

マオウエキスによるアルコール発酵促進効果の同時糖化発酵への適用*

松 山 雅 子**
 戸 高 昌 俊***
 田 中 亜 依****
 正 本 博 士*****
 コウハクル ワサナ*****
 重 松 幹 二*****

Application of promotion effect of ephedra extract to simultaneous saccharification fermentation (SSF) from cellulose to bioethanol

MASAKO MATSUYAMA**, MASATOSHI TODAKA***, AI TANAKA****, HIROSHI MASAMOTO*****,
 WASANA KOWHAKUL*****, MIKIJ SHIGEMATSU*****

ABSTRACT

For the bioethanol production, the promotion effect of ephedra extract on the ethanol fermentation was applied to the simultaneous saccharification fermentation (SSF) from cellulose using cellulase and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). According to the reaction temperature was expanded from an optimum condition of fermentation by adding ephedra extract, it was succeed that the ethanol production required for 3 days was achieved in only 1 day.

Key Words : Ephedra (mao), Simultaneous saccharification and fermentation (SSF), Cellulase, *Saccharomyces cerevisiae*, Bioethanol

1. はじめに

環境問題や社会情勢により脱炭素社会へのエネルギー変換が求められており、ガソリン代替燃料として期待されるバイオエタノールが注目されている。バイオエタノールは植物由来原料（バイオマス）から製造されたエタノールであり、カーボンニュートラルの概念から再生可能エネルギーの1つである。生産量の多いアメリカやブラジルではトウモロコシやサトウキビを原料にしたバイオエタノールが製造されているが、飢餓問題や原料作

物価格の高騰が懸念されており、食物と競合しないリグノセルロース系バイオマスを利用する方法が解決策として提案されている。

日本では未利用木質廃材が年間2.1億トン発生し、なかでも2016年の林地残材の利用率は約9%である。日本政府はこの利用率を「2025年までに30%以上とする」目標値を掲げている^[1]。同時に、バイオ燃料の利用について「2020年に全国のガソリン消費量の3%（180万キロリットルに相当）以上の導入を目指す」との方針を出した。このようにリグノセルロース系バイオマスの利用は後押しされている。

リグノセルロース由来のバイオエタノール製造工程は、セルロースをグルコースに加水分解する糖化と、グルコースからエタノールを得る発酵の大きく2段階に分けられる。非可食性バイオマスを燃料として活用していくため、効率的な糖化のための前処理^[2-6]や遺伝子組み

* 平成30年11月受付

** 工学研究科エネルギー・環境システム工学専攻博士課程後期

*** 工学研究科

**** 工学研究科化学システム工学専攻博士課程前期

***** 化学システム工学科

換え作物^[7]に関する研究が進められているが、化石燃料と比べると依然として製造コストが高い。

リグノセルロースは主にセルロース、ヘミセルロース、リグニンから成り、ヘミセルロースやリグニンを除去するための前処理^[2-6]や、糖化速度を上げるため硫酸を用いた酸処理の開発^[8,9]が行われている。しかし、これらは過分解を引き起こし、副生成物として発酵阻害物質であるフェノール類やアルデヒド類が生成するため制御が難しい^[9-11]。特に発酵阻害物質フルフラールの生成を抑制する技術について種々の検討がされている^[12]。一方で酵素を用いた糖化は過分解の心配はなく、酵素の回収も可能であり、反応後の廃液処理も不必要なため、クリーンな製造方法^[13,14]であるとされている。しかし、酵素セルラーゼは基質であるセルロース阻害や生成物であるグルコース阻害など解決すべき問題^[15,16]を抱えている。その解決策として、糖化と発酵を同時に行う同時糖化発酵 (simultaneous saccharification and fermentation: SSF) が検討されている^[17-20]。この方法は1つの反応器で糖化と発酵ができるだけでなく、酵母が酵素からの生成物を消費することによって酵素の生成物阻害が最小限に抑えられるため、分離型よりもエタノール生成効率がよいとされているが、糖化と発酵の至適温度・至適 pH が異なるため、どちらかの至適条件に合わせなければならず、同時に進行させるための条件設定が困難であるという欠点も有する。

当研究室では、植物由来成分の添加により発酵速度が促進することを発見した^[21]。最も効果が高かった植物由来成分は漢方薬に用いられる生薬であるマオウ (麻黄) であった。マオウを水で煎じ、得られたマオウエキスを発酵培地に添加すると、エタノール発酵速度が約2倍に促進した。また、発酵阻害物質として知られているフルフラール存在下でも、添加することにより発酵が維持されることがわかった。

