

## 《 解 説 》

天然ゼオライトを原料とした  
バイオリクター用固定化担体の開発と  
連続アルコール発酵技術

進藤 昌\*, 高田 進\*\*, 田口春男\*\*

\*秋田県総合食品研究所, \*\*TDK 株式会社

天然ゼオライトの焼成によるガラス化, 発泡現象を利用して適当な粒度に破碎し, 固定化酵母用の担体を作成することに成功した。原料として1 mm程度の粒径のものを1270~1300℃で焼成し, 0.6~1 mm程度に整粒したものは従来のガラスビーズと比較して強度が約6倍, 固定化酵母量は約2倍であった。この固定化担体に酵母を固定化してアルコール発酵を行ったところ, ガラスビーズに固定化された酵母と比較して1.2倍の高い発酵能を示した。さらに流動層型バイオリクターを用いて連続発酵を行わせたと, 500時間にわたり安定に発酵を行うことができた。この時, 担体には全く損傷は見られなかった。

## 1. はじめに

秋田県に豊富に賦存している天然ゼオライトは, マイクロポーラスクリスタルとして優れたガス吸着性や, イオン交換能を有する非金属鉱物資源である。これまでにその特性を応用し, 土壤改良材, イオン交換体, ガス吸着剤, 脱臭材などの開発が行われてきた。この天然ゼオライトは, アルミノケイ酸塩からなる化合物で, その構造中の水や火山性吸着ガスが加熱の過程で放出される。また, 主成分のシリカ, アルミナの他にカリウム, ナトリウム酸化物のような, 低沸点の成分を含んでいるため, 1000℃付近からガラス化し溶解し始める。これらの理由で, 天然ゼオライトは焼成により発泡し, 内部に空隙を持つ軽石状のガラス質多孔体になる。気泡の大きさ, 量は加熱温度などにより変えることができる。

一方, バイオリクターに使用する菌体固定化用担体には抱括タイプや吸着タイプ等が開発されている。実際, 工業生産に应用されている固定化担体の多くは, ガラスビーズ<sup>1)</sup> やキトサンビーズ<sup>2)</sup> の様な

吸着固定化タイプが多い。ガラスビーズは, 直径2~3 mmで内部に50~100 μm程の空隙を数多く持つており, この中に菌体を高密度に保持できるようになっている。このように多数の空隙を有するビーズであれば容易に菌体固定化用担体となりうる。

ここでは, 天然ゼオライトの特性を応用して開発された, 多くの空隙を持った菌体固定化用担体の作製方法および応用例について述べる。

## 2. バイオリクターと固定化担体

1990年に食品産業バイオリクターシステム技術研究組合から発行された「バイオリクターの品質評価基準」によると, バイオリクターや固定化担体は次の様に定義されている。「[バイオリクター]とは, 酵素や微生物, 動物細胞・組織等を生体触媒として用い物質変換を行う生物反応器をいう。また[固定化]とは, 生体触媒を担体である固体に結合または吸着させ, あるいは高分子物質で抱括する等の方法により安定化し, 固形物としての取り扱いを可能にすることをいい, [担体]とは, 生体触媒を結合あるいは吸着させることによって生体触媒を安定化し, 固形物としての取り扱いを可能にする固体をいう<sup>3)</sup>」。従って, バイオリクター技術を用いるこ

とにより、生物による物質変化を連続的に長期間行うことが可能になる。

現在、食品生産のためのバイオリクター技術は、遺伝子組換え技術や細胞融合技術と並んでニューバイオテクノロジーの中の一つの技術として注目されている。バイオリクターを食品生産に応用する場合、次のようなメリットが考えられる。(1) 連続的に食品を生産できる。(2) 省エネルギー化、省力化が図れる。(3) 製造期間を短縮できる。(4) 品質の均質性を確保できる。(5) 製造単価を下げることができる。(6) 運転制御が容易である。(7) 製造装置を縮小できる。

このように多くのメリットがあるにもかかわらず、なかなか実用化に至らない原因の一つに菌体固定化用担体の問題が挙げられる。現在市販されているガラスビーズやセラミックビーズのような無機担体は脆く、磨耗にも弱くしかも非常に高価であるため、実用的ではない<sup>4,5)</sup>。また、アルギン酸ビーズやキトサンビーズのような高分子ゲル状のものは、酵母の固定化量は非常に多いが無機担体以上に強度が弱く、実用規模での使用は困難をとまう<sup>6)</sup>。

