

Title	イタコン酸醱酵の培養工学的研究
Author(s)	中村, 以正
Citation	大阪大学, 1967, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/317
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

イタコン酸醗酵の培養工学的研究

中 村 以 正

イタコン酸醱酵の培養工学的研究

目 次

緒 言	1
略 語, 記 号, 単 位	4
第 1 章 本論題設定の意義と重要性	6
第 1 節 過去におけるイタコン酸醱酵の研究とその生産技術 の限界	6
第 2 節 従来の製造プロセスとその工業化の問題点	7
第 3 節 問題の設定と実施の要領	10
第 2 章 実験室規模による基礎的研究 (醱酵の高速度化の可能 性の根拠に関する予備的研究)	11
第 1 節 菌体反復利用法 (振盪培養) における醱酵速度およ び生産物収率	11
第 2 節 CSL の有効因子	18
第 3 節 菌体収率とイタコン酸収率の相関	19
第 4 節 要 約	24
第 3 章 単槽定常連続培養における培養速度式	26
第 1 節 定常状態設定法と醱酵速度の測定法	26
第 2 節 菌体濃度の効果	34
第 3 節 化学的因子の効果	38
第 4 節 醱酵速度式	55
第 5 節 物理的因子の効果	55

第6節 要 約	77
第4章 本醱酵における熱力学的知見	81
第1節 菌体収率とイタコン酸収率の相関	81
第2節 醱酵発熱量	82
第3節 要 約	88
第5章 小パイロットプラントによる試験（スケールアップに おける問題点の発見）	89
第1節 実験装置	89
第2節 菌体分離機の型式	89
第3節 攪拌所要動力	93
第4節 連続培養試験	94
第5節 イタコン酸の回収（蒸発晶析法）	95
第6節 要 約	99
第6章 考 察	100
総 括	115
引用文献	117
謝 辞	122

緒 言

この研究は、糸状菌を使用して醗酵法によりイタコン酸を製造する新しいプロセスを開発することを目標とする工業化のための基礎的研究の一部を構成するもので、微生物の関与するもっとも重要な反応工程に関するものである。すなわち、合成樹脂製造原料として安価多量の需要が見込まれるイタコン酸の製造プロセスを能率化するために従来法を検討した結果、醗酵速度の増大が原料の転換、生産物分離法の近代化とともにイタコン酸の安価多量生産に重要な条件であることが明らかとなった。そこで高菌体濃度下の定常連続培養系を設定して、醗酵速度、収率におよぼす物理的、化学的諸因子の影響を広範なる条件下に検討し、えられた結果等にもとづいてイタコン酸製造の新プロセスを予備的に設定してコスト推算をおこない、従来法と経済比較をおこなってこの研究の価値を評価したものである。

イタコン酸は、すでに米国ファイザー社により工業化され、¹⁰⁾年産2,000トンの規模で蔗糖蜜を原料として生産されており、米国における市場価格はポンド当り29.5~32.5セント(トン当り23.5~26万円)¹¹⁾である。しかし、その製品の市場がアクリル酸と競合する分野を重視するため、さらに生産規模を拡大するには糸状菌による醗酵生産技術の近代化による価格低下が不可欠である。それには⁴⁾設備費、原料費を低下させねばならないことはPfeiferらのパイロットプラント試験の結果にもとづく推定生産費の内訳からも明らかである。したがって研究の目標は、醗酵速度の増大、安価な原料への転換、生産物分離法の合理化の三点に示ぼられる。

クエン酸、イタコン酸等糸状菌を利用する醗酵工業は、一般の化学工業に比しては勿論のこと、アルコール工業、酵母工業等の醗酵工業に比して生産能率が低い。その原因は主として醗酵速度の低い点にあり、低い醗酵速度が建設費、エネルギー費の増加を招来している。イタコン酸は醗酵法により消費糖に対し50%以上の収率でえられることはすでに数多くの研究により明

らかとなっており、これはアルコール、酵母の収率に匹敵する。したがって醱酵速度と生産物の分離技術がアルコール製造技術の段階にまで向上すればその生産原価もこれらに接近し、したがって大規模生産へ移行しうるであろう。そのためには、醱酵速度は従来法の3倍以上に、生産物の分離費はその1/2以下に低下させる必要がある。これを目標とし、ここでは従来の回分法式を定常連続培養方式とし、しかも菌体濃度を従来の倍以上に増大して“高菌体濃度定常連続培養方式”を採用することによって醱酵速度の増大をねらい、この培養系で醱酵速度、収率に有意に作用する物理的、化学的諸因子の効果について検討をおこなった。

この研究は、その目的がとくに醱酵速度の向上に関する研究にあり、これと関連する生産物の収率との相関において培養工程の最適条件を設定しようとする点にあったので次の計画に沿って研究を実施した。

まず高菌体濃度下の連続培養の可能性を確かめるため振盪培養による実験を行った。すなわち、200 mlのフラスコを用い、菌体反復利用により菌株の種類、菌体活性の永続性に対するおよびその培養条件の検討等を行い、この段階で以後の実験に使用する菌株を選定した。ついで20ℓジャー培養槽とその付属装置を用いてベンチスケールの実験を行った。この段階では高菌体濃度下の単槽定常連続培養によって、反応特性とくに醱酵速度、収率におよぼす化学的、物理的因子のえいきょうを拡大した反応条件下で検討し、とくに醱酵速度の最高値を追跡した。高菌体濃度下の実験に適するよう菌体分離装置を考案した。すなわち培養槽に挿入したフィルターリーフによって醱酵液をこしとりながら培養する液部貫流方式を確立した。その結果、pH、イタコン酸濃度、ガス分圧等の化学的因子の効果について正確な測定が可能となり、これら因子と醱酵速度の相関を示す生物系の反応速度式を始めて提出することができた。一方物理的因子として醪への酸素移動速度、伝熱速度、見かけ比重をとり上げ、醪組成、混合条件のえいきょう、培養系と非培養系の差異等について検討した。

さらに200ℓフアーメンターを使用してジャー培養では測定困難な問題すなわち回分培養の物質収支，醱酵の代謝熱発生速度をもとめ，最後に1M規模の培養槽による小パイロット試験によりスケールアップにおける二，三の問題点につき検討した。以上四段階の規模の装置による一連のイタコン酸醱酵の工業化に関する基礎的研究からその速度論的研究成果を抽出し，この生物反応の最適条件を求めうる反応速度式を提出し，これと菌体分離条件，生産物回収条件に関する検討結果に基づいてイタコン酸生産プロセスを設定し，Aries¹⁾らの方法によりプラント建設費，生産原価の推算を行い，従来法との比較によるこの研究の評価を行った。

この研究は東京教育大学小林達吉教授の“木材からイタコン酸”に関する一連の研究の一環として昭和33年より昭和40年に亘り行ったものでありその大部分はすでに報告した。

略 語 , 記 号 , 単 位

- A : 伝熱面積 [m²]
- C_i : イタコン酸濃度, 対液% [-]
- C_m : 菌体濃度, 対液乾重量% [-]
- C_s : 還元糖濃度 (グルコースとして), 対液% [-]
- d_{app} : 培養液の見かけ比重, [-]
- h : 熱伝達係数 [kcal/m² hr °C]
- K_d : 酸素移動容量係数 [gmol O₂/ml min Atm]
- K_r : 菌体の酸素消費比速度, [gmol O₂/ml min %菌体濃度]
- N : 攪拌羽根回転数, rpm [min⁻¹]
- p_g, p₂ : 気相の酸素分圧, [Atm]
- p* : 溶存酸素と平衡な気相酸素分圧 [Atm]
- p_{CO₂} : 気相炭酸ガス分圧, [Atm]
- Q₁₀ : 醗酵の温度係数 [-]
- q : 伝熱量 [Kcal/hr]
- RQ : 呼吸商 [-]
- T : 温度 [°K]
- t : 温度 [°C]
- Δt : 管内, 管外流体の対数平均温度差, $\frac{t_o - t_i}{\ln(t_o - t_i / t_o - t_c)}$
- $\Delta t'$: 管外, 管壁の温度の対数平均温度差, $\frac{t_{wo} - t_{wi}}{\ln(t_{wo} - t_{wi} / t_{wo} - t_{wc})}$
- U : 総括伝熱係数 [Kcal/m²nr °C]
- V_{heat} : 代謝熱発生速度 [Kcal/l hr]
- V_i : イタコン酸集積速度, 対液%/day, [day⁻¹]

- V_m : 菌体増殖速度, 対液% day⁻¹
 V_n : CSL供給速度, 対液%/day (day⁻¹)
 V_s : 還元糖消費速度, 対液%/day (day⁻¹)
 W : 冷却水量 (Kg/hr)
 X : 対消費糖菌体収率, %
 Y : 対消費糖イタコン酸収率, %
 y : 冷却管の厚み, (m)
 CSL : コンスチープリカー
 λ : 冷却管の熱伝導度, (kcal/m hr °C)

添字 o, i, w, av, v はそれぞれ管内出口, 管内入口, 管壁, 平均, 醪の温度を表わす。

第 1 章 本論題設定の意義と重要性

第 1 節 過去におけるイタコン酸醱酵の研究とその生産技術の限界

イタコン酸を生成蓄積する微生物で工業生産の対称になりうる菌種として *Asp. itaconicus* と *Asp. terreus* が知られている。かびが糖からイタコン酸を生成蓄積することは 1929 年木下¹⁹⁾ によってはじめて見出され、*Asp. itaconicus* Kinoshita と命名された糸状菌が分離された。その後 1939 年に *Asp. terreus* もまたイタコン酸を生産することが Calam⁹⁾ により発表されたが、この醱酵が注目されるようになったのは第 2 次大戦後合成樹脂工業の発展にともない、その原料としての需要が予想されるようになってからである。以来、専ら *Asp. terreus* に属する菌株による醱酵法について多数の研究がおこなわれ、^{21, 23)} 対糖 50% 以上の収率でえられることが明らかにされた。

1955 年頃より米国ファイザー社は通気攪拌培養法によるイタコン酸の生産を開始し、現在年産 2,000 トンの能力を有している。一方 *Asp. itaconicus* については、田淵⁵⁰⁾ はその深部培養における特性について *Asp. terreus* と比較し、その至適条件における異同および得失について詳細に検討しており、糖質原料の醱酵法については小林²⁷⁾、木下²⁸⁾ らの特許がある。

これら工業化を目標とした諸研究は、大部分通常の回分式深部培養法でおこなったものであり、その技術の方向は菌株の優秀性のみ依存するがまたは粗糖質原料の処理および培養時の化学物質の添加による醱酵の制御にあると見ることができる。このような回分式によるイタコン酸の平均生産(蓄積)速度は Pfeifer⁴³⁾ らのパイロットプラントにおける最良の結果でも一日当り対醜約 2% 濃度であり、収率は 55~60% でアルコール、酵母に匹敵するが生産速度はこれらの数分の一にすぎない。米国における市場価格は数年来

29.5~32.5 cent/lb¹⁾ であり、この価格は現在のイタコン酸生産技術をもってしてはすでに限界に近づいたと考えられる。

第2節 従来の製造プロセスとその問題点

本研究の実施に先立って従来の製造プロセスの問題点を考察し、本研究の焦点を明らかにしておきたい。

Pfeifer⁴⁾らがブドウ糖を原料とし回分法によるパイロットプラント試験の結果から推算したプラント建設費を第1-1表に、生産原価を第1-2表A欄に示す。

第1-1表. イタコン酸製造プラント推定建設費

(規模: イタコン酸結晶(純度99%以上) 年産1,320t)

土地及び整地費	1,260 (万円)
建築費	7,740
装置費	19,080
今上据付費	4,680
配管, 配線費	4,680
その他の建設費	4,500
契約費, 技術費等	12,060
計	54,000

第1-2表. イタコン酸推定生産原価

	(A)	(B)
原料費	135,700円/1トンイタコン酸	146,000円/1トンイタコン酸
ユーティリティーズ	20,650	54,700
賃金, 俸給	20,650	20,500
維持費	18,260	18,200
固定費	50,000	99,800
計	245,260	339,200

第1-1表から明らかなように、イタコン酸²⁰⁾トン年の建設費は40.9万円となりSWLより飼料酵母製造の建設費10万円以下と比べても非常に高価である。また第1-2表より生産費は約25万円となるが、小林が日本の現状に換算したものは(B)欄のようであり非常に高価となる。かかる高価な建設費、生産原価は生産規模の小さい事もその一因ではあるが、建設費の低下、エネルギーの節約のためには醗酵速度の増大と生産物分離法の改良が不可欠の要件であろう。多量生産のための能率化達成の要件を以下に列挙し、現段階における考えを述べる。

i) 優良菌株の分離と改良

これまでに分離改良された菌株のうちでブドウ糖もしくは蔗糖を炭素源とした場合、速度、収率ともに最良の菌株は Pfeifer らの使用した *Asp. terreus* NRRL 1960 で、ブドウ糖6%初濃度で回分通気攪拌培養で平均生酸速度対液2%/day、対消費糖収率60%の結果がえられている。我国では霜⁴⁷⁾らの育成した *Asp. terreus* Taito.u-4-46 およびこれを親株として田淵⁵⁰⁾が育成した *Asp. terreus* K26 が勝れており、*Asp. itaconicus* については田淵⁵⁰⁾が梅酢から分離した *Asp. itaconicus* 34 および 23 が勝れている。とくに *Asp. terreus* K26 は能力的には NRRL 1960 に匹敵すると見られる。⁵⁰⁾ これら菌株の特性に関してはすでにかかなりの程度明らかにされており、工業化の基礎研究の対称菌株として使用出来ると考えられる。

ii) 菌体濃度の増大

醗酵速度を向上させる最も単純な方法の一つとして培養の菌体濃度の増大が考えられる。菌体の再利用による醗酵時間の短縮に関してはすでに *Asp. niger* のグルコン酸醗酵について試みられ^{6,44)} ているが、その結果は必ずしも菌体濃度に比例して速度は増大していない。その要因として高菌体濃度下の培養に通常の培養と異なる生物学的特性が存在することも考えられるが、拡散過程の律速も無視しえない。一般に糸状菌の通気攪拌培養系において、菌^{3,12)}体が高濃度になると酸素移動速度が極端に低下することが知られているので、

菌体濃度の効果を正しく知るにはまづ拡散律速を出来る限り分離することが重要であり、これと関連して液の流動特性、フェーメンターの型式、攪拌動力等の化学工学的因子の検討が重要となろう。第二次大戦中飼料酵母の生産に開発されたワルドホッフ型フェーメンター¹³⁾は戦後我が国では三輪ら³⁰⁾により250M³の規模にまで拡大され、安価多量生産にその優秀性が評価されているが、糸状菌の高菌体濃度培養にもこの種装置が改良することにより使用できるか否かを検討することは有意義である。これと附随して醗酵熱の除去すなわち伝熱の問題がある。イタコン酸醗酵の代謝熱はグルコース1mol当り250Kcalと推算されている⁵⁰⁾ので、醗酵速度が仮りに5倍に向上すると醗酵発熱速度は12Kcal/hr.ℓと推定され、酵母の場合に匹敵する。しかしイタコン酸醗酵の場合は至適温度が一般に酵母より高い^{40,43)}から熱の除去はそれ程困難ではないと考えられる。

iii) 高濃度菌体連続培養方式の確立

高濃度菌体連続培養方式を達成するためには先づ菌体を高い活性状態下に分離、回収する方法を確立することであり、ついで培養管理の最適条件を求めることである。それには醗酵速度、収率およびその高位永続性に対する化学的培養条件のえいきょうを広い範囲に亘って検討し、その相関関係を定量的に把握する必要がある。

iv) 原料の転換と生産物回収法の改良

現時点では廃糖蜜(Cane blackstrap molasses)が使用でき、将来は木材糖の利用も考えられよう。かゝる粗糖質原料においては、原料中の不純物の影響を除去する方法の確立とともに生産物の経済的な回収方法の発見はより重要であろう。精製原料において従来一般に行われている蒸発晶析法を粗原料醗酵液に適用するのは困難であろう。ファイザー社は石灰塩として醗酵液より分離回収していると見られるが回収率の向上にはさらに溶解度の低い塩についての検討が必要であろう。

第3節 問題の設定と実施の要領

前節でのべた如く安価多量生産達成の条件は多岐に亘っているが本研究はその目的がとくに醗酵速度の向上に関する研究にあるのでii), iii)の問題すなわち高濃度菌体による連続培養における培養工程の最適条件の設定に関連する問題のみをとり挙げた。菌株の特性についてはすでに田淵らにより詳細に行われているのでその知見を参考にし、次の四段階の装置を使用して研究を実施した。すなわち(1) 振盪培養(ビーカー, フラスコ規模)により菌体の活性の永続性, 菌体濃度の効果, おおよその培養条件の検討を行ない, この段階で以後の供試菌株を選定した。ついで(2) 20ℓジャーフェンターとその付属装置を使用し高菌体濃度下の単槽定常連続培養により醗酵速度, 収率におよぼす化学的, 物理的因子の効果を拡大した培養条件下に検討し, 醗酵速度の最高値を追究するとともに条件と結果の関係の示式化をおこなった。ついで(3) 200ℓフェンターにより回分培養の物質収支をもとめ, これより醗酵式を推定して発熱量, R, Q等の実測値より推定醗酵式の適合性をしらべ, 最後に(4) 1.4M規模の小パイロットプラントにより規模拡大に伴う問題点につき検討を行った。

第2章 実験室規模による基礎的研究(高速度化の可能性の根拠に関する予備的研究)

すでに述べたようにイタコン酸醸酵工業の生産能率を酵母、アルコール等の工業の段階にまで高めるには、まず醸酵速度を従来の3倍以上にする必要があるが、これの実現は菌体濃度の増大と連続培養方式の確立にかゝっている。本章ではその実現の可能性の根拠をうるため振盪培養法により予備的に検討を行った結果についてのべる。

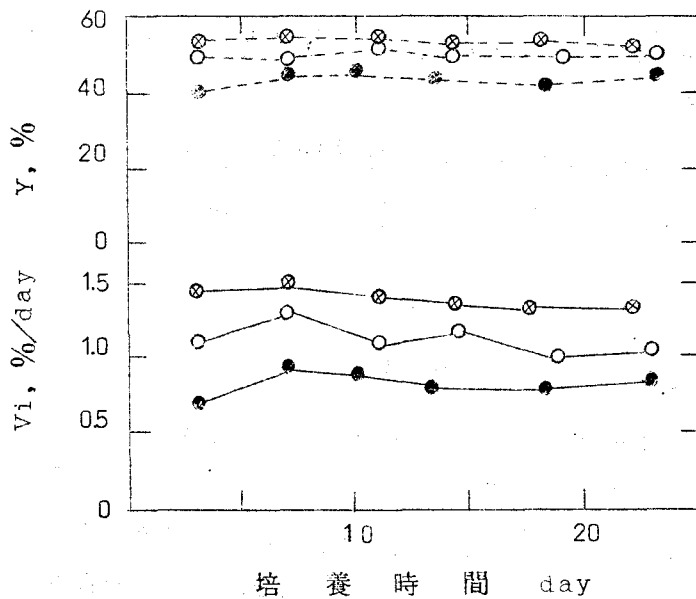
第1節 菌体反復利用法における醸酵速度および生産物収率²⁴⁾

(1) 実験材料と実験方法

1. 使用菌株, *Asp. terreus* T.u-4-46, *Asp. itaconicus* 34 および *Asp. terreus* K26
2. 原料, 炭素源は結晶ブドウ糖, 無機塩類はできるだけ良質のものを使用し, 微量元素として必要なものはすべてコンスチープリカー(CSL)により代用した。
3. 培養方法, 200 ml エルレンマイヤーフラスコに培地50 ml を仕込み, 約30時間培養した菌糸液2 ml を種母として加え, 30~32°C で毎分200回転の振盪器で培養した。培養終了後, 醪を径7 cmのブフナー濾斗(東洋濾紙No. 2を使用)で吸引濾過し, 濾紙上の菌体をスパテルで集め, 種々の組成の交換培地50 ml に入えつぎ再び培養し, この操作を毎日同様に行いながらうえつぎ培養を行った。液交換に要する時間は2分以内であり, Nelsonら³⁹⁾の指摘しているような培養中断によるえいきょうはない。
4. 分析方法, 菌体を分離した培養液はpH測定後洗液を合せて定容にし, 残糖, イタコン酸を定量し, 菌体は十分洗滌後105°Cで乾燥移量した。pHは硝子電極pH計で, 還元糖は半微量法²¹⁾, または改良ソモギ法⁴⁹⁾, イタコン酸はKoppeschaar法の改変法²¹⁾によった。

(2) 実験結果と考察

50)
i) 菌株の種類, 3 菌株をそれぞれ従来の最適培地で培養した場合速度および収率にどの程度差があるかについて醗の30%に相当する菌体を3~5日毎に殖継ぐ方法により24日間の培養を行ない平均 酸集積速度および対消費糖イタコン酸収率Yを比較した。その結果は第2-1図の通りである。*Asp. itaconicus*は*Asp. terreus*に比し劣っている。即ち,*Asp. terreus* K26は*Asp. itaconicus* 34の約2倍の速度を有し, 収率も約25%高い。この差の原因については次節で考察する。

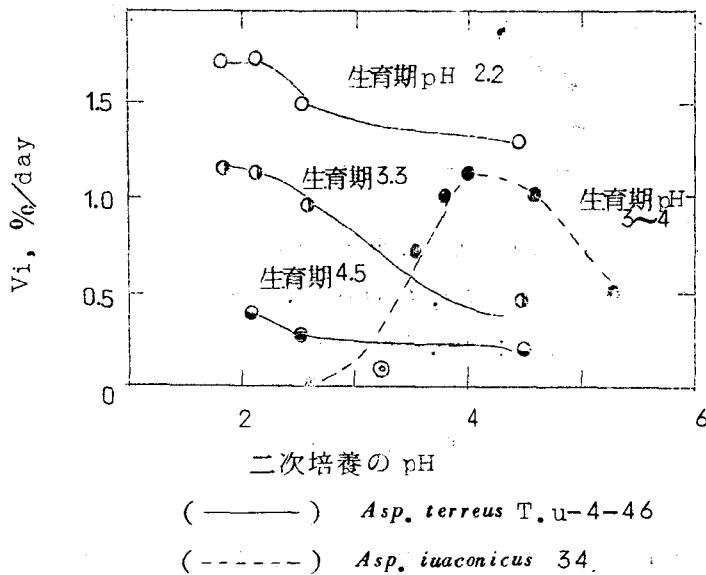


- (●) *Asp. itaconicus* 34
- (○) *Asp. terreus* T.u-4-46
- (⊗) *Asp. terreus* K26

第2-1図 菌体うえつきによる振盪培養

ii) pH

培地にイタコン酸-NaOH緩衝液をイタコン酸として0.2Mになるように加えて培養した。その結果は第2-2図の如くで、*Asp. terreus*は2前後、*Asp. itaconicus*は4前後で、その適値は狭い。*Asp. terreus*は主として菌体発育期におけるpH値が以後のイタコン酸生成を支配するのに対し、*Asp. itaconicus*は生酸期pHのえいきょうも大きいのが特徴である。これらの結果から両菌株共pHは狭い範囲に維持する必要があることがわかる。*Asp. terreus*の場合、pH2



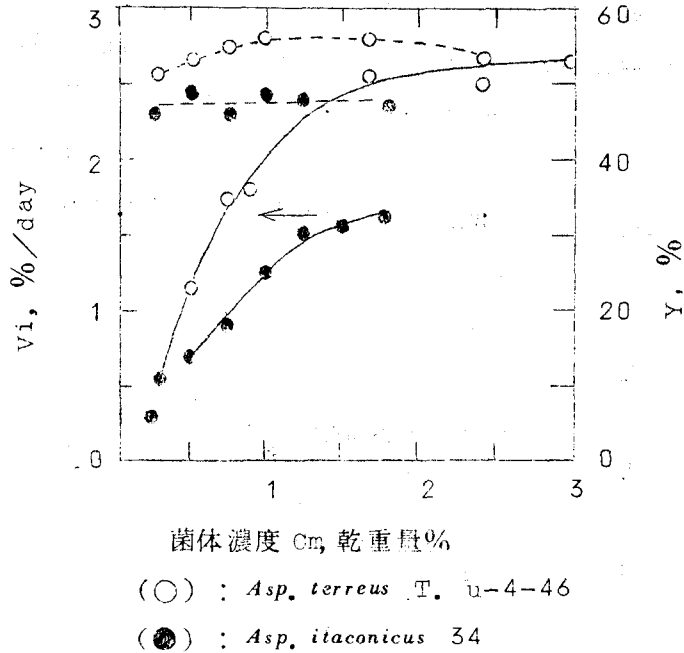
第2-2図 pHの効果

において、イタコン酸の他にイタ酒石酸、オキシパラコン酸が両者合して全酸の約5%副生する。pH5で発育した菌体のイタコン酸生成能は微弱で、リンゴ酸、フマル酸、コハク酸の微量副生がPPCより確認された。

iii) 菌体濃度の効果

通常の培地で生育させた菌体を、濾過集菌し、新培地に種々の濃

度になるように加えて24時間培養した。結果は第2-3図に示し

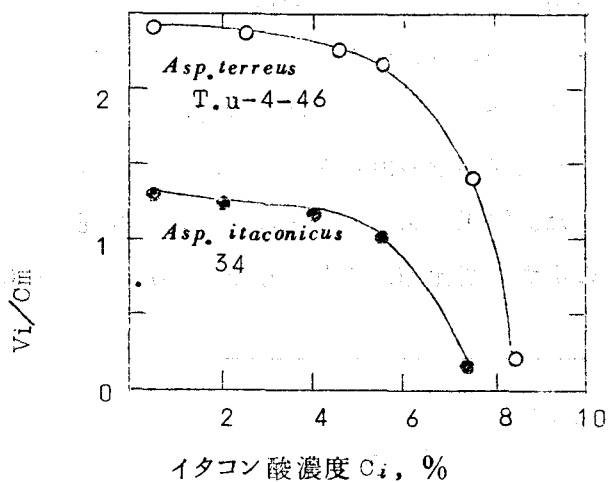


第2-3図 菌体濃度の効果

た。両菌株共、対液1%までは直線的に V_i は増加する。一般の他の糸状菌の好気培養におけると同様に本醗酵においても好気条件が速度、収率にえいきようし、この振盪条件では酸素供給速度が十分でないと予想される。1.5%以上では醗がアルコール臭を呈し、菌糸の異常形態化が認められた。したがって1%以上の菌濃度条件についてはジャー培養法によりさらに検討する必要がある。

V) イタコン酸濃度,

あらかじめ生育せしめた菌体を種々の酸濃度に調製した培地に加え60時間培養しイタコン酸集積比速度 V_i/C_m に対するイタコン酸濃度のえいきようをしらべた。両菌株共、5~6%までは醗酵速



第 2 - 4 図 イタコン酸濃度の影響

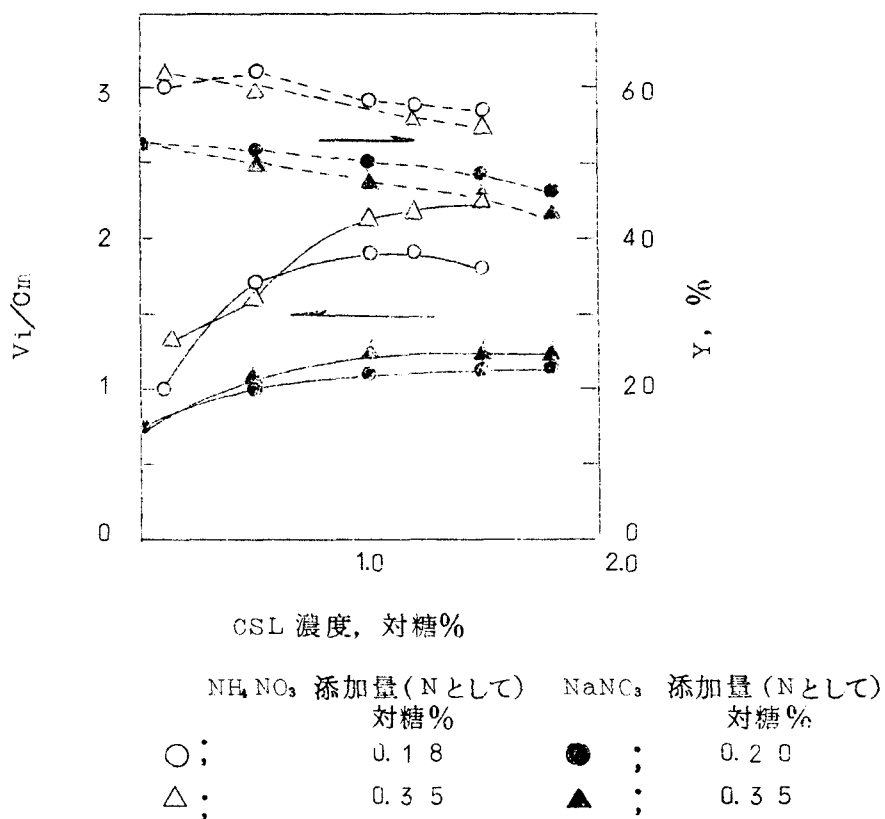
度に大差ないが 6% 以上で急激に低下する (第 2 - 4 図)。また菌体生育量はイタコン酸濃度 4% 以上で徐々に低下し, 7.5% ではその 1/2, 8.5% では 1/10 以下で酸生成と菌体生育に対してイタコン酸は同様なえいきようを与えている。しかし対消費糖収率には影響は殆んどない。

1) 栄養条件

^{29, 38, 50} 既往の報告にある回分醱酵の最適組成を基準とし, 各成分中特に菌体の活性を長期に維持するための主要な制限因子とみられる CSL の効果を検討した。

Asp. terreus T. u-4-46 では結晶ブドウ糖 9~12%, MgSO₄ · 7H₂O 対糖 1% の基礎培地に NH₄NO₃ と CSL を種々の濃度に組合せて 2~3 日毎のうえつきによる約 2 週間の培養をおこなった。*Asp. itaconicus* 34 では最適 pH が 4 附近にあるためイタコン酸緩衝液を培地に加えて適値附近に保ちながら培養した。即ち結晶ブドウ糖 10~11%, KH₂PO₄ 対糖 0.2%, MgCl₂ · 6H₂O 対糖 0.1%, 0.2 M

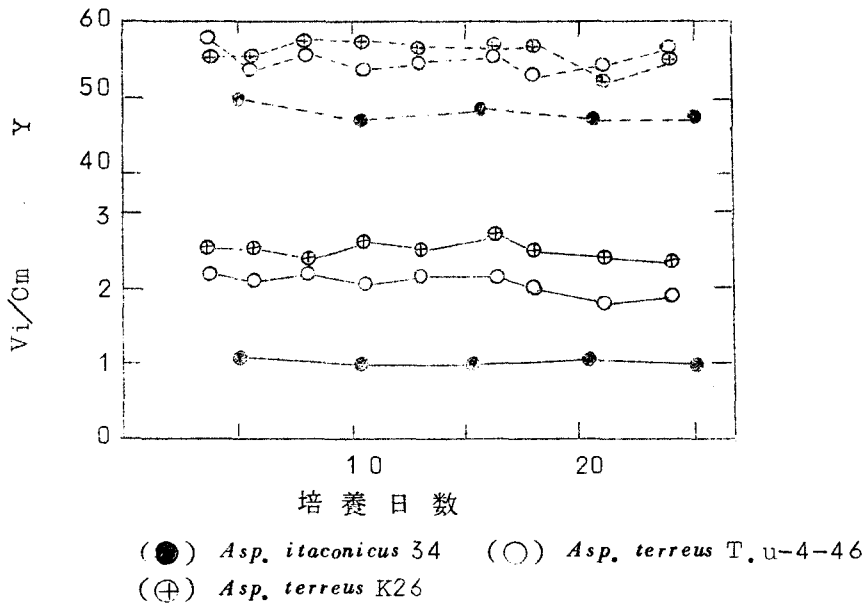
イタコン酸緩衝液よりなる基礎培地に NaNO_3 と CSL を種々の濃度に組合せ、4～5日毎のうえつぎによる約2週間の培養をおこなった。醗への酸素の供給条件をできるだけ同程度にするため、うえつぎの都度増加量に相当する量の菌体を除去し、醗の菌体濃度を大体1%になる様にした。結果を第2-5図に示す。醗酵速度は2週間後のイタコン酸の平均集積比速度で表わした。*Asp. terreus* については



第2-5図 CSL 濃度の効果

NH_4NO_3 の量は N として対糖 0.18% 以上あれば制限因子とはならない。醗酵速度は CSL 濃度により大きく影響されることがわかる。CSL 対糖 1% では平均醗酵速度は殖継ぎ毎に減少するが対糖 1.2%

以上では初期の高い活性を維持することができた。したがって対糖 NH_4NO_3 1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5%, CSL1.2%が適当と考えられる。*Asp. itaconicus* についても CSL濃度の効果に大きな差異は認められず、対糖 NaNO_3 2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, CSL1%が適当と考えることができる。これらの最適培地により3~5日毎の殖継ぎによる24~25日間の培養を行った。その結果は第2-6図



第2-6図 菌体再利用による振盪培養

のようになり、*Asp. terreus* K26 が速度、収率ともに最良であり、従来法に比し収率は同程度であるが、醗酵速度は菌濃度の向上により約2.5倍に増大することが明らかとなった。

