

令和5年度 修士論文

木材腐朽菌を用いた竹およびダンチクからの

エタノール生産

Improvement of saccharification in ethanol
production from bamboo and giant reed using
wood-decay fungi

高知工科大学

環境理工学群 生命科学専攻

1255086 島崎 幹生

指導教員 堀澤 栄 准教授

目次

1. 概要

2. 諸言

3. 実験方法

3-1. 供試菌

3-2. リグのセルロースバイオマス

3-3. エタノール発酵試験

3-4. 発酵試験におけるセルラーゼの検討

3-5. 発酵試験における原料粒径微細化の検討

3-6. 発酵試験におけるアルカリ処理の検討

3-7. 発酵試験におけるバイオマス量増加による影響の検討

3-8. セルラーゼの由来のエタノールの確認

3-9. 残糖量およびエタノール量の測定

4. 結果

4-1. セルラーゼ添加によるバイオマス発酵試験の結果

4-2. 原料粒径微細化によるバイオマス発酵試験の結果

4-3. アルカリ処理によるバイオマス発酵試験の結果

4-4. バイオマス量増加によるバイオマス発酵試験の結果

5. 考察

6. 謝辞

参考文献

概要

化石燃料の燃焼による大気中の二酸化炭素量増加は、地球温暖化の大きな原因となっており、世界中で大きな社会問題となっている。これらの背景から、現在燃焼による大気中のCO₂を全体として増加させないバイオエタノールが注目を集めている。そのバイオエタノール生産の中でも特に注目されているのが、木材など植物細胞壁に含まれるセルロース原料からのエタノール生産である。これらは、食料との競合による食料不足や価格の不安定さなどの問題が少ない。一方で、エネルギー作物に求められる特性に増殖力の大きさがあげられるが、高すぎる増殖力は時に放置されることによる増殖など環境問題を引き起こす「害」としての一面も持つ。したがって増殖過剰で環境に負荷を与える植物をエネルギー利用することは、環境調和的な資源循環の観点からも、用途開発の意義が高いとされている。

セルロース系原料からのエタノール生産では、セルロース、ヘミセルロース、リグニンが複雑に絡み合った構造のために、セルロースの糖化に対する障壁がある。すなわち脱リグニンを含む前処理ののちに糖化、そして発酵という過程が必要になる。糖化においてもセルロースが結晶化しているために難度が高い。現在、この過程には大量の薬品や酵素、酵母などを用いた化学・物理的処理が提案されている。しかし、設備や薬品などにかかる費用、エネルギーが大きく、硫酸などを用いた激しい化学変化で生じる廃液の処理などの環境負荷問題がある。一方で、生物を用いた処理は設備コストやエネルギーが比較的安く環境負荷が小さく、副産物が生じにくい。しかしながら、処理時間が長いといった特徴をもつ。

そこで本研究で検討したのが、木材腐朽菌であるスエヒロタケを用いたエタノール生産を行う方法である。木材腐朽菌の一種であるスエヒロタケは、リグニン分解を行うことができるだけでなく、木質バイオマスの構成成分である、セルロース、ヘミセルロースも分解する。さらに、発酵も行うことができるという特徴を持っていることで、複数の工程を連結して一つの反応槽で生物的に行う一貫バイオプロセス(Consolidated Bioprocess, CBP)を実現でき、コスト低減や時間短縮、さらに環境負荷の問題解決も期待できる。

先行研究により、スエヒロタケの持つリグニン分解能力はソフトバイオマスに対して有効性を示すことが分かり、糖化能力に不足があるという課題が見られた。そこで本研究は、グルコースやキシロース、マンノースなどに対して高い発酵能力を示す木材腐朽菌であるスエヒロタケ *Schizophyllum commune* NBRC4928 を用い、バイオマスからの発酵試験において、糖化改善条件の検討を行うことによるエタノール収率の影響を調べることを目的とした。その一つ目はセルラーゼの添加であり、多糖であるホロセルロースを構成しているグリコシド結合を加水分解により分解し、糖化の過程で単糖の量を向上させ、エタノール収率に影響を与えることができるのかを目的とした。二つ目の糖化促進法は原料粒径微細化であり、植物細胞壁を叩くことによるセルロースマイクロフィブリルの露出や、酵素や菌との

接触表面積を増やすことによる反応性を向上させることを目的とした。三つ目の糖化促進法は原料のアルカリ処理であり、アルカリを用いてアルカリに可溶である化学構造上複雑なヘミセルロースやリグニンを分解することで酵素や菌のセルロースへの反応性の向上を目的とした。また、1gのバイオマスにエタノール生産の限界が見られたことや、原料の微細化における収率の向上が見られず、培地に濁りや粘性が見られたことからバイオマス量を増加させた発酵試験を、0.1mmサイズのバイオマス、セルラーゼの添加の条件で同様に行った。

供試菌は上記したスエヒロタケ *Schizophyllum commune* NBRC4928 を用いた。糖源となるバイオマス原料として、増殖し植生の乱れ、その先の二次災害を起こしかねないといった環境問題を抱え、木材とほぼ同じ構成成分であるモウソウチク *Phyllostachys edulis* という竹の一種とダンチク *Around donax* を用いた。

実験では液体培地、バイオマス(1g)が入ったフラスコを熱滅菌したうえで供試菌を入れ、嫌気状態にした後に栓により蓋をした。30℃の暗所で回転培養後、日数毎に培養液を採取し、消費された糖量および生成されたエタノール量を HPLC を用いて分析した。セルラーゼの添加では1%のセルラーゼをフラスコに加えた実験を行い、原料粒径微細化では、0.5mm から 0.1mm サイズにバイオマスを微細化し実験を行った。またセルラーゼの添加を併用した実験も同様に行った。アルカリ処理では、アルカリ処理をした 0.1mm サイズのバイオマス原料を用い、セルラーゼ 1%を加えた発酵試験を行った。バイオマス量を増加させた発酵試験では、1gに加えて、2g、3g、4gのバイオマス(粒径 0.1mm)を用いた実験に1%のセルラーゼを添加した。

