

焼酎蒸留廃液処理としてのアセトン・ブタノール発酵

小宮山, 晶子

九州大学大学院生物資源環境科学研究科食糧化学工学専攻微生物工学研究室 | 九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門応用微生物学講座微生物工学研究室

小林, 元太

九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門応用微生物学講座微生物工学研究室

園元, 謙二

九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門応用微生物学講座微生物工学研究室

石崎, 文彬

九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門応用微生物学講座微生物工学研究室

他

<https://doi.org/10.15017/21080>

出版情報：九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 55 (2), pp.185-191, 2001-02. 九州大学大学院農学研究院

バージョン：

権利関係：

焼酎蒸留廃液処理としてのアセトン・ブタノール発酵

小宮山 晶子*・小林 元太・園 元 謙 二***
石 崎 文 彬・吉 野 貞 蔵**

九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門応用微生物学講座微生物工学研究室
(2000年10月31日受付, 2000年11月10日受理)

Production of Acetone, Butanol and Ethanol from
shochu distillery waste by *Clostridium*
saccharoperbutylacetonicum N1-4 (ATCC 13564)

Akiko KOMIYAMA*, Genta KOBAYASHI, Kenji SONOMOTO***,
Ayaaki ISHIZAKI and Sadazo YOSHINO**

Laboratory of Microbial Technology, Division of Microbial Science and Technology,
Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka 812-8581

緒 言

発酵法によるアセトンおよびブタノールの生産は、20世紀初頭に広く工業的に実施されていた。ブタノールは航空機燃料である高オクタン価のイソオクタンの原料とするため、また、アセトンは無煙火薬の溶剤として生産されていた。発酵法はトウモロコシ、小麦、きび等のデンプンや廃糖蜜を用いた糖質を原料とすることに始まり、当時の安価な種々のバイオマスから未利用であったリグノセルロース系の発酵原料を用いることも検討された (Lenz and Moreira, 1980; Ross, 1961)。戦後は溶剤や可塑剤としての原料として生産されていたが、石油化学工業の発展により石油資源を原料とする合成法との競争に押されて衰退した (Jones and Woods, 1986; Volesky *et al.*, 1981)。しかしながら、本発酵は近年化石燃料に代わる化学物質の供給原料や燃料の製造方法として再び注目されて

いる。最近の研究では、*Clostridium*属は農産廃棄物を含む種々の有機物を広範囲に原料として使用できるという特長からその価値が見直されている。

当研究室では、数年前から、本菌の優れた特長を用い、東南アジアの大きな産業であるパームオイル工場において、環境汚染物質として依然解決法の見出せないオイルパーム搾油廃液の処理法として、本搾油廃液を原料とすることを目的に研究開発を行い、良好な結果を得ている (Lee *et al.*, 1995; Ishizaki *et al.*, 1996)。

一方、焼酎は日本を代表する蒸留酒であり九州で特に多く生産されている。焼酎蒸留廃液は年間約40万トンが排出され、浮遊物質 (SS) を含み、生物化学的酸素要求量 (BOD) が高く (40,000ppm~80,000 ppm)、腐敗し易く悪臭を発する。また水分含量が高い (約90%) ため、現在でもまだ半量が海洋投棄に依存せざるをえない状況にある。しかし、海洋投棄処理

* 九州大学大学院生物資源環境科学研究科食糧化学工学専攻微生物工学研究室

** 九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門応用微生物学講座発酵化学研究室

* Laboratory of Microbial Technology, Department of Food Science and Technology, Graduate School of Biosource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University

** Laboratory of Applied Microbiology, Division of Microbial Science and Technology, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University

*** Corresponding author (sonomoto@agr.kyushu-u.ac.jp)

は生態系を乱し、海洋汚染を引き起こすことは十分に考えられ、また、ロンドン条約の適用により2001年には海洋投棄は全面的に禁止される。そこで海洋投棄にかわる、より効果的な焼酎蒸留廃液の処理法の開発が待望されている。焼酎蒸留廃液の処理法としては肥料化、飼料化などが広く知られているが、その他、酵母を使用して廃液のろ過効率の改良処理を行なう方法(鈴木ら, 1991; 高峯ら, 1994)や、焼酎蒸留廃液の嫌氣的流動床によるメタン発酵処理法(Kida and Sonoda, 1993; Kida *et al.*, 1994)、焼酎蒸留廃液を使用して糖分解性酵素、プロテアーゼや真菌由来タンパク質を生産した報告(Morimura *et al.*, 1991; Morimura *et al.*, 1994a; Morimura *et al.*, 1994b)などがある。いずれも、焼酎蒸留廃液から付加価値の高い生産物を製造し、廃棄物処理に要するコストを回収しようとする試みであるが、実用化された例はない。

