

酵素糖化とパン酵母発酵による竹からのエタノール生産

¹ 松岡 浩 ² 伊藤 明子 ² 佐藤 未怜

¹ 帝京科学大学生命環境学部生命科学科 ² 帝京科学大学生命環境学部生命科学科卒業生

Ethanol Production from Bamboo plant
by Enzymatic Saccharification and Fermentation Using Bakers' Yeast

Hiroshi MATSUOKA¹ Akiko ITOH² Misato SATO²

Abstract : Our aim is to produce ethanol efficiently by enzymatic saccharification coupled with ethanol fermentation using bamboo plant as a biomass. For this purpose, we examined pretreatment conditions of biomass for saccharification. At first bamboo plants were made into chips and then powders. When a distilled water with bamboo powder was 60-min autoclaved at 121 °C, 0.75 M NaOH-alkalization treatment was performed at 80 °C, and saccharification was carried out by 0.33 g/ℓ Acremonium cellulose at 45 °C, glucose was released at 5.7 g/ℓ after 96-h saccharification, which corresponded to 22.8 % on the basis of the bamboo plant. When fermentation was carried out at 30 °C following 96-h saccharification of the pretreated bamboo plant using Acremonium cellulase, the inhibitory effect of glucose was considered to be reduced and ethanol was produced at 4.2 g/ℓ after 72-h fermentation, which corresponded to 50.8 % yield on the basis of the total amount of bamboo.

Key words : 竹 リグノセルロース バイオエタノール セルラーゼ 酵素糖化 エタノール発酵
bamboo lignocellulose bioethanol saccharification ethanol fermentation

1. 緒言

バイオマスからの燃料用エタノールの生産は、化石資源に依存しない循環型社会の構築と温暖化対策としての二酸化炭素削減の観点から、近い将来、世界的規模での生産が期待される。2007年現在、バイオエタノールは、全世界で約5,000万kℓ生産されている。バイオエタノールの原料は、サトウキビやテンサイなどの糖質系、トウモロコシや小麦などのデンプン質系バイオマスが主である^(1,2)。糖質・デンプン質系バイオマスを用いることによりグルコースが容易に得られ、低コストでエタノール生産を行うことができる。しかし、世界的に食糧不足が深刻になりつつあることから、食糧として競合する糖質・デンプン質系バイオマスをエタノール生産へ転用することは避けることが望ましい。

近年、バイオマス資源として、リグノセルロース系バイオマスを利用する研究が進んでいる。我が国では年間2,700万トンに達する利用可能な木質系バイオマスが存在するが、木質系バイオマスは多くのリグニンを含むため、糖を得るためには硫酸による高温処理や爆砕などの過激な前処理プロセスが必要となる^(3,4)。これらの処理には、大量に発生する廃棄物の処理や、硫酸の中和・分離回収等の後処理の

ための大がかりな設備と高いランニングコストなど、解決しなければならない多くの課題がある。

竹は木質系バイオマスと同程度にセルロースを含んでおり、比較的成長が早いことから有望なセルロース資源といえる。しかし、リグノセルロースからのセルロースの加水分解は困難であることは木質系バイオマスと同様であり^(5,7)、竹からのエタノール生産をめざしての糖化の研究は、ほとんど行われていない。近年では、濃硫酸による竹の糖化⁽⁸⁾、竹粉の微細化による糖化速度の向上⁽⁹⁾、についての報告が行われているのみである。

本研究では、陸上栽培植物の中で成長後は食糧としてほとんど利用されず、エネルギー源としてもあまり利用されないが、本州以南、中国、東南アジアでは普遍的に存在する竹の一種であるモウソウチク（図1）を材料として小規模で比較的温和な条件での糖化発酵をめざして、前処理は加熱処理とアルカリ処理、それに続いて市販酵素による酵素糖化を行った。その後、パン酵母によるエタノール発酵を糖化と並行して行う、効率的なエタノール生産方法を構築するために必要な竹の前処理と酵素糖化条件について実験的検討を加えたので報告する。



図1 モウソウチク

2. 実験方法

2.1 前処理

チップ状のモウソウチク（山梨県産）を家庭用ミキサーで破碎し粉状にした後、ふるいを用いて粉径を揃えた竹粉を作成した。竹粉は蒸留水と混ぜて三角フラスコに入れ、121℃で60分オートクレーブ処理をした。その後、3,000 rpmで5分間遠心分離して上澄みを廃棄した（加熱処理）。つぎにこの竹粉を80℃に加温した0.75 M水酸化ナトリウム水溶液中で60分間静置し、3,000 rpmで5分間遠心分離して上澄みを廃棄した（アルカリ処理）。その後、0.2 M酢酸ナトリウム緩衝液（pH=4.8）で洗浄し、3,000 rpmで5分間遠心分離した後で上澄みを廃棄し150℃で5時間乾燥させて糖化処理用の竹粉を作成した。

