

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月30日現在

機関番号：10106
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20560756
 研究課題名（和文） 亜臨界水処理による農産廃棄物系バイオマスのカスケード利用
 プロセスの開発
 研究課題名（英文） Development of microbial process using agricultural waste biomass
 by subcritical water
 研究代表者
 多田 清志（Tada Kiyoshi）
 北見工業大学・工学部・助教
 研究者番号：90333666

研究成果の概要（和文）：農産廃棄物系バイオマスの構成成分をカスケード的に利用した微生物生産プロセスの開発を行った。亜臨界水を用いたバイオマスの加水分解を検討した結果、発酵性の糖類（キシロース、グルコース等）が得られた。この糖類を基質としてキシリトール発酵及びアスタキサンチン発酵を検討したところ、良好な生産が行われ、本プロセスを用いることでバイオマスの構成成分を有効に利用可能であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Effective microbial process using agricultural waste biomass by sub-critical water was developed. Fermentative sugars (Glucose, Xylose and so on) were obtained from the agricultural waste biomass when the biomass was hydrolyzed by sub-critical water. Using hydrolysates obtained from the hemicellulosic and cellulosic fraction of the biomass, xylitol production by *Candida magnoliae* and astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* were successfully performed, respectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：リサイクル工学、生物化学工学、培養工学

科研費の分科・細目：総合工学・リサイクル工学

キーワード：廃棄物再資源化、バイオマス、亜臨界水、キシリトール、アスタキサンチン

1. 研究開始当初の背景

世界各国で様々な農産廃棄物系バイオマスが産出されているが、その殆どは未利用の

まま廃棄されている。そこで、これまで農産廃棄物の1つであるコーンコブの高付加価値用途の開発の一環として、コーンコブのへ

ミセルロース成分を酸加水分解し生成するキシロースを用いたキシリトール微生物生産を行ってきた。しかしながら、持続的社會を構築するためには、廃棄物全成分をカスケード的に利用するプロセスの確立が早急な課題となっている。

一方、高齢化社會の進展とともにアンチエイジング（抗老化・抗加齢）への関心は急速に膨れ上がっており、特にアスタキサンチンは強力な抗酸化作用を有することから化粧品及び健康食品分野で脚光を浴びている。そこで、コーンコブのセルロース部分を原料としたアスタキサンチンの微生物生産を行うことで、コーンコブ全成分を有効に利用可能と考えられる。

従来、バイオマスを原料とした微生物による物質生産では、バイオマスを酸または酵素で分解し、生成するグルコース等の単糖を基質として用いる方法が大部分を占めていた。しかしながら、これらのバイオマスの分解方法では、酸による装置の腐食または酵素の生産コスト高などが問題となり、実用化は困難であった。一方、亜臨界水（100℃以上臨界点以下の温度領域で液相状態にある水）処理は、安全で環境にやさしい水を反応溶媒とし、少ない投入エネルギーで激しい加水分解作用と優れた成分抽出作用を有することから近年注目されている。そのため、微生物物質生産プロセスの糖化工程に亜臨界水反応を応用した研究もなされてきたが、従来の酸加水分解法と同様に、亜臨界水処理の操作条件により様々な化合物が生成し、それらが発酵を阻害するという問題は未だ解決されていなかった。そのために、加水分解の際に生成する副生成物の同定・定量は重要な課題であった。

しかしながら、酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* によるアスタキサンチン生産では、その生産性は酸化ストレスに大きく関与することが報告されていることから、副生成物を含む加水分解物を用いたアスタキサンチン発酵では、過剰な環境ストレスでは微生物は死滅するが、糖以外の化合物による適度な環境ストレスは生産を促進することが予想できる。したがって、微生物増殖に連動しない目的物質の生産では、加水分解物に含まれる様々な化合物が生産性を向上させることが期待できる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、農産廃棄物系バイオマスをを用い、亜臨界水処理によりコーンコブ構成成分をカスケード的に利用し、微生物による効率的な有用物質生産システムの開発を研究目的とした。また、本研究課題の研究期間内に、次のことを検討した。

(1) 亜臨界水処理におけるバイオマス加水分

解で生成する化合物の同定・定量

(2) バイオマスのヘミセルロース成分を利用したキシリトール及びアスタキサンチン生産

(3) バイオマスのセルロース成分を利用したアスタキサンチン生産

3. 研究の方法

(1) 供試材料及び菌株 農産廃棄物系バイオマスとしてコーンコブ及びエノキタケ廃培地を用いた。キシリトール発酵には、酵母 *Candida magnoliae* (FERM P-16522, AIST) を用いた。アスタキサンチン発酵には、酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* (NBRC 10129) を用いた。

