[農化 第 55 卷, 第 5 号, p. 479~482, 1961]

液内培養によるアミラーゼの生産について (第 7 報)*

液体麹における pH 規制について

菱 田 泰 治 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 35 年 11 月 2 日 受 理

緒 言

著者は先に黒麹菌の酸性側培養と中性側培養におけるアミラーゼの生成の差異を検討し, 特に糖化アミラーゼの生成に pH の低下が必要なることを述べたが⁽¹⁾, その後培養途中にて培養系を酸性側より中性側に変化せしめて試験した結果, 液化アミラーゼが急速に生成してくる一方, 糖化アミラーゼの生成が阻害され, アミラーゼ生成に対する pH の影響が一層明らかとなった.

澱粉質の酒精醱酵において収率を決定する最も大きな因子は糖化アミラーゼの力であると考えられているが^(2~5), α -アミラーゼも操作を便にし澱粉老化を防ぐために殊に高濃度仕込の際に必要な。したがって澱粉質酒精醱酵の糖化剤としての液体麹は充分の糖化アミラーゼと必要量の α -アミラーゼを併有することが望ましい。このような液体麹を製造するための要因は菌株, 培地, 通気攪拌等の諸条件が重要であるが, 著者は以上の実験結果から黒麹菌液内培養中 pH を適当に規制することも一つの方法であると考えに至った。すなわち黒麹菌の糖化アミラーゼの生成は酸性側でよく行われ, α -アミラーゼは微酸性側で生成されるから pH を培養途中で変化させて両アミラーゼの生成をうながす方法である。この pH 変化のプログラムは糖化アミラーゼは酸性でも微酸性でも安定であるが, α -アミラーゼは酸性でただちに失活すること, 糖化アミラーゼはできるだけ力価を高めることが望ましいことから, まず酸性側で糖化アミラーゼを充分生成させて後, 培養終期に中性側に移して α -アミラーゼを生成させる方法がよいと考え, この方法で得た液体麹を用いて酒精醱酵試験を行って好結果を得たので報告する。

実 験 方 法

液内培養: 前報同様 *Aspergillus awamori* var. *fumeus* を用い基本培地 (酸性側培養) として糠エキス (米糠 2.4g に当る) 80 ml, 澱粉 1.6g, 硫酸 0.16g, 燐酸 1 カリウム 0.08g を 500 ml 長頸振盪フラスコに取り, 30° で振盪培養を行いこれを A 区とし, これに 0.24g の CaCO_3 を 0 時間目, 34 時間目, 48 時間目, 58 時間目及び 72 時間目に添加して pH を微酸性に移した区をそれぞれ B, C, D, E 及び F 区とした。

酵素力測定法: 前報と同じく糊精化力は Wohlgemuth 価, 糖化アミラーゼ力は酸処理酵素液による 3 時間作用後の澱粉分解率を以て示した。全糖化力は無処理酵素液の澱粉分解率である。R. D. V. (Residual Detritin Value) は富金原法⁽⁵⁾にしたがい, 作用混液 5ml の還元力増加を N/10 チオ硫酸ナトリウムの滴定 ml 数で示す。

酒精醱酵: 切干甘藷粉 (20 メッシュ通過) と 200ml の水道水を 500ml 三角フラスコにとり, 湯煎上でいねいに糊化した後, pH 4.6 とし 120°, 20 分殺菌し, 55° に冷した後無菌的に菌体を濾別した液体麹 20 ml を加えて振盪混和し麹汁に 16 時間培養した酵母 4 ml を加えた後, 醱酵栓をつけて 30° で醱酵せしめた。

実 験 結 果

1. pH の経過並びにアミラーゼの生成経過

各区の pH 経過は第 1 表に示す如く CaCO_3 の添加によって

第 1 表 pH の 経 過

区分	CaCO ₃ 添加時間	培 養 時 間							れる。
		0	24	34	48	58	72	96	
A	無添加	5.4	4.8	2.2	2.2	2.2	2.2	2.6	糊精化力は第 1 図に示すように微酸性側 (B) においては, 20 時間目前後から生成してくるが酸性側 (A) では殆ど現れない。しかしこれに随時 CaCO ₃ を添加して中和すると数時間のうちに糊精化アミラーゼが
B	0	5.4	5.8	5.8	5.7	6.2	6.2	6.2	
C	34	5.4	4.8	2.2	6.0	5.8	5.8	5.8	
D	48	5.4	4.8	2.2	2.2	5.8	5.8	5.8	
E	58	5.4	4.8	2.2	2.2	2.2	5.6	5.8	

* Studies on the Amylase Production by Submerged Culture. Part VII. On the pH Control in Submerged Mold Culture.

