

琉球大学学術リポジトリ

バガスを炭素源とする泡盛麹菌の培養(農芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 当山, 清善, 与那覇, 和雄, 上原, 初枝, Toyama, Seizen, Yonaha, Kazuo, Uehara, Hatsue メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4242

バガスを炭素源とする泡盛麹菌の培養†

当 山 清 善*・与那覇 和 雄*・上 原 初 枝*

Seizen TOYAMA, Kazuo YONAHA and Hatsue UEHARA :
Cultivation of *Aspergillus awamori* with sugarcane bagasse
as a sole carbon source

I 緒 言

近年、家畜飼料用蛋白質源の需要増大に伴い、セルロース物質を原料とした微生物菌体蛋白の生産による蛋白質飼料資源の開発を図るための研究が進められている。^{1,2,9,10)} 特に、農産廃棄セルロース物質から微生物菌体を生産することが検討され、稲わら、甘蔗バガス等を微生物の培養基質として利用するための研究が行なわれつつある^{3,6,8,11)}。

筆者ら¹⁴⁻¹⁶⁾は、バガスの前処理条件と微生物起源酵素による分解との関係を調べ、アルカリ処理したバガスが酵素によって分解されやすくなることを明らかにするとともに、バガス培地に培養した微生物によるバガス分解酵素の生産条件を設定した。本報においては、バガスを炭素源とした培地で泡盛麹菌を培養するに当たってのバガスの前処理条件および培養条件について検討したので報告する。

II 実験方法

(1) 供試泡盛麹菌株：前報¹⁶⁾でアルカリ処理バガスを分解する酵素の生産性が高いことが確められた *Aspergillus awamori* IFO 4033 を供試菌株として用いた。

(2) バガス原料：麹菌の培養基質に供したバガス原料は前報¹⁶⁾に準じて調製し、40メッシュになるように粉碎した。

(3) バガスのアルカリ処理：麹菌の培養基質に用いるバガスのアルカリ処理は粉碎バガスに水酸化ナトリウム（アルカリ）溶液を加え加熱して行なった。アルカリ処理した後塩酸で中和したバガス溶液をアルカリ抽出液含有バガスとした。中和したバガス溶液を濾過して得られる固形部のバガスと液部の抽出液をそれぞれアルカリ処理バガスおよびバガスのアルカリ抽出液とした。アルカリ処理バガスは水洗、乾燥（70℃、一夜）した後培養基質として用いた。

(4) 培地組成と麹菌の培養：培地組成はバガス（1.5g）をアルカリ処理して得られるアルカリ抽出液含有バガス（アルカリ処理バガスあるいはバガスのアルカリ抽出液）、硫酸アンモニウム0.3%、リン酸第二カリウム0.2%、塩化カリウム0.05%および硫酸マグネシウム0.02%でpH 5.4に調整して用いた。培地中のバガス濃度は粉碎バガス原料として1.5%である。麹菌の前培養は、アルカリ抽出液培地（5ml）を試験管に採り、麹菌胞子を接種して30℃で48時間振とうして行なった。本培養はアルカリ抽出液含有バガス培地（100ml）を500ml容振とうフラスコに採り、前培養した麹菌菌体液（5ml）

† 甘蔗バガスの利用に関する研究（第4報）

* 琉球大学農学部農芸化学科

琉球大学農学部学術報告 24 : 253 ~ 261 (1977)

を植菌し30℃で振とうして行なった。

(5) 麹菌生育度の測定：麹菌培養終了後のバガス残渣含有菌糸体と培養液は濾紙濾過により分離した。バガス残渣含有菌糸体は十分蒸留水で洗浄し、80℃で一夜乾燥した後その乾燥重量を測定した。乾燥したバガス含有菌糸体の粗蛋白含量(%)は、乾燥粉末中の全窒素をマイクロケルダール法で求め、6.25の係数を乗じて算出した。麹菌の生育度は乾燥したバガス残渣含有菌糸体中の全粗蛋白量(mg)で示した。

III 結 果

1. 各種濃度アルカリ処理バガス培地における泡盛麹菌の生育

供試泡盛麹菌の培養基質としてのバガスの利用性を明らかにするために、バガスの前処理条件、すなわちバガスを処理する水酸化ナトリウム(アルカリ)濃度と麹菌の生育との関係を調べた。麹菌の培養

