

バイオエタノールの製造

応用数理科三年 乾祐子 堀田冨由利

【概要】

私たちは、酵母菌によるエタノール発酵を行った。
基質にはグルコースを使用し、生成したエタノールを屈折計、紫外可視分光光度計、アルコールチェッカーを使った三種類の測定方法により、正確なエタノール濃度の測定方法を研究した。
またセルラーゼを酵素として使用しろ紙からグルコースを生成、そのグルコースを基質としてエタノール発酵を行った。

We performed Ethanol fermentation caused by the yeast fungus.
First, we used glucose as substrate and generated ethanol. Second, we studied how to measure the exact concentration of ethanol through three methods. One is a refractometer, one is an ultraviolet and visible spectrophotometer and the other is an alcohol checker.
And then we performed Ethanol fermentation using the glucose as substrate.

【研究の目的】

通常、酵母菌によるアルコール発酵の実験では様々な規模に因るが大きな研究所などではバイオリアクターという500万円以上もする装置を使用する。バイオリアクターとはアルコール発酵を促進するために原料の循環や周りに温水を循環させ原料の濃度や温度を一定に保つ装置である。しかし、このような高価な装置を購入することはできないので、自分たちでこの装置と同じようにグルコースを発酵させたり、溶液の循環装置などを手作りで製作し、様々な実験を考察し、できるだけ高濃度のエタノールを製造することにした。

またろ紙からグルコースを製造し、そのグルコースを使用してのエタノール発酵を行うことを最終目標にした。

製造したエタノールの正確な濃度を測定するために様々な測定方法を試し、より正確な測定方法も研究した。

【仮説】

ヨードホルム反応により生成したヨードホルムの量はエタノール濃度に比例するのではないかと考えた。

また、生成するヨードホルムの量によって吸光度の値も変化していくのではないかと考えた。

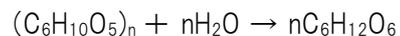
生成したヨードホルムの量を吸光度で調べると、エタノール濃度を調べることができるのではないかと考えた。

溶液の発酵環境の条件を変えることで、エタノール濃度はかわるのではないかと考えた。

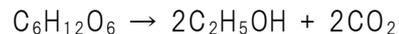
より良い発酵条件では、同じ分量でもより多くのエタノールを生成できるのではないかと考えた。

また、セルロースを分解する酵素のセルラーゼでろ紙を分解すると、グルコースが生成され、そのグルコースを基質としてエタノールを生成できるのではないかと考えた。

<ろ紙からグルコース>



<グルコースからエタノール>



【実験器具・装置】

注射器・駒込ピペット、ビーカー、三角フラスコ、ガラス棒、茶こし、試験管、マイクロピペット、紫外可視分光光度計 (SHIMADZU)、マグネチックスターラー、ウォータバス、循環型ウォータバス、アルコールチェッカー：東洋マーク製作所、屈折計、ミキサー、アルコールチェッカー：東洋マーク製作所

【実験材料】

酵母菌(ドライイースト) (0.5 g)、アルギン酸ナトリウム (0.75 g)、塩化カルシウム (0.5 g)、10%のショ糖溶液 (300ml)、純水、0.5・1.0・1.5・2.0%のエタノール溶液 (100%エタノール溶液を各濃度に純粋で薄める)、水酸化ナトリウム水溶液 (2 ml)、ヨウ素液 (2 ml)、酵母菌(ドライイースト) (0.5 g)、アルギン酸ナトリウム (0.75 g)、塩化カルシウム (0.5 g)、10%のショ糖溶液 300ml、2.0%のショ糖溶液 300ml、ろ紙 (各0.8 g)、セルラーゼ (0.5 g)、市販のガスピタン: 小林製薬 (1.0 g)

●酵母ビーズ作製

【実験方法】

- ① 100ml ビーカー内でドライイースト 0.5g を水 1.5ml に溶かす。
(今回は酵母菌の代わりとして入手が安易で安価な市販のドライイーストを使用。)
- ② もう1つの 100ml ビーカー内で昆布など褐色の海藻に含まれているアルギン酸ナトリウム 0.75 g を水 50ml に溶かす。
(アルギン酸ナトリウムは水に溶けにくいので今回は湯沸かし器のお湯を使用。)
- ③ 1と2で出来た溶液を混合し、注射器や駒込ピペットで出来た溶液を吸い上げ、1%の塩化カルシウム水溶液(1 g の塩化カルシウムに水 100ml)にゆっくりと滴下。そうすることによって、水に不溶な球体のゲルの中に酵母を閉じ込める固定化が終了。
- ④ できた酵母ビーズの表面に付着している塩化カルシウム溶液を純水で洗い流す。
- ⑤ それを10%のグルコース溶液を入れた三角フラスコにいれ栓をする。



