

環境技術開発を基盤とした 持続可能な環境経営システムの構築に向けて 第4報

榎本恵一¹, 松元信也², 大濱 武³, 堀澤 栄⁴, 有賀 修⁵
角 克宏⁶, 両角仁夫⁷, 井上喜雄⁸, 富澤 治⁹, 那須清吾¹⁰
平野 真¹¹, 草柳俊二¹², 馬淵 泰¹³

(受領日: 2011 年 4 月 20 日)

高知工科大学 大学院工学研究科
〒 782-8502 高知県香美市土佐山田町宮ノ口 185

E-mail: ¹enomoto.keiichi@kochi-tech.ac.jp, ²matsumoto.nobuya@kochi-tech.ac.jp,
³ohama.takeshi@kochi-tech.ac.jp, ⁴horisawa.sakae@kochi-tech.ac.jp,
⁵ariga.osamu@kochi-tech.ac.jp, ⁶sumi.katsuhiro@kochi-tech.ac.jp,
⁷morozumi.yoshio@kochi-tech.ac.jp, ⁸inoue.yoshio@kochi-tech.ac.jp,
⁹tomisawa.osamu@kochi-tech.ac.jp, ¹⁰nasu.seigo@kochi-tech.ac.jp,
¹¹hirano.makoto@kochi-tech.ac.jp, ¹²kusayanagi.shunji@kochi-tech.ac.jp,
¹³mabuchi.yasushi@kochi-tech.ac.jp

要約: バイオマスを利用したエネルギー生産は、環境経営の中心となる技術である。バイオマス利用の一例として、食用作物キャッサバから澱粉を抽出した後の残渣を原料とし、無蒸煮法でのアルコール発酵を実験室スケールで行なった。その結果を通常の高温蒸煮法及び低温蒸煮法による発酵と比較したところ、最適な無蒸煮法でのアルコール発酵は、高温及び低温蒸煮法と同等またはそれより優れていることが明らかとなった。一方、淡水産の藻である *Botryococcus braunii* は炭化水素を生産する石油生産藻として知られている。この藻を用いた炭化水素生産を実用化するための課題として、耐塩性、耐熱性、耐酸性または耐アルカリ性、短鎖炭化水素の生産能力等の性質を藻に賦与することが必要と考えられた。

1. はじめに

環境経営にとって重要な技術の一つがエネルギー生産である。化石燃料を用いたエネルギー生産を代替するために、太陽光や風力、地熱などの自然エネルギーの利用に加え、バイオマスを利用したエネルギー生産が有望視されている。木質系バイオマス利用についての試みはすでに述べた⁽¹⁾。一方、サトウキビやトウモロコシ等の作物を原料とする大規模な燃料用アルコールの製造は、アメリカやブラジルで既に実用化されている。しかし、本来食糧や飼料となる作物が燃料生産に使われることや、小麦から燃料用トウモロコ

シへの転作のため、トウモロコシや小麦等の穀物価格の上昇が懸念されている。そのため、食糧と競合しないバイオマスの利用が今後の課題となっている。ここでは、この目的にかなうバイオマス利用として、熱帯地方の食用作物であるキャッサバから澱粉を抽出した後の残渣を原料とするアルコール製造について報告する。また、石油生産藻を利用した燃料生産の可能性について探る。

2. キャッサバ澱粉残渣を原料とする無蒸煮法によるアルコール発酵

2.1 はじめに

塊根に多量の澱粉を含むキャッサバは栽培が容易で、生産効率が高いために、ナイジェリア、ブラジル、タイなどの熱帯地方で大量に生産され、それらの地域の重要な食糧として消費され、一部は澱粉製造用、飼料製造用などに利用されている^(2~4)。また、近年では地球温暖化対策の一つとしてアルコールが注目されたこともあって、上記のような栽培上の利点故にキャッサバを原料とする燃料用アルコール発酵に関する研究開発が活発に行なわれている。しかし、それらの研究開発のほとんどは食糧となるキャッサバペレットや澱粉を原料としている^(5~7)。一部は非食糧性の澱粉製造工場から排出される澱粉残渣(パルプ)を原料としているが、この場合は、澱粉質を原料とするアルコール発酵の前処理法として、一般に採用されている140℃以上の高温で蒸煮する、いわゆるエネルギー多消費型の高温蒸煮法⁽⁸⁾が採用されている^(9,10)。当然のことであるが、燃料用エタノールの製造に際しては、原料の食糧との競合の回避や省エネルギー化が必須である。このような状況に鑑み、ここでは、著者らが開発、工業化した原料を加熱処理することなくそのまま糖化、発酵させる、いわゆる省エネルギー的な無蒸煮法⁽¹¹⁾でのキャッサバ澱粉製造工場から排出される澱粉残渣を原料とするアルコール発酵について検討を加えた。

