

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5711873号
(P5711873)

(45) 発行日 平成27年5月7日(2015.5.7)

(24) 登録日 平成27年3月13日(2015.3.13)

(51) Int.Cl.

C 12 P 7/10 (2006.01)
C 13 K 1/02 (2006.01)

F 1

C 12 P 7/10
C 13 K 1/02

請求項の数 5 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2009-96867 (P2009-96867)
 (22) 出願日 平成21年4月13日 (2009.4.13)
 (65) 公開番号 特開2010-246422 (P2010-246422A)
 (43) 公開日 平成22年11月4日 (2010.11.4)
 審査請求日 平成24年1月26日 (2012.1.26)

前置審査

(73) 特許権者 000005119
 日立造船株式会社
 大阪府大阪市住之江区南港北1丁目7番8
 9号
 (74) 代理人 100079038
 弁理士 渡邊 彰
 (74) 代理人 100106091
 弁理士 松村 直都
 (74) 代理人 100060874
 弁理士 岸本 琢之助
 (72) 発明者 世良 豊
 大阪市住之江区南港北1丁目7番89号
 日立造船株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】セルロース系原料の同時糖化発酵法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

セルロース原料を酵素によって加水分解する糖化工程と、発酵菌によるエタノール発酵工程を一つの反応槽内で同時に進行する同時糖化発酵方法において、酵素糖化に適した温度である50以下かつ発酵菌の耐熱温度以下の条件を満たす温度を初期反応温度とし、同時糖化反応中に、発酵液中のエタノール濃度が2.0~4.0volum-%に達した時に、該初期反応温度から、3~10の範囲で反応温度を低下させることを特徴とする同時糖化発酵方法。

【請求項 2】

酵素が、トリコデルマ属、および/またはアルペルギルス属、リゾプス属、アクレモニウム属、あるいはそれらの遺伝子組換体の単一種由来のセルラーゼおよび/または複数種混合由来のセルラーゼである、請求項1に記載の同時糖化発酵法。 10

【請求項 3】

発酵菌がサッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロマイセス属、ピキニア属、キャンジダ属の酵母、ザイモモナス属、クロストリディウム属の細菌、あるいはそれらの遺伝子組換体の単一種および/または複数種の混合である、請求項1または2に記載の同時糖化発酵法。

【請求項 4】

発酵菌の増殖時に、糖以外の栄養塩類も加える、請求項1~3のいずれか1つに記載の同時糖化発酵法。

【請求項 5】

バッチ毎に、発酵菌を S S F 反応槽に接種して増殖させた後、S S F を開始する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の同時糖化発酵法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、セルロース系原料を酵素によって構成糖であるグルコースまで加水分解（糖化）し、得られた糖を酵母などの発酵微生物によってエタノールに変換する技術に関する。特に本発明は、糖化と発酵を一つの反応槽内で同時に並行して行うことにより原料や酵素のそれぞれの欠点を改善し、セルロース系原料からエタノールを効率的に製造できる同時糖化発酵法に関する。

10

【背景技術】**【0 0 0 2】**

酵母等によって生物的にエタノールを製造する場合、エタノール発酵が終了した発酵液から残渣や菌などの固体分を除去後、あるいはそれらが懸濁したままで発酵液中のエタノールを蒸留し、エタノール濃度 9 0 v o l % 以上になったものを脱水膜等で処理することで残りの水分を除去し、いわゆる無水エタノールにする方法が一般的である。なお、蒸留に要するエネルギーは、エタノール製造に要する総エネルギー量の大半を占めるうえ、発酵液中のエタノール濃度が 5 v o l % を境に急激に増大する（非特許文献 1）。このため、発酵終了時のエタノール濃度が少なくとも 5 v o l % に達することが事業性あるエタノール製造において最も重要な点である。

