

氏名(本籍)	李 相 虎 (韓 国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第1,165号
学位授与年月日	平成5年6月30日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	三種類の菌種同時混合固定系による生澱粉からのエタノール生産
主査	筑波大学教授 工学博士 田中秀夫
副査	筑波大学教授 工学博士 片岡 廣
副査	筑波大学教授 農学博士 中原忠篤
副査	筑波大学教授 農学博士 前川孝昭

論 文 の 要 旨

澱粉質系バイオマスは、自然界に未利用の状態でも豊富に存在するだけでなく、再生産が可能であることから、近年石油代替エネルギー源の一つとして注目されている。しかしながら、澱粉質系バイオマスは、一般の難分解性の多糖で構成されているため、実際に工業原料や醗酵原料として用いる場合、蒸煮などの前処理が必要である。この際、投入されるエネルギーは、生澱粉からの物質生産に必要な全エネルギーの25～30%に及ぶと報告されている。

本研究では、生澱粉を蒸煮などの前処理なしに直接糖化し、同時に生じたグルコースをエタノール醗酵させる新規な培養系を開発するとともに、加熱殺菌を行わない省エネルギー醗酵法を確立して、この培養系を用いることを目的とした。その結果、イ) 難分解性の生澱粉は二種類のアミラーゼ菌種 (*Aspergillus* 属菌と *Rhizopus* 属菌) によりグルコースに分解させ、生じたグルコースは細菌 (*Zymomonas mobilis*) によってアルコールへ変換させることが可能な三菌種の同時混合固定化培養系を開発し、ロ) 培養装置や培地を加熱殺菌せずに、天然食品添加物の殺菌剤を、この培養系に添加する省エネルギー醗酵法を用いることにより、長期間雑菌の汚染なしに、生澱粉から高収率でアルコールを生産することを試みている。本研究の内容は以下のような項目にまとめられる。

- ①二種類の混合固定化培養系における生澱粉からのエタノール生産プロセスの比較検討
- ②新しい混合固定化培養系による生澱粉からのエタノール生産
- ③新しい混合固定化培養系 (A-R-Z 18系) を用いた非加熱殺菌培養による生澱粉からのエタノール生産プロセス

① 2種類の混合固定化培養系における生澱粉からのエタノール生産プロセスの比較検討

可溶性澱粉からエタノールを効率的に生産することができる好気性カビ〔*Aspergillus awamori*(A)〕と嫌気性の細菌〔*Zymomonas mobilis*(Z)〕との混合固定化培養系(A-Z系)を生澱粉からのエタノール生産に用いた場合、生澱粉の分解性が悪く、エタノール生産性が低いことが明らかとなった。一般にアミラーゼ活性の高い菌として知られている *Rhizopus japonicus*(R)を *Z. mobilis*(Z)と混合固定化したR-Z系を組み立てA-Z系の培養結果と比較検討を行った。その結果、R-Z系における基質分解速度はA-Z系より速いにもかかわらず、エタノール生産量はA-Z系の半分しか得られなかった。そこで、A-Z系およびR-Z系で認められた相違を明らかにするため、両混合固定化培養系の特性について比較検討を行った。その結果、R-Z系はグルコアミラーゼ活性が高く、A-Z系な α -アミラーゼ活性が高いことが明らかとなった。一方、生澱粉に対する加水分解度はAおよびRそれぞれの酵素を単独で用いるより、両酵素を1対1で混ぜて反応させることにより両酵素の間で酵素活性の相乗効果が起こり、生澱粉の加水分解が高くなることが認められた。

② 新しい混合固定化培養系による生澱粉からのエタノール生産

①の結果に基づいて、二種類のカビ即ち、*A. awamori*(A)と *R. japonicus*(R)、さらにエタノールの生産菌である *Z. mobilis*(Z)からなる新しい混合固定化培養系(A-R-Z系)により、生澱粉からのエタノール生産について検討を行った。その結果、混合固定化する三菌株の接種量の比率を制御することによって、基質の加水分解速度は飛躍的に改善されたが、pHが低下し、エタノール収率が低く、ゲルビーズから菌糸が漏出することが認められた。これらは培養条件が好気状態であるため、カビ菌糸の過剰な生育に伴い、有機酸が生産されたためpHが低くなり、*Z. mobilis*のエタノール生産活性が低下した結果によるものと考えられた。そこで、カビ菌糸の過剰な生育を抑え、生澱粉からできたグルコースを *Z. mobilis* に優先的に使わせてエタノール生産活性を向上させる目的で、培養途中で培養条件を好気的な状態から嫌気的な状態に切り替える検討を行った。その結果、培養18時間目に綿栓を特殊加工した逆止弁付きシリコン栓に切り替えることによって形成されたA-R-Z 18系ではゲルビーズから菌糸の漏出もなく、pHは4.8程度を維持することができ、特に *A. awamori* と *R. japonicus* の胞子の混合比を1対1で制御した場合に20g/Lの生澱粉からエタノール生産濃度を8.2g/L ($Y_{p/s}; 0.48$)まで高めることができた。この収率はA-R-Z系の4倍に当たり、生澱粉を基質とした場合の理論収率(0.51)の94%に相当する。さらに、A-R-Z 18系はジャーフェーメンターを用いて流加培養をしてもフラスコと同様高いエタノール収率を示し、本混合固定化培養系の有用性が明らかにされた。