以上の背景を元に本研究では、同時糖化発酵に対するマオウエキス添加の応用を検討した。糖化で用いられる酵素の至適条件は約 50℃で弱酸性、発酵で用いられる酵母の至適条件は 25℃で中性であり、両者の至適条件が異なるため同時糖化発酵では条件設定が困難である。そこで、高温耐性酵母や細菌 (*Zymomonas mobilis*)^[22,23]、遺伝子組み換え大腸菌^[23]の研究が活発に行われている。しかし、遺伝子組み換えについては、環境への危険性や汚染の問題が生じ取扱いや流出が厳しく制限されているため実用化するには専用の施設が必要であり、やはり高コストにならざるをえない。

そこで、本研究は一般的に入手が容易なセルラーゼや酵母を用い、マオウエキス添加により発酵の至適条件の緩和を行うことで同時糖化発酵に応用できるか検討した。

2. 実験方法

2.1 酵母の前培養

酵母は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に属し、他の出芽酵母菌株にはない高いアルコール発酵性を示す清酒酵母の協会 6 号株 (理化学研究所) を用いた。寒天培地上で培養した酵母を白金耳播種し、100 mL の YPD 培地にて 35℃で 72 時間前々培養した。YPD 培地は酵母エキス B2 (ORIENTAL YEAST CO.,LTD) 10 g、ハイポリペプトン S (日本製薬) 20 g、D-グルコース (和光純薬工業) 150 g、イオン交換水 1 L にて調製後、121℃で 30 分間滅菌したものをを用いた。前々培養した酵母を 100 μL 採取し、新たな YPD 培地 100 mL に播種し 35℃でさらに 24 時間前培養したものをを用いた。酵母濃度は ATP アナライザー (東亜 DKK 製 AF-100) で細胞内 ATP の測定を行い、コロニーカウントにより作成した検量線を用いて換算した。

2.2 酵素セルラーゼの調製

酵素は商業用セルラーゼであるセルロシン AC40 (HBI Enzymes Inc.) を使用した。セルロシン AC40 10 g をイオン交換水 25 mL に溶解させ 45℃で 24 時間攪拌したものをを用いた。これはセルロシン AC40 には約 60% のデキストリンが混合されており、添加前にすべてをグルコースに分解させるために行った。この溶液を 0.45 μm メンブレンフィルター (ADVANTEC 製 A045A047A) を用いて濾過滅菌したものをを用いた。

2.3 マオウエキスの調製

マオウ (刻) 15 g (栃本天海堂) をイオン交換水 300 mL 中で 100℃ 30 分間煎じた。固液分離後、溶液を 15000 rpm で 5 分間遠心分離を行い、得られた上清を 0.45 μm メンブレンフィルター (ADVANTEC 製 A045A047A) を用いて濾過滅菌した。この溶液をマオウエキスとして試験に用いた。エキス中の蒸発残留物濃度は水分計 (島津製作所 MOC63u) を用いて測定した。

2.4 同時糖化発酵

Table 1 に実験条件を示す。YP 培地は酵母エキス B2 (ORIENTAL YEAST CO.,LTD) 10 g、ハイポリペプトン S (日本製薬) 20 g、イオン交換水 1 L を用いて調製後、クエン酸緩衝液を用いて pH5 に調整した。50 mL の蓋付き試験管に所定量の YP 培地、粉末セルロースを加え 121℃で 30 分間滅菌した。滅菌後、酵素溶液と酵母懸濁液を同時に加えることにより同時糖化発酵を行った。高いエタノール濃度を得ることを目的とし低酸素条件下で行った。粉末セルロース濃度 5% w/v、酵素溶液濃度 0.5 g/g-cellulose、酵母濃度 2×10^8 cell/L、マオウエキスを所定量入れ、YP 培地と合わせて総量 50 mL とした。ミッ

Table 1 Experimental conditions for SSF

Cellulose	5% w/v
Cellulosin AC40	0.5 g/g-cellulose
<i>S.cerevisiae</i> (Kyokai No.6)	2×10^8 cell/L
Temperature	37°C
pH	5
Rotation	110 rpm

クローター (アズワン製 VMRC-5) を用い恒温槽温度 37°C、回転速度 110 rpm で同時糖化発酵を行った。液相のサンプリングを 0, 12, 24, 48, 72 h に行い、グルコース濃度とエタノール濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて分析及び定量した。HPLC システムは、検出器 (日本分光製 RI-2031Plus)、ポンプ (日本分光製 PU-980)、カラム (昭和電工製 GF-510HQ) から構成され、LCNet II で制御した。カラムオープン 40°C、溶離液はイオン交換水 (流量 1 mL/min) を用いた。

