HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	北海道におけるシイタケ廃菌床を原料としたバイオエタノール製造に関する研究
Author(s)	檜山, 亮
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第6961号
Issue Date	2015-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6961
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59663
Type	doctoral thesis
File Information	Ryo_Hiyama.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北海道におけるシイタケ廃菌床を原料とした
バイオエタノール製造に関する研究

北海道大学　大学院農学院
檜山　亮

目次

第 1 章　序論・・・

2.3.1.1　菌床の化学組成分析に及ぼす抽出成分の影響・・・・・・・・・・・・・25
2.3.1.2　栽培前後の菌床の化学組成・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・26
2.3.2　栽培前後の菌床の粉砕性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・29
2.3.3　栽培前後の菌床の酵素糖化性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・29
2.4　小括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・31

第3章　糖化率向上のための前処理・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32
3.1　菌糸の活動期間を延長して木質の生分解を進める処理・・・・・・・・・・・32
3.1.1　目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32
3.1.2　実験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32
3.1.2.1　保蔵処理の廃菌床の調製・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32
3.1.2.2　収穫延長処理の廃菌床の調製・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・33
3.1.2.3　粒度分析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・33
3.1.2.4　化学組成の分析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・35
3.1.2.5　酵素糖化・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・35
3.1.2.6　統計処理・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・35
3.1.3　結果と考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・36
3.1.3.1　保蔵処理廃菌床の粉砕性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・36
3.1.3.2　保蔵処理後の廃菌床の化学組成・・・・・・・・・・・・・・・・・・・36
3.1.3.3　保蔵処理廃菌床の酵素糖化性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・38
3.1.3.4　糖化条件と保蔵処理廃菌床の酵素糖化性との関係・・・・・・・・・・40
3.1.3.5　収穫延長処理による子実体収量への影響・・・・・・・・・・・・・・・42
3.1.3.6　収穫延長処理後の廃菌床の化学組成・・・・・・・・・・・・・・・・・43
3.1.3.7　収穫延長廃菌床の酵素糖化性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・44
3.2　シイタケ廃菌床に対する蒸煮処理・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46
3.2.1　目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46
3.2.2　実験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46
3.2.2.1　蒸煮処理試料の調製・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46
3.2.2.2　化学組成の分析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46
3.2.2.3　酵素糖化・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・47
3.2.2.4　統計処理・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・47
3.2.3　結果と考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・47
3.2.3.1　蒸煮条件と糖化による Glc 生成量との関係・・・・・・・・・・・・・47
3.2.3.2　蒸煮による化学組成の変化・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・49
3.2.3.3　酵素糖化条件と蒸煮廃菌床の糖化性との関係・・・・・・・・・・・・50
3.3　シイタケ栽培用培地にヤナギを用いて得られた廃菌床の糖化性・・・・・・・52

3.3.1　目的・・・

謝辞・・・

第 1 章　序論

1. 1　北海道のシイタケ廃菌床

1. 1. 1　シイタケとその生産

シイタケ（*Lentinula edodes*）は担子菌門、帽菌亜綱、ハラタケ目に属する、食用キノコの一種であり（土居、1991）、リグニン分解能を持つので白色腐朽菌に分類される（吉原ら、1985；瀧澤、1986）。シイタケの生産には、直径 7～15cm 程度、長さ 1m 程度に裁断した広葉樹の丸太に接種する原木栽培と、1970 年代前半に導入された、栄養材を加えたおが粉に接種する菌床栽培がある（Chang、2002；Royse、2009）。菌床栽培は原木栽培に比べて栽培にかかるエネルギーは大きいものの、生産期間の短縮、収率の向上および通年の安定生産といった面で優れており、世界中で拡大している（Chang、2002；Royse、2009）。世界のキノコ全体の生産が 1981 年から 1997 年にかけて年率 12%以上伸び続ける中で、シイタケは特に生産が伸びたキノコである。シイタケ生産は 1981 年にキノコ生産全体の 14.3%だった比率が 1997 年には 25.4%を占め、その生産量も 156 万トンとなり（Chang、1999）、世界で最も多く生産される食用キノコの一つとなった。日本では、生シイタケはキノコ類の中でエノキタケおよびブナシメジに次いで 3 番目に生産量の多いキノコとなっており、2013 年には約 6 万 8 千トンが生産された（北海道、2015）。

1. 1. 2　北海道のシイタケ生産とその廃菌床

北海道では 2004 年に 4187 トンであった生シイタケ生産量が 2013 年には 8150 トンとなり、10 年間で 2 倍近くに急伸し、国内 2 位の生産量となっている（北海道、2010；北海道、2015）。生シイタケの生産額も同様に 2004 年の約 33 億円

から 2013 年には約 63 億円となり、10 年間で 2 倍近くに伸びている。また、2007 年には生シイタケの生産量がエノキタケを越えて、キノコ類の中で最大となっている（北海道、2010；北海道、2015)。北海道のシイタケ栽培では、菌床栽培の割合が全国平均より高いのが特徴であり、2013 年は全国平均が 88.7%であるのに対し 96.6%であった（北海道、2015)。

北海道では菌床栽培の生産量の増加により、一部の産地で大型化や集約化が進行し、年間 1000 トン以上の生産量の産地が近年 3 か所誕生している（北海道、2015)。大型の産地では、シイタケの最終収穫が終了した後の菌床（以下、廃菌床）が多量発生している。シイタケ廃菌床は、現状では主に堆肥の資材として安価に取引されている。

1.1.3 木質バイオマス資源としてみた廃菌床

シイタケの菌床栽培では、広葉樹おが粉と米ぬか等の栄養材を乾燥重量比 7：3 程度で混合して菌床が作られ（加藤ら、2000；原田ら、2014)、栽培中に栄養材が先に消費されることから、シイタケ廃菌床は主に木質バイオマスで構成されるとみなされる。白色腐朽菌であるシイタケは、木質中の主要 3 成分であるセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンをほぼ等比率で分解すること（沖ら、1981）から、シイタケの廃ほだ木（Lee ら、2008）および廃菌床（Yokota ら、2007）中のセルロースの酵素糖化性は向上しており、バイオエタノールの製造に向いていることが既に報告されている。

1.2 バイオエタノール

1.2.1 バイオエタノールの必要性

現代の人類が日常的に使用するエネルギーや製品の多くは石油に依存してい

るが、安価に採掘できる石油資源は徐々に減少している（片平、2000）。存在が確認され、経済的にも生産に見合うと推定される石油、天然ガスおよび石炭の量（可採量）は、それぞれ 53、56 および 109 年分であると世界最大級のエネルギー関連企業の British Petroleum（BP）から報告され（BP、2014）、化石資源は直ちに枯渇はしないものの長期的視点では有限の資源であると言える。近年、シェールガス（野神、2013）、シェールオイルおよびオイルサンド（畑佐、2013）といった、採掘が困難で従来では経済的に成り立たなかった石油資源が採掘され利用され始めている。これらが経済的に成り立ち始めた要因として採掘技術の革新および石油・ガス価格の上昇の二つがある。これらの資源はアメリカ等における天然ガスの価格を低下させているが、これらはアメリカやカナダ等の限られた地域で産出されており、日本にはこの効果はあまり及んでいない。石油価格は 1970 年代のオイルショックで高騰した後、しばらくの間は安定していたが、最近では上昇傾向にある（U.S. Energy Information Administration、2015）。これらの面から、日本は独自に石油資源を代替する液体燃料を開発する必要があると考えられる。

また、化石資源の使用による地球温暖化への影響も懸念されている。2013 年、気候変動に関する政府間パネル（Intergovernmental Panel on Climate Change （以下、IPCC））の第 5 次報告書において、第 1 作業部会により「気候システムの温暖化には疑う余地はない」と断定され、二酸化炭素が地球温暖化に対する寄与率が最も高いこと、および二酸化炭素濃度が産業革命以前と比べて 40%増加していることが述べられている。その二酸化炭素増加の主要因は、土地利用の変化と並んで化石資源からの二酸化炭素の排出によるとされている（IPCC Working Group 1、2013）。同報告書の第 2 作業部会により、気候変動が熱帯や温帯での作物収量の減少、暑熱による死亡者数の増加、および干ばつや洪水などの極端な気

象の増加などに関連していることが指摘されている（IPCC Working Group 2、2014）。脱化石資源は、地球規模の課題である。

日本では、1973 年から 2012 年において一次エネルギーの自給率は 6.0～19.9%と低く、エネルギーの大部分を石油、石炭および天然ガスとして中東地域をはじめとする他国に依存している（資源エネルギー庁、2014）。世界、特に中東地域では紛争や戦争が頻発していることから、日本への化石資源の供給が滞る可能性があり、エネルギーの安定的確保には課題がある。これらの、化石資源の有限性、地球温暖化問題、およびエネルギーの安定確保の観点から日本では、「バイオマス・ニッポン総合戦略」としてバイオエタノールおよびバイオディーゼルの生産目標を掲げて、生産技術開発が進められている（バイオマス・ニッポン総合戦略推進会議、2007）。

北海道では、日本の人口が集中する関東圏と比較して、民生部門でガソリンの消費量が 1.9 倍多い（株式会社 三菱総合研究所、2012）。これは人口密度が低く、鉄道等の公共交通機関が少ないためと推察される。すなわち、日本の中で輸送用の液体燃料の需要が多い地域であると言える。そのために、北海道では特に再生可能なバイオマス資源で化石資源由来の液体燃料を代替する技術開発を進める必要性が高いと考えられる。

1.2.2 可食資源由来のバイオエタノール

2013 年、アメリカおよびブラジルがそれぞれ 50.3×10^9 L および 23.7×10^9 L の燃料用バイオエタノールを生産し、世界生産の 83.5%を占めている（Renewable Fuels Association、2014）。バイオエタノールは、一般的には、ヘキソースであるグルコース（Glc）を、酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）を用いてエタノール発酵することで製造される。同様に、フラクトース（Fru）、マンノース（Man）やガ

ラクトース（Gal）などのヘキソースも発酵原料となる。しかし、キシロース（Xyl）やアラビノース(Ara)などのペントースは発酵されない。ペントースを発酵する酵母もあるが、現在では、遺伝子組み換えした大腸菌（例えば、KO-11; Kang ら、2010 ; Yasuda ら、2012）などがペントースの発酵に用いられている。アメリカでは、トウモロコシがバイオエタノール原料であり（日本貿易振興機構、2012）、ブラジルではサトウキビの搾汁や廃糖蜜（清水、2008）が原料である。サトウキビの搾汁の成分はスクロースに Glc、Fru およびラフィノースがわずかに混合したものである。（氏原ら、2009）、トウモロコシはグルコースが主に α-1,4 結合した澱粉を含有しており、その澱粉は 100℃以上の蒸煮処理およびアミラーゼによる糖化処理で単糖化され、エタノール発酵に用いられる（斉木、2009）。

しかしながら、可食資源由来のバイオエタノールには以下のような問題点がある。アメリカでは、トウモロコシ由来のエタノール生産が穀物価格の高騰を引き起こし（小泉、2008 ; 大江、2008）、また、アフリカでの食糧不足（八丁、2008）を考慮すると、食糧と競合する可食資源から燃料用エタノールを生産することに対しては、倫理的な問題があると言える。

アメリカのトウモロコシ由来およびブラジルのサトウキビ由来のエタノール生産において、投入したエネルギーに対して得られたエタノールのエネルギー収支を示す割合、すなわち Energy-Profit Ratio (EPR)はそれぞれ 1.3 および 7.9 であると試算されている（Blottnitz and Curran、2007）。従って、ブラジルのサトウキビ由来のエタノールは化石資源由来の二酸化炭素排出削減効果があると考えられる。一方、アメリカのバイオエタノール生産では上記のエネルギー収支が 1 を下回るとも言われており（Pimentel and Patzak、2005）、必ずしもバイオエタノールが優れた液体燃料とは言えない。加えて、ブラジルにおけるエタノールの増産が熱帯雨林の減少に間接的に影響していることも指摘され、可食資源からの

バイオエタノール生産は多くの問題を含んでいる（清水、2008）。

1.2.3 非可食のリグノセルロース由来のエタノールへの期待

セルロースは澱粉と同じ Glc を構成単位としており、単糖化すると Glc を得ることができるのでバイオエタノールの原料になり得る（横山、2010）。セルロースは植物中ではヘミセルロースおよびリグニンと共存しているため、リグノセルロースと呼ばれる（横山、2010 ; Mood、2013）。セロオリゴ糖が食物繊維としての若干の利用が期待される（渡辺、2000）ものの、ヒトはセルロースを分解する酵素群（セルラーゼ）を持たず、リグノセルロースの大部分は非可食の有機資源であると見なされる。従って、食糧との競合という倫理的な問題を避けられること、およびトウモロコシ等の農産物よりも原料価格が安い可能性があること（Pimentel and Patzek、2005）から、リグノセルロース系バイオマスを原料としたバイオエタノールの製造に関心が集まっている。

1.2.4 リグノセルロース由来のエタノールの原料調達面での課題

リグノセルロース系バイオマスの中でバイオエタノールの原料として研究されている主なものとして、古紙（Elliston ら、2013 ; Wang ら、2013）がある。他に、稲わら（Binod ら、2010 ; Roy ら、2012）、麦わら（Borrion ら、2012 ; Littlewood ら、2013 ; Han ら、2013）およびコーンストーバー（Bari ら、2014）等のような農業残渣、林地残材（独立行政法人 森林総合研究所、2013）や製材端材（三井造船株式会社、2007）のような林業・林産業の廃棄物、スイッチグラス（*Panicum virgtum* ； Keshwani and Cheng、2009）およびミスカンサス属（*Miscanthus* spp. ; Kang ら、2013）等のようなイネ科の資源作物（山田、2008 ; 2009）、ヤナギ（折橋と菊地、2011）、および木本系の資源作物がある。しかしながら、これらの原

料の利用にはそれぞれ課題があると考えられる。古紙は粉砕や脱リグニンが行われている原料であるため前処理が少なくて済み、石油と経済的に競争できる可能性が指摘されているが（Wang ら、2013）、古紙は既に半分以上が回収され、再生紙等としてリサイクルされており（バイオマス・ニッポン総合戦略、2006）、従来用途との競合や既に高い回収率をさらに向上させる必要性といった課題が存在する。北海道では水稲および小麦の生産量が多く（北海道農政事務所、2014）、稲わらおよび麦わらは有望なバイオマスであると考えられる。しかし、稲わらは秋にまとまって発生し、エタノール工場を通年稼働させるためには保管場所が必要になること、さらに保管方法によっては生分解の進行により品質が低下する懸念があること（片倉、2010）が課題である。麦わらも稲わらと同様に発生時期に季節的な偏りが大きい。林地残材は、収集コストが多大であることがアメリカでの研究例で指摘されて（Chen and Fan、2012）おり、北海道においても収集コストは大きな課題となると推測される。製材端材は日本国内で年間 430 万トン程度発生しており、製材工場でまとまって発生するため収集コストがかからない利点があるが、工場での燃料やチップ等として既に約 95%が利用されており、既存用途との競合問題がある（バイオ燃料技術革新協議会、2008）。木本系資源作物とされるヤナギを北海道で栽培してエタノール原料とした場合、エタノール 1L あたりの栽培および収穫の費用が 50 円程度となると試算された（折橋と菊地、2011；北海道開発局、2011）。国産バイオエタノールの製造コストは 100 円/Ｌ以下という数値目標が設定されている（バイオ燃料技術革新協議会、2008 年）ため、栽培および収穫費用のさらなる削減や成長量の多い品種開発等が必要と考えられる。スイッチグラスなどの草本系資源作物は年間の単位面積当たりの収穫量がヤナギと比べて 3–4 倍程度多く（山田、2009）、原料コストを下げられる可能性があるが、外来種の移入問題や大規模な栽培用地確保の課題

がある。

1.2.5 リグノセルロースを原料とするエタノール製造の課題

リグノセルロースの主成分であるセルロースはGlcがβ-1,4結合した直鎖状のホモポリマーである。セルロース一分子の直鎖は平板状になっており、平板状の幅方向に分子間で水素結合し、分子が平行に並び、そのシート状になったものがファンデルワールス力により重なっている。セルロースでは、これらの分子が規則正しく数十本束になってセルロースミクロフィブリルという最小単位の繊維を形成し、かなりの割合で結晶を形成している（和田、2003)。諸説あるが、セルロースの分子鎖の重合度は綿で 3,000～10,000、木材で 1,000 前後と言われている（上原、1993)。セルロースは結晶で存在するが、一部で欠陥や乱れがあり、非晶領域も存在する（西山、2003)。

他方、リグノセルロースのもう一つの多糖類主要成分であるヘミセルロースは、セルロースがGlcのみから成るのに対し、Xyl、Man、Ara、Gal、Glcおよびグルクロン酸等からという数種の単糖類で構成されている（本田と越島、1968；山口、1993)。また、ヘミセルロースは側鎖を持った高分子であり、ほとんど結晶を形成していない（山口、1993)。広葉樹ヘミセルロースの主体となるグルクロノキシランはXylのみからなる主鎖にアセチル基および4-O-メチル-D-グルクロン酸側鎖が結合しており、重合度は130～200となっている（山口、1993)。広葉樹のグルコマンナンは主鎖がGlc : Man ＝1 : 1～2となっており、アセチル基が付いていない（山口、1993)。針葉樹の主要なヘミセルロースであるグルコマンナンは、主鎖がGlc : Man ＝1 : 3.6～4となっており、ManのC2あるいはC3位にアセチル基が5～6%結合しており、重合度が90～100となっている（山口、1993)。ヘミセルロースは細胞壁内において、セルロースとは水素結合によって

会合し、リグニンとは化学結合（エーテル、エステルおよびグリコシド結合）して存在し、セルロースとリグニンを結び付けている（高部、2003）。

リグニンはフェニルプロパンを基本単位とし、様々な結合様式で三次元的に結合した複雑な高分子である（鮫島、1993）。フェニルプロパン単位の 3 位にメトキシ基を有する構造単位をグアイアシル核、3 位と 5 位に一つずつメトキシ基を有する構造単位をシリンギル核、メトキシ基を有しない構造単位を p-ヒドロキシフェニル核という（**図 1-1**）。針葉樹リグニンは主にグアイアシル核、広葉樹リグニンは主にグアイアシル核とシリンギル核から成っており、草本リグニンではグアイアシル核およびシリンギル核に加えて p-ヒドロキシフェニル核も多い（中野ら、1968；横山、2010）。リグニンは細胞壁および植物体に物理的強度、化学的安定性および微生物・昆虫に対する抵抗性を与えている（中野ら、1968；横田、2003）。

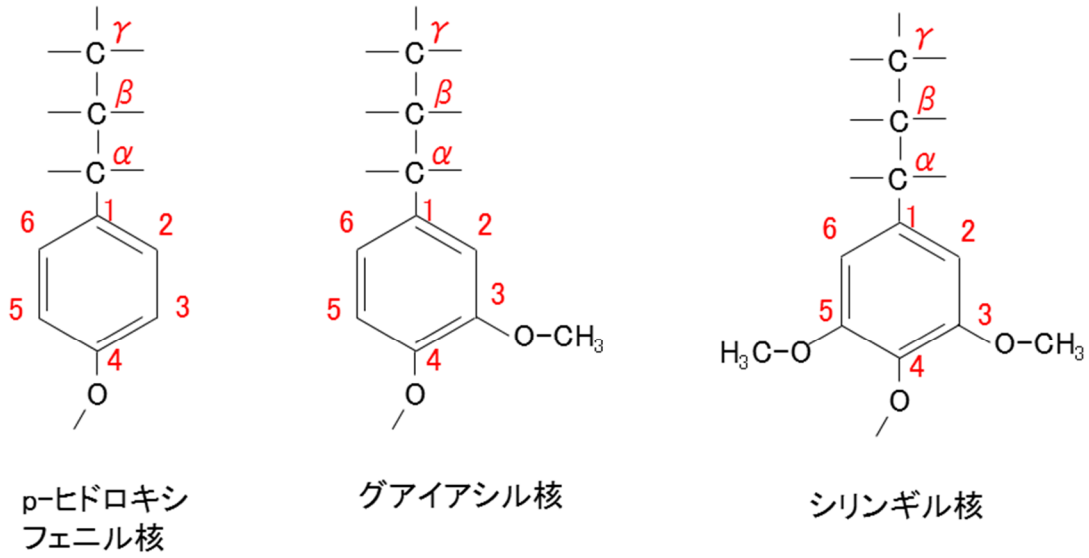


図1-1. リグニンの構造単位.

