

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16228

研究課題名（和文）木質バイオマスからの高濃度エタノール生産の実現

研究課題名（英文）Realization of high ethanol production from lignocellulosic biomass

研究代表者

神名 麻智（Kanna, Machi）

広島大学・工学研究科・助教

研究者番号：10619365

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：木質系バイオマスからエタノールを生産するための最終段階にアルコール発酵がある。この工程を行う酵母は様々な要因により発酵の進行を阻害される。その阻害要因として発酵で生成するエタノール及び熱が挙げられる。酵母が高濃度のエタノール耐性を獲得すれば、高効率燃料生産が可能となる。そこで本研究では高濃度エタノール生産が可能な酵母作出のため、それらに対する酵母の反応特性を解析した。さらに高濃度生産のためには、基質が高濃度であることも重要なため、グルコース濃度を上昇させ発酵を行った。またこれらの及ぼす影響をモノー式及びミカエリス・メンテン式に当てはめて各種パラメータを決定し定量的な解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Ethanol fermentation have to be performed for production bioethanol from lignocellulosic biomass. Although this step is mainly performed by yeast, the progress of fermentation is inhibited by various factors. The inhibitors include ethanol and heat generated by fermentation. Although yeast has a tolerance at low concentrations of ethanol, yeast is inhibited at high concentration ethanol. If yeast has tolerance of high concentration ethanol, fuel production will be high efficiency. Therefore, to produce yeast of ethanol tolerance, we analyzed the reaction characteristics of yeast to high concentration of ethanol. Furthermore, in order to produce high concentration of ethanol, fermentation has to perform by high concentration of glucose, which is a substrate, we also analyzed effect of high concentration glucose on yeast fermentation. The effect of these ethanol and heat on yeast growth and fermentation was fitted to Monod and Michaelis-Menten equation to determine various parameters.

研究分野：バイオマス

キーワード：発酵 酵母 エタノール

1. 研究開始当初の背景

近年、地球環境問題の深刻化に伴い、再生可能エネルギーの利用に注目が集まってきている。再生可能エネルギーの一つであるリグノセルロース系バイオマスから液体燃料のエタノールを生産するためには、前処理、糖化、発酵の工程が必要となる。以前に我々は前処理工程で生成する各種発酵阻害物質が最終工程である発酵の阻害要因となるため、これら発酵阻害物質の酵母への影響を解析し、各種阻害物質が濃度依存的に阻害影響を及ぼすことを明らかにした。これに加え、その他の阻害要因として高濃度エタノールによる阻害があることが知られている。発酵は酵母などの微生物によってグルコースから通常 5~10%のエタノールを生産する。しかし、実際にバイオ燃料として自動車などの内燃機関に利用するためにはエタノール濃度を 95%程度にまで濃縮しなければならない。エタノールを濃縮するには通常蒸留を行うが、この蒸留の工程は多量の電力を必要とする。そのため、全体を通して効率的なプロセスにするためには、発酵工程でより高濃度のエタノールを生産しなければならない。しかしながら、発酵を行う酵母は自身が生産したエタノールで阻害を受けるといった問題がある<sup>1)</sup>。効率的なエタノール生産のためには、酵母が高濃度エタノール下でも阻害をうけずに発酵を行う必要がある。

また、酵母がグルコースから発酵を行うことで生成するのはエタノール、二酸化炭素であるが、発酵に伴い発酵熱も生成する。この発酵中に生成する発酵熱の影響も解析することで、より実際の発酵環境での阻害影響を解析できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、リグノセルロース系バイオマスからの高効率なエタノール生産を可能とするため、高濃度エタノールに酵母が曝された際の反応特性を解析する。さらに複合的な影響も考慮するために、高濃度エタノール生産のために必要な高濃度基質での発酵を行い、それにより生じた発酵熱の影響をエタノール生成量およびグルコース消費量を解析することでより実際の発酵の状況に即した影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

