

バイオリアクターを用いたアルコール発酵

Ethanol Fermentation using Bioreactor

小野寺美佳*・山田 緑*・矢野 慎*・杉本 将英*

肥田野 豊**・長南 幸安*

Mika ONODERA*・Midori YAMADA*・Makoto YANO*・Masahide SUGIMOTO*

Yutaka HIDANO**・Yukiyasu CHOUNAN*

要 旨

近年、枯渇資源の代替エネルギーとして、バイオマスエネルギーが注目されている。その中の一つにアルコール発酵により得られるバイオエタノールがあるが、その合成方法は糖が溶けた水にドライイーストを加えて発酵させるというものである。この時、直接ドライイーストを加えて発酵させると、酵母の吸水による死滅によって働きが悪くなる。また一度アルコール発酵に用いたドライイーストは廃棄することになってしまう。そこで本研究では、ドライイーストを固定化したバイオリアクターを用いて発酵させることにより酵母の働きを良くし、さらにバイオリアクターは再利用可能ということで同じものを使って何度発酵させることが出来るか、ターンオーバーの検討を行った。その結果直接ドライイーストを加えて発酵させたときよりも酵母の働きが良くなり、15%という低い糖度の場合ではあるが8回繰り返し使うことが出来ると分かった。今後は20%、25%と高い糖度でも再利用可能なバイオリアクターの調製を考える必要がある。

Key Words：バイオリアクター・アルコール発酵・バイオエタノール・ターンオーバー

はじめに

バイオマスエネルギーは、生物体（バイオマス）の持つエネルギーを利用して生産されるアルコール燃料や合成ガスのことであり、現在主流である石炭や石油といった枯渇性資源の代わりとなり得る無限の生産可能なエネルギーとして、近年注目されている¹⁾。

バイオマスエネルギーが生産される方法の一つにアルコール発酵がある。アルコール発酵を行うにあたり触媒に酵母が利用されるが、たいていその酵母は一度使っただけで廃棄することになるだろう。エネルギーは得られるが、毎回廃棄があることはあまり好ましくない。その酵母をリサイクル出来るようになれば、廃棄量、経費ともに少なく抑えることができ、環境にも配慮したエネルギーの生産となる。そこで挙げられるのが、酵母を固定化したバイオリアクターである。

バイオリアクターとは、省エネルギー、省資源、低公害のプロセスを開発することが可能であることなど

の優れた特徴をもつ生化学反応を、有用物質の生産、様々な物質の分析や定量、医療、環境汚染物質の処理など、特定の物質を“生産する”、“分解する”、“測定する”ことに応用するシステムである²⁾。広い意味では、酵素や微生物菌体、動・植物細胞、細胞内小器官の“生体触媒”の触媒する生合成、生分解、物質の構造的部分的変化等の生化学反応を利用し、有用物質の生産、エネルギーの発生、環境汚染物質の分解などに応用する反応器と定義される²⁾。“リアクター”と言われる以上、これらは再利用可能である。狭義では触媒をリアクター内に安定に保持しつつ、連続あるいは繰り返し反応を行わせるシステム²⁾とされていることもあり、生体の持つ優れた性質を活用し、短所を補って長期間安定に働かせるために、生体触媒そのものに修飾を加えたり、反応器に工夫が凝らされたりする²⁾。

触媒を固定することにより、一度使った触媒を何度も使用することができる省資源のバイオリアクターは

* 弘前大学教育学部理科教育講座
Department of Natural Science, Faculty of Education, Hirosaki University
** 弘前大学教育学部技術教育講座
Department of Technology, Faculty of Education, Hirosaki University

有用なものである。しかし再利用可能とはいえ、永久に使い続けられるものではない。酵素の働きが弱まり、いずれその活性が失われるときがくる。よって限りある資源を有効に活用するために、バイオリアクターを上手く使っていかなければならない。特に酵素を用いる場合などは反応に対して適切な時間や量、濃度、pH、温度が決まっているため、それを満たすことで効率良く使用していくことが出来る。まずはその検討が必要であると考え。

バイオリアクターを用いたアルコール発酵

1) バイオリアクターの調製

本研究で調製したバイオリアクターは、人工イクラにドライイーストを固定したようなものである。人工イクラは外側の形を形成する層と中身、そして目玉を催した物の3層からなる。バイオリアクターは人工イクラのように中身と目玉は無いが、人工イクラの外側の層がリアクター全体を固め、その中にドライイーストが組み込まれた構造となっている。その様子を図1, 2に示す。