以上のリグノセルロースの構成成分において、セルロースおよびヘミセルロースのような多糖類は、後述する加水分解により単糖類に変換して、その後、酵

母による発酵によりエタノールに変換できるので、エタノール原料となり得るが、リグニンは芳香族高分子であり、多糖類ではないので、バイオエタノールの原料にはならない（横山、2010）。

ここで、リグノセルロースの糖化性について記す。セルロースは上述のように結晶性を持つため澱粉よりも生物的あるいは化学的に分解しにくい。さらに、そのセルロースをヘミセルロースとリグニンが被覆するように存在しているため、（原田、1968；横山、2010）リグノセルロースから Glc を得てエタノールに変換するのは、スクロース主体のサトウキビ搾汁（松永ら、2011）あるいは澱粉主体のトウモロコシからエタノールを製造するよりも技術的に難しいことが指摘されている（横山、2010）。

リグノセルロースに含まれるセルロースからエタノールを製造する際には、セルロースを Glc に単糖化する必要がある。その方法は、主に酸糖化と酵素糖化に大別される。酸糖化には希酸法と濃酸法があり、それぞれに硫酸、塩酸を用いる方法がある（財団法人　発酵工業協会、1984；鈴木、2000）。このうち希塩酸法は近年の研究開発報告があまり見られない（鈴木、2000）ことから、他の 3 方法より利点が少ないと推測される。希硫酸法では Glc 収率が高くても 60%程度にしかならないこと（財団法人　発酵工業協会、1984；Goldstein and Easter、1992）、高い収率を得るには高温短時間で反応させる必要があって制御が難しいこと（財団法人　発酵工業協会、1984）および糖の過分解による発酵阻害物質が多いこと（財団法人　発酵工業協会、1984；Goldstein and Easter、1992）等の課題があるが、日本では、このプロセスを用いたプラントが設立され、エタノール販売も行われた。濃塩酸法については揮発性の酸を扱うことから密閉性の確保など装置に対する要求性能が厳しいこと、および糖の過分解による発酵阻害物質が多いこと（財団法人　発酵工業協会、1984）が課題と考えられる。濃硫酸法は近

年も検討が行われ（社団法人　アルコール協会ら、2006；Sun ら、2011）、一定の実用化可能性が示されている。濃硫酸法には糖の過分解や硫酸回収に課題が残されているものの（柳田ら、2009；（財）地球環境産業技術研究機構、2008；原、2010）、このプロセスによる試験プラントが設立されている。

上記のように酸糖化では処理装置の腐食や高温の反応条件等の課題があるので、近年、特に、より温和な条件で腐食等の危惧が少ない酵素糖化法が注目され、世界各地で様々な研究が行われている（（財）地球環境産業技術研究機構、2008；Balat、2008；Alvira ら、2010；Balat ら、2011；　Mood ら、2013）。リグノセルロースに含まれるセルロースは前述のようにヘミセルロースとリグニンに被覆されているので、セルロース分解酵素であるセルラーゼをそのまま添加してもあまり糖化は進行しない。糖化には、こうした被覆構造を破壊してセルラーゼがセルロースにアクセスできるようにする必要がある（Mood ら、2013）。この工程は酵素糖化前処理と呼ばれる。酵素糖化前処理の主なものとして、アルカリを用いた蒸解処理でリグニンを除去する（Zhang ら、2009；Cheng ら、2013；独立行政法人 森林総合研究所、2013）、あるいは高温の希酸でヘミセルロースを溶出させる（Öhgren ら、2007；Sipos ら、2011）といった薬品を用いる方法があるが、酸糖化と同様に装置腐食の懸念や排水処理の課題がある（Littlewood ら、2013）。そのため、薬品を用いない前処理法が関心を集めている。研究報告が多いこうした前処理法の例として、微粉砕または高温の水による処理がある。微粉砕はボールミルやディスクミルでリグノセルロースを粉砕するもので、セルロースが表面に露出するようになり、セルラーゼのセルロースへのアクセシビリテイーが増加する。（独立行政法人　産業技術総合研究所、2009；Lee ら、2010）。しかしながら、微粉砕に要するエネルギーは小さくなく（Fujimoto ら、2008）、課題が残されている。高温の水を用いる処理には、超臨界水あるいは亜臨界水を含む超

高温・超高圧水処理（Ingram ら、2009；南と阿尻、2010；井上ら、2011；Ahmed ら、2013）と気体の加熱水蒸気を用いる蒸煮処理（折橋と菊地、2011）がある。超臨界水処理では、セルロースから Glc およびセロビオースが直接得られる（Miyafuji ら、2005；南と阿尻、2010）。亜臨界水処理は、ヘミセルロースを可溶化して溶出させることで（Mosier ら、2005；南と阿尻、2010）、酵素糖化効率の向上を目指している。しかし、超・亜臨界水処理では、非常に高い圧力に耐える装置が必要であること、Glc 生産の選択性が高くないこと、ならびに針葉樹を用いた場合、5-ヒドロキシメチルフルフラール等の過分解物質が多く生成し発酵阻害を引き起こすこと、などといった課題がある（Ehara and Saka、2005 ; Miyafuji ら、2005）。蒸煮処理（水熱処理と呼んでいる研究者もいる）も、ヘミセルロースを溶出させることが目的であり、200～230℃程度の高温が必要である（南と阿尻、2010；折橋と菊地、2011）。ここでも、亜臨界水処理と同様に、高圧装置を必要とすること、フルフラール等の発酵阻害物質が生成することも課題となっている。両者の利点は、水のみを用いるために、排水処理に関わる環境負荷の懸念が小さいことである（南と阿尻、2010；折橋と菊地、2011）。蒸煮処理後、装置の蓋を瞬時に開放する蒸煮爆砕処理は、物理的に木材の細胞壁構造を破壊するために、蒸煮処理より効果が高い前処理法として、検討されている（横山、2010；Asada ら、2011；Asakawa ら、2012）。

このように、酵素糖化法では、糖化率の向上、さらには、その後の発酵工程におけるエタノール収率の向上が最も重要であるが、コスト削減の観点からは、前処理の簡素化、酵素使用量の低減、蒸留エネルギーの低減、および排水処理費用の低減も重要な課題とされている（Galbe and Zacchi、2002；Fujimoto ら、2008；横山、2010 ; Littlewood ら、2013）。特に、酵素のコストがバイオエタノール製造の 50%以上を占めることから、如何に酵素使用量を低減できるかが、酵素糖化

における主要な課題である。

1.3 シイタケ廃菌床からのバイオエタノール製造

1.3.1 シイタケ廃菌床からバイオエタノールを製造する意義

シイタケ廃菌床は現状では堆肥化利用されているが、堆肥では、廃菌床中に残存するリグノセルロースは有効利用されることなく微生物によって分解され、二酸化炭素として大気中に放出されるに過ぎない（河田、2000）。そこで、廃菌床からエタノールを製造することは廃菌床中のセルロースの有効利用となり、1.2.1 で述べた地球温暖化およびエネルギーの安定供給対策に貢献しうると考えられる。また、北海道の廃菌床から有価物であるエタノールを製造することが実現すれば、北海道のきのこ生産者にも利益をもたらすと考えられる。

1.3.2 リグノセルロースの原料調達面におけるシイタケ廃菌床の利点

リグノセルロース由来のバイオエタノール製造では 1.2.4 で述べたように、原料調達面に課題がある。すなわち、資源作物では栽培費用、林地残材では収集運搬、農産残渣では季節性、製材端材および古紙では既存用途との競合といった課題である。シイタケ廃菌床は大規模生産地から多量に得られることから、収集運搬費用が極めて少ない原料であると考えられる。また、菌床栽培では年間を通じて安定的にシイタケが生産されることから（北海道、2015）、季節変動の少ない供給安定性の高い資源であると言える。シイタケ廃菌床は堆肥の資材として無償あるいは極低価格で取引されており、低価格なエタノール原料と位置付けることが出来、かつ、糖化発酵後の残渣は堆肥化利用が可能である。これらのことから、シイタケ廃菌床は既存のリグノセルロース原料と比較して有利な点が多い原料と考えられる。

1.3.3 酵素糖化法によるシイタケ廃菌床からのバイオエタノール製造の利点

北海道のシイタケ菌床栽培における基材は主に広葉樹おが粉である（加藤ら、2000；原田ら、2014）。一般的に、シリンギル核に富む広葉樹リグニンは、グアイアシル核のみから成る針葉樹リグニンに比べ縮合構造が少なく、さらに、木材中の量も少ないために、容易に脱リグニンされる。よって、リグニンの除去を前提とした酵素糖化前処理では広葉樹の方が針葉樹よりも効果が高いと言われている（渡辺、2007；志水、2009）。また、広葉樹の方が針葉樹よりも白色腐朽菌によるリグニン分解効果が高いという報告もあり（Katagiri ら、1997）、広葉樹のおが粉を基材としたシイタケの廃菌床においては、白色腐朽菌の一種であるシイタケにより広葉樹リグニンの分解が進んでいることが推測される。これらのことからシイタケ廃菌床は酵素糖化法に適合する原料と考えられた。

1.4 本研究の目的と構成

1.4.1 本研究の目的と概要

本研究では、原料調達面で優位性が見込まれ、白色腐朽菌であるシイタケの作用により高い酵素糖化性が期待できる北海道のシイタケ廃菌床について、エタノール原料としての可能性を評価することを目的とした。本章に続く第 2 章では、廃菌床の化学分析によりその構成を明らかにし、さらに、簡単な糖化実験により酵素糖化性を検討した。第 3 章では糖化率向上と酵素処理コスト低減のための前処理方法を検討した。第 4 章では蒸留コストの削減を目的に、高濃度のエタノールを得るための製造法として同時糖化発酵法を検討した。第 5 章では第 2～4 章の研究結果をまとめ、北海道産のシイタケ廃菌床を原料とするエタノール製造について総合的に考察した。

1.4.2 各章の目的と概要

1.4.2.1 第 2 章 廃菌床の化学分析と酵素糖化原料としての可能性評価

横田らは、菌床の基材としてハンノキ（*Alnus japonica*）およびケヤキ（*Zelkova serrata*）を用いてシイタケの商業生産用の一品種である北研 600 号（北研製）を栽培した後の廃菌床に対してセルラーゼを用いて酵素糖化すると還元糖が得られ、さらにそれを発酵させてエタノールを得ることができることを明らかにした（Yokota ら、2007）。北海道では、培地基材にナラ類（*Quelcus* spp.）およびシラカンバ（*Betula platyphylla* var. *japonica*）を使用し、シイタケの商業生産用の品種である森 XR1 号（森産業製）を栽培するのが主流であるが、森 XR1 号が使用された廃菌床の糖化発酵に関する研究例はこれまでのところ見当たらない。

北研 600 号を用いたシイタケ菌床栽培では主に、上面以外をビニール袋で包んで子実体を上面のみから発生させる上面栽培方式が採られる（鮎沢と藤田、2010）。森 XR1 号では培養に用いられたビニール袋をすべて外し、全面から子実体を発生させ、収穫する方式が採られる（清水と赤石、2010）。北研 600 号および森 XR1 号では子実体収穫期の含水率（湿重量ベース）がそれぞれ 70%程度（山内、2012）と 60%程度（清水と赤石、2010）であり、北研 600 号の方が湿潤条件で栽培される。このように、北研 600 号のシイタケ廃菌床と北海道で主流のシイタケ廃菌床では培地基材、シイタケ品種および栽培方法で様々な違いがあり、Yokota らの報告（2007）をそのまま適用することができない。したがって、北海道産のシイタケ廃菌床のセルロース含有量およびその酵素糖化性を把握する必要がある。そこで、第 2 章では北海道のシイタケ廃菌床の酵素糖化原料としての可能性を検討するために、シイタケ廃菌床の化学組成、粉砕性、および廃菌床を直接酵素糖化に供した時の糖化性を調べた。

1.4.2.2 第 3 章　糖化率向上のための前処理

酵素糖化を用いたエタノール製造には、主に 2 つの方法が提案されている。一つは、第 1 段階として酵素糖化を行って単糖を得た後、第 2 段階でこの単糖を、酵母を用いてエタノールにまで発酵するという段階的な方法である。これは、醸造酒から蒸留酒を作る工程と同じ製造法である。他方は、酵素糖化と発酵を同時に行う製造法で、これについては第 3 章で述べる。いずれの方法でも、酵素糖化率の向上が重要な課題である（独立行政法人　産業技術研究所、2009）。糖化率およびその速度の向上は、酵素量を増やすことで改善が見込まれるが、セルラーゼはアミラーゼに比べ非常に高価な酵素であるため、現実的には少ない酵素量で糖化率などの向上を目指す必要がある（Fujimoto ら、2008；Roy ら、2012；Littlewood ら、2013）。そこで、この課題を克服するために、種々の酵素糖化前処理が検討されている（横山、2010）。

1.2.5 でも述べたように酸やアルカリを用いた処理では、装置の腐食や排水処理に課題があり、微粉砕では多大な投入エネルギーが必要である。そこで、本研究では、薬品処理や微粉砕を用いない、環境に温和と思われる以下の前処理を検討した。通常の収穫期間が終了した菌床において培養を継続して菌床の木質の生分解を促進する処理、ならびに高温の水蒸気を用いる蒸煮処理である。また、シイタケ生産と廃菌床を用いたエタノール製造を一体化したコンビナートを想定し、シイタケの増産により、エタノール製造にかかるコストを低減する試みとして、最近発見されたシイタケの増産を可能とするヤナギ材の廃菌床の酵素糖化についても検討した。

1.4.2.3 第 4 章　シイタケ廃菌床の同時糖化発酵によるエタノール製造

リグノセルロースからのエタノール製造には、蒸留エネルギーも製造エネルギー全体に対して大きな割合を占めることが指摘されており、その軽減のためには蒸留前のエタノール濃度を高くする必要がある（Galbe and Zacchi、2002；Elliston ら、2013）。一般に、高濃度のエタノールを得るには、高濃度の発酵基質（Glc）が必要であるが、2 章までの酵素糖化では、基質濃度を高めて酵素糖化を行うと、溶液中の Glc 濃度が高まり、セルラーゼに対する生成物阻害が起こる（Tengborg ら、2001；Xiao ら、2004；片倉、2010）ことが知られている。これを解消する方法として、同時糖化発酵が提案されている（星田ら、2010；Viikari ら、2012）。本研究では、同時糖化発酵により濃度 50 g/L 以上のエタノールを製造することを目的に、種々の反応条件について検討した。濃度を目標値として、糖化と発酵処理の検討を行うこととした。

1.4.2.4 第 5 章 総括

2 章から 4 章にわたって行った研究結果をまとめ、シイタケ廃菌床のエタノール原料としての可能性を論じ、北海道におけるシイタケ栽培と廃菌床の利活用を可能にする産業形態を提言する。

第 2 章　廃菌床の化学分析と酵素糖化原料としての可能性の評価

2.1　目的

本章では、ナラおよびカンバを主体とする培地にシイタケを培養し、培養前後の培地成分の化学組成を調べ、セルロース残存量から培養後の培地（廃菌床）の酵素糖化原料としての可否について検討した。さらに、廃菌床の粉砕性も検討した。セルラーゼを用いたリグノセルロースの酵素糖化では一般に、粉砕物の方が未粉砕物より糖化率が高いが、その消費エネルギーは多大である。大形状のシイタケ廃菌床はそのまま糖化に供するのでなく、やはり、粉砕してスラリー状態で糖化する必要があり、その粉砕性を明らかにするために本実験を行った。本章の最後に、この廃菌床粉砕物を用いて酵素糖化を試み、Glc 生成量を測定した。

2.2　実験

2.2.1　シイタケ栽培用菌床およびその廃菌床の調製

絶乾重量で、244 g のミズナラ（*Quercus mongolica var. grosseserrata*）および 105 g のシラカンバの木質基材に、22 g のソバ殻を加え、141g の栄養材 [米ぬか、フスマ、ホミニーフィード（サニーメイズ製）およびデルトップ（森産業製）の混合物] を混合し、さらに、水道水を加えて、湿重量 1300g、含水率（全体の湿重量に対する水分量）61%の培地を作成した。これを以降、滅菌前培地と記す。この培地を、フィルター通気孔を備えたプラスチックバッグ（ミキパック 1.3×380BF、三鬼産業製）に入れ、オートクレーブで 121℃、1 時間滅菌した（以下、滅菌後培地）。滅菌後培地に、シイタケ菌糸（森 XR1 号、森産業製）を接種して、その後、プラスチックバックの口を密閉した。この植菌培地を 20–25℃、相対湿度約 70%の培養室に設置し、85 日間培養した。プラスチックバックを取

り外し、シイタケ子実体の収穫をした。この収穫後の菌床は一昼夜浸水処理し、さらに、15–20℃で相対湿度を 80%以上の条件で 20 日間培養した。その後、2 回目の子実体収穫を行った。再度浸水・収穫の処理を施し、3 回目の子実体収穫を行った。本章では、3 回収穫後の菌床を廃菌床と記す。また、この章では、(株)北海道きのこ生産総合研究所より提供を受けた廃菌床を以下の粉砕実験や糖化実験に用いた（**写真 2-1**、以下、廃菌床)。



写真2-1. (株)北海道きのこ生産総合研究所より提供されたシイタケ廃菌床.

