

バイオリクターによる食品廃棄物のバイオエタノール化

石川県立金沢泉丘高等学校理数科

大山 拓海 外川 和佳子 増尾 梨乃 増本 官泰 諸田 小百合

要旨

近年、化石燃料の枯渇によりバイオエタノールがエネルギー源として注目されている。本研究では、このバイオエタノールの作成のため、現在日本で問題となっている廃棄食材の活用方法の開拓も兼ねて、廃棄食材の内、コメなどのデンプン質をバイオエタノール化することを目指した。そのため今回は麴菌のアミラーゼを用いてコメに含まれるデンプンをグルコースに分解し、酵母菌の酵素を用いてアルコール発酵を行わせ、そのグルコースをアルコール化するという方法を取った。ここでは酵母菌の効率的利用のため酵母菌のバイオリクター化を行った。これらの過程の効率化のため様々に条件を変化させ実験を行い、麴菌を用いたデンプン糖化の最適環境やアルコール発酵に用いる酵母菌バイオリクターの作成条件を求めた。その結果、より効率的に反応を行えるバイオリクターの作成方法を確立できた。

1. 研究背景・目的

今日、化石燃料の枯渇やその使用による二酸化炭素排出が原因の地球温暖化が世界規模の問題となっている。そこで、化石燃料に代わるカーボンニュートラルなエネルギー源としてバイオエタノールの使用が進んでいる。そこで、本研究では日本で現在問題となっている食品廃棄物を用いてバイオエタノールを生成する方法を考えた。具体的には食品廃棄物のうち日本では身近なコメを原料にバイオエタノールを作成する実験を行った。その実験では、バイオエタノールの生成をより効率化することを目的とし、様々に実験の条件を変えた。

2. 研究手法

2-1 実験内容

本研究は大きく2つの段階に分けられる。1段階目ではコメに含まれるでんぷんを麴菌のアミラーゼを用いてグルコースに分解する。2段階目では酵母菌をバイオリクター化したものを用いたアルコール発酵により、グルコースからエタノールを生成する。具体的には、1段階目ではコメ、麴菌、水を一定の割合で混ぜ、でんぷんの分解を行い、その時のコメ、麴菌、水の割合や分解時の温度を変化させ最適な条件を探し出す実験を行った。2段階目ではまず、酵母菌のバイオリクター化を行った。ここで、バイオリクターとは、広義では微生物や酵素を触媒として、物質の合成・分解・変換などを行う装置である^[1]が本研究においては、酵母菌をアルギン酸カルシウムという不

溶性の物質の中に閉じ込めたものを指す。バイオリクター化の後、それを用いてアルコール発酵を行った。ここでは、バイオリクターの作成方法を変化させ、アルコール発酵に最適なバイオリクターの生成方法を明らかにする実験、アルコール発酵時の温度を変化させアルコール発酵に最適な環境を明らかにする実験を行った。本研究においては、酵母をバイオリクター化することで一度アルコール発酵をした後に、通常は取り出すことの難しい酵母菌を簡単に取り出して再利用し、反応を進めた。

2-2 バイオリクターの作成方法

- i. アルギン酸ナトリウム水溶液を作成する。
実験によって、濃度は変更する。
- ii. 酵母菌 1g と蒸留水 2g を混ぜ、i と混ぜる。
- iii. 20%塩化カルシウム水溶液に ii を滴下する。

2-3 バイオリクターの仕組み

本研究では酵母菌のバイオリクター化を行った。バイオリクター化には一般的に担体結合法という酵素を不活性担体に結合させ固定化する方法が用いられるが、この方法では化学修飾を行う場合があるので微生物菌体を固定化するとき、一部の酵素の変性や失活が起こり^[2]、微生物菌体により本来起こる反応をそのまま再現できない場合がある。このような理由などで微生物菌体である酵母菌をバイオリクター化する今回の実験では包括法という方法を用いた。包括法とは高分子ゲルの中に酵素を取り込ませることで、酵素を直接化学修飾することなくゲルの中に固定化

するという手法である。この手法では化学修飾を直接行うことがない^[2]ため酵母のバイオリアクター化の手法として適していると考えた。今回の実験ではその包括法の中で 2-2 で示した通りアルギン酸ナトリウム水溶液と酵母菌を混ぜ、塩化カルシウム水溶液の中に滴下し、表面に膜を作り酵母菌を固定化するという方法を取った。この方法では、アルギン酸ナトリウムと塩化カルシウムが反応し、不溶性のアルギン酸カルシウムが滴下したものの表面に生成し、それが膜となる^[3]という仕組みである。

