

糸状菌高密度培養でのフルゾーン[®]翼適用による改善効果

Improvement effect of applying Fullzone[®] impellers in high-density filamentous fungal cultivation

山上典之*・山部 芳*

Noriyuki Yamagami・Kaoru Yamabe

糸状菌の培養では、反応槽内が高密度・高粘度の状態になることが多い。培養が進むにつれて、従来のディスクタービン翼では攪拌流動状態が悪化する。その結果、十分な混合や酸素供給ができず、菌体の増殖及び活性が低下するという問題が発生することがある。高効率攪拌翼であるフルゾーン翼を用いて一般的な糸状菌の培養を行い、従来のディスクタービン翼と比較して高い菌体濃度および菌体活性が維持できることを確認した。

In the cultivation of filamentous fungi, the interior of the reactor often reaches a highly dense, highly viscous state. As cultivation progresses, the mixing flow conditions deteriorate with traditional disc turbine impellers. Consequently, adequate mixing and oxygen supply may not be achieved, leading to decreased mycelial growth and activity. This study confirmed that by using the highly efficient Fullzone impellers for the cultivation of common filamentous fungi, higher mycelial density and activity can be maintained compared to traditional disc turbine impellers.

Key Words :

高 密 度 培 養
攪 拌
糸 状 菌

high cell density cultures
mixing
filamentous fungi

まえがき

小型ジャーファーマンタ（10L以下）およびパイロットおよび大型培養槽（10L～100 m³規模）による微生物の培養では、一般的に低粘度で通気攪拌が行われ、ディスクタービン翼（DRT）による攪拌とスパー ज्याによる通気が多く用いられている。しかし、糸状菌の培養では高密度・高粘度の培養になることが多く、培養が進むにつれてDRTでは攪拌流動状態が悪化し、十分な混合や酸素供給ができなくなり、その結果、菌体の増殖及び活性が低下するという問題が発生する場合がある。この様な課題に対して糸状菌培養にフルゾーン翼（FZ）を用いることで攪拌状況が改善され生産性が向上した事例報告もあるが¹⁾、ただし攪拌翼形状に着目した報告は少ない。本稿では、一般的な糸状菌を用いて培養実証試験を行い、FZとDRTを比較することで、攪拌翼形状による溶存酸素濃度(DO)の変化や乾燥菌体濃度、菌体活性などの培養過程と結果の違いを確認した。

1. フルゾーン翼について

1.1 フルゾーン翼

FZは上下にそれぞれ異なる機能を持つ特殊ワイドパドルを立体的に組み合わせた形状の攪拌翼である（図1）。混合効率の向上や槽内全体に及ぶ大きな一つの循環流の形成を通じて広い粘度範囲で効率の良い均一混合をできるなど優れた攪拌性能をもつ²⁾³⁾。



図1 フルゾーン翼攪拌機

*プロセス機器事業部 技術部 攪拌設計室

1.2 FZのガス吸収性能

培養において、ガス吸収性能は重要な因子のひとつである。ガス吸収性能の測定は、次の方法により行った。まずテスト液にスパージャから窒素を通気して液中の酸素を置換した後、攪拌および通気しながらDOを測定し、次式にて液側物質移動係数(k_La)を算出した。

