

JAERI-M
89-052

固定化したトリコデルマ菌による
セルラーゼの生産

1989年5月

笠井 昇・玉田 正男・熊倉 稔

JAERI-Mレポートは、日本原子力研究所が不定期に公刊している研究報告書です。

入手の間合わせは、日本原子力研究所技術情報部情報資料課（〒319-11茨城県那珂郡東海村）あて、お申しこしてください。なお、このほかに財団法人原子力弘済会資料センター（〒319-11茨城県那珂郡東海村日本原子力研究所内）で複写による実費頒布をおこなっております。

JAERI-M reports are issued irregularly.

Inquiries about availability of the reports should be addressed to Information Division, Department of Technical Information, Japan Atomic Energy Research Institute, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken 319-11, Japan.

© Japan Atomic Energy Research Institute, 1989

| | |
|-------|------------|
| 編集兼発行 | 日本原子力研究所 |
| 印刷 | 日立高速印刷株式会社 |

固定化したトリコデルマ菌によるセルラーゼの生産

日本原子力研究所高崎研究所開発部

笠井 昇・玉田 正男・熊倉 稔

(1989年4月13日受理)

本報告は、セルラーゼ産生菌であるトリコデルマ菌 (*Trichoderma reesei*) を固定化し、フラスコスケールおよびベンチスケールで培養して得られる酵素活性について調べた結果をまとめたものである。フラスコスケールでは、100mℓの三角フラスコを用いて回分培養と反復回分培養を行った。ベンチスケールでは、セルロース廃資源糖化試験装置のユニットプロセスである培養装置(内容積30ℓ槽)を用いて回分培養、反復回分培養および連続培養を行った。フラスコスケールでの培養では、固定化したものは固定化しないものに比べて高い酵素活性を示し、6回の反復回分培養においても活性の低下が認められないことがわかった。ベンチスケールでの培養では、固定化したものと固定化しないもので最適な培養条件が異なることが明らかになった。固定化したものは攪拌翼回転数450rpm、供給空気量0.1v/v/m以上の条件で高い酵素活性の培養液となった。ベンチスケールにおいて反復回分操作や連続培養操作を行っても雑菌汚染されずに長期間に渡り培養できることがわかった。連続培養は回分培養の約85%の酵素活性を有し、高い酵素活性を持った培養液が長期間連続的に得られることがわかった。

Production of Cellulase from Immobilized
Trichoderma reesei

Noboru KASAI, Masao TAMADA and Minoru KUMAKURA

Department of Development
Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment
Japan Atomic Energy Research Institute
Watanuki-cho, Takasaki-shi, Gunma-ken

(Received April 13, 1989)

This report completed the results that obtained on the study of the enzyme activity in the culture of immobilized *Trichoderma reesei* cells in flask scale (100ml) and bench scale (30ℓ). In the flask scale culture, the batch and repeated batch culture were carried out, and in the bench scale culture, the batch, repeated batch and continuous culture were done by using a culture equipment that is an unit process of the bench scale test plant for saccharification of cellulosic wastes. The enzyme activity of the immobilized cells was higher than that of the intact cells in the flask scale culture and it was confirmed that the enzyme activity was not decreased on the repeated batch culture of six times even. In the bench scale culture, it was found that a optimum culture condition of the immobilized cells was not different from that of the free cells and the immobilized cells gave the enzyme solution with a high enzyme activity in the culture condition of 450rpm stirring speed and air supply of 0.1v/v/m above. The technique of the repeated batch and continuous culture for long times in bench scale without contamination was established. The enzyme activity of the immobilized cells in continuous culture became to be 85% to that in batch culture and it was found that the enzyme solution with high enzyme activity was continuously obtained in the continuous culture for long times.

Keywords : Cellulase, *Trichoderma reesei*, Immobilized Cells, Enzyme Activity, Repeated Batch Culture, Continuous Culture

目 次

| | |
|------------------------------|---|
| 1. はじめに | 1 |
| 2. 実験 | 1 |
| 2.1 セルラーゼ産生菌および培地 | 1 |
| 2.2 培養条件および固定化 | 1 |
| 2.3 酵素活性 | 3 |
| 3. 結果および考察 | 3 |
| 3.1 フラスコスケールでの固定化菌体の培養 | 3 |
| 3.1.1 回分培養 | 3 |
| 3.1.2 反復回分培養 | 4 |
| 3.2 ベンチスケールでの固定化菌体の培養 | 4 |
| 3.2.1 回分培養 | 4 |
| 3.2.2 反復回分培養 | 5 |
| 3.2.3 連続培養 | 6 |
| 4. まとめ | 6 |
| 参考文献 | 7 |

Contents

| | |
|---|---|
| 1. Introduction | 1 |
| 2. Materials and Methods | 1 |
| 2.1 Microorganism and Medium | 1 |
| 2.2 Condition of Culture and Immobilization | 1 |
| 2.3 Cellulase Assay | 3 |
| 3. Results and Discussion | 3 |
| 3.1 Culture of Immobilized Growing Cells in Flask Scale | 3 |
| 3.1.1 Batch Culture | 3 |
| 3.1.2 Repeated Batch Culture | 4 |
| 3.2 Culture of Immobilized Growing Cells in Bench Scale | 4 |
| 3.2.1 Batch Culture | 4 |
| 3.2.2 Repeated Batch Culture | 5 |
| 3.2.3 Continuous Culture | 6 |
| 4. Summary | 6 |
| References | 7 |

1. はじめに

バイオマス資源の中でセルロース廃資源（もみがら，バガス，廃木材など）は，大量に産出されるにもかかわらずあまり利用されていない。これらの廃資源に含まれているセルロースを酵素により効率よく加水分解（糖化）してグルコースに変換した後，醗酵させてアルコールに変える技術の開発が望まれている。セルロース廃資源の酵素糖化にはセルラーゼが用いられる。この酵素は，トリコデルマ菌などの酵素産生菌を培養することにより培養液中に産生され，酵素水溶液として得られる。しかし，酵素の生産コストは，セルロース廃資源からのアルコール製造コストの約半分に達するとの報告がある¹⁾。このため，安価な酵素の生産，高い活性を有する酵素の生産，糖化反応後の酵素の回収・再利用などが実用化において重要な研究課題になっている²⁾。

我々は，セルラーゼ産生菌であるトリコデルマ菌（*Trichoderma reesei*）やスポロトリクム菌（*Sporotrichum cellulophilum*）を固定化し，固定化増殖菌体による連続培養について研究している³⁾⁻⁵⁾。連続培養により一定の酵素水溶液を長期間連続的に得られる。また，連続培養は，回分培養に比べ，1回の培養操作により長期間の培養が可能であり，培養操作の省力化，ユーティリティや人件費等の削減により酵素生産コストの低下が考えられる。本報告は，固定化したトリコデルマ菌をフラスコスケールおよびベンチスケールで回分培養，反復回分培養，連続培養して得られた培養液の酵素活性について調べた結果を記述したものである。

2. 実験

2.1 セルラーゼ産生菌および培地

セルラーゼ酵素の産生菌としてトリコデルマ菌（*Trichoderma reesei*, QM-9414）を用いた。固定化したトリコデルマ菌は精製水 1 ℓ に対し， KH_2PO_4 , 10g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3g ; NaNO_3 , 3g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5g ; ペプトン（Difco）, 5g ; セルロース粉末（東洋濾紙，E）, 10g ; ツイーン80, 2mℓ の組成の液体培地（pH 5.3）で培養した。

2.2 培養条件および固定化

固定化用の担体は市販のガーゼをポリエチレングリコールジメタクリレート（4G）に浸漬した後，コバルト60- γ 線⁶⁾で10kGy照射して重合させたものを用いた。照射後の担体重量は元のガーゼ重量の約2.8倍であった。担体は菌体固定化後に栄養，酸素の供給が重要なことから多孔性を有する必要がある。上記の処理を行ったガーゼはトリコデルマ菌の固定化培養において好適な担体である⁶⁾。なお，担体作成手順をFig.1に示した。本実験における固定化方法は

1. はじめに

バイオマス資源の中でセルロース廃資源（もみがら，バガス，廃木材など）は，大量に産出されるにもかかわらずあまり利用されていない。これらの廃資源に含まれているセルロースを酵素により効率よく加水分解（糖化）してグルコースに変換した後，醗酵させてアルコールに変える技術の開発が望まれている。セルロース廃資源の酵素糖化にはセルラーゼが用いられる。この酵素は，トリコデルマ菌などの酵素産生菌を培養することにより培養液中に産生され，酵素水溶液として得られる。しかし，酵素の生産コストは，セルロース廃資源からのアルコール製造コストの約半分に達するとの報告がある¹⁾。このため，安価な酵素の生産，高い活性を有する酵素の生産，糖化反応後の酵素の回収・再利用などが実用化において重要な研究課題になっている²⁾。

我々は，セルラーゼ産生菌であるトリコデルマ菌（*Trichoderma reesei*）やスポロトリクム菌（*Sporotrichum cellulophilum*）を固定化し，固定化増殖菌体による連続培養について研究している³⁾⁻⁵⁾。連続培養により一定の酵素水溶液を長期間連続的に得られる。また，連続培養は，回分培養に比べ，1回の培養操作により長期間の培養が可能であり，培養操作の省力化，ユーティリティや人件費等の削減により酵素生産コストの低下が考えられる。本報告は，固定化したトリコデルマ菌をフラスコスケールおよびベンチスケールで回分培養，反復回分培養，連続培養して得られた培養液の酵素活性について調べた結果を記述したものである。

2. 実験

2.1 セルラーゼ産生菌および培地

セルラーゼ酵素の産生菌としてトリコデルマ菌（*Trichoderma reesei*, QM-9414）を用いた。固定化したトリコデルマ菌は精製水 1 ℓ に対し， KH_2PO_4 , 10g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3g ; NaNO_3 , 3g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5g ; ペプトン（Difco）, 5g ; セルロース粉末（東洋濾紙，E）, 10g ; ツイーン80, 2mℓ の組成の液体培地（pH 5.3）で培養した。