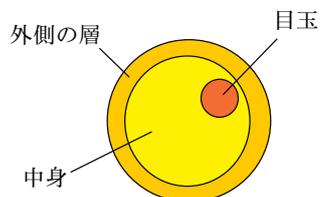


図1 人工イクラ

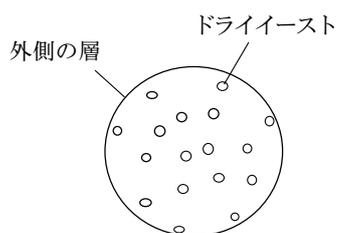


図2 バイオリアクター

まず100 mL ビーカーに36 mLの水とアルギン酸ナトリウム0.6 gを入れて溶かす。(写真1) 溶けにくい場合は300 mL ビーカーで湯煎すると溶けやすくなる(写真2)。次に300 mL ビーカーに水120 mLを入れ塩化カルシウム6 gを加えて溶かす。アルギン酸ナトリウムが完全に溶け(写真3)、湯煎した場合は体温程度まで温度が下がった後、ドライイースト3 gを加えて軽く混ぜる(写真4)。この時、酵母の吸水による死滅を防ぐため、あまり混ぜず且つアルギン酸ナト

リウム水溶液内で均等に散布するよう混ぜる必要がある。そして漏斗を使い、用意しておいた塩化カルシウム水溶液の中に滴下する(写真5)。塩化カルシウム水溶液中に溶液が滴下されると、すぐに流動性を失い固体状態となり、それを30分以上放置して固める³⁾。最後にバイオリアクターをビーカーに残して塩化カルシウム水溶液を捨て、バイオリアクターはビーカー内で水を用いて共洗いする。最後バイオリアクターを取り出すときに茶こし等を使うとこの操作は楽にできる³⁾。水洗いしたあと、キムワイプなどで水気を取る(写真6)。水に濡れた状態で置いておくと、中のドライイーストが水にしみ出してしまうため、必ず水気を取る必要がある。保存する場合はラップをして乾燥しないようにし、冷蔵庫に入れる。



写真1 アルギン酸 Na を水に溶かす



写真2 溶けにくい場合は湯煎する



写真3 溶けた状態

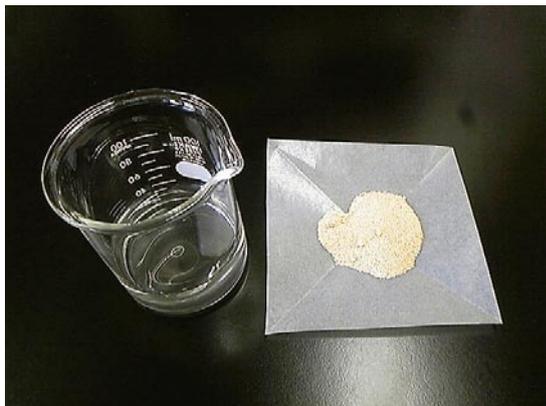


写真4 ドライイーストを加えて混ぜる

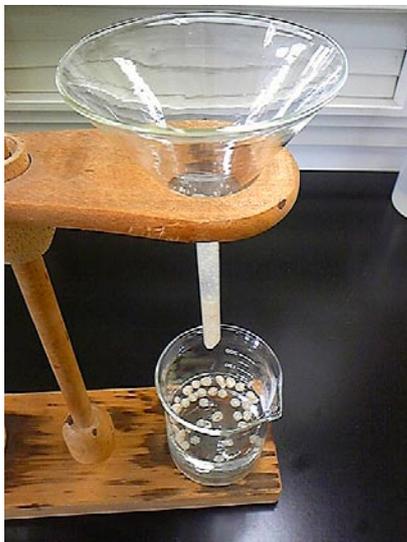


写真5 塩化Ca水溶液に滴下する

アルギン酸ナトリウム水溶液を塩化カルシウム水溶液に滴下したとき固体状となるのは、アルギン酸の性質によるものである。多糖類の一つであるアルギン酸(図3)はナトリウム塩(図4)が水に可溶であるの対し、カルシウム塩やアルミニウム塩などは水に不溶である²⁾。この性質を利用してアルギン酸ナトリウム水溶液とドライイーストを混合し、塩化カルシウム水

溶液中に滴下することによってアルギン酸カルシウム(図5)が生じ、その架橋により水に不溶となってその中にドライイーストが固定化された状態となる。これが固定化生体触媒のバイオリアクターである。

