セラミックモノリスに同時固定化した β -アミラーゼおよび枝切り酵素による可溶性澱粉からのマルトースの生産[†]

白石文秀・川上幸衛・小嶋 剛*
湯浅秋雄**・楠浩一郎

九州大学工学部 化学機械工学科^{††}

セラミックモノリスに固定化した β -アミラーゼと枝切り酵素（ブルナーゼまたはイソアミラーゼ）による可溶性澱粉の加水分解反応を、pH 4.8、40℃において回分式反応器および流通式反応器を用いて行った。回分式反応は3個の固定化酵素モノリスをセットしたバスケット攪拌翼を使い、外部拡散効果の無視できる条件下で反応液を攪拌することによって行った。まずマルトース収率の向上をはかるためセラミックモノリスへの効率のよい酵素固定化法を検討した。次にマルトース濃度の経時変化データに対して先の論文で検討した遊離の2酵素反応に対する反応速度式と細孔内拡散現象を組み合わせたモデル式を適用し、その適合性を調べた。流通式反応は固定化酵素モノリス10個を積み重ねた反応器を用いて行い、5~100 kg $\cdot$ m⁻³の濃度の澱粉を基質とする連続的なマルトース生産を検討した。その結果本固定化酵素モノリス反応器では効率よくマルトース生産が行われることが明らかになった。

緒 言

β -アミラーゼ^{1,2,6,7)} および固定化 β -アミラーゼープラナーゼ^{7,9)} による澱粉からのマルトースの連続生産に関しては、これまで多くの報告がなされているが、これらのほとんどが酵素を固定化するのに微粒子担体を用いている。しかしながら本プロセスでは、収率を増大させるためにDE (Dextrose Equivalent) 値が2以下の澱粉、すなわち分子量の大きな澱粉を使用すること、また反応終了後マルトースを濃縮分離するのに必要な熱エネルギーを節減するために高濃度で操作することが望ましい。したがって固定化酵素微粒子の充填層型反応器の使用は、圧力損失、層閉塞、チャネリングなどの問題を生じる。また粒子内拡散抵抗のほか立体障害の影響による反応速度の低下も問題となる。

先に著者らは固定化グルコアミラーゼによる可溶性澱粉からのグルコースの連続生産に関する研究において、担体としてセラミックモノリスを使用し、その有効性を示した^{11,13)}。また一方で、著者らは遊離状態での β -アミラーゼおよび枝切り酵素同時使用による澱粉からのマ

ルトースの生成反応に対して実用的な反応速度式を提出した¹⁰⁾。

本論文の目的は、澱粉からのマルトースの生成反応におけるセラミックモノリスに同時固定化した β -アミラーゼおよび枝切り酵素の性能を評価することにある。ゆえにまずマルトース収率の向上をはかるため、酵素の固定化法などの検討を行う。次に回分式固定化酵素反応に対して、上述の均相系反応速度式と細孔内拡散現象を考慮したモデル式の適用性を検討する。さらに流通式セラミックモノリス固定化酵素反応器を用いてマルトースの連続生産を行い、本反応器の有効性を検討する。

1. 実験装置および方法

1.1 使用材料および酵素の固定化法

使用した β -アミラーゼ(5,000 unit $\cdot$ g⁻¹-powder)は大豆起源、ブルナーゼ(2,000 unit $\cdot$ g⁻¹-powder)は*Aerobacter aerogenes* 起源、またイソアミラーゼ(1,250,000 unit $\cdot$ g⁻¹-powder)は*Pseudomonas amyloclavata* 起源のものであり、これらはすべて林原生物化学研究所から寄贈を受けた。これらの粗製酵素をpH 4.8の酢酸緩衝液に溶かした後、ろ過により増容安定剤粉末を除去し、そのろ液を固定化のために使用した。澱粉には和光純薬製の生化学用可溶性澱粉(DE 0.86、平均分子量Mw=30,000、以下澱粉Aと記す)および馬鈴薯澱粉を用いた。馬鈴薯澱粉は α -アミラーゼにより85℃で30分間液化

[†] 1987年6月19日受理；化学工学協会第19回秋季大会（名古屋、1985年10月）にて発表

^{††} 〒812 福岡市東区箱崎 6-10-1

* 住友化学 (株)

