

[醸酵工学会誌 第67巻 第3号 167-172. 1989]

アガロース包括固定化酵母, *Saccharomyces uvarum*, によるグリセリンの連続生産

山出 和弘*・中田 修・福島 達

関西大学工学部化学工学科

(昭和63年10月6日受付 平成元年1月13日受理)

Continuous glycerol production with yeast cells, *Saccharomyces uvarum*, immobilized with agarose. KAZUHIRO YAMADE*, OSAMU NAKATA, and SUSUMU FUKUSHIMA (Kansai University, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, 3-3-35 Yamate-cho, Suita, Osaka 564) Hakkokogaku 67: 167-172. 1989.

Continuous glycerol production was examined in a bioreactor packed with immobilized yeast cells (*Saccharomyces uvarum*) with agarose. The optimum pH value was 8.0 for adding sodium sulfite in feed solution. When the ethanol concentration was 20-30 kg/m³, the maximum yield of glycerol from glucose was obtained.

Using a feed solution containing 180 kg/m³ of glucose and adding 100 kg/m³ of sodium sulfite, 50 to 60 kg/m³ of glycerol and 23 to 28 kg/m³ of ethanol were obtained at the residence time of 40 h and a temperature of 303 K. The simulated values from immobilized yeast-cells properties, which were activity, and yields of ethanol and glycerol from glucose in batch or continuous operation, almost agreed with the observed data in continuous operation.

グリセリンは医薬、食品、化粧品、火薬、たばこ、樹脂原料など幅広く使われている。現在グリセリンの工業的生産法としては、1) 石鹼製造の際の廃液から得る方法、2) 油脂を高温・高圧下または酵素で加水分解する方法、3) 石油を原料とし 513 K から 523 K の条件下で反応を行うプロピレンオキシド法がある。蒸気分解またはプロピレンオキシド法ではエネルギー消費が大きく、酵素法では反応が不均一系で操作が複雑である。油脂の加水分解、石油からの合成以外にグリセリンを製造する方法としては、糖類から微生物の代謝を利用して生産する方法がある。この方法は酵母がエタノール発酵する際に常に少量のグリセリンを生成することを利用し、エタノール発酵中間生成物であるアセトアルデヒドを亜硫酸塩等で固定するか、アルカリ性発酵を行わせてグリセリンを生成させる。もしくは正常発酵でグリセリンを代謝する微生物を使用す

る方法がある。亜硫酸塩を使用する方法は1913年に Neuberg and Kerb¹⁾ によって報告され、第一次大戦中には油脂が不足した際に欧州で火薬の原料生産として行われた。わが国でも第二次大戦中に工業生産が検討された。しかし、その後微生物の代謝を利用したグリセリン生産の研究報告は多くない。

本報では、固定化酵母を充填したバイオリクターを用いて、常温・常圧下で亜硫酸ナトリウムを添加したグルコース溶液から迅速なグリセリン連続生産を行うことを目的とした。また、実測値のシミュレーションについて検討した。

実験方法

菌体および固定化法²⁾ 菌体として *Saccharomyces uvarum* を用いた。菌体を YM 培地 (グルコース 50 kg/m³, ポリペプトン 5 kg/m³, 酵母エキス 3 kg/m³, マルツエキス 3 kg/m³) で振盪 (3.33 rps), 好気下, 303 K で24時間培養し, 33.3 rps, 5分間遠

* 連絡先, Corresponding author

心分離する。その湿潤酵母菌体（水分70～75%（w/w））と 20 kg/m³ のアガロース溶液（Agarose Type VII : Sigma Chem. Co., USA）を 1 : 3 の割合で 310 K においてよく混合攪拌する。この懸濁液をシリンジを用いてアイスバス上のオリーブオイル中に滴下し、約 30 分後、粒径 3 mm、菌体密度 70 kg (dry cell)/m³ (biocatalyst) のアガロース包括固定化酵母を得た。

使用培地 回分操作での培地および連続操作での供給液の組成はグルコース 45～225 kg/m³、クエン酸 2 kg/m³、硫酸マグネシウム（7水和物）2 kg/m³、硫酸アンモニウム 1 kg/m³、酵母エキス 1 kg/m³、ポリペプトン 1 kg/m³、リン酸二水素カリウム 0.2 kg/m³、亜硫酸ナトリウム 50 kg/m³、または 100 kg/m³ である。

pH による影響 pH を 6.0～9.0 の範囲で変化させ、固定化物を液容積当たり 8% 充填し、回分操作で、嫌気下、303 K におけるグルコース消費初速度を測定することにより検討を行った。また、この pH の範囲でのグリセリン収率を調べるためグルコース 100 kg/m³ の培地を用い、48 時間反応させた。

