

平成 21 年度

修士論文

農産廃棄物を活用した

バイオエタノール生産の基礎研究

三重大学院 生物資源学研究科

資源循環学専攻 食品資源工学研究室

米田 大祐

目次

1. 略号	1
2. 緒言	2
3. 実験方法	
3.1 穀物酵素活性試験	
3.1.1 穀物を用いた可溶性デンプンの糖化方法	
3.2 最適温度の検討、培地とバッファーの比較	
3.2.1 コメの内生酵素を用いた可溶性デンプンの糖化方法	
3.3 浸漬日数の検討	
3.3.1 発芽方法	
3.3.2 浸漬日数の検討法	
3.4 希釈倍率の検討	
3.4.1 希釈法(2、5、10 倍)	
3.4.2 希釈法(10、25、50、75、100 倍)	
3.5 コメの内生酵素を用いた糖化液からのバイオエタノール生産	
3.5.1 培養方法	
3.6 コメの内生酵素を用いた生デンプンの糖化	
3.6.1 コメの内生酵素を用いたコメデンプン、ボールミル処理コメデンプンの糖化方法	
3.7 分析	
3.7.1 全糖量の測定	
3.7.2 還元糖量の測定	

3.7.3 平均重合度の計算

3.7.4 エタノール測定法

4. 実験結果および考察

4.1 穀物酵素活性試験

4.2 最適温度の検討、培地とバッファーの比較

4.3 浸漬日数の検討

4.4 希釈倍率の検討

4.4.1 希釈法(2、5、10倍)

4.4.2 希釈法(10、25、50、75、100倍)

4.5 コメの内生酵素を用いた糖化液からのバイオエタノール生産

4.6 コメの内生酵素を用いた生デンプンの糖化

5. 要約

6. 謝辞

7. 参考文献

1. 略号

DP average degree of polymerization

2. 緒論

地球は長い歴史の中で、地殻変動やマグマ活動、太陽エネルギーなどの大きな循環から、食物連鎖などの小さな循環を繰り返すことで、物質循環の絶妙なバランスを保ってきた。しかし近年、人類の活動によりバランスが崩れようとしている。ここ数百年で爆発的な発展を遂げ、人口もそれとともに増加してきた。この発展は、長い年月の中で蓄積した化石燃料を大量に消費することで得られたものである。このことが、地球温暖化問題、エネルギー問題、食糧問題、人口問題など様々な問題を引き起こしている。これらの問題は早急に、世界的な規模で対策されなければならない。

【エネルギーと環境問題】

現在、世界のエネルギーの約 88 %を化石燃料で賄っている¹⁾。化石燃料は、様々な分野で使用され(Fig.2-1)、大気中に大量の CO₂ を排出している。CO₂ は地球温暖化の大きな要因のひとつである。CO₂ 排気のおよそ 20%を占める自動車の排気ガスには CO₂ だけではなく、NO_x、SO_x、CO やアルデヒド類など人体に有害な成分が含まれ、地球温暖化のほかに酸性雨、大気汚染などの原因となり、環境負荷が大きい²⁾。

一昨年より、京都議定書の約束期間が始まった。日本では、2008 年から 2012 年までの 4 年間で基準年(1990 年)の CO₂ 排出量から 6 %削減を行わなければならない(Fig.2-2)。しかし、CO₂ 排出量は 1990 年から増加を続けている。そのため、政府機関、地域、企業では様々な対策がされている³⁾。

その中で、注目を集めているのがバイオマスエネルギーである。このエネルギーは「燃焼させても二酸化炭素量として加算しない」(Intergovernmental panel on Change (ICPP)より)と明示されている。化石燃料の使用は長い時間(数

千年以上)をかけて固定化したエネルギーの消費及び CO₂ の大量排出であり、排出された CO₂ の吸収は長い年月を要する。これに対し、バイオマスエネルギーの使用は短い時間(数十年)で固定化したエネルギーの消費及び CO₂ 排出で、これにより排出された CO₂ は短い年月で植物等に固定化される。これがカーボンニュートラルの考えであり、ICPP がバイオマスエネルギーは燃焼により二酸化炭素量として加算しないと明示した由来である。現在、世界で使用されるエネルギーの 10%はバイオマスエネルギーである⁴⁾。日本ではバイオマスから生産されたバイオエタノールは 2005 年から 3%エタノール混合ガソリン(E3)が導入され、注目を集めている。政府は 2030 年までに 10%エタノール混合ガソリン(E10)に置き換える予定である。ブラジルでは 1975 年から化石燃料の代替エネルギーとしてエタノール生産を行うアルコールプログラム(PROALCOOL)に取り組み⁵⁾、アメリカでは 1978 年に、カナダでは近年取り組みが始められている⁶⁾。このプログラムは環境、経済、社会面に効果があり、世界で重要なバイオマスエネルギープログラムとなっている⁷⁾。

世界的にバイオエタノールの原料として用いられているものは、サトウキビやトウモロコシである⁸⁻¹⁰⁾。バイオエタノール生産量の多いブラジルやアメリカは、これらバイオマスを大量生産し原料としている。サトウキビやトウモロコシは食糧として大変重要かつ多くの料理の原料となり、競合が起きる場合もある。実際に、2008 年末までの原油価格の高騰や、バイオマスエネルギーの需要が高まったことなどから、トウモロコシの価格高騰を引き起こした。それに伴い、トウモロコシが原料となるもの及びコーンスターチを含むものなども高騰した。食糧との競合は我々の生活にも大きな影響を与える。

そのため、未利用バイオマス資源からエタノール生産する研究が多く行われている。

【バイオエタノール生産について】

バイオマスからエタノール生産し、工業的に利用するためには低コストかつ効率のよいシステムの構築が必要となる。重要なファクターとして、糖質源、前処理(糖化、脱塩、pH 調整、滅菌)、培養液の成分、これらが大きな影響を与える。

糖質源については大きく分けてデンプン由来、リグノセルロース由来がある。デンプン由来糖質源は、上述のトウモロコシやサトウキビ、廃パンや廃米飯がある。トウモロコシ、サトウキビなどの資源が豊富な諸外国は比較的簡単にバイオエタノール生産可能だが、日本に適応した場合や食糧競合を考慮すると同様の方法をとることは難しい。そのため、食品工場からでる廃パン、廃米飯などのデンプン系食品廃棄物¹⁾を利用するのが望ましい。リグノセルロース由来糖質源は後ほど詳しく述べるが、間伐材、林地残材などのハードバイオマスや稲藁、麦藁、バガス(サトウキビの搾りかす)などのソフトバイオマスがあり、これらの利用は食糧競合しないことから注目を集めている。

前処理については、バイオマスの処理法に応じて大きく変わる。大きく分けて酵素糖化法と硫酸糖化法がある。酵素糖化法は、酵素によりバイオマスを糖化し、その糖化液を発酵液として直接利用できる。硫酸糖化法と比べ、少ない工程でエタノール生産が可能である。しかし、酵素が比較的高価なことと、硫酸糖化法と比べ糖化効率が悪いこと、予期せぬ阻害因子が生じることもあり、実用段階にいたるまでに時間がかかる。

硫酸糖化法は、酵素糖化法と比べ、糖化効率が高く、大量かつ短時間の処理が可能で比較的簡単に工業利用ができる。しかし、エタノール生産に一般酵母を用いる場合、硫酸によりバイオマスを糖化後、pH 調整、脱塩、滅菌と多段階の操作が必要になる。特に滅菌でのエネルギー使用は比較的大きく、全体の20-30%を占めるといわれる。ここをクリアできるならば硫酸糖化法による効率

のよいエタノール生産が期待できる。そのためには、なんらかのストレスがかかった培地での高濃度エタノール生産酵母が必要となる。これまでに、高温耐性、エタノール耐性¹²⁾、耐酸性¹³⁾、耐塩性¹⁴⁾を持ったエタノール生産菌の報告がある。

当研究室では、耐酸性、耐塩性、耐糖性を有するエタノール生産酵母を単離した¹⁵⁾。この酵母は、デンプン系食品廃棄物の希硫酸加水分解物からの高濃度のエタノールを生産することを想定し、酸性条件で生育が可能な酵母を求め、酸性温泉からスクリーニングされたものである。この酵母は耐酸性のほかに、希硫酸加水分解物の pH を調整するとき生じる硫酸塩に対する耐性を持ち、さらに耐糖性を持つため、高濃度の糖質源の発酵が可能な酵母である。この複合耐性酵母は *Issatchenkia orientalis* MF121 株(以後 *I. orientalis*)と同定された。*I. orientalis* は酸塩条件下にて、醸造用酵母、ワイン酵母と比べ高いエタノール生産性を有する。そのため、デンプン系食品廃棄物の硫酸処理法の工程で pH 調製は比較的軽く済み、脱塩の操作も必要なく、この条件では雑菌汚染の恐れもない。また酵素糖化法でも、予期せぬ阻害要因が生じた場合、一般酵母と比べ複合的な耐性を有する *I. orientalis* 用いれば、効率のよいエタノール生産が可能である。これらのことから *I. orientalis* の利用により低コストでのエタノール生産が可能となる。

培養液の成分については、加水分解物の発酵を行う際、1% polypepton、0.5% Yeast extract を栄養成分として添加している。しかし、polypepton(日本製薬株式会社)は 500 g で 3800 円、乾燥酵母エキス(ナカライテスク株式会社)は 500 g で 9800 円と非常に高価である。そこで微量のミネラル分を添加する無機合成培地を用いて発酵可能であればコストダウンにつながる。無機合成培地で発酵可能ならば、*I. orientalis* の複合耐性を利用して、海水によるエタノール生産という戦略も考えられる。日本では水が豊富に存在するが、水不足になっ

た場合や水資源が乏しい地域を考慮すると、この発酵技術も生きてくる。したがって、コストダウンとともに海水利用も考慮したエタノール生産が期待される。

【リグノセルロースの利用について】

リグノセルロースからのバイオエタノール生産技術は、食糧競合が起きないことから非常に注目されている。しかし、リグノセルロースの構成糖質すべてを使える酵母が存在しないことや、セルロース利用ができる酵母が非常に少ないことなどの問題点を抱えている。