By Yasuji MINODA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

第1図 糊精化アミラーゼの生成経過

現れてくる。但し添加時間が遅れるほど生成量は少くなる。

糖化アミラーゼ力は第2図に示す。微酸性側 (B

区) では生成が少く酸性側で 30 時間目より 72 時間目の間に顕著な生成がみられる。これに順次 CaCO_3 を添加していくと暫くは影響がないが、10 時間位後に明らかに影響が現われて生成が停止する。したがって糖化アミラーゼを充分生成せしめるには、少くとも最高力価に達する 10 時間前まで酸性側で培養する必要があり、 α -アミラーゼを必要とするならばその後 pH を上昇させれば数時間後に相当量の α -アミラーゼが生成しることが明かとなった。なお菌体量の測定結果によれば CaCO_3 の添加によって、菌体増殖には殆んど影響はない。

2. pH 規制を行った液体麹による酒精醸酵試験 以上の結果から糖化アミラーゼを充分生成させ、且つなるべく多量の α -アミラーゼをも期待するための pH 変換時期は、糖化アミラーゼ力価が最高に達する 10 時間前 (本実験条件では 60 時間目前後) が目標となる。このような pH 規制によって得た液体麹は、多量の糖化アミラーゼを含むと同時にかなりの α -アミラーゼを併有している。この α -アミラーゼ力価は、中性側で培養したものには劣るが、Wohlgemuth 価で 20~30 単位を有する。酒精醸酵では、モロミ 100ml 中 100 単位近くの α -アミラーゼがあればよいと考えられているから⁽⁸⁾、モロミに対して 1/10 量の液体麹を使用するとすればこの α -アミラーゼ力価は充分な価である。したがってこの液体麹 (D 区) を用いて酒精醸酵を行えば、よい醸酵率が期待されるので、 CaCO_3 無添加区 (A 区)、0 時間及び 48 時間目に添加した区 (B 及び C 区) と比較して醸酵

第2図 糖化アミラーゼの生成経過

第2表 酒精醸酵に用いた液体麹の酵素力価

区分	CaCO_3 添加時間	糊精化力 D_{37}°	糖化アミラーゼ力 %	全糖化力 %	R. D. V.
A	無添加	<1	28.6	36.5	32.9
B	0	58	5.8	38.0	8.1
C	48	48	31.4	58.2	39.9
D	60	20	40.2	61.4	38.9

試験を行なった。各区とも培養時間は 72 時間である。

用いた酵素液の力価は第2表に示す。A 区は糖化アミラーゼ力はあるが糊精化力なく、B 区は糊精化力はあるが糖化アミラーゼ力は微弱である。C 区は CaCO_3 の添加が早いために糖化アミラーゼ力はやや劣るが糊精化力は強く、D 区は糊精化力はやや劣るが充分糖化アミラーゼは生成されている。全糖化力は A, B 区に比べて C, D 区は糖化ののびのよいことを示している。又 R. D. V は

第3表 CO_2 減量

		時間	区 分			
			A	B	C	D
CO ₂ 減量 g	{	24	1.8	2.2	3.6	3.4
		29	2.0	2.9	4.4	4.0
		48	4.5	5.2	7.2	7.8
		70	5.4	6.6	8.2	8.9
		96	7.2	8.1	9.5	10.2
		118	8.6	9.2	10.6	10.9
		146	9.0	9.5	10.7	11.0
CO ₂ 減量による 醸酵率計算値%			77.4	81.7	92.1	94.7