2.2 実験材料及び方法

澱粉残渣は現地(インドネシア)の工場で天日乾燥されたもので、大小の塊りからなり、茶色を呈していた。水分は14.9%、全糖分はグルコースとして71.2%で、付着細菌数は1g当たり 3.8×10^6 と穀類などに較べて非常に多いものであった。なお、実験に際しては、試料をミキサーで粉碎して使用した。

- ・キャッサバ澱粉残渣:100g
- ・リゾプス起源のグルコアミラーゼ剤(GA):Xg
- ・純水:430ml
- ・酵母培養液:25ml

混合、攪拌

28℃で静置発酵

図1 基本的無蒸煮(NCS)仕込発酵法

基本的な無蒸煮仕込発酵法は図1に示した。すなわち、澱粉残渣粉碎物100gに、所定量のグルコアミラーゼ剤(HBI社製の“グルターゼ6000S”)、純水及び酵母培養液を加えて、混合、攪拌し、加熱することなくそのまま28℃で糖化、発酵させた。なお、この場合の初発モロミのpHは4.8であった。発酵中は経時的に炭酸ガス発生量を測定し、発酵後はpH、総酸、アルコール、菌数などを分析した。

2.3 結果および考察

表1はグルコアミラーゼ剤(GA)の添加量と120時間発酵後の発酵成績の関係を示したものである。

表1 グルコアミラーゼ剤添加量と発酵成績の関係

グルコアミラーゼ剤(GA)添加量(g)	熟成モロミ容量(ml)	pH	総酸(ml)	アルコール(v/v)%	総酵母数(cells/ml)	発酵歩合(%)
0.35	510	4.1	2.6	6.3	1.9×10^8	70.7
0.7	510	4.1	2.4	6.8	2.2×10^8	76.2
1.4	510	4.1	2.2	7.2	2.4×10^8	80.8

この表で、実用化にとって最も重要な指標である発酵歩合に注目してみると、当然のことながら、GA添加量が多くなるにつれて高くなっているが、それでも最も多い1.4g添加の場合で80.8%にとどまった。一般に、トウモロコシを原料とする実用規模での発酵歩合は87~88%である⁽¹¹⁾ので、実用化のためには、更に、改善する必要性がある。

そこで、改善策の一つとして、先ず、雑菌汚染防止作用に加えて、澱粉遊離作用のある亜硫酸を添加して、実験した。なお、亜硫酸源としては、酒類醸造でよく使われるメタカリ($K_2S_2O_5$)を用い、その添加量は SO_2 として150ppmとした。表2はその結果を示したものである。表2で、先ず、総酸をみてみると、いずれのGAの添加レベルでも、 SO_2 を添加した方が低い傾向にある。このことは、 SO_2 添加によって細菌の増殖発酵が抑制されたことを示している。次に、発酵歩合をみてみると、GA添加量の最も多い1.4g添加の場合では、無添加が80.8%であったのに対して、83.7%と、約3%向上している。これらのデータは、特に細菌汚染機会が多い実用規模では、 SO_2 の添加は成

表2 亜硫酸添加と発酵成績の関係

GA 添加量 (g)	亜硫酸 添加	容量 (ml)	pH	総酸 (ml)	アル コール (v/v)%	総酵母数 (cells/ml)	発酵 歩合 (%)
0.35	—	510	4.1	2.6	6.3	1.9×10^8	70.7
0.35	+	510	4.2	2.2	6.5	1.9×10^8	72.9
0.7	—	515	4.1	2.6	6.8	2.2×10^8	76.2
0.7	+	510	4.2	2.1	7.0	2.6×10^8	79.0
1.4	—	510	4.2	2.4	7.2	2.4×10^8	80.8
1.4	+	510	4.2	2.0	7.5	1.9×10^8	83.7