VI) イタコン酸の分解速度

Asp. itaconicus は *Asp. terreus* に比し、イタコン酸収率が低い。これは前者では集積したイタコン酸が分解される⁵⁾ ことによるものと考えられるが、更にこの点を確認するため *Asp. terreus* のイタコン

酸分解能につき検討した。すなわち、標準培地に 30℃で48時間培養してえられた菌体を集菌，0.2Mイタコン酸-NaOH緩衝液に懸垂し24時間振盪培養を行った。その結果を第2-1表に示す。pHが高くなるに従い分解速度が増す傾向があるが、その分解量は極め

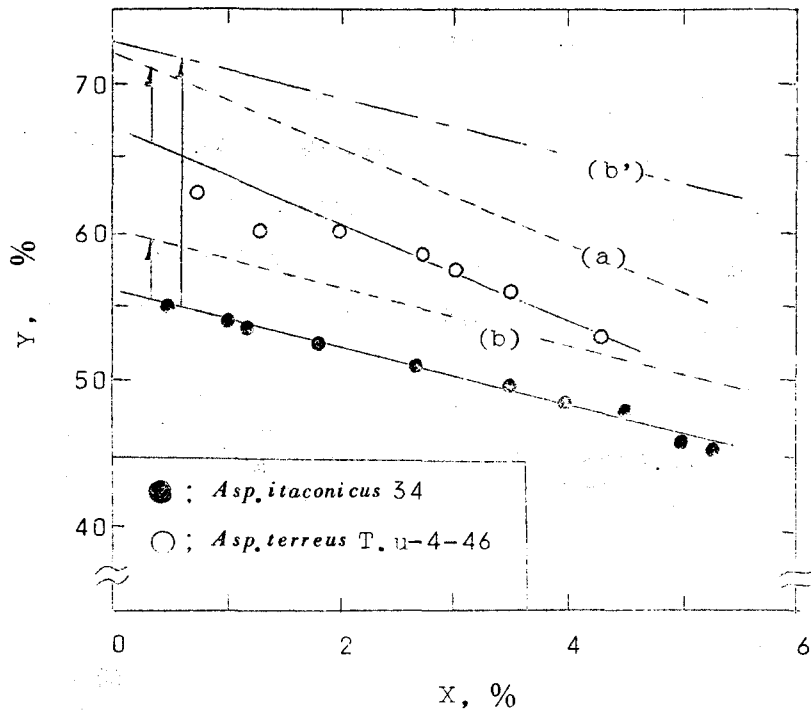
第2-1表 *Asp. terreus* K26 のイタコン酸分解速度

0.2Mイタコン酸-NaOH緩衝液, 30℃, 24時間振盪培養		
pH	初イタコン酸量, g	終イタコン酸量, g
2.12	1.354	1.366
4.00	1.354	1.342
6.09	1.354	1.327

て少く、*Asp. itaconicus* の場合（生成酸の20%が分解をうける）と大きく異なる。かゝる *Asp. terreus* の特性はイタコン酸の工業的生産に対して重要な意味をもつと考えられる。

第2節 菌体収率とイタコン酸収率の相関²⁴⁾

消費糖に対する菌体の収率Xと消費糖に対するイタコン酸の収率Yとの間には第2-7図に示す関係がえられた。両菌株共本実験条件下ではイタコン酸の約5%に相当するイタ酒石酸及びそのラクトンが副生するので、これを考慮すれば図の点線(a)および(b)の直線がえられる。*Asp. terreus* では菌体の生育を伴わないときのイタコン酸収率は72%と外挿され、理論収率（グルコース1Mよりイタコン酸1M生成すると仮定）に一致する。また消費糖のうちイタコン酸の生成以外に向けられたと考えられる糖に対する菌体の収率は、この直線よりもとめると25%前後となる。このことは呼吸に消費される糖量が非常に高いことを示している。一方 *Asp. itaconicus* の場合は副生酸を考慮してもYははるかに低い（点線(b)）。本菌の場合生成イタコン酸の20%は分解を受ける⁵⁰⁾ので、これを考慮すれば点線(b')で示



第2-7図 収率の相関 (振盪培養)

されるように $X=0$ で $Y=72\%$ となり、理論収率は両菌株とも一致する。

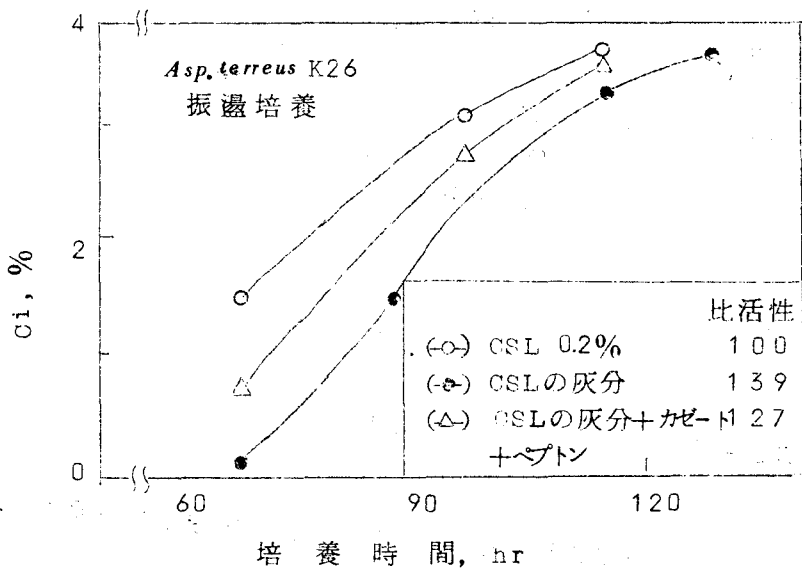
第3節 CSLの有効因子

第1節(V)の結果はイタコン酸醸酵においては微量栄養源としてCSLが最も有効であり、CSLによる醸酵速度の制御の可能性を示唆した。先の実験ではCSLは微量栄養源、主として磷酸と微量重金属の給源として用いたが、CSL中に含まれる各成分のうち何れが菌体の増殖あるいは生産物の集積に有効であるかについては明らかでないので *Asp. terreus* K26を供試して有効因子につき二三の検討を行った。使用した日本食品化工KK製のCSLは水分45~50%、固形分50~55%で、固形分中全窒素は8%、灰分は20%程度であり、窒素は大部分アミノ態、ペプチド態である。また磷酸はPとして対固

形分約4%でその90%が有機態である。

i) CSLの灰分の効果

CSLの有効成分が灰分にあるか否かを知るため、CSLを磁製ルツボにとり電気マッフル炉で約600℃で灰化後、少量の濃塩酸にとかし、一定量に稀釈し、これを基本培地に加えて振盪培養を行った。その結果を第2-8図に示す。これより明らかなようにCSLとその灰分の効果の



基本培地：グルコース8%、NH₄NO₃ 0.3%、MgSO₄・7aq. 0.2%

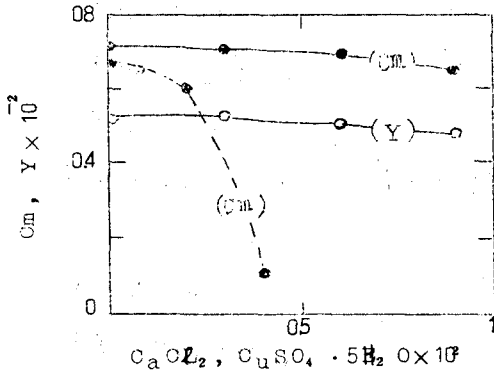
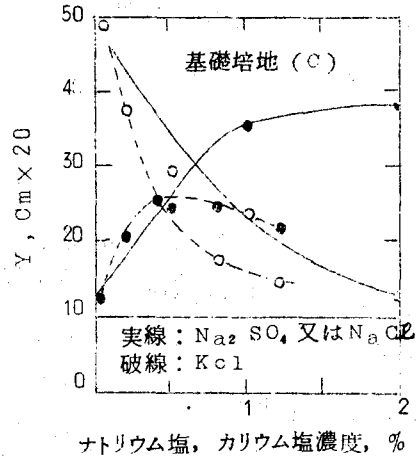
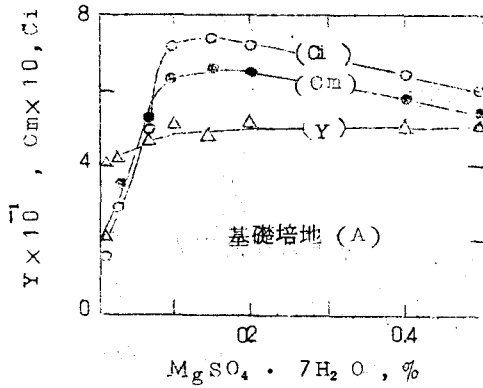
第2-8図 CSLの灰分の効果

差異はlagの長短にある。すなわちCSL添加では発芽、増殖が促進されるので総括醗酵速度が大きくなるのであって、酸集積期における比速度はむしろ灰分添加が勝っておりイタコン酸の酵素系生成に有機物は必要ないと考えられる。

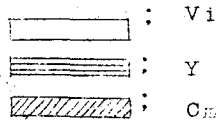
ii) 微量金属イオンの効果

基本培地A (グルコース8%、NH₄NO₃ 0.3%、KH₂PO₄ 0.02%、水道水、pH2),

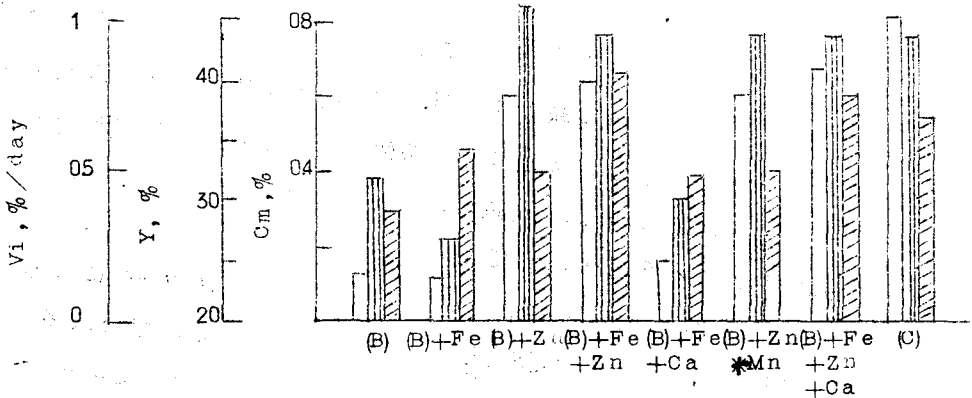
基本培地 B (グルコース 8%, NH_4NO_3 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, KH_2PO_4 0.02%, 純水, pH 2.), または培地 C (グルコース 8%, NH_4NO_3 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, CSL 0.2%, 水道水, pH 2.2) に FeCl_3 , MnSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 , CaCl_2 , Na_2SO_4 , NaCl , KCl , MgSO_4 を単独お



実線: CaCl_2
破線: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$



重金属の添加量はそれぞれ 2 ppm,



第2-9図 微量金属イオンの効果

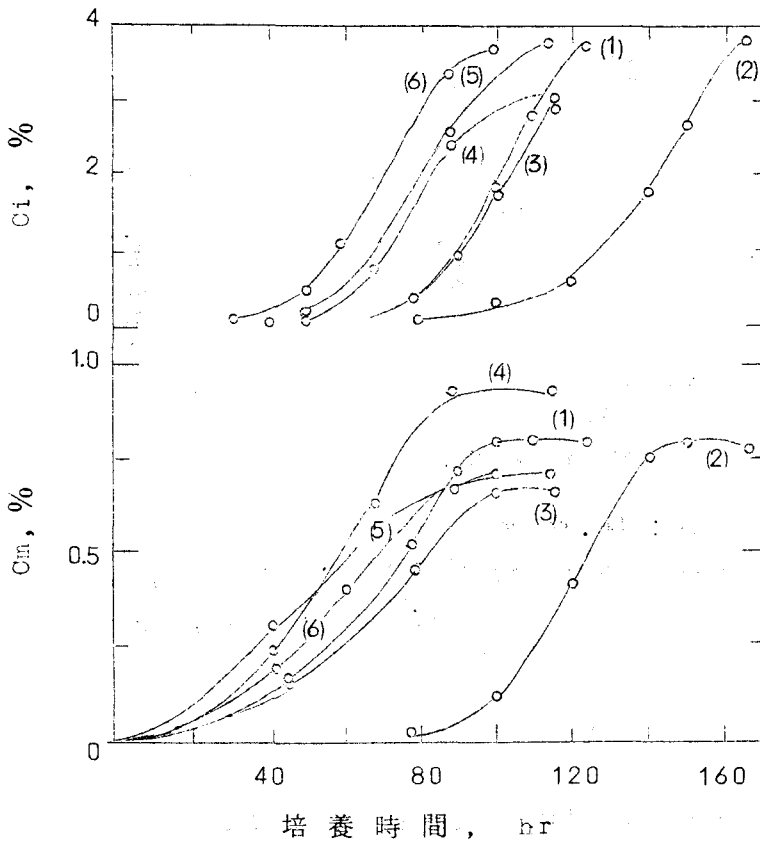
よび組合せて添加し培養し、培養4日後の成分濃度と平均酸生成速度をもとめた。その結果は第2-9図の通りであった。この結果、イタコン酸集積活性の向上にとくに有効なのは Zn^{2+} であり、イタコン酸収率が大幅に向上する。 Fe^{3+} 、 K^+ 、 Na^+ の存在は増殖型にし、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} はほとんど効果なく Cu^{2+} は 2ppm 以上で菌の生育を阻害する。 Mg^{2+} は $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ として対液 0.1%程度必要である。

iii) 有機窒素源および磷酸源の効果

CSL 中の有機物は菌体の増殖を促進する効果を有するが、これについて更に検討するため有機窒素源としてカゼート、ペプトンを、有機磷酸源としてフィチン酸、グルコース-6-磷酸を供試して CSL 培地の結果と比較した。またこれら成分の消長についても検討した。全窒素はマイクロケルダール法¹⁹⁾により、⁴⁾ 磷は Berenblum らの比色法によりそれぞれ定量した。その結果を第2-10、2-11図に示す。図10から有機態のNおよびPがいずれも lag 短縮に有効で、とくにNの効果の著るしいことがわかる。

図11はNとPの消長を追跡した結果である。Pは増殖にともなって菌体内に移行し、液中残存量が殆んど零になると同時に増殖は停止する。これはPが増殖制限因子であることを示している。一方Nも培養初期はその液中濃度は急激に減少するが、中期以後菌体の増殖は進行しているにも拘らず液中濃度は漸増する。菌体のN含量は80時間頃までは一定(80~85mgN/1g菌体)で以後液濃度と対応的に漸減し、培養100時間後には30mgN/1g菌体にまで減少する。磷過剰培地ではN含量低くイタコン酸生成能の微弱な菌体が多量に出来る。*Asp. terreus* によるイタコン酸醸酵では、CSLを補足剤として対液0.2~0.3%加えた場合は多くの報告は²¹⁾ 磷酸塩を別途に加えていない。この場合培地中の磷濃度は40~60 μg P/ml となるからこの程度のCSL添加が結果的に磷酸の適量添加となっており別途に加えることは磷酸過剰となり酸集積活性が低下すると考

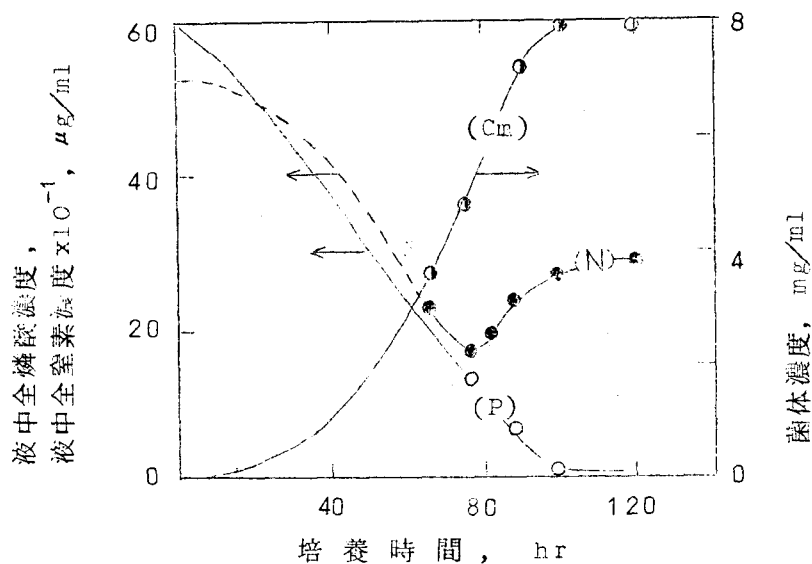
えられる。これらの結果より CSL のイタコン酸生成の有効因子は無機物とくに燐酸と亜鉛にあり燐酸濃度の制御により酸の蓄積が行われると考えられ、*Asp. itaconicus* の場合⁵⁰⁾と大きな差異がある。



基本培地：グルコース-8%， NH_4NO_3 0.3%， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%，
 KCl 0.01%， HNO_3 (Sp. Gr 1.38) 0.05%，
 Fe^{3+} 25ppm, Mn^{2+} 0.9ppm, Zn^{2+} 5ppm, Ca^{2+} 5ppm.

- (1) : グルコース-6-燐酸(バリウム塩) 対液 0.087%
- (2) : KH_2PO_4 " 0.03
- (3) : フィチン酸 " 0.02
- (4) : KH_2PO_4 0.03%+Casate 0.06
- (5) : CSL 0.2%
- (6) : casate 0.06%+フィチン酸 0.024

第2-10図 窒素源，燐酸源の影響



菌株: *Asp. terreus* K26

培地組成 (g/l): グルコース 80, NH_4NO_3 3,
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2, KH_2PO_4 0.3,
 フィチン酸 0.1

pH 2.2, 30°C

第2-11図 窒素, リン酸濃度の経時的变化

第4節 要 約

イタコン酸醸酵の高速化の可能性を確かめるため、菌体うえつきによる振盪培養により菌株の種類、およびその培養条件 (pH, 菌濃度, イタコン酸濃度, 栄養支配因子等) の醸酵速度、およびその永続性、収率に対する効果について予備的検討を行った。

1) 菌株では *Asp. terreus* K26 が速度、収率ともに最良で、この菌株を以

後の研究の供試菌株に選定した。菌体活性の永続性には微量栄養因子として CSL が有効で、長期の活性維持には対糖 1.2% 以上必要であった。

2) pH の適値は *Asp. terreus* では 2.0~2.2, *Asp. itaconicus* では 4.0~4.4 であった。前者は菌体生育期の pH が支配的であった。

3) この培養法では菌体濃度対醱 1% 以下では醸酵速度は菌体濃度に比例する。

4) イタコン酸濃度は対醱 6% までは醸酵速度に甚だしい影響を与えない。

5) 対消費糖菌体収率 X とイタコン酸収率 Y は対立関係にある。

6) CSL の酸集積の主有効因子は亜鉛と燐酸であり、これ以外は不純物として基質および水道水より混入する程度で十分である。

7) *Asp. terreus* のイタコン酸分解能は微弱であるのが *Asp. itaconicus* との特性の差異の一つであり、この特性は工業生産上の利点である。

第3章 単槽定常連続培養における培養速度式

前章では、菌体濃度の増大が醗酵の高速化に有効であることを明らかにし、さらに菌体活性の永続性に対するおおよその培養条件の影響をしらべ、その結果菌株として *Asp. terreus* K26 を選定した。本章ではこの醗酵の速度と化学的、物理的培養条件の相関関係をより広い条件において明確にするため 20ℓ ジャーファーメンターを主体とするベンチスケールの実験装置を使用し、単槽定常連続培養法を適用して工学的解析を行った結果についてのべる。

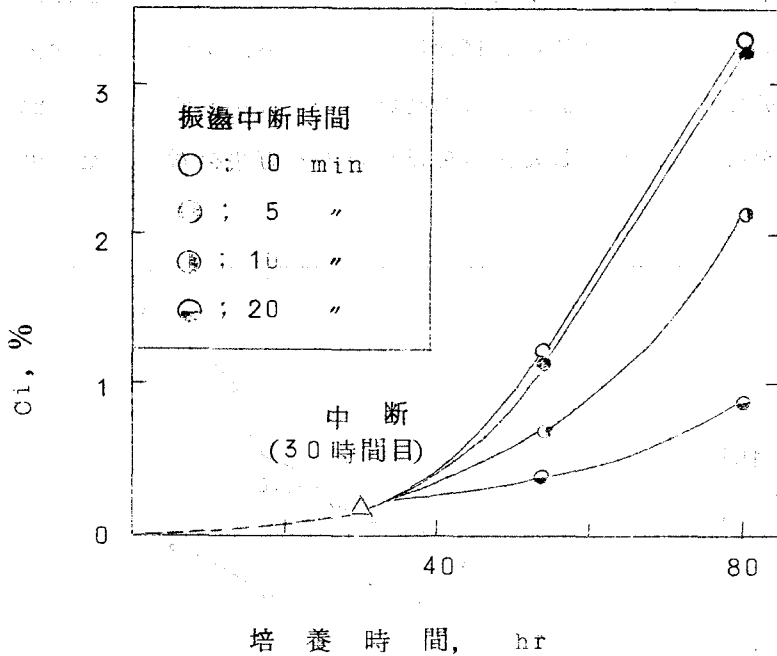
速度と培養条件の相関を正確にもとめるには、広い条件範囲で定常的な菌体の活性が維持でき、流速が明確に規定でき、直接速度が求められるような条件を確立することが望ましい。そこで研究手段として菌体分離装置を付設した 20ℓ の通気攪拌培養装置による単槽定常連続培養方式を採用した。その結果、データの解析が容易となり、条件と速度の相関を示すこの生物系の反応速度式を提出することができた。

第1節 定常状態設定法と醗酵速度の測定法^{25,34)}

(1) 実験装置と操作方法

i) 菌体分離方式

高菌体濃度下の培養を実施するためには、まず菌体を連続的に液と分離して再使用するための菌体分離装置が必要である。Porges⁴⁴⁾ら、Blom⁴⁾らは *Asp. niger* によるグルコン酸醗酵において、醗酵槽よりとり出し、圧濾機により菌体を分離し、再び醗酵槽に回収し良好な成績を収めているが *Asp. terreus* の場合は第3-1図に示すように培養の中断によって菌体のイタコン酸集積活性が低下するという生理的特性があるため、迅速な分離が必要である。すなわち 500ml フラスコに培地 120ml を仕込み常法により *Asp. terreus* K26 の胞子を接種し、30℃ で30時間培養したのち振盪培養機よりお

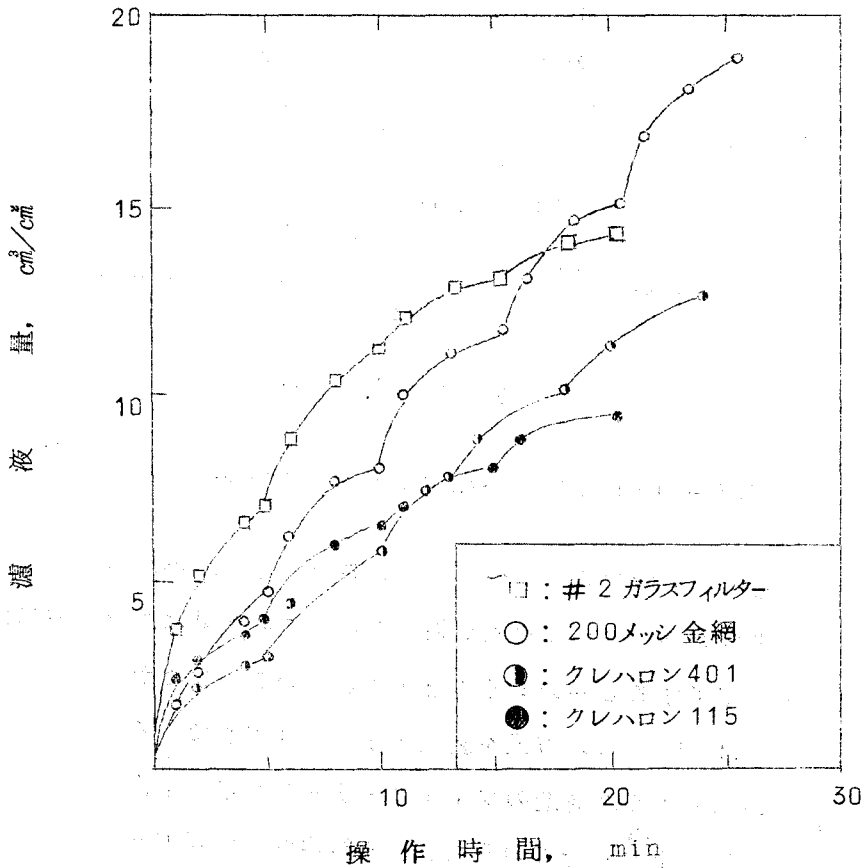


第3-1図 培養中断による醗酵速度の変化

ろし、所定時間（0～20分）静置した後、再び培養を行ない、イタコン酸の集積を見た結果である。この結果は5分以内に菌体分離を完了する必要があることを示している。したがって本実験の規模ではBlomらの方式を装置化するのは困難であると判断し、以下にのべるような構造のフィルター・リーフを培養槽内に直接挿入し、槽内外の圧力差で液のみこしとる槽内濾過分離方式を採用した。

Asp. terreus K26の液内培養菌体は、いわゆるパルプ状であり、網目状の菌糸集団の直径は大分部平均300 μ 前後であって通常の濾布で分離できる。しかし、濾布（クレハロン#115）を使用した予備試験の結果、膠に、ごく少量ではあるが存在する微細な菌糸断片のために短時間で濾布の目ヅマリが生じ、分離速度が急激に低下すること、および糸状菌体は圧縮性ケーキの挙動を示し、圧力差を大に

しても期待される程濾過速度が増加しないことが判明した。したがって分離速度維持には濾材面に沈積した菌体を連続的に除去することが必要であった。そこで適時濾液流出方向と逆方向から濾面に空気を吹込み、沈積した菌体をはく離する方法を考出した。第3-2図



醗酵液, Cm 1.1~1.3, 30°C

濾過面積 28.2 cm²

圧力 9 Psig, 逆送空気圧 14.5 Psig

第3-2図 濾材の種類の影響

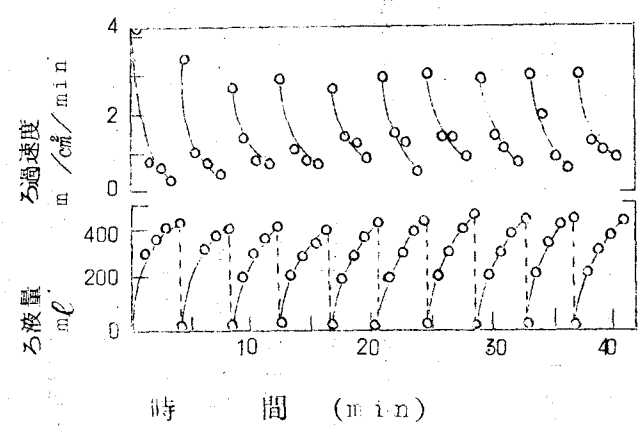
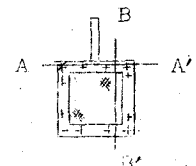
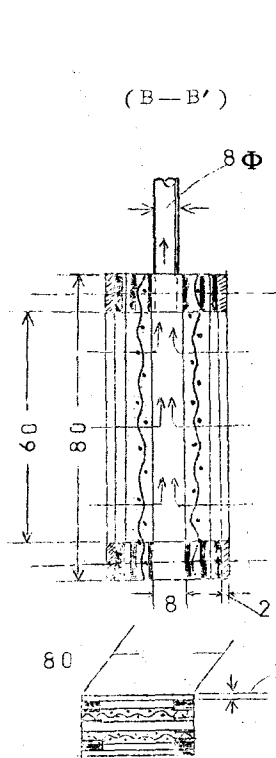
に示すように濾布としては200メッシュ平織金網が最良で、逆送操作により分離速度の低下を防止し得た。その他の濾材はこのような方法を用いても漸時目づまりのため速度が低下した。

フィルターリーフの構造はとり扱いの簡便さをも考慮して第3-3図に示す構造のものを使用した。すなわち外径8 mm (SUS27)の濾液流出用パイプをつけた幅8 mm, 一辺8 cmの正方形の中枠の両側に50メッシュ金網と200メッシュ金織(いずれも平織)をゴムパッキンを介して重ね合せ, さらにその外側に厚み2 mmで同じく正方形の枠を両側に重ねて周囲をボルト止めとしたもので濾過面積は72cm²である。50メッシュの金網は濾布(200メッシュ金網)が外圧により密着するのを防止するための補強として用いた。これをジャー内に入れてジャマ板に固定した。槽内圧により金網面で菌体を分離した濾液は中枠より流出管を通して槽外へ出る。一定時間後, 逆方向に無菌空気を通じて附着菌体を短時間にはく離して再び濾過操作にうつる。濾過時間と空気による逆送時間はタイマーと逆作動機構をもつ電磁開閉系の組合せにより, 前者は1~4分, 後者は0.1~0.4分の間で任意に調節できる。実際の培養醪を使用して濾過試験を行った結果は第3-3図のようになり, 長時間に亘り平均濾過速度を一定に保つことが可能であった。また一回の濾過時間をタイマーで変更することにより第3-4図に示すように濾過速度の調節が可能である。

ii) 実験装置と操作方法

広い条件範囲に亘って定常状態を維持しうる実験装置につき種々試作と改良を加え, 最終的に第3-5図の装置を作成した。以下同図に従い操作方法をのべる。

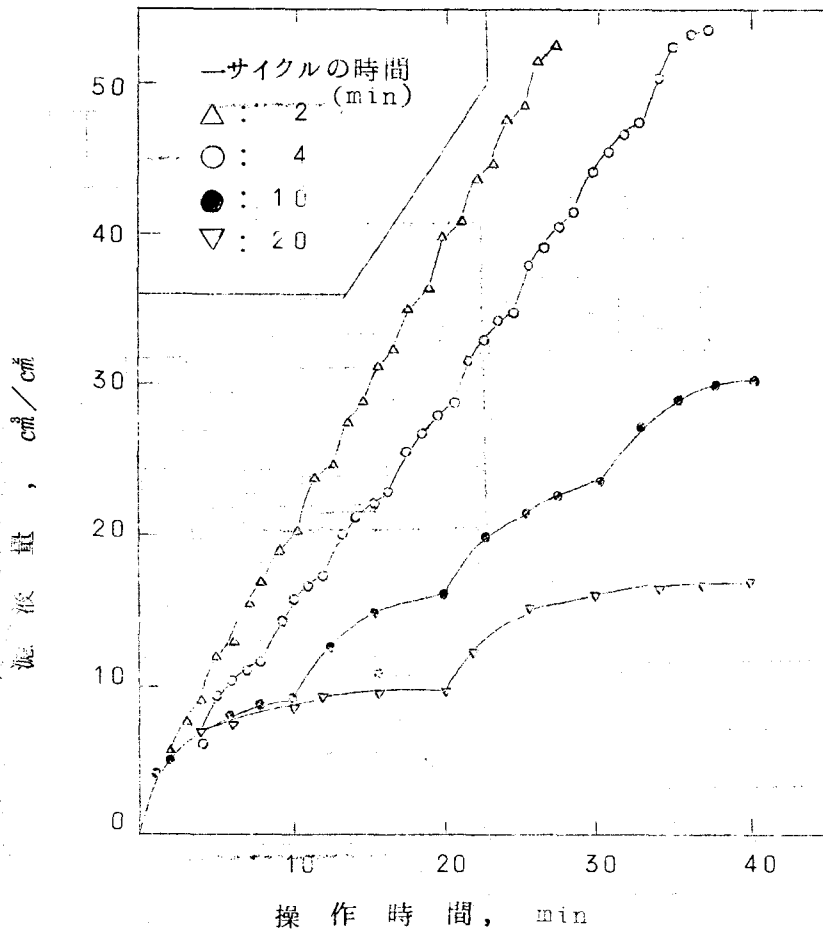
先づ連続培養前操作として200ℓ フェーマンター①に約100ℓの培地を仕込み, 常法により回分通気攪拌培養を40~45時間行ない菌体を生育せしめる。この時点で醪の菌体濃度は0.4~0.5%に達し,



ろ布：200メッシュ金網 (SUS27)，ろ過圧：2 psig，逆送空気圧：8 psig
 面積：72 cm^2 ，1回のろ過時間：4分，逆送時間：0.1分

(A-A')

