

令和3年度 修士論文

酵母を用いた一貫バイオプロセスによる
ダンチクからのエタノール生産条件の検討

Examination of ethanol production conditions
from *Arundo donax* by integrated bioprocess using yeast

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

1245099 菰田恵菜

指導教員 堀沢 栄 教授

目次

1、概要

2、緒言

3、実験方法

3-1、酵母

3-2、酵母の生菌数

3-3、トリコデルマ(*Trichoderma reesei*)

3-4、バイオマス

3-5、酵母を用いた発酵実験

3-6、*Trichoderma reesei* による糖化実験

3-7、*Trichoderma reesei* と酵母の共培養

3-8、*Trichoderma reesei* で糖化を行い、酵母で発酵する実験

3-9、残糖量及びエタノール量の測定

4、結果

4-1、酵母を用いた発酵実験

4-2、*Trichoderma reesei* による糖化実験

4-3、*Trichoderma reesei* と酵母の共培養

4-4、*Trichoderma reesei* で糖化を行い、酵母で発酵する実験

5、考察

6、謝辞

7、参考文献

1、概要

近年、地球温暖化や二酸化炭素削減の観点から再生可能な生物資源を原料とする液体燃料の生産が活発に行われ、その中でも食糧と競合しないセルロース系原料を用いたエタノール生産が注目されている。現在セルロース系原料を用いたエタノール生産では脱リグニン、糖化などの前処理は物理的、化学的に行われることが多いがこれらはコストやエネルギーの消費量が高くなるという問題がある。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処理も検討されているが、処理時間の長さや酵素の高コストが問題である。一貫バイオプロセスによるエタノール生産では同一の反応槽で前処理、糖化、発酵が行えることに加え、施設製造コストの削減を図ることが可能である。今回はエタノール発酵に有力な酵母 (*Sacchromyces cerevisiae*、*Candida shehatae*) とセルロース分解、リグニン分解能を持つ糸状菌 (*Trichoderma reesei*) を使った複合微生物系を用いて一貫バイオプロセスを行うことを考えた。使用するセルロース系原料は温暖な地域の海周辺に生息するイネ科の多年草で、繁殖力が高いダンチク (*Arundo donax*)、酵母は一般にパン酵母、ビール酵母、日本酒酵母として使用される *Sacchromyces cerevisiae* と、味噌や醤油、ワインの製造に使われることもあり、キシロースからもエタノールを生産することができる *Candida shehatae* の2種類の酵母株についてエタノール生産効率を比較した。糸状菌はセルロース分解能を持つ *Trichoderma reesei* を使用した。

本研究ではまず2種類の酵母株を用いて、グルコース 10%の条件、セルロースとダンチクをセルラーゼを用いて糖化した条件で実験を行ったがどの条件でもどちらの酵母もエタノールを生産することができると分かった。セルラーゼはオノヅカ 3S(ヤクルト薬品、東京)を使用した。

次に *T. reesei* を使用して、セルロースとダンチクの糖化を行ったがどちらもほとんど糖化することができなかった。セルロースとダンチクを *T. reesei* を用いて糖化し、酵母を用いて発酵する実験も行ったが、ほとんどエタノールを得ることができなかった。*T. reesei* の糖化効率の向上は、*T. reesei* と酵母を用いた一貫バイオプロセスを構築するうえで大きな課題であることが分かった。

2、緒言

近年、地球温暖化防止などの観点から再生可能な生物資源を原料とする液体燃料が見直されている。現在バイオエタノールの原料の主流はトウモロコシやサトウキビなどであるが、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。したがって、食料と競合しないセルロース系原料を用いたエタノール生産方法の確立が必須である。原料をセルロース系にすると、脱リグニンとセルロースの糖化という工程が加わり、そのコスト削減が課題である。現在、セルロース系原料を用いたエタノール生産では脱リグニン等の前処理は物理的、化学的に行われることが多く、設備高コストやエネルギー消費量が多いことが問題となっている。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も検討されているが、処理時間の長さや酵素の高コストが問題となっている。一貫バイオプロセスは同一の反応層で脱リグニン、糖化、発酵を行うことができコスト削減につながると考えられている。

本研究の目的はエタノール発酵に有力な酵母と、セルロース分解能を持つ糸状菌トリコデルマ(*Trichoderma reesei*)を使った複合微生物系を用いて一貫バイオプロセスを構築することである。セルロース系原料には温暖な地域の海辺周辺に生息するイネ科の多年草で繁殖力が高いダンチク(*Arundo donax*)を使用した。ダンチクはリグニンが比較的少ないという特徴があるので脱リグニンの工程を省略できると考えている。今回は発酵の段階で使用する酵母について *Sacchromyces cerevisiae* 株と、*Candida shehatae* 株の2種類の株について発酵能力を比較し、その後 *T. reesei* を用いた糖化について検討した。

3, 実験方法

3-1、酵母

発酵微生物として2種類の酵母を使用した。

1) *Sacchromyces cerevisiae* NBRC0224 株

一般にパン酵母、ビール酵母、日本酒酵母として利用され、バイオエタノールの実験などにも使用されている発酵能力の高い株。

2) *Candida shehatae* NBRC1983 株

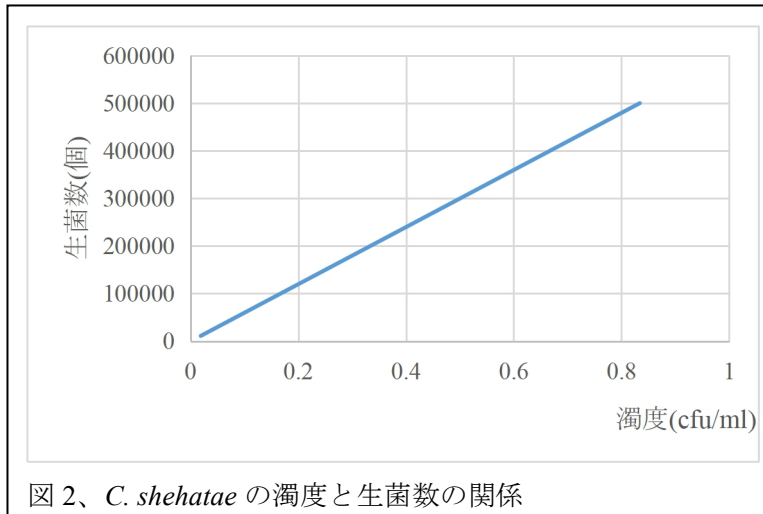
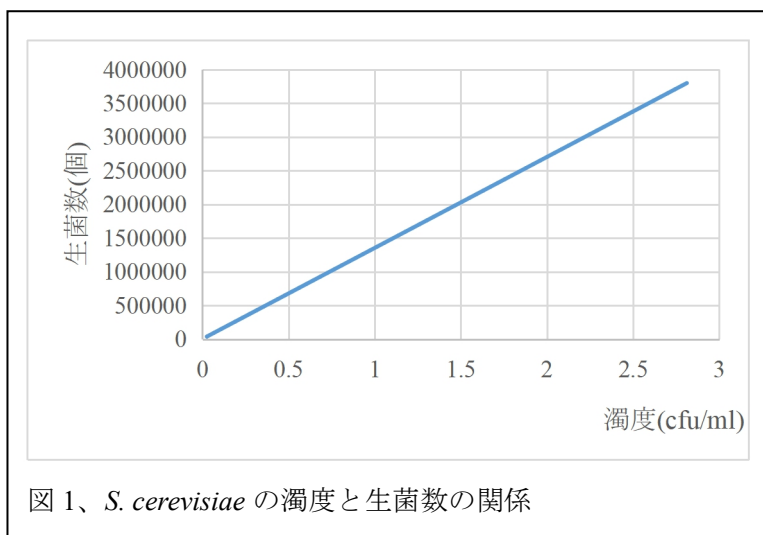
味噌やワインの製造に使われることもあり、グルコースだけでなくキシロースからもエタノール発酵が可能な株。