績の安定化と向上をもたらす可能性があることを強く示唆しているが、それでも、目標の87~88%には届かなかった。

そこで、次に、使用しているGAの至適pHが5付近であること、および本モロミのバッファアクションが弱いことを考慮して、初発モロミのpHを5.5に調整して、発酵させた。図2は、その際の炭酸ガス発生経過などを示したものである。この図で、オープンサークルはpH調整処置をしたものであるが、GAの添加レベルに関係なく、pH調整によって発酵速度が向上し、発酵歩合も、GA1.4g添加の場合、86.5%と、メタカリ添加処理のみの場合の83.7%より、約3%向上した。

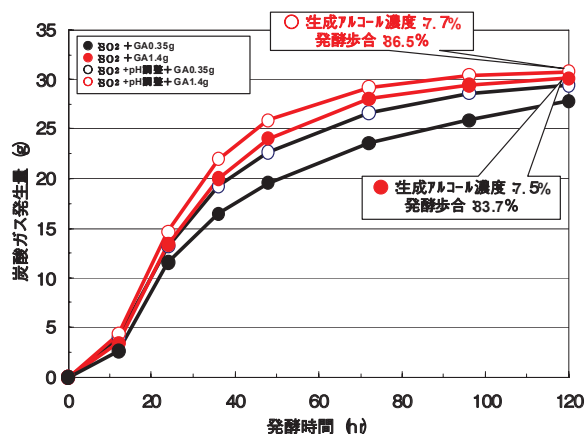


図2 初発モロミのpH調整と発酵特性の関係

ところで、グルコアミラーゼによる生澱粉の分解は α -アミラーゼによって促進されることは良く知られている⁽¹²⁾。ここで使用しているグルコアミラーゼ剤には α -アミラーゼも若干含まれているが、更に α -アミラーゼ剤(大和化成株製“クライスターゼT10S”)2mlを追加添加して発酵させた。図3はその際の炭酸ガス発生経過を示した

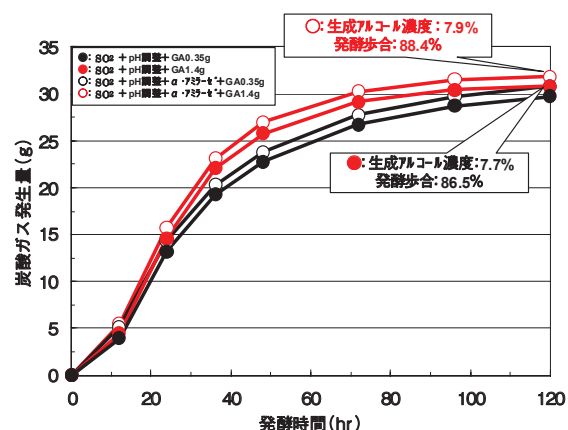


図3 α -アミラーゼ添加と発酵特性の関係

ものであるが、 α -アミラーゼを併用したオープンサークルの場合は、GAの添加レベルに関係なく、発酵速度が向上し、発酵歩合も、GA1.4gの場合、非併用の場合の86.5%より、更に約2%向上し、88.4%という良好な成績が得られた。このことは、仕込条件を最適化すれば、澱粉残渣を原料とする無蒸煮法によるアルコール発酵も実用可能であることを示唆している。

そこで、その可能性を検証する一環として、この無蒸煮法と省エネルギー的仕込法の一つである低温蒸煮法⁽¹³⁾及び高温蒸煮法の比較発酵試験を実施した。図4は、その際の仕込発酵法の概要を示したものである。すなわち、pHを5.5に調整、 α -アミラーゼ剤を添加後、無蒸煮法(NCS)はそのまま、低温蒸煮法(LTC)は80℃で10分間、高温蒸煮法(HTC)は120℃で10分間、それぞれ加熱処理し、冷却後、所定量のグルコアミラーゼ剤及び酵母培養液を加えて、28℃で静置発酵させた。表3は、発酵120時間後の発酵成績を示したものである。表3で、発酵歩合に注目すると、NCSの場合、最高88.3%と、LTCの87.6%、HTCの

