

# アルギン酸ゲルビーズ固定化酵母の発酵特性

幡手 泰雄・濱川 直樹・吉澤 秀和・  
上村 芳三  
(受理 平成 6 年 5 月 31 日)

## Characterization of Ethanol Fermentation of Immobilized Yeast in Calcium Alginate Gel Beads

Yasuo HATATE, Naoki HAMAKAWA, Hidekazu YOSHIZAWA,  
and Yoshimitsu UEMURA

In recent years, much attention has been paid to the technique for the immobilization of micro-organisms with biocompatible polymer. Especially by using yeast, various immobilization procedures were proposed for the prevention of leakage of yeast from immobilized beads. There have been few investigations concerning the leakage characteristics, while the fermentation properties of immobilized yeast have been studied frequently.

In this study, the characterization of immobilized yeast on calcium alginate gel beads was studied from the point of view of leakage properties. Conditions such as sodium alginate concentration, calcium chloride concentration and the number of coating layers, etc. were varied. An increase in the concentrations of sodium alginate and calcium chloride reduced the leakage of yeast, to some degree. The number of coating layers significantly affects leakage properties. Leakage from gel beads with double gel layers was less than that from gel beads with single layers.

As a result of the continuous fermentation experiment using immobilized yeast in calcium alginate gel beads with a double layer, satisfactory operation for the ethanol fermentation was maintained.

### 1. 緒 言

微生物が生産する生理活性物質はきわめて微量であるため、効率的な生産方法が考えられている。微生物 1 個当たりの物質生産能が同じであると仮定すると、より高い生産性を得るためには菌体密度を増大させる方法、つまり固定化法が重要であると考えられる。微生物を固定化する利点を列挙すると以下ようになる。

- (1) 細胞の高密度培養が可能
- (2) 培養中の攪拌から細胞を保護する
- (3) 細胞と培養液の分離が容易
- (4) 培養液の再利用が可能

などがあげられる。

固定化微生物を用いたプロセスでは、担体内の物質拡散が全体の反応速度を支配すると考えられるので、酸素を必要とする好気性微生物より嫌気性微生物を用いたプロセスがより実用的であると思われる。最近では特に、嫌気性プロセスであるエタノールの連続発酵が盛んに研究され実用化の段階に入っている<sup>1)</sup>。固定化法的手段としてはアルギン酸カルシウムゲルを担体とした方法がよく使用される<sup>2, 3)</sup>。アルギン酸カルシウムゲルは容易に調製できる反面、培養液中への酵母の漏出、長期培養時の崩壊といった問題点が指摘されている。アルギン酸カルシウムゲルに固定化した酵母

を用いて醸造酒などの生産特性について研究が行われているが、酵母の漏出についてはほとんど触れていない<sup>4,5)</sup>。このような実状に鑑み、本研究では酵母の漏出を抑えることを目的とした鹿児島酵母の固定化実験を行い、その固定化酵母の発酵特性及び担体からの酵母の漏出挙動について詳細に検討した。

## 2. 実験

### 2.1 実験操作及び条件

図1に鹿児島酵母の培養を示す。鹿児島酵母を保存してあるスラント上のコロニーより試験管中のYEP培地5mlに1白金耳接種を行った。表1にYEP培地組成を示す。これを振盪恒温槽で30℃に保ち10時間培養を行った。前培養の培地から2ml取り、これを三角フラスコ中のYEP培地100mlに接種して、ロータリーシェーカーにて30℃で7時間培養を行った。

図2に鹿児島酵母の固定化を示す。本培養の培養液を30mlサンプリングし、これを遠心分離器(国産遠心器株式会社, 10000rpm, 5分間)にかけて上澄みだけを捨てた。これに生理食塩水10mlを加えて酵母を懸濁させて洗浄し、もう一度遠心分離器にかけて上澄みを