2.2 培養条件および固定化

固定化用の担体は市販のガーゼをポリエチレングリコールジメタクリレート（4G）に浸漬した後，コバルト60- γ 線で10kGy照射して重合させたものを用いた。照射後の担体重量は元のガーゼ重量の約2.8倍であった。担体は菌体固定化後に栄養，酸素の供給が重要なことから多孔性を有する必要がある。上記の処理を行ったガーゼはトリコデルマ菌の固定化培養において好適な担体である⁶⁾。なお，担体作成手順をFig.1に示した。本実験における固定化方法は

フラスコスケール、ベンチスケールともに培地中に担体を入れた後、トリコデルマ菌の種菌を接種して担体への吸着または絡みつきにより固定化して増殖させる方法とした。

〔フラスコスケールでの培養〕

① 回分培養

フラスコスケールでの培養は100 mℓの三角フラスコを用いた。フラスコに所定量の担体と15 mℓの培地を入れ、オートクレーブで120°C、30分間滅菌を行った後、トリコデルマ菌を接種して28°Cの温度で振盪して培養を行った。

② 反復回分培養

回分培養後、担体だけ残して培養液を抜取り、新しい培地を15 ml 加えて再び回分培養を行った。この操作を繰り返し、反復回分培養を行った。

〔ベンチスケールでの培養〕

① 回分培養

ベンチスケールでの培養はセルロース廃資源糖化試験装置の1つのユニットプロセスである培養装置⁷⁾を用いた。Fig. 2に示した培養槽(内容積30ℓ)に所定量の担体をFig. 3に示したように取付け20ℓの培地を加えて120°C、40分間蒸気滅菌した後、種菌を接種して28°Cの温度で通気、攪拌しながら培養を行った。ベンチスケールで使用する種菌はあらかじめ孢子をフラスコ内の液体培地に接種して、28°Cで一定期間振盪培養して増殖させた菌体を用いた。(液体培地500 mℓ中の菌体を液体培地とともに培養槽に添加した)また、種菌培養のロットの違いにより、培養時間に対する酵素活性の上昇割合や得られる最大酵素活性が少し異なるため、培養条件の探索実験においては同一のロットの種菌を使用した。

② 反復回分培養

回分培養後、あらかじめ蒸気により滅菌した培養槽のドレン口より培養液をすべて抜取り、Fig. 4に示した培地槽から蒸気滅菌、水冷却した新しい培地を培養槽に20ℓ加えて再び回分培養を行った。この操作を繰り返し、反復回分培養を行った。

③ 連続培養

回分培養で培養液の酵素活性が高い値に達した後に、下記の手順により連続培養を行った。なお、連続培養のフローシートをFig. 5に示した。

- ・培地槽に培地を仕込み蒸気により滅菌する。
- ・滅菌後、ジャケットに水道水を流して培地を冷却する。(培地は常に水道水で冷却しておく)
- ・滅菌したシリコンチューブを培地槽と培養槽に、培養槽と貯蔵タンクにそれぞれ接続する。
- ・培地ポンプ(ローラーポンプ)で培地を培養槽に供給する。
- ・培養液ポンプ(ローラーポンプ)でオーバーフローした培養液を取り出し、貯蔵タンクに溜める。

連続培養において培地の滞留時間が遅く(滞留時間が8日の場合、培地の供給速度は20ℓ/8 day = 2.5ℓ/dayとなる)培地供給チューブ内で培地中のセルロースが沈澱して供給できないため、

Fig.6に示したように一定時間毎に培地を速い流速で供給した。また、培養液の取り出しも培地の供給と時間をずらして同じように行った。

2.3 酵素活性

培養液中のセルラーゼ酵素の活性はFPA (Filter paper activity) の測定法⁸⁾によりGPA (Glucose production activity) の値⁹⁾で求めた。0.5 mℓの培養液(酵素水溶液)、1 mℓの0.1 N酢酸緩衝液(pH 4.8)および50 mgの濾紙(Whatman No.1)を50°Cで1時間振盪した後、生成したグルコースの濃度をグルコースアナライザー(島津製作所, CGA-10)により測定してGPAを求めた。なお、GPAの1単位は1時間に生成したグルコース1 mgに相当する。

3. 結果および考察

3.1 フラスコスケールでの固定化菌体の培養

3.1.1 回分培養

本実験で用いた固定化用担体は、Fig.7で示したように網目構造を有している。糸状菌であるトリコデルマ菌は網目や繊維の枝に吸着またはからみつきにより固定化され、増殖する。菌体が固定化した場合、培地中のセルロースは菌体とともに担体に吸着されるため培養液中に固形分がなくなり、透明な培養液になる。

固定化したトリコデルマ菌の培養において担体量の影響を調べるため、種々の担体量で培養を行い培養液の酵素活性を調べた。なお、担体量は担体の厚さが薄いため培地量に対する担体の面積($\text{cm}^2/\text{m}\ell$)で表した。培養結果をFig.8に示した。この結果から、得られるGPAは担体量に大きく依存することがわかった。すなわち、 $0.5 \text{ cm}^2/\text{m}\ell$ の担体量まではGPAが低くintact(固定化しないで培養, 担体量 = $0 \text{ cm}^2/\text{m}\ell$)より酵素活性が低い。これに対し、 $0.8 \text{ cm}^2/\text{m}\ell$ 以上では高いGPAが得られintactより高い酵素活性を示した。担体量が $0.8 \text{ cm}^2/\text{m}\ell$ 以上ではほとんど同じGPAを示し、担体量の影響が認められなかった。また、培養後の観察から担体量の多少にかかわらず、すべての担体の表面には菌体が一様に増殖していることや培養液中に浮遊している菌体がないことがわかった。これらのことから、固定化培養において高い酵素活性を得るためには、菌体の増殖する足場(担体の面積)が一定量必要であることがわかった。さらに、固定化した菌体が担体から脱離して培養液中でfreeの状態が増殖することがないことがわかった。

以上の結果から、フラスコでは $0.8 \text{ cm}^2/\text{m}\ell$ 以上の担体量でトリコデルマ菌を固定化して培養することによりintactより高い酵素活性(GPA)の培養液が得られることが明らかになった。

Fig.6に示したように一定時間毎に培地を速い流速で供給した。また、培養液の取り出しも培地の供給と時間をずらして同じように行った。

2.3 酵素活性

培養液中のセルラーゼ酵素の活性はFPA (Filter paper activity) の測定法⁸⁾によりGPA (Glucose production activity) の値⁹⁾で求めた。0.5 mℓの培養液(酵素水溶液)、1 mℓの0.1 N酢酸緩衝液(pH 4.8)および50 mgの濾紙(Whatman No.1)を50°Cで1時間振盪した後、生成したグルコースの濃度をグルコースアナライザー(島津製作所, CGA-10)により測定してGPAを求めた。なお、GPAの1単位は1時間に生成したグルコース1 mgに相当する。

3. 結果および考察

3.1 フラスコスケールでの固定化菌体の培養

3.1.1 回分培養

本実験で用いた固定化用担体は、Fig.7で示したように網目構造を有している。糸状菌であるトリコデルマ菌は網目や繊維の枝に吸着またはからみつきにより固定化され、増殖する。菌体が固定化した場合、培地中のセルロースは菌体とともに担体に吸着されるため培養液中に固形分がなくなり、透明な培養液になる。

固定化したトリコデルマ菌の培養において担体量の影響を調べるため、種々の担体量で培養を行い培養液の酵素活性を調べた。なお、担体量は担体の厚さが薄いため培地量に対する担体の面積($\text{cm}^2/\text{m}\ell$)で表した。培養結果をFig.8に示した。この結果から、得られるGPAは担体量に大きく依存することがわかった。すなわち、 $0.5 \text{ cm}^2/\text{m}\ell$ の担体量まではGPAが低くintact(固定化しないで培養, 担体量 = $0 \text{ cm}^2/\text{m}\ell$)より酵素活性が低い。これに対し、 $0.8 \text{ cm}^2/\text{m}\ell$ 以上では高いGPAが得られintactより高い酵素活性を示した。担体量が $0.8 \text{ cm}^2/\text{m}\ell$ 以上ではほとんど同じGPAを示し、担体量の影響が認められなかった。また、培養後の観察から担体量の多少にかかわらず、すべての担体の表面には菌体が一様に増殖していることや培養液中に浮遊している菌体がないことがわかった。これらのことから、固定化培養において高い酵素活性を得るためには、菌体の増殖する足場(担体の面積)が一定量必要であることがわかった。さらに、固定化した菌体が担体から脱離して培養液中でfreeの状態が増殖することがないことがわかった。

以上の結果から、フラスコでは $0.8 \text{ cm}^2/\text{m}\ell$ 以上の担体量でトリコデルマ菌を固定化して培養することによりintactより高い酵素活性(GPA)の培養液が得られることが明らかになった。

3.1.2 反復回分培養

反復回分培養は回分培養を行った後、培養液の一部を残して抜取り（残した培養液中の菌を次の種菌として使用）新しい培地を追加して回分操作を繰り返して継続する方式であり、半連続法とも呼ばれる¹⁰⁾。回分培養の場合には、1回1回の培養の前に数段の種菌培養が必要であるが、この方式ではそれが不要となる。

