

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870355

研究課題名(和文)膜分離・通電式発酵の検討

研究課題名(英文) Investigation of microbial fermentation utilizing membrane separation and electrochemical system

研究代表者

佐々木 建吾 (sasaki, kengo)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命准教授

研究者番号：50558301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：リグノセルロース系バイオマスである稲わらの利用として、低エネルギー消費である微粉碎前処理を行い、メタン発酵/エタノール発酵の高効率化に寄与した。また、稲わら水熱処理液をナノフィルトレーション膜により濃縮し、酵素糖化を行うことで、効率的にリグニンを回収する事に成功した。ソルガム搾汁液についてウルトラフィルトレーションを行い、その後ナノフィルトレーション膜により濃縮した液より、約100g/Lのエタノールを連続的に生成する事に成功した。

研究成果の概要(英文)：Utilization of rice straw, which is one of lignocellulosic biomass, was aimed. As the pretreatment, mechanical milling of rice straw increased subsequent production of methane or ethanol by microorganisms. (Energetic consumption using mechanical milling was low.) Liquid fraction of hydrothermally pretreated rice straw was concentrated by nano-filtration (NF) membrane. Enzymatic hydrolysis of this concentrate precipitated lignin easily. Ultra-filtration permeation and NF concentration were performed on the sweet sorghum juice. *Saccharomyces cerevisiae* repeatedly produced about 100 g/L of ethanol from the NF concentrate.

研究分野：Biochemical engineering

キーワード：rice straw mechanical milling methane fermentation ethanol fermentation nano-filtration  
lignin sweet sorghum juice

## 1. 研究開始当初の背景

食品残渣、家畜糞尿、下水汚泥、農業系残渣、陸生植物のような得られる有機性資源（エタノールのような液体燃料・メタンのような気体燃料）は再生可能エネルギーであり、石油代替エネルギーとして注目されている。そのため、バイオマス資源を生物化学的変換により有機性資源に高効率に変換する技術の進展が求められている。しかし、微生物による変換過程での生産物濃度は微生物種の性質に依存するが、これを制御する事が望まれている。

リグノセルロース系バイオマス中に含有されるリグニンは高分子のフェノール性化合物であり、セルロース・ヘミセルロースに続く大量な含有物である。セルロース・ヘミセルロースの利用に加えて、リグニンを有価物として回収する事が望ましい。

一方、微粉碎前処理はバイオマス資源の酵素糖化効率を増加でき、固定床式発酵は微生物濃度を制御する事が可能であり、高度膜分離技術は物質の濃度を制御する事が可能であるため、これらのシステムは微生物発酵プロセスを最適に制御できる事が期待される。

## 2. 研究の目的

バイオマス資源の有機性資源への高効率変換を目指して、下記の3つを達成する事を目的とした。

(1) ソルガム搾汁液から高度膜分離技術により高効率なエタノール生産プロセスを構築する。

(2) 稲わら水熱処理液からリグニンを回収する方法を構築する。

(3) 稲わらを原料として、微粉碎・固定床式メタン発酵・膜分離式発酵複合システムを用いて微生物発酵を制御する方法を確立する。

## 3. 研究の方法

### (1) ソルガム搾汁液からのエタノール生産

ソルガム(cv. SIL05)からの搾汁液については名古屋大学生物機能開発利用研究センターより支給頂いた。

フッ化ビニリデン樹脂製の限外ろ過 UF 膜として RS50 膜(分子量分画: 150,000 Da)(日東電工株式会社製) およびポリアミド製のナノフィルトレーション NF 膜として ESNA3 膜(分子量分画: 150 Da)(日東電工株式会社製)を使用した。

・ソルガム搾汁液 UF 膜透過(0.4 MPa)  
NF 膜濃縮(2.8MPa) エタノール発酵

### (2) 稲わら水熱処理液からのリグニン回収

稲わら水熱処理液については三菱重工メカトロシステムズ(株)より支給頂いた。NF 膜として ESNA3 膜を使用した。

NF 膜濃縮液には 5g/L ヘミセルラーゼを添加して 37、48 時間反応させた。

・稲わら水熱処理液 遠心にて上清取得  
NF 膜濃縮(2.5MPa) 酵素糖化 遠心にて黒色沈殿物を取得

### (3) 稲わらからのメタン・リグニン回収

2-3mm に切断した稲わら 150g を 1800g の鉄球と混ぜてナノメックリアクター(CMJ101、テクノアイ製)中にて 10 サイクル(1000rpm 15s, 1500rpm 45s) 処理した。

微粉碎した稲わら 10g/L を固定床式メタン発酵槽中にてメタン発酵を行った。固定床式メタン発酵槽中には炭素繊維(S-255AH、大阪ガスケミカル製)を設置している。発酵温度は 55 で行った。

上記のメタン発酵残渣は室温にて 30 日間放置した。その後、発酵残渣を遠心分離して上清を取得した。上清について高度膜分離を行った。使用した膜は、スルホン化ポリエーテルスルホン製である NF 膜である NTR-7410 膜、NTR-7430 膜、NTR-7450 膜(日東電工株式会社製)である。

