

固定化酵母によるアルコールの連続発酵

Continuous Production of Ethanol Using Immobilized Yeast Cells.

花井 四郎*

Shiro Hanai

1. はじめに

最近の石油価格の低落は、つい十数年前に起きた石油ショックによるパニックが、うそのように忘れ去られようとしている。しかし、代替エネルギー開発の研究は、一時のフィーバーの様相がなくなったものゝ地道に、しかも着実に進められている。それは化石燃料は早晚、枯渇するという認識に立っているためである。特にアルコールが、再び燃料として見直されているのは、枯渇する化石燃料に対して、太陽エネルギー変換で得られる再生産可能なバイオマスを原料としているためである。バイオマスからアルコールを生産するためには、価格的に石油と競争できるものでなければならないが、さらにそれ以前の問題として、アルコールを生産するために投入するエネルギー以上に、生産されたアルコールのもつ産出エネルギーの方が大きくななければならない。このような観点から、固定化酵母による連続高生産プロセスを実用化するための研究が、世界的に行われたのである。

酵母菌体を担体に固定化して、連続発酵でアルコールをつくる研究は、KierstanとBucke¹⁾によって1977年に初めて試みられた。WhiteとPortno²⁾もアルギン酸カルシウムに酵母を包括固定化して、7ヶ月間ビールの連続生産を報告した。わが国では、和田³⁾らがカラギーナンゲルで包括した固定化酵母で、約30日間連続発酵を行った報告が最初である。また、新燃料油開発技術研究組合が昭和55年に発足し、パイロットプラントによる実証試験が行われた⁴⁾。

当社も昭和55年から、固定化酵母による連続発酵の研究を400 ml容量のバイオリクターからスタートさせ、59年からは当社の島原工場に5 klのパイロットプラントを建設し、長期運転による企業化可能性を追求する実証試験を行っている。本稿では、これまでに到

る過程で、どのような問題について検討を加えながら、スケールアップしたかについて述べる。

2. 包括固定化剤の選択

酵母を固定化する担体には、カラギーナン³⁾アルギン酸⁵⁾、光硬化性樹脂⁶⁾、ポリアクリルアミド⁷⁾などがある。いずれを選択するかは、包括できる菌体量が多く、長期の運転に耐えうる強度を持ち、しかも工業的にみて価格が安いということのほか、飲料用アルコールを製造する場合は、食品添加物として使用が認められたものでなければならない。われわれは、このような見地からアルギン酸を採用した。固定化酵母粒の作り方は図-1⁵⁾に示す方法によった。アルギン酸がゲル状になるのは、構成成分であるウロン酸のカルボキシル基に、二価以上の多価カチオンが結合して、立体の網

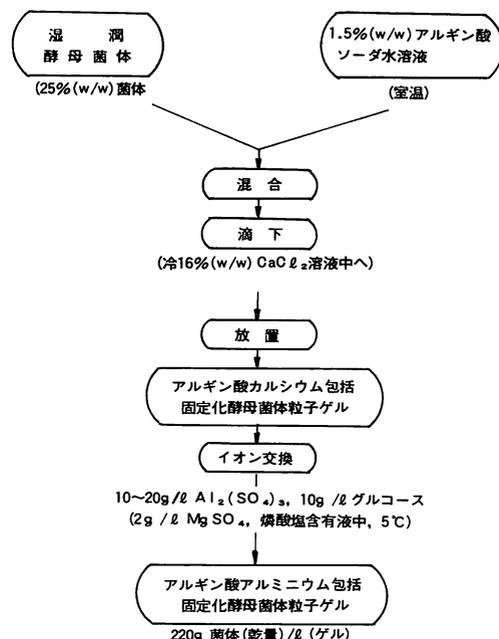


図-1 アルギン酸カルシウムおよびアルミニウム包括固定化法

* 宝酒造(株) 取締役技術部長

〒600-91 京都市下京区四条通東洞院東入ル

目構造をつくるからである。この場合、3価のアルミニウム塩は、2価のカルシウム塩よりも硬い網目構造をとるので⁸⁾、実験室規模の試験ではアルミニウム塩を用いたが、長期運転の可能性をみるための5 klのパイロットプラント試験では、コストの面と食品添加物であることを考慮してカルシウム塩を用いた。

3. バイオリアクターの型式

反応器であるバイオリアクターは、反応形式に応じて最も適したものを採用する必要がある。連続反応を行う場合には、最も理想的なものにプラグフロー型と完全混合型がある。固定化酵母を用いる連続アルコール発酵では、炭酸ガスが反応生産物として発生するため、固-液-気系の3相反応となる。従ってプラグフロー型のリアクターでは、発生した炭酸ガスが大きな気泡となってリアクター内部に滞留し、糖液流の短絡現象が起り、効率が低下する。このため、われわれは図-2に示す上下円錐三相流動層型バイオリアクター⁷⁾を採用した。糖液は上下円錐型の底面部を接線方向から入る。流動をよくするため、リアクター下部よりガス分散板を通じて空気、または発酵炭酸ガスを上向きに吹き込む。糖液と固定化酵母粒は、発酵しながら気泡とともに中央部を上昇し、リアクター上部で炭酸ガスを放出する。固定化酵母粒は、発酵液の一部とリアクター壁面に沿って流下し、リアクター下部から入る糖液と混って反転上昇を繰り返す。発酵液の一部は、次のリアクターに送られる。酵母や固定化剤の選択試

