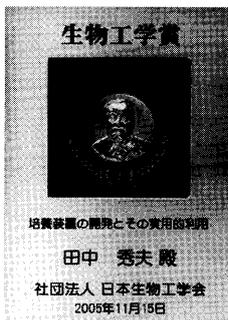


総合論文

平成17年度 生物工学賞 受賞



培養装置の開発とその実用的利用

田中 秀夫



Development and Practical Application of Bioreactors

HIDEO TANAKA (*University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba 305-8572*) *Seibutsu-kogaku* 84: 2-15, 2006.

The traditional method of designing and scaling up bioreactors for aerobic microorganisms has been based mainly on quantitative indices of the oxygen supplied to the inoculated microorganisms. However, many experiments based on such oxygen indices have produced unsatisfactory results. The author and his group have developed new bioreactors which take account not only of the oxygen uptake capacity but of the whole range of cell properties. Here, the author summarizes the group's work on the following four new bioreactors and outlines their practical application. 1. In response to the two problems of adequate oxygen supply and hydrodynamic stress associated with oxygen supply by aeration-agitation, a new rotating drum fermentor and a new jar fermentor with a modified paddle-type impeller were developed for culturing plant cells at high density. Industrial-scale (1 kl) production of shikonin derivatives through cultivation of *Lithospermum erythrorhizon* cells at high density was achieved for the first time in both of these bioreactors. 2. In response to the two problems of oxygen supply and efficient mixing, the Maxblend fermentor equipped with the Maxblend impeller and a spiral sparger was developed for high-viscosity fermentation broth. Industrial-scale (10 kl) production of hyaluronic acid from *Streptococcus zooepidemicus* cells in high-viscosity fermentation broth was achieved using this fermentor. 3. A special pressure-proof fermentor with pressure control system was used to study the effects on microorganisms in large fermentors of (a) liquid pressure gradient between liquid surface layer and liquid bottom layer, and (b) dissolved gas gradient. The scale-up of bialaphos production from a 3 l jar fermentor to a 300 kl industrial fermentor was achieved using a new scale-up method based on the results obtained with the special pressure-proof fermentor. 4. A new system (apparatus) for real-time quantitative assessment of individual cell activities in a mixed culture system was developed. The system was used to analyze individual cell growth activities in mixed culture systems of two or three strains.

[Key words: bioreactor, microbial cells, plant cells, scale-up, industrial production]

はじめに

微生物関連産業に係わる培養装置の歴史は、パスツール (1822-1895) やコッホ (1843-1910) らによる培養微生物学の確立後、19世紀の後半から20世紀の前半にかけての嫌気性微生物細胞用の培養装置の開発を経て、20世紀の前半における好気性微生物細胞用の培養装置の開発に引き継がれ現在に至っている、と概観することができる。好気性微生物細胞にとって、酸素が他の栄養源と

比較して極端に難溶性であるにもかかわらず、炭素源の1~3倍のモル数を代謝や増殖に必要とすることから、好気性微生物細胞用の培養装置は、いかに経済的で効率よく酸素を培養液中へ供給できるかを旨としてこれまで進化してきたと言えよう。小型の好気性微生物細胞用の培養装置の先駆けとして、1933年にオランダのKluyverとPerquin¹⁾による綿栓付き三角フラスコを回転振盪機上で、1942年に日本の鹽田と坂口²⁾による綿栓付き肩付きフラスコを往復振盪機上で、それぞれ振盪させ、酸素を

著者紹介 筑波大学大学院生命環境科学研究科 (教授) E-mail: hitanaka@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

綿栓を通して培養液中へ供給する画期的な小型の培養装置が開発された。また、堅牢で長期使用可能な現在型の回転振盪機は1954年に³⁾、往復振盪機は1952年に⁴⁾すでに完成していた。一方、大型の好気性微生物細胞用培養装置として、1937年頃、中部ヨーロッパで内部に攪拌機とエア・スパージャーが設置され、内壁に邪魔板を取り付けて、通気と攪拌を組み合わせ、培養液の混合と効率よい酸素供給を行うことができる、直立円筒式通気攪拌型の培養装置の原型が開発された⁵⁾。その後、この通気攪拌型の培養装置は広く用いられ、1943年に米国でペニシリン生産用の54 klの大型培養装置が、1955年には、ペニシリンやストレプトマイシン生産用の125 klの大型培養装置が用いられた。さらに、それらの小型培養装置の綿栓付きフラスコで得られた基礎研究結果を、酸素移動容量係数(k_{La})や単位液量あたりの攪拌消費動力(P_v)を定量的指標として大規模の工業用培養装置の通気攪拌型培養装置で再現させるスケールアップ法もすでに開発されていた。このように、好気性微生物細胞用の小型および大型培養装置やスケールアップ法は、1955年頃すでに開発され、ほぼ完成されていたと言えよう。

筆者は大学を卒業して以来40年近く、微生物細胞や植物細胞の培養に係わる研究に携わってきた。その間、多くの学生や研究者との共同研究の中で、好気性の生物細胞(微生物細胞および植物細胞)の培養や培養装置、さらにスケールアップ法などの取扱いにおいて、支配因子として酸素供給を中心に考える1955年までの考え方だけでは解決できない多くの問題に遭遇し、それらの解決を図ってきた。解決に当たっては、従来の考え方に把われることなく、細胞の対酸素特性以外の種々の特性に注

目した。それらの特性を定量的に把握することにより、新たに生まれる培養装置のコンセプトの下に対象細胞の機能が十分活かせる新規な培養装置を開発し、その実用的利用を目指してきた。ここでは、その中で受賞対象となった「培養装置の開発とその実用的利用」について紹介したい。表1にそれらについてまとめた。開発した8種類の培養装置と特に配慮した細胞の特性および培養装置の特性が示してある。本論文では誌面の都合上、実用的利用を中心に1, 2, 3および4のみを記述し、5, 6, 7および8についてはふれていない。興味のある方は参考文献を参照されたい。

1. 植物細胞用培養装置の開発とその実用的利用¹⁴⁾

植物細胞の液体培養で得られる細胞の状態は一般に図1に示すように、すべてが単細胞の状態ではなく、むしろ大部分が数十、数百の細胞集塊の状態であり、それらが培養液中に混在している。ハリクワ(*Cudrania tricuspidata*)の液体培養を綿栓付きの肩付きフラスコ

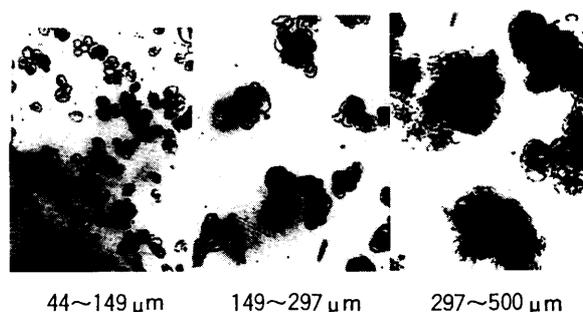


図1. 液体培養におけるハリクワ培養細胞(各細胞集塊グループは粒径サイズ別に篩分けした)

表1. 開発した培養装置とその実用的研究

開発培養装置(実用的利用の例)	配慮した細胞の特性および培養装置の特性
1. 植物細胞用培養装置 (ムラサキ細胞によるシコニンの工業生産)	物理的ストレスが与える細胞への影響
2. 高粘性物質生産用培養装置 (連鎖状球菌によるヒアルロン酸と放線菌による γ -リノレン酸の工業生産)	高粘性物質生産に適した通気攪拌による培養液の混合特性と酸素供給能
3. スケールアップ解析用培養装置 (放線菌による除草剤ピアラホスの工業生産)	大型培養装置内での圧力変動および気体濃度変動の細胞への影響
4. 混合培養解析装置	複数種の細胞の混合培養における各種細胞濃度のリアルタイム測定
5. ベンチレーション機能付きフラスコ培養装置 ^{6, 7)}	振盪フラスコの換気効果
6. スケールアップ可能な光合成細胞用培養装置 ⁸⁻¹⁰⁾	効率的、経済性の高い均一な光の細胞への供給
7. 酸素除去機能L字管型培養装置 ¹¹⁾	嫌気条件下で簡便な経時的細胞濃度の測定
8. ヘチマ繊維体を固定化担体として用いる培養装置 ^{12, 13)}	細胞の付着性、使用後の自然分解性および経済性にすぐれた固定化担体の使用

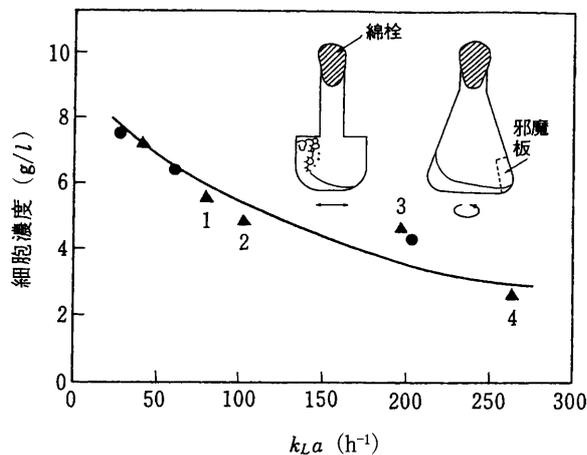


図2. ハリクワ細胞の振盪培養における初発 k_{La} と培養15日後の細胞濃度との関係。●, 往復振盪機上の肩付きフラスコ培養; ▲, 回転振盪機上の三角フラスコ培養. 数字は邪魔板の数

