

固定化酢酸菌による酢酸醗酵

長谷川賢一・堤 将和

酢酸（酢）は我々の食生活において、調味料、食品保蔵液、食品加工原料として広く用いられ、今後も大きな需要が見込まれている。

酢酸の製造法は合成法と醗酵法に大別される。合成酢酸は化学工業の原料として重要であり、醸造酢酸は食用として、あるいは食品加工原料として用いられている。

醗酵法による酢酸の製造は、表面醗酵法、深部醗酵法および塔型醗酵法に区別される。近年、効率のよい酢酸醗酵を目指して、固定化増殖微生物型のバイオリアクターが研究され、種々の装置が試作されてきた¹⁾。しかし、現在試作されているバイオリアクターは、酢化能力、長期間の安定した生産能力、経済性など総合すれば、従来の醗酵法に勝るものはない、といわれている²⁾。

このような現況から、著者らは酢酸醗酵用のバイオリアクターの開発を目的とし、本研究を行った。今回は、一つのモデルとして、二塔式サイフォン型バイオリアクターを試作し、その性能について検討した。

実験材料および方法

1. 供試菌

Acetobacter aceti IFO 3281

2. 培地ならびに培養

ポリペプトン（大五栄養化学）5 g，チオグリコレート培地（DIFCO）10 g，グルコース 2 g，グリセリン 15 g，酵母エキス（大五栄養化学）2 g，麦芽エキス（DIFCO）5 g，脱イオン水 1000 ml，pH 7.0。

培養は 30℃ で振とう培養を行った。

3. バイオリアクター

Fig. 1 に示したような二塔式サイフォン型バイオリアクターを用いた。

二つのサイフォン付容器として、大型のソックスレー

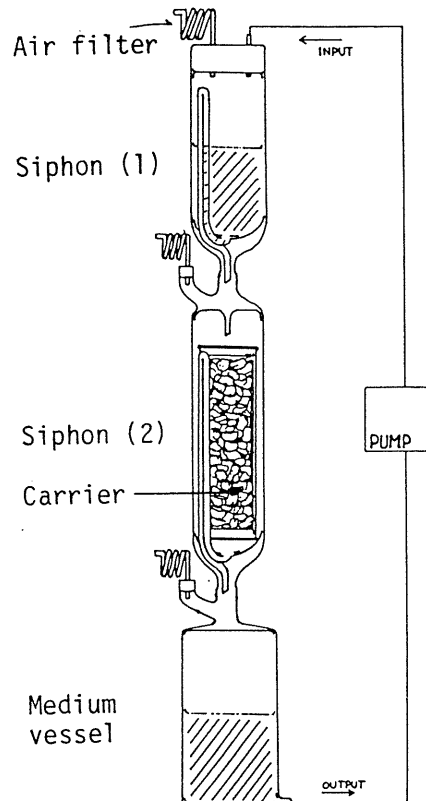


Fig.1 Double siphon-type reactor

抽出器（上部抽出器 350 ml，下部抽出器 450 ml，以下抽出器と略す）を用いた。担体は下部抽出器に充填した。通气孔はグリセリンを塗布した蛇管を取り付け、装置全体を滅菌した。ポンプ流速は 300 ml/hr とした。装置は 30℃ の恒温室に設置した。

4. 酢酸菌の固定

酢酸菌の固定は付着菌体法で行った。担体としては、ガラスビーズ（径 16 mm），セラミック（バイオキャリア，

SI型, 新日本製鉄), 粒状活性炭(径4mm×長さ6mm)を使用した。担体は予め10%酢酸で洗浄した後流水にて酢酸を除去し, リアクターに充填した。酢酸菌はまず前培養(培地10ml, 2日間)を行った後, 全量を新鮮培地300mlに加え, ひき続き2日間培養した。この培養液にさらに新鮮培地200mlを追加して, 2日間リアクター内を循環させ, 担体に酢酸菌を付着させた後培養液を除去した。

5. 酢酸醗酵

5%のエタノール(基質)を含む培地(基質液)1000mlをリアクター最下部の受器に注入した。基質液はポンプで上部抽出器に送られ, 下部抽出器に落下させた。基質液は下部抽出器中の酢酸菌付着担体を満した後, 直ちに最下部の受器まで落下する。この際, 下部抽出器内の空気は置換され, 酢酸菌には新鮮な空気が供給される。なお下部抽出器内は次の基質液の落下まで空気にさらされる状態となり, 酢酸醗酵は進行する。生成した酢酸は滴定法で, 残存基質は酸化法で定量した。

