

微生物保持粒子に固定化された
糸状菌の菌体内リパーゼ生産
およびそのエステル転移反応への
応用に関する研究

1991年

中 嶋 敏 光

①

微生物保持粒子に固定化された
糸状菌の菌体内リパーゼ生産
およびそのエステル転移反応への
応用に関する研究

1991年

中 嶋 敏 光

目次

第1章 序論	1
1-1 はじめに	1
1-2 微生物によるリパーゼ生産に関する既往の研究	3
1-3 エステル転移反応に関する既往の研究	9
1-4 微生物保持粒子への固定化に関する既往の研究	16
1-5 本論文の目的と内容	26
第2章 <i>Rhizopus chinensis</i> の菌体内リパーゼ生産を 促進する培養条件	28
2-1 緒言	28
2-2 実験装置および実験方法	29
2-3 実験結果および考察	33
2-3-1 菌体内リパーゼ活性を高める培地組成	33
2-3-2 微生物保持粒子固定化菌体のリパーゼ生産	36
2-3 結論	42
第3章 微生物保持粒子固定化菌体の大量培養	43
3-1 緒言	43
3-2 実験装置および培養方法	45
3-3 実験結果および考察	49
3-3-1 有機窒素源の選定	49
3-3-2 回分培養	50
3-3-3 比基質供給速度を制御した流加培養	54
3-3-4 最適通気量の決定	61

3-3-4-1	Circulating Bed Fermentor の酸素移動特性	61
3-3-4-2	微生物保持粒子内での増殖特性	66
3-3-4-3	微生物保持粒子最小循環通気量 における培養	69
3-4	結論	73
第4章	<u>Rhizopus</u> 属糸状菌の菌体内リパーゼ生産促進誘因	74
4-1	緒言	74
4-2	実験装置および実験方法	76
4-3	実験結果および考察	79
4-3-1	種々の微生物保持粒子への固定化が リパーゼ生産に与える影響	79
4-3-2	増殖形態とリパーゼ生産の関係	83
4-3-3	<u>Rhizopus</u> 属糸状菌のリパーゼ生産に 対する菌体集合現象の影響	87
4-4	結論	90
第5章	微生物保持粒子固定化菌体を用いたエステル転移反応	91
5-1	緒言	91
5-2	実験装置および実験方法	93
5-3	実験結果および考察	100
5-3-1	水分濃度平衡関係	100
5-3-2	水分濃度と酵素失活	102
5-3-3	液循環充填式バイオリアクターと カラムバイオリアクターの比較	104

5-3-4	長期連続エステル交換反応	106
5-4	結論	109
	総括	110
	使用記号	113
	引用文献	115
	本論文に関する報文	132
	謝辞	134
	参考論文	136

第1章 序論

1-1. はじめに

本論文は微生物保持粒子に固定化された糸状菌の菌体内リパーゼ生産およびそのエステル転移反応への応用について検討したものである。

リパーゼ酵素は油脂であるトリグリセライドをグリセリンと脂肪酸に加水分解するが、微水反応系においては加水分解反応が抑制され、トリグリセライドのアシル残基を他の脂肪酸と交換するエステル転移反応を触媒する。酵素であるリパーゼはトリグリセライドに作用する際の位置特異性、また脂肪酸に作用する際の基質特異性を持つなど、通常の化学触媒にみられない特徴を有している。したがってリパーゼを用いたエステル転移反応では原理的には油脂中の脂肪酸組成を任意に変化させることが可能であるので、近年油脂化学工業界では新機能性油脂の開発、油脂の物性改善を目的としてこの酵素的エステル転移反応が非常に注目されている。

一般的には図1-1に示すような固定化酵素法によるエステル転移反応が数多く検討されており、実用化されつつある。¹⁾すなわち酵素は微生物を培養した後、濃縮や脱塩等の工程を経て、単離精製され（菌体外酵素）、その後何らかの担体に固定化されてはじめて、反応触媒として利用される。しかしながら、このような酵素の精製、固定化工程に非常にコストがかかり、如何にしても酵素が割高になってしまうという欠点をかかえている。Macrae²⁾、山根³⁾、橋本⁴⁾、間瀬ら⁵⁾も指摘しているように現状におけるリパーゼの市場価格はアミラーゼやプロテアーゼとの比較において高価であり、それがリパーゼの工業的利用を妨げる一つの要因となっていると思われる。したがって工業的に有利なエステル転移反応プロセスの開発には固定化酵素の調製コストを低減することのできる技術の開発がキーとなる。

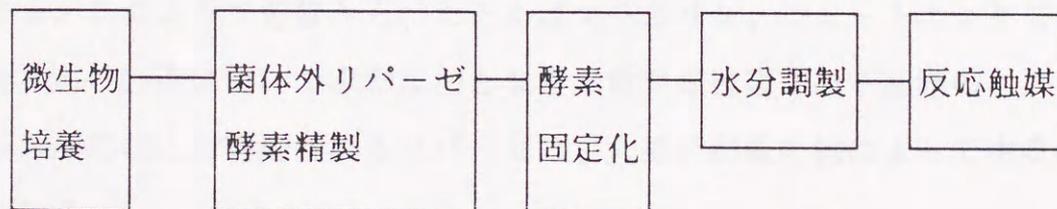
本研究では固定化酵素の調製コスト低減策の一つとして、リパーゼを生

産する微生物を直接、酵素剤（菌体内酵素）として使用できれば図1-1に示すごとく酵素精製、固定化工程を省略でき、経済的に有利なプロセスを提供できると考え、検討を開始した。

このような菌体法によるエステル転移反応の技術開発には、微生物の菌体内リパーゼ生産を促進する培養条件の選定、さらに微生物菌体の取り扱いを容易にするために、微生物の効果的な固定化法の開発、固定化微生物の大量培養法の開発、および固定化微生物バイオリアクターの開発が要求される。これらの検討に培養工学的手法、化学工学的手法を応用すればより高度な技術開発が可能である。

そこで本章では本研究と関係の深い（1）微生物によるリパーゼ生産、（2）エステル転移反応、および（3）微生物保持粒子への固定化に関する既往の研究を紹介し、本論文の目的と内容について述べることにする。

a) 酵素法



b) 菌体法

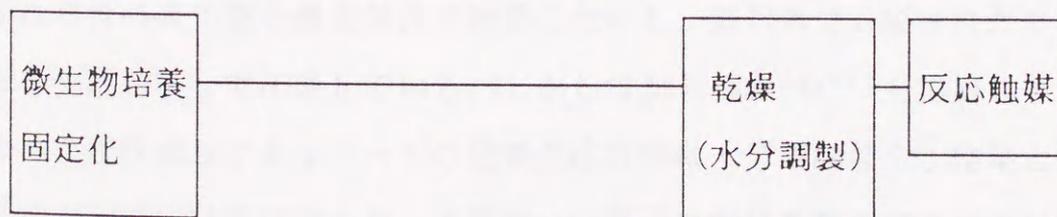


図1-1. 酵素法と菌体法の比較

1-2. 微生物によるリパーゼ生産に関する既往の研究

リパーゼはアミラーゼ、プロテアーゼとともに3大消化酵素の1つとして、生物の生命維持に重要な役割を果すものである。したがって、その研究の動向は生物化学、医学、生理学等の学術分野はもとより、また応用酵素の領域、例えば油脂化学工業の分野でも常に注目されている。自然界におけるリパーゼの分布は広く、動物界では膵臓、肝臓などに、植物界ではヒマシ、燕麦などに、また微生物界ではカビ、酵母、バクテリアなどに見出されている。しかしながら工業的な酵素給源としての見地からは、動物臓器や植物種子を給源とするものは無尽蔵にうることができず、また水に抽出されにくく不安定であるという欠点を持っている。これに対し微生物起源のものは自然界に多種多様に存在する微生物の中から目的にあったリパーゼを生産するものを選び出し、その培養条件を種々変更することによって人為的に酵素の生産性を高めることができるので工業生産には有利である。このような背景から、たとえばマーガリン、ショートニングなどの加工脂の製造において水素添加とならぶ重要な技術である油脂のエステル転移反応などに利用されるリパーゼは、大部分が微生物によって生産されている。

微生物によるリパーゼの工業生産においては、酵素精製の簡便性から菌体外リパーゼを得ることを目的として、微生物のスクリーニングを行ない、それぞれの微生物を最適条件で培養したのち、菌体外に分泌されたリパーゼを分離精製して市販している。しかしながら Macrae²⁾ も指摘しているように現状におけるリパーゼの培養生産収率は十分ではなく、結果としてリパーゼ酵素は高価であり、工業的には高価な製品を生産する以外にはその応用は期待できない状況下にある。したがって既往の研究においては、リパーゼの安価な供給を目的として、高生産菌の発見、効率的な培養法の開発、遺伝子操作を利用した安定性と特異性に優れ、夾雑酵素産生の少な

い高リパーゼ生産菌の創製などが主として検討されている。

微生物の中でもリパーゼの生産性、分泌性を見地から糸状菌について多くの研究がなされている。Rhizopus 属の菌株に関して、岩井ら⁶⁾は Rhizopus delemar の培養条件とリパーゼ生産の関係を検討し、ペプトン、コーンスィープリカー、あるいは大豆粕のような有機態窒素源を相当量添加した培地において、著しくリパーゼの生産性が増大することを示し、また培地組成に支配されて、タンパク的性状をやや異にするとみなされる3種のリパーゼを生産することを報告している。さらに同菌株の培地組成に関して、Espinosaら⁷⁾は炭素源としてデキストリン、窒素源として酵母エキスが適切であり、また脂質関連物質の添加がリパーゼ生産を促進し、中でも Tween 80 が効果的であるという結果を得ている。また Mohsenら⁸⁾はグルコース、ペプトンをそれぞれ適切な炭素源、窒素源として報告しており、最適培養温度は30°Cとの結果を得ている。Giuseppin⁹⁾は Rh. delemar の培養時における溶存酸素濃度の影響について検討を加え、47 $\mu\text{mol/l}$ 以下の酸素律速状態がリパーゼ生産を促進することを見い出している。他の Rhizopus 属の菌株について、Nahas¹⁰⁾、宇佐美ら¹¹⁾が Rh. oligosporus のリパーゼ生産条件を検討しており、それぞれ炭素源としてTweens、オリーブ油が適切であるとの結論を得ている。Rh. japonicus については Aisakaら¹²⁾の報告があり、レシチンのようなリン脂質の添加が著しく本菌のリパーゼ生産を促進し、これはレシチンによりリパーゼの分泌が促進されるためであるとの結論を得ている。Akhterら¹³⁾は Rh. arrhizus, Rh. japonicus, Rh. delemar, Rh. nigricans のリパーゼ生産に対するオリーブ油の影響を検討し、オリーブ油の添加培地では菌体外活性は低下し、リパーゼの失活速度が速くなることを示唆した。加えてAkhterら¹⁴⁾はオリーブ油、マスタード油、トリブチリン、ヤシ油を用いて、Rh. arrhizus, Rh. japonicus, Rh. oryzae のリパーゼ生産に対するトリグリセリド種の影響を調べ、生産されるリパーゼの生成阻害や基質特異性に特別な変化を

見出さなかったと報告した。このようにRhizopus属の糸状菌の中には高いリパーゼ生成能を持つものが多く日本においては天野製薬(株)でRhizopus niveus由来のリパーゼが、大阪細菌研究所でRhizopus japonicus由来のリパーゼがすでに工業生産されている。³⁾

Rhizopus属以外の糸状菌に関して、Nakaら¹⁵⁾はMucor javanicusのリパーゼ生産性の向上について検討を加え、培養時間の短縮と培養ブロス中で最大活性が得られた後のリパーゼの安定性に大豆油の添加が効果的であることを示した。Penicillium citrinumのリパーゼ生産条件についてはSztajerら¹⁶⁾の報告があり、炭素源としてスターチ、窒素源としてペプトン、温度 22°C、pH 7.2、インデューサーとして菜種油が最適であると報告している。Petrovićら¹⁷⁾はPenicillium roquefortiのリパーゼ生産に対する炭素源の影響を検討し、2%グルコースが適切であることを示唆している。Aspergillus foetidusについてはNairら¹⁸⁾が検討しており、2%オリーブ油および 0.5% シュクロースからなる培地で最大活性が得られたと報告している。Omarら¹⁹⁾はHumicola lanuginosaの生産する耐熱性リパーゼの生産条件を検討し、インデューサーとして鯨油あるいはビーバー油、消泡剤としてシリコンKm-70を含むソルビトール-コーンステープリカー培地が最適であるとの結論を得ている。現在、Aspergillus niger 由来のリパーゼが工業生産され、市販(天野製薬(株)より)されている。³⁾

酵母由来のリパーゼでは、Candida rugosa (Candida cylindracea)について、Valeroら²⁰⁾の報告があり、バクテリア由来のリパーゼでは、Okekeら²¹⁾によって、Acremonium stictum の静置培養における最適条件が検討されている。

上述のごとく、微生物によるリパーゼ生産に関する既往の研究のほとんどは菌体外リパーゼ生産を促進する培地組成、すなわち炭素源、窒素源、脂質関連物質(インデューサー)の検討、および通常の攪拌槽での回分培養における最適な培養温度、pHの検討にその中心課題をおいている。しか

しながら、既に述べた如く、これらの条件は使用する微生物に依存しており、新たな微生物を使用する場合はその微生物に特有な最適条件をその都度、検討しなければならないと考えられる。

このような回分培養における培養条件の最適化により、微生物リパーゼの生産性をある程度高めることができ、リパーゼの生産コストをかなり低下させることに貢献したが、前述のごとく、工業的利用を考えた場合にはまだまだ十分とはいえ、最近、流加培養などの培養工学的手法あるいは遺伝子操作等のニューバイオテクノロジーを応用してさらなる生産性の増加が試みられている。以下最近のトピックスを紹介する。

Lechnerら²²⁾は彼らが開発した透析培養槽を用いて、リパーゼ分泌遺伝子を導入した *Staphylococcus carnosus* の高密度培養および菌体外酵素生産を試みた。透析によって酸、アルコール等の増殖阻害をひきおこす生産物濃度を低レベルに保つことができ、結果として、60 g dry cell/l の高菌濃度を実現し、菌体外タンパク質の約30%に相当するリパーゼ(230 mg/l)の生産に成功している。Voitら²³⁾は同じくリパーゼ分泌遺伝子を導入した *Staphylococcus carnosus* のリパーゼ生産に彼らの開発した遠心場バイオリアクター (Centrifugal field bioreactor) を適用し、578 units/l/h (フラスコ培養の10倍) の高リパーゼ生産性が得られたことを報告している。Voitら²³⁾の検討結果によれば、*Staphylococcus carnosus* のリパーゼ生産収率および最大増殖速度はフラスコ、透析培養槽²²⁾、遠心場バイオリアクターで差がなく、*Staphylococcus carnosus* のリパーゼ生産は増殖連動型であり、その生産速度は培養槽の酸素移動速度に比例する。遠心場での酸素移動速度は通常の気泡塔(重力場)に比べ、数オーダー高く、理論的には遠心場バイオリアクターにおいて、100 g/l の高菌濃度、6600 units/l/h の高生産性が得られると指摘している。

既に、天野製薬(株)で工業生産されている *Pseudomonas fluorescens* 由来のリパーゼの生産性向上に流加培養法の適用が試みられている。Suzuki

ら²⁴⁾は培養基質であるオリーブオイルの比基質供給速度を $0.04-0.06(\text{g-oil})(\text{g-dry cell})^{-1}(\text{h})^{-1}$ の範囲にコントロールすることが Pseudomonas fluorescens のリパーゼ生産に効果的である事を見出し、増殖速度に対応するものとして、培養時の二酸化炭素生成速度をオンラインで測定し、二酸化炭素生成速度に対するオリーブオイル供給速度を変化させた。その結果、菌体濃度が60 g/lまではオリーブオイル供給速度を50 g oil/mol CO₂とし、その後30 g oil/mol CO₂に減少させることにより、1980 units/mlの高リパーゼ活性を得ることに成功し、回分培養に比べ、リパーゼの生産性および収率共に増加したと報告している。さらにIshiharaら²⁵⁾は Pseudomonas fluorescens の菌体濃度を直接、レーザー濁度計を用いて測定し、比基質(オリーブオイル)供給速度を最適値にコントロールした。加えて、Ishiharaら²⁵⁾は過剰のFeイオンがPseudomonas fluorescens のリパーゼ生成を阻害することを見出し、濁度を指標にしてオリーブオイルとFeイオンを同時に流加する事により、5600 units/mlの極めて高いリパーゼ活性を得ている。

しかしながら、これらの方法²²⁻²⁵⁾は工業生産への応用を考えた場合、複雑な形状を有する培養槽のスケールアップ、培養基質として高価なオリーブオイルを使用している点など、まだまだ多くの検討課題を残している。

遺伝子操作を応用した例として、Huge-jensenら²⁶⁾はRhizomucor miehei のリパーゼ生成に関する遺伝子を Aspergillus oryzae に導入した。この遺伝子組替え麹菌によりリパーゼの大量生産がノボ生化学工業によって実施されているようである(日経バイオテク:1988年2月1日号)。また本酵素は洗剤用酵素として、コンパクト化洗剤に配合され既に消費者向けに売り出されている。しかしながら、本酵素の価格は数1000円/kg程度であり、まだまだ工業的利用を考えた場合、安価であるとは言い難い(日経バイオテク:1988年2月15日号)。

以上、紹介した研究例はすべて菌体外リパーゼをその研究対象としてい

る。本研究と関係の深い菌体内リパーゼに関してはBlainら²⁷⁾が多くの糸状菌において生産されたリパーゼ(活性)の一部が菌体内に残存する事を報告して以来、Bellら²⁸⁾, Pattersonら²⁹⁾, Knoxら³⁰⁾によってRhizopus arrhizusの乾燥菌体を利用したエステル合成が試みられている。しかしながら、彼らは単にRhizopus arrhizusが菌体外リパーゼを生産する際に菌体内に認められた残存リパーゼ活性を利用しているに過ぎず、菌体内リパーゼ活性を高めるような培養条件等、何ら検討されていない。Gomiら³¹⁾は酵母Saccharomyces lipolyticaをオリーブオイルや長鎖脂肪酸(例えばオレイン酸)を含む培地で培養すると菌体内リパーゼ活性が上昇することを報告し、太田ら³²⁾は本菌の乾燥菌体の油脂のエステル交換反応への応用を試みている。しかしながら、詳細は次項(1-3)で詳しく紹介するがSaccharomyces lipolyticaの乾燥菌体の場合、エステル交換反応助剤として、セライトを添加する必要があるなどの技術的課題を残している。

したがって、菌体内リパーゼを利用する本研究では、優良な菌体内リパーゼ生産株の選定、菌体内リパーゼ活性を高める培養条件の検討、菌体内リパーゼ活性を効率よく発現させることのできる乾燥条件の検討が重要となるであろう。

1-3. エステル転移反応に関する既往の研究

リパーゼは、いうまでもなく、トリグリセライドを加水分解してグリセリンと脂肪酸にする酵素であり、triacylglycerol acylhydrolase, E.C. 3.1.1.3 と命名されている。しかし最近、この反応以外にも種々の反応を触媒することが明らかになってきた。これらリパーゼ反応は1) エステルの加水分解、2) エステル合成反応、3) エステル転移反応 (transesterification) に分類される。さらにエステル転移反応はエステルと反応する相手の化学種によって、3-1) アシドリシス (acidolysis)、3-2) アルコホリシス (alcoholysis)、3-3) エステル交換 (interesterification)、3-4) アミノリシス (aminolysis) の4反応に分類される。これらについては山根^{3) 33)}の総説に詳しく述べられている。

油脂の加水分解やエステルの立体特異的加水分解などは工業的に重要な反応ではあるが、後述の如く、本論文の目的は菌体内リパーゼの転移反応への応用であるので、ここでは触れないことにする。リパーゼの触媒作用は可逆的であり、微水系ではエステルの合成を触媒する。油脂工業で付加価値の高いリパーゼ反応としてはエステル合成やエステル転移がより重要のようで、現在、最も興味をもたれている反応は、安価な油脂からカカオバター代用脂を合成する反応である。製菓用 (主としてチョコレート) の原料として、油脂の中でも比較的高価なカカオ脂は、1,3位に飽和脂肪酸であるパルミチン酸あるいはステアリン酸を、2位に不飽和脂肪酸であるオレイン酸ををもつ対称型トリグリセライドである。そこで、安価な油脂 (2位に不飽和脂肪酸を多く含むもの: 自然界に比較的多く存在する。) と脂肪酸あるいは脂肪酸エステルに1,3位置特異性リパーゼを作用させてカカオバター様油脂を製造する研究が多数報告されている。^{1) 2) 4) 34-37)} 本研究においても菌体内リパーゼをこのカカオバター代用脂製造プロセスに応用することを最終目的としている。

油脂工業でのリパーゼによるエステル転移反応の特徴として、まず反応基質（油脂、脂肪酸）が水に難溶であることが挙げられる。しかしながらリパーゼに限らず酵素の活性発現には、酵素がアクティブはコンホメーション（3次元構造）を維持するために最低量の水の存在が不可欠であることが最近の研究により明らかになりつつある。³⁸⁻⁴⁰⁾したがって、如何にして水に難溶の基質中で酵素まわりに微量の水分を保持させて反応させるかが重要となる。既に述べたように酵素まわりの保持水分量が多いと加水分解反応が促進され、目的とする転移反応の収率は低下する。したがって既往の研究においてはリパーゼを何らかの担体に固定化し、担体中の水分濃度を乾燥などの操作により、適切量に調整して、エステル転移反応に用いている。また酵素の活性発現に必要とされる水分量は非常に少なく、基質である油脂や脂肪酸中に存在する水分量、あるいはこれらの基質を溶解した有機溶媒（ヘキサンなど）中の水分量（ppm オーダー）で十分であるようで、酵素を固定化せず、直接、粉末状態（固体酵素）で反応に供した報告⁴¹⁻⁵⁰⁾もある。これらの研究例はリパーゼがどのような反応を触媒するか、酵素の活性発現あるいはエステル転移反応に水がどの程度必要であるか、といったようなリパーゼ反応の基礎研究、あるいは純酵素化学的検討がその中心課題である。また安島、稲田⁵¹⁾によって報告されているようなリパーゼをポリエチレングリコールで修飾して有機溶媒に可溶化して、エステル転移反応に利用する試みもなされている。しかしながら、工業的には高価な酵素の再利用あるいはリパーゼの触媒機能を最大限に発揮させ、酵素を有効利用できるようなバイオリアクターの構築を考えると、やはり固定化法の方が有利であろう。脂質類の酵素的変換バイオリアクターは最近、活発に研究されており、山根⁵²⁾の総説に紹介されているようにエステル転移用バイオリアクターとして、充填層型バイオリアクター、超臨界ガスバイオリアクター⁴⁸⁾（ここでは、酵素は固定化せずに用いられている。）、膜型バイオリアクターが報告されている。そこで、ここではバイ

オリクターの構築を念頭に置いた固定化リパーゼによるエステル転移反応の研究例を紹介する。

Yokozekiら⁵³⁾は *Rhizopus delemar* 由来のリパーゼの種々の光硬化性樹脂、ウレタンプレポリマーへの包括固定化、また種々の多孔性シリカへの物理吸着、イオン結合、共有結合による固定化を試み、ヘキサン中でオリブオイルとステアリン酸のアシドリシス反応によりカカオバター様油脂を生成する活性（エステル転移活性）を比較した。すべての固定化酵素において活性発現は認められたが、中でも疎水性の光硬化性樹脂に包括固定化したもの、セライトに物理吸着したものが高活性を示し、包括固定化はリパーゼの操作安定性を増加させたと報告した。Yokozeki⁵³⁾らの先駆的研究に端を発し、その後多くの研究者によってリパーゼのセライト（けいそう土）への固定化、ならびにそのエステル転移反応への応用が検討されている。固定化担体としてセライトが注目を集めた理由として、既にろ過助剤等で食品工業に利用されており、安全である点が挙げられよう。

Wisdomら⁵⁴⁾は3種類のけいそう土について、パーム中融点部とミリスチン酸のアシドリシス反応を対象として、*Aspergillus*属糸状菌由来のリパーゼの固定化担体としての適切性を比較検討した。彼らの検討結果によれば、3種類のけいそう土の中ではHyflo Supercelが最も高いエステル転移活性を示した。興味深い結果として、これら3種のけいそう土についてリパーゼの加水分解活性についてはほとんど差を見い出さず、そのエステル転移活性については有意差を見い出している。電子顕微鏡によるこれらけいそう土の内部構造と固定化リパーゼ酵素（沈澱）の観察から Hyflo Supercelの表層近くあるいは内部空隙の一部に形成されている薄いリパーゼ酵素の層が有効に働いているのではないかと推察している。またWisdom⁵⁵⁾らはセライト上に粗精製リパーゼをアセトン沈澱、固定化する際に粗精製リパーゼ中に存在すると考えられるリパーゼ以外の物質（タンパク質）影響を検討し、共存物質の存在は加水分解活性を変化させることなく、エ

エステル転移活性を低下させることを示した。エステル転移活性を増加させるには粗精製リパーゼの濃度を増加させる、あるいは粗精製リパーゼに精製リパーゼを加えて沈澱させるのが効果的であると報告している。しかしながら、リパーゼ濃度を上昇させてもある濃度以上ではエステル転移活性はプラトーになり（加水分解活性は比例して増加する。）、担体内でエステル転移反応に効果的に働く酵素界面が飽和するためではないかと推察している。さらにWisdomら⁵⁶⁾は担体内エステル転位活性を増加させるために *Rhizopus arrhizus* 由来のリパーゼをセライトに固定化し、2.9-1のカラムリアクターでシアオレインとステアリン酸、シアオイルとミリスチン酸のバッチエステル転移反応を実施し、シアオレインでは3日間で50kg処理しても殆どリパーゼ活性の低下は認めなかったが、シアオイル（シアオレインに比べ低グレード）を用いた場合、徐々に活性が低下する poisoning effect を報告している。

長田ら⁵⁷⁾は市販の3種類のリパーゼ (Lipase OF, Lipase A, Lipase TOYO) を Celite 545 に固定化したもの、およびノボ社より市販されている固定化酵素 Lipozyme（多孔性陰イオン交換樹脂に *Mucor miehei* のリパーゼを固定化したもの）を用いて、トリオレインとパルミチン酸のアシドリシス反応の最適水分量について検討し、使用する酵素により違いがあることを示した。さらに最適水分条件においてトリオレインとエイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) のアシドリシスを実施し、EPA 導入率は Lipase OF で最も高く、DHA 導入率は Lipase TOYO が最も高いと報告した。加えて、いわし油への EPA, DHA の濃縮を試み、この時の EPA 導入率は Lipase TOYO で最も高く、DHA 導入率は Lipozyme が最も高いことを示した。

Kaimalら⁵⁸⁾はリパーゼの脂肪酸に対する基質特異性が低温では不飽和度の高い脂肪酸に対して高くなる性質を利用し、セライトに固定化したブタ膵臓リパーゼ、および Lipozyme を用いて、10°C でのアシドリシス反応を行なうことにより、大豆油フレーバーの不安定要因である大豆油中のリノ

レン酸量を3%以下に低減することができたと報告している。Mittelbach⁵⁹⁾はCandida由来のリパーゼをビーズ状のアクリル樹脂上に固定化したもの、および Lipozymeを用いて、サンフラワー油と種々のアルコールとのアルコールシスを石油エーテル中で実施し、十分な反応速度が得られたこと、長鎖アルコールほど反応速度が高くなることを示した。

以上、紹介した研究例はすべて、固定化リパーゼをバッチ反応で利用したものである。酵素を固定化することのメリットの1つとして、連続反応への展開が考えられる。そこで次に連続操作によるエステル転移反応の研究例を紹介する。Macrae⁶⁰⁾はRhizopus niveus由来の酵素をけいそう土に固定化したものを充填した充填層型バイオリアクターにパーム油の中融点部とミリスリン酸を石油エーテルに溶解した反応液を一定流量で通液した連続アシドリシスを実施し、反応液中の水分濃度を予め飽和濃度とすることにより、リパーゼ酵素は安定で、約 600 h の連続操作が可能であったと報告した。松本ら³⁷⁾は同じく充填層型バイオリアクターを用いた、パームオレインとステアリン酸の連続アシドリシス反応によりカカオバター代用脂の生産を検討している。彼らはエステル転移能の高いリパーゼとして、Alcaligenes起源のリパーゼを選択し、最適な固定化担体として、イオン交換樹脂(DEAEトヨール 650)を使用している。松本ら³⁷⁾のプロセスの特徴は酵素活性を維持するために系内の水分を制御する代わりに、エタノールを添加する方法を開発したことであり、エステル転移率を一定に保つように流速を調整しながら、約360日の連続反応が実施され、酵素の活性半減期は180~200日と報告されている。

Yamaneら⁶¹⁻⁶³⁾はPseudomonas fluorescensのリパーゼおよび彼らが開発した微孔性薄膜型バイオリアクターを用いて、アルコールシスの1種であるグリセロリシス(油脂とグリセリンの反応)の連続反応を実施した。テフロン膜の方がポリプロピレン膜に比べ、より高い反応率を与え、この反応におよぼす一番大きな影響因子はグリセリン中の水分であり、その水

分濃度の連続測定にフローセル型の電気伝導度計の利用が有効であることを示した。酵素の活性半減期は約3週間であると報告されている。さらにこのバイオリアクターのスケールアップについても検討されており、膜総面積あたりの油流量を基準にスケールアップ可能であることが示唆されている。⁶⁴⁾

最後に、本研究と関係の深い乾燥菌体内リパーゼを利用した研究例について述べる。前項(1-2)で少し触れたが、太田ら³²⁾は *Saccharomycopsis lipolytica* と細菌(未同定)の乾燥菌体によるオリーブ油とステアリン酸のアシドリシス反応を検討した。乾燥菌体を調製する際に使用する有機溶媒として、酵母ではアセトン、細菌ではイソプロピルアルコールが適切であることを示した。また酵母細胞のエステル交換反応の最適pH、温度は8.0、35°Cであり、加水分解反応のそれらに比べ、それぞれアルカリ側、高温側に偏倚していることを示し、最適水分濃度は酵母では1%、細菌では0.25%であると報告した。さらに脂肪酸に対する特異性についても検討を加えている。しかしながら、これらの乾燥菌体では反応助剤としてセライトを加えなければ反応が起こらないという技術課題を残している。

1-2項で少し紹介したように、エステル転移反応ではないが、Bellら²⁸⁾はリパーゼを含有する *Rhizopus arrhizus* の乾燥菌体がパルミチン酸とオクタノール、グリセリンとオレイン酸のエステル合成を触媒すること示唆した。Pattersonら²⁹⁾は同乾燥菌体を用いたグリセリンとオレイン酸のエステル合成反応およびセチルリノレートの合成反応を充填層型リアクター、攪拌槽型リアクターで実施し、リアクター内の菌体量当りのエステル化率は充填層リアクターの方が若干優れていると報告した。さらにKnoxら³⁰⁾は同乾燥菌体を用いたセチルアルコールとオレイン酸からのセチルオレート、1-オクタノールとオレイン酸からオクチルオレートの合成を検討した。バイオリアクターとしては、乾燥菌体を充填したリアクターと合成反応によって生成した水を除くためのモレキュラーシーブを充填した充填カラム

より構成されるループリアクターシステムを用いている。反応液の流量、酸濃度、アルコール濃度、水の除去速度などの操作量が合成反応速度に与える影響を調べ、最適条件では $19\sim 58 \times 10^{-8} (\text{mol})(\text{s})^{-1}(\text{g-mold})^{-1}$ 程度の反応速度が得られ、約 300 h の連続操作が菌体内活性を殆どロスする事なしに可能であったと報告している。しかしながら、彼らの用いた *Rhizopus arrhizus* の菌体内活性は 50 U/(g-cell) (加水分解活性) 程度であり、工業的応用を考えた場合にはさらなる活性の増加が望まれる。

エステル転移反応においては、反応系の水分濃度が重要なファクターであり、上述の固定化酵素を用いた多くの研究においてもその影響が検討されている。しかしながら、これらはバッチ反応における初期水分量、あるいは充填層型リアクターに供給する反応液中の初期水分濃度について検討しているに過ぎず、実際に反応が起こっているリアクター内の水分濃度の影響については何ら検討されていない。工業的に高価なリパーゼ酵素を有効利用するためにはリアクター内の水分濃度を制御できるようなバイオリアクターの開発が望まれ、それを可能とするようなリパーゼの使用形態 (固定化酵素) を探究することが重要となるであろう。

1-4. 微生物保持粒子への固定化に関する既往の研究

酵素、微生物あるいは動植物細胞などの生体触媒を固定化し、有用物質を生産する研究は近年ますます盛んであり、実用化例も多く発表されている。微生物や細胞を固定化する方法としてはアルギン酸、 κ -カラギーナン、寒天などの天然高分子材料あるいはポリアクリルアミド、光硬化性樹脂やウレタンプレポリマーなどの合成高分子材料を用いる包括法が一般的である。しかしながら、包括法は微生物の回収工程や固定化工程における無菌操作が煩雑であるという欠点を持っている。また、固定化した微生物が増殖する場合にゲルの破壊がおこり、長期連続運転をする上で非常に問題となる。

