グルタミン酸醗酵の半連続化に関する検討 (第 2 報)

一次醗酵槽の連続運用

椎 尾 剛, 土屋 卓 児 (味の素株式会社)

昭和 40 年 11 月 4 日受理

A Study on the Semi-continuous Culture of Glutamic Acid Fermentation
Part II. Continuous Operation of the Primary Fermentation TankBy Tsuyoshi SHIIO and Takuji TSUCHIYA
Ajinomoto Co., Inc.

In the previous report, we found that, at the secondary fermentation the cell concentration of the medium recovered to that of the end point of the primary fermentation in 4 or 6 hours. Then, this culture can be used for further division as primary fermentation. That is to say, after the primary fermentation has terminated the culture medium is divided into two. One half is transferred to other tank (secondary fermentation tank), a basic medium is added to it and is cultured to produce L-glutamic acid. Another half remained in the primary fermentation tank is mixed with basic medium and is cultured about 4 hours for further division as primary fermentation. By repeating these treatments successively, L-glutamic acid can be produced continuously. In comparison with common batch operation about 40% productivity-increase can be obtained by this method.

(Received November 4, 1965)

I. 緒 言

著者らは第 1 報⁽¹⁾において、グルタミン酸醗酵の対数期末から減速期の時期に醗酵液を分割し、培地を追加して 2 次醗酵するという半連続的醗酵方法を考え、諸条件の検討を行なった。その際、1 次醗酵液を 1/2 容分割後、1 次醗酵槽に新培地 1/2 容追加して培養を続けると、4~6 時間では元の比濁に回復する知見を得たので、この事実に従って 1 次醗酵槽を連続運用し、一連の連続的スケジュールより半連続醗酵を行なわしめ、いっそうの効率向上をはかった。

II. 実験方法

供試菌株: *Brev. lactofermentum* No. 2256.

培地組成: グルコース (澱粉糖化液) 15%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04%, 味液 0.5%, Fe^{++} 2 p.p.m., これにビオチンを所定量添加し, pH 7.0 に調整する。

培養条件: 40 l ジャーフェーマンターに上記培地を殺菌して張り込み、種菌を接種して 31° で通気攪拌培養を行なう。培養中 pH が 7.0 以下になる場合には尿素飽和水を添加した。通気量 1/4 v.v.m., 攪拌数 350 r.p.m. であった。1 次醗酵の連続運用に際しては第 1 図のごと

き連続的スケジュールを想定し、これに基づいた運用の可能性を検討した。すなわち、1 次醗酵槽の 16 時間培養後、醗酵液を 1/2 容分割し 2 次醗酵槽に移行し培地を追加して 2 次醗酵を行なわしめる一方、1 次醗酵槽に残留させた 1/2 容の醗酵液にも培地を追加し醗酵を継続させ、約 4 時間後醗酵液が元の菌濃度に達したとき第 2 回目の分割を行ない、以上の操作を継続して行なう。1 次醗酵槽の連続運用中、1 号タンクについていえば、第 6 回目の醗酵液分割から第 7 回目の醗酵液分割の間隔はタイム・スケジュール上 8 時間となるので、第 6 回目醗酵液分割後に 1 次醗酵槽に加える培地は、ビオチン無添加とし菌増殖を遅延せしめる。したがって第 7 回目の 1 次醗酵液分割を受けた 2 次醗酵槽へ追加する培地、および第 7 回目の分割後の 1 次醗酵槽へ追加する培地は、ビオチン量を補足する。1 次醗酵槽は長期運転を行なうと雑菌汚染が問題となるので、第 9 回目の分割後 1 次醗酵としての運用を打ち切り、2 次醗酵に転換せしめ終了させる。2 次醗酵での追加培地へはビオチンを添加しない (ただし、第 7 回目の 1 次醗酵液分割を受けた 2 次醗酵槽への追加培地には、ビオチンを所定量添加する)。

分析方法：第 1 報に準ずる。

III. 実験結果および考察

1 次醗酵培地ビオチン添加量 $7 \gamma/l$ と $8 \gamma/l$ の 2 段階に実験を行なった。

1. 1 次醗酵培地ビオチン添加量 $7 \gamma/l$ の場合 (2 次醗酵ビオチン $3.5 \gamma/l$ の場合)

第 1 図 半連続醗酵連続運用方式

- * 1 次醗酵槽は培養 16 時間で醗酵液 1/2 容を分割移行し、残りの 1/2 容に培地 1/2 容を混合し、さらに培養し以後 4 時間ごとに分割をくりかえす。
- ** 1 次醗酵液 1/2 容を 2 次醗酵槽へ分割移行し、培地 1/2 容を追加して 2 次醗酵させる。
- *** 第 9 回目の分割後、1 次醗酵槽の 1 次醗酵としての運用を打ち切り、2 次醗酵に転換させる。

