

ポーラス水酸アパタイトの機能性に関する研究

— 紅麴菌の固定化に関する研究 —

窯業室 花城可英・照屋善義

1. 緒言

近年微生物あるいは酵素を固定化し生体触媒として用いたバイオリアクターの研究^{1)・2)}が盛んに行われるようになった。

バイオリアクターは微生物等を固定化することにより、バッチプロセスを連続プロセスに変えることができ、生成物と微生物等の分離が簡単である等の利点がある。固定化の方法には担体結合法、包括法、架橋法があり、このうち担体結合法に用いられる固定化担体には種々の天然高分子、合成高分子、ガラスやセラミックスが使用されている。このうちセラミックス担体は耐熱性、耐久性が高く、腐食に強い、再生可能であるなど種々な特徴を持っている³⁾。

本研究はこれまでの研究で得られたポーラス水酸アパタイトを紅麴菌担体として利用し、紅麴菌の大量生産技術を確立することを目的としている。これまでに行った乾式法によるポーラス水酸アパタイトの合成³⁾の他、水酸アパタイト粉体に有機物を加え鑄込成形したのち、焼成することも行った。

今回これらポーラス水酸アパタイトの成形方法と成形体の物性及びポーラス水酸アパタイト担体に紅麴菌を固定化した時の菌体量について検討したので報告する。なお本研究はトロピカルテクノセンターからの受託研究として行ったものである。

2. 実験方法

2. 1 ポーラス水酸アパタイトの成形方法

(1) 造粒成形法

前報³⁾で用いたコーラル等石灰石と $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を Ca/Pモル比1.89となるように配合し、原料粉体とした。これを皿型造粒機を使用して、造粒成形し、乾式法によりアパタイト造粒成形体を合成した。

(2) 鑄込成形法

本部石灰岩と $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を原料として乾式法により水酸アパタイトを合成した。これをアルミナ製ポットミルで粉碎し、鑄込用粉体とした。鑄込用粉体に粉末ろ紙(100~200メッシュ)、あるいは425 μm 以下のバガスを加えた後、10%セルナD-305(中京油脂製)水溶液⁴⁾を加え泥漿とし、石膏型を用い6mm ϕ ×60mmの円柱状に鑄込成形した。

焼成は300 $^{\circ}\text{C}$ ~400 $^{\circ}\text{C}$ において1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温した以外は、5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温した。途中500 $^{\circ}\text{C}$ において1時間保持し、さらに1100 $^{\circ}\text{C}$ まで昇温し、1時間保持することによりアパタイト鑄込成形体を得た。

2. 2 成形体の物性

(1) 見掛気孔率、かさ比重

水置換法により、アパタイト造粒成形体、アパタイト鑄込成形体の見掛気孔率、かさ比重を求めた。

(2) 細孔分布

アパタイト造粒成形体、アパタイト鑄込成形体の細孔分布を島津製作所製水銀圧入式細孔分布測定装置ポアサイザー9310により測定した。

2. 3 紅麹菌の固定化試験

アパタイト担体(5~6g)を300ml三角フラスコに入れ160℃で一晩乾熱滅菌した。この担体に超音波粉碎し生理食塩水で薄めた紅麹菌(沖工試保存菌株8004株)を2ml滴下した。培地を50ml加え、30℃で静置培養し、6日後担体を取り出した。なお固定化菌体量は80℃乾燥後の重量と650℃加熱後の減量より求めた。

使用した培地の組成⁹⁾は次のとおりである。

- グルコース 5%、ポリペプトン 1%、硫酸マグネシウム7水和物 0.05%
- リン酸水素2カリウム 0.1%、L-アスパラギン酸 0.2%

3. 結果及び考察

3. 1 ポーラス水酸アパタイトの成形法

(1) アパタイト造粒成形体とその物性

Ca源としてコーラル(A)、ハマサンゴ(B)、海砂(C)、本部石灰岩(D)を用いた。

原料粉体はメタノール単独でも造粒可能であったが、造粒物が取扱にくいメタノールに増粘剤としてエチレングリコールを加えた。造粒機の回転数を35rpm、傾斜角度45°~50°で原料粉体に対し47%前後のメタノール+エチレングリコール溶液(3倍希釈)を加えることにより造粒可能であった。造粒後前報⁹⁾に従いポーラス水酸アパタイトを合成し、アパタイト造粒成形体とした。