これに対して、Atkinsonら^{65) 66)}は球状に加工したステンレススチールやポリウレタンフォームなどの多孔性物質による固定化法を開発し、種々の微生物に応用している。彼らはこのような多孔性物質を Biomass Support Particles (以下 BSPs)、すなわち微生物保持粒子と呼んでいる。この方法は予め増殖させた菌体や細胞を人為的に固定化するのではなく、微生物の付着特性を利用して、例えば増殖過程で自然に付着固定化するもので、いわゆる "passive" な物理的吸着による固定化法である。BSPsによる固定化法は次の特徴を有する。

- (1)ゲル化剤、固定化反応試薬が不要
- (2)基質や生産物の粒子内物質移動速度が大きい
- (3)無菌操作が容易
- (4)担体(BSPs)の再使用が可能
- (5)担体の機械的強度が高い

当然のことながら、固定化微生物法の利点である

- (6)バイオリアクター内の微生物濃度が高められる
- (7)多段階酵素反応に利用できる

(8)生産物の分離が容易である

などの特徴を兼ね備えている。

ここでは微生物、動植物細胞のいくつかのBSPs固定化例をバイオリアクター形式も含めて紹介する。

まず糸状菌の固定化例を紹介する。Kobayashiら⁶⁷⁾はペニシリン生産菌である Penicillium chrysogenum の固定化用担体として ポリウレタンフォームを用いて、流動層型バイオリアクター (Fluidized bed reactor)

(FBR)によるペニシリン生産におよぼす担体添加量および酸素移動容量係数 k_{La} の影響を検討した。回分操作における最適な担体占有率、通気線速度を明らかにし、その条件下で反復回分操作を行ない、BSPs固定化菌体により半連続生産が可能であること、またペニシリンの生産収率が約2倍上昇することを示した。さらに連続培養を実施し、培養液中の残存基質濃度をゼロとするように連続定常操作することによって、高いペニシリンの比生産速度、生産収率が得られることを示し、このような操作条件下で、約2ヶ月間高ペニシリン生産濃度を維持することができたと報告した。⁶⁸⁾ Karhootら⁶⁹⁾は Rotating disc fermentor (RDF) を用いて、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ステンレススチール、ナイロン、ポリスルフォン製のディスクへの Penicillium chrysogenum の付着性およびディスク上でのフィルム増殖の度合いを比較した。検討した材料の中ではポリカーボネートが最適であり、ポリカーボネートを装着したRDFにおいては菌体は直線増殖し、固定化 Penicillium chrysogenum により、約6日間安定してペニシリンが生産されたと報告した。

ペニシリン醗酵にBSPsが応用された背景として、Gbewonyoら^{70) 71)}による多孔質球体のセライトビーズの表面に Penicillium chrysogenum の生物膜を形成させたペレットを気泡塔型バイオリアクター (Bubble column reactor) (BCR) 内で浮遊培養した試みが挙げられる。これは酸素移動の観点から小粒径のペレットを形成するように増殖させた方が、パルピー増殖

させた場合よりもペニシリンの生産性が優れているというKönigら⁷²⁾の報告に基づいて人為的なペレット形成を試みたもので、Kimら⁷³⁾によっても同様の試みがバイオリクターとして、FBRを用いてなされている。また、最近、Kerhavarzら⁷⁴⁾によって250~320-1の実容積をもつAir-lift reactor (ALR)を用いて、大スケールでのセライトへのPenicillium chrysogenumの固定化およびそのペニシリン生産が検討報告されている。

次に、酵素セルラーゼ生産への応用例を示す。Webbら⁷⁵⁾はTrichoderma virideの固定化担体として、球状のステンレススチールBSPsを用いて、Spouted bed fermentor (SBF)内でセルラーゼの連続生産を検討した。連続生産における収率および生産性はバッチ生産に比べ、それぞれ31%、53%上昇することを示し、固定化菌体のセルラーゼ比生産性は固定化しないものに比べ、約3倍高かったと報告した。Tamadaら⁷⁶⁾はSporotrichum cellulophilumをポリエステル不織布に固定化し、セルラーゼの反復回分生産を実施した。不織布内での増殖は不織布の空隙率に依存し、固定化菌体の耐熱性は固定化しないものに比べ上昇することを示した。反復操作により、23バッチ、のべ69日間安定したセルラーゼ生産が可能であったと報告している。また固定化菌体により生産されるセルラーゼの基質特異性が変化することも示唆している。⁷⁷⁾ Kumakuraら⁷⁸⁾はテトラエチレングリコールジメタアクリレートモノマーにセルロース繊維を加え、放射線重合して調製したBSPsにTrichoderma reeseiを固定化し、セルラーゼ生産が促進されることを示した。固定化培養ではサスペンション培養に比べ、培養槽内菌濃度が高くなるのがその主要因であると報告している。

その他、糸状菌に対するBSPsの適用例として、Fukudaら⁷⁹⁾はポリウレタンBSPsへのMucor ambiguusの固定化をSpouted bed fermentor (SBF)を用いて実施し、 γ -リノレン酸の分泌生産を試みている。反復回分培養により収率は従来法に比べ、40%程度、生産性は75%程度上昇することを示した。Sakuraiら⁸⁰⁾はポリエステル不織布にAspergillus nigerを固定化

し、高溶存酸素濃度下(150 ppm)で反復回分培養14バッチ、約1000 h、活性の低下なしに高濃度(220 g/l)でグルコン酸生産が可能であったと報告している。Kirkpatrickら⁸¹⁾はポリウレタンBSPsに固定化したTrametes versicolorによる潤葉樹クラフトパルプのバイオブリーチングを試み、固定化菌体では処理後のパルプ内に含まれる菌体がほとんどないこと、および繰り返し使用できることの利点を指摘している。Kautola⁸²⁾らはポリウレタンに固定化した Rhizopus arrhizusによるキシロースからのフマル酸の生産を検討した。統計的手法と経験的モデル式により培養条件を最適化し、固定化することにより、サスペンション培養に比べ、フマル酸濃度を3.4倍高めることができたと報告した。Capdevilaら⁸³⁾はポリウレタンに固定化した Phanerochaete chrysosporium によるリグニンパーオキシダーゼの生産を検討し、反復回分培養により、40.6 nkat/mlの高活性が得られ、反復操作による活性低下は1バッチ当たり約 7% で約8回の反復操作が可能であることを示した。

本研究では糸状菌のBSPsへの固定化を試みているので、ここでは詳しくは述べないが、放線菌への応用例として、Trückら^{84) 85)}の多孔性のガラスビーズBSPsに Streptomyces tendae を固定化をし Fluidized bed reactor (FBR)内で、抗性物質ニコマイシンの生産を試みた報告、Parkら⁸⁶⁾のセライトにCephalosporium acremoniumを固定化し、リアクターとしてFBRを用いて、セファロスポリンCの生産を検討した報告がある。

また酵母への適用例として、Blackら⁸⁷⁾のポリエステルフォームBSPsやステンレススチールBSPsを用いて、凝集性酵母(Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces uvarum)を固定化し、エタノール醗酵を実施した報告、Champluvierら⁸⁸⁾の Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces lactis のガラスプレート、ポリカーボネートプレート、ポリスチレンプレート付着性を調べ、これらの菌体内 β -ガラクトシダーゼの固定化を試みた報告がある。D'Souza⁸⁹⁾らはフランネル綿(布)へのパン酵母の固定化を試み、

彼らの開発した Cloth bioreactor (CB) を用いて、転化糖の製造を検討している。

細菌に対する適用例として、メタン細菌の固定化⁹⁰⁻⁹⁵⁾を試みた研究例、固定化担体としてポリプロピレンファイバーを用い、カラムリアクター内で *Acetobacter* sp. を固定化し酢酸醗酵へ応用した例⁹⁶⁾、またコットンタオルを装着した Rotating disc reactor (RDR) 内で *Acetobacter* sp. をディスク上に固定化し、同様に酢酸醗酵を実施した報告⁹⁷⁾がある。その他、修飾処理を施したポリビニルアルコールファイバーに、陰イオン性界面活性剤 (硫酸アルキル) の分解能を有する *Pseudomonas aeruginosa* を付着固定化した報告⁹⁸⁾、Bisping⁹⁹⁾らのカラムリアクター内で、*Pichia farinosa* を焼結ガラスのラシッヒリングに固定化し、グリセリン生産について検討した報告がある。さらに *Escherichia coli* が付着しやすい担体として、スチレンを含む N-benzyl-4-vinylpyridinium bromide の重合体を開発した報告¹⁰⁰⁾、耐熱性アミラーゼを菌体外に生産する *Escherichia coli* のシリコン発泡体への固定化を試みた報告¹⁰¹⁾、*Clostridium acetobutylicum* を親水処理を施したポリエステルスポンジに固定化し、Trickle bed reactor (TBR) 内でアセトノーブタノール発酵を実施した報告^{102) 103)}がある。また混合培養あるいは不安定な組換え微生物の培養における定常状態の挙動を操作する方法として、微生物の付着特性の違いを利用することが提案され、理論的解析も行なわれている。¹⁰⁴⁾

Bailliezら¹⁰⁵⁾は藻類 *Botryococcus braunii* のポリウレタンフォームへの付着固定化を検討し、その炭化水素生産への影響を調べている。

ヒトや動物由来の種々の生理活性物質を生産するために、動物細胞を大量に培養する技術や、医薬、香料などの原料となるアルカロイド、ステロイド、テルペノイドなどの二次代謝産物を生産する目的で、植物細胞の大量培養技術が近年、集中的に研究されている。これらの細胞を培養する際の問題点として、1) 増殖 (成育) が遅い、2) 高密度に培養できない、3)

せん断ストレスに弱い、などが挙げられる。^{106) 107)} これらの問題を解決する手段の一つとして、これら細胞を固定化することが考えられ、最近、BSPsによる固定化が試みられている。

動物細胞の固定化例として、Yamajiら^{108) 109)}の浮遊性細胞、Mouse myeloma MPC-11 をポリビニルホルマール(PVF)樹脂の多孔質体に固定化した報告があり、柳ら¹¹⁰⁾も肝細胞の固定化担体として、コラーゲンをコーティングしたPVF樹脂を応用している。また付着性細胞 Monkey kidney cells (Vero), Chinese hamster ovary cells (CHO-K1) をポリウレタンフォームに固定化した報告¹¹¹⁾、Perryら¹¹²⁾の多孔性のグラスファイバーに Chinese hamster ovary cells (CHO)を固定化した報告がある。

植物細胞に対する応用例として、Lindseyら¹¹³⁾はキャプサイシン生産細胞 Capsicum frutescens や Daucus carota のポリウレタンへの固定化に成功している。また、Rhodesら¹¹⁴⁾は Beta vulgaris と Humulus lupulus のポリウレタンへの固定化に影響する因子について検討を加え、さらに Hop cells のナイロンメッシュ、ステンレススチールBSPsへの固定化も試みている。¹¹⁵⁾ Parkら¹¹⁶⁾は Lithospermum erythrorhizon をポリウレタンに固定化し、Packed bed reactor (PBR) を用いてシコニンの生産を検討している。

現在、BSPs固定化法の実用化例としては、活性汚泥をポリウレタンBSPsに固定化した排水処理プロセスが報告されている。¹¹⁷⁾

以上、紹介した微生物、細胞のBSPsへの固定化例を表1-1にまとめた。微生物/細胞と担体の親和性、付着機構などを研究した報告¹¹⁸⁻¹²¹⁾もあるが、まだまだ不明な点が多く、今後の進展が期待される。しかしながら1-2項で述べた高リパーゼ生産菌が多い糸状菌類は容易にBSPsに固定化できると予想され、糸状菌や放線菌のような菌糸を形成する微生物に対する実用的な固定化法として、BSPs固定化法は非常に有望であろう。

表1-1. 微生物/細胞のBSPs固定化例 (その1)

微生物・細胞	生産物	BSPs	Bioreactor	文献
糸状菌				
<u>Penicillium chrysogenum</u>	ペニシリン	PU, PP, PC,	FBR, RDF,	67)68)
		SS, NY, SF,	BCR, ALF	69)70)
		CB		71)73)
				74)
<u>Trichoderma viride</u>	セルラーゼ	SS	SBF	75)
<u>Sporotrichum cellulophilum</u>	セルラーゼ	PE		76)77)
<u>Trichoderma reesei</u>	セルラーゼ	TEGMA		78)
<u>Mucor ambiguus</u>	γ-リノレン酸	PU	SBF	79)
<u>Aspergillus niger</u>	グルコン酸	PE		80)
<u>Trametes versicolor</u>	パイオブリー	PU		81)
	チンク			
<u>Rhizopus arrhizus</u>	フマル酸	PU		82)
<u>Phanerochaete chrysosporium</u>	リグニン	PU		83)
	パ-オキシダ-ゼ			

BSPs: PU, ポリウレタンフォーム; PP, ポリプロピレン; PC, ポリカーボネート; SS, ステンレススチール;
 NY, ナイロン; PS, ポリスルフォン; CB, セライトビーズ; PE, ポリエステル; TEGMA, テトラエチレングリ
 コルジメタアクリレートポリマー.

Bioreactor: FBR, Fluidized bed reactor; RDF, Rotating disk fermentor;
 BCR, Bubble column reactor; ALR, Air-lift reactor; SBF, Spouted bed fermentor;
 CBF, Circulating bed fermentor.

表1-1. 微生物/細胞のBSPs固定化例 (その2)

微生物・細胞	生産物	BSPs	Bioreactor	文献
放線菌				
<i>Streptomyces tendae</i>	ニコマイシン	GB	FBR	84)85)
<i>Cepharosporium acremonium</i>	セファロスポリンC	CB	FBR	86)
酵母				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		PE, SS	FBR, CBF	87)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	転化糖	CC	CB	89)
<i>Saccharomyces uvarum</i>		PE, SS	FBR, CBF	87)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	β -ガラクトシダーゼ	GP, PC, PST		88)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	β -ガラクトシダーゼ	GP, PC, PST		88)
バクテリア				
混合培養	排水処理	PU		117)
<i>Methanogen</i> sp.	メタン	PU	CR, PBR	90)91) 93)94) 95)
<i>Acetobacter</i> sp.	酢酸	PPF, CC	CR, RDF	96)97)

BSPs: PU, ポリウレタン; SS, ステンレススチール; PE, ポリエステル; GB, ガラスビーズ; GP, ガラスプレート; PST, ポリスチレン; CC, 綿布; PPF, ポリプロピレンファイバー; PVAf, ポリビニルアルコールファイバー.

Bioreactor: FBR, Fluidized bed reactor; RDF, Rotating disk fermentor; BCR, CBF, Circulating bed fermentor; CB, Cloth bioreactor; CR, Column reactor; PBR, Packed bed reactor.

表1-1. 微生物/細胞のBSPs固定化例 (その3)

微生物・細胞	生産物	BSPs	Bioreactor	文献
バクテリア				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		PVAF		98)
<i>Pichia farinosa</i>	グリセリン	SGR	CR	99)
<i>Escherichia coli</i>	アスパラギン酸	BVPB	CR	100)
<i>Escherichia coli</i>	アミラーゼ	SF		101)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	アセトンブタノール	PE	TBR	102)103)
藻類				
<i>Botryococcus braunii</i>	炭化水素	PU	ALR	104)
動物細胞				
Mouse myeloma	IgG	PVF	CBF	108)109)
肝細胞		PVF		110)
Monkey kidney cells		PU	PBR	111)
Chinese hamster ovary cells	インターフェロン	PU,GF	PBR,FBB	111)112)

BSPs: SGR, 焼結ガラスラッシュヒリング; BVPB, N-benzyl-4-vinylpyridinium bromideホリマー; SF, シリコンフォーム; PE, ホリエステル; PU, ホリウレタン; PVF, ホリビニルフォルマルゼン; GF, グラスファイバー.

Bioreactor: CR, Column reactor; TBR, Trickle bed reactor; ALR, Air-lift reactor; CBF, Circulating bed fermentor; PBR, Packed bed reactor; FBB, Fiber bed bioreactor.

表1-1. 微生物／細胞のBSPs固定化例（その4）

微生物・細胞	生産物	BSPs	Bioreactor	文献
植物細胞				
<i>Capsicum frutescens</i>	キャプサイシン	PU		113)
<i>Daucus carota</i>		PU		113)
<i>Beta vulgaris</i>		PU		114)
<i>Humulus lupulus</i>		PU		114)
Hop cells		NY, SS		115)
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	シコニン	PU	PBR	116)

BSPs: PU, ポリウレタン; NY, ナイロン; SS, ステンレススチール.

Bioreactor: PBR, Packed bed reactor.

1-5. 本論文の目的と内容

リパーゼを生産する微生物の菌体内リパーゼ活性を増加させ、その乾燥菌体を直接、リパーゼ酵素剤（固定化酵素）として利用することが可能になれば、固定化酵素の調製コストを著しく低減させることができ、リパーゼによって触媒される種々の有用な酵素反応の工業化に大きく貢献すると期待される(図 1-1 参照)。

本論文の目的は、培養工学的、化学工学的な実験検討を行ない、高菌体内リパーゼ活性を有する菌体の効率の良い（安価な）培養法を開発（確立）すること、および菌体内リパーゼをエステル転移反応に応用し、その実用性を評価することにある。本論文は本研究の目的およびその背景となる関連技術（既往の研究）について述べた、本章（第1章 序論）を含め5章から成立っている。

第2章ではまず、糸状菌 (*Rhizopus chinensis*)の菌体内リパーゼ活性を増加させる培地組成について検討を加え、オレイン酸のような基質関連物質の添加が効果的であることを示す。さらに工業的に微生物菌体の取り扱いを容易にするために、ポリウレタン微生物保持粒子(BSPs)への固定化を試みた。固定化させるための培養条件、および固定化が菌体内リパーゼ生産に与える影響を検討し、固定化操作により菌体内活性が飛躍的に上昇することを示す。

第3章ではBSPs固定化菌体をリパーゼ触媒として工業的に利用するため、BSPs固定化菌体の大量培養法について検討した。ファーメンターとして Circulating bed fermenter (CBF) を選定し、培養条件のうち培地の主成分である肉エキスの供給速度のコントロールが菌体内リパーゼ活性をさらに高める上で効果的であり、比肉エキス供給速度がそのための有効な指標となることを示す。さらに通気量も菌体内リパーゼ生産に影響を与えることを明らかにし、最適通気量の決定のため3種異塔径のCBFを用いて、まず、

CBFの酸素移動特性について検討を加えた。その結果および培養実験からCBF内でBSPsの円滑な循環を実現できる最低通気量、すなわちBSPs最小循環通気量が適切であることを示し、スケールアップファクターとしての可能性を示唆する。また比肉エキス供給速度をコントロールするためのBSPs内菌体濃度の予測実験式も提示する。

第4章ではポリウレタンBSPsに固定化することにより、菌体内活性が飛躍的に上昇する誘因(Trigger)を明らかにするため、ポリウレタン以外の種々のBSPsへの固定化を試みた。またBSPsを用いないサスペンション培養において糸状菌の増殖形態をパルピーからペレットに変化させることを試み、その誘因がペレット形成のような菌体の集合現象であることを明らかにする。さらにRhizopus chinensis以外のRhizopus 属糸状菌をBSPsに固定化し、菌体集合現象はRhizopus 属に共通の菌体内リパーゼ生産促進誘因であることを示唆する。

第5章ではBSPs固定化菌体のリパーゼ酵素剤としての実用性を評価するため、モデル反応として、オリーブオイルとステアリン酸メチルのエステル交換反応を実施し、カカオバター代用脂(1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol)の生産を行なった。まず、BSPs固定化菌体用バイオリアクターとして、リアクター内の水分濃度を任意にコントロールできる液循環充填式バイオリアクターを提案する。本リアクターを用いて、BSPs固定化菌体内リパーゼの失活に対する水分濃度の影響を調べ、失活速度は一次式で表現できること、および失活速度定数の水分濃度依存性を示す。さらに最適水分濃度で長期間の連続エステル交換反応を実施し、BSPs固定化菌体の実用性を明らかにする。

第2章 Rhizopus chinensis の菌体内リパーゼ

生産を促進する培養条件

2-1. 緒言

ここでは微生物菌体を直接、リパーゼ酵素剤として利用するため、リパーゼを生産する微生物として、Rhizopus chinensis を選び、その菌体内リパーゼ活性を高める培養条件について検討を加えた。

Rh. chinensis を選定した理由は

- 1)本菌が菌体外に生産するリパーゼが1,3-位置特異性を有し、耐熱性、pH安定性に優れていることが既に、岩井ら¹²²⁾によって報告されており、エステル交換反応によるカカオバター代用脂の生産のような基質として高融点物質（例えばステアリン酸）を利用する反応に適するリパーゼを生産すると考えられる
- 2)本菌は東洋の醗酵食品製造に利用されているカビの中に見い出されており¹²³⁾、菌体を直接、食品製造プロセスに応用する上で、より安全性が高いと考えられる

ところにある。

まず、Rh. chinensis の菌体内リパーゼ活性を高める培地組成、すなわち、炭素源としてのグルコース、および基質関連物質の影響を検討した。次に工業的に微生物菌体の取り扱いを容易にするために、ポリウレタン微生物保持粒子(Biomass support particles, 以下 BSPs) への固定化を試みた。BSPsへの固定化条件として、BSPsのサイズ、孔径、添加量の影響を調べ、さらにBSPsへの固定化操作が Rh. chinensis の リパーゼ生産に与える影響を検討した。

2-2. 実験装置および実験方法

(1) 使用菌株

Rhizopus chinensis IFO 4768

(2) 基本培地組成

岩井ら^{6) 122)}の培地から、グルコースを除いた、ポリペプトン 70 g/l, NaNO₃ 1 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/l (pH 5.6) の組成をもつ培地を基本培地として使用した。

(3) 基質関連物質

基質関連物質をして、オリーブオイル、リノレン酸、オレイン酸、オレイルアルコール、カプリン酸メチル、Tween-40, -60, -80、魚油、および茶油を基本培地に加えて、培養し、その影響を調べた。

(4) 微生物保持粒子(Biomass support particles, BSPs)

BSPsとして、ブリジストン社(製)ポリウレタンフォーム、商品名エバーライトスコットHR-20, -30, -40, -50を3~10 mm立方体に切断加工したものを使用した。表 2-1 に使用したBSPsの特性値を示した。

表 2-1. Biomass support particles (BSPs)

BSPs	Porosity (—)	Pore size (ppi) ^a	Tensile characteristics	
			Elongation percentage (%)	Tensile strength (kg/cm ²)
HR-20	>0.97	20	>200	>1.0
HR-30	>0.97	30	>200	>1.5
HR-40	>0.97	40	>300	>1.5
HR-50	>0.97	50	>300	>2.0

^a Pores per linear inch.

(5) フラスコ培養

培地100 ml (およびBSPs)を加えた500 mlの坂口フラスコをオートクレーブで120°C, 20 min 滅菌した後、PSA(Potato-sucrose-agar)スラントより *Rh. chinensis* の孢子を無菌的に1白金耳(Inoculum size: $2\sim6 \times 10^6$ spores/1)、接種した。その後、振盪数 200 oscillations/min, 振幅 70 mm, 温度 30°Cの条件で約 90 h 振盪培養した。

(6) 乾燥菌体調製方法

サスペンション菌体および BSPs固定化菌体を培養液よりろ別した後、水で2回洗浄した。その後、アセトンでさらに2回洗浄し、真空乾燥器内でおよそ48時間乾燥した。約4~6%の水分を含んだ乾燥菌体が本操作により調製され、次に示す酵素反応に直接、リパーゼ酵素剤として利用した。

(7) 酵素反応

菌体内外リパーゼによる加水分解反応、および菌体内リパーゼによるエステル交換反応は図2-1に示す125 ml-酵素反応器を用いて、40°C、一定攪拌条件下で実施した。

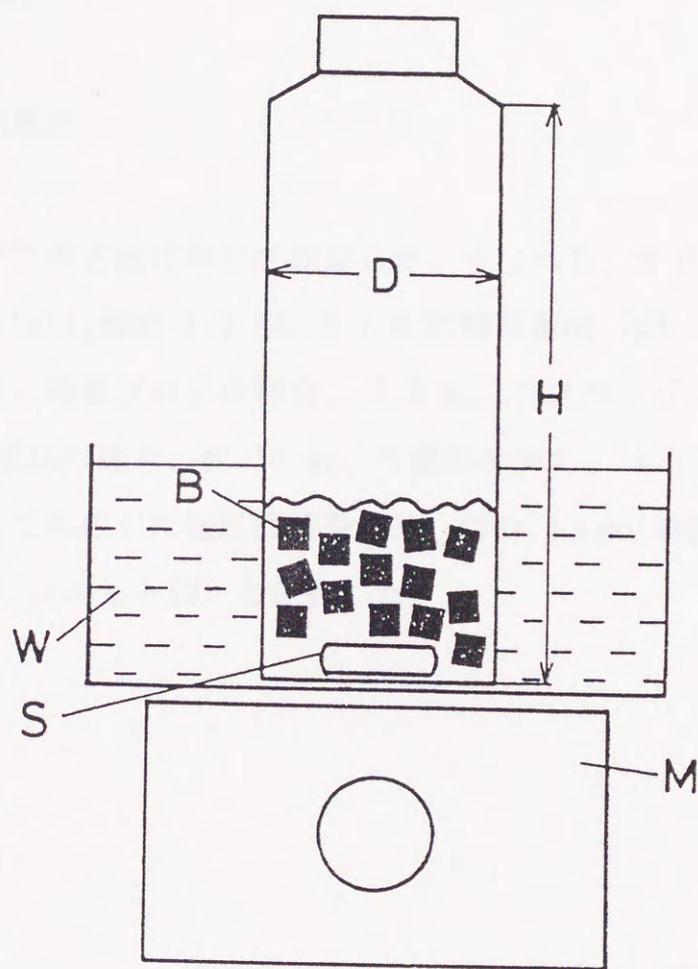


図 2-1. 酵素反応器

H: 10 cm; D: 4 cm; S: 攪拌回転子 (0.6 x 20 mm);

M: マグネティックスターラー; B: BSPs固定化菌体; W: ウォーターバス.

(a) エステル交換反応

オリーブオイル 2.0 g, ステアリン酸メチル 8.0 g, n-ヘキサン 5.0 g からなる反応液にサスペンション菌体の場合、約 0.5 g、BSPs固定化菌体の場合、約 0.25 g の菌体を加え、5 h 反応させた。エステル交換反応の結果、生成するオレイン酸メチルを後述のごとく、ガスクロマトグラフで測定し、毎分 $1\mu\text{mol}$ のオレイン酸メチルを生成する酵素量を 1 ユニット(U) と定義した。

(b) 加水分解反応

Fukumotoら¹²⁴⁾の方法に準じて測定した。すなわち、オリーブオイル 2.0 g, 0.05 M CaCl_2 溶液 1.0 ml, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) 10 ml からなる反応液に、培養ブrossの場合、2.0 ml、サスペンション菌体および BSPs固定化菌体の場合、約 50 mg、の菌体を加え、1 h 反応させた。中和滴定によって生成した脂肪酸量を求め、毎分 $1\mu\text{mol}$ の脂肪酸を生成する酵素量を 1 ユニット(U) と定義した。

(8) 分析方法

(a) 菌体濃度

BSPsへの固定化菌体量は Webbら⁷⁵⁾の方法に準じて測定した。20~50個の固定化菌体を含む BSPsを再度、数回、アセトンで洗浄し(菌体に付着している基質関連物質を充分取り除くため)、 100°C で 24 h乾燥した。

(BSPs + 固定化菌体量)の重量を測定した後、次亜塩素酸ソーダ水溶液(約 10% v/v)で処理し、固定化された菌体を取り除いた空BSPsを水洗、乾

燥して、BSPsのみの重量を求め、その差より算出した。

サスペンション菌体の濃度は BSPs固定化菌体と同様に 再度、数回、アセトンで洗浄した後、100°Cで 24 h乾燥して、その重量を測定した。

(b)オレイン酸メチル濃度

内部標準物質として、カプリン酸メチルを使用し、島津製作所（製）ガスクロマトグラフGC-7Aを用いて分析した。分析条件は次のとおりである。

カラム：ガラスカラム(2 m x 3 mm ID)

カラム充填剤： ガスクロ工業（製）Unisole 3000

インジェクション温度： 270 °C

カラム温度： 210 °C

キャリアーガス： N₂（流量： 40 ml/min）

2-3. 実験結果および考察

2-3-1. 菌体内リパーゼ活性を高める培地組成

2-3-1-1. Rhizopus chinensis のリパーゼ生産へのグルコースの影響

岩井らと同様の培地、すなわち、基本培地にグルコース 10 g/l を加えた培地で培養したところ、Rh. chinensis は菌体外のみにリパーゼを生産し、菌体内リパーゼ活性はほとんど認められなかった。そこで基本培地にオレイン酸を 2% 加えた培地を用い、フラスコ培養における初発グルコース濃度を変化させ、グルコースが Rh. chinensis のリパーゼ生産へ与え

る影響を調べた結果を表2-2に示す。

初発グルコース濃度が 0~2 g/l と低い場合、菌体内活性は高い値を示したが、3 g/l を越えると菌体内活性の急激な低下が認められ、同様の傾向が僅かではあるが菌体外活性にも認められた。したがって培地中に多量のグルコースが存在する場合、*Rh. chinensis* のリパーゼ生産に対して、抑制効果を示すようであり、本菌の菌体内リパーゼ生産のための培地中にグルコースは必要ないことがわかった。同様の現象がグルコース以外の炭素源に関して、*Rh. delemar* の菌体外リパーゼ生産に対して報告されている。⁷⁾

表2-2. *Rh. chinensis* のリパーゼ生産へのグルコースの影響

Glucose conc. (g/l)	Cell conc. (g/l)	Intracellular lipase activity		Extracellular lipase activity
		Interesterification (U × 10 ² /mg)	Hydrolysis (U × 10 ² /mg)	Hydrolysis (U × 10 ² /ml)
0	8.47	0.79	25.3	275
1	8.15	0.91	17.8	183
2	8.70	0.51	17.6	245
3	6.97	0.07	5.3	166
4	6.89	0.07	1.3	138
5	6.62	0.04	0.7	142
7	6.48	0.03	1.6	142

2-3-1-2. 基質関連物質の影響

第1章, 1-2 で紹介したように糸状菌のリパーゼ生産にオリーブ油などの油脂類やTweensのようなリパーゼの基質関連物質の添加が影響を与えることが報告されている。^{7) 10-19)}そこで、種々の基質関連物質を基本培地に加え、*Rh. chinensis* のリパーゼ生産への影響を調べた (表 2-3)。各基質関連物質の濃度は 2% とし、表 2-2.の結果よりグルコースは使用しなかった。

表 2-3 より各種基質関連物質の添加は *Rh. chinensis* の菌体内リパーゼ活性を増加させていることがわかる。中でもオリーブオイル、オレイン酸、茶油が非常に効果的であった。菌体外活性に注目するとこれらの物質を加えない場合に最も高い活性が認められることは非常に興味深い。岩井ら⁶⁾はこれらの物質を添加しない場合の *Rh. delemar* のリパーゼ生産において、培養過程における菌体の増殖静止期までは多量のリパーゼが菌体内に存在するが、その後急激に減少し、ほとんどのリパーゼが菌体外に分泌されると報告している。本研究で使用した *Rh. chinensis* はリパーゼを構成的に生産しているが、これら基質関連物質がリパーゼを菌体内に保持する上で、何らかの役割を果たしていることは非常に興味深い。リパーゼの分泌を抑制する効果があるのか、あるいは違う種類のリパーゼが生産されているのかなど、さらに詳細な検討が必要と考えられる。表 2-3 に示した結果より、*Rh. chinensis* の菌体内リパーゼ生産の促進物質としてオレイン酸を選択した。

最適なオレイン酸濃度を決定するためにオレイン酸濃度を 0~10% の間で変化させた。結果、エステル交換活性、加水分解活性、共にオレイン酸濃度2%の場合に、最大活性を示した。したがって以後、すべての実験においてオレイン酸濃度は 2% とした。

表 2-3. *Rh. chinensis* のリパーゼ生産への基質関連物質の影響

Substrate-related compounds	Cell conc. (g/l)	Intracellular lipase activity		Extracellular lipase activity
		Interesterification (U × 10 ² /mg)	Hydrolysis (U × 10 ² /mg)	Hydrolysis (U × 10 ² /ml)
Olive oil	5.7	0.73	24.7	300
Linoleic acid	3.0	0.11	5.7	233
Fish oil	6.8	0.02	1.7	92
Tea oil	8.1	0.76	22.5	142
Oleyl alcohol	4.1	0.24	19.0	358
Methyl caprate	2.7	0.04	0.1	100
Tween 40	6.7	0.24	10.6	483
Tween 60	6.0	0.43	15.3	367
Tween 80	6.8	0.22	6.7	242
Oleic acid	8.4	0.79	25.3	275
None	5.8	0	1.6	801

