

JAERI - M
88-237

セルロース廃資源糖化試験装置による研究(IV)
—培養装置の特性およびトリコデルマ菌の培養—

1988年12月

笠井 昇・玉田 正男・熊倉 稔・嘉悦 勲*

JAERI-Mレポートは、日本原子力研究所が不定期に公刊している研究報告書です。
入手の問い合わせは、日本原子力研究所技術情報部情報資料課（〒319-11茨城県那珂郡東海村）あて、お申しこしてください。なお、このほかに財団法人原子力弘済会資料センター（〒319-11茨城県那珂郡東海村日本原子力研究所内）で複写による実費頒布をおこなっております。

JAERI-M reports are issued irregularly.

Inquiries about availability of the reports should be addressed to Information Division, Department of Technical Information, Japan Atomic Energy Research Institute, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken 319-11, Japan.

© Japan Atomic Energy Research Institute, 1988

編集兼発行 日本原子力研究所
印刷 株式会社原子力資料サービス

セルロース廃資源糖化試験装置による研究 (IV)
—培養装置の特性およびトリコデルマ菌の培養—

日本原子力研究所高崎研究所開発部
笠井 昇・玉田 正男・熊倉 稔
嘉悦 勲*

(1988年11月2日受理)

本報告は、培養装置の特性およびトリコデルマ菌の培養条件について調べた結果をまとめたものである。培養装置は、セルロース廃資源の糖化醗酵への放射線利用技術の開発のテーマの基で、昭和57年3月に設置されたセルロース廃資源糖化試験装置の1つのユニットプロセスである。この装置はベンチスケールで、セルラーゼを産生するトリコデルマ菌のバッチ培養および固定化増殖菌体による連続培養でセルラーゼ酵素液を得るために使用する。本研究では、酵素液サンプリングの自動化動作、クリーンブースによる汚染粒子の除去、培養での雑菌汚染に対する対策およびトリコデルマ菌の培養における通気量と攪拌の影響などを調べた。汚染を防ぐクリーンブース内で長期間雑菌汚染されず培養液を供給し、連続培養する操作技術を確立した。また、培養槽内を雑菌汚染させず、一定時間毎に自動的に酵素液をサンプリングできることがわかった。トリコデルマ菌のバッチ培養において空気量 4 l/min 以上、攪拌翼の回転数 250 rpm で攪拌することにより高い酵素活性を持った培養液の得られることが明らかになった。

Study on Saccharification of Cellulosic Wastes
with Bench Scale Test Plant (4)
- Characteristics of the Culture Equipment
and Culture for *Trichoderma reesei* -

Noboru KASAI, Masao TAMADA, Minoru KUMAKURA
and Isao KAETSU^{*}

Department of Development
Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment
Japan Atomic Energy Research Institute
Watanuki-cho, Takasaki-shi, Gunma-ken

(Received November 2, 1988)

This report has described the characteristics of the culture equipment and the results obtained on the study of culture condition for *Trichoderma reesei* cells. The culture equipment is an unit process of the bench scale test plant for saccharification of cellulosic wastes that has been constructed in Mar. 1982, on the theme Development of radiation utilization technique for saccharification and fermentation of cellulosic wastes. This equipment is used to get cellulase enzyme solution in the batch culture of the cells producing cellulase and the continuous culture of the immobilized cells on bench scale test. In this work, the authors have investigated the automatic operation technique of enzyme solution's sampling, elimination of dust particles with clean booth, improvement for the contamination on the culture, effect of stirring speed and amount of air supply on the culture, and then have established a conventional operation technique method on the continuous culture for long times without contamination in the clean booth preventing contamination. It was found that the enzyme solution was able automatically to get the enzyme solution on every sampling

* Kinki University

time without contamination of the culture vessels. It was clarified that the enzyme solution with high enzyme activity was obtained on the batch culture of the cells under conditions of stirring speed of 250 rpm and air flow rate of 4 l/min above.

Keywords: Cellulosic Wastes, Culture, *Trichoderma reesei*, Cellulase, Continuous Culture

目 次

1. はじめに	1
2. 培養装置の概要	1
2.1 目的	1
2.2 培養手順	2
2.3 装置の構成	2
3. 装置の特性	2
3.1 自動サンプリングユニット	2
3.1.1 目的および機能	2
3.1.2 機能試験	3
3.1.3 接続時の雑菌汚染防止法	3
3.2 クリーンブースユニット	4
3.2.1 目的および機能	4
3.2.2 機能試験	4
3.3 菌体培養ユニット	5
3.3.1 目的および機能	5
3.3.2 培養試験	5
3.4 固定化増殖菌体培養ユニット	6
3.4.1 目的および機能	6
3.4.2 長期培養試験	6
4. トリコデルマ菌の培養条件	7
5. まとめ	8
参考文献	9

Contents

1. Introduction	1
2. Outline of culture equipment	1
2.1 Purpose of usage for culture equipment	1
2.2 Culture process of cells	2
2.3 Components of culture equipment	2
3. Characteristics of culture equipment	2
3.1 Automatic sampler	2
3.1.1 Purpose of usage and function for automatic sampler	2
3.1.2 Functional test of automatic sampler	3
3.1.3 Methods of contamination prevention in automatic sampler connection	3
3.2 Clean booth	4
3.2.1 Purpose of usage and function for clean booth	4
3.2.2 Functional test of clean booth	4
3.3 Equipment unit for culture of intact cells	5
3.3.1 Purpose of usage and function in equipment unit for culture of intact cells	5
3.3.2 Culture test of intact cells	5
3.4 Equipment unit for culture of immobilized growing cells	6
3.4.1 Purpose of usage and function in equipment unit for culture of immobilized growing cells	6
3.4.2 Long-term culture test with intact cells	6
4. Culture condition of <i>Trichoderma reesei</i>	7
5. Summary	8
References	9

1. はじめに

セルロース廃資源（もみガラ、バガス、廃木材など）に含まれているセルロースを酵素により効率よく加水分解（糖化）してグルコースに変換した後、醗酵させてアルコールに変える技術の開発が望まれている。酵素による糖化は酸による糖化に比べ、反応速度が比較的遅いものの常温、常圧に近い条件で反応を行うことができることや、生成物に醗酵を阻害する物質を含まないなど多くの利点がある。このため、セルロース廃資源の糖化においては、酵素による方法が検討されている。酵素による糖化では、セルロースが高分子量で水に不溶性であることやリグニンなどとの強固な結合により、セルロースへの酵素の吸着が阻害され反応性が悪いため、種々の前処理法の研究が行われている^{1)~4)}。また、酵素によるセルロース廃資源の糖化では、前処理に要するコストと酵素を生産するコストが非常に高く、全糖化コストの約80%にも達するとの報告がある⁵⁾。このため、セルロース廃資源の糖化において、低コストで有効な前処理方法と酵素生産コストの低減化は重要な研究課題である。

我々は、ベンチスケールのセルロース廃資源糖化試験装置により、セルロース廃資源の糖化醗酵への放射線利用技術の開発を行っている。本装置は、セルロース廃資源を電子線照射および粉碎により前処理した後、放射線重合を利用して得られた固定化菌体を用いて連続的にグルコースに変換する糖化試験装置であり、放射線を利用したセルロース廃資源の糖化技術を確立するために使用するものである。セルロース廃資源の前処理方法については、国内で大量に副生されるにも関わらずほとんど利用されていないもみガラについて粉碎効果^{6), 7)}、放射線照射効果⁸⁾およびアルカリ処理効果⁹⁾について検討してきた。前処理した原料は、トリコデルマ菌などの酵素産生菌の培養によって得られる酵素（セルラーゼ）を用いて糖化される。

本報告はセルラーゼ産生菌であるトリコデルマ菌（*Trichoderma reesei*）を固定化して培養を行い、増殖した菌体（固定化増殖菌体）により連続的に酵素を生産する培養装置の特性およびトリコデルマ菌の培養条件についてまとめたものである。特に構成装置の特徴、雑菌汚染の防止および装置でのトリコデルマ菌の培養における空気量と攪拌の影響について調べた結果を詳細に記述した。

2. 培養装置の概要

2.1 目 的

セルロース廃資源の酵素糖化には、セルラーゼが用いられる。この酵素は、トリコデルマ菌などの酵素産生菌を培養することにより培養液中に産生され、酵素水溶液として得られる。しかし、酵素は生産コストが高いため実用化においては安い酵素の生産、高い活性を有する酵素の生産、

1. はじめに

セルロース廃資源（もみがら、バガス、廃木材など）に含まれているセルロースを酵素により効率よく加水分解（糖化）してグルコースに変換した後、醗酵させてアルコールに変える技術の開発が望まれている。酵素による糖化は酸による糖化に比べ、反応速度が比較的遅いものの常温、常圧に近い条件で反応を行うことができることや、生成物に醗酵を阻害する物質を含まないなど多くの利点がある。このため、セルロース廃資源の糖化においては、酵素による方法が検討されている。酵素による糖化では、セルロースが高分子量で水に不溶性であることやリグニンなどとの強固な結合により、セルロースへの酵素の吸着が阻害され反応性が悪いため、種々の前処理法の研究が行われている^{1)~4)}。また、酵素によるセルロース廃資源の糖化では、前処理に要するコストと酵素を生産するコストが非常に高く、全糖化コストの約80%にも達するとの報告がある⁵⁾。このため、セルロース廃資源の糖化において、低コストで有効な前処理方法と酵素生産コストの低減化は重要な研究課題である。

我々は、ベンチスケールのセルロース廃資源糖化試験装置により、セルロース廃資源の糖化醗酵への放射線利用技術の開発を行っている。本装置は、セルロース廃資源を電子線照射および粉碎により前処理した後、放射線重合を利用して得られた固定化菌体を用いて連続的にグルコースに変換する糖化試験装置であり、放射線を利用したセルロース廃資源の糖化技術を確立するために使用するものである。セルロース廃資源の前処理方法については、国内で大量に副生されるにもかかわらずほとんど利用されていないもみがらについて粉碎効果^{6), 7)}、放射線照射効果⁸⁾およびアルカリ処理効果⁹⁾について検討してきた。前処理した原料は、トリコデルマ菌などの酵素産生菌の培養によって得られる酵素（セルラーゼ）を用いて糖化される。

本報告はセルラーゼ産生菌であるトリコデルマ菌（*Trichoderma reesei*）を固定化して培養を行い、増殖した菌体（固定化増殖菌体）により連続的に酵素を生産する培養装置の特性およびトリコデルマ菌の培養条件についてまとめたものである。特に構成装置の特徴、雑菌汚染の防止および装置でのトリコデルマ菌の培養における空気量と攪拌の影響について調べた結果を詳細に記述した。

2. 培養装置の概要

2.1 目的

セルロース廃資源の酵素糖化には、セルラーゼが用いられる。この酵素は、トリコデルマ菌などの酵素産生菌を培養することにより培養液中に産生され、酵素水溶液として得られる。しかし、酵素は生産コストが高いため実用化においては安い酵素の生産、高い活性を有する酵素の生産、

糖化反応後の酵素の回収・再利用などが重要な研究課題になっている¹⁰⁾。

本装置は固定化菌体により連続培養を行い、酵素水溶液（培養液）を長期間連続的に得るためのものである。連続培養は回分培養に比べ、1回の培養操作により長期間の培養が可能であり、培養操作の省力化、ユーティリティや人件費等の削減により、酵素生産コストの低下が考えられる。

