

## 酵素糖化と発酵を併用した小麦フスマからの 効率的エタノール生産

是石真友子<sup>1</sup>・今中 洋行<sup>2</sup>・今村 維克<sup>2</sup>・狩山 昌弘<sup>1</sup>・中西 一弘<sup>2\*</sup>

(2009年1月28日受付 2009年3月13日受理)

### Efficient Ethanol Production from Wheat Bran by Enzymatic Saccharification Using Commercially Available Enzyme Products and Fermentation Using Bakers' Yeast

Mayuko Koreishi<sup>1</sup>, Hiroyuki Imanaka<sup>2</sup>, Koreyoshi Imamura<sup>2</sup>, Masahiro Kariyama<sup>1</sup>, and Kazuhiro Nakanishi<sup>2\*</sup> (*Fujiwara Techno-Art Co., Ltd., 2827-3 Tomiyoshi, Okayama 701-1133*<sup>1</sup>; *Division of Chemistry and Biochemistry, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, 3-1-1 Tsushima-Naka, Okayama 700-8530*<sup>2</sup>) *Seibutsu-kogaku* **87**: 216-223, 2009.

We aimed to produce ethanol efficiently by enzymatic saccharification coupled with ethanol fermentation using wheat bran as a biomass. For this purpose, we examined pretreatment conditions of biomass and a combination of commercially available enzyme products for saccharification. When a 3.3% (w/v) wheat bran suspension was pretreated using subcritical water at 140°C with a holding time of 0 h, followed by saccharification at 45°C using a mixture of commercially available Meiselase (composed of cellulase, cellobiase/ $\beta$ -glucosidase, and xylanase) and Novozyme<sup>®</sup> 188 (composed of cellobiase/ $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase, and glucoamylase) at a ratio of 4 to 1 by weight, glucose was released at 10.6 g/l, which corresponded to 90% of the value calculated on the basis of the total amount of glucose-based saccharides contained in the wheat bran. On the other hand, from a pretreated 33% (w/v) wheat bran suspension, 85 g/l glucose was produced, which corresponded to only 72% of the theoretical value, owing to the inhibitory effect of glucose on  $\beta$ -glucosidase activity. However, when fermentation was carried out at 30°C following 24-h saccharification of the pretreated wheat bran using a mixture of Meiselase and Novozyme<sup>®</sup> 188, the inhibitory effect of glucose was considered to be reduced and as a result, after 21-h fermentation, ethanol was produced at 5.2% (w/v), which corresponded to 88% of the theoretical maximum value.

[**Keywords:** bioethanol, enzymatic saccharification, ethanol fermentation, wheat bran, subcritical water treatment]

バイオマスを原料とした燃料用エタノールの生産は、化石資源に依存しない循環型社会の構築と温暖化対策としての二酸化炭素削減の観点から、近い将来、世界的規模での生産が期待される。2004年現在、バイオマスエタノールは、全世界で4100万kl生産されているが、その原料となるバイオマスのほとんどがサトウキビ、トウモロコシ、デンプン芋などの糖質・デンプン質系バイオマスである<sup>1,2)</sup>。糖質・デンプン質系バイオマスを原料として用いると、エタノール発酵の原料であるグルコースを安価な市販酵素製剤を用いた糖化反応により調製できるので、低コストでエタノール生産を行うことができるとい

う利点がある。しかし、世界的な食糧不足が深刻になりつつあることを考慮すると、糖質・デンプン質系バイオマスのエタノール生産への転用には限界があると考えられる<sup>3)</sup>。最近、バイオマス資源として、木質系バイオマスを利用する研究が進んでいる。しかし、木質系バイオマスはリグニンを多く含むため、糖を効率よく得るためには、硫酸処理や爆砕などの過激な前処理プロセスが必要不可欠である<sup>4,5)</sup>。大量に発生する廃棄物の処理や、高温・高圧処理のための設備費および高ランニングコストなど、解決しなければならない多くの課題がある。さらに、木質系バイオマス資源は広い地域に分散しているた

\*連絡先 <sup>2</sup>岡山大学大学院自然科学研究科機能分子化学専攻 (〒700-8530 岡山市津島中3-1-1)  
TEL. 086-251-8200 FAX. 086-251-8264 E-mail: kazuhiro@cc.okayama-u.ac.jp

216 <sup>1</sup>株式会社フジワラテクノアート

めに集荷コストが無視できない。一方、小麦フスマ、米糠および籾殻などのセルロース系バイオマス資源は世界中に存在するが、ほとんどが未利用資源として廃棄されている状況にある<sup>6,7)</sup>。セルロース系バイオマスはデンプンおよびセルロースを多く含むが、リグニン含量が少ないため、複数の糖化酵素を用いて糖化反応を行うことにより、効率よくグルコースを得ることが期待できる。

上述の背景を考慮して、本研究では、農業廃棄物のセルロース系バイオマスの一つである小麦フスマを原料として、市販酵素製剤を用いる糖化反応とパン酵母によるエタノール発酵を並行して行うことを原理とする、効率的エタノール生産方法の構築のために必要な小麦フスマの前処理および市販糖化酵素製剤の組み合わせなどの諸条件について実験的検討を加えた。

