

# TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

水圏酵母の発酵による未利用バイオマスからの効率的エタノール生産に関する研究

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2014-06-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小原, 信夫 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1004">https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1004</a>

博士学位論文

水圏酵母の発酵による未利用バイオマスからの効率的エタノール生産に関する研究

平成 25 年度

(2014 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

応用環境システム学専攻

小 原 信 夫

## 目 次

第1章	緒 論	
	1-1 背景	p.7
	1-2 クリーンエネルギー	p.9
	1-3 原油価格高騰回避のための石油代替エネルギーの開発	p.10
	1-4 本論文の目的	p.12
第2章	都市バイオマスの前処理・糖化条件の検討	
	2-1 緒言	p.15
	2-2 原料	p.16
	2-3 方法	
	2-3-1 ビール粕の前処理・糖化工程	p.18
	2-3-2 茶殻の前処理・糖化工程	p.19
	2-3-3 シュレッダー紙の前処理・糖化工程	p.20
	2-4 結果	
	2-4-1 ビール粕	p.21
	2-4-2 茶殻	p.24
	2-4-3 シュレッダー裁断紙	p.29
	2-5 考察	p.31
第3章	シュレッダー裁断紙糖化液の発酵	
	3-1 酵母と培養条件	
	3-1-1 エタノール発酵微生物の選定	p.33
	3-1-2 酵母培養	p.33
	3-2 エタノール発酵	
	3-2-1 糖化液の静置発酵	p.35

3-2-2	糖化液の攪拌発酵	p.35
3-2-3	固定化酵母を用いた連続発酵	p.36
3-2-4	固定化酵母の調製	p.36
3-2-5	固定化酵母の調製時に及ぼすアルギン酸濃度の影響	p.37
3-2-6	固定化ビーズの酵母とアルギン酸溶液量の検討	p.38
3-2-7	固定化酵母による連続エタノール発酵	p.38
3-2-8	気化エタノール回収システムの構築	p.39
3-3	結果	
3-3-1	静置発酵におけるエタノール濃度の経時変化	p.40
3-3-2	攪拌醗酵におけるエタノール濃度の経時変化	p.41
3-3-3	固定化ビーズ酵母とアルギン酸溶液量におけるエタノール生成量の影響	p.42
3-3-4	シュレッダー紙糖化液 270 g/L を使用した固定化酵母による連続エタノール発酵	p.44
3-3-5	ETS 内エタノール量と回収率	p.47
3-4	考察	p.48
第 4 章	ワカメ芯茎部とシュレッダー紙の混合原料の発酵によるバイオエタノール生産	
4-1	緒言	p.51
4-2	原料の前処理・糖化	
4-2-1	前処理方法	p.53
4-2-2	糖化方法	p.53
4-3	発酵方法	

4-3-1 シュレッダー裁断紙とワカメ芯茎部の混合糖化液のエタノール発酵	p.54
4-3-2 酵母発酵方法	p.55
4-4 糖化液の混合比の検討	
4-4-1 酵母培養と発酵方法	p.56
4-5 Jar Fermentor によるスケールアップ発酵(3000mL)	
4-5-1 酵母培養と発酵方法	p.57
4-6 ETS(Ethanol Trap System)	
4-6-1 ETS の製作	p.58
4-7 蒸留	
4-7-1 蒸留方法	p.59
4-8 結果	
4-8-1 ワカメ芯茎部の前処理条件が糖化後のグルコース生成量に及ぼす影響	p.59
4-8-2 シュレッダー裁断紙糖化液とワカメ芯茎部糖化液の濃縮混合糖化液のエタノール発酵における経時変化	p.60
4-8-3 3,000 mL 発酵のエタノール生成量の経時変化	p.64
4-8-4 ETS によるエタノール回収量の比較	p.65
4-8-5 3,000mL 発酵液の蒸留	p.66
4-9 考察	p.66

## 第5章

## 総括

5-1 結論	p.70
5-2 展望	p.71



# 第 1 章

## 緒 論

本研究は、水圏酵母を用いて様々な未利用バイオマスを発酵させて、効率的なバイオエタノール生産を行うための技術開発を目的とする。本章では研究の背景とその目的・意義を述べる。

## 1-1 背景

世界規模での産業振興による化石燃料の消費急増は、大気炭酸ガス濃度の急上昇による地球環境の温暖化をもたらした。Fig. 1-1 に地球温暖化の例として、「世界の年平均気温差」を示す。1980年の年平均気温を基準とすると、1980年以前はマイナスを示す。逆に1980年以降はプラスに転じている。これは地球が温暖化へ進行していることを意味する。地球温暖化対策として、クリーンでエコなエネルギーを生産し活用して行こうとする機運が、世界的に高まっている。そこで、再生産可能でカーボンニュートラルなエネルギーとして、バイオマスを原料として発酵生産されるバイオエタノールが注目されている。1997年12月に採択された京都議定書により、先進国を中心に二酸化炭素やメタン、一酸化二窒素、代替フロン等ガス(HFC、PFC、SF6)といった温室効果ガス排出量の削減目標が議決された。日本でも、議定書に基づくさまざまな対策が実施され、温室効果ガス排出量削減に対する政策が精力的に行われているが、削減効果の高い代替輸送用燃料の開発は遅れている。しかし、石油価格の高騰等によるエネルギーセキュリティ問題が社会生活に打撃を与えていることから、自動車代替燃料の開発が急務となってきた。中でも、バイオマスエネルギーは化石燃料に代わる新エネルギーとして注目されている<sup>1)</sup>。バイオマスとは、牧草や木材、菜種油など生物由来の資源の総称である<sup>2)</sup>。京都議定書の枠組みでは、バイオマスの燃焼により発生するCO<sub>2</sub>は、排出量にカウントしないとしている。石油・石炭などの化石資源が数億年に渡り地球上で蓄積した炭素を多く含むのに対して、



植物バイオマス由来の炭素は光合成により大気中の CO<sub>2</sub> を取り込み、植物体を構成するため、エネルギーに際し燃焼により CO<sub>2</sub> を発生させてもカーボンニュートラルとなりえるため、地球温暖化には影響がないとされている。世界的にはブラジルとアメリカが、穀物由来代替燃料としてバイオエタノールを大量生産し、自動車燃料として実用化している。穀物原料としてサトウキビやトウモロコシが中心となっているが、これらは食糧と競合するため穀物価格の世界的高騰の原因になっている。また、アメリカでは 2012 年の大干ばつが原因とした穀物の不作により、トウモロコシのバイオ燃料への変換が難しくなり、穀物原料は天候に左右されることが明らかになった。そこで穀物原料ではなく、次世代バイオ燃料の原料として、セルロース系バイオマス及びそれらの未利用バイオマスを利用したバイオエタノール生産に対する注目が集まっている<sup>3)</sup>。次世代バイオマスは、循環型社会を構築する上でも、極めて重要な役割を果たすと期待される<sup>4)</sup>。なお、バイオエタノール生産がもたらす意義を、以下の 1-2~1-4 で補足する。

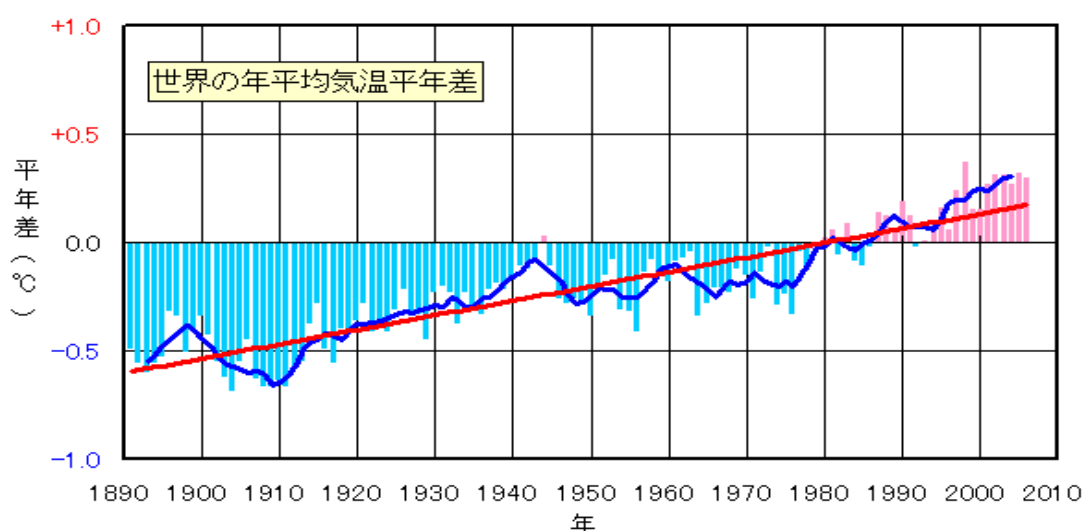


Fig. 1-1 世界の年平均気温差

出典：米国海洋大気庁気候データセンターの GHCN (Global Historical Climatology Network) データ

## 1-2 クリーンエネルギー

地球温暖化対策として期待されているエネルギーとして、クリーンエネルギーが挙げられる。これは再生可能エネルギー、すなわち自然エネルギーを活用することで、CO<sub>2</sub>の発生を抑制することである。その中でも発電と代替輸送燃料が期待されているエネルギー源である。現在、世界的には発電に目が向けられており、太陽光発電、水力発電<sup>5)</sup>、地熱発電、風力発電等が代表的なクリーンエネルギーである。これらはいずれ発電方法における多様化の代表例となるだろう。現在、大規模太陽光発電所（メガ・ソーラー）の建設が急ピッチで世界各地に進んでいるが、太陽光発電は日中のみに充電可能であり、また発電量が天候に左右される。地熱発電は発電量が保たれ、またその発電技術は日本がトップであることから、期待されている。しかし設置場所が国立公園や温泉地に近いことから普及に時間を要する。風力発電は風車から発する低周波によって、人体に悪影響を及ぼす。これらのことからクリーンエネルギーにおける発電はまだ多くの課題が残されている。このような新しい技術で発電された電気は電気事業者に買い取られている。そして買い取り料金は、消費者の電力料金に上乗せされており、社会全体で負担する形となっている。このようにクリーンエネルギーである発電は、国の後押しにより成り立っている。一方、もう1つのクリーンエネルギーである代替輸送燃料は主にバイオエタノール、バイオディーゼル及び燃料電池が挙げられる。バイオディーゼルは、原料として油脂を含む菜種等の農作物から作られており、ヨーロッパで主に代替輸送燃料として認知されつつあるが、アメリカではあまり浸透していない。それはトウモロコシ由来のバイオエタノールが既に流通しているからである。燃料電池は原料が酸素と水素であり、酸素は大気中から摂取している。水素は工業的に化石燃料や水の電気分解から水素を抽出している。日本では世界に先がけて、燃料電池車

を販売することになっているが、燃料電池の課題として水素を販売できる社会インフラが未整備であるので、次世代の燃料と言える。

上記の情勢を背景にして、筆者はすでに実用化されている代替輸送燃料としてバイオエタノールに注目した。バイオエタノールの歴史は、ヘンリー・フォードが開発した1919年製T型フォードにまでさかのぼる。本格的なバイオエタノール生産は1970年代のオイルショックの祭、ガソリンの代替燃料として、サトウキビ由来のアルコールでガソリンに添加した。バイオエタノールの主な生産国はブラジルとアメリカであり、この2国で全世界の約7割のバイオエタノールを生産している。アメリカは主に国内で消費し、ブラジルのバイオエタノールは、基幹輸出商品となっている。このようにバイオエタノールはすでに実用化されているので、日本で生産し消費できれば、クリーンエネルギーの普及に貢献し、地球温暖化対策の1つに成りえると考える。

### 1-3 原油価格高騰回避のための石油代替エネルギーの開発

バイオエタノールは、1973年の第1次オイルショックによる原油価格の高騰を契機に、原油由来のガソリン代替燃料として注目をされるようになった。Fig. 1-2に1970年～2013年までの原油価格の推移を示す。1970年代に2回のオイルショックがあり、原油の調達が難しくなった時期があり、価格が上昇している。2000年代に入りイラク戦争勃発を皮切りに、原油価格は大きく上昇している。そして、2011年度における化石エネルギー中東依存度は83.6%にも達する<sup>6)</sup>。しかし、歴史的にも中東情勢は不安定となりやすく、地政学的リスクも加味され、輸入価格高騰に拍車をかけている。また、アジア、南米、中東など新興地域での需要増加が確実視されていることも加味すると、中東からの輸入に依存している日本はその依存度の減少に努力し、石油代替エネルギーの開発が必要

と考える。日本のエネルギー資源はほとんどを輸入に依存しているので、国民生活に大きな影響を与える原油価格高騰は、ガソリンや電気料金等の生活全般に影響を及ぼす。原油輸入価格が上昇すると、企業の収益や家計に影響を受けることが知られている。

さらに近年、産業革命・IT革命に続くシェール革命が話題となっている。アメリカにおける地下の地層から天然ガスが採掘されている。これはアメリカでの石油由来エネルギー選択枝が多様化することを意味し、天然ガスを利用した自動車の開発が急ピッチで進行している。天然ガスはガソリンよりCO<sub>2</sub>排出量が少ないとされ、地球温暖化防止にも貢献する。事実日本でも公共バスで天然ガスを燃料としている。原油価格上昇により、ガソリン価格高騰を回避するためにも、消費者に代替燃料の選択枝を拡大することが重要な課題と考える。

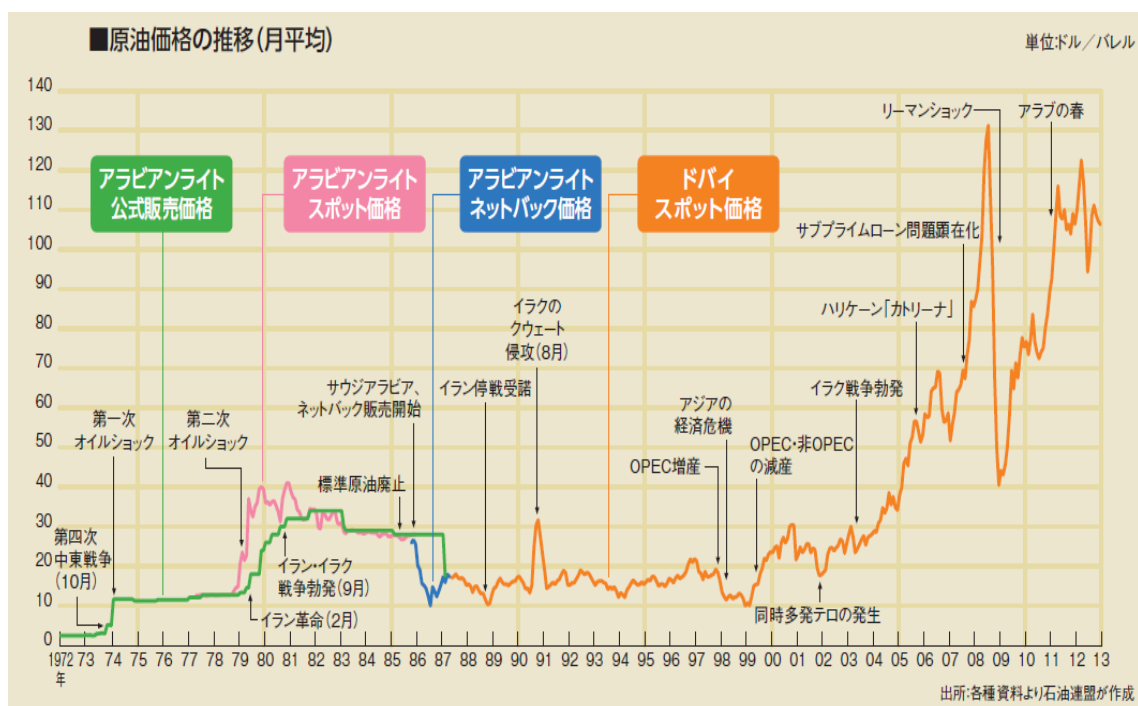


Fig. 1-2 原油価格の推移

出典：石油連盟「今日の石油産業 2013 年」

以上述べてきたように、石油資源及び代替エネルギー資源の乏しい日本にとって、温暖化対策及びガソリン代替燃料の開発は、エネルギーセキュリティー上、

最重要課題であると考え。特に食料と競合しない輸送用バイオ燃料の開発が強く望まれており、そのために日本独自の方法でエタノールを生産することが必要であると考え。日本は諸外国と違い、糖質系及びデンプン系の農産物は豊富ではないため、日本でエタノール生産できる安価な原料として、未利用セルロース系バイオマス、特に廃棄系原料及び食品製造残渣の利用が重要課題であると結論される<sup>7)</sup>。

#### 1-4 本論文の目的

本研究での目的は未利用セルロース系バイオマスから効率的バイオエタノール生産技術の確立にある。すなわち、①セルロースを主成分とする高分子を前処理・糖化することで、グルコースを主成分とする低分子が生成される。②低分子を酵母により発酵することでバイオエタノールが生成される。③バイオエタノールを含有する発酵液を蒸留することで精製エタノールが生成される。本研究では①、②、③の技術開発を行い、従来報告のある原料の前処理・糖化工程<sup>8,9)</sup>、および低コスト生産条件<sup>10)</sup>を再検討し、さらに海洋酵母を用いて、より高効率なバイオエタノール生産を行うことを目的とする。

さらに筆者の研究室では、2012年度より文部科学省による東北マリンサイエンス拠点形成事業（新たな産業の創成につながる技術開発として、「三陸産ワカメ芯茎部の効率的バイオエタノール変換技術開発と被災地復興への活用法の提案」の課題研究が開始された。筆者も研究員として本事業に参加している。

本事業は被災地における新産業を創出し、東北地方沿岸域の復興支援への貢献を期待している。本研究室では、三陸地方の特産であるワカメに着目し、現状では海洋投棄しているワカメの芯茎部を未利用バイオマスと捉えて、原料として有効利用することで、効率的なバイオエタノール生産を計画している。本

事業には筆者も参加することになり、本論文の第 4 章では東北マリンサイエンス拠点形成事業の成果を筆者の論文に組み込んだ研究を記述する。

## 第2章

### 都市バイオマスの 前処理・糖化条件の検討

## 2-1 緒言

世界的にバイオエタノール生産に関心が寄せられている。アメリカでコーン、ブラジルではサトウキビがバイオエタノールの原料として使用されている<sup>11)</sup>。サトウキビ、トウモロコシは第一世代のバイオエタノール原料と言われ、加工コストが比較的安いいため、エタノール生産技術がすでに確立されている。コーンの主成分はデンプンであり、アミラーゼで容易にグルコースに変換される。サトウキビは絞ることで、グルコースやフルクトースが抽出できる。従って、この2つの農作物は発酵微生物により容易にエタノールを生成できる。しかし、本来食糧である穀物等を利用したエタノール生産は世界の食糧供給との競合、原料生産のために熱帯雨林伐採・開拓などの環境問題へ与える影響も懸念されている。一方、日本ではエタノール生産原料として使用するための専用作物は生産されていない。そこで、日本でバイオエタノールを生産する場合、セルロース系バイオマスを利用することが望まれている<sup>12)</sup>。セルロース原料として木質系バイオマスと草本系バイオマスがあり、中でも廃材木や稲わらが注目されている。しかし、セルロースにはリグニンやペクチンなどの高粘性物質及び難分解物質が強固に結合しており、それらの除去にコストがかかることから、今なお研究段階となっている。そこで、これらの物質が比較的容易に除去できる草本系バイオマスの中で、一定量を確保できる食品製造残渣及び都市バイオマスの古紙に注目した<sup>13,14)</sup>。

