HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	表面培養法によるクエン酸生成の速度について
Author(s)	桜井, 明彦; 今井, 弘; 江尻, 哲男
Citation	北海道大學工學部研究報告, 154, 43-52
Issue Date	1991-01-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/42274
Type	departmental bulletin paper
File Information	154_43-52.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北海道大学工学部研究報告
第154号（平成3年）

Bulletin of the Faculty of Engineering,
Hokkaido University, No. 154 (1991)

表面培養法によるクエン酸生成の速度について

桜井　明彦　　今井　弘　　江尻　哲男

平成2年10月24日受理

Rate Expression of Citric Acid Formation by *Asp. Niger* -Surface Culture-

Akihiko SAKURAI, Hiroshi IMAI and Tetsuo EJIRI

(Received October 24 1990)

Abstract

The citric acid formation rate expressions were compared between the Luedeking-Piret type and the Contois type in the case of surface culture using *Aspergillus niger* Yang No. 2. The batch cultivation time course was simulated rather well by the Luedeking-Piret type equation. The critical biofilm surface density below which the equation was applicable was experimentally determined to be 40 mg/cm^2.

The biofilm at the interface between the liquid and air enhanced the oxygen transfer from the air to the liquid.

1．はじめに

クエン酸発酵は好気性の発酵であるために，大量の酸素を必要とする。このため，従来から行なわれている深部培養法では培地中に通気を行なっているが，培地中の基質，あるいは有機酸のような発酵の生成物のために発泡現象を伴い易く，これが問題となることがある。表面培養法では培地の液面に微生物膜が形成し，微生物が気相に接しているため，培地中に通気を行なう必要が無い。また，培地中に微生物が分散していないため，培地の攪拌を必要としない。これらの点を考慮すると表面培養法は攪拌動力，通気動力の面で通常の深部培養法に比べて経済的である。さらに，深部培養法に比べて有利な点としては微生物膜が液面に存在し，培地中に分散しないことから菌体と生成物の分離が容易なことである。

Aspergillus niger によるクエン酸発酵に関しては多くの報告[1,4-15]が行なわれているが，それらの多くは深部培養法を用いて，培地中の成分の影響について報告している[4-12]。クエン酸生成に与える操作条件についての検討を行なった報告[10-15]もあるが，それらの多くは深部培養法に関する報告[13-15]であり，表面培養法に関する報告は少ない。

ここでは，表面培養法での *Aspergillus niger* によるクエン酸生成を取り上げ，操作設計に必要なクエン酸生成の速度式を得ることを目的とした。

合成化学工学科　化学工業装置講座

2．実験装置及び方法

クエン酸生成菌として，*Aspergillus niger* Yang No. 2[1] を用いた。胞子は試験管内の寒天斜面培地で10℃で保存し，培養には28℃で7～15日間程度，寒天斜面培地で前培養を行なってから用いた。

培養は内径8.4cm，高さ13.5cm，口径4.5cmの広口瓶を用いて行なった。広口瓶の上部に綿栓をし，通気はこの綿栓からの自然通気のみとした。培養は広口瓶の中に表1に示した培地を入れ，上部の口に綿栓をして，120℃で15分間オートクレーブする事により滅菌してから行なった。

表1 培 地 組 成

nutrients	concentration [g/l]
Sucrose	140
KH_2PO_4	10
NH_4NO_3	2.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.014
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.021

培地体積を150～400mlの範囲で培養を行なった。培地の初期pHは4.15とし培養途中のpHのコントロールは行なわなかった。寒天斜面培地上で前培養を行ない，胞子が十分に着成したものに液体培地を加え振動させることにより胞子懸濁液を作成した。培養はこの胞子懸濁液を培養瓶内に移植することにより開始した。培養開始時の胞子濃度は約1×10^{10}[spore/l]程度とした。培養温度は30±1℃とし，培地の攪拌はマグネチックスターラーにより，3日毎に2分間行なった。

