

令和元年6月12日現在

機関番号：32685

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00660

研究課題名(和文)ハイブリッド酵母による草木質バイオマスの並行複発酵

研究課題名(英文) Simultaneous Saccharification and Fermentation of Lignocellulosic Biomass by Hybridized Yeast

研究代表者

田中 修三 (Tanaka, Shuzo)

明星大学・理工学部・教授

研究者番号：00171760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、草木質バイオマスからのエタノール製造を目指し、アルカリ酸化処理による前処理、自前のMT酵素の生産と糖化能及びキシロース利用酵母FSC株による並行複発酵について検討した。NaOHとH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるアルカリ酸化処理により、炭水化物の糖化率として稲藁100%、ナラ73%、杉35%を得た。MT酵素は稲藁基質により生産可能で、温度30℃で高い糖化能を有した。凍結保存のFSC株は、活性化培養により、本来の発酵能を回復・維持した。前処理済み稲藁(BM)の並行複発酵により、酵素/基質比=1/100(低い酵素添加量)でもエタノール転換率0.39 L/kg-BMを得て、本研究の目標値を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

草木質バイオマス(BM)からのエタノール製造は、BM構造の難糖化性、市販酵素の高価格及び酵母のキシロース利用不可の3点の課題を抱えている。本研究のアルカリ酸化処理、自前のMT酵素とFSC株による並行複発酵プロセスは、これらの課題を概ね解決し、その学術的・社会的な意義は大きい。特に、30℃高活性のMT酵素とキシロース利用FSC株による並行複発酵は独自の技術で、独創的である。達成したエタノール転換率は本プロセスの実用化を近づけ、仮にわが国の年間ガソリン消費量6,000万kLの10%にエタノールを使えば、単純計算で年間924万tの二酸化炭素排出を削減できることになる。

研究成果の概要(英文)： This study investigated the alkali-oxidative pretreatment, production and saccharification ability of the onsite MT-enzyme and simultaneous saccharification and fermentation (SSF) by xylose utilizing yeast FSC strain, aiming at ethanol production from lignocellulosic biomass (rice straw, oak and cedar).

By the alkali-oxidative pretreatment using NaOH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, carbohydrate saccharification rates obtained are 100% in rice straw, 73% in oak and 35% in cedar. The MT-enzyme could be efficiently produced using rice straw as a substrate and has possessed a high saccharification ability at 30 degree C. The freeze-preserved FSC strain could recover and maintain the fermentation ability originally possessed, after its cultivation for activation. The SSF of pretreated rice straw (BM) achieved 0.39 L/g-BM in ethanol production even at a high ratio of enzyme/substrate of 1/100, a low addition of enzyme, and satisfied the target of this study.

研究分野：草木質バイオマスからのバイオエタノール製造のための前処理、酵素糖化及び並行複発酵技術の研究・開発

キーワード：バイオエタノール アルカリ酸化処理 MT酵素 キシロース利用酵母FSC株 並行複発酵 エタノール転換率 リグノセルロース 草木質バイオマス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

未利用の草木質バイオマス（稲藁や廃・残材など）を原料とするエタノールの製造は、化石燃料由来の二酸化炭素の排出抑制と再生可能エネルギーの確保の両面で注目されている。この製造法は、食料供給と競合しないが、草木質を構成するリグノセルロースが糖化されにくい構造であり、また酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が主な糖成分の一つである五炭糖キシロースを利用できないという問題も抱えている。草木質バイオマスの場合、糖化の程度とキシロース利用の可否がエタノール発酵の効率を大きく左右する。

リグノセルロースを糖化するには、前処理により、エタノール原料とならないリグニンの除去や難分解性構造の改変を行う必要がある。そのため前処理法に熱・薬品処理（古くはパルプ用蒸解法）、超臨界水処理、イオン液体処理などがあるが、草木質バイオマスに対してはいずれも研究・試験段階のものが多い。前処理はバイオエタノール製造のボトルネックになる工程であり、草木質バイオマスに適した前処理技術の開発が求められている。