6. 回分式醗酵

担体として粒状活性炭を用い, 5%酢酸および5%エタノールを含む2倍濃度の培地1000mlを7日間循環させ, 培地成分を担体に吸着させた。その後滅菌水で担体を洗浄後, 4に従って酢酸菌を付着させ, 回分式醗酵用リアクターとした。酢酸醗酵は5と同様に行った。

実験結果

1. エタノール耐性ならびに酢酸生成能

供試菌のエタノール耐性をFig.2に, 酢酸生成能をFig.3に示す。

Fig.2から明らかなように, 本菌のエタノール耐性は7%以下であった。また本菌の酢酸生成能は5%エタノール濃度で高い値を示した(Fig.3)。

2. 担体の選定

ガラスビーズ, セラミック, 粒状活性炭を担体として用い, 本バイオリアクターによる酢酸生成能を測定した(Fig.4)。

これらの担体の中では, セラミックが最も高い酢酸生

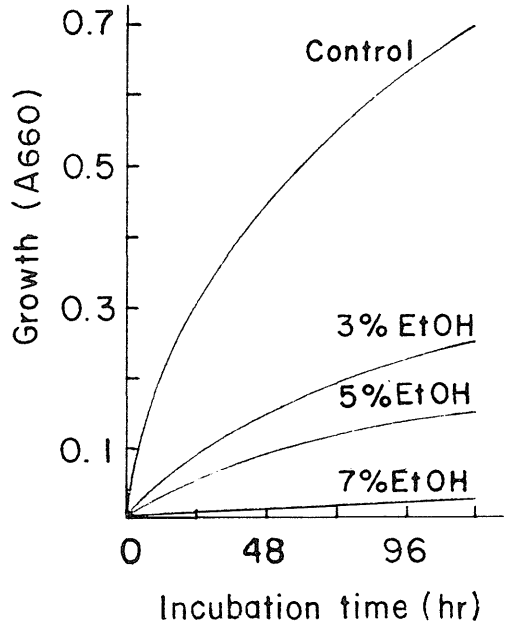


Fig.2 Ethanol tolerance of *Acetobacter aceti* IFO 3281

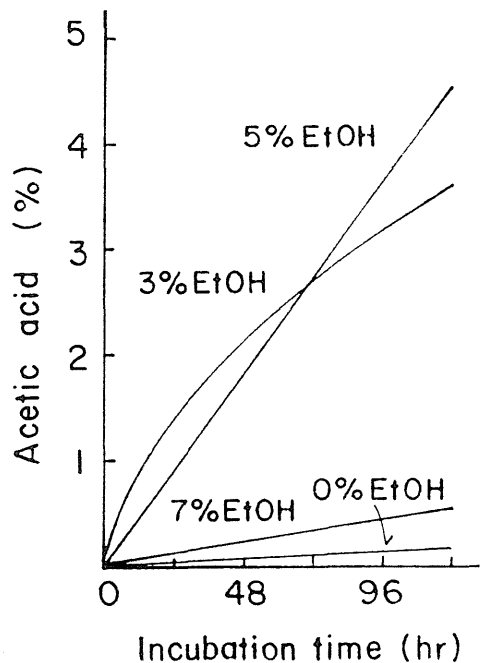


Fig.3 Effect of ethanol concentration on acetic acid production.

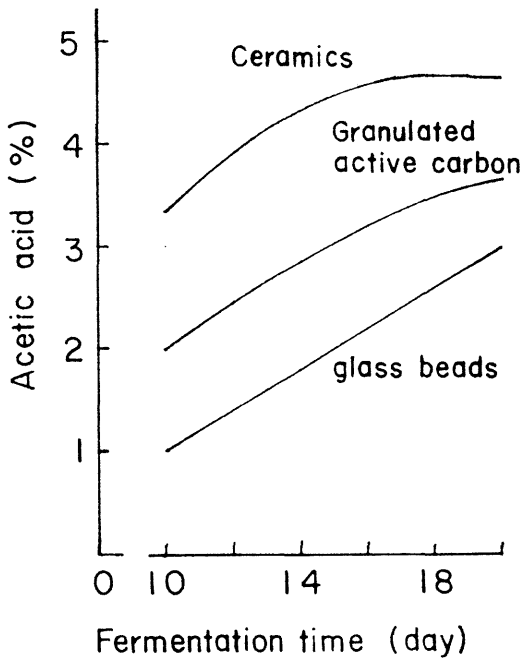


Fig.4 Selection of carrier

Table 1 Carriers and the rate of acetic acid production

Carrier	Acetic acid production (% / day)
Glass beads (16 mm)	0.16
Granulated active carbon (4mm x 6mm)	0.19
Ceramics	0.32

