

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760730

研究課題名(和文) 木質バイオマスからのエタノール生産のための発酵阻害物質耐性酵母の作出

研究課題名(英文) Construction of tolerant yeast of fermentation inhibitors for ethanol production from lignocellulosic biomass

研究代表者

神名 麻智 (Kanna, Machi)

広島大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10619365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：木質バイオマスからエタノール生産をする過程の一つである水熱前処理は、発酵を行う酵母に阻害的な影響を及ぼす発酵阻害物質が生成する。そこで本研究では、ユーカリを用い、前処理後に含まれている発酵阻害物質の定量を行った。さらに、それらの発酵阻害物質が発酵および増殖へ及ぼす影響を確認した。その結果、他の阻害物質は発酵・増殖共に同程度の濃度で阻害影響を示したが、酢酸は、増殖で阻害が起こる濃度で発酵には影響を及ぼさなかった。また、阻害影響を定量的に示すために、微生物増殖の式であるMonod式にあてはめることにより、それぞれの発酵阻害物質の酵母増殖への影響を定量的に表すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Lignocellulosic biomass passes through the process of three steps: pretreatment, enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. During the process of hydrothermal pretreatment that is one of the pretreatment, fermentation inhibitors are generated from lignocellulosic biomass. In this study, we analyzed quantification of various fermentation inhibitors derived from hydrothermal pretreatment. Furthermore, we investigated an effect of fermentation inhibitors on yeast growth and fermentation. As a result, furfural, 5-HMF and formic acid affected both yeast growth and ethanol fermentation under the same condition. However, in the case of acetic acid, inhibition of fermentation was not caused by high concentration though the rate of yeast growth decreased at the same condition. Moreover, we determined the effects of inhibition substance on yeast growth by fitting to Monod equation. Also, we quantified the effect of these inhibitors on the Monod parameters.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：総合工学、エネルギー学

キーワード：発酵阻害物質 エタノール発酵 バイオマス

### 1. 研究開始当初の背景

近年、環境問題の深刻化および石油枯渇問題等の諸問題から、再生可能エネルギーが注目されてきている。再生可能エネルギーのひとつとしてバイオマスが挙げられ、バイオマスの中でもリグノセルロース系バイオマスは、食料と競合しない次世代のエネルギーとして期待が高い。リグノセルロース系バイオマスから生産されるエタノールは、ガソリン代替燃料として用いられ、石油枯渇問題の解決策のひとつとして挙げられる。エタノールの生産過程は、前処理、糖化、発酵の主に3つの工程を経る。種々の前処理の中でも、水熱前処理は酸処理等で生じる廃液処理の問題がなく、またコスト面においても効率的な処理方法であるが、その処理中に発酵阻害物質が生成することが明らかになっている。この発酵阻害物質が後の酵母によるエタノール発酵の効率に大きく影響する。そのため、水熱前処理によって生産されるエタノールの生産効率にこの発酵阻害物質が深く関係している可能性が示唆されている。

### 2. 研究の目的

本研究では水熱前処理によって生成する発酵阻害物質の影響を詳細に解析し、酵母の発酵阻害物質耐性の一端を明らかにする。

水熱前処理によって生じる発酵阻害物質は主にフルフラール、5-ヒドロキシフルフラール(5-HMF)、酢酸、ギ酸などがあげられる。現在までに、単一の阻害物質が及ぼす影響を解析している研究は多くあるが、複合的な影響を調べた例は少ない。実際にリグノセルロース系バイオマスを水熱前処理した際に生成する発酵阻害物質は、単一ではなく、先にあげた種々の発酵阻害物質が生成する。既報の研究で、木質バイオマスのひとつである、ユーカリ(*Eucalyptus globulus*)に前処理を行った際には、フルフラール、酢酸および5-HMFのいずれも生成することが報告されている。そこで本研究では発酵阻害物質の複合的な影響を解析し、重要となる遺伝子の探索、遺伝子組換えにより、発酵阻害物質耐性酵母を作成することを目的とした。

### 3. 研究の方法

まず、水熱前処理を行うことによってバイオマスから生成する発酵阻害物質量を定量した。水熱前処理はバッチ式のオートクレーブを用いた。リグノセルロース系バイオマスとして、ユーカリ(*Eucalyptus globulus*)を用い、生成した発酵阻害物質は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で定量した。

また、それぞれの発酵阻害物質が酵母増殖に及ぼす影響を解析するために、酵母の増殖初期から発酵阻害物質を添加し、培養することによって増殖する酵母量を分光光度計によって測定した。さらに酵母によるエタノール発酵への影響をみるために、増殖と同様、発酵開始時に発酵阻害物質を添加した。発酵

