

平成20年度 戦略的基盤技術高度化支援事業

「セルロース系バイオマスの分散型超高効率エタノール生産システムの開発」

研究開発成果等報告書

平成21年 3月

委託者	中国経済産業局
委託先	財団法人岡山県産業振興財団

目 次

第1章 研究開発の概要	1
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	
1-2 研究体制	
(研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)	
1-3 成果概要	
1-4 当該プロジェクト連絡窓口	
第2章 セルロース系バイオマスの小麦麩、米糠、粃殻に関する情報収集と分析	10
2-1 粃殻の組成調査	
2-1-1 粃殻の構造	
2-1-2 粃殻の内・外穎の内部構造	
2-1-3 粃殻の組成	
2-2 小麦麩の前処理	
2-2-1 処理方法	
2-2-2 作製試料の評価	
2-3 粃殻の前処理方法	
2-3-1 処理方法	
2-3-2 作製試料の評価	
2-4 アブラ椰子副産物の組成	
2-4-1 各副産物の概要	
2-4-2 成分組成	
2-5 3年間の総括	
2-6 参考文献	
第3章 セルロース系バイオマスにおける液化・糖化に関する情報収集・調査	16
3-1 はじめに	
3-2 調査の必要性	
3-3 調査結果について	
3-3-1 日本におけるセルロース・エタノール開発企業の動向	
3-3-2 欧米におけるセルロース・エタノール開発企業の動向	
3-3-3 新規セルラーゼ	
3-3-4 新規エタノール生産菌	
3-3-5 セルラーゼ遺伝子組替えコーン	
3-4 結語	
3-5 参考資料（欧米におけるセルロース・エタノール生産の開發現状）	
3-6 3年間の総括	

第4章	セルロース系バイオマス（小麦麩、米糠、粃殻）の液化・糖化に最適な複合酵素の探索と、それらの酵素遺伝子や共通する転写因子遺伝子をセルフクローニングで組込むことにより複合酵素高発現糸状菌を開発	25
4-1	セルロース系バイオマスの液化・糖化に最適な複合酵素遺伝子の探索	
4-1-1	目的	
4-1-2	方法	
4-1-3	結果および考察	
4-2	麴菌の新規エンド- β -グルカナーゼ EglA, EglB の酵素学的諸性質の解明	
4-2-1	目的	
4-2-2	方法	
4-2-3	結果および考察	
4-3	麴菌のセルラーゼ高生産株による生産条件の検討	
4-3-1	目的	
4-3-2	方法	
4-3-3	結果及び考察	
4-4	バイオマス分解に関与する転写因子の探索と高発現株の造成	
4-4-1	目的	
4-4-2	方法	
4-4-3	結果および考察	
第5章	セルロース系バイオマス分解酵素生産に適した糸状菌の高効率固体培養法の開発	39
5-1	はじめに	
5-2	研究内容と成果	
5-2-1	無通風箱培養における麴菌の酵素生産の特性	
5-2-2	セルラーゼ生産のための培養条件の最適化	
5-2-3	セルラーゼ高発現株の生産性評価	
5-2-4	実証プラントによるセルラーゼの高生産	
5-3	まとめと課題	
5-4	3年間の総括	
第6章	併行複発酵における反応速度論的及び反応工学的エタノール生産プロセスの最適化条件の確立	52
6-1	平成20年度成果の要約	
6-2	研究開発成果	
6-2-1	研究開発項目の目的および概要	
6-2-2	実験方法	
6-2-2-1	併行複発酵	
6-2-2-2	分析および定量的方法	

6-2-3	実験結果および考察	
6-2-3-1	市販糖化酵素とパン酵母による小麦フスマの併行複発酵の操作条件の検討	
6-2-3-2	複合酵素発現糸状菌と BGL 産生酵母を用いた併行複発酵	
6-2-3-3	籾殻を用いた市販糖化酵素およびパン酵母による併行複発酵	
6-3	目的に照らした達成状況	
6-4	3年間の総括	
6-5	参考文献	
第7章	併行複発酵に適した糖化遺伝子組込み酵母の開発	68
7-1	本年度の目標	
7-2	材料と方法	
7-3	遺伝子全合成	
7-4	結論	
7-5	3年間の総括	
第8章	ナノテク膜による蒸留・脱水プロセスの最適化条件の確立	72
8-1	研究開発成果の概要	
8-1-1	平成20年度成果の要約	
8-1-2	英文成果の要約	
8-2	研究開発成果	
8-2-1	研究開発項目の目的および概要	
8-2-2	還流を伴う回分蒸留によるエタノール水溶液の濃縮	
8-2-3	セラミック膜を用いたエタノール発酵液の濃縮	
8-2-4	まとめ	
8-2-5	参考文献	
第9章	全体総括	82

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

燃料用エタノールは循環型社会構築と温暖化対策として世界的に増産が予想されるが、現在主流の糖・デンプン系バイオマスは世界的な食糧不足予想から増産への理解は得られ難く、一方、木質系バイオマスはコストの壁を壊せてない。従って今後の需要増はセルロース系で賄われると予想される。

本研究開発では、セルロース系バイオマスである小麦フスマ、米糠、籾殻を原料とし、小麦フスマを基質とした糸状菌の固体培養によりバイオマスを効率的に分解する複合酵素活性の高い酵素を現場施設内で供給することにより、高効率にエタノールが生産できるシステムを構築する。更にこれらの原料の発生地である日本や世界の製粉工場や精米工場の隣接地でエタノールが生産できるように（分散型）、エタノールが出来るまでの全プロセスを見直し（各プロセスを最適化）することを目的とする。また、省エネ技術を導入することにより、比較的小規模なエタノール生産にも対応できる低コストシステムを構築する。

バイオマス・エタノールの開発研究は、各国共に国家の威信をかけての取り組みをしている。このような研究開発競争のなかで、最新情報の入手にも力を入れる。具体的には、液化・糖化情報、糖化の前処理情報、セルラーゼ関連情報、およびアルコール発酵情報等の開発情報である。特に、企業化が進んでいる海外（アメリカ、カナダ、欧州など）のバイオマス・エタノール研究活動グループ（研究機関や企業）の情報について収集を行い、得られた最新技術情報を本研究開発の方向性を構築する上で活用する。

小麦フスマ、米糠、籾殻について、各成分（セルロース、ヘミセルロース、リグニン、澱粉など）の構成、複合的構造及び糖組成について調査する。得られた情報は、小麦フスマ、米糠、籾殻中のセルロースや澱粉を効率的に糖化する技術へ活用する。また、小麦フスマにおける酵素分解の効率を上げるため、希酸処理や熱水処理などの前処理方法を検証する。

麹菌ゲノムデータから抽出したセルラーゼ類酵素の中から、セルロース結合ドメインを持つ3種類のエンド型 β -グルカナーゼと1種類のエンド型 β -キシラナーゼの高発現株を造成する。また、文献等から知られているバイオマス分解に効果がある酵素、および3種類のセロビオハイドrolラーゼの高生産株を造成する。セルラーゼやヘミセルラーゼの生産に関わると考えられる転写因子を探索、作成する。さらに分泌系を強化する目的で高分泌性変異株を取得する。

セルロース系バイオマス分解には安価で高活性なセルラーゼ（複合酵素）が大量に必要なため、効率的な糸状菌由来セルラーゼの固体培養生産が求められる。小麦フスマを用いた固体培養において、セルラーゼの効率的生産に必要な培養条件（温度、水分等）を検討し、最適な培養条件の構築を試みる。また、上述で得られた高セルラーゼ生産株の評価及びスケールアップ条件を検討する。

市販パン酵母を用い高グルコース濃度条件（基質添加）でのエタノール発酵特性、溶存酸素及び共存物質等のエタノール生成に及ぼす影響について検討する。条件の最適化を図

るために、速度論モデルにより実験結果をシミュレートする。また、工業化に際して重要な酵母の安定性についても検討を行う。セルロース性基質（結晶セルロース）、市販セルラーゼ及びパン酵母を用いて、モデル併行複発酵を実施する。更に、小麦フスマを用い熱水等前処理条件の影響について検討する。また、実際にバイオマス（小麦フスマ）から得られる糖化液を用いて、併行複発酵を検討する。

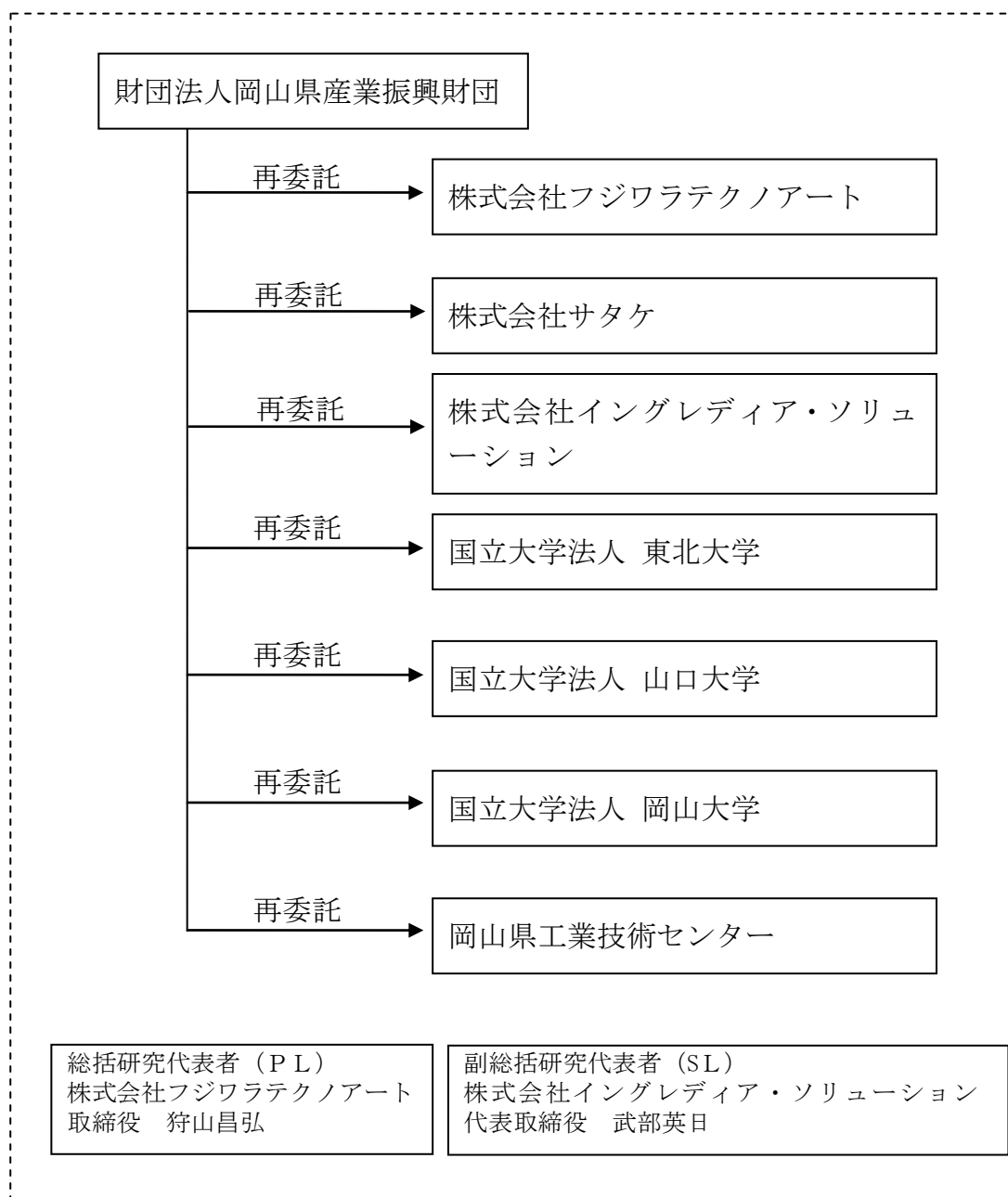
併行複発酵に用いるセルロース系バイオマス分解酵素を組み込んだ酵母を開発する。糸状菌および酵母菌からセルロースやデンプン分解酵素遺伝子をクローニングし、発酵用酵母に導入する。さらに、遺伝子の全合成を簡単に行える方法を完成させ、全合成した遺伝子の酵母での発現効率を調べる。

エタノール発酵でつくられるエタノール水溶液から、蒸留塔および浸透気化膜濾過装置を用いて無水エタノールを製造するためのシステムの熱収支に関して検討を行う。また、浸透気化膜濾過装置については、実験室規模で多孔性膜（セラミックス膜）を用いたエタノール水溶液の脱水試験の外部委託及び文献・資料による調査に基づいて、省エネルギーシステムに関する知見を得る。

1－2 研究体制（研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者）

（1） 研究組織及び管理体制

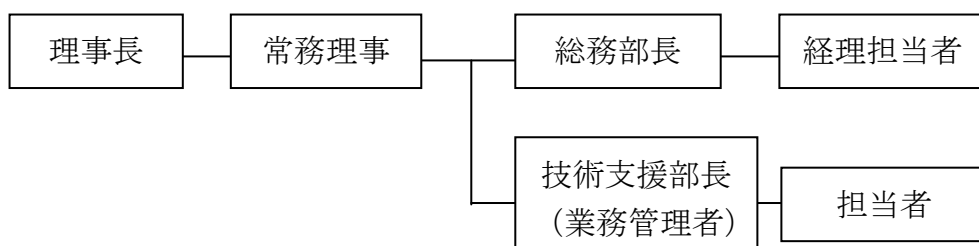
1） 研究組織（全体）



2) 管理体制

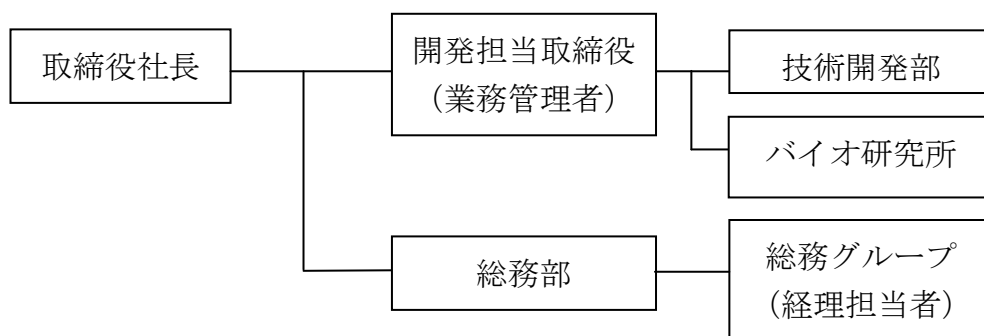
①事業管理者

財団法人岡山県産業振興財団

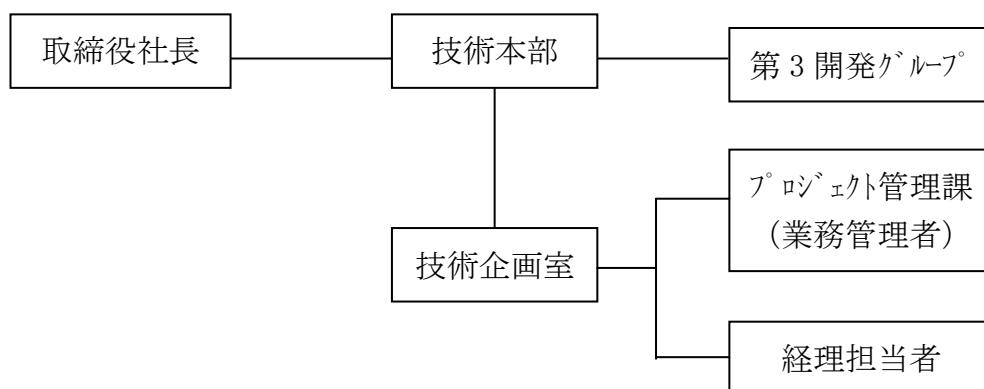


②（再委託先）

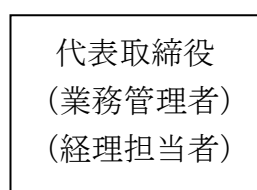
株式会社フジワラテクノアート



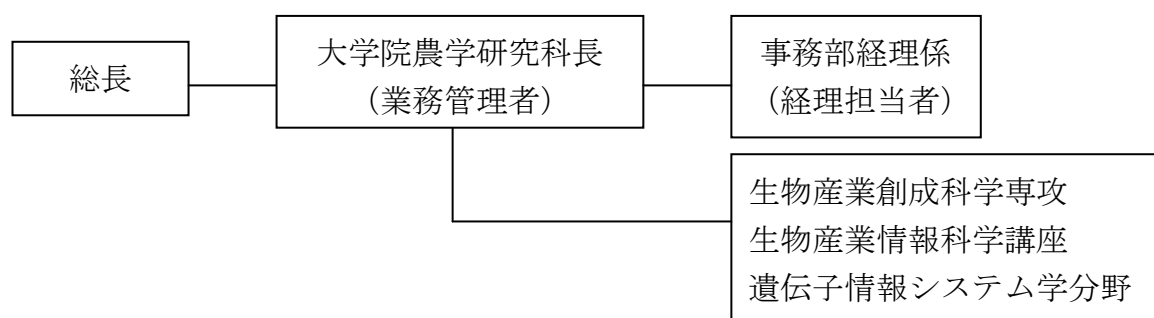
株式会社サタケ



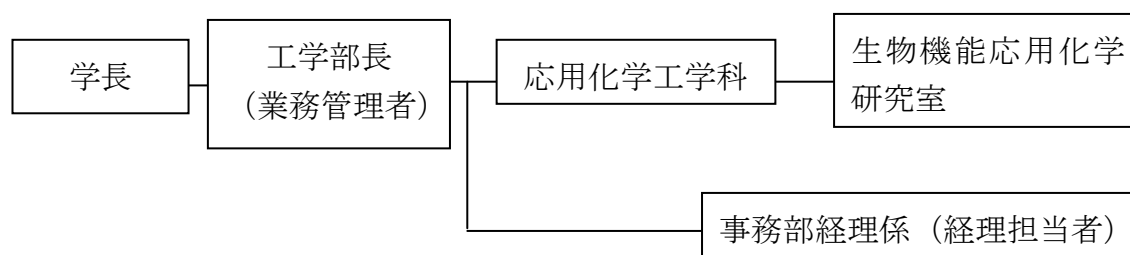
株式会社イングレディア・ソリューション



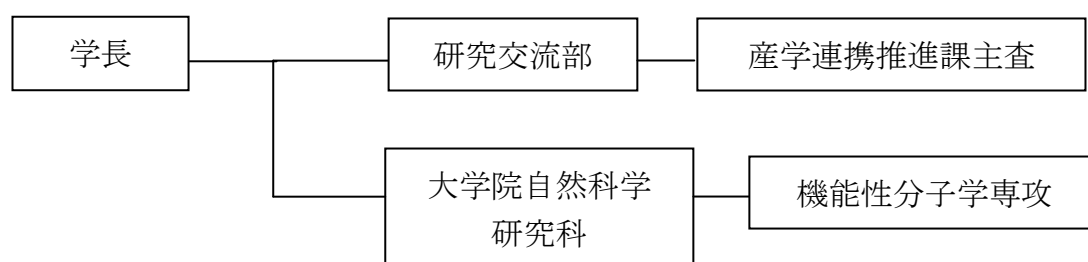
国立大学法人 東北大学



国立大学法人 山口大学

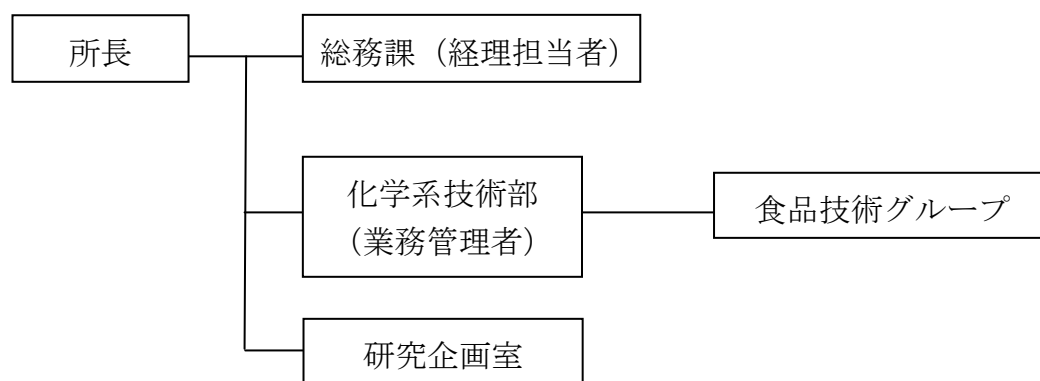


国立大学法人 岡山大学



(注：国立大学法人岡山大学は、大学院化に伴い、研究実施場所の名称と研究担当者の所属が異なる。研究担当者が所属する場所は、工学部（長）の所轄であるが、研究担当者は大学院自然科学研究科に所属する）

岡山県工業技術センター



(2) 管理員及び研究員

【事業管理者】 財団法人岡山県産業振興財団

①管理員

氏 名	所属・役職
松成 博和	技術支援部 部長
三島 佳洋	技術支援部 副部長
本位田 和昭	技術支援部 開発支援グループ 次長
前田 清二	技術支援部 開発支援グループ 主幹
綱澤 知則	技術支援部 開発支援グループ 主事
宮内 隼	技術支援部 開発支援グループ 主事
井田 雅文	技術支援部 開発支援グループ 主事
柘野 賢太郎	技術支援部 開発支援グループ 主事

【再委託先】 ※研究員のみ

株式会社フジワラテクノアート

氏 名	所属・役職
狩山 昌弘	取締役
臼井 康朗	技術開発部 係長
新谷 精豊	バイオ研究所
河瀬 朋華	技術開発部
斉藤 朱美	技術開発部
是石 真友子	技術開発部

株式会社サタケ

氏 名	所属・役職
渡辺 健吾	技術本部 第3開発グループ 副グループ長
前原 裕之	技術本部 第3開発グループ 主査
柏村 崇	技術本部 第3開発グループ 主査

株式会社イングレディア・ソリューション

氏 名	所属・役職
武部 英日	代表取締役

国立大学法人 東北大学

氏 名	所属・役職
五味 勝也	大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻 生物産業情報科学講座 遺伝子情報システム学分野教授
渡部 昭	大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻 生物産業情報科学講座 遺伝子情報システム学分野助教

国立大学法人 山口大学

氏 名	所属・役職
赤田 倫治	医学系研究科応用分子生命科学専攻 教授
星田 尚司	地域共同研究開発センター 准教授

国立大学法人 岡山大学

氏 名	所属・役職
中西 一弘	大学院自然科学研究科機能分子学専攻 教授
今村 維克	大学院自然科学研究科機能分子学専攻 准教授
今中 洋行	大学院自然科学研究科機能分子学専攻 助教

岡山県工業技術センター

氏 名	所属・役職
三宅 剛史	化学系技術部 食品技術グループ 研究員
産本 弘之	研究企画室 専門研究員

1-3 成果概要

小麦フスマの前処理条件（水熱処理）を検討し、140℃/0hr処理（昇温時間約2hrと冷却時間約0.5hr）が最も糖化が高かった。この水熱処理した小麦フスマは構造が破壊されていた（電子顕微鏡観察）。また、籾殻の成分組成と糖組成を調べた結果、小麦フスマや米糠に比べてセルロースが多く、澱粉が少ない（全グルコース量では、小麦フスマとほぼ同等）。珪酸が多く（20%）機械的な破壊は難しいが、小麦フスマと同条件（水熱処理）で前処理が可能であった。小麦フスマ、籾殻、麦藁以外のセルロースバイオマス資源についても調査した。アブラ椰子副産物（EFB、[Fiber+Shell]）が小麦フスマや米糠に比べてセルロース含量が多く（40%以上）、将来有効なセルロース系バイオマスとしての可能性を見いだした。

欧米でのバイオマス系エタノール開発状況の動向を調査した。セルロース・エタノールの開発を実施している主な欧米企業、団体は約33社に及んでいる。セルロース・エタノールを実証プラントで既に生産している企業は有るが、商業規模で実生産を開始した企業は現時点（2008年12月）では未だない。既に設備建設工事を開始した企業が有るが、その完成は2011年である。

セルロース系資源としては、コーン・ストーバー（とうもろこしの芯、茎、葉）、小麦わら、スイッチグラス（黍の類）、稲わら、麦わら、籾殻、その他の農産廃棄物、木材残渣（木材チップ）、製紙用パルプ、オリーブ種子などが取り上げられている。しかし、リグニンによる強固な結合と結晶構造を緩めるため前処理工程が課題とされる。この前処理工程は化学的方法と酵素又は両方によって行われている。前者は酸加水分解法、及び蒸気爆砕の他に、アンモニアによる繊維拡張、アルカリ酸化、オゾン前処理、という方法が報告されている。後者は、複合酵素（遺伝子組替えカビでセルラーゼ、キシラナーゼ、ヘミセルラーゼ生産菌を誘導）が用いられている。これら糖化酵素として用いられている菌種については、*Trichoderma reesei*、*Chrysosporium lucknowence* が中心

であった。

発酵法によるエタノール生産は、一般に酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が利用されてきたが、原料にキシロースやアラビノースのような 5 炭糖が含まれるリグノセルロースを原料としているために、5 炭糖の利用が可能な *S. cerevisiae*、*Zymomonas mobilis*、*Escherichia coli* など酵母や細菌の遺伝子組替え変異株の利用も試みられている。また、醗酵性能については、セルロース系糖化液でも糖蜜に近いエタノール濃度 9 %、発酵収率 85 % が得られているという報告がある（糖蜜：生成エタノール濃度は 7 – 11 %、発酵収率は 85 – 92 %）。生産収率、コストについては、セルロース系バイオマスからでも 400 L/1 トン（乾燥バイオマス）のエタノールが得られるとの試算がある。また、小麦わらを原料としたセルロース・エタノール価格（工業規模）については、1 ガロン（3.8 リットル）当り 1.40–1.60 ドルになるとの報告がある（穀類からエタノール価格は 1 ガロン当り 90–95 セント）。

セルロース系バイオマスの液化・糖化に最適な酵素として、エンド型 β -グルカナーゼ 17 種、セロビオハイドrolラーゼ 2 種、 β -グルコシダーゼ 9 種、エンド型 β -キシラナーゼ 3 種について、実用菌株を宿主として高発現株を造成した。このうち、新規のエンド型 β -グルカナーゼ 2 種（EglA, EglB）を高生産株から精製し、その酵素学的諸性質を明らかにした。転写因子の網羅的高発現株ライブラリー作製については、前年度までに得られていた 120 種類の転写因子の高発現株に加えて、転写因子 272 種類の PCR 増幅、168 種類の高発現ベクター、56 種類の高発現株を取得した。セルラーゼ・キシラナーゼ生産性を促進する新規の転写因子は今のところ見出されていない。また、CelA 高生産株を用いて固体培養における高分泌生産条件を検討した。小麦フスマの水分量が多いほど（フスマ：水=1：3）、分泌生産量が高いことが判明した。

中規模試験固体培養法として考案構築した無通風箱培養法の特性を更に明らかにするため、条件検討による最適化を行った。また、これらの知見をもとにセルラーゼ高発現株を用いたプラント（大規模）による大量生産の実証を目指した。無通風箱培養法においては、一定環境下（30℃、95%RH）で麹菌が生産分泌する各種酵素は従来法（トレー培養法）と比べて初発の水分含量がより高水分で高生産できることが判った。しかもその生産性は従来法以上であり、効率的な固体培養が実現できることを示すことが出来た。次いで、水蒸気分圧を指標に温度と湿度を変えた一定環境下で、セルラーゼおよびキシラナーゼの生産に及ぼす影響について検討した。セルラーゼとキシラナーゼの高生産に最も適した培養条件は 100%加水、30℃、80%RH であった。生産性は、従来法と比べてセルラーゼで 2 倍以上、キシラナーゼで 1.5 倍以上の高生産を示した。また、この条件下において、セルラーゼ高発現株（CelE）の生産性評価を行い、親株の 5 倍以上（従来法の 12 倍以上）の高生産を達成できた。

15 L 容実証プラント（30℃、80%RH、100%加水）を用いた大量生産の検証を行ったところ、上記の無通風箱培養法で得られた高生産を再現良く実証できた。実証プラントによる培養では、キシラナーゼの生産がさらに向上していること、プロテアーゼの生産が低いレベルで抑えられていることなど、無通風箱培養法とは異なるさらなる優位性も確認できた。これらについては、実証プラントにおける培養状態（特に水分）の制御管理が若干異な

る経過をたどることなどが影響していることが示唆される。

上記の前処理条件（140℃、0 h 水熱処理）で処理した 33% (w/v) 小麦フスマ懸濁液を基質として、市販酵素（メイセラゼ：0.004% (w/v) および Novozyme 188 : 0.001% (w/v)，24 時間）で糖化反応後、市販パン酵母による併行複発酵を 21 時間行い、5.2% (w/v) エタノールが得られ留ことを確認した。この値は、小麦フスマに含まれる遊離可能なグルコース量から算出される理論エタノール収率のおよそ 88% に相当する。

また、上記の小麦フスマ懸濁液を基質として、*A. oryzae* AOK11 株または セルラーゼ高発現 CelE 株と BGL 産生酵母 *S. cerevisiae* RAK4230 株による併行複発酵により、5.5 % (w/v) エタノールが得られた。

一方、バイオマス資源として籾殻を用い、市販糖化酵素およびパン酵母による併行複発酵を行った結果、リグノセルロースの分解およびグルコース生産をより効果的に行うための前処理条件、糖化に必要な酵素の組合せと添加量、培地中の窒素源が発酵に及ぼす影響等の検討が課題であることが分かった。

セルロース分解およびデンプン分解酵素遺伝子を酵母に効率よく組み込む方法を確立し、酵母での分解酵素の発現を調べた。酵素遺伝子の導入はシステムティックに可能となり、様々な遺伝子の導入ができる実験系が完成できた。BGL (β -グルコシダーゼ) 産生酵母 *S. cerevisiae* RAK4230 株を造成した。

また、遺伝子全合成の方法を詳細に検討し、様々な遺伝子の合成を試みた。マーカー遺伝子となる yEGFP, yEYFP, および, yECFP の合成と活性体発現には成功したが、他のセルロースの遺伝子全合成は、DNA 断片の合成には成功するものの活性発現に至っていない。その原因が PCR にあると示唆される。合成遺伝子に変異等の問題があると考えていたが、合成自体には問題はない。相補鎖を完全に合わせることや品質のよいオリゴDNAを使うことで今後活性のある遺伝子が合成できるものと思われる。

エタノール醗酵液からの脱水プロセスとして、① 多段回分蒸留装置、② セラミック膜を用いる蒸気透過分離および③ セラミック膜を用いる浸透気化分離の3つのステップからなる地域分散型省エネルギーのプロセスを提案した。本プロセスを用いることにより、小麦フスマ醗酵液（約 5vol%エタノール）から 99.5vol% (99.0mol%) の燃料用エタノール濃縮液を製造可能であることを検証した。本プロセスの有効性が実証された。

1-4 当該プロジェクト連絡窓口

住所 : 岡山県岡山市芳賀 5 3 0 1

名称 : 財団法人岡山県産業振興財団

連絡先: 技術支援部 開発支援グループ

連絡担当者所属役職・氏名: 開発支援グループ長 本位田 和昭

Tel: (086) 286-9651

Fax: (086) 286-9676

E-mail: kbook@optic.or.jp

第2章 セルロース系バイオマスの小麦麩，米糠，粃殻に関する情報収集と分析

【実施機関】 株式会社サタケ 株式会社イングレディア・ソリューション

2-1 粃殻の組成調査

2-1-1 粃殻の構造

イネの粃は玄米を中心として包み込むような形態をとり，向軸面に内穎，背軸面に外穎が位置する（図1）。粃の玄米以外の部分を粃殻と呼び，内穎と外穎に大きく分けられる。内穎は舟形で，その中央部と両側面に縦に走る計3本の維管束がある。外穎は内穎より幅が広く粃面の約2/3を占め，その中央部に1本，両軸面に各2本の維管束があり，これら計5本の縦に走る部位は表面に隆起した縦稜線となる。内・外穎の両縁部は互いに堅く鉤合し，鉤合部では内穎の側部維管束と外穎の辺縁部維管束がほぼ重なった形態をとる。

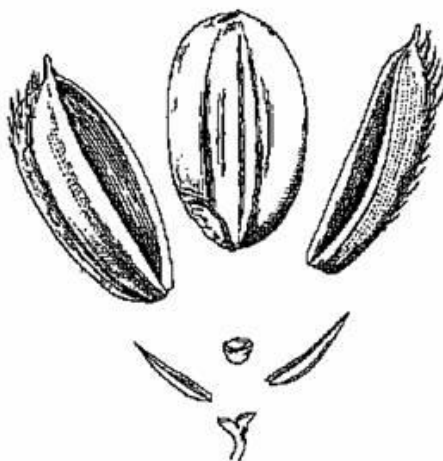


図1 粃の構造

2-1-2 粃殻の内・外穎の内部構造

内・外穎とも内部構造は非常に似ているため，ここでは外穎について示す。横断面でみると外側から上表皮，表皮下繊維組織，柔組織，そして最も内側に下表皮がある。上表皮は細胞が粃の縦軸に沿って規則正しい列に並び，細胞壁にはケイ酸が沈積して肥厚している。このケイ化細胞列の間には圧縮された狭い細胞列があり，その部分に毛が生えている。毛は1~2細胞性で，穎の先端部に生えるものほど長く，先端部では長太い剛毛となるが，その長さや数は品種によっても異なる。また狭い細胞列には気孔の退化跡が存在する。表皮下繊維組織は数層の細胞が，縦軸方向に長く伸びて厚膜化したもので，乾燥時は脆いが水を吸うと丈夫になる。維管束はその下にあり，維管束鞘をもつ。柔組織は数層の細胞からなり，各細胞の内容物が消失した海綿状の組織である。下表皮は1層の薄い細胞からなり，上表皮と違って細胞配列は不整でケイ化はしていない。また，まばらに気孔や短い毛がある。内・外穎の組織構造は，総じて葉の葉鞘と類似しており，内・外穎は葉鞘と相同器官であるとみられている。

2-1-3 籾殻の組成

籾殻の組成分析については H18 年度に実施したが、本年度に取り扱う原料とは品種が異なるため、新たに成分組成と糖組成を調べた。

表 1 籾殻の成分組成

項目	水分	灰分	澱粉	脂質	全窒素	リグニン	ヘミセルロース	セルロース
サンプル	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹
籾殻(広島コシヒカリ)	121	176	4	7	2.4	163	153	360

表 2 籾殻の糖組成

項目	グルコース	アラビノース	キシロース
サンプル	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹
籾殻(広島コシヒカリ)	276	16	126

各分析値は表 1 と表 2 に示したが、籾殻は、小麦麩や米糠に比べてエタノール収量に繋がるセルロースが多い。一方で、それらに比べ澱粉が少ないため、全グルコース量で捉えた場合、籾殻と小麦麩では、ほぼ同等となる。