廃木材や稲藁等などのリグノセルロース由来のバイオマスはすべて、セルロース、ヘミセルロース、リグニン(含有率 4 : 3 : 3)から構成される。このうち、セルロースは100%グルコースからなり、リグニンは発酵の阻害要因となるが、分離すればバイオ燃料として使える。ヘミセルロースはグルコースのほかにマンノース、キシロース、アラビノースなど多種類の糖質から構成されている。広葉樹や稲藁などはヘミセルロース中に約80%ものキシロースを含んでおり、リグノセルロース全体を見るとキシロースの割合がグルコースについて高くなる。したがって、キシロース発酵性酵母 *Pichia stipitis* NBRC10063(以後 *P. stipitis*)を用いるかキシロースを分離しなければ発酵効率が低下してしまう。現在、キシロース発酵性酵母の遺伝子を醸造酵母に導入するなどの研究がたくさん行われている¹⁶⁾。

【果物を用いたエタノール生産】

日本のリンゴ、ナシ、カキ、温州ミカンなどは、品質において高い評価を受け、アジア諸国の富裕層で人気が高い。国内で生産される総果実生産量は約400万トンであるが、摘果、撥ね、売れ残りなどで廃棄される果実（本論文では不

要果実と扱う) を含めると国内の果樹が生産するバイオマス資源はかなりの量である。さらに、完熟した果実の糖濃度は 10%から 20%でエタノール生産に適している。また、砂糖、グルコース、果糖がほとんどであるため、糖化工程を経ないで直接エタノール発酵できることはバイオエタノールの生産では大きなメリットとなる。果実生産量の約半分ほどが廃棄物として生産されていると試算すれば 200 万トンの不要果実が毎年捨てられていることになる。これから約 10 万キロリットルのエタノールが生産できると予測される。

【内生酵素を用いたエタノール生産】

上述の通り、バイオエタノール生産をするためには、さまざまな問題を抱えている。そこで、今回は穀物の内生酵素に着目し、糖化の工程を行うことにした。穀物の内生酵素に着目した理由として、ビールを醸造する際に用いられる麦芽の製造方法にある。麦芽は大麦を浸漬させ、発芽に適した条件にすることにより、大麦に含まれている数々の加水分解酵素、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、プロテアーゼ、ホスファターゼ、キシラナーゼなどが合成され胚乳中に分泌されて細胞壁炭水化物、タンパク質、およびデンプンの一部が分解し、いわゆる“溶け”の現象を進行させる¹⁷⁾。この内生酵素を用いることができれば、市販の酵素を用いずに糖化が可能となる。

農家は米種子の発芽方法を熟知している為、糖化酵素を生産することができると考えられる。このことから、各農家で余剰分として残った米種子を利用して発芽させ、農産廃棄物などのデンプンを糖化できるようになれば、農家レベルでバイオエタノール生産が可能となる。

本研究では、米種子の発芽条件と内生酵素の生産性、デンプンを糖化する場合の酵素作用の最適条件を検討した。また、米種子の内生酵素を用いた糖化液

でバイオエタノール生産も試みた。

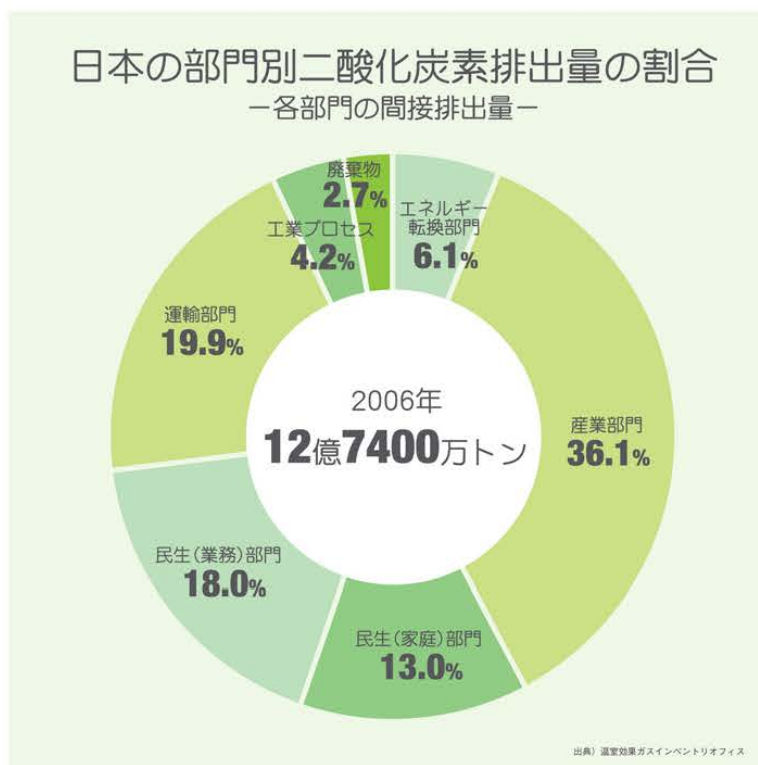
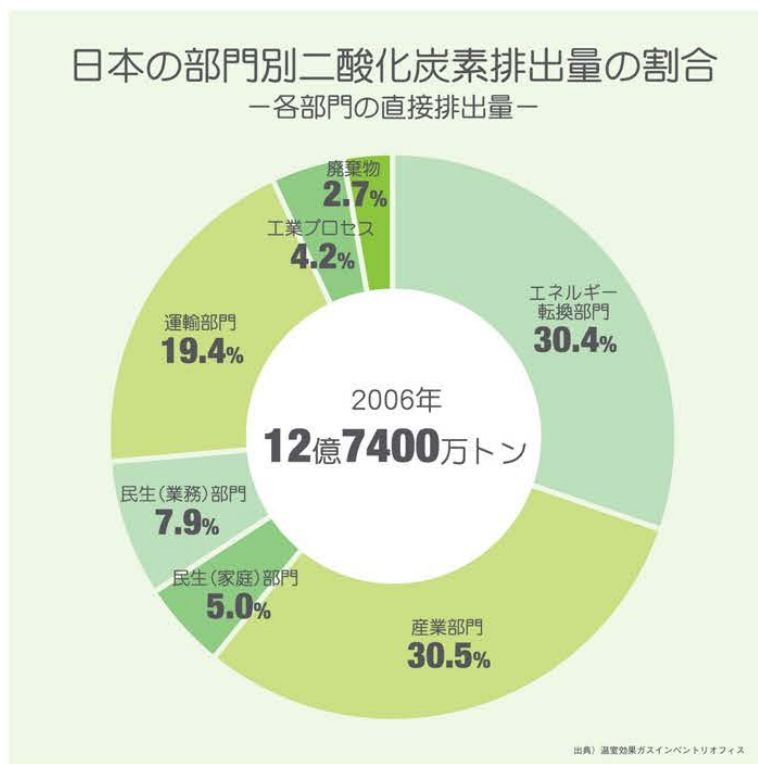


Fig.2-1 日本の部門別二酸化炭素排出量の割合(2006)

(出典：国立環境研究所温室効果ガスインベントリオフィスウェブページ)

○先進国の温室効果ガス排出量について、法的拘束力のある数値約束を各国毎に設定

対象ガス	二酸化炭素、メタン、一酸化二窒素、代替フロン等3ガス(HFC、PFC、SF ₆)の合計6種類
吸収源	森林等の吸収源による二酸化炭素吸収量を算入
基準年	1990年(HFC、PFC、SF ₆ は1995年としてもよい)
目標期間	2008年～2012年の5年間
数値目標	各国の目標→日本△6%、米国△7%、EU△8%等先進国全体で少なくとも5%削減を目指す

○国際的に協調して約束を達成するための仕組み（京都メカニズム）を導入

<p>排出量取引：先進国間での排出枠(割当排出量)をやり取り</p> <p>共同実施：先進国間の共同プロジェクトで生じた削減量を当事国間でやり取り</p> <p>例) 日本・ロシアが協力してロシア国内の古い石炭火力発電所を最新の天然ガス火力発電所に建て替える事業</p> <p>クリーン開発メカニズム：先進国と途上国の間の共同プロジェクトで生じた削減量を当該先進国が獲得</p> <p>例) 日本・中国が協力して中国内の荒廃地に植林を行う事業</p>
--

Fig.2-2 京都議定書概要

(出典：国立環境研究所温室効果ガスインベントリオフィスウェブページ)

3. 実験方法

3.1 穀物酵素活性試験

本研究は、穀物の内生酵素を用いて糖化を行った。今回用いた穀物の中で、糖化能力の高いものを検討した。

3.1.1 穀物を用いた可溶性デンプンの糖化方法

発芽したサツマイモ、ジャガイモ、コメをそれぞれミキサーで粉砕した。粉砕した試料 20g とツアペックドックス培地(以降 Cz 培地)20ml を混合しさらにミキサーにかけた後、水切り用ゴミ袋を用いてろ液を採取した。培地の組成は表 3.1 に示した。採取したろ液を遠心分離(3000rpm、3 分)し、上清を採取した。スクリーバイアルに上清 1ml と 1%(w/v)可溶性デンプン 9ml を混合し、ドラインキュベーターを用いて 60°C で反応を進めた。1、15、30、45、60、120 分ごとに 500 μ l サンプリングを行った直後、沸騰水中に 5 分間入れておき、酵素反応を止めた。それらを Park-Johnson 法とフェノール硫酸法で還元糖量と全糖量を測定し、平均重合度(以降 DP)を算出した。

3.2 最適温度の検討、培地とバッファの比較

3.1 のセクションから、以降の実験では試料としてコメを用いる事とした。3.2 では酵素反応を行う際に重要となる温度の検討を行った。また、pH を調整するバッファの代用として、培地を使用できるのかも検討を行った。