全酸度，クエン酸濃度，糖濃度，窒素濃度の分析は，3日毎に培地をサンプリングし，ろ過した後に分析した。全酸度はフェノールフタレインを指示薬とし，0.1N NaOH水溶液で適定する事により求めた。クエン酸は全酸度とクエン酸濃度の相関式から求めた。クエン酸は相関式作成に当たり，高速液体クロマトグラフィ(カラム Yanaco SAX-801)を用い，吸光度により求めた。ショ糖，還元糖に関してはサンプルをTMS (trimethylsilylation) 化処理した後，FIDガスクロマトグラフィ (Shimadzu GC-6APF カラム OV-17 3%) により測定した。窒素濃度（アンモニア態窒素，硝酸態窒素）に関しては，形態別窒素分析装置 (Shimadzu Sumigraph GCT-13N) により測定した。微生物濃度に関しては，遠心分離(10,000rpm)により微生物と培地を分離した後，40mlの脱イオン水により3度洗浄し，その後105℃で24時間乾燥させて乾燥微生物濃度として求めた。酸素消費速度に関しては自動ＢＯＤ測定装置[2]により測定した。

3．結果及び考察

3.1 培養の経時変化について

図1に培養の経時変化の例を示した。培養開始2～3日までに培地液面に白色の菌体膜が形成する。その後増殖を続け，膜上面に黒い胞子が着成する。この期間には活発な増殖が起こる。クエン酸濃度に関しては，急激な増殖が終わる培養9日目程度から活発にクエン酸を生成し，図1に示したように，ほぼ一定の傾きを示す期間がある。培地中のショ糖は培養9日目までにブドウ糖，果糖に完全に分解される。培地中のショ糖，ブドウ糖，果糖の濃度の和を糖濃度とした。ク

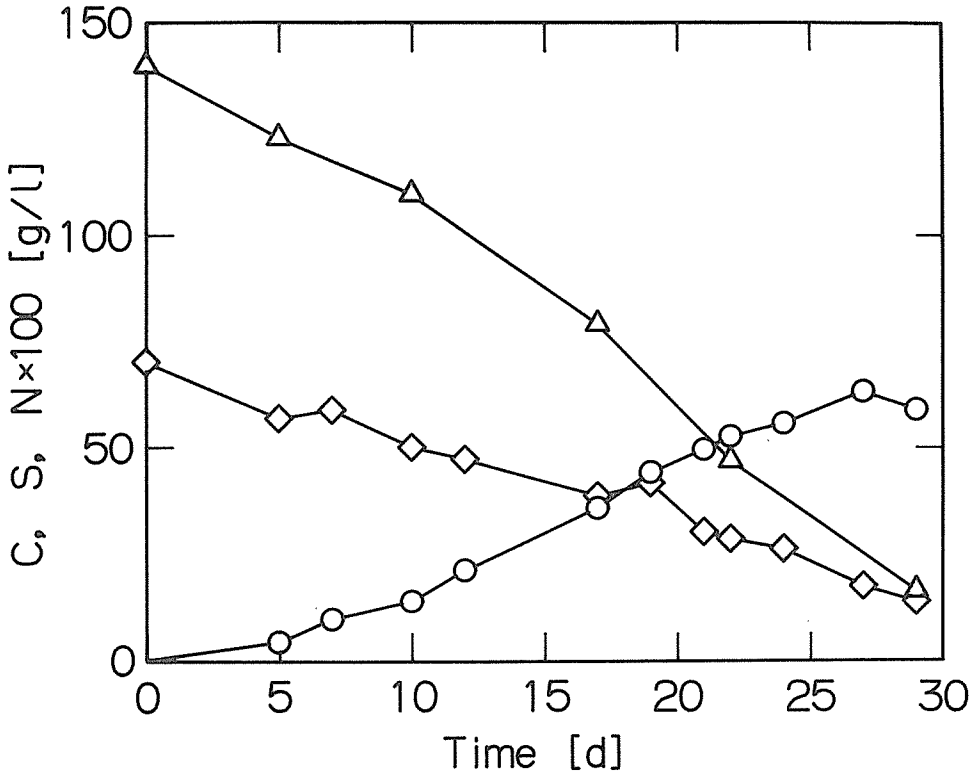

図1　クエン酸濃度，糖濃度，窒素濃度の経時変化。○：クエン酸（C），△：糖（S），◇：窒素濃度（N），培地体積，200ml

エン酸濃度，糖濃度，窒素濃度の経時変化を図1に示した。クエン酸濃度の経時変化を見ると培養5日目まではクエン酸の生成があまり行なわれず，5日目から27日目の間で活発に生産し，クエン酸濃度はほぼ一定の傾きを示し，それ以後クエン酸濃度は減少した。ここで培養5日目までを第1期，5～27日目を第2期，それ以後を第3期と称することにする。糖に関しては第1期で16～36%，第2期で41～74%，第3期で4～26%が消費されることが分かった。