本章では、バイオエタノール原料としてビール粕、茶殻、シュレッダー裁断紙を選択した。飲料メーカーより発生する茶殻やビール粕は堆肥及び家畜飼料として再加工されている。しかし堆肥の製造には広い敷地を必要とし、また家畜飼料としては、家畜の増肉係数が穀物飼料より低いことが報告されている。ところで、本学の品川駅周辺は都内でも有数のオフィス街であり、各ビルでは毎



日大量の茶殻やシュレッダー裁断紙が発生している。こうしたオフィス街の廃棄物や食品製造の副産物である茶殻やビール粕を利用することはゴミの削減とエコ燃料として利用—引いてはCO<sub>2</sub>削減による地球温暖化の緩和が期待される。さらに、世界のビール生産量は増加傾向にあること、ビール粕は粒径が小さく、操作性にすぐれていること等いくつもの優位性を有する素材である。

上記原料のエタノール発酵に必要な前処理及び糖化条件について検討する。セルロース系バイオマスはサトウキビと異なり、発酵のための前処理工程（複雑に絡みあう高分子成分を解して低分子化する工程）と糖化工程（多糖を単糖化する工程）を必要とする。従来法によるこれらの工程は高エネルギー、高コストであるため、筆者は省エネルギー、省コスト化するための、最適な工程条件を検討する。

## 2-2 原料

### ビール粕

ビール粕（モルトフィード）はビール製造過程で発生する副産物（絞り粕）である。主に畜産用配合飼料の原料として使用されているが、その他では肥料、活性炭、土壌改良材としての利用法がある。山口畜産会の調査では、ビール粕を含む家畜用配合飼料を与えた乳牛からの牛乳は、乳質が低下し不快臭が残る。また、ビール粕は変質し易く、家畜飼料にすると給与量の半数が未消化であり、品質（栄養）不均一であるため牛の発育不良を誘因するとしている。そこで、最近ではビール粕のより高次の利用法も検討されている。サッポロビールでは、パン工場が発生するパン残渣とビール粕の混合原料からメタン及び水素ガスを生成する試験を行っているなど、新たな利用法の開発が必須である。本章で使用したビール粕はサッポロビール（株）から提供された。ビール粕はほぼ麦芽

の形状を維持し、乾燥状態で約 5 mm の大きさ、無味無臭であった。

### 茶殻

緑茶は飲料製造会社の主力商品である。緑茶の原料は茶葉であり、製造段階で多く廃棄されるのが茶殻であり、ビール粕と同様その多くは畜産飼料として利用されている。その他の有効利用法として封筒やベンチを作っている。しかし茶殻の渋み成分タンニンが原因で、家畜が好んで食せず増肉不良となる傾向があり、家畜用配合飼料として適しているとは言い難い。本章では、茶殻は東京海洋大学生協食堂より譲渡された。通常茶殻は営業時間の終了と同時に生ゴミとして廃棄されるが、大学生協は週 5 日間営業しているので、年間廃棄量はかなりの量になる。採集した茶殻は水分を除くため、乾燥器で一晩乾燥してから、前処理・糖化実験に使用した。

### シュレッダー裁断紙

官公庁・企業のオフィス・病院・学校等では、毎日大量の機密書類が取り扱われ、会議等で使用後は廃棄されることも多い。廃棄紙は秘密保持のために、シュレッダーにかけられて細かく裁断される。シュレッダー裁断紙はゴミとして収集され、1 部がトイレットペーパーやティッシュになるが、多くは溶解され廃棄されている。シュレッダー裁断紙はセルロース繊維が細かく粉砕され過ぎているため、再生紙として使用することが不可能である場合が多い。エタノール原料に利用する際には、セルロース繊維が微細化されているため、原料の前処理工程の省力化に繋がる利点がある。使用したシュレッダー裁断紙は、本学の各研究室から調達した。裁断された紙の種類はほぼコピー用紙が主流であり、紙の形状は短冊状・大きさ約 4 mm×40 mm であった。

## 2-3 方法

### 2-3-1 ビール粕の前処理・糖化工程

ビール粕は草本系バイオマスであり、セルロースにリグニンが結合している。リグニンは難分解性で原料化できず、セルロースの糖化阻害、糖化物の発酵阻害となる。従って、セルロースの酵素糖化の前にリグニンを除去する処理<sup>15,16)</sup>が必要となり、これを前処理工程と称する。前処理工程を施した原料内のセルロースに酵素セルラーゼを適用して低分子化し、グルコース等の単糖を生産する工程を糖化工程と称する。

ビール粕の前処理・糖化工程の第一段階では、製紙産業で実用化されているクラフトパルプ製法を利用した。クラフトパルプ製法とは木材のパルプを水酸化ナトリウムまたは硫化ナトリウムと共に蒸解釜で水と圧力と熱を加えて、繊維の中のリグニンが溶出させ、繊維間結合を解除する方法である。前処理行程として、乾燥したビール粕 3 g と 0.4%~1.0% 水酸化ナトリウム水溶液 100 mL をビーカーに入れて、常温で 1 h 攪拌浸漬した。次に糖化工程では、冷却後水酸化ナトリウム(10 M)で pH4.6 に調整して、セルラーゼ (Genencor GC-220 450 U) を添加して、マグネテック・ホットスターラー (AS ONE, REXIM RSH-1DR) を用いて 50°C, 48 h 攪拌糖化を行った。生成したグルコース濃度は酵素キット (ROSH, F-kit glucose) にて定量した。

第二段階では、ビール粕(3 g)を最適水酸化ナトリウム濃度(0.8%)で処理し乾燥させた後、ビーカー中で硫酸(0.4~1.0%) 100 mL と混合した。そして混合液を高温高压処理 (121°C、60 min) した。次に糖化工程では、冷却後、pH4.6 に調整して、セルラーゼ(450 U)を添加して、50°C、48 h で攪拌糖化を行った。

第三段階では、水酸化ナトリウム+硫酸で前処理したビール粕と硫酸のみで前処理したビール粕からのグルコース生成量の影響を検討した。ビール粕(3 g)

を第二段階前処理の最適条件である水酸化ナトリウム(0.8%)100 mL 中で常温, 1 h 攪拌浸漬した。乾燥後に硫酸(1.0%)100 mL と混合して高温高压処理した。また、対照として、ビール粕(3 g)を硫酸(3.0%)100 mL と混合して高温高压処理した。前処理した各試料は冷却後、pH4.6 に調整して、セルラーゼ(450 U)を添加して、50°C、48 h で攪拌糖化を行った。

### 2-3-2 茶殻の前処理・糖化工程

調達した茶殻は水分を多く含んでいるので、乾燥器で 80°C、24 h 乾燥させ、石臼を用いて乾燥茶殻を粉碎した。乾燥粉碎試料の前処理工程にて、沸騰加熱処理、冷凍解凍処理、超音波処理を取り入れて、茶殻の高分子繊維間の会合解除を促進させた。さらに糖化工程にて、減圧酵素含浸処理を用いてセルロース間にセルラーゼを浸透させて、酵素反応を促進させた。以下、①～④の方法にて検討した。

- ① 加熱処理の影響を検討した。乾燥粉碎茶殻 3 g を蒸留水 100 mL と混合し、沸騰加熱 30 min の処理を行った。冷却後 pH4.6 に調整してセルラーゼ(450 U)を添加し、50°C、48 h の糖化を行った。対照として、茶殻 3 g を蒸留水 100 mL と混合した後、加熱処理は除いて、セルラーゼによる糖化工程を行った。
- ② 冷凍解凍処理の影響を検討した。乾燥粉碎茶殻 3 g を蒸留水 100 mL と混合して、-10°C、12 h の冷凍処理を行った後、室温まで解凍した。pH4.6 に調整してセルラーゼ(450 U)を添加し、50°C、48 h の糖化を行った。対照として、茶殻 3 g を蒸留水 100 mL と混合した後、冷凍解凍処理は除いて、セルラーゼによる糖化工程を行った。
- ③ 超音波処理と減圧酵素含浸処理を検討した。乾燥粉碎茶殻 3 g を蒸留水 100 mL と混合して、20 kHz、5 min の超音波 (TAITEC 超音波ホモジナイザー VP-300) 処理を行った。超音波処理された茶殻 3 g の酵素減圧含浸法は、茶殻 3 g と蒸留水を 3 方コック付きの 500 mL フラスコに入れ、真空ポンプで減圧を行い、マグネテック・ホットスターラーにて 50°C、1 h 恒温攪拌した。1 h 以降は常圧に戻し pH4.6 に調整して、セルラーゼで (450 U) による 50°C、48 h の糖化を行った。対照として、超音波処理を除いた前処理・糖化工程を行った。

- ④ 超音波処理＋減圧酵素含浸処理と希硫酸＋高温高压処理の比較を検討した。乾燥粉碎茶殻 3g を蒸留水 100 mL と混合して、12 h 冷凍処理し、20 kHz, 5 min の超音波処理を行った。処理試料と蒸留水を 3 方コック付きの 500 mL フラスコに入れ、真空ポンプで減圧を行い、マグネテック・ホットスターラーにて 50°C、1 h 恒温攪拌した。1 h 以降は常圧に戻し pH4.6 に調整して、セルラーゼ (450 U) による 50°C, 48 h の糖化を行った。比較対照として、乾燥粉碎茶殻 3 g を 3.0%希硫酸 100 mL と混合して、高温高压処理(121°C、60 min)を行った。冷却液を pH4.6 に調整し、セルラーゼ (450 U) による 50°C, 48 h の糖化を行った。

### 2-3-3 シュレッダー裁断紙の前処理・糖化工程

本研究で使用したシュレッダー裁断紙は、ほぼコピー用紙であった。コピー用紙などの上質紙はパルプ原料から紙を生産する際、パルプ内のタンパク質、リグニン及びペクチンはほとんど除去されている。そのためシュレッダー裁断紙の前処理工程では、加熱・冷凍解凍・超音波処理は行う必要が無いと考えた。ここでは、前処理工程で希硫酸＋高温高压処理と、無処理（非硫酸）法を比較した。また、裁断紙はリグニンやペクチンは除去されているが、代わりにデンプンが繊維強固のために使用されている。酵素糖化にはセルラーゼと共にアミラーゼ処理も併用した。

最初に、シュレッダー裁断紙 3 g を蒸留水に 30 min 浸漬し、セルロース繊維を柔らかくした。その後フードプロセッサー (FMI 社 Robot Coupe R3-1500 ) で粗粉碎した。粉碎試料を硫酸(3%)100 mL と混合して、高温高压処理 (121°C、60 min) を行った。処理液を冷却後、pH4.6 に調整した。セルラーゼ (900 U) と  $\alpha$ -アミラーゼ(天野エンザイム、490 U)を添加し、50°C, 48 h で糖化を行った。対照である非硫酸処理では、シュレッダー裁断紙 3 g をフードプロセッサーで粗粉碎した後に、糖化工程を行った。

## 2-4 結果

### 2-4-1 ビール粕

Fig. 2-1 にビール粕からのグルコース生成に及ぼす水酸化ナトリウム濃度の影響を示す。水酸化ナトリウム処理により、ビール粕のリグニンを除去することで、高分子セルロースから単糖グルコースの生成を促進していると考えられ、水酸化ナトリウム(0.8%)でグルコースが最大生成量 0.23 g を示した。従って、最適な水酸化ナトリウム濃度は 0.8% として、以後の実験を行った。

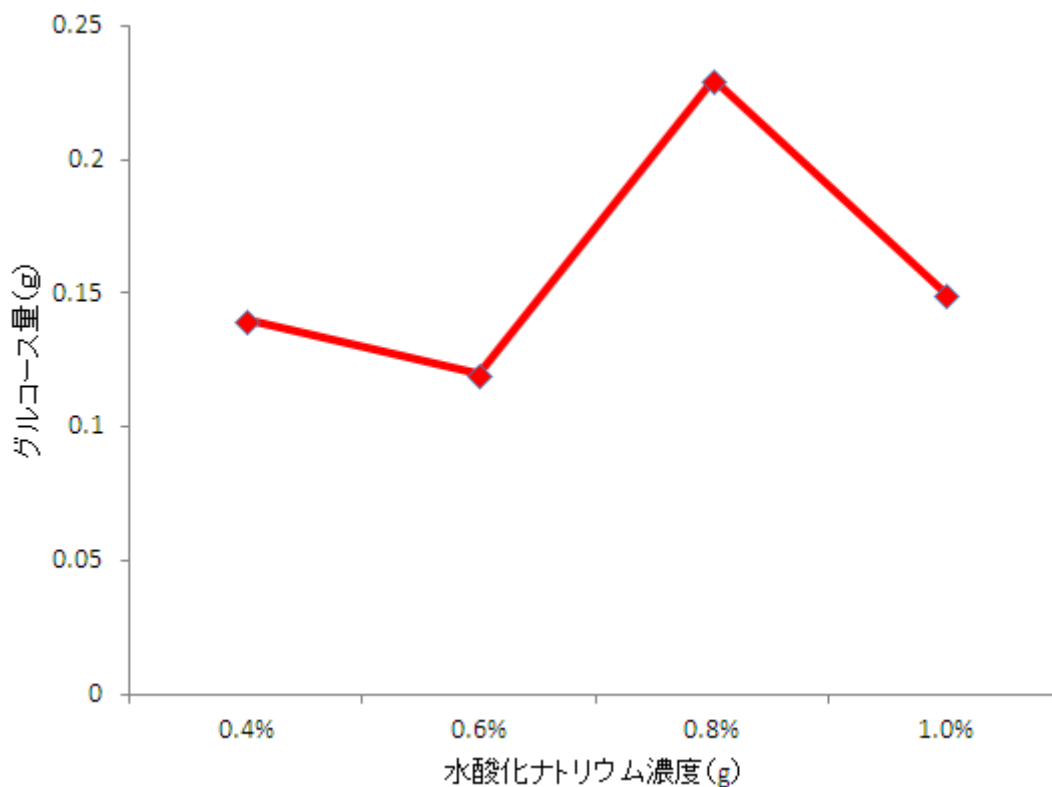


Fig. 2-1 ビール粕からのグルコース生成に及ぼす水酸化ナトリウム濃度の影響

原料：ビール粕 3 g

前処理条件：0.4~1.0% 水酸化ナトリウム水溶液 100 mL, 室温, 1 h

糖化条件：セルラーゼ 450 U, pH4.6, 50°C, 48 h (攪拌)

Fig. 2-2 ビール粕からのグルコース生成に及ぼす硫酸濃度の影響を示す。硫酸(1%)でグルコース最大生成量 0.99 g を示した。硫酸濃度 0.4~1%ではセルロースの分解が不十分であり、硫酸濃度 2-3%ではグルコースが過分解したと考えられた。

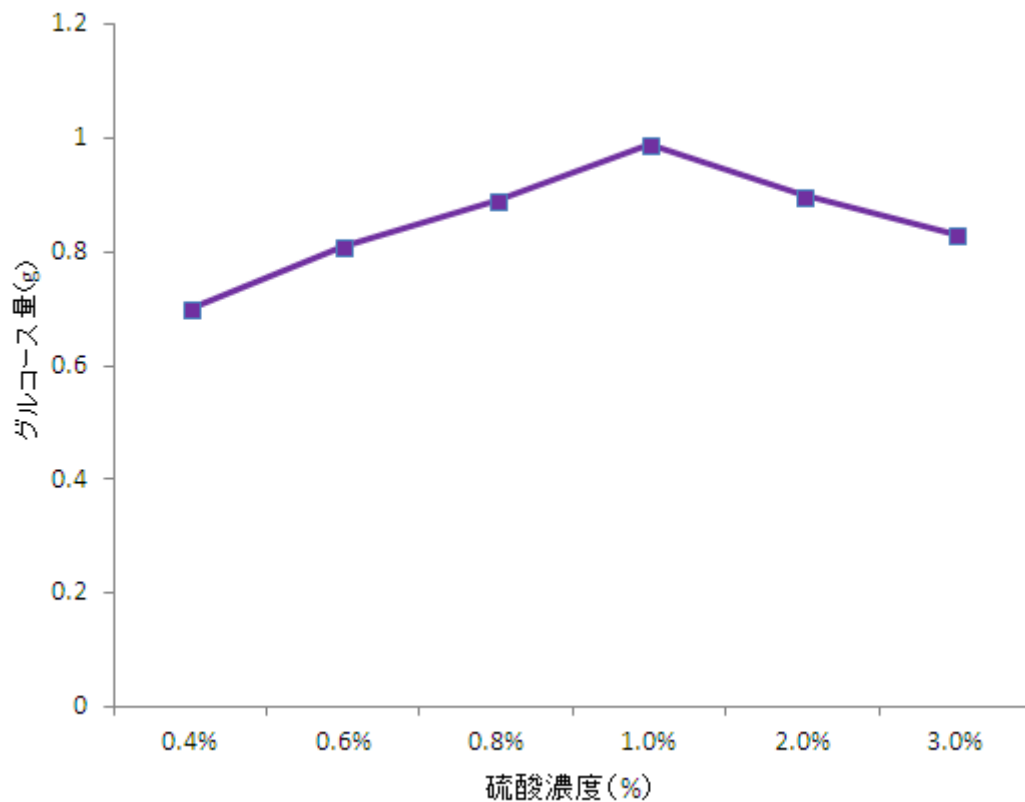


Fig. 2-2 ビール粕からのグルコース生成に及ぼす硫酸濃度の影響

原料：           ビール粕 3 g  
前処理条件：0.8% 水酸化ナトリウム水溶液 100 mL, 室温、1 h  
                  乾燥後、0.4~3.0% 硫酸 100 mL, 121°C, 1 h  
糖化条件    : セルラーゼ 450 U, pH4.6, 50°C, 48 h (攪拌)

Fig. 2-3 にビール粕からのグルコース生成量に及ぼす水酸化ナトリウム+硫酸処理と硫酸処理の比較を示す。ビール粕を水酸化ナトリウム(0.8%)処理した後、硫酸(1%)で高温高圧処理した後に酵素糖化を行った際のグルコース生成量は 0.99 g であった (グラフ左)。一方、硫酸(3%)高温高圧処理した後に酵素糖化を行った際のグルコース生成量は 0.84 g であった (グラフ右)。従って、水酸化ナトリウム処理でリグニンを除去した後の希硫酸処理は、効率的な糖化を促進する効果があることがわかった。



