

[J. Ferment. Technol., Vol. 47, No. 5, p. 285~290, 1969]

糸状菌による糖化アミラーゼ生産過程の動力学的研究

上山 英夫・北田 牧夫・富金原 孝

(理化学研究所醸酵工学研究室)

Kinetic Studies on Saccharifying Amylase Production by Fungi

Hideo Ueyama, Makio Kitada, Takashi Fukimbara

(The Institute of Physical and Chemical Research)

A kinetic analysis was made during the fermenting stage of saccharifying amylase production by fungi. Then, it was assumed that the following factors underlie the kinetic equations on the saccharifying amylase producing process: (1) Existence of a specific mRNA efficacious for saccharifying amylase production in fungal cells, (2) Decay of the m-RNA obeys to the first order reaction kinetics., and (3) Simultaneous formation of mRNA and fungal cell growth.

In these assumptions, the process of enzyme production was represented by the equations (8) and (9).

In a comparison between the experimental value and the theoretical one obtained from the determination of constants by the trial and error method, these equations possessed a wide adaptability to the case of production of enzyme associated with growth.

緒 言

一般に、培養過程の定式化は醸酵過程の生理学的な解明と共に醸酵工学的見地より不可欠なものと考えられる。したがって、本研究においては、糸状菌による糖化アミラーゼの生産過程を検討するに際し、菌体増殖を基本にして定式化を試みた。

実 験 方 法

本研究において使用した菌株は *Aspergillus awamori* var. *fumeus* 1-B-42 と *Aspergillus oryzae* No. 69-20U であり、Table 1 の組成の培地を 300 ml エルレンマイヤーフラスコに 50 ml 分注して 2 kg/cm² で 2 分間の加圧殺菌を行ない、30°C で少量の孢子接種の下でロータリーシェーカーを使用して 200 rpm の攪拌条件下で培養した。なお、Table 1 に示した培地組成並びに殺菌条件は前報¹⁾に準拠した。

糖化アミラーゼ力価は常法により測定して glucose · mg/ml · hr at 4 0°C で表示し、菌体量は 70°C で減圧乾燥後秤量した。全糖は試料 10 ml に蒸留水 20 ml を注加し、25% HCl 3 ml を加えて 2.5 時間加水分解

Table 1. Composition of culture medium.

	Exp. 1	Exp. 2	
Soluble starch	3.79%	7.6 %	
Peptone	1.31%	1.31%	
KH ₂ PO ₄	1 %	1 %	
NaNO ₃	0.2 %	0.2 %	70 ml
Wheat bran extract	1 g	1 g	30 ml

して冷却後中和し、Bertrand 変法により還元糖を定量し、glucose 量として表示した。pH はガラス電極法により測定した。

結果および考察

本研究においては菌体増殖相を対数増殖期とそれ以後の増殖相の 2 つに分けて取り扱った。対数増殖期においては(1)式を適用し、 $t=0$, $x=x_0$ なる初期条件下で積分して(2)式によって菌体増殖を表わす。さらに、対数増殖期以後の増殖相における菌体増殖は(3)式で近似できる^{2,3)}。

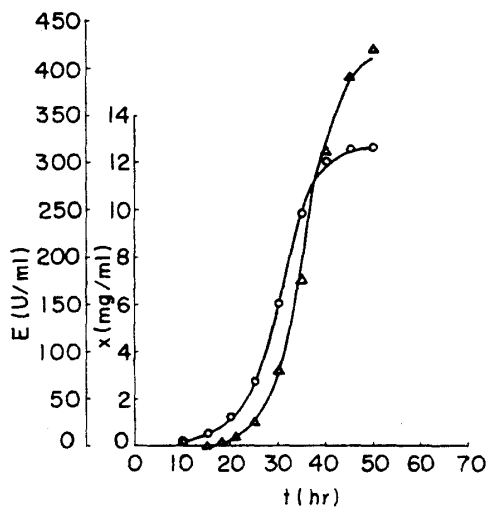


Fig. 4. Conformity of the kinetics of Exp. I (Fig. 1) with equations (8) and (9).