## 実験方法

**原料** バイオマスとして、hard系品種の小麦大麩・小麩 (bran and feed) に、末粉 (皮部が多く混入した見栄えの悪い小麦粉, low grade wheat flour) を重量比23:7で配合した小麦フスマ (wheat bran) を使用した。なお、小麦大麩・小麩と末粉の配合比率は、製粉工場における小麦大麩・小麩と末粉の回収率の値を使用した。

**バイオマスの成分分析** 小麦大麩・小麩および末粉の成分分析は、日本食品分析センターに委託した (第207121157-001および207121157-002号, 2008年01月09日) が、それぞれ以下に示す方法で行われた。セルロース、ヘミセルロースおよびリグニンの含有量は、Van Soestらの方法<sup>9)</sup> に準じて測定された。粗タンパク質の含有量は、ケルダール法により測定した全窒素量から算出された<sup>9)</sup>。デンプン含有量は、低分子糖を除去後に、グルコアミラーゼ処理により生成したグルコース量に、加水分解反応により付加された水分子を考慮して0.9を乗じて算出された<sup>10)</sup>。灰分は直接灰化法により<sup>11)</sup>、脂質は酸分解法により定量された<sup>12)</sup>。

**酵素活性の測定** セルラーゼ活性、セロビアーゼ活性、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性、グルコアミラーゼ活性、 $\alpha$ -アミラーゼ活性およびキシランナーゼ活性は、いずれも45°C, pH4.5~4.8の条件で測定した。測定は3~4回行い、その平均値を示した。このときの平均値からの測定誤差は最大で8.2%であった。なお、これらの反応条件は、酵素製剤の取扱説明書に記載されている反応特性に関するデータに基づいて設定した。

セルラーゼ活性の測定では、ろ紙を2% (w/v) となるように50 mMクエン酸ナトリウムバッファーに懸濁後、酵素を添加して反応を行い、生成還元糖濃度を定量した。セロビアーゼ活性の測定では、7.5 mM セロビオース水

溶液に酵素を添加して反応を行い、生成グルコース濃度を定量した。 $\beta$ -グルコシダーゼ活性の測定においては、7.5 mM *p*-ニトロフェニル- $\beta$ -グルコシド (*p*-NPG) 水溶液を基質として用い、生成した*p*-ニトロフェノール (*p*-NP) 濃度を定量した。グルコアミラーゼ活性および $\alpha$ -アミラーゼ活性は、それぞれ糖化力分別定量キットおよび $\alpha$ -アミラーゼ測定キット (キッコーマン) を用いて決定した。キシランナーゼ活性の測定では0.5% (w/v) キシラン水溶液を基質として用い、反応により生成した還元糖の濃度を定量した。なお、各酵素活性1 U はpH 4.5~4.8, 45°Cで、1分間に1  $\mu$ molの生成物が生じるのに必要な酵素量と定義した。

**糖およびエタノールの定量法** 全糖濃度はフェノール・硫酸法により<sup>13)</sup>、還元糖濃度はソモギ・ネルソン法により<sup>14)</sup>、また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) を用いて定量した。測定は2~4回行い、その平均値を求めた。グルコース濃度、還元糖濃度および全糖濃度の平均値からの測定誤差は、それぞれ最大2.5%, 13%および15%であった。エタノール濃度は、アルコールデヒドロゲナーゼを用いた酵素定量法により求めた<sup>15)</sup>。

**バイオマスの前処理** 小麦フスマの前処理方法として、煮沸処理 (boiling), 酸処理 (acid treatment), 水熱処理 (subcritical water treatment) および粉碎処理 (fine grinding) を検討した。煮沸処理はオートクレーブ (SX-500, トミー精工) を用いて100~130°C, 10分間処理の条件で行った。酸処理の場合は、オートクレーブを用いて0.2~1% (v/v) 希硫酸水溶液中, 100°C, 10分間処理の条件で行った。水熱処理は、誘導攪拌式オートクレーブユニット (LC, 東洋高圧) を用いて140~200°C, 保持時間0~2時間の条件で行った。なお、ここに示す保持時間は、装置内の温度が設定温度に到達後の保温時間を示す。したがって、実際の処理に要する時間は、この保持時間に約2時間の昇温時間および0.5時間の冷却時間を加算した時間とみなすことができる。粉碎処理は、もみ殻成形機フォーミル (GMG-200RD, 北川鉄工所), もみ殻播潰装置ミルクル・ミニ (GMG-150D, 北川鉄工所) または卓上遠心粉碎機 (レッチ社) を用いて行った。未処理または前処理小麦フスマを、30容量の50 mMクエン酸ナトリウムバッファー (pH 4.8) 中に懸濁し、45°Cで24時間振盪後にろ過を行い、上清を得た。得られた上清中に含まれる全糖、還元糖およびグルコースを定量した。