(2) 糖化方法

バイオマスの糖化は亜臨界水処理法及び酸加水分解法を検討した。亜臨界水処理法では、ステンレス製の小型リアクター（耐圧硝子工業株式会社）にコーンコブと蒸留水を入れ、N₂ ガスで加圧し種々の温度条件下で加水分解を行った。酸加水分解法では、粉碎したバイオマスに10倍容の種々の濃度のH₂SO₄溶液を加え、121℃、処理時間60 minの条件下で加水分解を行った。亜臨界水処理法及び酸加水分解法で得られたバイオマス加水分解液は、必要に応じて活性炭（白鷺M, 日本エンバイロケミカルズ株式会社）処理を行い、その後ロータリーエバポレーターにより濃縮し培地として使用した。

(3) 培養方法

① キシリトール発酵 培地はバイオマス加水分解液及び蒸留水に、酵母ニトロゲンベース（アミノ酸及びアンモニウム不含）、カサミノ酸、尿素を添加し、それぞれ1.7, 1.0, 2.27 g/Lに調製した。フラスコ培養では、培地100 mLの入った500 mL容バツフル付き三角フラスコを用い、温度30℃、振とう速度110 strokes/minの条件下で培養を行った。ジャーフェーマンターを用いた培養では、培地2.0 Lを含む5 Lジャーフェーマンターを使用し、温度30℃、酸素移動速度（OTR）0.5 mmol-O₂/L・hの条件下で培養を行った。

② アスタキサンチン発酵 培地はバイオマス加水分解液及び蒸留水に、(NH₃)₂SO₄ 5.0 g/L、KH₂PO₄ 1.0 g/L、MgSO₄・7H₂O 0.5 g/L、CaCl₂・2H₂O 0.1 g/L、Yeast extract 1.0 g/L、アデカノール（消泡剤）0.1 mL/Lになるように添加し調製した。フラスコ培養では、培地100 mLの入った500 mL容バツフル付き三角フラスコを用い、温度25℃、振とう速度110 strokes/minの条件下で培養を行った。ジャーフェーマンターを用いた培養では、2 Lの培地を含む有効容量5 Lジャーフェーマンター

ーを使用し、温度 25°C、pH 5.0、好気条件下（溶存酸素濃度 > 4.0 mg）の条件下で行った。キシリトール・アスタキサンチン同時発酵では、初発基質濃度（Glc 25 g/L + Xly 25 g/L, Glc 50 g/L + Xly 50 g/L, Glc 100 g/L + Xly 100 g/L）に調製した混合基質培地を用いた。

(4) 分析方法

バイオマス加水分解で生成した有機酸、フラン化合物及びリグニン由来のフェノール性化合物等の化合物は、高速液体クロマトグラフィ（HPLC）のフォトダイオードアレイ（FDAD）検出器を用いて測定した。バイオマス加水分解で生成したグルコース及びキシロース等の単糖及びキシリトール等の糖アルコールは、HPLC の RI 検出器を用いて測定した。また、アスタキサンチンは菌体内からアセトンで抽出後、HPLC の UV 検出器を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 亜臨界水を用いた農産廃棄物系バイオマスの加水分解 亜臨界水を用いたコーンコブの加水分解に及ぼす反応温度の影響を検討し、その結果を Fig. 1 に示した。

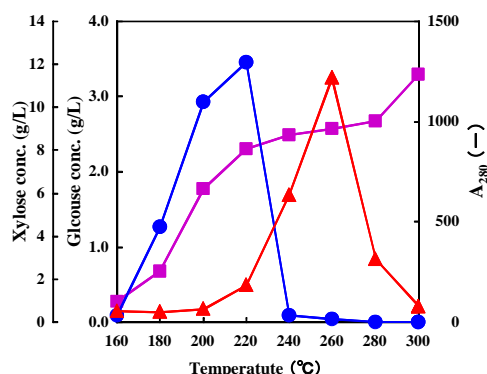


Fig. 1 亜臨界水処理における反応温度の影響
シンボル：●, Xylose；▲, Glucose；■, A₂₈₀

その結果、生成するキシロース濃度は温度上昇とともに増加し、反応温度 220°C の条件下のとき最大値 12.1 g/L となり、その後減少することがわかった。一方、グルコース濃度もキシロースの生成挙動と同様に温度上昇とともに増加し、反応温度 260°C の条件下のとき最大値 3.3 g/L となり、その後減少した。これは、温度領域 190 - 220°C の亜臨界水は、イオン積の上昇によりセルロースを覆っているヘミセルロースの加水分解が可能となりキシロースを生成し、温度領域 240 - 280°C の亜臨界水はさらに加水分解作用が激しくなるので、より難分解性のセルロースの加水分解が可能となりグルコースを生成したと考えられる。このことから、亜臨界水の反応温度を制御することで、選択的に構成糖（キシロース及びグルコース）を分画可能である

