

炭水化物資源からの連続アルコール発酵 についての研究報告書

カセサート大学研究協力計画事業

昭和57年3月

国際協力事業団

JR



JICA LIBRARY

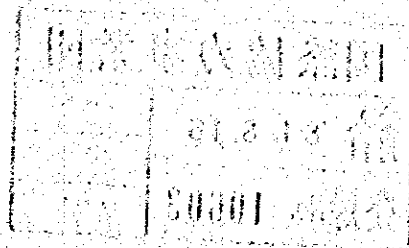


1050136[9]

炭水化物資源からの連続アルコール発酵 についての研究報告書

カセサート大学研究協力計画事業

昭和57年3月



国際協力事業団

国際協力事業団

海外労働者派遣事業

労働者派遣契約書

労働者派遣契約書

国際協力事業団	
受入 月日 '84. 8. 15	122
登録No. 10603	684
	ADL

労働者派遣契約書

目 次

研究課題 タイ産凝集性酵母によるエタノール連続生産

緒 論	1
第1章 実験方法および材料	3
第2章 結果および考察	11
第3章 要 約	24
第4章 Summary	25
引用文献	28
(参考資料)	
タイの炭水化物資源作物の生産動向	
はじめに	31
タイの農業生産環境	31
タイのアルコール変換用主要農産物	32
稲 作	34
砂糖キビ	34
トウモロコシ	35
コオリャン	36
キャッサバ	36
サツマイモ	38
む す び	38

研究課題

“タイ産凝集性酵母による
エタノール連続生産”

昭和57年3月

Jaroon Kumnuanta (カセサート大学)

Charan Chettanachitara (カセサート大学)

Savitree Limtong (カセサート大学)

中田 正 典 (大 阪 大 学)

吉 田 敏 臣 (大 阪 大 学)

上 田 清 基 (筑 波 大 学)

田 口 久 治 (大 阪 大 学)

緒 論

近年、化石エネルギーの枯渇が問題となるに伴い石油に代わるエネルギー開発が急務となってきている。代替エネルギーとして核融合、原子力（核分裂）、太陽電池、太陽炉、風力発電、地熱利用、波力発電、石炭の再利用、バイオマス燃料等の開発努力が進められているが、中でもバイオマス液体燃料は既存の燃料使用形態を変更することなく使用可能であること、環境の劣化をきたさず再生産が可能であることにより、現状の燃料生産システムの中で実用可能な代替エネルギーの一つといえる⁽¹⁾。従って長期的には石油供給に限界があるという認識のもとに世界各国の代替エネルギー開発は推進されており、特に再生可能なバイオマス・エネルギーとしてのアルコールに関して強い関心が寄せられている。

この様な状況のもとで実際ブラジルにおいて国策的にさとうきび・糖みつなどからアルコールが16,794 kl/day 生産されており、自動車燃料用およびエチレンなどの化学工業用等に用いられている。また、アルゼンチンにおいては日産量は確かではないが、CAMARA DE ALCOHOLS (アルコール組合) のアルコール工場全体の生産能力は802 kl/day を持ち、糖みつやさとうきび濃縮シロップよりアルコールの生産を行っている⁽²⁾。

この様に各国でエネルギー用アルコール醱酵が行なわれつつあるが、プロセスとして主に採用されているのは Melle-Boinot 法⁽³⁾ であり、たとえば以下に述べる様な半回分操作法である。すなわち前培養によって得た酵母液と原料を主培養槽容量の半分まで満たし醱酵させ、その後醱酵経過にともなって原料を添加して行き、主醱酵槽が満量になり醱酵が停止すると培養液を遠心分離機にかけ上澄みを蒸留にかけるといった方法である。この Melle-Boinot 法の場合遠心分離によって濃縮された酵母は pH 2.8 ~ 2.9 に調整された培養液中で雑菌除去された後再び主醱酵槽へ返送され使用される。この方法においては醱酵時間が短いため発泡が少なく、また開放系であるにもかかわらず雑菌汚染のトラブルが少ないという利点を持つが、連続的にエタノール生産を行うためには複数の培養槽において交互に培養することが必要となる。

一方、エネルギーとしてのエタノール生産においては代替対象の化石燃料価格に競合するために、できるだけ少ないコストおよび少ない投入エネルギーでエタノールを生産しなければならない。それゆえに従来のエタノール生産技術以上の技術開発が望まれている。現在の所、コストの低減化および省エネルギー化を目的とし、糖化工程、培養工程、蒸留工程において種々の方法が研究されており、たとえば木場、上田⁽⁴⁾⁽⁵⁾は無蒸煮でんぷん（キャサバ、とうもろこし）を黒麹のアミラーゼにより液化糖化し、*Saccharomyces cerevisiae* で醱酵させたモロミを 30 ~ 35 °C で減圧蒸留し、残液をアミラーゼや種酵母として再利用する半連続法を提案している。また、グルコアミラーゼ酵素等による可溶性でんぷんの糖化においては膜を用い酵素を包括する方法⁽⁶⁾ や多孔質ガラス⁽⁷⁾⁽⁸⁾、アルミナ⁽⁹⁾、イオン交換樹脂⁽¹⁰⁾、角閃石⁽¹¹⁾ に酵素をグルタルアルデヒドで連結する方法によって糖化酵素の有効利用を計っている。エタノール分離工程においてもコストの低減化が考えられ、エタノールの共沸蒸留においてはベンゼン、n-ヘ

キサンよりもエチルエーテル¹³を用いることによって、また Arthur D. Little Co.¹⁴らによる加圧CO₂を用いる方法によって蒸留コストの低減化を試みている。エタノールの相変化を伴わずに分離を行う方法として田村ら（東京大学物性研究所）の超音波振動によるエタノールの膜分離があるが、超音波に要するエネルギー量は確かでない。

培養工程においてもコストを低減化するため種々の方法が検討されている。培養装置等固定費が単位時間当りに要するという観点に立つと、この培養行程におけるコスト低減化のためには生産性を上げることが重要となり、その手法として菌株の改良を行ったり培養方法の改善が考えられる。Gerald. R. Cysew, Charles. R. Wilke¹⁵らはエタノールの阻害を除去するため醗酵槽内を50 mm Hgまで減圧し菌体を循環することによって生産性82 g/l/hrを得ている。また、P. L. Rogers¹⁶らは比増殖速度の速いバクテリア *Zymooreaus mobilis* を用い膜分離菌体再循環培養によって生産性120 g/l/hr の生産能力を得ている。M. Wada, I. Chibata^{17,18}らは *S. cerevisiae* を K-カラギーナンによって固定化後増殖させ、高菌体濃度での連続培養を行うことによって生産性50 g/l/hr、30日以上連続生産可能であることを示した。しかしこの様な培養系においては膜分離のための装置が必要であること、固定化操作が必要であることなどプロセスとして複雑となる。一方凝集性酵母を用いた場合、菌体の特性である凝集沈降性を利用して沈降槽をもちい簡単に菌体を濃縮し回収できるという利点を有する。塔型の醗酵槽における凝集性酵母の連続培養は1968年英国のA. P. V社とビール会社が公表しており¹⁹、またT. K. Ghose²⁰らは培養槽と菌体沈降分離槽を組み合わせた装置を用い菌体再循環培養を行った結果、流出アルコール60 g/l 生産性32 g/l/hr を得ている。しかしT. K. Ghoseらの研究においては、返送率や沈降槽の培養槽に対する比、または速度論的な解析が行われておらず最適な培養条件を検討する必要がある。

本研究においては、タイ国において分離した凝集沈降性の高い酵母を用いて沈降槽を附設した菌体再循環連続培養を行い、種々の稀釈率および返送率における生産性について検討を行った。

第1章 実験方法および材料

1. 使用菌株

タイ国で分離した菌株は凝集沈降性のある酵母 TJ-1 株で *Saccharomyces cerevisiae* と同定した。同定方法及び結果は以下に示す。菌株はポテトデキストロース寒天培地（日本製菓）に植菌し、一日培養後冷保存（4℃）した。

2. 酵母の同定方法²⁰⁾

i) 形態観察

酵母の形態は光学顕微鏡（Nikon OPTIPHOT）によって細胞の形状、発芽方法、有性胞子の有無およびその形態を観察した。なお胞子観察においては Gorod kowa 培地（胞子形成培地）を用いて細胞の形状観察においてはポテトデキストロース寒天培地を用いて 30℃ 5日間培養を行った。射出胞子は自画像法により検出した。ペトリ皿の両面に麦芽寒天培地を流して固定させたあと、底の方に酵母を線状に接種し、ペトリ皿を倒立して 30℃ 7日間培養した。

Potato Dextrose Agar (Nissui, LTD.)		Gorod kowa agar	
Potato	200.0 g	Glucose	1 g
Glucose	20.0 g	Peptone	10 g
Agar	15.0 g	NaCl	5 g
Tap water	1000 ml	Agar	20 g
		Tap water	1000ml

ii) 生理試験

・酸酵試験

酸酵試験基本培地（糖の入れていないもの Table 2）

1 l 組成のものを 900 ml に溶かし、Durham 管（小管 25 mm, 小試験管 120 mm）に 1.8 ml ずつ分注して 120℃ 15分滅菌した。メンブランフィルターによって除菌した 20% 糖液（Raffinose は 40%, 糖液の種類は Table 1）を滅菌ピペットを使用して無菌的に 0.2 ml ずつ Durham 管の基本培地 1.8 ml に加えた。この培地を 30℃ 24時間保ち雑菌による汚染のないことを確認した後接種し、30℃ 7日間静置培養を行い毎日ガス発生の有無を観察した。

Table 1 20%糖液

Glucose
Galactose
Sucrose
Maltose
Cellobiose
Melezitose
Inulin
Sol. Starch
α -Methyl
D-Glucofide
Trehalose
Lactose
Melibiose
Raffinose

Table 2 醱酵試験基本培地

酵母エキス	200g
蒸留水	1000ml

◦炭素源資化性試験

炭素源資化性基本培地 (Table 4) 38 ml に別殺菌した各炭素源 (Table 3) 10% 溶液を 2 ml 加えた試験管に酵母懸濁液を 1 滴接種し、30℃ で 1 週間静置培養を行い発育の有無を観察した。また同時に産膜性、酢酸生成の有無も観察した。

Table 3 炭素源

Glucose	Inulin	Galactitol
Galactose	Sol. Starch	D-Mannitol
L-Sorbose	D-Xylose	D-Glucitol
Sucrose	L-Arabinose	α -Methyl
Maltose	D-Arabinose	D-Glucofide
Cellobiose	D-Ribose	Salicin
Trehalose	L-Rhamnose	DL-Lacticacid
Lactose	Ethanol	Succinicacid
Melibiose	Glycerol	Citricacid
Raffinose	Erythritol	Inocitol
Melezitose	Ribitol	Control

◦窒素源の資化性

窒素源資化性基本培地 (Table 4) に硝酸カリウム 0.78 g/l, 硫酸アンモニウム 1 g/l をそれぞれ加え、直径 15~16mm 試験管に 5 ml 分注し滅菌した。その培地に酵母懸濁液を 1 滴接種し 30℃ 7 日間静置培養し発育の有無をみた。

Table 4 酵母の資化性基本培地

		炭素化合物資化性培地	硝酸塩資化性培地
窒素源	硫酸アンモニウム	5	—
	アスパラギン	—	—
炭素源	ブドウ糖	—	10 g
アミノ酸	ヒスチジン・一塩酸塩	10 mg	1 mg
	メチオニン	20 mg	2 mg
	トリプトファン	20 mg	2 mg
ビタミン	ビオチン	20 μg	20 μg
	パントテン酸カルシウム	2,000 μg	2,000 μg
	葉酸	2 μg	2 μg
	イノシトール	10,000 μg	10,000 μg
	ナイアシン	400 μg	400 μg
	パラ・アミノ安息香酸	200 μg	200 μg
	ピリドキシン塩酸塩	400 μg	400 μg
	リボフラビン	200 μg	200 μg
微量元素	チアミン塩酸塩	400 μg	400 μg
	BH ₃ O ₃	500 μg	500 μg
	CuSO ₄	40 μg	40 μg
	KI	100 μg	100 μg
	FeCl ₃	200 μg	200 μg
	MnSO ₄	400 μg	400 μg
	Na ₂ MoO ₄	200 μg	200 μg
塩類	ZnSO ₄	400 μg	400 μg
	KH ₂ PO ₄	0.85 g	0.85 g
	K ₂ HPO ₄	0.15 g	0.15 g
	MgSO ₄	0.5 g	0.5 g
	NaCl	0.1 g	0.1 g
蒸留水	CoCl ₂	0.1 g	0.1 g
		1,000 ml	1,000 ml

3. 培地組成

菌体再循環連続培養，単槽連続培養，回分培養および前培養における培地組成を Table 5 に示す。培地組成はグルコース濃度 200 g/l において初期比増殖速度及び最終菌体濃度が変化しないだけの十分な窒素源，リン酸，マグネシウム，酵母エキス量とした。

Table 5 Composition of culture medium

Component	Content (g/l)
Glucose	10 ~ 200
KH ₂ PO ₄	8
(NH ₄) ₂ SO ₄	4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2
Yeast extract	6

pH 4.5

4. 培養条件決定

i) 最適pH

前記 (Table 5) の培地成分 (グルコース 50 g/l) を 500 ml マイヤフラスコに 100 ml 仕込み殺菌後 1 N HCl, あるいは 1 N KOH にて各 pH に調整した。酵母懸濁液 0.2 ml 接種後 30°C 6 時間培養を行い、濁度法 (後述の菌体濃度測定法を参照) によって菌体濃度を経時的に測定し初期比増殖速度をもとめた。培養時間 6 時間内では pH はほとんど一定であった。

ii) 最適温度

0.1 M リン酸緩衝液によって pH 6.0 に調整した前記の培地成分 (グルコース 100 g/l) を 500 ml マイヤフラスコに 100 ml 仕込み殺菌後酵母懸濁液 1.0 ml 接種した。培養温度 31°C, 35°C, 39°C にて 8 時間培養し、濁度法によって菌体濃度を経時的に測定し初期比増殖速度を求めた。

5. 培養方法

i) 前培養

全容 500 ml のマイヤフラスコに培養液 (グルコース 200 g/l) を 100 ml 仕込み保存菌株を 1 白金耳植菌し、菌体量を増加させるため培養温度 30°C, 回転速度 180 rpm のロータリーシェイカーで好氣的に 24 時間振盪培養した。

ii) 本培養

§ 単槽連続培養

S. cerevisiae TJ-1 の Monod 式の飽和定数およびその他の速度論的なデータを得るため単槽連続培養を行った。容量 2 l の培養槽 (東京理科学機械製) に培養液 (グルコース 200 g/l) 900 ml 仕込み、前培養した菌体を 100 ml 植菌後 24 時間回分培養した。その後、下記のグルコース濃度および流入速度において連続培養を開始し、3 サイクル分以上培地が流出した後、菌体濃度およびアルコール濃度を経時的に検討しほぼ変動のなくなった時を定常としてサンプリングを行った。培養 pH, 温度は 4.5, 30°C に設定した。

