

- 松島: 醸工, **31**, 367 (1953). 7) 徳岡: 醸学, **25**, 71 (1947). 8) 加藤: 醸学, **2**, 601 (1924~5).
 9) 岡崎: 農化, **24**, 88 (1950). 10) 大島: 札幌林報, **16**, 235 (1924). 11) 松山: 醸工, **28**, 149 (1950).
 12) 村上: 醸協, **47**, 62 (1952). 13) 入江: 農化, **28**, 550 (1954). 14) CREWTER, W.: Aust. J. Biol. Science Research Service **6**, 410 (1953). 15) 吉田: 農化, **28**, 66 (1954); **29**, 175 (1955).
 16) 城: 合技報, **8**, 80 (1955). 17) 黒野, 滝沢: 醸試報, **115**, 41 (1932). 18) 松島: 醸工, **32**, 58 (1954). 19) 根平, 能美: 醸工, **34**, 391, 1956; **34**, 423, 1956, **34**, 457 (1956).
 (昭和 31, 12, 18 受理)

高層堆積通気法による工業的培養 I. クエン酸醱酵の場合

照井堯造・芝崎 勲・望月 務 (大阪大学工学部醸酵工学教室)

I. 緒 言

近年その技術に長足の進歩をみた深部培養方式はクエン酸醱酵にも工業的に採用されつつあるが、一般にクエン酸の収量は供試原料中の不純物に左右されることが多く、屢々原料の前処理を必要とし、且つ動力費も表面培養に比してかなり大であつて、未だ必ずしも決定的に有利な方法とは云えない。

1944年著者の1人照井は甘藷或いはその澱粉粕を原料とする高層堆積培養方式を提案し¹⁾、以来これに関する基礎的な研究を行つて来た²⁾。この方式ではクエン酸の生産のみならず諸種の工業酵素の生産にも適することが見出され、従つて量産方式として優れている深部培養方式に対し原料並びに動力費の吾国の実情より勘案し大いに検討の余地あるものと思考せられる。Chas. Pfizer & Co.では shallow pan により古くよりクエン酸を生産しているが、最近 Kemball Bishop Co.が同法にて生産を開始した³⁾事情も一考に値する。

固形培養においては代謝熱による品温過昇と過度の乾燥とを防ぎつつ、空気の供給を行う必要があり、その型式として薄層法(麹式とその機械化方式)、回転ドラム法及び高層堆積法の3方式が考えられるが、量産方式としては後2者が問題となる。その何れにおいても冷却方式について一段の工夫を要するが、最も普通に考えられるのは水管冷却であり、これにより水分のある程度の保留と温度調節とを行うことができる。

本報告では甘蔗糖蜜を主原料とした堆積培養において、量産に適用可能な副原料或いは原料処理方法を予備的に検討し、冷却管付堆積培養装置を試作して中間工業的な試験を実施した結果について述べる。澱粉粕を原料とする場合については別の機会に譲る。

I. 実験方法

A. 培養装置

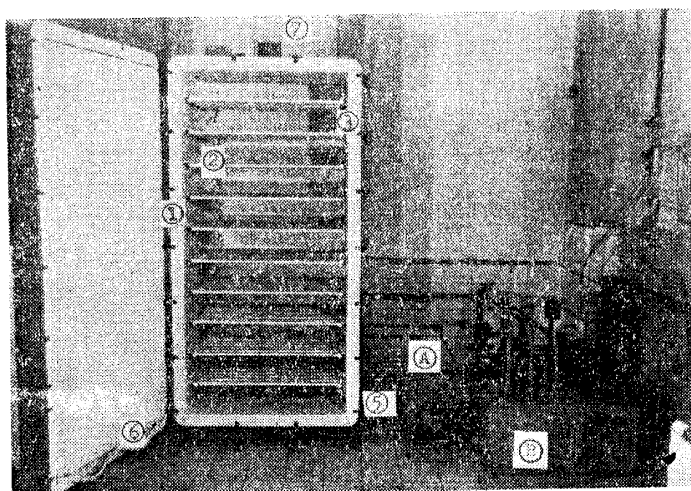


Fig. 1a. Chest of incubator I and its attached equipment. Air humidifier ④ and the device for water circulation through thermostat ⑤ are shown.

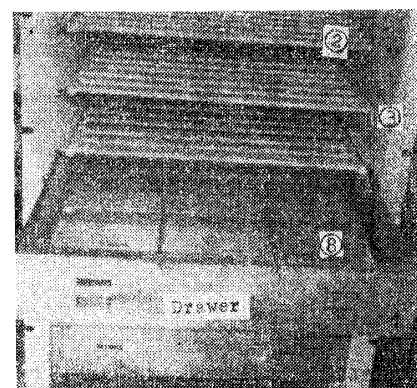


Fig. 1b. Drawer of incubator I.

