

学 位 論 文 題 名

Aspergillus niger の微生物膜による

クエン酸生成に関する工学的研究

学位論文内容の要旨

クエン酸の工業的製造は主原料の性状の違いに応じて、固体培養法、液体表面培養法、液体深部培養法により生産されている。このうち微生物膜を用いる液体表面培養法によるクエン酸生産は、古くから応用され、その反応速度が遅いにもかかわらず、深部培養法への新しい設備投資が経済的に引き合わない場合が多いことから現在でも存続している。しかし、その工学的解析は殆どなされていない。微生物膜型反応器としてはこの他に回転円板型反応器があり、廃水処理の分野でその操作特性が検討され、欧米、日本などで実用化されているが、有用物質生産に用いる場合、基質濃度が高いため従来の設計基準をそのまま適用できない。

本論文はクエン酸生産に液体表面培養法、回転円板型反応器を用いた場合のクエン酸発酵特性に及ぼす操作条件の影響を反応工学的に検討し、操作設計法を確立することを目的としている。

本論文は6章からなる。第1章は序論で、液体表面培養法、固体培養法、液体深部培養法と変遷してきたクエン酸製造に用いられている培養法の歴史的変化、工業的に用いられるクエン酸の将来的な用途について触れ、本研究の目的について述べたものである。

第2章においては、液体表面培養法における培地の液深さとクエン酸生成速度の関係を検討した。培養瓶の直径8.4cmの場合、培養液深さが4.5cmの時、単位表面積当りに存在する菌体の乾燥重量（菌体膜表面密度）は培養終了時に $40\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ であり、液深さがこれ以下の時は菌体膜表面密度は $40\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ より低く、単位面積あたりのクエン酸生成速度も低い。これに対し、液深さを4.5cm以上にとると、菌体膜表面密度は上昇するが、単位面積あたりのクエン酸生成速度は上昇せず、膜表面密度が $40\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ の場合の生成速度と殆ど変わらない。このために、液中のクエン酸濃度が最大値に到達する時間は遅れる。このため単位面積当りの生成速度は低下しないが、クエン酸濃度が最大値に達する時間は長くなり、液深さ4.5cmがクエン酸生成の至適深さとなる。ついで液体表面培養によるクエン酸製造の操作設計と生産管理の基礎的知見を得るために、培養の時間経過を記述するための反応工学的モデル式の適用を試みた。菌体増殖に対しては Monod

型を、クエン酸生成に対しては Luedeking-Piret 型の速度式を仮定し、非線形最小自乗法によって諸速度の係数を決定した。数回にわたる実験の結果について諸係数を求め、その平均値を用いて培養経過をシミュレーションすると、液深さが4.5cm以下の場合については実験結果を良好に表現できた。更に表面培養における酸素濃度の影響について実験的に検討し、気相の酸素濃度を空気よりも上げてもクエン酸収率と菌体収率は低下し、生産性向上には有効な手段とは言えなかった。

第3章においては上述の結果に基づき、原料として安価なデンプンを用いた液体表面培養によるクエン酸生成に与えるデンプン初期濃度の影響と、反応速度論的モデル式の適用を検討した。その結果、クエン酸の消費デンプンに対する収率は、デンプンの初期濃度とともに増加し、 $180 - 220 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ではほぼ一定値（消費デンプンをグルコース当量に換算して0.46）となり、ショ糖を原料とした値（ $140 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ）とほぼ同じになる。反応速度論的モデルの構築には、デンプンの利用に関して残存デンプン（デンプンの遅分解性部分）を考慮した Monod 型の速度式を仮定した。菌体とクエン酸生成に対しては第2章と同様にグルコース濃度に対して Monod 型と Luedeking-Piret 型の速度式を適用し、これらを組み合わせてパラメータを推定したところ、良好に培養経過を表すことが出来た。