その結果、糖化促進なしのエタノール収率はモウソウチクでは 3.0%、ダンチクでは 7.5%であったが、セルラーゼを加えることによりモウソウチクでは 7.0%、ダンチクでは 21%と、モウソウチクとダンチクに大きな収率の差が見られた。また粒径を微細化することにより、モウソウチクでは 13.4%、ダンチクでは 28.6%と両バイオマスに大きな向上は見られなかったが、アルカリ処理を行うことにより、モウソウチクでは 34.3%、ダンチクでは 41.0%と大きく収率を改善できる結果となった。そしてバイオマスの増加実験では、モウソウチクでは 2g : 16.2%、3g : 14.0%、4g : 18.5%と、バイオマス増加に収率の向上が見られたが、ダンチクでは 2g : 20.2%、3g : 20.9%、4g : 18.3%のように低い値となった。糖化促進法やバイオマスによって、収率に異なる影響を与える結果となったが、セルラーゼや原料粒径微細化による影響と比べ、両バイオマスにおいてアルカリ処理は大きく影響を与えることが示された。またこの結果から、ソフトバイオマスであるモウソウチクやダンチクであっても、リグノセルロースバイオマスと木材腐朽菌の発酵試験におけるリグニン分解の重要度は、やはり非常に高いものと示された。また、エタノール生産や収量の向上を目指し、更なるリグニン分解法を検討する必要がある。

2. 諸言

現在、地球温暖化抑制や化石燃料の枯渇の可能性などの観点から、化石燃料を用いたエネルギーの代替案として再生可能エネルギーが注目されている。再生可能エネルギーに含まれる液体燃料であるバイオエタノールは植物由来のバイオマスから生産されるので、化石燃料とは異なり、大気中の二酸化炭素量を増やさなばかりではなく、枯渇しない再生可能資源として活用されている。このバイオエタノール生産の中でも特に注目を集めているのが、木材などに含まれるセルロース原料からのエタノール生産である。これらは従来の糖・デンプンなどを用いたエタノール生産と比べ、食料との競合が少ないばかりでなく、非可食部の植物廃棄物や、増殖力が高いエナジー作物を利用できるなど、原料調達において有利になる点が多い。またタケのように高すぎる増殖力ゆえに環境問題を起こす即物を資源として活用することは環境改善に貢献し、用途開発の意義が高い。セルロース系原料からのエタノール生産では、セルロース、ヘミセルロース、リグニンが複雑に絡み合った構造のために、セルロースの糖化に対する障壁がある。すなわち脱リグニンを含む前処理ののちに糖化、そして発酵という過程が必要になる。糖化においてもセルロースが結晶化しているために難度が高い。現在、木質バイオマスからのエタノール生産の過程では化学・物理的処理による方法が主流となっている。しかしこの方法は、大量の薬品や、大規模な設備が必要となるなど、大きなコストやエネルギーなどの問題がある。また化学薬品を含む廃液の処理などの環境負荷の大きさも問題となっている。さらには、熱や化学処理によって生じた副産物による発酵阻害は大きな問題となっている。

これらの問題を解決する方法として、木材腐朽菌であるスエヒロタケを用いたエタノール生産を提案した。白色腐朽菌の一種であるスエヒロタケは、脱リグニン、セルロース・ヘミセルロースの分解をできることからを含む前処理や糖化、発酵の全ての過程を一貫して行うことができるという特徴を持っている。従って1つの反応槽の中で、脱リグニン、糖化、発酵を同時に行う一貫バイオプロセス(Consolidated Bioprocess, CBP)を活かすことができれば、工程削減、設備簡素化など、従来の方法と比べ、コスト削減や時間短縮の期待ができる。また、廃液処理を含む環境負荷の低下も期待できる。本研究では、先行研究より、木質バイオマスに含まれるマンノース、グルコース、キシロースなどの単糖を用いた発酵試験で高い発酵能力を示し、エタノール発酵能力に優れていると明らかになったスエヒロタケ *Schizophyllum commune* NBRC4928^(2, 3)を供試菌として用い、増殖によって様々な環境問題を引き起こしているモウソウチク *Phyllostachys edulis* とダンチク *Arundo donax* をバイオマスとして用いた。モウソウチクやダンチクは繁殖力が高く、木材とほぼ同じ成分であるセルロース、ヘミセルロース、リグニンから構成されている。また増殖速度が著しく高いことから放置された竹やダンチクは増殖することで、植生を含む

