

## 耐熱性酵母によるリグノセルロースからの 繰り返し高温エタノール発酵

中野 晃輔<sup>1\*</sup>, 濱 真司<sup>1</sup>, 市来 健一郎<sup>1</sup>, 原島 俊<sup>2</sup>, 近藤 昭彦<sup>3</sup>, 野田 秀夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bio-energy 株式会社, <sup>2</sup>大阪大学大学院工学研究科, <sup>3</sup>神戸大学大学院工学研究科

〒660-0053 兵庫県尼崎市南七松町 2-9-7

\*E-mail: knakano@bio-energy.jp

Home Page: <http://www.kce.co.jp/bioenergy/index.htm>

近年、食糧と競合しない非可食バイオマスからのエタノール製造技術の開発が積極的に進められている。特に農業廃棄物やエネルギー作物などを含むリグノセルロースは世界的にも賦存量が高く、これらのエネルギー利用システムの確立が急務である。酵素糖化法と発酵法を組み合わせたエタノール製造プロセスでは、糖化・発酵温度の上昇と菌体調整コストの削減が求められる。そこで本研究では、耐熱性酵母を用いた高温での稲わら併行複発酵と酵母菌体の回収・再利用を検討した。

### 1. はじめに

再生可能で食糧と競合しないバイオマス資源から液体燃料や化学品原料を生産する「バイオリファインリー」技術の開発が求められている。例えば農業廃棄物やエネルギー作物に由来するリグノセルロースからバイオエタノールを生産するプロセスは、主に前処理→糖化→発酵→蒸留→脱水などの工程で成り立っており、既に多くの研究成果が報告されている<sup>[1]</sup>。このプロセスにおいて、酵素によるバイオマスの糖化と微生物による発酵は極めて重要な役割を果たしており、省エネルギーかつコスト低減を可能とする技術の開発が実用化の鍵を握っている。

酵素糖化に要する時間や生成糖による反応阻害を考慮すると、糖化と発酵を同時に行う併行複発酵が有利である。この場合、一般に酵素糖化に利用されるセルラーゼの至適温度が約 50℃と高いため、併行複発酵の温度上昇が糖化効率の向上に有効といえる。さらに高温での発酵が可能である場合、発酵槽の冷却コスト削減にもつながる。このような観点から、耐熱性酵母の育種に関する研究が積極的に進められている<sup>[2]</sup>。

発酵プロセスの実用化に対してもう一つ大きな障壁は、微生物の調製コストである。一例として、乾燥重量（グラム）あたり 0.2 円の酵母の発酵能力が仮に平均  $0.8 \text{ g-EtOH} \cdot \text{g-dry-cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  とするならば、酵母の調製コストをエタノール 1L あたり 1 円に抑えるために約 200 時間の発酵を維持することになる<sup>[3]</sup>。言い換えれば、20 時間の発酵ごとに酵母を使い捨てにすれば、酵母の調

製コストは 10 円/L にも達する。このように、酵母の再利用はプロセスの経済面から必須であり、発酵阻害物の多いリグノセルロース発酵液からの酵母回収・再利用に資する技術の重要性は極めて大きい。

本研究では、稲わら水熱処理物を原料とする高温での併行複発酵、及び発酵液からの酵母菌体の回収・再利用について検討した。

### 2. 実験方法

#### (1) 稲わら水熱処理物と酵母株

稲わらを加圧熱水処理したものを原料として用いた。この稲わら水熱処理物の含水率は約 76%であり、グルコース由来の成分を乾燥重量あたり約 57%含む。

耐熱性を示す酵母として、*Saccharomyces cerevisiae* TJ14 株を用いた。この酵母は 41℃、pH3 で増殖可能であり、41℃、pH3.5 で 10%グルコースを 24 時間で発酵し得る酵母である<sup>[4]</sup>。

#### (2) 稲わら水熱処理物の糖化・発酵

稲わら水熱処理物にセルラーゼ Cellic CTec2 を投入し、俣野らの方法<sup>[5]</sup>に従い 50℃で短時間液化させた。この液化物を 30~41℃に設定し、発酵液 1L あたり 4 g-wet-cell の酵母を加えて併行複発酵を開始した。発酵後の蒸留工程に要するエネルギーを低減するためにも、発酵液のエタノール濃度は高い方が望ましい。したがって、上記の稲わら水熱処理物を発酵液に対して約 20%（乾燥重量基準）となるように添加した。

### (3) 酵母の回収・再利用

リグノセルロース発酵液には酵母以外の残渣が非常に多く、菌体のみを回収することは困難である。そこで図 1 に示すように酵母を含む発酵残渣を回収して次のバッチに用い、繰り返し発酵が可能であるかを検討した。酵母の生菌数はコロニーカウントにより求めた。