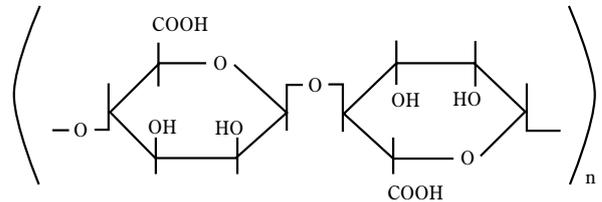


図3 アルギン酸

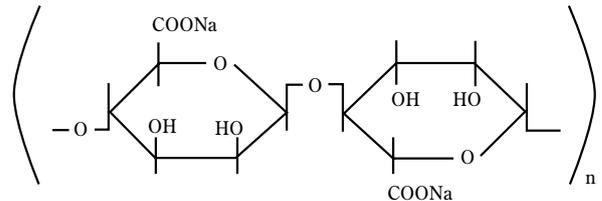


図4 アルギン酸ナトリウム

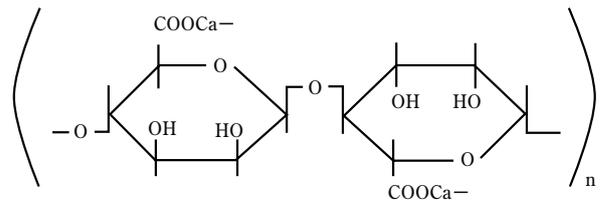


図5 アルギン酸カルシウム

2) アルコール発酵と糖度測定

アルコール発酵とは、酵母の働きにより糖を分解しエタノールと水が生成される過程である。その反応式を以下に示す。



この反応は、酵素を使わない嫌気条件のみで進行し、酵素がある場合はピルビン酸を完全に分解して糖を水と二酸化炭素に変えるが、パン酵母等を使用した場合酵素の存在下においても発酵を好むため、発酵条件によっては好気条件であってもエタノールを生産することが出来る¹⁾。また酵母による発酵の結果、糖度計による計測糖度の値の約半分の値のアルコールが生成される¹⁾。

本研究室を卒業した山田の研究によると、15%砂糖水の糖度が10%下がった時点でアルコールの着火実験に成功したという結果があり、また長時間発酵させても4%以下には下がりにくいため、アルコール発酵を行う際は5%程度まで下がった時点で発酵を終了した。また、使用するドライイーストの量は山田の直にドライイーストを加え発酵させた実験の結果と比較が

出来るよう、同じ量である3gを用いるとした。

水42.5 mLに砂糖を7.5g加え、50 mLの15%砂糖水を用意し、それに3gのドライイーストで作ったバイオリアクターを加えてアルミホイルでふたをし、37°Cの恒温槽で発酵させた(写真7)。



写真7 発酵させている様子

発酵に使ったバイオリアクターはビーカー内で水道水により何度か共洗いし、キムワイプやティッシュペーパーで水気を拭き取る処理をした。すぐ次の発酵に用いる場合はそのまま使い、次の発酵まで時間がある時はビーカーにラップをして冷蔵庫に入れ保存する。

発酵させてから時間経過とともに糖度を測定した。使用した糖度計は株式会社 ATAGO のデジタル糖度計で、光の屈折を利用し液体の濃度を測定する。



写真8 使用した糖度計

また山田の実験で扱われたスイートソルガムは、成長過程の差で糖度が20%を超す事もある。スイートソルガムの搾汁液を用いてバイオリアクターによる発酵を考えたとき、15%の砂糖水だけの結果では応用できないため、20%、25%の砂糖水を用意し同様の実験を行った。ターンオーバーの検討をする前に、それぞれの程度糖度が下がるのか2時間半おきに糖度を計測

し、最低糖度を検証した。そしてその値に達するあるいは近くなった時点で実験終了とした。

3) ターンオーバーの検討

ここで扱うターンオーバーとは、何度試料を同じように利用できるかということを表している。バイオリアクターはその名の通り、“リアクター”であるため何度かは利用できるが、酵母の働きが弱くなっていくといずれ同じように反応させることは出来なくなっていくと考えられる。そこで同じリアクターを用いて何度同じようなアルコール発酵をさせることが出来るか検討した。

まずは15%砂糖水での実験である。15%に調整した砂糖水50 mLを2つ用意し発酵させ、時間経過による糖度を測り、その平均を結果とした(表1)。

表1 15% 砂糖水 50 mL を約5% になるまで発酵させたときの糖度変化と発酵時間

	2.5 h後	5 h後	7 h後	7.5 h後	8 h後	9 h後
1回目	9.45	7.10	—	—	5.35	4.85
2回目	9.35	6.70	—	—	4.95	—
3回目	9.30	6.50	—	—	4.75	—
4回目	9.30	6.55	5.00	—	—	—
5回目	9.30	6.90	5.30	4.65	—	—
6回目	9.95	7.05	5.65	4.95	—	—
7回目	10.0	7.20	5.60	4.95	—	—
8回目	10.0	7.25	5.80	5.20	4.90	—
9回目	9.75	8.00	6.55	6.00	5.40	5.05