2.2 培養手順

Fig. 1に示した培養手順により菌の培養を行った後、連続培養に切替えて連続的に酵素液を取出す。まず、120℃の蒸気により培養槽の空殺菌、培地の殺菌、エアークリーナーの殺菌、メカニカルシールの殺菌および配管等の殺菌を行う。殺菌後、培地の温度調節および通気を行った後、種菌を接種して培養を開始する。培養後、一定時間毎にサンプリングを行い、培養液中の酵素活性を調べる。酵素活性が高くなった時点で連続培養を開始する。連続培養は新培地を培養槽に供給しながら培養液を取出す方法であり、酵素水溶液が連続的に得られる。また、培養槽およびその周辺はクリーンブースに覆われ無菌的な状態になっており、長期間の培養においても培養槽内の雑菌汚染を防止できる。

2.3 装置の構成

培養装置は下記のユニットから構成されており、2号加速器棟実験室に設置されている。なお、各ユニットの配置をFig. 2に示した。

構成ユニット

- (1) 自動サンプリングユニット
- (2) クリーンブースユニット
- (3) 菌体培養ユニット
- (4) 固定化増殖菌体培養ユニット

3. 装置の特性

培養装置は2.3項で述べたように、主に4つのユニットから構成されており、それぞれ使用目的、機能が違うため各ユニット毎に特性を調べ、その結果について述べる。

3.1 自動サンプリングユニット

3.1.1 目的および機能

本ユニットは、培養槽の雑菌汚染を防ぎながら培養液を一定時間毎に、自動的にサンプリングして低温に保存するものである。略図をFig. 3に、仕様をTable 1に示した。スタートタイマ

糖化反応後の酵素の回収・再利用などが重要な研究課題になっている¹⁰⁾。

本装置は固定化菌体により連続培養を行い、酵素水溶液（培養液）を長期間連続的に得るためのものである。連続培養は回分培養に比べ、1回の培養操作により長期間の培養が可能であり、培養操作の省力化、ユーティリティや人件費等の削減により、酵素生産コストの低下が考えられる。

2.2 培養手順

Fig. 1に示した培養手順により菌の培養を行った後、連続培養に切替えて連続的に酵素液を取出す。まず、120℃の蒸気により培養槽の空殺菌、培地の殺菌、エアフィルター殺菌、メカニカルシールの殺菌および配管等の殺菌を行う。殺菌後、培地の温度調節および通気を行った後、種菌を接種して培養を開始する。培養後、一定時間毎にサンプリングを行い、培養液中の酵素活性を調べる。酵素活性が高くなった時点で連続培養を開始する。連続培養は新培地を培養槽に供給しながら培養液を取出す方法であり、酵素水溶液が連続的に得られる。また、培養槽およびその周辺はクリーンブースに覆われ無菌的な状態になっており、長期間の培養においても培養槽内の雑菌汚染を防止できる。

2.3 装置の構成

培養装置は下記のユニットから構成されており、2号加速器棟実験室に設置されている。なお、各ユニットの配置をFig. 2に示した。

構成ユニット

- (1) 自動サンプリングユニット
- (2) クリーンブースユニット
- (3) 菌体培養ユニット
- (4) 固定化増殖菌体培養ユニット

3. 装置の特性

培養装置は2.3項で述べたように、主に4つのユニットから構成されており、それぞれ使用目的、機能が違うため各ユニット毎に特性を調べ、その結果について述べる。

3.1 自動サンプリングユニット

3.1.1 目的および機能

本ユニットは、培養槽の雑菌汚染を防ぎながら培養液を一定時間毎に、自動的にサンプリングして低温に保存するものである。略図をFig. 3に、仕様をTable 1に示した。スタートタイマ

ーの設定時間が経過するとドレインタイマーの設定時間だけポンプが作動し、サンプリング用ラインに詰まっている培養液（残存物）を冷蔵庫外に排出する。数秒後、注入パイプが試験管上に移動すると同時に、ターンテーブルが回転して未使用の試験管が注入パイプの下に移動する。サンプリングタイマーの設定時間だけポンプが作動し、培養液を一定量試験管にサンプリングする。サンプリング後、注入パイプがドレイン受け上に移動して停止する。以後、インターバルタイマーで設定した時間毎に上記動作を繰返し、培養液のサンプリングを行う。一度に4槽からのサンプリングが可能で、ターンテーブルに12回分（4槽×12回=48本）の試験管が設置できる。

3.1.2 機能試験

一連のサンプリング動作が自動的に行われるか確認試験を行った。スタートタイマー作動→ドレイン排出（ドレインタイマーによるポンプ作動）→注入パイプの試験管上への移動、ターンテーブルの回転による試験管の移動→サンプリング（サンプリングタイマーによるポンプ作動）→注入パイプのドレイン受け上への移動→インターバルタイマー作動、という一連のサンプリング動作が自動的に行われた。また、下記の条件で作動させて培養液のサンプリング量を調べた。

ポンプ流量	: 最大の流量
シリコンチューブ	: 内径5 mm, 外径7 mm, 長さ4 m
サンプリングタイマー設定時間	: 3 sec
ドレインタイマー設定時間	: 1 min

ドレインタイマーの設定時間内に排出された培養液の量は130 ml, サンプリングタイマーの設定時間内に試験管にサンプリングされた培養液の量は11mlであった。この量は、サンプリング用ライン内残存物の排出、培養液の酵素活性の測定に十分な量である。また、サンプリングタイマーの設定時間を変えることにより、サンプリング量の調節ができた。

3.1.3 接続時の雑菌汚染防止法

自動サンプリングユニットを用いてのサンプリングにおいて、培養槽内が通気により加圧状態になっていることやローラーポンプによるサンプリングチューブの締付けによりサンプリング用パイプライン内残存物や注入口からの空気の逆流は考えられない。このため、自動サンプリングユニットの接続後において、本ユニットが原因の培養槽内の雑菌汚染は無いと考えられる。しかし、培養槽のサンプリングパイプと自動サンプリングユニットのサンプリングチューブの接続の際に雑菌汚染の可能性があるので、下記の手順により接続を行った。

(1) サンプリングチューブの滅菌

チューブはシリコン製を用いて、150℃, 1時間乾熱滅菌を行う。

- (2) 培養槽のサンプリングパイプの接続部およびバルブの火炎滅菌
- (3) 火炎中でのサンプリングパイプとサンプリングチューブの接続
- (4) サンプリングチューブの固定

3.2 クリーンブースユニット

3.2.1 目的および機能

本ユニットは、固定化菌体による長期間の培養において、雑菌の混入を防止するため固定化増殖菌体培養槽、培地槽およびその周辺を無菌的な状態にする簡易式のクリーンルームである。略図をFig. 4に、仕様をTable 2に示した。ビニールカーテンで覆われた空間（ブース内）にプレフィルター（大きな粒子の除去）とメインフィルター（小さな粒子の除去）で空気中の浮遊粒子等の異物を除去した清浄な空気を天井から吹出させ、ブース内を清浄化させる。また、ブース内は陽圧になっており、外部からの汚染粒子の流入を防止して清浄度を保持する。

本クリーンブースは、培養操作時の作業性が損なわれないことや蒸気殺菌時に蒸気がかからないように、以下の特徴を有している。

- (1) 通常のクリーンブースは1枚のビニールカーテンで周囲（4面）が囲まれているが、本クリーンブースは各面毎に1枚のビニールカーテンとなっており、カーテンレールにより前面だけでなく4面ともどちら方向にも開閉できる。
- (2) 4面のビニールカーテンの両端部にマジックテープが取付けてあり、他の面のビニールカーテンと簡単に脱着できる。
- (3) ビニールカーテンは帯電防止型であり、静電気によるチリ等の付着を防止できる。
- (4) カーテンレール部にタレ幕を取付け、この部分からの汚染粒子の侵入を防止できる。

3.2.2 機能試験

クリーンブースのファンを作動させ清浄空気の風量、およびブース内の清浄度を測定した。

(1) 風量の測定

クリーンブース天井部の2基のフィルターユニットの清浄空気吹出し口での風速を風速計で測定し、風速×吹出し口の面積により風量を求めた。フィルターユニット1基当りの風量は14.7 m³/minであり、2基での総風量は29.4m³/minであった。また、クリーンブース内の清浄空気の循環回数は、クリーンブース内容積（4 m×3 m×1.8 m）を風量で割り求めたところ82回/hrであった。これらの値はTable 2に示した仕様を上回るものであった。

(2) 清浄度の測定

空気の清浄度に関する規格として、米国連邦規格（U. S. Federal Standard 209）が最も広く利用されている。本クリーンブースの清浄度はクラス10,000であり、0.5 μm以上の粒子数が10,000個/ft³以内でなければならない。粒子数の測定はParticle Counter KC-01A（リオン製）により0.5 μm以上の粒子について調べ、以下の結果を得た。

- ・ブース外粒子数

79,400 個/ft³, 74,800 個/ft³

- ・ファン作動前のクリーンブース内粒子数

66,800 個/ft³, 62,500 個/ft³

- ・ファン作動15分後のクリーンブース内粒子数

100 個/ft³, 200 個/ft³

- ・ファン作動時，1人が軽作業した場合の粒子数

3,600個/ft³

培養槽の設置場所において1 ft³の空気中に0.5 μm以上の粒子が7～8万個浮遊しているが、クリーンブースにより極端に粒子数が減少し、本クリーンブースの仕様であるクラス10,000を大きく超えてクラス100近くになっていることがわかった。このことから、クリーンブース外部からの汚染粒子の流入による培養中の雑菌汚染は、ほとんどないと考えられる。

3.3 菌体培養ユニット

3.3.1 目的および機能

トリコデルマ菌を固定化しないで培養（固定化培養と区別するため以後、フリー培養と記す）するために使用するものである。フリー培養における培養条件の検討、および固定化培養と同じ種菌でフリー培養を行い、固定化培養に使用した種菌の性状を確認する。

本ユニットは内容積30ℓの培養槽1槽と各機器から構成されている。培養槽の略図をFig. 5、培養槽と各機器の関係をFig. 6、仕様をTable 3に示した。軟水器、ボイラー、コンプレッサーおよびエアードライヤーは後述の固定化増殖菌体培養ユニットの蒸気殺菌、通気にも用いられるが説明の都合上この項で記した。軟水器により水を軟水化させ、ボイラーにより蒸気を発生させる。120℃の蒸気で培養槽、培地、メカニカルシール、エアフィルターおよび配管等の殺菌を行う。また、コンプレッサーにより圧縮された空気はエアードライヤーにより乾燥された後、エアフィルターを通り、スパージャーから気泡として培養槽内（培養液）に供給される。温度調節器により温水または水をジャケットに流し、培養液の温度を一定に保ち、攪拌しながら培養を行う。なお、培養槽においてメカニカルシールからの雑菌汚染を防止するため、メカニカルシールは内部を蒸気により殺菌でき、メカニカルシールポットに殺菌水をためシール液とする構造になっている。

3.3.2 培養試験

本ユニットは各機器が正常に作動することはもとより、雑菌による汚染がなく目的の菌体を培養できることが重要である。このため、各機器が正常に作動することを確認した後、Fig. 1に示した培養手順によりトリコデルマ菌（*Trichoderma reesei*）のフリー培養を試みた。なお、培養槽への接種はあらかじめ胞子をフラスコ内の液体培地に、28℃で一定期間振盪培養して増殖させた菌体を種菌として用いた。（液体培地500 ml中の菌体を液体培地とともに培養槽に添加した）

〔培養条件〕

空殺菌	:	120℃, 30分
エアフィルター殺菌	:	120℃, 15分
培地殺菌	:	120℃, 40分
メカニカルシール殺菌	:	120℃, 40分
培地量	:	20ℓ