3. 予備実験

3-1 目的

作成したバイオリアクターを発酵に用いる事ができるかを調べる。

3-2 実験方法

- i. 研究手法に従ってバイオリアクターを作成する。
- ii. 15%グルコース水溶液を作成する。
- iii. グルコース水溶液 40ml にバイオリアクター18gを入れる。
ついで、50℃に設定した恒温器に実験装置を入れ、1日発酵を進める。
- iv. 1日後、実験装置中の溶液のアルコール濃度をアルコール濃度計を用いて測定する。
- v. 溶液からバイオリアクターを取り出し、蒸留水で洗浄したあと水分をとる。
- vi. iii～ivをもう一度行う。

3-3 実験結果

作成したバイオリアクターを繰り返し発酵に用いることができた。

4. バイオリアクターの調整 1

4-1 目的

塩化カルシウムへの浸漬時間とアルコール発酵の強さとの関係を調べる。

4-2 仮説

バイオリアクターの作成時、塩化カルシウムへの浸漬時間を長くするほどバイオリアクターの表面が強化され、長時間何回も発酵を行い続けられる。

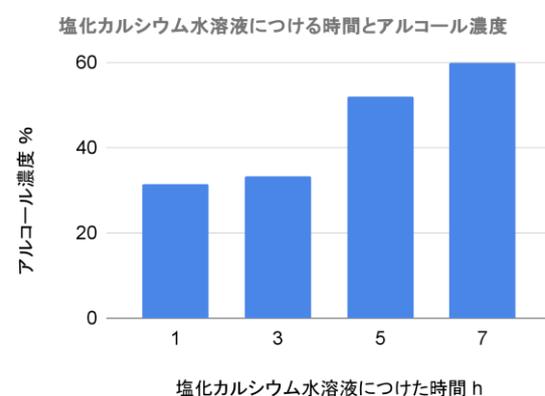
4-3 実験方法

先行研究では、塩化カルシウムへの浸漬時間を長くするとバイオリアクターの膜が強化されると考察されている^[3]。そこで、浸漬時間と生成されるアルコールの濃度の関係を調べた。

- ・塩化カルシウム水溶液への浸漬時間：1時間、3時間、5時間、7時間
- ・アルギン酸ナトリウム水溶液の濃度：2.0%
- ・発酵時の温度：50℃

4-4 結果

浸漬時間が長いほどアルコール濃度が高くなる傾向がみられる。



4-5 考察

実験より、塩化カルシウム水溶液への浸漬時間が長いほどバイオリアクターの表面が強化され、バイオリアクターの内側から二酸化炭素が発生してもバイオリアクターが壊れることなくアルコール発酵が継続できている。

5. バイオリアクターの調整 2

5-1 目的

アルギン酸の濃度によるアルコール濃度の変化を調べる。

5-2 仮説

アルギン酸の濃度が高いほど、バイオリアクターの表面が強化され、長い時間発酵を続けられるのではないかと考えられる。

5-3 実験方法

実験 4 の考察からバイオリアクターの表面が強化されると生成されるアルコール濃度が高くなると考え、アルギン酸の濃度とアルコール濃度の関係を調べた。

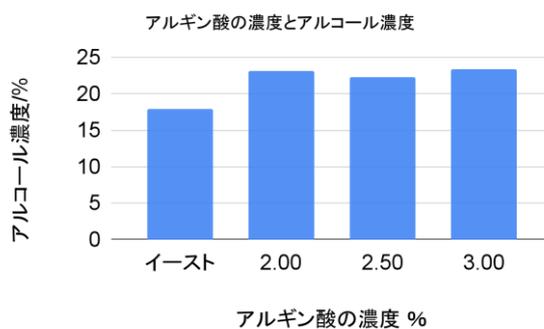
- ・塩化カルシウムへの浸漬時間：10分

実験を効率的に進めるため浸漬時間を 10 分に固定した。

- ・アルギン酸ナトリウム水溶液の濃度：0% (バイオリアクター化しない) 2.0%2.5%、3.0%
- ・発酵時の温度：50℃

5-4 結果

バイオリアクターを用いたときのほうが酵母菌単体でアルコール発酵をしたときよりもアルコール生成量は大きくなる。アルギン酸の濃度を変えてもアルコールの生成量は変わらない。



5-5 考察

酵母菌のみの場合は、反応中に酵母菌が沈殿するためアルコール発酵が進行しにくい。バイオリアクターを用いた場合は、酵母菌がアルコール発酵している時にバイオリアクター中で二酸化炭素が発生し、バイオリアクターが浮いたり沈んだりするため、酵母菌のみの時と比べて比較的アルコール発酵が進行しやすいと考えられる。

