

充填塔型バイオリアクターによる連続酢酸発酵の効率化*1

田畠 浩司*2・鳴海 正樹*2・菅野 亨*3
堀内 淳一*3・小林 正義*3

Effective Production of Acetic Acid Using a Packed-Bed Bioreactor*1

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

Abstract

Continuous acetic acid fermentation in a packed-bed bioreactor was conducted using ceramic or charcoal pellet carriers. Continuous fermentation was successfully conducted using a synthetic medium containing 31.6 g/l ethanol in both cases. Using the ceramic carrier, a maximum acetic acid productivity of 2.07 g/l/hr was obtained at the dilution rate of 0.08 hr⁻¹, while using charcoal pellets, the maximum acetic acid productivity reached 5.48 g/l/hr at a dilution rate of 0.16 hr⁻¹. From these results, it was determined that charcoal pellets are preferable to ceramic carriers as packed media for vinegar production.

1. 結 言

酢酸発酵に用いられる酢酸菌は増殖並びに発酵速度が遅く、発酵の効率化を実現するためにはリアクター内の菌体濃度を高く維持することが必要とされている。これまで菌体濃度の高め方についてはいくつかの方法が考案¹⁻⁵⁾されており、担体に微生物を固定化して発酵を行う固定化法⁶⁻¹⁴⁾や菌体をリアクター内にとどめたまま発酵を行うリサイクル及びろ過培養¹⁵⁻¹⁸⁾など多くの方法について検討が行われている。中でも、菌体固定化法については、一般に実験装置の操作・管理が簡便であること、安定的に発酵を行えることなどの理由から多くの報告例があり、用いられる担体もカラギーナン⁸⁾、アルギン酸塩^{6,7)}のような天然物（包括法）、セラミックスモノリス⁹⁻¹¹⁾などの多孔質（付着法）、酸化チタン¹²⁾などの無機質（イオン結合法）などさまざまである。これらの報告において、そのほとんどは酢酸の生産速度は高いものの生成酸濃度が低かったり、高生産性を得るために高濃度の酸素を必要とするなど、工業化を念頭においた実用的条件下で検討が行われているものは多くない。

*1 本研究の一部は化学工学会第64年会（1999年3月）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

そこで本報では、微生物固定化担体として、一般的に用いられているシランリングおよび近隣の生田原町より大量に発生するキノコ廃培地を起源とする木炭ペレットを用いた連続酢酸発酵を行った。そして、工業化を念頭においた実用的運転条件、すなわちAirを使用し、生成酸濃度が約4%となるような基質濃度条件下における充填塔型バイオリアクターの発酵特性についていくつかの知見を得たので報告する。

2. 実験方法

2.1 使用菌株

本研究で使用した菌株は北海道工業技術センターより提供していただいた、No.1株 (*Acetobacter Pasteurianus*に属する) を使用した¹⁹⁾。

2.2 培地組成と前培養

連続発酵並びにその前培養には、あらかじめオートクレーブ処理した合成基質を使用した。あらかじめ前培養した培養液の一部を新鮮な前培養培地 (グルコース10g/l, 酵母エキス10g/l, ポリペプトン5g/l, エタノール20g/l, 肉エキス2g/l, 酢酸ナトリウム2g/l, Tween 80 (5%溶液)10ml, 塩類溶液5g/l, pH6.8)150mlに接種し30℃で48時間振とう培養したものを以下の連続発酵試験に用いた。連続発酵試験には、グルコース5g/l, 酵母エキス2.5g/l, ポリペプトン5g/l, エタノール31.6g/l, からなる合成基質を使用した。

2.3 固定化担体

固定化担体はシリカ (SiO_2) を主成分とする円筒形多孔質担体のシランリング (空隙率0.7, 比表面積 $0.15 \text{ m}^2/\text{g}$, サイズ: 外径15mm, 内径9mm, 長さ16mm) および北海道生田原産のキノコ廃培地を起源とする, キノコ廃培地由来木炭ペレット (空隙率0.43, 比表面積 $200 \text{ m}^2/\text{g}$, サイズ: 直径9mm, 高さ4mm) を使用した。木炭ペレットはフルイにかけ, 粒子径を均一にして用いた。図1にシランリング, 図2にキノコ廃培地由来木炭ペレットを示す。