3.2.1 コメの内生酵素を用いた可溶性デンプンの糖化方法

育苗に用いる種もみをミキサーで粉砕した。粉砕した試料 20g と Cz 培地 20ml を混合したもの、粉砕した試料 20g と 0.016M 酢酸バッファ(pH4.8)20ml を混合したものをさらにミキサーにかけた後、水切り用ゴミ袋を用いてろ液を採取した。採取したろ液を遠心分離(3000rpm、3分)し、上清を採取した。スクリーバイアルに上清 1ml と 1%(w/v)可溶性デンプン 9ml を混合し、ドライインキュベーターを用いて 30°C、60°C で反応を進めた。1、15、30、45、60、120 分ごとに 500 μ l サンプルングを行った直後、沸騰水中に 5 分間入れておき、酵素反応を止めた。それらを Park-Johnson 法とフェノール硫酸法で還元糖量と全糖量を測定し、DP を算出した。

3.3 浸漬日数の検討

3.2 のセクションで検討した、コメを用いた場合における糖化の最適条件をもとに、種もみを浸漬させて発芽させる最適日数を検討した。

3.3.1 発芽方法

株式会社ミエバイオから提供して頂いた種もみ 600g を育苗用プラスチックバットに敷き詰め、2l の水道水に浸した。そのバットを 30℃ の恒温室に光が当たらないよう箱に入れ、発芽を行った。3、6、12、14 日に試料を 150g ずつサンプリングした後、50℃ で 1 日乾燥させ、発芽を止めた。これらのサンプルを以降の実験で使用した。

3.3.2 浸漬日数の検討法

3.3.1 で得たサンプルをミキサーで粉碎した。粉碎した試料 20g と Cz 培地 20ml を混合しさらにミキサーにかけた後、水切り用ゴミ袋を用いてろ液を採取した。採取したろ液を遠心分離(3000rpm、3分)し、上清を採取した。スクリーンバイアルに上清 1ml と 1%(w/v)可溶性デンプン 9ml を混合し、ドライインキュベーターを用いて 30℃ で反応を進めた。1、15、30、45、60、120 分ごとに 500 μ l サンプリングを行った直後、沸騰水中に 5 分間入れておき、酵素反応を止めた。それらを Park-Johnson 法とフェノール硫酸法で還元糖量と全糖量を測定し、DP を算出した。

3.4 希釈倍率の検討

3.3 のセクションで検討した最適浸漬日数をもとに、どれぐらいの希釈倍率まで、発芽コメを用いて糖化を行えるのか検討した。

3.4.1 希釈法(2、5、10 倍)

スクリーバイアルに可溶性デンプン 2g を量りとり、Cz 培地を加え、20%(w/v)可溶性デンプン 10ml になるように調整した。3.3.1 で得たサンプル(発芽 6 日目)をミキサーで粉砕した。そこに粉砕した試料 1000、400、200mg を混合し、希釈倍率が 2、5、10 倍になるように調整した。その後、ドライインキュベーターを用いて 30°C で反応を進めた。1/60、2、6、24、48 時間ごとに 200 μ l サンプルングを行った直後、沸騰水中に 5 分間入れておき、酵素反応を止めた。それらを Park-Johnson 法とフェノール硫酸法で還元糖量と全糖量を測定し、DP を算出した。

3.4.2 希釈法(10、25、50、75、100 倍)

スクリーバイアルに可溶性デンプン 2g を量りとり、Cz 培地を加え、20%(w/v)可溶性デンプン 10ml になるように調整した。3.3.1 で得たサンプル(発芽 6 日目)をミキサーで粉砕した。そこに粉砕した試料 200、80、40、26.7、20mg を混合し、希釈倍率が 10、25、50、75、100 倍になるように調整した。その後、ドライインキュベーターを用いて 30°C で反応を進めた。1/60、2、6、24、48 時間ごとに 200 μ l サンプルングを行った直後、沸騰水中に 5 分間入れておき、酵素反応を止めた。それらを Park-Johnson 法とフェノール硫酸法で還元糖量と全糖量を測定し、DP を算出した。

3.5 コメの内生酵素を用いた糖化液からのバイオエタノール生産

実際にコメの再生酵素を用いた糖化液からバイオエタノール生産を行えるのか検討した。なお、3.4のセクションで検討した希釈倍率(2、5、10倍)をもとに実験を行った。

3.5.1 培養方法

使用菌株として、*Issatchenkia orientalis* MF121 株(以後 *I. orientalis* MF121)、*Saccharomyces cerevisiae* 協会7号(以後 *S.cerevisiae* K-7)を用いた。*I. orientalis* MF121 は当研究室で単離同定した酸塩耐性酵母である。*S.cerevisiae* K-7 は醸造酵母である。

前培養の培地には YPD 培地(2 % Glucose、1 % Polypepton、0.5 % Yeast extract)を使用した。この前培養用の YPD 培地 10 mL を内容積 30 mL の試験管に分注し、121 °C、15 分間オートクレーブ滅菌を行った。スラントから酵母 1 コロニーを白金針でとり、上記の培地に植菌した。この培地を、30°C 恒温下、160rpm の条件にて 24 時間振とう培養を行い、これを前培養とした。

上記の前培養液 450 μ L を、3.4.1 でコメの内生酵素を用いた糖化液に植菌し、30°C 恒温下、160rpm の条件にて 192 時間振とう培養を行った。

24 時間ごとの本培養液 250 μ L を内容量 1.5mL のマイクロチューブに採取した。それらを、4°C 恒温下、3000rpm の条件にて、1 分間の遠心分離を行い、100 μ L を用いてアルコール濃度測定を行った。

3.6 コメの内生酵素を用いた生デンプンの糖化

一般に生デンプンは分解されにくいため、今回はコメの内生酵素でどれだけ糖化が行えるのか検討した。また、生デンプンをボールミル処理¹⁸⁾し、物理的に構造を柔らかくしたものでも検討を行った。

3.6.1 コメの内生酵素を用いたコメデンプン、ボールミル処理コメデンプンの糖化方法

スクリーバイアルにそれぞれコメデンプンとボールミル処理コメデンプン、可溶性デンプンを 2g 量りとり、Cz 培地を加え、20%(w/v)可溶性デンプン 10ml になるように調整した。3.3.1 で得たサンプル(発芽 6 日目)をミキサーで粉砕した。そこに粉砕した試料 1000、200mg を混合し、希釈倍率が 2、10 倍になるように調整した。その後、ドライインキュベーターを用いて 30°C で反応を進めた。1/60、2、6、12、24 時間ごとに 20 μ l サンプルングを行った直後、Park-Johnson 法とフェノール硫酸法で還元糖量と全糖量を測定し、DP を算出した。

3.7 分析

3.7.1 全糖量の測定

全糖量の測定には、フェノール硫酸法を用いた。

0、20、40、60、80、100 μ g/ml のグルコース溶液を作成し、蒸留水をブランクとして、490nm での吸光度(OD490nm)を測定した。y 軸を OD490nm、x 軸をグルコース濃度(μ g/ml)として検量線を作成した。この検量線を用いて各サンプルの全糖量を算出した。

3.7.2 還元糖量の測定

還元糖量の測定は Park-Johnson 法を用いた。

0、1、2、3、4、5 μ g/ml のグルコース溶液を作成し、蒸留水をブランクとして、715nm での吸光度(OD715nm)を測定した。y 軸を OD715nm、x 軸をグルコース濃度(μ g/ml)として検量線を作成した。この検量線を用いて各サンプルの還元糖量を算出した。

3.7.3 平均重合度の計算

フェノール硫酸法、Park-Johnson 法で測定した全糖量、還元糖量をもとに平均重合度を算出した。

まず、グルコース標準溶液を使用して平均重合度を算出した。ここで得られた値の逆数を平均重合度求める公式にかけることでサンプルの平均重合度とした。

$$\text{平均重合度} = \{ \text{全糖量}(\%) / \text{還元糖量}(\%) \} \cdot 1/a$$

a: グルコース標準溶液を使用して得られた平均重合度

3.7.4 エタノール測定法

エタノール濃度は、各サンプル 200 μL を遠心分離(8500 rpm、5分)した後、簡易エタノール分析器 AL-2 型アルコメイト(理科計器株式会社製)に 100 μL 供し、エタノール濃度(% v/v)を測定した。この値にエタノールの比重 0.8 を乗じてエタノール濃度(% w/v)とした。

表 3-1 ツアペックドックス培地

Component	Concentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.0(g/L)
KH_2PO_4	1.0(g/L)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.75(g/L)
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	60(mg/L)
Yeast extract	0.5(g/L)

4. 実験結果および考察

4.1 穀物酵素活性試験

発芽した穀物の内生酵素を用いて、可溶性デンプンを 60°C で、2 時間反応させた還元糖量を図 4.1、DP を図 4.2 にそれぞれ示した。

図 4.1 を見てみると、穀物の種類によって差はあるが 2 時間反応させると還元糖量の増加がみられた。それぞれの最終還元糖量は、サツマイモが 1.8mg/ml、コメが 1.3mg/ml、ジャガイモが 0.5mg/ml となり、この 3 サンプルの中ではサツマイモとコメが高い還元糖量があるという結果になった。

図 4.2 を見てみると、還元糖量が増加していることから、3 サンプルとも DP の値が減少し、糖化が進んでいることが分かる。それぞれの最終 DP は、サツマイモが 5.6、コメが 7.3、ジャガイモが 18.5 となった。

以上の結果から、この 3 サンプルの中ではサツマイモとコメの糖化能力が高いことがわかった。なお、サツマイモは水分含量がコメと比べて高いなどの理由により、長期保存が難しく、コメよりも保存する際に場所をとるという問題点がある。一方コメは長期保存が可能であり、発芽の手順が容易¹⁹⁾であることから、以降の実験はコメをサンプルとして用いることとした。

4.2 最適温度の検討、培地とバッファーの比較

コメの内生酵素を用いて、可溶性デンプンを 30、60°C で、培地とバッファーを比較するために、2 時間反応させた還元糖量を図 4.3、DP を図 4.4 にそれぞれ示した。

図 4.3 を見てみると、30°C と 60°C では培地とバッファーそれぞれで、60°C の還元糖量が高い値を示している。それぞれの最終還元糖量は、60°C の培地で 4.8mg/ml、60°C のバッファーで 3.6mg/ml、30°C の培地で 3.3mg/ml、30°C のバ