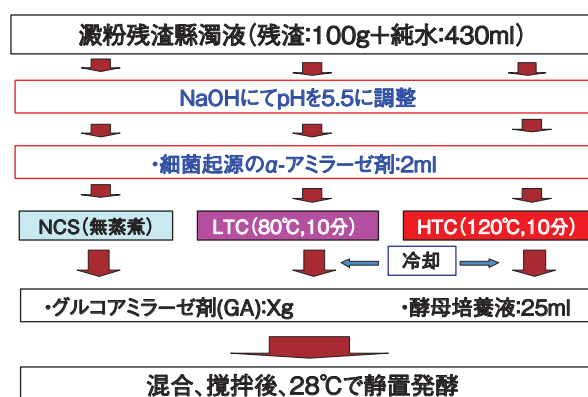


図4 無蒸煮(NCS)、低温蒸煮(LTC)及び高温蒸煮(HTC)の仕込発酵法

87.0% と同等以上の良好な成績であり、NCS 法の実用化の可能性が確認された。

表3 NCS 法、LTC 法および HTC 法の発酵成績の比較

GA 添加量 (g)	蒸煮法	容量 (ml)	pH	総酸 (ml)	アルコール (v/v)%	総酵母数 (cells/ml)	発酵歩合 (%)
1.4	NCS	510	4.2	2.9	7.9	2.3×10^8	88.3
0.35		515	4.2	2.8	7.6	1.8×10^8	85.4
0.1	LTC	510	4.2	2.6	7.8	1.9×10^8	87.6
0.05		510	4.2	2.5	7.6	1.8×10^8	85.4
0.1	HTC	515	4.2	2.5	7.7	1.6×10^8	87.0
0.05		515	4.2	2.4	7.5	1.5×10^8	85.0

キャッサバを原料とする無蒸煮アルコール発酵が可能であることは上田ら⁽⁶⁾、吉栖ら⁽⁷⁾によって報じられているが、彼らは、それぞれ澱粉、チップ・ペレットを原料にしており、それらは、いずれも地域の重要な食糧である。食糧供給に余裕のある米国ではトウモロコシから大々的に燃料用アルコールが生産されているが、それでも世界中から非難の声が上がっている。ましてや食糧供給に問題を抱えているアフリカや東南アジアの諸地域で食糧と競合する澱粉やチップ・ペレットを原料にするのは問題が大きい。それに対して、本研究で取り扱った澱粉残渣は、澱粉製造工場の廃棄物の一つであり、食糧と競合しないという点で、燃料用アルコールの原料として問題はない。しかし、実験材料及び方法の項で述べたように、澱粉残渣はその工程特性から発酵原料として最も避けたい雑菌汚染が極めて激しいという欠陥がある。しかし、本研究で殺菌工程の無い無蒸煮法でもその欠陥を克服し得る可能性があるということを実証したということは、実用化の可能性を示すものであり意義がある。

一方、無蒸煮法 (NCS) の場合、低温蒸煮法 (LTC) や高温蒸煮法 (HTC) と同等の成績を得るためには、表3にも示されているように、高価なグルコアミラーゼ剤を比較的多量に必要とする。しかし、生澱粉分解性のグルコアミラーゼを分泌する酵母は、既に遺伝子操作によって育種され、その有用性も明らかになっている^(14,15)。従って、無蒸煮法で澱粉残渣から燃料用のアルコールを実用規模で製造する際は、飲料用のアルコールを製造する場合と違って、バイオハザードの問題をクリ

アーすれば、遺伝子操作で育種された菌株を使用することができるので、その問題は解決されると考えられる。

以上述べてきたように、基本的には、澱粉製造工場から排出される澱粉残渣から省エネルギー的なアルコール発酵法である無蒸煮法で燃料用のアルコールを製造できる可能性が示された。ただ、その実用化に際しては、工場の立地する設備的、製造技術的、及び法的規制などの諸要因との関連を精査すると共に、前述した今一つの省エネルギー的仕込発酵法である低温蒸煮法とも十分に比較検討した上で、そのいずれを採用するか決定すべきである。