得られたアパタイト造粒成形体の物性を表1に示す。また図1から図4に細孔分布を示す。

表1 アパタイト造粒成形体の物性

試料名	Ca源	見掛気孔率	かさ比重	メディアン径	全細孔容積
Z-A	コーラル	65.3%	0.96	2.0μm	0.60cc/g
Z-B	ハマサンゴ	72.2%	0.70	3.8μm	1.04cc/g
Z-C	海砂	71.3%	0.71	12.2μm	1.05cc/g
Z-D	本部石灰岩	74.4%	0.67	6.9μm	1.03cc/g

得られたアパタイト造粒成形体は見掛気孔率65.3%~74.4%、かさ比重0.97~0.67であり、前報⁹⁾のプレス成形体より多孔質である。この結果の違いは原料粉体の成形密度と造粒成形時に加えたエタノール+エチレングリコールの影響によるものと考えられる。

全細孔容積はプレス成形体と比較して大きい値を示し、Z-A(Ca源:コーラル)が0.6cc/g、Z-B(Ca源:ハマサンゴ)、Z-C(Ca源:海砂)、Z-D(Ca源:本部石灰岩)が1.0cc/gとなつて

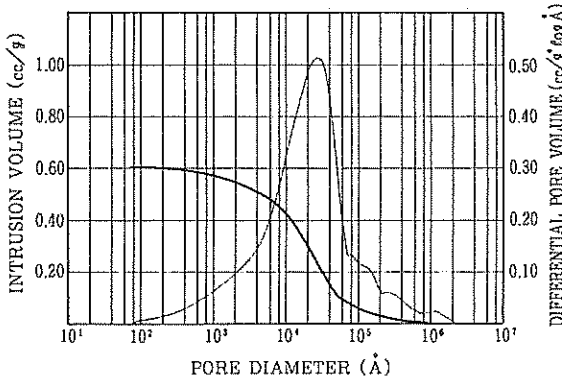


図1 Z-Aの細孔分布図

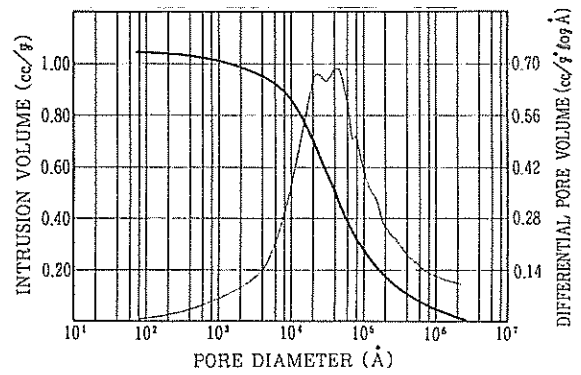


図2 Z-Bの細孔分布図

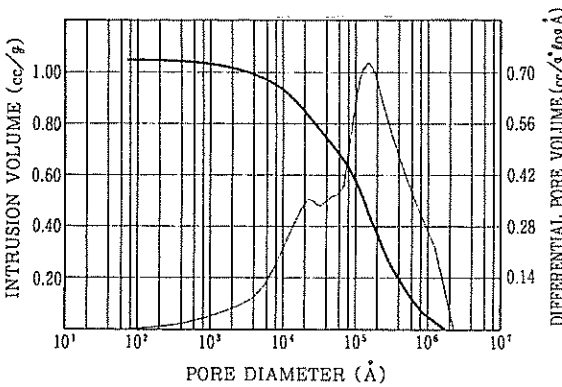


図3 Z-Cの細孔分布図

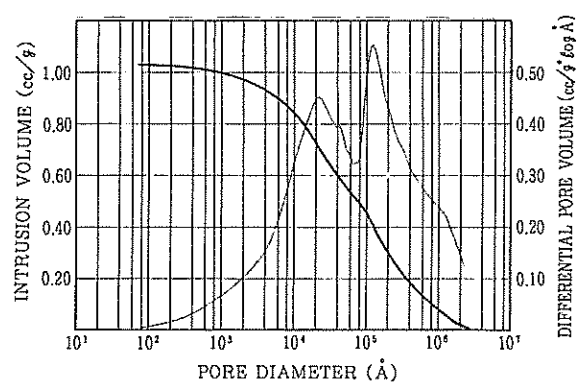


図4 Z-Dの細孔分布図

いる。

細孔分布はプレス成形体より $10\mu\text{m}$ 以上の細孔が多く、成形密度の影響が現れている。Z-C及びZ-Dは $10\mu\text{m}$ と $2\mu\text{m}$ 付近に極大値を持つ細孔分布を示し、Z-A及びZ-Bは $4\mu\text{m}$ 付近に極大値を持つ細孔分布を示している。