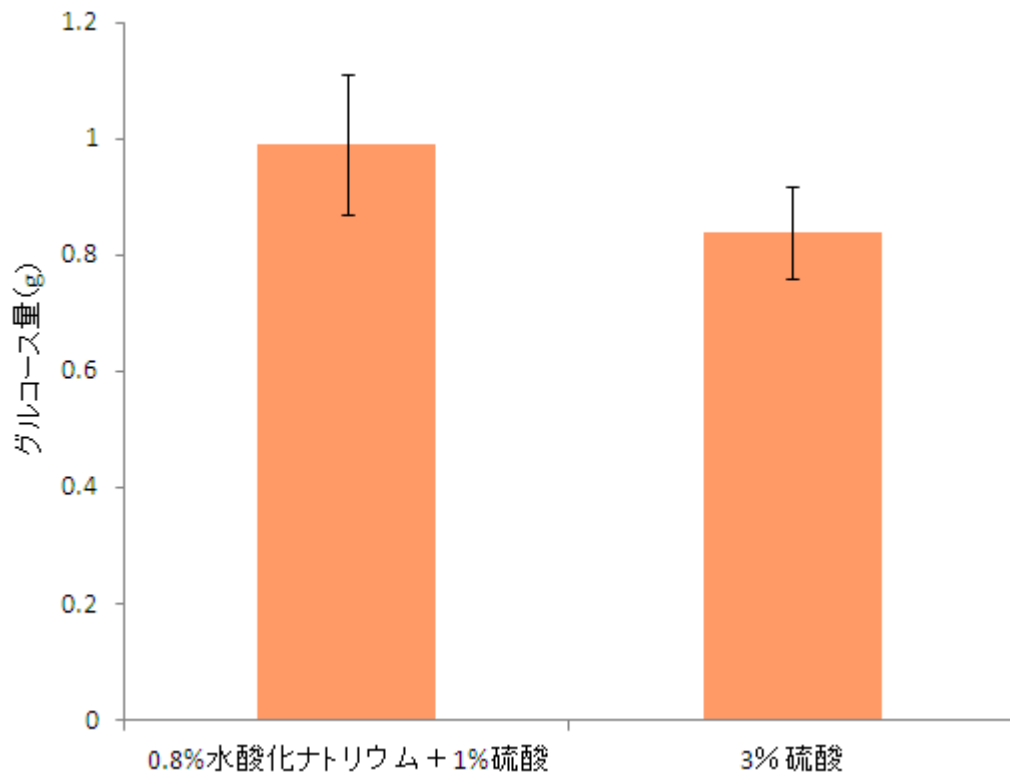


Fig. 2-3 ビール粕からのグルコース生成量に及ぼす水酸化ナトリウム＋硫酸処理と硫酸処理の比較、誤差棒は3例の標準偏差値

原料： ビール粕 3 g

前処理条件 (グラフ左)：

0.8% 水酸化ナトリウム水溶液 100 mL

室温, 1 h

乾燥後、1.0% 硫酸 100 mL, 121°C, 1 h

(グラフ右)：

3.0% 硫酸 100 mL, 121°C, 1 h

糖化条件 : セルラーゼ 450 U, pH4.6, 50°C, 48 h (攪拌)

#### 2-4-2 茶殻

Fig. 2-4 に茶殻の加熱処理・非処理によるグルコース生成量の比較を示す。茶殻は加熱処理 (グラフ右) と非加熱処理 (グラフ左) にて、グルコース生成量は 0.15 g と 0.14 g となり、加熱による影響はほとんど無いことがわかった。従って、以後の実験では原料の加熱操作は行わないことにした。

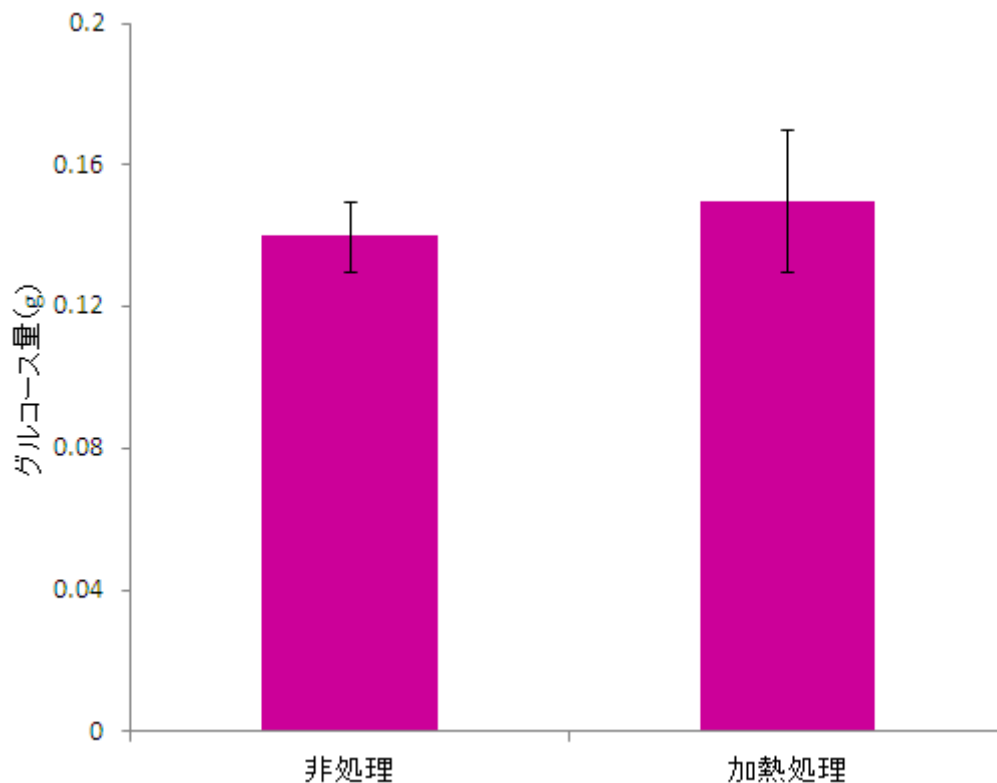


Fig. 2-4 茶殻の加熱処理・非処理によるグルコース生成量の比較

原料 : 茶殻 3 g  
 前処理条件 : 加熱沸騰、30 min  
 糖化条件 : セルラーゼ 450 U, pH4.6, 50°C, 48 h (攪拌)

Fig. 2-5 茶殻の冷凍解凍処理・非処理によるグルコース生成量の比較を示す。非処理（グラフ左）と冷凍解凍処理（グラフ右）ではグルコース生成量は 0.15 g と 0.2 g となり、冷凍凍結処理よりグルコース生成量が促進されることがわかった。冷凍により茶殻内の水分が凍結し、さらに解凍により高分子繊維が崩壊したと考えられた。

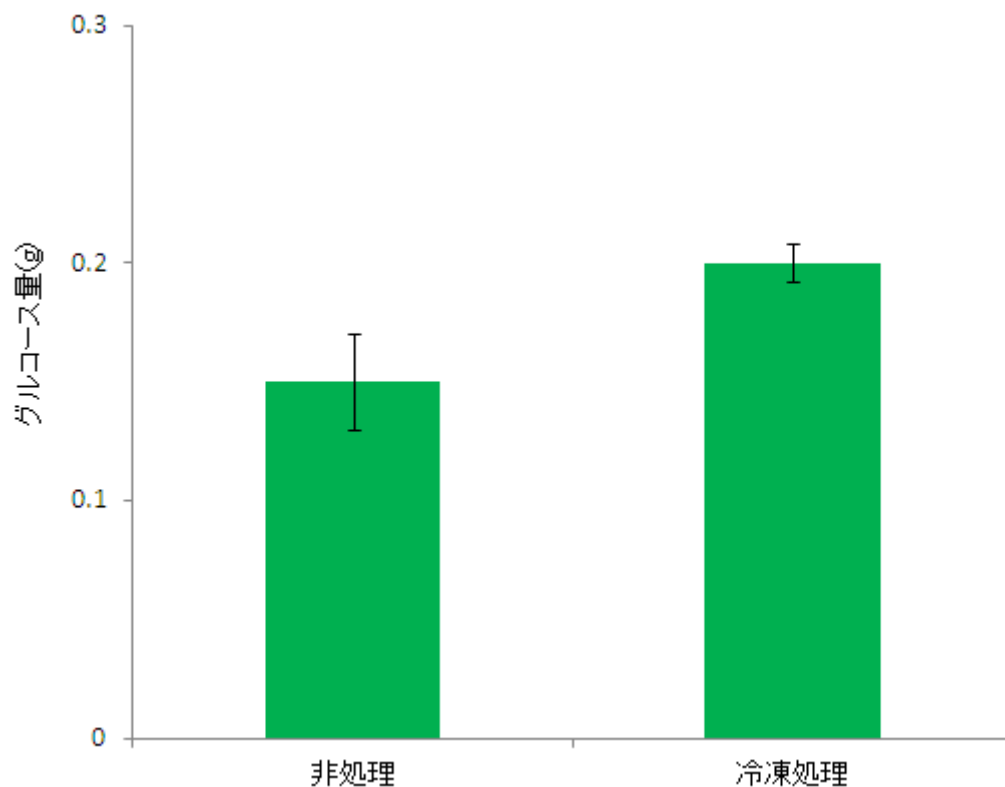


Fig. 2-5 茶殻の冷凍解凍処理・非処理によるグルコース生成量の比較

原料 : 茶殻 3 g  
 前処理 : 蒸留水冷凍, -10°C, 12 h  
           : 蒸留水解凍, 室温  
 糖化条件 : セルラーゼ 450 U, pH4.6, 50°C, 48 h (攪拌)

Fig. 2-6 に茶殻の超音波処理と超音波処理によるグルコース生成量の比較を示す。茶殻の前処理工程に超音波処理を施し、糖化工程で減圧酵素含浸処理を行った場合には、生成グルコース量 0.32 g となった (グラフ右)。一方、糖化工程に超音波処理を施さずに、糖化工程で減圧酵素含浸処理を行った場合 (グラフ左) には、生成グルコース量 0.18 g となった。茶殻の繊維高分子が超音波により、微細化されたものと考えられた。

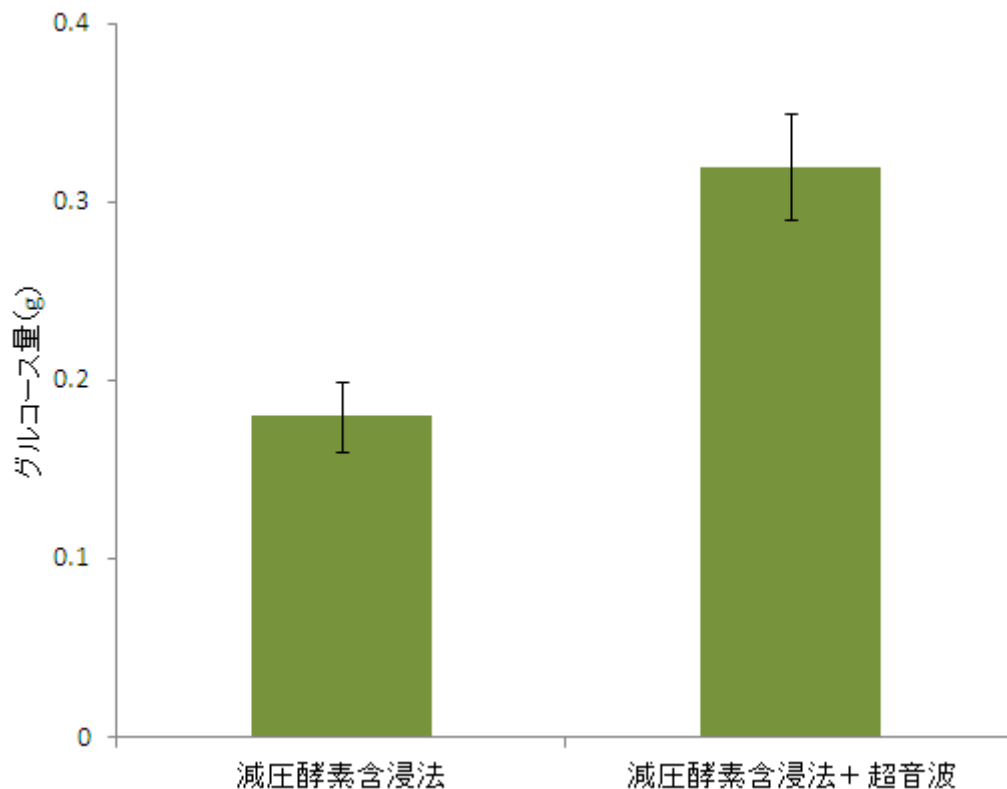


Fig. 2-6 茶殻の減圧酵素含浸法と超音波処理によるグルコース生成量の比較

原料 : 茶殻 3 g  
 前処理条件 : 超音波, 20 kHz, 5 min  
 糖化条件 : 減圧酵素含浸処理  
           セルラーゼ 450 U, pH4.6,  
           減圧下, 50°C, 48 h (攪拌)

Fig. 2-7 に茶殻の減圧酵素含浸処理+超音波+冷凍処理と希硫酸処理によるグルコース生成量の比較を示す。Fig. 2-6 の結果により、超音波処理+減圧酵素含浸処理の優位性が確認されたため、本処理法と比較対照として希硫酸法を用いた前処理工程・糖化工程の比較を行った。前者による生成グルコース量 0.72 g、後者による生成グルコース量 1.02 g となった。以上の結果を受けて、茶殻からのグルコース生成は、前処理工程に 3.0%硫酸処理、糖化工程は減圧酵素含浸法+超音波+冷凍処理を行わずに、セルラーゼ 450 U, pH4.6, 50°C, 48 h (攪拌) に

よる方法が有効性であることがわかった。なお、ここで適用した酵素含浸法は食品産業で使用されている方法で、果物の軟化に使用されている。酵素糖化の反応初期に真空ポンプで減圧状態にし、酵素の最適温度になったら常温に戻す方法である。これは減圧状態から常圧に戻すことで、糖化液内の空気と酵素が置換され、より糖化反応が進行しやすくなる<sup>17)</sup>。さらに超音波による前処理を施した茶殻を使用した。茶殻に超音波の衝撃によるせん断作用でさらに原料の微細化を行い、酵素糖化をより反応しやすくするものである<sup>18,19)</sup>。

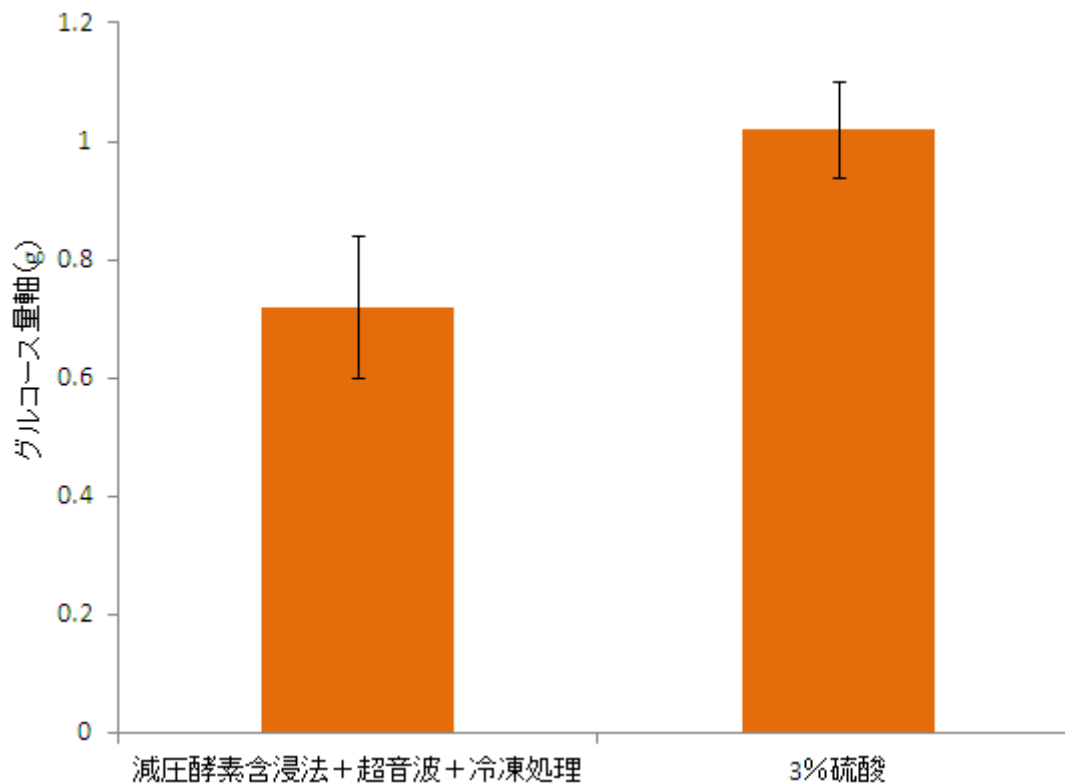


Fig. 2-7 茶殻の減圧酵素含浸法+超音波+冷凍処理と希硫酸処理によるグルコース生成量の比較

原料：茶殻 3 g

(グラフ左)

前処理条件：超音波, 20 kHz, 5 min、12 h 冷凍処理

糖化条件：減圧酵素含浸処理

セルラーゼ 450 U, pH4.6,

減圧下, 50°C, 48 h (攪拌)

(グラフ右)

前処理条件：3.0% 硫酸

糖化条件：セルラーゼ 450 U, pH4.6, 50°C, 48 h (攪拌)

#### 2-4-3 シュレッダー裁断紙

Fig. 2-8 にシュレッダー裁断紙からのグルコース生成に及ぼす希硫酸の影響を示す。非硫酸法 (グラフ左) と 3%硫酸法 (グラフ右) におけるグルコース生成

量はそれぞれ、1.29 g と 2.28 g となった。シュレッダー裁断紙の場合には、前処理工程で 3%硫酸を必要とせず、セルラーゼと  $\alpha$ -アミラーゼの使用のみで効率的な糖化が可能であることがわかった。さらに、3%硫酸法+高温高压処理を施すことで、高分子が過分解され、低分子量化がグルコース単位に留まらずに、より低分子量物質の生成が進展したものと考えられた。