(500 ml 容, 50 ml 液量)と三角フラスコ (500 ml 容, 100 ml 液量) を用いて次の条件で行った. 前者は往復振盪機上で3つの振盪速度 (85, 100 および 120 往復/分) で, 後者は回転振盪機上で, 内壁に0~4枚の邪魔板を取り付けたフラスコを用いて回転速度一定 (130 rpm) とした. これら2種類のフラスコを用いて15日間培養して得られた細胞濃度と, それらの振盪条件における酸素移動供給能の指標, 初発 k_{La} との関係を示したのが図2である. 酸素供給能が大きい条件ほど得られる細胞濃度が低いという, 細菌や酵母の培養では認められない結果が得られた. これらの結果から, 植物細胞の増殖が酸素供給以外の因子に支配されていることが示唆された. そこで肩付フラスコにおける3つの振盪条件で15日間培養して得られた細胞について, 細胞集塊の粒径サイズ分布を重量比率で調べたところ, ハリクワ細胞の粒径サイズは大きいものは1981 μm 以上であり, 広い粒径分布を有していた. また, 3つの振盪条件の粒径分布を比較した結果, 振盪速度が速いほど粒径サイズが大きな部分 (径 1981 μm 以上) の比率が減少し, 逆にサイズの小さな部分 (径 80 μm 以下) の比率が増大することが明らかとなった. さらに100および120往復/分の条件におけるサイズの小さな部分の顕微鏡的観察では, 生細胞がほとんど認められず, 破壊損傷した細胞が大部分であった. なお, 三角フラスコ培養において, 邪魔板数が増大するほど小さな部分の比率の増大が同様に認められた. 以上のような現象は, ハリクワ細胞に限らず植物細胞に一般に認められる現象であり, 振盪操作の悪影響の強弱は細胞自体の大きさや物理的強度, 細胞集塊サイズ分布などに依存しているといえよう. このことは, 植物細胞の液体培養において, 酸素供給速度よりも振盪操作などの物理的ストレスの細胞に与える影響の強さの方が細胞増殖速度の律速

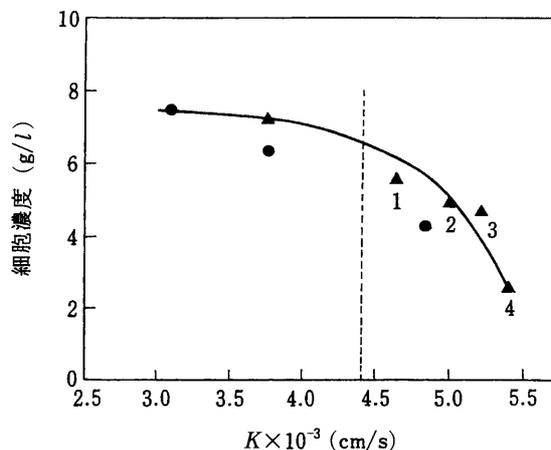


図3. ハリクワ細胞の振盪培養における15日後の細胞濃度と物理的ストレスが細胞に与える影響の強さ (K) との関係. シンボルは図2と同じ.

因子になり得ることを示唆している.

植物細胞に与える剪断応力などの物理的ストレスの影響度を定量的に測定する方法は, これまで開発されてこなかった. HixsonとCrowellは, 攪拌槽において固体粒子の液中における物質溶解速度係数 (K) が, 用いる装置の操作条件, 構造や規模, 固体や液体の物性, 固体粒子の形状や大きさなどの関数であることから, 攪拌系において, K 値の大きさにより, 攪拌の強さが比較できることを明らかにした¹⁵⁾. 固-液系において, K 値の大小を支配している因子のほとんどが, 細胞集塊の破壊損傷にかかわる因子と同じであるという考えの下に筆者は, 剪断応力などの物理的ストレスが細胞に与える影響の強さを間接的な方法で定量的に把握するための指標として K 値を用いることを提案した. 植物細胞のモデルとして, 植物細胞と比重がほぼ等しく, 水に難溶性の β -ナフトールを選択した. また, 物理的ストレスの影響を受け易い, 大きな細胞集塊の粒径サイズにほぼ等しい円筒型 (径および高さが2 mm) の粒子に β -ナフトールを整形して用いた. なお微量の β -ナフトールの水における溶存濃度は, 分光光度計により波長 275 nm の吸光度で測定された. 次に図2に示したフラスコの種々の培養条件下で, 15日間培養して得られた細胞量と, それらの培養条件における物理的ストレスの細胞に与える影響の強さ K 値との関係を示したのが図3である. K 値の増大につれて得られる細胞濃度の減少が認められ, 細胞増殖が物理的ストレスに支配されていることが示唆された. なおハリクワ細胞の場合, 物理的ストレスが細胞に与える影響の強さが K 値で 4.4×10^{-3} (cm/s) 程度までは, ほぼ正常な増殖を示し, それ以上の K 値では悪影響を生じることが明らかとなった.

植物細胞培養用の培養装置としての性能の評価を,

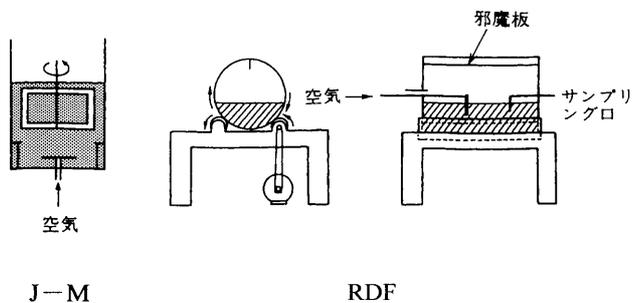


図4. 開発した植物細胞培養装置. J-M, 変形パドル型インペラー付きジャーフェーマンター; RDF, 回転ドラム型培養装置.

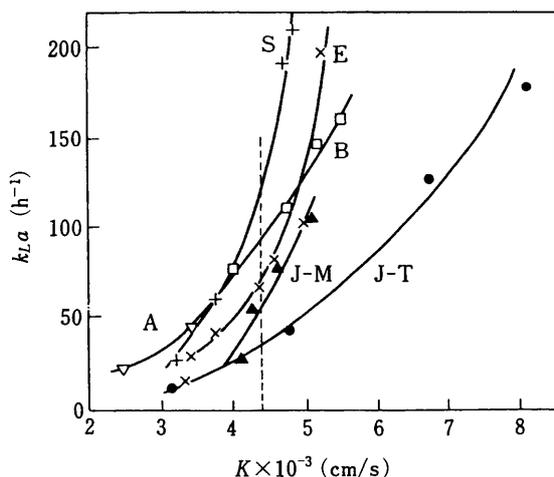


図5. 種々の培養装置の培養条件における初発 k_{La} と細胞への物理的ストレスの影響の強さ(K)との関係. S, 綿栓付き肩付きフラスコ; E, 綿栓付き三角フラスコ; B, 気泡塔型リアクター; A, エアリフト型リアクター; J-T, 平羽根タービン型インペラー付きジャーフェーマンター; J-M, 変形パドル型インペラー付きジャーフェーマンター.

①培養液における酸素供給能の定量的指標(初発 k_{La})と
②通気攪拌操作などによる細胞への物理的ストレスの影響の強さの定量的指標(K)の2つの指標を用いて行った. ここで使用した培養装置は, 綿栓付き肩付きフラスコ(S), 綿栓付き三角フラスコ(E), 気泡塔型リアクター(B), エアリフト型リアクター(A), 平羽根タービン型インペラー付きジャーフェーマンター(J-T)および変形パドル型インペラー付きジャーフェーマンター(J-M)の6種類である. なお, J-Mは筆者らが開発した糸状菌¹⁶⁾および植物細胞用の培養装置である(図4). この装置は, 大きな変形パドル型の攪拌翼を用いるため, 気泡の微細化力は弱い攪拌翼近傍のみに強い剪断力を集中させることなく, また, 小型の邪魔板と合わせて用いることにより, 培養槽全体を均一に攪拌混合することが可能である. なお, 酸素供給は, スパージャーからの通気に加え, 液表面からの空気の巻き込みにより行う仕組みになっている. 水系に近い低細胞濃度の培養におい

て, 6種類の培養装置の植物細胞培養装置としての性能を比較した結果が図5である. 植物細胞培養用の装置としては, 細胞への物理的ストレスの影響が少なく, 酸素供給能が大きい装置が好ましい. この図より, 振盪機上の2種類のフラスコ[S, E]や通気型培養装置[A, B]の方が, 通気攪拌型培養装置[J-T, J-M]に比べて植物細胞培養装置として適しており, またJ-Mの方がJ-Tに比べて適していることがわかる. なお, より高濃度の植物細胞を含む培養液は擬塑性で非ニュートン流体を示し, 細胞濃度が1%以上になると, そのみかけの粘度(μa)は対数的に増大することが知られている¹⁷⁾. 2%以上の細胞濃度の高粘性培養液を含む種々の培養装置を用いて, K 値で 4.4×10^{-3} (cm/s)程度の条件で酸素供給能(k_{La})を測定したところ, J-M以外の培養装置では, 装置内の混合が不均一となり, その結果 k_{La} の測定が不可能であり, J-Mのみが, 高濃度の植物細胞培養装置として適していることが明らかとなった. このJ-Mを用いて, ハリクワ細胞の高濃度培養をした結果, 培養24日目ではほぼ3%の細胞濃度が得られた¹⁴⁾. この濃度は, 生細胞の含水率が93~94%である多くの植物細胞培養においてこれまで得られた最高の細胞濃度に相当するものであった. 以上の結果から, J-Mが高濃度の植物細胞用培養装置として適していることが実証された.