糖化法としては濃硫酸法と酵素糖化法があるが、濃硫酸法は糖の一部分解、発酵阻害物質の生成及び高濃度有機性廃液の発生などの難点があり、近年は酵素糖化法の研究が進められている。しかし、市販の工業用セルラーゼを用いると、高価格の酵素の購入費に加えて、酵素反応の最適温度が 50-55℃であるため、並行複発酵（30℃）での糖化率の低下などの問題がある。これに対して、酵素の添加量を増やして並行複発酵する方法や糖化と発酵を別々のタンクで行う方法があるが、これらはコストや発酵効率の面から好ましくない。

酵母 *S. cerevisiae* がキシロースを利用できないという問題に対しては、近年遺伝子組換えによりキシロースの発酵能を賦与した組換え酵母の研究がなされている。しかし、キシロース利用組換え酵母によるエタノール発酵については、発酵条件や酵母の安定性など、まだ解決しなければならない問題が残っている。

### 2. 研究の目的

本研究は、上記の背景と先行研究（環境研究総合推進費助成）の成果を踏まえて、草木質バイオマスを原料とするバイオエタノールの製造に対して、熱アルカリ処理等による前処理、温度 30℃での酵素による糖化、*S. cerevisiae* と *Candida intermedia* との細胞融合で製造したキシロース利用ハイブリッド酵母による発酵、さらにこれらの要素技術の改良とその組み合わせによる並行複発酵プロセスとして技術の確立を目指すものである。

本研究の最終目標として、草木質バイオマス（BM）に対して、①前処理+酵素糖化による糖化率 90%以上、②並行複発酵によるエタノール生成 0.35 (L/kg-BM) 以上、の 2 点の達成を掲げた。

### 3. 研究の方法

本研究は先行研究の発展・応用型研究であり、MT 酵素を産生する *T. reesei* 変異株（MT95 株）とキシロース代謝能を細胞融合により賦与したハイブリッド酵母（FSC 株）はすでに獲得している。その上で、本研究はつぎの 3 つの課題を取り上げた。草木質 BM に対して、①アルカリ酸化処理等による前処理、②MT 酵素の生産方法と糖化能、③ハイブリッド酵母 FSC 株による並行複発酵に関する検討である。研究期間 3 年のうち、平成 28 年度は項目①について前処理条件の検討と BM 糖化性からの評価を行い、平成 29 年度は項目③について並行複発酵の影響因子や運転・管理条件を調べ、平成 30 年度は項目②について影響因子や糖化条件及び MT 酵素の生産方法を検討し、さらに MT 酵素と FSC 株による並行複発酵についてプロセス全体としての解析・評価を行った。平成 28 年度実施状況報告書に記述の通り、当初二年目に予定していた課題②は最終年度に回し、課題③を二年目に検討した。

#### (1) 草木質バイオマスのアルカリ酸化処理等による前処理

対象とする草木質 BM は、未利用廃棄物の中でも量の多い稲藁、杉（針葉樹）及びナラ（広葉樹）である。ここに、BM の種類（草本系と木質系、針葉樹と広葉樹）による相違、特に BM 中の糖組成の違いによる影響を評価するために、これらを選定した。稲藁はブレンダーで破碎し、木材はおが屑を使用した。破碎稲藁とおが屑をハンマクラッシャーで粒径 1~0.3mm に粉碎し、BM 粒径が前処理に及ぼす影響を調べた。前処理法としてはアルカリ酸化処理を取り上げ、稲藁に対しては先行研究で開発した亜塩素酸・重曹法についても検討した。

アルカリ処理は、NaOH によるアルカリ処理（A 処理）及び NaOH と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によるアルカリ酸化処理（AO 処理）、という 2 つの方法を検討した。粉碎木質 BM1.0g に対して、A 処理では NaOH の添加量を変え、その結果を踏まえて AO 処理では NaOH1.0g に対して H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 0.025~0.2g の範囲で添加し、加熱下でリグニンの除去と BM の膨潤化を図ることにより、BM の糖化性を高めることを検討した。稲藁の前処理は、木質 BM の結果を参考にして、AO 処理を採用し、さらに先行研究で開発した亜塩素酸・重曹法による稲藁の前処理についても検討した。具体的には、処理条件（粉碎粒径、加熱温度、薬品添加量、処理時間）を変化させて、前処理済み BM を酵素により糖化し、その糖化性の変化から処理効率を評価した。

