間上でも、時間的にも変化するため、従来の簡単な統計学的手法のみでは結論をうることが困難である。しかし従来の手法でも各時点における回帰式による推定値に対する信頼限界は計算可能であり、精度について若干の考察を行うことができる。即ち t 分布を用いることにより、比増殖速度 μ 、エタノール比消費速度 ν 、グルタミン酸比生産速度 ρ 、 Q_{CO_2} の変化速度 κ の推定値について各時点で 90% 信頼区間を算出した。その結果 Fig. 16 で示したシミュレーションにおける信頼区間を培養時間を通じて平均すると、Fig. 15 における平均値に対し μ は 61%、 ν は 91%、 ρ は 100%、 κ は 67% であり、推定値の信頼性が高くなっている考えられる。しかし以上の簡単な情報のみでは状態変数 X 、 S 、 Q 、 V についての培養全期間にわたる全体的な予測の精度を定量化することはできない。この点について直接的に検討するには既往の手法だけでは困難であり、感度解析等も用いた新しい数学的取り扱いが必要と考える。

第5節 要約

流加培養のモデル式中、微生物の挙動に関する速度論的關係を定式化するために、状態空間上で近傍に位置する培養データから重回帰分析によって、その關係を記述しうる

方法を採用し、Runge-Kutta-Gill法と組み合わせて培養の経時変化をシミュレートした。その結果本プロセスの良好なシミュレーションが可能となり、回帰分析に使用するデータの中に、シミュレーションの対象となる状態と類似した実験を含めることによって、より精度を上げることがわかった。

第3章 動的計画法による最適化アルゴリズム

第1節 緒言

流加培養は非定常システムであるため動的な最適操作をとる必要がある。ここで取り扱っている培養系も前述のごとくエタノール濃度を途中でシフトすることによりグルタミン酸生産が増大するという動的操作が必要な系である。

さて非定常な培養系の最適化に適用しうる数学的手法としては、古典的変分法⁵³⁾、ポントリャーギンらによって発展された最大原理¹¹⁾、Bellmanによる動的計画法¹⁵⁾等の他に直接探索法としての山登り法⁵⁴⁾や修正シンプレックス法⁵⁵⁾等がある。現在までに流加培養の最適化に使われたものとして最大原理^{12), 13)}とグリーンの定理¹⁴⁾が報告されている。

本培養系への適用を考えると、グリーンの定理では系の次元が高すぎ⁵⁶⁾、変分法は操作変数と状態変数について拘束条件が存在する場合には使用できない⁵⁷⁾ので、これらの方法は除外される。さらに直接探索法は定常な最適解をうるには適当であるが、動的な最適解をうるためには不向きである。そこで残る動的計画法と最大原理を比較する。これにはFan⁵⁸⁾による次の記述が参考となる。即ち「動的計画法は“最適性の原理”の優雅な簡素化と多様性のために各段階での変化を有限差分方程式で表現することが困難で、逐語的に記述されるようなプロセスを取り扱うのに用いられる。一方、最大原理は巧く表現されたシステム方程式を

もプロセスに対してのみ応用され、システム方程式は状態変数について連続的に微分可能な場合に限定される」と述べている。前章のモデル式は状態変数について連続微分可能ではなく逐語的な記述に近いため動的計画法が適している。また動的計画法はまず1段階での状態空間上における全グリッドについて最適解を探索することから出発し、このグリッドの最適値を保有しておき、段階から段階へと進める計算法で、最大原理では全段階にわたる一つの最適経路を改良してゆくことを続ける計算法をとることから⁵⁹⁾、状態方程式の不連続な本プロセスには動的計画法が適していると判断できる。

従って、本章では回帰分析と動的計画法とを組み合わせた最適化計算アルゴリズムについて述べる。

第2節 理論

本培養系のシステム方程式は第2章の(1)~(5)、(8)~(11)式で示される。

本培養系の評価関数を培養時間を限定した時のグルタミン酸生産量であると定義する。

動的計画法では時間を離散化して計算するので培養時間を N 等分し、離散化された時点をも $t_0, t_1, t_2, \dots, t_N$ とする。

$$\Delta t \triangleq \frac{T}{N} \quad (12)$$

評価関数は

$$J \triangleq V(t_f) G(t_f) - V(t_0) G(t_0) \quad (13)$$

ここで

$$t_f = t_N \quad (14)$$

さて Δt 時間内のエタノール流加速度を一定, F_k , とすれば, t_k 時点における状態 X_k と F_k が定められると t_k 時点から t_{k+1} 時点までのグルタミン酸生産量は一意的に定まり, その値は次式で求められる。

$$f_k(X_k, F_k) \triangleq \int_{t_k}^{t_{k+1}} (\rho(t) X(t) V(t))_{F=F_k} dt \quad (15)$$

従って評価関数は

$$\begin{aligned} J &= \int_{t_0}^{t_f} (\rho(t) X(t) V(t)) dt \\ &= \sum_{k=0}^{N-1} f_k(X_k, F_k) \end{aligned} \quad (16)$$

次に $P(X_i, t_i)$ を状態 X_i から出発し, $t = t_f$ までに生産されるグルタミン酸量の最大値であると定義すると,

$$P(X_i, t_i) \triangleq \underset{F_{\text{lower}} \leq F_k \text{'s} \leq F_{\text{upper}}}{\text{maximum}} \sum_{k=i}^{N-1} f_k(X_k, F_k) \quad (17)$$

となり動的計画法における再帰方程式は,

$$P(X_i, t_i) = \underset{F_{\text{lower}} \leq F_i \leq F_{\text{upper}}}{\text{maximum}} \{f_i(X_i, F_i) + P(X_{i+1}, t_{i+1})\} \quad (18)$$

この再帰方程式の意味は次のごとくである。すなわち状態 X_i から培養最終時点までに生産されるグルタミン酸量の最大値はその次の時点 t_{i+1} までに生産されたグルタミン酸量と次の状態 X_{i+1} から始まって最終時点までに生産されたグルタミン酸量の最大値の和が最大になるように F_i を選ぶことによって得られる。この培養系の場合初期値が定まっているため後向き動的計画法にて解かねばならない。具体的な計算手続きは次節で示す。

第3節 アルゴリズム

前章のシミュレーションと動的計画法による最適化計算の概要を Fig. 17 に示し、以下に説明する。

- 1) 種々の条件下の培養でえられた実験データを読み込む。この系については菌体濃度、エタノール濃度、炭酸ガス比生成速度、培養液量、グルタミン酸濃度に関して4時間おきの値を培養データとした。上述の各状態変数の変化速度を計算し、データとして記憶した。これらのデータは回帰分析に使用する。