筆者らは, さらにこれまでの植物細胞培養装置とはまったく異なるコンセプトのもとに, 新規な回転ドラム型培養装置(RDF)の開発を行った¹⁸⁾. 図4に示すように, 培養器自体が回転することにより, 培養液の混合攪拌が行われ, 同時に酸素が液中に供給される仕組みとなっている. この培養装置はメカニズムが単純であり, 槽内壁がたえず洗浄されているために, 壁面には細胞が付着することなく, 安定な長期間運転が可能である. また剪断応力などの物理的ストレスの細胞へ与える影響が少なく, 高濃度の細胞の培養液に効率よい酸素供給が可能なる点に特徴がある. 本研究者のニチニチソウを用いた研究結果からも, 森本らの多年生のムラサキ細胞による二次代謝産物のシコニンの生産に関する研究からも, RDFはJ-Mと同様に植物細胞の増殖や二次代謝産物の生産に適した植物細胞用培養装置であることが明らかとなった¹⁹⁾.

三井石油化学工業(株)の藤田らは, 筆者らが開発した培養装置RDFとJ-Mを用いて, 物理的ストレスの影響に敏感なムラサキ細胞のシコニン生産に関して1klの大型培養装置で, 工業生産を目的に検討を行った²⁰⁾. RDF, J-Mおよびエアリフト型リアクター(A)の3種類の培養装置を用い, 2.5lの実験室規模の培養装置から1klの大型培養装置へのスケールアップで得られた結果を図6

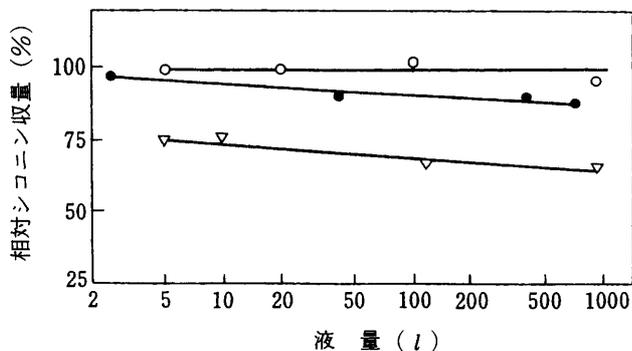


図6. ムラサキ細胞の回分培養における相対シコニン収量と培養装置の大きさ(液量)との関係。(相対シコニン収量: 5 lの回転ドラム型培養装置で得られた収量に対する他の条件で得られた収量の比較)。○, 回転ドラム型培養装置; ●, 変形パドル型インペラ付きフェルメンター; ▽, エアリフト型培養装置。

に示した。なお、いずれの培養においても初発 k_{La} を10 (h^{-1})に設定した。Aに比べ、RDFとJ-Mはいずれも高収量のシコニンが得られ、スケールアップに成功した。特に、RDFにおけるシコニン生産は最高の収量が得られ、以後工業生産用の培養装置として用いられた。本培養装置を用いた“バイオ口紅”の原料としてのシコニンの工業生産は、植物細胞による有用物質生産に関し、世界で最初の成功例である。なお、本培養装置は他の植物細胞の大量培養にも広く利用できる。

2. 高粘性培養液用培養装置の開発とその実用的利用²¹⁾

ヒアルロン酸やキサンタンガムなどの多糖類を含む培養液や、糸状菌菌糸を含む培養液は、いずれも非ニュートン性の高粘性培養液である^{22, 23)}。従来の低粘性培養液用の培養装置は培養装置の機能①培養液の均一混合、②細胞への効率的な酸素供給の2つの機能を同時に機能させる観点に立って開発された。これに対し、本研究にお

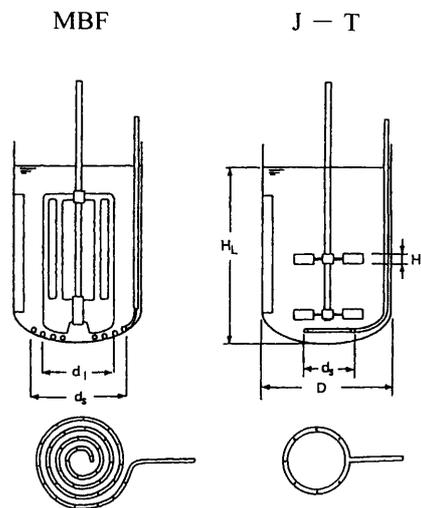


図7. MBFとJ-Tの概略図。MBF, マックスブレンドジャーフェルメンター(スパイラルスパージャー付き); J-T, タービン型インペラ付きフェルメンター(リングスパージャー付き)。

いて高粘性培養液用の培養装置の開発に当たっては、培養装置の2つの機能を別々に機能させるというこれまでにない新たな観点に立って行った。すなわち、培養液の均一混合の機能は、高粘性液体の混合攪拌用に開発され、使用されてきた大きな攪拌翼面を有するマックスブレンド翼(MB)²⁴⁾を用いた。また、細胞への効率的な酸素供給機能は、培養槽底全面から微細な気泡が上昇するように、微細な細孔を多数持つスパイラルスパージャー(直径0.1 mmの細孔を34個)を作製し用いた。筆者らはMBとこのスパージャーを組み合わせたマックスブレンドフェルメンター(MBF)を高粘性培養液用培養装置として提案した。本装置の特性を比較するために、従来から広く用いられている2段平羽根タービン型インペラ付きで、リングスパージャー(直径2 mmの孔を7個)を有するタービン型インペラ付きジャーフェルメン

表2. MBFとJ-Tの形状

	MBF	J-T
実容量 (l)	2.0	2.0
インペラー径, D (cm)	13.0	13.0
液の高さ, HL (cm)	16.0	16.0
スパージャー	スパイラルスパージャー	リングスパージャー
径, ds (cm)	10.0	6.0
	$\phi 0.1 \text{ mm} \times 34$ (穴数)	$\phi 2.0 \text{ mm} \times 7$ (穴数)
邪魔板数 (-)	4	4
インペラー	マックスブレンド型	2段, 6枚平羽根, タービン型
径, di (cm)	6.9	6.9
高さ, Hi (cm)	14.8	14.8

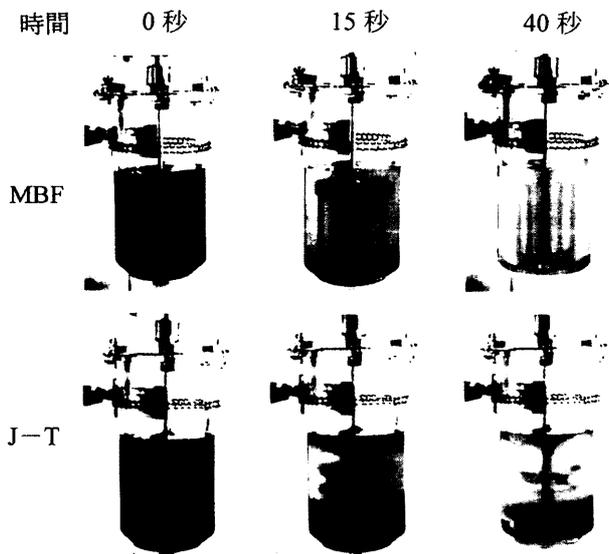


図8. ヨウ素脱色反応による混合培養時間の比較. MBF, 粘度4500 cP, 190 rpm, 1.5 kw/m³; J-T, 粘度4500 cP, 290 rpm, 1.5 kw/m³.

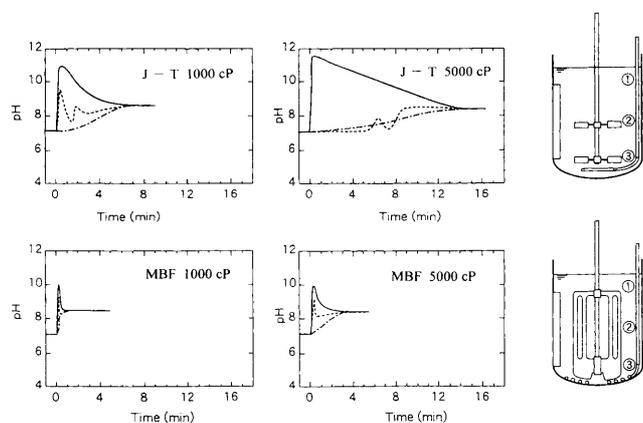


図9. MBFとJ-Tにおけるアルカリ添加時のpH分布経時変化(0.71 kw/m³). ①—, ②---, ③-.-.

ター(J-T)を用いた. それらの概略図を図7に, MBFとJ-Tの形状は表2に示した.

はじめに, ヨウ素脱色反応における混合状態の経時変化により, 混合特性を調べた. 4500 cPのCMC水溶液を, 単位攪拌動力(P_v) 1.5 kw/m³でMBFとJ-Tを攪拌した時の脱色反応を示したものである. なお通気は行っていない. 攪拌しながらヨウ素で着色したCMC水溶液に脱色剤(Na₂S₂O₃)を添加して, 15秒後と40秒後の培養槽内の状態が図8に示した. MBFでは培養槽内全体で脱色が速やかに進行するが, J-Tでは培養槽内下部の脱色が遅れることが明らかとなった.