固定化物の活性の測定 グルコースを基質とし、固定化物を液容積当たり 8% 充填し、回分操作で、嫌気下、303 K における各グルコース濃度での消費初速度を測定することによって検討した。

グリセリンによる阻害の測定 グリセリン濃度を 0～65 kg/m³ の範囲で変化させ、固定化物を液容積当たり 8% 充填し、回分操作で、嫌気下、303 K におけるグルコース消費初速度を測定することにより検討を行った。

装置および操作条件 Fig. 1 に連続操作のフローダイアグラムを示す。容積 2.40×10^{-4} m³ の上下円錐型バイオリクターを用いた。固定化酵母の充填率は 26% である。供給液はペリスタポンプでリアクター下部より送入した。また、攪拌と嫌気下操作のため 5.0×10^{-7} m³/s の汙過除菌された窒素ガスを焼結ガラス板を通してリアクター最下部より分散送入させた。送出液は排ガスとともにリアクター上部より流出させた。

連続操作におけるシミュレーション このリアクターを完全混合槽とみなし、反応は Michaelis-Menten 式に従うとすると、グルコースの物質収支は (1) 式によって示される。

$$F(S_{in} - S_{out}) = [V_{max} \cdot S_{out} / (K_m + S_{out})](V_s) \quad (1)$$

ここで F は液容積速度 [m³/h]、 S_{in} と S_{out} はそれぞれ送入および送出グルコース濃度 [kg/m³]、 V_{max} はグルコース最大消費速度 [kg/m³ (biocatalyst)·h]、 K_m は Michaelis 定数 [kg/m³]、 V_s は固定化物体積 [m³ (biocatalyst)] である。

さらに、エタノールとグリセリン濃度の推算値は (2)、(3) 式によって得られる。

$$P_e = (S_{in} - S_{out}) \cdot Y_{e/s} \quad (2)$$

$$P_g = (S_{in} - S_{out}) \cdot Y_{g/s} \quad (3)$$

ここで、 P_e はエタノール濃度 [kg/m³]、 P_g はグリセリン濃度 [kg/m³]、 $Y_{e/s}$ はエタノール収率 [—]、 $Y_{g/s}$ はグリセリン収率 [—] である。

分析 エタノールはガスクロマトグラフィー (GC)

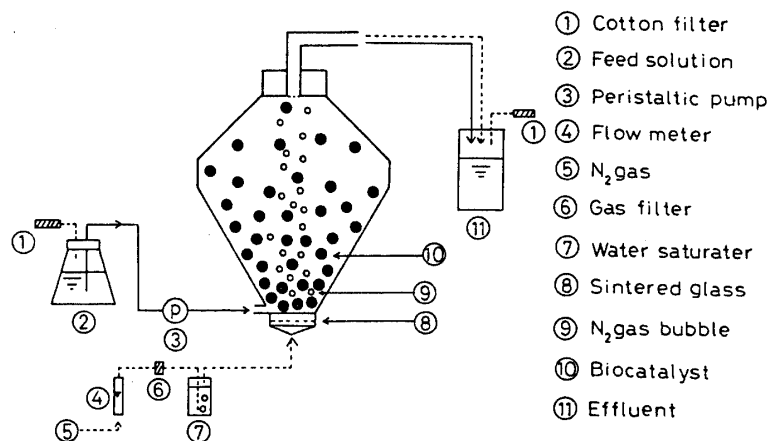


Fig. 1. Flow diagram of continuous glycerol production with rhomboid bioreactor containing yeast cells immobilized with agarose.