$$k_La = \frac{\ln(C_I - C_0) - \ln(C_I - C)}{t} \dots\dots\dots (1)$$

ここで

- C_I : ガス飽和溶解濃度
- C_0 : 初期ガス溶解濃度
- C : 任意の時刻におけるガス溶解濃度
- t : 任意の時刻

である。

またガス吸収性能の測定テストで使用したテスト装置の概略図は図2に示す。DOの測定には蛍光式溶存酸素計(WTW製 光学式DO電極FDO925型)を用いた。

図3にFZと2段DRTの水-空気系での k_La と単

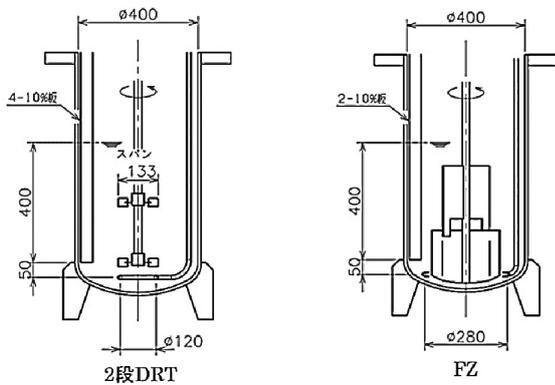


図2 テスト装置概略図

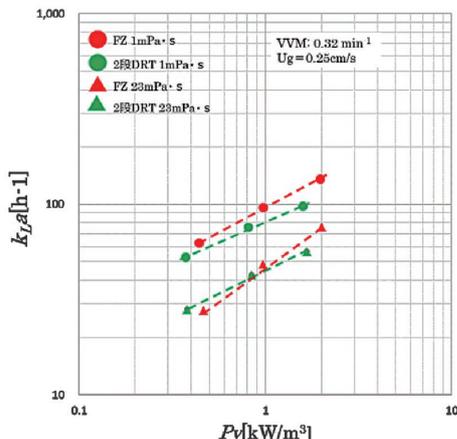


図3 FZおよび2段DRTのガス吸収性能比較

位体積当たりの攪拌動力(P_v)の関係を示す。

P_v が 1.0 kW/m^3 付近の領域において、FZでは2段DRTと同等程度の k_La が得られた。2段DRTは高いせん断力で気泡を微細化することで高い k_La を実現する攪拌翼である。一方FZは表面ガス吸収に極めて優れた性能を持っているため⁴⁾ 2段DRTと同等の k_La が得られたと考える。また同じ k_La での周速を評価すると、 k_La が 100 h^{-1} 程度ではDRTでは約 2.8 m/s 、FZでは約 2.0 m/s とFZは2段DRTにくらべ約30%低減できた。これによりせん断の影響が大きい培養系での適用が有効と考えられる。

2. 糸状菌培養実証試験

2.1 培養条件

使用する糸状菌には、ゲノム解析が行われており、標準的な糸状菌として知られる *Aspergillus oryzae* NBRC100959株を採用した。上記の糸状菌を表1に示す前培養液に植菌し、 30°C で3日間振とう培養を行った。本培養では初期仕込み量を 1.5 L とし、前培養液を 15 mL 添加した。培養槽内は 30°C に維持し、培養を開始した。また栄養源であるグルコースを培養開始24時間後から流加し、48時間(計72時間)流加培養を行った。

2.2 実験方法

図3に示すFZ(翼スパン:86 mm)、2段DRT(翼スパン:55 mm)をジャケット付透明ガラス製ジャーファーマンタ(内径143 mm 全容3 L)に取

表1 培養液の組成

前培養		
Glucose		3 g
KCL		0.2 g
KH_2PO_4		0.1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0.05 g
ハイポリペプトン		1 g
Yeast extract		0.5 g
イオン交換水		
		100 mL定容

本培養		
Glucose		45 g
KCL		3 g
KH_2PO_4		1.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0.75 g
ハイポリペプトン		15 g
Yeast extract		7.5 g
イオン交換水		
		1.5 L定容
+でんぷん(溶性)		150 g
+SI(消泡剤)		100 μL

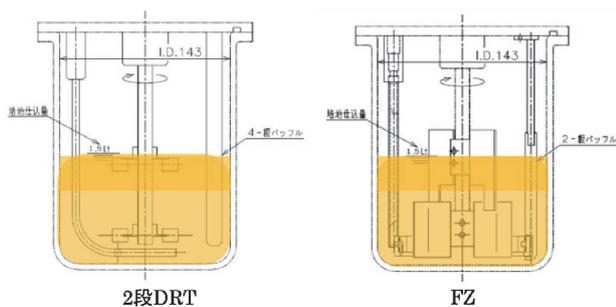


図3 テスト装置概要

付けた。また FZ には2枚の幅10 mm バッフルとリング型スパージャを取付け、2 段 DRT では4枚の幅13 mm バッフルと U 字型スパージャを取付けた。通気量は1.5 L/min (VVM: 1 min⁻¹, 空塔速度 (U_g): 0.31 cm/s), とし攪拌条件は両攪拌翼の培養初期での P_v が同等となる回転数を計算し, FZ では285 rpm, 2 段 DRT では475 rpm に設定した。また培養液は pH を5.5に制御し, DO を記録した。培養結果については培養液をサンプリングし, 菌体の乾燥菌体濃度およびジニトロサリチル酸法により遊離還元糖を定量する方法で培養上清の α-アミラーゼ濃度を測定し評価した。