この他、籾殻にはケイ酸が多いという特徴がある。イネ科植物はケイ酸の局在分布性が著しく、籾殻での含有率は約 20%にも及ぶ。このため、籾殻は強靱な組織を形成し、これを機械処理する場合にはその装置の磨耗度合いや電力負荷に大きく影響することとなる。

2-2 小麦麩の前処理

2-2-1 処理方法

本件に関しては、昨年度からの継続事項である。これまで、セルロース系バイオマスの原料という位置付けで小麦麩を前処理するには、水熱処理が相応しいことを確認している。更には、その条件として、温度：140℃、処理の〔保持〕時間：0hr、水量を糠の 3 倍量で処理したものが、170℃、及び 200℃で処理したものと比較し、エタノール収量が多くなることを検証している。ここで補足すると、処理の〔保持〕時間については、装置内の設定温度が 140℃になった時点で処理を終了したという意味であり、実際には昇温時間約 2hr と冷却時間約 0.5hr が試験に要した時間となる。

表 3 小麦麩処理の条件表

サンプル NO.	処理温度	処理時間	配合(g)	
	(℃)	(h)	水	小麦麩
1	120	0	140	420
2	130	0	140	420
3	140	0	140	420

表 4 小麦麩処理の温度履歴（昇温時）

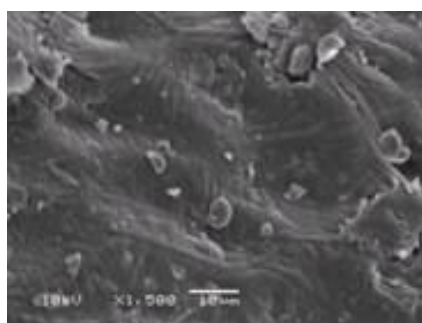
時間	サンプル 1		サンプル 2		サンプル 3	
時：分	温度 (℃)	内圧 (MPa)	温度 (℃)	内圧 (MPa)	温度 (℃)	内圧 (MPa)
0 :3	57	0	62	0	73	0
0 1:0	88	0	99	0	103	0.2
0 :3	108	0.2	119	0	135	0.5
0 :5	120	0.4	125	0.4	141	0.5
0 2:0	—	—	130	0.4	—	—

尚，今年度に実施した内容は，熱量の削減，そして水熱処理装置の簡素化を想定する目的を持ち，処理温度を 140℃～120℃の範囲にして，各処理物を比較したものである（表 3，表 4）。

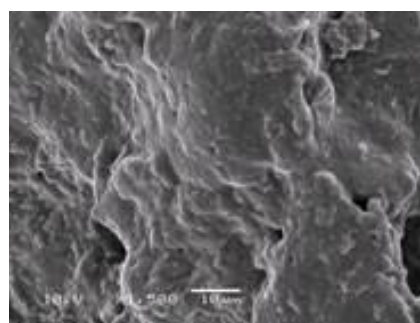
2－2－2 作製試料の評価

各処理物の糖化量については，岡山大学での検証結果から 140℃処理物＞130℃処理物＞120℃処理物となり，これまでの結果と併せると，小麦麩を水熱処理する場合には，130℃よりも高く 170℃よりも低い温度域で処理することが望ましいという結果に至った。

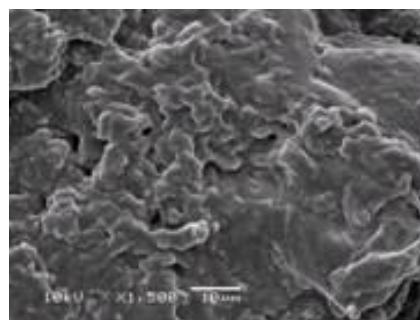
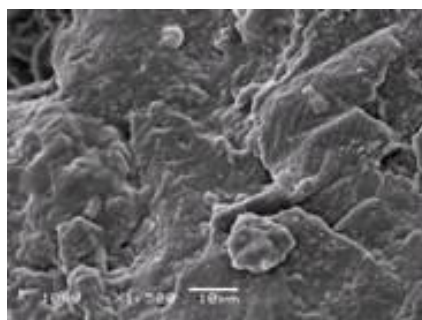
続いて，これら処理物の状態を SEM 像（日本電子㈱ 電子顕微鏡 型式 JSM-6460 倍率 1,500 倍／後述の SEM 画像も同じ条件）でも比較検討した（図 2）。



（無処理）



（120℃処理）



(130℃処理)

(140℃処理)

図 2 小麦麩処理物の SEM 画像

それにより，140℃処理物が他の処理物と比べて物質の単離化，あるいは溶化する傾向にあることが推察された。

2-3 籾殻の前処理の方法

2-3-1 処理方法

籾殻をセルロース系バイオマスの原料として前処理する際には，粉碎処理などを例として多くの処理方法が考えられるが，ここでは，小麦麩の前処理法で得られた知見を活かし，水熱処理のみに焦点を絞って検証した。条件については，前述の表 3 にある小麦麩を処理した際の 3 条件で対応している。その他，温度履歴については，表 5 の通りであった。

表 5 籾殻処理の条件表

サンプル NO.	処理温度	処理時間	配合 (g)	
	(℃)	(h)	水	小麦麩
4	140	0	100	300
5	170	0	100	300
6	200	0	100	300

表 6 籾殻処理の温度履歴（昇温時）

時間	サンプル 4		サンプル 5		サンプル 6	
	温度	内圧	温度	内圧	温度	内圧
時：分	(℃)	(MPa)	(℃)	(MPa)	(℃)	(MPa)
:30	63	0	79	0	62	0
1:00	100	0.1	113	0.1	90	0.1
:30	125	0.1	137	0.2	108	0.2
2:00	140	0.3	152	0.4	122	0.2
:45	—	—	170	0.7	138	0.3
4:00	—	—	—	—	170	0.7
5:15	—	—	—	—	200	1.5

2-3-2 作製試料の評価

ここでも処理後の状態を SEM 像により比較検討したが，どの処理物も処理前と比べて大きく様子が変わっている。170℃処理物では，籾殻を形成する各層が捲れて単層化する傾向がみられ，170℃処理物や 200℃処理物については，さらに単層化したものが細分化していることが伺えた。このことから，170℃や 200℃での処理は，熱が過度に与えられたことに

よる過分解や炭化が起こっている危険性もあり，エタノール収量にとっては逆効果であることが懸念された。

尚，各処理物の糖化量やエタノール生成量に関しては，後述の岡山大学の報告に委ねる。

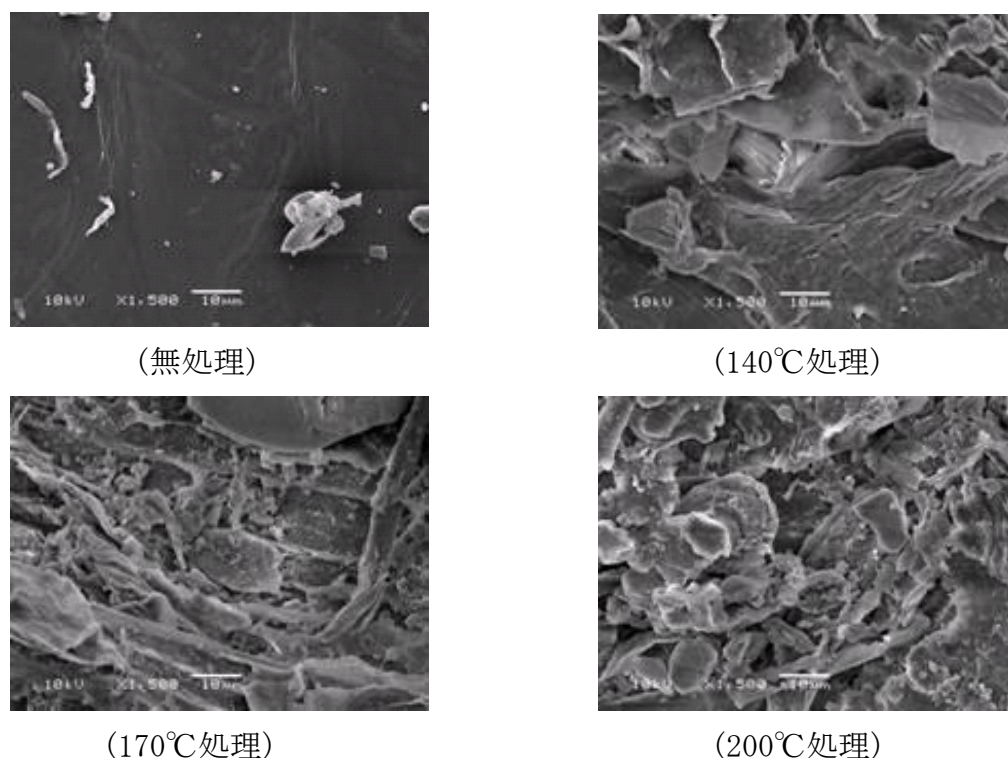


図 3 籾殻処理物の SEM 画像

2-4 アブラ椰子副産物の組成

2-4-1 各副産物の概要

パーム油の世界的な生産量は，植物性油の中では大豆油に次ぐ。特にアジア圏で多く生産され，マレーシアでは 1,000 万 t を超えており，世界シェアでは約 50% を占める。工場におけるパーム油生産工程では結果として多くの取り分けがなされ，固形残渣として排出される EFB (Empty Fruits Brunch), Fiber, Shell は，原料に対してそれぞれ 23%, 18%, 7% にも及ぶ。しかしながら現時点で，その利用は具現化されていないため，今回の調査に至った。

2-4-2 成分組成

アブラ椰子副産物は，概して硬い骨格を持ち合わせているため，エタノール化するにあたり各処理で難航することが予想されるものの，表 6 にある通り，セルロースの含有率としてはある程度の量を示すため，将来的に世界の技術力が底上げされた際，有効な原料となり得る。

表 7 パーム油の成分組成

項目 サンプル	水分 g kg ⁻¹	灰分 g kg ⁻¹	澱粉 g kg ⁻¹	脂質 g kg ⁻¹	全窒素 g kg ⁻¹	リグニン g kg ⁻¹	ヘミセルロース g kg ⁻¹	セルロース g kg ⁻¹
ETB	112	36	ND	41	5.2	118	250	403
Fiber + Shell	106	32	ND	34	5.2	316	136	252

2-5 3年間の総括

本プロジェクトでは、セルロース系バイオマスの原料として小麦麩、米糠、籾殻を中心にその利用を検討してきた。

これらのエタノール化については、成分量の面では充分に対応できることが予想される。ただし、どれもセルロース、ヘミセルロース、そしてリグニンが複雑に絡み合い、緻密な構造を形成しているため、酵素を用いた糖化工程を前にそれらを崩す前処理が必要となる。構造を崩すという意味では、水熱処理が有効であることが検証されたが、実機に反映させる場合にコスト高になることが予想される。よって、今後はコストに着眼しながらの技術の遂行が望まれる。

いずれにしろ、穀物副産物はその利用が完全には確立されていない原料であるため、今まで注目されていない物も含め、今後とも積極的に利用を検討していきたい。

2-6 参考文献

- 1) 辻 啓介・森文平，食品成分シリーズ 食物繊維の科学，朝倉書店（1999）
- 2) 松尾 孝嶺，稲学大成第1巻 形態編，農山漁村文化協会（1997）

第3章 セルロース系バイオマスにおける液化・糖化に関する情報収集・調査

【実施機関】 株式会社イングレディア・ソリューション

欧米におけるセルロース・エタノールの生産開発状況について、昨年度に引き続き調査を実施した。

3-1 はじめに

2008年7月に北海道で開催された主要国首脳会議（洞爺湖サミット）や、その前の国連食糧農業機関（FAO）の「食糧サミット」で福田首相によって強調された（「原料を食糧作物に求めない第2世代のバイオ燃料の研究と実用化を急ぐ必要がある」）ように、非食糧植物を原料とするエタノール、いわゆるセルロース・エタノール生産の開発がわが国においても強く要望され、最近その動きがより活発になっている。

この報告書では、昨年（2007年）の報告書に引き続いてアメリカ、カナダを中心としたその後の政府や企業の動きについて調査したが、技術大国を標榜する日本企業においても、最近その動きがより活発になってきたことを覗かせる幾つかのニュースを耳にするようになって来たことは喜ばしい。

例えば、現在世界の約4万3千の量に当たるバイオ燃料がブラジルのアメリカ2国によって、コーンやサトウキビを原料として生産されていることから、わが国の出光興産（株）、三菱商事（株）、ホンダ自動車（株）の子会社である本田技術研究所は、地球環境産業技術研究機構（RITE）と共に、非食糧を原料としたバイオ燃料の量産に乗り出す計画であると発表された。この目的で、稲わらや雑草を原料に用いる生産技術を導入した。これらの企業は、北米やアジアを候補地として世界最大級の工場を建設、2011年にも日本などに出荷する計画であると言う。温暖化ガス対策や原油高に伴うバイオ燃料の需要急増が、世界的な食料価格上昇の一因と指摘されている現在、日本政府も実用化推進を表明しており、その普及へ向けた国際競争が加速することを明らかにしている。

このほか、稲わらや雑草からのエタノール生産については大成建設とサッポロ・ビールが北海道で、三菱重工などは兵庫県で、いずれも農林水産省の資金援助で、実験プラント設備を計画している。

一方、北米でのセルロース・エタノール生産の企業化は、未だ時間がかかりそうだが、近年の食糧価格高騰によって、ブッシュ政権が主導するコーンなどを原料としたエタノール増産促進に強い批判が高まっている。例えば、国連の食糧問題に関する特別報告官はバイオ燃料増産を公然と批判し、欧州連合（EU）もバイオ燃料使用の目標見直しが迫られている。6月3日からローマで開かれた国連食糧農業機関（FAO）の加盟国高官会議や7月のサミットでもバイオ燃料と食糧安全保障が主要議題として取り上げられたことは周知の通りであるが、国連の特別報道官ジャン・ジグレル氏はドイツのラジオ局で、「バイオ燃料の大量生産は、世界の食糧価格破壊をもたらす『人道に対する罪』である」とまで述べてこの政策を強く批判している。即ち、コーンを原料としたエタノールについて、2000年1月にアメリカ政府が、2020年までに生産目標を当時の生産能力の7.5倍に相当する360

億ガロンに設定したことを契機に、アメリカ農家が小麦や大豆の栽培を縮小し、コーン増産に走った結果、他の穀物価格にも高騰が波及したこと、更には穀物産地のオーストラリアの干魃（かんばつ）や投機筋の資金流入などに加え、アジアの主食であるコメ価格もベトナムなどの輸出停止措置の影響を受け、食糧全体の高騰につながったことを重要視したものである。

これまで温暖化対策を目的としてバイオ燃料使用の割合を増やす目標を掲げている EU 内部でも、見直しを迫る声が上がりに始めている。EU の欧州委員会は 2020 年までに運輸部門の燃料に使用されるバイオ燃料の割合を、現在の 2%以下から 10 %にまで上げることを目指しているが、英国政府は早急の計画見直しを要請し、また農業国フランスのバルニエ農業・漁業相も「最優先されるべきは食糧生産だ」と述べている。

このような事情を考慮したアメリカ政府も 2007 年末、目標の 360 億ガロンのうち 210 億ガロンは植物の茎や木材の屑などを使ったルローズ・エタノール生産するよう修正しており、超党派でバイオ燃料増産を推進しているアメリカ民主党上院のリード院内総務は、5 月 22 日の地球の日を記念する会見で、「原料を食糧から切り替える必要がある」と強調している。これに対して、欧州環境委員会の担当者は、「政策目標を変更すれば他の目標を危険にさらすことになる」と反論し、バイオ燃料に関する目標数値を変更する考えはないことを強調した。

FAO は 2008 年 2 月に専門家による「バイオ燃料政策と食糧安全保障に関する基調声明」を出し、バイオ燃料政策が食糧安全保障に与える影響は十分に解明されておらず、早急な分析が求められていると強調し、その上で食糧の安定供給を確保しつつ、貧しい農業従事者がバイオ燃料生産から得られる利益を奪われることのないような政策立案が必要と提言したが、サトウキビを中心としたバイオ燃料の世界最大輸出国、ブラジルのルラ大統領は、世界が必要な食糧を「供給できないでいるだけで、バイオ燃料が食糧価格に与える影響はない」とすべてのバイオ燃料を否定するような動きを牽制（けんせい）している。国際通貨基金（IMF）と世界銀行も、「食糧価格高騰は一部の国の無分別な農作物の価格政策の反映でもある」（ストロスカーン IMF 専務理事）と指摘、生産国の農作物に対する補助金や輸出制限なども問題視している。

日本でも先にローマで開かれた国連食糧農業機関（FAO）の「食糧サミット」で福田首相は、バイオ燃料が「食糧供給と競合する場合はあることは事実」と認定した上で、「原料を食糧作物に求めない第 2 世代のバイオ燃料の研究と実用化を急ぐ必要がある」と述べたことは、わが国におけるセルローズ・エタノールの大規模生産を活発化させるものと期待される。

3-2 調査の必要性

上述のように、糖・デンプン系原料であるバイオマスは、世界的な食糧不足の予想から現在主流となっているこれら原料を利用したエタノール増産には理解が得られ難く、非食料系バイオマス利用の期待が高まっており、その研究開発推進へと流れが激しく変わりつつある。

こうした背景から、本研究開発のセルロース系バイオマス（小麦麩、米糠、籾殻）によるエタノール生産システムを効率的に開発するためには、欧米でのバイオマス系エタノール開発状況を迅速的確に集め、これら最新技術情報を本研究開発の方向性を構築する上で活用することが必要である。本年度は、日本国内についても調査を強化した。

3-3 調査結果について

3-3-1 日本におけるセルロース・エタノール開発企業の動向

日本企業の動向について、その概要を表. 1に纏めた。出光興産（株）、三菱商事（株）、ホンダ自動車（株）の子会社である本田技術研究所は、地球環境産業技術研究機構（RITE）と共に、非食糧を原料としたバイオ燃料の量産に乗り出す計画である。この目的で、稲わらや雑草を原料に用いる生産技術を導入した。これらの企業は、北米やアジアを候補地として世界最大級の工場を建設、2011年にも日本などに出荷する計画であると言う。報道によれば、出光と三菱商事が、本田技術研究所（埼玉県和光市）と地球環境産業技術研究機構（RITE）からバイオエタノールの量産技術の供与を受けることになっており、原料を大量に安く調達できる北米か中国、東南アジアの穀倉地帯で、一貫生産設備を建設する計画である。その生産能力は年 20 万—50 万キロリットルと世界最大級になる見通しで、総事業費は 100 億円程度といわれ、近く候補地を絞り込む作業に入る、とのことである。

出光と三菱商事は現地企業を加えた合弁会社を設立し、生産したエタノールは工場周辺の需要地や日本向けに出荷する予定で、その生産コストは 1 リットル当たり 30 円程度で、食糧を原料にしたエタノールの輸入価格（同 30—40 円程度）と同等かそれ以下を目標としている。具体的には、三菱商事が稲わらなどの栽培地や供給ルートを確保し、出光は生産販売を中心に手掛ける計画で、本田技研と RITE に技術ライセンス料を支払う方向で検討するとのことである。

更にこのほかでは、新日本石油（株）やトヨタ自動車（株）なども 15 年後のエタノール量産を目指していると伝えられている。（日経テレコン 21）

朝日新聞は、タイ、バンコックのサラブリー県で 2008 年 7 月 11 日、丸紅、サッポロ・ビール、月島機械が、新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）から設備の開発・供給を受託したバイオエタノール工場の開所式が行われたことを報じた。運営主体は現地の製糖会社で、この工場で生産される年間 3 万 6,000 リットルのエタノールの約 1 割をサトウキビの絞りかす、バガスを原料とすることで、バガスによるエタノールの商業ベースでの生産は世界初のことと注目されている。

このほか、稲わらや雑草からのエタノール生産については大成建設とサッポロ・ビールが北海道で、三菱重工などは兵庫県で、いずれも農林水産省の資金援助で、実験プラント設備を計画している。

表. 1 日本企業におけるセルロース・エタノールの動向

企業名	技術関係	特徴	生産能力(規模)／コスト	その他
出光興産(株)、三菱商事(株)	本田技術研究所と地球環境産業技術研究機構(RITE)より量産技術供与を受ける。	非食糧を原料。原料を大量に安く調達できる北米か中国、東南アジアの穀倉地帯で、一貫生産設備を建設する計画。	20万—50万キロリットル/年。食糧を原料にしたエタノールの輸入価格(同30—40円程度)と同等かそれ以下を目標。	総事業費は100億円程度。三菱商事が稲わらなどの栽培地や供給ルートを確保、出光は生産販売する。
新日本石油(株)、トヨタ自動車(株)			15年後(2023年)にエタノール量産。	
丸紅、サッポロ・ビール、月島機械	新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)から設備の開発・供給を受託。	一部非食糧(バガス)を原料。タイ(バンコック)の製糖会社にバイオ・エタノール工場開所。	年間3万6,000リットルのエタノールの約1割をサトウキビの絞りかす(バガス)を原料とする。	
大成建設、サッポロ・ビール		稲わらや雑草を原料。北海道で、実験プラント設備(農林水産省資金援助)を計画している。		
三菱重工		稲わらや雑草を原料。兵庫県で、実験プラント設備(農林水産省資金援助)を計画している。		

3-3-2 欧米におけるセルロース・エタノール開発企業の動向

アメリカの 2001 年以降エタノール生産量は、その大部分はコーン由来であるが、2000 年の 16 億ガロンから 2007 年には推定 64 億ガロンへと増加した。こうして 2005 年にはアメリカは世界のエタノール生産者としてリーダー国となり、昨年度には世界のほぼ半分近くを生産した。政府は更にセルロース・エタノールのような次世代バイオ燃料開発に資金を投じていることを強調している。

アメリカの 2009 年の予算では、政府エネルギー省 (Department of Energy) はセルロース・エタノールを競争可能な価格で生産できる技術開発を目的として、2001 年以来約 10 億ドルを提供してきており、大統領就任以来セルロース・エタノールのコストは 60%以上低下したという。

また、セルロース・エタノールの工業生産を促進するためにアメリカ DOE は工場建設に要する費用の一部を援助すると決定した。即ち、2007 年 2 月末、下に記す 6 社に対してアメリカ国内におけるセルロース・エタノール工場建設に必要な資金の一部として、今後 4 年間にわたり連邦政府予算から総額 3 億 8,500 万ドルを援助すると発表した。ここに示した額に各企業からの投資を加えれば、建設費は総額 10 億ドルから 12 億ドルに達する可能性がある。

工場が完成すれば、年間 1 億 3,000 万ガロン (4 億 9,400 万リットル) 以上のセルロース・エタノールがアメリカで製造できる予定である。この計画に沿った総額 3 億 8,500 万ドルの資金援助は、運輸用燃料、電力などエネルギー生産を目的として、食糧として利用できない農業や林業廃棄物など広範囲のわたる原料の利用を促進する、というブッシュ大統領による「バイオ燃料イニシアティブ、President's Bush's Twenty in Ten Initiative」の主要な一段階である。セルロース・エタノールは化石燃料に代わる燃料としての利点は勿論、でんぷんを原料とした従来法によるエタノールよりも、温室効果ガス排出量が少ないのも魅了である。

数あるセルロース・エタノール開発企業の中でも、アメリカ政府が選択した最も注目すべき企業 6 社についての動向を表. 2 に纏めた。

表. 2 米国企業におけるセルロース・エタノールの動向

企業名	技術関係	特徴	生産能力(規模)/コスト	その他
Abengoa Bioenergy Biomass of Kansas, LLC	Dyadic International, Inc. (フロリダ州)と契約(3年間)し、共同開発。Abengoa社の生産プロセスは、バイオマス原料を酵素法で糖に分解、得られた糖を酵母によってエタノールに発酵させる。また、syngas (合成ガス)を利用する熱化学法という物理化学的な方法も検討している。	コーン・ストーパー(とうもろこしの芯、茎、葉)、小麦わら、スイッチグラス(黍の類)、黍に似たもろこしの刈り株(milo stubble)などを原料。1日700トン処理。	カンザス州Colwichに工場建設を計画。年産1,140万ガロン(4,332万リットル)。穀類エタノールは1ガロン(3.8リットル)当り90-95セント、小麦茎セルロース・エタノールは1ガロン当り1.40-1.60ドルになると試算している。	本格的商業生産工場の建設は、2008年後半に開始され、計画によれば完了は2011年を予定。
ALICO, Inc.	Bioengineering Resources Inc.(BRI社)によって開発された発酵法技術を利用。		フロリダ州LaBelleに年間1,390万ガロン(5,282万リットル)のエタノールを生産する工場を建設する計画を検討。	発表を取り消し、プロジェクト中断。
BlueFire Ethanol, Inc.	アメリカArkenol社の特許プロセスを開発、展開。70-77%濃硫酸で処理、生成された糖はポリスチレン・カチオン系などのイオン交換樹脂で分離する。ヘキソースとペントースを資化する酵母 <i>Zymomonas mobilis</i> などを使用。	木材屑、都市から得られる廃棄物、稲わら、麦わら、その他の農産廃棄物を原料。	南カリフォルニアにある既存のゴミ埋立地に工場を建設、1日当り約900トンの木材など植物廃棄物を原料に、年間1,900万ガロン(7,220万リットル)のセルロース・エタノールを生産する計画。	BlueFire社は既に建設・エンジニアリング会社Brinderson社と契約。これは年間310万ガロンのセルロース・エタノール生産設備で、濃縮酸加水分解法による最初の商業用スケールの工場となる。
Poet (旧Broin Corporation)	リグセルロースからのエタノール生産には、BPXTM 及び BFRAC TM という特許申請中の技術を用いる。コーン・ストーパーを原料とする技術については、E.I. DuPont de Nemours and Company と提携。	コーン繊維、芯、茎を原料。	アイオワ州Emmetsburg に、年産1億2,500万ガロン(4億7,500リットル)のエタノール工場を建設予定で、このうちの約25%がセルロース・エタノールの生産に向けられる。原料は、1日842トンのコーン繊維、芯、茎を処理。	
Jogen Biorefinery Partners, LLC		麦わらその他を原料。		セルロース・エタノール生産工場を、2009年度内にサスカチュワン州北部に工場建設を開始し、2011年にセルロース・エタノールの生産開始
Range Fuels (IBKergy Inc.)	Range Fuels社の方法は、K2システムと呼んでいる2段階法で、バイオマスからの合成ガス生産と、得られたガスをエタノールに転換する技術に基づいている。廃棄物を出すことなく温室効果ガスの排出量も極めて少量で、高収率でクリーンなエタノールを生産することができることを特徴としている。	木材残渣(木材チップ)、製紙用パルプ、オリブ種子などを原料。	ジョージア州Treutlen Countyで年産4,000万ガロン(1億5,200万リットル)のエタノールに加えて、同900万ガロン(3,420万リットル)のメタノールも生産する計画である。原料には1日当り1,200トンの木材残渣と木材に関連あるエネルギー作物を用いる。	2007年9月に同社工場の建設が開始され、2008年に完成しエタノール生産は最初年産2,000万ガロン(7,600万リットル)、その後は1億ガロン(3.8億リットル)に増加すると報告されている。

(1) Abengoa Bioenergy Biomass of Kansas, LLC (工場設置予定地: ミズーリ州 Kansas)

本格的商業生産工場の建設は、2008 年後半に開始され、計画によればこのプロジェクトの完了は2011 年を予定しているとのことである。1 日に700 トンのバイオマスを利用して、年産4,400 万リットルのエタノール、電力や蒸気を生産する予定と伝えられる。

また、小麦わらを原料としたエタノール生産について、そのコストを試算している。穀類からエタノール価格は1 ガロン (3.8 リットル) 当り 90-95 セント、一方工業規模でのセルロース・エタノールは、1 ガロン当り 1.40-1.60 ドルになるとのことである。

(2) Alico, Inc. (工場設置予定地: フロリダ州 Labelle)

2007 年 3 月、Alico 社はエタノール工場建設の情報は未だ決定されたものではなく、正しいものではないと前の発表を取り消した。実際その後同社からのセルロース・エタノール生産に関する発表はない。DOE が何故この会社を選抜したのか疑問である。

(3) BlueFire Ethanol, Inc. (工場設置予定地: カリフォルニア州 Irvine)

2008 年 4 月 24 日、BlueFire 社は、建設及びエンジニアリング会社 Brinderson 社) と契約をした。これは年間 310 万ガロンのセルロース・エタノール生産設備で、これが完成すれば、濃縮酸加水分解法による最初の商業用スケールの工場となる。

(4) Poet (旧 Broin Corporation) (工場設置予定地: アイオワ州 Emmetsburg)

年産1 億2,500 万ガロン (4 億7,500 リットル) のエタノール工場を建設する予定で、このうちの約25%がセルロース・エタノールの生産に向けられる。原料は、1 日842 トン

のコーン繊維、芯、茎である。

(5) Iogen Biorefinery Partners, LLC (工場設置予定地：アイダホ州 Shelley)

2008 年 3 月 15 日の地元の The Ottawa Citizen 紙は、Iogen 社はこの支援金が承認されれば、この秋か来年度内にサスカチュワン州北部に工場建設を開始し、2011 年にはセルロース・エタノールの生産が実現すると述べたと伝えている。

(6) Range Fuels (旧 Kergy Inc.) (工場設置予定地：コロラド州 Broomfield)

年産 4,000 万ガロン (1 億 5,200 万リットル) のエタノールに加えて、同 900 万ガロン (3,420 万リットル) のメタノールも生産する計画である。原料には 1 日当たり 1,200 トンの木材残渣と木材と関連あるエネルギー作物を用いる。

3-3-3 新規セルラーゼ

(1) Accellerase™1000

Genencor 社と Cornell University とは共同で、セルロース・エタノールのための酵素、Accellerase™ についての発表を行っている。この酵素が、種々の段階でバイオマスからのエタノールを生産する際の加水分解過程利用できること、並びに簡単なセルラーゼ活性測定法などを明らかにしている。

Genencor 社によれば、この酵素は Accellerase™1000 と名づけられ、特に再生可能燃料や化学品生産を目的としたリグノセルロース・バイオマス加工産業に応用できる酵素複合体である。この酵素を用いることによって、これら産業のプロセス開発やスケールアップを容易にさせることが出来ると Genencor 社は発表している。

Accellerase™1000 が従来のセルラーゼと異なるところは、①種々の原料を用いた際の糖化機能が強められていること；②糖化と発酵とを同時に実施する SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) プロセス、糖化と発酵とを 2 段階で行う SHF (Sequential Hydrolysis and Fermentation) プロセス、これらの二つの方法を組み合わせたプロセス、のいずれにも応用できること；③高いベーター・グルコシダーゼ活性で余剰のセロビオース量を最低にし、それにより糖化率を高め、最終的にはエタノール発酵を早めることが出来、収率も向上できること；④酵素生産の際に残った栄養素を、糖化により生産される発酵可能な糖類に加えることで酵母のために利用できること。これによりエタノール発酵をより迅速に行い、その結果エタノール発酵原料のコストを下げ、その収量を上げる可能性があること；⑤培地組成が単純で、それに含まれている化学成分が糖化炭水化物プロファイル分析や酵母による発酵を阻害することのないこと、などで、これらが大きな利点を持っていると強調されている。

Accellerase™1000 酵素コンプレックスは、リグノセルロース・バイオマスの構造的成分である非でんぷん炭水化物を、効果的に修飾、消化することのできる強力な酵素の組み合わせを含んでいる。リグノセルロース原料は主に、セルロース、ヘミセルロース、ベーター・グルカンより成っており、お互いに或いはリグニン、ペクチン、蛋白、でんぷん、リピッドなどと結合して存在しているが、この酵素は効率よくリグノセルロース・バイオマスから発酵可能な単糖類を作る能力を持っている。更にこの酵素は、高活性のベーター・グルコシダーゼをも含んでいて、セロビオースをほぼ完全にグルコースに転換することが

できる。

Accellerase™1000 の生産菌は、遺伝子組替えされた *Trichoderma reesei* であることが明らかにされた。勿論発酵終了時にこの菌は不活性化されており、使用には問題が無い。Genencor 社のカタログによれば、この酵素の活性は

Endoglucanase Activity: 2500 CMC U/g (minimum)

β -Glucosidase Activity: 400 pNPG U/g(minimum)

褐色の液状で、至適 pH は 4.8-5.2、温度は 50℃ - 65℃である。

(2) アルカリ耐性で高熱安定性を持ったセルラーゼ

インドの Calcutta University Dutta の Tanmay 博士は、新しい高度好熱性のセルラーゼを見出した。これは以前、土壌から分離された *Penicillium citrinum* が、アルカリ耐性で高熱安定性を持ったセルラーゼ類を生産することを示したもの。同博士らは小麦のふすまを使って、固体培養と液体培養で生産されたこれら酵素の性質を検討している。

3-3-4 新規エタノール生産菌

アメリカ農務省、農業研究サービス(Agricultural Research Service, ARS)の Liu たちは、キシロースとグルコースの混合物をエタノールやその他の化合物に転換する菌として、燃料用エタノール生産設備から、ヘテロ乳酸菌 *Lactobacillus buchneri* strain NRRL B-30929 を選び出している。

この菌は、キシロースを単一炭素として嫌氣的に利用でき、12%までのエタノールに耐性を持っている。調べた結果この菌は、種々の単糖類、(C5 及び C6)、二糖類、オリゴ糖を嫌気性条件下で広く利用できる。PH をコントロールしたバイオリアクターでこの菌はキシロースとグルコースの混合物を高濃度で同時に利用し(125 g L⁻¹, pH 6.0)、主要産物は乳酸(52 g L⁻¹)、酢酸 (26 g L⁻¹) 及びエタノール(12 g L⁻¹)であった。またこの菌株は、グルコース単独で pH 4.0 で培養すると、乳酸とエタノールを 1.03 対 1 の割合で生産したという。

3-3-5 セルラーゼ遺伝子組替えコーン

Technology Review (Wednesday, April 16, 2008) によれば、Michigan State University (作物及び土壌科学) の DM. Sticklen 教授たちはバイオ燃料生産を目的として、自らセルロースを分解できるコーンを開発中で、コーンの持つセルロースを自ら生産する酵素によって糖に加水分解し、引き続く酵母による発酵法でエタノールに変換することを可能とした。これはセルロースの加水の分解に必要な 3 種のセルラーゼ系酵素を生産する遺伝子組替えコーンを作出した。この遺伝子は温泉地から得た微生物から得られたものと述べられている。

同教授らは、得られたこれら遺伝子群が、自然界において他の作物や野生植物に移る可能性を避けるために、酵素が植物の葉や茎でのみ生産され、種子や根、花粉では生産されないようにした。更に、コーン自らこれらの酵素で消化されるのを防ぐため、これらの酵素が細胞内の特殊な場所である液胞 (vacuole) にのみ蓄積されるよう植物を遺伝子組替えず

ることにも成功している。

彼女によれば、これら3種の遺伝子を別々のコーンではなく一種類のコーンに導入することは技術的に可能ではあるが、異なる3種の遺伝子を持った3種類のコーンを用いる方が、セルロースから糖への転換をコントロールできるため有利であると述べている。予備的実験によると、これら3種のコーンを1:4:1の割に組み合わせることで、市販の酵素を利用した場合と同様に、効率的にグルコースを得ることができた。

