

焼酎蒸留廃液を原料とするアセトン・ブタノール発酵における食用廃油メチルエステル（COME）による最終生産物阻害解除

小宮山, 晶子

九州大学大学院生物資源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

衛藤, 晃嗣

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 | 九州大学大学院生物資源環境科学研究科生物機能科学専攻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生物学講座発酵科学研究室 | 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

他

<https://doi.org/10.15017/21081>

出版情報：九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 55 (2), pp.193-199, 2001-02. 九州大学大学院農学研究院

バージョン：

権利関係：

焼酎蒸留廃液を原料とするアセトン・ブタノール発酵における 食用廃油メチルエステル (COME) による最終生産物阻害解除

小宮山 晶子*・江藤 晃嗣**・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)

Extractive ABE Fermentation to Release End-product
Inhibition with Methylated Used Cooking Oil (COME)
for *shochu* Distillery Waste Treatment

Akiko KOMIYAMA*, Koji ETOH**, 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

アセトン・ブタノール発酵は戦前からの発酵技術で、既に工業化された技術であるが、1950年代以降の石油化学の発展とともにコスト競争力を失って衰退した (Lenz and Moreira, 1980; Ross, 1986; Jones and Woods, 1986; Volesky *et al.*, 1981). その理由は①原料のモラセスなどの農産物が石油に比べて割高な上、安定供給にも不安を生じたこと②ブタノールによる強い生産物阻害があり、生産性が低いこと③ブタノールを回収するのに蒸留のためのエネルギーを必要とすること、などである。我々は、近年環境を破

壊しその処理に困っている産業廃棄物をブタノール発酵の発酵原料として使用できないか検討を行っている。Ishizaki らは、東南アジアの低湿地帯に自生しているサゴヤシからデンプンを抽出した廃液 (サゴデンプン廃液) が発酵原料として良好であることを明らかにした (Lee *et al.*, 1995). 前報で明らかにしたように焼酎蒸留廃液もまた、サゴデンプン廃液同様、発酵原料として使用できる。このように我々は一連の農産廃棄物や食品廃棄物がブタノール発酵の新しい原料になることを明らかにしてきた。

また一方、最終生産物阻害の軽減を目的として、近年適当な溶剤でブタノールを抽出しながら発酵する抽

* 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

** 九州大学大学院生物資源環境科学研究科生物機能科学専攻応用微生物学講座微生物工学研究室

*** 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 Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University

** Laboratory of Microbial Technology, Division of Microbial Science and Technology, Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource 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)

出発酵法が検討されるようになった。抽出発酵法は、培養液中のブタノール濃度を低減して、最終生産物阻害を軽減する効果がある。しかし同時に、抽出剤は菌への毒性が問題となる。Ishizaki らは、パームオイル搾油工場から産する粗パーム油をメチルエステル化して抽出発酵の抽出剤として用いると、このメチルエステルは発酵を全く阻害せず、抽出剤として優れた効果を発揮することを見出した (Ishizaki *et al.*, 1997; Ishizaki *et al.*, 1999)。本研究では、家庭から排出される食用廃油が処理に困っている状況を考え、この油のメチルエステル (cooking oil methyl ester, 以後 COME と略す) が抽出剤として使用できないかどうかを検討した。その結果、COME は粗パーム油メチルエステル同様優れた抽出剤であることを確認した。

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

まず保存株を沸騰温浴中で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種菌とした。

3. 培地

(1) 焼酎蒸留廃液の培地調製法

九州の焼酎メーカーから供給されたイモ焼酎蒸留廃液を使用した。焼酎蒸留廃液に生ごみに似た成分のモデル生ゴミ (100ml 水道水に米10g, キャベツ 5g, ニンジン 5g, 刺し身 5g, バナナ 5g) を添加したものをホモゲナイズし、後述の方法で酵素処理を行い発酵培地とした。調製後のグルコース濃度は40g/l である。

(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 pH 5.8 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 とともに沸騰温浴中で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

Bacillus subtilis 由来耐熱性アミラーゼ Kleistase T5 (大和化成, 大阪) と *Rhizopus delemar* 由来グルコザイム (天野製薬, 名古屋) 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 100 ml をミキサーでよく混合し、5N KOH を用いて pH 6.5 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 pH 6.5 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 pH 5.5 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 pH 5.8 に調整し発酵培地とした。

