

発泡体を用いた固体培養法による glucoamylase の半連続生産



技術開発本部
小林 哲 男
Tetsuo Kobayashi

Semi-continuous Production of Glucoamylase by the Solid-State Fermentation Using Urethane Foam as a Carrier

By using the soft and porous material of urethane foam as an immobilizing carrier (UFC), which was impregnated with a liquid medium, we have studied an effective solid-state cultivation system of *Aspergillus oryzae*.

The system was designed that the separation procedure of enzyme could be reduced only to squeeze of the UFC. Furthermore, it was found that the enzyme production activity of molds on the UFC remained after the squeeze, then enzyme produced repeatedly by feeding fresh liquid medium to the carriers. Namely, we have developed a semi-continuous production method of glucoamylase by feeding starch solution repeatedly and obtained about 5 times higher enzyme activity than by conventional wheat bran fermentation.

ま え が き

α -Amylase, glucoamylase, protease や S1nuclease などの有益な酵素は、主に固体培養法によって生産されている。しかし、従来の固体培養法には、

- (1) 農作物を固体培地とするため培地の品質を一定に保つことが困難
- (2) 培養過程の pH, 基質濃度や生産物濃度などの状態量の測定が困難
- (3) 固体培地由来の不純物の混入などによって、酵素の分離・精製が煩雑

などの理由で、従来のアミノ酸やアルコール発酵生産と比較して、装置の大型化、自動化および連続操作化などが遅れた生産性の低い培養方法となっている。

近年、これらの問題を解決する新しい培養方法として、

- (1) 通風堆積培養装置¹⁾, 回転式自動麹製造器²⁾ などによる酒, 味噌の麹生産の大量培養
- (2) 気・固流動培養装置によるエタノール生産, グルタチオン生産^{3),4)}

などの報告がある。これらは、酸素の物質移動また熱移動過程を改善し、培養装置の大型化、機械化を可能にするが、農作物を固体培地として用いる限り、培地の品質保証や酵素の分離・精製などに問題を残している。

筆者らは、従来の固体培養法の問題点を解決し、酵素の半連続生産を可能にするために、柔軟で多孔質な発泡体(ウレタンフォーム)に液体培地を含浸させたものを半固体培地とする新しい固体培養法を開発した。これは理化学研究所 化学工学研究室と共同で行ったもので、麹カビを用いた α -amylase の生産において液体培養法と比較して、約10倍の α -amylase が生産できることがわかった^{5),6),7)}。また、菌体が付着した発泡体を圧搾することによって、発泡体に含まれている酵素を含む培養液を容易に回収できること、さらに、圧搾後に液体培地を新たに供給することによって、増殖付着菌体の酵素生産活性を持続させ、引続き酵素生産が行えるという知見を得た⁸⁾。

ここでは、glucoamylase 生産麹カビを用いた小麦ふすまを固体培地とする従来法と発泡体固体培養法との比較検討

討、および発泡体固体培養法による glucoamylase の半連続生産について報告する⁹⁾。

1. 実験方法

1) 使用菌株

Aspergillus oryzae B-3 (天野製薬提供菌株)。

2) 使用担体

日東電工(株)製PMウレタン, 5 mm 角粒子を使用, 以下UFCと呼ぶ。

3) 使用培地

ふすま培地: 乾燥ふすま 10 g と 5 ml の蒸留水を 300 ml 容コニカルフラスコに投入, 121 °C, 70 min で滅菌したものを固体培地として用いた。このかさ容量は約 120 ml である。

発泡体固体: 種々の液体培地を検討し, 可溶性デンプンと Yeast Extract を主体とする培地を選定した。基本液体培地組成は, 可溶性デンプン 40 g/l, Yeast Extract 40 g/l, K_2HPO_4 10 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/l から構成される。発泡体 1 g 当たり 19 ml の液体培地を含浸させ, 121 °C, 20 min で滅菌したものを半固体培地として用いた。