発酵を行うための酵母は *Saccharomyces cerevisiae* type (Sigma-Aldrich) を用いた。エタノールによる阻害実験は、YPD 培地 (Yeast, Peptone, dextrose, BD, Difco, YPD Broth, Fisher Scientific) に 5~12.5%エタノールを添加し、酵母増殖に対するエタノールの阻害影響を解析した。エタノール阻害実験で行った実験条件を表 1 に示す。酵母の増殖は分光光度計による細胞濃度測定及び YPD plate を用いてコロニー数を計測することで解析を行った。また生体内でのエタノール

Table 1 Experimental conditions

Yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> type 2
Medium	YPD
Incubation temperature	30 °C
Ethanol concentration	0-12.5%
Rotation speed	100 rpm

ルの影響を調べるために生体内 ATP 量の変化を ATP 測定装置 (Lucifer 250 Kikkoman biochemifa Co. Tokyo, Japan) を用いて解析した。さらに、酵母は発酵の際にエタノールと同時に発酵熱を生成するため、発酵中の発酵熱の生成を熱電対による温度変化測定によって解析した。また、発酵によって得られたエタノール量およびグルコースの消費量は、各時間毎にサンプリングを行い、高速液体クロマトグラフィー (HPLC; Shimadzu, Japan) を用いてそれぞれ定量した。

最終的に、得られた結果から酵母への阻害影響を定量的に解析するために微生物の一般的な増殖の式である Monod 式および酵素反応の一般的な式であるミカエリス・メンテン式を用いてフィッティングを行い、各種パラメータを決定した。

4. 研究成果

本研究の主な成果は、高濃度エタノールおよび熱の酵母細胞に及ぼす影響を評価した点および、得られた結果から各種一般式を用いて定量的に解析した点にある。

(1) まず、酵母の増殖開始前にエタノールを 5~12.5%添加し、酵母増殖への影響を解析した。その結果、酵母増殖はエタノールを加えていないものと比べ 5%エタノールでは大きな阻害は見られないが、10%エタノールで

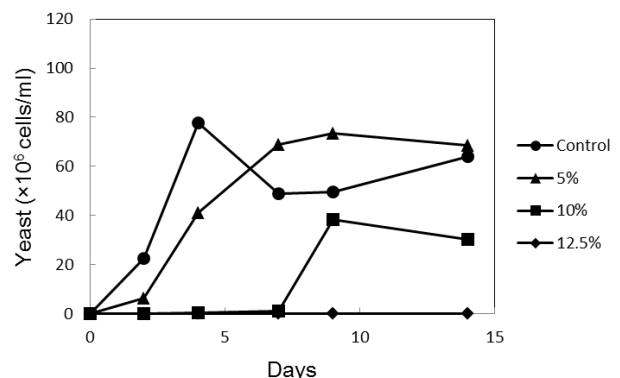


図 1 各種エタノール濃度の酵母増殖への影響

は阻害を受けることが明らかになった。さらに 12.5%では完全に増殖が阻害された(図 1)。阻害影響の程度は濃度に依存し、12.5%程度高濃度エタノールでは、時間が経過しても増殖はみられなかった。しかし、10%エタノール

ルにおいては、開始時には増殖が全くみられなかったが、7日後から増殖が開始された。これは、10%エタノールでは完全に酵母が死滅したわけではなく、その後も回復の可能性があると示唆された。さらに、酵母の生体内でのエタノールに対する反応を調べるために生体内 ATP 量の変化および分光光度計で酵母の細胞濃度を測定する増殖解析を行った。その結果、エタノール添加後一晩培養した酵母において、5%、12.5%エタノール存在下では、生体内 ATP 量および酵母量は、エタノール無添加と比べ、減少がみられなかった(data not shown)。分光光度計による細胞濃度測定及び ATP 量の結果と先のプレートによる細胞数測定による酵母増殖の結果が一致しなかったことは、以前の報告においてエタノールは老化を促進することが明らかになっていることなどから<sup>2)</sup>、発酵において生成するエタノールの阻害は単に直接的に阻害を及ぼすのみではなく老化促進などによって細胞に阻害影響を及ぼしている可能性が示唆された。