なお、本研究を通して、小麦フスマ量は乾燥重量で表記する。

**市販糖化酵素製剤による糖化反応** 糖化酵素製剤と

して、セルラーゼ製品として市販されている Meiselase (明治製菓), Cellulase A “Amano” (アマノエンザイム) およびセロビアーゼ製品として市販されている Novozyme® 188 (シグマアルドリッチジャパン) を使用した。酵素量は、Meiselase および Cellulase A “Amano” では乾燥粉末重量で、Novozyme® 188 では溶液重量で表した。まず、市販セルラーゼ製品である Meiselase および Cellulase A “Amano” を用いて、小麦フスマ前処理条件の糖化反応に及ぼす影響について検討した。30 容量の 50 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 4.8) に懸濁した未処理または前処理小麦フスマ (3.3% (w/v)) に、小麦フスマの乾燥重量の 1% 量の市販セルラーゼ製剤を添加し、恒温振盪培養機 (タイテック) を用いて 130 strokes/min, 45°C で 24 時間、反応を行った。次に、Novozyme® 188 の添加効果を、上記と同じ条件で検討したが、この場合の酵素製剤の添加量は、小麦フスマの乾燥重量の 0.25% 量 (Meiselase あるいは Cellulase A “Amano” の 1/4 量) とした。いずれの場合も反応後に反応液をろ過し、得られた上清中の全糖、還元糖およびグルコース濃度を定量した。

**酵母と前培養方法** 酵母として、市販のカネカ生イースト (カネカ) を用いた。まず、カネカ生イーストを 10 容量の生理食塩水中に懸濁後、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, 2% (w/v) 寒天) に植菌した。得られたコロニーを 1 白金耳採取し、250 ml 前培養液 (0.5% (w/v) 硫酸二水素カリウム, 0.2% (w/v) 硫酸アンモニウム, 0.04% (w/v) 硫酸マグネシウム・七水和物, 2% (w/v) 酵母エキス, 5% (w/v) グルコース, pH 4) を含む 500 ml 坂口フラスコに植菌し、120 strokes/min, 30°C で、OD<sub>660</sub> の値が 2 前後になるまで振盪培養した。このようにして得られた前培養液 100 ml を 5000 × g で 10 分間遠心分離し、酵母菌体 (乾燥重量; 約 50 mg) を回収した。

**小麦フスマの酵素糖化を伴うエタノール発酵** 3 容量の水に小麦フスマを加え、140°C, 0 h 水熱処理した小麦フスマ懸濁液 50 g を 100 ml 三角フラスコに加え、4 N HCl を用いて pH を 4.2 に調整した。この小麦フスマ懸濁液に、原料の小麦フスマ乾燥重量の 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, または 1% 量の Meiselase と、それぞれ、その 1/4 量の Novozyme® 188 を添加し、130 strokes/min, 45°C で糖化反応を開始した。24 時間反応後に、前培養で得られた酵母 50 mg (乾燥重量) を植菌し、130 strokes/min, 30°C の条件で振盪しながら、エタノール発酵を開始した。培養液を経時的にサンプリングし、培養上清中のグルコース濃度、エタノール濃度および生菌率を測定した。なお、上記の実験で基質として使用した小麦フスマ溶液は、多

量の微粒固形物を含むために、菌体数の測定を行うことはできなかった。そこで、エタノール発酵中の菌体増殖量について知見を得るために、小麦フスマ懸濁液を 1% 量の Meiselase とその 1/4 量の Novozyme® 188 を添加し、45°C で 24 時間糖化反応を行った。得られた酵素糖化懸濁液の遠心分離 (4°C, 8,000 rpm, 20 分間) 上清 50 ml にパン酵母 50 mg (乾燥重量) を加え、エタノール発酵を行った。21 時間発酵後の菌体懸濁液の濁度 (OD<sub>660</sub>) を測定し、予め求めておいた濁度と乾燥菌体の関係 (乾燥菌体濃度 (g/ml) = 0.252 × (OD<sub>660</sub>)) から、乾燥菌体重量を推定した。なお、酵素糖化液上清中の初期グルコース濃度は 70 g/l であった。

**酵母の生菌率の測定** エタノール発酵中の酵母の生菌率を Cot らの方法<sup>16)</sup> で測定した。すなわち、サンプリングした培養液を生理食塩水で適当に希釈後に、酵母懸濁液と同量の 0.3 mM メチレンブルー溶液 (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 (青く染色されていない菌体) および死菌数 (青く染色された菌体) をそれぞれカウントし、生菌率を算出した。

**糖化反応に及ぼすグルコースの阻害の影響** 0~110 mM グルコースを含む 0.25 ~ 2 mM *p*-NPG 溶液を用いて、β-グルコシダーゼ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。

## 実験結果および考察

**バイオマスの成分分析** 小麦フスマの成分分析の結果を Table 1 に示す。小麦大麩・小麩には、末粉と比べてセルロースとヘミセルロースがそれぞれ約 17 倍および 24 倍多く含まれていた。一方、末粉には小麦大麩・小麩の約 4 倍のデンプンが含まれていた。本研究でバイオマスとして使用する小麦フスマ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、使用した小麦フスマ 1 g (乾燥重量) あたり 497 mg と算出される。小麦フスマに含まれる還元糖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、小麦フスマ 1 g あたり 324 mg 含まれることになる。一方、遊離可能なグルコース量は、還元糖量と同様に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が、加水分解反応によるグルコース生成時の水の付加を考慮すると、小麦フスマ 1 g あたり 356 mg と算出された。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、それぞれの理論値とみなし、以降の計算に使用した。

**市販糖化酵素製剤の酵素活性** 本研究で使用した市

Table 1. Component and composition of wheat bran.