1 次醗酵におけるビオチン濃度を $7 \gamma/l$ で行ない、第 1 図のスケジュールにしたがって 1 次醗酵槽を運用した場合の経過は第 2 図のごとくである。1 次醗酵槽では最初 16 時間培養で第 1 回目の分割を行ない、以後 4 時間ごとに分割を繰り返すが、この分割直前の分析値では特殊条件の第 7 回目分割時を除けば、比濁 (菌の増殖度) $0.75 \sim 0.80$ 、残糖 (初糖当りの %) $68.4 \sim 72.0\%$ と、ほぼ安定しており、第 1 図のごときスケジュールで 1 次醗酵を運用できると推測される。タイム・スケジュール上 8 時間の間隔をとった第 6 回目分割～第 7 回目分割においても、第 6 回目分割後に追加する培地をビオチン無添加で行なったところ、第 7 回目分割時の比濁 0.86 、残糖 63.0% とほぼ制御されている。以上の 1 次醗酵液の 2 次醗酵結果は第 1 表のごとくである。醗酵収率の点では問題がないが醗酵時間が $26 \sim 34$ 時間と比較的長く、第 1 図のタイム・スケジュールにある 2 次醗酵所要時間 24 時間を上回っている。したがってビオチン $3.5 \gamma/l$ で 2 次醗酵せしめることは、タイム・スケジュール上不適

第 1 表 2 次醗酵結果 (ビオチン $3.5 \gamma/l$ の場合*)

1 次醗酵液	2 次醗酵時間 (hrs.)	比濁 ($\times 26$)	残糖 (初糖当り %)	グルタミン酸 (%)
第 1 回分割液	28	0.97	8.2	47.86
第 3 回 "	29	0.94	7.3	40.97
第 5 回 "	26	1.05	8.8	47.15
第 7 回 "	31	0.94	8.3	47.60
第 9 回 "	34	0.98	7.0	49.50

* 第 2 図の 1 次醗酵分割液 (1/2 容、ビオチン $7 \gamma/l$ 、ただし第 7 回分割液はビオチン $3.5 \gamma/l$) にビオチン無添加培地 (第 7 回分割液にはビオチン $3.5 \gamma/l$ 培地) を 1/2 容混合し、2 次醗酵させる。

第 2 図 1 次醗酵槽連続使用経過 (ビオチン $7 \gamma/l$ の場合)

— 残糖 — 比濁

* 1 次醗酵液 1/2 容の分割を受けた 2 次醗酵槽では、さらに培地を 1/2 容混合し醗酵させる。

第3図 1次醱酵槽連続使用経過 (ビオチン 8 γ/l の場合)

— 残糖 — 比濁

* 1次醱酵液 1/2 容の分割を受けた2次醱酵槽では、さらに培地 1/2 容混合し、醱酵させる。

第2表 2次醱酵結果 (ビオチン 4 γ/l の場合*)

1次醱酵液	2次醱酵時間 (hrs.)	比濁 (×26)	残糖 (初糖当り%)	グルタミン酸 (%)
第1回分割液	24	1.05	8.8	45.14
第2回 "	22	1.11	7.3	48.82
第5回 "	24	1.04	9.3	44.47
第7回 "	22	1.08	8.0	47.80

* 第3図の1次醱酵分割液 (1/2 容, ビオチン 8 γ/l, ただし第7回分割液はビオチン 4 γ/l) に、ビオチン無添加培地 (第7回分割液にはビオチン 4 γ/l 培地) を 1/2 容混合し、2次醱酵させる。

と考えられる。なお、運転中雑菌の汚染は全く認められなかった。

2. 1次醱酵培地ビオチン添加量 8 γ/l の場合 (2次醱酵ビオチン 4 γ/l の場合)

前回の実験結果から考えて、1次醱酵の連続運用は第7回目分割まで行なえば可能性の検討ができると考えたので、今回の1次醱酵連続試験は第7回目分割までで打切った。その経過を第3図に示す。第7回目分割時の残糖が57%とやや低目になっているが、その他は比濁 0.77~0.84, 残糖 67~70% と非常に安定している。

また第2表に示したごとく、対応する2次醱酵の結果も醱酵収率、醱酵時間ともに良好で (第3表 通常醱酵結果比較参照) 第1図にしたがって運用できると考えられる。1次醱酵液第7回目分割液の2次醱酵が比較的短時間で収率的にも良好であることは醱酵菌の活性が安定していることを示すものであり、第1図のごとき連続スケジュールにおいて突発事故が生じた場合の応急処置として1次醱酵のタイム・スケジュールの間隔を引延ばし、事故の生じた2次醱酵槽の運転を止め修理するとか、1