6. アルコール発酵実験

6-1 目的

バイオリアクターを用いたときのアルコール発酵の最適温度を測定する。

6-2 仮説

バイオリアクター化したときも酵母菌単体でのアルコール発酵時の最適温度と等しくなる。

6-3 実験方法

先行研究では、酵母菌のアルコール発酵の最適温度は約 45℃と考えられている^[4]。そこ

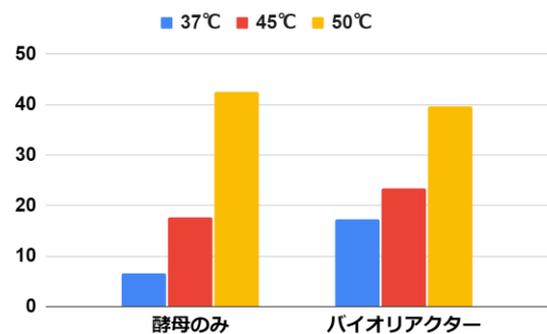
で、バイオリアクター化した際のアルコール発酵の最適温度を調べる。

- ・塩化カルシウムへの浸漬時間：10 分
- ・アルギン酸ナトリウムの濃度：2.0%
- ・発酵時の温度：37℃、45℃、50℃

なお、恒温器の最大温度が 50℃であったため 50℃まで測定した。

6-4 結果

実験を行った中では 50℃で発酵を行ったときが最もアルコールの生成量が大きかった。



6-5 考察

45℃が酵母菌の最適温度であるが、バイオリアクター化することによって酵母が周りの高い温度から保護され、50℃のときにアルコール発酵が盛んに行われたと考えられる。37℃のときは、酵母菌の最適温度より低かったため他の温度で実験を行ったときよりもアルコール生成量が少ないと考えられる。

7. 糖化実験

7-1 仮説

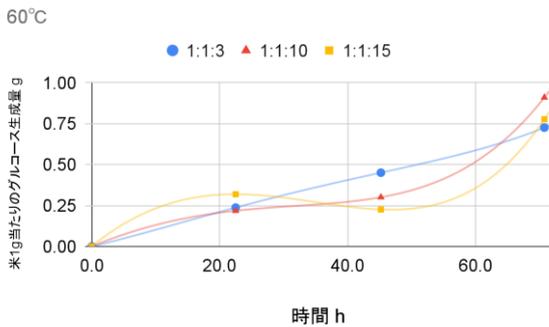
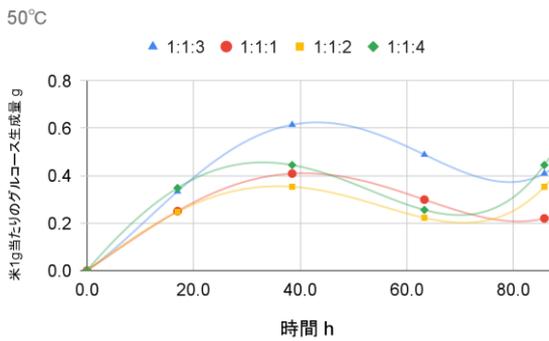
糖化には最適温度が存在し、またこうじに対する水の割合が大きいほど糖化の効率上がる。

7-2 実験方法

- ①米、こうじ、水の割合を変化させた試料を作成する。
- ②恒温器を使い試料を 50℃と 60℃の場合でそれぞれ 4 日ほど保温した。
- ③試料の上澄み液をとり純水で質量の 10 倍に希釈した。
- ④10 倍希釈液の糖度を糖度計により測定し、結果よりご飯 1g 当たりのグルコース生成量を算出した。

7-3 結果

7-2 の④で糖度計を使って測定したグルコース水溶液の質量パーセント濃度から、生成したグルコースの質量を求め、それを米の質量で割り、米1グラム当たりのグルコース生成量を求めた。(以下これを糖化効率とする)
50℃では米:麴:水の比が1:1:3の割合、60℃では1:1:15の割合で糖化効率の減少が大きかった。また、水の割合が比較的多い試料が最終的に糖化効率が大きくなる傾向が見られた。



