

バイオリアクターによる果汁を原料にした酸性調味料の生産

第3報 麹菌 *Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* IFO 6082 によるクエン酸の連続生産

山下純隆・森山弘信¹⁾

(生産環境研究所)

麹菌 *Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* IFO 6082 の遊離菌体を用いた通気攪拌培養により、クエン酸の連続生産を行った。

単槽式連続発酵において、菌体を含まない発酵ろ液だけを流出させながら孢子懸濁液を添加する操作、または菌体を含む発酵液を流出させながら菌糸培養液を添加する操作を行ったリアクターは、最高クエン酸濃度がそれぞれ 42、45g/l に達したが、その後、急速にクエン酸濃度が低下した。

単槽式を改良した 2 槽式連続発酵において、第 1 槽を 1,000 ml・第 2 槽を 1,000 ml とし、連続発酵開始から毎日 1 回、第 1 槽に孢子懸濁液 10 ml (孢子数 5.7×10^8 個) を添加することにより、連続発酵開始後 22 日間に渡り、平均 0.17g/l, h のクエン酸生成速度でクエン酸濃度 30g/l 以上の発酵液を長期に生産することができた。

[キーワード: 麹菌, クエン酸, 通気攪拌培養, 連続発酵]

Production of Sour Seasoning from Fruit Juice by Aeration-Agitation Culture.(3) Continuous Production of Citric Acid from *Koji*-mold Using Bioreactor. YAMASHITA Sumitaka and Hironobu MORIYAMA (Fukuoka Agric. Res. Cent., Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull.Fukuoka Agric. Res. Cent.* 18:92-95 (1999)

Koji-mold of *Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* IFO 6082 was used in a single or dual bioreactor to produce citric acid continuously.

Two methods were applied to a single bioreactor continuous culture. One was to add spores to the reactor after draining a part of the culture medium without mycelium, and the other was to add cultured-mycelium for 48 hours after draining a part of the culture medium with mycelium. In these methods, maximum citric acid concentration of 42 and 45g/l were achieved during all of fermentation, respectively. However, in both cases, the citric acid density dropped abruptly.

A dual bioreactor continuous culture method was improvised as an improved version of the above. The volume of the two bioreactor tanks were both 1,000 ml. The procedure was to add 5.7×10^8 spores to the first tank everyday while draining a part of the culture medium with mycelium from the second. This reactor produced continuously a concentration of over 30g/l of citric acid at an average rate of 0.17g/l, h for 22 days.

[Key words: *Koji*-mold, citric acid, bioreactor, continuous production]

緒言

キウイフルーツやカキ等の果汁を利用した新しい酸性調味料の開発を目的に、微生物を用いたクエン酸発酵について検討した。

第 1 報³⁾では、みりん⁴⁾や焼酎⁵⁾等の食品製造用の菌株として高い評価がなされている麹菌 *Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* IFO 6082 が、精製クエン酸を得るための代表的な発酵菌株である *Aspergillus niger* に代わりうることを、また第 2 報⁴⁾では、この菌株を用いて果汁に大豆油 1% を添加し、通気攪拌による回分発酵を行うことによりクエン酸の生産が飛躍的に高まることを報告した。

本報告では、さらにクエン酸の一層の効率的な生産を図るために、遊離菌体を用いた通気攪拌培養による連続発酵について検討したので、その結果を報告する。

試験方法

1 供試菌株

第 1 報で選定した麹菌株 *Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* IFO 6082 (財団法人発酵研究所 (IFO) より購入) を用いた。

2 培地

合成培地は第 1 報で用いた培地を用い、エタノール 20 ml/l と大豆油 1% を添加して使用した。

3 供試孢子懸濁液及び菌糸培養液の調整

孢子懸濁液は、孢子を $\phi 15$ mm 試験管を用いたスラントで 30℃, 1 週間培養し、0.05% Tween80 液 10 ml で懸濁した後、培地 1,000 ml に対して孢子懸濁液 10 ml (孢子数 5.7×10^8 個) を使用した。

菌糸培養液は、500 ml 三角フラスコに 100 ml の合成培地を入れ、孢子懸濁液 10 ml を接種して、30℃で 48 時間

1) 現八女分場

振とう培養を行って得た。

4 発酵条件

2,000 ml 容ジャーファーマンター (サクラ精機製 TBR-2, 190mmL×110mmID) に培地と孢子懸濁液または菌系培養液を添加し, 培養温度 30℃, 回転数 300rpm, 通気量 IVVM で培養を行った。

