

Pa-245. 固体培養によるオンサイト生産酵素を用いた タケパルプからのエタノール生産

(森林総研) ○下川知子、池田努、真柄謙吾、野尻昌信、
(バイオアカデミア) 品川早苗、品川日出夫

Ethanol production from take pulp under simultaneous saccharification and fermentation using onsite produced enzyme by solid-state fermentation.

○Tomoko SHIMOKAWA, Tsutomu IKEDA, Kengo MAGARA, Masanobu NOJIRI
(Forestry&Forest Products Res. Inst.),
Sanae SHINAGAWA, Hideo SHINAGAWA (BioAcademia Inc.)

SYNOPSIS

Bamboo plants grow rapidly, reaching their maximum size within a few months. Effective ways of utilizing bamboo are also attractive from a landscape preservation perspective. Bamboo pulp was prepared by soda-anthraquinone cooking to increase the susceptibility to cellulase. The combined whole crushed medium from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus tubingensis*, grown on the solid-state medium was mixed with thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* BA-11 to gain higher ethanol concentration under simultaneous saccharification and fermentation. The addition of *Aspergillus* enzyme resulted in an increased ethanol concentration of 4.4 wt% and the ethanol yield of 80% at 40°C after 6 days of fermentation in a small reactor having a working volume of about 0.7 L.

1. 緒言

竹類は循環利用の可能な早生資源であるが、その生育の旺盛さから過剰に繁茂し、周辺地域に拡大して悪影響を及ぼす例が報告されている。放置・拡大竹林を無くしていくためには、バイオマス資源である竹材の利用方法を開発していく必要がある。竹材の用途開発方向としてバイオエタノール生産があるものの、他の木質バイオマス資源と同様に実用化に向けてはコストの削減と効率化が不可欠である。

バイオマス資源にはかなりの量のリグニンが含まれており、一般的にはリグニン含量の高い基質ほどセルラーゼによる分解作用を受けにくいことが知られているため、効率的なバイオマス利用においてはなんらかの前処理が必要となる。モウソウチクも未処理の状態ではリグニン含量が高いことから、何らかの前処理が不可欠である。アルカリ蒸解による前処理は樹種を選ばず、大量処理に適するといった利点があり、アルカリ蒸解により調製したタケパルプを用いて同時糖化発酵によるバイオエタノール生産試験を行った。反応システムの低コスト化を図るために *Trichoderma reesei* 及び *Aspergillus tubingensis* を固体培養によってオンサイト生産したカクテル化酵素を使用し、高基質濃度での反応を行った。

2. 実験方法

タケパルプは、タケチップを 155°C、60 分間のソーダ-アントラキノン蒸解を行って調製した。得られたパルプのクラソン-リグニン含量は 1.91%であった。タケパルプの糖組成は、硫酸分解後にイオン交換クロマトグラフィーで分析した。

酵素は、固体培養によって調製した。5%スギパルプ、33%コーンコブ、62%小麦ふすまに培地乾燥重量の 2.5%にあたる量の硫酸を添加した固体培地を調製し、PDA プレート上で生育させた菌の破砕液を植菌して 5.7 日間静置培養を行った。*T. reesei* ATCC 66587 及び *A. tubingensis* は別個に培養し、培養後の培地にバッファーを加えて破砕した液を酵素液として使用した。

酵母は、耐熱酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BA-11 株 (BioAcademia) を使用した。培地 100 ml 当たり 0.3 g の熱失活した同時糖化発酵液を添加した YM broth を用いて 35°C での培養を 2 回繰り返した。遠心処理によって菌体を回収し、同時糖化発酵に用いた。

同時糖化発酵によるエタノール生産試験は、19 ml 容のスクリュウ瓶で行い、オンサイト生産による酵素液、酵母、バッファー (終濃度 25mM クエン酸ナトリウム, pH 4.8) を混合した後、チューブ付きのシ

リコン栓を取り付け、トラップを設けてスターラーによる攪拌下、40°Cでの反応を行った。反応液は、遠心処理によって不要物を取り除いてからバイオセンサ BF-5D（王子計測）によって溶液中のエタノール及びグルコース濃度を求めた。特に記載のない場合、同時糖化発酵は4日間反応を行った。ニーダーでは全容量1Lの反応槽に400gの反応物を入れて連続混合しつつ、40°Cでの同時糖化発酵を行った。

3. 結果と考察

タケパルプの糖組成のうち、*Saccharomyces* 酵母で発酵可能な6炭糖はパルプ多糖類中の66%であった。固体培養により調製したトリコデルマ酵素とアスペルギルス酵素は、アスペルギルス酵素を10%混合させた状態において最もろ紙分解活性:FPUが高かったため、10%のカクテル化酵素を用いて同時糖化発酵に供する酵素の量を変化させてエタノール生産に及ぼす影響を検討した(Fig. 1)。