供試菌の前培養として YPD 寒天培地 (Glucose150g/L, Yeast extract10g/L, Peptone20g/L, 寒天15g/L) を用いて 25℃ のインキュベーター内で培養したのち、白金耳で YPD 液体培地 (Glucose150g/L, Yeast extract10g/L, Peptone20g/L) に植菌した。定期的に YPD 液体培地に植え継ぎを行い 25℃ で培養した。

3-2、酵母の生菌数

以下の2つの方法で生菌数をカウントした。

- 1) 所定時間ごとに YPD 液体培地を 1ml ずつ採取し、濁度を測定した。また、採取した YPD 液体培地を希釈して YPD 寒天培地に 100 μ l ずつ塗り付けた。25°C で培養したのち菌数を数え、濁度と菌数の関係のグラフを作成した。(図 1、図 2)



- 2) 時間ごとに YPD 液体培地採取し希釈した。希釈した YPS 液体培地 100 μ l と 0.4% トリパンプルー溶液 400 μ l を混合し、Burker-turk セルカウンターに 10 μ l ずつロードした。これを顕微鏡で観察し、染色されない細胞を生菌として生菌数を数えた。

3-3、トリコデルマ(*Trichoderma reesei*)

セルロース系バイオマスを分解する糸状菌として *Trichoderma reesei* を用いた。*T. reesei* は、木質バイオマスを完全分解するのに必要な糖質加水分解酵素を全て分泌分解生産することが可能である。PDA 寒天培地を用いて 25°C のインキュベーター内で *Trichoderma reesei* を前培養したのち、白金耳で 2% グルコース液体培地 (Glucose 20g/L, Yeast extract 10g/L, Peptone 20g/L) に植菌した。定期的に YPD 液体培地に植え継ぎを行い 25°C で培養した。

3-4、バイオマス

セルロース系原料にはダンチク (*Arundo donax*) を使用した。ダンチクはイネ科の多年草であり、温暖な気候であればあらゆる土壌、特に貧栄養や高塩濃度の土壌に適応できる。場所を選ばず繁殖率が高いことや、C4 植物並みの光合成能力を有し乾物生産量が高いためバイオマス資源植物として有望であると考えられる。本研究では、高知県沿岸地域より採取したダンチクを気乾し、カッティングミルを用いて、約 5 mm 以下に粉砕した。

3-5、酵母を用いた発酵実験

1) グルコースからの発酵実験の結果

グルコース 10%液体培地 (Glucose 100g/L, Yeast extract 10g/L, peptone 20g/L) をオートクレーブで 121°C、20 分間滅菌した。あらかじめ滅菌しておいた 200ml フラスコに 30ml ずつ分注した。

YPD 液体培地で前培養しておいた酵母を菌数がフラスコあたり 3×10^8 個になるように YPD 液体培地を加えた。フラスコを N_2 ガスでパージして、発酵栓のトラップには無菌水を 7ml 入れて封入した。(図 3)

これらを *S. cerevisiae* は 27°C、*C. shehatae* は 24°C に設定したインキュベーター内で静置培養を行い、所定時間ごとに 1ml ずつ液体培地を採取した。

測定用のサンプルを採取した後に、フラスコ内に N_2 ガスを吹き込み、パージ後、栓をすることで準嫌気条件を保った。繰り返し数は 3 とした。

2) 糖源をセルロースにした場合の発酵実験

液体培地 (Yeast extract 10g/L, peptone 20g/L, cellulose 2.5g/L, cellulase 10g/L) をオートクレーブで 121°C、20 分間滅菌した。セルラーゼは終濃度 10 倍濃度を調整し、 $0.45 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターで濾過滅菌し、オートクレーブ滅菌した液体培地に所定量加えた。これらをあらかじめ滅菌しておいた 200ml フラスコに 30ml ずつ分注した。

YPD 液体培地で前培養しておいた酵母を菌数がフラスコあたり 3×10^8 個になるように YPD 液体培地を加えた。フラスコを N_2 ガスでパージして、発酵栓のトラップには無菌水を 7ml 入れて封入した。(図 3)

これらを *S. cerevisiae* は 27°C、*C. shehatae* は 24°C に設定したインキュベーター内で静置培養を行い、所定時間ごとに 1ml ずつ液体培地を採取した。

測定用のサンプルを採取した後に、フラスコ内に N_2 ガスを吹き込み、パージ後、栓をすることで準嫌気条件を保った。繰り返し数は 3 とした。

3) ダンチュクからの発酵実験

液体培地 (Yeast extract 10g/L, peptone 20g/L, cellulase 10g/L) をオートクレーブで 121°C、20 分間滅菌した。セルラーゼは終濃度 10 倍濃度を調整し、 $0.45 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターで濾過滅菌し、オートクレーブ滅菌した液体培地に所定量加えた。これらをあらかじめ滅菌しておいた 200ml フラスコに 30ml ずつ分注した。

セルロース系原料に用いたダンチュクはカッティングミルを用いて、約 5 mm 以下に粉碎した。得られた資料をフラスコに 2 g ずつ加えた。

YPD 液体培地で前培養しておいた酵母を菌数がフラスコあたり 3×10^8 個になるように YPD 液体培地を加えた。フラスコを N_2 ガスでパージして、発酵栓のトラップには無菌水を 7ml 入れて封入した。(図 3)

これらを *S. cerevisiae* は 27°C、*C. shehatae* は 24°C に設定したインキュベーター内で静置培養を行い、所定時間ごとに 1ml ずつ液体培地を採取した。

測定用のサンプルを採取した後に、フラスコ内に N_2 ガスを吹き込み、パージ後、栓をすることで準嫌気条件を保った。繰り返し数は 3 とした。

4) 温度によるエタノール生産効率の比較実験

液体培地 (Yeast extract 10g/L, peptone 20g/L, cellulase 10g/L) をオートクレーブで 121°C、20 分間滅菌した。セルラーゼは終濃度 10 倍濃度を調整し、0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過滅菌し、オートクレーブ滅菌した液体培地に所定量加えた。これらをあらかじめ滅菌しておいた 200ml フラスコに 30ml ずつ分注した。

セルロース系原料に用いたダンチクはカッティングミルを用いて、約 5 mm 以下に粉碎した。得られた資料をフラスコに 2 g ずつ加えた。

YPD 液体培地で前培養しておいた酵母を菌数がフラスコあたり 3×10^8 個になるように YPD 液体培地を加えた。フラスコを N_2 ガスでパージして、発酵栓のトラップには無菌水を 7ml 入れて封入した。(図 3)

これらを *S. cerevisiae* は 27°C、28°C、*C. shehatae* 24°C、28°C に設定したインキュベーター内で静置培養を行い、所定時間ごとに 1ml ずつ液体培地を採取した。

測定用のサンプルを採取した後に、フラスコ内に N_2 ガスを吹き込み、パージ後、栓をすることで準嫌気条件を保った。繰り返し数は 3 とした。



図 3, 実験装置概要

3-6、*Trichoderma reesei* による糖化実験

1) セルロースを糖化する実験

液体培地 (Yeast extract 10g/L, peptone 20g/L, cellulose 2.5g/L) をオートクレーブで 121°C、20 分間滅菌した。あらかじめ滅菌しておいた 200ml フラスコに 30ml ずつ分注した。

2%グルコース液体培地で前培養しておいた *T. reesei* をフラスコあたり 1ml ずつ加えた。フラスコを N_2 ガスでパージして、発酵栓のトラップには無菌水を 7ml 入れて封入した。(図 3)

これらを 28°Cに設定したインキュベーター内で静置培養を行い、所定時間ごとに 1ml ずつ液体培地を採取した。

測定用のサンプルを採取した後に、フラスコ内に N_2 ガスを吹き込み、パージ後、栓をすることで準嫌気条件を保った。繰り返し数は 3 とした。

2) ダンチュクを糖化する実験

液体培地 (Yeast extract 10g/L, peptone 20g/L) をオートクレーブで 121°C、20 分間滅菌した。あらかじめ滅菌しておいた 200ml フラスコに 30ml ずつ分注した。