により、*n*-プロピルアルコールを内部標準物質として直接注入法で定量した。GC は Hitachi 163 型(FID) を用い、カラム (3 mmφ×2 m) には西尾工業(株)製 PEG 20 M/Chromosorb W (AW DMCS) MESH 60/80 を充填し、キャリアーガスとして窒素ガスを $3.0 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{s}$ で流し、水素および空気の流量はそれぞれ $4.17 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{s}$, $1.67 \times 10^{-8} \text{ m}^3/\text{s}$ である。カラムおよび注入口の温度はそれぞれ 373 K, 423 K とした。グリセリンの定量は Hanahan 法³⁾ により、グルコースの定量は酵素法 (グルコース-B-テスト: 和光純薬工業(株)) により行った。遊離酵母数はトーマ氏血球計による直接検鏡法で計数した。

実験結果および考察

pH による影響 増殖と代謝の至適条件は必ずしも一致するとは限らない。そこで、pH のみを変化させてグルコース消費速度とグリセリン収率について検討を行った。pH 8.0 におけるグルコース消費速度を 1 とした時の、グルコース消費速度の相対活性と pH の関係を Fig. 2 に示す。pH 8.0 で最大の活性を示した。また、pH とグリセリン収率の関係を調べた結果、pH の変化によるグリセリン収率への影響はなかった。

酵母の増殖の至適 pH は弱酸性であるが、本研究において亜硫酸ナトリウムを使用しているため酸性領域では遊離亜硫酸の影響を受けてグルコース消費速度の至適 pH が弱アルカリ性に移動したものと考えられる。そこで、以下の実験は pH 8.0 で行った。

固定化物の活性 各グルコース濃度でのグルコー

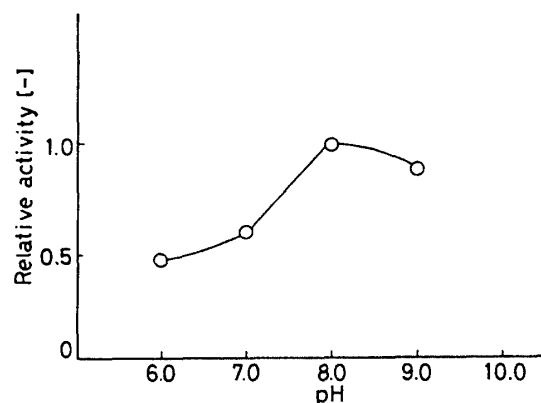


Fig. 2. Effects of pH values on relative activity of glucose consumption rate in batch operation (303 K). The glucose consumption rate was one at pH 8.0.

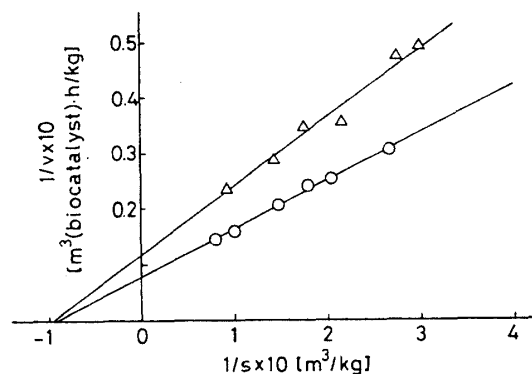


Fig. 3. Lineweaver-Burk plots of glucose consumption rate and glucose concentration for yeast cells (*Saccharomyces uvarum*) immobilized with agarose.
(○: 50 kg/m³ of sodium sulfite; △: 100 kg/m³ of sodium sulfite)

ス消費速度を Lineweaver-Burk プロットしたものを Fig. 3 に示す。亜硫酸ナトリウム 50 kg/m³ の場合には $V_{\max} = 128.3 \text{ kg/m}^3 \text{ (biocatalyst)·h}$, $K_m = 13.8 \text{ kg/m}^3$ である。また、亜硫酸ナトリウム 100 kg/m³ の場合には $V_{\max} = 101.4 \text{ kg/m}^3 \text{ (biocatalyst)·h}$, $K_m = 12.1 \text{ kg/m}^3$ である。

グリセリンによる阻害 グルコース消費速度と添加グリセリン濃度の関係より、グリセリン濃度が 65 kg/m³ まで顕著な阻害は見られなかった。

グリセリン生産性に対するエタノール濃度の影響

Table 1 にグリセリン生産性に対するエタノール濃度の影響を示す。エタノール濃度が 46 kg/m³, 供給グルコース濃度が 180 kg/m³ までは大きく生産性に変化はないが、エタノール濃度が 62.6 kg/m³, 供給グルコース濃度が 225 kg/m³ になると30%低下した。この連続操作においてリアクター内の残グルコース濃度はほぼ一定であった。Kalle ら⁴⁾ は、エタノール濃度が 30 kg/m³ 以上になると糖消費が極端に減少するため、減圧することによりエタノール濃度を 30 kg/m³ 以下にして操作したことを報告している。しかし、本研究においては、エタノール濃度が 30 kg/m³ 以上でもエタノール阻害を考慮していないグルコースの物質収支が成立したことよりエタノール濃度の上昇がグルコース消費速度の低下の原因とは考えられない。さらに、生産性低下の原因としてはエタノール濃度の変化でグリセリン収率が変化することである。そこで、エタノール濃度だけを変化させた回分操作と Table 1 に示した連続操作の定常期でのグリセリン収率とエタノール

Table 1. Effects of ethanol concentration on glycerol productivity.