2-3-2. 微生物保持粒子固定化菌体のリパーゼ生産

2-3-2-1. 固定化およびリパーゼ生産へのBSPsの孔径、添加量の影響

表 2-4 に 6-mm立方体 BSPsの孔径、添加量が BSPsへの固定化、およびリパーゼ生産に与える影響を示した。HR-20の場合、150 コ/100-ml 培地、HR-30, -40, -50の場合、100 コ/100-ml以上 BSPsを加えると、ほとんどの菌体は BSPs に固定化され、BSPs外での増殖はほとんど認められなかった。それゆえ菌体を完全に固定化するために必要な BSPs添加量は BSPsの孔径に依存することが明らかになった。

表 2-4 よりBSPsに固定化することによって、菌体内リパーゼ比活性が固定化しない場合の活性に比べて、上昇していることがわかる。特に菌体内エステル交換活性は飛躍的に上昇し、サスペンション培養菌体の4~7倍

の高活性を示したことは注目に値する。BSPsへの固定化により菌体内加水分解活性にも増加傾向が認められるが、エステル交換活性の増加には比例していない。本結果は BSPsへの固定化により種類の異なったリパーゼが生産された可能性を示唆している。したがって今後、生産されるリパーゼの種類に関する詳細な研究が必要と考えられる。

一方、菌体外リパーゼ活性に関しては、BSPsに固定化した場合としない場合で、両者の間に顕著な差は認められなかった。BSPsの添加量が少ない場合に、BSPs外で増殖した菌体の菌体内活性は固定化菌体の活性に比べ、非常に低く、サスペンション培養菌体と同程度あるいはそれ以下であったことは大変興味深い。

図 2-2 にBSPs固定化菌体の断面写真(図 2-2a, 倍率 x10) および断面の電子顕微鏡写真(図 2-2b, 倍率 x100)を示す。図 2-2a より菌体はBSPsの表層近くに密にフィルムを形成していることがわかる。また図 2-2b より *Rh. chinensis* の菌糸が強固にBSPsの骨格に絡みついている様子が観察される。このようなBSPs骨格への菌体の付着(絡みつき)は非常に強いようで、強攪拌条件下での酵素反応(図 2-1 参照)の際にも菌体の剥離は全く認められなかった。

糸状菌にはパルピー状態とペレット状態の2つの典型的な増殖形態があり、pH、攪拌数、溶存酸素濃度などの培養条件の僅かな変化に非常に敏感に反応して、増殖形態が変化することが知られている。¹²⁵⁾ またこのような増殖形態の変化がクエン酸¹²⁶⁻¹²⁸⁾ やペニシリンの生産^{67) 71-73)} に影響をおよぼすという報告もある。図 2-2a より BSPsへの固定化は菌体の増殖形態をペレット状態に近づけているのではないかと推察され、この増殖形態の変化が菌体内活性の上昇に寄与しているのではないかと考えられる。本件については第4章で詳細に検討を加えた。

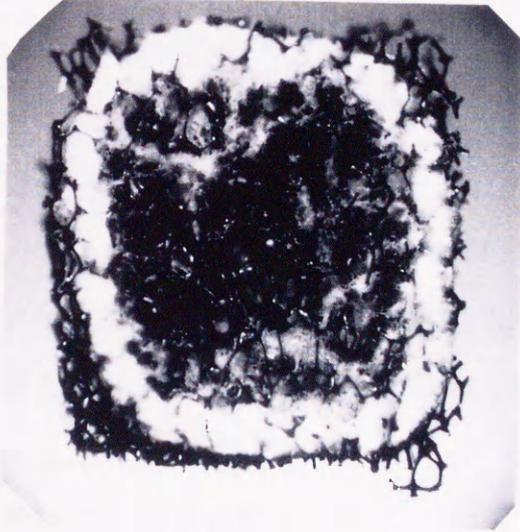
表 2-4. BSPsの孔径、添加量が固定化およびリパーゼ生産に与える影響

Number (particles/100 ml medium)	Cell conc. (mg/BSP)	Intracellular lipase activity		Extracellular lipase activity
		Interesterification (U × 10 ² /mg)	Hydrolysis (U × 10 ² /mg)	Hydrolysis (U × 10 ² /ml)
(HR-20)				
100	6.82	3.28	32.3	208
	3.05 ^a (g/l)	0.35	4.6	
150	6.25	3.49	29.6	333
200	6.34	3.87	22.7	288
(HR-30)				
50	4.09	3.14	50.6	208
	5.70 ^a (g/l)	0.47	9.3	
100	4.35	3.07	51.5	293
150	4.38	2.72	61.1	341
200	3.26	2.65	36.6	108
(HR-40)				
50	4.96	4.96	54.8	222
	3.20 ^a (g/l)	0.32	5.3	
100	4.20	5.30	50.3	93
150	4.36	3.91	50.8	112
200	2.90	4.39	52.7	217
(HR-50)				
50	4.67	2.31	55.6	283
	4.26 ^a (g/l)	0.32	6.6	
100	5.23	2.98	34.7	347
150	4.16	2.54	28.0	275
200	3.35	3.58	52.5	75
Control ^b	8.47 (g/l)	0.79	25.3	275

^a Cells grown outside of BSPs.

^b Freely suspended cells.

a)



1 mm

b)

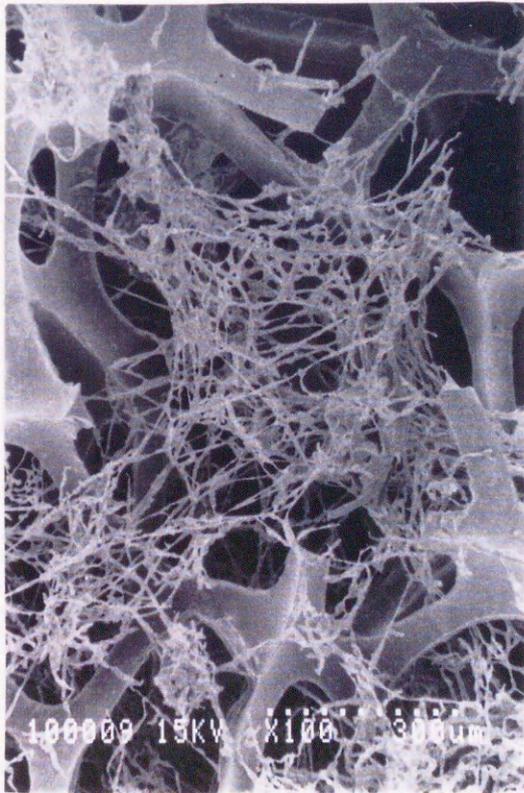


図 2-2. BSPs固定化菌体の断面写真

2-3-2-2. BSPsサイズの影響

Rh. chinensis の固定化状態やリパーゼ生産におよぼすBSPsサイズの影響を調べるため、3-, 6-, 10-mm のポリウレタンBSPsを用いて、フラスコ培養を行なった。培養液中に占めるBSPsのみかけの容積を同一とするため、100 mlの培地中に3-mm BSPs を 800個、6-mm BSPs を 100個、10-mm BSPs を 22個、それぞれ加えた(表 2-5)。

3-mm BSPs の場合、使用したすべてのBSPsにおいてまったく固定化は認められず、すべての菌体はBSPs外で増殖した。一方、6-mm および 10-mm のBSPsを使用した場合はBSPs外での増殖はまったく認められず、ほとんどすべての菌体はBSPsに固定化され、表 2-4 の結果と同様に菌体内のリパーゼ生産が著しく促進された。

ポリウレタンBSPsへの菌体の固定化(付着現象)は電気的作用によるものではなく、むしろ機械的作用によるものであり、それゆえBSPsまわりのせん断力によって影響を受けやすいことが指摘されている。^{91) 93)} 図 2-2 より Rh. chinensis の BSPs への固定化のドライビングフォースは機械的な菌糸の絡みつきであると推察される。3-mm BSPs の場合、6-mm および 10-mm BSPs と比べて、同一培養条件(振盪数: 200 oscillations/min)のもとでは培養液中でのBSPsの動きが激しいことが観察された。したがって 3-mm BSPs のまわりでは他の大きな BSPsよりも強いせん断力が作用していると推察され、このせん断力の増加が 3-mm BSPs への付着固定化(絡みつき)を妨害しているのではないかと考えられる。

表 2-5. 固定化およびリパーゼ生産への BSPsサイズの影響

Cubic size of BSPs (mm)	Cell conc. (mg/BSP)	Intracellular lipase activity		Extracellular lipase activity
		Interesterification ($U \times 10^2/mg$)	Hydrolysis ($U \times 10^2/mg$)	Hydrolysis ($U \times 10^2/ml$)
(HR-20)				
3 ^a	0	—	—	92
6	4.68	5.50	32.3	208
10	21.2	4.15	38.1	325
(HR-30)				
3 ^a	0	—	—	237
6	6.22	3.02	39.5	154
10	22.6	3.75	30.1	423
(HR-40)				
3 ^a	0	—	—	174
6	4.20	5.30	50.3	93
10	21.7	4.81	44.3	305
Control ^b	8.47	0.79	25.3	275

^a No immobilization was observed.

^b Freely suspended cells.

本研究において、BSPs固定化菌体内のエステル交換活性としては 0.03 ~0.05 (U/mg-dried cells)程度の活性が得られた。これは Wisdomら⁵⁴⁾の報告している精製酵素をセライトに固定化した場合の固定化酵素のエステル交換活性[0.03-0.07 (U/mg-Celite)]に比べて少しも遜色が無いものと考えられる。既に述べたように本プロセスではBSPsを加えて培養するだけで、自然に高活性の固定化酵素(菌体)が調製できる。したがって高価なリパーゼ酵素を用いる従来の固定化酵素プロセスに比べて、経済的、工業的には非常に有利であると考えられる。

2-3. 結論

菌株として *Rhizopus chinensis* を選定し、その菌体内リパーゼ活性を高める培養条件について検討した結果

- 1) 培地組成としては、グルコースを含まず、有機窒素源を主成分とする培地に、オレイン酸のような基質関連物質の添加が必要であることが明らかになった。
- 2) ポリウレタンBSPsと共に培養することにより容易にBSPs固定化菌体を調製することが可能であり、固定化操作により菌体内リパーゼ活性をサスペンション培養菌体に比べ、4~7倍上昇させることができた。
- 3) BSPsに良好に固定化させるためにはBSPsの孔径、添加量、サイズを調整する必要があり、それぞれ 30 ppi以上、1000個/1以上、6 mm 以上にする必要があることがわかった。
- 4) BSPs固定化菌体内のエステル交換活性は0.03~0.05 (U/mg-dried cells) で、精製酵素をセライトに固定化した場合の固定化酵素のエステル交換活性と同レベルにあり、リパーゼ酵素剤として工業的に十分、利用可能であることが明らかになった。

第3章 微生物保持粒子固定化菌体の大量培養

3-1. 緒言

第2章において糸状菌 *Rhizopus chinensis* をポリウレタン微生物保持粒子 (Biomass support particles, 以下、BSPs) に固定化することによって、本菌の菌体内リパーゼ活性を飛躍的に上昇させることができ、BSPs固定化菌体を安価なリパーゼ酵素剤として、直接、リパーゼ反応に応用できる可能性を示唆した。本章では、このような高リパーゼ活性を有する菌体を工業的に利用するために、BSPs固定化菌体の大量培養法について検討した。

まず、フェルメンターの選定に関して、第1章(表 1-1 参照)で紹介したように BSPsを用いた培養に、Fluidized bed reactor (FBR), Spouted bed fermentor (SBF), Air-lift reactor (ALF) などの塔式フェルメンターが適用され、ペニシリン、^{67) 70)} γ -リノレン酸⁷⁹⁾、セルラーゼ⁷⁵⁾ など生産に利用されている。しかしながら、目的生産物が菌体外に分泌されるこれらの培養システムと本研究の目的である菌体内にリパーゼを生産する培養システムではフェルメンターの選定に関して、本質的な違いがあると考えられる。なぜなら前者では酸素または物質移動の促進、あるいは生産物の分泌促進のため、フェルメンター内に激しい流動混合状態が要求されるが、本研究の目的はリパーゼを菌体内に効率よく保持させ、菌体外への分泌を抑制することにある。したがって本研究で対象とする培養システムは酸素あるいは物質移動を促進するため、ある程度の流動混合状態は必要とするが、あまりに激しい流動混合状態は BSPsまわりのせん断力を増加させ、田中¹²⁹⁾ によって報告されているような菌体内成分の漏洩を引き起こし、菌体内リパーゼ活性を低下させるのではないかと、さらにはBSPsへの固定化をも妨害するのではないかと懸念される。

最近、Blackら⁸⁷⁾はポリウレタンBSPsのような比重が小さく、浮遊性を有する発泡体の使用に適するフェルメンターとして、Circulating bed fermentor (CBF) を考案した。CBFでは空気を低部に装着した多孔板の一部分(約半分のエリア)より供給する。したがって比較的低い通気量で、BSPsの良好な循環を実現でき、BSPsまわりのせん断力をFBR, SBF, ALFのような他の塔式フェルメンターに比べ、小さくできるのではないかと期待される。

本研究ではBSPs固定化菌体を大量培養するためのフェルメンターとしてCBFを選定し、まず回分培養における通気量、BSPs添加量の影響を検討した。次に、固定化菌体内のリパーゼ活性を高めるために流加培養技術の応用を試みた。さらに通気量の影響をクリアーにするため、3種類の塔径の異なるCBFを用いて、CBF-BSPs培養系の酸素移動特性を検討した。その結果より最適通気量として、CBF内でBSPsの円滑な循環を実現できる最低通気量、すなわちBSPs最小循環通気量に注目し、3種類のCBFを用いた培養によりその妥当性を検討した。

3-2. 実験装置及び実験方法

(1) Circulating bed fermentor (CBF)

培養実験には 5-1 ガラス製CBF (塔径: 10 cm; 高さ: 50 cm; 実液量; 3.5~3.7 l)、10-1 ガラス製CBF (塔径: 15 cm; 高さ: 60 cm; 実液量; 6~8 l)、25-1 ステンレススチール製CBF (塔径: 20 cm; 高さ: 80 cm; 実液量; 18~20 l) の3種類のCBFを用いた。

一方、酸素移動容量係数 k_{La} の測定には塔径 11, 15, 20 cm, 縦横比 2.07~6.34 の種々のプラスチック製CBFを使用した。

図 3-1 に CBF培養システムのフローシートを示す。CBFの下部にはサンプリング口が設けられ、pHセンサー [電気化学工業 (製)]、溶存酸素センサー [L. E. Marubishi (製)]、および温度センサーが装着され、空気は図 3-1 に示した水飽和塔、空気流量計、除菌フィルター、および孔径 3 mm の多孔板 (半分のエリアのみ開孔) を通じて CBF内に供給された。培養温度、pHはそれぞれ 30°C, 5.0にコントロールした。

(2) 培養方法

(a) 種培養

グルコース 10 g/l, ポリペプトン 70 g/l, NaNO_3 1 g/l, KH_2PO_4 1 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l (pH 5.6) の組成をもつ種培地 100 mlを加えた 500 mlの坂口フラスコをオートクレーブで120°C, 20 min 滅菌した後、PSAスラントより *Rh. chinensis* の胞子を無菌的に1白金耳 (Inoculum size: $2 \sim 6 \times 10^6$ spores/l)、接種した。その後、振盪数 200 oscillations/min, 振幅 70 mm, 温度 30°Cの条件で約 24 h 振盪培養した。ファーメン

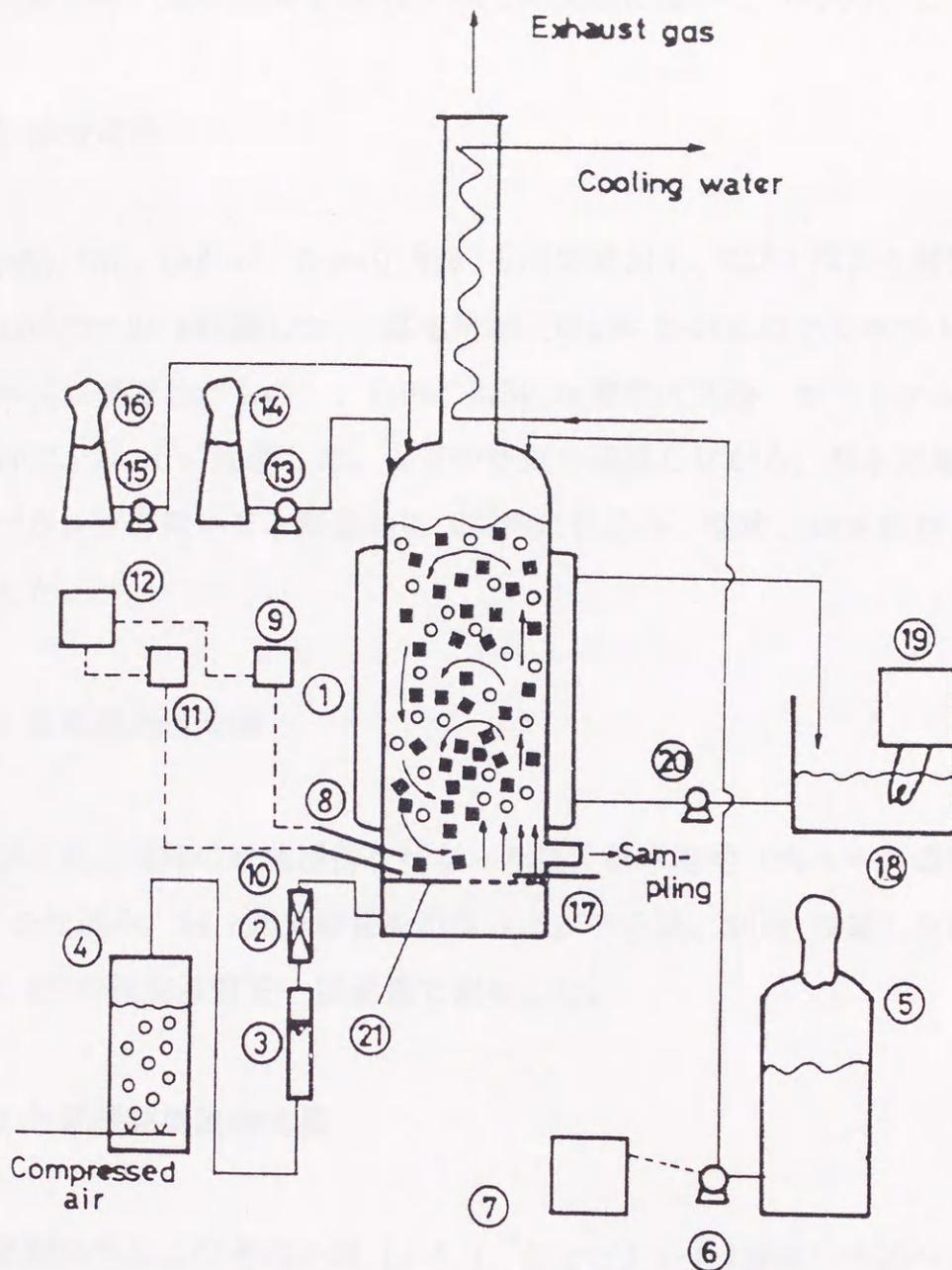


図 3-1. Circulating bed fermentor (CBF) 培養システム

- 1) CBF; 2) 除菌フィルター; 3) 空気流量計; 4) 水飽和塔; 5) 培地貯蔵ボトル;
 6) 培地供給ポンプ; 7) マイクロコンピュータ; 8) pHセンサー; 9) pHコントローラー; 10) DOセンサー;
 11) DO計; 12) 記録計; 13) NaOH供給ポンプ; 14) NaOH貯蔵ボトル; 15) H₂SO₄供給ポンプ;
 16) H₂SO₄貯蔵ボトル; 17) 温度計; 18) ウォーターバス; 19) 温度コントローラー;
 20) 循環ポンプ; 21) 多孔板

ター(CBF)への Inoculum sizeはすべての実験において 5%(v/v) とした。

(b) 回分培養

CBF内にBSPs (HR-40, 6-mm立方体)を所定量加え、CBF上部より蒸気を流し、100°Cで 24 h殺菌した。基本培地 [第2章 2-2(a)のポリペプトンを肉エキスに変更したもの]、NaOH、H₂SO₄水溶液は別途、オートクレーブで 120°C、20 min 殺菌した。少量の空気を通気しながら、基本培地をチューブポンプを用いて、無菌的に CBF内に仕込み、温度、pHを調整した後、接種した。

(c) 定流量流加培養

回分培養と同様の殺菌操作を行なった後、基本培地 (肉エキス濃度: 2 g/l) を仕込み、24 h回分培養を行なった。その後、別途 殺菌した肉エキス 70 g/lの流加基質を一定流量で流加した。

(d) 計算機制御流加培養

実験結果および考察の項 (3-3-3、および3-3-4-2参照) で述べる、BSPs内の菌体増殖に関する知見、および定流量流加培養の結果から示唆された最適な比肉エキス供給速度を基本に、培養中の比肉エキス供給速度を一定に保つため、肉エキスの流加量を1~2時間のインターバルで微小変化させた。肉エキスの流量を変化させるため、DAコンバーターモジュール [コントロールテクノロジー社 (製)] を装備したマイクロコンピュータ PC-9801Vm2 [日本電気 (製)] にコンピュータ制御可能なポンプ Perista-bio-mini-pump [アトー社 (製)] を接続したシステムを構築した。

詳細なコントロール手順は実験結果および考察の項 (3-3-3 参照) で述べる。

(3) k_{La} 、ガスホールドアップ ϵ_c 測定法

図 3-2 に示す Nakanohら¹³⁰⁾ 同様の実験装置及び方法を用い、温度 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ で、 k_{La} はダイナミック法により、 ϵ_c はマノメータ法により測定した。

使用菌株、フラスコ培養法、乾燥菌体調製法、酵素反応、分析方法については第2章と同様の菌株、方法を用いた。

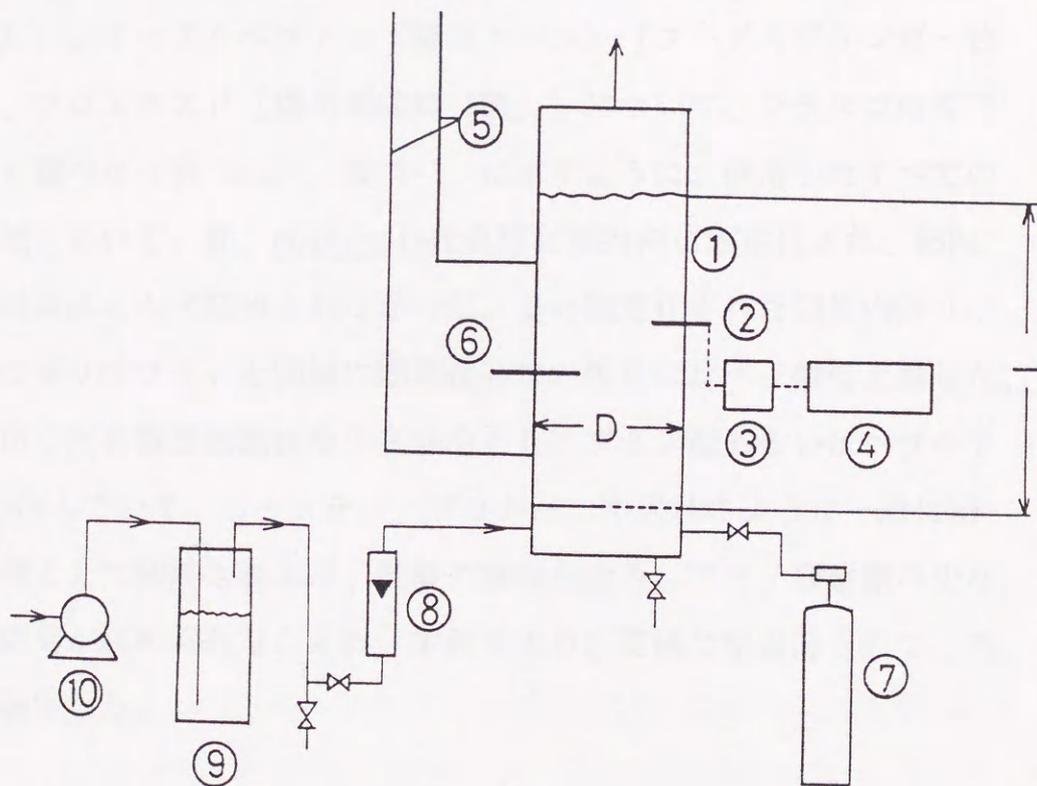


図 3-2. k_{La} 、 ϵ_c 測定装置¹³⁰⁾

- 1) CBF; 2) DOセンサー; 3) DO計; 4) 記録計; 5) マノメータ; 6) 温度計 7) N_2 ポンペ; 8) 空気流量計; 9) 空気飽和塔; 10) エアーコンプレッサー.

3-3. 実験結果および考察

3-3-1. 有機窒素源の選定

固定化酵素プロセスを工業化する上で、重要となる課題の一つに、既に述べたように低コストでの高活性を有する酵素剤の調製が挙げられる。第2章では、*Rh. chinensis*のリパーゼ生産のための有機窒素源として、ポリペプトンを使用した。しかしながら、工業的観点からはポリペプトンの市場価格は安価であるとは言い難く、したがって、工業的にBSPs固定化菌体を大量培養する培地には、ポリペプトンにかわる安価な窒素源が必要となる。

ここでは、市販されている他の3種類の有機窒素源、肉エキス〔(和光純薬(製))〕、イーストペプトン(酵母エキス)〔(フードスプリンガー社(製))〕、プロエキスP〔(播州調味料(製))〕について、フラスコ培養でその影響を調べた(表3-1)。表3-1.に示すように、使用したすべての有機窒素源において、*Rh. chinensis*は良好にBSPs内に固定化され、BSPs外での増殖はほとんど認められなかった。また固定化された菌体内のリパーゼ生産はポリペプトンと同様に固定化しない場合に比べ、数倍上昇した。ここで使用した有機窒素源はその主成分としてアミノ酸あるいはペプチドを50%以上含んでいる。コーンティープリカー、や麦汁のように一般に培地に窒素源として利用されるが、乳酸や糖類を含み、アミノ態窒素の少ないものは効果が認められなかった。本結果より、安価な窒素源として、肉エキスを選定した。

表 3-1. *Rh. chinensis* のリパーゼ生産への有機窒素源の影響

Nitrogen source	Cell conc. (mg/BSP)	Intracellular lipase activity		Extracellular lipase activity
		Interesterification ($U \times 10^2/mg$)	Hydrolysis ($U \times 10^2/mg$)	Hydrolysis ($U \times 10^2/ml$)
Polypepton				
BSPs	4.20	5.30	50.3	93
Control*	8.47 (g/l)	0.79	25.3	275
Meat extract				
BSPs	4.92	3.88	41.3	225
Control*	8.41 (g/l)	1.74	36.3	243
Yeast peptone				
BSPs	5.23	2.50	19.0	197
Control*	9.20 (g/l)	0.33	4.0	202
Proext. P				
BSPs	5.84	3.22	32.3	57
Control*	9.52 (g/l)	0.41	8.0	92

* Freely suspended cells without using BSPs.
Number of BSPs (HR-40) was 100 particles/100 ml-medium. Culture conditions: temperature, 30°C; initial pH, 5.6; cultivation time, 90 h; reciprocal shaking using 500 ml Sakaguchi flask, 200 oscillations/min and 70 mm amplitude.

3-3-2. 回分培養

3-3-2-1. CBFにおける固定化培養とサスペンション培養の比較

図 3-3に CBF(D = 15 cm)における固定化培養とサスペンション培養の代表的なタイムコースを比較した。固定化培養の場合、培養 50 h目で約 2.2 mg/BSPの菌体が固定化されており、その後、BSPs内菌濃度は徐々に増加した。培養 100 h目で、BSPs外の菌濃度はほぼゼロとなり、BSPs内菌濃度は最大値 3.8 mg/BSPに達した。

菌体内のリパーゼ活性は培養期間中ほぼ一定の値 [$4.2 (U \times 10^2/mg$ -dried cells)]を示し、表 3-1 に示したフラスコ培養と同レベルの高活性が得られた。一方、菌体外活性は単調増加し、培養 50 h目の 4.2 U/ml、から培養終了時には 6.8 U/ml まで増加した。

サスペンション培養では、溶存酸素濃度は培養 15 h目でゼロになり、菌濃度は培養 15 h目の 4 g/lから徐々に増加し、培養 70 h目に 7 g/lに

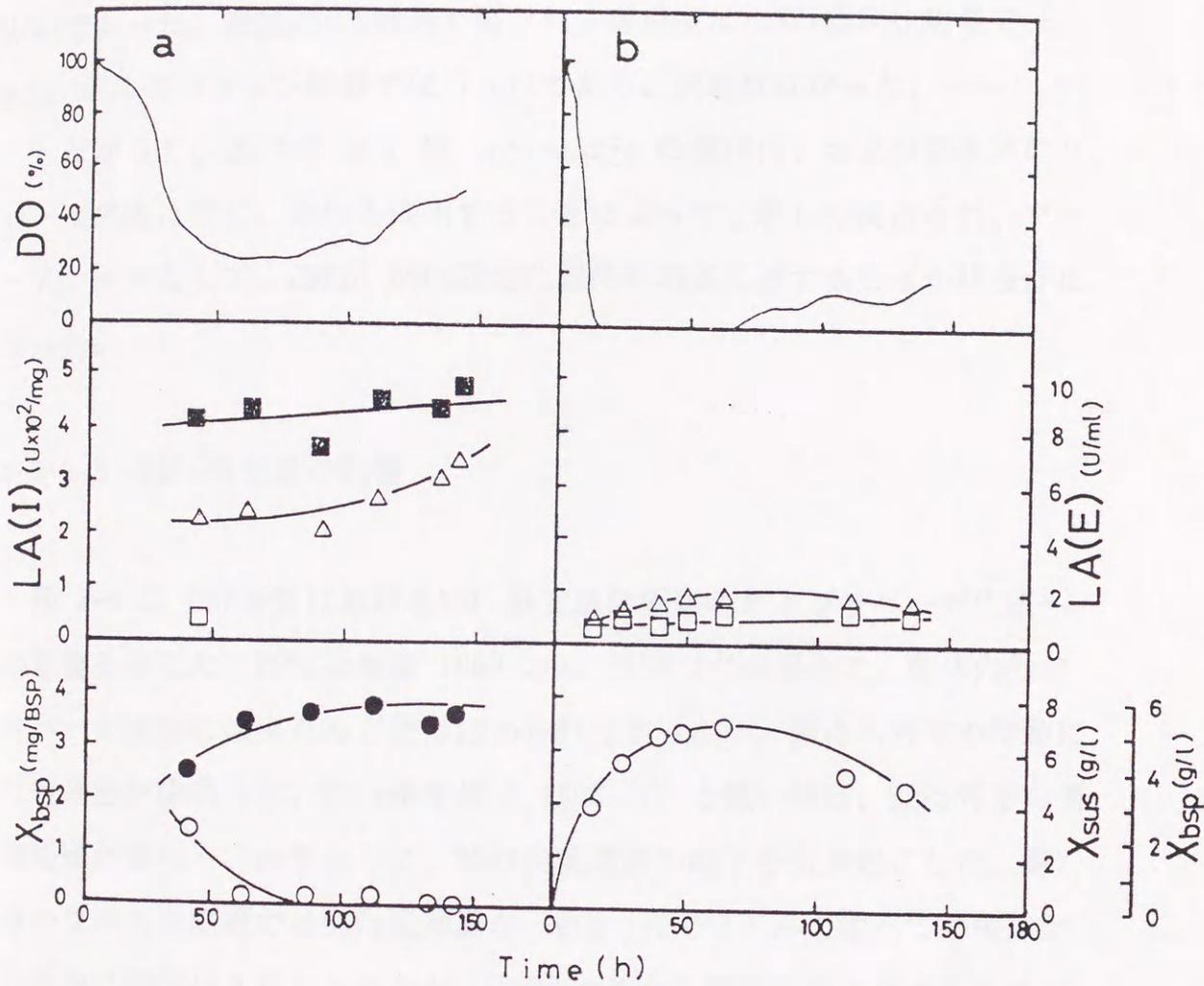


図 3-3. CBFにおける固定化培養とサスペンション培養の比較

(a) BSPs固定化培養; BSPs添加量, 1500 コ/l; (b) サスペンション培養.

X_{bsp} (●), BSPs内菌体濃度; X_{sus} (○), BSPs外菌体濃度; LA(I) (■), BSPs固定化菌体の菌体内エステル交換活性; LA(I) (□), サスペンション培養菌体の菌体内エステル交換活性; LA(E) (△), 菌体外加水分解活性.

通気量: 4 vvm. 実培養容積: 6 l.

