

酸性下におけるエタノール生成適正菌株の検討

日大生産工(院) ○大貫 翔馬 環境文明 21 木科 大介
新潟県立上越総合技術高等学校 大森 将希
日本大学 高橋 岩仁

1 序文

エタノール発酵は、長年にわたって醸造発酵産業の中で使用されてきたが、化石燃料の大量使用によるCO₂の排出や燃料の枯渇化といった環境問題を受け、現在ではバイオエタノールに利用されている。しかし、バイオエタノールはサトウキビやトウモロコシなどの食糧を原料としているためフードクライシスの問題が生じる。したがって、食糧と競合しない原料でバイオエタノールを行う必要がある。本研究では廃棄物を原料としてエタノール生成を行うものであるが、既往の研究より模擬生ごみに一般酵母を接種し、エタノール生成を行ったところ、有機酸の蓄積によるpHの低下によりエタノール生成が劣る結果となった。このため、本実験は酸性条件下でもエタノール生成が可能な菌株を得るため、分離培養および増殖代謝特性の検討をし、有用菌株の選定を行った。

表-1 NG 培地の組成

成分	使用試薬	使用量(g/L)
炭水化物	グルコース	24.9
タンパク質	ペプトン	10.7
脂質	脂肪酸 グリセリンエステル	3.2

希塩酸によりpH4に調整



写真-1 NG 寒天培地

2 実験概要

2-1 培地作成

表-1 に NG 培地の組成、写真-1 に NG 寒天培地、写真-2 に NG 液体培地を示す。培地は、生ごみ培地 (以後、NG 培地) を使用し、NG 寒天培地は分離培養、NG 液体培地は菌株の増殖量および代謝の検討に用いた。

作製方法はメディウムビンにNG液体培地を作製した後、オートクレーブにより滅菌を行った。なお、NG寒天培地には2%の寒天を添加した。また、酸性条件下で活動可能な

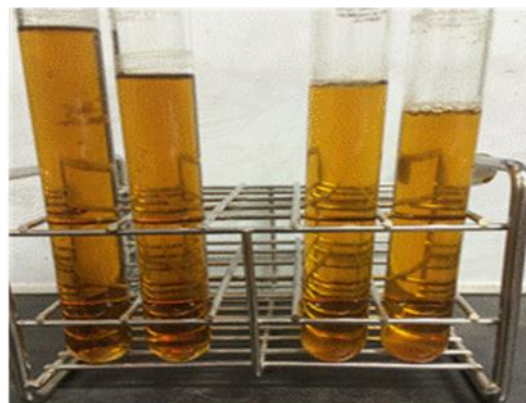


写真-2 NG 液体培地

Examination on the Strain Suitable for Ethanol Formation under an Acidic Condition
Shouma OONUKI, Shouki OHMORI, Disuke KISHINA and Iwahito TAKAHASHI

菌を選定するため、寒天および液体培地は希塩酸を添加しpH4に調整した。

2-2 分離培養

分離培養に使用する菌株は、下水処理場から採取した活性汚泥と本研究室で運転している酸生成槽内の消化試料から採取して用いた。分離培養の手順として、まず試料検体をpH4のNG培地表面に塗布し、30℃で培養を行った。培養後、生成したコロニーの形態的特徴から菌を選別し、新たな培地に植え継ぎを行った。この作業を2～3回繰り返し、単一菌と確認できるまで分離培養を行った。分離培養によって得られた菌株は、形や大きさなどの形態的特徴の視的観察を行った後、写真-2のNG液体培地の試験管に保存した。

なお、サンプリング名は活性汚泥より分離した菌株の頭文字をA、消化試料より分離した菌株をBとした。

2-3 エタノール適正菌株の特定

分離培養で得られた各菌株をNG液体培地に植え継ぎ、48時間後のエタノール生成量を高速液体クロマトグラフィーにより測定し比較を行った。この結果より、エタノール

生成量が多い菌株を3つ選定し、バッチ実験により増殖能力特性について検討を行った。なお、各菌株をNG液体培地に植え継いだ時間を0時間目とし、6時間ピッチで48時間目までサンプリングした後、分光光度計を用い、波長600nmで増殖量の測定を行った。また、バッチ実験後に有機酸生成量を測定した。以上の結果からエタノール生成適正菌株を選定した。

3 実験結果および検討

3-1 分離培養

写真-3に分離培養前の状態、写真-4に分離培養後の状態を示す。写真より、分離培養前は培地表面に菌が繁殖し菌の集合体（以下、コロニー）が確認された。また、コロニーの形や大きさが異なっていることが確認できるため、複数種の菌が生息しているといえる。分離培養後では、同一の形態的特徴である菌が増殖し菌の単離培養が行えていることが確認できた。