20

【0 0 0 3】

サトウキビの搾汁やそれ由来の廃糖蜜、あるいは熱で糊化されたトウモロコシデンプンスラリーを酵素（ - アミラーゼおよびグルコアミラーゼ）で酵素糖化して得られる糖液中のショ糖やグルコースを糖源として供給するバッチ式あるいは連続式発酵によって、エタノール濃度 8 v o l % 以上、条件の選択によっては 1 5 v o l % 前後の発酵液を得ることが出来る（非特許文献 2）が、これはひとえに上記の原料からは高濃度のショ糖、あるいはグルコース溶液を容易に調製でき、糖源として安定的に供給できるからである。例えばサトウキビ搾汁（ケーンジュース）中の糖濃度は 1 1 ~ 1 7 %、これ由来の廃糖蜜中の糖濃度は 4 5 ~ 5 0 % にも達するため、2 0 ~ 2 4 % に薄めて発酵させる場合が多い。

30

【0 0 0 4】

一方、セルロースを構成糖であるグルコースまで糖化（加水分解）する手段として、酵素（セルラーゼ）を用いる方法があり、この方法は、硫酸、あるいは超～亜臨界水による加水分解のように生成糖の過分解が起こらないため、有望な糖化手段として期待されているが、セルラーゼの場合、それ自体の働きによって生成されたグルコースが蓄積すると酵素活性が阻害されて糖化率も低下する「競争阻害」が顕著という欠点がある（デンプンを糖化するアミラーゼの場合は競争阻害がほとんどなく、高濃度の糊化デンプンスラリーを高濃度のグルコース溶液に糖化できる）。また、セルロースは冷水、熱水のいずれにも不溶のうえ、水分を吸収して膨張するため、冷水には不溶だが熱水で糊化することで 5 0 d r y - w t % 以上のスラリーにできるデンプンのように高濃度の原料スラリーにはできない、前述の競争阻害という欠点も加わって、セルロース系原料から濃いグルコース溶液を得ることは極めて困難である。

40

【0 0 0 5】

この対策として同時糖化発酵（Simultaneous Saccharification and Fermentation：以降 S S F と表記）という方法がある。この方法によると、酵素によるセルロースの糖化と酵母などの発酵菌による糖化物のエタノール発酵が同時進行することで、生成された糖が蓄積して酵素活性が阻害される前に発酵菌が糖をエタノールに変換してしまうため、酵素活性を維持することができる。しかし、前述した通り、セルロース原料の処理濃度はデンプンの処理濃度よりも大幅に低いことに変わりはないため、S S F を駆使しても、最終的に得られる発酵液中のエタノール濃度は糖蜜あるいはデンプン原料のエタノール濃度には

50

及ばない。また、SSFは糖をエタノールに変換するだけの単反応ではなく、セルロースの糖化も伴う、より複雑な反応であるため、バッチ式であることが望ましい。したがって酵素法をベースとしたセルロース系原料からのエタノール製造の場合、あくまでもバッチ式でエタノール濃度5v o l%以上を達成することが現実的、かつ妥当な目標値となる。

【0006】

酵素糖化とエタノール発酵を同時進行させるSSFの場合、例えば酵素糖化の適温が50前後、酵母発酵の適温が30前後とすると、それらの中間温度付近で反応させることとなる。つまり、酵母が耐えられる限りは高温の方が反応効率は良く、適用する酵母の耐熱性が重要な鍵となる。反応によってエタノールが生成され、反応槽内のエタノール濃度は目標値である5v o l%に近づいていくが、酵母は適温よりも高い温度に絶えず曝されるのみならず、それ自体が生成するエタノール濃度も高まることで2つのストレスが加わり、活性が低下していく。酵母の場合、適温下であれば前述の通り最大15v o l%のエタノール濃度にも耐えられるケースもあるが、耐熱温度付近になるとその影響も加わって、エタノール濃度5v o l%程度でもストレスとなり得る。