2. 2. 2 廃菌床の粉砕

滅菌前後の培地および廃菌床は、50–60℃のオーブンで含水率が 10%以下（対培地の総重量）になるまで乾燥した。乾燥した試料を 2 mm の目皿を備え付けたウィレーミル（**写真 2-2**；型式 1029-08、吉田製作所製）を用いて、回転刃の回転速度 980 rpm で粉砕した。粉砕は、試験培地が全て目皿を通るまで行った。粉砕前後の気乾重量と 105℃での一昼夜乾燥後の重量から含水率を求めた。この論文では、全ての含水率は気乾重量に対する割合で示すこととする。

2. 2. 3 培地の化学組成分析

培地の化学組成の分析手順を**図 2-1** に示す。図 2-1 の分析は、NREL が定めた

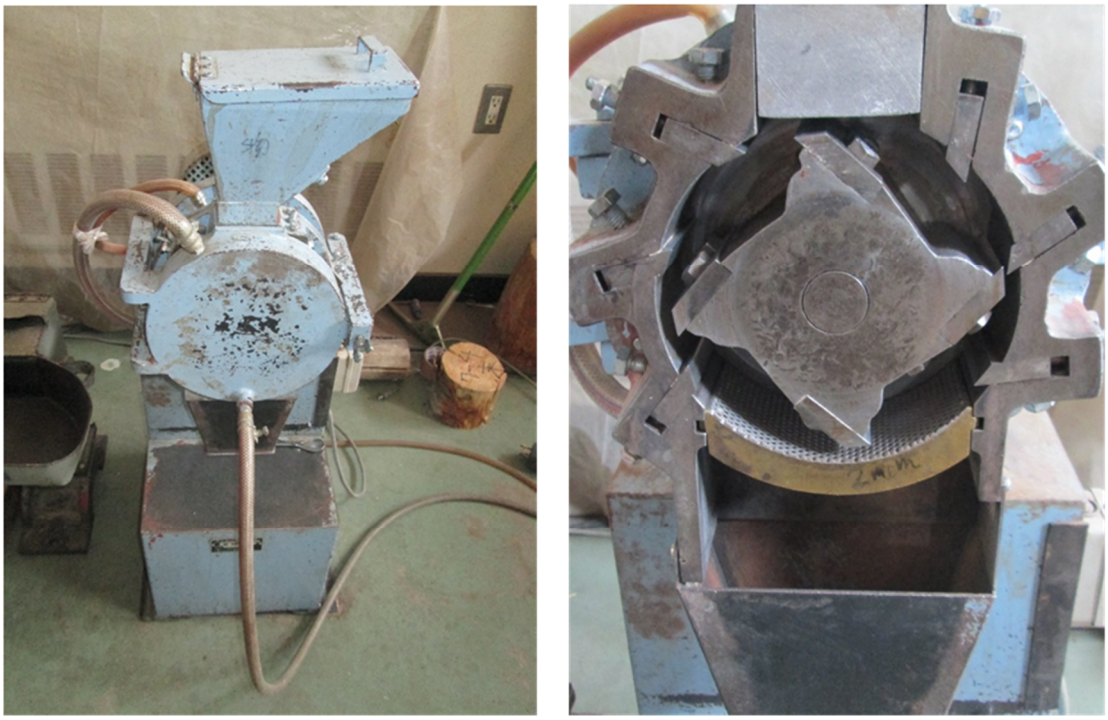


写真2-2. 粉砕に使用したウィレーミル（左：外観、右：2 mm目皿と回転する刃）.

方法に従って行った（Sluiter ら、2008）。この方法において、リグニンの分析は72%の硫酸を用いる Klason 法に準じており、酸で沈殿した酸不溶性リグニン（以下、リグニン）を重量測定で、酸可溶性リグニンを UV-Vis 分光光度計（228A、日立製作所）を用いて定量した。分光測定における吸光度は、199-206 nm の最大値を用い、E=110 L g^{-1} cm^{-1} の吸光係数を用いて算出した（Dence、1994 ; 黒田、2000）。

構成糖（Glc、Xyl、Gal、Ara および Man）量は、上記のリグニン除去後の培地加水分解液から測定した。酸性の分解液を水酸化バリウムで中和し、沈殿を遠心で除去した上清を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）に供して、各単糖類の濃度を定量した。HPLC は、示唆屈折計（以下、RI）を検出器として備えた日立ハイテクノロジーズの L2000 series を使用した。カラムは Aminex HPX-87P

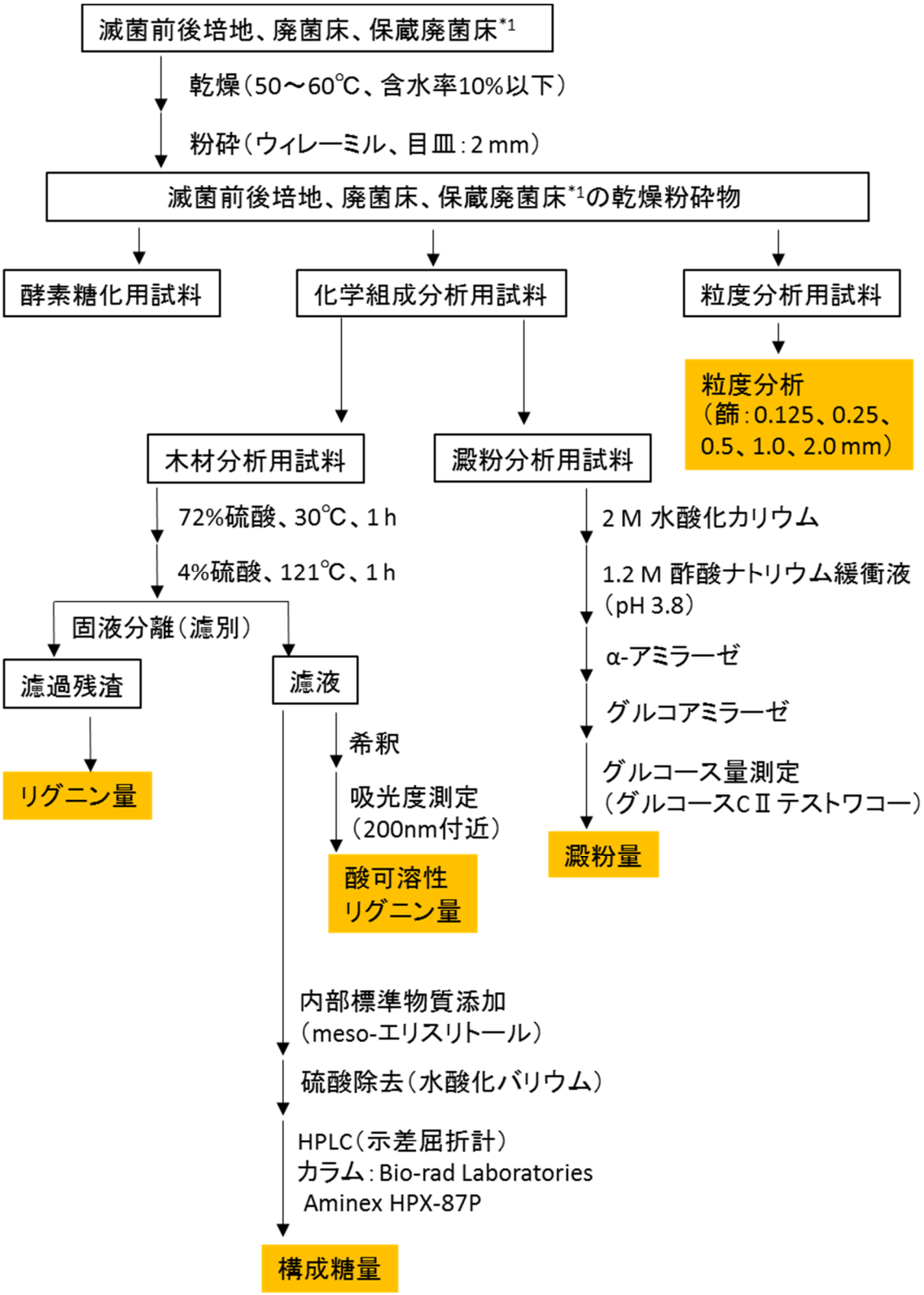


図2−1. 栽培前後の菌床の酵素糖化用および分析用試料の調製.
*1 第三章で使用.

（Bio-Rad Laboratories）を 2 本接続した用いた。カラム温度は 80℃とし、脱イオン水を溶離液として 1ml/min の流速で流した。これらの単糖類は、基本的には培地の木質中では多糖類として存在するために、本研究では、それぞれの単糖類の定量値を対応するホモ多糖類の量に換算して以下では表示する。そのため、ヘキソースでは実際の定量値に 0.9 の係数を掛け、ペントースでは 0.88 を掛けて、それぞれ単糖類量を算出した。

滅菌後培地および廃菌床では、上記の分析の前に、ソックスレー抽出器を用いて、エタノール：ベンゼン＝1：2（v/v）の混合溶媒（以下、アルベン）によるアルベン抽出も行った。特記しないかぎり、本論文では、アルベン抽出を行わずに構成成分の分析を行った結果を記す。

α-アミラーゼおよびグルコアミラーゼで分解可能な多糖を「澱粉」と本研究では見なし、Hideno ら（2007）および佐々木（1986）の方法を参考にした以下に記す方法で澱粉を定量した。0.2 g の栽培前後の菌床をねじキャップ付き試験管（遠沈管、15 mL 容、2315-015、AGC テクノグラス）に入れ、2 mL の 2 M KOH を入れてフタをし、流水で冷却しながら 30 分間浸漬した。この懸濁液に 1.2 M 酢酸緩衝液（pH 3.8）8 mL を加えた。その後、*Bacillus subtilis* 由来の α-アミラーゼ（300 U、和光純薬工業）懸濁液 0.1 mL を添加し、フタをし、試験管立てに立てて沸騰湯浴に下部 5.5 cm 程度が浸かるようにして加熱した。室温まで冷却後、*Rhizopus* sp.由来のグルコアミラーゼ（20 U、和光純薬工業）溶液 0.1 mL を加え、50℃で 40 分間加熱した。この液に、発色試薬（グルコース CII-テストワコー、和光純薬工業）を加え、505 nm で吸光度を測定した。予め、グルコースを用いて作成した検量線から、澱粉量を算出した。前述の HPLC で求めたグルカン量からこの澱粉量を差し引いて、「非澱粉グルカン」を求めた。

2. 2. 4 粒度分析

2. 2. 2 においてウィレーミルで粉砕した培地（気乾重量で 60–200 g）を、JIS 標準篩（孔径 0.125、0.25、0.5、1.0 および 2.0 mm）に入れて、ロータップ型ふるい振とう機（**写真 2–3**；S-1、テラオカ製）を用いて篩い分けした。振とう機の回転数 250 rpm で、打数は 125 rpm の条件で 20 分間振とうした。終了後、各篩上の粉砕物重量を測定した。



写真2–3. 粒度分布の分析に使用したロータップ式篩振とう機.

2. 2. 5 酵素糖化

Trichoderma viride 由来の市販の酵素製剤（メイセラーゼ、明治製菓）を、セルラーゼとして使用した。メイセラーゼの単位酵素重量当たりのセルラーゼ活性は、Adney と Baker（1996）らが提案している方法、すなわち、3,5-ジニトロサリチル酸を発色試薬として還元糖量求めるろ紙分解活性（Filter Paper Units、FPU）測定法を用いて測定した。この章で用いたメイセラーゼは、518 FPU/mg-酵素であった。

培地の酵素糖化試験は、まず、基質濃度が 2%（w/v）になるように、乾燥重量で 240 mg の各種培地を試験管に入れた。その後、4.8 FPU 相当のメイセラーゼを含む 12 mL の 0.1M 酢酸緩衝液（pH4.8）を加えた。試験管を振とう機（Multi Shaker MMS-310、東京理科機械）に乗せ 80 rpm で撹拌しながら、50℃で 24 時間酵素糖化した。糖化後の単糖量を、HPLC を用いて測定した。

ここで、基質濃度は下記の式（2-1）のように定義する。

$$\text{基質濃度（\% w/v）} = \frac{\text{基質乾燥重量（g）} \times 100}{\text{緩衝液量と基質中の水の量の合計（ml）}} \qquad \text{式（2-1）}$$

糖化率は、以下の手順で算出した。

まず、メイセラーゼの澱粉分解能を求めた。市販の試薬級澱粉［でんぷん（溶性)、関東化学］を基質として、上記と同じ酵素分解条件下で反応を行った。この時生成した Glc 量は、澱粉の定量で用いたグルコース CII テストワコーで測定した。この結果を基に、培地中の非澱粉グルカンの糖化率（S_1）を下記の式（2-2）に従い、計算した。

$$S_1(\%) = [\{B-(C \times D/100)\}/A] \times 100 \qquad \text{式（2-2）}$$

ここで、A は非澱粉グルカン含量（mg)、B はメイセラーゼで加水分解されたグルカンの量（mg)、C は培地中の澱粉量（mg)、D はメイセラーゼにより糖化される澱粉の割合（%）である。

2.2.6 統計処理

各試料の化学組成の等分散性を Bartlett’s test で検定した。等分散性が認められた試料について、試料間の差は一元配置分散分析および Tukey-Kramer test で検定した。5%を有意水準とした。

2.3 結果と考察

2.3.1 シイタケ菌床およびその廃菌床の化学組成

2.3.1.1 菌床の化学組成分析に及ぼす抽出成分の影響

滅菌後培地および廃菌床をアルベン抽出した。それぞれの抽出率は 8.1%と 5.2%となり、廃菌床では抽出可能な有機物量が減少した。極性の低いジエチルエーテルも用いて抽出した結果、それぞれ 0.8%と 2.8%となり、極性の高い有機成分が培地に含まれていることが分かった。

図 2-2 に、これらの溶媒による抽出前後のグルカン量（澱粉を含む）とリグニン量を示す。アルベン抽出量がエタノール抽出量より多いために、グルカン量、リグニン量ともエタノール抽出物の方が多くなるはずである。しかし、逆転した結果が部分的に得られた。このことは、分析操作が増えると実験誤差を生じさせることを意味するので、今後の実験では、アルベン抽出を行わず分析を進めた。なお、アルベン抽出の操作を省略した別の理由として、本論文の中心となる廃菌

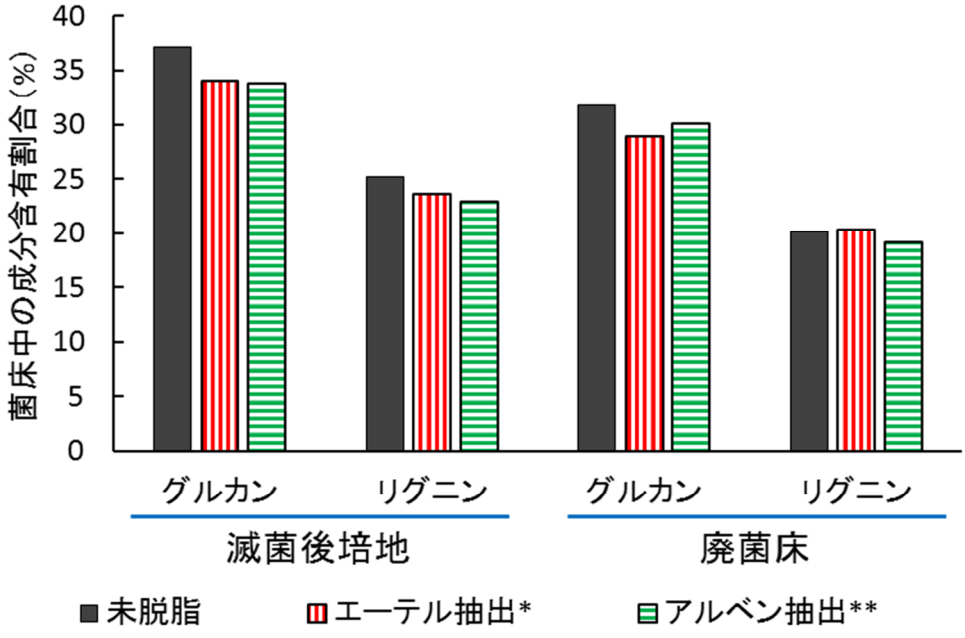


図2-2. ソックスレー抽出による脱脂処理の成分分析に及ぼす影響.
* 8時間のジエチルエーテル抽出. ** 8時間のエタノール/ベンゼン抽出(1/2).