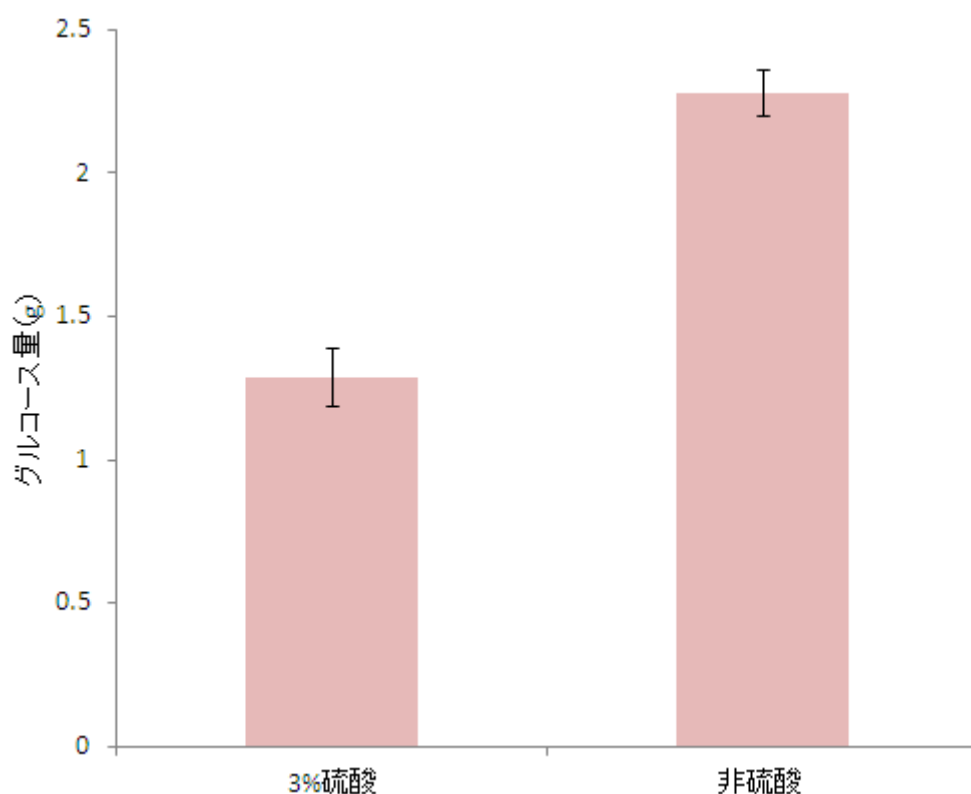


Fig. 2-8 シュレッダー裁断紙からのグルコース生成に及ぼす希硫酸の影響

原料： 茶殻 3 g

前処理条件（グラフ左）： 3.0% 硫酸, 121°C, 1 h

前処理条件（グラフ右）： 蒸留水, 121°C, 1 h

糖化条件：セルラーゼ(900 U),  $\alpha$ -アミラーゼ(490 U), 50°C, 48 h

## 2-5 考察

既存の前処理法の濃硫酸法や亜臨界処理法は大量の薬品やエネルギーを使用する。硫酸を使用する濃硫酸法は前処理工程終了後、硫酸を回収しなければならない<sup>20,21)</sup>。そこで、ビール粕では前処理工程に水酸化ナトリウム(0.8%)処理を行った。ビール粕では水酸化ナトリウム処理(0.8%)+希硫酸(1.0%)による前処理行程は、希硫酸法(3%)によるそれよりグルコース生成量が多かった。セルロースと結合しているリグニンは難分解性物質であるが、水酸化ナトリウム処理することで、2種の高分子間の結合を弱めることで、ビール粕からグルコースが多く生成されたと考えられた。よって、使用する硫酸濃度を下げることができた。次に、茶殻の前処理では、超音波処理と冷凍解凍処理を併用する新しい前処理を試みた。さらに、酵素糖化の際にはセルラーゼとセルロース繊維の反応効率化のために、減圧酵素含浸処理も使用した。しかし、超音波、冷凍解凍、減圧酵素含浸法処理のいずれにおいても、植物バイオマス中のセルロース分解とグルコース生成のためには十分ではないことが示唆され、いずれの方法も硫酸を用いた方法によるグルコース生成量を上回ることがなかった。

ビール粕、茶殻と比べて、シュレツダー裁断紙の場合には、前処理工程で硫酸を使用しない処理の生成グルコース量が高かった。これはシュレツダー紙の元となるコピー用紙は製紙段階で、パルプ原料からリグニンやタンパク質が除去されているためである。紙の成形では、セルロース繊維のつなぎとしてデンプンが使用されている。つまり紙自体は天然のセルロースバイオマスのような強固な構造ではなく、ある程度製紙段階でセルロース繊維が細かくなっており、それをデンプンでセルロース繊維間を弱くつなぎ合わさっているだけだと考える。つまりフードプロセッサで粗粉碎した後、酵素による糖化で十分であることがわかった。シュレツダー裁断紙を希硫酸で高温高圧処理することでセル



ローズ及びグルコースが過分解したためにグルコース生成量が少なかったと考えられた。

以上の結果から、第 3 章、第 4 章では、原料としてシュレッダー裁断紙を使用して、非硫酸処理の方法を適用することにした。

# 第3章

シュレッダー裁断紙糖化液の発酵

### 3-1 酵母と培養条件

#### 3-1-1 エタノール発酵微生物の選定

エタノール発酵には主に酵母と細菌が用いられている。細菌ではテキーラの醸造に用いられる *Zymomonas mobilis*<sup>22)</sup>、沖縄のヤシ樹液から分離された新しいエタノール発酵細菌 *Zymobacter palmae*<sup>23)</sup>、また酵母では *Saccharomyces cerevisiae* 等が代表的な発酵微生物である。一般に、細菌は酵母と比較してエタノール生成速度が速いことが知られている。しかし、原核生物である細菌は高浸透圧下などの適応能力を超えた過酷なストレス環境では、その有用機能は著しく制限される。本研究におけるシュレッダー紙の糖化液は約 300 g/L あるので、発酵微生物が高度耐糖性、高度エタノール耐性を持つことが要求される。そこで本研究では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いてエタノール発酵することにした。さらに、*S. cerevisiae* に関しては、研究室保存株である海洋由来高発酵酵母である C-19 株を主に使用し、比較対照として日本酒酵母 K-7 株及び基準酵母 NBRC10217 株を使用した<sup>24)</sup>。

#### 3-1-2 酵母培養

使用する酵母株は YPD (Glucose 20 g/L, Yeast Extract 10 g/L, Peptone 20 g/L, Agar 10 g/L) 寒天培地にて 30°C で培養して、コロニーを形成させた。酵母コロニーは 4°C で保存株とした。前培養には、保存株菌体を白金耳で YPD 液体培地 10 mL に植菌し、30°C, pH7, 24 h の静置培養を行った。次に本培養では、前培養液 100 mL を植菌した坂口フラスコ YPD 液体培地 100 mL で 30°C、120 rpm(振とう培養機 YAMATO 社 IK400W)、48 h の振とう培養をおこなった。本培養が終了した菌体は、遠心分離機 (HITACHI CF12RX) で 3000 rpm, 5 min の遠心を行った。沈澱した菌体を生理食塩水で懸濁と遠心を 3 回繰り返して、洗浄菌体を

回収した。

### 3-2 エタノール発酵

#### 3-2-1 糖化液の静置発酵

供試菌株は海洋から単離した高発酵酵母 C-19 株、比較対照株として使用頻度が高い日本酒酵母の協会 7 号（以下 K-7 株と記載）及び基準酵母 NBRC10217 株を用いた。酵母は前培養、本培養した後、菌体をエタノール発酵に使用した。試験管 20 mL 内に pH7.0 に調整した糖化液（297 g/L）10mL を入れ、酵母 0.2 g を添加した。試験管を嫌気ジャー（日本ベクトン・ディッキンソン）に入れ、嫌気条件 30℃下で、1～7 日の静置発酵を行った。嫌気ジャーは脱酸素剤（三菱ガス化学株式会社 アネロパック・ケンキ 酸素吸収・炭酸ガス発生剤）を用いて嫌気条件にした<sup>25)</sup>。なお、嫌気ジャー内は、エタノール発酵により発生する CO<sub>2</sub> による加圧醗酵が誘因する醗酵阻害を防止するため、試験管を最大 3 本までに制限した。生成エタノール濃度は酵素法（エタノール測定用 F-kit, ロッシュ）により測定した。

#### 3-2-2 糖化液の攪拌発酵

##### 酵母培養

酵母の前培養・本培養・菌体回収は 3-1-1 と同様の方法を用いた。

##### 発酵

酵母菌体 2 g を pH7 に調整した糖化液 100 mL の入った三角フラスコ(500 mL) に添加し、嫌気条件 30℃下で 1～7 日間の攪拌発酵を行った。嫌気発酵を行うために、三角フラスコの上部に三方コックを接続し、フラスコ内の空気を窒素置換した。

### 3-2-3 固定化酵母を用いた連続発酵

エタノール発酵には酵母が利用されるが、一般にその酵母は一度使っただけで廃棄することになる。酵母菌体をリサイクル出来るようになれば、廃棄量、経費ともに少なく抑えることができ、環境にも配慮したエネルギーの生産となる。そこで、酵母を固定化したバイオリアクターの構築を試みた。本研究では、酵母をアルギン酸ゲルビーズ内に包括した固定酵母を用いて、シュレッター紙糖化液から連続的にエタノールを製造する条件について検討した。シュレッター裁断紙糖化液は高濃度であるため、固定化酵母のアルギン酸ビーズ製作に工夫が必要である。第 1 として固定化酵母から酵母の漏出防止、第 2 として固定化酵母の調製時に及ぼす塩化カルシウム濃度とアルギン酸濃度の影響、つまり固定化酵母の製作における最適な塩化カルシウム濃度とアルギン酸濃度を調べ、高濃度糖化液の発酵に最適な強度を有する固定化酵母を製作する。第 3 としてアルギン酸ビーズ量とエタノール発酵の関係である。これはエタノール濃度を一定にした場合の最適なビーズ量の検討である。なお使用するアルギン酸は、第 4 章におけるワカメ加工廃棄物からの抽出物の使用を、最終的な目標としている。

### 3-2-4 固定化酵母の調製

アルギン酸ナトリウム (WAKO, 300~400cP) を水と電子レンジで加温しながらかくはん棒でかき混ぜ、半透明のゲル状にした。アルギン酸ナトリウム懸濁液 (アルギン酸濃度 2%) を常温まで冷却し、これと酵母菌の懸濁液を混合すると均一にアルギン酸内に固定化されることが明らかになっている<sup>26,27)</sup>。次にアルギン酸ナトリウム懸濁液と酵母懸濁液を同容量(混合割合 1:1)で混合した。これまでの実験でグルコース濃度 270 g/L~300 g/L の高糖濃度の発酵では酵母は

湿重量 2 g が最適であることがわかっている。次に、アルギン酸ナトリウム懸濁液と酵母菌懸濁液の混合液を 50 mL 用シリンジで吸い取り、塩化カルシウム水溶液表面に一滴一滴落下させた。今回は Ghasem らの研究から 2%塩化カルシウムを選択した<sup>28)</sup>。塩化カルシウム水溶液を攪拌せずに液を滴下することで、アルギン酸ナトリウムが直ちにカルシウムイオンと反応し、ゲルビーズを形成されることが証明されている<sup>29,30)</sup>。酵母を包括させたアルギン酸カルシウムビーズは 4°C、12 h 冷却静置させることで、ゲルビーズの強度を強くさせた。調製した固定化酵母ビーズは滅菌水で数回繰り返し洗浄して保存した。

### 3-2-5 固定化酵母の調製時に及ぼすアルギン酸ナトリウム濃度の影響

本研究では、高濃度糖化液を発酵に使用するため、従来法に基づく塩化カルシウム濃度とアルギン酸ナトリウム濃度では、ゲルビーズの破裂や固定化酵母のゲル外への多量漏出が観察された。そこで、固定化酵母の調製時に及ぼす塩化カルシウムとアルギン酸ナトリウム濃度の影響を詳細に検討し、ゲルビーズの強化を試みた。

アルギン酸カルシウムによる固定化酵母は容易に調製できる反面、発酵液中への酵母の漏出、長期発酵時の崩壊といった問題点が指摘されている<sup>31)</sup>。アルギン酸カルシウムゲルに固定化した酵母を用いた醸造酒などの生産特性について研究が行われているが、酵母の漏出防止についてはほとんど触れていない。そこでアルギン酸ナトリウム懸濁液に無機塩類： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01 g/L、窒素源：Yeast Extract 5 g/L を添加して調製することにした。まず、酵母を YPD 液体培地で 30°C、120 rpm で、2 日間培養した。酵母を蒸留水で 3 回洗浄後、2 g の菌体を収した。次に、アルギン酸の溶解には、蒸留水を用いる調製法（通常型）と、蒸留水に上記の無機塩

類と窒素源を添加した液を用いる調製法（本研究）の 2 種類の方法があるが、本実験では酵母の漏出が観察されなかった後者を採用した。

### 3-2-6 固定化ビーズの酵母とアルギン酸ナトリウム溶液量の検討

本研究では、高濃度糖化液を発酵液とするため、固定化酵母量の最適条件の検討が必要である。固定化ビーズ量を多くするには、アルギン酸ナトリウム溶液量を多くすれば固定化ビーズが多くなり、グルコースとの接触機会が増加し、高エタノール生成が期待できる。そのため酵母量を 2 g と一定にした場合、アルギン酸ナトリウム溶液量をどのくらいの量にしたらよいのかを調べる必要がある。そこで酵母量を一定してアルギン酸ナトリウム溶液量を順次多くした場合のエタノール量を検討することとした。固定条件は酵母菌体量 2 g、シュレッダー紙糖化液 280 g/L、2 日間の好気発酵を行った。アルギン酸ナトリウム溶液は本研究で開発した無機塩類と窒素源を添加した液を用いる調製法での固定化酵母を作成し、40~90 mL と 10 mL 刻みで作成した。

### 3-2-7 固定化酵母による連続エタノール発酵

本研究では、固定化酵母による高濃度糖化液の繰り返しエタノール発酵を調行った。通常型により調製した固定化酵母を用いると、初回発酵でアルギン酸カルシウム担体からの酵母の漏出が観察され、複数回発酵では担体ビーズの割れが生じることを確認していた。そこで、本研究ではより調製した固定化酵母を用いた連続発酵時の担体の安定性を併せて調べることにした。

#### 方法

以下の操作で固定化酵母の調製を行った。100 mL ビーカーにアルギン酸ナトリウム 2 g と希釈液 45 mL を加え、レンジで加熱しながら、半透明になるまで溶

かした。十分に冷却したゾル状のアルギン酸ナトリウムに酵母（C-19 株または K-7 株）を混合した。これに無機塩類と窒素源を添加した溶液 45 mL に添加した。次に、50 mL シリンジを使用して、混合液を 2%塩化カルシウム水溶液にゆっくり滴下した。瞬時に丸いビーズ状の固定化酵母の形成が観察された。三方コック付き三角フラスコ 500 mL に、固定化酵母と糖化液 100 mL を入れて混合し、30 rpm（マグネティックスターラ）、30°C でエタノール発酵を行った。遊離酵母による発酵では、攪拌条件は 100~150 rpm で行ったが、固定化酵母では、攪拌子の圧迫による担体の破損を避けるために、30 rpm とし、フラスコ内を嫌気状態にするために、窒素置換を行った。次に発酵用フラスコと蒸留水を充填した ETS ボトル(Fig.3-5)をシリコンチューブで接続した。酵母による発酵が始まると、発生した CO<sub>2</sub> はフラスコ、チューブを通して、ボトル中の蒸留水に気泡として出現した。気泡が発生しなくなった時点を、エタノール発酵の終了時間とした。発酵終了後に、固定化酵母をフラスコから回収し、滅菌蒸留水で洗浄し、次の発酵まで 4°C で保存し、同じ操作で発酵を 5 回繰り返した。

### 3-2-8 気化エタノール回収システムの構築

バイオエタノール生産において、発酵液から気化するエタノール量を考慮し、捕集する研究はほとんど行われていない。しかし、筆者は沸点 78.3°C（1 気圧）のエタノールはプラントレベルの発酵では、かなりの量のエタノールが気化する可能性を仮定した。エタノール発酵中に CO<sub>2</sub> 発生に伴って気化するエタノールがどれくらいあるのかを調べるために、Fig. 3-5 に示す気化エタノール回収システム ETS(Ethanol Trap System)を構築した。さらに、発酵タンクに本システムを接続することで、発酵タンク内を常圧に保ち、加圧発酵を防ぐことができることがわかった。ETS 容器内のエタノール量を測定し、発酵液のエタノール量



に加算し、総エタノール生成量とした。本研究では攪拌発酵において ETS による気化エタノールの捕集効果は確認している。そこでさらにプラントレベルでのエタノール生産コスト削減策の一環として「固定化酵母による連続エタノール発酵」に設置し、バイオエタノール生産コスト削減を目的とした。ETS に関しては、簡便なシステムで気化エタノールを捕集するシステムを考案した。

#### ETS の説明

エタノール発酵に伴い  $\text{CO}_2$  が発生し泡となって液面から気化する際に、同時にエタノールが気化すると仮定した。三角フラスコ中の発酵液表面から気化したエタノールは、接続しているシリコンチューブを通り、ペットボトル製 ETS 内の蒸留水へ通気され液化した。500 mL の ETS 容器 2 個以上を接続し、各 ETS 内の蒸留水は 300 mL に制限することで加圧発酵を防ぎ、 $\text{CO}_2$  および気化エタノールが各 ETS を連続的に通過して、ETS 内の蒸留水に液化エタノールが段階的に貯まるようにした。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 静置発酵におけるエタノール濃度の経時変化

糖化液 10 mL の静置発酵結果を Fig. 3-1 に示す。C-19 株、K-7 株及び NBRC10217 株はそれぞれ発酵 5 日目で最大エタノール生成量を示した。最大エタノール濃度はそれぞれ C-19 株 68.9 g/L, K-7 株 54.0 g/L, NBRC10217 株 19.5 g/L であった。5 日目以降エタノール濃度は緩やかに減少していった。

