

〔醸酵工学会誌 第69巻 第6号 471-475, 1991〕

ノ ー ト

Aspergillus niger の表面培養によるデンプンからのクエン酸生成の特性とシミュレーション

桜井 明彦・今井 弘*

北海道大学工学部合成化学工学科
〒060 札幌市北区北13条西8丁目

(平成3年4月12日受付 平成3年8月19日受理)

Characteristics and simulation of citric acid production from starch by *Aspergillus niger* in surface culture. —Note— AKIHIKO SAKURAI and HIROSHI IMAI* (Department of Chemical Process Engineering, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Sapporo 060) Hakkokogaku 69: 471-475, 1991.

The effect of the initial starch concentration on citric acid production by *Aspergillus niger* was examined in batch surface culture. From the experimental results, the kinetics of citric acid production was examined by simulation. The yield of citric acid increased with increase of the initial starch concentration (S_0) and showed a constant value, ca. 0.46 in the range of $S_0=180-220$ g/l. The cell yield decreased with increase of S_0 and showed a constant value, ca. 0.14 when $S_0 \geq 100$ g/l. The citric acid production from soluble starch by *A. niger* Yang No. 2 was simulated well with the Luedeking-Piret type rate equation by taking the residual starch concentration into consideration in the period of the vigorous production of citric acid.

クエン酸発酵に関しては多くの報告¹⁻¹⁵⁾があるが、デンプンを原料にしたもの¹⁶⁾は少ない。ここでは原料として溶性デンプンを用い、*Aspergillus niger*によるクエン酸発酵を行い、初期デンプン濃度のクエン酸生産性に与える影響について検討した。また、クエン酸生成に関する速度式を仮定し、速度係数、飽和定数を決定し、シミュレーション結果と実験データとの一致性について検討した。

クエン酸生成菌として *Aspergillus niger* Yang No. 2^{5,6)}を用いた。500 ml 広口瓶を用い回分表面培養を行い、通気は広口瓶上部の綿栓による自然通気のみとした。培地液量は 200 ml とし、 NH_4NO_3 2.0 g, KH_2PO_4 10.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 14 mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 21 mg, および溶性デンプン (和光純薬) 20~240 g を脱イオン水に溶解し、全量を 1 l としたも

のを培地として用いた。培地の初発 pH は 4.15 に調整し、培養途中の pH コントロールは特に行わなかった。培養温度は 30°C とした。試験管内の寒天斜面培地上で十分に胞子を着成させ、培養開始時に胞子濃度が約 5×10^9 [spores/l] となるように培地に接種した。

グルコース濃度は示差屈折計を検出器とし、高速液体クロマトグラフ (HPLC) により求めた。デンプン濃度は、アンスロン法¹⁷⁾により求めた全糖の濃度から、グルコース濃度を差引くことにより求めた。クエン酸濃度 (g/l) は、全酸度 (g- CaCO_3 /l) から対照 (初期培地) の全酸度を差引き、量論係数 1.28 を乗じることにより求めた。全酸度は 0.1 N NaOH による滴定によって求めた。全酸度とクエン酸濃度の比較は、一部の培養液につき、紫外分光光度計を検出器とする HPLC を用いた有機酸の定量分析により行った。この場合、培養液中にシュウ酸などの他の有機酸は検出されなかった。また、クエン酸は滴定値の 95% 以上と

* 連絡先, Corresponding author.

して検出され、定量的に良い一致がみられた。次に、窒素濃度は形態別窒素分析装置 (Shimadzu Sumigraph GCT-13N) により測定した。菌体量は、脱イオン水を用いて菌体を遠心分離 ($10,000 \times g$, 5 min, 20°C) で3回洗浄した後 105°C で乾燥し、乾燥菌体重量として求めた。

Fig. 1に、初期デンプン濃度 200 g/l の場合の代表的な培養経過を示した。培養開始後9日目までにデンプン濃度が急激に減少し、この期間で初期濃度の約60%が消費された。その後、9~21日目ではクエン酸生成が活発に行われ、この期間にはデンプンの減少速度が小さくなるのが分かる。遊離のグルコース濃度はデンプンの分解が活発な培養初期 (0~9日目) には増加し、その後は減少する傾向にあった。

