



Process intensification in α -amylase production with *Aspergillus oryzae* : focusing on mixing enhancement

Ghobadi, Narges

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2017-03-25

(Date of Publication)

2018-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6929号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006929>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



Draft of Dissertation Abstract

Name: Narges GHOBADI

Department: Chemical Science and Engineering

Dissertation Title

Process intensification in α -amylase production with *Aspergillus oryzae*: focusing on mixing enhancement

(混合促進に着目した麹菌*Aspergillus oryzae*を用いた α -アミラーゼ生産のプロセス強化に関する研究)

Academic Supervisor: Professor Naoto OHMURA

Process intensification in α -amylase production with *Aspergillus oryzae*: focusing on mixing enhancement

Abstract

The strain of *Aspergillus oryza* is eukaryotes, having considerably more genes than bacteria. Advantage of *A.oryzae* was that it could be genetically manipulated and is suitable fungi for production of large amount of heterologous proteins. Large fungal surface area of *A.oryzae* acts like an adsorption layer of extra-polysaccharide matrix, protecting them from inhibitory compounds. *A.oryzae* has high thermal stability and heat sense and is a good fungi for extracellular enzyme production in batch fermentation.

Industrial bioprocess with filamentous fungi includes the production of a main products in the sense of quality as well as the diversity of metabolites. The development of bioreactor is an essential factor to provide optimum production condition. To reach this aim, finding an appropriate flow pattern of mixing to intensify the mixing in fermenters and produce greater turbulence with reduced shear stress could be an effective solution. Due to this reason the purpose of this thesis is investigating on characterizations of new agitators for application to the stirred fermentation systems. The main idea behind this work is to study the feasibility of using the efficient mixing state in stirred tank bioreactor for process intensification of stirred batch- submerged fermentation of *A.oryzae* to increase the activity of alpha amylase. Finally, it could be concluded that which agitator would be efficient for mixing the non-Newtonian and complex bio-fluid and show better adoption with biological culture containing fungal cells.

In this research, the complete mixed fermented system is defined as a uniform distribution of the nutrients and oxygen which will be led to the efficient mass transfer and achieving in high quality and quantity of production. One of the challenges in this project is finding a complete mixing condition with low shear rate and low power consumption, also sometimes it is impossible to reduce mixing times by raising the power input into the stirrer. Besides, mycelial damage at high stirrer speeds or power inputs can limit the capability and volumetric productivity of fermenter. Additional obstacles that were existed during the submerged fermentation of fungal cells and seems to be over come by mixing improvement were as follows;

(a) Inability to find a clear knowledge on the viscosity change and rheological behavior of fermentation culture by growing the microorganism (time-dependent and complex rheology) (b) Mechanical stress prediction and calculation during fermentation to control the shear damage to the cells when using conventional impellers (because there are two main stress sources in aerated fermentation; aeration stress and mechanical impeller stress. Therefore get a knowledge about the most effective stress source in each hydrodynamic condition is difficult. The existence of several phases in the system elevates the difficulty of the simulations, also there is various phenomena in terms of phase interaction that can be difficult to consider in the simulations.

(c) oxygen transfer is a limiting factor in an aerobic fermentation, because extended and branched fungi inhibit the nutrient transfer to the cell and were resulted in low cell growth. Most of the common agitators disperse the oxygen locally and it leads to local cell growth. Using some other agitators the aeration stress was increased during breaking the bubbles.

(d) control the morphology of fungi to reach optimal productivity; *A. oryzae* are morphologically complex and differ structure in different time of life cycle.

Therefore, controlling the morphology during the fermentation is difficult.

According to above problems, enhancing the mixing in a bioreactor is more required than constructing a new bioreactor. Because, construction of a new fermenter will cost more and is not as fast as the modification in a stirred fermenter. Modifying the hydrodynamic and mixing condition of a stirred fermenter might be an economically main point to reach an improved mixing.