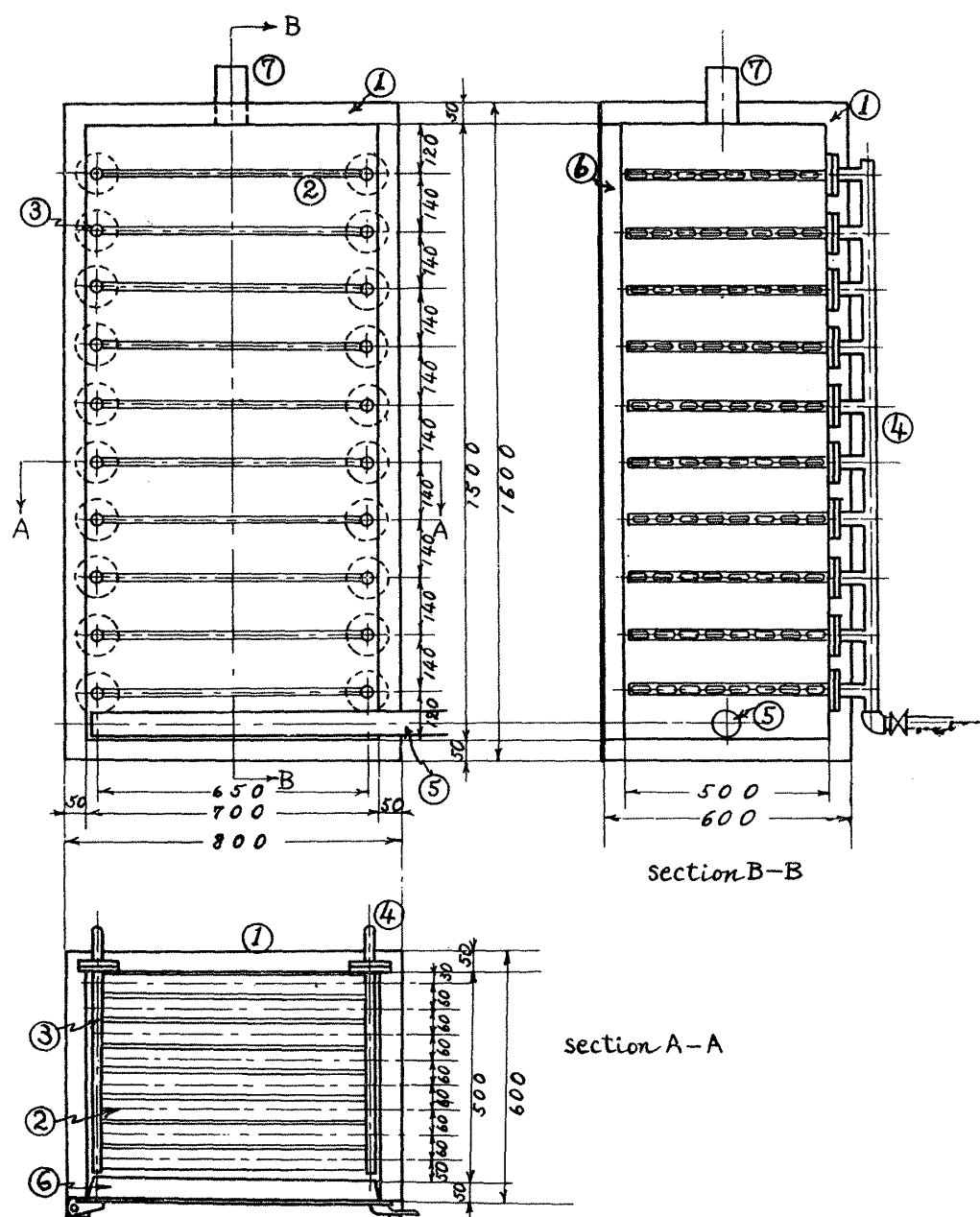
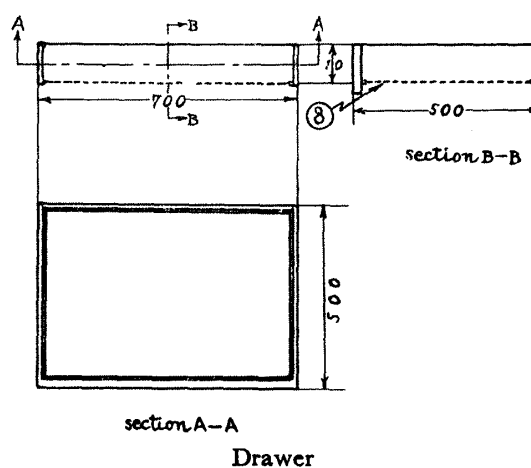


Fig. 1c. Outline plan of incubator I (1/20 scale)

- (1) Hulls-packed iron wall of incubator chest, inner wall being vinyl-coated.
- (2) Vinyl-coated copper pipe (3/4", flattened).
- (3) Inner collecting tube.
- (4) Outer collecting tube.
- (5) Air inlet (sparger).
- (6) Front door of incubator chest.
- (7) Air outlet.
- (8) False bottom with nylon netting.



(108)

(照井, 芝崎, 望月) 高層堆積通気法による工業的培養

たもので仕込容量約 400l である (Fig. 3).

Table 1 には各型式の培養装置の伝熱係数 (培養物充填時) 並びに冷却面積を示した.

B. 培養操作

輸入廃糖蜜又は精製糖蜜を主原料として用い, その分析値は Table 2 に示す. 20~30%加水した糖蜜に米糠又は麩を加え 90~95°C, 20~30分加熱し約 40°C迄放冷後水を加えて希釈し定容となす.

これに *Asp. niger* の供試菌株の孢子懸垂液を加え (0.01~0.05%の割合) よく混合した後, 混合槽内で坦体と混和し培養装置に仕込む.

Table 1. Heat transfer coefficients and areas of cooling pipes.

Incubator	Over-all coefficient of heat transfer, U. (kcal/m ² ·hr·°C)	Area of heat transfer, A. (m ²)	A
			Liters of culturing material (m ² /l)
I	16.6	4.40	0.0147
II	86.2	0.47	0.0028
III	82.5	1.82	0.0047

Table 2. Composition of cane molasses employed.