連続発酵は, ジャーファーマンターにエアコンプレッサー, 送液ポンプ及び電磁弁等を取り付け, 通気攪拌を行いながらタイマーにより電磁弁を定期的に作動させることにより, 自動的に培地交換を行うバイオリクター方式とした。

5 単槽式連続発酵

1,000 ml の合成培地に孢子懸濁液を添加し, 発酵を行った。一定期間発酵を行いクエン酸が 25~30g/l に達した後, 菌体を含まない発酵ろ液だけを排出する操作, または菌体を含む発酵液を排出する操作を行い, 同量の合成培地を供給することにより連続発酵を行った。発酵ろ液と培地との交換操作は, 1.5 時間毎に 10 ml/回 の割合で行った。また菌体を含む発酵液と培地との交換操作は, 1 日に 1 回, 160 ml を行い, さらに, 1 日に 1 回, 160 ml を行いながら流出した菌系に相当する菌系培養液を添加する条件, あるいは 3 時間毎に 20 ml/回 の割合で行いながら流出した菌系に相当する孢子懸濁液を 1 日に 1 回添加する条件で行った。

6 2槽式連続発酵

ジャーファーマンターを 2 槽連結し, 合成培地を第 1 槽には 500,750 及び 1,000 ml, 第 2 槽にはすべて 1,000 ml 入れ, それぞれの槽の合成培地量に対応する孢子懸濁液を添加し, 培養を行った。一定期間培養後, 1.5 時間毎に 15 ml/回 の割合で菌体を含む発酵液を第 1 槽から第 2 槽に供給し, 同時に第 2 槽から同量の菌体を含む発酵液を排出させた後, 同量の新鮮培地を第 1 槽に供給する連続発酵を行った。連続発酵開始から毎日 1 回, 第 1 槽に孢子懸濁液 10 ml を添加した。

7 分析方法

クエン酸濃度は, 第 1 報³⁾ に示す方法により定量した。

結果及び考察

1 単槽式連続発酵

一般的にクエン酸の生産速度 (V) は, 次式で表される^{7,10)}。

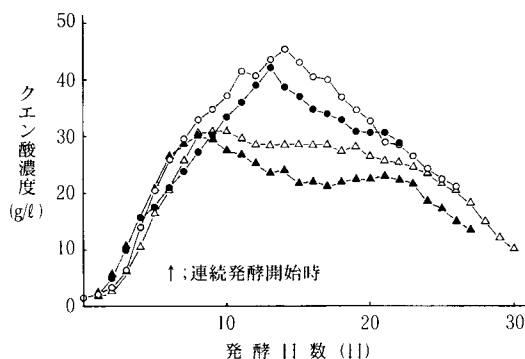
$$V = \alpha \cdot VX + \beta \cdot X$$

但し, α : 比例定数 (無次元), VX : 菌の増殖速度 (g-cell/l, h), β : 生産菌当たりの活性 (g/h, g-cell), X : リアクター槽容積当たりの菌数 (g-cell/l)

したがって, 連続発酵においてリアクターの単位容積当たりの生産速度を維持向上させるためには, 発酵液とともに増殖活性や生産活性の高い菌体が流出しないようにする操作や, もしくは活性の衰えた菌体を速やかに活

性の高い菌体と交換する操作等が必要と思われる。第 1 図にリアクター内の菌数を維持もしくは増加させるために種々の操作を行い, 連続発酵を行ったときに生産される発酵液中のクエン酸濃度の変化を示した。菌体を含む発酵液を流出させただけのものでは, 連続発酵開始 2 日目ごろからクエン酸濃度が低下したが, 菌体を含む発酵液を流出させ, 孢子懸濁液を添加する操作を行ったリアクターでは, 連続発酵開始後 11 日間程度は目標値である約 30g/l のクエン酸濃度を維持することができた。菌体を含まない発酵ろ液だけを流出させ, さらにリアクターに孢子懸濁液を添加する操作, および菌体を含む発酵液を流出させる代わりに菌系培養液を添加する操作を行ったリアクターでは, 高濃度の菌数や活性の高い菌が確保されたためか, どちらも連続発酵開始後にクエン酸濃度が大幅に増加し, それぞれ 42 及び 45g/l の濃度に到達した。しかし, その後急速にクエン酸濃度が低下し始め, 酸性調味料に望ましい 30g/l 以上のクエン酸濃度を長期に維持することができなかつた。この急速な濃度の低下は, 高濃度に蓄積したクエン酸により培地の pH が低下し, 菌のクエン酸生産活性や増殖活性が不可逆的に影響を受けたものと考えられる。さらに, リアクター内のクエン酸濃度が低下した後も, 孢子懸濁液や菌系培養液の添加によるクエン酸濃度の復活増加がみられなかつたことから, 酸蓄積が起こる単槽式連続発酵では効率的連続生産に問題が残るものと思われる。