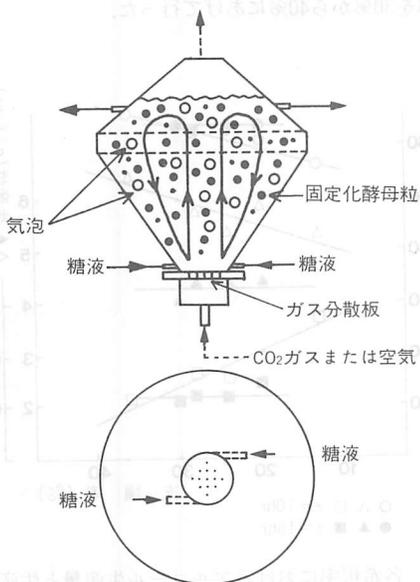
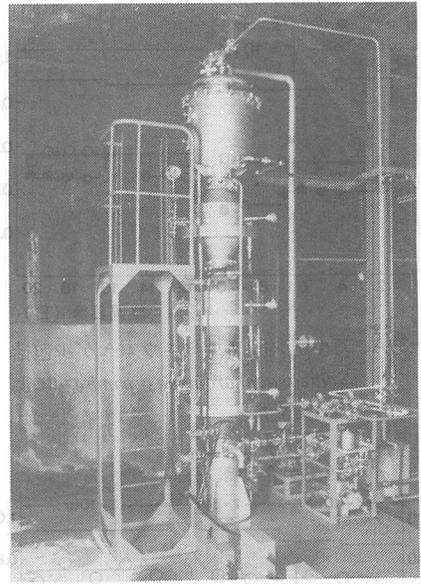


図-2 上下円錐三相流動層型バイオリアクター



写1 150 l F型バイオリアクター

験には、400ml 容量のこの型式のリアクターを用いたが、スケールアップの中間装置としては、50 l 容量のリアクターを垂直に3段積み重ねた、写1のF型タイプのものを用いた。この完全混合型に近いリアクターを直列に継ぐことによって、滞留時間の分布が鋭くなり、槽数の無限大はピストンフロー型になるためである。しかし、工業化する上で、容量の大きいリアクターを垂直に積み重ねることは、プラントのイニシャルコスト・アップになって必ずしも有利でないため、後述するように5 klのパイロットプラントは、より一層流動をよくするため、内部構造を改良したT型のリアクターを開発し、二槽を横に並べる形式にした。

4. 糖蜜発酵酵母の選択

わが国で糖蜜発酵に用いる酵母には、*Saccharomyces formosensis* と *Schizosaccharomyces pombe* などがある。この二種類の酵母を図-1に示した手順でアルギン酸アルミニウムゲルに包括固定化し、それぞれを1200 ml 容量の三段上下円錐三相流動層型バイオリアクター(F型)に、充填率を30%になるように入れた。これに硫酸でpH3.2にした0.9 Mの糖液を、滞留時間を10hrにして送り、30℃で連続発酵を行った。その結果は図-3A,Bのように、*Schizo. pombe* ではアルコールの生成量が約55g/l、残糖が0.4 M前後であるのに対して、*S. formosensis* はアルコールが70 g/l以上で、残糖も0.1~0.2Mと少なく*S. fa-*

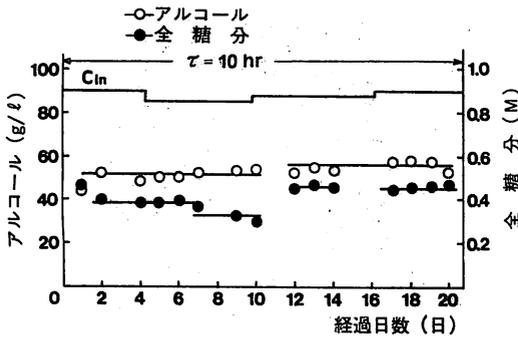


図-3-A アルギン酸アルミニウム・ゲル包括 *Schizosaccharomyces pombe* による糖蜜発酵

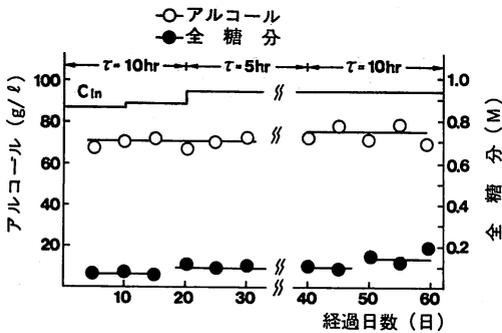


図-3-B アルギン酸アルミニウム・ゲル包括 *Saccharomyces formosensis* による糖蜜発酵

rmosensis の方が固定化して連続発酵するのに適している。したがって、以後の試験には、*S. forma-sensis* を用いることにした。

5. 連続運転条件

5.1 低pHによるコンタミ防止

長期間にわたっての連続運転では、乳酸菌などの細菌によるコンタミが起り、アルコール生産量の低下がみられる。ブラジルでは、Melle-Boinot法と称する半連続発酵法でアルコールを製造しているが、蒸留前の醪から酵母を遠心分離機で回収して、酵母処理槽に移し硫酸でpHを3にして殺菌する方法を行っている。発酵糖液の方にはペニシリンを添加して、細菌の汚染を防止している。清酒の速醸酵母は、乳酸を添加してpHを下げ雑菌の汚染を防止をはかり、ワイン醸造では亜硫酸を用いている。乳酸菌の増殖抑制に硫酸でpHを4以下にすると、抑制効果があるが同時に酵母の増殖と、発酵が阻害されると考えられていた。ところが、低pHでは発酵の立ちあがりが遅れるが、図-4でわかる

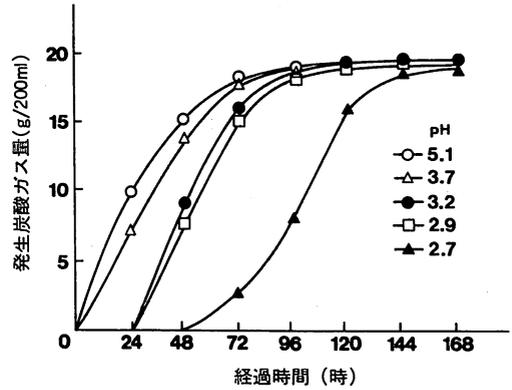


図-4 発酵に対するpHの影響

ように炭酸ガスの減量はpH 3.2の方がよい成績を示し、pH 3.2~3.7の範囲での連続発酵では、発酵速度、発酵歩合の低下もみられず、乳酸菌などの増殖を完全に抑制した。それで、以後の試験ではpHを3.2~3.7の範囲で行うことにした。

