

発泡体を用いた固体培養法による

α -アミラーゼの生産

Production of α -Amylase by The Solid-state Fermentation Using Urethane Foams as Carriers



技術開発本部
小林 哲 男
Tetsuo Kobayashi

The useful microbial enzyme like α -Amylase and Protease are produced by a solid-state fermentation and/or liquid fermentation. Solid-state fermentation by using molds and mycelia has been utilized to produce these enzymes.

Agricultural products like rice, soybean and wheat bran have been used as a solid-substrate. In these conventional solid-state cultivation method, therefore, it is difficult to perform on-line measurements and to separate enzymes from microorganisms.

In this paper a new effective cultivation method of *Aspergillus oryzae* was examined by using urethane foams carriers impregnated with liquid medium as a solid-substrate. Namely, the production of α -Amylase was studied by changing cultivation conditions such as the initial concentration of liquid medium, the moisture content and cultivation methods. As a results, we have obtained the α -Amylase up to 10 times as high activity as it is obtainable by submerged cultivation.

ま え が き

α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、レンニン、セルラーゼなど多くの有用酵素が微生物によって生産されている。このような酵素の生産方法は、液体培養法と固体培養法に大別することができる。液体培養法は深部培養にみられるように微生物を培養液中に分散生育させる操作方法で、菌体と栄養分(基質)は均一に分散させることが容易である。一方、固体培養法は、米、麦などの固体状の発酵原料表面に微生物を付着させて培養する操作方法で、菌体と基質の培養系内における分散は不均一となる。細菌による酵素生産の場合には、その品質管理が容易でpH、温度、溶存酸素濃度、基質濃度などが測定できるため培養条件の制御がしやすいなどの理由により、液体培養法が採用されている。しかし、カビ類による酵素生産の場合には、多種多様な酵素がバランス良く生産される、液体培養では生産あるいは分泌されない酵素が生産分泌されるなどの理由で、固体培養法が採用されている。固体培養法は主に食品(醤油、味噌、清酒、みりんなどの醸造物)、飼料、生合成用酵素などの前培養あるいは直接発酵生産に採用されている。

従来の固体培養法は、

- (1) 低含水率の環境下で培養するため、液体培養法と比較して細菌による雑菌汚染が起こりにくい。
- (2) 酵素を抽出するための溶剤が液体培養法と比較して少量ですみ、工程廃水も比較的小量である。
- (3) 通気などに要する動力費が比較的小さい。

などの利点がある。

しかし、その反面

- (1) 小麦ふすま、大豆粕などの天然農作物を固体培地として用いるため、培地組成の品質管理が困難。
- (2) 基質や酸素の物質移動過程、熱移動過程に問題がある。
- (3) 発酵過程の状態量の測定が困難である。
- (4) 抽出の過程で培地由来の不純物が混入し、分離・精

製工程が煩雑になる。

などの理由により、液体培養法と比較して、培養装置の大型化、自動化、連続操作化が著しく遅れた生産性の低い培養法となっている。

このような従来の固体培養法の問題点を解決するために、液体培地を含浸させた発泡体(ウレタンフォーム)を固体基質として用いる新規固体培養法、ならびに培養装置の開発を理化学研究所化学工学研究室(遠藤勲主任研究員)と共同で進めてきた。

発泡体培養法は、菌体を担体表層に付着固定化することにより、栄養分や酸素の移動過程を改善させ、微生物の代謝活性を向上させ、また、菌体をリアクター内に保持させたまま培養液を容易に引き抜くことができるため、連続操作化を可能とさせるという利点がある。既に、発泡体を菌体の付着担体とした発泡体浮遊培養法として、流動層型バイオリアクターを用いたカビ類による抗生物質の生産を行ってきた^{1),2)}。

ここでは、麴カビによる α -アミラーゼの生産を例に取り、液体培養法による酵素生産量と発泡体固体培養法による酵素生産量の比較を行った。発泡体担体へ含浸させる培地濃度、培地の含浸率、および、培養方式(静置、振盪、回転培養方法)などが酵素生産活性に及ぼす影響を検討した³⁾。