生態系の破壊を招いており、これから先、その規模が大きくなる可能性もある。そして、竹の増殖による広葉樹林の浸食が地盤を弱くし、土砂崩れなどの二次災害を起こす恐れがあることも事実である。このような背景から、これらのバイオマスに資源活用できるという付加価値をつけることができれば、再生可能資源の開発、環境問題解決の双方に利点があると考えた。また先行研究からスエヒロタケ NBRC4928 の糖化能力に課題が見られたので、これを用いたエタノール発酵試験において、セルラーゼの添加や原料粒径微細化、アルカリ処理などの糖化促進法を検討することにより、糖化の過程に影響を与え、その先のエタノール収率にも影響を与えることができるのかを検討した。酵素的なセルロースの分解について、セルラーゼの添加を検討した。セルラーゼは多糖のグリコシド結合を加水分解する酵素で、本研究ではバイオマスの中で最も含有量が多い多糖であるセルロースに対して、結合の分解に働くセルラーゼを加えることで分解される単糖の量が増え、最終的に生産されるエタノール量も増えるのではないかと考えた。二つ目の糖化促進法として考えたのは、原料粒径の微細化である。まず、リグノセルロースバイオマスでは、結晶構造をしたセルロースの分子がいくつも連なった微小繊維のマイクロフィブリルが、ヘミセルロースやリグニンを接着剤のようにして、木材繊維を形成しています。そしてこれが積層することにより細胞壁や木材組織となる。そして糖化の過程では、酵素や菌がセルロース分子に影響を与えることにより反応が進むので、バイオマスを微細化することによる、酵素や菌体との接触表面積の増加の意義は大きい。そしてこれまでは、原料粒径サイズを 0.5mm 以下に粉碎したバイオマス原料を試料に用いてきたが、植物細胞壁を叩くことによるマイクロフィブリルの露出や、更なる酵素や菌との接触表面積の増加を狙い、原料粒径サイズを 0.1mm 以下にすることによる糖化促進を検討した。リグノセルロース系バイオマスでは、セルロースにリグニンやヘミセルロースが絡みつくように分布しており、エタノールを得るまでの過程の中で、前処理に含まれるリグニン分解を行うことは非常に重要となる。またスエヒロタケ NBRC4928 の持つリグニン分解能力は、リグニン含有量が比較的少ないソフトバイオマスであるモウソウチクとダンチクに対して有効性を示すという考えのもと実験を行ってきた。しかし、アルカリを用いて、アルカリに可溶である化学構造上複雑なヘミセルロースやリグニンを更に分解除去することにより、酵素や菌のセルロースへの反応性を向上させ、糖化効率やエタノール生産量により影響を与えられるという考えのもとアルカリ処理を検討した。

セルラーゼ添加の発酵試験において、1g のバイオマスにエタノール生産の限界が見られ、原料粒径微細化による発酵試験ではエタノール収率の向上があまり見られなかったことに加え、培地内に濁りや粘性が確認された。これらの背景から、バイオマス原料の量、つまり糖源を増やすことによる発酵試験を行い、バイオマス量がエタノール生産や収率にどのような影響を与えるのかを調べた。

3. 実験方法

3-1. 供試菌

本研究では、研究室が保有しているスエヒロタケ *Schizophyllum commune* NBRC4928 を供試菌として用いた。スエヒロタケは、木材腐朽菌の中でもリグニン、セルロースとも分解可能な白色腐朽菌の一種である。また成長速度が速く、エタノール生産における脱リグニン、糖化、発酵の全てを行うことができることから^②、複数過程を同時に行うバイオプロセスに用いることができると考えた。また、この菌株についてはこれまでに、乾燥や高温に強く、木質バイオマスに含まれるマンノース、グルコース、キシロースなどの単糖を用いた発酵試験で高い発酵能力を有することが報告されている。

本菌株は前培養として、ポテトデキストロース寒天培地(PDA, 日水製薬, 東京)を用いて 30℃の暗所で静置培養した。

3-2. リグノセルロースバイオマス

本研究では、糖源となるリグノセルロースバイオマスとして、タケの一種であるモウソウチク *Phyllostachys edulis* とダンチク *Arundo donax* を用いた。モウソウチク、ダンチクともに稈の部位をバイオマス原料として用いた。モウソウチクおよびダンチクの稈を乾燥させた後、カッティングミル (MF10, IKA, Germany, 図 1)を用いて、0.5mm の篩を通った粉砕物を今回の発酵試験に用いた。



図 1. カッティングミル MF10

3-3. エタノール発酵試験

表 1 に示した組成でできた液体培地を混合させた後に、200ml フラスコに 60ml ずつ分注した。そして、そこに粒径 0.5mm 以下のバイオマス(モウソウチク、ダンチク)1g を加え、シリコンゴムのついた発酵栓で蓋をした。このフラスコをオートクレーブで 121℃で 20 分間滅菌し、フラスコ冷却後に、PDA 培地で前培養した供試菌をコルクボーラーで直径 1.2cm のサイズに打ち抜き、各フラスコに 4 片ずつ接種した。フラスコ内を嫌気状態にする為、N₂ ガスで窒素パージを行い、最後に発酵栓のトラップに 7ml の無菌水を入れて封入した。(図 2)

表 1 液体培地組成

組成	濃度
Yeast extract	1%
KH ₂ PO ₄	1%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05%



無菌水を
7ml 注入

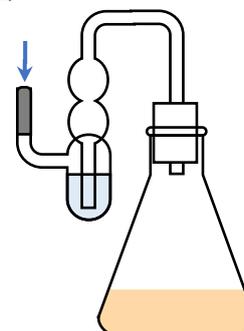


図 2 実験装置概要

スエヒロタケを接種したフラスコをインキュベータ内で振とう機を用いて、30℃、90rpm の設定で回転培養させた。所定の期間ごとに培養液を採取した。モウソウチクとイナワラでは 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21 日目、ダンチクでは 3 日おきに採取した。



図.3 振とう機を用いた培養の様子

3-4. エタノール発酵試験におけるセルラーゼの検討

実験に用いたセルラーゼはセルラーゼオノズカ 3s（ヤクルト，東京）を用いた。オノズカ 3s は食品加工用で比較的安価で市販されている。この酵素は *Trichoderma reesei* (糸状菌) から生産された加水分解酵素で、精製していないためセルラーゼ以外の酵素を含む可能性がある。実験では1日寝かした10%濃度のセルラーゼを0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過滅菌し、オートクレーブ滅菌したのち冷却した液体培地に加え、終濃度は1%とした。手順やその他の条件はセルラーゼを加えていない場合と同じで発酵試験を行った(液体培地を作る際の水の量はセルラーゼストックを加える分を減量した)。また培養液の採取日数は3-3と同様とした。

3-5. 発酵試験における原料粒径微細化の検討

カッピングミルを用いて原料を粒径0.5mm以下に粉碎したのち、ハンマーミル (TissueLyser, Qiagen, CA, US) を用いて原料を更に粉碎し、0.1mmの篩を用いて粒径0.1mm以下の試料を調製した。この試料を用いてエタノール発酵試験を、セルラーゼを添加した場合、していない場合で行った。手順やその他の条件は初期条件の場合と同じで発酵試験を行った。