セルロース系原料に用いたダンチュクはカッティングミルを用いて、約 5 mm以下に粉碎した。得られた資料をフラスコに 2 g ずつ加えた。

2%グルコース液体培地で前培養しておいた *T. reesei* をフラスコあたり 1ml ずつ加えた。フラスコを N_2 ガスでパージして、発酵栓のトラップには無菌水を 7ml 入れて封入した。(図 3)

これらを 28°Cに設定したインキュベーター内で静置培養を行い、所定時間ごとに 1ml ずつ液体培地を採取した。

測定用のサンプルを採取した後に、フラスコ内に N_2 ガスを吹き込み、パージ後、栓をすることで準嫌気条件を保った。繰り返し数は 3 とした。

3-7、*Trichoderma reesei* と酵母の共培養

1) 液体培養による共培養

10%グルコース液体培地 (Glucose 100g/L, Yeast extract 10g/L, peptone 20g/L) に 2% グルコース液体培地で前培養しておいた *T. reesei* と YPD 液体培地で前培養しておいた酵母を 1ml ずつ加え、28°C に設定したインキュベーター内で静置培養した。

所定時間ごとに培養液を 1ml 採取して、希釈した。希釈した液体培地 100 μ l と 0.4% トリパンブルー溶液 400 μ l を混合し、Burker-turk に 10 μ l ずつロードした。ロードした Burker-turk を顕微鏡で観察し、酵母の生菌数を数えた。

2) 寒天培地による共培養

2%グルコース液体培地で前培養しておいた *T. reesei* と YPD 液体培地で前培養しておいた酵母を YPD 寒天培地に 100 μ l ずつ塗り付けたものを 25°C に設定したインキュベーター内で培養し、その後同一の PDA 寒天培地に植菌した。(図 4)

28°C に設定したインキュベーター内で培養し、*T. reesei* と酵母の成長を確認した。

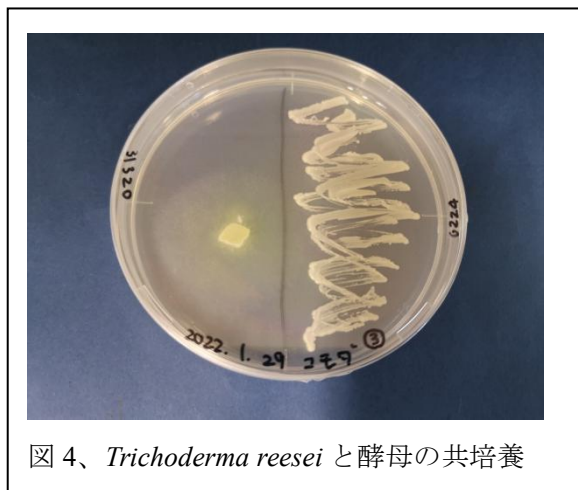


図 4、*Trichoderma reesei* と酵母の共培養

3-8、*Trichoderma reesei* で糖化を行い、酵母で発酵する実験

1) セルロースからの発酵実験

液体培地 (Yeast extract 10g/L, peptone 20g/L, cellulose 2.5g/L) をオートクレーブで 121°C、20 分間滅菌した。あらかじめ滅菌しておいた 200ml フラスコに 30ml ずつ分注した。

2% グルコース液体培地で前培養しておいた *T. reesei* をフラスコあたり 1ml ずつ加えた。フラスコを N_2 ガスでパージして、発酵栓のトラップには無菌水を 7ml 入れて封入した。(図 3)

これらを 28°C に設定したインキュベーター内で 1 日静置培養を行った後、YPD 液体培地で前培養しておいた酵母を菌数がフラスコあたり 3×10^8 個になるように YPD 液体培地を加えた。

これらを 28°C に設定したインキュベーター内で静置培養を行い、所定時間ごとに 1ml ずつ液体培地を採取した。

測定用のサンプルを採取した後に、フラスコ内に N_2 ガスを吹き込み、パージ後、栓をすることで準嫌気条件を保った。繰り返し数は 3 とした。

2) ダンチクからの発酵実験

液体培地 (Yeast extract 10g/L, peptone 20g/L) をオートクレーブで 121°C、20 分間滅菌した。あらかじめ滅菌しておいた 200ml フラスコに 30ml ずつ分注した。

セルロース系原料に用いたダンチクはカッティングミルを用いて、約 5 mm 以下に粉碎した。得られた資料をフラスコに 2 g ずつ加えた。

2% グルコース液体培地で前培養しておいた *T. reesei* をフラスコあたり 1ml ずつ加えた。フラスコを N_2 ガスでパージして、発酵栓のトラップには無菌水を 7ml 入れて封入した。(図 3)

これらを 28°C に設定したインキュベーター内で 1 日静置培養を行った後、YPD 液体培地で前培養しておいた酵母を菌数がフラスコあたり 3×10^8 個になるように YPD 液体培地を加えた。

これらを 28°C に設定したインキュベーター内で静置培養を行い、所定時間ごとに 1ml ずつ液体培地を採取した。

測定用のサンプルを採取した後に、フラスコ内に N_2 ガスを吹き込み、パージ後、栓をすることで準嫌気条件を保った。繰り返し数は 3 とした。

3-9、残糖量及びエタノール量の測定

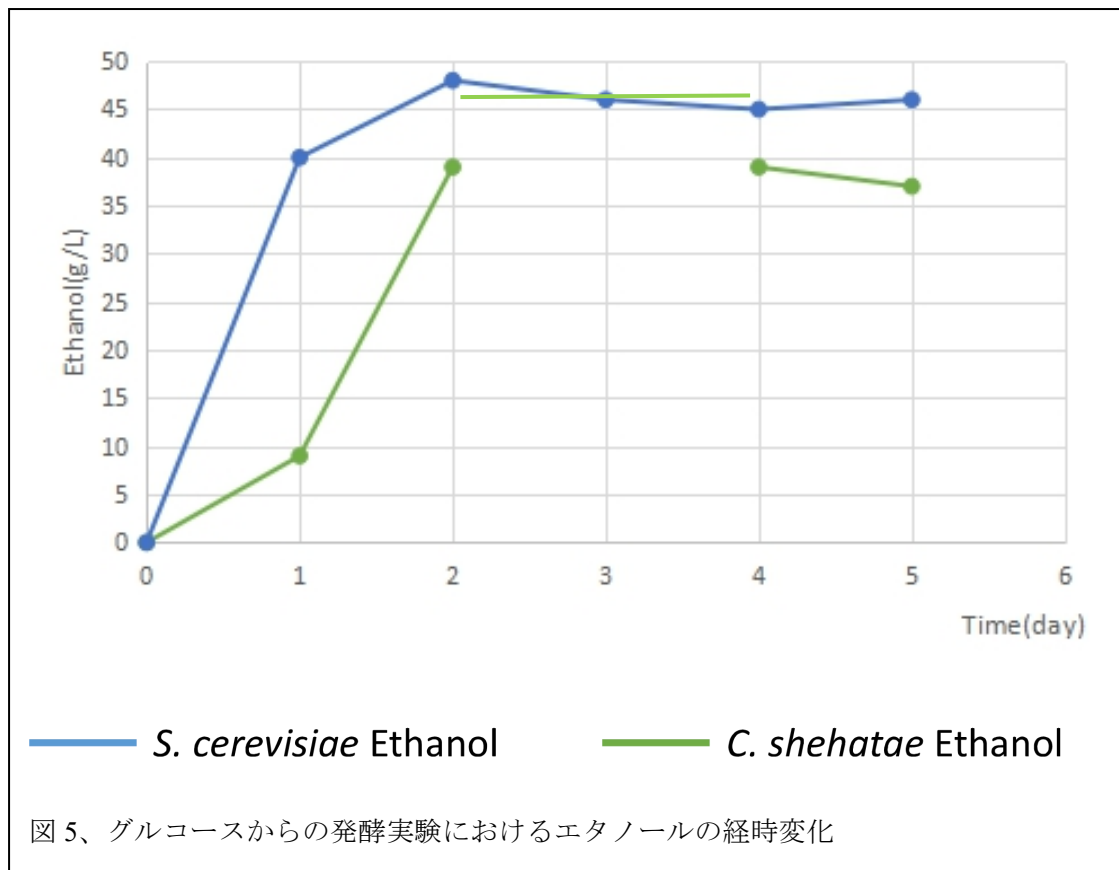
HPLC を用いて培養液中の残糖量とエタノール量を測定した。HPLC は株式会社日立製作所製の高速液体クロマトグラフィー D-7000 シリーズを用いて、検出器に示唆屈折検出器 (L-7490)、カラムは株式会社ジーエルサイエンス製 GL-Pack (4.6 × 250 mm) を用いた。移動相として脱気水、カラム温度 40°C、流速 1.0 ml/min の条件で分析した。