本実験では、トリコデルマ菌が担体に固定化されているため、フラスコ中の培養液（15 mℓ）を全部抜取り、新しい培地を15 mℓ 加えて反復回分培養を行った。Fig.9に固定化した菌により11日間回分培養を行った後、6日毎に培地を全部抜取り、新しい培地を加えて反復回分培養した結果を示した。この結果から、毎回ほとんど同じGPAを示し、6回目の反復回分培養においても活性の低下が認められなかった。一般的に反復回分培養では、雑菌汚染や菌自体の活性低下などにより使用回数が限られる¹⁰⁾。しかし、本実験で6回目の回分培養においても酵素活性の低下が見られないことから、固定化したトリコデルマ菌では雑菌汚染を防ぐことにより長期間に渡り、半連続的に酵素活性の高い培養液が得られるものと考えられる。また、固定化した菌による反復回分培養により2回目以後の種菌の培養が不要なことから、安価な酵素の生産が可能になると思われる。

3.2 ベンチスケールでの固定化菌体の培養

3.2.1 回分培養

ベンチスケールでの培養は、フラスコスケールの場合と下記に示したように大きく異なる。このため、固定化した菌の培養条件を検討した。

〔フラスコスケール〕

- ・ 振盪により固定化用担体が培地中（フラスコの底）で移動する。
- ・ 培地の攪拌は振盪による液の乱れで行う。

〔ベンチスケール〕

- ・ 固定化用担体は培養槽内に取付け固定するため動かない。
- ・ 培地の攪拌は攪拌翼により行う。
- ・ 培地量が多いため強制的に空気を供給する。

(1) 担体量の影響

フラスコでの培養において担体量が $0.8 \text{ cm}^2/\text{mℓ}$ 以上で高い酵素活性が得られた。ベンチスケールにおいても同じ傾向と考えられるが、担体量を $0.1 \text{ cm}^2/\text{mℓ}$ と $0.9 \text{ cm}^2/\text{mℓ}$ に極端に変えて培養を行い、酵素活性を調べた。培養時間とGPAの関係を Fig. 10 に示した。この結果においても、フラスコでの培養と同じように担体量が少ないとGPAが小さく、多いとGPAが大きくなることがわかった。また、担体量の多少にかかわらず担体表面に菌体が増殖し、培養液中に浮遊している free な菌体は見られなかった。

(2) 攪拌速度の影響

ベンチスケールによる培養では、培地の混合や通気した空気（酸素）の拡散などを良くするため攪拌する必要がある。固定化した菌の培養におよぼす攪拌の影響を調べるため、攪拌翼の

回転数を 250rpm (周速91m/min), 450rpm (周速 164m/min) で培養を行った結果を Fig. 11 に示した。回転数の大きな 450rpm の方が 250rpm より大きな G P A を示した。前報⁷⁾で述べたように intact (固定化しないもの) では培養液中に菌体が free の状態で分散している。このため、回転数が大きいと糸状菌であるトリコデルマ菌の菌糸が翼による剪断力で切断されたり損傷を受ける。しかし、固定化した菌の培養においては菌体はすべて担体に固定化されており、培養液中に浮遊している菌がないことから翼による切断や損傷が起こらないことや、回転数が大きいことにより培地の混合・空気の拡散が良くなるため高い G P A が得られるものと考えられる。

(3) 供給空気量の影響

トリコデルマ菌は好気性の菌でありベンチスケールのように大量の培地で培養する場合、培養時に通気する必要がある。固定化した菌の培養において必要な供給空気量を調べるため、0.1 v/v/m (空気量/培地量/時間: 2ℓ/20ℓ/1min) と 0.2 v/v/m (4ℓ/20ℓ/min) の空気量で培養した。培養結果を Fig. 12 に示した。0.1 v/v/m と 0.2 v/v/m ではほとんど同じ G P A を示すことがわかった。前報⁷⁾で述べたように intact では、0.1 v/v/m に比べ 0.2 v/v/m の方が高い G P A を示した。この違いは、今回の実験では攪拌翼の回転数が 450rpm (intact では 250rpm) と大きいため、スパージャーから供給された空気が翼により小さな気泡となり培地への酸素の拡散が効果的になるため、空気量が 0.1 v/v/m でも 0.2 v/v/m と同じ酵素活性が得られるものと考えられる。

以上の回分培養の結果から、固定化したトリコデルマ菌をベンチスケールで培養する場合には、担体量 $0.8 \text{ cm}^2/\text{m}\ell$ 以上、攪拌翼回転数 450rpm, 供給空気量 0.1 v/v/m 以上の条件で行うことにより高い酵素活性 (G P A) の培養液が得られることが明らかになった。

3.2.2 反復回分培養

ベンチスケールにおいて担体量 $0.9 \text{ cm}^2/\text{m}\ell$, 攪拌翼回転数 450rpm, 空気量 0.2 v/v/m の条件で 13 日間回分培養を行った後、培地を全部抜取り新しい培地を加えて反復回分培養を行った結果を Fig. 13 に示した。3 回目の反復回分操作後、G P A の上昇が見られなくなった。また、実験後の培養液は雑菌汚染が認められなかった。3.1.2 項で述べたように、フラスコスケールでは 6 回反復回分操作を行っても最初の回分培養と同じ G P A を示したが、ベンチスケールでは早い段階で活性が無くなった。この原因として、最初の回分培養を行う期間が 13 日目 (フラスコでは 6 日) と長すぎたことや 20ℓ の培養液を抜取り、新しい培地を供給する反復回分操作に約 2 時間 (培養槽の培地取り出し口の大きさや培地供給ポンプの最大流量が小さいため) を要したことにより、菌が培地に浸っていない時間が長かったためと思われる。

ベンチスケールの装置は設計・製作時に反復回分培養について考慮しなかったが、上記結果から雑菌汚染が起こらない状態で反復回分操作を行えることや、本培養装置で反復回分培養を行う場合の装置の改良点が明らかになった。

3.2.3 連続培養

連続培養は回分培養を行った後、新しい培地を供給しながら培養液（酵素水溶液）を取り出す方式である。この方式では、1回の培養操作により長期間の培養が可能であり、連続的に一定の培養液が得られる。

回分培養後、2.2項で述べた連続培養の手順に従い連続培養に切替え、培養時間とGPAの関係調べた。担体量 $0.8 \text{ cm}^2/\text{m}\ell$ 、攪拌翼回転数 450 rpm、空気量 0.2 v/v/m の条件で回分培養した後、そのままの条件で連続培養した結果を Fig. 14 に示した。培養液の取り出しはオーバーフロー方式であり、連続培養前の回分培養時のサンプリングで培養液が少なくなり、その不足分の補給に1~2日間要した。なお、連続前の回分培養においてGPAの上昇カーブの相違は、種菌の培養ロットが違いためと思われる。No. 1 (●) と No. 3 (■) は連続培養の時間とともに徐々にGPAが低下し、連続培養開始前（回分培養の最大値）に比べ約50%の値で一定となった。これに対し、No. 2 (▲) は連続培養初期に急激にGPAが上昇したのち徐々に低下し、連続培養開始前に比べ約85%の値で一定となった。連続培養初期のGPAの上昇は、回分培養時のサンプリングによる培養液の不足分の補給の際、何らかの原因で固定化した菌体の一部が脱離し、菌体内にある酵素が培養液中に放出されたため一時的にGPAが上昇したものである。

連続培養における固定化の有効性を調べるため、トリコデルマ菌を固定化しないで回分培養した後、新培地を供給しながら培養液を取り出して連続化した結果を Fig. 15 に示した。固定化しないで連続培養を行うと徐々にGPAが低下し、連続培養開始前に比べて約20%で一定となった。

以上の連続培養の結果から、①長期間雑菌汚染のない状態で連続培養できる②固定化した菌で連続培養を行うことにより固定化しないものに比べ、高い酵素活性の培養液が連続的に得られる③適正な連続化の条件を設定することで連続化前の回分培養に比べ、酵素活性があまり低下しないで培養液が連続的に得られる、等のことがわかった。また、トリコデルマ菌と同じセルラーゼ酵素産生菌であるスポロトリウム菌では、連続化後の酵素生産性が連続化前に比べ高くなる⁵⁾ことから、トリコデルマ菌の連続培養においても最適な培養条件を設定することにより、高い酵素活性を有する培養液が連続的に得られるものと考えられる。

4. ま と め

セルラーゼ産生菌であるトリコデルマ菌を固定化し、フラスコスケールおよびベンチスケールで培養した。フラスコスケールでは回分培養と反復回分培養を行い、ベンチスケールでは回分培養、反復回分培養および連続培養を行い得られる酵素活性について調べた結果、下記のこと明らかになった。

(1) フラスコでの回分培養において得られる酵素活性は、ガーゼ担体の充填量に大きく依存し、 $0.8 \text{ cm}^2/\text{m}\ell$ 以上の担体量で培養することにより固定化しない (intact) ものより高くなる。

(2) フラスコで6回の反復回分培養を行っても酵素活性の低下が認められなかったことから長期間に渡り、半連続的に高い酵素活性を持つ培養液が得られる。

(3) ベンチスケールでの回分培養において最適な培養条件は固定化しない intact の場合と異なり、攪拌翼回転数 450 rpm, 供給空気量 0.1 v/v/m 以上の条件で高い酵素活性の培養液が得られる。

(4) ベンチスケールにおける反復回分培養では、3回目の回分培養で酵素活性が上昇しなくなった。しかし、雑菌汚染が起こらない状態で反復回分操作を行えることや反復回分培養を行う上でのベンチスケール装置の改良点が示唆された。

(5) 本実験からベンチスケールによる連続培養で適正な培養条件を設定することにより回分培養の85%の酵素活性を有する培養液が雑菌汚染のない状態で長期間連続的に得られることがわかった。最適な連続培養条件の探索により、より高い酵素活性の培養液が得られる可能性がある。

