

〔醸酵工学 第61巻 第3号 117-128. 1983〕

工業規模装置によるタバコ植物細胞の連続培養

畦地 昭二*・橋本 壽夫・湯山 二男・永塚 敏
中静 素子・西山 告・村田 章

日本専売公社小田原製塩試験場

Continuous cultivation of tobacco plant cells in an industrial scale plant. SHONI AZECHI,* TOSHIO HASHIMOTO, TSUGIO YUYAMA, SATOSHI NAGATSUKA, MOTOKO NAKASHIZUKA, TSUGURU NISHIYAMA, and AKIRA MURATA (Odawara Salt Experiment Station, The Japan Tobacco and Salt Public Corporation, 4-13-20 Sakawa, Odawara, Kanagawa 256, Japan; *Central Research Institute, The Japan Tobacco and Salt Public Corporation, 6-2 Umegaoka, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 227, Japan) *Hakkokogaku* 61: 117-128. 1983.

To develop the technique of industrial biomass production of tobacco cells by continuous cultivation, many experiments were carried out in 200 l and 2,000 l fermentors, using the strain of *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2. In this study, the cultivation conditions indicated by the above experimental results were applied to a 20 kl fermentor and the validity of the conditions for stabilizing the continuous culture for a long time was confirmed.

The residual sugar content in the culture would be an index of the state in the continuous culture. It was important to maintain this value at over 5 g/l by controlling the aeration, agitation and dilution rates. An increase of the medium concentration was required for improving the productivity. The maximum value obtained was 5.82 g/l⁻¹·day⁻¹, when the sugar content in the fresh medium was 37 g/l.

Morphological change of cell aggregates with time in the unstable state ceased in the stable state and characteristic values became almost constant throughout the run.

タバコ植物細胞を天候や土壌の条件に影響されることがなく大量に生産して、たばこ原料とする研究が進められた。その一環として、昭和50年3月完成したテストプラントによる、タバコ植物細胞 *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2 株の連続培養結果を報告する。

同株の他の面での有用性、回分培養特性および特にたばこ素材としての品質向上を指向した培養法等については別の報告がある^{1,2)} ので参照されたい。

テストプラントは、連続培養の可能性を示唆した加藤らの小型槽による短期間の試験結果³⁾ を参考として、日本専売公社小田原製塩試験場にて昭和48年設計に着手、同49年度末完成した。公称 20 kl 培養槽 3 基を中心に、20 l, 200 l, 2,000 l 種培養槽各 1 基、20 kl 槽への培地連続滅菌設備、培養液の連続排出その他一連の設備をそなえている。昭和50年度中に回分培養、およ

び 1 日に 1 回培養液量の 1/2~1/3 を排出（採取）して直ちに同量の新鮮培地を補給し、増殖倍率 2~1.5 倍の回分培養を連日くり返すことに相当する半連続培養試験を終え、^{4,5)} 年度後半には予備試験設備として種培養槽にも培地連続滅菌設備を付設して連続培養試験を実施した。

連続培養試験でのトラブル 当初、200 l および 2,000 l 槽で先行した連続培養試験では、次の諸点の解決が課題となった。

(1) 連続滅菌設備で培地成分の一部がスケールとして析出したことに起因して、多くの場合 3 週間程度で増殖がほとんど停止した現象。(2) 前記(1)と明確な区別はできないが、回分培養に用いる従来からの培地組成が必ずしも連続培養には適合しないためとみなされる増殖の不調、すなわち増殖速度が低位である現象。(3) 通気・かくはん、希釈率の不適合に起因した細胞集塊

* 現在、日本専売公社中央研究所

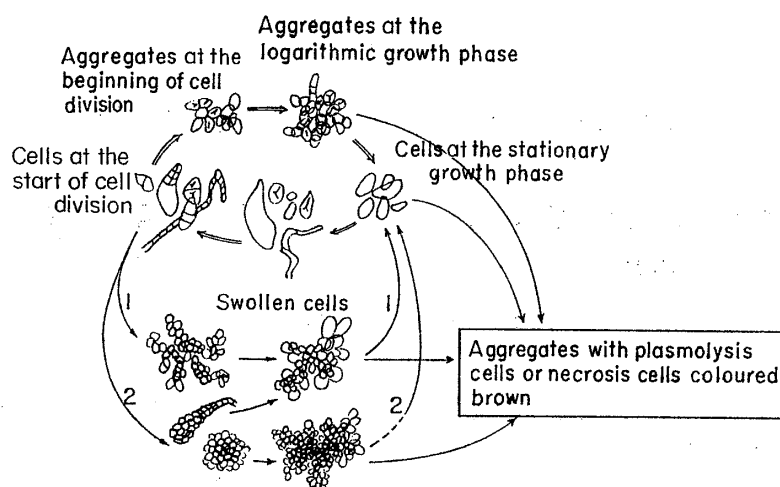


Fig. 1. Model diagram of morphological change of cells in a continuous culture.

Double arrow Morphological change in the cell cycle on batch culture or continuous culture under the proper conditions.

1-1 Course of morphological change on continuous culture under the more excessive aeration and agitation conditions. (Aggregates became various shapes like sponge.)

2-2 Course of morphological change on continuous culture under excessive aeration, agitation and dilution rate conditions. (Aggregates became large and tight clumps with small cells.)

の大型化とち密化，および褐色化など，壊死・破碎を伴う連続培養の不安定現象。

初期には，上記が複合した不安定性のため，3～4週間以上の連続培養は不可能であった。

トラブル対策 前記の問題点(1)と(2)については，連続滅菌器でのスケール析出防止のため，培地中のリン成分を分離滅菌する手法を開発し，⁶⁾ それと併せて培地中の糖と窒素成分以外を増量した⁷⁾ 結果，増殖の停止あるいはそれに近い増殖阻害現象，を解決することができた。しかし，問題点(3)の不安定現象はなお解決できなかった。⁸⁾ 希釈率を検討した結果⁹⁾ から，適正值は比較的低い領域に存在するとの示唆を得たが，それだけでは安定化に対してまだ十分ではなかった。

細胞観察からの見解¹⁰⁾ そこで，不安定状態が発生するときの細胞の状態を観察して，状態変化の過程と操作～環境条件との関係を把握することを意図した。

回分培養では，植えつきから植えつきまでの間に，細胞または細胞集塊の形状は Fig. 1 の二重線矢印で示した閉サイクル的な変化をたどるが，多くの連続培養では，二重線矢印以外の形態が出現する。特に，通気・かくはん条件が過大で細胞の増殖が旺盛なときは，集塊の形態変化は Fig. 1 の1-1または2-2の経路をたどり，同時に基質濃度の著しい低下とともに細胞自らが変色・壊死して培養液は褐色化する。ついで壊死細胞