・ Monod 式の飽和定数を求めるための単槽連続培養 Table 5 に示す培地成分 (グルコース 10 g/l) にて、稀釈率 0.25, 0.33, 0.39, 0.40, 0.43 l/hr における単槽連続培養を行った。

・ 基質に対する増殖収率を求めるための単槽連続培養

培地成分は Table 5, 流入グルコース濃度および稀釈率は次に示した条件にて培養を行った。

Table 6-1 流入グルコース濃度と稀釈率

Glucose concentration (g/l)	Dilution rate (l/hr)
10	0.5
100	0.46, 0.33
160	0.30, 0.13
200	0.10, 0.05, 0.02, 0.018, 0.01

・速度論的な資料を得るための単槽連続培養

培地成分は Table 5, 流入グルコース濃度および稀釈率は次に示した条件にて培養を行った。

Table 6-2 流入グルコース濃度と稀釈率

Glucose concentration (g/l)	Dilution rate (l/hr)
100	0.20, 0.30, 0.40
200	0.01, 0.05, 0.075, 0.10

§ 菌体再循環連続培養

主培養槽, 緩衝槽, 沈降槽の3槽よりなる培養槽および培養槽に沈降槽を直接付設した培養槽で菌体再循環連続培養を行った。

・主培養槽, 緩衝槽, 沈降槽より成る培養槽

主培養槽, 緩衝槽, 沈降槽よりなる培養槽の構造を Fig. 1 に示す。主培養槽1060 ml, 緩衝槽 250 ml, 沈降槽 416 ml の各容量を有し, 沈降槽断面積は23.8 cm²である。なおこの容量でこの沈降槽断面積を有するとき, 沈降槽内液体上昇速度が1.0 cm/min を越えるのは総括稀釈率, すなわち全培養液量当りの培地供給速度が0.83 l/hr 以上のときである。培地は主培養槽に供給され, 主培養槽からの越流は緩衝槽を経て沈降槽に受け菌体を濃縮して主培養槽に再循環した。主培養槽からの越流による沈降槽でのかくらんを防ぐ目的と, 主培養槽内の残糖を食い切らす目的のためこの培養においては緩衝槽を附設した。培養槽内で発生した二酸化炭素をガスポンプで循環し, 主培養槽下部から1 l/min で通気して培養槽内を嫌気的にかくはんした。培養にあたっては培養液 (グルコース 200 g/l) に前培養菌体を6%植菌し, 24時間好氣的に回分培養を行って菌体濃度を高めた後, 嫌気条件にて連続培養を開始した。培養温度および pH は30°C, 4.5 である。培養液が3 サイクル流出した後流出アルコール濃度を測定し, 濃度が経時的にはば変動しない時を定常とみなして各槽内のサンプリングを行った。

・直接沈降槽を附設した培養槽

菌体再循環培養をより詳細に解析するため, Fig. 2 に示した培養槽容量1060 ml 沈降槽容量 200 ml の培養槽を用いて培養を行った。沈降槽は培養槽に直接附設し, 越流による沈降槽内かくらんを防ぐため, パイプによって越流が沈降槽液面下 2.5 cm の位置に流入するような構造にした。培養液 (グルコース 200 g/l) を槽内に1100 ml 仕込み, 前培養菌体を9%植菌して24時間好氣的に回分培養を行い菌体濃度を高めた。その後嫌気条件での連続培養に切り替え, 培地流入速度 378 ml/hr, 各返送率における培養を行った。なお, この培養系においては沈降槽内での醱酵による内部かくらんを防ぐため, 流出グルコース濃度が1 g/l 以下になる様流入グルコース濃度を調整した。培養液が3 サイクル以上流出した後, 流出エタノール濃度, 培養槽内菌体濃度, 培養槽内エタノール濃度を経時的に検討し, 一定とみなされたときを定常状態と判断してサンプリングを行った。

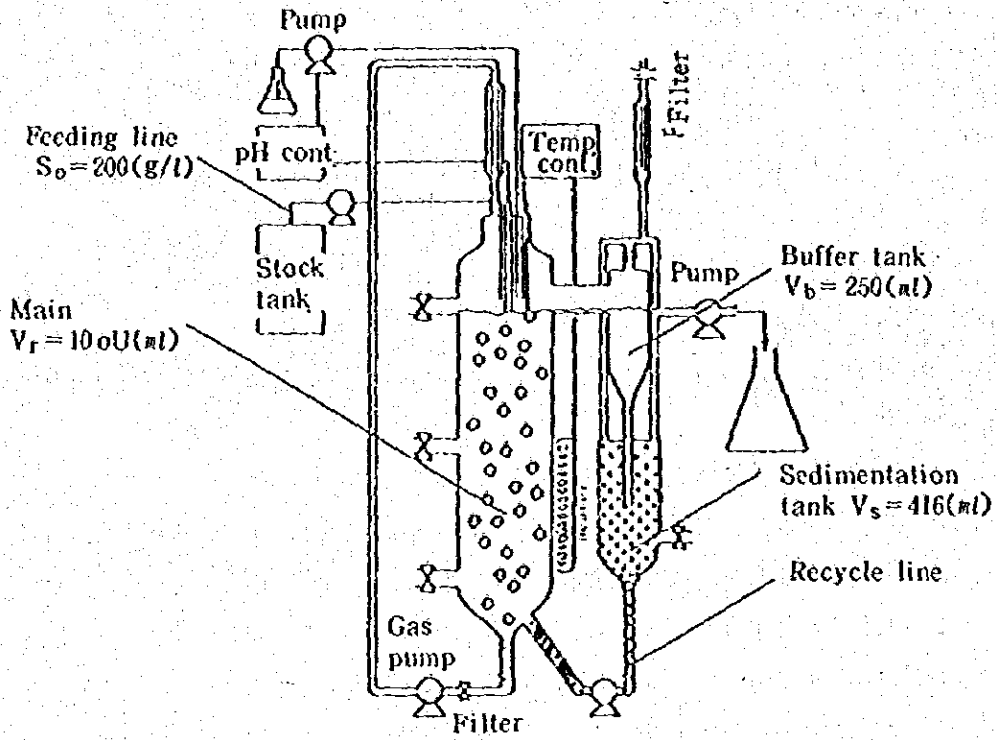


Fig. 1 Schematic diagram of a system of cell recycle continuous culture of flocculating yeast

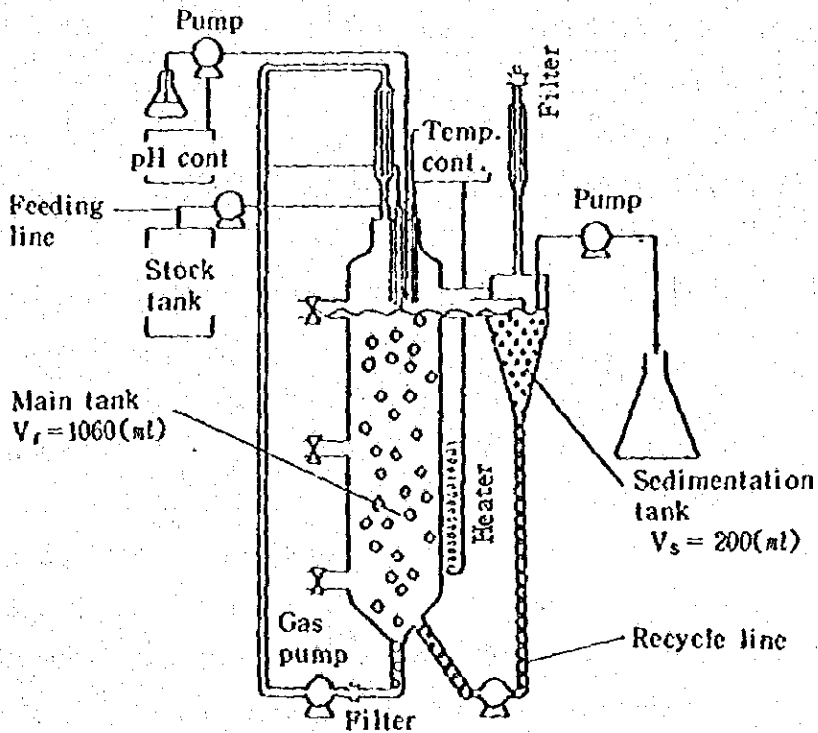


Fig. 2 Schematic diagram of a system of cell recycle continuous culture of flocculating yeast (without buffer tank)

6. 分析方法

1) 菌体濃度

本培養の培養液一定量を遠心分離 (12,000 rpm, 10 min) にかけて上澄液と菌体とに分離し、菌体をさらに洗浄後90°C 24時間乾燥しその乾燥重量を乾燥菌体濃度に換算した。上澄液はエタノール濃度および糖濃度測定用サンプルとした。

また、菌体濃度測定の簡易法として波長 660nm における吸光度を測定し、乾燥菌体濃度に換算する濁度法も採用した。凝集した菌体をなるべく分散させるために、界面活性剤 (tween 80, 0.5% 溶液) を含む生理食塩水 (NaCl 0.9%) によってサンプルを適度に稀釈し強いかくはんを行った。しかし、この菌株の凝集沈降性という特性のため濁度法では誤差を伴った。

ii) グルコース濃度

遠心分離によって得た上澄液をリン酸緩衝液 (pH 7.0, 0.1 M) で適当に稀釈し、その溶液 1 ml にグルコスタット溶液 (東洋紡ダイヤカラー GC) を 1 ml 加え 37°C の恒温槽にて 30 min 反応させる。反応終了後脱イオン水 2 ml 加え室温に戻した後比色計 (HITACHI model 100-40) により波長 500 nm における吸光度を測定し、同様にして得た検量線からグルコース濃度を求めた。

iii) エタノール濃度

エタノール濃度は n-プロパノールを内部素示としガスクロマトグラフィ (日立 Gas Chromatograph 163 型) によって定量した。サンプルを 1 ml メスフラスコ (100 ml) にとり n-プロパノール (100 g/l 溶液) を 1 ml 加え脱イオン水でメスアップする。その混合液をマイクロシリンジによって約 0.4 ml ガスクロマトグラフに注入すると、滞留時間約 2 分にてエタノール、約 3.5 分にて n-プロパノールのピークが出てくる。n-プロパノールに対するエタノールのピーク高さの比を求め、同様に作成したエタノール標準のピーク高さの比とエタノール濃度の関係よりサンプルのエタノール濃度を求めた。ガスクロマトグラフィの使用充填剤および設定条件は以下に示す。

充填剤: PEG-1000 Uniport R Max Temp 150°C

Mesh 60/80 (ガスクロ工業株式会社製)

カラム: 金属カラム, 長さ 2 m, 内径 3 mm, 外径 4 mm

検出器: 水素イオン化検出器 (FID)

設定条件

キャリアガス及びその流速	N ₂ . 35 ml/min
カラム温度	80°C
インジェクション温度	120°C
空気圧力	1.5 kg/cm ²
水素圧力	0.8 kg/cm ²

iv) 沈降速度測定

培養槽より流出した菌体を回収し、グルコースを含まない培地で適当な菌体濃度に稀釈後2.1メスシリンダーに入れ、室温にてシリンダー底面から菌層界面までの高さの経時変化を測定した。この結果より W. P. Talmage, E. B. Fitch らの方法¹⁾により、各菌体濃度と沈降速度の関係を求めた。

第2章 結果および考察

第1節 菌株の同定と培養条件の検討

1) 菌株の同定

タイ国より得られた凝集沈降性を特性とする酵母 (TJ-1 株) の分類学的位置づけを行うために、形態観察および生理試験によって同定を行った。

1)-1 形態観察

細胞は卵形か円筒形であり発芽方法は multilateral budding であった。真正菌糸は形成しなかった。射出胞子は存在せず、子のうが存在しその中には卵形の子のう胞子が 3~4 個存在していた。

1)-2 生理試験

以下に窒素源・炭素源の資化性、醱酵性、産膜性、酢酸生成性の有無についての結果を示す。シンボルは、(+)がその特性を有したことを示し(-)が有さなかったことを示す。

窒素源資化性

(NH₄)₂SO₄ (+) KNO₃ (-)

炭素源の資化性

Glucose	(+)	Inulin	(+)	Galactitol	(-)
Galactose	(+)	Sol. Starch	(-)	D-Mannitol	(-)
L-Sorbose	(-)	D-Xylose	(-)	D-Glucitol	(-)
Sucrose	(+)	L-Arabinose	(-)	α-Methyl	
Maltose	(+)	D-Arabinose	(-)	D-Glucofide	(-)
Cellobiose	(-)	D-Ribose	(-)	Salicin	(-)
Trehalose	(+)	L-Rhamnose	(-)	DL-Lacticacid	(-)
Glucose	(+)	Trehalose	(-)	Melezitose	(-)
Galactose	(+)	Lactose	(-)	Inulin	(-)
Sucrose	(+)	Melibiose	(-)	Sol. Starch	(-)
Maltose	(+)	Raffinose	(+)	α-Methyl	
Cellobiose	(-)			D-Glucofide	(-)

醱酵性

Lactose	(-)	Ethanol	(+)	Succinicacid	(-)
Melibiose	(-)	Glycerol	(-)	Citricacid	(-)
Raffinose	(+)	Erythritol	(-)	Inocitol	(-)
Melezitose	(-)	Ribitol	(-)	Control	(-)

産膜性 (-)

酢酸生成 (-)

以上の結果より Ladder の「The Yeast」²⁾ によって菌株を検索すると、この TJ-1 株は Saccharomyces cerevisiae と同定された。

2) 培養条件決定

この *S. cerevisiae* TJ-1 株の最適な pH および温度を求めた。また菌体再循環連続培養において必要な monod 式の飽和定数 K_s 値および増殖収率についても検討した。

2)-1 最適 pH

Fig. 3 に各 pH における初期比増殖速度を示す。pH 4~7 の範囲では初期比増殖速度にほとんど影響はなかった。

2)-2 培養温度

各培養温度、各エタノール初期濃度における初期比増殖速度を Table 6 に示す。この結果よりエタノールの存在しない場合の増殖最適温度は 35°C、その時の比増殖速度は 0.56 (l/hr) であったが、初期エタノール濃度 60 g/l の回分培養では他の温度に比べて 31°C の時が最も高い比増殖速度を示した。従って本実験においては培養温度 30°C pH 4.5 と決定した。