図.4 粉碎機とバイオマス原料

左：カッピングミルを用いた粉碎

右：ハンマーミルを用いた粉碎

3-6. 発酵試験におけるアルカリ処理の検討

まず粒径0.1mmサイズに粉碎したバイオマス1gと2% NaOH溶液を混合した後、オートクレーブで105 $^{\circ}$ C、90 minで熱処理をした。その後、水でバイオマスを洗浄し、pH6~7に調整した後に下に沈殿している原料を発酵試験の原料として用いた。発酵実験では1%

のセルラーゼ剤を添加し、その他の手順や条件は 3-3 に準じた。



図.5 バイオマス 1g と 2%NaOH



図. 6 アルカリ処理後の pH 調整

3-7. 発酵試験におけるバイオマス量変化による影響の検討

バイオマス原料の重量を変化させて発酵試験を行った。粒径 0.1mm サイズのバイオマスを 1g、2g、3g、4g の 4 つの条件で、それぞれに 1%のセルラーゼを添加した。その他の手順や条件は 3-3 と同様とした。

3-9. 残糖量およびエタノール量の測定



図 7 HPLC(高速液体クロマトグラフィーD-7000)

残糖量およびエタノール量は HPLC を用いて測定した。HPLC は株式会社日立製作所製の高速液体クロマトグラフィーD-7000 シリーズを用いた。検出器では示唆屈折率検出器(L-7490)用い、カラムは株式会社ジーエルサイエンス製 GL-Pack シリーズ(4.6×250mm)を用いた。カラム温度は 50℃、流速 1.0ml/min の条件とし、移動層として脱気水を用いた。

4. 結果

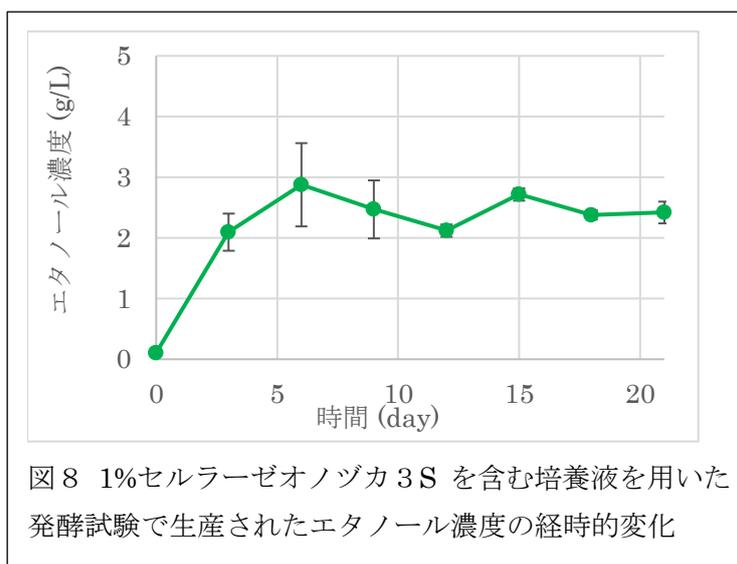
表2 結果における対理論収率を求める際に必要な、バイオマスの成分分析結果

	モウソウチク	ダンチク ⁽⁴⁾
Holocellulose (%)	63	61.3
Lignin (%)	28.7	26

4-1 セルラーゼ添加によるバイオマス発酵試験の結果

4-4-1 セルラーゼ剤に含まれる糖から生産されるエタノール量の測定

本研究で用いたセルラーゼ剤であるセルラーゼオノヅカ 3s には、酵素剤の安定化のために賦形剤が加えられている。散剤状の製剤の賦形剤には乳糖、でんぷん、デキストリンなど発酵可能な糖が頻用される。従って、セルラーゼ製剤に含まれる糖より生産されるエタノールをあらかじめ定量しておく必要がある。従って1%セルラーゼ製剤と培養液を混和したものにスエヒロタケ *Schizophyllum commune* NBRC4928 を摂取し、エタノール発酵試験を行った。その結果を図8に示す。



4-1-2 糖化補助としてセルラーゼを加えたバイオマスの発酵試験

図9にはモウソウチク、図10にはダンチクにセルラーゼ剤を加えた発酵試験の結果を示した。理論収率は、分子を実際に得られたエタノール濃度を60mlあたりの濃度に換算した値とした。そして分母を、バイオマスに含まれるホロセルロース量(モウソウチク:63% ダンチク:61.3%)をグルコース量とし、そのホロセルロース量から理論上得られるエタノール量(グルコース一分子あたりエタノール2分子発生するアルコール発酵分子式より求める)として計算を行った。

モウソウチクにおけるエタノール濃度はセルラーゼを加えていない0.5 mm(無処理)では培養7日目に最高値の0.16 (g/L)となり、エタノール対理論収率では3.0%となった。セルラーゼを加えた場合のエタノール濃度は7日目に最高値の3.24 (g/L)となったが、セルラーゼ由来の濃度も含んでいるので6日目のセルラーゼからのエタノール濃度の最高値2.88 (g/L)を引いた値から対理論収率を求め7.0%となった。(図9)

ダンチクにおけるエタノール濃度はセルラーゼを加えていない0.5mm(無処理)では培養4日目に最高値の0.42 (g/L)となり、エタノール対理論収率では8.1%となった。セルラーゼを加えた場合のエタノール濃度は7日目に最高値の3.95 (g/L)となったが、セルラーゼ由来の濃度を引いた値から対理論収率を求め21.0%となった。(図10)