【0007】

この対策として、発酵槽からもろみ（菌や基質も含む発酵液）を減圧に保持したフラッシュタンクに送り、エタノールを除去した後、もろみを発酵槽に返送し、発酵槽内のエタノール濃度を低く保つフラッシュ連続発酵法がある。あるいは連続発酵槽ともろみ塔を組み合わせた装置で発酵と蒸留を並行して行い、連続発酵槽内のエタノール濃度を約5%に保つことでエタノールによる発酵阻害が起こらないBiostillプロセスがあり、後者は実用化されてオーストラリアやインドネシアなどで採用されている（非特許文献2）。同法を適用すればエタノールによるストレスを軽減することは容易に考えられるが、前述の通り、SSFにおけるエタノール濃度は最大で5v o l%程度、かつバッチ式反応が前提のため、SSF反応槽にBiostillプロセスを適用するのは非効率、かつ非現実的であり、もうひとつのストレスである温度への対策が妥当、かつ効率的であるのは言うまでもない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Philip W.Madson and David B.Lococo著、「Recovery of Volatile Products from Dilute High-Fouling Process Streams」、Applied Biochemistry and Biotechnology、2000年、第84-86巻、p.1049-1061

【非特許文献2】柄倉辰六郎著、「発酵ハンドブック」、共立出版株式会社

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

以上において説明したように、セルロースからエタノールを製造する方法における課題をまとめると以下のようになる。

【0010】

(1) 事業性あるエタノール製造においては、発酵終了時のエタノール濃度が少なくとも5v o l%に達することが重要である。

【0011】

(2) セルロースは冷水、熱水のいずれにも不溶のうえ、水分を吸収して膨張する。これを構成糖まで加水分解できる酵素がかかえる競争阻害という欠点も加わり、セルロース系原料から濃いグルコース溶液を得ることは極めて困難である。

【0012】

(3) 酵素の競争阻害対策としてSSFが有効だが、(2)で述べたセルロースの物性のため、SSFを駆使しても、最終的に得られる発酵液中のエタノール濃度は糖蜜あるいはデンプン原料のように10v o l%以上には達しない。あくまでもバッチ式SSFで5v o l%以上を達成することが現実的、かつ妥当な目標値である。

【0013】

10

20

30

40

50

(4) S S F の場合、酵母などの発酵菌は適温よりも高い温度に絶えず曝されるほか、それ自体が生成するエタノール濃度も高まるため 2 つのストレスが加わり、活性が低下する。

【0014】

(5) ストレスの一つであるエタノールを S S F 槽から連続的に留去するのが対策として有効だが、バッチ式、かつエタノール濃度が最大 5 v o l % 程度に同法を適用するのは非効率、かつ非現実的である。

【課題を解決するための手段】

【0015】

セルロースを構成糖であるグルコースまで糖化（加水分解）する手段として、酵素を用いることが一般的であるが、この手段では酵素の働きでグルコースが生成され、それが蓄積することによって酵素活性が阻害され、ひいては糖化率が低下する「競争阻害」という問題がある。この対策として S S F という方法があり、この方法によれば、酵素による糖化と酵母などの発酵菌による糖化物のエタノール発酵が同時進行することで、生成された糖が蓄積して酵素活性が阻害される前に酵母などの発酵菌が糖をエタノールに変換してしまうため、酵素活性を維持することができる。10

【0016】

S S F の採用は、競争阻害対策のみならず、糖化および発酵を一つの反応槽内で同時に行うことができるため、工程がシンプルかつコンパクトになり、設備に要するイニシャルコストを低減することにも繋がる。なお、糖をエタノールに変換するだけの単発酵よりも複雑な反応となるため、連続式よりもバッチ式、セミバッチ式により行う方が好ましい。20

【0017】

反応槽に投入するセルロース系原料としては、例えば針葉樹、広葉樹などの木材、ヤシ類を中心とした南洋材（幹および実の外殻）、稻藁、麦藁、バガス、コーンストーバー、コーンコブなどの農業残渣、大型藻類や微細藻類等の他、建築廃材、街路樹の剪定枝、紙類など、都市部の廃棄物も含まれる。ただし、これらを効率よく酵素糖化するためには、適切な前処理によって脱リグニンされていることが必須であり、その点において製紙工程において既に脱リグニンされている紙類は、S S F に最適なセルロース系原料である。上記の原料は水に懸濁させて 15 d r y - w t % 前後のスラリーに調製したうえで S S F に適用する。30

【0018】

上記の脱リグニンされたセルロース系原料を加水分解する酵素には、トリコデルマ属、および / またはアスペルギルス属、リゾpus 属、アクレモニウム属、あるいはこれらの遺伝子組換体由来の市販のセルラーゼ製剤、これらを培養して得られる培養液（菌体を含む）、菌体を除いた培養液上澄を用いてもよい。