培地組成	: Table 4 参照
攪拌翼	: タービン翼 2枚
攪拌翼の回転数	: 250 rpm
通気量	: 4 ℓ / min
培養温度	: 28°C

培養開始後、培養液は自動サンプリングユニットを3.1.3項の接続時の雑菌汚染防止法で述べた手順により接続してサンプリングした。サンプリングした培養液中の酵素活性をFig. 7に示したFPA (Filter Paper Activity) の測定法により求めた¹¹⁾。なお、FPAの1単位は1時間に生成したグルコース1mgに相当する。Fig. 8に雑菌汚染のない場合を白丸、雑菌汚染した例を黒丸に示した。白丸は培養時間とともに培養液中に菌体が多く見られるようになり、培養8日目でFPAが2.3まで上昇した。8日目以降FPAは一定となったが培養液に異常がなく、菌の増殖が飽和に達したものと考えられる。これに対し、黒丸(雑菌汚染した培地で培養したもの)はFPAが0.4と低く、培養時間を長くしても上昇しなかった。

菌体培養ユニットでは各機器が正常に作動しており、培養操作を正確に行うことにより雑菌汚染がなくトリコデルマ菌のフリー培養が行えることがわかった。また、自動サンプリングユニットを接続してサンプリングしても雑菌汚染がなく培養できることが明らかになった。

3.4 固定化増殖菌体培養ユニット

3.4.1 目的および機能

担体に固定化したトリコデルマ菌を培養(固定化培養)して増殖させた後、連続培養により培養液(酵素水溶液)を長期間連続的に得るベンチスケール試験装置である。

本ユニットはFig. 9に示したように内容積30ℓの固定化増殖菌体培養槽2槽、60ℓの培地槽2槽、60ℓの培養液貯蔵タンク1槽およびポンプから構成されている。ユニット全体はFig. 2に示したようにクリーンブース内に設置され、外部からの汚染粒子の流入を防止してある。培養槽の略図をFig. 10、培地槽の略図をFig. 11、仕様をTable 5に示した。固定化増殖菌体培養槽は菌体培養槽と同じ構造になっているが接種口が広く、培地の供給・取出し口がある。また、固定化増殖菌体培養槽と培地槽の殺菌用蒸気や培養時の空気はFig. 12のフローシートに示したように菌体培養ユニットを構成するボイラー、コンプレッサーにより得る。

3.4.2 長期培養試験

本ユニットは長期間の連続培養において、雑菌による汚染がなく目的の菌体を培養できることが重要である。そのためには、①固定化増殖菌体培養槽で汚染がなく培養できる②培地槽で一定期間培地を汚染のない状態で保存できる③固定化培養から連続培養に切替える際に汚染されない④連続培養中に汚染されない、等の汚染防止の性能が要求される。また、連続培養においては、培地をポンプで定量的に供給できることが重要である。

本試験では固定化増殖菌体培養槽により目的の菌体を培養した後、培地槽から新しい培地を供給して雑菌汚染がなく連続培養操作できることを確めた。培養試験のため菌体は固定化せず、フ

リー培養を行い新培地を供給して連続化を試みた。固定化増殖菌体培養槽により 3.3.2 項の培養試験と同じ条件、手順でトリコデルマ菌を培養して F P A が高い値に達した後、下記の手順により連続化を行った。

〔連続培養手順〕

- ① 培地槽に培地を仕込み蒸気により殺菌する。
- ② 殺菌後、ジャケットに水道水を流して培地を冷却する。（培地は常に水道水で冷却しておく）
- ③ 殺菌したシリコンチューブを Fig. 9 に示したように培地槽と培養槽に接続する。
- ④ 培地ポンプで培地を培養槽に供給する。
- ⑤ 培養液ポンプでオーバーフローした培養液を取出し、貯蔵タンクに溜める。

連続培養において培地の滞留時間を 8 日に設定した。連続的に培地を供給する場合、流速が 2.5 ℓ/day (20ℓ/8 day) と非常におそくなりチューブ内で培地中のセルロースが沈殿して供給できないため、Fig. 13 に示したように一定時間毎に培地を速い流速で供給した。また、培養液の取出しも培地供給と時間をずらし、同様に行った。

実験結果を Fig. 14 に示した。培養開始から 14 日目に Fig. 13 に示した方法により新培地の供給を始め、培養 16 日目から連続培養を開始した。（培養液の取出しはオーバーフロー方式であり、培養 14 日目までの培養液のサンプリングにより培養液が少なくなり、その不足分の補給に 2 日間を要した）F P A は連続化後急激に低下し、培養開始から 38 日目で 0.3 程度で一定となった。雑菌汚染した培養液は悪臭が発生して pH も上昇するが、培養開始から 42 日目においても培養液に悪臭がなく pH も上昇していないことから、雑菌汚染のない状態で長期間の培養を行えることが明らかになった。連続培養時の培地滞留時間を 8 日に設定したが平均滞留時間は 8.9 日となった。また、ポンプやチューブ内での詰まりもなく供給できることがわかった。

今回の長期培養試験で下記の事項が明らかになったことから、固定化増殖菌体培養ユニットで汚染されずに長期連続培養が可能であることがわかった。

- ① 固定化増殖菌体培養槽で汚染がなく培養できる。
- ② 培地槽で一定期間（今回の試験では 14 日間）汚染のない状態で培地を保存できる。
- ③ 汚染がなく連続培養に切替えられる。
- ④ 連続培養中に汚染されない。
- ⑤ 連続培養時の培地の供給・取出しが詰まりなく正常に行える。

4. トリコデルマ菌の培養条件

菌体培養ユニットを用いてトリコデルマ菌のフリー培養を行い、F P A（培養液の酵素活性）におよぼす培養時の空気量の影響と攪拌の影響を調べた。

(1) 空気量の影響

トリコデルマ菌は好気性の菌であり、培養時に通気を行う必要がある。トリコデルマ菌の培

リー培養を行い新培地を供給して連続化を試みた。固定化増殖菌体培養槽により 3.3.2 項の培養試験と同じ条件、手順でトリコデルマ菌を培養して F P A が高い値に達した後、下記の手順により連続化を行った。

〔連続培養手順〕

- ① 培地槽に培地を仕込み蒸気により殺菌する。
- ② 殺菌後、ジャケットに水道水を流して培地を冷却する。（培地は常に水道水で冷却しておく）
- ③ 殺菌したシリコンチューブを Fig. 9 に示したように培地槽と培養槽に接続する。
- ④ 培地ポンプで培地を培養槽に供給する。
- ⑤ 培養液ポンプでオーバーフローした培養液を取出し、貯蔵タンクに溜める。

連続培養において培地の滞留時間を 8 日に設定した。連続的に培地を供給する場合、流速が 2.5 ℓ/day (20ℓ/8 day) と非常におそくなりチューブ内で培地中のセルロースが沈殿して供給できないため、Fig. 13 に示したように一定時間毎に培地を速い流速で供給した。また、培養液の取出しも培地供給と時間をずらし、同様に行った。

実験結果を Fig. 14 に示した。培養開始から 14 日目に Fig. 13 に示した方法により新培地の供給を始め、培養 16 日目から連続培養を開始した。（培養液の取出しはオーバーフロー方式であり、培養 14 日目までの培養液のサンプリングにより培養液が少なくなり、その不足分の補給に 2 日間を要した）F P A は連続化後急激に低下し、培養開始から 38 日目で 0.3 程度で一定となった。雑菌汚染した培養液は悪臭が発生して pH も上昇するが、培養開始から 42 日目においても培養液に悪臭がなく pH も上昇していないことから、雑菌汚染のない状態で長期間の培養を行えることが明らかになった。連続培養時の培地滞留時間を 8 日に設定したが平均滞留時間は 8.9 日となった。また、ポンプやチューブ内での詰まりもなく供給できることがわかった。

今回の長期培養試験で下記の事項が明らかになったことから、固定化増殖菌体培養ユニットで汚染されずに長期連続培養が可能であることがわかった。

- ① 固定化増殖菌体培養槽で汚染がなく培養できる。
- ② 培地槽で一定期間（今回の試験では 14 日間）汚染のない状態で培地を保存できる。
- ③ 汚染がなく連続培養に切替えられる。
- ④ 連続培養中に汚染されない。
- ⑤ 連続培養時の培地の供給・取出しが詰まりなく正常に行える。

4. トリコデルマ菌の培養条件

菌体培養ユニットを用いてトリコデルマ菌のフリー培養を行い、F P A（培養液の酵素活性）におよぼす培養時の空気量の影響と攪拌の影響を調べた。

(1) 空気量の影響

トリコデルマ菌は好気性の菌であり、培養時に通気を行う必要がある。トリコデルマ菌の培

養において必要な空気量（通気量）を調べるため、2～8 l/minの空気量で培養を行った。なお、培地組成、培養手順、培養条件（空気量以外）は3.3.2項の培養試験と同じである。Fig. 15に空気量を変えて培養した時の培養時間とFPAの関係を示した。空気量が4 l/minと8 l/minでは10日でFPA 2.5に達したが、2 l/minではFPA 1.7となり培養時間を長くしても上昇しなかった。このことから、トリコデルマ菌のフリー培養においては、空気量が4 l/min以上必要であることがわかった。培地に消泡剤を添加しているものの、空気量が多くなると培養中に泡の発生が多くなり、空気排出口から培養槽外に泡が吹き出し培養液が減少するとともに外部雑菌による汚染の危険性が高くなる。このため、空気量は4 l/minが適当であると考えられる。

(2) 攪拌の影響

トリコデルマ菌の培養において培地の混合、通気した空気（酸素）の拡散などを良くするため攪拌する必要がある。トリコデルマ菌の培養におよぼす攪拌の影響を調べるため、タービン翼1枚を取付け250 rpm、500 rpmの回転数で培養を行った。なお、培地組成、培養手順、培養条件（攪拌翼の枚数と回転数以外）は3.3.2項の培養試験と同じである。Fig. 16に攪拌翼の回転数を変えて培養した時の培養時間とFPAの関係を示した。250 rpmの回転数では培養時間とともにFPAが増加した。これに対し、500 rpmの回転数では250 rpmの回転数に比べFPAの値が低く、短時間で一定値となった。この原因として、攪拌翼の回転数が500 rpmの場合、糸状菌であるトリコデルマ菌の菌糸が翼によるせん断作用のため切断されたり、損傷を受けたものと考えられる。

5. ま と め

本培養装置を構成する自動サンプリングユニット、クリーンブースユニット、菌体培養ユニット、固定化増殖菌体培養ユニットの特性およびトリコデルマ菌のフリー培養での培養条件について調べた結果、下記のことになった。

- (1) 培養液は自動サンプリングユニットにより一定時間毎に必要な量だけサンプリングできる。また、サンプリング操作により培養槽内に雑菌汚染を生じさせない。
- (2) クリーンブースにより固定化増殖菌体培養ユニット周辺の汚染粒子を80,000個/ft³から200個/ft³に少なくでき、ほとんど無菌的な状態にできる。
- (3) 菌体培養ユニットにおいて雑菌汚染がなく培養できる。
- (4) トリコデルマ菌のフリー培養において4 l/min以上の空気量で高いFPAが得られる。また、攪拌翼の回転数が500 rpmでトリコデルマ菌の菌糸が損傷を受けたり、切断されることが考えられるため250 rpmが適当である。
- (5) 固定化増殖菌体培養ユニットにおいて雑菌汚染がなく長期間培養できる。また、連続培養操作においても雑菌汚染が認められなかったことから、固定化菌体での長期連続培養が可能である。

養において必要な空気量（通気量）を調べるため、2～8 l/minの空気量で培養を行った。なお、培地組成、培養手順、培養条件（空気量以外）は3.3.2項の培養試験と同じである。Fig. 15に空気量を変えて培養した時の培養時間とFPAの関係を示した。空気量が4 l/minと8 l/minでは10日でFPA 2.5に達したが、2 l/minではFPA 1.7となり培養時間を長くしても上昇しなかった。このことから、トリコデルマ菌のフリー培養においては、空気量が4 l/min以上必要であることがわかった。培地に消泡剤を添加しているものの、空気量が多くなると培養中に泡の発生が多くなり、空気排出口から培養槽外に泡が吹き出し培養液が減少するとともに外部雑菌による汚染の危険性が高くなる。このため、空気量は4 l/minが適当であると考えられる。

