

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18710070

研究課題名（和文）タケ等早生未利用資源の酵素分解による資源化

研究課題名（英文）Effects of growth stage on enzymatic saccharification of bamboo for biomass resources.

研究代表者

下川 知子 (SHIMOKAWA TOMOKO)

独立行政法人 森林総合研究所・きのこ・微生物研究領域・主任研究員

研究者番号：60353728

研究成果の概要：

タケはアジアに広く分布する再生可能な資源であり、その有効利用方法の一つとして、早世資源としての特徴を生かし、同時糖化発酵によるバイオエタノール生産を試みた。成長段階毎に区分したタケを市販酵素製剤およびセルラーゼ生産菌培養液によって酵素糖化を行い、酵母によってエタノールを生産させた。タケの成長段階と利用しやすさには関連性が認められ、枝を展開させる前のタケは利用しやすいバイオマス資源であることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	210,000	3,610,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 環境技術・環境材料

キーワード：タケ、セルラーゼ、バイオマス、バイオエタノール、モウソウチク、マダケ、酵素糖化

1. 研究開始当初の背景

タケ、ササ類は日本及び東南アジアに分布する循環利用の可能な早生資源であり、利用可能な資源量は日本国内で300万トンを超えると推定されているが、利用用途は限られており、未利用資源となっている。手入れの滞った竹林の拡大被害も報告されており、その利用方法を開発することは、バイオマスの有効活用に利するのみならず、景観の維持にお

いても有効である。過去に農林水産省で行われた「バイオマス変換計画」においても、タケ、ササ類は既存量の多さから注目され、有効利用法のひとつとして酵素糖化処理の検討が行われたが、十分な結果を出すことはできなかった。酵素糖化処理は、環境負荷の少ない条件で資源を活用できることから、近年バイオマスエタノール製造、バイオマスマテリアル変換の分野で注目されている手法で

ある。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、早生未利用資源であるタケ、ササ類を、環境負荷の少ない酵素糖化処理を通じて有効利用する手法を開発することである。早生資源であるために、タケ類では生育途中のものと成熟したものとで性質及び酵素糖化率が大きく変化することが予想される。そのため、成長に伴って変化するタケ資源の性質をとらえ、細胞壁分解酵素に対する抵抗性出現機構に対して理解を深め、早生資源としてのタケの適切な収穫時期を判断し、生育過程に応じた効率的な前処理方法及び細胞壁分解酵素の組み合わせを検討する。

3. 研究の方法

(1) 試料 森林総合研究所（茨城県つくば市）樹木園内のマダケ、およびモウソウチクを試料として用い、伸長成長段階ごとに収穫した。樹木園内のマダケの大きさは、枝が伸長して皮が脱落するまでに平均6メートルほどであり、地上より1メートルごとに伐採してチップ化した。モウソウチクもマダケと同様に成長段階毎に収穫し、地上から1メートル毎に区分化した。成分分析に供するモウソウチク試料は、中央部分の30センチをサンプルとしてチップ化した。

(2) 粉碎処理 採取したタケ資源のバイオマス量を測定した後、チップを乾燥させ、含水率が10%以下となるまで乾燥させてから0.5mmの篩を装着したロータースピードミルで粉碎処理し、リグニン（酸不溶性リグニン）、灰分、糖成分などの成分分析を行った。

(3) 酵素糖化率の測定 セルラーゼ剤のメイセラゼ (*Trichoderma viride* 由来) 及びキシラナーゼ酵素剤のセルロシン TP25 (*T. viride* 由来) を用いて糖化実験を行った。粉碎試料 20 mg に対し、0.5%となるように酵素剤を加え、40°Cで酵素糖化処理を行った。熱失活させた後、生成した還元糖量を Somogyi-Nelson 法により定量した。

(4) 同時糖化発酵 試料を5%基質濃度となるように調製し、酵素剤、バッファー (25 mM クエン酸ナトリウムバッファー、pH 4.8)、エタノール発酵性酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* NBRC 2347、湿重量で1%) を加えて30°Cにて同時糖化発酵を行った。生じたエタノール量は、HPLCにより測定した。

(5) セルラーゼ生産菌の培養 アルカリ処理

によって調製したスギパルプを2%を炭素源として含む培地で *T. reesei* NBRC 31329 を2週間、28°Cで培養した培養液を調製し、同時糖化発酵におけるセルラーゼ給源として用いた。

4. 研究成果

(1) 成熟したマダケと成長途中のマダケの違い

タケ類は初期成長が著しく、モウソウチクでは成竹前の幼竹でも6メートルほどになり、かなりの資源量が見込まれる。マダケやモウソウチクの幼竹は根本に近い方より成長が進行していくが、成竹に比べてリグニン含量は低い。

表1 マダケ成竹、幼竹の成分

	成竹	幼竹
酸不溶性リグニン (%)	25.2	4.7
灰分 (%)	1.3	3.4
タンパク (%)	0.5	4.6
エタノール・ベンゼン抽出 (%)	2.0	2.4
多糖 (%)	61.9	50.9