5.2 固定化酵母粒の充填率と生産性

リアクター内への固定化酵母粒の充填率を高くするならば、生産性の増大が考えられる。充填率と、糖液のリアクター内での滞留時間(=τ)との関係を見たのが図-5である。τ=15hrでは充填率とは関係なく、アルコールの生産量は一定となったが、τ=10hrでは充填率を10%から40%にあげると、比生産性はむしろ低下したが、アルコールの生産量は増加している。このことから、パイロットプラントの連続運転では、充填率を30%から40%にあげて行った。

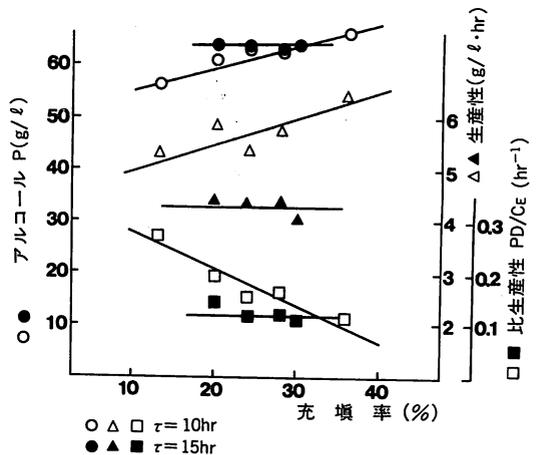


図-5 各希釈率におけるアルコール生産量と生産性に対する充填率の関係

6. 150ℓ容量F型バイオリアクターによる運転

今までに述べてきた試験結果をもとに、1ユニット50ℓの上下円錐三相流動層型のリアクターを3段積み重ねた写1のF型タイプのを島原工場に設備し、糖蜜を原料とし、表1の運転条件で90日～120日間に

表1 150ℓF型バイオリアクター運転条件

F型バイオリアクター容量	150 ℓ
固定化酵母 直径	1~2 mm
酵母菌体濃度	2.0~3.5 ×10 ⁹ 個/ℓ
充 填 率 (固定化酵母容量/リアクター容量)	0.3
温 度	30℃
pH	3.7
滞 留 時 間 (τ)	10~15 hr

わたる連続運転をくり返した。これはあくまでも現場的环境下で長期運転することによって、プラントとしての欠陥をみつけたしたり、さらに規模の大きいパイロットプラントを開発するための反応工学的シミュレーションすることを目的としたものであった。pHは硫酸で調整し、固定化酵母粒の充填率は30%から始め、後半は40%にした。試験結果は図-6に示したが、90日以上にわたっての連続運転でも良好な結果を示し、アルコール濃度も最高12 (v/v) %に達した⁹⁾。

この反応の速度式を導くため、リアクターは完全混合槽であり、酵母の増殖が起らない、酵素反応とみなしてのモードを設定するならば、糖収支は次の(1)式で示すことができる。

$$\frac{Fℓ}{V_s} (C_i - C_o) = \frac{V_{max} \times C_o}{K_m + C_o} \dots\dots\dots (1)$$

ただし、固定化酵母粒と糖液間の物質移動抵抗と、粒子ゲル内の拡散抵抗は無視している。こゝで

Fℓ : 供給液容積速度 (ℓ/hr)

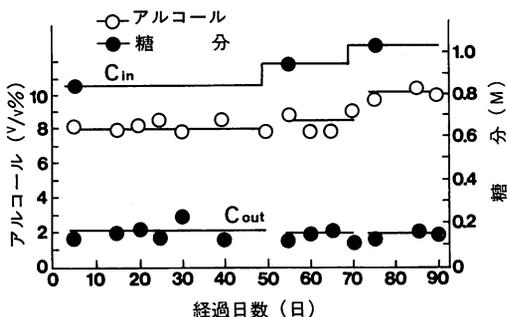


図-6 150ℓF型バイオリアクターによる連続発酵

V_s : 充填した固定化酵母粒子容量(ℓ)

C_i : 供給液糖濃度 (mol/ℓ)

C_o : 流出液糖濃度 (mol/ℓ)

V_{max} : 最大反応速度 (mol/固定化物ℓ・hr)

K_m : ミカエリス定数 (mol/ℓ)

である。さらに次の(2)式は固定化酵母粒子容量当りの滞留時間と、リアクターの稼動容積に対する滞留時間との関係を示している。

$$\begin{aligned} \frac{V_s}{Fℓ} = \tau_s = \frac{1}{D_s} &= \left(\frac{V}{Fℓ}\right) \left(\frac{V_s}{V}\right) = \tau \left(\frac{V_s}{V}\right) \\ &= \frac{1}{D} \left(\frac{V_s}{V}\right) \dots\dots(2) \end{aligned}$$

$$P = (2)(46)(C_i - C_o) \dots\dots\dots(3)$$

ここで、

D : 稀釈率 (hr⁻¹)

V : リアクター実容量 (ℓ)

τ : リアクター実容量基準の滞留時間 (hr)

τ_s : 固定化酵母粒子容量基準の滞留時間(hr)

P : アルコール生成量(mol/ℓ)

$$K_m = 0.02 \text{ mol } \ell / \ell$$

$$V_{max} = 0.69 \text{ mol } \ell / \ell \cdot \text{hr}$$

(1)式で求めたC_oより、(3)式からアルコールの濃度が計算される。K_m, V_{max}は固定化発酵母粒の発生する炭酸ガスを、ワーブルグ検圧計で測定して求めた。図-7の実線と破線は、上述のシミュレーションで得られたものである。黒印のプロットは、150ℓのF型パイロットプランで測定した、実験値である。実測値と計算値が、よく一致していることは、大型バイオリアクターのスケールアップが、比較的容易であることを示唆している。