【0019】

酵素の働きによってセルロースから生成される糖をエタノールに変換するため、酵素と同時にサッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロマイセス属、ピキア属、キャンジダ属の酵母、ザイモモナス属、クロストリディウム属の細菌、あるいはそれらの遺伝子組換体をセルロース系原料に接種する。40

【0020】

S S F 終了時の発酵液中エタノール濃度が 5 v o l % 以上に達するようにするには、植物の種類や前処理法によっても異なってくるが、熱水、酸、アルカリなどによる適切な前処理によって脱リグニンされ、セルロースおよびヘミセルロースが中心となった原料が、後述するエタノール発酵菌やセルラーゼも含んだ状態で 10 ~ 30 d r y - w t %、好ましくは 15 ~ 20 d r y - w t % のスラリーになるように調製して反応槽に充填する。このスラリーを調製する段階で酵素糖化およびエタノール発酵に適した pH に調整しておく。

【0021】

セルラーゼは、原料の乾燥重量あたり 6 ~ 15 F P U / g、好ましくは 8 ~ 12 F P U 50

/ g 添加する (F P U / g は 60 分間にろ紙からグルコースを 10.8 mg 生成するセルラーゼ酵素活性の単位)。

【0022】

セルラーゼと並行して接種するエタノール発酵菌は、例えば酵母サッカロマイセス セレビジエの場合、原料スラリー容積あたり 1 ~ 4 g wet-wt / L、好ましくは 2 ~ 3 g wet-wt / L 接種する。

【0023】

原料、セルラーゼおよび酵母を反応槽に投入した後は、物理的動力により、これらが均一に混合するよう、攪拌や混練を施す。15 dry-wt % 以上の原料スラリーは、実際には流動性が全くない含水率 85 % の固形分の様相であるが、セルラーゼの働きによるセルロースの低分子化に伴って液化が促進され、流動性の増加と粘度の低下が起こる。そして、最終的には構成糖である单糖、すなわちグルコースが生成される。10

【0024】

並行して接種した発酵菌は、このグルコースを基質として増殖しながら、エタノールを生成する。このときにグルコース以外に必要な栄養塩類を最適量加えることにより、増殖、発酵が促進され、エタノール発酵に好適な条件が整う。具体的な栄養塩類としては、アミノ酸源、窒素源、リン源が挙げられるが、これらの安価な代替品としては、廃糖蜜、コーンスティーブリカー、肥料として知られる硫安、過リン酸石灰が挙げられる。

【0025】

前述した通り、現在市販されている酵素の糖化に適した温度は 50 前後である。これに対し最も一般的な発酵菌である酵母サッカロマイセス セレビジエの生育に適した温度は 30 度である。このため、発酵菌が耐えられる限り、できるだけ 50 に近い温度で S S F を実施することになるが、その温度に耐えられるだけで決して増殖や発酵に適した条件とはいえないため、発酵菌には絶えず高温というストレスがかかることになる。更には発酵に伴い反応槽内のエタノール濃度は上昇するため、S S F 中期から後期になると、それ自体が生成したエタノールおよび高温という 2 つのストレスが加わり、発酵菌の活性は低下する。この対策として、S S F 中期から後期にかけて温度を低下させることが効果的である。具体的には、例えば適用する発酵菌の耐熱温度が 40 、S S F 初期から中期の反応温度を 38 と設定している場合、これから 3 ~ 10 、好ましくは 5 ~ 8 の範囲で温度を下げるにより、少なくともストレスの一つを軽減できる。これにより発酵菌の活性が回復し、S S F を終始 38 で反応させた場合よりも、エタノール収率は向上する。なお、S S F に適用する発酵菌の耐熱性の違いによって S S F 初期から中期の反応温度ならびに中期から後期にかけての降温幅が変動することは言うまでもないが、発酵菌の耐熱性に基づいて、S S F 時の温度を制御する本発明は、適用する発酵菌が代わっても普遍的に有効である。そして、適用する発酵菌の耐熱性が高いほど、酵素糖化に最適な 50 前後により近い温度付近で S S F が実施できるため、より製造効率が高くなる、あるいは S S F 中期から後期に降温しなくてもエタノール生成能が低下しない発酵菌の場合は、終始同じ反応温度を維持しても良いことは言うまでもない。なお、温度を下げる時期の目安としては、発酵液中のエタノール濃度が 2.0 ~ 4.0 vol%、好ましくは 2.5 ~ 3.5 vol% に達した時期が望ましい。3040