そこで天然ゼオライトの特性に着目して、固定化担体の作成を試みた。ゼオライトは強度が強いのので菌体固定化用の担体としての可能性が十分にあると考えられる。さらに天然無機物であり担体からの不純物の溶出も無いと考えられるので食品にとっては安全である。担体のスペックは、直径1~2 mmの球形で、100 μmの穴が均一に数多く開いており、強度の強いものが望まれる。また酵母を固定化する場合 $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^9$  (cells/ml 担体) の固定化能のある担体が望ましい。

### 3. 固定化担体の作成方法とその特性

天然ゼオライトはアルミノケイ酸塩からなる化合物で、その構造中の水や火山性吸着ガスが加熱の過程で放出される。そのため焼成により発泡し、内部に空隙を持つ軽石状のガラス質多孔体になる。気泡の大きさ、量は原料粒子の大きさや加熱温度などにより変えることができる。

天然ゼオライトから固定化担体を作成するに当たり、固定化担体としての最適な焼成温度を決めるため、様々な大きさの原料を用いて予備実験を行った。使用した原料は日本ゼオライト製（粒子径0.1~0.3

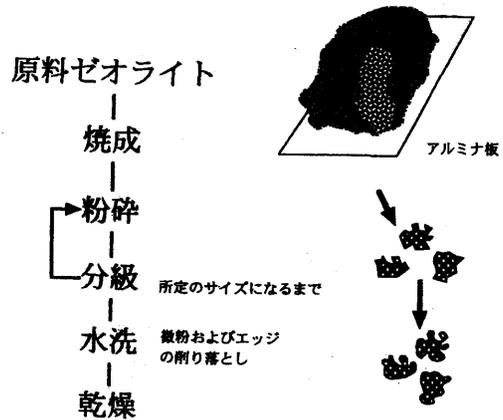


図1 天然ゼオライトからの担体の作製方法

mm, 0.5~1 mm), サンゼオライト製（粒子径0.06~0.2 mm, 0.84~2.4 mm), KSライト工業製（粒子径20~40 mm) の天然ゼオライトである。作成方法は原料をアルミナセッターに乗せ、時間あたり400℃で昇温し、1150~1310℃で10分保持した後急冷することにより、天然ゼオライトの発泡体を得た。

その後、それぞれの発泡ゼオライトを乳鉢で解砕し、0.15, 0.6, 1, 2 mmの目開きのふるいにかけ粒子の大きさ別に分級した。(図1) 各担体の区分は表1に示した。酵母担持量の比較を行うため、各作成条件につき50 ml以上作成した。

嵩密度はJIS規格(K-6721)に準じて測定した。

担体圧縮破壊強度は担体一粒を取り出し、顆粒強度試験器で破壊し、そのときの破壊強度を担体の見かけ断面積で除して算出した。

固定化酵母数の測定はYEPD液体培地(グルコース2%, 酵母エキス1%, ポリペプトン2%) 100 mlと担体10 gを500 ml三角フラスコに入れ、121℃ 15分間の滅菌を行いその後、清酒酵母協会7号を1白金耳植菌し、28℃で2日間振とう培養を行い、担体に酵母を固定化した。この担体を滅菌水中で破碎し、酵母を遊離させ、その懸濁液中の遊離酵母数をトーマの血球計を用いて計測した。遊離酵母数を担体の体積で除して算出した。

表1に天然ゼオライト担体の特性について示した。比較の担体としてガラスビーズ(ショット社)を用いた。最も固定化能の高かったのは、SZ5の3.6×

表1 天然ゼオライト担体の特性比較

サンプル名	焼成温度 (°C)	粒子径 (-)	嵩密度 (g/ml)	強度 (Kg/mm <sup>2</sup> )	固定化酵母数 (cells/ml beads)
NZ1	1270	S	0.86	NT	$2.4 \times 10^8$
NZ2	1270	M	0.85	37.1	$2.9 \times 10^8$
NZ3	1270	L	0.75	9.1	$3.1 \times 10^8$
SZ1	1270	S	0.85	NT	$1.7 \times 10^8$
SZ2	1270	M	0.89	69.8	$1.8 \times 10^8$
SZ3	1270	L	0.95	10.4	$1.1 \times 10^8$
SZ4	1300	S	0.85	NT	$1.7 \times 10^8$
SZ5	1300	M	0.83	37.7	$3.6 \times 10^8$
SZ6	1300	L	0.95	99.8	$1.2 \times 10^8$
KSL1	1310	M	0.68	33.9	$0.48 \times 10^8$
KSL2	1310	L	0.69	11.5	$0.73 \times 10^8$
ガラスビーズ		S	0.43	6.6	$1.5 \times 10^8$