(2) 攪拌の影響

トリコデルマ菌の培養において培地の混合、通気した空気（酸素）の拡散などを良くするため攪拌する必要がある。トリコデルマ菌の培養におよぼす攪拌の影響を調べるため、タービン翼1枚を取付け250 rpm、500 rpmの回転数で培養を行った。なお、培地組成、培養手順、培養条件（攪拌翼の枚数と回転数以外）は3.3.2項の培養試験と同じである。Fig. 16に攪拌翼の回転数を変えて培養した時の培養時間とFPAの関係を示した。250 rpmの回転数では培養時間とともにFPAが増加した。これに対し、500 rpmの回転数では250 rpmの回転数に比べFPAの値が低く、短時間で一定値となった。この原因として、攪拌翼の回転数が500 rpmの場合、糸状菌であるトリコデルマ菌の菌糸が翼によるせん断作用のため切断されたり、損傷を受けたものと考えられる。

5. ま と め

本培養装置を構成する自動サンプリングユニット、クリーンブースユニット、菌体培養ユニット、固定化増殖菌体培養ユニットの特性およびトリコデルマ菌のフリー培養での培養条件について調べた結果、下記のことになった。

- (1) 培養液は自動サンプリングユニットにより一定時間毎に必要な量だけサンプリングできる。また、サンプリング操作により培養槽内に雑菌汚染を生じさせない。
- (2) クリーンブースにより固定化増殖菌体培養ユニット周辺の汚染粒子を80,000個/f t³から200個/f t³に少なくでき、ほとんど無菌的な状態にできる。
- (3) 菌体培養ユニットにおいて雑菌汚染がなく培養できる。
- (4) トリコデルマ菌のフリー培養において4 l/min以上の空気量で高いFPAが得られる。また、攪拌翼の回転数が500 rpmでトリコデルマ菌の菌糸が損傷を受けたり、切断されることが考えられるため250 rpmが適当である。
- (5) 固定化増殖菌体培養ユニットにおいて雑菌汚染がなく長期間培養できる。また、連続培養操作においても雑菌汚染が認められなかったことから、固定化菌体での長期連続培養が可能である。

参 考 文 献

- (1) M. Mandels, L. Hontz, and J. Nystrom: *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 1471 (1974)
- (2) C.R. Wilke, G.R. Cysweski, and R.D. Yang: *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 1315 (1976)
- (3) N. Nesse, J. Wallick, and J.M. Harper: *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 323 (1977)
- (4) Gharpuray. M.M., Y.H. Lee, and L.T. Fan: *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 157 (1983)
- (5) Allen. A.L.: *AIChE Symp, Ser.*, 72, 115 (1976)
- (6) M. Kumakura, T. Kojima, N. Kasai, and I. Kaetsu: *Appl. Radiat. Isot.*, 37, 513 (1986)
- (7) 笠井 昇, 玉田 正男, 熊倉 稔, 嘉悦 勲: JAERI-M. 86-040 (1986)
- (8) 笠井 昇, 玉田 正男, 熊倉 稔, 嘉悦 勲: JAERI-M. 87-047 (1987)
- (9) 笠井 昇, 玉田 正男, 熊倉 稔, 嘉悦 勲: JAERI-M. 88-015 (1988)
- (10) 大嶋 寛, 原納 淑郎: *化学工場*, 27, 93 (1983)
- (11) M. Mandels, R. Raymond, and C. Roche: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 6, 21 (1976)

Table 1 Specification of automatic sampler.

1. Sampler (Komatsugawa Chemical Engineering Co., Ltd.)

size : 500x435x866 mm

power : 100V, 200W

sampling number : 4

sampling frequency : 12times/1number

sampling volume : max 100 ml/1piece

start timer : 1-24hr

interval timer : 1-24hr

sampling timer : 1-30sec

drain timer : 30sec-3min

2. Refrigerator (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.)

size : 500x435x550mm

power : 100V, 150W

temperature : 1-10°C

3. Roller pump

type : RP-N N-3 (Furue Science Co., Ltd.)

tube size : 5 ϕ x7 ϕ

flow : 20-200 ml/min

motor : 100V, 15W

Table 2 Specification of clean booth.

Clean booth (Air Tech Japan, Ltd.)

size

4000x1800x3000 mm

degree of purity

class 10,000

filter

pre-filter: nonwoven materials by nylon

main-filtr: HEPA (High Efficiency Particulate
Air Filter)

air flow rate

over 26 m³/min

circulation time

over 60 times/hr

materials

frame: square pipe, steel

filter unit: steel

ceiling: steel

curtain: vinyl plastic curtain

anti-static electricity type

(attached to chain on the lower part)

lighting

fluorescent light, dampproof type

40 W, 4 number

Table 3 Specification of culture vessel for intact cells and instrument.

1. Culture vessel

type: jacketed vessel, pressure vessel
 (Komatsugawa Chemical Engineering Co., Ltd.)
 design pressure: 2 kg/cm² G
 volume: 30 l
 agitator: paddle double stairs
 rotation speed: 60-600 rpm
 motor: 1.5 KW
 mechanical seal: T3-08942 (Tanken Seiko Co., Ltd.)

2. Softener

type: FB-3 (Fuji Boiler Co., Ltd.)
 ion exchange volume: 6 l
 max water volume: 0.3 m³/hr
 pressure: 1.5-5.0 kg/cm²

3. Boiler

type: EFB-120W (Fuji Boiler Co., Ltd.)
 evaporation volume: 120 kg/hr
 heat capacity: 64700 kcal/hr
 max pressure: 7 kgf/cm²

4. Compressor

type: package bebicon PO-0.4p (Hitachi, Ltd.)
 air tank volume: 38 l
 pressure: 5-7 kg/cm²
 power: 0.4 kw

5. Air drier

type: NL-5D (Shinko Kikai Co., Ltd.)
 volume of wind: 0.3-0.5 m³/min
 power: 0.13 kw

6. Thermo-regulator

type: PZAW, DIGIZET-A (Fuji Electric Co., Ltd.)
 Pt 100Ω
 PID control

Table 4 Composition of culture medium.

Component	Quantity per liter of distilled water
KH_2PO_4	10.0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.0 g
NaNO_3	3.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
Peptone* ¹	5.0 g
Cellulose* ²	10.0 g
Tween 80	2.0 ml

*1 Difco

*2 Cellulose powder E (Toyo Roshi Co., Ltd.)

Table 5 Specification of equipment unit for culture of immobilized growing cells.

1. Medium storage vessel

type: jacketed vessel, pressure vessel

(Komatsugawa Chemical Engineering Co., Ltd.)

design pressure: 2 kg/cm² G

volume: 60 l

agitator: paddle stairs

rotation speed: 200-600 rpm

motor: 1.5 KW

mechanical seal: T3-08942 (Tanken Seiko Co., Ltd.)

cooling medium: water

2. Culture vessel for immobilized growing cells

type: jacketed vessel, pressure vessel

(Komatsugawa Chemical Engineering Co., Ltd.)

design pressure: 2 kg/cm² G

volume: 30 l

agitator: turbine stairs

rotation speed: 200-600 rpm

motor: 1.5 KW

mechanical seal: T3-08942 (Tanken Seiko Co., Ltd.)

thermo-regulator: PZAW, DIGIZET-A (Fuji Electric Co., Ltd.)

Pt100Ω, PID control

3. Storage tank

volume: 60 l

4. Medium pump

type: glass pump MODEL-GM (Tokyo Rikakikai Co., Ltd.)

5. Culture solution pump

type: roller pump, RP-N N-3 (Furue Science Co., Ltd.)

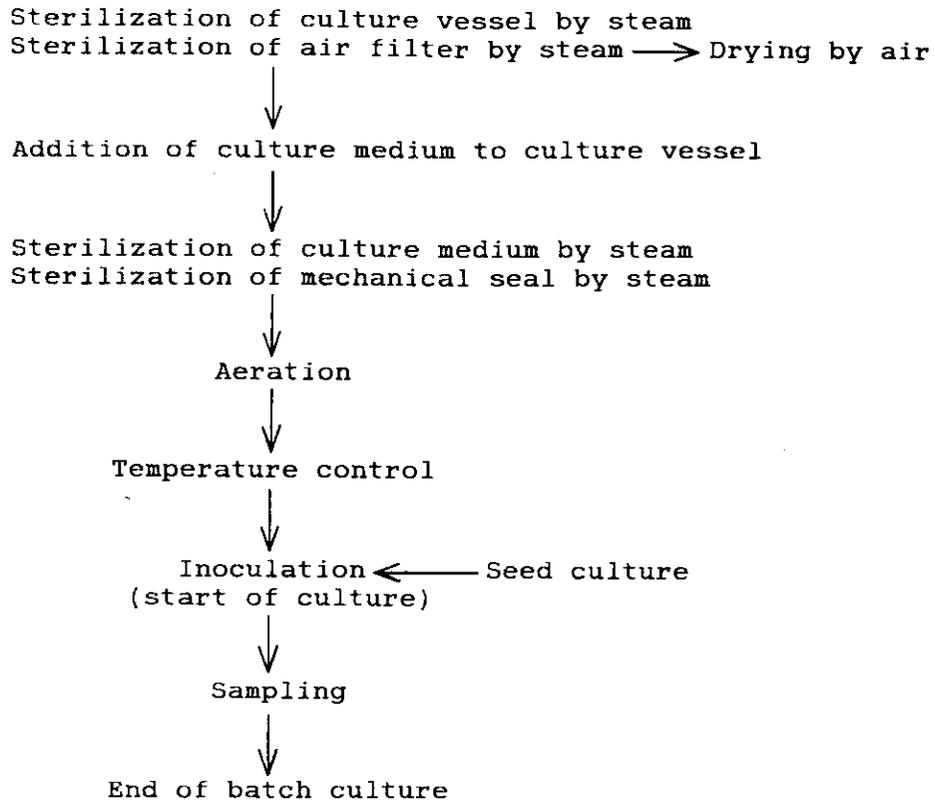


Fig. 1 Culture process of cells.

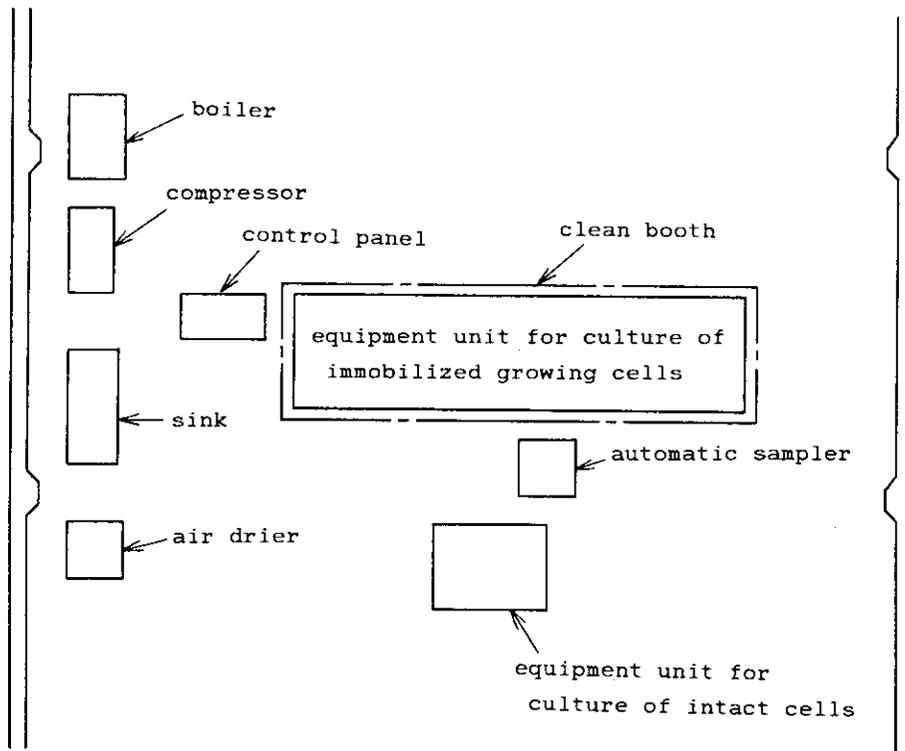


Fig. 2 Layout of equipment.