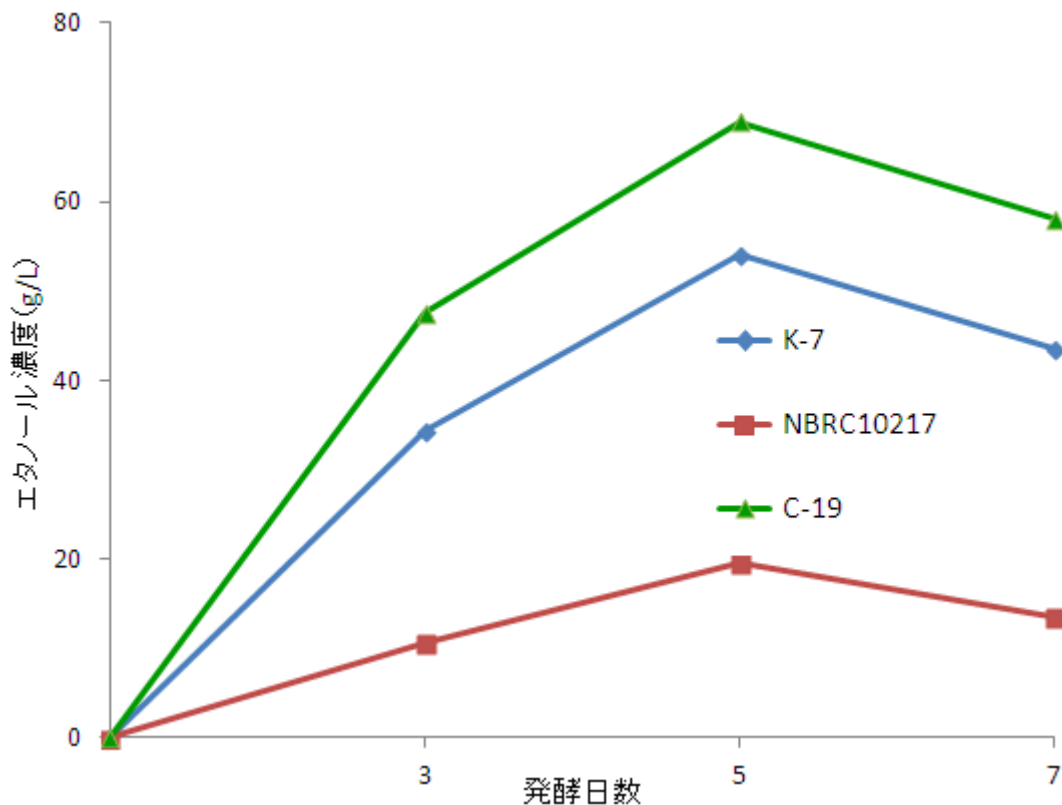


Fig. 3-1 シュレッダー紙糖化液 297 g/L を使用した各酵母株による静置発酵

原料 シュレッダー紙 糖濃度 297 g/L 糖化液濃縮倍率 5 倍  
 使用機材 脱酸素剤 (三菱ガス化学株式会社製) 20 mL 試験管  
 嫌気ジャー (日本ベクトン・ディッキンソン)  
 発酵条件 攪拌 酵母菌体量 0.2 g pH 7 30°C 1~7 日間 嫌気条件

### 3-3-2 攪拌発酵におけるエタノール濃度の経時変化

糖化液 100 mL の攪拌発酵の結果を Fig. 3-2 に示す。C-19 株は 3 日目で最大エタノール生成量 122.5 g/L を示した。K-7 株及び NBRC10217 株はそれぞれ 7 日目で最大エタノール生成量を示し。それぞれ 98.5 g/L、37.5 g/L であった。C-19 株の 3 日目以降エタノール濃度は下降したが、エタノール濃度が高くなり、酵母が生成したエタノールを資化し始めたためと考えられる。一方、K-7 株及び NBRC10217 株の 3 日目以降エタノール濃度は緩やかではあるが上昇した。供試

菌株の中で海洋由来酵母 C-19 株は最もエタノール生成量が多く、K-7 株及び NBRC10217 株よりエタノール生成速度が速いことが示された。

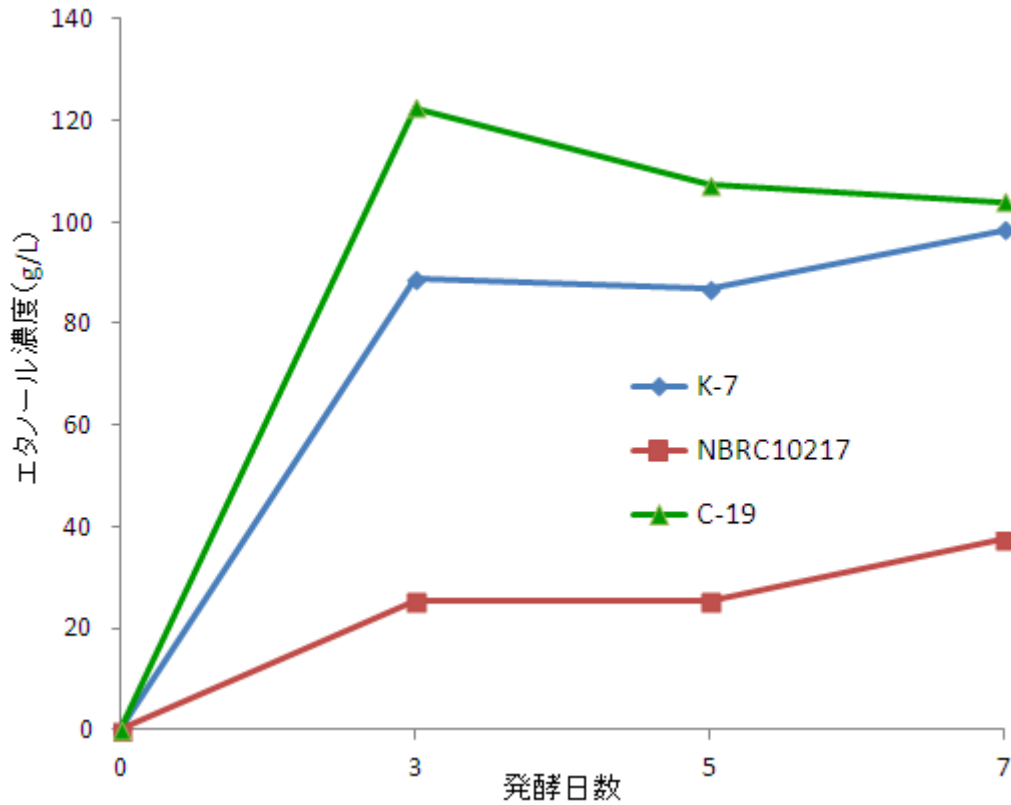


Fig. 3-2 シュレッダー紙糖化液 297 g/L を使用した各酵母株による攪拌発酵

原料 シュレッダー紙 糖濃度 297 g/L 糖化液濃縮倍率 5 倍  
 使用機材 三方コック付き 500 mL フラスコ マグネテックスタラー  
 発酵条件 攪拌 酵母菌体量 2 g pH 7 30°C 7日間 嫌気条件

### 3-3-3 固定化ビーズ酵母とアルギン酸ナトリウム溶液量におけるエタノール生成量の影響

アルギン酸溶液量とエタノール濃度の関係を Fig. 3-3 に示す。固定化酵母のビーズ量が最大であるアルギン酸ナトリウム溶液量 90 mL が最大エタノール

生成量を示した。つまりアルギン酸溶液量（固定化ビーズの量）とエタノール生成量は比例関係があることが示唆されたので、そこで連続エタノール発酵におけるアルギン酸ナトリウム溶液量は 90 mL とした。アルギン酸ナトリウム溶液 100 mL 以上を利用した固定化ビーズを使用した場合、固定化ビーズの体積が大きくなり、攪拌に支障をきたすことがわかった。

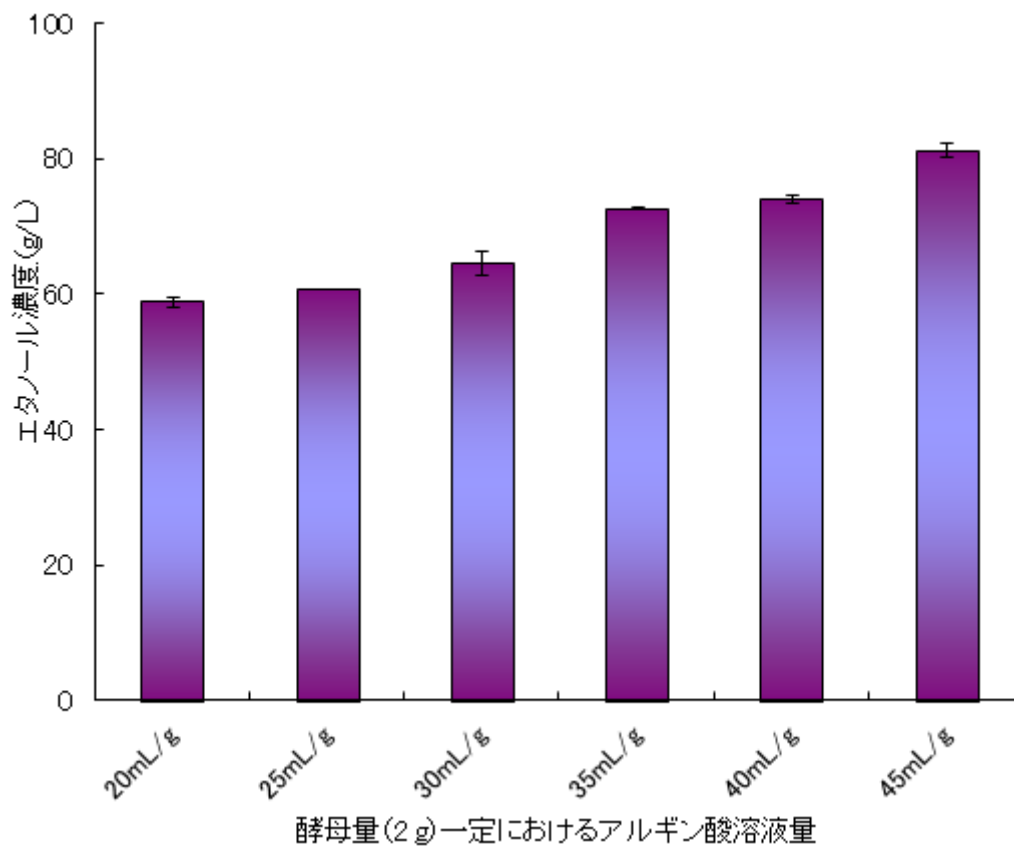


Fig. 3-3 固定化ビーズ酵母とアルギン酸ナトリウム溶液量におけるエタノール生成量の影響

原料 シュレッダー紙 糖濃度 280g/L 糖化液濃縮倍率 5倍  
 使用機材 三方コック付き 500 mL フラスコ マグネテックスタラー  
 アルギン酸カルシウム製作条件: アルギン酸ナトリウム 2%,  
 塩化カルシウム 2%, 使用菌体量 2g  
 アルギン酸ナトリウム溶液添加物  
 無機塩類 :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g/L,  
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01 g/L,  
 窒素源 : Yeast Extract 5 g/L  
 アルギン酸ナトリウム溶液量 40~90 mL  
 発酵条件 攪拌 pH 7 30°C 2日間 好気条件

### 3-3-4 シュレッダー紙糖化液 270 g/L を使用した固定化酵母による連続エタノール発酵

固定化酵母による連続エタノール発酵の結果を Fig. 3-4 に示す。糖化液濃度

270 g/L、固定化酵母 C-19 株、K-7 株を用いて発酵した。第 1 回発酵ではエタノール 50 g/L が生成された。第 2~4 回発酵では、80~85 g/L のエタノールが生成された。第 5 回発酵では、固定化酵母 C-19 株で約 70 g/L、固定化酵母 K-7 株で約 50 g/L のエタノールが生成された。発酵液中の残存グルコースは初期量の 1% 以下となっていた。5 回の発酵で、坦体外への酵母の漏出と坦体の破損はほとんど観察されなかった。固定化酵母の形状安定性に窒素源と無機塩類の添加が有効であることが明らかになった。このように、固定化酵母によるシュレッダー廃棄紙糖化液のエタノール発酵により、高濃度のエタノールを連続的に生産できることがわかった。

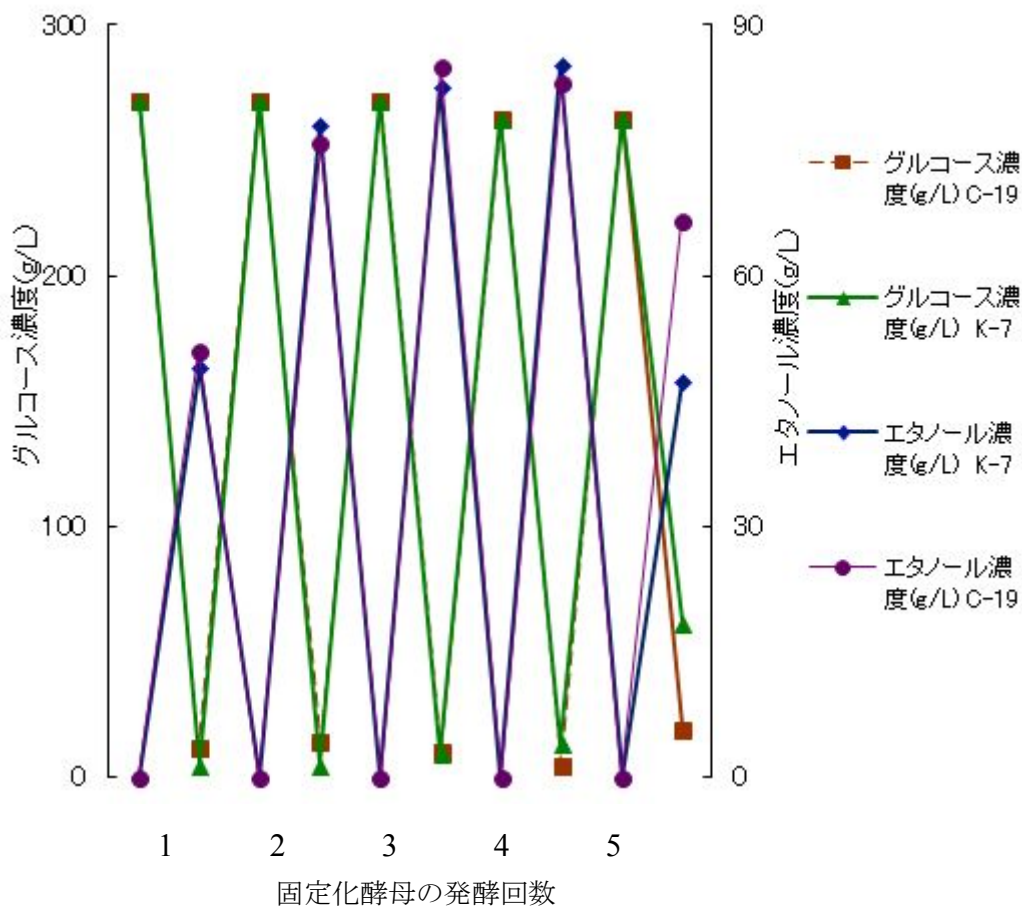


Fig. 3-4 シュレッダー紙糖化液 270 g/L を使用した固定化酵母による連続エタノール発酵

原料 シュレッダー紙 糖濃度 270 g/L 糖化液濃縮倍率 5 倍  
 使用機材 三方コック付き 500 mL フラスコ マグネテックスタラー  
 アルギン酸カルシウム製作条件: アルギン酸ナトリウム 2%,  
 塩化カルシウム 2%, 使用菌体量 2 g  
 アルギン酸ナトリウム溶液添加物  
 無機塩類:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g/L,  
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01 g/L,  
 窒素源: Yeast Extract 5 g/L  
 アルギン酸ナトリウム溶液量 90 mL  
 発酵条件 攪拌 pH 7 30°C 2 日間×5 回 嫌気条件

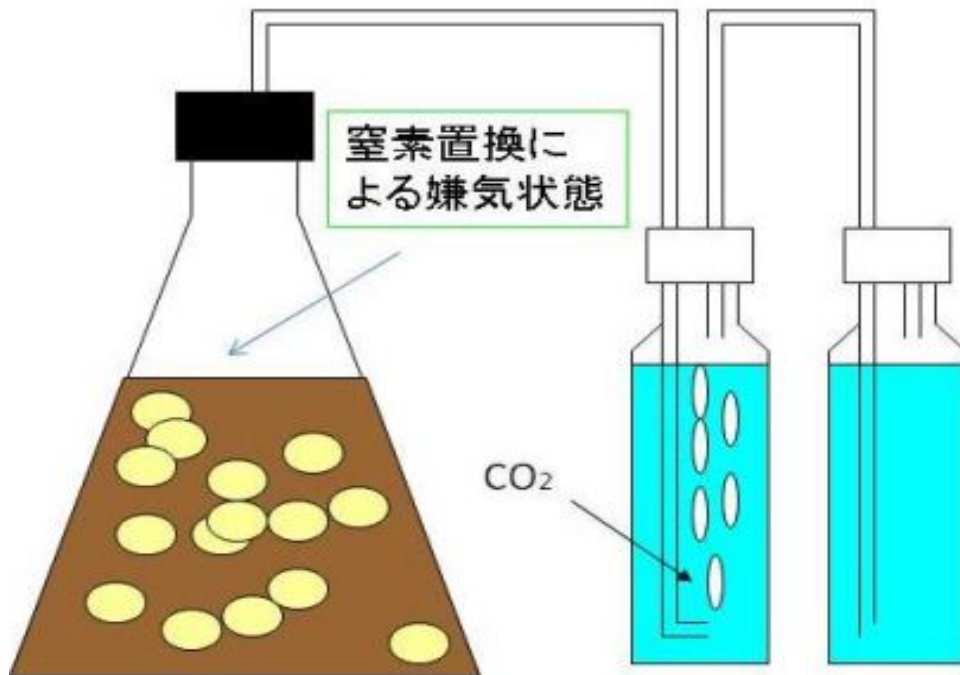


Fig.3-5 ETS のシステム略図

使用機材 三方コック付き 500 mL フラスコ シリコンチューブ  
ETS 用 500 mL 容器

### 3-3-5 ETS 内エタノール量と回収率

発酵液及び ETS 内蒸留水のエタノール濃度を Table 1 に示す。また ETS の略図を Fig. 3-5 に示す。K-7 株と C-19 株による発酵液のエタノール濃度はほぼ同レベルであった。エタノール回収率とは、総エタノール量（発酵液内エタノール量と ETS 内エタノール量）に対する ETS 内エタノール量の割合を示す。本結果のみ「エタノール濃度(g/L)」ではなく、「エタノール量(g)」としたのは、発酵液量(100 mL)と ETS 内蒸留水量(300 mL)が違うため、濃度表示にすると捕集したエタノールが正確に把握できないからである。K-7 株の発酵時に接続した ETS 内エタノール生成量は C-19 株より 2 倍高く、またエタノール回収率は 2.5 倍で



あった。

Table 1 ETS 内エタノール量と回収率

酵母株	発酵液内エタノール量(g)	ETS内エタノール量(g)	回収率(%)
K-7	8.27	0.4	5%
C-19	8.5	0.2	2%

### 3-4 考察

シュレッダー紙糖化液 297 g/L を使用した静置発酵及び攪拌発酵では、酵母による生成エタノール量に大きな違いがあった。静置発酵では、酵母と糖化液との接触効率が低い上、密閉容器内で CO<sub>2</sub> が発生したために容器内の圧力が上がり、加圧発酵となり、発酵収率が低くなったと考える。C-19 株は、K-7 株や NBRC10217 株と比較し発酵速度が速いことがわかった。C-19 株は海洋由来酵母であるため、浸透圧耐性や耐塩性が高く、高濃度糖化液や生成エタノール耐性を有しているためと考える。