(2) アパタイト鑄込成形体とその物性

乾式合成した水酸アパタイト粉体に10%セルナD-305水溶液を加えることにより良好な鑄込泥漿となり、鑄込成形が可能であった。

本実験では16時間粉碎物に対して10%セルナD-305を35%添加して鑄込成形した。なお、細孔形成材として水酸アパタイト粉体に対し粉末ろ紙を5%、10%、バガスを1%、2%、3%加え、 1100°C で焼成し、アパタイト鑄込成形体を得た。

アパタイト鑄込成形体の物性を表2に示す。またその細孔分布を図5と図6に示す。

アパタイト鑄込成形体の見掛気孔率は46.7%~52.8%、かさ比重は1.47~1.68である。粉末ろ紙、バガスを添加していくと見掛気孔率、全細孔容積が増加し、かさ比重が低下している。しかし有機物の添加量が最も多いI-R10(粉末ろ紙10%添加鑄込成形体)においても見掛気孔率52.8%、かさ比重1.47と造粒成形体と比較して見掛気孔率は小さく、かさ比重は大きくなっている。全細孔容積も $0.28\text{cc/g} \sim 0.36\text{cc/g}$ と造粒成形体より小さい。

表2 アバタイト鑄込成形体の物性

試料名	添加物	添加量	見掛気孔率	かさ比重	メディアン径	全細孔容積
I-R5	粉末ろ紙	5%	49.3%	1.58	0.49 μm	0.32cc/g
I-R10	粉末ろ紙	10%	52.8%	1.47	0.64 μm	0.36cc/g
I-B1	バガス	1%	46.7%	1.68	0.38 μm	0.28cc/g
I-B2	バガス	2%	48.4%	1.62	0.43 μm	0.30cc/g
I-B3	バガス	3%	50.9%	1.54	0.54 μm	0.32cc/g