菌体は、培養2日目までに培地表面に白色の膜を形成した。その後、4日目より膜上面に黒色の胞子を着成しクエン酸の活発な生成が開始する9日目まで急激に増殖した。これ以後、増殖速度は低下する傾向にあった。表面培養法では菌体が培地中に存在しないため、培養途中での培地のサンプリングによる菌体量の測定は困難である。このため、菌体濃度は培養終了時 (27日目) には実測値を用い、途中 (3~24日目) についてはあらかじめ作成した相関図 (Fig. 2) により、消費窒素濃度から菌体濃度を算出した。¹⁶⁾

初期デンプン濃度とクエン酸収率、菌体収率を Figs. 3, 4 に示した。ここで、デンプンはグルコースに分解された後、菌体の増殖とクエン酸の生成に用い

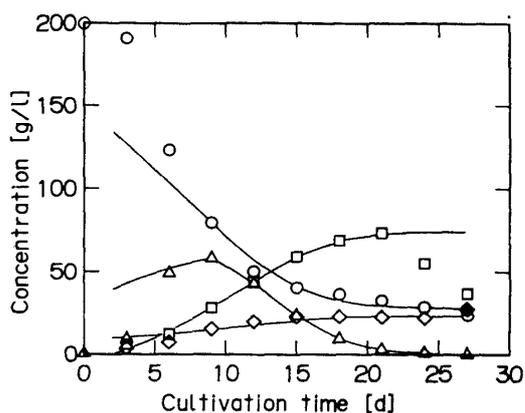


Fig. 1. Typical time course of citric acid production by *A. niger* Yang No. 2 in surface culture. Initial starch concentration was 200 g/l . Solid lines are the simulation results using Eqs. (1)~(4); and the parameters are shown in Table 1. Symbols: □, citric acid; O, starch; Δ, glucose; ◇, cells (calculated values); ◆, cells (measured values).

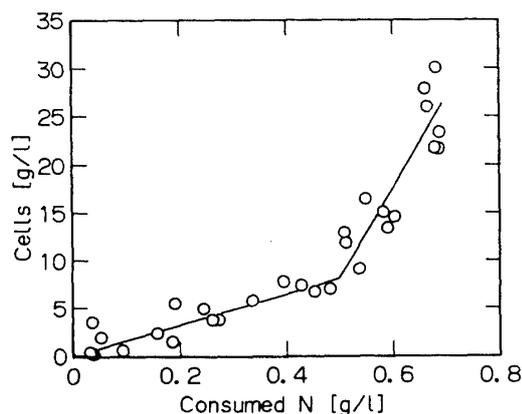


Fig. 2. Relationship between the consumed nitrogen and the cell concentration.

られると考え、収率はグルコース当量に換算した消費デンプンに対する生成物の重量比と定義した。すなわち、グルコース当量は消費デンプン量に量論係数1.11を乗じて求めた。Fig. 3に示すように、クエン酸収率は初期デンプン濃度に対し、 100 g/l まで、ゆるやかに増加し、これ以上の値では初期デンプン濃度の増加にほぼ比例して大きくなり、初期濃度 180 g/l 以上では、ほぼ一定値 (約0.46) となることが分かる。Fig. 4に示すように、菌体収率は初期デンプン濃度が 100 g/l までは初期濃度の増加に伴って減少し、これ以上の値になるとほぼ一定値 (約0.14) となることが分かる。Figs. 3, 4 から、初期濃度が 100 g/l までは、菌体増殖に基質がより多く消費されるため、クエン酸生成に利用される基質が比較的少なくなると考えられる。

