

## 酢酸生成に及ぼす酸素移動度の影響

誌名	福岡県農業総合試験場研究報告. B, 園芸 = Bulletin of the Fukuoka Agricultural Research Center. Series B, Horticulture
ISSN	02863030
著者	山下, 純隆 馬場, 紀子 平野, 稔彦
巻/号	9号
掲載ページ	p. 91-96
発行年月	1989年11月

## 酢酸生成に及ぼす酸素移動度の影響

山下純隆・馬場紀子・平野稔彦  
(生産環境研究所流通加工部)

酢酸生成速度を向上させるための発酵条件を明らかにするために、菌膜による静置及び通気かくはんの方式を用いて酢酸発酵を行った。通気かくはん発酵は遊離菌体を用いて、回分培養と連続培養を行った。静置発酵においては、雰囲気ガス中の酸素濃度を増加させると酢酸生成速度が増加した。また、通気かくはん発酵では、培地へ通気しているガス内の酸素濃度を増加させると、同じく酢酸生成速度が増加した。さらに、連続培養により定常状態に到達したときに、酢酸濃度が45g/lとなるような希釈率と通気流量の関係は、ほぼ比例関係にあった。

以上のことから、遊離菌体による酢酸発酵と同様に固定化菌体あるいは高密度菌体を用いたバイオリアクターによる酢酸発酵でも、酸素移動度が菌の呼吸速度、比増殖速度、酢酸比生成速度および酢酸生成速度の増加を制限しているものと推察された。

[ Keywords : *Acetobacter aceti*, acetic acid, continuous production, oxygen transfer. ]

### 結 言

酢酸発酵への固定化等微生物の利用、すなわちバイオリアクターを用いた酢酸発酵の研究事例は、最近著しく増加している。しかし、酢酸生成速度は高くても、生成される酢酸濃度は2~3%程度であったり、生成速度を算出する場合の容積を固定化担体の容量も含めたリアクター全容量にすると実際の生成速度は固定化していない場合と大差がない場合もある。また、食酢として具備すべき4~5%以上の酢酸濃度の酢を安定的に生産するための条件、さらには同じリアクターを用いて固定化していない場合との詳細な比較等の研究事例はあまり見受けられない。

本報では、酢酸生成速度の向上を図りながら、果実酢としてJAS規格に適合する酢酸濃度4.5%以上の酢を連続的、かつ安定的に生成するために、発酵条件の中で酢酸生成に特に大きく影響を及ぼすと考えられる酸素移動度について遊離の酢酸菌を用いて検討を行い、バイオリアクターを用いる場合の条件について知見を得たので報告する。

### 試 験 方 法

#### 1 使用菌株

*Acetobacter aceti* IFO3283 (発酵研究所より譲受)

#### 2 培地

(1) 種培養：YPG 1%培地 (粉末酵母エキス

10g/l, ポリペプトン10g/l, グルコース10g/l, エタノール20ml/l) を用いた。

(2) 回分前及び本培養：YPG 1%加酸培地 (粉末酵母エキス10g/l, ポリペプトン10g/l, グルコース10g/l, エタノール60ml/l, 酢酸10ml/l) 及び YPG 0.2%加酸培地 (粉末酵母エキス 2g/l, ポリペプトン 2g/l, グルコース 2g/l, エタノール60ml/l, 酢酸10ml/l, 酢酸ナトリウム 4g/l) を用いた。

(3) 連続培養：YPG 0.2%培地 (粉末酵母エキス 2g/l, ポリペプトン2g/l, グルコース 2g/l, エタノール70ml/l, 酢酸ナトリウム 4g/l) を用いた。

#### 3 培養法

(1) 種培養：直径18mmの試験管に10mlの種培養培地を入れ、保存菌株スラントから1白金耳を接種し、32℃で4日間培養した。

(2) 回分前培養：500mlの三角フラスコに、100ml YPG 1%加酸培地と種培養10mlを添加し、32℃で36時間往復振とう培養を行った。また、100ml YPG 0.2%加酸培地を用いた場合には、YPG 0.2%培地の連続培養菌液10mlを添加し、32℃で24時間往復振とう培養を行った。