	Refinery molasses (%)	Blackstrap molasses (Formosa) (%)	Blackstrap molasses (Philippines) (%)
Water	19.0	17.7	20.7
Total sugar	62.8	56.7	63.7
Reducing sugar	22.7	20.9	28.9
Total N	0.31	0.69	0.35
Ash	6.78	8.92	4.90
Iron	0.0662	0.0348	0.0155

供試菌株の種培養は麩或いは糖蜜-鋸屑培地で 30°C, 4~5 日培養したもの又はこれらの真空乾燥物を用いた.

坦体としては鋸屑を主として用い, 必要に応じて少量の粗殻を配合した. 前者は製材所より購入したもので杉, 松, 檜等の混合物であつて, 操作の定常状態では湿つたもの (回収物を主とし, 水分 40~50% 含有) を使用するものであるが, 本実験では便宜上水洗して風乾乃至は熱風乾燥したものをを用いた.

仕込配合例は Table 3 に示す.

Table 3. Raw materials used in preparing culture media.

Exp.	Incubator	Undiluted molasses (kg)	Bran (kg)	Saw dust (kg)	Rice-hulls (kg)	Total weight (kg)
2	I	50	1.0(r)	42.5	—	150
5	II	17	0.5(w)	17	3	63
6	II	18	0.5(r)	18	—	61
7	III	51	2.5(r)	100		200
8	II	18	0.5(r)	21	—	57

r = rice-bran ; w = wheat-bran

中間工業試験に供試した菌株は照井が 1940 年に澱粉質原料よりのクエン酸生産に適したものとして分離した *Asp. niger* T である.

仕込後約10時間前後より約30°Cに加温せられた増湿空気(関係湿度殆んど100%)を通じ, 循環水は代謝熱の発生と共に孵温々度(32°C附近)より徐々に低下せしめる。

通気速度は培養物1容量当り1分間に通ずる空気量を以て示す。

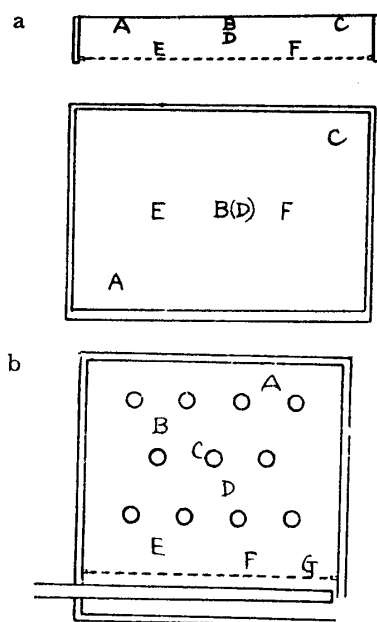


Fig. 4. Loci of thermometers inserted in incubators.

(a) A drawer of incubator I

(b) Incubator II

C. 測定法

培養物の温度はガラス温度計により Fig. 4 に示すような諸点で測定し, 又分析用試料も Fig. 4 に示す部分より採取した。培養終了後は各区分の培養物を十分混和しその平均試料をとつて分析に供した。

糖分は BERTRAND 法により求め, クエン酸はアルカリ滴定法より求めた。供菌株のクエン酸醗酵純度は既にペンタブロムアセトン法により検討済で適用条件下では蓚酸等の生成は微量である。

培養物中の糖分及びクエン酸 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 量はすべて乾燥物量当りの数値に換算して示した。

培養物の呼吸能の測定は WARBURG 検圧法を適用し, 30°C において乾燥培養物 1g 当り 1 時間に吸収又は発生する酸素又は炭酸ガスの ml 数で示し Q_{O_2} , Q_{CO_2} で表わした。培養物の実際の呼吸能は平均温度係数を別に求めておき, これを上記の値に乘じて概算した。

II. 予備実験

本研究に先立ち先ず *Asp. niger* に属する研究室保存菌株並びに新に各地の土壌試料より分離した菌株を供試してクエン酸生産能を比較すると共に種々なる添加物の影響をも検討した。培地としては糖蜜-鋸屑培地(全糖分15~20%, 水分50~55%)を用い, 100 乃至 500ml 容マイヤーフラスコ中堆積層 1~2cm となし 30°C で培養した(培養期間 3~4 日)。添加物質は培地調製時又は接種時に所定量添加した。培地は特記しない場合はすべて前処理或いは窒素源の添加は行わずに供試した。

A. 低級アルコールの影響

クエン酸, イタコン酸等の生成に対する低級アルコール及びそのエステルの影響については既に MOYER⁴⁾ が詳細に検討している。

糖蜜を原料とする堆積培養方式においてこれらの影響を比較検討した結果は Table 4 に示す。即ちこれらの効果は菌株, 糖蜜の種類により異なり, その効果が認められる場合も深部培養の場合のように顕著でなく且つ有効添加量も 1% 以上を必要とするので工業的見地よりする適用の価値は疑問である。

B. 諸種添加物質の影響

既にクエン酸生産促進物質として認められている諸物質を堆積培養方式に適用した結果は Table 5 に示す。

Table 4. Effect of methanol, ethanol and ethyl acetate.