固定化酵母調製時のアルギン酸ビーズ形成には無機塩類や窒素源を添加することで、坦体強度が向上し、連続使用耐性が増大することがわかった。Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>のような 2 価金属イオンがアルギン酸ゲル強度を増し。酵母漏出の発生防止、高濃度糖化液がもたらす高浸透圧耐性を獲得したと考える。また、固定化酵母の連続エタノール発酵によるエタノール生成量は、攪拌発酵のそれより少なかったが、この現象の理由は不明である。シュレッダー紙糖化液を用いた発酵では生成エタノール量は大きく変動することが多かった。シュレッダー紙を使用した場合には、紙質が一定しないため、原料の差が酵母の代謝に何らかの影響を及ぼしている可能性もあり得るであろう。酵母の発酵能が安定する新たな方法の開発が必要であると考え。

本実験では ETS がエタノール収率向上に有効な手段であることが明らかとなった。さらに、今回は発酵時に気化したエタノールを自然な状態で ETS により

捕捉したが、発酵中あるいは発酵後に、発酵液に外部から窒素ガス等を注入することにより、ETS により多くのエタノールを捕捉できると考えられる。

## 第4章

ワカメ芯茎部とシュレッダー紙  
の混合原料の発酵によるバイオ  
エタノール生産

#### 4-1 緒言

第3章にて、シュレッダー裁断紙を原料とする酵母発酵により、最大 122.5 g/L のエタノールを生成することができたが、エタノール生成量が安定していないことも明らかになった。紙の製紙工程では、パルプ材からタンパク質、リグニン及びペクチンを薬剤除去しており、紙の主成分はセルロースとヘミセルロースである。従って、シュレッダー裁断紙の糖化液は炭素源のみを含んでいるが、長期間に渡る酵母活性維持には、炭素源に加えて窒素源、無機塩類、ビタミンが必要である。従って、糖化液の発酵期間中に添加酵母の活性低下が著しいため、発酵効率は添加酵母の初期活性に大きく依存しており、この現象がエタノール生成量の不安定化に繋がったと推定される。

さて、筆者が本研究を実施中の平成24年度から、所属研究室で「東北マリンサイエンス拠点形成事業（新たな産業の創生につながる技術開発）「三陸産ワカメ芯茎部の効率的バイオエタノール変換技術と被災地復興への活用法の提言」（文部科学省主催）を開始した。そこで第4章では、筆者は使用したシュレッダー裁断紙にワカメ芯茎部を混合した原料を調製することで、新たなるバイオエタノール生産を試みることにした。

ワカメを含む褐藻類は世界的に分布しているが、食用としての利用は東アジア圏特有の習慣である。また、褐藻類にはアルギン酸が多く含まれ、主に食品生産・食品加工における添加剤：増粘多糖類として利用されている<sup>32)</sup>。しかし、褐藻類は成長が速く、成熟体は葉先から根茎部まで数 m～数十 m に及ぶが、成体の全てが加工利用されている訳ではなく、先端部と根幹部（芯茎部）を中心に廃棄されている場合が多い。従って、現在は海洋投棄されているのみで、活用方法が見出されていないワカメ加工廃棄物の有効利用の一つとして、バイオエタノール変換を試みることにした。第2章、第3章にて記述したように、穀

物由来のエタノール生産を回避するために、海藻の廃棄部位を利用する。また、海藻は廃材木や稲わら等のリグノセルロースバイオマスと比較して、原料化に適した新規次世代原料といえる。現在のエタノール発酵原料は陸上バイオマスを使用しているが、耕作エリアの限界があり、また更なるエタノール原料の増産は、未開拓エリアの拡大・森林伐採に繋がり、環境問題視されている。Somervilleらは海洋由来資源である褐藻の利用は、陸上由来資源の原料化が引き起こす問題・環境破壊を回避することが可能であると示している<sup>33)</sup>。褐藻はリグニンを含まないため、粉碎等の前処理が容易である。しかし、セルロース成分が少ないため、糖化により生成するグルコースが少なく、逆にアルギン酸などの海藻特有の多糖を多く含んでいる。Stephanopoulosはこれらの多糖の抽出はコストが高く、安価な原料が必須条件であるエネルギー原料として、アルギン酸を利用することは現段階では難しいと指摘している<sup>34)</sup>。

日本のワカメは主に東北地方で生産されており、岩手県及び宮城県で日本の生産量の67%を占めている<sup>35)</sup>。沖合にある養殖場から船で浜まで運ばれ、その場で葉、茎、根の部分に分けられる。ワカメの食用部は主に葉部であり、茎や芽株についてはごく一部を生食や佃煮として利用するのみである。ワカメ芯茎部は未利用物として収穫期に大量発生するので、業者はその処理問題に苦慮している。三陸地方の場合、ワカメ芯茎部（根幹部）はウニやアワビの餌とするため、再度沖合の給餌場まで船で運ばれ海洋投棄される。芯茎部は食用に適さないため、生産業者にとって新たな利用法の開発が待たれていた。バイオエネルギー変換の例として、褐藻であるカラフト昆布を原料とした酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のエタノール発酵では、0.45%(V/V)と非常にエタノール生成量が低いことが明らかになっている<sup>36)</sup>。そこで、筆者の所属研究室ではワカメ芯茎部を効率的なエタノール生産の原料とすることを考えた。本研究では、

ワカメ芯莖部とシュレッダー裁断紙の混合原料を調製して、安定的な高エタノール生産条件を検討することにした。

## 4-2 原料の前処理・糖化法

### 4-2-1 前処理方法

南三陸町のワカメ養殖場から購入したワカメ芯莖部は、東京海洋大学まで冷蔵輸送され、研究室の冷凍庫（-80℃）に保管した。冷凍ワカメ芯莖部は凍結状態のまま、大型おろし機（RHG-15、ハッピー工業）で粉砕した。ワカメ試料の微粉末化は技術的な困難を伴うため研究報告が無く、筆者は様々な方法を試みて、最終的に以下の方法を確立した。

粉砕試料は水分を多く含むゼリー状の半固体状を呈しており、乾燥器（80℃）で一晩乾燥した。乾燥試料は平均 5~8cm 四方の大きさであり、再度大型おろし機で粉砕処理した。再粉砕試料は平均 2~3cm 四方の大きさになり、これを乾燥状態のまま大型石臼処理することで、ワカメ試料の微粉末化を行った。

### 4-2-2 糖化方法

本研究室では、粉末ワカメ芯莖部 3 g に対して 3%硫酸溶液 100 mL で前処理を行ってきたが、グルコース生成量が少ないことが、これまで筆者の研究でわかっていた。また Hendriks らは原料の酸やアルカリにより糖が過分解され、フルフラール及びHMF等の発酵阻害物質の溶出を避けることを明らかにしている<sup>37)</sup>。そこで、海藻には陸上バイオマスほどリグニンが含有していないことを考慮し、低環境負荷で生成グルコースがより多い糖化法を検討することにした。微粉末化したワカメ芯莖部試料は高温高压処理を施さなくても、酵素のみで糖化が可能であるため、下記①~④の前処理・糖化工程を検討した。

- ① 高温高圧処理・硫酸処理はいずれも無  
300 mL ビーカーに蒸留水 100 mL と微粉末化ワカメ 3 g を入れ、46°C, 12 h の攪拌をした。pH4.6 に調整し、セルラーゼ (Genencor 社 GC-220) 500  $\mu$  L(150 U) を添加して 46°C, 48 h の攪拌を行った。
- ② 高温高圧処理は無、0.3%硫酸処理は有  
300 mL ビーカーに 0.3%希硫酸溶液 100 mL と微粉末化ワカメ 3 g を入れ、46°C, 12 h の攪拌をした。pH4.6 に調整し、セルラーゼを添加して 46°C, 48 h の攪拌を行った。
- ③ 高温高圧処理は有、硫酸処理は無  
300 mL ビーカーに蒸留水 100 mL と微粉末化ワカメ 3 g を入れ、121°C, 1 h で高温高圧処理を行った。pH4.6 に調整し、セルラーゼを添加して 46°C, 48 h の攪拌を行った。
- ④ 高温高圧処理、0.3%硫酸処理はいずれも有  
300 mL ビーカーに 0.3%硫酸溶液 100 mL と微粉末化ワカメ 3 g を入れ、121°C, 1 h で高温高圧処理を行った。pH4.6 に調整し、セルラーゼを添加して 46°C, 48 h の攪拌を行った。

#### 4-3 発酵方法

第3章では酵母 *Saccharomyces cerevisiae* である C-19 株、K-7 株及び NBRC10217 株を比較すると、C-19 株が最もエタノール生成量が高いことがわかったため、第4章では C-19 株に限定し発酵を行った。

一般的なシュレッダー裁断紙はコピー用紙が主であるが、他にカラー印刷された広告や給料明細、および紙の表面を光沢剤できれいにされた上質な紙等のさまざまな種類の紙が混在している。第3章ではシュレッダー裁断紙のみを発酵原料とした場合、エタノール生成量が大きく上下する現象が観察された。そこで第4章では、安定的な高エタノール発酵を得るために、シュレッダー裁断紙にワカメを混合した原料を調製した。

##### 4-3-1 シュレッダー裁断紙とワカメ芯茎部の混合糖化液のエタノール発酵

シュレッダー裁断糖化液とワカメ芯茎部糖化液の混合液の発酵をおこなった。

Table 4-1 混合液のグルコース濃度-1

シュレッダー裁断紙 糖化液の混合比(%)	ワカメ芯基部糖化液 混合比(%)	グルコース濃度(g/L)
100	0	291
90	10	265
80	20	239
70	30	213
60	40	186

シュレッダー裁断紙糖化液：ワカメ芯基部糖化液 =10:0、9:1、8:2、7:3、6:4 の5種類の混合液を調製した。シュレッダー裁断紙糖化液は、原液をエバポレーター（EYELA N-3NW）で5倍濃縮した。ワカメ芯基部糖化液は10倍濃縮した。混合液のグルコース濃度をTable 4-1に示す。

#### 4-3-2 酵母発酵方法

発酵には酵母 C-19 株を使用した。酵母を使用する際には、前培養及び本培養を行った。前培養は試験管内の YPD 液体培地 10 mL に、寒天培地より酵母菌体を 1 白金耳植菌し、1 日、30°C で静置培養を行った。その後、増殖した酵母菌体を YPD 液体培地 100 mL 入りの坂口フラスコ(500 mL)に植菌した。本培養は浸とう培養機（IK400W、YAMATO）を用いて 120 rpm、30°C で 48 h 攪拌培養した。定常期まで増殖した酵母菌体は遠心分離機（CF12RX、HITACHI）で 3,000 rpm、5 min の遠心を行い集菌した。菌体を蒸留水に懸濁して、同様の遠心法で菌体洗浄を 3 回繰り返した。次に、酵母菌体 2 g を三方コック付き 500 mL フラスコに規定の混合割合の糖化液 100 mL と共に加え、窒素置換法でフラスコ内を嫌気にした後、30°C、7 日間の静置発酵を行った。発酵液のエタノール濃度は酵素法（エタノール測定用 F-kit）で測定した。



#### 4-4 糖化液の混合比の検討

4-3-1 でシュレッダー裁断紙とワカメ芯茎部に混合比は 7:3 または 6:4 が適していることがわかった。ここでは、混合比を 5:5, 4:6, 3:7 とした場合も含めて、最適混合比を再度検討した。なお、ワカメ糖化液を 5 倍濃縮した場合、濃縮液の塩濃度約 8%、10 倍濃縮では塩濃度約 16%となり、濃縮率を高くすると糖化液の塩濃度が高くなり過ぎることがわかったので、4-4 では、ワカメ芯茎部糖化液をシュレッダー裁断紙糖化液と同様に、5 倍濃縮液を使用した。この条件下で混合液のエタノール発酵を検討した。混合液のグルコース濃度を Table 4-2 に示す。

Table 4-2 混合液のグルコース濃度-2

シュレッダー裁断紙 糖化液の混合比(%)	ワカメ芯茎部糖化液 混合比(%)	グルコース濃度(g/L)
70	30	213
60	40	190
50	50	159
40	60	132
30	70	104

##### 4-4-1 酵母培養と発酵方法

発酵には C-19 株を使用した。酵母を使用する際には、前培養及び本培養を行った。前培養は試験管内の YPD 液体培地 10 mL に、寒天培地より酵母菌体を 1 白金耳植菌し、24 h、30°C で静置培養を行った。その後、増殖した酵母菌体を YPD 液体培地 100 mL 入りの坂口フラスコ (500 mL) に植菌した。本培養は浸とう培養機 (IK400W、YAMATO) を用いて 120 rpm、30°C で 48 h 攪拌培養した。定常期まで増殖した。酵母菌体は遠心分離機 (CF12RX、HITACHI) を用いて 3000 rpm、5 min の遠心を行い集菌した。菌体を蒸留水で懸濁して、同様の遠心を 3 回繰り返して洗浄した。次に、酵母菌体 2 g を三方コック付き 500 mL 内の混合

液 100 mL に植菌して、窒素置換によりフラスコ内を嫌気にして、30°C, 7 日間の静置発酵を行った。

#### 4-5 Jar Fermentor による発酵のスケールアップ(3,000 mL)

第 3 章、第 4 章の前半までは、三角フラスコ 500 mL を用いた 100 mL スケールの高濃度発酵について記述してきた。第 4 章後半では、10 L 容 Jar Fermentor(MBF、EYELA)を使用し、発酵のスケールアップ (3,000 mL) を行った。100 mL スケールでの高濃度発酵と同レベルの発酵が、3,000 mL にて実現可能であるかどうかの検討を行った。

##### 4-5-1 酵母培養と発酵方法

前培養した酵母菌体を Jar Fermentor 内の YPD 液体培地 5000 mL に添加し、Fermentor 附属通気装置 (AERATION MAU-2、EYELA) で通気しながら、30°C、100 rpm、48 h で本培養を行った。培養液を遠心分離機 (多本架冷却遠心機 HITACHI CF12RX ) を用いて 3000 rpm、5 min の遠心を行い集菌した。菌体を蒸留水で懸濁して、同様の遠心を 3 回繰り返して、洗浄した。酵母菌体 97 g をシュレッター裁断紙とワカメ芯茎部の 7:3 混合糖化液(グルコース濃度 235 g/L) に添加し、窒素置換により Jar Fermentor 内を嫌気にした後、30°C, 7 日間の静置発酵を行った。発酵液のエタノール濃度は酵素法 (エタノール測定用 F-kit) で測定した。

#### 4-6 ETS (Ethanol Trap System)

第 3 章では、100 mL 発酵に ETS を接続すると、発酵液からの気化エタノールを捕集できることを確認した。第 4 章では、10 L Jar Fermentor に ETS を接続す

ることで、気化エタノールの回収率を検証してみた。発酵中に Fermentor 内に窒素を吹き込むことで、嫌気状態を保つと同時にエタノールの気化を誘因した。さらに発酵終了後に、発酵槽に窒素を強く吹き込むことで、どれだけ気化エタノールが捕集できるかを解析した。

#### 4-6-1 ETS の製作

Jar Fermentor（発酵液 3,000 mL）にペットボトル製 ETS 容器 2 本（蒸留水各 300 mL）をシリコンチューブで接続した。Jar Fermentor での発酵では嫌気状態を維持するために窒素を極少量吹き込み、5～10 秒毎に 1 度、ETS ボトル内の水中に窒素の気泡が出て来るように調整した。これは ETS 容器と発酵に伴う CO<sub>2</sub> が発生し、嫌気状態を維持しやすいシステムになっているため、大量の窒素量は必要としないからである。発酵液のエタノール濃度は酵素法（エタノール測定用 F-kit）で測定した。

#### 4-7 蒸留

発酵液はエタノール濃度 10%程度であるので、エタノール濃度 90%以上の精製エタノールを得るために蒸留を行った。蒸留とは、水とエタノールがそれぞれ異なる沸点（水：100℃，エタノール：78℃）であることを利用して、加熱により両者を分離する方法であるが、水とエタノールの沸点が近く共沸点を形成し易い。従って、蒸留により気化された共沸点物から、水とエタノールを分離する操作が必要となる。近年、加熱蒸留法と膜分離法を組み合わせることで、95%以上の高純度エタノールを 1 度の蒸留で得る技術が開発された<sup>38)</sup>。本研究では、蒸留後にスチールウール充填カラムを通すことで、水からエタノールを分離して、エタノール精製を行った。

#### 4-7-1 蒸留方法

本研究では、マントルヒーター (SH-5)、5,000 mL 容 3 ッロマントルフラスコ、蒸留塔(キリヤマ PAC)、リービッヒ冷却機から成る蒸溜器(KIRIYAMA GLASS WORKS COMPANY)を使用した。発酵終了後、Jar Fermentor 内の発酵液を取り出し、遠心分離機 (CF12RX、HITACHI) を用いて、3000 rpm、5 min の遠心を行い、酵母を除去して発酵液を得た。次に、発酵液を 3 ッロマントルフラスコに注入し、スライダック (RSA-10、Tokyo-Rikosha Riko-Sridetrans) により電氣量を調節しながら加熱した。発酵液の共沸点物が蒸留塔カラムに送り込まれると、カラム内に充填されている金属性スチールウールが気液接触効率を上げて、共沸点物中の気化水を液体にしてフラスコ内に戻し、気化エタノールを冷却器に送りこんだ。蒸留塔の先端にある温度計を常に 78°C であるように、加熱調整に使用してあるスライダックのスイッチを微調整した。冷却器を通して液化したエタノールをフラスコで捕集した。1 次蒸留及び 2 次蒸留のエタノール濃度は酵素法 (F-kit) で測定し、質量パーセントで表記した。

#### 4-8 結果

##### 4-8-1 ワカメ芯茎部の前処理条件が糖化後のグルコース生成量に及ぼす影響

ワカメ芯茎部の前処理条件が糖化後のグルコース生成量に及ぼす影響を Fig. 4-1 に示す。高温高圧処理ワカメ (③、④) と非高温高圧処理ワカメ (①、②) を比較すると、高温高圧処理ワカメは、糖化後のグルコース生成量が多かった。従って、非高温高圧処理ワカメを使用すると、糖化が不十分であることがわかった。さらに、④0.3%硫酸処理ワカメと③非硫酸処理ワカメを比較すると、③の糖化後のグルコース生成量 3.46 g/L と高かった。④は硫酸使用したことによりグルコースが過分解したと考えられた。以上により、ワカメ芯茎部の前処理条