3. 結果および考察

3.1 SSF におけるマオウエキスの添加効果

SSF におけるエタノール発酵に及ぼすマオウエキス添加の影響を調べた。反応温度は 37°C と、酵母の至適温度である 25°C より高めに設定し、酵素の至適温度に近づけた。マオウエキスの添加濃度は 3 g/L とした。Fig.1 より、時間と共にグルコース濃度が減少し、エタノール濃度が増加していることから、酵母がグルコースを消費してエタノールが生成したことが示された。0 h におけるグルコース濃度は、酵素であるセルロシン AC40 に含まれているデキストリンに由来する。マオウエキスを添加したものは 24 h でエタノール濃度 8.3 g/L に到達した。これは、無添加のとき 72 h で生成したエタノール量で

ある 7.6 g/L よりも高くなった。このことより、マオウエキスを添加することで無添加のものに比べて発酵時間を 1/3 に短縮できることがわかった。しかし、すべてのグルコースをエタノールに転換することは、今回の反応時間の範囲では実現できていない。これは温度 37°C が酵母にとって増殖に適さない条件であったためと考えられる。

3.2 SSF におけるマオウエキスの添加濃度

マオウエキスの添加濃度が SSF に及ぼす影響を検討した。結果を Fig.2 に示す。マオウエキス 0.24 g/L 添加した条件では無添加に比べてエタノール生成量が低かった。この原因として、この濃度のマオウエキスでは発酵阻害に作用したことが考えられる。一方、マオウエキス 1.2 g/L 添加ではエタノール生成量は無添加に比べて約 1.1 倍の増加がみられた。また、添加量 3 g/L では 24 h 後には無添加の約 1.5 倍のエタノール生成がみられ、実験開始 72 h 後もその阻害及び促進効果は継続することが確認された。これらの結果より、マオウエキスは低濃度では酵母に対し阻害作用があるが、一定の濃度以上では促進効果が発現し、SSF によるエタノール製造時間の短縮に寄与したものと考えられる。

4. 結論

バイオエタノール生成において、マオウエキスの添加による発酵促進効果を同時糖化発酵に応用したところ、マオウエキス添加による至適条件の緩和作用により、無添加で 3 日かかるエタノール製造を 1 日に短縮させることに成功した。なお、本研究の内容は特許出願済 (特願 2018-199484) である。

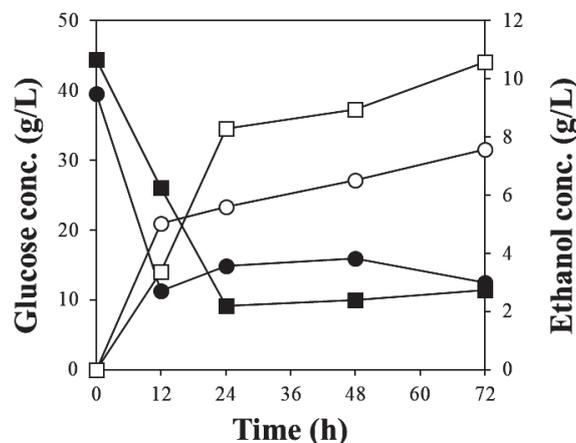


Fig.1 Time course of glucose and ethanol concentration during SSF process with / without adding 3 g/L ephedra extract. ●; Glucose concentration without addition, ○; Ethanol concentration without addition, ■; Glucose concentration with addition of ephedra extract 3 g/L, □; Ethanol concentration with addition of ephedra extract 3 g/L

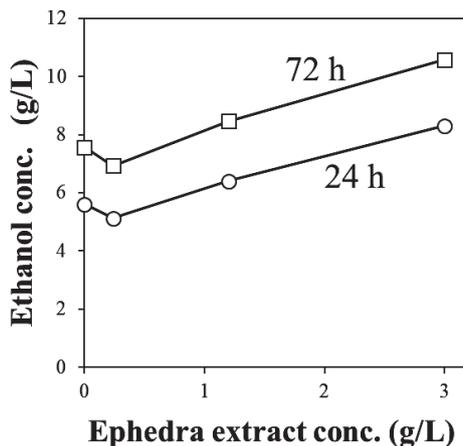


Fig.2 Ethanol concentration after 24 h and 72 h on SSF with different ephedra extract concentration.
 ○; Ethanol concentration after 24 hours, □; Ethanol concentration after 72 hours