3.2　クエン酸生成速度と微生物膜表面密度

図2に微生物膜表面密度と微生物膜の面積基準のクエン酸生成速度を示した。ここで表面密度とは，培養終了時の微生物膜の乾燥重量を培養瓶の断面積で割った値である。つまり微生物膜の面積は培養瓶の断面積と等しいと仮定している。以後，微生物膜の面積として培養瓶の断面積を用いた。図2の縦軸は微生物膜の面積基準のクエン酸生成速度を表わしている。生成速度は第2期の平均の傾きから計算したものである。微生物膜表面密度が40mg/cm²までは，クエン酸生成速度は表面密度に比例して大きくなるが，これ以上の範囲で一定値を示した。

3.3　クエン酸及び微生物の収率

クエン酸及び微生物膜の全消費糖に対する収率と培地液深の関係を図3に示した。ばらつきはみられるが，この実験範囲では培地液深に依らずほぼ一定値となることが分かる。平均値はクエン酸については43.0%，微生物に関しては6.6%であった。

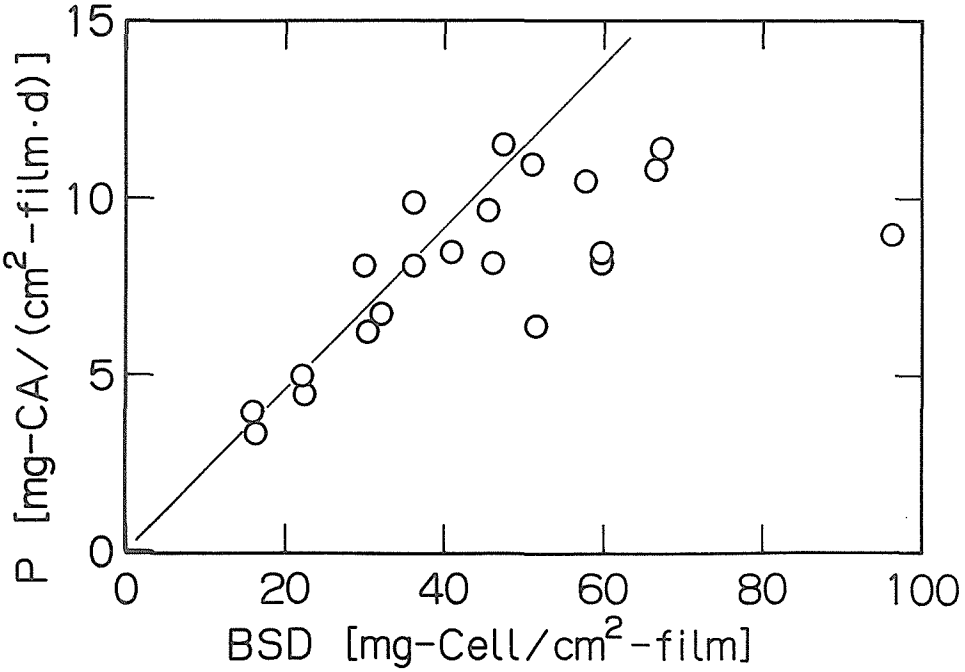

図2　培養終了時の微生物膜表面密度（ＢＳＤ）とクエン酸生成速度（Ｐ）の関係
ＣＡ：クエン酸；実線：式(1)～(3)による計算，諸定数は表2参照。

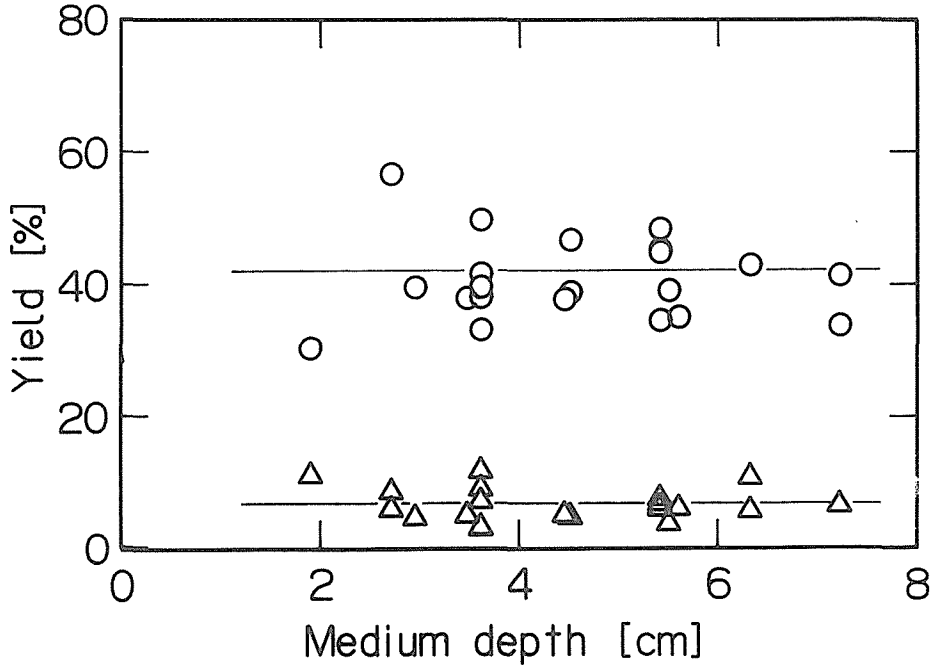

図3　全消費糖に対するクエン酸及び微生物収率
○：クエン酸，△：微生物

3.4　反応速度式の型とシミュレーション

ここでは，Luedeking-Piret 型[16]の式(1)～(3)と Contois 型[17]の式(4)～(6)の当てはめを行ない，適用性を検討した。すなわち，第2期（クエン酸生成速度がほぼ一定値を示す期間）のシミュレーションを行ない速度定数を求め，諸元の経時変化との適合性により，どちらの式が適当か検討した。ここでは完全混合を仮定している。