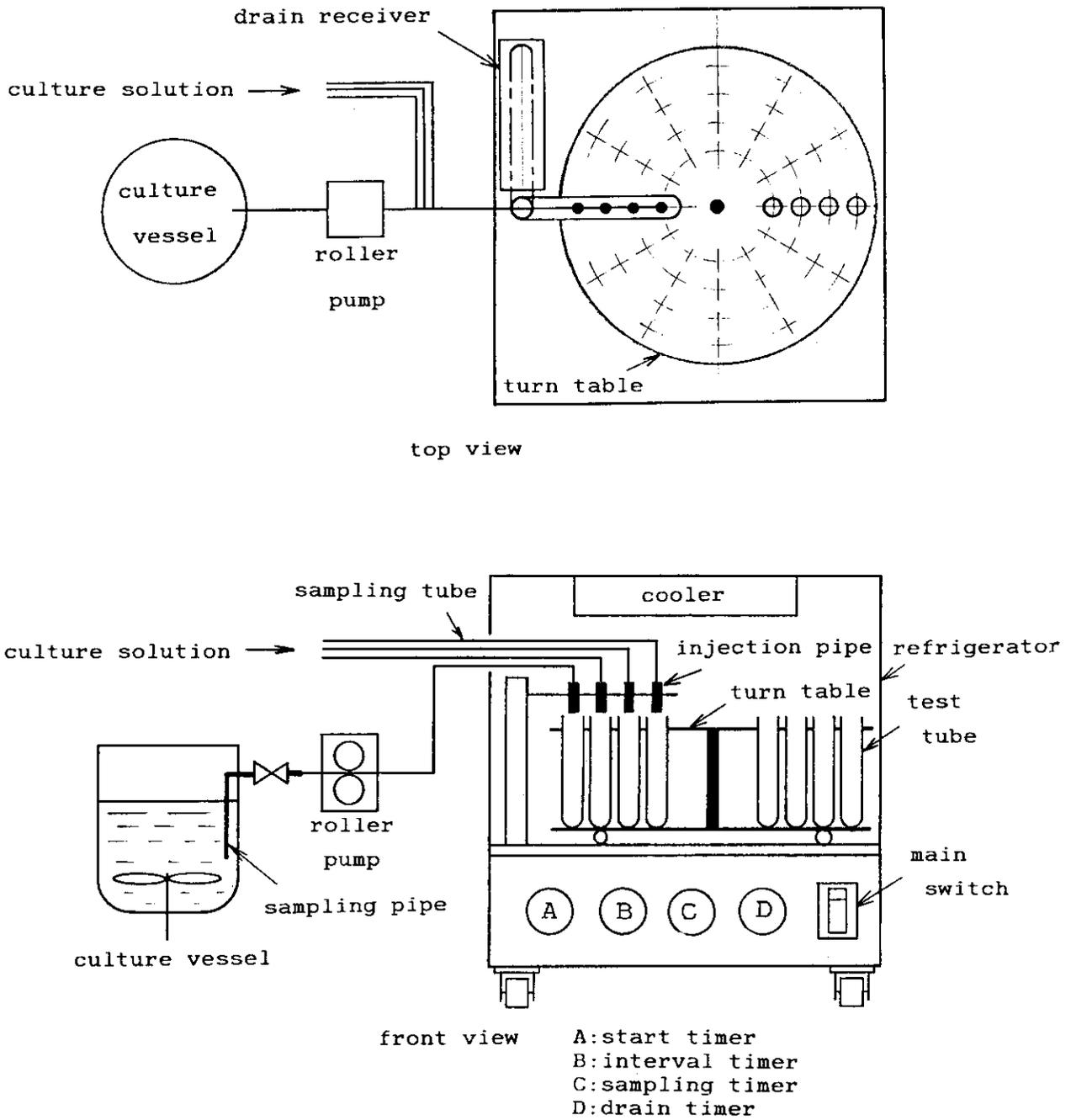


Fig. 3 Sketch of automatic sampler.

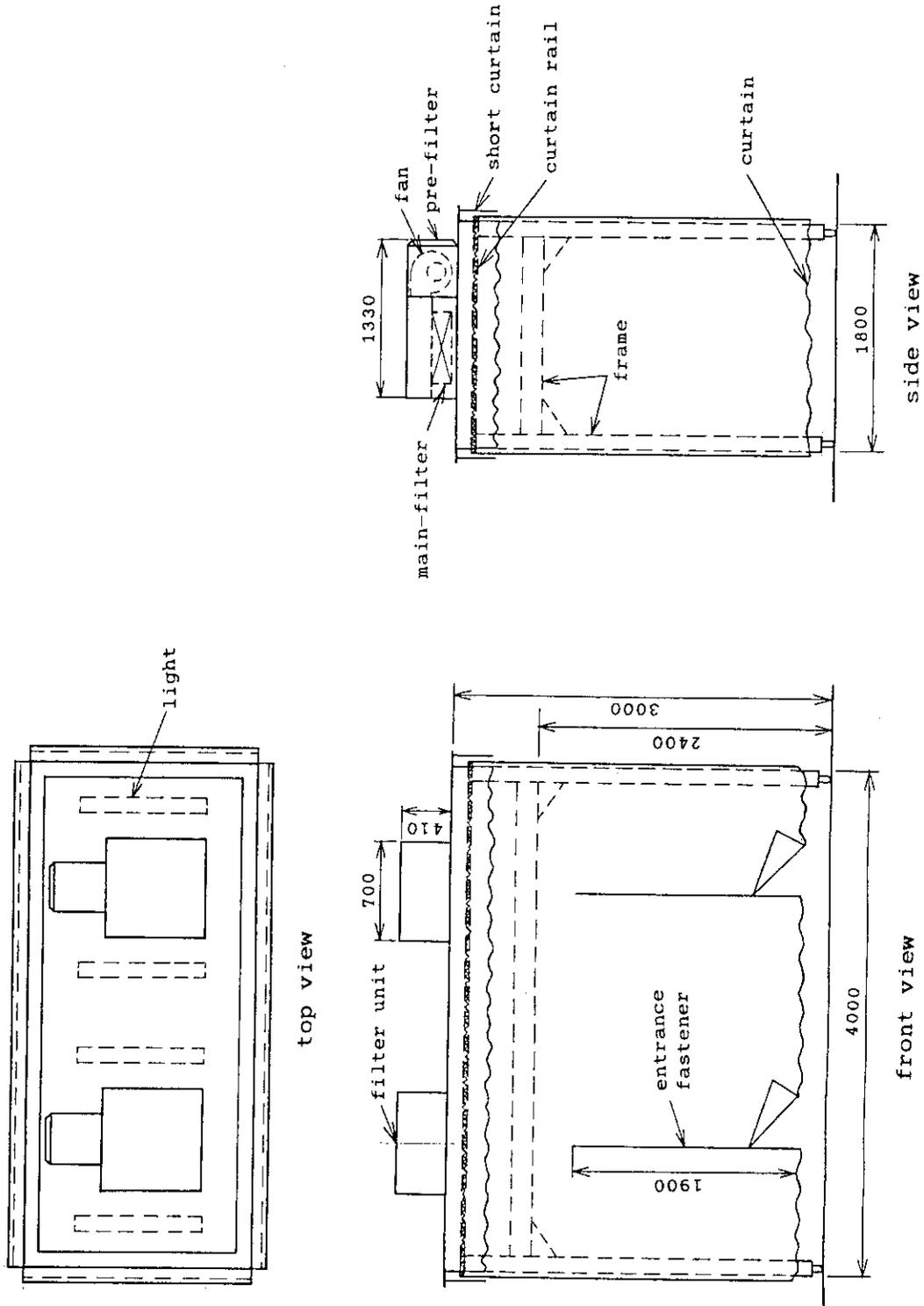


Fig. 4 Sketch of clean booth.

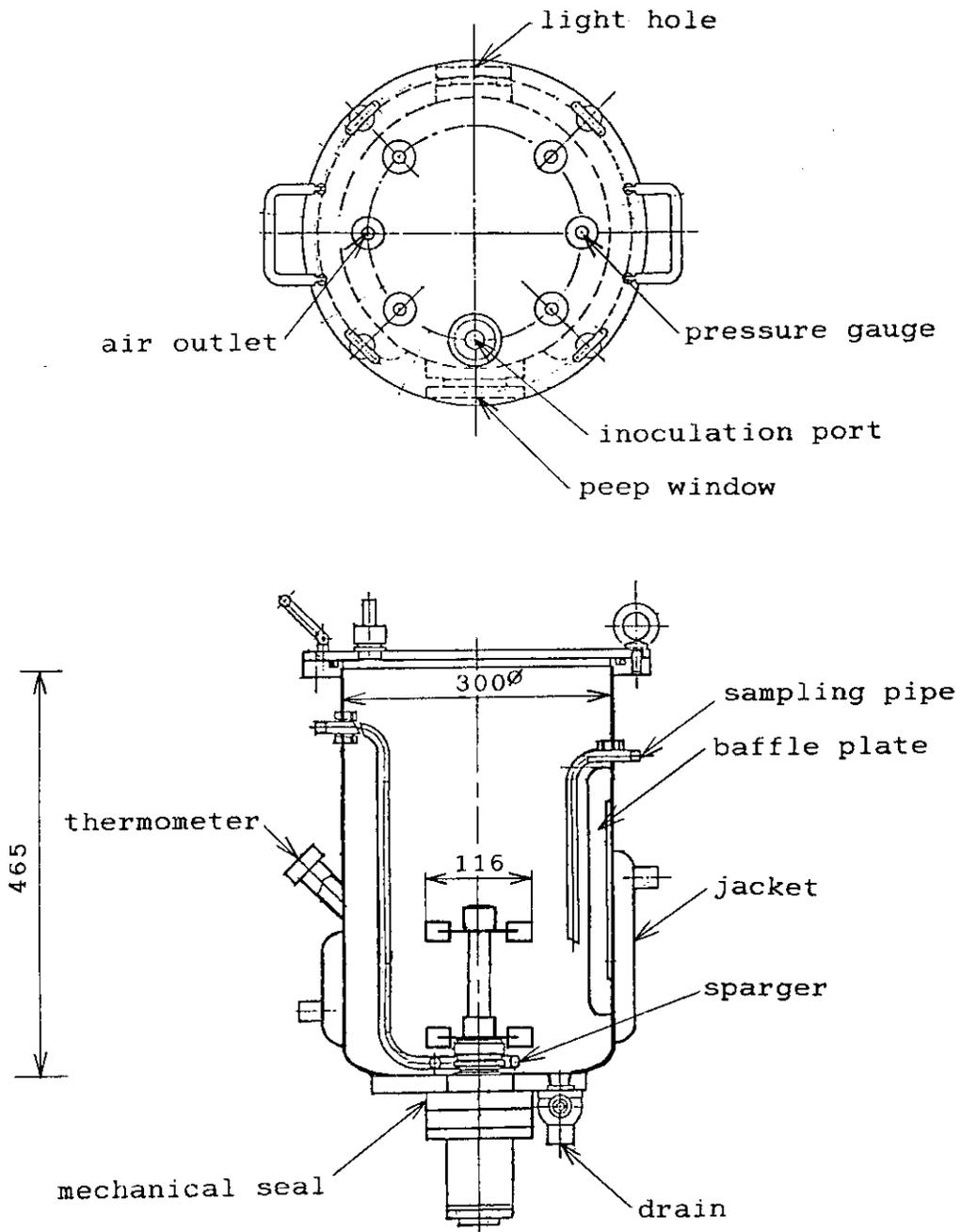


Fig. 5 Sketch of culture vessel for intact cells.