主な分析項目のリグニンは米国立再生可能エネルギー研究所（NREL）リグニン定量法、糖は DNS 法と HPLC で分析し、バイオマスの形状変化（膨潤化）は顕微鏡観察により解析した。また、MT 酵素については SDS-PAGE による酵素タンパクの分離・解析を行った。

## (2) ハイブリッド酵母 FSC 株による並行複発酵

FSC 株は凍結保存してあるので、まず解凍した保存株の活性化培養を行い、FSC 株の発酵能を回復させた上で、以下の実験を行った。

FSC 株と酵素を用いて、多糖類のセルロースやキシラン及びキシロース（五炭糖）などの基質に対して、温度 30℃ で効率的にエタノールを生産する並行複発酵の運転・管理条件を検討した。具体的には、バッフル付フラスコやジャーフェーマンターを用いて、温度 30℃ での並行複発酵における各種因子（酵素濃度、菌体濃度、基質濃度・負荷、溶存酸素、反応時間）の影響及び糖化と発酵に及ぼす生成物阻害を調べ、並行複発酵槽の運転・管理条件や発酵効率等を詳細に検討した。これらの実験では、酵素として市販の CTec2 (Novozymes) を用いた。

## (3) MT 酵素の生産方法と糖化能及び FSC 株を用いた並行複発酵

先行研究で獲得した MT95 株が産生する MT 酵素を使って、前処理済み BM の糖化 (30℃) に対する酵素/基質の比、反応時間、生成物などが糖化活性に及ぼす影響を調べ、その結果を基に並行複発酵での糖化条件を検討した。また、MT95 株による MT 酵素の生産方法についても検討し、MT95 株の培養及び酵素産生における炭素源として粉碎 BM を利用できないかについても調べた。さらに、前処理・酵素糖化・発酵の一連の発酵プロセスを総合的に評価するため、亜塩素酸・重曹法により前処理した稲藁を使って、MT 酵素と酵母 FSC 株を用いた並行複発酵によるエタノール生成についても調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 草木質バイオマスのアルカリ酸化処理等による前処理

木質系のナラと杉に対して、各粉碎 BM に NaOH によるアルカリ処理 (A 処理) 及び NaOH と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によるアルカリ酸化処理 (AO 処理) を行い、その糖化促進の効果を評価した。

A 処理の場合、BM 1.0g に対して、NaOH 1.0g 添加の効果が大きく、図 1 に示したように、糖生成は未処理 BM (図 1 の「未」) に対してナラで 16.5 倍及び杉で 5.1 倍の生成量であった。これらを糖化率にするとそれぞれ 36.5% と 15.1% であった。図 1 の「熱」は薬剤無添加の熱処理のみであり、NaOH 添加の効果が確認できた (杉の A 処理が低下しているのは不明)。A 処理により BM 中リグニン量はナラで 22% 減少したが、杉はほとんど変わらなかった。

AO 処理では、A 処理の結果から NaOH を 1.0g に固定して、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 0.025~0.2g の範囲で添加して処理する同時処理 (AO 処理と表記) の効果を検討した (図 2 の AO 処理)。効果の高かった H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1g 添加系で、糖化率はナラが 61.4% 及び杉が 34.9% に向上した。このとき BM 中のリグニンはナラが 8% 減少したが、杉は変わらず、また炭水化物は両 BM でキシランの減少 (溶出) とグルカンの増加が確認された。但し、キシラン溶出は炭水化物全量に対して最大 18% に留まった。また、顕微鏡観察によれば BM が前処理により膨潤化しており、この形態変化も糖化促進の重要な因子であると考えられる。

