

道内未利用バイオマス資源のバイオエタノール変換技術

北口 敏弘, 三津橋浩行, 山越 幸康, 岡 喜秋, 上出 光志

Bioethanol Conversion Technology for Herbaceous Biomass Resources in Hokkaido

Toshihiro KITAGUCHI, Hiroyuki MITSUHASHI
Yukiyasu YAMAKOSHI, Yoshiaki OKA, Mitsushi KAMIDE

抄 録

バイオエタノールの原料として食料と競合しない草などを利用するために①牧草などセルロース原料の爆砕法を用いた前処理方法の検討, ②機能性酵母の構築, ③前処理産物を原料とし, 糖化酵素を生産する機能性酵母を利用したエタノール発酵試験を行った。

その結果, ①蒸煮・爆砕試験の結果, 温度が高くなるほどグルコース分, キシロース分, リグニンの残存率が減少した。特にキシロース分は200℃以上で急激に分解が進むことから, 処理温度は200℃以下が望ましいことが分かった。②セロビオースを糖化し, エタノール発酵することのできる機能性酵母を構築できた。③蒸煮・爆砕産物を基質として用い, エタノールが生成することを確認した。エタノール生成速度はセルロース試薬, 爆砕産物を基質として用いた場合, セロビオースを用いた場合よりも遅くなったが, 両者のエタノール生成速度はほぼ同等であることが分かった。また, エタノール収率はセロビオースを用いた場合の83%程度であった。

キーワード: 草本類, バイオマス, エタノール, 蒸煮・爆砕, 酵母

Abstract

Bioethanol conversion technology for herbaceous biomass resources in Hokkaido was studied through examinations of steam explosion pretreatment, constructions of functional yeasts with ability of saccharifying cellobiose, tests of simultaneously saccharification and fermentation using functional yeasts.

It was found that the survival rates of glucose, xylose and lignin decreased as the temperature became higher. It was desired that the temperature of the steam explosion pretreatment for herbaceous biomass was under 200 celsius degrees, because of preventing the degradation of xylose. We recognized the functional yeasts to be able to ferment the products of the steam explosion pretreatment. The conversion rates to ethanol from cellulose reagents and the products of the steam explosion pretreatment as the substrates of fermentation were lower than that from cellobiose reagents. The ethanol yield using cellulose reagents and the products of the steam explosion pretreatment were 83% of that using cellobiose reagents.

KEY-WORDS : Herb, Biomass, Ethanol, Steam explosion, Yeast

事業名: 一般試験研究, 外部資金等活用研究

課題名: 「道内未利用バイオマス資源のバイオエタノール変換技術に関する研究」, 「爆砕法と遺伝子組み換え機能性酵母を用いた高効率草本系バイオエタノール生産に関する研究」

1. はじめに

植物などバイオマスを原料としたバイオエタノールは元々大気中にあった二酸化炭素を太陽エネルギーによって植物が体内に固定したものであり、それを燃焼させても大気中の二酸化炭素を増加させることの無いクリーンな燃料として注目されている。現在、サトウキビや穀類などの糖質やでんぷんを原料としたエタノールが生産されているが、それらは食料、家畜飼料などと競合し物価上昇の原因のひとつといわれ問題があるほか、将来的に増加するエタノール要求量に対して国内での原料供給量の確保が難しいなどの指摘がある。そのため、食料と競合せず、賦存量が多い木本類、草本類や木質廃棄物などリグノセルロース系を原料としたエタノール生産が期待されている。

本研究では食料と競合しない草本類をエタノール原料として利用するために①牧草などセルロース原料の爆砕法を用いた前処理方法の検討、②機能性酵母の構築、③前処理産物を原料とし、糖化酵素を生産する機能性酵母を利用したエタノール発酵試験を行ったので以下に報告する。なお、機能性酵母とは酵母にセルラーゼなどの酵素を生産させ、酵素を附着性タンパク質によって酵母表層に提示あるいは酵母外に分泌させることのできる酵母のことである。