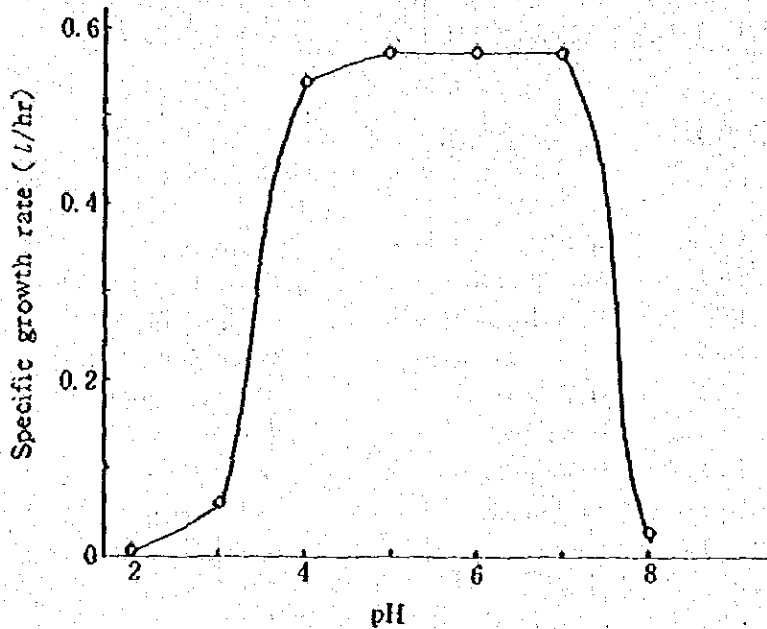


Fig. 3 Effect of pH on specific growth rate

Table 6 各温度及び各エタノール濃度での比増殖速度 (l/hr)

Ethanol conc. (g/l)	Culture temp. (°C)		
	31	35	39
0	0.50	0.56	0.46
30	0.26	0.25	0.15
60	0.10	0.050	0.030

2)-3 monod 式の飽和定数 K_s

グルコース制限の単槽連続培養より得られた結果を用いて基質濃度と比増殖速度の Lineweaver-

Burk プロットをとると Fig.4 の様になった。この結果より monod 式の飽和定数を求めると $K_s = 0.070$ (g/l) が得られた。すなわち比増殖速度は 1 g/l においても基質が十分に存在する時の比増殖速度の 93% であり、基質による制限は小さいと考えられる。

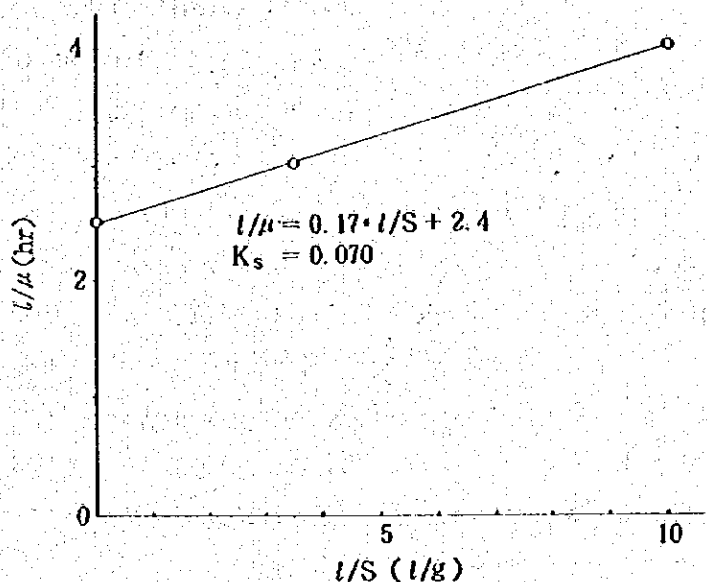


Fig. 4 Lineweaver-Burk plot ; $1/\mu$ vs. $1/S$ in the steady state.

2)-4 増殖収率

各エタノール濃度における増殖収率を Fig. 5 に示す。これより増殖収率 $Y_{x/s}$ はエタノール濃度 68 g/l 以下においてエタノール濃度に関係なくほぼ一定値 $Y_{x/s} = 0.04$ g Cell/g glucose をとると考えられる。

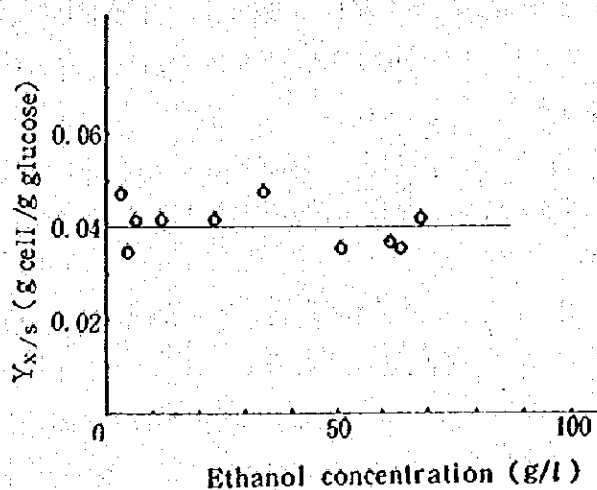


Fig. 5 Effect of ethanol concentration on $Y_{x/s}$

第2節 菌体再循環培養における生産性の検討

1) 初期菌体濃度に対する沈降速度

この *Saccharomyces cerevisiae* TJ-1 株は強い凝集沈降性を示し、嫌気培養中かくはんを停止すると直ちに凝集し沈降する。2 l 容量のメスシリンダーにおいて沈降菌層界面の沈降速度を測定した結果を Fig. 6 に示す。グラフよりこの菌株は初期菌体濃度 36 g/l において 1.0 cm/min の沈降速度が得ら

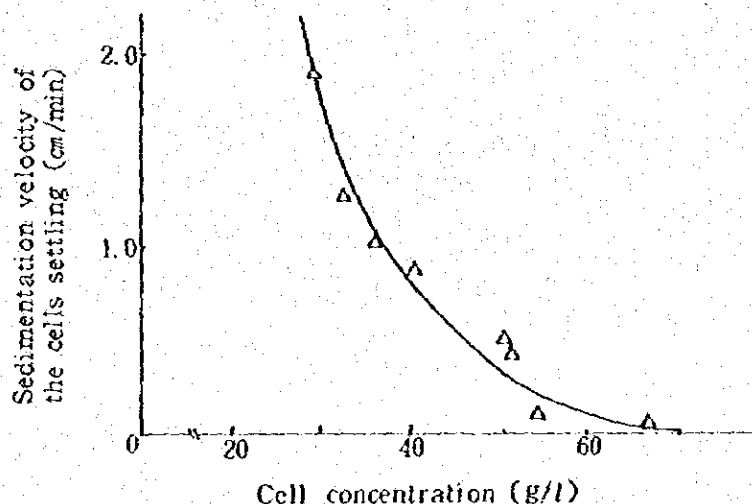


Fig. 6 Sedimentation velocity vs. cell concentration

れ、菌体と培養液との分離状態は非常によく、上溶液にはほとんど菌体のない澄んだ状態となった。この様にこの菌株は高い凝集沈降性を示すので沈降槽を附設することによって菌体を簡単に分離でき、分離した菌体を再び培養槽に返送することによる再利用が可能である。例えば、全培養槽容量が1760mlの培養槽に対し断面積23.9 cm²の沈降槽を装備した装置において、総括稀釈率0.83 l/hr での沈降槽内液体上昇速度は1 cm/min でありその時の沈降槽内上部菌体濃度はFig. 5より36 g/l が得られ、培養槽内はそれ以上の菌体濃度が得られると考えられる。

2) 主培養槽、緩衝槽、沈降槽の3槽より成る培養槽での菌体再循環培養 (Fig. 1 参照)

菌体再循環培養は単槽連続培養とは異なり、稀釈率が比増殖速度よりも高い状態においても菌体が流出してしまわず高濃度菌体培養を行うことが可能であり、生産速度を上げることが可能である。T. K. Ghose²³らは沈降槽を用いて菌体再循環培養を行い生産性32 g/l/hr を得ているが、返送率の検討は行っていない。一方 Aiba²²らによると、活性汚泥においては返送率が高いほど菌体濃度が増加するということである。また、Imanaka²⁴らによっても連続生産における菌体再循環によって生産性の増加することが示されている。

以上のことにより、流入グルコース濃度 200 g/l、培養温度 30°C、pH 4.5 においてそれぞれの稀釈率および返送率における培養を行い、生産性の検討を試みた。なお、総括稀釈率 (以後稀釈率と略す)、返送率は次の様に定義した。

$$\alpha = F_r / F$$

$$C = X_s / X_r$$

$$D = F / (V_m + V_b + V_s)$$

α : Recycle ratio (-)

F: Feed rate (l/hr)

F_r : Flow rate in recycle line (l/hr)

C: Concentration ratio (-)

X_r : Dry cell concentration in the maintank (g/l)

X_s : Dry cell concentration in the sedimentation tank (g/l)

D: Overall dilution rate (l/hr)

2)-1 稀釈率0.10 l/hrにおける培養

Fig. 7に稀釈率0.10 l/hrの時の各返送率における菌体濃度、流出エタノール濃度、流出グルコース濃度、生産性を示す。返送率9.0付近において最大エタノール濃度86.4 g/lであったが生産性は8.6 g/l/hrにとどまった。また菌体濃度においては92.0 g/lの高菌体濃度に達した。

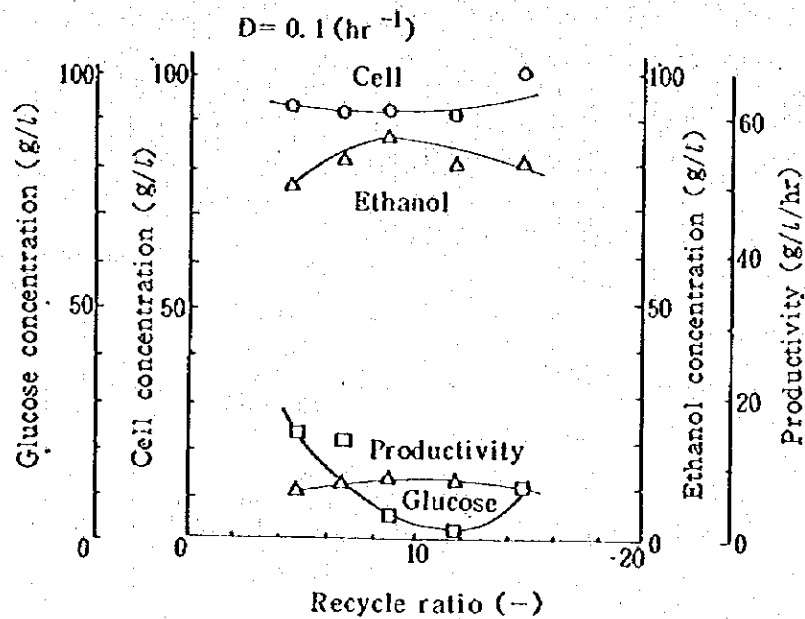


Fig. 7 Effect of recycle ratio on the ethanol production

2)-2 稀釈率0.31 l/hrにおける培養

稀釈率0.31 l/hrにおける各返送率での培養結果をFig. 8に示す。返送率7.0付近で最大エタノール濃度、最大生産性が得られた。返送率が9.0になると菌体濃度、エタノール濃度ともに減少した。これは、返送による流速が高くなりすぎ沈降槽内がかくらんされたために菌体が流出してしまったと考えられる。

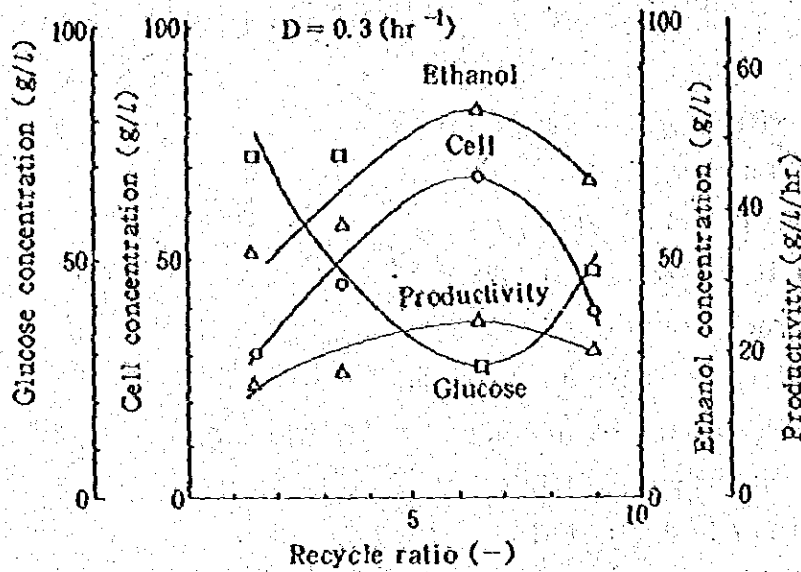


Fig. 8 Effect of recycle ratio on the ethanol production

2)-3 稀釈率0.50 l/hrにおける培養

稀釈率0.50 l/hrにおける各返送率での培養結果をFig. 9に示す。返送率7.0付近において最大エタノール、最大生産性が得られた。アルコール濃度60 g/lの時のTJ-1株の比増殖速度は0.02 l/hrであるにもかかわらずウォッシュアウトしてしまわず77.9 g/lの高菌体濃度に保持されており、この菌株の凝集沈降性が高いという特性が有効に働いていることがわかる。

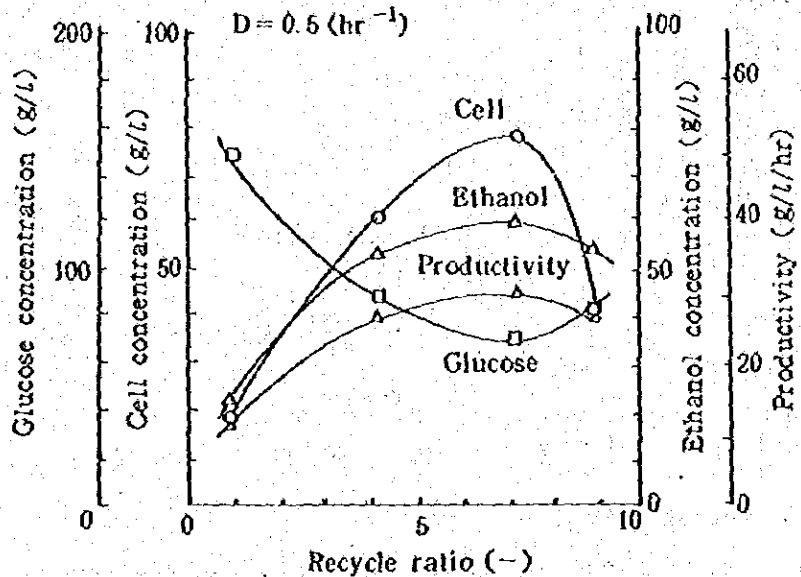


Fig. 9 Effect of recycle ratio on the ethanol production.