Component	Bran and feed (g/100 g-bran and feed)	Low-grade wheat flour (g/100 g-low-grade wheat flour)	Total content of wheat bran <sup>a</sup> (g/100 g-wheat bran)
Ash	4.9	1.0	4.0
Crude fat	4.1	1.3	3.4
Crude protein	2.8	2.9	2.8
Lignin	2.7	<0.2	2.1
Starch	15.6	58.9	25.7
Cellulose	8.6	0.5	6.7
Hemicellulose	22.3	0.9	17.3

The content of each component was expressed as g per 100-g dry biomass.

<sup>a</sup> The total content of wheat bran was calculated by summing the contents contained in bran/feed and low-grade wheat flour at a ratio of 23:7 by weight.

Table 2. Enzymes and their specific activity contained in three commercially available enzyme products used in this work.

Enzyme	Meiselase (U/mg-powder)	Cellulase A "Amano" (U/mg-powder)	Novozyme 188 (U/mg-liquid)
Cellulase	0.91	0.08	0
Cellobiase	0.2	0.14	0.55
$\beta$ -Glucosidase	1.1	0.08	0.65
Glucoamylase	<0.01	0.05	0.9
$\alpha$ -Amylase	<0.01	0.39	0.24
Xylanase	0.15	0.13	<0.01

販糖化酵素製剤のMeiselase, Cellulase A "Amano"およびNovozyme<sup>®</sup> 188には、複数の酵素が含まれている。そこで、これらの酵素製剤中のセルラーゼ活性、セロビアーゼ活性、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性、グルコアミラーゼ活性、 $\alpha$ -アミラーゼ活性およびキシラナーゼ活性を測定した。Table 2にそれぞれの酵素製剤1 mgあたりの比活性を示す。Meiselaseはセルロースおよびヘミセルロースの糖化に必要なセルラーゼ活性、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性およびキシラナーゼ活性が比較的高いことがわかる。特に $\beta$ -グルコシダーゼ活性は使用した3酵素製剤の中で最も高い。Cellulase A "Amano"には、セロビアーゼ活性およびキシラナーゼ活性に加えて、比較的高い $\alpha$ -アミラーゼ活性およびグルコアミラーゼ活性が含まれている。またNovozyme<sup>®</sup> 188は、セロビアーゼ/ $\beta$ -グルコシダーゼ活性に加え、著しく高いグルコアミラーゼ活性と $\alpha$ -アミラーゼ活性を有している。

**種々の前処理条件により遊離する全糖、還元糖およびグルコース量の比較** Table 3に種々の条件で前処理を行った3.3% (w/v) 小麦フスマ懸濁液の上清に含まれる全糖量、還元糖量およびグルコース量を比較した結果を示す。ここで、遊離した全糖、還元糖およびグルコース

量の値は、それぞれ全糖量の理論値 (497 mg/g-小麦フスマ)、還元糖量の理論値 (324 mg/g-小麦フスマ) および遊離可能なグルコース量の理論値 (356 mg/g-小麦フスマ) に対する%で表した。未処理の場合は全糖の12%が遊離したが、還元糖およびグルコースの遊離量はきわめて低い値であった。煮沸処理は全糖の遊離に対しては若干の効果がみられた。粉砕処理では全糖の遊離に対してはほとんど効果がみられなかったが、還元糖およびグルコースの遊離量が、未処理の場合と比較して増加した。

酸処理においては、0.5%および1% (v/v) 希硫酸溶液を用いた場合に、全糖および還元糖の遊離量が未処理の場合と比較して顕著に増加した。1% (v/v) 希硫酸溶液を用いた場合には全糖は69%遊離したが、還元糖の遊離は41%であった。一方、水熱処理では遊離全糖量の顕著な増加がみられた。170°C、0~2 hまたは200°C、0 hの条件では、90%あるいはそれ以上の全糖が遊離したが、遊離還元糖量は酸処理の場合よりも低い結果となった。以上の結果から、水熱処理は、主として小麦フスマから物理的にセルロースおよびデンプンを遊離する作用を有するが、酸処理は予想されるように加水分解作用を有することが示唆される。

Table 3. Effects of pretreatment on the release of total sugar, reducing sugar, and glucose.