Glucose concentration in feed solution [kg/m ³]	Ethanol concentration [kg/m ³]	Glycerol concentration [kg/m ³]	Glycerol productivity [kg/m ³ ·h]
45	11.4	9.94	1.24
100	20.0	24.8	1.55
180	46.2	37.8	1.56
225	62.6	40.3	1.05

濃度の関係を調べた結果を Fig. 4 に示す。グリセリン収率は回分操作と連続操作ではほぼ同様の傾向を示し、エタノール濃度が 30 kg/m³ 付近で最大値を示した。また、グリセリン収率とエタノール濃度の関係は次の二次式で近似できた。

$$Y_{g/s} = (-4.48 \times 10^{-5})P_e^2 + (2.23 \times 10^{-3})P_e + 0.213 \quad (4)$$

グリセリン収率とエタノール濃度の関係より、供給グルコース濃度が 225 kg/m³ の場合、エタノール濃度が 62.6 kg/m³ になることにより生産性が低下したと考えられる。

連続操作 回分操作と連続操作の結果をもとに長期間の連続操作を行った。送入グルコース濃度が 100 kg/m³、亜硫酸ナトリウムが 50 kg/m³、温度 303 K、装置当たりの液滞留時間が16時間での結果を Fig. 5 に示す。グリセリン濃度が 22~28 kg/m³、エタノール濃度が 20~24 kg/m³、残グルコース濃度が 2~7 kg/m³ の連続操作を35日間以上続けることができた。実線は (1), (2), (3) 式に回分操作で得られた $Y_{e/s}=0.20$ と $Y_{e/s}=0.245$ および V_{max} と K_m を代入して得ら

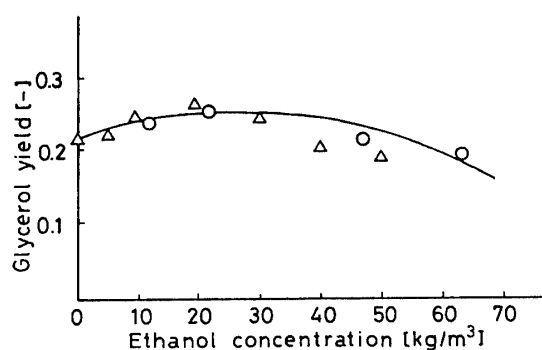
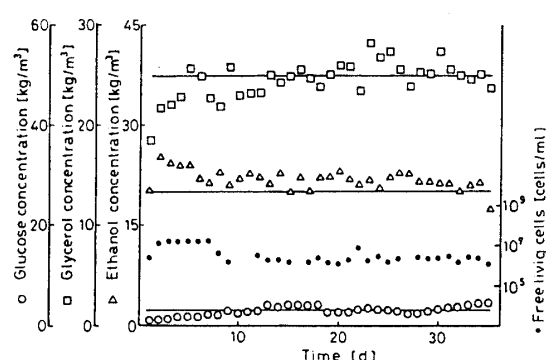


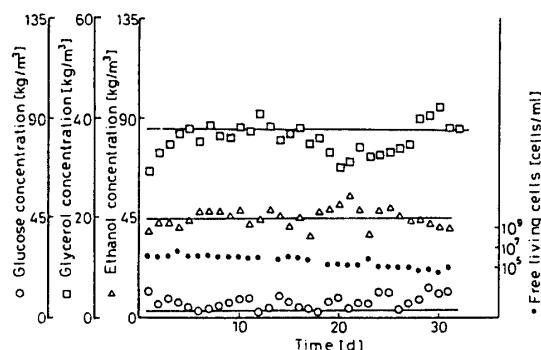
Fig. 4. Effects of ethanol concentration on glycerol yield (303 K, pH 8.0).

(○ : continuous operation; △ : batch operation)

Fig. 5. Course of continuous glycerol production with rhomboid bioreactor containing yeast cells immobilized with agarose (100 kg/m³ of glucose, 50 kg/m³ of sodium sulfite, residence time 16h, 303 K, pH 8.0).