以上の結果から, より高濃度のクエン酸発酵液を長期に生産するためには, 増殖活性や生産活性の高い菌系が常に発酵槽に供給されるとともに, 発酵槽のクエン酸生成速度に応じた希釈率で連続発酵が行われる必要があり, 宇佐美ら⁸⁾が提案しているような, 菌生育と酸蓄積を分割させる発酵方式が有効と考えられる。そこで, 筆者らは, リアクターを 2 槽連結することにより, 低クエン酸濃度に維持した第 1 槽で孢子から菌系に生育させることにより活性菌体の増殖を行い, 適切な希釈率で第 2 槽に常時, 活性菌体を送り込むことによって第 2 槽で本格的



第 1 図 通気攪拌式培養による単槽式連続発酵

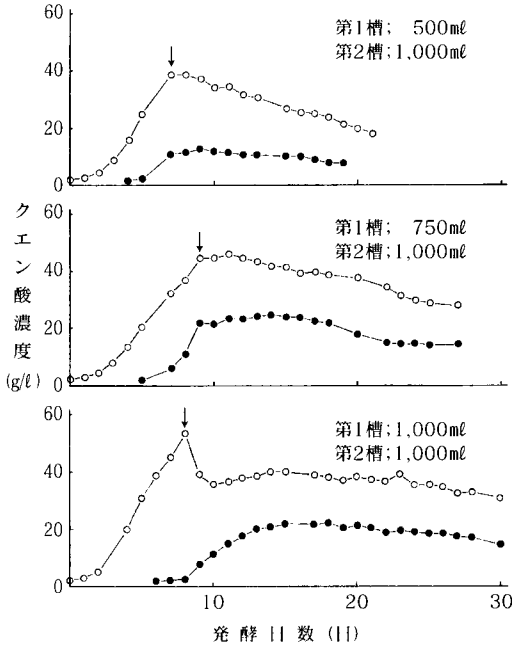
- ▲: 菌体を含む発酵液の流出
- △: " + 孢子懸濁液添加
- : " + 菌系培養液添加
- : 菌体を含まない発酵液の流出 + 孢子懸濁液添加

なクエン酸の生産発酵を行う方式を考案した。

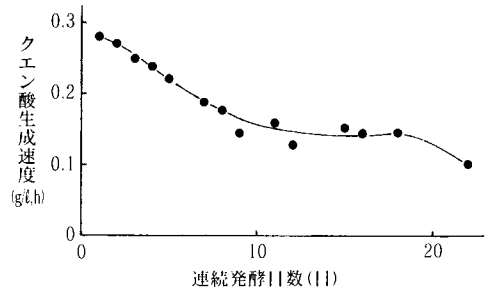
2 2槽式連続発酵

これまでの単槽式による発酵法を改良した2槽式発酵槽を用いて、連続発酵を行った。リアクターの第1槽の容量を500、750及び1,000mlとして、第2槽をすべて1,000mlに設定し、発酵を行ったときのクエン酸濃度の変化を第2図に示す。菌体の増殖と供給を行う第1槽では、どのリアクターにおいても、発酵全期間に渡ってクエン酸濃度を25g/l以下の低濃度に維持することができた。クエン酸生産を行う第2槽では、第1槽が500mlのリアクターは、連続発酵開始後、クエン酸濃度が徐々に低下したが、第1槽が1,000mlのリアクターでは連続発酵開始後22日間もの長い期間、クエン酸濃度30g/l以上の発酵液を連続的に生産することができた。このことは、第2報⁴⁾で報告したように、クエン酸生成速度のピークが孢子培養後4~5日目に現れることから、培養4