3. 石油生産藻 *Botryococcus braunii* の特徴と実用化に必要な事項

Botryococcus braunii は緑藻、トレボウキシア綱に分類される淡水産の藻である。15 - 40 くらいの細胞が寄り集まって群体を形成するが細胞間に機能分化は認められない。その緑藻は、乾燥重量の約 40% ほどの炭化水素を細胞内に蓄積し、その一部はゴルジ体を介した輸送経路により細胞周辺に分泌する⁽¹⁶⁾。分泌された炭化水素はヘキサンなどの有機溶媒で回収が可能であり、しかも残った藻体は培地に戻せば正常に生育することが知られている (図5、図6)。そのため、石油生産

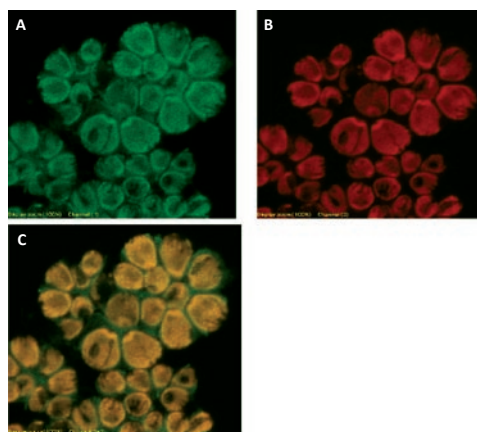


図5 共焦点レーザー顕微鏡による *Botryococcus braunii* の観察像

- A ナイルレッドで染色後 550 nm 以上の自家蛍光を観察した像。炭化水素の細胞外マトリクスと葉緑体自家蛍光が検出された。
- B 610 nm 以上の自家蛍光象。葉緑体のクロロフィルのみが検出された。黒い穴状に抜けて見えるところは核。
- C A と B の像を重ねた像。細胞周囲の淡い黄緑色部分が細胞外に分泌された炭化水素。

藻として注目されている⁽¹⁷⁾。

興味深いことに、*Botryococcus braunii* は、株によって蓄積される炭化水素が異なる事が知られている^(18,19)。Berkeley 株 (= Showa 株) は botryococcen (C30 から C34 の炭化水素) を主として蓄積する。軽油成分の主成分が C16 の炭化水素であり、ガソリンの主成分が C8 の炭化水素であることを考えると、botryococcen はそれらよりもまだ、2 倍から 4 倍の長さの炭素骨格を持つ炭化水素であることが分かる。生活環は明らかにされていないが、2n の核相を持つと推定されている⁽²⁰⁾。

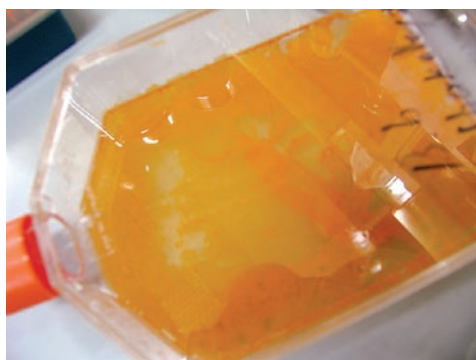


図6 過増殖した後の死滅した *Botryococcus braunii*
黄色く水面に浮かんでいるのが死滅した藻体。

現状では野生型の *Botryococcus braunii* を大量培養して、その炭化水素を回収した場合の精密な生産コストを見積もれる段階にないが今後、実用化に向けて以下のような点を解決できれば大きな前進になると期待される。

耐塩性：*Botryococcus braunii* は淡水産であり、海水中で生育できない。無尽蔵にある海水を培地のベースとして使用できれば培養コストを引き下げることができる。

短鎖炭化水素の生産：botryococcen の炭素鎖は軽油の代替物として使用するには大き過ぎる。炭化水素合成系の改変により C16 程度の炭化水素を主たる成分とできれば、利便性が増す。