床ではアルベン抽出量も少なく、化学組成に大きな影響を与えないことを付記しておく。

2.3.1.2 栽培前後の菌床の化学組成

培地の化学組成を表すのに、木質由来の成分量か、栄養剤由来の成分量かが重要である。本研究では、Glc が重要なエタノール原料であるので、この Glc を与え得る栄養剤由来の澱粉量のみを栄養剤由来成分として定量した。今回の澱粉測定では、アミラーゼ類による酵素加水分解によって生成するグルコースを定量する、グルコース CII テストワコーという定量キットを用いている。このキットには、ムタロターゼというβーアノマー型 Glc のみを生成させる酵素と、その Glc を特異的に酸化するグルコースオキシダーゼを含んでおり、Glc のみを選択的に定量できる。したがって、他の還元糖の影響を排除できる。実験項では、HPLC により定量した総 Glc 量から澱粉由来の Glc を引いた量を非澱粉グルカン量と称した。本来は非澱粉グルカンの中に含まれる、セルロース量を正確に求めるべきであるが、シイタケの菌体に含まれるβ1→3 および 1→6 グルカン（Lo ら、2007；Synytsya and Novàk、2013）の定量が難しく、正確なセルロース量の算出は困難であった。しかし、「非澱粉グルカン」という記載では、本論文の記述を複雑にするばかりなので、菌体由来のグルカン量は全体の定量値にあまり寄与しないとみなし、以降では、非澱粉グルカンを「セルロース」と記す。

シイタケ栽培による乾燥重量、糖およびリグニンの減少を**図 2-3A** に示す。滅菌前培地の乾燥重量を 100%としたとき、滅菌後培地および廃菌床の乾燥重量の割合はそれぞれ 98%および 47%であった。これにより、培地の固形分がシイタケに栽培により半減することがわかった。**図 2-3B** の化学組成の割合から、澱粉が 80%以上減少しており、栄養剤が優先的に消費されたことが示された。しか

し、元々の栄養剤の割合が 27.5%であるのに対し、乾燥重量の減少はその値を超えている。このことは、シイタケが栄養材以外、すなわち、おが粉の木質も分解していることを示す。

ここで、シイタケの木質の分解による化学組成変化に注目する。図 2-3B には、統計的有意差（Tukey-Kramer test、有意水準 5%）を表すために、アルファベットを付してある。同一成分において、a と a、あるいは a と ab のように同一文字を含む時は試料間に差が検出されなかったことを示し、a と b など異なる文字が付されている時は有意差があることを示す。この有意差を考慮して化学組成を比較すると、リグニンがシイタケ栽培により有意に減少した。しかし、酸可溶性リグニンの割合は増加した。このことより、リグニンがシイタケにより分解され、一部が低分子の酸可溶性リグニンとして廃菌床中に残存している可能性が推測された。また、キシランも有意に減少した。一方、非澱粉グルカン（セルロース）は、その存在割合がほとんど変化していない。したがって、シイタケはセルロース以外の木質成分を優先的に分解・資化していると推定された。

最後に、本項の目的である酵素糖化原料としての廃菌床について考察する。廃菌床のセルロース量は滅菌前培地と同等であることから、見かけ上はシイタケ栽培前の培地を糖化するのと同じと見なされる。しかし、セルロースを被覆しているリグニンおよびキシランが除去されていることより、セルラーゼによる糖化され易さ、すなわち、受容性が向上していることが期待される。

また、廃菌床の乾燥重量が滅菌前後の培地の約半分と、バイオマス利用の観点から一見すると木質成分の損失がデメリットと感じられる。この損失は本来のシイタケ栽培によるもので、栽培による培地組成の変化ということでは重要である。しかし、本研究では、出発原料である廃菌床中のセルロース量が重要であり、栽培による損失はエタノール生産に何の影響も及ぼさない。したがって、私

は、廃菌床が有望な糖化原料と判断した。

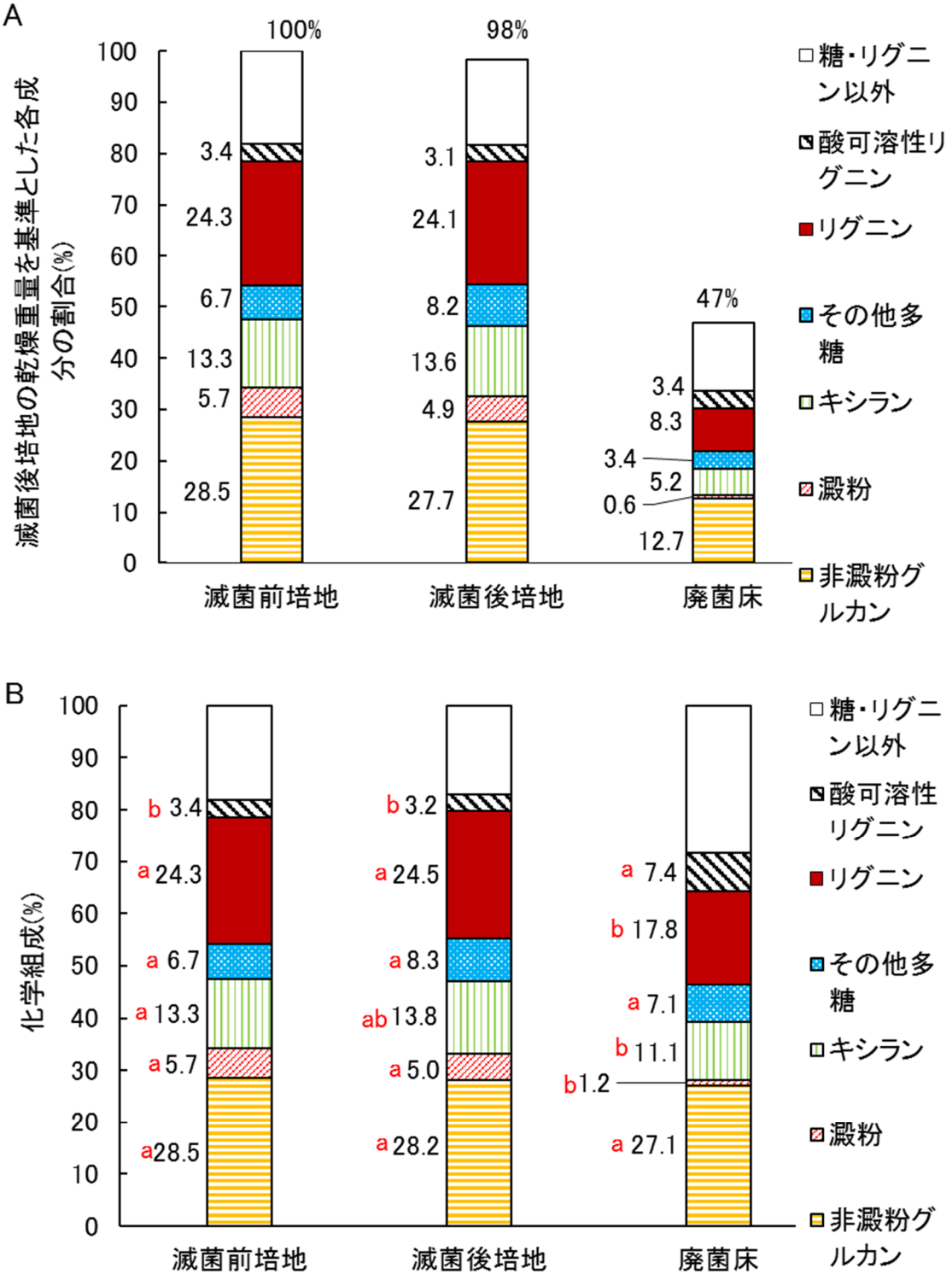


図2-3. シイタケ栽培培地の構成成分量(A)と化学組成(B).
n = 3. 棒グラフの各成分割合の数値に付したアルファベットは有意差を示す(Tukey-Kramer test, 有意水準5%).

2.3.2 栽培前後の菌床の粉砕性

滅菌前後培地および廃菌床を、ウィレーミルを用いて同条件で粉砕した（**図 2-4**）。滅菌前後では各粒径の割合がほとんど変わらなかったが、廃菌床では、細粒画分（0–0.125 mm と 0.125–0.25 mm）の量が増加した。これに伴い、当然ではあるが、0.5–1.0 mm と 1.0–2.0 mm の粗い画分の割合が減少した。よって、シイタケ栽培によって木質が分解されて、細粒化し易くなったと結論付けられ、粉砕性の向上は、廃菌床の酵素糖化に大きな寄与を果たすと推測された。

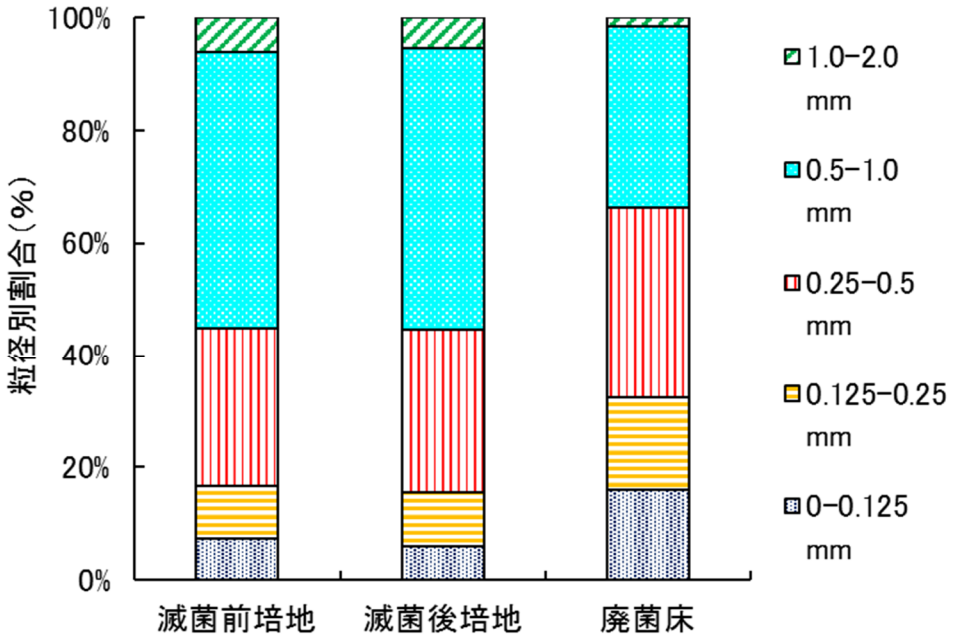


図2-4. シイタケ栽培前後の菌床のウィレーミル粉砕後の粒度分布.

2.3.3 栽培前後の菌床の酵素糖化性

酵素糖化の実験に先立ち、本研究で用いるセルラーゼ（メイセラーゼ、明治製菓）の特性を把握するために、澱粉の糖化性について調べた。試薬として販売されている試薬級澱粉は、メイセラーゼにより重量の 4.4%が Glc に変換された。このことは、メイセラーゼには、若干ではあるがアミラーゼ様の澱粉分解活性があることを示している。よって、本研究では、澱粉量が多い試料に対して、セル

ラーゼによる糖化率を求めるとき、澱粉の分解によって生じた Glc 量を補正した。また、メイセラーゼには、若干のキシラナーゼなどのヘミセルラーゼ活性が見出されているが、その力価は乏しいと報告されている（Shimokawa、2007；是石、2009）。このことも、後述する酵素糖化実験で確認した。

ウィレーミルで粉砕した滅菌前後の培地および廃菌床をメイセラーゼで糖化した時の、単糖収量および糖化率を**図 2-5** に示す。滅菌処理を行うだけで、糖化率が 7%から 14%に増加した。滅菌前後の化学組成がほとんで変化していないことより、基質となる培地中の木質成分の形態変化、すなわち、121℃の水蒸気による木質膨潤が、糖化率を上昇させたと推測している。廃菌床では、糖化率が 38%まで上昇し、滅菌後培地の 2.8 倍となった。これは前項で予想した通り、セルロースを被覆しているヘミセルロースおよびリグニンの一部がシイタケ栽培により消失したことによる効果といえる。さらに、粉砕により多くの微粒子が生成したことも酵素糖化の向上に寄与していると思われる。この結果より、廃菌床が有望な糖化原料であることが結論付けられる。

酵素糖化により Glc 以外の単糖量も増加した。Xyl の量は、原料のキシランの 12%に相当した。この結果は、メイセラーゼが若干のキシラナーゼ活性を有していることを示しているが、全ての単糖量が増加したことを考慮すると、酸性条件下で行う酵素糖化反応では、全ての多糖類に対して酸加水分解が起きていることも考えられる。しかし、これらの単糖類の生成量は少なく、本研究で使用する酵母では発酵できないことから、今後は、Glc 生成量に着目し、酵素糖化性について論じることとする。

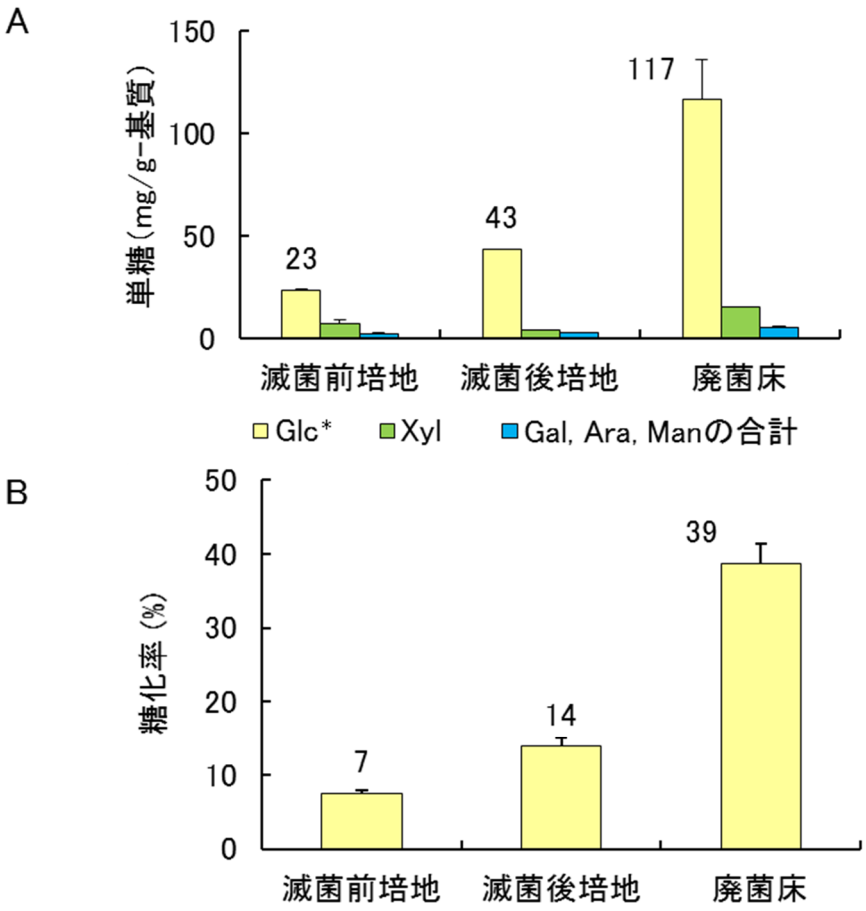


図2-5. シイタケ栽培前後の菌床から得られた単糖の量(A)と菌床中のセルロースの糖化率(B).
酵素糖化条件：基質濃度2%, 20 FPU/g-基質, 50℃, 24 h. n = 3, エラーバーは標準偏差. * Glcは澱粉由来を含まない.

2.4 小括

廃菌床には、非澱粉グルカン（セルロース）が乾燥重量の27%残存していた。これは、シイタケ栽培前の培地中のセルロースの割合とほぼ同等で、糖化のための有望なリグノセルロース原料であることが確認できた。実際に糖化を行うと、栽培前の培地の糖化より、顕著に糖化率が向上した。この効果は、リグニンやヘミセルロースの部分的消失、および粉砕され易い特性によると推定され、シイタケ栽培が酵素糖化率向上に寄与していることが明示された。

第 3 章　糖化率向上のための前処理

前章で、廃菌床が有望な糖化原料であることを示したが、糖化率が約 40%とまだ 60%のセルロースが未糖化である。そこで、本章では、その糖化率を向上させる前処理法を検討した。また、シイタケ生産と廃菌床からエタノール生産の一体化を想定して、シイタケ生産性を向上させる新たな培地についても、その糖化性を検討した。

3.1　菌糸の活動期間を延長して木質の生分解を進める処理

3.1.1　目的

前章で、シイタケ栽培が培地中のリグニンおよびヘミセルロースを減少させ、糖化率を向上させることを明らかにした。このことより、シイタケ菌糸がより長時間培地中の木質成分と接触すると、リグニンなどの分解がさらに進み、糖化率が向上すると考えられた。そこで、シイタケ栽培を延長する以下の二つの方法で木質の分解を試み、それぞれの条件における廃菌床の糖化性を検討した。すなわち、シイタケ子実体の収穫終了後に、一定温度で 1～2 か月保蔵する方法（保蔵処理）、ならびにシイタケの収穫回数を通常の 3 回から 5 回に増やすことで、シイタケ栽培期間を延長する方法（収穫延長処理）を検討した。

3.1.2　実験

3.1.2.1　保蔵処理の廃菌床の調製

まず、2 章で用いた廃菌床と同様の廃菌床を、30 個用意した。このうち 15 個を、それぞれ 4×4×4 cm 以下のサイズとなるように手で粗くほぐした（以下、粗砕廃菌床）。、残りの 15 個は、そのまま次の保蔵処理に供した。廃菌床を、通気孔を備えたプラスチックバッグ（ミキパック、MT-S25B、三鬼産業製）入れて密

封し、**表 3-1 に示す** 15 と 25℃で 1、2 か月、5℃で 2 か月の条件で保蔵した。保蔵室の相対湿度は 60–80%で、光は 1 週間に一度程度、観察する時以外は当てなかった。処理毎に 3 パックを調製し、処理後の廃菌床の名称を表 3-1 に示す。

表3-1. 保蔵処理した廃菌床の略称.