謝辞

本研究の一部は、福岡大学研究推進部の研究経費によるものである。(課題番号: 177006)

参考文献

[1] バイオマス活用推進基本計画 (2016)
 [2] N. Mosier, C. E. Wyman, B. D. Dale, R. T. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple, C. M. Ladisch: Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass: *Bioresour. Technol.*, 96, 673-686 (2005)
 [3] F. Carneiro, L. C. Duarte, F. M. Girio: Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments: *J. Sci. Ind. Res.*, 67, 849-864 (2008)
 [4] A. T. W. M. Hendriks, G. Zeeman: Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass: *Bioresour. Technol.*, 100, 10-18 (2009)
 [5] B. Yang, C. E. Wyman: Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol: *Biofuels Bioprod. Bior.*, 2, 26-40 (2008)
 [6] J.D McMillan: Pretreatment of lignocellulosic biomass: *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, American Chemical Society, 292-324 (1994)
 [7] F.ois Torney, L.Moeller, A. Scarpa, K. Wang: Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize: *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 193-199 (2007)
 [8] S. Larsson, E. Palmqvist, B. Hahn-Hagerdal, C. Tengborg, K. Stenberg, G. Zacchi, N.-O. Nilvebrant: The generation of fermentation inhibitors during dilute

acid hydrolysis of softwood: *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 151-159 (1999)
 [9] B. C. Saha, L. B. Iten, M. A. Cotta, Y. V. Wu: Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol: *Process Biochemistry*, 40, 3693-3700 (2005)
 [10] G. Bonn: Analytical determination of 1,6-anhydro-b-D-glucopyranose and kinetic studies under hydrothermal conditions: *J. Carbohydr. Chem.*, 4, 405-419 (1985)
 [11] S. Larsson, E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, C. Tengborg, K. Stenberg, G. Zacchi, N. Nilvebrant: The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood: *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 151-159 (1999)
 [12] Y. Y. Lee, Prashant Iyer, R. W. Torget: Dilute-Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass *Advances in Biochemical Engineering: Biotechnology*, 65, 93-115 (1999)
 [13] B. C. Saha, M. A. Cotta: Ethanol Production from Alkaline Peroxide Pretreated Enzymatically Saccharified Wheat Straw: *Biotechnology Progress*, 22 (2008)
 [14] J. M. Lee, J. Shi, R. A. Venditti, H. Jameel: Autohydrolysis pretreatment of Coastal Bermuda grass for increased enzyme hydrolysis: *Bioresour. Technol.*, 100, 6434-6441 (2009)
 [15] A. E. Farrell, R. J. Plevin, B. T. Turner, A. D. Jones, M. O' Hare, D. M. Kammen: Ethanol can contribute to energy and environmental goals: *Science*, 311, 506-508 (2006)
 [16] Z. Xiao, X. Zhang, D. J. Gregg, J. N. Saddle: Effects of Sugar Inhibition on Cellulases and β-Glucosidase During Enzymatic Hydrolysis of Softwood Substrates: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1115-1126(2004)

- [17] M. Holtzapfle, M. Cognata, Y. Shu, C. Hendrickson: Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents: *Biotechnology and Bioengineering*, 36 (1990)
- [18] Z. Kádár, Z. Szengyel, K. Réczey: Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol: *Industrial Crops and Products*, 20, 103-110 (2004)
- [19] S. H. Krishna, G.V. Chowdary, D. S. Reddy, C. Ayyanna: Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated *Antigonum leptopus* (Linn) leaves to ethanol: *J Chem Technol Biotechnol*, 74, 1055-1060 (1999)
- [20] T. Nishida, S. Shindo, S. Matsuda, I. Sakaki, T. Takahashi, H. Mori: Production of Bioethanol from Pulverized Japanese Cedar Powder by Simultaneous Saccharification and Fermentation with High-temperature Fermentability Yeast *Schizosaccharomyces japonicus* SS4-5: *Journal of the Japan Institute of Energy*, 95, 283-288 (2016)
- [21] H. Masamoto, M. Matsuyama, Y. Fukuhara, W. Kowhakul, M. Shigematsu: Accelerating effect of the crude drug extracts on the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: *Proceeding Book of Full Papers ACB 2017, The 13rd Asian Congress on Biotechnology "Bioinnovation and Bioeconomy"*, 255-1-255-10 (2017)
- [22] B. C. Saha, L. B. Iten, M. A. Cotta, Y. Victor Wu: Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol: *Process Biochemistry*, 40, 3693-3700 (2005)
- [23] B. C. Saha, M. A. Cotta: Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol: *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 528-532 (2007)