5. 抽出剤の調製

酸触媒反応は、大豆油 1 mol/l に対して 20 mol/l の 1% 硫酸・メタノールを混合し、65℃69時間 で処理を行うと、90%以上の収率でエステル生成を得ると報告されている (Freedman *et al.*, 1984)。当研究室で使用したサラダ油は、大豆油とナタネ油の混合である。大豆油の平均分子量は約876であり、ナタネ油の平均分子量は約970である。そこで使用した油はそれらの平均をとり923とした。短時間で反応させるため、反応に使用するメタノール溶液は、5% (v/v) 硫酸を加えて硫酸・メタノール溶液とした。1 mol/l の使用済み天ぷら油に対し、40 mol/l の硫酸・メタノールを混合し、ナス型フラスコに移し、オイルバスにて 95℃で24時間反応させた。冷却後、エバポレーターを用いて、メチル化サンプルからメタノールを除去・回収した。分液ロートにサンプルおよび同量のヘキサンを加え、穏やかに混合し、静置後、水相を除去した。さらにエバポレーターを用いて、ヘキサンを除去・回収した後、精製したメチル化溶剤を 115℃15分オートクレーブ殺菌し、抽出発酵に使用した。また抽出剤のコントロールとして、最も抽出効率が良いオレイルアルコール (ナカライテスク, 京都) を使用した。

6. 抽出効率の検討

今回調製した抽出剤、COME、のブタノールに対する分配係数を求めるために 5, 10, 15g/l 濃度のブタノール溶液と同等の抽出剤を添加し、30℃でインキュ

バートし平衡状態に達した時点で反応を止めた。抽出相とブタノール溶液相からそれぞれサンプルを採取しGC分析を行った。

7. アセトン・ブタノール発酵

アセトン・ブタノール発酵は全容1lのジャーに培地500ml張り込みで行った。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6時間ごとに行った。また培養中pH制御は行わなかった。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。またブタノール生産が確認される培養3時間目から抽出剤をポンプで培地中におくり、抽出発酵を行った。

8. 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。溶剤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2m 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。

結果と考察

抽出剤を培養系に用いる前にCOMEの抽出効率を、分配係数の測定によって検討した。結果をFig. 1に示す。図に示すように、対照のオレイルアルコールと比較すると分配係数は低いが、COMEによりブタノールが良好に抽出されることがわかった。分配係数はオレイルアルコール3.0に対してCOMEは1.0であった。

そこで、実際の培養に抽出剤を添加して抽出発酵を行い、その効果を検討した。コントロール培地であるTYAを用いて、初発グルコース濃度40g/lに調整した培地を用い、抽出剤は添加しない回分培養と、抽出剤のオレイルアルコールとCOMEを添加してブタノールを抽出する抽出発酵による回分培養を行った。結果を比較してFig. 2に示す。その結果、抽出剤を入れない場合、培養24時間で40g/lのグルコースが消費され、9.7g/lのブタノールの生産を確認した。オレイルアルコールを用いて抽出発酵を行うと、オレイルアルコール層に8.9g/lのブタノールが移動し、培養液中のブタノール濃度は3.0g/lに低下した。培養液を用いて実測した、オレイルアルコールのブタノールに対する分配係数は2.9であり、この値は純粋系のブタノールの分配係数試験3.0とほぼ同じであった。次にイモ焼酎蒸留廃液を用い、初発グルコース濃度40g/lに調整した培地で、抽出剤を添加しない回分培養と、抽出剤のオレイルアルコールとCOMEを添加して、ブタノールを抽出する抽出発酵による回分培養を行っ

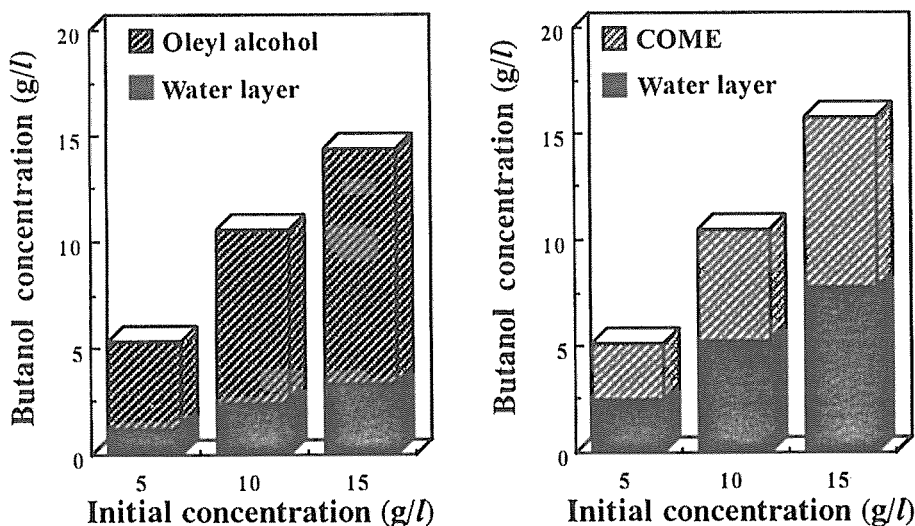


Fig. 1. Extraction of butanol by oleyl alcohol and COME.

