

# シイタケ廃菌床からブドウ糖を生成する (4) ～高濃度バイオエタノールへの挑戦～

利用部 微生物グループ 檜山 亮

## ■はじめに

北海道内で最も多く生産されるキノコは生シイタケで、平成28年の生産量は全国2位の7,614トンでした<sup>1-3)</sup>。そのほとんど(約96%)は、おが粉と栄養材を材料とした菌床栽培によるものです。北海道の廃菌床発生量は年間4,700トン以上と試算されます<sup>4)</sup>。

既報でセルロース分解酵素(セルラーゼ)を使用することによりシイタケ廃菌床からバイオエタノールの原料となるブドウ糖が生成できること<sup>1)</sup>、高温高压の水蒸気処理でブドウ糖の回収率が大幅にアップすること<sup>2)</sup>、シイタケ収穫期間の長期化や菌床に用いるおが粉をヤナギにすることによってブドウ糖の回収率を向上させる試み<sup>3)</sup>について紹介しました。バイオエタノールの実用化のためには、エネルギー収支やコスト、環境負荷等を考える必要があり、エネルギーや化学薬品(酸・アルカリ・有機溶媒)をあまり使わない酵素糖化前処理にすること、セルラーゼの使用量を限定的にして酵素費用を抑えること、発酵後(蒸留前)のエタノール濃度を高くして蒸留・精製にかかるエネルギーを抑えることが非常に重要な検討課題になります。

ここでは、菌床材料としてヤナギを用い、長期間栽培を行ったシイタケ廃菌床を原料とし、前処理の

簡素化や酵素使用量の節減の検討をしながら、高濃度のバイオエタノールを得ることを目指した研究<sup>5)</sup>について紹介します。

## ■酵素糖化は原料(基質)濃度を高めても問題ないか

密封状態で保温しながら攪拌できる装置(ファーマンター、**写真1**)を使って、まずは高基質濃度での酵素糖化にチャレンジしました。本稿における基質濃度(%、w/v)とは、ファーマンター内部の水分(100mL)に対する基質の乾燥重量(g)を指します。既報<sup>1-3)</sup>でシイタケ廃菌床の酵素糖化率を調べる際に使ってきた、十分に酵素糖化しやすい基質濃度である基質濃度2%の条件と、大幅に基質濃度を上昇させた基質濃度30%および35%を比較しました(**図1**)。

基質濃度2%の方が早い時間に酵素糖化率が50%に達し、高基質濃度条件よりも早く糖化しましたが、48時間以降は酵素糖化率にあまり差が無く、基質濃度30~35%でも基質濃度2%のときと同程度の割合で酵素糖化できることがわかりました。

なお、紙面の都合上割愛しますが、基質濃度35%で酵素糖化した廃菌床に酵母を添加すると問題なく発酵してエタノールができること、50℃・24時間の酵素糖化後に酵母の発酵温度に合わせて30℃まで冷



写真1 3L容量のファーマンター

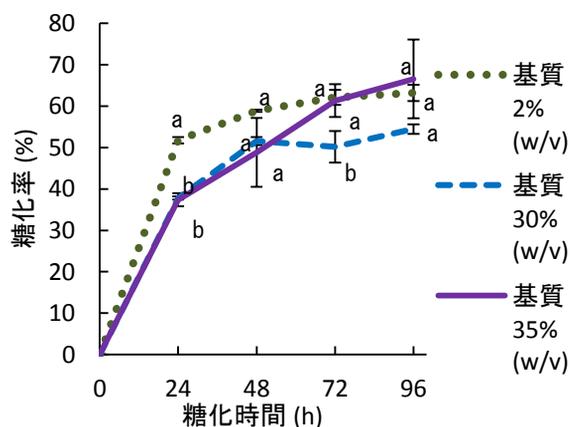


図1 基質濃度を変えたシイタケ廃菌床の酵素糖化率 (n=3)