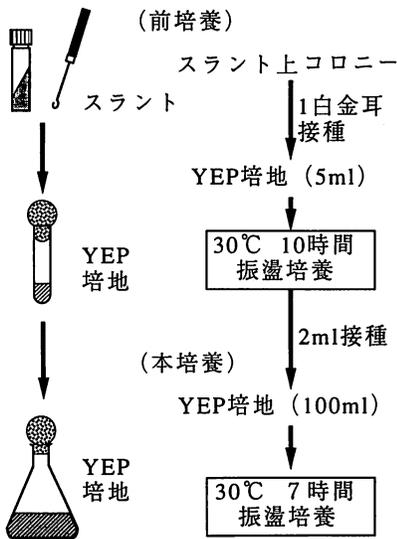


図1 鹿児島酵母の培養

表1 YEP培地組成

1.0%	yeast carbon base (Difco)
2.0%	glucose
2.0%	trypton (Difco)

捨てた。残った酵母をアルギン酸ナトリウム溶液に懸濁させ、注射針を用いて塩化カルシウム溶液に滴下し、直径約3mmのアルギン酸カルシウムゲルビーズを作成した。このビーズを用いてYCB培地で発酵させ、漏出した酵母の菌体密度、二酸化炭素の発生量、及びエタノール濃度を測定した。通常は200mlの三角フラスコで発酵させるが、菌体密度を測定時に攪拌を行い、ビーズの表面に付着した酵母がはがれ落ちるおそれがあるので、試験管サイズとフラスコサイズとに分けて行った。

(試験管サイズ)

YCB培地を5ml入った試験管に酵母固定化ビーズを10個入れ、これをインキュベーター中で30℃に保ち6日間発酵させ、6日後の菌体密度、エタノール濃度を測定した。YCB培地組成を表2に示す。

(フラスコサイズ)

YCB培地を100ml入った200ml三角フラスコに酵母固定化ビーズを200個入れ、インキュベーター(静置)