日後には第1槽の発酵液の約85%が交換される500mlのリアクターでは、希釈率が高すぎるために、添加した孢子がクエン酸生産活性の高い菌系に十分生育する前に第2槽に送り込まれ、クエン酸の生成速度が低下したためと考えられる。また、第1槽が500及び750mlのリアクターに比べて、クエン酸生成速度においても高い値であった1,000mlのリアクターにおける連続発酵開始3日目に降の生成速度を第3図に示した。クエン酸濃度が30g/l以上の発酵液を生産するときの平均のクエン酸生成速度は、0.17g/l・hであった。これらの値を第1表に示す既報のバイオリアクターと比較すると、生成速度ではDual Hollow-Fiber型¹⁾やAirlift型²⁾よりも劣ったものの、濃度ではDual Hollow-Fiber型、Tower型²⁾、Airlift型よりも優れ、酸性調味料の製造に望ましい30g/l以上の濃度を確保できた。しかし、今回考案した2槽式連続発酵による遊離菌体を用いたクエン酸の生産方式においても、クエン酸濃度が30g/l以上の発酵液を生産するときのクエン酸生成速度は発酵日数に伴い徐々に低下しており、生成速度を長期に安定して維持するためには、本方式について、さらに改善を図る必要がある。



第2図 通気攪拌式培養による2槽式連続発酵
●:第1槽、○:第2槽、↓:連続発酵開始時点



第3図 総容量2,000mlの2槽式連続発酵におけるクエン酸生成速度の変化

第1表 種々のクエン酸生産方式の比較

方式	菌株	菌体の状態	培地糖濃度 (g/l)	クエン酸濃度 (g/l)	クエン酸生成速度 (g/l・h)
Dual Hollow-Fiber	<i>Aspergillus niger</i> B60	ホローファイバー固定化菌体	60	26	1.3
Tower	<i>Aspergillus niger</i> G-011	ポリアクリルアミドゲル固定化菌体	100	24	0.16
Airlift	<i>Aspergillus usamii</i> ATCC 9142	アルギン酸カルシウムゲル固定化菌体	150	12	0.77
2槽式(本報告)	<i>Aspergillus usamii</i> mut. shiro-usamii IFO 6082	遊離菌体	100	30以上	0.17

引用文献

- 1) CHUNG, B., H., and CHANG, H., N., (1988) Aerobic Fungal Cell Immobilization in a Dual Hollow-Fiber Bioreactor: Continuous Production of a Citric Acid. *Biotech. Bioeng.* **32** : 205~212.
- 2) HORITU, H., ADACHI, S., TAKAHASHI, Y., KAWAI, K. and KAWANO, Y (1985) Production of Citric Acid by *Aspergillus niger* Immobilized in Polyacrylamide Gels : *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 8~12.
- 3) 森山弘信・山下純隆・馬場紀子 (1994) バイオリアクターによる果汁を原料にした酸性調味料の生産 第1報 クエン酸生産能力の高い菌株の選定. 福岡農総試研報 **B-13** : 73~76.
- 4) 森山弘信・山下純隆・馬場紀子 (1996) バイオリアクターによる果汁を原料にした酸性調味料の生産 第2報 油脂類の添加によるクエン生産性の向上. 福岡農総試研報 **B-15** : 98~101.
- 5) 大屋敷春男 (1989) みりん用麹菌の適正評価と改良育種. 醸協. **84(11)** : 756~762.
- 6) OYASHIKI, H., UCHIDA, M., OBAYASHI, A., OKA, S. (1989) Evaluation of *Koji* Prepared with Various Molds for *Mirin*-Making. *J. Ferment. Bioeng.* **67(3)**:163~168.
- 7) 桜井明彦・今井 弘 (1991) *Aspergillus niger* の表面培養によるデンプンからのクエン酸生成の特性とシミュレーション. 発酵工学. **69(6)** : 471~475.
- 8) 宇佐美昭次・福富直樹 (1977) パイナップル加工残渣搾汁を原料とする半個体培養法によるクエン酸発酵. 発酵工学. **55(1)** : 44~50.
- 9) VAJJA, J., LINKO, Y., Y. and LINKO, P., (1982) Citric Acid Production with Alginate Bead Entrapped *Aspergillus niger* ATCC 9142: *Appl. Biochem. Biotech.* **7**:51~54.
- 10) 吉田敏臣 (1985) 微生物培養工学 (田口久治・永井史郎編). 東京: 共立出版, p68.