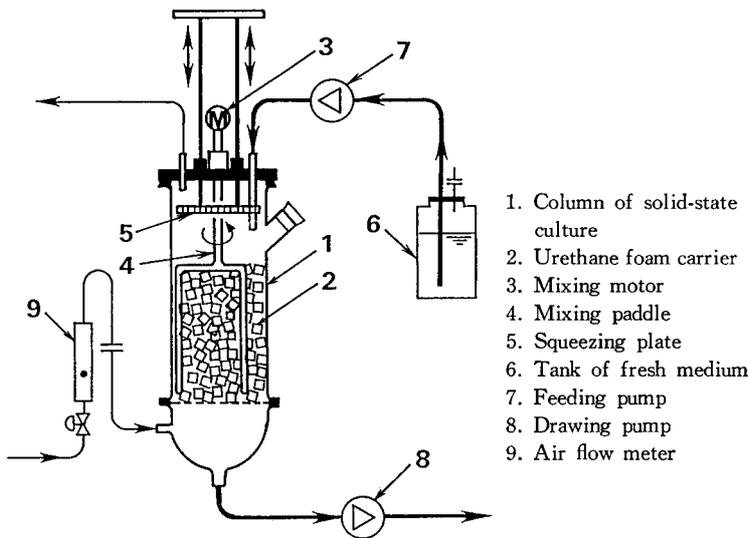
4) 植菌

300 ml 容コニカルフラスコに粉ふすま 10 g と 100 ml の蒸留水を投入し, pH を 4.5 に調製滅菌後, 胞子を 3 白金耳植菌し, 30 °C, 48 hr で培養を行った培養液を植菌液とした。

5) 培養方法

ふすま培養: ふすま培地に 2 ml の植菌液を投入し, 30 °C で 3 日間, その後, 28 °C で 2 日間静置培養を行った。

発泡体培養: ふすま培地と同じかさ容積 (120 ml) とするようになり, 2 g の UFC を 300 ml 容コニカルフラスコに仕込んだものに所定量の液体培地を含浸させ, 2 ml の植菌液を投



第1図 カラム型固体培養装置
Fig. 1 Column type of solid-state fermentor.

入し、30 °Cで静置培養を行った。反復回分培養法は、第1図に示したカラムテスト器にUFCを8g仕込み、所定量の液体培地を含浸させ、滅菌後、8mlの植菌液を投入し、30 °Cで培養を開始した。攪拌翼を回転数10 rpmで1時間に2~3 min、間欠運転した。通気量は10 Nℓ/hとした。回分培養を開始してから36時間後に、压榨板を用いて発泡体中含浸している酵素を含む培養液を所定量引抜き、同量の新鮮液体培地を供給した。その後は12時間毎に同様の引抜き、供給操作を繰返し行うことによって反復回分操作を行った。

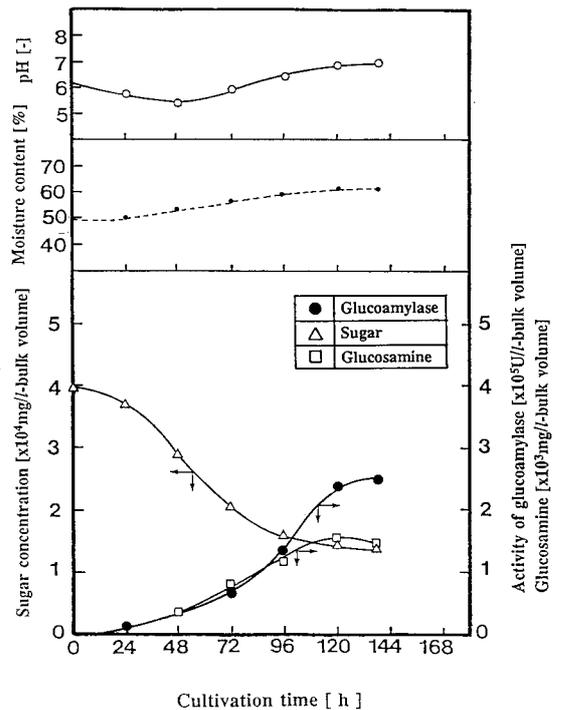
6) 分析方法

glucoamylase 活性 : UFCに含浸している培養液をそのまま酵素液として用いた。ふすま培養法では、試料重量の10倍の蒸留水を添加希釈後、ホモジナイザー (2500 rpm, 1 min) で混合し、その濾液を酵素液として使用した。酵素活性は、可溶性デンプンを基質とし、その5%溶液10mlに酵素液1mlを加え、40 °C, 30 minの反応条件下で10mgのブドウ糖を生成する酵素活性を1単位とした。glucoamylase 活性および糖量、菌体量は固体培地の単位かさ容積当りの活性、および濃度としてそれぞれ表示した。

