

令和 2 年度 修士論文

スエヒロタケによるセルロース系バイオマスからの

エタノール生産における糖化の改善

Improvement of saccharification

in ethanol production from cellulosic biomass

by *Schizophyllum commune*

高知工科大学大学院

工学研究科 基盤工学専攻

生命科学コース

1235042 山中優花

指導教員 堀沢 栄 教授

目次

1.概要

2.緒言

3.実験方法

- 3-1 ホテイアオイとダンチクの主要成分の分析
- 3-2 バイオマス 1 g を原料とした発酵試験
- 3-3 バイオマス 2 g を原料とした発酵試験
- 3-4 糖化酵素による糖化促進発酵試験
- 3-5 濃度別の糖化酵素剤によるダンチク 1 g の発酵試験
- 3-6 濃度別の糖化酵素剤によるダンチク 4 g の発酵試験

4.結果

- 4-1 ホテイアオイとダンチクの主要成分の分析
- 4-2 バイオマス 1 g を原料とした発酵試験
- 4-3 バイオマス 2 g を原料とした発酵試験
- 4-4 糖化酵素による糖化促進発酵試験
- 4-5 濃度別の糖化酵素剤によるダンチク 1 g の発酵試験
- 4-6 濃度別の糖化酵素剤によるダンチク 4 g の発酵試験

5.考察

6.謝辞

7.参考文献

8.付録

1.概要

近年、地球温暖化防止や二酸化炭素削減などの観点からカーボンニュートラルであるバイオエタノールの生産が活発に行われており、その中でも食料と競合しないセルロース系バイオマスからのエタノール生産が注目を集めている。現在セルロース系バイオマスを用いたエタノール生産では、脱リグニンを含む前処理では主に物理・化学的処理が行われているが、それらはコストが高いことや発酵阻害物質の生成などが問題となっている。そこで、酵素や微生物により脱リグニンや糖化を行う生物的処理法も研究されている。その一つに木材腐朽菌を用いるという方法がある。木材腐朽菌は、植物細胞壁の主成分であるリグニン、セルロース、ヘミセルロースを分解することができるので、脱リグニン、糖化、発酵の全ての工程に関与できると考えられ、全てを一貫して行うことが可能であり、生産効率の向上やコストの削減が期待できる。

本研究では増殖速度の大きいダンチク (*Arundo donax*) を原料とし、発酵性の高い木材腐朽菌株であるスエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) NBRC 4928 による発酵試験を行った。その際、セルラーゼを加えた発酵試験も行い、セルラーゼの濃度を変えることでバイオマスからのエタノール生産における糖化の改善の影響を調べた。セルラーゼはオノヅカ 3S (ヤクルト薬品, 東京) を用いた。

ダンチクのみ、ダンチクと 0.2%、0.5%、1.0%、2.0%の濃度のオノヅカ 3S をそれぞれフラスコに加えて発酵試験を行った結果、ダンチクのみではほとんどエタノールは生産されなかったが、オノヅカ 3S を加えた場合に生産量は増加した。オノヅカ 3S を加えた発酵試験におけるダンチク由来のエタノール生産量は、オノヅカ 3S の濃度が 0.2%の時に 0.9 g/L、0.5%、1.0%の時に 1.3 g/L、2.0%の時に 1.2 g/L となった。また、ダンチクを 4 g に変更して同様の試験を行った結果、ダンチク 4 g のみの場合には 1.6 g/L だったエタノール生産量は、オノヅカ 3S の濃度が 0.2%の時に 4.0 g/L、1.0%の時に 4.7 g/L、2.0%の時に 5.0 g/L に増加した。これらの結果から、ダンチクにおいては、セルラーゼによる糖化の改善はエタノール生産量の増加につながるが、閾値が存在することがわかった。従って、さらに糖化改良法の開発が必要である。

2.緒言

近年地球温暖化が大きな問題となり、二酸化炭素の削減が求められている。そこで、カーボンニュートラルであるバイオエタノールが液体燃料として注目されている。バイオエタノールを使用する際に排出される二酸化炭素は、原料となるバイオマスが大気中の二酸化炭素を固定したものであり、長期的に見れば大気中の二酸化炭素の濃度を増加させることはないとされている。現在バイオエタノールの原料にはトウモロコシやサトウキビが使用されているが、それらは食料や家畜の飼料でもあるため、燃料として使用することで物価の高騰を招くことが懸念されている。また、トウモロコシ、サトウキビ、セルロース系バイオマスを原料とした場合のバイオエタノールによる温室効果ガスの削減率を比較すると、セルロース系バイオマスが最も大きい効果を示すという報告もされている^{1),2)}。これらのことから、食料と競合せず、二酸化炭素の削減効果が大きいセルロース系バイオマスを用いたエタノール生産に期待が寄せられている。しかし、トウモロコシやサトウキビなどのデンプン系、糖質系の原料に比べて、セルロース系原料からのエタノール生産は工程が多く、エネルギー投資量の大きさや設備の高コストが問題となっている。また、その前処理では主に物理・化学的処理が行われており、それらは環境への負荷の大きさや、発酵阻害物質の生成なども問題となっている。そこで、脱リグニンや糖化を酵素や微生物によって行う生物的处理法も検討されているが、処理時間の長さ、酵素の高コストなどが課題である。木材腐朽菌は、植物細胞壁の主成分であるリグニン、セルロース、ヘミセルロースを分解することができるので、脱リグニン、糖化、発酵の全ての工程に関与できると考えられ、工程を一貫して行うことが可能である。

本研究では木材腐朽菌を用いてセルロース系バイオマスからエタノールを生産することを最終の目的として、有用なセルロース系バイオマスの検討、エタノール生産量を増加する条件の検討、エタノール生産における糖化改善の影響の調査を行った。当研究室ではこれまでに、優れたエタノール発酵能をもつスエヒロタケ NBRC4928 を見出しており^{3,4)}、スエヒロタケ NBRC4928 は植物細胞壁に多く含まれているセルロース、ヘミセルロースの主な構成糖であるグルコースやキシロースをはじめとした様々な単糖からのエタノール生産が可能である^{5,6)}。また、スエヒロタケを用いてセルロース系バイオマスのエタノール変換を試みた結果、スギ材などリグニンが強固なハードバイオマスよりも、イナワラなど比較的リグニン含有量の少ないソフトバイオマスを原料として用いた方が、エタノール生産量が大きいということがわかっている^{7,8)}。そこで本研究では発酵試験の供試菌にスエヒロタケ NBRC4928 を、原材料にソフトバイオマスであるホテイアオイとダンチクを用いた。ホテイアオイは水面に浮かんで生育する水草で比較的温暖な多くの国に生息しており、非常に強い繁殖力を持っている。また、その強い繁殖力のために水面を覆い尽くし、水上輸送の障害、漁業に対する影響などの問題を引き起こす⁹⁾。ダンチクは耐塩性、耐湿性を持っており、様々な土壌環境に適応できると考えられている¹⁰⁾。また高い光合成能力を持っているため

繁殖力が高く¹¹⁾、火に強いという特性も持ち、駆除が難しいことから侵入先における生態系の破壊が危惧されている。両者は国際自然保護連合の種の保全委員会が定めた、生態系や人間活動への影響が大きい外来種リストである世界の侵略的外来種ワースト 100¹²⁾にも指定されており、これらをバイオエタノールの原料とすることで処理、利用法として提案できるのではないかと考えた。

3.実験方法

3-1 ホテイアオイとダンチクの主要成分の分析

ホテイアオイは2020年6月～9月の間に高知県高知市の住吉池(33°31'27.7"N 133°35'29.4"E)で採取した。採取後は室温で3日間乾燥したのち60°Cで48時間加熱してさらに乾燥した。ダンチクは2019年10月～2020年8月に高知県香南市夜須町付近(33°31'12.8"N 133°45'36.9"E)で採取した。採取後は、ホテイアオイと同様に乾燥した。