の増加に伴い基質濃度が増大するが，その増大に際して原形質分離する細胞もみうけられる一方，一部の生き残り細胞が増殖を始め，再び1-1，2-2の経路をたどる細胞が増加して基質濃度を低下させ，以後，上記の現象をくり返すところの不安定状態となる。しかし，そこで通気・かくはん条件を適当に緩和すれば基質濃度その他がほぼ定常となり不安定状態が軽減する，ことが認められた。

研究の目的 以上から，後述する 20 kl 培養槽の各実験は次の事項を目的とした。

no. 1 試験：前述の問題点(1)と(2)に対する対策の成果を実用設備で確認する。no. 2 試験：希釈率の適正值に関する上記の示唆を確かめる。それによる低い希釈率では低い生産性となるのを，培地濃度の増大で補うことを試みる。no. 3 試験¹¹⁾：希釈率とともに通気・かくはん条件の適正化をはかり，培養液の基質濃度を適当値に保持して細胞の形態変化を二重線経路に近づけることが，総括的な安定化条件であることを確かめる。生産性向上の手段として，積極的に培地濃度の増大をはかる。

試験設備および方法

培養設備 20 kl 培養槽は，内径 2.5 m，実容積約 21 m³，変速範囲 10～40 rpm，1/2 内径傾斜角 45° の広

幅型かくはん翼4枚を上下2段にそなえている。スパージャーは数 mm 径の小孔多数をリング状管の下面に開孔させ、各孔からの噴気量が均一になるようにした。

長期連続培養にそなえ、かくはん軸貫通部は特殊な除菌対策を施し、¹²⁾ 槽内に供給する空気除菌フィルターは、ポリビニル・アルコール (PVA) を基材とするフィルター2段と、放射線で穿孔したポリカーボネート膜フィルター1段の3段構成とした。

培地の連続滅菌設備として、水蒸気加熱プレート型熱交換器と、それに直列させた2重蛇管熱交換器をそなえ、120°Cで20分間滅菌し、プレート型予熱器と冷却器で培養温度まで冷却した。

培養液の排出には、槽内圧力を利用した。槽からスラリー受槽へ導いた排出口の無菌シールについては、排出管の途中に接続させた配管から槽内よりも低圧の除菌空気を常に供給し、培養液と除菌空気とを並流させ放出する方式とした。また随時配管を滅菌した。

種培養槽として、メーカー製の標準型 20 l, 200 l, 2,000 l 培養槽を設備した。このうち 200 l, 2,000 l 槽には自家製の連続給液設備を付設して、¹³⁾ 連続培養槽としても活用した。^{8,9)}

フローシート Fig. 2 は 20 kl 槽を用いた連続培養試験のフローシートである。20 kl 槽1基を連続培養槽、他の1基を滅菌培地貯槽とした。これはプラント本来の使用方法ではなく、長期試験における生産物処理の負担を軽くするため、培養液量を正規の約1/3～

1/2 量としたことによる。このため、連続滅菌設備の流量が培養液量に対して過大となったので、正規流量で滅菌した培地を貯槽にたくわえ、所要量を貯槽から培養槽に給液した。無菌を保持すべき槽は2槽、実質負担はそれ以上となったが、無菌保持に困難はなかった。

培地調製槽で、リン成分を除いた I 成分液をつくり、連続滅菌設備をとおして貯槽に給液する一方、II 成分液槽でリン成分主体の液を調製し、加熱器で滅菌したあと冷却器をとおして貯槽に給液、両液を混合したとき Table 2 の培地組成になるようにした。⁶⁾ 培地の使用に伴い随時補給した。

貯槽から培養槽への給液管に、滅菌可能なテーパー金属管面積式流量発振器と調節計とを組み合わせた流量記録調節計 FRC を取り付けた。

連続給液による増加液量を培養槽の液位調節記録計 LRC で検出して、間欠的にはば一定液量をスラリー受槽に排出した (Table 1, 排出量参照)。

20 kl 槽試験の種細胞は、20 l 槽から 2,000 l 槽に接種してほぼ100倍に増殖¹⁴⁾ させたものを用いた。

試験条件 各試験の条件を Table 1, 培地の組成を Table 2 に示す。

no. 2 と no. 3 試験では、圧力差による培養液の排出をスムーズにするため、槽の圧力を少し高めた。no. 3 試験では、後述するように細胞の状態、希釈率に応じて通気量を微調節した。

Table 2 の基本培地は、Linsmaier & Skoog の培

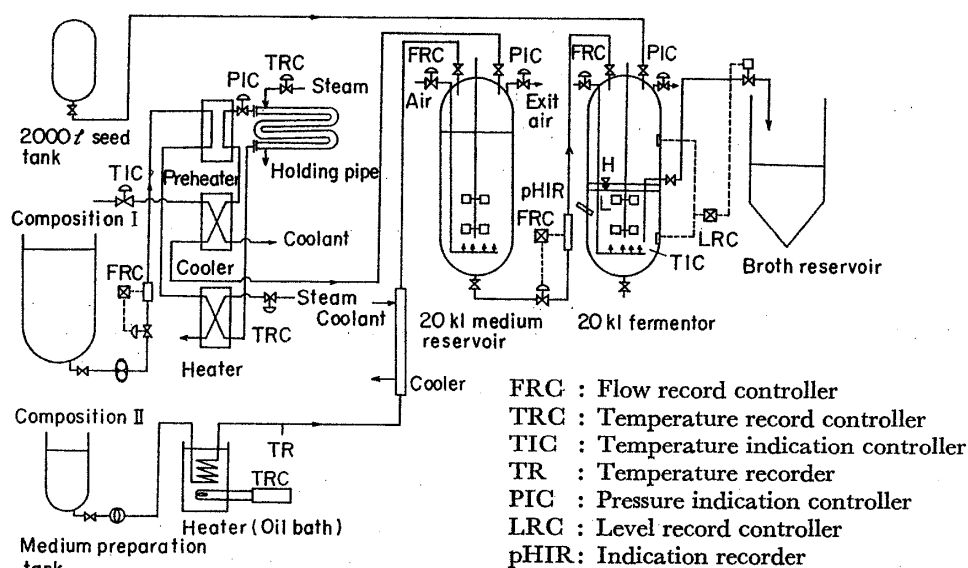


Fig. 2. Schematic flow diagram of pilot plant for continuous cultures with a 20 kl fermentor.

Table 1. Experimental conditions. (20 kl fermentor)

	Expt. no. 1	Expt. no. 2	Expt. no. 3
Working volume* (kl)	5 or 6	5.65	6.34
Temperature* (°C)	28	28	28
Pressure* (kg/cm ² G)	0.5	0.7	0.7
Aeration rate* (Nm ³ /min)	2~3	3**	3~2.23**
Agitation rate (rpm)	20	30	35~27.5
Flow rate of fresh medium* (kl/day)	1.92	1.85	1.8~2.4
Dilution rate (day ⁻¹)	0.32 or 0.38	0.33	0.28~0.38
Effluence of culture broth*	About 40 l per about 30 min. with LRC	About 50 l per about 40 min. with LRC	About 50 l per about 40~30 min. with LRC***

* Automatic control, ** Included a little air for the airseal, *** Depth change of culture broth with LRC was about 1 cm.