Strain	Addition	Concentration (%)	Acidity attained	
			Refinery molasses	Blackstrap molasses (Philippine)
T	Methanol	—	12.0	10.4
		2.0	12.2	12.0
		3.0	11.2	13.0
	Ethanol	2.0	13.3	14.7
		3.0	5.0	13.0
	Ethyl acetate	1.0	10.6	11.2
		3.0	10.0	8.2

(110)

(照井, 芝崎, 望月) 高層堆積通気法による工業的培養

O-52	— Methanol	—	10.6	10.7
		0.1	9.4	9.1
		0.5	9.4	8.9
		1.0	10.8	9.9
		3.0	11.0	8.5
	Ethanol	0.1	9.6	10.7
		0.5	10.6	10.1
		1.0	12.5	11.3
		2.0	12.8	11.3
		3.0	5.5	5.8
U-2	— Methanol	—	10.3	11.1
		0.1	9.3	9.5
		0.5	8.9	8.5
		1.0	9.5	10.4
		3.0	10.2	11.5
	Ethanol	0.1	10.6	10.3
		0.5	10.7	10.7
		1.0	12.5	12.0
		2.0	11.0	13.2
		3.0	7.0	9.1

照井^{5), 6)} (1943) が既に表面培養において黄血塩, 赤血塩, クロム酸塩がクエン酸酸酵を促進することを認めたが, 殊に前二者の効果は再現性に富むものと思われる⁷⁾. しかし Table 5 で明かなように, この堆積培養においてはこれらの効果は何れの場合にも明らかに認め得ない.

Aconitase, Isocitric dehydrogenase の阻害剤として知られる諸物質の生酸促進効果も亦この実験では認め難い.

Table 5 The effect of various additions

(a) 1: Blackstrap molasses from Formosa.
2: Refinery molasses.
3: Blackstrap molasses from Philippine.

Strain	Molasses	Addition	Concentration (%)	Acidity	Strain	Molasses	Addition	Concentration (%)	Acidity
T	1	—	—	11.7	T	2	—	—	11.8
		K ₄ Fe (CN) ₆	0.1	10.8			K ₄ Fe (CN) ₆	0.1	9.9
		"	0.3	14.0			"	0.3	11.2
		K ₃ Fe (CN) ₆	0.1	13.3			K ₃ Fe (CN) ₆	0.05	10.2
		K ₂ CrO ₄	0.05	12.0			"	0.1	10.2
		"	0.1	14.5			"	0.2	9.7
T	3	"	0.2	12.8	O-52	2	K ₂ CrO ₄	0.05	10.5
							"	0.10	9.9
		—	—	10.4			—	—	10.7
		K ₄ Fe (CN) ₆	0.1	10.4			K ₄ Fe (CN) ₆	0.03	10.3
		"	0.3	12.2			"	0.1	10.5
		K ₃ Fe (CN) ₆	0.05	10.1			"	0.3	11.6
O-52	3	"	0.2	9.4			K ₃ Fe (CN) ₆	0.01	11.1
		K ₂ CrO ₄	0.05	9.8			"	0.05	10.6
		"	0.1	10.2			"	0.2	12.6
		—	—	10.8			K ₂ CrO ₄	0.01	10.9
		K ₄ Fe (CN) ₆	0.03	10.8			"	0.05	10.2
		"	0.1	10.5			"	0.2	10.6
U-2	2	"	0.3	11.4	U-2	2	—	—	10.4
		K ₃ Fe (CN) ₆	0.01	11.3			K ₄ Fe (CN) ₆	0.03	10.5
		"	0.05	10.2			"	0.1	11.0
		"	0.2	12.1			"	0.3	11.7
		K ₂ CrO ₄	0.01	11.0			K ₃ Fe (CN) ₆	0.01	11.3
		"	0.05	10.8			"	0.05	10.9
O-52	3	"	0.2	10.9			"	0.2	13.5
		—	—	10.8			K ₂ CrO ₄	0.01	10.9
		K ₄ Fe (CN) ₆	0.03	10.8			"	0.05	10.4
		"	0.1	10.5			"	0.2	10.1
		"	0.3	11.4					
		K ₃ Fe (CN) ₆	0.01	11.3					

(照井, 芝崎, 望月) 高層堆積通気法による工業的培養

(111)

U-2	3	—	—	11.0	O-52	1	—	—	14.3
		K ₄ Fe (CN) ₆	0.03	11.4			K ₄ Fe (CN) ₆	0.1	13.0
		//	0.1	11.7			K ₃ Fe (CN) ₆	0.1	12.6
		//	0.3	9.7			—	—	—
		K ₃ Fe (CN) ₆	0.01	10.7	U-2	1	—	—	12.6
		//	0.05	10.9			K ₄ Fe (CN) ₆	0.1	12.8
		//	0.2	11.8			K ₃ Fe (CN) ₆	0.1	13.1
		K ₂ CrO ₄	0.01	10.5			—	—	—
		//	0.05	10.7	On-81	1	—	—	11.8
		//	0.2	11.3			K ₄ Fe (CN) ₆	0.1	12.5
							K ₃ Fe (CN) ₆	0.1	15.2

(b)

Strain	Added nutrient source	Concentration (%)	without iron cyanide	with K ₄ Fe(CN) ₆ (0.3%)	with K ₃ Fe(CN) ₆ (0.1%)
T	—	—	13.2	12.9	13.1
	Rice bran	2.0	16.6	17.3	17.1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2	13.6	14.7	14.1
	NH ₄ NO ₃	0.1	14.2	14.4	14.8
48-20	—	—	12.1	12.5	12.3
	Rice bran	2.0	13.6	12.8	13.8
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2	12.5	13.3	13.2
	NH ₄ NO ₃	0.1	12.0	13.3	12.9
O-52	—	—	9.7	11.3	10.8
	Rice bran	2.0	12.8	13.6	11.9
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2	10.3	12.4	12.3
	NH ₄ NO ₃	0.1	11.6	12.5	11.9

(c) *Asp. niger* strain T, with refinery molasses.

