

平成 24 年度 修士論文

白色腐朽菌によるリグノセルロース  
を原料としたエタノール発酵

---

Ethanol fermentation from lignocellulosic  
materials by white rot fungi

高知工科大学大学院 工学研究科 基盤工学専攻

物質・環境システム工学コース

堀沢研究室 修士 2 年 1155007 西田達由

## 1. 概要

近年、化石燃料の枯渇の懸念や地球温暖化対策としてCO<sub>2</sub>の削減の観点から再生可能エネルギーが注目されており、生物資源もその中に含まれている。液体燃料の生産ではバイオエタノールが挙げられ、食料と競合しないリグノセルロース原料に注目が集まっている。リグノセルロース原料をバイオ燃料へ変換するためには、前処理として植物細胞壁多糖を被覆するリグニンを除去した後、前処理物の糖化・発酵を行うという複数の工程が必要となり、物理・化学処理及び生物処理を組み合わせるため、多くの手間や費用を必要とする。一方で、木材腐朽菌の中にはエタノール発酵する種が知られている。木材のセルロース及びリグニンの分解が可能な白色腐朽菌の中でエタノール発酵が可能な菌株を選抜すれば、木材を原料とするエタノール生産プロセスの簡略化を図ることができると考えた。そこで白色腐朽菌から効率良くエタノール発酵を行う株を選抜し、その菌株を用いて、ヘミセルロースの構成糖からエタノール生産を検討した。

白色腐朽菌15種21株を対象にグルコースを用い、好氣的または準嫌氣的条件でエタノールの発酵性を評価した。次いで、エタノール生産量の高い菌株でグルコース、キシロース、セロビオースを糖源としてエタノール生産性を検討した。液体培地（2%糖、1%イーストエキス、1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.05% MgSO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>O）を用いた25℃の静置培養で、2通りの培養系（①または②）で発酵実験を行った。また、2種類の糖を1%ずつ混合した条件、糖濃度を5%にした条件（グルコースとキシロースのみ）での液体培地も用いた。本実験ではシリコ栓を用いて好氣的条件、シリコン栓を用いて準好氣条件とした。

実験系①:100mlの三角フラスコを用い、20mlの液体培地に、PDAに前培養した供試菌を  
径4mmのコルクボーラーで打ち抜き、その3片を種菌として接種

実験系②:200mlの三角フラスコを用い、100mlの液体培地に、PDAに前培養した供試菌  
を径4mmのコルクボーラーで打ち抜き、その6片を種菌として接種

測定方法としては酵素法を用いるF-kit エタノール (Roche Diagnostics GmbH, Germany)、センサーにより測定を行うアルコメイト、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の3種類の測定方法を用いて検討した。培養条件は測定方法により違い、F-kitとアルコメイトでは実験系①で、HPLCでは実験系②で培養を行った。F-kitとアルコメイトでは培養10日目及び21日目にフラスコ内の培養液を採取し、培養液中のエタノール量を測定した。HPLCでは培養開始から5日毎に培養液を採取し、測定を行った。

まず、F-kitを用いてスクリーニングを行った結果、スエヒロタケで高いエタノール生産が見られた。そこでスエヒロタケ (*Schizophyllum commune* NBRC4928) を供試菌として用いて準好氣条件で培養を行い、F-kit、アルコメイト、HPLCの測定を行った。まず、実験系①で培養を行ったF-kitとアルコメイトの測定結果では、グルコース2%で培養21日目にF-kitで90%、アルコメイトで59%、グルコース5%ではF-kitで90%、アルコメイトで84%の

収率が得られた。キシロース2%では培養21日目にF-kitで83%、アルコメイトで50%、キシロース5%でF-kitが40%、アルコメイトでは27%の収率が得られた。セロビオース2%では培養21日目でF-kitが72%、アルコメイトが51%の収率が得られた。次に、実験系②で培養を行ったHPLCの測定結果では、グルコース2%と5%どちらでも100%近い収率が得られた。セロビオース2%では約6割の収率が得られた。また、糖を混合し培養を行った結果では、糖による分解速度に違いがあるものの、どの測定方法でも単一の糖で培養を行ったものと遜色ない結果が得られたため、複数の糖を同時に分解し、発酵させることが可能であると考えられる。以上の事から、スエヒロタケNBRC4928ではグルコースを原料とする高いエタノール発酵能を有しており、キシロースやセロビオースからのエタノール生産も示された。