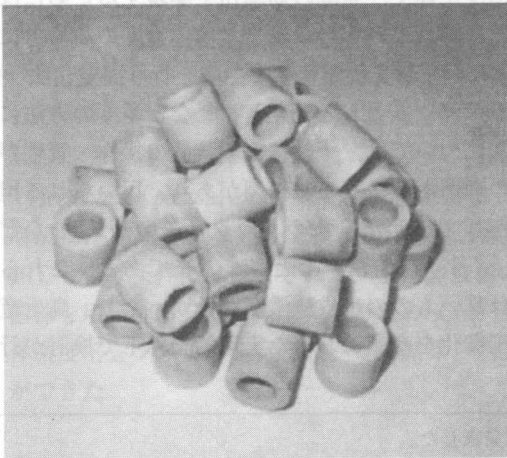


図1 シランリング

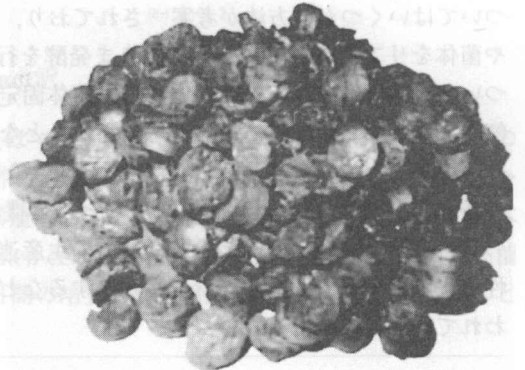


図2 キノコ廃培地由来木炭ペレット

2.4 実験装置

連続酢酸発酵は図.3 に示すように、定量送液ポンプを用い下部より培地を供給し発酵液を上部からオーバーフローにより流出させる構造としたガラス製の充填塔型バイオリアクター（東京理化製、容量775ml）を用いた。無菌空気（0.20~2.0 v/v/m）はリアクター底部より供給し、恒温水により培養温度30℃に制御して連続発酵を行った。実際に固定化担体を充填した際の空隙率はシランリングで0.75、木炭ペレットで0.48であった。

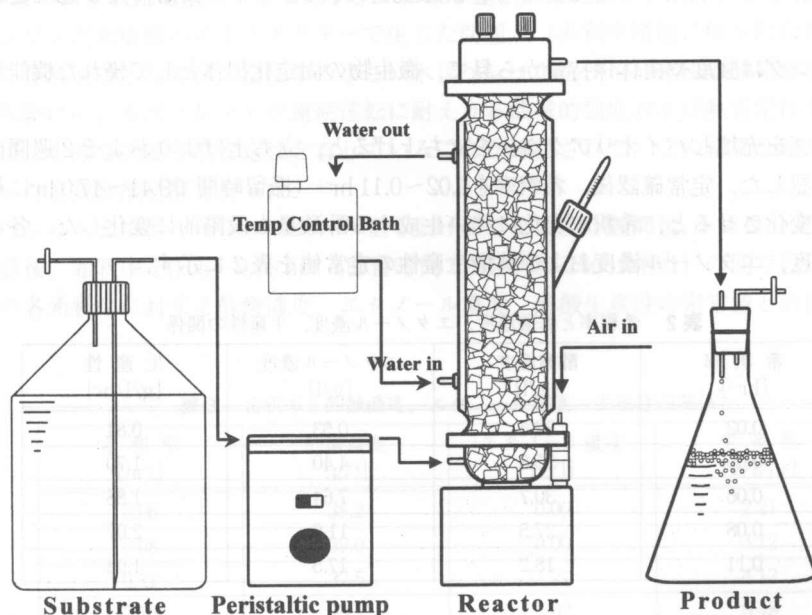


図3 充填塔型バイオリアクター

2.5 分析方法および菌体数の測定

酢酸、エタノール、および糖は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて分析した。HPLCの分析条件を表1に示す。菌体数の測定は紫外可視分光光度計（島津製UV-1600PC）を用い、OD660における吸光度より定量した。

