アルコールの高濃度連続生産システムの開発に関する研究

- 流加培養システムの利用による高濃度アルコール製造技術の開発について -

食品工業部
江口良寿
材料環境部
福元　豊　矢野昌之　円城寺隆志

高濃度アルコールの製造を目的として，流加培養を利用したシステム開発を行った．このシステムを利用することで，17 ～ 18%程度の高濃度アルコールを含有する発酵もろみが 84 時間程度で製造可能となった．また，高濃度アルコールの製造には協会７号酵母より協会９号酵母の方が適しており，発酵原料の糖がグルコースでもスクロースでもその到達アルコール濃度及び発酵効率に差がないことが明らかとなった．

１．はじめに

世界的な環境問題の顕著化により，環境負荷の少ない再生可能なエネルギーの研究開発が活発化している．その中でも，農産物や農産廃棄物，廃木材などを原料としたバイオエタノールは世界的に研究開発や実証試験が行われている．現在行われている研究としては，木質系バイオマスの高効率な糖化，C5 糖（キシロースなどの炭素数５の糖）発酵性微生物の育種，遺伝子組み換え細菌による高効率アルコール発酵などの技術開発やエネルギー作物としての農産物の開発などが挙げられる．

このような動きは全国的に広がっており，（独）産業技術総合研究所や大手プラントメーカーを中心とした木質系バイオマスからのバイオエタノール製造をはじめとして，コメ，小麦，こうりゃんなどの農作物や糖蜜からのエタノール製造・実証試験が進められている．

現在実施されているアルコール発酵では，酵母を用いて 10%程度のアルコールを製造し，これを蒸留して 90%以上のバイオエタノールを製造している．しかしながら，この製造方法では発酵によって得られるアルコール濃度が低いため，発酵装置や蒸留装置，廃水処理施設が大きく，発酵・蒸留・廃水処理に関する投与エネルギー量が膨大になる問題がある．この問題を解決するには，発酵により得られる発酵もろみのアルコール濃度を高くする必要があり，そのためには発酵原液の糖濃度を高める必要がある．しかしながら，糖濃度を高くすると高糖圧迫により酵母が発酵阻害を受けるため，単発酵で 14%以上のアルコールを得ることは困難となっている．

一方，清酒醸造では低温での発酵という制限はあるものの，清酒醪（もろみ）では 18 ～ 20%のアルコールが製造されている．これは清酒醸造が並行複発酵と呼ばれるデンプンの液化・糖化とアルコール発酵が醪中で同時に進行する発酵形態であるために，醪中の糖濃度は発酵期間中１～２%程度に抑えられ，酵母が高糖圧迫を受けずにアルコール発酵できるためである．このような並行複発酵のメカニズムが知られているにもかかわらず，現在でも一般的なアルコール発酵によってバイオエタノールが製造されているのは，並行複発酵による高濃度アルコール発酵が低温で行われることで発酵期間が長くなり，発酵システム全体としては発酵効率が悪いためである．また，現在の並行複発酵はデンプン質でのみ実施可能であり，糖蜜や廃木材等を原料として糖化した原料については実施できないことも一要因である．しかしながら，糖化した原料を用いて並行複発酵を擬似的に再現することが可能になれば，いろいろな糖原料を用いた高濃度アルコールの製造が可能になると考えられる．

そこで，本研究では並行複発酵を擬似的に再現できるバイオリアクターを開発し，高効率で高濃度アルコールが製造可能なシステムの開発を行うことを目的とする．本年度は高濃度アルコール生産を可能とするシステムの開発を行うために流加培養に着目してバッチシステムの開発及び高濃度アルコールの生産条件について検討を行った．

２．実験方法

2.1 供試菌株及び培地

発酵性酵母として当センターに保存している清酒酵母の協会７号酵母及び協会９号酵母を用いた．これらの菌株はＭＹ培地（酵母エキス 0.3%，麦芽エキス 0.3%，ペプトン 0.5%，グルコース 1.0%）でそれぞれ培養して実験に用いた．また，酵母エキス，麦芽エ