カッピングミルにより約5 mm以下に粉砕したホテイアオイとダンチクを用いて、有機溶媒可溶成分、ホロセルロース、リグニンの3つの成分の分析を行った。

①有機溶媒可溶成分

円筒ろ紙の絶乾重量を量り、ホテイアオイを円筒ろ紙の7割ほど入れた。それをソックスレー抽出器に入れ、エタノール(50 ml)とベンゼン(100 ml)の混合溶剤(約150 ml)を加えて、円筒ろ紙浸漬部分の溶媒が透明になるまで80°Cで沸騰還流し、有機溶媒可溶成分を抽出した。抽出終了後、あらかじめ絶乾重量を測定した200 mlフラスコに溶液を移し、ドラフト内で静置し溶媒を蒸発させたのち、約80°Cの乾燥器中で溶媒を留去し乾燥した。デシケーター内で放冷したのちに重量を測定し、増加した分を有機溶媒可溶分量とした。

②ホロセルロース

①で得た脱脂試料を約1 gを精秤し、300 mlのフラスコに入れ、蒸留水150 ml、亜塩素酸ナトリウム1.0 g、酢酸0.2 ml加え、80°Cの湯浴で1時間加熱した。1時間後、さらに亜塩素酸ナトリウム1.0 g、酢酸0.2 mlを加え、1時間加熱した。これをさらに2回繰り返したのち、あらかじめ絶乾重量を測定したガラスフィルターを用いて吸引ろ過を行った。フィルターを約80°Cの乾燥器で乾燥し、増加した分をホロセルロース量とした。

③リグニン

①で得た脱脂試料を約0.3gを精秤し、50 mlのバイアルビンに入れ、氷上で72%硫酸3 mlを1 mlずつ分けて加えたのち、120rpmで振盪しながら30°Cで2時間30分インキュベーションした。インキュベーション終了後、110 mlの蒸留水を加えながらバイアルビンの内容物を200 mlフラスコへ移し、アルミホイルでフタをしてオートクレーブで120°C、30分処理した。室温まで冷却したのち、あらかじめ絶乾重量を測定したガラスフィルターを用いて吸引ろ過を行った。その際ろ液を回収し、容積を測定した。フィルターを約80°Cの乾燥器で乾燥し、増加した分を酸不溶性リグニン量とした。回収したろ液を蒸

留水で 10 倍希釈し、210 nm の波長で吸光度測定を行った。次式により求めたものを酸可溶性リグニン量とし、酸不溶性リグニン量と合わせたものをリグニン量とした。このときのリグニンの吸光係数を 110 (L/g・cm)とした。

$$\text{酸可溶性リグニン量(\%)} = \frac{\text{希釈率} \times \text{ろ液量(l)} \times \text{試料溶液の吸光度}}{\text{リグニンの吸光係数} \times \text{試料重量}}$$

3-2 バイオマス 1 g を原料とした発酵試験

ホテイアオイ 1 g 又はダンチク 1 g を原料として、スエヒロタケ(*Schizophyllum commune*) NBRC4928 による発酵試験を行った。

200 ml のフラスコにホテイアオイ又はダンチク 1 g と表 1 の組成で作成した液体培地を 60 ml 加え、発酵栓のついたシリコン栓でフタをし、オートクレーブで 121℃、20 分の処理を行った。室温まで冷却したのちに発酵栓のトラップに無菌水 7 ml を注入し、供試菌として PDA 培地で前培養しておいたスエヒロタケ(*Schizophyllum commune*) NBRC4928 を直径 1.2 cm のコルクボーラーで打ち抜いた菌糸片 4 片を投入した。繰り返し数は 3 である。培養条件は窒素ガスでパージし、準嫌気条件とした。実験装置の外観は図 1 に示している。

これらを 30℃のインキュベーターにおいて 90rpm で振盪し、回転培養を行った。振盪機にはタイテック株式会社の中型振盪機、ダブルシェーカー NR-30 を用いた。2 日おきに培養液を採取し、HPLC でエタノール量を測定した。

HPLC は株式会社日立製作所製の高速液体クロマトグラフィーD-7000 シリーズを用いて、検出器に示唆屈折率検出機(L-7490, 日立ハイテク, 東京),カラムは Shodex SUGAR KS-802 8.0 mm×300 mm (昭和電工, 東京)を用いた。分析時の移動相は脱気水で、カラム温度は 40℃、流速は 1.0 ml/min であった。



図 1.実験装置

表 1.液体培地の組成

試料	濃度(w/v%)
Yeast extract	1%
KH ₂ PO ₄	1%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%

3-3 バイオマス 2 g を原料とした発酵試験

ホテイアオイ 2 g 又はダンチク 2 g を原料として、スエヒロタケ(*Schizophyllum commune*) NBRC4928 による発酵試験を行った。ホテイアオイはかさ高で、2g の粉体に対し 60 ml の液体培地はほとんど空隙に吸い取られるため上清部がなくなり、回転培養させることができなかつたため、フラスコのサイズと液体培地の量を変更している。

500 ml のフラスコにホテイアオイ又はダンチク 2 g と表 1 の組成で作成した液体培地を 150 ml 加え、発酵栓のついたシリコン栓でフタをし、オートクレーブで 121°C、20 分の処理を行った。室温まで冷却したのちに発酵栓のトラップに無菌水 7 ml を注入し、供試菌として直径 1.2 cm のコルクボーラーで打ち抜いた菌糸片 4 片を投入した。培養条件は窒素ガスでパージし、準嫌気条件とした。実験装置の外観は図 1 に示している。

これらを 30°C のインキュベーターにおいて 90rpm で振盪し、回転培養を行った。2 日おきに培養液を採取し、HPLC でエタノール量を測定した。その際のカラム温度は 40°C、流速は 1.0 ml/min であった。

3-4 糖化酵素による糖化促進発酵試験

3-2 の 1 g のバイオマス発酵試験の条件に糖化を担う酵素であるセルラーゼを加えて、発酵試験を行った。糖化酵素剤にはセルラーゼオノヅカ 3S (ヤクルト薬品, 東京) を用いた。

液体培地をオートクレーブ滅菌し、そこにろ過滅菌した酵素剤液を加えることによって、酵素入り培養液を調製した。オートクレーブで滅菌する液体培地の調製では、表 1 の組成において、後にセルラーゼ水溶液を加える分の蒸留水の量を減らして作成した。200 ml のフラスコにホテイアオイ又はダンチクを 1 g と液体培地を 54 ml 加え、発酵栓のついたシリコン栓でフタをし、オートクレーブで 121°C、20 分の処理を行った。室温まで冷却したのちに発酵栓のトラップに無菌水 7 ml を注入した。蒸留水にセルラーゼオノヅカ 3S を濃度 10% で溶解し、5°C で 1 晩放置したものを 0.45 µm のメンブレンフィルターを用いてろ過滅菌した。液体培地 54ml の入ったフラスコに、10% セルラーゼ水溶液を 6 ml 加えた (終濃度は 1%)。そこへ供試菌として直径 1.2 cm のコルクボーラーで打ち抜いた菌糸片 4 片を投入した。窒素ガスでパージし、準嫌気条件とした。実験装置の外観は図 1 に示している。

これらを 30°C のインキュベーターにおいて 90rpm で回転培養を行った。2 日おきに培養液を採取し、HPLC でエタノール量を測定した。その際のカラム温度は 40°C、流速は 1.0 ml/min であった。

3-5 濃度別の糖化酵素剤によるダンチク 1 g の発酵試験

3-4 の糖化酵素による糖化促進発酵試験の酵素剤の終濃度を 0.2%、0.5%、2.0% に調整し、発酵試験を行った。原料はダンチク 1 g である。

3-4 と同様に、後にセルラーゼ水溶液を加える分の蒸留水の量を減らし表 1 の組成で液体培地を作成した。200 ml のフラスコにダンチク 1 g と液体培地を 54 ml 加え、発酵栓のついたシリコン栓でフタをし、オートクレーブで 121℃、20 分の処理を行った。室温まで冷却したのちに発酵栓のトラップに無菌水 7 ml を注入した。酵素剤の濃度を 2%、5%、20% に調整した水溶液を 5℃ で 1 晩放置したものを、0.45 μm のメンブレンフィルターを用いてろ過滅菌した。液体培地 54ml の入ったフラスコに、各濃度のセルラーゼ水溶液を 6 ml 加え、終濃度を 0.2%、0.5%、2.0% とした。そこへ供試菌として直径 1.2 cm のコルクボーラーで打ち抜いた菌糸片 4 片を投入した。培養条件は窒素ガスでパージし、準嫌気条件とした。実験装置の外観は図 1 に示している。