バッファーで 2.3mg/ml となった。また、糖化開始の時点で、培地とバッファーに差が出ているのは、培地に 0.5mg/ml の酵母エキスが含まれているためだと考えられる。

図 4.4 を見てみると、2 時間でほぼ同じ DP になっていることが分かる。それぞれの最終 DP は、60°C の培地で 3.5、60°C のバッファーで 3.7、30°C の培地で 5.1、30°C のバッファーで 5.4 となった。

以上の結果から、培地とバッファーは、還元糖量では大差が見られないことから培地をそのままバッファーの代用として使用できることが示唆された。温度の比較では還元糖量を見た場合、30°C よりも 60°C で反応を進めた場合のほうが糖化の速度が速いことが分かった。しかし、DP で比較した場合、最終 DP で 30°C と 60°C で大差が見られないことから、エネルギー使用量を考慮したうえで、以降の実験は 30°C で反応を進めた。

4.3 浸漬日数の検討

これまでの実験は、種もみを浸漬させてからの日数が、不明なサンプルを用いていた。そのため、今回の実験では実際に種もみを発芽させ、どの日数のものが糖化に適しているかを検討した。浸漬日数の異なったコメの内生酵素を用いて、可溶性デンプンを 30°C で、2 時間反応させた還元糖量を図 4.5、DP を図 4.6 にそれぞれ示した。

図 4.5 を見てみると、浸漬 12 日目以降に還元糖量が最大となり、それ以降は下がっていることが分かる。このことから、12 日目以降には種もみに含まれるデンプンの糖化が終了し、酵素の活性が弱くなっていることが示唆される。それぞれの最終還元糖量は、浸漬前で 1.0mg/ml、浸漬 3 日目で 2.9mg/ml、浸漬 6 日目で 6.1mg/ml、浸漬 12 日目で 7.7mg/ml、浸漬 14 日目で 5.8mg/ml となった。

図 4.6 を見てみると、浸漬 6、12、14 日目で DP に差がないことが分かる。このことから、コメの酵素を用いた場合の糖化限界値が 6 日以降であることが示唆された。それぞれの DP は、浸漬前で 11.9、浸漬 3 日目で 3.9、浸漬 6 日目で 1.8、浸漬 12 日目で 1.5、浸漬 14 日目で 1.9 となった。

以上の結果から、DP に差が出ていない点と、浸漬日数は短いほうが、時間とコストがかからないという点で、以降の実験は浸漬 6 日目のコメを用いて検討を行った。

4.4 希釈倍率の検討

4.4.1 希釈法(2、5、10 倍)

コメの内生酵素を、可溶性デンプンの 2、5、10 倍希釈に調整し 30℃で、24 時間反応させた還元糖量を図 4.7、DP を図 4.8 にそれぞれ示した。

図 4.7 を見てみると、2、5、10 倍希釈の順に還元糖量が増えている。それぞれの最終還元糖量は、2 倍希釈で 84.9mg/ml、5 倍希釈で 63.8mg/ml、10 倍希釈で 45.1mg/ml となった。

図 4.8 を見てみると、反応開始から 6 時間でおおよそ DP7 にそれぞれのサンプルが収束していることが分かる。それぞれの最終 DP は、2 倍希釈で 4.0、5 倍希釈で 4.6、10 倍希釈で 6.4 となった。

4.4.2 希釈法(10、25、50、75、100 倍)

コメの内生酵素を、可溶性デンプンの 10、25、50、75、100 倍希釈に調整し 30℃で、24 時間反応させた還元糖量を図 4.9、DP を図 4.10 にそれぞれ示した。

図 4.9 を見てみると、2、5、10 倍希釈の順に還元糖量が増えている。それぞれの最終還元糖量は、10 倍希釈で 45.1mg/ml、25 倍希釈で 38.9mg/ml、50 倍希釈で 23.0mg/ml、75 倍希釈で 21.3mg/ml、100 倍希釈で 17.2mg/ml となった。

図 4.10 を見てみると、それぞれの最終 DP は、10 倍希釈で 6.4、25 倍希釈で 7.0、50 倍希釈で 11.5、75 倍希釈で 12.6、100 倍希釈で 16.4 となった。

4.5 コメの内生酵素を用いた糖化液からのバイオエタノール生産

コメの内生酵素を 2、5、10 倍希釈で、反応を進めた糖化液に *I. orientalis* MF121、*S.cerevisiae* K-7 を培養した際の時間変化によるエタノール生産量を図 4.11 に示した。

I. orientalis MF121 のそれぞれの最高エタノール濃度は、2 倍希釈で 4.2%(w/v)、5 倍希釈で 2.3%(w/v)、10 倍希釈で 1.2%(w/v)となり、2、5、10 倍希釈の順にエタノール濃度に大きな差が見られた。*S.cerevisiae* K-7 のそれぞれの最高エタノール濃度は、4.4%(w/v)、4.1%(w/v)、3.5%(w/v)となり、2、5、10 倍希釈の順にエタノール濃度に大きな差が見られなかった。

このことから、*S.cerevisiae* K-7 のほうが *I. orientalis* MF121 よりも DP が高くても発酵を行えることがわかった。

以上の結果から、コメの内生酵素 2、5、10 倍希釈でエタノールの生産を行う場合においては *S.cerevisiae* K-7 を用いることがよいと示唆された。しかし、*I. orientalis* MF121 よりも発酵速度が遅いため、培地の改良を行うことが考えられる。また、10 倍希釈以上の検討を行っていないため、*S.cerevisiae* K-7 を用いてさらなる検討も必要である。

4.6 コメの内生酵素を用いた生デンプンの糖化

コメの内生酵素を、コメデンプン、ボールミル処理コメデンプン、可溶性デンプンそれぞれ 2、10 倍希釈に調整し 30°C で、24 時間反応させた還元糖量を図 4.12、DP を図 4.13 にそれぞれ示した。

図 4.12 を見てみると、可溶性デンプン、ボールミル処理コメデンプン、コメ

デンプンの順に還元糖量が増加していることが分かる。このことから、ボールミル処理により、物理的にコメデンプンの構造が破壊されたことで、酵素反応が進みやすくなったと示唆される。それぞれの最終還元糖量は、コメデンプン 2、10 倍希釈で 31.6mg/ml、13.4 mg/ml、処理コメデンプン 2、10 倍希釈で 44.7mg/ml、30.9 mg/ml、可溶性デンプン 2、10 倍希釈で 84.9mg/ml、45.1 mg/ml となった。

図 4.13 を見てみると、12 時間でそれぞれの DP が 20 以下まで収束していることが分かる。このことから、生デンプンでもある程度まではコメの内生酵素で糖化できることが分かった。それぞれの DP は、コメデンプン 2、10 倍希釈で 10.8、21.5、処理コメデンプン 2、10 倍希釈で 7.6、9.3、可溶性デンプン 2、10 倍希釈で 4.0、6.4 となった。

以上の結果から、コメデンプンをボールミル処理することにより、糖化の速度と、最終 DP に改善が見られた。また、2 倍希釈と 10 倍希釈の比較では、2 倍希釈は DP が 20 以下になるまで 2 時間要したが、10 倍希釈は 12 時間要している。このことから、希釈倍率が高くなるにつれてボールミル処理をしたものとそうでないものに差が出てくると考えられる。そのため希釈倍率を高くした実験も検討していきたい。

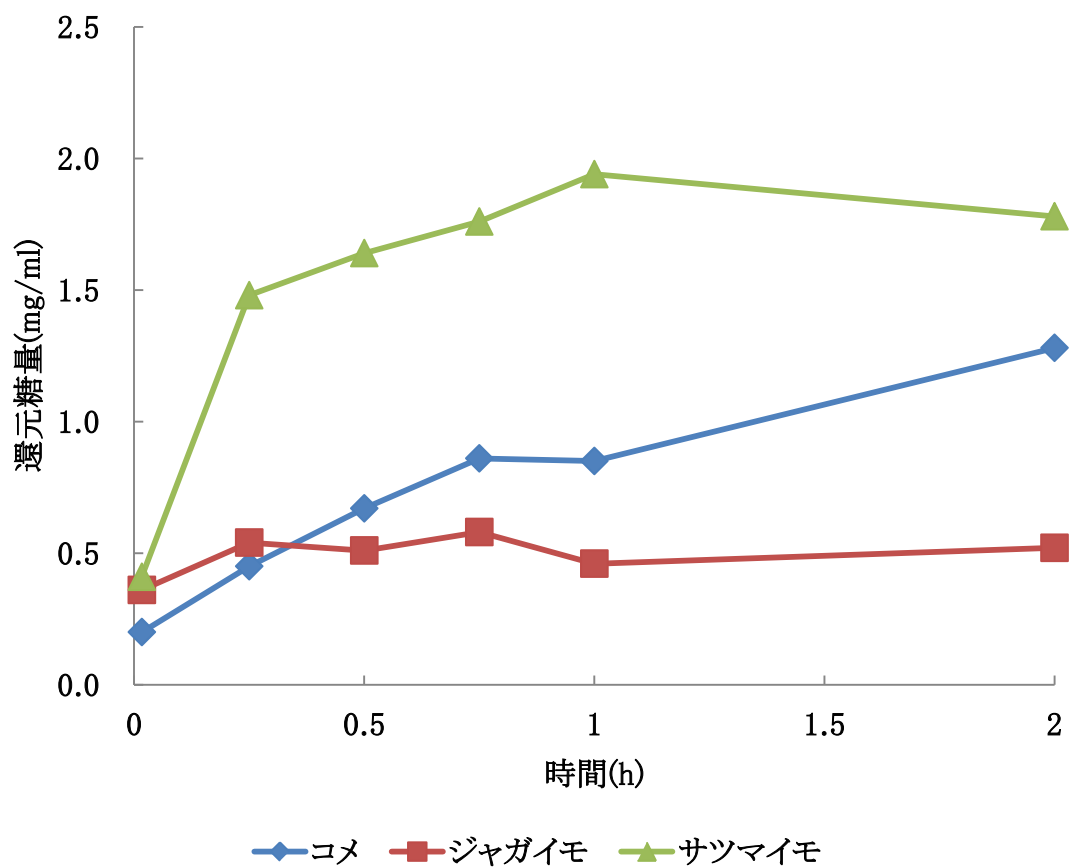


図 4.1 穀物を用いた可溶性デンプンの糖化(還元糖量)