達したのち、自己消化のため減少した。培養中における k_{La} は 4 g/lの菌体を含む培養液の粘度の増加により、培養 15 h目で急激に低下しているもの推察される。¹³¹⁾ サスペンション培養における菌体内、および菌体外リパーゼ活性は大変低く、それぞれ 0.5 ($U \times 10^2/mg\text{-dried cells}$)、1.5 U/mlであった。最終的にCBF内で得られる菌濃度は BSPs固定化培養で 6 g/l、サスペンション培養では 7 g/lであり、大差はなかった。

したがって、表 3-3 より *Rh. chinensis* の菌体内、および菌体外のリパーゼ生産は共に、BSPsを使用することによって、著しく促進され、ファーマンターとして、CBFが BSPs固定化菌体の培養に適することが明らかになった。

3-3-2-2. BSPs添加量の影響

図 3-4 に CBF培養におけるBSPs添加量の固定化およびリパーゼ生産への影響を示した。BSPs添加量 1000 コ/1、1500 コ/1の場合で、菌体内外のリパーゼ生産にはほとんど差は認められなかったが、菌体内外での増殖には有意差が認められ、BSPs添加量が 1000 コ/1 と低い場合、BSPs外での菌体増殖が著しく、結果として、BSPs内菌濃度の低下を引き起こした。第2章のフラスコ培養ではBSPs添加量が 1000 コ/1でほとんどすべての菌体がBSPs内に固定化されたが、CBF内で完全な固定化を実現するためにはさらに多くのBSPsを加える必要があった。これは両者の間での液の流動状態、あるいはBSPsに対するせん断力の違いによるものと推察される。

本結果より以下の実験ではCBF内で良好な固定化状態を実現するために、BSPs添加量を 1500コ/1とした。

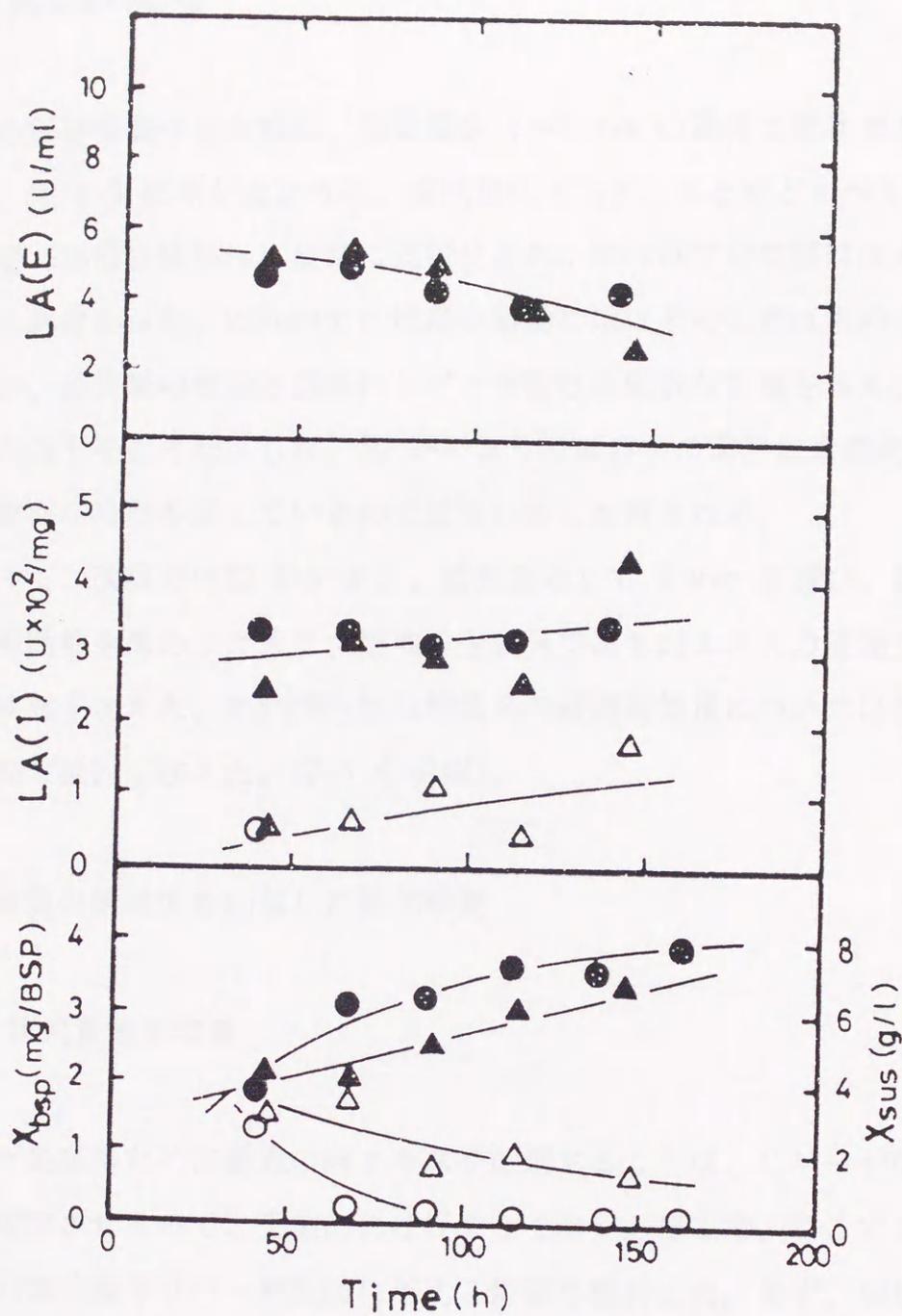


図 3-4. CBF(D=15 cm)回分培養におけるBSPs添加量の固定化およびリパーゼ生産への影響

BSPs添加量: (▲, △), 1000 ヲ/l; (●, ○), 1500 ヲ/l. 使用記号: 図 3-3 参照. (△, ○), BSPs外増殖菌体. 通気量; 5 vvm. LA(I): 菌体内エステル交換活性. LA(E): 菌体外加水分解活性.

3-3-2-3. 通気量の影響

通気量の影響を調べるために、通気量を 4~7 vvm の範囲で変化させて培養した。図 3-5 に示したように、通気量によらず、ほとんどすべての菌体が培養 50h目以降BSPsに良好に固定化され、BSPs外での増殖はほとんど認められなかった。BSPs内での増殖の挙動にはほとんど差は求められなかったが、通気量の増加は菌体内リパーゼ活性に顕著な影響を与え、菌体内活性の低下を引き起こした。図 3-5 より培養液中の溶存酸素濃度が何らかの重要な役割を果しているのではないかと推察される。

したがって、次項では図 3-5 より、通気量として 4 vvm を選び、菌体内リパーゼ活性を高めるために、培地の主成分である肉エキスの流加方法について検討を加えた。またCBF-BSPs培養系の最適通気量については後にさらに詳細な検討を加えた。(3-3-4 参照)。

3-3-3. 比基質供給速度を制御した流加培養

3-3-3-1. 定流量流加培養

リパーゼ生産のために多量の肉エキスを使用することは、リパーゼ生産コストを増加させるので、工業的には好ましくない。そこで、ここでは肉エキスの流加培養がリパーゼ生産に与える影響を検討した。まず、少量の肉エキスを含む(肉エキス濃度: 2 g/l)培地で、24 h回分培養した後、肉エキスを 0.94~2.30 g-肉エキス/hの範囲で定流量流加した培養結果を図 3-6 に示した。

すべての流加速度において、BSPs外での増殖はほとんど認められず、BSPs内での増殖速度は流加速度に依存せず、一定でほぼ直線的に増殖した。菌体内リパーゼ活性は回分培養時の活性に比べ、ほぼ1.3~1.5上昇する傾

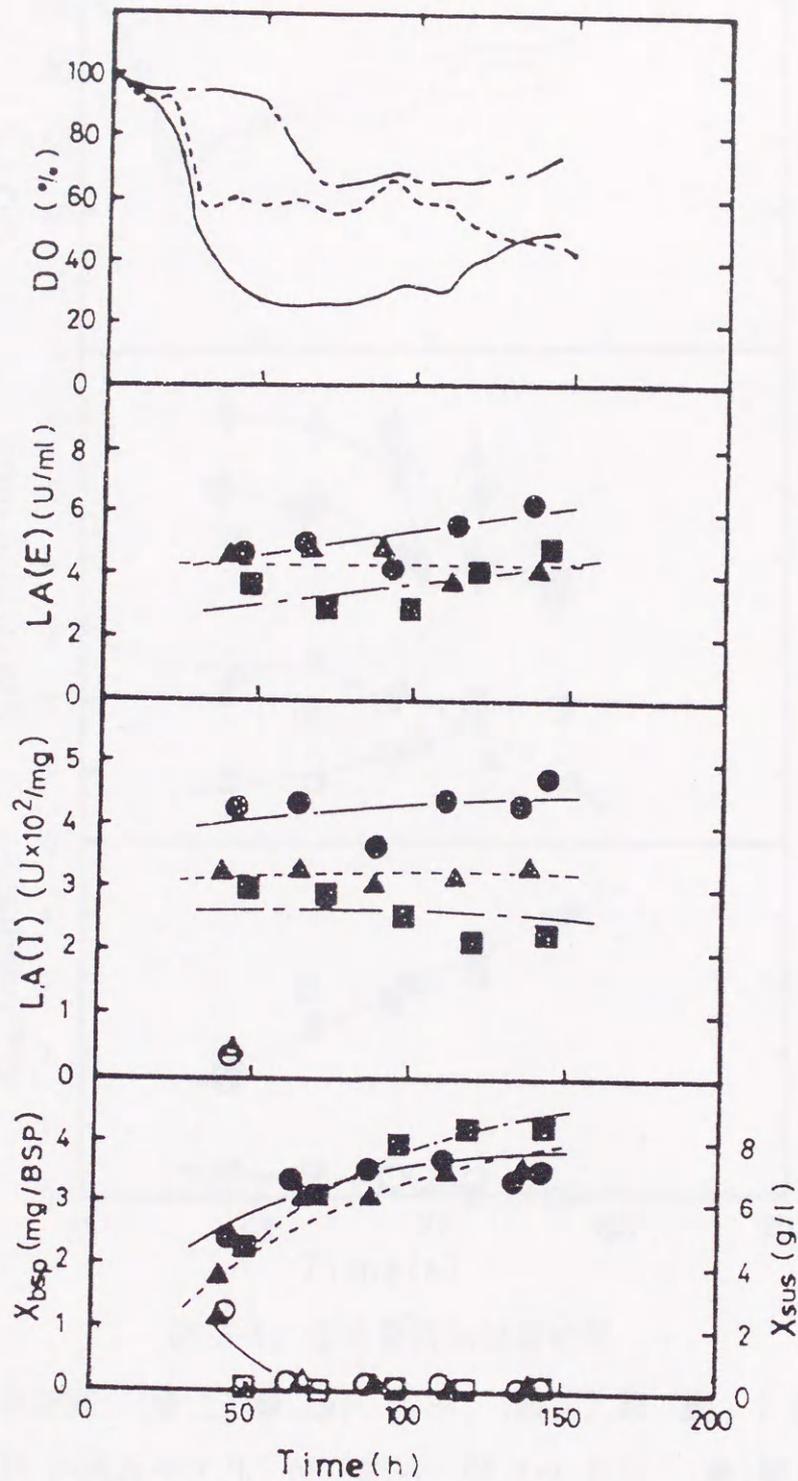


図 3-5. CBF(D=15 cm)回分培養における通気量の影響

通気量: (○, ●), 4 vvm; (△, ▲), 5 vvm; (□, ■), 7 vvm. 使用記号:

図 3-3 参照. (○, △, □): BSPs外増殖菌体. DO カ-ブ: ——, 4 vvm;

-----, 5 vvm; - - - - , 7 vvm. LA(I): 菌体内エステル交換活性. LA(E)

: 菌体外加水分解活性.

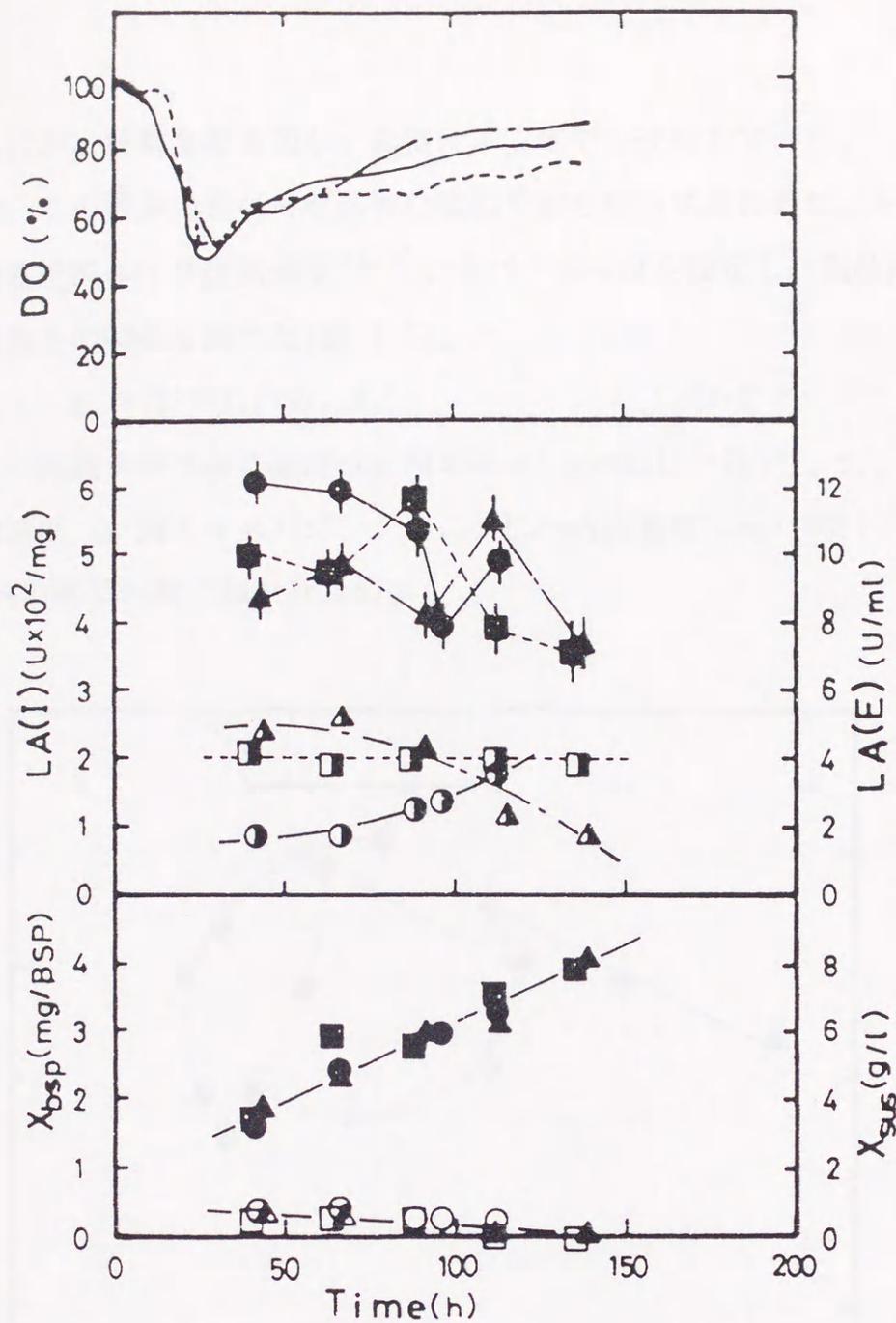


図 3-6. 定流量流加培養結果

肉エキス供給速度: (●, ○, ◐, ◑), 0.94; (■, □, ◐, ◑), 1.37; (▲, △, ▲, △), 2.30 g-肉エキス/h. 使用記号: 図 3-3 参照. (●, ■, ▲), BSPs 内菌体濃度; (○, □, △), BSPs外菌体濃度; (◐, ◑, ◒), 菌体内エステル交換活性; (◓, ◔, ◕), 菌体外加水分解活性. DO カブとライン: —, 0.94, , 1.37, ——, 2.30 g-肉エキス/h. 通気量: 4 vvm. BSPs: 1500 ml.

向を示したが、培養全般を通じ、非常に不安定で、変動していた。

そこで、この菌体内リパーゼ活性の変動現象を解析するために、3-1 式で示される比肉エキス供給速度²⁴⁾というパラメータを設定し、菌体内リパーゼ活性との関係を調べた(図 3-7)。

$$q_s = 1000f_s / (X_{b.s.p}N_t) \quad (3-1)$$

但し、 q_s : 比肉エキス供給速度 (g-肉エキス)(g-cell)⁻¹(h)⁻¹; f_s : 肉エキス供給速度 (g-肉エキス)(h)⁻¹; $X_{b.s.p}$: BSPs内菌濃度 (mg)(BSP)⁻¹; N_t : CBF内の総BSPs数 (particles).

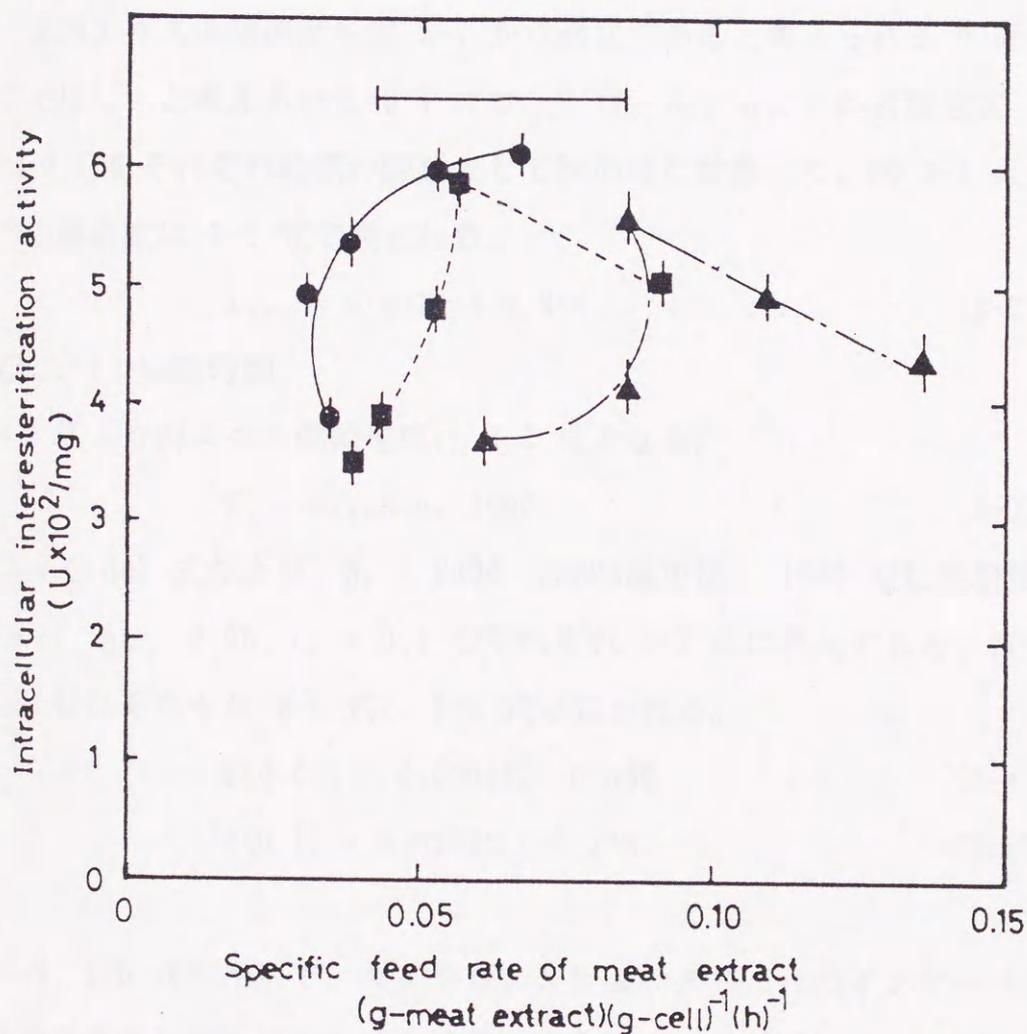


図 3-7. 比肉エキス供給速度とBSPs固定化菌体内リパーゼ活性との関係
使用記号とライン: 図 3-6 と同様

図 3-7 より 最大の菌体内リパーゼ活性は比肉エキス供給速度が0.04～0.08の比較的、狭い範囲内で認められることがわかる。本結果は肉エキスの供給速度を菌体増殖にあわせて変化させ、最適な値にコントロールしてやれば、培養全般を通じて、より高い菌体内活性を維持できる可能性を示唆していると考えられる。そこで次にマイクロコンピュータを用いて比肉エキス供給速度を最適値に制御することを試みた。

3-3-3-2. 比肉エキス供給速度を制御した流加培養

比肉エキス供給速度を図 3-7 から適切であると考えられる 0.05、適切ではないと考えられる 0.1 にコントロールするための流加速度 $f(0.05)$ 、 $f(0.1)$ をそれぞれ時間の関数として次の様に計算した。図 3-7 より BSPs 内の菌濃度は 3-2 式で表される。

$$X_{b.s.p} = 0.023t + 0.864 \quad (3-2)$$

但し、 t : 培養時間

3-1 式より肉エキス供給速度は 3-3 式となる。

$$f_s = X_{b.s.p} N_t q_s / 1000 \quad (3-3)$$

よって 3-2 式および、 $N_t = 9000$ (BSPs 添加量: 1500 コ/1, 実培養液量: 6 l), $q_s = 0.05$, $q_s = 0.1$ をそれぞれ 3-3 式に代入すると、 $f(0.05)$ 、 $f(0.1)$ はそれぞれ 3-4 式、3-5 式で表される。

$$f(0.05) = 0.0104t + 0.389 \quad (3-4)$$

$$f(0.1) = 0.0207t + 0.778 \quad (3-5)$$

3-4, 3-5 式を用いて、マイクロコンピュータで 2-h のインターバルで肉エキスの流加量を変化させた培養結果を図 3-8 に比較した。

図 3-8 より比肉エキス供給速度を 0.05 にコントロールした場合、回分培養に比べ、1.3～1.5 高い菌体内リパーゼ活性が培養全般を通じて維持

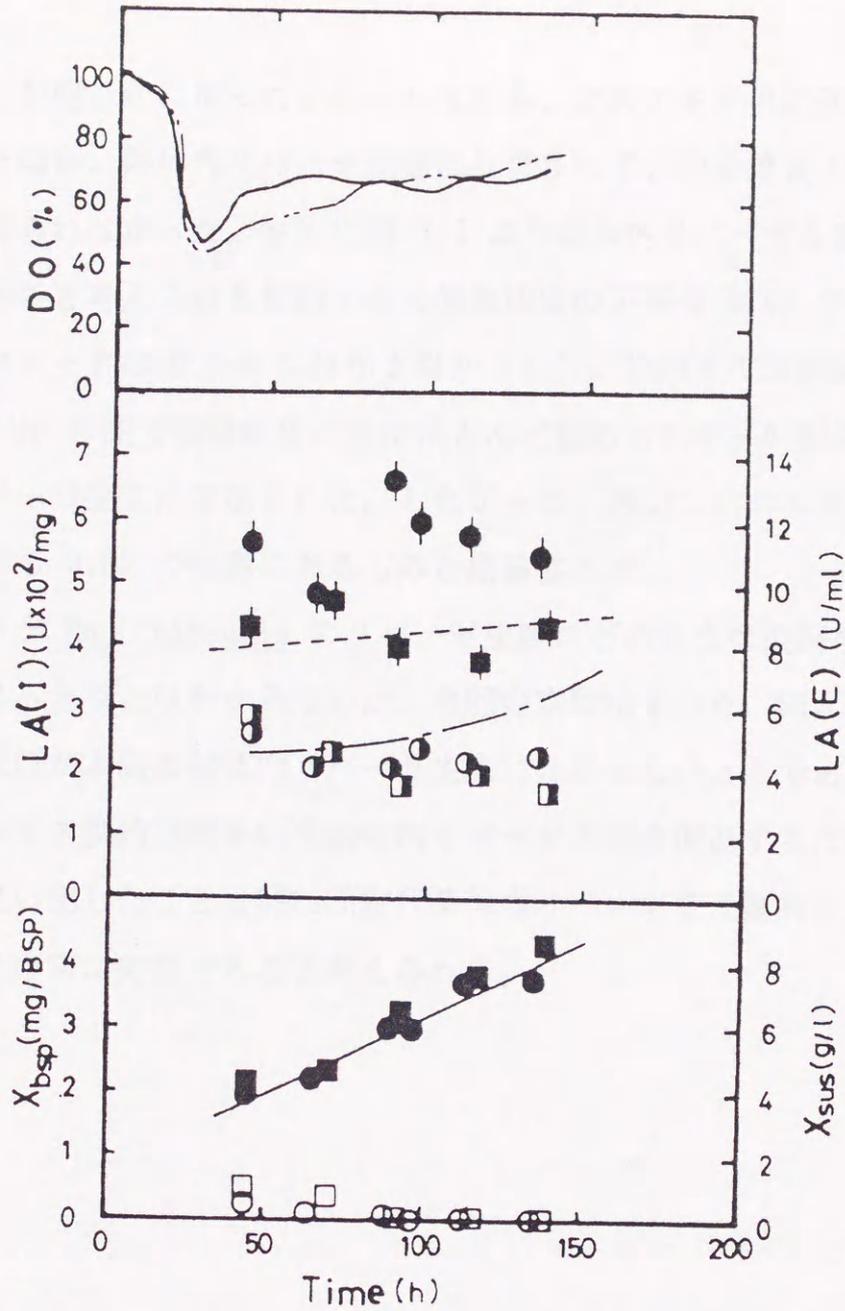


図 3-8. 比肉エキス供給速度を一定値に制御した流加培養結果
 比肉エキス供給速度: (●, ○, ●, ○), 0.05; (■, □, ■, □), 0.1 (g-肉
 エキス)(g-dried cells)-1(h)-1. 使用記号: 図 3-3 参照. (●, ■),
 BSPs内菌濃度; (○, □), BSPs外菌体濃度; (●, ■), 菌体内エステル交換
 活性; (○, □), 菌体外加水分解活性. DO カブ: ——, 0.05, -----,
 0.01 (g-肉エキス)(g-dried cells)-1(h)-1. ライン: ——, 3-2 式; -----,
 回分培養における菌体内活性(図 3-3); ———, 回分培養における菌体外
 活性(図 3-3).

されることが明らかになった。しかしながら、比肉エキス供給速度を 0.1 に維持した場合、菌体内リパーゼ生産は促進されず、回分培養と同程度の活性しか得られなかった。さらに図 3-7 より菌体内リパーゼ生産の促進に効果があると考えられる比肉エキス供給速度の下限値 0.04 での培養も実施した（データは図 3-8 には示さなかった）。比肉エキス供給速度 0.04 と 0.05 の間で実験結果に差はほとんど認められず、0.04 の場合も菌体内リパーゼ生産は促進された。したがって、適切な比肉エキス供給速度は 0.04 から 0.05 の範囲にあるものと結論された。

肉エキスが *Rh. chinensis* のリパーゼ生産にどのような役割を果たしているかははっきりとはわからないが、今回の実験結果より、肉エキスが制限された状態が本菌の菌体内リパーゼ生産には好ましいようである。今回、比肉エキス供給速度をいう菌体内リパーゼ生産を促進するために有効な指標を見出したことはBSPs固定化菌体内リパーゼを工業的に大量生産する場合に非常に有益であると考えられる。

3-3-4. 最適通気量の決定

すでに述べたように BSPs固定化菌体の菌体内リパーゼ生産に影響を与える因子として、肉エキス濃度の他にもうひとつ、通気量が見い出されている(図 3-5)。通気量はフェルメンター内の酸素移動と密接に関係すると考えられ、ひいては好気性菌である *Rh. chinensis* の菌体増殖にも影響を与えると予想される。したがって、BSPs固定化菌体の大量培養法を確立するためには最適な通気条件を決定することが必須となる。特にフェルメンター内の酸素移動はフェルメンターのスケールによる影響を受けることが良く知られており、最適通気量の決定に関しては1種類(1スケール)のフェルメンターを用いた検討では不十分であると考えられる。そこで、ここでは塔径の異なる3種類のCBFを用いて、まず、CBF-BSPs系の酸素移動特性について検討した。

3-3-4-1. Circulating bed fermentor の酸素移動特性

図 3-9 にBSPsを加えない水系の k_{La} 、 ϵ_c に対するCBFの塔径 D および縦横比 L/D の影響を示した。図 3-9 より D および L/D は CBF内の k_{La} にほとんど影響を与えず、水系の k_{La} は実験式 (3-6 式) で表せることがわかった。

$$\log(k_{La}) = 1.09 \log(V_s) - 2.14 \quad (3-6)$$

$D = 11$ cm の場合の ϵ_c は塔径が大きい場合 ϵ_c に比べて数倍大きく、物質移動係数 k_L は D や V_s の影響をほとんど受けずほぼ一定と考えられるので^{132) 133)}、 $D = 11$ cm の CBF内の平均気泡径は $D = 15$ あるいは 20 cm の場合に比べて、数倍大きいと考えられる。観察結果からもそのような傾向

が認められた。

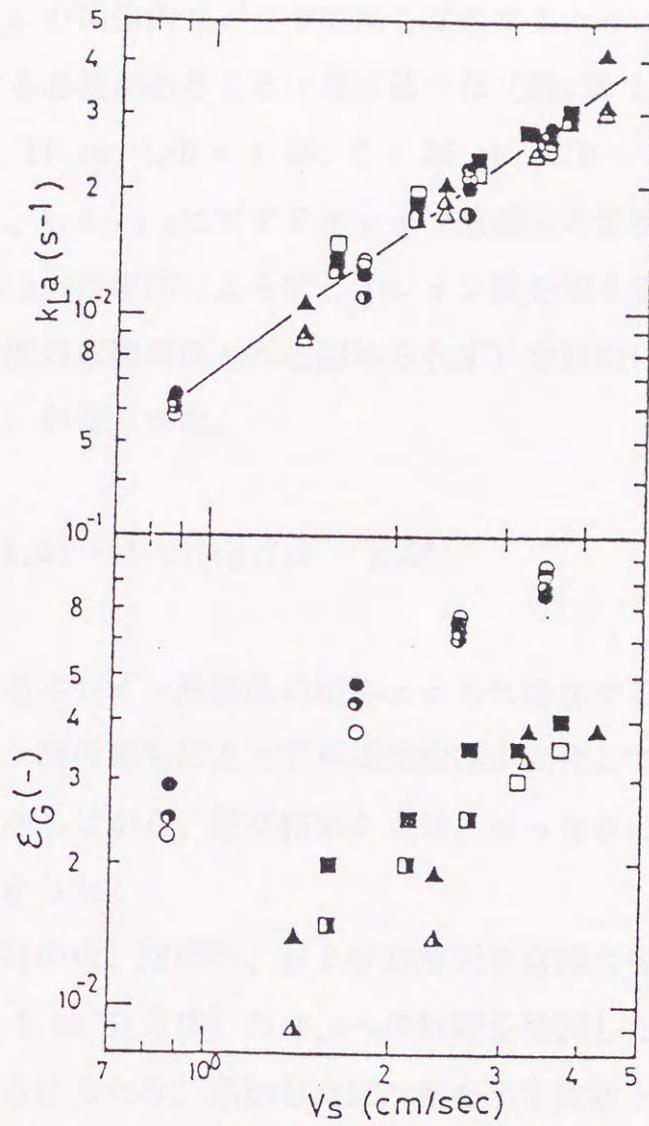


図 3-8. 水系の k_{La} 、 ϵ_G へのCBFの塔径 D 、および縦横比 L/D の影響

Symbol	Diameter (cm)	Aspect ratio (-)
●	11	3.45
○	11	4.36
○	11	5.36
○	11	6.34
▲	15	2.07
△	15	3.44
△	15	4.81
■	20	2.48
□	20	2.97
□	20	3.45

Rh. chinensis の菌体内リパーゼ生産を促進するために、培地中にオレイン酸を添加する必要があることは既に述べた (第2章 2-3-1)。そこで2種類の CBF ($D = 11$ cm, $L/D = 4.36$; $D = 20$ cm, $L/D = 2.48$) にオレイン酸を1~4% 加え、 k_{La} 、 ϵ_g に対するオレイン酸濃度の影響を調べた。図 3-9 に示すように k_{La} は塔径によらず、オレイン酸を加えることによって (オレイン酸濃度の影響はほとんど認められず) 全体的に低下し、新たな実験式 (3-7 式) が得られた。

$$\log(k_{La}) = 1.40 \log(V_s) - 2.37 \quad (3-7)$$

ϵ_g は添加するオレイン酸濃度の増加とともに増加する傾向が認められ、本結果はオレイン酸の添加によって平均気泡径が変化している可能性を示唆している。しかしながら、観察結果からは、はっきりとした気泡径の違いは認められなかった。

以上の予備検討の後、空BSPs、および2%寒天を含浸させた菌体付着模擬BSPs (いずれも 6 mm 立方体) の k_{La} への影響を検討した (図 3-9)。BSPs の影響を検討するにあたり、添加したBSPs量を示す変数として、BSPsの見かけのホールドアップ $\epsilon_{s,s}$ を次のように定義した。

$$\epsilon_{s,s} = N_p V_p / V_R \quad (3-8)$$

但し、 N_p , BSPs添加個数 (particle); V_p , BSPs1個の見かけの容積 (例えば 6 mm 立方体BSPsは $V_p = 0.216$ cm³); V_R , CBFの実容積 (cm³)。

