[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol. 67, No. 6, pp. 955~960, 1993]

蔗糖転化ケインモラセスを原料としたグルタミン酸 発酵の工業的实施

吉井寛依, 吉村 実, 中森 茂, 井上寿美男
(味の素株式会社生産技術研究所)

平成4年10月23日受理

L-Glutamic Acid Fermentation on a Commercial Scale by Use of Cane Molasses with Inverted Sucrose

Hiroe YOSHII, Minoru YOSHIMURA, Shigeru NAKAMORI, and Sumio INOUE
*Technology and Engineering Laboratories, Ajinomoto Co., Inc.,
Suzuki-cho, Kawasaki 210*

A scaled-up trial of L-glutamic acid fermentation with cane molasses treated with mineral acids or enzymes for the hydrolysis of sucrose is described. Of the mineral acids tested, sulfuric acid gave the best results. A commercial-scale process for treatment was established. In addition, an enzymatic process on the commercial-scale was established that used crude invertase obtained as a by-product of yeast extract production from cells of *Saccharomyces cerevisiae*. In a 60 kl fermentor, the hydrolyzed cane molasses gave a yield increased by about 3% compared with nonhydrolyzed cane molasses; the concentration was 5 g/l. (Received October 23, 1992)

緒 言

ケインモラセスをインベルターゼもしくは硫酸で前処理し、蔗糖をフラクトースとグルコースに転化した原料を使用することにより、トレハロースの副生が抑制されグルタミン酸発酵の生産収率の向上が実現することを報告した⁽¹⁾。これを工業化する際に、以下に考えられる幾通りかの現実的な方法がある。(i) 転化プロセスに酸を使用する、(ii) 安価なインベルターゼを使用する、(iii) 固定化インベルターゼを使用する。

著者らは、上記3方法について工業化を前提とした開発研究を行った。本報告においては、実用的な転化に用いる酸の種類を検討し硫酸が適していることを見出し、また、インベルターゼ源としては、市販のものも使えるが、酵母エキス製造残渣が安価であり適していることを見出した。硫酸またはインベルターゼを用いて、ブラジル産のケインモラセスを転化し、この転化糖を原料としてグルタミン酸発酵を実施した。工業的で大規模な装置を用いて検討したところに特徴がある。この試験研究に

おけるグルタミン酸発酵は、60 kl 規模の発酵槽を用いて行ったが、さらに大規模な生産運転を実施する際の有力な基礎資料となった。

次報以後においては、固定化インベルターゼの大量製造、それを用いた大型スケールにおけるケインモラセスの連続転化の検討について報告する。

実 験 方 法

1. 原料ケインモラセス ブラジル産のケインモラセスを使用した。原料の直糖/全糖は約 40% であった。直糖はほとんどがグルコースとフラクトースであり他の全糖成分はほとんど蔗糖であった。

2. グルタミン酸発酵の実施 生産菌: *Brevibacterium lactofermentum* 2256 から誘導したグルタミン酸高生産性突然変異株 AJ 11211 株を使用した⁽¹⁾。

培地 1 (種培地): グルコース 25 g/l, KH_2PO_4 1 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/l, 大豆タンパク質塩酸加水分解物 360 mg/l (窒素として), ビオチン 300 γ /l, チアミン塩酸塩 200 γ /l, 消泡剤 (エチレン

オキサイド、プロピレンオキサイド共重合物) 0.03 g/l, pH 6.8 (KOH), 殺菌 115°C, 10 分.

培地 2 (生産培地): ケインモラセス転化糖 60 g/l, KH_2PO_4 2 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8 g/l, 大豆タンパク質塩酸加水分解物 120 mg/l (窒素として), チアミン塩酸塩 200 γ /l, 消泡剤 (上記) 0.03 g/l, 殺菌 115°C, 10 分.

培地 3 (培養途中の糖フィード液): ケインモラセス転化糖 400 g/l, 上記消泡剤 0.2 g/l, 殺菌 115°C, 10 分.