3-4. 結語

現時点でセルロース・エタノールを実証プラントで生産している企業は有るが、商業規模で実生産を開始した企業は未だない。設備建設工事を開始した企業が有るが、その完成は2011年である。

技術的には、酸によるバイオマスのセルロースとヘミセルロースの分離、酵素を用いた糖への加水分解、生成された糖のアルコール発酵生産から成る生物的方法を取り入れた企業と、熱化学的分解によるエタノールの生成、或いはその両者を取り入れようとする企業とが有る。しかし、世界のどの企業も工業的生産を実施していない現時点では、いずれの技術がより経済的に有利であるかを判定することは不可能である。

3-5. 参考資料

欧米におけるセルロース・エタノール生産の開発現状

企業名	原料	前処理法	糖化酵素	エタノール発酵
Abengoa Bioenergy Biomass of Kansas, LLC	コーン・ストーパー、小麦わら、スイッチグラスなど	不明	Dyadic社の技術を応用.C. lucknowense変異株	不明
ALICO, Inc.	廃棄物(家畜、木材、野菜など)	〃	Bioengineering Resources Inc.社の技術を応用	〃
BlueFire Ethanol, Inc.	木材を含めた植物の廃棄物	濃硫酸による加水分解法	Arkenol社の技術の独占的権利を保有	C5, C6資化性酵母利用
Poet社(旧 Broin Companies)	コーン繊維、芯、茎	不明(DuPont社と共同開発)	Novozymes社酵素と推定	不明
American Process, Inc.	パルプ廃液	アルコール亜硫酸溶液分離法	使用せず	不明
Archer Daniels Midland Company (ADM)	植物繊維、殻、わら、木材	不明	Purdue大学と共同研究	キシロース発酵性酵母
BioEnergy International LLC	さとうきび残渣、稲わら、木材屑	不明	不明	遺伝子組換え Escherichia coli株
Ceres, Inc.	ソルガム	不明	Texas Agricultural Experiment Stationと提携	不明
Colusa Biomass Energy Corporation	稲わら、籾殻	中濃度の酸(硫酸等)と混合し、60℃反応	不明	C5, C6資化性遺伝子組換え好熱性細菌
Genencor International		pHは4.8-5.2, 温度は50℃-65℃	Accellase 1000	遺伝子組換えされた Trichoderma reesei
Green Star Products, Inc.	農業廃棄物や都市廃棄物	希酸2段階法による加水分解	不明	不明
Gulf Ethanol Corporation	ソルガム	不明	不明	不明
Mascoma Corporation	木材屑	不明	不明	組換え好熱性細菌、併行複発酵法
SunEthanol Inc.	バガスやエネルギー・ケーンなどの廃棄物	希酸による加水分解法	CE生産菌 E. coli BW34株、HCE細菌 KO11	Klebsiella oxytoca P2による併行複発酵法
Xethanol Corporation	ポプラ、ヤマナラシ、cottonwoodなど	酸加水分解法、蒸気爆砕	不明	不明
Iogen Technologies, LLC	小麦わら、大麦わら、コーン・ストーパー、稲わら、スイッチグラス、	希硫酸又は蒸気爆砕	Trichoderma reeseiの変異株、酵素回収再利用	C5, C6資化性 Saccharomyces変異株
Greenfield Ethanol Inc.	木材チップ	不明	不明	不明
SunOpta Inc.	木材屑、農業廃棄物	高温、高圧又は高圧、無水アンモニア	不明	不明
Svensk Ethanol Kemi AB (SEKAB社)	木材チップ、リグノセルロース含有原料	弱酸加水分解処理	不明	不明
Novozymes A/S			H. insolens	

平成19年度調査に新たな情報を追加

3-6. 3年間の総括

『欧米におけるセルロース資源を原料とした燃料用エタノール生産に関する活動』を調査した。

食糧や飼料と競合しないこれらの原料からのエタノール生産は、再生可能エネルギーの供給と環境面から極めて重要な課題であることは間違いのないことであるが、技術や経済性から見てもその実用化には未だ解決すべき問題が多々ある。事実アメリカ・エネルギー省の報告書でも、バイオエネルギー・システムの開発に10年から15年という長い年月を予想している。

セルロース・エタノールの開発を実施している主な欧米企業、団体は約33社に及んでいる。但し、セルロース・エタノールを実証プラントで既に生産している企業は有るが、商業規模で実生産を開始した企業は現時点（2008年12月）では未だない。既に設備建設工事を開始した企業が有るが、その完成は2011年である。

『セルロース系資源』としては、コーン・ストーバー（とうもろこしの芯、茎、葉）、小麦わら、スイッチグラス（黍の類）、稲わら、麦わら、籾殻、その他の農産廃棄物、木材残渣（木材チップ）、製紙用パルプ、オリーブ種子など挙げられている。

リグノセルロースのような強固な構造を持つ大きな分子を、生物的に加水分解するには、リグニンによる結合と結晶構造を緩めるため前処理工程が必要とされる。

この『前処理工程』は化学的方法と酵素又は両方によって行われている。前者は酸加水分解法、及び蒸気爆砕の他に、アンモニアによる繊維拡張、アルカリ酸化、オゾン前処理、という方法が報告されている。後者は、複合酵素が用いられている。遺伝子組替えカビでセルラーゼ、キシラナーゼ、ヘミセルラーゼ生産菌を誘導している。糖化酵素として用いられている菌種については、*Trichoderma reesei*、*Chrysosporium lucknowence* が中心であった。

世界のどの企業も工業的生産を実施していない現時点では、いずれの技術がより経済的に有利であるかを判定することは不可能である。

『発酵法』によるエタノール生産は、一般に酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が利用されてきたが、原料にキシロースやアラビノースのような5炭糖が含まれるリグノセルロースを原料としているために、5炭糖の利用が可能な *S. cerevisiae*、*Zymomonas mobilis*、*Escherichia coli* など酵母や細菌の遺伝子組替え変異株の利用も試みられている。

また、醗酵性能については、セルロース系糖化液でも糖蜜に近いエタノール濃度9%、発酵収率85%が得られているという報告がある（糖蜜：生成エタノール濃度は7-11%、発酵収率は85-92%）。

『生産収率、コスト』については、セルロース系バイオマスからでも400 L/1トン（乾燥バイオマス）のエタノールが得られるとの試算がある。但し、セルロース及びヘミセルロース（C6 & C5）を利用した場合である。また、小麦わらを原料としたセルロース・エタノール価格（工業規模）については、1ガロン（3.8リットル）当り1.40-1.60ドルになるとの報告がある（穀類からエタノール価格は1ガロン当り90-95セント）。

第4章 セルロース系バイオマス（小麦麩、米糠、籾殻）の液化・糖化に最適な複合酵素の探索と、それらの酵素遺伝子や共通する転写因子遺伝子をセルフクローニングで組込むことによる複合酵素高発現糸状菌の開発

【実施機関】 国立大学法人東北大学、株式会社フジワラテクノアート、株式会社イングレディア・ソリューション

4-1 セルロース系バイオマスの液化・糖化に最適な複合酵素遺伝子の探索

4-1-1 目的

セルロース系バイオマスの分解酵素の供給源としては、これまでカビなどの真菌類が多く利用されてきており、今後の未知・未利用の酵素資源としてもこれらの真菌類起源のものが有望であることが期待される。本プロジェクト研究においても、真菌類起源のバイオマス分解酵素をターゲットとして、その中からバイオマス分解に最適な複数の酵素の組み合わせを見出すことが重要と考えられる。また、本プロジェクトの実用化に際しては見出された酵素の高分泌生産が求められ、そのためには遺伝子組換え技術を利用した酵素生産性の高い株の育種が必要となることから、麹菌 (*Aspergillus oryzae*) を宿主として利用することとした。麹菌は、酵素タンパク質の生産性に優れており、わが国で古くから醸造食品の製造に利用されていることから安全性の高いことが世界的に認められていて、麹菌における遺伝子組換え技術も確立していること、さらにわが国が得意とする固体培養ですでに技術が確立しており世界的にも優位性が高いことなど、本プロジェクトの目的に適した微生物である。またすでに本プロジェクト分担研究者を含むわが国のコンソーシアムによってゲノム解析が終了しており、他のアスペルギルス属カビに比較して加水分解酵素遺伝子が多く存在していることも明らかとなっている。今年度は前年度に引き続き、麹菌ゲノム情報から見出された、セルロース分解に関わるセルラーゼ類酵素（エンド- β -グルカナーゼ・17種（分類が不明確なもの・2種を含む）、エキソ- β -グルカナーゼ・3種、セロビオヒドロラーゼ・3種、 β -グルコシダーゼ・20種）について、菌体外に分泌される酵素を中心に選択して、高発現用ベクターを用いて高生産性麹菌の造成を試み、ほぼすべての酵素遺伝子について高発現株を取得することができた。

4-1-2 方法

1) 麹菌のセルロースおよびキシラン分解酵素の高生産性株の造成

前年度までに、麹菌ゲノムデータベース (http://www.bio.nite.go.jp/dogan/MicroTop?GENOME_ID=ao) をもとに、glycosyl hydrolase ファミリーの分類データベース CAZy (http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html) を利用して抽出したセルロース分解に関わるセルラーゼ類酵素（エンド型 β -グルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ、 β -グルコシダーゼ）のアミノ酸配列を、SignalP プログラム (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) にかけて、シグナルペプチドを有する酵素群を選抜した。セルロース分解酵素以外にキシラン分解酵素も5種類選択し、シグナルペプチドを有するすべての酵素遺伝子（第1表）について、翻訳開始点の上流周辺にセンスプライマーを、また翻訳終了点またはその100塩基ほど下流にアンチセンスプライマーを設計して、PCRによりコード領域を含む断片を増幅した。高発現用ベクターpNGA142のグルコアミラーゼA (GlaA) 遺伝子のプ

ロモーターに region III を多コピー導入して高発現用に改変したプロモーター *P_{glaA142}* の下流に、増幅した DNA 断片を連結して麹菌の実用宿主株 AOK11 *niaD* (*niaD*) に形質転換した。

麹菌の形質転換はプロトプラスト-PEG 法により行い、窒素源を 0.6% NaNO₃ とした最小培地で生育できる株を選抜した。得られた形質転換体については、PCR およびサザン解析により形質転換体であることを確認した。

第 1 表 高発現株作製に用いたセルロース分解酵素とキシラン分解酵素遺伝子

酵素の種類	麹菌ゲノムデータベースの遺伝子 ID
エンド-β-グルカナーゼ	<u>A0090026000102</u> (<i>celA</i>), <u>A0090010000314</u> (<i>celB</i>), <u>A0090005001553</u> (<i>celE</i>), A0090011000715 (<i>eglA</i>), A0090005000531 (<i>eglB</i>), A0090009000373 (<i>eglC</i>), A0090103000087 (<i>eglD</i>), A0090038000175 (<i>eglE</i>), A0090003000905 (<i>eglF</i>), A0090701000185 (<i>eglG</i>), A0090001000221 (<i>eglH</i>), A0090012000090 (<i>eglI</i>), A0090023000787 (<i>eglJ</i>), A0090023000056 (<i>eglK</i>), A0090138000004 (<i>eglL</i>), A0090023000159 (<i>eglM</i>), A0090003001341 (<i>eglN</i>)
セロビオハイドロラーゼ	<u>A0090012000941</u> (<i>celD</i>), <u>A0090001000348</u> (<i>celC</i>)
β-グルコシダーゼ	A0090038000223 (<i>bglA</i>), A0090012000135 (<i>bglB</i>), <u>A0090009000356</u> (<i>bglC</i>), <u>A0090701000274</u> (<i>bglD</i>), A0090001000266 (<i>bglE</i>), A0090103000127 (<i>bglF</i>), <u>A0090001000544</u> (<i>bglG</i>), A0090038000425 (<i>bglH</i>), A0090701000841 (<i>bglI</i>)
β - キシラナーゼ	A0090103000326 (<i>xynA</i>), <u>A0090701000887</u> (<i>xynB</i>), <u>A0090103000423</u> (<i>xynF1</i>), <u>A0090001000208</u> (<i>xynF3</i>), <u>A0090120000026</u> (<i>xynG2</i>)

(注) 下線を付した遺伝子は、麹菌の EST 解析によって発現が認められているもの。
網掛けの遺伝子はすでに生産された酵素タンパク質について報告されているもの。
また、*eglA*, *eglB*, *eglD* はセルロース結合ドメインを有している。

形質転換体のセルロース分解酵素生産性については、カルボキシメチルセルロース (CMC) を加えた Czapek-Dox 寒天平板培地 (1% グルコースの代わりにマルトースを含む) に培養後、0.05% Congo Red 溶液を重層し 30 分染色し、その後で 0.1 M NaCl を用いて脱色してクリアゾーンの出現の有無で酵素活性を検出した。また、セロビオハイドロラーゼについては、同様の寒天平板培地に、野生株および各遺伝子高発現株の孢子懸濁液を孢子量が 10⁴ 個となるようにスポットし、30℃で 3 日間静置培養した後、0.1% の 4-メチルウンベリフェリル-β-D-ラクトシド (MUL) または 4-メチルウンベリフェリル-β-D-セロビオシド (MUC) を含む軟寒天を重層し、37℃で 1 時間インキュベートした。その後、トランスイルミネーター上で紫外線を照射し、コロニー周辺の蛍光を観察することにより活性を検出した。β-グルコシダーゼ高発現株についても、同様に培養した後に、4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルコシド (MUG) を含む軟寒天を重層、37℃で 1 時間インキュベートし、その後トランスイルミネーター上で紫外線を照射してコロニー周辺の蛍光を観察することで活性を

検出した。一方、キシラン分解酵素生産性は 0.1% AZCL-xylan を含む Czapek-Dox 寒天平板培地（1%グルコースの代わりにマルトースを含む）に培養して、基質の AZCL-xylan が分解されることによって生じる青色の呈色により酵素活性を検出した。

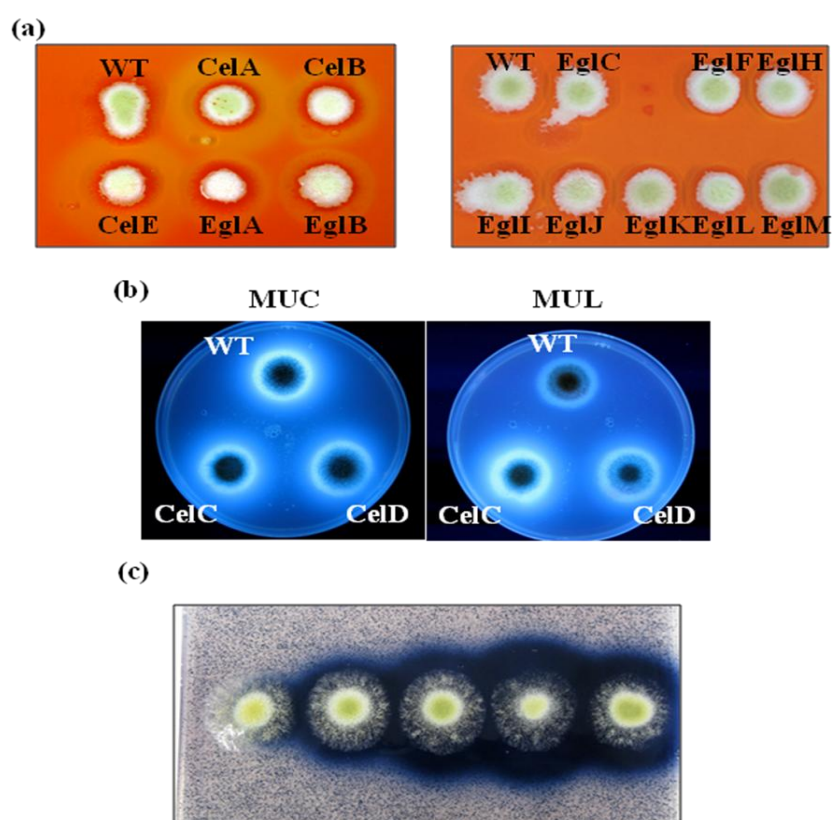
2) 麹菌のバイオマス分解酵素高生産性株の生産量の確認

バイオマス分解酵素高生産株の液体培養における酵素タンパク質の生産量について、培養上清を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により観察した。培養液中のタンパク質の SDS-PAGE は Leammli の方法に従って行った。サンプル溶液に対し SDS 化溶液を加え、3 分間煮沸して SDS 化を行った。分離ゲルは 12.5%、濃縮ゲルは 5% のアクリルアミドゲルを用いて泳動し、泳動後にタンパク質はクマシーブリリアントブルー R-250 (CBB) により染色した。

4-1-3 結果および考察

1) 麹菌のセルロースおよびキシラン分解酵素の高生産性株の造成

シグナルペプチドを有するセルロース分解酵素およびキシラン分解酵素遺伝子について、そのコード領域を PCR で増幅して高発現用ベクターの高発現用プロモーターの下流に連結した。このようにして得られた高発現プラスミドを、宿主である清酒用実用菌株の AOK11 株由来の *niaD* 欠損株に導入し高発現株を取得した。得られた形質転換体については、それぞれの酵素活性をプレート培養のコロニー周辺のクリアゾーン（ハロー）の出現や基質が分解されることにより生じる青色の呈色の有無により生産性の検出を行った（第 1 図）。



第 1 図 形質転換体のセルラーゼ・キシランナーゼ活性のプレートアッセイ
(a) β -グルカナーゼ、(b) セロビオハイドロラーゼ、(c) β -グルコシダーゼ

CMC を用いたプレートアッセイの結果、*celA*, *celB*, *celE*, *eglA*, *eglB* 遺伝子の高発現株が CMC 分解活性を示した。その他の高発現株ではコロニー周辺のハロー形成は観察されなかった。図には示していないが、*eglA*, *eglB* 遺伝子と同じようにセルロース結合ドメインを有する *eglD* 遺伝子は明瞭なハローを示さず、CMC 分解活性をもたない可能性が示唆された。また、セロビオハイドロラーゼとして高発現させた 2 種類の *celC*, *celD* 遺伝子の高発現株は、ともに蛍光基質である MUC、MUL に対する分解活性が検出された。MUC プレートアッセイでは野生株も活性を示した。一方、キシラナーゼの高発現株では、供試した 5 種類の遺伝子すべてで強い分解活性を示した（第 1 図には *xynF1* 遺伝子高発現株が示していないが、同様の試験により活性を認めている）。さらに、図には示さなかったが、 β -グルコシダーゼ高発現株については、MUG を用いたプレートアッセイの結果、*bglA*, *bglC*, *bglF* 遺伝子高発現株で蛍光のハローが検出された。

以上のようにして、これまで高発現用プラスミドを構築して麹菌に導入してプレートアッセイした酵素遺伝子の中から、CMC 分解活性を示すことが明らかとなったセルロース分解酵素（エンド- β -グルカナーゼ）は以下の 5 種類である。

A0090011000715 (*EglA*), A0090005001553 (*CelE*), A0090010000314 (*CelB*),
A0090026000102 (*CelA*), A0090005000531 (*EglB*)

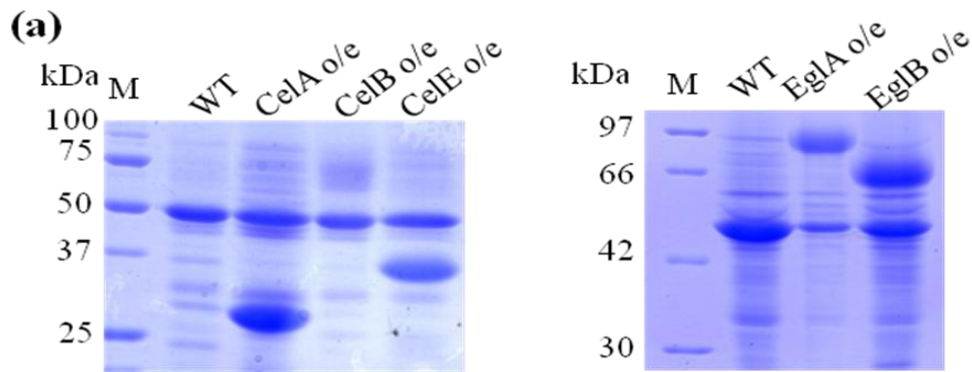
これらのうち、*EglA* および *EglB* はこれまで遺伝子ならびに酵素タンパク質のセルラーゼ活性については報告のなかった新規の酵素遺伝子であり、バイオマス分解への利用だけでなく、酵素の諸性質などについて興味を持たれたため、以下の項で高生産性株から酵素の精製と諸性質の解析を行った。

一方、そのほかの 10 種類の酵素遺伝子については、高発現させても CMC 分解活性を示さなかった。これは、酵素タンパク質としては正しいフォールディングをとっており、酵素としては機能しているが、単に CMC を分解する活性を有していないだけなのかもしれない。そのため、基質を変えて活性を測定する必要があると考えられる。また、大部分の酵素遺伝子はゲノム情報から検索されたものであり、GH ファミリーに分類されているとしても、活性中心や構造維持に重要な領域のアミノ酸に変異があるため、酵素タンパク質として正常に機能していない可能性も考えられる。

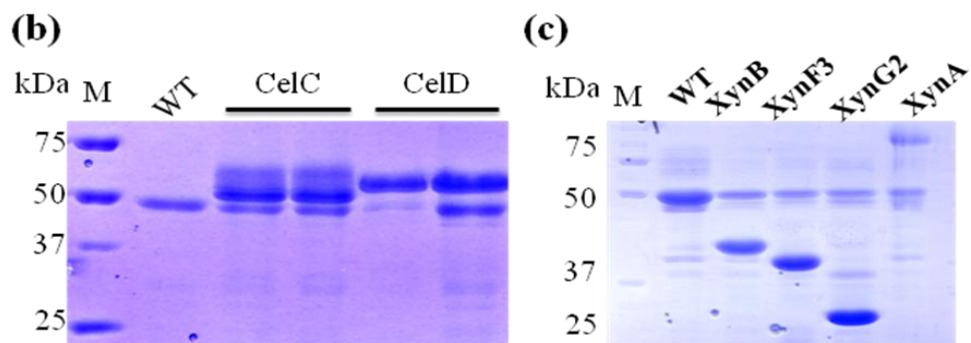
3) 麹菌のバイオマス分解酵素高生産性株の分泌生産性

高発現株のプレートアッセイにより酵素活性が認められた株について、生産量はどの程度か調べるために、液体培養の培養上清中のタンパク質について SDS-PAGE を行った。

50 ml の YPM 培地（1%酵母エキス、2%ポリペプトン、2%マルトース）に 1×10^6 個の孢子を植菌し、30°C で 120 rpm、24 時間浸とう培養した。培養後、上清をミラクロスで濾過し、200 μ l を TCA 沈殿により濃縮した後に SDS-PAGE に供した。



第2図(a) エンド- β -グルカナーゼ高発現株による酵素生産



第2図 (b) セロビオヒドロラーゼ、(c) キシラナーゼ高発現株による酵素生産

第2図の SDS-PAGE の結果から、CelA および CelE は麹菌が多量に生産する α -アミラーゼ (50 kDa 付近の強く染色されるバンドに相当する) と同程度の量が生産されていた。また、同様に EglA と EglB の分泌生産量も多かったが、CelB はプレートアッセイでは活性が検出されたにもかかわらず、液体培養液中には明瞭なバンドを検出できるほど生産はされていなかった。また、分泌生産された CelA および CelE の分子量は、遺伝子から予想されたもの (CelA ; 31 kDa, CelE ; 36.9 kDa) とほぼ同じであったが、EglA と EglB については、遺伝子配列から予測された分子量 (EglA ; 51.7 kDa, EglB ; 38.0 kDa) よりも 2 倍程度大きな分子量のタンパク質として分泌されていることが明らかになった。EglA 及び EglB はカルボキシル末端領域にセルロース結合ドメインを有しており、アミノ末端領域の触媒ドメインと Ser/Thr-rich なリンカー領域で連結した構造を示す。Ser/Thr-rich な配列には *O*-グルコシル化により多量にマンノース糖鎖が付加されることが考えられるため、遺伝子から予想される分子量よりもかなり大きなタンパク質として検出されたのは、この糖鎖修飾によることが一つの理由として考えられる。

セロビオヒドロラーゼについては、CelC, CelD とともに 2 株ずつ高発現株を選んで、液体培養を行い培養液中の分泌タンパク質を SDS-PAGE にかけてが、いずれも高生産していた。特に、CelD の 1 株では、 α -アミラーゼ量が顕著に低下している一方で、CelD のバンドのみが強く検出された。これは、region III をタンデムに持つ高発現用プラスミドが多コピー組み込まれたため、転写因子 AmyR の titration が生じたことにより、本来高発現されて

いるはずの α -アミラーゼ遺伝子の発現が著しく減少したことによるものと考えられた。

キシラナーゼについては、XynA 以外の酵素では α -アミラーゼに比べて 2 倍以上の生産量が認められた。一方、XynA は遺伝子配列から予想される分子量 (38.1 kDa) よりもかなり大きなタンパク質として検出された。おそらく糖鎖修飾によって分子量が大きくなったものと考えられる。

β -グルコシダーゼについては図を示さなかったが、BglA, BglC, BglF とともに液体培養で生産が認められた。このうち、BglA, BglF の 2 種類はこれまで報告のない新規な β -グルコシダーゼであった。一般的な微生物由来の β -グルコシダーゼの多くはセロオリゴ糖の最終分解産物であるグルコースが蓄積して高濃度になるとグルコースによって阻害を受けることが知られているが、高濃度グルコース中でも活性を示すグルコース耐性 β -グルコシダーゼが見出されれば、セルロース系バイオマスの分解酵素として適していると考えられる。今後はさらに多くの新規麹菌 β -グルコシダーゼの酵素学的諸性質を解明したい。

以上のように、本研究により新たに 2 種類の新規エンドグルカナーゼ遺伝子 (*eglA*, *eglB*)、2 種類の新規 β -グルコシダーゼ遺伝子 (*bglA*, *bglF*)、2 種類の新規キシラナーゼ遺伝子 (*xynA*, *xynB*) の高生産性株を取得することができた。

4-2 麹菌の新規エンド- β -グルカナーゼ EglA, EglB の酵素学的諸性質の解明

4-2-1 目的

4-1 で麹菌ゲノムデータベースから抽出されたセルロース分解酵素遺伝子の高発現株を作製し、これまで報告のない新規の酵素の高生産性株を取得することができた。このうち、EglA, EglB は、セルロース結合ドメイン (CBM) を有する分泌型の新規エンド- β -グルカナーゼであった。これら 2 種類の酵素は共通して触媒ドメイン、Ser/Thr-rich なリンカードメイン、及び CBM から構成されている。これまで麹菌において CBM を持つ分泌型酵素は同定されておらず、これらの酵素が、どのような酵素学的特性を有しているか興味深い。そこで、これら 2 種類の新規エンドグルカナーゼの基本的な酵素学的諸性質の解析を行うこととした。

4-2-2 方法

酵素の精製のためには、EglA, EglB の高発現株を用いた。

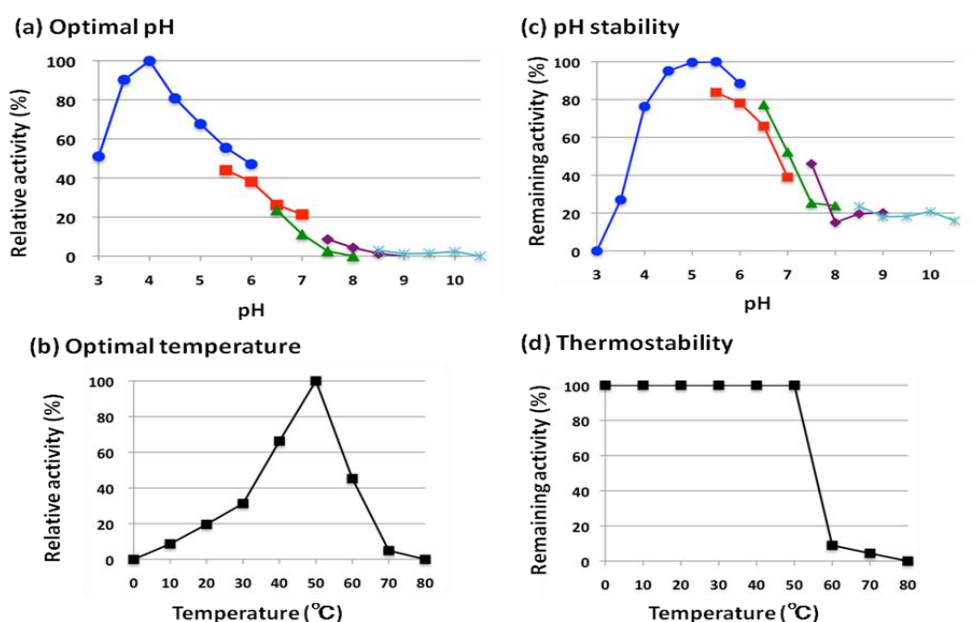
それぞれの高発現株の分生子を 100 ml の YPM 培地に接種し、30℃で 48 時間振盪培養した。培養液をミラクロスにて濾過して得た培養上清に 60%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え遠心し、沈殿を 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解した。その後、透析により緩衝液を 1 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) に置換した。1 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) にて平衡化した Butyl-TOYOPEARL 650M (TOSOH) に供し、吸着画分を 1.0 M-0 M 飽和硫酸アンモニウムの直線濃度勾配により溶出させた。溶出させた全画分について、CMC を基質としてセルラーゼ活性を測定し、活性画分を回収した。精製した酵素については、その N 末端アミノ酸配列解析を行うとともに、酵素学的諸性質の解析に用いた。

至適温度は、反応温度を 0℃から 80℃まで 10℃毎に変化させて 20 分反応を行い、最も活性が高かった温度の活性を 100%とした相対活性として表した。至適 pH は、酵素溶液に

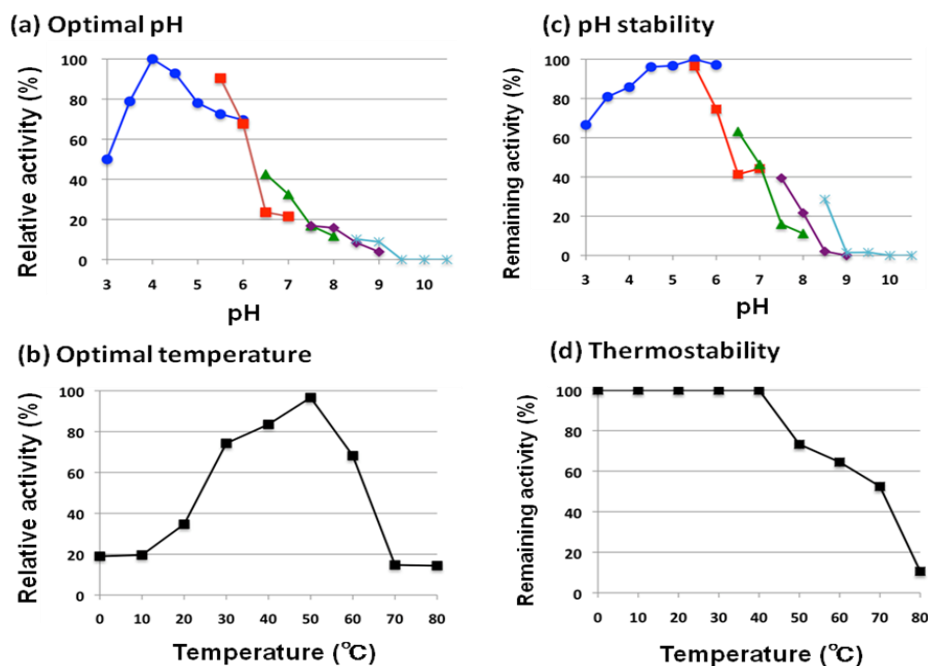
20 mM 各種緩衝液（クエン酸緩衝液：pH3.0 - 6.0, MES 緩衝液：pH5.5-7.0 リン酸緩衝液：pH6.5 - 8.0, TAPS 緩衝液：pH7.5- 9.0, グリシン緩衝液：pH8.5-10.5)を入れ、50℃で20分反応させ、最も活性が高かった pH の活性を 100%とした相対活性として表した。また、温度安定性は、酵素溶液（20 mM クエン酸緩衝液（pH5.5））を 30℃から 80℃まで 10℃毎に変化させて 30 分放置後、50℃で 20 分反応させ、50℃のときの分解活性を 100%とした相対活性として表した。pH 安定性は、酵素を含む 20 mM 各種緩衝液（クエン酸緩衝液：pH3.0 - 6.0, MES 緩衝液：pH5.5-7.0 リン酸緩衝液：pH6.5 - 8.0, TAPS 緩衝液：pH7.5- 9.0, グリシン緩衝液：pH8.5-10.5)を入れ、37℃で 30 分間インキュベートした後、pH5.5、50℃で反応させた。各最も活性が高かった pH の活性を 100% とした相対活性として表した。

4-2-3 結果及び考察

精製した Eg1A, Eg1B を SDS-PAGE に供し、CBB 染色によりそれぞれ約 80 kDa、70 kDa の単一バンドとして検出できた。また、精製したタンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定したところ、Eg1A は GSGFTWVGVS、Eg1B は HATVHAVWIN であった。遺伝子から予測される配列と比較すると、Eg1A は 18 個の推定シグナル配列の下流 8-9 個目に存在する KR の C 末側でプロセシング酵素 KexB によりプロセシングされていることが示唆された。また、Eg1B は 20 個のシグナル配列を持つことが示された。この結果から、Eg1A 及び Eg1B の成熟型タンパク質は、それぞれ 463 アミノ酸と 347 アミノ酸からなり、糖鎖修飾などがないタンパク質と考えると、それぞれ 48.7 kDa、36.1 kDa となる。しかし、精製酵素タンパク質は、



第 3 図 新規エンド-β-グルカナーゼ Eg1A の至適 pH (a)、至適温度 (b)、pH 安定性 (c)、温度安定性 (d)



第4図 新規エンド- β -グルカナーゼ EglB の至適 pH (a)、至適温度 (b)、pH 安定性 (c)、温度安定性 (d)

80 kDa と 70 kDa の大きさであったことから、2 倍ほどの分子量を示しており、おそらく Ser/Thr-rich な配列に O -グルコシル化によって多量のマンノース糖鎖が付加されているものと考えられる。

EglA 及び EglB の精製酵素を用いて温度や pH の活性への影響を調べた結果を第5図および第4図に示した。いずれも同じような傾向であったが、EglB では至適 pH 及び pH 安定性が EglA よりも中性側までやや広く、至適温度及び温度安定性も低温側と高温側にやや広いという性質を示した。

第2表 EglA 及び EglB の基質特異性

(a) EglA

Substrate	Specific activity*(U/mg)
CMC	68.5 $\pm$ 3.9
Avicel	N.D.**
Xylan	N.D.**
Laminarin	N.D.**
Lichenan	1.5 $\pm$ 0.28

