

固定化酵母菌を用いる回転式カゴ型バイオリアクターによる アルコール発酵の研究

村上 和雄*, 掛本 道子**

(平成11年9月30日受理)

Ethanol Fermentation of Immobilized Yeast Cells in a Rotating Basket Bioreactor

Kazuo MURAKAMI and Michiko KAKEMOTO

(Received on September 30, 1999)

1. 諸 言

エタノールの固定化増殖微生物による連続生産は石油資源に代わるクリーンエネルギーの製造法として注目され、種々のバイオリアクターシステム、増殖微生物の固定化法などが提案され、多くのエタノール生産法の検討が続けられている^{1)~5)}。通気攪拌装置は気-液接触を目的とする装置のうち、最も高い接触効率を得られるので発酵工業、合成化学工業、排水処理などの分野で広く使われている。この原理に基づいた、通気気体の細分化を図り、攪拌効率を高めるカゴ攪拌型培養装置による微生物の培養への応用で酵母細胞の高度密度培養に効果があることが確認されている^{6)~7)}。

一条らは、パン酵母を巻き玉状ポリビニールアルコール細繊維モジュールに固定化し、プロトタイプのバイオリアクターで回分式アルコール発酵を行っているが、基質のアルコール変換に要する時間は、日数オーダーを要している⁸⁾。著者らは可能な限り短時間で基質がアルコールに変換する方法として上述のカゴ攪拌型培養装置の利用を考えた。そして、培養装置のカゴの中にパン酵母を包括固定したゲルを詰め、容器に入れたグルコース液中でカゴを攪拌することにより固定化ゲルと基質の接触機会を高める迅速なエタノール発酵を回分式で検討した。

2. 実 験

2.1 試薬

パン酵母；オリエンタル酵母製，アルギン酸ナトリウム；和光純薬製（純度90%以上）， κ -カラギーナン；三晶製LC-1-J，酵母エキス；DIFCO Lab. 製，グルコース，塩化アンモニウム，リン酸水素二カリウム，硫酸マグネシウム，塩化カルシウム，塩化ナトリウム，クエン酸；いずれも和光純薬製特級。その他，本実験で使用した試薬はすべて特級である。

2.2 基質溶液の調製

グルコース10%または15%，酵母エキス0.1%，塩化アンモニウム0.25%，リン酸二水素カリウム0.25%，硫酸マグネシウム0.025%，塩化カルシウム0.001%，塩化ナトリウム0.1%，クエン酸0.3%を含む溶液を調製し，これを基質溶液とし，オートクレーブで滅菌後実験に供した。

2.3 装置

カゴ攪拌式培養装置；エイブル製MJジャーファーマンター（槽容量1 dm³，軸シールマグネットによるノンシール，回転数90~1300 rpm，使用温度15~50℃），高速液体クロマトグラフ；Shodex製ポンプDS-4型，日本分析工業製示差屈折率検出器RI-2型，Shodex製デガッサーKT-17型，SIC製クロマトコーダー-21。