2. 試験装置

2.1 蒸煮・爆砕装置

試作した蒸煮・爆砕装置を図1に示す。装置は電気炉、容量約1.5Lの圧力容器、圧力開放弁、約30Lの受け容器で構成される。圧力容器は既存のオートクレーブを改造し、蓋の中央に爆砕産物排出用の配管を施し、配管の途中で手動で開閉できる圧力開放弁を設け、圧力を保持、開放できるようにした。また、圧力容器の蓋には容器内の温度計測のための座が設けられており、温度調節計によって温度が制御される。受け容器内には容量約20Lの円筒状の容器を入れ、蒸煮・爆砕試験終了後に容器内に入った爆砕産物を容易に取り出せる構造とした。図には示していないが、高温となった圧力容器内壁にバイオマスが直接接触して炭化することの無いように、上部が開放された円筒状の80メッシュの金網を圧力容器上端のフランジから吊し、その中にバイオマスを入れる構造とした。

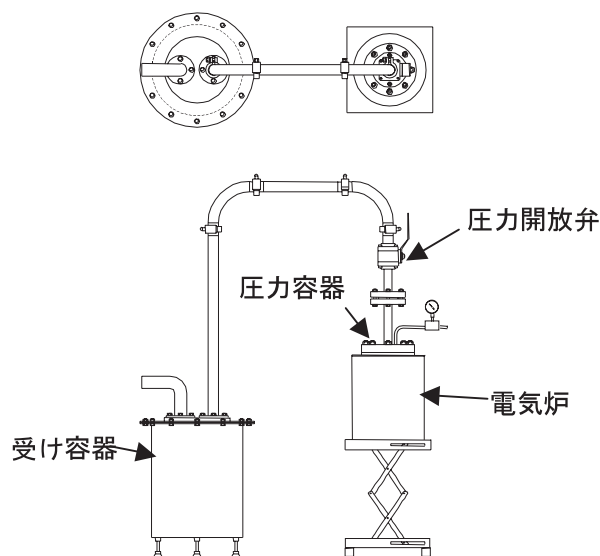


図1 蒸煮・爆砕装置

2.2 発酵試験装置

発酵試験装置の概要図を図2に示す。装置は主に恒温水循環装置、水槽、6連式スターラー、発酵容器から構成される。100mLの発酵容器の蓋に発酵中に発生する二酸化炭素を逃がすための管を設けた。その管にシリコンチューブを繋ぎ、シリコンチューブの多端を水の入った三角フラスコ内に沈め、水封した（図には示していない）。発酵容器内に攪拌子を入れ、スターラーによって攪拌できるようにした。

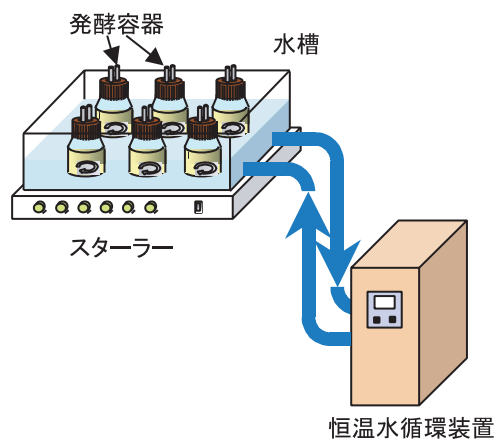


図2 発酵試験装置

表1 バイオマス組成

単位：％

バイオマス	グルカン	キシラン	ガラクトタン	リグニン	抽出物質
リードカナ リーグラス	24.3	13.4	0.2	12.8	28.7

3. 供試試料等

3.1 バイオマス

試験に使用したバイオマスは寒地型イネ科牧草のリードカナリーグラスを用いた。その原料組成を表1に示す。分析は糖類、リグニンについてはNREL Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass¹⁾によって、抽出物質についてはNREL Determination of Extractives in Biomass²⁾によって行った。抽出物質とは水およびアルコールそれぞれによって抽出された物質である。分析の結果、抽出物質が多く、30%弱であった。抽出物質フリーベースでのグルカン、キシラン、ガラクトタン、リグニンの構成割合はそれぞれ34.1, 18.8, 0.3, 18.0%であった。

3.2 使用した酵母およびプラスミド等

機能的酵母の構築に使用した菌株およびプラスミドなどの媒体を表2に、用いたプラスミドを図3に示す。酵母はMT8-1 (*Saccharomyces cerevisiae*) という1倍体のものを用いた。この酵母はアデニン、ヒスチジン、ロイシン、トリプトファン、ウラシル計5種類のアミノ酸あるいは核酸の栄養要求性を持つ。