NZ ; 日本ゼオライト製、SZ ; サンゼオライト製、KSL ; KSライト工業製  
 粒子径 S ; 0.15-0.6mm , M ; 0.6-1.0mm , L ; 1.0-2.0mm  
 NT ; not tested

$10^8$  (cells/ml) であった。この担体は強度もガラスビーズの約5.7倍であった。NZおよびSZの各担体はいずれもガラスビーズと同等以上の酵母の固定化能を持っており、強度も高かった。一方、KSLの2種類の担体はいずれも固定化能がガラスビーズよりも劣っていた。なお、固定化担体のSサイズは細かすぎてバイオリクターによる連続生産の際、固液分離の取り扱いが非常に困難であった。

電子顕微鏡写真でこれらの担体を検鏡したところ、固定化能の高い担体はいずれも空隙の度合いが高く、球状の開放気泡を有していることが判明した。図2にSZ5担体の電子顕微鏡写真を示した。写真からも明らかのように、内部に100~300  $\mu$ mの開放気泡を有していた。

サンゼオライト製原料粒子径0.06~0.2 mmおよび日本ゼオライト製原料粒子径0.1~0.3 mmは焼成温度1270, 1300°Cではほとんど気泡のない膜状のガラスになってしまったので、1200, 1150°Cまで焼成温度を下げてみたが、今度はガラス化が充分に進まず、良好な発泡状態は得られなかった。これは原料粒子が小さいとガラス化よりも先にガスが抜けてしまうため、発泡が不十分となり、目的とする気泡が少ないためと考えられる。このことより、サンゼオライト製0.06~0.2 mmおよび日本ゼオライト製0.1~0.3 mmは検討対象から除外した。

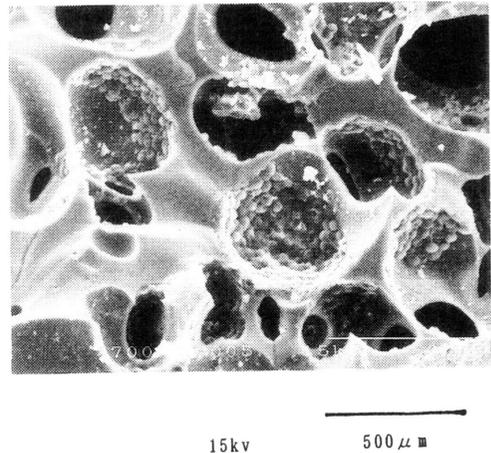


図2 天然ゼオライト担体の電子顕微鏡写真

また、KSライト工業製原料粒子径20~40 mmのようにゼオライトの大粒子を用いた場合、1300°Cでもガラス化が充分でなく、1310°Cまで加熱してやっと小石状のものが軽石状に発泡し、内部は5~10 mm程度の気泡があるスポンジ状となった。これを粉砕すると表1から嵩密度は他の担体より小さくなっており、高い多孔質性をうかがわせるが、酵母の固定化能は半分以下と低い。これは粉砕粒子の形状がスポンジの骨格に当たる部分からなるため、見かけ上の嵩密度は低いが、酵母の固定化に必要な100

表2 担体の特性比較

担体	固定化能	固定化操作	機械的強度	耐摩耗性	流動性
アルギン酸カルシウムゲル	高	困難	弱	中	高
κ-カラギーナンゲル	高	困難	弱	中	高
ポリビニルアルコールゲル	高	困難	中	強	高
セラミックビーズ	中	容易	強	弱	低
ガラスビーズ	中	容易	強	弱	低
DEAE-セルロース	低	容易	強	弱	低
ゼオライトビーズ	中	容易	強	中	低
キトサンビーズ	高	容易	中	強	高

～300 μmの開放気泡ができないためと考えられる。

以上の結果より発泡させる原料の粒子径は0.5～3 mmが望ましい。原料粒子径が0.5 mmより小さいとガスが発生してもすぐに粒子表面から抜け、雰囲気中に放出されるため、気泡の発生が不十分となり、酵母の固定化能力が低くなる。また、原料粒子径が3 mmまでは発生した気泡は表面への拡散の過程で集約され、大きくなり目的とする大きさの気泡となり、粒内にとどまる。一方、3 mmより大きいと目的よりも気泡が大きくなりすぎ、数も減少し、酵母の固定化能力が低くなる。