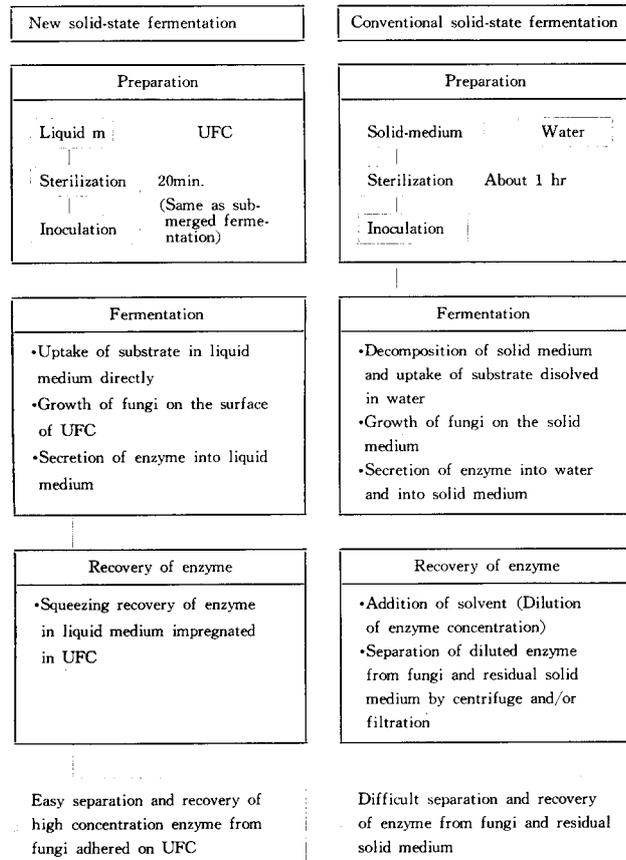
1. 発泡体固体培養技術

第1図に従来の固体培養法と発泡体を用いた新規固体培養法との比較を示す。発泡体培養法は従来の農作物を固体基質とした固体培養法と比較して、

- (1) 培地として合成液体培地を用いるので、培地組成を一定に保持することができ、液体培養法と同様な培地調整、殺菌操作が可能
- (2) 従来法では、菌体が分泌する酵素によって固体基質を可溶化し、初めて基質を菌体内に摂取できるが、発泡体固体培養法では液体培地中の基質を直接摂取することが可能であるため菌体の増殖が速くなり培養期間

第1図 新規発泡体固体培養法と従来法の比較

Fig. 1 Comparison of the new solid-state fermentation with urethane foam carriers (UFC) impregnated liquid medium and conventional one.



が短縮される。

- (3) 発泡体細孔内に菌体を付着固定化できるので、菌体を損傷させることなく担体の振盪・混合などの操作が可能となり、菌体と基質・酸素との接触を高め物質移動を促進できる。

- (4) 培養終了時には、発泡体担体を直接圧搾することにより濃厚な酵素液を回収することが可能

などの利点を有する。

固体培養法は、固体の取扱いが液体に比し著しく困難であること、固体表面部分のみが菌体増殖の場で全体としての培養効率が低い、また、分泌酵素の回収時に菌体と酵素液との分離が困難など、液体培養法と比較して多くの問題を有している。発泡体粒子を菌体の付着担体として用いる場合、基質成分を液体培地として担体に含浸させるので、菌体の増殖、酵素生産能力(生産活性)に及ぼす含浸培地濃度の影響を検討することが重要となる。また、担体に含浸させる液体培地量、および、菌体と基質や酸素の接触など物質移動を促進させる方式の設定が重要となる。ここでは、発泡体固体培養法の基本的な操作条件として培地濃度、液体培地の含浸量、および、振盪・混合などによる物質移動促進方式について、これらが麹カビの α -アミラーゼ生産活性に及ぼす影響を実験的に検討した。

Saccharose	30.0 g
Yeast extract	5.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
NaNO ₃	0.3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
Distilled water	1.0 ℓ

第1表
基本培地組成
(Czapek 培地)
Table 1
Basal medium
composition

2. 実験方法

1) 使用菌株

麹カビ (*Aspergillus oryzae* var. *brunneus* (JCM 2058))

2) 使用培地

Czapeck 培地 (第1表に基本培地組成を示す。)

3) 使用発泡体

10 mm 角 (日東電工製, 土壤用PMウレタンフォーム)