糖量 : 試料を加水分解後、ペルトラン法で還元糖量として求めた。

菌体量 : 細胞の主要な構造多糖であるキチンを形成するグルコサミンを測定することにより換算菌体量として求めた。

含水率 : 試料重量と乾燥試料重量(105 °C, 48 hr)の差(蒸発水分量)を試料重量で除した値とした。



第2図 ふすま培養法の培養経過
Fig. 2 Time course of the cultivation by using wheat bran medium.

pH : glucoamylase 測定用酵素液をガラス電極法で測定した。

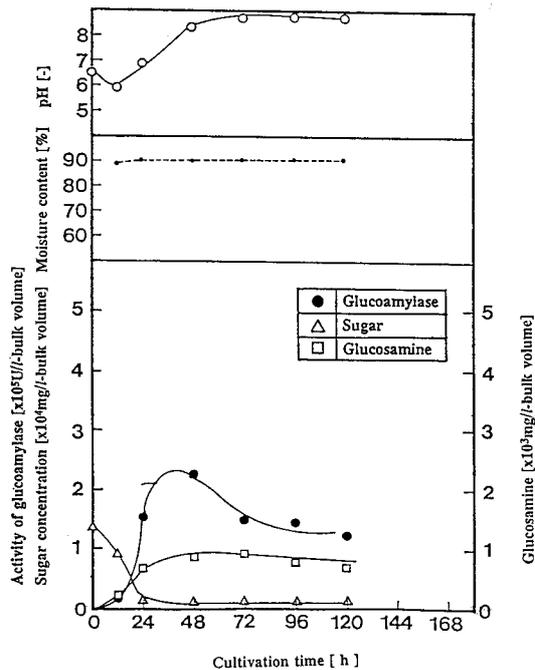
2. 回分培養結果および考察

2.1 酵素生産活性に及ぼす初期糖量の影響

従来法であるふすまを固体培地とした時の培養経過を第2図に示す。培養開始後、ふすまに含まれる糖は菌体の増殖にしたがって消費され、投入糖量の約1/5程度の糖を残したまま菌体増殖は停止した。glucoamylase 活性は、糖の消費が停止する培養開始後おおよそ5日目頃に最大となり約254000 U/ℓ-bulk volume が得られた。pHは糖の消費、菌体の増殖が優先する期間において5.5~6.0と低いが、glucoamylase 生産が優先する培養後期においては6.5~7.0と上昇した。また、糖の消費にしたがって含水率が45%から60%に増加する傾向にあるが、これは固形基質の酵素による分解、代謝過程によって炭酸ガスとともに水が生成する可溶性現象によるものと考えられた。このように固体培地を用いた場合、液体培養法と異なり菌体は固形基質と不均一な状態で培養されるため、糖の資化(消費)が遅く、糖が多く残るのが一般的である。

第3図に基本液体培地を含浸させたUFCを半固体培地とした時の培養経過を示す。培養開始後1日で糖はほとんど消費され、約1.5日で glucoamylase 活性が最大となり約233000 U/ℓ-bulk volume とふすま培養とほぼ同等の生産量が得られた。固形物であるふすま培養と異なり、基質が液体培地である発泡体培養法では、液体培地中の基質を直接接触することが可能となるため菌体の増殖が速くなり、培養期間が短縮されたと考えられる。