成能を示した。しかしセラミックの場合、醸酵液が僅かに硫化水素臭を帯びたため、回分式醸酵では粒状活性炭を担体として用いた。なお粒状活性炭を用いた場合の酢化速度は0.19%/dayであった (Table 1)。

3. 回分式醸酵

担体に予め培地成分を吸着させた後酢酸菌を附着させ、

醸酵を開始した。Fig. 5 の結果から明らかなように、第1回目から酢酸生成は順調で、酢化速度も0.22%/dayとTable 1 の値よりも高い値を示した (Table 2)。

また回分式醸酵を重ねることにより、酢酸生成能は徐々に高まり、4回目の酢化速度は0.31%/dayとなった。この理由は恐らく担体附着の酢酸菌量が増加し、リアクター全体として酢酸菌の密度が高まったためと思われる。

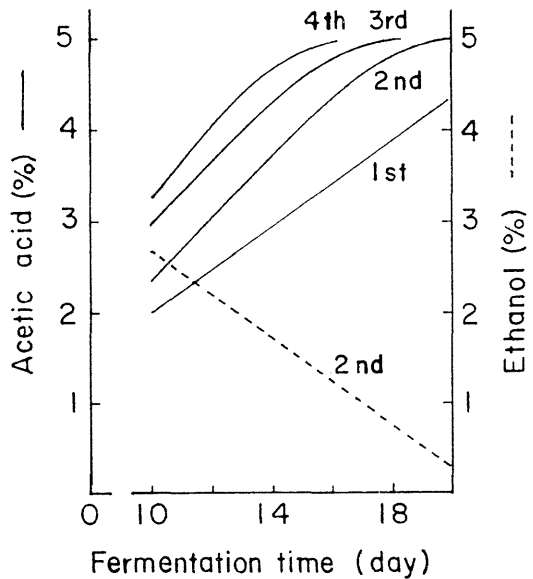


Fig.5 Batch fermentation

Table 2 Batch fermentation and the rate of acetic acid production

Batch fermentation	Acetic acid production (% / day)
1 st	0.22
2 nd	0.26
3 rd	0.28
4 th	0.31

考 察

我が国の酢酸(食酢)醸造技術はAD400年頃、中国より伝えられたといわれている³⁾。当初は米や酒粕を原料とし、かめ仕込み(表面醱酵法)で醸造されていたが、その後種々の原料が使われるようになり、黒糖酢、かき酢、そば酢、りんご酢、こんぶ酢など特有な風味を持つ酢酸(食酢)が開発された。

一方、酢酸は食品加工原料として大量に消費されるようになり、醸造技術も18世紀以降大きな発展をみせた。とくに1932年に開発され、その後改良を重ねて完成したフリingsジェネレーター⁴⁾は一種のバイオリクターであり、現在も世界の各地で稼働している。また1950年代には、酢化速度としてはジェネレーターの10倍(3.84%/day)の性能を有するフリingsアセテーター⁵⁾が開発され、実用化された。1970年代になると塔型醱酵も盛んになり、Kennedyら⁶⁾はGreenshildsのタワーフェメンターを用いて、凝集菌体法による固定化醱酵を行った。この方法による酢化速度は6.0%/dayとアセテーターを凌ぐ性能をおさめたが、凝集菌体を保持するため毎日凝集剤を添加しなければならない点が問題であった。1984年、森ら⁷⁾は気泡攪拌式の流動槽型リアクターを用い、カラギーナンゲルに包括した固定化酢酸菌で連続醱酵を行い、9.6%/dayの酢化速度を得た。さらに大菅ら⁸⁾は酸素の供給と流動性を高め、ゲルビーズにかかる力を軽減したエアリフト型リアクターを開発し、酢化速度12%/dayを得た。このようにバイオリクターとしては高い性能を持つ装置が考案され、酢化速度の点では表面醱酵法の数十倍の値を示す装置が試作されているが、酢酸生成能の安定性、経済性など総合的な見地に立てば、前述のジェネレーターやアセテーターに勝る装置はない、といわれている。

酢酸菌の固定化法としての付着菌体法は、凝集菌体法や包括菌体法にくらべ古典的な固定化法であるが、酢酸醱酵用バイオリクターでは今なお盛んに研究されている。Ghommidhら⁹⁾はセラミックモノリスに酢酸菌を付着させたリアクターを開発した。また奥原¹⁰⁾はポリプ