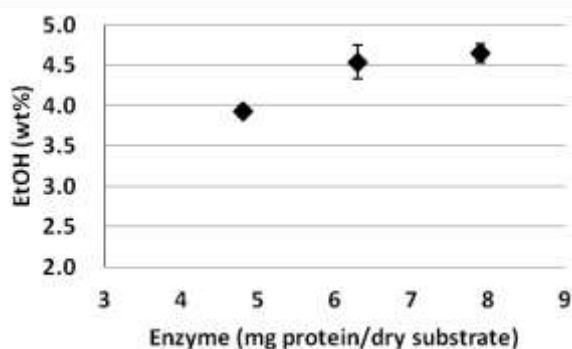


Fig.1. タケパルプの同時糖化発酵において酵素量がエタノール生産に与える影響

乾燥パルプ1g当たりの添加酵素量を増加させるほど生成するエタノールの量は増加したが、1gあたりタンパク量6.3mgより酵素の量を増やしても生成エタノール量の増加に対する効果あまり認められなかった。また、155°C、30分間のソーダ-アントラキノン蒸解を行って調製したリグニン含量7.3%のタケパルプでは、添加酵素量6.3mg/gでのエタノール生産濃度は4.24±0.15wt%であり、60分間処理を行った基質よりも反応効率が低くなった。

同時糖化発酵に供する酵素のうち、アスペルギルス酵素を添加する割合を変化させた実験結果をFig. 2に示す。15wt%のタケパルプは、反応前の混合物に流動性は見受けられず、4日間の同時糖化発酵の反応初期にはほとんど攪拌子で攪拌することはできなかった。しかし、糖化酵素による反応が進むにつれて液化し、攪拌が可能となったが、アスペルギルス酵素を添加しなかった場合では4日間の反応終了後

もパルプの均一な液化は確認できなかった。アスペルギルスの添加割合が15-20%で最も高いエタノール濃度が得られた(Fig. 2)。ろ紙分解活性はアスペルギルスの混合割合が10%で最も高い値を示したが、トリコデルマ酵素に不足する糖質分解酵素系をアスペルギルス酵素が補うことで効率的な同時糖化発酵が進行したと考えられる。

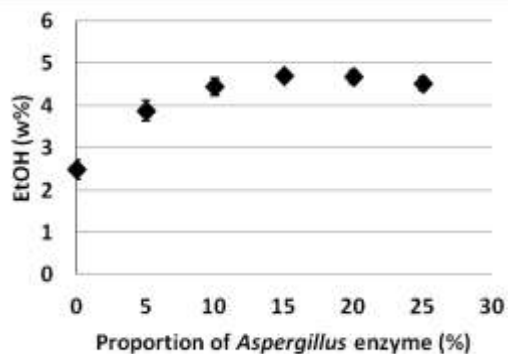


Fig.2. タケパルプの同時糖化発酵におけるアスペルギルス酵素の添加効果

同時糖化発酵の大容量化を、ニーダーを用いて検討した。乾燥パルプ1gあたりの酵素タンパク量を6.3mgとし、経時的にエタノール濃度を測定した。ニーダーによる反応で、パルプは小容量の反応時よりも早い段階で液化したが、小容量で4日反応後のエタノール濃度: 4.54±0.21wt% (Fig. 1) 近傍まで反応が進むのに6日間を要した(Fig. 3)。反応6日時点でのエタノール濃度は4.40wt%であり、パルプ中に含まれるC6糖の量を元にしたエタノール変換率は80.3%であった。

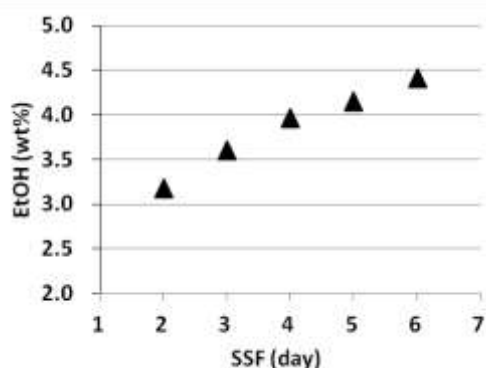


Fig.3. タケパルプからのニーダーを利用した同時糖化発酵によるエタノール生産

謝辞

本研究は農林水産省委託プロジェクト「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発」の一環として実施したものであり、関係各位に謝意を表します。