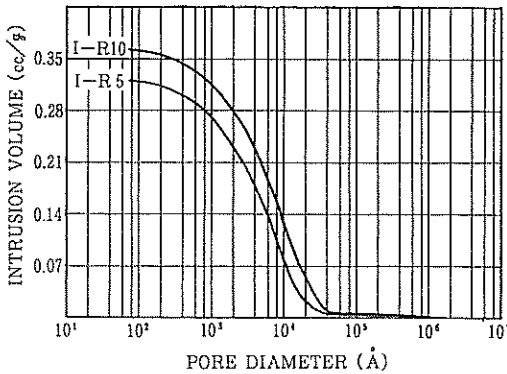


図5 粉末ろ紙添加鑄込成形体の細孔分布図

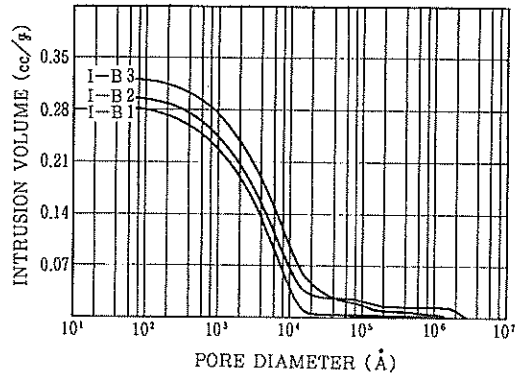


図6 バガス添加鑄込成形体の細孔分布図

メディアン径は0.38 μm ~0.64 μm の範囲にあり、有機物の添加量と共に大きくなっている。顕微鏡観察では100 μm 程度の比較的大きい細孔も見られることから、細孔がボトルネックの形状であると考えられる。細孔分布図から粉末ろ紙を添加していくと数 μm 、バガスを添加していくと10 μm の細孔が増加しているのがわかる。

3. 2 紅麹菌の固定化試験

固定化試験には2 mm~4.76 mmの造粒成形体、6 mm ϕ \times 10 mmの鑄込成形体を供した。

振盪培養では担体同士が衝撃破砕により、固定化が困難であったため静置培養を行った。

担体の物性と静置培養における6日後の固定化菌体量を表3に示す。また培養後取り出した担体の写真を写真1、写真2に示す。

静置培養において菌体は培地表面上に広がり主に担体の上半分に固定化されている。空気を吹き込むか、あるいは緩やかに攪拌する方法により担体全面に固定化する必要があった。

造粒担体の固定化菌体量は見掛気孔率、全細孔容積の小さいZ-Aを除くと約120 mg/g とほぼ同じ値となっており、固定化菌体量はメディアン径の影響をあまり受けていないと考えられる。

鑄込成形担体は見掛気孔率、全細孔容積が造粒担体より小さいうえ、固定化された菌体のはがれ易く、写真2に見られるように取り出す段階で剥がれている菌体がかかり認められる。このため鑄込成形担体の固定化量は18 mg/g~41 mg/gと造粒担体に比較して低い値を示した。菌体のはがれ易いのは見掛気孔率あるいはメディアン径の影響と考えられるので、今後鑄込成形における細孔制御の方法や担体の形状を検討する必要がある。

表3 担体の物性と菌体量

	担体名	固定化菌体量 1g当り(1cm ³ 当り)	見掛気孔率	かさ比重	メディア径	全細孔容積
造粒担体	Z-A (Ca源: コーラル)	82mg/g (78mg/cm ³)	65.3%	0.96	2.0 μm	0.60cc/g
	Z-B (Ca源: ハマサンゴ)	121mg/g (84mg/cm ³)	72.2%	0.70	3.8 μm	1.04cc/g
	Z-C (Ca源: 海砂)	117mg/g (83mg/cm ³)	71.3%	0.71	12.2 μm	1.05cc/g
	Z-D (Ca源: 本部石灰岩)	117mg/g (78mg/cm ³)	74.4%	0.67	6.9 μm	1.03cc/g
鑄込担体	I-R 5 (ろ紙5%添加)	18mg/g (27mg/cm ³)	49.3%	1.58	0.49 μm	0.32cc/g
	I-R10 (ろ紙10%添加)	40mg/g (59mg/cm ³)	52.8%	1.47	0.64 μm	0.36cc/g
	I-B 1 (バガス1%添加)	41mg/g (69mg/cm ³)	46.7%	1.68	0.38 μm	0.28cc/g
	I-B 2 (バガス2%添加)	33mg/g (53mg/cm ³)	48.4%	1.62	0.43 μm	0.30cc/g
	I-B 3 (バガス3%添加)	31mg/g (47mg/cm ³)	50.9%	1.54	0.54 μm	0.32cc/g