一方、生ゴミは我が国では焼却により処理を行なっているが、焼却法による処理は生ゴミのほか、石油系製品も同時に焼却処理を行っているため、ダイオキシン発生が予想される。今後、ダイオキシンの排出規制が強化され、焼却施設自体がダイオキシン放出削減能力の向上が要求されることは間違いない。焼却施設の設備投資などにより種々の焼却処理費用が高くなり、生ゴミの処理を含めた焼却処理は今後、難しくなることが予想される。そこで、もし大量に発生する生ゴミをアセトン・ブタノール発酵の原料として使用し、生ゴミから燃料や溶剤を回収できれば、新しい環境対策技術として社会的貢献は大きなものが期待される。本研究は、それだけでは発酵しにくい焼酎蒸留廃液に生ゴミを加えた培地で *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4菌を用いるアセトン・ブタノール発酵を実施し、焼酎蒸留廃液処理法に生ゴミ処理法を兼ねた新しい環境対策技術を開発したものである。

材料と方法

1. 使用菌株

使用菌株にはアセトンおよびブタノール生産菌である *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) を用いた。

2. シード調製

まず保存株を沸騰湯浴中で60秒間ヒートショック処理を行い、滅菌済みの新鮮なポテト-グルコース培地に10% (v/v) 接種した。これを30℃ 2日間嫌氣的に

培養し、グルコースを糖源とする TYA 培地に10% (v/v) 接種し、30℃15時間培養したものをシードとした。

3. 培地

(1) 焼酎蒸留廃液の培地調製法

九州各県の焼酎メーカーから供給されたイモ焼酎蒸留廃液、ムギ焼酎蒸留廃液、ソバ焼酎蒸留廃液、ゴマ焼酎蒸留廃液の4種類の焼酎蒸留廃液を使用した。各メーカーによると焼酎蒸留廃液は水分86%~96%であった。そこで焼酎蒸留廃液だけで何も添加しないものと、焼酎蒸留廃液に古米を添加したもの、焼酎蒸留廃液にモデル生ごみ(以下生ゴミとする)を添加したものをそれぞれホモゲナイズし、酵素処理を行い発酵培地とした。モデル生ごみは100ml中に米10g、キャベツ5g、ニンジン5g、刺し身5g、バナナ5gと定義し、毎回同じ物を調製した。生ゴミを添加した焼酎蒸留廃液の糖化後のグルコース濃度は40g/lとした。

(2) TYA 培地

前培養および本培養における TYA 培地(グルコース40g/l、酵母エキス2g/l、トリプトン-ペプトン6g/l、 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 3g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g/l、 KH_2PO_4 0.5g/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg/l)は、1N KOHを用いてpH5.8に調整し、115℃15分オートクレーブにて殺菌後、使用した(Ogata *et al.*, 1982)。

(3) ポテト-グルコース培地

新鮮なジャガイモ150g/lをすりおろし、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g/l、グルコース10g/l、 CaCO_3 3g/lとともに沸騰湯浴中で60分間インキュベートし、ガーゼでろ過後、121℃60分オートクレーブにて殺菌後、使用した。

4. 生ゴミおよび焼酎蒸留廃液の酵素処理

大和化成製(大阪)の *Bacillus subtilis*由来耐熱性アミラーゼ Kleistase T5と天野製薬製(名古屋)の *Rhizopus delemar*由来グルコザイムを使用した。これらの酵素活性はメーカーによれば、5,000AU/g、6,000U/gである。反応温度およびpH調整は以下のように行った。焼酎蒸留廃液と生ゴミの混合溶液100mlをミキサーでよく混合し、5N KOHを用いてpH6.5に調整した。Kleistase T5を0.2% (v/v) 添加し、95℃で2時間液化処理を行った後、130℃10分オートクレーブ処理を行って酵素を失活させた。5N KOHで再びpH6.5に調整し Kleistase T5を0.1% (v/v) 添加し95℃で1時間液化処理を行った。次に1N HClにてpH5.5に調整し、糖化酵素グルコザイムを0.1% (v/v) 添加して50℃で24時間糖化反応を行ったものを1N HClにてpH5.8に調整し発酵培地とした。