ロピレンの綿状繊維を、南波ら¹¹⁾はポリプロピレンのホロファイバーを用いて酢酸菌を付着させ、連続醱酵を行って好結果を得た。しかしいずれも実用化までには経済的な問題を解決しなければならない、といわれている。

著者らが試作した二塔式サイフォン型リアクターは、基質液を間歇的に散布する点ではサイフォンバレルと同じ発想に基づくものであり、酢酸菌を付着菌体法で固定化した点はジェネレーターに近いものである。しかし一台のポンプで全操作(送液、通気)が可能である点では経済的に有利なバイオリクターといえることができる。また固定化された酢酸菌全体が間歇的に基質液に浸漬されるため、生成酢酸を十分に回収できるとともに、酢酸菌への栄養分の供給も均一に行うことができる利点がある。一方、本装置における酢化速度は0.31%/dayと極めて低く、これは攪拌付角型醱酵槽による表面醱酵法(0.34%/day)やジェネレーター(0.38%/day)よりも低い値であった。このように本装置において酢化速度が低かった原因の一つは、担体の体積に対し基質液量が約4倍と、非常に高かったことがあげられる。従って適正な基質液量、例えば2倍程度の基質液量を用いれば現在の酢化速度の2倍以上の値を得ることは可能であろう、と考えている。また本装置における基質液の循環速度は下部抽出器からの基質液の落下速度が律速となり、スケールアップが難しいなど、解決すべき課題もある。今後は本装置の改良を含め、酢酸醱酵用ニューバイオリクターの試作を行っていきたいと思っている。

なお本研究において供試された酢酸菌は、一般に公開された菌種であり、酸度も4~5%と低いものであった。現在は酸度14%に達する酢酸菌も分離されている。実用化という視点に立てば、このような高酸度生産菌を用いることも重要であろう。

要 約

酢酸醱酵に用いるバイオリクターとして、二塔式サイフォン型バイオリクターを試作し、その性能について検討した。

1. 供試菌(*Acetobacter aceti* IFO 3281)の

酢酸生成能は、酸度として約5%（基質：5%エタノール含有培地）であった。

2. 酢酸菌の固定は付着菌体法で行った。担体として粒状活性炭を用いた場合、酢化速度は0.19%/dayであった。

3. 粒状活性炭を担体として、培地成分を予め担体に吸着させた結果、酢化速度は0.22%/dayと高くなった。なお回分式で醸酵を行ったところ、4回目で酸化速度は0.31%/dayと高くなり、担体付着菌体密度の増加が示唆された。

文 献

- 1) 森 明彦：醸協，**81** 601 (1986)
- 2) 森 明彦：微生物 **4** 40 (1988)
- 3) 正井博之：微生物 **4** 3 (1988)
- 4) Prescott S.C. and Dunn C.G. : Industrial Microbiology 2nd ed. p.428 (1959) McGrawHill.
- 5) Hromatka O. and Ebner H. : Ind. Eng. Chem. **51** 1279 (1959)
- 6) Kennedy J.F., Humphreys J.D., Barker S.A. and Greenshields R.N. : Enzyme Microb. Technol. **2** 209 (1980)
- 7) 大菅順一・森 明彦・加藤錠治：J. Ferment. Technol. **62** 139 (1984)
- 8) 大菅順一・梅本和夫・森 明彦：特開昭60-168377 (1985)
- 9) Ghommidch C., Navarro J.M. and Durand G : Biotechnol. Bioeng. **24** 605 (1982)
- 10) 奥原 章：J. Ferment. Technol. **63** 57 (1985)
- 11) 南波 章・木村清之・永井史郎：J. Ferment. Technol. : **63** 175 (1985)

Acetic Acid Fermentation by Immobilized *Acetobacter* Cells

KENICHI HASEGAWA and MASAKAZU TSUTSUMI

This study was carried out to develop a new type of immobilized cell reactor for acetic acid production. A double siphon-type reactor was made on trial and the production efficiency of acetic acid was tested. The strain used was *Acetobacter aceti* IFO 3281. Living *Acetobacter* cells were immobilized on a carrier by adsorption.

Results obtained were as follows :

- 1) Among the different type of carriers available, a granulated active carbon was selected. This had good mechanical properties and was chemically inert. The rate of acetic acid production by the cells immobilized was 0.19% per day.
- 2) Batch fermentation was performed using the reactor. The rate of acetic acid production increased to 0.31% per day when the fermentation was repeated 4 times. This result shows that significantly higher cell concentrations were achieved on the carrier.

(Sci. Rep. Fac. Agr. Ibaraki Univ., No.36, 53~58, 1988)