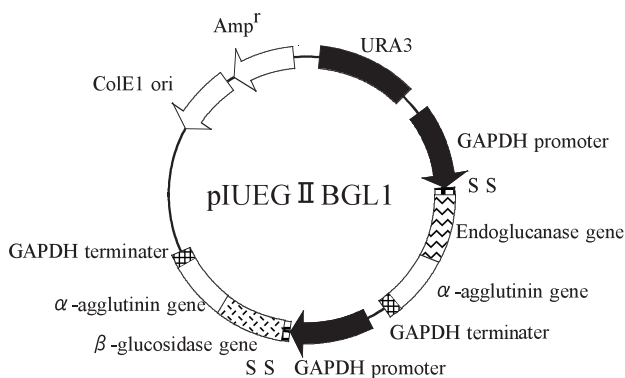


図3 プラスミド (pIUEG II BGL1)

プラスミドを増幅するために大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 α を用いた。また、プラスミドは核酸ウラシルの生産能と抗生物質アンピシリン耐性を持っている他、糸状菌 *Trichoderma reesei* 由来の酵素エンドグルカナーゼ (EG II) と同 *Aspergillus aculeatus* 由来の β グルコシダーゼ (BGL1) を酵母の表層に提示する発現カセットを有している。

4. 試験方法

4.1 蒸煮・爆砕試験方法

カッターミルにて粗砕し、20~80メッシュに分級したバイオマス 5 g を圧力容器内の金網に投入後、水を100 g 圧力容器に入れた。蒸気等が漏れないよう蓋を確実に閉めた後、電気炉によって昇温を始め、所定の温度 (圧力) に到達した時点から一定時間、その温度を維持した。所定時間経過後、手動にて圧力開放弁を開放し、爆砕産物を得た。受け容器内には予め質量を計測した20Lの円筒状容器が据え付けられており、容器と回収された爆砕産物の質量を計測し、容器質量を差し引くことで爆砕産物の質量を得た。爆砕産物は爆砕の効果によりキシラン、セルロースが分解され、キシロオリゴ糖やセロオリゴ糖となって水に溶解する分と、分子量が小さくなるものの水に溶解するには至らずに固形分として残る分があるので、水溶液、固形分の両方について糖類、リグニンの分析を行った。水溶液についてはフルフラールやHMF (ヒドロキシメチルフルフラール) などの糖の過分解物質についても分析した。水溶液中の糖類や過分解物質はNREL Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples³⁾によって、また、固形分の糖類はNREL Determination of Carbohydrates and Lignin in Biomass¹⁾によって分析を行った。

一方、発酵試験では、蒸煮・爆砕装置に投入するバイオマ

表2 使用した菌株およびプラスミド等

菌株, プラスミド	仕様, 特徴等
酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MT8-1 MT8-1/pIUEG II BGL1	MATa ade his3 leu2 trp1 ura3 Codisplay of EG II and BGL1
大腸菌 <i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , ϕ 80d/lacZ Δ M15, Δ (/lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsd17(r _k ⁻ , m _k ⁺), phoA, supE44, λ ⁻ , thi-1, gyrA96, relA1
プラスミド pIUEG II BGL1	URA3 surface coexpression of <i>T. reesei</i> endoglucanase and <i>A. aculeatus</i> β -glucosidase genes

ス量を15gとし、200℃、5分の条件にて処理した。発酵状態の評価には発酵阻害物質等の影響を排除するため、爆砕産物を500mLの遠沈管に入れ、約200mLの蒸留水を加えて10分間振とう、遠心後、上清の色がクリアになるまでこの操作を繰り返し、発酵試験用試料に供した。

4.2 機能性酵母の構築

酵素エンドグルカナーゼIIおよびβグルコシダーゼを生産し、酵母表面に酵素を表層提示させるためのプラスミドpIUEG II BGL1を用いて大腸菌DH5αのコンピテントセルを形質転換した。その大腸菌をLB培地(トリプトン10g/L、酵母エキス5g/L、塩化ナトリウム5g/L、アンピシリン(抗生物質)100μg/mL)で、菌体内にpIUEG II BGL1を取り込んだすなわち抗生物質アンピシリン耐性をもつ大腸菌のみを選別し、増殖させた。次に、増殖した大腸菌からプラスミドを回収し、増えたプラスミドによって酵母MT8-1を形質転換後、ウラシルを含まないSDプレート(酵母窒素ベースアミノ酸不含6.7g/L、D-グルコース20g/L、該当アミノ酸・核酸(ウラシル不含)、アガー20g/L)で二度の継代培養を経て、選別した。