** 旭化成 (株)

したのち、凍結乾燥して用いた (DE 5.6, Mw=270,000, 以下澱粉Bと記す)。セラミックモノリスは日本碍子(株)寄贈のものを用いた。その性状は前報¹³⁾に記した。

固定化酵素は以下の二つの方法に従って調製した。

固定化法 I

1) 適当な大きさに切断したモノリス担体を、10%の γ -アミノプロピルトリエトキシシラン (トーレ・シリコン(株)寄贈)-トルエン溶液に浸し、還流下で5時間シラン化した後、トルエンで洗浄し、110°Cで一晩乾燥した。

2) このシラン化モノリスを5°Cの2.5%グルタルアルデヒド水溶液に24時間浸した後、蒸留水で洗浄した。

3) 次にこれを β -アミラーゼのみ、または β -アミラーゼと枝切り酵素を同時に含むpH 4.8, 5°Cの酢酸緩衝液に一昼夜浸した。

4) さらに酵素の脱離を防ぐため、再びグルタルアルデヒド水溶液に一昼夜浸した。

固定化法 II

1) 固定化法Iの手順1)と同様にして担体をシラン化した。

2) β -アミラーゼのみ、または β -アミラーゼと枝切り酵素を同時に含むpH 4.8の酢酸緩衝液に、使用した酵素粉末の10%に相当するグルタルアルデヒドを加え、NaOHでpHを4.8に調整した後、室温において2時間マグネチックスターラーで混合しながら架橋反応を行った。

3) これらの溶液に手順1)で得たシラン化モノリスを5°Cで一昼夜浸した。

1・2 反応実験

回分式反応 モノリス本体を厚さ10mm、縦45mm、横10mmの角板に切断し、 β -アミラーゼのみ、または β -アミラーゼと枝切り酵素を同時に前述の方法で固定化した。この固定化酵素モノリス3個を、攪拌軸に取り付けたバスケット翼¹¹⁾に挿入した後、邪魔板4枚付きのセパラブルフラスコ中で基質溶液を外部拡散抵抗の無視できる攪拌速度で混合しながら反応を行った。後述の流通式反応実験を含めて反応条件はすべてpH 4.8, 40°Cである。また基質溶液には酵素の安定化剤⁹⁾としてCaCl₂を2mol・m⁻³の濃度となるよう添加した。定刻に反応液の一部をサンプリングし、マルトース濃度を高速液体クロマトグラフにより前報の手順¹²⁾に従って測定した。なお反応液の蒸発を防ぐため、反応はすべて密閉して行った。

流通式反応 流通式反応は β -アミラーゼと枝切り酵素を同時に固定化した四角柱モノリス(一辺の長さ、20mm:高さ、76mm:ダクト数、256)10個を積み重ねた角型反応器を用い、前報に示した手順¹³⁾に従って行っ

た。反応器上部からの流出液をサンプリングして、マルトース濃度を測定した。

2. 反応条件の検討

Fig. 1に固定化法Iにより β -アミラーゼを単独で固定化したセラミックモノリスを用い、回分式反応で所定濃度の澱粉Aを糖化した場合のマルトース濃度の時間変化を示した。各澱粉濃度の結果ともマルトース収率は約60%で、Table 1に示す遊離酵素と澱粉Bを用いた場合の結果とはほぼ同様な値となった。Fig. 2は同じ方法で β -アミラーゼとプルラーゼを同時に固定化したセラミックモノリスにより同様な糖化を行った際のマルトース濃度の経時変化を示したものである。最終的なマルトース収率は69.1~73.7%の範囲にあり、明らかに枝切り酵素の作用が起こったことがわかる。しかしながらこの結果はTable 1の遊離酵素による結果に比べて小さく、本固定化酵素の性能が高いとはいいがたい。よって反応開始から2日後のマルトース収率を目安に、以下で改めて酵素固定化法の検討を行った(Table 2(a))。この場合、枝切り酵素にはイソアミラーゼを用いた。