(3) 回分本培養：酢酸菌膜の呼吸量と酢酸生成量を測定するための静置発酵は、直径86mmのシャーレに90mlの YPG 1%加酸培地と種培養10mlを添加した後、32℃で36時間以上静置して液表面に菌膜が十分に生成し、酢酸濃度が25g以上到達したとき

に容積2,400mlのデシケーターに入れた。デシケーターの下部からマグネチックスターラーでかくはんし、呼吸量は1時間おきに、酢酸生成量は2時間おきに測定した。

通気かくはん回分培養は1,000mlの吸引ろ過びん(実容量1,400ml)を用いて試作したリアクター(第1図)を使用した。培地及び通気はろ過びんの上から供給し、下部で放出させる形式とした。温度制御は恒温水槽を用いて32℃に設定した。通気により直径約0.2mmの気泡を発生させた。かくはんは約1,000rpmの速度で水槽下部からマグネチックスターラーにより行った。このリアクターを用いて、発酵の経時変化を測定するための回分培養では、800mlの YPG0.2% 加酸培地に YPG0.2% 加酸培地前培養菌液200mlを添加し、通気量600ml/min(空気)で培養した。通気条件を変えた回分培養では、700mlの YPG 1% 加酸培地に YPG 1% 加酸培地前培養菌液100mlを添加し、通気には空気、純酸素または空気と純酸素の混合気体を用いた。

(4) 連続培養：試作したリアクターに1,200mlの YPG0.2% 加酸培地をいれ、YPG0.2% 加酸培地前培養菌液200mlを添加し、32℃で通気量(空気)を変えて培養した。酢酸濃度が40g/lに到達したときにペリスターポンプを用いて、YPG0.2% 培地の供給流量を変化させた連続培養を開始した。

#### 4 測定方法

(1) 菌膜による呼吸量 ( $XQ_{O_2} \cdot \text{mg}O_2/\text{h}$ )：デシケーター内の酸素と二酸化炭素を島津製 TCD ガスクロマトグラフ GC-8 AIT (ポラパック Q 50/80 3m, モレキュラーシーブ 5A 80/100 2m, キャリアーガス He 3 Kg/cm<sup>2</sup>, COL TEMP 80℃, INJ TEMP 150℃) で測定した。

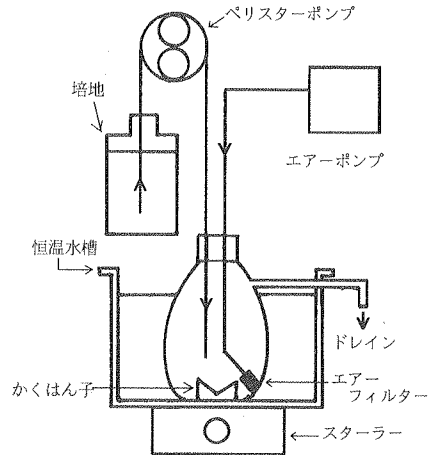
(2) 酢酸濃度 ( $P \cdot \text{g}/\ell$ )：0.1N-NaOH で滴定した。

(3) 還元糖 ( $SG \cdot \text{g}/\ell$ )：除蛋白後に Somogyi, Nelson 法で測定し、グルコースとして表示した。

(4) エタノール ( $SE \cdot \text{g}/\ell$ ) 及び酢酸エチル濃度 ( $EA \cdot \text{g}/\ell$ )：島津製 FID ガスクロマトグラフ GC-9 A (PEG20M-15% on Chromosorb-G 80/100 3m, N<sub>2</sub> 50ml/min, COL TEMP 85℃, INJ TEMP 150℃) を用いた。

(5) 菌体濃度 ( $X \cdot \text{g}/\ell$ )：660nm の比濁度を測定し、乾燥菌体重に換算した。

(6) 溶存酸素 ( $CL \cdot \text{mg}O_2/\ell$ )：リアクター内にクラーク型隔膜ポーラログラフセンサーを挿入し、YSI 製 54A 溶存酸素計で測定した。