参 考 文 献

- (1) U. S. Department of Energy " Preliminary economic evaluation of a process for the production of fuel grade ethanol by enzymatic hydrosis of agricultural waste " (1978) .
- (2) 大嶋 寛, 原納 淑郎 : 化学工場, 27, 93 (1983)
- (3) M. Kumakura, I. Kaetsu, and K. Nisizawa : Biotechnol. Bioeng., 26, 17 (1984)
- (4) M. Tamada, N. Kasai, M. Kumakura, and I. Kaetsu : Biotechnol. Bioeng., 28, 1227 (1986)
- (5) M. Tamada, N. Kasai, and I. Kaetsu : Biotechnol. Bioeng., 30, 697 (1987)
- (6) 嘉悦 勲, 熊倉 稔, 藤村 卓, 玉田 正男, 笠井 昇, 吉井 文男 : 第10回繊維連合研究発表会予稿集., 109 (1984)
- (7) 笠井 昇, 玉田 正男, 熊倉 稔, 嘉悦 勲 : JAERI-M 88-237 (1988)
- (8) M. Mandels, R. Raymond, and C. Roche : Biotechnol. Bioeng. Symp., 6, 21 (1976)
- (9) M. Tamada, N. Kasai, and I. Kaetsu : Biotechnol. Bioeng., 32, 920 (1988)
- (10) 山根 恒夫 : 化学装置, 28, 58 (1986)

(2) フラスコで6回の反復回分培養を行っても酵素活性の低下が認められなかったことから長期間に渡り、半連続的に高い酵素活性を持つ培養液が得られる。

(3) ベンチスケールでの回分培養において最適な培養条件は固定化しない intact の場合と異なり、攪拌翼回転数 450 rpm, 供給空気量 0.1 v/v/m 以上の条件で高い酵素活性の培養液が得られる。

(4) ベンチスケールにおける反復回分培養では、3回目の回分培養で酵素活性が上昇しなくなった。しかし、雑菌汚染が起こらない状態で反復回分操作を行えることや反復回分培養を行う上でのベンチスケール装置の改良点が示唆された。

(5) 本実験からベンチスケールによる連続培養で適正な培養条件を設定することにより回分培養の85%の酵素活性を有する培養液が雑菌汚染のない状態で長期間連続的に得られることがわかった。最適な連続培養条件の探索により、より高い酵素活性の培養液が得られる可能性がある。

参 考 文 献

- (1) U. S. Department of Energy " Preliminary economic evaluation of a process for the production of fuel grade ethanol by enzymatic hydrosis of agricultural waste " (1978) .
- (2) 大嶋 寛, 原納 淑郎 : 化学工場, 27, 93 (1983)
- (3) M. Kumakura, I. Kaetsu, and K. Nisizawa : Biotechnol. Bioeng., 26, 17 (1984)
- (4) M. Tamada, N. Kasai, M. Kumakura, and I. Kaetsu : Biotechnol. Bioeng., 28, 1227 (1986)
- (5) M. Tamada, N. Kasai, and I. Kaetsu : Biotechnol. Bioeng., 30, 697 (1987)
- (6) 嘉悦 勲, 熊倉 稔, 藤村 卓, 玉田 正男, 笠井 昇, 吉井 文男 : 第10回繊維連合研究発表会予稿集., 109 (1984)
- (7) 笠井 昇, 玉田 正男, 熊倉 稔, 嘉悦 勲 : JAERI-M 88-237 (1988)
- (8) M. Mandels, R. Raymond, and C. Roche : Biotechnol. Bioeng. Symp., 6, 21 (1976)
- (9) M. Tamada, N. Kasai, and I. Kaetsu : Biotechnol. Bioeng., 32, 920 (1988)
- (10) 山根 恒夫 : 化学装置, 28, 58 (1986)

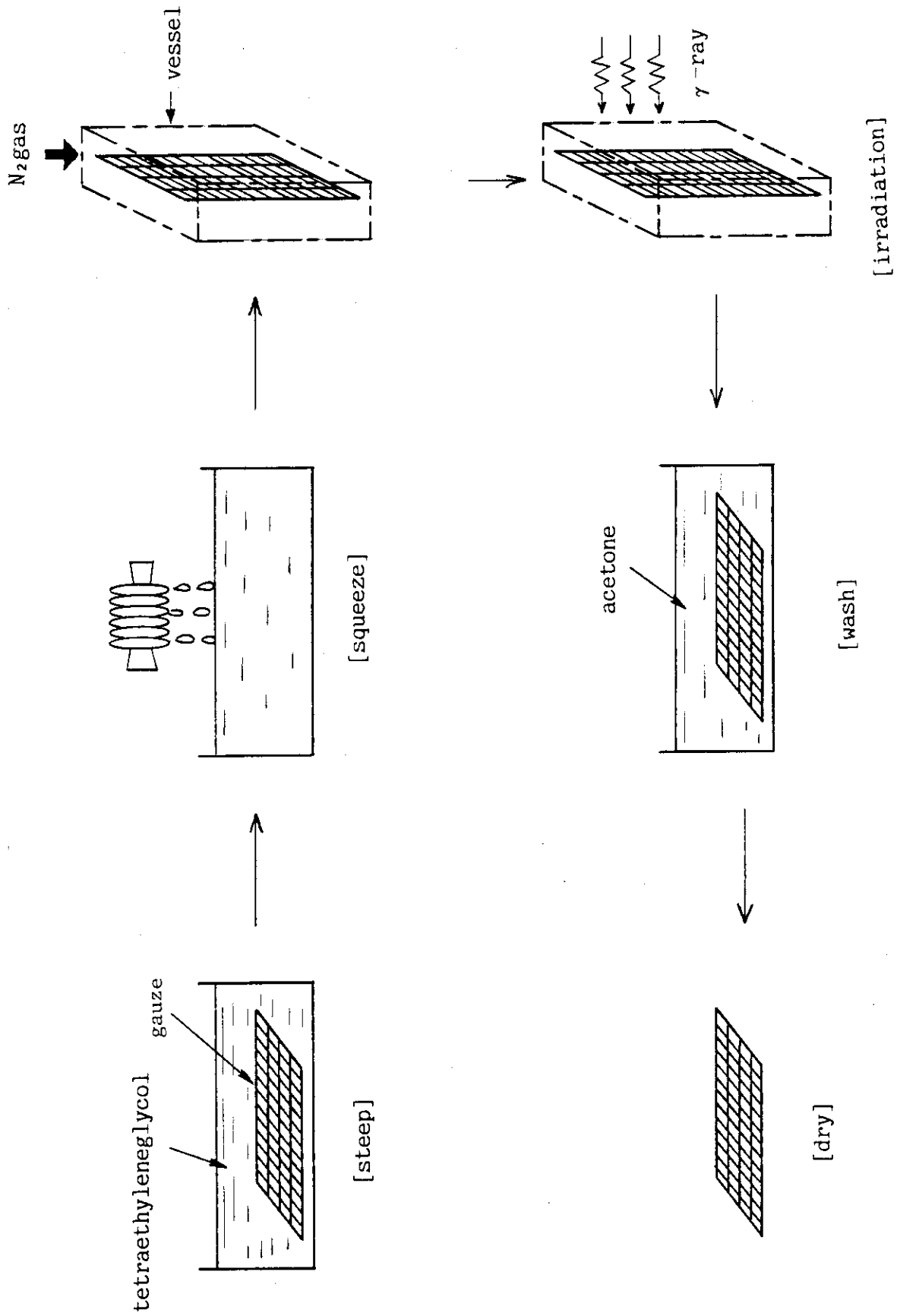


Fig. 1 Preparation process of carrier.

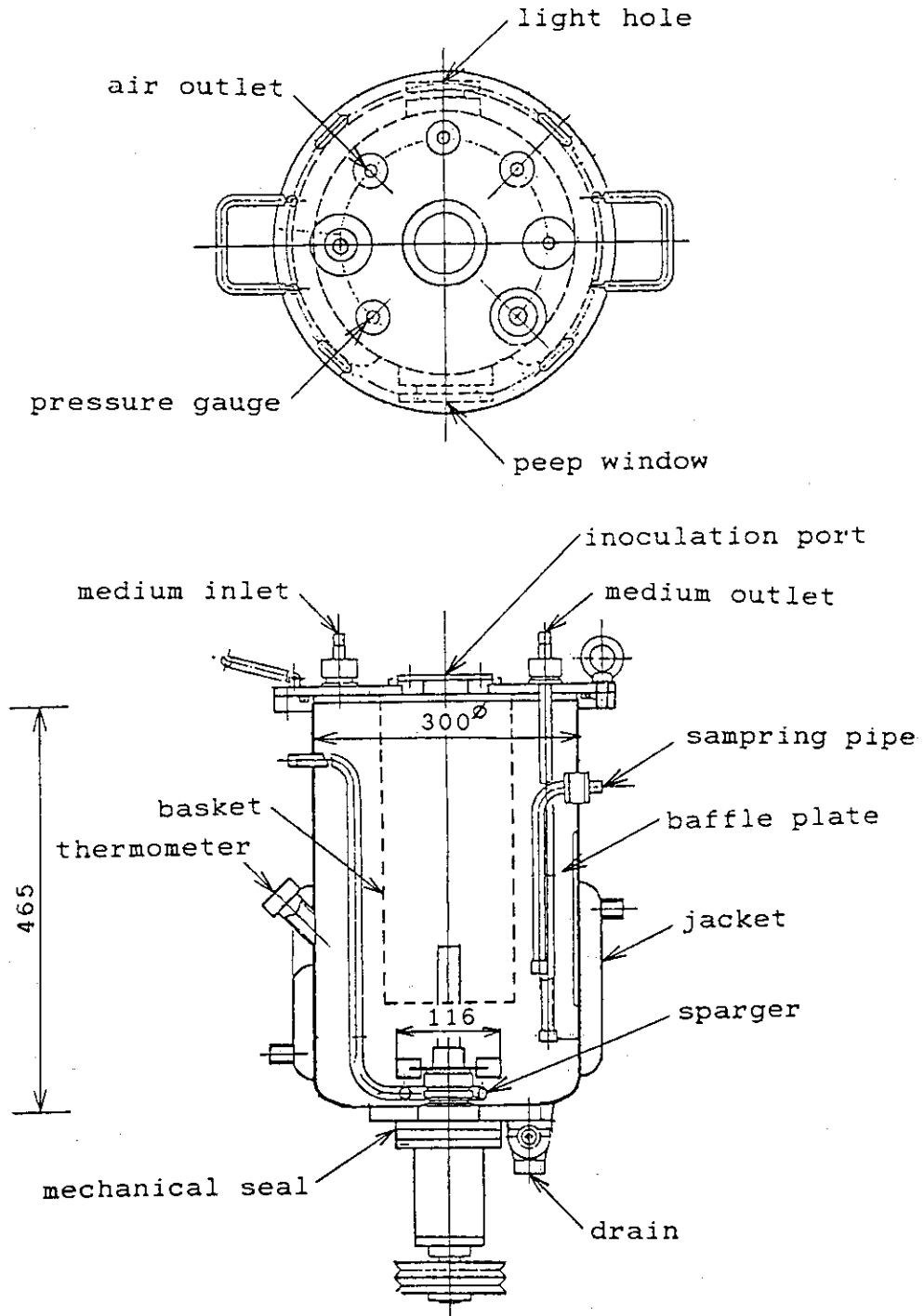


Fig. 2 Sketch of culture vessel for immobilized cells.