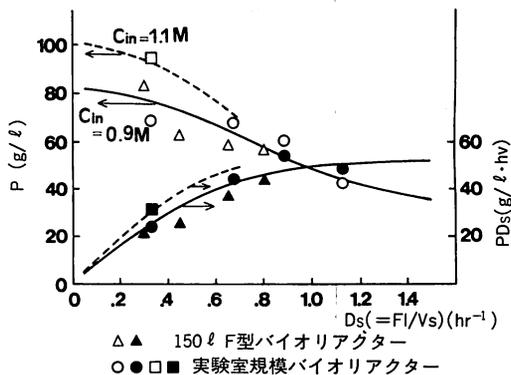


図-7 連続発酵に於ける実測値とシミュレーション

7. 糖蜜酵母の育種改良

150 ℓのF型パイオリクターで長期間にわたる連続発酵試験に於いて、沖縄産の甘蔗搾汁を用いたところ図-8にみられるように、グリセリンが多くつくられることがわかった。この搾汁中の無機物量を表2に示したが、カリウムの量が特に多く、ブラジル産の2倍以上も含まれている。酵母は一般に、無機物を多く含んだ糖液を発酵させると、グリセリンやアセトインなどを多くつくりアルコール生成量の低下することが知られている^{10) 11)}。また、アルギン酸塩としてカルシ

ウム、あるいはアルミニウムを用いる場合、イオン交換による崩壊を防ぐため、糖液中にその塩を加える必要があるため、グリセリンの生成量が多くなる。工業化を考える場合、アルコール収率の低下はコストアップにつながる。このため無機物の多い糖の発酵でも、グリセリンを多くつくらない酵母を突然変異によって達成することを試みた。

また、パイロットプラントでの長期連続発酵で、乳酸菌汚染による酸度の上昇がみられないのにかかわらず、アルコール生成量の低下する現象が図-9のように起ることがあった。リアクターより流出する発酵液中の酵母をTTC染色¹²⁾すると、発酵開始時では全ての酵母は赤色に染ったが、日数が経過するにしたがい、ピンク色に染る酵母の数が多くなり図-9では、40日で20%弱であったものが、80日頃には80%以上になった。これにともなって、当初8~9%生成されたアルコールが6%台にまで低下した。この現象は野生酵母が発生し、リアクターのマイクロフローが変わったことを示している。野生酵母は同じ酵母の仲間であって、一般に低pHでもよく繁殖し、特異的に野生酵母のみを殺す抗生物質や殺菌剤がないため、いったん発生すると排除することが困難である。したがって、別の手段で汚染を防ぐ必要がある。酵母にはキラーク酵母といって、他の酵母を殺す蛋白質系のトキシンを生成するものがある。この性質を利用して清酒¹³⁾、ワイン¹⁴⁾、ビール¹⁵⁾などの醸造では、細胞融合法などの手法を用いて、キラートキシンを生産するプラスミドを導入したキラーク酵母を育成し、実用化している。われわれも糖蜜発酵用酵母にキラークプラスミドを導入して、野生酵母の発生を防止することができたので、酵母の育種改良を、どのような手法と手順で行ったかについて述べる。

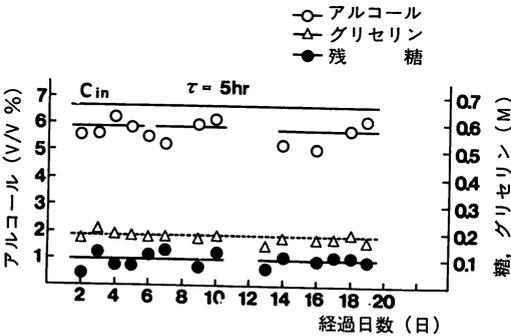


図-8 甘蔗搾汁（沖縄産）の固定化酵母による連続発酵

表2 沖縄、ブラジル産甘蔗搾汁の無機成分

	沖 縄	ブラジル
T. Sugar (%)	19.1	14.3
T. Nitrogen (%)	0.26	0.01
K (ppm)	2800	1130
Mg (ppm)	315	280
Ca (ppm)	270	180

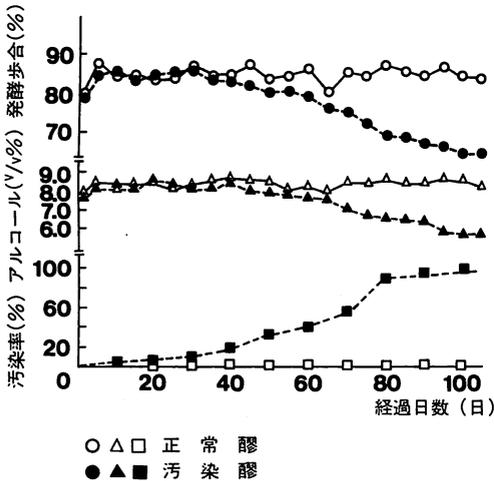
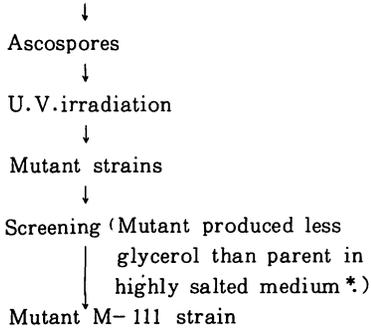


図-9 連続発酵における野性酵母の汚染

7.1 突然変異株の造成¹⁶⁾

グリセリン生成の少い酵母を造成するため、図-10の手順にしたがい、胞子にUV照射して変異株をつくり、次に8%硫酸カリウムを含む高塩濃度糖液を発酵させて、グリセリン生成量が親株より少く、糖消費量が親株と変わらない変異株をスクリーニングした。M-111株と呼称する変異株は、 α -methyl-glucosideを発酵し、ビタミン要求性は、N源に硫酸アンモニウムを用いた培地では、Ca-pantothenateを適応的に要求するなどの点で親株と異っている。無機塩を多量に含む沖縄産糖蜜醗の発酵生産物を比較した表3では、エステル、グリセリン、ダイアセチル、アセトインな

Saccharomyces formosensis No 396



*The highly salted medium : 15% glucose, 0.2% yeast extract, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄ · 7 H₂O, 0.2% casaminoacids, 8 % K₂SO₄

図-10 突然変異株造成の手順

どの代謝副産物の量は、親株のNo 396より変異株のM-111株の方が少ない。したがって、アルコールの生成量はM-111株の方が多くなり、発酵歩合もNo 396の76.4%に対して、M-111株は80.8%と優れている。この両株のアルコール発酵に関与する酵素系について比較したところ、図-11で示すように、硫酸カリウム濃度の高い培地で培養した菌体中の酵素力価は、pyruvate decarboxylase と alcohol dehydrogenase では変異株の方が高く、glycerol-3-phosphate dehydrogenase では親株が高い。このことは、変異株の方が無機塩によるアルコール代謝系酵素の疎害をうけることの少ないことを示している。