Table 2. Medium composition.* (mg/l)

	Components	Basal medium**	Medium used in expt. no. 1	Medium used in expt. no. 2	Medium used in expt. no. 3
Composition I ***	NH ₄ NO ₃	1485	1485 (1)	1733 (1.167)	1827 (1.23)
	KNO ₃	1710	1710 (1)	1996 (1.167)	2103 (1.23)
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	260	390 (1.5)	390 (1.5)	416 (1.6)
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	33.6 ↓	33.6 ↓	35.7 ↓
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10.6	15.9	15.9	17.0
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.039	0.039	0.04
	Na ₂ -EDTA	37.3	56.1	56.1	59.7
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	41.7	41.7	44.5
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	220	330	330	352
	Vitamin B ₁	0.4	0.6	0.6	0.64
	2,4-D	0.2	0.3	0.3	0.32
	Sucrose	30000	30000 (1)	35000 (1.167)	37000 (1.23)
Composition II ***	KH ₂ PO ₄	600	900 (1.5)	900 (1.5)	960 (1.6)
	H ₃ BO ₃	6.2	9.3 ↓	9.3 ↓	9.9 ↓
	KI	0.83	1.245	1.245	1.33
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.375	0.375	0.4
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.0375	0.0375	0.04
Ratio			1.5/1=1.5	1.5/1.167=1.285	1.6/1.23=1.3

* Concentration of each component in the medium reservoir.

** Linsmaier & Skoog's medium was changed for this composition. Main elements, such as nitrogen and phosphorus, were changed to 0.9 and 3.5 times the concentrations, respectively.

*** Each composition was sterilized separately with each continuous sterilizer to prevent scale from being deposited on the heating surface.

() = concn. of used medium / concn. of basal medium = concn. ratio

地¹⁵⁾ に対し、窒素成分を0.9倍に減じ、リン成分を3.5倍に増量、その他も若干修正した培地である。¹⁶⁾ 前記の、トラブル対策で述べたように、200 l, 2,000 l 槽による試験結果から、糖と窒素成分以外を増量した方が

よいと判断されたので、^{8,9)} no. 1 試験の培地は基本培地の糖と窒素成分量を基準としてその他を表の(濃度比率)値で増量した。また生産速度を向上するため、no. 2 試験以後は、スクロースと窒素成分の濃度とと

もに他の成分の濃度を表の(濃度比率)で増大した。各培地の pH は 6.3~6.1 とした。

測定項目 以下に示す項目その他を測定または観察した。

1) 比増殖速度 $\mu(\text{day}^{-1})$ は(1)式, 希釈率 $D(\text{day}^{-1})$ は(2)式で求めた。

$$\mu = \ln(X/X_i)/t + F/V \quad (1)$$

$$D = F/V \quad (2)$$

X は細胞乾物重量濃度 (g/l), X_i は測定区間のはじめすなわち時間 $t=0$ における X 値, F は連続的に供給する培地の流量を (kl/day) で表した給液量, V は培養液量 (kl), t は X_i を測定してから X を測定するまでの経過時間 (day) である。ただし, no. 1 試験では上記の給液量を F とし, no. 2 試験以後は培養槽からの排出液量を F として D を求めた。なお, (1)式による μ は, $t=0$ から $t=t$ までの測定区間の間は, その系の μ は変わらないと仮定した値を表す。

2) 細胞湿物重量濃度 X_f は, 既知容量の培養液試料を 200 メッシュ程度のろ布で吸引ろ過した細胞重量濃度 (g/l), 細胞乾物重量濃度 X は, X_f を測定した細胞試料を 4 時間以上 80°C で通風乾燥してほぼ恒量とした値, 重量比 X_f/X は上記の比である。

3) 生産速度 DX は, (2)式の D と X の積であり, 単位培養液量, 単位時間当たりの細胞生産量 ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) を, 測定区間(本試験では 1 日)ごとに求めた値。

4) 培養ろ液の糖濃度 S は, スクロース基準によるフェノール硫酸法¹⁷⁾による値 (g/l), 同じくリン酸イオン濃度 PO_4^{3-} は, 吸光光度計¹⁸⁾による値 (mg/l) である。

5) 細胞収率 y, y' , 糖消費率 S_c の計算式は別報¹⁹⁾に示した。ただし, それぞれは次の意味をもつ。収率記号に y を用いたのは回分培養の $Y_{x/s}$ と区別するためである。

収率 y : 連続培養で消費された糖量に対する細胞収穫量(乾物重量)の割合を, 測定区間ごとに求めた値。

実用収率 y' : 連続培養に投入した糖量に対する上記細胞収穫量の割合を, 同上区間ごとに求めた値。 $y' = yS_c$, であり経済性の指標となる。

糖消費率 S_c : 連続培養に投入した糖のうち消費された糖量の割合を, 測定区間ごとに求めた値。

6) 培養液の pH と細胞液(しぼり液)の pH を測定した。

7) 発熱量 Q は, 培養槽の温度調節機構を利用して, 熱精算方式で求めた。ジャケット冷却水, 排気管から

の空気と水蒸気の持ち出し熱量, かくはん機軸動力, 空気, スチーム・シール部からの入熱量, を測定または推定し, それらの代数和を細胞乾物重量で除して Q ($\text{cal} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) とした。槽の保温壁をとる熱量, 培地・培養液による入・出熱量は無視した。

8) 細胞を観察した。形態を分類記録し, 変化の過程を考察して操作の指針とした。¹⁰⁾

試験期間 200 l および 2,000 l 槽で連続培養試験を先行し, 20 kl 槽でそれらの成果を確認した。

no. 1 試験 昭和51年 8月24日~9月24日

no. 2 試験 昭和52年 2月5日~3月25日

no. 3 試験 昭和52年 8月24日~11月1日

実施の経緯については, 試験結果の項で説明する。

試験結果

1) no. 1 試験

概要 初期の頃, 3週間程度で増殖がほとんど停止した理由は, 連続滅菌器でのスケール析出に起因することが突きとめられた時点で no. 1 試験を実施した。スケール成分はおもに $(\text{CaMg})_3(\text{PO}_4)_2$ であった。⁹⁾ 対策として, リン成分を分離滅菌し, Table 2 のように糖と窒素成分以外を増量した結果, こうした阻害については克服し得たことを示す Fig. 3 の結果が得られた。