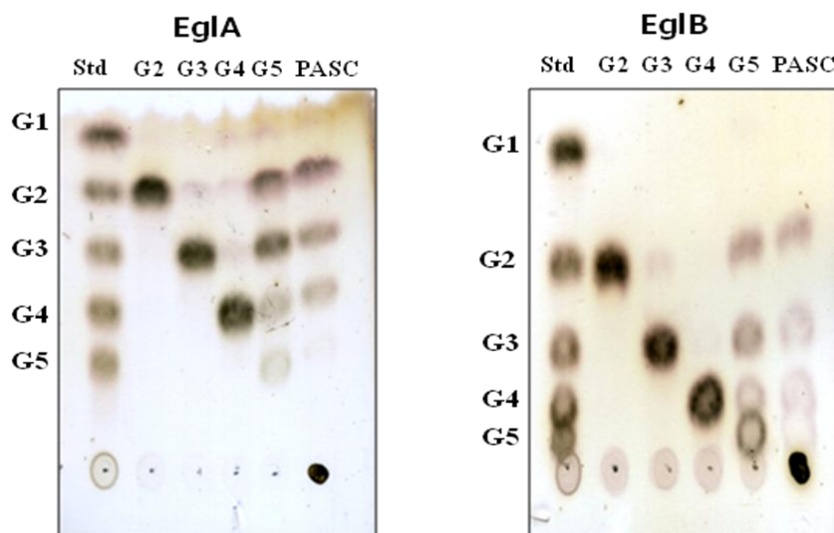
(b) EglB

Substrate	Specific activity*(U/mg)
CMC	0.8 $\pm$ 0.03
Avicel	N.D.**
Xylan	N.D.**
Laminarin	N.D.**
Lichenan	0.04 $\pm$ 0.019

** N.D., not detected

精製した EglA と EglB について基質特異性を調べたところ、いずれも Avicel やキシラン、及びラミナリンに対する分解活性を検出できなかったが CMC、リケナンに対する分解活性を有していた。また、CMC を基質とした時の EglB の比活性は EglA に比べ約 80 倍低かった (第 2 表)。

さらに、EglA と EglB の分解様式を明らかにするために、基質として 1 % (w/v) リン酸膨潤セルロース (PASC) 溶液及び 0.1% セロオリゴ糖 (cellobiose、cellotriose、cellotetraose、cellopentaose) 溶液を用いて酵素反応を行い、反応産物を TLC プレート (TLC Silica gel 60) によるクロマトグラフィーで解析した。TLC は展開溶媒 (クロロホルム：酢酸：水=4：7：1) で展開した後、検出溶液 (硫酸：メタノール= 5：95) を噴霧して糖のスポットを検出した。その結果、EglA、EglB とともにリン酸膨潤セルロースと cellopentaose を分解し、その分解産物の量は、cellotriose=cellobiose>cellotetraose>glucose の順であった。一方、4 量体以下のセロオリゴ糖は、cellotriose と cellotetraose がわずかに分解されているように見えたが、分解率は極めて低く、cellobiose はほとんど分解されなかった (第 5 図)。



第 5 図 EglA および EglB のセロオリゴ糖の分解様式

G2, cellobiose; G3, cellotriose; G4, cellotetraose; G5, cellopentaose;
PASC, phosphoric acid swollen cellulose

EglA, EglB は結晶性セルロース粉末 Avicel に対して分解活性を示さなかったが、可溶性セルロース CMC に対して分解活性を示した。また、 β -1,3 グルカンと β -1,6 グルカンの複合多糖であるラミナリンに対して分解活性を示さなかったが、 β -1,3 グルカンと β -1,4 グルカンの可溶性の複合多糖であるリケナンに対して分解活性を示した。これはリケナンの β -1,4 結合が加水分解されたことによるものと考えられる。また、EglA, EglB による可溶性セロオリゴ糖の分解様式を調べたところ、いずれの酵素も加水分解反応には 5 量体以上のセルロース鎖が必要であり、主な分解産物は cellobiose, cellotriose であった。

以上のように、麹菌の新規エンドグルカナーゼ EglA, EglB は可溶性の基質に対してのみ

分解活性を示すことが分かった。天然のセルロースの大部分は結晶構造を形成しており、エンドグルカナーゼによる加水分解反応に抵抗性を示す。この難分解性の結晶セルロースを効率的に液化・糖化するためには、酸処理や水熱処理等の化学的、物理的な前処理を行って結晶構造を崩したセルロースとする必要があると考えられる。

4-3 麹菌のセルラーゼ高生産株による生産条件の検討

4-3-1 目的

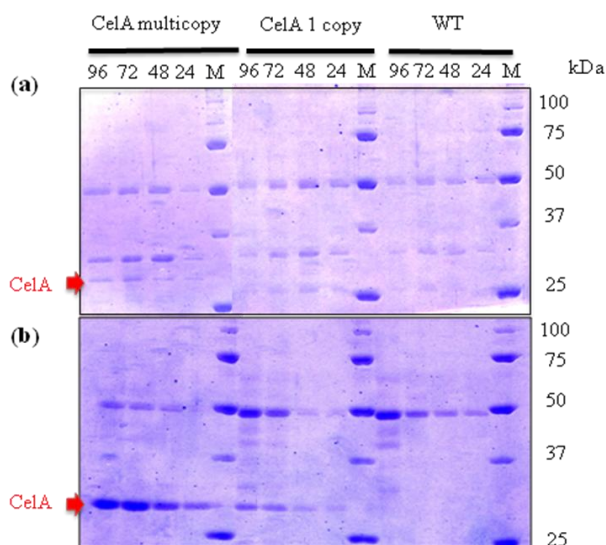
高発現用プロモーターに酵素遺伝子を連結して麹菌に導入した結果、いくつかの酵素では液体培養の培養液中に α -アミラーゼよりも多量の酵素タンパク質が分泌生産されていることが認められた。しかし、本プロジェクトでは小麦フスマなどの固体基質を用いた固体培養により酵素を高生産させることを最終的な目標としていることから、フラスコレベルで小麦フスマを用いた固体培養を行い、高生産条件を検討した。

4-3-1 方法

CelA 高生産性株をモデル株として用い、基質としては乾燥小麦フスマ及び水熱処理した(140℃、0 時間)小麦フスマを用いた。乾燥小麦フスマは 40%~300%の水分を加え、一方水熱処理小麦フスマはもともと乾燥重量の 300%量の水分を含んでいるのでそのままを使用した。乾燥重量として 1 g の小麦フスマをフラスコにとり、水分調整してオートクレーブ処理したものに CelA 高生産性株を接種し、30℃、2 日から 4 日間培養した。培養後、50 mM クエン酸緩衝液 (pH5.5) で抽出して SDS-PAGE により酵素タンパク質を調べた。

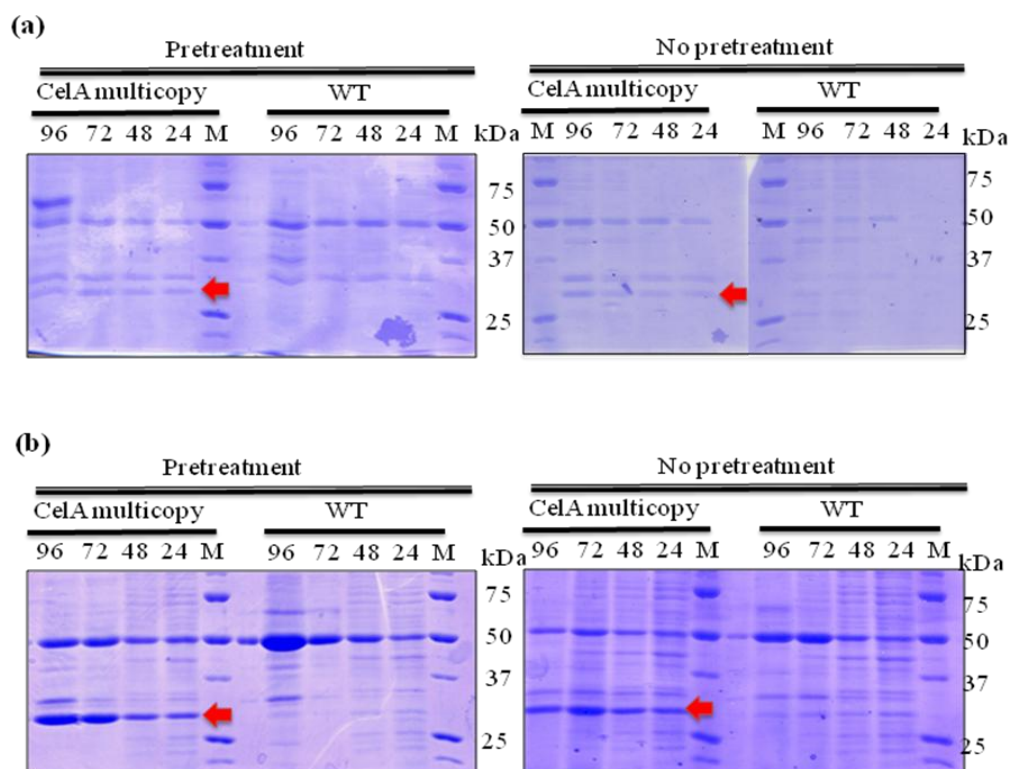
4-3-2 結果及び考察

CelA 高生産性株 (1 コピー導入株と多コピー導入株) 及び野生株を用いて、小麦フスマ (水分量 40%) と水熱処理小麦フスマを基質にして固体培養を行った後、抽出液のタンパク質を SDS-PAGE により調べたところ、水熱処理小麦フスマを基質に用いた場合に、多量の CelA の分泌生産が認められた (第 6 図)。



第 6 図 CelA 高生産性株を用いた固体培養による酵素生産
(a) 小麦フスマ、(b) 水熱処理小麦フスマ

水熱処理小麦フスマはリグニン層やセルロースの結晶構造が壊れて、菌や酵素がアタックしやすいため、酵素生産量に差が生じたことも考えられるが、固体基質の水分量も影響していることが考えられたため、予備的に小麦フスマの水分量を変えて培養したところ、水分量が 200%以上ある方が分泌生産量は高くなることが分かった。そこで、水熱処理した小麦フスマを乾燥させ、これに水分を 40%及び 300%加えて Cel1A 高生産性株を培養した。また、同様に無処理の小麦フスマも 40%及び 300%の水分量を加えて培養して酵素生産を比較した（第 7 図）。



第 7 図 Cel1A 高生産に及ぼす小麦フスマの水分量の影響
(a) 水分量 40%、(b) 水分量 300%

この結果から、水熱処理した小麦フスマでも水分量が少ないと生産量が少なくなるが、300%と高い水分量になれば、無処理の小麦フスマでも生産量が多くなることが分かった。これはおそらく今回用いた高発現用プロモーターの *Pgl1a142* が水分量の少ない条件よりも、多い条件の方が発現活性が高いことによるものと考えられる。今後ノーザン解析によって転写産物量を調べる必要があると考えている。また、一般的な固体培養槽において培養する場合には、水分量が 300%という条件は適していないので、より乾燥した条件で高発現するプロモーターを選択する必要があると思われる。

4-4 バイオマス分解に関与する転写因子の探索と高発現株の造成

4-4-1 目的

セルロースは単一酵素で分解されるわけではなく、複数の酵素が協調的に作用して分解

される上に、セルロース系バイオマスはセルロースのほかにキシランやアラビナン、ペクチンなどを含む複合多糖類からなっており、これらの分解に関わる酵素も同時に作用することが効率的な分解には必要である。また、カビではデンプンやセルロース、キシランなどの多糖類を分解する複数の酵素遺伝子は共通の転写因子で発現が制御されていることが知られている。例えば、麹菌のデンプン分解酵素群は AmyR という転写因子により生産が制御されており、キシラン分解酵素群と一部のセルロース分解酵素は XlnR によって生産が制御されている。したがって、これらの転写因子を人為的にコントロールすれば、複数の分解酵素を同時に高生産させることが可能となると考えられる。そこで、ここではいまだ見出されていないセルロース分解酵素やアラビナン分解酵素、さらにはペクチン分解酵素の生産に関与する新規転写因子を探索し、その人為的制御により複合的なバイオマス分解酵素群の高生産を目的とした。そのために、麹菌ゲノムデータベースから見出された機能未知の転写因子遺伝子の条件的高発現株バンクを作製し、プレートアッセイなどによりバイオマス分解酵素生産性の高い株をスクリーニングすることによって、目的の転写因子を探索することを目指して、前年度に引き続き転写因子遺伝子の条件的高発現株の作製を行った。

4-4-2 方法

1) 転写因子遺伝子の条件的高発現バンクの作製

麹菌ゲノムデータベースを検索することにより、転写因子様遺伝子は約 350 種類存在することが明らかとなった。このうち、AmyR や XlnR のような分解酵素生産に関わると考えられる真核微生物に典型的な Zn2Cys6 タイプの転写因子は約 250 種類ほど見出されている。本プロジェクト開始前にこのうちの 120 種類についてその条件的高発現株をすでに作製していたことから、残りの 140 種の Zn2Cys6 タイプの転写因子の高発現株を作製することとしたが、最近になって各種カビの全ゲノム解析またはドラフト解析が進行し、それらの結果を麹菌ゲノムデータと比較することにより、さらに 100 種類ほどの Zn2Cys6 タイプの転写因子遺伝子が見出された。これらの新たに見いだされた転写因子遺伝子もあわせて条件的高発現株を作製した。また、バンクの作製と並行してプレートアッセイによって分解酵素高生産株のスクリーニングも行った。

【使用菌株】

前年度と同様に、組換えプラスミドの取得には、*Escherichia coli* DH5 α 株 (*supE44*, Δ *lacU169*, *hsdR17*, *recA1*, *girA96*, *thi-1*, *relA1*) を用いた。バンク作製用の麹菌宿主としては、*A. oryzae* RIB326/*niaD* (*niaD*) 株を用いた。

【転写因子遺伝子 ORF 断片と発現プラスミドの作製】

ゲノム解析結果から推定されたコード領域を含む配列 (ORF 断片) を Pfu Ultra II Fusion DNA Polymerase を使用して PCR で増幅した。この断片を麹菌タカアミラーゼ遺伝子 (*amyB*) プロモーターを持つプラスミド pAPLTN を用い、*amyB* プロモーターの下流に挿入して、麹菌に導入するプラスミドを構築した。

【麹菌の形質転換】

高発現用プラスミドを *niaD* 部位に 1 コピー導入するために、*niaD* 領域で制限酵素で 1

カットし直鎖状にしてから形質転換に用いた。制限酵素は、*ApaI*, *HpaI*, *MunI*, *XcmI* のうち、転写因子遺伝子内に認識部位がないものを用いた。*A. oryzae* RIB326/*niaD* 株を宿主としたプロトプラスト-PEG 法による形質転換を行った。得られた候補株について、転写因子遺伝子のコード領域を含む DNA 断片の作製で設計したセンスプライマーと *Tamy* プライマーで孢子 PCR を行うことにより、目的の高発現用プラスミドが導入されていることを確認した。

2) プレートアッセイによる分解酵素生産性の検出

セルロース分解酵素生産性およびキシラン分解酵素生産性について、発色用基質を含んだ寒天培地で形質転換体を培養し、発色の程度や消化円（ハロー）の大きさなどにより可視的に判定した。

- ・セルロース分解酵素生産性—基質として 0.1%カルボキシメチルセルロース (CMC) を用い、プロモーター誘導用に 0.5%マルトースを加えた最小培地で培養後、寒天培地に Congo Red を重層することにより消化円の有無を調べた。
- ・キシラン分解酵素生産性—0.1%AZCL-xylan を含み、プロモーター誘導用に 0.5%マルトースを加えた最小培地で培養後、分解されることによって生じる青色の呈色を調べた。

4-4-3 結果および考察

1) 転写因子遺伝子の条件的高発現バンクの作製

すでに条件的高発現株作製済みの 120 種の転写因子に加えて、残りの 240 種の Zn2Cys6 タイプに加えてさらに 40 種の C2H2 タイプなどの転写因子遺伝子について、ORF 領域の PCR 増幅、高発現プラスミドの作製、麹菌形質転換体の取得を進めた。

i) 転写因子遺伝子のコード領域を含む配列 (ORF 断片) の作製と高発現用プラスミドの作製

transcription factors group 1 (141 種類) —ゲノム解析終了当初のデータに基づいて推定された Zn2Cys6 タイプの転写因子遺伝子のうち、条件高発現株が得られていなかったもの。プライマー設計は 141 種類終了した。そのうち 3 種類について PCR で増幅されなかった。これらについては再度プライマー設計を検討する予定である。残り 138 種類の ORF 断片の作製は完了した。高発現用プラスミドは 74 種類完成した。

transcription factors group 2 (100 種類) —ゲノム解析終了後に他のカビのゲノム解析結果と比較して新たに見出された Zn2Cys6 タイプの転写因子遺伝子。プライマー設計は 100 種類終了した。そのうち 3 種類について PCR で増幅されなかった。これらについては再度プライマー設計を検討する予定である。残り 97 種類の ORF 断片の作製は完了した。高発現用プラスミドは 60 種類完成した。

transcription factors group 3 (38 種類) —Zn2Cys6 タイプ以外の転写因子遺伝子で、条件高発現株が得られていなかったもの、および他のカビのゲノム解析結果と比較して新たに見出されたもの。プライマー設計は 38 種類終了した。そのうち 1 種類について ORF 断片内に制限酵素認識部位がある制限酵素配列をアンチセンスプライマーに付加したため、目的の ORF 断片を得ることはできなかった。認識部位のない制限酵素配列を再度付加してプライマーを再設計する予定である。残り 37 種類の ORF 断片の作製は完了した。高発現用

プラスミドは 34 種類完成した。

ii) 麹菌形質転換体の取得

transcription factors group 1, 2, 3 で完成した高発現用プラスミドを用いて *A. oryzae* RIB326/*niaD* 株を宿主としたプロトプラスト-PEG 法による形質転換をおこない、得られた形質転換体コロニーからガラスビーズ法で孢子 PCR 用ゲノムを作製し、孢子 PCR で形質転換体候補株を確認した。これまでの結果、それぞれのグループで以下の数の高発現用プラスミドが導入された高発現候補株が得られた。

transcription factors group 1・・・16 株

transcription factors group 2・・・26 株

transcription factors group 3・・・14 株

2) プレートアッセイによる分解酵素生産性の検出

セルロース分解酵素生産性、キシラン分解酵素生産性についてプレートアッセイを行った。表の高発現候補株をプレートアッセイをおこなったが、セルロース分解酵素生産性では消化円を示した株は見られなかった。また、キシラン分解酵素生産性も青色の呈色を示した株は見られなかった。供試した形質転換体の数が少なかったこともあり、これまで目的の高生産性株は取得できていない。今後高発現用プラスミドの作製と導入された麹菌形質転換体が取得でき次第、順次プレートアッセイをおこなって、酵素活性の向上した転写因子条件的高発現株を引き続きスクリーニングしていきたい。

第5章 セルロース系バイオマス分解酵素生産に適した糸状菌の高効率固体培養法の開発

【実施機関】 岡山県工業技術センター、株式会社フジワラテクノアート、株式会社イングレディア・ソリューション

5-1 はじめに

本研究課題では、目的とするセルロース系バイオマスの分解には固体培養により安価で大量に生産される高活性なセルラーゼ（複合酵素）が必要かつ最適であると考え、セルラーゼの効率的な高生産が可能な糸状菌の固体培養法を開発することを目的としている。昨年度までの報告書から、これまでに、小麦フスマを用いた固体培養における培養条件を検討し生産されるセルラーゼ活性を確認したところ、菌種によりセルラーゼ生産能が大きく違うことに加え、セルラーゼ生産は培養条件により厳密に制御されていることが判った。特に培養開始時の基質（処理した小麦フスマ）の水分は低水分であることが重要である。さらにセルラーゼ生産に影響を及ぼす因子を検討したところ、栄養補助は特別必要ではなく、培養過程における水分状態の管理調節が酵素生産に最も重要かつ必要であることが明らかとなった。しかし、固体培養においては小規模試験のままだでは、その不均一性から再現性が低いことに加え、実質水分状態の制御は不可能である。しかも、拡大時との培養状態（特に品温と水分状態）が大きく異なってくる。そこで我々は、実証プラントにも適応可能な中規模の固体培養モデルとして、透湿性フッ素樹脂膜を利用した無通風箱培養法を考案構築した（図1）。そしてこの方式により環境（恒温恒湿器）の温度と湿度を適切にコントロールすることで、精度かつ再現性のよい固体培養における品温と水分状態の管理制御が可能となることを示した。

そこで本年度は、無通風箱培養法における麹菌の酵素生産特性を把握するとともに、セルラーゼの高生産に適した培養条件の検討を行った。また、別に構築されたセルラーゼ他の高発現株についての生産性評価も行い、これらを最終的に実証プラントで検証した。

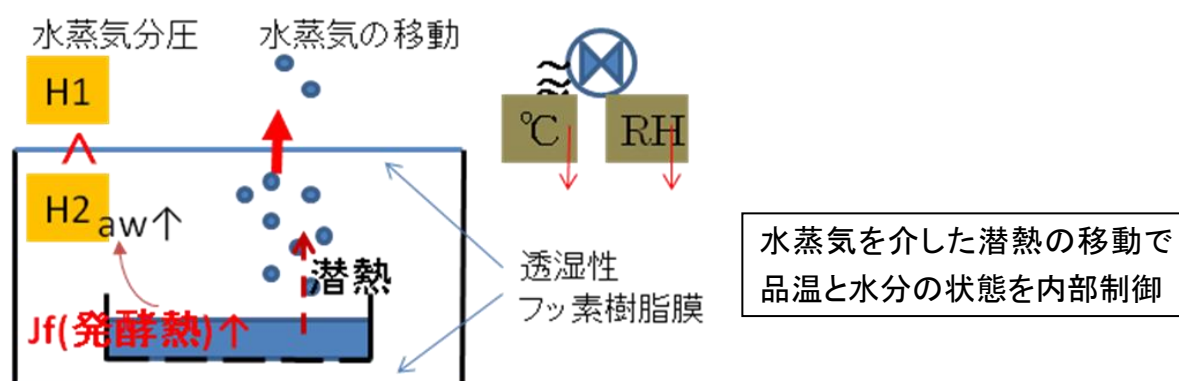


図1 無通風箱培養法の原理と制御の特性

5-2 研究内容と成果

5-2-1 無通風箱培養における麹菌の酵素生産の特性

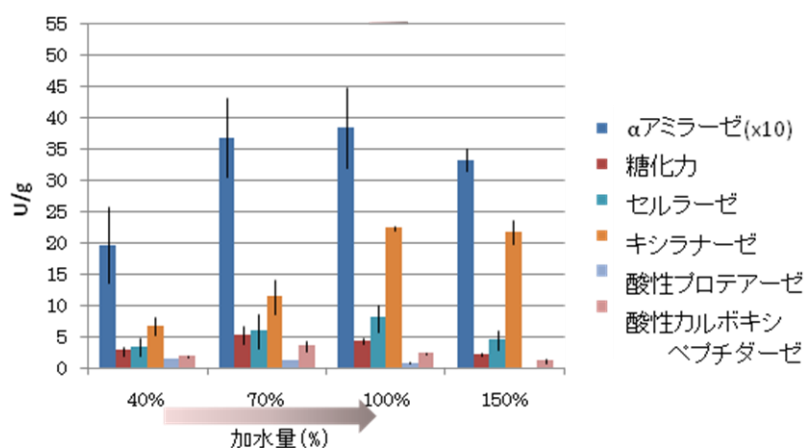
昨年度に、一定環境下（30℃、95%RH）のもと、従来法であるトレイ式培養との比較を行い、

基本的な培養特性(水分、品温、生育)について把握し、セルラーゼの生産動向を明らかにした。今回の直接の目的はセルラーゼの高生産ではあるが、本研究で行う糖化反応には麴をそのまま用いることから、麴菌が従来多量に生産することが知られている他の関連酵素の影響を考慮しておく必要がある。そこで、無通風箱培養法の培養特性により麴菌の酵素生産特性がどのように影響を受けるのか検討を行った。

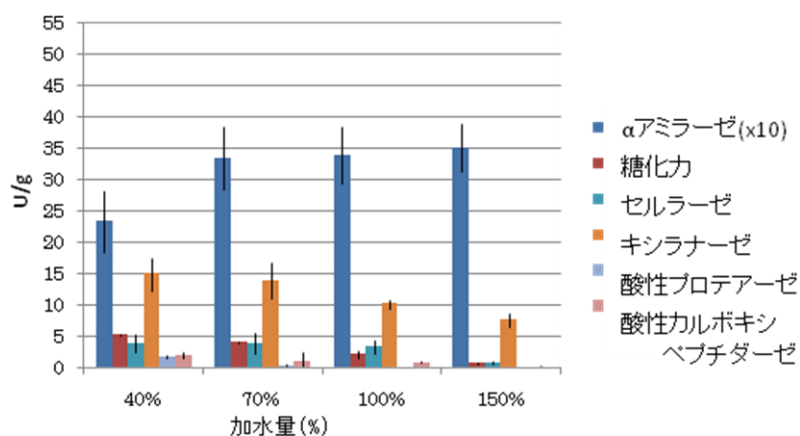
小麦フスマ(水分 13%)を蒸し(100℃、20 分)、蒸し上がりの加水量が 40～150%(w/w)となるように調整した。これにあらかじめ、*Aspergillus oryzae* AOK11 株を固体培養しておいた麴を種フスマとして 2%混合し、恒温恒湿器 (30℃、95%RH)に 4 日間静置して培養を行った。そして、経時的に品温を測定し、培養後の各種酵素活性、菌体量、出麴重量、水分含量、を測定した。各種酵素活性は表 1 の方法に従ってそれぞれ行い、1U は 1 μ mol 生成物/min で表した。菌体量は N-アセチルグルコサミン量の値で換算して測定した。

表 1 各種酵素活性測定法

酵素	測定方法
α アミラーゼ	キッコーマン醸造分析キット
糖化力	キッコーマン醸造分析キット
セルラーゼ	DNS 法による CMCase 活性
キシラナーゼ	DNS 法によるキシラン分解活性
酸性プロテアーゼ	国税庁所定分析法
酸性カルボキシペプチダーゼ	キッコーマン醸造分析キット

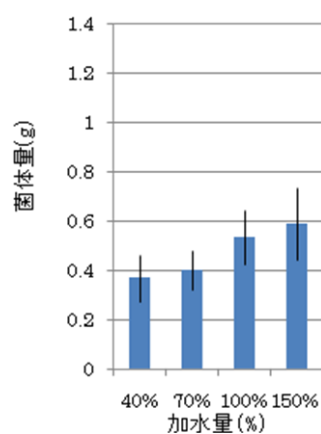


<無通風箱培養>

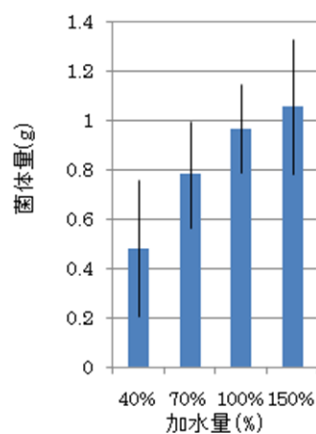


<トレイ式培養>

図2 麹菌の酵素生産特性

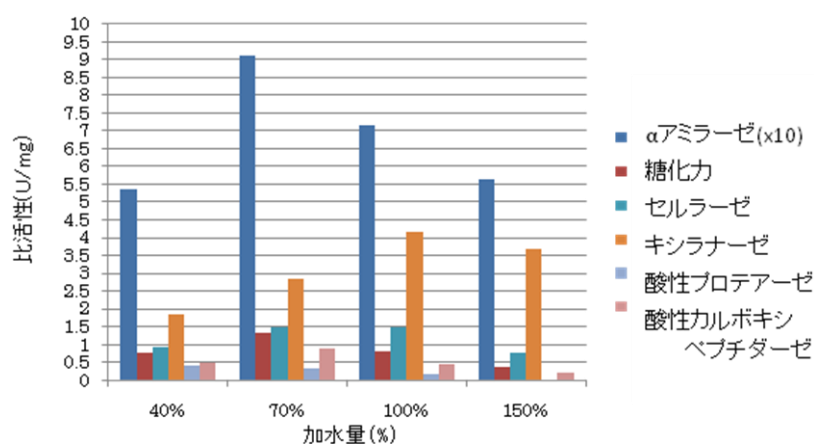


<無通風箱培養>

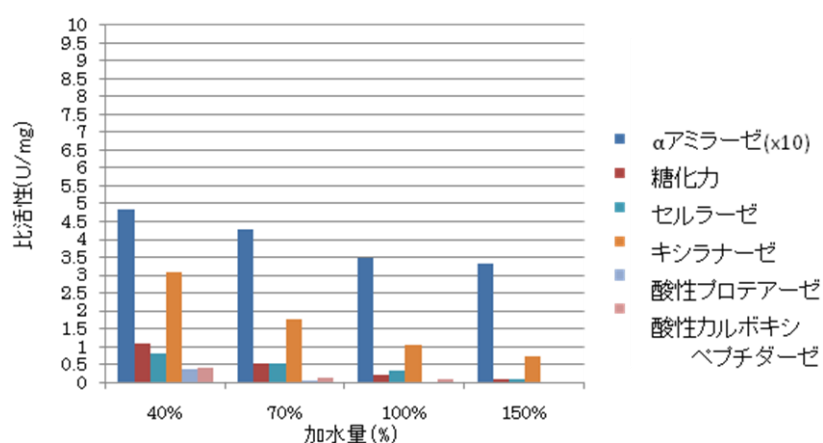


<トレイ式培養>

図3 菌体量における加水量の影響

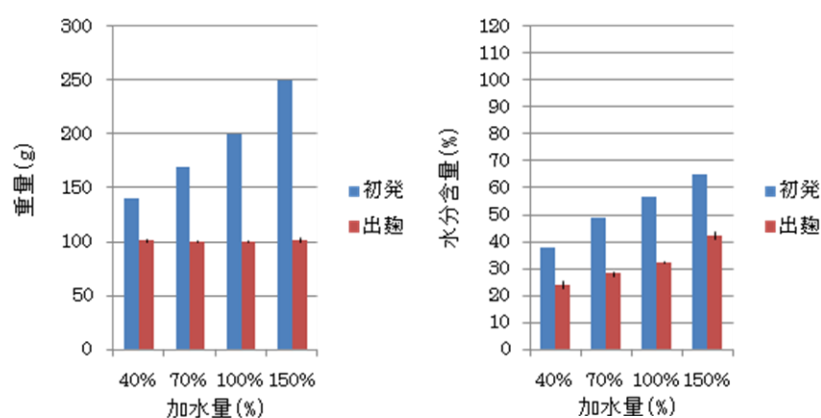


<無通風箱培養>

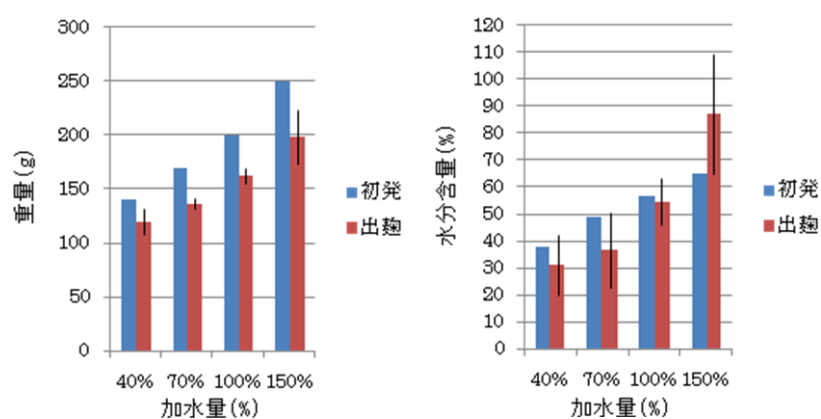


〈トレイ式培養〉

図4 菌体あたりの比酵素生産性

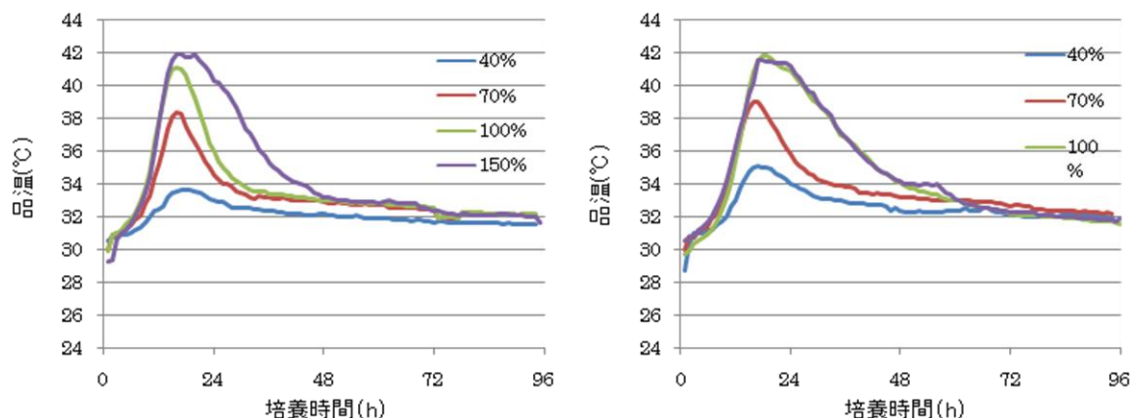


〈無通風箱培養〉



〈トレイ式培養〉

図5 出麹重量と水分含量



<無通風箱培養>

<トレイ式培養>*

図 6 代表的な品温経過

*トレイ式では再現性が低く示したような経過をたどらないことが多くあった

アミラーゼとセルラーゼの個々については昨年確認したが、今回併せて無通風箱培養における他の関連酵素の生産性についてトレイ式培養と比較し評価したところ、アミラーゼ活性は両方の培養において、同じ傾向(加水量 70%以上で高活性)がみられたが、アミラーゼ以外の酵素の生産では最も良い時の加水量が、トレイ式培養では40%となったのに対し、無通風箱培養ではそれよりも高い加水量である70～100%となることが判った(図2)。そしてこのとき従来(トレイ式)以上に高生産されていることも明らかとなった。菌体量はどちらの培養においても加水量が増えると増加したが、同じ加水量ではトレイ式と比べて低くなり(図3)、どの酵素も菌体あたりの比酵素生産性が大きく向上していることが示された(図4)。また出麴重量および水分含量および品温経過は、昨年同様の結果(図5、6)が得られ、無通風箱培養法の特性と再現性の良さが改めて確認できた。無通風箱培養では、十分な発酵(生育)による発酵熱に伴い水分が良く乾燥する経過をとるが、トレイ式培養ではほとんど水分は乾燥せず、しかも同条件での培養における状態のばらつきがとても大きい。すなわち無通風箱培養法では、従来の固体培養(トレイ式)では実質不可能だった実際の培養状態(品温と水分)の管理制御が再現性よく可能となることが確認できた。しかも無通風箱培養法の特性(良く乾燥する)によれば、初発の水分含量をトレイ式よりも高水分に設定することにより、十分な菌体量を確保しながらも、効率的な酵素生産に必要な水分状態の管理制御も容易に可能となるといえる。今回この結果として、麹菌が生産する主要な酵素が無通風箱培養によりそれぞれより効率的に高生産することができたことが判った。