液体表面培養は簡便であるが、生産速度が遅い欠点を持つ。微生物膜型反応器としての回転円板型反応器は、微生物膜面積の制御が容易で表面培養よりもクエン酸生成速度も高く、深部培養よりも菌体と培地の分離が容易であり、また菌体の反復使用も容易のため省エネルギー的である。第4章においては、回転円板型反応器によるクエン酸生成の諸特性と菌体膜比表面積、気中の酸素濃度、円板回転速度並びに反復回分培養による半連続培養等の操作条件との関係を検討した。培養終了時には培地中の炭素源は90%以上消費され、最大菌体膜表面密度は比表面積（培地体積に対する菌体膜表面積の比）に逆比例した。すなわち、消費された糖に対する菌体の収率が比表面積に依存せず一定である。回転円板型反応器では、単位膜面積当りのクエン酸生成速度は、菌体膜の比表面積が 4 cm^{-1} 以上（この時の膜表面密度は約 $4 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 以下）ではほぼ一定である。このため反応器全体において一定の培地液量では、生成速度は膜面積に比例して増加する。すなわち、比表面積を大きくすると単位培地容積当りの生成速度を向上できる。気相酸素濃度の影響については、酸素濃度100%にした場合の生成速度が空気(21%)の場合の1.5倍程度になること、またクエン酸収率が低下しないことから、酸素濃度の増加は生成速度の向上には有効である。円板の回転速度についての検討の結果、溶存酸素濃度を $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上に保つ回転数（円板枚数8枚、培地液量400mlの場合には5 rpm）ではクエン酸生成速度は影響されなかった。よって消費

動力の面から、この回転速度が最適である。菌体膜は回転円板型反応器中に保持したまま、培養液のみ半連続的に交換する培養法の生成速度は、報告されている連続流れ式深部培養法と同程度である。また生成したクエン酸濃度は連続培養の数倍であるので培地中からクエン酸を濃縮改収するプロセスを考慮すると、連続流れ式深部培養法よりもプロセス全体としての生産性が高い。このように生産性を向上させるために、フェッドバッチとともに非常に有効な手段である。

第5章では第4章の結果（回転円板型反応器では単位膜面積当りのクエン酸生成速度は、菌体膜の比表面積が 4 cm^{-1} 以上ではほぼ一定）から、単位膜面積当りのクエン酸生成速度が存在する菌体量のみによって決まるのではなく、基質、特に酸素の移動速度によって大きく影響されている可能性が高いので、菌体膜中における糖、クエン酸、並びに酸素の拡散を考慮した反応速度式を検討した。膜深さ方向の拡散方程式と各成分の拡散係数の値および扱う濃度範囲を考慮すると、糖とクエン酸については膜深さ方向にはほとんど濃度分布が生じないと計算された。糖の濃度に対しては、菌体の増殖には Monod 型の速度式を、クエン酸生成については Luedeking-Piret 型の速度式を適用した。酸素の影響については、Adair-Pauling のモデルを参考にした基質阻害型速度式を菌体の増殖と、クエン酸生成の両速度式に適用した。以上の反応速度モデルを用いた非定常物質収支式の数値計算の結果、クエン酸発酵の時間経過、クエン酸生成速度と膜比表面積の相関、ならびにクエン酸生成速度と気相中酸素濃度の相関が実験結果と良好に一致した。よってこの方法は、操作条件とクエン酸発酵の非定常的特性との関係を推定する上で有効であった。

第6章では *Aspergillus niger* の表面培養及び回転円板型反応器における微生物膜によるクエン酸生成に関する諸特性と操作条件との関係、速度論的な解析を総括し、これからの問題点を指摘し、膜状微生物による有用物質生産にこの反応器を応用する上での操作設計と生産管理上の基本的な取扱方法について概説した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	木下晋一
副査	教授	竹澤暢恒
副査	教授	高井光男
副査	助教授	今井弘

クエン酸は工業的には固体培養法、液体表面培養法、液体深部培養法等で生産されている。この中で微生物膜を用いる液体表面培養によるクエン酸生産法は、古くから実施されているが、その工学的解析は少なく、仕込み倍地の液深さのような基本的な操作基準さえも経験に頼っているのが実状である。一方、微生物膜型反応器のもう一つの代表的な反応器である回転円板型反応器は廃水処理の分野でその操作特性が検討され、欧米各国、日本などで実用化されているが、高濃度基質を用いる有用物質生産に用いる場合の操作設計法については検討されていない。このように液体表面培養、回転円板反応器による培養等の微生物膜を用いた有用物質生産の操作設計法は確立されていない。