4.3 発酵試験

発酵試験は十分な量の酵母を得るためにまず、SD培地(酵母窒素ベースアミノ酸不含6.7g/L、D-グルコース20g/L、該当アミノ酸・核酸)5mLに当該酵母を植菌し、30℃、24h、好気条件下で試験管培養した。次に、SDC培地(酵母窒素ベースアミノ酸不含6.7g/L、D-グルコース20g/L、カザミノ酸20g/L、該当アミノ酸・核酸)500mLに先の試験管培養にて得られた酵母を植菌し、1L三角フラスコを用いて好気条件下で30℃、48h培養した。得られた酵母を酵母濃度OD₆₀₀ = 20となるよう、100mLの発酵容器内の発酵用培地(表3参照)50mLに植菌し、約1週間、発酵試験を行った。

	1	2	3
1Mクエン酸バッファー(mL)	2.5	2.5	2.5
10×YNB ^{*1} (mL)	5	5	5
10×C. A. ^{*2} (mL)	5	5	5
200g/Lセロビオース(mL)	12.5	0	0
セルロース(g)	0	1	0
爆砕産物(水分80%)(g)	0	0	3.95
酵母(OD ₆₀₀)	20	20	20
セルラーゼ(10mg/mL)(mL)	0	1	1
蒸留水	Balance	Balance	Balance

※1 Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids

※2 Casamino Acids

その間、所定の経過時間毎にサンプリングを行い、糖類、エタノールのほか、グリセロールなどの副生物について高速液体クロマトグラフィーを用いて分析を行った。

5. 試験結果および考察

5.1 蒸煮・爆砕試験結果

図4に処理時間5分の場合の蒸煮・爆砕試験結果を示す。凡例に示すグルコース、キシロースとは蒸煮・爆砕処理後の水に溶解した単糖、オリゴ糖と固形物として残ったセルロース、キシランを合計したものである。また、リグニンについても同様に水に溶解したリグニンと固形物として残ったリグニンを合わせたものである。グルコース分、キシロース分、リグニンは処理温度が高くなるほど残存率が低下し、分解が進んでいることが分かる。特に、キシロース分は200℃以上で急激に分解された。このことから、キシロースを有効に利用するためには蒸煮・爆砕処理温度は200℃以下で行うことが必要であることが分かった。