ことがわかった。また、A₂₈₀ 画分の値は単糖類の過分解物、または可溶性リグニンの分解物の指標であり、単糖類の生成と共に増加した。

(2) 農産廃棄物系バイオマスを原料としたキシリトール生産

① バイオマス加水分解液に含まれる生成物の同定及び濃度測定 コーンコブ及びエノキタケ廃培地加水分解液の上澄み液中の副生成物を測定し、その結果を Table 1 に示した。

Table 1 農産廃棄物系バイオマス加水分解液中の生成物濃度

検出物質	コーンコブ	廃培地
Lactic acid	0.0	0.0
Acetic acid	0.0	0.0
Levulinic acid	0.0	0.0
5-Hydroxymethylfurfural	5.8	16.8
Furfural	1500	1130
3,4-Dihydroxybenzaldehyde	8.8	27.0
4-Hydroxybenzoic acid	12.2	9.4
4-Hydroxybenzaldehyde	49.0	75.5
Vanillic acid	118	90.5
Syringic acid	214	82.2
Vanillin	222	128
Syringaldehyde	872	88.3

単位：mg/L

その結果、12 種類のフラン化合物及び芳香族化合物が検出された。また、廃培地加水分解液はコーンコブ加水分解液に比べて殆ど全ての物質において低く、特にバニリン酸及びシリングアルデヒドが著しく低濃度であることがわかった。これは、エノキタケ廃培地はきのこ栽培の過程で白色腐朽菌によってリグニンが分解されるので、加水分解の際に生成する副生成物濃度は低下したためと考えられる。

② バイオマス加水分解物を用いたキシリトール生産 Table 1 で得られた加水分解物を用いてキシリトール発酵を検討した結果、コーンコブ加水分解物を直接使用した場合、キシリトール発酵は行われず、活性炭処理によりフラン化合物及び芳香族化合物を除去したとき、良好なキシリトール発酵が行われた。一方、廃培地加水分解物を使用した場合、活性炭による除去処理を行わずとも良好なキシリトール発酵が行われた。その結果を Fig. 2 に示した。その結果、キシリトール収率及び生産性はそれぞれ 0.81 (g-xy1/g-xo1) 及び 0.43 (g/L・h) が得られ、コーンコブ加水分解液を用いたときよりも高い値が得られた。このことから、エノキタケ廃培地加水分解液は、微生物の増殖及び発酵阻害物質の含有率

が小さく、微生物による物質生産の原料に適していることが明らかとなった。

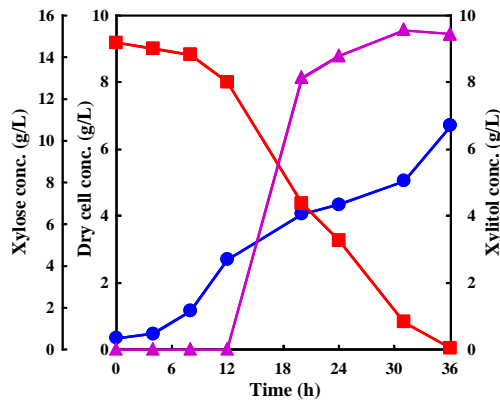


Fig. 2 エノキタケ廃培地加水分解物を用いたキシリトール生産 (活性炭処理無)
シンボル: ●, Cell; ■, Xyl; ▲, XOH

(3) 農産廃棄物系バイオマスを原料としたアスタキサンチン生産

①種々の基質を用いたアスタキサンチン生産の検討 これまでの結果より、バイオマス加水分解物から発酵性の糖質としてグルコース、キシロース及びキシリトールが得られることがわかった。酵母 *X. dendrorhous* は、様々な炭素源と基質としてアスタキサンチン (数千-数万 / mg) の生産が可能である。そこで、アスタキサンチン生産に及ぼす種々の基質の影響について検討を行った。その結果を Table 2 に示した。