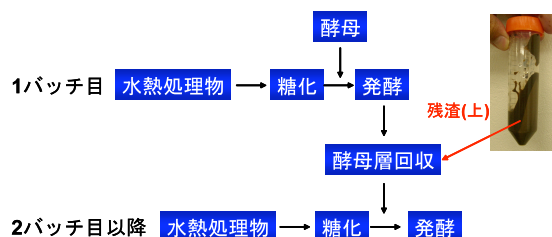


図 1. 繰り返し発酵プロセス

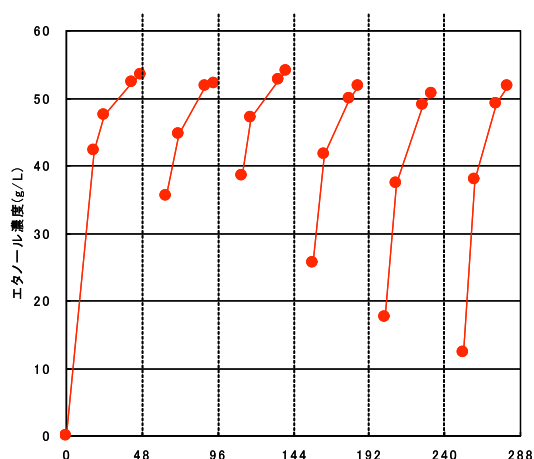


図 2. 稲わら水熱処理物からの繰り返し発酵結果

## 3. 結果と考察

### (1) 稲わら水熱処理物の高温エタノール発酵

まず、稲わら水熱処理物の短時間液化物を 30~41℃に設定し、耐熱性酵母 TJI4 株を用いて発酵したところ、41℃での併行複発酵が可能であった。さらに *S. cerevisiae* での一般的な発酵温度である 30℃と比較したところ、高温発酵では高いエタノール濃度を得ることができた。しかしながら、稲わら水熱処理物を用いた場合 41℃での発酵は可能であるものの、発酵液中の生菌数は減少した。そこで酵母の繰り返し利用が可能な程度に増殖する上限温度を調べたところ、39℃であることが分かった。

### (2) 酵母の増殖を伴う繰り返しエタノール発酵

前述の結果に基づき、温度制御における安全性を考慮して 37℃で以降の繰り返し発酵試験を行った。1 バッチ 48 時間後の発酵液を回収し、遠心した。これによりエタノールを含む発酵液と酵母を含む残渣に分けられ、さらに残渣は比重差によって 2 層に分かれた。この残渣の上層と下層のどちらにも酵母は含まれるが、それぞれの層を組成分析したところ、下層のほうが上層よりも明らかに多くの灰分を含むことが分かった。

この結果より、次バッチの発酵液に対して 10%になるように前バッチの残渣上層を投入した。これにより前バッチ終了後の全菌体量の一部が回収され、次バッチの発酵中に微増殖することで全バッチを通して生菌数を保つことが可能になった。生菌数を含めた詳細なデータは本会の講演で示す。最終的に、培養した酵母を再調製する必要なく、6 バッチの繰り返し発酵においてエタノール濃度は 50 g/L 以上に達した (図 2)。

## 4. 今後の展望

本研究では、リグノセルロース発酵残渣の一部を回収して酵母の増殖を伴う発酵系とすることで、6 バッチの繰り返しエタノール発酵が可能であることを示した。このような酵母の増殖には発酵中の栄養源が重要な因子であり、安価な栄養源を用いた繰り返し発酵については既に知見を得ている。また、実用化には残渣の回収に適した装置の選定も重要であり、演者らの研究グループでは酵母の回収・再利用を伴うベンチプラントでの発酵データを蓄積している段階である。

世界中に存在するリグノセルロースの種類は豊富であり、演者らは他の農業廃棄物やエネルギー作物を原料に用いた繰り返し発酵も検討している。本研究では主にグルコース成分を多く含む前処理物についてデータを示したが、キシロース成分が多い前処理物も存在するため、高温での繰り返し発酵に耐え得る酵母にキシロース資化能力を付与することも今後の課題である。

## 参考文献

- [1] Menon V and Rao M: Progr. Energy Combust. Sci., 38, 522-550 (2012)
- [2] 杉山峰崇, et al.: 繊維学会誌 (繊維と工業), Vol.66 No.5, 159-163 (2010)
- [3] 片倉啓雄: 生物工学会誌, Vol.89 No.4, 177-180 (2011)
- [4] Benjaphokee S, et al.: N. Biotechnol., 29, 379-386 (2012)
- [5] Matano Y, et al.: Bioresour. Technol., 108, 128-133 (2012)