一般的にはリグニン含量の低いバイオマス試料ほど、セルラーゼに対して高い酵素糖化率を示す。そのため、伐採の時期を検討する

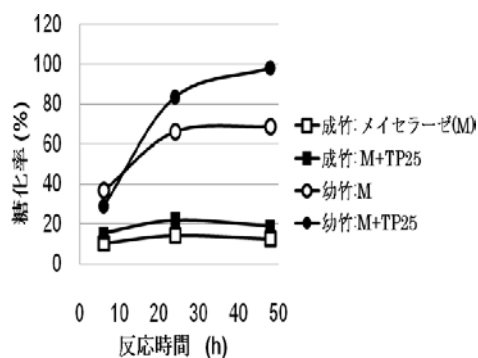


図1 成竹、幼竹の酵素糖化率と酵素剤の影響

ことにより、酵素糖化処理しやすい原料を得ることが可能と考えられた。225 cmの幼竹(マダケ)と、1年以上経過した成竹(マダケ、660 cm)を破碎し、成分分析を行い(表1)、市販セルラーゼ剤及びキシラナーゼ剤による酵素糖化処理を試みた結果、マダケを構成する多糖類の構成糖成分は、主にグルコースとキシロースであり、その存在比はほぼ1:1であることが分かった。幼竹のリグニン含量は4.7%と、成竹の25.2%に比べて極めて低かった。多糖成分にキシラン関連成分が多く含まれることから、キシラナーゼ剤

であるセルロシン TP25 をセルラーゼ製剤に加えて糖化处理を行った (図 1)。成竹では 20% 程度の酵素糖化率しか得られなかったが、幼竹ではメイセラゼによる酵素糖化处理で、多糖成分の約 70% が糖化した。添加するセルラーゼ製剤の半分をキシラナーゼ製剤に置き換えることにより、酵素製剤中のセルロース分解力値は低下するものの酵素糖化率は上昇し、試料中に含まれる多糖成分の殆どを糖化することができた。キシラナーゼ製剤であるセルロシン TP25 には、キシラナーゼ活性の他、 β -キシロシダーゼ活性、 β -グルコシダーゼ活性が多く含まれていた。従って、今回のマダケ試料のようにキシラン関連成分が多いと予想される資源を十分に分解するには、酵素製剤で一般に指摘されている β -グルコシダーゼ活性の不足を補うほか、キシラン分解活性などの補填が有効であることが示された。

(2) タケの成長段階が酵素糖化率に与える影響

マダケの成長段階に応じて、1 m 長さのもの、2 m のもの、と採取していき、収穫されたタケをさらに地上部より 1 m ごとに区分してリグニン含量を分析した結果、マダケは成長するに従って根本からリグニン含量が増加していくが、枝が展開する頃にはその違いがなくなっていく傾向が認められた。すなわち、枝が展開する前の一部皮をつけた状態の幼竹では根本から先端の間にリグニン含量の違いが認められ、上部ほど未成熟である傾向が確認された。これは過去にも報告されている、タケの早生資源としての特徴をよく表す性質である。モウソウチクでも概してマダケと同様の傾向が確認され、根本からのリグニン含量は枝が展開する時期には違いがなくなっていった。枝が展開した後のサンプルでは、高さによってリグニン含量のばらつきは認められなくなり、成竹と同様に竿全体にリグニンが行き渡っている傾向が現れた。成長段階に応じて 1 m 毎に分画したマダケ試料を、それぞれメイセラゼとセルロシン TP25 の複合酵素製剤により酵素糖化处理をおこなった (図 2)。リグニン含量の少ない上部画分ほど酵素糖化率が高く、根本に近いリグニン量の多い部分の方は上部に比べて酵素糖化率の低い傾向がみられた。酵素糖化率とリグニン含量には相関性のあることが知られており、今回の結果からもタケが成長してリグニン量が増えると、微粉碎処理、アルカリ処理に代表されるような特別な前処理を施さない限り、高い酵素糖化率を得るのは難しいことが明らかになった。一方、成長途中でリグニン含量の少ない幼竹では、比較的リグニン含量の高い根本の部分であっても成竹よりも高い酵素糖化率を示し、糖化

されやすいバイオマス資源であることが明らかになった。モウソウチクでもマダケと同様の分析を行い、枝が展開する前の約 8 M の幼竹で、リグニン量の高さによる量の違いと、酵素糖化率の違いを確認した。