【0026】

一方、セルロースの糖化と、発酵菌によるエタノール発酵を一つの反応槽内で行う方法において、先ずセルロース原料と酵素を反応槽に充填して酵素糖化に最適な温度下で攪拌し、次いで、この反応槽に発酵菌を投入する方法では、最初から発酵菌を酵素と共にセルロース原料に投入する前述の方法よりも原料を迅速に液化でき、かつ初期の攪拌動力が大幅に節減できる。そして、液化後にエタノール発酵菌の耐熱温度以下まで下げたうえで発酵菌を接種することにより、同じく前述の方法よりも発酵菌を耐熱温度付近に曝す時間が短くなりストレスが低減できる。なお、本発明の方法では発酵菌の耐熱温度以下に下げた後は S S F 終了までその温度を維持することもできるが、前述の方法通り、S S F 中期から後期にかけて更に温度を低下させることが、エタノール生成の点で効果的なのは言うま50

でもない。

【0027】

バッチ式SSFが前提の場合、初回バッチの発酵菌を次回バッチの種菌として返送することが考えられるが、終始、発酵菌がその耐熱限界付近に絶えず曝されるSSFでは、発酵菌にストレスがかかっており、種菌としては相応しくない。また、雑菌汚染された場合には次回バッチの種菌として使用できなくなるため、常にリスクがつきまとう。この対策として、バッチ毎に少量の種菌をSSF反応槽に接種して増殖されれば、これらのリスクを軽減できる。具体的には、例えばSSF反応槽容量 1 m^3 の場合、グルコース濃度5~10%になるように、水、廃糖蜜およびその他の安価な培地成分から成る培養液0.5m³を充填する。ここに酵母サッカロマイセス セレビジエの場合、2~3g wet-wt/L密度になるよう接種して適度に攪拌しながら6~10時間培養することで、酵母密度は30~70g wet-wt/Lに達する。ここに原料および酵素を加え、最終的に15wt%の原料スラリー 1 m^3 に調製した後、SSFを開始する。これにより、種菌培養に必要な前培養槽や、別槽で培養した場合に必要な菌の移送も不要となる。

【0028】

最後に、セルラーゼにはヘミセルロースを構成糖であるキシロースやアラビノースなどの五炭糖に加水分解できるヘミセルラーゼも含まれているため、セルロース以外にヘミセルロースを含有する原料の場合はこれらの糖も生成されるが、通常の酵母やザイモモナスでは五单糖をエタノールに変換できない。このため、これらの糖を利用できる遺伝子組換体を適用すれば、エタノール収率が更に向上するのは言うまでもない。

【発明の効果】

【0029】

本発明は、SSF法において同時糖化反応中に初期反応温度から段階的にまたは連続的に反応温度を低下させてるので、少なくとも5vol%以上のエタノール溶液を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】酵素添加量毎の実験区および対象区のエタノール濃度の推移を示すグラフである。

【図2】50℃で原料を液化後に38℃まで降温して酵母を接種した場合のエタノール濃度の推移(終始38℃のSSFと比較)を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0031】

(実施例)

次に、本発明を実施例および比較例により更に詳細に説明するが、本発明は、これらの例によって何ら限定されるものではない。また、今回はセルロース原料にはコクヨ工業製のOA紙(コピー用紙)、発酵菌には酵母サッカロマイセス セレビジエ、セルラーゼにはGenencor製のAccelleraseを用いているが、これら以外であっても構わない。セルロース原料からバッチ式SSFによって、少なくとも5vol%以上のエタノール溶液を得る方法に関するのが本発明である。

【0032】

(実施例1:SSFにおける温度制御効果)