③ 新しい混合固定化培養系(A-R-Z 18系)を用いた非加熱殺菌培養による生澱粉からのエタノール生産プロセス

本研究で開発したA-R-Z 18系の場合、④培養18時間目から嫌気的に培養を行うため、好気性微生物による汚染の可能性が少なくなり、⑤3菌株を混合固定化したため、生澱粉から生じたグルコースの消費が速く、培養液にはグルコースの蓄積が見られない、⑥最終生産物がエタノールである、などの特徴を持ち、さらに⑦ゲルビーズ表面部の近くに増殖しているカビ菌糸とゲルビーズ自身が高分子物質の移動障害になる。これらを総合的に考慮し、高分子の薬剤の添加による非加熱殺菌培養法の

開発を行った。バイオマス物質生産を行う際、最大の問題となっているエネルギーの収率を上げることを目的とし、高分子の薬剤を用いることにより生澱粉や培地、さらに培養装置などを加熱殺菌せずに、そのままエタノールの生産を行う省エネルギー醗酵法、即ち非加熱殺菌培養法について検討を行った。はじめに、A-R-Z 18系のみでの雑菌の防御力について検討を行った結果、培地に含まれているバクテリアによる汚染のため、非加熱殺菌培養ができないことが認められた。そこで、種々の殺菌剤について検討を行った結果、培地の雑菌汚染を抑え、しかも固定化された3菌株の孢子および細胞に対しては影響の少ない殺菌剤として抗菌剤であるバントシール IB (Kao-Atlas Co. Ltd., Tokyo) と天然食品添加物であるノイペクチン L (Asama Co. Ltd., Tokyo) を得た。両殺菌剤は菌株の懸濁培養では殺菌力が強かったが、菌株を固定化することによって殺菌剤の殺菌作用が妨げられることが明らかとなった。これらの結果は両殺菌剤が他の殺菌剤に比べて高分子であるだけでなく、殺菌剤の物質移動がカビの菌糸を含むゲルビーズによって妨げられたか、吸着されたためであろうと推定された。殺菌剤を用いた非加熱殺菌培養法で、10%の生澱粉を用いた比較的基質高濃度培養を行っても両殺菌剤ともコントロールと同様なエタノール収率が得られた。なお、殺菌剤として用いたバントシール IB は食品工業の機械消毒に用いられている抗菌剤であるため、燃料用のエタノール生産には有効に使われると思われるが、飲料用のアルコール醗酵を行う際には天然食品添加物であるノイペクチン L が適していると考えられる。

審 査 の 要 旨

本論文は、難分解性の生澱粉からエタノールを生産させるための新規な三種類の菌種同時混合固定系を開発し、さらに加熱殺菌をせず、天然食品添加物の殺菌剤(ノイペクチンL)を用いる省エネルギー醗酵法にこの固定系を利用することを目的としたものである。これまで、生澱粉が難分解性であるために直接用いずに、蒸煮などにより可溶性澱粉にして醗酵原料に用いた研究が多い。これに対し、本研究のように経済性から生澱粉を直接利用する観点に立ち、二種類のアミラーゼ生産カビの特長を巧みに利用し、しかもアミラーゼにより分解生成したグルコースを細菌によって同時にエタノールへ変換させる混合固定化培養系の研究は独創性の高い研究といえる。さらに、省エネルギー醗酵の立場から、加熱殺菌せずに天然食品添加物を直接添加し、長時間雑菌汚染なしに高収率のエタノールを生産することができた点は、実用上の有用性からも評価できるものである。今後、エタノールの生産速度と生産濃度を増大させることが、より実用性を高めるために重要な課題となろう。

よって、著者は博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。