The aim in this thesis is to investigate, the effect of mixing (environmental change in hydrodynamic of fungal cells) on the fermentation of *A. oryzae* to overcome to the some of the mentioned obstacles during using the STBR as a fermenter. The work was undertaken in 8 chapters. In chapter one a brief review was done on the *A. oryzae* and application of stirred bioreactors in submerged fermentation. Chapter two was contained all materials, techniques and analytical methods were used for fermentation of *A. oryzae* and investigating the mixing characterization of different kind of agitators. In chapter three effect of different hydrodynamic conditions in stirred fermenter on shear rate and shear stress formation was studied. In chapter four, effect of mixing flow pattern on mass transfer during fungal fermentation has been investigated. Based on the results of shear rate, shear stress and mass transfer, macro- and micro morphology of *A. oryzae* was studied in chapter five. Regarding to the strong interaction between morphology and rheology in stirred submerged fermentation, effect of mixing condition and morphology on the rheology of fermentation fluid was investigated in chapter six. From the combination results of the last six chapters, in chapter seven, there are some suggestions for improving the mixing during the large scale fermentation of *A. oryzae* in stirred fermenter.

Finally, in chapter 8, important conclusions have been written. Results indicate that using flexible-shaft mixer could improve the most important parameters for fermentation intensification such as; controlling the environmental stress, decreasing the culture viscosity by controlling the cell morphology, and also waste biomass reduction. Because, improving

most of these factors are considered as a representative of process intensification in submerged fermentation.

氏名	Narges Ghobadi		
論文 題目	Process Intensification in α -amylase production with <i>Aspergillus oryzae</i> : focusing on mixing enhancement (混合促進に着目した麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> を用いた α -アミラーゼ生産のプロセス強化に関する研究)		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	大村 直人
	副 査	教授	荻野 千秋
	副 査	教授	山地 秀樹
	副 査	教授	今石 浩正
	副 査		印
要 旨			
<p><i>Aspergillus oryzae</i> (ニホンコウジカビ) は、麹または麹菌と呼ばれており、デンプン分解能力やタンパク質の分解能力に優れているため、醤油や味噌、醸造酒など様々なものを作るために利用される。また、<i>Aspergillus oryzae</i> は、デンプンやタンパク質の分解だけでなく、様々な代謝産物の生成も行うことができ、抗生物質やビタミン類などの有用物質の生成にも利用されている。このような背景から、本論文では、麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> の α-アミラーゼ生産のための培養プロセスに着目し、攪拌槽を用いた液中発酵プロセスにおいて、攪拌混合が発酵（培養）特性と α-アミラーゼ生産特性に及ぼす影響を詳細に調べ、混合促進の観点からみたプロセス強化法について論じている。</p> <p>第1章では、<i>Aspergillus oryzae</i> と α-アミラーゼ生産特性に関する解説を行った後、現行の攪拌槽を用いた液中発酵プロセスによる酵素生産における問題点を提示している。その上で、提示した問題点を克服する課題を挙げ、この課題解決のための本論文の位置づけと目的を述べている。</p> <p>第2章では、実験手法と解析手法を述べている。実験手法では、菌体の調整、攪拌槽や攪拌翼などの装置形状、液中発酵条件、発酵特性評価法について述べている。また、攪拌混合性能評価法についても詳細に述べている。また、攪拌混合性能評価においては、数値流体解析(CFD)も行っており、数値解析手法についても述べている。</p> <p>第3章では、攪拌翼によるせん断速度とせん断応力に着目して、発酵特性を調べている。使用した攪拌翼は、2段小型ディスクタービン翼、大型1枚翼 (Maxblend 翼)、大型2枚翼 (Fullzone 翼)、非回転旋回攪拌翼 (Swingstir 翼) の4種類の攪拌翼を用いている。その結果、大型2枚翼は局所速度せん断速度が、2段小型ディスクタービン翼、大型1枚翼に比べて低いことを明らかにしている。また、非回転旋回攪拌翼では、速度分布が槽内で均一であり、せん断速度分布も小さいことを明らかにしている。攪拌動力の観点から、せん断応力を評価した結果、非回転旋回攪拌翼を用いた場合が、最大せん断応力、平均せん断応力とも最も小さいことを見出し、菌体の損傷の観点からは最も優れた攪拌翼であると結論づけている。</p> <p>第4章では、液中発酵において重要な要因である酸素物質移動に及ぼす攪拌混合の影響について考察している。液中発酵において、菌体濃度が増加するにつれて、培養液は増粘し、さらに非ニュートン性が顕著になり、攪拌による気-液間の酸素物質移動性能が低くなる。このことに着目して、前述の4種類の攪拌翼で調べている。その結果、発酵後期においても、<i>Aspergillus oryzae</i> の培養を制御することで、培養液の粘性を低く保つことで、酸素物質移動性能が維持できることを見出している。特に、非回転旋回攪拌翼を用いた場合は、培養24時間を経過した菌体成長後も物質移動性能が比較的一定に保たれることを明らかにしている。</p> <p>第5章では、攪拌による菌体の形態制御について、菌体の形態と発酵特性とを関連づけながら議論している。最も一般的な攪拌翼である2段小型ディスクタービン翼を用いた場合、酸素物質移動性能が低いため、菌糸が弱く、空胞が多くなり、活性長さも減少することを見出している。さらに、局所的なせん断が強いため、菌体が容易に損傷を受け、菌体の成長と酵素発酵性能が阻害されることを明らかにしている。また、大型1枚翼では、攪拌動力に菌体の形態が大きく依存していることを見出し、これは大型1枚翼が攪拌動力の増加に伴い、平均せん断速度が大きくなるためと考察している。一方、大型2枚翼や非回転旋回攪拌翼では、均一なせん断速度分布や高い物質移動性能により、高酵素活性を得るために適した攪拌翼</p>			