Experiment	Addition	Concentration (%)	Acidity	Experiment	Addition	Concentration (%)	Acidity
1	—	—	13.5	3	Morpholine	0.03	9.5
	Morpholine	0.03	12.8			0.1	9.3
		0.1	12.5			0.3	8.5
		0.3	11.5		Quinine hydrochloride	0.01	10.0
	HgCl ₂	0.001	13.7			0.03	9.5
		0.0036	11.9			0.1	8.9
		0.018	3.6		—	—	12.3
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.01	14.4		KCN	0.00065	11.4
		0.035	14.4			0.00234	12.5
		0.1	14.1			0.023	12.3
		0.35	12.5			0.234	13.2
	Pb(NO ₃) ₂	0.002	14.7	3	Sodium arsenate	0.0018	11.9
		0.02	13.3			0.0073	11.7
		0.17	12.5			0.022	7.7
	ZnSO ₄	0.01	14.0			0.13	0.9
		0.035	14.4		NaF	0.0005	10.1
		0.1	14.1			0.0015	10.1
		0.35	12.6			0.005	8.1
	Ni(SO ₄) ₂	0.006	13.7			0.030	7.4
		0.02	13.2		α,α'-Dipyridyl	0.0003	11.6
		0.06	12.6			0.0014	11.6
		0.17	12.3			0.0055	11.4
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.002	13.5			0.031	10.6
		0.006	14.0				
		0.017	14.5				

(112)

(照井, 芝崎, 望月) 高層堆積通気法による工業的培養

2	AgNO ₃	0.0012	15.6	Monoiodoacetic acid	0.0033	11.7
		0.012	11.1		0.0073	12.0
		0.12	8.8		0.025	10.3
					0.145	1.8
	Potassium pyrophosphate	0.003	9.7	Sodium fluoracetate	0.003	11.2
		0.01	10.7		0.01	11.1
		0.03	9.2		0.07	6.7
		0.1	9.1		0.23	4.8
	Sodium bisulfite	0.003	10.3	Oxine	0.003	12.1
		0.01	10.4		0.01	11.8
		0.03	10.1		0.02	10.7
		0.1	9.5		0.10	7.7
	Ethanolamine	0.01	9.9	Pentachlorophenol	0.0003	12.1
		0.03	10.8		0.0014	11.5
		0.1	11.0		0.007	12.4
				Benzalconium chloride	0.0003	12.2
					0.0017	11.8
					0.0035	11.3
					0.007	11.6

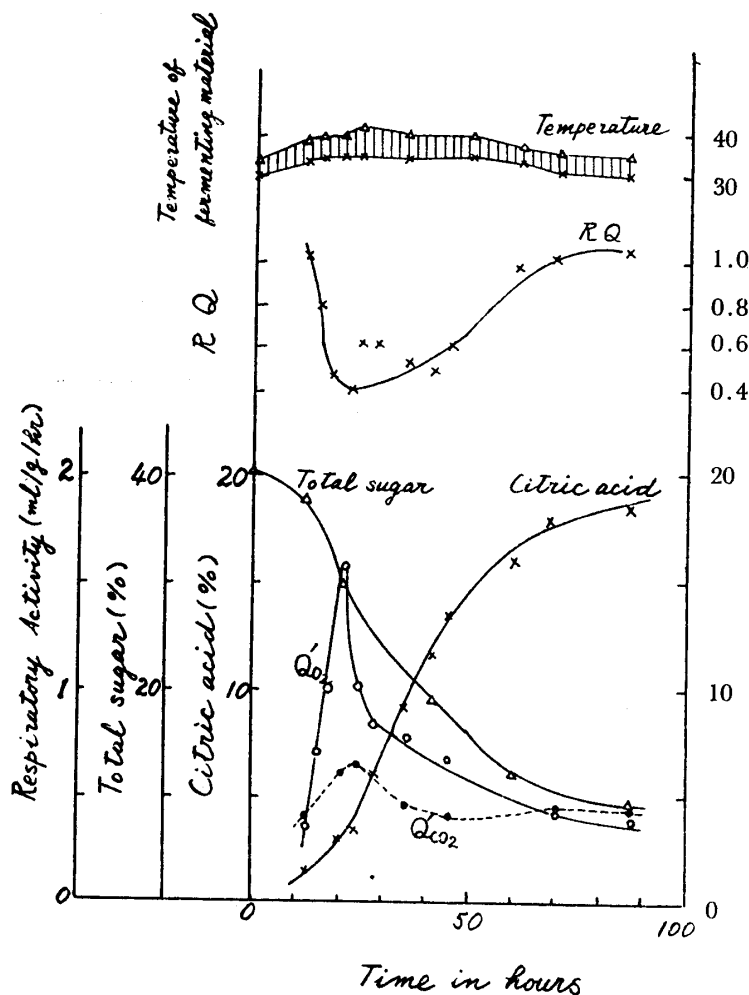


Fig. 5. Time-course of the fermentation.
Incubator II. composition of medium: cf.
Table 3, Exp. 6. aeration rate: 0.25.