これらを 30℃ のインキュベーターにおいて 90rpm で回転培養を行った。2 日おきに培養液を採取し、HPLC でエタノール量を測定した。その際のカラム温度は 50℃、流速は 1.0 ml/min であった。

3-6 濃度別の糖化酵素剤による 4 g のダンチク発酵試験

3-5 の濃度別の糖化酵素剤による糖化促進発酵試験の原料をダンチク 4 g に変更して、発酵試験を行った。酵素剤の終濃度は 0.2%、1.0%、2.0% に調整した。また、酵素剤によるエタノール生産量への影響を確認するために、酵素剤を入れずにダンチクと供試菌のみでの発酵試験も 3-2 と同様の手順で行った。

3-4 と同様に、後にセルラーゼ水溶液を加える分の蒸留水の量を減らし表 1 の組成で液体培地を作成した。200 ml のフラスコにダンチク 4 g と液体培地を 54 ml 加え、発酵栓のついたシリコン栓でフタをし、オートクレーブで 121℃、20 分の処理を行った。室温まで冷却したのちに発酵栓のトラップに無菌水 7 ml を注入した。酵素剤の濃度を 2%、5%、20% に調整した水溶液を 5℃ で 1 晩放置したものを、0.45 μm のメンブレンフィルターを用いてろ過滅菌した。フラスコに、各濃度のセルラーゼ水溶液を 6 ml 加え、終濃度を 0.2%、0.5%、2.0% とした。そこへ供試菌として直径 1.2 cm のコルクボーラーで打ち抜いた菌糸片 4 片を投入した。培養条件は窒素ガスでパージし、準嫌気条件とした。実験装置の外観は図 1 に示している。

これらを 30℃ のインキュベーターにおいて 90rpm で回転培養を行った。2 日おきに培養液を採取し、HPLC でエタノール量を測定した。その際のカラム温度は 50℃、流速は 1.0 ml/min であった。

4.結果

4-1 ホテアオイとダンチクの主要成分の分析

主要分析の結果、ホテアオイとダンチクの有機溶媒可溶分、ホロセルロース、リグニンの含有率は表 2 のようになった。比較対象にスギ (*Cryptomeria japonica*)の文献値⁽¹³⁾を示している。

表 2.ホテアオイとダンチクの主要成分

	ホテアオイ	ダンチク	スギ
有機溶媒可溶分(%)	5.7	8.1	3.5
ホロセルロース(%)	55.5	51.5	61.8
リグニン(%)	13.8	22.5	33.8

リグニン含有率はホテアオイで 13.8%、ダンチクで 22.5%であり、ハードバイオマスであるスギの 33.8%と比較すると低い値となった。ホテアオイ、ダンチク共にハードバイオマスに比べてリグニンが少なく、エタノール生産の原料に適していると考えた。

4-2 以降のバイオマスからのエタノール発酵におけるエタノール生産効率を評価する際には、このホロセルロースの値を元に理論収量を計算する。

4-2 バイオマス 1 g を原料とした発酵試験

スエヒロタケ NBRC4928 を供試菌とし、ホテイアオイ 1 g 又はダンチク 1 g を原料としたエタノール発酵試験の結果は図 2 のようになった。

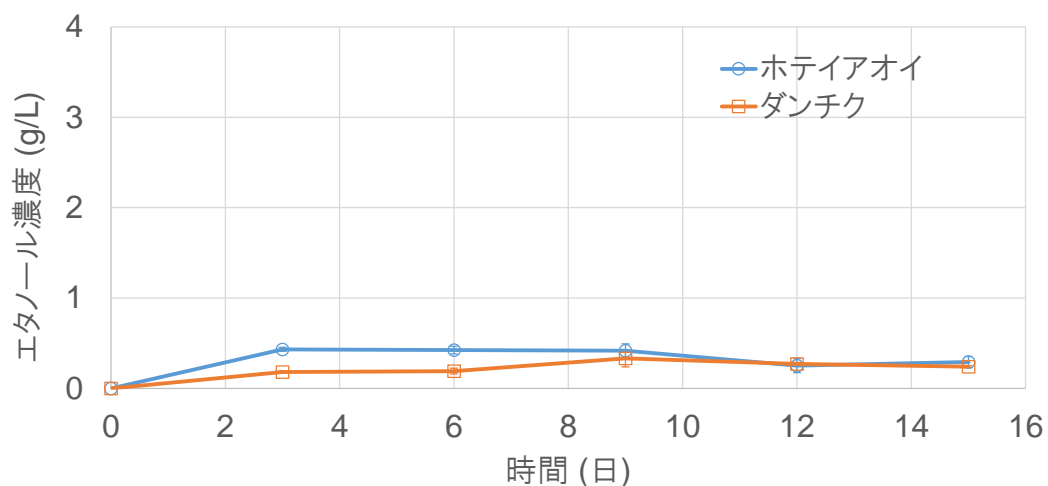


図 2. 1 g のバイオマス発酵試験におけるエタノールの経時変化

エタノール濃度の最高値は、ホテイアオイが 3 日目に 0.43 g/L、ダンチクが 9 日目に 0.33 g/L であった。この値は HPLC の検出限界付近であると考えられるため、正確な値とは言い難い。しかし、ホテイアオイ、ダンチクを原料とした場合に得られるエタノールの理論収量は両者ともに 4.0g/L 以上であるのに対し、実際に得られたエタノールはどちらも 0.5 g/L に満たないほどで、ほとんど収量はないという結果が得られた。

理論収量は各バイオマスのホロセルロースを糖源とした際に得られるエタノールの最大量を計算したもので、ホテイアオイが 4.7 g/L、ダンチクが 4.4 g/L となっている。

4-3 バイオマス 2 g を原料とした発酵試験

スエヒロタケ NBRC4928 を供試菌とし、ホテイアオイ 2 g 又はダンチク 2 g を原料としたエタノール発酵試験の結果は図 3 のようになった。

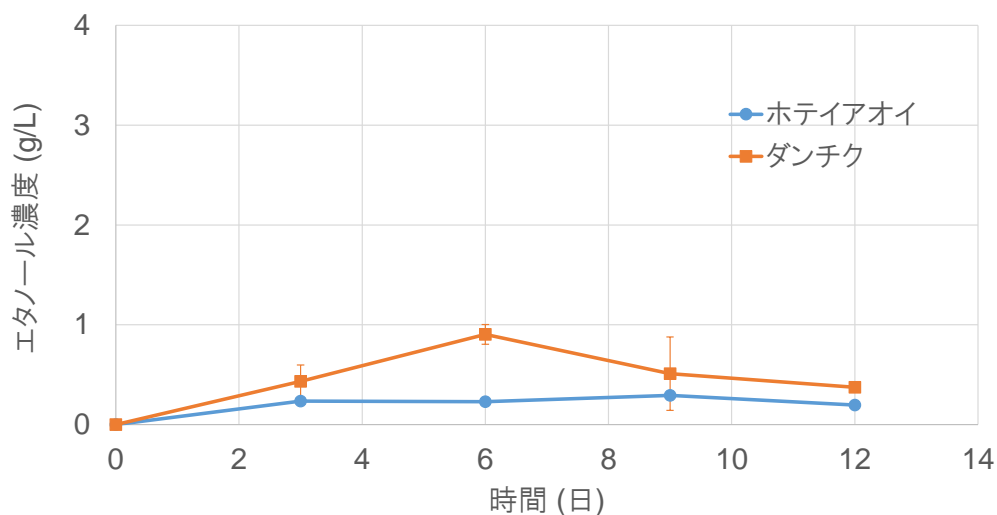


図 3. 2 g のバイオマス発酵試験におけるエタノールの経時変化

エタノール濃度の最高値は、ホテイアオイが 9 日目に 0.29 g/L、ダンチクが 6 日目に 0.90 g/L であった。原料としたバイオマスが 2 g であるため、理論収量は 1 g の場合の 2 倍のホテイアオイが 9.4 g/L、ダンチクが 8.8 g/L となっている。1 g のバイオマス発酵試験と同様に、理論収量には遠く及ばない結果となった。