以後の計算は培養最終時点から出発して培養時間を逆のぼって行う。

- 2) 計算上の時点に近い培養時間で得られた実験データ

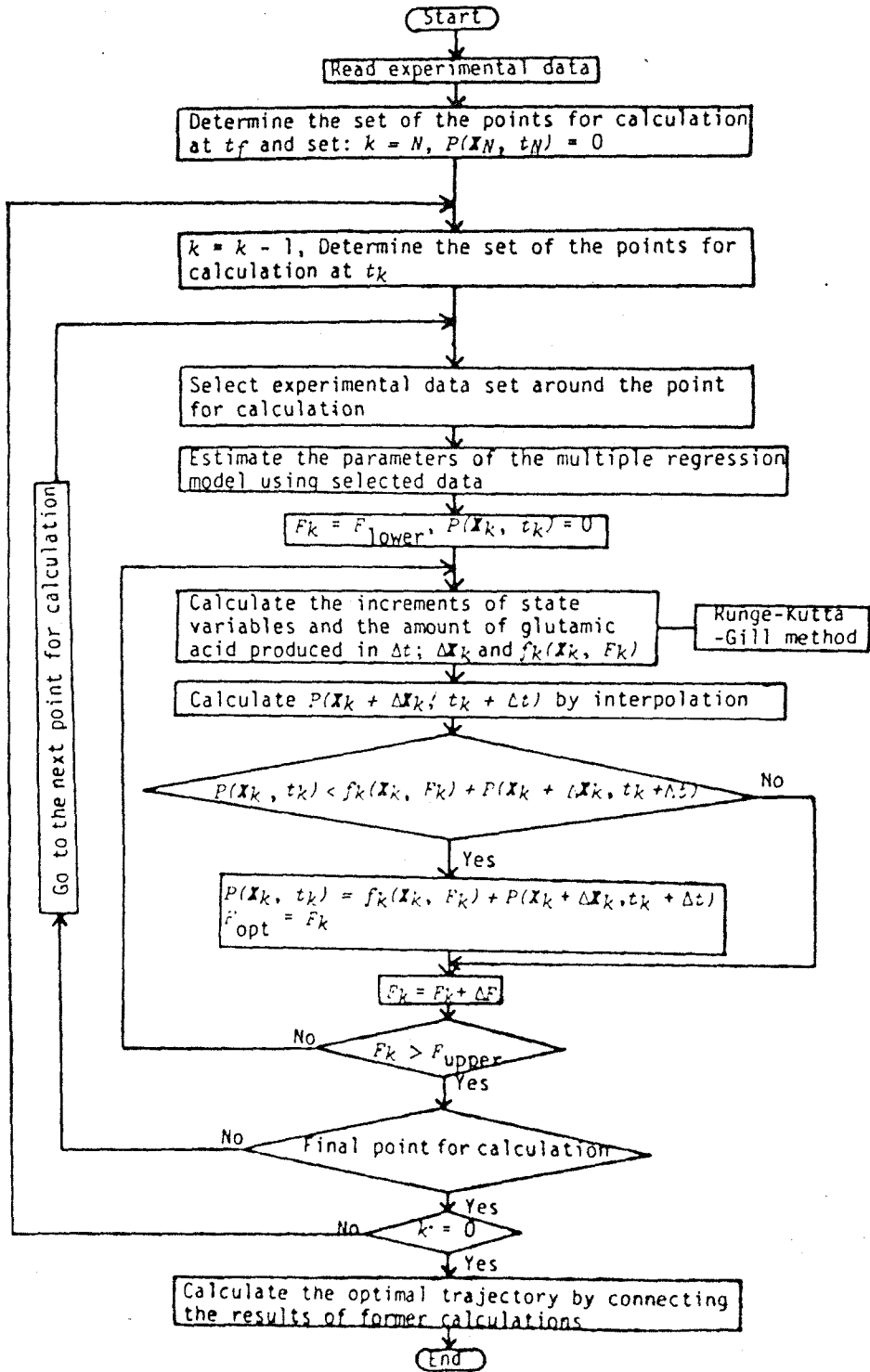


Fig. 17. Flow diagram of the optimization.

の平均値を示す状態点を中心として (19) 式によって定義されるユークリッド距離にして半径 1.3 の範囲内に均一に計算点を設定した。

$$E = \{(X - \bar{X}_e)/\sigma(X_e)\}^2 + \{(S - \bar{S}_e)/\sigma(S_e)\}^2 + \{(Q - \bar{Q}_e)/\sigma(Q_e)\}^2 + \{(V - \bar{V}_e)/\sigma(V_e)\}^2 \quad (19)$$

- 3) 計算上の点に近い実験データを選択するか、その選択は第2章，第2節，p26 に述べた基準に従う。
- 4) F_e の各値に対する状態変化を前章で述べたシミュレーション手法を用いて算出し， $f(X_e, t_e)$ の値を求める。
- 5) 算出された次の状態点， $X_e + \Delta X_e$ における $P(X_e + \Delta X_e, t_e + \Delta t)$ の値を，すでに計算済みの近傍に位置する計算点における P の値を使って内挿法により求め， $f(X_e, F_e) + P(X_e + \Delta X_e, t_{e+1}) (=P')$ を計算し，各 F について求めた P' を比較する。このようにして最適な F が決定される。
- 6) 以上で全ての離散化された状態について P の値が決定されたので任意に定められた初期値から最適な培養経過及び最適操作を決定する。すなわち $t=t_0$ から順次 $f(X_e, F_e) + P(X_e + \Delta X_e, t_{e+1})$ の値を最大にする F の値を探索する方法によって 1 段階づつ最適な状態変化を求めていく。ここで $P(X_e + \Delta X_e, t_{e+1})$ は上の 5) で述べた手順と同様，近傍の計算点の値を用いて内挿法によ

り求めた。

第4節 計算結果

Fig. 18 にエタノール濃度を一定に維持した実験データのみを用いて行った最適化計算結果の例を示す。評価関数は80時間で生産されるグルタミン酸量で動的計画法により4時間おきに最適流加速度を決定した。また Runge-Kutta-Gill 法のきざみは0.4時間ごとである。この計算結果によるとエタノール濃度が32時間目から急に増加しており、エタ

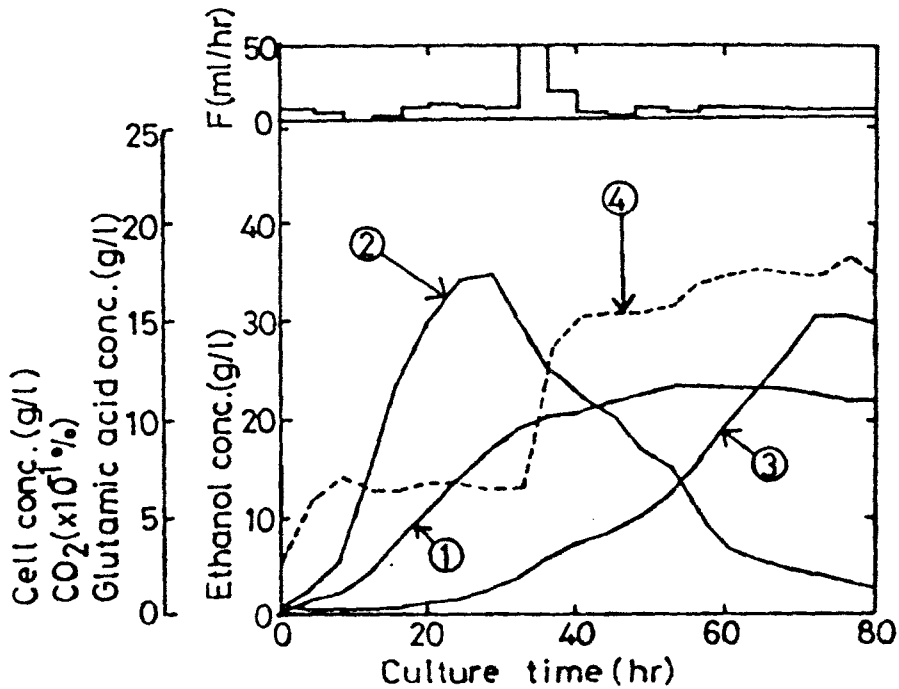


Fig. 18. Results of preliminary optimization.
Data used for multiple regression: Constant ethanol concentration.

- ① : Cell mass, ② : CO₂,
③ : Glutamic acid, ④ : Ethanol.