キス，ペプトンをそれぞれ２倍とした 2MY 培地（酵母エキス 0.6%，麦芽エキス 0.6%，ペプトン 1.0%）のグルコース濃度を 15%（2MY15），16%（2MY16），18%（2MY18）及び 20%（2MY20）とした開始培地と 1/2MY 培地（酵母エキス 0.15%，麦芽エキス 0.15%，ペプトン 0.25%）のグルコース濃度を 40%（1/2MY40），50 %（1/2MY50），55 %（1/2MY55）とした流加培地を用いた．

2.2 流加培養システムの構築

流加培養システムは東京理化器械株式会社製 MINI JARFERMENTOR M-100 にアタゴ社製 RX-5000 をフローセルに改造した Brix 測定装置（RX-5000FA）及び GE Healthcare Bio-Sciences AB 社製 Peristaltic Pump P-1，株式会社システムサコム販売の USB-TMI-AC10Aa，制御用コンピュータ（OS:Windows 2000 Professional）を用いて構築した（図１）．また，制御プログラムは Microsoft 社製 Visual Basic 6.0 で作成した．

2.3 アルコール発酵試験

各種グルコース濃度の開始培地 900ml をジャーファーメンタに入れ，これに MY 培地で 18 時間振とう培養した酵母培養液 15ml を添加した後，30℃及び 28.5℃で培養を開始した．10 秒毎に培養液の Brix 糖度を測定し，設定した Brix 濃度以下になったら流加培地を添加して培養液の Brix 濃度を一定に保ちながら培養を行った．規定量の流加培地を添加後さらに培養を行い，Brix 濃度の低下が認められなくなってから６時間後を発酵終了とした．

2.4 発酵液の分析

発酵液のアルコール濃度は島津社製ガスクロマトグラフィー GC-A9 による絶対検量線法で，グルコース濃度は株式会社アークレイ ファクトリー社製グルテストエース R により測定し，菌体量は培養液 1.0ml 中の菌体の湿重量とした．

2.5 流加プログラム

開始培地への流加培地（高濃度糖液）の流加は開始培地への糖の供給を行うと共にアルコール濃度の低下を引き起こすことから，その流加タイミングは重要な要素となる．また，生成エタノール濃度により酵母の耐糖性は低くなると考えられるため，目標とする Brix 値はアルコール濃度の上昇に従い低く設定する必要がある．そこで，流加プログラムは開始糖液の糖濃度が 20％の場合，発酵開始後 Brix 値が 2.7％低下してから（約 12 時間後）流加を開始し，段階的に目標 Brix 値を低下させた．

３．結果及び考察

3.1 20%グルコース開始培地，50%グルコース流加培地による発酵経過

開始培地として２MY20 培地 900ml を用い，これに 1/2MY50 培地 480ml の流加培地を用いたときの発酵経過を図２に示す．流加プログラムは Brix が 2.7%低下してから流加培地を 240ml 流加し，その後 Brix が 0.5%低下する毎に流加培地を 60ml 流加してそのまま発酵が終了（Brix の低下が認められなくなって６時間後）するまで発酵させた．制御期間における Brix 値はおおむね一定に保たれ ON/OFF 制御であっても十分に制御可能であることがわかった．このことは Brix の測定に菌体粒子が影響を与えていないことと，Brix 測定部と発酵槽が多少離れていても発酵速度に対して流加速度が高速であるためであると考えられた．しかしながら，Brix 測定装置内に気泡が混入した場合は異常な Brix 値を示してミスフィードする場合があり，Brix 測定部への気泡の混入及び混入した気泡の排除ができるような機構にすることが今後のプロセス化での課題となった．

流加培地の流加は発酵開始後約 12 時間から始まり，流加速度は流加開始直後から徐々に向上して流加開始

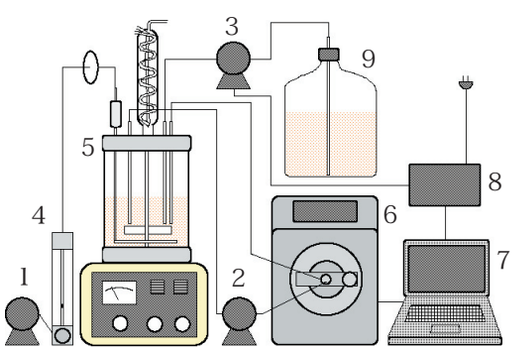

図１ 流加培養システムの概略図

１：送気ポンプ，２，３：送液ポンプ（P-1），４：流量計，５：ジャーファーメンタ（M-100），６：Brix 測定装置，７：制御コンピュータ，８：リレーユニット，９：リザーバータンク