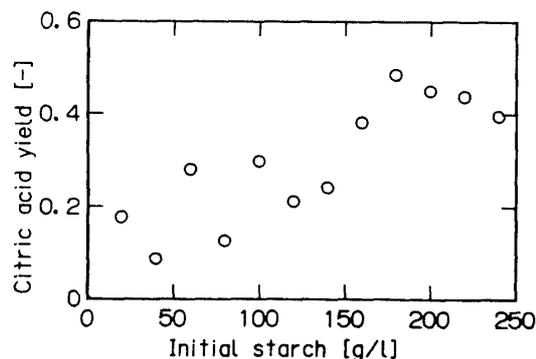


Fig. 3. Yield of the citric acid based on consumed starch (glucose equivalent) against initial starch concentration S_0 [g/l], at the time (t_m [d]), at which point the citric acid concentration was maximum. (S_0, t_m): (20, 8), (40, 8), (60, 15), (80, 15), (100, 16), (120, 16), (140, 21), (160, 21), (180, 18), (200, 21), (220, 21), (240, 21).

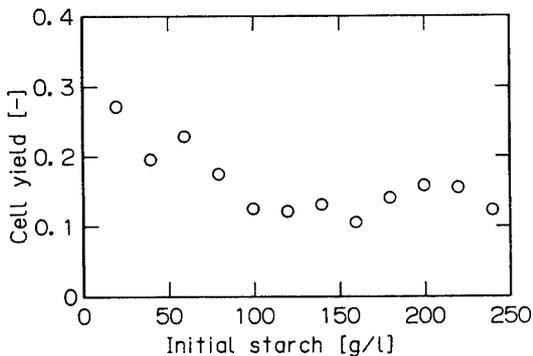


Fig. 4. Cell yield based on consumed starch (glucose equivalent) at the end of the cultivation (t_c [d]). (S_0, t_c): (20, 22), (40, 22), (60, 22), (80, 22), (100, 26), (120, 26), (140, 26), (160, 26), (180, 27), (200, 27), (220, 27), (240, 27).

本実験に用いた溶性デンプンでは、培養終了時 (Fig. 1 では27日目) においては、基質の一部が残存し、分解速度は低かった。ここで初期基質濃度と残存基質濃度の関係を Fig. 5 に示した。Fig. 5 から平均の残存基質濃度は初期基質濃度の約12.9%であり、*A. niger* Yang No. 2 の培養では溶性デンプンは完全には消費されなかった。

クエン酸の収率が、ほぼ一定値を示す初期デンプン濃度 180, 200, 220 g/l の培養について、以下の式を用いてシミュレーションを行った。ここではデンプンが分解されて、グルコースが生成されるとし、クエン酸生成および菌体増殖はグルコースを基質として行われると仮定した。

$$\frac{dX}{dt} = k_1 \frac{G}{K_X + G} X \quad (1)$$

$$\frac{dC}{dt} = k_2 \frac{dX}{dt} + k_3 \frac{G}{K_G + G} X \quad (2)$$

$$\frac{dS}{dt} = -k_4 \frac{S - S_0 \times 0.129}{K_S + S - S_0 \times 0.129} X \quad (3)$$

$$\frac{dG}{dt} = -\frac{dS}{dt} Y_{GS} - \frac{dX}{dt} Y_{GX} - \frac{dC}{dt} Y_{GC} \quad (4)$$

$$\alpha Y_{GC} + \beta Y_{GX} = 1 \quad (5)$$

S: 溶性デンプン濃度 [g/l]; S_0 : S の初期濃度 [g/l]; C: クエン酸濃度 [g/l]; X: 菌体濃度 [g/l]; G: グルコース濃度 [g/l]; t: 培養時間 [d]; k_1, k_3, k_4 : 速度定数 [1/d]; k_2 : 比例定数 [-]; K_S : デンプンの分解に関する飽和定数 [g-glucose/l]; K_X : 菌体増殖に関する飽和定数 [g-glucose/l]; K_G : 増殖を伴わないクエン酸生成に関する飽和定数 [g-glucose/l]; Y_{GX} : 増殖のために消費された