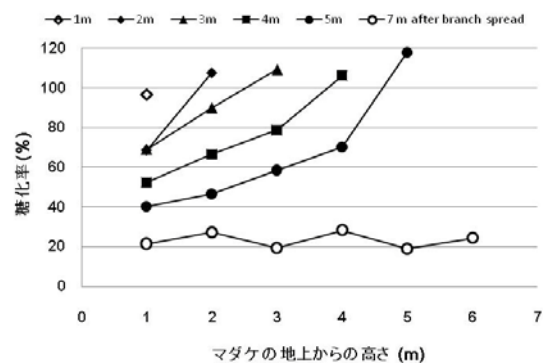


図 2 マダケの成長段階が酵素糖化率に与える影響

(3) 同時糖化発酵 (SSF) によるタケ資源からのバイオエタノール生産

枝が展開する前のマダケ、およびモウソウチクを同時糖化発酵によるエタノール生産試験へ供するために収穫し、地上部全てを裁断してチップとした。マダケは 380、390、400 cm のものを収穫し、混合させて各成分を分析したところ、リグニン含量が 5.0%、多糖が 59% であり、多糖中に占めるグルコースを主とする G_6 糖の割合は 51.9% だった。モウソウチクは 551、640 cm の 2 本を収穫し、同様に分析した結果、リグニン含量 6.0%、多糖 60.5%、 G_6 糖の割合は 50.2% だった。1 g の乾燥バイオマスに対するセルラーゼの力値を 2、5、10 FPU/g として SSF を検討した。用いた酵素はメイセラゼとセルロシン TP25 を混合したものであり、酵母は *S. cerevisiae* を使用した。この酵母は G_5 糖からエタノールを生産することはできないので、エタノール変換効率は、試料中に含まれる多糖成分のうち、 G_6 糖のみからどれだけのエタノールが作られたかで計算した。マダケの場合、2 FPU/g の酵素量でも 7 日間の SSF で乾燥マダケ 1 kg から 123 g のエタノールが生産され、このときの理論値に対するエタノール収率は 71% だった。12 FPU/g の酵素量で SSF を行った場合では、169 g/kg、98% の変換効率でエタノールが生産された (図 3)。モウソウチクで 12 FPU/g の酵素量で SSF を行った場合では、81% の収率でエタノールが生産された (図 4)。

酵素糖化によるバイオエタノール生産において、欠点となるのは酵素製剤の値段の高さである。市販の酵素製剤に頼らず、オンサイトで酵素を生産し、酵素糖化に要する値段を下げる検討は、バイオエタノール生産の経

済性を考える上でたいへん重要である。そのため、スギバルブを炭素源とした液体培地で代表的なセルラーゼ生産菌株である *T. reesei* NBRC 31329 を培養した培養液を酵素源として、SSF を行った。その結果、マダケ及びモウソウチクからのエタノール生産量は、7日間のSSFの後、それぞれ125 g/kg、108 g/kgであり、エタノール変換効率は72%、63%となった。

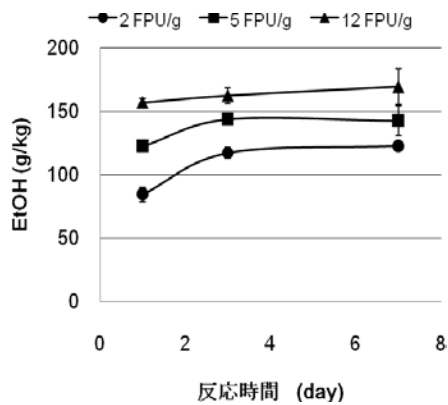


図3 マダケからのSSFによるエタノール生産

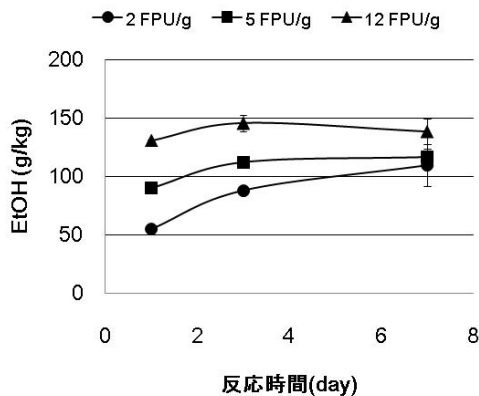


図4 モウソウチクからのSSFによるエタノール生産

以上の結果より、成長の早いタケは有望なバイオマス資源であることが確認され、利用しやすい状態のタケを収穫することで、化学的前処理などの必要がない、酵素糖化しやすいバイオマスを得られることが分かった。未熟なタケは酵素糖化率が高く、一般的なエタノール発酵性酵母によって高効率でバイオエタノールを生産することが可能であった。今回の研究は、タケ資源のバイオエタノール変換への可能性を明確に示したのみならず、バイオマテリアル材料としての有効利用法の可能性を広げ、タケバイオマスの資源的価

値を高めたものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)
投稿中

〔学会発表〕(計2件)

- ① 下川知子、野尻昌信、吉田滋樹、タケの酵素糖化および同時糖化発酵における成長段階の影響、セルラーゼ研究会報、23、(2009)、査読無
- ② Tomoko Shimokawa, Masanobu Nojiri, Mutsumi Ishida, Shigeki Yoshida, Effect of growth stage on the enzymatic hydrolysis of bamboo lignocellulose, The 18th Symposium of The Materials Research Society of Japan, Program and Abstracts, 294, (2007)、査読有

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

とくになし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下川 知子 (SHIMOKAWA TOMOKO)

独立行政法人森林総合研究所・きのこ・微生物研究領域・主任研究員

研究者番号：60353728