表1 HPLC分析条件

カラム	東ソー TSKgel SCX (7.8mm ϕ × 30cm) × 2
カラム温度	40℃
溶離液	50mM HClO ₄
溶離液流量	0.9ml/min
検出方法	RI, UV(210nm)
サンプル注入量	500 μ l
カラムオープンポンプ	CO-8010 (東ソー) CCPM-II (東ソー)
検出器	示差屈折率検出器 (RI-8020, 東ソー) 紫外可視検出器 (UV-8020, 東ソー)

実験結果および考察

3.1 シランリング充填型バイオリアクターによる連続酢酸発酵

我々は、これまでもシランリングを使用しエタノール、酢酸のそれぞれの発酵について次のことを確認している。

- 1) シランリングを充填したリアクター内は完全混合状態となる^{20,22)}。
- 2) 固定化担体として利用することにより、酢酸発酵で700日という長期に渡る連続運転が可能である^{20,21)}。
- 3) シランリングは強度や菌体保持量から見て、微生物の固定化担体として優れた機能を有する^{20,22)}。

シランリングを充填しバイオリアクターを立ち上げると、立ち上げよりおよそ2週間後に一点目の定常を確認した。定常確認後、希釈率を $0.02 \sim 0.11 \text{ hr}^{-1}$ （滞留時間で $9.41 \sim 47.0 \text{ hr}$ に相当）の間で段階的に変化させると、希釈率変化に伴い生成する酢酸量も段階的に変化した。各希釈率における酢酸濃度、エタノール濃度および酢酸生産性の定常値を表2に示す。

表2 希釈率と酢酸濃度、エタノール濃度、生産性の関係

希 釈 率 [hr ⁻¹]	酢酸濃度 [g/l]	エタノール濃度 [g/l]	生 産 性 [g/l/hr]
0.02	39.6	0.53	0.84
0.05	35.8	4.40	1.70
0.06	30.7	7.64	1.88
0.08	27.5	11.0	2.07
0.11	18.2	17.5	1.93

シランリング充填型バイオリアクターにおける最大生産性は希釈率 0.07 hr^{-1} における 2.07 g/l/hr が最大であった。しかしながら、この希釈率における出口エタノール濃度は高く、実用的な生産性は希釈率 0.05 hr^{-1} における 1.7 g/l/hr 程度であった。

図4に各希釈率と酢酸の対理論収率（消費エタノール量から算出される酢酸の理論値に対する実際に検出された酢酸量）の関係について示す。

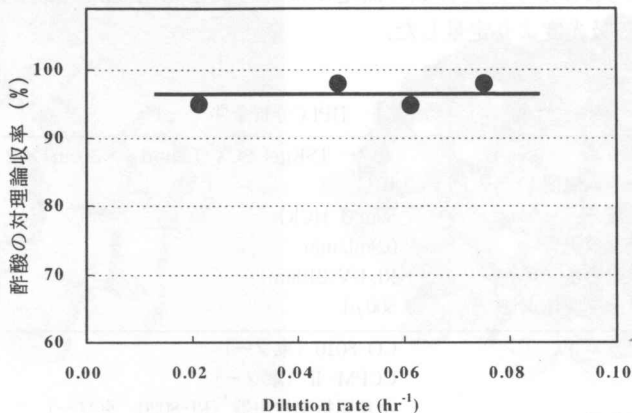


図4 希釈率と酢酸対理論収率の関係

本バイオリアクターにおける酢酸対理論収率は、希釈率に関わらず一定の値（約96%）を示し、高効率で酢酸に変換されていることが明らかとなった。

シランリングを用いるバイオリアクターは、スタートアップが容易であり、かつ長期的に安定運転が可能であるなどの長所を有する。一方でリアクター内が完全混合状態となるため、希釈率の増加（すなわち滞留時間の減少）に伴う出口エタノール濃度の上昇が欠点として挙げられる。