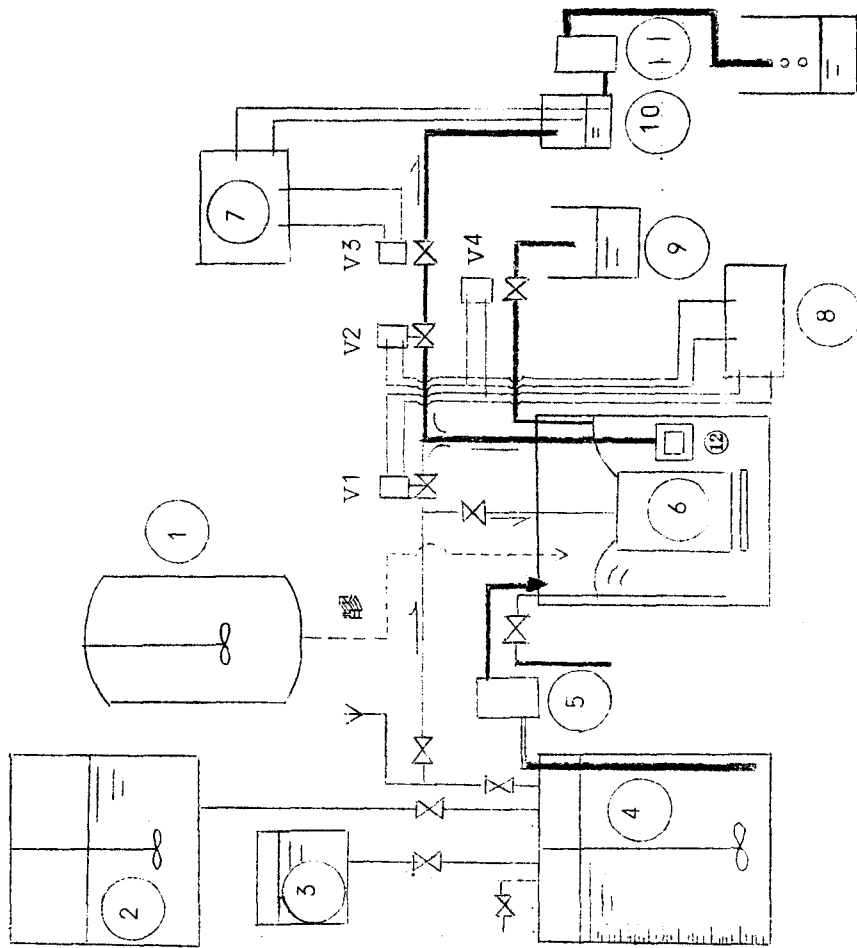
第3-3図 フィルターリーフの構造と濾過特性



圧力 : 2 Psig , 逆送空気圧 : 8 Psig ,
 濾布 : 200メッシュ金網 , 濾過面積 72cm²

第3-4図 作動時間の調節による濾液量の変化

イタコン酸の集積比速度も最高値に近づく。この醗を約 2 Psig に保った 20 l ジャーフェーマンター⑥に重力で流入させながら同時にジャーにセットしたフィルターリーフ⑦により液部のみこし取りながら槽内菌濃度を高める。この操作により短時間 (1~2 時間) で 1% 以上の菌体濃度に達し、能率的に連続培養操作に移ることがで



第3-5図 実験装置系統図（単槽連続培養）

きる。所定の菌濃度に達したとき①からの醪の輸送を中止し、連続培養または高菌体濃度回分培養を開始する。培地は200ℓの貯槽②で調製する。③はイタコン酸水溶液の貯槽で醪のイタコン酸濃度を人為的に制御するために必要に応じて流加培地に加えるための貯槽として使用した。培地または培地とイタコン酸水溶液を目盛り付きの計量槽④に輸送して計量した後、ポンプ⑤で⑥に定速で供給する。

ポンプは東京マシナリーKK製の小型プランジャー式（接液部SUS 27）で、ストローク長と往復数の組合せにより流量を0.1~2ℓ/hrの範囲で連続的に変えることができる。流速大の条件では計量槽を二基設け交互に使用した。

一方培養槽からの醸酵液の排出はa) フィルターリーフから濾液の状態、b) 電磁バルブV4を通じて直接醪の状態、すなわち二ヶ所より行った。まずフィルターリーフ⑩により分離された液は電磁バルブV2、V3を通過して中間槽⑪に一たん入り、これより隔膜ポンプ⑫で連続的に排出される。V1とV2はタイマーにより定時間間隔で逆作動し、V2が閉じるとV1が開き無菌空気がフィルターリーフを通過して培養槽に放出され、附着菌体をはく離し、0.1~0.4分後再びV1がとちV2が開いて濾過が開始される。⑩は流出速度を定常化させるための後衝タンクであり、これに液面調節のための電極をもうけ、液位が下るとリレーによりV3が開いて濾液が流入し、常に一定の液位が保たれるようにした。このようにして排出速度は±1%以内の誤差で定常化することができた。一方外径8mmの排出用パイプをその先端をジャーの醪の上表面に密着して設け槽内醪をV4を通じて直接排出させる操作を並行した。この操作は次の三つの機能を同時に満足させる。すなわち、1)槽内菌体濃度の調節（菌体の増殖を伴うような培養条件の際には増殖量に担当する量の菌体を系外に排除する必要がある。2)槽内圧の一時的な上昇の防止（前述のごとく8 Psigの無菌空気の槽内逆送による内圧上昇により濾布面に菌体が圧縮され濾過速度が急減する。これを防止し、槽内圧が常に濾過圧即ち2 Psig以上にならないようにする）3)培養槽内醪量の調節（連続開始時にポンプ⑤および⑥を調整して流量の同調化を行ってもサンプリング、蒸発水分等のために醪量の変動はさけられない。この方式によれば醪量の調節が容易となりその結

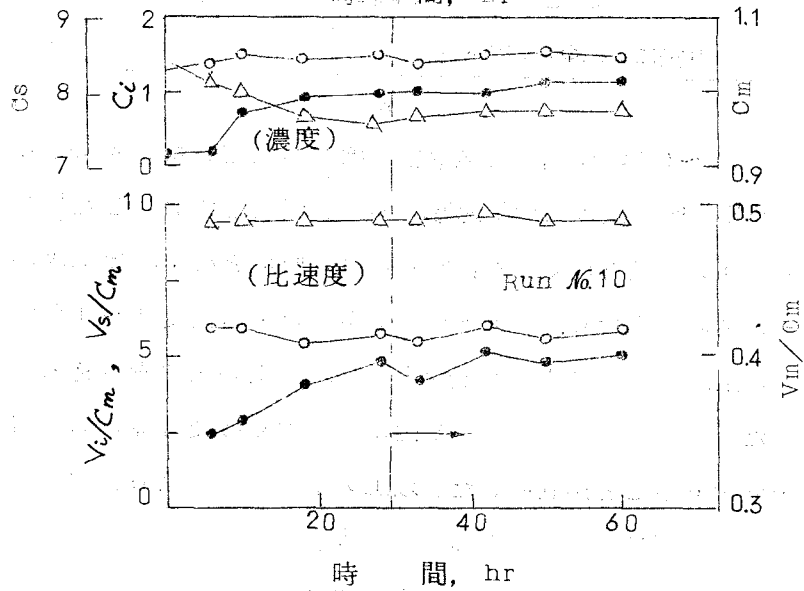
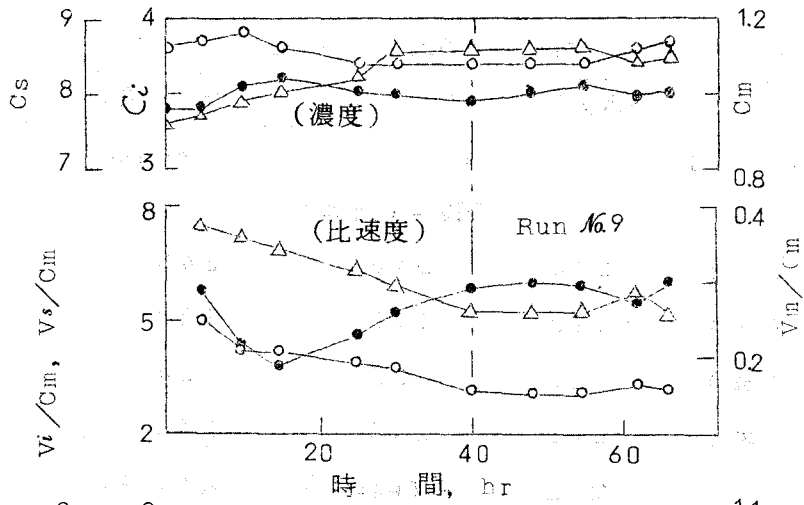
果膠量の変動は2%以下であった。V4は電磁開閉式であるが菌体による弁部の閉塞をさけるため径6mmのゴム管にピンチコックをつけ、マグネットでピンチコックを開閉するようにした。V1とV4は同時作動とした。以上のような排出機構により、広範な条件下で菌濃度を任意の準位に定常化することが可能となった。

(2) 測定法

種々の条件下で連続培養を行い、4時間乃至8時間毎に100~150 ml サンプルングし、同時に流出液および流出醪を秤量した。流入培地量は計量槽の液位目盛で容積をよみとり液比重を乗じて重量を算出した。培地、流出液、槽内醪それぞれについてpH、還元糖濃度、イタコン酸濃度、菌体濃度を定量し、各成分濃度が定常化するまで培養を続けた。第3-6図は単槽連続培養の経過の一例であり、イタコン酸濃度 C_I 、糖濃度 C_S 、菌体濃度 C_M の経時的变化ならびにイタコン酸集積比速度 V/C_M 、糖消費比速度 V_S/C_M 、菌体増加比速度 V_M/C_M の経時的变化を示した。図で破線で示した時期すなわちRun 9では連続培養開始後40時間目、Run 10では30時間目では定常状態に達したとみなすことができる。従ってこの時期以降の平均値を以てそれぞれの条件における濃度および速度の定常値とした。醪の各成分の分析は第2章第1節に準じて行った。

第2節 菌体濃度の効果

振盪培養の結果ではイタコン酸の集積速度は対液2.8%/dayを越えず、これは回分式培養の最高速度と同程度であって、これ以上の速度は高い菌体濃度下でも期待できないように見られた。しかし高菌体濃度における培養では攪拌、混合等の物理因子が醸酵速度に大きく影響し、ロータリーシェーカーの如き低混合条件では酸素の気液間移動過程が律速段階を形成して結果の解析を混乱させる。したがって醸酵速度の最高値を追究するためには、まず



△ , 還元糖, ○ : イタコン酸, ● : 菌体

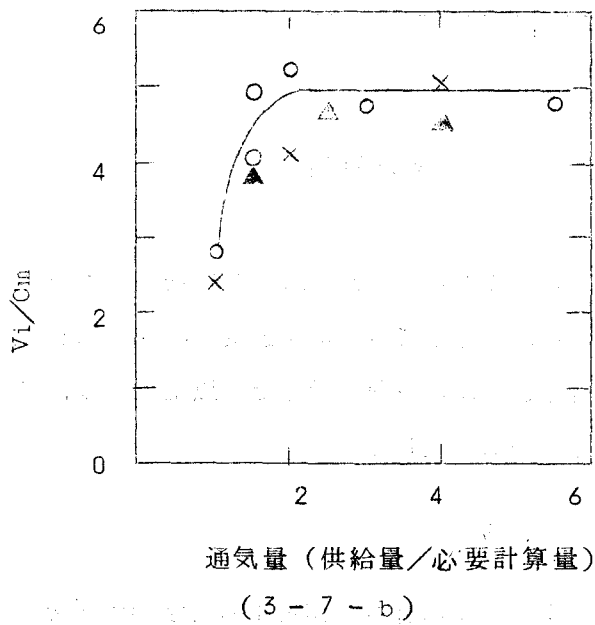
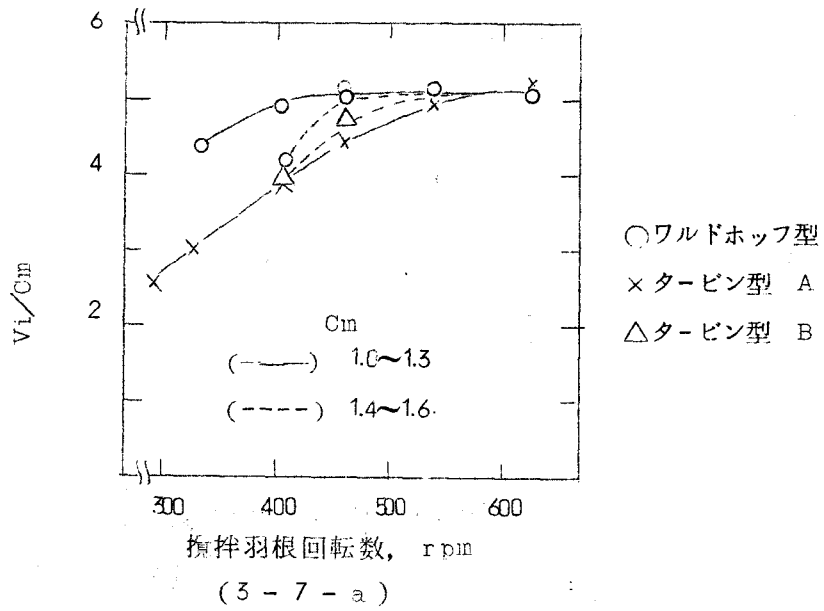
第3-6図 単槽連続培養経過例

拡散抵抗が無視出来る培養条件を見出す必要がある。そこで第3-1表のような三種類の培養槽を使用して回分法で攪拌機の回転数および通気量の効果を検討した。

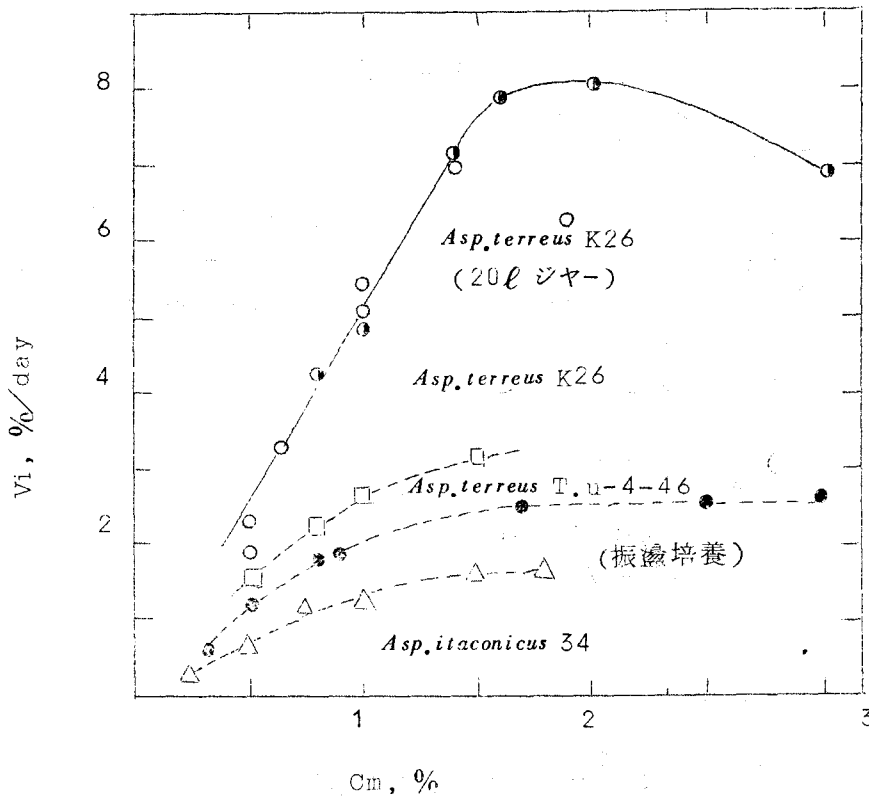
第3-1表 培養槽の型式と主要寸法

	ワルドホッフ型	タービン型 A	タービン型 B
羽根の型	円盤付彎曲6枚羽根	上段4枚軸流 下段4枚平羽根	6枚平羽根
槽 径 (mm)	240	240	240
羽根径 (mm)	132	110	120
羽根幅 (mm)	26	22	24
液 高 (mm)	240	240	240
シヤマ板	なし	4枚(幅24mm)	4枚(幅24mm)
中央に132Φのドラフト管			

羽根の回転数は280~670rpm, 通気量は田⁵⁰の推定した必要量より, イタコン酸収率を50%, 最大集積比速度を4.5と仮定して算出した量を基準としてその1~5.5倍量を通気した。その結果回転数と酸集積比速度の関係は第3-7-a図の如くなり, ワルドホッフ型では菌体濃度1~1.3%の場合405rpm以上, 1.4~1.6%の場合475rpm以上の条件を与える必要が明らかとなった。通気量は第3-7-b図に示す如く必要計算量の2倍以上供給すれば十分であることが判明した。以上の予備的実験より菌体濃度に対応した通気攪拌条件がほゞえられたので, 菌体濃度C_{in}のイタコン酸集積速度V_iに及ぼす効果につき検討した。培養時間は培養条件や生産物のえいきょうを可及的少くするため, 連続培養では20時間以内の平均速度, 回分式高菌体濃度培養では初期の速度で表わした。その結果は第3-8図の通りであった。通気攪拌培養では菌濃度1.6%前後まで集積速度は直線的に増大する。振盪培養の場合, 菌濃度1%以上で直線比例関係のくずれる原因が



第3-7図 通気攪拌の効果



第3-8図 菌体濃度の効果

醗の好気条件にあるのは明らかである。しかし通気攪拌培養でも菌体濃度2%で酸集積速度8%/dayを最高としてさらに菌濃度が増すと集積速度は低下する傾向になり、振盪培養と異なる挙動を示した。以上の結果、イタコン酸の集積速度は従来法の約5倍に増大した。

第3節 化学的因子の^{34, 36)}効果

イタコン酸^{34, 36)}醗の速度および収率に有意に作用する化学的因子としてイタコン酸濃度、糖濃度、温度、pH、ガス分圧、CSL供給速度の6因子をとりあげ、その相関につき検討した。本節では醗速度との相関について述べる。

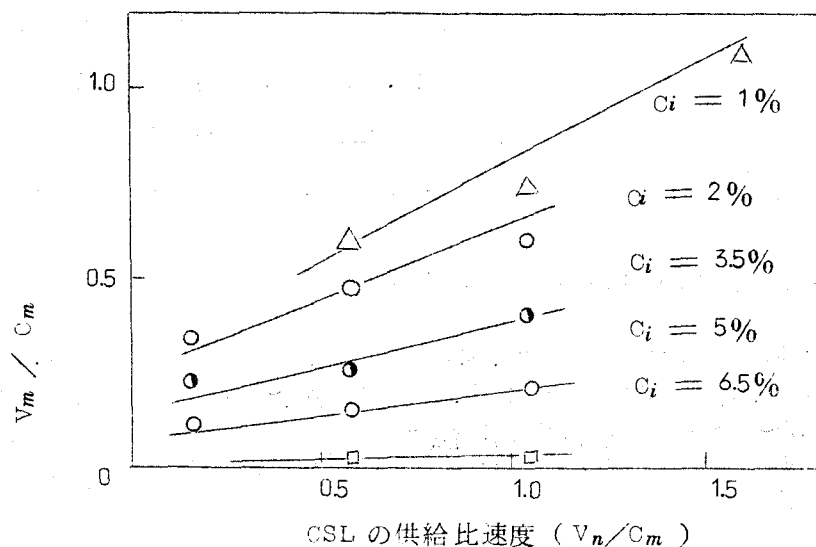
(1) イタコン酸濃度 C_i および CSL 供給速度 V_n

菌体の増殖に対して C_i と V_n は互は逆の関係にある。すなわち C_i が高くなるに従い菌体増殖速度 V_m は減少するか、その程度は V_n によって異なると考えられる。そこで第3-2表に示すように種々の準位の条件下に単槽連続培養をおこなった。その結果は第3-9図、第3-10図のようであった。

第3-2表 C_i および V_n/C_m の効果に関する実験条件

基本培地：結晶グルコース 11%, $V_nH_4NO_3$ 0.3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2%,
 HNO_3 (Sp Gr. 1.38) 0.1% pH: 2.2, 温度: 35.5~36.5°C, 通気量: 1ℓ/min
 攪拌数: 7.7~8.1ℓ, 連続培養時間: 60~341hrs,

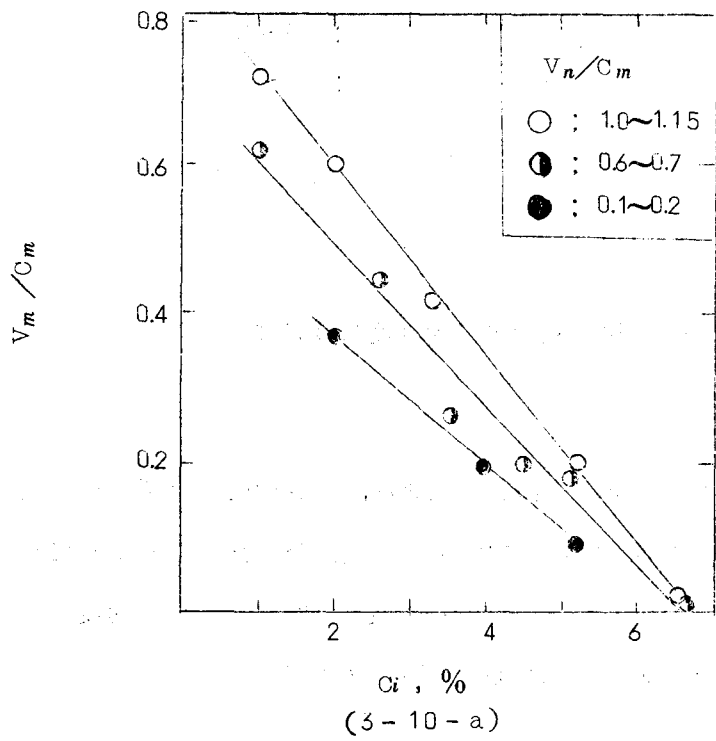
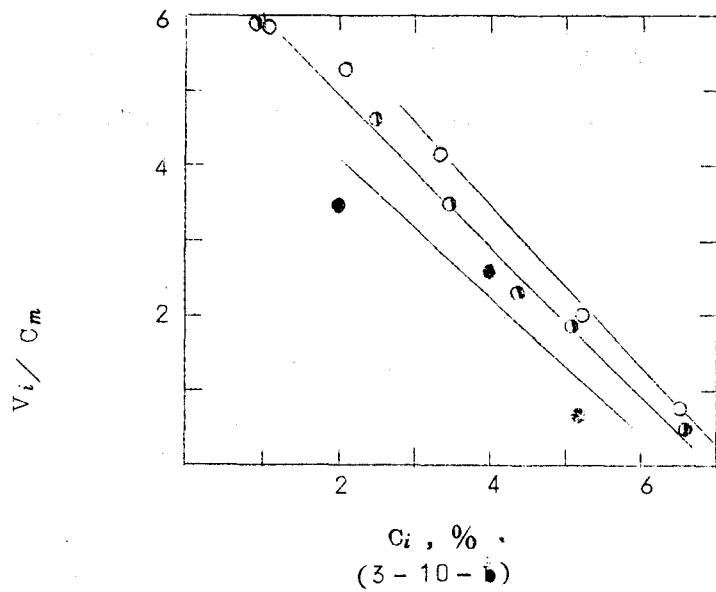
Run No.	培地供給速度 ℓ/hr	V_n/C_m , %/day/%菌体	培地のCSL 濃度,%	培地イタコン酸 濃度,%	定常時の 菌濃度, %	定常時の イタコン酸 濃度,%
1	1.6	1.16	0.2	0	0.88	0.98
4	0.8	1.07	0.4	0	0.90	2.02
2	0.65	1.05	0.45	1.5	0.87	3.34
3	0.65	1.12	0.45	4.5	0.83	5.27
5	0.65	1.00	0.45	6.2	0.89	6.50
18	2.0	0.64	0.1	0	0.98	0.92
22	1.0	0.59	0.2	0.95	1.01	2.51
23	0.65	0.58	0.3	1.7	1.03	3.50
19	0.65	0.55	0.3	3.2	1.10	4.48
20	0.65	0.57	0.3	4.0	1.05	5.13
24	0.65	0.61	0.3	6.5	0.96	6.70
21	1.3	1.75	0.25	0	0.58	0.83
25	1.3	1.97	0.3	0	0.63	0.91
26	1.3	3.50	0.2	0	0.22	0.21
27	1.0	1.50	0.3	0	0.61	1.15
28	1.3	2.40	0.15	0	0.25	0.32
33	1.2	2.43	0.4	0	0.60	1.10
34	3.1	4.71	0.2	0	0.40	0.2
35	0.65	0.12	0.06	0	1.05	2.0
36	0.32	0.13	0.15	0	1.25	4.0
37	0.15	0.08	0.2	0	1.10	5.2
38	2.0	0.80	0.18	0	1.41	1.38
39	1.3	2.0	0.75	4.0	1.10	5.1



第3-9図 CSL供給速度の効果

第3-9図は CSL供給比速度 V_n/C_m と菌体増殖比速度 V_m/C_m の関係を示した。また第3-10図は C_i と V_m/C_m およびイタコン酸集積比速度 V_i/C_m の関係を V_n/C_m をパラメータとして示した。これより比速度は V_n/C_m と正比例関係にあり、 C_i と逆比例的関係にあることが明らかとなった。 C_i 6.5以上では V_n/C_m 1.15 においても V_m/C_m は0に近似し、 C_i の低下に伴ない V_n/C_m の大なる程、 V_m/C_m は大になる。また $V_n/C_m = 1.0 \sim 1.15$ の条件では V_i/C_m と C_i の直線相関性は C_i 2.5% 以上の領域にあり、2.5% 以下では直線からの偏奇が認められた。

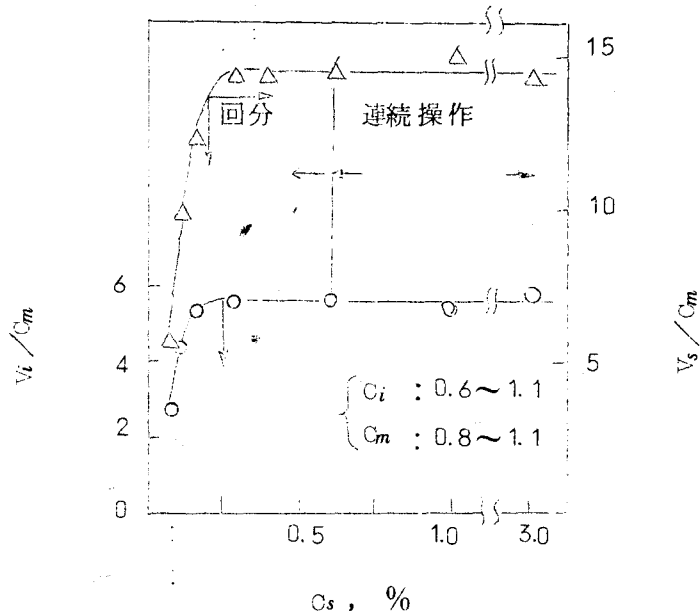
以上のように長期の単槽定常培養では C_i が醸酵速度に著るしい影響を及ぼすのであって、この C_i の負の効果は V_n/C_m の正の効果に勝り、とくに C_i 準位の 大なる領域で顕著である。このことは単槽定常培養においては酸集積速度の向上は C_i の犠牲において達せられることを示している。



第3-10図 比速度に及ぼすイタコン酸濃度の効果

(2) 糖 濃 度

対醪 3%濃度以下の領域について糖濃度の影響をしらべた結果を第 3 - 11 図に示す。C_i の影響を出来る限り少くするため C_i 1%以下の定常条件



第 3 - 11 図 糖濃度の比速度に及ぼす影響

で行った。0.6%以下の糖濃度の検討は、実験精度の点で連続培養操作が困難であったので0.6%濃度で定常培養後回分培養にきりかえて追跡した。第 3 - 11 図より明らかなように糖濃度 0.3%までは醗酵速度は影響されないがこれ以下の領域で濃度依存性が表われる。

(3) 温度

第3-3表に示す条件で温度の効果を検討した。

第3-3表 温度の効果に関する実験条件

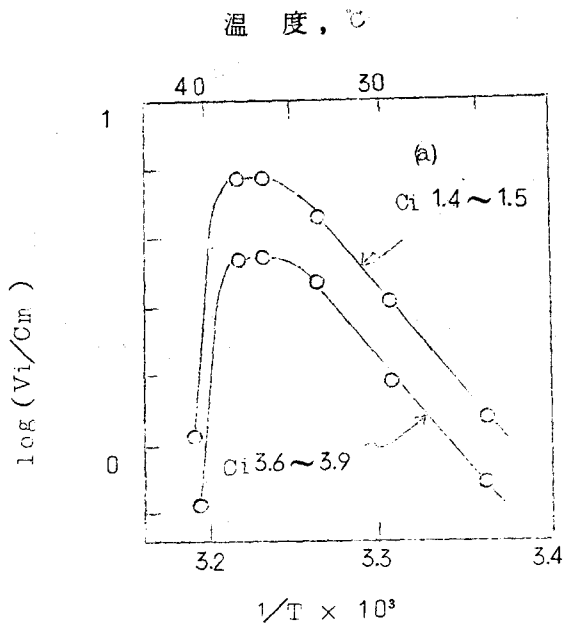
基本培地 (A) 組成：結晶グルコース11%, NH_4NO_3 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%,
 CSL 0.15%, conc. HNO_3 0.1%,

基本培地 (B) " : 結晶グルコース11%,

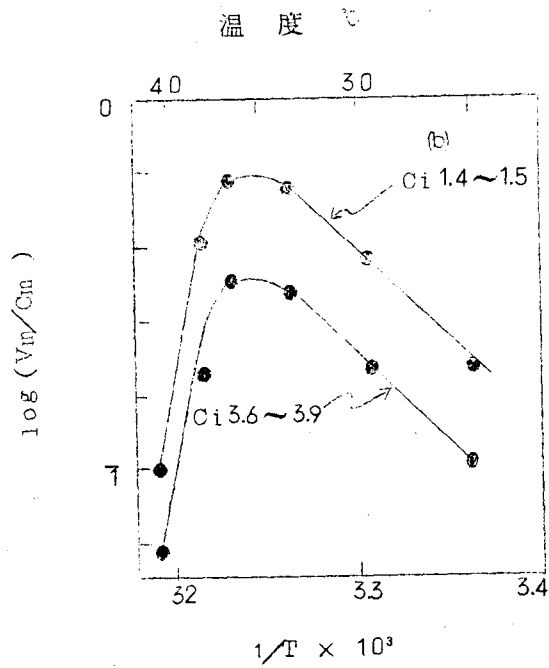
培養液量 : 7.7~8.1 l, 通気量 1 l/min, 攪拌数: 470 rpm, 連続培養時間: 30~90 hrs

	培養温度 °C	培地供給速度 l/hr	流加培地の イタコン酸濃 度, %	基本培地	定常時の 菌濃度, %	定常時の イタコン酸 濃度, %	C_n
14	24.5	1.3	1.1	A	1.03	1.4	0.61
16	29.5	"	1.0	"	1.04	1.4	0.57
8	33.5	"	0.3	"	1.02	1.4	0.61
6	36.5	"	0	"	1.04	0.5	0.59
10	38.0	"	0	"	1.04	0.6	0.60
12	40.5	"	1.1	"	1.02	0.6	0.60
15	24.5	"	3.5	"	1.03	0.6	0.60
17	29.5	"	3.5	"	1.00	0.6	0.66
9	33.5	"	3.0	"	1.04	0.5	0.58
7	36.5	"	"	"	1.09	0.6	0.61
11	38.0	"	"	"	1.11	0.5	0.59
13	40.5	"	3.5	"	1.02	0.5	0.59
29	26	0.65	0	B	0.95	0	0
30	31	1.3	"	"	1.06	0	0
31	36.5	"	"	"	1.01	0	0
32	38.5	"	"	"	0.97	0	0

(i) 菌体増殖を伴う定常連続培養系における温度効果 (Run 6~17) 菌体増殖比速度 V_m/C_m とイタコン酸集積比速度 V_i/C_m の対数を絶対温度 T の逆数に対してプロットすれば V_i/C_m と $1/T$ の相関は第3-12-a 図 V_m/C_m と $1/T$ の相関は第3-12-b 図のようになった。 V_i/C_m は 24.5~36°C の範囲で、また V_m/C_m は 24.5~33.5°C の範囲でいずれも絶対



$Q_{10} = 4.4$
(25~35°C)

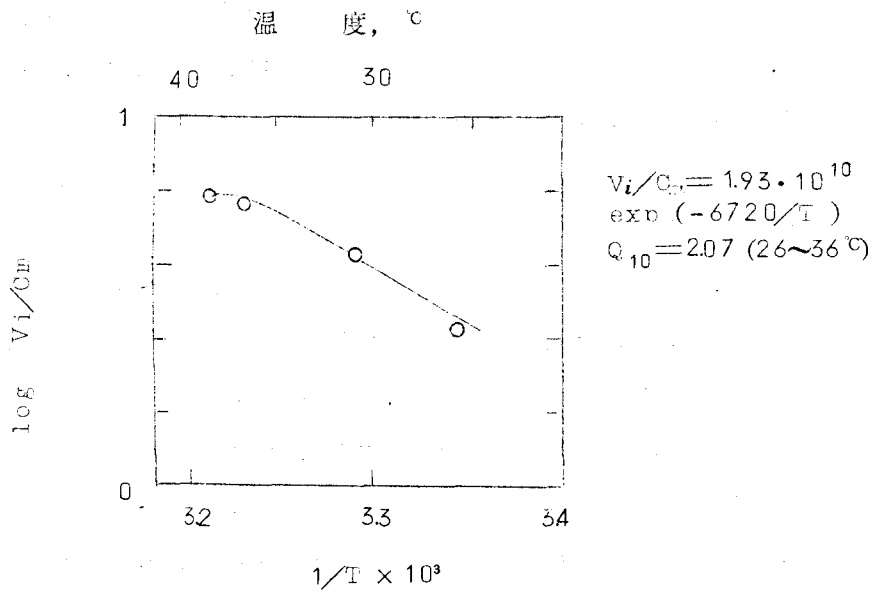
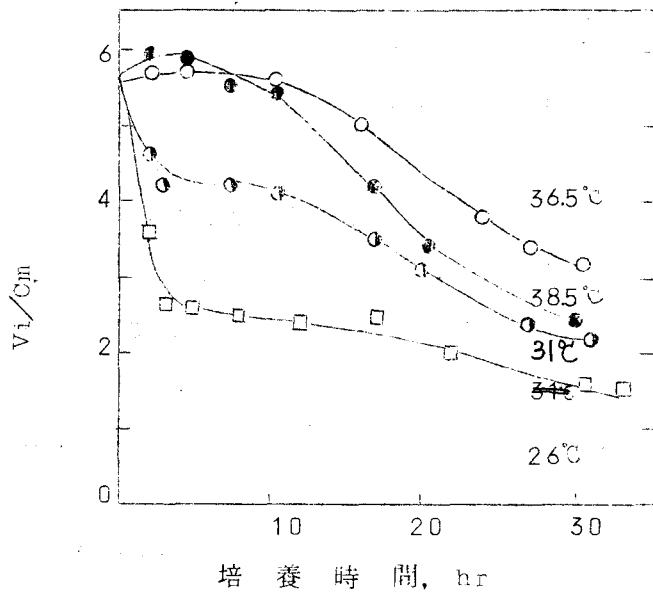