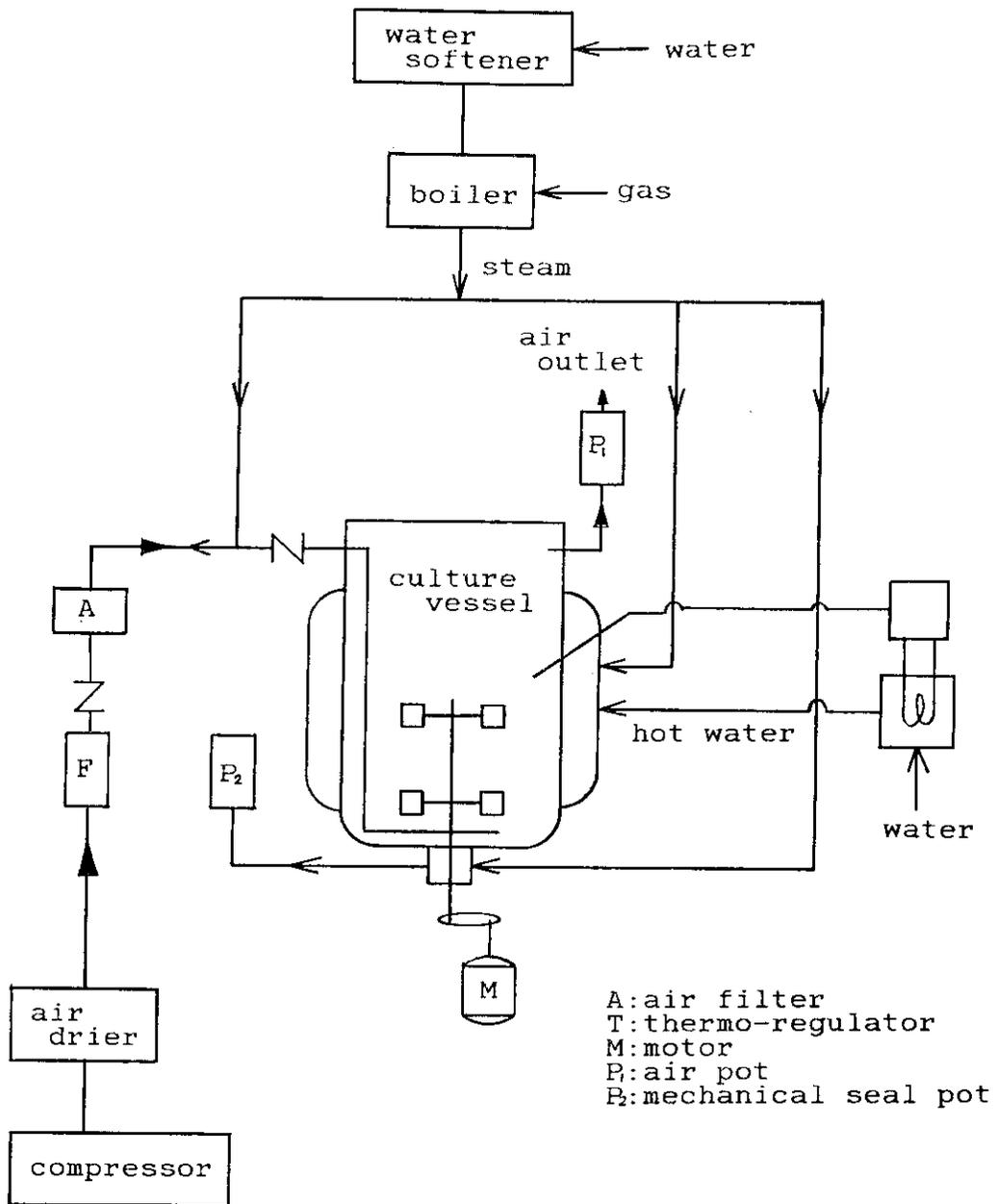


Fig. 6 Connection between culture vessel and various equipments.

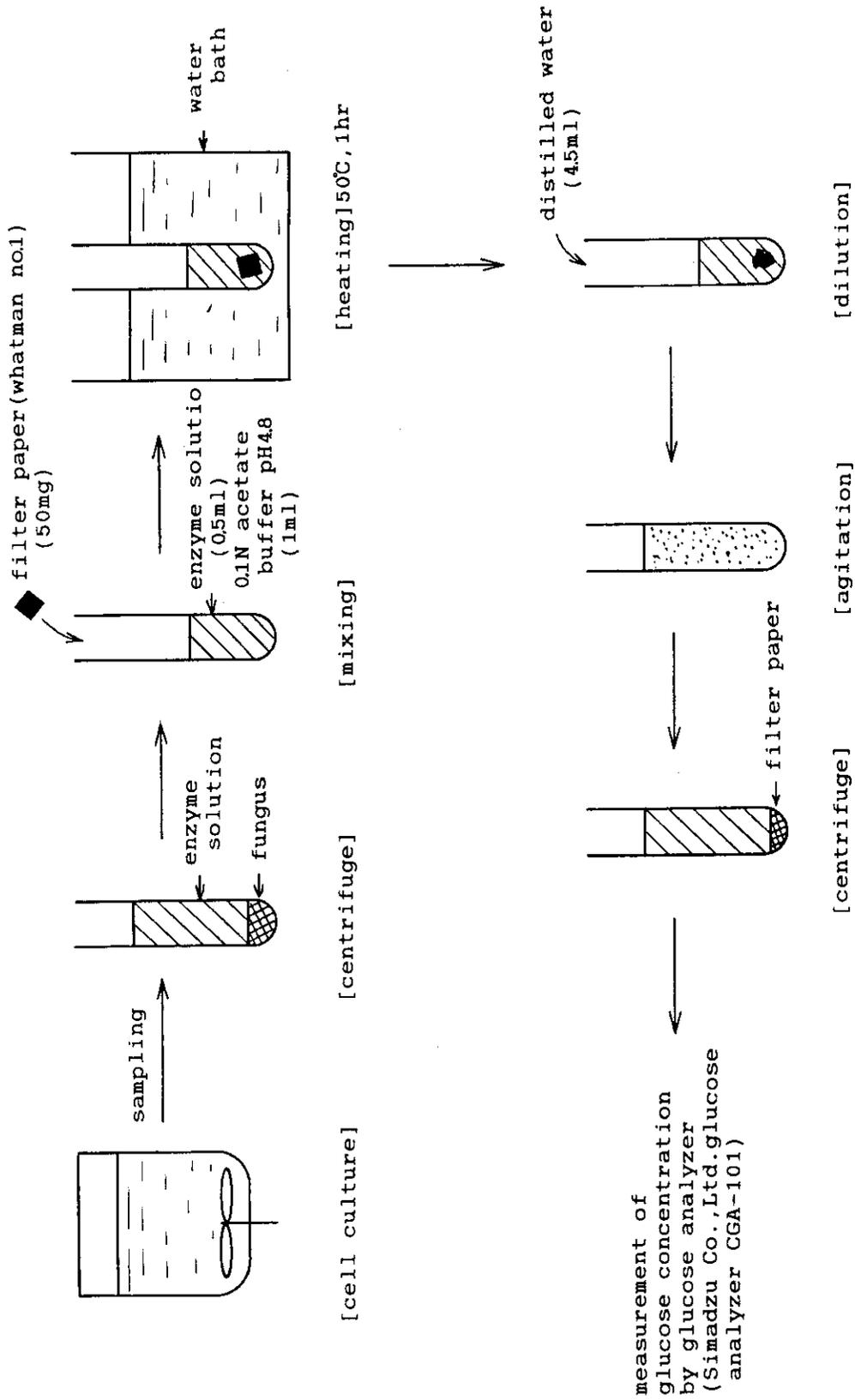


Fig. 7 Method of measurement of filter paper activity (FPA).

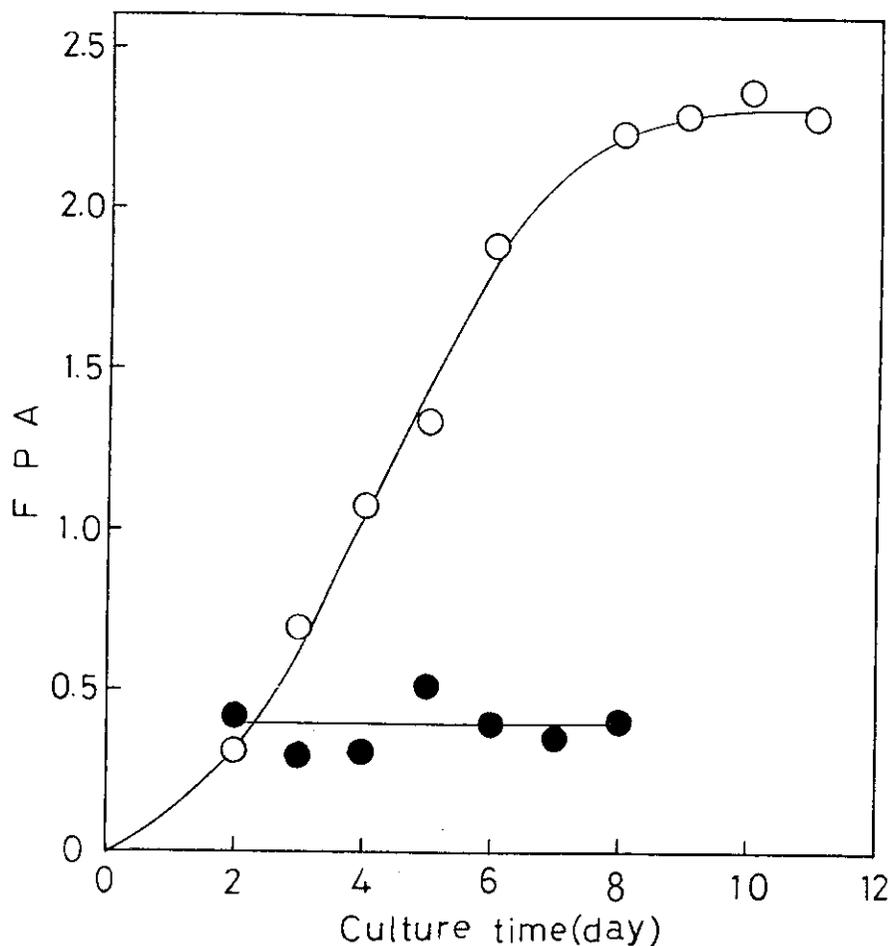


Fig. 8 Test of culture for intact cells.
 (○) normal cells and (●) contaminated cells.