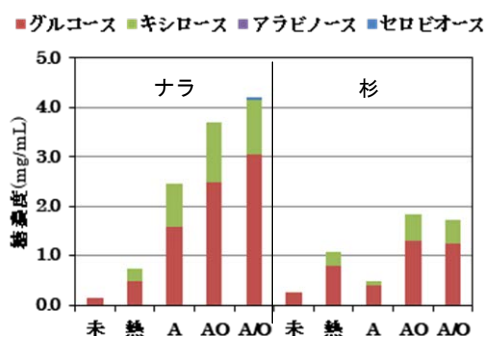


図 1 アルカリ酸化処理による木質 BM (0.3mm 粉碎) の糖化促進効果

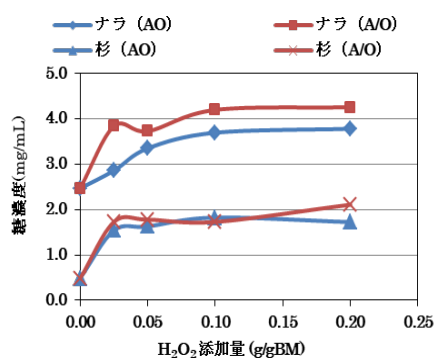


図 2 木質 BM (0.3mm 粉碎) のアルカリ酸化処理における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加の効果

つぎに、NaOH 処理後に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えて再処理する二段処理 (A/O 処理と表記) を行った結果、ナラは前述の AO 処理の 1.14 倍 (糖化率 73%) の糖を生成した (図 1、図 2)。なお、杉は両処理法に大きな差異は見られなかった。なお、経済産業省化学工業統計 (2015 年) による NaOH と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の価格から薬品コストを試算すると、ナラの A/O 処理費は約 60 円/kg-BM であった。木質 BM は非食用 BM のうち最も存在量が多いが、そのリグノセルロース構造のため前処理がエタノール製造のボトルネックになっている。本研究により、A/O 処理は糖化促進効果が高く、操作も簡単であり、木質 BM の前処理技術として優れていることが分かった。

草本系の稲藁に対しては、木質 BM の前処理結果を参考にして、アルカリ酸化の同時処理 (AO 処理) を採用し、その糖化促進の効果を評価した。粉碎粒子径 2.0~0.3mm の稲藁 1g に対して NaOH を 0.1~0.5g 及び H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 0.01~0.05g の範囲で添加して、AO 処理の効果を検討した。

AO 処理による稲藁のリグニン含有量の変化を調べると、図 3 に示したように、リグニンの除

去（脱リグニン）が起きており、未処理 28%に対して AO(0.5/0.05)では5%以下になった。前処理済み稲藁を糖化すると、図4に示したように、AO処理により糖化が大いに促進されることが分かった。糖化48hでの糖化率で見ると、AO(0.1/0.01)系で80%及びAO(0.25/0.025)系で100%に達し、目標値90%を上回る結果も得られた。木質BMと同様に、AO(0.1/0.01)系で稲藁の薬剤コストを計算すると約6円/kg-BMであり、かなり低価格で済むことが分かった。

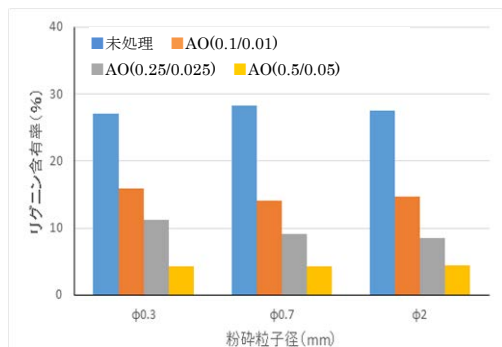


図3 アルカリ酸化処理 AO(NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)による稲藁のリグニン含有率の変化

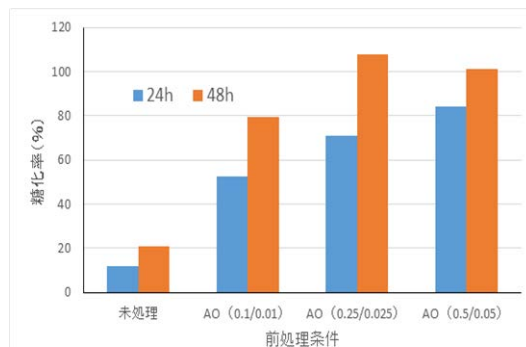


図4 アルカリ酸化処理 AO(NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)による稲藁 (φ2mm)の糖化率の変化