7.2 キラー酵母の育成¹⁷⁾

酵母がつくるキラー毒素には、K₁からK₁₀まであることが知られている¹⁸⁾。清酒やワイン酵母ではK₁

表 3 沖縄産糖蜜を使用してのS. formosensis No 396と変異株M-111の代謝生産物

	Parent No 396	Mutant M-111
Alcohol (Vol %)	8.6	9.1
Acidity (ml/ml)	0.68	0.71
Volatile acids as acetic acid (mg/ml)	0.9	0.5
Aldehydes as acetaldehyde (mg/ml)	0.108	0.051
Esters as ethyl acetate (mg/ml)	4.62	1.98
Glycerol (mg/ml)	14.2	11.5
Diacetyl (mg/ml)	0.015	0.002
Acetoin (mg/ml)	2.35	0.08
2,3-Butanediol (mg/ml)	0.55	0.85
n-Propyl alcohol (mg/ml)	0.078	0.074
iso-Butyl alcohol (mg/ml)	0.036	0.036
iso-Amyl alcohol (mg/ml)	0.2	0.208
Rate of sugar consumption (%)	92.1	92.5
Fermentation efficiency (%)	76.4	80.8

キラープラスミドが、戻し交配法などで導入された。このプラスミドがつくるキラー蛋白は、温度やpHには比較的不安定で30℃で失活し、至適pHが4.7であってpHでは活性を示さない。バイオリクターでの糖蜜の連続発酵では、乳酸菌汚染を防ぐためpHを3.7以下に保ち、発酵温度も35℃位になるため、これまでに利用されてきたK₁では活性を示さない。K₂キラー蛋白は、至適pHが4.2で、3.2でも活性を示し、発酵温度が35℃でも失活しないことから、糖蜜発酵々母M-111株には、K₂キラープラスミドの導入をcytoduction法によって試みた。

(1) プロトプラスト融合による育成

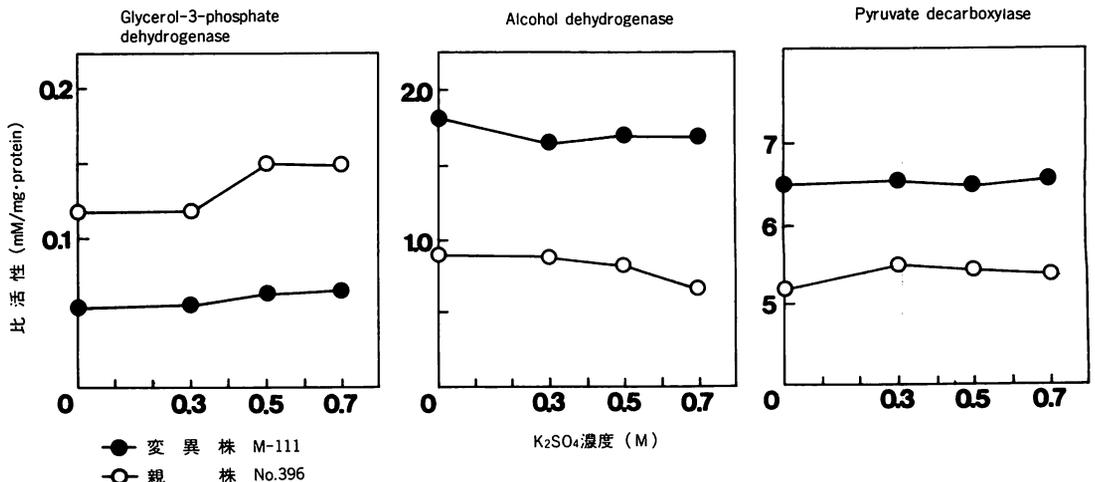


図-11 高塩培地に培養した酵母菌体内酵素力価の比較

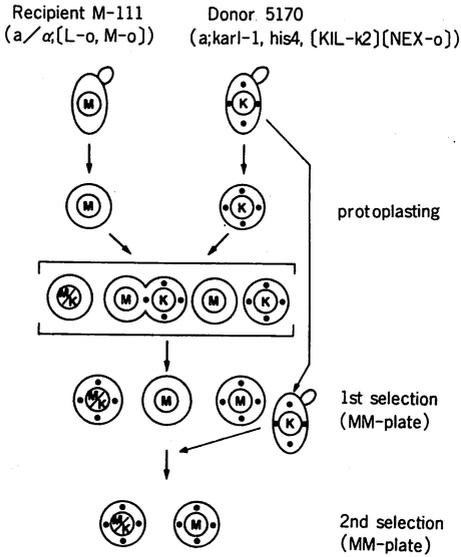


図-12 細胞融合法によるキラー酵母の育成手順

キラープラスミド供与株として核融合欠損株の 5,170株を、また受容株としてM-111株を使用し、図-12の要領でプロトプラスト融合を行った。プロトプラスト化は、培養した洗浄菌体を20mM・EDTA, 50mM・2-mercaptoethanolを含むST緩衝液に懸濁し、100 μg/mlのzymolyaseで30℃, 60分処理して細胞をプロトプラスト化した。このようにして調整した1~3 × 10⁷個の受容菌プロトプラストと、1~3 × 10⁸個の供与菌プロトプラストをSTC緩衝液(塩化カルシウムを含むST緩衝液)に混合し、30℃, 15分間保持後、PCT緩衝液(35% poly ethylene glycol 4000, トリス塩酸, 塩化カルシウムを含む)に再懸濁し30℃, 20分間軽く振とうしながら保持し、プロトプラスト融合をした。これを遠心後、STC緩衝液で洗浄、つづいて再懸濁し、ヒスチジン無添加の再生培地に混合してプレーティングした。生育したコロニーの酵母を液体培養し、これに5170株の培養濾液を加えることによって、キラー毒素に耐性のないM-111株を除去した。培養後の菌体は洗浄し、再び最小培地に塗抹し、増殖したコロニーをK₂感受性菌5059株を塗抹したメチレンブルー含有酵母エキス・ペプトン培地にレプリカして、キラー活性の有無を調べた。キラー活性を有するコロニーを融合株として一次分離し、糖蜜の発酵試験を行って、そのなかからM-111株と変わらない発酵能を有するキラー酵母をK₂-M-111株として選択した。この菌株中のキラープラスミドの存在については、親株のM-111株