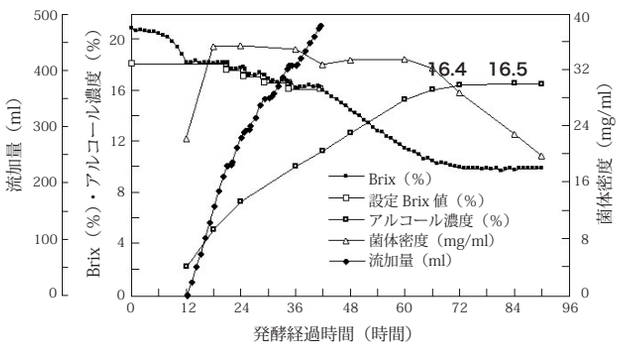

図２　流加培養システムによる発酵経過

開始培地：20％グルコース 2MY 培地 900ml，流加培地：50％グルコース 1/2MY 培地 480ml，酵母菌株：協会９号，発酵温度：30℃，通気量：50ml/ 分，撹拌速度：250rpm

後約６時間で最高に達した後徐々に低下し，最終的に約 41.5 時間で終了した．流加終了後は Brix 値は徐々に低下し，約 70 時間後にほぼ一定の値となった．

菌体密度は発酵開始後から急速に上昇し，18 ～ 24 時間で最高の 35mg/ml に達した後，若干低下し，流加終了後に若干上昇した後，66 時間以降急速に低下した．このことから発酵開始直後は菌体増殖が激しく，流加培地の流加による希釈速度よりも増殖速度が速くなっているのに対し，流加終期では増殖速度よりも流加による希釈速度の方が高いこと，また，流加終了直後は多少菌体増殖が認められることがわかった．さらに，発酵終期の 66 時間以降は自己消化する菌体が増えることにより，菌体密度の低下が急速に進行するものと考えられる．

生成アルコール濃度は発酵開始 24 時間（約８％）までは急速に向上しているが，その後 60 時間（約 15%）以降ほとんど上昇しないことがわかった．また，本システムを用いることで，並行複発酵でなくても 16.5%の高濃度アルコールの製造が可能であることがわかった．

3.2 20%グルコース開始培地，40%グルコース流加培地による発酵経過

開発した流加培養システムを用いることで 16%を超える高濃度アルコールの製造が可能となった．そこで次に，流加培地の糖濃度及び流加量の違いによる発酵効率の違いを検討した．流加培地の糖濃度を低くして流加量を増大させることで，発酵初期の高泡期の液量を少なく抑え，その後の液量を増大させることで発酵槽の有効利用率を向上させることができることから，流加培地の糖濃度を 40%として流加培養を行った．流加培地の液量増に従い，流加プログラムは Brix 値が 2.7%低下してから 420ml 流加し，その後 Brix 値が 0.5 低下する毎に 130 ～ 160ml の流加培地を流加した．発酵経過を図３に示す．

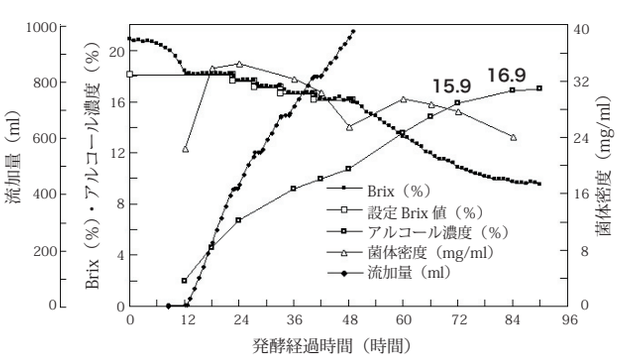

図３　流加培養システムによる発酵経過

開始培地：20%グルコース 2MY 培地 900ml，流加培地：40%グルコース MY 培地 980ml，酵母菌株：協会９号，発酵温度：30℃，通気量：50ml/ 分，攪拌速度：250rpm