阻害物質による阻害影響は、培養液中のグルコースの消費量およびエタノールの生成量を HPLC によって定量することによって解析した。

さらに、阻害物質の影響を定性的のみならず、定量的に解析するために、微生物増殖の式である、Monod 式に増殖曲線をフィッティングさせることにより、パラメータを決定し、阻害影響を数値化した。

### 4. 研究成果

ユーカリを原料とし、バッチ式オートクレーブを用いて反応温度を 180°C, 220°C, 260°C とし、水熱前処理を行ない、生成した発酵阻害物質を HPLC で定量した。ユーカリの水熱前処理によって生成したフルフラール量を図1に示す。

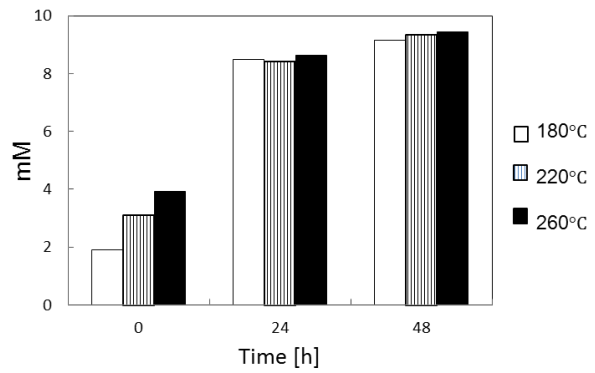


図1 水熱前処理によって生成したフルフラール

発酵阻害物質の複合的な影響を調べるためには、まず、単一の阻害物質が及ぼす影響を詳細に明らかにしなければならない。そこで、発酵阻害物質の濃度を変化させて、低濃度および高濃度の両条件での影響を調べ、単一の阻害物質のみが及ぼす影響を濃度変化と共に解析した。

さらに、発酵阻害物質は酵母がおこなうエタノール発酵能のみならず、酵母の細胞増殖においても影響を及ぼすことが知られているが、それらを共に比較し測定した例は少ない。そこで、酵母の増殖および発酵に対する影響を同一の濃度条件で解析することにより、発酵阻害物質が酵母の増殖および発酵におよぼす影響を調べた。その結果、フルフラール、5-HMF、ギ酸は、発酵、増殖ともに、発酵阻害物質の濃度に依存して阻害影響を及ぼし、発酵・増殖共に同程度の濃度で阻害影響を示すことが明らかになった。しかしながら、酢酸の発酵・増殖における阻害影響を調べたところ、増殖で阻害が起こる濃度で、発酵に対しては影響を及ぼさないことが明らかになった(図2, 3)。

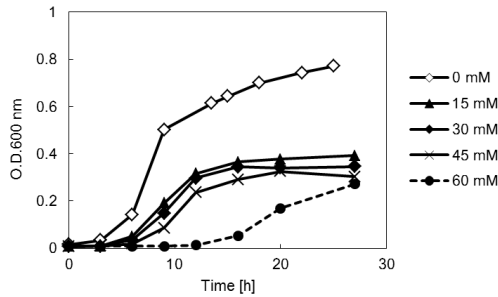


図2 酢酸が酵母の増殖に及ぼす影響

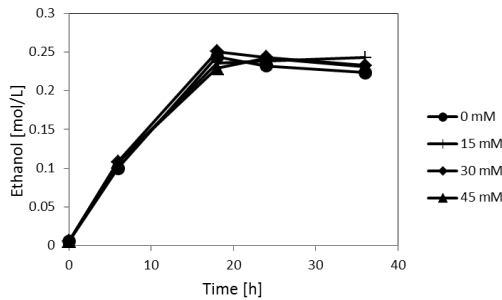


図3 酢酸が酵母のエタノール発酵に及ぼす影響

また、エタノール発酵技術を実際に応用に持っていくためには、今までの研究で行われているような定性的な研究に加え、今後広く応用を可能にさせる定量的な解析も必要不可欠であると考えた。

そこで、それらの阻害影響を定量的に示すために、微生物増殖の式として広く知られている Monod 式を増殖曲線にフィッティングさせることにより、それぞれの発酵阻害物質の酵母増殖への影響を定量化した。微生物増殖の式である Monod 式は以下のような式である。

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \frac{S}{K + S} X \quad (1)$$

ここで、 $X$  は単位体積辺りの微生物の数、 $S$  は基質濃度、 $t$  は時間である。 $\mu_{max}$  と  $K$  は定数である。

基質濃度が細胞数の増加とともに変化すると考えると以下の式が成り立つ。

$$\frac{dS}{dt} = -k \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

式(1),(2)を積分して得られる式(3)を示す。

$$\left\{ 1 + \frac{K}{kX_0 + S_0} \right\} \ln \frac{X}{X_0} - \frac{K}{kX_0 + S_0} \ln \left| 1 - \frac{k}{S_0} (X - X_0) \right| = \mu_{max} (t - \tau) \quad (3)$$