2.4 エタノールとグルコースのHPLC測定条件

カラム；Shodex KS 801(8φ×300mm)，KS-800
(6φ×50mm)。

カラム温度；30℃

* 環境情報学科 環境有機化学研究室

** 中央大学理工学部応用化学科

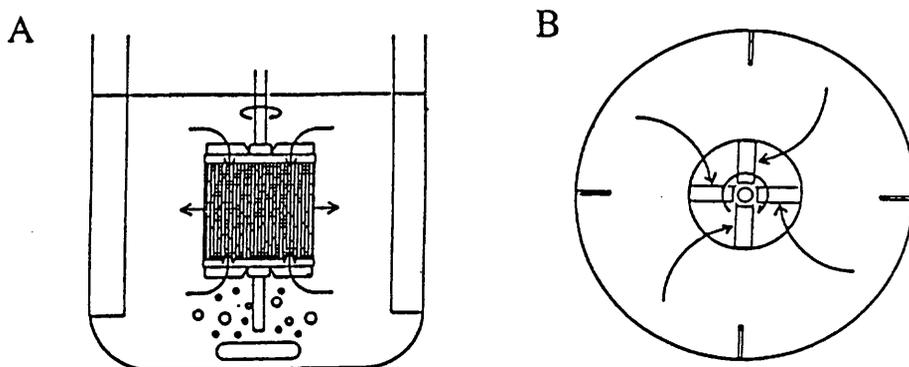


Fig. 1 Configuration of a Rotating Basket Bioreactor⁹⁾
 A : Front View B : View from Above
 Basket : Height 55mm, Diameter : 80mm (outer net), 40mm (inner net)
 When it is rotated, substrate solution is vigorously agitated by it's impellera.
 → : The flow direction of the substrate solution

移動相 ; 水 1 ml / min

検出器 ; 示差屈折率検出器

2.5 カゴ攪拌型培養装置の原理

図1は模式図を示す。ステンレス製の網のカゴの上下にはプロペラがついていて、このプロペラの回転によりカゴの中央に向かって液の流れが起こる。回転速度を高めると流れは激しくなり液が強制的に網目を通り、中のパン酵母を包括固定したゲルと接触、アルコール発酵する。生じた二酸化炭素の気泡は微細化される。円筒形のカゴはドラフトチューブのような働きをして層内の液の流れを矢印の方向に動かすと考えられる。上部のプロペラは溶液を水面近くから液深の中央部に向かう流れをつくる。このようにカゴ内部のゲルと糖液との接触する機会が非常に多くなり発酵を促進した。

2.6 パン酵母の包括固定化

(1) アルギン酸ナトリウムへの固定化 : 4%アルギン酸ナトリウム水溶液 (wt%) 50gをオートクレーブ中で120℃、15分間滅菌し、その後45℃の恒温槽中で冷却、保温する。この溶液に予め滅菌処理した生理食塩水37.5mlに12.5gのパン酵母を溶かした溶液を均一混合し45℃に保温する。ローラーポンプによりこの混合溶液を、冷却した2%塩化カルシウム溶液をマグネチックスターラーで回転させ、その液の中に滴下して球状のビーズを作製、そのまま冷蔵庫中で一晩放置した。ビーズを取り出しYPD培地中に移し30℃で24時間振とう増殖させる。この後、固定化酵母ゲル30ml、または60mlを

リアクターのカゴの部分に充填した。

(2) κ -カラギーナンへの固定化 : 5% κ -カラギーナン水溶液 (wt%) 100gをオートクレーブで120℃、15分間滅菌し、その後45℃恒温槽中で冷却、保温する。この溶液に滅菌処理した生理食塩水90mlに10gのパン酵母を溶かした溶液10mlを均一混合し45℃に保温する。ローラーポンプによりこの混合溶液を2%塩化カリウム溶液に滴下して球状のビーズを作製、その後2%塩化カリウム溶液と10%基質溶液の等量混合溶液で30分間洗浄、YPD培地に移し30℃で24時間振とう増殖させる。以下(1)と同じ操作を行う。

2.7 酵母数の測定

5粒のゲルをろ紙の上に置き、軽く水分をとりその質量を測る。ゲルを試験管に入れ、蒸留水5mlを加えて37℃の恒温槽で振とうさせてゲルを溶解する。この溶液を酵母密度約 2×10^7 個/mlになるよう希釈する。そして、トーマの血球計により酵母密度(酵母数/ゲルml)を求める。ただし、酵母数はゲル重量をゲル容量とみなして計算した。

2.8 カゴ型バイオリアクターの運転

リアクターの槽に基質溶液700mlを入れ、30℃で所定のカゴの回転数で運転する。基質溶液の表面はベッセル内に窒素をガスを送り、空気との接触を遮断している。一定時間間隔で基質グルコース濃度、エタノール濃度、固定化ゲル中の酵母菌数を測定する。