件は③が最適と判断した。

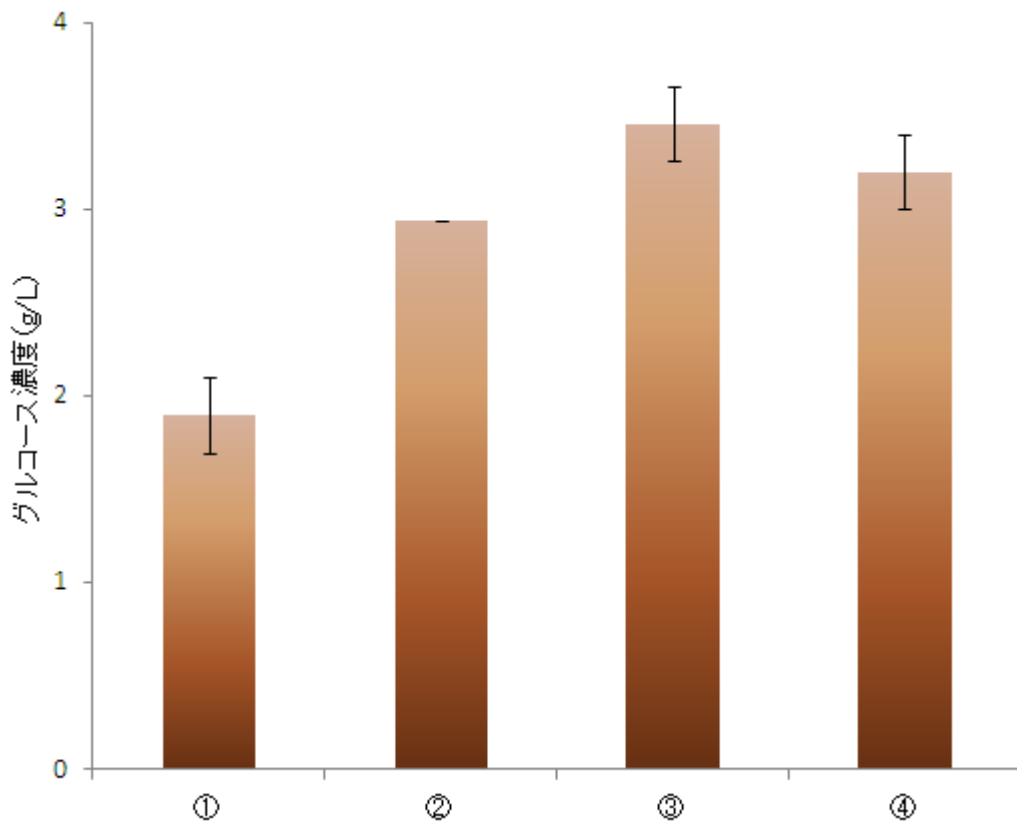


Fig. 4-1 ワカメ芯茎部の前処理条件が糖化後のグルコース生成量に及ぼす影響

原料：ワカメ芯茎部 3 g

① 前処理条件：—

② 前処理条件：0.3%希硫酸溶液 100 mL に 3 h 浸漬

③ 前処理条件：高温高压処理(121°C,60 min)

④ 前処理条件：0.3%希硫酸溶液 100 mL と混合  
高温高压処理(121°C,60 min)

糖化条件（共通）：セルラーゼ 150 U, pH4.6, 50°C, 48 h（攪拌）

#### 4-8-2 シュレッダー裁断紙糖化液とワカメ芯茎部糖化液の濃縮混合糖化液

のエタノール発酵における経時変化

シュレッダー裁断紙糖化液とワカメ芯茎部糖化液の濃縮混合糖化液のエタノール発酵における経時変化-1 を Fig. 4-2 に示す。5 パターンの混合糖化液のエタノール発酵は、いずれも 3 日目までに急激にエタノール生成量が増大し、5 日目

で最大エタノール生成量を示した。しかしそれ以降はエタノール濃度が上下せずに、ほぼ横ばい状態にあった。その中でも、高エタノール生成量を示したのは混合割合 6:4 の糖化液の発酵で、最大エタノール濃度 87.8 g/L となった。一方、原液（シュレッダー裁断紙糖化液：ワカメ芯茎部糖化液=10:0）での発酵では、最大エタノール濃度 53.7 g/L と低かった。また、混合割合 9:1 の糖化液の発酵でエタノール濃度 49.2 g/L と最大エタノール生成量が最も低かった。ところが、混合比が 8:2、7:3、6:4 と増加するに連れて、エタノール生成量が増大した。よって、シュレッダー裁断糖化液とワカメ芯茎部糖化液を 7:3～6:4 の割合で混合すると、高エタノール生成量が得られ、ワカメ芯茎部を発酵原料に使用することの有効性が確認された。

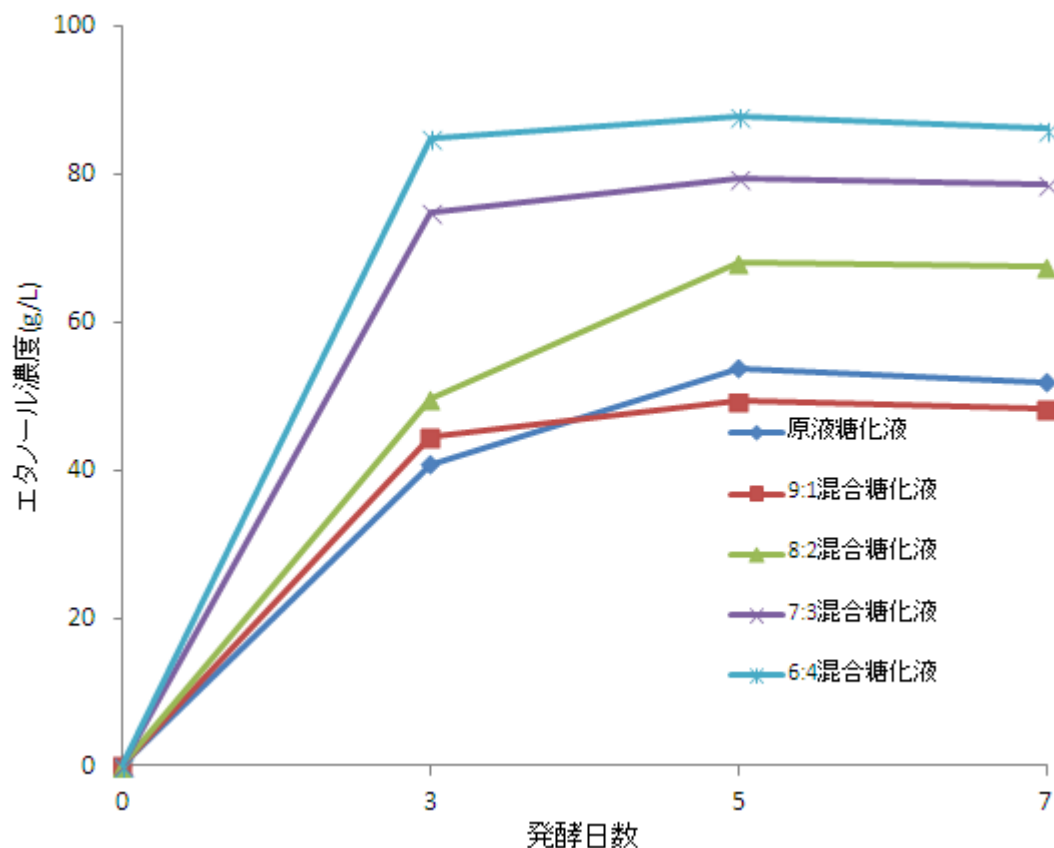


Fig. 4-2 シュレッダー裁断紙糖化液とワカメ芯茎部糖化液の濃縮混合糖化のエタノール発酵における経時変化-1

原料：シュレッダー裁断紙濃縮糖化液 (糖濃度 291 g/L)

ワカメ芯茎部濃縮糖化液 (糖濃度 30.8 g/L)

(Table 4-1 混合液のグルコース濃度-1 参照)

糖化液濃縮倍率：シュレッダー裁断紙 5 倍 ワカメ芯茎部 10 倍

使用機器：三方コック付き 500 mL 三角フラスコ、マグネティックスターラー

発酵条件：攪拌、酵母菌体量 2 g、pH 7、30°C、~7 日間

シュレッダー裁断紙糖化液とワカメ芯茎部糖化液の濃縮混合糖化液のエタノール発酵における経時変化-2 を Fig. 4-3 に示す。本実験では、9 日間のエタノール生成量の測定を行った。3 日目までに急激なエタノール生成量の増大を示し、それ以降はほぼ横ばいであった。5 パターンの混合糖化液のエタノール発酵は、いずれも 5 日目で最大エタノール生成量を示した。その中でも、混合比 7:3 の糖

化液の発酵でエタノール濃度 95g/L と最大になった。混合比 6:4 の糖化液の発酵でエタノール濃度 89.2 g/L となり、7:3 とほぼ同レベルの発酵収率を示した。しかしながら、混合比が 5:5、4:6、3:7 とワカメ芯茎部の割合が高まるにつれて、生成エタノール量が減少して行った。これらの結果から、シュレッダー裁断紙とワカメ芯茎部の混合比は 7:3 または 6:4 が酵母によるエタノール発酵に最も良い影響を与えることがわかった。

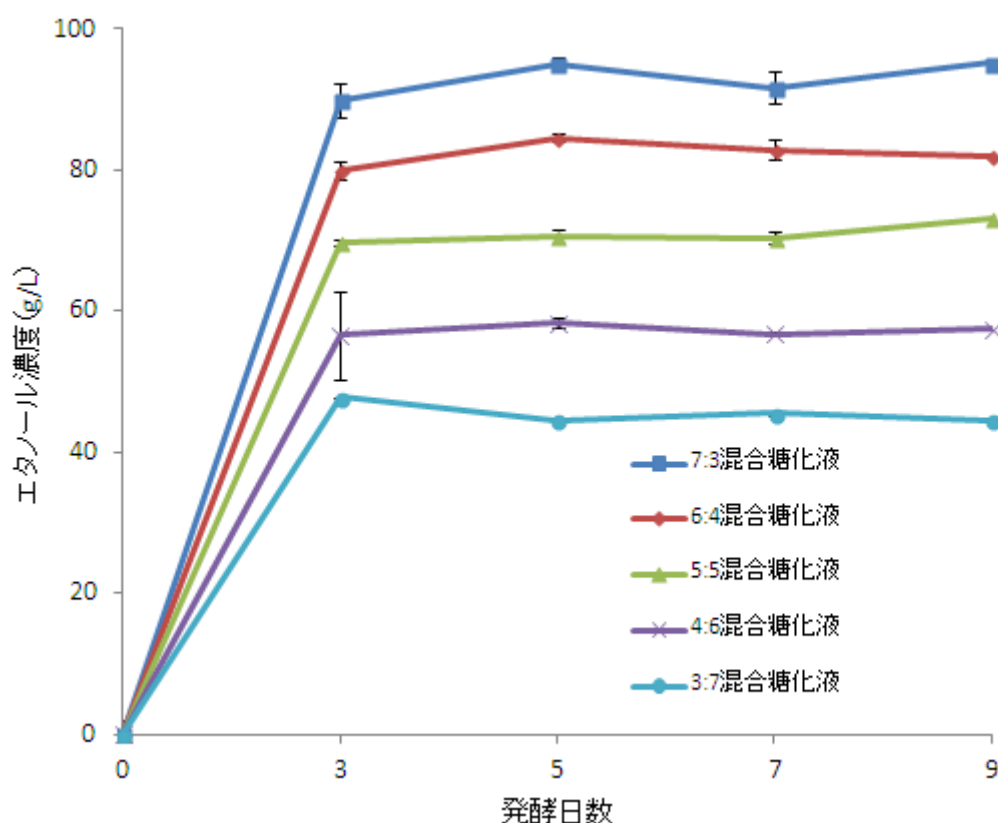


Fig.4-3 シュレッダー裁断紙糖化液とワカメ芯茎部糖化液の濃縮混合糖化液のエタノール発酵における経時変化-2

原料：シュレッダー裁断紙濃縮糖化液 (糖濃度 294 g/L)

ワカメ芯茎部濃縮糖化液 (糖濃度 23.2g/L)

(Table 4-2 混合液のグルコース濃度-2 参照)

糖化液濃縮倍率：シュレッダー裁断紙、ワカメ芯茎部、各 5 倍

使用機器：三方コック付き 500 mL 三角フラスコ、マグネテックスターラー

発酵条件：攪拌、酵母菌体量 2 g、pH 7、30°C、～9 日間



#### 4-8-3 3,000 mL 発酵のエタノール生成量の経時変化

Jar Fermentor (3,000 mL)発酵のエタノール生成量の経時変化を Fig. 4-4 に示す。本実験も 100 mL 発酵と同様に、3 日目までに急激なエタノール生成量の増大を生成し、それ以降はほぼ横ばい状態にあった。発酵は 7 日間行った結果、最大 87.7 g/L のエタノール生成量を得た。発酵液の残グルコース量は、3 日目までに急激に減少したが、全グルコースが消費されず、7 日目で 14.8 g/L のグルコース量が残っていた。また、第 3 章において、原料シュレッダー裁断紙とした際のエタノール生成量の経時変化は、発酵 3 日目が最大で、その後はエタノール量が大きく減少した。一方、Fig. 4-2, 4-3, 4-4 に示すように、混合原料を使用すると、エタノール生成量はピークを過ぎても大きな減少が観察されず、安定したエタノール生成量を示した。

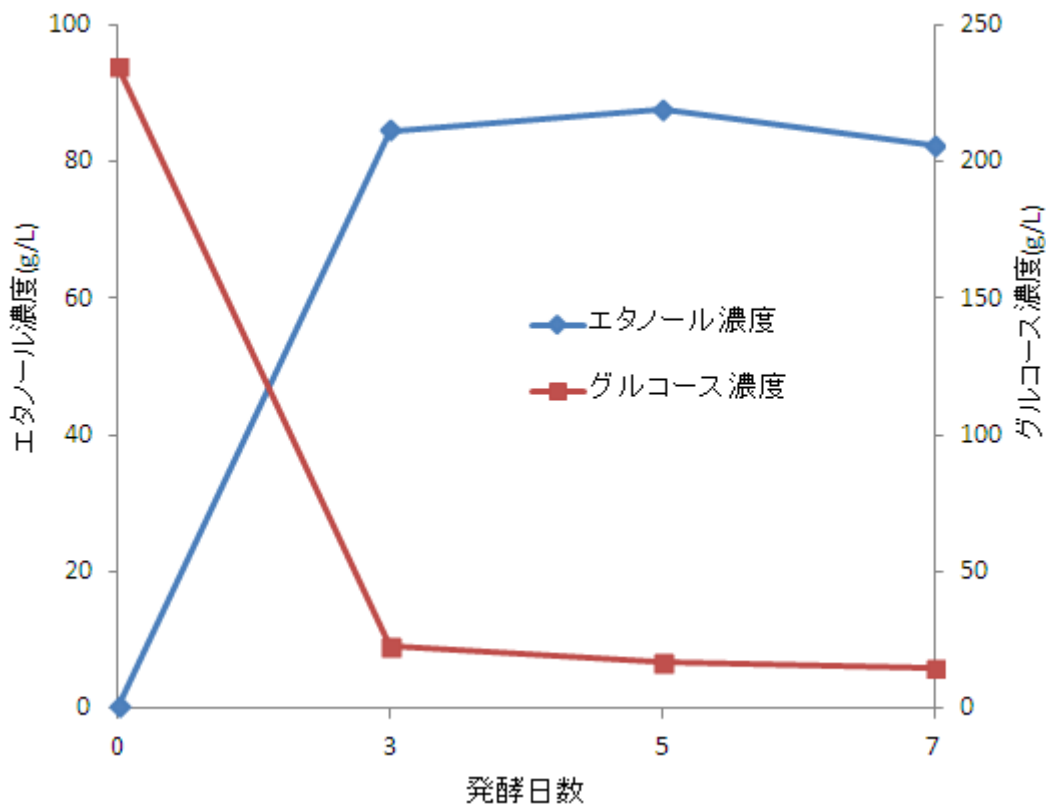


Fig. 4-4 3,000 mL 発酵液のエタノール生成量の経時変化

原料：シュレッダー裁断紙、ワカメ芯基部

初期グルコース濃度：235 g/L(混合割合 7:3) 各糖化液濃縮倍率 5 倍

使用機器：Jar Fermentor (MBF, EYELA)

発酵条件：攪拌、酵母菌体量 97 g、pH 7、30°C、7 日間

#### 4-8-4 ETS によるエタノール回収量の比較

100 mL, 3,000 mL 発酵時の ETS エタノール回収量の比較を Table 4-3 に示す。全生成エタノール量に対する回収エタノール量は、100 mL 発酵時に ETS が 2-5% であったのに対して、3,000 mL 発酵時には 8% と増大した。本結果がスケールアップの影響か、窒素ガスのエアレーションの影響であるかは不明であり、今後の検討課題である。

Table 4-3 100 mL, 3,000 mL 発酵における ETS エタノール回収率の比較

	100mL 発酵 ETS	3,000mL 発酵 ETS
ETS 捕集エタノール量/全エタノール量 (%)	2-5	8

#### 4-8-5 3,000 mL 発酵液の蒸留

3,000 mL 発酵液に 2 回の蒸留操作を施し、精製エタノールを得た。各蒸留液のエタノール濃度を Table 4-4 に示す。3,000 mL の糖化液は、発酵後に遠心して酵母を除去すると、約 2800 mL の発酵液が残った。本発酵液を 1 次蒸留すると、濃度 78.6%のエタノール液が得られた。78.6%のエタノール液を 2 次蒸留すると、濃度 91.3%のエタノール液 331 mL が得られた。従って、発酵液中のバイオエタノールの 90%以上を、蒸留により回収できることがわかった。

Table 4-4 3000 mL 発酵液の蒸留によるエタノール濃度

	1 次蒸留	2 次蒸留
エタノール濃度(%)	78.6	91.3

#### 4-9 考察

第 4 章は、文部科学省：東北マリンサイエンス拠点形成事業（新たな産業の創成につながる研究開発）「三陸産ワカメ芯茎部の効率的バイオエタノール変換技術開発と被災地復興への活用法の提案」に関する事業に組み込まれる形で、研究を遂行した。

第 3 章において、シュレッダー裁断紙を原料とする酵母発酵では、バイオエタノール生産量が安定しなかった。具体的には、Fig. 3-1, 3-2, 3-4 において、最も発酵能が高かったのは C-19 株である。ところが、C-19 株の最大エタノール生成量が発酵の度に大きく変動したこと、さらに、最大エタノール生成量を示した発酵日を超えると、エタノール生成量が大きく減少していく等の傾向が見ら

