

固定化菌体を用いた有価物質等への変換プロセスの開発*

河村 真也**
早川 潔***
上野 義栄****
山中 朝恵*****
村上 誠*****
飯尾 毅*****

要 旨

不織布担体あるいはそれにパ-ライトを併用した担体に酵母等を付着させたバイオリアクタ-を用いて、有価物質の生産及び排水処理の検討を行った。糖蜜・グルコ-スを原料とし酵母を不織布担体に固定化させたバイオリアクタ-でアルコ-ル発酵を行い、そのアルコ-ルを原料とし酢酸菌をパ-ライト不織布に固定化させたバイオリアクタ-によって酢酸発酵を行って、2週間以内で糖から酢酸に変換することができた。6種酵母と活性汚泥を不織布担体に固定化し高濃度有機性排水(COD30000ppm)の処理実験を行ったところCOD除去率は約50%であった。また、色素等の有価物生産用ドラム回転式バイオリアクタ-を試作した。

1. 緒 言

微生物は常温常圧で複雑な化学反応を効率よく行うので、その活用が望まれている。バイオリアクタ-は、酵素・微生物等の生体触媒を用いて、物質生産、機能の変換等を効率的に行うための反応システムであり、現在、アミノ酸、異性化糖、オリゴ糖等での実用化例が知られている。筆者らは、微生物を不織布等に自然付着させたバイオリアク

タ-を用いた微生物による変換プロセスの検討を行っている。

本年度は不織布担体あるいはそれにパーライトを併用した担体に微生物を固定化し、酢、色素の生産、高濃度排水処理及び有価物生産用バイオリアクタ-の試作を行った。

2. 実験方法

2.1 保持担体

微生物の保持担体としてはポリプロピレン不織布(山中産業株式会社から提供)を単独で使用するか、多孔性物質のパーライト(三井金属工業製加工4号)と併用した。

2.2 使用菌株及び培養

酢酸醸造のアルコ-ル発酵用酵母としては、

* バイオコンバ-ジョンプロセスの開発()

** 応用技術課 主任

*** 応用技術課 主任研究員

**** 応用技術課 技師

***** 山中産業株式会社

***** 京都水研株式会社

***** 株式会社飯尾醸造

Saccharomyces cerevisiae ATCC 26602を用いた。

酢酸発酵菌については、酢醸造メーカーから入手した酢酸発酵もろみをそのまま種菌として使用した。

赤色素生産用紅麹菌として *Monascus purpureus* IFO 4478を用いた。培養はポテトデキストロース + 麦芽エキス培地により行った。

排水処理用酵母としては、*Saccharomyces cerevisiae* IFO 2018、*S.cerevisiae* ATCC 26603、*Pichia anomala* IFO 0963、*P.anomala* IFO 1181、*Candida schatavii* IFO 10258、*C.edax* IFO 10273を用いた。酵母の培養はいずれも麦芽エキス培地により行った。

2.3 実験装置と方法

2.3.1 酢酸醸造実験

図1の装置によりアルコール発酵を行った。原料液としてグルコース、糖蜜を用いた。

図2の装置により酢酸発酵を行った。回転体の内部には50mm厚のドーナツ板状不織布を圧縮固定し、パーライトを添加し、1回転する毎に不織布全面が必ず1回液中に没するようにした。アルコール発酵でできた液に水を加え、回転数0.4rpm、35℃で培養した。

2.3.2 色素生産実験

図2に準じた装置により紅麹菌を培養し、色素生産を行った。回転体の内部には、50mm厚の円盤状不織布を固定し、1回転する毎に不織布全面が必ず1回液中に没するようにした。培地は月岡らの報告¹⁾に準じて、スクロース10%、ペプトン1%、 KH_2PO_4 0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%、酒石酸0.1%、L-アスパラギン0.3%の組成のものを用いた。回転数10rpm、28℃で培養した。不織布担体・回転体を用いず、そのほかは同じ条件で培養