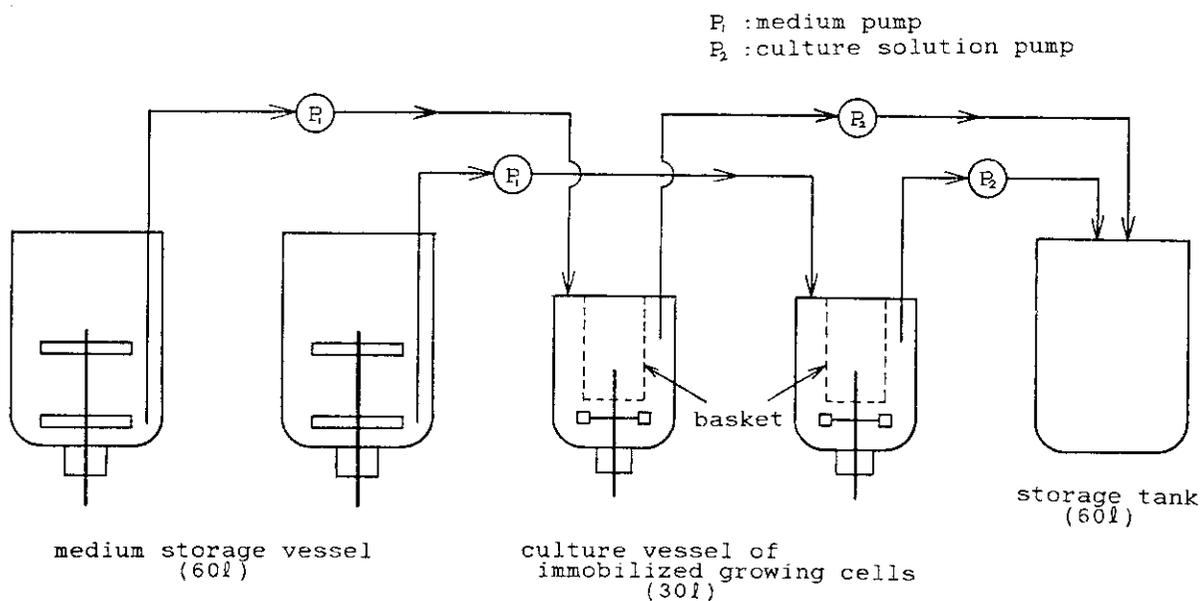


Fig. 9 Flow sheet of continuous culture.

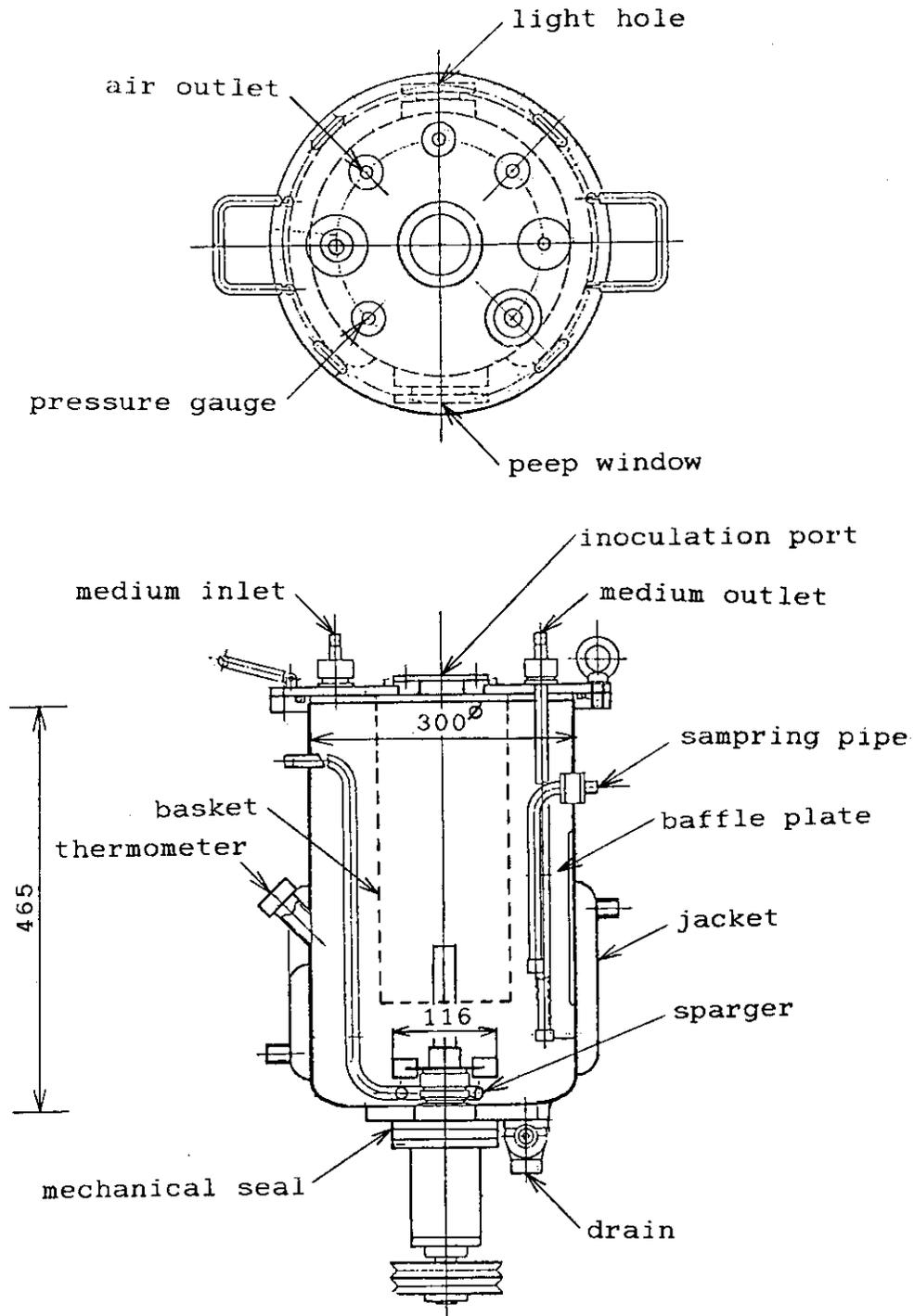


Fig. 10 Sketch of culture for immobilized cells.

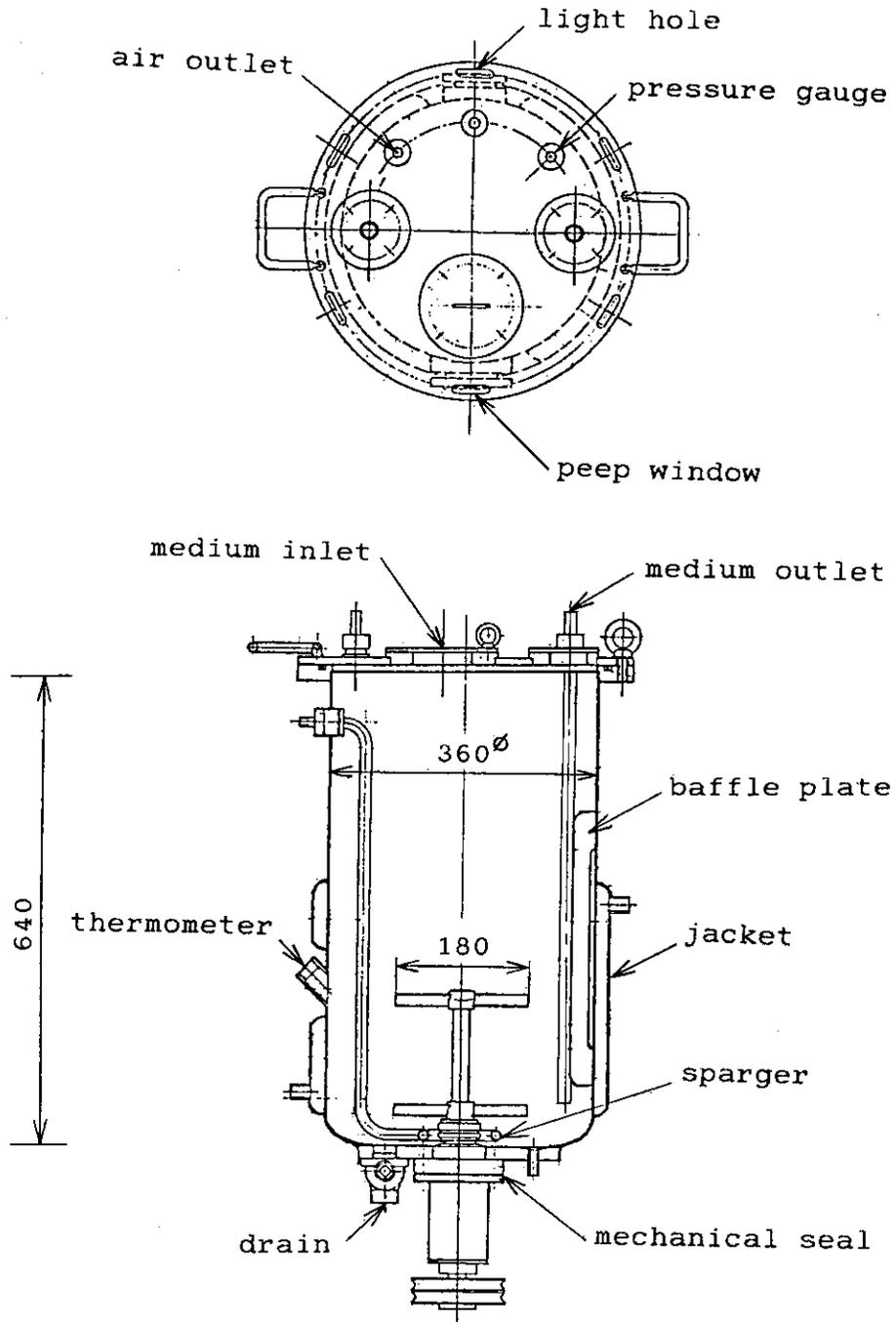


Fig. 11 Sketch of medium storage vessel.

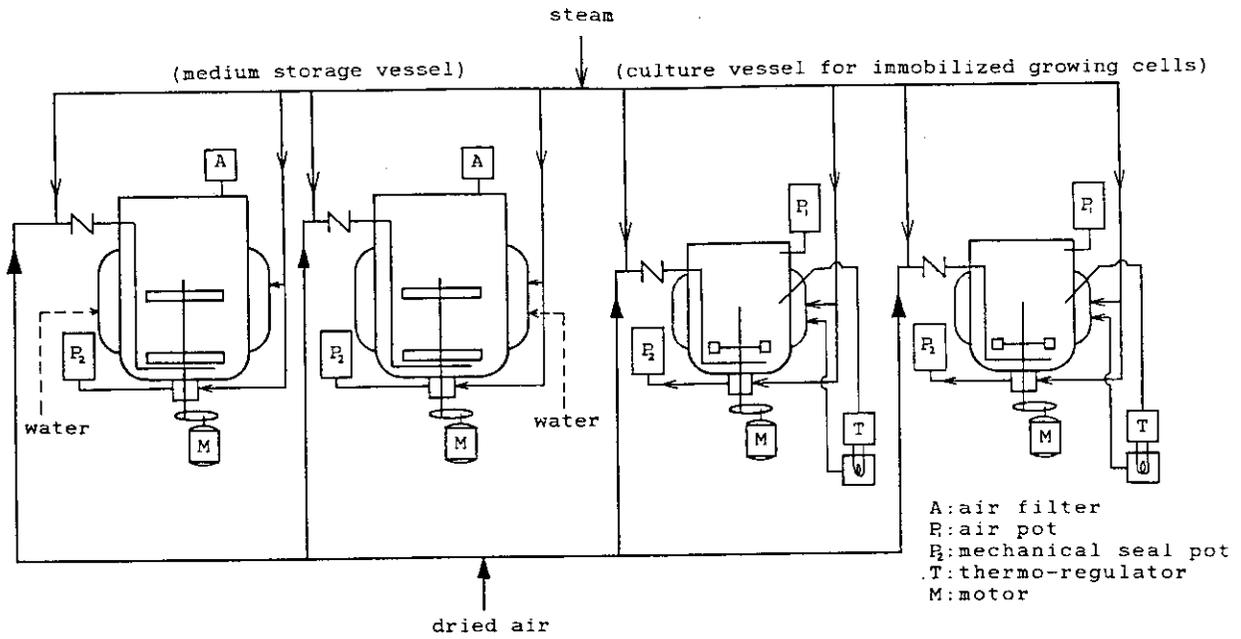


Fig. 12 Diagram of culture vessel for immobilized cells and medium storage vessel.