Theoretical value: —; Eq. (10), (11), (14) and (15)

Experimental value: $\odot$, microbial growth; $\triangle$, enzyme production

2. 実験 II 菌体増殖に関して培養時間 $t=10$ hr を原点にとり, $t=0$ とする. $t=0$ で $x_0=0.3$ mg/ml である. 菌体増殖相の分岐時点は $t_i=20$ hr である. 実験 I と同様にして菌体増殖に関する諸式は次のようになる.

$$0 \leq t \leq 20 \text{ hr} \\ x = 0.3e^{0.15t} \quad \dots\dots\dots (16)$$

$$t \geq 20 \text{ hr} \\ x = 16.0 - 9.93e^{-0.1(t-20)} \quad \dots\dots\dots (17)$$

実測値と理論値を対比させた結果を Fig. 5 に示す. 酵素生産は $t=0$ より 5 hr の遅れをもって始まる. したがって, 酵素生産時の菌体増殖速度式は次のように表わされる.

$$0 \leq t \leq 15 \text{ hr} \\ x = 0.3e^{0.15(t+5)} \\ \frac{dx}{dt} = 0.045e^{0.15(t+5)} \quad \dots\dots\dots (18)$$

$$t \geq 15 \text{ hr} \\ x = 16.0 - 9.93e^{-0.1(t-15)} \\ \frac{dx}{dt} = 0.993e^{-0.1(t-15)} \quad \dots\dots\dots (19)$$

酵素生産過程は実験 I と同様にして定数を決定し, $0 \leq t \leq 15$ hr においては $\lambda=0.22$ hr⁻¹, $\kappa R_0=7.12$ を, $t \geq 15$ hr においては $\lambda=0.22$ hr⁻¹, $\kappa R_0=5.47$ を得た. したがって, 酵素生産相は次式のように表わされる.

$$0 \leq t \leq 15 \text{ hr} \\ E = 3.09(3.96e^{0.15t} + 2.7e^{-0.22t} - 6.66) \quad \dots\dots\dots (20)$$

$$t \geq 15 \text{ hr} \\ E = 3.09(56.84 - 692e^{-0.22t} + 24.7(8.34e^{-0.22(t-15)} + 10 - 18.33e^{-0.1(t-15)}) \quad \dots\dots\dots (21)$$

実測値と理論値を対比させた結果を Fig. 5 に示す.

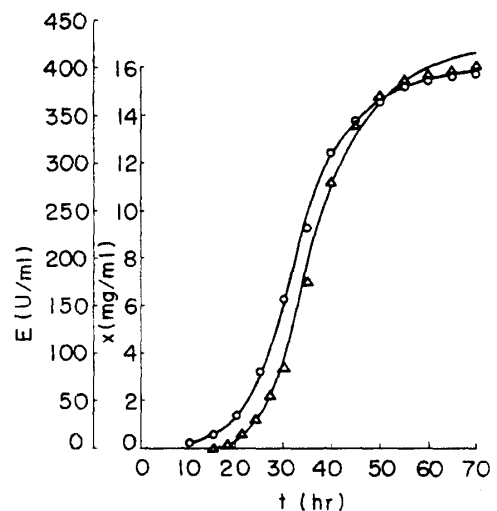


Fig. 5. Conformity of the kinetics of Exp. II (Fig. 2) with equations (8) and (9).

Theoretical value: —; Eq. (16), (17), (20) and (21)

Experimental value: $\odot$, microbial growth; $\triangle$, enzyme production

3. 実験 III 菌体増殖に関して培養時間 $t=5$ hr を原点にとり, $t=0$ とするとき $x_0=0.5$ mg/ml である. 菌体増殖相の分岐時点は $t_i=25$ hr である, 実験 I と同様にして菌体増殖に関する諸式は次のようになる.

$$0 \leq t \leq 25 \text{ hr} \\ x = 0.5e^{0.127t} \quad \dots\dots\dots (22)$$

$$t \geq 25 \text{ hr} \\ x = 17.0 - 5.0e^{-0.112(t-25)} \quad \dots\dots\dots (23)$$

実測値と理論値を対比させた結果を Fig. 6 に示す. 酵素生産は $t=0$ より 10 hr の遅れをもって始まり, 酵素生産時の菌体増殖速度式は次のようになる.

$$0 \leq t \leq 15 \text{ hr} \\ x = 0.5e^{0.127(t+10)} \\ \frac{dx}{dt} = 0.0635e^{0.127(t+10)} \quad \dots\dots\dots (24)$$

$$t \geq 15 \text{ hr}$$

$$x = 17.0 - 5.0e^{-0.112(t-15)}$$

$$\frac{dx}{dt} = 0.56e^{-0.112(t-15)} \dots\dots\dots (25)$$

酵素生産過程は実験 I と同様にして定数を決定し、 $0 \leq t \leq 15 \text{ hr}$ においては $\lambda = 0.15 \text{ hr}^{-1}$, $\kappa R_0 = 0.23$ を、 $t \geq 15 \text{ hr}$ においては $\lambda = 0.15 \text{ hr}^{-1}$, $\kappa R_0 = 1.05$ を得た。したがって、酵素生産相は次式のように表わされる。

$$0 \leq t \leq 15 \text{ hr}$$

$$E = 0.348(3.61e^{-0.15t} + 4.26e^{0.127t} - 7.87) \dots\dots\dots (26)$$

$$t \geq 15 \text{ hr}$$

$$E = 0.348(45.13 - 484e^{-0.15t} + 3.92(26.3e^{-0.15(t-15)} + 8.93 - 35.23e^{-0.112(t-15)}) \dots\dots\dots (27)$$