次に, 1000および5000 cPのCMC水溶液を用い, 無通気で両培養装置を攪拌しながら培養槽上部からアルカリ(NaOH)を添加し, 培養槽内のpHの変化を図9に示した. pHは図中に示す3点で測定した. 単位攪拌動力を

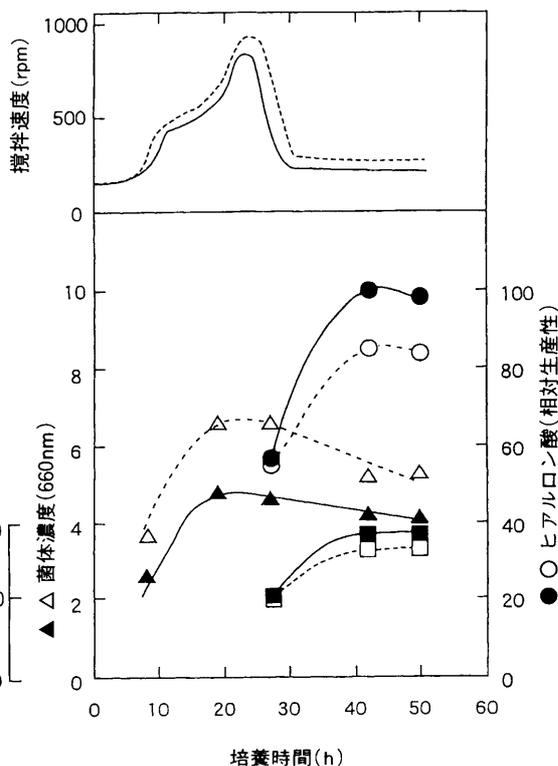


図10. MBFおよびJ-Tを用いたヒアルロン酸発酵の培養経過(溶存酸素濃度1 ppmに維持). —, MBF; ---, J-T.

0.71 kw/m³とした. まず, 5000 cP溶液では, J-Tの場合, NaOH滴下直後に上段のインペラー周辺に滴下したアルカリが停滞し, 槽内が均一になるまで約14分を要したが, MBFでは約3分で完全に均一状態となった. 1000 cP溶液では, J-Tの場合は約6.5分に対し, MBFでは約1分と良好な混合性能を示した. このように, 3点のpHが同じになるのに要する時間はMBFの方がJ-Tより短く, 図8の結果と合わせて考えるとMBFの高粘性系での攪拌混合性能が高く, 特に上下混合流の強いことが明らかとなった.

通気特性については酸素移動容量係数(k_{La})により評価した. 水系および4600 cPのCMC水溶液で P_v を変えて k_{La} を測定した結果をMBFとJ-Tの比較で見ると, 水系では $P_v = 3 \text{ kw/m}^3$ 以下でMBFの k_{La} がJ-Tに比較して高く, P_v が小さくなるほどその差は大きくなった. 4600 cPでもMBFの k_{La} はJ-Tの k_{La} より40~70%大きく, 特に低動力下での通気攪拌性能がよいことがわかった.

上記のような特徴をもつMBFを, 高粘性を示すヒアルロン酸発酵に適用してみた. ヒアルロン酸は, 連鎖状球菌(*Streptococcus zooepidemicus*)が生産する高分子のバイオポリマーで, すぐれた保湿性と潤滑性を有することから, 化粧品素材や医薬用間接潤滑剤などに使われている. MBFとJ-Tを用いて培養した典型的な発酵パターンを

比較して図10に示した。ヒアルロン酸の蓄積とともに培養液の粘度が著しく増大し、菌体形成が終了した定常期以降は酸素の需要が減り、攪拌回転数は低下した。MBFでは、菌体濃度(OD)がJ-Tに比べ低く推移するもののヒアルロン酸生産濃度は逆に高く、約20%の生産量の増大が認められた。ヒアルロン酸発酵では、MBFを用いることで培養槽内のpH分布および翼剪断などが改善され、ヒアルロン酸生成が増大したことが推察された。

次に、MBFを高濃度の γ -リノレン酸を含有する糸状菌(*Martienella ramanniana*)の変異株の培養に適用してみた。 γ -リノレン酸は必須脂肪酸として生理機能を有するとともに、プロスタグランジン合成の前駆物質として種々の生理活性に関与していることが知られている。MBFで培養した場合、J-Tで培養した場合と比較して低い攪拌動力で、効率よい生産性を示し、均一で小さなペレットを形成し、高含量の γ -リノレン酸菌糸を高濃度に得ることができた。

開発した高粘性培養液用培養装置MBFは、高粘性物質であるヒアルロン酸や糸状菌菌糸内に蓄積する γ -リノレン酸の工業生産において、10 klレベルのスケールで用いられた。なお、本論文は明治製菓(株)および住友化学工業(株)との共同研究の成果である。

3. スケールアップ解析用圧力可変型培養装置の開発とその実用的利用

好気性微生物の発酵生産システムにおけるスケールアップ法の歴史的経緯を概観してみても、スケールアップ法は未だ十分に確立した状態に達しているとは言い難い²⁵⁾。好気性微生物の培養装置には図11に示すように、実験室における培養装置として、①振盪培養フラスコおよび②ジャーファーマンター(小型通気攪拌型培養装置)、工場における培養装置として、③パイロットプラントの発酵タンク(中規模通気攪拌型培養装置)および④工業生産用の発酵タンク(大規模通気攪拌型培養装置)

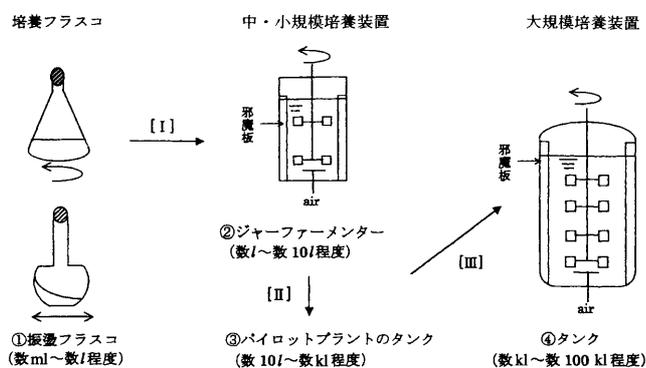


図11. 培養フラスコから大規模培養装置へのスケールアップの手順

の4種類に大別される。発酵生産プロセスの培養装置のスケールアップはI(①→②)、II(②→③)およびIII(③→④)と順次行われる。このようなスケールアップを行うに当たっての基本的な考え方は、用いる培養装置の形や大きさに関係なく微生物細胞を取り巻く培養環境が同等になるように調整することであり、そのことによってスケールアップは達成されることになる。大きさが異なる2つの培養装置間で培養環境が同等であるか否かを判定するための定量的指標として、これまで多くの指標が提案され用いられてきた。その代表的な定量的指標として装置の単位液量あたりの攪拌消費動力(P_v)と酸素移動容量係数(k_{La})がある。

スケールアップの問題点をまとめてみると、IIに比べて、IとIIIのスケールアップのプロセスに問題点が多く認められる。Iのスケールアップに関する問題点とその解決法に関して、細胞に与える物理的ストレスの影響については参考文献(14)、(16)を、換気効果については参考文献(6)、(7)を参照していただき、ここでは特にIIIのスケールアップのプロセスの問題点とその解決法に絞って述べる²⁶⁾。

これまで、これらのスケールアップ指標(P_v と k_{La})を採用してストレプトマイシン、ペニシリン、カナマイシン、メディカマイシンなど多くの抗生物質発酵の小型培養装置から大型培養装置へのスケールアップに成功して

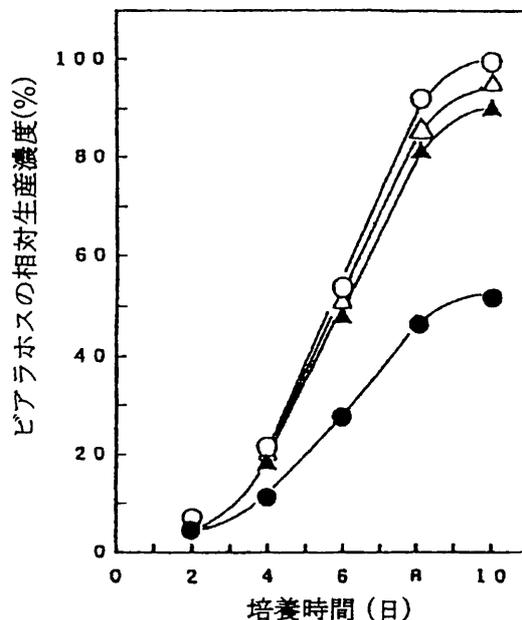


図12. 一定の k_{La} および単位液量あたりの攪拌消費動力(P_v)における種々の培養装置でのピアラホス生産。○, 3 l (750 rpm, $k_{La}=135 \text{ h}^{-1}$); △, 2 kl (200 rpm, $k_{La}=135 \text{ h}^{-1}$, $P_v=2.5 \text{ kw/kl}$); ▲, 10 kl (170 rpm, $P_v=2.5 \text{ kw/kl}$); ●, 300 kl (95 rpm, $P_v=2.5 \text{ kw/kl}$)。ピアラホスの相対生産濃度: 3 lジャーファーマンターにおけるピアラホスの生産濃度を100%とした。