$Q_{10} = 3.45$
(24~34°C)

第3-12図 培養温度の効果

温度の逆数と近似的に直線関係がなりたち、 $V_i/C_m (V_m/C_m) = a \cdot \exp(-b/T)$ で表わすことができる。 V_i/C_m は 38°C で最大となりそれ以上では急激に低下する。一方 V_m/C_m は 35°C で最大となり 36°C 以上では同様に急激に低下する。同一の V_m/C_m においても C_i の高い場合は、 $V_m/C_m, V_i/C_m$ ともに低い値を示すけれども直線部分の勾配は近似している。また、菌体の生育適温と酸集積の適温は一致せず、前者は後者より $1\sim 2^\circ\text{C}$ 低い。対消費糖イタコン酸収率は温度の上昇とともに漸増し、 38°C で最高 (60%) を示した。しかし、 40.5°C では収率は遂に低下した。 V_m/C_m に関する Q_{10} は 3.45 ($24\sim 34^\circ\text{C}$)、 V_i/C_m に関する Q_{10} は 4.40 ($25\sim 35^\circ\text{C}$) であった。

- (ii) 温度変換による既成菌体のイタコン酸集積比速度の変化 (Run 29~32)
- V_i/C_m と V_m/C_m に対する適温に $1\sim 2^\circ\text{C}$ の差のあることが判ったので適温附近すなわち 36.5°C で 43 時間回分培養を行って菌体を生育させた後、短時間に種々の温度に変換して連続培養をおこない、既成菌体の V_i/C_m 値およびその永続性に対する温度効果をしらべた。連続培養開始後の V_i/C_m の経時的变化を各温度についてプロットした結果は第 3-13-a 図の如くであった。 36.5°C より 26°C または 31°C に低下させた場合、連続開始後 V_i/C_m は急速に減少し、 $3\sim 4$ 時間後よりそれぞれの温度に応じた定常値を示した後 12 時間以後活性は除々に低下する。一方 38.5°C に上昇させた場合は、全醸酵期間中 36.5°C に維持した場合に比べて初期は高い V_i/C_m 値を示すが、以後の活性の低下は 36.5°C の場合より大きい。第 3-13-b 図は連続開始後 4~10 時間の間の V_i/C_m の値の対数を $1/T$ に対してプロットしたものであり、 36.5°C 以下で直線関係が成立つ。 V_i/C_m に関する Q_{10} は 2.07 ($26\sim 36^\circ\text{C}$) であった。すなわち、生育適温において生育させた菌体は以後温度を低下させても V_i/C_m 値の低下は増殖を伴う培養系でのその $1/2$ に止まることがわかった。



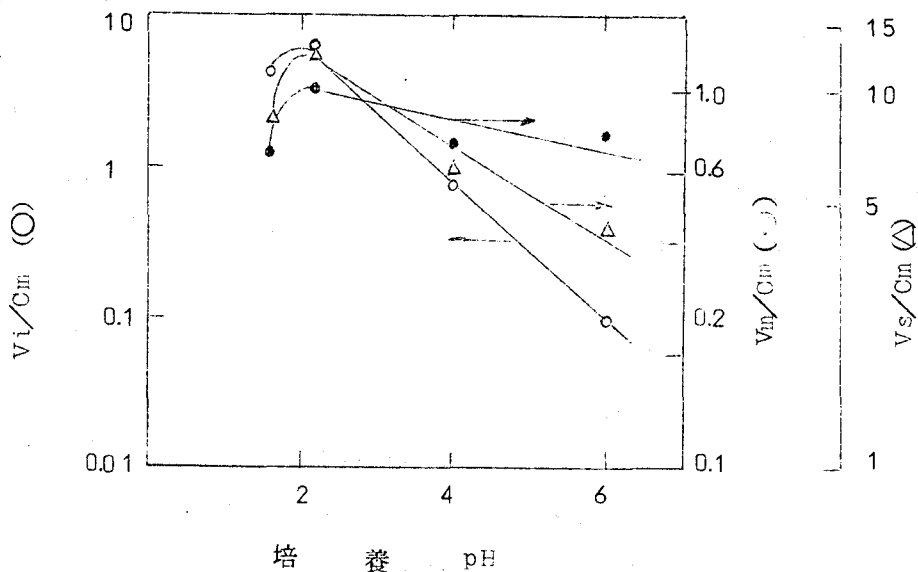
第3-13図 温度変換による既成菌体のイタコン酸集積比速度の変化

Asp. terreus によるイタコン酸醸酵に対する温度の影響に関しては、Pfeifer⁴³⁾らは *Asp. terreus* NRRL1960 の通気攪拌培養により 33.9°C~39.5°C の範囲で四段階の温度について平均の酸集積速度を比較した結果、35°C のときが最も速く 37°C 以上では速度は極度に減少した。*Asp. terreus* K26 は 38°C においても高い酸集積活性を有しているので大規模かつ高速度の培養の際に生ずる多量の醸酵熱の除去が容易となり、工業生産上有利となる。第 3-12 図の直線部分より一般の化学反応の活性化熱に相当する値は、 V_i/C_m に関しては 26,900 cal であり、一方 V_m/C_m に関しては 22,900 cal であった。両者の値は接近しており、Calam.⁸⁾が *Penicillium chrysogenum* X57 によるペニシリン醸酵において "thermal increment" (活性化熱に相当する値) として表わした値、すなわち増殖速度に関して 8,230 cal、ペニシリン生産に対して 26,800 cal の如き大きな差はイタコン酸培養ではみとめられなかった。増殖を伴なう系におけるイタコン酸醸酵の酸生成反応の活性化熱に相当する値が、殆んど増殖を伴わない(既成菌体による)系におけるその 2 倍以上の値を示したことは、本実験条件下においては菌体の増殖速度がイタコン酸集積活性の維持に支配的であることを意味している。また V_i/C_m に関する Q_{10} が 4.4 を示したことは、35°C 以下においては厳密な温度管理の必要性を示唆する。Nubel⁴⁰⁾ は糖蜜を原料とする回分式イタコン酸醸酵において、38°C で菌体を生育させた後、41°C に上昇させた場合に最良の結果がえられたとしている。このような培養途中での温度変換は従来他の醸酵でも試みられ^{39,42)} 収率または速度の向上に有効な手段となっている。しかし *A. terreus* K26 の場合は V_i/C_m の適温と V_m/C_m の適温の差は 1~2°C 程度であり、かつ活性化熱に相当する値が接近しているので培養途中の温度変換はそれ程有効な手段とはならないと推論される。

(4) pH

Asp. terreus によるイタコン酸醸酵では pH 2 附近でもっとも収率よく酸を

集積することはすでに明らかにしたが、醸酵速度に対する pH の効果を、より定量的にもとめるため、ガラス電極 pH 計を付設して自動制御下で培養し、検討した。pH の調整には $2\text{N NH}_4\text{SO}_4$ および $2\text{N NH}_4\text{OH}$ を用い、pH は 1.6, 2.2, 4.0, 6.0 の四段階について実施した。通気攪拌その他の条件は (1) に記した条件に準じた。その結果は第 3 - 14 図の通りであった。これより菌体増殖、イタコン酸生成、糖消費のいずれもその比速度は pH2 附



第 3 - 14 図 培養 pH の影響

近が最高であって、pH 値が上昇するに従って比速度は低下する。その低下割合はイタコン酸集積比速度においてもっとも大きい。換言すればイタコン酸収率も pH2 附近で最大となる。

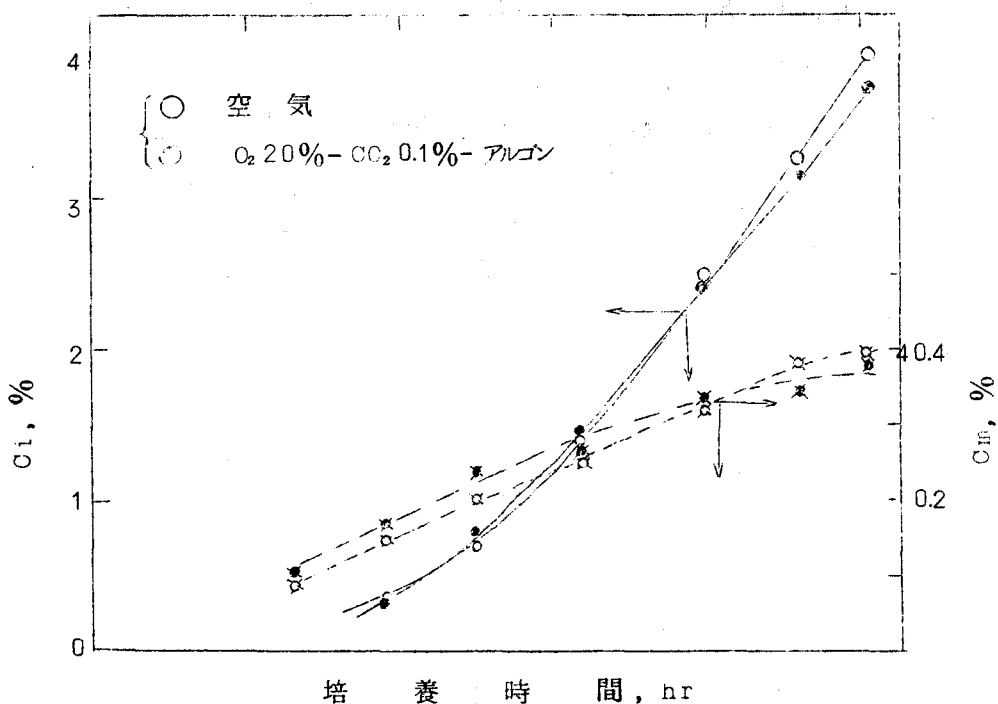
(5) ガス分圧

イタコン酸醸酵は酸化醸酵であるから酸素供給量が不足すれば当然醸酵は悪くなるが酸素の供給が過剰になると醸酵が抑制され、糖消費が少なくなるといわれている。⁵⁰⁾ 液内培養では溶解酸素が菌体内にとり込まれ消費され

ると同時に炭酸ガスが産生，放出される。したがって液中には各成分ガスの分圧に対応した溶存気体が存在し，この溶存気体分子の化学的作用により醸酵にえいきょうが現れると考えられる。そこで酸素，炭酸ガス等のガス分圧が醸酵速度に及ぼす効果について検討した。

ジャーは20ℓのワルドホッフ型を用い，培養条件は通気攪拌条件（後に記す）以外は(1)に準じた。通気ガスは空気， O_2 ， O_2-N_2 ， O_2-CO_2 二種混合， $O_2-CO_2-N_2$ 三種混合ガスを用いた。これらのガスはポンペより減圧弁，流量計を通して培養槽に通気した。気相のガス組成は排出ガスを250mlのガスコレクターにとり，オルザット型ガス分析計で常法により²⁹⁾測定した。

まず実験条件の範囲では窒素ガスの影響は殆んどないことを確かめてから(第3-15図) 第3-4表に示す組成の一連のガスを供試した。通気攪拌



第3-15図 窒素ガスの影響

条件は以下に従って設定した。醸酵速度の最高を $V_s/C_m = 15$ ，収率 40% と仮定し，定常状態の菌体濃度を 0.6% とすれば最大酸素必要量の推定値は $0.7 \times 10^{-6} \text{ mol O}_2 / \text{ml min}$ となる。

一方培養系における O_2 吸収速度は C_m 0.8% 以下で次のように推定される (第 3 章，第 5 節参照)

通気量, l/min	攪拌数, rpm	O_2 吸収速度		
0.5	405	5.2×10^{-6}	mol/ml	min Atm
1	405	$8.2 \times "$		
1	475	$10.2 \times "$		
2.5	470	$12.0 \times "$		

以上の需給推定値から次の条件を設定した。即ち供給ガスの酸素含量が 10 vol.% 以下の場合は 475 rpm, それ以上の場合は 405 rpm とし，通気量はすべて $1 l/\text{min}$ 以上とした。

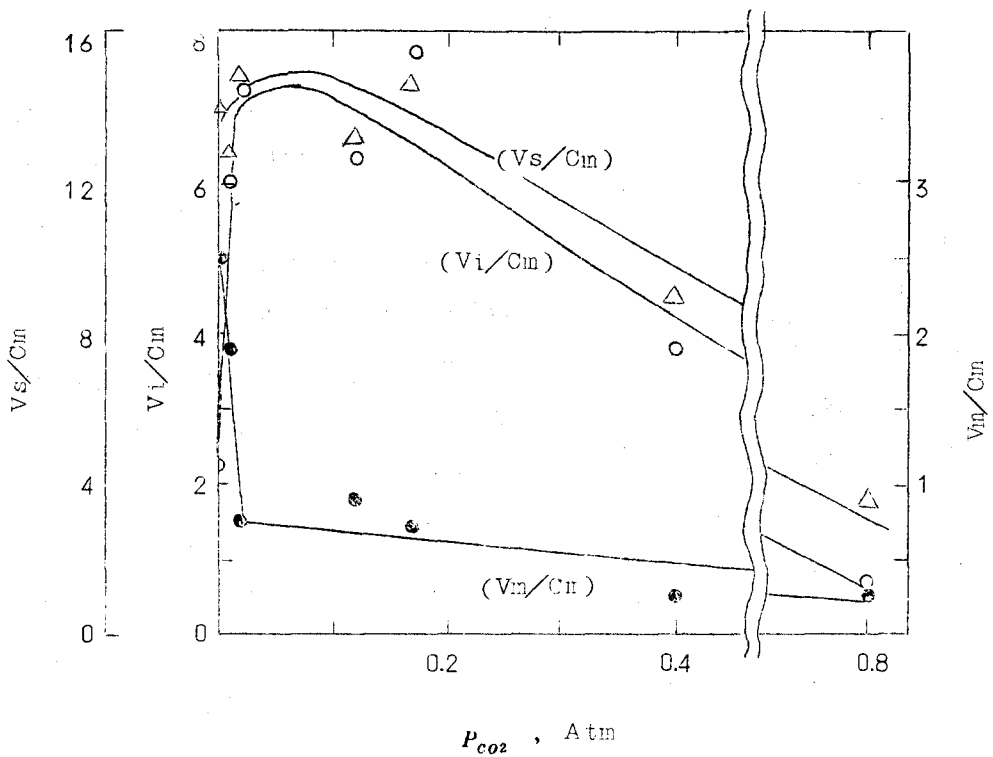
第 3 - 4 表 供試ガスの組成および通気攪拌条件

吹込ガス組成 (Vol%)			ガス供給速度	攪拌速度
O_2	CO_2	N_2	l/min	rpm
9	11	80	0.5	475
9	11	80	1	"
15	76	9	1	405
15	40	45	1	"
16	15	69	1	"
	空	氮	1	"
	空	氮	8	"
	空	氮	32	"
	空	氮	32	"
31	10	58	1	"
35	10	55	1	"
40	11	49	1	"
51	0	49	1	"
100	0	0	1	"
9	11	80	8	475
20	2	78	1	405

(i) 炭酸ガス分圧の影響

r_{CO_2} と比速度の関係は第3-16図の通りである。 P_{CO_2} の値は培養槽の入口および出口のガス分圧の対数平均値で表わした。この実験における酸素分圧は0.12~0.20 atmの範囲であった。この結果から明らかのように P_{CO_2} はイタコン酸發酵に大きな影響を及ぼす。 V_i/C_m は P_{CO_2} 0.01~0.16 において最大で、その前後で大きく低下する。とくに P_{CO_2} の低い領域での低下が著しい。イタコン酸収率 Y も V_i/C_m の最高域でもっとも高い。 V_s/C_m は V_i/C_m 程影響を受けない。 P_{CO_2} 0.16 以下ではほぼ同一値を示す。すなわち、 P_{CO_2} が低下しても V_s/C_m 値に大差ないので収率は急減する。一方菌体増殖速度に対して P_{CO_2} は阻害的にはたらく、したがって P_{CO_2} の低下にともない増殖速度は漸増するが、とくに P_{CO_2} 0.02 以下において急激に増大する。後述する酸素分圧に関する結果と併せ考察すると空気の過剰通気による速度、収率の低下は P_{CO_2} の増大によるよりもむしろ P_{CO_2} の低下にその原因があると考えられる。

糸状菌の培養における O_2 , CO_2 の効果については Halliwell,¹⁵⁾ Barinova²⁾らが通気量、吹込みガス組成を種々変えて検討している。Halliwell は *Asp. niger* の増殖およびクエン酸産生に対する通気の効果について検討し、基質の最大利用速度は通気制御下または CO_2 を2%含有した空気を通気したときに得られ、通気量が大になると基質消費速度、クエン酸収率が低下することを指摘している。本実験結果では過剰通気条件下でも糖消費速度には影響は殆んどないが、収率が低下する現象は類似している。

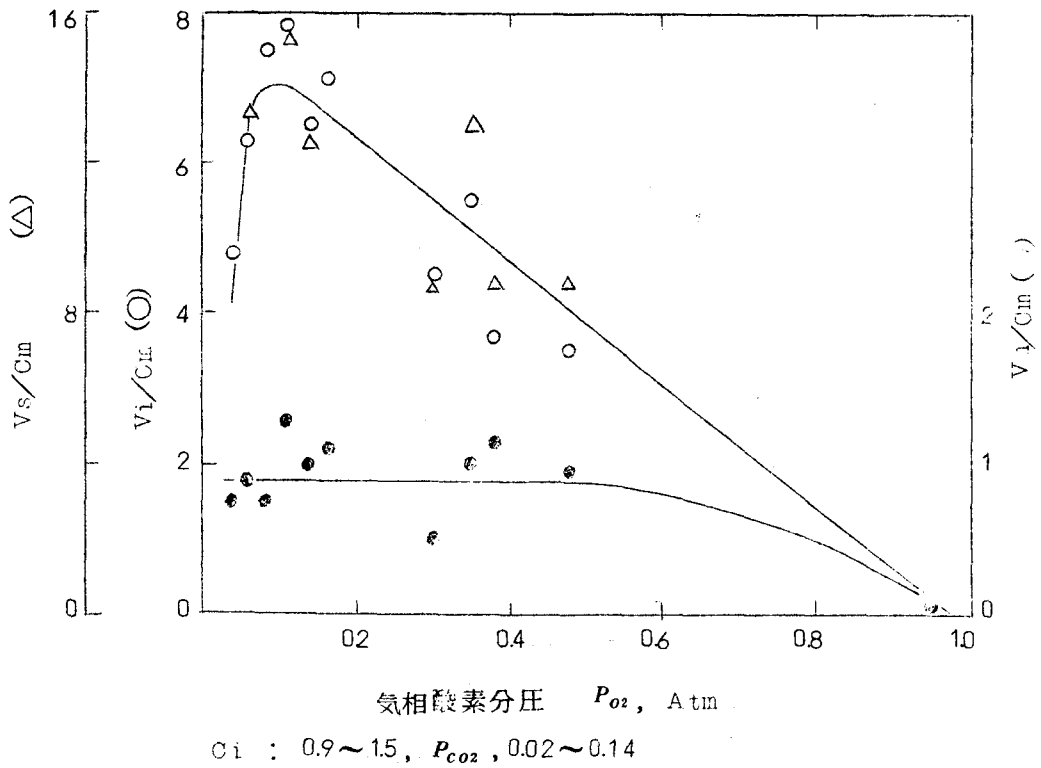


C_i : 0.9 ~ 1.5
 P_{O_2} : 0.12 ~ 0.20

第3-16図 気相炭酸ガス分圧の影響

(ii) 酸素分圧 P_{O_2} の影響

P_{O_2} と比速度の関係は第3-17図の如くであった。 P_{O_2} の値は P_{CO_2} と同様に培養の入口および出口ガスの対数平均値で表わした。この実験における炭酸ガス分圧は 0.02 ~ 0.14 の範囲であった。この結果より P_{O_2} も P_{CO_2} と同様に V_i/C_m に対して適値が存在することが判った。すなわち P_{O_2} 0.06 以下では比速度、収率は分圧に比例して増加し、0.06 ~ 0.15 では分圧に関係なくほぼ一定値をとり、それ以上の領域では分圧に逆比例的に減少する。 P_{O_2} 0.5 では V_i/C_m は最高値の 1/2 以下に減じ、高い

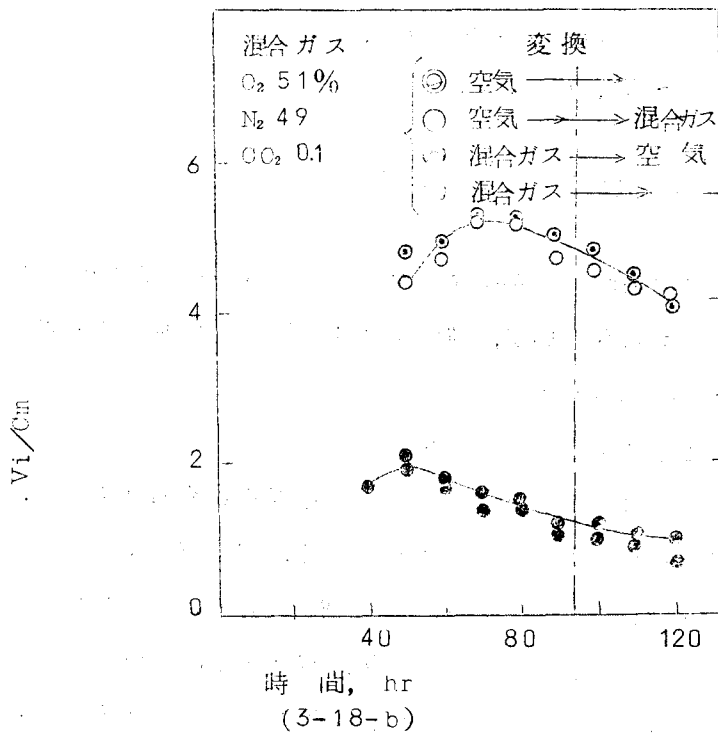
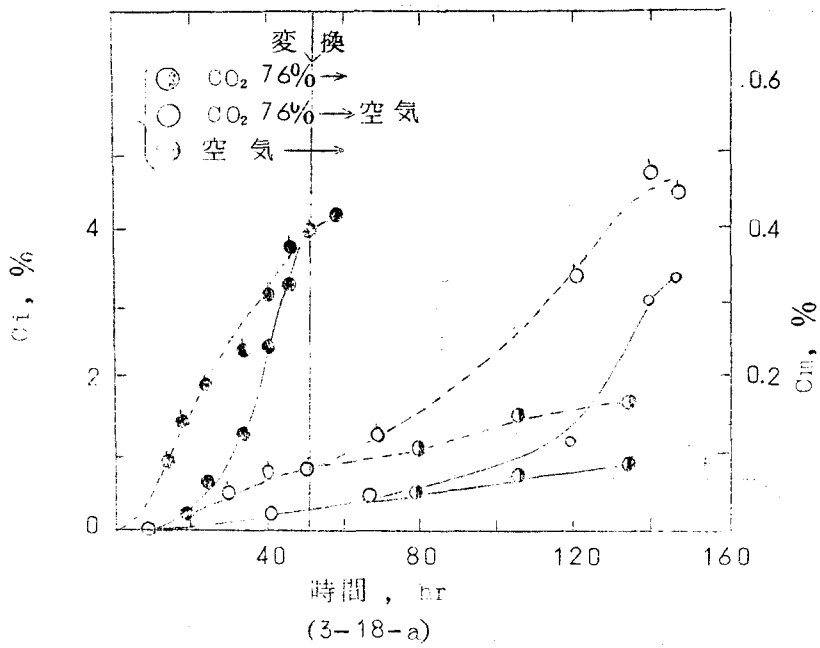


第3-17図 気相酸素分圧の影響

酸素分圧の阻害的効果が明らかになった。 V_m/C_m に対しては P_{O_2} 0.5 以下では有意な効果を示さないが、純酸素ガスを通気した場合は菌体の増殖は殆んど完全に抑制された。

iii) ガス組成変換による発酵速度の変化

前述の如く、 CO_2 は高い分圧下で菌の増殖を著るしく抑制するが、この増殖抑制効果について若干の知見を得るべく、回分方式で以下の実験をおこなった。すなわち a) CO_2 76%, O_2 15%, N_2 9% なる組成のガスを通気して培養を開始し、50時間経過後、空気通気に切換えて培養を続行する、b) 空気通気のみ、c) 上記混合ガス通気のみ、の三種の条件



第 3 - 18 図 吹込ガス組成変換による醗酵速度の変化

について菌の増殖および酸の生成を調べた。その結果は第3-18-a図に示す如く、空気に変換後、数十時間の lag を示した後、イタコン酸の産生を始めることより、この程度の CO₂ 分圧では CO₂ は菌の増殖に static な効果を示すものと考えられる。

一方酸素分圧は 0.5 前後で菌の増殖には殆んど影響しないが、酸の集積に負の効果を示す。これは酸素がイタコン酸生成の酵素系の形成に阻害的にはたらくことを示唆する。第3-18-図は空気および O₂-N₂ 混合ガスを用いて通気攪拌培養をおこない、菌体量が最高に達した時期（95時間前後）で吹込みガスを変換し培養を続け、培養経過時間と V_i / C_m の関係をしらべた結果である。これより明らかなように菌体増殖期の P_{O₂} の準位が以後の酸集積活性に大きく影響する。

第4節 醗酵速度式

前節で明らかなようにイタコン酸培養系の醗酵速度（菌体増殖、イタコン酸集積）は、化学的因子の函数として表わすことができる。各々の因子と速度との相関実験式をまとめて整理した結果、下に示す醗酵速度式がえられた。すなわち、

$$V_i = 2.83 \times 10^{18} \left\{ C_m (0.315 - 0.94 C_i) + 13 V_n \right\} (1 + 340 P_{CO_2}) (7.9 - 8.1 P_{CO_2}) \exp \left(\frac{13540}{T} - 1.027 \text{ pH} \right) \text{ --- (1)}$$

$$V_m = 1.07 \times 10^{16} \left\{ C_m (0.315 - 0.047 C_i) + V_n (0.55 - 0.084 C_i) \right\} (2.8 - 123 P_{CO_2}) \exp \left(\frac{-11230}{T} - 0.08 \text{ pH} \right) \text{ --- (2)}$$

上記の適用範囲は T: 297.5 ~ 308, C_s: 0.2 ~ 7, C_i: 0.9 ~ 6.5, C_m: 0.5 ~ 1.6, V_n/C_m: 0.1 ~ 1.15, P_{CO₂}: 0.003 ~ 0.018, P_{O₂}: 0.1 ~ 0.5, pH: 2 ~ 6 である。計算値は 10% 誤差以内で実測値と一致した。

第5節 物理的因子^{39) 37)}

糸状菌の通気攪拌培養は気・液・固三相の存在するいわゆる異相系反応に

属し、反応は異相系の界面を通じて行われる。すなわち基質および反応生成物の拡散が行われて反応が進行するが糸状菌の場合とはくにこの拡散速度が醸酵速度の制限因子になる場合が多い。したがって真の“見かけの醸酵速度”の測定にあたっては拡散抵抗を可及的小にする工夫が必要となる。物質拡散については、好氣的液内培養では一般に基質としての酸素の拡散速度、とくに気液界面を通じての拡散（溶解）過程が律速段階と云われるが、糸状菌の培養系では菌糸束の凝集、分散が大きいので、乱流拡散、換言すれば懸濁系の混合の程度も問題となろう。したがって、酸素の拡散速度は装置および操作条件（醪の物性、温度、圧力等）により大きく影響される。とくに高菌体濃度培養系では菌体濃度が拡散抵抗の主要因であることが指摘されている。

他方、物理的因子として熱移動の問題が挙げられる。醸酵ではその反応速度がおそい故もあって従来伝熱についてはあまり問題とされていないが、反応系が熱の出入をとまなう以上、醸酵速度が増大すれば、当然検討を要する問題となり、最適伝熱面積を決定するためにも熱移動速度と操作因子の関係を定量的にもとめることは重要である。

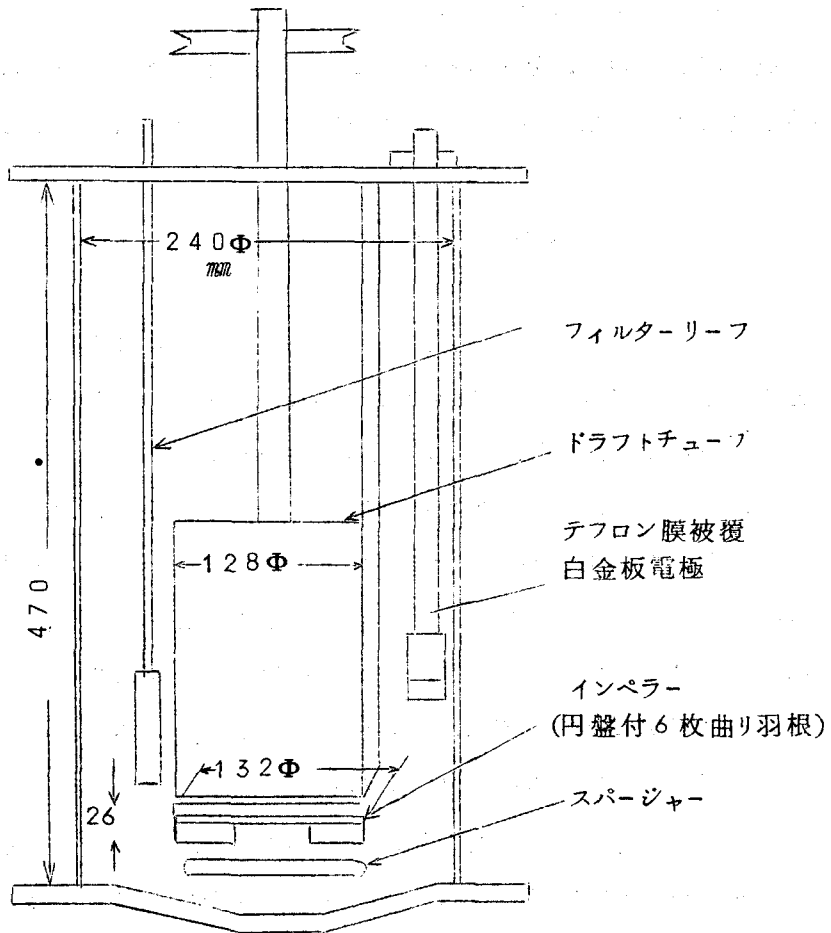
したがって本節では物理的因子として気液界面の酸素移動および冷却管壁を通しての伝熱をとり挙げ、醪成分、攪拌通気条件のえいきょうにつき検討するとともに、培養系と非培養系の移動速度の差異についても検討した。

(1) 酸素移動速度

さきに醸酵速度に対する化学的因子の効果に関する実験を行った際、菌濃度の増大にともない醪の流動状態が著るしく不均一となり、菌体は異常形態化し、赤色色素の生成により醪は深紅色となり酸集積速度は最適条件下のその1/2以下になることを認めた。かかる現象は通常の場合の回分培養の際にも低い通気攪拌条件下でみとめられる事実から醸酵速度低下の原因が酸素の供給不足にあると考えられた。そこで酸素移動速度にえいきょうする諸因子のうち、主として菌体濃度の効果について検討し、さらに酸素移動速度と醸酵速度の相関について明らかにせんとした。

i) 実験装置および実験方法。

1. 菌株：*Aspergillus terreus* K26
2. 装置：第3 - 5 図に示す装置を用いた。培養槽は内容約 20ℓ のワルドホッフ型で、その主要寸法を第3 - 19 図に示す。空気の



第3 - 19 図 ワルドホッフ型培養槽略図

送人は中空攪拌軸よりおこなう方法では空気導入部の構造が不完全で空気もれを防ぐことが困難であったため、回転羽根の直下に設置したリングスパージャー（孔径1mm，孔数12）より導入する方法をとった。