5-2-2 セルラーゼ生産のための培養条件の最適化

次に無通風箱培養法の特性を活かし、環境の温度と湿度を変えることで品温と水分状態の積極的な管理制御を行うことで、効率的な酵素生産が行えるより最適な培養条件を検討することにした。無通風箱培養法による品温と水分状態の管理制御は、その原理から環境と箱内部の水蒸気分圧の差に依存している。そこで環境の水蒸気分圧が19～30mmHgとなるように温度25～35℃、湿度60～95%RHの範囲で条件を設定し、今回は全て設定した一定の

環境下で検討を行った。

アミラーゼ活性は、いずれの条件下でも加水量が多いほど増加する傾向にあったが、その効果(差)は、環境温度の影響というよりは、環境湿度が低く(水蒸気分圧が低い)なるほど大きくなり、環境温湿度が 25℃、80%RH のとき最大となった。つまりアミラーゼの高生産のためには、培養初期は高水分で後半よく乾くことが重要であると考えられた。 α グルコシダーゼ活性は、環境温度は低い方が相対的に高く、初発の加水量は少ないより多い方がよく、100%が最も適していると考えられた。しかし初発の加水量が多く(150%)ても、環境湿度を低くすることで生産は十分維持できることが判った。グルコアミラーゼ活性は、 α グルコシダーゼと比べ、初発の加水量はより少ない方(70%以上)がよいが、環境湿度は低すぎないことが必要であると考えられた。すなわち培養初期でより乾いた条件が生産に適しているが、培養を通して乾き過ぎないことも重要であるという特性が考えられる。

セルラーゼ活性は、初発はある程度の水分がある方がよいが、同時に水蒸気分圧が低く後半ある程度は乾くことが重要であると考えられる。100%加水で 30℃、80%RH のときが最も生産が高くなった。キシラナーゼ活性は、環境温度は 30℃が最も良く、高いと特によくない。初発の加水量はある程度(100%以上)必要で、乾くことが必須であるとは考えられない。

酸性プロテアーゼ活性は、環境温度が低いほど活性が高い。初発の水分はより低い方がよいが、多少増えて(100%以下)も水蒸気分圧を低くすることで活性が維持できることも判った。酸性カルボキシペプチダーゼ活性は、プロテアーゼ同様に環境温度が低い方が高くなる傾向にあった。また初発の水分はある程度(70~100%)あることが重要であると考えられた。

水分含量は、環境温度が高くなるほど減少しているが、各温度間の比較では菌体量や品温経過からみると増殖に伴う発酵熱による影響(内部の水蒸気分圧があがりより乾く傾向になる)は少ないと考えられる。逆に同じ環境温度下では、これらの影響が顕著に見られた。菌体量は、水分が増える(初期も後半も)状態になることにより増加したと考えられる。低水分(40%以下)と低い水蒸気分圧のときや、35℃では若干の増殖阻害もみられた。

いずれにしても今回検討した中で、セルラーゼおよびキシラナーゼの高生産に最も適した条件は 100%加水(水分含量として 56.5%)、30℃、80%RH であることが明らかとなった。また AOK11 株が比較的セルラーゼおよびキシラナーゼ生産能に優れた菌株であることも判った。これにより、従来法と比べて 2 倍以上のセルラーゼを高生産することが可能な培養条件を確立することができたといえる(表 2)。

表 2 各最適条件下におけるセルラーゼおよびキシラナーゼ生産性の比較(まとめ)

	初発水分	環境温湿度	酵素生産(U/g) セルラーゼ	キシラナーゼ
トレイ式培養	40%加水 →(37.9%)	30℃、95%RH	3.8	15.0
無通風箱培養	100%加水→(56.5%)	30℃、80%RH	9.4	22.7

5-2-3 セルラーゼ高発現株の生産性評価

別に構築され、液体培養やプレートアッセイなどにより、タンパク質の生産分泌もしくは活性が確認された 10 株の高発現株(β エンドグルカナーゼ: CelA、CelB、CelE、EglA、 β グルコシダーゼ: BA、BF、セロビオハイドロラーゼ: CelC、CelD、キシラナーゼ: XynG2、XynF3)について、無通風箱培養法を用いた固体培養により、セルラーゼ生産性の評価を行った。培養条件は親株 AOK11 の検討において β エンドグルカナーゼ(セルラーゼ)の生産性が最も高かった 100%加水、30℃、80%RH、4 日間静置の条件で行った。無通風箱培養法の特性により、この条件下では、キシラナーゼやアミラーゼなど他の酵素も同時に高生産することができることが判っている。その結果酵素の生産性については、 β エンドグルカナーゼの 4 株では、どの株も 30 (U/g) 以上の高生産性を示し、その中で CelE 株が最も生産性が良く親株と比べて 5 倍以上(従来法と比べると 12 倍以上)に向上していた。 β グルコシダーゼの 2 株では、20 (U/g) 以上の高生産性を示し、親株と比べて 2 倍以上に向上していた。セロビオハイドロラーゼの 2 株では、親株よりも高生産されていたが、1.3 倍程度であった。またキシラナーゼの 2 株でも、明らかな高生産を示し、XynG2 株で 4 倍以上に高生産されていた。一方アミラーゼは同程度か若干低めとなっており、使用している PglaA142 プロモーター発現における転写因子の競合による影響も示唆される。また出麹重量は親株とあまり変わらず 90g 前後、水分含量は親株とほぼ同じで 22%程度であった。ただ菌体量は、各菌株により異なっており、例えば CelE 株などはとても生育が良く、親株の 2 倍以上になっている。これらのことも酵素産性の程度に影響を及ぼしていることも考えられる。

このように、今回効率的なセルラーゼの高生産のために構築し確立した無通風培養法での最適な培養条件に加え、使用する菌株によりさらに 5 倍以上(従来法と比べると計 12 倍以上)のセルラーゼの生産性の向上が可能であることが明らかとなった。さらに、組み換えされた各遺伝子の使用プロモーターの発現に対して最適な条件をそれぞれに検討することでさらなる生産性の向上が期待できる。今後は、タンパク質生産分泌や固体培養環境(品温や水分)の観点からもこれらの高活性の要因を検討する必要がある。

なお今回の評価で高生産が確認できた CelE(β エンドグルカナーゼ)と XynG2(キシラナーゼ)株による混合培養も実施検討したが、期待される相乗効果はみられなかった(データは示さない)。

表 3 高発現株の酵素生産性

菌株	酵素生産性(U/g)					出 麴 重 量(g)	水 分 含 量(%)	菌 体 量 (g)
	β エンド グルカ ナーゼ	β グル コシダー ゼ	セロビオ ハイドロ ラーゼ	キシラナ ーゼ	アミラー ゼ(x10)			
AOK11	9.4	9.3	1.1	22.7	37.9	94	22.3	0.37
CelA	46.3	—	—	—	22.2	95	22.3	0.76
CelB	31.3	—	—	—	29.0	93	22.5	0.41
CelE	48.2	—	—	—	34.2	94	22.5	0.98
EglA	36.3	—	—	—	33.9	94	22.4	0.60
BA	—	21.9	—	—	32.9	91	20.1	0.37
BF	—	22.5	—	—	30.2	89	21.4	0.50
CelC	—	—	1.6	—	31.2	88	21.3	0.46
CelD	—	—	1.5	—	25.8	89	21.9	0.53
XynG2	—	—	—	96.1	23.8	92	22.1	0.25
XynF3	—	—	—	72.8	32.4	87	21.0	0.37

5-2-4 実証プラントによるセルラーゼの高生産

無通風箱培養法による培養条件の最適化と高発現株の使用により、セルラーゼの高生産が実現できることが明らかとなった。そしてこれらを実現する中、無通風箱培養法におけるセルラーゼ生産の解析により、セルラーゼの効率生産に必要な培養開始時の基質(小麦フスマ)の水分状態、培養経過に伴う培養状態(品温と水分)の管理、培養期間などが把握できた。そこでこれらの条件をもとに実証プラント(大規模)の運転条件を実施し、これを用いたフスマを培地とした菌(AOK11 および CelE 株)の培養によるセルラーゼの高生産を検証することにした。

実証プラントは、さらなる工業生産(運転)化を考え自動攪拌と品温制御を可能とした通気式固体培養装置(培養床 ϕ 350 h200、実質培養容積 約 15 リットル)である(写真)。培地はサタケ調製フスマ元 2.3 kgに水 2.3 kg加えたものを使用した。投入原料水分は 60%の予想。AF350で堆積層厚 13~15cmを目標として投入し残れば廃棄する。蒸煮条件は 120℃20 分。蒸煮後冷却工程で送風し、品温が 30℃になったところで、別途用意した AOK11 もしくは CelE 株の孢子懸濁液(約 3×10^8 個)を接種攪拌し培養を開始した。昨年度の無通風箱培養法を用いた親株における検討で、培養期間は 2 日程度でも十分な生産が行われていることを確認している。そこで、高発現株 CelE 株を用いた高生産においても培養時間が短縮できるかどうかを確認したところ、2 日間の培養でも十分の酵素生産が行われていることが確認できた(データは示さない)ことから培養期間は 2 日間(48 時間)とすることにした。品温



経過は、無通風箱培養法で得られた知見と各種プラントの実施例から検討を行い、33℃で培養を開始し12時間目から22時間目の間に38℃になるように上昇させ、以後48時間までこの温度を維持するように決定した。実際に行ったプラント培養における品温、通風および攪拌制御は別紙「通気式固体培養装置 培養テスト①～③報告書」に詳細を示す。そして経時的および出麹時に試料採取を行い、酵素活性(セルラーゼ、キシラナーゼ、アミラーゼ)、水分含量、菌体量を測定した。

培養開始約12時間以降から発酵熱が生じ、約17時間目までにはAOK11株、Ce1E株ともに菌体の生育が確認でき、以後菌体の増殖に相関してアミラーゼの生産もみられており、出麹時にはほぼ600(U/g 麹)近くにまで達した(図8)。発酵熱による品温の上昇に伴い、攪拌通風により、33℃→38℃まで品温制御を実施している。これにともない、17時間目以降から徐々に水分含量の低下がみられ出麹時には親株で約38%程度となった(図8)。このような培養経過のもと、目的とする酵素(セルラーゼ、キシラナーゼ)の生産は良好で、親株において出麹時までに最大で、約7(U/g 麹)のセルラーゼと約33(U/g 麹)のキシラナーゼが生産されていた(図7)。一方高発現株であるCe1E株においては、17時間目までですでに親株以上の高生産が確認され、出麹時までに最大で約39(U/g 麹)のセルラーゼと約48(U/g 麹)のキシラナーゼが生産されていた(図7)。これらの結果は、無通風箱培養法におけるこれらの酵素の生産性と同等(もしくはそれ以上)のものであると判断できることから、本実証プラントにおける培養生産の妥当性と優位性を示すことができた。特に、キシラナーゼに関してはプラントによる培養により、さらに生産性の向上がみられており興味深い。また一方で目的の酵素生産と活性の維持には一般に不必要と考えられる酸性プロテアーゼの生産は、経時的には菌体の増殖とともにみられたが、低いレベルで抑えられていた(図8)。これは初発から出麹時の水分含量が比較的多めに経緯していることが一因として考えられる。これらの点でも本プラント培養による酵素生産に極めて高い優位性があるといえる。これら各酵素の生産性に影響を及ぼしている要因については様々な観点(無通風箱培養法との違いなど)から今後さらに検討する必要があると思われた。またCe1E株とXynG2株による混合プラント培養も実施検討したが、無通風箱培養法同様に期待される相乗効果はみられなかった。

以上、実証プラントに適応可能な優れたモデルとして構築、最適化した無通風箱培養法をもとに、実証プラントを用いたセルラーゼおよびキシラナーゼの効率的な高生産が実現できた。

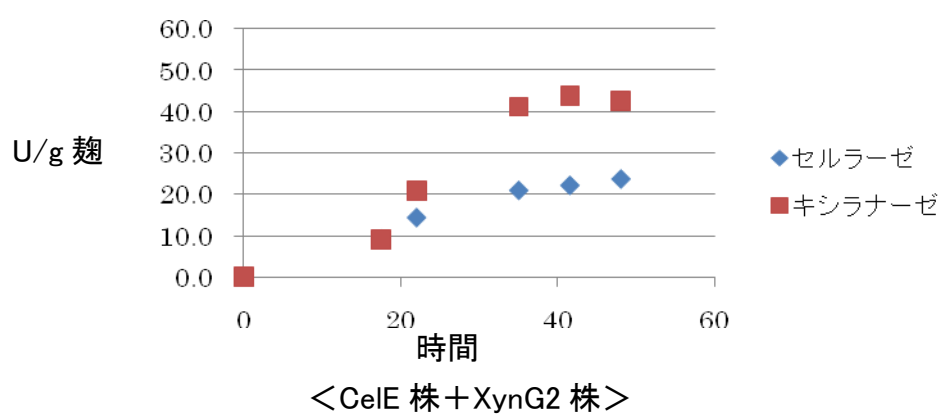
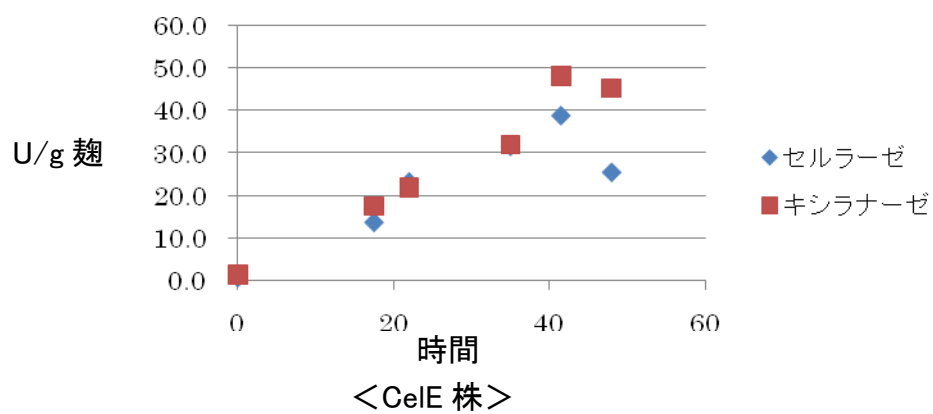
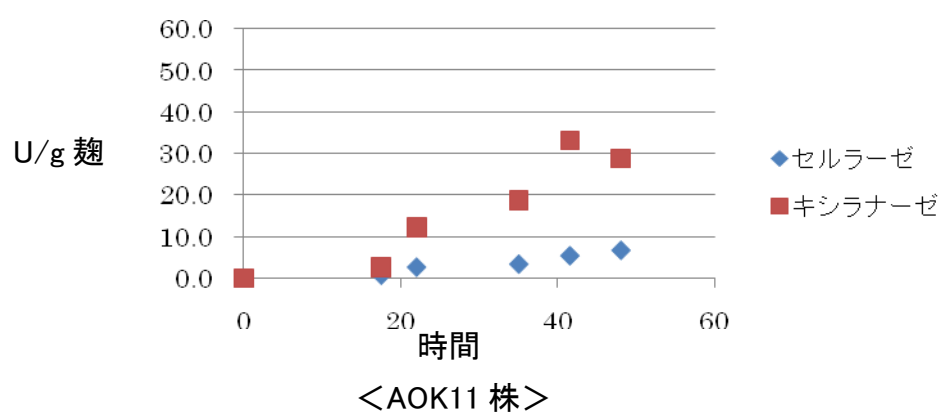


図 7 実証プラントにおける酵素生産

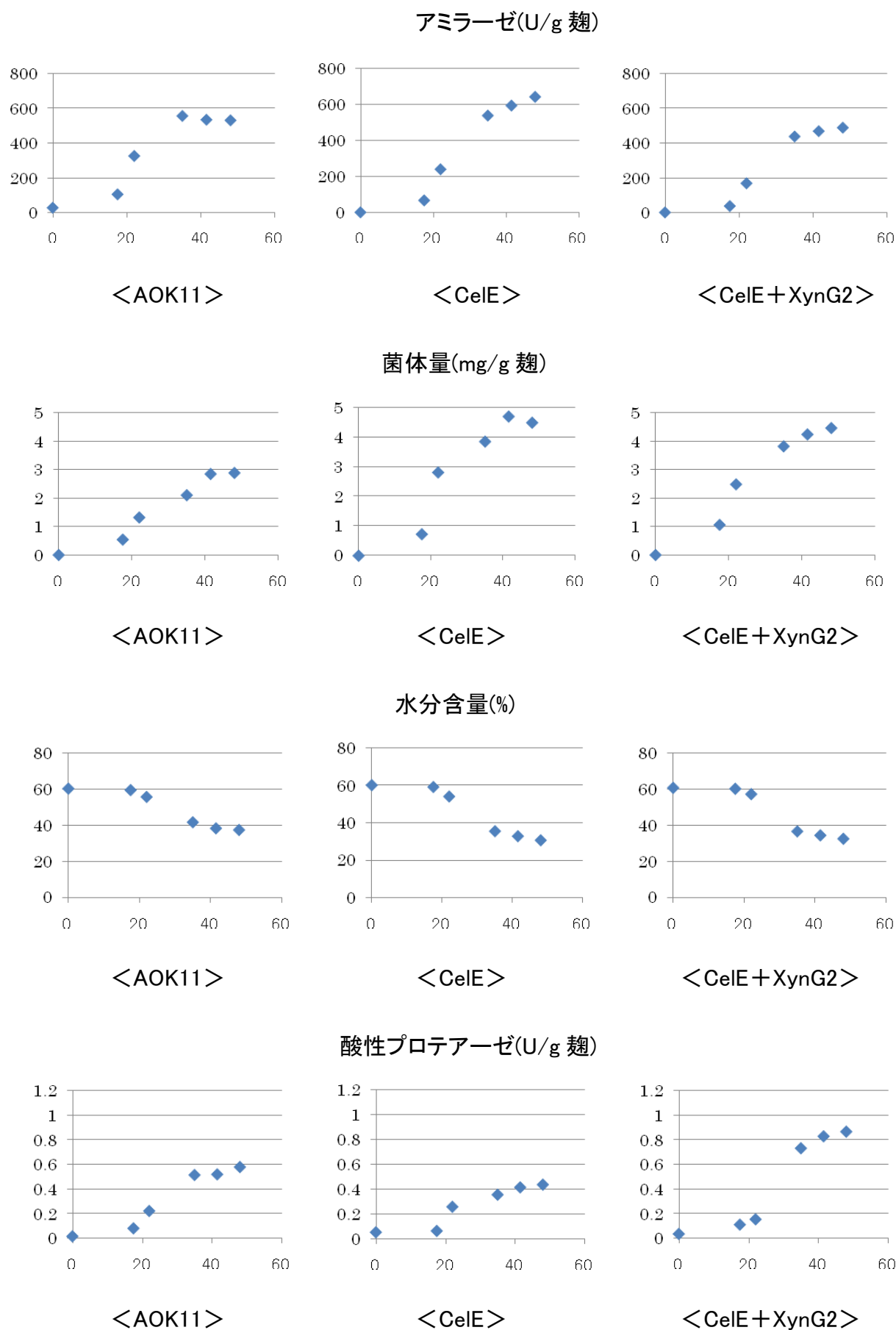


図 8 実証プラントにおける培養経過(横軸は時間)

5-3 まとめと課題

本研究(今年度)においては、昨年度までに多様な品温と水分状態の制御が再現良く内部制御することが可能となる中規模の試験固体培養法としてあらたに考案構築した無通風箱培養法の特性を理解し、それをもとにした条件検討による最適化を行い、これらの知見をもとにセルラーゼ高発現株を用いたプラント(大規模)による大量生産の実証を目指した。

特性を理解するために、麹菌が多様に生産分泌する各種酵素の生産性について一定環境下(30℃、95%RH)での検討を行ったところ、検討したいずれの酵素も従来法と比べて初発の水分含量がより高水分で高生産できることが判った。しかもその生産性は従来法以上であり、効率的な固体培養が実現できることを示すことができた。しかしながら、本培養法はその原理と検討結果からもより乾く培養経過をたどることから菌体量を維持することが重要であると思われる。全体の絶対生産量を向上させることを考えると、将来いろいろと想定される各素材(培養基質)と菌体(種)に対する最適な培養条件(初期と経過)をそれぞれに検討し設定することが必要であり、この観点からも本培養法の特性(中規模で培養状態(品温や水分状態)を再現性よく試験培養ができ、この知見をさらなる拡大培養時に適応可能)は極めて優れたものであるといえる。

次に、水蒸気分圧を指標に温度と湿度を変えた一定環境下で、セルラーゼおよびキシラナーゼの生産に及ぼす影響について検討し、セルラーゼとキシラナーゼの高生産に最も適した培養条件(100%加水、30℃、80%RH)を確立することができた。このとき従来法と比べてセルラーゼで2倍以上、キシラナーゼで1.5倍以上の高生産となった。さらに、この条件下において、別に構築されたセルラーゼ他の合計10株の高発現株についての生産性評価も行い、これらがそれぞれに極めて高い生産性を示すことを明らかにするとともに、そのなかで最も生産性に優れていたCelE株(β エンドグルカナーゼを親株の5倍以上(従来法の12倍以上)生産できた)を用いて実証プラントにおける培養による大量生産の検証を行ったところ、同等(もしくはそれ以上)の高生産性を実現することができた。加えて実証プラントによる培養では、キシラナーゼの生産がさらに向上していること、プロテアーゼの生産が低いレベルで抑えられていることなど、無通風箱培養法とは異なるさらなる優位性も確認できた。これらについては、実証プラントにおける培養状態(特に水分)の制御管理が若干異なる経過をたどることなどが影響していることが示唆される。今後これらの観点からの詳細な検討も必要である。

5-4 3年間の総括

本分担課題では、目的とするセルロース系バイオマスの分解には固体培養により安価で大量に生産される高活性なセルラーゼ(複合酵素)が必要かつ最適であると考え、セルラーゼの効率的な高生産が可能な糸状菌の固体培養法を開発することを目的とした。一般に固体培養は、微生物(特に糸状菌)を用いた物質生産(ないしは処理)において注目される技術であるものの、物質の低移動性により均一で効率的な制御が難しく再現性が低いことがプロセスを達成実現する上での大きな障害となっている。そこで本研究においては、特に小麦フスマと麹菌を用いた固体培養において、再現性の高い均一で効率的な培養制御を実現することで、最適化された培養条件のもとセルラーゼの高生産が可能となることを示すことを目指した。

小規模試験において、培養開始時の基質(処理した小麦フスマ)の水分は低水分であることが重要であることに加えて、培養過程における水分状態の管理調節が酵素生産に最も重要かつ必要であることが明らかとなった。しかし、固体培養においては小規模試験のままでは、その不均一性から再現性が低いことに加え、実質水分状態の制御は不可能である。しかも、拡大時との培養状態(特に品温と水分状態)が大きく異なってくる。これらの問題

を解決すべく、実証プラントにも適応可能な中規模の固体培養モデルとして、透湿性フッ素樹脂膜を利用した無通風箱培養法を考案構築した。そしてこの方式により環境(恒温恒湿器)の温度と湿度を適切にコントロールすることで、精度かつ再現性のよい固体培養における品温と水分状態の管理制御が可能となることを示した。

そしてこの無通風箱培養法における麹菌の酵素生産特性を把握したところ、培養開始時の水分含量ができるだけ低水分であることが重要とされてきた従来法と比べ、より高水分含量で麹菌が最大の酵素生産を示すことが判った。これにより菌体量の維持も十分可能となった。すなわち無通風箱培養法は、麹菌の酵素生産能力を効率的かつ十分(今以上に)引き出すことができる極めて優れた培養方法だといえる。このように麹菌の酵素生産特性にも影響を及ぼしていることも興味深い。さらに、水蒸気分圧を指標に温度と湿度を変えた一定環境下で、酵素生産に及ぼす影響について検討し、セルラーゼの高生産に最も適した培養条件(100%加水、30℃、80%RH)を確立した。このとき従来法と比べて2倍以上の高生産となった。同時にそれぞれの酵素による生産特性の違いも明らかとなった。

また無通風箱培養法で確立できた条件において、別に構築されたセルラーゼ他の高発現株についての生産性評価も行い、これらがそれぞれに極めて高い生産性を示すことも明らかとなった。なかでも CelE 株を用いることによりセルラーゼ(β エンドグルカナーゼ)を親株の5倍以上、XynG2 株を用いることによりキシラナーゼを親株の4倍以上向上することができた。このようにセルラーゼおよびキシラナーゼを高生産することができた小麦フスマ麹(AOK11、CelE、XynG2)は、本研究全体の目的でもある糖化反応へ供し実際に糖化できることを確認している。

そしてこれら(AOK11、CelE 株)を最終的に実証プラントにおける培養で検証し、同等(もしくはそれ以上)の高生産性を実現することができた。加えて実証プラントによる培養では、キシラナーゼの生産がさらに向上していること、プロテアーゼの生産が低いレベルで抑えられていることなど、無通風箱培養法とは異なるさらなる優位性も確認できた。

以上、無通風箱培養法は実証プラントに適応可能なモデルとして優れた特性をもつことが示されたと同時に、これらの検討条件をもとに実証プラントを用いたセルラーゼおよびキシラナーゼの効率的な高生産が実現できることを明らかにした。今後は、タンパク質生産分泌や固体培養環境(品温や水分)の観点からもこれらの高活性の要因を詳細に検討する必要があるが、今回開発した技術を基盤として、適応していく菌種やそれぞれに対する最適化を考慮していくことで、糸状菌の固体培養による物質生産技術のさらなる可能性が展開できるものと確信している。

第6章 併行複発酵における反応速度論的及び反応工学的エタノール生産プロセスの最適化条件の確立

【実施機関】 国立大学法人岡山大学、株式会社フジワラテクノアート、株式会社イングレディア・ソリューション

6-1 平成20年度成果の要約

- (1) バイオマスとして小麦フスマを用い、市販糖化酵素製剤およびパン酵母による併行複発酵における操作条件の検討を行った。
- (2) バイオマスとして小麦フスマを用い、育種された複合酵素発現糸状菌および糖化遺伝子組込み酵母による併行複発酵を行った。
- (3) バイオマスとして籾殻を用い、市販糖化酵素製剤およびパン酵母による併行複発酵を行い、籾殻におけるエタノール発酵の課題を探索した。

6-2 研究開発成果

6-2-1 研究開発項目の目的および概要

本研究開発の目的は、糸状菌によるバイオマス糖化（一次糖化）および酵母によるアルコール生成（二次糖化）を同時に進行させる発酵方法である併行複発酵の最適条件の確立である。この目的を達成するために、研究開発を下記に示すように3段階に分けて行うことにした。

- 1) 第1段階：モデル基質である結晶セルロース、市販セルラーゼおよびパン酵母を用いたモデル発酵に対する反応挙動の解明および速度論的解析を行う。
- 2) 第2段階：モデル基質の代わりにバイオマスを用いて、市販セルラーゼとパン酵母を用いた併行複発酵を行う。
- 3) 第3段階：育種された複合酵素発現糸状菌と高エタノール生産酵母を用いた、バイオマスからの併行複発酵を行う。最終的な成果目標は、15% エタノール生産における発酵期間半減を可能とする発酵条件の確立である。

昨年度、バイオマスとして小麦フスマを用いて、前処理条件の検討および市販糖化酵素による糖化反応の条件検討を行った。その結果、140°C、0 h 水熱処理した小麦フスマをメイセラゼおよび Novozyme®188 で糖化することにより、小麦フスマから遊離可能なグルコース量のおよそ9割が遊離することが分かった。また、得られた小麦フスマ糖化液にパン酵母を添加し、併行複発酵を行ったところ、遊離可能なグルコース量から算出される理論収率のおよそ9割に相当するエタノールが生成した。

本年度は、第2および3段階の研究開発項目の検討を目的とした。まず、バイオマスとして小麦フスマを用い、市販糖化酵素製剤とパン酵母によるモデル併行複発酵における操作条件を検討した。次に、市販糖化酵素製剤とパン酵母の代わりに、育種された複合酵素発現糸状菌と糖化酵素組込み酵母を用いて併行複発酵を行った。また、小麦フスマにおける最適な前処理、糖化およびエタノール発酵の条件を参考に、籾殻を用いた併行複発酵を行い、籾殻におけるエタノール発酵の課題を探索した。

6-2-2 実験方法

6-2-2-1 併行複発酵

(1) 使用したバイオマス

バイオマスとして、小麦フスマまたは籾殻を用いた。成分分析の結果、小麦フスマには、26wt%デンプン、7wt% セルロースおよび 17wt% ヘミセルロースが含まれていた。また、籾殻には、0.4wt% デンプン、36wt% セルロースおよび 15wt% ヘミセルロースが含まれていた。

(2) バイオマスの前処理

前処理として、水熱処理または希硫酸処理を行った。水熱処理は、バイオマスを 2 または 3 容量の水で懸濁させた後、120, 130 または 140°C で、保持時間 0 h の条件で、誘導攪拌式オートクレーブユニット ((株) 東洋高圧) を用いて行った。また、籾殻の希硫酸処理は、170°C, 0 h 水熱処理した籾殻に、1%(v/v)となるように硫酸を添加し、120°C, 45 min の条件で、オートクレーブ SX-500 ((株)トミー精工) を用いて行った。

(3) 市販糖化酵素製剤または複合酵素発現糸状菌による糖化反応

市販糖化酵素製剤として、メイセラゼ ((株) 明治製菓) および Novozyme®188 ((株) シグマアルドリッチ) を用いた。酵素量は、メイセラゼでは乾燥粉末重量で、Novozyme®188 では溶液重量で表した。Novozyme®188 の添加量は、メイセラゼの 1/4 量とした。複合酵素発現糸状菌として、親株 *Aspergillus oryzae* AOK11、エンドグルカナーゼ CelE 高発現株およびキシラナーゼ XynG2 高発現株のフスマ麴を用いた。

前処理したバイオマスを pH 4.2 に調整後、バイオマスの乾燥重量の 0.0125~1% 量のメイセラゼと 0.0031~0.25% 量の Novozyme®188 または 20% 量のフスマ麴を添加し、130 strokes/min, 45°C で 3~24 時間糖化反応を行った。得られたバイオマス糖化液を本培養液として使用した。

(4) 酵素活性の測定法

市販糖化酵素製剤に含まれるセルラーゼ活性、セロビアーゼ活性、 β -グルコシダーゼ (BGL) 活性、デンプン糖化活性、グルコアミラーゼ活性、 α -グルコシダーゼ活性、 α -アミラーゼ活性およびキシラナーゼ活性はいずれも 45°C, pH 4.5 の条件で測定した。なお、酵素活性 1 U は、45°C, pH 4.5 で、1 分間に、1 μ mol の生成物が生じるのに必要な酵素量と定義した。

セルラーゼ活性の測定では、2% (w/v) 濾紙懸濁液に酵素を添加し反応を行い、生成還元糖濃度を測定した¹⁾。セロビアーゼ活性の測定においては、7.5 mM セロビオース水溶液を用い、生成グルコース濃度を測定した¹⁾。BGL 活性の測定では、7.5 mM *p*-ニトロフェニル- β -グルコシド (*p*-NPG) 水溶液を用い、生成した *p*-ニトロフェノール (*p*-NP) 濃度を測定した。デンプン糖化活性の測定では、1% (w/v) デンプン水溶液を用い、生成グルコース濃度を測定した。グルコアミラーゼおよび α -グルコシダーゼ活性の測定においては、糖化力分別定量キット (キッコーマン) を使用した。 α -アミラーゼ活性の測定においては、 α -アミラーゼ測定キット (キッコーマン) を用いた。キシラナーゼ活性の測定では、0.5% (w/v) キシラン水溶液を用い、生成還元糖濃度を測定した。

(5) 糖化反応に及ぼすグルコースの阻害の影響

0~20 g/L (0~110 mM)グルコースを含む 0.25~2 mM *p*-NPG 溶液を用いて、BGL による糖化反応に及ぼすグルコースの阻害の影響を調べた。

(6) 併行複発酵に使用した酵母

市販パン酵母として、カネカ生イーストを用いた。糖化遺伝子組込酵母として、BGL 産生酵母の *Saccharomyces cerevisiae* RAK4228 株および *S. cerevisiae* RAK4230 株を用いた²⁾。

(7) 培地

平板培地には、YPD 寒天培地 (2% (w/v) グルコース, 2% (w/v) ポリペプトン, 1% (w/v) 酵母エキス) を用いた³⁾。前培養液は、基本培地 (0.5% (w/v) KH_2SO_4 , 0.2% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.04% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2% (w/v) 酵母エキス, pH 4) に、終濃度が 50 g/L となるようにグルコースを添加して調製した。本培養液には、100 g/L グルコースを含む基本培地またはバイオマス糖化液を用いた。

(8) 酵母の前培養

250 mL 前培養液を含む 500 mL 坂口フラスコまたは 800 mL 前培養液を含む 2 L 坂口フラスコに、YPD 寒天培地上で単離した酵母を植菌し、 $OD_{660} = 2.0 \sim 4.0$ になるまで、 30°C 、120 strokes/min で振盪培養した。

(9) エタノール発酵

50 mL 本培養液を含む 100 mL 三角フラスコに、 $OD_{660}=2.0$ の前培養液 100 mL から回収した酵母（乾燥重量：50 mg）を植菌し、 30°C 、130 rpm で振盪培養した。また、4 kg 小麦フスマ懸濁液を用いた併行複発酵においては、4 kg 小麦フスマ糖化液を含む 10 L 丸型瓶に、 $OD_{660}=4.0$ の前培養液 4 L から回収した酵母（乾燥重量：4 g）を植菌した。経時的に、本培養液をサンプリングし、菌体濃度、グルコース濃度、エタノール濃度、生菌率および BGL 活性を測定した。

6-2-2-2 分析および定量の方法

(1) 菌体濃度の測定^{4, 5)}

培養液を $OD_{660}=0.2 \sim 0.5$ の範囲となるように生理食塩水で希釈し、 OD_{660} を測定した。菌体の乾燥重量は、あらかじめ調べておいた OD_{660} と乾燥菌体重量との関係から換算して求めた（換算係数 = $0.252 \text{ (g/L/} OD_{660})$ ）。

(2) グルコースの定量法

培養液中のグルコース濃度は、グルコース CII-テストワコー（和光純薬工業）を用いて測定した。

(3) エタノール濃度の定量⁶⁾

培養液中のエタノール濃度は、アルコールデヒドロゲナーゼによる酵素定量法により測定した。

(4) 生菌率の測定³⁾

6-2-2-2 (1) で調製した $OD_{660}=0.2 \sim 0.5$ の細胞懸濁液に、等量の 0.3 mM メチレンブルー／68 mM クエン酸ナトリウムバッファー（pH 5.5）を添加し、5 分間室温でインキュベーション後、細胞計数盤に注入した。生菌数（染色しない菌体）および死菌数（青く染色された菌体）をカウントし、生菌率を算出した。