4-4 糖化酵素による糖化促進発酵試験

スエヒロタケ NBRC4928 を供試菌、ホテイアオイ 1 g 又はダンチク 1 g を原料とし、糖化酵素としてオノズカ 3S を用いたエタノール発酵試験の結果は図 4 のようになった。

オノズカ 3S には培養とともにグルコースが遊離される糖源が含まれており、オノズカ 3S 由来のグルコースの発酵によるエタノール、スエヒロタケ NBRC4928 が発酵して得られたエタノールの経時変化も図 4 に示している。

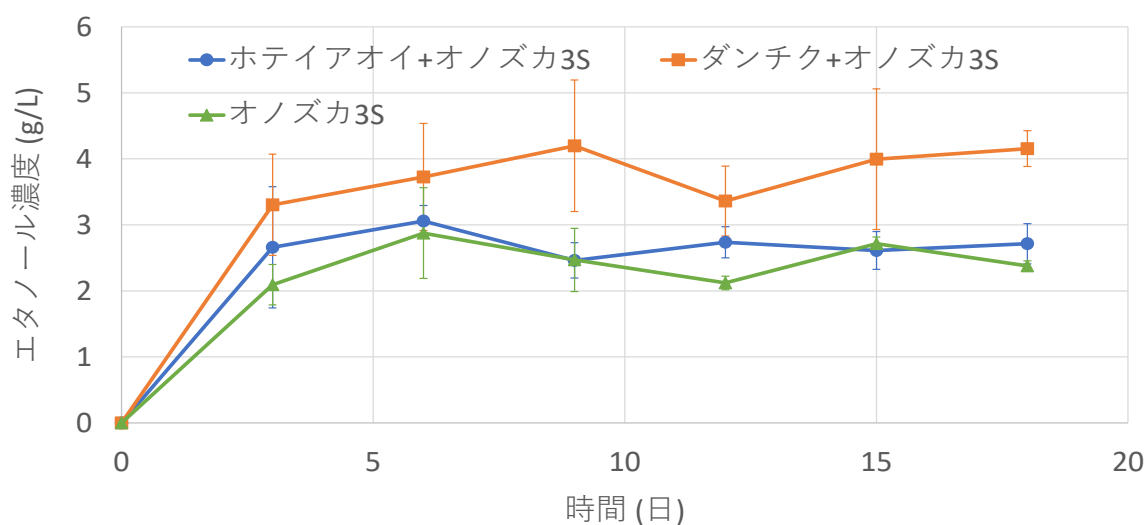


図 4.糖化酵素を用いたエタノール発酵試験におけるエタノールの経時変化

エタノールの理論収量に対する収率はホテイアオイが 6 日目に 3.9%、ダンチクが 9 日目に 29.8%となっていた。収率はピーク時のエタノール生産量からオノズカ 3S 由来のエタノール生産量を引いた値を、理論収量で割って算出している。ダンチクの場合だと 9 日目の 4.2 g/L から、6 日目に見られたオノズカ 3S 由来のエタノールの最大量である 2.9 g/L を引いた 1.3 g/L を、ダンチクを原料とした場合に得られるエタノールの理論収量である 4.4 g/L で割って算出している。

糖化を促進してもホテイアオイの場合はエタノール生産量の増加はほとんど見られなかったが、ダンチクでは収率が 22.5%向上した。

4-5 濃度別の糖化酵素剤によるダンチク 1g の発酵試験

スエヒロタケ NBRC4928 を供試菌、ダンチク 1g を原料とし、糖化酵素としてオノズカ 3S を用いたエタノール発酵試験の結果は図 5 のようになった。オノズカ 3S の濃度は 0%、0.2%、0.5%、1.0%、2.0% の 5 段階を図に示している。酵素剤の濃度とエタノール生産効率の関係を表 2 にまとめた。

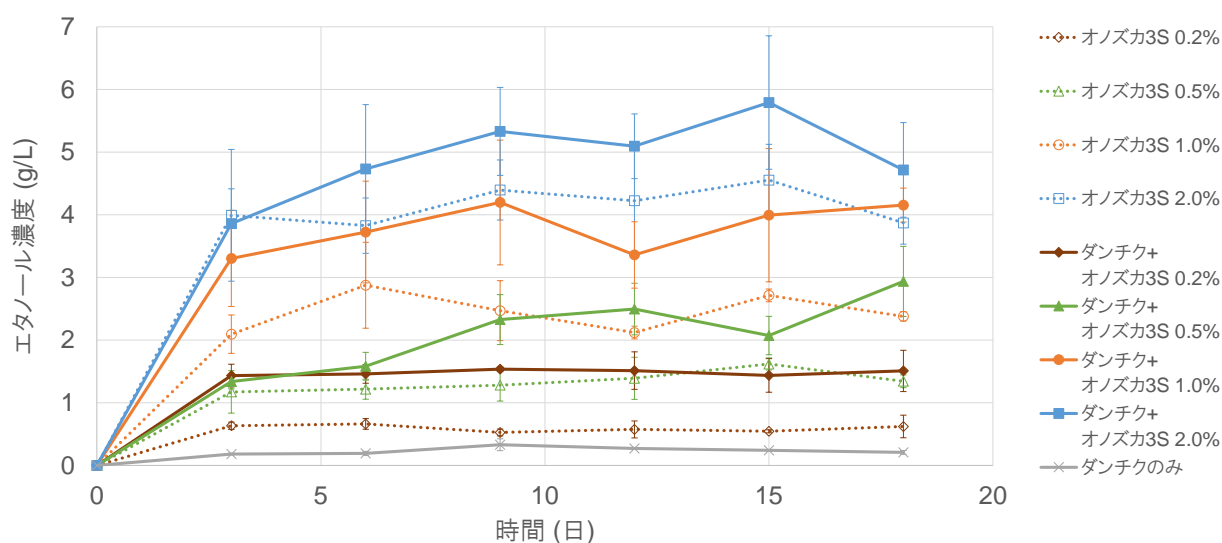


図 5. 糖化酵素を用いたエタノール発酵試験におけるエタノールの経時変化。
オノズカ 3S の濃度は 0%,0.2%,0.5%,1.0%,2.0%.