コメ、ジャガイモ、サツマイモの内生酵素を用いて糖化を行った際の時間変化による還元糖量(mg/ml)

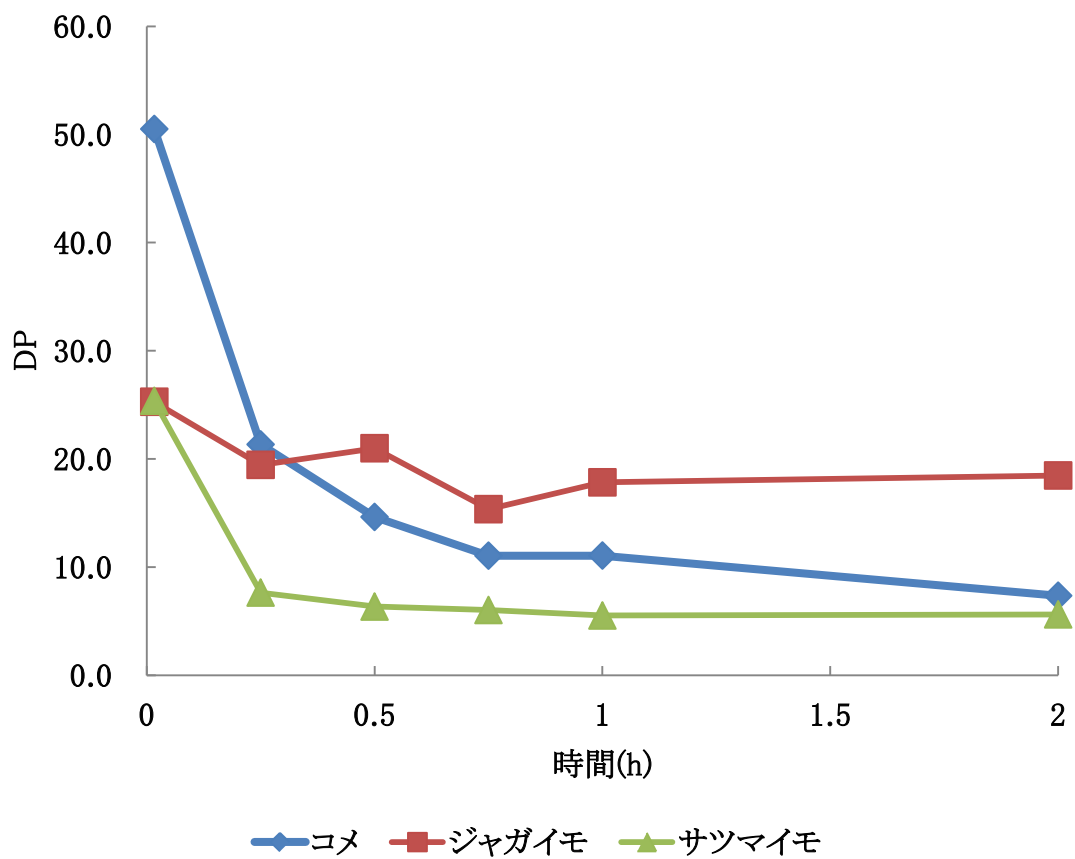


図 4.2 穀物を用いたデンプンの糖化(DP)

コメ、ジャガイモ、サツマイモの内生酵素を用いて
糖化を行った際の時間変化による DP

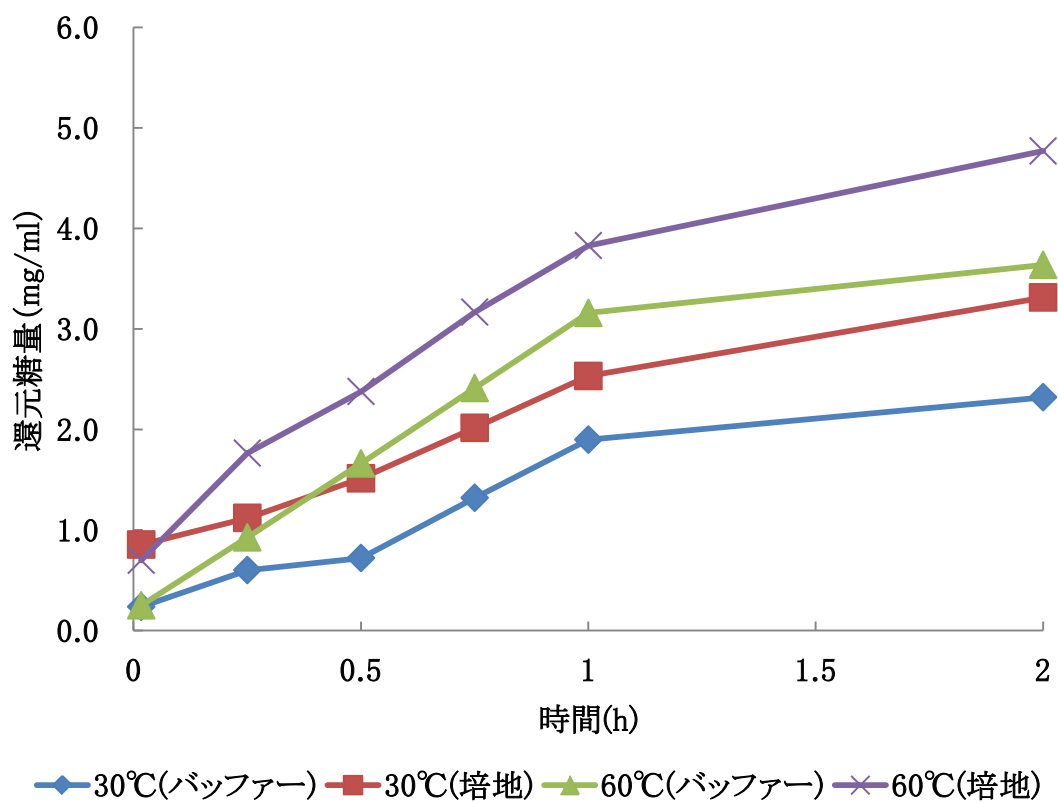


図 4.3 最適温度の検討、培地とバッファーの比較(還元糖量)

コメの内生酵素を用いて 30°C、60°C で反応を進めた場合と培地、バッファーを比較した際の時間変化による還元糖量(mg/ml)

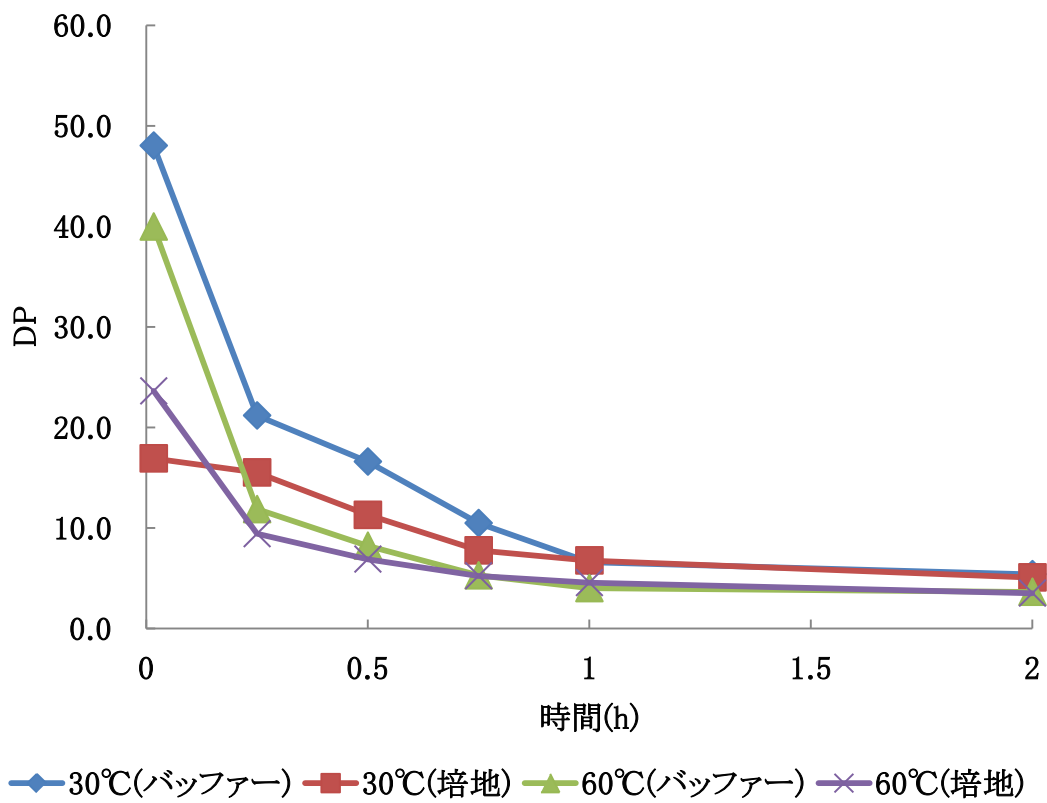


図 4.4 最適温度の検討、培地とバッファーの比較(DP)