glucoamylase 生産活性に及ぼす初期液体培地濃度の影響を検討するため、基本培地の1, 2, 3, 4倍と濃度(投入培



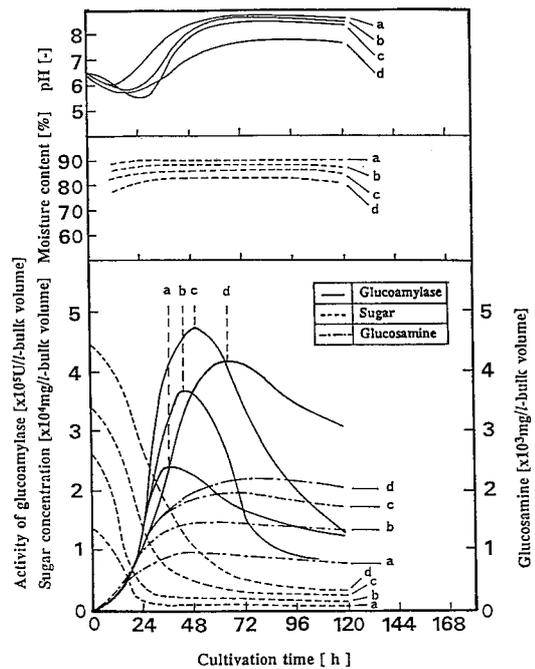
第3図 基本培地を用いた発泡体培養法の培養経過
Fig. 3 Time course of the UFC process by using basal medium.

地液量は等しい)を高めて回分培養を行った。それぞれの培養結果を第4図に示す。いずれの場合においても、培養開始後2~3日と短い培養期間で糖が消費され、最大酵素生産活性が得られることがわかった。pHはふすま培養と同様の傾向を示すが、やや高い値で推移した。また、含水率は初期濃度が高いほど、すなわち、溶解固形基質量が多くなるほど初期含水率は低くなるが、培養過程において82~90%と高い値で推移した。発泡体固体培養法はふすま培養と異なり培地が液体状であるため、基質の資化が容易で残存糖量はほとんど残らず消費されることから、酵素の分泌および基質消費後の自己消化による酵素活性の失活など代謝調節機構に変化が生じたと考えられる。

第5図に glucoamylase 活性および生産収率に及ぼす初期投入糖量の影響をふすま培養の結果と共に示す。投入糖量が34 000 mg/l-bulk volume の場合に従来法と比較して約2倍の最大 glucoamylase 活性が得られ、収率も1.5倍と高くなることがわかった。投入糖濃度が高い場合(基本培地の4倍)、酵素生産活性および生産収率ともに低下し、初期投入糖量が増大すると異化代謝産物抑制が働き、酵素生産活性が低下するものと考えられる。

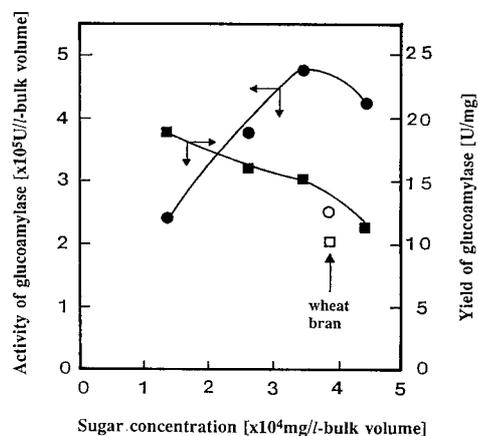
2. 2 酵素生産活性に及ぼす含浸率と初期糖量の影響

固体培養法における菌体の増殖、酵素生産活性は基質濃度などの他に固体培地の含水率の影響も大きく受ける。液体培地を含浸させる発泡体固体培養法においても、投入培地濃度と培地液量によって初期含水率は変化する。第6図に glucoamylase 生産活性に及ぼす初期含水率および投入糖量の影響を示す。ここでは、ふすま培養の酵素生産活性を1とする相対値(Pmax*)で酵素活性を表示した。図で示されるように、初期含水率が78~82%，初期糖量が30 000~35 000 mg/l-bulk volume で最大生産活性が得られることがわかった。この含浸液体培地量は、UFCの



第4図 Glucoamylase 活性に及ぼす初期糖量の影響
Fig. 4 Effect of the initial sugar concentration on glucoamylase activity.