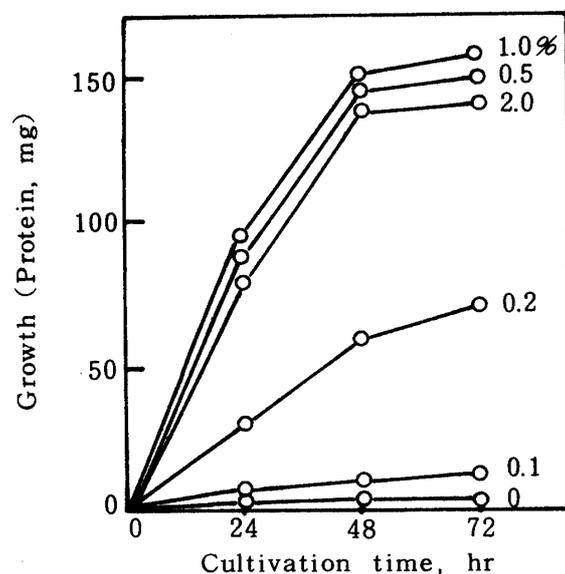


Fig. 1. Relationship between alkali treatment of bagasse and growth of *Asp. awamori*

The growth medium contained 0.3% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2% KH_2PO_4 , 0.05% KCl , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 1.5% sugarcane bagasse. The bagasse (1.5 g) was treated with different concentrations of NaOH solution (30 ml) at 120°C for 20 min and then neutralized with HCl . The pH of the medium was adjusted to 5.2. The cultures were carried out in 500 ml shake-flask using 100 ml of working volume of the medium. Shake-flask cultures were inoculated with the culture broth (5.0 ml) of *Asp. awamori*, which had been cultured on a medium containing alkali extract of bagasse as the sole carbon source. The culture flasks were incubated on a reciprocating shaker at 30°C. Fungal mycelium and residual bagasse were collected from culture broth, washed, dried at 70°C, and weighed. The dried material was ground and analyzed for Kjeldahl nitrogen. The factor 6.25 was used to calculate crude protein. The degree of the growth of *Asp. awamori* was shown as the amount of crude protein yield in the dried material.

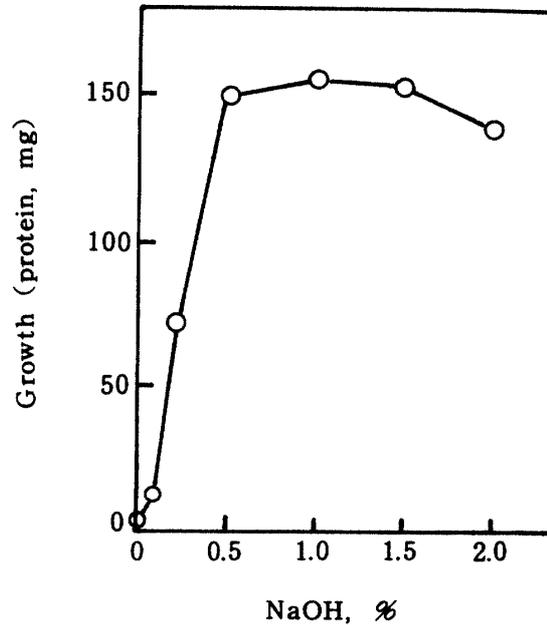


Fig. 2. Effect of the alkali treatment of bagasse on the growth of *Asp. awamori*

Bagasse was treated with different concentrations of NaOH solution at 120°C for 20 min. The culture was carried out for 72 hr. Other conditions are the same as Fig. 1.

は、バガス(1.5 g)に各種濃度のアルカリ溶液(30 ml)を加え、120°C、20分間処理した後、塩酸で中和したアルカリ抽出液含有バガスを炭素源とした培地で行なった。Fig. 1は各種濃度アルカリ溶液で処理したバガス培地における麹菌の培養時間と生育度との関係を調べた結果であり、Fig. 2にはアルカリ濃度と培養72時間目の生育度との関係を示した。図から明らかなように、麹菌は水溶液で処理したバガス培地ではほとんど生育しないが、アルカリ溶液で処理したバガス培地では生育し、アルカリ濃度が増すに従い生育度が増大する。0.5%アルカリ溶液で処理したバガス培地において培養72時間目に最も高い麹菌の生育がみられ、さらにアルカリ溶液の濃度を増しても生育度は高められない。従って、バガスを基質とした麹菌の培養にあたってバガスを処理する最適アルカリ濃度は0.5%である。

