

Acetobacter pasteurianus の酢酸発酵特性評価

およびSCMフラスコ培養への適用*1

鳴海正樹*2・田畠浩司*2・菅野 亨*3

堀内淳一*3・小林正義*3

Factors Affecting Acetic Acid Fermentation Using *Acetobacter pasteurianus* and the Application of a Shaken Ceramic Membrane Flask Culture System for High-Density Cultivation*1.

Masaki NARUMI*2, Kouji TABATA*2, Tohru KANNO*3, Jun-ichi HORIUCHI*3
and Masayoshi KOBAYASHI*3

Abstract

Factors affecting acetic acid fermentation using *Acetobacter pasteurianus* were investigated. The growth of acetic acid bacteria was inhibited under the following conditions; initial ethanol conc. > 32 (g/l), initial acetic acid conc. > 32 (g/l), pH < 3.2 and culture temperature > 40°C. The optimal temperature range for the bacteria growth was 20~35°C. A dense cell culture system using an SCM (shaken ceramic membrane) flask was then examined for efficient acetic acid fermentation. Consequently, the cell concentration reached approximately 10 (g/l) after 20 days of cultivation.

1. 緒 言

元来我が国では食酢を伝統的な和風料理の味付けなどに用いてきたが、近年食酢は戦後からの食品多様化に伴い増加してきた洋風調味料の副原料としての需要が高まり、さらに健康食品としても見直されてきており、年々需要が増大している¹⁾。現在市場にはいろいろな種類の酢が出回っているが、その製法に関する研究は他の醸造物に比べ少ないのが現状である。酢酸発酵は発酵速度が非常に遅いことが知られており、生産性の向上を計るため菌体濃度をより高く保持できる連続バイオリクターや固定化担体を用いた研究²⁾が盛んに行われてきた。しかし、連続バイオリクターではたとえ固定化担体を用いたとしても遊離菌体の流出は避けられず生産性の向上には限度がある。そこで我々は連続的に新鮮な培地の供給ができ、しかもリアクター内に完全に菌体を保持できるSCM (shaken ceramic membrane) フラスコを用いた振盪灌流培養³⁻⁷⁾により酢酸菌を高菌体濃度培養することで、食酢の生産性を向上させる方法を検討した。SCMフラスコ

*1: 本研究の一部は化学工学会北海道地区連合会第8回研究発表会 (1999. 2. 4) で発表した。

*2: 北見工業大学 大学院 (博士前期課程) 化学システム工学専攻

*3: 北見工業大学 化学システム工学科

を用いた振盪灌流培養では酵母⁴⁾、乳酸菌⁵⁾、大腸菌⁶⁾の菌体濃度を短時間で高濃度にしうることが明らかとなっている。

本報では使用菌株の酢酸発酵特性に関する基礎的検討を行ったものと併せて振盪灌流培養によるこれまでの成果を報告する。

2. 実験方法

2.1 使用菌株

菌株は北海道立工業技術センターより提供して頂いた*Acetobacter pasteurianus*に属するNO.1株⁸⁾を使用した。

2.2 菌株発酵特性評価

前培養はグルコース10(g/l)、酵母エキス10(g/l)、ペプトン5(g/l)、肉エキス2(g/l)、酢酸ナトリウム2(g/l)、塩類溶液5(ml/l) {硫酸マグネシウム7水和物40(g/l)、硫酸マンガン4水和物2(g/l)、硫酸鉄7水和物2(g/l)、塩化ナトリウム2(g/l)}、ツイン80(5%)10(ml/l)の組成とし300mlフラスコに100mlの培地を入れ30℃で48時間振盪培養した。本培養はグルコース5(g/l)、酵母エキス2.5(g/l)、ペプトン5(g/l)、エタノール7.9~55.3(g/l)、酢酸0~63(g/l)の組成に調整し500mlフラスコに200mlの培地を入れ20~40℃で振盪培養を行った。実験操作はすべて回分操作で行い、温度管理にはインキュベーターを用いた。また本培養における培地の初期pHは5N-NaOH、12N-HCl水溶液を使用しすべてpH6.0に調整した。また酢酸、エタノールの定量にはHPLCを使用し、菌体濃度は分光光度計を用いOD₆₆₀で測定した。