2.2 酵素糖化

セルラーゼは、アクレモニウムセルラーゼ（明治製菓）を用いた。アクレモニウムセルラーゼは、セルロースの β -1,4-グルコシド結合をランダムに加水分解するエンドグルカナーゼ活性のみならず、セロビオースやセロオリゴ糖の非還元末端からグルコース単位に加水分解する β -D-グルコシダーゼ活性も高く、本酵素のみでセルロースの糖化を行えることが特徴である⁽¹⁰⁾。典型的な糖化実験では、100 ml 三角フラスコに、前処理を行った竹粉1.5 gを含む0.2 M酢酸緩衝液（pH=4.8）60 mlを入れ（25 g/l）、アクレモニウムセルラーゼを0.02 g添加し（0.33 g/l）、反応温度45℃、130 rpmで振とうを行っている。

2.3 エタノール発酵

酵母は市販のカネカ生イーストを用いた。酵母を

10倍容量の滅菌生理食塩水中に懸濁し、その100 μ lをYPD寒天培地（20 g/lグルコース、20 g/lポリペプトン、10 g/l酵母エキス、20 g/l寒天）に塗布した。その後、30℃、2日間培養し、コロニーを得た。事前に1コロニーをかきとり、前培養培地で培養後、マイクロチューブ中に酵母液を冷凍保存した。酵母液を解凍し、前培養培地250 mlに接種し、120 rpm、30℃で2日間振とう培養した。乾燥重量は、吸光度計でOD₆₆₀を測定し、（乾燥重量）=0.25x（OD₆₆₀）より算出した⁽⁶⁾。酵素糖化液100 mlにパン酵母100 mg（乾燥重量）を添加し、密栓フラスコで130 rpm、30℃で嫌気発酵させ、一定時間ごとにサンプリングを行い、グルコース濃度、エタノール濃度、生細胞数の測定を行った。グルコースの定量は、YSI BIOCHEMISTRY ANALYZER 2700を用い、エタノールの定量は、F-キットエタノール（ロシュ・ダイアグノスティクス）を用い、各データともに2回測定を行いその平均値を示した。生細胞数は、YPD寒天培地上でのコロニー数を数えることによるプレートカウント法で測定した。

3. 実験結果と考察

3.1 酵素糖化の至適 pH

本実験においてはアクレモニウムセルラーゼの酵素糖化の進行度を生成グルコース量で代表して示している。pH=4.5-5.0において最大のグルコース生成量を示したことから、酵素糖化における至適 pH は4.5-5.0と見なせる（図2）。以下の実験においては、pH=4.8の0.2 M酢酸緩衝液中で酵素糖化を行っている。

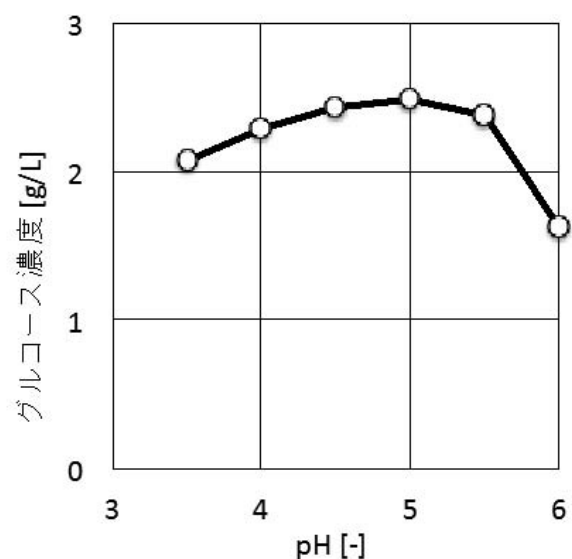


図2 酵素糖化における初期 pH の影響
（糖化 72 時間後のグルコース濃度）

3.2 竹粉サイズの影響

竹粉のサイズによる酵素糖化の影響を調べたところ、本実験の範囲内では竹粉サイズが小さいほど糖化が進みやすいが、99.9 μm 以下ではその影響はほとんどないことがわかった（図3）。小さなサイズの竹粉は取り扱いが難しくなることから、以下の実験においては、サイズ径を75-99.9 μm に揃えた竹粉を用いて実験を行っている。