表 2.各濃度の酵素剤におけるエタノール生産効率

オノズカ3Sの濃度 (%)	バイオマス由来のエタノール生産量 (g/L)	理論収量に対する収率 (%)
0	0.3	7.6
0.2	0.9	21.6
0.5	1.3	30.0
1.0	1.3	30.1
2.0	1.2	28.2

糖化酵素剤の濃度が上がるにつれて収量も増加しているように見えるが、これはオノズカ 3S 由来のグルコースによるものである。実際の収量は実線のピークの数値から点線のオノズカ 3S 由来のグルコースから生産されたエタノール量を引いて算出する。オノズカ 3S 2%の場合だと、15 日目の 5.8 g/L から 15 日目に見られたオノズカ 3S 由来のエタノールの最大量の 4.6 g/L を引いた 1.2 g/L となる。このようにして計算を行った結果、実際の収量はオノズカ 3S が 0.2%の時に 0.9 g/L、0.5%、1.0%の時に 1.3 g/L、2.0%の時に 1.2 g/L となっており、理論収量に対する収率は、オノズカ 3S が 0.2%の時を除き、いずれも 30% ほどとなっていた。

ダンチクのみの場合には約 0.33 g/L だったエタノール生産量は 0.5%のオノズカ 3S を加えることで約 1.32 g/L まで増加した。しかしオノズカ 3S の濃度を 1.0%、2.0%に上げてもエタノール生産量に大きな変化は表れず、エタノール生産量と酵素剤の濃度との間に比例的な関係は見られなかった。

4-6 濃度別の糖化酵素剤によるダンチク 4 g の発酵試験

スエヒロタケ NBRC4928 を供試菌、ダンチク 4 g を原料とし、糖化酵素としてオノズカ 3S を用いたエタノール発酵試験の結果は図 6 のようになった。オノズカ 3S の濃度は 0%、0.2%、1.0%、2.0% の 4 段階を図に示している。比較のために 4-2 のデータを 0% として用いている。また、酵素剤の濃度とエタノール生産効率の関係を表 3 にまとめた。

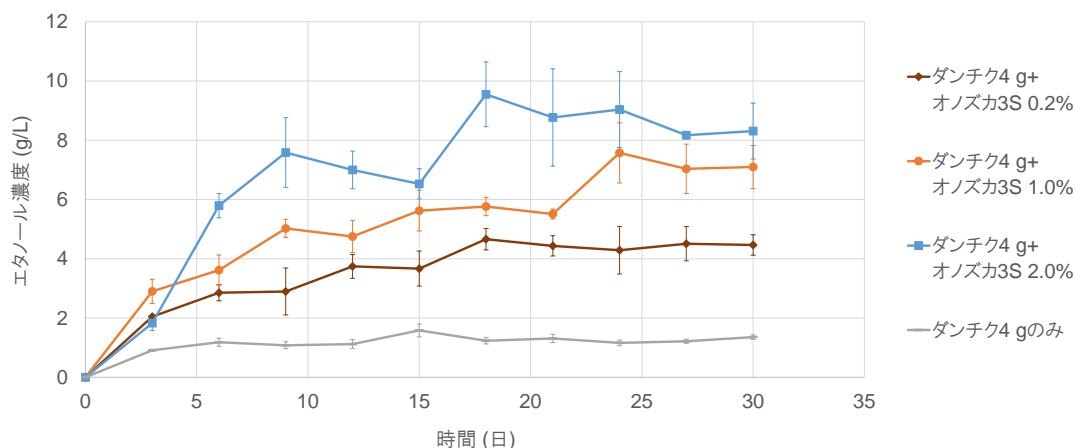


図 6. 糖化酵素を用いたエタノール発酵試験におけるエタノールの経時変化。
オノズカ 3S の濃度は 0%、0.2%、1.0%、2.0%。

表 3. 各濃度の酵素剤におけるエタノール生産効率

オノズカ3Sの濃度 (%)	バイオマス由来のエタノール生産量 (g/L)	理論収量に対する収率 (%)
0	1.6	9.0
0.2	4.0	22.8
1.0	4.7	26.8
2.0	5.0	28.4

4-5 と同様に実際の収量を計算すると、オノズカ 3S が 0.2% の時に 4.0 g/L、1.0% の時に 4.7 g/L、2.0% の時に 5.0 g/L となっている。対理論収率は、オノズカ 3S が 0.2% の時に 22.8%、1.0% の時に 26.8%、2.0% の時に 28.4% であった。

ダンチク 4 g を原料とした発酵試験でのエタノール生産量は培養時にオノズカ 3S を加えることで大きく増加した。また、オノズカ 3S の濃度を高めると、それに伴いエタノール生産量も増加した。

5. 考察

ホテイアオイとダンチクの主要成分の分析の結果から、ホテイアオイとダンチクのリグニン含有率はスギなどのハードバイオマスよりも比較的低いことがわかった。また、ホロセルロース含有率もスギよりも高くなっており、これらのバイオマスを木材腐朽菌によるエタノール発酵の原料とすることが可能ではないかと考えた。未処理の1gのバイオマスを原料としたスエヒロタケ NBRC4928 による発酵試験で得られたエタノール量は、ホテイアオイを原料とした場合に0.43 g/L、ダンチクの場合では0.33 g/Lとなった。これらはHPLCの検出限界付近であると考えられるため正確な値とは言い難いが、両バイオマス共に理論収量に遠く及ばない値であり、したがって、スエヒロタケ単独による糖化・発酵では収量はほとんどないという結果が得られた。

このような結果となったのはバイオマスの量が少なく、スエヒロタケ NBRC4928 が自身の生命を維持するのが限界で、エタノールを生産する余裕がなかったからではないかと考え、2gのバイオマスを原料とした発酵試験を行った。その結果、ホテイアオイを原料とした場合に0.29 g/L、ダンチクでは0.90 g/Lのエタノールが得られた。バイオマスが1gの時と比較すると、ダンチクにおいては対理論収率が7.6%から10.3%に向上した。しかし、ホテイアオイにおいては9.2%から3.1%に低下している。ホテイアオイに抗菌性がない⁽¹⁴⁾ことを考えると、これは発酵阻害や増殖阻害というよりはむしろHPLCの検出限界を下回っていたため正確な値ではない、すなわち増加や減少という生産性の議論はできないが、ともかくエタノール生産量としてはわずかであるといえる。

本研究のバイオマス発酵試験において収率が低くなった原因は、供試菌として用いたスエヒロタケ NBRC4928 がバイオマスを糖化する能力が十分ではない、またはその能力があったとしても引き出すことができていないと考え、エタノール生産の3つの工程のうちの糖化の段階に着目し、糖化酵素による糖化促進発酵試験を行った。脱リグニンではなく糖化に着目した理由は、原料とするバイオマスがリグニン含有量の少ないソフトバイオマスであり、脱リグニンの必要性が低いのではないかと考えたためである。糖化促進発酵試験の結果、ホテイアオイを原料とした場合にはエタノール生産量の増加はほとんど見られなかったが、ダンチクでは対理論収率が22.5%向上した。ホテイアオイに糖化促進の効果が見られなかった理由はわかっていないが、ホテイアオイは水上で生育する水草であるため、水中で糖が容易に溶け出ししてしまわないように、なんらかのバリア機能を有しているのではないかと考えている。Mishimaらは20通りの化学処理について、アルカリ処理と酸処理を組み合わせる方法であると報告しており⁽¹⁵⁾、Sukumaranらは、アルカリ処理で糖化を著しく改善したと報告している⁽¹⁶⁾。これらのことから、まだ改善の余地があると考えられる。

次に糖化の改善がエタノール生産量に与える影響をさらに調べるために、糖化促進の効果が見られたダンチク1gを原料として、濃度別の酵素剤による糖化促進発酵試験を行った。その結果、得られたエタノール量はオノヅカ3Sが0.2%の時に0.9 g/L、0.5%、1.0%の

時に 1.3 g/L、2.0%の時に 1.2 g/L となっており、対理論収率は、オノヅカ 3S が 0.2%の時を除き、いずれも 30%ほどとなっていた。この結果から、本研究の糖化促進発酵試験の条件においては酵素剤の終濃度の 0.2%から 0.5%の間に閾値が存在し、エタノール生産量と酵素剤の濃度との間に比例的な関係性は成立しないことがわかった。

また、糖化の改善がエタノール生産効率の向上にどの程度貢献しているのかを、より正確に調査するため、生産されたエタノールが HPLC の検出限界を下回らないよう、原料のダンチクを 4 g に変更して、糖化促進発酵試験を行った。その結果、ダンチクを 4 g のみの場合には 1.6 g/L だったエタノール生産量は、オノヅカ 3S が 0.2%の時に 4.0 g/L、1.0%の時に 4.7 g/L、2.0%の時に 5.0 g/L となった。また、対理論収率は、9.0%だったものが、オノヅカ 3S が 0.2%の時に 22.8%、1.0%の時に 26.8%、2.0%の時に 28.4%となり、最高値としては 19.4%向上した。これはダンチク 1 g を原料とした場合のエタノール生産効率の向上よりも程度が小さくなっているが、その理由としては、酵素剤の濃度を高めるに伴ってエタノール生産量も増加していることから、ダンチク 4 g を原料とした場合に糖化促進効果のある酵素剤の終濃度の閾値が 2.0%よりも高い濃度であることや、30 日目の段階でまだグルコースが消費され切らずに残っていたためであることが考えられる。