$$\frac{dX}{dT}=k_1\cdot\frac{S}{K_X+S}\cdot X \tag{1}$$

$$\frac{dC}{dT}=k_2\cdot k_1\frac{S}{K_X+S}\cdot X+k_3\cdot\frac{S}{K_S+S}\cdot X \tag{2}$$

$$\frac{dS}{dT}=-Y_{SX}\cdot\frac{dX}{dT}-Y_{SC}\cdot\frac{dC}{dT} \tag{3}$$

$$\frac{dX}{dT}=k_1\cdot\frac{S/X}{K_{XC}+S/X}\cdot X \tag{4}$$

$$\frac{dC}{dT}=k_2\cdot k_1\frac{S/X}{K_{XC}+S/X}\cdot X+k_3\cdot\frac{S/X}{K_{SC}+S/X}\cdot X \tag{5}$$

$$\frac{dS}{dT}=-Y_{SX}\cdot\frac{dX}{dT}-Y_{SC}\cdot\frac{dC}{dT} \tag{6}$$

S：糖濃度［g/l］　　X：微生物濃度［g/l］
C：クエン酸濃度［g/l］　　T：培養時間［d］
Y_{SX}：菌体増殖に消費された糖に対する菌体収率の逆数［g-sugar/g-cell］
Y_{SC}：クエン酸生成に消費された糖に対するクエン酸収率の逆数［g-sugar/g-CA］
k_1：増殖に関する速度定数［1/d］
k_2：増殖に関するクエン酸生成速度比例定数［g-CA/g-cell］
k_3：クエン酸生成に関する速度定数［g-CA/(l•d)］
K_S：クエン酸生成に関する飽和定数［g-sugar/l］
K_X：増殖に関する飽和定数［g-sugar/l］
K_{SC}：クエン酸生成に関する飽和定数[-]
K_{XC}：増殖に関する飽和定数[-]