4、実験結果

4-1、酵母を用いた発酵実験

1) グルコースからの発酵実験の結果

S. cerevisiae と *C. shehatae* を供試菌とし、グルコース 100 g/L を原料としたエタノール発酵実験の結果は図 5 のようになった。



エタノール濃度の最高値は *S. cerevisiae* は 2 日目で 47.5 g/L、*C. shehatae* は 2 日目で 39.3 g/L であった。原料としたグルコースが 100 g/L であるため、収率は *S. cerevisiae* が 93.0%、*C. shehatae* が 77.0% となっている。*S. cerevisiae*、*C. shehatae* ともにエタノール濃度のピークが 2 日目であることから 2 日目で反応が終了していると考えられる。

2) 糖源をセルロースにした場合の発酵実験の結果

S. cerevisiae と *C. shehatae* を供試菌とし、セルロース 2.5 g/L を原料としたエタノール発酵実験の結果は図 6 のようになった。

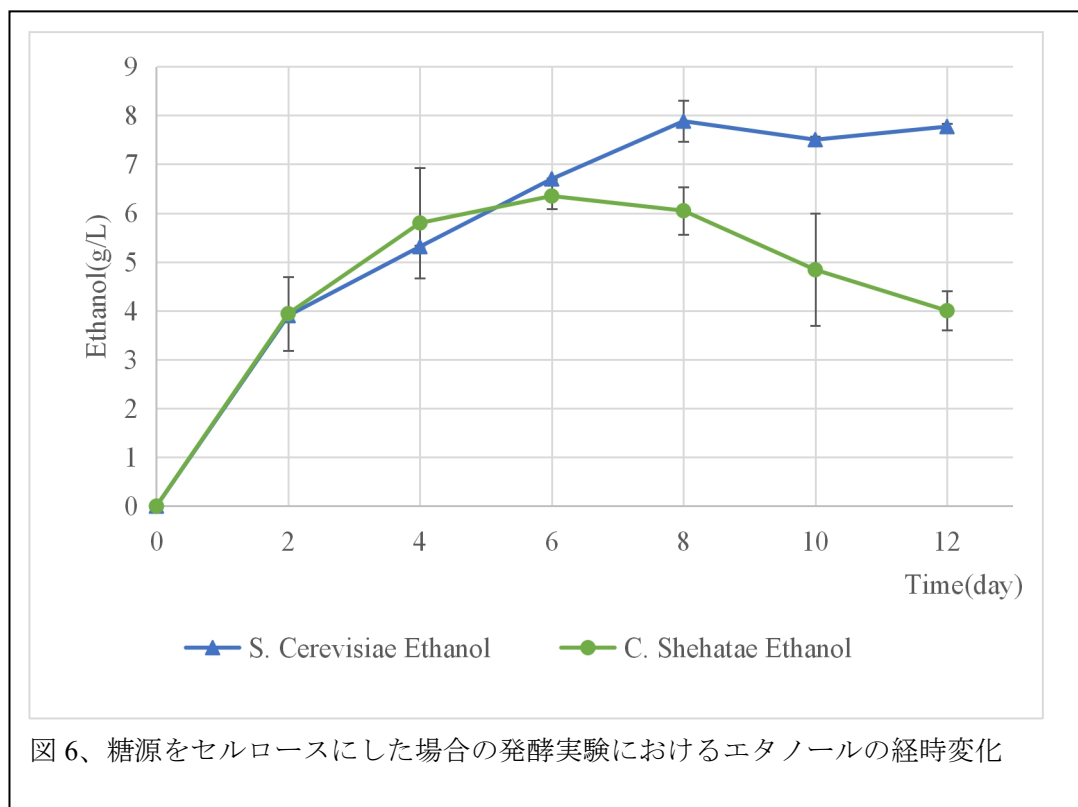
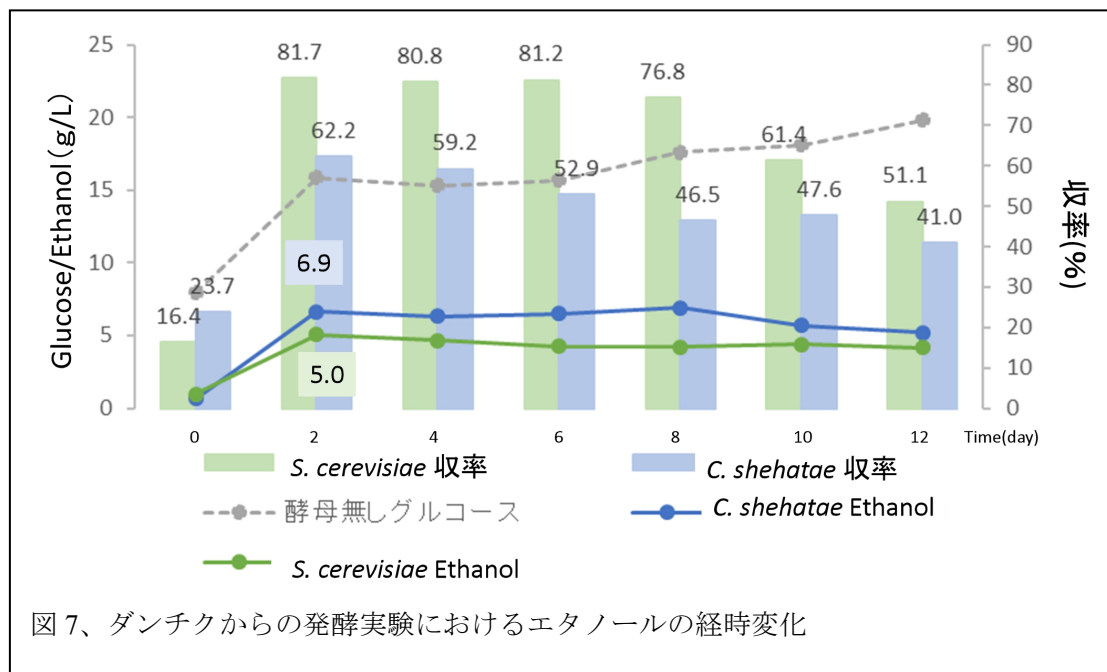


図 6、糖源をセルロースにした場合の発酵実験におけるエタノールの経時変化

エタノール濃度の最高値は *S. cerevisiae* は 8 日目で 7.8 g/L、*C. shehatae* は 6 日目で 6.3 g/L であった。収率は *S. cerevisiae* が 69.1%、*C. shehatae* が 52.7%となっている。*S. cerevisiae*、はエタノール濃度のピークが 6 日目であることから 4 日目から 8 日目の間で反応が終了していると考えられる。*C. shehatae* はエタノール濃度のピークが 8 日目であることから 6 日目から 10 日目の間で反応が終了していると考えられる。

3) ダンチュクからの発酵実験の結果

S. cerevisiae と *C. shehatae* を供試菌とし、ダンチュク 2 g を原料としたエタノール発酵実験の結果は図 7 のようになった。



エタノール濃度の最高値は *S. cerevisiae* は 2 日目で 6.9 g/L、*C. shehatae* は 2 日目で 5.0 g/L であった。原料としたダンチュクが 2 g であるため、最大収率は *S. cerevisiae* が 2 日目に 81.7%、*C. shehatae* が 2 日目に 62.2% となっている。*S. cerevisiae*、*C. shehatae* ともにエタノール濃度のピークが 2 日目であることから 3 日目までに反応が終了していると考えられる。