## 4. 研究成果

### (1) 連続的高濃度エタノール生産

ソルガム搾汁液より窒素源が非添加でも高濃度エタノール生産が可能であった。そこで、窒素源非添加条件において連続的にバッチ培養を行った。なお、1 回のバッチ培養は 48 時間で行った。5 回目のバッチ培養でも 113.7g/L のエタノールを生産し、理論的エタノール収率は 89.1%であった。このレベルは 1 回のバッチ培養(115.2g/L のエタノール生産、理論的エタノール収率 81.7%)と同様であった。

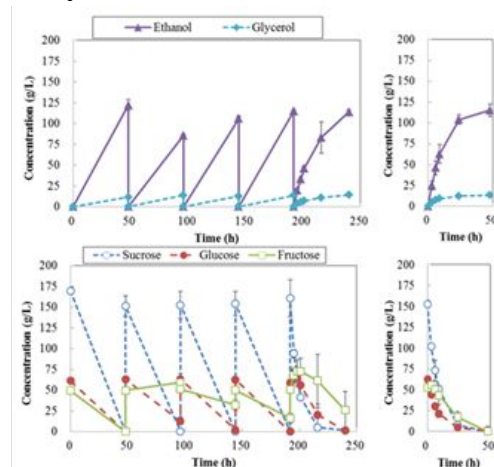


図1．ソルガム搾汁液からの連続的高濃度エタノール生産

ソルガム搾汁液を UF/NF 膜プロセスにより濃縮する事により、酵母とソルガム搾汁液濃縮液のみで（窒素源非添加で）連続的に高濃度のエタノール生産が可能である事が明らかとなった。窒素源非添加条件にて連続的にエタノール生産に成功した事例としては世界初である（表1）。連続的なエタノール生産が可能であった理由として、NF 膜濃縮により糖とともにアミノ酸も濃縮されていたため、アミノ酸が窒素源となった事が考えられる。

(2) リグニン高含有沈殿物の取得

稲わら水熱処理液上清を NF 膜濃縮してヘミセルラーゼにて酵素糖化する事で、黒色沈殿物が沈殿してくる事が明らかとなった。逆に、稲わら水熱処理液上清を酵素糖化しただけでは黒色沈殿が得られていない。

得られた黒色沈殿の組成を分析した。その結果、酸不溶性リグニンは 52.9wt% であり、酸可溶性リグニンは 12.9wt% であった。すなわち、リグニンを約 65% 含有する沈殿物であり、初発の稲わら中のリグニンの約 11.9% を回収する事に成功した。稲わら水熱処理液中から高効率にリグニンを回収する方法を確立できたと考えられる。

表1．黒色沈殿の組成

	酸不溶性リグニン (wt%)	酸可溶性リグニン (wt%)
黒色沈殿	52.9	12.9

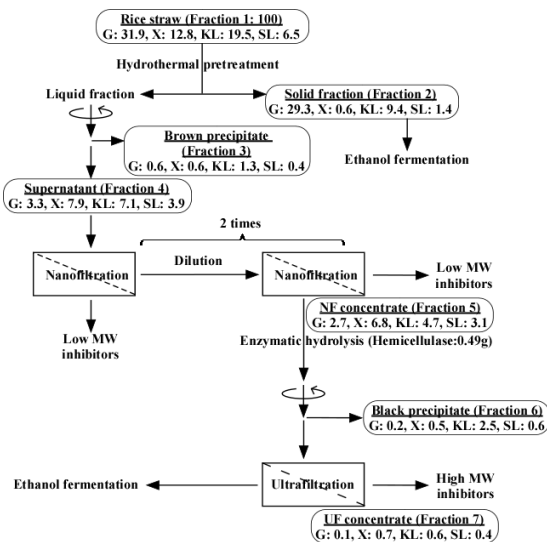


図2．リグニン回収のフロー

(G: グルカン、X: キシラン、KL: 酸不溶性リグニン、SL: 酸可溶性リグニン) 稲わら 100g からスタートしたと仮定している。

(3) 稲わらからのメタン生成・リグニン回収

稲わらを微粉碎処理した。微粉碎処理に掛かるエネルギー量は 1.9NJ/kg-rice straw と比較的に低エネルギーにて行った。

微粉碎処理した稲わらは固定床式発酵槽に投入してメタン発酵を行った。比較対象として、無処理の稲わらも固定床式メタン発酵を行った。その結果、メタン生成速度は微粉碎する事で無処理に比べて約 1.9 倍に達しており、微粉碎前処理はメタン生成を促進する事が明らかとなった。さらにメタンの増加分は 3.6MJ-CH<sub>4</sub>/kg-rice straw であり、微粉碎処理による投入エネルギー量を上回っていた。

表2．メタン生成速度

	メタン生成速度 mL/L/day
微粉碎稲わら	419
無処理稲わら	226

微粉碎した稲わらの発酵液残渣は室温にて 30 日間放置すると上清の色が褐色に濁っているのを確認した。この上清を NF 膜濃縮を行ったところ、黒色沈殿を得る事に成功した。この黒色沈殿は 50% 以上のリグニンを含有していた。また、もとの稲わらの約 19% 以上を回収していた。

