

# Aspergillus niger を用いた曝気培養による アミラーゼの生産性に及ぼす不溶性高分子粒子の添加の影響

宮原 敏郎・永谷 尚紀・三井 亮司\*・田中 三男\*

岡山理科大学工学部バイオ・応用化学科

\*岡山理科大学理学部生物化学科

(2009年9月9日受付、2009年11月5日受理)

## 緒言

人間は微生物の存在を知らない時代から、発酵食品を生活に取り入れる事により、その能力を利用してきた。存在が明らかになってからは、盛んに研究され、人間にとって有用な物質の生産も行われるようになった。その一例として、コウジカビが挙げられる。コウジカビは澱粉をブドウ糖に、蛋白質をアミノ酸に分解する性質が強く、また種によっては、効果的に脂肪を分解吸収するので、古くから、酒、味噌、醤油および饅頭等の発酵食品の製造に利用されている。

*Aspergillus niger* (黒コウジカビ) は自然界の常在真菌であり、食品を腐敗させる代表的な菌である。しかし同時に、古くから産業用酵素の製造に使用されてきた。この *Aspergillus niger* の培養液からは、 $\alpha$ -アミラーゼやグルコアミラーゼ等の酵素が得られる。 $\alpha$ -アミラーゼは、アミロースやアミロペクチン等の $\alpha$ -1,4グルコシド結合を任意の位置で加水分解し、デキストリンやオリゴ糖の生成反応を触媒するため、食品分野では、加工助剤として澱粉の液化に使用されている。また、グルコアミラーゼは、アミロースやアミロペクチン等の $\alpha$ -1,4、 $\alpha$ -1,6グルコシド結合を、非還元末端からブドウ糖単位で加水分解する反応を触媒する酵素で、澱粉工場にてブドウ糖の製造に用いられている。これらの糖類は、酸分解法によっても得られるが、副産物が多い。そこで、食品工業では、酵素分解法が行われる。酵素の生産は、微生物培養によって得られるが、培養条件により必ずしも高効率生産が難しい。一方、*Aspergillus niger* の振盪培養の際、不溶性高分子粒子を培養液に添加し、不溶性高分子粒子の添加量が適量であると、アミラーゼの生産量が增大することが確認されている(Mitsui *et al.*, 2009)。

そこで本研究では、振盪培養での結果を踏まえ、 $\alpha$ -アミラーゼやグルコアミラーゼを高分泌生産する *Aspergillus niger* の曝気培養の際、不溶性高分子粒子の培養液への添加のアミラーゼ生産性への影響を実験的

に検討する事を目的とする。

## 1. 実験装置と方法

### 1-1 実験装置

曝気培養の実験装置の概要をFigure 1に示す。装置は、Compressor, Air filter, Pressure regulator, Flow meter, Water bath, Saturator, ReactorおよびDO meterにより構成される。Reactorの内径は10 cm, 高さは26 cmである。

まず、Water bathでReactor内の培養液の温度を28°Cに調節し、Compressorから空気を供給し、Air filterを通し清浄空気とした。その後、Pressure regulatorで圧力調整し、Flow meterで流量を計測し、Saturatorに通し湿度および温度を調節した後、ReactorにG1 filterを通して培養液中に気泡として分散し、無菌的に培養を行った。ここで、Reactorでの空塔ガス速度 $U_G$ は、予備実験から得られた最適値 $U_G = 1.06$  mm/sである(Miyahara *et al.*, 2007)。また、Reactor内の液量は、不溶性高分子粒子を含めて、全体積は1300 cm<sup>3</sup>である。

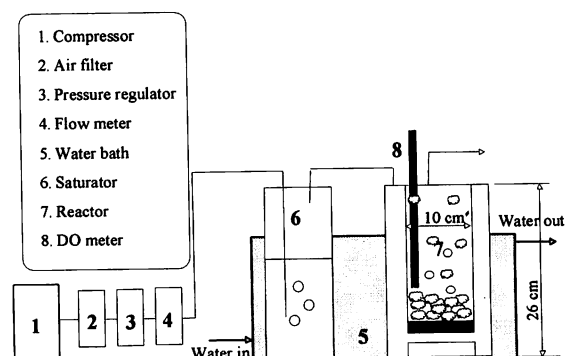


Fig. 1 Experimental Apparatus

### 1-2 菌体、培養液および不溶性高分子粒子

使用菌体は *Aspergillus niger* である。使用培地成分は Table 1 に示すものを用いた。菌体培養のための炭素源

としては、可溶性澱粉(Starch, Soluble(和光純薬工業(株)製))を使用した。本実験の最大目的である添加する不溶性高分子粒子は、ポリスチレン粒子(粒子径2.38–2.83 mm, 平均粒子径2.6 mm, 密度1.01 g/cm<sup>3</sup>)である。これはパール重合で得られたポリスチレン粒子を篩分けしたものである。