処理	保蔵温度（℃）	保蔵期間（月）	略称
未砕保蔵廃菌床	5	2	未砕保蔵5℃2か月
	15	1	未砕保蔵15℃1か月
	15	2	未砕保蔵15℃2か月
	25	1	未砕保蔵25℃1か月
	25	2	未砕保蔵25℃2か月
粗砕保蔵廃菌床	5	2	粗砕保蔵5℃2か月
	15	1	粗砕保蔵15℃1か月
	15	2	粗砕保蔵15℃2か月
	25	1	粗砕保蔵25℃1か月
	25	2	粗砕保蔵25℃2か月

3. 1. 2. 2 収穫延長処理の廃菌床の調製

図 3-1 に、収穫延長処理培地調製方法を示す。 2 章と同じ手順で 3 回収穫したシイタケ栽培培地（3 回収穫廃菌床）を、さらに、浸水処理、発生、収穫を 2 回行い、5 回収穫廃菌床を調製した。このとき、27 個の 3 回収穫廃菌床を準備し、その内 6 個を延長処理に供した。

3 回目および 5 回目収穫の後、3 回収穫廃菌床および 5 回収穫廃菌床を直ちに化学組成分析と酵素糖化試験のために 2 mm の目皿を付けた切削式ミルで粉砕した。粉砕後、それぞれ 6 個ある 3 回収穫廃菌床および 5 回収穫廃菌床から 3 個ずつランダムに取り出し、分析と試験に供した。両廃菌床は 2.2.1 と同様にオーブンで乾燥し、切削式ミルで粉砕し、乾燥重量を測定した。

3. 1. 2. 3 粒度分析

保蔵処理した廃菌床および収穫延長処理した廃菌床は、50–60℃のオーブンに

入れ、含水率が 10%以下になるまで乾燥した。この乾燥廃菌床を、2 mm の目皿の付いたウィレーミルに供し、全てが目皿を通過するまで、粉砕した。これを篩にかけ、サイズごとの粒子量を測定し、粒度分布を求めた。

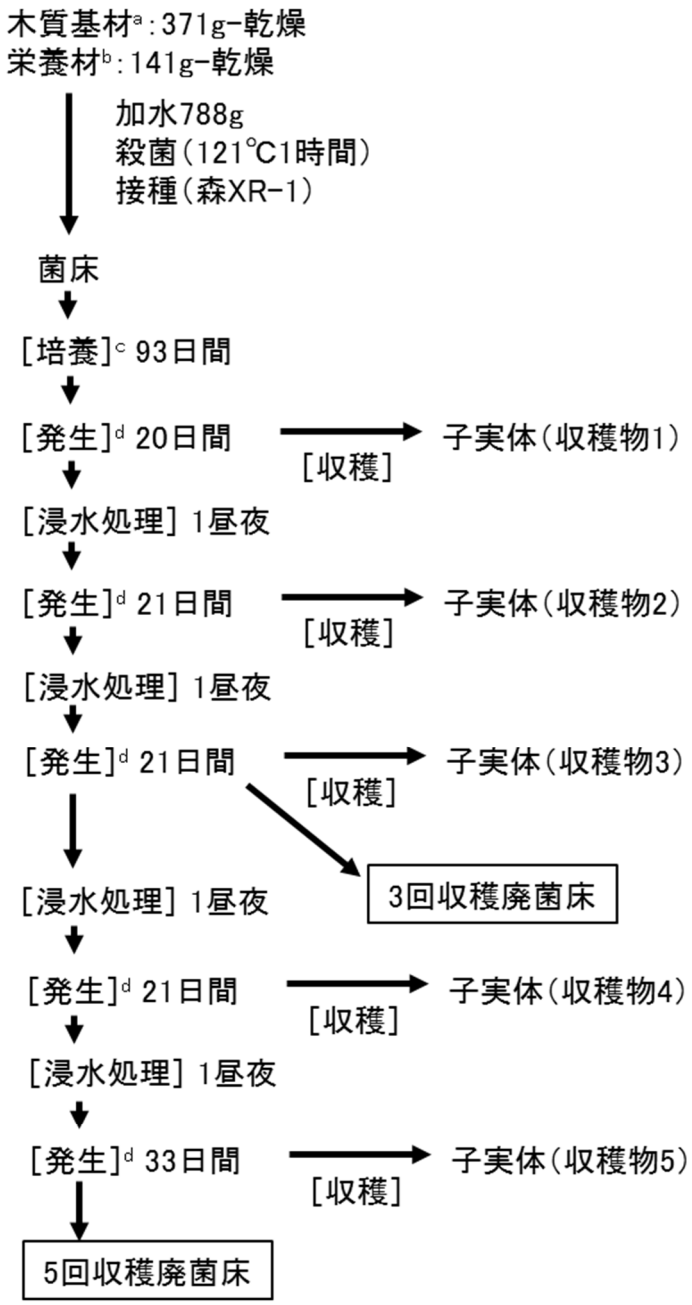


図3-1. 収穫期間を変えた廃菌床の調製方法.
[a] ミズナラ244 g, シラカンバ105 g, ソバ殻22 g. [b] デルトップ, 米ぬか, フスマ, ホミニーフィードの混合物. [c] 22±1℃, 相対湿度70%程度. [d] 16±1℃, 相対湿度85%以上.

3.1.2.4 化学組成の分析

前項の乾燥した廃菌床を、2.2.3 項と同じ方法で、リグニン量および構成糖などの化学組成を分析した。保蔵処理廃菌床では、澱粉量も定量したが、収穫延長廃菌床には行わなかった。

3.1.2.5 酵素糖化

基質（廃菌床）濃度を 2%になるように、0.1 M 酢酸緩衝液（pH4.8）に懸濁させ、メイセラーゼを加えて酵素糖化を行った。酵素量は 5 FPU/g-基質 から 50 FPU/g-基質 で、糖化時間は 24 から 72 時間とした。糖化温度は 40 ℃と 50 ℃を用いた。

糖化後は、2.2.3 と同様に HPLC を用いて単糖量を測定した。各培地中のセルロース量に対する Glc 収量から糖化率を求めた（2 章参照）。

3.1.2.6 統計処理

各種の試料（廃菌床）について、粒径別割合および化学組成の等分散性を Bartlett’s test で検定した。等分散性が認められた試料では、一元配置分散分析および Tukey-Kramer test で、試料間の有意差を検定した。等分散性が確認できなかった試料では、有意差を Games and Howell test で検定した。

収穫延長処理廃菌床における子実体の生重量と個数に関する等分散は、F test で検定し、等分散性が認められた試料間の有意差は、Student’s t test で検定した。また、検定事項により、Welch’s t test と Dunnett’s test を用いた。これらの使用については、結果と考察の項で明示する。全ての検定は有意水準を 5%とした。

3.1.3 結果と考察

3.1.3.1 保蔵処理廃菌床の粉砕性

表 3-2 に栽培前後および保蔵処理前後の菌床の粒度分布を示した。未砕保蔵廃菌床では、保蔵期間の延長により、15 ℃、25 ℃のどちらでも細粒度（0–0.125 mm）の割合が、統計的（Tukey-Kramer test または Games-Howell test、有意水準 5%）に有意に増加することが認めらた。しかし、廃菌床と、粗砕および未砕保蔵廃菌床との間には、粒度分布には有意差は観測されなかった。

表3-2. ウィレーミルで粉砕した栽培および保蔵前後の菌床の粒度別割合.

		粒径(mm)				
		0–0.125	0.25–0.125	0.5–0.25	1.0–0.5	1.0–2.0
滅菌前培地		7.3±1.1 d	9.4±1.2 de	28.3±1.0 f	49.0±2.3 a	6.0±0.9 a
滅菌後培地		6.0±0.4 d	9.5±0.2 e	29.3±0.6 ef	49.9±0.2 a	5.4±0.9 a
廃菌床		16.0±1.7 abc	16.4±0.6 cd	33.9±1.1 abc	32.2±1.5 bcd	1.5±0.1 b
未砕保蔵	5℃2か月	17.6±1.6 abc	18.2±0.4 ab	34.4±0.2 abc	29.0±1.9 cd	0.9±0.1 b
	15℃1か月	13.2±2.2 c	15.3±0.9 abcd	35.6±1.5 ab	35.0±3.0 ab	1.0±0.1 b
	15℃2か月	20.3±1.1 a	17.9±0.3 abc	32.0±0.8 cde	28.4±0.5 cd	1.4±0.4 b
	25℃1か月	14.2±2.3 bc	15.9±0.7 bc	36.3±1.5 a	32.6±1.7 bc	0.9±0.2 b
	25℃2か月	20.7±1.9 a	18.6±0.4 a	32.8±0.7 bcd	26.7±1.0 d	1.3±0.2 b
粗砕保存	5℃2か月	19.1±2.3 ab	17.8±0.4 abc	33.4±1.7 abc	28.5±1.2 bcd	1.3±0.4 b
	15℃1か月	18.0±2.0 abc	17.1±0.5 cd	33.5±0.3 abc	30.1±1.8 cd	1.4±0.3 b
	15℃2か月	20.3±0.8 a	18.2±1.7 abcd	31.1±1.0 cdef	28.9±2.2 cd	1.5±0.3 b
	25℃1か月	20.0±0.7 a	18.0±0.5 abc	32.8±0.3 bcd	28.2±0.9 cd	1.1±0.2 b
	25℃2か月	19.8±2.9 a	19.2±2.5 abcd	32.0±2.0 cde	27.6±3.4 cd	1.3±0.0 b

数値は粒度別割合(w/w)の平均±標準偏差(%)を示す(n = 3, 滅菌後培地はn = 4). 菌床の温度と月数は保蔵処理の条件を表す(表3-1参照). アルファベットは試料間での有意差を示す(有意水準5%). 径級0.25-0.125における試料間の差はGames-Howell testにより検定し, それ以外の径級はTukey-Kramer testにより検定した.

3.1.3.2 保蔵処理後の廃菌床の化学組成

栽培および保蔵処理前後の菌床の構成成分量と、滅菌前培地に対する乾燥重量の変化を**表 3-3** に示す。保蔵処理により、全ての廃菌床の乾燥重量が減少した。特に、粗砕保蔵 25℃2 か月では、処理前の廃菌床に対して 57%まで減少し

た。15℃2 か月でも 72%となり、保蔵期間の延長は、予想された結果ではあるが、培地の分解を進めて廃菌床量を減少させた。未砕保蔵でも減少量は粗砕ほど大きくないが同様の傾向が観測され、15℃2 か月が最大の減少量 71%を示した。

表3-3. 栽培および保蔵前後の菌床の成分および重量変化.

		構成成分[% (w/w)]			
		セルロース	澱粉	キシラン	その他多糖
滅菌前培地		28.5±1.6 abc	5.7±0.3 a	13.3±1.2 a	6.7±0.5 a
滅菌後培地		28.2±2.3 abc	5.0±0.5 a	13.8±0.3 a	8.3±3.8 abc
廃菌床		27.1±3.4 abcd	1.2±0.3 bc	11.1±1.3 b	7.1±5.0 abc
未砕保蔵	5℃2か月	30.4±0.3 a	不検出 d	9.8±0.4 bc	3.1±0.1 abc
	15℃1か月	29.4±2.4 abc	不検出 d	9.5±0.4 bcd	4.2±0.3 b
	15℃2か月	23.5±1.3 cde	0.4±0.5 bcd	8.3±0.2 cd	3.2±0.7 bc
	25℃1か月	30.0±2.9 ab	0.1±0.2 d	9.5±0.3 bcd	3.2±0.3 c
	25℃2か月	29.9±1.1 ab	不検出 d	7.9±0.4 cd	3.5±0.4 c
粗砕保蔵	5℃2か月	23.7±3.4 bcde	1.5±0.8 bcd	9.1±1.1 bcd	4.9±1.4 abc
	15℃1か月	30.4±10.6 abcde	1.3±0.3 b	9.9±1.2 bc	6.2±2.3 abc
	15℃2か月	19.7±1.7 e	0.9±0.3 bc	8.0±0.7 cd	3.5±0.7 bc
	25℃1か月	21.1±1.3 de	0.8±0.7 bcd	8.4±0.6 cd	3.1±0.6 bc
	25℃2か月	17.9±2.0 e	0.8±0.1 c	7.3±0.5 d	3.0±1.0 c

		構成成分[% (w/w)]			重量変化 (%)[1]	重量変化 (%)[2]
		リグニン	酸可溶性リグニン	糖・リグニン以外		
滅菌前培地		24.3±0.5 abc	3.4±0.3 b	18.1±3.2	100	214
滅菌後培地		24.5±0.8 ab	3.2±0.4 b	17.0±0.7	98.3±1.1 a	210
廃菌床		17.8±1.7 cdef	7.4±1.1 a	28.4±5.4	46.8±2.5 bc	100
未砕保蔵	5℃2か月	17.1±1.6 def	7.3±0.6 a	32.2±1.2	43.8±5.1 bcd	94
	15℃1か月	15.9±1.0 f	7.6±0.2 a	33.5±1.3	47.5±5.1 b	101
	15℃2か月	19.7±0.9 bcdef	7.7±0.1 a	37.2±1.3	33.4±0.3 d	71
	25℃1か月	16.7±2.4 ef	7.4±0.3 a	33.1±0.3	41.1±8.4 bcd	88
	25℃2か月	16.5±0.3 ef	6.3±1.6 a	35.9±1.1	34.3±1.6 cd	73
粗砕保蔵	5℃2か月	18.9±3.3 bcdef	7.6±0.8 a	34.3±1.2	44.4±5.4 bcd	95
	15℃1か月	19.1±0.7 bcdef	8.5±1.1 a	24.7±5.2	41.1±3.3 bcd	88
	15℃2か月	22.4±3.5 abcde	8.1±1.2 a	37.5±1.7	33.7±1.4 d	72
	25℃1か月	23.1±2.6 abcd	7.6±0.1 a	35.9±0.8	34.9±2.3 cd	75
	25℃2か月	27.6±4.7 a	7.2±0.5 a	36.2±0.9	26.9±1.5 e	57

[1] 対滅菌前培地. [2] 対廃菌床. 数値は平均値±標準偏差(%)を表す(n = 3). アルファベットは試料間の有意差を表す(有意水準5%). 澱粉およびその他多糖はGames-Howell testで, それ以外の成分はTukey-Kramer testで検定した.

セルロースに関しては、粗砕保蔵で減少が見られ、15℃2か月と25℃2か月が、処理前の廃菌床に対し、統計的に有意な減少を示した。しかし、未砕保蔵では、統計的に有意ではないが、セルロースの割合が増加している様子が観測された。一方、キシランは、セルロースの減少が見られない未砕保蔵でも有意な減少を示し、いかなる形態でも保蔵処理で減少することが明らかとなった。リグニンはその割合がほとんど変わらず、粗砕保蔵では逆に増加した。このことは、保蔵しても、さらなるリグニンの分解が起きず、キシランの分解が優先して起こることを示唆している。

3.1.3.3 保蔵処理廃菌床の酵素糖化性

栽培および保蔵処理前後の菌床から糖化により得られた単糖量と糖化率を**図3-2**に示す。未砕保蔵廃菌床では、得られたGlc量が増加し、25℃2か月が159 mg/g-基質 という廃菌床の1.36倍の最大値を示した。単糖収量から算出した糖化率（図 3-2B）も、同様に向上した。しかし、粗砕保蔵では、セルロースの減少による単糖収量の減少しか観測されず、粗砕保蔵が酵素糖化向上には無益であることが明確となった。

未砕保蔵の廃菌床の糖化率の向上は、セルロースの分解が少なく、キシランが顕著に分解したことに起因すると考えられる。しかし、処理前の廃菌床に対する未砕保蔵処理によって得られるGlc量はほぼ同等（乾燥収率73%、単糖収率136%）であることから、エタノール原料Glcを多量に得るという目的には、合致しない。しかし、バイオエタノールの実用化を考えたとき、別の利点がある。すなわち、廃菌床をそのまま長期間保存でき、製造工場の操業に合わせて原料の使用が可能になる点である。また、25℃などの高温では、カビが生えやすく、実際、粗砕廃菌床ではカビの発生が観察されたが、未砕菌床では25℃2か月の保

蔵ではカビの発生が認められなかった。原料の保管といった点では未砕保蔵にメリットがあることが、本研究により示された。

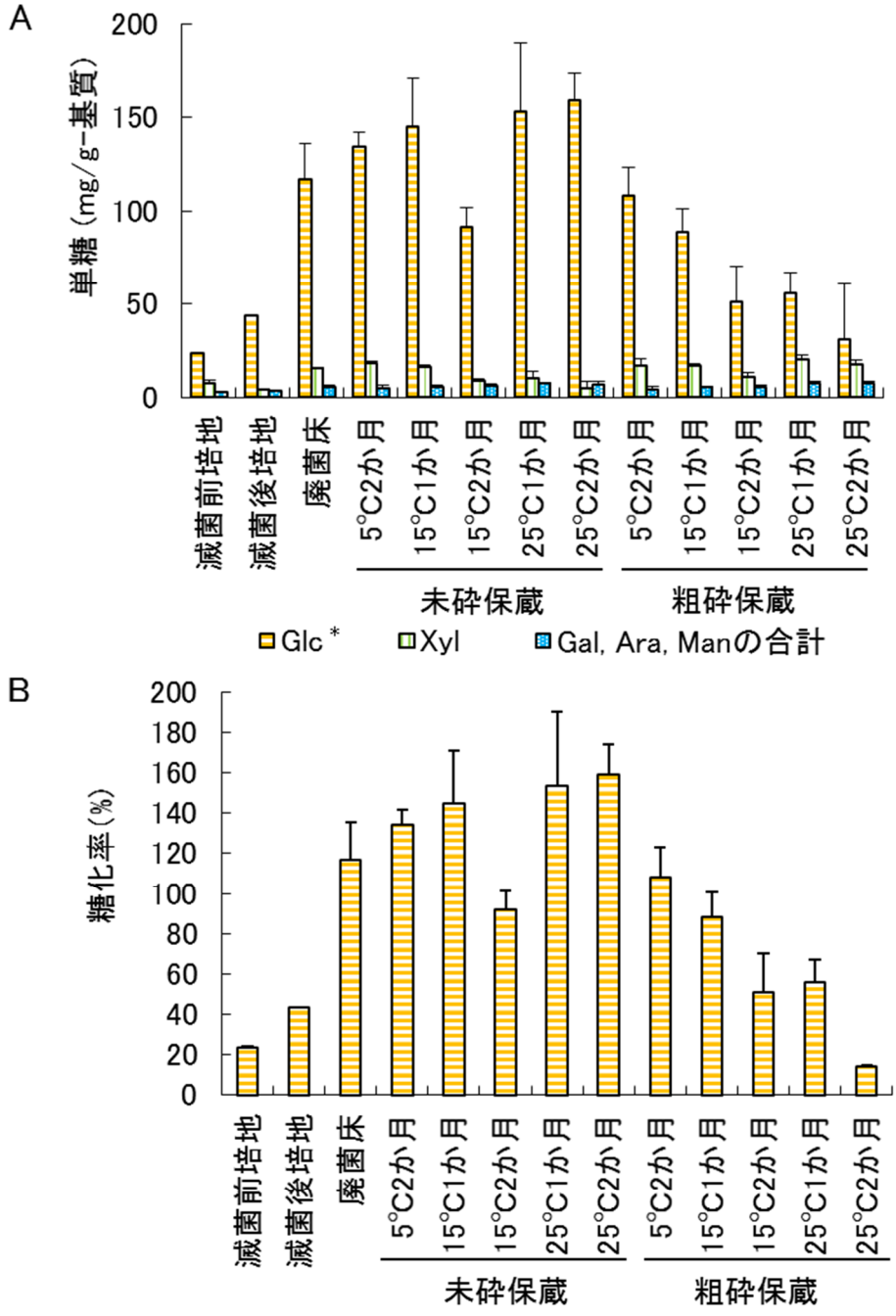


図3−2. 栽培および保蔵処理前後の菌床の酵素糖化により得られた単糖量(A)と, 菌床中セルロースの糖化率(B).

* Glcは澱粉由来を除く. n = 3, エラーバーは標準偏差. 糖化条件: 20 FPU/g−基質のメイセラーゼ添加量, 50℃, 24時間.