培養および培養条件: 1 白金耳の菌体を, 培地 1 を 500 ml 張り込んだ角形ガラスビンに接種した. このビンは綿栓をし, 磁石の攪拌子を内部にいており, 培養中, 綿栓を通した酸素は, 攪拌子によって攪拌されている培養液に供給された. 31.5°C, 20 h 培養した. 500 ml の培養液は, 次に, 種母培養槽内の 2.5 kl の種培地に接種され, 31.5°C, 24 h 培養した. 酸素供給条件は, 内圧 1.5 kg/cm², 通気 1/3 vvm, 攪拌は 146 rpm であった. 主培養は培地 2 を用いて行った. 種母培養液 2.5 kl を接種し, 全容を 42 kl とし, 31.5°C で生産培養を開始した. 酸素供給条件は, 内圧 1.5 kg/cm², 攪拌 80 rpm, 通気 1/3 vvm であった. pH は培養期間を通してアンモニアガスによって 7.8 に制御した. 培養途中菌生育が $\text{AOD} = 0.4$ (26 倍希釈液, 始発培地との 562 nm 吸光値差) に達した際にポリオキシエチレン・ソルビタン・モノパルミテートを培地中に 2 g/l になるように添加し, その後培養温度を 34°C にシフトした. 培養液中の糖が消費される直前に培地 3 組成のフィード液を 5 kl-5 kl-4 kl-4 kl と 4 回に分けて添加した.

3. 酵母エキス製造菌株 *Saccharomyces cerevisiae* (AJ 4005) を用いて製造した.

4. 酵母培養培地 培地は, 次の 3 種類を使用した. 種母培地-A: グルコース 2 g/l, 酵母エキス 10 g/l, マルトエキス 10 g/l, NaCl 5 g/l, pH を KOH にて 6.5 に調整し, 120°C, 20 分殺菌した. 種母培地-B: グルコース 20 g/l, 大豆タンパク質塩酸加水分解物 310 mg/l (窒素として), KH_2PO_4 3 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.52 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.52 g/l. pH を KOH にて 5 に調整し, 120°C, 20 分殺菌した. 主培地: KH_2PO_4 10 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.7 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.9 g/l, CSL 2.3 g/l (窒素として), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.7 g/l, 130°C, 15 分殺菌した. ほかに, 120°C, 15 分殺菌した 350 g/l のグルコース溶液をフィード液として,

培養途中に約 20 kl を後述の方法にて添加した.

酵母培養条件: 前種母培養は種母培地-A を用いて行った. 菌体 1 白金耳を 500 ml の培地に接種し, 30°C, 24 h 通気培養を行った. 種母培養は種母培地-B を用いて行った. 前種母培養液 1 l を 2.5 kl の培地に接種し, 30°C, 24 h 培養した. 酸素供給条件は, 内圧 1.5 kg/cm², 通気 1/2 vvm, 攪拌は 146 rpm に設定した. 主培養は主培地を用いて行った. 種母培養液 2.5 kl を主培地 35 kl に接種し, 30°C, 30 h 培養した. 酸素供給条件は, 内圧 1.5 kg/cm², 攪拌 80 rpm, 通気 1/3 vvm であった. pH は培養期間を通してアンモニアガスによって 5.5 に制御した. 培養期間を通じて, 排気ガス中のエタノール濃度を分析した. 気相中エタノール濃度と平衡関係にある培地中エタノール濃度を定量し, 0.5~3 g/l になるように制御した. すなわち, エタノール濃度が 0.5 g/l に近づくと前述のグルコース・フィード液を添加し, 3 g/l に近づくとフィード液の添加をストップした. 使用した酵母は, 好気条件下でも多量のエタノールを蓄積し, エタノール濃度が 3 g/l 以上になると生育阻害を受け, 3 g/l 以下では蓄積したエタノールを資化して生育を続行する特徴があった.

5. 気相中エタノール濃度の分析 コスモス電気(株)のエタノール分析計 VH-1 を使用した.

6. インペルターゼ 東京化成(株)の市販インペルターゼおよび酵母エキス製造の際の残渣を使用した.

7. インペルターゼ活性測定 蔗糖濃度 100 g/l 液を基質とし, 0.625 M 酢酸バッファー (pH 5.5) 中, 55°C で反応を行った. 反応により生成するグルコースをグルコース分析計 (Beckmann) で定量し, グルコース生成の初速度から酵素活性を測定した. 力価の表示 (ユニット) は, $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg protein}$ とした.

8. グルタミン酸, 糖の分析 前報⁽¹⁾に示した方法によった. 蔗糖の重量は, その構成する単糖の重量の和で表した. 発酵収率は, 使用した糖量に対する生成したグルタミン酸の重量比を百分率で示した.

実験結果

1. ケインモラセスの実用的転化剤としての硫酸と酵母エキス製造残渣

工業的な転化方法の開発に先立ち, 実用的な転化剤の検索を行った. 実験方法は前報⁽¹⁾に示した実験室レベルで行った.