第1図 通気かくはん式培養槽

(7) 最大呼吸速度 ( $XQ_{O_2} \cdot \text{mg}O_2/\ell, \text{min}$ )：純酸素を用いて通気かくはんしながら、培養液内の溶存酸素が10mgO<sub>2</sub>/ℓの濃度に達したときに通気を停止し、溶存酸素の減少を溶存酸素計を用いてレコーダーに記録し、溶存酸素4~5.5mgO<sub>2</sub>/ℓの範囲の減少曲線から換算した。したがって、基質としての溶存酸素が十分存在するときの呼吸量であり、実際の培養中の呼吸量  $XQ_{O_2}$  とは区別される。

(8) 酸素移動容量係数<sup>1)</sup> ( $KLa \cdot \text{min}$ )：Gass-ingout<sup>2)</sup> 法を用いた。

(9) 比増殖速度 ( $\mu \cdot \text{h}$ )  $\mu = 1/X \cdot dX/dt$

(10) 酢酸比生成速度 ( $\rho \cdot \text{g}/\text{g cell}, \text{h}$ )

$$\rho = 1/X \cdot dP/dt$$

(11) 希釈率 ( $D \cdot \text{h}$ )

$$D = \text{流量 (ml/h)} / \text{容積 (ml)}$$

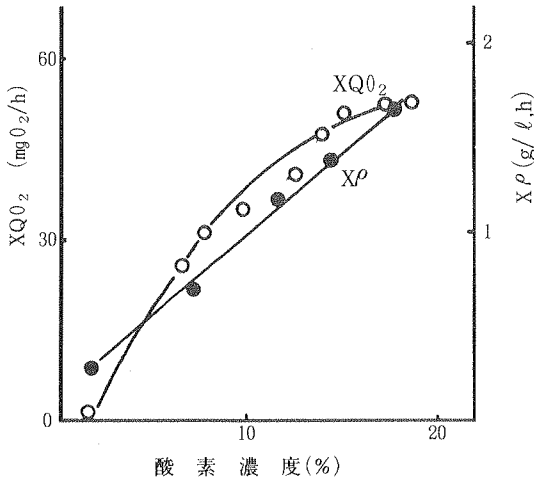
## 結果及び考察

### 1 静置発酵による菌膜の呼吸

デシケーター内の酸素濃度の減少曲線から単位時間当たりの酸素の減少速度すなわち菌の実際の呼吸速度  $XQ_{O_2}$  と、酢酸濃度の増加曲線から酢酸生成速度  $X\rho$  を算出し第2図に示した。 $XQ_{O_2}$  と  $X\rho$  は酸素濃度に対して同じ傾向を示し、酸素濃度が低くなると共に低下した。Nanba<sup>5)</sup> ら、Osuga<sup>7)</sup> ら、はバイオリクターを用いて定常状態に到達したときの通気中の酸素分圧と  $X\rho$  または生産活性  $\pi$  との間に Monod型の式

$$\mu = \frac{\mu_m \cdot S}{k_s + S}$$

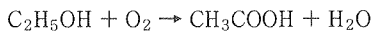
S; 基質濃度,  $k_s$ ; ミハエリス定数,  $\mu$ ; 比増殖



第2図 デシケーター内の酸素濃度が XQO<sub>2</sub> と Xρ に及ぼす影響

速度, μm; 最大比増殖速度

が成り立つことを認め、それぞれ ks = 400mmHg, 2atom, Xρm = 1.89g/l, h, πm = 125.7mg/ml gel, h の値を得ている。そこで、菌膜による酢酸発酵において、酸素分圧を制限基質としたときの ks と Xρm を求めるために、実際の酢酸生成にあずかる X は見かけ上一定と仮定し、デシケーター内の酸素分圧を 3~63% の範囲で変化させてラインウェーバークのプロットにより作図したところ、ks = 14.3%, Xρm = 2.2g/l, h の値が得られた。菌膜の表面積 A に対するこの試験で設定した容積 V の値 V/A は 1.73ml/cm<sup>2</sup> であるので、V/A をこの値以下にするとバイオリアクターを用いるよりも菌膜を用いた方が酢酸生成速度は向上することが判明した。また、既に菌膜下の発酵液中の溶存酸素 CL はほぼ 0 になっているのを確認しているの、生成された酢酸濃度が同じであり、見かけ上菌膜の菌数が定常状態に到達していると仮定すると、菌膜 1m<sup>2</sup> 当たりの酸素吸収速度である総括物質移動係数 KG<sup>(10)</sup> は約 200/m<sup>2</sup>, h と推定される。なお、次の式