Sugar concentration: a; basal medium, b; 2 times of basal medium, c; 3 times of basal medium, d; 4 times of basal medium

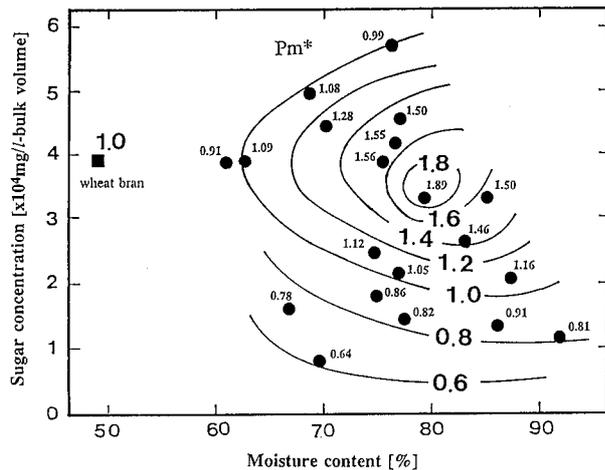


第5図 Glucoamylase 活性と生産収率に及ぼす初期糖量の影響
Fig. 5 Effect of the initial sugar concentration on the activity and yield of glucoamylase.

容積に対して約60%の含浸率に相当する。この以降の初期回分培養条件として、基本培地の3倍濃度の液体培地を19 ml/g-UFC(約80%含浸率)の割合で投入することとした。

3. 反復回分操作による酵素の半連続生産

通常の液体培養法における反復回分培養操作は、回分培養終了後、培養槽内に一定の増殖菌体を残して(植菌液とする)培養液を引き抜き、新鮮培地を投入して再び回分培養を繰り返す操作をいう。



第6図 含水率と初期糖量に対する glucoamylase 相対活性の等高線図
Fig. 6 Contour map of the relative glucoamylase activity, Pm^* , against the moisture content and sugar concentration.

著者らは、発泡体固体培養法において、第7図に示すように酵素生産が行われた後、UFCに付着増殖した菌体を培養槽内に残したままUFCを圧搾して酵素を含む培養液を回収し、同量の新鮮液体培地を供給することによって付着菌体の酵素生産活性を持続させ、繰り返し酵素生産を行う方法を採用した。反復回分培養時の酵素生産性を持続させるためには反復回分操作開始時期、反復供給培地濃度および組成などの培養条件を決定することが重要となる。

反復回分操作開始時期については、

- (1) 初期回分培養時の残存糖量が高く酵素生産活性が低い状態で反復回分培養に移行すると、酵素生産活性は低下する。
- (2) 初期回分培養時に糖が消費され尽くし、菌体の自己消化が始まる状態で反復回分培養に移行すると、酵素生産活性の立ち上がりは遅れ酵素生産量は減少する。
- (3) 初期回分培養で糖が消費され尽くす前の最大酵素生産速度が得られる時点で、反復回分培養に移行すれば高い生産活性が得られる。

ことを見いだした。初期投入糖量が基本培地の3倍の培地を使用する場合、培養開始から36時間後に反復回分培養を開始すれば高い酵素生産活性が持続できることを明らかにした。