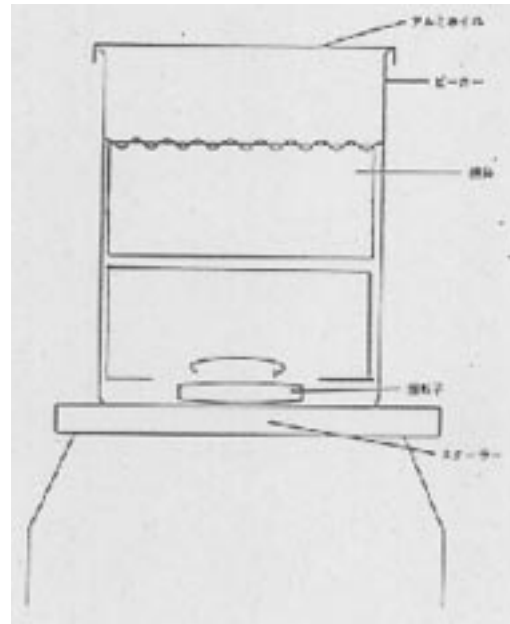


図1 アルコール発酵用実験装置

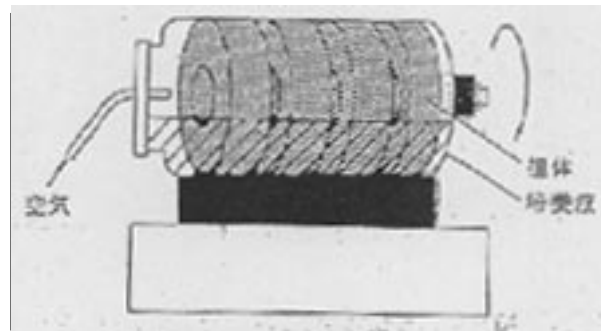


図2 酢酸醸造用バイオリクター

したもの対照とした。

2.3.3 排水処理実験

図3の装置を用い排水処理実験を行った。円筒状に加工したポリプロピレン不織布担体をビーカーに固定し、加熱殺菌後、酵母培養液、麦芽抽出培地及び加熱滅菌パーライトを添加し、エアープンプ曝気による自然付着を行った。

COD除去実験には合成排水(可溶性でんぷん:ペプトン=4:1)を使用した。排水処理は合成排水を入れ、1.5L/minの吐出量のエアープンプで曝気し、24時間後にCOD値を測定した。曝気処理中に発泡したときは、菌体及び合成排水の流出

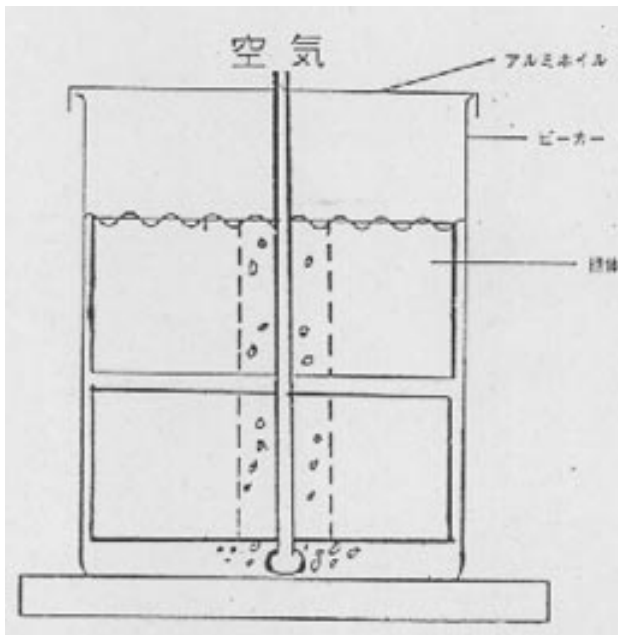


図3 酵母の排水処理実験装置

を防ぐためシリコン消泡剤を少量添加し、発泡を抑えた。

2.4 測定分析

酢酸、エチルアルコールはガスクロマトグラフィにより、CODはJIS法により測定した。色素重量は月岡らの報告に準じて、生成した菌体を80%エタノール300mlで60 1時間振とうし、色素を抽出し、色素重量を測定した。

3. 結果及び考察

3.1 二段階固定化法による酢酸発酵

米酢は静置発酵といわれる方法で生産されており、この方法では、種酢に諸味を加温して注入し、静置して酢酸菌によるアルコールの酸化が行われる。この方法では、酢酸発酵に1~3ヶ月という長期間を要する。前報⁴⁾において酢製造期間の短縮を図るためにパーライトと不織布に酢酸菌を固定化した回転式バイオリアクターを用いて酢酸発酵を行い、アルコールから酢酸の変換を行うこと

表1 培養液中のエタノール、酢酸の変化

(原料: グルコース12% + 麦芽エキス1% + ペプトン0.1%)

	アルコール発酵		酢酸発酵	
	0日目	4日目	0日目	4日目
エタノール(g/100ml)	0	5.7	3.2	0.1
酢酸(g/100ml)	-	-	1.0	4.3

表2 培養液中のグルコース、エタノール、酢酸の変化

(原料: グルコース10% + 糖蜜3%)

	アルコール発酵		酢酸発酵	
	0日目	7日目	0日目	7日目
グルコース(g/100ml)	11.6	0.6	-	-
エタノール(g/100ml)	0	4.2	3.1	0
酢酸(g/100ml)	-	-	1.9	5.3