耐熱性：野外に大型のバイオリアクターを設置し、太陽光を利用して *Botryococcus braunii* を培養しようとする場合、あるいは野外に浅い大型のプールを設置して培養しようとする場合、夏期の日中の温度は本藻の最適増殖温度である 25 度を大きく超えると思われる。そのため、安価な培養には耐熱性の賦与が望まれる。

排他性：野外に浅い大型のプールを設置して培養しようとする場合、細菌やカビなどの増殖が考え

られる。これらを防ぐには、本藻がアルカリ性や酸性の培養液でも生育できるような性質が賦与されていれば、簡便にそれを実現できる。

上記のうち、耐塩性に関しては既に陸上植物で基礎研究が進んでおり、藻類でも応用できる段階にある。ところが、*Botryococcus braunii* では未だ外来遺伝子の導入と安定は発現法が確立されていない。そのため、これらの性質を遺伝子工学的に賦与することが出来ていない。ゲノム配列の決定、EST 情報の整備とともに、効率の良い遺伝子導入法の確立は *Botryococcus braunii* を利用した石油代炭化水素の実用化に必須な要素であろう。

謝辞

キャッサバ澱粉残渣のアルコール発酵に関する研究は、大学院生及び卒業研究生との共同研究に基づくものである。協力頂いた学生諸氏に感謝する。

Botryococcus braunii による炭化水素生産の研究は CREST, JST(大濱)の一環として行なった。

文献

- (1) 榎本他、“環境技術開発を基盤とした持続可能な環境経営システムの構築に向けて 第3報”、高知工科大学紀要、Vol.7、No.1、pp.125-131、2010年7月。
- (2) 澱粉科学ハンドブック、二国二郎監修、朝倉書店、pp.398-403、1977年。
- (3) S. Denworalak, “Cassava in Thailand”, Proceedings of upgrading of cassava/cassava waste by appropriate biotechnologies Thailand, pp.24-26, November 1987.
- (4) 森泉由恵、Piyawan Suksri、本藤祐樹、和気洋子、“タイにおけるバイオエタノール導入への取り組み (I)、(II)”、学術フロンティア推進事業、「デジタルアジア構築と運用による地域戦略構想のための融合研究」、慶応義塾大学 デジタルアジア地域戦略構想研究センター、2007年3月。
- (5) P. Atthasampunna and A. Eur-aree, “Utilization of cassava for ethanol production” Proceedings of upgrading of cassava/cassava waste by appropriate biotechnologies Thailand, pp.27-32, November 1987.
- (6) S. Ueda, C. T. Zenin, D. A. Monteiro and Y. K. Park, “Production of ethanol from raw cassava