4) 温度によるエタノール生産効率の比較実験の結果

S. cerevisiae と *C. shehatae* を供試菌とし、ダンチク 2 g を原料としたエタノール発酵実験の結果は図 8 のようになった。

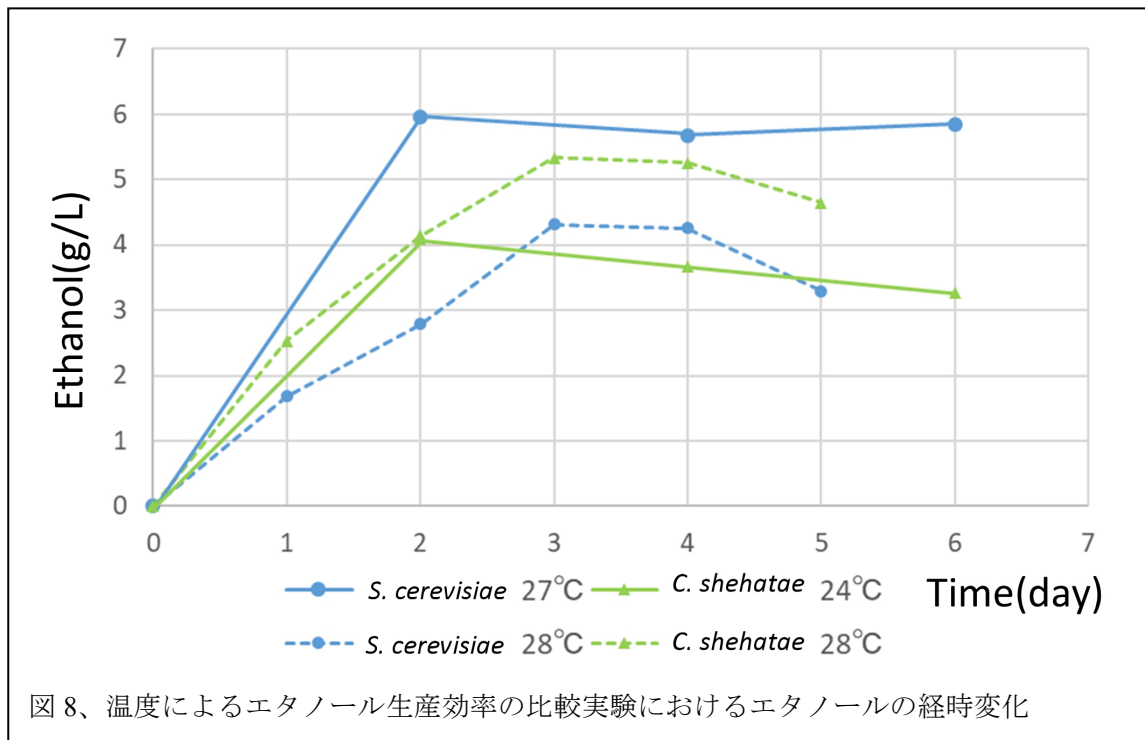


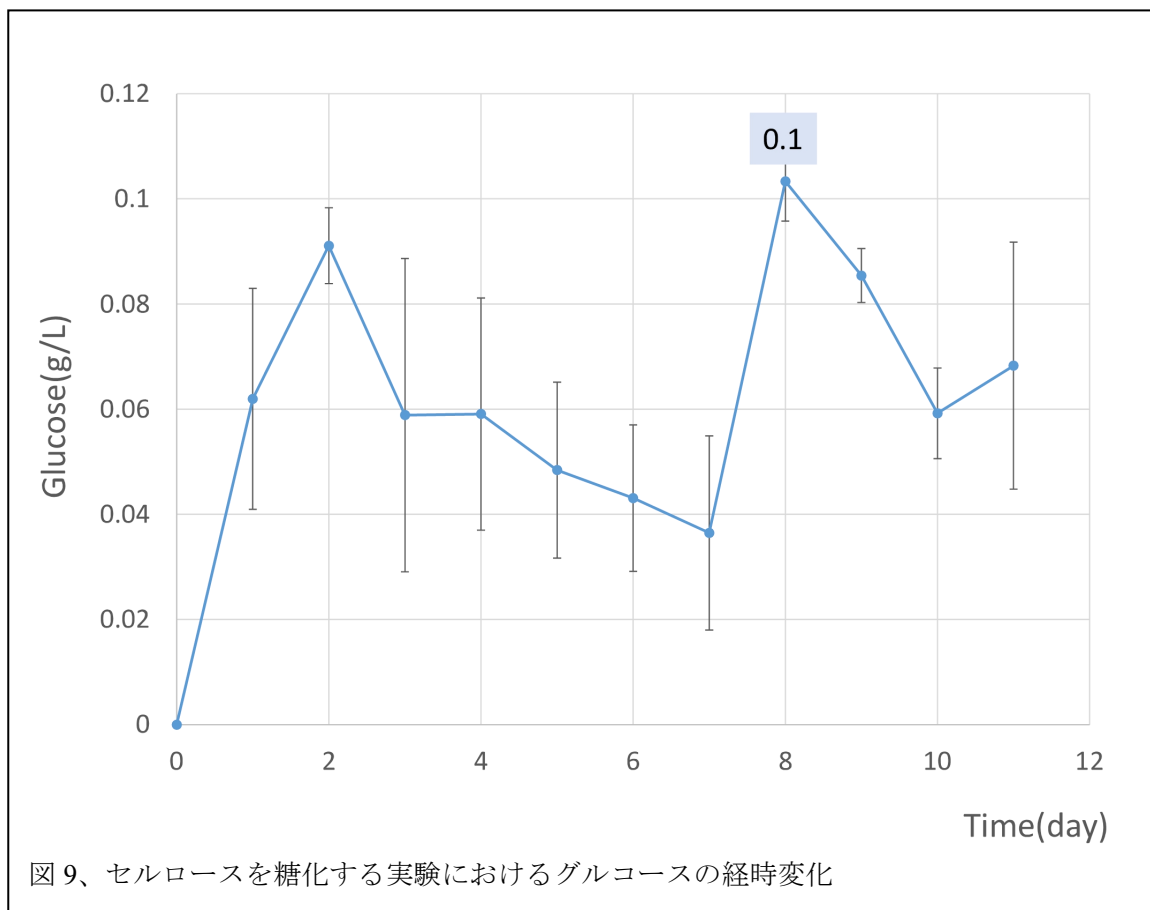
図 8、温度によるエタノール生産効率の比較実験におけるエタノールの経時変化

S. cerevisiae は 27 度のほうがエタノール生産効率が良いという結果だった。*C. shehatae* は 28°C のほうがエタノール生産効率が良いという結果だった。どちらの酵母も 28°C で培養すると、27°C、24°C で培養した時よりピークが遅くなっており反応速度が遅くなった。

4-2、*Trichoderma reesei* による糖化実験

1) セルロースを糖化する実験の結果

Trichoderma reesei を供試菌とし、セルロース 2.5 g/L を原料とした糖化実験の結果は図 9 のようになった。



グルコース濃度の最高値は 8 日目で 0.1 g/L であった。原料としたセルロースが 2.5 g/L であるため、*T. reesei* はセルロースをほとんど糖化していないことが明らかとなった。