固定化酵素を用いた場合にマルトース収率が上がらない原因としてまず考えられることは、酵素、特に枝切り酵素の担持量が少ないのではないかということである。そこでまず固定化に使用する β -アミラーゼ濃度 E_β を20kg・m⁻³の一定とし、イソアミラーゼ濃度 E_I は20, 40kg・m⁻³として調製した固定化酵素を使いマルトース収率を測定したところ、 E_I が大きい方が大となった(Table 2(a)のNo.1, 2)。次に E_β についても40kg・m⁻³と増加させたが、この場合はマルトース収率は減少した(No.3)。これは明らかに固定化される枝切り酵素の量が、固定化に使用した酵素液中の2酵素濃度の比率によって制約を受けていることを意味する。さらに E_β を40kg・m⁻³の一定として E_I を増加させた場合の結果をFig. 3およびTable 2(a)(No.4, 5)に示した。この場合のマルトース収率はTable 1の遊離酵素と澱粉Aを用いた場合の値に匹敵する。

一方、澱粉が高分子であることから、固定化酵素を使用するとき反応に対する立体障害の影響が考えられる。固定化グルコアミラーゼを使用した場合は、澱粉への作用がexo型であることからその影響は小さかった^{11, 13)}。 β -アミラーゼの場合も作用がexo型であることから影響は小さいと考えられるが、イソアミラーゼの場合には枝切り酵素であるため立体障害の反応への影響が大きくなる可能性が高い。そこで β -アミラーゼのみを固定化し、澱粉溶液にイソアミラーゼを加えたものと β -アミラーゼとイソアミラーゼを同時に固定化したものについ

Fig. 1 Time course of maltose formation in hydrolysis of starch A by β -amylase immobilized on ceramic monolith

Fig. 2 Time course of maltose formation in hydrolysis of starch A by β -amylase and pullulanase immobilized simultaneously on ceramic monolith

Fig. 3 Time course of maltose formation in hydrolysis of starch A by β -amylase and debranching enzyme immobilized on ceramic monolith

て反応実験を行い、マルトース収率を比較した。Fig. 3 および Table 2(a) の No. 5 と No. 6 において両者の差は小さく、立体障害の効果は小さいことがわかった。

以上は固定化法 I による結果であるが、この方法は酵素の使用量が極端に多いのが欠点である。そこで米山の提案¹⁵⁾を採用した固定化法 II を用いて酵素を固定化し、

Table 1 Maltose yield in hydrolysis of starch by free β -amylase and isoamylase

$F_{\beta f}$ [kg·m ⁻³]	E_{If} [kg·m ⁻³]	Starch	S_{00} [kg·m ⁻³]	X_M [%]
0.028	0	B	5	62.9
0.028	0.028	A	5	80.8
0.028	0.028	B	5	86.7
1.59	2.00	B	100	80.4

Table 2(a) Maltose yield in hydrolysis of starch A by co-immobilized β -amylase and isoamylase prepared according to method I

No.	E_{β} [kg·m ⁻³]	E_I [kg·m ⁻³]	S_{00} [kg·m ⁻³]	X_M [%]
1	20	20	5	69.3
2	20	40	5	75.8
3	40	40	5	69.7
4	40	120	5	76.3
5	40	200	5	80.0
6	40	0.028*	5	82.3

*) In this case isoamylase was used in free form

Table 2(b) Maltose yield in hydrolysis of starch A by co-immobilized β -amylase and isoamylase prepared according to method II

No.	E_{β} [kg·m ⁻³]	E_I [kg·m ⁻³]	S_{00} [kg·m ⁻³]	X_M [%]
7	0.907	2.72	5	70.0
8	2.72	8.16	5	73.0
9	2.72	13.6	5	70.0
10	6.67	20.0	5	75.4
11*	6.67	20.0	5	85.4

*) In this case starch B was used as a substrate

2 酵素の使用量とマルトース収率との関係を調べた。

Table 2(b) の No. 7, 8, 9 の比較から固定化法 II では 2 酵素をまず架橋してシラン化したモノリスに固定化するため、両酵素の量比に最適値があること、また No. 8 と No. 10 の比較から酵素量は多い方がよいことがわかる。固定化法 I に比べて使用酵素は約 1/10 であるにもかかわらず、No. 10 の結果では 75.4% のマルトース収率が得られた。