空BSPsを加えた場合、 $\epsilon_{s,s}$ の増加につれて、僅かではあるが k_{La} が低下する傾向が認められた。一方、寒天含浸BSPsを加えた場合は加えない場合 (3-7 式) に比べ、 k_{La} は極端に低下し、しかも $V_s = 2$ cm/s 以上ではほぼ

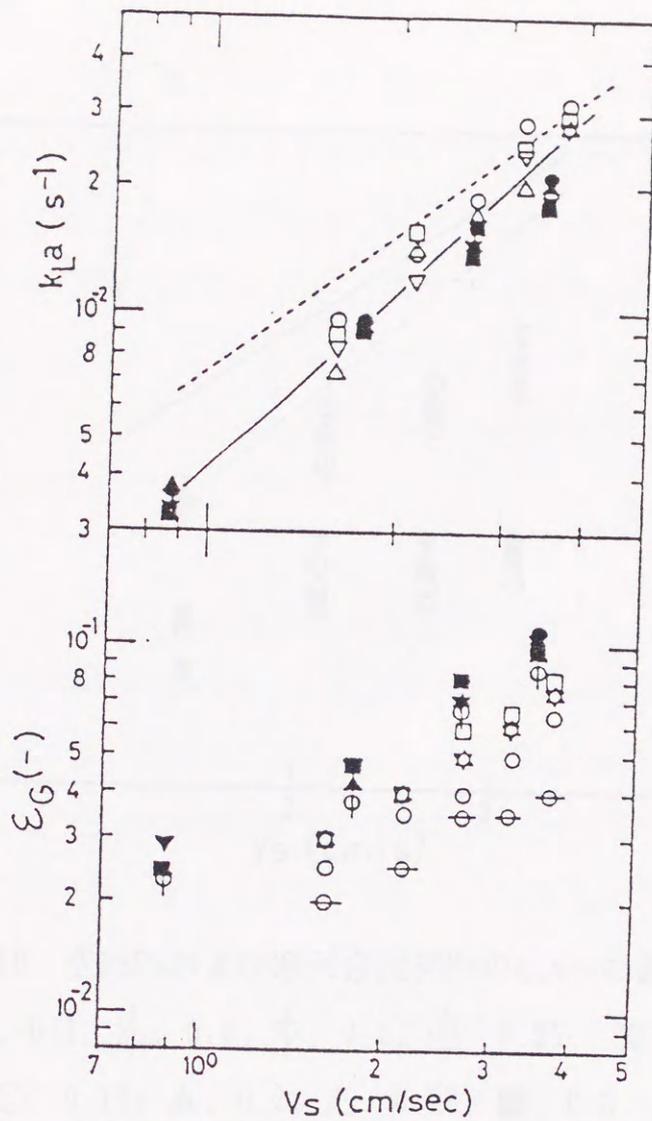


図 3-9. オレイン酸の添加が k_{La} 、 ϵ_G に与える影響

Symbol	Oleic acid concentration (%)	Diameter (cm)
⊕	0	11
⊗	0	20
●	1	11
○	1	20
▲	2	11
△	2	20
▼	3	11
▽	3	20
■	4	11
□	4	20

Line:-----, k_{La} when no oleic acid was added

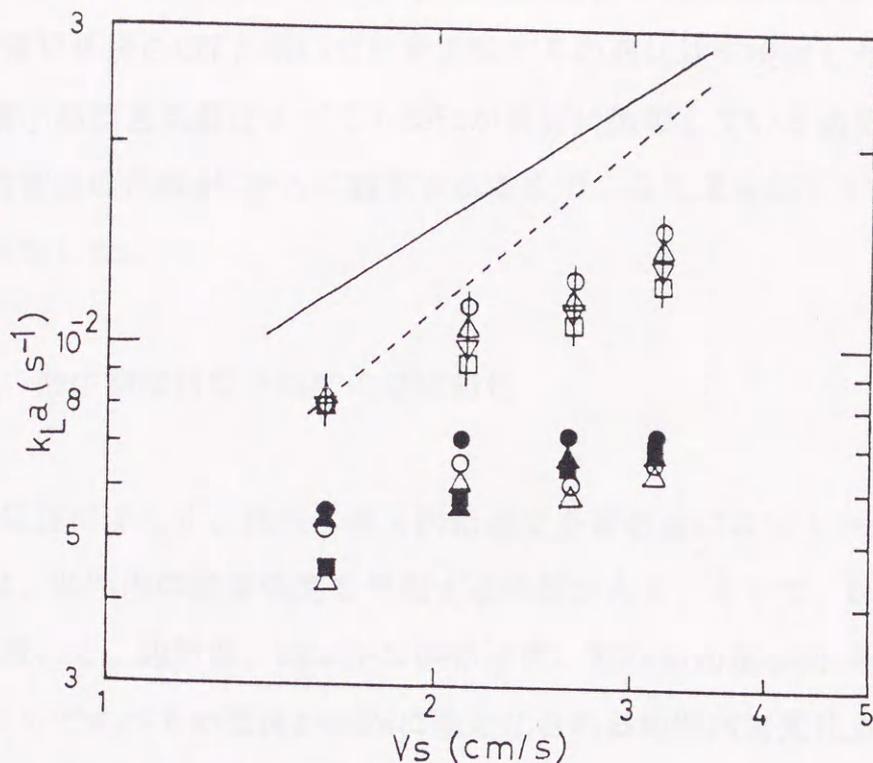


図 3-10. 空BSPsおよび寒天含浸BSPsの k_{La} への影響

空BSPs, ε_{sa} , \circ , 0.1; \triangle , 0.2; ψ , 0.3; \square , 0.35. 寒天含浸BSPs, ε_{sa} , \bullet , 0.1; \circ , 0.15; \blacktriangle , 0.2; \triangle , 0.25; \blacksquare , 0.3. ライフ: ———, 水系の k_{La} (3-6 式); - - - - - , 酢酸を加えた場合の k_{La} (3-7 式).
CBF ($D = 20 \text{ cm}$, $L/D = 2.48$)

一定の値を示した。

既に述べたように、回分培養において $V_s = 2.26 \text{ cm/s}$ 以上で、通気量の増加は菌体内活性の低下を引き起こした(図 3-5)。さらに図 3-9 の結果より、実培養系において通気量を $V_s = 2.1 \text{ cm/s}$ 以上増加させても CBF の酸素供給能力はほとんど増加しないと考えられる。したがって、通気量を増大させることは CBF-BSPs 菌体内リパーゼ生産システム対して、何ら好結果をもたらさないのではないかと推測された。そこで、CBF-BSPs 菌体内リパーゼ生産システムの最適通気量として、CBF 内で BSPs の円滑な循環

を実現できる最低通気量、すなわち BSPs最小循環通気量に注目し、次に述べる3種異塔径のCBFを用いた培養実験でその適切性を検討した。

BSPs最小循環通気量はすべてのBSPsが良好に循環している通気量から、BSPsの滞留層の形成がCBF内に観察されるまで、通気量を低下させることにより決定した。

3-3-4-2. 微生物保持粒子内での増殖特性

CBFの塔径によらず、比肉エキス供給速度を最適値にコントロールするためには、BSPs内の菌体濃度を予測する必要がある。そこで、 $D = 15 \text{ cm}$ のCBFを用いて、通気量、肉エキス供給速度、BSPs添加量を図 3-11 に示す、ほとんどすべての菌体がBSPsに固定化される範囲内で変化させ、これら培養条件がBSPs内増殖に与える影響を調べた。さらに通気ガス中の酸素分圧を変化させ、BSPs内増殖に与える影響も検討した(図 3-12)。

図 3-11、図 3-12に示すように、BSPs内菌体増殖は通気ガス中の酸素分圧を変化させる以外、ほとんど変化せず、実験式

$$X_{\text{b.s.p.}} = \frac{X_{\text{m.b.s.p.}}(t-t_{\text{i.n.}})}{K_t + (t-t_{\text{i.n.}})} \quad (3-9)$$

で表現できた。 $X_{\text{b.s.p.}}$: BSPs内菌体濃度(mg/BSP), $X_{\text{m.b.s.p.}}$: BSPs内最大菌体濃度(4.2mg/BSP), t : 時間(h), $t_{\text{i.n.}}$: 流加開始時間(h), K_t : 定数(27.7h, $t_{\text{i.n.}} = 24\text{h}$ の場合)

これらの結果はBSPsに固定化した場合、菌体はBSPs表層付近にフィルムを形成するので(第2章、図 2-2 参照)、フィルム内で酸素が拡散律速状態となり、酸素がBSPs内で増殖制限基質となっていることを示唆している。また図 3-10 の k_{La} の挙動とも良く一致していると考えられる。したがって、以後すべての実験において、3-9 式を用いて比肉エキス供給速度を最適値にコントロールした。

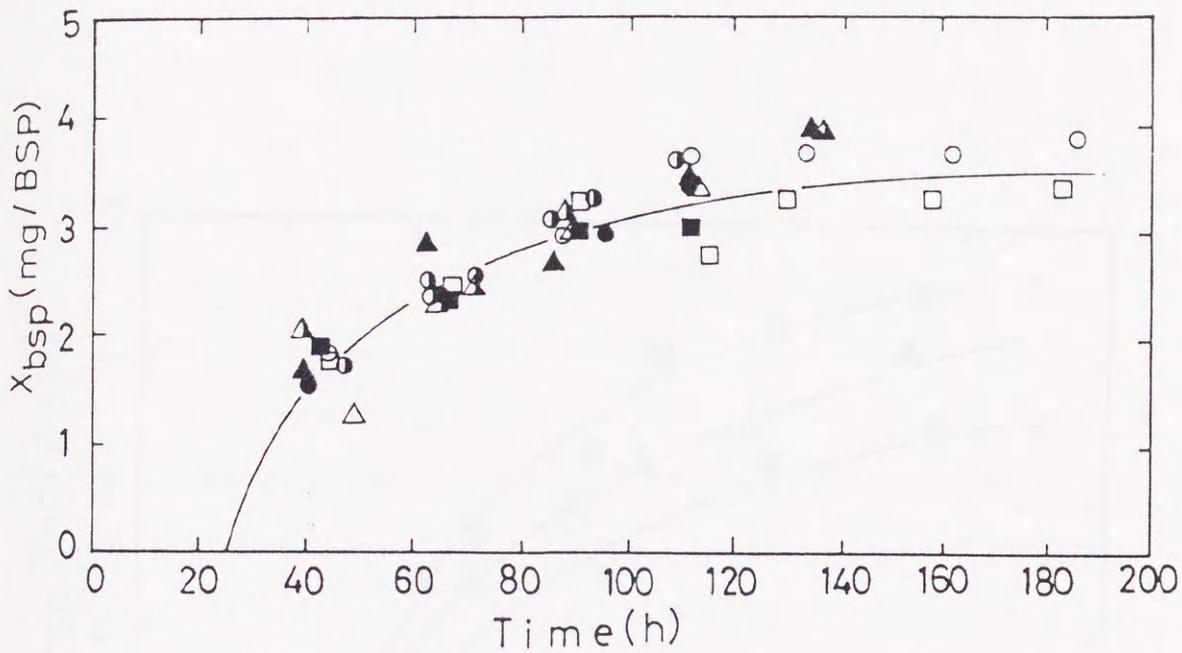


図 3-11. 培養条件（酸素分圧以外）がBSPs内増殖に与える影響。

symbol	aeration rate V_s (cm/s)	feed mode	meat extract feed rate (g-meat extract/h)	BSPs conc. (particles/l)
● ^a	2.26	C.F.	0.94	1500
▲ ^a	2.26	C.F.	1.37	1500
■ ^a	2.26	C.F.	2.30	1500
○	2.26	C.C.	—	1500
△	2.26	C.F.	1.52	1800
□	2.26	C.F.	2.04	1800
◐	3.39	C.F.	1.90	1800
△	2.83	C.C.	—	1800

Feed mode: C.F., constant-feed rate fed-batch culture; C.C., computer-controlled fed-batch culture in which the feed rate of meat extract was varied by a microcomputer at 1-h intervals to maintain the specific feed rate of meat extract at 0.05.

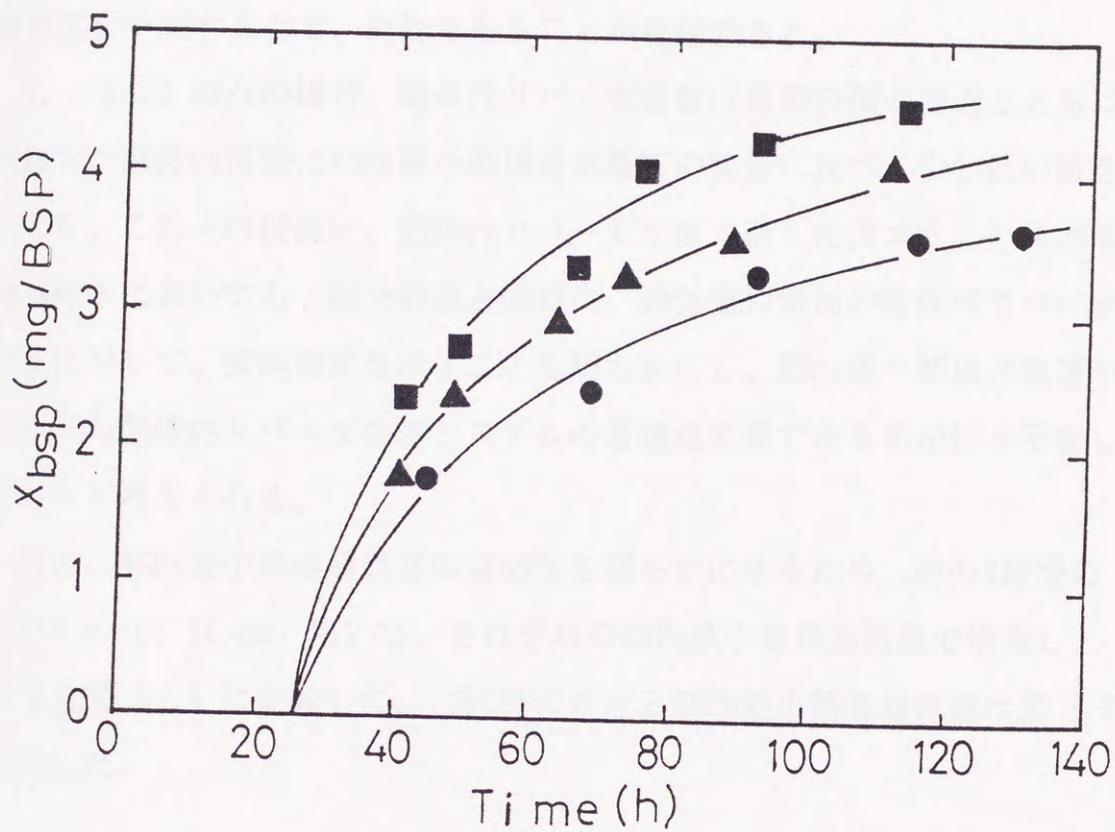


図 3-12. 通気ガス中の酸素分圧がBSPs内増殖に与える影響

酸素分圧 (atm): ●, 0.21; ▲, 0.34; ■, 0.41. 培養条件: 通気量, $V_a = 2.26 \text{ cm/s}$; 肉エキス流加速度, $2.30 \text{ (g-肉エキス)(h)}^{-1}$; BSPs, HR-40 (1800 particles/l); 温度, 30°C ; pH, 5.0.

3-3-4-3. 微生物保持粒子最小循環通気量における培養

D = 20 cmのCBFにおいて、通気量をBSPs最小循環通気量($V_s = 1.48$ cm/s)および $V_s = 2.12$ cm/sとして培養した結果を図 3-13 に比較した。通気量によらず、培養 40 h目でほとんどすべての菌体はBSPsに固定化され、その後、BSPs内菌体濃度予測式(3-9 式)と良好な一致を示しながら、BSPs内で増殖した。3-9 式は塔径の大きなCBF(D = 20 cm)においてもBSPs内の菌濃度を予測する上で、有効であることが確認できた。

$V_s = 2.12$ cm/sの場合、菌体外リパーゼ活性は培養時間の経過とともに増加し、菌体内活性はBSPs最小循環通気量での培養に比べ、少し低い値を示した。これらの結果は、菌体内リパーゼ生産に適した肉エキスの流加培養条件下においても、回分培養と同様に、通気量の増加が菌体内リパーゼ生産に対して、抑制効果を示すことを明らかにし、BSPs最小循環通気量がCBF-BSPs菌体内リパーゼ生産システムの最適通気量である可能性を示唆していると考えられる。

次に、BSPs最小循環通気量の適切性を明らかにするため、他の2種類のCBF(D = 10, 15 cm)を用いて、それぞれのBSPs最小循環通気量で培養し、結果を図 3-14 に比較した。各CBFにおけるBSPs最小循環通気量は表 3-2 に示した。

表 3-2. 3種類のCBFの形状およびそれぞれのBSPs最小循環通気量

Diameter D (cm)	Aspect ratio L/D (-)	Working volume (l)	Minimum circulating aeration rate of BSPs V_s (cm/s)
10	4.46	3.5	2.12
15	2.26	6.0	1.69
20	2.86	18.0	1.48

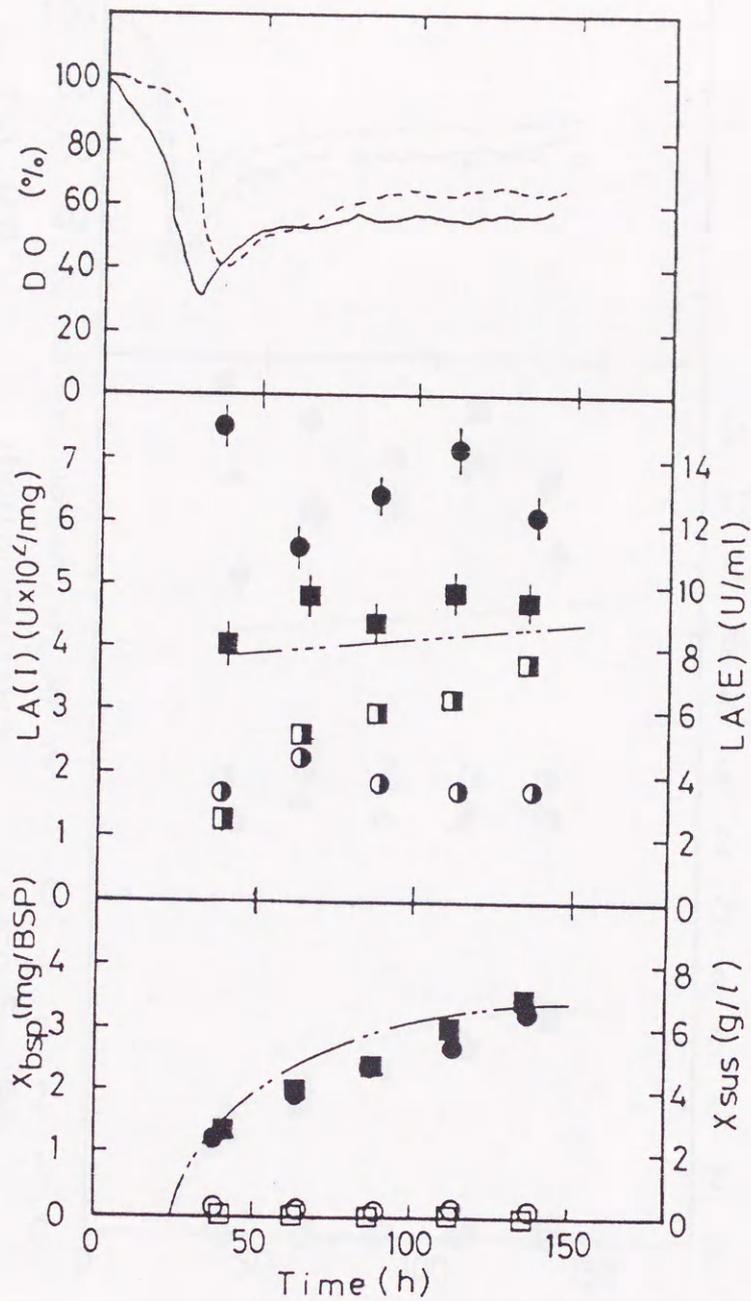


図 3-13. CBF(D=20 cm)での流加培養における通気量の影響

通気量: (●, ○, ◐, ◑), BSPs最小循環通気量 (1.48 cm/s); (■, □, ◒, ◓), 2.12 cm/s. 使用記号: 図 3-3 参照. (●, ■), BSPs内菌濃度; (○, □), BSPs外菌体濃度; (◐, ◒), 菌体内エステル交換活性; (◑, ◓), 菌体外加水分解活性. DO カブ: ——, 1.48 cm/s; - - - - -, 2.12 cm/s.
 注: — — —, 3-9 式; ———, 回分培養における菌体内活性(図 3-3).

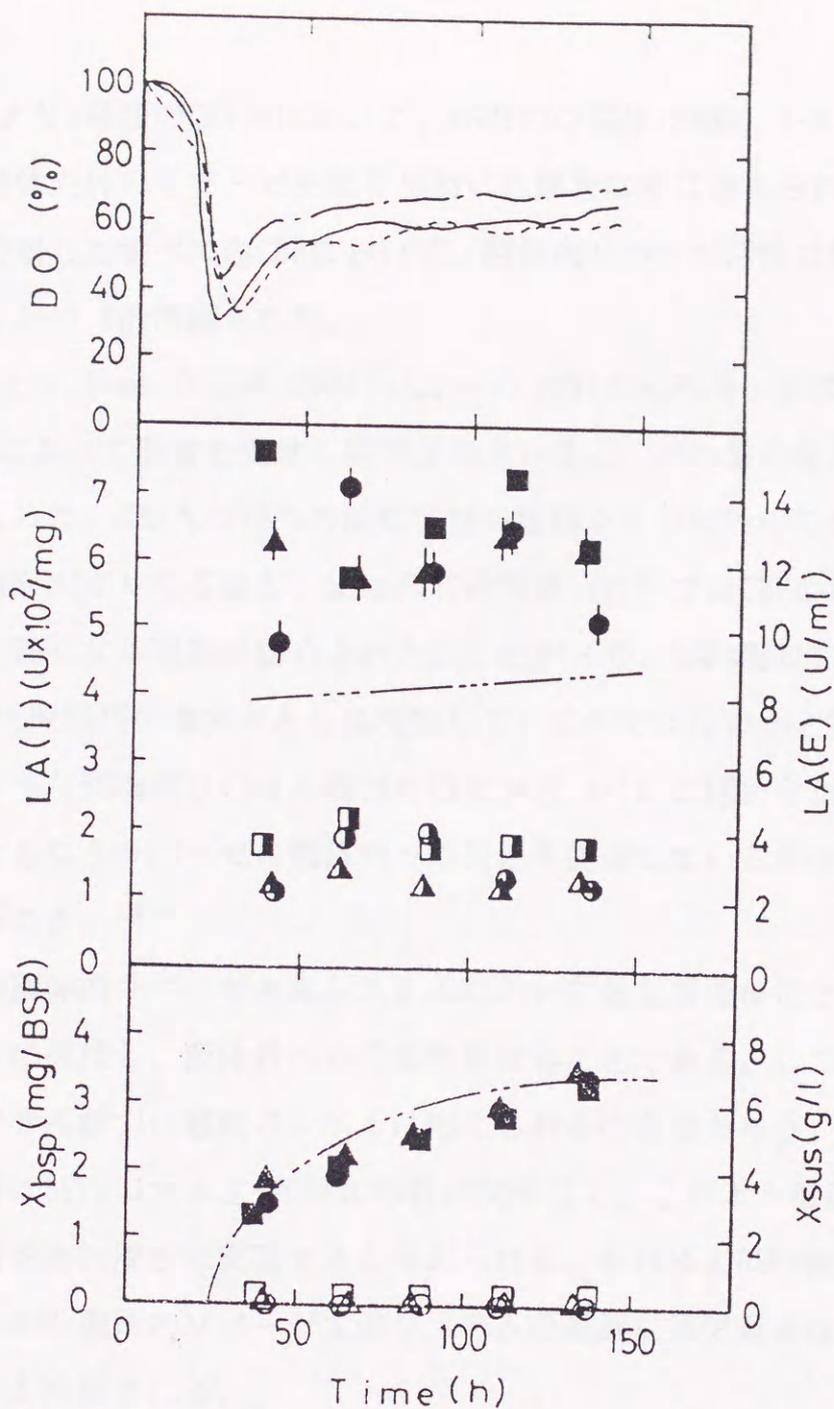


図 3-14. 3種類のCBFにおけるそれぞれのBSPs最小循環通気量での培養結果

BSPs最小循環通気量: 表 3-2 参照. CBFの塔径: (▲, △, ▲, ▲), 10 cm; (●, ○, ●, ●), 15 cm; (■, □, ■, ■), 20 cm. 使用記号: 図 3-3 参照. (▲, ●, ■), BSPs内菌体濃度; (△, ○, □), BSPs外菌体濃度; (▲, ●, ■), 菌体内エステル交換活性; (△, ○, □), 菌体外加水分解活性. DO カ-ブ: ———, 10 cm; ——, 15 cm; ·····, 20 cm. ライフ: 図 3-13 参照.

図 3-14より3種類のCBF内において、BSPs内の菌体増殖は 3-9 式に良く一致し、菌体内外のリパーゼ生産の挙動にも顕著な差は認められなかった。加えて、使用したすべてのCBFにおいて、菌体内リパーゼ活性は回分培養に比べ、1.3~1.8倍増幅された。

表 3-2 より 6-mm 立方体 BSPs($\epsilon_{s,0} = 0.389$)のBSPs最小循環通気量はCBFの塔径によって影響を受け、塔径が大きいほど、BSPs最小循環通気量は小さくなった。CBF内のBSPsの流動状態の観察から、BSPsの循環スピードは通気量が大きくなるほど、また同じ通気量 (V_s) ではCBFの塔径が大きいほど、速くなる現象が認められた。したがって、BSPs周りのせん断力は通気量やCBF塔径の増大とともに増加しているのではないかと推察される。このようなBSPs周りのせん断力の増加が図 3-13 に認められる通気量の増大にともなうリパーゼの菌体外への分泌を促進している原因ではないかと考えられる。¹²⁹⁾

CBF-BSPs菌体内リパーゼ生産システムにおいて最も重要なことはリパーゼを菌体内に保持し、菌体外への分泌を避けることである。したがって、BSPs周りのせん断力は最低のレベルに抑えられるべきであろう。BSPs最小循環通気量はBSPsの大きさやCBFの形状に関係なく、このような最低のせん断力環境をBSPs周りに実現すると考えられる。それゆえBSPs最小循環通気量はCBF-BSPs菌体内リパーゼ生産システムの最適な通気量となるのではなかろうかと推察される。

さらに、図 3-14 に示した実験結果より、BSPs最小循環通気量は CBF-BSPs菌体内リパーゼ生産システムのスケールアップファクターとなるのではないかということが考えられる。しかしながら、スケールアップファクターとして有効であることを確認するためにはさらに大きなスケール ($D > 20$ cm) の CBFを用いた検討が必要と考えられる。

3-4. 結論

BSPs固定化菌体の大量培養法について検討した結果

- 1) Circulating bed fermentor (CBF) を用いて、BSPs固定化菌体の大量培養が可能であることが明らかになった。
- 2) 流加培養において肉エキスの供給速度が菌体内リパーゼ活性に影響を与えることがわかり、比肉エキス供給速度を0.04~0.05の範囲に制御して培養すれば、菌体内活性を回分培養に比べ、1.3~1.5倍程度増幅できることがわかった。
- 3) BSPs内増殖の増殖制限基質は酸素であり、BSPs内増殖は通気ガス中の酸素分圧を変化させる以外ほとんど変化せず、実験式

$$X_{b.s.p} = \frac{X_{m.b.s.p}(t-t_{i.n})}{K_t + (t-t_{i.n})}$$

で表現できた。但し、 $X_{b.s.p}$: BSPs内菌体濃度(mg/BSP), $X_{m.b.s.p}$: BSPs内最大菌体濃度 (4.2mg/BSP), t : 時間(h), $t_{i.n}$: 流加開始時間(h), K_t : 定数(27.7h, $t_{i.n} = 24$ hの場合)。

これはCBF-BSPs培養系の酸素移動特性に起因するものと考えられた。

- 4) 通気量も菌体内リパーゼ活性に影響を与え、通気量の増加は菌体内リパーゼ活性を低下させることがわかった。CBF-BSPs菌体内リパーゼ生産システムには、CBF内でBSPsの円滑な循環を実現できる最低通気量、すなわち BSPs最小循環通気量が適切であることが明らかになった。

第4章 Rhizopus属糸状菌の菌体内リパーゼ生産促進誘因

4-1. 緒言

ポリウレタン微生物保持粒子(Biomass support particles, 以下 BSPs)に固定化することにより、Rhizopus chinensisの菌体内リパーゼ生産が著しく促進され、そのアセトン乾燥菌体を直接、リパーゼ酵素触媒として利用できることは、リパーゼ酵素が高価な現状において、実用的、経済的に非常に興味あることである。一方、酵素工学的見地からは、このような菌体内リパーゼ生産の促進を引き起こす誘因(Trigger)はいったい何なのかということが、将来的に応用展開できる可能性を有する一つの関心事である。本章ではこの菌体内リパーゼ生産の促進誘因について検討を加えた。

既に示したように、Rh. chinensis をBSPsに固定化した場合、菌体はまずBSPs骨格にしっかりと絡み付き、次第にBSPsの表層近くに密にフィルムを形成する。本現象より、次の2つの誘因を想定することができるであろう。すなわち

(1)ポリウレタンの構成成分として存在する何らかの物質

(2)バイオフィルムの形成のような菌体の集合現象

である。

ここでは、ポリウレタンの構成成分として存在する何らかの物質の影響を調べるために、ポリウレタン以外の材質からなる種々の BSPsへの Rh. chinensis の固定化を試み、固定化された菌体内の活性をポリウレタン固定化菌体の活性と比較した。また、菌体集合現象の影響を明らかにするために、BSPsを用いないサスペンション培養において、培養条件を変化させ

て、本菌の増殖形態をバルピー状態からペレット状態に変化させることを
試み、ペレットの形成が菌体内リパーゼ生産に与える影響を調べた。

さらに、*Rh. chinensis* 以外の *Rhizopus* 属の糸状菌に対してもBSPsへ
の固定化を試み、これら菌体のリパーゼ生産に与える固定化の影響を調べ
た。本章では、*Rhizopus* 属の糸状菌に共通していると考えられる菌体内
リパーゼ生産の促進誘因が明らかにされた。

4-2. 実験装置及び実験方法

(1) 使用菌株

リパーゼ生産菌株であることが既に報告されている次の7種類のRhizopus 属の糸状菌を使用した。

Rhizopus chinensis IFO 4768^{1,2)}

Rhizopus javanicus IFO 5441

Rhizopus delemar IFO 4697⁶⁻⁹⁾

Rhizopus oligosporus IFO 8631^{10) 11)}

Rhizopus niveus IFO 4759³⁾

Rhizopus japonicus IFO 4759^{3) 12-14)}

Rhizopus oryzae IFO 4744¹⁴⁾

これらの菌株はPSA(Potato-sucrose-agar)スラント上で培養した後、4℃で保存した。

(2) 基本培地組成

第2章で述べた基本培地[2-2. (2)]に菌体内リパーゼ活性を高めるために、オレイン酸 20 g/l を加えたものを基本培地として使用した。

(3) 微生物保持粒子(Biomass Support Particles, BSPs)

次に示す6種類のBSPsを使用した。

- ポリウレタンフォームBSPs HR-40 [ブリジストン社 (製)]
ナイロン不織布BSPs Scotch-Brite TM [住友3M 社 (製)]
ポリエステル不織布BSPs Floor Scrub TM [住友3M 社 (製)]
ステンレススチールフェルトBSPs Naslon TM [日本精線社 (製)]
ポリビニルフォルマール樹脂BSPs Bell-Eta TM [鐘紡化成社 (製)]
セルロースBSPs CSII [酒伊エンジニアリング社 (製)]

これらBSPsの特性値を表 4-1 に示した。

表 4-1. 使用したBSPsの特性値

Material	Cubic size (mm)	Pore size (μm)	Porosity (-)
Polyurethane	6	635 ^b	0.97
Nylon	8	Nonwoven fabric	
Polyester	8	Nonwoven fabric	
Stainless steel	6	Felt	
PVA ^a	5	500	0.86
Cellulose	5	1260	0.98

^a Polyvinyl formal resin.

^b 40 pores per linear inch.