2. 泡盛麹菌の生育とバガスのアルカリ処理温度との関係

0.5%アルカリ溶液で処理したバガスが供試麹菌の良好な培養基質となることが明らかになったので、次にバガスをアルカリ処理する温度と麹菌の生育との関係について調べた。Fig. 3は、バガスに0.5%アルカリ溶液を加え、30°C、100°Cおよび120°Cで20分間処理した後、塩酸で中和したアルカリ抽出液含有バガスを基質とした培地で麹菌の培養を行なった結果である。麹菌の生育は基質として用いるバガスの処理温度によって異なっている。処理温度が高くなるとともに生育が高められ、120°Cで処理したバガス培地で最も高い生育度を示した。

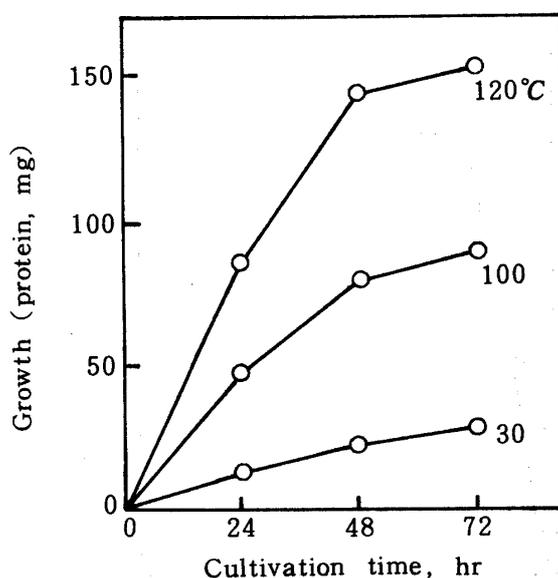


Fig. 3. Effect of the temperature in alkali treatment of bagasse on the growth of *Asp. awamori*

Asp. awamori was cultured in a medium containing the bagasse treated with 0.5% NaOH solution at the indicated temperature for 20 min. Other conditions are the same as Fig. 1.

3. アルカリ処理バガスおよびバガスのアルカリ抽出液による泡盛麹菌の培養

アルカリ抽出液含有バガス中の抽出液とアルカリ処理バガスの炭素源としての利用性を明らかにするために、バガスをアルカリ処理した後濾過により固液分離を行ない、固形部のアルカリ処理バガスと液部の抽出液を基質とした培地における麹菌の生育について調べた。麹菌の培養は0.5%アルカリ溶液を用いて120°Cで20分間処理して得られるアルカリ処理バガスおよび抽出液を基質として行なった。その結果をアルカリ抽出液含有バガス培地における生育経過とともにFig. 4に示す。麹菌の生育度は抽出液含有バガス培地で最も高く、抽出液を除いたアルカリ処理バガス培地では生育度が極めて低い。抽出液培地でも麹菌は生育し、培養初期(24時間目)にかなり高い生育度を示す。抽出液含有バガス培地における培養液のpHは培養48時間目まで上昇し、培養72時間目には急激に低下してpH 3.5になる。アルカリ抽出液培地における培養液のpHは培養時間とともに上昇するが、アルカリ処理バガス培地では培養24時間目で急激なpHの低下がみられる。抽出液含有バガス培地においては、抽出液が麹菌の基質となるとともに培養液の急激なpH低下を防ぎアルカリ処理バガスの麹菌による利用性を高めている。

4. 泡盛麹菌の生育と窒素源

Table 1は供試泡盛麹菌の生育と窒素源の形態との関係調べのために、各種窒素源を加えたアルカリ抽出液含有培地で供試麹菌を72時間培養した結果である。麹菌の生育は硫酸アンモニウムを窒素源とした培地で良好な生育を示している。各種濃度の硫酸アンモニウムを加えたアルカリ抽出液含有培地における麹菌の生育度を調べた結果をFig. 5に示す。培地中の硫酸アンモニウム濃度の増加とともに麹菌の生育が促進され、0.3%で最も高い生育度を示している。