Pretreatment	Pretreatment conditions	Yields <sup>a</sup> (%)		
		Total sugar	Reducing sugar	Glucose
Nontreatment		12	6	4
Boiling	100°C, 10 min	14	2	1
	120°C, 10 min	22	2	1
	130°C, 10 min	28	2	1
Fine grinding	MILLKURUmini GMG-150D	13	15	7
	Formill GMG-200RD	15	14	3
	Centrifugal grinding mill	14	15	6
Acid treatment <sup>b</sup>	0.2% (v/v) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	39	21	4
	0.5% (v/v) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	64	32	4
	1.0% (v/v) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	69	41	6
Subcritical water treatment	140°C, 0 h	23	5	1
	140°C, 1 h	33	8	1
	140°C, 2 h	55	5	3
	170°C, 0 h	89	9	1
	170°C, 1 h	97	11	3
	170°C, 2 h	92	14	1
	200°C, 0 h	88	26	6
	200°C, 1 h	20	2	1
	200°C, 2 h	15	3	1

<sup>a</sup> The yields of total sugar, reducing sugar, and glucose were calculated on the basis of the total content of starch, cellulose, and hemicellulose (497 mg/g-wheat bran), the total content of starch and cellulose (324 mg/g-wheat bran), and the total content of starch and cellulose (356 mg/g-wheat bran), which takes the amount of water added as a result of hydrolysis into consideration, in wheat bran, respectively.

<sup>b</sup> The acid treatment was carried out at 100°C for 10 min.

**種々の前処理条件が酵素糖化に及ぼす影響** 種々の条件で前処理した 3.3% (w/v) 小麦フスマ懸濁液を、市販セルラーゼ製剤である Meiselase および Cellulase A “Amano” を用いて pH 4.8, 45°C で 24 時間糖化反応を行い、遊離した全糖量、還元糖量およびグルコース量の比較を行った。煮沸処理または粉碎処理した小麦フスマを用いた場合は、いずれの酵素製剤を用いても、遊離全糖量、還元糖量およびグルコース量は未処理の小麦フスマを用いた場合と同程度であった (data not shown)。一方、酸処理小麦フスマを用いた場合には、いずれのセルラーゼ製剤を用いても、未処理フスマを用いた結果と比較して遊離還元糖量およびグルコース量は増加した (Table 4)。硫酸濃度が増加するに伴い、全糖および還元糖の遊離量は増加し、1% (v/v) 希硫酸処理の条件では、それぞれ理論値の 80% あるいはそれ以上に達した。一方、水熱処理小麦フスマを用いた場合は 140°C, 0~2 h の前処理条件では、いずれの酵素製剤を用いた場合でも、未処理フスマを用いた結果と比較して、全糖の遊離量は顕著に増加した。しかし、還元糖およびグルコースの遊離量は、Meiselase を用いた場合には効果がみられなかつ

たが、Cellulase A “Amano” を用いた場合には顕著に増加した。また、小麦フスマの水熱処理時間は、糖の遊離にほとんど影響を及ぼさなかった。なお、170°C, 0~2 h の条件で水熱処理した小麦フスマを糖化した場合、遊離全糖量は理論値のほぼ 100% であったが、遊離還元糖およびグルコース量は 140°C, 0~2 h 水熱処理した小麦フスマを糖化した場合と同程度か若干低い結果となった (data not shown)。また 200°C, 0~2 h 水熱処理した小麦フスマの糖化反応においては、遊離全糖量、還元糖量およびグルコース量の収率は 140°C, 0~2 h 水熱処理した小麦フスマを用いた糖化反応で得られた結果よりも低い値を示した (data not shown)。全糖、還元糖およびグルコースの遊離量と省エネルギーの観点から総合的に判断すると、検討した水熱処理条件の中では 140°C, 0 h 処理が最適であると考えられる。しかし、上述したように、この条件においても Cellulase A “Amano” で処理した時の遊離グルコース量は、理論値 (356 mg/g-小麦フスマ) の 55% にすぎなかった。Table 2 に示すように、Cellulase A “Amano” は、比較的高い  $\alpha$ -アミラーゼ活性およびグルコアミラーゼ活性を有するものの、セルラーゼ活性およ

Table 4. Effects of pretreatments and enzymatic hydrolysis using Meiselase and Cellulase A “Amano” on the release of total sugar, reducing sugar, and glucose.

Pretreatment	Pretreatment conditions	Commercially available enzyme product	Yields <sup>a</sup> (%)		
			Total sugar	Reducing sugar	Glucose
Nontreatment		Meiselase	20	28	13
		Cellulase A “Amano”	17	26	13
Acid treatment <sup>b</sup>	0.2% (v/v) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ,	Meiselase	53	40	17
		Cellulase A “Amano”	46	44	28
	0.5% (v/v) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ,	Meiselase	84	69	22
		Cellulase A “Amano”	76	72	27
	1.0% (v/v) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ,	Meiselase	89	84	29
		Cellulase A “Amano”	79	80	29
Subcritical water treatment	140°C, 0 h	Meiselase	76	23	10
		Cellulase A “Amano”	99	67	55
	140°C, 1 h	Meiselase	85	21	11
		Cellulase A “Amano”	100	67	50
	140°C, 2 h	Meiselase	87	29	15
		Cellulase A “Amano”	100	73	53

Enzymatic saccharification was carried out at 45°C and pH 4.8 for 24 h, using pretreated 3.3% (w/v) wheat bran suspension.