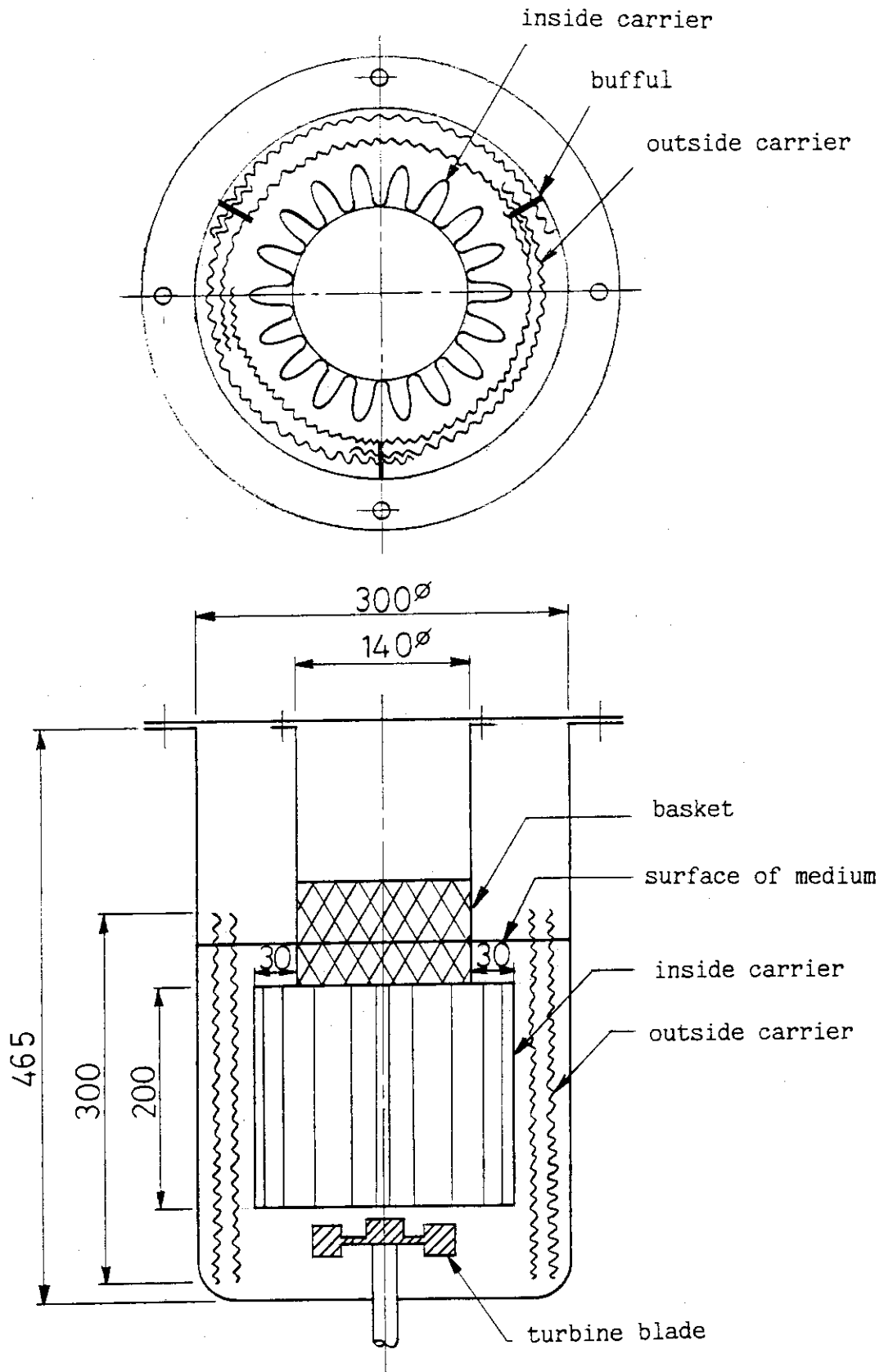


Fig. 3 Sketch of carrier installed in culture vessel.

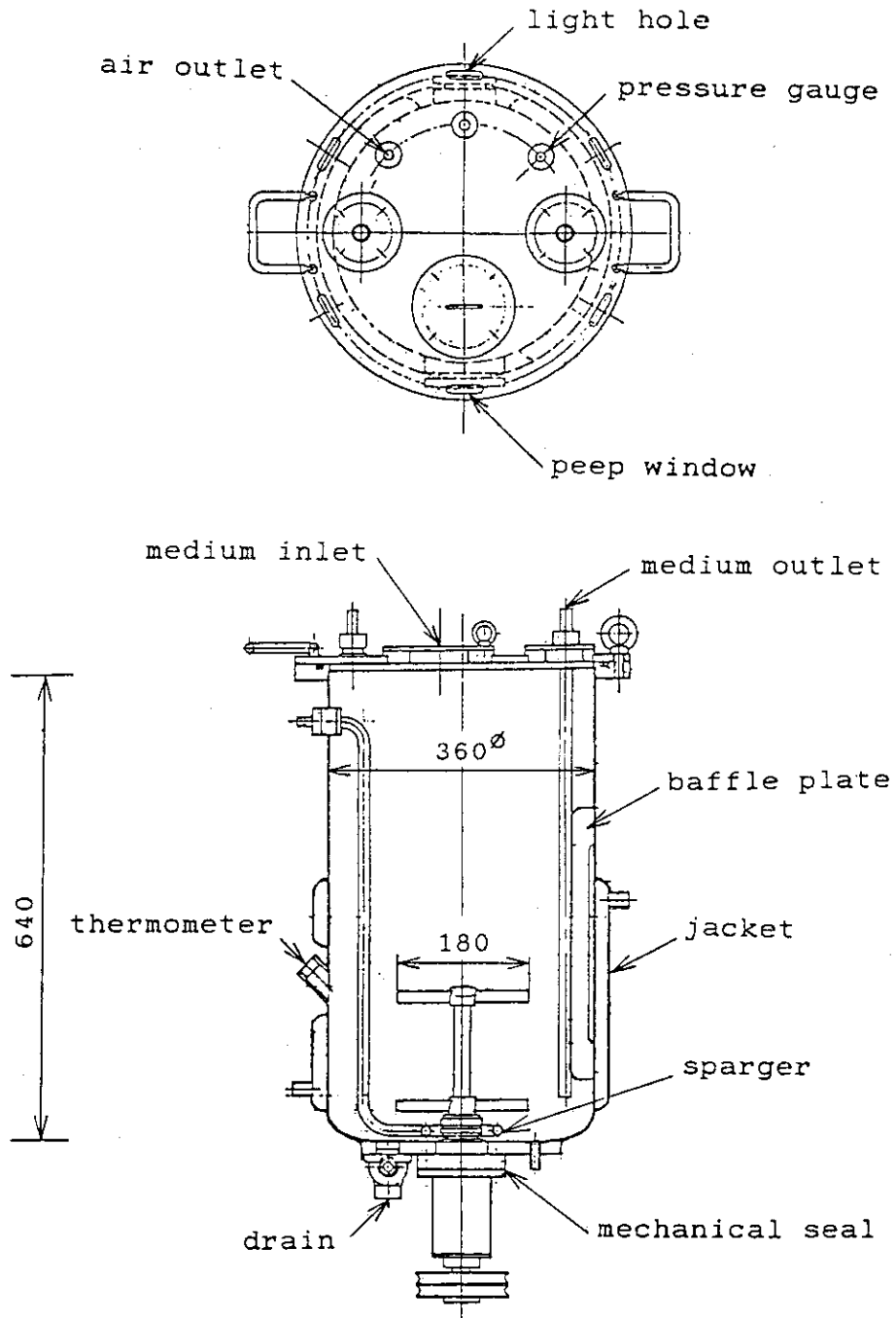


Fig. 4 Sketch of medium storage vessel.