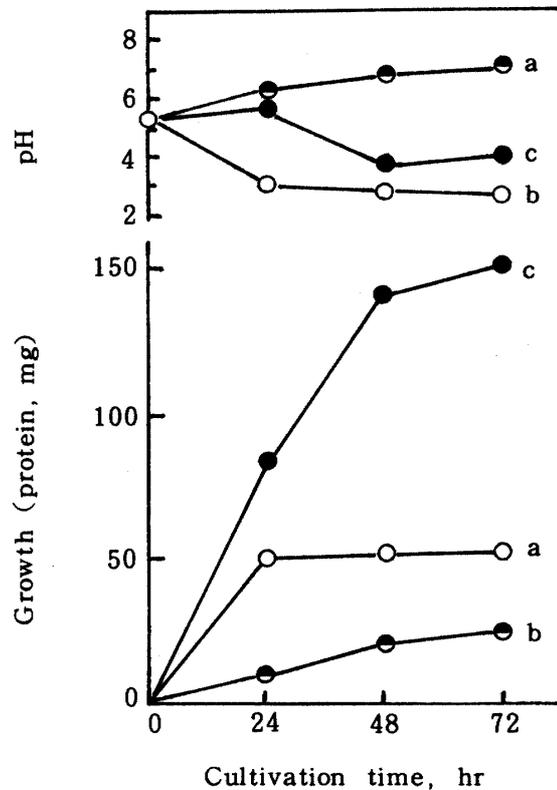


Fig. 4. Growth of *Asp. awamori* on alkali-treated bagasse and alkali-extract

Bagasse was treated with 0.5% NaOH solution at 120°C and then neutralized with HCl. The solution (alkali-extract) and solid (alkali-treated bagasse) were separated by filtration, and the latter was washed with water. *Asp. awamori* was cultured in a medium containing alkali-extract (a), alkali-treated bagasse (b), or (c) [(a) and (b)] as the sole carbon source. Other conditions are the same as Fig. 1.

Table 1. Effect of nitrogen source on the growth of *Asp. awamori*

Asp. awamori was cultured on the bagasse treated with 0.5% NaOH solution for 72 hr. Other conditions are the same as Fig. 1 except nitrogen source.

Nitrogen source	Growth (protein, mg)
(NH ₄) ₂ SO ₄	158
NH ₄ Cl	133
NaNO ₃	110
Urea	97
Peptone	150

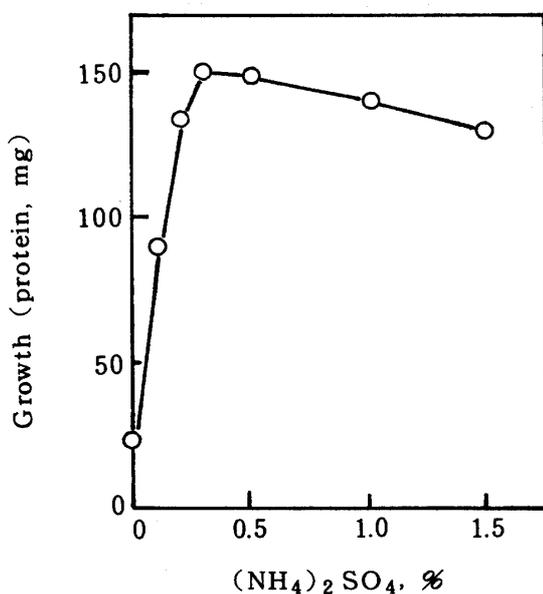


Fig. 5. Effect of ammonium sulfate concentration on the growth of *Asp. awamori*

Asp. awamori was cultured for 72 hr in a medium containing various concentrations of ammonium sulfate as the nitrogen source. Bagasse treated with 0.5% NaOH solution was used. Other conditions are the same as Fig. 1.

5. 各種粉碎画分バガスによる泡盛麹菌の培養

粉碎バガスを各種メッシュの篩を通すと各種粉碎画分のバガスが得られる。この各種粉碎バガスに0.5%アルカリ溶液を加えて120℃で20分間処理した後の抽出液含有バガスを炭素源とした培地で麹菌の培養を72時間行ない、生育度を調べたのがTable 2である。図から明らかなように、麹菌の生育度は16-32メッシュ画分バガス培地で最も高い値を示している。しかし、9メッシュ以上あるいは32メッシュ以下の画分でも麹菌は生育しており、粉碎画分による顕著な差はみられない。

Table 2. Effect of the particle size of bagasse on the growth of *Asp. awamori*

Asp. awamori was cultured for 72 hr on the bagasse having various particle sizes. Bagasse was treated with 0.5% NaOH solution. Other conditions are the same as Fig. 1.