IV. 中間工業試験結果

以上の予備試験より明かなように原料糖蜜に米糠, 麴, 或いはアンモニウム塩の添加によりクエン酸収量の増加が認められるので以下の中間工業試験には Table 3 に示すように米糠或いは麴を添加した。

A. 醗酵経過

クエン酸醗酵経過の 1 例は Fig. 5 に示す。培養管理が良好な場合培養装置の何れの型式においても大体醗酵経過は Fig. 5 に示した代表例のようになることが多くの実験結果から認められる。

$Q'o_2$ の値はクエン酸生産の初期に最高の値を示し, $Q'co_2$ も同時期に最高値を示すが前者より緩慢な変化を示している。一方クエン酸生成速度 (即ちクエン酸曲線の傾斜) も殆んど同時に最大値となる。この呼吸能並びにクエン酸生成力の特に大なる期間は大体 20 時間前後で, RQ 値もこの期間に最低値 (例えば 0.5 或いはそれ以下の値) を示し, この値は以後徐々に上昇し, クエン酸生産が停止するまでは, 1.0 より低い値が保たれる。

クエン酸の大部分は 10~70 時間の間に蓄積され醗酵終了は 70~90 時間の間であつた。品温が 30~40°C に保たれる場合, 全糖の 50% のクエン酸の蓄積が認められる。この結果は通気速度が 0.25 というように低い場合

にもえられるが, このような場合には品温の部分的過昇が避けられない。

Table 6 には多くの培養実験に於ける経過例を示してある。クエン酸の生産速度は培養管理が正常に行われる場合 3~4 g/kg/hr である。糖消費はクエン酸蓄積の最大な時期でも 85% 以下であつた。

Table 6. Some examples of citric acid production by heap culture process.

(Contents of sugar and acid are expressed on dry basis)

a. Sugar consumption and remarks

Exp.	Initial sugar (%)	Time elapsed for sugar consumption to attain		Sugar consumption at the maximum yield (%)	Aeration rate (vol/vol/min)
		50%	75%		
2	29.3	43	90	78.5(104 hr)	ca 1.0
5	36.4	38	95	79.4(84 hr)	0.25
6	40.5	39	79	84.2(93 hr)	//
7 #	37.2	30	57	81.9(68 hr)	1.40
8 ##	37.2	50	>90	76.8(108 hr)	0.25

Excess moisture in the culture medium

Overheat on the earlier phase of culture.

b. Citric acid formation

Exp.	Active fermentation phase		Max. accumulation of the acid (%)	Acid yield in per cent of	
	Time range (hr.)	Average velocity of acid formation (%/hr)		sugar added	sugar consumed
2	20~65	0.29	14.5	49.3	62.8
5	12~65	0.33	18.9	51.8	72.2
6	20~50	0.39	18.8	46.4	61.0
7	10~65	0.18	14.0	37.4	45.6
8	15~85	0.19	15.1	40.5	52.9

c. Respiration

Exp.	Max. $Q'O_2$ (age of culture, hr.)	Min. RQ (age of culture, hr.)	Time range in which RQ was less than unity (hr)
6	1.50 (21)	0.40 (20)	12~90
7	1.82 (18)	0.27 (18)	13~63
8	1.24 (13)	0.34 (13)	<13~76

Table 7. Some examples concerning distributions of water and citric acid contents.

a) Incubator I; aeration rate=ca 1; composition of medium: cf. Exp. 2, Table 3.

Drawer no.*	Location**	Moisture content (%)	Citric acid (%)
10	A	50.7	14.3
	B	50.7	11.7
	C	50.7	16.7
	D	52.8	13.8
	E	43.1	15.2
	F	43.1	16.9
6	A	45.2	12.9
	B	45.2	13.3
	C	45.2	14.0
	D	58.8	16.0
	E	43.2	14.1
	F	43.2	14.3

B. 堆積層における温度, 水分及びクエン酸の分布

高層堆積培養においては堆積層内の温度, 水分, 反応速度, クエン酸蓄積が不均一なことは避けられない事実である。

Table 7, Fig. 4, 6 には堆積層の各箇所より採取した試料の水分並びにクエン酸量を示す。堆積層内の著しい不均一性は冷却管に直接接触しているか否かによつて現われるもので, 冷却管直下の培養物は凝縮水により異常に水分が高く(60%或いはそれ以上)従つて基質や栄養物質の稀釈によりクエン酸蓄積も少い。しかし Table 7 a の場合の様に通気速度の大なる場合はこの様な不均一性はあまり目立たなくなる、

(114)

(照井, 芝崎, 望月) 高層堆積通気法による工業的培養

4	A	51.1	16.9
	B	51.1	12.2
	C	51.1	14.2
	D	47.7	15.4
	E	40.1	13.5
	F	40.1	14.0
2	A	36.6	14.2
	B	36.6	10.6
	C	36.6	15.1
	D	46.3	14.4
	E	44.3	13.0
	F	44.3	16.8

* Number started from the bottom drawer.

** Cf. Fig. 4 (a)

b) Incubator II; aeration rate=0.25; composition of medium: cf. Exp. 5, Table 3.

Location*	Moisture content (%)	Citric acid (%)
A	51.2	16.8
B	62.9	4.8
C	62.9	8.1
D	51.2	18.3
E	51.2	17.5
F	44.1	16.0
G	62.9	9.5
H	44.1	12.9
I	52.0	17.2
J	52.0	24.5
K	52.0	18.6
L	63.9	5.8
M	63.9	5.8
N	50.2	18.8
O	50.2	18.5
P	45.8	18.8
Q	45.8	19.3

* Cf. Fig. 6

Table 8. Some examples of temperature distributions in fermenting heaps.

Conditions for each incubator: cf. Table 6.