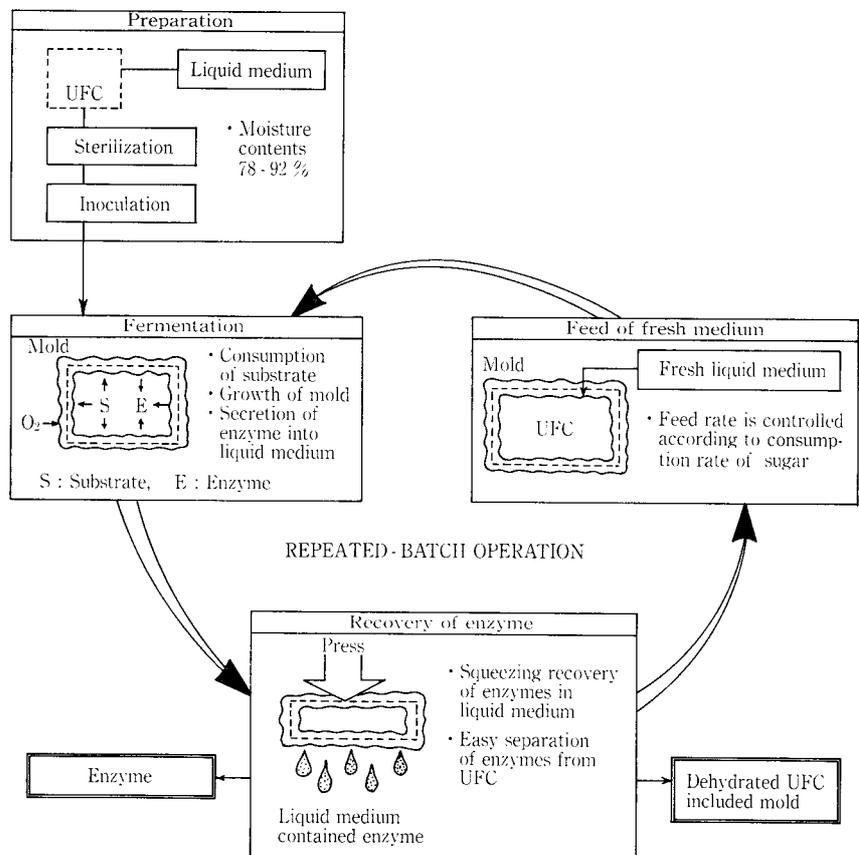
次に、反復回分操作以降の酵素生産活性に及ぼす供給培地組成の影響について検討した結果を示す。初期回分培養開始から

36時間後に、その時点での糖消費速度に見合うように供給培地糖量を決定した。供給培地として、可溶性デンプン濃度を100 g/l、Yeast Extractを0, 50, 100 g/lとした液体培地を12時間間隔で2.5 ml/g-UFCの割合で供給した。可溶性デンプンのみを反復供給した場合の結果を第8図に示し、第1表にこれらの培養結果を従来法のふすま培養の結果と共に示した。6回の反復回分培養操作を行ったところ、供給した糖は消費され、酵素生産活性が高く維持された。総 glucoamylase 活性(培養期間120時間における全回収酵素活性量)は約1 200 000 U/l-bulk volumeと大量に回収された。第1表に示すように、ふすま培養法と比較して同じ培養期間における回収酵素活性は4.7倍、対糖収率が2.5倍と高い生産性が得られることがわかった。Yeast Extractを含む供給培地の場合、酵素生産活性がやや減少する傾向となったが、これは、過剰のYeast Extractが分解されずにUFC内に残存し、結果として含水率が低下すること、増殖菌体が優先して増加することにより酵素の分泌が抑制されると考えられる。以上より、反復供給培地として可溶性デンプンのみでよいことが明らかとなった。

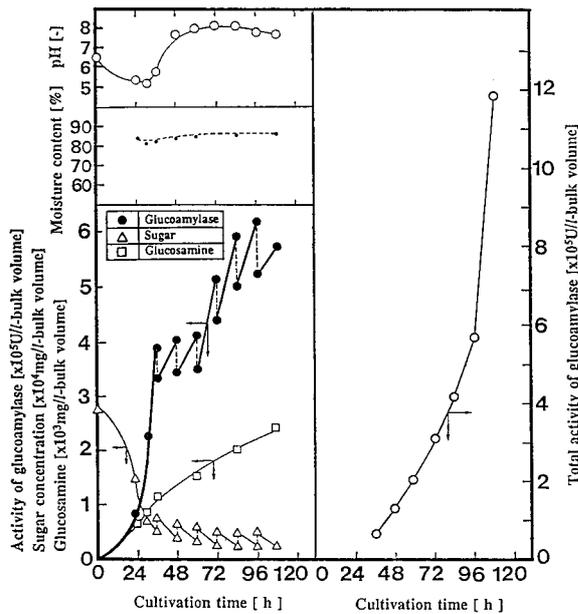
むすび

液体培地をUFCに含浸させたものを半固体培地とした発泡体固体培養法による glucoamylase の発酵生産を試み、次の結果を得た。

- 1) 回分培養操作において、glucoamylase 生産活性は、投入培地組成および含水率によって影響されることを明



第7図 発泡体培養法による半連続操作の概要図
Fig. 7 Schematic diagram of semi-continuous operation by the UFC process.