- starch by a nonconventional fermentation method”, Biotech. Bioeng., Vol. 23, pp.291-299, 1981.
- (7) 吉栖 肇、山本浩嗣、村上哲男、“熱帯産キャッサバの無蒸煮仕込法によるエタノール発酵に関する研究”、近畿大学農総研報、Vol. 1、pp.45-48、1993 年。
 - (8) E. D. Ynger, H. F. Willkie and H. C. Blankmeyer, “The development and design of a continuous cooking and mashing system for cereal grains”, Trans. Am. Inst. Chem. Eng., Vol.40, pp.421-443, 1944.
 - (9) A. Kosugi, A. Kondo, M. Ueda, P. Vaithanomsat, W. Thanapase and Y. Mori, “Ethanol production from cassava waste using a surface-engineered yeast strain displaying glucoamylase”, 第 3 回バイオマスアジアワークショップ発表要旨集、pp.112、2006 年。
 - (10) 岩崎 博、小島紀徳、松村幸彦、山本博己、山地憲治、山田興一、“キャッサバパルプ原料のバイオエタノールプロセスの合理化”、J. Jpn. Inst. Energy, Vol.86, pp.470-474, 2007.
 - (11) N. Matsumoto, O. Fukushi, M. Miyanaga, K. Kakihara, E. Nakajima and H. Yoshizumi, “Industrialization of a noncooking system for alcoholic fermentation from grains”, Agric. Biol. Chem., Vol.46, pp.1549-1558, 1982.
 - (12) 上田誠之助、“各種黒麹菌による生澱粉の糖化”、農化、Vol.31、pp.902-904、1957 年。
 - (13) 松元信也、福士 収、福田 修、井上 繁、吉栖 肇、“工業的規模における低温蒸煮法の発酵成績について”、農化、Vol.59、pp.271-277、1985 年。
 - (14) T. Ashikari, S. Kunisaki, N. Matsumoto, T. Amachi and H. Yoshizumi, “Direct fermentation of raw corn to ethanol by yeast transformants containing a modified *Rhizopus* glucoamylase gene”, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.32, pp.129-133, 1989.
 - (15) 吉栖 肇、村上哲男、芦刈俊彦、“*Rhizopus oryzae* のグルコアミラーゼ遺伝子導入酵母による穀類モロミの無蒸煮エタノール醗酵”、近畿大農総研報、Vol.1、pp.49-54、1993 年。
 - (16) T. Noguchi, F. Kakami, “Transformation of trans-Golgi network during the cell cycle in a green alga, *Botryococcus braunii*” J. Plant Res. Vol.112, 175-186, 1999.
 - (17) 岡田茂、“石油を作る微細藻”、化学と生物 Vol.36、pp.173-181、1998 年。
 - (18) M. Grung, P. Metzger, S. L-jensen, “Primary and secondary carotenoids in two races of the green alga *Botryococcus braunii*”, Biochem. System. Eco. Vol.17, pp.263-269, 1989.
 - (19) P. Metzger, C. Largeau, “*Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids” App. Micr. Biotech. Vol.66, pp.486-496, 2004.
 - (20) T. E. Weiss, K. Fujisawa, K. Sumimoto, S. Okada, J. Spencer, J. Chappell, T. Devarenne, “Phylogenetic placement, genome size, and GC-content of the liquid hydrocarbon producing green microalga *Botryococcus braunii* var. Berkeley (Showa) (CHLOROPHYTA)”, J. Phycol., Vol.46, pp.534-540, 2010.

Construction of a sustainable environmental management system based on the development of environmental technologies

The forth report

**Keiichi Enomoto¹, Nobuya Matsumoto², Takeshi Ohama³, Sakae Horisawa⁴,
Osamu Ariga⁵, Katsuhiro Sumi⁶, Yoshio Morozumi⁷, Yoshio Inoue⁸,
Osamu Tomisawa⁹, Seigo Nasu¹⁰, Makoto Hirano¹¹,
Shunji Kusayanagi¹², Yasushi Mabuchi¹³**

(Received : April 20th, 2011)

Graduate School of Engineering
Kochi University of Technology
Tosayamada, Kami-city, Kochi 782-8502 JAPAN

E-mail: ¹enomoto.keiichi@kochi-tech.ac.jp, ²matsumoto.nobuya@kochi-tech.ac.jp,
³ohama.takeshi@kochi-tech.ac.jp, ⁴horisawa.sakae@kochi-tech.ac.jp,
⁵ariga.osamu@kochi-tech.ac.jp, ⁶sumi.katsuhiro@kochi-tech.ac.jp,
⁷morozumi.yoshio@kochi-tech.ac.jp, ⁸inoue.yoshio@kochi-tech.ac.jp,
⁹tomisawa.osamu@kochi-tech.ac.jp, ¹⁰nasu.seigo@kochi-tech.ac.jp,
¹¹hirano.makoto@kochi-tech.ac.jp, ¹²kusayanagi.shunji@kochi-tech.ac.jp,
¹³mabuchi.yasushi@kochi-tech.ac.jp

Abstract: The production of energy from biomass is a pivotal technology for the management of environment. As an example of biomass utilization, alcoholic fermentation from cassava solid waste with a noncooking system was carried out on a laboratory scale. The results were compared with those with a conventional high temperature cooking system and a low-temperature cooking one and it was found that the alcoholic fermentation with an optimum noncooking system was equal or superior to the high- and low- temperature cooking systems. On the other hand, *Botryococcus braunii*, an alga from fresh water, is known to produce hydrocarbon oil. For the industrial production and practical use of the hydrocarbon, it is necessary to endow the alga with the tolerance to high salinity, high temperature, and acidic or alkaline condition, in addition to the ability to produce short chain hydrocarbons.