(4) ジャーフェーマンター培養

10-1 ジャーフェーマンター MD 500 [L. E. marubishi (製)] (実培養液量: 6 l) を用いたサスペンション培養において、攪拌数を変化させ、*Rh. chinensis* の増殖形態をパルピー状態から、ペレット状態に変化させることを試みた。ジャーフェーマンターの攪拌ペラは6枚羽根タービン翼(径: 10 cm)、1枚とし、バッフルプレートは使用しなかった。

第3章と同様の方法で種培養[第3章, 3-2. (2)-(a)]し、フェーマンターに Inoculum size 5% (v/v) で接種した。培地としては基本培地のポリペプトン 70 g/l を肉エキス 30 g/l に変更し、オレイン酸濃度を 65 g/l としたものを用いた。培養条件は次のようにした。

通気量, 2 l/min; 攪拌数, 250, 350, 450 rpm; pH, 5.0; 温度, 30°C.

フラスコ培養法、乾燥菌体調製法、酵素反応、分析方法については第2章と同様の方法で行なった。

4-3. 実験結果及び考察

4-3-1. 種々のBSPsへの固定化がリパーゼ生産に与える影響

ポリウレタンの構成成分として存在する何らかの物質が *Rh. chinensis* の菌体内リパーゼ生産の促進に寄与している可能性を明らかにするため、*Rh. chinensis* を表 4-1 に示した種々の材質よりなるBSPsと共にフラスコ培養した。その結果、使用したすべてのBSPsにおいて、ほとんどすべての菌体が培養中に自然にBSPsに固定化され、BSPs外での増殖は全く認められなかった。表 4-2 に種々のBSPsへの固定化が *Rh. chinensis* のリパーゼ生産に与える影響を示し、図 4-1 に *Rh. chinensis* を固定化した表 4-1 に示した種々のBSPsの断面写真を示した。図 4-1 よりナイロンBSPs、ポリエステルBSPs、およびセルロースBSPsではポリウレタンBSPsの場合と同様にBSPs表層近くに菌体がフィルムを形成している様子が観察された。一方、ステンレススチールBSPsおよびPVA BSPsの場合はフィルムの形成は認められないが、ステンレススチールフェルトのすき間あるいはPVA樹脂のくぼみの部分に菌体がコロニーを形成している様子が観察された。

表 4-2 より 使用したすべての材質のBSPsにおいて、固定化された菌体の菌体内活性はサスペンション培養菌体に比べ、数倍上昇していることがわかる。本実験で使用したBSPsは合成高分子であるポリウレタン、ナイロン、ポリエステル、PVA、無機材料であるステンレススチール、天然物質であるセルロースにより構成されている。これらの物質の構成成分を詳細に比較することはできないが、これらに共通の構成成分が存在しているとは考えにくい。したがって、表 4-2 の結果は *Rh. chinensis* の菌体内リパーゼ生産の促進誘因はポリウレタン構成成分として存在する何らかの特定な物質ではないことを示唆していると考えられる。

表 4-2. 種々のBSPsへの固定化が *Rh. chinensis* の
リパーゼ生産に与える影響

BSPs	Cell conc. (mg/BSP)	Intracellular lipase activity		Extracellular lipase activity
		Interesterification (U × 10 ² /mg)	Hydrolysis (U × 10 ² /mg)	Hydrolysis (U × 10 ² /ml)
Polyurethane (6 mm)	3.8	5.15	37.5	198
Nylon (8 mm)	6.6	4.20	26.7	273
Polyester (8 mm)	6.2	5.07	41.6	225
Naslon (6 mm) (stainless steel)	3.9	3.53	13.8	250
PVA (5 mm)	2.1	3.64	14.3	225
Cellulose (5 mm)	2.7	3.89	38.3	231
Control ^a	5.3 (g/l)	0.58	13.4	316

^a Freely suspended cells without using BSPs.

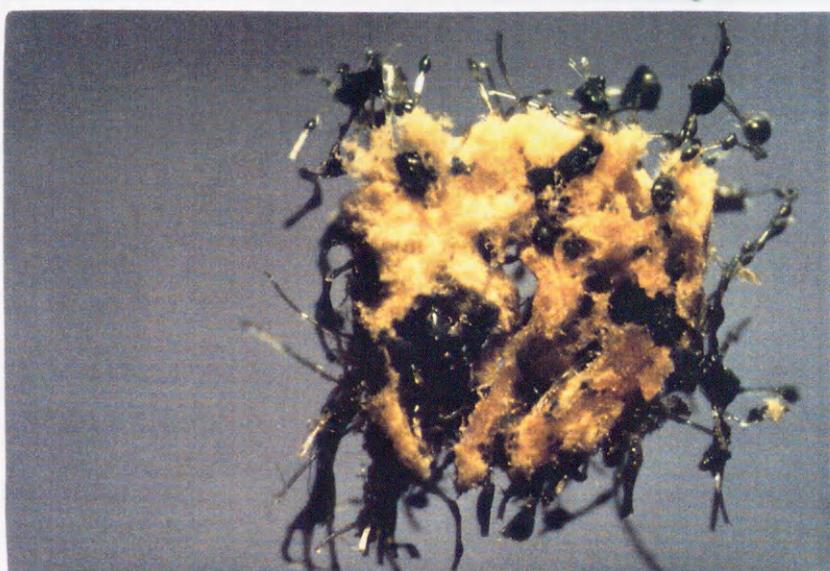
Concentrations of polyurethane, nylon, polyester, Naslon, PVA, and cellulose were 150, 100, 100, 150, 200 and 200 particles/100 ml-medium, respectively.

Basal medium: Polypepton, 70 g; NaNO₃, 1.0 g; KH₂PO₄, 1.0 g; MgSO₄·7H₂O, 0.5 g; oleic acid, 20 g in 1 l of tap water.
Culture conditions: temperature, 30°C; initial pH, 5.6; cultivation time, 85 h; reciprocal shaking, 150 oscillations/min and 70 mm amplitude.

a)



b)



c)

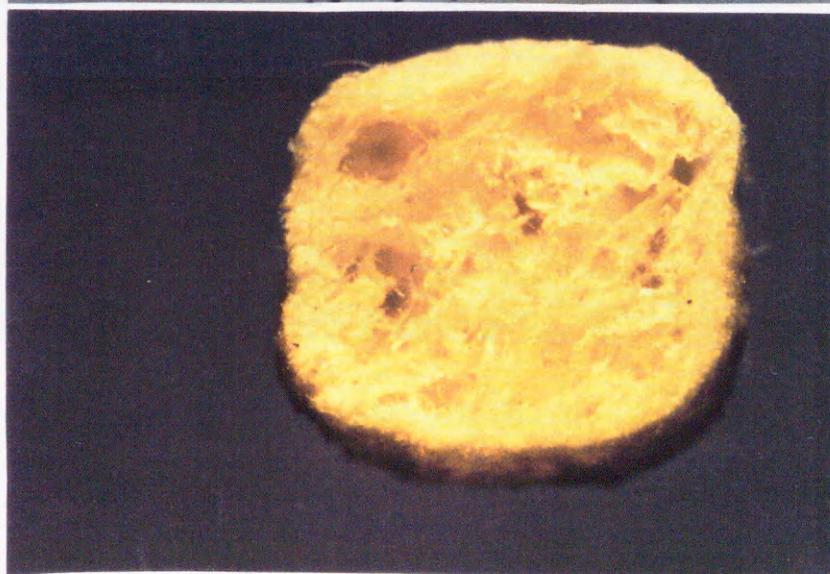


図 4-1. *Rh. chinensis* を固定化したBSPsの断面写真 (その1)

a) ナイロンBSPs, b) ポリエステルBSPs, c) セルロースBSPs.

d)



e)

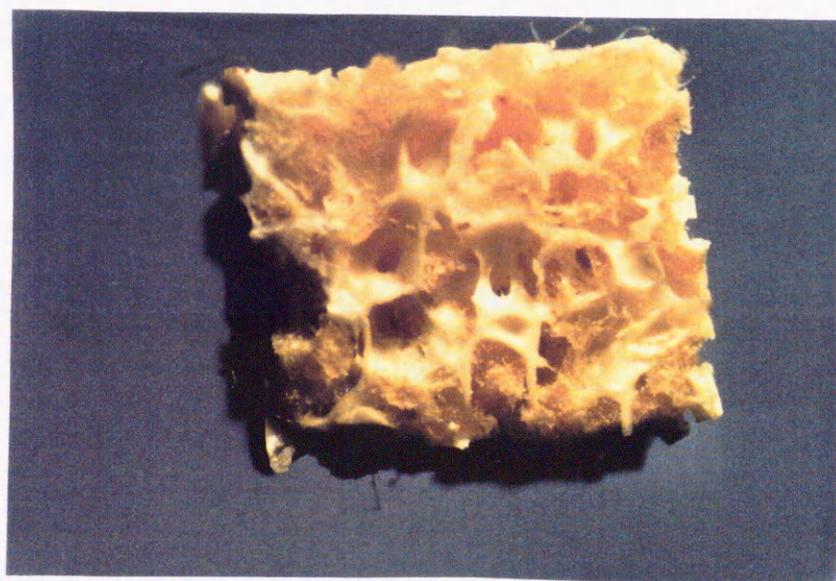


図 4-1. *Rh. chinensis* を固定化したBSPsの断面写真 (その2)

c) ステンレススチールBSPs, d) PVA BSPs.

4-3-2. 増殖形態とリパーゼ生産の関係

Rh. chinensis 菌体内リパーゼ生産の促進に対する菌体集合現象の影響を明らかにするために、培養条件をかえて、Rh. chinensisの増殖形態をパルピー状態からペレット状態に変化させることを試みた。既に述べたように、糸状菌の増殖形態は培養条件の微妙な変化に影響されて、複雑に変化することが知られている。¹²⁵⁾ Rh. chinensis の場合、攪拌数によりペレット形成が影響を受けることが明らかになった。

図 4-2 に攪拌数がサスペンション培養における Rh. chinensis の菌体増殖、リパーゼ生産に与える影響を示した。また攪拌数 450 rpm の場合の培養経時における増殖形態の変化を図 4-3 に示した。図 4-3 に見られるように攪拌数 350, 450 rpm の場合は培養 42 h目にペレットの形成が認められ、その後、培養時間の経過と共にペレット数の増加が認められた。しかしながら、攪拌数 250 rpmの場合、培養全般を通じて、パルピー増殖のみが認められ、ペレットは形成されなかった。

図 4-2 より菌体内活性が培養中に見い出されるペレット数の増加に比例して、増大していることは注目すべき現象であると考えられる。特にこの菌体内活性の増加現象は菌体内エステル交換活性に関して、顕著であった。一方、攪拌数によらず、パルピー状の増殖形態を示した菌体は $0.5 \sim 0.8$ ($U \times 10^2 / \text{mg-dried cells}$)の低い菌体内エステル交換活性を示した。菌体外活性については、攪拌数 450 rpm の場合に、培養後期に幾分高い活性が認められるが、攪拌数による顕著な差は認められなかった。また菌体の増殖速度に対しても、攪拌数は顕著な影響を示さなかった。

しかしながら、培養液中の溶存酸素濃度は攪拌数による影響を受け、攪拌数が大きいほど、溶存酸素濃度は高い値を示した。本結果より、培養液中の溶存酸素濃度が Rh. chinensis の菌体内リパーゼ生産の促進に対して、何らかの重要な役割を果しているのではないかということが考えられ

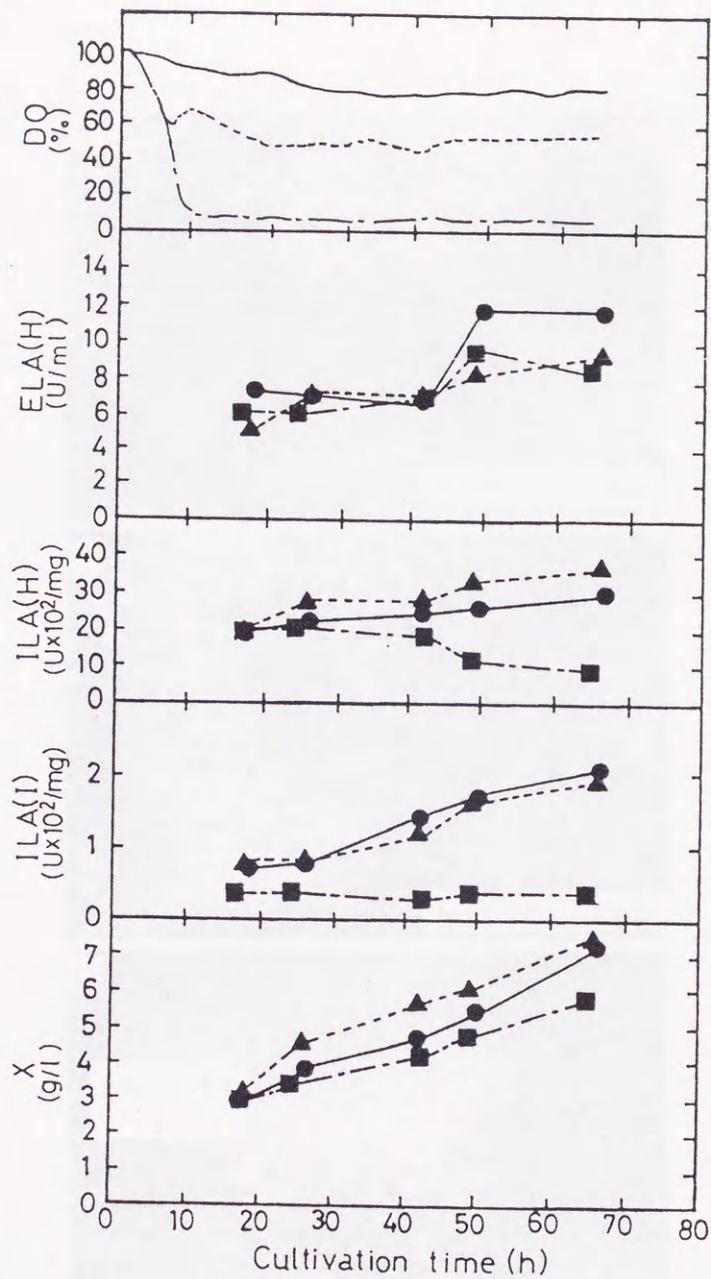


図 4-2. 攪拌数が *Rh. chinensis* のリパーゼ生産に与える影響

(サスペンション培養)

攪拌数: ●, 450 rpm; ▲, 350 rpm; ■, 250 rpm. DO カブ: ——, 450

rpm; - - - - - , 350 rpm; - · - · - · , 250 rpm. X: サスペンション菌体濃度.

ILA(I): 菌体内エステル交換活性. ILA(H): 菌体内加水分解活性.

ELA(I): 菌体外加水分解活性.

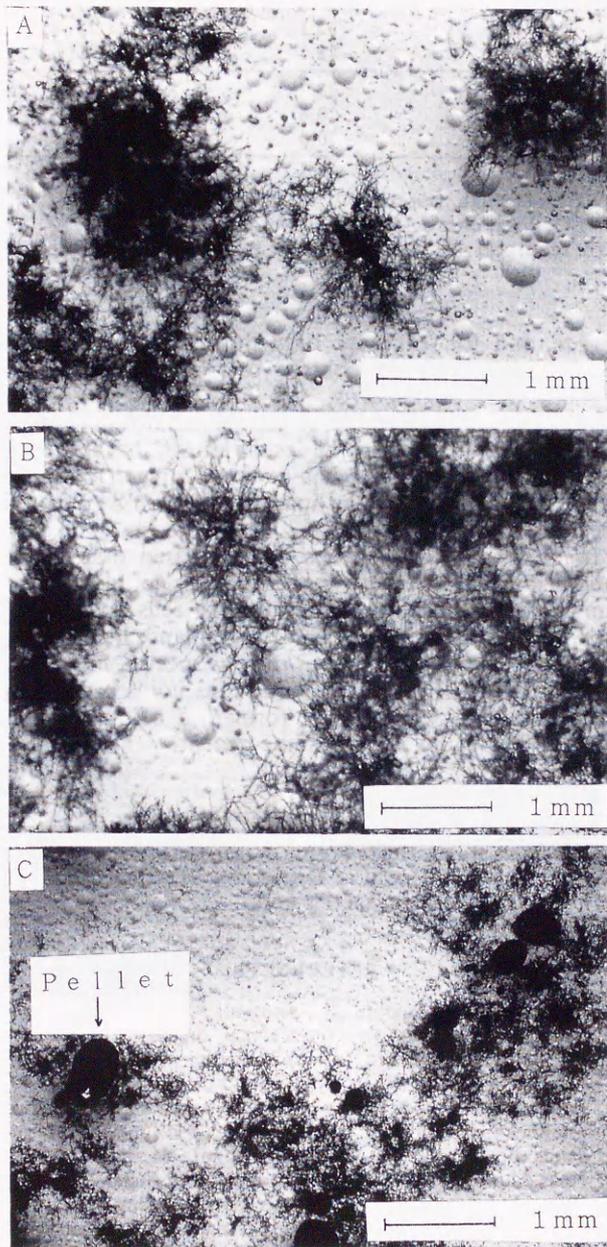
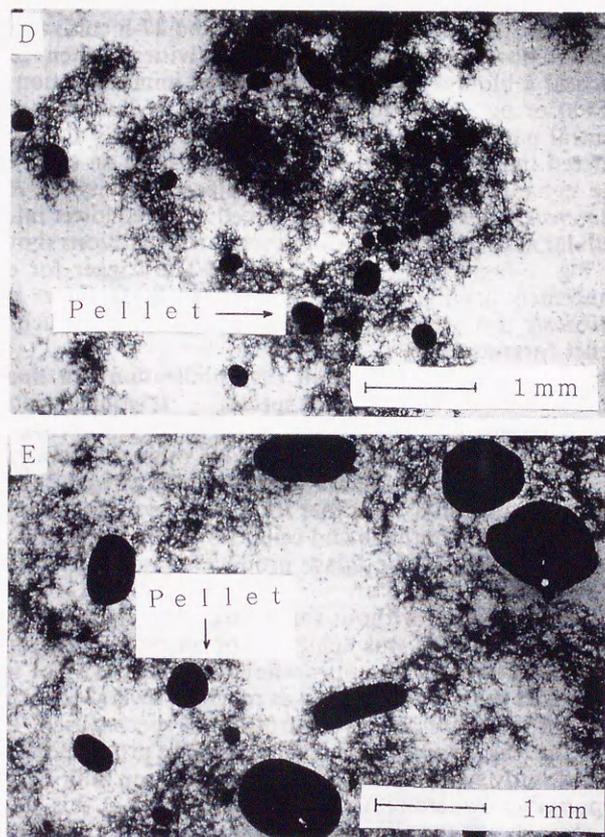


図 4-3. *Rh. chinensis* の増殖形態の変化(攪拌数: 450 rpm)(その1)
培養時間: A) 18 h; B) 27 h; C) 42 h.



☒ 4-3. *Rh. chinensis* の増殖形態の変化(攪拌数: 450 rpm)(その2)

培養時間: D) 50 h; E) 67 h.

る。しかしながら、高溶存酸素濃度の条件下(攪拌数: 350, 450 rpm)においても、パルピー状の増殖形態を示した菌体(培養 18 h目あるいは 27 h目の菌体)は低い菌体内活性を示していた。

菌体がバイオフィームやペレットを形成すると、その主要部分は酸素律速状態になると考えられ、このような酸素律速状態が *Rh. chinensis* の菌体内リパーゼ生産を促進している可能性も考えられる。しかし、図 4-2 に示した、攪拌数 250 rpm の場合、培養液中の溶存酸素濃度はほぼゼロであり、菌体は酸素律速状態にあると考えられるが、パルピー状の増殖形態を示し、菌体内活性はやはり低かった。したがって、図 4-2, 図 4-3 より *Rh. chinensis* の菌体内リパーゼ生産の促進誘因はペレット形成のような菌体の集合現象であると考えられる。

4-3-3. *Rhizopus* 属糸状菌のリパーゼ生産に対する菌体集合現象の影響

菌体集合現象(BSPsへの固定化)が *Rh. chinensis* に特有の菌体内リパーゼ生産の促進誘因なのか、また他の微生物のリパーゼ生産に与える影響はどうかと言うことは非常に興味ある問題である。ここでは表 4-3 に示した *Rh. chinensis* 以外のリパーゼ生産菌株である *Rhizopus* 属の糸状菌、6菌株について、ポリウレタンBSPs、セルロースBSPsへの固定化を試み、固定化操作がこれらの菌株のリパーゼ生産に与える影響を調べた。

使用したすべての微生物は両BSPsに良好に固定化され、BSPs外での増殖は全く認められなかった。表 4-3 よりすべての微生物において、固定化菌体内リパーゼ活性は固定化しないものに比べて数倍上昇していることがわかる。また固定化操作により、菌体外のリパーゼ生産は *Rh. japonicus* を除くほとんどの微生物において、*Rh. chinensis* の場合と同様に抑制された。ここで使用した *Rh. japonicus* は主としてリパーゼを菌体内に生産

するようである。³⁾ BSPsを用いないサスペンション培養において、Rh. javanicus, Rh. delemar, Rh. oligosporus, Rh. niveus の4菌株では一部ペレットの形成が認められたが、Rh. japonicus, Rh. oryzae は Rh. chinensis と同様にバルビー状の増殖形態のみが認められた。したがって、前者4菌株のコントロールの菌体内活性は後者2菌株に比べ、2~3倍高い値を示したのではないかと考えられる。表 4-3 に示された結果より、菌体集合現象は Rhizopus 属糸状菌に共通の菌体内リパーゼ生産促進誘因であることが示唆された。

表 4-3. 菌体集合現象(BSPsへの固定化)が *Rhizopus* 属糸状菌の
リパーゼ生産に与える影響

Microorganism	BSPs	Cell conc. (mg/BSP)	Intracellular lipase activity		Extracellular lipase activity
			Interesterification ($U \times 10^2/\text{mg}$)	Hydrolysis ($U \times 10^2/\text{mg}$)	Hydrolysis ($U \times 10^2/\text{ml}$)
<i>Rh. javanicus</i>	Polyurethane	3.7	4.97	83.3	158
	Cellulose	2.8	3.27	35.8	123
	Control ^a	5.6 (g/l)	1.29	29.8	336
<i>Rh. delemar</i>	Polyurethane	3.2	7.13	94.8	183
	Cellulose	2.6	4.92	56.3	141
	Control ^a	7.6 (g/l)	1.89	29.6	186
<i>Rh. oligosporus</i>	Polyurethane	3.9	4.47	28.0	71
	Cellulose	2.6	3.54	25.5	85
	Control ^a	6.3 (g/l)	1.27	11.3	128
<i>Rh. niveus</i>	Polyurethane	4.2	5.38	62.5	76
	Cellulose	2.7	5.02	38.0	183
	Control ^a	5.1 (g/l)	1.30	24.6	288
<i>Rh. japonicus</i>	Polyurethane	4.0	3.00	29.6	21
	Cellulose	2.3	3.68	32.1	25
	Control ^a	7.4 (g/l)	0.60	12.5	21
<i>Rh. oryzae</i>	Polyurethane	3.6	4.75	26.7	283
	Cellulose	1.8	3.73	20.6	133
	Control ^a	5.6 (g/l)	0.62	10.0	408

^a Freely suspended cells without using BSPs.

Concentrations of polyurethane and cellulose were 100 and 200 particles/100 ml-medium, respectively.

Basal medium: Polypepton, 70 g; NaNO₃, 1.0 g; KH₂PO₄, 1.0 g; MgSO₄·7H₂O, 0.5 g; oleic acid, 20 g in 1 l of tap water.

Culture conditions: temperature, 30°C; initial pH, 5.6; cultivation time, 90 h; reciprocal shaking, 200 oscillations/min and 70 mm amplitude.

4-4. 結論

BSPsへ固定化することによって *Rh. chinensis* の菌体内リパーゼ生産は著しく促進される。本章ではその促進誘因について検討した結果、

BSPsへ固定化することは *Rhizopus* 属糸状菌のバルピー状態からペレット状態への増殖形態の変化を助長することであり、ペレット形成のような菌体集合現象が *Rhizopus* 属糸状菌の菌体内リパーゼ生産に共通の促進誘因であることが示唆された。

したがって、糸状菌や放線菌のペレット形成が何らかの効果をもたらすバイオプロセスに対して、BSPs固定化培養技術のさらなる発展が期待される。

第5章 微生物保持粒子固定化菌体を用いたエステル転移反応

5-1. 緒言

第1章で紹介したように、リパーゼ酵素は油脂であるトリグリセライドを加水分解するが、水の少ない微水反応系ではエステル合成反応を触媒する。油脂化学工業界では、このリパーゼによる合成反応を利用した油脂の品質改善、新機能性油脂の開発が注目され、最近、この分野の研究開発が精力的に実施されている(第1章, 1-3 参照)。中でも最も興味をもたれている反応は安価な油脂からカカオバター代用脂を合成するエステル転移反応であり、既に実用化されつつある。¹⁾このような状況下において、リパーゼ酵素のコストはまだまだ安価であるとは言い難く²⁻⁵⁾、産業界における最大の関心事は リパーゼ酵素を用いたエステル転移反応が経済的に実施可能であるかどうかという一点に集約されている。

第4章までの検討により、高リパーゼ活性を有する微生物保持粒子(Bio-mass support particles, BSPs)に固定化された *Rhizopus chinensis*の乾燥菌体をリパーゼ酵素剤として利用できることがわかり、本プロセスではリパーゼ酵素剤の調製コストを市販の精製リパーゼ酵素を用いる一般の固定化酵素法に比べ、著しく低減できると期待できる(第1章, 1-1 参照)。したがって、次なる課題は BSPs固定化菌体の特徴を生かし、その機能を最大限に発揮させることのできるバイオリクターシステムを構築することであり、さらにそのバイオリクターシステムの実用性を評価することである。

エステル転移反応では反応系の水分濃度をコントロールすることが非常に重要であることは既に述べた(第1章, 1-3 参照)。しかしながら、一般的な固定化酵素を用いるカラムバイオリクターシステムでは装置上の制約から、カラムに供給する反応液中の初期水分濃度しかコントロールす

ることはできず、エステル転移反応用バイオリアクターシステムとして、適切であるとは言い難い。そこで、本章ではまず、固定化菌体と反応液の間で成立する水分濃度の等温平衡関係を利用した固定化菌体内水分濃度（リパーゼ酵素まわりの水分濃度）のコントロール方法を提案し、さらに、BSPs固定化菌体の特性を巧く利用して、反応中の反応液の水分濃度を任意の値にコントロールできる液循環充填式バイオリアクターシステムを考案した。

ここでは、BSPs固定化菌体を用いたエステル転移反応の実用性を評価するために、ベンチスケール（実容積：32 l）の液循環充填式バイオリアクターシステムを用いて、モデル反応として、オリーブオイルとステアリン酸メチルのエステル交換反応を実施し、カカオバター代用脂 SOS (1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol)の生産を行なった。まず、連続エステル交換反応における水分濃度の影響を検討し、固定化菌体内リパーゼの失活速度の水分濃度依存性を明らかにした。次に液循環充填式バイオリアクターシステムの優位性（水分濃度コントロールの重要性）を明らかにするため、固定化していないサスペンション培養菌体を充填したカラムリアクターとその性能を比較した。最後に液循環充填式バイオリアクターシステムにおいて、酵素半減期までの長期連続エステル交換反応を実施し、その実用性を明らかにした。

5-2. 実験装置及び実験方法

(1) 反応基質

オリーブオイル、ステアリン酸メチル、ヘキサンを 1: 2: 3 の比率（重量比）で混合したものを反応基質（液）として使用した。

(2) 固定化菌体（反応触媒）調製法

Rh. chinensis を第3章で述べた塔径 $D = 20$ cm の Circulating bed fermentor (CBF) を用いてポリウレタンBSPs (HR-40) と共に、比肉エキス供給速度を最適値にコントロールして培養した。培養方法、および乾燥菌体調製法はそれぞれ第3章、第2章で述べた方法と同様にした。

固定化しないサスペンション培養菌体は第4章で述べた装置（ジャーファーメンター）、方法により調製した。

(3) 液循環充填式バイオリアクターシステム

図 5-1 にベンチスケール液循環充填式バイオリアクターシステムのフローシート、図 5-2 にその写真を示した。固定化乾燥菌体を充填したステンレススチール製反応器（塔径, 20 cm; 高さ, 90 cm）(1) に水分調整槽として機能する 5-1 攪拌槽とシリカゲルカラムが接続された。さらに反応液中の水分濃度を連続的に検出するために、反応器内に水分計 System I [パナメトリックス社 (製)] のセンサーが挿入された。反応液中の水分濃度はマイクロコンピュータ PC-9801Vm2 [日本電気 (製)] を用いてコントロールした。すなわち水分計から指示値に対応する直流電流をマイクロコンピュータにとりこみ、水分濃度設定値と比較して、設定値よ

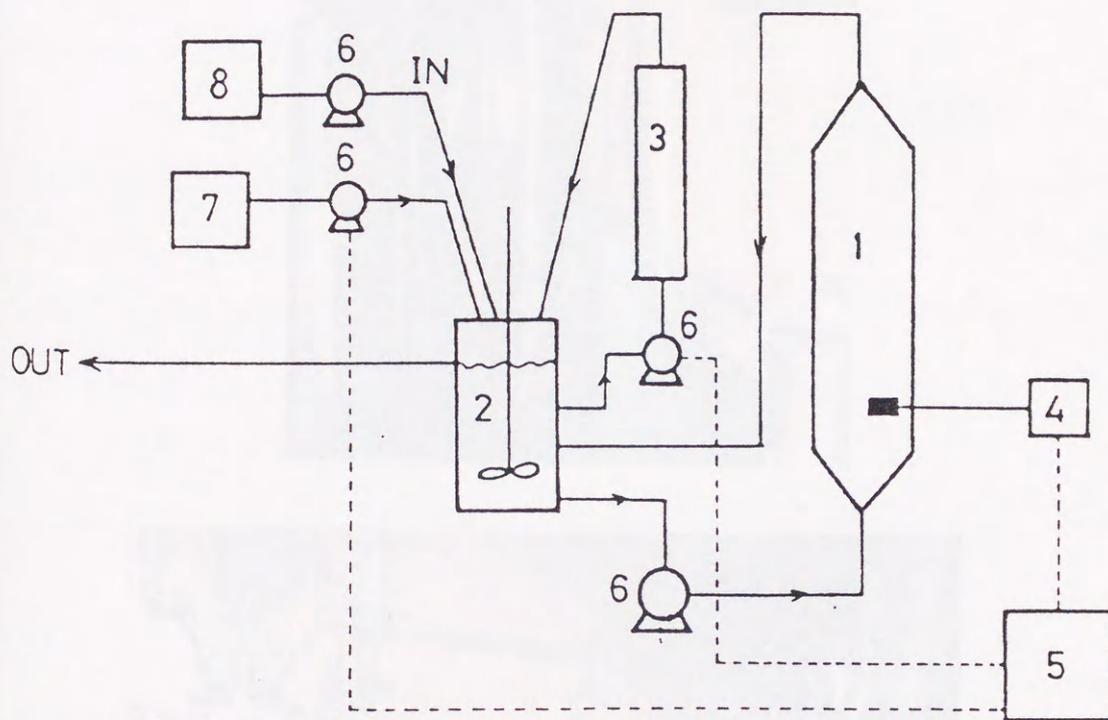


図 5-1. 液循環充填式バイオリアクターシステムフローシート

- (1) 反応器；(2) 水分調整槽；(3) シリカゲルカラム；(4) 水分計；
- (5) マイクロコンピュータ；(6) ポンプ；(7) 水貯蔵タンク；
- (8) 反応液貯蔵タンク

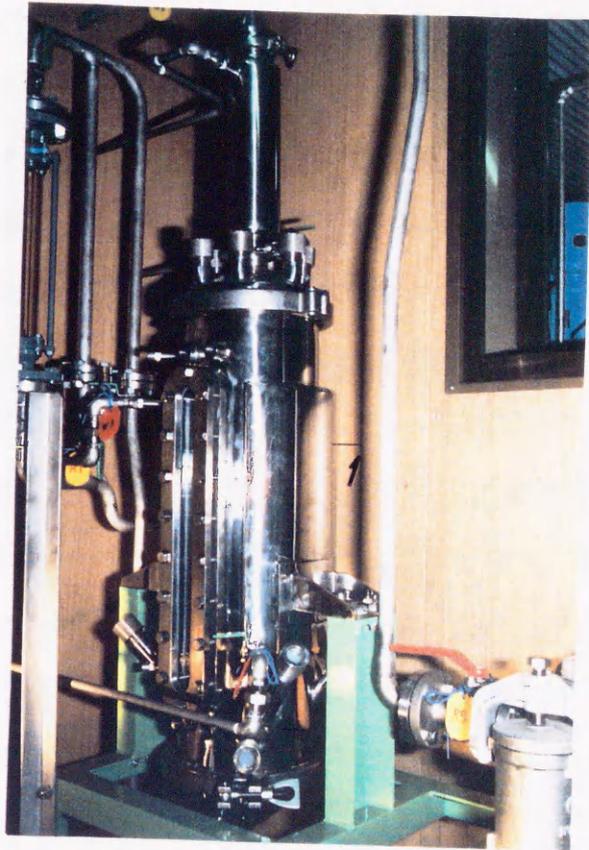


図 5-2. ベンチスケール液循環充填式バイオリアクター
システムの写真

(1) 反応器; (2) 水分調整槽; (3) ポンプ; (4) 反応液貯蔵タンク.