2)-4 単槽連続培養との比較

Fig. 10は単槽連続培養と菌体再循環培養との比較を示す。菌体再循環培養は、最大生産性の得ら

れた返送率7.0のときのデータを採用した。単槽連続培養においては、最大生産性3.9 g/l/hr、その時のエタノール濃度16.3 g/lであった。それに対し、菌体再循環系においては生産性27 g/l/hrの時アルコール濃度53.6 g/lが得られ、生産性は単槽連続培養の7倍アルコール濃度は3.3倍であった。この様に菌体再循環培養系の方が高い生産性が得られるのは、沈降槽において濃縮された菌体が培養槽に返送されることによって、低い比増殖速度においても培養槽内の菌体は流出してしまわず高菌体濃度に保つことができるためである。槽内菌体濃度は稀釈率が増加するに伴い減少し、総括稀釈率

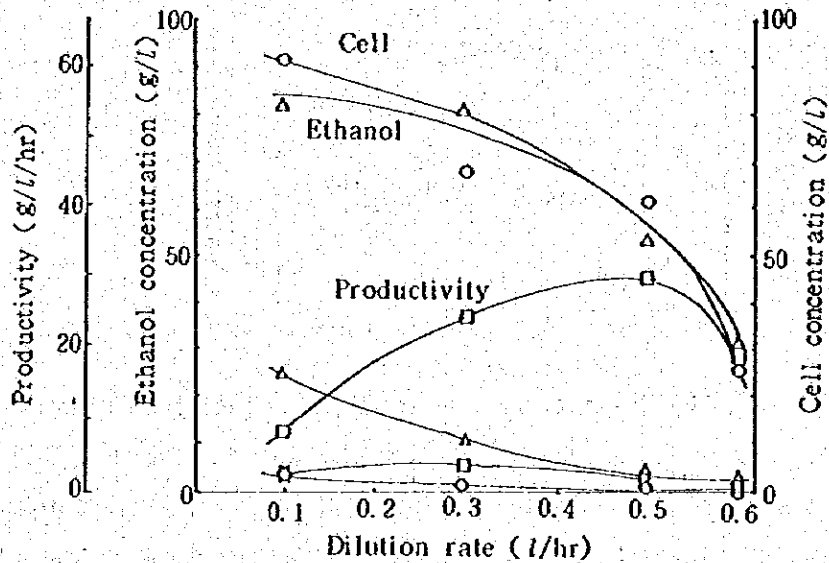


Fig.10 Comparison between the cell recycle and ordinary continuous culture system.

Recycle, ○△□; non-recycle, ○△□

0.60 l/hr においては菌体濃度は低く、エタノール濃度、生産性とも小さな値しかとらなかつた。これは稀釈率の増加に伴う沈降槽内液体上昇速度の増加によって、沈降槽での保持可能な菌体濃度が減少したためと考えられる。このことより、沈降槽での保持可能な菌体濃度を増加させ生産性を上げるためには、沈降槽の断面積を大きくし、稀釈率の大きな時においても上昇液体流速が小さくなる様にすればよいことがわかる。

3) 沈降槽を直接培養槽に附設した培養槽による培養 (Fig. 2 参照)

前述の培養槽において槽内菌体濃度は返送率によっても変化することが明らかとなったが、3槽より成る培養系を解析するのは困難であった。よって菌体再循環系を詳細に解析するため緩衝槽の代替として太いパイプを使用し、沈降槽を直接培養槽に附設した解析の行いやすい培養槽 (Fig. 2) を用いて菌体再循環培養を行った。また、沈降槽内での酸酵を防ぐため流出グルコース濃度が1 g/l 前後になるよう流入グルコース濃度を調整した。

3)-1 稀釈率0.30 l/hrにおける各返送率での培養結果

稀釈率 0.30 l/hr における各返送率での培養結果を Fig. 11 に示す。培養槽内菌体濃度は返送率が

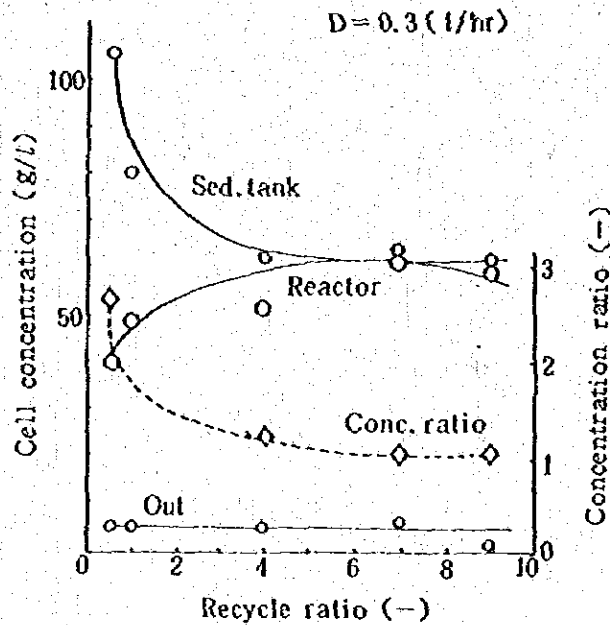


Fig. 11 Effect of recycle ratio on cell concentration

増加するに従い増加した。一方、沈降槽下部菌体濃度は返送率 0.50 にて 105 g/l の高い菌体濃度を示したが、返送率の増加に伴い減少した。ここで濃縮率 = 沈降槽下部菌体濃度 / 培養槽内菌体濃度を計算すると (Fig. 11, Conc. ratio), 返送率 0.50 において濃縮率 2.7 を示していたが、返送率増加に伴い 1 に漸近し濃縮はおこななくなるという結果を得た。合衆⁴³の曝気槽および最終沈澱池における収支では濃縮率 C を一定として返送率に対する槽内菌体濃度を予測しているが、本実験においては濃縮率は一定でなく返送率増加に伴い減少するため、槽内菌体濃度は単純に返送率から槽内菌体濃度が予測できないという結果を得た。

Fig. 12 には各返送率におけるエタノール濃度、生産性を示す。これらエタノール濃度および生産性は返送率増加すなわち培養槽内菌体濃度増加に伴い増加し、前回の培養と同様返送率 7.0 において最大エタノール濃度 67.8 g/l, 生産性 20 g/l/hr が得られた。

また、この菌株の炭素源に対する増殖収率は Fig. 5 より 0.04 g Cell/g Substrate が得られたが、この菌体再循環連続培養においても流出菌体量より増殖収率を求めると、ほぼ 0.04 g Cell/g Substrate の値になった。すなわち、この菌体再循環連続培養は単槽連続培養同様流入する基質が増殖菌体およびエタノールに変換され流出していくことによって定常が保たれていると考えられる。

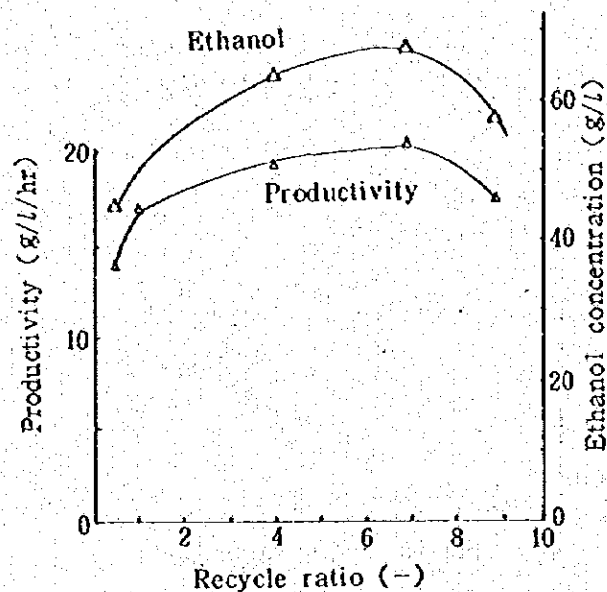


Fig. 12 Effect of recycle ratio on the ethanol production

第3節 *S. cerevisiae* TJ-1株の速度論的検討

アルコール醗酵においては主にアルコール濃度によって増殖速度や生産速度が制限され、多くの研究者によってそれぞれの酵母におけるアルコールの増殖速度及び生産速度に対する制限が報告されている^{28~29}。Holzberg²⁸らによると比増殖速度はアルコール濃度増加に伴い直線的に減少するということであり、また Aiba²⁹らによると比増殖速度、比生産速度どちらもアルコール濃度に対し指数的に減少することである。本研究において使用している菌株は monod の飽和定数 $K_s = 0.07$ g/l であり、流出基質濃度が 1 g/l の時ほとんど基質によって制限されない。また初期グルコース濃度 50~180 g/l での回分培養においては初期増殖速度において差はなく、高グルコース濃度による増殖の阻害はその範囲においては存在しないと考えられる。従って、この菌体再循環培養系においてもアルコールが増殖およびエタノール生産を制限していると考えられ、この培養系における定常状態を解析し培養状態の予測の可能性を検討するため、グルコースは十分に存在しエタノール濃度によって増殖制限される単槽連続培養を行ってこの菌株の定式化を行った。

1)-1 エタノール濃度の比増殖速度に対する影響

Fig. 13 は各エタノール濃度における *S. cerevisiae* TJ-1 の比増殖速度を示す。エタノール濃度 (P g/l) 増加にともない比増殖速度 (μ g/l) は指数的に減少し、次の様な関数で表わされた。

$$\mu = 0.56 \exp(-0.056P)$$

なお、エタノール濃度 80 g/l においては比増殖速度はほぼ 0 l/hr であり、この関係が成り立つのはエタノール濃度 67 g/l までである。

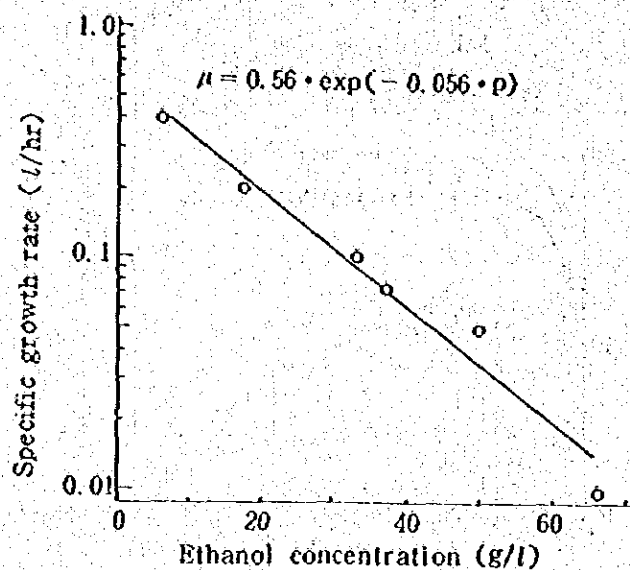


Fig. 13 Effect of ethanol concentration on specific growth rate.

1)-2 エタノール濃度の比生産速度に対する影響

Fig. 14 は各エタノール濃度における比生産速度を示す。エタノール濃度増加にともない比生産速度は直線的に減少し、次の様に表わされた。

$$\rho = -0.020P + 1.6$$

エタノール濃度 80 g/l においては比生産速度は 0.03 g Ethanol /g Cell/hr まで減少した。この時の比増殖速度はほぼ 0 1/hr でありエタノールのみ生産するという状態であった。

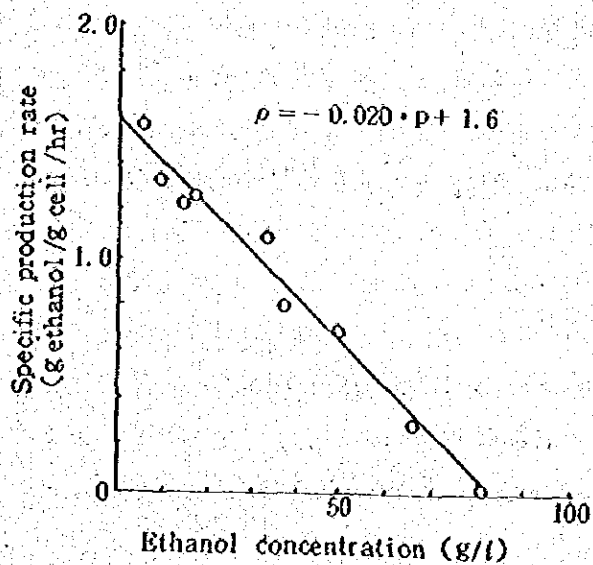


Fig. 14 Effect of ethanol concentration on specific production rate

1)-3 エタノール濃度の比基質消費速度に対する影響

Fig. 15 は各エタノール濃度における比基質消費速度を示す。エタノール濃度増加とともに比基質消費速度は直線的に減少し次の様に表わされた。

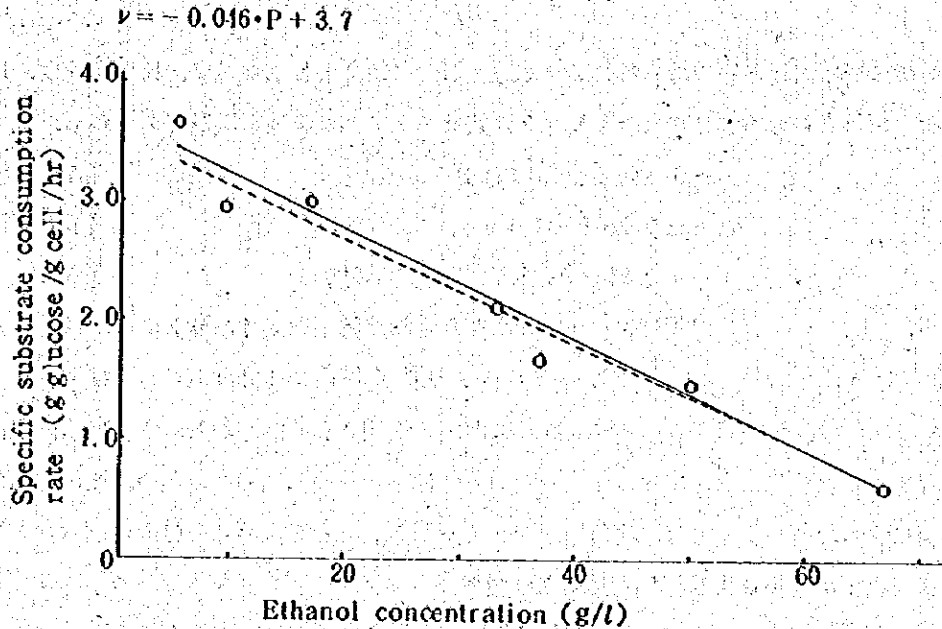


Fig. 15 Effect of ethanol concentration on specific substrate consumption rate.