コメの内生酵素を用いて 30°C、60°C で反応を進めた場合と
培地、バッファーを比較した際の時間変化による DP

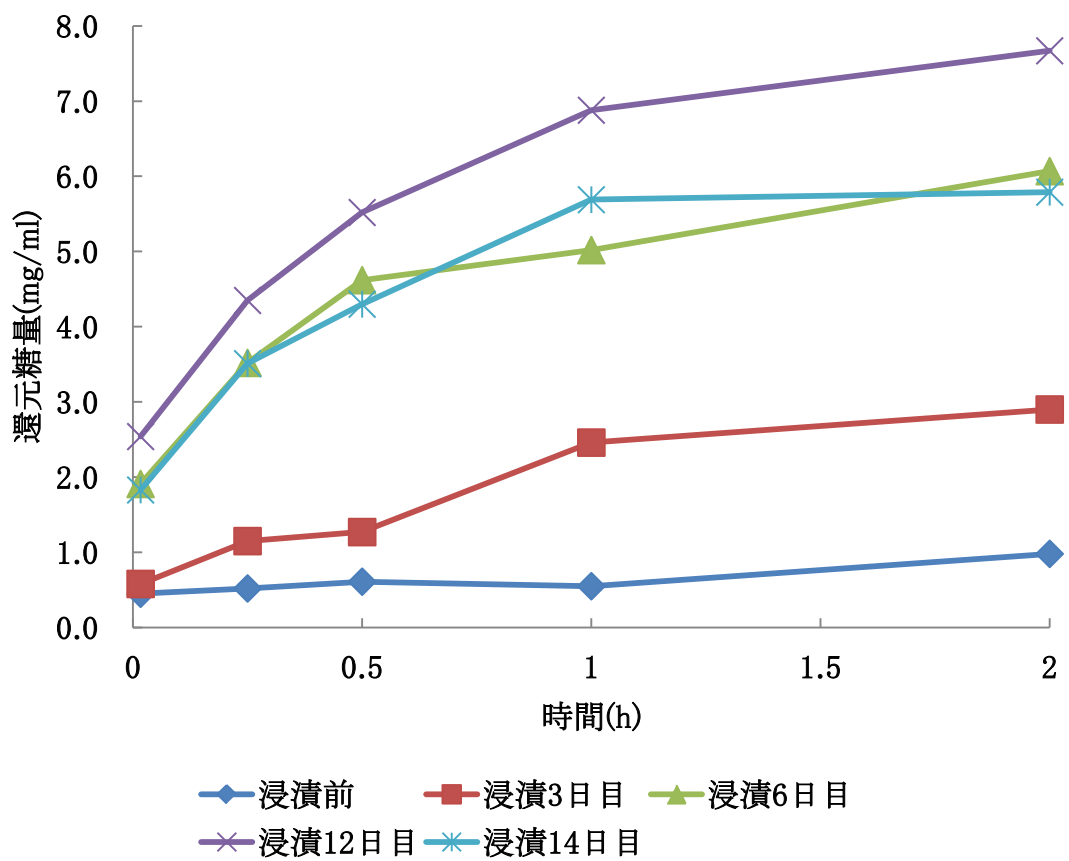


図 4.5 浸漬日数の検討(還元糖量)

種もみの浸漬日数の違いによる糖化を行った際の還元糖量(mg/ml)

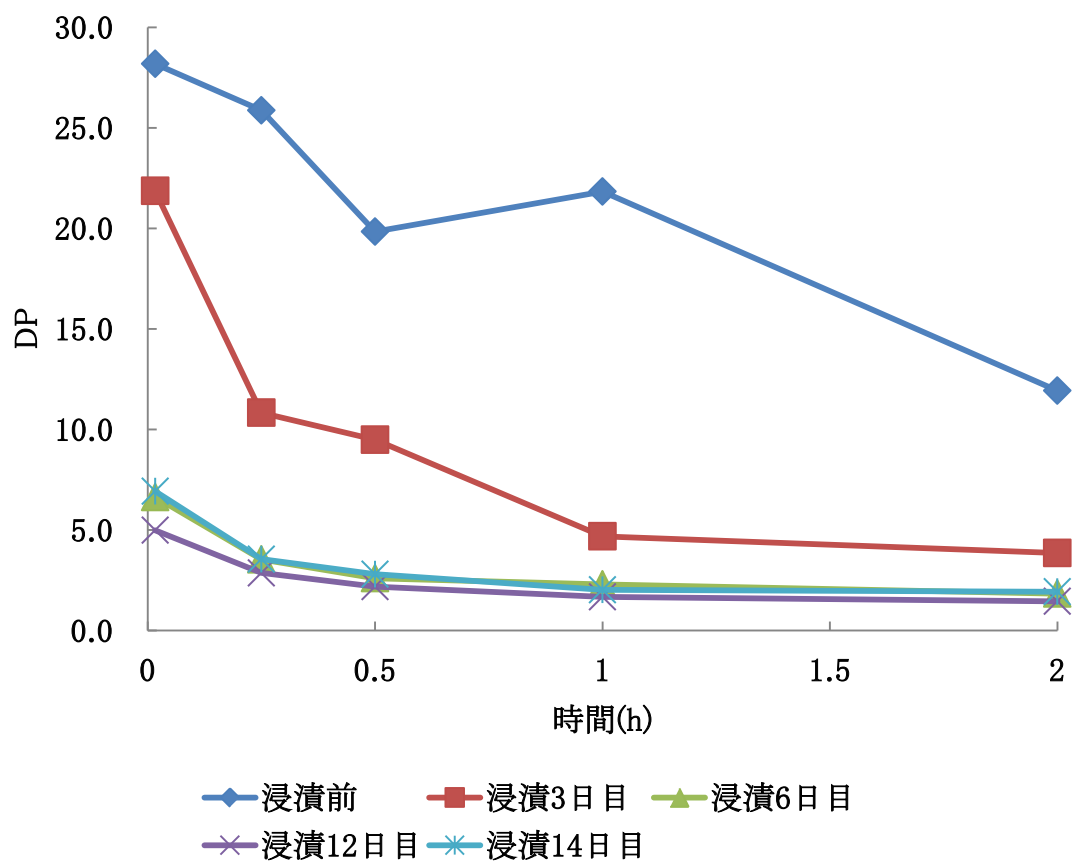


図 4.6 浸漬日数の検討(DP)

種もみの浸漬日数の違いによる糖化を行った際の DP

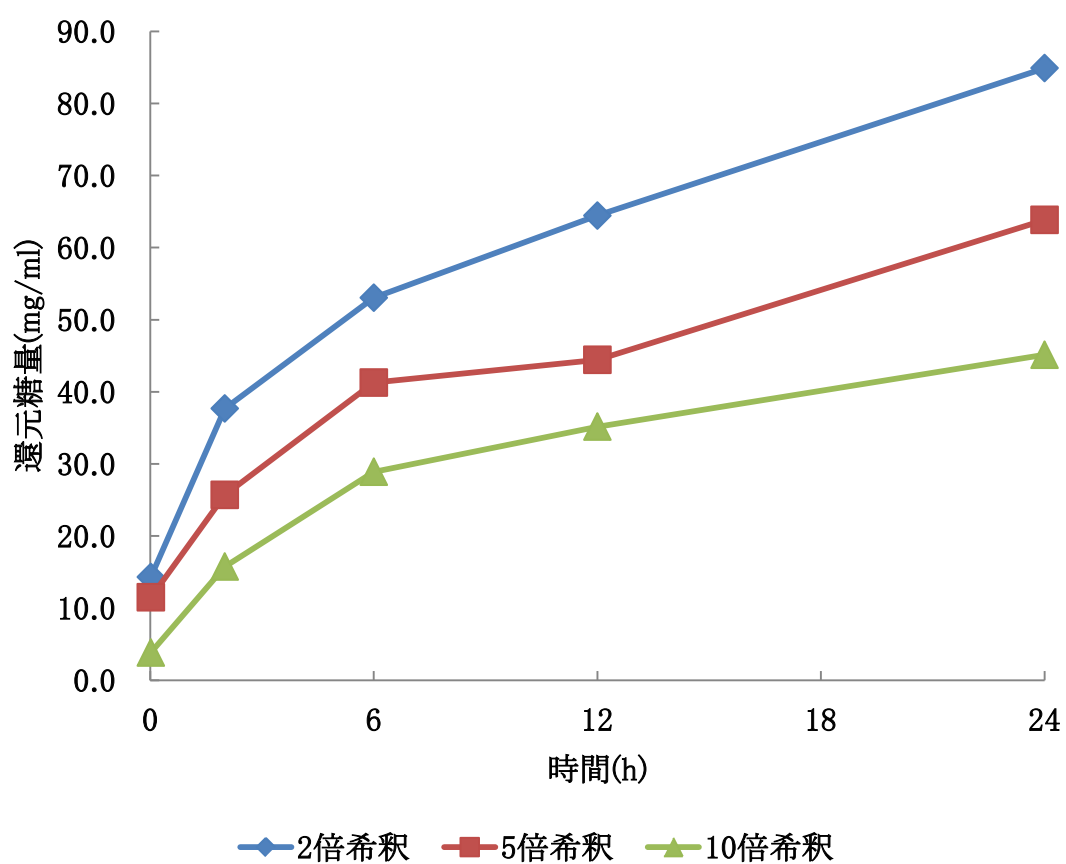


図 4.7 希釈倍率の検討(還元糖量)

浸漬日数 6 日目のコメ酵素を用いて

2、5、10 倍希釈で糖化を行った際の時間変化による還元糖量(mg/ml)