表-2に分離培養した菌株の形態的特徴一覧を示す。分離培養の結果から、活性汚泥の試料より10株、消化試料より16株の計

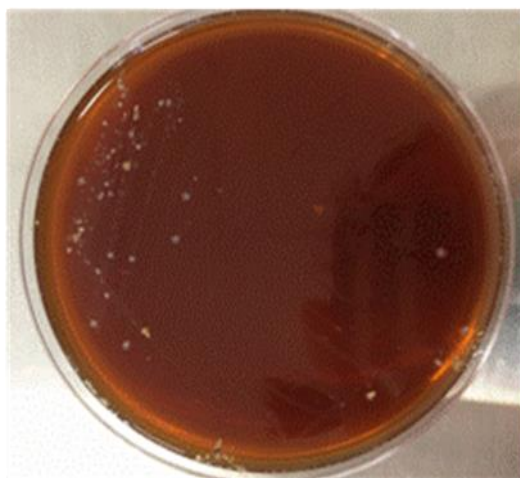


写真-3 分離培養前の状態



写真-4 分離培養後の状態

26 株の分離株が得られた。また、視的観測より、コロニーの形態特徴には白色や茶色およびクリーム色などの色や、大きさや辺縁、断面にも違いがみられ、その中にはカビが生えているものもあった。さらに、においでは、すっぱいものや独特なアルコールなどのにおいもあった。

3-2 エタノール生成量

図-1 に培養 48 時間後のエタノール生成

量を示す。まず、活性汚泥より得られた菌株からは、A-8 の生成量が 3950mg/l と最も高く、次いで A-6 が 2600mg/l、A-1 が 1300mg/l であった。他の菌はエタノールが生成されていなかった。次に消化試料より得られた菌株からは少量ではあるが B-4、B-5 からエタノールは生成されていたが他の菌は、酸性に阻害されたためにエタノールが生成されていなかった。これらの結果

表－2 分離培養により得られた分離株の形態的特徴

サンプル名	コロニー性状							臭い
	色	広がり	厚さ	辺縁	表面粘度	表面光沢	表面湿感	
A-1	淡黄	大	高	毛状	有	有	有	エタノール
A-2	白	大	高	滑らか	無	無	無	エタノール
A-3	茶	大	高	綿状	有	有	有	エタノール
A-4	白	小	高	滑らか	無	無	無	弱エタノール
A-5	白	大	高	毛状	無	有	有	なし
A-6	赤茶	大	高	滑らか	有	有	有	エタノール
A-7	黄土	大	高	滑らか	有	有	有	なし
A-8	黄	大	高	滑らか	有	有	有	弱エタノール
A-9	淡黄	大	高	綿状	無	無	無	エタノール
A-10	白	大	高	滑らか	無	無	無	エタノール
B-1	透明	無	小	線状	無	有	有	なし
B-2	透明	無	小	線状	無	有	有	なし
B-3	焦茶	小	小	滑らか	有	有	有	酸
B-4	焦茶	小	小	滑らか	有	有	有	酸
B-5	透明	無	小	線状	無	有	有	酸
B-6	焦茶	小	小	滑らか	有	有	有	酸
B-7	黄土	小	小	滑らか	有	有	有	酸
B-8	焦茶	小	小	滑らか	有	有	有	酸
B-9	黄土	小	小	滑らか	有	有	有	エタノール
B-10	黄土	小	小	滑らか	有	有	有	弱エタノール
B-11	焦茶	小	小	滑らか	有	有	有	エタノール
B-12	黄土	小	小	滑らか	有	有	有	エタノール
B-13	黄土	小	小	滑らか	有	有	有	エタノール
B-14	黄土	小	小	滑らか	有	有	有	エタノール
B-15	黄土	小	小	滑らか	有	有	有	エタノール
B-16	焦茶	小	小	滑らか	有	有	有	弱エタノール