(2) 次に、高濃度エタノール生産を実現するために、高濃度基質下での発酵に及ぼす影響を解析した。発酵および増殖には通常基質としてグルコースが必要である。高濃度エタノールを生産するためには高濃度の基質が

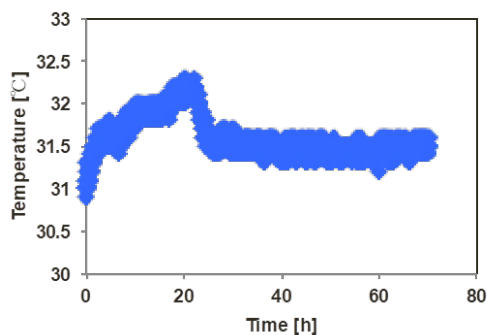


図 2 80 g/L glucose 存在下での発酵中の温度変化

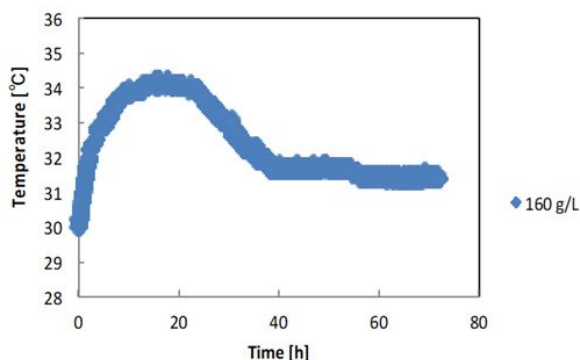


図 3 160 g/L glucose 存在下での発酵中の温度変化

存在しなければならないため、グルコースを通常の濃度 (20 g/L) に加え、80 g/L, 160 g/L の条件で発酵を行った。その結果、20 g/L グルコースでの発酵では発酵熱による温度上昇が 30°C から 2°C 程度であった。さらにグルコースの濃度を 80 g/L まで上昇させても温度上昇は 20 g/L 時と変わらず 2°C 程度であった(図 2)。しかしながら、グルコースの濃度が非常に高い条件下 (160 g/L) では 30°C から発酵開始後 24 時間付近で 5°C 程度槽内の温度が上昇した(図 3)。この結果から、基質の濃度が高いため発酵がより進み、それに伴い発酵熱がより多く生成したと考えられたため、次に、各基質濃度で発酵を行った際の生成エタノール量およびグルコース消費を測定したところ、80 g/L グルコース存在