ここで用いている作製方法では材料を焼成発泡後所定の大きさに粉碎、分級することが必要である。このことにより、発生した気泡表面のガラス膜が物理的に取り除かれ、開放気孔となり、この中に酵母が固定化されるようになる。はじめから粉碎しないで良いように1～2 mmのゼオライト粒子を用いて一粒一粒を分離した状態で焼成すると、粒子が球状になりガラス膜でおおわれ、気泡の出口面が表面に出ないため、酵母の固定化能力が低い。このような担体を使用する場合は使用前にガラス膜を除去する必要がある。この方法では一度に作れる量が限られ生産性に欠け、使用に際してガラス膜除去のための薬品、溶解などの前処理が必要であり、実用的ではない。

#### 4. 固定化担体の性能比較

SZ5に酵母を固定化して回分発酵によるアルコール生産を行わせたと、発酵能はガラスビーズに固定化された酵母に比較して、1.2倍ほど高い発酵能を示した。このことより天然ゼオライトを用いて、バイオリアクターでアルコール生産を行えることが

示唆された。

そこでバイオリアクターによるアルコール発酵を目的とした際の固定化担体の性能比較を行った。担体は、菌体固定化用としてよく用いられる抱括タイプ3種類と吸着タイプの4種類、ならびに天然ゼオライト担体 (SZ5) の性能をそれぞれ比較した。表2に示したように、抱括タイプの固定化担体であるアルギン酸カルシウムゲル、κ-カラギーナンゲル、ポリビニルアルコールゲルは、固定化能は高いものの固定化操作が煩雑で実用的ではないと考えられる。一方、吸着固定化タイプの担体であるセラミックビーズ、ガラスビーズ、DEAE-セルロース、天然ゼオライト担体は固定化操作が非常に簡単で強度も高い。しかし、固定化能は抱括タイプの担体に比較してやや劣る。また流動層型リアクターに使用する場合、天然ゼオライト担体以外は容易に磨耗するという欠点がある。キトサンビーズも吸着固定化担体であるが、磨耗に強いため流動層型リアクターに適している。しかし高価であるため食品生産等に用いるには実用的でない。従って天然ゼオライト担体が流動層型リアクターにおいて長期的に安定であれば、酵母固定化用担体として有用のものであると考えられる。

#### 5. バイオリアクターによるアルコール発酵

バイオリアクターには種々のタイプがあり、現在よく使用されているバイオリアクターは、大きく3つの型式に分類される。(1) 攪拌槽型バイオリアクター、(2) 固定層型バイオリアクター、(3) 流動層型バイオリアクターである。これらは次のような特徴を持っている。すなわち、(1) のリアクターは温度やpHの制御が容易であり、コロイド状基質や不溶性基質でも処理できるという利点があるが、回転

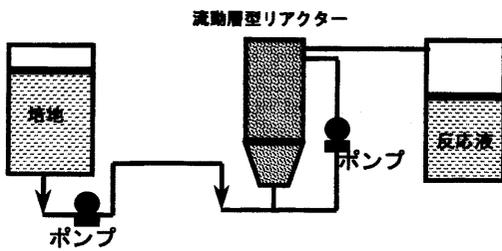


図3 流動層型バイオリアクターによる連続アルコール発酵システム

する攪拌翼のせん断力により担体が破壊されるという欠点がある。(2) のリアクターは反応器単位面積当たりの触媒負荷量が多く効率の良い反応器であるが、温度やpHの制御がむずかしく軸方向に基質や生成物の濃度に分布が生じる。さらに圧損があり基質を流入するのに加圧しなければならないという欠点がある。(3) のリアクターは熱や物質移動性が良く、微粒子の触媒を用いても圧損はさほど高くないなどの利点がある。しかし流速をある程度高くしなければならず、それによって担体の磨耗が生じやすいという欠点を有している<sup>7)</sup>。