<sup>a</sup> The yields of total sugar, reducing sugar, and glucose were calculated on the basis of the total content of starch, cellulose, and hemicellulose (497 mg/g-wheat bran), the total content of starch and cellulose (324 mg/g-wheat bran), and the total content of starch and cellulose (356 mg/g-wheat bran), which takes the amount of water added as a result of hydrolysis into consideration, contained in wheat bran, respectively.

<sup>b</sup> The acid treatment was carried out at 100°C for 10 min.

β-グルコシダーゼ活性は、Meiselaseと比較すると低い。したがって、Cellulase A “Amano”を用いた糖化反応で得られた遊離グルコース量が理論値よりも低い理由として、本酵素製剤に含まれるセルラーゼ活性およびβ-グルコシダーゼ活性が低いことが考えられる。一方、Meiselaseは比較的高いセルラーゼ活性、セロビアーゼ/β-グルコシダーゼ活性およびキシラナーゼ活性を有するが、グルコアミラーゼ活性およびα-アミラーゼ活性は著しく低い。したがって、グルコアミラーゼ活性およびα-アミラーゼがほとんど含まれていないために、Table 4に示すようにMeiselaseで糖化反応を行った時の遊離グルコース量が、Cellulase A “Amano”で糖化した場合よりも著しく低くなったものと考えられる。一方、Novozyme® 188は、Table 2からわかるように、比較的高いセロビアーゼ/β-グルコシダーゼ活性およびきわめて高いグルコアミラーゼ活性を示す。したがって、グルコースを高収率で得るためには、複数の市販酵素製剤を併用することにより不足している酵素成分を補うことが、より効果的であると予測される。下記では、複数の糖化酵素製剤を用いることによる遊離グルコース量に及ぼす影響について検討した。

糖化酵素製剤の併用による糖化反応 1% (v/v) 希硫

酸処理または140°C、0 h水熱処理した3.3% (w/v) 小麦フスマ懸濁液を基質とし、Meiselase、Cellulase A “Amano”およびNovozyme® 188の3種類の酵素製剤の中の2種類または3種類の酵素製剤を併用して糖化反応を行った。反応溶液中、セルラーゼ製剤であるMeiselaseおよびCellulase A “Amano”は、実験方法の箇所で示したように、小麦フスマ乾燥重量の1%である0.033% (w/v)、セロビアーゼ製剤であるNovozyme® 188は小麦フスマ乾燥重量の0.25%の0.0083% (w/v)となるように添加した。結果をFig. 1に示す。酸処理および水熱処理のいずれの前処理条件においても、遊離グルコース量は、MeiselaseおよびNovozyme® 188の2種類あるいはCellulase A “Amano”、MeiselaseおよびNovozyme® 188の3種類の酵素製剤を併用することにより、単独酵素製剤を用いた場合と比較して増加した。特に140°C、0 h水熱処理した小麦フスマを用い、MeiselaseとNovozyme® 188を併用した場合には、検討した条件中で最大の10.6 g/lのグルコース量（理論値のおよそ90%）が遊離した。以下の実験では140°C、0 h水熱処理した小麦フスマをMeiselaseおよびNovozyme® 188の2種類の酵素製剤を併用して糖化反応を行った。

酵素糖化を伴うエタノール発酵 まず、140°C、0 h

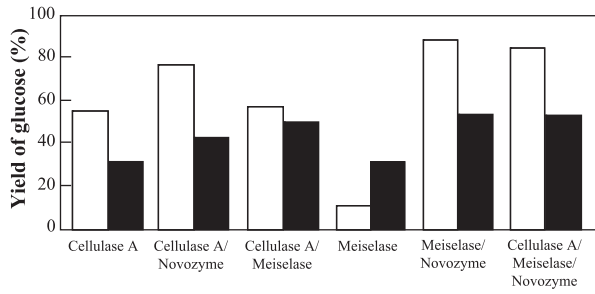


Fig. 1. Effects of a combination of commercially available enzyme products on the release of glucose during saccharification. As the commercially available enzyme products, Meiselase, Cellulase A “Amano”, and Novozyme® 188 were used. A suspension containing 3.3% (w/v) wheat bran was subjected to subcritical water treatment at 140°C for 0 h or 1%(v/v) sulfuric acid treatment at 100°C for 10 min, followed by enzymatic saccharification at 45°C and pH 4.8 for 24 h, using either two or three commercially available enzyme products or single enzyme product as a control. The yield of glucose was expressed as the relative percentage of the amount of glucose produced to the total content of starch and cellulose contained in wheat bran (356 mg/g-wheat bran), which takes the amount of water added as a result of hydrolysis into consideration. Bars: □, subcritical water treatment at 140°C for 0h; ■, 1% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treatment at 100°C for 10 min.