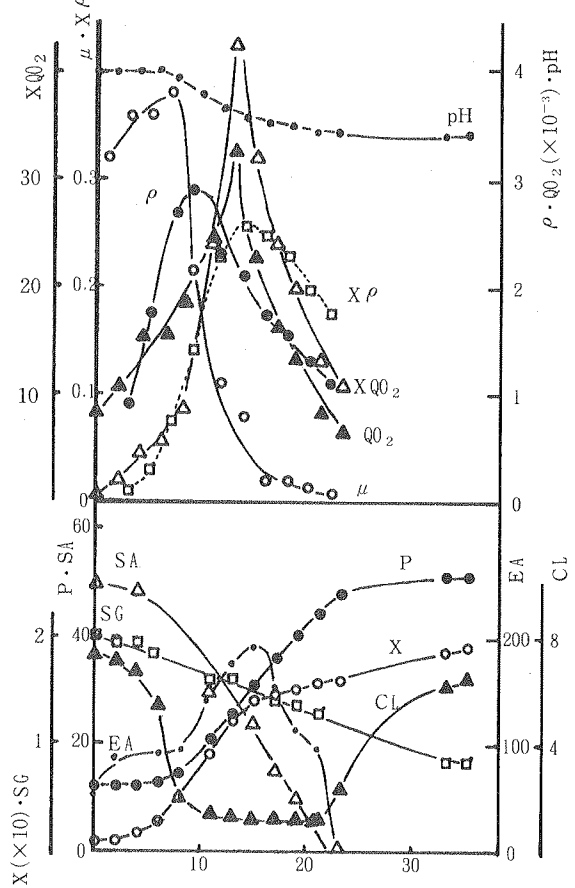


により酢酸生成が進むとすると、静置発酵の場合、菌膜表面積 A = 1m<sup>2</sup> 当たりの酢酸生成速度は第 1 図から約 12g/m<sup>2</sup>, h の生産力と計算される。

以上のことから、菌膜による静置発酵方式を用いて設置面積当たりの酢酸生成量を向上させるためには、酸素分圧を高めた雰囲気ガス中において、流動床で多段式菌膜による発酵を連続的に行うようなリアクターの開発が考えられる。

## 2 通気かくはん回分培養

第 3 図には通気かくはん回分培養による経時変化を示した。P は菌を接種後、約 4 時間後から急激に増加し、約 24 時間で 50g/l に達した。X は前培養に連続培養中の菌を使用したためか、本培養接種後 1 ag 期がほとんどなく log 期に移行した。エタノール濃度 SA とグルコース濃度 SG は、発酵が進行するとともにほぼ直線的に減少したが、溶存酸素濃度 CL は急減した後、培養開始 10 時間目ごろから約 1mg O<sub>2</sub>/l で一定になり、20 時間を過ぎてから再び増加した。比増殖速度 μ と酢酸比生成速度 ρ のピークはほぼ同じ時期に出現したが、最大呼吸速度 XQO<sub>2</sub>、最大比呼吸速度 QO<sub>2</sub> 及び Xρ の 3 つのピークとはやや時期が異なった。酢酸菌は絶対好気性菌であり、菌体の増殖に伴い酢酸が生成される増殖連動型に近い菌である<sup>(9)</sup>とされている。本試験の結果も X の増加につれて、ほぼ同じ傾向で P が増加していること



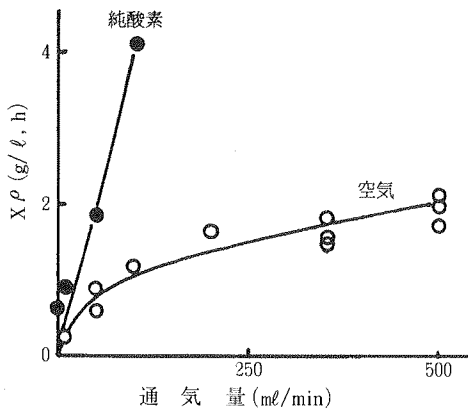
第3図 通気かくはん回分培養における酢酸発酵の経時的変化

から、使用した菌もほぼ増殖連動型の菌であると考  
えられる。一般に、絶対好気性菌における生産物生  
成速度は旺盛な酸素需要をいかに満たすかにかかっ  
ている<sup>8)</sup>と言われているが、酢酸発酵の場合、基質  
として絶対量の多い SA, SG 及び CL の中では、第  
3 図に示されるように CL の減少速度が極めて高く、  
増殖における実際の呼吸速度  $XQ_{O_2}$  を次式