1-エタノール濃度の急激な増加がグルタミン酸生産を増大させることを示した Fig. 9 の実験結果と一致している。したがって本計算方法は培養操作の改善に適切な指針を与えるものと考えられるが、前章で述べたようにシミュレーション上の状態点近傍に回帰分析用の実験データがないとシミュレーションが不正確になると考えられる。したがってグルタミン酸生産の最終値は 16.0 g/l にとどまり、実際にエタノール濃度をシフトした実験値 (Fig. 9 の例では 17.7 g/l) に比べても少ない。

さらにエタノール濃度を途中でシフトした培養実験 (5 g/l から 25 g/l, 5 g/l から 30 g/l, 5 g/l から 35 g/l) を加えて最適化計算を行った結果を Fig. 19 に示す。この場合も培養の途中でエタノール濃度を増加させることとなり、グルタミン酸生産量はシフトした培養実験でえられたデータより高く 19.5 g/l に達した。

第5節 考察

本最適化計算法が従来の最適化計算法と異なる点は、回帰分析を用いているため、状態方程式が各段内においても状態空間上で異なった式に変化するのていたる所で不連続となっている系で最適計算を行なっていることである。微生物の挙動は状態変数の変化に対し通常連続的に応答すると考えると原則的には誤差が生じると考えられる。しかし培養系は複雑な生体内反応を含んでおり、簡単にモデル化することは困難な上、状態変数の可測性および再現性の欠如といった問題がある。さらに複雑なモデル式は最適化を

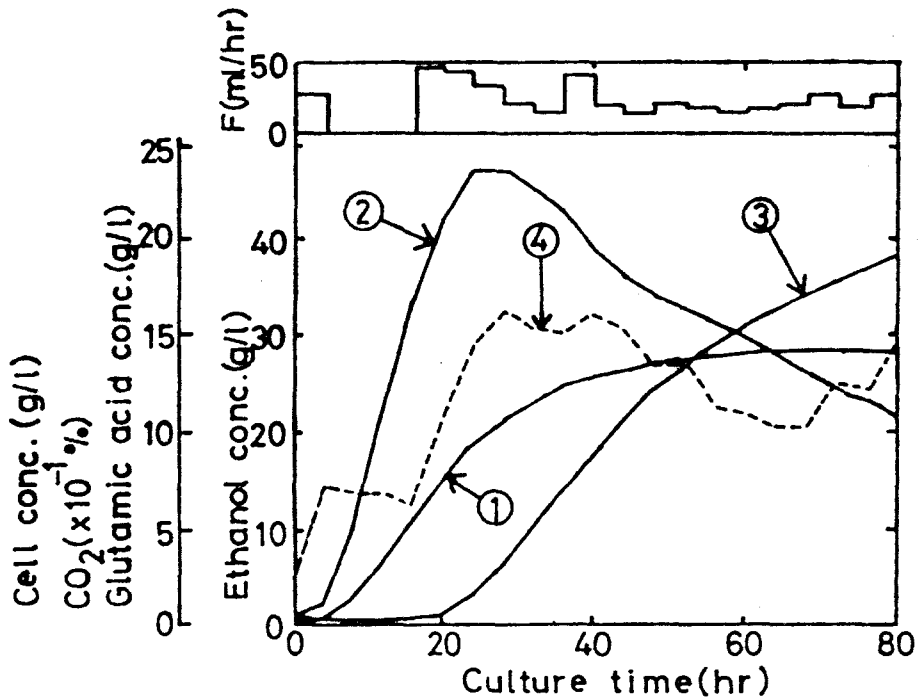


Fig. 19. Results of optimization by use of more adequate data.

Experimental data of fed-batch cultures with a sudden increase in ethanol concentration were added to the data used for the regression analysis.

- ① : Cell mass, ② : CO_2 ,
 ③ : Glutamic acid, ④ : Ethanol.

行うことを困難にするので，本法で用いた回帰分析によるシミュレーション法は実用的最適化に適していると考えられる。特に本法は培養系における実験データが適当数存在し，あとは回帰方程式中の独立変数の選定さえ行えば，最適計算は可能である。以上のことは，実験データは多くあるがモデル化のための実験を行っていく場合，例えば生産

プロセス, において特に有効であると考えられる。

さらに本法においても最適制御の精度を上げるためには, 最初に得られた最適政策を参考にして実験し, えられた実験データを回帰分析に用いるデータにつけ加えて, 真の最適制御に近づける, 逐次的方法も考えられる。その逐次的方法を従来の最適化手法を用いて遂行することはモデル式の修正が必要なことから本法と比較すると難しい。

次に本最適化計算法について今後検討すべき問題点として, 2章の考察でのべた回帰分析に関する問題, すなわち線形近似による誤差の検討, 及び独立変数の選択方法の開発等がある。さらに動的計画法の問題点としては, 状態変数の数が多くなるといわゆる次元の壁すなわち計算機の必要記憶容量が大きくなりすぎる欠点がある。現在までに次元の壁を破る方法としては Durling⁶¹⁾の逐次近似動的計画法 (Successive approximating dynamic programming) や, Larson⁶²⁾の State increment dynamic programming が考えられる。まず逐次近似法は逐次の段階の傾斜に基づいており, 最適解が複数個ある場合には間違えた最適解をうる可能性がある。実際の適用にあっては注意する必要がある。Larsonの方法は状態変化に方向性を有していないと適用しても効果が少ないので一概に有効な方法とは言えず, 培養系に用いるに当たっては十分な配慮が必要である。最後に計算時間の縮小が本法の汎用性を増大させるために重要であるが, それには微分方程式の数値計算について計算精度への影響を考慮しつつ計算時間の短縮を企てる必要がある。

第6節 要約

回帰分析を用いた流加培養のシミュレーション法と動的計画法とを組み合わせた最適化計算法を提案し、その有効性を考察した。エタノール濃度を一定に維持した流加培養のデータのみを回帰分析に用いて最適化計算を行ったところエタノール濃度を32時間目ごろから急に増加させるように流加を行うべきであるとの結果を得、第1章で述べた実験結果と流加形式で一致した。しかしグルタミン酸生産推定量は16.0 g/lにとどまった。一方エタノール濃度を途中でシフトした実験データを加えて最適計算を行った場合グルタミン酸生産推定量は19.5 g/lであった。本法では培養状態を適確に把握できる状態変数を決定するとともに、流加培養実験のデータが蓄積されておれば最適化を行い得ることを明らかにした。

第4章 オンライン最適制御システム

第1節 緒言

前章で述べた最適手法は、新たな培養実験のデータを簡単に回帰分析の基礎データとして付け加えうることから、実質上システム方程式の修正が培養実験ごとに遂行しうる。しかし前章の計算によってえられた最適流加政策にそのまま従って培養を行っても、各時点の操作は計算上の状態についての最適操作であり、その培養時点の実測データは計算には考慮されていない。従って一旦計算値と実測値に差が生じるとその時点からの操作は真の最適操作と異なり、その結果最終培養状態が計算で予測された状態から大きく隔たってしまうことも起り得る。醗酵プロセスの実操作にあたっては、各培養時点における実測データを考慮に入れた最適制御、いわゆる適応制御^{63, 64)}が望ましいと考えられる。

本章では流加培養のオンライン最適化を目指して前章で述べた最適化計算を改良したアルゴリズムを作成し、それに基づきオンライン最適制御のための模擬システムを設定し、培養実験を行った。

第2節 計算方法

醗酵槽と連動しうる小型の制御用計算機を用いたオンライン制御システムが最近報告されている⁶⁵⁾。しかし最適化計算に必要な計算量は比較的大きく、前章で述べた最適化計算法もそのままではミニコンピュータで計算させること

は困難であった。従って制御用計算機の実行すべき計算量が少ない最適化手法を開発する必要がある。

さて第3章で述べた動的計画法に基づくプログラムは分割可能である。即ち再帰方程式を最終時点から順に解いていき、各計算上の状態点 X_i において、その時点 t_i から最終培養時点 t_f までに生産されるグルタミン酸量の最大値 $P(X_i, t_i)$ を求める部分と、与えられた初期値に対する最適な培養経過を決定する部分に分割できる。この後半部で実測データが示す状態点を、その時点の計算された最適過程上の状態点と入れ換えることにより、その時点の最適政策は実測値に対応したものとなり、より実用的な制御が遂行できると考えられる。