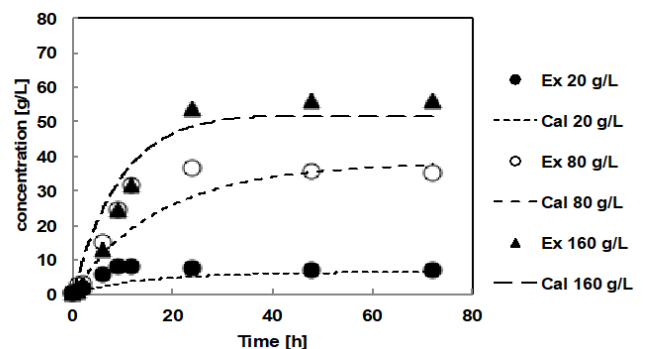


図 4 基質濃度変化に伴うエタノール生成量

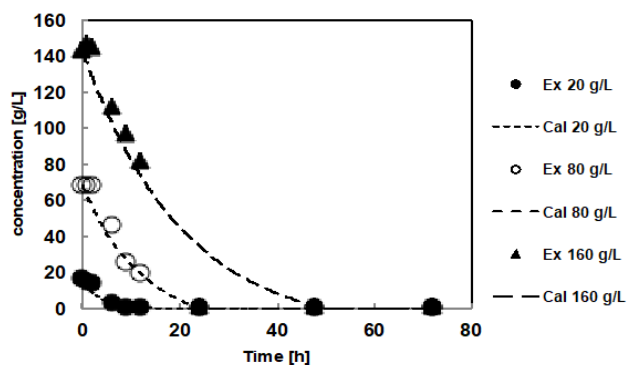


図 5 基質濃度変化に伴うグルコース消費量

下では 20 g/L グルコース存在下の約 4 倍のエタノールが生成した。しかしながら、160 g/L グルコース存在下では 80 g/L の 2 倍のエタノール量よりはるかに低い生成量であった(図 4)。またそれぞれの条件下でのグルコースの消費量を解析したところ、いずれの条件でも発酵開始後すぐにグルコースが消費され、20 g/L および 80 g/L では 24 時間後にほぼ完全にグルコースが消費され、160 g/L では 48 時間後に完全にグルコースが消費された(図 5)。これらの結果を合わせて、基質が高濃度である場合、熱は多く生成し槽内の温度も上昇するが、エタノール生成量の結果と合わせると、

発酵の際の温度上昇は、必ずしも発酵によって生成した熱ではないことが示唆された。酵母は発酵槽内で自身を増殖させることが可能であり、発酵以外でも熱が生成していると考えられる。以上のことから、酵母はグルコース濃度 80 g/L 程度では順調に発酵が行え、それに伴い上昇する温度にも耐えうる。そのため、20 g/L グルコース存在下よりも高濃度のエタノールを生産することが可能である。しかしながら、さらにグルコース濃度を上昇させた 160 g/L の高い基質濃度条件下で発酵を行ったところ、生成した熱に伴う温度上昇は発酵に阻害影響を及ぼすことが明らかとなった。

このことから温度上昇もエタノールの生成量を低下させる要因であり、それは基質濃度 160 g/L では現れることが明らかとなった。

(3)さらにこれらの影響を定量的に解析するために一般的な微生物増殖の式である Monod 式 (式 1)、および酵素反応の式であるミカエリス・メンテン式を用い、実験値に対し fitting を行い、それぞれのパラメータを決定した。まず、エタノールの酵母増殖への

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

#### Monod 式

影響を解析したところ、エタノールの阻害は酵母増殖の指数増殖期に強く影響を及ぼすことが明らかとなった (data not shown)。さらに発酵熱の発酵への影響において、酵素反応の一般的な式であるミカエリス・メンテン式を基に熱の影響を考慮した式を用いて、各基質濃度下でのエタノール生成、グルコース消費の実験値にあてはめ (図 4, 5 line) パラメータを決定した。

以上の結果からエタノール発酵で生成するエタノールは、濃度 10%を超えると阻害影響を及ぼし、それは特に細胞増殖の指数増殖期にみられることを明らかにした。また、高濃度エタノールを生産するために、基質であるグルコースを高濃にした条件において 80 g/L グルコースであれば阻害影響を受けないが 160 g/L グルコースでは阻害影響が現れ、発酵効率が落ちることが明らかとなった。この要因の一つとして発酵熱を含む熱が生成しそれに伴う温度上昇が原因であることが示唆された。本研究では高濃度エタノールに対する影響をエタノール添加した条件及び高濃度基質条件下で解析を行い、生理的および定量的な面からエタノール阻害影響を明らかにした。

#### 引用文献

- 1) Brown, S. W.; Oliver, S. G.; Harrison, D. E. F.; Righelato, R. C. *Europe. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 151-155 (1981)
- 2) Orlandi, I.; Ronzulli, R.; Casatta, N.; Vai, M. *Oxid. Med. Cell. Longev.* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/802870> (2013)

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Machi Kanna, Yukihiko Matsumura  
 “ Analysis of Ethanol Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* ”  
 5th Asian Conference on Biomass Science 2018

中田陽也, 神名麻智, 松村幸彦  
 発酵により生じた熱の回収と有効利用  
 日本機械学会 2018

武富稜, 神名麻智, 松村幸彦  
 発酵熱を考慮したエタノール生成の定量的解析  
 バイオマス科学会議 2018

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

神名 麻智 (Kanna Machi)  
 広島大学・大学院工学研究科・助教  
 研究者番号: 10619365