

半固体基質培養によるミカン外皮分解酵素の生産

(広大工・醗酵)・田井 潔, 西尾尚道, 林 光則, 永井史郎

1. 目的 半固体基質培養は、醸造工業などで実施されているが、その方法は、経験的な手法に依存することが多く培養工学的な立場からの研究は比較的少ない。その主な原因の一つは、半固体基質培養では、基質が固体状であり、主としてその表面で微生物が増殖するため増殖経過を経時的に把握することが困難であるためと考えられる。本研究では、糸状菌体のグルコサミン含量がほぼ一定であることに着目して菌体量を測定すると同時に呼吸速度を基準にして、間接的に I_{O_2} 値より菌体量を推測する方法を検討した。次に、ミカン外皮は、大量に産出される農産廃棄物の一つであるが、酵素処理により可溶化が可能となれば醗酵原料として利用できる可能性がある。そこで、靱を原料とした半固体基質培養法によってミカン外皮分解酵素の生産を目標に、培養工学的な立場から基質の水分量をパラメーターとして菌体増殖、 I_{O_2} など諸経過と植物組織崩壊酵素生成の関係を検討した。

2. 方法 基質は、市販の靱を用いた。約25メッシュで篩い分けられる細粒を除去したもの150gを、Fig. 1に示す回転ドラム型醗酵槽(容量2l)に入れ、水道水により基質水分量を調整した。供試菌は、当研究室で、分離同定した *Aspergillus niger* を用いた。本菌は、靱を基質としてミカン外皮分解活性の高い酵素を生産する。

回転ドラム型醗酵槽は、断続的攪拌が可能であり

同時に調湿空気(8.8 l/min)を醗酵槽内に送入し、基質(靱)が恒湿を保つように、あらかじめ操作条件を決定した後、回転ドラム型通気培養を実施した。通気速度は、1 (l/min)、恒温槽内(Fig. 1の8)の水を循環ポンプにより醗酵槽上部より散水することによって装置内の培養温度を30℃に保った。呼吸速度 I_{O_2} ($\mu\text{mol O}_2/\text{g dry solid/hr}$)は、酸素電極を用い閉鎖系内での酸素濃度(%)の減少速度を測定する方法で求めた。ミカン外皮分解酵素活性としては、培養基質から純水によって粗酵素液を抽出した後、陳皮(ミカン外皮乾燥物)と反応させ、上清中に遊離される還元糖の増加量を基準にした。還元糖は、Somogyi-Nelson法により測定した。植物組織崩壊値(maceration value)として、酵素反応後の陳皮の残存量を測定し初期固形物量との比較値として表わした。菌体量は、培養基質中に存在するグルコサミンを、Elson-Morgan法により測定し、グルコサミン量($\text{mg glucosamine/g dry solid}$)として表わした。水分量は、培養基質を、105℃、24時間乾燥して求めた。培養基質のpHとして粗酵素液におけるpHを測定した。また、粗酵素液中における蛋白量(mg/ml)は、Folin-Lowry法により測定した。

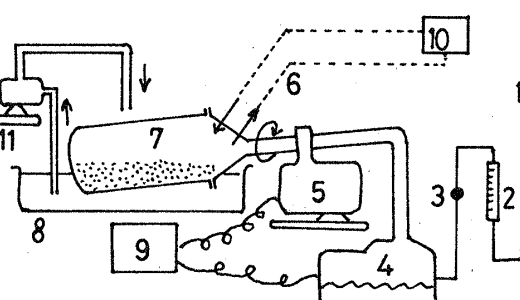


Fig. 1. Scheme of solid-substrate fermentor.

1. fresh air 2. flow meter 3. filter
4. humidifier 5. rotary motor
6. exhaust air 7. rotary fermentor
8. thermostat 9. timer
10. oxygen analyzer 11. circulating pump

素液を抽出した後、陳皮(ミカン外皮乾燥物)と反応させ、上清中に遊離される還元糖の増加量を基準にした。還元糖は、Somogyi-Nelson法により測定した。植物組織崩壊値(maceration value)として、酵素反応後の陳皮の残存量を測定し初期固形物量との比較値として表わした。菌体量は、培養基質中に存在するグルコサミンを、Elson-Morgan法により測定し、グルコサミン量($\text{mg glucosamine/g dry solid}$)として表わした。水分量は、培養基質を、105℃、24時間乾燥して求めた。培養基質のpHとして粗酵素液におけるpHを測定した。また、粗酵素液中における蛋白量(mg/ml)は、Folin-Lowry法により測定した。