さらにマルトース収率に対する澱粉の種類の影響を比較した。Table 2(b) の No. 10 は澱粉 A、No. 11 は澱粉 B の結果である。また遊離酵素を使用した場合の結果を Table

1に示した。分子量分布の幅が広い澱粉Bの方がマルトース収率が高く、また遊離酵素、固定化酵素とも85%以上の収率を示した。

3. 反応速度解析

3.1 固定化酵素反応に対するモデル式の設定

β -アミラーゼは澱粉分子の非還元性末端に作用して逐次マルトース単位に α -1,4グルコシド結合を切断し、マルトースを生産する。一方、枝切り酵素はアミロペクチンの分岐点に存在する α -1,6結合を切断し、 β -アミラーゼによってマルトースへと加水分解される直鎖結合部分を生じる。このような機構に従って進行する澱粉の加水分解反応に対して、著者らは先に実用的な均相系反応速度式を提出した¹⁰⁾。

β -アミラーゼの作用によるマルトースの生成反応に対しては、以下のような式を用いた。

$$v_M = \frac{V_\beta (S - M^2 / K_{eq})}{S + K_{M\beta} (1 + M^2 / K_{Mr})} \quad (1)$$

この式は β -アミラーゼによるマルトースからのマルトテトラオースへの縮合反応(逆反応)の項を含む。 β -アミラーゼのみを使用する場合、式中の澱粉濃度 S は

$$S = S_{\beta 0} - M / 1.05 \quad (2)$$

となる。ここで $S_{\beta 0}$ はアミロースとアミロペクチン分子に β -アミラーゼが単独で作用した場合にマルトースに分解される箇所の質量濃度であり、 $S_{\beta 0}$ はその全質量濃度を表す。一方、 β -アミラーゼと枝切り酵素を併用する場合、Eq.(2)に代わって S は

$$S = S_{\beta 0} + S_d - M / 1.05 \quad (3)$$

となる。ここで S_d は枝切り酵素のアミロペクチンへの作用の結果、新たに β -アミラーゼによりマルトースに分解されるようになる直鎖結合部分の質量濃度であり、最終的に S_{df} まで増大する。よって2酵素併用の場合には全体として質量濃度 $S_0 (= S_{\beta 0} + S_{df})$ に相当する澱粉がマルトースに分解される。 S_d についての増加速度式は

$$v_d = V_d \quad (4)$$

とした。ただし

$$S_d / S_{df} \leq 0.3 \text{ のとき } V_d = V_{d0} \quad (5)$$

$$S_d / S_{df} > 0.3 \text{ のとき}$$

$$V_d = V_{d0} \{1 - 1.429 (S_d / S_{df} - 0.3)\} \quad (6)$$

ここでEq.(6)中の1.429は $S_d / S_{df} = 1.0$ のとき V_d をゼロとおくことによって決定した。以上の式による計算値を酵素濃度および基質濃度が様々な条件下での反応結果に適用したところ、その適合性は枝切り酵素の種類を問わず非常に良好であった¹⁰⁾。

上述の均相系反応速度式が担体表面に固定化された酵素の反応においても同様に成立すると仮定すると、モノ

リス壁細孔内で起こる反応に対して澱粉、マルトース、および枝切り酵素がアミロペクチンの分岐点の切断の結果 β -アミラーゼによる作用が可能となる直鎖結合部分についての物質収支式はそれぞれ以下ようになる。

$$\frac{d}{dx} (De_s \frac{dS}{dx}) = v_M' / 1.05 - v_d' = -v_s' \quad (7)$$

$$-De_M \frac{d^2 M}{dx^2} = v_M' \quad (8)$$

$$-\frac{d}{dx} (De_d \frac{dS_d}{dx}) = v_d' \quad (9)$$

境界条件は

$$x=0 \text{ で } dS/dx=0, \quad dM/dx=0, \quad dS_d/dx=0 \quad (10)$$

$$x=L \text{ で } S=S_i, \quad M=M_i, \quad S_d=S_{di} \quad (11)$$

である。ここで v_M', v_d', v_s' は v_M, v_d, v_s の式を固定化酵素質量濃度基準の式に変換したものである。一方、反応の進行とともに澱粉の分子量は低下するのでEq.(7)の De_s についても澱粉の拡散係数を初期値として反応の進行により増大するような相関式を与えることが必要である。ここではグルコアミラーゼの場合¹¹⁾と同様に、一般に溶質の分子容は分子量の増加とともに増大することを考慮して、 De_s を任意の時刻における基質の分子量と反応開始前の澱粉の分子量との比、すなわち未反応率の関数として次のように変化させる。