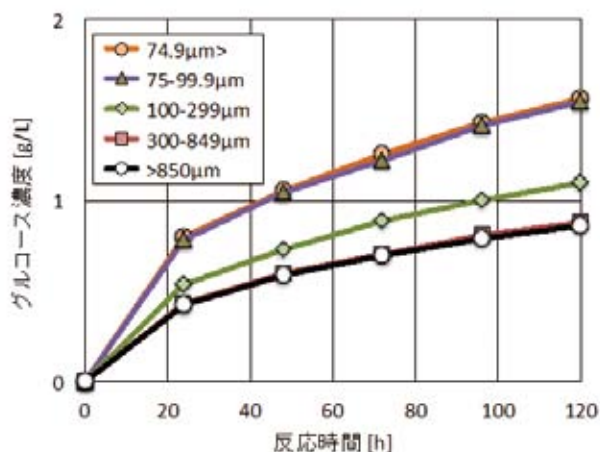


図3 酵素糖化における竹粉サイズの影響

3.3 前処理の影響

オートクレーブによる加熱処理とアルカリ処理することにより脱リグニン化を行っている。加熱処理は、本実験では121 $^{\circ}\text{C}$ で60分とした。アルカリ処理における水酸化ナトリウム濃度を変えた場合の実験結果が図4である。この図より、水酸化ナトリウム濃度の上昇に伴い、酵素糖化の進行は速くなるが、0.75 M 以上ではその差がほとんどないことがわかった。また、アルカリ処理における反応温度と反応時間の影響について調べた結果が図5である。今回の実験範囲内では、反応温度は高いほど、反応時間は長いほど反応は速く進行することが確認できた。以下の実験では、アルカリ処理における水酸化ナトリウム濃度は0.75 M、反応温度80 $^{\circ}\text{C}$ 、反応時間60分で実験を行っている。

3.4 酵素濃度の影響

酵素糖化における酵素量の影響について調べた。酵素濃度を変えて糖化72時間後のグルコース濃度を測定したところ、竹粉25 g/Lに対しては、酵素濃度0.3 g/L以上では糖化速度にはほとんど差がないことがわかった（図6）。