5. アセトン・ブタノール発酵

アセトン・ブタノール発酵は200mlの三角フラスコにそれぞれ調製した培地100ml張り込みで行なった。前培養のTYA培地から10% (v/v)を本培養培地に接種し30℃で48時間～96時間回分培養した。サンプリングは12時間ごとに行なった。また培養中pH制御は行なわなかった。シードにはポテト-グルコース培地を使用し、前培養にはTYA培地を、本培養には焼酎蒸留廃液培地、焼酎蒸留廃液に古米を添加した培地、焼酎蒸留廃液に生ゴミを添加した培地、コントロール培地にはTYA培地を使用した。

6. 分析方法

グルコース濃度は、固定化酵素法による簡易グルコース分析器 (Gluco Jr.; バイオット, 東京) により測定した。菌体数は寒天平板培地上でシングルコロニーによる生菌数の測定を行った (Ogata and Hongo, 1974)。ソルベントおよび酸の生成はガスクロマトグラフ (島津 GC-8A; 島津, 京都) により 2 m ガラス

カラム (内径3.2mm) にクロモソルム101 (メッシュ 80/100) を充填し、水素炎イオン化検出器 (FID) で検出した。カラム温度は210℃, 検出器温度は210℃, 注入口温度は250℃とした。キャリアーガスとして窒素を用い、1.2kg/cm²の圧力とした。イモ焼酎蒸留廃液、ソバ焼酎蒸留廃液、ムギ焼酎蒸留廃液、ゴマ焼酎蒸留廃液の元素分析は九州大学理学部中央分析センターに依頼した。全糖量、全窒素量、アミノ態窒素量は財団法人日本食品分析センターに依頼した。還元糖定量は2.3% (w/w) HClを添加し、沸騰温浴中で2.5時間、加水分解を行い、ソモジーネルソン法で測定した。全窒素およびアミノ態窒素はケルダール法とホルモール法でそれぞれ測定した。

7. 生物化学的酸素要求量 (BOD)

培養液上清を蒸留水にて10,000倍希釈して検水とし、ウインクラー法 (並木博, 1993) によって速やかに溶存酸素を測定し、20℃で5日間保存したのち再び溶存酸素を測定し、前後の差からBODを算出した。

Table 1. Element analysis of sweet potato, buckwheat, wheat and sesame *shochu* distillery waste

Element	Sweet potato ^a % (w/w)	Buckwheat ^b % (w/w)	Wheat ^c % (w/w)	Sesame ^d % (w/w)
C	40.9	43.1	42.4	44.8
H	6.7	5.7	5.8	7.1
N	4.5	7.6	7.3	6.3
Ash	2.9	1.2	2.7	4.2

^a Sweet potato *shochu* distillery waste.

^b Buckwheat *shochu* distillery waste.

^c Wheat *shochu* distillery waste.

^d Sesame *shochu* distillery waste.

Table 2. Characteristics of *shochu* distillery waste

	Sweet potato ^a	Buckwheat ^b	Wheat ^c	Sesame ^d
BOD (ppm)	66,000	84,000	49,000	66,000
Total sugar % (w/w)	0.98	1.05	0.97	2.83
Total nitrogen % (w/w)	0.28	0.78	0.76	1.59
Amino-formed nitrogen % (w/w)	0.06	0.18	0.27	0.15
pH	4.30	4.25	4.15	4.25

^a Sweet potato *shochu* distillery waste.

^b Buckwheat *shochu* distillery waste.

^c Wheat *shochu* distillery waste.

^d Sesame *shochu* distillery waste.

結果および考察

イモ焼酎蒸留廃液、ソバ焼酎蒸留廃液、ムギ焼酎蒸留廃液、ゴマ焼酎蒸留廃液の BOD を JIS 規格に定められた方法に基づき測定したところイモ焼酎蒸留廃液 66,000ppm, ソバ焼酎蒸留廃液 84,000ppm, ムギ焼酎蒸留廃液 49,000ppm, ゴマ焼酎蒸留廃液 66,000ppm であった。pH はイモ焼酎蒸留廃液 4.30, ソバ焼酎蒸留廃液 4.25, ムギ焼酎蒸留廃液 4.15, ゴマ焼酎蒸留廃液 4.25 であった。元素分析の結果を Table 1 に、全糖量, 全窒素量, アミノ態窒素量の結果を Table 2 に示す。全窒素はゴマ焼酎蒸留廃液が 1.59% (w/w) と最も高く, 最も低いイモ焼酎蒸留廃液は 0.28% (w/w) であった。アミノ態窒素量も全窒素量と同様にゴマ焼酎蒸留廃液が最も高く, イモ焼酎蒸留廃液が最も低い値であった。還元糖量もゴマ焼酎蒸留廃液で 0.28% (w/w) と最も高く, ムギ焼酎蒸留廃液で 0.10% (w/w) と最も低い値となった。