$$De_s = De_{s0} / (S/S_0)^c \quad (12)$$

ここで定数 c を決定する際にどのオリゴ糖の拡散係数を使用するかが問題である。グルコアミラーゼ反応系の場合、澱粉がグルコアミラーゼの作用を受けグルコースになる過程において最終的な基質はマルトースであるので、マルトースの値を用いた^{3,12)}。しかし β -アミラーゼを用いる本反応系では、枝切り酵素併用の場合でも最終反応率が90%以下であり、最終的な基質を特定できない。ここでは便宜的に、市販されているマルトペンタオースをもって代表させた。すなわちEq.(12)の定数 c は S/S_0 が0.01のとき $De_s = De_{MP}$ において決定する。さらに De_d についても

$$De_d = De_{s0} / \{(S_{df} - S_d) / S_{df}\}^c \quad (13)$$

として変化させる。枝切り酵素の基質はアミロペクチンであるので、便宜的に本基質の拡散係数の初期値には De_{s0} を、また c にはEq.(12)と同じ値を用いた。

一方、回分式反応器中では以下のような収支式が成り立つ。

$$-V_b \frac{dS_i}{dt} = \frac{V_c}{L} \int_0^L (-v_s') dx \quad (14)$$

$$V_b \frac{dM_i}{dt} = \frac{V_c}{L} \int_0^L v_M' dx \quad (15)$$

Table 3 Kinetic parameters and effective diffusivity

V_{β}	$[\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} - \text{cat} \cdot \text{s}]$	3.97×10^{-14}
Km_{β}	$[\text{kg} \cdot \text{m}^3]$	0.414
De_{s0}	$[\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}]$	1.13×10^{-11}
De_{MP}	$[\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}]$	2.75×10^{-11}
V_{d0}	$[\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} - \text{cat} \cdot \text{s}]$	5.83×10^{-16}

$$V_b \frac{dS_{d_i}}{dt} = \frac{V_c}{L} \int_0^L v'_d dx \quad (16)$$

初期条件は

$$t=0 \text{ で } S_i = S_{\beta 0}, M_i = 0, S_{d_i} = 0 \quad (17)$$

である。まず Eqs.(7)～(13)をCrank-Nicolson法¹⁴⁾および準線形化法⁸⁾によって数値的に解き、担体内における各成分の濃度分布を求めた。次にその濃度の値をもとに各点での反応速度を計算し、これをEqs.(14)～(16)の右辺に代入して数値積分した後、これらを改良オイラー法によって解いて任意の時刻における液本体濃度を求めた。

これらの計算に必要な固定化 β -アミラーゼの速度パラメーターおよび有効拡散係数をTable 3に示した。このうち V_{β} , Km_{β} , および澱粉の有効拡散係数 De_{s0} については、固定化 β -アミラーゼを用いた回分式反応で広範囲の澱粉初濃度に対する反応初速度の測定値から、前報の手順¹¹⁾にしたがって決定した。 De_{MP} は文献^{4,5)}に基づき推算した。この De_{s0} , De_{MP} の値を使ってEqs.(12), (13)中の定数 c は0.327と決定した。また V_{d0} は唯一の調節パラメーターとして計算値が実測値に適合するように決定した。

3.2 実験結果の解析

Fig. 1に β -アミラーゼ単独固定化系に対する計算結果を示した。計算は上述のEqs.(7)～(17)において枝切り酵素に関する式および項を除いて行った。また澱粉濃度が小さいので、逆合成反応の項を無視して計算した。一方、Fig. 2に β -アミラーゼとプルラーナーゼの同時固定化系に対して、Eqs.(7)～(17)により計算した結果を示した。 β -アミラーゼ単独固定化系および β -アミラーゼとプルラーナーゼの同時固定化系とも計算値にはば一致しており、本モデル式が有効であることがわかった。