また、Fig. 15 の波線は、グルコースからアルコールへの変換率88%として比生産速度より比基質消費速度を求めたものであり、実測値と比較的一致していた。従ってこの菌株はエタノール濃度 67g/l 以内において変換率はほぼ一定であり、88%の割合で変換することがわかった。

2) 沈降槽を直接培養槽に附設した培養系における物質収支

沈降槽を直接培養槽に附設した培養槽における菌体、エタノール、基質に対する物質収支をとると次の様になる。

菌体の収支
$$V_r \cdot \frac{dX_r}{dt} = \alpha F \cdot X_b - (\alpha + 1)F \cdot X_r + V_r \cdot X_r \cdot \mu_r$$

エタノールの収支
$$V_r \cdot \frac{dP_r}{dt} = \alpha F \cdot P_s - (1 + \alpha)F \cdot P_r + V_r \cdot X_r \cdot \rho_r$$

グルコースの収支
$$V_R \cdot \frac{dS_R}{dt} = F \cdot S_0 - \alpha F \cdot S_s - (1 + \alpha)F \cdot S_r + V_r \cdot X_r \cdot \nu_r$$

沈降槽内では脱糖が行なわれていない ($P_s = P_r$) とすると、定常状態においては次の様に表わされる。

$$X_r = \frac{\alpha}{1 + \alpha - \mu_r / D_r} \cdot X_b \quad (1)$$

$$P_r = \frac{\rho_r}{D_r} X_r \quad (2)$$

$$S_o = (1 + \alpha) \cdot S_r + \frac{X_r \cdot \nu_r}{D_r} \quad (3)$$

一方、単槽連続培養において得られたエタノール濃度に対する比増殖速度、比生産速度、比基質消費速度は次の様に表わせる。(4)、(5)、(6)式はエタノール濃度の関数であるから、(1)、(2)

$$\mu = 0.56 \exp(-0.056 P) \quad (4)$$

$$\rho = -0.020 P + 1.6 \quad (5)$$

$$\nu = -0.046 \cdot P + 3.7 \quad (6)$$

であるから、(1)、(2)、(3)式はエタノール濃度 P と沈降槽下部菌体濃度 X_b の関数となる。今 X_b が与えられれば、(1)、(2)、(4)、(5)式より培養槽内菌体濃度 X_r およびエタノール濃度 P_r が求まり、(3)、(6)式より流入グルコース濃度も決定される。しかし、 X_b は菌体の沈降濃縮性能に依存するが、沈降槽内菌体濃度が高いため菌体は干渉沈降状態でありかつ、沈降槽内はかなり速い循環流による流動状態であり、沈降槽をシュミレートし X_b を求めるのは困難だった。

2) - 1 沈降槽下部菌体濃度を用いた槽内菌体濃度、エタノール濃度、流入グルコース濃度の計算

沈降槽下部菌体濃度 X_b より培養槽内菌体濃度、培養槽内エタノール濃度、流入グルコース濃度の計算値を Fig. 16 に実線で示す。返送率が 0.50 から 9.0 の間で菌体濃度に関しては比較的一致したが、エタノール濃度、流入グルコース濃度は特に返送率 0.5, 7.0, 9.0 において食違いが生じた。これは Fig. 14, Fig. 15 からわかる様に菌体の比生産速度および比基質消費速度にばらつきがあるためであると考えられる。

返送率 12.0 においては、醗酵槽内菌体濃度は減少しその濃度と沈降槽下部菌体濃度はほとんど等しくなった。これは返送率が高すぎることによって沈降槽内かくらんが生じ、菌体が流出してしまったと考えられる。その菌体濃度減少のため、エタノール濃度は減少してしまったと考えられる。

使用記号

V_r : 培養槽容量 (l)	F : 基質流入速度 (L/hr)
X_r : 培養槽内菌体濃度 (g/l)	D_r : 培養槽内稀釈率 (l/hr)
P_r : 培養槽内エタノール濃度 (g/l)	α : 返送率 (-)
S_r : 培養槽内グルコース濃度 (g/l)	μ : 比増殖速度 (l/hr)
X_b : 沈降槽下部菌体濃度 (g/l)	ρ : 比エタノール生産速度 (g Et-OH/g Cell/hr)
P_s : 沈降槽内エタノール濃度 (g/l)	ν : 比基質消費速度 (g Glucose/g Cell/hr)
S_s : 沈降槽内グルコース濃度 (g/l)	
S_o : 流入グルコース濃度 (g/l)	

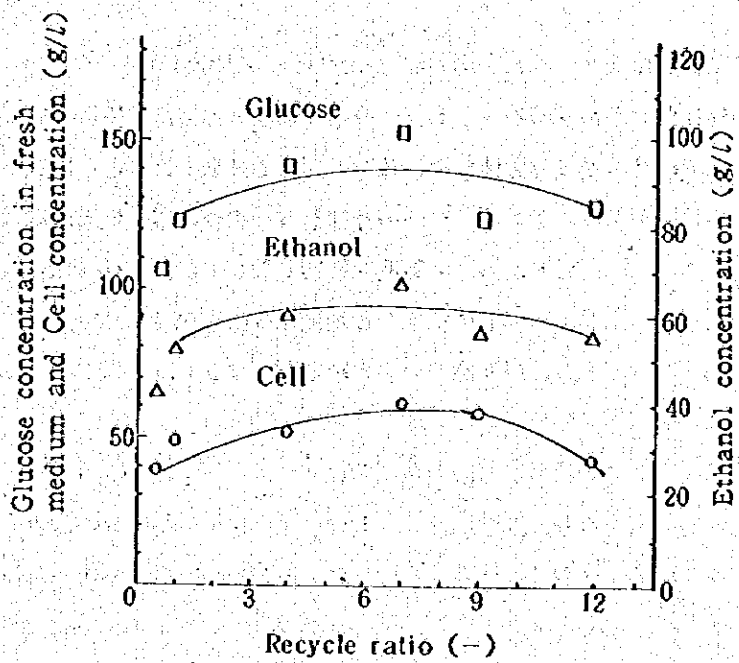


Fig.16 Comparison of estimated and experimental result.

第3章 要 約

- タイ国より分離した凝集性酵母を *Saccharomyces cerevisiae* と同定した。
- *S. cerevisiae* TJ-1 株は強い凝集沈降性を示し、連続培養によって得た菌体について沈降菌層界面の下降速度を測定した結果、沈降速度は菌体濃度に依存し菌体濃度の上昇とともに低下した。
- *S. cerevisiae* TJ-1 株は嫌気条件下でエタノールの存在しない場合の増殖最適温度は35°C、その時の比増殖速度は0.56 l/hr であり pHは4 から7の範囲で影響しなかった。しかし初期に60 g/l のエタノールが存在する時、増殖の最適温度は30°Cに低下し比増殖速度は0.05 l/hrであった。また monod 式の飽和定数 K_s は0.070 g/l であり、炭素源に対する増殖収率は0.04 (g Cell /g Substrate)であった。
- 主培養槽、緩衝槽、沈降槽の3つの槽による培養系においては、稀釈率0.31, 0.50 l/hr の時いずれも返送率7付近で生産性が最大となり、0.50 l/hr においてエタノール濃度53.6 g/l, 生産性27g/l/hr が得られた。単槽連続培養における最大生産性は3.9 g/l/hr であり、菌体の再循環を採用することによって生産性は約7倍となった。
- 緩衝槽を除いた主醱酵槽、沈降槽からなる培養系で稀釈率0.30 l/hr の菌体再循環連続培養を行った結果、上述の系と同様に返送率7付近にて最大の生産性21 g/l/hr が得られた。また、この培養においては槽内グルコース濃度は0.5 g/l 以上であるので基質濃度により増殖はほとんど制限されておらず、生産物であるエタノールの濃度によって支配されていると考えられる。
- グルコース濃度が十分に高い培養系において、比増殖速度 μ (l/hr), 比生産速度 ρ (g Ethanol /g Cell/hr), 比基質消費速度 V (g glucose /g Cell/hr) はエタノール濃度 P (g/l) によって支配され、 $\mu = 0.56 \cdot \exp(-0.056 \cdot P)$, $\rho = -0.020P + 1.6$, $V = -0.046 \cdot P + 3.7$ の関係で表わされた。
- 緩衝槽を除いた主培養槽・沈降槽よりなる系の物質収支から得られた定常状態での関数、および比増殖速度、比生産速度、比消費速度の関数を用いると、沈降槽下部菌体濃度より培養槽内菌体濃度、培養槽内エタノール濃度、流入基質濃度を求めることができた。

(Summary)

Continuous Ethanol Production by Flocculating Thai Yeast

Dr. Jaron Kumnuanta (Kasetsart University)

Dr. Charan Chettanachitara (Kasetsart University)

Dr. Savitree Limtong (Kasetsart University)

Dr. Masanori Nakata (Osaka University)

Dr. Toshiomi Yoshida (Osaka University)

Dr. Seiki Ueda (Tsukuba University)

Dr. Hisaharu Taguchi (Osaka University)

第4章 Summary

Continuous Ethanol Production by Flocculating Thai Yeast

With the exhausting of fossil energy, the development of substitute energies for petroleum is urgently required. The substitute energies being focused on at present are: nuclear fusion, atomic energy, solar electric cell, solar furnace, wind generation, wave power, use of terrestrial heat, reuse of charcoal and biomass energy. Among these, biomass has most attracted the world's attention as it can be used without changing existing application systems and replaced without damaging the environment. Alcohol which is a reproducible biomass energy has particularly become of great interest of the public.

In a few countries such as Brazil, Argentina or the Philippines alcohol has been developed for automobile use and is manufactured by the "Melle-Boint" method. However, it is necessary to produce ethanol at a lower cost and with less input of energy than petroleum and this is why technological development relating to ethanol production is greatly desired.

The main issue difficulty in a solution to this problem is how to decrease the cost required in the ethanol manufacturing process. The material's important benefits are its ease of use and cultured advantage. Scientists, Gerald R. Cysew and Charles R. Wilke, for example, carried their experiments on decreasing pressure in a fermentation tank to the extent of 50mm Hg in order to promote a cycle of living cells and gained a productivity of 82g/ℓ/hr. P. L. Rogers reached a productivity height of 120g/ℓ/hr using Zymomous mobilis, which has the fast velocity of reproductivity. M. Wada and I. Shibata proved the possible production of 50g/ℓ/hr by continuous culture at high cell density.

In this research, the productivity of the TJ-1 cell, Saccharomyces cerevisiae which was isolated in Thailand and has high cohesion and sedimentation, was examined using a system of cell recycle continuous culture.

1. Saccharomyces cerevisiae showed a strong cohesion and sedimentation. The living cells (Saccharomyces cerevisiae Spp.) obtained by continuous culture were examined for their sedimentation velocity and the result showed that the sedimentation velocity was depended on the cell density: The velocity decreased in proportion to the density increasing.

2. The optimal temperature for the reproduction of Saccharomyces cerevisiae TJ-1 under non-ethanol and anaerobic conditions was 35°C. The reproduction velocity at this time was 0.56 l/hr and pH did not show effectiveness in the range of 4 to 7. However, when 60 g/l ethanol was presented at the beginning, the optimal temperature for reproduction went down to 30°C and reproduction velocity was 0.05 l/hr. The saturation constant, K_s was 0.070 g/l while the reproduction rate against carbon source was 0.04 (g cell/g substrate).

3. In a culture system consisting of three tanks, the main culture, buffer and sedimentation tanks, if the dilution rates were 0.31 and 0.50 l/hr productivity was highest respectively at the recycle rate of around 7. Under the condition of 0.50 l/hr, ethanol density of 53.6 g/l and productivity of 27 g/l/hr were obtained. The largest productivity obtained by single tank continuous culture was 3.9 g/l/hr and productivity increased about 7 times by adopting the cell recycling method.

4. In a culture system consisting of two tanks, the main fermenter and sedimentation tanks (excluding a buffer tank), continuous cell recycling culture at a dilution rate of 0.30 l/hr was conducted. The largest productivity, 21 g/l/hr, was obtained around recycle rate 7 as in the case mentioned above. In this culture experiment, the density of glucose in the tank was more than 0.5 g/l and reproduction (multiplication) was not limited by the substrate density, but was thought to be controlled by the ethanol density.

5. In a culture system which has a high density of glucose,

the proportionate velocities of μ (l/hr) production φ (g ethanol/g cell/hr) and substrate consumption ν (g glucose/g cell/hr) were controlled by ethanol density P . (g/l).

Their relations are shown as: $\mu = 0.56 \cdot \exp(-0.056 \cdot p)$,

$\varphi = -0.020P + 1.6$, $V = 0.046 \cdot P + 3.7$

6. The densities of cell, ethanol and substrate in the main culture tank were obtained respectively from the cell density in the lower part of the sedimentation tank using the proportionate velocity functions of consumption, production and reproduction, and the functions at the steady state obtained by the analysis of material input and output in the culture system consisting of two tanks (main culture and sedimentation).