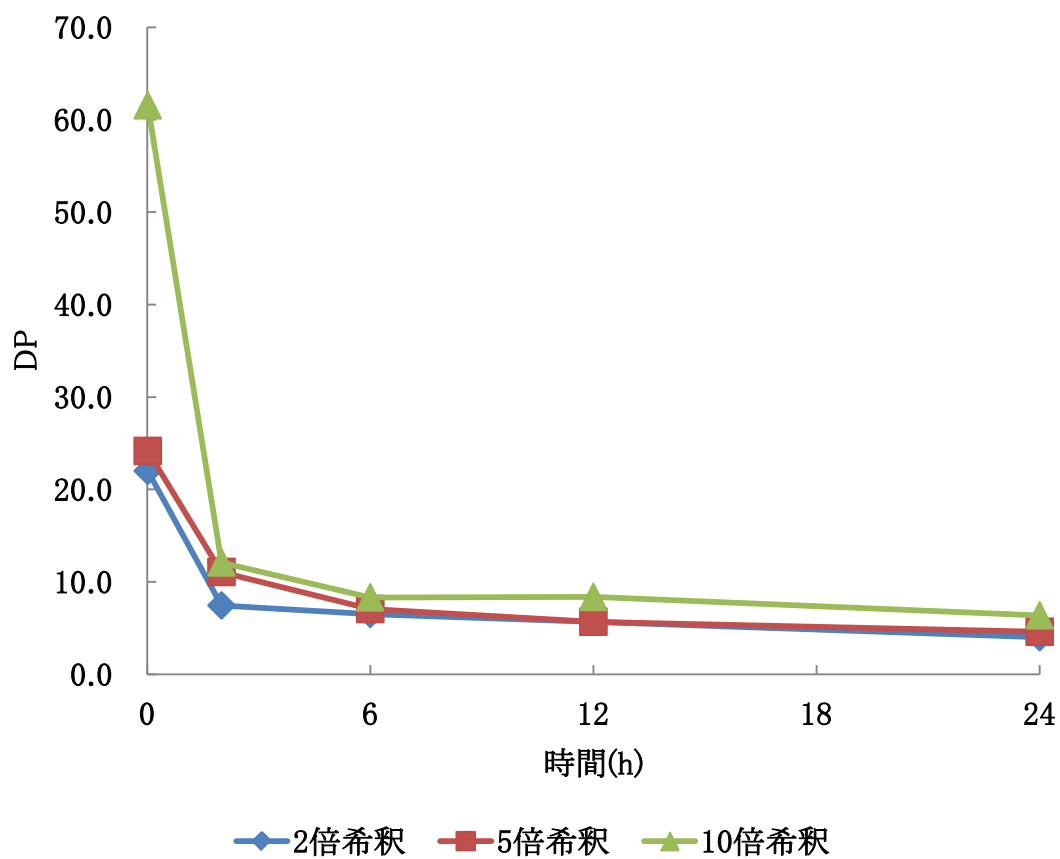


図 4.8 希釈倍率の検討(DP)

浸漬日数 6 日目のコメ酵素を用いて

2、5、10 倍希釈で糖化を行った際の時間変化による DP

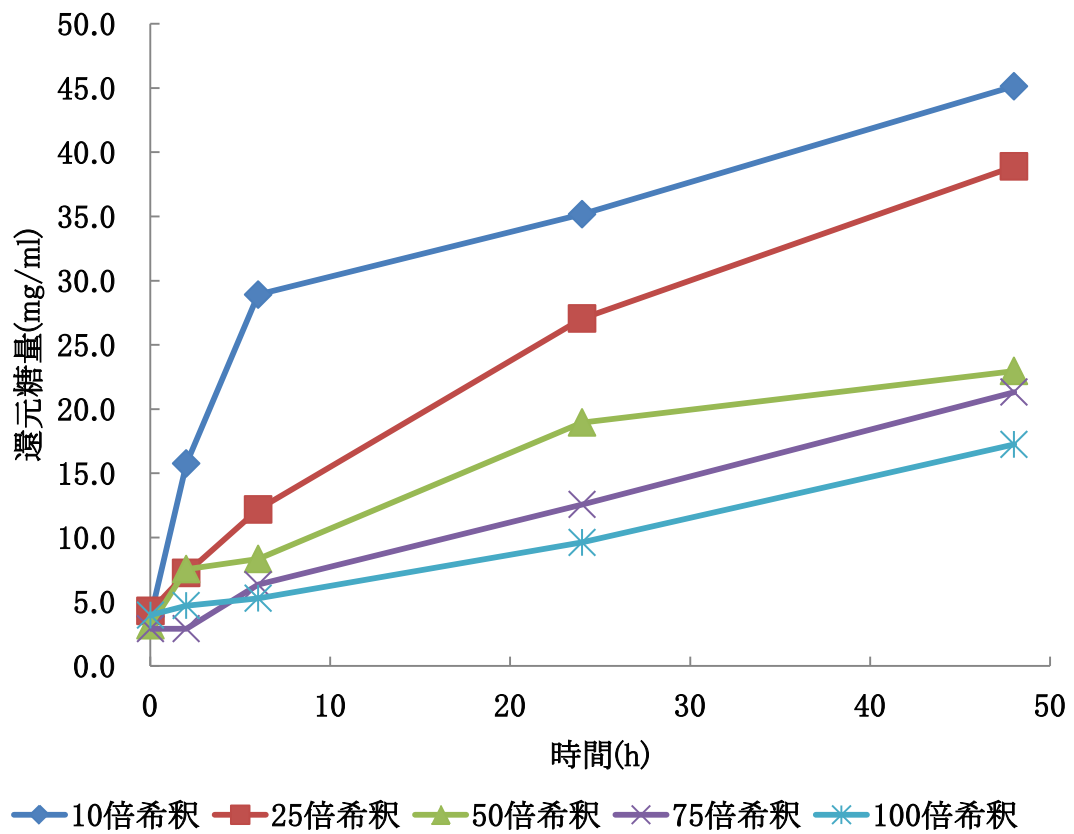


図 4.9 希釈倍率の検討(還元糖量)

浸漬日数 6 日目のコメ酵素を用いて

10、25、50、75、100 倍希釈で糖化を行った際の時間変化による還元糖量(mg/ml)

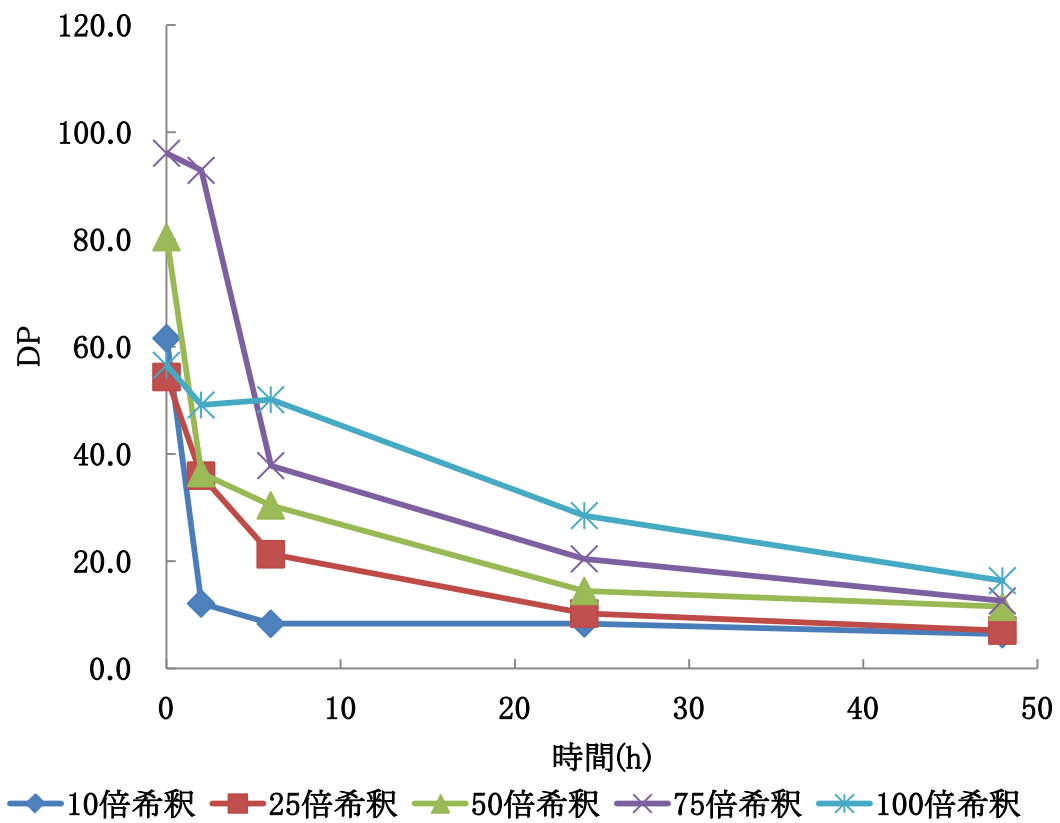


図 4.10 希釈倍率の検討(DP)

浸漬日数 6 日目のコメ酵素を用いて

10、25、50、75、100 倍希釈で糖化を行った際の時間変化による DP

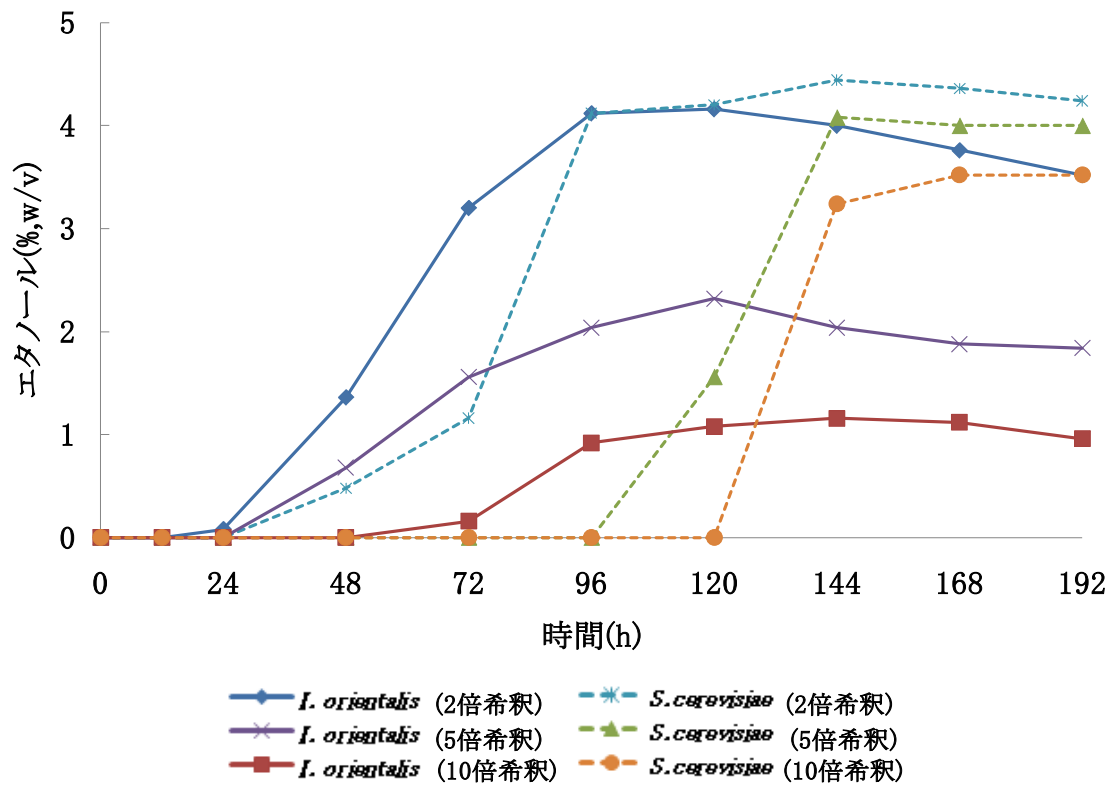


図 4.11 コメの内生酵素を用いた糖化液からのエタノール生産

2、5、10 倍希釈で反応を進めた糖化液に

I. orientalis MF121、*S. cerevisiae* K-7 を培養した際の

時間変化によるエタノール生産量(%,w/v)