3. 1. 3. 4 糖化条件と保蔵処理廃菌床の酵素糖化性との関係

セルラーゼでは、至適温度が 50℃との報告が多いために、これまでの糖化実験は 50℃で行ったが、コスト削減の観点から、40℃での酵素糖化性について検討した。**図 3-3** に、未砕保蔵 25℃2 か月廃菌床を、40℃と 50℃で糖化した結果を示す。この図より、40 ℃と 50 ℃で糖化率に大きな差は見られなかった。これは、Teratani ら（1997）と結果と一致している。したがって、本章ではこれ以降、40 ℃での糖化について検討を加えた。

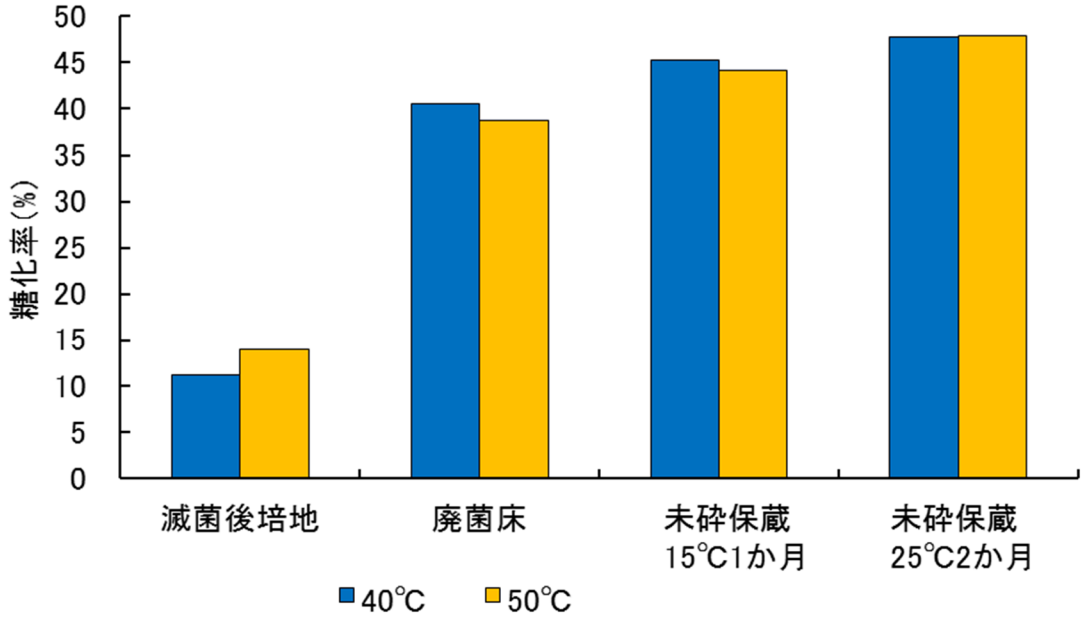


図3-3. 40℃と50℃におけるメイセラーゼによる廃菌床の糖化率.
n = 3. 糖化条件: 酵素添加量20 FPU/g-基質, 24時間.

次いで、糖化時間と糖化率の関係を調べた（**図 3-4**）。滅菌後培地では、前章で示したように、糖化率が廃菌床に比べ著しく低いが、いずれの菌床も 24 時間までは急速に糖化される。しかし、その後の糖化は遅く、72 時間に延長することで若干糖化率は向上するものの、コスト的な優位性はあまり見られないと考えた。この図で最も糖化性が良かったのは未砕保蔵 25℃2 か月で、48 時間で 58%、72 時間で 60.3%となった。

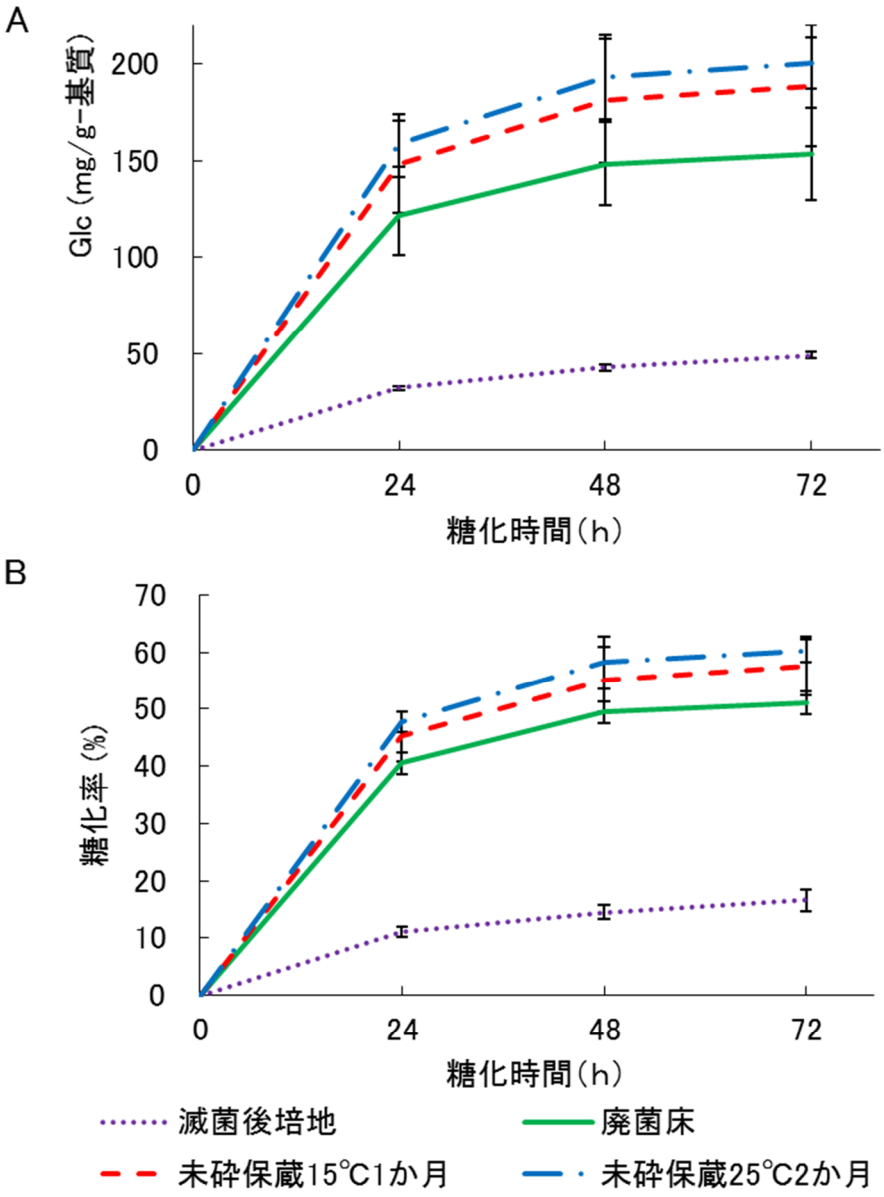


図3−4. 酵素糖化時間と生成したGlcの量(A)およびセルロースの糖化率(B)との関係.
n = 3, エラーバーは標準偏差を表す. 糖化条件: 20 FPU/g−基質のメイセラーゼ添加量, 40℃.

次に酵素添加量の影響を調べた（**図 3−5**）。これまでの 20 FPU/g-基質 から 50 FPU/g-基質 に酵素量を増加させても、Glc 収量の増加は観測されなかった。一方、未砕保蔵 25℃2 か月では、5 FPU/g-基質 と 1/4 に減少させると、193.5 mg/g-基質 から 172.7 mg/g-基質 へと 11％の減少しか見られなかった。廃菌床では、

148.3 mg/g-基質 から 110.2 mg/g-基質 と 26%という大幅な減少が起き、保蔵処理による酵素使用量の低減に関する効果も示された。

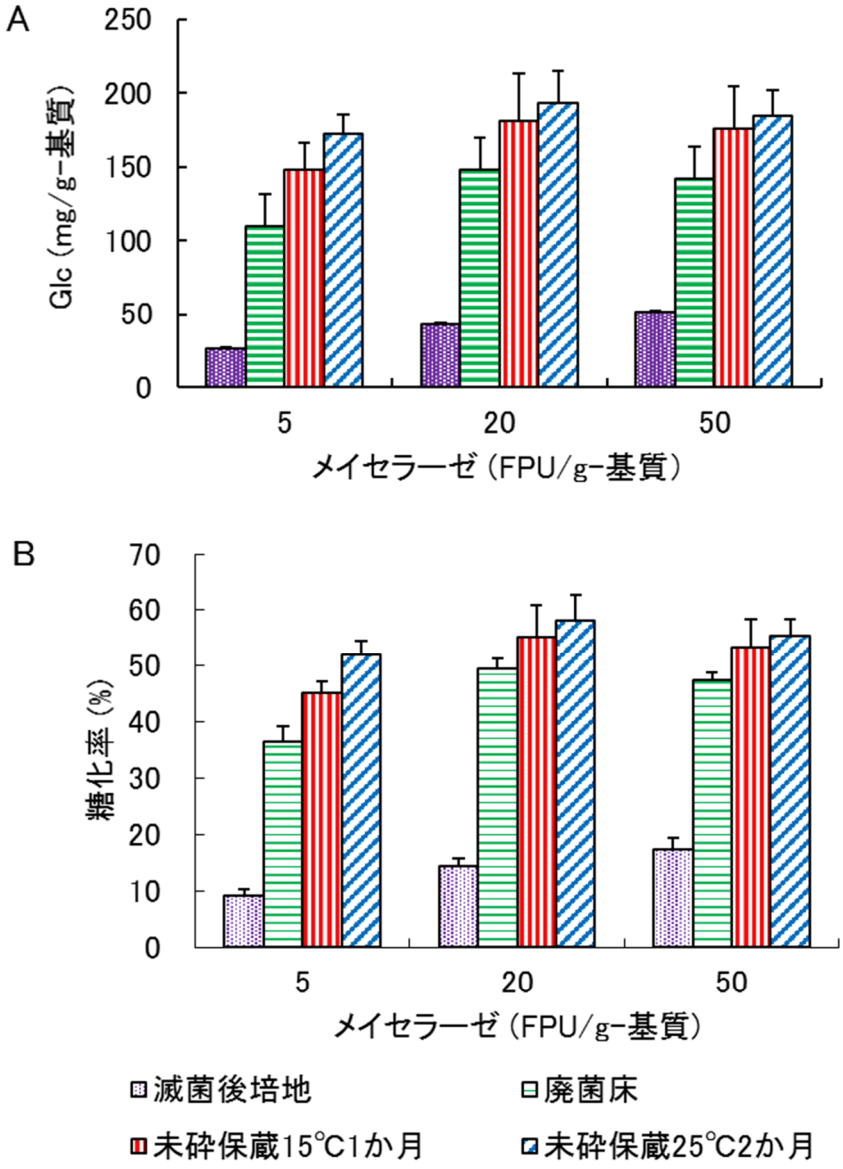


図3-5. 酵素添加量と生成したGlcの量(A)およびセルロースの糖化率(B)との関係.
n = 3, エラーバーは標準偏差を表す. 糖化条件: 40℃, 48時間.

3.1.3.5 収穫延長処理による子実体収量への影響

前項までで、未砕保蔵処理が酵素糖化率の向上に有効であることを明らかに

した。本項では、子実体の収量を増加させつつ、菌糸体と木質との接触時間を延長する目的で、子実体の収穫回数を 3 回から 5 回に増加させた。これは、54 日間の延長を意味する。

収穫延長処理を行った菌床から得られた子実体の重量と個数を**表 3-4** に示す。通常の 3 回目の収穫では、菌床当たり平均約 500 g、35–40 個の子実体が得られた。4 回目の収穫期には子実体が得られず、5 回目に、菌床当たり平均で 21 g、0.5 個が収穫できた。この収穫重量は、5 回目の全収穫総量の 4.1%であり、このナラとカンバを主木質材料とする培地では、収穫回数の増加は収穫にはほとんど影響を及ぼさないことが分かった。

表3-4. 3回および5回収穫で得られた子実体の収量.

		子実体生重量(g/菌床)		子実体数(個/菌床)	
		3回*	5回*	3回*	5回*
収穫物1		347.2 ± 11.6	365.5 ± 11.3	30.0 ± 6.1	37.7 ± 5.3
収穫物2		111.3 ± 20.1	80.8 ± 51.8	3.8 ± 2.6	1.8 ± 1.3
収穫物3		46.7 ± 45.5	48.2 ± 53.7	1.2 ± 1.2	1.2 ± 1.3
収穫物4		-	0.0 ± 0.0	-	0.0 ± 0.0
収穫物5		-	21.0 ± 32.8	-	0.5 ± 0.8
合計	収穫物1-3	505.2 ± 39.0	494.4 ± 39.8	35.0 ± 8.3	40.7 ± 5.0
	収穫物1-5	-	515.4 ± 49.0	-	41.2 ± 4.8

* 3回および5回は収穫回数を示す. 数値は平均値±標準偏差(%)を表す(n = 6).

3. 1. 3. 6　収穫延長処理後の廃菌床の化学組成

収穫延長処理前後の廃菌床の構成成分割合と乾燥重量の変化を**表 3-5** に示す。収穫延長処理（5 回収穫）により、廃菌床の乾燥重量が 22%減少した。セルロースに関しては含有割合に変化が見られなかった。キシランおよびリグニンが統計的に（Student’s t test、有意水準 5%）有意な減少を示した。他の多糖類には、収穫延長処理による変化が観察されなかった（アラビナンは Weltch’s test、ガラクタンとマンナンは Student’s t test、共に有意水準 5%)。したがって、セルロー

スの残存、およびキシランとリグニンの減少から、酵素糖化率の向上が期待された。

表3-5. 3回および5回収穫廃菌床の化学組成および乾燥重量の変化.

		3回収穫廃菌床	5回収穫廃菌床
化学組成（% w/w）	セルロース	31.0 ± 0.6 a	31.6 ± 1.1 a
	キシラン	12.0 ± 0.5 a	9.6 ± 0.4 b
	ガラクタン	1.6 ± 0.4 a	1.2 ± 0.1 a
	アラビナン	2.4 ± 0.5 a	2.1 ± 0.0 a
	マンナン	3.3 ± 0.6 a	3.5 ± 0.3 a
	リグニン	11.9 ± 0.4 a	10.0 ± 1.0 b
	酸可溶性リグニン	6.1 ± 0.2 a	6.0 ± 0.1 a
	糖・リグニン以外	31.8 ± 2.8	35.9 ± 1.2
乾燥重量の変化（%）*		100.0 ± 6.5	78.0 ± 1.2

* 3回収穫廃菌床の平均の乾燥重量に対する割合. 数値は平均値±標準偏差（%）を表す（n = 3）. アルファベットは試料間の有意差を表す（アラビナンはWeltche's test, それ以外はStudent's t test, 有意水準5%）.

3. 1. 3. 7 収穫延長廃菌床の酵素糖化性

収穫延長処理前後の廃菌床から糖化により得られた単糖の量と糖化率を**図 3-6** に示す。収穫を 3 回から 5 回増やすことで、廃菌床当たりの Glc 量が増加した。この増加量から、セルロースに対する糖化率を求めると、45.0%から 54.5%に向上したことになる。しかし、この処理においても、期間延長による重量減少を考慮すると、コントロールとなる廃菌床（通常の 3 回収穫）と得られる Glc の量には、統計的な有意差は観測されなかった（Dunnett's test、有意水準 5%）。

以上の 2 つの菌糸接触時間を延長した処理では、当初期待した糖化率は図られたが、廃菌床全体の重量減少が伴うために、廃菌床（通常の 3 回収穫後）当たりの Glc 収量の向上には寄与しなかった。

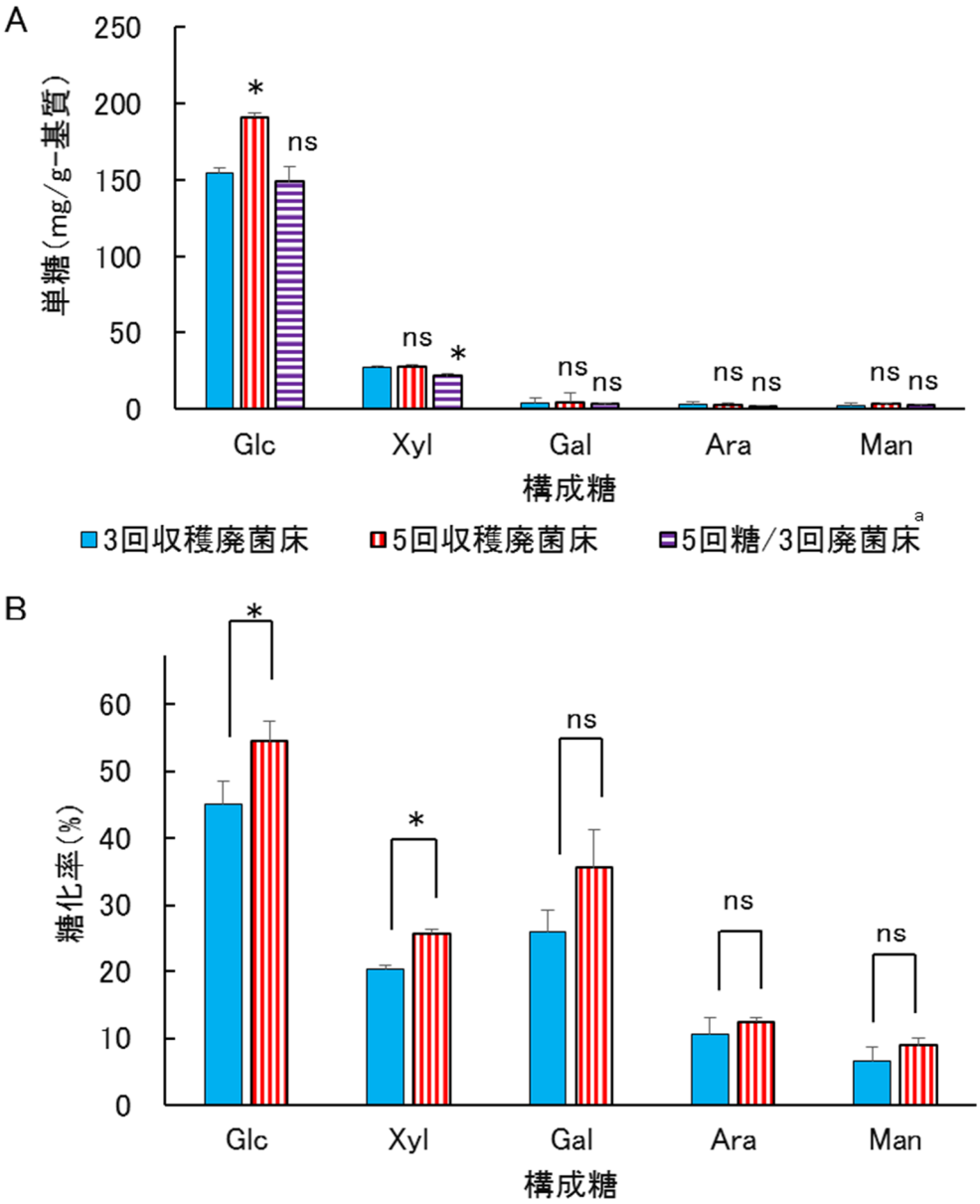


図3-6. 3回および5回収穫廃菌床から酵素糖化により得られた単糖の量（A）と糖化率（B）.