第4表 酒精醸酵成績

区分	残全糖 g	残直糖 g	生成アルコール g	醸酵歩合 %	酒精醸酵のモロミは、切干甘藷粉 34g を用い、全糖分は 23.73g で糖濃度は 11.3% であった。醸酵の経過を CO_2 減量で追跡した結果は第3表、醸酵モロミの分析結果は第4表に示す如くである。A 区は α -アミラ
A	4.29	0.27	9.43	77.7	
B	3.42	0.37	10.06	82.8	
C	2.06	0.42	11.01	90.7	
D	1.31	0.41	11.35	93.5	

ーゼ不足のため、B区は糖化アミラーゼ不足のため、いずれも酸酵が遅れ、残糖が多く酸酵歩合も悪い。これに対しD区は酸酵が早く進み、残糖少くよい酸酵歩合を示した。C区はD区よりやや成績が劣った。

次にモロミの糖濃度を高くし、切干甘藷粉 50g を用いて同様の酸酵試験を行った。モロミの全糖分は 32.15 g, 糖濃度 14.5% である。使用した酵素液のアミラーゼ力及び酸酵試験の結果は第 5 表に示す。D区は糖化アミ

第 5 表 酵素力価並びに高濃度仕込酸酵試験成績

区分	CaCO ₃ 添加時間	糊精化力 D ₃₀ ^{37°}	糖化アミ ラーゼ力 %	全糖化力 %	R. D. V. ml	酸酵歩合 %
A	無添加	1	32.2	38.4	39.1	71.0
B	0	18	6.8	29.3	23.5	72.3
C	60	21	38.0	52.2	43.9	93.2

ラーゼ力, R. D. V. も高く, α -アミラーゼをも併有し, 全糖化力において格段優れ, 高濃度仕込でも十分な酸酵歩合を示した。これに対し殆んど糖化アミラーゼのみの A 区, 殆ど α -ア

ミラーゼのみの B 区では酸酵歩合 80% にも達しなかった。

考 察

(1) 以上によって糖化アミラーゼ生成に対する培養 pH の影響が一層明らかとなったが、この現象は本実験に使用した菌株、培地に特有のものではない。例えば第 6 表の如き菌株、培地を用いると培養 pH はほぼ 4.0 附近に保たれるが、これに CaCO₃ を添加して pH 5.8 附近で培養した場合と比較すると、同表に示すようにやはり微酸性において糖化アミラーゼの生成が阻害される。尚この阻害が Ca イオンによるものでないことは前報に述べたとおりである。

第 6 表 培養 pH によっておこるアミラーゼ生成の差異

培地	pH	α -アミラーゼ w. v	糖化アミ ラーゼ %
A	3.8	6	27.3
B	6.2	50	12.9

菌株: *Asp. usamii* R 1219

培地: A...100ml 中 澱粉 2g, グルコース 0.5g, 酒石酸アンモニウム 0.92g, Na₂HPO₄·12H₂O 1.79g, KCl 0.0746g, MgSO₄·7H₂O 0.0493g, CaCl₂ 0.0111g, FeSO₄·7H₂O 0.0003g, pH 5.6

B...A に CaCO₃ 1g 添加

培養: 30° で 70 時間振盪培養

(2) 前述のような pH 規制を行って、pH を微酸性に移して後生成してくる糊精化アミラーゼは一部耐酸性の糊精化力を含んでいる。第 2 表 D 区の糊精化力は B 区の 1/3 の力価であるが、これを酸処理した後糊精化力を測定すると B 区は全く糊精化力を失うに対して D 区ではその 1/5 が残存する。その後の検討の結果、この耐酸糊精化力が別種のアミラーゼの生成によるものであること

ことが明らかとなった。本報では糖化アミラーゼ力価は酸処理後の糖化率で示してあるので、D 区で示した糖化アミラーゼ力にはこのアミラーゼによる糖化力が一部加算された値となっている。

(3) 菌体内酵素力価を前報と同様に測定した。糊精化アミラーゼについては外生酵素力 (第 1 図) とほぼ同じ傾向を示しているが (第 3 図), 糖化アミラーゼについては第 2 図と全く逆の生成経過を示している。即ち第 4 図のように A が最も力価が低くほぼ一定の保持量を示すに対し、B 区は力価が高い。又 CaCO₃ を添加す