上述の考えに基づく最適制御アルゴリズムを Fig. 20 に示す。プログラム 1 により再帰方程式をとくとき、状態空間上であらかじめ設定された計算上の点における P の値を算出し、記憶させる。次に計算した P の値とその時点 t_i の培養状態を示す、菌体濃度 X_i 、エタノール濃度 S_i 、炭酸ガス比生成速度 Q_i 、培養液量 V_i の実測データを用いて、次の時点 t_{i+1} までの最適政策をプログラム 2 により決定する。本システムでは計算された最適エタノール濃度の経時変化にそうようエタノール流加ポンプを作動させる。

プログラム 1 は前章で説明したとおりであり、プログラム 2 のフローチャートは Fig. 21 に示す。プログラム 2 が前章におけるプログラム後半部と異なる点は、記憶容量の節約のため、プログラム 1 で行った各時点における計算上の点の位置を再計算して求めていること、実験データを読み取

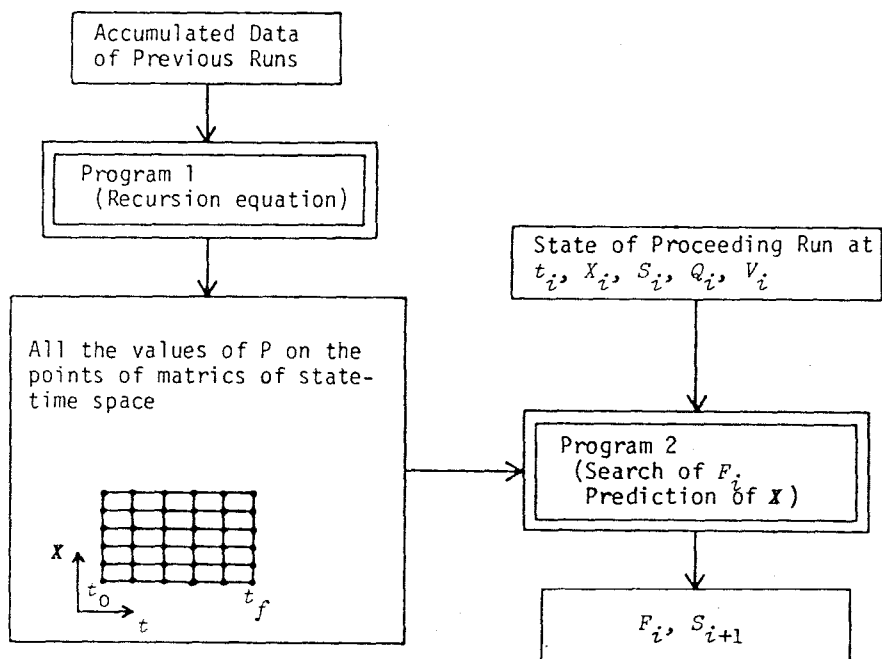


Fig. 20. Structure of algorithm for adaptive optimal control of fed-batch culture for glutamic acid production.

りその状態に対して再帰方程式を解くこと、計算はその培養時間 t_k から 次の培養時間 t_{k+1} までであること等である。

プログラム 1 とプログラム 2 を比較すると計算量はプログラム 1 の方が比較にならない程多い。

またプログラム 1 は培養開始前予め計算させることが可能であり、培養中にはプログラム 2 のみを比較的計算容量の小さい制御用計算機で計算することにより、オンライン

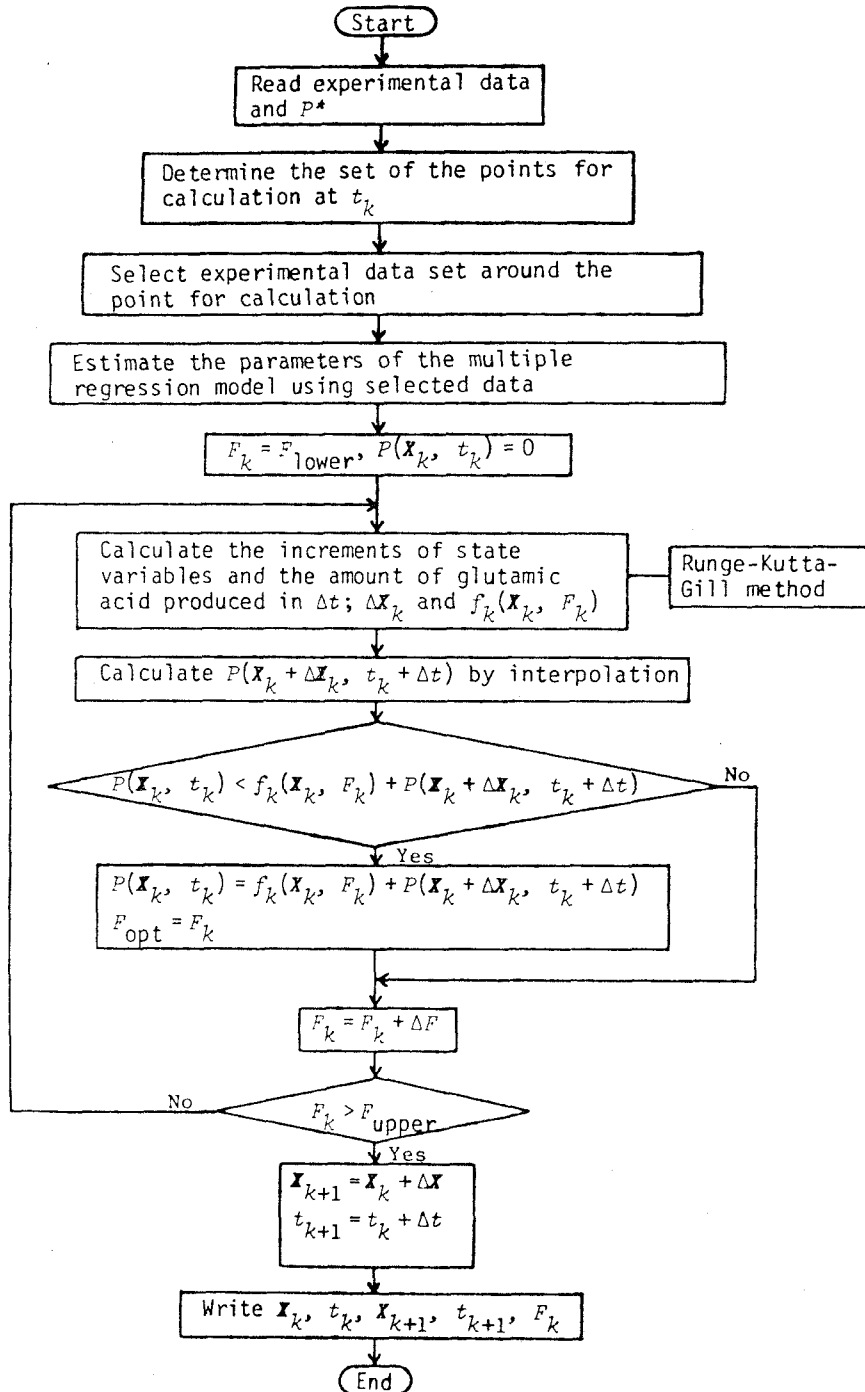


Fig. 21. Flow diagram of program 2 for the determination of the optimal trajectory with current data of culture state.