本研究では木材腐朽菌を用いてセルロース系バイオマスからエタノールを生産することを最終の目的として、有用なセルロース系バイオマスの検討、エタノール生産量を増加する条件の検討、エタノール生産における糖化改善の影響の調査を行った。その結果、ダンチクにおいては糖化酵素により糖化速度を増加させるとエタノール生産量も増加したことから、ダンチクはセルロース系バイオマスからのエタノール生産において原料として有用であり、糖化効率を高めることはエタノール生産量の増加につながるということがわかった。しかし、糖化を促進する酵素剤の濃度には閾値が存在するため、さらなる糖化改良法の開発が必要だと考えられる。

6.謝辞

卒業研究のご指導をしていただきました堀沢栄教授、また同研究室の皆様に深くお礼申し上げます。

7.参考文献

- 1) US Environmental Protection Agency. (2007). Greenhouse gas impacts of expanded renewable and alternative fuels use. <http://purl.access.gpo.gov/GPO/LPS84081>
- 2) Alexander E. Farrell.et al. (2006). Ethanol Can Contribute to Energy and Environmental Goals. *Science*. 331. 506-508.
- 3) 西田達由. (2013).白色腐朽菌によるリグノセルロースを原料としたエタノール発酵. 高知工科大学修士論文.
- 4) Horisawa S, Nishida T. (2014). Ethanol production from lignocellulosic material by white rot fungi. *Journal of Advances in Clean Energy*, 1.1, 71-76.
- 5) 安藤広将. (2015). スエヒロタケを用いた並行複発酵によるセルロース系原料からのエタノール生産. 高知工科大学卒業論文.
- 6) Horisawa S et al. (2015). Direct ethanol production from cellulosic materials by consolidated biological processing using the wood rot fungus *Schizophyllum commune*. *Bioresource Technology* 197, 37–41.
- 7) 井上瑛絵. (2018). 木材腐朽菌の混合培養を用いた一貫バイオプロセスの構築によるセルロース系原料からのエタノール生産. 高知工科大学修士論文.
- 8) Horisawa S, Inoue A, Yamanaka Y. (2019). Direct Ethanol Production from Lignocellulosic Materials by Mixed Culture of Wood Rot Fungi *Schizophyllum commune*, *Bjerkandera adusta*, and *Fomitopsis palustris*. *Fermentation* 5, 21; doi:10.3390
- 9) 沖陽子. (1980). 水生雑草ホテイアオイをめぐる諸問題. *農業技術*. 35. 495-501.
- 10) 和田義春ら. (2015). ダンチク (*Arundo donax* L.) の耐塩性と耐湿性の評価. 第 240 回日本作物学会講演会要旨集. 26.
- 11) 和田義春ら. (2013). ダンチク (*Arundo donax* L.) の葉の光合成特性. 第 236 回日本作物学会講演会要旨集. 168-169.
- 12) 世界の侵略的外来種ワースト 100 種のリスト.
http://www.iucngisd.org/gisd/100_worst.php
- 13) Rabemanolontsoa, H et al. (2013). Comparative study on chemical composition of various biomass species. *RSC Advances* 3, 3946-3956.
- 14) 山中優花. (2019). ホテイアオイを原料とした木材腐朽菌によるバイオエタノール生産 高知工科大学卒業論文.
- 15) Mishima, D.et al. (2008). “Ethanol production from candidate energy crops: Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes* L.)” *Bioresource Technology* 99(7), 2495-2500. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.04.056

(16) Sukumaran, R. K. et al. (2009). "Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production," *Renewable Energy* 34(2), 421-424. DOI: 10.1016/j.renene.2008.05.008

8.付録

8-1 オノズカ 3S に含まれるグルコースについて

本研究の糖化促進発酵試験に用いたセルラーゼオノズカ 3S にはグルコースが含まれていたので、オノズカ 3S のみで培養を行い、その量を調査した。

実験方法

後にセルラーゼ水溶液を加える分の蒸留水の量を減らし表 1 の組成で液体培地を作成した。200 ml のフラスコに液体培地を 54 ml 加え、発酵栓のついたシリコン栓でフタをし、オートクレーブで 121℃、20 分の処理を行った。室温まで冷却したのちに発酵栓のトラップに無菌水 7 ml を注入した。酵素剤の濃度を 2%、5%、10%、20% に調整した水溶液を 1 晩冷蔵庫で放置したものを、0.45 μm のメンブレンフィルターを用いてろ過滅菌した。フラスコに、各濃度のセルラーゼ水溶液を 6 ml 加え、終濃度を 0.2%、0.5%、1.0%、2.0% とした。培養条件は窒素ガスでパージし、準嫌気条件とした。実験装置の外観は図 1 に示している。

これらを 30℃ のインキュベーターにおいて 90rpm で回転培養を行った。2 日おきに培養液を採取し、HPLC でグルコース量を測定した。その際のカラム温度は 50℃、流速は 1.0 ml/min であった。

結果

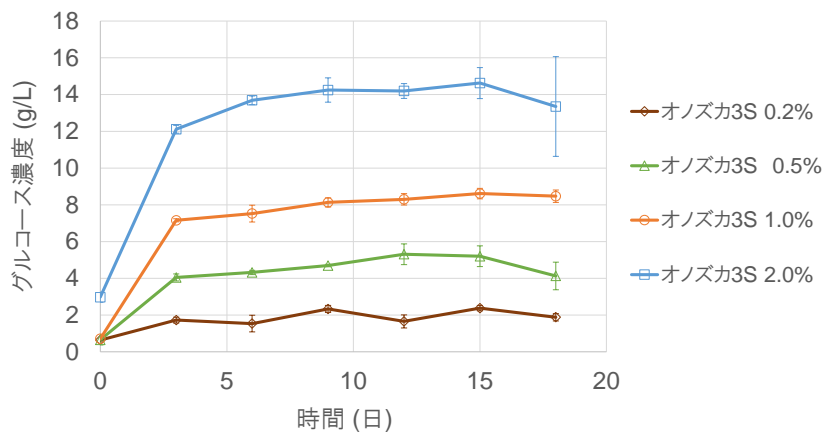


図 7-1.セルラーゼオノズカ 3S から溶出するグルコースの経時的変化.

オノズカ 3S の濃度は 0.2%,0.5%,1.0%,2.0%.

各濃度のオノヅカ 3S から溶出したグルコースの最大量は、0.2%の時に 2.4 g/L、0.5%の時に 5.3 g/L、1.0%の時に 8.6 g/L、2.0%の時に 14.6 g/L であった。オノヅカ 3S 2.0%の0日目のグルコース量が他に比べて多くなっているのは、室温下でのろ過滅菌処理に時間がかかったためだと思われる。

初期のグルコース濃度は、酵素剤 0.2%、0.5%、1.0%ではほぼ同じで約 0.7g/L であるのに対し、2.0%では約 3.0g/L であった。また、いずれの酵素剤の濃度においても、インキュベーションによってグルコースが増加し、徐々に一定濃度に至った。その一定濃度と酵素剤濃度の関係はほぼ直線関係であった（図 7-2）。したがって酵素剤にはグルコースを放出することのできる多糖などが含まれていたのではないかと考えられる。したがって、バイオマスの糖化にこの酵素剤を用いると、その濃度に対応して糖源が持ち込まれることになる。