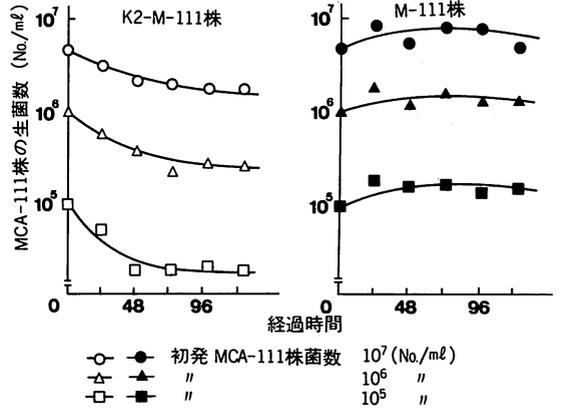


図-13 回分発酵における感受性菌MCA-111株の消長

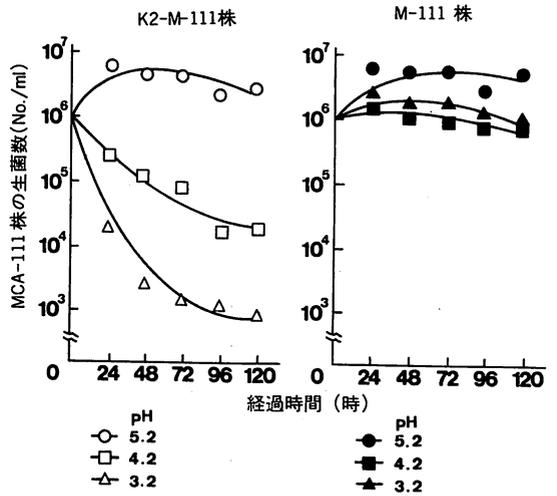


図-14 各 pH の回分発酵における感受性菌MCA-111株の消長

にはM-ds RNA (キラー蛋白質とキラー耐性をコードしている)もL-ds RNA (M-ds RNAの外被蛋白質をコードしている)も、ともに認められないが、K2-M-111株は5170株と同様に、両 ds-RNAを保持し、かつそれらの分子量も一致した。

(2) 回分発酵でのキラー活性発現

初発全糖分15%, pH 4.2に調整した糖蜜醗に、K2-M-111株の菌体を1 × 10⁷/ml加え、30℃で発酵させると同時に、汚染酵母MCA-111株を、それぞれ1 × 10⁵, 1 × 10⁶, および1 × 10⁷/ml加えて混合培養し、MCA-111株の経時的な生菌数を調べたところ、図-13のように120時間後には、いずれも1/10程度まで減少した。対照のM-111株では、MCA-111株はむしろ増加の傾向がみられた。糖蜜醗の初発pHを3.2, 4.2および5.2に調整し、K2-M-111株と、MCA

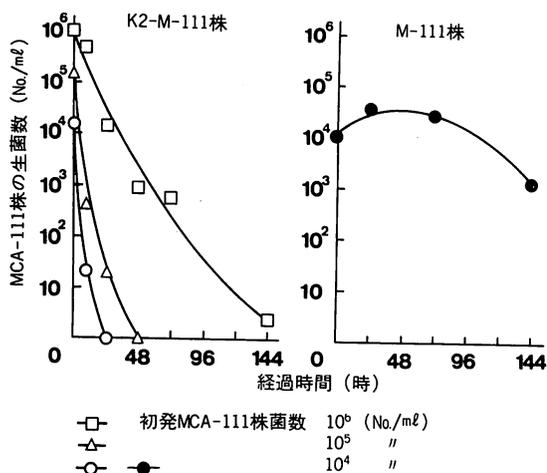


図-15 連続発酵における感受性菌MCA-111株の消長

111株の植菌濃度を、それぞれ 1×10^6 /ml なるようにして培養したところ、図-14のようにpH5.2ではMCA-111株の生菌数は増加して、まったく効果がなかったが、pH4.2と3.2では、その生菌数は120時間後で約1/1000ないし1/100に減少し、低pHでの致死効果の大きいことがわかった。

(3) 連続発酵でのキラー活性発現

アルギン酸アルミニウムゲルに包括したK2-M-111株の固定化粒子を、バイオリクターに充填し、発酵が定常状態になった時点で、糖蜜液にMCA-111株をそれぞれ 1×10^6 、 1×10^5 、および 1×10^4 /ml 加えてリアクターを送入した。図-15で 1×10^4 、 1×10^5 /ml は共に生菌数は急激に減少し、24時間と48時間にはそれぞれ不検出となった。 1×10^6 /ml のものは144時間には、ほとんど不検出となった。対照のM-111株のリアクターの方では、 1×10^4 /ml 加えたMCA-111株は144時間後でも生菌数は 5×10^3 /ml であって、ほとんど減少しないことがわかった。キラー活性に対するpHの影響についても、図-16でK2-M-111株のリアクターの方は、糖液中に 1×10^6 /ml 加えたMCA-111株は、pH3.2では72時間に不検出、5.2と4.2でも1/1000以下に減少し、対照のM-111株に比較してキラー活性効果のあることを示している。これはリアクター内では、常に酵母が増殖しているためキラー蛋白の生成が増進されること、低pHとの相乗効果によるものと考えられる。

以上の実験で、K2-M-111株は短期間であるが、低pHの糖蜜でもキラー活性を示すことから、パイロットプラントでの長期運転でも、野生酵母の増殖をおさえ、正常に発酵が行われるかどうかをみるため、