本論文はクエン酸生産に液体表面培養法、回転円板型反応器を用いた場合のクエン酸発酵特性に及ぼす操作条件の影響を反応工学的に検討し、操作設計法を確立することを目的としたもので6章からなっている。

第1章は序論で、クエン酸製造に用いられている培養法の歴史的変遷、クエン酸の工業的用途とその将来性について触れ、本研究の目的について述べる。

第2章においては、液体表面培養法において、単位表面積当りに存在する菌体の乾燥重量（菌体膜表面密度）が $40\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ になると、単位面積当りのクエン酸生成速度はほぼ一定となり、培養液単位体積基準のクエン酸生成速度は低下する事を見出し、菌体膜表面密度 $40\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ に相当する培養液深さ4.5cm程度（糖濃度 $140\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ の場合）がクエン酸生成の至適深さとなることを明らかにした。ついで培養の経時変化を予測するための反応工学的モデル式の適用を試み、菌体増殖に対しては Monod 型を、クエン酸生成に対しては修正 Luedeking-Piret 型の速度式を適用し、数回にわたる実験の結果から非線形最小自乗法によって諸パラメーターを決定し、培養経過をシミュレーションし、液深さが4.5cm以下の場合についてはクエン酸比生成速度の実験結果を良好に表現できることを示している。

第3章においては、原料としてデンプンを用いた液体表面培養によるクエン酸生成においてク

エン酸の対消費デンプン収率がデンプンの初期濃度とともに増加し、 $180-220\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ではほぼ一定値(0.46)となる事を見出し、ショ糖($140\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$)を原料とした収率とほぼ同じ値であった。更にデンプンの利用に関して残存デンプン(デンプンの非分解性部分)を考慮した Monod 型の速度式を適用する事により、ショ糖を原料とする場合と同様に培養経過を表現できることを示した。

第4章では回転円板型反応器によるクエン酸生成の諸特性を検討し、最大菌体膜表面密度は比表面積(倍地体積に対する菌体膜表面積の比)に逆数に比例し、消費糖に対する菌体の収率が比表面積に依存せず、一定である事を見出した。単位菌膜面積当りのクエン酸生成速度が菌体膜の比表面積が 4 cm^{-1} 以上ではほぼ一定となる事を見出し、比表面積を大きくすれば生成速度が高まることを示した。気相酸素濃度の増加は生成速度の向上に有効であることを見出し、純酸素を用いた場合には空気(21%)の場合の1.5倍のクエン酸生成速度が得られる事を見出した。回転円板型反応器で菌対を保持したまま、培養液のみを交換する半連続培養法の生産性は、報告されている連続流れ式深部培養法と同程度であり、クエン酸濃度は連続培養より数倍高いので、連続流れ式深部培養法よりもプロセス全体としての生産性が高く、生産性向上の手段として有効であることを明らかにした。

第5章では、菌体膜中における糖、クエン酸、及び酸素の拡散を考慮した反応モデルを構築し、菌体の増殖に Monod 型の速度式を、クエン酸生成に修正 Luedeking-Piret 型の速度式を適用した。酸素の影響については、微生物膜への拡散を考慮したモデルを考え、基質阻害型速度式を菌体の増殖とクエン酸生成の両速度式に適用した。反応モデルがクエン酸発酵の経時変化、クエン酸生成速度と膜比表面積の関係、並びにクエン酸生成速度と気相中酸素濃度の関係等の実験結果と良好に一致する事を示し、この方法がクエン酸発酵の操作条件等を推定する上で有効であることを示した。

第6章では本研究で得られた知見と成果を総括し、今後の問題点を指摘し、膜状微生物を用いた反応器による有用物質生産の操作設計法と生産管理上の基本的な取扱方法について概説している。

以上これを要するに、本論文は微生物膜によるクエン酸発酵の諸特性と操作条件との関係に関して多くの反応工学的な新知見を得ており、微生物膜を用いた有用物質生産の操作設計上の指針を与え、特に回転円板型反応器を有用物質生産に適用できることを証明し、生物化学工学の進歩に寄与するところが大きい。

よって、著者は博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。