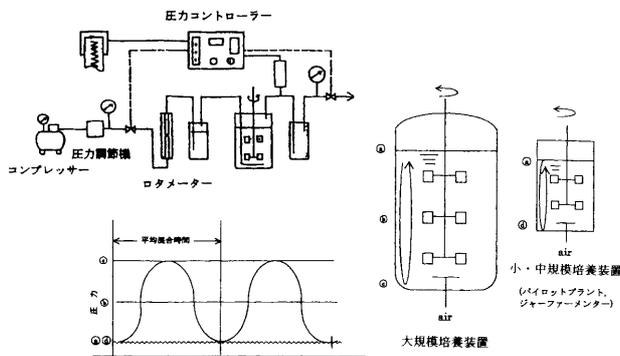


図13. スケールアップ解析用圧力可変型培養装置の概略図

いる。本研究では、放線菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) が生産するピアラホス (非選択性茎葉処理型除草剤で殺草スペクトルが広く、生育中の作物の根から吸収されて薬害作用を示すことがなく、また土壌で容易に代謝、分解される微生物農薬) 発酵を対象にスケールアップの検討を行った。ピアラホス発酵においても、これらの抗生物質の例にならって、3 lジャーフェーマンターから2 k l培養装置へのスケールアップ (II) は k_{LA} を指標に、また、2 k l培養装置から10 k l培養装置および300 k l培養装置へのスケールアップ (III) は単位液量あたりの攪拌消費動力 P_v を指標に実施した。それらの結果を図12に示したが、これまでの抗生物質生産において得られた結果に反して、3 lジャーフェーマンターのピアラホス生産能に比べ300 k l培養装置では約50~60%と著しく低い結果に終わった。ピアラホス生産は、大型培養装置になるほど生産能の低下は大きく、またグルコースの消費が速く、菌体濃度が高まることが観察された。このようにピアラホス生産では、 k_{LA} や P_v を指標にスケールアップした場合には、小型培養装置と大型培養装置の発酵経過を同一にすることは困難であり、酸素供給以外の別の律速因子を検索することが必要となった。小型培養装置と大型培養装置での発酵経過の不一致の原因としては、a) 翼径などと関係する物理的因子 (剪断応力) の相違、およびb) 大型培養装置での液深に付随する環境因子 (圧力、炭酸ガス濃度、溶存酸素濃度) などの相違が考えられた。

まず、攪拌速度 (N) および攪拌翼径 (D_i) をそれぞれ変化させて剪断応力 (翼先端周辺速度, $\pi N D_i$) のピアラホス生産に及ぼす影響を調べた。その結果、攪拌速度および攪拌翼径いずれを変化させた場合も、ピアラホス生産には変化は認められなかった。

次に、大型培養装置の水圧勾配に関連する環境を小型培養装置で再現するための圧力可変型培養装置²⁷⁾ (液量2 lの培養装置) を製作し (図13)、液深0~10 mの大型槽内を微生物が循環する環境を本培養装置内に設定 (培

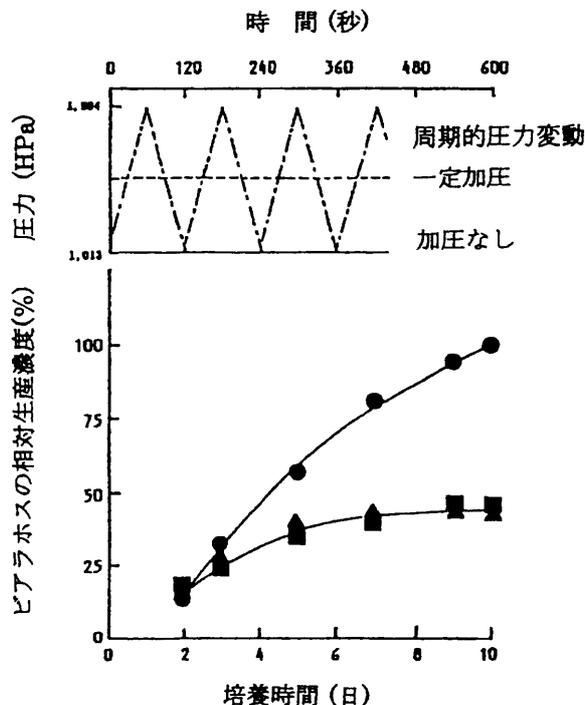


図14. ピアラホス生産に及ぼす圧力の影響。●, 加圧なし (1013 HPa); ▲, 周期的圧力変動 (1013~1994 HPa); ●, 一定加圧 (1503 HPa)。

養装置内を2分間周期で1013~1994 HPa変動) したところ、ピアラホスの生産能は300 k l大型培養装置と同じく低い結果となった (図14)。また、周期的な変動圧力の平均圧力 (1503 HPa) を一定に維持した場合でもまったく同じ低い生産能が観察された。

これらのことから、圧力可変培養装置を用いることにより、液深に付随する環境因子がピアラホスの生産を阻害していることが明らかとなった。この環境因子として、a) 圧力そのもの、b) 溶存炭酸ガスおよびc) 溶存酸素ガスが挙げられる。そこでまず小型培養装置にガス富化装置を設置し、酸素分圧を一定に設定した条件下で圧力そのものの影響を調べた。その結果、圧力そのものはピアラホスの生産を阻害しないことが明らかとなった。次に溶存炭酸ガスの影響を調べた結果、溶存炭酸ガス濃度が通常の6~20倍高い場合でも、ピアラホスの生産阻害が認められなかった。さらに、溶存酸素濃度を一定に維持しながら発酵を行わせた。その結果、ピアラホス発酵では溶存酸素濃度を低く保つ発酵条件が望ましく、その最大生産能を与える溶存酸素濃度は0.5 ppmであった。また、溶存酸素濃度0.25 ppm以下ではピアラホス生産は完全に停止した。

小型培養装置の実験で得られた最大の生産能を与える溶存酸素濃度 (0.5 ppm) を大型培養装置300 k lに再現させることを試みた。培養装置の中心部にセンサーを取

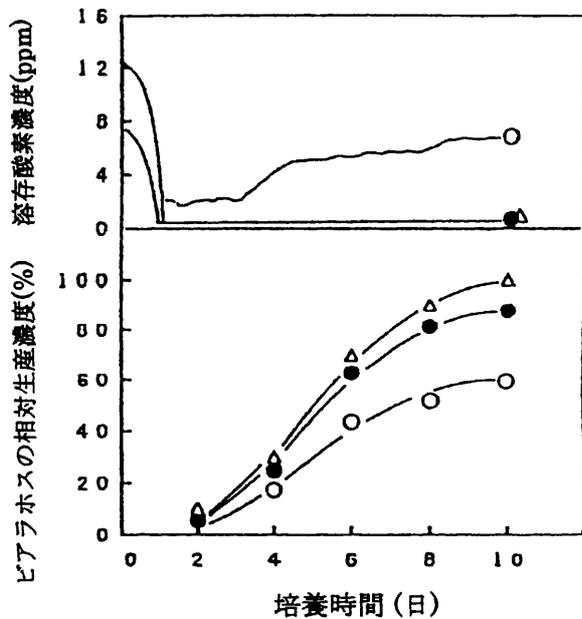


図15. 溶存酸素濃度に基づいたピアラホス生産に関するスケールアップ. Δ , 3 lジャーフェーマンター (DO=0.5 ppm); \circ , 300 klタンク ($P_v=2.5$ kw/kl, DOコントロールせず); \bullet , 300 klタンク (DO=0.5 ppm, センサー位置は槽内中央).

り付け, 溶存酸素濃度を0.5 ppmに制御した場合の結果を図15に示した. 300 kl大型培養装置のピアラホス生産能は小型培養装置のそれに比べ85%であった. この生産能は, 溶存酸素濃度を制御しない場合の生産能 (60%) に比べては著しく向上したが, まだ小型培養装置のそれには及ばなかった. このことは, 培養装置内の溶存酸素濃度の不均一性が微生物細胞に種々の悪影響を与えるようなピアラホス発酵については, 小型培養装置の実験で得られた最大生産能を与える溶存酸素濃度を大型培養装置全体に再現させることが難しいことを意味している.

従来のスケールアップ法は, 大型培養装置内環境が小型培養装置内環境と同様に均一であるという前提のもとに行われてきた. しかしながら, 培養液が攪拌混合されているにもかかわらず, 実際には大型培養装置内には大きな液深により水圧勾配が形成され, その結果溶存酸素濃度 (DO) の勾配が同様に形成される. 溶存酸素濃度の不均一性が細胞に種々の悪影響を与えるようなピアラホス発酵については, 槽内環境が均一であることを前提としている従来のスケールアップ法は十分であるとはいえない. したがって, 本研究のように溶存酸素濃度が生産に影響を与える発酵の場合には, 大型培養装置の中央付近にある DO センサーの設置位置に小型培養装置の最大生産能を与える溶存酸素濃度を設定させることは好ましくなく, 底から表面までの大型培養装置内の溶存酸素濃度の分布の幅を考慮に入れた新しいスケールアップ法が必要となる.