(5) 全糖の定量方法

全糖の定量は、フェノール・硫酸法により行った⁷⁾。

(6) 還元糖の定量方法

還元糖の定量は、ソモギーネルソン法により行った⁸⁾。

(7) 薄層クロマトグラフィー (TLC) による糖の分析

標品として、グルコース、マルトース、セロビオースおよびキシロースを用い、 R_f 値から、サンプルに含まれる糖の同定を行った。サンプルおよび標品を $12 \times 10 \text{ cm}$ の Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) にスポットした後、 n -プロパノール：酢酸エチル：水 = 30：5：15 の組成からなる展開溶媒⁹⁾で 2 時間展開した。展開後、よく乾燥させた TLC 上に、0.25 mg/mL Novozyme®188 水溶液を塗布し、 45°C で 1 時間インキュベーションした。得られた TLC を硝酸銀水溶液で発色させた。

6-2-3 実験結果および考察

6-2-3-1 市販糖化酵素とパン酵母による小麦フスマの併行複発酵の操作条件の検討

(1) 小麦フスマを懸濁させる水の容量の検討

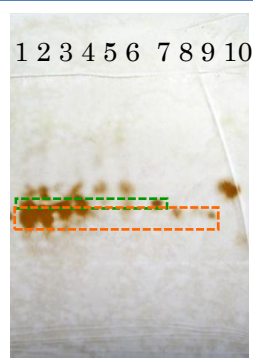
小麦フスマを懸濁させる水の容量を 2, 3 または 4 容量に変化させて、市販糖化酵素製剤およびパン酵母を用いた併行複発酵を行った。表 1 に、生成グルコース濃度、糖化率、生成エタノール濃度および生成エタノール量の比較を示す。水の比率が小さくなるのに伴

い、糖化率は低下したが、生成エタノール量はどの条件においても、遊離可能なグルコース量から算出される理論収量のおよそ 9 割に相当する量であった。その理由として、糖化反応がグルコースによる阻害の影響を受けているものと考えられる。そこで、2 容量の水で懸濁した小麦フスマを併行複発酵した時の反応溶液に含まれる糖を TLC により分析した。結果を図 1 に示す。まず、レーン 1 の併行複発酵開始時には、グルコースとオリゴ糖に相当するスポットが顕著に見られるが、レーン 2 の併行複発酵 2 h 後のサンプルでは、グルコースがほとんど消失した。しかし、レーン 3 および 4 の併行複発酵 4~6 h のサンプルでは、オリゴ糖のスポットが薄くなるに伴い、グルコースのスポットが顕著に見られた。その後、グルコースも反応の進行に伴い、消滅した。したがって、糖化反応時に残存していたオリゴ糖が、併行複発酵により、全てグルコースに糖化されたことが定性的に確認できた。以上の結果から、本研究において、併行複発酵は有用な手法であることが示された。

また、表 1 に示すように、小麦フスマ 1 g あたりの生成エタノール量は、1:3 および 1:4 の時に比べて、1:2 の比率では小さくなった。その理由として、1:2 の比率で反応を行った時に、エタノールを含む濾液の回収量が顕著に低かったためと考えられる。そこで、以降の実験では、小麦フスマと水の比率を 1:3 にして反応を行うことにした。

表 1 小麦フスマと水の比率を変化させた時の生成グルコース濃度、糖化率、生成エタノール濃度および生成エタノール量の比較

小麦フスマ：水の比率 (小麦フスマに対する水の容量)	1:2 (2 容量)	1:3 (3 容量)	1:4 (4 容量)
生成グルコース濃度 (g/L)	105	82	73
糖化率 (%)	66	77	91
生成エタノール濃度 (g/L)	69.5	53	40.1
生成エタノール量 (g/g-小麦フスマ)	0.112	0.146	0.144



レーン 1; 併行複発酵開始時, 2; 併行複発酵 2 h, 3; 併行複発酵 4 h, 4; 併行複発酵 6 h, 5; 併行複発酵 9 h, 6; 併行複発酵 21 h, 7; グルコース標品, 8; セロビオース標品 9; マルトース標品, 10; キシロース標品

図 1 TLC による併行複発酵時の糖組成の分析

(2) BGL 活性に及ぼすグルコースによる阻害の影響

糖化反応において、生成したグルコースやセロビオースにより、セルラーゼや BGL による糖化反応が阻害されることはよく知られている¹⁰⁻¹²⁾。また、昨年度の検討結果から、市販糖化酵素製剤 Novozyme®188 に含まれる BGL がグルコースにより阻害されることが示唆された。そこで、BGL 活性のグルコースによる阻害の型式および阻害剤定数の算出を行った。図 2 に示す L-B plot から、阻害型式は拮抗阻害で、阻害剤定数 K_i はおよそ 10 mM (1.8 g/L) であることが分かった。阻害剤定数の値は、文献値 $K_i=3\sim14$ mM^{13, 14)} と同程度であった。また、多くの糸状菌由来 BGL のグルコースによる阻害は、拮抗阻害であ

ることが報告されている¹⁴⁾。

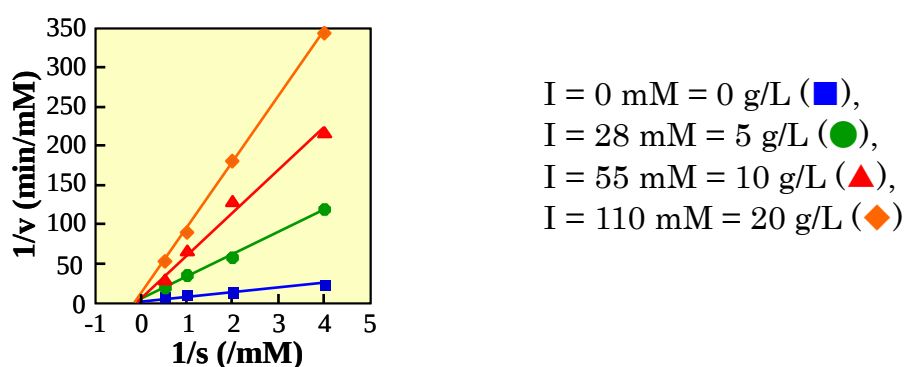


図2 BGL のグルコースによる阻害における L-B の逆数プロット

以上の結果から、小麦フスマの糖化反応時には、BGL による糖化反応のグルコースによる阻害が非常に強いため、併行複発酵を行うことで、グルコースによる阻害が緩和され、効率良くエタノールが得られると考えられる。そこで、BGL 活性は、併行複発酵開始時に添加することが効果的であると考えられる。

(3) 水熱処理の温度条件の検討

昨年度の前処理条件の検討において、 140°C より低い温度条件での水熱処理の検討を行っていなかったため、 120°C (●) または 130°C (■) で水熱処理した小麦フスマを用いて併行複発酵を行い、 140°C で水熱処理した小麦フスマ (▲) との比較を行った。図 3 に、併行複発酵時のグルコース濃度 (○, □, △) およびエタノール濃度 (●, ■, ▲) の経時変化のグラフを示す。どの水熱処理温度においても、生成グルコース濃度に差は見られなかったが、生成エタノール濃度は 140°C で処理した場合に最大となった。よって、 140°C より低い温度条件では、小麦フスマの構造変化が不十分であるため、酵素糖化により遊離するグルコース量が低下したと考えられる。従って、以降の実験では、小麦フスマの前処理として、 140°C , 0 h の条件で水熱処理を行うことにした。

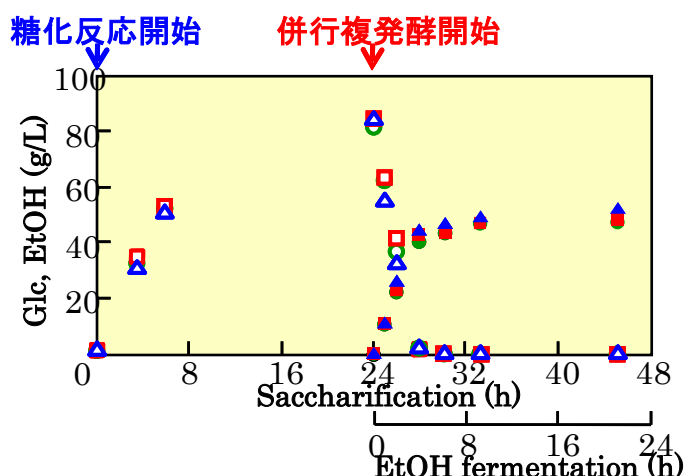


図3 異なる温度条件で水熱処理した小麦フスマを用いた併行複発酵におけるグルコースおよびエタノール濃度の経時変化

(4) 市販糖化酵素の濃度の検討

140°C , 0 h 水熱処理した 33% (w/v) 小麦フスマ懸濁液に、小麦フスマ乾燥重量の 0.0125 (▲), 0.025 (▼), 0.05 (■), 0.1 (◆) または 1% (●) のメイセラーゼおよびその 1/4 量の Novozyme 188 を添加し、24 時間糖化反応後、パン酵母を添加して併行複発酵を行

った。図4に、グルコース（△, ▽, □, ◇, ○）およびエタノール濃度（▲, ▼, ■, ◆, ●）の経時変化の結果を示す。24 h 糖化反応を行った場合、最も低い酵素濃度でも、理論エタノール収率のおよそ 88% に相当する 5.2% (w/v) のエタノールが生成した。よって、以降の実験では、小麦フスマ乾燥重量の 0.0125% のメイセラゼとその 1/4 量の Novozyme 188 を用いることにした。この反応においては、原料の小麦フスマ 1 g あたり、デンプン糖化活性 = 5 U、 α -アミラーゼ活性 = 0.1 U、BGL 活性 = 0.5 U、セルラーゼ活性 = 0.1 U、キシラナーゼ活性 = 0.03 U の酵素活性が含まれている計算となる。よって、糖化酵素発現糸状菌および酵母を用いた併行複発酵を行う場合、これらの酵素活性の値を基準として、フスマ麴および酵母の添加量を決定することにした。

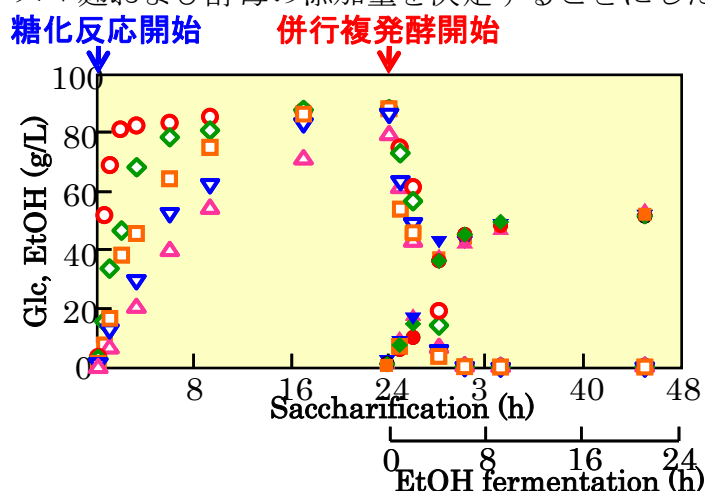


図4 異なる市販糖化酵素濃度での併行複発酵におけるグルコースおよびエタノール濃度の経時変化

(5) 酵母の添加時期の検討

酵母の添加時期を糖化後 3 (●), 6 (■) および 24 h (▲) に変化させて併行複発酵を行った。図5に、併行複発酵時のグルコース濃度 (A) およびエタノール濃度 (B) の経時変化を示す。まず、図5 (A) に示すように、小麦フスマ糖化液のグルコース濃度は、糖化 3 h では 39.1 g/L、糖化 6 h では 51.7 g/L、糖化 24 h では 80.3 g/L であった。それぞれの糖化液にパン酵母を添加してエタノール発酵を開始したところ、図5 (B) に示すように、24 h 糖化反応を行った場合、5.2% (w/v) のエタノールが得られたが、糖化反応 3 または 6 h の場合には、24 h 糖化反応を行った時のおよそ 8 割のエタノールしか得られなかった。以上の結果から、小麦フスマ乾燥重量の 0.0125% のメイセラゼとその 1/4 量の Novozyme 188 を用いた場合、高収率でエタノールを得るためには、24 時間糖化反応を行う必要があることが分かった。

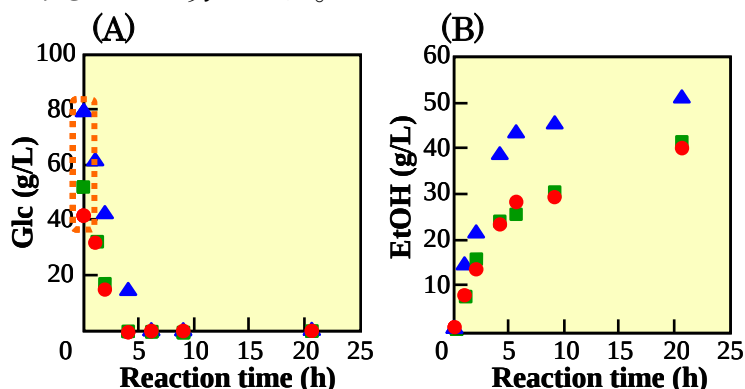


図5 酵母の添加時期を変えて併行複発酵を行った時のグルコース濃度 (A) およびエタノール濃度 (B) の経時変化

6-2-3-2 複合酵素発現糸状菌と BGL 産生酵母を用いた併行複発酵

(1) BGL 産生酵母のエタノール発酵能の評価

6-2-3-1 (2) で述べたように、BGL 活性は併行複発酵時に添加するのが効果的であると考え、糖化遺伝子組込み酵母として、BGL 産生酵母を用いることにした。まず、2 種類の BGL 産生酵母 (*S. cerevisiae* RAK4228 株 (▲) および *S. cerevisiae* RAK4230 (■)) のエタノール発酵能をパン酵母 (●) と比較した。本培養培地には、10% グルコースを含む基本培地を用いた。結果を図 6 に示す。BGL 産生酵母の菌体増殖速度 (図 6 (A)) およびグルコース消費速度 (図 6 (B)) は、パン酵母のおよそ 1/2~1/3 となった。エタノール生成速度もパン酵母のおよそ 1/2~1/3 程度であったが (図 6 (C))、どちらの BGL 産生酵母においても、最終生成エタノール濃度はパン酵母を用いた場合と同程度になった。生菌率を比較したところ、図 6 (D) に示すように、パン酵母に比べ、BGL 産生酵母の方が高い生菌率を保持していた。また、2 つの BGL 産生酵母について BGL 活性を比較してみると、*S. cerevisiae* RAK4228 株では、培養 2 時間で 0.06 U/mL に増加した後、培養 24 時間まではほぼ一定の酵素活性を示したが、*S. cerevisiae* RAK4230 株の BGL 活性は、培養 4 時間後から増加し始め、培養 12 時間後に 0.19 U/mL に達した。以上の結果から、どちらの BGL 産生酵母も、菌体増殖速度、グルコース消費速度およびエタノールの生成速度はパン酵母に比べて遅いものの、パン酵母と同程度のエタノール発酵能、パン酵母よりも高い安定性および BGL 産生能を有することが確認できた。

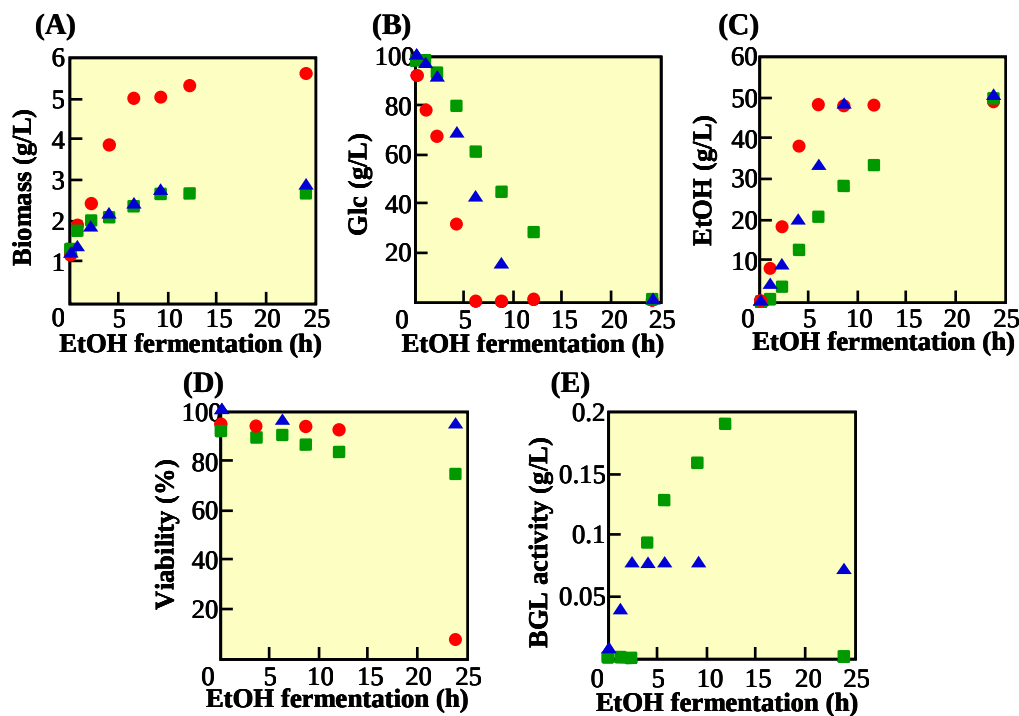


図 6 BGL 産生酵母またはパン酵母を用いたエタノール発酵における菌体濃度 (A)、グルコース濃度 (B)、エタノール濃度 (C)、生菌率 (D) および BGL 活性 (E) の経時変化

(2) *A. oryzae* AOK11 株の糖化活性の評価

複合酵素発現糸状菌の親株である *A. oryzae* AOK11 株の糖化活性を評価した。原料の小麦フスマ 1 g あたり、5 U のデンプン糖化活性となるように、市販糖化酵素 (◆) または *A. oryzae* AOK11 株のフスマ麴 (●) を添加して糖化反応を行い、生成グルコース濃度を比較した。結果を図 7 に示す。どちらの反応においても、経時的にグルコース濃度がよく似た挙動で増加し、反応 24 時間でおおよそ 80 g/L に達した。従って、*A. oryzae* AOK11 株のフスマ麴は、市販糖化酵素と同程度の糖化活性を有することが確認できた。

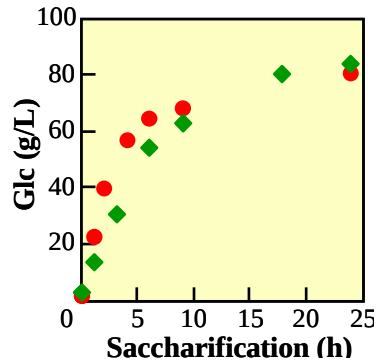


図7 市販糖化酵素または *A. oryzae* AOK11 株を用いた糖化反応時のグルコース濃度の経時変化

(3) *A. oryzae* AOK11 フスマ麴の添加量

A. oryzae AOK11 フスマ麴に含まれる酵素活性を測定した。フスマ麴 1 g あたり、デンプン糖化活性 = 40 U、セルラーゼ活性 = 0.51 U およびキシラナーゼ活性 = 2.9 U であった。そこで、6-2-3-1(4) で算出した原料の小麦フスマ 1 g を糖化するのに必要な酵素活性（デンプン糖化活性 = 5 U、セルラーゼ活性 = 0.1 U およびキシラナーゼ活性 = 0.03 U）を満たすため、小麦フスマ乾燥重量の 20% のフスマ麴を添加することにした（デンプン糖化活性 = 8 U、セルラーゼ活性 = 0.1 U およびキシラナーゼ活性 = 0.5 U）。

(4) *A. oryzae* AOK11 フスマ麴とパン酵母または BGL 産生酵母を用いた併行複発酵

小麦フスマを *A. oryzae* AOK11 株のフスマ麴で糖化した後、パン酵母 (●), *S. cerevisiae* RAK4228 株 (▲) または *S. cerevisiae* RAK4230 株 (■) を添加して併行複発酵を行い、グルコース濃度、生成エタノール濃度、BGL 活性および生菌率の経時変化を比較した。結果を図8に示す。図8 (B) に示すように、生成エタノール濃度を比較すると *S. cerevisiae* RAK4230 株を用いた時に最大の 5.5% (w/v) となった。また、BGL 活性(図8 (C)) についても、*S. cerevisiae* RAK4230 株を用いた時に、発酵開始 6 時間で最大活性となる 2.2 U/mL に達した。この時の反応溶液には、原料の小麦フスマ 1 g あたり BGL 活性が 6.6 U 含まれる計算となるため、BGL 活性の基準値 0.5 U のおよそ 13 倍の値となった。従って、以降の実験では、BGL 産生酵母として *S. cerevisiae* RAK4230 株を用いることにした。

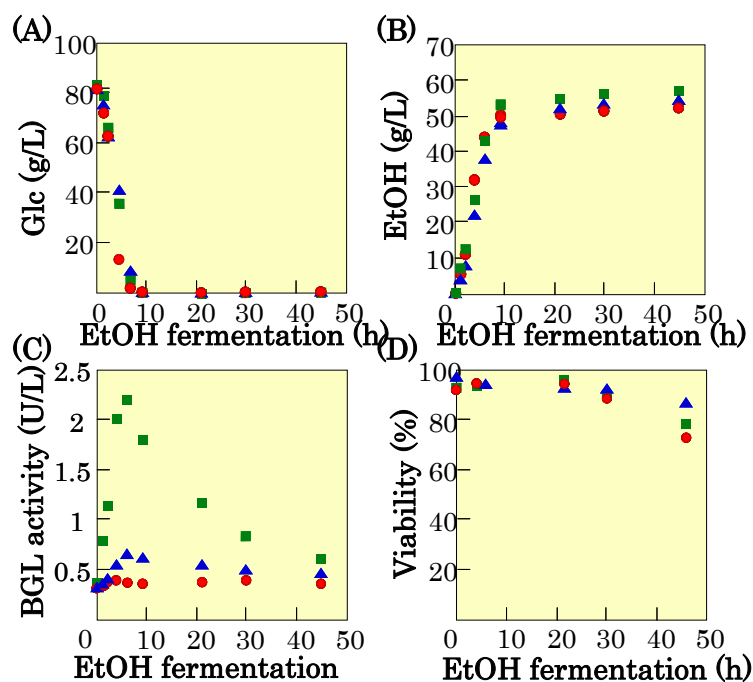


図8 *A. oryzae* AOK11 株のフスマ麴および BGL 産生酵母またはパン酵母を用いた併行複発酵におけるグルコース濃度 (A), エタノール濃度 (B), BGL 活性 (C) および生菌率 (D) の経時変化

(5) 複合酵素発現系状菌 (CelE および XynG2 高発現株) と BGL 産生酵母による併行複発酵

複合酵素発現系状菌として、CelE 高発現株 (◆)、XynG2 高発現株 (▲) および CelE 高発現株と XynG2 高発現株の混合培養 (■) のフスマ麴を用い、BGL 産生酵母 *S. cerevisiae* RAK4230 との併行複発酵を行い、親株 *A. oryzae* AOK11 (●) と比較した。糖化反応および併行複発酵時のグルコース濃度 (○, ◆, ▲, ■) およびエタノール濃度 (●, ◆, ▲, ■) の経時変化の結果を図 9 に示す。糖化反応後の生成グルコース濃度は、親株および CelE 高発現株を用いた時に、最大 70 g/L に達したが、XynG2 高発現株および混合培養のフスマ麴の場合、60 g/L にとどまった。また、エタノール濃度については、CelE 高発現株を用いた場合に、親株と同程度となり、XynG2 高発現株および混合培養のフスマ麴については、親株より若干低い濃度となった。このように、親株の代わりに遺伝子組換え株を用いても、生成エタノール濃度に影響が認められなかった。そこで、使用したフスマ麴の酵素活性を比較した。結果を表 2 に示す。CelE 高発現株では親株のおよそ 3 倍のセルラーゼ活性が、XynG2 高発現株ではおよそ 3 倍のキシラナーゼ活性が認められた。しかし、デンプン糖化活性を比較してみると、親株と CelE 高発現株ではほぼ同程度の活性がみられたが、XynG2 高発現株では親株の半分の活性しかみられなかった。今回バイオマスとして使用した小麦フスマは、デンプン含量が高いため、セルラーゼおよびキシラナーゼ遺伝子組換え株を用いてもその効果が発揮できなかったと考えられる。そのため、セルロースの含有量が多いバイオマスを基質とした併行複発酵では、反応時間の短縮やフスマ麴の添加量の低減が期待されると考えられる。

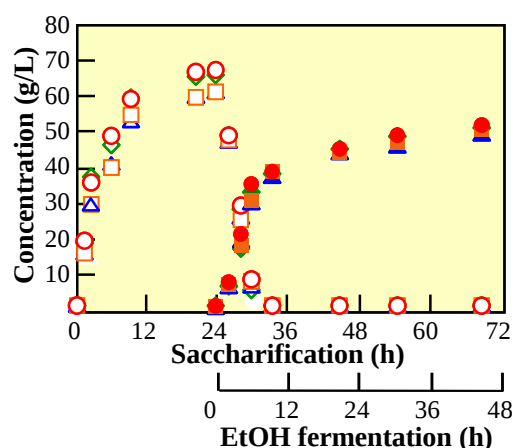


図9 複合酵素発現糸状菌と BGL 産生酵母 *S. cerevisiae* RAK4230 による併行複発酵におけるグルコースおよびエタノール濃度の経時変化

表2 親株 *A. oryzae* AOK11 と複合酵素発現糸状菌の酵素活性の比較

	AOK11 株 (U/g-フスマ 麴)	CelE 高生産 株 (U/g-フスマ 麴)	XynG2 高生 産株 (U/g-フスマ 麴)	CelE, XynG2 混合培養 (U/g-フスマ 麴)
デンプン糖化活 性	33.0	27.2	16.5	24.9
セルラーゼ活性	0.85	2.6	0.90	2.3
キシラナーゼ活 性	2.5	2.3	7.2	6.2

(6) 4 kg 小麦フスマ懸濁液を用いた併行複発酵

140°C で水熱処理した 33.3% (w/v) 小麦フスマ懸濁液 4 kg (1 kg 小麦フスマ/3 L 水) に、*A. oryzae* AOK11 株のフスマ麴 200 g を添加し、24 時間糖化後、*S. cerevisiae* RAK4230 を添加し、併行複発酵を開始した。45 時間エタノール発酵を行った後、濾液と残渣をそれぞれ回収した。各反応段階における溶液の様子を図10に示す。

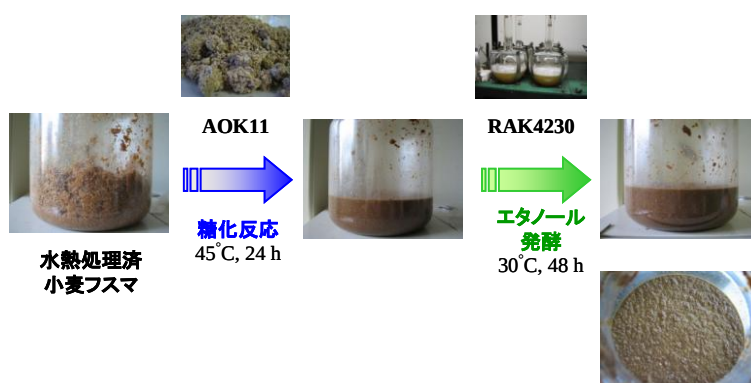


図10 4 kg 小麦フスマ懸濁液を用いた *A. oryzae* AOK11 株のフスマ麴および *S. cerevisiae* RAK4230 株による併行複発酵時の反応溶液の様子

また、糖化反応および併行複発酵時のグルコース濃度、エタノール濃度および BGL 活性の経時変化の結果を図11に示す。生成エタノール濃度は 55 g/L であった。得られた濾液

2.5 L は、同じ方法で調製した濾液 1.5 L とともに、第 8 章の蒸留・脱水試験に用いた。

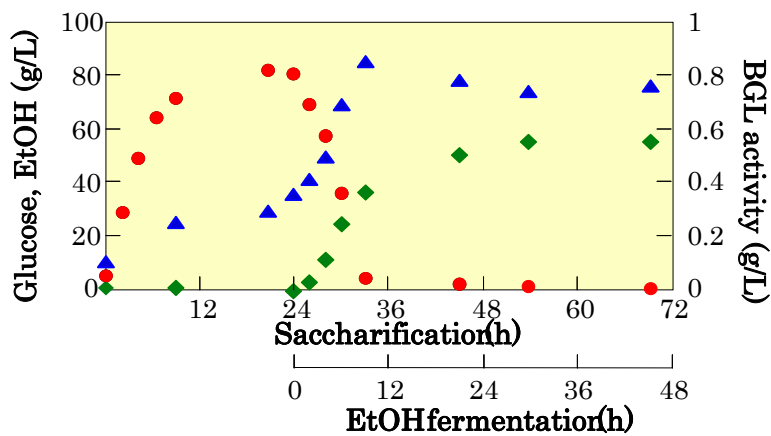


図 1 1 4 kg 小麦フスマ懸濁液を用いた *A. oryzae* AOK11 株のフスマ麴および *S. cerevisiae* RAK4230 株による併行複発酵時のグルコース濃度、エタノール濃度および BGL 活性の経時変化

6-2-3-3 粳穀を用いた市販糖化酵素およびパン酵母による併行複発酵

(1) 粳穀と小麦フスマの糖および成分組成の比較

粳穀と小麦フスマの糖および成分組成の比較を行った。結果を表 3 および 4 に示す。糖の組成を比較すると、グルコースの組成比は同程度であったが、アラビノースは小麦フスマに、キシロースは粳穀に多く含まれていることが分かった (表 3)。また、成分組成については、粳穀は小麦フスマと比較して、全窒素およびデンプン量が極端に少なく、リグニンおよびセルロースが多く含まれていることが分かる (表 4)。

粳穀に含まれる全糖量は、デンプン、セルロースおよびヘミセルロースの合計量とみなすことができるので、粳穀の乾燥重量 1 g あたり 517 mg と算出される。還元糖量および遊離可能なグルコース量は、デンプンおよびセルロースの合計量とみなすことができるので、粳穀 1 g あたり 364 mg 含まれることになる。しかし、遊離グルコース量は、水の付加を考慮し、1.1 を乗じて 400 mg と算出される。これらの全糖量、還元糖量および遊離可能なグルコース量を理論値とみなし、以降の計算に使用した。また、小麦フスマに含まれる全糖量および遊離グルコース量の理論値は、それぞれ 497 mg/g-小麦フスマ, 356 mg/g-小麦フスマであったことから、バイオマス 1 g あたりの遊離可能なグルコース量としては、粳穀の方が 1.1 倍多いことが分かった。

表 3 小麦フスマと粳穀における糖組成の比較

	グルコース (%)	アラビノース (%)	キシロース (%)
粳穀	27.6	1.6	12.6
小麦フスマ	34.8	5.7	8.5

表 4 小麦フスマと粳穀における成分組成の比較

	灰分 (%)	脂質 (%)	全窒素 (%)	リグニン (%)	澱粉 (%)	セルロース (%)	ヘミセルロース (%)
粳穀	17.6	0.7	0.24	16.3	0.4	36.0	15.3
小麦フスマ	4.0	3.4	2.8	2.1	25.7	6.7	17.3

(2) 籾殻の水熱処理

小麦フスマの前処理方法において、糖の遊離に最も効果的だった水熱処理を、籾殻について行った。温度条件を 140, 170 または 200℃ とし、保持時間を 0 h とした。前処理により遊離した全糖、還元糖およびグルコース量を、同様に水熱処理した小麦フスマの結果と比較した。結果を図 1 2 に示す。なお、遊離した全糖、還元糖およびグルコース量の値は、それぞれのバイオマスに含まれる全糖量の理論値に対する % で表した。籾殻においては、140℃ の時に比べ、170℃ 以上の温度条件において、遊離全糖量および還元糖量が増加したが、それぞれ全糖および還元糖量の理論値のおよそ 10% にすぎなかった。グルコースの遊離はほとんどみられなかった。また、同じ条件で処理した小麦フスマと比較したしても、籾殻の遊離全糖量は小麦フスマのそれに比べて極端に少ないことがわかった。

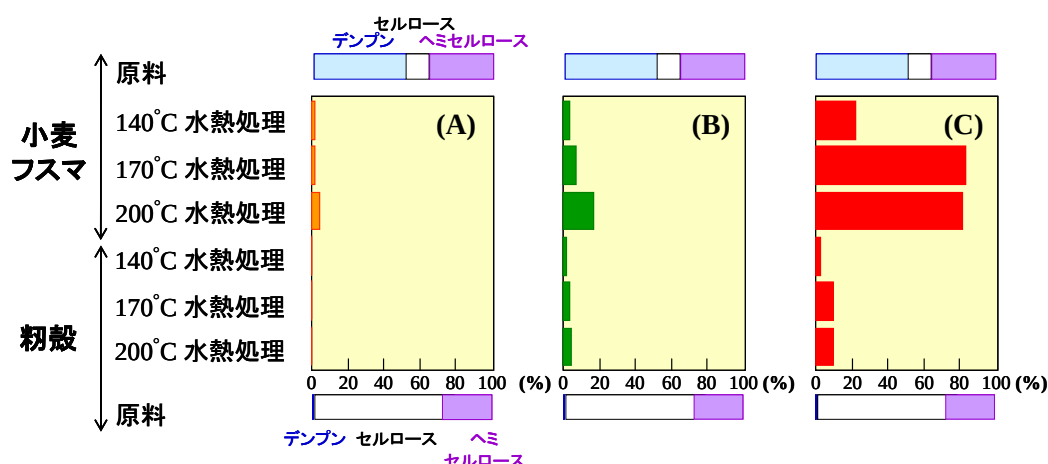


図 1 2 水熱処理により遊離するグルコース (A), 還元糖 (B) および全糖 (C) の比較

(3) 水熱処理した籾殻の糖化反応

140, 170 または 200℃, 0 h 水熱処理した籾殻を、籾殻の乾燥重量の 0.0125, 0.1 および 1% 量のメイセラゼおよびその 1/4 量の Novozyme 188 で 45℃, 24 h 糖化反応を行い、遊離した全糖、還元糖およびグルコース濃度を測定した。結果を図 1 3 に示す。170℃ で水熱処理した籾殻を 1% メイセラゼおよび 0.25% Novozyme 188 で糖化した時に、全糖、還元糖およびグルコース量の遊離が最大となったものの、遊離グルコース量は理論値のおよそ 10% 程度だった。この値は、140℃ で水熱処理した小麦フスマを酵素糖化した時の遊離可能なグルコース量の 6 分の 1 量にすぎなかった。また、遊離した全糖および還元糖量を比較しても、小麦フスマの結果と比較して、籾殻の方がかなり小さい値であった。このように、水熱処理した籾殻を用いた場合に糖の遊離量が小さい理由として、籾殻に含まれるリグノセルロースの構造が強固であるため、水熱処理では効果的な酵素糖化を行うのに必要な構造変化が行われていないと考えられる。