シンポジウム (酸酵動力学とその応用)

3. 結果 ① I_{O_2} と菌体増殖速度の関係: 予備実験として澱の熱水抽出液を培地として液体培養を行ない、乾菌体量とグルコサミン量 ($\text{mg glucosamine/g dry mycelia}$) の関係を、経時的に調べた結果、静止期付近までは比例関係があることを確認した。次に、初期水分量をパラメーターとした各培養結果 (初期水分量, 54% の培養経過を, Fig. 2 に示す) におけるグルコサミン量 (X_G) の経時変化を、対数プロットして $\mu_m (\text{hr}^{-1})$ を求め、対数増殖期における I_{O_2} を $\mu_m \cdot X_G (= \frac{dX_G}{dt})$ ($\text{mg glucosamine/g dry solid/hr}$) に対してプロットすると直線関係 (Fig. 3) が得られた。この関係より半固体基質培養における菌体増殖速度を、 I_{O_2} によって指標化することが可能と考えられる。

② 初期水分量の酵素生産への影響: 初期水分量が 54% の時、最も多量の酵素が蓄積された。この場合、酵素量として粗酵素液 1 ml 当り、酵素反応後 (24 時間), 1 mg の還元糖が遊離された場合を 1 unit として表示すれば、23.5 (unit/g dry solid) であった。また、初期水分量を μ_m に対してプロットした場合、同様に、54% 付近にピークが得られた。次に、酵素量の経時変化から算出した酵素の比生成速度を μ_m に対してプロットすると、ほぼ直線となった。初期水分量が 25% の場合、蓄積された酵素量は、17.0 (unit/g dry solid) と低く、 μ_m も $0.030 (\text{hr}^{-1})$ と低い値であった。

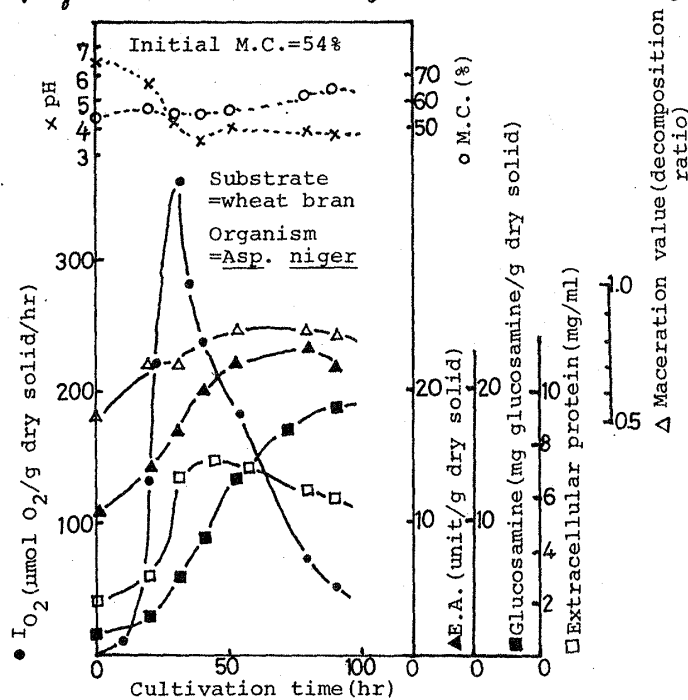


Fig. 2. Time courses of I_{O_2} , pH, M.C. (moisture content), X_G , E.A. (enzyme activity), maceration value and extracellular protein.

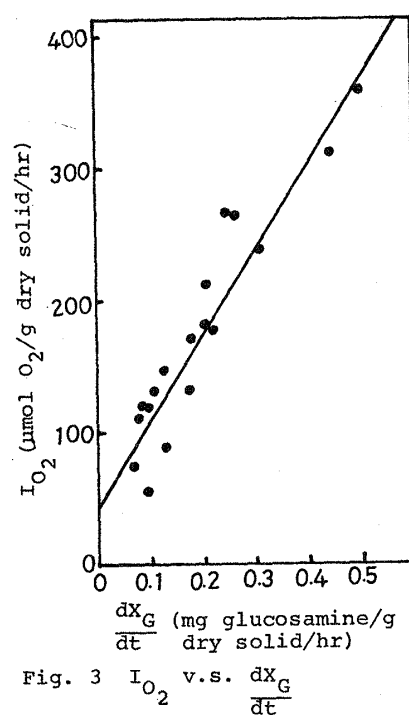


Fig. 3 I_{O_2} v.s. $\frac{dX_G}{dt}$