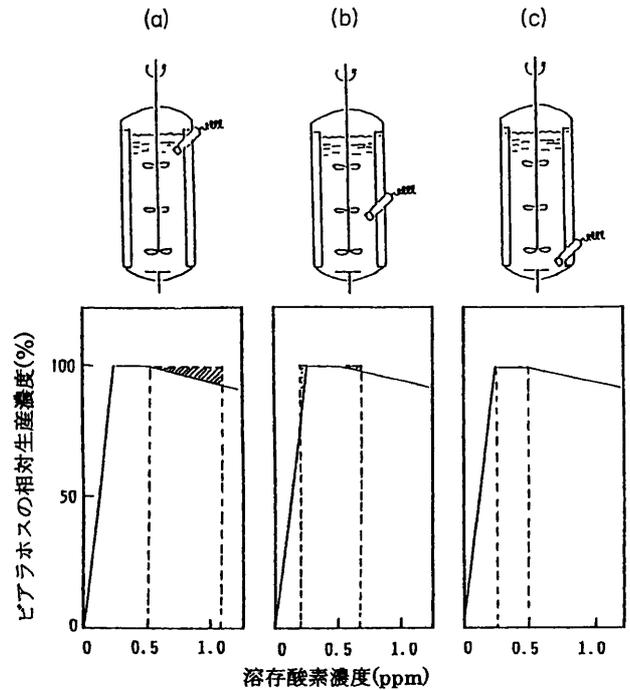


図16. アラホス生産に関するスケールアップにおける溶存酸素濃度勾配の影響. 図中の2本の破線はそれぞれ培養装置の液表面付近と底面の溶存酸素濃度を示す.

大型培養装置の種々の位置に DO センサーを取り付けて, それぞれの位置で溶存酸素濃度を小型培養装置の最大生産能を与える溶存酸素濃度に設定した場合の生産能の差異を図16に示した. すなわち, a) は液面付近, b) は中央付近, c) は底部付近にそれぞれ DO センサーを設置し, 小型培養装置の最大生産能を与える溶存酸素濃度 0.5 ppm に制御した. 破線で示される部分が大型培養装置 (液深 10 m) の溶存酸素濃度の分布幅で, また斜線で示される部分は, 小型培養装置より生産能が減っている部分を示している. このことから, 生産能を最大にするには, 従来の培養装置の中央付近に設置してある DO センサーに小型培養装置の最大生産能を与える溶存酸素濃度を合わせることにより, タンク底部付近に小型培養装置の最大生産能を与える溶存酸素濃度を合わせる方が有利であることが説明できる.

この考えを実際のピアラホス生産の大型培養装置に適用した結果, 300 kl大型培養装置の底部に DO センサーを取り付け, 溶存酸素を 0.5 ppm に制御した場合には, 小型培養装置の最大生産能の 96%まで再現することが可能となり工業生産の実用化に成功した.

以上のように, 装置内の溶存酸素濃度が均一な小型培養装置で得られた結果を, 不均一な大型培養装置で再現するためには, 装置内の溶存酸素濃度分布を考慮したスケールアップ法が有効であることが明らかとなった. なお, 本論文は明治製菓(株)との共同研究の成果である.

4. 混合培養解析装置の開発とその利用^{28,29)}

19世紀の後半に、パスツールやコッホらによって確立された単一の微生物の純粋培養法は、20世紀の100年間に数多くの産業を興し、人間生活に多くの豊かさを潤してきた。これらの成果の延長上に、複数の微生物を組み合わせたいわゆる複合系の混合培養法を用いれば、さらに大きな可能性と成果が得られるであろうと考え、多くの研究者が複合系の混合培養を試みてきたが、これまで得られた成果はほんのわずかに過ぎなかった。その主な原因として、複合系の培養で期待された成果を上げるには、単一の微生物の純粋培養で永きにわたってこれまで蓄積されてきた種々の経験や理論だけでは十分対応できなかった点にあると考えられる。すなわち、イ) 微生物の複合系として、利用目的に適した安定な複合系の選抜法やその構築法、ロ) 複合系の混合培養において、構成する微生物それぞれの増殖や代謝などの挙動を別々にリアルタイムで定量的に把握し、解析する方法、ハ) 目的を達成するための効率的で安定な複合系の最適培養条件の設定法など、微生物の複合系の混合培養法のみが有する独特の解決すべき課題が現在までほとんど未解決のまま放置され、複合系の培養法が未だ確立されてこなかった点にあるといえよう。

筆者らは、これらの背景のもとに、混合培養系を構成

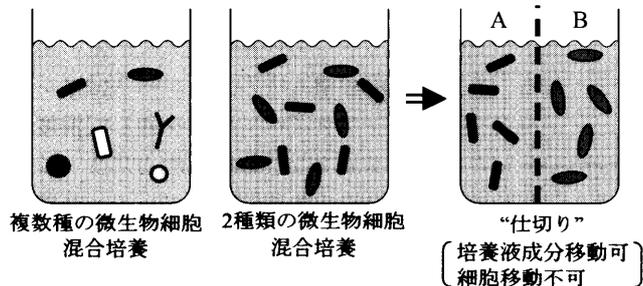


図17. 混合培養解析装置の概念図

する複数種の微生物の挙動を別々に把握し、それらの微生物間の相互作用の解析をするために必要な、混合培養系の解析装置の開発を目的としてこれまで研究を行ってきた。本稿では、新規に開発したメンブランフィルター型およびホローファイバーモジュール型混合培養解析装置とその利用について紹介する。

4.1. 混合培養解析装置の開発 混合培養系解析装置の開発に当たっての基本概念は、同一槽内に複数の菌株細胞が混在する混合培養において認められる各菌株細胞の挙動を、同一環境を維持した複数の槽内に複数の菌株細胞を1種類ずつ別々に培養することによって再現することが可能な装置を開発するというものである。具体的には、最も単純な2菌株間の混合培養を例にとると、図17に示すように、培養液の成分は通過できるが、細胞は通過できない1つの“仕切り”を培養槽の中に設けて、2菌株の細胞をそれぞれ別々の槽内に生育させ、人為的な操作によってこの両槽内の環境を同一に維持することができれば、混合培養におけるそれぞれの菌株細胞の挙動を別々にリアルタイムで定量的に把握できるのではないかと、という考えに基づいた混合培養装置を開発することである（なお、3種類以上の菌株の細胞の混合培養においても、菌株数に応じた数の“仕切り”を設けて同様に考えることができる）。上記の概念に基づいて、2菌株細胞の混合培養を想定した「混合培養解析装置」の開発研究を行い、図17に示した第1槽（A）と第2槽（B）の環境をいかに早く同一環境にするかという目的のために、“仕切り”に相当する部分をメンブランフィルター型にした解析装置（Type 1）およびホローファイバー型にした解析装置（Type 2）の2種類の解析装置を開発した。

1) メンブランフィルター型混合培養解析装置の開発 (Type 1) 培養槽AおよびBの間の仕切りにメンブランフィルターを用いた装置でType 1-1、Type 1-2およびType 1-3の3種類を開発した（図18）。いずれの装置においても2つの培養槽内はマグネチックスターラーで攪拌

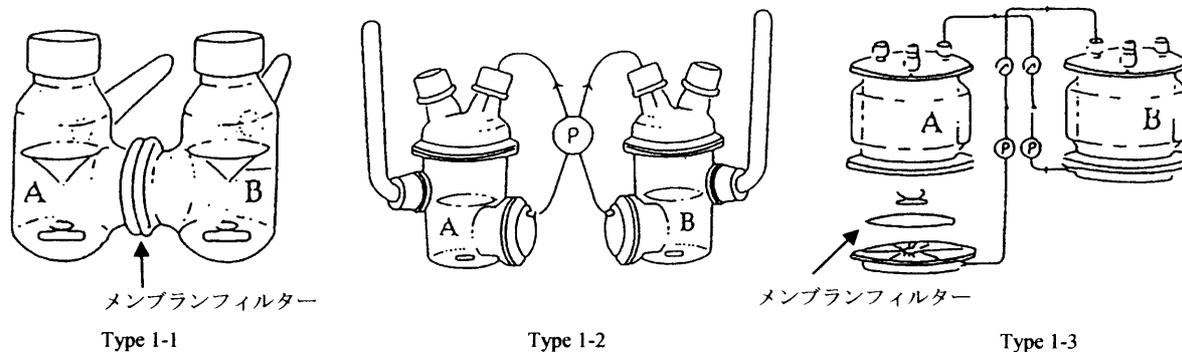


図18. 開発したさまざまなタイプのメンブランフィルター型混合培養解析装置の概略図

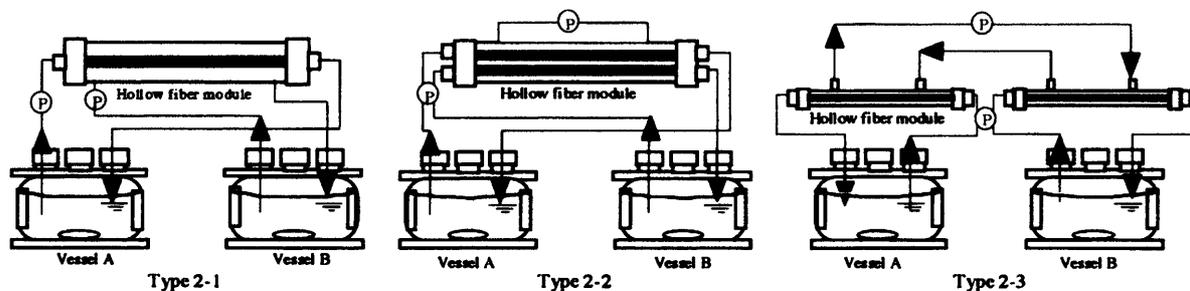


図19. 開発したさまざまなタイプのホローファイバー型混合培養解析装置の概略図

され均一系となっている。なお、Type 1-1の培養槽の液量は250 mlであり、Type 1-2およびType 1-3の培養槽の液量は300 mlである。

Type 1-1は培養槽AおよびB間の培養液成分の濃度差のみの拡散による移動機能を有した装置であり、Type 1-2は培養槽AおよびB間をポンプにより強制的に一定の液量を循環させ培養液成分を移動させることができる装置であり、Type 1-3はType 1-2の機能を拡大した装置である。すなわち、細胞懸濁液を用いた場合生じる膜面の細胞の目詰まりを少なくするために循環流の方向を横方向から縦方向に変え、膜面積を拡大した。Type 1-1およびType 1-2のメンブランフィルターはMillipore社製で材質 polycarbonate、直径47 mm、孔径 $0.6\ \mu\text{m}$ 、空隙率5～10%である。Type 1-3のメンブランフィルターはType 1-1およびType 1-2と同様な素材で大きさのみが異なる（直径90 mm）。