酵素処理を行ったイモ焼酎蒸留廃液, ムギ焼酎蒸留廃液, ソバ焼酎蒸留廃液, ゴマ焼酎蒸留廃液それぞれを原料として, アセトン・ブタノール発酵を行った結果を Fig. 1 に示す。初発グルコース濃度はいずれの焼酎蒸留廃液培地でも低く, 最も高いソバ焼酎蒸留廃液で 1.82g/l, 最も低いイモ焼酎蒸留廃液で 1.33g/l で

あった。培養 72 時間のブタノール生産はイモ焼酎蒸留廃液で最も高く 3.29g/l, ムギ焼酎蒸留廃液で最も低く 0.33g/l であった。

次に糖源を補うために, 古米 10g を焼酎蒸留廃液培地に添加し, 焼酎蒸留廃液単独の場合と同じ条件で酵素処理を行い, アセトン・ブタノール発酵を行なった。結果を Fig. 2 に示す。古米添加イモ焼酎蒸留廃液培地と古米添加ソバ焼酎蒸留廃液培地では, それぞれ 14.2g/l, 11.9g/l のブタノールの生産を確認し一方, TYA 培地では 16.5g/l のブタノールの生産を確認した。しかし古米添加ムギ焼酎蒸留廃液, 古米添加ゴマ焼酎蒸留廃液では培養 98 時間目までに, ブタノールの生産はそれぞれ 0.43g/l, 0.68g/l であった。古米添加の場合, イモ焼酎蒸留廃液培地とソバ焼酎蒸留廃液培地にてブタノールの生産を確認した。ムギ焼酎蒸留廃液培地とゴマ焼酎蒸留廃液培地では古米添加のみでは, 今回データには示していないが, 菌体が増殖期に移行するまでの適応期が長く, 菌体増殖期に移行しなかったためブタノールの生産が確認できなかった。初発グルコース濃度の高低による影響も検討したが, グルコースによる基質阻害はみられず, 米添加のみではブタノールの生産が難しいと思われた。

次に, 生ゴミを添加し, 焼酎蒸留廃液単独の場合と同じ条件で酵素処理をした培地にて培養を行った結果

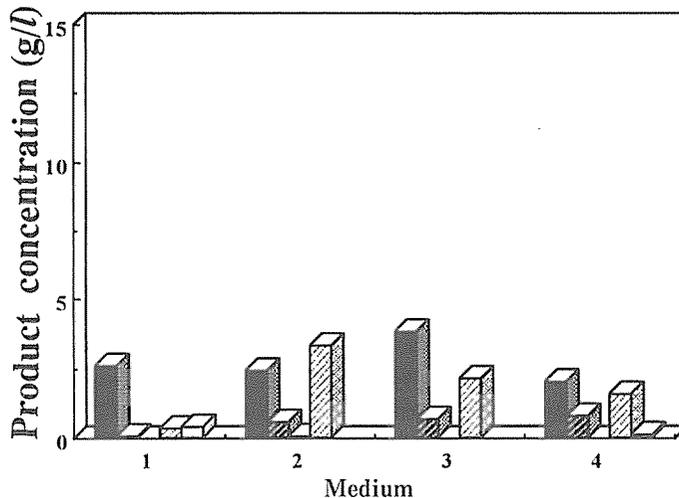


Fig. 1. Products on ABE fermentation using four types of *shochu* distillery waste without any supplements. Medium: 1, Wheat *shochu*; 2, Sweet potato *shochu*; 3, Sesame *shochu*; 4, Buckwheat *shochu*. Products: (■), Ethanol; (▨), Acetone; (⊞), Acetate; (□), Butanol; (□), Butyrate.