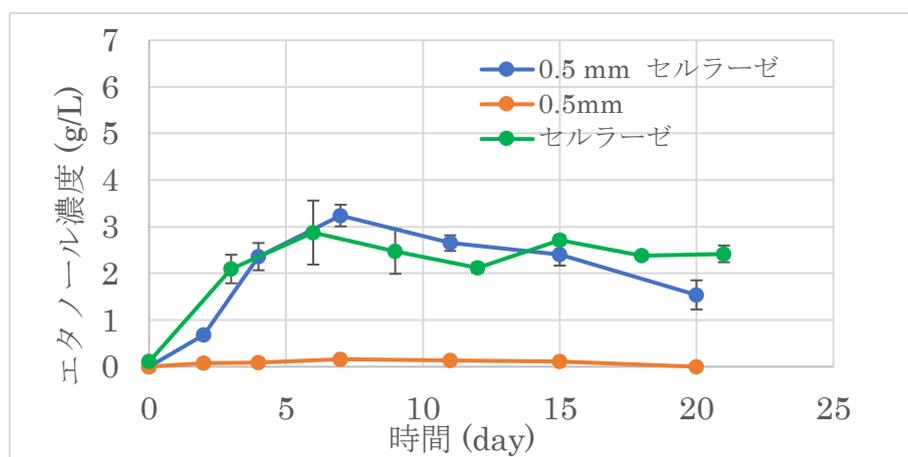


図9 スエヒロタケ NBRC4928 を用いたモウソウチクからのエタノール発酵試験

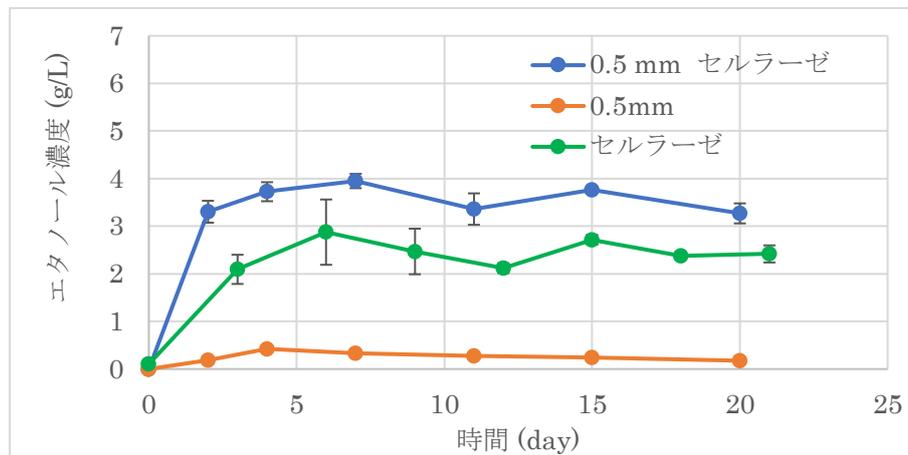


図 10 スエヒロタケ NBRC4928 を用いたダンチクからのエタノール発酵試験

4-2. 原料粒径微細化によるバイオマス発酵試験の結果

図 11 にはモウソウチク、図 12 にはダンチクからのエタノール発酵試験におけるエタノール濃度の時間に対する変化を示した。4-1 の結果も比較として示した。

モウソウチクにおけるエタノール濃度はセルラーゼを加えていない 0.1mm では培養 11 日目に最高値の 0.32 (g/L) となり、エタノール対理論収率では 6.3% となった。セルラーゼを加えた場合のエタノール濃度は 7 日目に最高値の 3.59 (g/L) となったが、セルラーゼ由来の濃度 2.88 (g/L) を引いた値から対理論収率を求め 13.5% となった。(図 11)

ダンチクにおけるエタノール濃度はセルラーゼを加えていない 0.1mm では培養 2 日目に最高値の 0.42 (g/L) となり、エタノール対理論収率では 8.2% となった。セルラーゼを加えた場合のエタノール濃度は 7 日目に最高値の 4.35 (g/L) となったが、セルラーゼ由来の濃度を引いた値から対理論収率を求め 28.6% となった。(図 12)

原料粒径微細化では両バイオマスとも、収率に大きな変化は見られなかった。原料の粒径を 5 分の 1 サイズにし、体積当たりの比表面積は増えたが、木材繊維の幅が 2~60 μ m、セルロースマイクロフィブリルの幅が 3~5nm であるのを考慮すると、この程度の粒度分布の違いにおける接触表面積の変化では反応性の向上が見られないことが原因であると考えられる。

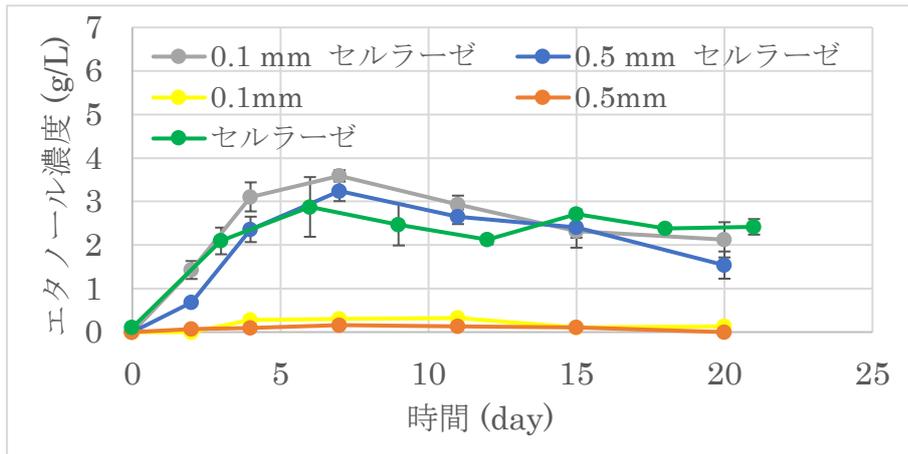


図 11 スエヒロタケ NBRC4928 を用いたモウソウチクからのエタノール発酵試験(セルラーゼ添加と原料粒径微細化)