実測値と理論値を対比させた結果を Fig. 6 に示す。

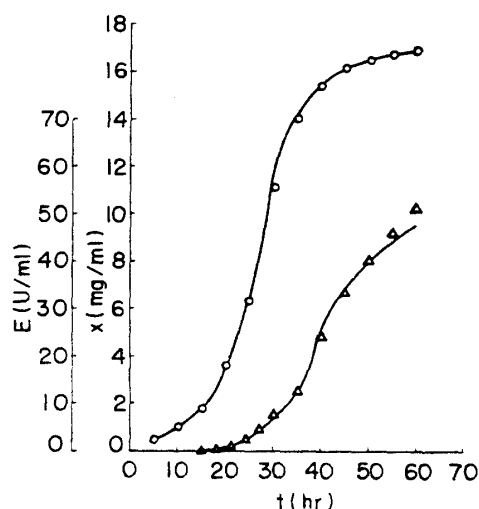


Fig. 6. Conformity of the kinetics of Exp. III (Fig. 3) with equations (8) and (9).

Theoretical value: —; Eq. (22), (23), (26) and (27)

Experimental value: $\odot$, microbial growth; $\triangle$, enzyme production

Table 2. Value of constants in equations 9) and 10).

	$0 \leq t \leq t_l$		$t \geq t_l$	
	κR_0	λ [hr ⁻¹]	κR_0	λ [hr ⁻¹]
Exp. I	5.5	0.22	4.5	0.22
Exp. II	7.12	0.22	5.47	0.22
Exp. III	0.23	0.15	1.05	0.15

(8)式並びに(9)式において決定した諸定数を Table 2 に総括する。

本研究で対象としたのは菌体増殖と酵素生産の連動した場合であり、非連動の場合、たとえば、増殖停止後の菌体による酵素生産、または、対数増殖期における酵素生産の僅微な場合とかには当然適用することは不可能であり、これと近似した条件下での適用も困難である。これは Fig. 6 の培養 50 hr 以後の理論値と実測値の差が顕著になり、残余活性でのみ説明できない程度のずれを生じてくることによって明らかであり、これは mRNA の寿命に関して turnover を考慮していないことに起因するものである。しかし、実用上、生産物生成が菌体増殖と連動している場合における近似計算式としては適用性の広いものと考えられる。

要 約

糸状菌による糖化アミラーゼ生産過程を菌体増殖を基本にして定式化を試みた。糸状菌による糖化アミラーゼ生産過程を説明するに際して、糖化アミラーゼ生産に対して特異的な mRNA を仮定し、mRNA は 1 次反応形式で崩壊し、菌体の生成と同時に生産されるとの仮定の下に菌体増殖相を対数増殖期とそれ以後の増殖相に分けて酵素生産を(8)式および(9)式で表わした。実測値と理論値の対比を行なった結果、菌体増殖と酵素生産が連動している場合の近似計算式としてはかなり広い適用性をもつものと考えられる。

記 号

- x_0 : 菌体量 ($t=0$) [mg/ml]
- x_{t_l} : 菌体量 ($t=t_l$) [mg/ml]
- x_m : 最大菌体量 [mg/ml]
- x : 菌体量($t=t$) [mg/ml]
- t : 時間 [hr]
- t_l : 増殖相境界時間 [hr]
- θ : 時間 [hr]
- k : 比増殖速度定数
- λ : mRNA の崩壊速度定数 [hr⁻¹]
- R_0 : mRNA の量 ($\theta=0$)
- R : mRNA の量 ($\theta=\theta$)
- α, β, κ : 定数

本報告は日本醸造工学会第 3 回支部講演会 (1968. 6. 22. 東京) で発表したものである。

文 献

- 1) 北田, 上山, 富金原: 本誌, **44**, 509 (1966).

- 2) Kitada, M., Ueyama, H., Fukimbara, T.: *J. Ferment. Technol.*, **46**, 1007 (1968).
- 3) 河野, 浅井: 本誌, **46**, 391 (1968).
- 4) Watanabe, K., Fukimbara, T.: *J. Ferment. Technol.*, **43**, 864 (1965).
- 5) 上山, 富金原, 照井: 本誌, **43**, 475 (1965).
- 6) Penman, S., Zubay, G., Beckev, Y., Darnell: J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **49**, 654 (1963).
- 7) 岡崎, 照井: 本誌, **44**, 287 (1966).
- 8) Shu, P.: *J. Biochem. Microbiological, Tech and Eng.*, **3**, 95~105 (1961).

(昭44. 2. 24 受付)