Table 2 種々の基質を用いたアスタキサンチン生産

基質	Glucose	Xylose	Xylitol
消費基質濃度 (g/L)	20.2	19.3	7.2
増殖速度 (g/h)	0.09	0.05	0.08
最終菌体濃度 (g/L)	3.0	4.0	6.6
アスタキサンチン生産量 (mg)	0.25	0.34	0.74
収率 (mg/g)	0.125	0.174	1.02

この結果、全ての基質でアスタキサンチンの可能であるが、キシリトールを基質としたときが最も高いアスタキサンチン生産量および収率となり、それぞれ 0.74 mg および 1.02 mg-Ax / g-xylitol となった。しかしながら、キシリトールを基質とすると他の基質よりもアスタキサンチン生産量および収率は高くなるが、アスタキサンチンの生産性は非常に小さなり、0.0092 mg/h であった。このことから、より効率的なアスタキサンチン

生産を行うためには、生産性の向上が必要であることがわかった。

②二段階発酵によるアスタキサンチン生産 Table 2 の結果、酵母 *X. dendrorhous* は基質としてキシリトールを資化したとき、グルコース及びキシロースを基質したときよりも高収率でアスタキサンチン生産可能なことが明らかとなった。このことから、バイオマスを加水分解して得られるキシロースから生成されるキシリトールを基質としてアスタキサンチンを生産することが可能ならば、アスタキサンチン生産性の向上が期待できる。しかしながら、酵母 *X. dendrorhous* は酵母 *C. magnoliae* と比較するとキシリトール収率及び生産性が極めて小さい。そこで、最初にバイオマス加水分解物を用いて酵母 *C. magnoliae* によるキシリトール生産を行い、引き続き生成したキシリトールを基質とした酵母 *X. dendrorhous* によるアスタキサンチンの生産を行う二段階培養法について検討を行った。その結果を Fig. 3 に示した。培養開始 0 h から 24 h までは、この加水分解物の上澄み液を培地 (Xylose 15.4 g/L, A₂₈₀ 画分値 188) として *C. magnoliae* によるキシリトール発酵を行った結果であり、最終キシリトール濃度、収率及び生産性は、それぞれ 13.8 g/L, 0.90 g-XOH/g-xyl 及び 0.33 g/L・h となった。次に、この生産されたキシリトールを炭素源として *X. dendrorhous* によりアスタキサンチン生産を検討した。その結果が培養開始 24 h から 132 h である。酵母 *X. dendrorhous* はキシリトールを消費し良好な菌体増殖が行われた。最終アスタキサンチン生産量及び収率はそれぞれ 6.9 mg 及び 0.46 mg-Ax/g-xylitol が得られ、効率的なアスタキサンチン生産が行われた。これらのことから、バイオマスを原料としキシリトール発酵を行い、引き続きキシリトールを基質としてアスタキサンチン生産を行う二段階発酵により、効率的なアスタキサンチン生産が可能であることが明らかになった。

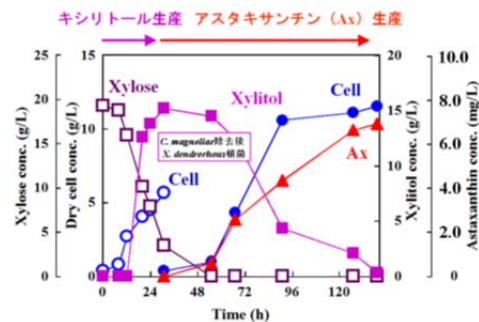


Fig. 3 エノキタケ廃培地を原料とした二段階発酵によるアスタキサンチン生産
シンボル: ○, Cell (*C. magnoliae*); □, Xyl; ■, XOH; ●, Cell (*X. dendrorhous*); ▲, Ax

(4)キシリトール・アスタキサンチンの同時生産

①混合基質培地を用いたキシリトール・アスタキサンチンの同時生産 グルコース 25 g/L 及びキシロース 25 g/L を含む基質混合培地を用いて回分培養を行った結果を Fig. 4 に示した。