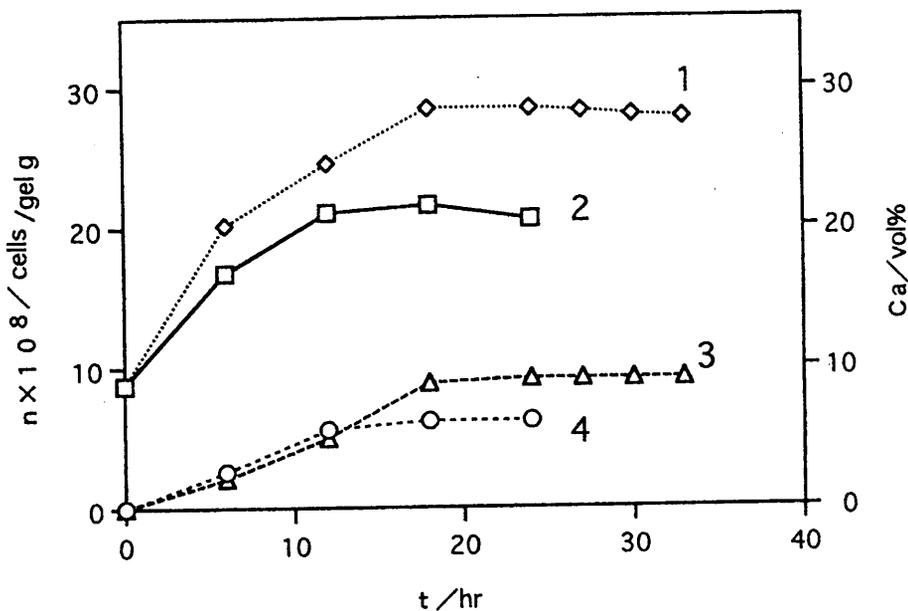


Fig.2 Dependence of running time(t) of reactor on number of Baker's yeast(n) and concentration of ethanol(Ca)

Concentration of yeast cells(□,◇) and ethanol(○,△) are shown. Initial glucose concentration were 10%(□,○) and 15%(◇,△), respectively.

Volume of substrate: 700ml

Support; 2% Sodium alginate with 12.5% Baker's yeast

Volume of immobilized gel: 60ml

3. 結果および考察

3. 1 固定化担体のゲル濃度およびパン酵母固定化量

固定化ゲルのアルギン酸ナトリウム最終濃度を1~4%について検討したが、1%のゲルは軟らかく、しかも機械的強度は弱く、一方3, 4%ではゲルが堅く、酵母菌の増殖がむずかしかった。これに対して2%のゲルは機械強度があり、酵母菌の増殖に適した堅さをもっていた。κ-カラギーナンについても同様な検討を行い、5%のκ-カラギーナン濃度のゲルが最もよいことがわかった。アルギン酸ナトリウムとκ-カラギーナンのゲルを比較すると機械的強度の点で前者の方が優れていた。また、パン酵母固定化量はゲルがカゴ中に入れられ、攪拌に耐えられる機械的強度があり、しかも最も多くパン酵母が固定化できることが必要である。この条件を満たすパン酵母の量は、アルギン酸ナトリウムゲルでは12.5%、κ-カラギーナンゲルでは、0.5%であった。

3. 2 リアクター運転時間とアルコール濃度およびゲル中のパン酵母数の変化

図2はアルギン酸ナトリウムゲルを用い、基質濃度10%と15%、基質量700ml、カゴの回転数200回転、30Cで運転したときのアルコール濃度(Ca)とゲル中のパン酵母数(n)の経時変化(t)を示したものである。アルコール濃度は基質濃度10%のときが12時間で、15%のときが17時間でほぼ一定となり、グルコース濃度はゼロとなった。最終アルコール濃度は繰り返し実験から、グルコース濃度10%のときが平均6%、15%のときが平均9%でアルコールへの変換率は92%前後であった。収率が100%にならないのは、パン酵母の増殖にグルコースが消費されたためと考えられる。ゲル中のパン酵母数はアルコール濃度と同じような変化を示した。アルギン酸ナトリウムゲルビーズ(ゲル容量60ml)調製直後のゲル中の酵母数 4.84×10^8 個/g、YPDで24時間増殖後で 8.8×10^8 個/gであった。グルコース濃度10%のとき、その濃度がゼロになる12時間では 2.1×10^9 個/gに増加していた。また、グルコース濃度15%のときの17時間後では、その数は 2.99×10^9 個/gに増加