The loci of temperature measurement in incubators are the same as indicated in Fig. 4

Incubator	Location	Temperature (°C) at			
		15hr	24hr	40hr	80hr
I	A	30	31	32	31.5
	B	30	32	33	30.5
	C	28	28	29	29.0
	D	31	40	34	31.5
II	A	31	38	35.5	32.0
	B	31	38	34.5	34.5
	C	32	39	33	31.5
	D	32	40	33	32.0
	E	28	36	30	27.5
	F	28	36	33	29.5
	G	27	33	33	29.0

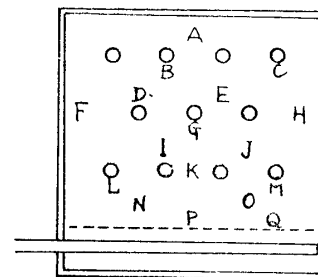


Fig. 6. Loci of sampling

培養容器 I 及び II の様に堆積層の比較的高い場合は高さによる影響があらわれるが、これは通気速度の増大により軽減されることが認められる。Table 8, Fig. 4 には堆積層内の温度分布を例示してある。

堆積層内の温度、水分、クエン酸蓄積量等の分布状態は通気の為の空気温度によつても、堆積層の緻密度によりても変動するものと考えられる。

C. 代謝熱の移動

固形培養において大量且つ高層に堆積する場合最も重要なことは堆積層より代謝熱を除去することである。好気醗酵における代謝熱の大部分は酸化反応に由来し、この場合の酸化反応は正常酸素呼吸（基質の完全燃焼）と糖よりのクエン酸生成反応とであつて、他の生理学的変化に伴う熱量は熱収支の大略の計算には無視できるものである。

正常酸素呼吸では糖を基質とする際 5.0cal/mlO_2 、クエン酸生成反応 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 1\frac{1}{2}\text{O}_2 = \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 + 2\text{H}_2\text{O}$ では 5.95cal/mlO_2 の熱量が発生する。従つて次式によつて代謝熱 H_M [kcal/kg (培養物乾燥量)/hr] が算出できる。

$$H_M = 5.0 \frac{Q'_{\text{CO}_2}}{RQ'} + 5.95 \left(Q'_{\text{O}_2} - \frac{Q'_{\text{CO}_2}}{RQ'} \right) \\ = 5.95 Q'_{\text{O}_2} - 0.95 \frac{Q'_{\text{CO}_2}}{RQ'} \quad \dots\dots\dots (1)$$

(1) 式において RQ' は仮想呼吸商であつて、次の如く定義できる。

$$RQ' = \frac{Q'_{\text{CO}_2}}{(Q'_{\text{O}_2} - Q'_r)}$$

但し Q'_r はクエン酸生成反応の酸素摂取に対応する Q' 値である。

従つて RQ' 値はクエン酸生成のための酸素摂取が他のガス代謝に何等影響を与えずに停止されたと仮定した場合、ガス代謝の測定値より直接もとめら

れる。RQ' 値は照井の提案した炭素収支及び酸化還元収支より算出できるが、この報告では RQ' = 1 とおいて簡単化した。即ち RQ' 値は正確には 1 ~ 1.2 の範囲にあると考えられるが、簡単化により生ずる誤差はこゝでの概算の上には大した問題とならないと考えられる。一方吾々は空気及び冷却水の測定温度並びに流量より代謝熱を算出した。熱量算出に用いた記号は次の如くであり、 H_M は(2)式により計算出来る。

Nomenclature

H_W = heat absorbed by cooling water per hour.

H_A = difference, on the average, in total heat content between inlet and outlet air in an hour's observation.

H_S = change in heat quantity caused by difference in temperature of culture medium at the start and the end of an hour's observation.

H_C = heat evolved from the walls of incubator (heat by radiation was neglected) per hour.

W = quantity of cooling water supplied per hour.

L = quantity (kg on dry basis) of air supplied per hour.

M = quantity of culture media in the incubator (kg on dry basis).

a = total area (in m^2) of incubator wall.

U' = overall heat transfer coefficient of incubator wall.

Δt_W = temperature difference between inlet and outlet water.

Δt_M = difference in heap temperature at the start and the end of an hour's observation.

Δt_C = temperature difference between culture and the exterior of the incubator.

Δi = difference in enthalpy between inlet and outlet air (kcal/kg)

C_W = specific heat of water

C_M = specific heat of culturing material

$H_M = H_W + H_A + H_S + H_C \dots \dots \dots (2)$

但し $H_W = WC_W \cdot \Delta t_W$

$H_A \cong L \cdot \Delta i$

$H_S = MC_M \cdot \Delta t_M$

$H_C = a \cdot U' \cdot \Delta t_C$

Table 6 における実験結果より求めた代謝熱は Table 9~11 に示す。(2)式より計算した代謝熱の発生経過は Table 9 に示してあるが、1 時間に発生する最大熱量は約 20kcal/kg である。

Table 9. Metabolic heat evolved.

Exp.	Age of culture (hrs)	H_M in kcal/kg/hr. (by heat balance)
5	14~15	11.2
	19~20	18.3
	36~38	7.1
	64~69	6.2
	84~94	4.8
6	12~14	9.4
	15~19	10.6
	20~24	17.6
	25~27	20.8
	35~41	14.9
	44~46	13.6
	61~66	3.9
	71~93	4.1

Table 10. Metabolic heat at the peak of respiratory activity

Exp.	Age of culture (hrs)	H_M , kcal per kg (dry basis) of fermenting culture per hour computed on the basis of	
		heat balance	metabolic activity
5	19~20	18.3	
6	20~24	—	18.5
	25~27	20.8	—
7	15~18	19.4	20.6
8	14~17	10.4	14.0

Table 11. Distribution of metabolic heat at the peak of respiratory activity.