糖化率は廃菌床に含まれるセルロースから得られるブドウ糖の理論量に対する酵素糖化により得られたブドウ糖量の割合。

糖化時間ごとの糖化率に付した異なるアルファベットは統計的有意差を示す。

エラーバーは標準偏差を示す。

ましてから酵母を添加する条件が効率的であることが実験によりわかりました。

### ■前処理の簡素化の限界へ

先の実験でシイタケ廃菌床は水分を10%以下に乾燥し、カッターミルで10mm以下に粉砕していましたが、実用化に向けてコストやエネルギーの節減をするためには糖化発酵の前処理を徹底的に簡素化することが必要と考えられました。そこで、シイタケ収穫が終了したばかりの湿潤状態で、ファーメンターの入口に入る程度の大きさ（1辺が4cm程度のブロック状）に手でほぐした廃菌床（以下、手ほぐし廃菌床）が、乾燥粉砕した廃菌床（以下、乾燥・粉砕廃菌床）と同様に糖化発酵できるかどうか調べました。その結果、統計的な差は確認されず、手ほぐし廃菌床は乾燥・粉砕廃菌床とほぼ同じように糖化発酵できることがわかりました（図2）。シイタケ廃菌床は、ファーメンターに付属する攪拌機の攪拌力と酵素の作用で容易にドロドロに分解し、50%程度のエタノール収率が見込めるため、通常の木質バイオマスに比べて非常に有利な原料であることがわかりました。

### ■高い濃度のエタノールが得られるか

ガソリンに混合できるエタノールは蒸留などにより水を除去して99.5%以上にする必要がありますが、蒸留開始時のエタノール濃度が低いと多大なエネルギーがかかってしまう問題があり、発酵終了後（蒸留開始時）のエタノール濃度を少なく

とも5%以上にすることが重要と考えられます。図2の実験では約3%のエタノール濃度が得られましたが、もう少し濃度を高める必要があります。糖化発酵の反応中のファーメンターに基質を追加投入してエタノール濃度を高める方法が報告されており、それをシイタケ廃菌床の糖化発酵にも適用して高濃度化に挑戦しました。

その結果、160時間とやや長い反応時間を要したものの、5%を超えるエタノール濃度を得ることができました（図3）。なお、木質バイオマス由来のバイオエタノールの研究分野で、酵素糖化前処理をほとんどせずに本研究程度の酵素添加量（5FPU/g-基質）まで抑えて、5%を超えるエタノール濃度を達成した例は他に見られません。

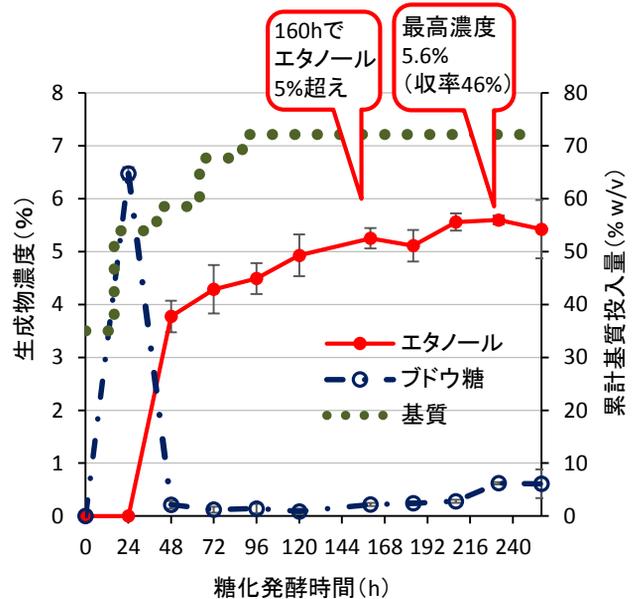


図3 基質追加投入を伴う糖化発酵によるエタノールの高濃度化 (n=3) エラーバーは標準偏差を示す。

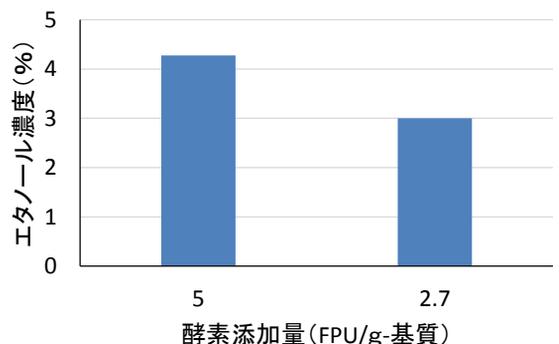


図4 酵素添加量を減らした時のエタノール濃度への影響 (160h時点での濃度) 実験条件：基質追加投入による最終基質濃度63% (w/v)、反応開始時に酵素添加。