(1)式は微生物の増殖に関する速度式で通常の Michaelis-Menten 型を用いた。(2)式はクエン酸の生成に関する式で Luedeking-Piret[16] 型の速度式を変形したものを用いた。(2)式の右辺第一項は微生物の増殖速度に比例するクエン酸の生成を表わす。第2項は通常の Michaelis-Menten 型により表現した。(3)式は糖の消費速度を表わし，微生物の増殖，クエン酸の生成のそれぞれについて消費される糖の和として表わした。

式(4)，(5)はそれぞれ式(1)，(2)を修整したものであり，Contois[17] のモデルで用いられた基質濃度と微生物濃度の比を(1)(2)式の基質濃度の代わりに用いたものである。上記の2種類の連立方程式を Runge-Kutta-Gill 法を用いて計算した。表面培養法では培養途中の微生物濃度の測定が困難なため，予め作成した消費窒素量と微生物量の相関から微生物量を算出した。消費窒素量と微生物量の関係を図4に示した。両者の間には良好な相関関係があることが分かる。この場合の相関式は次の通りである。

$$DCW = 18.67 \times N \tag{7}$$

DCW：微生物濃度(g-biomass/l)　　N：消費窒素量(g-N/l)

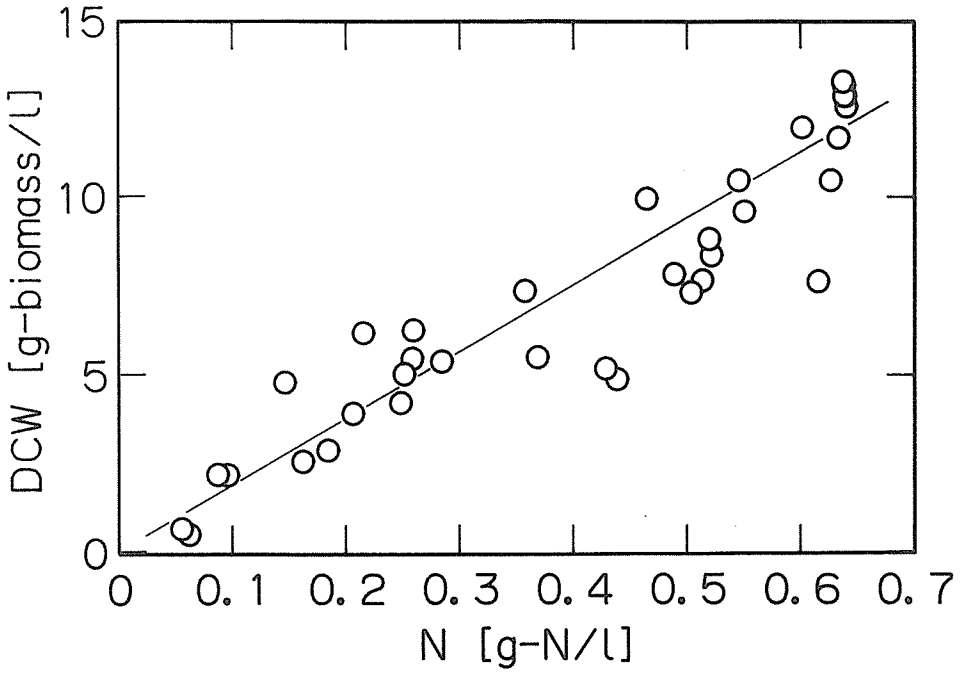

図4　消費窒素量Nと増殖微生物量ＤＣＷの関係，増殖微生物量ＤＣＷは乾燥微生物濃度を示す。

(7)式を用いて微生物濃度を算出し，シミュレーションを行なった結果を図5に示した。諸定数の決定は非線形最小自乗法によった。それぞれの式を用いてシミュレーションを行なった結果得られた速度定数，飽和定数，計算に用いた量論係数を表2に示した。

表2　シミュレーションにより得られた速度定数と飽和定数

パラメータ	Luedeking-Piret型		Contois型
	図5	平均(図2)	図5
k_1[l/d]	0.103	0.049	0.26
k_2[g-CA/g-cell]	10.9	21.0	6.0
k_3[g-CA/(g-cell･d)]	0.003	0.70	0.24
K_S[g-sugar/l]	0.21	0.046	
K_X[g-sugar/l]	57.0	64.5	
K_{SC}[−]			0.78
K_{XC}[−]			58.0
Y_{SX}[g-sugar/g-cell]	6.616	4.39	6.616
Y_{SC}[g-sugar/g-CA]	0.9376	0.9376	0.9376