第8図 反復回分操作における培養経過
 Fig. 8 Time course of the repeated batch operation; Amount of liquid medium fed; 2.5 ml/g-UFC, Feed medium; Soluble starch 100 g/l.

らかにし、初期投入糖量を 30 000~35 000 mg/g-bulk volume, 含水率を 78-82 % とすることにより最大酵素生産活性が得られる。

- 2) 初期回分操作後期の糖消費速度に見合う新鮮培地の繰返し供給による反復回分操作を行うことによって、従来法と比較し、約 5 倍の glucoamylase 生産活性、2.5 倍の対糖収率を得ることができる。
- 3) 生産性の向上のほかに、発泡体固体培養法では液体培地を用いるため、液体培養法と同じように均質な培地調整、滅菌操作が容易となる。
- 4) 分泌酵素液を反応器より容易に回収することができ、回収・新鮮培地の供給という反復回分操作によって効率的な酵素の半連続的生産が可能となる。

このように、液体培養法と固体培養法の長所を持ち合わせた発泡体固体培養法は種々の有用酵素を生産するための新しい固体培養プロセスを提供できるものと考えられる。

第 1 表 発泡体培養法とふすま培養法による glucoamylase 生産の比較

Table 1 Comparison of glucoamylase production of the UFC process with conventional wheat bran fermentation.

	Repeated-batch operation by UFC process. Composition of medium (starch/yeast)			Conventional wheat bran fermentation Batch operation
	100/0 [g/l]	100/50 [g/l]	100/100 [g/l]	
Total production amount of glucoamylase [U/l-bulk volume]	1 189 400 (4.70)	1 080 700 (4.25)	1 069 140 (4.21)	254 170 (1.0)
Total amount feed sugar [mg/l-bulk volume]	51 600 (1.3)	516 000 (1.3)	51 600 (1.3)	39 180 (1.0)
Total amount of sugar consumed [mg/l-bulk volume]	45 810 (1.89)	47 430 (1.96)	45 300 (1.87)	24 200 (1.0)
Yield of glucoamylase [U/mg]	25.96 (2.47)	22.79 (2.17)	23.60 (2.25)	10.50 (1.0)
Amount of glucosamine [mg/l-bulk volume]	2 900 (1.74)	2 850 (1.71)	3 070 (1.84)	1,670 (1.0)
Average moisture content [%]	84-86	82-84	80-82	55-60

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共に、ご協力下さった当研究室の関係各位に感謝の意を表します。

〔参考文献〕

- 1) Nunokawa, Y.: "Sake" in Rice; Chemistry and Technology, American Society of Cereal Chemists, St. Paul, pp. 449-487 (1972)
- 2) Toyama, N.: Biotechnol. Bioeng. Symp., Vol. 6, p. 207 (1976)
- 3) Bauer, W.: C. J. of Chem. Eng., Vol. 64, p. 561 (1986)
- 4) Röttenbacher, L., M Schößler and W. Bauer: Bioprocess Engineering, Vol. 2, p. 25-31 (1987)
- 5) 長棟輝行, 小林哲男, 西村実, 遠藤勲: 第 8 回発泡体培養技術研究会講演要旨集, p. 1 (1988)
- 6) 小林哲男, 西村実, 長棟輝行, 遠藤勲: 化学工学協会第 21 回秋期大会講演要旨集, p. 32 (1988)
- 7) 小林哲男: 神鋼パンテック技報, Vol. 33, p. 10 (1989)
- 8) 小林哲男, 角田勝二, 加養知義, 長棟輝行, 遠藤勲: 第 9 回発泡体培養技術研究会講演要旨集, p. 1 (1989)
- 9) 小林哲男, 角田勝二, 遠藤勲: 化学工学会第 22 回秋期大会講演要旨集, p. 457 (1989)