2) ダンチクを糖化する実験

Trichoderma reesei を供試菌とし、ダンチク 2 g を原料とした糖化実験の結果は図 10 のようになった。

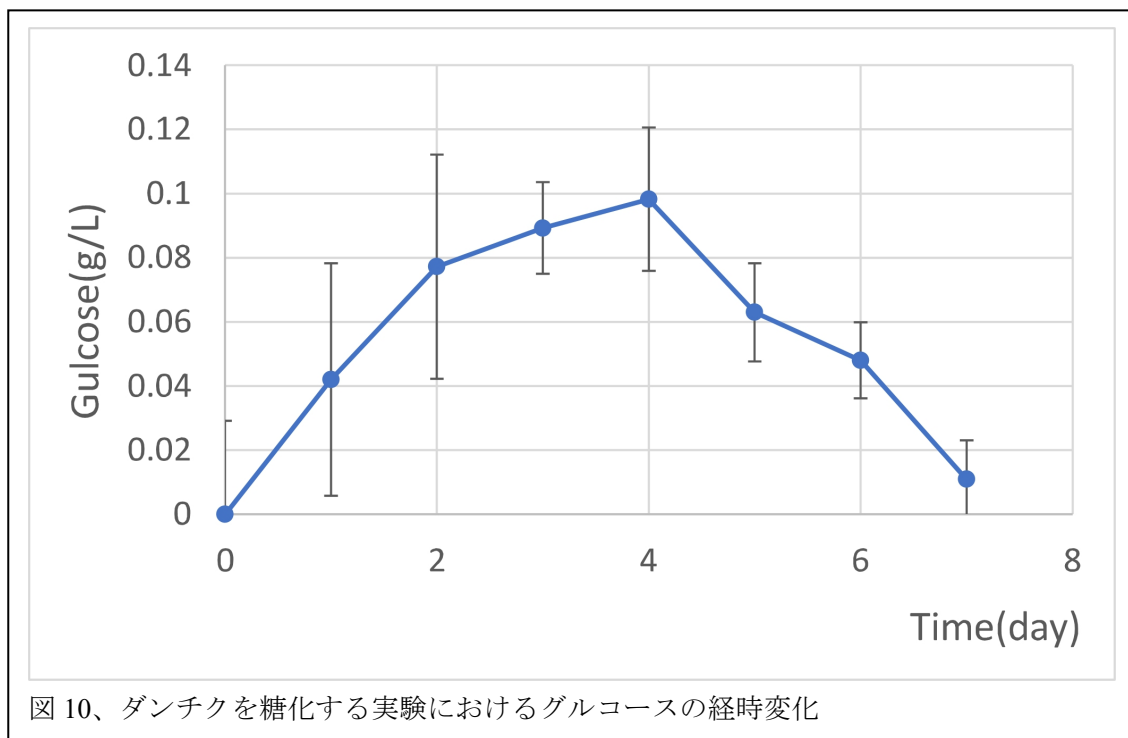


図 10、ダンチクを糖化する実験におけるグルコースの経時変化

グルコース濃度の最高値は4日目で0.14 g/Lであった。原料としたダンチクが2 gであるため、*T. reesei* はダンチクをほとんど糖化していないことがわかった。

4-3、*Trichoderma reesei* と酵母の共培養

1) 液体培養による共培養の結果

液体培地で酵母と *T. reesei* を共培養し、酵母の生菌数をカウントした結果は図 11 のようになった。

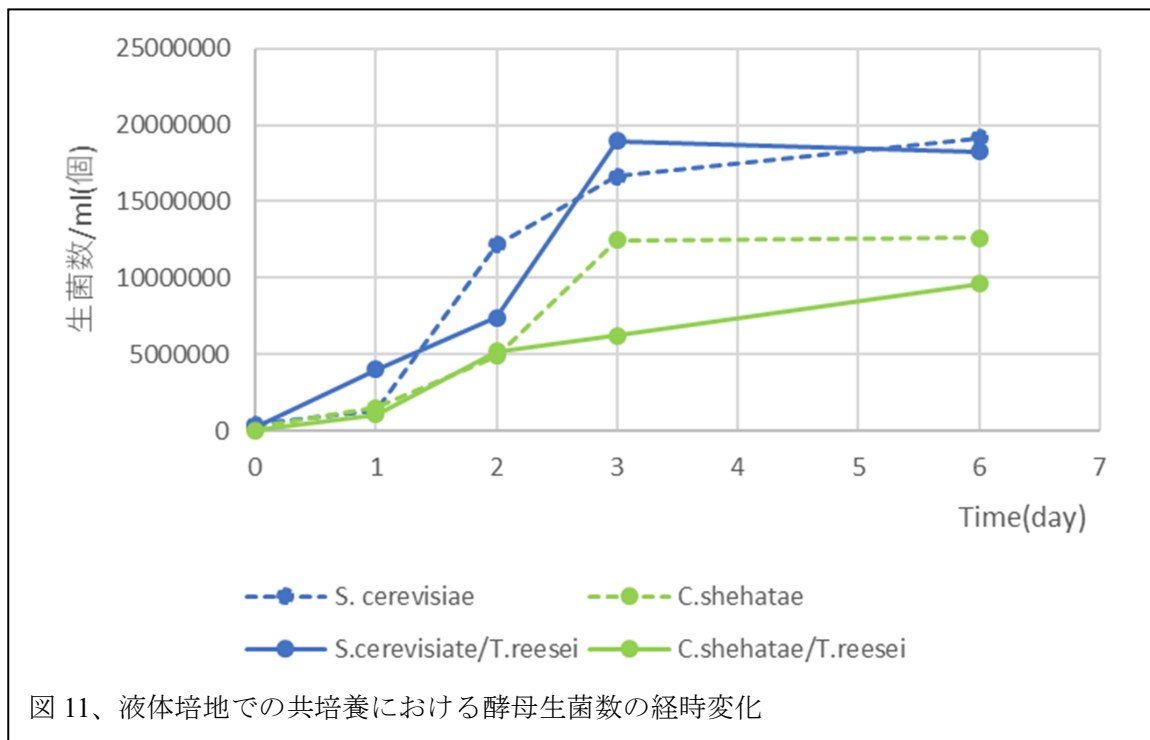


図 11、液体培地での共培養における酵母生菌数の経時変化

S. cerevisiae は *T. reesei* を加えて培養した条件と *S. cerevisiae* のみで培養した条件では酵母の生菌数の増加に大きな変化は見られなかった。*C. shehatae* は *S. cerevisiae* のみで培養した条件のほうが酵母の生菌数の増加が大きいという結果が得られた。*S. cerevisiae* と *C. shehatae* を比較すると、*S. cerevisiae* のほうが酵母の生菌数の増加が大きいという結果が得られた。