$$dCL/dt = KLa(C_{max} - CL) - XQ_{O_2}$$

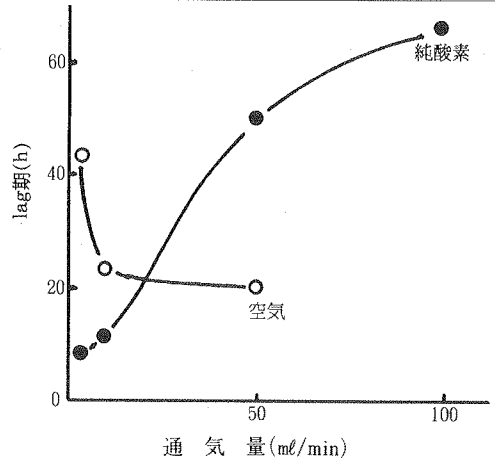
に従ってプロットすると、そのピークは  $X\rho$  のピーク  
と一致する。したがって、YGP0.2%加酸培地に  
よる酢酸発酵でも溶存酸素濃度が酢酸生成速度を律  
速しているものと考えられる。さらに、通気を停止  
した後の呼吸による CL の減少速度は CL が約 3 mg  
 $O_2/l$  で大きく変化し始めることから、 $CL = 3\text{ mg } O_2/l$   
以下の濃度で  $XQ_{O_2}$  が大きく抑制され、 $\mu$  と  
 $\rho$  に影響を及ぼすものと考えられる。このことは、  
第 3 図に示されるように  $\mu$  と  $\rho$  のピーク後の急激  
な減少は、CL が  $3\text{ mg } O_2/l$  以下に到達したときに  
起こっていることからもうかがえる。また、CL 濃  
度に無関係と考えられる  $XQ_{O_2}$  及び  $Q_{O_2}$  のピークが  
 $P = 25g/l$  の時に出現したのは、この値以上では  
酢酸による阻害<sup>1,6)</sup>を受けて、次第に低下していっ  
たものと思われる。

第 4 図には空気または純酸素を用いたときの通気  
量の違いによる  $X\rho$  の変化を、第 5 図には菌を接  
種後 P が 10 から  $15g/l$  に到達するまでの時間すなわ  
ち lag 期を示した。  $X\rho$  は P による阻害は受けな



第 4 図 通気かくはん回分培養において  
通気量が  $X\rho$  に及ぼす影響

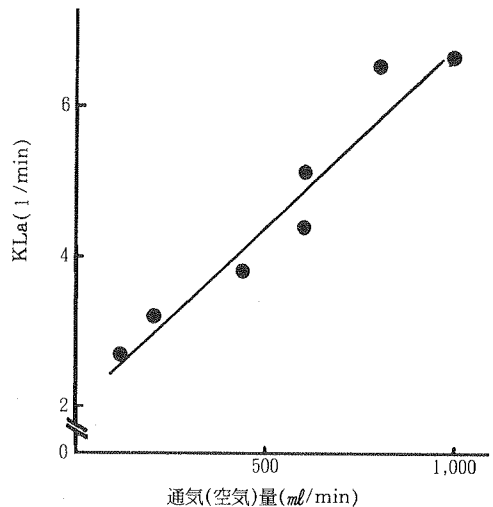
注)  $X\rho$  は P が 25 から  $40g/l$  に増加  
するときの平均速度