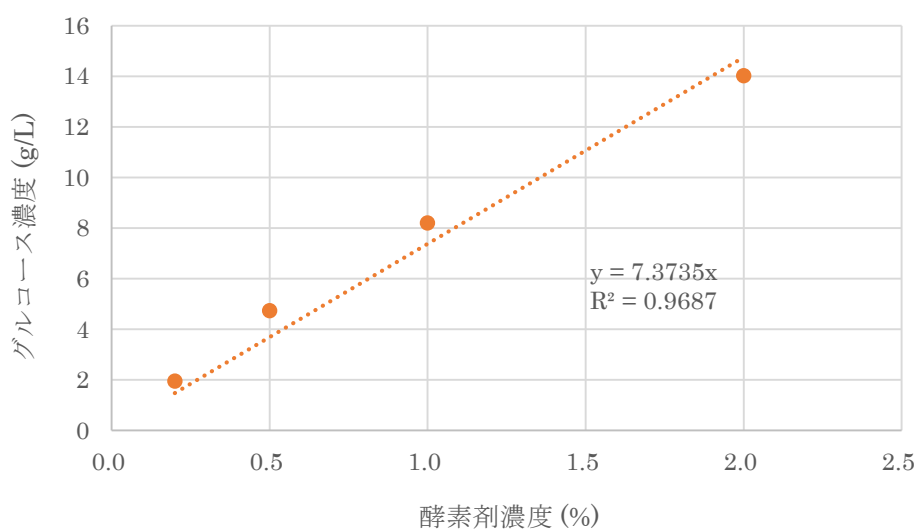


図 7-2.酵素剤（セルラーゼオノヅカ 3S）の濃度と遊離されるグルコース濃度の関係.

8-2 オノズカ 3S のセルラーゼ活性測定

本研究の糖化促進発酵試験に用いたオノズカ 3S のセルラーゼ活性の測定を行った。

実験方法

1.5ml のチューブにペーパーディスク厚手 8 mm(アドバンテック、東京)を投入し、無菌水を 200 μ l、オノズカ 3S の水溶液を冷蔵庫で一晩放置したものを 50 μ l 加えた。オノズカ 3S の水溶液の濃度は 0%、0.5%、1.0%、2.0%である。これらを 30°C で 30 分、60 分、180 分の間静置した後に、100°C で 5 分間加熱して酵素反応を停止した。この溶液を 100 μ l 取り出して 300 μ l の DNS 試薬と混合し、100°C で 5 分間加熱した後に 5 分間急冷させた。この溶液を 160 μ l 取り出して無菌水 1 ml で希釈し、500 nm の波長で吸光度測定を行った。

オノズカ 3S はグルコースを含んでいるため、オノズカ 3S のみでの吸光度測定、ペーパーディスクと事前の加熱により失活状態のオノズカ 3S での吸光度測定も上記と同様の方法で行った。

結果

オノズカ 3S の水溶液の濃度 0%、0.5%、1.0%、では分光光度計の検出限界を下回ってしまっただため、結果にはオノズカ 3S 2.0%のみを示す。

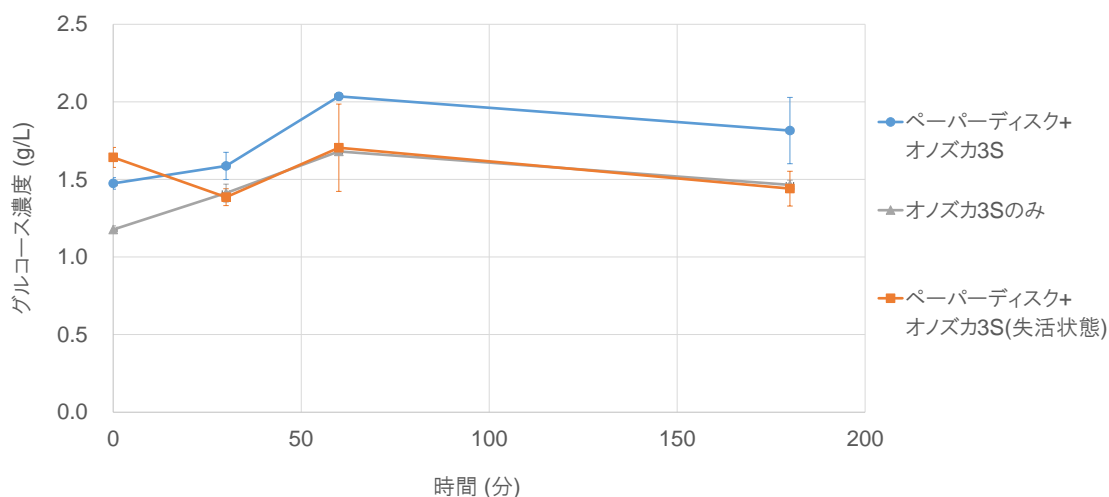


図 8.オノズカ 3S 2.0%におけるペーパーディスクの分解によるグルコース量の変化

30 分から 60 分におけるペーパーディスクの分解によるグルコース量の変化から、オノズカ 3S 2.0%でのセルラーゼ活性は 0.17 U/ml と計算された。1 U は 1 分間に 1 μ mol の還元糖を生成する酵素量と定義している。

8-3 αセルロースの定量

ホテイアオイとダンチクの主要成分の分析に加え、αセルロースの定量を行った。

実験方法

バイオマスの主要成分分析で得たホロセルロースをハンマーミルで砕いたもの 0.25 g を 100 ml ビーカーに入れ、17.5%水酸化ナトリウム水溶液を 6.25 ml 加え、ガラス棒を使って試料を軽くつぶした。その後 100 ml ビーカーを上においてフタをし、水酸化ナトリウム水溶液を加えた時から 25 分間室温で放置した。25 分後、蒸留水を 6.25 ml 加え、スターラーで 1 分間攪拌し、あらかじめ絶乾重量を測定したガラスフィルターを用いて吸引ろ過を行った。その際、10%酢酸 10 ml を加え、電子レンジで加熱した蒸留水で洗浄を行った。フィルターを約 80°C の乾燥器で乾燥し、増加した分を αセルロース量とした。

結果

ホロセルロース量から αセルロースを引いた値をヘミセルロース量としている。また、αセルロースの定量にあたってホロセルロースの定量も再度行ったので、4-1 の結果とは少々異なる値となっている。

ホテイアオイと比較すると、ダンチクの方が少し αセルロース、すなわち発酵に利用しやすいグルコースが多く含まれていることがわかった。8-4 のダンチクの糖化効率の評価では、この αセルロースの値を元に理論収量を計算する。

表 4. ホテイアオイおよびダンチクのホロセルロース、αセルロース、ヘミセルロースの含有量。括弧内の数値はホロセルロース量を 100 とした時の αセルロース、ヘミセルロースの割合をそれぞれ示している。

	ホテイアオイ	ダンチク
ホロセルロース(%)	52.6	54.9
αセルロース(%)	29.5(56.0)	34.3 (62.5)
ヘミセルロース(%)	23.1 (44.0)	20.6 (37.5)

8-4 バイオマスの糖化

供試菌を入れずに、オノヅカ 3S によるホテイアオイ又はダンチクの糖化を行った。

実験方法

後にセルラーゼ水溶液を加える分の蒸留水の量を減らし表 1 の組成で液体培地を作成した。200 ml のフラスコにホテイアオイ又はダンチクを 1 g と液体培地を 54 ml 加え、発酵栓のついたシリコン栓でフタをし、オートクレーブで 121°C、20 分の処理を行った。室温まで冷却したのちに発酵栓のトラップに無菌水 7 ml を注入した。酵素剤の濃度を 2%、5%、10%、20% に調整した水溶液を 1 晩冷蔵庫で放置したものを、0.45 μm のメンブレンフィルターを用いてろ過滅菌した。フラスコに、各濃度のセルラーゼ水溶液を 6 ml 加え、終濃度を 0.2%、0.5%、1.0%、2.0% とした。ホテイアオイはこのうち、1.0% と 2.0% のオノヅカ 3S による糖化試験のみを行った。培養条件は窒素ガスでパージし、準嫌気条件とした。実験装置の外観は図 1 に示している。

これらを 30°C のインキュベーターにおいて 90rpm で回転培養を行った。2 日おきに培養液を採取し、HPLC でグルコース量を測定した。その際のカラム温度は 50°C、流速は 1.0 ml/min であった。