3. 酸素移動容量係数 k_d の測定

以下に記す二種類の方法により行った。

3-1. ガス分析計と溶存酸素電極の組合せ

直接培養系の k_d を求めるためにおこなった。今、気泡からの酸素供給速度と菌体の酸素消費速度が平衡状態にあるとすれば次式が成立つ。

$$k_d (P_g - P^*) = K_r C_m$$

したがって酸素消費速度， P_g および P^* がわかれば上式より k_d をもとめることができる。本実験では $K_r C_m$ ， P_g の測定はオルザット型ガス分析計を使用し， P^* は酸素覆白金板電極を用いて測定した。すなわち培養槽の入口，出口のガス組成の分析値より P_g をもとめ，ガス流量と P_g 値より物質収支により $K_r C_m$ をもとめた。ガス流量の測定はオリフィス流量計によった。培養は単槽定常連続培養法でおこなったが， k_d の測定に際しては連続培養下ではガス組成が変動し測定困難であったため，酵母の定常時期で培地の流入，醗の排出をとり，回分培養に切り替え1~2時間以内に測定する方法を採用した。*

** ここで行った高濃度菌体連続培養法では，槽内菌体濃度を維持するためフィルターーフにより醗を一部濾過して排出させる方法をとっているが，濾布面に附着する菌体を空気の逆送によりはがす操作を約4分間隔で反復するためガス圧，ガス濃度が変動して

測定値がはらつくので回分培養法でおこなった。しかし測定中の槽内菌体濃度の変動は最大7%であり，後の結果が示すよう

に K_d 値に殆んどえいきょうを与えないと考えられる。

溶存酸素計は電気化学計器 K K 製で外筒は硬質塩ビ、電極はテフロン膜被覆の白金電極と甘汞電極の組合せ、電解液は 0.1N KCl であり、 $-0.9V$ 加電圧における拡散電流値をよみとり検量線より溶存酸素分圧を求めた。検量線は熱により不活性化した膠に窒素、空気、混合ガスを通気してえられた平衡電流値より作成した。酸素分圧値と電流値は直線相関を示し、 36° で空気飽和の電流値 $165 \pm 0.1 \mu A$ 、残余電流値は $0.2 \mu A$ であった。この培養は雑菌汚染の危険度が低いので電極部は無殺菌で使用した。

3-2 亜硫酸酸化法、上記の培養系との比較の意味で従来培養槽の好気状態の評価に広く利用されている亜硫酸ソーダ法による K_d 値の測定を行った。この実験では銅触媒を含む $0.2M Na_2 SO_3$ 水溶液に、溶液の見かけ比重を培養液のそれに類似させるため、OSL を起泡剤として対液 0.1% 加え、さらに後記する方法で調製した *Asp. terreus* K26 のパルプ状菌体を懸垂させた系で、種々の通気攪拌条件下で酸化速度を測定した。
(菌体の調製は) (通常の培地で3日間通気攪拌培養して生育させた菌体を濾紙上で吸引濾過して集め、透過水洗後、10倍量の水に懸濁し、 $120^\circ C$ 、10分加熱殺菌後濾過し、 $0.2M Na_2 SO_3$ 水溶液に30分間懸濁、濾過水洗し、湿潤状態で $5^\circ C$ に保ち、必要量だけ $Na_2 SO_3$ 溶液に懸濁して使用した。

4. 実験条件：培養系では温度 $36^\circ C$ 、醗量 $7.5 \sim 8 l$ 、菌濃度 $0.5 \sim 1.6 \%$ 、通気 $0.3 \sim 2.5 l/min$ 、攪拌 $405 \sim 660 rpm$ 、亜硫酸酸化法（非培養系）では $36^\circ C$ 、仕込液量 $8 l$ 、通気 $0.5 \sim 4 l/min$ 、攪拌 $335 \sim 760 rpm$ 、菌濃度 $0 \sim 4 \%$ 。上記の条件を種々組合せて培養系 12 回、亜硫酸ソーダ系 46 回の実験をおこなった。

5. 分析法、酸素の吸収液は JIS K2301 の組成³⁾ を用い、膠の成分分析は第3章、第1節に準じた。亜硫酸根の定量は 0.2N 沃素-沃素加里液 $10 ml$ $1 : 3 HCl$ $5 ml$ 、水 $30 ml$ を $100 ml$ 共栓三角フラスコにとり試料 $2 ml$ (ピペットの先端に脱脂綿をまきつけて菌体をこしとりながら採取した)

第3-5表 種々の通気攪拌条件下のイタコン酸産生における酸素移動容量係数

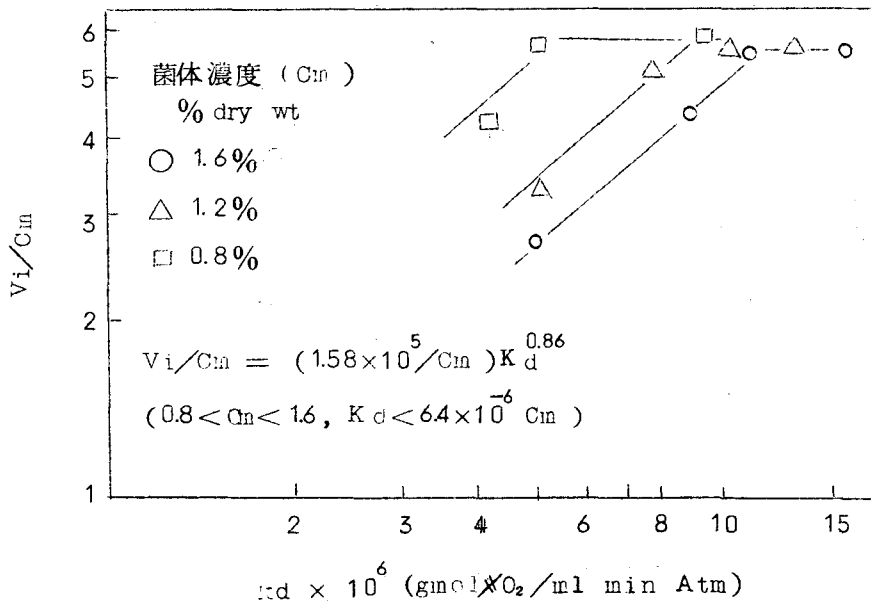
Run	攪拌速度 (rpm)	通気量 (ℓ/min)	C_m (%)	C_i (%)	$V_i/C_m, V_m/C_m$ (%/day / %菌体)	酸素分圧差 ΔP_{O_2} (Atm)	酸素消費速度, $K_r C_m$ (g mol/inl min) $\times 10^6$	酸素移動容量係数 (Kd) $\times 10^6$	培養系	亜硫酸ソーダ-菌体懸濁系
7	405	0.5	0.49	0.80	6.03	0.83	0.079	0.42	5.32	4.77
5	405	2.5	0.85	0.55	5.88	0.79	0.095	0.89	9.32	7.80
12	405	0.5	0.81	0.35	4.31	0.74	0.117	0.49	4.19	4.53
6	470	1.5	1.23	2.60	5.90	0.67	0.100	1.03	10.33	10.61
2	660	1.6	1.61	2.56	5.43	0.53	0.071	1.14	16.10	14.32
1	540	2.5	1.60	2.44	5.61	0.61	0.114	1.27	11.10	9.98
11	470	1.8	1.63	2.88	4.40	0.57	0.111	1.00	9.02	8.01
10	405	2.0	1.58	2.07	2.72	0.45	0.122	0.61	4.98	6.31
3	540	2.5	1.19	1.44	5.76	0.64	0.080	1.06	13.20	11.01
4	405	1.5	1.25	1.78	5.24	0.61	0.115	0.90	7.81	7.70
8	405	0.8	1.20	1.45	3.32	0.62	0.122	0.63	5.13	7.80
9	405	0.8	0.77	0.73	5.71	0.84	0.118	0.59	5.00	4.53

$$\Delta P_{O_2} = P_{in} - P_{out} / \ln (P_{in} - P^* / P_{out} - P^*)$$

を加え 0.1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ で滴定した。

ii) 実験結果と考察

培養系における結果を第 3 - 5 表に示す。同一通気攪拌条件においても菌体濃度 C_m により K_d 値がことなる。いずれの C_m 単位においても攪拌数がますにしたがい K_d 値が増加する。亜硫酸法でえられた K_d 値 (第 3 - 5 表最右欄) と比較した結果, 通気攪拌条件が同一であれば両法の K_d 値に大きな差異は認められない。 K_d 値と V_i/C_m の関係は第 3 - 20 図の通りである。 V_i/C_m 5.5~6 までは K_d 値に比例する。 V_i/C_m 6 以下で K_d との間に対数目盛上で近似直線関係が成立し, $V_i/C_m = k K_d^{0.86}$ で表わすことができる。 k は C_m の函数であり, この関係を代入すると (3) 式で表わしうる。



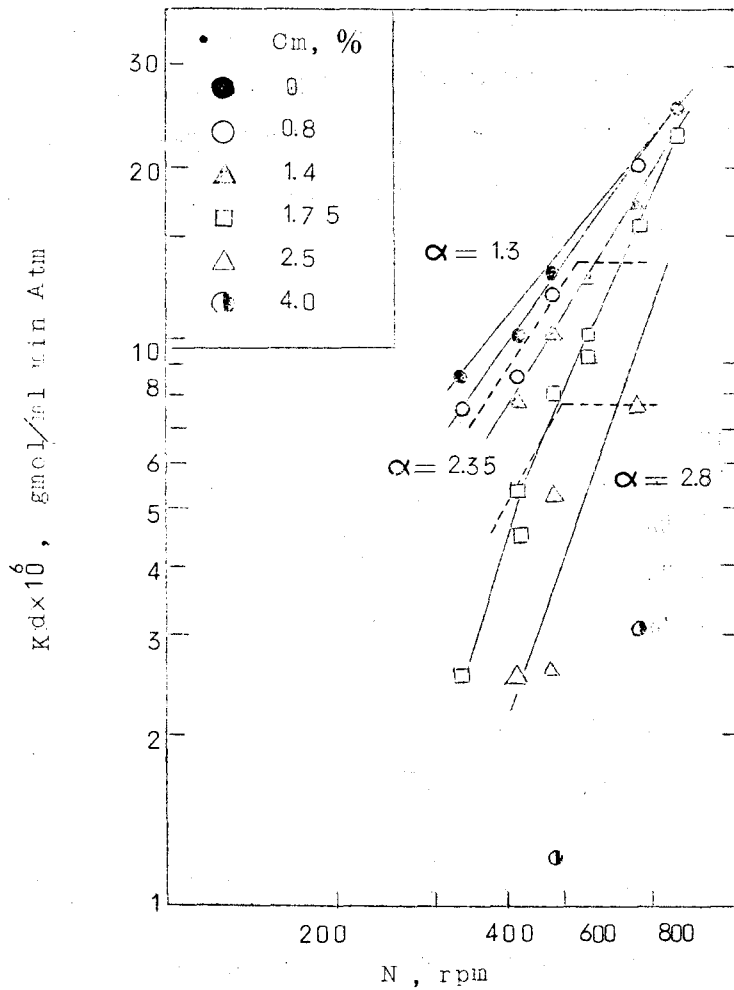
第 3 - 20 図 V_i/C_m に対する K_d の効果

$$V_i/C_m = (1.585 \times 10^5 / C_m) (K_d)^{0.86} \text{----- (3)}$$

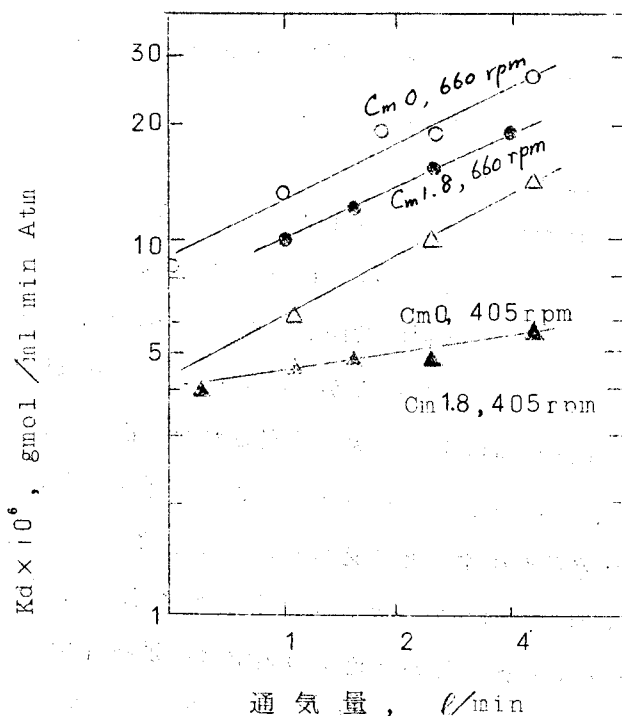
ただし, $0.8 < C_m < 1.6$, $K_d < 6.4 \times 10^6 C_m$

一方 V_m/C_m は K_d の低下に伴ない減少する傾向を示すが, この実験条件下では V_i/C_m 程顕著な差異は認められなかった。

亜硫酸酸化法で種々の通気攪拌条件下で測定した結果は第3-21図の通りであった。第3-21-a図は K_d と攪拌羽根回転数 N の相関,



第3-21-a 図 K_d と攪拌速度の関係



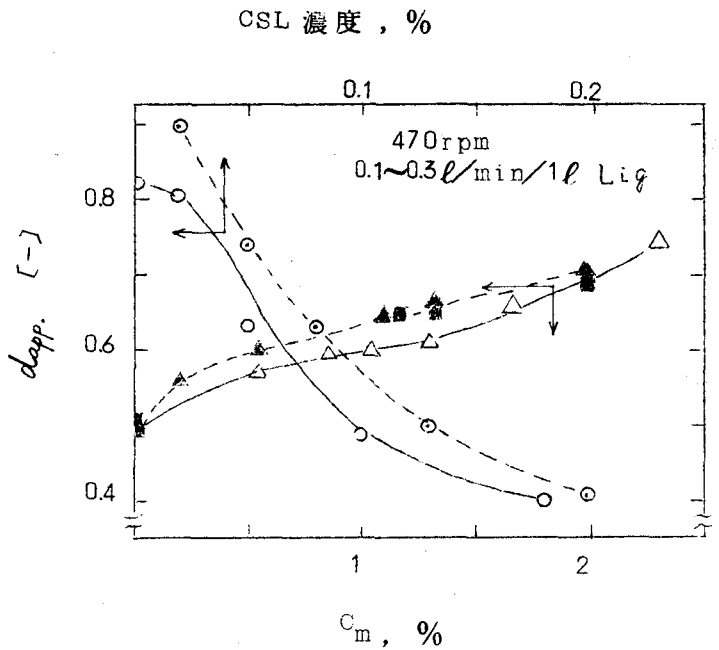
第3-21-b図 K_d と通気量の関係

第3-21-b図は同様に K_d 値と通気量の相関を C_m をパラメータにして表わしたものである。 C_m の増大に伴ない K_d 値の低下することを示している。図3-21-a より明らかなように C_m の増大に伴なう K_d 低下の割合は N が低い程顕著に表われる。云いかえれば、 K_d に対する N の効果すなわち $K_d = kN^\alpha$ で表わされる α の値は C_m が大になるに従い大きくなる。たとえば $C_m = 1.75\%$ においては 405rpm の場合、無菌体の場合の K_d 値に対して 56% の低下を示すのに対して、660rpm の場合は 25% 低下するにすぎない。一方通気量の効果は逆に C_m が高くなるにつれて小となる。これは低攪拌になる程顕著である。また第3-21-a 図の破線で示したものは菌体無添加で通気量をそれぞれ 0.5 l/min, 1 l/min の条件で N の効果をしらべた結果で、 K_d は

$N=470\text{rpm}$, 540rpm でそれぞれ最高値を示し、それ以上攪拌を増しても K_d は増加しない。通気量 $2.5\ell/\text{min}$ の場合はかゝる限界値を見出しえなかったが、上述の実験結果および C_m の低濃度領域の直線群が 760rpm で接近している事実から、 $K_d = 2.5 \times 10^{-5}$ 附近が本培養槽の限界値と考えられる。

ここでえられた K_d 値は、いずれもワルドホフ型特有の流動状態すなわち液中に分散した気泡が細断されいわゆる泡沫状混相流となって槽内を循環するような攪拌領域で測定した値であるが、 N の増大にともなって混相流体の循環量は明らかに増大し、見かけ容積は増加する。すなわち見かけ比重低下の現象が観察された。液の見かけ比重は通気量、液組成、 C_m などにより変化することが予想され、それにより K_d 値に大きな差異が生ずると考えられた。そこで Na_2CO_3 溶液に種々の培地成分を加え、さらに種々の菌体濃度下で実験し、液の見かけ比重、 K_d 値をもとめた。見かけ比重の測定は所要条件で運転し、槽内液のかさが一定に達した後攪拌をとめて急ぎ流体容積を測り、ついで消泡して実液容積を測り、（見かけ比重 = 液容積 / 気・液混相容積）よりもとめた。その結果を第3-22図に、および第3-6表に示す。CSL、ペプトンは見かけ比重に大きくえいきようし、CSL濃度がますにつれて見かけ比重は減少する（発泡促進）。菌体は逆に見かけ比重を増加させる（発泡抑制）。0.1% CSI 添加により見かけ比重は無添加に対して40%低下し、 K_d 値は30%上昇する。通気量の効果は無通気と $0.8\ell/\text{min}$ (0.1V.V.M.) 通気では差異があるが、 $2.4\ell/\text{min}$. (0.3 V.V.M.) に増しても見かけ比重に殆んど差がない。

糸状菌懸濁系における酸素移動速度に関しては、すでに多数報告されている。^{3,5,7,12,49} いずれも繊維状菌体の濃度増大に伴ない K_d 値が減少することが示されており、本実験結果も同様な傾向を示した。しかし K_d 値の低下率は攪拌条件により差異があり、換言すれば回転羽根の



- : Na₂SO₃ - CSL系, 通気
- : " " " " , 通気せず
- △ : Na₂SO₃ - 0.1% CSL- 菌体系, 通気
- ▲ : " " " " " " , 通気せず
- : 培養液, 通気せず

第3-22 図見かけ比重におよぼす CSL および
菌体濃度の影響

回転数 N の指数は菌濃度 C_m の関数であって、第3-21-a 図より次の相関実験式がえられた。

$$K_d = 5.5 \times 10^{-6} C_m^{-2} N^{-0.87} (1.3 + 0.49 C_m) \quad (0.8 < C_m < 4.4, 405 < N < 760)$$

田淵⁵⁰⁾ は *Asp. terreus* によるイタコン酸の通気攪拌培養において亜硫酸酸化法による K_d 値と糖消費速度の関係をしらべ、 $K_d = 4.6 \times 10^{-6}$ ($g \text{ mol O}_2 / \text{ml, min Atm}$) に適値が存在するとしているが、高菌体

第 3 - 6 表 酸素移動容量係数および見かけ比重に及ぼす培地成分の影響

亜硫酸酸化法, 撈拌: 470 rpm, 通気量: 25ℓ/min, 温度: 36°
液量: 8ℓ,

培地成分 添加量	酸素移動容量係数, K_d (g mol O ₂ / ml min Atm) × 10 ⁶ [A]	見かけ比重	
		(一) [B]	[A] × [B]
無添加	9.2	0.82	7.54
0.1% CSL	12.0	0.49	5.86
0.02% CSL	7.6	0.89	6.08
8% glucose	8.6	0.88	7.57
0.1% peptone	11.3	0.47	5.31
4% 濃縮液 [*] (2.5倍濃縮)	11.5	0.53	6.10

* 濃縮液の調製は次のようにした。醸酵終了液を濾過により菌体分離後、濾液を 50℃ 1/25 容まで濃縮し、冷却して析出した結晶を分離した。濃縮液の組成: イタコン酸 3.1%, 還元糖 (グルコースとして) 0.5%, 水その他 96.4%

濃度培養系においては、この条件では明らかに酸素供給不足である。また第 3 - 5 表の酸素消費速度と通気速度の実測値より通気効率をもとめると十分攪拌された条件下では通気効率は 65~70% を示した。このことは通常の酸素必要量の 1.5 倍前後供給すれば足りることを意味し、ワルドホフ型培養槽が通気効率の点で標準型タービン培養槽に勝っていることを示している。Bartholomew⁹⁾ は培地に含まれる微量成分の K_d におよぼす影響をポーラログラフ法で検討し、CSL を加えた場合、気泡は微細となって分散されるにも拘らず K_d は低下することを認めている。本実験結果はこれに反して CSL, ペプトンを 0.1% 加

えることにより見かけ比重は減少し、 K_d は上昇することを示した。かゝる K_d 上昇の原因を考察するべく、液の見かけ比重を気泡容積を反映する値とみなして K_d に見かけ比重を乗じ、見かけ比重一定として比較すると第3-6表の最右欄に示すようにグルコース添加の場合以外はいずれも亜硫酸ソーダ液のみの場合の K_d 値より低下することがわかる。この結果から、CSLなどは物質移動係数に対して負の効果を有するが、気液接触面積の増大が前者の減少に打ち勝って K_d 値が上昇するのではないかと考えられる。また菌濃度の K_d に及ぼす効果はCSLと逆に K_d に対して負の効果を有することは先に指摘したがこの点に関して上述の場合と同様に見かけ比重と K_d 値の積をもとめて比較すると次のようになる。すなわち通気量 2.5 l/min 、 $N=470 \text{ rpm}$ 亜硫酸酸化法で C_m が0, 0.84, 1.35, 1.75, 2.30%の各条件で、見かけ比重と K_d の積はそれぞれ6.7, 6.9, 6.3, 5.2, 4.0, となり C_m 1.35%以下ではほぼ等しくなるが、高菌体密度になるに従いこの値は減少する。 C_m 1.35%以上では物質移動係数を低下させる何かの物質が菌体から溶出する可能性も考えられるが、この実験結果からのみでは K_d 値の変化を見かけ比重のみで説明づけることは困難である。培養系の K_d 値と、亜硫酸ソーダ-菌体懸濁系の K_d 値とは最大21%の差異があるが、大部分は比較的良い一致をみた。したがって見かけ比重をできるだけ培養系のそれに近似させた系で測定すれば実用的には亜硫酸ソーダ法による結果を培養系に適用しうると考えられる。

(2) 醱酵の伝熱係数

次章で詳述するように高菌体濃度連続培養においては、毎時最大約 14°C の醱温度上昇に相当する代謝熱が発生すると推定される。この発熱量は通常の回分培養のその7倍以上であり、SWLからの酵母製造の場合に匹敵する。第2次大戦中のドイツのmannheim waldhof yeast

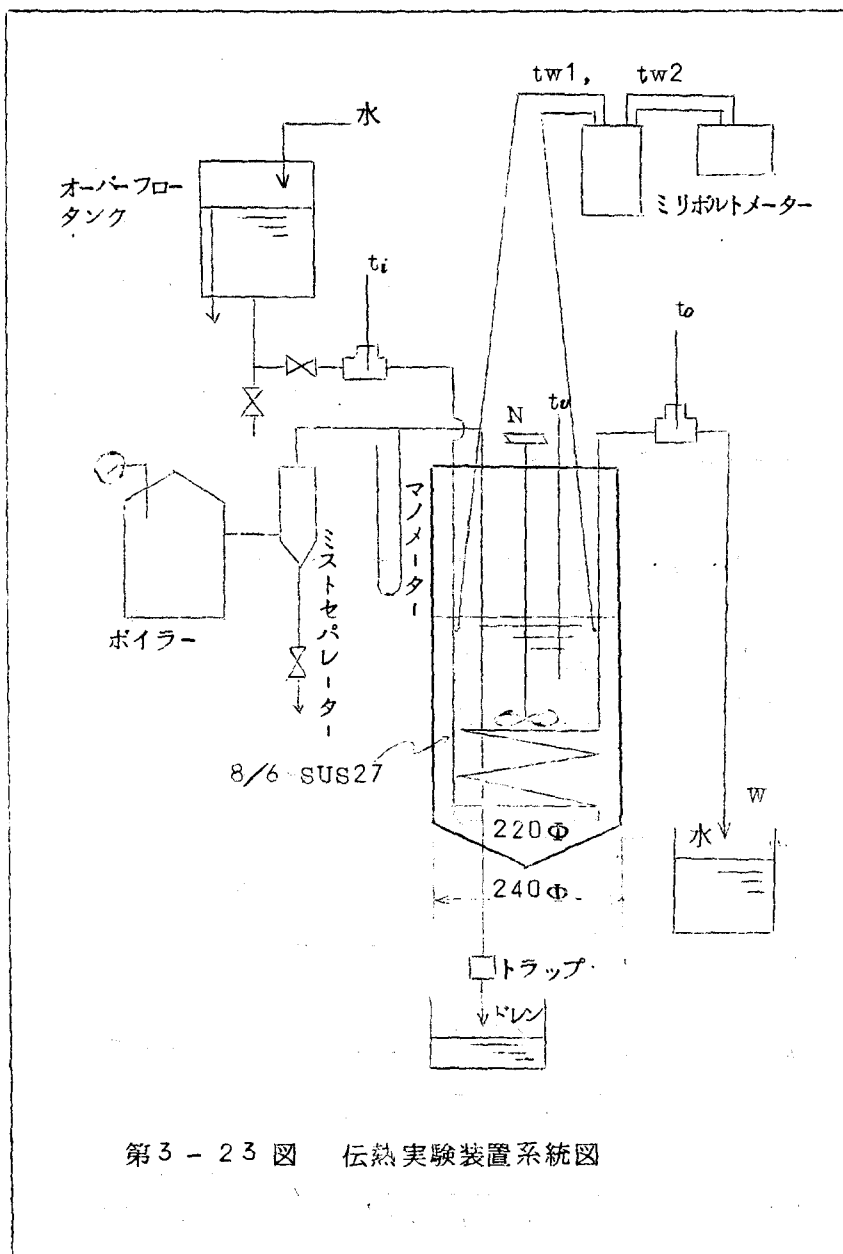
plant の例¹³⁾では、200M³ フェーマンターで醗の冷却のために、蛇管を同心円状に4重に付設してあり、その全長は1キロメートルに及んでいる。これは液のタービュランスの抵抗にもなり、攪拌の負荷量もます。したがって物質移動の点からも合理的な伝熱面積の決定は重要である。

攪拌槽伝熱操作はニュートン流体に關してはすでにかんりの実験的集積があり、伝熱面積の決定も容易になりつゝあるが、糸状菌培養液のごとき非ニュートン流体の攪拌槽伝熱に關しては実験的研究が少なく³⁾、さらに醗(反応)を伴う場合の知見はみあたらない。そこで20ℓジャーフェーマンターを使用しイタコン酸³⁾醗の冷却管側熱伝達係数を測定し、これにえいきょうする二三の因子について検討した。

(i) 実験装置および方法

第3-23図は装置の主要部分の系統図である。槽は20ℓ容、内径240mm、高さ470mmで蓋及び底板はSUS27、胴部は厚さ8mmの硬質ガラス製である。攪拌羽根は第3-27図に示す型式および寸法のものを用いた。

実験はすべて^{加熱}冷却管を併用する定常実験である。加熱管は外径6mm内径4mm、冷却管は外径8mm、内径6mmでいずれもSUS27製で直径220mmのコイルで2回巻きとした。非培養系の実験では、まず槽に醗を所定量張込み所定の通気攪拌条件で運転を開始した後、加熱管に飽和蒸気を通じて加温する。所定温度(36℃)に達したならば冷却管にヘッドタンクより冷却水を通じ、水出口のコックで流量を調節しながら醗を定温にする。各測定部の温度が定常となった後測定を開始する。加熱蒸気はすべて105~106℃の飽和蒸気を用い、マンメーターの圧力差より蒸気温度をもとめた。醗温、冷却水温は水銀棒状温度計で0.1℃まで読みとり、冷却管外壁温は鉄-コンスタンタン系熱伝対により入口側、出口側各一ヶ所を測定した。コイルは使用前稀酸、稀アルカリで十分洗滌し、スケール抵抗は無視した。醗温度はすべて



36° とし、攪拌速度はあらかじめ、槽内醪の温度勾配を無視しうる速度条件を各菌体濃度について予備的に検討し、530~670 rpm とした。菌体濃度は0~3.4%の範囲でおこなった。見かけ比重のえいきょうの実験では醪に発泡剤として Tween 40 等を0.1%以下加えた。

培養系の測定は所要条件で通気攪拌培養を行ない培養経過の一定時期で水槽の温水を排出した後、非培養と同様な操作をとった。入口、出口の水温、コイル壁温、醪温、を1~2分毎にチェックし、水量、ドレン量は5分間の排出量を10kg秤量の上皿天秤で秤量した。

伝熱量 q は(4)式より算出した。この伝熱量と蒸気のドレン量より求めた伝熱量とから熱損失量を求めた結果、この装置における熱損失は全入熱に対し7~16%であった。

$$q = W \cdot C_p \cdot (t_o - t_i) \quad \text{----- (4)}$$

さらに(5)式より総括伝熱係数、(6)式より冷却管外壁基準熱伝達係数、(7)式より管内熱伝達係数を求めた。

$$U_{av} = \frac{q}{\Delta t \cdot A_{av}} \quad \text{----- (5)}$$

$$h_o = \frac{q}{\Delta t' \cdot A_o} \quad \text{----- (6)}$$

$$h_i = \frac{(A_o/A_i)}{\frac{1}{U_{av}} - \frac{1}{h_o} - \frac{A_{av}}{A_o} - \frac{y}{\lambda_{av}}} \quad \text{----- (7)}$$

$$\text{ここに、} \quad t = \frac{t_v - t_i}{\ln(t_v - t_i / t_v - t_o)}, \quad \Delta t' = \frac{t_{w2} - t_{w1}}{\ln(t_v - t_{w1} / t_v - t_{w2})}$$

y は外径 8 mm, 内径 6 mm の冷却管を使用した故、 $y = 1 \times 10^{-3}$ [m] となり、 λ は便覧¹⁸⁾より $\lambda_{av} = 13.2$ [kcal/m.hr °C] を採用した。

(iii) 実験結果および考察

結果を一括して第3-7表に示す。

第3-7表 醱酵液の伝熱係数に関する実験結果

$A_o = 0.0427 \text{ m}^2, A_i = 0.0321 \text{ m}^2, A_{av} = 0.0374 \text{ m}^2, \gamma = 10^{-3} \text{ m}, \lambda_{av} = 13.2 \text{ kcal/m hr } \tau$

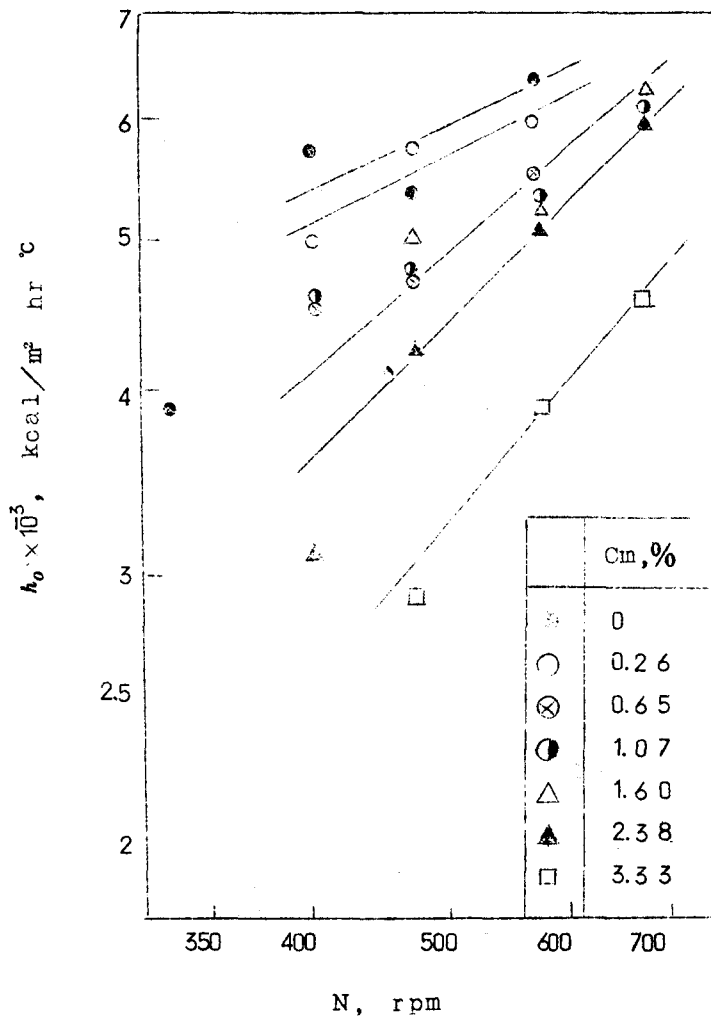
Run	試料	攪拌羽根 の型式	菌体濃度 $C_m, \%$	攪拌数 N, rpm	W (kg/hr)	q (kcal/hr)	Δt ($^{\circ}\text{C}$)	$U_{av} \times 10^3$ ($\frac{\text{kcal}}{\text{m}^2 \text{ hr } \tau}$)	Δt ($^{\circ}\text{C}$)	$h_o \times 10^3$ ($\frac{\text{kcal}}{\text{m}^2 \text{ hr } \tau}$)	$h_i \times 10^3$ ($\frac{\text{kcal}}{\text{m}^2 \text{ hr } \tau}$)	d_{app} (-)
1	酸	WF	0	330	64.0	647	11.8	1.46	3.9	3.89	3.03	0.79
2		"		475	114.3	1,041	12.6	2.21	5.7	5.72	5.23	0.66
3		"		405	130.2	1,170	13.0	2.41	6.3	5.42	6.60	0.62
4		"		570	141.2	1,260	12.8	2.63	4.65	6.37	7.00	0.60
8	醇	"	0.26	405	96.4	897	12.1	1.98	4.2	4.97	4.62	0.65
10		"		475	102.8	967	12.4	2.08	4.2	5.74	4.65	0.60
9		"		570	121.8	1,132	12.5	2.42	4.4	6.02	6.12	0.62
6		醱 (非培養系)		"	0.65	405	84.5	818	12.3	1.78	4.25	4.51
5	"		475	93.8		909	12.9	1.88	4.5	4.74	4.31	0.67
7	"		510	114.2		1,083	12.8	2.27	4.6	5.52	5.65	0.64
12	"		405	113.2		985	12.6	2.08	5.05	4.57	5.50	0.69
13	醱 (非培養系)	"	1.07	475	109.9	977	12.4	2.10	4.8	4.77	5.40	0.63
11		"		570	128.1	1,134	12.8	2.37	5.0	5.32	6.48	0.67
14		"		670	128.6	1,147	12.8	2.40	4.65	5.78	6.20	0.59
15		"		570	102.0	948	12.7	2.00	4.8	4.63	4.99	0.64
16	醱 (非培養系)	"	1.60	475	80.0	787	11.5	1.83	7.9	4.98	3.96	0.69
18		"		570	92.1	930	11.7	2.13	5.6	5.21	5.18	0.66
17		"		670	111.3	1,124	11.8	2.54	5.4	6.33	6.56	0.66
21		"		405	82.4	727	12.2	1.59	6.3	3.10	4.33	0.78
22	醱 (非培養系)	"	2.38	475	96.1	864	13.0	1.77	6.3	4.27	4.72	0.70
24		"		570	117.5	1,016	12.6	2.15	6.0	5.08	5.41	0.73
23		"		670	133.3	1,179	12.9	2.44	5.9	6.07	6.18	0.68

