

## 流加培養によるエタノールからのグルタミン酸生産

(阪大・工・醸酵) 岸本通雅, 加藤道信, 大麻善之, 吉田敏臣, 田口久治

1. 目的 近年エタノールを原料とした種々のアミノ酸醸酵が開発されてきた。本研究ではそれらのうち代表的なグルタミン酸生産について、エタノール濃度がグルタミン酸生産に及ぼす影響を調べると同時に流加培養の培養経過を記述し、モデル式を作成し、エタノールの流加方法について検討した。

2. 方法 使用株は *Brevibacterium divaricatum* NRRL 2311 である。培地組成はエタノール(培養液中のエタノール濃度がほぼ所定の濃度を維持しつづけるよう流加されていく), 尿素 2.5 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/l,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/l, 味液 12 cc/l, 酵母エキス 0.3 g/l, ナアミン塩酸塩 100  $\mu\text{g}/\text{l}$ , ビオチン 0.5  $\mu\text{g}/\text{l}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10  $\mu\text{g}/\text{l}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  7.2  $\mu\text{g}/\text{l}$ , 脱イオン水 5 l。醸酵槽は丸菱理化 MD-500 を使用した。操作条件は容量 5~6 l, pH=7.5~7.9, 温度 28°C, 通気量 5 l/min, 搅拌速度は 500 rpm である。測定事項は菌体濃度(乾燥重量法または OD 610), エタノール濃度(多孔性テフロンチエゼンゲ法を使用し、ガスクロで検出), グルタミン酸濃度(L-ケルタミン酸脱炭酸酵素を用いたワールブルグ検定法), 酢酸濃度(酵素法), 生菌数(コロニー計数法),  $\text{CO}_2$  発生速度(赤外線分析計),  $\text{O}_2$  摂取速度(磁気式酸素分析計), さらに必要に応じて ATP 濃度(ルシフェラーゼ反応により生じた光を ATP photometer にて測定), ビオチン濃度(*Lactobacillus plantarum* IFO 3070 による bioassay) を測定した。

3. 結果 エタノール濃度を種々のレベルで一定に維持して行なった流加培養の結果を比較してみると、グルタミン酸の最大比生産速度はエタノール濃度 1 g/l から 30 g/l までの間でエタノール濃度によってあまり大きな差異は生じなかつた。しかし生産開始時期はエタノール濃度により影響され、エタノール濃度が高い程生産開始時期が早くなる傾向があつた。また菌体増殖速度及び最大菌体濃度もエタノール濃度が高いと低い値を示した。ところでエタノール濃度を 1% に保つた培養実験では、培養液中のビオチンは培養開始後 10 時間以内に菌体内に吸収されており全量は培養経過中ほとんど変化しないことがわかつた。このことより菌体内ビオチン濃度は始め投入されたビオチン量を菌体量でわづかの値にほぼ比例していると思われる。従ってエタノール濃度が高いう場合菌体内ビオチン濃度が比較的高い状況でも生産が開始されることになり、エタノール濃度は生産開始時期を決定づける重要な因子であることがわかつた。また比生産速度が最大値から低下しはじめる時期では比生産速度の低下と呼吸活性の低下との間に対応がみられた。培養後期グルタミン酸生産が緩慢になつてきたころには酢酸が生成され始め、エタノールが無駄に消費された。以上の現象をもとにモデル化を行ない、エタノールの流加方法について動的計画法に基づいて最適化を試みた。