2) 寒天培地による共培養の結果

寒天培地で酵母と *T. reesei* を共培養した結果は図 12 のようになった。

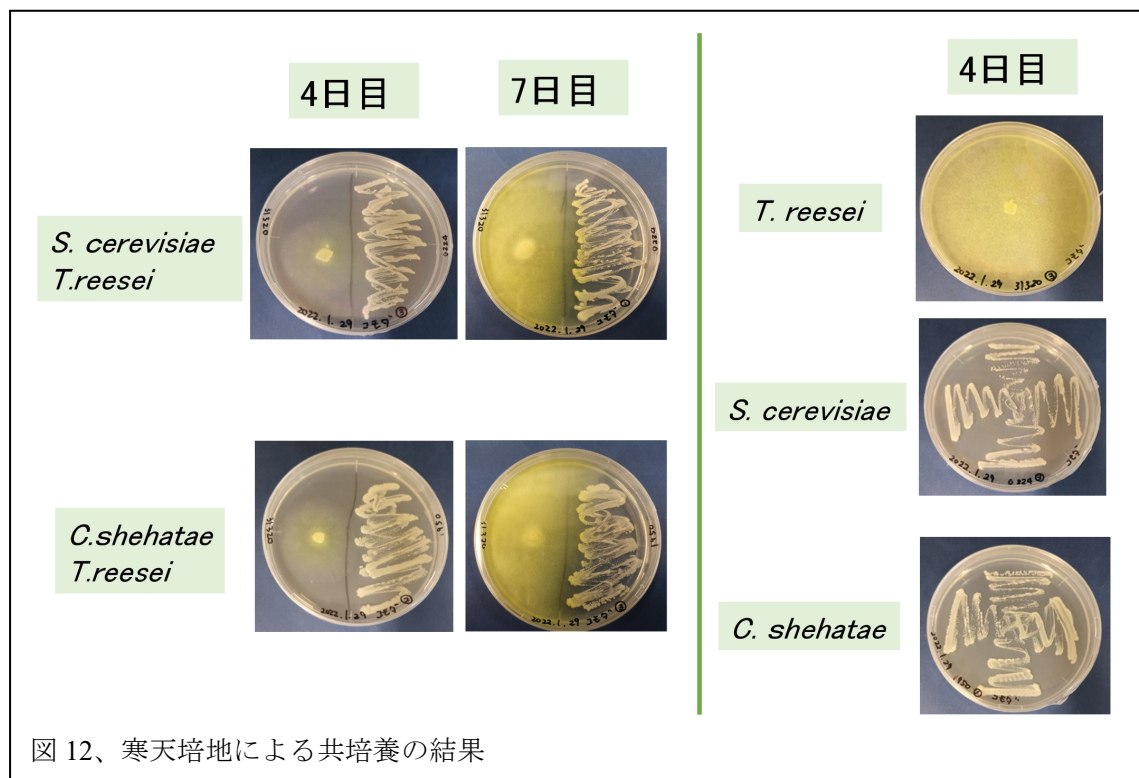


図 12、寒天培地による共培養の結果

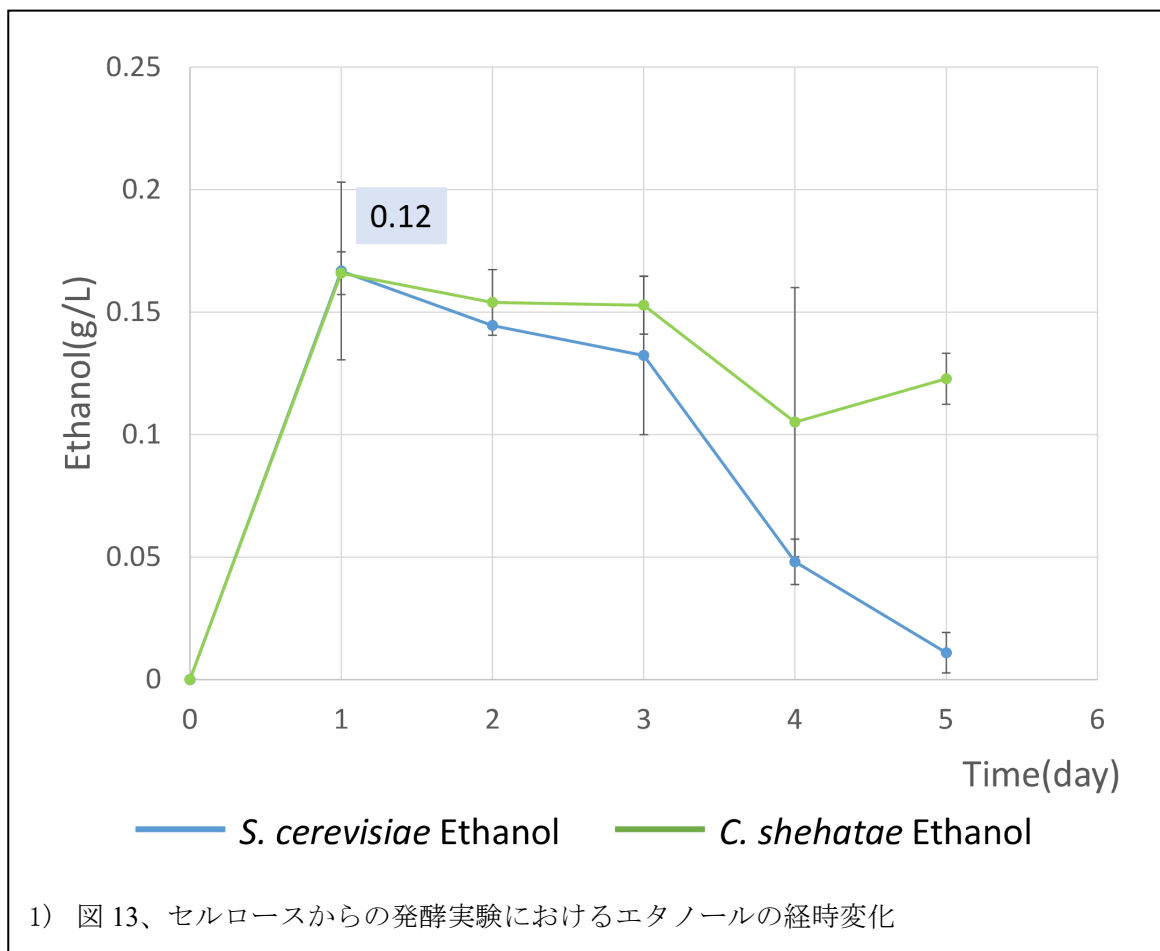
S. cerevisiae と *C. shehatae* は 4 日目の酵母単独で培養したものと比較しても成長に変わりはなく、*T. reesei* と共培養しても成長や成長速度に影響はないという結果が得られた。

T. reesei は 4 日目の段階では、同じ 4 日目の *T. reesei* のみ培養したものと比較すると明らかに成長が小さいのが見てわかった。しかし、7 日目の段階をみると *T. reesei* のみ培養した 4 日目のものと変わらないくらい成長している。このことから *T. reesei* は酵母と共培養すると成長速度が著しく低下するが、成長自体には影響はあまりないという結果が得られた。

4-4、*Trichoderma reesei* で糖化を行い、酵母で発酵する実験

1) セルロースからの発酵実験

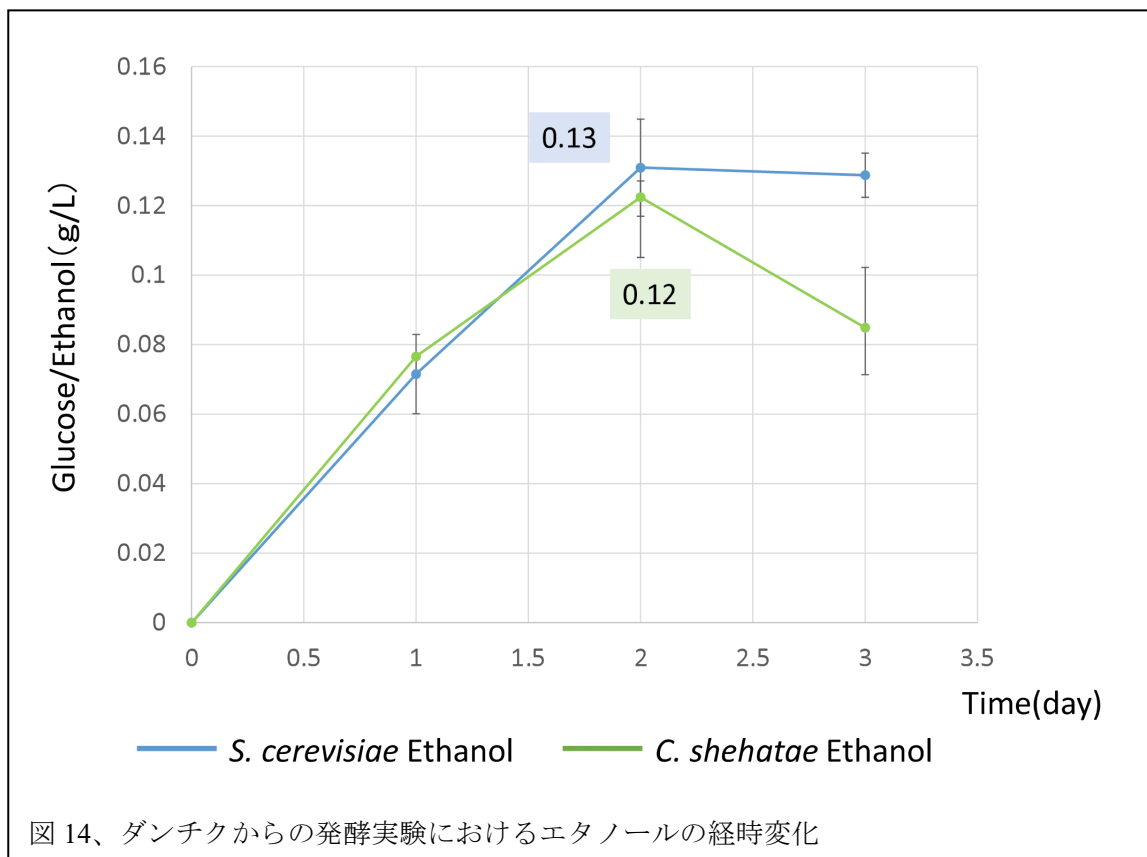
S. cerevisiae と *C. shehatae*、*T. reesei* を供試菌とし、セルロース 2.5 g/L を原料とした発酵実験の結果は図 13 のようになった。