Exp.	Incubator	Aeration rate	H_M	H_W	H_A	H_S	H_C
6	I	0.25	100	80.9	3.7	3.6	11.8
7	II	1.40	100	62.6	18.4	0.7	18.3

(116)

(照井, 芝崎, 望月) 高層堆積通気法による工業的培養

Table 10には(1)式より求めた H_M を比較の為に示した。供試した培養容器は多少絶縁性は悪いけれども代謝熱に対して1種の大型カロリーメーターとも考えられる。Table 11には各交換熱量の分布の1例を示したが代謝熱の約70%は冷却水に持ち去られることが明かである。

容器からの放出空気による熱伝達は通気速度に左右せられ通気速度0.25の場合には代謝熱の僅か4%に過ぎないが1.4の場合は20%にも達した。

V. 考察並びに総括

高層堆積培養方式は Mold bran 或いは類似の培養に十分利用でき、従来よりも能率的な方法となる可能性が認められる。培養容器に設けられた冷却管は培養物より代謝熱を除去するのに重要な役割を演じ、適切な通気速度を採用することにより高層培養に成功し得る。

本報では鋸屑を担体とした糖蜜培地を用いて中間工業的規模でクエン酸醱酵を行つた。予備試験より明かなようにこのような培地ではクエン酸生産の促進剤として報告されている多くの添加物質の効果は現われなかつたが米糠或いは麩の少量添加はクエン酸収量を上昇せしめることができる。

培養管理の不適當な場合例えば通気速度が低い場合 (0.25 vol./vol.), 培養物の水分、温度及びクエン酸蓄積量に著しい不均一性が認められ、特に冷却管直下部位では凝縮水の蓄積が甚しい。しかしこの部分の全体に対し占める割合は比較的少く、この状態は又通気速度を増加することによつて改善される。

クエンの収量は培養管理の良好なとき初糖に対して約50%に達するが、管理操作の改善、培養容器の構造、菌株等の改良によりこの収量は尚向上するであろう。醱酵、呼吸能、RQ 変化、糖消費についての時間的経過を検討したところ、クエン酸生成速度の最大な時期、RQ 値の最小値、更には呼吸能の最大を示す時期は醱酵の比較的初期の段階にあり殆んどそれらの時期が一致しているのを見た。又 RQ の値が1以下に保たれる期間の長さはクエン酸収量と密接な関係にあることが認められる。

代謝熱はガス代謝よりの計算と培養容器の熱収支との両者から別個に求めたが、これ等の値は大体一致しており、呼吸能の最大時に培養物より発生する熱量は培養物乾燥量(kg)当り約20kcal/hrに達することが判つた。

実験条件下では冷却管の役割は大であり、代謝熱の約70%が冷却水に伝達される。しかしこの様な熱伝達は培養物内を通過する空気により仲介せられるものと考えられ、培養物より直接に冷却管への伝達は当然比較にならないほど僅少なものと考えられる。即ち湿潤空気が培養物に接触して加熱せられて温度の上昇を来し、水分を取得して飽和される。次いでその空気は冷却管により冷却され、水分の若干が凝縮する。この様に冷却せられた空気は再び培養物に接触する。これを繰返して空気が上昇していく。かくして上述の如き冷却管直下に凝縮水の蓄積がみられる訳であるが、通気速度を1.0以上に増加するとこの蓄積が著しく減少する。通気速度が比較的高い場合は培養物の中心部と冷却管に接する部分との温度差が減少し、而も熱の伝達がより速かに行われるわけである。

UNDERKOFER 等は冷却管を附さない堅型培養容器(容量9ft³)を用い堆積層12"にて Mold bran の製造試験を行つており⁹⁾、この場合温度調節には30~40(最大50)の通気速度を要することを見出している。著者等の方法ではこのような高い通気速度は不必要であつて培養容器に設けた冷却管の効果が極めて大きい。

本研究は文部省科学試験研究費補助金の援助により行はれたもので、ここに深謝の意を表する。

文 献

- 1) 照井: [甘藷工業] 富民社(昭25), 照井: 生産と技術, **2**, 8 (1950).
- 2) 照井, 芝崎: [醱酵工業の展望] 225, 大阪醸造学会30周年記念特集(1952).
- 3) BEESCH, S.C. and SHULL, G.H.: Ind. Eng. Chem., **47**, 1857 (1955).
- 4) MOYER, A.J.: Applied Microbiology, **1**, 7 (1953); U.S.P. 2, 674, 561 (1954).
- 5) 照井: 日本特許, 155, 685 (1943).
- 6) 照井: 本誌, **21**, 494 (1943).
- 7) BERNHAUER, K. RAUCH, J. and GROSS, G.: Biochem. Z., **319**, 499 (1949), MARTIN, M. and WATERS, W.R.: Ind. Eng. Chem., **44**, 2229 (1952), CLEMENT, M.T.: Can. J. Technol., **30**, 82 (1952).
- 8) 照井: 本誌, **18**, 45 (1940).
- 9) UNDERKOFER, L.A., SEVERSON, G.M., GOERING, K.J. and CHRISTENSEN, L.M.: Cereal Chem., **24**, 1 (1947).

(昭和32, 1, 21受理)