3. 結果と考察

3.1 培養パラメータの比較

3.1.1 DO の比較

図4に培養中の DO 経時変化を示す。両翼とも培養開始12時間後までは DO が徐々に減少する。

FZ は12時間以降も培養が進行するにつれ, 徐々に DO が減少する傾向を示した。これは FZ では菌体濃度が高まり, 液粘度が上昇しても槽内全域を攪拌でき, 混合・ガス分散出来ているためと考えられる。一方 DRT では DO は不安定で, 特に培養開始後40時間程度で DO=0 程度を6時間示した。この2 段 DRT で DO が安定しない理由としては以下のことが考えられる。培養が進行するにつれ菌体濃度が上昇し, 非ニュートン流体に近い槽内状況となることで, 攪拌翼周辺のみ流動・攪拌し2 段 DRT 翼から離れた DO センサを設置している領域の流動性が悪くなったと考えられる。上記結果より FZ は, 菌体増殖に伴い液粘度が上昇した場合でも, 安定した培養液混合と酸素供給を可能にすると考えられる。

3.1.2 グルコース濃度の比較

図5に培養中のグルコース濃度変化を示す。本培養では栄養源であるグルコースを培養開始24時間後から流加した。両翼とも培養開始から24時間までは

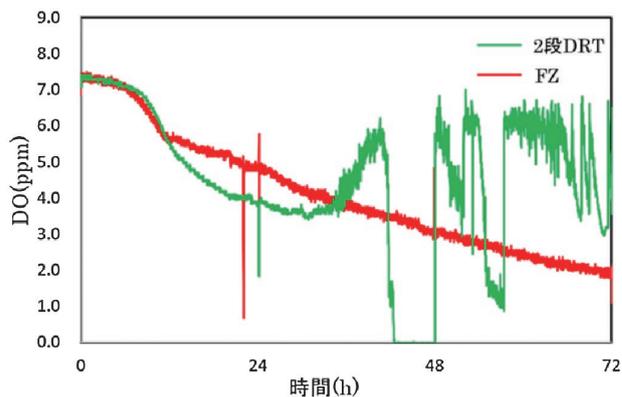


図4 DO の経時変化

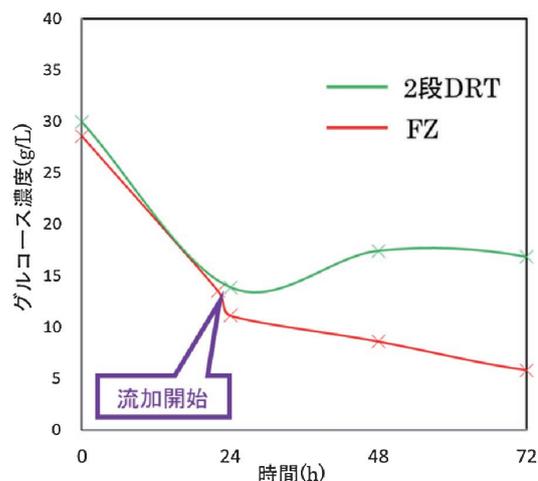


図5 グルコース濃度の経時変化

グルコース濃度が徐々に減少するが, その後は FZ でのみグルコース濃度がさらに減少し, 2 段 DRT では減少しない傾向が見られた。理由としては, 上述の様に培養が進行するにつれ菌体濃度が上昇し, 流動性が悪くなった結果, 糸状菌とグルコースの会合が不十分となり, グルコースを効率的に消費できていないためと推測する。一方 FZ では菌体増殖に伴い液粘度が上昇した場合でも, 安定的にグルコースを消費できていると考えられる。