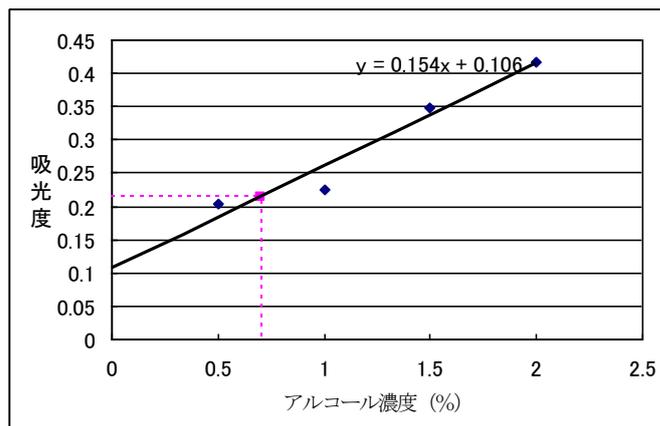
これを二日間、常温で放置する。

●生成したと思われるエタノール溶液の測定

【実験方法】

各濃度のエタノール溶液と実験1のエタノール溶液それぞれにヨウ素液、水酸化ナトリウム、の順に試薬を 2ml ずつ入れた。

試薬を入れてからの時間をタイマーで正確に測り 15分後に660nm に設定し光度計で測定し始める。(これから様々な溶液で同様の実験を行うときも常に15分後に測りだした。)



●条件によるエタノール濃度の違い

今回この実験では3つの違う条件で発酵を行った。

- 1) 200rpm で回転させながら発酵
- 2) グルコース溶液の濃度を2倍にしたものを静置して発酵
- 3) すべて通常の分量を静置で発酵
(温度はいずれも発酵に適していると思われる約 40°Cに設定)

【実験方法】

- ① 酵母ビーズは実験1と同じ要領で作る。
- ② 1)と3)は10%のショ糖溶液、2)は20%のショ糖溶液、の中に入れる。
- ③ 1)はマグネチックスターラーの上にウォーターバスを置きそこに設置し、2)3)の循環型ウォーターバスに設置し一日放置。

【測定】

- ・吸光度で測定
実験②と同じ要領・分量で測定。
- ・アルコールチェッカーで測定。
一日後、測定する溶液の栓をゆっくり取り、直ち

に液面すれすれのところで注射器を引いて 10ml 気体採取。

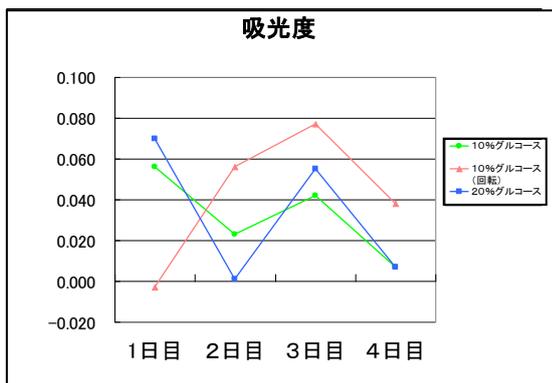
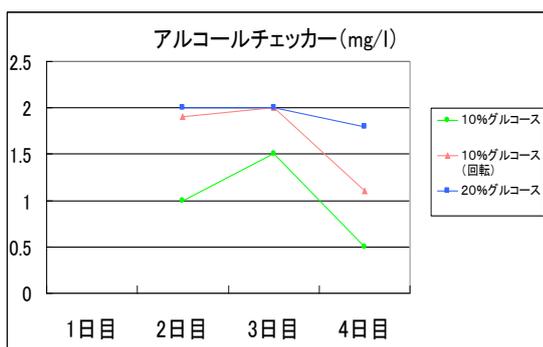
アルコールチェッカーの検出口に採取した気体を排出し測定

・屈折計で測定

スポイトで測る溶液を一滴あたり屈折計に滴下し測定。

(スポイトで溶液を吸い上げるとき沈殿物を吸わないように注意。)

三日間にわたり、この濃度を測定した。



●手作りでのグルコース溶液

【実験方法】

- ①ろ紙(各0.8 g)をミキサーで繊維状にする。
- ②三角フラスコにろ紙を入れ純水(100ml)を加えたものを2つ作り、一方にはセルラーゼ(0.5 g)、もう一方にはガスピタン(0.1 g)を加える。
- ③共に39℃に設定した循環型ウォーターバス中で一日静置した。