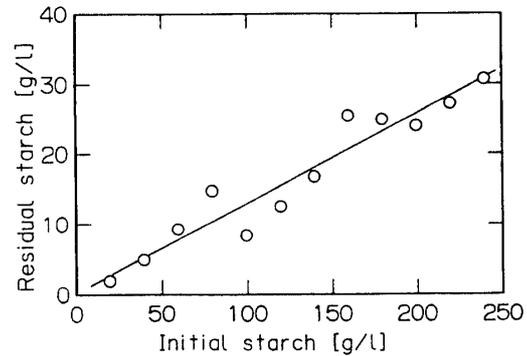


Fig. 5. Relationship between the initial starch concentration and residual starch concentration at the end of the cultivation (t_c). $Y = 0.129 \times X$
The values of t_c are shown in the caption to Fig. 4.

グルコースに対する菌体の収率係数の逆数 [-]; Y_{GS} : デンプンが加水分解し、グルコースになる場合のデンプンに対するグルコースの量論係数, 1.11; Y_{GC} : クエン酸に対するグルコースの量論係数, 0.938; α, β : それぞれ、シミュレーション期間での、全消費グルコース当量に対するクエン酸収率 [-], 菌体収率 [-]

菌体増殖に関しては (1) 式の Monod 型、クエン酸生成に関しては (2) 式の Luedeking-Piret 型¹⁹⁾ を用いた。また、デンプンの分解に関しては上述のように、平均として初期デンプン濃度の12.9%が残存することを考慮して (3) 式のような修整を施した Monod 型を用いた。(2) 式の右辺第1項は、菌体の増殖に伴うクエン酸生成を表わし、第2項は増殖を伴わないクエン酸生成を表わす。(4) 式はグルコース濃度の変化を表わし、デンプンの分解により生成する量、菌体増殖のための消費量、クエン酸生成のための消費量の和で表わした。(5) 式は増殖のために消費されたグルコースに対する菌体収率の逆数 Y_{GX} を求める式である。 Y_{GC} は、グルコース 1 mol からクエン酸 1 mol が生成すると仮定した場合のクエン酸に対するグルコースの量論係数である。

パラメーター ($k_1 \sim k_4, K_S, K_G, K_X$) を試行錯誤的に変化させ、(1)~(4) 式を Runge-Kutta-Gill 法を用いて解き、C, S, G, X の実験値と計算値の偏差の総和が最小となるような最適な値を求めた。パラメーターの決定のために考慮した期間は、クエン酸生成が活発に行われる期間 (9日目からクエン酸濃度が最大値をとる日まで (Fig. 1 では培養9~21日目)) とし、9日目の濃度を微分方程式の初期値 (Table 1 参照) とした。このようにして得られた速度係数、飽和定数を Table

Table 1. Summary of kinetic parameters, initial conditions and yield coefficients used for simulation.

	Initial starch concentration (g/l)			Unit
	180	200	220	
Kinetic parameters				
$k_1 \times 10$	1.70	1.05	1.15	d ⁻¹
k_2	2.40	5.70	3.90	—
$k_3 \times 10^4$	20.0	8.00	10.0	d ⁻¹
$k_4 \times 10$	8.00	10.0	8.00	d ⁻¹
K_G	18.0	16.0	14.0	g/l
K_X	33.0	47.0	49.0	g/l
K_S	23.0	51.0	37.0	g/l
Yield coefficients and initial conditions				
Y_{GX}	4.62	9.13	5.81	—
$\alpha \times 10$	3.69	4.17	4.33	—
$\beta \times 10^2$	14.2	6.67	10.2	—
G_i	63.1	58.7	63.9	g/l
X_i	11.7	15.7	12.7	g/l
S_i	83.0	80.0	95.9	g/l
C_i	25.8	28.6	24.1	g/l

G_i , X_i , S_i , and C_i are initial conditions for simulation. Y_{GX} was obtained from Eq. 5 by use of yield coefficients α and β . The seven kinetic parameters were determined by a simple trial and error method, solving the differential equations by the Runge-Kutta-Gill method for the period from 9 d to the time (t_m), at which point the citric acid concentration was maximum (See also caption to Fig. 3 for t_m). The simulation results for 200 g/l of initial starch concentration are shown in Fig. 1 as solid lines.