2回目から5回目までは同じような糖度の下がり方をしている。6回目から8回目の2時間半経過したときの糖度は今までと比べて少し大きい値となったが、その後発酵を続けていると7時間半後には同じように5%以下に下がった。また、9回目は時間経過による糖度の下がり方が小さく、9時間発酵させても5%以下とならなかった。

次に20%砂糖水での実験である。最低糖度の計測の結果20時間の経過で平均5.45%の糖度から下がらなくなり、その後発酵を続けても糖度は下がらず逆に上昇したため、その値を目安にターンオーバーの検討を行った。100 mL ビーカーに40 mLの水と砂糖を10g加え50 mLの20%砂糖水を2つ用意し、同じく3gのドライイーストで調整したバイオリアクターを各々に加え、37°Cの恒温槽で発酵させた。その糖度変化の平均を結果とし、表2に示す。

表2 20%砂糖水50 mL を5.45%付近を目安に発酵させたときの糖度変化と発酵時間

	2.5 h後	5 h後	7.5 h後	10 h後	12.5 h後	20 h後	30 h後
1回目	13.8	10.7	8.30	6.80	5.85	5.30	—
2回目	14.3	11.6	9.45	7.75	6.75	5.85	—
3回目	14.9	13.1	11.7	10.1	9.10	7.20	6.25
4回目	16.5	15.2	—	—	13.9	—	10.1

表3 25%砂糖水50 mL を7.00%程度まで発酵させたときの糖度変化と発酵時間

	2.5 h後	5 h後	7.5 h後	12.5 h後	20 h後	21 h後	28 h後	35 h後
1回目	17.9	15.1	12.8	9.70	7.60	—	—	—
2回目	18.9	16.7	15.0	12.2	—	9.55	8.50	7.80
3回目	19.7	—	—	17.8	15.4	—	—	—

20%砂糖水50 mL の場合では、糖度はある程度下がるが同じ発酵時間で同じような糖度変化はみられなかった。2回目に発酵させたとき、1回目と同じ時間経過で0.55%の差が生じた。3回目の発酵では1回目、2回目の発酵時間よりさらに10時間多く発酵させ、2回目の最終糖度と比べて0.40%の差まで下がった。4回目では3回目と同様の時間まで発酵させたが、その差は3.85%と大きく開いてしまった。

そして25%砂糖水の実験である。最初に最低糖度の検討を行ったところ、1約7.00%から糖度が下がりにくくなると考えられるため、最低糖度を約7.00%とした。2つの100 mL ビーカーに37.5 mL の水を入れ、12.5 g の砂糖を加えて溶かし、3 g のドライイーストで調製したバイオリアクターをそれぞれに入れ、37°C の恒温槽で発酵させた。この時、1回の発酵が終わってから次の発酵まで時間を置かず、すぐに次の発酵を開始した。糖度変化の平均を結果とし、表3に示す。

25%砂糖水50 mL の場合一度7.00%台まで発酵させたあと、次の発酵で同程度まで下げるにはおよそ倍の時間がかかった。また、3回目の発酵では20時間の発酵時間でも1回目、2回目と比較して明らかに酵母の働きが弱くなっているため、20時間経過したところで発酵を終了した。

考 察

これらの結果から今回調整したバイオリアクターでは、まず15%砂糖水50 mL の場合9回の実験より7時間半から8時間の発酵時間で糖度が約10% 下がることが分かった。これは着火実験が成功するほどのエタノールが生成されたことを意味する。また、9回目は時間経過による糖度の下がり方が小さく、9時間発

酵させても5%以下にならなくなったため、酵母の活性が小さくなってきたと言える。発酵時間とエタノールの生成量を毎回同様のものにするとした場合、3g のドライイーストで調製したバイオリアクターを用いて15%砂糖水50 mL の糖度を5%まで下げるアルコール発酵は、8回可能であることが分かる。

次に20%砂糖水50 mL の場合では、4回の実験により同じ時間経過で同様の結果を得ることは出来なかった。ただ1回目から3回目の結果より、時間経過を考えなければ6%程度までは繰り返しアルコール発酵が出来ると考えられる。4回目では3回目と同じ醗酵時間でも差が大きく出てしまったが、そこから糖度は下がりにくくなるため、同じような糖度まで下がるとしてもかなりの時間を要することになる。よって4回目の利用は期待できないため、20%の砂糖水50 mL を発酵させたとき、時間経過を考えないとすると約6%まで下げるアルコール発酵は3回繰り返し可能であると言える。