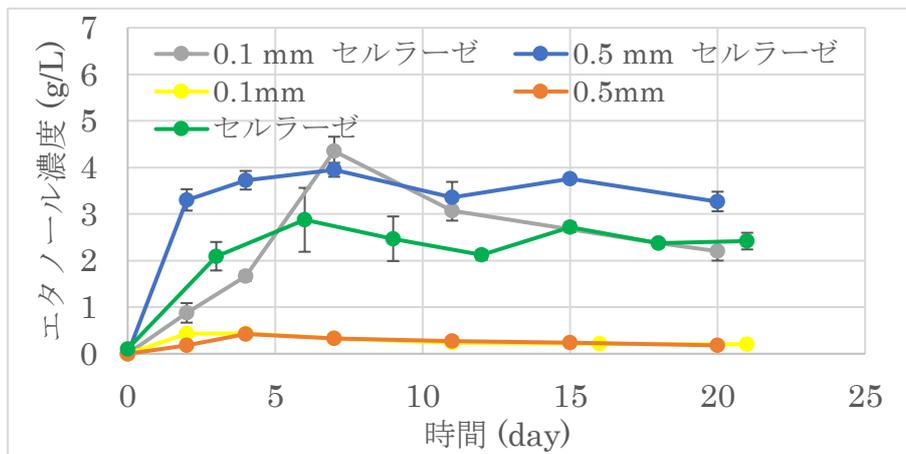


図 12 スエヒロタケ NBRC4928 を用いたダンチクからのエタノール発酵試験(セルラーゼ添加と原料粒径微細化)

4-3. アルカリ処理によるバイオマス発酵試験の結果

図 13 にはモウソウチク、図 14 にはダンチクを原料とし、アルカリ処理した発酵試験の結果を示した。4-1、4-2 の結果も比較として示した。

モウソウチクにおけるエタノール濃度は NaOH 処理では培養 4 日目に最高値の 4.70 (g/L)となったが、セルラーゼ由来の濃度を引いた値から対理論収率を求め 34.3%となった(図 13)。ダンチクにおけるエタノール濃度は NaOH 処理では培養 4 日目に最高値の 5.02 (g/L)となり、エタノール対理論収率では 41.0%となった(図 14)。

アルカリ処理では両バイオマスにおいて、大きくエタノール生産や収率の向上が見られた。

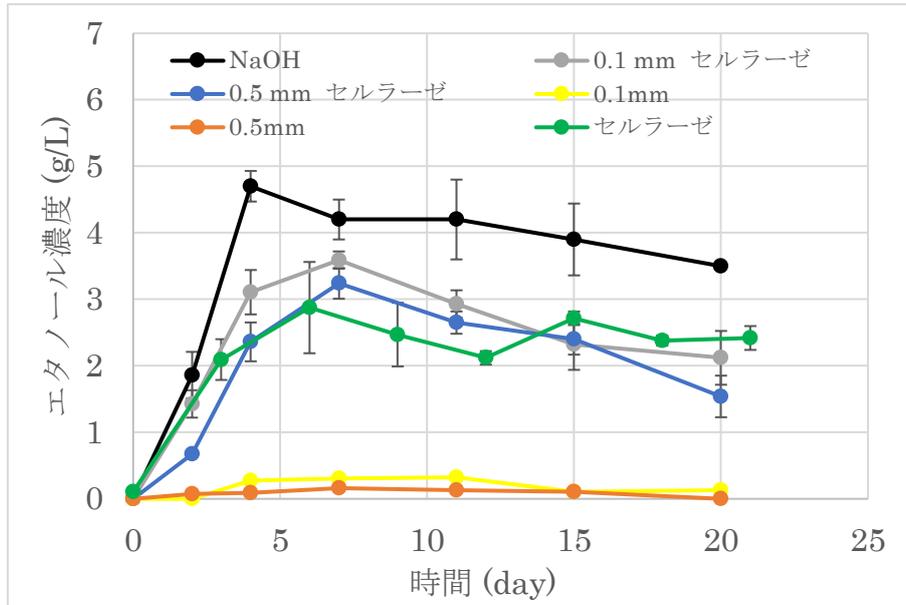


図 13 スエヒロタケ NBRC4928 を用いたモウソウチクからのエタノール発酵試験(セルラーゼ添加、原料粒径微細化、アルカリ処理)

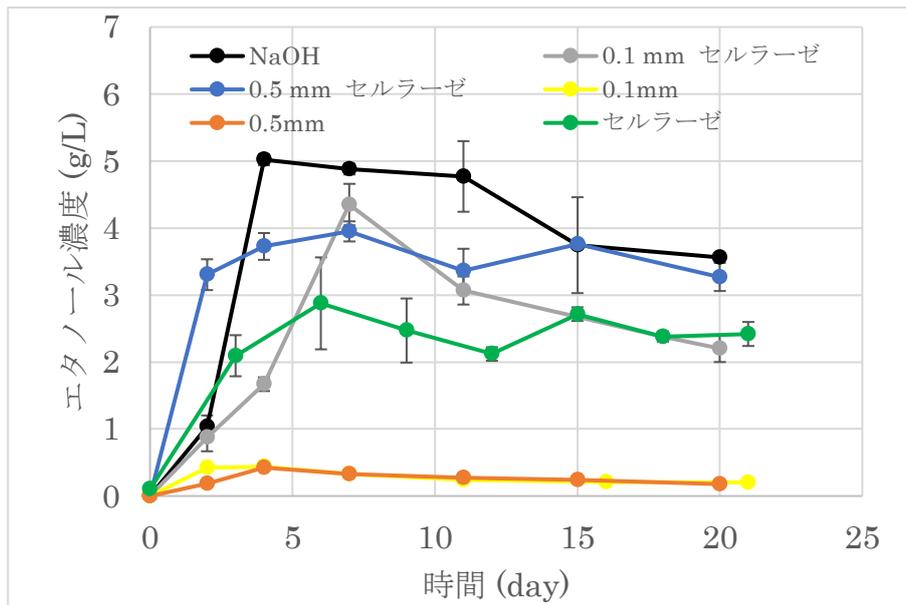


図 14 スエヒロタケ NBRC4928 を用いたダンチクからのエタノール発酵試験(セルラーゼ添加、原料粒径微細化、アルカリ処理)