表3 培養液中のグルコース、エタノール、酢酸の変化

(原料: グルコース10% + 糖蜜10%)

	アルコール発酵		酢酸発酵	
	0日目	7日目	0日目	7日目
グルコース(g/100ml)	16.2	0.7	-	-
エタノール(g/100ml)	0	6.2	3.9	0.1
酢酸(g/100ml)	-	-	1.9	6.2

ができた。本年度は、糖分からエタノールの変換及びエタノールから酢酸への変換をバイオリアクターを用いて検討した。その結果は表1~3に示すように、グルコースからエタノール、エタノールから酢酸への変換が行われた。2週間以内で糖から酢酸に変換することができ、酢製造期間の短縮が可能となった。なお、アルコール発酵におけるエタノールリアクターのエタノール収率は平均77%、酢酸発酵における酢酸リアクターの酢酸収率は84%であった。今後はソース醸造において糖蜜及び酢を共に使用するのでソース用原料酢に利用するため糖蜜を多く含んだ濃厚な酢(今回醸造したものではまだ淡いので)の醸造を実用化に向けて検討していく必要がある。

3.2 色素生産実験

紅麹菌によって産出される色素の色調は赤色系である。菌体重量及び抽出色素重量を月岡らの方法に準じて測定した。その結果は表4に示すとおりであり、回転式バイオリアクターの方が対照より菌体重量、抽出色素重量が高い値であり、回転式バイオリアクターの優位性が認められた。また、担体の目の粗さによる差は認められなかったが、回転数によって色素重量も異なると考えられるので、今後さらに回転数による差異等について検討することが重要である。

表4 菌体重量及び色素量

	菌体重量(g)	抽出色素重量(g)
回転リアクター (保持担体:粗)	54.8	10.69
回転リアクター (保持担体:密)	53.5	10.27
対 照	47.7	7.16

3.3 酵母による高濃度排水処理

酵母を用いた排水処理法が最近開発され、通常の活性汚泥法に比べ高濃度の排水に対応でき、高負荷運転が可能になるといわれている²⁾。この方法では使用酵母は固液分離の必要性から凝集性酵母が用いられており、排水処理において沈降性の保持が重要である。しかし、前報³⁾のように酵母を多孔物質(パーライト)に保持させ、さらに酵母を保持させた多孔物質を繊維担体(ポリプロピレン不織布担体)に保持させるという二段階固定化法を用いれば、必ずしも酵母の凝集性は必要ではなくなった。この固定化法を用いて前報³⁾⁴⁾において単一酵母より6種酵母(*Saccharomyces cerevisiae* IFO 2018、*S.cerevisiae* ATCC 26603、*Pichia anomala* IFO 0963、*P.anomala* IFO 1181、*Candida schatavii* IFO 10258、*C.edax* IFO 10273)

を共生させたものの方がCOD除去率が高く、COD約10000ppmの合成排水は6種共生によってCODを85%除去できたが、COD約36000ppmの排水では6種共生でCOD除去率は50%程度であった。そこで、COD30000ppm以上の排水のCOD除去率を向上させるために6種酵母と活性汚泥を固定化し処理実験を行った。参考までに浮遊状態活性汚泥、保持担体に固定化した活性汚泥についても同様の実験を行った。その結果、図4に示すように、活性汚泥のみを用いる場合よりも6種共生酵母を用いるほうがCOD値は低くなったが、6種酵母と活性汚泥を保持担体に固定化したものと6種酵母を固定化したものとのCOD値は変わらなかった。したがって、30000ppm以上の排水を一つの処理槽で処理するにはCOD除去率は50%程度が限界であると思われ、高濃度排水(COD30000ppm程度)の処理には、酵母処理槽を複数用いることによ