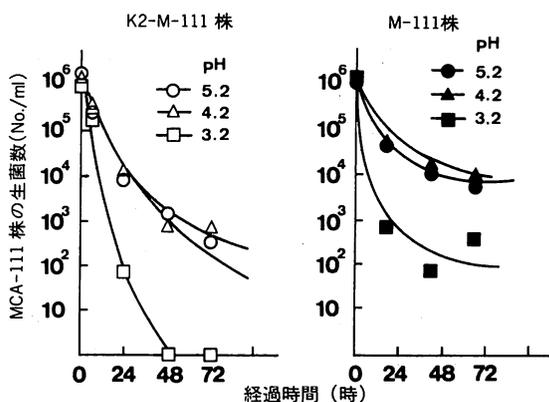


図-16 各pHの連続発酵における感受性菌MCA-111株の消長

150 l のF型バイオリクターにK2-M-111株の固定化粒子を充填して、長期間にわたる連続発酵試験をした。全糖分15%、pH3.7の糖蜜を、滞留時間 $\tau = 10$ hr で30日間、さらに $\tau = 6$ hr で35日間供給し、流出液のキラー活性をカップ法で測定したが、その結果は図-17に示した。キラー活性による阻止円は、全期間を通じ15mm前後で、ほぼ一定であり、流出液中の酵母をTTC染色しても、赤色に染る酵母のみで野生酵母の発生もみられず、発酵も正常であった。野生酵母の排除は、キラー酵母を育成することによって可能となった。

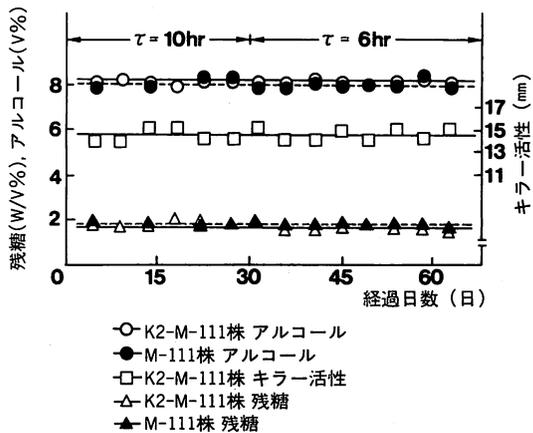


図-17 連続発酵醪のキラー活性

8. 造粒装置の開発

固定化酵母粒子を用いて、アルコールを連続高生産するためには、バイオリクターに充填するゲル粒子を、多量に製造できる造粒機の開発が必要である。粒子の径が均一にすることは、充填率を高めることにな

るが、粒子の大きさも考慮が必要である。粒子の径が大きくなるほど、比生産性が低下する¹⁹⁾ほか、3mm以上になると割れて摩擦したり、浮上してガス閉塞を起す。1~2mmの粒子は、リアクター内全体に分布し、底部に送入された糖液とともに発酵しながら上昇、流動する。したがって、われわれは1~2mmの粒子を、均一につくりうる造粒機の開発を試みた。

8.1 滴下式造粒装置

図-18に示す滴下式²⁰⁾は、ノズル2からアルギン酸ソーダと酵母乳の混合液を流下させ、ノズルの周囲16から噴出した空気流で混合液を、18の塩化カルシウム溶液の中に滴下させる。工業的規模にするためには、ノズルの数を狭い範囲の中で、どれだけ多くつけうるかなど機械工作的な問題が残る。

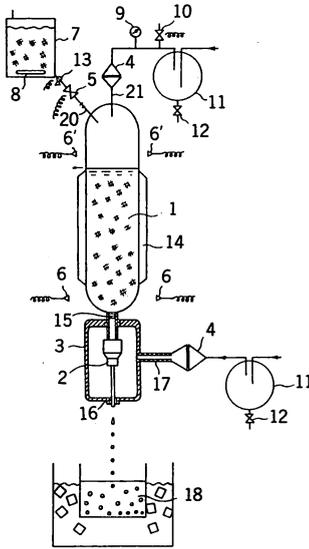


図-18 滴下式造粒装置

8.2 噴射式造粒装置

図-19に示す構造の噴射式²¹⁾では、アルギン酸ソーダ・酵母乳混合液はAのミックスタックから、1の圧力タンクに送られる。混合液は2の多孔板から圧搾空気、下部の造粒タンクの塩化カルシウム液の中に、降りそそぐようにして落下し、アルギン酸カルシウムゲルの粒子となる。一定の粒度のものをつくるためには、多孔板の孔の径、形状、噴射圧力、造粒塔の高さなどのほか、アルギン酸ソーダの種類、重合度、アルギン酸ソーダと酵母乳混合液の粘度などが問題となる。

アルギン酸ソーダ・酵母乳混合液の粘度1000, 2000, 3000cp.の三水準について、図-19の噴射式造粒機で造粒したものの粒度分布を図-20に示した。3000cp.