4-4. バイオマス量増加によるバイオマス発酵試験の結果

バイオマス量を増加させた場合のモウソウチクおよびダンチクからのエタノール濃度の時間に対する変化を示した (図 15, 図 16)。

結果を下記の表に示した。

表 3 モウソウチクおよびダンチクのバイオマス量におけるエタノール収率

	1g	2g	3g	4g
モウソウチク	13.4%	16.2%	14.0%	18.5%
ダンチク	27.7	20.2%	20.9%	19.1%

モウソウチクにおけるエタノール濃度は 1g : 3.59(g/L) 2g : 4.62(g/L) 3g : 5.19(g/L) 4g : 6.87(g/L) となった。(図 15)

ダンチクにおけるエタノール濃度は、1g : 4.32(g/L) 2g : 4.98(g/L) 3g : 6.16(g/L) 4g : 6.69(g/L) となった。また、全てセルラーゼ由来の濃度を引いた値から対理論収率を求めている。(図 16)

モウソウチクにおいては 1g と比べ、バイオマス量が増えることでエタノール生産や収率に向上が見られた。一方ダンチクでは 1g のエタノール収率が最も高く、バイオマス量が増えることでエタノール生産量は増えたが、収率は低下した。これらの結果から、バイオマス量と液体培地の割合、つまり固液比はエタノール生産量に影響を与える可能性が示唆された。