Table 1 Components of culture medium

Casamino acid	1.0 g/l	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5.0 mg/l
Urea	0.3 g/l	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.6 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 g/l	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1.4 mg/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.4 g/l	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	4.0 mg/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.3 g/l	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.4 g/l

### 1-3 培養培地の調製と培養方法

試験管にTable 1に示す培地成分と、予め逆浸透法で得た純水に溶解させた1.0 (w/v)%可溶性澱粉を炭素源として加えた。さらに、1.5 (w/v)%の寒天を溶解させ、オートクレーブで滅菌処理し、試験管に22 cm<sup>3</sup>加えスラント培地とした。このスラント培地に *Aspergillus niger* を植菌し、1週間、28 °Cで培養した。

スラント培地で培養した菌体を滅菌食塩水(0.85 % NaCl水溶液)6 cm<sup>3</sup>に懸濁させ、50倍希釈した後、λ = 610 nmで吸光度を測定し、Optical density (O.D.) = 0.1になる菌体量を求め、前培養培地を130 cm<sup>3</sup>となるよう調製した。

この前培養培地およびFig. 1の実験装置で使用する本培養培地1170 cm<sup>3</sup>(添加粒子を含めて)を作成する際、炭素源としての澱粉濃度は1.0 (w/v)%であり、Table 1のUreaは培地をpH3.8に調整し、オートクレーブ(121 °C, 20 min)で滅菌処理の後、殺菌灯により滅菌し加えた。これはUreaが熱により分解し、pH調整に影響するためである。

*Aspergillus niger*の増殖活性を高めるため、前培養培地を28 °C, 105 strokes/minの条件下で2日間振盪培養した。その後、Ureaを除いた本培養培地(1160 cm<sup>3</sup>)を作成し、ポリスチレン粒子を所定量加え、オートクレーブで滅菌処理し、クリーンベンチ内で自然冷却する。その後、純水(10 cm<sup>3</sup>)にUreaを溶解し、本培養地に加え全液量を1170 cm<sup>3</sup>とする。この本培養培地から粒子体積分に相当する培地を抜き取り、前培養培地を全量加え、粒子を含めて全体積を1300 cm<sup>3</sup>とした。

以上で得られた本培養培地をFig. 1の実験装置で、空塔ガス速度  $U_G = 1.06$  mm/s, 28 °Cの条件下で10日間前後曝気培養を行った。培養開始より24時間毎にサンプリングし、フィルターを過し、酵素溶液とした。サンプリングと同時に、pHとDO(溶存酸素濃度)の測定

をした。

### 1-4 酵素活性の測定

グルコアミラーゼ活性は、標準物質としてグルコースを使用し、Somogyi-Nelson法で、波長λ = 650 nmでの吸光度から定量した。α-アミラーゼ活性はBlue-Value法にて、波長λ = 660 nmでの吸光度から定量した。ただし、α-アミラーゼ活性は、1 cm<sup>3</sup>の酵素溶液が0.5 (w/v)%澱粉溶液2 cm<sup>3</sup>に含まれる澱粉量を1時間で半減させる活性を1 unitと定義する。

## 2. 結果と考察

### 2-1 pHと溶存酸素濃度の経時変化

初期pHを3.8に設定し、培養培地中の粒子ホールドアップをパラメーターとしたpHの経時変化をFigure 2に示す。pHは培養初期に低下し、30分を過ぎた辺りから徐々に増加し、その後増加の程度が大きくなるが、培養終了時付近ではほぼ一定値になっている。図より、粒子ホールドアップの影響はほとんど見られない。

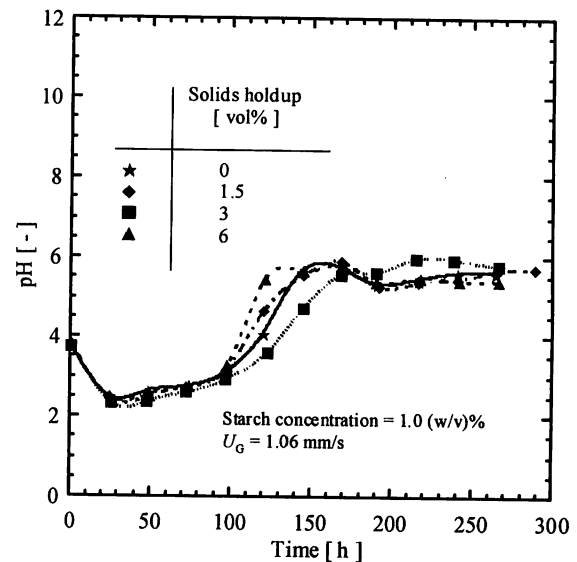


Fig. 2 Time course of pH

Figure 3は溶存酸素濃度(DO)の経時変化を示したものである。この種の培養中の培地内の溶存酸素濃度の測定例はあまり公表されていない。この場合、特に顕著な現象は、培養初期30時間辺りに溶存酸素濃度の最小値が見られることである。この時間はFigure 2でのpHの増加し始める時間とほぼ対応している。これはおそらく培養初期に菌体の激しい増殖が起こり、曝気による酸素供給が不足しているためと推測される。しかし、その後急激に溶存酸素濃度は増加し、ほぼ一定値を呈