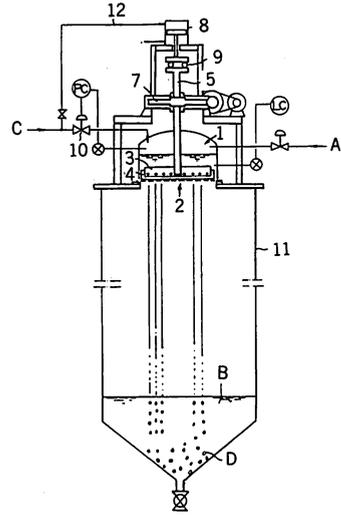


図-19 噴射式造粒装置

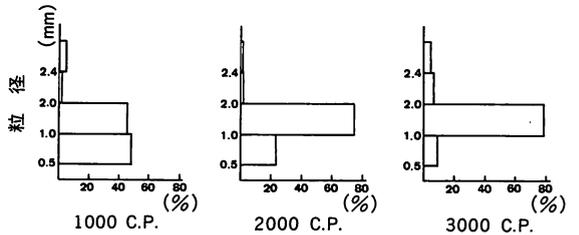


図-20 アルギン酸ソーダ酵母混合液の粘度と粒度分布

の混合液では、1~2mm粒度のものが80%を占め、この型式の造粒装置を用いて、工業的規模で固定化酵母粒子を造ることが可能となった。

また、この粒子に包括する酵母数を、最初から 10^9 オーダーのものをつくることは、酵母を多量に前培養する必要がある。例えば、アルコールの生産能力100kl/Dのプラントの場合、充填する固定化酵母容量は160m³になる。これに使用する酵母を培養するためには、320m³の培養タンクが必要となる。したがって、培養タンクの容量を小さくするため、どの程度の量の酵母を包括して、リアクターに充填したのち増殖をはかり、 10^9 オーダーまで増やすことが出来るか試験をした。すなわち、 10^6 , 10^3 /ml台の酵母をアルギン酸カルシウムゲルに固定化し、リアクターで5%の糖液を供給しながら、0.2v/v min.の空気を通気し増殖をはかった。図-21のように、 10^6 のものは2日間の培養で 10^9 オーダーにまで増殖したが、 10^3 のものは4日間の培養でも 10^7 台にとどまった。したがって、 10^6 オーダーの酵母を包括するならば、リアクター内で増殖をはかることによって、 10^9 台にすることは可能である。これ

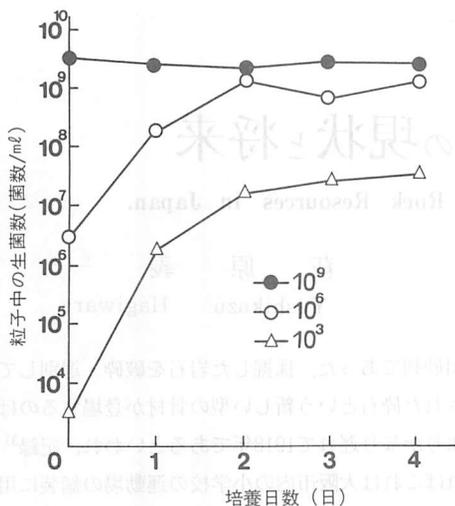
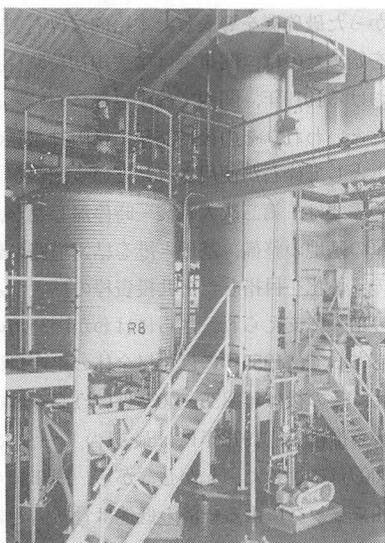


図-21 アルギン酸ゲル(粒子)内酵母の増殖



写2 5 kL T型バイオリアクターと噴射式造粒装置

は前培養タンクの容量が、さきの例の100kL/Dプラントの場合で1/1000の0.32m³でよいことになる。

9. 5 kLパイロットプラントによる実証試験

上述のような試験結果から、工業化可能性の目途がたったため、島原工場に昭和59年に写2の5 kL容量のT型バイオリアクター2基と、造粒能力1.5 m³/hrの噴射式造粒装置を1基設備し、長期間運転によるフィジビリティースタディを目的とする実証試験に入った。島原工場は、従来から回分式発酵槽で、糖蜜からのアルコール生産を行っており、同じ産地の糖蜜を原料にして、平行して二つのプロセスによ

るアルコールの生産を、比較しながらルーチン的に行うことが可能である。その間、新しいプロセスの長期間運転による、トラブルの有無などについての調査も出来る。固定化酵母による連続発酵プロセスでのアルコール生産は、パイロットプラントではあるが、年間200 kL以上に達している。旧来の回分式発酵プロセスと比較して、今までの成果から、この新しいプロセスは工業生産でも、より有利なものになりうると考える。

参考文献

- 1) Kierstan, M., Bucke, C.; *Biotechnol. Bioeng.*; 19, (1977) 387.
- 2) White, F.H., Portno, A.D.; *J. Inst. Brew.* 84, (1978) 228.
- 3) 和田満, 加藤錠治, 千畑一郎; 日本醸酵工学会大会講演要旨集, (1978) 159.
- 4) Noguchi S., Nagasima M., Azuma M.; *Preprint of Pan-Pacific Synfuels Conf.* 11, (1982) 464.
- 5) 福島達; バイオマスによる燃料・化学原料の開発技術資料集成, (1981) 197.
- 6) Tanaka, A., Yasuhara, S., Fukui, S., Iida, T., T., Hasegawa, E.; *J. Ferment. Technol.* 55, (1977) 71.
- 7) 福島達, 永井雅郎, 杉山明敏, 太田茂, 寺中孝収, 山口利康; ; 日本醸酵工学会大会講演要旨集, (1979) 153.
- 8) 福島達, 畠山博行, 平岩章良, 藤原康昌, 山出和弘; 日本農芸化学会講演要旨集, (1981) 219.
- 9) 福島達, 畠山博行; 日本醸酵工学会大会講演要旨集, (1981) 16.
- 10) 梅本春一, 入江淑郎, 今井富雄; *醸工*, 45, (1967) 117.
- 11) 田嶋克彦, 吉栖肇; *醸工*., 50, (1972) 764.
- 12) 古川敏郎, 秋山裕一; *農化*., 37, (1963) 398.
- 13) 大内弘造; *醸工*., 54, (1976) 615.
大内弘造, 秋山裕一; *醸工*., 59, (1981) 517.
- 14) Hara, S., Iimura Y., Otsuka K.; *Am. J. Enol. Vitic.*, 31, (1980) 28.
- 15) Young, T. W.; *J. Inst. Brew.* 87, (1981) 292.
- 16) 花井四郎, 平松順一, 寺本正也, 矢野忠徳; 日本醸酵工学会大会講演要旨集, (1980) 119.
- 17) 山本哲郎, 柳生淳二, 太田香矢乃, 浜野充博, 大内弘造, 西谷尚道; *農化*., 58, (1984) 559.
- 18) 大内弘造; *発酵と工業*, 39, (1981) 190.
- 19) Nan, K., Sam S. Sofer; *Enzyme Microb. Technol.*., 7, (1985) 538.
- 20) 公開特許; 昭57-186446
- 21) 公開特許; 昭59-52521