[a] 3回収穫廃菌床の乾燥重量(g)あたりの，5回収穫廃菌床から得られた糖の量(mg)を計算した値. n = 3, エラーバーは標準偏差を示す. Aの*は3回収穫廃菌床との間に有意差があることを示す（3回収穫廃菌床を対照としたDunnett's test, 有意水準5%）. Bの*は基質間の有意差を示す（Student's t test, 有意水準5%）. nsは有意差の不検出を示す. 糖化条件: 5 FPU/g-基質の酵素添加量, 40℃, 48時間. Glc以外の単糖類の糖化率は，相当するホモ多糖類の重量に対する単糖類の割合.

3.2 シイタケ廃菌床に対する蒸煮処理

3.2.1 目的

廃菌床の効果糖化率向上による Glc 収量の増加を目的に、リグノセルロースの酵素糖化前処理として提案されている蒸煮処理の効果について、本項で検討する。

3.2.2 実験

3.2.2.1 蒸煮処理試料の調製

本実験では、滅菌後培地、廃菌床および 15℃で 1 か月保蔵した廃菌床（以下、保蔵廃菌床）を蒸煮処理用の試料として用いた。試料はいずれも、含水率が 10%以下になるように 50–60℃のオーブンで乾燥し、その後、2 mm の目皿を備えたウィレーミルで、全てが目皿を通過するまで粉砕した。

22.6 または 24.2 g 粉砕試料を、内径 17.9 または 18.5 cm のガラス製のペトリ皿に入れ、万遍なく広げた。蒸煮処理の 1–3 時間前に霧吹きで脱イオン水を加え、含水率が約 55%となるようにした。皿には 80 メッシュのステンレス網をかぶせて蓋とした。オートクレーブ（容量 0.767m^3、日立造船製）の内圧の設定値を 1.91 MPa として、所定時間の蒸煮を行った。この圧力で、内部温度は 210℃となった。蒸煮処理後、試料を 2–4 日間風乾した。蒸煮前後の乾燥重量から、次式を用いて、蒸煮収率（Y）を求めた。

$$Y(\%) = A/B \times 100 \qquad \text{式(3-1)}$$

ここで、A は蒸煮処理後の試料の乾物重量（g）で、B は蒸煮処理前の基質の乾物重量（g）である。

3.2.2.2 化学組成の分析

これまでの廃菌床と同様（2.2.2 項参照）に、試料の化学組成を測定した。澱粉量については、滅菌培地のみを測定対象とした。

3.2.2.3 酵素糖化

蒸煮した試料を 2. 2. 3 項と同様の方法で酵素糖化した。蒸煮した滅菌培地および保蔵廃菌床に対しては、メイセラーゼの添加量と糖化時間を変えた実験も行った。

3.2.2.4 統計処理

蒸煮時間と試料乾燥重量との相関性を、Spearman の順位相関係数から評価した。種々の廃菌床から糖化で得られた Glc 量の等分散性は F test で評価し、各試料の化学組成の等分散性は、Bartlett's test で検定した。等分散性が認められた試料間の有意差は、Student's t test、一元配置分散分析および Tukey-Kramer test で検定した。等分散性が認められない試料間の有意差は、Games-Howell test により検定した。全ての検定において、有意水準を 5%とした。

3.2.3 結果と考察

3.2.3.1 蒸煮条件と糖化による Glc 生成量との関係

予備実験として、蒸煮温度を 190℃から 210℃に設定し（Shimizu ら、1983 ; 安久津ら、1986）、得られた各種試料の糖化性を検討した結果、210℃の高温条件で最も多量の Glc が得られた。そこで、蒸煮処理は 210℃で行うこととした。実際には、昇温には、90–120 秒要し、処理後にオートクレーブから試料を取り出すための放冷時間は 120–150 秒であった。

蒸煮時間と蒸煮収率との関係を**図 3-7** に示す。全ての試料で、蒸煮時間の延

長により試料重量が減少するという、負の相関が見られた。

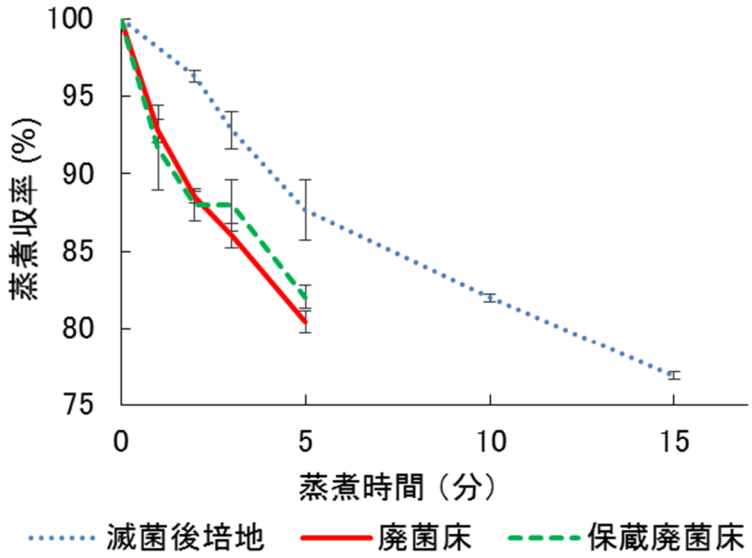


図3-7. 210℃の水蒸気を用いた蒸煮処理による菌床の重量減少.
n = 3, エラーバーは標準偏差を示す.

図 3-8 に、蒸煮処理培地および廃菌床の酵素糖化による Glc 収量を示す。滅菌後培地では、蒸煮処理 10 分間で最大 Glc 収量が得られた。一方、廃菌床およ

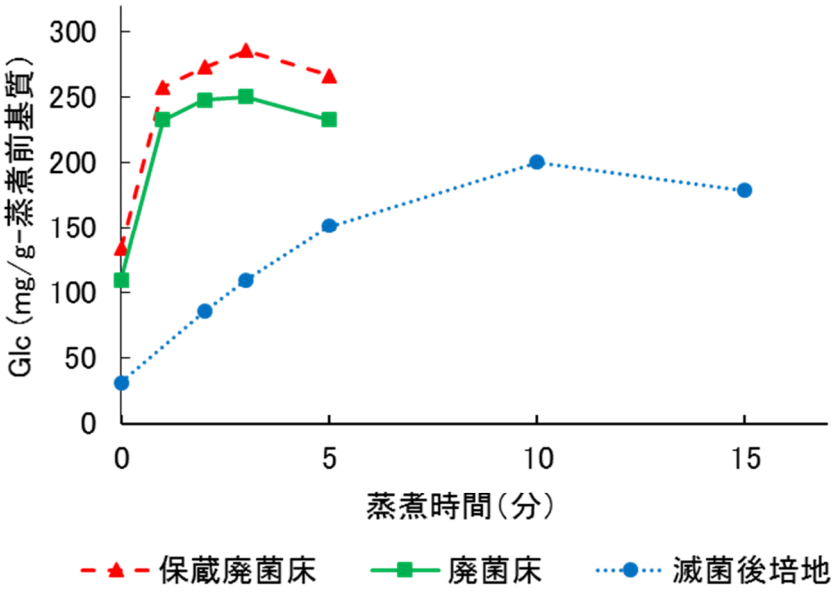


図3-8. 蒸煮処理時間と酵素糖化で生成したGlc量との関係.
蒸煮温度: 210℃. 糖化条件: 酵素添加量20 FPU/g-基質, 40℃, 24時間. n = 3.

び保蔵廃菌床とも、短時間の蒸煮処理で Glc 収量が著しく増加し、3 分間で最大の収量が得られた。この収量増は、未蒸煮の 2 倍以上である。蒸煮により乾燥重量が 12-14%減少したが、この減少分を考慮しても、未処理物より約 2 倍も Glc 収量が増えたことになり、廃菌床に対しても蒸煮処理が優れた酵素糖化前処理であることが確認できた。

3. 2. 3. 2 蒸煮による化学組成の変化

表 3-6 に示すように、蒸煮後の全ての試料で、リグニンの割合は蒸煮前より高くなった（Games-Howell test、$P < 0.05$）。廃菌床では、セルロースの割合が若干増加（Tukey-Kramer test、$P < 0.05$）しているが、全体的には蒸煮の影響は受けないと考えられる。一方、キシランの割合が、全ての試料で低下した（Tukey-

表3-6. 栽培前後、保蔵前後および蒸煮前後の菌床の化学組成と重量変化.

菌床	化学組成[% (w/w)]			
	セルロース	澱粉	キシラン	その他多糖
滅菌後培地	28.5 ±1.8 bc	4.9 ± 0.5	13.7 ±0.6 a	6.2 ±0.2 d
蒸煮培地	33.6 ±1.8 ab	2.4 ± 0.2	4.7 ±0.9 e	4.4 ±0.6 d
廃菌床	26.2 ±1.8 c	–	9.5 ±0.5 bc	10.1 ±0.8 a
蒸煮廃菌床	34.4 ±3.1 ab	–	6.9 ±0.7 d	6.3 ±1.3 bc
保蔵廃菌床	33.7 ±3.0 ab	–	11.5 ±1.2 ab	8.8 ±1.2 ab
蒸煮保蔵廃菌床	32.1 ±0.2 abc	–	6.2 ±0.8 de	8.5 ±0.1 bc

菌床	化学組成[% (w/w)]			重量変化 (%)[1)]
	リグニン	酸可溶性リグニン	糖・リグニン以外	
滅菌後培地	24.8 ± 0.5 c	3.3 ± 0.5 c	18.7 ± 1.5	100.0 ± 1.1
蒸煮培地	39.0 ± 1.5 a	4.6 ± 0.2 b	11.3 ± 1.1	82.0 ± 0.2
廃菌床	13.8 ± 0.4 d	6.4 ± 0.1 a	34.1 ± 2.4	45.0 ± 0.4
蒸煮廃菌床	27.0 ± 0.1 b	6.1 ± 0.1 a	19.2 ± 2.5	38.7 ± 0.7
保存廃菌床	11.8 ± 0.4 e	6.9 ± 0.3 a	27.3 ± 3.5	40.2 ± 0.9
蒸煮保存廃菌床	23.5 ± 2.4 bc	6.4 ± 0.4 a	23.4 ± 1.7	35.2 ± 1.4

1) 対滅菌後培地. 数値は平均値および標準偏差を示す(n = 3). アルファベットは試料間の有意差を示す. 酸不溶性リグニンはGames-Howell testで検定し, それ以外はTukey-Kramer testで検定した(有意水準5%).

Kramer test、$P < 0.05$)。したがって、蒸煮処理は、ヘミセルロースの分解・除去を引き起こし、酵素糖化性を向上させたと推論される。リグノセルロースであるササを蒸煮して酵素糖化する際に、酸を添加して蒸煮するとヘミセルロースの分解が促進され酵素糖化率が向上することが報告されており（津田ら、1998)、シイタケの廃菌床は内部が pH 3.4–4.0 の酸性になっていること（徳島県立農林水産総合技術センター　森林林業研究所、2002）も、蒸煮による廃菌床からのキシランの除去の一助になっていると考えられた。

3. 2. 3. 3 酵素糖化条件と蒸煮廃菌床の糖化性との関係

10 分-蒸煮滅菌後培地および 3 分-蒸煮保蔵廃菌床に対し、2、5 および 20 FPU/g-基質 の酵素量を用いて、120 時間糖化を行った時に得られた Glc の量および糖化率を**図 3-9** に示す。20 FPU/g-基質 という大量の酵素を用い、120 時間糖化を行うと、どちらの基質も約 330 mg/g-基質 の Glc を与え、糖化収率は 93%まで達した。しかし、図から明らかなように、蒸煮保蔵廃菌床では、どの酵素量でも糖化が早く、高い糖化率を示した。具体的には、酵素量 20 FPU/g-基質 の時蒸煮保蔵廃菌床は、24 時間で 86%、72 時間で 95%という最大収率を与えた。しかし、蒸煮滅菌培地では、24 時間で約 60%、72 時間で 83%にとどまり、蒸煮保蔵廃菌床の優れた酵素受容性が示された。

酵素添加量を 5 FPU/g-基質 に低下させると、蒸煮保蔵廃菌床の糖化率はかなり遅くなったが、120 時間の糖化で 87%と、未蒸煮物では得られなかった高い糖化率が観測された。2 FPU/g-基質 まで酵素量を低下させると、糖化率が大幅に減少するが、それでも 120 時間で 60%の糖化率に達し、未蒸煮物に対し 20 FPU/g-基質 を用いて 72 時間糖化した時と同等の糖化率となった。

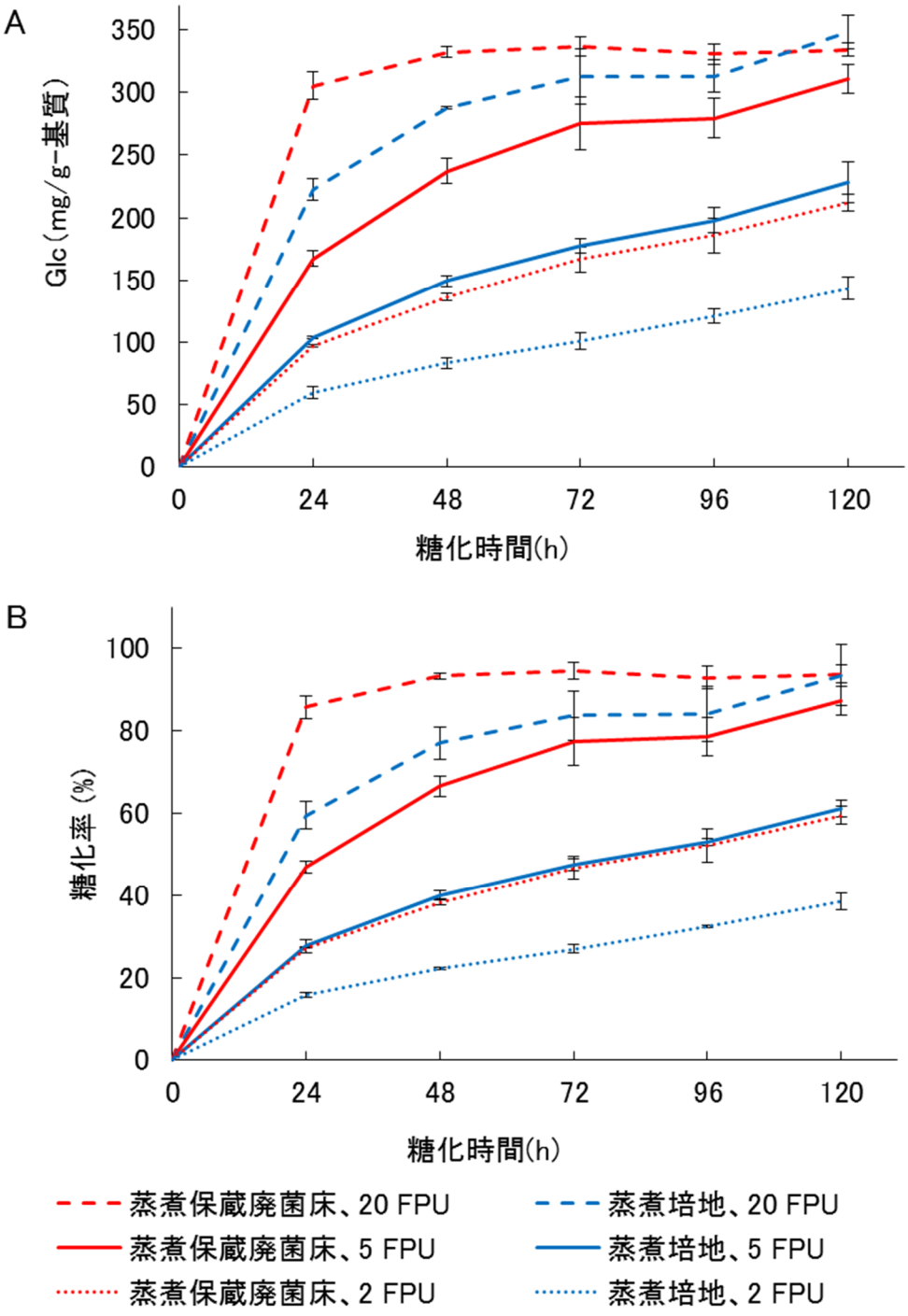


図3−9. 異なる酵素量を用いたときの廃菌床の酵素糖化に及ぼす蒸煮処理の効果.（A）, 生成したGlcの量;（B）, セルロースの糖化率（B）.
72時間はn = 6, それ以外はn = 3, エラーバーは標準偏差を表す. 糖化温度: 40℃.

以上のことから、蒸煮処理で24時間までの糖化率が著しく向上し、特に、その効果が保蔵廃菌床に顕著に表れている。酵素量の低減の観点からは、5 FPU/g-基質 でも87%に達したことから、かなりの低減が可能であることが示されたが、長時間の糖化というデメリットもあり、LCA（Life Cycle Assessment）からの考察が必要である。

3.3 シイタケ栽培用培地にヤナギを用いて得られた廃菌床の糖化性

3.3.1 目的

原田ら（2014）は、北海道の河川で優先的に生育するなヤナギ2種（オノエヤナギとエゾノキヌヤナギ）をシイタケ栽培用培地に用い、大粒のシイタケ子実体が多数収穫でき、かつ、収穫が5回可能であることを示した。私は、この章の初めに、ナラとカンバを用いた培地では、3回目以降はほとんど子実体が収穫できないが、この廃菌床（収穫延長廃菌床）の糖化率が向上することを示した。したがって、ヤナギの主要成分とする培地から得られた廃菌床、特に、5回収穫後の廃菌床は、糖化率が高いことが予想された。この多収穫化と糖化率の向上は、シイタケあるいはバイオエタノールの製造コスト低減につながると推測される。よって、本項では、ヤナギ培地の廃菌床化学組成および酵素糖化性を調べ、従来の廃菌床との比較を行った。

3.3.2 実験

3.3.2.1 ヤナギを培地基材とした廃菌床の調製

乾燥重量390 gのオノエヤナギ（*Salix Sachalinensis*；以下、オノエ）あるいはキヌヤナギ（*Salix pet-susu*；以下、キヌ）のおが粉に、栄養材として乾燥重量130 gのデルトップ（森産業製）を混ぜ、さらに、水道水を加えて混合し、合計の湿

重量が 1300 g の滅菌前培地を調製した。この培地を滅菌したのち、シイタケ菌糸を接種し、収穫延長処理廃菌床の調製方法（3.1.2.2 項参照）で 5 回の収穫を行った。得られた収穫延長廃菌床を、それぞれオノエ廃菌床およびキヌ廃菌床と呼ぶ。

これらの廃菌床を 50–60℃のオーブンで含水率が 10%以下になるまで乾燥し、乾燥した廃菌床を 10 mm の目皿を備え付けたカッターミル（**写真 3-1**、ロートプレックス粉砕機、型式 R-16/8、富士産業製）を用いて 1500 rpm で、全ての試料が目皿を通過するまで粉砕した。



写真3-1. ヤナギ材廃菌床の粉砕に使用したロートプレックス粉砕機（左：外観、右：10 mm目皿と回転する刃）.