材料および方法：市販の化学パルプ由来の上質OA紙(コクヨ工業製)の同ロットをまとめて購入し、シュレッダーで細断した後、乾燥機中で絶乾させたものを供試した。これに適量の蒸留水を加えてミキサーで離解させた後に脱水し、ここに酵母サッカロマイセス セレビジエの菌体を原料スラリー容量あたり3g wet-wt/L、トリコデルマリーゼイ由来のセルラーゼ製剤(商品名:Accellerase、Genencor製)を原料の乾燥重量あたり、それぞれ4、8、12FU/gになるように加え、最終的にセルロース原料濃度が15dry-wt%になるように調製して200mL容量のサンプル瓶に100mL充填した。なお、pHはミキサーで原料を離解させて脱水する前の段階で6.0に調整し

10

20

30

40

50

た。これらを振とう機にセットして 38℃ で反応させ、経過時間毎に反応液 1 mL をサンプリングしてエタノール濃度の推移を計測した。そして、エタノール濃度が 3.0 v o l % に達した後に反応温度を 38℃ から 33℃ に下げた実験区と、そのまま 38℃ を維持した対象区のそれらを比較した。

【0033】

結果：図 1 に実験区および対象区のエタノール濃度の推移を示す。発酵によって生成されたエタノール濃度が 3.0 v o l % 以上になったのを目安に反応温度を 33℃ に下げた場合の方が最終的なエタノール濃度は高くなる傾向を示したほか、酵素添加量が多いほど、エタノールの生成速度および濃度は大きい傾向だった。なお、酵素添加量が 4 F P U / g の場合、エタノール濃度が低かったため温度を下げるには至らず、同等の結果となった。

10

【0034】

(実施例 2：原料の液化促進)

材料および方法：請求項 7 の実施例として、実施例 1 と同様に原料を調製し、ここに酵素 Accellerase を原料の乾燥重量あたり、それぞれ 4 および 8 F P U / g になるように加え、最終的にセルロース原料濃度が 15 d r y - w t % になるように調製して 200 mL 容量のサンプル瓶に 100 mL 充填した。なお、この場合も pH はミキサーで原料を離解させて脱水する前の段階で 6.0 に調整した。これらを振とう機にセットして 50℃ 下で反応させ、原料が液化して流動性が充分になった時点で温度を 38℃ まで下げた後、酵母サッカロマイセス セレビジエの菌体を原料スラリー容量あたり 3 g wet-wt / L になるように接種し、実施例 1 と同様にエタノール濃度の推移を計測した。そして、同じ量の酵素と酵母を同時期に原料に添加して終始 38℃ で S S F 反応させた対象区のそれと比較した。

20

【0035】

結果：図 2 に 50℃ で原料を充分に液化した後に 38℃ まで温度を下げ、酵母を添加して発酵を開始した場合と、対象区として、酵素と酵母を同時期に原料に添加して終始 38℃ で S S F 反応させた場合のエタノール濃度の推移を示す。前者については、液化が進んで温度を 38℃ に下げた後、酵母を接種するため、後者よりも早く酵母を接種する前者よりも酵母の増殖が遅いはずであるが、エタノールの生成自体に大きな違いはなかった。この結果を受けて酵素添加量 8 F P U / g のまま酵母接種量を 5 g wet-wt / L に増やしたところ、エタノール濃度が 5 v o l % に達する時間が早まるという効果が認められた。

30

【0036】

一方、原料の液化・流動化は、酵素添加量 8 F P U / g で 38℃ の場合が 6 時間を要したのに対し、8 F P U / g で 50℃ の場合は 2 時間程度で同等の液化・流動化が認められた。なお、酵素添加量が 5 F P U / g になると、液化・流動化は遅くなった。流動性の全くない濃度 15 d r y - w t % の原料を混練、あるいは攪拌する動力に要す電力は多大である。充分な酵素添加量の場合、酵素の働きによって 38℃ 、 50℃ のいずれにおいても、液化は促進されるが、それに要する時間が大幅に短縮、つまり処理電力を大幅に節減できる点において、50℃ 下で短時間に液化させることは、経済性の点で非常に利点がある。