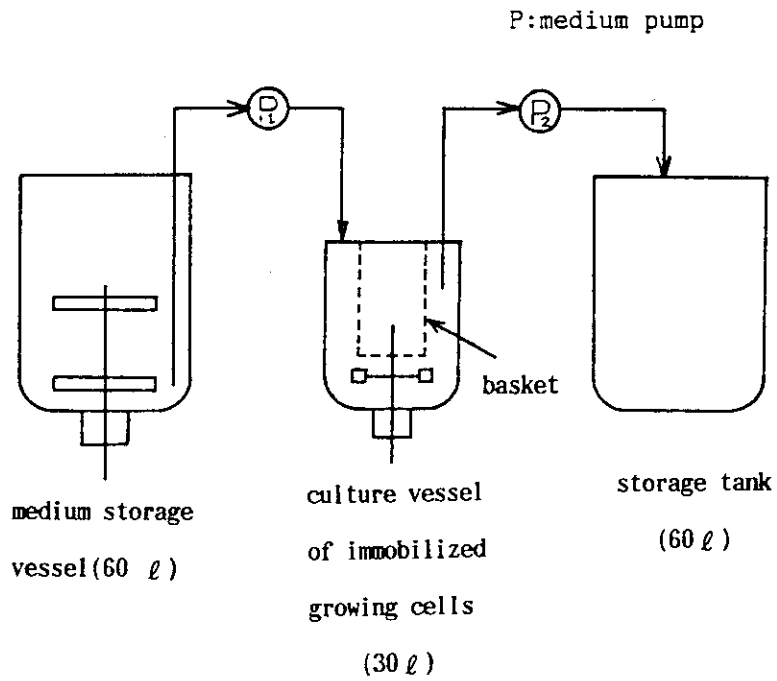


Fig. 5 Flow sheet of continuous culture.

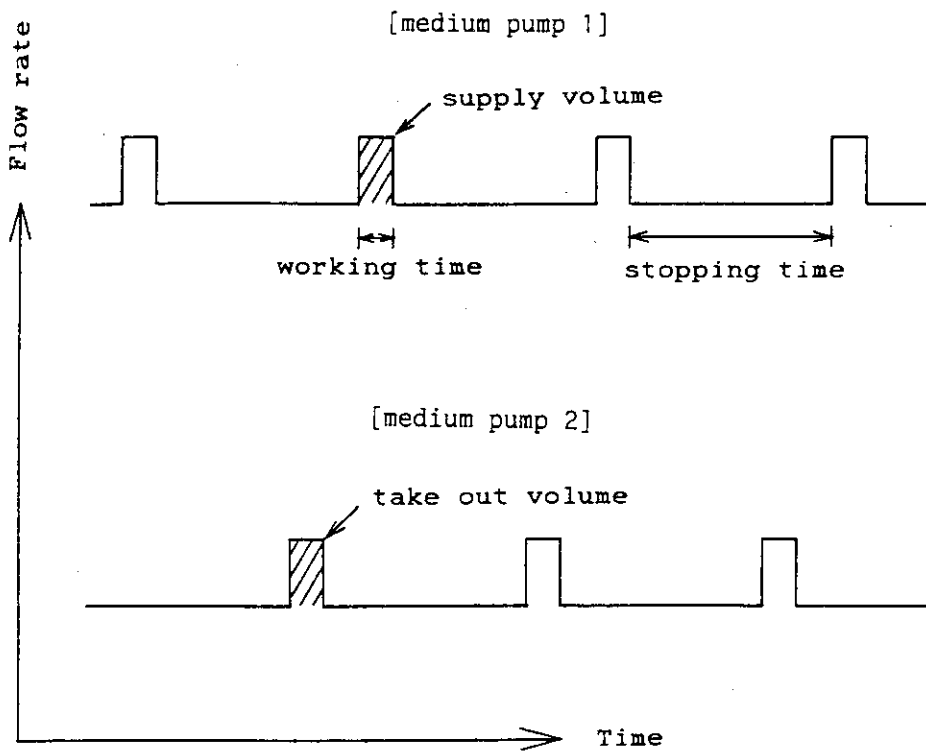
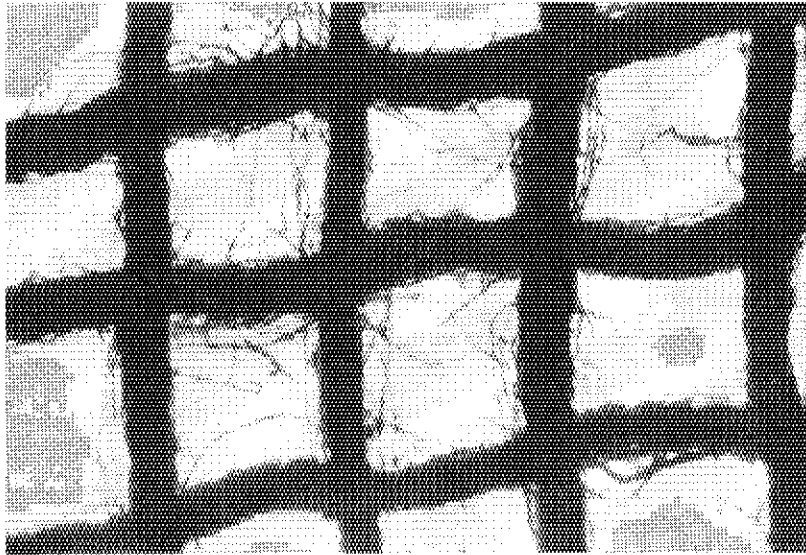
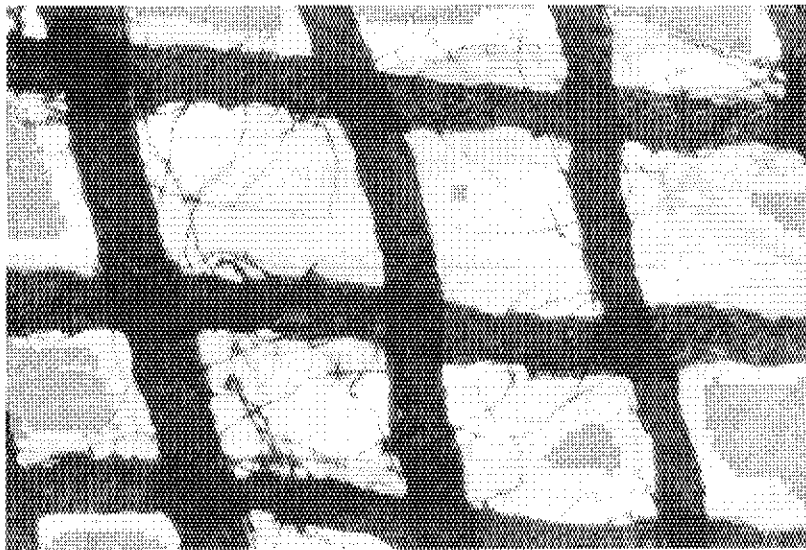


Fig. 6 Working condition on medium pump.



(a) gauze



(b) carrier

Fig. 7 Photograph of carrier.

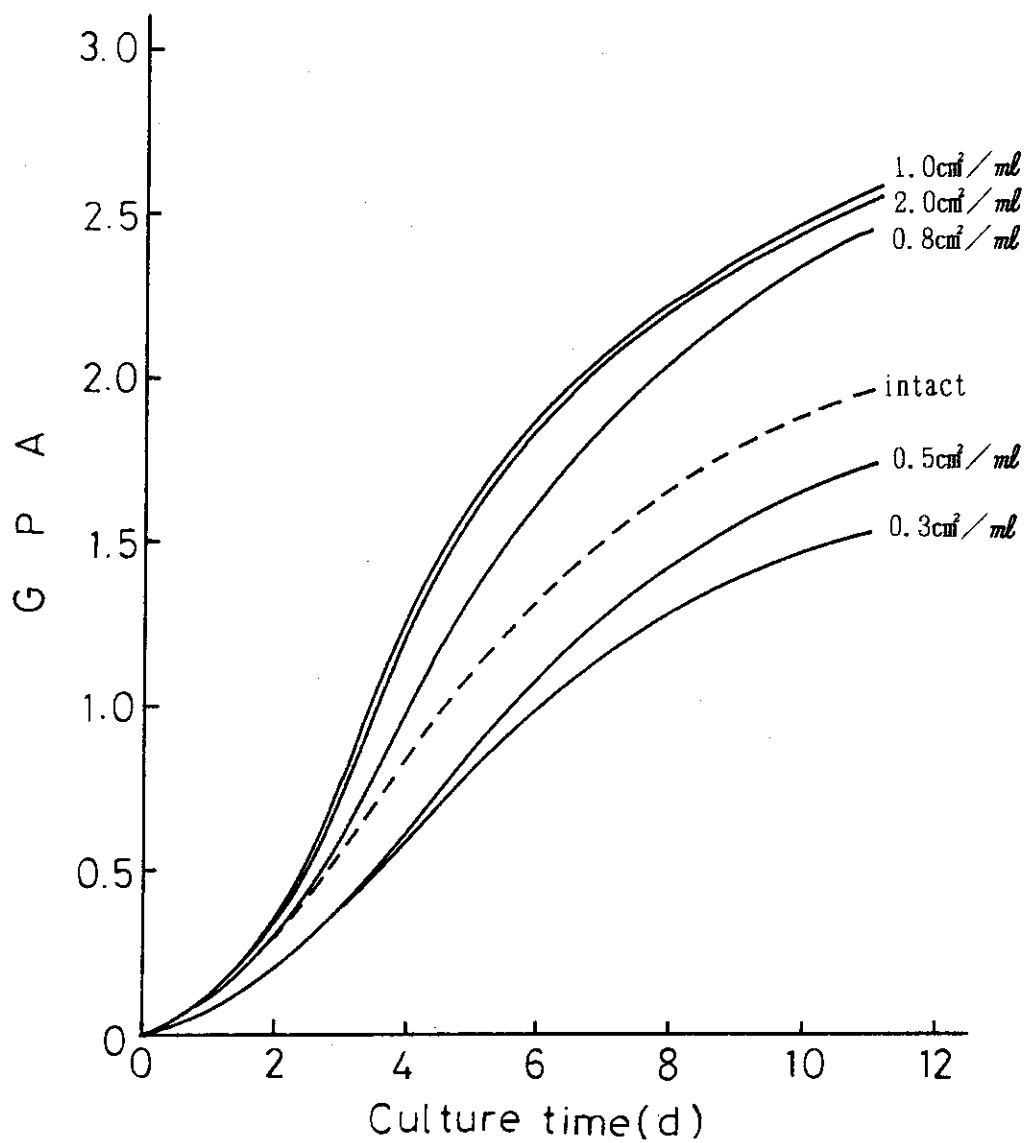


Fig. 8 Influence of amount of carrier for culture.