表 1 各種酸により転化されたケインモラセスを糖源としたグルタミン酸発酵

転化剤	グルタミン酸蓄積 (g/l)	グルタミン酸対糖収率 (%)	トレハロース副生 (g/l)
無処理	90.0	55.5	16.4
リン酸	88.5	55.0	4.7
硝酸	84.5	52.5	3.4
塩酸	90.3	56.4	4.5
硫酸	98.0	61.0	5.6

各種酸によりケインモラセスの pH を 2.5 とし、110℃、10 分殺菌した。蔗糖が完全に転化したことを確認して発酵原料とした。

ケインモラセスを酸で転化する場合、硫酸のほかにもリン酸、硝酸、塩酸などが考えられる。前報で示した硫酸による転化条件と同じ pH 2.5 で各種酸によってケインモラセスを転化した。沈殿を生じた場合は除去して発酵試験を行った。蔗糖が完全に転化し、また発酵終了後に副生物としてのトレハロースの蓄積が、無処理の場合に比較して減少しているにもかかわらず、硫酸以外で転化した場合には、発酵収率の向上にはならなかった（表 1）。グルタミン酸発酵は、無機塩の影響を受けやすい発酵であるので、硫酸以外のこれら酸に由来する塩類の阻害が表れたものと考えられる。

インペルターゼ源の場合は、ケインモラセスの処理に市販インペルターゼあるいは後述の方法で製造した酵母エキスを製造残渣を用いても、グルタミン酸発酵の成績に何ら差を見出すことはできなかった。

2. 酵母の生育

酵母の増殖の 1 例を図 1 に示す。エタノールの濃度は 1~2 g/l に制御され酵母は順調に生育し、68 g/l の乾燥菌体濃度に達した。グルコースのフィード液は約 20 kl 添加され、対消費グルコース当りの菌体収率は 54% であった。

3. 酵母エキスおよびインペルターゼ高含有残渣の製造

発酵終了後の培養液（55 kl、酵母菌体 3800 kg）を連続遠心分離により重液と軽液に分けると、酵母菌体は重液側に移行する。このとき、重液 21 kl には 3600 kg の酵母菌体が含まれていた。これに KH_2PO_4 375 kg、 K_2HPO_4 100 kg、 NaCl 125 kg を加え、45℃、25 h 放置して自己消化を完了させた。自己消化液を遠心分離により重液と軽液に分け、軽液側を酵母エキス製造原料に使用する。重液は、さらに 2 回の遠心分離工程によって酵母

図 1 エタノール濃度制御下における酵母の増殖
—○—, Cell concentration;
—●—, Ethanol concentration.

培地中に生成するエタノールの濃度を 0.5~3.0/l になるように、廃棄ガス中のエタノール濃度をオンライン検出してフィードする糖の添加を自動コントロールすることにより酵母を好気培養した。

エキスを製造に使われる軽液を除くと、残渣を含んだ重液が取得できる。この重液は 12 kl 得られ、乾燥重量で 1280 kg の残渣が含まれていた。残渣には合計 2.0×10^{10} ユニットのインペルターゼ活性が存在した。

軽液画分を冷却後、115℃、10 分殺菌し、濃縮すると乾物量 2500 kg を含んだ酵母エキス濃縮液 4.5 kl が得られた。

本工程の途上でインペルターゼ活性を測定した。酵母菌体を除いた除菌液部分に含まれるインペルターゼと自己消化液画分（酵母菌体画分）に含まれるインペルターゼの量比は 15:85 であり、自己消化画分のうち、残渣画分と酵母エキス画分（濃縮前）では、60:25 であった。したがって酵母培養で生成するインペルターゼ活性のほぼ 60% が残渣画分に回収された。

4. インペルターゼを含有した酵母エキス製造残渣によるケインモラセスの転化

ケインモラセスを全糖が 400 g/l になるように希釈し、その 50 kl を簡単な攪拌装置を備えたタンクに入れた。インペルターゼ源としての酵母エキス製造残渣の濃度は 10 ml/l（16,000 ユニット）とした。50℃、10 h 転化反応させたところ転化率が 95% 以上に達した。

5. 工業的規模における硫酸によるケインモラセスの転化

次に硫酸を用いたケインモラセスの転化を工業規模において実施することを検討した。ケインモラセスは Ca^{2+} を多量に含んでいる。したがって、硫酸を添加して

図4 転化ケインモラセスを糖源とした
グルタミン酸発酵の例

—□—, 菌生育; …●…, 培地中還元糖濃度;
—○—, グルタミン酸蓄積.

硫酸処理ケインモラセスを糖源として, 60kl 発
酵槽にてグルタミン酸発酵を行った.