結果

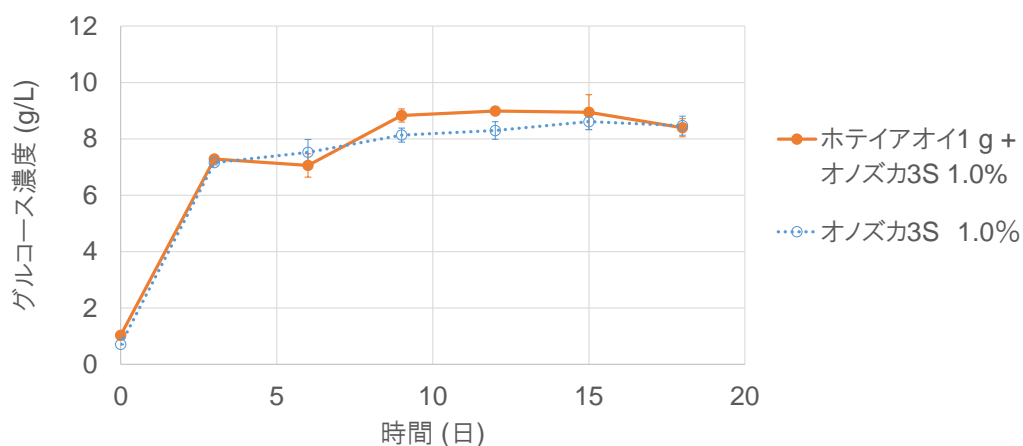


図 9.オノヅカ 3S 1.0%におけるホテイアオイ 1 g の糖化によるグルコースの経時的変化.

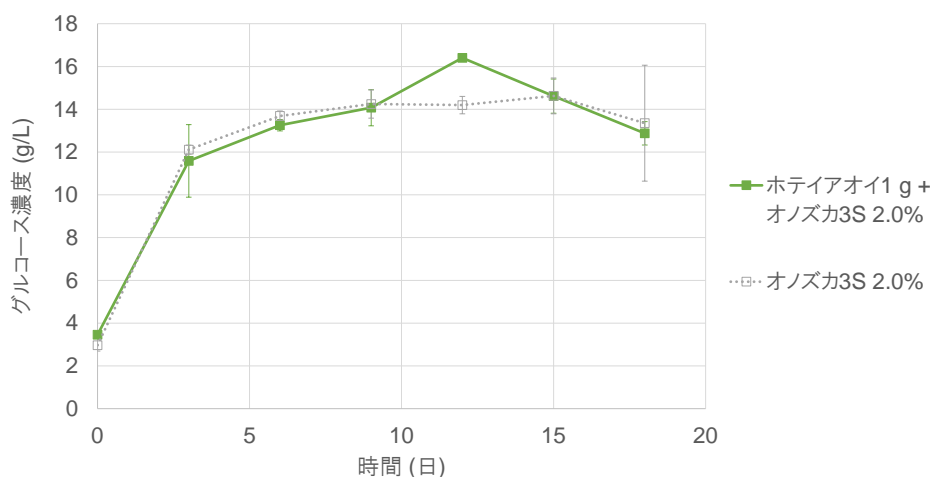


図 10. オノズカ 3S 2.0%におけるホテアオイ 1 g の糖化によるグルコースの経時的変化.

オノズカ 3S 1.0%によるホテアオイの糖化では、ホテアオイを糖化した 12 日目のグルコース量 8.99 g/L から、オノズカ 3S 由来の 15 日目のグルコース量 8.61 g/L を引くと、0.38 g/L となった。オノズカ 3S 2.0%によるホテアオイの糖化では、ホテアオイを糖化した 12 日目のグルコース量 16.40 g/L から、オノズカ 3S 由来の 15 日目のグルコース量 14.63 g/L を引くと、1.77 g/L となった。しかし、ホテアオイを糖化した場合のグルコース量において 15 日目以外はオノズカ 3S 由来のグルコースとほとんど同程度であるため、測定誤差の可能性がある。その場合は、オノズカ 3S はホテアオイをほとんど糖化できていないことになる。

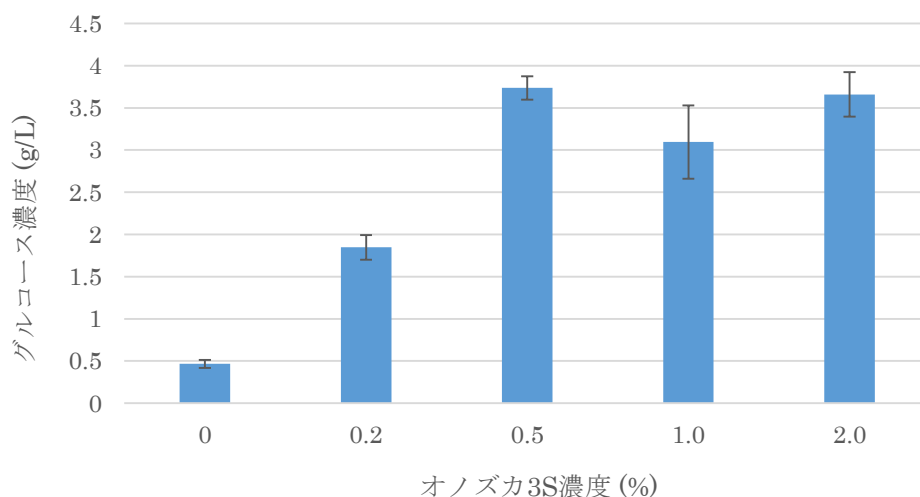


図 11.各濃度のオノズカ 3S による糖化で得られたダンチク 1 g に由来するグルコース量

図 11 を見ると、オノズカ 3S 0.5%まではダンチク由来のグルコース量は増加しているが、それ以降は濃度が上がってもグルコース量の増加は見られない。これは糖化促進発酵試験におけるオノズカ 3S の濃度とエタノール生産量の関係と一致する結果となったため、やはり糖化を促進する酵素剤の濃度には閾値が存在することが確認された。この結果ではオノズカ 3S 0.5%の時にダンチク由来のグルコースが 3.7 g/L と最も大きくなるが、これは理論収量の 65.4%であり、さらなる糖化効率の向上が望まれる。ダンチクに含まれるグルコースの理論収量は 8-3 の α セルロースの量から 5.7 g/L と計算される。

また、オノズカ 3S 0.5%の時のダンチク由来のグルコース量である 3.7 g/L から計算されるエタノールの理論収量は 1.9 g/L である。しかし、実際に糖化促進発酵試験で得られたオノズカ 3S 0.5%の場合のエタノール生産量は、1.3 g/L であった。ダンチクを糖源とした発酵試験ではキシロースやマンノースもエタノールに変換されるため、1.9 g/L よりも多くのエタノールが得られると考えられる。また、セルロースの加水分解物がセルラーゼ活性を阻害する¹⁾ことがわかっているため、木材腐朽菌による並行複発酵ではバイオマスのみで糖化して得られるグルコースから算出される理論収量よりも、エタノール生産量は多くなると予想していた。それにも関わらず 1.9 g/L を下回っている理由としては、スエヒロタケ NBRC4928 が自身の生命活動の維持に糖を消費していることが考えられる。スエヒロタケ NBRC4928 はグルコース濃度が 2%から 10%までの間で、グルコースのエタノール変換率は 85%以上と高い値となっているが²⁾、グルコース濃度が 2%以下の場合や、キシロースなどの五炭糖が培地に同時に含まれている場合にはどのような挙動を示すかわかっていない。木材腐朽菌によるバイオマスからのエタノール発酵の効率を高める方法を探るためには、供試菌についての知見を蓄積させることが重要な要素の一つである。

参考文献

- 1) 荒井健一郎. (1970). セルラーゼによるセルロース繊維の加水分解におよぼす分解生成物の阻害効果. 工業化学雑誌. 74. 460-463.
- 2) 河野惇. (2020). スエヒロタケを用いた エタノール発酵における糖濃度の影響. 高知工科大学卒業論文.