4) 培養温度 25 °C

5) 測定方法

(1) pH

発泡体含浸培養液の絞りを pH ガラス電極にて測定

(2) 糖濃度

0.45 μ m メンブレンフィルターで濾過後, HPLC (Column; Shodex Ionpak KS-801, Detector; RI) で測定

(3) 菌体量

菌体付着発泡体を蒸留水で洗浄後, 乾熱乾燥 (105 °C) 重量を測定し, 発泡体重量を差し引いて算出。

(4) α -Amylase 活性

ヨウ素-デンプン反応 (Blue-Value 法) により測定

0.2% アミロスを基質とし, pH 7.0 に調整後, 酵素液を添加, 40 °C, 30 min. で反応させ, ヨウ素-デンプン反応を行わせた後, 反応液の吸光度を 690 nm で測定した。酵素活性は, 青色ヨウ素呈色強度を 10% 低下せしめた 1 ml 中のアミロスの mg で定義し, 活性の単位は DB40 °C 30' mg-Amylase/ml で表示した。

6) 培養方法

(1) 液体振盪培養方法

100 ml-broth/500 ml-flask, 振盪条件, 200 rpm で培養

(2) 固体静置培養方法

500 ml-flask に所定の液体培地量, 2.5 g の発泡体を添加し, 25 °C のインキュベータ内で静置培養

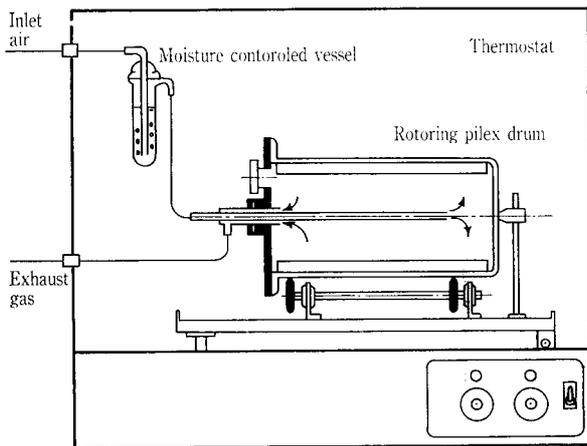
(3) 固体振盪培養方法

固体静置培養法と同様に仕込, 振盪条件, 200 rpm で培養

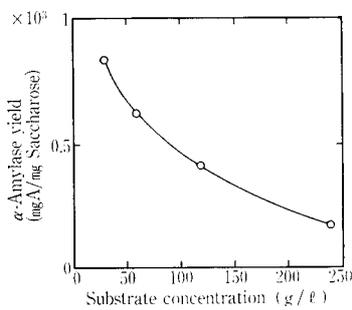
(4) 固体回転培養方法

ガラス製円筒 (直径 250 mm, 3.0 ℓ) に 120 g の発泡体と所定の液体培地を投入し, 25 °C の恒温槽内で, 回転数 45 rpm, 通気量 0.5 ℓ/min で培養

第2図に実験に用いた回転培養装置を示す。



第2図 固体回転培養実験装置
Fig. 2 Schematic flow diagram of bench scaled solid-rotating fermentor



第3図
含浸培地濃度の α -アミラーゼ生産収率に及ぼす影響
Fig. 3
Effect of the initial concentration of impregnated medium on α -Amylase yield

3. 実験結果および考察

3.1 培地濃度の酵素生産収率に及ぼす影響

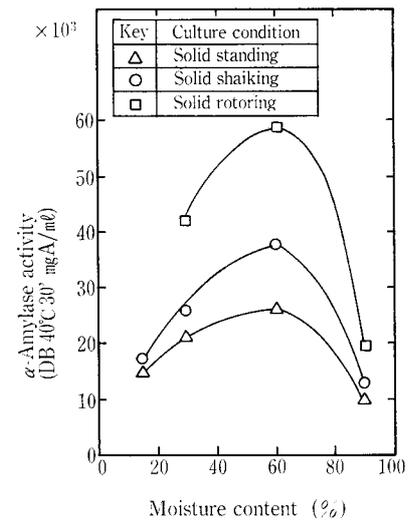
基本培地組成の糖濃度を30, 60, 120, 240 g/l (他の成分も比例的に増加)と変えて、含浸率を50%の条件で静置培養を行った。なお、含浸率は発泡体のかさ体積に対する含浸液体培地の体積割合として定義した。 α -アミラーゼ収率(添加糖量当たりの α -アミラーゼ活性)は、第3図に示すように糖濃度の増加に対して反比例的に減少し、糖濃度30 g/l以上では α -アミラーゼの生産過程に異化代謝抑制が作用していることが明らかとなった。以下の発泡体固体培養法の実験には糖濃度を30 g/lとした基本培地組成を用いて行った。