そのように工業的な方法に近い培養法を用いて, 硫酸で転化したケインモラセスの発酵試験を実施した. その結果を図4に示す. 急速な糖消費を伴った生育の後期からグルタミン酸の蓄積が開始される. 培養時間の経過とともに糖消費速度が低下した.

転化ケインモラセスと無処理ケインモラセスを原料としたグルタミン酸発酵を比較すると, 菌体生育および糖消費速度には大きな差を見出せないにもかかわらず, グルタミン酸の蓄積に関しては, 転化ケインモラセスを糖源とした場合のほうが上回った. 無処理ケインモラセスを使用した場合, 90 g/l (対糖収率 55.2%) のグルタミン酸の蓄積が得られたのに対し, 転化ケインモラセスを使用すると, 95 g/l (対糖収率 58.3%) となった.

同じ方法を用いて, 酵母エキス製造残渣のインペルターゼによって転化したケインモラセスの発酵試験を実施し, 同様な結果を得た. グルタミン酸の蓄積で約 5 g/l, 対糖収率で約 3% の向上が認められた.

考 察

グルタミン酸発酵の糖源として蔗糖を用いるよりも転化糖を用いた場合のほうが若干生産収率が高いという現象を見出し, 以後, 固定化酵素法を含めてその実用化の検討を続けてきたが, 本報告で示したようにその実用化に成功した.

ケインモラセスを原料とする場合に, その主要成分で

ある蔗糖を転化する実用的な方法の検討に際し, 酸転化に適する酸の種類の選択と酵素転化のための安価なインペルターゼ源を検索し, それぞれ, 硫酸とインペルターゼ源としての酵母エキス製造残渣を見出した. どちらも発酵工場には通常みられる簡単なタンクを組み合わせることによってその実用化が可能であった. 硫酸を用いてケインモラセスを転化する場合には, 多量の石膏が沈殿するため, この沈殿部分を含んだ重液より糖を回収すること, および多量の沈殿を系外に取り出すという操作と装置を付加する必要があった. 塩酸などにより転化処理した場合に発酵収率が悪いのは, CaCl_2 などは析出せず, イオンのまま発酵培地に移行し無機塩過多の培養が行われるためと考えられる. 硫酸が良好な結果を示すのは, 添加した硫酸根の大部分が石膏として系外に除去され, 培地に移行しないためと考えられる.

ケインモラセスを前処理し, 蔗糖を転化する際に, 硫酸を使うか, インペルターゼを使うかは, グルタミン酸の単離精製プロセスと無関係ではなかった. 培養液よりグルタミン酸を晶析分離するときに, 等電点沈殿法が使われ, 培養液が硫酸または塩酸で処理されており, 硫酸を使うか塩酸を使うかは工場のある地方または国の原料供給事情によった.

Ca^{2+} を除去し, さらに酸性下で転化したケインモラセスを発酵原料とすることは, 転化糖を資化することによる発酵収率の向上という長所だけでなく, 発酵液からグルタミン酸を硫酸により晶析する工場では, Ca^{2+} による妨害が除けるので, 同時に大きな長所であり, 実用化を進めるうえでドライビングフォースになった.

インペルターゼ法の場合には, 同じ発酵工場で酵母エキスを製造しているという条件つきであるが, 従来価値がないとされてきた酵母エキス製造残渣が極めて安価なインペルターゼ源として使用できるという大きな利点があった.

すなわち, 硫酸を使用している工場では, 硫酸前処理法が有利であり, 塩酸を使用している工場ではインペルターゼ前処理が有利であった.

両者の方法とも国内外のグルタミン酸発酵工場で, さらに大規模な生産設備を用いて現在実用化されている.

グルタミン酸生産菌が自然界から発見されて⁽²⁾, 実験室規模において生産フローが確立されて以後, これを実際の工業規模における生産に結びつけるためには, (A) 生産菌のさらなる遺伝的育種, (B) 原料問題の解決,

(C) 工業的な生産プロセスの確立の3方面からの研究が必要とされた。

生産菌の遺伝育種に関しては、解糖系およびTCAサイクルの阻害剤に対する耐性菌の取得⁽³⁻⁵⁾、ビオチン過剰培地で必要とされる界面活性剤の要求が小さいか必要としない生産菌の誘導⁽⁶⁻⁸⁾、電子伝達系阻害剤に対する耐性菌の取得⁽⁹⁻¹¹⁾などが行われ、生産収率の向上に寄与してきた。