図5に過分解物質等の生成状況を示す。HMF(ヒドロキ

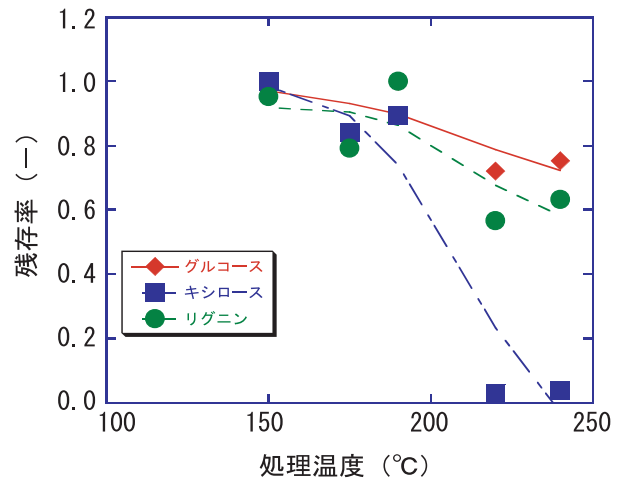


図4 蒸煮・爆砕装置

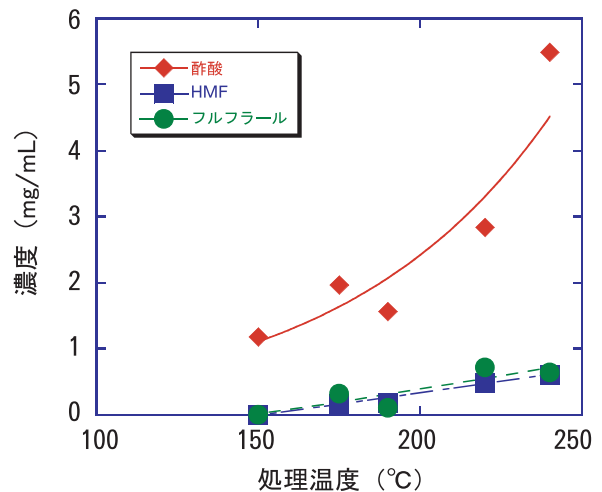


図5 過分解物質

シメチルフルフラール), フルフラールは糖類が過分解を起こして生成されるものであるが, 処理温度が高くなると生成量が徐々に増加した。また, 酢酸濃度は処理温度が高くなるほど高くなった。酢酸はバイオマス中のアセチル基に由来するものと言われており, その酢酸の生成により, ヘミセルロースなどの分解が進むと考えられた。これらの物質は濃度が高すぎると発酵阻害を起こすと言われており, どれも濃度が低いことが必要であることから, 処理温度はできるだけ低い方がよいことが分かった。

5.2 糖化・発酵試験結果

図6に基質としてセロビオース試薬を用いた場合の発酵試験結果を示す。セロビオースは発酵試験開始直後から急速に分解されていることが分かる。グルコースはセロビオースの分解に伴って一時的に生成したが, すぐに酵母によって消費されてエタノールが生成した。エタノールは最初の20時間, 濃度が上昇したが, 20時間以降は一定の値(約19 g/L)となった。セロビオース100 gから理論上, 約51 gのエタノールが生成することから, 発酵収率は約75%であった。副生成物としてグリセロール等が認められた。これらの結果から酵母に酵素(β グルコシダーゼ)を生産させ, 酵母の表面に提示された酵素によってセロビオースの分解が行われ, エタノール生産できることが確認できた。

図7, 8に基質としてセルロース試薬, 爆砕産物を用いた試験結果をそれぞれ示す。今回, 用いた酵母はセロビオヒドロラーゼを生産できないため, これを補うためにセロビオヒドロラーゼを含む酵素(セルラーゼ, シグマアルドリッチ製 Cellulase, from *Trichoderma reesei*(ATTC26921), 6 units/mg)を65 FPU(10mg/mL, 1 mL)加えた。基質としてセルロースおよび爆砕産物を用いたどちらの場合についてもエタノールの生成が認められた。その発酵速度はセロビオースを基質として用いた場合に比べて遅くなったが, 両方の発酵速度はほぼ同程度であることが分かった。それぞれの基質濃度はセルロース試薬20 g/Lに対して爆砕産物は15.8 g/Lである。爆砕産物のエタノール到達濃度は約5 g/Lであり, エタノール収率は約62%となった。エタノール収率がセロビオースの場合より低くなった理由として, 爆砕産物を用いた場合, 分解していないリグニンがセルロース表面を覆い, 酵素が物理的にセルロースにアタックできないため, 酵素による糖化率が制限されるためと考えられる。

6. おわりに

バイオエタノールを生産するための資源作物として有望なイネ科の牧草を原料として, 蒸煮・爆砕法による前処理試験と酵母に酵素を生産させ, セルロースの糖化と発酵を同時に行う同時糖化発酵試験を行った結果, 以下のことが明らかとなった。

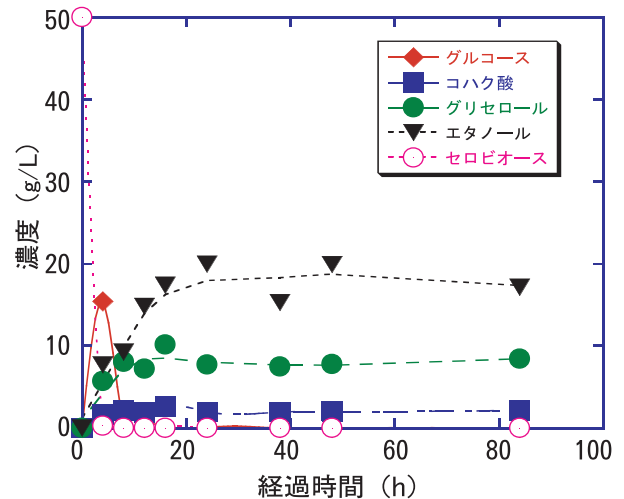


図6 発酵試験結果1(セロビオース)