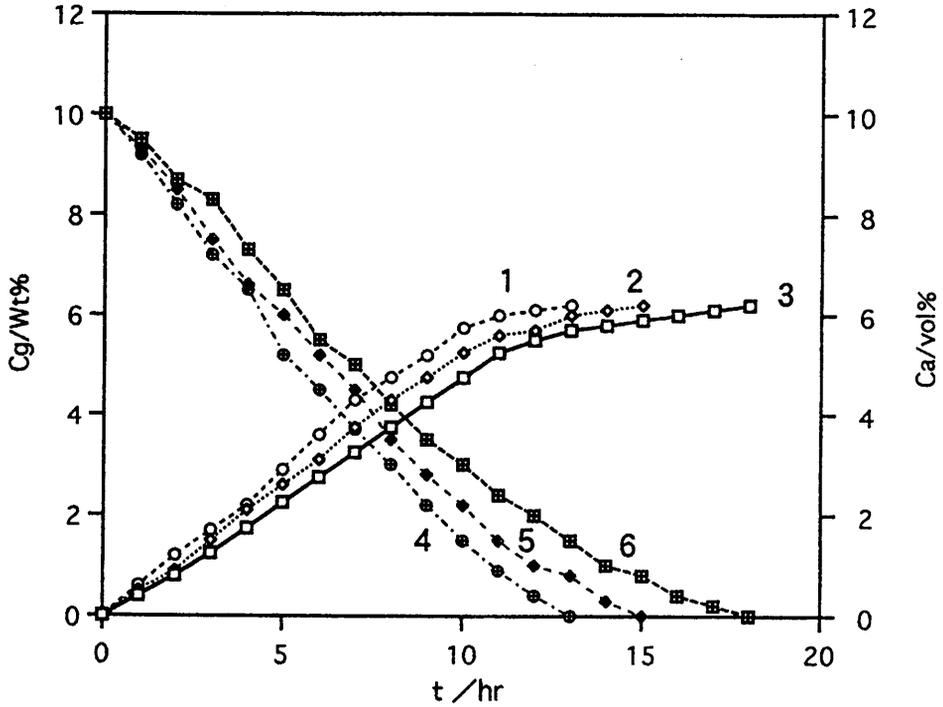


Fig.3 The effect of changing revolutions of the basket reactor, on the production of ethanol(Ca) and concentration of glucose(Cg)
 concentration of ethanol(Ca):1,2,3 concentration of glucose(Cg):4,5,6.
 Revolution number of reactor:1,4: 300rpm 2,5:200rpm 3,6:100rpm
 Volume of substrate: 700ml, Support: 2% Sodium alginate with 12.5 Baker's yeast, Volume of immobilized gel: 60ml.

した。κ-カラギーナンゲル(ゲル容量30 ml)の場合、ゲル調製直後が 1.92×10^7 個/g、YPDで24時間増殖後が 1.01×10^8 個/g、グルコース濃度10%と15%がゼロとなる22時間、36時間後では、どちらも 1.59×10^9 個/gであった。これは、運転終了後のκ-カラギー

ナンゲルの質量が調製直後より軽くなっており、機械的強度が弱いため基質溶液中に溶解したものと考えられる。

3.3 カゴの回転数とアルコール濃度、グルコース濃度の変化

図3は基質のグルコース濃度10%でカゴの回転数を

Table 1 Dependence of glucose concentration in substrate solution, volume of immobilized yeast cell gel, revolution number of basket reactor and kind of immobilization support and the time required to the completion of alcoholic fermentation

Immobilization support	Volume of immobilized yeast cell gel(ml)	Glucose concentration in substrate solution(%)*	Revolution number of basket reactor(rpm)	The time required to the completion of the alcoholic fermentation(hrs)
Sodium alginate	3 0	1 0	2 0 0	1 7
	3 0	1 5	2 0 0	2 5
	6 0	1 0	1 0 0	1 8
	6 0	1 0	2 0 0	1 5
	6 0	1 0	3 0 0	1 3
	6 0	1 5	2 0 0	2 3
κ-carrageenan	3 0	1 0	2 0 0	2 2
	3.0	1 5	2 0 0	3 6