試験経過 最初, 2,000 l 培養槽から 1.4 kl の培養液を接種して 5 kl で回分培養したあと連続培養を開始した。給液量 F を 1.92 kl/day, 希釈率 D は 0.38 day^{-1} とした。細胞濃度 X が次第に減少したので, 通気量を 2 から $3 \text{ Nm}^3/\text{min}$ に増加し, 給液量は一定のまま, 連続培養の 6 日目から培養液量を 6 kl に増加して希釈率を 0.32 day^{-1} に下げた結果, X は増大した。だが, 細胞集塊の大型化・ち密化がすすみ, X_f/X が急速に低下して不安定状態の前兆となった。

そこで, 8 日目から通気量を減らし $2.5 \text{ Nm}^3/\text{min}$ としたがなお細胞の集塊化はすすみ, 試験中期にはザラザラした大粒となり, 壊死した細胞と破砕片が増加して培養液は次第に茶褐色になり, 培養ろ液の糖濃度 S は $2 \sim 3 \text{ g/l}$ に減少, 培養液 pH > 細胞液 pH, となつて不安定状態が一層すすんだ。そのときの生産速度 DX は, 実用生産を考慮した当面の目標値 $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ には達しない $4.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ にとどまったので, 19 日以降, 試みとして再び培養液量を 5 kl に減らし, D を最初の 0.38 day^{-1} にもどした。

その結果, 以後終了までの 9 日間, 系の比増殖速度 μ

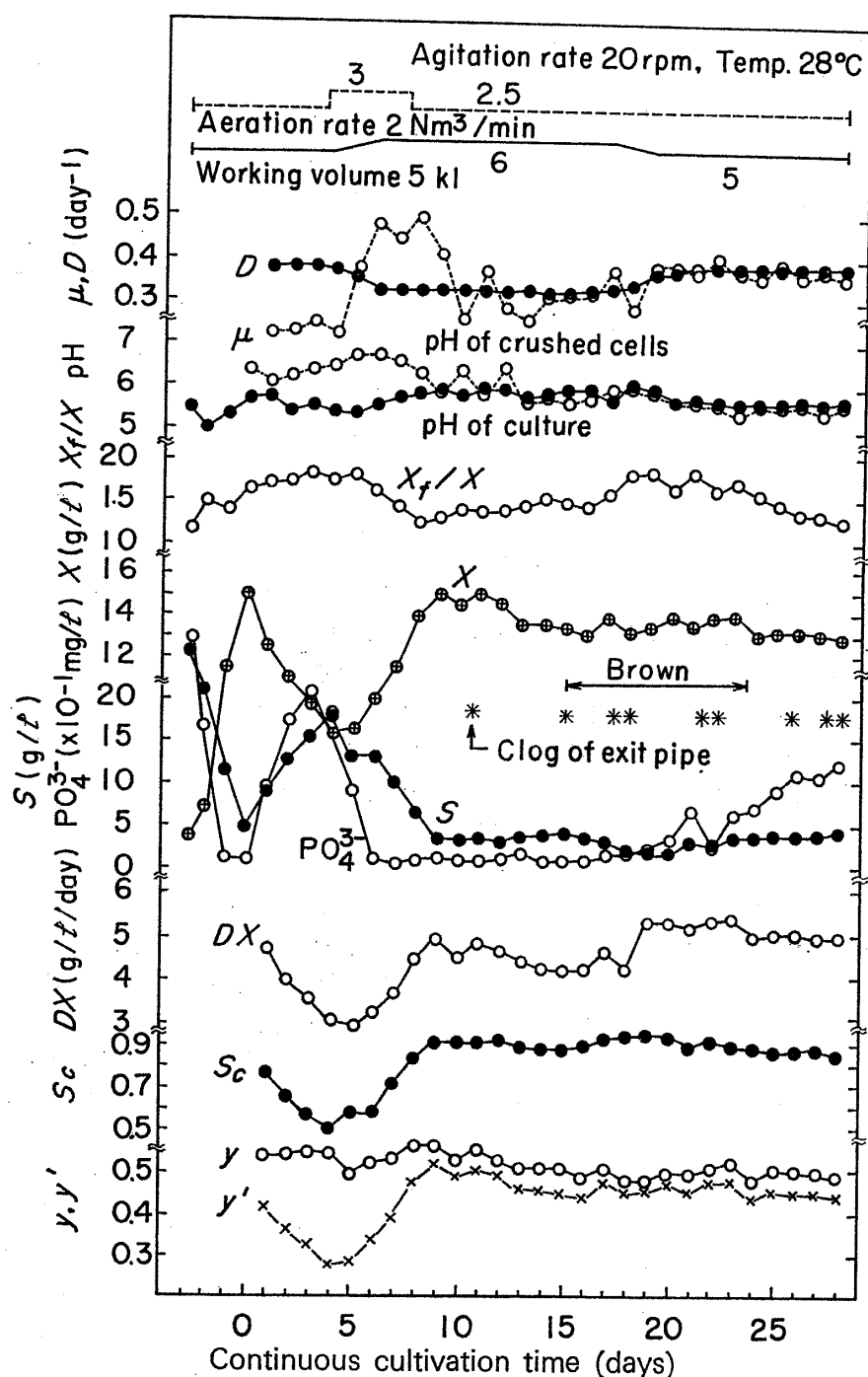


Fig. 3. Time course of continuous culture in experiment no. 1.

Refer to Tables 1 and 2 for the experimental conditions and Table 5 for the symbols. The values of D , μ and DX were calculated from the flow rate of fresh medium. Culture broth was normally yellowish grey, but it turned brown in the unstable state because of cell aggregation, necrosis of a part of the aggregated cells and broken cells. The exit pipe was clogged with large and compact cell aggregations at the symbol*. The true value of DX was estimated to be below 5 g·l⁻¹·day⁻¹ (Table 3).

は D の増加にほぼ伴った形となり、 DX は $5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ 程度になった。 S はほぼ 4 g/l まで回復し、細胞の状態にも変化がみられ破砕片が減少して培養液は正常色に近くなったが、細胞集塊のち密化とともに X_f/X が減少しはじめ再び不安定状態が進行した。このあとも試験を継続していたならば、細胞集塊の褐色化・壊死・破砕を周期的にくり返していたとみなされる。

結果および考察 希釈率を増大した19日目以後の成績値を Table 3 に示した。

一時は培養液が褐色化する不安定状態となり、細胞の形態的变化にはほぼ伴って諸特性値も変化した。回復可能な範囲を逸脱しない培養状態を維持することができた。この結果は、既述した増殖の停止またはそれに近い現象は克服し得たことを示すと同時に、与えた希釈率 $0.32\sim 0.38\text{ day}^{-1}$ の範囲内に、上記の変化を消失させる適当な希釈率があることをも予想させた。

しかし、その条件下では生産速度 DX は、19日目以後の値をかなり下回することは明らかであり、なお、 DX を求めた D は給液量による値であるため、培養中の水分蒸発量を考慮すると（槽への給気と排気の湿度差から、蒸発量は給液された量の数%に及ぶと推定された）、実質の生産速度 DX はさらに小さい値にとどまる見込みとなった。したがって、目標値 $5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ を達成するには別途の対策を必要とする一方、排出液量を正しく把握することも大切となった。