さらに、先行研究で開発した亜塩素酸・重曹法による稲藁の前処理についても検討した。具体的には、稲藁2.5gに対して、亜塩素酸Na1.0gを添加して80℃・1hの熱処理で脱リグニンを行い、これを3回繰り返した後、0.5%重曹水溶液に浸して122℃・20分の熱処理により膨潤化を行った。写真1に示したように、重曹処理により稲わらは微細繊維が膨潤化し、酵素による攻撃を受けやすい形態に改変されることが分かった。結果的に、前処理済み稲わらの糖化率として約85%が得られ（データ省略）、本研究の目標値に近い糖化率を達成することができた。

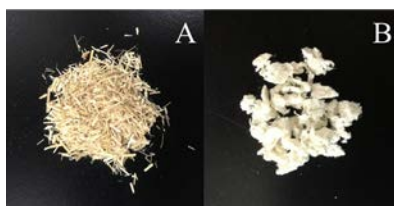


写真1 稲藁の前処理による形状変化 (A: 未処理、B: 前処理)

## (2) ハイブリッド酵母 FSC 株による並行複発酵

長期間凍結保存した FSC 株を解凍後、FSC 株の発酵能を活性化させるため、単糖のグルコース・キシロース基質（参考としてアラビノースも添加）で培養を開始し、キシロースの消費後新たな基質を繰り返し投与して培養を続けた。培養開始から約1か月後の結果を図5に示す。キシロースは2日で消費され、エタノールも安定的に生成されており、活性化培養により FSC 株の発酵能が回復・維持されていることを確認した。

キシロース発酵に及ぼす有機物負荷（グルコース・キシロース基質 20~100 g/g-菌体）の影響を調べたところ、発酵48hにおいては負荷100 g/g-菌体でも FSC 株はキシロースを消費し、安定したエタノール生成を示した（データ省略）。

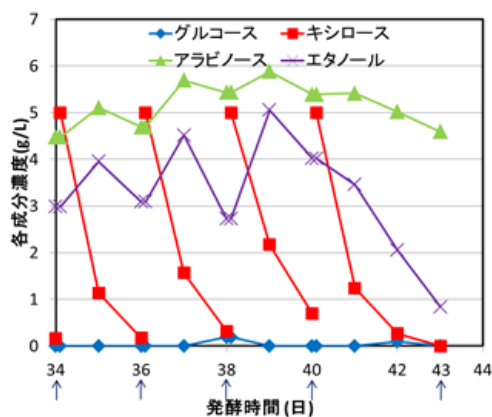


図5 FSC 株の凍結保存株の活性化培養

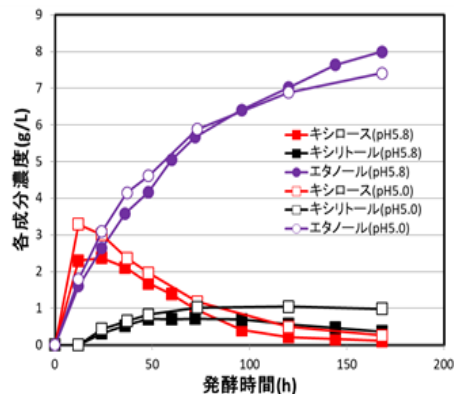


図6 セルロース・キシラン基質の FSC 株による並行複発酵に及ぼす pH の影響

つぎに、多糖類のセルロース・キシラン基質を用いて、酵素と FSC 株による並行複発酵に対する pH、酸素供給及び補酵素 NAD の影響を調べた。実験は市販酵素 CTec2 (Novozymes) を用いて、酵素/基質 (E/S) 比=1/14 で行った。酵素糖化に適した pH5.0 と酵母発酵に適した pH5.8 で並行複発酵を行ったところ、図 6 に示したように、両 pH 系においてキシロース消費やエタノール生成に大差はなく、並行複発酵は pH5~6 程度で運転すればよいことが分かった。

酸素供給については、準嫌気と準好気の異なる環境での発酵を比べると、エタノール生成活性は準嫌気環境の方が 2 倍以上高く、逆にキシロース消費は準好気の方が高かったが、キシリトールの蓄積も高かった (データ省略)。

ところで、キシロース発酵においてキシリトールからキシロースへの酸化分解には補酵素 NAD が必要 (NAD は NADH に還元) であるので、NAD の添加系と無添加系を比較したところ、わずかながら NAD 添加系でキシロース蓄積の減少とエタノール生成の向上が見られた。また、キシロース 10g/L の系において、グルコース 8g/L 以下であれば、いわゆるカタボライト抑制は起こらず、グルコースの存在がキシロース消費にプラスに働くことが分かった。グルコースとキシロースが主な構成糖である草木質バイオマスにとって、これは重要な知見である。