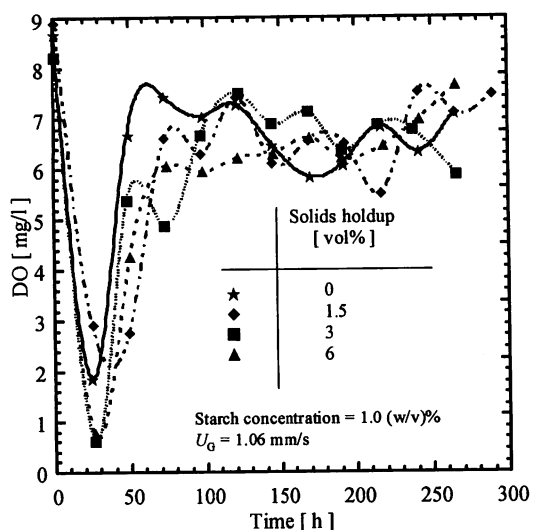


Fig. 3 Time course of dissolved oxygen concentration

している。粒子ホールドアップが3 vol%の場合、培養初期でのDO値が最も低下している。粒子を添加した影響がこの辺りにあろうことが推察される。

## 2-2 アミラーゼ活性

Figure 4に、Blue-Value法で定量した $\alpha$ -アミラーゼ活性値の経時変化を示す。図より活性値はFigure 2に見られるpHの増加とともに増加し、その最大値は培養時間がおおよそ150時間程度で見られる。粒子ホールドアップ3 vol%の場合活性の発現が最も早い。しかしその最

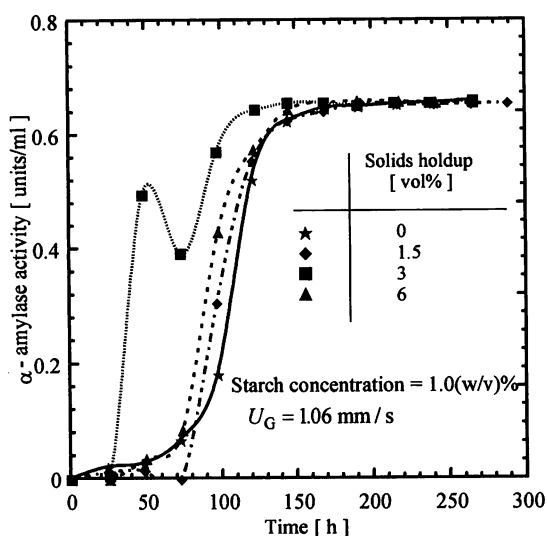


Fig. 4 Time course of  $\alpha$ -amylase production

大値には、粒子ホールドアップの影響はほとんど認められない。他の粒子ホールドアップの場合にも、活性

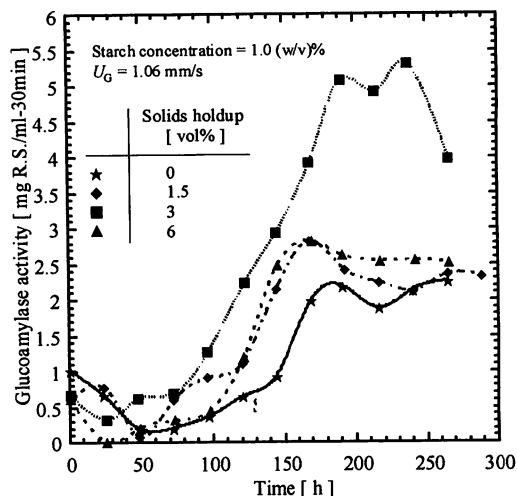


Fig. 5 Time course of glucoamylase production

の発現時間は、その値に大小はあるものの、培養30時間辺りである。これもFigure 2に見られるpHの増加する時間とほぼ合致している。

Figure 5より、グルコアミラーゼ活性は $\alpha$ -アミラーゼ活性と同様、Figure 2に見られるpHの増加とともに増加している。その最大値は200時間前後の培養時間で得られている。粒子ホールドアップの影響が顕著に見られる。図より粒子を添加すると、本実験範囲内では、グルコアミラーゼの生産性は良い。特に、粒子ホールドアップが3 vol%の時最大の活性値が得られている。その最大活性値はおおよそ5.5 mg R.S./ml/30 minと振盪培養で本実験と同じ不溶性高分子粒子を6 vol%添加した場合の最大値3.5 mg R.S./ml/30 min (Mitsui *et al.*, 2009) より大きい。これは通気によるReactor内の液流れと粒子添加による剪断力の増加によるフロックの形成が阻害されることおよび生じたフロックの細分化が曝気培養では振盪培養と比較して顕著であることによると考えられる。