3.2 菌体活性の比較

3.2.1 菌体形状および菌体直径の比較

サンプリングした培養液より菌体を採取し, 菌体直径の測定および菌体形状の観察を行った。図6に72時間後の菌体形状, 図7に菌体平均直径の経時変化を示す。各時間において, 2 段 DRT は FZ に比べて平均菌体直径が約1.5-2.5倍大きい結果となった。また2 段 DRT では菌体直径のばらつきが大きく, 72時間後の菌体直径は0.51-6.46 mm と最大と最小で5.95 mm の差があった。一方 FZ ではばらつきが小さく, 72時間後の菌体直径は0.86-2.17 mm と最大と最小で1.31 mm の差であった。さらに菌体直径



図6 培養開始72時間後での菌体形状
左写真：2段DRT 右写真：FZ

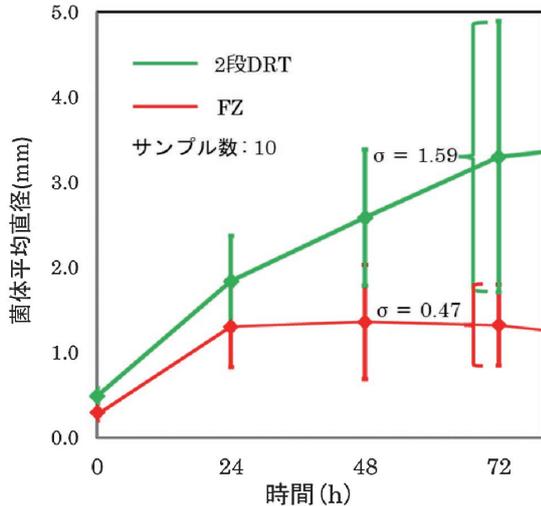


図7 菌体平均直径の経時変化

のばらつきを数値化するために、72時間後の菌体直径のばらつきを標準偏差 (σ) で表した。2段DRTでは1.59, FZでは0.47となり、FZを用いることで菌体直径のばらつきを約1/3に改善できると考えられる。

3.2.2 乾燥菌体濃度の比較

サンプリングした培養液を乾燥させ、乾燥物の重量から乾燥菌体濃度を算出した。図8に乾燥菌体濃度の経時変化を示す。培養開始48時間後の乾燥菌体濃度は2段DRTでは約14 g/L に対し、FZでは約17 g/L と約1.2倍多い結果となった。またグルコースを流加開始した24時間後から48時間後までの菌体増殖速度についてはDRTで0.32 dry-g/ (L・h) に対し、FZでは0.47 dry-g/ (L・h) と約1.4倍の速度となった。これは上記で述べたDOの経時変化およびグルコース濃度の変化とも関連していると推測される。2段DRTでは、24時間後から48時間後までのDOの挙動が不安定であり、またグルコース濃度が増加していることから、糸状菌が酸素およびグルコースを効率的に消費できていないと考えられる。一方FZでは、DOおよびグルコース濃度が菌体増殖に伴い減少しているため、糸状菌が酸素およびグルコースを効率的に消費できていることが示唆される。その結