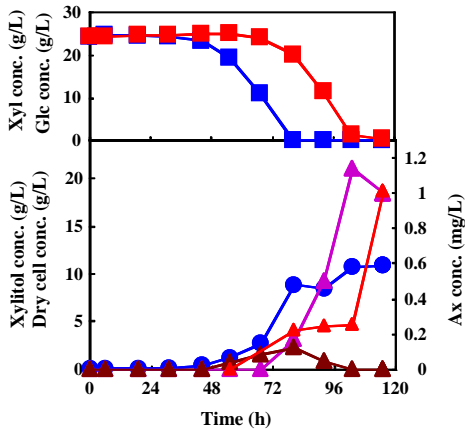


Fig. 4 混合基質培地を用いたキシリトール・アスタキサンチンの同時発酵
シンボル：■, Glc；■, Xyl；●, Cell；▲, XOH；▲, Ax；▲, EtOH

この結果、培養開始から 31 h までは誘導期であり、31 h 以降は良好な菌体増殖が観察され、このときの比増殖速度は 0.089 g-cell / g-cell · h であった。この培養期間では、グルコースのみが消費されていることから、培養初期では菌体はグルコースを基質として増殖することがわかった。これは、カタボライト抑制によりグルコース存在下ではキシロース消費に関与する酵素が遺伝子レベルで抑制されるために、キシロースの消費が行われなかったと考えられる。このため、培養初期ではキシリトールの生成も観察されなかった。グルコースが枯渇した培養 80 h 以降では、菌体濃度はほぼ一定となった。このときから、キシロースの消費が始まり、同時にキシリトールの生成が観察された。このことから、グルコース及びキシロースの基質混合培地を用いてもキシロースを基質としたキシリトール生産が行われることがわかった。一方、アスタキサンチンはグルコースが枯渇し、菌体増殖が定常的になった培養後期から菌体内に生成され蓄積することがわかった。これは、アスタキサンチンは電子伝達系から発生する活性酸素種からのストレス以外に、C 源及び N 源等の栄養源不足のストレスからもアスタキサンチンの蓄積が起こったためと考えられる。以上の結果より、グルコース及びキシロースを基質としたとき、キシリトール及びアスタキサンチンの同時生産は可能であることがわかった。

②キシリトール・アスタキサンチンの同時生産に及ぼす基質濃度の影響 同時発酵に及ぼす基質濃度の影響について検討を行うために、種々の基質濃度の混合培地を用いた回分培養の結果を Table 3, 4 にまとめた。

Table 3 同時発酵に及ぼす基質濃度の影響

基質濃度 (g/L)		菌体濃度 (g/L)	XOH 濃度 (g/L)	Ax 濃度 (mg/L)
Glc	Xly			
20	0	6.2	0.0	1.0
0	20	9.9	11.5	0.0
25	25	10.3	21.0	1.5
50	50	16.4	23.3	7.0
100	100	29.6	38.1	11.5

Table 4 同時発酵に及ぼす基質濃度の影響

基質濃度 (g/L)		XOH 生産性 (g/L · h)	Ax 収率 (mg/g-cell)
Glc	Xly		
20	0	0.0	0.16
0	20	0.16	0.00
25	25	0.20	0.14
50	50	0.05	0.49
100	100	0.10	0.39

Glc:グルコース、Xyl:キシロース、
XOH:キシリトール、Ax:アスタキサンチン

また、グルコース及びキシロースを単一の基質として回分培養を行った結果も合わせて示した。Table 3 の結果より、基質濃度の増加とともに、菌体濃度、キシリトール及びアスタキサンチン濃度は増加した。一般に、酵母を用いた培養では、基質濃度を高濃度にするクラブトリー効果によりエタノールが生成し目的生産物の生成が低下することが知られているが、基質濃度 100 g/L までは良好なアスタキサンチン及びキシリトール生産が行われることがわかった。一方、Table 3, 4 の結果より、エタノール濃度及び比増殖速度は基質濃度の増加とともに低下した。これは、クラブトリー効果によりエタノール以外の副生成物が生産されたことが示唆される。また、Table 4 を見るとわかるように、基質濃度の増加とともにアスタキサンチンの生産性は増加しているが、キシリトールの生産性は減少している。さらに、基質混合培地を用いた培養のキシリトール生産性は、キシロースを単一基質とした培養結果と比較すると低下していることがわかった。これは、グルコース存在下ではカタボライト抑制によりキシロースが消費されず、グルコースが低濃度になるとキシロース消費が開始されることに起因すると考えられる。

以上のことから、亜臨界水処理により農産廃棄物系バイオマスの構成成分をカスケード

的に利用することで、効率的なキシリトール生産及びアスタキサンチン生産が行われることがわかった。

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)

[学会発表] (計 17 件)