3.2 培地含浸率の酵素生産活性に及ぼす影響

糖濃度が30 g/lの Czapek 培地を、含浸率がそれぞれ15, 30, 60, 90%となるように発泡体に添加含浸させ静置培養を行った。その結果、第4図に示すように、含浸率が60%で α -アミラーゼ活性が最大となることが明らかとなった。基質の摂取、菌体の増殖、および、酵素分泌の代謝過程に最適な含浸率が存在することがわかった。以下の発泡体固体培養法では含浸率60%の条件で培養を行った。

3.3 培養方法の影響

カビ類による酵素生産においては、物質移動を促進させるために行う操作が増殖形態や酵素分泌などに大きな影響を与える。そこで、培地組成を等しくした液体振盪培養方法、固体静置培養方法、固体振盪培養方法、固体回転培養



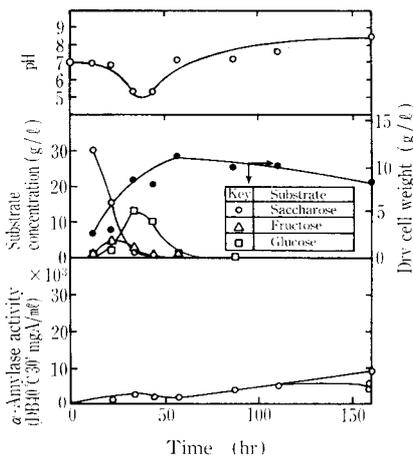
第4図 含浸率の α -アミラーゼ活性に及ぼす影響

Fig. 4 Effect of the moisture content on the α -Amylase activity

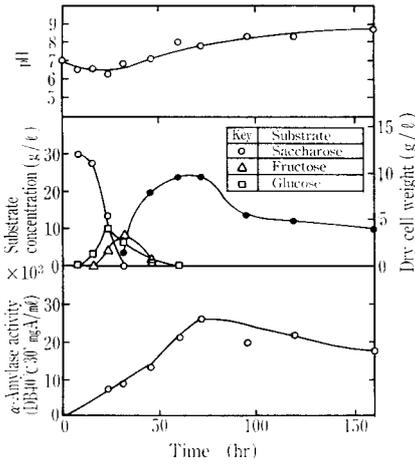
第2表 培養方法の α -アミラーゼ活性に及ぼす影響
Table 2 Effect of the cultivation method on α -Amylase activity

Cultivation method	α -Amylase activity (DB40°C30' mg-Amylase/ml)
Submerged	5 926
Solid-standing	26 667
Solid-shaking	37 778
Solid-rotoring	58 182

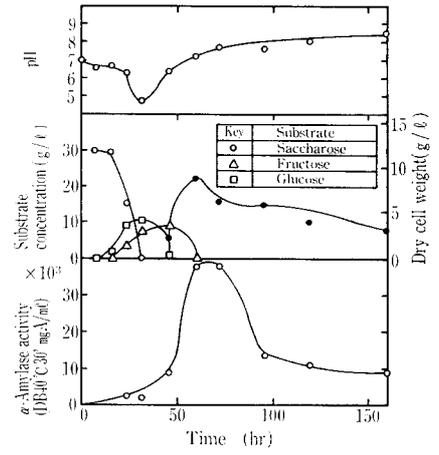
方法の各種培養方法で生産される α -アミラーゼの活性を比較検討した。第5~8図にそれぞれの培養経過結果を示す。なお、発泡体固体培養法は60%の含浸率、また、培地は基本培地組成を用いた。シュクロースはフラクトースとグルコースに分解され、培養開始後ほぼ48~72時間で消費し尽され、菌体の増殖が停止した。 α -アミラーゼ活性は糖の消費終了、菌体増殖の停止(減衰増殖期)時期に増大することがわかった。第2表に示すように α -アミラーゼ活性は、液体振盪培養方法<固体静置培養方法<固体振盪培養方法<固体回転培養方法の順に高くなり、酵素の分泌生産に関しては、固体培養法が有利となることが明らかとなった。液体振盪培養方法では、菌体は菌糸が塊状になるペレット増殖形態を示した。その結果、溶存酸素のペレット内菌体への移動が律速となり、 α -アミラーゼ活性発現が遅く、かつ、低くなったと考えられる。発泡体固体培養法では、 α -アミラーゼ生産活性の発現は培養方法で異なり、固体振盪培養方法、固体回転培養方法において生産活性が高くなった。これは、酸素供給条件の改善に伴って酵素生産活性が増加したものと考えられた。固体静置培養では、菌糸は発泡体表面外部に露出して増殖した。一方、固体振盪、固体回転培養では発泡体細孔内で菌糸が増殖し、振盪、混合による発泡体同士あるいは発泡体と反応