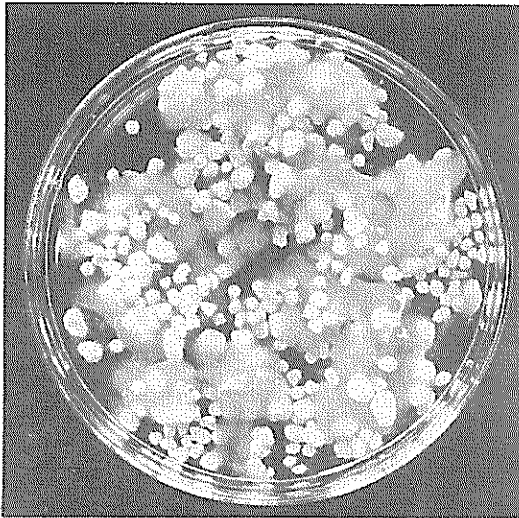


写真1 Z-Bの培養後写真

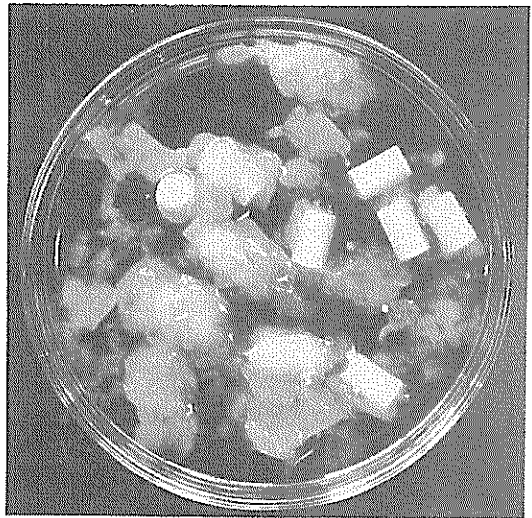


写真2 I-R10の培養後写真

4. まとめ

ポーラス水酸アパタイトを紅麹菌担体として利用するため、担体の成形方法と固定化について検討し以下の結果を得た。

- 1) 石灰石等と $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を配合し皿型造粒機を用い、皿の回転数35rpm、傾斜角度 $45^\circ \sim 50^\circ$ 、メタノール+エチレングリコール(3倍希釈)を47%加えることにより造粒成形が可能であった。
- 2) アパタイト造粒成形体は見掛気孔率65.3%~74.4%、かさ比重0.67~0.96と多孔質であり、全細孔容積は0.60cc/g~1.05cc/gと大きい値を示した。
- 3) 乾式合成したアパタイト粉体を16時間ポットミル粉砕し、10%セルナD-305水溶液を粉体に対し35%加えることにより鑄込成形が可能であった。

- 4) アパタイト鑄込成形体は粉末ろ紙及びバガスの添加量増加により見掛気孔率、全細孔容積が増加し、かさ比重も低下するが、造粒成形体に比較して多孔質とはならない。
- 5) 紅麹菌の静置培養においてアパタイト造粒担体の固定化菌体量はZ-Aを除くと約120mg/gであり、固定化菌体量は造粒担体のメディア径の影響を受けない。
- 6) アパタイト鑄込担体は菌体をはがれ易く造粒成形担体に比較して固定化菌体量が少なくなっている。今後細孔制御方法及び担体の形状について検討する必要がある。

参考文献

- 1) 近藤正夫 鈴木康之 加藤熙 発酵工学 66 5 P393 1988 等
- 2) 堀津浩章 セラミックス 24 No.7 P628 1989
- 3) 花城可英 照屋善義 沖縄県工業試験場業務報告 第17号 P37 1989
- 4) 鳥山素弘 川村資三 窯業協会誌 95 [7] P741 1987
- 5) 田村博三 照屋比呂子 沖縄県工業試験場研究報告 第20号 P97 1992

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。