3.2 木炭ペレット充填型バイオリアクターによる連続酢酸発酵

シランリング充填型バイオリアクターで生じた問題点（希釈率増加に伴う出口エタノール濃度の上昇）を解決するために、空隙率の小さい木炭ペレットを使用し連続酢酸発酵を試みた。連続運転に先駆けて、木炭ペレットが連続運転に耐えうる機械的強度および熱安定性を有するか試験した結果、十分な強度と熱安定性を有していることが確認された。この結果を踏まえ木炭ペレットを用いた連続酢酸発酵を行った。

木炭ペレット充填型バイオリアクター立ち上げよりおよそ3週間後、一点目の定常を確認した。定常確認後、希釈率を $0.06 \sim 0.16 \text{ hr}^{-1}$ （滞留時間で6.41～17.2 hrに相当）の間で段階的に変化させたときの各希釈率に対する酢酸濃度、エタノール濃度、酢酸生産性の定常値との関係を表3に示す。

表3 希釈率と酢酸濃度、エタノール濃度、生産性の関係

希 釈 率 [hr ⁻¹]	酢酸濃度 [g/l]	エタノール濃度 [g/l]	生 産 性 [g/l/hr]
0.06	38.2	0.00	2.21
0.08	39.0	0.00	3.12
0.11	37.5	1.21	4.12
0.16	35.1	3.02	5.48

本バイオリアクターを用いた連続酢酸発酵については、現在も検討中であるが、これまでのところ希釈率 0.16 hr^{-1} において最大生産性は 5.48 g/l/hr （シランリングの約3倍に相当）を確認している。シランリング充填型バイオリアクターと本バイオリアクターにおける、最も異なっている点は、前者が高空隙を有し完全混合槽となるのに対し、後者は低空隙となるためリアクター内で押し出し流れが生じていると考えられる点である。そのため、高希釈率下での運転が可能となり高生産性が得られたと推察される。

本バイオリアクターは、立ち上げよりおよそ2ヶ月後においても非常に高安定であった。また、バイオリアクター出口付近における遊離菌体数（乾燥菌体重量に換算）を測定したところ、 0.04 g/l （シランリングでは 0.12 g/l 程度の値を示した）と非常に低い値を示すことが分かった。これは木炭ペレットが高表面積、高充填率を有することに起因すると考えられる。本リアクターの長期安定性、菌体保持量など詳細については現在検討中であるが、木炭ペレットは機能性に優れた固定化担体であることが示された。

4. 結 言

(1) シランリング充填型バイオリアクターはスタートアップが容易で長期的に渡る連続運転が可能である。一方、希釈率増加に伴い出口エタノール濃度が上昇しやすい欠点を有する。