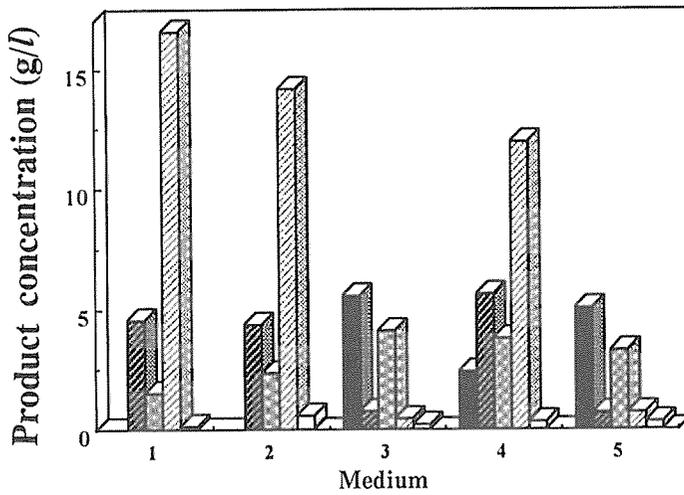


Fig. 2. Addition of rice to *shochu* distillery waste on ABE fermentation.

Medium: 1, TYA (glucose for control); 2, Sweet potato *shochu*; 3, Wheat *shochu*; 4, Buckwheat *shochu*; 5, Sesame *shochu*.

Products: (■), Ethanol; (▨), Acetone; (⊞), Acetate; (□), Butanol; (□), Butyrate.

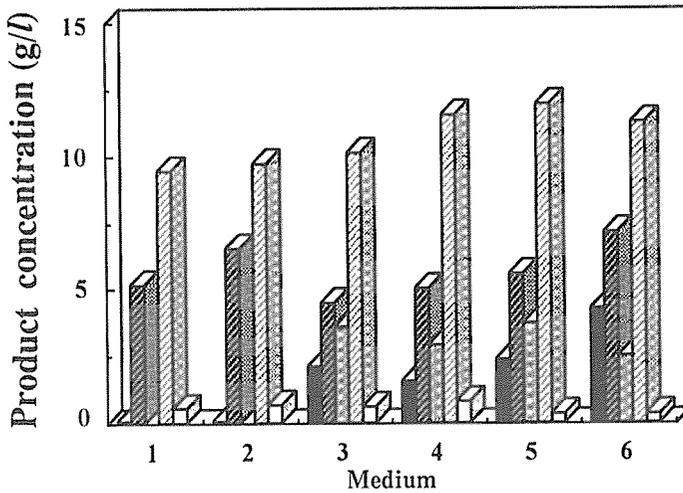


Fig. 3. Addition of garbage to *shochu* distillery waste on ABE fermentation.

Medium: 1, TYA (glucose for control); 2, Garbage; 3, Sweet potato *shochu*; 4, Wheat *shochu*; 5, Buckwheat *shochu*; 6, Sesame *shochu*.

Products: (■), Ethanol; (▨), Acetone; (⊞), Acetate; (□), Butanol; (□), Butyrate.

を Fig. 3 に示す。TYA 培地では 9.4g/l のブタノールの生産であったが、生ゴミを焼酎蒸留廃液に添加することで、ソバ焼酎蒸留廃液で最も高い 11.3g/l のブタノール生産を確認し、生ゴミ培地単独においても、9.7g/l のブタノール生産を確認した。TYA 培地をコントロールとした場合、生ゴミ培地は 12 時間目までのグルコース消費速度が速く（データには示していない）、古米添加時よりも生ゴミを添加することにより適応期を短縮したと考えられた。本菌は特にアミラーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼやリパーゼ等の様々な酵素を生産する。これらの酵素により生ゴミと焼酎廃液中に含まれる種々の高分子化合物が低分子化され本菌の増殖を活性化しコントロール培地よりも高い生産を得たと考えた。したがって本発酵は焼酎蒸留廃液と生ゴミ処理法としてきわめて有用であると考えられた。

要 約

焼酎蒸留廃液は、多量の浮遊物質 (SS) を含み、生物化学的酸素要求量 (BOD) 値が 40,000ppm 以上あり、夏場は常温で 2, 3 日以内に腐敗し、悪臭を発生する。そこでアセトン・ブタノール発酵の原料として焼酎蒸留廃液が使用可能かどうか検討した。イモ焼酎、ムギ焼酎、ソバ焼酎、ゴマ焼酎 4 種の焼酎蒸留廃液を、発酵原料として用いた場合、4 種類とも十分なソルベント生産を得ることが出来なかった。焼酎蒸留廃液中の元素分析、還元糖定量、アミノ酸定量を行い、組成を検討した結果、炭素源が明らかに不足していた。炭素源を補うために古米を添加した結果、イモ焼酎蒸留廃液とソバ焼酎蒸留廃液ではソルベント生産を確認できた。さらに、古米の代わりに生ゴミを添加して発酵を行なったところ、4 種類の焼酎蒸留廃液全てについて、コントロールと同等もしくはそれ以上の高いソルベント生産を確認した。