- ① 多田清志、荻野享太、菅野 亨、堀内淳一、コーンコブを原料とした機能性食品成分の微生物生産、第 18 回化学工学・粉体工学研究発表会、2009 年 1 月 31 日、室蘭
- ② 多田清志、荻野享太、菅野 亨、堀内淳一、コーンコブ構成成分のカスケード利用による機能性食品成分の開発、化学系学協会北海道支部 2009 年冬季研究発表会、2009 年 2 月 4 日、札幌
- ③ 多田清志、山内 太、菅野 亨、堀内淳一、コーンコブを原料としたアスタキサンチンの微生物生産、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 28 日、福岡
- ④ 荒木 慶、多田清志、菅野 亨、堀内淳一、寒冷地バイオ資源を活用したバイオリファイナリー (第 2 報キシリトール生産)、化学工学会第 41 回秋季大会、2009 年 9 月 18 日、広島
- ⑤ 多田清志、山内 太、菅野 亨、堀内淳一、寒冷地バイオ資源を活用したバイオリファイナリー (第 3 報アスタキサンチン生産)、化学工学会第 41 回秋季大会、2009 年 9 月 18 日、広島
- ⑥ 多田清志、山内 太、菅野 亨、堀内淳一、コーンコブを原料とした *Xanthophyllomyces dendrorhous* によるアスタキサンチン生産、第 61 回日本生物工学会大会、2009 年 10 月 24 日、名古屋
- ⑦ 多田清志、山内 太、菅野 亨、堀内淳一、原田 陽、エノキタケ廃培地を原料とした有用物質生産プロセスの開発、第 19 回化学工学・粉体工学研究発表会、2010 年 1 月 29 日、網走
- ⑧ 多田清志、原田 陽、菅野 亨、堀内淳一、キノコ廃培地を原料としたキシリトール微生物生産、化学工学会第 75 回年会、2010 年 3 月 18 日、鹿児島
- ⑨ 多田清志、原田 陽、菅野 亨、堀内淳一、エノキタケ廃培地を用いた *Xanthophyllomyces dendrorhous* によるアスタキサンチン生産、日本生物工学会 2010 年度シンポジウム、2010 年 7 月 23 日、北見
- ⑩ 多田清志、高村裕哉、水尻直樹、菅野 亨、堀内淳一、コーンコブを原料としたキシリトール発酵の酸素供給制御、日本生物工学会 2010 年度シンポジウム、2010 年 7

月 23 日、北見

- ⑪ 鈴木由麻、多田清志、菅野 亨、堀内淳一、コーンコブを原料とした *Xanthophyllomyces dendrorhous* によるキシリトール・アスタキサンチンの同時発酵生産、日本生物工学会 2010 年度シンポジウム、2010 年 7 月 23 日、北見
- ⑫ 多田清志、原田 陽、菅野 亨、堀内淳一、エノキタケ廃培地を用いた *Candida magnoliae* によるキシリトール生産、化学工学会第 42 回秋季大会、2010 年 9 月 6 日、京都
- ⑬ 多田清志、鈴木由麻、原田 陽、菅野 亨、堀内淳一、エノキタケ廃培地を原料とした *Xanthophyllomyces dendrorhous* によるアスタキサンチン生産、第 62 回日本生物工学会大会、2010 年 10 月 29 日、宮崎
- ⑭ 鈴木由麻、多田清志、菅野 亨、堀内淳一、バイオマスを原料とした *Xanthophyllomyces dendrorhous* によるキシリトール・アスタキサンチンの同時発酵生産、第 62 回日本生物工学会大会、2010 年 10 月 29 日、宮崎
- ⑮ 多田清志、鈴木由麻、原田 陽、菅野 亨、堀内淳一、コーンコブのカスケード利用によるキシリトール・アスタキサンチンの微生物生産、化学工学会札幌大会、2011 年 8 月 25 日、札幌
- ⑯ 多田清志、鈴木由麻、原田 陽、菅野 亨、堀内淳一、キシロース・グルコース混合培地を用いた流加培養によるキシリトール・アスタキサンチンの同時生産、化学工学会第 43 回秋季大会、2011 年 9 月 15 日、名古屋
- ⑰ 多田清志、鈴木由麻、原田 陽、菅野 亨、堀内淳一、バイオマスを原料とした流加培養によるアスタキサンチン・キシリトールの同時生産、第 63 回日本生物工学会大会、2011 年 9 月 27 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 清志 (TADA KIYOSHI)

北見工業大学・工学部・助教

研究者番号：90333666