2) ホローファイバー型混合培養解析装置の開発 (Type 2) 培養槽AおよびBの仕切りにホローファイバーを用いた装置でType 2-1、Type 2-2およびType 2-3の3種類を開発した(図19)。メンブランフィルターに比べて膜の表面積を飛躍的に増大させることができる特徴を有する。なお、いずれの装置においても各培養槽の液量は300 mlで槽内はマグネチックスターラーで攪拌され、均一系となっている。

Type 2-1は1本のホローファイバーモジュールに1束(160本)のホローファイバーを組み入れたもので、ホローファイバー内・外で培養液成分の移動を行うシステムを有する装置である。Type 2-2は1本のホローファイバーモジュールに2束(160本 \times 2)のホローファイバーを組み入れたもので、グルコースは一方のホローファイバーの内部から外へさらに他方のホローファイバーの内部へと2段階の物質移動を行うシステムを有する装置である。Type 2-3はType 2-1およびType 2-2が手作りである点を改良し、耐圧性にすぐれ、循環流速を高めることが可能な市販のホローファイバーを2基つなげ、それぞれのホローファイバーモジュールから浸透した溶液を循

環させるシステムを有する装置である。

Type 2-1およびType 2-2のホローファイバーは材質が polypropylene、内径 $250\ \mu\text{m}$ 、外径 $290\ \mu\text{m}$ 、口径 $0.3\ \mu\text{m}$ である。Type 2-3のホローファイバーは三菱レイヨン社製で材質 polypropylene、内径 $380\ \mu\text{m}$ 、口径 $0.15\ \mu\text{m}$ である。またType 2-1およびType 2-2のホローファイバーモジュールはいずれも内径10 mm、長さ40 cmとした。

3) 混合培養解析装置の性能評価 混合培養を考える上で、混合培養解析装置を構成する2つの培養槽の環境は常に同じ状態になっていなければならない。そこで装置の性能を評価する1つの目安としてグルコース溶液を用いた場合は、2つの培養槽間の物質の移動率(De)90%を得るまでの時間、および移動速度定数(K)を、細胞懸濁液を用いた場合は膜への細胞の目詰まりを取り上げた。

物質移動率の測定は、一方の培養槽Aに30 g/lのグルコース溶液を250 ml、もう一方の培養槽Bに同量の蒸留水を入れる。ここで、培養槽A中のグルコースはメンブランフィルターやホローファイバーの膜を通して濃度差を駆動力とした拡散やポンプなどの機械的力によって培養槽Bに移動する。この時の各培養槽のグルコース濃度の経時変化を測定した。

Type 1およびType 2のそれぞれ3種類の混合培養解析装置の特性評価を表3に示した。Type 1に関して、移動率90%を得るまでの時間はType 1-1では長時間(16時間)かかったのに対し、Type 1-2およびType 1-3は(いずれも循環速度10 ml/min程度の場合)35分程度であった。膜への目詰まりはType 1-2は著しく、Type 1-3は逆洗操作により解消することが可能となった。一方Type 2-1およびType 2-2(いずれも循環速度10 ml/minの場合)では移動率90%を得るまでの時間は100分前後であり、膜への細胞の目詰まりに問題があった。Type 2-2の循環速度150 ml/minの場合17分、Type 2-3の循環速度150および600 ml/minの場合は11分および3分と短時間でほぼ均一化し、培養槽Aおよび培養槽Bが同一環境になり、しかも膜への細胞の目詰まりが生じないことが明

表3. Type 1およびType 2の混合培養解析装置の性能評価

条件	移動率 90% を 得るまでの時間	移動速度定数 K (min^{-1})	細胞の目詰まり
Type 1-1 濃度差を駆動力とした拡散のみ 膜面積: 17.3 cm^2	16 h	1.22×10^{-3}	測定せず
Type 1-2 循環速度 8.3 ml/min 膜面積: 17.3 cm^2	36 min	3.21×10^{-2}	+++
Type 1-3 循環速度 10 ml/min 膜面積: 63.6 cm^2	34 min	3.35×10^{-2}	+*
Type 2-1 循環速度 10 ml/min モジュール長: 40 cm, 膜面積: 582 cm^2	88 min	1.31×10^{-2}	++
Type 2-2 循環速度 10 ml/min 循環速度 150 ml/min モジュール長: 40 cm, 膜面積: 582 cm^2	100 min 17 min	1.15×10^{-2} 6.76×10^{-2}	+ -
Type 2-3 循環速度 150 ml/min 循環速度 600 ml/min モジュール長: 18 cm, 膜面積: 764 cm^2	11 min 3 min	1.08×10^{-1} 3.71×10^{-1}	- -

移動率 90% を得るまで時間および移動速度定数の測定はグルコース溶液を, 細胞の目詰まりの測定は細胞懸濁液を用いて行った.
-, 目詰まりなし; +, 目詰まりあり; ++, 目詰まり多い; +++, 目詰まり顕著.
* 逆洗操作 (6 分間循環後 24 秒間) により細胞の目詰まりを解消.

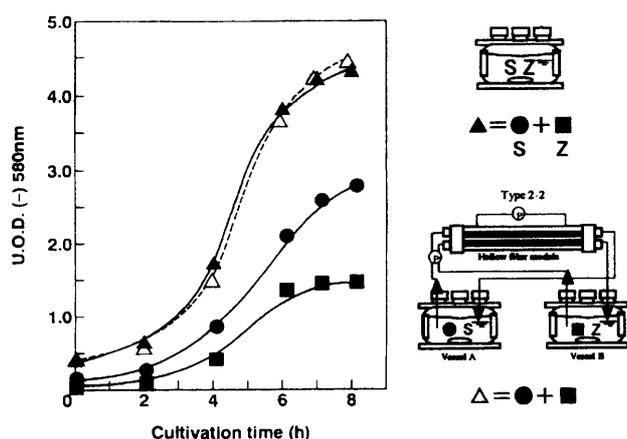


図20. 嫌気条件における酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) と細菌 (*Zymomonas mobilis*) の混合培養とその解析. 嫌気条件, N_2 ガス (50 ml/min).

らかとなった.

以上の結果により, 混合培養解析装置として, メンブランフィルター型よりもホローファイバー型の方が性能評価ですぐれていることが明らかとなり, 特にホローファイバー型の Type 2-2 および Type 2-3 は実用性の高い混合培養解析装置としての可能性が明らかとなった.

4.2. 開発した混合培養解析装置の利用 開発したホローファイバー型混合培養解析装置 (Type 2-2) を用いて, *Saccharomyces cerevisiae* (S) および *Zymomonas mobilis*

表4. 単独および混合培養用培地

Components	g/l
Glucose	30
KH_2PO_4	8
Yeast extract	8
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2

pH 6.2

(Z) の混合培養における, 両菌株それぞれの増殖経過とコントロールの両菌株を合わせた増殖経過を図 20 に示した. なお, 使用した培地組成は表 4 に示した. いずれの培養も嫌気条件 (N_2 ガスを 0.3 vvm) で行い, 培養液の循環速度はいずれも 100 ml/min とした. 1つの培養装置に両菌株を同時に接種したコントロールでは, 両菌株を合わせた増殖 (UOD) 経過 (\blacktriangle) しか得られなかった. しかしながら, Type 2-2 の培養装置では, それぞれの菌株が同一環境に保たれた別々の培養槽に存在しているため, それぞれの培養槽の増殖 (UOD) を測定することで, 各菌株の増殖経過を別々に, リアルタイムで迅速かつ定量的に把握することができた. なお, 両菌株の UOD の値を足して得られた増殖経過 (\triangle) は, コント

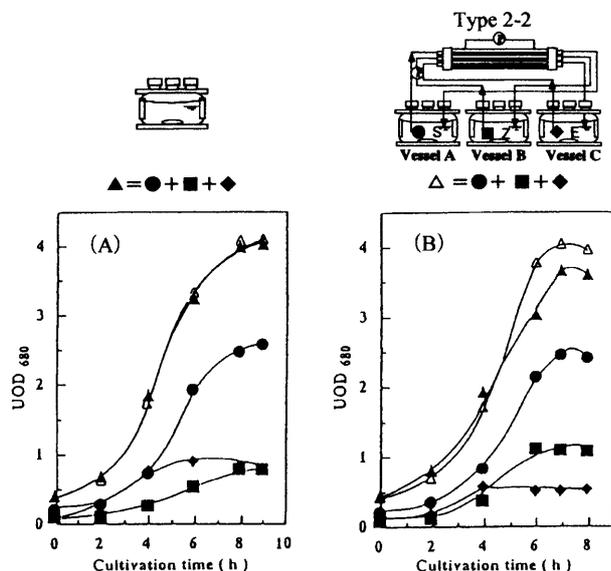


図 21. 好気条件 (A) および嫌気条件 (B) における酵母 (*S. cerevisiae*) と細菌 (*Z. mobilis* および *E. coli*) の混合培養とその解析. 好気条件, 空気 (50 ml/min); 嫌気条件, N_2 ガス (50 ml/min).