最適制御を容易に遂行でき、しかもその制御内容はミニコンピュータの能力をはるかに超えたものである。

第3節 実験方法

前節で述べた *On-line* 最適制御用アルゴリズムを本培養系に理想的な形で採用した場合には Fig. 22 に示すごとくなると推察される。FID detector とあるのはテフロンチューブからのエタノール蒸気を測定するガスクロマトグラフの検出器であり、他の測定値等と併用し現時点の培養状態を把握しプログラム2を制御用計算機で計算させる。

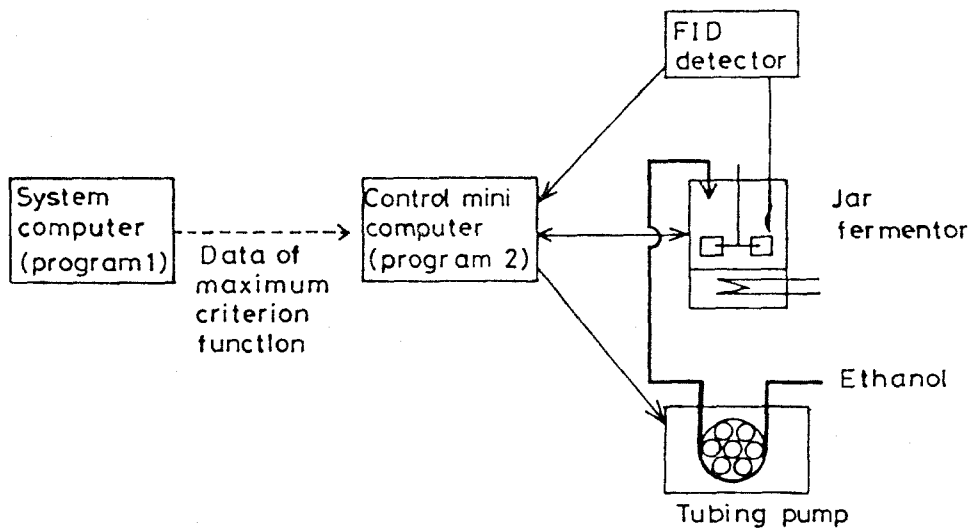


Fig. 22. Schematic diagram of the ideal on-line optimal control of fed-batch culture.

本研究では Fig. 22 に示した理想的オンライン最適制御システムの代わりに、Fig. 23 に示す如く模擬システムを使用し、提案されたオンライン最適制御方式の実効性を検討した。使用した醗酵槽は 50ℓ 容(丸菱理化製)で、初発仕込液量は 25ℓ、通気量は 25ℓ/min、他の培養条件は第1章と同じである。このシステムは Fig. 23 に示すごとく、培養期間中、10項目すなわち培養中のエタノール濃度、排気ガス中の酸素分圧及び炭酸ガス分圧、溶存酸素濃度、醗酵槽内圧力、pH、酸化還元電位、温度、攪拌速度、通気速度がモニターできる。実際に最適化計算に關係する測定値はエタノール濃度、炭酸ガス濃度、醗酵槽内圧力、温度である。次に制御システムを概説する。プログラム 1 を計算するための大型計算機は、大阪大学大型計算機センター内の ACOS system 900 (日本電気製)を用いた。プログラム 1 の計算は培養を開始する前に予め行い、計算結果はカードで保管する。培養中には小型計算機である MELCOM 70/25 によってプログラム 1 の計算結果と X , S , Q , V の実測値を用いてプログラム 2 の計算を行わせる。Figure 24 に模擬システムでのデータの流れを示す。菌体濃度は最適化計算を行う直前にサンプリングし、OD 610nm を測定し、乾燥菌体重量に換算する。エタノール濃度は Dairaku 5²²⁾ が開発した多孔性テフロンチューブ法により測定した。使用したガスクロマトグラフは Model 164 (日立製)である。排気ガス中の炭酸ガス分圧は赤外線ガス分析計(富士電気製 ZAR 型)にて測定し、 Q_{CO_2} に換算する。培養液量 V は流加した培地を積算して求めた。4 時間ごとにプログラム 2 の計算を行わせるために、

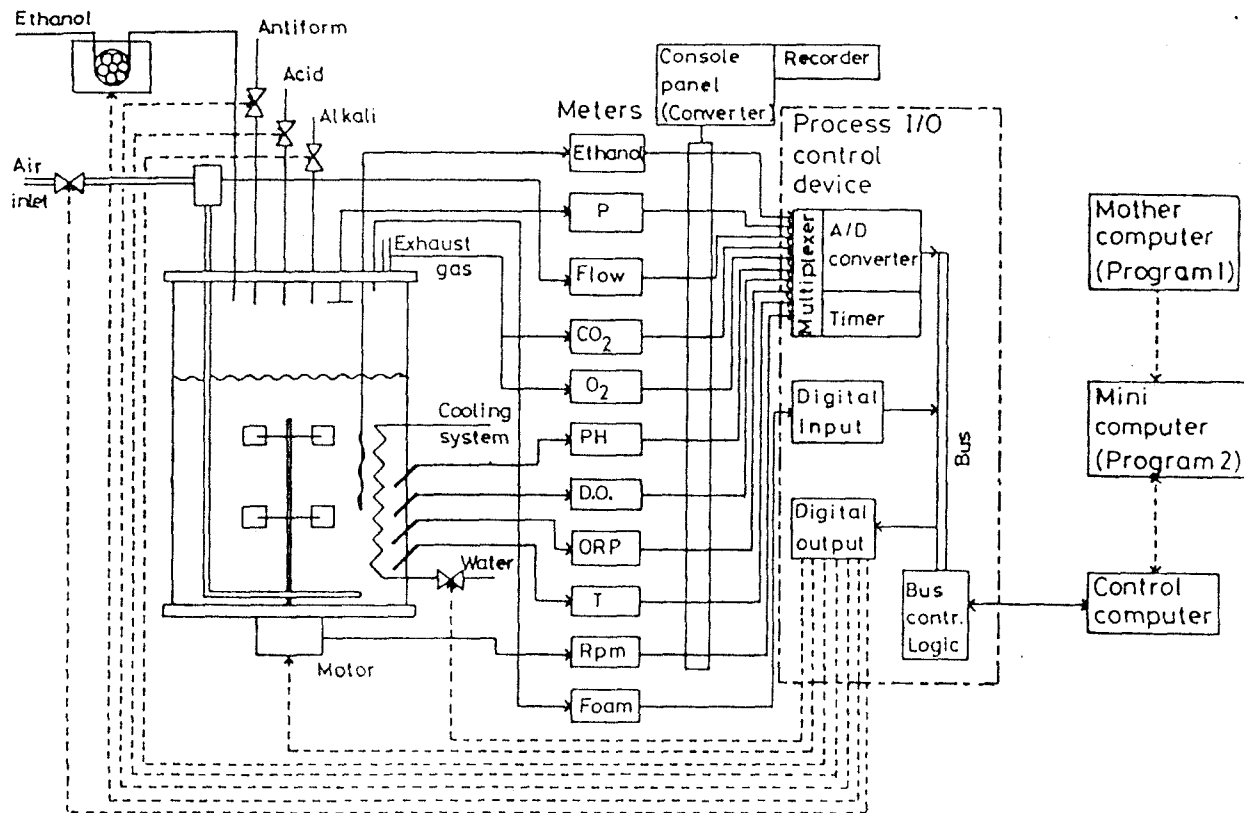


Fig. 23. Schematic diagram of the hardware configuration of the presented system for the simulation of the adaptive optimization system.