れた。筆者は C-19 株の発酵活性が不安定である原因が、原料に問題があると考えた。シュレッター裁断紙の成分は、ほぼ炭素源—この場合はセルロース—のみであり、窒素源・ミネラル他の微量成分を含有していないため、発酵中の酵母活性の不安定性に繋がった可能性が高いと判断した。酵母は発酵液中の栄養分—この場合はセルロース分解物であるグルコース—を消費し尽くすと、栄養分として主代謝産物であるエタノールを資化し始めることが、上記の現象を誘因したものと考えた。

そこで、第 4 章ではワカメ芯茎部を混合した原料を調製して、C-19 株による発酵を行った。Fig. 4-2, 4-3, 4-4 に示すように、最大エタノール生成量が一定化したこと、さらに最大エタノール生成量に成った発酵日を超えても、エタノール生成量が減少しない等の、C-19 株の発酵活性による十分な安定化が見られた。原料のシュレッター裁断紙にワカメ芯茎部を加えた混合原料は、酵母の生育に必要な栄養源を含有しているため、発酵中にも酵母が増殖することで、発酵活性の著しい増減を防いでいると考える。また、Fig. 4-4 に示すように、C-19 株は発酵によりグルコースを消費し尽くすことは無かった。ワカメ糖化物中にグルコース以外で酵母の栄養源となる成分が存在し、発酵液中で生産されたエタノールを栄養源とすることが無かったため、エタノール生産量が安定化したものとする。と考える。

ワカメ養殖加工業の廃棄物である芯茎部を利用したエタノール生産はこれまで、報告されていないため、新規有効利用としての期待が大きい。ワカメ芯茎部は固く、これまで微粉末化は困難であったが、第4章で開発した前処理方法により、芯茎部の微粉末化が可能となった。ワカメ芯茎部を微粉末化したことで、硫酸処理の必要が無くなり、原料の表面積増大による酵素反応効率が向上して、糖化が平易となった。さらに、発酵中に受ける酵母ストレスの大きな部分は、

生成エタノールである。エタノールが増加すると共に酵母は弱化する可能性が高いが、第4章の実験ではその現象が観察されなかった。この要因として、ワカメには稲わらや廃材木のような陸上植物に見られるリグニン・ペクチンが含まれないことが推定される。リグニン・ペクチンを含む材料を発酵原料とした場合、糖化及び発酵阻害を引き起こすことが知られている<sup>39)</sup>。さらに、リグニン・ペクチン成分を除去するために前処理工程は煩雑となり、エタノール生産コストの増大に繋がるが、ワカメ等の海藻を利用する利点はここにあると考えている。

発酵を100 mLから3,000 mLにスケールアップしても、約90 g/Lとほぼ同レベルのエタノール生成能を達成できた。産業レベルのパイロットプラントを想定した各プロセスの検証も、本実験である程度確認できたと判断している。次に、バイオエタノールは蒸留することで精製エタノールを製造することができた。しかし、発酵液中には酵母や原料残渣が含有されているため、効率的な蒸留を妨げている。酵母は遠心により分離したが、原料残渣は除去できず、そのまま蒸留工程を施した。Table 4-4に示すように、1次蒸留、2次蒸留ともにエタノールの精製率が高く無かったのは原料残渣の存在に起因していると思われる。そこで蒸留物を、発酵液—エタノール系から水—エタノール系への変換を試みた。具体的には、発酵終了後に、Jar Fermentorにエアレーションを施し、接続したETS内の水へエタノールの移動を試みた。このETSシステムの実験は、温度とエアレーション強度を変化させて解析中である。短時間で発酵液中のバイオエタノールの大半が、ETS内の水中に溶解することが観察されたため、今後の蒸留が平易化されると考えている（本ETSシステムは特許出願を検討しているため、博士論文での詳細な記載は遠慮させていただくことにします。）

# 第 5 章

## 総 括

## 5-1 結論

本博士論文は、都市から発生する様々な未利用バイオマスを利用し、海洋由来酵母を用いて発酵させ、効率的なバイオエタノール生産を行うための技術開発を目的とした。第1章では、本研究の背景とその目的・意義を述べた。

第2章では、都市で発生する未利用バイオマスの原料化として、ビール粕、茶殻、シュレッダー裁断紙を選択した。各バイオマスの前処理・糖化工程を検討した。ビール粕では、0.8%水酸化ナトリウムと1%硫酸の併用法、茶殻では3%硫酸法で前処理を行った後、セルラーゼによる糖化处理で、原料重量の約30%(w/w)をグルコースに変換した。さらに、シュレッダー裁断紙の前処理には酸アルカリを使用せずに、セルラーゼ・ $\alpha$ -アミラーゼによる糖化のみで、原料重量の76%をグルコースへ変換することができた。以後は、原料としてシュレッダー裁断紙を用いた研究を遂行した。

第3章ではシュレッダー裁断紙の濃縮糖化液を利用したエタノール発酵を行った。海洋由来酵母であるC-19株は資化スペクトルが広く、グルコースからの高エタノール発酵能を持っていた。同定の結果、C-19株は *Saccharomyces cerevisiae* であることがわかった。シュレッダー裁断紙の糖化液をC-19株で発酵した処、最大で122.5 g/Lのバイオエタノールを生産することができた。しかし、エタノール生産能は安定していなかった。固定化酵母(C-19株)を調製し、連続的なバイオエタノール生産を行った処、80-85 g/Lのバイオエタノールを生産することができた。

第4章ではシュレッダー裁断紙とワカメ芯茎部の混合濃縮糖化液を利用したエタノール発酵を行った。シュレッダー裁断紙とワカメ芯茎部の糖化液を5倍濃縮した後に7:3で混合すると、安定的にバイオエタノール生産が可能な原料を調製することができた。混合原料を用いて、海洋由来酵母C-19株による3,000 mL

発酵を行い、87.7 g/L のバイオエタノールを生産することができた。さらに発酵液からの気化エタノールを回収するために、Jar Fermentor に ETS を接続した。ETS により 43.0 g/L のバイオエタノールを回収することができた。Jar Fermentor の 3,000 mL 発酵液と ETS 液を蒸留して、91.3% の精製エタノール 331 mL を製造することができた。さらに、発酵終了後に Jar Fermentor を 30-70°C に保温して、エアレーションするとエタノール気化が誘因され、発酵バイオエタノールの大半が ETS 水へ移動したため、エタノール精製を水-エタノール液の蒸留系へと効率化することができた（特許出願検討中のため、詳細は記載せず。）

以上、本研究により、廃棄物系バイオマスとして、シュレッダー裁断紙とワカメ芯茎部の混合液を原料として、海洋由来酵母 C-19 株の発酵により、安定的に高濃度バイオエタノールを生産した。さらに、Jar Fermentor に ETS を接続することで、高効率なバイオエタノール生産を実現することができた。

## 5-2 展望

本博士論文における研究成果は、東北マリンサイエンス拠点形成事業（新たな産業の創成につながる技術開発）「三陸産ワカメ芯茎部の効率的バイオエタノール変換技術開発と被災地復興への活用法の提案」に還元予定である。具体的には、平成 26 年 4 月以後に、本研究・第 4 章にて確立した原料調製、前処理、糖化、発酵、蒸留の全工程条件を用いて、筆者がサッポロビール（株）価値創造フロンティア研究所にて、30 L Jar Fermentor を用いたバイオエタノール生産を行う計画である。Fig. 5-1 にサッポロビール（株）価値創造フロンティア研究所研の Jar Fermentor (30 L)（全景写真）を示す。



さらに、筆者は精製エタノールの商品化を計画している。現段階では精製エタノールを殺菌剤（非医薬系）として販売することを仮定して、製造費用を試算して、商品価格を決定する予定である。



Fig. 5-1 サッポロビール（株）価値創造フロンティア研究所研の Jar Fermentor (30 L) （全景写真）

平成 27 年 4 月以後に、筆者は岩手大学釜石サテライトにて、バイオエタノール生産用パイロットプラントの建設に着手予定である。Fig. 5-2 にバイオエタノール生産パイロットプラント概要図を示す。本プラントを使用して、殺菌用アルコールおよび燃料用アルコールの生産を予定している。

以上、本技術を東北マリンサイエンス拠点形成事業に導入することが、被災地における新たな産業創成の一助となることを期待する。

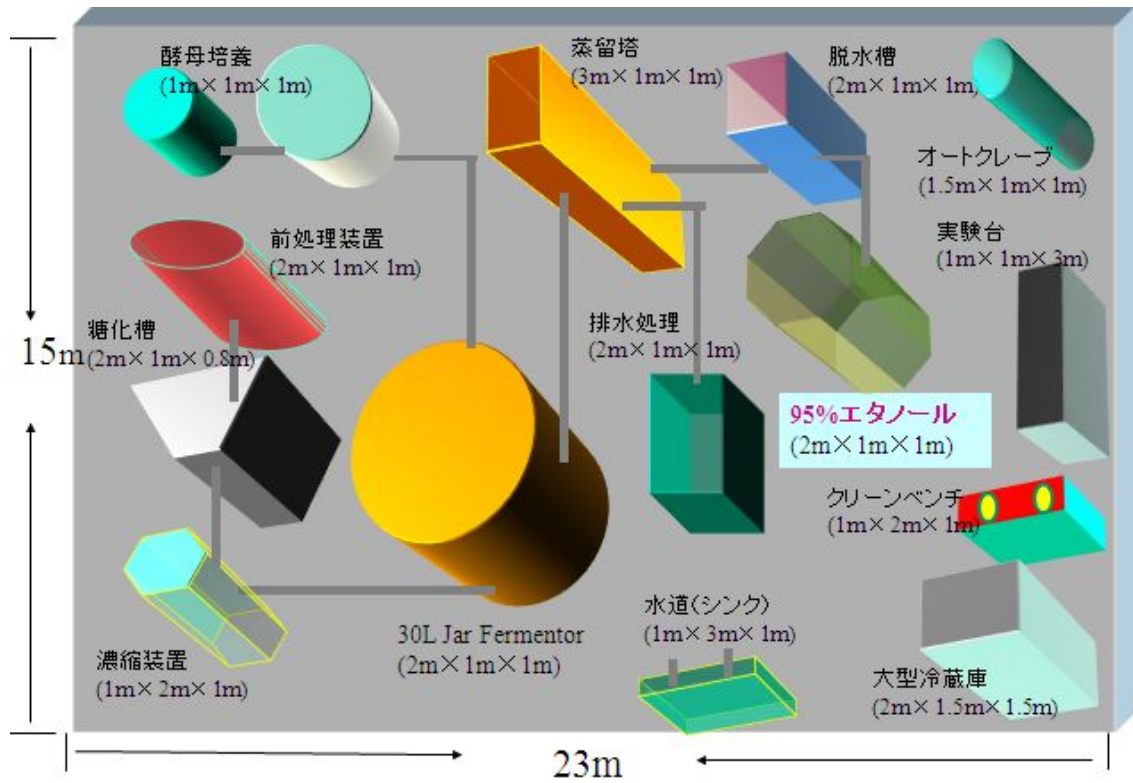


Fig. 5-2 岩手大学釜石サテライトに建設予定の  
バイオエタノール生産パイロットプラント

## 参考文献

1. Lynd ,L.R., Cushman, J.H., Nichols,R.J.,Wyman,C.E.(1991) Fuel ethanol fromcellulosic biomass,*Science*,25(1),1318–1323.
2. 井熊均(2004) 図解 よくわかるバイオエネルギー, 東京,日刊工業新聞社 p.26
3. Kim,S.,Dale,B.E.G .(2004) potential bioethanol production from wasted crops and crop residues, *Biomass and Bioenergy*,26(4),361–375.
4. Farrell,A.E.,Plevin,R.J.,Turner,B. T.,Jones,A.D.,O’Hare,M.,Kammen,D.M. (2006) Ethanol can contribute to energy and environmental goals, *Science*,311(5760),506-508.
5. 中島大 (2007) 小水力発電の現状と普及への道. *資源環境対策*, 593(5), p.27-29.
6. 石油連盟 (2013) わが国の国別原油輸入比率の推移「今日の石油産業 2013 年」 p.12
7. Sanchez ,O.J.,Cardona,C.A.(2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks,*Bioresource Technology*,99(13), 5270-5295.
8. Sun,Y., Cheng,J.(2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production ,*Bioresource Technology*,83(1),1–11.
9. Mosier,N.,Wyman,C.,Dale,B.,Elander.E.,LeeY.Y., Holtzapple,M., Ladisch,M. (2005) Features of promising technologies for pre-treatment of lignocellulosic Biomass. *Bioresource Technology* ,96(6),673–686.
10. Yang,B., Wyman,CE.(2008) Pre-treatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol,*Biofuels Bioproducts and Biorefining*,2(1),26–40.

11. 小泉達次 (2007) バイオエタノールと世界の食糧需給, 東京 筑波書房  
p. 23-25.
12. 農林水産省 (2007) 平成 19 年度版食料・農業・農村白書のポイント,  
農林統計協会 p.4
13. 吉備の国クラスター推進委員会 (2004) バイオマスワーキングチーム.  
バイオマス(食品廃棄物)の有効利用に関する調査報告書
14. 北海道石狩市 (2010) 平成 22 年度 地域新エネルギー・省エネルギービジ  
ョン策定等事業. 石狩市地域新エネルギー重点ビジョン報告書 (概要版)  
(バイオマスエネルギーに係る詳細ビジョン策定調査)
15. CULLIS Ian,F., MANSFIELD Shawn,D.(2010) Optimized Delignification of  
Wood-Derived Lignocellulosics for Improved Enzymatic Hydrolysis,  
*Biotechnology and Bioengineering*,106(6),884-893.
16. Ikeda,T.,Sugimoto,T.,Nojiri,M.,Magara,K.,Hosoya,S.,Shimada,K.(2009)Alkali  
Pretreatment for Producing Bioethanol Fuel from Lignocellulosics Part 2  
-Bioethanol Production from Waste and Recycled Materials-,*Japan Tappi  
Journal*,63(5),581-591.
17. Yasuda,K.(2009) Enhancement of Enzymatic Saccharification Cellulose by  
Using Ultrasonic Irradiation, *Cellulose Communications*,16(1),16-20
18. 安田啓司 (2009) 超音波による化学物質の分解と超音波反応器の開発.  
*The Chemical Times* ,No.2 (通巻 212 号), p.2-7
19. 坂本宏司 (2007) 硬さ制御技術 (凍結含浸法) を用いた高齢者・介護用食  
品の開発. *食品と技術* (財)食品産業センター,427(1), p.7-9
20. Toyama,N.,Ogawa,K.(1982) Native cellulose hydrolyzing cellulase of  
*Trichoderma reesei*,*J.Fermentat. Technol.*,60(4),349-355.

21. Toyama,N.,Ogawa,K.(1977) Sugar production from rice straw by saccharification with *Trichoderma viride* cellulase. *Proc. International Course. Biochemical Engineering and Bioconversion, IIT, New Delhi, India*, 120.
22. 岩本浩明 (1981) エタノール製造技術に関する最近の研究 IV 細菌によるエタノールの生産. *発酵と工業*,39(9),827-832.
23. Okamoto,T.,Taguchi,H.,Nakamura,K.,Ikenaga,H.,Kuraishi,H.,Yamasato,K. (1993) *Zymobacter palmae* gen. nov., sp. nov., a new ethanol-fermenting peritrichous bacterium isolated from palm sap, *Archives of Microbiology*, 160(5),333-337.
24. Takagi,T., Uchida,M., Matsushima,R., Ishida,M.,Urano,N.(2012) Efficient bioethanol production from water hyacinth *Eichhornia crassipes* by both preparation of the saccharified solution and selection of fermenting yeasts, *Fisherries Science*,78(4),905-910.
25. 小原信夫, 浅沼進, 浦野直人, 濱田奈保子(2009) ビール粕を原料としたバイオエタノール生産—食品製造副産物のエネルギー変換—, *日本フードシステム学会フードシステム研究*,16(3),112-117.
26. Tataridis,P.,Ntagas,P.,Voulgaris,I.,Nerantzis,E.T.(2005) Production of sparkling wine with immobilized yeast fermentation,*Electronic Journal of Science and Technology*,1,1-21.
27. Rakin,M.,Mojovic,L.,Nikolic,S.,Vukasinovic,M.,Nedovic,V.(2009) Bioethanol production by immobilized *Sacharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus cells, *African Journal of Biotechnology*,8(3),464-471.

28. Najafpour,G, Younesi,H., Ku Syahidah,K.,Ismail,K. (2004)  
Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*,*Bioresource Technology*,92(3),251–260.
29. Kwang,HL.,In,SC.,Young,GK.,Duck,JY.,Hyeun,JB.(2011) Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused. *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads, *Bioresource Technology* ,102(17),8191–8198.
30. Masniroszaima,MZ., Kofli,NT., Yahya,SRS.(2011) Bioethanol production by calcium alginate-immobilized St1 yeast system: effects of size of beads, ratio and concentration,*IIUM Engineering Journal*,12(4),11-19.
31. Kourkoutas,Y.,Bekatorou,A.,Banat,I,M.,Marchant,R.,Koutinas,A.A.(2004) Immunologies and support materials suitable in alcohol beverages production(Review), *Food Microbiology*,21(4),377-397.
32. Wu,Z.J., Xiong,H.P.(2001) Analysis of the Fatty Acid Composition of the Floating Residus from an Algin Factory, *Marine Sciences-Qingdao-Chinese Ed*, 25(10),49-50.
33. Somerville,C.,Youngs,H.,Taylor,C.,Davis,S.C.,Long,S.P.(2010) Feedstocks for Lignocellulosic Biofuels,*Science* ,329 (13),790-792.
34. Stephanopoulos,G.(2007) Challenges in Engineering Microbes for Biofuels Production,*Science*,315(5813),801-804.
35. 農林水産省・農林水産統計（2013）「平成 24 年漁業・養殖業生産統計」  
p.4

36. Adams, J.M., Gallagher, J.A., Donnison, I.S. (2008) Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments, *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 569-574.
37. Hendriks, A. T. W. M., Zeeman, G. (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*, 100(1), 10-18.
38. Mark., Antoni, W.M., Maria, T. (2000) Ethanol production in membrane distillation bioreactor, *Catalysis Today*, 56(1-3), 159-165.
39. Laser, M., Schulman, D., Allen, S.G., Lichwa, J., Antal, Jr. M.J., Lynd, L.R. (2002) A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol, *Bioresource Technology*, 81(1), 33-44.

## 謝辞

本研究に関して，多大なるご指導ご校閲を賜った国立大学法人 東京海洋大学 海洋環境学科 海洋生化学研究室 教授 浦野直人博士に深なる感謝の意を表する．

また，本論文の審査にあたり，多大なるご指導ご鞭撻をいただいた東京海洋大学 大学大学院 食品流通安全管理専攻 教授 濱田奈保子博士 東京海洋大学 海洋環境学科 海洋生化学研究室 准教授 石田真己博士 東京海洋大学 大学 海洋環境学科 生体機能利用学研究室 教授 遠藤英明博士 に深く感謝の意を表する．