並行複発酵における糖化促進効果を知るために、セルロース・キシラン基質の酵素単独による糖化 (分離糖化) を調べたところ、表 1 に示したように、糖化率は分離糖化が 49%、並行複発酵が 76% であり、並行複発酵により糖化率が約 1.6 倍高くなった。並行複発酵では糖化生成物である糖がエタノールに転換されるため、酵素糖化に対する生成物阻害が緩和されるためであると考えられる。

表 1 分離糖化と並行複発酵における酵素糖化率 (糖化時間 48h)

生成物 (g/L)	分離糖化	複発酵糖化
糖	10.7	1.3
エタノール	—	15.5
合計	10.7	16.8
糖化率 (%)	49	76

### (3) MT 酵素の生産方法と糖化能及び FSC 株を用いた並行複発酵

MT95 株が産生する MT 酵素を使って、ろ紙 (セルロース) の糖化 (30°C) に対する酵素/基質 (E/S) 比の影響を調べた結果、E/S=1/50 で糖化率 90% を達成し、E/S=1/50~1/200 で比較対象の市販酵素 C1.5L (Novozymes) より 10~15% 高い率を示した (データ省略)。MT95 株は 15 世代に亘り安定したタンパク生成能を維持した。SDS-PAGE による酵素タンパク解析の結果、MT 酵素は糖化酵素 (BGL, CBH, EG 及び XYN) を C1.5L より多く含むことを確認した。

つぎに、MT95 株による酵素生産 (30°C) において、基質として微結晶セルロース、稲藁のブレンダー粉砕及びボールミル粉砕を使い、生成される酵素タンパク量の違いを調べた。図 7 に示したように、ボールミル粉砕稲藁は、一般に使われる微結晶セルロースより高い酵素生産量を示し、稲藁を炭素源として十分利用できることを確認した。

MT 酵素の優れた点を定量的に評価するため、 $\alpha$ -セルロースの糖化に対してミカエリス・メンテン式に基づく糖化速度を解析した。その結果、表 2 に示したように、ラインウィーバー・バークプロットにより求めた最大反応速度  $V_{max}$  とミカエリス定数  $K_m$  を比較すると、MT 酵素は対象酵素 C1.5L より  $V_{max}$  が約 22% 高く、また  $K_m$  値から基質に対する親和性も高いことが分かった。

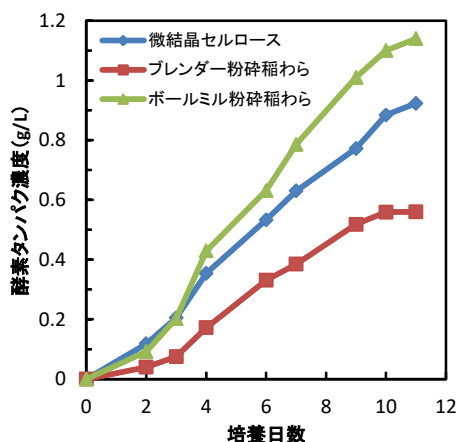


図 7 粉砕稲藁を炭素源とした MT95 株による MT 酵素タンパクの生産 (30°C)

表 2 MT 酵素のミカエリス・メンテン式に基づく最大反応速度 ( $V_{max}$ ) とミカエリス定数 ( $K_m$ )

ミカエリス・メンテン式	MT 酵素 (炭素源別)		対象酵素 C1.5L
	ミル粉砕稲藁	セルロース	
$V_{max}$ (g/L·min)	0.0209	0.0203	0.0172
$K_m$ (g/L)	26.1	26.9	35.9

本研究で開発した前処理、酵素糖化、発酵の一連の発酵プロセスを総合的に評価するため、亜塩素酸・重曹法により前処理した稲藁 (BM) を原料として、MT 酵素と酵母 FSC 株による並行複発酵をジャーファーメンター (30°C) により行った。