2.3 振盪灌流培養

前培養の培地組成は2.2と同様とした。本培養は培養温度を30℃とし、培地組成はエタノールを32(g/l)としたものを使用した。次にSCMフラスコ培養システムの概略をFig.1に示す。SCMフラスコは、500ml容器の振盪フラスコの肩の部分にセラミック精密濾過膜を1本取り付けられたものを使用した。セラミック濾過膜は表面層の平均細孔径が0.2 μ m(肉厚:0.2mm)、内側細

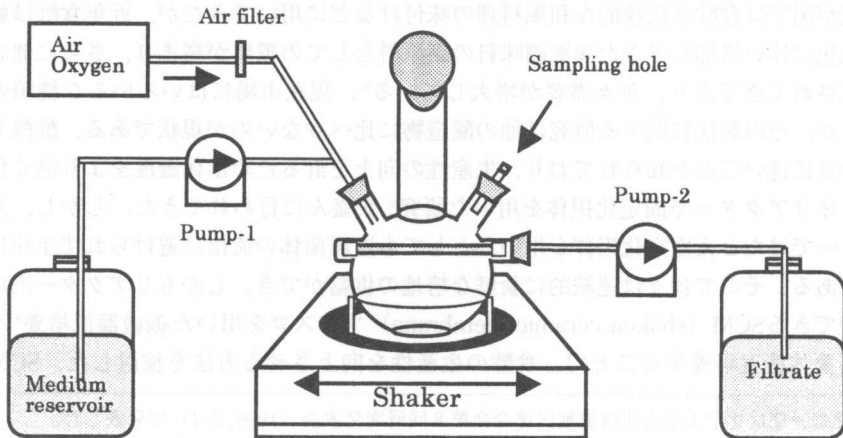


Fig. 1 Schematic diagram of the shaken ceramic membrane flask (SCM flask) system.

孔径が $25\mu\text{m}$ (肉厚: 1.3mm) の非対称構造を有するアルミナセラミック中空管膜 (内径: 8mm , 外径: 11mm , 長さ: 150mm) であり, 有効膜面積は約 50cm^2 のものを使用した. SCMフラスコには培地供給管, セラミック濾過膜に接続した濾液抜き取り管の他, 液上面への通気管を連結しフラスコ内の換気を行った. 振盪培養はレシプロシェーカーを用い, 振盪速度を 130rpm に固定して行った. 通気条件は培養経過に応じて変化させた. 酸, エタノール, 菌体濃度の測定は2.2と同様に行った.

3. 実験結果及び考察

3.1 菌株発酵特性評価

3.1.1 酢酸菌の増殖に及ぼす初期エタノール濃度の影響

まず制限基質である初期エタノール濃度の増殖に及ぼす影響を検討するため, 培地の初期エタノール濃度を $7.9\sim 55.3(\text{g/l})$ に調整し $20, 30, 35, 40^\circ\text{C}$ の温度条件で培養を行ったものをFig. 2に示す. 40°C においてはほとんど増殖しなかったため省略した. このFigは初期エタノール濃度と比増殖速度の関係を示したものである.

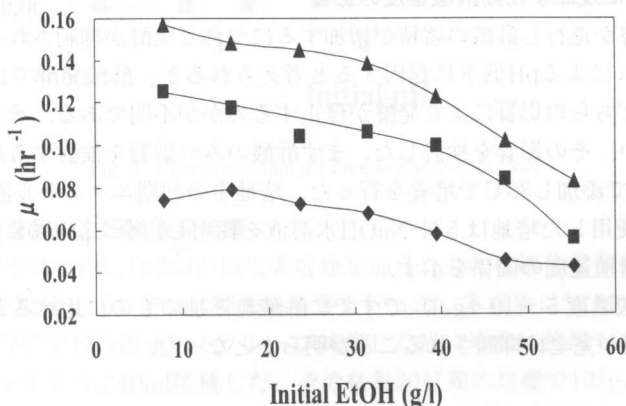


Fig. 2 Effect of initial ethanol concentration on growth of *Acetobacter pasteurianus*.