Particle size (mesh)	Growth (protein, mg)
> 9	145
9-10	150
10-16	155
16-32	130
< 32	110

6. 泡盛麹菌の生育と培養 pH

抽出液含有バガス培地を塩酸あるいは水酸化ナトリウムで種々の pH に調整し、麹菌の培養を行ない培養 72 時間目で生育度を測定した。その結果を Fig. 6 に示す。麹菌生育の最適 pH は 3.5 ~ 6.0 にある。本麹菌は pH 8.0 以上では生育がみられないが、pH 3.0 付近の酸性側でもかなり生育することができる。

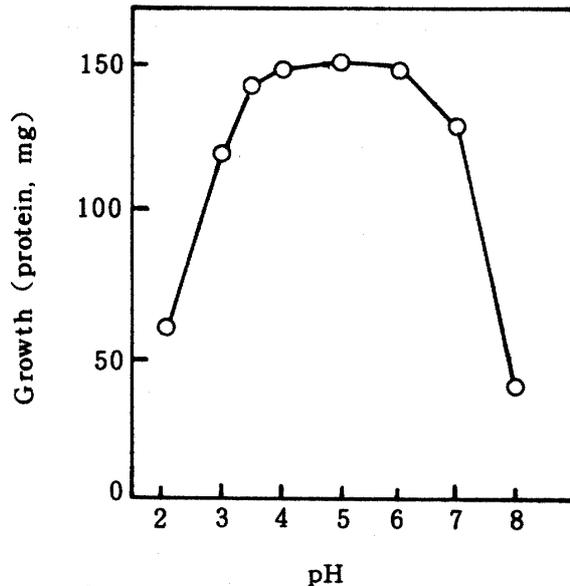


Fig. 6. Effect of pH on the growth of *Asp. awamori*

Asp. awamori was cultured for 72 hr in a medium containing the bagasse treated with 0.5% NaOH solution. Other conditions are the same as Fig. 1.

IV 考 察

天然(無処理)のバガスは微生物による資化分解も受け難く、また微生物起源酵素による分解も受けにくい。バガスを微生物の培養基質として利用するための前処理条件、特にアルカリによるバガスの前処理条件の検討が行なわれつつある^{4,5,7,12,13)}。バガスのアルカリ処理条件は処理バガスの利用目的によって設定される必要があり、本実験では泡盛麹菌の培養基質として利用するに当たっての処理条件の検討を行なった。供試泡盛麹菌はアルカリ抽出液含有バガスを炭素源として良好に生育することができるが、生育度はバガスのアルカリ処理条件によって著しく異なる。バガスを処理するアルカリ溶液の最適濃度および最適処理温度はそれぞれ 0.5% および 120°C である。本処理条件は泡盛麹菌酵素によるバガスの分解においてすでに設定したバガスの最適アルカリ処理条件¹⁶⁾と一致している。

供試泡盛麹菌がアルカリ抽出液含有バガス培地で最もよく生育していることは、バガスのアルカリ抽出液とともにアルカリ処理バガスが炭素源として有効に利用されていることを示している。泡盛麹菌は、アルカリ抽出液含有培地で培養すると培養液中にアルカリ処理バガスを分解する酵素を生産することがすでに明らかになっている¹⁶⁾。従って、麹菌は炭素源として利用され易いバガスのアルカリ抽出液の成分を基質として生育し、生育に伴って生産される酵素によってアルカリ処理バガスが分解され、その分

解産物が麹菌の基質として利用されるものと考えられる。アルカリ処理バガスを基質とした培地で麹菌の生育が極めて悪いのは、培養液中に酵素が生産されずアルカリ処理バガスの分解が進行しないためであろう。アルカリ抽出液含有バガスが麹菌の良好な炭素源となることが明らかになったのであるが、アルカリ抽出液および固形のアルカリ処理バガスが麹菌によって資化分解される程度については明らかでないので今後検討を要する。

供試泡盛麹菌はpH3付近の酸性側でも顕著な生育を示しており、酸性側で培養を行えば培養過程での細菌汚染が少ない利点を有している。本麹菌は伝統的に泡盛の製造に際し開放培養が行なわれており、バガスを基質とした培養における開放培養の可能性についても今後検討したい。

V 要 約

甘蔗バガスを唯一炭素源とした無機塩培地で泡盛麹菌を培養するにあたってのバガスの前処理条件ならびに培養条件について検討し、次の結果を得た。

バガスはアルカリ処理することによって泡盛麹菌の基質となり、本菌はアルカリ抽出液含有バガス培地で良好な生育を示した。最も良好な基質となったのは0.5%水酸化ナトリウム溶液を用いて120°Cで20分間処理したバガスであった。バガスの粉碎画分による生育度の差はほとんどみられなかった。窒素源としては硫酸アンモニウムが適当で、その最適濃度は0.3%であった。供試麹菌はpH 3.5～6.0の範囲で良好な生育を示した。