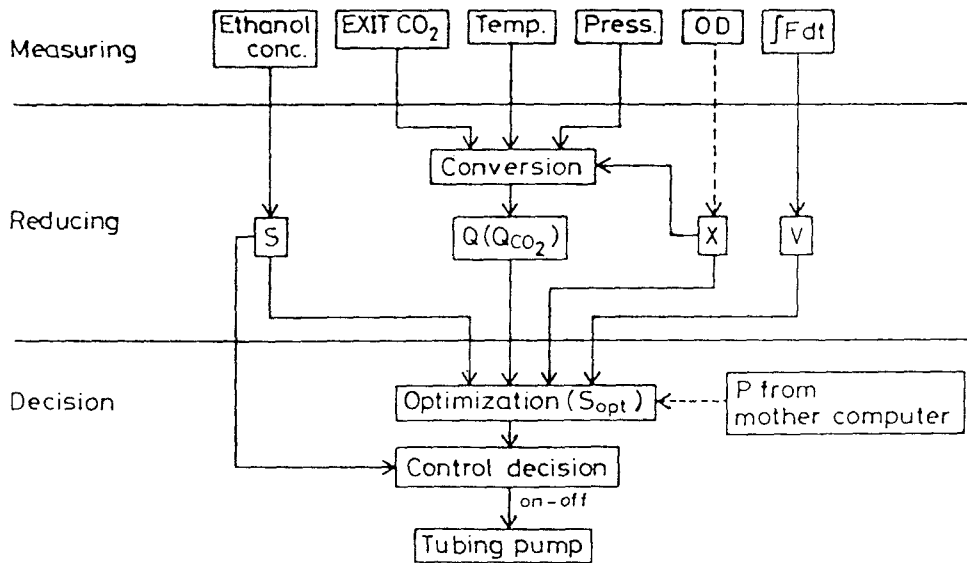


Fig. 24. Data flow for the adaptive optimal control of the fed-batch culture for glutamic acid production.

X, S, Q, Vの測定値をカードリーダーから MELCOM 70/25 に入力した。計算の結果次の4時間までのエタノール濃度の最適経時変化が決定される。培養液中のエタノール濃度は決定された最適経時変化にそつようフィードバックコントロールされる。Fig. 24に示すごとく、このフィードバックコントロールは、算出された最適エタノール濃度と、測定値を比較してエタノール流加用チュービングポンプをオンオフ制御することにより行われる。

第4節 実験結果

Fig. 25は Fig. 23に示した模擬システムを用いて行った流加培養実験の結果である。この実験におけるエタノール

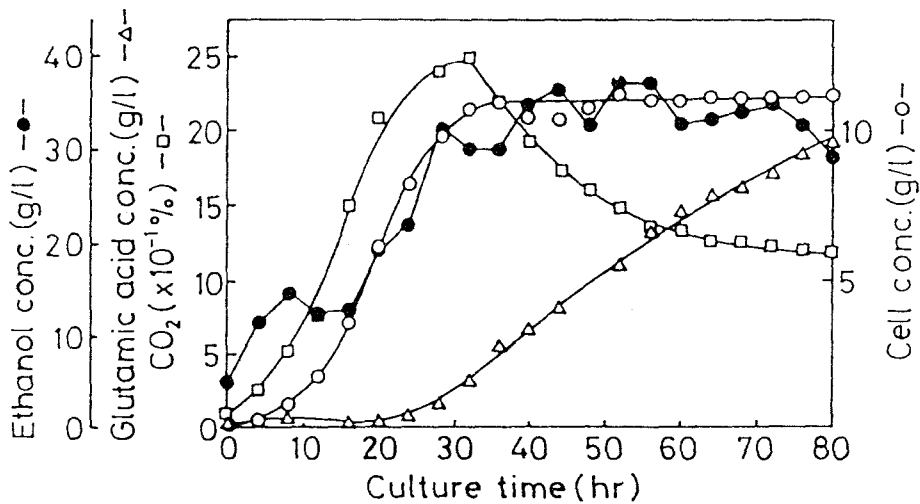


Fig. 25. Result of fed-batch culture using the examination system for adaptive control.

○: Cell mass, △: Glutamic acid,
 ●: Ethanol, □: CO₂.

濃度の経時変化は培養開始後45時間目までは、3章での最適化計算結果に近似されるが、その後そのシミュレーション結果より高いエタノール濃度約35g/lを維持している。また菌体増殖は第3章のシミュレーションに比べて低かった。このように状態変化の予測が実測値と異なる結果になったが最終的なグルタミン酸生産量は19.2g/lで予測値19.5g/lとほぼ同程度であり、80時間内に生産されるグルタミン酸量の実測データとしてはこれまでの最高を示した。従ってこのオンライン最適制御システムがこの培養系には有効であることが判明した。

プログラム2を計算して次の4時間までの最適エタノール濃度の経時変化を決定するのに必要な計算時間はかなり短かく、MELCOM 70/25で3分以下であり、培養への影響は無視出来ると考えられる。なおこの計算を大型計算機に行わせると約3秒であり、最適化全体の計算時間の約1/300であった。従ってプログラムを分割して最適制御を行うことは非常に効率がよいと考えられる。

第5節 考察

前節の実験データからオンライン制御システムがこの系には有効であることが実験により判明した。さらにオンライン最適化計算の精度を上げるには計算の各段について、モデルの修正を行いつつ、最適化計算を行うことが考えられる。しかし修正されたモデル式に基づいてプログラム1を再計算したとしても、その前の時点で決定された最適制御は真の最適制御ではなかったことになり、真の最適制御は遂行出来ない。以上のような最適化計算法はプログラムを分割することができなくなるため制御用計算機に対する負担が大きくなり精度の改善を行えたとしても不利である。従って本研究のオンライン最適化システムが培養の実際上の最適化に適合していると考えられる。

さらに予期しない培養状態の大きな変化に対して、このオンライン最適制御がどのように応答するかは興味ある問題である。培養データが状態空間上の近傍領域に十分存在しておれば、適切な対処を行うことも可能であると考えられる。

前章で述べたごとく、動的記憶法による必要記憶容量の節約のための改善方法として逐次近似動的計画法⁶¹⁾や *state increment dynamic programming*⁶²⁾ があるが、これらをプログラム1の計算に適用し、より詳細に計算を行って、その計算結果をカードイメージではなくディスクイメージとして記憶させ、その結果を使ってプログラム2の計算結果を行わせ、現行制御システムを改善することが考えられる。即ち、これらの方法を適用できればハードメモリーの節約が可能であるので、より高次元の計算が可能となる。

第6節 要約

オンライン最適制御用のアルゴリズムとして、前章で述べた最適化計算法を分割して計算させる手法を検討した。即ち再帰方程式を解く部分は培養開始前予め大型計算機により計算させ、その計算結果を使用して実測された培養状態に対応する最適政策を制御用計算機に計算させる。このオンライン最適制御の模擬システムを流加培養に用いたところグルタミン酸生産量は80時間目で19.2 g/lに達し、前章における最適化計算の値19.5 g/lとほぼ一致し、80時間内に生産されるグルタミン酸量の実測値として最高値がえられた。さらに各制御時点でミニコンピュータが最適政策を決定するのに必要な計算時間は全最適計算時間の中で無視できる程短く、約1/300であり、培養時間に比べて十分短く計算による応答遅れは問題ないと考えられる。従って前章の最適化計算法のプログラムを分割して用いるオンライン最適化制御システムは本培養系には、有効であることが判明した。

総 括

本論文は、流培養によるエタノールからのグルタミン酸生産を対象として、醗酵プロセスの最適制御について新しい手法を検討したものである。すなわち経時変化をシミュレートする方法として、従来一般に使用されている決定論的モデル式に依存せず、定式化が困難な比増殖速度、比エタノール消費速度、比グルタミン酸生産速度、比炭酸ガス発生速度の変化速度と状態変数（菌体濃度、エタノール濃度、比炭酸ガス発生速度）の関係を培養データを用いて得られる回帰方程式によって示す手法を用いた。さらにこのシミュレートする方法と動的計画法を組み合わせて最適化計算法を展開し、一定時間内のグルタミン酸生産量を目的関数として本流加培養系に適用した。また以上の最適化計算法のプログラムを分割し、*On-line* 最適制御に適したアルゴリズムに修正し、実験によりその有効性を確認した。