Symbols: ◆; 20°C , ■; 30°C , ▲; 35°C

比増殖速度は初期エタノール濃度の上昇に伴い減少し, 特に $32(\text{g/l})$ 以上では増殖が顕著に阻害されることが明らかとなった.

3.1.2 酢酸発酵における培養温度の影響

次にこの実験結果から培養温度の影響を検討するため, 比増殖速度に対するアレニウスプロットをFig. 3に示す. その結果, 本菌株の最適温度圏は $20\sim 35^\circ\text{C}$ の範囲であり, 35°C を越えると急激に増殖は抑制されることが明らかとなった.

この最適温度圏の直線の傾きから活性化エネルギーを求めたところ $7.5\sim 10(\text{kcal/mol})$ となり, その値は通常の微生物の活性化エネルギーが $13\sim 17(\text{kcal/mol})$ であるのに比べ若干低い値となった.

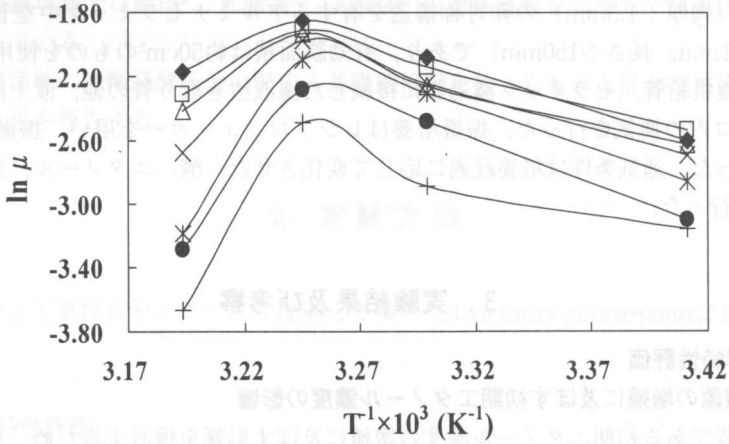


Fig. 3 Effect of culture temperature on growth of *Acetobacter pasteurianus*.
 Symbols: ◆, □, △, ×, *, ●, +; 7.9, 15.8, 23.7, 31.6, 39.5, 47.4, 55.3 (g/l)

3.1.3 酢酸発酵に及ぼす初期酢酸濃度の影響

酢酸発酵では発酵が進行し酢酸の蓄積が増加するにつれて発酵が抑制される。この阻害効果は主に酢酸蓄積とそれによるpH低下に起因すると考えられるが、酢酸発酵ではこれら両者が同時に進行するため、どちらの影響により発酵が停止するのかが不明である。そこで二つの阻害因子を個別に実験を行い、その影響を検討した。まず酢酸のみの影響を検討するため培地に酢酸を0~63 (g/l) の濃度で添加し30°Cで培養を行った。培地中の初期エタノール濃度は23.7 (g/l) とした。この実験に使用した培地は5 N-NaOH水溶液を使用し、全てpH6.0に調整した。Fig. 4に初期酢酸濃度と比増殖速度の関係を示す。

比増殖速度は酢酸濃度5~10 (g/l) ですでに酢酸無添加のものに比べると半減しており、32 (g/l) 以上では増殖が完全に抑制されることが明らかとなった。

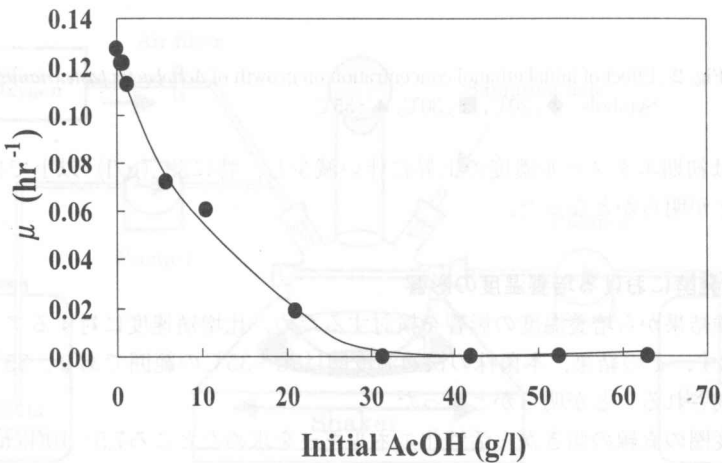


Fig. 4 Effects of Initial acetic acid concentration on specific growth rate.