第 5 図 通気かくはん回分培養において  
通気量が lag 期に及ぼす影響

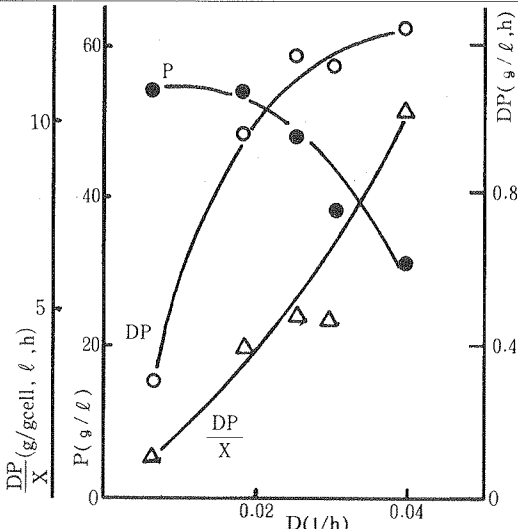
注) lag 期は菌接種後、P が 10 から  
 $15g/l$  に到達するまでの時間

がらも、通気量が多くなるほど増加し、空気よりも  
純酸素を用いた方が増加は大きい。このことは、第  
6 図に示すように通気 (空気) 量の増加に伴って、  
リアクターの KLa がほぼ直線的に増加し、純酸素  
を使用した場合には空気に比べて約 5 倍の酸素供給  
速度になることから飛躍的に  $X\rho$  が増加したもの  
と考えられる。したがって、酢酸生成速度を律速し  
ている溶存酸素濃度は、容積に対する通気量すなわ  
ち溶存酸素の供給速度を支配している KLa に支配  
されているものと考えられる。また、第 5 図に示す



第 6 図 通気量が KLa に及ぼす影響

注) 測定培地は YGP0.2%加酸培地を用い  
た発酵液 (P =  $45g/l$ , X =  $0.136gcell/l$ ,  
SE =  $20g/l$ ) を使用した。

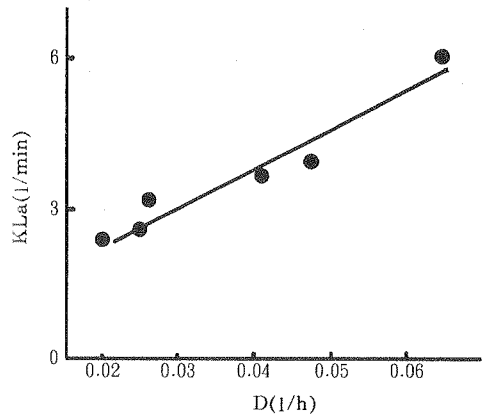


第7図 通気かくはん連続培養において定常状態に到達した時のDに対するP, DP及びDP/Xの変化

ように lag 期については、純酸素を用いた場合には空気とは逆に、通気量が多いほど長くなった。このことは、純酸素または高濃度溶存酸素による阻害の両方が考えられるが、酸素を富化した通気による試験でも純酸素と同じ傾向を示したことから、高濃度溶存酸素による阻害によるものであろう。以上のことから、通気に純酸素を用いた場合には酸素適応性が獲得される<sup>3)</sup>まで lag 期が続き、その後は豊富な溶存酸素を基質にして、飛躍的に  $X\rho$  は増加したものと考えられる。

### 3 通気かくはん連続培養

通気(空気)量300ml/minで通気かくはん連続培養した時の希釈率Dに対する定常状態における培養液中の酢酸濃度、酢酸生成速度及び酢酸比生成速度の変化を第7図に示した。定常状態の決定は、容積の3倍量以上の培地の流出入があっても、リアクター内のPとXが一定に保持されていたときに行い、定常状態に到達するまでには14日以上を要した。Dを減少させるにつれて、DP及びDP/Xは急速に減少し、Pは増加するが次第に $P=54\text{g/l}$ 付近で一定になっている。このことは、Dを減少させるとPの増加とともに、 $XQO_2$ さらには $XQO_2$ が阻害されたものと考えられる。また、定常状態における連続培養においては $\mu = D$ <sup>9)</sup>であり、Dに対する $\mu$ とDP/Xの関係はほぼ一致し、第4図で得られた $\mu$ と $\rho$ の関係と同じ結果が連続培養においても認められた。さらに、通気(空気)量を変えてKLaを変化させた場合に、JAS規格で果実酢として最低必要濃度と規