の条件で水熱処理した 33% (w/v) 小麦フスマ懸濁液に、Meiselase および Novozyme® 188 を添加して糖化反応を開始した。反応液の pH は、Meiselase および Novozyme® 188 それぞれに含まれるセルラーゼおよび β-グルコシダーゼの至適 pH の実測値である 4.2 (data not shown) に調整した。糖化反応に用いた Meiselase の濃度は、小麦フスマ乾燥重量の 1% である 0.33% (w/v) に加えて、0.033, 0.017, 0.0083, 0.0041% (w/v) とした。また、Novozyme® 188 の添加量は、いずれの場合も Meiselase 添加量の 1/4 量とした。酵素製剤の濃度を变化させて糖化反応を行った結果を Fig. 2 に示す。酵素濃度の増加に伴い、遊離グルコースの生成速度は顕著に増加したが、反応 24 時間後のグルコース濃度は、最も低い酵素濃度 (0.0041% (w/v)) の結果 (△) を除いて、ほぼ 85 g/l に達した。しかし、この値は、遊離可能なグルコース量の理論値の 72% に過ぎない。このように、理論値よりも低い理由として、糖化反応に関与する酵素群中の β-グルコシダーゼ活性が、反応生成物のグルコースにより阻害を受けることが考えられた。そこで、Novozyme® 188 に含まれる β-グルコシダーゼのグルコースによる阻害の影響について調べた。種々のグルコース濃度の存在下で、p-NPG 濃度と反応初速度を測定し、L-B プロットを行うことにより、阻害形式は拮抗阻害であり、阻害定数  $K_1$  はおよそ 10 mM (1.8 g/l) であることが分かった (data not shown)。この値は、文献値  $K_1 = 3 \sim 14$  mM とほぼ同程度である<sup>17,18)</sup>。また、多くの糸状菌由来 β-グルコシダー

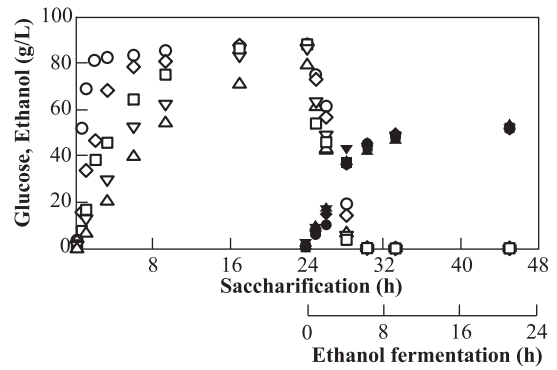


Fig. 2. Time courses of enzymatic saccharification and ethanol fermentation by baker's yeast using 33% (w/v) wheat bran suspension, pretreated by subcritical water treatment at 140°C for 0 h. Saccharification of the pretreated wheat bran suspension was carried out at 45°C and at pH 4.2 for 24 h, followed by addition of yeast cells to start ethanol fermentation at 30°C and at pH 4.2. For the saccharification, Meiselase and Novozyme® 188 were used at a ratio of 4 to 1 by weight. The Meiselase concentrations were 0.33% (w/v) (○, ●), 0.033% (w/v) (◇, ◆), 0.017% (w/v) (□, ■), 0.0083% (w/v) (▽, ▼), and 0.0041% (w/v) (△, ▲). The filled and open symbols represent the glucose and ethanol concentrations, respectively.

ゼにおけるグルコースによる阻害形式は拮抗阻害であることが知られている<sup>18)</sup>。そこで、糖化反応開始 24 時間後にパン酵母を糖化液に添加し、エタノール発酵を開始した。Fig. 2 に示すように、発酵 21 時間後には、どの酵素濃度の条件でも約 52 g/l のエタノールが生成した。このエタノール濃度は、最大理論エタノール濃度の 88% に相当する値である。なお、最大理論エタノール濃度は、基質の小麦フスマに含まれる遊離可能なすべてのグルコースが 100% エタノールに変換されると仮定した時に得られる値、すなわちグルコース濃度に  $2 \times (46/180) = 0.51$  を掛けた値として算出した。また、発酵 21 時間後に得られた約 52 g/l のエタノール濃度は、上述の糖化反応開始 24 時間後の糖化液中のグルコース濃度から算出される最大理論エタノール濃度 (43 g/l) よりも高い。この理由として、エタノール発酵中にグルコースが消費され、β-グルコシダーゼ活性に対する阻害が解除された結果、溶液中のセロオリゴ糖の加水分解が促進され、より多くのグルコースが生成したことが考えられる。さらに、小麦フスマ中に残留しているデンプン、セルロースやそれらの部分加水分解物であるオリゴ糖が、エタノール発酵中に、酵素反応によりグルコースに変換されることによる増加も考えられる。Fig. 2 からわかるように、グルコースの全量はエタノール発酵中に消費されているので、最大理論エタノール濃度の約 12% に相当するグルコース量が、酵母の菌体増殖および維持代謝に使用されたことになる。また、エタノール発酵中の生菌率を測定したと