Y_{SC}：量論係数

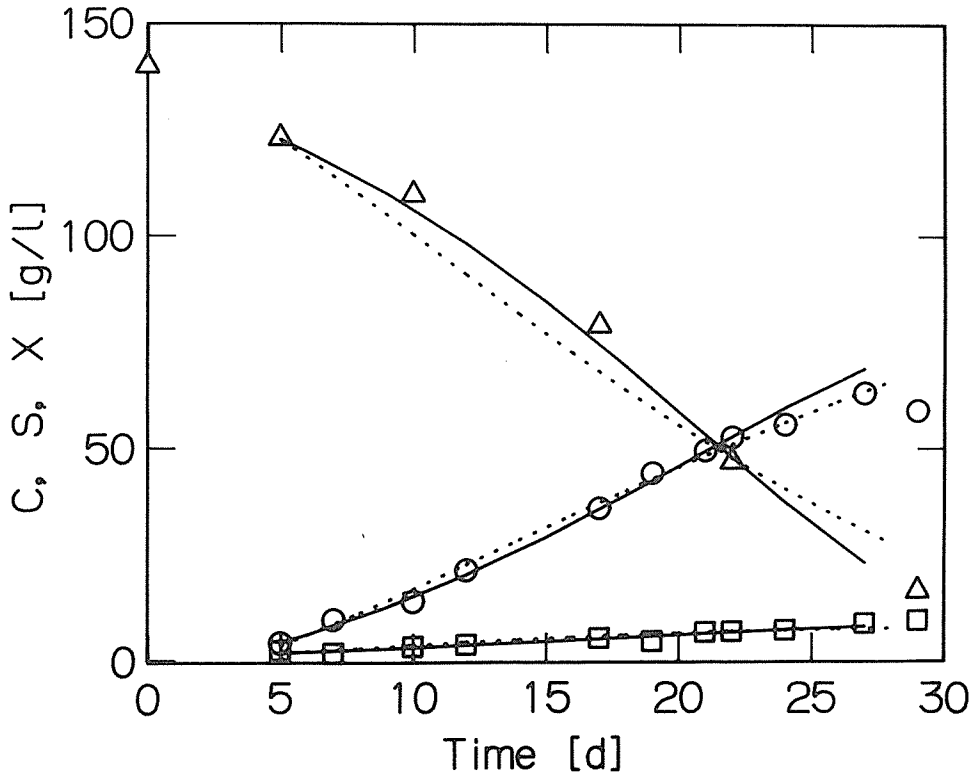

図5　実験データとシミュレーションの比較，諸定数は表2参照，○：クエン酸，△：糖，□：微生物，実線：Luedeking-Piret 型，式(1)～(3)，点線：Contois 型，式(4)～(6)

図5の実線は速度式(1)～(3)を用いて計算した値であり，点線については(4)～(6)を用いて計算を行なった値である。糖濃度に関しては両方とも多少，計算値と実測値がずれているが，クエン酸濃度，微生物濃度に関しては良好な一致が見られる。どちらの式を用いた場合にも良好に表現されるが，全体でのデータとの偏差を見ると修整 Luedeking-Piret 型の方が偏差が小さく，良好に表現されることが分かる。諸定数のうち Y_{sc} はブドウ糖1モルからクエン酸が1モル生成すると仮定した場合の量論係数である。また Y_{sx} は(8)式から求めた微生物の収率係数である。

$$Y_{sx}\times\alpha+Y_{sc}\times\beta=1 \tag{8}$$

α：全消費糖に対する微生物収率(g-cell/g-sugar)

β：全消費糖に対するクエン酸収率(g-CA/g-sugar)

図2の実線は表2にある平均的諸定数を用いた式(1)～(3)によるシミュレーションの結果の傾きから求めた結果であり，式(1)～(3)の適用限界が微生物膜表面密度40mg/cm²付近に存在することを示す。ここで微生物膜表面密度が微生物膜の厚さを表わしていると考えると，表面密度の大きい範囲では酸素あるいは基質の微生物膜内への拡散律速により，膜内の一部がクエン酸生成に有効に働かないため生成速度と表面密度が比例しなくなると考えられる。