結論においては、流加培養に関する最適化の現状を述べるとともに本研究の意義を明らかにし、本論文の概要を述べた。

第1章では、*Brevibacterium divaricatum* NRRL 2311 によるグルタミン酸生産を流加培養で行い、エタノール濃度の影響を検討した。

すなわちエタノール濃度を培養中一定に維持した一連の流加培養実験より、エタノールが高濃度に維持された培養ほど菌体増殖は抑えられ、グルタミン酸生産の開始時期が早

くなるという結果をえた。

次に培養初期エタノール濃度を低濃度に保ち、培養途中で低濃度から高濃度にシフトした結果、エタノール濃度を一定に維持した培養と比較して、グルタミン酸生産は著しく増大した。例えば 5 g/l から 25 g/l へとエタノール濃を変化させた培養ではグルタミン酸生産は 80 時間目で 17.7 g/l に達した。またシフトした直後、菌体内グルタミン酸含有量は低下し、菌体外にグルタミン酸が蓄積し始めた。

第2章では回帰分析を用いた流加培養のシミュレーションについて検討した。すなわち流加培養における比増殖速度、比エタノール消費速度、比グルタミン酸生産速度、比炭酸ガス発生速度の変化速度と状態変数（菌体濃度、エタノール濃度、比炭酸ガス発生速度）の速度論的関係を定式化するために、状態空間上で近傍に位置する培養データから重回帰分析によって、その関係を記述する方法を採用し、Runge-Kutta-Gill 法と組み合わせて培養の経時変化をシミュレートした。その結果本プロセスの良好なシミュレーションが可能となり、回帰分析に使用するデータの中に、シミュレーションの対象となる状態と類似した実験を含めることによって、より精度を上げうることがわかった。

第3章では回帰分析を用いた流加培養のシミュレーションと動的計画法とを組み合わせた最適化計算法を提案した。

エタノール濃度を一定に維持した流加培養のデータのみを用いて最適化計算を行ったところエタノール濃度を 32 時間目ごろから急激に増加する流加を行うべきであるとの結果を得、第1章で述べた実験結果と流加形式が一致した。

しかしグルタミン酸生産推定量は 16.0 g/l にとどまった。一方エタノール濃度を途中でシフトした実験データを加えて最適化計算を行った場合グルタミン酸推定量は 19.5 g/l であった。本法は培養状態を適確に把握できる状態変数を選定するとともに、流加培養実験のデータを用いることにより、最適化計算を行い得ることを明らかにした。

第4章ではオンライン最適制御用のアルゴリズムとして、前章で述べた最適化計算を分割して計算させる手法を検討した。すなわち再帰方程式を解く部分は培養開始前予め大型計算機により計算させ、その計算結果を使用して、培養中実測された状態に対応する最適政策を制御用計算機に計算させる。このオンライン最適制御の模擬システムを流加培養に用いたところグルタミン酸生産量は 80 時間で 19.2 g/l に達し、前章における最適化計算の値 19.5 g/l とほぼ一致し、80 時間内に生産されるグルタミン酸量の実測値として、最高値がえられた。さらに各制御時点でミニコンピュータが最適政策を決定するのに必要な計算時間は全最適化計算時間の $1/300$ であり、それは培養時間に比して十分短く計算による応答遅れは無視できる。従って前章の最適化計算法のプログラムを分割して用いるオンライン最適化制御システムは本培養系には、有効であることが判明した。

以上本論文は流加培養のシミュレーション、最適化、オンライン最適化について決定論的な速度論モデルを使用する代わりに、回帰分析による蓄積データの有効利用と動的計画法とにより実施可能であることを示した。

これらの研究は本来複雑な微生物反応を含む培養プロセ

入の制御に対し統計的手法を応用する有効性を示すもので、
流加方式に対する適用に限定せず、醗酵プロセスの他の
操作因子(例えば pH, 温度等)の最適化への応用も考えられ
る。

使用記号説明

Alphabets

- $a_i, b_i, c_i, d_i; i=1, 2 \text{ or } 3$: Partial regression coefficients
derived from multiple regression analysis (-)
- D : Euclid distance defined by Eq. (6) (-)
- E : Euclid distance defined by Eq. (19) (-)
- F : Volumetric feed rate (ℓ/hr)
- f : Defined by Eq. (15) (g-glutamic acid)
- G : Concentration of glutamic acid (g/ℓ)
- G^* : Aeration rate (ℓ/hr)
- J : Objective function defined by Eq. (16) (g-glutamic acid)
- N : Number of stage (-)
- n : Number of experimental data (-)
- P : Defined by Eq. (17) (g-glutamic acid)
- Q : Metabolic activity of the culture, herein $Q = Q_{CO_2}$
(mole CO_2 /g-cell·hr)
- S : Ethanol concentration in culture broth (g/ℓ)
- S_0 : Ethanol concentration in Feed (g/ℓ)
- S^* : Ethanol concentration in effluent gas (g/ℓ)
- T : Total culture time (hr)
- t : culture time (hr)
- t_0 : Initial culture time (hr)
- V : Volume of culture broth (ℓ)
- X : Cell concentration (g/ℓ)

- \mathbf{X} : State vector (X, S, Q, V)
 κ : Rate of QCO_2 change (mole $CO_2/g\text{-cell}\cdot\text{hr}^2$)
 μ : Specific growth rate of microorganisms (hr^{-1})
 ρ : Specific production rate of glutamic acid (g-glutamic acid/g-cell \cdot hr)
 ν : Specific consumption rate of ethanol (g-ethanol/g-cell \cdot hr)
 σ : Standard deviation defined by Eq. (7) (g/l)

Subscripts

- e : Experimental data
 f : Final
 i, k : Stage number
 M : Maximum value
 o : Initial
 s : Selected experimental data

Superscripts

- $-$: mean

引用文献

- 1) White, J.: Yeast Technol., P. 31, John Wiley Sons Inc., New York (1954).
- 2) Hosler, P., Johnson, M. J.: Ind. Eng. Chem., 45, 871 (1953).
- 3) 山根: 醸工, 56, 310 (1978).
- 4) Aiba, S., Nagai, S., Nishizawa, Y.: Biotechnol. Bioeng., 18, 1001 (1976).
- 5) Wang, H. Y., Cooney, C. L., Wang, D. I. C.: Biotechnol. Bioeng., 19, 69 (1977)
- 6) 大橋: 工化, 61, 1001 (1958).
- 7) Hospodka, J.: Biotechnol. Bioeng., 8, 117 (1966).
- 8) 藤尾, 三分一, 上田: 醸工, 12, 626 (1971).
- 9) Miskiewicz, T., Lesniak, W., Ziobrowski, J.: Biotechnol. Bioeng. 17, 1829 (1975).
- 10) 矢野, 小林, 清水: 醸酵工学大会要旨集 P215 (1976).
- 11) ポントリャーギン, ボルチャンスキー, ガムクレリーゼ, ミシチェンコ (関根訳): 最適過程の数学的理論, 文一総合出版, 東京 (1967)
- 12) Fishman, V. M., Biryukov, V. V.: Biotechnol. Bioeng. Symp. No 4, 647 (1974).
- 13) Yamane, T., Kume, T., Sada, E., Takamatsu, T.: J. Ferment. Technol., 55, 587 (1977).
- 14) Ohno, H., Nakanishi, F., Takamatsu, T.: Biotechnol. Bioeng., 18, 847 (1976).
- 15) Bellman, R.: Dynamic Programming, Princeton University Press (1957).