引 用 文 献

- (1) 醱酵と工業 vol. 39 No. 5 (1981)
- (2) 醱酵と工業 vol. 39 No. 6 (1981)
- (3) 「ブラジルにおける甘蔗糖蜜のアルコール醱酵について」; 醱酵協会誌 24 p 114 (1966)
- (4) 木場, 上田; 農芸化学会大会講演要旨集 p 376, p 490 (1979)
- (5) 木場, 上田; 醱酵工学大会講演要旨集 p 36 (1979)
- (6) 福島 達; 「固定化酵素, 固定化微生物バイオリアクター」触媒 21 p 447 (1979)
- (7) Weetall, H.H.; "Methods in Enzymology" vol. 44, edited by K.Moshbach p 134 (1976)
- (8) Johnson, D. B. and M. Costelloe; Biotechnd. Bioeng. 18 p 421 (1976)
- (9) Allen, B. R., M. Charles and R. W. Coughlin; Biotechnol. Bioeng. 21 p 689 (1979)
- (10) 橋本, 木村, 鮫島; 農芸化学会大会講演要旨集 p 34 (1979)
- (11) messing, R. A.; "Methods in Enzymology" vol. 44 edited by K. Moshbach p 148 (1976)
- (12) marion, L.; Chemical Engineering. Feb. 26, p 78 (1979)
- (13) ibid., ; vol. 9 No. 21, May 21 (1980)
- (14) Cysewski, G. D. and C. R. Wilke; Biotechnol. Bioeng. 19 p 1125 (1977)
- (15) P. L. Reyers, K. J. Lee and D. E. Tribe; Procoss Biochemistry August / September p 7 ~ p 11 (1980)
- (16) 和田, 加藤, 千畑; 醱酵工学大会講演要旨集 p 159 (1978)
- (17) 和田, 加藤, 千畑; 農芸化学会大会講演要旨集 p 18 (1980)
- (18) Shore, D. T. and M. G. Royston; Chem. Enger. (London) CE 99 (1968)
- (19) T. K. Ghose and R. D. Tyagi; Biotechnology and Bioengineering vol XXI p 1387 ~ 1400 (1979)
- (20) 微生物学実験法 p 382 微生物研究法懇談会編
- (21) Tulmadge, W. P. and Fitch, E. B.; Industrial Engineering Chemistry (1955)
- (22) J. Lodder; THE YEASTS (1970)
- (23) 合葉, 永井; 生物化学工学 p 252 ~ p 254 (1975)
- (24) T. Imanaka, T. Kaieda, H. Taguchi; J. Ferment. Technol., vol. 51, p 431 ~ p 439 (1973)
- (25) Holzberg, I., R. K. Pinn and K. H. Steinkvans; Biotechnol. Bioeng. 9 p 413 (1967)
- (26) Aiba, S., M. Shoda and M. Nagatani; ibid., 10 p 845 (1968)
- (27) Nagatani, M., M. Shoda and S. Aiba; J. Ferment. Technol. 46 p 241 (1968)

⑧ Ghose, T.K. and R.D. Tyagi ; *Biotechnol. Bioeng.* 21 p 1401 (1979)

⑨ 高松, 吉田, 上田, 田口 ; *醱酵工学* 52 p 190 (1974)



(参 考 資 料)

タイの炭水化物資源作物の生産動向

西 山 喜 一 (東京農業大学)

小 崎 道 雄 (東京農業大学)

はじめに

石油代替エネルギーとしてのアルコールの開発は、古くは第2次世界大戦中台湾の製糖各社やフィリピンにおける日本軍によって行われていた。戦後産油国の石油増産によって、パワーエネルギーとしてのアルコール利用は姿を消した。しかし化石燃料である石油埋蔵に限界が現れ、かつ開発途上国でも非産油国では、石油ショック以降の石油価格の高騰によって貴重な外貨が流出し、後進性離脱のために大きな阻害要因となっている。したがって非産油国のブラジル、フィリピン、アルゼンチンなどでは、既に外貨節減策として代替液体エネルギーとしてアルコール開発を行い実用化しているところもある。しかるに、アルコール生産にはその原料である炭水化物が必要であり、これらは人の食糧や家畜の飼料と競合するものが大部分を占めている。したがって農業生産が停滞し、人口圧がかかっている国では、膨大なパワーアルコールの需要に代替するアルコール安定生産には多くの困難が予測される。この点タイは農業開発が順調に進み潜在農業生産力は現況では東南アジア第一である。しかもタイの農業は安定した国際市場の得られるものが少なく、常に世界の需要動向に支配されて作目が転換されている。

この様にタイの農業や農業生産環境は、流動する国際的需給事情に対応して、如何なる作目転換でもなすうる程度の途上国においては高い能力を有している。したがって、食糧需要にも対応する多量の需要量の見込まれる、アルコール原料としての代替需要が確立されるなら、需要に対応する供給の確保を期待することは容易と推察される。そこでここではタイにおけるアルコール原料農産資源の生産動向について記すこととした。

タイの農業生産環境

タイは北緯6度から北部の21度までの間に位置する。気候的には南タイと呼ばれるマレー半島部とシャム湾沿岸でカンボジアに国境を接する南東タイのチャンタブリー県は、海洋性の気候で周年降雨に恵まれた地域である。この地域では一年生の短期作物は、自給作物である水稲以外にない。大部分はココ椰子やゴムなど木本性の永年作物が作られる。内陸のメナム、チャオプラヤのデルタ地帯に形成される中央平原は広大な氾濫水田地域でタイの穀倉地帯として知られている。しかし、この地域は雨季、乾季が明瞭で、雨季には河川が氾濫し、乾季には乾燥が厳しい。一部裏作として畑作が可能な場所があるが、大部分は雨季の稲作が行われるのみで、土地利用の効率が低い。

北部タイのランパン、チェンマイ、チェンライなどの各県は、雲南地方から連なる高地で、古くからピン河から分水する川水を利用して灌漑が行われている。灌排水の完備した耕地が多く、需給の動向によって水田にも畑作にも変化する。一般には夏作に稲が作られ、裏作としてタバコや野菜が作られるが、需要の安定した作物は水稲を除くと殆んどみられない。

カンボジアやラオスに国境を接する東北タイは、東側を流れるメコン河に傾く台地で形成される。タイの国内では最も広大な地域を占めるが、土壌生成期から溶脱が一元的に行われているため瘠薄である。また雨量が少なく、年による雨季到来の時期が不安定なため、20年程前までは農耕地として殆んど利用されていなかった。ところが1960年代にアメリカの協力によってFriend Ship High Wayが開通し、中央平原の穀倉地帯から人口増加によって溢れ出た農民が、この地方に押し出されて移り住んだ。農民は世界の需要に対応して畑作物を生産している。しかし、安定した需要を得た作物が少なく、国際需要に合わせてトウモロコシ、ケナフ、キャッサバなど、5年から7年の周期で作物が大きく変化しているのもこの地方の農業の特徴である。この様なタイの農業生産環境からみて、南タイや南東タイはゴムや果樹、椰子など有利で安定した作物が多く、アルコール原料作物の生産は期待できない。中央平原はその大部分が稲作地帯であるが、ビルマの国境に近いカンチャナブリー周辺は幾分地盤が高く、現状でもタイの一大蔗作地帯として変貌してきている。これより僅か北に上ったチャイナウータイ地方も畑作・稲作地帯で、広大な地域に亘って蔗作の普及が予測され、アルコール原料生産地帯としても有望である。

北部タイの名県は気象、地勢、交通等に恵まれ、南タイと共に所得も高い。農業は中央消費地の需給動向によって、多様な作物が作付けられる。野菜やタバコなどより有利なアルコール原料作物があれば生産も可能である。しかし、経営規模は最も狭い地域で、集約度の高い収益性の良い作物以外は、農民の生産意欲を刺激することが少ない。この点東北タイは経営規模の最も広い営農地帯で、作物は集約度の低い粗放作物で、しかも海外市場を対象とした加工原料作物生産地帯であり、需要が開発され消費が安定すれば、アルコール原料作物の生産地帯として最も期待が寄せられる地域と考えられる。

タイのアルコール変換用主要農産物

タイの農作物は地勢、気象条件の多様に由来して多様性に富むが、市場性を有する程の生産量のみられるものは極く一部に限られる。特に澱粉性作物では、主食である米以外は国内における消費が少なく国際需要の多少や海外市場の有無に支配され、産額が一定しない特徴がある。この様に国際市場を対象とした農作物の栽培は、ここ20年来道路輸送網が発達し、耕地面積が飛躍的に拡大した東北タイに多い。また、この地域では在米で飼育の作物が少なく、かつ乾季の乾燥が強いため、一年生の畑作物が中心となっている。したがって、常に市場性を要求し、何時でも作目が転換可能な状態にあり、作物が固定していないのも今後のアルコール変換作物の増産に期待がもてる。

ここでは、かなりの生産量が現状ある作物及び将来増産が期待される作物について記述する。

Table 1 タイにおける主要炭水化物資源生産の推移

1. イネ

年次	1969-71	1974	1975	1976	1977	1978	1979
作付面積	6,919	7,333	8,383	8,200	7,947	8,288	8,300
収量	1,947	1,825	1,825	1,817	1,752	2,115	1,884
生産量	13,475	13,386	15,300	14,900	13,921	17,530	15,640
輸出量	—	1,046	951	1,869	2,931	1,598	2,723

2. トオモロコシ

作付面積	771	1,130	1,180	1,200	1,205	1,435	1,466
収量	2,567	2,257	2,562	2,250	1,391	1,945	2,251
生産量	1,979	2,257	3,023	2,700	1,677	2,791	3,300
輸出量	—	2,190	2,072	2,359	1,518	1,955	1,980

3. 砂糖キビ

作付面積	144	307	309	445	499	480	480
収量	40,683	47,531	51,051	53,119	44,380	42,834	41,667
生産量	5,856	14,592	19,910	23,638	23,638	20,561	20,000

4. コオリヤン

作付面積	52	120	130	130	173	176	220
収量	2,065	1,833	1,538	1,777	754	1,229	1,091
生産量	107	220	200	231	130	216	240

5. キヤッサバ

作付面積	211	479	429	441	960	1,323	1,000
収量	15,025	13,027	14,821	17,821	12,888	13,906	12,500
生産量	3,208	6,246	6,358	7,850	12,372	18,399	12,500

6. サツマイモ

作付面積	32	36	37	38	36	36	36
収量	8,669	8,889	8,960	9,026	9,114	9,218	9,669
生産量	280	320	333	347	324	330	350

出典：FAO Production Yearbook, Vol 30—Vol 33.

FAO Trade Yearbook, Vol 30—Vol 33.

(注) 表中の単位は次の通りである。

作付面積 1,000 ha, 収量 kg/ha

生産量 1,000トン, 輸出量 1,000トン

稲 作

広大な平原地を有するメナム、チャオブラヤデルタを中心に、タイは全域に亘って稲作が行われている。米はタイの輸出農産物として重要な地位を有していたが、輸出余力は国内消費の増大によって低下してきている。特に米は政府の財源として農民からの買上げ価格を抑え、輸出に際してプレミアムが課せられるなど、稲作農民には魅力が薄い。また国際的に高く評価されているタイ米の地位を確保するため、IR系統の多収だけを目標とした食味の劣る高収量品種の導入を避けている。近年タイ農務省、米穀局によってR.D系統の高収量品種が開発され普及が奨められている。しかし、前述した様にタイの稲作は、河川沿いの氾濫水田や水位の調節の不能な水田が多く、短稈のR.D系統の作付拡大には限度がある。

タイの稲作は高収量品種の導入によって増産傾向にあるが、2.3倍以上の人口増加によって輸出余力の減少が大きいことも事実である。特に農民はプレミアムがなく、収益性の高い新しい作物に対し生産意欲が集中する傾向がある。したがって、タイの稲作の拡大には、それ程大きな期待が持てないものと予想される。

米をアルコール変換原料として利用することについては、今日将来共碎米に僅かな期待が持てるに過ぎない。しかし昨今のブロイラーや養鶏の普及振興からみて、碎米でも飼料用消費に向けられても、アルコール用に振り向けられる予測は薄い。

砂糖キビ

タイの砂糖キビ栽培は、戦前の歴史ではシャム湾沿いのチョンブリーからライヨンにかけて行われていた。しかし、約20年前に日本の芝糖が東北タイのウボン・タニ周辺で生産を開始した。しかし、この地域は乾季の乾燥が厳しく、加えて約10年程前にバイラスによる黄条病の大発生によって栽培面積の拡大に抑止条件となった。その後中央平原西南端のカンチャナブリーからスパンブリーの水田地帯に新産地が開発され、急速にその面積が拡大した。それに伴ってチョンブリー方面の砂糖キビ栽培面積は、キヤッサバの需要増大によってかなり侵食される結果となった。しかし、この地域の作付体系は、吸肥力の強いキヤッサバの輪作作物として砂糖キビが採用されているため、栽培面積の減少があっても消滅することはないであろう。

チョンブリーやスパンブリーの蔗作地帯をみると、栽培面積の増加や製糖工場の拡大に顕著なものがある。特に製糖工場は現況過剰設置の状況にあり、更に栽培面積の拡大や単位面積当り生産力の増加が期待されるところである。単位面積当り生産量はタイの国内では高い位置にあるが、世界的には極めて低いレベルにあり、栽培技術の工夫により収量増加が強く望まれる。

一方、スパンブリー北部のチャイナウタイ地方は、ビルマの国境に接し未開発地が多い。この地方は

Table 2 タイにおける砂糖及びモラセスの生産量推移

(単位: Mt)

作物年度	蔗茎生産量	砂糖生産量	モラセス生産量	砂糖価B/kg
1966/67	2,834,280	250,445	160,757	3.70
67/68	2,855,200	226,532	148,471	4.52
68/69	4,657,360	388,890	266,388	3.91
69/70	5,463,960	464,437	306,163	3.41
70/71	6,786,320	584,266	387,976	3.99
71/72	8,798,500	734,264	494,740	4.53
72/73	9,512,794	794,318	525,590	4.39
73/74	12,694,500	1,073,315	702,391	4.73
74/75	13,413,442	1,138,722	678,355	5.07
75/76	19,099,069	1,710,142	909,552	5.80
76/77	26,094,452	2,293,622	1,223,394	5.78
77/78	18,941,209	1,646,132	887,755	6.00

出典 The Sugar Institute, Thailand 1st may 1978

注 ; B/kg は kg 当りパーツ (1 パーツ = 10 円)

明瞭な乾雨季があり砂糖キビの栽培に適している。特にこれより約 100 km 東にチャイナートダムが設けられ、水利施設の整備に伴って農耕地化が急速に進んでいる。この地方ではカシオ地域を中心にズシタニホテルやその他幾つかの植栽企業に関心をもつデベロッパーが、アルコール生産を主体とした広大な地域に砂糖キビ生産のコンセッションを得ている。

この点からみてもタイのパワーエネルギー用アルコール生産の原料作物は、砂糖キビにその主眼が向けられていると考えられる。砂糖キビのアルコール利用は、これまでも南東タイのチョンブリー県でイースタンケミカル社が実施している。ここでは廃糖蜜を利用してアルコールが作られているが、1980年の政府アルコールコミッティーでは、搾汁の一部直接醗酵が計画されている。

トウモロコシ

タイは古くから東南アジアにおける最大の米の輸出国として知られている。したがって、主食である米の供給が充分で、雑穀やイモ類に主食を依存することがなかった。そのためトウモロコシの生産は、古くは副食的に極く僅か栽培されていたにすぎない。その頃はカンボジア種と呼ばれた赤粒のフリント種で、収量は ha 当り 800kg 以下と低い品種が作られていた。ところが、中央平原の穀倉地帯の人口増加によって、東北タイの一部地域に農民が流出を始めた1955年頃から、日本の養鶏飼料として需要の高いトウモロコシの栽培が着眼され始めた。この頃から東北タイのコーラトを中心に栽培が拡大されたが、本格的に栽培され生産量が 200 万トン以上に成長したのは1970年頃からである。東北タイは元来降雨量が少なく、農耕不適地として過疎のまま放置されていた。ところが、アメリカのフレンドシップハイ