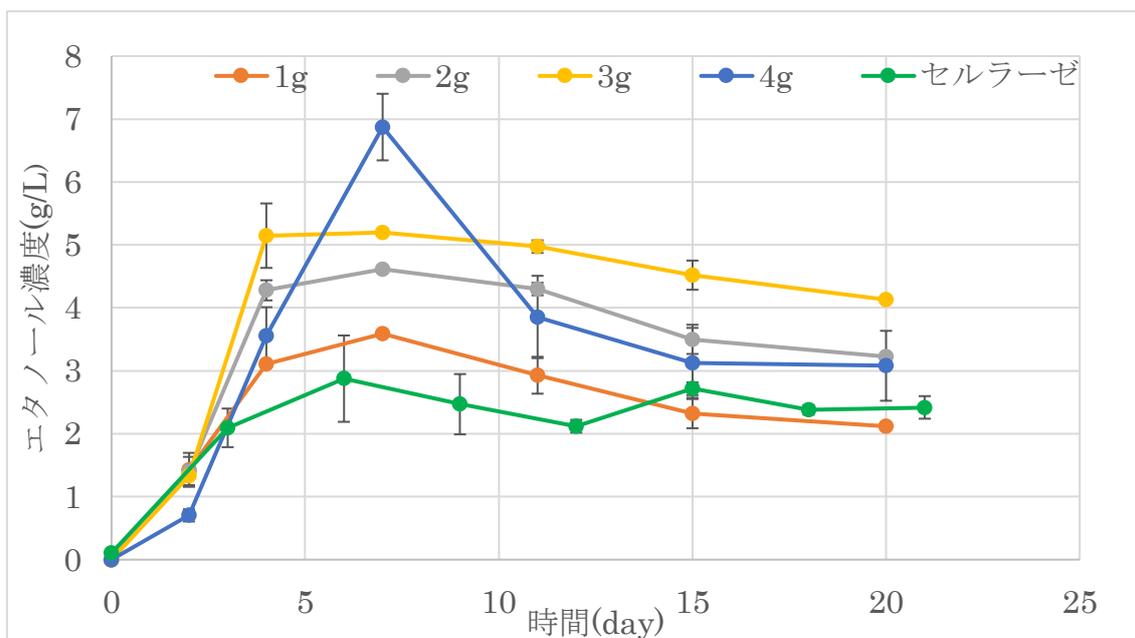


図 15 スエヒロタケ NBRC4928 を用いたバイオマス量変化によるモウソウチクからのエタノール発酵試験

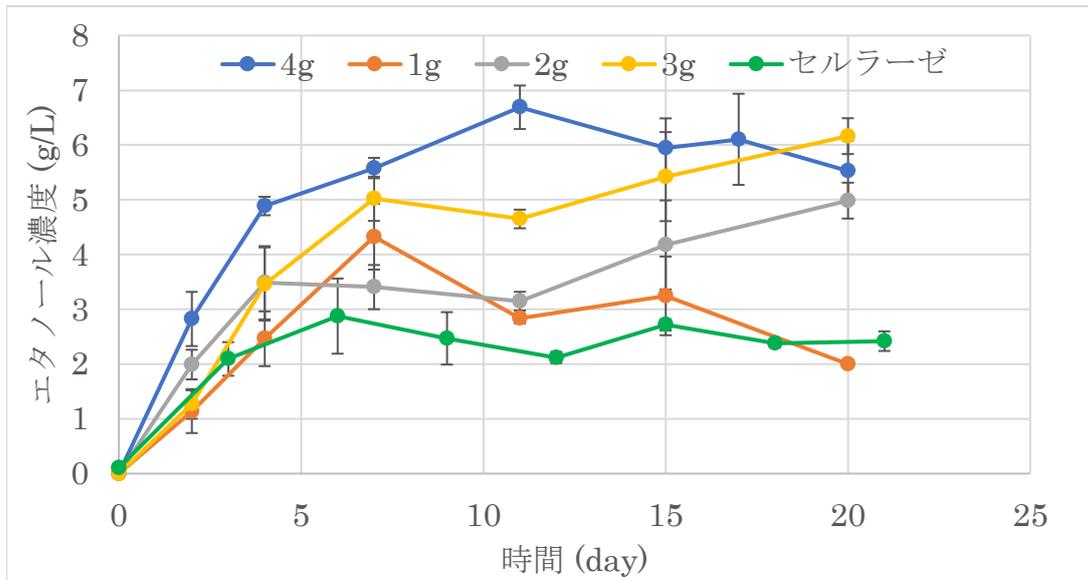


図 16 スエヒロタケ NBRC4928 を用いた、バイオマス量変化によるダンチクからのエタノール発酵試験

5. 考察

本研究では、スエヒロタケ NBRC4928 を用いたセルロース系バイオマスからのエタノール生産において、糖化を改善するための条件の検討を行った。セルラーゼ剤（セルラーゼ活性のほかにヘミセルラーゼ活性を含む）の添加により、多糖の分解を促進させ、エタノール生産量や収率の向上を目的としたが、モウソウチクではその効果が見られなかった。これは、モウソウチクはダンチクに比べ、リグニン含有量が少し多いことが分かっている。これが要因で糖化の妨げを行い、モウソウチクではダンチクと比べ収率の向上が見られなかったと考える。また、先行研究においてダンチク 1g を用い、セルラーゼ濃度を増加させた実験^②を行ったがエタノールの収率は変化しなかった。これらより、今回の発酵試験における条件下では、両バイオマスとも 1g では現在のエタノール生産が限界であると考えた。

原料粒径の微細化では、粒径サイズを小さくすることで、植物細胞壁を叩くことによるセルロースマイクロフィブリルの露出や、酵素や菌との接触表面積を増やすことによる反応性を向上させ、糖化量や最終的なエタノール生産量の増加をできるのではないかと考えたが、両バイオマスにおいて収率の改善はほとんど見られなかった。実際に体積あたりの比表面積は大きくなり、菌や酵素との接触面積は増えているはずであるが、その効果が見られなかったのは粉碎の規模レベルにあると考えられる。実際に酵素や菌が影響を与えるセルロース分子はかなり小さく、それらがいくつも連なって構成されている木材繊維であっても 2~60nm の幅^⑤となる。しかし実際に準備した試料サイズは 0.1mm であり、比べるとかなり大きさに違いがある。それでも 0.5mm から 0.1mm の変化により粒度は細かくなったと考える為、分解が進まなかった理由は木材組織の構造にあり、0.1mm サイズでは細胞壁は破壊されず残っており、壁の厚みが菌や酵素の接触や反応性向上の妨げになったと考える。また、影響を与える為には、更なる微細化が必要であり、木材繊維の幅サイズまで細かくすることが必要になると考える。

アルカリ処理によるエタノール発酵試験では、両バイオマスにおいて大きく生産量や収率が向上した。これはアルカリ可溶である、リグニンやヘミセルロースが多く除去され、菌や酵素のセルロースへの反応性が向上したことによる要因であると考えられる。また、NBRC4928 のリグニン分解能力がソフトバイオマスに有効である考えのもと本研究を行ってきたが、この結果を考慮すると十分とは言えず、バイオマスと木材腐朽菌を用いた発酵試験において、リグニン処理による影響はソフトバイオマスにおいても大きく、リグニン処理が更なるエタノール生産の鍵となる。これはセルラーゼ添加実験における、少しのリグニン含有量の違いから、エタノール収率に大きな差が出た事からも示される。最終的には、無処理である 0.5mm の時に比べ、複合した糖化促進(セルラーゼ、原料サイズ、NaOH)により、モウソウチクでは 31.3%、ダンチクでは 32.9%のエタノール収率の向上が見られた。

バイオマス量増加による発酵試験では、モウソウチクとダンチクで異なる結果となっ

た。モウソウチクではバイオマス量を増加することにより、エタノール生産量だけでなく収率の向上も見られたが、ダンチクではバイオマス量を増加することにより、エタノール生産量の向上が見られた一方、収率は低くなった。このようにバイオマス量と液体培地の割合である固液比はエタノール生産量に影響を与える可能性が示唆された。また、両バイオマスの構成成分はほぼ同じであるにも関わらず、収率は異なった。原料を微細化することや、増やすことにより、液体培地に濁りや粘性がダンチクにおいては強く見られたので、更なる成分分析などによりその原因を明らかにし、関連性を検討していく必要がある。

6. 謝辞

本論文、本研究のご指導をしていただきました堀沢栄准教授、そして協力していただいた、同研究室の皆様にも深く感謝を申し上げます。

また、実験で用いたモウソウチクを提供してくださった、香美市土佐山田町在住の今西隆男さんにも深く感謝を申し上げます。

7. 参考文献

1. 井上瑛絵 (2018)木材腐朽菌の混合培養を用いた 一貫バイオプロセスの構築による セルロース系原料からのエタノール生産, 高知工科大学修士論文.
2. S. Horisawa, T. Nishida. (2014) Ethanol production from lignocellulosic material by white rot fungi. *Journal of Advances in Clean Energy*, 1.1, 71-76.
3. S. Horisawa, H. Ando, O. Ariga, Y. Sakuma, (2015) Direct ethanol production from cellulosic materials by consolidated biological processing using the wood rot fungus *Schizophyllum commune*. *Bioresource Technology* 197, 37–41.
4. 山中優花 (2021) スエヒロタケによるセルロース系バイオマスからの エタノール生産における糖化の改善に与える影響, 高知工科大学修士論文.
5. T. Endo (2009) Bioethanol Production from woods with the aid of nanotechnology. *Synthesiology* 2(4): 310-320.
6. S. Horisawa, A. Inoue and Y. Yamanaka (2019) Direct Ethanol Production from Lignocellulosic Materials by Mixed Culture of Wood Rot Fungi *Schizophyllum commune*, *Bjerkandera adusta*, and *Fomitopsis palustris*. *Fermentation* 5(1): 21.