氏名	Narges Ghobadi
<p>であることを明らかにしている。特に、低動力条件下で非回転回攪拌翼を用いた場合は、省エネルギーかつ菌体の形態にも良い効果を与えると結論づけている。</p> <p>第6章では、攪拌槽内の流動パターンが複雑な発酵液のレオロジーに及ぼす影響について調べている。ここでは、混合を強化することで、粘度や非ニュートン性などのレオロジー特性が制御できるかを検討している。発酵液のレオロジー特性が指数モデルで表現できることから、このモデルの中の粘度の大きさを示すパラメータ K_{app} とせん断速度の依存性を示すパラメータ n_{app} の二つのパラメータを評価指標として議論している。その結果、2 段小型ディスクタービン翼では、発酵中の発酵液の粘度変動が激しく、このことが、局所的な物質移動や菌体成長をもたらし、槽内のよどみ領域の生成を助長し、結果として酵素活性の低下につながることを見出している。また、大型1 枚翼では、発酵中の発酵液の粘度変化は小さいものの、高粘度になることを見出している。一方、大型2 枚翼は、粘度は小さく保てるものの、レオロジーを制御することが難しいことを明らかにしている。これら3 種類の攪拌翼と比較して、非回転回攪拌翼では、粘度も低く保て、レオロジーが時間的に変化するチクソ性も低く保たれることから、非回転回翼の流動パターンが最も良好なレオロジー特性を与えることを見出している。</p> <p>第7章では、実生産のためのスケールアップ手法を攪拌混合の観点から議論している。この章では、発酵プロセスを、種培養する準備フェーズ、菌体を成長させ生産物を得る実行フェーズ、分離精製を行う終了フェーズの3つのフェーズに分けて、それぞれのフェーズに適合する攪拌翼について考察している。その結果、これまでに得られた4つの攪拌翼の性能評価から、準備と実行の二つのフェーズでは、大型2 枚翼と非回転回翼が実生産においては適しており、終了フェーズにおいては、非回転回翼と大型1 枚翼が適していると結論づけている。</p> <p>第8章では、各章で得られた結果をまとめ、将来の研究課題について述べることで、本論文のまとめとしている。</p> <p>以上、本論文は麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> の α-アミラーゼ生産のための培養プロセスに着目し、攪拌槽を用いた液中発酵プロセスにおいて、攪拌混合が培養特性と α-アミラーゼ生産特性に及ぼす影響を詳細に調べ、混合促進の観点からみたプロセス強化法について論じたものである。本発酵プロセスを、生物工学的なアプローチのみならず、流体力学、物質移動論、レオロジー論など様々な観点から考察を進め、今後の液中発酵プロセス設計の指針となるべき知見を得ていることから、本論文は工学的価値が高いものである。よって、提出された論文は工学研究科学学位論文評価基準を満たしており、学位申請者の Narges Ghobadi は、博士（工学）の学位を得る資格があると認める。</p>	