第3-7表(続き)

Run No.	試料	攪拌羽根の型式	菌体濃度, %	N, rpm	W (Kg/hr)	q (kcal/hr)	$\Delta t, \tau$	Uav $\times 10^{-3}$	$\Delta t'$	$h_o \times 10^{-3}$	$h_i \times 10^{-3}$	dapp	
19	酸酵液	WF	3.33	475	74.1	75.4	13.4	1.63	7.1	2.92	4.94	0.84	
25		"	3.33	570	81.8	88.7	12.5	1.90	5.30	3.91	4.63	0.79	
20		"	3.33	670	92.7	94.4	12.5	2.02	6.2	4.55	5.17	0.79	
30	水道水 + Tween 40 + 0 ppm	"	0.82	570	114.2	98.8	11.5	2.30	5.8	4.89	6.51	0.97	
31		" + 50 "	"	0.82	"	112.8	103.1	11.5	2.40	5.7	5.25	6.73	0.78
32		" + 100 "	"	0.82	"	123.9	109.8	12.0	2.45	5.6	5.85	6.41	0.71
33		" + 250 "	"	0.82	"	116.0	101.3	11.7	2.32	5.7	5.20	6.20	0.63
34		" + 500 "	"	0.82	"	124.0	105.5	12.1	2.33	6.35	4.69	7.06	0.33
36		" + CSI 5%	"	0	475	104.7	99.2	12.8	2.07	4.4	5.27	4.86	0.62
35		" + " "	"	0	510	117.2	112.4	13.0	2.32	4.8	5.49	6.00	0.58
28	水道水 + Tween 60 + 150 ppm	"	0	475	112.1	108.8	12.6	2.30	4.3	5.93	5.54	0.69	
29		" + " "	"	0	570	114.9	113.6	13.1	2.32	5.0	5.32	6.16	0.60
46	酸酵液	"	0.80	475	103.7	85.1	11.2	2.04	4.0	4.95	4.90	0.68	
47		"	0.80	510	112.1	94.1	11.3	2.23	3.9	5.61	5.37	0.68	
48		TA	0.80	475	83.3	71.7	11.9	1.61	5.0	3.36	4.07	0.81	
49		"	0.80	510	86.8	77.46	12.1	1.65	5.0	3.49	4.17	0.79	
50		TB	0.80	475	100.3	82.4	12.6	1.75	5.4	3.59	4.63	0.88	
51		"	0.80	510	108.0	85.3	12.5	1.83	5.2	3.82	4.80	0.84	
38		酸酵液	WF	0	475	92.6	86.8	10.9	2.14	3.3	6.17	4.67	0.58
37	"		0	405	84.8	73.0	10.1	1.93	3.2	5.43	4.16	0.69	
42	TA		0	405	117.4	78.7	11.2	1.88	5.4	3.40	5.88	0.73	
43	"		0	475	114.0	82.0	11.5	1.90	5.0	3.85	5.25	0.73	
44	TB		0	405	103.8	81.0	11.9	1.82	5.2	3.65	5.00	0.74	
45	"		0	475	112.4	90.0	12.3	1.96	5.4	3.92	5.54	0.70	
26	培養系 (42時間目)	WF	0.55	405	111.5	104.7	12.3	2.21	5.3	4.62	6.23	0.65	
27	" (66 ")	"	0.65	405	85.7	82.3	12.4	1.78	5.4	4.41	4.07	0.66	

1. 攪拌速度の効果

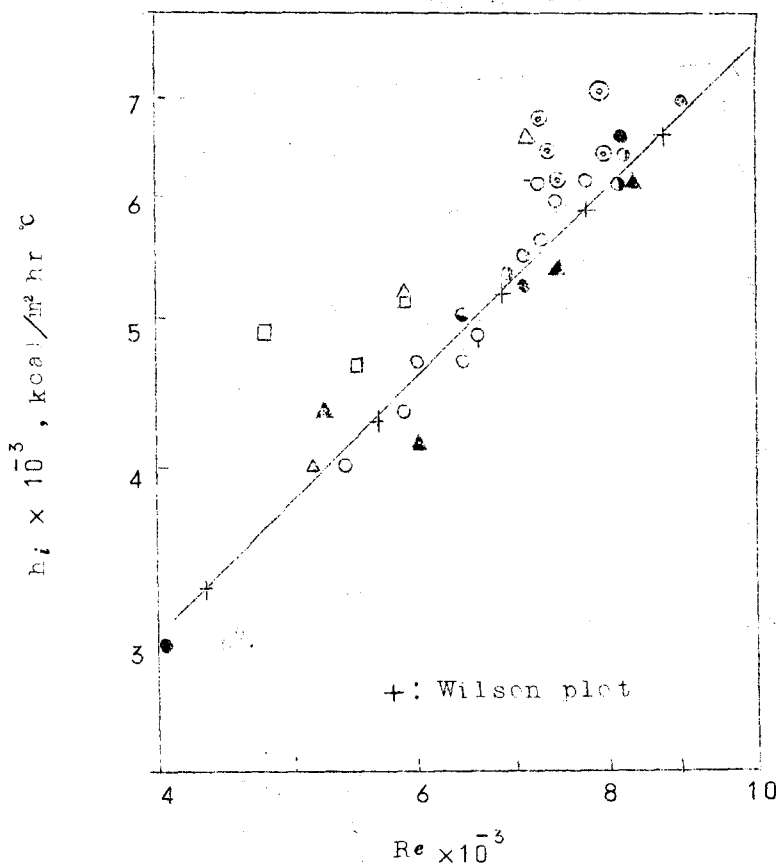
第3-24図に冷却管外壁基準熱伝達係数 h_o と攪拌数 N の関係を菌体濃度 C_m をパラメーターにして示した。この図から C_m が増加するにつれて h_o に対する N の効果が大きくなり、先に明らかにした k_d に対する N の効果に類似した傾向を示した。 h_o と N の関係は $\pm 10\%$ 誤差以内で次の実験式で示式出来る。



第3-24図 h_o に対する攪拌速度の効果

$$h_o = 363 \cdot 10^{-0.65 C_m N} (0.45 + 0.2 C_m)$$

別にそれぞれの操作条件における U の値と h_o 値を(7)式に代入して算出した冷却管内熱伝達係数 h_i の値と、管内流速を段階的にかえて Wilson plot によりもとめた h_i の値を比較し、冷却管外壁温度の実測値の信頼性を調べた。その結果は第3-25図の通りであって、両 h_i 値は大體一致した結果を示した。



第3-25図 h_i と管内冷却水の Re の関係

糸状菌懸濁系は非ニュートン流体の特性を示すといわれ、本実験の *Asp. terreus* の菌体懸濁系も予備的実験の結果類似の傾向を示したので、 h_0 と N の関係を一般化するため、構造粘性指数を測定し、無次元項による実験結果の整理を試みたが、*Asp. terreus* の液内培養の菌体は凝集、分散が速やかなために測定値のばらつきが大きく無次元項でまとめるのは困難であった。

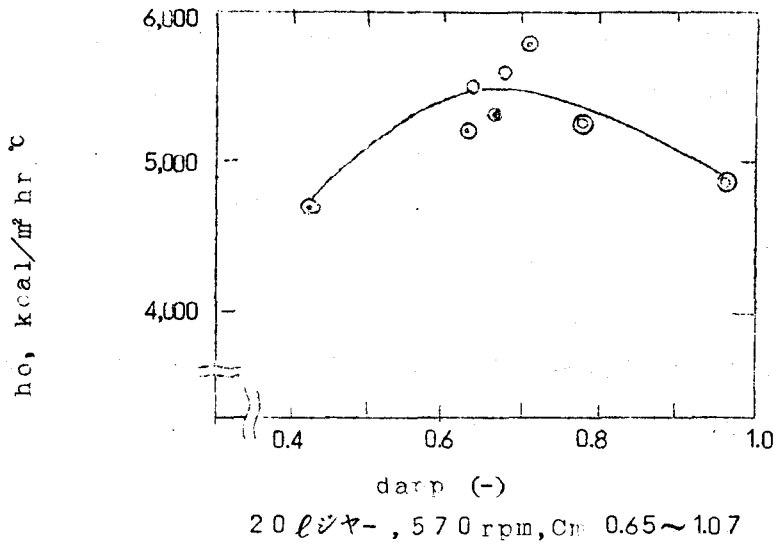
上述の h_0 の値と既報³⁵⁾のイタコン酸集積速度と N との相関結果を合せ考えると、正常なイタコン酸醸酵における h_0 は 4,000~5,000 と推定される。

2. 見かけ比重の影響

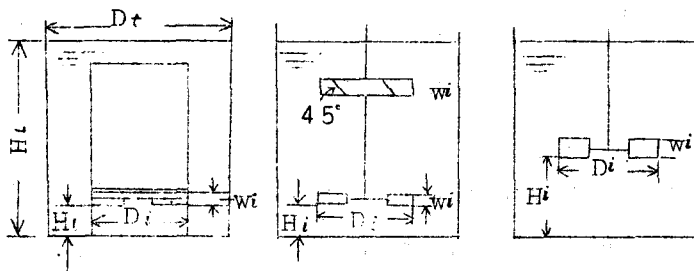
前節で明らかにした如くワルドホッフ型培養槽における培養時の醪の状態は分散気泡と液との泡沫相状態であり、その見かけ比重は液の物性、攪拌強度等により変化する。この見かけ比重の変化は、当然 h_0 に影響を及ぼすと考えられた。そこで繊維状菌体の水懸濁液に発泡剤として Tween 40, Tween 60, CSL を種々の見かけ比重になるように添加し、 h_0 に及ぼす影響を調べた。その結果、第 3-26 図に見る如く、見かけ比重 d_{app} , 0.7 附近に h_0 の最大値が存在し、その前後では h_0 は低下する。即ち 30 vol % 程度気泡の混在した場合、 h_0 は水の場合に対し約 15% 向上する。イタコン酸醸酵の通気攪拌培養における d_{app} は 0.6~0.7 であるから伝熱の点で最適条件にあると考えられる。

3. 攪拌羽根の型式 (Run 37, 38, 42~51)

第 3-27 図に示すような諸元の三型式の攪拌槽を使用して不完全ジヤマ板条件下で伝熱速度を測定し h_0 を比較した。この実験ではワルドホッフ型と標準タービン型で攪拌羽根の直径が異なるので、 h_0 の差異を直接比較しえないが、今、 h_0 と消費動力が一次函数関係にあると仮定し、培養濾液 (Run 37, 38, 42~45) の場合、ニュートン流



第3-26図 醗の見かけ比重と h_o の関係



	WF	TA	TB
	ワルドホップ型	タービン型	タービン型
		(上段: 軸流)	(六枚平羽根)
		(下段: 平羽根)	
$D_t = 240 \text{ mm}$			
D_t/H_i	1	1	1
D_i/D_t	0.55	0.50	0.50
H_i/D_i	0.30	0.33	1.0
W_i/D_i	0.2	上段 0.2 下段 0.1	0.2

第3-27図 攪拌羽根の型式

体と考へて、修正レイノルズ数 Re をもとめ Re と動力数 N_p の相関⁴⁾ 図から動力を推定し、ワルドホフ型 405 rpm の場合と同一の動力基準で比較するとワルドホフ型の h_0 5530 に対し、タービン型 A (TA) では h_0 3510、タービン型 B (TB) では $h_0 = 3720$ となり、ワルドホフ型は 50% 程度勝れていることが推算される。

4. 培養系の h_0 (Run 26, 27)

化学反応の場合には反応を伴う場合の伝熱は、反応を伴わない場合の数倍に達する可能性が指摘されている。そこで醸酵の場合も培養系と非培養系に h_0 の差があるか否かについて検討した。結果を第 3 - 7 表の Run 26, 27, 6 に示した。この結果よりイタコン酸醸酵においては培養系と非培養系で h_0 に殆んど差のないことが判明した。

第 6 節 要 約

菌体濃度の増大によるイタコン酸醸酵の高速度化を目的として、リーフフィルターを付設した 20 l 培養槽を使用し、液部貫流方式による単槽定常培養をおこない醸酵速度に有意に作用する化学的、物理的諸因子の効果を定量的に検討した。

(1) 好適な物理的、化学的管理条件を与えることにより、醸酵速度は菌体濃度に比例して直線的に増大し、対液 1.6% においてイタコン酸集積速度は対液 8% / day に達した。これが最高速度であった。

(2) V_m/C_m に対して CSL 供給速度は正比例的関係にあり、酸濃度 C_i は逆比例的関係にある。その効果は C_i の方が大きくとくに C_i の高水準の領域程顕著である。 V_m/C_m が C_i により極度に抑制される結果、 V_i/C_m も C_i の増加により減少する。このことは単槽連続培養においては、 V_i/C_m の向上は C_i の犠牲において達せられることを示すものである。

(3) 糖濃度 0.3% 以下では、醸酵速度は糖濃度依存性を示す。

(4) pH の影響は顕著で、酸集積、菌体増殖、糖消費いずれも、その比速

度は pH2 附近で最大であるがとくに酸集積比速度に対する影響が大であった。

(5) 温度の効果も大であり、 V_i/C_m に対する適温は 36~37°C であり V_m/C_m に対する適温より約 2°C 高温側にかたよっている。 V_i/C_m に関する Q_{10} は 4.4 (25~35°C), V_m/C_m に関する Q_{10} は 3.45 (24~34°C) であった。活性化熱は V_i/C_m に関して 26,900 cal, V_m/C_m に関しては 22,300 cal で両者に著るしい差はみられなかった。

(6) V_i/C_m に対して気相ガス分圧に適値が存在する。とくに p_{CO_2} の低下により Y が急減する。通気過剰による Y および V_i/C_m の低下の原因は p_{O_2} の上昇によるものではなく、 p_{CO_2} の低下にあると考えられる。 V_i/C_m に対する適値は p_{CO_2} 0.003~0.2, p_{O_2} 0.06~0.16 であった。 V_m/C_m に対する p_{O_2} の影響は p_{O_2} 0.5 以下では明確な差異は認められなかった。

(7) 以上の化学的諸因子と菌酵速度は次の実験式で関係づけられた。すなわち、

$$V_i = 2.83 \cdot 10^{18} \{ C_m (5.85 - 0.94 C_i) + 1.3 V_n \} (1 + 340 p_{CO_2}) (7.9 - 8.1 p_{O_2}) \exp \left(- \frac{13540}{T} - 10.27 \text{ pH} \right)$$

$$V_m = 1.07 \cdot 10^{16} \{ C_m (0.315 - 0.047 C_i) + V_n (0.5 - 0.084 C_i) \} (28 - 123 p_{CO_2}) \exp \left(- \frac{1230}{T} - 0.08 \text{ pH} \right)$$

但し、T: 297, 5~308, C_s : 0.3~7, C_i : 0.9~6.5, C_m : 0.5~1.6,

V_n/C_m : 0.1~1.15, p_{CO_2} : 0.003~0.018, p_{O_2} : 0.1~0.5, pH: 2~6

$K_d > 26.4 \times 10^{-6} C_m$

(8) 培養系における K_d と Y_i/C_m の間には正相関があり、次の実験式で関係づけられた。

$$V_i/C = (1.585 \times 10^{-5} / C_m) (K_d)^{0.86}$$

但し、 $0.8 < C_m < 1.6$, $K_d < 6.4 \times 10^{-6} C_m$

K_d に対し菌体濃度は負の効果を示し、醪の見かけ比重は正の効果を示した。培養系の K_d と亜硫酸曹達-菌体懸濁系の k_d とは大差がなく、見かけ比重を培養系のそれに近似させた系で測定すれば、実用的には亜硫酸曹達による結果を培養系に適用出来ることを示した。

正常なイタコン酸醱酵における液の培養時の見かけ比重は約 0.65 で、SWL による酵母培養に比べて約 2 倍であることを知った。

(9) 醱酵醪の伝熱係数について等温系で検討し、冷却管外壁基準の熱伝達係数 h_o に及ぼす諸因子の効果について検討した。その結果、 G_m の増大により h_o は減少すること、見かけ比重 0.7 附近に h_o の最高値の存在すること培養系と非培養系で h_o に殆んど差のないことを知った。正常なイタコン酸醱酵における培養時の h_o は 4000~5000 であることを推論した。

第4章 本醱酵における熱力学的知見

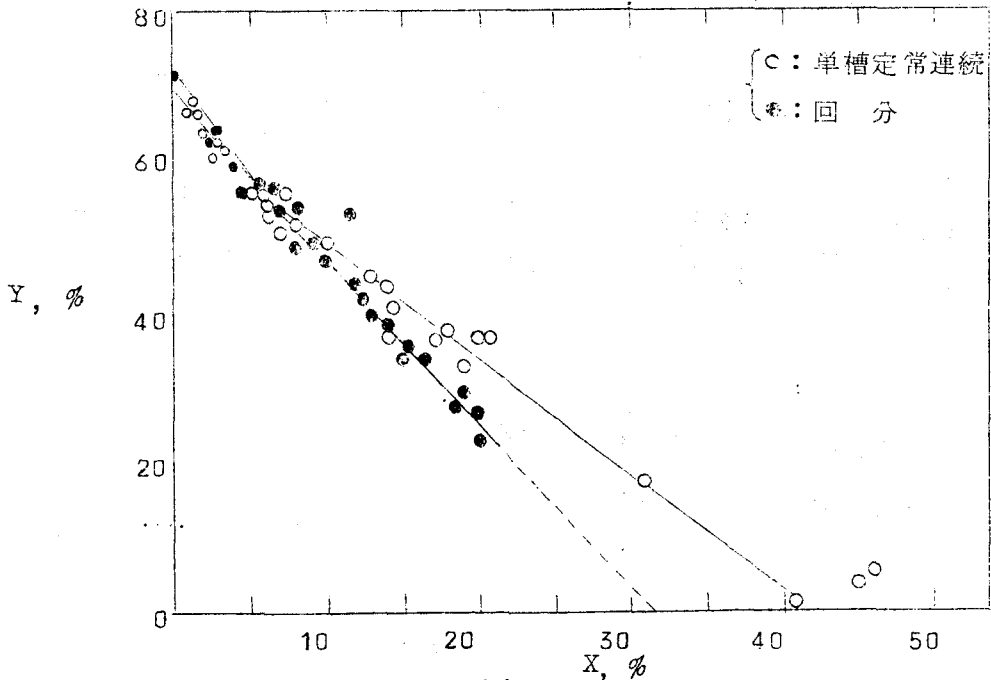
前章ではイタコン酸醱酵の醱酵速度と化学的、物理的操作因子との関係について明らかにしたが、この醱酵の培養工程の最適条件を設定するためには、代謝生産物の生成割合、代謝熱等に関する定量的な知見にもとづいて本醱酵の物質収支および生理的熱収支関係を明らかにする必要がある。

本章ではまず本醱酵の主生成物であるイタコン酸と菌体の生成割合の数的関係を広い領域に亘り検討し、その結果より推定した生理的熱収支の適合性を代謝熱発生量、ガス収支の面より実験的に検討した結果についてのべる。

第1節 対消費糖イタコン酸収率 Y と対消費糖菌体収率 X の相関

単槽定常培養における結果を、回分培養のそれと対比させて第4-1図に示した。

第4-1図 収率の相関



これより明らかなように、回分、連続ともに収率の相関は $X = 6$ 附近で屈折する二つの直線で近似できる。 $X = 0$ で $Y = 6.8 \sim 7.2$ (%) と外挿されグルコース 1 M よりイタコン酸 1 M 生成すると仮定した本酸酵の理論収率の妥当性がたしかめられた。また単槽連続の場合 $X = 4.0 \sim 4.5$ % で $Y = 0$ % となる。このことは菌体一部産生に糖 2.2 ~ 2.5 部が消費されることを意味するが、この関係は X が減少するに従い成立しなくなる。この点に関しては第 6 章で論議する。 X と Y の数的関係は回分と連続でことなる、とくに $X > 6$ の領域で顕著にあらわれる。単槽連続系では次式で関係づけられる。

$$Y = 6.9 - 2.48 X \quad (\text{但し } 1 < X < 6)$$

$$Y = 63.5 - 1.53 X \quad (\text{但し } 6 < X < 4.5)$$

第 2 節 醱 酵 熱

200 l フェーマンターを用いてグルコースを炭素源として回分通気攪拌培養をおこない、還元糖、イタコン酸、菌体の 3 成分について物質収支をとった。その結果と二・三の仮定に基づいて生理的熱収支式を推定した。この収支式の適合性を熱発生量、ガス収支の実験より検討した。

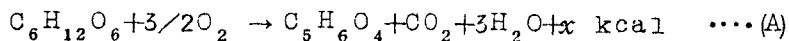
実測値 (三成分の収支)

	グルコース (kg)	イタコン酸 (kg)	菌体 (乾物) (kg)
培養前	20,600	0.024	0.009
培養後	0.220	1,183.0	1,001
差	20,380	1,180.6	0,992

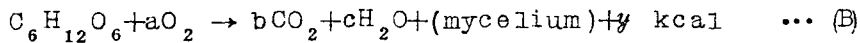
仮定値；

次の醱酵式が成立つものとする。

(イタコン酸生成系について)



(菌体合成系について)



各成分の燃焼熱は次のように仮定する。

$$\text{グルコース} ; 673 \text{ Kcal/mol} = 3.74 \text{ Kcal/g}$$

$$\text{イタコン酸} ; 476 \text{ Kcal/mol} = 3.66 \text{ Kcal/g}$$

$$\text{菌体} ; 4.8 \text{ Kcal/g}^{(4)}$$

$$\text{上より} \quad \text{イタコン酸生成熱} = 673 - 476 = 197 \text{ Kcal/mol}$$

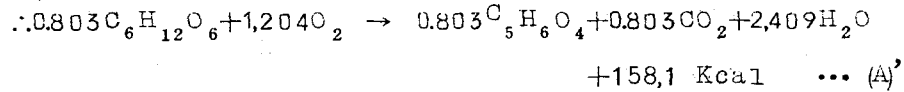
$$\text{イタコン酸の理論収率} = 130/180 = 0.722$$

$$\begin{aligned} \text{実測値より} \quad \text{対消費糖イタコン酸収率 } Y &= (11,806/20,380)(100) \\ &= 58.0(\%) \end{aligned}$$

$$\text{イタコン酸生成にむけられた糖の比率} = 58.0/72.2 = 0.803$$

$$\text{イタコン酸生成系以外に} \quad \quad \quad = 1 - 0.803 = 0.197$$

醸酵式(イタコン酸生成系について); (A)式に代入すれば,



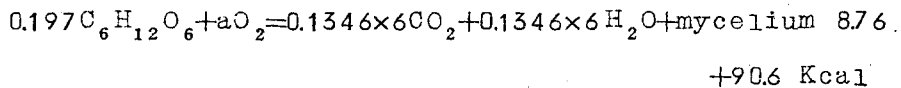
$$\text{対消費糖菌体収率 } X = (0.992/20,380)(100) = 4.87(\%)$$

$$\begin{aligned} \text{グルコース } 1 \text{ g mol あたり生成した菌体量} \\ = (180)(0.0487) = 8.76(\text{g}) \end{aligned}$$

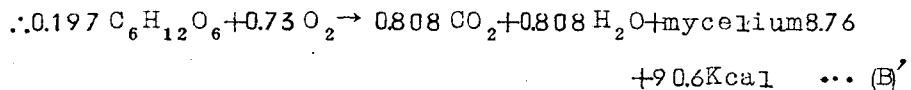
$$\text{菌体生成系に消費された糖量} = (180)(0.197) = 35.45(\text{g})$$

$$\begin{aligned} \text{菌体生成熱} &= (35.45)(3.74) - (8.76)(4.8) = 90.6 \text{ Kcal} \\ (90.6/673) &= 0.1346 \end{aligned}$$

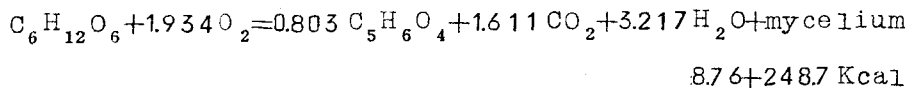
醸酵式(菌体生成系について); (B)式に代入すれば,



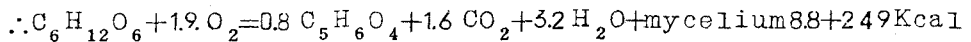
$$a = (355 + 14.5 + 8.76 - 35.45)/32 = 0.73$$



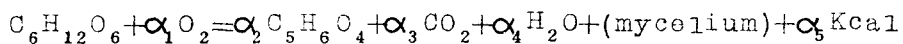
(A)+(B)



簡単にして



前述の結果より回分式イタコン酸醸酵の生理的熱収支の推定式の係数は、
下の如く収率 X および Y の函数としてあらわすことができる。すなわち、



$$\text{ここで } \alpha_1 = 6 - 0.062Y - 0.093X$$

$$\alpha_2 = 0.014Y$$

$$\alpha_3 = 6 - 0.069Y - 0.077X$$

$$\alpha_4 = 6 - 0.042Y - 0.077X$$

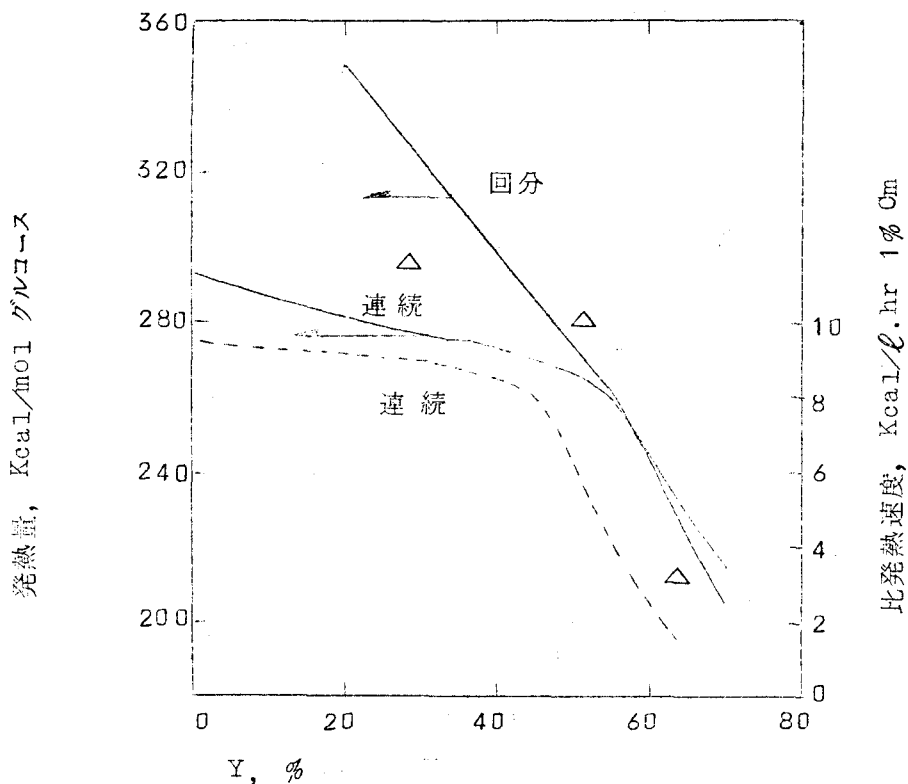
$$\alpha_5 = 6.73 - 6.59Y - 8.64X$$

$$(\text{mycelium}) = 1.8X$$

この推定醸酵式に第1節で明らかにした回分培養における収率の相関式、
即ち、 $Y = 70.5 - 2.9X$ ($0 < X < 6$)、および $Y = 67.5 - 2.15X$ ($6 < X < 20$)
を代入してとけばイタコン酸収率 Y と代謝熱の関係がもとめられる。またこ
の醸酵式を連続培養にも適用出来るものとすれば、上と同様に連続培養にお
ける収率の相関式すなわち $Y = 69 - 2.48X$ ($1 < X < 6$)、 $Y = 63.5 - 1.53X$
($6 < X < 45$) とから連続培養における Y と代謝熱の関係がもとめられる。
第4-2図の実線は、このようにしてもとめた種々の Y における代謝熱
(Kcal/molグルコース)の推定値である。

この推定値の適合性を発熱に伴う温度上昇および R、Q の両面より実験
的に検討した。

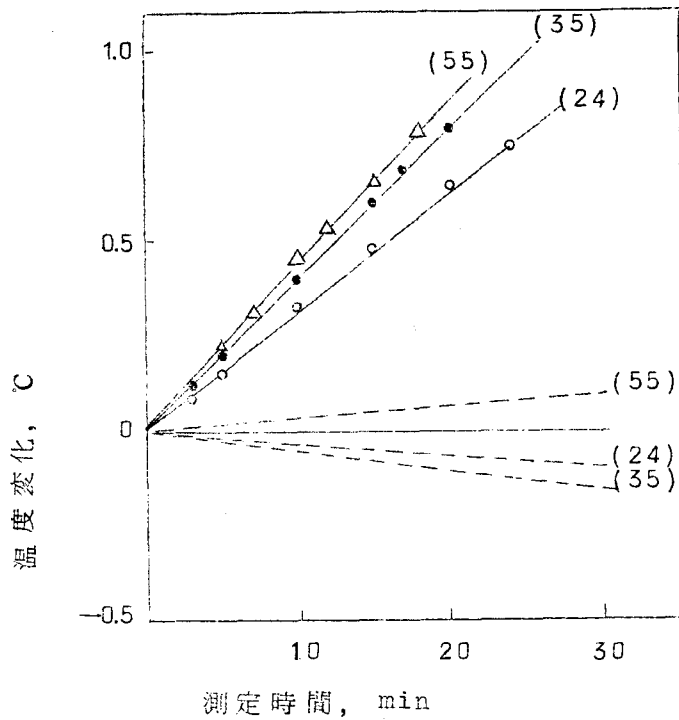
まず、醸酵発熱量の測定は次のようにおこなった。200ℓフェーメンタ
ーにより最適培養条件下に回分培養を開始し、培養経過の所定期間(表11
参照)に達した後、ジャケット内の温水を抜きとり、繻温度の上昇を水銀棒



△；発熱量実測値（回分）

第4-2図 醗酵発熱量

状温度計で0.1℃までよみとった。温度測定後、ジャケットに蒸気を通じて醗を加熱殺菌した後培養時と同じ温度まで冷却し、先と同様にジャケット内の温水を抜きとってから同一条件で運転し、通気、攪拌、槽壁よりの熱損失等による温度変化をしらべ、これを対照とした。温度変化の時間経過は第4-3図のようであつた。点線は対照であり、実線で示した培養時の温度変化から対照の温度変化を控除した値をもって代謝熱による正味の温度変化とみなした。その結果を第4-1表に示す。醗の比熱はグルコースとイタコン酸のみ考慮し、推算⁴⁶⁾によりもとめた。R・Qの測定は排出ガスを経時的にサンプリングし、オルザットガス分析でO₂、CO₂を測定してもとめた。



200ℓフェーマンターによる回分培養

第4-3図 培養における温度上昇

第4-1表 回分培養の種々の培養時期における代謝熱発生量

培養時間 (時期)	24時間目	35時間目	55時間目
対消費糖イタコン酸収率, %	28	52	63
正味の温度上昇, °C/hr	2.09	2.71	2.49
醜の比熱	0.95	0.96	0.96
C_m , %	0.22	0.43	0.60
代謝熱発生量, Kcal/l.hr	1.99	2.60	2.39
対消費糖菌体収率 (X), %	20(184)	9.3(7.2)	1.6(3.1)
酸集積速度 V_i , %/day	0.81	2.24	3.00

糖消費速度 V_s , %/day	29	43	48
発熱量 Kcal/mol, glucose	297(329)	282(268)	215(228)
R . Q .	1.04(1.06)	0.93(0.88)	0.75(0.79)