文 献

- Ishizaki, A., T. M. Lee and J. I. Todd 1996 Solvent Production from Palm Oil Waste. *Proc. Of the 1996 Porim International Palm Oil Congress*,: 114-121
- Jones, D. T. and D. R. Woods 1986 Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.*, 50: 484-524
- Kida, K. and Y. Sonoda 1993 Influence of metal nutrients on high performance during anaerobic treatment of distillery wastewater from barley-shochu making. *J. Ferment. Bioeng.*, 75: 235-237
- Kida, K., K. Tanemura, Y. Sonoda and S. Hikami 1994 Anaerobic treatment of distillery wastewater from barley-shochu making UASB. *J. Ferment. Bioeng.*, 77: 90-93
- Lee, T. M., A. Ishizaki, S. Yoshino and K. Furukawa 1995 Production of acetone, butanol and ethanol from palm oil waste by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Biotech. Lett.*, 17: 649-654
- Lenz, T. G. and A. R. Moreira 1980 Economic evaluation of the acetone butanol fermentation. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, 19: 478-483
- 並木 博 1993 詳細工場排水試験方法, 改訂 3 版 日本規格協会, 東京, 98-108 頁
- Morimura, S., K. Kida, Y. Yakita, Y. Sonoda and H. Myoga 1991 Production of saccharifying enzyme using the wastewater of a shochu distillery. *J. Ferment. Bioeng.*, 71: 329-334
- Morimura, S., K. Kida and Y. Sonoda 1994a Production of protease using wastewater from the manufacture of shochu. *J. Ferment. Bioeng.*, 77: 183-187
- Morimura, S., K. Kida, M. Nakagawa and Y. Sonoda 1994b Production of fungal protein by *Aspergillus awamori* var. *kawachi* grown in shochu distillery wastewater. *J. Ferment. Bioeng.*, 78: 160-163
- Ogata, S., S. Yoshino, Y. Okuma and S. Hayashida 1982 Chemical composition of autoplast membrane of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 28: 293-301
- Ogata, S., and M. Hongo 1974 Lysis induced by sodium ion and its relation to lytic enzyme systems in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *J. Gen. Microbiol.*, 81: 315-323
- Ross, D 1961 The acetone butanol fermentation. *Prog. Ind. Microbiol.*, 3: 73-85
- 鈴木 修・佐藤俊一・家藤治幸・下飯 仁・蓼沼 誠・吉沢 淑 1991 凝集性酵母による芋焼酎蒸留排液の処理. 醸協, 85(2): 137-141
- 高峯和則・瀬戸口真治・間世田春作・浜崎幸男・武宮 重人・小幡孝之 1994 Trichosporon M111 株を用いた甘藷焼酎蒸留排液の固液分離. 醸協, 89(4): 315-320
- Volesky, B., A. Mulchandani and J. Williams 1981 Biochemical production of industrial solvents (acetone-butanol-ethanol) from renewable resources. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 369: 205-218

Summary

Shochu distillery waste contains high suspended solid (SS) material, so that high biochemical oxygen demand (BOD) concentration indicates above 40,000ppm. *Shochu* distillery waste is easy to be spoiled at ambient temperature within a few days. A study for the feasibility of utilizing *shochu* distillery waste as a substrate for acetone, butanol and ethanol fermentation by *Clostridium saccharoperbutylaceticum* N1-4 (ATCC13564) was carried out. *Shochu* distillery waste used as the sole substrate, could not produce solvents because it does not contain sufficient level of substrate for fermentable. Elementary analysis of total sugar and amino acids of *shochu* distillery waste from the process using sweet potato, buckwheat, wheat and sesame indicated those four types of *shochu* waste contained, 1.6~4.8(w/w%) of total sugar, and 0.28~1.59(w/w%) of total nitrogen. Cooked rice hydrolyzed with enzyme was then supplemented to the waste. Waste made from sweet potato and that from buckwheat produced solvent while wheat waste and sesame waste did not. When discarded food whose composition was similar to garbage was supplemented, solvent production was improved markedly.