図8に示したように、発酵48hで約16g/Lのエタノールが生成され、前処理済みBMに対してエタノール転換率0.39 L/kg-BM、基質の菌体への転換分を除くと0.52 L/kg-BM、という高い値を得た。この転換率はE/S=1/100という高い負荷（低い酵素添加量）にもかかわらず、既報告等に見られる各種バイオマスによる約0.30 L/kg-BMに対して30%高い値であり、本研究の目標値0.35 L/kg-BMを十分達成することができた。

なお、本実験では初期菌体量を低く設定したため、基質の菌体への転換量（酵母の増殖量）が多かったが、連続又は半連続実験であれば菌体増殖が平衡状態に達した時点で、エタノール転換率として0.39L/kg-BMより高い率を達成できるものと考えられる。

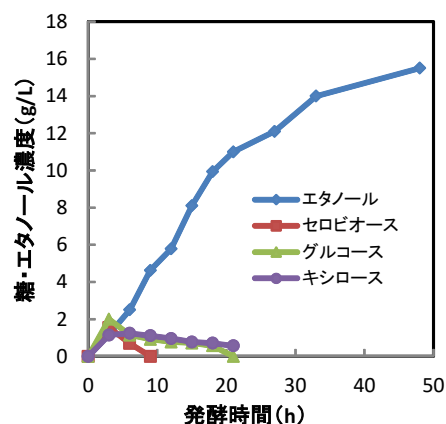


図8 前処理済み稲藁のFSC株とMT酵素による並行複発酵（30°C）

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計10件)

- ① Taichi Yamada, Ryota Ukai, Haruyuki Sakai and Shuzo Tanaka, Simultaneous Saccharification and Co-fermentation of Holocellulose by a Hybridized Yeast FSC Strain. The 13rd Asian Congress on Biotechnology (ACB 2017). Khon Kaen, Thailand, July 2017
- ② 山田泰地、酒井遙行、田中修三、ハイブリッド酵母FSCの凍結保存株の活性化と並行複発酵、日本生物工学会、第69回日本生物工学会大会、平成29年9月
- ③ 酒井遙行、山田泰地、田中修三、エタノール発酵のための木質バイオマスのアルカリ酸化処理による前処理、日本生物工学会、第69回日本生物工学会大会、平成29年9月
- ④ 山田泰地、酒井遙行、田中修三、ハイブリッド酵母FSC株によるホロセルロースの並行複発酵、廃棄物資源循環学会 春の研究発表会、平成29年6月、川崎市産業振興会館
- ⑤ 酒井遙行、山田泰地、田中修三、木質バイオマスのアルカリ酸化による前処理、廃棄物資源循環学会 春の研究発表会、平成29年6月、川崎市産業振興会館
- ⑥ Taichi Yamada, Haruyuki Sakai and Shuzo Tanaka, Ethanol Fermentation of Pentose by Hybridized Yeast FSC Strain, 4th International Scientific Conference on Material Cycles and Waste Management, March 8-10, 2017, New Delhi, India
- ⑦ 酒井遙行、山田泰地、田中修三、ソーダ法とライム法による木質バイオマスのアルカリ前処理、廃棄物資源循環学会 第27回研究発表会、平成28年9月27日～29日、和歌山大学
- ⑧ 山田泰地、酒井遙行、田中修三、ハイブリッド酵母FSC株による五炭糖のエタノール発酵、廃棄物資源循環学会 第27回研究発表会、平成28年9月27日～29日、和歌山大学
- ⑨ 酒井遙行、山田泰地、田中修三、木質バイオマスのアルカリ前処理と酵素糖化、廃棄物資源循環学会 春の研究発表会、平成28年5月27日、川崎市産業振興会館
- ⑩ 山田泰地、酒井遙行、田中修三、融合酵母FSC株の五炭糖の発酵能、廃棄物資源循環学会 春の研究発表会、平成28年5月27日、川崎市産業振興会館

[その他]

ホームページ等

草木質バイオマスからの高効率エタノール生産技術の開発

- ① 亜塩素酸塩処理と重曹熱処理による稲藁の前処理

<https://corec.meisei-u.ac.jp/archives/1477>

- ② キシロース利用酵母の変異処理とプロトプラスト融合

<https://corec.meisei-u.ac.jp/archives/1487>

## 6. 研究組織

研究分担者なし。