設備上、約30分に1回排出した管路（内径 17.5 mm）が、大型のち密集塊で詰まり勝ちであった。こうした操作上の障害を排除するためにも、細胞の状態すなわち連続培養の安定化が急務となった。

2) no. 2 試験

概要 no. 1 試験以後の数次の 200 l, 2,000 l 槽試験により、著しく不安定になった状態を改善するには、その時点で希釈率または供給する培地の濃度を下げ、基質負荷すなわちその時点の細胞量に対する供給基質量の割合を低減するのが有効とわかり、安定化条件についての1つの知見が得られた。^{8,9)} 一方、これまでの培地では、生産速度の目標を達成できないことは明らかであった。

そこで、供給培地濃度を高くして生産性を確保すると同時に、上の知見にもとづき単位細胞量当たりの基質負荷を適当な値に維持することにより、連続培養の安定化をはかることを目的とした。

培地濃度を高めた見返りとして、希釈率を幾分小さくした。Fig. 4 のように諸特性値は周期変化した。

Table 3. Results of experiment no. 1.

Dilution rate	D	day^{-1}	0.38
Dry cell weight	X	g/l	13
Productivity	DX	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$	5
Yield	y		0.5
Practical yield	y'		0.44

Values of D and DX were approximate figures calculated from the flow rate of fresh medium. Refer to Table 5 for the other items.

培養液の褐色化は見うけられない準安定状態で終始し、生産速度は向上した。

試験経過 培地の糖と窒素成分を 1.167 倍、その他は 1.5 倍とした。糖に対する増量比率を $1.5/1.167 = 1.285$ としたのは、no. 1 試験のその値 1.5 はやや過剰ではないかとの判断による。

2,000 l 槽からの種 1.4 kl を接種して培養液 5.65 kl、かくはん速度 30 rpm、通気量 $3\text{ Nm}^3/\text{min}$ 、給液量 1.85 kl/day 、希釈率 0.33 day^{-1} で試験を開始した。終了まで条件を変えなかったため、細胞の状態と諸特性の周期変化をよく観察できた。¹⁰⁾

Fig. 3 の [A] 期間は、 X が低下し培養液の S が増大して、通常は余り多くないきわめて細長い紐状の細胞（20~40×数100ミクロン）ばかりとなり、異様な状態となった。実用収率 y' 、生産速度 DX は低い値であったが、発熱量は大きかった。しかし、10日目頃からすべての長大な紐状細胞の内部に、まず横縞状の細胞板が現れ、ついで縦方向にも分裂を重ね、期末には一塊の長径が数100ミクロンに達するあたかもいびつなとうもろこし状の集塊が増加した。

[B] 期間は、試験終了まで、集塊状の発達→個々の細胞の肥大→一部の分散→再分裂・集塊状の発達を循環的にくり返し、発達期の集塊が多い時期は X が増大して X_f/X と S が減少、肥大→分散状が多いときはその逆となった。しかし、集塊のち密化傾向はなく、むしろ肥大した細胞が破砕されたとみなされる破片が多く、 X_f/X はほぼ20~23の範囲で増減し、これと槽内圧力を高くした効果で排出管が詰まることはなかった。

破砕片は多かったが、集塊の褐色化・壊死によるものではなかったため、培養液は正常よりもややにごった灰黄色で終始した。 S は no. 1 試験よりも高い値 $4\sim 9\text{ g/l}$ の範囲で周期変化し、また常に、細胞液 pH > 培養液 pH、であった。

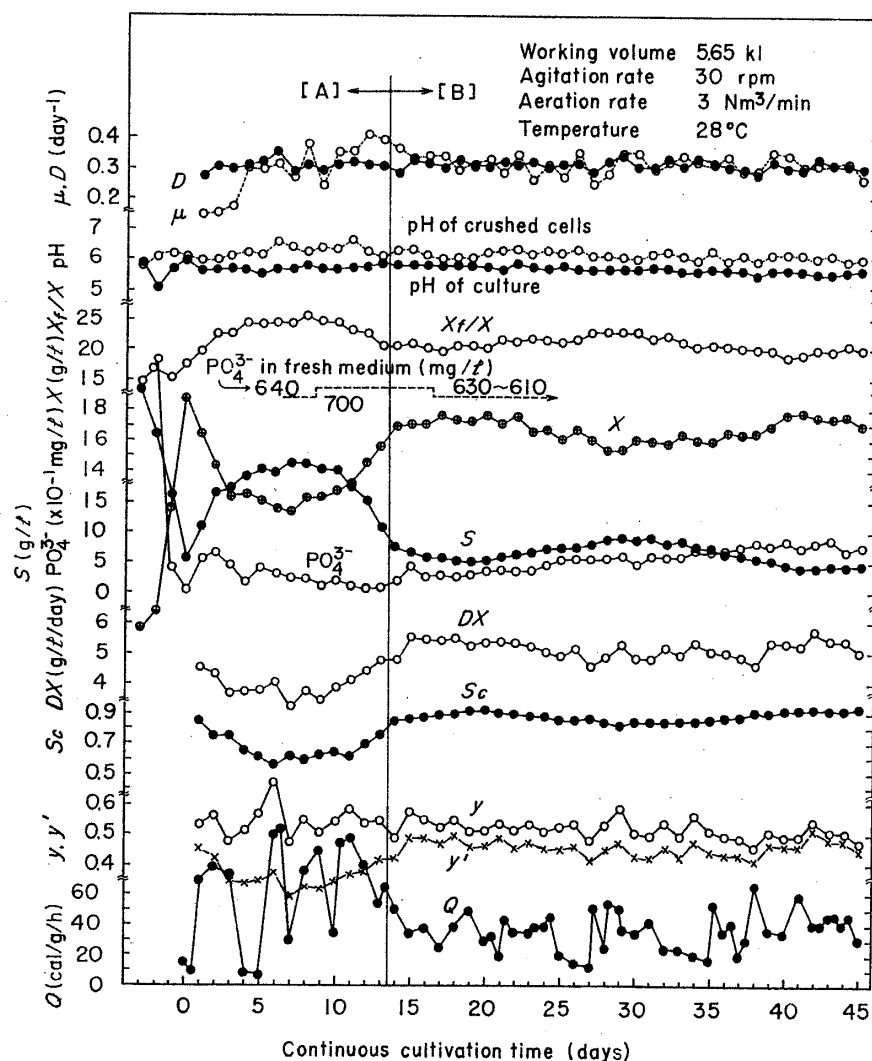


Fig. 4. Time course of continuous culture in experiment no. 2.