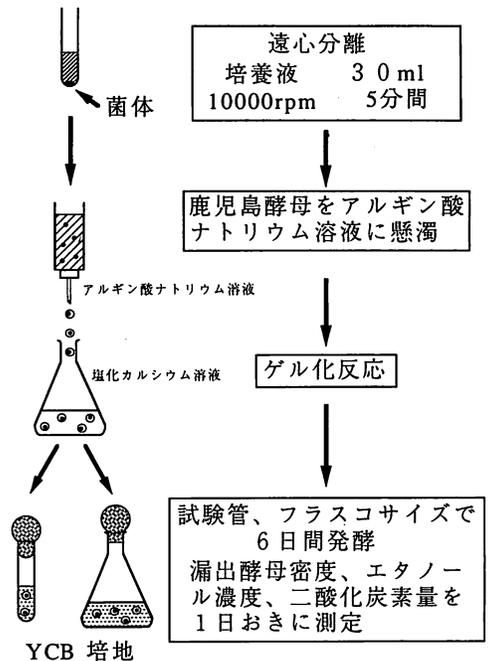


図2 鹿児島酵母の固定化

表2 YCB培地組成

1.17%	yeast carbon base (Difco)
0.50%	casamino acids (Difco)
15.00%	glucose

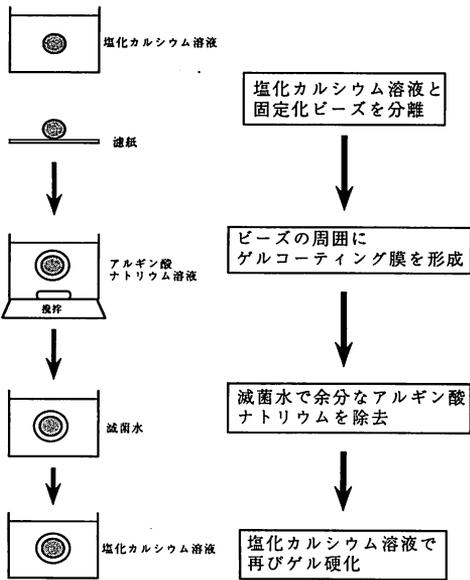


図3 ゲルコーティング膜法

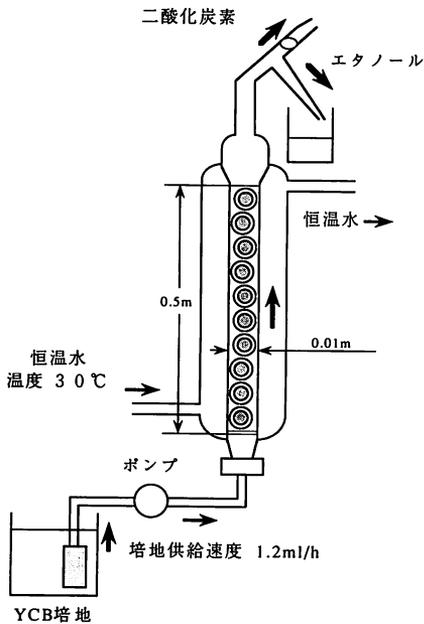


図4 連続発酵装置図

とロータリーシェーカー（攪拌160rpm）に分けて1日置きに菌体密度，二酸化炭素の発生量を測定した。

図3にゲルコーティング膜法を示す。塩化カルシウム溶液中のビーズをろ紙を用いて分離しアルギン酸ナトリウム溶液に浸した。1分間攪拌を続けることでビー

表3 連続発酵の実験条件

酵母固定化二重膜ビーズ	80個
カラム体積	$4 \times 10^{-5} \text{m}^3$
反応温度	30℃
供給速度	$2 \times 10^{-8} \text{m}^3/\text{s}$
カラム断面積	$1 \times 10^{-4} \text{m}^2$

表4 エタノールの分析条件

ガスクロマトグラフ	GC-8A（島津製作所）
検出器	FID
内部標準物質	1,4-ブタンジオール
カラム温度	200℃
インジェクション温度	250℃

ズ表面に付着した塩化カルシウム溶液と反応しコーティング膜を形成させた。次に余分なアルギン酸ナトリウム溶液を滅菌水で洗浄し，再びビーズを塩化カルシウム溶液に浸し硬化させた。

図4に示すような連続発酵装置を用いて表3の条件で連続的にYCB培地を供給させ，1日置きに菌体密度，エタノール濃度を測定した。

### 2.2 分析方法

（菌体密度）

培養液0.5mlを0.9wt%生理食塩水4.5mlで10倍に希釈し，660nmにおける吸光度を分光光度計で測定した。

（二酸化炭素量）

上皿天秤で発酵前の培養液の重量と発酵時の培養液の重量を測定し，その差を用いた。

（エタノール濃度）

培養液2mlを遠心分離（3000rpm，5min）し，その上澄みと内部標準物質を混合し，マイクロシリンジで約1μlガスクロマトグラフに注入した。表4にガスクロマトグラフの分析条件を示す。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 試験管サイズ

図5に，アルギン酸ナトリウム濃度と塩化カルシウム濃度変化における漏出した酵母密度とエタノール濃度を示す。漏出酵母密度は，アルギン酸ナトリウム濃度の増加，塩化カルシウム濃度の減少に伴い最小限にすることができたが，エタノール濃度は低下した。これは高分子であるアルギン酸カルシウムゲルの構造が濃度を上げるにより複雑になったためと思われる。