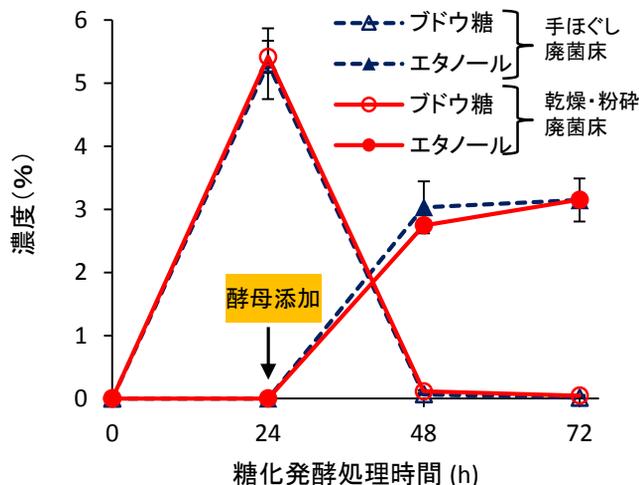


図2 糖化発酵の前処理を変えた時の生成物濃度 (n=3) 0~24時間は50°C、24時間以降は50°C。各時間の生成物濃度で有意差不検出。エラーバーは標準偏差を示す。

## ■酵素使用量を減らせるか

バイオエタノール生産コストで酵素費用は大きな割合を占めると言われています。ここまでの実験で使用してきた、基質1gあたりの酵素添加量が5FPUであるというのはバイオエタノールの研究分野においてかなり低い方なのですが、さらに酵素添加量を減らすための検討も行いました(図4)。その結果、5%より酵素添加量を減らしてしまうとエタノール濃度と収率が顕著に低下してしまい、現状の酵素では5FPU程度の酵素添加量が必要であることがわかりました。

## ■おわりに

シイタケ廃菌床は、ごく簡易な前処理、比較的少ない酵素添加量でも高濃度のエタノールを得られることから、バイオエタノールの原料として非常に優れていると言えます。今回の研究では市販のセルラーゼ使用量を節減したものの、できたバイオエタノールに対する酵素費用は安くない計算になってしまっています。しかし、近年のセルラーゼ研究は目覚ましく、低価格で高性能なセルラーゼが開発されつつあります。また、現状では5%超のエタノールを得るのに糖化・発酵に長時間を要しており生産性が低くなってしまっていますが、これは酵母のエタノール発酵に合わせて糖化発酵温度を30℃にしたことからセルラーゼの最適温度(40~50℃)から外れ

てしまい、糖化が遅くなっているためと考えられます。こちらにも高温耐性の酵母等が開発されており、そのような酵母を使用して糖化発酵温度を50℃近くにすると大幅に改善できる可能性があります。これらの技術開発動向を注視し、必要な先進技術との組み合わせを考えて実現可能性を見極めていきます。

## ■参考文献

- 1) 檜山 亮：シイタケ廃菌床からブドウ糖を生成する，林産試だより12月号，pp. 5-7 (2011)
- 2) 檜山 亮：シイタケ廃菌床からブドウ糖を生成する(2)～蒸煮処理による酵素糖化率の向上～，林産試だより10月号，pp. 1-3 (2013)
- 3) 檜山 亮：シイタケ廃菌床からブドウ糖を生成する(3)―収穫期間と酵素糖化率―，林産試だより4月号，pp. 3-5 (2016)
- 4) 米山 彰造：Q&A先月の技術相談から，林産試だより9月号，p. 11 (2007)
- 5) Hiyama *et al.* : Ethanol production from unpretreated waste medium of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) by semi-simultaneous saccharification and fermentation under high substrate concentration conditions, *Cellulose Chemistry and Technology*, pp. 771-780 (2016)