本研究の概要は、昭和51年度日本醸酵工学会大会(大阪)で講演発表した。

なお、本研究の費用の一部は、昭和51年度文部省科学研究費補助金(特定研究「微生物による環境浄化」)によったもので謝意を表します。

参 考 文 献

1. Cysewski, G. R. and Wilke, C. R. 1976 Utilization of cellulosic materials through enzymatic hydrolysis. I. Fermentation of hydrolysate to ethanol and single cell protein, *Biotechnol. Bioeng.*, **18**:1297～1313
2. Crawford, D. L., McCoy, E., Harkin, J. M. and Jones, P. 1973 Production of Microbial protein from waste cellulose by *Thermomonospora fusca*, a thermophilic actinomycete, *Biotechnol. Bioeng.*, **15**:833～843
3. 海老根英雄 1977 農産廃棄物資源からSCPの生産とその利用, *食品工業* **20** No 10 P. 20～27
4. Garcia Martinez, D. W., Ogawa, T., Shinmyo, A. and Enatsu, T. 1974 Hydrolytic degradation of bagasse by enzymes produced by *Penicillium variable*, *J. Ferment. Technol.*, **52**:378～387
5. Han, Y. W. and Callihan, C. D. 1974 Cellulose fermentation: Effect of substrate pretreatment on microbial growth, *Appl. Microbiol.*, **27**:159～165
6. Han, Y. W. 1975 Microbial fermentation of rice straw: Nutritive composition and *in vitro* digestibility of the fermentation product, *Appl. Microbiol.*, **29**:510～514
7. Han, Y. W. and Srinivasan, V. R. 1968 Isolation and characterization of a

- cellulose utilizing bacteria, *Appl. Microbiol.*, **16**:1140~1145
8. 袁田泰治 1976 SCP(微生物蛋白)開発の現状と問題点, *農化* **50** P. R 105~R 114
 9. Moo-Young, M., Chahal, D. S., Swan, J. E., and Robinson, C. W. 1977 SCP production by *Chaetomium cellulolyticum*, a new thermotolerant cellulolytic fungus, *Biotechnol. Bioeng.*, **19**:527~538
 10. Nagy, G., Vaillant, M., Bálint, K. and Sos, A. 1975 Fermentation of agricultural wastes by yeast, *Biotechnol. Bioeng.*, **17**:1823~1826
 11. Peiterson, N. 1977 Continuous cultivation of *Trichoderma viride* on cellulose, *Biotechnol. Bioeng.*, **19**:337~348
 12. Toyama, N. and Ogawa, K. 1972 Utilization of cellulosic wastes by *Trichoderma viride*, *Proc. IV IFS ; Fermentation Technology Today*, P. 743~757
 13. Toyama, N. and Ogawa, K. 1972 Sugar production from agricultural woody wastes by saccharification with *Trichoderma viride* cellulase, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No 5, 225~244
 14. 当山清善, 保井美恵子 1969 甘蔗バガスの利用に関する研究, 第1報 甘蔗バガスの微生物による分解について, *琉大農学報*, **16**: 147~155
 15. 当山清善, 宮里興信, 金城均 1972 甘蔗バガスの利用に関する研究, 第2報 バガス分解カビの分離ならびに酵素的性質, *琉大農学報*, **19**: 279~290
 16. 当山清善, 与那覇和雄, 池間洋一郎, 上原初枝 1976 泡盛麹菌のバガス分解酵素について, *琉大農学報*, **23**: 195~203

Summary

This paper reports the cultivation of *Aspergillus awamori* with a mineral medium containing sugacane bagasse as a sole carbon source. The results obtained were as follow:

The effect of alkali treatment of bagasse on the growth of *Asp. awamori* and culture conditions were investigated. The alkali treatment markedly stimulated the growth of the strain. The strain grew well in a liquid medium containing alkali-treated bagasse and alkali-extract of bagasse as the sole carbon source. The maximal growth was obtained when the bagasse was treated with 0.5% NaOH solution at 120°C for 20 min. When the strain was cultured on the bagasse having various particle sizes, little difference in the growth was observed. Ammonium sulfate (0.3%) was the most effective nitrogen sources. The strain grew most favorably at the range of pH 3.5 to 6.0.