図6に一重膜、二重膜にした時の漏出した酵母密度とエタノール濃度を示す。芯ビーズは酵母の漏出が少

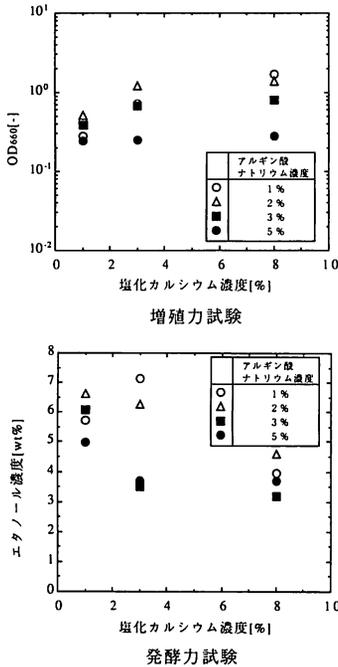


図5 濃度変化による影響

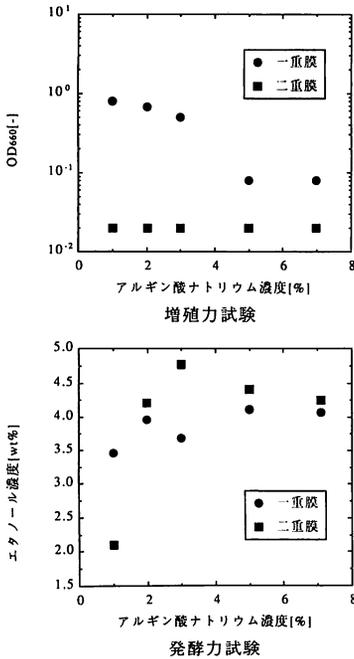


図6 コーティング膜形成時の影響

なくエタノール濃度が高い調製条件（アルギン酸ナトリウム濃度5%，塩化カルシウム濃度1%）を用いた。一重膜においては、アルギン酸ナトリウム濃度の増加に伴い酵母の漏出を抑えることができた。一方、エタノール濃度はアルギン酸ナトリウム濃度に関係なくほぼ同じであった。二重膜においては、漏出した酵母密度はアルギン酸ナトリウム濃度に関係なくほとんど漏出が見られなかった。また、二酸化炭素の発生によりビーズとコーティング膜との間に空間ができ、そこに酵母がたまる現象がみられた。このことより培地とビーズの間は遮断されたと思われたが、エタノールは生成されているので培地はビーズまで浸透していることが予想される。

3.2 フラスコサイズ

図7に、コーティング膜を形成しない固定化ビーズのみで発酵を行った時の漏出酵母密度と、生成した二酸化炭素量を示す。二酸化炭素の減少量が大きいほど発酵は行われている。増殖力においては攪拌が静置よりも酵母の漏出が増加した。これはビーズの表面に付着した酵母がはがれ落ちたものと考えられる。発酵力においては攪拌、静置とも同じような重量変化を示すことから、攪拌によって発酵の進行度を速めることはできないと思われる。

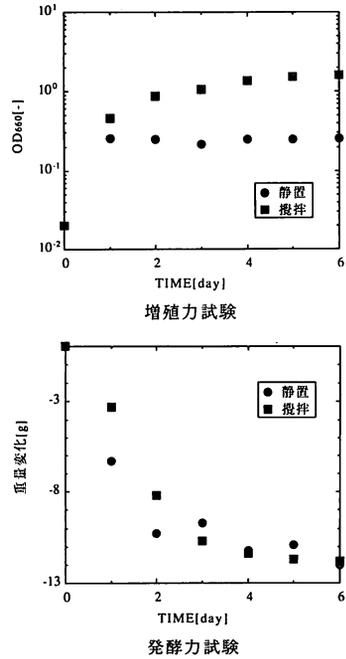


図7 フラスコ発酵（ビーズのみ）

図8に、一重膜にした時の漏出酵母密度と生成した二酸化炭素量を示す。増殖力においては先程とは逆に、

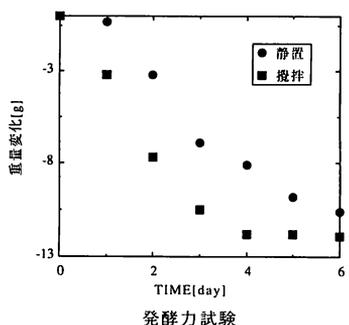
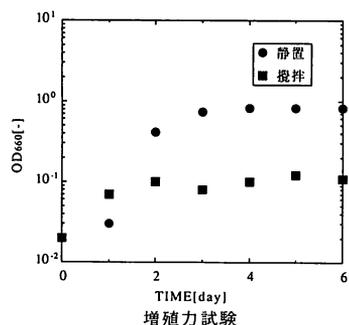


図8 フラスコ発酵（一重膜）

静置が攪拌よりも酵母の漏出は増加した。これは、静置の場合では増殖した酵母が一カ所に固まってコーティング膜に亀裂がはいり、漏出したものと考えられる。発酵力においては攪拌が静置よりも減少量が大きいのので、攪拌によって発酵の進行度を速めることができると思われる。

図9に、二重膜にした時の漏出酵母密度と生成した二酸化炭素量を示す。増殖力においては静置、攪拌ともに酵母の漏出はほとんど見られなかった。発酵力においては一重膜と同様に、攪拌が静置よりも減少量が大きいのので、攪拌によって発酵の進行度を速めることができると思われる。また、静置の減少量が少ないのは培地がビーズの中心に浸透するまでに時間がかかったためと考えられる。