*Volume of substrate solution: 700ml

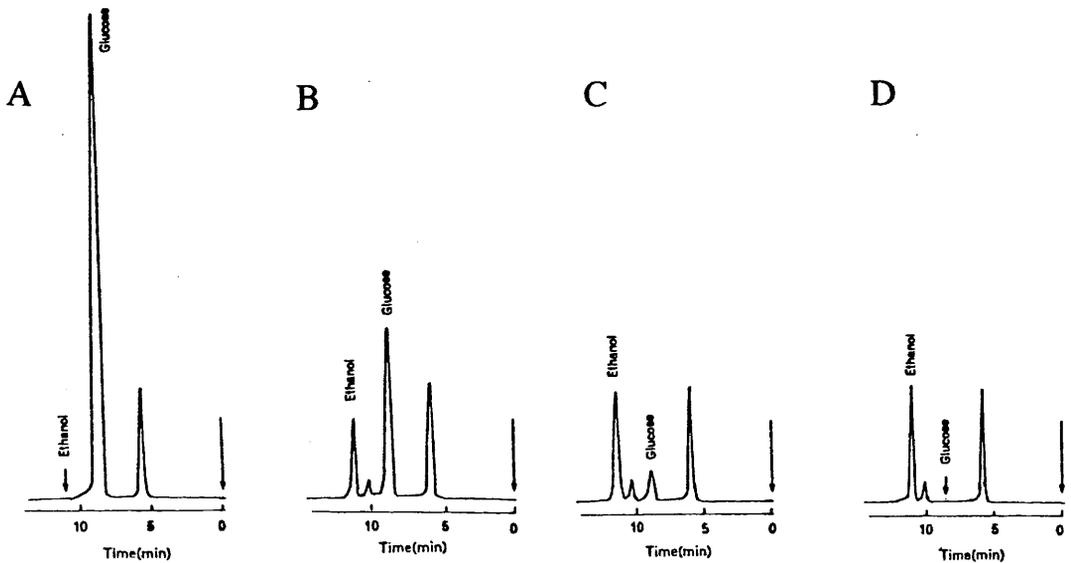


Fig. 4 Change in the Chromatogram of Reaction Solution with Elapse of Running Time
A: Substrate solution B: 8 hours C: 13 hours D: 18 hours

Running Condition: temperature 30°C, revolution number of basket reactor: 200 rpm,
immobilized support: sodium alginate, volume of gel beads in the basket: 60 ml,
volume of substrate solution: 700 ml

100, 200, 300 rpmでリアクターを運転したときのアルコール濃度 (Ca) とグルコース濃度 (Cg) の経時 (t) 変化を示した。カゴの回転数が早いほどグルコースからアルコールへの変換速度が速く、それぞれ18, 15, 13時間であった。アルコール、グルコースの濃度変化はカゴの回転数により異なるがその変化のパターンは類似している。図4はカゴの回転数200 rpmのときのグルコース濃度の減少、アルコール濃度の増加を運転時間0, 8, 13, 18時間後の反応溶液を高速液体クロマトグラフィーで測定した結果である。18時間後にはまったくグルコースのピークはみられない。

表1は固定化担体、基質濃度の違いによるアルコール生成時間の関係を示した。

アルギン酸ナトリウムゲル、κ-カラギーナンゲルともゲル容量が大きいかほど、またカゴの回転数が多いほどアルコールの生成時間が短かった。同じゲル容量、基質濃度、カゴの回転数でゲル担体の異なる場合では、アルギン酸ナトリウムゲルの方がκ-カラギーナンゲルよりもグルコースからアルコールへの変換が速かった。これはパン酵母のゲルへの固定化量の差によるものと考えられる。

反応終了後のゲルの状態はアルギン酸ナトリウムゲルの方が機械的強度が高いためゲルの形に大きな変化はみられない。κ-カラギーナンゲルはアルギン酸ナトリウムゲルと比べる機械的強度は低いため、カゴの回転数を高くしたり、反応時間が長くなるとゲルや酵母菌が溶液中に溶解しゲルの大きさが運転開始時と比べると若干減少した。運転終了時のゲルの形状からアルギン酸ナトリウムゲルの方がこのシステムには適していることがわかった。