さて、アルコール発酵をバイオリアクターで行わせるのに最も適したバイオリアクターは、発酵の際に産生される炭酸ガスの排出を容易にできる流動層型バイオリアクターである。そこで天然ゼオライト担体 (SZ5) に酵母を固定化し、500 ml容量の流動層型バイオリアクター MBR051 (東京理科機械株式会社) を用いて連続アルコール発酵試験を行った (図3)。固定化酵母の作成は、天然ゼオライト担体をベッドボリュームで400 mlと YEPD 液体培地 (グルコース 5%, 酵母エキス 1%, ポリペプトン 2%) 270 ml をリアクターに充填し、121℃で20分間滅菌を行った。次に冷却後、種母培養を行った培地から無菌的に1 ml 植菌し、25℃で2日間培養を行い固定化酵母を得た。連続発酵試験は、固定化酵母の増殖後に培地を取り除き、再度新鮮培地 270 ml を入れて、循環流量 200 ml/min で 15℃で24時間の回分発酵を行わせた後、空間速度 0.2 h<sup>-1</sup> で新鮮培地を連続的に流入させた。その結果、図4に示したように約500時間にわたって連続的にエタノールを生産することができた。また連続運転終了後の担体には、損傷や磨耗も全く見られなかった。したがって天然

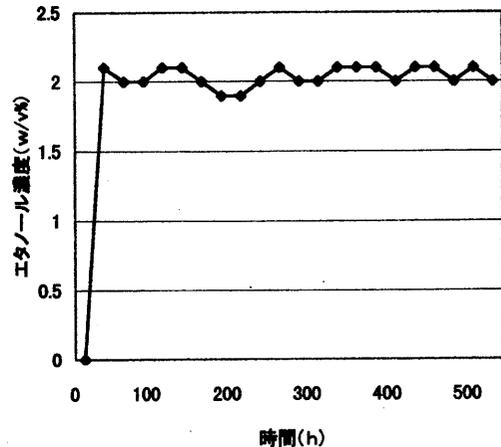


図4 流動層型バイオリアクターによる連続アルコール発酵

ゼオライト担体は流動層型リアクターに最適な担体であることが判明した。

## 6. おわりに

天然ゼオライトのガラス化、発泡現象を利用して、固定化酵母用の担体を作成することに成功した。本担体は従来のガラス担体と比較して強度も強く、固定化酵母量も高かった。また流動層型バイオリアクターを用いて連続アルコール発酵を行わせたところ、長時間にわたり安定に発酵を行わせることができた。この時担体には全く損傷は見られなかった<sup>8)</sup>。

天然ゼオライト担体は天然無機物であり、食品産業にも応用可能であると考えられ、今後の広い範囲の応用が期待される。また、ここでは紹介しなかったが、天然ゼオライト担体に乳酸菌を固定化したところ高濃度に固定化できることが判明した。固定化乳酸菌を用いた食品の生産も期待される所である。しかし、天然ゼオライト担体の作成は実験室スケールで検討を行っているため、今後は大量製造のための検討を行う必要がある。

## 文 献

- 1) N. A. Mensour, A. Margaritis, C. L. Briens, H. Pilkington, and I. Russel, *J. Inst. Brew.*, **103**, 363 (1997).
- 2) S. Shindo, H. Sahara, and, S. Koshino, *Proc. of the Inst. Brew. Conv.*, Sydney, 109 (1994).
- 3) 食品産業バイオリアクターシステム技術研究組合: 品質評価基準, 食品科学新聞社, 5 (1990).

- 4) 川瀬三雄, *FC Report*, **8**, 12 (1994).  
5) 池上 徹, 鋤本峻司, *Gypsum & Lime*, **251**, 276 (1994).  
6) 大森勝雄, 岩手県醸造食品試験場報告, **25**, 63 (1991).  
7) 進藤 昌, 中村以正, 中原忠篤, 木内 幹, 発酵工学会誌, **67**, 525 (1989).  
8) 進藤 昌, 高田 進, 特開平10-150982 (1998).
- 

### Development of Carrier for Bioreactor Using Natural Zeolite and Technology of Continuous Alcohol Production

Sho Shindo\*, Susumu Takata\*\*, and Haruo Taguchi\*\*

\*Akita Research Institute of Food and Brewing, \*\*TDK Corporation

Novel carrier for bioreactor was developed using natural zeolites. A natural zeolite is easily vitrified and blown at 1270~1300 °C. Mechanical strength of natural zeolite carrier was 6-fold higher than glass beads. Furthermore, capacity for immobilization of natural zeolite carrier and alcohol fermentation activity was 2-fold higher and 1,2-fold higher than glass beads, respectively. The continuous alcohol fermentation was done stably for over 500 h using natural zeolite carrier and the carrier was not broken.

Keywords: Natural zeolite, Carrier, Bioreactor, Yeast