() の数値は計算値

実測値と計算値は比較的良好な一致をみた。

以上の結果より前述の推定方程式を用いてイタコン酸醸酵の物質収支、生理的熱収支をもとめることができると考えられる。

単槽連続培養においても、 X と Y の数的関係の補正をおこなえば、上述の醸酵式が適用できると考えられる。この結果と単槽連続培養における速度と収率の相関式(第6章III, 第6-2図参照)とからこの醸酵の推定発熱速度を収率 Y の函数として下のように示式できる。

$$V_{\text{heat}} = \left(\frac{1750}{Y} - 37.6 + 0.18Y \right) C_m \quad (\text{但し } 55 < Y < 68)$$

$$V_{\text{heat}} = \left(0.0543Y + \frac{1278}{Y} - 22.06 \right) C_m \quad (" \quad 55 > Y > 45)$$

$$V_{\text{heat}} = \left(9.8 - 0.0297Y - \frac{3.91}{Y} \right) C_m \quad (" \quad 45 > Y > 5)$$

このように発熱推定速度は Y の領域により異なる三つの式で表わすことができる。例えば菌濃度1.6%における単槽連続培養で、収率 $Y = 40\%$ で定常化したとすれば $V_{\text{heat}} = 8.5 \times 1.6 = 13.6 \text{ Kcal}/\ell \cdot \text{hr}$ となり、毎時約14℃に相当する代謝熱の発生が推算される。第4-2図の点線でしめした曲線は上式の計算値を Y に対してプロットしたものである。

第3節 要 約

(1) イタコン酸醸酵においては消費糖に対する菌体の収率 X とイタコン酸収率 Y は反比例的関係にあるが、その数的関係は、次の相関実験式で与えられるように、 X の大小により、また回分と連続で異なる。

$$\text{連続系では, } Y = 6.9 - 2.48 X \quad (1 < X < 6)$$

$$Y = 63.5 - 1.53 X \quad (6 < X < 45)$$

$$\text{回分系では, } Y = 70.5 - 2.9 X \quad (0 < X < 6)$$

$$Y = 67.5 - 2.15 X \quad (6 < X < 20)$$

イタコン酸生成系以外にむけられた糖に対する菌体の収率は一定ではなく、回分、連続ともに X の大小により変化する。

(2) 回分培養の糖消費量、イタコン酸および菌体産生量の実測値と二、三の仮定にもとづいて本醸酵の醸酵式を推定し、この式の適合性を発熱量、 R より実験的に検討し、これが実用的に使用できることを確かめた。さらに単槽連続培養における速度と収率の相関結果と併せて、この醸酵の発熱速度を推算する発熱速度式をイタコン酸収率 Y の函数としてあらわした。

第5章 小パイロットプラントによる試験 —スケールアップにおける問題点の発見

前章までの諸研究結果に基づいて1.4 M³ 培養槽規模の小パイロットプラントを設計、設置し、結晶グルコースを主原料として主として連続培養に関する試験を行ないスケールアップにともなう問題点につき検討した。本試験装置は培地の調製から粗イタコン酸結晶の分離回収までを含んでいるが、次の諸点に研究の力点をおいて実施した。即ち、a) 菌体分離機の型式と性能、とくに分離後の菌体の活性変化、b) 培養槽の攪拌所要動力、c) イタコン酸_菌の回収における分級式連続晶析器の性能。

第1節 試験装置

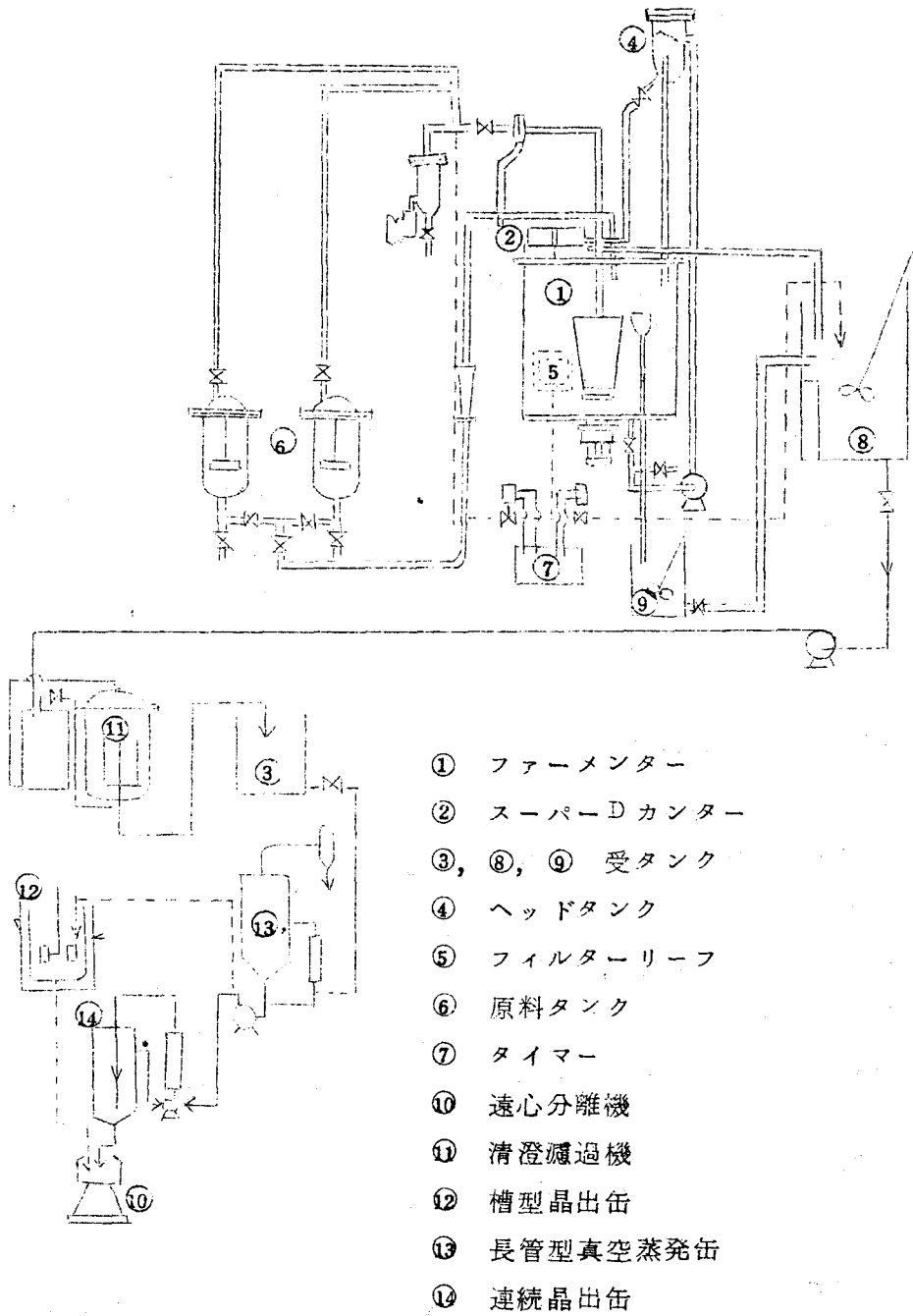
第5-1図に試験装置の系統図を、第5-2図に培養槽の概略図を示す。第5-1図の破線部分の実験中に改良を行なった箇所である。すなわち菌体分離装置とイタコン酸の晶析器の改良を行なった。培養槽は第5-2図に示す如くワルドホッフ型で、回転羽根は円盤付曲り羽根(6枚)タービン型であり3HPモーターにより150~600 rpm. で駆動される。槽内容量は上下移動可能のオーバーフロー管により調節できるようになっている。

第2節 菌体分離機の型式と性能

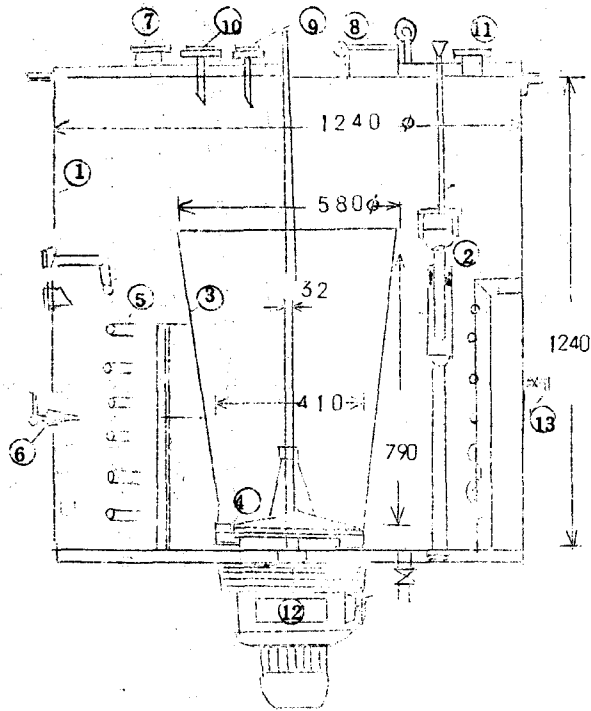
次の3種類の型式について試験を行なった。

a) Sharples Super-D-Canter P600 型連続遠心分離機；連続的に固液分離が可能で、遠心力900g、この種型式の分離機としては最小の処理能力に属する。酵母_m(C_m 0.83%)を供試した予備実験では、_m供給速度0.68 l/min, 生菌体分離速度30.2 g/min, 分離菌体含水率4.49, 菌体分離効率98%の結果がえられた。

b) バスケット遠心分離機；回分脱液型で、回転ボウル直径18cm, 2000



第5-1図 パイロットプラント実験装置系統図



- ① 培養槽本体 (軟鋼内面ゴムライニング)
- ② オーバーフロー管
- ③ ドラフトチューブ
- ④ インペラー
- ⑤ 蛇管
- ⑥ 温度計
- ⑦ 回収菌体入口
- ⑧ ハンドホール
- ⑨ 空気入口
- ⑩ 培地入口
- ⑪ 排気口
- ⑫ 変速機
- ⑬ サンプルング口

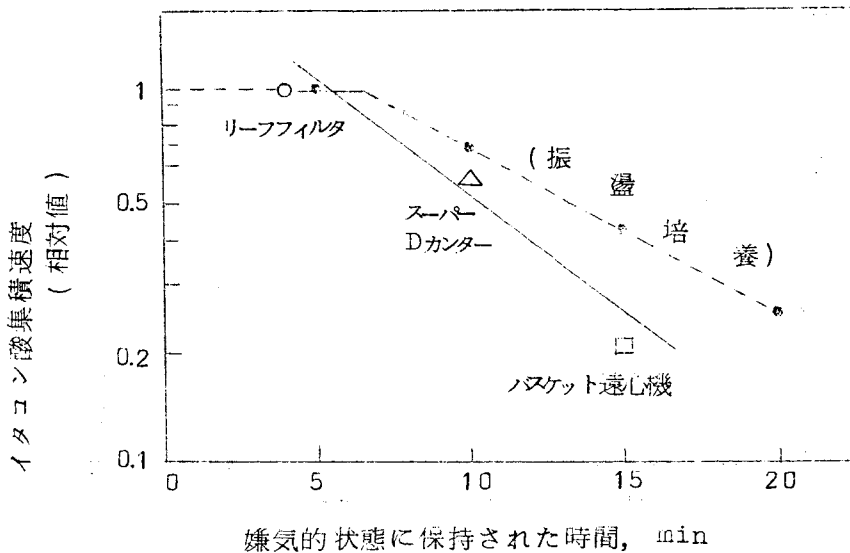
第5-2図 1.4 M³ ワールドホッフ型醸酵槽断面図

rpmで処理量 1.5 ℓ /min。

c) フィルターリーフ; 20 ℓ ジャーによるベンチスケールの実験結果を参考にし、直径 25 cm の円形枠を用い、濾材は 200 メッシュ SUS 27 金網、濾過面積 760 cm^2 でベンチの約 10 倍にスケールアップした。このリーフを培養槽に挿入して固定した。培養槽は常圧とし、濾液受器内圧を 560 mmHg とし、4 分 - 0.1 分間つけ濾過方法により操作した。予備的に分離実験を行った結果、定常時の濾過速度は 35 ℓ /hr であった。これを 20 ℓ ジャーでのフィルターリーフの能力すなわち 6 ℓ /hr と比較すると、その能力は同一濾過面積基準で前者は後者の 60% 程度にすぎないことがわかる。これは金網を通過した微生物糸が空気の逆送によっても一部分は排出されず、その結果有効濾過面積が減少するためであり、濾布の構造よりも逆送の方式に装置的な工夫をする必要があることが判った。

これら三種類の分離機を用いて 1 M^3 培養槽で高濃度菌体回分培養をおこない、分離前後の菌体活性の変化をしらべた。その結果、フィルターリーフでは分離前後の菌体活性に殆んど差は認められないが、Super-D-Canter は分離前の 60 ~ 65% に低下し、バスケット遠心機では 20% にまで低下した。この原因は遠心機内に菌体が圧縮状態で滞留する時間に関係のあることを、Super-D-Canter において染色菌体をトレーサーとして用いた実験により確かめた。第 5-3 図はそれぞれの分離機による分離菌体のイタコン酸集積速度を、圧縮状態で嫌気的狀態に保持される時間を尺度として表わしたもので、これより 5 分以上嫌気的狀態におくことにより活性の減少があらわれることがわかる。これはすでに第 3 章において指摘したが、

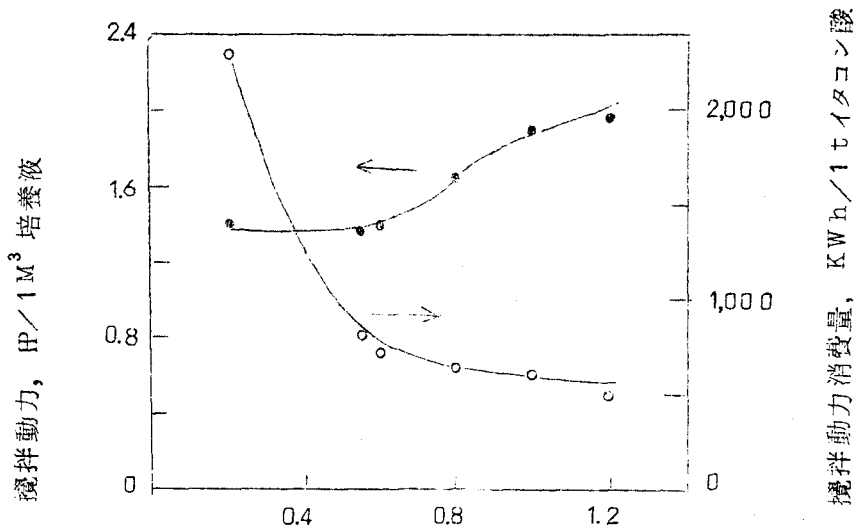
Asp. terreus のかかる特性を考慮すると、遠心脱液型式よりも連続濾過型式の方が糸状菌体の分離装置として適しているとみることができる。



第5-3図 嫌気状態下の菌体の生酸活性の低下

第3節 攪拌所要動力

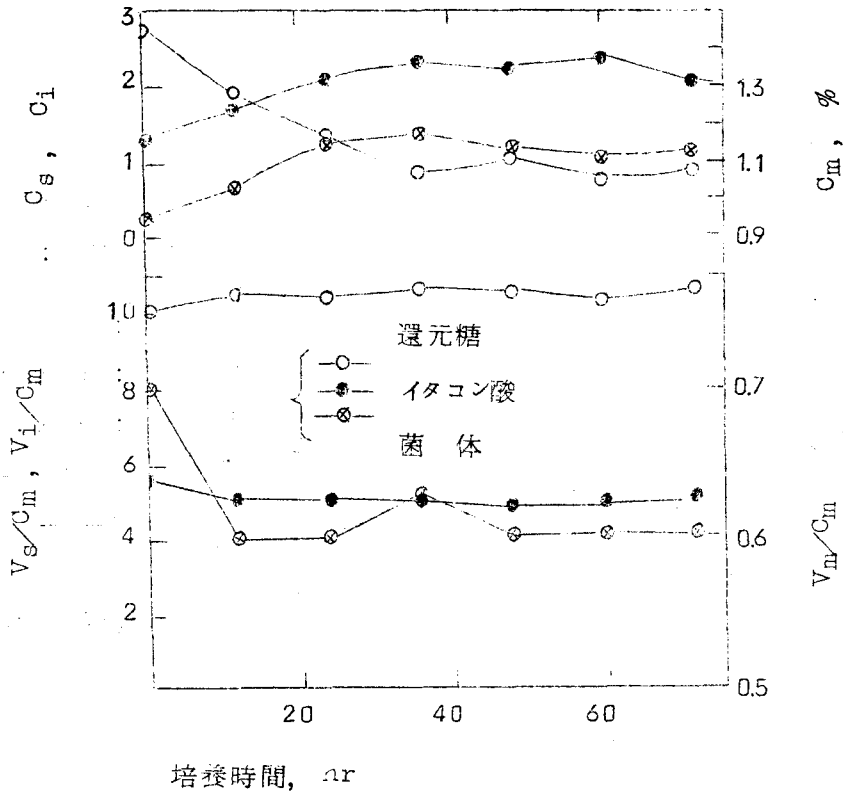
同一の菌体濃度において攪拌速度を低下させると醗の流動状態が不均一になり槽内循環量が低下して、醗の上層部に菌体が集積し、上層と下層で菌体濃度に差を生じ、イタコン酸集積速度が低下する。他方同一攪拌速度において菌体濃度が増加する場合にも上述と同様な傾向を示す。第5-4図は、槽内醗の菌体濃度分布が無視出来、且正常な醗酵が行なわれた際の動力消費量と菌体濃度の関係を示したもので、醗 1 M^3 当りの動力は菌体濃度 C_m 0.2 ~ 0.6% では大差ないが、それ以上で漸増し、 C_m 1% 以上で約 $2\text{ HP}/1\text{ M}^3\text{ broth}$ に達する。この値は一般の化学反応槽では強度の攪拌領域にあると考えられる。しかし、菌体濃度の増加によりイタコン酸集積速度が向上するため、液中イタコン酸1トン当りに換算した動力消費量は約 500 KWhr となり、回分培養の $\frac{1}{2}$ 以下に低下する。



第5-4図 菌体濃度と攪拌動力消費量の関係

第4節 連続培養試験

1.4 M³培養槽を使用し、フィルターリーフ挿入による単槽連続培養試験の結果を第5-5図に示す。醗量720ℓ、温度36℃、で結晶グルコース6.5%、硝安0.3%、硫酸マグネシウム0.2%、CSL0.3%、pH2.2の培地を70~73ℓ/hrの流速で流した。その結果、醗の糖濃度、イタコン酸濃度、菌体濃度はそれぞれ0.8%、2.3%、1.1%、イタコン酸集積比速度5%/day/1%菌体、イタコン酸収率48%で定常化し、20ℓジャーでの結果を1.4 M³タンクで再現した。

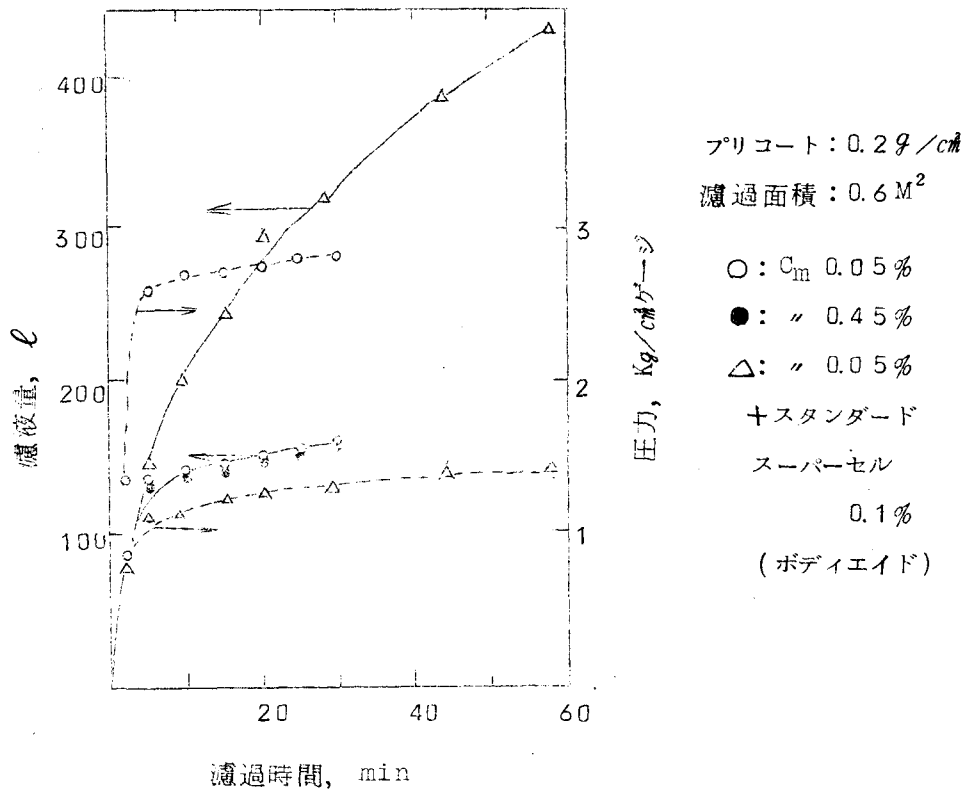


第5-5図 菌体再利用連続培養経過 (フィルターリーフ使用)

第5節 イタコン酸の回収 (蒸発晶析法)

發酵液からのイタコン酸の回収はその溶解度特性を利用して回分濃縮，冷却方式により多く行なわれている。しかし，發酵の連続化にともない，生産物回収工程も連続化する方が望ましい。そこで本パイロット試験では晶析缶としてφ810型の分級式連続晶析器を設置し，その性能について試験した。

まづ濃縮晶析に先立って，フィルターリーフによる菌体分離液の清澄試験を行なった (第5-6図)のち，この清澄液を自然循環式長管型真空蒸発缶により缶温46℃で，30℃および50℃におけるイタコン酸の飽和濃度まで濃縮した濃縮液を晶出缶に約55ℓ送り込み，回分式で循環速度33ℓ/min および100ℓ/min，過飽和濃度2gイタコン酸/100gH₂O



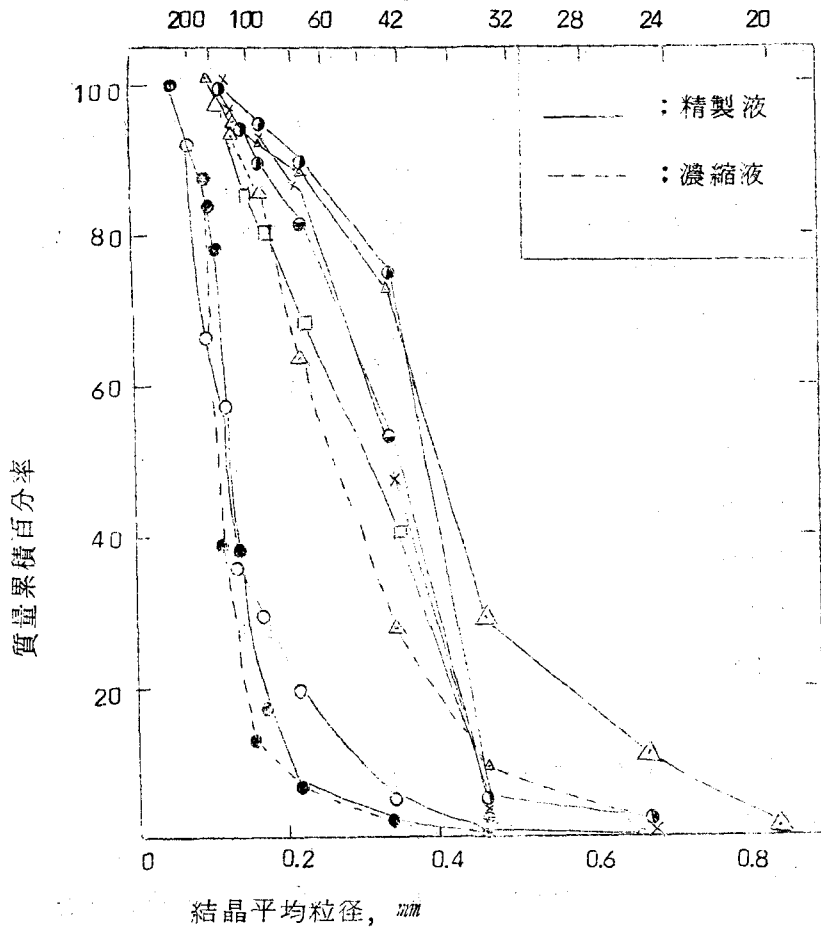
第5-6図 菌体分離液の清澄濾過

および1.05g/イタコン酸/100gH₂O, 冷却速度0.1°C/minの条件で17°Cまで冷却した。その結果循環中に気泡が発生して, 液は気液混相流となり結晶は殆んど100メッシュ以下の偽晶であって結晶の生長は認められなかった。

偽晶発生の原因としては次の諸点が考えられた。①溶液の純度, ②気泡の混入, ③過飽和濃度が高過ぎる, ④晶出缶の循環ポンプ部による強制攪拌により偽晶発生のみでなく生長した結晶が破壊される。これらの点を検討するため, 晶出缶と20ℓ攪拌槽を使用して実験を行なった。すなわち45°Cで40°C飽和(19.2g/100gH₂O)イタコン酸溶液を調製し, 40°Cまで冷却後0.1°C/minの速度で20°Cまで除冷し, 減圧濾過分液後, 50°C,

260 mmHg で減圧乾燥し、篩分し粒径分布をもとめた。

Tyler mesh 粒径



- △— 20 l 攪拌槽, 300 rpm
- " " 800 "
- X— " " 1,000 "
- " " 500 "
- " " 500 " (通気 1 l/min)
- 晶析缶 (ポンプ 1450 rpm) (気泡混入)
- " (" ") (" なし)

第5-7図 晶析条件と製品結晶の粒径分布

結果は第5—7図に示した。この試験では種結晶は加えなかったので40℃から30℃まで冷却したところで結晶の発生が認められた。したがって過飽和濃度は6.4g/100H₂O 附近にあると考えられる。

べつに過飽和濃度のえいきょうを調べるため晶出缶を使用し、精製液、濃縮液を試料として過飽和濃度4.5g/100gH₂O 以下(準安定領域とみなせる)で60~80メッシの結晶を種として加え、30℃に保って晶出させた。種結晶の添加割合は空間率として0.94である。その結果製品結晶の粒径分布は下の如くであった。:

Tyler mesh	質量百分率, %	
	精製液	濃縮液
20~40	3	0
40~60	44	5
60~80	44	50
80~115	7	21
115以上	2	24

以上の実験結果より次のことが明らかになった。

1. 濃縮液は精製液にくらべて同一条件で偽晶の発生率が高く、生長速度が低い。これは濃縮液中に結晶の生長を阻害する物質のあることを示している。中川ら³³⁾も同様な結果を実験室規模の実験でみとめている。

2. 攪拌槽では攪拌速度が増すにつれ、粒径分布曲線は粒径が小さくなる方につれる。また精製液の場合、モード粒径はいずれの条件でも42メッシ附近にあるが500rpm の場合は分布曲線の山が高く、40~60メッシ結晶が全体の70%をしめ粒径がそろっている。

3. 晶出缶による試験では結晶重量の50%以上は100メッシより微細な偽晶である。そして攪拌槽で現れたような溶液の純度、気泡混入の有無による差異は微かである。この場合は機械的なショックが偽晶発生が一番大き

な誘因と推定される。今攪拌機の Re をこれを反映する値と仮定して計算すると、攪拌槽の場合 $300 \text{ rpm} \sim 1,000 \text{ rpm}$ で $3.86 \times 10^6 \sim 1.29 \times 10^7$, 一方晶出缶の循環ポンプ部 5.23×10^7 , 熱交換部(蛇管) 2.83×10^6 となり、循環ポンプ部が最も支配的に働くと見られる。

4. 分級晶析缶においても準安定領域にあれば、種結晶を加えることにより偽晶発生は低下し、結晶の生長は行なわれるが、不純な濃縮液を用いた場合は生長は著るしく抑制される。しかも $60 \sim 80$ メッシ結晶の取得量は種結晶の 70% 程度である。このことはイタコン酸結晶は比較的崩壊しやすいことを示唆する。

以上の結果より考察すると濃縮液からイタコン酸粗結晶をうる晶析装置としては、外部循環塔型のいわゆる Oslo Krystal 型よりも、攪拌機付きの内部循環型、いわゆる D.T.B. 型式の方が適していると考えられる。

第6節 要 約

1.4 M³ 培養槽規模の小パイロットプランによりスケールアップに伴なう問題点につき検討した。

菌体再利用のための菌体分離機としては、まづイタコン酸生産菌株の生理的特性を考慮した型式の選定が重要であり、遠心分離型式よりも濾過型式が適している。リーフフィルター型式はこの目的に合致するが、 20ℓ ジャーで使用したリーフの構造ではスケールアップに伴って能力が低下し、空気の逆送方式と関連して構造の検討が必要であることを知った。攪拌に要する動力は菌体濃度 C_m の増大により増加し、 C_m 1% 以上で 2 Hp/M^3 前後を要する。しかし C_m 増大による生産速度の向上により液中イタコン酸 1 トン当りの攪拌エネルギーは 500 KWh と回分法の $\frac{1}{2}$ 以下に低下する。イタコン酸粗結晶回収のための晶析缶の型式につき検討し、Oslo 型の連続分級方式では偽晶の発生と生長結晶の崩壊が大きく、攪拌槽型式が勝れていることを製品結晶の粒径分布より推論した。

第6章 考 察

i) 収率の相関について

イタコン酸醸酵の反応過程は巨視的には糖よりイタコン酸と菌体が並発反応的に産生すると見ることができる。したがって第4章, 第1節で明らかにしたように消費糖に対するイタコン酸収率 Y と, 菌体収率 X の間には逆比例的關係があるが, その数的關係は回分系と定常連続系で異なっている。第4-1図よりイタコン酸の理論収率を72%と仮定し, 菌体の最大収率($Y=0$ において)を定常連続系で44%, 回分系で32%と仮定し, 消費されたグルコースのうち菌体の生成系(イタコン酸生成系以外)に向けられたと考えられる糖に対する菌体の収率を計算すると第6-1表のようになる。

第6-1表 イタコン酸生成系以外にむけられた糖に対する菌体収率

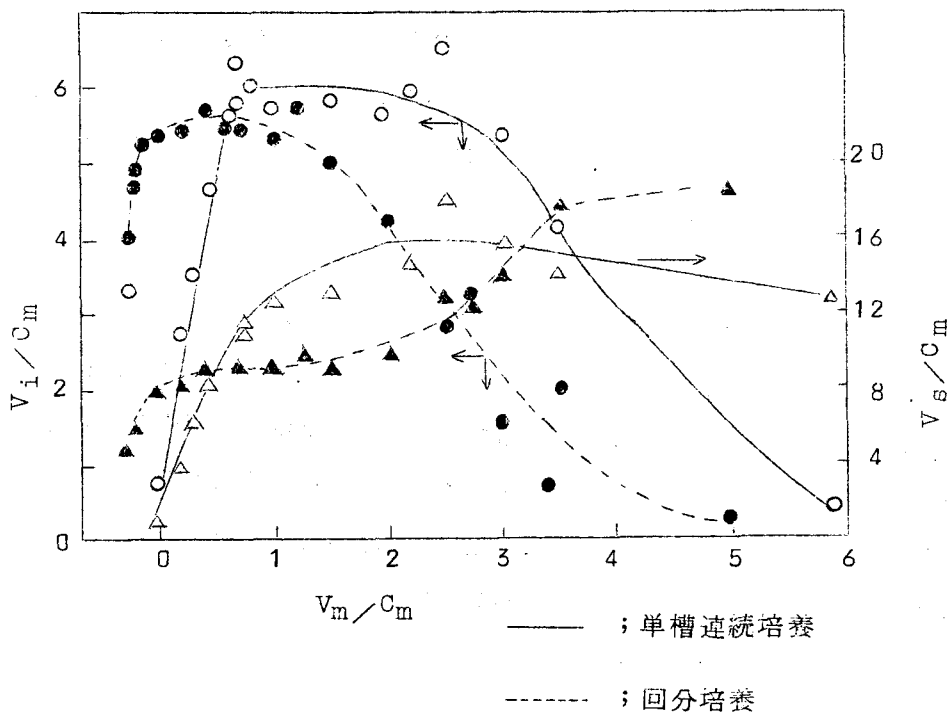
対消費糖 菌体収率 X , % (1)	対消費糖イタコン 酸収率 (Y) , %		菌体生成系に消費され た糖の全消費糖に 対する割合, $(1-Y/72)(100)$, %		(1)/(2)	
	連続系	回分系	連続系	回分系	連続系	回分系
5	58	56	19	22	0.26(59)	0.23(72)
10	49	46	32	36	0.33(75)	0.28(87)
15	42	35	42	51	0.36(82)	0.29(91)
20	35	25	51	65	0.40(91)	0.31(97)
30	20	—	72	—	0.42(95)	—
44	0	—	100	—	0.44(100)	—

() は最大菌体収率に対する百分率

第6-1表の最右欄の数値は連続系と回分系で菌体収率に差があるだけでなく、 X の値によっても差異のあることを示している。すなわち Y の大なる領域では単位量の菌体生成に、より多くの糖が消費されることを意味し、菌体収率は一定ではない。