第5図 液体培養法における培養経過
Fig. 5 Time course of the submerged cultivation



第6図 固体静置培養法における培養経過
Fig. 6 Time course of the solid-standing cultivation



第7図 固体振盪培養法における培養経過
Fig. 7 Time course of the solid-shaking cultivation

器壁との衝突による菌糸の損傷は顕微鏡観察では認められなかった。

このように、発泡体表面で菌糸が増殖し、気相中の酸素の直接利用が可能で、回転混合操作により物質・熱移動が促進される。固体回転培養方法では、液体培養方法の約10倍、固体静置培養の約2.2倍の α -アミラーゼが生産されることがわかった。

4. まとめ

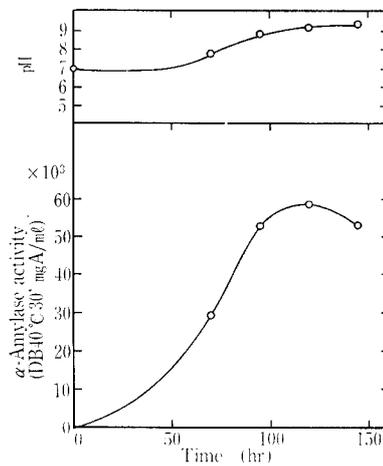
合成液体培地を発泡体担体に含浸させた固体基質を用いる発泡体固体培養法において、各種培養方法による麹カビによる α -アミラーゼ生産を検討した。その結果、酸素供給の優れた固体回転培養方法によって、液体培養法の10倍の α -アミラーゼが生産されることが明らかになった。発泡体固体培養法は、

- (1) 均質な培地の調整、滅菌操作が液体培養法と同じように容易にできる。
- (2) 菌体を発泡体に付着させたまま、容易に酵素液を分離回収することができる。
- (3) 振盪、回転混合することによって物質・熱移動を促進し、発泡体表面内に菌糸を損傷することなくほぼ均一に菌体を付着増殖させることができる。
- (4) 酸素を十分に供給でき、酵素生産活性を高めることが可能となる。

培養方法であることがわかった。

むすび

固体培養法は日本では、麹カビを利用する醸造技術に代表されるように数百年の歴史を持つ伝統技術として発達してきた。この数十年ほどの間に種麹製造などに用いられた木箱（こうじ蓋）による培養方法から機械的通气堆積培養法への転換が次第に進み、世界でも最も多く固体培養の工業技術の経験を持つ国になったといわれる^{4),5)}。固体培養法は、固体の取扱、菌体からの酵素分離に問題が多く残され、液体培養法のような自動化、連続化による生産性の向上が困難な培養法となっている。合成液体培地を柔軟で多



第8図 固体回転培養法における培養経過
Fig. 8 Time course of the solid-rotating cultivation

孔質な発泡体に含浸させた発泡体固体培養法は液体培養方法と固体培養法の長所を合わせ持つため、これらの問題点を解決し培養過程の監視、連続化、大型化を可能とする方法として期待できると思われる。

おわりに、本研究の遂行に当たりご指導いただいた理化学研究所化学工学研究室遠藤勲主任研究員、長棟輝行研究員に深謝するとともに、ご協力下さった当室関係者各位に感謝の意を表します。

〔参考文献〕

- 1) I. Endo et. al.: Bioprocess Engineering, Vol. 3, p. 63 (1988)
- 2) T. Nagamune et. al.: Bioprocess Engineering, Vol. 3, p. 173 (1988)
- 3) 小林哲男ほか: 化学工学協会第21回秋季大会講演要旨集p. 32 (1988)
- 4) R. E. Nudgett: "Solid-State Fermentation", Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Chapter 7, American Society for Microbiology (1986)
- 5) 日本発酵工学会編: バイオエンジニアリング p. 235 (1985), 日刊工業新聞社