れた推算値であり、実測値をほぼ説明することができた。

次に、グリセリンの高濃度生産を行うために送入グルコース濃度を 180 kg/m³ にし、液滞留時間を24時間

Fig. 6. Course of continuous glycerol production with rhomboid bioreactor containing yeast cells immobilized with agarose (180 kg/m³ of glucose, 50 kg/m³ of sodium sulfite, residence time 24 h, 303 K, pH 8.0).

にした時の結果を Fig. 6 に示す. グリセリン濃度が $36\sim 38\text{ kg/m}^3$, エタノール濃度が $40\sim 50\text{ kg/m}^3$, 残グルコース濃度が $4\sim 8\text{ kg/m}^3$ となり, 送入グルコース濃度が 100 kg/m^3 の場合に比べて, より高濃度の生産を30日間以上続けることができた. 実線は(1), (2), (3)式に回分操作より得られた $Y_{e/s}=0.26$, $Y_{e/s}=0.21$ および $V_{\max}$ と K_m を代入し, 得られた推算値であり実測値をほぼ説明することができた.

さらに, 回分操作における供給グルコース濃度が 225 kg/m^3 でエタノール濃度が 62.6 kg/m^3 の場合以上にグリセリン濃度を上昇させて生産性を上げるには, 供給グルコース濃度を上げるだけでなく亜硫酸ナトリウムの濃度を上昇させて, グリセリン収率を上昇させる必要がある. そこで, 亜硫酸ナトリウムの濃度を 100 kg/m^3 にし, 供給グルコース濃度を 180 kg/m^3 , 温度 303 K , 装置当たりの液滞留時間40時間で連続操作を行った. その結果を Fig. 7 に示す. グリセリン濃度が $50\sim 60\text{ kg/m}^3$, エタノール濃度が $23\sim 28\text{ kg/m}^3$, 残グルコース濃度が $4\sim 10\text{ kg/m}^3$ の連続操作を20日間以上続けることができた. 生産性は $1.40\text{ kg/m}^3\cdot\text{h}$ と回分操作の供給グルコース濃度が 225 kg/m^3 に比べて良好な結果が得られた. 実線は(1), (2), (3)式に回分操作で得られた $Y_{e/s}=0.14$, $Y_{g/s}=0.31$ および亜硫酸ナトリウムの濃度が 100 kg/m^3 のときの $V_{\max}$ と K_m を代入して得られた推算値であり, 実測値をほぼ説明することができた.

これらの連続操作で遊離菌体数は亜硫酸ナトリウムが 50 kg/m^3 で, 供給グルコース濃度が 100 kg/m^3 の場合, $10^6\sim 10^7\text{ cells/ml}$ であり, 180 kg/m^3 の場合, $10^5\sim 10^6\text{ cells/ml}$ であった. これは, 供給グルコース

濃度が 100 kg/m^3 に比べて 180 kg/m^3 の方がエタノール濃度が高いため, 酵母の増殖が抑えられたものと考えられる. Kalle ら⁴⁾ はエタノール濃度が 30 kg/m^3 以上になると, 酵母の生存率が減少すると報告している. また, 亜硫酸ナトリウムが 100 kg/m^3 で供給グルコース濃度が 180 kg/m^3 の場合, エタノール濃度が $23\sim 28\text{ kg/m}^3$ と比較的低い濃度であっても遊離菌体数は直接検鏡法では測定できない程低かった. 酵母の増殖はエタノールだけでなく亜硫酸ナトリウムの濃度も影響していると考えられる. Bisping and Rehm⁵⁾ は57時間の回分操作において, エタノール濃度が 14.3 kg/m^3 という低い濃度にもかかわらず遊離菌体数が $3.1\times 10^7\text{ cells/ml}$ から $5.5\times 10^6\text{ cells/ml}$ に減少すると報告している.

また, 各連続操作においてアガロース包括固定化酵母の崩壊はなく, 膨潤もほとんどなかった.