II) 比速度の相関について

イタコン酸集積比速度 (V_i/C_m) および糖消費比速度 (V_s/C_m) と菌体増殖比速度 (V_m/C_m) の関係を回分系と対比して第6-1図に示した。この相関より回分系と連続系の差異は $V_m/C_m - V_i/C_m$ の関係よりもむしろ $V_m/C_m - V_s/C_m$ の関係にあらわれている。 $V_i/C_m - V_m/C_m$ の相関曲線には、ずれがあるが曲線のパターンは類似しているのに対し、 $V_s/C_m - V_m/C_m$ の相関はその様子が異なり、連続系では V_i/C_m がほぼ最大になった後でも V_m/C_m



第6-1図 比速度の相関

の増加に伴って V_s/C_m は漸増すること、 V_m/C_m 3 附近に V_s/C_m のピークのあること、さらに V_i/C_m 最適の領域で連続系は約 1.5 倍の糖消費速度を示していることである。これらの点から、 $V_m/C_m > 0.7$ の領域においてはイタコン酸の放出過程がこの発酵の律速段階を形成していると考えられる。

本発酵の場合、糖消費速度の最高は菌体乾重量 1% 濃度基準で対液 1.8% / day (0.75% / hr) であってこれ以上の速度を出すことはできなかった。Rahn⁴⁵⁾ はバクテリアと酵母の同一菌体質量における糖消費速度の差異を両者の細胞膜表面積の差と関連づけて論じている。このような物理的な尺度のみで基質のとりこみ速度を論ずることは出来ないであろうが、今試みに糸状菌の場合に延用して酵母と糸状菌の速度の差を比較してみよう。酵母生菌体 1% の濃度の糖消費速度は対液 0.3% / hr 程度であるから、生菌体の水分含量を 300% (乾物基準) と仮定すれば酵母乾量 1% 濃度における糖消費速度は 1.2% / hr と計算される。一方 *Asp. terreus* の繊維状菌体の菌糸の長さは 100 μ 程度であるから同一質量当りの表面積すなわち比表面積は酵母の約 $\frac{3}{4}$ であり、単位表面積当りの糖消費速度は酵母と糸状菌は同程度であると推論される。

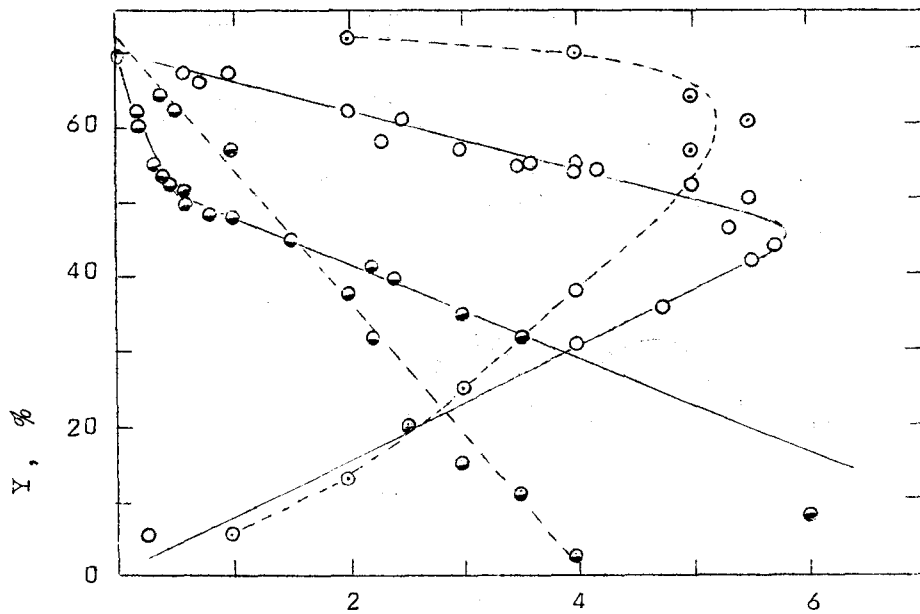
iii) 比速度と収率の相関について

第 6-2 図に示す如く、 $Y = 50\%$ 附近に $Y - V_m/C_m$ の相関に屈折点があり、この附近で V_i/C_m は最高値に近づく。一方、 $Y = 40\%$ 附近で V_i/C_m は減少し始めるが、この点は V_s/C_m の最高値に対応している。この図から回分と連続の一つの差異が V_m/C_m と Y の関係にあると見ることが出来る。速度と収率を考慮すれば、屈折点附近が実用的な条件設定点と考えられる。連続系で比速度と収率の間に次の関係が成立つ。

$$Y = 67.5 - 3.2 V_m/C_m \quad (0.2 < V_m/C_m < 0.6)$$

$$Y = 54 - 6.5 V_m/C_m \quad (0.6 < V_m/C_m < 6)$$

$$Y = 70 - 4 V_i/C_m \quad (0.6 < V_i/C_m < 6)$$



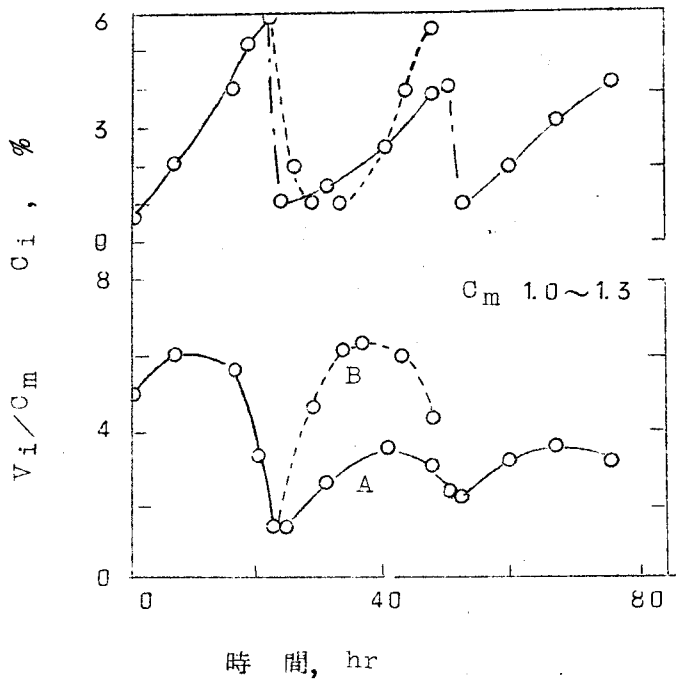
イタコン酸集積比速度 (V_i/C_m), 菌体増殖比速度 (V_m/C_m)

—— : 定常連続 ○ : V_i/C_m
 - - - - : 回分 ⊙ : V_m/C_m

第6-2図 比速度と収率の相関

IV) 活性低下菌体の賦活について (高菌体濃度回分培養)

連続定常系では $V_m/C_m < 0.7$ で $V_i/C_m = 1 + 7.3 V_m/C_m$ なる関係が存在する (第6-1図)。これはイタコン酸の平均集積比速度が増殖菌体に大きく依存していることを推定させる。一方既成菌体の再活性化も同時に一部行なわれていると考えられる。第6-3図は既成菌体の再活性化の程度を高菌体濃度下の回分培養により検討した結果を示したものである。すなわち回分培養終了後、栄養培地を高速で流加すると同時に培養液を抜きとりながら1.5~2時間でイタコン酸濃度を1%以下とし、直ちに再び回分培養をおこなった場合は、菌体の活性は第1回目の約 $\frac{1}{2}$ に止まる (図の実線) のに対して、第2回目の回分培養の前に10時間新培地を流入して連続培養を行



第6-3図 菌体再利用回分式醗酵におけるイタコン酸集積速度の経時的変化

なった場合(図の点線)は第1回目以上の活性を示した。回分, 連続それぞれの菌体増殖比速度の実験値から第2回醗酵における菌体のうち第1回目からもち越された菌体(既成菌体)と新たに増加した菌体の量比をもとめると, 図のA即ち連続操作をおこなわない場合(a)はそれぞれ83%, 17%となり, 5時間連続培養後(b)ではそれぞれ70%, 30%となり, 10時間培養後(c)は同様に60%, 40%となる。今, 菌体の最大活性を V_i/C_m として6.5とみなし, それぞれの条件における V_i/C_m の値とから既成菌体の再活性化率を計算すると, (a) 0.54, (b) 0.74, (c) 0.95となる。これより明らかなように活性の低下した既成菌体の賦活は醗酵の蓄積物質の除去のみでは達成されず, 栄養培地流加による V_m/C_m の向上により促進されることがわかる。以上の結果は, 実用的には連続系と回分系

の組合せによって連続系の菌体の活性を利用してイタコン酸濃度の高い醗を
うるプロセスの成立する可能性を示唆している。

V) 醗酵速度式および発熱速度式の応用について

第3章で単槽定常連続培養における醗酵速度を pH 、イタコン酸濃度等の
化学的因子の函数として表わす醗酵速度式を提出した。また、発熱速度を Y
の函数として表わしうる発熱速度式で推算できることを第4章でのべた。

これらの速度式を使用すれば任意の収率または速度を満足する培養工程の
操作条件をもとめることができる。たとえばイタコン酸収率を50%と定め
れば、 $Y = 70 - 4 V_i / C_m$ の関係より $V_i / C_m = 5$ となり、 $C_m = 1.2\%$
とすれば $V_i = 6\% / \text{day}$ となる。今、 $pH 2.2$ 、温度 35°C 、 V_m / C_m
 0.65 に設定し、通気量は必要計算量の2倍とすれば、発酵式より p_{CO_2} と
 p_{O_2} はそれぞれ $p_{CO_2} = 0.016$ 、 $p_{O_2} = 0.15$ となるから、これらの数
値を醗酵速度式(第3章、第4節)に入れてとけば、この条件における醗の
イタコン酸濃度 C_i は 1.5% となる。従って単槽定常培養における醗の平均
滞留時間は $(1.5/6.0)(2.4) = 6$ 時間となる。また上記の諸条件より
 $V_m = 0.70\% / \text{day}$ となる。発熱速度は発熱速度式(第4章、第2節)
を用いて $V_{\text{heat}} = 7.5 [\text{Kcal} / \ell \cdot \text{hr}]$ と概算され、通常の回分培養の約
4倍の速度で代謝熱が発生すると推定される。

上述の設定値に近い条件として、 20ℓ ジャー培養槽を使用し、醗量 8ℓ 、
攪拌 470rpm 、通気量 $1\ell / \text{min}$ 、温度 35°C 、培地；結晶グルコース 6% 、
硝安 0.3% 、硫酸マグネシウム・7水塩 0.2% 、CSL 0.2% 、培地流
加速度； $1.3\ell / \text{hr}$ 、の条件で単槽連続培養を行ない、 $C_m 1.1\%$ 、 C_i
 1.6% 、 $C_s 2.1\%$ で定常化した。これより $V_i = 6.4\% / \text{day}$ 、 $V_m =$
 $0.65\% / \text{day}$ 、 $Y = 48\%$ となり、計算値に近似する結果がえられた。

VI) イタコン酸生産費の比較による本研究の評価

以上の速度式および物質、熱収支式および小パイロットプラント実験でえ
られた結果にもとづいて、結晶ブドウ糖よりイタコン酸製造のプロセスを設

定したプラント建設費および生産原価の計算をAriesら¹⁾の方法に準拠しておこない、Pfeiferらの推定した生産費と比較して本研究の評価をおこなった。

Pfeiferらとの比較の意味で生産規模はイタコン酸結晶状粉末年産1320t(純度99%以上)とし、原料は結晶ブドウ糖とし、プロセスは直列二槽連続培養方式を採用し、酸の回収は濃縮-晶析(冷却)方式とした。

操作条件および速度式から算出した定常状態における各槽の成分濃度は下の通りである。

	第 1 槽	第 2 槽
$C_m, \%$	1.2	1.5
$C_i, \%$	1.5	4.0
$V_n, \%$	0.78	0.62
pH	2.2	2.2
p_{O_2}, atm	0.15	0.15
p_{CO_2}, atm	0.016	0.016
Temp, °C	35	35
$V_i, \%/day$	6.0	5.4
$V_m, \%/day$	0.7	0.44
$V_s, \%/day$	12.0	9.3
Y, %	5.0	5.8
$C_s, \%$ (培地 7.6)	4.6	0.3
流速, hr^{-1}	0.17	0.09

フローシートおよび熱収支を含む物質収支を第6-4図に、プラント建設費、主要原単位および生産費(イタコン酸1トン当り)を従来法と対比して第6-2表に示す。

第6-2表 従来法との経済比較

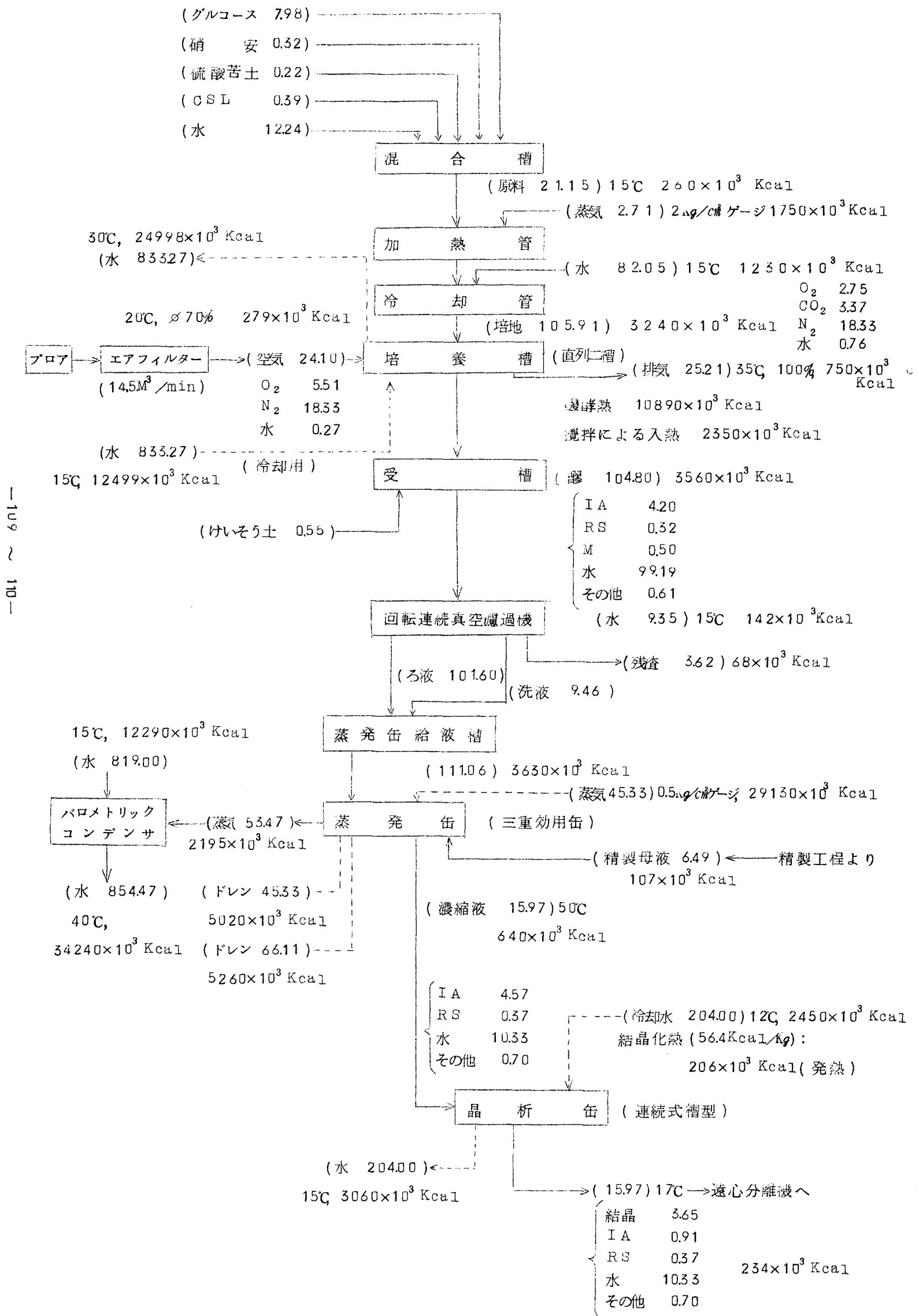
Pfeiferら		著者
培養方式	回分	直列二槽連続
回収方式	蒸発晶析法	蒸発晶析法
プラント建設費(万円)	54,000	17,900
“	(万円/年・イタコン酸) 40.9	13.6
主要原単位(t/tイタコン酸)		
グルコース	1.9	2.0
蒸気	25	15
水	470	612
電力(KW hr)	5,000	1260
生産原価(万円)	24.5	20.1
	33.9 [*]	
終末イタコン酸濃度, %	3.5	4.0
醸酵収率, %	58	52
回収収率, %	90	95
イタコン酸平均集積速度, %/day	2.0	5.6

*:小林が日本の現状に換算したもの

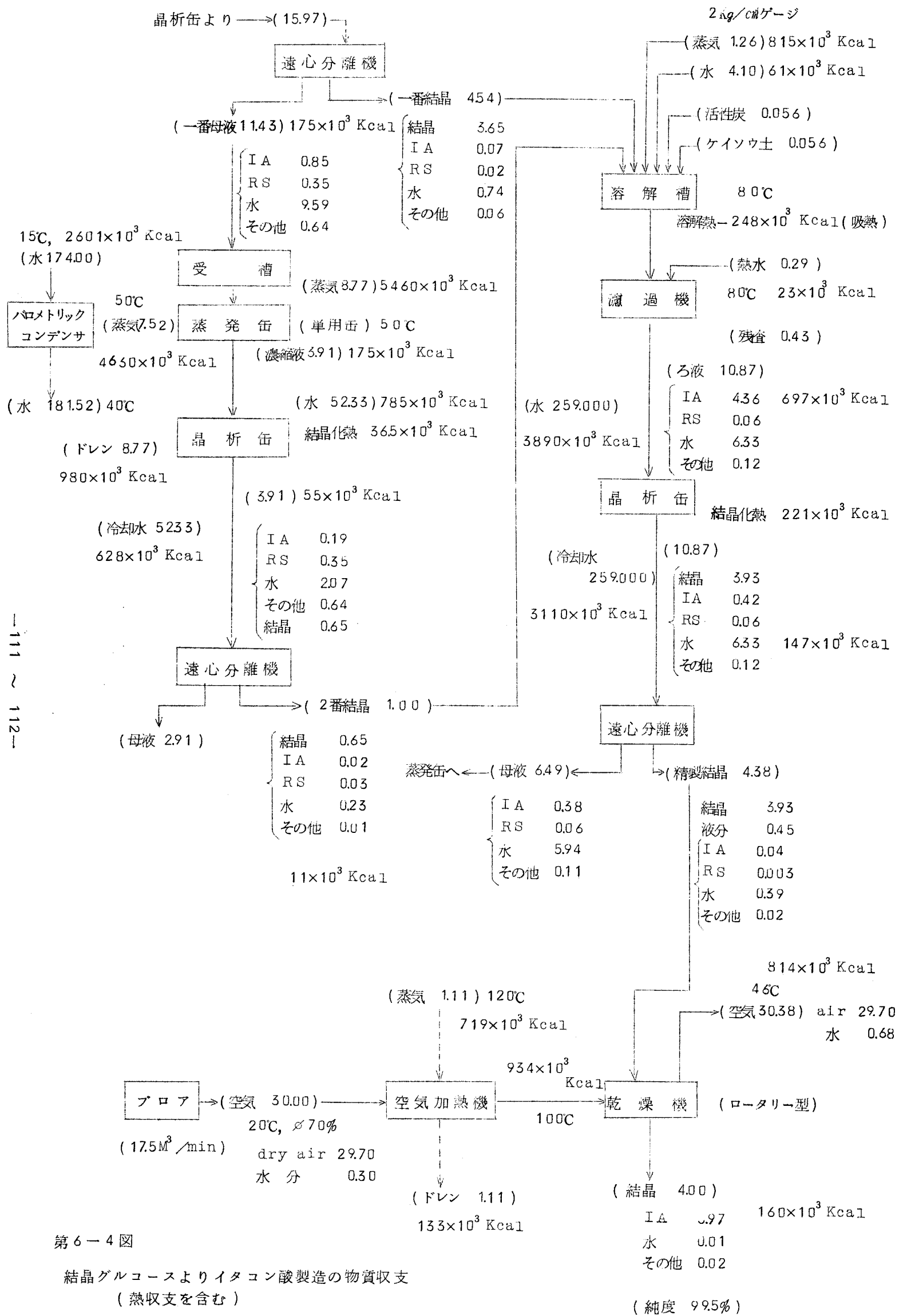
醸酵収率の低下により原料必要量は増加したが、醸酵速度の増大(約3倍)によりプラント費、ユーティリティーズが大きく低下する可能性を示している。

イタコン酸結晶状粉末(純度99%以上)年産1,320トン(日産4トン) 単位:トン

略号: IA: イタコン酸, RS: 還元糖(グルコースとして), M: 菌体(乾物として)



109 ~ 110



第6-4図

結晶グルコースよりイタコン酸製造の物質収支
(熱収支を含む)

第7章 総 括

糸状菌を利用する醸酵工業の近代化をめざす研究の一つとして、安価多量の需要が期待されるイタコン酸醸酵をとり挙げ、その工業化のための基礎的研究をフラスコ、20ℓジャー、200ℓファーメンター、1.4M³ファーメンターの四段階の装置を使用しておこない、支配的因子である培養過程の速度を装置と操作条件との関連において追究し、生産物の収率との相関において培養工程の最適条件をもとめたものである。

第1章では従来のイタコン酸培養工程を解析して醸酵の高速度化の必要性を指摘し、その実現の可能性に対する考察を行なって問題を設定し、第2章では菌体反復利用による振盪培養により菌体濃度増大の効果、菌体活性の持続性と培養条件の相関等につき予備的研究をおこない、高速度化の可能性を実験的に確かめた。

第3章では著者の考案した糸状菌体分離を可能とする20ℓ規模の培養装置を使用して高菌体濃度による単相定常連続培養をおこない、醸酵速度の最高値を追究し、醸酵速度を化学的諸因子の函数として表わした。

$$\begin{aligned} \text{即ち, } V_i &= 2.83 \times 10^{18} \{ C_m (5.85 - 0.94 C_i) + 1.3 V_n \} (1 + 340 \\ &\quad p_{CO_2}) (7.9 - 8.1 p_{CO_2}) \exp\left(-\frac{13540}{T} - 1.027 \text{pH}\right) \\ V_m &= 1.07 \times 10^{16} \{ C_m (0.315 - 0.047 C_i) + V_n (0.55 - 0.084 \\ &\quad C_i) \} (2.8 - 123 P_{O_2}) \exp\left(-\frac{11230}{T} - 0.08 \text{pH}\right) \end{aligned}$$

但し, T : 297.5~308, C_s : 0.2~7, C_i : 0.9~6.5, C_m : 0.5~1.6, V_n/C_m : 0.1~1.15, p_{CO_2} : 0.003~0.018, p_{O_2} : 0.1~0.95, pH : 2~6, $K_d \geq 6.4 \times 10^{-6} C_m$

更に物理的因子として培養罐の酸素移動および伝熱につき検討した。第4章では本醸酵の主生成物である菌体とイタコン酸の対消費糖収率の相関関係

を検討し、正味の菌体収率はイタコン酸収率により変化することを明らかにした。また回分培養の物質収支よりもとめた生理的熱収支式、単槽連続培養の發酵速度と収率の相關式にもとづいて、発熱速度をイタコン酸収率 Y の函数として表わしうる推定発熱速度式を提出した。すなわち、

$$\begin{aligned}
 V_{\text{neat}} \text{ [kcal/hr]} &= \left(\frac{1750}{Y} - 37.6 + 0.18Y \right) C_m \quad (\text{但し } 55 < Y < 68) \\
 " &= \left(0.0543Y + \frac{1278}{Y} - 22.06 \right) C_m \quad (\text{但し } 55 > Y > 45) \\
 " &= \left(9.8 - 0.0291Y - \frac{3.91}{Y} \right) C_m \quad (\text{但し } 45 > Y > 5)
 \end{aligned}$$

第5章では小パイロットプラントにより菌体分離機の型式と性能、攪拌所要動力、イタコン酸の晶析法による回収等規模拡大により生ずる問題点を指摘した。第6章では、収率の相關、比速度の相關および収率と比速度の相關について回分と連続定常を対比してその差異につき考察した。さらに速度式および速度と収率の相關式を用いて培養工程の最適条件を求める方法につき論じ、最後に熱エネルギー収支を含む物質収支データと速度的データにもとづいてイタコン酸生産プロセスを予備的に設定してプラント建設費と生産費の推算をおこない、従来の回分法と比較して本研究の評価をおこなった結果について論じた。

引 用 文 献

- (1) Aries, R.S. and Newton, R.D.; Chemical Engineering Cost Estimation McGraw-Hill Book Co., Inc., N.Y. 1955
- (2) Barinowa, S.A.; Mikrobiologiya, 22, 497 (1953), Influence of Carbon Dioxide on Mold Growth.
- (3) Bartholomew, W.H., Karow, E.O., Sfat, M.R. and Wilhelm, R.H.: Ind. Eng. Chem., 42, 1801 (1950), Oxygen Transfer and Agitation in Submerged Fermentations.
- (4) Berenblum, I. and Chain, E.; Biochem. J., 32, 295 (1938), An improved Method for the Colorimetric Determination of Phosphate.
- (5) Blakebrough, N. and Hamer, G., Biotech. and Bioeng., 5, 59, (1963), Resistance to Oxygen Transfer in Fermentation Broths.
- (6) Blom, R.H. et al; Ind. Eng. Chem., 44, 435 (1953), Sodium Gluconate Production, Fermentation with *Asp. niger*.
- (7) Brierley, M.R. and Steel, R., Appl. Microbiol., 7, 57 (1959), Agitation-Aeration on Submerged Fermentation. Effect of Solid Disperse Phase on Oxygen Absorption in a Fermenter.
- (8) Calam, C.T., Driver, N. and Bowers, P.H., ; J. Appl. Chem., 1, 209 (1959), Studies in the Production of Penicillin, Respiration and Growth of *P. chrysogenum* in Submerged Culture in relation to Agitation and Oxygen Transfer.
- (9) Calam, C.T., Oxford, A.E. and Raistrick, H.; Biochem. J., 33, 1488 (1939), The biochemistry of microorganisms LXIII, Itaconic acid, a metabolic product of a strain of *Asp*

terreus Thom.

- (9) Chas. Pfizer & Co. Inc., Chem. Eng. Progr., 51, 68(1955)
- (10) Chemical and Engineering News, Aug. 3, p.69(1964)
- (11) Deindoerfer, F.H. and Gaden, Jr, E.L., Appl. Microbiol., 3, 253(1955), Effects of Liquid Physical Properties on Oxygen Transfer in Penicillin Fermentation.
- (12) FIAT Final Report No.499
- (13) Foster, J.W., Chemical Activities of Fungi, Academic Press. N.Y. 1949, p.158
- (14) Halliwell, G.J., J. exp. Bot., 4, 369(1953), The Effect of Aeration on the Metabolism of Acetate by *Asp. niger*
- (15) 池中徳治；実験化学講座，日本化学会編，23巻生物化学I . p.35, 丸善(1957)
- (16) Inskeep, G.C., Wiley, A.J., Holderby, J.M. and Hughes, L.P., Ind. Eng. Chem., 43, 1702(1951), Food Yeast from Sulfite Liquor.
- (17) 化学工学便覧， p.45, 丸善(1958)
- (18) 木下広野；日化， 50, 583(1929,) 一新糸状菌によるイタコン酸及びマンニットの生成
- (19) 小林達吉；応用微生物研究所シンポジウム生物化学工学 p.114(1963), イタコン酸製造の工程計画
- (20) 小林達吉, 田淵武士；。 菌の利用工業 “微生物工学講座第5巻， 共立出版， 昭和31年， p.69
- (21) Kobayashi, T. and Nakamura, I., Hakko Kogaku Zasshi (J. Ferment. Technol.) 44, 264(1966), Dynamics in Mycelial Concentration of *Asp. ergillus terreus* K 26 in Steady State of

Continuous Culture.

- (23) 小林達吉・中村以正；醸協会誌 22, 67, 118(1964), 糸状菌の連続培養
- (24) 小林達吉・中村以正；醸酵工学, 39, 341(1961), イタコン酸醸酵に関する研究(第3報)連続培養に関する基礎的研究(その1)振盪培養における醸酵速度及び生産物収率
- (25) 小林達吉・中村以正；同上, 40, 181(1962), イタコン酸醸酵に関する研究(第4報)連続培養に関する基礎的研究(その2)20ℓジャーファーメンターによる単槽定常連続培養と高菌体濃度回分式殖継培養
- (26) 小林達吉・田淵武士；農化, 28, 171(1954), 第三燐酸曹達を用いる半微量糖定量法
- (27) 小林達吉・田淵武士；日本特許, 232377(1957), 241270(1958), 260208(1960)
- (28) 協和醸酵工業(木下祝郎, 田中勝宣.)；日本特許, 昭35-742(昭35-2-4)
- (29) Lockwood, L.B. and Nelson, G.E.N., Arch. Biochem., 10, 365 (1946), Some Factors Affecting the Production of Itaconic Acid by *Asp. terreus* in Agitated Cultures.
- (30) 三輪万治；醸酵工学, 30, 297(1952), 亜硫酸パルプ廃液より酵母の製造
- (31) 水池 敦；ガス分析, 分析化学講座7-B, 共立出版(1957)
- (32) 水科篤郎・伊藤竜象・村上泰弘・祠祇崇；化学工学, 30, 827(1966), 攪拌槽内冷却管への熱伝達に関する実験的研究
- (33) 中川允利・小林達吉；工化, 67, 761(1964), 醸酵液からのイタコン酸晶析速度
- (34) 中村以正・小林達吉；醸酵工学, 42, 673(1964), イタコン酸醸酵に関する研究(第5報)単槽定常連続培養におけるイタコン酸集積速度, 菌体増殖速度におよぼす培養温度およびC S L供給速度の効果
- (35) 中村以正・小林達吉；醸酵工学, 43, 622(1965), イタコン酸醸酵に関

- する研究 (第6報) . *Asp.terreus* K 26によるイタコン酸醸酵における酸素移動速度におよぼす菌体濃度のえいきょう .
- (36) 中村以正・小林達吉; 日本醸酵工学会大会講演要旨集 p.15(1965), イタコンの醸酵速度及び収率に対する気相ガス分圧のえいきょう
- (37) 中村以正・小林達吉; 日本醸酵工学会大会講演要旨集 p.27(1966), イタコン酸醸酵の伝熱係数について
- (38) Nelson, G.E.N., Traufler, D.H., Kelly, S.E. and Lockwood, L. B., Ind.Eng.Chem., 44, 1166(1952), Production of Itaconic Acid by *Asp.terreus* in 20 Liter Fermenter.
- (39) 野口祐一・荒尾修; 醸酵工学, 38, 491(1960), クエン酸醸酵に関する研究 (第3報) 酸生産におよぼす培地と培養温度の関係ならびに培養温度変化について
- (40) Nubel, R.C. and Ratajak, E.J. (to Chas. Pfizer and Co. Inc.), U.S. 3, 044, 941, July 17, 1962.
- (41) 大山義年・伊藤四郎; 分離及び混合, 丸善 (1957), p.146
- (42) Owen, S.P. and Johnson, M.J., Appl. Microbiol., 3, 375(1955), The Effect of Temperature Changes on the Production of Penicillin by *Penicillium chrysogenum* W 49-133.
- (43) Pfeifer, V.G., Vojnovich, C. and Heger, E.N., Ind.Eng.Chem., 44, 2975(1952), Itaconic Acid by Fermentation with *Aspergillus terreus*.
- (44) Porges, N., Clark, T.F. and Aronovsky, S.T., Ind.Eng.Chem., 33, 1065(1941), Gluconic Acid Production - Repeated Recovery and Re-use of Submerged *Aspergillus niger* by Filtration.
- (45) Rahn, O., Microbes of Merit, The Jaques Cattell Press, Lancaster, Pennsylvania (1946)

- (46) 佐藤一雄；物性定数推算法，丸善(1954)，p.172
- (47) 霜三雄・藤本紫郎・佐々木許太・金内忠司；醸協会誌，16 532(1958)，
イタコン酸醸酵に関する研究(第1報)優良菌株の育成
- (48) Solomons, G.L.and Weston, G.O., J.Biochem.Microbiol.
Technol.and Eng., 3, 1(1961), The Prediction of Oxygen
Transfer Rates in the Presence of Mould Mycelium.
- (49) Somogyi, M., J.Biol.Chem., 160, 61(1945), A New Reagent
for the Determination of Sugars.
- (50) 田淵武士；東京教育大学農学部紀要，No.9 p.247(1963)，イタコン
酸生産菌 *Aspergillus itaconicus*, *Aspergillus terreus* の
深部培養における特性に関する研究

謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始懇篤なる指導と鞭撻を賜った東京教育大学農学部教授小林達吉先生に深厚なる謝意を表します。また種々助言を頂いた大阪大学工学部教授照井堯造先生、東京教育大学農学部助教授田淵武士先生に深謝致します。なお、実験実施にとくに御協力いただいた中川允利、日下部功、一色貞夫、清水洋司の諸氏に深謝致します。