7-4 考察

50℃のグラフより、1:1:3の割合の時間が糖化効率がよいことからこの条件が糖化に適していると考えられる。

60℃のグラフより、1:1:3と水の割合が小さい条件と1:1:10、1:1:15といった水の割合が大きい条件とで糖化効率に大きな差異はないと考えられる。

50℃、60℃の各実験の結果より、米:麴:水の割合は米、麴より水が多い場合、どの割合でも糖化効率に大きな差異は生じないと考えられる。

また、50℃の60時間目で糖化効率の低下が見られることから、麴菌が増殖して溶液中のグルコースを消費したと考えられる。

8. 糖化・アルコール発酵の連続実験

8-1 仮説

糖化によって生成した糖を酵母菌が消費してアルコールを生成する。それにより作成した溶液中の糖度が低下し、糖の量に応じたアルコールが生じる。

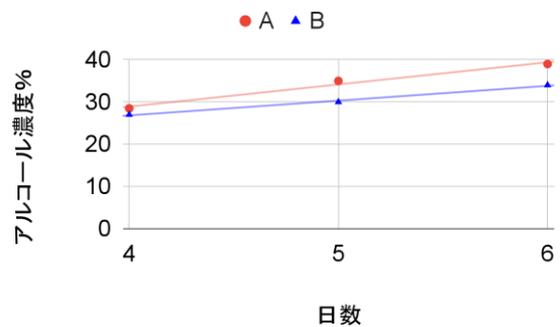
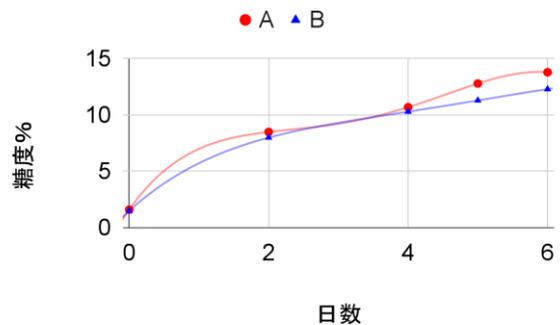
8-2 実験方法

これまでの実験では、糖化反応と発酵をそれぞれ独立した実験として行い、双方の反応に適した条件を決定した。実験7より米:麴:水の割合は糖化効率にあまり影響しないと考えられるので、ここでの条件は計測の効率化を図るため、米:麴:水の比が1:1:10、温度は50℃とする。

この条件下で糖化・アルコール発酵の連続実験を行う。

- ①実験7と同様の方法で糖化実験を行う。
- ②2日間糖化を行ったものにバイオリアクターを入れ、アルコール発酵を行う。この際、糖化後の溶液に残った米粒をA:濾過、B:遠心分離により清澄な液にして反応を行った。
- ③一日毎に糖度、アルコール濃度を測定する。

8-3 結果



8-4 考察

糖化によって生じた糖からアルコールを生成できた。この時、アルコール発酵を開始してからも糖度の上昇が見られたため、米粒を除去しても麹菌や酵素が溶液中に残っていること、またある程度の糖が溶液中に存在していれば、糖化とアルコール発酵を並行して行うことが可能だと考えられる。加えて、遠心分離によって米粒を除去したものと濾過によってそれを行ったもので大きな値の差異は認められないため、米粒の除去方法はこれらのどちらでも発酵反応に大きな影響はないと考えられる。

したバイオリアクター. 高分子. 1986, vol. 35, no. 6, p. 540-543.

9. 今後の課題

測定して出たアルコール度数が予想以上に高いため、アルコール度数をより正確に測定し、信頼性を高める必要がある。さらに、発酵反応の効率化のため反応時の温度や試料の割合を変えた条件下での実験を行う。最終的には反応の条件を決定するため、最も効率の良かった条件を組み合わせた上で実験を行い、各々の条件の他の条件に対する干渉や影響の有無を調べる。この際、麹の酵素をバイオリアクター化し、糖化反応も繰り返し行えるか実験したい。糖化させた後アルコール発酵を行い、アルコールを精製する一連の流れの確立を目指していく。

10. 参考文献

[1] バイオリアクター. コトバンク. 株式会社 VOYAGE MARKETING, 閲覧日 2022-01-26

[2] 戸田 弘. 固定化酵素・細胞の利用. 生物工学. 2018, vol. 96, No. 8, P. 467-471.

[3] 小野寺美佳, 山田緑, 矢野慎, 杉本将英, 肥田野豊, 長南幸安. バイオリアクターを用いたアルコール発酵. 弘前大学教育学部紀要. 2011, vol. 105, p. 69-74.

[4] 大橋淳史, 福山勝也, 大場茂. アルコール発酵の最適温度の測定. Hiyoshi Review of Natural Science Keio University. 2009, No. 45, p. 1-13

[5] 中澤克行. ”バイオリアクターの作成ー固定化酵母によるアルコール発酵ー, 青少年のための科学の祭典第1回 神戸大会” (1996. 1. 6-7)

[6] 千畑一郎, 土佐哲也. 固定化微生物を利用