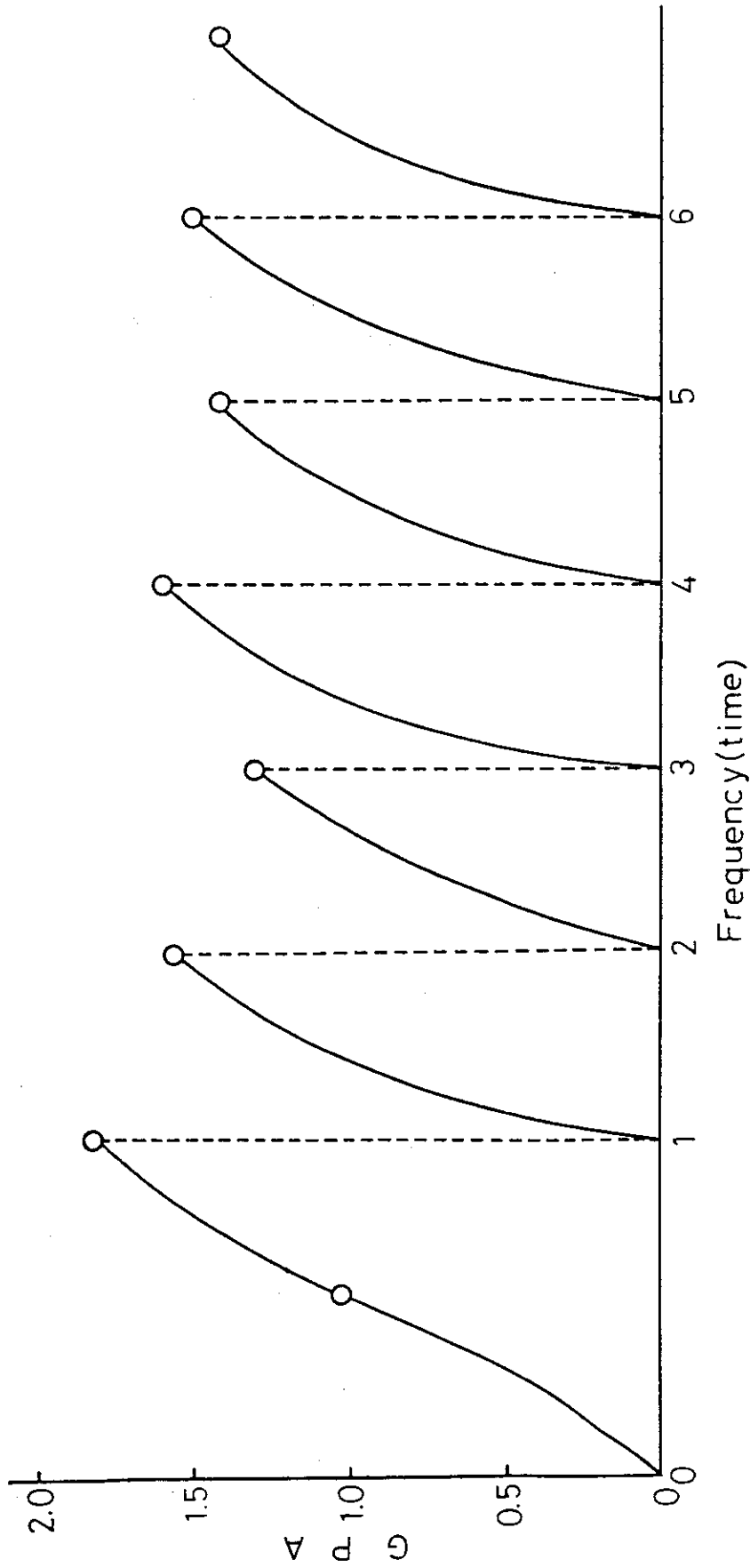


Fig. 9 Relationship between frequency of repeated batch culture and cellulase activity. Culture time on repeated batch culture was 6 days.

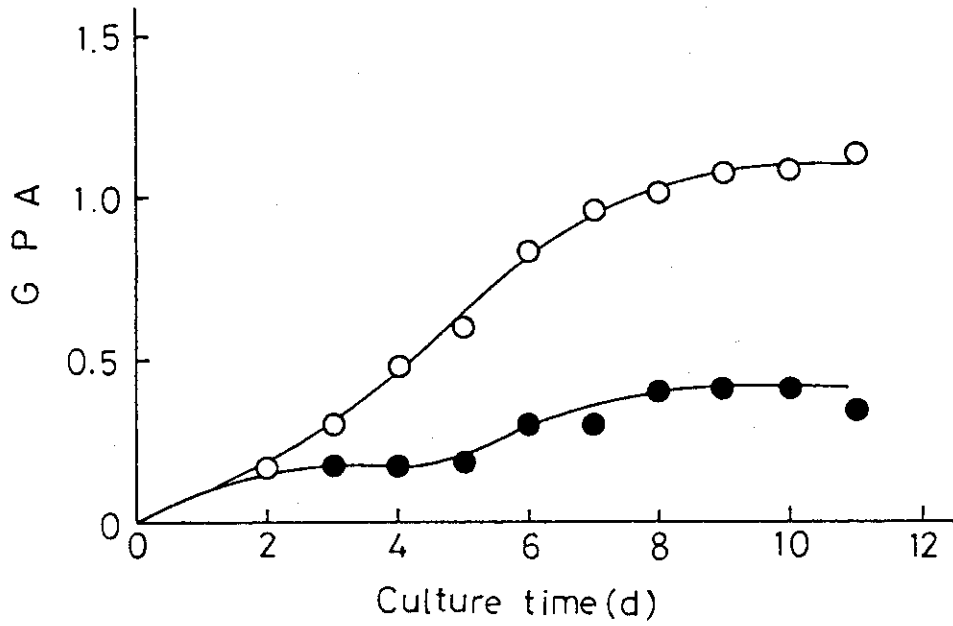


Fig. 10 Influence of amount of carrier for culture on vessel.
 Amount of carrier: (○), 0.9 cm²/ml; (●), 0.1 cm²/ml.
 Culture condition: stirring speed, 250rpm; aeration, 0.2v/v/m.

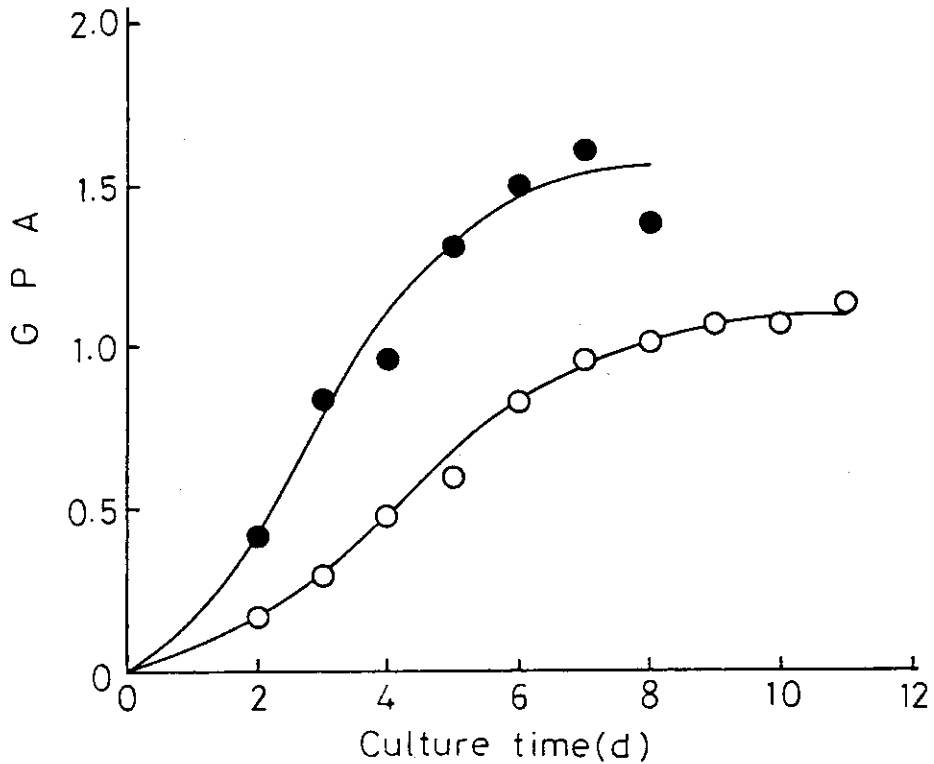


Fig. 11 Influence of stirring speed for culture with immobilized cells.
 Stirring speed: (○), 250rpm; (●), 450rpm.
 Aeration: 0.2v/v/m.

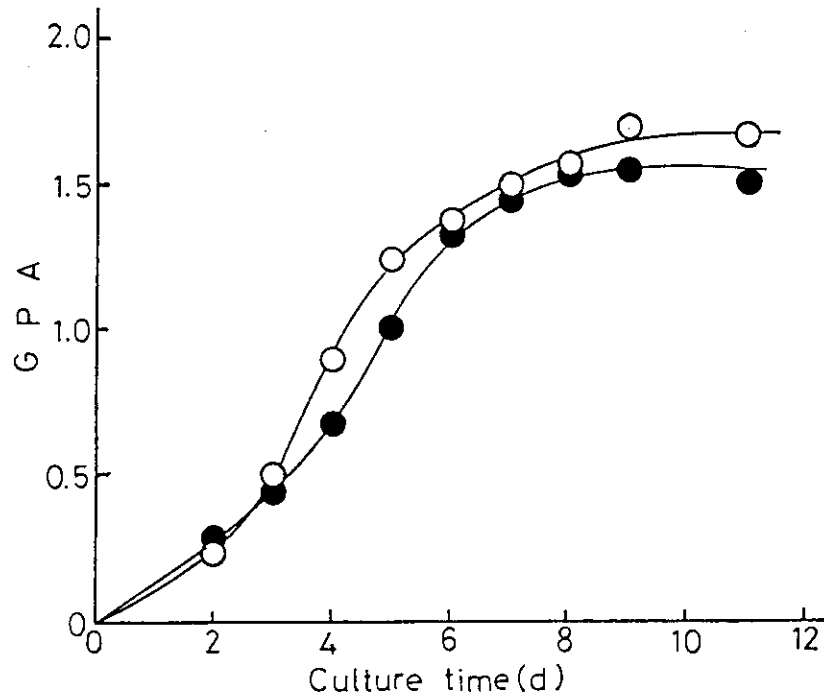


Fig. 12 Influence of aeration rate for culture with immobilized cells.