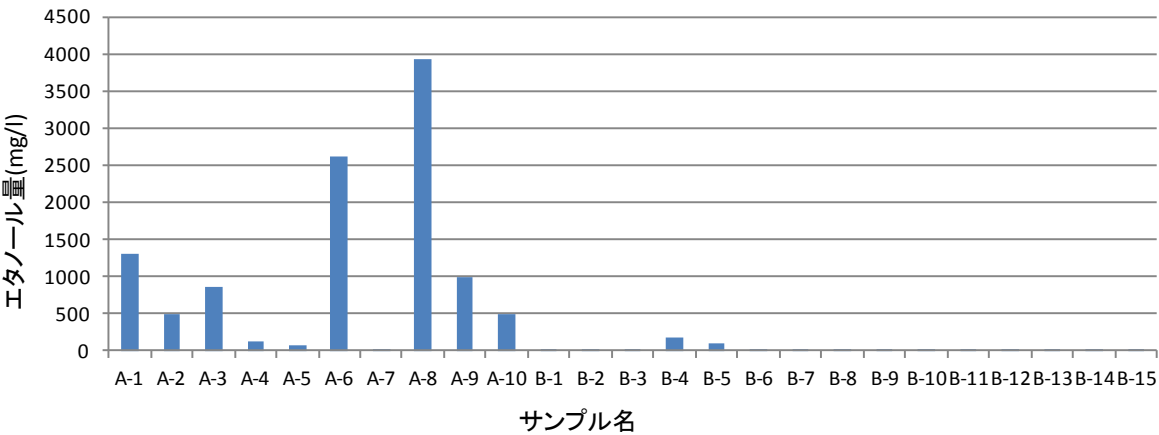


図-1 培養 48 時間目のエタノール生成量

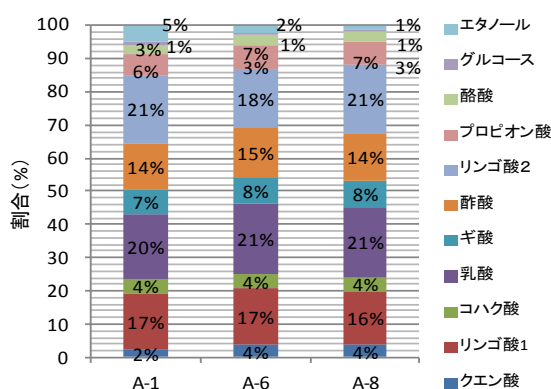


図-2 エタノールと有機酸生成割合

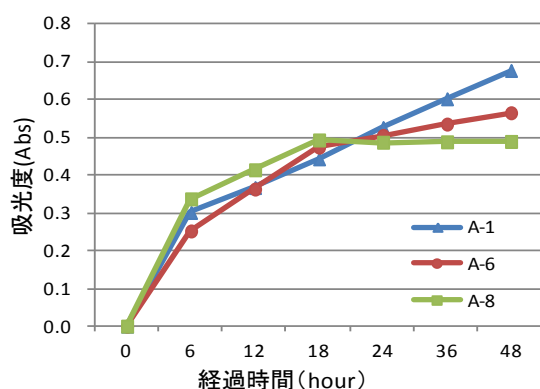


図-3 増殖量の経時変化

から活性汚泥は消化試料に比べ酸性状態の中ではエタノール生成に優れていることと消化試料は酸性下に適応した菌がいなかったことが確認された。以上のことから、エタノール生成量の多いA-8、A-6、A-1の増殖能力について検討を行った。

3-3 分離株の有機酸生成量

図-2に有機酸生成の高かった3種類の菌株からのエタノールおよび有機酸生成割合を示す。これより、有機酸生成は3つの菌株とも同様の割合であった。もっとも生成された有機酸は乳酸菌約20%と次にリンゴ酸1と2は約19%と17%、酢酸は14%、ギ酸は8%であった。この結果から有機酸生成の中で一番多く生成していたのは乳酸と確認できた。乳酸はメタン発酵において

有用な有機酸であるため、エネルギー化の観点から、今回得られたこれらの菌株を使用することによりエタノール生成後の効率的メタン発酵に繋げることも考えられる。

3-4 増殖特性

図-3に増殖度合いの経時変化を示す。これより、増殖度合いは各菌株とも初期段階から増加がみられた。このことから、選定した3つの菌株は、pH4の弱酸性下においても増殖し、エタノールを生成する特性があることが確認された。また、各菌株を比較すると増殖の経時変化からA-1は開始0-18時間では増殖が他の菌株に比べ低いが、24時間後以降、最も高い増殖を示した。A-6は全体を通して他の菌株に比べ、中間の値を示し、A-8は培養開始0-18時間は増殖の値が最も高かったが培養24時間からの増殖は他の菌株に比べ増殖が見られなかった。

4 まとめ

本研究により、以下の知見を得られた。

- 1) 分離培養の結果、活性汚泥の試料より10株、消化試料より16株の計26株の分離株が得られた。
- 2) 得られた菌株を培養した結果、A-8のエタノール生成量が最も高く、次いでA-6およびA-1で高い値が得られた。
- 3) 増殖度合いは各菌株とも初期段階から増加がみられた。

以上のことから、A-8、A-6、A-1は酸性下における効率的エタノール生成菌株に成り得る菌株であるといえる。今後、長期的稼働実験棟により、エタノール発酵システムの効率化に向けて検討することが課題であるといえる。