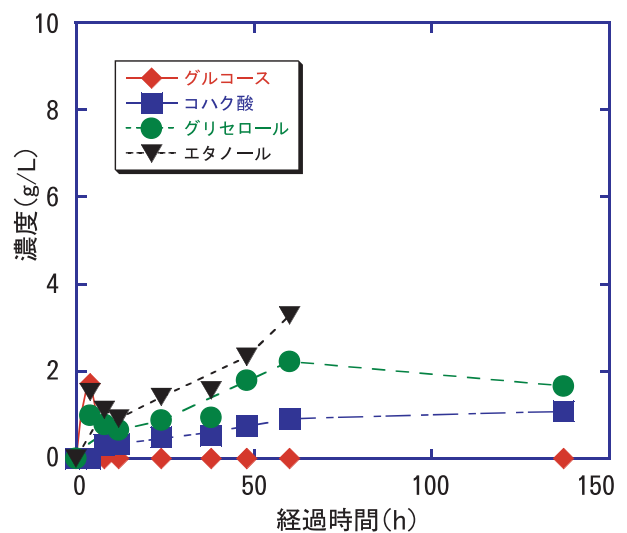


図7 発酵試験結果2(セルロース)

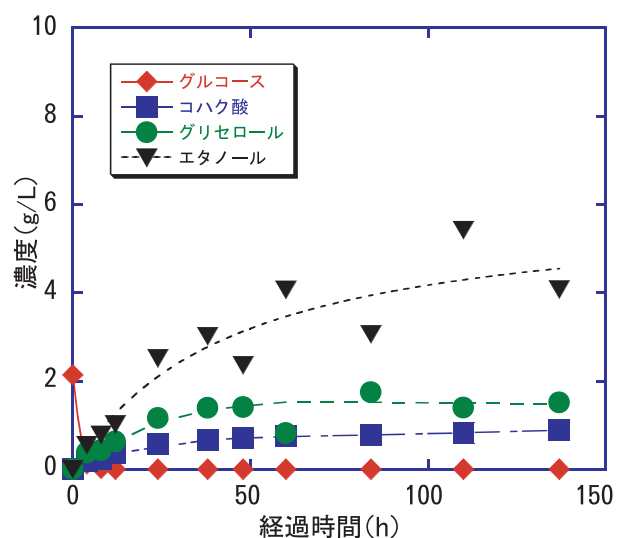


図8 発酵試験結果3(爆砕産物)

- 蒸煮・爆砕試験の結果、温度が高くなるほどグルコース分、キシロース分、リグニンの残存率が減少した。特にキシロース分は200℃以上で急激に分解が進むことから、処理温度は200℃以下が望ましいことが分かった。
- セロビオースを糖化し、エタノール発酵することのできる機能性酵母を構築できた。
- 蒸煮・爆砕産物を基質として用い、エタノールが生成することを確認した。エタノール生成速度はセルロース試葉、爆砕産物を基質として用いた場合、セロビオースを用いた場合よりも遅くなったが、両者のエタノール生成速度はほぼ同等あることが分かった。また、エタノール収率はセロビオースを用いた場合の83%程度であった。

謝辞

本研究の遂行にあたり、神戸大学大学院工学研究科近藤昭彦教授、同大学大学院伊藤純二様には、親身なご指導、ご助言を賜りました。ここに心より、感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Amie Sluiter • Bonnie Hames • Raymond Ruiz • Christopher Scarlata • Justin Sluiter • David Templeton • David Crocker: Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, Standard Biomass Analytical Procedures (NREL Laboratory Analytical Procedures), (2005)
- 2) Amie Sluiter • Ray Ruiz, Chris Scarlata • Justin Sluiter • David Templeton: Determination of Extractives in Biomass, Standard Biomass Analytical Procedures (NREL Laboratory Analytical Procedures), (2005)
- 3) Amie Sluiter • Nommie Hames • Raymond Ruiz • Christopher Scarlata • Justin Sluiter • David Templeton: Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples, Standard Biomass Analytical Procedures (NREL Laboratory Analytical Procedures), (2005)