Aeration: (○), 0.1v/v/m; (●), 0.2v/v/m.
 Stirring speed: 450rpm.

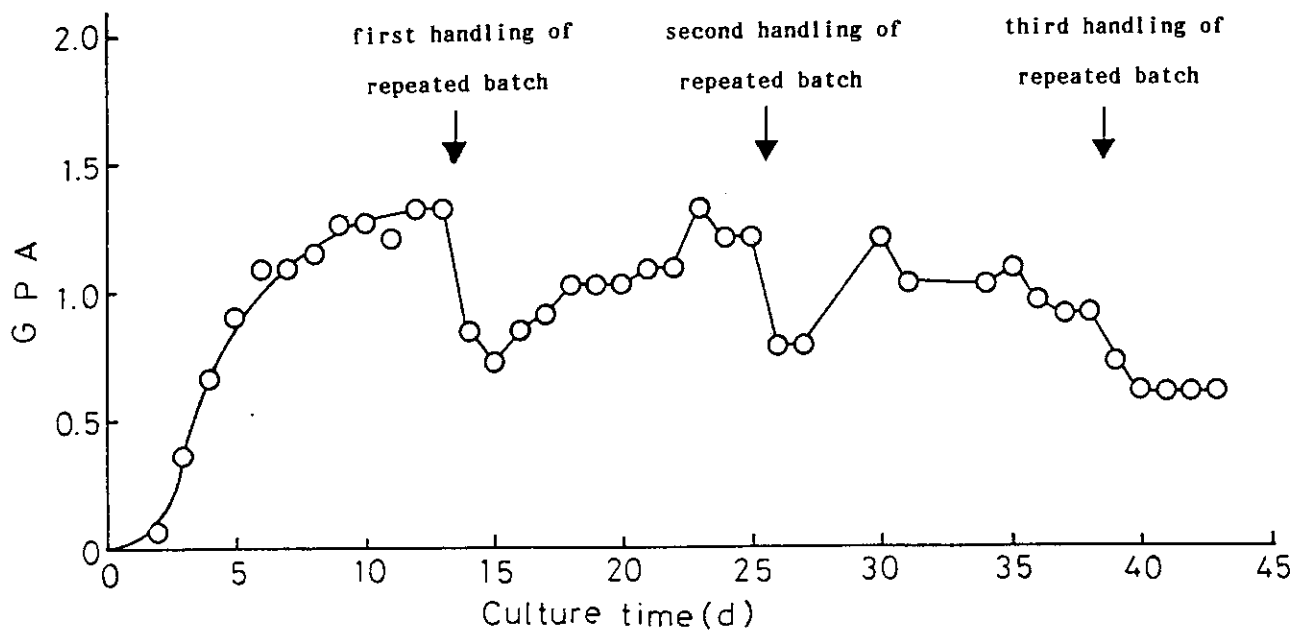


Fig. 13 Relationship between flequency of repeated batch culture and cellulase activity.

Culture condition: stirring speed, 250rpm; aeration, 0.2v/v/m;
 amount of carrier, $1.0 \text{ cm}^2/\text{m}\&$.

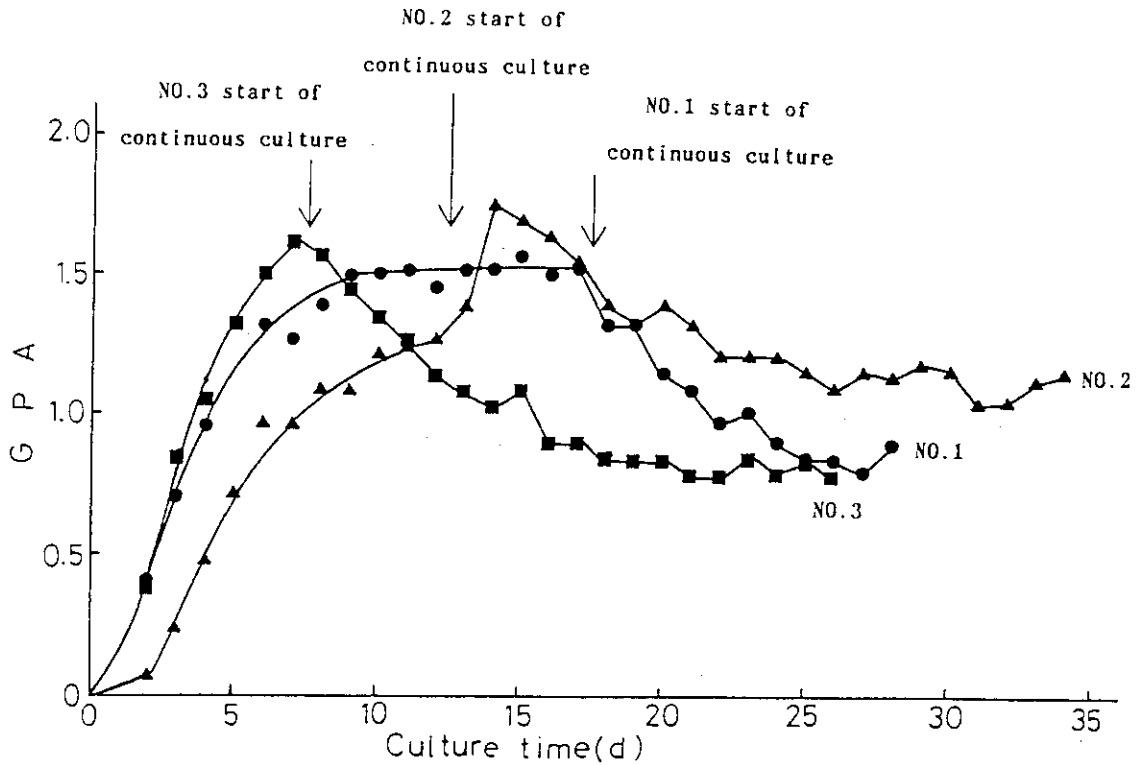


Fig. 14 Relationship between culture time and cellulase activity on continuous culture.

Retention time:NO.1, 6days;NO.2, 8.8days, NO.3, 8.4days.

Culture condition:stirring speed, 250rpm;aeration, 0.2v/v/m, amount of carrier, 0.8cm²/ml.

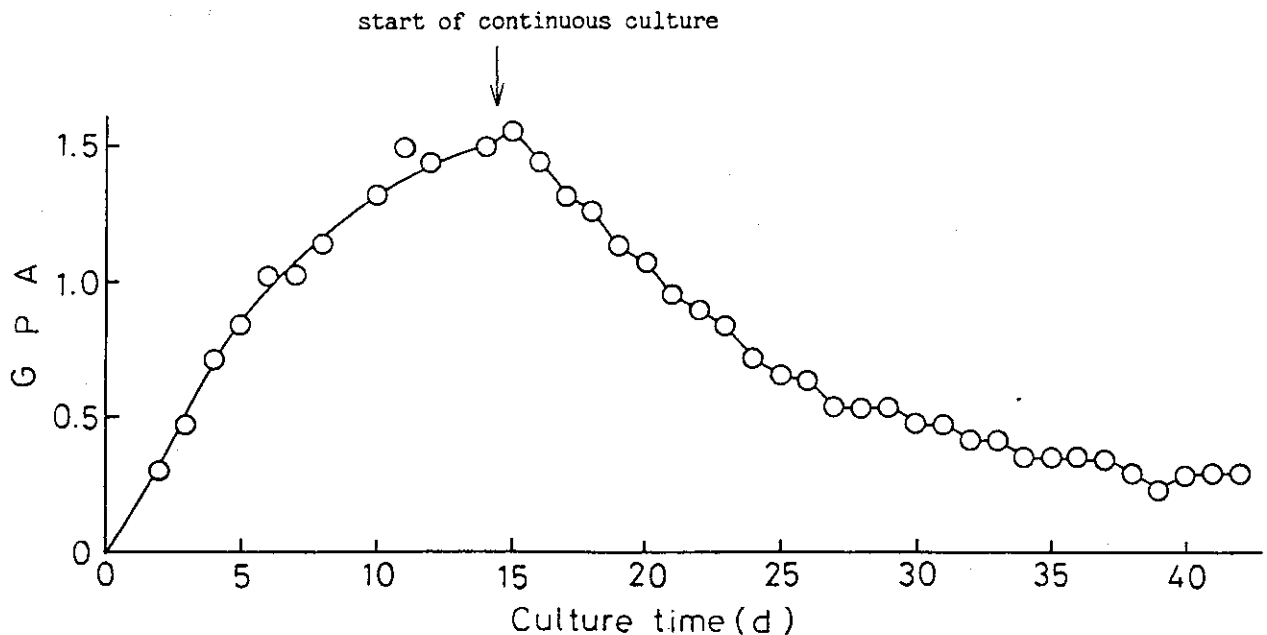


Fig. 15 Relationship between culture time and cellulase activity on continuous culture with intact cells.

Retention time: 8 days.

Culture condition:stirring speed, 250rpm;aeration, 0.2v/v/m.