流加培地の糖濃度の低下により流加速度は大幅に向上したために，菌体密度は 24 時間をピークに大幅に減少し，流加終了後に一旦回復後 60 時間以降再び減少した．菌体密度は全発酵期間で前回より低く，そのためにアルコール濃度の伸びは全体的に低くなった．また，流加終了時間及び発酵終了時間も遅くなり，それぞれ 49，90 時間となった．これは流加培地の糖濃度が低いために流加量が増えることで菌体増殖速度よりも流加量が多くなり，菌体密度が向上しなかったためだと考えられた．しかしながら，アルコール生成速度は 3.55ml/hr（90 時間での平均）となり，50%グルコース流加培地とほとんど変わらないか若干高くなった．この原因としては 50%グルコース流加培地が 1/2MY だったのに対して，今回は MY としたことにより栄養成分が多かったためであると考えられる．これらのことから，流加培地の糖濃度が低い場合は発酵期間の延長が起こるものの，アルコール生成速度にはほとんど影響しないものと考えられた．従って，本流加培養システムでは様々な糖濃度の糖液（培地）を原料として用いても，高効率で高濃度アルコールの製造が可能であると言える．

3.3 15%グルコース開始培地，55%グルコース流加培地による発酵経過

3.2 で述べたように，流加培地の糖濃度を低くすると流加液量が増加するために発酵期間の延長が起きることが判明したが，開始培地の糖濃度を低くした場合は流加液量の増加は起こるものの，初期発酵速度の向上が見込まれる．また，これまで設定 Brix 値を段階的に下げていたが，高糖圧迫を受けにくいために１段階の設定で制御できるため，より制御が容易になると考えられる．そこで，開始培地の糖濃度を 15%，流加培地の糖濃度を 55%としてその影響について検討を行った．開始培地の糖濃度を低くしたことから流加プログラムは Brix 値が 1.1%低下して流加を開始し，

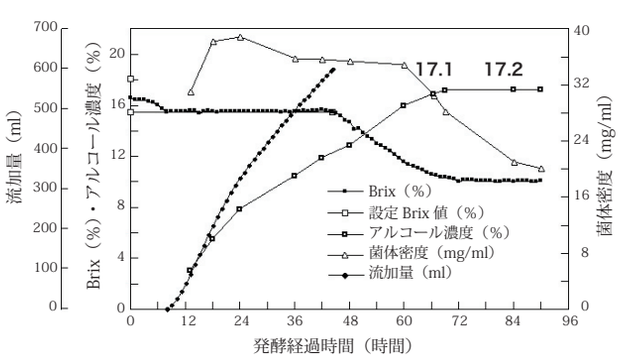

図４　流加培養システムによる発酵経過

開始培地：15%グルコース 2MY 培地 900ml，流加培地：55%グルコース MY 培地 600ml，酵母菌株：協会９号，発酵温度：30℃，通気量：50ml/ 分，攪拌速度：250rpm

600ml 流加した．その発酵経過を図４に示す．

流加速度は流加時期が早まったために流加開始直後は遅くなったが，全流加期間を通じて 3.1 の実験よりも速く進行し，44 時間で流加を終了した．また，菌体密度も 3.1 の実験よりも高い数値で推移した．これは 3.1 の実験での流加培地が 1/2MY50 であったのに対して今回は MY55 としたために栄養成分の希釈が少なく，菌体密度の低下が少なかったためだと考えられる．しかしながら，アルコール濃度の経過は 3.1 の実験とほとんど差がないことから，MY55 培地を用いたときの発酵効率は開始培地及び流加培地の糖濃度や流加量に係わらずほぼ一定になることがわかった．