り低ければマイクロコンピュータに接続されたポンプを動作させて、水貯蔵タンク (7) より水分調整槽 (2) に水を加え、逆に設定値より高い場合は同様にポンプを動作させて、シリカゲルカラム (3) に反応液を循環することにより反応液を脱水した。反応液は反応器と水分調整槽の間を 20 l/min の高速で循環した。したがって、液循環充填式バイオリアクターシステム内では反応液の完全混合状態が確保されていた。このようなリアクターシステムにおいて、反応液中の水分濃度は設定値 ± 5 ppm の範囲内にコントロールすることができた。

連続エステル交換反応は次の要領で実施した。まず生成物である SOS (1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol) のトリグリセライド中の濃度が 35 % 程度に上昇するまで、回分反応を実施した。その後、反応液貯蔵タンク (8) より、反応液 (基質) を水分調整槽 (2) に流量 20 l/min でチャージした。同量の反応液を水分調整槽 (2) よりオーバーフローさせることにより、連続エステル交換反応を実施した。

反応器内には約 312 g の BSPs 固定化菌体 (乾燥菌体のみの重量) が充填され、エステル交換反応は 40°C で実施した。

(4) カラムバイオリアクターシステム

エステル交換反応における水分濃度のコントロールの重要性を明らかにするため、固定化していないサスペンション培養菌体を充填したカラムバイオリアクターシステムを用いて、連続エステル交換反応を実施した。図 5-3 にカラムバイオリアクターシステムのフローシートを示した。ガラスカラム (内径, 25 mm; 高さ, 500 mm) 内に約 30 g の乾燥菌体を充填し、液循環充填式バイオリアクターシステムの項で述べたものと同様の装置、方法を用いて、反応液貯蔵タンク (3) 内の反応液 (基質) の初期水分濃度を調整した。反応液 (基質) を 2 ml/min の流量でカラム内に供給し、

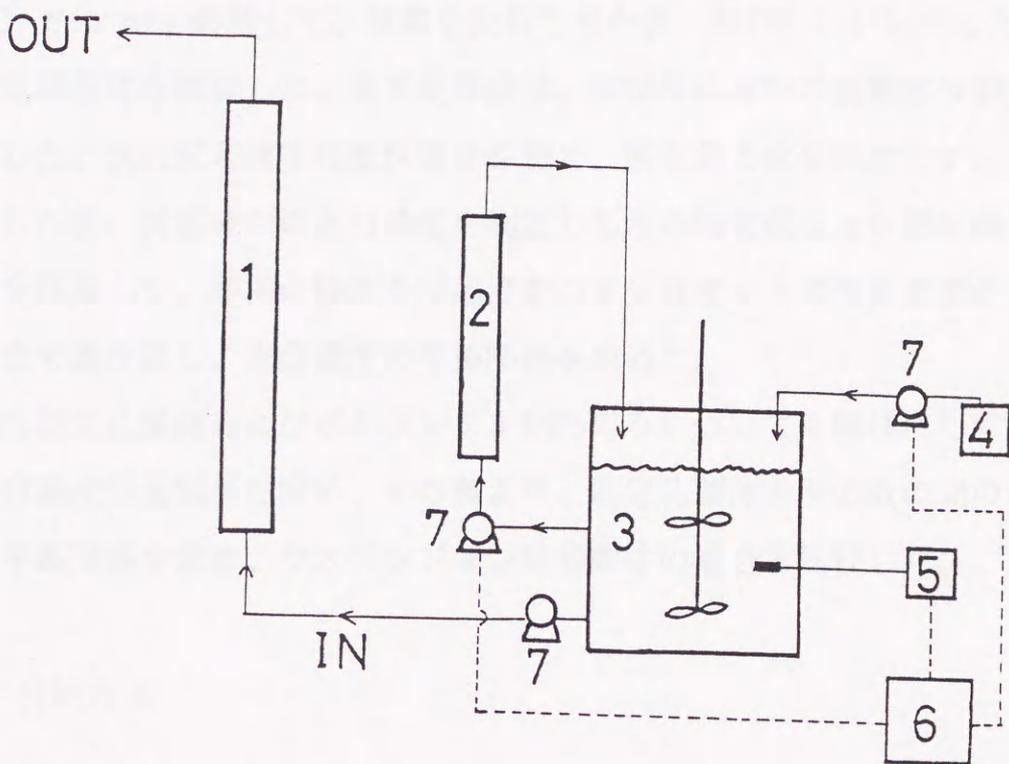


図 5-3. カラムバイオリアクターシステムのフローシート

(1) カラム; (2) シリカゲルカラム; (3) 反応液貯蔵タンク; (4) 水貯蔵タンク; (5) 水分計; (6) マイクロコンピュータ; (7) ポンプ.

40°Cで連続エステル交換反応を実施した。

(5) 水分濃度平衡関係の測定

菌体と反応液の間の水分濃度平衡関係は通常の液相吸着の等温吸着平衡関係の測定法にしたがって求めた。すなわち サスペンション培養菌体を 100°C で 5 min 処理して、酵素を失活させた後、第2章 2-2 に示した方法で乾燥菌体を調製した。まず乾燥菌体、及び反応液中の初期水分濃度を測定した。次に反応液中に乾燥菌体を加え、所定量の水を添加して、十分混合した後、反応液中の水分濃度を測定して水の物質収支より菌体内の水分量を推算した。同様の操作を反応液中の水分濃度がその飽和濃度近くになるまで繰り返し、水分濃度の平衡関係を求めた。

BSPs固定化菌体およびポリウレタンBSPsのみについても同様にして固液間水分濃度平衡関係を求め、その差より、固定化菌体と反応液の間の水分濃度平衡関係を求め、サスペンション培養菌体の場合と比較した。

(6) 分析方法

連続エステル交換反応において、オーバーフローした反応液（流出液）はシリンジフィルターユニット [孔径, 0.5 μm : 東洋ろ紙 (製)] を用いて濾過した後、次の方法で分析した。

反応液のトリグリセライド組成は検出器として、昭和電工 (製) 示差屈折計 Shodex Model SE-11 を装備した日立製作所 (製) 液体クロマトグラフ Model 638-50 を用いて分析した。カラムとして、Lichrospher 100 RP-10 [Merck社 (製)] を用い、移動相溶媒としてはアセトニトリル/クロロホルム混合液 (7/3 v/v) を 1.5 ml/min で流した。カラム温度は恒温

槽により 30°Cに保った。

全脂質中のトリグリセライド、ジグリセライド、モノグリセライド、脂肪酸の濃度は島津製作所（製）GPCカラム HSG-15 を 2本、HSG-20 を 2本を直列につないだゲルクロマトグラフ [島津製作所（製） Model LC-3A] を用いて分析した。移動相として、テトラヒドロフランを 1.0 ml/min で流し、検出器としては昭和電工（製）示差屈折計 Shodex Model SE-11を使用した。カラム温度は 30°Cとした。

さらに反応液中の水分濃度はカールフィシャー水分計 [京都電子（製）MKC-210]を用いて、オフラインでも測定し、パナメトリックス社（製）オンライン水分計の指示値をチェックした。

5-3. 実験結果及び考察

5-3-1. 水分濃度平衡関係

エステル交換反応のような微水反応系において、図 5-4 に示すような水分濃度の平衡関係が菌体と反応液の間で見いだされた(温度: 40°C)。サスペンション培養菌体、および BSPs 固定化菌体を用いて平衡関係をそれぞれ測定したが、両者の結果は良く一致し、図 5-4 に示す関係が認められた。これらの関係は通常の吸着平衡関係に類似しており、Brunauer-Emmett-Teller の式 (5-1 式) で良く表現できた。

$$V = \frac{V_m C X}{(1 - X)(1 - X + C X)} \quad (5-1)$$

但し、 V , 固定化菌体内の水分濃度 (g-H₂O/g-dried cells); X , 反応液の相対水分濃度 (= C_w/C_s) (-); C_w , 反応液中の水分濃度 (mol/ml), C_s , 反応液の飽和水分濃度 (mol/ml); V_m , 定数 (g-H₂O/g-dried cells); C , 定数 (-) を表す。

図 5-4 のシンボル (●) は実測値であり、実線は $V_m = 0.3702$, $C = 2.447$ とした場合の 5-1 式による計算結果である。したがって、エステル交換反応において、重要なコントロールファクターである酵素まわり (固定化菌体内) の水分濃度は反応液中の水分濃度をコントロールすれば図 5-4 に示された平衡関係により自動的に制御できるものと考えられた。

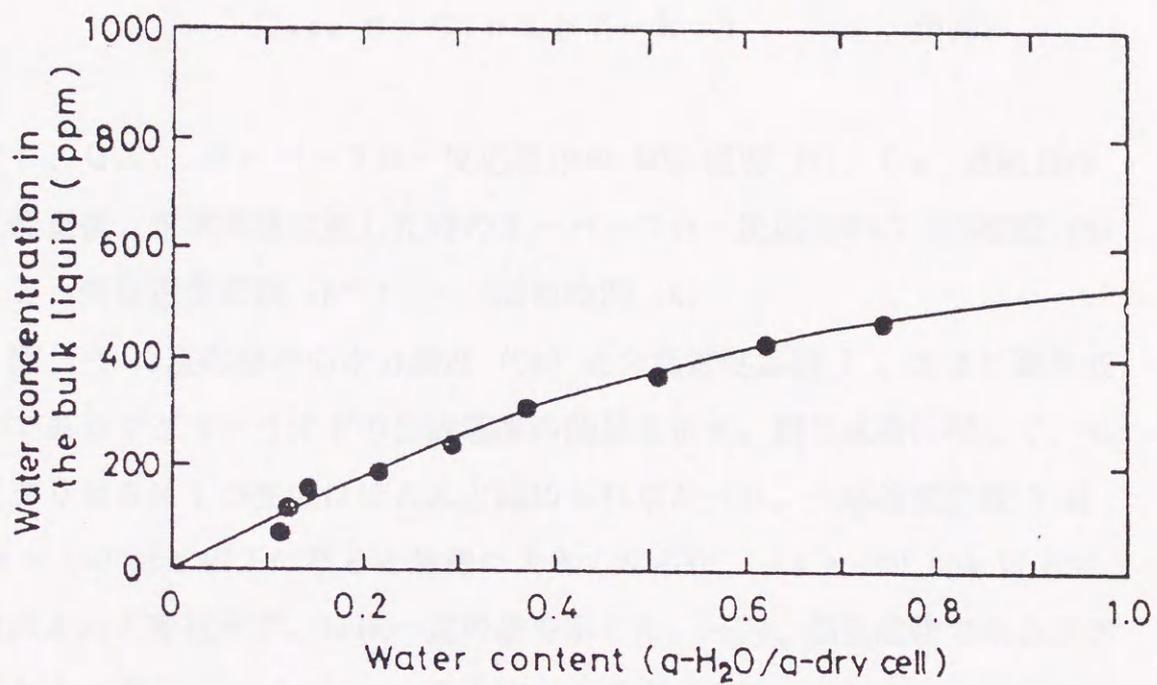


図 5-4. 固定化菌体と反応液の間での水分の等温吸着平衡関係

5-3-2. 水分濃度と酵素失活

反応液中の水分濃度 (C_w) が固定化菌体内リパーゼの失活速度に与える影響を連続エステル交換反応によって検討した。リパーゼの失活速度はオーバーフロー液 (流出液) 中の生産物である SOS 濃度の減少速度より求められ、次に示す 1 次速度式で表現できることがわかった (図 5-6, 5-7 参照)。

$$C_{s,ss} = C_0 \exp(-k t) \quad (5-2)$$

但し、 $C_{s,ss}$, オーバーフロー反応液中の SOS 濃度 (%); C_0 , 連続操作に変更後、定常状態に達した時のオーバーフロー反応液中の SOS 濃度 (%); k , 失活速度定数 (h^{-1}); t , 反応時間 (h)。

図 5-5 に反応液中の水分濃度 (C_w) と失活速度定数 k 、および副生成物であるジグリセライドの生成速度の関係を示す。副生成物に関して、モノグリセライドの生成はほとんど認められなかった。失活速度定数 k は $C_w = 100$ ppm 以下になると急激に大きくなるが、 $C_w = 100$ ppm 以上ではほとんど変化せず、ほぼ一定の値を示した。一方、副生成物であるジグリセライドのオーバーフロー反応液中の濃度は連続エステル交換反応期間中ほぼ一定に保たれており、その生成速度は水分濃度の増加に比例して、単調増加した。Kawauchiら¹³⁴⁾は脂肪中にジグリセライドが存在すると脂肪の結晶成長、多形現象を妨害し、脂肪を軟化させる作用を持つと報告している。したがって、結果として、ジグリセライドの存在はカカオバター代用脂を含むチョコレートのような製菓製品の品質に悪影響を与える。また、本エステル交換反応における、SOS の生産速度は C_w が 30~95 ppm の範囲で最大値を示すことが既に明らかにされている。¹³⁵⁾したがって、生産物の生成速度、酵素の失活速度、副生産物の生成速度を考慮すると、

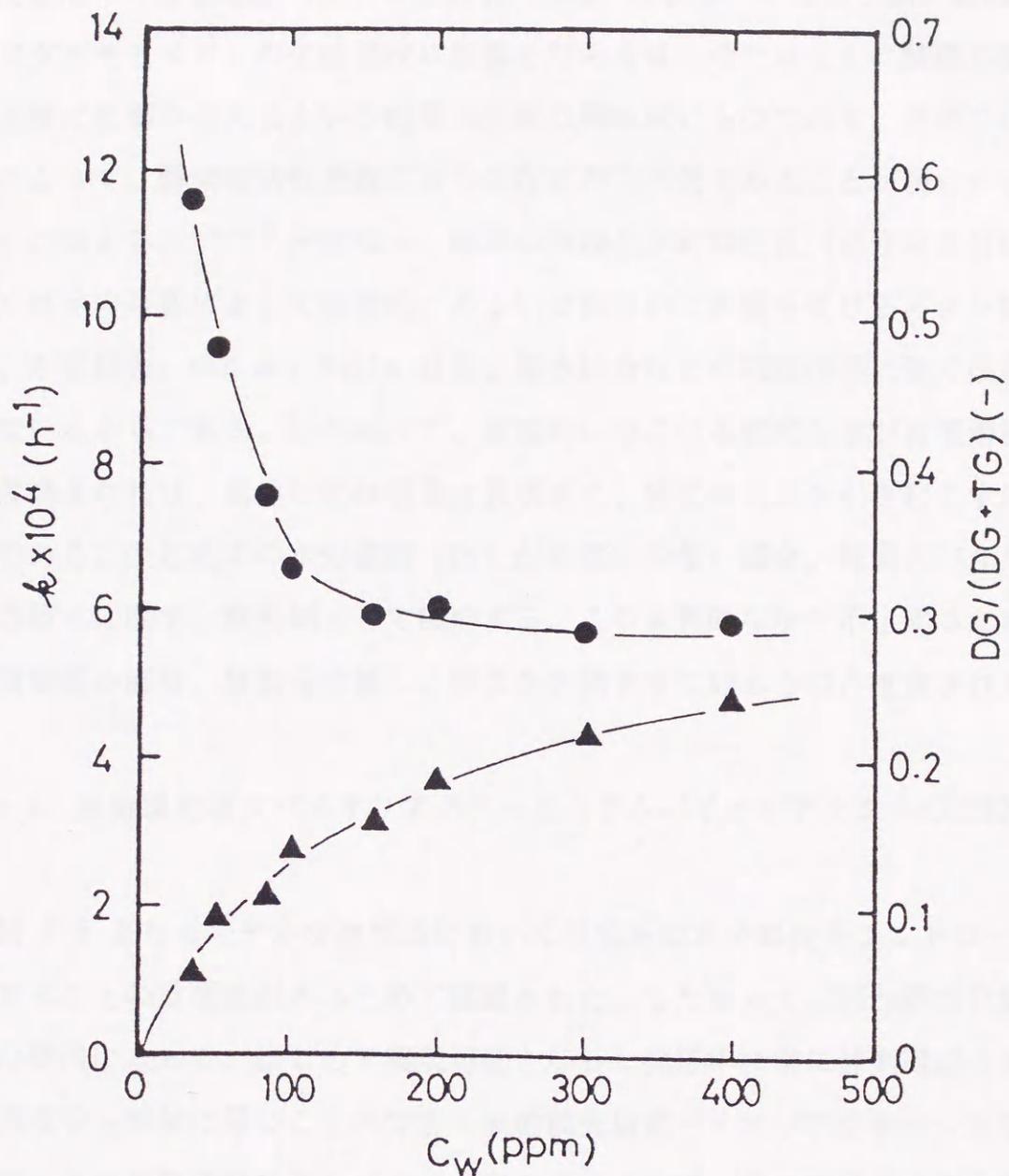


図 5-5. 反応液中の水分濃度が酵素の失活速度定数 k および副生成物（ジグリセライド）の生成速度に与える影響
 (●), 酵素の失活速度定数 k ; (▲) オーバーフロー反応液（流出液）中のジグリセライド濃度.

エステル交換反応における最適水分濃度は 100 ppm 付近であると考えられる。

反応液中の水分濃度 (C_w) が生産物 (SOS) の収率、すなわち副生成物 (ジグリセライド) の生成速度に影響を与えるばかりではなく、酵素の失活速度に影響を与えるという結果は非常に興味深いものである。最近の研究によって、酵素の活性発現には水の存在が不可欠であることが明らかになりつつある。³⁸⁻⁴⁰⁾ 何故なら、酵素の物理化学的な性質 (活性な立体構造) は水の存在によって直接的、あるいは間接的に影響を受けるイオン結合、水素結合、van der Waals 結合、疎水結合などの相互作用に強く依存しているからである。したがって、原理的にはこの本質的な水が有機溶媒で置換されれば、活性な立体構造は破壊され、酵素の失活を引き起こすはずである。反応液中の水分濃度 (C_w) が非常に少ない場合、酵素とバルク反応液との間で、緩衝剤として機能する、この本質的な水が不足するため、有機溶媒が直接、酵素を攻撃し、酵素を失活させているものと推察される。

5-3-3. 液循環充填式バイオリアクターとカラムバイオリアクターの比較

図 5-5 よりエステル交換反応において反応系の水分濃度をコントロールすることの重要性があらためて認識された。したがって、BSPs固定化菌体の使用によって、はじめて実現可能となった反応中に常に酵素周辺の水分濃度を一定値に保つことのできる液循環充填式バイオリアクターシステムはエステル交換反応用のバイオリアクターとして、優れていると考えられる。ここでは液循環充填式バイオリアクターシステムの優位性をクリアーにするため、固定化しないサスペンション培養菌体を充填したカラムバイオリアクターを用いて、連続エステル交換反応を実施した。

図 5-6 にカラムリアクターに供給する反応液の初期水分濃度を図 5-5 よりの最適値付近 110 ppm および反応液の飽和水分濃度濃度 (775 ppm)

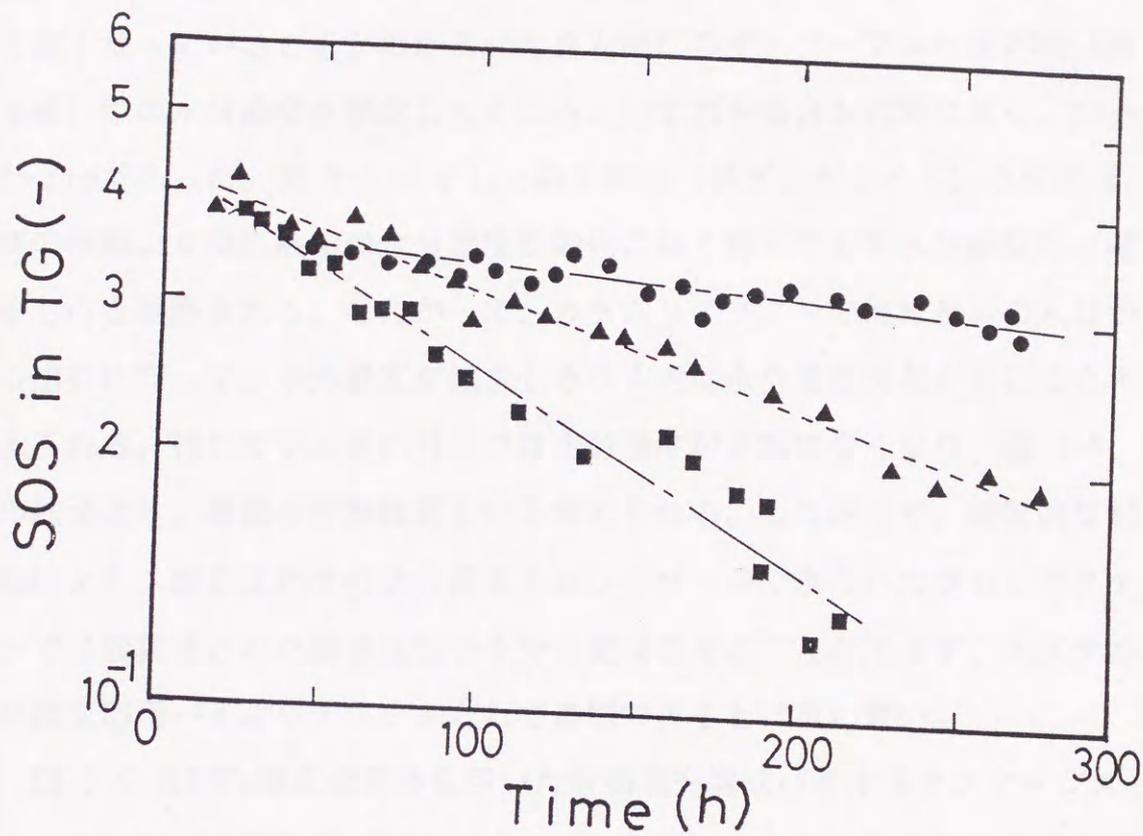


図 5-6. 液循環充填式バイオリアクターとカラムバイオリアクターの比較
 (●), 液循環充填式バイオリアクター (水分濃度を 100 ppm にコントロール); (▲), カラムバイオリアクター (入口水分濃度: 750 ppm); (■), カラムバイオリアクター (入口水分濃度: 110 ppm). SOS: 生産物、カカオバター代用脂 (1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol). TG: トリグリセライド.

近くの値である750 ppm にコントロールして、連続エステル交換反応を行った結果を、液循環充填式バイオリアクターで水分濃度を最適値 100 ppm にコントロールした場合の結果と比較した。図 5-6 よりいずれの水分濃度の場合も、酵素の失活速度は液循環充填式バイオリアクターに比べて速くなっていることがわかる。カラム出口のオーバーフロー反応液（流出液）中の水分濃度を測定したところ、いずれも場合も非常に低く、20～25 ppmであった。図 5-5 に示した副生産物（ジグリセライド）の生成速度の挙動より反応液中の水分濃度を如何に低く抑えても加水分解反応は起るものと推察される。したがって、カラムリアクターではカラムの入口から出口に向って、水分濃度が減少しカラム内に水分濃度分布が生じると考えられる。特にカラム出口付近では水分濃度が非常に低くなり、図 5-5 の結果より、酵素の失活は著しいと考えられる。したがって、装置的な制約により、酵素まわりの水分濃度をコントロールできないカラムリアクターでは固定化された酵素活性を十分に発現させることができず、エステル交換反応用バイオリアクターとして適切であるとは言い難い。

図 5-6 はBSPs固定化菌体を用いた液循環充填式バイオリアクターシステムのエステル交換反応用のバイオリアクターとしての優位性を示唆していると考えられる。

5-3-4. 長期連続エステル交換反応

図 5-7 に BSPs固定化菌体を用いた液循環充填式バイオリアクターシステムにおける最適水分濃度での長期連続エステル交換反応の結果を示した。長期連続エステル交換反応期間中、急激な活性の低下を認めることなく、安定して運転でき、BSPsよりの菌体の剥離もほとんど認められなかった。図 5-7 に示したように最適水分濃度での酵素活性半減期は約 1200 hであった。本結果は BSPs固定化菌体を用いたエステル交換反応が工業的に十

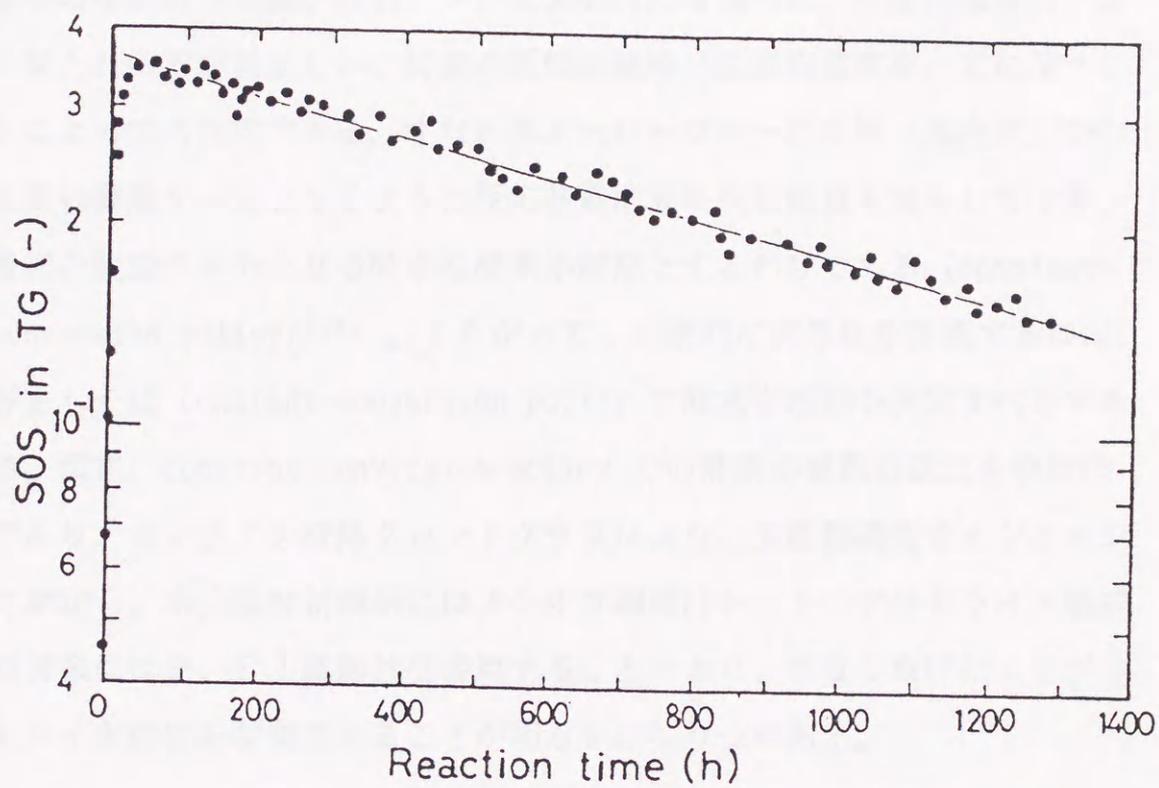


図 5-7. 長期連続エステル交換反応結果

SOS: 生産物、カカオバター代用脂 (1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol).

TG: トリグリセライド.

分実施可能であることを示唆していると考えられる。

本章では固定化菌体内リパーゼの酵素半減期を反応基質溶液を一定流量で供給した連続エステル交換反応で決定した。すなわちYamameら¹³⁶⁾によって報告されている constant-feed-rate policy によって決定したわけである。constant-feed-rate policy では図 5-7 に示したようにオーバーフロー反応液（流出液）中の生産物濃度は反応時間とともに減少する。しかしながら、工業的にはこの生産物濃度の変動は好ましくなく、例えば生産物の後処理（分離、精製）プロセスを考える場合に、生産物濃度は一定に保たれる方が望ましい。酵素の活性半減期は生産物濃度を一定に保つことによっても決定できる。すなわちオーバーフロー反応液（流出液）中の生産物濃度が一定となるように反応基質溶液の供給流量を減らしてゆき、最初の流量の半分となる時点を酵素半減期とするわけである（constant-conversion policy)¹³⁶⁾。したがって、工業的な実用性を評価するには、好ましくは constant-conversion policy で酵素半減期を決定すべきである。現在、constant-conversion policy での酵素半減期の決定を検討中であり、オンライン液体クロマトグラフにより、生産物濃度をオンラインで測定し、水分濃度制御系にはオンオフ調節計を、トリグリセライド組成制御系にはP、PI調節計を併用することにより、かなり良好にトリグリセライド組成を制御できることが明らかになりつつある。

5-4. 結論

BSPs固定化菌体を用いた連続エステル交換反応を実施し、固定化微生物の利用に適したバイオリアクター、およびその実用性を検討した結果

- 1) 固定化菌体と反応液の間で成立する水分濃度の等温平衡関係を利用した固定化菌体内水分濃度（リパーゼ酵素まわりの水分濃度）のコントロール方法が開発され、さらに、反応中の反応液の水分濃度を任意の値にコントロールできる液循環充填式バイオリアクターシステムがBSPs固定化菌体を用いたエステル交換反应用リアクターとして開発された。
- 2) 液循環充填式バイオリアクターを用いた連続エステル交換反応において、リパーゼ酵素の失活速度は反応液の水分濃度(C_w)に依存することが明らかになり、 $C_w = 100$ ppm 以下では失活速度は急激に上昇するが、 $C_w = 100$ ppm 以上ではほぼ一定となることがわかった。また副生産物（ジグリセライド）の生成速度は C_w に比例して、単調増加することがわかった。したがって、BSPs固定化菌体を用いたエステル交換反応の最適水分濃度は 100 ppm 付近であると結論された。
- 3) 最適水分濃度における酵素半減期はおよそ 1200 hであり、BSPs固定化菌体を用いたエステル交換反応は工業的に十分実施可能であることが示唆された。

総括

本研究は菌体内に高リパーゼ活性を有する微生物の乾燥菌体を直接、リパーゼ酵素剤として利用する新たなリパーゼ酵素反応システムについて、工学的に検討を加えたものである。本方法によれば固定化リパーゼ（反応触媒）の調製コストを著しく低減させることができ、リパーゼによって触媒される種々の有用な酵素反応の工業化に大きく貢献すると考えられる。

まず、菌株として *Rhizopus chinensis* を選定し、その菌体内リパーゼ活性を高める培養条件について検討した結果

1) 培地組成としては、グルコースを含まず、有機窒素源を主成分とする培地に、オレイン酸のような基質関連物質の添加が必要であることが明らかになった。

さらに、微生物菌体の取り扱いを容易にするために微生物保持粒子 (Biomass support particles, BSPs) の固定化を試みたところ

2) ポリウレタンBSPsと共に培養することにより容易にBSPs固定化菌体を調製することが可能であり、固定化操作により菌体内リパーゼ活性をサスペンション培養菌体に比べ、4~7倍上昇させることができた。またBSPsに良好に固定化させるためにはBSPsの孔径、添加量、サイズを調整する必要があることが明らかになった。BSPs固定化菌体内のエステル交換活性は0.03~0.05 (U/mg-dried cells)で、工業的に十分、利用可能であることがわかった。

次にBSPs固定化菌体の大量培養法について検討した結果

3) Circulating bed fermentor (CBF) を用いて、BSPs固定化菌体の大量培養が可能であることが明らかになった。

4) 流加培養において比肉エキスの供給速度を0.04~0.05の範囲に制御して培養すれば、菌体内活性を回分培養に比べ、1.3~1.5倍程度増幅できることがわかった。

5) BSPs内増殖の増殖制限基質は酸素であり、BSPs内増殖は通気ガス中の酸素分圧を変化させる以外ほとんど変化せず、比肉エキス供給速度をコントロールする上で有用なBSPs内での増殖を表す実験式が提示された。

6) 通気量の増加は菌体内リパーゼ活性を低下させることが明らかになり、CBF-BSPs菌体内リパーゼ生産システムには、CBF内でBSPsの円滑な循環を実現できる最低通気量、すなわち BSPs最小循環通気量が適切であることが明らかになった。

また、BSPsへ固定化することによって *Rh. chinensis* の菌体内リパーゼ生産は著しく促進される、その促進誘因について検討した結果、

7) BSPsへ固定化することは *Rhizopus* 属糸状菌のバルピー状態からペレット状態への増殖形態の変化を助長することであり、ペレット形成のような菌体集合現象が *Rhizopus* 属糸状菌の菌体内リパーゼ生産に共通の促進誘因であることが示唆された。

最後に、BSPs固定化菌体を用いた連続エステル交換反応を実施し、固定化微生物にの利用に適したバイオリアクターの検討、およびその実用性の評価を行なった結果

8) 固定化菌体と反応液の間で成立する水分濃度の等温平衡関係を利用して固定化菌体内水分濃度（リパーゼ酵素まわりの水分濃度）のコントロールできることがわかり、反応中の反応液の水分濃度を任意の値にコントロールできる液循環充填式バイオリアクターシステムがBSPs固定化菌体用バイオリアクターとして考案された。

9) 液循環充填式バイオリアクターを用いた連続エステル交換反応において、リパーゼ酵素の失活速度は反応液の水分濃度(C_w)に依存することが明らかになり、 $C_w = 100$ ppm 以下では失活速度は急激に上昇するが、 $C_w = 100$ ppm 以上ではほぼ一定となることがわかった。また副生産物（ジグリセライド）の生成速度は C_w に比例して、単調増加し、BSPs固定化菌体を用いたエステル交換反応の最適水分濃度は 100 ppm 付近であることが明らかになった。最適水分濃度における酵素半減期はおよそ 1200 hであり、BSPs固定化菌体を用いたエステル交換反応は工業的に十分実施可能であると考えられた。

使用記号

C	: 定数, -
C ₀	: 連続エステル交換反応の定常状態に : おける SOS濃度, %
C _s	: 反応液中の飽和水分濃度, mol · ml ⁻¹
C _{s,0}	: 連続エステル交換反応の流出液中の SOS濃度, %
C _w	: 反応液中の水分濃度, mol · ml ⁻¹
D	: CBFの塔径, cm
f _s	: 肉エキス供給速度, (g 肉エキス) · h ⁻¹
ILA(H)	: 菌体内加水分解活性
K _t	: 定数, h
k	: 酵素の失活速度定数, h ⁻¹
k _{La}	: 酸素移動容量係数, s ⁻¹
L	: CBFの高さ, cm
LA(I), ILA(I)	: 菌体内エステル交換活性, U · (mg dried cells) ⁻¹
LA(E), ELA(H)	: 菌体外加水分解活性, U · ml ⁻¹
N _p , N _t	: BSPs添加個数, particle
q _s	: 比肉エキス供給速度, (g 肉エキス)(g cell) ⁻¹ · h ⁻¹
t	: 時間, h
t _{in}	: 肉エキスの流加開始時間, h
V	: 固定化菌体内の水分濃度, (g H ₂ O)(g dried cells) ⁻¹
V _m	: 定数, -
V _p	: BSPs1個の見かけの容積, cm ³
V _R	: CBFの実容積, l
V _s	: 通気線速度, cm · s ⁻¹
X	: 反応液の相対水分濃度 (= C _w /C _s), -

- $X_{b s p}$: BSPs内菌濃度, (mg dried cells)(BSP)⁻¹
 $X_{m b s p}$: BSPs内最大菌濃度, (mg dried cells)(BSP)⁻¹
 $X_{s u s}$: BSPs外菌濃度, (g dried cells) · l⁻¹

ギリシャ文字

- ϵ_G : ガスホールドアップ, -
 $\epsilon_{s a}$: BSPsの見かけのガスホールドアップ, -

引用文献

- 1) 橋本征雄, 松尾高明, 沢村紀夫 : 酵素エステル基交換反応による油脂の加工. 日本醗酵工学会大会講演要旨集, p62 (1989).
- 2) Macrae, A. R.: Tailored triacylglycerols and esters. *Biochem. Soc. Transactions*, 17, 1146-1148 (1989).
- 3) Yamane, T.: Enzyme Technology for the Lipids Industry: An Engineering Overview. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64, 1657-1662 (1987).
- 4) 橋本征雄: 酵素エステル交換によるカカオバター様油脂の製造. *バイオサイエンスとバイオインダストリー*, 47, 36-37 (1989).
- 5) 間瀬民夫, 山口庄太郎 : 微生物リパーゼの工業的生産と精製. *バイオインダストリー*, 7, 455-461 (1990).
- 6) 岩井美枝子, 辻坂好夫, 板谷公和, 岡本精文, 福本寿一郎 : Rhizopus delemarの培養条件とlipaseの生産. *科学と工業*, 40, 80-89 (1967).
- 7) Espinosa, E., Sanchez, S., and Farres, A.: Nutritional factors affecting lipase production by Rhizopus delemar CDBB H313. *Biotechnol. Lett.*, 12, 209-214 (1990).
- 8) Mohsen, S. M., Alian, A. M., Attia, R., and El-Azhary, T.: Factors affecting lipase production by Rhizopus delemar. *Egypt J. Food Sci.*, 14, 165-174 (1986).
- 9) Giuseppin, M. L. F.: Effects of dissolved oxygen concentration on lipase production by Rhizopus delemar. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 161-165 (1984).
- 10) Nahas, E.: Control of lipase production by Rhizopus oligosporus under various growth conditions. *J. Gen. Microbiol.*, 134, 227-233 (1988).
- 11) 宇佐美昭次, 桐村光太郎, 伊藤繕男, 志村進, 上沼敏彦, 森隆雄 : リパー

ゼ生産菌 Rhizopus oligosporus の単離と培養条件の検討. 日本食品工業学会誌, 36, 479-481 (1989).