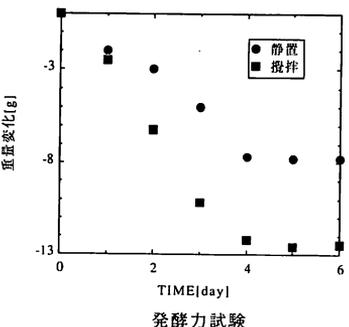
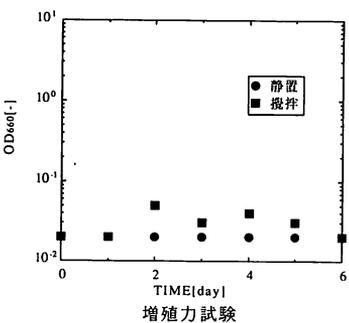


図9 フラスコ発酵（二重膜）

図10に連続発酵の漏出酵母密度とエタノール濃度を示す。高濃度のエタノールを生産できたが、かなりの酵母が漏出した。また、発酵開始後6日目あたりからカラムの底付近のビーズが崩壊する現象が見られた。

これは連続的に新しい培地を供給させたため、フラスコサイズで発酵させた時よりも酵母の増殖が迅速化したためであると思われる。

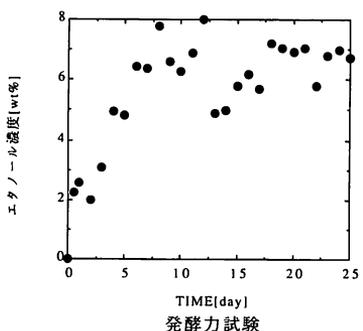
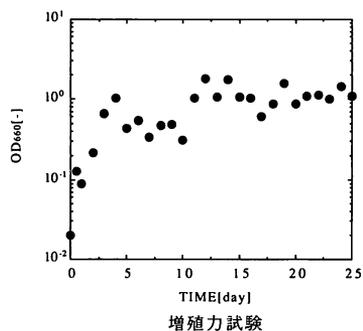


図10 連続発酵

#### 4. 結 言

以上の事より次の事が明らかになった。

- (1) 芯ビーズは、アルギン酸ナトリウム濃度の増加、塩化カルシウム濃度の減少に伴い酵母の漏出を抑えることができた。また、コーティング膜を形成すれば、形成しない時よりも酵母の漏出は減少し、生成されたエタノールも同等な濃度を得ることができた。
- (2) コーティング膜を形成した場合の発酵の進行度では、攪拌が静置よりも速かった。
- (3) 連続発酵では、二重膜にしてもある程度の酵母の漏出はあったが、高濃度のエタノールを生産することができた。

#### 文 献

- 1) 広常正人・仲田富士男・浜地正昭・本馬健光；J. Brew. Soc. Japan. 82, (8), 582-586 (1987).
- 2) 久寿米木一裕・馬場雅幸・中原民也；J. Brew. Soc. Japan. 87, (9), 651-656 (1992).
- 3) 安楽城恵一・皆見武志・末木雅昭・木村隆志；生物工学会誌 71, (1), 9-14 (1993).
- 4) Sho Shindo, Hirohisa Sahara, Shohei Kosino, Hideo Tanaka；Journal of Fermentation and Bio-engineering, 76, (3), 199-202 (1993).
- 5) 大田修明・末永 光・長浜正治・山下純隆・平野稔彦・山口 剛；Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 36, (11), 903-909 (1989).
- 6) 永井英雄・中沢英五郎・三島秀夫・竹村成三・高橋康次郎・吉沢 淑；J. Brew. Soc. Japan. 83, (3), 195-200 (1988).
- 7) Kazuaki Yamagiwa, Yukari Simizu, Taro Kozawa, Masayuki Onodera, Akira Ohkawa；Journal of Chemical Engineering of Japan, 25, (6), 723-728 (1992).
- 8) 田上 修；平成4年度鹿児島大学卒業論文(1992).
- 9) 守谷克也；平成4年度鹿児島大学卒業論文(1992).