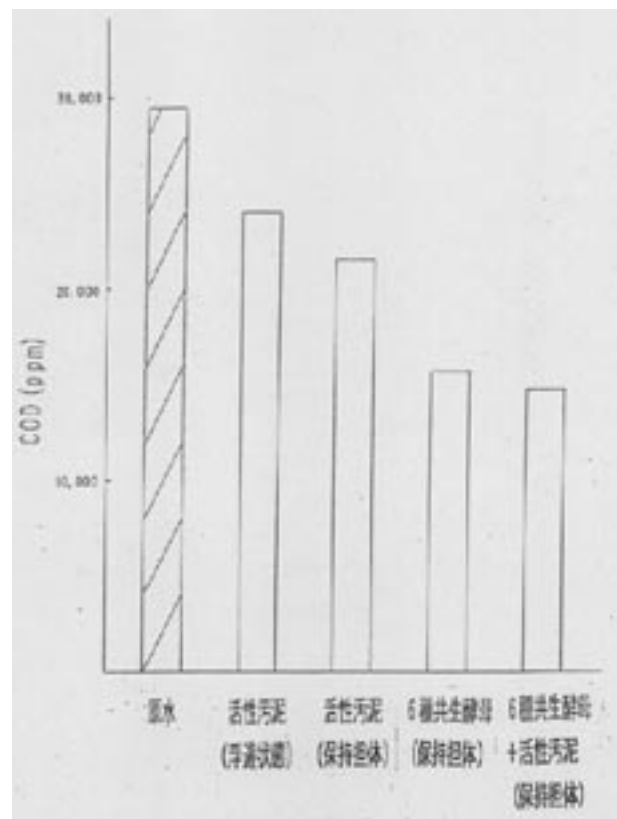


図4 固定化酵母及び活性汚泥による排水処理

て段階的に濃度を下げ、COD約10000ppmまで落とせば6種共生酵母によって85%除去でき、その後活性汚泥で処理が可能となると考えられる。

3.4 有価物生産用バイオリアクタ - の試作

微生物を担体に固定化し、微生物によって色素等の有価物を効率的に生産する装置として有価物生産用バイオリアクタ - を下記の仕様で試作した。本装置は固定化担体の種類、培養ドラムの回転速度、培養温度等で、最適な条件を検討するために、培養ドラム3個で一式のドラム回転式培養装置である。本装置の概要は、図5図6に示すとおりである。

仕様

ドラム回転装置

回転数 0.4 ~ 6.0rpm(直径90mmの円筒をのせたときの円筒の回転数) 可変調節できる

口 - ラ寸法 250mm

電源 単相 100 V

チャンバ -

外寸 550W × 550D × 450H(mm)

温度 室温 ~ 65 可変調節できる

蛍光灯 10 W、殺菌灯 10 Wを備える

攪拌ファンでチャンバ - 内の温度を均一にできる

電源 単相 100 V

4. 結 言

エネルギー - 効率がよく、地球環境に優しい技術として、微生物を不織布などに自然付着させたバイオリアクタ - を用いた微生物変換プロセスの化学、食品、環境分野への応用を検討し、次のような結果を得た。

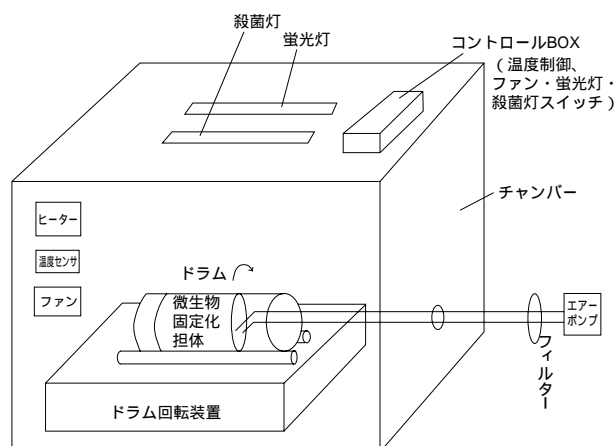


図5 有価物生産用バイオリアクタ - の見取図



図6 有価物生産用バイオリアクタ -

- (1) 糖蜜・グルコースを原料とし、バイオリアクタ - によるアルコール発酵を行い、そのアルコールを回転式バイオリアクタ - によって酢酸発酵を行って、2週間以内で糖から酢酸に変換することができた。
- (2) 不織布に紅麹菌を固定化することによって、赤色素を生成することができ、通常の液体培養より、効率的であった。固定化担体の繊維の目の粗さを変えて実験したところ、色素重量に差は認められなかった。
- (3) 6種の酵母と活性汚泥をともに保持担体に固定化したものを高濃度排水(COD30000ppm)処理実験を行ったが6種の酵母を固定化した場合とCOD除去率は変わらなかった。
- (4) 有価物生産用ドラム回転式バイオリアクタ - を試作した。

(参考文献)

- 1) 月岡 本、廣井忠夫、鈴木恒夫、今野俊雄：
日本農芸化学会誌、60,451(1986)
- 2) 千種 薫、矢口淳一、大下信子、長谷川太郎、山本菜穂子：用水と廃水、137,17,(1995)
- 3) 早川 潔、河村眞也、上野義栄、増野栄二、
李村美奈子、村上 誠、飯尾 毅：京都府中
小企業総合センタ - 技報、24,23(1996)
- 4) 河村眞也、早川 潔、上野義栄、東 和徳、
村上 誠、浦辺裕光、飯尾 毅：京都府中小
企業総合センタ - 技報、25,31(1997)