次に微生物に対して完全混合を仮定しないで，培地には完全混合を仮定した場合，上記の(1)～(3)式を微生物膜の表面密度（M）で表わした場合の変化速度式(Ⅰ)～(Ⅲ)を示す。

$$\frac{dM}{dT}=k_1\cdot\frac{S}{K_X+S}\cdot M \qquad (I)$$

$$\frac{dC}{dT}=h_2\cdot k_1\frac{S}{K_X+S}\cdot M+h_3\cdot\frac{S}{K_S+S}\cdot M \qquad (II)$$

$$\frac{dS}{dT}=-Y_{SX}\cdot\frac{dM}{dT}\cdot\frac{A}{V}-Y_{SC}\cdot\frac{dC}{dT} \qquad (III)$$

上記の式(1)が(Ⅰ)，(2)が(II)，(3)が(III)に対応する。
ここで微生物膜表面密度は下式のように表わされる。

$$M=X\cdot V/A \qquad (9)$$

V：培地体積　A：微生物膜面積

この関係から $h_2=k_2\cdot A/V$, $h_3=k_3\cdot A/V$ が得られ，微生物に完全混合を仮定しない場合でも同様の計算が可能なことが分かる。

3.5　微生物膜の酸素移動促進効果

図6に微生物膜が存在する場合の実測の酸素移動量，及び微生物膜が存在しない場合の計算による酸素移動量を示した。微生物膜が存在しない場合としては，疋田ら[3]の示した攪拌槽でのレイ

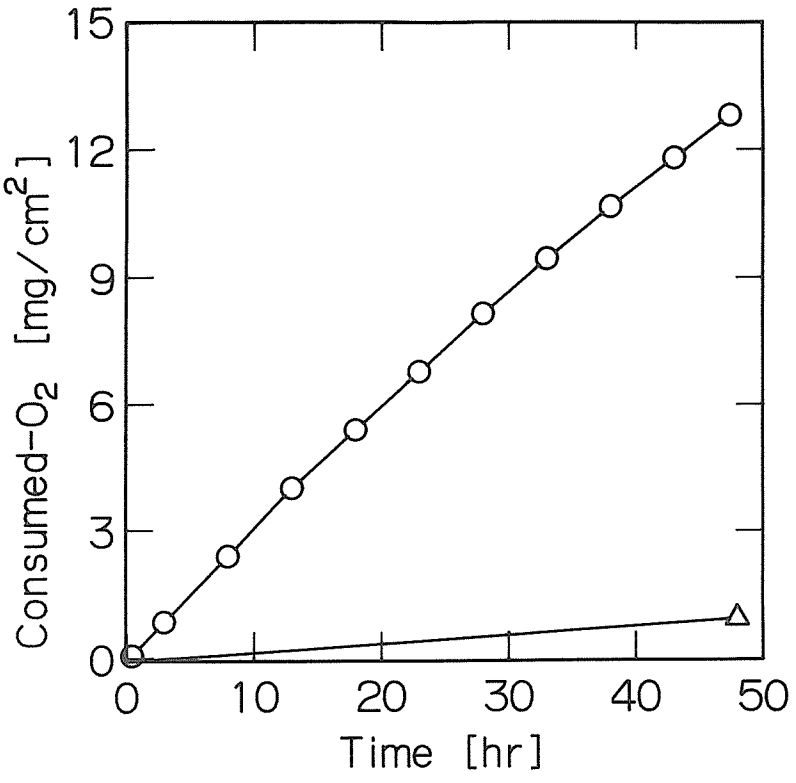

図6　微生物膜が存在する場合と存在しない場合の酸素移動速度の比較
○：実験値，培地体積300ml，培養15日目から，△：計算値

ノルズ数（Re）とシャーウッド数（Sh）の関係式を用い，攪拌のレイノルズ数 Re＝1400 の場合の酸素移動係数 K_L を求め，推進力として C*(酸素の飽和濃度，7.6mg/l)を用いて，計算を行なった結果である。以下に Re 数1400の条件を示す：インペラー直径：3cm，回転数：123rpm，培地粘度：1.397×10^{-2}g/(cm•sec)，培地密度：1.064g/cm³。以上の条件で酸素の拡散係数 0.064cm²/hr の場合について，Sh 数から酸素移動速度係数(K_L) 2.67cm/hr を得た。この値を用いて，微生物膜が存在しない静止界面への酸素移動速度係数とした(攪拌しない場合の K_L は，より小さいと考えられる)。