Refer to Tables 1 and 2 for the experimental conditions and Table 5 for the symbols. The values of D , μ and DX were calculated from the flow rate of effluent. The values of X , S and X_f/X changed periodically, but culture broth was close to the normal colour. Only cylindrical cells grew in period [A], but they changed into the normal form in period [B]. The average value of DX increased to $5.18 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ on use of high concentration medium (Table 4).

結果および考察 細胞形態の循環に伴い諸特性が周期変化した以外には、不安定要素は見うけられない準安定の状態を終始し、no. 1 試験と比較して安定化

の面での進歩がみられた。

[B] 期間の成績値を Table 4 に示した。Table 3 の値よりも D は小さいが、 DX は給液量による値と比較すると $5.46/5=1.09$ 倍に増大し、タンク計量した排出液量による実質の生産速度は、目標値以上の値である $5.18 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ となった。排出液量による値と給液量による値との差は約 5% であった。

排出液は小気泡を含み供給培地とは比重、性状が異なり、大量を計量するのは意外に難しく、ある程度の誤差は避けられないが、上記の両生産速度の差は排出液量による値で生産性を評価すべきことを示している。

初期に細長い紐状細胞ばかりが増殖したとき、培養

Table 4. Results of experiment no. 2.

Dilution rate	D	day^{-1}	0.309 (0.325)
Dry cell weight	X	g/l	16.8
Productivity	DX	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$	5.18 (5.46)
Yield	y		0.515
Practical yield	y'		0.455

Values in parentheses and others were calculated from the flow rate of fresh medium and effluent, respectively. Refer to Table 5 for the other items.

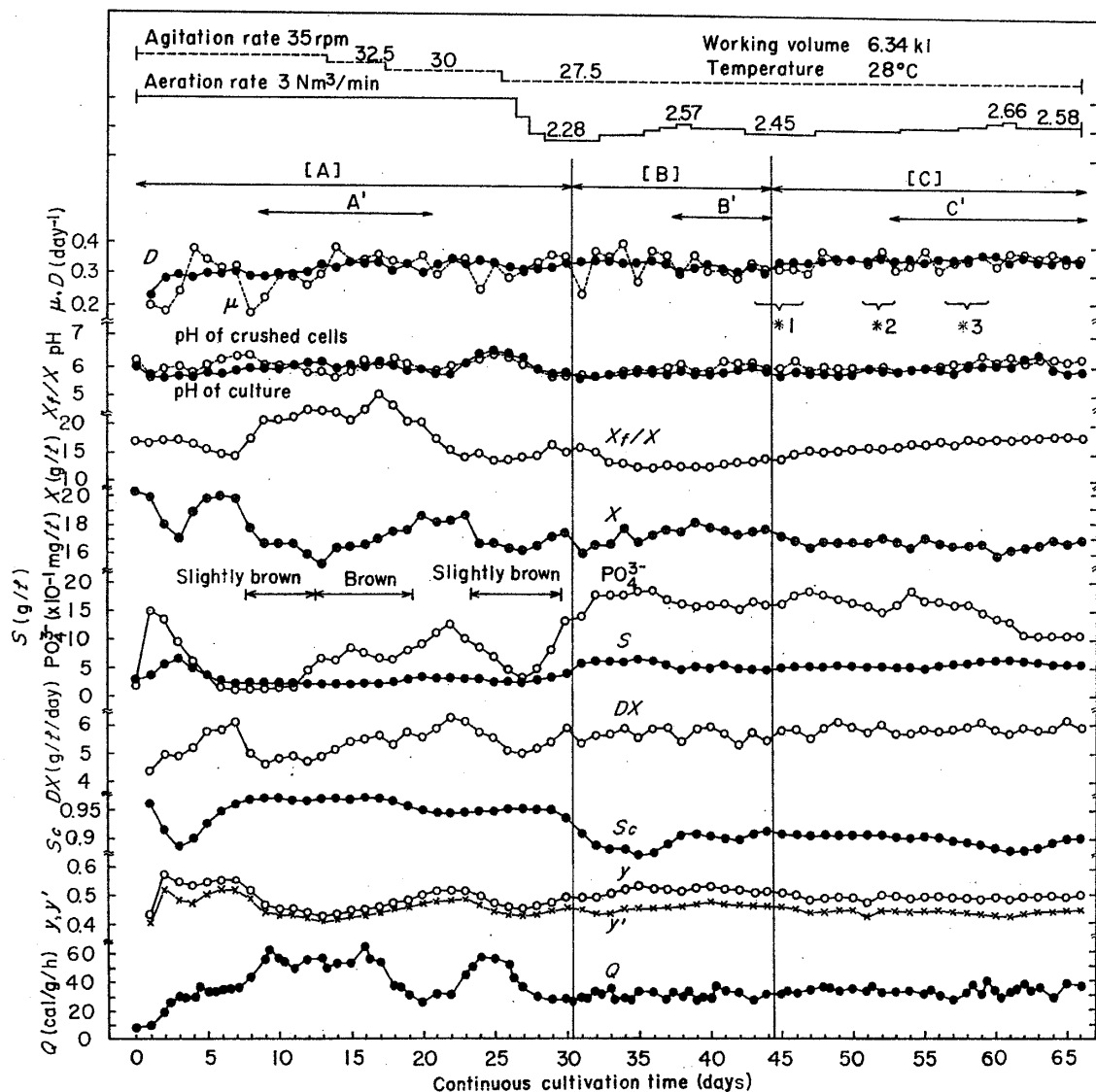


Fig. 5. Time course of continuous culture in experiment no. 3.

Experimental conditions, symbols and calculation methods of D , μ and DX were the same as in Fig. 4. Period [A] was the unstable state in which culture broth was brown. Periods [B] and [C] were the stable state which was achieved by means of adjusting the aeration rate and keeping the residual sugar content at about 5 g/l. In order to elevate the productivity DX , D was gradually increased and the average value of $DX=5.82 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ was obtained (Table 5).