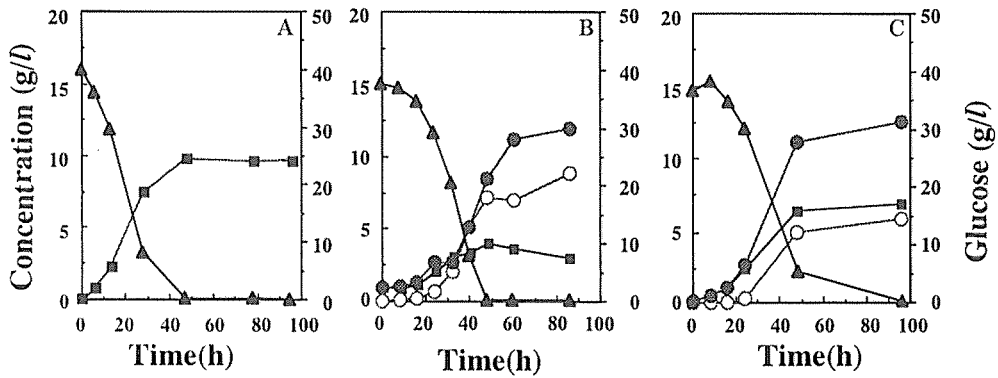


Fig. 2. Non-extractive fermentation (A), extractive fermentation using oleyl alcohol (B) and COME (C) as extractant in TYA for control culture. (▲); Glucose, (■); Butanol in broth, (○); Extracted butanol, (●); Total butanol.

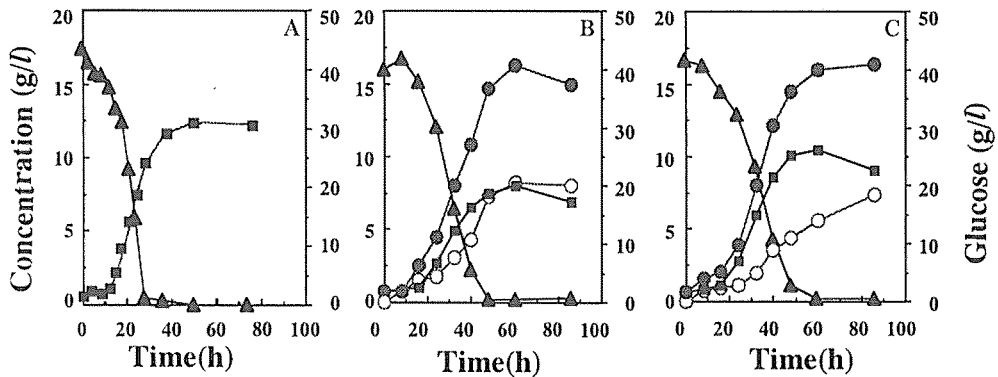


Fig. 3. Non-extractive fermentation (A), extractive fermentation using oleyl alcohol (B) and COME (C) as extractant in sweet potato *shochu* distillery waste and garbage medium. (▲); Glucose, (■); Butanol in broth, (○); Extracted butanol, (●); Total butanol.

た。結果を比較して Fig. 3 に示す。抽出剤を添加しない培養では、培養36時間でグルコース42.8g/lが消費され12.5g/lのブタノールの生産を確認した。オレイルアルコールを用いた抽出発酵では培養24時間で39.4g/lのグルコースが消費され、8.2g/lのブタノールがオレイルアルコール層に抽出された。培養液のブタノール濃度は8.0g/lに低下した。培養液を用いて実測した、オレイルアルコールに対するブタノールの分配係数は1.1となった。純粋系で得られた値に比べるとブタノールの分配係数は約1/3に減少し、またTYA培地を用いたものに比べても、ほぼ1/3であっ