40

【0037】

(実施例 3：種菌の前培養)

材料および方法：酵母培地として一般的な Y P D 培地（酵母エキス 1.0% 、ポリペプトン 2.0% 、グルコース 2.0% ）をベースに、グルコース濃度は 10.0% の培養液 40 L を調製し、100 L 容量の S S F 槽に充填した。ここに酵母サッカロマイセス セレビジエの菌体を 3 g wet-wt / L の密度で接種し、30℃ 、 pH 4.0 、攪拌速度 50 r p m の条件で 8 時間培養した。

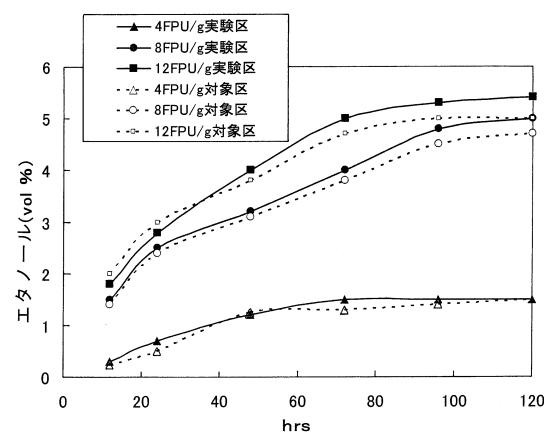
【0038】

結果：8 時間後に培養液中の菌密度は培養開始時の約 13 倍の 40 g wet-wt / L に達した。ほぼ同条件で実施した 100 mL 規模のラボテストのそれが最大 70 g we

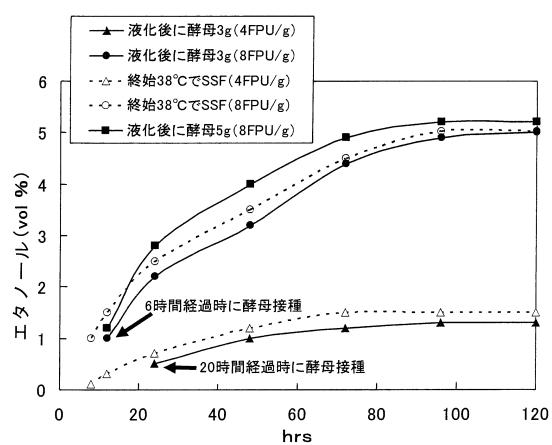
50

t - w t / L、平均 50 g wet-wt/L 前後であるのと比べると劣っていたが、これはラボテスト時には実施した曝気がなく、培養液の攪拌が不十分だったことに起因すると思われる。8時間後の培養液中のグルコース濃度が約 2.0 % と全て消費されていなかったことから、もっと攪拌する、あるいは培養時間を 8 時間以上にすれば、この規模でもラボテストと同程度の菌密度が得られると思われる。以上の方針により、攪拌と温度制御のみの簡易的な方法でも酵母サッカロマイセス セレビジエを大量培養でき、そのまま種菌としてその容器ごと S S F に適用できる。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(72)発明者 吉良 典子
大阪市住之江区南港北1丁目7番89号 日立造船株式会社内

(72)発明者 富山 茂男
大阪市住之江区南港北1丁目7番89号 日立造船株式会社内

(72)発明者 中森 研一
大阪市住之江区南港北1丁目7番89号 日立造船株式会社内

(72)発明者 林 俊介
大阪市住之江区南港北1丁目7番89号 日立造船株式会社内

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 特開2009-022165 (JP, A)

Biotechnology for Biofuels, 2008年, Vol. 1, No. 7, P. 1-14, doi:10.1186/1754-6834-1-7

Bioresource Technology, 2009年 3月16日, Vol. 100, P. 3245-3251

Enzyme and Microbial Technology, 2005年, Vol. 37, P. 195-204

Process Biochemistry, 2005年, Vol. 40, P. 3693-3700

Process Biochemistry, 2004年, Vol. 39, P. 1843-1848

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 P 7 / 10
C 13 K 1 / 02
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
P u b M e d
T h o m s o n I n n o v a t i o n