ろ液のリン酸イオン濃度 PO_4^{3-} が幾分低かったので、図示のように給液の PO_4^{3-} 濃度を少し (640を 700 mg/l に) 増大した頃、紐状細胞の分裂がはじまり大型の集塊に発達した。しかしその後は、紐状細胞はほとんど現れなかった。これらの理由は不明であるが、生命体としての興味ある細胞挙動といえよう。

その一面、一定した操作条件下であったにもかかわらず、細胞の状態に周期性がみられ、ともなう S が増減したが、濃度の変化範囲は no. 1 試験の約 2~4 g/l よりも高い 4~9 g/l の範囲であり、 S の上限と下限を律する因子の存在を示唆していた。

3) no. 3 試験

概要 前回以後の 2,000 l 槽試験で、基質負荷とともに適正な通気・かくはん条件を与えることが、連続培養を安定にする決め手であることが明らかになった。⁹⁾ そこで安定化条件の総合確認とともに、前回の試験で実施した培地濃度増大による生産性向上をより一層押しすすめる、この2つを目的とした。

66日間の試験により、不適当な通気・かくはんのため不安定状態となった前半 [A] と、安定状態を実現した後半 [B], [C] とが、明瞭に対比された Fig. 5 の結果が得られた。生産速度は、培地濃度の増加に相応し

て増大した。

試験経過 Table 2 のように、培地のスクロース濃度を 37 g/l、糖に対する他成分の増量比率は no. 2 試験とほぼ同じとして、一層の生産速度向上を目標とした。試験条件は Table 1 のとおりである。2,000 l 槽から 1.4 kl の培養液を接種して 6.34 kl で回分培養したあと、給液量 1.8~2.4 kl/day、給液量でみた希釈率 D を $0.28\sim0.38\text{ day}^{-1}$ として実施した。Fig. 5 の [A] 期間は不安定期、[B] は安定化し得た期間、[C] は生産速度を上げるため希釈率を徐々に増大した期間である。

[A] 期間：no. 2 試験は培養液の糖濃度がやや高い値で推移したのを参考として、かくはん速度を増大し 35 rpm でスタートした。酸素移動容量係数 k_{La} の適当値は、2,000 l 槽の結果から初発値でほぼ 20 h^{-1} 程度と推定されていたが、20 kl 槽の液量を 6.34 kl としたときの諸条件と k_{La} との関係は未測定であったため、 k_{La} 値での条件設定はできなかった。

その結果、4日目頃から同調的な増殖とともに X が増加しはじめ、7日目頃までその状態がつづいて細胞集塊の大型化とち密化がすすみ、培養液の S は約 2 g/l に低下した。ついで、細胞集塊が変色・壊死して培養液全体が褐色となり、破砕片の増加で X_f/X が増大、従来からの不安定状態そのものとなった。

そこで図示のように、ほぼ 0.3 day^{-1} 以下であった希釈率を少しずつ増し、かくはん速度を逐次小さくしたが、 S の増加は約 3 g/l までにとどまり、褐色度は一時減少したものの、23日目頃までの盛んな増殖のあと再び中度の褐色化をくり返したので、26日目以後、通気量も低減した結果、 S は漸く 2,000 l 槽で安全濃度と認められた 5 g/l 付近に増大し、それに伴って変色現象は急速に退行した。

この間、増殖が盛んなときは、細胞液 pH > 培養液 pH となり、生産速度、収率、発熱量は図示のように変化した。褐色化したときの発熱量は正常時の値である $30\sim35\text{ cal}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ のほぼ 2 倍に近く、 PO_4^{3-} 濃度は上の諸数値とは必ずしも相関しない変化を示した。

[B] 期間：分裂中の個々の細胞が比較的大きくソフトな固まりにみえる集塊の増加とともに、細胞破砕片とち密集塊が減少して次第に細胞の状態が安定し、ほぼ、細胞液 pH > 培養液 pH となり、 S および PO_4^{3-} 濃度も一定値を示すようになった。また状態が安定しているときの指標である特に大きく肥大した単独の細胞も見うけられた。^{9,10)} その時の排出液量による D は

0.32 day^{-1} 程度で、Table 4 に示した no. 2 試験の値よりも少し大きい。

糖消費率 S_r は、 S が増大したため [A] 期よりも低下したが、実用収率 y' は余り変わらなかった。図示した通気量の変化は、 S を 5 g/l 付近に維持するために、 S のわずかな変化に応じて微調節した結果である。

[C] 期間：細胞の状態が十分に安定したので、いま一步の生産性向上を期待して希釈率を徐々に増大するかたわら、可能な希釈率の上限、すなわち安定した連続培養において比増殖速度が最も大きくなる時（以下、この状態を臨界状態と呼ぶ）の細胞の状態を観察することに期待をかけた。

通気量を調節しながら給液量をわずかずつ増加した。排出液量による期末の希釈率は $0.35\sim0.37\text{ day}^{-1}$ となり、その間 X_f/X は次第に増加したが、 X は [B] 期の約 17 g/l に対してやや低い値の 16.5 g/l 付近で一定となり、結果として生産速度は増大した。しかし、通気量の相つぐ増加にもかかわらず、 S は少し増大して実用収率 y' は低下気味となり、これ以上希釈率を増大しても生産性向上には寄与しないとみなされる、つまり、安定状態を前提とした増殖に関する 1 つの限界状態であることを示唆した。

小型の集塊とともに単独細胞も混在しているところの、回分培養終期の姿に近い全体として比較的バラバラした感じの細胞状態となり、特に最後の 1 週間は、Fig. 1 に示した二重線経路の諸形態が、常にほぼ一定割合で混在している定常状態となったので、その状態がとりもなおさず臨界状態であろうと判断した。¹⁰⁾

しかし、図の *1, *2, *3 は [C] 期の中で発泡が比較的多かった時期であり、細胞の状態が見掛け上安定していたときにも、わずかながら周期性が存在していたことを示している。

この試験は、なお継続可能であったが、先述した 2 つの目的と、臨界状態と思われる細胞の姿を観察したので、66日で一応試験を終了した。全期を通じ、排出管が詰まることはなかった。

結果および考察 Table 5 は各期間の成績値を示した。ただし、[A] 期は全期と変色が激しかった A' 期間、および A' を除いた期間に、[B] 期は全期と比較的高収率の B' 期間に、[C] 期は全期と臨界状態の C' 期間に分けて示した。

D , μ , DX はタンク計量した排出液量による値である。今回は給液量による値との開きは 2~3% 程度と測定された。 DX は C' 期が最も大きく $5.82\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$

Table 5. Results of experiment no. 3.

Period (cf. Fig. 5)			[A]			[B]		[C]	
			Total	Total-A'	A'	Total	B'	Total	C'
Days			30	18	12	14	7	22	14
pH of culture			5.95	5.92	6.00	5.82	5.86	5.92	5.97
pH of cell squeeze			6.01	6.04	5.96	5.93	6.04	6.08	6.12
Fresh cell weight	X_f	g/l	312	279	361	235	238	274	283
Dry cell weight	X	g/l	17.4	17.9	16.7	17.1	17.5	16.5	16.4
X_f/X			18.0	15.6	21.7	13.7	13.6	16.6	17.2
Flow rate of fresh medium	F	kl/day	2.00	2.00	2.01	2.11	2.05	2.27	2.29
Flow rate of effluent	F^*	kl/day	1.94	1.93	1.96	2.07	2.02	2.23	2.25
Dilution rate	D	day ⁻¹	0.306	0.304	0.309	0.327	0.318	0.352	0.355
Specific growth rate	μ	day ⁻¹	0.301	0.292	0.313	0.325	0.317	0.350	0.354
Productivity	DX	g $\cdot$ l ⁻¹ ·day ⁻¹	5.32	5.43	5.15	5.62	5.57	5.82	5.82
Sugar content in filtrate	S	g/l	2.79	3.23	2.14	5.31	4.69	5.37	5.61
Consumption ratio of sugar	S_c		0.950	0.939	0.965	0.893	0.904	0.897	0.893
Yield	y		0.483	0.502	0.453	0.511	0.515	0.489	0.489
Practical yield	y'		0.458	0.471	0.437	0.456	0.466	0.439	0.437
Heat of fermentation	Q	cal $\cdot$ g ⁻¹ ·h ⁻¹	40.5	34.5	49.7	30.2	33.3	33.5	33.2

Values of D , μ and DX were calculated from F^* .