第 3 図 菌体内糊精化アミラーゼの生成経過

第 4 図 菌体内糖化アミラーゼの生成経過

ると保持量が急速に高まる。内生酵素は外生酵素に比し力価が低いから、菌体外と菌体内の全糖化アミラーゼの生産量は菌体外糖化アミラーゼの力価に左右されるけれども、以上の結果は培養 pH が糖化アミラーゼ生成に及ぼす影響の検討を進める上に興味ある事実と考えられる。

要 約

(1) 黒麹菌を酸性側で培養した後、微酸性に移し培養をつづけると、 α -アミラーゼが急速に生成してくるが、10 時間位後に糖化アミラーゼの生成が停止する。これによって前報に報告した微酸性側における糖化アミラーゼ生成に対する阻害現象が一層明らかとなった。

(2) 糖化アミラーゼ力価が最高に達する 10 時間位前に培養系を酸性より微酸性に移すことによって、糖化アミラーゼが充分に生成され、かつ α -アミラーゼを併有した液体麹を得ることができる。

(3) このような規制を行った液体麹を使用して酒精醸酵試験を行い、よい結果を得た。

(1) 養田泰治, 茂木孝也, 中村哲郎: 本誌, 29, 115 (1955).

(2) J. Corman, A. F. Langlykke.: *Cereal Chem.*, 25, 190 (1948).

(3) S. C. Pan, A. A. Andreasen, P. Kolachov: *Ind. Eng. Chem.*, 42, 1783 (1950).

(4) J. Corman, A. F. Langlykk, H. M. Tsuchi-

ya: *Cereal Chem.*, 28, 280 (1951).

(5) 富金原孝, 井出聰彦: 本誌, 29, 62 (1955).

(6) 小野英男, 上林 明: 醸酵協, 10, 168 (1953).

(7) 小野英男, 上林 明: 同上, 13, 145 (1955).

(8) 朝井勇宜編: 微生物工業, 朝倉書店, p. 68 (1956).

〔農化 第 35 卷, 第 5 号, p. 482~487, 1961〕

液内培養によるアミラーゼの生産について (第 8 報)*

pH 自動制御方式による黒麹菌アミラーゼの生成試験

養田 泰治, 塚本 功 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 35 年 11 月 2 日 受 理

緒 言

さきに黒麹菌液内アミラーゼの生成に対する培養 pH の影響について報告し⁽¹⁾, 又酒精醸酵の糖化剤としての液体麹製造の際の pH 規制の方針について論じた⁽²⁾が, 黒麹菌は液内培養中 pH の変動が甚しくその規制が困難なため, やや特殊な培地を用いて pH 2.0 附近と pH 6.0 附近において培養せる場合の傾向の差異を論ずるにとどまり, その他の pH レベル特に工業的に最も検討を必要とする pH 3.0, 4.0, 及び 5.0 附近における生成状態を試験するにいたらなかった。pH の影響の現われるのは初発又は終末の pH ではなく, 菌糸が激しく増殖する期間及びそれに続く期間であって, 黒麹菌を液内培養する場合にはこの期間の pH は刻々に激しく変動するため, 緩衝液の添加等によって規制しきれものではない。したがって, 一定の培地を用いて pH のみを変え, しかもそれぞれのレベルに培養の期間を通じて固定しつつ pH の影響を比較検討するには pH 自動制御器に頼る以外不可能である。そこで著者等は連続自記ガラス電極 pH 計に連動する pH 自動制御装置の試作を依頼して設置し, 種々検討して改良を加えた結果, 培養 pH を任意の値に小さな誤差内に規制し得たのでこれによって各 pH に規制しつつ液内アミラーゼを生成せしめた結果を報告する。

又最近 pH 連続測定, 並びに自動制御操作の醸酵工業への導入が各方面で試みられているが, 醸酵工業の近代化の一環として当然の趨勢であり, 又その要請も大きい。著者等の装置は小規模であり, いくつかの問題を残しているが, その概要を記して大方の参考とした。なお本報の概要は, 昭和 34 年 4 月農芸化学会大会において講演した。

実 験 方 法

* Studies on the Amylase Production by Submerged Culture. Part VIII. Amylase Production by Black Aspergilli in Automatic pH Controlling Culture.

By Yasuji MINODA and Isao TSUKAMOTO (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)