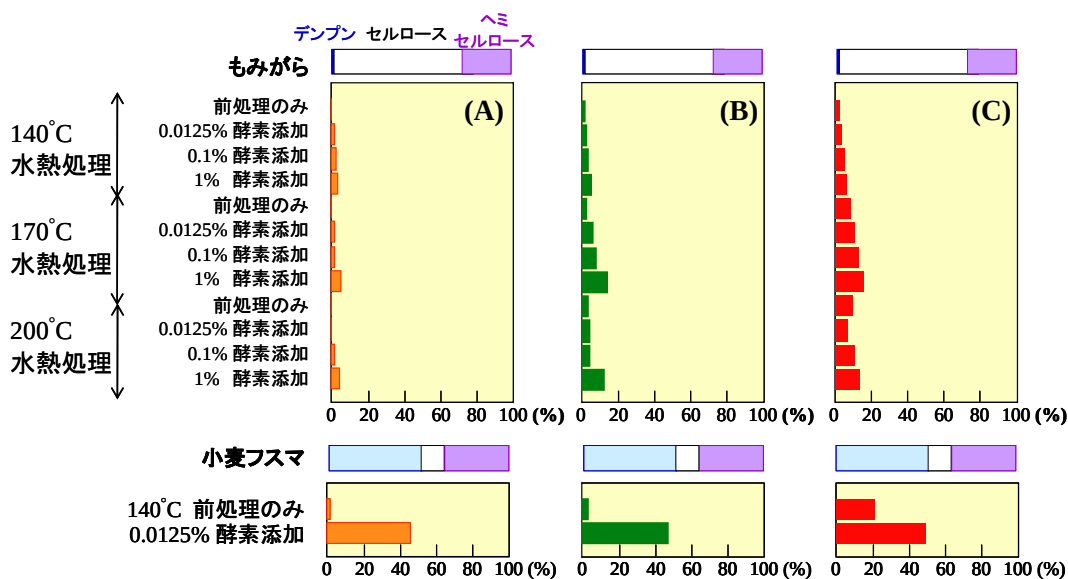


図 1 3 酵素糖化により遊離する グルコース (A), 還元糖 (B) および全糖 (C) の比較

(4) 希硫酸処理した籾殻の糖化反応

リグノセルロース系バイオマスの前処理方法として、酸処理が最も汎用されている¹⁵⁾。そこで、170°C で水熱処理した籾殻を、Saha らの方法¹⁶⁾に基づいて希硫酸処理後、糖化反応を行い、遊離したグルコース、還元糖および全糖濃度を測定した。その結果、図 1 4 に示すように、希硫酸処理を行うことにより、全糖および還元糖の遊離量は顕著に増加したが、それぞれ全糖および還元糖の理論値の 40% および 45% 程度であった。一方、遊離グルコース量はほとんど増加しなかった。以上の結果から、リグノセルロースの分解およびグルコース生成をより効果的に行うための前処理条件の検討が必要であると考えられる。また、小麦フスマにはデンプンが、籾殻にはセルロースが多く含まれるため、糖化に必要な酵素の組合せや添加量を検討する必要があると思われる。

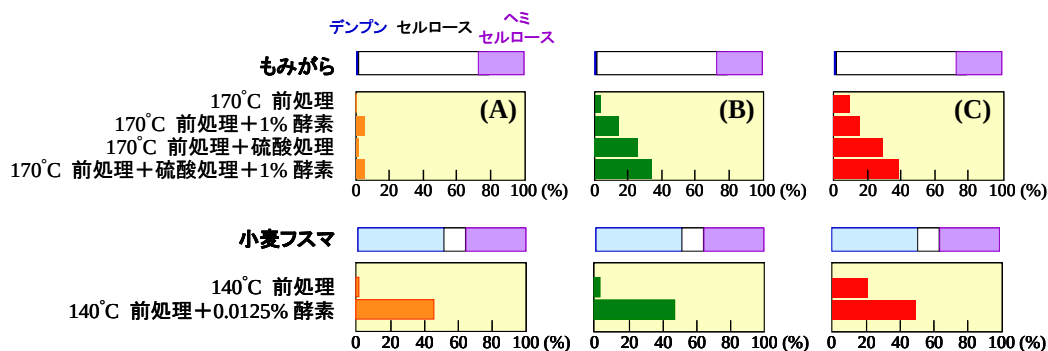


図 1 4 水熱処理または希硫酸処理済籾殻の糖化反応後のグルコース (A), 還元糖 (B) および全糖 (C) の比較

(5) 水熱処理した籾殻を用いた併行複発酵

140 (●), 170 (◆) または 200°C (▲) で水熱処理した籾殻を、1% 量のメイセラーゼとその 1/4 量の Novozyme 188 および市販パン酵母により併行複発酵を行った。図 1 5 に、反応溶液中のグルコース濃度 (○, ◇, △) およびエタノール濃度 (●, ◆, ▲) の経時変化のグラフを示す。

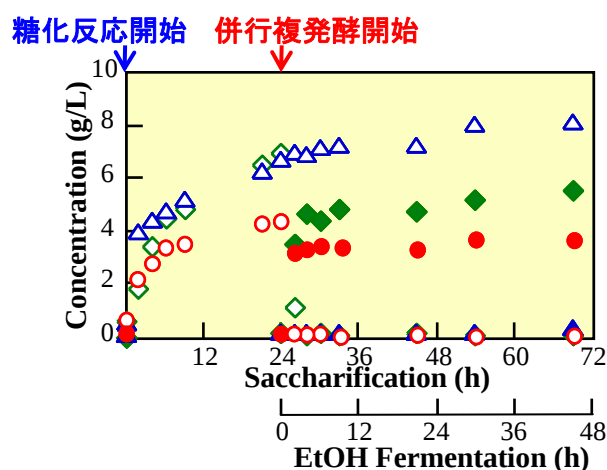


図 1 5 異なる温度で水熱処理した籾殻を用いた併行複発酵におけるグルコースおよびエタノール濃度の経時変化

140 または 170℃ で水熱処理した籾殻を用いた場合に、それぞれ 3.8 g/L および 5.6 g/L のエタノールが得られたが、この値は、小麦フスマを用いた併行複発酵時に得られたエタノール濃度の 10 分の 1 以下であった。しかも併行複発酵の初期の段階でエタノール濃度は一定となり、併行複発酵の効果はみられなかった。また、200℃ で水熱処理した籾殻を用いた場合、糖化反応により、170℃ で水熱処理した籾殻を用いた時とほぼ同程度のグルコースが生成したが、エタノール発酵は全く見られなかった。

次に、生菌率を比較してみたところ、表 1 6 に示すように、水熱処理温度が高くなるにつれて、死滅速度が速くなっていた。特に、200℃ で水熱処理した場合、生菌率の著しい低下が見られた。

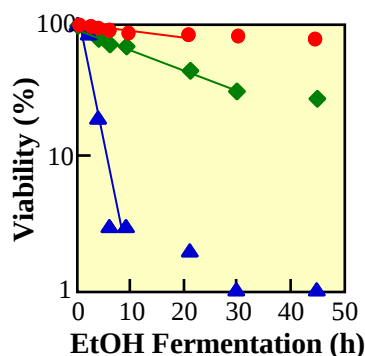


図 1 6 異なる温度で水熱処理した籾殻を用いた併行複発酵における生菌率の経時変化

以上の結果から、籾殻を用いた併行複発酵において、エタノールの生産性および酵母の安定性が低下する理由の 1 つとして、窒素源の不足および阻害物質の影響が考えられる¹⁷⁾。表 3 に示すように、籾殻には、元来、小麦フスマの 10 分の 1 程度の窒素源しか含まれていないため、酵母の増殖および維持代謝に必要な量が含まれていない可能性が考えられる。さらに、高温で水熱処理した籾殻ほど死滅速度が大きくなることから、高温での水熱処理による窒素源の過分解の可能性およびリグニンの加水分解物や糖の過酸化由来の阻害物質の存在も示唆される。したがって、籾殻を用いたエタノール発酵において、培地中の窒素源や阻害物質がエタノール発酵に及ぼす影響について検討する必要があると思われる。

6-3 目的に照らした達成状況

本研究項目では、大方、当初の計画通り実験を進めることができた。得られた成果を以下に示す。

- (1) 140°C, 0 h 水熱処理した 33% (w/v) 小麦フスマ懸濁液を基質として、0.004% (w/v) メイセラゼおよび 0.001% (w/v) Novozyme 188 で 24 時間糖化反応後、パン酵母による併行複発酵を 21 時間行い、5.2% (w/v) エタノールが得られた。この値は、小麦フスマに含まれる遊離可能なグルコース量から算出される理論エタノール収率のおよそ 88% に相当する。
- (2) 140°C, 0 h 水熱処理した 33% (w/v) 小麦フスマ懸濁液を基質として、*A. oryzae* AOK11 株または CelE 高産生糸状菌と BGL 産生酵母 *S. cerevisiae* RAK4230 株による併行複発酵により、5.5 % (w/v) エタノールが得られた。
- (3) バイオマスとして粃殻を用い、市販糖化酵素およびパン酵母による併行複発酵を行い、
 - 1) 効率的な酵素糖化のための前処理条件の検討
 - 2) 粃殻の糖化に必要な酵素の組合せと添加量の検討
 - 3) 培地中の窒素源および阻害物質がエタノール発酵に及ぼす影響の検討が、粃殻におけるエタノール発酵の課題であることが分かった。

6-4 3 年間の総括

本研究開発項目では、糸状菌によるバイオマス糖化および酵母によるアルコール生成を同時に進行させる発酵方法である併行複発酵の最適条件の確立を目的として実験を行い、以下に示すような結果を得た。

まず、パン酵母のエタノール発酵特性の解析として、好氣的培養条件下での回分培養における培養条件の検討を行い、初発グルコース濃度、酵母の植菌量および pH が、増殖速度、グルコース消費速度およびエタノール生成速度に及ぼす影響を明らかにした。バイオマス・グルコース・エタノール濃度をシミュレートするため、速度論パラメータおよびエタノールによる阻害定数を算出し、速度論モデルを構築した。その過程で、窒素源が酵母の安定性およびエタノール生産に必要であることが分かった。

次に、バイオマスとして小麦フスマを用い、市販糖化酵素およびパン酵母による併行複発酵による効率的エタノール生産を行うため、小麦フスマの前処理条件や使用する市販糖化酵素製剤の組合せおよび酵素濃度などの諸条件について検討した。その結果、140°C, 0 h 水熱処理した 33% (w/v) 小麦フスマ懸濁液を基質として、メイセラゼおよび Novozyme 188 による糖化およびパン酵母によるエタノール発酵を行い、最終的に 5.2% (w/v) エタノールが得られた。

続いて、市販糖化酵素およびパン酵母の代わりに、複合酵素発現糸状菌および糖化遺伝子組込み酵母を用いて併行複発酵を行った。140°C, 0 h 水熱処理した 33% (w/v) 小麦フスマ懸濁液を基質として、*A. oryzae* AOK11 株または CelE 高産生糸状菌と BGL 産生酵母 *S. cerevisiae* RAK4230 株による併行複発酵により、5.5 % (w/v) エタノールが得られた。

最後に、粃殻における併行複発酵の課題の探索として、小麦フスマを用いた検討結果を参考にして、粃殻の前処理および市販糖化酵素とパン酵母による併行複発酵を行った。その結果、粃殻を基質としたエタノール生産における課題として、効果的な酵素糖化のための前処理条件の検討、糖化に必要な酵素の組合せと添加量の検討および培地中の窒素源および阻害物質がエタノール発酵に及ぼす影響についての検討が挙げられることが分かった。

6 - 5 参考文献

- 1) Ghose, T. K.: Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.*, **59**, 257-268 (1987).
- 2) Machida, M., Ohtsuki, I., Fukui, S., and Yamashita, I.: Nucleotide sequences of *Saccharomycopsis fibuligera* genes for extracellular β -glucosidases as expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 3147-3155 (1988).
- 3) Cot, M., Loret, M.-O., Francois, J., and Benbadis, L.: Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. *FEMS Yeast Res.*, **7**, 22-32 (2007).
- 4) Ge, X. M. and Bai, F. W.: Intrinsic kinetics of continuous growth and ethanol production of a flocculating fusant yeast strain SPSC01. *J. Biotechnol.*, **124**, 363-372 (2006).
- 5) Alfenore, S., Molina-Jouve, C., Guillouet, S. E., Uribe Larrea, J.-L., Goma, G., and Benbadis, L.: Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 67-72 (2002).
- 6) 生物学実験書 改訂版 (日本生物工学会編) 培風館, pp. 335.
- 7) 生物化学実験法 1 還元糖の定量法 第2版 福井作蔵著 学会出版センター, pp. 50-52.
- 8) 生物化学実験法 1 還元糖の定量法 第2版 福井作蔵著 学会出版センター, pp. 9-11.
- 9) Saif-Ur-Rahman, S., Krishnamurti, C. R., and Kitts, W.D.: Separation of cello-oligosaccharides by thin-layer chromatography. *J. Chromatog.*, **38**, 400-402 (1968).
- 10) Eklund, R. and Zacchi, G.: Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated willow. *Enzyme Microb. Technol.*, **17**, 255-259 (1995).
- 11) Hari Krishna, S. and Chowdary, G.V.: Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from lignocellulosic biomass. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1971-1976 (2000).
- 12) Teherzadeh, M.J. and Karimi, K.: Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*, **2**, 707-738 (2007).
- 13) Seidle, H. F., Marton, I., Shoseyov, O., and Huber, R. E.: Physical and kinetic properties of the family 3 β -glucosidase from *Aspergillus niger* which is important for cellulose breakdown. *Protein J.* **23**, 11-23 (2004).
- 14) Riou, C., Salmon, J.-M., Vallier, M.-J., Günata, Z., and Barre, P.: Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3607-3614 (1998).
- 15) Taherzadeh, M. J. and Karimi, K.: Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources* **2**, 707-738 (2007).
- 16) Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A., and Wu, Y. V.: Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biotechnol. Prog.* **21**, 816-822 (2005).
- 17) 平成 19 年度 戦略的基盤技術高度化支援事業「セルロース系バイオマスの分散型超高効率エタノール生産システムの開発」成果報告書

第7章 併行複発酵に適した糖化遺伝子組込み酵母の開発

【実施機関】 国立大学法人山口大学、株式会社フジワラテクノアート、株式会社イングレディア・ソリューション

7-1 本年度の目標

我々の目標は外来糖化酵素を効率的に発現する酵母を育種することである。特に、セルロース系バイオマス分解酵素を発現する酵母の育種が目標であり、以下の3つの研究からなる。

- 1) セルロース分解酵素遺伝子のクローニング
- 2) セルロース分解酵素遺伝子の酵母へ導入
- 3) 遺伝子の全合成の試作と酵母での発現

セルロース系バイオマスの効率的分解のためにセルロース分解酵素遺伝子を酵母に導入する方法を昨年度に示した。遺伝子さえあれば、自在に酵母に導入するしくみは完成した。しかし、開始した遺伝子を全合成するという試みはまだ成功していない。そこで、本年度の目標は、遺伝子を全合成する方法を確立することである。

いままでグルカナーゼ *egl4* の酵母高発現型遺伝子の設計を行い、オリゴDNAとPCRで完全長遺伝子の合成までできた。しかし、活性のある遺伝子導入酵母を作製することができなかった。また、別のマーカー遺伝子として蛍光タンパク質の遺伝子 *yEYFP* と *yECFP* を合成したところ、今までの方法で活性のある遺伝子を取得できた。本年度はさらに大きな遺伝子の合成を目指した。*endo-1,4-beta-glucanase* [*Pyrococcus horikoshii* OT3], *Cel5A* [*Bacillus licheniformis*], *CelA* [*Clostridium thermocellum*]などのセルラーゼに加え、*Gluc* [luciferase], *PvuII* [restriction enzyme], および *yEGFP* [yeast EGFP]などのマーカー遺伝子も合成を試みた。

7-2 材料と方法

今まで合成を試みたセルラーゼ遺伝子は、*Humicola grisea* のエンドグルカナーゼ遺伝子である *egl4* である。これはこうじ菌で発現できることも知られており、遺伝子が小さいという特徴を持つ。

また、酵母コドンに最適化した蛍光を発するタンパク質 *yECFP* (Yeast codon-optimized Enhanced Cyan Fluorescent Protein), および, *yEYFP* (Yeast codon-optimized Enhanced Yellow Fluorescent Protein) も作製した。これらは約2割から3割のクローンが活性を認めした。

そこで、本年度は

endo-1,4-beta-glucanase [*Pyrococcus horikoshii* OT3]

Cel5A [*Bacillus licheniformis*]

CelA [*Clostridium thermocellum*]

Gluc [luciferase]

PvuII [restriction enzyme]

yEGFP [yeast EGFP]

の合成を試みた。

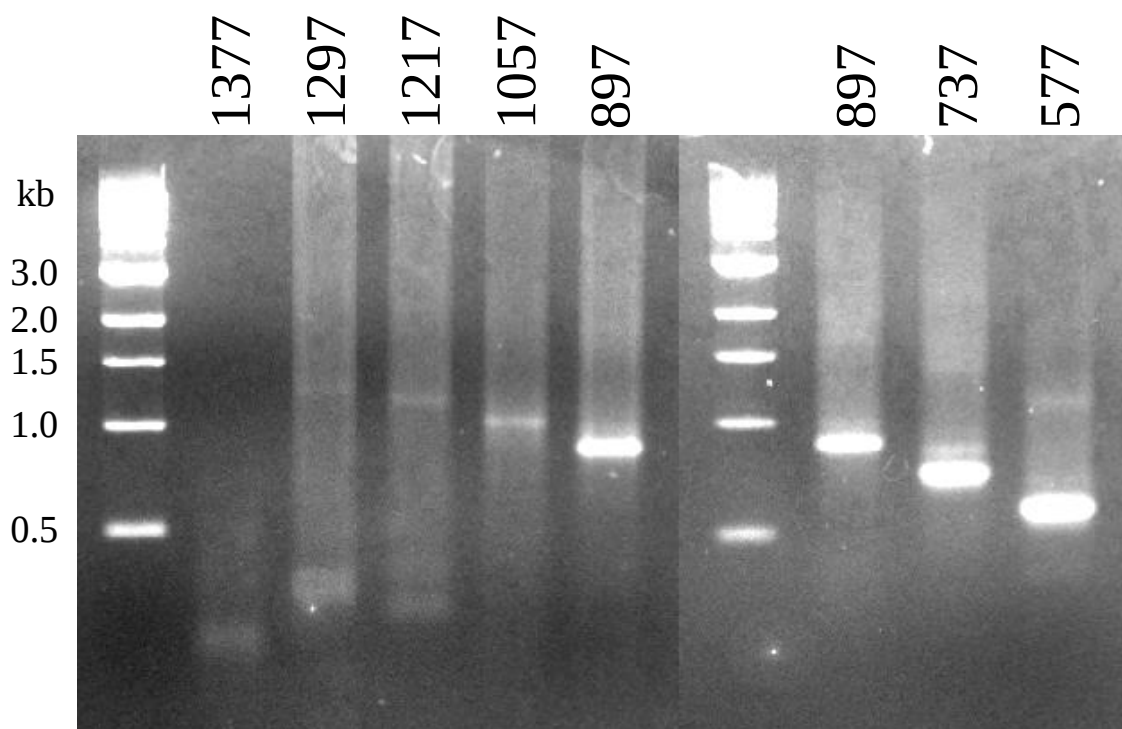
超好熱性古細菌である *Pyrococcus horikoshii* 由来のセルラーゼは70℃以上の反応条件で高い活性を示し、従来の耐熱性セルラーゼとは異なり、不溶性セルロースを分解するこ

とも可能なようなのでもし活性ができれば非常に有用と考えられる。

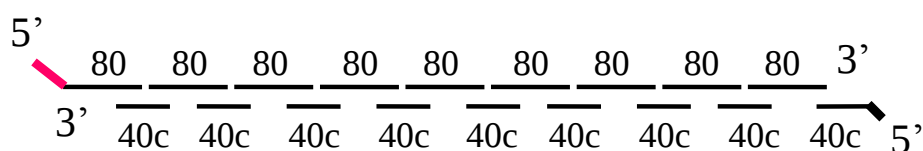
7-3 遺伝子全合成

まず、古細菌のセルラーゼの全合成を試みたが合成自体が今回は難しかった。今回のサイズが 1.4 kb 程度で今までよりはかなり長い配列である。全長の合成ができなかったので、2 回目の DNA を短めに合成してみると下図のように短いと合成ができることがわかった。

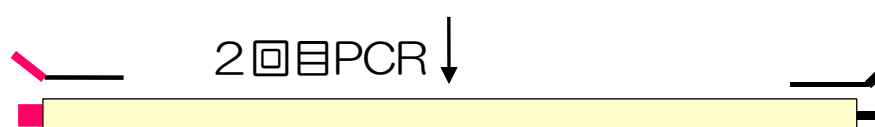
2回目のPCR合成サイズ（C末固定）

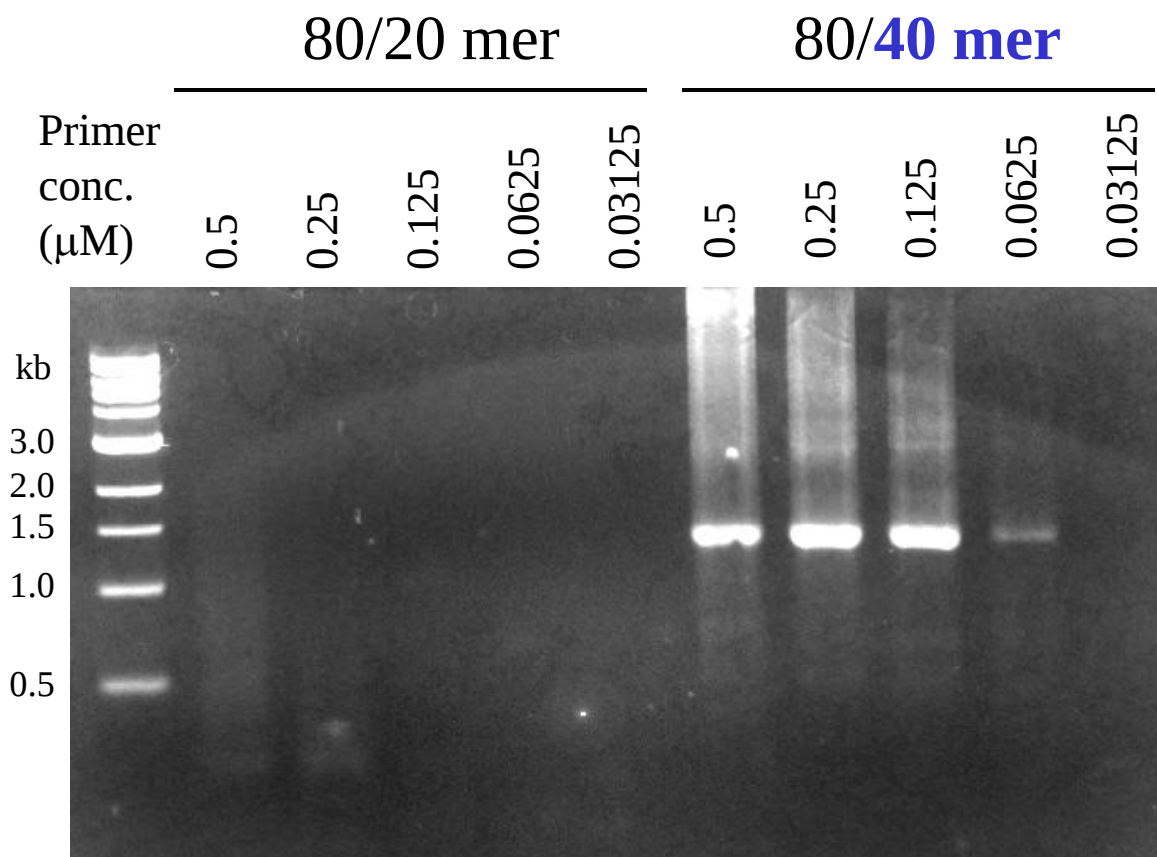


そこで、下図のように、今までは 80 mer と 20 mer で合成していたところを 80 mer と 40 mer で合成することにした。



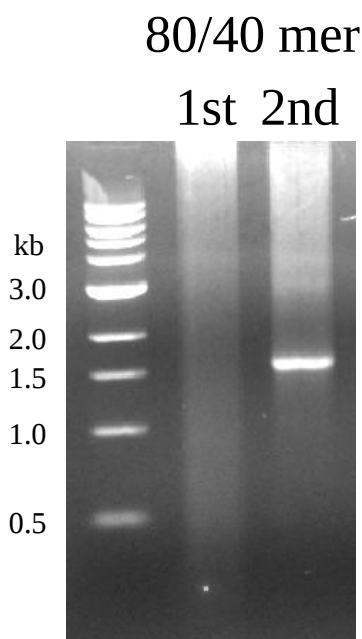
1回目PCR 80 mer vs 40 mer





長い相補鎖の配列で合成すると，上図のように目的のバンドができることがわかった。
つまり，相補鎖の長さは長いDNA合成には非常に重要であることが結論できる。

次に，Cel5A [*Bacillus licheniformis*]の合成を試みた。



こちら80 mer と 40 mer で設計することで目的バンドを得ることができた。さらに、データは示していないが CelA [*Clostridium thermocellum*] の合成にも成功した。しかし、いずれの場合も酵母での活性検出には至っていない。

そこで、マーカー遺伝子での検討が重要と考え、

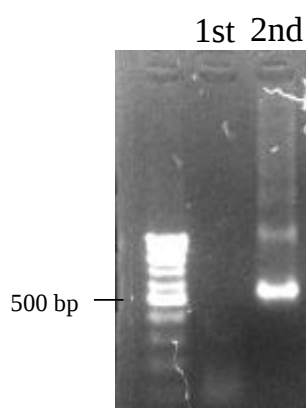
Gluc [luciferase]

PvuII [restriction enzyme]

yEGFP [yeast EGFP]

の3種類のマーカー遺伝子の合成を試みた。

Gluc の活性はでなかったが、PvuII と yEGFP の活性は検出できた。



上図は PvuII 遺伝子のバンドである。このとき、活性出現率は 23 クローンのうち、1 つしかなかった。したがって、遺伝子により、合成に問題が生じることが考えられた。

yEGFP に関しては、いままでと同じように活性体が約 3 割の割合で取得できた。

7-4 結論

今まで、合成遺伝子に変異等の問題があると考えていたが、合成自体には問題はない。

たぶん、合成の段階のプライマー設定に関して問題が起きることで活性のある遺伝子が取得できないのではないかと考えている。相補鎖を完全に合わせることや品質のよいオリゴDNAを使うことで今後活性のある遺伝子が合成できるものと思われる。

7-5 3年間の総括

1. 遺伝子をプラスミドなしに酵母に導入する方法を開発した。
2. アミラーゼやセルラーゼを組み込んだ酵母を開発した。
3. *Saccharomycopsis fibuligera* の β グルコシダーゼ遺伝子を導入した酵母株を育種し、岡山大でエタノール発酵試験を行い、良好な結果を得た。
4. 遺伝子全合成の方法の条件検討を行い、ポリメラーゼの選定、温度条件、プライマー設定方法が確立した。
5. 蛍光タンパク質の全合成は成功し、約 2-3 割の確率で活性体を得た。
6. 様々な遺伝子合成体を酵母に導入し、活性が現れるものと現れていないものが得られた。

第8章 ナノテク膜による蒸留・脱水プロセスの最適化条件の確立

【実施機関】 国立大学法人岡山大学、株式会社サタケ、株式会社フジワラ
テクノアート、株式会社イングレディア・ソリューション

8-1 研究開発成果の概要

8-1-1 平成20年度成果の要約

平成19年度に、還流を伴う回分蒸留、ナノテク膜を用いたエタノール/水混合液からの水蒸気分離及びエタノール/水混合液の浸透気化分離を組み合わせたプロセスが、地域密着型の小規模エタノール濃縮プロセスとして適していることを報告した。今年度は、先ず、昨年度提案したプロセスの基盤技術についてエタノール水溶液を用いて、その可能性と問題点について検討を行った。この結果に基づいて、小麦フスマ発酵液から99.5%(v/v)エタノールを調製できることを実証した。

8-1-2 英文成果の要約

We proposed, last year an energy-saving process for ethanol concentration composed of a batch distillation unit and two types of membrane separation units equipped with an inorganic membrane, last year. In this study, we studied factors affecting the performance of the fundamental technologies used in the process using an ethanol/water mixture to produce 99.5mol% fuel ethanol from wheat-bran fermented ethanol.

8-2 研究開発成果

8-2-1 研究開発項目の目的および概要

本年度は、本プロジェクトの最終年度であるので、過去2年間に得られた知見に基づいて、小麦フスマを原料として、99.5vol%(99.0mol%)の燃料用エタノールを生産可能であることを実証することを目的とした。すなわち、昨年度に、本プロジェクトが目指している地域密着型の小規模エタノール濃縮脱水プロセスとして、還流を伴う多段回分蒸留、ナノテク膜を用いたエタノール/水混合液からの蒸気透過分離及びエタノール/水混合液の浸透気化分離を組み合わせたプロセスが、省エネルギーの観点から適していることを報告した(図1)。今年度は、昨年度のプロセスを具現化して、小麦フスマ発酵液から99.5 vol%(99.0mol%)の燃料用濃縮エタノールを調製することを目的とした。この目的を達成するために、先ず、水-エタノール水溶液を用いて、還流を伴う多段回分蒸留、ナノテク膜を用いたエタノール/水混合液からの蒸気透過分離及びエタノール/水混合液の浸透気化分離を行い、問題点の検討と本プロセスの特徴の把握および操作条件に関する知見を得た。

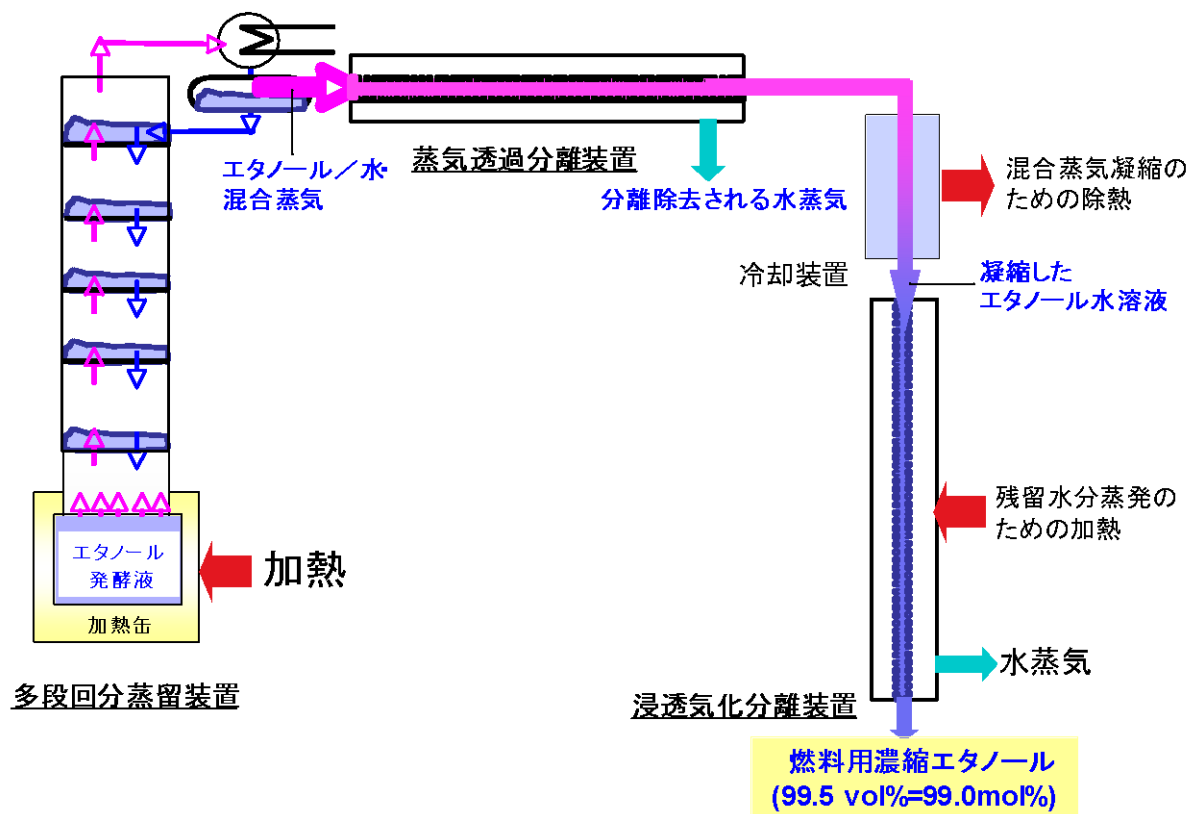


図1 本プロジェクトで検討したエタノール脱水プロセス

8-2-2 還流を伴う回分蒸留によるエタノール溶液の濃縮

(1) エタノール水溶液の回分蒸留

昨年度までの研究において、回分蒸留で得られるエタノールの濃度は、その後に行われる膜濃縮に供するには、十分に高くはないことが明らかにされた。昨年度の検討結果によると、エタノールの回収率を90%程度とすると、5% (W/V) (約1.8mol%)のエタノール水溶液を高々8mol%程度にまでしか濃縮することができない。一方、多段棚段式精留部を上部に設けた還流を伴う回分蒸留器を用いると、回収率が同程度であってもより高濃度に濃縮できると考えられる。そこで、まず、多段棚段式精留部を組込んだ回分蒸留操作について、理論的検討を加えた。特に、還流比と濃縮度の関係について調べた。なお、還流するためには、段上部から発生する混合蒸気を一部、凝縮させる必要があるが、規模が小さいので、送風程度でも可能であると考えられる。

まず、図2に示す、5段棚段式精留部を上部に設けた、回分蒸留装置に着目して理論的解析を行った。解析に際して使用した主な仮定を下記に示す。

- 1) 凝縮器の後ろに設置されている液貯め中の液量 ($U_1 = U$) 各棚段上に存在する液量 ($U_2, U_3, U_4, U_5, U_6 = U$) は、時間により変化しない。
- 2) 上段からの還流液流量 ($L_1, L_2, L_3, L_4, L_5, L_6 = L$) は、時間により変化しない。
- 3) 液の蒸発量 ($V_1, V_2, V_3, V_4, V_5, V_6 = V$) は、時間により変化しない。
- 4) 留出液流量 D は時間により変化しない。