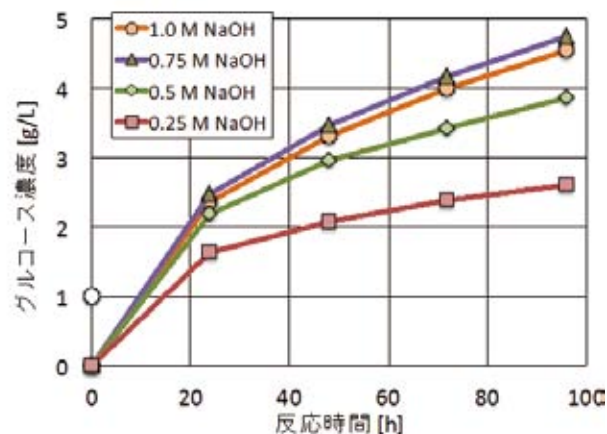


図4 アルカリ処理における水酸化ナトリウム濃度の酵素糖化に及ぼす影響

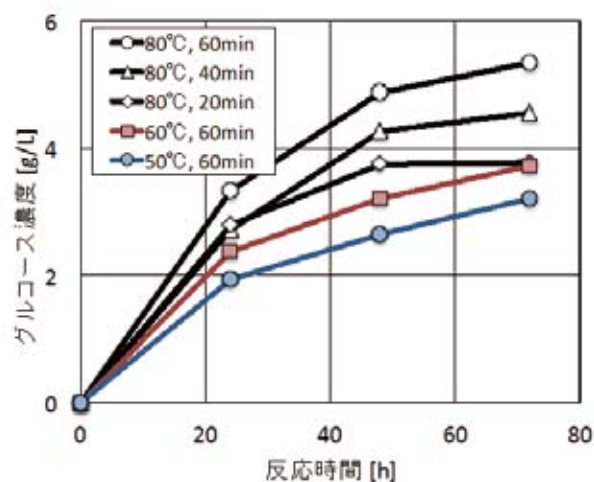


図5 アルカリ処理における反応時間・温度の酵素糖化に及ぼす影響

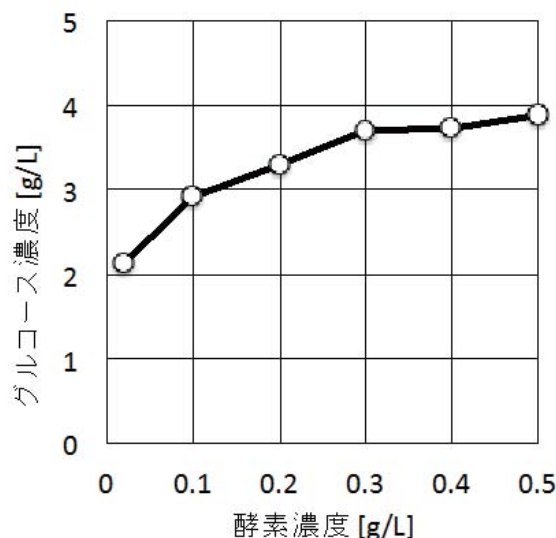


図6 酵素糖化における酵素濃度の影響
(糖化72時間後のグルコース濃度)

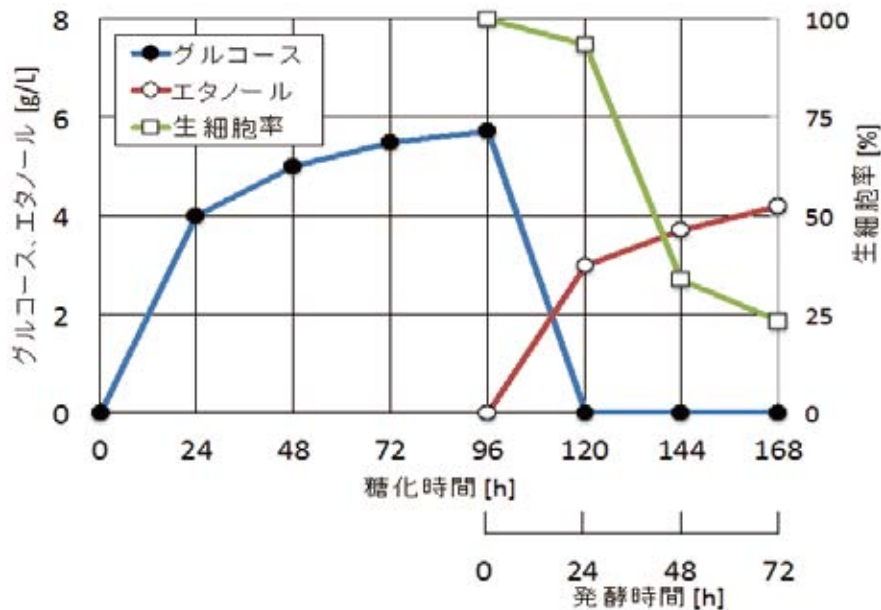


図7 酵素糖化とエタノール発酵
(96 時間まで酵素糖化を行い、96 時間の時点で酵母を投入して発酵を行っている)

3.5 糖化とエタノール発酵

糖化開始 96 時間まで酵素糖化を行い、その時点で糖化液に酵母を投入してエタノール発酵を行った(図7)。エタノール発酵開始時のグルコース濃度は 5.7 g/l であるが、発酵 24 時間後にはほぼ 0 g/l となっている。最大のエタノール生産量は 4.2 g/l であった。

4. 考察

本研究でバイオマスとして使用するモウソウチクに含まれる全糖量はデンプン、セルロースおよびヘミセルロースの合計量とみなせる。モウソウチクのセルロース含量は季節変動や個体差はあるが、竹のセルロース含量は 40-45 %、ヘミセルロース含量は 20-25 %であるとの報告がある⁽⁵⁾。また、ヘミセルロースは各種ペントースから構成されるが、竹の場合は約 90 %がキシロースであり、グルコースは数パーセント以下である⁽¹¹⁾。したがって竹から得られるグルコースはほぼセルロース由来と考えてよい。セルロースからの最大グルコース濃度は、セルロース濃度に 180/162 を掛けた値として算出されることから、本研究のモウソウチクのセルロース含量を 45 %と推定すれば、25 g/l のモウソウチクから生成する最大グルコース濃度の推定値は 12.5 g/l である。実際には、糖化 96 時間後までのグルコース濃度は 5.7 g/l であり、モウソウチクからの収率は 22.8 %、セルロースからの推定収率は 45.6 %で

あった。

最大理論エタノール濃度は、1 分子のグルコースから 2 分子のエタノールが生成するとして、モウソウチクに含まれる遊離可能なすべてのグルコースが 100 %エタノールに変換されると仮定し、グルコース濃度に $2 \times (46/180) = 0.51$ を掛けた値として算出される。ゆえに、25 g/l のモウソウチクから生成する理論エタノール濃度の推定値は 6.37 g/l であり、推定理論収率は 89.4 %である。発酵時におけるグルコース濃度は、発酵開始後は急激に下がり、24 時間以降はほとんどゼロであることから、発酵過程においては基質供給が律速となっていることがわかる。