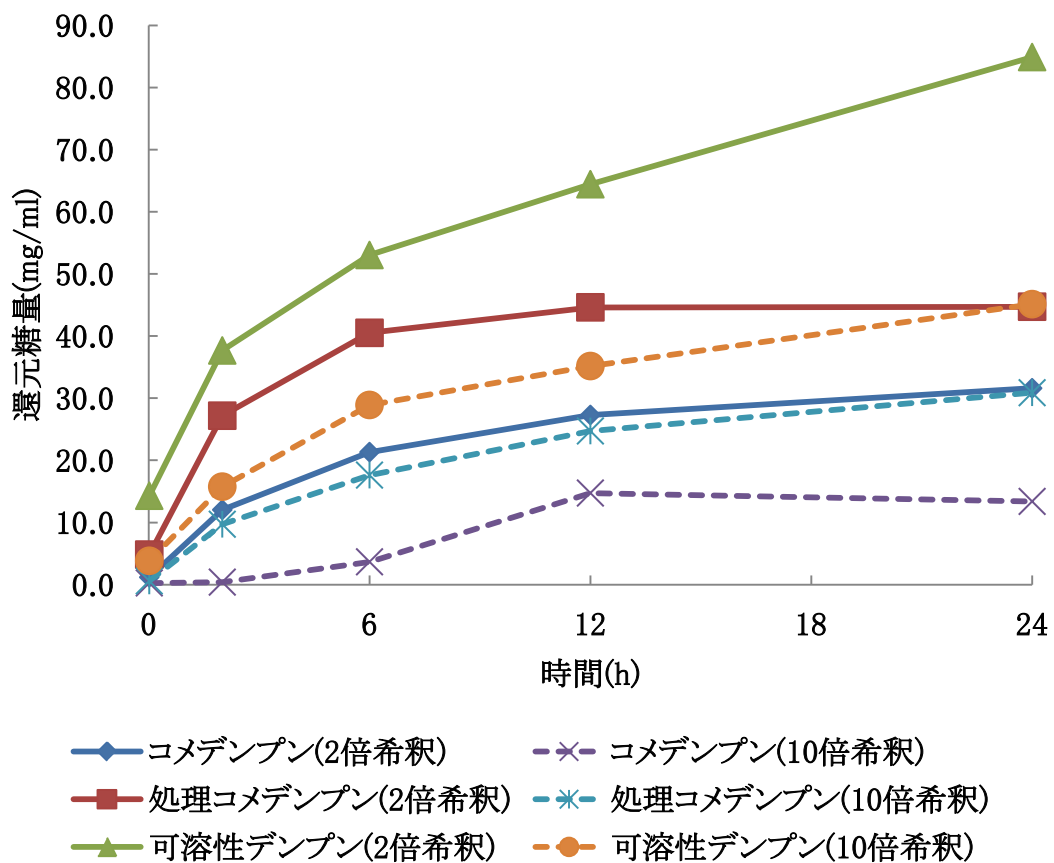


図 4.12 2、10 倍希釈還元糖量

コメデンプン、ボールミル処理コメデンプン、可溶性デンプンを
 コメの内生酵素 2 倍希釈、10 倍希釈で糖化を行った際の
 時間変化による還元糖量(mg/ml)

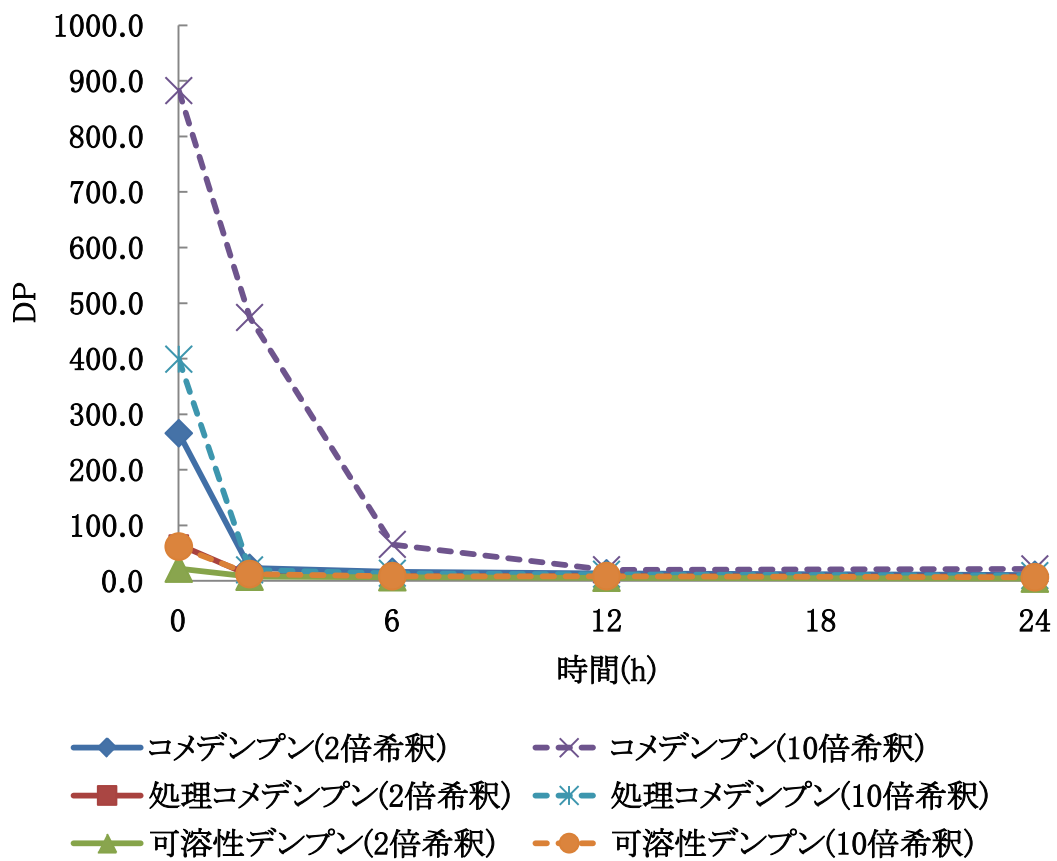


図 4.13 2、10 倍希釈 DP

コメデンプン、ボールミル処理コメデンプン、可溶性デンプンを
 コメの内生酵素 2 倍希釈、10 倍希釈で糖化を行った際の
 時間変化による DP

5. 要約

6. 謝辭

7. 参考文献

1. BP plc.: statistical review of world energy full report, (2007)
2. Segio M. Correa, Eduardo M. Martins, Graciela Arbilla: Formaldehyde and acetaldehyde in a high traffic street of Rio de Janeiro, Atmospheric Environment, 37 23-29 (2003)
3. 大聖泰弘, 三井物産(株): バイオエタノール最前線. 工業研究会, 10-20 (2004)
4. United Nation Development Programmed. World energy assessment. United Nation Development Programmed. New York, (2006)
5. Jose Goldemberg, Suani Taixeira Taixeira Coelho, Plinio Mario Nastari, Oswald Lucon: Ethanol learning curve -the Brazilian experience Biomass and Bioenergy 26 301-304 (2004)
6. Correa, S.M., Martins, E.M., Arbilla G.: Formaldehyde and acetaldehyde in a high traffic street of Rio de Janeiro, Atmospheric Environment, 37 23-29 (2003)
7. Goldemberg J, Moreira JR.: The alcohol program. Energy Policy, 27 229-45 (1999)
8. Seungdo Kim, Bruce E. Dal: Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. Biomass and Bioenergy, 26 361-375 (2004)
9. Wheals,A.E., Basso, L.C., Alves, D.M.G., Amorim, H.V., Fuel ethanol after 25 years. Trends Bioethanol, 17 482-287 (1999)
10. Rosillo-Calle F, Cortez L: Towards proalcohol II . A review of the Brazilian bioethanol programme. Biomass Bioenergy, 14 115-124 (1998)
11. 吉岡亜里沙: 酸塩耐性酵母によるデンプン系残飯のアルコール発酵に関する研究. 修士論文, 三重大学大学院生物資源学研究所 (2005)

12. Peres, M. F. S., and Laluece, C.: Ethanol tolerance of thermotolerant yeast cultivated on mixture of sucrose and ethanol, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85 388-397 (1998)
13. Tao, F., Miao, J, Y., Shi, G, Y., and Zhang, K, C.: Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition. *Process Biochemistry*, 40 183-187 (2005)
14. Morimura. S., Ling, Z, Y., and Kida, K., Ethanol production by repeated-batch fermentation at high temperature in a molasses medium containing a high concentration of a total sugar by a thermotolerant flocculation yeast with improved salt-tolerance. *Journal of fermentation and bioengineering*, 83 271-274 (1997)
15. 古林卓也：酸性耐性酵母のアルコール発酵. 修士論文, 三重大学大学院資源循環学研究科(2003)
16. Kuyper, Marko., M.P., Miranda: Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *Journal of FEMS Yeast Research*, 5 399-409 (2005)
17. 野白喜久雄：改訂醸造学. 講談社サイエンティフィク, 108-109(1993)
18. 玉置信司：物理的処理によるデンプン粒の分子構造変化の解明. 博士論文, 三重大大学院資源循環学研究科(1999)
19. 江原薫：栽培学大要. 養賢堂, 205-207(2000)