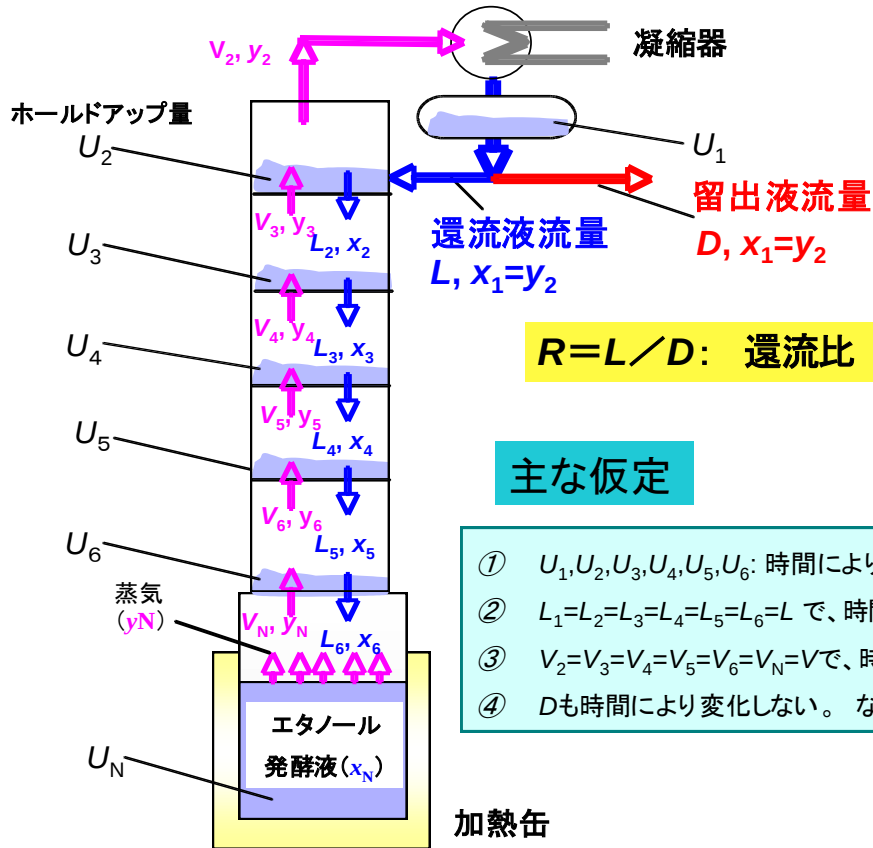


図2 還流を伴う多段回分蒸留装置

上記の仮定の下で、加熱缶、格段及び液貯め中で、エタノールに関する物質収支をとると下記の(1)～(7)式が導かれる。(8)式は、全液量に関する物質収支である。

$$U_N = U_0, U_2 = U_0, U_3 = U_0, U_4 = U_0, U_5 = U_0, U_6 = U_0, V = V_0, L = L_0 \quad (1)$$

$$U_2 \frac{dx_2}{dt} = -(V \cdot y_2 + L \cdot x_2) + L \cdot y_2 + V \cdot y_3 \quad (2)$$

$$U_3 \frac{dx_3}{dt} = -(V \cdot y_3 + L \cdot x_3) + L \cdot x_2 + V \cdot y_4 \quad (3)$$

$$U_4 \frac{dx_4}{dt} = -(V \cdot y_4 + L \cdot x_4) + L \cdot x_3 + V \cdot y_5 \quad (4)$$

$$U_4 \frac{dx_5}{dt} = -(V \cdot y_5 + L \cdot x_5) + L \cdot x_4 + V \cdot y_6 \quad (5)$$

$$U_6 \frac{dx_6}{dt} = -(V \cdot y_6 + L \cdot x_6) + L \cdot x_5 + V \cdot y_N \quad (6)$$

$$U_N \frac{dx_N}{dt} + x_N \frac{dU_N}{dt} = V \cdot y_N + L \cdot \frac{dx_6}{dt} \quad (7)$$

$$\frac{dU_N}{dt} = -V + L \quad (8)$$

上式において、 x と y は、それぞれ液中および蒸気中のエタノールのモル分率である。 U , V , L , および x と y に付されている下付きの数字及び N は、各段と凝縮器後の液溜めおよび加熱缶を示す (図2)。

x_i と y_i は、気液平衡関係にあるが、上記の微分方程式を解くためには、この関係を式で

表す必要がある。前年度は、エタノール濃度の低い範囲での近似的に直線 ($y = 7.3x$) として取り扱ったが、本年度ではより精度の高い、下記の (9) 式で示される近似式を使用した。

$$y = 10.27 \cdot x - 98.35 \cdot x^2 + 552.23 \cdot x^3 - 1849.60 \cdot x^4 + 3742.71 \cdot x^5 - 4468.56 \cdot x^6 + 2890.53 \cdot x^7 - 779.46 \cdot x^8 \quad (9)$$

上記の (1) ~ (9) 式を、初期条件 (at $t = 0$; $L_0 = 1000$ mol, $x_i (i=1-6) = 0$), $x_N = 0.0175$, $U_{N0} = 1000$, $U_i (i=1-6) = 10$, $V=10$, $L=20/3$, 4) の下で、Mathematica (Wolfram) ver. 6 を用いて解いた。還流比 $R=L/D$ は、 L の値に対応して、2 と 4 とした。 $R=2$ と 4 に対する留出液中のエタノール濃度および回収率を、(10)、(11) 式により算出した。ただし、 $\cdot D$ は、ある時点までに留出した留出液量である。図 3 には、回分蒸留及び還流を伴う回分蒸留 (還流比 $L/D = 2, 4$) の場合の、留出液中のエタノール濃度およびエタノールの回収率の関係を示す。図からも明らかなように、本研究の条件 (例えば、原料中の初期エタノール濃度) においても、還流を伴う回分蒸留を行なった場合、同程度の回収率と比較すると、留出液中のエタノール濃度は回分蒸留の場合よりも明らかに高いことがわかる。留出液中のエタノール濃度は還流比が大きいほど高い。

$$x_D = (U_{N0} \cdot x_0 - U_N \cdot x_1) / (\Sigma D) \quad (10)$$

$$Y(\%) = (100 \cdot x_D \Sigma D) / (U_{N0} \cdot x_0) \quad (11)$$

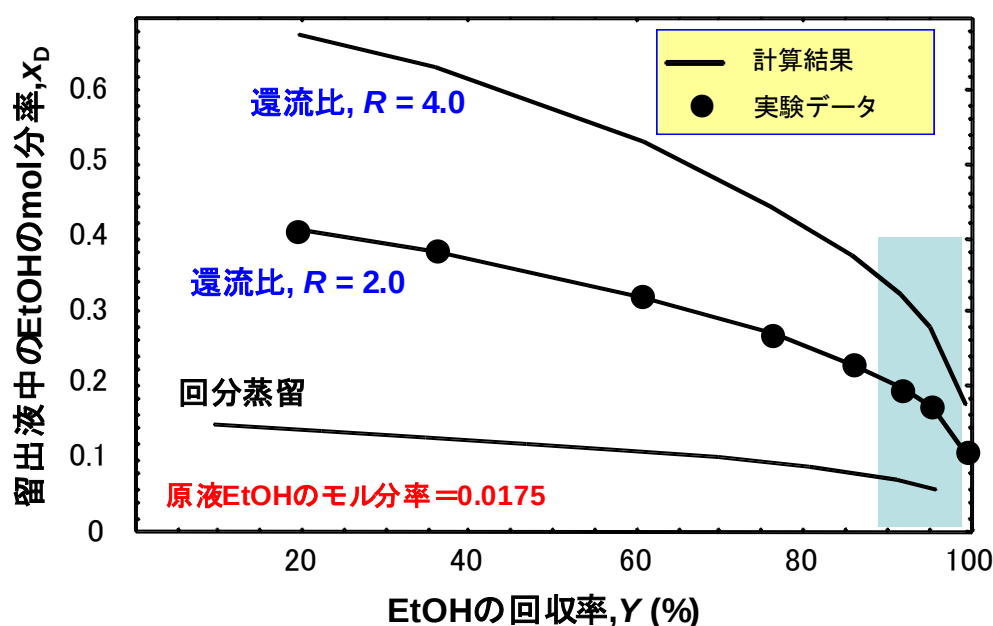


図3 回分蒸留における還流比のエタノール濃縮に及ぼす効果と回収率の関係

(2) 醗酵由来エタノール水溶液の回分蒸留

これらの予備検討に基づいて、第7章で得られた小麦フスマ発酵液 4000 ml (エタノールモル分率=0.0175) を、各 1000 ml づつ、4回のバッチに分けてオルダーショウ蒸留装置 (柴田科学 4Y-773) を用いて濃縮した。実験結果の一例を表1に示す。また、表1に示す回収率とエタノール濃度の関係を図3中にプロットするが、その傾向は還流比 $R=2$ の計算結果と非常に良好に一致した。

表1 小麦フスマ発酵液の回分蒸留の実験結果

留出時間 (min)	留出液量, D [ml]	留出液中 EtOH mol 分率, x_D	EtOH 回収率, Y [%]	頭頂温度 (°C)	底部温度 (°C)
0	0	-	-	70	89
10	26	0.44	40.7	81	93

20	46	0.37	64.4	89	95
25	61	0.31	75.9	90	96
40	76	0.27	87.4	90	96
55	91	0.23	93	91	96
70	108	0.2	95.7	91	96

缶残液（モル分率 $x_0 = 0.0010$ 以下）870 ml

最終的に、4回のバッチ合計で、390 ml の留出液（エタノールのモル分率、 $x_D = 0.175$ ）を回収した。この時のエタノールの回収率は約 85.3%であった。なお、缶残液としては約 3490 ml 残留し、そのエタノールのモル分率は、約 0.0013 であった。留出液中に白色沈殿が生じたので、濾過を行い次の膜分離実験に用いた。この白色沈殿の同定は行わなかったが、小麦フスマ由来の物質であると思われる。

8-2-3 セラミック膜を用いたエタノール発酵液の濃縮

上記で述べた様に、小麦フスマ醗酵液を、多段回分蒸留装置を用いて濃縮した。想定している地域密着型プロセスとしては、多段回分蒸留後の蒸気の一部を直接、セラミック膜により分離する（蒸気透過分離）。その後、凝縮したエタノール／水混合液を浸透気化分離により、99.5vol% (99.0mol%) にまで濃縮する。本研究では、多段回分蒸留後に得られる液を、加熱蒸発しながら蒸気を発生させ、蒸気透過膜分離装置を用いて脱水した。得られた濃縮液を液体の状態で、浸透気化分離装置に通し、さらに濃縮することにした。セラミック膜を用いた、蒸気透過分離と浸透気化分離による濃縮脱水実験は、昨年度と同様に、株式会社 CemTech（広島県呉市、浅枝正司社長）に委託した。

(1) 膜分離装置

図4（装置外略図）には、膜分離装置の概略を、図5には写真を示す。

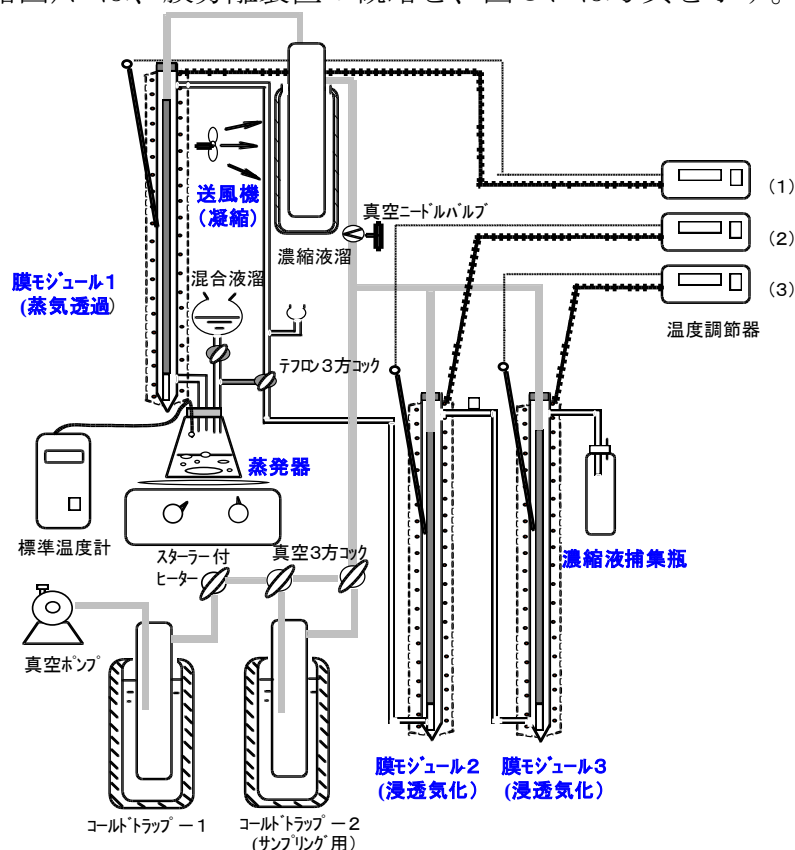


図4 蒸気透過及び浸透気化法によるエタノール水溶液の高度濃縮分離装置の概略



(a) 使用した膜分離システム



(b) 作成したセラミック分離膜(長さ50 cm, 外径 1 cm)

図5 高度濃縮分離システム (a) と分離膜 (b) の写真

図4および図5に示すように、本装置では、3本のセラミック膜モジュール(外径 ; 1cm、長さ ; 50cm、ケーシング内径 ; 1.15cm)が、直列に配置されている。

先ず、本装置を用いて、種々の濃度のエタノール水溶液からの脱水実験を異なる条件下で行い、膜分離特性を調べた。詳細は省略するが得られた主な結果は、①蒸気透過による濃縮では、供給混合蒸気中の水蒸気流量の水蒸気膜透過流量に及ぼす影響は大きい、濃縮比に及ぼす影響は小さく、ほぼ2倍程度であること、②浸透気化分離法に基づくエタノール水溶液の脱水においては、エタノール濃度が比較的高くない条件では、エタノール水溶液の流量が大きくても効率よく濃縮されること、③したがって、エタノール濃度が99モル% (99.5 vol. %) 以上の高度濃縮操作をする場合には、エタノール濃度を97~98モル%まで濃縮後に、さらに最終段階濃縮処理を行う必要があることなどである。

(2) 醗酵由来エタノール水溶液の高度濃縮

上記で述べたように、膜分離装置を用いた、エタノール蒸気からの水蒸気の分離とエタノール水溶液からの脱水操作により、当初予定していた通りの高い性能を達成可能であることが示唆された。この結果を踏まえて、醗酵由来のエタノール水溶液(濃度 17.5モル%、390 ml)から高濃度エタノール(濃度 : 99モル%(99.5 vol%))の調製を下記の手順で実施した。

本実験では、基本的には、バッチ操作ではなくフロー操作を適用した。すなわち、分離濃縮されるべきエタノール/水混合物は、回分蒸留器回収部から得られる混合蒸気を蒸気透過法により分離濃縮し、その後、全縮後に沸点近くでの分離温度で、浸透気化分離を行った。膜を透過した水蒸気の蒸気透過分離部での水蒸気の分圧が高いので、透過水蒸気の除去は空冷あるいは水冷によって除去することが可能である。したがって、実際の操作においては、冷媒を使用する必要はないが、ここでは、定量測定を容易にするため、コールドトラップを用いて除去した。

混合蒸気の膜分離器への定常供給は、大気圧下での沸騰液へのエタノール水溶液の滴下

によって行い、その蒸気温度は標準温度計にて、常時、モニターした。蒸気供給量は加熱ヒータの入力調節により行った。実験中の、エタノール濃度などの測定は、定常状態が達成された後に行った。定常状態の確認は、1 回目では蒸発器の蒸気温度、分離後の留出混合液組成が一定であることで判断した。定常状態達成後、所定時間での留出量、膜透過量を測定し、各々の組成をガスクロにて測定した。

脱水分離実験は、1 回目、2 回目・・・6 回目に分けて行った。図 6 に示す様に、1 回目はモジュール 1 とモジュール 2 およびモジュール 3 の組み合わせを用いて行った。2 回目以降は、モジュール 2 と 3 を、1 セットとして使用した。膜出口から排出される濃縮液全量を、次の濃縮の供給液とした。ただし、供給速度の調製が困難であったため各回で処理時間が異なった。6 回目の膜出口から得られる濃縮液全量と膜のクリアランス等に残留している液を回収した。1 回目から 6 回目までの結果を表 2～6 に示す。最終的に、濃縮液総量は 97.65 g(122 mL)、エタノール濃度は 99.57 vol% (99.1mol%, 99.7wt%)、エタノールの回収率は 88.1%であった (表 6)。

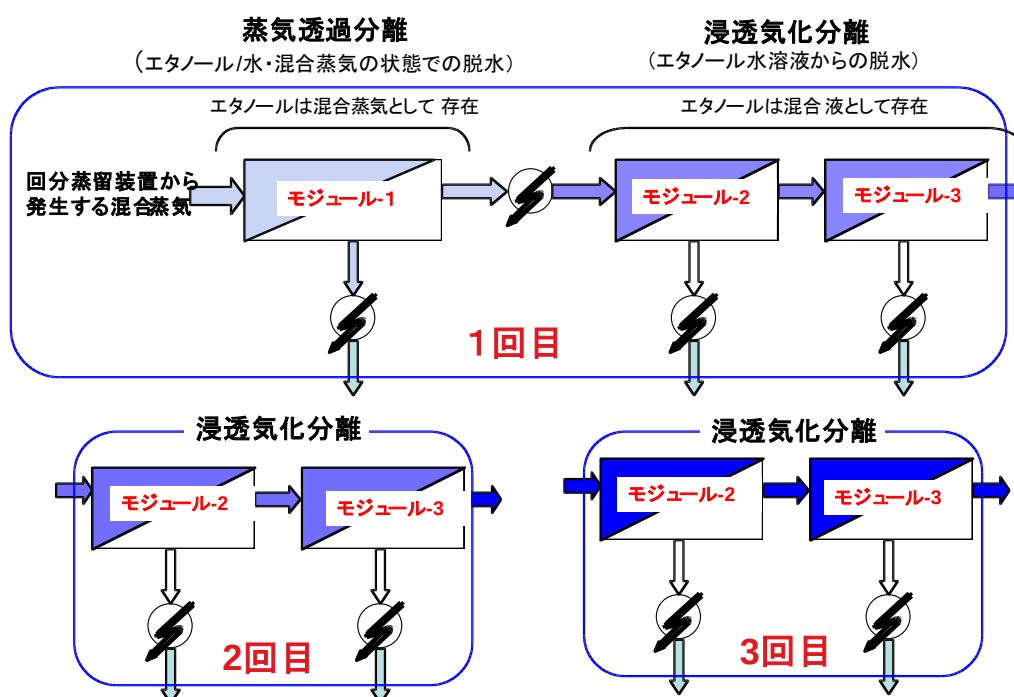


図6 膜分離法を用いる小麦フスマ醗酵液の回分蒸留濃縮液からの脱水方法

表2 1回目と2回目の濃縮結果

1回目分離操作					
膜モジュール1 + 膜モジュール2 + 膜モジュール3 (蒸気透過) (浸透気化) (浸透気化)					
膜面積 [m2]		0.0157		0.0157 0.0157	
原液体積	原液組成	蒸気温度	原料重量[g]	アルコール[g]	水[g]
370 cc	17.5 モル%	95.1℃	350.2	123.3	227.0
		35.19	原料を蒸気 温度0.9466とした		
分離時の原料供給温度: 94.7~95.5 C					
分離時間	膜-1の後	膜-2の後	膜-3の後	透過物組成	備考
[min.]	[mol %]	[mol %]	[mol %]	[mol %]	
60		0.736	0.859		(操作ミス有)
80	0.335				
100	0.336	0.762	0.849	0.01	
125	0.315	0.671	0.865		
155	0.282	0.782	0.875	0.034	
210	0.3	0.74	0.873		
(終了)					
留出回収量:		93.09	[g]		
平均組成:		0.866	[mol %]	0.943 [wt %]	
アルコール回収量:		87.8	[g]		
装置内残留量:		約	43	[cc]	
平均原料供給流量:		101.6	[g/h]		
(アルコール平均流量):		35.5	[g/h]		
(水・平均流量):		66.1	[g/h]		

2回目分離操作			
膜モジュール2 + 膜モジュール3 (浸透気化) (浸透気化)			
分離時間	膜-3の後	透過物組成	備考
[min.]	[mol %]	[mol %]	
0	0.904	測定なし	(操作ミス有)
8	0.926		はじめの30分
20	0.931		無視し再度
30	0.931		
40	0.933		
60	0.932		
75	(終了)		
留出回収量:		80.89 [g]	
平均組成:		0.933 [mol frac.]	0.973 [wt. frac.]
アルコール回収量		78.7 [g]	
装置内残留量		約	43.0 [cc]
平均原料供給流量:		74.5 [g/h]	
(アルコール平均流量):		70.2 [g/h]	
(水平均流量):		4.2 [g/h]	

表3 3回目の濃縮結果（左側）と1~3回目の濃縮実験の物質収支

3回目分離操作			
膜モジュール2+ 膜モジュール3 (浸透気化) (浸透気化)			
分離時間	膜-3の後	透過物組成	備考
[min.]	[mol %]	[mol %]	
0	0.960	測定無し	
10	0.961		
20	0.964		
35	0.968		
50	0.970		
75	0.970		
95	0.970		
115	0.971		
160	(終了)		
留出回収量:	75.06[g]		
組成:	0.967[mol frac.]	0.987	[wt. frac.]
アルコール回収量	74.08 [g]		
装置内残留回収量:	34.13 [g]		
組成	0.960 [mol %]	0.984	[wt. frac.]
平均原料供給流量:	30.3 [g/h]		

分離操作1, 2, 3回目終了時の物質収支		
(1日目操作終了時に装置内容物全て回収した。)		
留出回収量:	75.06[g]	
組成:	0.967[mol frac.]	0.987 [wt. frac.]
アルコール:	74.08 [g]	
水:	0.98 [g]	
全透過量:	169.78[g]	
組成:	0.0152[mol frac.]	0.038[wt. frac.]
アルコール:	6.45 [g]	
水:	163.33 [g]	
装置内滞留物		
回収量:	34.13[g]	
組成:	0.960 [mol frac.]	0.984 [wt. frac.]
アルコール:	33.58 [g]	
水:	0.55 [g]	
蒸発器内残存	93.73[g]	(含む 初期投入水:約50g)
	0.0101 [wt. frac.]	
アルコール量:	0.94 [g]	
全アルコール量=	(74.08+6.45+33.5+0.94)	114.11 [g]

表4 4回目と5回目の濃縮結果

4回目分離操作				5回目分離操作			
		膜モジュール2+	膜モジュール3			膜モジュール2+	膜モジュール3
		(浸透気化)	(浸透気化)			(浸透気化)	(浸透気化)
分離時間	膜-3の後	透過物組成		分離時間	膜-3の後	透過物組成	
[min.]	[mol %]	[mol %]		[min.]	[mol %]	[mol %]	
0	0.979	測定無し		15	0.987	測定無し	
15	0.981			25	0.987		
30	0.982			35			
40	0.981			40	0.987		
60	0.981			50	0.987		
75	0.980			60	0.988		
80	0.980			80	0.988		
90	0.981			100	0.988		
105	0.981			122	0.988		
120	0.982			終了			
終了							
留出回収量:	72.135 [g]			留出回収量:	69.48 [g]		
組成:	0.9801 [mol frac.]	0.992 [wt. frac.]		組成:	0.9868 [mol frac.]	0.9948 [wt. frac.]	
アルコール回収量	71.57 [g]			アルコール回収量	69.12 [g]		
装置内残留量	推定 約 32.00 [g]			装置内残留量	推定 約 32.00 [g]		
組成		[mol %]	[wt. frac.]	組成	測定なし	[mol frac.]	[wt. frac.]
平均原料供給	約 35.5 [g/h]			平均原料供給	約 34.2 [g/h]		

表5 6回目の濃縮結果（左側）と装置内残留液回収操作の結果

6回目分離操作			膜モジュール2+ (浸透気化)	膜モジュール3 (浸透気化)
分離時間 [min.]	膜-3の後 [mol %]	透過物量、組成		
0	0.9897	4, 5, 6回分離後の		
5	0.9903	透過物総量: 9.08 [g]		
20	0.9905	0.227 [mol frac.]		
30	0.9907	0.430 [wt. frac.]		
40	0.9909	透過アルコール 3.90 [g]		
50	0.9910			
60	0.9912			
70	0.9912			
87	0.9914			
119	0.9915			
終了				
留出回収量:		65.85 [g]		
組成:		0.9909 [mol frac.] 0.996 [wt. frac.]		
アルコール回収量:		65.61 [g]		
装置内残留量: 推定 約		32.00 [g]		
組成 測定なし		[mol frac.] [wt. frac.]		
平均原料供給流量: 約		33.2 [g/h]		

装置内残留物回収操作			膜モジュール2+ (浸透気化)	膜モジュール3 (浸透気化)	
分離時間 [min.]	膜-3の後 [mol frac.]	留出量 [wt. frac.]	留出量 [g]	透過物組成 [mol %]	備考
15分間	0.9917	0.9967	25.70	測定無し	
10分間	0.9916	0.9967	17.92		
10分間	0.9919	0.9968	18.67		
備考					
分離操作終了後、装置内のアルコールは所定の最終濃度以下である可能性があるため、回収前に回収した留出高濃度アルコールを約35分間再循環させ、装置内残留物の濃度が所定濃度以上になった時点で操作を終了し、加圧押し出しおよび流出させることによって装置内アルコールを回収した。					
加圧押し出し回収量:		26.8450 [g]			
		0.9918 [mol frac.]		0.9968 [wt. frac.]	
配管をはずし流出回収:		9.293 [g]			
		0.9906 [mol frac.]		0.9963 [wt. frac.]	
回収液総量:		36.1380 [g]			
組成:		0.9916 [mol frac.] 0.9968 [wt. frac.]			

表6 濃縮実験全体の物質収支

全分離操作における物質収支				
原液	約2000残した 密度0.9466			
原液体積	原液組成	全重量[g]	アルコール[g]	水[g]
370ml	17.5 mol% 35.19 wt%	350.2	123.3	227.0
分離操作後				
操作		全重量[g]	アルコール[g]	水[g]
1～3回分離透過量		169.78	6.45	163.3
4～最終回透過量		9.08	3.90	5.2
蒸発器残留物		43.73	0.94	43.29
分離回収最終濃縮液		97.65	97.32	0.33
計		320.24	108.61	212.13
原液	370 ml			
密度	0.9466	350.2	123.3	227.0
原液に対する分離後回収液量比		0.914	0.881	0.935
コメント	全成分について約10パーセントのロスが見られる。原料液約35gを失ったことになる。少し大きすぎるようである。原料容器の体積目盛りの誤差も考えられる。			

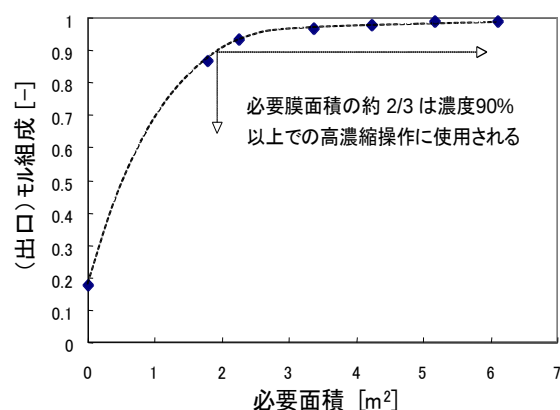


図7 膜面積と濃縮度の関係

以上の実験結果に基づいて、膜出口エタノール濃度と膜面積の関係を求めた結果を、図7に示すが、99.5vol.%のエタノールを1 kg/hで得るためには約6 m²の膜面積を要することがわかる。また、所要膜面積の約2/3は、エタノール濃度90%以上の高濃度濃縮に必要であることもわかる。このことは、アルコール濃度が高くなるにつれて水蒸気透過の駆動力である水蒸気分圧が小さくなり、水の透過が極端に減少するためであり、膜分離操作等で、通常、よく見られる現象である。

本濃縮試験においては、大気圧下の蒸気透過分離に引き続き、約75.5℃での浸透気化分離をおこなったが、加圧可能な装置で、約3気圧で同様な分離を行うと、必要面積は約2.5 m²に縮小することができる。

8-2-4 まとめ

バイオマスを原料として得られるエタノール発酵液から脱水することにより99.5 vol%の燃料用エタノール濃縮液を生産するための、地域分散型省エネルギー的プロセスを提案し、その理論的ならびにエタノール水溶液を用いた実験により検証した。すなわち、本研究で提案したプロセスは、エタノール発酵液を、①還流を伴う回分蒸留、②①で発生するエタノール蒸気を直接膜分離装置で蒸気透過分離に、③凝縮液の浸透気化分離の3ステップから構成される。本プロセスを用いることにより、小麦フスマ醗酵液（約5vol%エタノール）から99.5 vol%（99.0mol%）の燃料用エタノール濃縮液を製造可能であることにより、本プロセスの有効性が実証された。

8-2-5 参考文献

- 1) 食品工学基礎講座：第3章佐々木洋吉、矢野俊正、桐栄良三編、光琳（2000）

最9章 全体総括

本プロジェクトを企画した平成17年ごろは、今ほどにバイオエタノールについて一般的に報道されることはなかった。しかし本プロジェクトがスタートした平成18年ごろからブラジルやアメリカでのバイオエタノール生産について喧伝され、再生可能な循環型社会を構築するための有望なエネルギー源と信じられるようになってきた。しかし本プロジェクトは当初から、このような食料と競合する農作物を利用することには破綻が生じるだろうと考えていた。技術的にハードルの高い木質系バイオマスでなく、世界中どこにでも存在する小麦胚や籾殻、稲わらなど十分に有効利用されてないセルロース系バイオマスがバイオエタノール生産の本命になると信じて本プロジェクトを推進した。実際、原油が高騰するとバイオエタノールへの関心が高まり、トウモロコシ価格が高騰しすべての穀物相場が上昇した。日本においては大豆が高値となり、輸入飼料も高騰し、食料へ影響がでてきた。原料だけでなく、従来の手法は製造プロセスにも問題があった。本当に自然の循環のなかで生み出されるエネルギーを有効にエタノールという形でとりだすことができているのであろうか。現在、生産されているバイオエタノールは、特にトウモロコシを原料としているものは、原料生産過程も含めるとかなりの化石エネルギーを投入しなければ生産できないといわれている。

本プロジェクトに参加している機関やメンバーは、長年、醗酵技術や日本の伝統的な醸造生産技術に携わってきた。この技術は、自然の恵みの穀物を安全で有用な微生物を巧みに制御して、人間にとって有用な食品や医薬品をつくりあげる。微生物は生産する酵素により最低限のエネルギーで穀物を有価物に変換してしまう。本プロジェクトは、自然の循環のなかで太陽エネルギーが高レベルに蓄積された植物から、できるだけ余分なエネルギーを使わず、微生物の力で低レベルのエネルギーで、人類が利用できるエネルギーや有価物を生産する技術を開発したいと考えている。

3年間の研究開発を終え、当初考えていた目標のかかなりの部分が達成できたと思う。その成果概要と今後の実用化について下記に示す。

研究背景

燃料用エタノールは循環型社会構築と温暖化対策として世界的に増産が予想されるが、現在主流の糖・デンプン系バイオマスは世界的な食糧不足予想から増産への理解は得られ難く、一方、木質系バイオマスはコストの壁を壊せてない。従って今後の需要増はセルロース系バイオマスで賄われると予想される。しかしセルロース系においても低コストで生産するための技術的課題が多くあり、世界的にも実用化の目途が立っておらず、そのための技術開発が求められていた。

研究目的及び目標

上記のような背景を踏まえ、「特定ものづくり基盤技術高度化指針」において示されている「醗酵に係る技術」という高度化目標の達成に向けて本研究開発に取り組むこととし、具体的には、次のような事を目標として研究開発を実施した。

セルロース系バイオマスとして小麦胚、米糠、籾殻を選択し、製粉工場や精米工場等、原料の発生する場所に隣接可能な地域分散型エタノールプラントを実現するために必要な要素技術を開発し提供することを目的として下記を研究目標とした。

- ① 小麦胚、米糠、籾殻を低コストで液化・糖化する高効率複合酵素を探索し、それを大量生産する糸状菌をバイオテクノロジーで開発する。
- ② 開発された糸状菌の固体培養における最適培養条件を確立する。
- ③ 探索された高効率複合酵素と酵母とを組み合わせ最適醗酵条件を確立する。

- ④ エタノールの蒸留・脱水工程にナノテク膜を採用し最適蒸留・脱水条件を確立する。

研究開発の成果



開発した固体培養実証プラント



製造した 99.5%バイオエタノール

各研究目標における成果は下記のとおりである。

- ① 醸造業界で使用されている安全な糸状菌である麹菌の遺伝子から、エンド型 β -グルカナラーゼ 17 種、セロビオハイドロラーゼ 2 種、 β -グルコシダーゼ 9 種、エンド型 β -キシラナーゼ 3 種のセルラーゼ遺伝子を選び出し、遺伝子組み換えにより麹菌を宿主とした高発現株を造成した。このなかから小麦麩を効率的に分解する酵素を生産する株を選抜した。
- ② 実験室において使用できる再現性の高い固体培養試験装置を開発し、セルラーゼを高生産する固体培養条件を確立した。①で開発した高発現株での高生産性を実験室で検証し、新たに開発した固体培養実証プラントに適用しセルラーゼ酵素の高生産性を確認した。新規開発したセルラーゼ高発現株を新規固体培養条件で固体培養すると従来法に比べ、12 倍以上のセルラーゼ生産性が達成できた。
- ③ セルラーゼ等による酵素処理を有効に作用させるために小麦麩の前処理技術を検討した。その結果、酵素処理に適した緩やかな水熱処理条件を見出した。後工程の醗酵処理においても醗酵阻害は生じないことが検証された。最適水熱処理した小麦麩を、②で生産した酵素と、新たに遺伝子組み換えで開発した β -グルコシダーゼ産生酵母により、最適化した条件で併行複醗酵を行い、5.5%エタノール醗酵液を得ることができた。また籾殻を用いる場合の、前処理条件、併行複醗酵条件を検討し課題を抽出した。
- ④ 地域分散型システムを目指していることから連続蒸留システムは大規模であり馴染まない。そこで蒸留プロセスを多段式回分蒸留で、また脱水プロセスをセラミック膜による蒸気透過分離と浸透気化分離で行うシステムを考案し、シミュレーション検討により有効性と省エネルギー性を確認した。その結果を基に実験室レベルの試験装置を製作し、③で製造した 5.5%エタノール醗酵液を用いて検証をおこなった結果、濃度 99.5%のバイオエタノールを製造することができた。

その他にも本プロジェクトから有益な成果が得られている。詳細は各章を参照されたい。

本研究により上述の研究成果を得ることができた。今後、次のとおり実用化を目指す。

本プロジェクトでセルロース系バイオマスを有効にエタノール化するための要素技術を確認することができた。しかし実用化までには乗り越えなければならない課題は多い。今後は、実用化に向けて各テーマの担当機関が国内外の企業・研究機関との共同研究開発プロジェクトに参加し、本プロジェクトで確立した要素技術を更に発展させることが、セルロース系バイオマスによるバイオエタノールの実用化にもっとも貢献できる方法である。そしてその成果を基に、2012年ごろを目途に世界の商業化プロジェクトに参加し実用化を目指す。