Values of y' were the ratios of dry cell weight to sugar used in the medium. They equal yS_c .

となった。この値は no. 1 試験の1.16倍以上である。

[B] 期は収率が大き、安定期の中では S が低い B' 期の値が特に大きい。[C] 期の収率が小さいのは S が [B] 期よりも高いためとみなされるが、これを改善するため、そのとき図示の値よりも通気量を増大して S の低下をはかっていたとしても、それまでの安定状態を維持したまま目的を達し得たかどうかはわからない。

[A] 期は不安定であったため、生産速度は Fig. 5 のように大きく変動したが、平均値は他期よりも若干悪い程度である。また、 S が低く糖消費率 S_c は約 0.95 と大きかったにもかかわらず、実用収率 y' は [B] 期と比べて大差のない 0.46 程度で、特に、A' 期の y' は最も低い [C] 期と同等であり、消費された糖の一部はいたずらに解糖生成物に転化され、発熱量を増大させたと推定される。細胞破碎が激しくなったのは S がほぼ 3 g/l 以下のときであった。そのときは細胞が利用し得るスクロース、グルコース、フルクトースはほとんど存在しない多糖類ばかりの状態であったとみなされる。²⁰⁾

通気量の過大が細胞活性の増大を促し、 S を著しく低下させるために不安定状態を招く、との見解から、[B] 期以降、 S を通気量で調節して安定状態を達成し

た。これは S が安定化への直接指標であることを意味すると同時に、no. 2 試験の結果が示唆した S の上限と下限を律する因子は、間接には通気・かくはん条件であったことを示している。また、細胞群の増殖が非同調的であれば、周期性は減少ないし消失することを観察した。

使用した培地については、[C] 期末にわずかに希釈率を下げたとき、直ちに PO_4^{3-} 濃度がそれまでの約 170 mg/l から 110 mg/l 程度に低下したが、その濃度で再び平衡していることから、糖と窒素成分以外を増量した Table 2 の培地はほぼ適当であったとみなされる。

各期の通気量と希釈率の比はほぼ、[A] 1.5~1.4, [B] 1.15, [C] 1.1 vvm/ D であり、[B], [C] 期の値は上記培地における安定条件の目安を与える。

要 約

20 kl 培養槽により、タバコ植物細胞 *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2 の連続培養試験を実施した。目的は、別報の 200 l, 2,000 l 槽試験で把握した連続培養の安定化と生産性向上条件を、実用規模装置で確かめることであった。

1) 糖と窒素成分以外の割合を増加した培地を用い、培養ろ液の糖濃度 S を適当な値に保つような通気・かくはん条件と希釈率を与えたとき、細胞の状態が良好になり、安定した連続培養が可能であった。

2) 連続培養の安定を保ちながら生産速度を向上するには、培地濃度を増大する必要があった。Table 2 の糖濃度 37 g/l の培地により、Table 2 の糖濃度 30 g/l 培地の 1.11~1.16 倍以上の生産速度 $DX=5.57\sim5.82$ g $\cdot$ l $^{-1}\cdot$ day $^{-1}$ を得た。このとき、細胞濃度 $X=17.5\sim16.4$ g/l、排出流量による希釈率 $D=0.318\sim0.355$ day $^{-1}$ 、培養ろ液の糖濃度 S は約 5 g/l であった。

3) 安定した状態では、Fig. 1 に示した二重線経路(適正な条件下での経路)に属する細胞形態が、常に一定の割合で存在するようになり、諸特性値はほぼ定常化する。しかし、不十分な安定状態では、細胞濃度 X 、培養ろ液の糖濃度 S 等が周期的に増減する。

操作条件のうち、おもに通気量の過大が不安定状態の原因になり、その条件下では、細胞の旺盛な増殖と集塊の大型化・ち密化、それにつづいて変色・壊死・破砕する現象が順次くりかえし発生する。

文 献

- 1) Noguchi, M., Matsumoto, T., Hirata, Y., Yamamoto, K., Katsuyama, A., Kato, A., Azechi, S., Kato, K.: *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application* (Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M. H.), p. 85, Springer-Verlag, Heidelberg (1977).
- 2) 加藤: 醸酵工学, **60**, 105 (1982).
- 3) Kato, A., Kawazoe, S., Iijima, M., Shimizu, Y.: *J. Ferment. Technol.*, **54**, 82 (1976).
- 4) 橋本, 畦地, 湯山, 永塚, 鈴木: 日本醸酵工学会大会講演要旨集, p. 82 (1978).
- 5) 橋本ほか: 未発表
- 6) 杉田, 畦地, 山崎, 吉田, 橋本, 湯山, 永塚, 鈴木: 特許 1,054,332号.
- 7) 畦地, 永塚, 橋本, 鈴木: 特許 1,116,453号.
- 8) 畦地, 橋本, 永塚, 湯山, 西山, 村田, 中静: 専売小田原試報告, **19**, 95 (1983).
- 9) 畦地, 橋本, 永塚, 湯山, 西山, 村田, 石井, 中静: 専売小田原試報告, **19**, 105 (1983).
- 10) 畦地: 専売小田原試報告, **19**, 123 (1983).
- 11) 畦地, 橋本, 湯山, 永塚, 中静, 西山, 村田: 日本醸酵工学会大会講演要旨集, p. 83 (1978).
- 12) 畦地, 橋本, 湯山: 実用新案 1,379,123号.
- 13) 畦地, 永塚, 橋本, 湯山: 特許 981,732号.
- 14) 橋本, 西山, 湯山, 中静, 鈴木, 畦地: 日本醸酵工学会大会講演要旨集, p. 224 (1979).
- 15) Linsmaier, E. M., Skoog, F.: *Physiol. Plant.*, **18**, 100 (1965).
- 16) Kato, A., Fukasawa, A., Shimizu, Y., Soh, Y., Nagai, S.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 207 (1977).
- 17) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F.: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 18) Lowry, O. H., Lopez, J. A.: *J. Biol. Chem.*, **162**, 421 (1946).
- 19) 畦地, 橋本: 専売小田原試報告, **19**, 163 (1983).
- 20) 中静, 橋本, 畦地: 専売小田原試報告, **19**, 171 (1983).

(昭58. 1. 14受付)