3.4 流加培養における発酵温度の影響

これまでの実験で構築した流加培養システムを用いることにより 17%を超えるアルコール濃度の発酵もろみが製造できることがわかったが，清酒醪では低温発酵ではあるものの 20%程度のアルコールが製造されている．これまでの実験では発酵温度を 30℃としていたが，アルコール濃度が高い環境下で発酵温度が高いと酵母には相当のストレスがかかると考えられる．実際，これまでの実験でアルコール濃度が 16%を超えると酵母が自己消化していることから，発酵温度を低くすることでさらに高濃度のアルコールを製造できる可能性がある．そこで，本実験では発酵温度を 28.5℃として，到達アルコール濃度の向上について検討を行った．また，開始培地及び流加培地のグルコース濃度はそれぞれ 16%，55%とし，設定 Brix 値を一定として流加を行った．その結果を図５に示す．

図５から発酵温度を下げたことにより，初期発酵速度（流加速度及びアルコール濃度の増加速度）は若干低下したものの，流加終了時間は 52 時間と 30℃で発酵させた場合とほぼ同じか若干遅くなった．また，菌体密度は発酵前期から中期までは 30℃の方が高くなったものの発酵後期から終期では菌体密度の低下速度が遅くなり，発酵温度を低下させたことにより酵母細胞の自己消化が抑さえられていることが明らかとなった．そのため，アルコール濃度も発酵中期までは 30℃の方が高く推移していたが，発酵 48 時間後にはほぼ同じになり，70 時間で逆転した．同様に発酵 70 時間以降では Brix 値が低下したことから，発酵温度を低下させたために高濃度アルコール存在下での自己消化が抑えられ，より高いアルコール濃度まで発酵が可能になったと考えられる．しかしながら，28.5℃でもアルコール濃度が 18%に達すると菌体密度が急速に低下することから，さらに高いアルコール濃度の発酵もろみを製造するためには発酵温度をさらに低くするか，アルコール耐性菌及び高温耐性菌を取得し，アルコール濃度が高くても菌体が死滅しないようにする必要があると考えられる．

3.5 発酵微生物の影響

これまでの実験で流加培養システムを用いることによりアルコール濃度が 18%程度の発酵もろみを製造可能になることがわかったが，それ以上の高濃度アルコール製造には酵母の育種が必要であることが示唆された．一方，清酒製造には協会７号酵母がよく用いられており，協会９号酵母と共に発酵能が高いといわれている．そこで，発酵微生物の違いによるアルコール発酵に及ぼす影響について検討を行った．

発酵微生物として協会７号酵母を用いたときの発酵経過を図６に示す．流加速度は流加初期には協会９号酵母より若干速くなっていたが，発酵 30 時間後には逆転して発酵約 55 時間で流加を終了した．また，流加終了後の Brix の低下速度は協会９号酵母より遅くなっており，協会９号酵母の方が協会７号酵母よりも発酵後期においても発酵能が低下しにくいことがわかった．実際，アルコール濃度も協会７号酵母は協会９号酵母と発酵 48 時間まではほぼ同じ経過を示したのに対して，それ以降では明らかに遅くなっており，

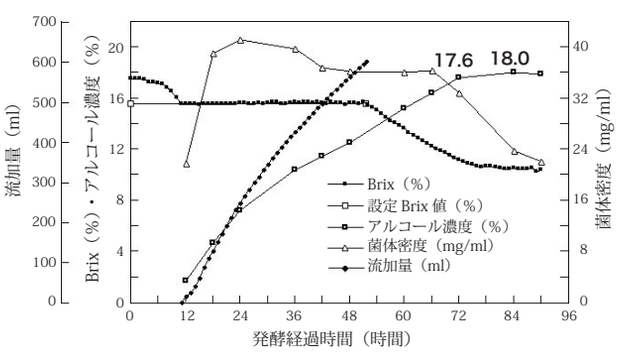

図５　流加培養システムによる発酵経過

開始培地：16%グルコース 2MY 培地 900ml，流加培地：55%グルコース MY 培地 600ml，酵母菌株：協会９号，発酵温度：28.5℃，通気量：50ml/ 分，撹拌速度：250rpm