文献値との比較 Bisping and Rehm⁵⁾ は焼結ガラスに吸着固定化した *Saccharomyces cerevisiae* を用いた嫌気下での回分操作において, グルコース濃度が 100 kg/m^3 でグリセリン濃度が 29.5 kg/m^3 , 生産性は $0.7\text{ kg/m}^3\cdot\text{h}$ という値を報告している. 生産性, 濃度とも本報の方が上回っている. これは, 酵母を吸着固定化しているため, 本報よりも菌体濃度が低く, 固定化物当たりのグルコース消費速度が低いためと考えられる. Vijaikishore and Karanth⁶⁾ は κ -カラギーナンで固定化した *Pichia farinosa* を用いた好気下での連続操作を行っていて, グルコース濃度が 100 kg/m^3 でグリセリン濃度が 13.5 kg/m^3 , 生産性は $2.7\text{ kg/m}^3\cdot\text{h}$ という報告がある. この報告に比べて本報での生産性が下回っている原因としては好気下で操作しているため嫌気下よりグルコース消費速度が大きくなったためと考えられる. *Pichia farinosa* は酸素を十分に供給しないと多価アルコール発酵からエタノール発酵へ代謝が移動するという報告がある⁷⁾. グリセリン濃度が低いのは十分に固定化物内の菌体に酸素が供給されなかったためと考えられる. Kalle and Naik⁸⁾ は cane molasses を原料として, それを還元糖に換算して 385 kg/m^3 で *Saccharomyces cerevisiae* の遊離菌体を用いた場合グリセリン濃度は 96.0 kg/m^3 と本報を上回っているが, 生産性は $0.66\text{ kg/m}^3\cdot\text{h}$ と本報の半分以下の値であった. この場合, 遊離菌体を用いているため本報より菌体濃度が低いため生産性が低くなったと考えられる.

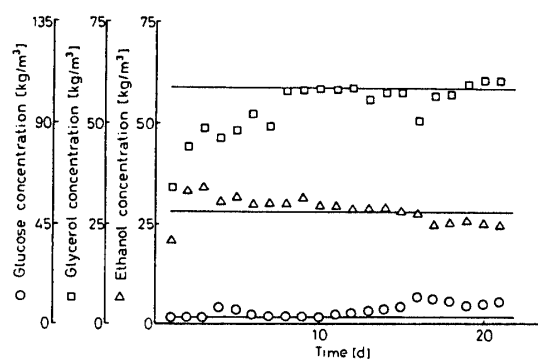


Fig. 7. Course of continuous glycerol production with rhomboid bioreactor containing yeast cells immobilized with agarose (180 kg/m^3 of glucose, 100 kg/m^3 of sodium sulfite, residence time 40 h , 303 K , $\text{pH } 8.0$).

要 約

1. 酵母の至適 pH は酸性側であるが、本報においては亜硫酸ナトリウムを使用しているため酸性側では遊離亜硫酸の影響を受け、至適 pH は8.0であった。

2. 回分操作で各グルコース濃度における消費初速度を測定することによって得られた $V_{\max}$ と K_m の値を連続操作のグルコース物質収支式に代入することによりグルコース濃度の推算を行うことができた。また、回分操作より得られた $Y_{g/s}$, $Y_{e/s}$ よりグリセリン、エタノール濃度を推算することができた。

3. エタノール濃度とグリセリン収率の間には二次曲線の関係が見出され、エタノール濃度が 20~30kg/m³ の時、最大のグリセリン収率となった。

4. 供給グルコース濃度の上昇とともにグリセリン濃度も上昇するが、同時に生成するエタノールの影響をうけて生産性が低下する。しかし、亜硫酸ナトリウム濃度を 50 kg/m³ から 100 kg/m³ にすることにより高濃度・高生産性の連続生産を行うことができ

た。

文 献

- 1) Neuberg, C., Kerb, J.: *Biochemische Zeitschrift.*, 58, 158-170 (1913).
- 2) Nilsson, K., Brinbaum, S., Flygare, S., Linse, L., Schröder, U., Jeppson, U., Larsson, P., Mosbach, K., Brodelius, P.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 319-326 (1983).
- 3) Hanahan, D. J., Olley, J. N.: *J. Biol. Chem.*, 231, 813-828 (1958).
- 4) Kalle, G. P.; Naik, S. C., Lashkari, B. Z.: *J. Ferment. Technol.*, 63, 231-237 (1985).
- 5) Bisping, B., Rehm, H. J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 174-179 (1986).
- 6) Vijaikishore, P., Karanth, N. G.: *Biotechnol. Lett.*, 8, 257-260 (1986).
- 7) Vijaikishore, P., Karanth, N. G.: *Process Biochem.*, 21, 160-162 (1986).
- 8) Kalle, G. P., Naik, S. C.: *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 1173-1175 (1987).