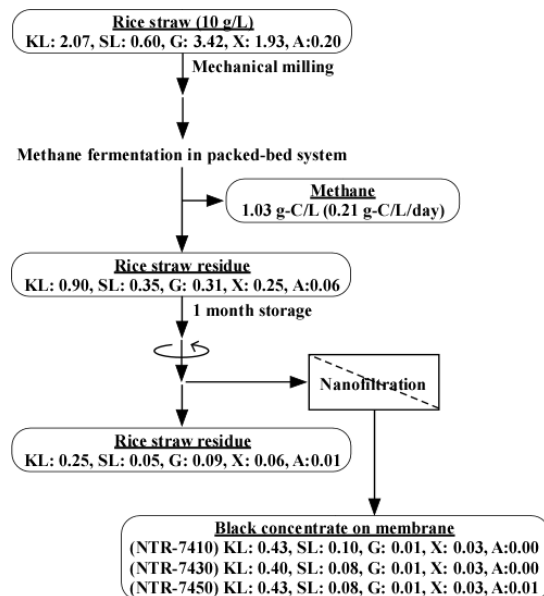


図3．メタン発酵/リグニン回収のフロー 稲わら 10g/L からスタートしたと仮定している。

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 6件)

Sasaki K., Hara K.Y., Kawaguchi H., Sazuka T., Ogino C., Kondo A. Nanofiltration concentration of extracellular glutathione produced by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bioscience and Bioengineering 120(1) pp. 96-100 2016 「査読有」

Sasaki K., Okamoto M., Shirai T., Tsuge Y., Teramura H., Sasaki D., Kawaguchi H., Hasunuma T., Ogino C., Matsuda F., Kikuchi J., Kondo A. Precipitate obtained following membrane separation of hydrothermally pretreated rice straw liquid revealed by 2D NMR to have high lignin content. Biotechnology for Biofuels 8:88 2015 「査読有」

Sasaki K., Tsuge Y., Sasaki D., Kawaguchi H., Sazuka T., Ogino C., Kondo A. Repeated ethanol production from sweet sorghum juice concentrated by membrane separation. Bioresource Technology 186 pp. 351-355 2015 「査読有」

Sasaki K., Tsuge Y., Sasaki D., Teramura H., Inokuma K., Hasunuma T., Ogino C., Kondo A. Mechanical milling and membrane separation for increased ethanol production during simultaneous saccharification and co-fermentation of rice straw by xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresource Technology 185 pp. 263-268 2015 「査読有」

Sasaki K., Tsuge Y., Sasaki D., Teramura H., Wakai S., Kawaguchi H., Sazuka T., Ogino C., Kondo A. Increased ethanol production from sweet sorghum juice concentrated by a membrane separation process. Bioresource Technology 169 pp. 821-825 2014 「査読有」

Sasaki K., Tsuge Y., Sasaki D., Hasunuma T., Sakamoto T., Sakihama Y., Ogino C., Kondo A. Optimized membrane process to increase hemicellulosic ethanol production from pretreated rice straw by recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresource Technology 169 pp. 380-386 2014 「査読有」

〔学会発表〕(計 6件)

佐々木建吾・白井智量・柘植陽太・近藤昭彦「膜分離プロセスによる稲わら水熱処理液からのリグニン回収」『日本農芸化学会 2016年度大会』札幌コンベンションセンター(北海道) 2016年3月27~30日

佐々木建吾「バイオプロセス高効率化のための遺伝学的・代謝学的解析」『第39回広島大学バイオマスイブニングセミナー』、広島大学(広島県) 2016年2月19日

Sasaki K.・Kondo A.「Recovery of lignin from rice straw liquid hydrolysate with membrane separation」The 6th iBioK Asian Workshop, Kobe University (Hyogo prefecture) (December 7-8 2015)

佐々木建吾・柘植陽太・佐々木大介・寺村浩・川口秀夫・荻野千秋・春日重光・佐塚隆志・近藤昭彦「膜濃縮したソルガム搾汁液からのエタノール発酵」『日本農芸化学会 2015年度大会』、岡山大学(岡山県) 2015年3月26-29日

佐々木建吾・柘植陽太・佐々木大介・荻野千秋・近藤昭彦「稲わら前処理液の膜プロセスによるエタノール発酵高効率化」『日本生化学会 2014年度大会』札幌コンベンションセンター(北海道) 2014年9月9~11日

佐々木建吾・近藤昭彦「膜プロセスによるエタノール発酵高効率化」『第38回九州紙パルプ研究会講演会』、福岡大学(福岡県) 2014年6月6日

〔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〕  
ホームページ等  
<http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/sasaki.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
佐々木 建吾 (SASAKI, Kengo)  
神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点研究部・特命准教授

研究者番号: 50558301

(2)研究分担者  
特になし

(3)連携研究者  
特になし