4. 固定化酵素モノリス反応器における澱粉からのマルトースの連続生産

Fig. 4は固定化酵素モノリス反応器において澱粉の連続的な糖化を行った際のマルトース収率と空間時間との関係を示したものである。枝切り酵素としてイソアミラーゼを用いた場合、酵素の固定化は固定化法IIによって行い、基質には澱粉Bを使った。一方、プルラーナーゼを

Fig. 4 Relation between maltose yield and space time in continuous hydrolysis of starch in a co-immobilized β -amylase and debranching enzyme monolithic reactor

Fig. 5 Relation between maltose yield and space time in continuous hydrolysis of starch B in a co-immobilized β -amylase and isoamylase monolithic reactor

用いた場合、固定化は固定化法Iによって行い、基質には澱粉Aを使った。基質濃度はいずれの場合も $5 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ である。本反応条件に関する限り、両結果に大きな違いはみられない。イソアミラーゼ使用の場合、空間時間7hにおいてマルトース収率は80.8%に達した。

Fig. 5は固定化 β -アミラーゼ-イソアミラーゼモノリス反応器において高濃度の澱粉Bを原料として連続的に糖化した際のマルトース収率と空間時間との関係を示したものである。酵素の固定化は固定化法IIにより行った。空間時間の大きな領域においてマルトース収率は、Table 1に示した遊離の β -アミラーゼ作用の場合の値をはるかに越えている。両澱粉濃度に対するマルトース収率の値には顕著な差は見られない。100 $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ の場合、空間時間9.9hにおいてマルトース収率は77%であった。このことは本反応器の有効性を示している。

結 言

セラミックモノリスに固定化した β -アミラーゼと枝切り酵素による可溶性澱粉の加水分解反応を回分式反応器および連続式反応器を用いて pH 4.8, 40°C において行ない、以下の新たな知見を得た。

1) セラミックモノリスへ酵素を固定化する場合、シラン化したモノリスをグルタルアルデヒドで処理した後、酵素と接触させる従来の方法よりも、酵素をあらかじめグルタルアルデヒドにより架橋したものをシラン化モノリスに結合させる方法の方が活性の高い固定化酵素が得られ、有効である。

2) 先に著者らが提出した均相系反応速度式と細孔内拡散現象を組み合わせたモデル式は、固定化 β -アミラーゼ、および固定化 β -アミラーゼ-プルラーゼによる澱粉の回分式糖化反応におけるマルトース濃度の経時変化データに対してよく適合する。

3) 本研究で検討した固定化法に基づき、 β -アミラーゼとイソアミラーゼを同時固定化したモノリス10個を反応器中に積み重ねて連続式反応を行ったところ、100kg $\cdot$ m⁻³の澱粉の場合、空間時間9.9hにおいてマルトース収率が77%であった。このことは本反応器の有効性を示している。

Nomenclature

c	= constant in Eqs.(12) and (13)	[-]
De	= effective diffusivity	[m ² ·s ⁻¹]
E	= mass concentration of enzyme in solution employed for enzyme immobilization	[kg·m ⁻³]
Keq	= equilibrium constant	[kg·m ⁻³]
Km	= Michaelis constant	[kg·m ⁻³]
Km_r	= constant for condensation of maltose into maltotetraose	[kg ² ·m ⁻⁶]
k	= kinetic constant	[s ⁻¹]
L	= half-width of slab	[m]
M	= mass concentration of maltose	[kg·m ⁻³]
S	= mass concentration of starch	[kg·m ⁻³]
S_d	= mass concentration for portion hydrolyzed to maltose anew by the simultaneous action of β -amylase and debranching enzyme	[kg·m ⁻³]
S_0	= mass concentration of starch convertible into maltose in two-enzyme system	
	$S_0 = S_{p0} + S_{df}$	[kg·m ⁻³]
S_{00}	= mass concentration of starch initially added into reactor	[kg·m ⁻³]