原料問題に関しては、当初、澱粉加水分解液^(12,13)で工業化されたが、のちに、ケインモラセス^(14,15)、酢酸⁽¹⁶⁾を用いた方法が開発された。ビオチン過剰なケインモラセス培地でもグルタミン酸を多量蓄積することができるようになったのは、そのような培地でも生産を可能にするペニシリン⁽¹⁷⁾または高級飽和脂肪酸の界面活性剤⁽¹⁸⁾の添加効果の発見が大きく寄与した。また、窒素源としてアンモニアガスや液安を使用した方法の開発は原料問題だけでなく、プロセスの簡易化に大きく貢献した。

工業的なプロセスの確立においては、好気的な発酵槽の製作⁽¹⁹⁾、プロセス自動制御⁽²⁰⁻²²⁾、生産に最適な溶存酸素分圧の定量的な把握^(23,24)などの研究が、グルタミン酸発酵の工業化を可能にした。

いったん工業化された後でもさらなるコストダウンを目指した改良研究が続き、国際的な価格競争に対応しなければならなかった点にグルタミン酸発酵の特徴がある。

要 約

グルタミン酸発酵において、糖源として蔗糖を用いるよりも転化糖を用いた場合のほうが生産収率が高いという実験室規模の知見を工業的な規模において実用化した。ケインモラセス中の蔗糖の転化には硫酸またはインベルターゼ源としての酵母エキスを製造残渣が有利であった。工場規模で実施されている糖フィード法を用いたグルタミン酸発酵の場合、転化モラセスを原料にした場合には、無処理のケインモラセスを原料にした場合に比較して、グルタミン酸蓄積で約5g/l、対糖収率で約3%上回った。

- (1) 吉井寛依, 吉村 実, 竹中義弘, 河原義雄, 中森 茂, 堀越弘毅, 池田茂穂: 農化, **67**, 949—954 (1993).

- (2) S. Kinoshita, S. Uda, and M. Shimono: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **3**, 193—205 (1957).
 (3) 吉井寛依, 鹿島信一, 田中 崇, 広瀬義夫: 特公昭 55-9197 (1980. 3. 8).
 (4) 鹿島信一, 高木高志, 山田耕従, 滝波弘一: 特公昭 59-10797 (1984. 3. 12).
 (5) 小野栄治, 鹿島信一, 後藤瑛二, 戸坂 修, 山田耕従, 滝波弘一: 特公昭 56-50837 (1981. 12. 1).
 (6) 滝波弘一, 田中 崇, 千葉道明, 広瀬義夫: 特公昭 52-24593.
 (7) 中沢英次, 阿久津栄一, 山根一郎: 特公昭 57-18795.
 (8) 中沢英次, 阿久津栄一, 紙屋治司: 日本発酵工学会講演要旨, 1981, p. 46.
 (9) 吉井寛依, 吉村 実, 竹中義弘, 池田茂穂: 特公昭 58-32596 (1983. 7. 14).
 (10) 吉井寛依, 池田茂穂, 吉村 実, 竹中義弘, 井上寿美男: 特公昭 58-10075 (1983. 2. 24).
 (11) 吉井寛依, 池田茂穂, 吉村 実, 後藤幸一, 井上寿美男: 特公昭 62-36677 (1987. 8. 7).
 (12) 奥村信二, 都河龍一郎, 角田俊直, 河野景明, 松井俊規, 宮地 昇: 農化, **36**, 141—159 (1962).
 (13) Y. C. Su and K. Yamada: *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, **24**, 140—146 (1960).
 (14) K. Takinami, H. Okada, and T. Tsunoda: *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 114—119 (1964).
 (15) 渋谷 満, 小松謙一, 大沢岳義, 山本外男: 農化, **38**, 285—290 (1964).
 (16) T. Tsunoda, I. Shio, and K. Mitsugi: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **7**, 18—29 (1961).
 (17) N. L. Somerson and T. Phillips: 特公昭 37-1695.
 (18) K. Takinami, H. Yoshii, H. Tsuru, and H. Okada: *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 351—359 (1965).
 (19) 紀谷孝彦: 化学工学, **35**, 143 (1971).
 (20) S. Yamashita, H. Hoshi, and T. Inagaki: "Glutamic Acid, Fermentation Advances," ed. by D. Perlman, Academic Press, New York and London, 1969, pp. 441—463.
 (21) 木下一幹: 「アミノ酸発酵(上)」, 共立出版, 東京, 1972, p. 264.
 (22) 倉谷隆博, 後藤祐二: 化学工業, **9**, 36—40 (1980).
 (23) Y. Hirose, H. Sonoda, K. Kinoshita, and H. Okada: *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 1210—1216 (1967).
 (24) 明石邦彦, 柴井博四郎, 広瀬義夫: 発酵と工業, **37**, 321—330 (1971).