微生物膜が存在する場合には，明らかに酸素移動速度の増加する事が分かる。図 6 の場合には酸素移動速度は13倍程度であるが，他の実験についても検討を行なった結果，微生物膜が存在する場合には，存在しない場合の約3.6～16倍程度になっていることが分かった。この原因としては，液面の微生物膜が歪んでいるために界面積が増加していること，及び液面の微生物が気体状の酸素を直接取り込む可能性が考えられる。液面に存在する微生物膜が酸素移動を促進することに関しては，戸田らが酢酸菌を用いて同様の報告[18]を行なっているが，この場合にも微生物膜の歪みが有効界面を増加させていることが原因の１つであるとされている。

4．おわりに

本実験では，表面培養における反応速度の表式を検討した結果，以下の結論が得られた。

(1) クエン酸生成は，Luedeking-Piret 型の速度式により良好に表現される。

(2) クエン酸生成速度は，微生物膜表面密度により相関され，表面密度が40mg/cm²以下の範囲では，生成速度と表面密度は比例関係にあり，速度式による計算結果と一致した。これ以上の範囲では表面密度に関係なく一定値となり，速度式の適用範囲を越える。

(3) クエン酸及び微生物の消費基質に対する収率は，培地液深によらず一定値となる。

(4) 液面に存在する微生物膜は，空気中から液中への酸素の移動を４～16倍程度促進する。

参考文献

1) 宇佐美昭次，福富直樹：発酵工学，第55巻 (1977)，p. 44～50
2) 園田頼和，熊谷裕男，中田二男：発酵工学雑誌，第50巻 (1972)，p. 313～320
3) 疋田晴夫，土野昌利，綾井節：第27年会　研究発表講演要旨集　化学工学協会 (1962)，p. 58～59
4) Nowakowska-Waszczuk, A., Rubaj, E., Matsusiak, B., and Kosiek, E.: Appl. Microbiol Biotechnol., Vol. 20 (1984), p. 416～418
5) Purohit, H. J. and Daginawara, H. F.: J. Ferment. Technol., Vol. 64 (1986), p. 561～565
6) Hossain, M., Brooks, J. D, and Maddox, I. S.: Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 19 (1984), p. 393～397
7) 熊谷和夫，宇佐美昭次，服部達彦：発酵工学雑誌，第59巻 (1981)，p. 461～464
8) Kristiansen, B. and Sinclair, C. G.: Biotechnol. Bioeng., Vol. 20 (1978), p. 1711～1722
9) Kristiansen, B. and Sinclair, C. G.: Biotechnol. Bioeng., Vol. 21 (1979), p. 297～315
10) Hossain, M., Brooks, J. D., and Maddox, I. S.: New Zealand J. Dairy Sci. Technol., Vol. 18 (1983), p. 161～168
11) Tsay, S. S. and To, K. Y.: Biotechnol. Bioeng., Vol. 29 (1987), p. 297～304
12) Chung, B. H. and Chang, H. N.: Biotechnol. Bioeng., Vol. 32 (1988), p. 205～212
13) Dawson, M. W., Maddox, I. S., Boag, I. F., and Brooks, J. D.: Biotechnol. Bioeng., Vol. 32 (1988), p. 220～226
14) Kristiansen, B. and Chaley, R.: Adv. Biotechnol., Vol. 1 (1981), p. 221～227
15) Roehr, M., Zehentgruber, O., and Kubicek, C. P.: Biotechnol. Bioeng., Vol. 23 (1981), p. 2433～2445
16) Luedeking, R. and Piret, E. L.: J. Biochem, Microbiol. Technol. Eng., Vol. 1 (1959), p. 393～412

17) Contois, D. E.: J. Gen. Microbiol. Vol. 21 (1959), p. 40～50
18) Toda, K., Miyake, M., and Ohtake, H.: J. Ferment. Bioeng., Vol. 70 (1990), p. 114～118