S_p	= mass concentration for portion hydrolyzed to maltose by the action of β -amylase alone	[kg·m ⁻³]
t	= time	[s]
V	= maximum reaction rate based on volume of liquid	[kg·m ⁻³ -liq·s ⁻¹]
V'	= maximum reaction rate based on volume of support	[kg·m ⁻³ -cat·s ⁻¹]
V_b	= volume of bulk solution in a batchwise reactor	[m ³]
V_c	= volume of monolithic support	[m ³]
v	= reaction rate based on volume of liquid	[kg·m ⁻³ -liq·s ⁻¹]
v'	= reaction rate based on volume of support	[kg·m ⁻³ -cat·s ⁻¹]
x	= one-dimensional coordinate of distance	[m]
<Subscripts>		
d	= debranching enzyme	
f	= final value or free enzyme	
I	= isoamylase	
i	= value in bulk solution or at external surface of immobilized enzyme support	
M	= maltopentaose	
MP	= maltose	
P	= pullulanase	
s	= starch or substrate	
0	= initial value	
β	= β -amylase	

Literature cited

- 1) Caldwell, K.D., R.Axen, M.Bergwall and J.Porath: *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1573 (1976)
- 2) Caldwell, K.D., R.Axen, M.Bergwall, I.Olsson and J.Porath: *ibid.*, **18**, 1605 (1976)
- 3) Kusunoki, K., K.Kawakami, F.Shiraishi, K.Kato and M.Kai: *ibid.*, **24**, 347 (1982)
- 4) Lee, D.D., G.K. Lee, P.J. Reilly and Y.Y. Lee: *ibid.*, **22**, 1 (1980)
- 5) Longthworth, L.G.: *J. Phys. Chem.*, **58**, 770 (1954)
- 6) Maeda, H., G.T. Tsao and L.F. Chen: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 383 (1978)
- 7) Martensson, K.: *ibid.*, **16**, 567, 579, 1567 (1974)
- 8) Na, T.Y.: "Computational Method in Engineering Boundary Value Problems", Academic Press, London (1979)
- 9) Ohba, R. and S. Ueda: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 2137 (1980)
- 10) Shiraishi, F., K. Kawakami, A. Yuasa, T. Kojima and K. Kusunoki: *ibid.*, **30**, 374 (1987)
- 11) Shiraishi, F., K. Kawakami, K. Kato and K. Kusu-

- noki : *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **9**, 316 (1983)
- 12) Shiraishi, F., K. Kawakami and K. Kusunoki :
Biotechnol. Bioeng., **27**, 498 (1985)
- 13) idem : *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **12**, 492 (1986)
- 14) Smith, G.D. : "Numerical Solution of Partial Differential Equations", The Clarendon Press, Oxford (1965)
- 15) Yoneyama, M. : *Japan Patent*, **60**, 1879 (1985)

Maltose Production from Soluble Starch by β -Amylase and Debranching Enzyme Immobilized on Ceramic Monolith

Fumihide Shiraishi, Koei Kawakami, Tsuyoshi Kojima *,
Akio Yuasa ** and Koichiro Kusunoki

Dept. of Chem. Eng., Kyushu Univ., Fukuoka 812

Key Words : Biochemical Engineering, Immobilized Enzyme, Ceramic Monolith, Starch, Maltose, Amylase, Isoamylase, Pullulanase

Hydrolysis of soluble starch by β -amylase and debranching enzyme (pullulanase or isoamylase) immobilized on a ceramic monolith were carried out in batch and continuous reactors at pH 4.8 and 40°C. In batchwise reaction, reactant solution was stirred by a basket impeller involving three of the immobilized enzyme monolith under the condition of negligible external diffusion effect. To improve the maltose yield, a method to immobilize the enzymes efficiently on ceramic monolith was examined. Also, an associated model of the reaction kinetics for the two free enzymes discussed in our previous paper and pore diffusion phenomena was proposed and its agreement with time course data of maltose formation was investigated. Continuous production of maltose was conducted in a co-immobilized reactor, wherein ten blocks of immobilized enzyme monolith were stacked, at starch concentrations ranging from 5 to 100 kg·m⁻³. As a result, it was found that efficient production of maltose was performed in the immobilized enzyme monolithic reactor.

* Sumitomo Chemical Co. Ltd.

** Asahi Chemical Industry Co. Ltd.