エタノール濃度の最高値は *S. cerevisiae* と *C. shehatae* どちらも 1 日目で 0.12 g/L、であった。
T. reesei を用いたセルロースの糖化はほとんど起きていないのではないかと考えられた。

2) ダンチュクからの発酵実験の結果

S. cerevisiae と *C. shehatae*、*T. reesei* を供試菌とし、ダンチュク 2 g を原料とした発酵実験の結果は図 14 のようになった。



エタノール濃度の最高値は *S. cerevisiae* は 2 日目で 0.13 g/L、*C. shehatae* は 2 日目で 0.12 g/L であった。*T. reesei* を用いたダンチュクの糖化はほとんど進んでいない、または糖化によって生成した糖からはエタノールをほとんど生産できない(阻害を含む)と考えられる。

5、考察

S. cerevisiae と *C. shehatae* を用いた 10% グルコースからの発酵実験の結果から、*S. cerevisiae* はグルコースからのエタノール生産に適しているということが分かった。*C. shehatae* も *S. cerevisiae* と比較すると、エタノール生産効率は低くなるがグルコースからエタノールを生産することが可能だということが分かった。*S. cerevisiae* と *C. shehatae* を用いたセルロースからの発酵実験の結果からセルロースをセルラーゼを用いて糖化した糖からでも、*S. cerevisiae* と *C. shehatae* のどちらの株もエタノールを生産することが可能だと分かった。しかし、グルコースからの発酵実験と比較して反応速度が遅くなるという結果も得られた。この理由として、セルラーゼがセルロースを糖化する時間が必要であるためだと考えている。*S. cerevisiae* と *C. shehatae* を用いたダンチュクからの発酵実験の結果からダンチュクをセルラーゼを用いて糖化した糖からでも、*S. cerevisiae* と *C. shehatae* のどちらの株もエタノールを生産することが可能だと分かった。*S. cerevisiae* と *C. shehatae* のどちらの株も 3 日目までに反応が終了していると考えられ、セルロースからの発酵実験と比較すると反応速度が速いと考えられる。この理由としてダンチュクにもともと含まれている糖を使用しているからだと考えている。*S. cerevisiae* 27°C、28°C と *C. shehatae* 24°C、28°C の温度によるエタノール生産効率の比較実験の結果から *S. cerevisiae* は 27°C のほうが生産効率が高く *C. shehatae* は 28°C のほうが生産効率が高いことが分かった。しかし、反応速度は *S. cerevisiae* は 27°C、*C. shehatae* は 24°C のほうが反応速度が速いという結果だった。このことから *S. cerevisiae* は 27°C のほうが生産効率が高く、反応速度も速いということが分かったが、*C. shehatae* は 24°C のほうが反応速度が速く、28°C のほうが生産効率が高いという結果だったのでどちらの温度での培養が適しているかは一概には分からないと考えている。

T. reesei を用いたセルロースの糖化実験の結果から、今回は *T. reesei* はセルロースをほとんど糖化できていないことが分かった。グルコースの経時変化のグラフで一度ピークを迎えた後もう一度ピークを迎えていることについて、*T. reesei* グルコースが培地に存在していると酵素を分泌しなくなるため一度はグルコースが減少したが、グルコース濃度が低くなったことで再び酵素が分泌されたためだと考えている。また、*T. reesei* を用いたダンチュクの糖化実験の結果からも、今回は *T. reesei* はダンチュクをほとんど糖化できていないことが分かった。液体培地などの培養環境、嫌気条件 28°C のなどの培養条件、前培養の失敗など様々な理由が考えられるが、はっきりとはわかっていない。

T. reesei と酵母の液体培地での共培養の結果から、*S. cerevisiae* は *T. reesei* と共培養した条件でも、*S. cerevisiae* のみで培養した条件でも酵母の生菌数の増加に大差ないことから *T. reesei* と *S. cerevisiae* の液体培地での共培養は *S. cerevisiae* の成長に影響はないと考えられる。*C. shehatae* は、*C. shehatae* のみで培養した条件のほうが *T. reesei* と共培養した条件と比較すると酵母の生菌数の増加が大きい。このことから *T. reesei* との共培養が *C. shehatae* の成長に影響を与えている可能性が考えられるが、1 回しか実験を行っていないため断言はできない。*T. reesei* と酵母の寒天培地での共培養の実験結果から *S. cerevisiae* と *C. shehatae* のどちらの酵母株も *T. reesei* と共培養を行っても成長速度に影響はないことが分かった。*T. reesei* は酵母と共培養すると成長速度が著しく低下することが分かったが、成長することは可能だということが分かった。*T. reesei* が成長する際に酵母に菌体自体を避けている様子ではないことから、シャーレ内に酵母が発した何らかの成分が浮遊しており、*T. reesei* の成長に影響

響を及ぼしているのではないかと考えている。

T. reesei が糖化した糖を用いた発酵実験では、セルロースから糖化した糖、ダンチクから糖化した糖のどちらからもエタノールを生産することができなかった。この理由として *T. reesei* の糖化がうまくいっていないのではないかと考えている。上述した通り *T. reesei* の糖化がうまくいっていない理由は定かではないが、これに加え酵母と同時培養を行っているため酵母の影響を受けた可能性も考えられる。今後、*T. reesei* と酵母を用いて一貫バイオプロセスを構築するにあたって、*T. reesei* の糖化の改善は大きな課題である。

今回、発酵を行う酵母として *S. cerevisiae* と *C. shehatae* の2つの酵母株を用い、エタノール生産効率の比較を行ってきたがどの実験も *S. cerevisiae* が生産効率が高いという結果だった。発酵酵母として *C. shehatae* を用いた理由は、前述したとおり *C. shehatae* はグルコースだけでなくキシロースからもエタノールを生産できるためである。本研究でバイオマス資源として使用しているダンチクは糸状菌を用いて糖化を行った際、グルコースだけでなくキシロースも生産することが考えられるので、ダンチクを *T. reesei* を用いて糖化した発酵実験では *S. cerevisiae* よりエタノール生産効率が高くなることを期待したが、期待通りの結果ではなかった。この理由として *T. reesei* の糖化がうまくいっていないためキシロースが十分に生産されなかった可能性があると考えている。

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. Wang GS et al. (2009) Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose (SPORL) for robust enzymatic saccharification of hardwoods. *Biotechnol Prog.* 25(4):1086-93.
2. Luo X. et al. (2010) Evaluation of mountain beetle-infested lodgepole pine for cellulosic ethanol production by sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose, *Industrial and Engineering Chemistry Research* 49 (17), 8258-8266.
3. Pilu R et al, (2013) *Arundo donax* as an energy crop: pros and cons of the utilization of this perennial plant. *Maydica* 58,54-59.
4. 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.
5. 山中優花(2021). 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. 高知工科大学修士論文
6. 菰田恵菜(2020). セルロース系バイオマスを原料とする一貫バイオプロセスによるエタノール生産条件の検討. 高知工科大学卒業論文
7. [2010930634. pdf \(affrc. go. jp\)](#)
8. [安価な糖原料を用い効率的に産業用酵素を生産する技術を開発 | Research at Kobe \(kobe-u. ac. jp\)](#)