以上の結果を粒子添加と無添加の場合のグルコアミラーゼ活性値の最大値の比を粒子ホールドアップに対して点綴したのがFigure 6である。図より粒子を添加すると、無添加の場合と比較して、活性値は大きくなるが、添加する粒子ホールドアップには最適値が存在し、その値はおおよそ3 vol%である。この値を液の剪断力に大きく影響する培養液全体積（粒子を含む）に対する粒子表面積を求めてみるとおおよそ0.7  $\text{cm}^{-1}$ であり、振盪培養での0.8–1.4  $\text{cm}^{-1}$  (Mitsui *et al.*, 2009)の値と似通った値となる。この粒子ホールドアップの時のグルコアミラーゼ活性値の最大値は、粒子無添加の場合と比較して、おおよそ2.5倍程度となっている。

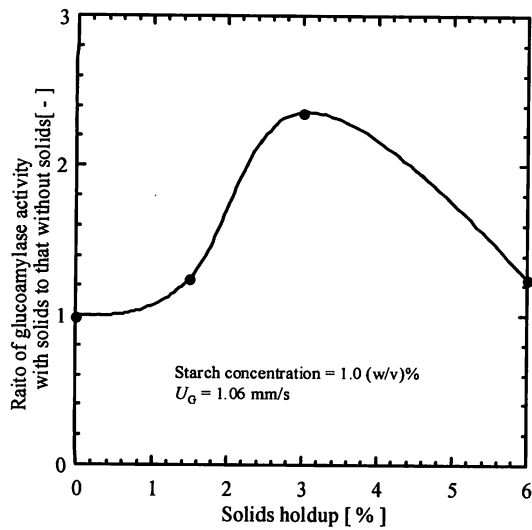


Fig. 6 Effect of solids holdup on glucoamylase activity

#### 結言

*Aspergillus niger*を用いて曝気培養を行い、培地に不

溶性高分子粒子を添加すると、 $\alpha$ -アミラーゼの発現は培養時間の早い時に起こり、グルコアミラーゼは粒子添加により大きくなる。またその程度は振盪培養の場合より効果大きい。これは通気によるReactor内の液流れによる攪拌および粒子添加による固体表面の増大に伴う剪断力の増加により、培養時に生成するフロックの生成阻害と生成したフロックの細分化に起因すると考えられる。

#### References

- Miyahara, T., N. Nagatani, Y. Kawakami, K. Hoshino, M. Tanaka and R. Mitsui, "Amylase Production in Liquid Culture with Aeration by *Aspergillus Niger*," OUS Forum 2007, Okayama, Japan, Abstracts (Japanese), p.11 (2007)
- Mitsui, R., K. Tamura, T. Miyahara and M. Tanaka, "Effect of Insoluble Polymer Particles Added into Culture Liquid on Enzyme Production by Mold," *The Bulletin of Okayama University of Science*, No.45A (2009) in press

## Effect of Addition of Insoluble Polymer Particles on Amylase Production in Liquid Culture with Aeration by *Aspergillus Niger*

Toshiro MIYAHARA, Naoki NAGATANI, Ryoji MITSUI\* and Mitsuo TANAKA\*

*Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty of Engineering,*

*\*Department of Biochemistry, Faculty of Science*

*Okayama University of Science,*

*1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama-shi, Okayama 700-0005, Japan*

(Received September 9, 2009; accepted November 5, 2009)

Experiments were performed to investigate the effect of addition of insoluble polymer particles (polystyrene particle, mean diameter 2.6 mm) on amylase production in liquid culture with aeration by *Aspergillus niger*. The findings showed that the highest effect of addition of particles was around 0.03 of solids holdup, leading to around  $0.7 \text{ cm}^{-1}$  of specific surface area (ratio of total surface area of particles added to total volume of culture liquid and particles added). This value stands comparison with that for shaking culture ( $0.8\text{--}1.4 \text{ cm}^{-1}$ ). The most positive effect of around 0.03 of solids holdup is probably due to the inhibition of formation of flocks and the fragmentation of flocks based on the shear stress between liquid and particle surface and the agitation of culture liquid induced by gas flow.

**Keywords:** *Aspergillus niger*; amylase production; insoluble polymer particle; aeration.