ロールでの増殖経過とほぼ一致しており, このことから Type 2-2 では 2 菌株の混合培養系が再現されていることが明らかとなった. また, このように得られた結果から, 培養期間を通してホローファイバー内に細胞の“目詰まり”が認められなかった. ちなみに, 培養 8 時間目の細胞濃度の比率は (S) : (Z) = 2.8 : 1.5 であった.

次に 3 菌株からなる混合培養系の解析を, 図 21 に示す 3 つの培養槽を連結した, 3 菌株用混合培養解析装置を作成した. 用いた菌株は *S. cerevisiae* (S), *Z. mobilis* (Z) と *Escherichia coli* (E) の 3 種類を用いた. なお, 好気条件 (空気を 0.3 vvm) と嫌気条件 (N_2 ガスを 0.3 vvm) の異なる 2 つの通気条件下で混合培養を行い, 培養液の循環速度はいずれも 100 ml/min とした. それぞれの条件下での個々の菌株の挙動について, 検討した結果を図 22 の (A), (B) に示した. これらの図より, 3 菌株用混合培養解析装置における 3 菌株それぞれの増殖経過を得ることができ, しかもそれらの増殖経過を足した増殖経過 (Δ) は, 好気条件および嫌気条件いずれもコントロールで 3 菌株同時に培養した場合の増殖経過 (\blacktriangle) と一致することが明らかとなった. このことは, ホローファイバー 3 束を組み入れたホローファイバーモジュールを用いた 3 菌株用混合培養解析装置が 3 菌株からなる混合培養の解析に有効であることが示された. ちなみに, 好気条件における培養 9 時間目の細胞濃度比率は (S) : (Z) : (E) = 2.5 : 0.8 : 0.8 に対して, 嫌気条件では (S) : (Z) : (E) = 2.4 : 1.1 : 0.5 であった.

以上の結果のように, 本研究で開発したホローファイ

バー型混合培養解析装置は, これまで不可能であった 2 菌株, 3 菌株あるいはそれより多数の菌株の混合培養系において, それぞれの菌株の増殖経過を別々にリアルタイムで迅速で正確に得ることを可能にした. また, ここには示さなかったが, 代謝に関しても混合培養系での種々の情報を得ることも可能であった. その結果, 微生物の複合系の混合培養法のみが有する独特の解決すべき課題 (先に述べたイ) ~ ハ)) を解決するための方法の 1 つとして, 本混合培養解析装置を用いることの有効性が明らかとなった.

なお, 谷口らは本研究で開発した 2 菌株用混合培養解析装置を活用して, *Pichia stipitis* と *S. cerevisiae* の混合培養によるグルコースとキシロースの混合基質から効率的にエタノールを生産することに成功している³⁰⁾.

おわりに

20 世紀の中頃から後半にかけて, あれほど繁栄を誇った微生物関連産業のいきおいは, 今どこに行ってしまったのか, 21 世紀の微生物関連産業の新たな発展を目指すためにどのようにしたらよいか. それらの問いに対して, 微生物関連産業の根底を支えているパスツールやコッホらが確立してきた「純粋培養法に基づく培養微生物学」の限界によるのではないかと, という立場から新たな視点を求めて多くの研究者がその方向を探っているのが現状であろう. あるシンポジウムの会場で, 「あなたにとって発酵微生物の研究者はどのように見えますか」という筆者の問いに, ある高名な土壌微生物の研究者は「パスツールを始め発酵微生物の研究者は非常にせっかちな研究者の集団に見えます. パスツールらが微生物の純粋培養法を確立してから約 100 年経ちましたが, その間に発見され培養された微生物の数は, 自然界に存在する全微生物のたかだか 1% にもすぎないのですよ. せっかちにならず, 自然界をもっとしっかり見つめてはいかがですか」という, 私たち発酵微生物の研究者にとって大変貴重で意味深いお答えをいただいた. 筆者は長い年月, 微生物細胞の培養工学の研究に携わってきた. その間, 培養装置は微生物細胞の家であり, いかにもすみ易い家をつくるかという思いを巡らせ研究を重ね, やっと最近になってその家が少し見えてきたなと思っていた. しかしながら, 未知の微生物細胞がまだ自然界に 99% 以上もいるとなれば, これからも途方もない多くの家をつくり続けなければならないことに愕然とし, と同時に, 思いを新たに微生物の家に関する次の設計計画を考え始めているところである.

表 1 に示しました 8 つの研究はじめ他の多くの研究は, 東京

教育大学農学部培養工学研究室および筑波大学大学院生命環境科学研究科の細胞培養工学(現細胞機能開発工学)研究室にかかわる多くの優れた学生や研究室のスタッフ、オボンナ・ジェームス先生(現ナイジェリア、アボニ大学教授)、青柳秀紀助教授、さらに多くの企業の方々と共同で行った研究であり、それらの成果であります。この間、絶えずご指導ご薫陶をいただいた恩師 上田清基先生に御礼申し上げます。また、筆者の研究に対し、これまで絶えずあたたかい目で支えて下さいました合葉修一先生、高橋穰二先生、山中啓先生、中村以正先生、片岡廣先生および三澤正愛先生に深謝申し上げます。

なお、本研究の一部は、21世紀COE「複合生物系応答機構の解析と農学的高度利用」プロジェクトからサポートを受けましたので、ここに厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Kluyver, A. J. and Perquin, L. H. C.: *Biochem. Z.*, **266**, 68–81 (1933).
- 2) 鹽田日出夫, 坂口謹一郎: 農化, **23**, 426–429 (1949).
- 3) Paladino, S.: *Rend Ist Sub. Sanita*, **17**, English Ed., 145–148 (1954).
- 4) Chain, E. B., Paladino, S., Callow, D. S., Ugarini, F., and Van Der Sluis, J.: *Bull. World Hlth. Org.*, **6**, 73 (1952).
- 5) Beege, G. D. and Liebmann, A. J.: *Ind. Eng. Chem.*, **36**, 882–890 (1944).
- 6) Kato, I. and Tanaka, H.: *J. Ferment. Bioeng.*, **85**, 392–397 (1998).
- 7) 田中秀夫, 小川洋子: 特願141796 (2001).
- 8) Ogbonna, J. C., Yada, H., and Tanaka, H.: *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 259–264 (1995).
- 9) Ogbonna, J. C., Yada, H., and Tanaka, H.: *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 369–376 (1995).
- 10) Ogbonna, J. C., Yada, H., Masui, H., and Tanaka, H.: *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, 61–67 (1996).
- 11) Tanaka, H., Nakanishi, M., Ogbonna, J. C., Ashihara, Y., and Yajima, M.: *Biotech. Tech.*, **7**, 189–192 (1993).
- 12) Ogbonna, J. C., Liu, Y.-C., Liu, Y.-K., and Tanaka, H.: *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 437–442 (1994).
- 13) Ogbonna, J. C., Mashima, H., and Tanaka, H.: *Biores. Technol.*, **76**, 1–8 (2001).
- 14) Tanaka, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1203–1218 (1981).
- 15) Hixson, A. W. and Crowell, J. H.: *Ind. Eng. Chem.*, **23**, 923–931 (1931).
- 16) 田中秀夫, 上田清基: 醸酵工学, **54**, 143–150 (1975).
- 17) Tanaka, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 425–442 (1982).
- 18) Tanaka, H., Nishijima, F., Sawa, M., and Iwamoto, T.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 2359–2370 (1983).
- 19) 森本梯次郎: *Bioindustry*, **3**, 155–160 (1986).
- 20) Fujita, Y. and Tabata, M.: *VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*, p. 2, Minesota (1986), および私信.
- 21) Hiruta, O., Yamamura, K., Takebe, H., Futamura, T., Iinuma, K., and Tanaka, H.: *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 79–86 (1997).
- 22) Sutherland, I. W. and Ellwood, D. C.: *Soc. Gen. Microbiol. Symp.*, **29**, 107–150 (1979).
- 23) Wang, D. I. C. and Fewkes, R. C. J.: *Dev. Ind. Micro.*, **18**, 39–57 (1977).
- 24) 倉津正文, 西見晴行, 三島 守, 鴨田武征: 住友重機技報, **35**, No. 104 (1987).
- 25) 田中秀夫: 最近の化学工学, **54**, 62–81, 化学工業社 (2002).
- 26) Takebe, H., Tanaka, N., Hiruta, O., Satoh, A., Kataoka, H., and Tanaka, H.: *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 93–99 (1994).
- 27) Kataoka, H., Sato, S., Mukataka, S., Namiki, A., Yoshimura, K., and Takahashi, J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 663–667 (1986).
- 28) Tanaka, H., Ebata, T., Kuwahara, I., Matsuo, M., and Ogbonna, J. C.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **80**, 51–64 (1999).
- 29) 田中秀夫, 青柳重郎: 特許第3490517号 (2003).
- 30) Taniguchi, M., Itaya, T., Tohma, T., and Fujii, M.: *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 59–64 (1997).