た。焼酎蒸留廃液培地の粘性が高いため、抽出層との接触面積が純粋系に比べると低くなったと考えられた。COMEを抽出剤として使用した場合、培養43時間でグルコース41g/lが消費され、7.3g/lのブタノールがCOME層に抽出され、培養液中のブタノール濃度は9.0g/lに低下した。培養液を用いたCOMEのブタノールへの分配係数は、0.8であった。この値は純粋系のブタノールの分配係数試験1.0とほぼ同じであった。焼酎蒸留廃液を培地にしてCOMEで抽出発酵したとき生成した全ブタノール濃度は16.4g/lで、これはオレイルアルコールを抽出剤として用いた場合16.3g/l、

抽出発酵しない場合の12.5g/lに比べて一番高いものである。オレイルアルコール、COMEとも生ゴミ添加した焼酎蒸留廃液にいずれの抽出剤を添加しても、分配係数は純粋系に比べて低下した。この原因として、イモ焼酎蒸留廃液は特に他の焼酎蒸留廃液に比べ粘性が高く、培養液がかくはんされにくく、培地と抽出剤との接触面積が、TYA培地に比べると小さくなると思われた。抽出発酵では、オレイルアルコールの分配係数は顕著に低下し事実上COMEとほぼ同じとなった。その結果、COMEはオレイルアルコールに比べ抽出効率ほとんど同じであるが、菌に対する毒性が低いので、ブタノール生産速度、ブタノール収率ともに、オレイルアルコールよりも高い値となった。

これらの結果からも、抽出剤としてCOMEを用いることが有用であることが確認された。

要 約

前報で明らかにしたように *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4の発酵原料として、焼酎蒸留廃液は使用可能であった。そこで、この培養の生産性を向上させる目的で、発酵生産物ブタノールによる阻害を軽減するために抽出剤による抽出発酵を検討した。家庭から排出される食用廃油をメチルエステル化 (COME) して発酵試験を行った。ブタノールの抽出剤としてオレイルアルコールをコントロールとした。発酵原料として、イモ焼酎蒸留廃液を、標準培地としてTYAを用いた。その結果、オレイルアルコールと比較して、食用廃油メチルエステル (COME) を用いた場合、高いブタノール生産速度、ブタノール収率を得た。

文 献

Freedman, B., E. Pryde and T.L. Mounts
1984 Variables affecting the yields of

- fatty esters from transesterified vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**: 1638-1643
- Ishizaki, A., S. Michiwaki, E. Crabbe, G. Kobayashi, K. Sonomoto, S. Yoshino, D. M. Flores and K. b. Bujang 1997 Extractive ABE Fermentation Using Crude Palm Oil Methyl ester a New Approach for Sago Waste Treatment. *Ann. Rep. ICBiotech.*, **20**: 237-249
- Ishizaki, A., S. Michiwaki, E. Crabbe, G. Kobayashi, K. Sonomoto and S. Yoshino 1999 Extractive Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation Using Methylated Crude Palm Oil as Extractant in Batch Culture of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4(ATCC13564). *J. Biosci. Bioeng.*, **87**: 352-356
- Jones, D. T. and D. R. Woods 1986 Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.*, **50**: 484-524
- Lenz, T. G. and A. R. Moreira 1980 Economic evaluation of the acetone butanol fermentation. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **19**: 478-483
- 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. Letters.*, **17**: 649-654
- 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
- Ross, D 1961 The acetone butanol fermentation. *Prog. Ind. Microbiol.*, **3**: 73-85
- 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

The possibility of employing methylated used cooking oil (COME) as extractant to reduce end-product inhibition and to enhance solvent productivity in acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation was evaluated using oleyl alcohol as the standard butanol extractant. Fermentation was carried out at an initial glucose concentration of 40g/l using TYA medium and *shochu* distillery waste as fermentation substrate. In the case of TYA medium, butanol production without solvent extractant ceased after 47h cultivation at a concentration of 9.8g/l. The extractant coefficient of oleyl alcohol to butanol was more than three times that of COME to butanol. However, using COME as extractant, total butanol reached 12.6g/l. Using oleyl alcohol, as extractant, on the other hand, total butanol was 11.9g/l. In the case of *shochu* distillery waste, butanol production without solvent extractant ceased after 50h cultivation at a concentration of 12.5g/l. The extractant coefficient of COME to butanol decreased; that of COME was 0.8 and that of oleyl alcohol was 1.0. Though butanol that extracted using COME as extractant was less than using oleyl alcohol, total butanol reached 16.4g/l and was similar to that using oleyl alcohol as extractant. This fact suggests that COME as extractant is more effective for the reduction of end-product inhibition.