ウエーの敷設やその後引続いた中国の文化大革命によって、在タイ華僑の母国送金が中断したことが東北タイの開発を促進した。すなわち、内陸深くハイウェイが完備したことによって、華僑の資金が東北タイの斜地にまで農産物の集散都市を形成する結果を招いた。それによって未利用地の開発が急速に進み、需要の保証されたトウモロコシは畑作農民の生産意欲を刺激するに足る価値があった。しかし、タイのトウモロコシは1974年に最高に達したが、港湾施設の未発達が原因で、アメリカなどの補充商品以上の地位を築く国際的な供給基地となり得なかった。生産量はその後 EC のキャッサバ需要の増加に伴って、トウモロコシ生産耕地は序々に侵食されて減少している。

トウモロコシの生産量は国際需要により変動しているが、生育期間が短かく、かつ栽培が容易なところから需要が再燃するならば極めて高い潜在生産性が期待される作物である。

コオリヤン

東北タイの開発に基づいて作付面積の拡大した新興作物で、1974年以降その生産量は飛躍的に増大した。特にソルガムは生育に当って耐旱性が大きく、トウモロコシの生育不能な土地でも良く生育する。コオリヤンはインドが世界的に最も作付面積が多く、アジアの全作付面積の約90%を占めている。ブラジルその他の熱帯地域でも新興作物として栽培面積の拡大している国が多いが、小穀粒種子のために播種時の覆土が厚いと発芽が阻害され易い。また鳥に食害される被害が多い。作物としては粗放栽培に適する反面、初期の生育や登熟期の管理に配慮が必要など、トウモロコシに較べれば作りにくい性質がある。しかし、熱帯では収穫後刈株に施肥を行ったり適当な管理を施せば、株元から萌芽して連続して収穫出来るなどの利点がある。

収量は ha 当り 1,500~2,000kg が得られ、瘠薄地でも安定した収量が得られるなどの長所がある。タイでの栽培は東北タイを中心に普及した。コオリヤンの普及と同地域へのキャッサバの普及が時を共にしたため、栽培面積の拡大は漸増的である。しかし、1981年に EC が一元的に家畜飼料として買付けを行っていたキャッサバが、EC より買付け制限の通告を受けたことから、キャッサバに代る輸出代替農産物としての期待も得られる。

キャッサバ

キャッサバは熱帯恒熱地域において高い生産力を示す C₄ 作物として知られている。澱粉作物としては最高の生産力を有する作物として、熱帯各地域で主食あるいは家畜の飼料として栽培されている。栽培適地は赤道周辺の年間雨量配分が良く、肥沃な砂質土の低地で、雨水が停滞しない排水性や保水性の優れた土地とされている。しかし、耐旱性はイモ類の中でも高く、土壌に対する適応性が高く、タイにおいては全土に亘って栽培が可能である。

タイのキャッサバ産地は、過去においては適地条件を具備した南東タイのチョンブリーやライオンに産地が形成されていた。ところが1970年代に入り EC 圏から飼料用としての需要が増大して以来、1974年には1970年代の21万 ha から一挙に48万 ha に作付け面積が拡大した。更に、東北タイの主要作物であるケナフが合成繊維に市場が掠われて以降、ケナフ代替作物として1977年以降東北タイの乾燥にまで栽培面積が波及拡大した。

1979年には EC の安定した需要に支えられて、栽培面積は10年前の約5倍量の100万 ha に拡大した。生産量も1,250万トンと増大し、短期畑作物ではイネやトウモロコシに次ぐ3大作物に生長した。しかし、

Table 3 地域別キャッサバ生産の推移

東北タイ地方			
作物年度	作付面積(Rai)	生産量(Mt)	Rai 当り収量(kg)
1976-77	2,490,000	4,800,000	2,000
1977-78	2,800,000	5,400,000	1,900-2,000
東南タイ地方			
1976-77	1,700,000	4,250,000	2,500
1977-78	1,900,000	4,370,000	2,300
その他の地方			
1976-77	380,000	950,000	2,500
1977-78	54,000	1,350,000	2,500
全国合計			
1976-77	4,480,000	10,000,000	2,230
1977-78	5,244,000	11,120,000	2,120

出典 office of Commodity Standards

Board of Trade of Thailand, 1978.

注 ; Rai = 1,600㎡ = 約1/4 ha

1981年に EC の一方的買付け制限の通達により、今後の需要開発が懸念される場所である。しかし、キャッサバは生産力が高く、かつ粗放栽培にも適するところから、これに代る代替作物の開発は困難に近い。

したがって、昨今のバイオマスエネルギー資源として代替需要開発の構想があるが、澱粉の素質やアルコール醱酵法の開発など、アルコール資源としては課題の多い作物である。

サツマイモ

南米原産のイモ類で、高温や乾燥に対する適応性が高く、かつ熱帯産イモ類の中では生育期間が3～4か月と短かく生産性が高い。収量はha当り10～20トンと高いが、キャッサバの10～30トンよりは劣る。しかし、地力の消耗はキャッサバよりはるかに低く、かつ生育期間が3分の1以下と短かいから熱帯においては極めて有利な作物といえる。

しかも、サツマイモからアルコールを製造する技術は、安定した技術が確立されている。しかるに熱帯低地においてはサツマイモの栽培は極めて少ない。その理由は、熱帯低地においてはイモに大害を及ぼすアリモドキゾウムシの被害が多く、かつ天狗巣病やモザイク病などのウイルス被害が発生し易く生産は常に不安定である。したがってサツマイモの普及には安定生産技術の開発や耐病性品種の育成が今後の課題となっている。

タイのサツマイモの栽培は、一進一退の状況にあり、3万6千haを中心に年による僅かな変動がみられるに過ぎない。しかしサツマイモは、確立したアルコール製造技術のあるところから、安定生産技術が開発されるならば、砂糖キビに次ぐアルコール資源作物として期待される。

む す び

タイにおけるアルコール醸造用炭水化物資源として有望視される作物には、イネ、砂糖キビ、トウモロコシ、コオリャン、キャッサバ、サツマイモなどがある。これら作物のうち米と砂糖キビ及びサツマイモは、多くの量が国内需要により消費され、過剰生産部分が輸出に供されている。しかし、トウモロコシやコオリャン、キャッサバなどは、国内需要は殆んどなく、大部分が海外市場に供給されている。

輸出を対象とした作物は、いずれも作付面積、生産量共に10年の間に倍以上に増加している。砂糖キビも生産の伸びが大きい。これは輸入代替作物として内需の増加に対応した結果と推察される。タイの伝統作物である米は、作付面積の伸びは微増にとどまるが、生産量の伸びは品種の改良や栽培技術の向上に伴って大きい。生産の伸びの大きいキャッサバやコオリャンは、海外需要の増大に刺激されて生産が増加した。

生産の伸びの大きい作物の需要は、タイの場合には必ずしも安定したものでない。特に砂糖キビは投機的性質が強く、価格の変動は農民の生産意欲がどこまで維持されるか疑問がある。また、近年最大の伸びを示したキャッサバは、適地条件を脱した乾燥地にまで作付けが拡大している。ECの需要に刺激されて生産拡大を続けたキャッサバも、ECの買付け制限によって生産量が維持出来るか疑問が生じてきた。トウモロコシやコオリャンなどの穀類も海外需要の増加に対応して生産が拡大した作物であるが、港湾設備の未整備なタイにおいては輸出の大きな伸びは期待が薄い。

この様にタイの炭水化物資源作物をみると、いずれも海外需要の安定な伸びの期待が薄い。輸出以外

の代替需要の確立が望まれる。しかし、トウモロコシやコオリャンは国内の養鶏事業の振興によって、飼料需要の増加が著しいところから需要の後退は少ないものと思われる。以上のことからタイにおけるアルコール用炭水化物資源を概観すると、需要後退の予測されるキャッサバや投機性の強い砂糖キビの利用が将来有望と思われる。また、これまで病害虫の被害や需要が薄いために生産が少ないサツマイモは、アルコール資源として優れた性質を有し、かつ醗酵技術が確立されている。需要が確立すれば、水田裏作々物として栽培技術が開発されれば、病害虫の回避は容易となり、農民の生産意欲を刺激してアルコール資源として増産の期待がもたれる。

タイのパワーエネルギー用アルコールの開発は、主食である米の十分な生産によって食糧が確保されているこの国では、炭水化物資源をエネルギー源の輸入代替としてのアルコール開発が行なわれるならば、砂糖キビ、キャッサバなどの新興作物を中心に可能性が大きい。

写 真

施肥とキャッサバの生育状況

(植付後 60 日)

無 肥 料 区

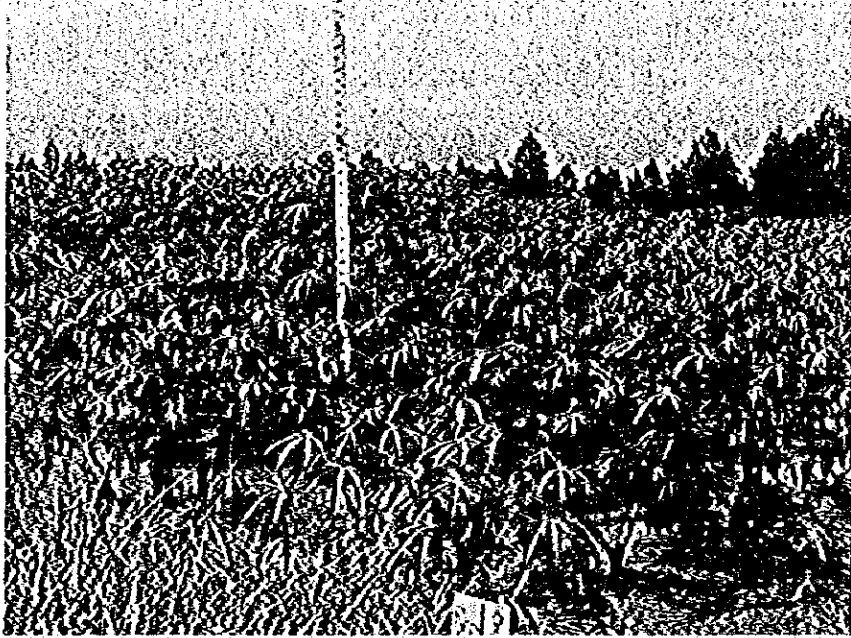


完全肥料施肥区 (8-8-8, 225kg/ha)



(植付後 119 日)

無 肥 料 区

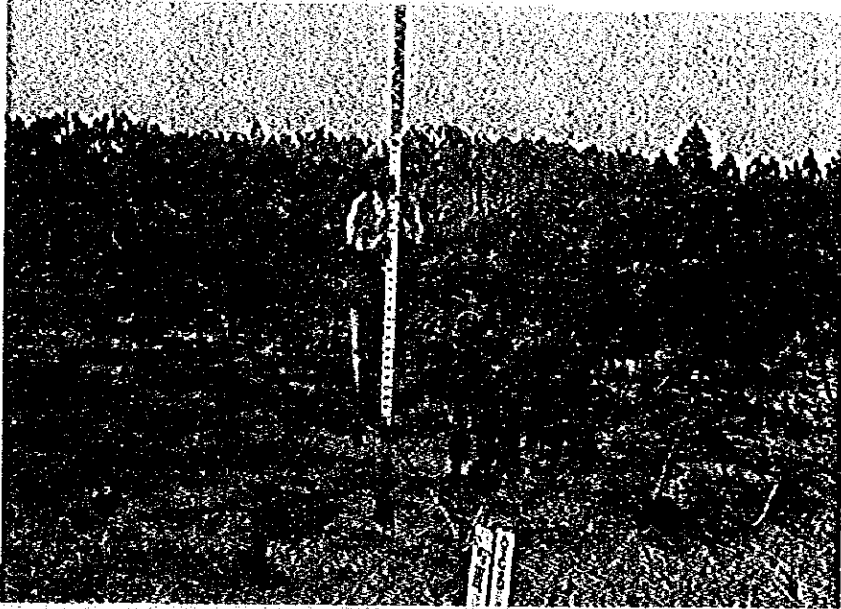


完全肥料施肥区 (8-8-8, 225kg/ha)

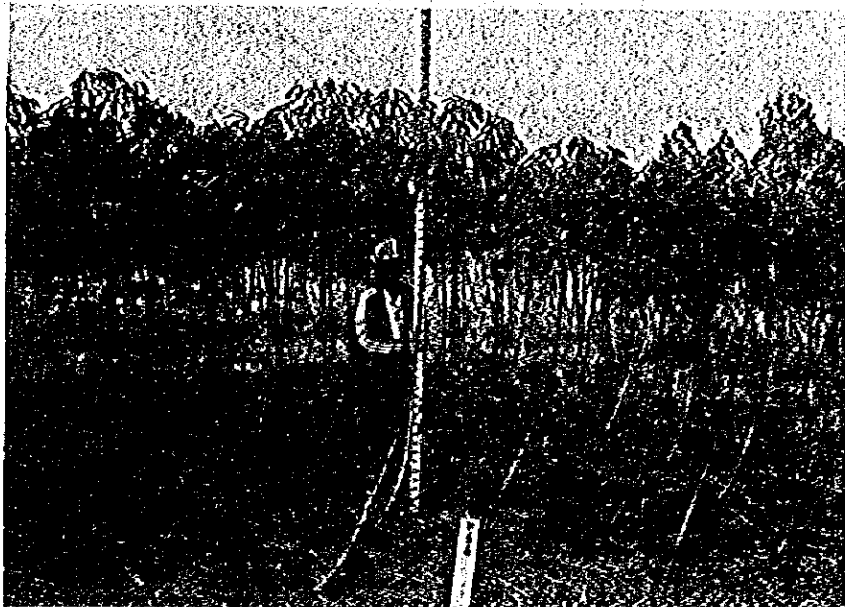


(植付後 209 日)