式中の変数  $X$ ,  $S$ ,  $t$  はそれぞれ酵母数濃度 [ $\text{m}^{-3}$ ]、基質濃度 [ $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ ]、時間 [ $\text{s}$ ] であり、添字の 0 は初期値を示す。また、 $\mu_{max}$  [ $\text{s}^{-1}$ ]、 $K$  [ $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ ]、 $k$  [ $\text{mol}$ ]、 $\tau$  [ $\text{s}$ ] はパラメータである。本研究では、 $K$  [ $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ ]、 $k$  [ $\text{mol}$ ] については、 $K^* = K/S_0$  [-]、 $k^* = k/S_0$  [ $\text{m}^3$ ] の値として決定した。すなわち、式(3)を以下のように変形して、フィッティングを行った。

$$\left\{ 1 + \frac{(K/S_0)}{(k/S_0)X_0 + 1} \right\} \ln \frac{X}{X_0} - \frac{(K/S_0)}{(k/S_0)X_0 + 1} \ln \left| 1 - \left( \frac{k}{S_0} \right) (X - X_0) \right| = \mu_{max} (t - \tau) \quad (4)$$

$$t = \tau + \frac{1}{\mu_{max} \{k^*X_0 + 1\}} \left[ \{k^*X_0 + 1 + K^*\} \ln \frac{X}{X_0} - K^* \ln |1 - k^*(X - X_0)| \right] \quad (5)$$

各濃度ごとに得られた増殖曲線に最小乗法でフィッティングを行い、パラメータを決定した。 $\mu_{max}$  の各濃度での変化を図 4 に示す。

その結果、フルフラール添加における細胞増殖速度への影響は以下のように一次反応に準じて扱えることが明らかになった。

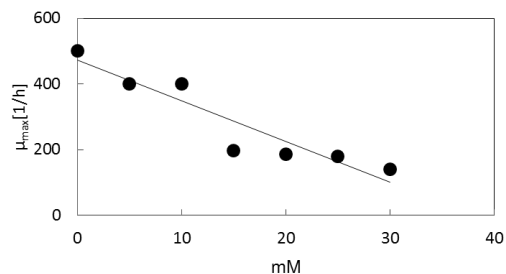


図4 フルフラール添加時のパラメータの変化

以上のことから、水熱前処理によって生成する発酵阻害物質であるフルフラール、5-HMF、酢酸、ギ酸が酵母増殖に及ぼす影響を、各濃度ごとに解析し、Monod 式のパラメータに及ぼす影響として整理した。その結果、フルフラール、5-HMF は増殖速度に、酢酸、ギ酸は最終酵母濃度に、濃度に依存した影響を及ぼすことが確認された。また、いずれの阻害物質についても誘導期の遅延が確認された。

本研究では耐性酵母の作出には至らなかったが、バイオマスからのエタノール生産を効率的に行う上で重要となる発酵阻害物質の影響を定量的に解析することに成功した。

これにより、エタノール生産技術を広く応用するための装置設計の際にも発酵阻害の影響を実験を行わずに予測する可能性を示した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

神名麻智, 木村直人, 山下康貴, 柳田高志, 松村幸彦

発酵阻害物質が酵母増殖の Monod 式に与える影響, J.Jpn.Petrol.Inst., 56, 査読有, 2013, pp326-330

[学会発表](計 4 件)

1. Fukutomi Yuta, Yanagida Takashi, Kanna Machi, Matsumura Yukihiro, Effect of inhibitors from hydrothermal pretreatment on ethanol fermentation, 20<sup>th</sup> European Biomass Conference & Exhibition, 3-7 Jun 2013 Copenhagen Denmark

2. Kanna Machi, Fukutomi Yuta, Yamashita Kouki, Yanagida Takashi Matsumura Yukihiro, Effect of fermentation inhibitors derived from hydrothermal pretreatment on yeast, 9<sup>th</sup> Biomass-Asia Workshop, 3-4 Dec 2013 Tokyo Japan

3. 神名麻智, 山下康貴, 福富裕太, 松村幸彦, 発酵阻害物質と温度が酵母増殖に及ぼす影響 日本機械学会 2013 年 9 月 8 日~9 月 11 日 岡山大学

4. 神名麻智, 福富裕太, 柳田高志, 松村幸彦, 発酵阻害物質が発酵におよぼす影響の定量的解析 化学工学会 2013 年 9 月 16 日~2013 年 9 月 18 日 岡山大学

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

神名 麻智 (KANNA MACHI)

広島大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号: 10619365