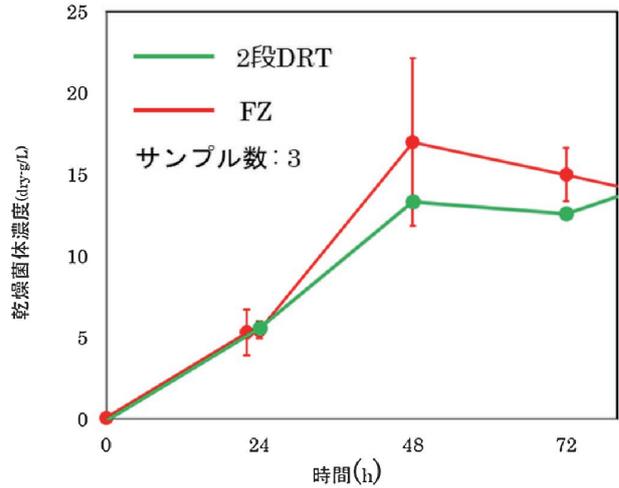


図8 乾燥菌体濃度の経時変化

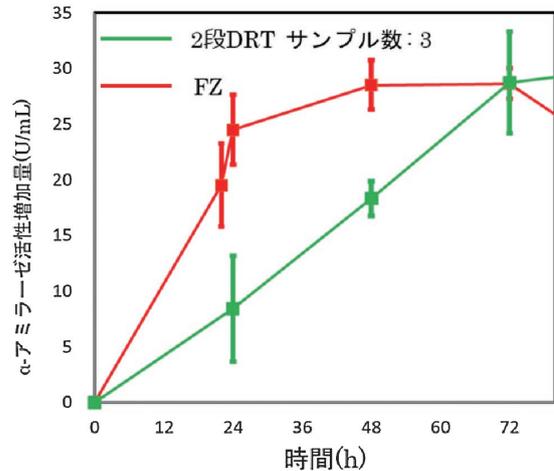


図9 α -アミラーゼ活性増加量の経時変化

果FZでは、2段DRTに比べて乾燥菌体濃度および菌体増殖速度が高くなったと考えられる。

3.2.3 α -アミラーゼ濃度増加量の比較

ジニトロサリチル酸法を用いて遊離還元糖を定量することで、培養上清中の α -アミラーゼ濃度を測定し評価した。図9に α -アミラーゼ活性増加量の経時変化を示す。なお試験によっては前培養時にすでに α -アミラーゼ活性が生じているケースもあるため、初期状態の差をなくすために、本培養開始時から各時間での α -アミラーゼ活性の増加量を評価した。

培養開始48時間後の α -アミラーゼ活性の増加量は、2段DRTでは18.3 U/mL に対し、FZでは28.5 U/mL と約1.5倍高い結果となった。また、2段DRTでは培養開始72時間後にFZと同程度の α -アミラーゼ活性を示したが、FZは48時間後ではその活性値に到達しており、FZを用いることで2段DRTに比べて培養時間を約30%短縮できると推測される。ま

た一般的に培地中にグルコースが存在すると、でんぷん分解酵素である α -アミラーゼ生産が抑制されることが知られている⁵⁾。そのため α -アミラーゼ活性の差についても、前述のグルコース濃度の変化が関連していると考えられる。2段 DRT では、グルコース流加開始後もグルコース濃度が減少せず、そのため2段 DRT では α -アミラーゼ活性の阻害が生じたと考えられる。一方 FZ では、グルコース流加後もグルコースを効率的に消費できており、 α -アミラーゼ活性を阻害することなく培養を進行できたと考えられる。

4. 今後の展望

培養プロセスでは、従来からガス吸収性能不足、混合性能不足、伝熱性能不足などの課題が指摘されている。さらに、菌体の代謝物や培養基質による発泡も問題であり、仕込み量の制限や菌体活性に影響を与える消泡剤の添加など、様々な問題が発生して

いる。今後当社の攪拌技術を用いてこれらの問題を改善できるよう、詳細な調査と改善策の検討を進めていきたい。

むすび

本稿では、一般的な糸状菌培養での攪拌翼の効果について紹介した。これらがユーザ各位の設備検討の参考になれば幸いである。最後に本稿の培養実証試験についてご協力いただいた Bio-energy 株式会社 濱真司様にこの紙面を借りて深くお礼申し上げる。

[参考文献]

- 1) 小林猛ほか, 生物化学工学 バイオプロセスの基礎と応用 2 版 東京化学同人 (2021) 7
- 2) 菊池雅彦ほか 神鋼パンテック技報 Vol.35 No.1 (1991)
- 3) 小林哲男 神鋼パンテック技報 Vol.38 No.2 (1994)
- 4) 今中照雄 神鋼パンテック技報 Vol.41 No.2 (1998)
- 5) Carlsen M. et al Influence of carbon source on alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae.*, Appl. Microbiol Biotechnol.,3,346-349 (2001)