第8図 通気かくはん連続培養において酢酸濃度が45g/lで定常状態に到達した時のDとKLaの関係

定されている45g/lの酢酸濃度になるためのDについて検討し、結果を第8図に示した。KLaが増加するにつれてDも増加し、通気量1,000ml/min( $KLa=6.6/\text{min}$ )においてもリアクター内の溶存酸素は $Cl=2.5\text{mgO}_2/\text{l}$ しかなく、溶存酸素律速になっていた。したがって、連続培養においても静置及び通気かくはん回分培養と同様にKLaがDPを律速していることが明らかになった。

### 総合考察

遊離の菌体を用いた静置培養、通気かくはん回分培養及び通気かくはん連続培養のいずれにおいてもKLaがDPを律速していると考えられる。バイオリアクターを用いる方式は、固定化菌体あるいはろ過膜を使用したいずれの型でも、培地と共に流出してしまう菌を固定化担体あるいはろ過膜によりリアクター内に保持し、菌数Xを増加させる方式であり、増加したXの呼吸に対する酸素需要を満足させるだけのKLaが伴わなければ $XQO_2$ は制限され、DPすなわち $X\rho$ が制限されることは、遊離菌体の場合と同じであると推察される。したがって、酢酸生成速度の向上を図るためにバイオリアクターを用いる場合には、気相から培地液相さらには培地液相から菌体内への酸素移動度を向上させることが最も重要であり、そのためにはKLaを増加させ、リアクター内の溶存酸素濃度を常に $3\text{mgO}_2/\text{l}$ 以上に維持すること必要である。

### 引用文献

1) Ameyama, M., K. Osada, E. Shinagawa, K. Mat-

- sushita, and O. Adachi. (1981) : Purification and Characterization of Aldehyde Dehydrogenase of *Acetobacter aceti*. *Agric. Biol. Chem.* 45(8), 1889~1890.
- 2) Ghommidh, C., J. M. Navarro, and G. Durand. (1982) : A Study of Acetic Acid Production by Immobilized *Acetobacter* Cells: Oxygen Transfer. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 605~617.
- 3) 森明彦・金野範之・照井堯造(1970): 深部培養による酢酸発酵の動力学的研究 (第1報). *醸工.* 48(4), 203~212.
- 4) 森明彦・照井堯造(1972): 深部培養による酢酸発酵の動力学的研究 (第2報). *醸工.* 50(2), 70~78.
- 5) Nanba, A., K. Kimura, and S. Nagai. (1985) : Vinegar Production by *Acetobacter rancens* Cells Fixed on a Hollow Fiber Module. *J. Ferment. Technol.* 63(2), 175~179.
- 6) Nanba, A., A. Tamura, and S. Nagai. (1984) : Synergistic Effects of Acetic Acid and Ethanol on the Growth of *Acetobacter* sp.. *J. Ferment. Technol.* 62(6), 501~505.
- 7) Osuga, J., A. Mori, and J. Kato. (1984) : Acetic Acid Production by Immobilized *Acetobacter aceti* Cells Entrapped in a  $\kappa$ -Carrageenan Gel. *J. Ferment. Technol.* 62(2), 139~149.
- 8) 清水祥一・山根恒夫(1987): バイオリアクターシステム. 共立出版社. 77~80.
- 9) Stanbury, P.F., and A. Whitaker. (1988): 発酵工学の基礎. 学会出版センター. 14~16, 169~190.
- 10) 田口久治・永井史朗(1985): 微生物培養工学. 共立出版社. 162~169.

Effects of Oxygen Transfer on Acetic Acid Production by *Acetobacter aceti*.

Y AMASHITA Sumitaka, Noriko BABA, and Toshihiko HIRANO

Summary

Surface and submerged cultures were used to study the effects of oxygen transfer on acetic acid production. Batch and continuous cultures with agitation and aeration were tested using by free cells.

Increasing of oxygen partial pressure as atmosphere or aeration resulted a strong enhancement of acetic acid productivity not only in surface culture, but also in submerged culture. Also, in continuous culture, the flow rate of air became proportional to the dilution rate when acetic acid concentration achieved 45g/l at steady-state operation.

These results suggest that oxygen transfer was the limiting factor for increasing the respiration rate, specific growth rate, specific rate of acetic acid production and productivity of acetic acid in immobilized or concentrated cells fermentation as bioreactor as well as free cells culture.