- 12) Aisaka, K. and Terada, O.: Production of lipoprotein lipase and lipase by Rhizopus japonicus. Agric. Biol. Chem., 43, 2125-2129 (1979).
- 13) Akhter, M. W., Paterson, J. D. E., and Blain, J. A.: Influence of olive oil on extracellular and cell-bound lipase production by fungi. Pak. J. Biochem., 7, 81-87 (1974).
- 14) Akhter, M. W., Mirza, A. Q., and Chughtai, M. I. D.: Influence of the nature of triglycerides on lipase production by Rhizopus species. Pak. J. Biochem., 10, 82-87 (1977).
- 15) Naka, Y., Hasegawa, N., and Amano, S.: Effects of lipid addition on the profile of lipase production by Mucor javanicus. J. Jpn. Oil Chem. Soc (Yukagaku), 37, 1104-1107 (1988).
- 16) Sztajer, H. and Maliszewska, I.: The effect of culture conditions on lipolytic productivity of Penicillium citrinum. Biotechnol. Lett., 11, 895-898 (1989).
- 17) Petrović, S. E., Škrinjar, M., Baćarević, A., Vujičić, I. F., and Banka, L.: Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis. Biotechnol. Lett., 12, 299-304 (1990).
- 18) Nair, C. S. and Bone, D. H.: Production of lipase of Aspergillus foetidus in a batch stirred reactor. Biotechnol. Lett., 9, 601-604 (1987).
- 19) Omar, I. C., Nishio, N., and Nagai, S.: Production of a thermostable lipase by Humicola lanuginosa grown on sorbitol-corn steep liquor medium. Agric. Biol. Chem., 51, 2145-2151 (1987).
- 20) Valero, F., Ayats, F., López-Santín, J., and Poch, M.: Lipa-

- se production by Candida rugosa: fermentation behaviour. *Biotechnol. Lett.*, 10, 741-744 (1988).
- 21) Okeke, C. N. and Okolo, B.N.: The effect of cultural conditions on the production of lipase by Acremonium strictum. *Biotechnol. Lett.*, 12, 747-750 (1990).
 - 22) Lechner, M., Märkl, H., and Götz, F.: Lipase production of Staphylococcus carnosus in a dialysis fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 345-349 (1988).
 - 23) Voit, H., Götz, F., and Mersmann, A. B.: Overproduction of lipase with Staphylococcus carnosus (pLipPS1) under modified gravity in a centrifugal field bioreactor. *Chem. Eng. Technol.*, 12, 364-373 (1989).
 - 24) Suzuki, T., Mushiga, Y., Yamane, T., and Shimizu, S.: Mass production of lipase by fed-batch culture of Pseudomonas fluorescens. *Appl. Microbiol. Bioeng.*, 27, 417-422 (1988).
 - 25) Ishihara, K., Suzuki, T., Yamane, T., and Shimizu, S.: Effective production of Pseudomonas fluorescens lipase by semi-batch culture with turbidity-dependent automatic feeding of both olive oil and iron ion. *Appl. Microbiol. Bioeng.*, 31, 45-48 (1989).
 - 26) Høge-Jensen, B., Andreassen, F., Christensen, T., Christensen, M., Thim, L., and Boel, E.: Rhizomucor miehei triglyceride lipase is processed and secreted from transformed Aspergillus oryzae. *Lipids*, 24, 781-785 (1989).
 - 27) Blain, J. A., Patterson, J. D. E., and Show, C. E. L.: The nature of mycelial lipolytic enzymes in filamentous fungi. *FEMS Lett.*, 3, 85-87 (1978).

- 28) Bell, G., Blain, J. A., Patterson, J. D. E., Show, C. E. L., and Todd, R.: Ester and glyceride synthesis by Rhizopus arrhizus mycelia. FBMS Lett., 3, 223-225 (1978).
- 29) Patterson, J. D. E., Blain, J. A., Show, C. E. L., Todd, R., and Bell, G.: Synthesis of glycerides and esters by fungal cell-bound enzymes in continuous reactor system., Biotechnol. Lett., 1, 211-216 (1979).
- 30) Knox, T. and Cliff, K. R.: Synthesis of long-chain esters in a loop reactor system using a fungal cell bound enzyme. Process Biochem., 8, 188-192 (1984).
- 31) Gomi, K., Ota, Y., and Minoda, Y.: Physical and Chemical Characterization of cell-bound lipases from Saccharomyces lipolytica. Agic. Biol. Chem., 48, 1061-1062 (1984).
- 32) 太田安英, 壇辻雅彦: 微生物細胞を用いた油脂のエステル交換. 油化学, 37, 38-43 (1988).
- 33) 山根恒夫: リパーゼ反応による油脂およびエステルの合成と変換. 日本農芸化学会誌, 62, 783-786 (1988).
- 34) 森弘之: バイオテクノロジーによる油脂の改質と応用. フードケミカル, 8, 39-43 (1987).
- 35) 沢村紀夫: リパーゼによる油脂のエステル交換. フードケミカル, 7, 49-53 (1989).
- 36) 橋本征雄: バイオリアクターの油脂加工への応用—加水分解とエステル交換—. 油脂, 41, 62-66 (1988).
- 37) 松本渉, 大嶋章夫, 高木英倫: 対称型トリグリセリドの製造—バイオリアクターによる製菓用油脂の製造—. 食品産業バイオリアクターシステム技術研究組合編, 実践バイオリアクター, p314 食品化学新聞社 (1990).

- 38) Dordick, J. S.: Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 11, 194-211 (1989).
- 39) Zaks A. and Russell A. J.: Enzymes in organic solvents: properties and applications. *J. Biotechnol.*, 8, 259-270 (1988).
- 40) Klibanov, A. M.: Enzymes that works in organic solvents. *Chem-technology*, 16, 354-359 (1986).
- 41) Zaks, A. and Klibanov, A. M.: Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C. *Science*, 224, 1249-1251 (1984).
- 42) Zaks, A. and Klibanov, A. M.: Enzyme-catalyzed process in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 3192-3196 (1985).
- 43) Margolin, A. L. and Klibanov, A. M.: Peptide synthesis catalyzed by Lipases in anhydrous organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 3802-3804 (1987).
- 44) 樋口勝彦,山科孝夫,石川一彦,平田博文: 無溶媒下でのリパーゼによるトリ-n-ブチリンと脂肪族第一級アルコールとのエステル交換反応. *油化学*, 36, 355-361 (1987).
- 45) Hirata, H. and Higuti, K.: Enzyme reaction in organic solvent. I.: *Candida cylindracea* lipase catalyzed transesterification between tri-n-butyrin and 1-octanol in various organic solvents. *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, 36, 643-649 (1987).
- 46) 平田博文: 有機溶媒中におけるリパーゼの活性発現と耐熱性について. *バイオサイエンスとインダストリー*, 47, 41-45 (1989).
- 47) Higuti, K. and Hirata, H.: Enzyme reaction in organic solvent. II.: Preparation of substituted benzyl butyrates by lipase catalyzed transesterification between tributyrin and the corresponding benzyl alcohols. *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, 37, 599-605 (1988).

- 48) Nakamura, K., Chi, Y. M., Yamada, Y., and Yano, T.: Lipase activity and stability in supercritical carbon dioxide. *Chem. Eng. Commun.*, 45, 207-212 (1986).
- 49) Hajjar, A. B., Nicks, R. F., and Knowles, C. J.: Preparation of monometric acrylic ester intermediates using lipase catalysed transesterifications in organic solvents. *Biotechnol. Lett.*, 12, 825-830 (1990).
- 50) Bevinakatti, H. S. and Newadkar, R. V.: Lipase catalysis in organic solvents: transesterification of o-formyl esters of secondary alcohols. *Biotechnol. Lett.*, 11, 785-788 (1989).
- 51) 安島綾子, 稲田祐二: 修飾リパーゼを用いた合成反応. *油化学*, 37, 1097-1103 (1988).
- 52) 山根恒夫: 脂質類の酵素的変換とバイオリアクター. *バイオサイエンスとインダストリー*, 47, 17-23 (1989).
- 53) Yokozeki, K., Yamanaka, S., Takinami, K., Hirose, Y., Tanaka, A., Sonomoto, K., and Fukui, S.: Application of immobilized lipase to regio-specific interesterification of triglyceride in organic solvent. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14, 1-5 (1982).
- 54) Wisdom, R. A., Dunnill P., Lilly, M. D., and Macrae, A.: Enzymic interesterification of fats: factors influencing the choice of support for immobilization lipase. *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 443-446 (1984).
- 55) Wisdom, R. A., Dunnill P., and Lilly, M. D.: Enzymic interesterification of fats: the effect of non-lipase material on immobilized enzyme activity. *Enzyme Microb. Technol.*, 7, 567-572 (1985).

- 56) Wisdom, R. A., Dunnill P., and Lilly, M. D.: Enzymic inter-esterification of fats: laboratory and pilot-scale studies with immobilized lipase from Rhizopus arrhizus. *Biotechnol Bioeng.*, **29**, 1081-1085 (1987).
- 57) 長田恭一,高橋是太郎,羽田野六男: 微生物由来固定化リパーゼによるいわし油の改質. *油化学*, **39**, 467-471 (1990).
- 58) Kaimal, T. N. B. and Saroja, M.: Selective removal of linoleic acid from soybean oil by lipase-catalyzed interesterification at low temperature. *Biotechnol. Lett.*, **10**, 337-340 (1988).
- 59) Mittelbach M.: Lipase catalyzed alcoholysis of Sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**, 168-170 (1990).
- 60) Macrae, A. R.: Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **60**, 291-294 (1983).
- 61) Yamane, T., Hoq. M. M., Itoh, S., and Shimizu, S.: Glycerolysis of fat by lipase. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **35**, 625-631 (1986).
- 62) Yamane, T., Hoq. M. M., Itoh, S., and Shimizu, S.: Continuous glycerolysis of fat by lipase in microporous hydrophobic membrane bioreactor. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **35**, 632-636 (1986).
- 63) Yamane, T., Rhee, J. S., Ohta, Y., and Shimizu, S.: Some characteristics of continuous glycerolysis of fat by lipase with microporous membrane bioreactor. *Jpn. Oil Chem. Soc.*, **36**, 474-479 (1987).
- 64) Koizumi, Y., Mukai, K., Murakawa, K., and Yamane, T.: Scale-up of microporous hydrophobic membrane bioreactor with respect to continuous glycerolysis of fat by lipase. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **36**, 561-564 (1987).

- 65) Atkinson, B., Chem, F. I., Black, G. M., and Pinches, A.: Process intensification using cell support systems. *Process Biochem.*, 5, 24-32 (1980).
- 66) Atkinson, B., Black, G. M., Lewis, P. J. S., and Pinches, A.: Biological particles of given size, shape, and density for use in biological reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 193-200 (1979).
- 67) Kobayashi, T., Tachi, K., Nagamune, T., and Endo, E.: Production of penicillin in a fluidized-bed bioreactor using urethane forms as carriers. *J. Chem. Eng. Japan*, 23, 408-413 (1990)
- 68) Kobayashi, T., Tachi, K., Nagamune, T., and Endo, E.: Continuous production of penicillin in a fluidized-bed bioreactor. *J. Chem. Eng. Japan*, 23, 505-507 (1990)
- 69) Karhoot, J. M., Anderson, J. G., and Blain, J. A.: Production of penicillin by immobilized films of Penicillium chrysogenum. *Biotechnol. Lett.*, 9, 471-474 (1987).
- 70) Gbewonyo, K. and Wang, D. I. C.: Confining mycelial growth to porous microbeads: a novel technique to alter the morphology of non-Newtonian mycelial cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 967-983 (1983).
- 71) Gbewonyo, K. and Wang, D. I. C.: Enhancing gas-liquid mass transfer rates in non-Newtonian fermentations by confining mycelial growth to microbeads in a bubble column. *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 2873-2887 (1983).
- 72) König, B. and Schügerl, K.: Strategies for penicillin fermentation in tower-loop reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 259-280 (1982).

- 73) Kim, J. H., Oh, D. K., Park, S. K., and Park, Y. H.: Production of penicillin in a fluidized-bed bioreactor using a carrier-supported mycelial growth. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1838-1844 (1986).
- 74) Keshavarz, T., Eglin, R., Walker, E., Bucke, C., Holt, G., Bull, A. T., and Lilly, M. D.: The large-scale immobilization of Penicillium chrysogenum: batch and continuous operation in an air-lift reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 763-770 (1990).
- 75) Webb, C., Fukuda, H., and Atkinson, B.: The production of cellulose in a spouted bed fermentor using cells immobilized in biomass support particles. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 41-50 (1986).
- 76) Tamada, K., Kasai, N., Kumakura, M., and Kaetsu, I.: Periodical batch culture of the immobilized growing fungi Sporotrichum cellulophilum producing cellulase in the nonwoven materials. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1227-1232 (1986).
- 77) Tamada, M., Kasai, N., and Kaetsu I.: Improvement of cellulase activity by immobilization of Sporotrichum cellulophilum. *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 1343-1346 (1989).
- 78) Kumakura, M., Tamada, M., Kasai, N., Kaetsu, I., and Kanno, S.: Enhancement of cellulase production by immobilization of Trichoderma reesei cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 1358-1362 (1989).
- 79) Fukuda, H. and Morikawa, H.: Enhancement of γ -linolenic acid production by Mucor ambiguus with nonionic surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 15-20 (1987).
- 80) Sakurai, H., Lee, H. W., Sato, S., Mukataka, S., and Takahashi,

- J.: Gluconic acid production at high concentrations by Aspergillus niger immobilized on a nonwoven fabric. J. Ferment. Bioeng., 67, 404-408 (1989).
- 81) Kirkpatrick, N., Reid, I. D., Ziomek, E., and Paice, M. G.: Biological bleaching of hardwood kraft pulp using Tremetes (Coriolus) versicolor immobilized in polyurethane foam. Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 105-108 (1990).
- 82) Kautola, H. and Linko Yu-Y.: Fumaric acid production from xylose by immobilized Rhizopus arrhizus cells. Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, 448-452 (1989).
- 83) Capdevila, C., Corrieu, G., and Asther, M.: A feed-harvest culturing method to improve lignin peroxidase production by Phanerochaete chrysosporium INA-12 immobilized on polyurethane foam. J. Ferment. Bioeng., 68, 60-63 (1989).
- 84) Trück, H. U., Chmiel, H., Hammes, P., and Trösch, W.: Effects of oxygen supply on the production of nikkomycin with immobilized cells of Streptomyces tendae. Appl. Microbiol. Biotechnol., 34, 1-4 (1990).
- 85) Trück, H. U., Chmiel, H., Hammes, P., and Trösch, W.: A study of N- and P-dependence of nikkomycin production in continuous culture with immobilized cells. Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 139-144 (1990).
- 86) Park, Y. H., Kim, E. Y., Seo, W. T. Jung, K. H., and Yoo, Y. J.: Production of cephalosporin C in a fluidized-bed bioreactor. J. Ferment. Bioeng., 67, 409-414 (1989).
- 87) Black, G. M., Webb, C., Matthews, T. M., and Akinson, B.: Practical reactor systems for yeast cell immobilization using

- biomass support particles. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 134-141 (1984).
- 88) Champluvier, B., Kamp, B., and Rouxhet, P. G.: Immobilization of β -galactosidase retained in yeast: adhesion of the cells on a support. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 464-469 (1988).
- 89) D'Souza, S. F. and Kamath, S.: Cloth bioreactor containing yeast cells immobilized on cotton cloth using polyethylenimine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29, 136-140 (1988).
- 90) Fynn, G. H. and Whitemore, T. N.: Colonisation of polyurethane reticulated foam biomass support particle by metanogen species. *Biotechnol. Lett.*, 4, 577-582 (1982).
- 91) Fynn, G. H. and Whitemore, T. N.: Retention of methanogens in colonised reticulated polyurethane biomass support particle. *Biotechnol. Lett.*, 6, 81-86 (1984).
- 92) Fynn, G. H. and Rankin S. W.: Methanogenesis by methanogen species immobilized on reticulated foam biomass support particles. inhibition of methane production at high substrate concentrations. *Biotechnol. Lett.*, 9, 67-70 (1987).
- 93) Huysman, P., Meenen, P. V., Assche, P. V., and Verstrete, W.: Factors affecting the colonization of non porous and porous packing materials in model upflow methane reactors. *Biotechnol. Lett.*, 5, 643-648 (1983).
- 94) Verrier, D., Mortier, B., and Albagnac, G.: Initial adhesion of methanogenic bacteria to polymers. *Biotechnol. Lett.*, 9, 735-740 (1987).
- 95) Fukuzaki, S., Nishio, N., and Nagai, S.: The use of polyurethane foam for microbial retention in methanogenic fermenta-

- tion of propionate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 408-413 (1990).
- 96) Okuhara, A.: Vineger production with Acetobacter grown on a fiber support. *J. Ferment. Technol.*, 63, 57-60 (1985).
- 97) Lotong, N., Malapan, W., Boongorsrang, A., and Youngmanitchai: Production of vineger by Acetobacter cells fixed on a rotating disc reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 27-31 (1989).
- 98) Stavskaya, S. S., Nikovskaya, G. N., Shamolona, I. I., Samolenko, L. S., Grigor'eva, T. Y., and Lusta, K. A.: Decomposition of alkyl sulfates by a culture of Pseudomonas aeruginosa immobilized on polyvinyl alcohol fiber. *Mikrobiologiya*, 58, 607-610 (1989).
- 99) Bisping, B., Baumann, U., and Rehm, H. J.: Production of glycerol by immobilized Pichia farinosa. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 380-386 (1990).
- 100) Kawabata, N., Nishimura, S., and Yoshimura, T.: New method of immobilization of microbial cell by capture on the surface of insoluble pyridinium-type resin. *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 1000-1005 (1990).
- 101) Oriel P.: Amylase production by Escherichia coli immobilized in silicone foam. *Biotechnol. Lett.*, 10, 113-116 (1988).
- 102) Park, C. H., Okos, M. R., and Wankat, P.C.: Acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation in an immobilized cell tricle bed reactor. *Biotechnol Bioeng.*, 34, 18-29 (1989).
- 103) Park, C. H., Okos, M. R., and Wankat, P.C.: Characterization of an immobilized cell, tricle bed reactor during long term butanol (ABE) fermentation. *Biotechnol Bioeng.*, 36, 207-217

- (1990).
- 104) Roos, J. W. and Hjortso, M. A.: Control of mixed microbiol cultures via specific cell adhesion. *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 638-649 (1989).
 - 105) Bailliez, C., Largeau, C., Casadevall, E., Yang, L. W., and Berkaloff, C.: Photosynthesis, growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* immobilized by entrapment and adsorption in polyurethane foams. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29, 141-147 (1988).
 - 106) 飯島信司: 動物細胞の新領域. *化学工学*, 55, 107-110 (1991).
 - 107) 高山真策, 小林義典: 植物細胞の新領域. *化学工学*, 55, 111-114 (1991).
 - 108) Yamaji, H., Fukuda, H., Nojima, Y., and Webb, C.: Immobilisation of anchorage-independent animal cells using reticulated polyvinyl formal resin biomass support particles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 609-613 (1989).
 - 109) Yamaji, H. and Fukuda, H.: Long-term cultivation of anchorage-independent animal cells immobilized within reticulated biomass support particles in a circulating bed fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 735-741 (1991).
 - 110) 柳健一, 水野秀一, 大島宣雄: ポリビニールホルマール樹脂多孔質体を用いる肝細胞高密度培養のための基礎研究. *人工臓器*, 19, 840-843 (1990).
 - 111) Matsushita, T., Ketayama, M., Kamihara, K., and Funatsu, K.: Anchorage-dependent mammalian cell culture using polyurethane foam as a new substratum for cell attachment., 33, 287-290 (1990).

- 112) Perry, S. D. and Wang., D.I.C.: Fiber bed reactor design for animal cell culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 1-9 (1989).
- 113) Lindsey, K., Yeoman, M. M., Black, G. M., and Mavituna, F.: A novel method for the immobilisation and culture of plant cells. *FEBS Lett.*, 155, 143-149 (1983).
- 114) Rhodes, M. J. C., Smith, J. I., and Robins, R. J.: Factors affecting the immobilisation of plant cells on reticulated polyurethane foam particles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 28-35 (1987).
- 115) Rhodes, M. J. C. and Krisop, B. H.: Plant cell cultures as sources of valuable secondary products. *Biologist*, 29, 134-140, (1982).
- 116) Park, Y. H., Seo, W. T., and Liu, J. R.: Enhanced production of shiconin by Lithospermum erythrorhizon cells immobilized in polyurethane foam matrices. *J. Ferment. Bioeng.*, 70, 317-321 (1990).
- 117) Cooper, P. F., Walker, I., Crabtree, H. E., and Aldred, R.P.: Evaluation of the CAPTOR process for uprating an overloaded sewage works, p 205-217. In Webb, C., Black, G. M., and Atkinson, B. (ed.), *Process engineering aspects of immobilised systems*. The Institution of Chemical Engineers, Rugby, Warwickshire (1986).
- 118) Wollersheim, R.: Adhesion and biofilm development of acetate-, propionate-, and butyrate- degrading microorganisms on glass surface. *Biotechnol. Lett.*, 10, 749-752 (1989).
- 119) Grishin, S. I. and Tuovinen, O. H.: Scanning electron microscopic examination of Thiobacillus ferrooxidans on different

- support matrix materials in packed bed and fluidized bed bio-reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, 505-511 (1989).
- 120) Wang, S-D. and Wang, D. I. C.: Pore dimension effects in the cell loading of a porous carrier. Biotechnol. Bioeng., 33, 915-917 (1989).
- 121) Asther, M., Bollon-Forntaine, M-N., Capdevila, C., and Corrieu, G.: A thermodynamic model to predict Phanerochaete chrysosporium INA-12 adhesion to various solid carriers in relation to lignin peroxidase production., Biotechnol. Bioeng., 35, 477-482 (1990).
- 122) 岩井美枝子, 富永嘉男, 中西克己: 新規耐熱性リパーゼの製造法. 日本公開特許公報, 昭59-156282 (1984).
- 123) Hesseltine, C. W.: Microbiology of oriental fermented foods. Ann. Rev. Microbiol., 37, 575-601 (1983).
- 124) Fukumoto, J., Iwai, M., and Tsujisaka, Y.: Studies on lipase IV. purification and properties of a lipase secreted by Rhizopus delemar. J. Gen. Appl. Microbiol., 10, 257-265 (1964).
- 125) Metz, B. and Kossen, N. W. F.: Biotechnology review. the growth of molds in the form of pellets - a literature review., Biotechnol. Bioeng., 19, 781-799 (1977).
- 126) Martin, S. M. and Waters, W. R.: Production of citric acid by submerged fermentation. Ind. Eng. Chem., 44, 2229-2233 (1952).
- 127) Steel, R., Martin, S. M., and Lentz, C. P.: A standard inoculum for citric acid production in submerged culture. Can. J. Microbiol., 1, 150-157 (1954).
- 128) Clark, D. S.: Submerged citric acid fermentation of ferricya-

- nide-treated beet molasses: morphology of pellets of Aspergillus niger. *Can. J. Microbiol.*, 8, 133-136 (1962).
- 129) Tanaka, H.: Studies on the effects of agitation on mycelia in submerged culture. *J. Ferment. Technol.*, 54, 818-829 (1976).
- 130) Nakanoh, M. and Yoshida, F.: Gas absorption by Newtonian and non-Newtonian liquids in a bubble column. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, 19, 190-195 (1980).
- 131) Moo-Young, M., Halard., B., Allen, D. G., Burrell, R., and Kawase, Y.: Oxygen transfer to mycelial fermentation broths in an airlift fermentor. *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 746-753 (1987).
- 132) Fukuda, H., Nakashima, T., and Morikawa, H.: Bubble size and mass transfer coefficient in a tower bioreactor containing a draft tube and perforated plates. *J. Ferment. Technol.*, 57, 554-561 (1979)
- 133) Schügerl, K., Oels, U., and Lücke, J.: Bubble column bioreactor., 7, 1-84, In Ghose, T. K., Fiechter, A., and Blakebrough, N. (ed.), *Advances in biochemical engineering*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York (1977).
- 134) Kawauchi, T., Sagi, N., and Mori, H.: Confectionary fats from palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 62, 421-425 (1985).
- 135) Kyotani, S., Fukuda, H., Nojima, Y., and Yamane, T.: Inter-esterification of fats and oils by immobilized fungus at constant water concentration. *J. Ferment. Technol.*, 66, 567-575 (1988).
- 136) Yamane, T., Sirirote, P., and Shimizu, S.: Evaluation of half-life of immobilized enzyme during continuous reaction on bio-

reactors: a theoretical study. *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 963-969 (1987).

本論文に関する報文

- 1) Culture Conditions for Intracellular Lipase Production by Rhizopus chinensis and Its Immobilization within Biomass Support Particles

Toshimitsu Nakashima, Hideki Fukuda, Susumu kyotani, and
Hisashi Morikawa

Journal of Fermentation Technology, 66, 441-448 (1988)

- 2) Intracellular Lipase Production by Rhizopus chinensis Using Biomass Support Particles in a Circulating Bed Fermentor

Toshimitsu Nakashima, Hideki Fukuda, Yasuhiro Nojima, and
Shiro Nagai

Journal of Fermentation and Bioengineering, 68, 19-24 (1989)

- 3) Cell Aggregation as a Trigger for Enhancement of Intracellular Lipase Production by a Rhizopus Species

Toshimitsu Nakashima, Susumu Kyotani, Eiji Izumoto, and
Hideki Fukuda

Journal of Fermentation and Bioengineering, 70, 83-89 (1990)

- 4) Effect of Aeration Rate on Intracellular Lipase Production by Rhizopus chinensis Immobilized within Biomass Support Particles in a Circulating Bed Fermentor

Toshimitsu Nakashima and Hideki Fukuda

Journal of Fermentation and Bioengineering, 70, 355-358 (1990).

- 5) Continuous Interesterification of Oils and Fats Using Dried Fungus Immobilized in Biomass Support Particles

Susumu Kyotani, Toshimitsu Nakashima, Eiji Izumoto, and Hideki Fukuda

Journal of Fermentation and Bioengineering, 71, 286-288 (1991).

- 6) 微水系連続エステル交換反応プロセスの水分濃度、トリグリセリド組成同時制御

泉本英次, 京谷晋, 中嶋敏光, 福田秀樹, 中西英二

化学工学論文集, 印刷中.

謝辞

本論文は、広島大学工学部 醗酵工学科 永井史郎教授のご指導を仰ぎ、取り纏めたものであります。本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、御懇篤なる御指導と御教示を賜り、また格別なる御高配を賜った永井史郎教授に心から感謝いたします。

また本論文の審査にあたり、適切なる御指導と御助言を賜った広島大学工学部 醗酵工学科 室岡義勝教授、大竹久夫教授、西尾尚道助教授に感謝の意を表します。

本研究は、鐘淵化学工業 (株) 生産技術研究所において、初代研究所長、元常務取締役、故 森川 久博士、ならびに取締役 野島康弘 (現) 研究所長のもとで、7年余りにわたって行なったものであります。長きにわたり、温かく本研究の進捗を見守っていただき、叱咤激励していただいた 故 森川 久常務取締役、ならびに野島康弘所長に心から感謝いたします。特に、故 森川 久常務取締役におかれましては、著者の我が儘を快く聞き入れてくださり、著者に広島大学工学部 醗酵工学科において、醗酵工学の基礎を勉強する機会 (国内留学) を与えていただきました。思えば、このことが本研究の出発点であったように思います。

さらに、研究グループリーダーとして、本研究の細部にわたり、適切な御助言、御指導をいただいた鐘淵化学工業 (株) 生産技術研究所 主任研究員 福田秀樹博士に感謝の意を表します。福田秀樹主任研究員の強力なリーダーシップのもとで、本研究が実用化 (企業化) のレベルにまで到達したことは大変、喜ばしいことでもあります。

また、名古屋大学農学部 山根恒夫教授には、ほんとうに御親切な御助言をいただきました。特に、第3章における比基質供給速度、第5章のリパーゼの失活速度の評価に関する御教示は本研究を進展させる上で、非常に効果的でありました。山根恒夫教授に心より感謝いたします。

最後に、本研究を遂行するにあたり御協力いただいた、鐘淵化学工業
(株) 生産技術研究所の 塩谷武修 主任研究員、岡田 渉 主任研究員、京谷
晋氏、泉本英次氏、辻村勇夫氏に厚く御礼申し上げます。