3.1.4 酢酸発酵に及ぼす初期pHの影響

次にpHの増殖へ及ぼす影響のみを検討するため、培地の初期pHを12N-HCl水溶液により2～6に調整し、30℃で実験を行った。培地中の初期エタノール濃度は23.7(g/l)とした。Fig.5に初期pHと比増殖速度の関係を示す。

初期pH 4～6の範囲ではさほど大きな阻害効果は見られないものの、pH 4以下になると増殖は急激に抑制され、pH3.2付近では増殖が完全に抑制されることが明らかとなった。

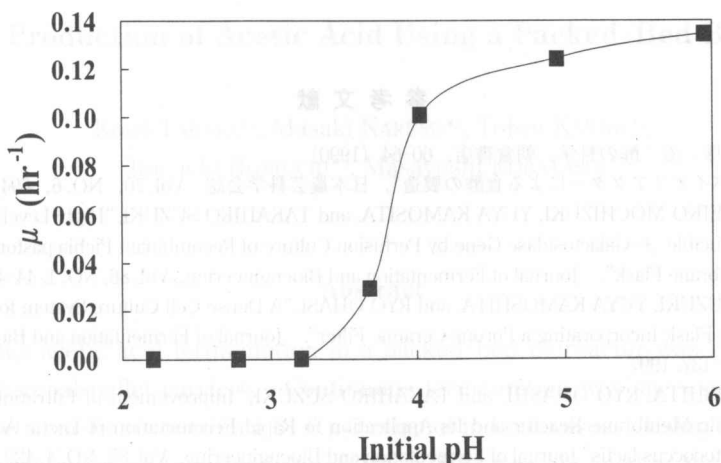


Fig. 5 Effects of initial pH on specific growth rate.

3.1 SCMフラスコを用いた振盪灌流培養

前培養は300mlフラスコ内に100mlの前培養培地を加えたものに継代保存していた寒天培地から1白金耳の菌株を接種し30℃で48時間振盪培養を行った。本培養はSCMフラスコに供給用培地を200ml加え、121℃で15分間オートクレーブ滅菌した後に培養に使用した。菌株は前培養した液体培地をSCMフラスコに10ml接種した。その結果20日間の培養で10(g/l)程度の菌体濃度に達し、最大生産性はおよそ6(g/l·h)であった。菌体濃度の増加が停止した原因としては、培地中の溶存酸素濃度が不足または過剰であったためであると考えられる。酢酸発酵は酸素律速^{9,10)}であるという報告がなされており、DO計を用いて溶存酸素濃度を制御することが好ましいと考えられるが、今回は長期に渡って発酵を行うためDO計は用いなかった。これ以上菌体濃度を高めるには溶存酸素濃度を随時観察し最適濃度に制御する必要がある。その方法については現在検討中であり今後の検討課題とする。

4. 結 言

SCMフラスコを用いた振盪灌流培養で酢酸発酵の効率化を図るため、使用菌株の発酵特性を実験的に検討した。

- 1) 初期エタノールによる基質阻害の影響は32(g/l)以上になると顕著に現れた。
- 2) 菌株の最適温度圏は20～35℃であり40℃以上では増殖が困難であった。又最適温度圏の活性化エネルギーは7.5～10(kcal/mol)と通常の微生物のものが13～17kcal/molであるのに比べ