1に、初期値、収率係数とともに示した。次に、得られたパラメーターを用いて全期間でのシミュレーションを行い、計算結果をFig. 1に実線で示した。すなわち、9～27日目までのシミュレーションは、9日目のそれぞれの濃度を初期値として計算を行い、0から9日目に関しては、9日目のそれぞれの濃度を初期値とし時間を逆にさかのぼって計算を行った。培養2日目以前はクエン酸濃度が負の値となるため、計算は培養9日目から2日目までとした。Fig. 1から分かるように、仮定した式にクエン酸の消費の項がないため、21から27日目ではクエン酸に関しては一致はみられない。また、9日目以前では、クエン酸以外は計算値と実験値の差が大きい。以上より(1)～(4)式はクエン酸生成の活発な期間 (Fig. 1では9～21日目) では、デンプンからのクエン酸発酵を良好に表現でき、発酵管理に有効な手段となると考えられる。

要 約

表面培養法を用いて、*Aspergillus niger* Yang No. 2 によるデンプンからのクエン酸発酵を行い、初期デンプン濃度のクエン酸収率に与える影響と、発酵過程のシミュレーションモデルを検討した。

消費されたデンプン量に対するクエン酸収率は、初期基質濃度の増加にともない増加し、初期濃度180～220 g/lの範囲ではほぼ一定値(約0.46)となる。また、菌体収率は初期濃度の増加にともない減少し、初期濃度100 g/l以上ではほぼ一定値(約0.14)となる。一方、デンプンからのクエン酸発酵を、残存デンプン濃度を考慮した Monod 型の速度式と Luedeking-Piret 型の速度式との組合せを用いてシミュレーションを行った結果、クエン酸の生成が活発な時期には計算値は実験値と良好に一致した。

終わりに、実験に協力いただいた学部生、古沢恵君(現、㈱リコー)に深謝致します。

文 献

- Nowakowska-Waszczyk, A., Rubaj, E., Matsusiak, B., Kosiek, E.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 416-418 (1984).
- Purohit, H. J., Dagainwala, H. F.: *J. Ferment. Technol.*, **64**, 561-565 (1986).
- Hossain, M., Brooks, J. D., Maddox, I. S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 393-397 (1984).
- Hossain, M., Brooks, J. D., Maddox, I. S.: *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.*, **18**, 161-168 (1983).
- 宇佐美昭次, 福富直樹: *醸酵工学*, **55**, 44-50 (1977).
- 熊谷和夫, 宇佐美昭次, 服部達彦: *醸酵工学*, **59**, 461-464 (1981).
- Kristiansen, B., Sinclair, C. G.: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1711-1722 (1978).
- Dawson, M. W., Maddox, I. S., Boag, I. F., Brooks, J. D.: *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 220-226 (1988).
- Kristiansen, B., Chaley, R.: *Adv. Biotechnol.*, **1**, 221-227 (1981).
- Tsay, S. S., To, K. Y.: *Biotechnol., Bioeng.*, **29**, 297-304 (1987).
- Kristiansen, B., Sinclair, C. G.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 297-315 (1979).
- Eikmeier, H., Rehm, H. J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 365-370 (1984).
- Horitsu, H., Adachi, S., Takahashi, Y., Kawai, K., Kawano, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 8-12 (1985).
- Chung, B. H., Chang, H. N.: *Biotechnol. Bioeng.*,

- 32, 205-212 (1988).
- 15) Roehr, M., Zehentgruber, O., Kubicek, C. P.: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 2433-2445 (1981).
- 16) 宇佐美昭次, 武富 昇: *工業化学雑誌*, **63**, 122-125 (1960).
- 17) Koehler, L. H.: *Anal. Chem.*, **24**, 1576-1579 (1952).
- 18) 桜井明彦, 今井 弘, 江尻哲男: 北海道大学工学部研究報告, No. 154, 43-52 (1991).
- 19) Luedeking, R., Piret, E. L.: *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.*, **1**, 393-412 (1959).