25%砂糖水50 mL の場合は3回の実験により20%砂糖水の時と同じように、同じ時間経過では同程度の糖度変化が得られなかった。また3回目で既に酵母の働きが悪くなっているため、リアクターとしての効果は発揮されなかった。よって25%砂糖水50 mL を発酵させるときは、山田の実験と比較して1回の発酵で直にドライイーストを加えたときよりも酵母の働きが良くなったという点で、バイオリアクターを用いる利点があると考えられる。

バイオリアクターを繰り返し使うにあたって、一度使ってから再び使うまでの時間も酵母の働きに影響すると分かった。発酵させ保存したあと次に使うまでの時間が短ければ酵母の働きも弱くなりやすく、一方長ければ酵母の働きが弱くなってしまふ。よって効率よ

く繰り返しバイオリアクターを使うとすると、一度発酵させてから次の発酵までの時間を長く置かず、連続的に発酵させた方が繰り返し使うことの出来る回数も増えると考えられる。

バイオリアクターを用いて発酵させているとき、糖度はある一定の値まで下がるとそれ以降下がらなくなり、逆に糖度が上昇してしまうこともある。この結果は発酵を開始してから長時間放置しておくことで得られた。この状態で放置しておくことも、酵母の働きを悪くする原因の一つであると考えられる。例を挙げると糖度20%の砂糖水を発酵させていたとき、20時間でおよそ最低糖度の平均5.45%まで下がり、その後発酵を続けたところ31時間後には平均6.00%に上がっていた。そして同じバイオリアクターを用いて2回目の発酵をしたとき、47時間発酵させて平均5.75%と1回目に分かった最低糖度へ近づくまで倍以上の時間を要した。しかし再び新しく同じバイオリアクターを調整し同じように発酵させ、20時間の発酵で平均5.30%と最低糖度まで下がった時点で放置せずに発酵を終了し、2回目の発酵を始めたところ、同じ20時間で平均5.85%まで糖度が下がった。その発酵で下がる最低の糖度に達してからすぐ発酵をやめ次の発酵に用いた場合と、最低糖度に達してもそのままの状態に長時間置いたものを次の発酵に使った場合では、前者の方が酵母の働きが良かったのである。よって発酵をする際は、使う砂糖水とバイオリアクターによる最低糖度および発酵時間を検証することで、その条件における効率の良いアルコール発酵が繰り返し出来ると考えられる。

ここで問題点だが、15%砂糖水の場合は8回同じ発酵時間で同じような値の糖度まで下げることに成功したのに対し、20%では1度使っただけで酵母の働きが弱くなってしまい2度目は同じ発酵時間では同じような糖度まで下がらなかった。これではスイートソルガムの搾汁液を発酵させる時に応用できない。そのため調製時に塩化カルシウム水溶液に浸ける時間を長く

し、架橋の強化を試みるなどのバイオリアクターを構成する架橋の強化や、酵母の働きを弱めない工夫が必要であると考えられる。

結 言

本研究ではアルコール発酵において酵母の働きを良くするためにバイオリアクターを用いた発酵とそのターンオーバーの研究、そしてクロマトグラフィーにより発酵溶液中のエタノールを分析することを目的として行った。

バイオリアクターを用いたアルコール発酵では、山田の研究と比較して酵母の働きが良くなったため短時間でより糖度を下げる発酵を行うことに成功した。また糖度が15%の砂糖水の発酵ではリアクターとして再利用可能という効果を発揮することが出来た。しかし20%、25%と糖度が上がると、酵母を直に加えて発酵を行う場合より働きは良いと考えられるが、バイオリアクターを使って1度発酵させると15%の時のように同じ発酵時間で同じ糖度変化は得られなかった。スイートソルガムの発酵に応用すると考えたときこれでは再利用は難しいため、バイオリアクターの強化や工夫、発酵させるときの条件などを考える必要がある。

参考文献

- (1) 山田 緑 (2009) 「スイートソルガムを用いたバイオエタノールの合成方法と教材化」 弘前大学 卒業論文
- (2) 福井 三郎・田中 渥夫 (1987) バイオリアクター ー生化学的側面からー 共立出版株式会社 p.2,4
- (3) 西山 隆造 (1989) 身近なライフサイエンスの実験 オーム社

(2011. 1. 24受理)