- 16) 島 : システムと制御, 16, 942 (1972).
- 17) 奥村 : 酵協誌, 33, 185 (1975)
- 18) 河野, 飯島, 沖, 宮地, 尾崎 : *Amino Acid and Nucleic Acid*, 11, 99 (1965).
- 19) 奥村, 都河, 角田, 河野, 松井, 宮地 : 農化, 36, 141 (1962).
- 20) 沖, 西村, 佐山, 北井, 尾崎 : *Amino Acid and Nucleic Acid*, 19, 73 (1969).
- 21) 沖, 西村, 佐山, 北井, 尾崎 : *Amino Acid and Nucleic Acid*, 19, 82 (1969).
- 22) Dairaku, K., Yamane, T.: *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 1671 (1979).
- 23) 松原, 森田, 木下 : 酵協誌, 17, 584 (1959).
- 24) Beutler, H. O., Michal, G.: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H. U., ed.) vol. 4, p. 1708; Verlag Chemie, Weinheim Academic Press, Inc., New York and London (1974)
- 25) 吉井, 山田 : 第20回酵素化学シンポジウムB集会予稿集, 48 (1969).
- 26) Bergmeyer, H. U., Mölling, H.: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.) vol. 2, p. 1520, Verlag Chemie, Weinheim Academic Press, Inc., New York and London (1974).
- 27) Möllering, H., Gruber, W.: *Anal. Biochem.*, 17, 369 (1966).
- 28) Wright, L. P., and Skeggs, H. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 56, 95 (1944).
- 29) Takinami, K., Yamada, Y., Okada, H.: *Agr. Biol. Chem.*, 30, 674 (1966).

- 30) Yoshida, T., Taguchi, H.: Workshop Computer Application
in Fermentation Technology 1976. (Jefferis, R. P.,
ed.), p. 93, Verlag Chemie·Weinheim 1977.
- 31) Monod, J.: Ann. Rev. Microbiol., 3, 371 (1949).
- 32) Pirt, S. J., Richeloto, R. C.: Appl. Microbiol. 15, 1284
(1967).
- 33) Luedeking, R., Piret, E. L.: J. Biochem. Microbiol.
Technol. Eng., 1, 393 (1959).
- 34) Shu, P.: Biotechnol. Bioeng., 3, 95 (1961).
- 35) Blanch, H. W., Dunn, I. J.: Advances in Biochem. Eng.,
3, 127 (1974).
- 36) Jacob, F., Monod, J., : J. Mol. Biol., 3, 318 (1961).
- 37) Imanaka, T., Kaieda, T., Sato, K., Taguchi, H.: J. Ferment.
Technol., 50, 633 (1972).
- 38) Vandedem, G., Young, H. M.: Biotechnol. Bioeng., 15, 419
(1973).
- 39) Tsuchiya, H. M., Frederickson, A. G., Aris, R.: Advances
in Chem. Eng. 6, 125 (1966).
- 40) 尾形 : ダイナミックプログラミング, 培風館, 東京 (1973).
- 41) 高松, 橋本, 吉田 : 化学増刊, 36, P323, 化学同人, 京都 (1968)
- 42) Ohno, H., Nakanishi, F., Takamatsu, T.: Biotechnol.
Bioeng., 20, 625 (1978).
- 43) D'Ans, G., Kokotović, P., Gottlieb, D.: J. Optimization
Theory Application, 7, 61 (1971).

- 44) Takamatsu, T., Hashimoto, I., Shioya, S., Mizuhara, K.
Koike, T., Ohno, H.: Automatica, 11, 141 (1975).
- 45) Hampel, W. A.: Advances in Biochem. Eng., 13, 1 (1979).
- 46) Kishimoto, M., Yamane, T., Yoshida, F.: J. Ferment. Technol.,
54, 891 (1976).
- 47) Draper, N. R., Smith, H.: Applied Regression Analysis,
John Wiley and Sons (1966).
- 48) Dunn, O. J., Clark, V. A.: Applied Statistics; Analysis of
Variance and Regression, John Wiley and Sons (1974).
- 49) Yamashita, S., Hoshi, H., Inagaki, T.: Fermentation Advances
(Perlman, D. ed.), p. 441, Academic Press New York and
London (1969).
- 50) 奥野, 芳賀, 矢島, 奥野, 橋本, 古河: 続多変量解析, P4,
日科技連出版社, 東京(1971)
- 51) Cheruy, A., Durand, A.: Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 9,
303-320 (1979).
- 52) Alvarez, J., Ricano, J.: Biotech. Bioeng. Symp. No. 9,
149-154 (1979).
- 53) 吉田, 加藤: 応用数学I, 学華房,(1961)
- 54) 後藤: 動的システムの最適化, P74, 昭晃堂, 東京(1977)
- 55) Nelder, J. A., Mead, R.: Computer J., 7, 308 (1965).
- 56) Ohno, H., Nakanishi, E., Takamatsu, T.: Biotechnol. Bioeng.,
20, 625 (1978).
- 57) 北森: 計測と制御, 8, 465 (1969)

- 58) Fan, L. T., Wang, C. S. (高松武一郎, 范良政, 范良信 訳):
離散型最大原理, P132, 工口十社, 東京 (1972)
- 59) Lee, E. S.: Optimization by Pontryagin's Maximum Principle
on the Analog Computer, p. 524-531, reprints of papers,
JACC, (1963).
- 60) George, L. Nemhauser: Introduction to Dynamic Programming,
p. 26-40, John Wiley and Sons, Inc., New York. London.
Sydney, (1966).
- 61) Lucas Pun: Introduction to Optimization Practice, p. 280-
283, John Wiley and Sons, Inc., (1969).
- 62) Larson, R. E.: IEEE Tr. on Automatic Control Ac-10, No. 2,
135 (1980).
- 63) John, G. Truxal: Adaptive Control Systems (Eli Mishkin
and Ludwig Braum, Tr. ed.) McGraw-Hill Book Co., Inc. (1961).
- 64) Richard Bellman: Adaptive Control Process, Princeton
University Press (1977).
- 65) Hampel, W. A.: Adv. Biochem. Eng., Ghose, T. K., Fischter, A.,
Blakebrough, N. (eds), 13, p. 1, Berlin, Heidelberg,
New York: Springer- Verlag (1979).

本論文に關係ある報告

- (1) Simulation of Fed-Batch Culture for Glutamic Acid Production with Ethanol Feeding by Use of Regression Analysis.
Kishimoto, M., Yoshida, T., Taguchi, H., J. Ferment. Technol., in Press.
- (2) Optimization of Fed-Batch Culture by Dynamic Programming and Regression Analysis.
Kishimoto, M., Yoshida, T., Taguchi, H.: Biotechnology Letters 2, 403 (1980).
- (3) On-Line Optimization Control of Fed-Batch culture of Glutamic Acid Production.
Kishimoto, M., Yoshida, T., Taguchi, H.: J. Ferment. Technol., in Press.

謝 辞

本研究に対し終始御懇篤なる御指導を賜った田口久治教授に衷心より謝意を表します。また、本研究に適切な御援助をいただいた合葉修一教授、並びに本論文の御校閲を賜りました市川邦介教授に謹んで感謝の意を表します。また有益な御助言と御鞭達を下さった芝崎勲教授、大島泰治教授、岡田弘輔教授、原田篤也教授に感謝致します。

さらに本研究遂行に絶えず御指導を賜りました吉田敏臣助教授を始め田口研究室の各位には多大な御助力をいただき感謝の意を表します。

併せて実験に協力していただいた佐古田久雄氏、加藤道信氏、沢野俊博氏に深謝致します。