そして生成したアルコールの濃度をアルコールチェッカーとフェノール硫酸法による

吸光度(可視紫外分光光度計を490nmに設定して測定)で測定した。

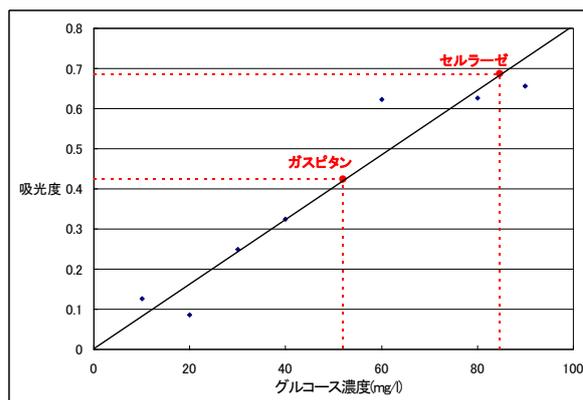
フェノール硫酸法

1. できたとと思われるグルコース溶液に濃硫酸2 mlとフェノール2 mlを加える。
2. タイマーで10分を計り経過後に、吸光度で測定する。

●セルロースからグルコース

【実験方法】

- ①実験1の酵母ビーズの手順で、ドライイーストおよびセルラーゼ、ガスピタンを加えた3種類のビーズを作る。
- ②実験4の①②の手順で溶液を2つ作り酵母ビーズをそれぞれに入れる。
- ③1つにはセルラーゼビーズ、もう一方にはガスピタンビーズを入れて、39℃の循環型ウォーターバス中で発酵させる。
- ④1日発酵させた溶液をアルコールチェッカー、屈折計、吸光度でアルコール濃度を測定する。



【実験結果】

全体を通して身近にあるものからアルコールを生成できた。

市販のドライイーストを使用し、グルコースを発酵させる基礎実験からは匂いからも分かるほどのアルコールが生成され、約0.7%のアルコールが検出できた。

基礎実験をもとにして、回転速度などを変えてより多くのエタノールが検出できる実験を行いグルコースの濃度を20%にしたものが10%のものより高濃度のエタノールが検出できた。

次にすべて身近なものからエタノールを生成することを目標にしていた私たちはグルコース溶液も自分たちで作るため、理科室にはよくあるろ紙からグルコースを生成した。ろ紙に含まれるセルロースを

分解する酵素であるセルラーゼとそのセルラーゼ入りの市販のガスピタン（腸の働きをよくする薬）を用いてろ紙をグルコースに分解した。その結果、セルラーゼ入りの方がガスピタンより多くグルコースを生成した。セルラーゼ 8.2 mg/1、ガスピタン 5.2 mg/1 であった。

それを使用し、エタノールの生成を試みたところ、微量のエタノールが検出できた。しかし、微量すぎて量を正確に測定できなかった。

【考察】

条件によるエタノール濃度を調べた実験では、グルコース濃度を 20%にしたものが最も高濃度のエタノールができた。しかし、実験に最適なグルコース濃度を調べることはできていない。

市販のセルラーゼ入りのガスピタンでも同様にろ紙を分解しグルコースを生成できることが分かった。含まれるセルラーゼがすくなく、または活性が小さいため生成するグルコース量が少なかったと思われる。

ろ紙→グルコース→エタノールと一続き

に実験したところ、微量ながらエタノールを生成することができた。ただし、高濃度のエタノールを生成するための条件までは調べることができなかった。今後は最適条件を調べるとともに、セルロースを含む他の材料からもエタノールが生成できるか調べていきたい。

また正確なエタノール濃度を測定するために、大学などで使用しているガスクロマトグラフィーによる成分分析も行いたい。

【引用文献（参考文献）】

- 酵母によるアルコール発酵作用に関する学生実験の改良
加藤徳雄, 斎藤正明
<http://www.epu.ac.jp/tosyokan/kiyou/kiyou4-1/kiyou29-33-katou.pdf#search>
- バイオリアクターでアルコール発酵
<http://www.saijyo-ah.hiroshima-c.ed.jp/gaka/seibutu/bio/bizu/index.htm>
- 麦芽による紙の糖化
白藪大和 三石嵩
<http://www.hst.titech.ac.jp/~meh/2002/Paper/Paper.htm>