- (2) キノコ廃培地由来木炭ペレットは連続運転に耐える強度、熱安定性を有し、機能性に優れた固定化担体であることが分かった。

参考文献

- 1) 鮎山 實, 大塚 滋: 酢の科学, 朝倉書店, 97-108 (1990)
- 2) 森 明彦: バイオリアクターによる酢の製造, *New Food Industry*, Vol. 34, No. 10, 1-11 (1992)
- 3) 森 明彦: 食酢とバイオリアクター (その1), 讀協, Vol. 81, No. 9, 601-607 (1986)
- 4) 森 明彦: 食酢とバイオリアクター (その2), 讀協, Vol. 81, No. 11, 789-794 (1986)
- 5) 戸田 清: 連続微生物反応プロセスの研究, *生物工学会誌*, Vol. 72, No. 6, 481-490 (1994)
- 6) 佐伯昭比古: 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)
- 7) 佐伯昭比古: アルギン酸カルシウムゲルを担体とした固定化酵母と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. 9, 722-725 (1990)
- 8) J. Osuga, A. Mori, J. Kato: Acetic Acid Production by Immobilized *Acetobacter aceti* Cells Entrapped in a k-Carrageenan Gel, *J. Ferment. Technol.*, Vol. 62, No. 2, 139-149 (1984)
- 9) C. Ghommidh, J. M. Navarro, G. Durand: A Study of Acetic Acid Production by Immobilized *Acetobacter* Cells: Oxygen Transfer, *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 24, 605-617 (1982)
- 10) 近藤 正夫, 鈴木 康之: ハニカム状セラミックモノリスを担体とする固定化酢酸菌による食酢の製造, *発酵工学*, Vol. 66, 393-399 (1988)
- 11) 高田 満郎, 平光 武: Continuous Production of Vinegar Using Bioreactor with Supports of Porous Ceramics, *日食工*, 38, 967-971 (1991)
- 12) J. F. Kennedy, J. D. Humphreys, S. A. Barker: Application of Living Immobilized Cells to The Acceleration of The Continuous Conversions of Ethanol (wort) to Acetic Acid (Vinegar)-Hydrous Titanium (IV) Oxide-Immobilized *Acetobacter* Species, *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 2, 209-216 (1980)
- 13) M. Sueki, N. Kobayashi, A. Suzuki: Continuous Acetic Acid Production by The Bioreactor System Loading a New Ceramic Carrier for Microbial Attachment, *Biotechnol. Lett.*, Vol. 13, No. 3, 185-190 (1991)
- 14) A. Nanba, K. Kimura, S. Nagai: Vinegar Production by *Acetobacter rancens* Cells Fixed on a Hollow Fiber Module, *J. Ferment. Technol.*, Vol. 63, No. 2, 175-179 (1985)
- 15) 玉井 正弘, 丸子 修, 門 隆興: 中空糸膜モジュールを用いた菌体の完全濃縮培養法による食酢の連続生産, *日本食品科学工学会誌*, Vol. 44, No. 2, 119-125 (1997)
- 16) 玉井 正弘, 丸子 修, 門 隆興: 中空糸膜モジュールを用いた濃縮菌体の一部排出培養法による食酢の連続生産, *日本食品科学工学会誌*, Vol. 44, No. 2, 126-132 (1997)
- 17) Y. S. Park, H. Ohtake, K. Toda: Acetic Acid Production Using a Fermenter Equipped with a Hollow Fiber Filter Module, *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 33, 918-923 (1989)
- 18) Y. S. Park, H. Ohtake, M. Fukaya, H. Okumura, Y. Kawamura, K. Toda: Enhancement of Acetic Acid Production in a High Cell-Density Culture of *Acetobacter aceti*, *J. Ferment. Bioeng.*, Vol. 68, No. 5, 315-319 (1989)
- 19) 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, アスバラガス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)
- 20) 富田 弘毅: たまねぎの食品機能開発と食酢製造法, 北見工業大学大学院修士課程学位論文 (1997)
- 21) 小林 秀彰, 山口 文, 富田 弘毅, 菅野 亨, 小林 正義: 二段連続バイオリアクターを用いたタマネギ食酢製造の最適操作, *北見工業大学研究報告*, Vol. 29, No. 1, 1-8 (1997)
- 22) 小林 秀彰, 山口 文, 富田 弘毅, 中井 義昭, 菅野 亨, 小林 正義: 二段連続式バイオリアクターを用いたタマネギ食酢の製造法と食品機能性開発, *北見工業大学研究報告*, Vol. 29, No. 2, 47-53 (1997)

Abstract 訳

2種類の固定化担体(セラミック担体と木炭ペレット)を用い、充填塔型バイオリアクターによる連続酢酸発酵試験を行った。31.6 g/lのエタノールを含む合成培地を用いて連続運転を行っ