また、発酵 72 時間後に得られた 4.2 g/l のエタノール濃度は、上述の糖化 96 時間後の糖化液中のグルコース濃度から算出される最大理論エタノール濃度の推定値 (2.9 g/l) よりも高い。一般に β -グルコシダーゼ活性は高濃度のグルコースに対しては基質阻害を受けることが知られている^(6,12)。本実験では、エタノール発酵中にグルコースが消費され、 β -グルコシダーゼ活性に対する基質阻害が解除されたことにより、溶液中のオリゴ糖の加水分解が促進され、より多くのグルコースが生成したことが考えられる。さらに、モウソウチク中の加水分解物であるオリゴ糖が、エタノール発酵中に残留酵素によりグルコースに変換されることによる増加も考えられる。

また、エタノール発酵時においては、糖化处理の生産物であるグルコース以外の培地成分を加えていないので酵母は死滅していくと考えられるが、発酵24時間後でも93%、72時間後でも25%の生細胞数が残存していた。これは、モウソウチクに含まれる微量の窒素源が酵母の代謝維持および増殖に影響しているのかもしれない。

5. 結言

本研究では、モウソウチクを原料として用い、アクレモニウムセルラーゼによる糖化反応とパン酵母によるエタノール発酵を併用した効率的エタノール生産方法について検討を行っている。バイオマスの前処理条件については、過激な硫酸法を避け、温和な条件であるアルカリ処理と酵素法の組み合わせについてその反応条件の検討を行った。前処理条件としては、121℃で60分間の加熱処理、80℃で60分間の0.75 M 水酸化ナトリウム中でのアルカリ処理、pH=4.8、45℃でのアクレモニウムセルラーゼを用いての糖化が効果的であった。酵素糖化を45℃で96時間行った後に、パン酵母を添加し30℃でエタノール発酵を行うことにより、糖化反応とグルコース消費が併行して進み、モウソウチクからの収率は50.8%に相当する5.7 g/ℓのエタノール生成が認められた。

参考文献

- 1) Licht, F. O.: World Ethanol & Biofuels Report (2006) .
- 2) 日本エネルギー学会：バイオマスハンドブック, 日本エネルギー学会編, オーム社, 2002, pp.157-165.
- 3) M. Teherzadeh, K. Karimi : Enzyme-based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic Materials : A Review, *BioResources*, 2: 707-738, 2007.
- 4) M. Teherzadeh, K. Karimi : Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review, *Int. J. Mol. Sci.*, 9: 1621-1651, 2008.
- 5) 中村嘉年, 佐々木千鶴：リグノセルロースの総合的利用法と各段階における技術的課題, 近藤昭彦, 植田充美, セルロース系バイオエタノール, エヌ・ティ・エス, 2005, pp.73-85
- 6) 是石真友子, 今中洋行, 今村維克, 狩山昌弘, 中西一弘：酵素糖化と発酵を併用した小麦フスマからの効率的エタノール生産, 生物工学会誌, 87 巻：216-223, 2009.
- 7) C. Asada, Y. Kondo, C. Sasaki, Y. Nakamura : Bioconversion of Soy Sauce Residue Treated with Steam Explosion into Ethanol by Meicelase and *Mucor indicus*, *J. Food Technol.*, 8 : 187-190, 2010.
- 8) 岩永 朋弘, 庄 智裕, 安 明哲, 吉田 裕美, 城 昭典, 木田 建次：竹の濃硫酸糖化および電気透析により調製した糖液の連続発酵によるバイオエタノールの生産、日本生物工学会大会講演要旨集：108, 2009.
- 9) 柳沢 満則、中崎 清彦：バイオエタノール生産のための竹粉末の微細化とアルカリ処理、日本生物工学会大会講演要旨集：169, 2009.
- 10) 渡部昭, 五味勝也：非可食用バイオマスからの糖化技術および糖化酵素の現状と課題, 近藤昭彦, 植田充美, セルロース系バイオエタノール, エヌ・ティ・エス, 2005, pp.177-187.
- 11) 前川英一, 北夫弘一郎：竹のヘミセルロースに関する研究 (1), 木材研究, : 100-104, 1965.
- 12) C. Riou, J.-M. Salmon, M.-J. Vallier, Z. Günata, P. Barre : Purification, Characterization, and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant β - Glucosidase from *Aspergillus oryzae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 : 3607-3614, 1998.