4. 結論

回転式のカゴ型バイオリアクターを用い、固定化酵母によるグルコースのエタノール発酵を回分式で試みた。固定化担体は、アルギン酸ナトリウムとκ-カラギーナンについて検討したが、機械的強度、パン酵母の固定化量が多くできることなどからアルギン酸ナトリウムを固定化担体として用いた。パン酵母を固定化したゲルビーズはリアクター運転前にYPD培地で24時間増殖培養を行った。そのゲルをリアクターのカゴに充填した。容量700 ml、基質濃度(グルコース濃度)10%、15%の基質は13時間と18時間で6%と9%のエタノールに変換

された。このように本リアクターシステムは固定化ゲルと基質との接触機会が多いため迅速にエタノール発酵が行える非常に有力な方法である。

<要 旨>

回転式カゴ型バイオリアクターを用い、固定化酵母ゲルによりエタノール発酵を試みた。固定化担体にはアルギン酸ナトリウムと κ -カラギーナンが検討されたが、ゲルの機械的強度が強いこと、固定化量が多いことから固定化担体としてアルギン酸ナトリウムが選択された。パン酵母が包括固定されたアルギン酸ナトリウムゲルは運転前にYPD培地で24時間増殖後、カゴに充填された。発酵はゲルビーズを入れたカゴを回転させて30℃で行われた。カゴの回転数、基質濃度のアルコール生産性への依存性などが検討された。容量700 mlの10と15%の基質(グルコース)は、13時間と18時間で6%と9%のエタノールに変換された。収率は平均92%である。本リアクターは迅速にアルコール発酵が行える有力なシステムである。

文 献

- 1) E. N. Sanchez, E. M. Alhadeff, M. H. Rocha-Leao, R. C. Fernades, N. Jr. Pereira: *Biotech. Letter*, **18**, 91(1996).
- 2) M. Kobayashi, K. Ishida, K. Shimizu, *J. Chem. Tech. and Biotech.*, **63**, 141(1995).
- 3) P. Bravo, G. Gonzalez, *J. Chem. Tech. and Biotech.*, **52**, 127(1991).
- 4) J. W. Tzeng, L. S. Fan, Y. R. Gan, T. T. Hu, *Biotech. and Bioeng.*, **38**, 1253(1991).
- 5) P. Bejar, C. Casas, C. Sala, *Appl. Biochem. and Biotech.*, **20/21**, 437(1989).
- 6) T. Ohishi, T. Hayashi, 日本食品工業学会誌, **36**, 924(1989).
- 7) K. Koge, Y. Orihara, T. Furuya, *Biotech. Techniques*, **6**, 313(1992).
- 8) 一条久夫, 末広哲朗, 長沢順一, 上平初穂, 山内愛造, 相坂 登, 繊維高分子材料研究所研究報告 **163**, 165(1990).
- 9) 林 毅彦, 石川陽一, 吉沢純治, 岡本幸彦, 大石 勉, 化学工学会第25回秋季年会予稿集 p. 227 (1992).

Summary

Ethanol fermentation using a rotating basket reactor packed with immobilized yeast cells was investigated. The properties of two kind of supports immobilized with yeast cells, sodium alginate and κ -carrageenan, were compared. Sodium alginate as the support was selected since the mechanical strength of the gel was better than that of κ -carrageenan gel and a lot of yeast cells could be immobilized in it. Before the running bioreactor, yeast cells in sodium alginate gel were proliferated in a YPD culture medium for 24 hours. Ethanol fermentations were done by turning a basket reactor with immobilized gel beads in glucose solution. The effects of the revolutions and also concentration of the glucose on the productivity of the ethanol were examined.

A 700ml of substrate solution containing 10 and 15% glucose was transformed to 6% and 9% ethanol for 13 and 18 hours. The yeild of this fermentation reaction was an average of 92%.

This bioreactor was a good system which could produce alcohol for a short time.