次醱酵事故の際、前回の分割液を受けた2次醱酵槽を1次醱酵槽として転用する等の手段をとることが可能であると考えられる。

一方、以上のごとく半連続醱酵法を第1図に示した連続的スケジュールにしたがって運営した場合には、第1図スケジュールの反復単位時間と考えられる84時間で、20罐分の醱酵終了液が生産される。これに対して、通常のバッチ運転では、第3表のビオ

チン 4 γ/l 培地の結果を例にとり、醱酵時間を46時間とすれば、84時間の間に醱酵槽8罐で13.4罐分の醱酵終了液が生産されることとなり、これを対照とすれば半連続醱酵の生産性向上率は1.48、すなわち4割8分の増産が期待される。第3表において、最も醱酵時間の短いビオチン 5 γ/l 培地の例をとった場合には、醱酵時間が42時間であるから、8罐・84時間で14.6罐分の醱酵終了液ができる。これと比較すると半連続醱酵の生産性向上率は1.37となり、この場合でも3割7分の増産が見込まれる。通常バッチ運転においてビオチン添加量をさらに増すことは収率の著しい低下をおこし、生産量の面でも、むしろ減少する危険性がある。

第3表 通常醱酵結果

ビオチン (γ/l)	醱酵時間 (hrs.)	比濁 (×26)	残糖 (初糖当り%)	グルタミン酸 (%)
3	53	0.90	10.7	46.54
4	46	0.94	7.5	43.41
5	42	1.00	6.9	42.30

また、半連続醱酵では第1図のスケジュールにあるごとく、1次醱酵槽を第9回目の醱酵液分割後、2次醱酵に切り換え連続運転を打切っているが、これは連続運転中の雑菌汚染の危険度を考慮したもので、1次醱酵槽を2基保有して交互に使用するように設定している。したがって、抗生物質その他、薬剤添加方法⁽²⁾により雑菌汚染の心配がなくなれば、1次醱酵槽は1基ですむことになり、2次醱酵槽についてもタンク空殺菌工程が必要でなくなり、2次醱酵槽の運転間かくも若干短縮されるので

生産性はさらに向上すると考えられる。

従来、醗酵工業における生産性向上は連続醗酵を主体に検討されてきているが、元来、工程の連続化の試みは原料、製品の出・入に要する時間を節約することにより、装置当りの生産向上を計るものであり、醗酵工程のごとく、一反応時間の長いものについては物の出・入に要する時間の比重が低くなり、これを節約することの効果も減少する。一方、醗酵の特性として醗酵菌の増殖期に関連して醗酵時間を短縮できる可能性があり、この面での生産向上効果が比較的大きいと考えられる。著者らの半連続醗酵は醗酵菌の増殖特性を利用し、特に第 1 次醗酵におけるビオチン添加量を通常の 2 倍とし増殖速度を高め、2 次醗酵に移してからビオチン濃度をグルタミン酸蓄積のための至適量に下げるという方法を取り、さらに効果をあげた。このような手段は半連続醗酵特有のものと考えられる。

III. 要 約

第 1 報⁽¹⁾に引続き、グルタミン酸醗酵の半連続化を検

討し、1 次醗酵槽において醗酵液 1/2 容分割後、培地を追加すれば約 4 時間で菌濃度が回復し、4 時間間隔で 2 次醗酵槽へ醗酵液を供給できることが判明したので、これを利用し 1 次醗酵槽の連続運用を試み、醗酵槽 (1 次醗酵槽および 2 次醗酵槽) 8 基 1 組としたタイム・スケジュール (第 1 図参照) を組み、可能性を検討した。

その結果、1 次醗酵をビオチン 8 r/l 培地で行ない、2 次醗酵に移ってビオチン 4 r/l になるように条件設定した場合、醗酵収率もよく、時間的にも想定タイム・スケジュール内で運営できることがわかった。この方式で運転した場合、醗酵槽 (1 次醗酵槽および 2 次醗酵槽) 8 基で 84 時間の間に 20 罐分の醗酵終了液が生産され、通常のバッチ運転に比べ 4 割前後の生産性向上が見込まれる。

-
- (1) 椎尾 剛, 土屋卓児: 本誌, **40**, 213 (1966).
 - (2) 上田清基, 後藤恵三, 篠崎威夫, 前田 馨: 醸工, **41**, 148 (1963).