若干低い値となった。

- 3) 初期酢酸濃度による阻害効果は低濃度から大きく現れており, 32(g/l) 以上では増殖が困難であることが明らかとなった。
- 4) 初期pHによる阻害効果は, pH 4 以下になると急激に大きくなり, 初期pH3.2以下では増殖が困難であることがわかった。
- 5) 以上の結果をもとにSCMフラスコによる振盪灌流培養を行った結果, 約20日間の培養で10 (g/l) 程度の菌体濃度を達成することに成功し, その間の最大生産性はおよそ6 (g/l·h) であった。

参 考 文 献

- 1) 館山 實, 大塚 滋: 酢の科学, 朝倉書店, 60-64 (1990)
- 2) 森 明彦, “バイオリクターによる食酢の製造”, 日本農芸学会誌 Vol. 70, NO. 6, 694-697 (1996)
- 3) RYO OHASI, EIKO MOCHIZUKI, YUYA KAMOSHITA, and TAKAHIRO SUZUKI, “High-Level Expression of the Methanol-Inducible β -Galactosidase Gene by Perfusion Culture of Recombinant *Pichia pastoris* Using a Shaken Ceramic Membrane Flask”. *Journal of Fermentation and Bioengineering.*, Vol. 86, NO. 1, 44-48. 1998
- 4) TAKAHIRO SUZUKI, YUYA KAMOSHITA, and RYO OHASI, “A Dense Cell Culture System for Microorganisms Using a Shake Flask Incorporating a Porous Ceramic Filter”. *Journal of Fermentation and Bioengineering.*, Vol. 84, NO. 2, 133-137. 1997
- 5) YUYA KAMOSHITA, RYO OHASHI, and TAKAHIRO SUZUKI, “Improvement of Filtration Performance of Stirred Ceramic Membrane Reactor and Its Application to Rapid Fermentation of Lactic Acid by Dense Cell Culture of *Lactococcus lactis*” *Journal of Fermentation and Bioengineering.*, Vol. 85, NO. 4, 422-427. 1998
- 6) YUYA KAMOSHITA, RYO OHASHI, and TAKAHIRO SUZUKI, “A Dense Cell Culture System for Aerobic Microorganisms Using a Shaken Ceramic Membrane Flask with Surface Aeration. *Journal of Fermentation and Bioengineering.*, Vol. 85, NO. 2, 218-222. 1998
- 7) RYO OHASHI, YUYA KAMOSHITA, MICHIMASA KISHIMASA KISHIMOTO, and TAKAHIRO SUZUKI, “Continuous Production and Separation of Ethanol without Effluence of Wastewater Using a Distiller Integrated SCM-Reactor System”. *Journal of Fermentation and Bioengineering.*, Vol. 86, NO. 2, 220-225. 1998
- 8) 宮崎 俊一, 大坪 雅史, 青木 央, 澤谷 拓治, “分離酢酸菌株によるマルメロ, アスパラを原料とした酢酸発酵”, 日本食品科学工学会誌 Vol. 43, NO. 7, 858-865 (1996)
- 9) 佐伯 明比古, “アルギン酸カルシウムゲルを担体とした固定化酢酸菌による食酢の製造” 日本食品工業学会誌 Vol. 37, No. 3, 191-198 (1990)
- 10) 大菅 順市, 森 明彦, 加藤 錠治, Acetic Acid Production by Immobilized *Acetobacter aceti* Cells Entrapped in a κ -Carrageenan Gel. *Journal of Fermentation Technology.* Vol. 62, 139-149 (1984)

Abstract 訳

Acetobacter pasteurianus を用いた酢酸発酵に及ぼす因子について実験的に検討した。酢酸菌の増殖は, 初期エタノール濃度 >32 (g/l), 初期酢酸濃度 >32 (g/l), 初期pH <3.2 , 培養温度 $>40^{\circ}\text{C}$ という条件では阻害された。また酢酸菌の増殖における最適温度域は $20\sim 35^{\circ}\text{C}$ であった。本菌株を用い酢酸発酵を効率化するためSCM (shaken ceramic membrane) フラスコを用いた高菌体濃度培養システムを行った。その結果, 約20日間の培養で 10 (g/l) 程度の菌体濃度を得ることができた。