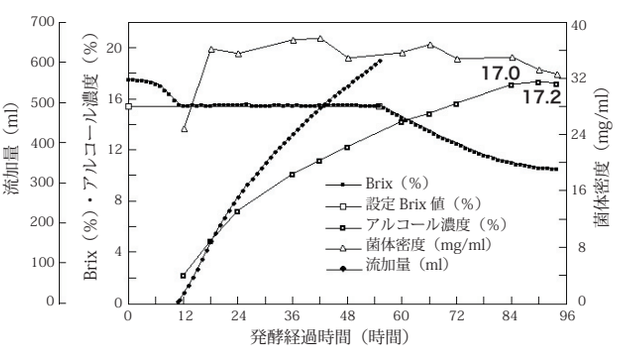

図６　流加培養システムによる発酵経過

開始培地：16%グルコース 2MY 培地 900ml，流加培地：55%グルコース MY 培地 600ml，酵母菌株：協会７号，発酵温度：28.5℃，通気量：50ml/ 分，撹拌速度：250rpm

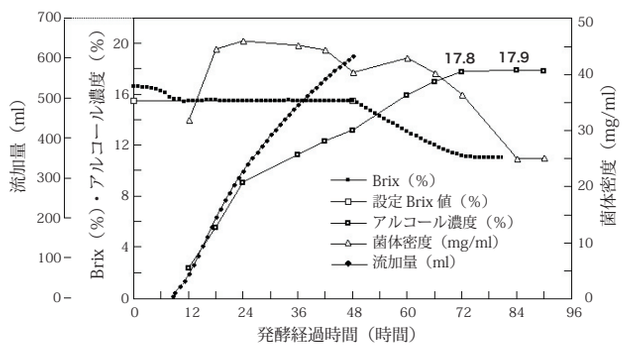

図７　流加培養システムによる発酵経過

開始培地：15%スクロース 2MY 培地 900ml，流加培地：55%スクロース MY 培地 600ml，酵母菌株：協会９号，発酵温度：28.5℃，通気量：50ml/ 分，攪拌速度：250rpm

また，到達アルコール濃度も低いことがわかった．そのため，高濃度アルコールの製造には協会９号酵母がより適していると考えられる．一方，発酵後期までの菌体密度は協会７号酵母と協会９号酵母でほとんど差がなかったのに対し，発酵終期では協会９号酵母に見られた菌体密度の急速な低下が協会７号酵母の方には認められなかったことから，協会７号酵母は死滅しても自己消化による菌体破壊がおきにくいことが示唆された．このように本システムを用いることで従来の実験方法では確認できない高濃度アルコール存在下での酵母細胞の挙動が確認できることから，本システムは酵母細胞の機能研究に役立つ可能性があると考えられる．

3.6 発酵性糖の影響

これまでの実験では発酵原料としてグルコースを用いたが，安価な発酵原料として廃糖蜜などのスクロースが知られている．そこで，本システムがグルコース以外の発酵原料に対しても高濃度アルコールの製造が可能かどうかについて検討を行った．

スクロースを発酵原料としたときの発酵経過を図７に示す．発酵原料糖の種類を変えても発酵経過はほとんど同じであり，原料糖の影響はほとんどないと考えられた．しかしながら，今回の実験では菌体密度がこれまでの実験より高くなっており，そのために発酵速度が若干高くなっていた．また，流加終了後の Brix の低下速度は逆に若干遅くなっていたことから，菌体密度の上昇は他の要因があることが示唆される．

４．おわりに

流加培養システムを構築し，高濃度アルコールの製造について検討を行った．酵母細胞に対して高糖圧迫を引き起こさない糖濃度の開始培地と高濃度糖液の流加培地を用いることで，様々な濃度の開始培地と流加培地の組み合わせでアルコール濃度 17%を超える発酵もろみの製造が可能になったことから，本システムは並行複発酵を擬似的に再現できるシステムであると考えられる．また，本システムは酵母株や発酵性糖の種類を変えても高濃度アルコールの発酵もろみが製造可能なことから，様々な発酵原料や酵母株でも利用可能であると考えられる．さらに，本システムは高濃度アルコール存在下での酵母細胞の挙動が確認できることから，酵母のアルコール耐性機構をはじめとする酵母細胞の機能研究に役立つツールとなる可能性がある．

今後は，高濃度アルコールを製造するための糖液製造方法の検討，並びにバイオリアクターによる高濃度アルコールの連続生産システムの構築を行い，高濃度アルコールの高効率な製造方法について検討を行っていく予定である．