ころ、発酵21時間後でもおよそ90%の生菌率を保持していた。これは、小麦フスマ中に酵母の代謝維持および増殖に対して必要な窒素量が十分含まれているためであると考えられる<sup>19,20</sup>。

酵素糖化液上清を用いた場合の21時間発酵後のエタノール濃度は42 g/l、また増殖酵母量は156 mg（乾燥重量）であった。得られたエタノール濃度が上述の酵素糖化懸濁液を用いた場合の52 g/lよりも低いが、その理由としては、発酵前に小麦フスマを除去しているために遊離可能なグルコースが上記の実験よりも少なかったことが考えられる。グルコースはすべて消費されていたのでグルコース重量基準の菌体収率は $0.156 / (50 \times 0.07) = 0.045$  (g-乾燥酵母/g-グルコース)と算出された。この菌体収率の値は、Önerのデンプンを用いた好気的条件下でのエタノール発酵における菌体収率0.063 (g-乾燥酵母/g-グルコース)<sup>21</sup>)よりも若干低い値であった。

## 要 約

小麦フスマを原料として用い、市販酵素製剤による糖化反応と酵母によるエタノール発酵を併用した効率的エタノール生産方法の構築のために必要なバイオマスの前処理条件および糖化のための酵素の組み合わせなどの検討を行った。糖化反応条件としては、小麦フスマを140°Cで保持時間0 hの条件下で水熱処理を行い、反応温度45°CでMeiselaseおよびNovozyme® 188の2種類の酵素製剤を用いて糖化することが、グルコース生成に対して最も効果的であることがわかった。3.3% (w/v)の水熱処理小麦フスマから理論値の90%に相当するグルコースが生成した。しかし、33% (w/v)の水熱処理小麦フスマを用いた場合には、理論値の72%のグルコースしか生成しなかった。この理由として、反応生成物であるグルコースの $\beta$ -グルコシダーゼに対する阻害の影響が考えられた。しかし、酵素糖化を45°Cで24時間行った後に、酵母を添加し30°Cでエタノール発酵を行うと、糖化反応とグルコース消費が併行して起こるために阻害効果が緩和され、その結果、理論値の88%に相当する約5.2% (w/v)のエタノールが生成した。

本研究は、平成18～20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（認定番号 中国0608006）により遂行された。ここに記して謝意を表する。

## 文 献

- 1) Licht, F. O.: *World Ethanol & Biofuels Report* (2006).
- 2) 日本エネルギー学会：バイオマスハンドブック（日本エネルギー学会編），p. 157-165，オーム社（2002）.
- 3) 日本エネルギー学会：バイオマスハンドブック（日本エネルギー学会編），p. 36-41，オーム社（2002）.
- 4) Teherzadeh, M. J. and Karimi, K.: *Int. J. Mol. Sci.*, **9**, 1621-1651 (2008).
- 5) Teherzadeh, M. J. and Karimi, K.: *BioResources*, **2**, 707-738 (2007).
- 6) 日本エネルギー学会：バイオマスハンドブック（日本エネルギー学会編），p. 54-58，オーム社（2002）.
- 7) 清水 浩：バイオマス —生産と変換—（柴田和雄，木谷収編），p. 261-273，学会出版センター（1981）.
- 8) Van Soest, P. J. and McQueen, R. W.: *Proc. Nutr. Soc.*, **32**, 123-130 (1973).
- 9) <http://www.jfrl.or.jp/modules/contents2/content/fpdf/004.pdf>
- 10) <http://www.jfrl.or.jp/modules/contents2/content/fpdf/049.pdf>
- 11) <http://www.jfrl.or.jp/modules/contents2/content/fpdf/005.pdf>
- 12) <http://www.jfrl.or.jp/modules/contents2/content/fpdf/003.pdf>
- 13) 福井作蔵：生物化学実験法1還元糖の定量法第2版（瓜谷郁三，駒野 徹，志村憲助，中村道徳，船津 勝編），p. 50-52，学会出版センター（1990）.
- 14) 福井作蔵：生物化学実験法1還元糖の定量法第2版（瓜谷郁三，駒野 徹，志村憲助，中村道徳，船津 勝編），p. 9-11，学会出版センター（1990）.
- 15) 小川隆平：生物工学実験書改訂版（日本生物工学会編），p. 335，培風館（2002）.
- 16) Cot, M., Loret, M.-O., Francois, J., and Benbadis, L.: *FEMS Yeast Res.*, **7**, 22-32 (2007).
- 17) Seidle, H. F., Marton, I., Shoseyov, O., and Huber, R. E.: *Protein J.*, **23**, 11-23 (2004).
- 18) Riou, C., Salmon, J.-M., Vallier, M.-J., Günata, Z., and Barre, P.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3607-3614 (1998).
- 19) Bafrncová, P., Šmogrovičová, D., Sláviková, I., Pátková, J., and Dömény, Z.: *Biotechnol. Lett.*, **21**, 337-341 (1999).
- 20) Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., and Leão, C.: *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 540-545 (2004).
- 21) Öner, E. T.: *Yeast*, **23**, 849-856 (2006).