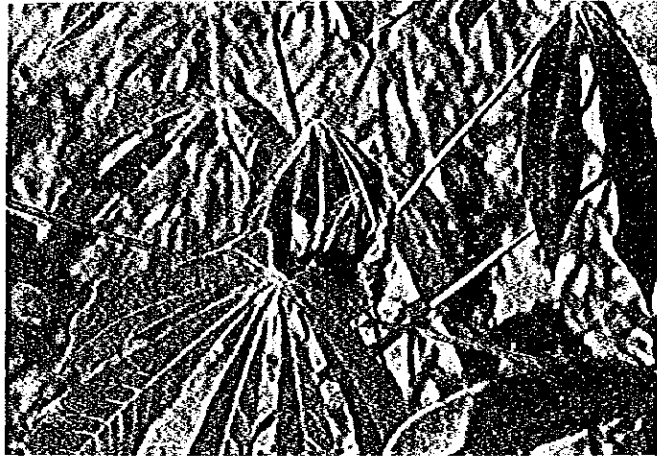
無 肥 料 区



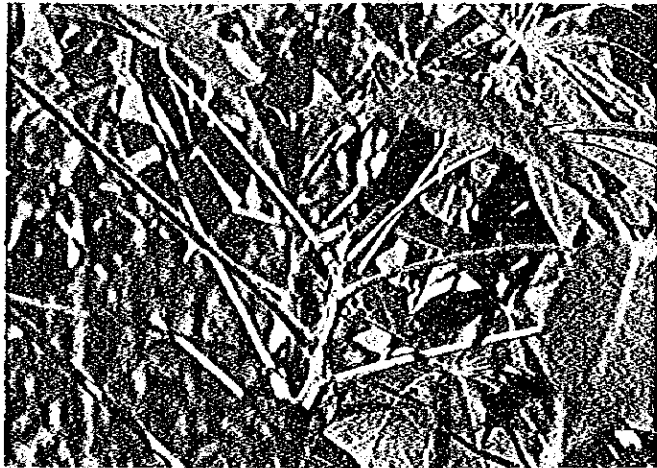
完全肥料施肥区 (8-8-8, 225kg/ha)



季節による生育形態



雨季の頂芽
(新葉が伸びている)



乾季の頂芽
(出葉していない)



乾季後半の状況

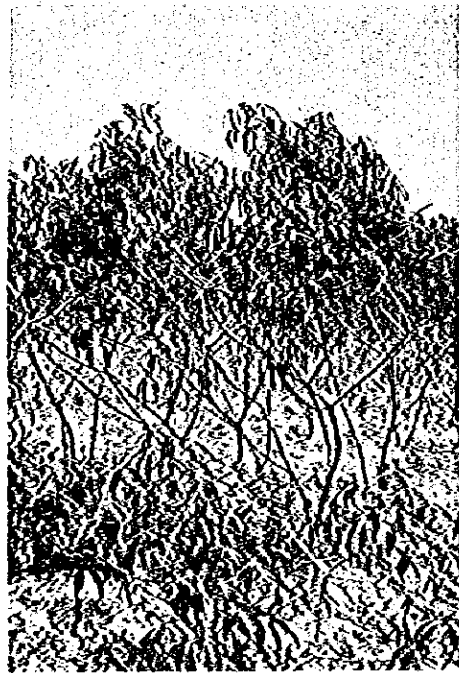
品種による生育収量

コロンビアにあるCIATで改良した品種で、原種は晩生であったが、タイに導入され馴化して中生種となり、高い生産力を発揮している。

M Ven 218種の原種草形

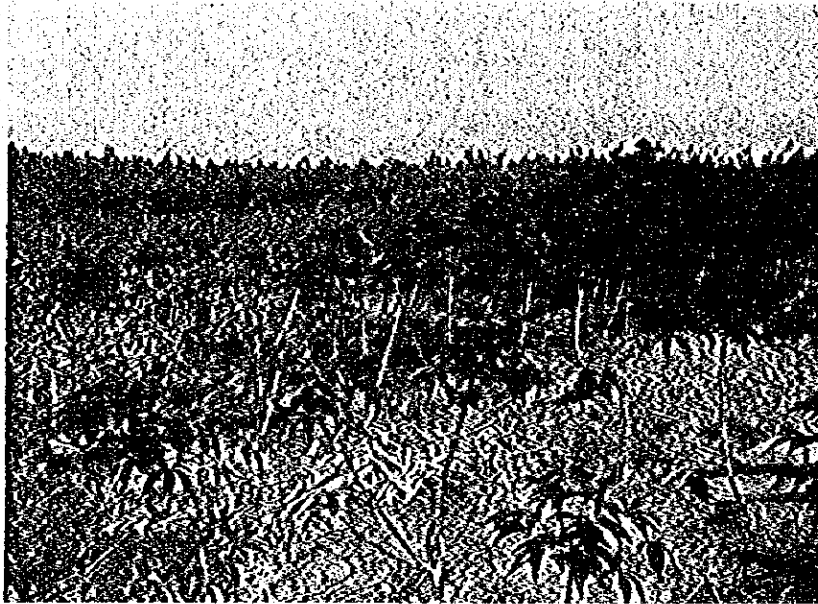


タイに馴化したM Ven 218の草形
タイではハナデーと呼ばれている。

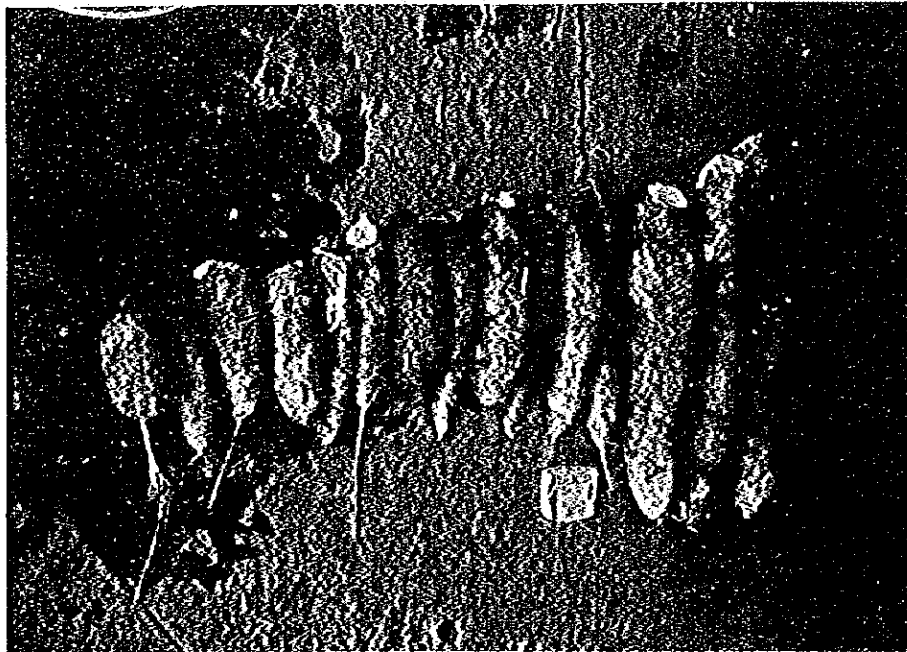


CIATの改良種 CM-407-7 (早生種)

草 形

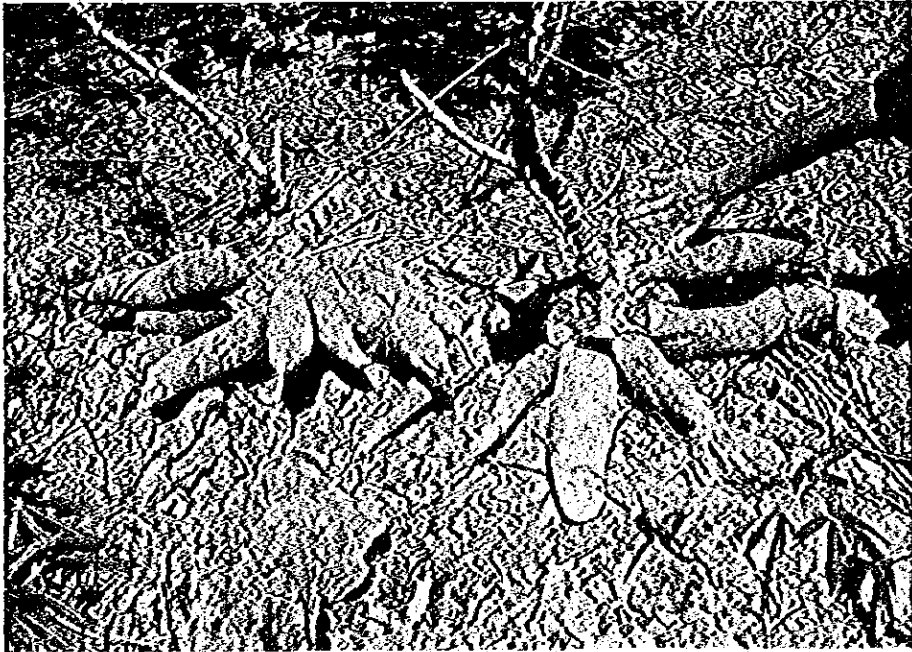
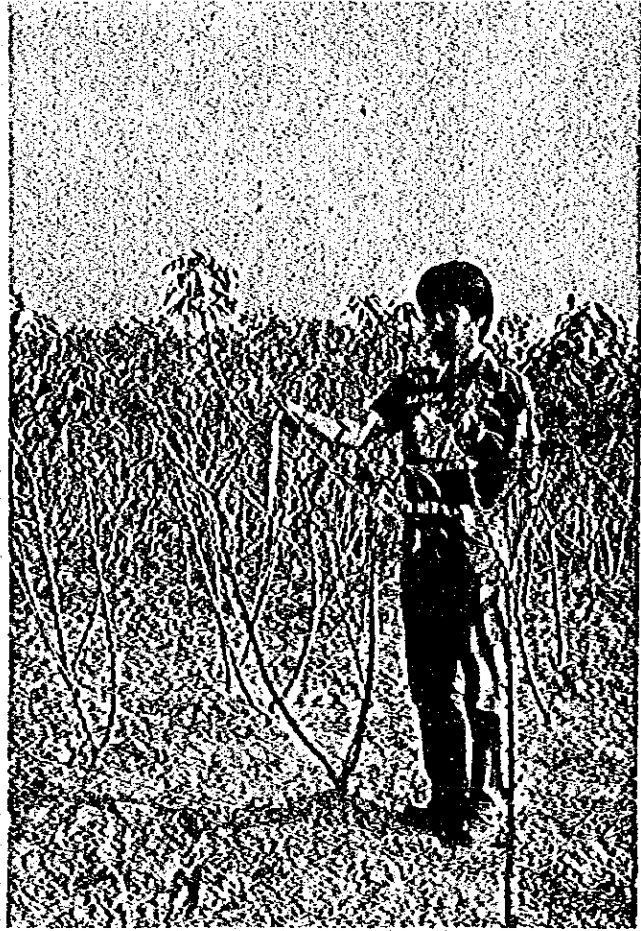


イモの形状



CM 407 (晩生タイプ)

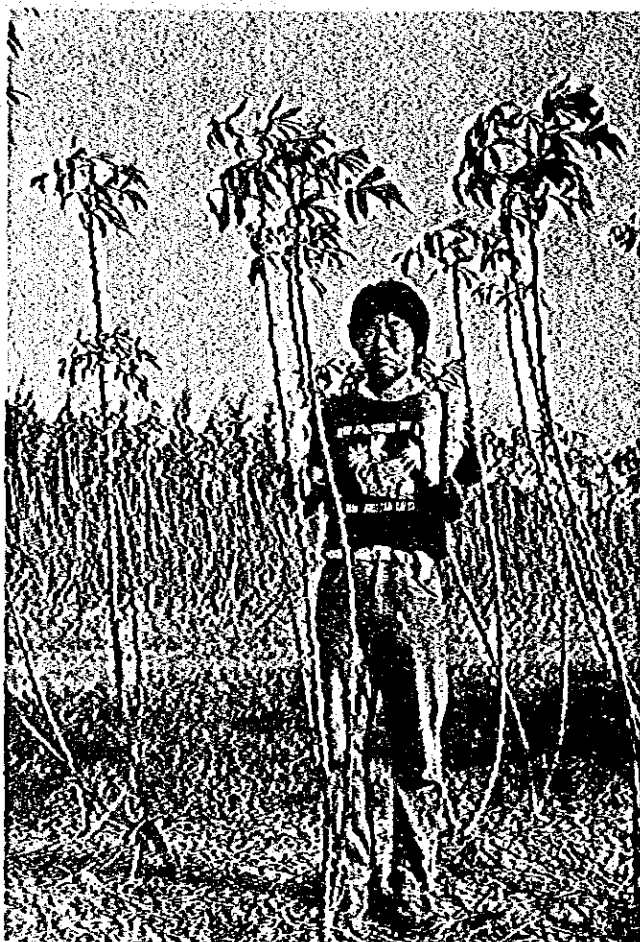
草 形



イモの形状

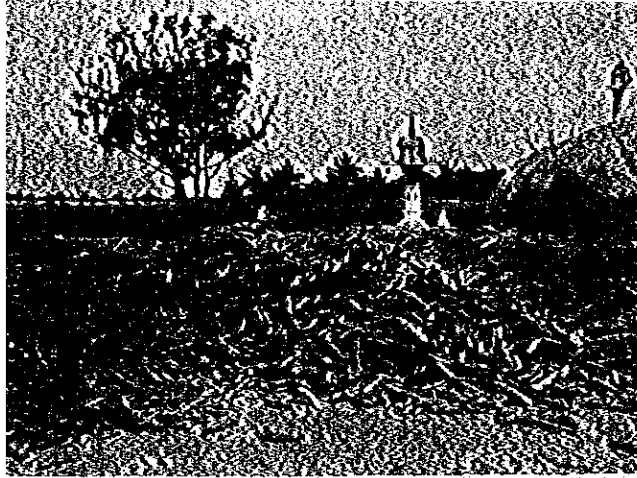
タイの在来種
Rayong No.1 (晩生タイプ)

草 形

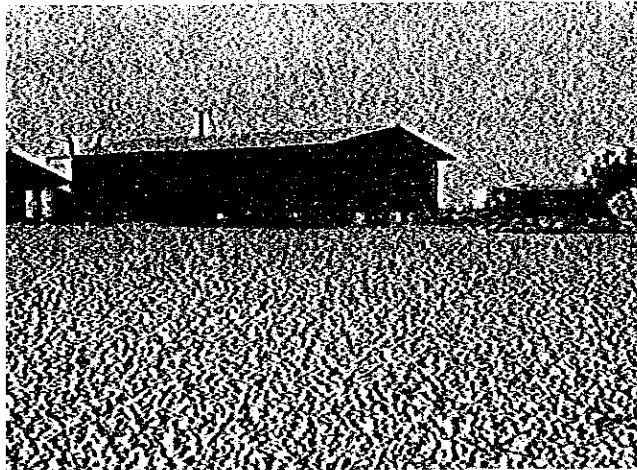


イモの形状

工場に集荷されたキヤツサバの塊根



塊根をチップにして乾燥している風景



収穫作業の状況



JICA

LIB