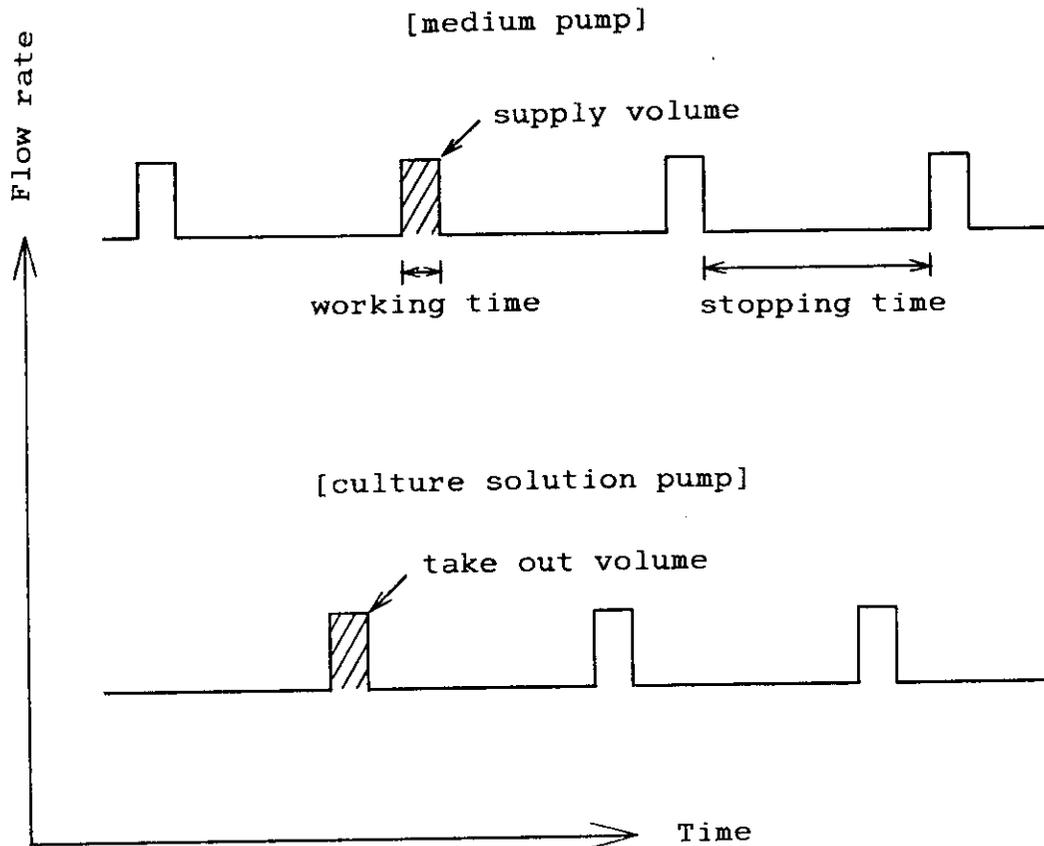


Fig. 13 Working condition on medium pump and culture solution pump.

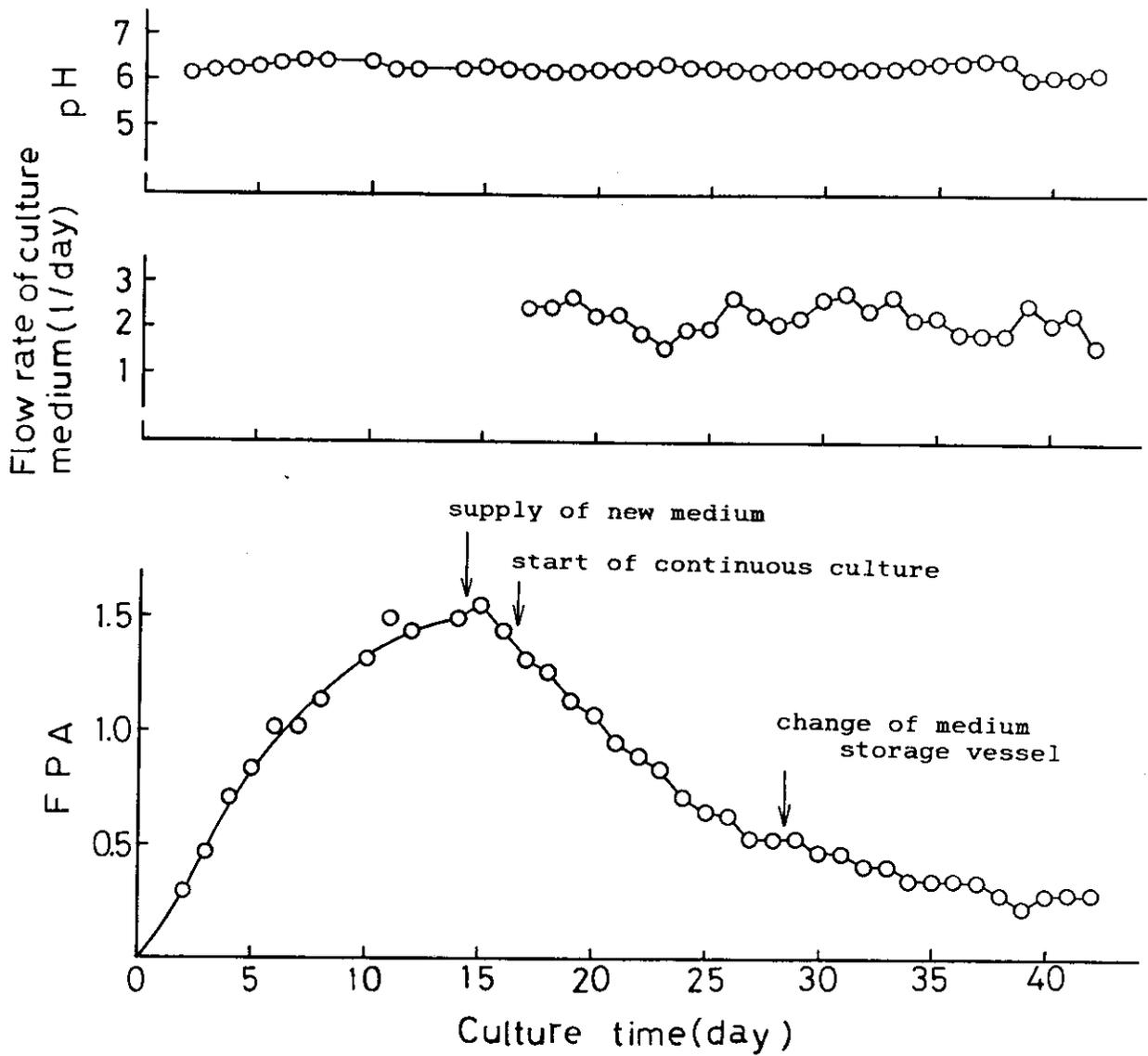


Fig. 14 Long-term culture with intact cells.
 Culture condition: stirring speed, 250 rpm;
 aeration rate, 4 l/min.

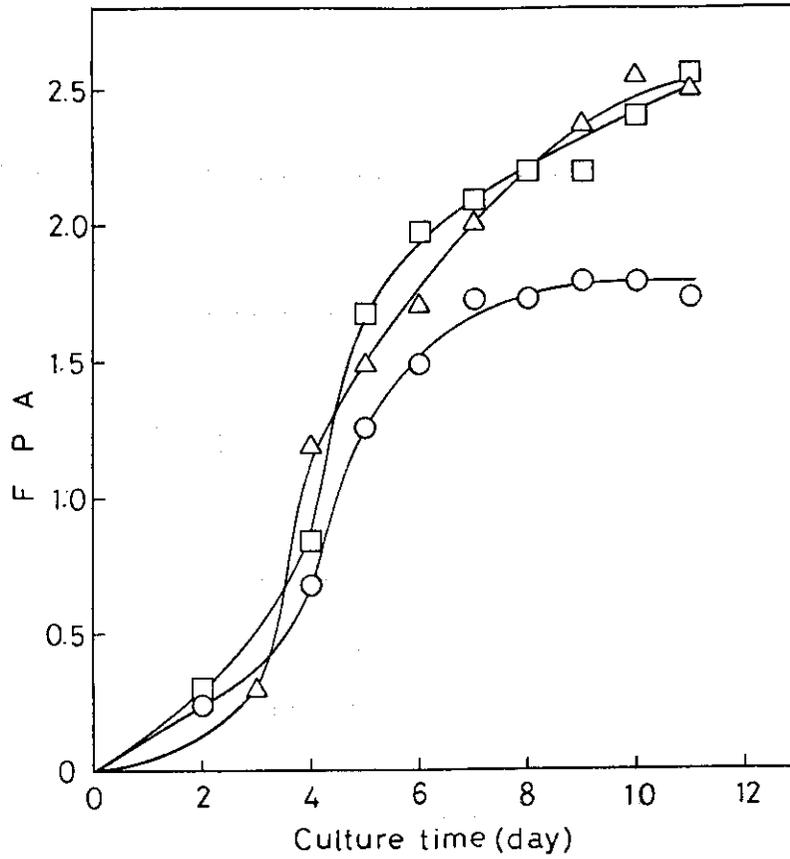


Fig. 15 Influence of aeration air flow rate.
 Aeration rate: \circ , 2 l/min; Δ , 4 l/min; \square , 8 l/min.
 Stirring speed: 250 rpm.

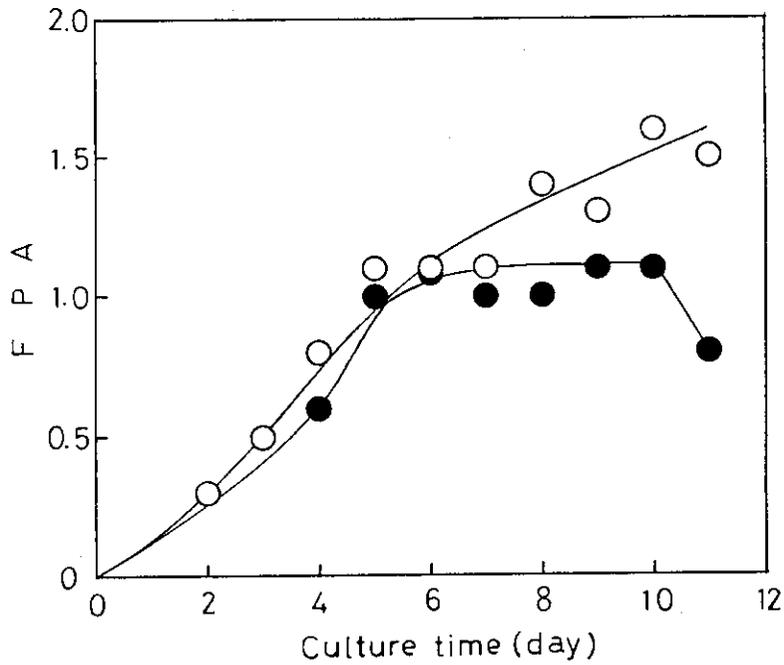


Fig. 16 Influence of stirring speed.
 Stirring speed: \circ , 250 rpm; \bullet , 500 rpm.
 Aeration rate: 4 l/min.