3.3.2.2 化学組成の分析

2.2.2 項と同様の方法でリグニンおよび多糖の量を分析した。澱粉は定量しなかった。

3.3.2.3 粒度分析

目開き 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 mm の篩を用い、乾燥粉砕試料を篩分けし、各々の粒試料から粒度分布を求めた。(2. 2. 4 項参照)

3. 3. 2. 4 酵素糖化

3. 1. 2. 4 項と同様に基質濃度を 2%（w/v）とし 40℃で 5 FPU の酵素添加量で 72 時間酵素糖化した。緩衝液は、0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液（pH4.8）を用いた。

3. 2. 2. 5 統計処理

糖化により得られた糖の量および糖化率の等分散性を F test を用いて検定し、等分散性が確認された試料間の有意差を Student's t test を用いて検定した。

3. 3. 3 結果と考察

3. 3. 3. 1 ヤナギを培地基材とした廃菌床の化学組成

表 3-7 に、ヤナギを培地基材とした廃菌床（以下、ヤナギ材廃菌床）の化学組成を示す。オノエおよびキヌの廃菌床のセルロースの含有率は約 30%であり、

表3-7. ヤナギ材シイタケ廃菌床の化学組成.

化学組成	廃菌床*	
	オノエ	キヌ
セルロース	31.5 ± 2.6	29.6 ± 1.2
キシラン	9.3 ± 0.8	9.7 ± 0.7
ガラクタン	1.8 ± 0.4	1.7 ± 0.3
アラビナン	3.0 ± 0.3	3.0 ± 0.3
マンナン	5.3 ± 0.6	5.3 ± 0.8
リグニン	13.5 ± 1.3	14.2 ± 0.6
酸可溶性リグニン	6.6 ± 0.2	6.7 ± 0.3
糖・リグニン以外	29.0	29.7

* 廃菌床のオノエはオノエヤナギ, キヌはエゾノキヌヤナギを示す. 数値は平均± 標準偏差(%)を表す(n = 3).

シラカバおよびミズナラを培地基材の主体とした廃菌床（保蔵廃菌床、収穫延長廃菌床を含む）と同程度で、酵素糖化の原料となる可能性があると考えられた。リグニンおよびキシラン量も大きな差はなかった。

3.3.3.2 ヤナギ材廃菌床の粒度分布

前項までの粉砕には、ウィレーミルを用いて 2 mm 以下の粉砕物を得ていたが、本項では粉砕コスト削減を意図し、ロートプレックスという、粗い粉砕しかできないが大量の処理が可能なカッターミルを用いて、10 mm 以下に廃菌床を粉砕した。**表 3-8** にヤナギ材廃菌床の粉砕物の粒度分布を示す。0.5 mm 以上の粗い粒度画分が 6 割を占め、前項までの粉砕物と比較して粗い粉砕物となった。

表3-8. ヤナギ材シイタケ廃菌床の粒径別割合.

	粒度別割合(%)	
粒径 (mm)	オノエ廃菌床	キヌ廃菌床
>4.0	3.2 ± 0.3	3.9 ± 0.4
4.0–2.0	14.2 ± 0.8	14.0 ± 0.2
2.0–1.0	16.7 ± 0.3	17.3 ± 0.3
1.0–0.5	23.0 ± 0.2	26.4 ± 0.7
0.5–0.25	21.5 ± 0.2	22.7 ± 0.4
0.25–0.125	12.7 ± 0.6	11.0 ± 0.5
0.125–0	8.6 ± 0.5	4.8 ± 0.1

数値は平均±標準偏差(n = 3)を表す.

3.3.3.3 ヤナギ材廃菌床の酵素糖化

ヤナギ材廃菌床の酵素糖化により得られた Glc の量および糖化率を**図 3-10** に示す。72 時間の酵素糖化によりオノエおよびキヌの廃菌床からそれぞれ 176 および 181 mg/g-基質 の Glc が得られ、このときの糖化率はそれぞれ 56.4 および 61.1%であった。統計的には、これら Glc 量および糖化率には有意差はなかった。（Student's t test、有意水準 5%）。これらの糖化率は、20 FPU/g-基質 の酵素量を用いた前項までのナラ-カンバ材保蔵廃菌床と同等な値である。

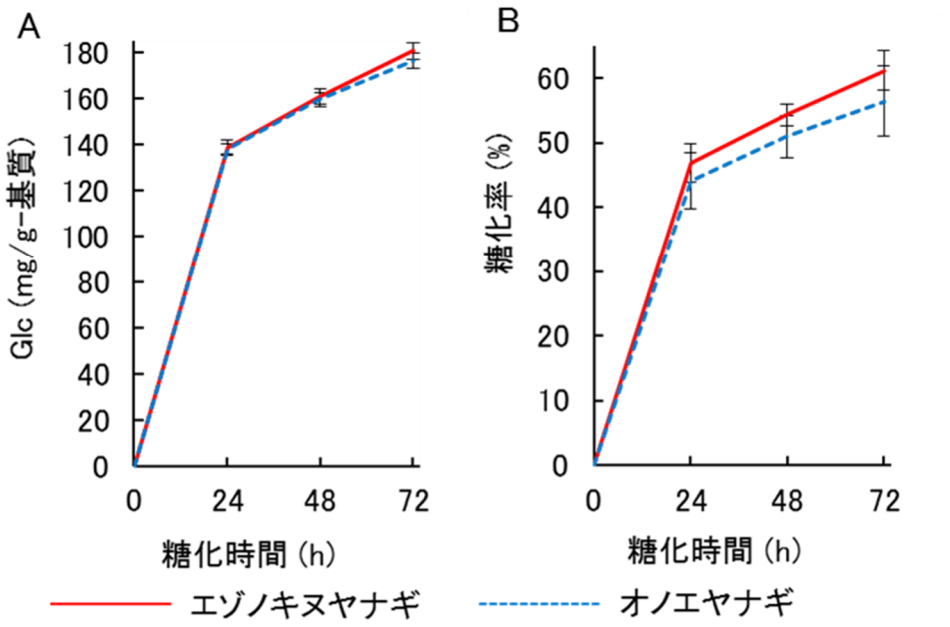


図3−10. ヤナギ材シイタケ廃菌床の酵素糖化により生成したGlcの量(A)と廃菌床中セルロースの糖化率(B).
n = 3, エラーバーは標準偏差を示す. 酵素糖化条件: 酵素量5 FPU/g−基質, 40℃.

各種廃菌床に対する糖化性を比較するために、酵素量 5 FPU/g-基質 を用いた糖化結果を**図 3-11** に示す。ヤナギ材廃菌床の糖化率は、ナラ-カンバ材廃菌床よりも高かったが、ヤナギ材廃菌床は収穫延長処理（5 回収穫）を行っているために、比較は無意味である。したがって、ナラ-カンバ材の保蔵処理および収穫延長処理廃菌床と比較すると、同程度の糖化率が得られた。一見するとヤナギ材廃菌床の利点は感じられないが、ヤナギ材廃菌床が大きな粒子への粗粉砕、ナラ-カンバ材では小径粒子への粉砕といったことから、大粒子でも同等な糖化が可能であったことが優位な点として挙げられる。

3.4 小括

ナラ-カンバ材廃菌床について、菌糸と菌床の接触時間を延長する保蔵処理および収穫延長処理を行うことにより、乾燥重量が減少した。これは、処理前に比

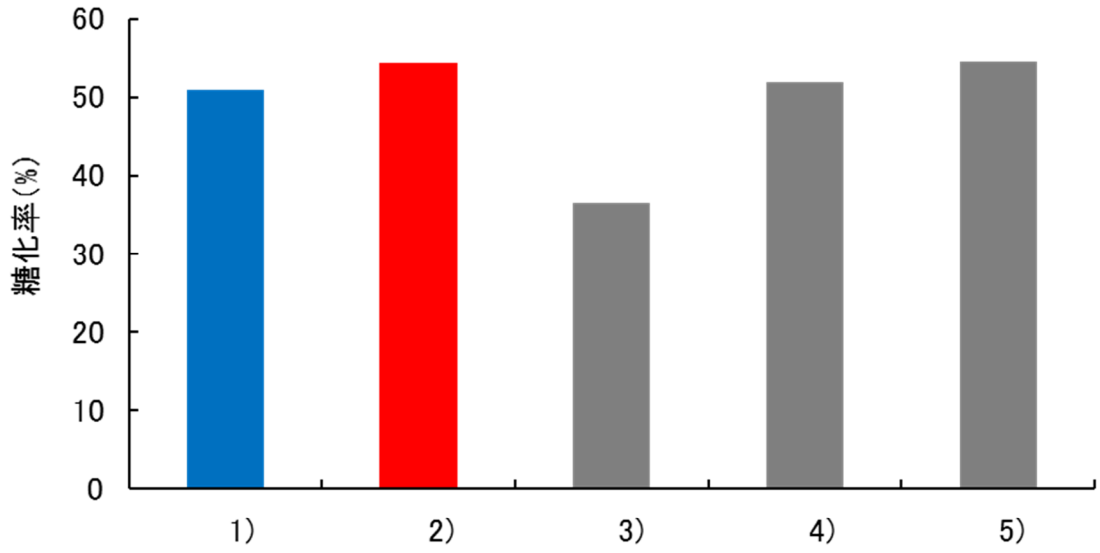


図3−11. 酵素量5 FPU/g−基質で48時間酵素処理したときのヤナギ材およびミズナラ・シラカンバ材廃菌床の糖化率.
1), オノエ廃菌床. 2), キヌ廃菌床. 3), ミズナラ・シラカンバを培地基材とした廃菌床（図3−5より引用）. 4), 3)を25℃2か月保蔵処理した廃菌床（図3−5より引用）. 5), 3)を収穫期間延長処理した廃菌床（図3−6より引用）.

べ、木質成分の減少を意味したが、糖化率は向上した。この糖化性の向上は、酵素使用量の低減を可能にさせた。具体的には、1/4 の糖化量でも、糖化率が 58%から 53%と若干低下した程度であった。エタノール原料となる Glc の収量の面では、処理を経ても、元の廃菌床から得られる収量は同じであった。よって、菌糸の接触時間の延長、特に、保蔵処理は、廃菌床の長期保存を可能にしつつ、少ない酵素量で保存前と同等量の Glc を得るといった点で優位といえる。

また、ナラ-カンバ材廃菌床の蒸煮処理は大幅に酵素糖化性を改善し、非常に有望な酵素糖化前処理であることが示された。しかし、210℃という高温水蒸気が必要なため、製造コストおよび LCA の観点からの検討が必要である

ヤナギ材廃菌床は、ナラ-カンバ材収穫延長処理廃培地と同等の糖化性を示した。この培地では、5 回目まで連続的に子実体が収穫できたこと、および大粒径の廃培地でも糖化できたことは、ヤナギ材廃菌床の優位性を示していると考える。

第 4 章　シイタケ廃菌床の同時糖化発酵によるエタノール製造

4.1　目的

2 章および 3 章で北海道のシイタケ廃菌床が酵素糖化可能であることを明らかにした。本章では、有望なシイタケ廃菌床と推定されたヤナギ材廃菌床を用いて、その酵素糖化糖化液の発酵性と、高濃度バイオエタノール製造を目的として、廃菌床の同時糖化発酵を検討した。

高濃度のバイオエタノールの製造が、蒸留コストの低減に必要である。それには、高 Glc 濃度の糖化液が要求されるが、セルラーゼによる糖化では、Glc 濃度の上昇は生成物阻害を引き起こし、高濃度 Glc の製造を困難にしている。そこで、本件では、生成物阻害を緩和する同時糖化発酵法を適用することにした。この方法では、糖化で生成した Glc が直ぐに酵母でエタノール発酵されるために、反応系内の Glc 濃度はそれほど上昇しない。そこで、50 g/L を目標エタノール濃度と設定し、これを少ない酵素量で達成する条件について探索した。

4.2　実験

4.2.1　糖化発酵用廃菌床の調製

ヤナギ材廃菌床を、**図 4-1** に示す手順に従い、同時糖化発酵（Simultaneous Saccharification and Fermentation; SSF）のための数種の廃菌床を調製した。まず、オノエ乾燥廃菌床は、子実体収穫後のオノエ廃菌床を、50–60℃のオーブンで含水率が 10%以下になるまで乾燥し、10 mm の目皿を備えたロートプレックス粉砕機で粉砕したものである。オノエ生廃菌床は、廃菌床を 5℃で 4 週間保存し、その後、この廃菌床を 4×4×4 cm の角片になるように手でほぐしたもので、ほぐして直ぐに SSF に供した。この生廃菌床を乾燥し、ロートプレックスで粉砕し

たものをオノエ保存廃菌床と呼ぶ。また、キヌヤナギ材廃菌床は、乾燥・粉砕したものだけを調製し、キヌ乾燥廃菌床と呼ぶ。

オノエ生廃菌床は、さらに乾燥させたのち、目開き 1、2、4、20、31.5 および 40 mm を用いて篩分けを行い、粒度分布を調べた。同様に、オノエ保存廃菌床の粒度分布も、目開き 0.125、0.25、0.5、1、2、および 4 mm の篩を用いて行った。

全ての廃菌床は、SSF に供する直前に、105℃オーブンで一昼夜乾燥させる方法、または赤外水分計（FD-720、Kett 製）を用いて含水率を測定した。

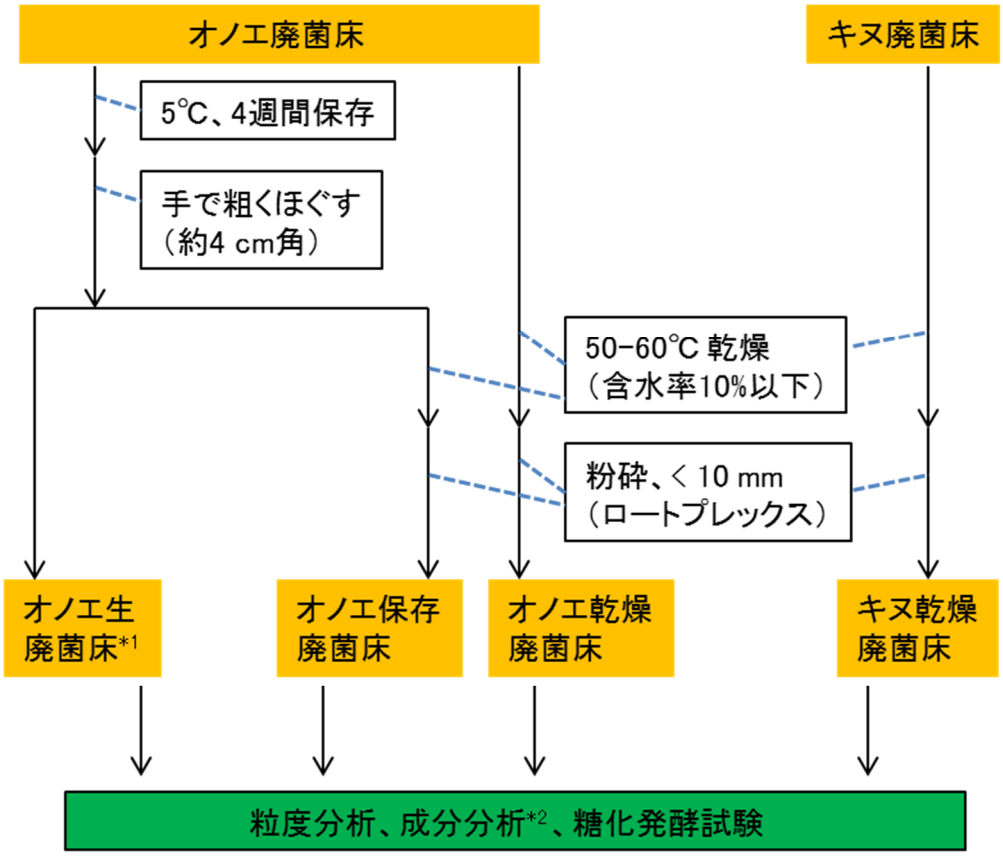


図4–1. 糖化発酵試験に供した廃菌床試料.
*1 この廃菌床の粒度分布測定は，乾燥後（含水率10%以下）行った. *2 成分分析はオノエ乾燥とキヌ乾燥廃菌床についてのみ行った.

4. 2. 2 酵素糖化

廃菌床の酵素糖化および次項の SSF 実験では 3-L 容のジャーファーメンター（**写真 4-1**；BJ30-N、東京理化器械製）を使用した。このジャーファーメンターには、攪拌機（NZ-1200、東京理化器械製）が設置され、テフロンの撹拌翼（T-12、東京理化器械製）を取り付けて、特に明記しない限り 200±5 rpm で作動させた。また、ジャーファーメンターに低温恒温水槽（NCB-2500、東京理化器械製）からの配管を接続し、温度を制御した。



写真4-1. 3-L容ジャーファーメンターとテフロン撹拌翼.

オノエ乾燥廃菌床を絶乾重量で 15、177 および 198 g の基質をジャーファーメンターに入れ、0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液（pH4.8）を廃菌床に含まれる水と合わせて、それぞれ 750、588 および 567 ml となるように投入した。これに

より、菌床濃度 2、30 および 35%（w/v）の糖化用懸濁液を調製した。この懸濁液を 50℃に加熱後、5 FPU/g-基質 となるようにメイセラーゼと、153 mg のアジ化ナトリウムを加えた。この章で用いたメイセラーゼは、396 FPU/mg-酵素であった。糖化中、糖化液の pH を 4.3–4.8 となるように、固体の水酸化ナトリウムを 24 時間毎に加えた。糖化液の一部を 24 時間ごとに取り出し、Glc 量を HPLC で測定し、下記の式（4-1）により Glc 濃度を算出した。

$$\text{グルコース濃度(g/L)} = \frac{\text{グルコース(g)}}{\text{基質中および緩衝液中の水量の合計(L)}} \qquad \text{式(4-1)}$$

4.2.3 SSF 試験

基質となる廃菌床の乾燥重量を 198 g として、基質濃度を 35%なるようにクエン酸緩衝液（0.1 M, pH4.8）を加え、50℃で所定時間糖化を行った。この工程を先行糖化と呼ぶ。その後、ジャーファーメンターの温度を 30℃に下げて、乾燥酵母（Ethanol Red, Lesaffre Yeast Co.）を式 4-2 に示す濃度により所定量を投入して発酵を行った。

$$\text{酵母添加量(\%)} = \frac{\text{乾燥酵母(g-気乾)} \times 100}{\text{緩衝液量と基質中の水の量の合計(ml)} + \text{基質(g-絶乾)}} \qquad \text{式(4-2)}$$

文献によると、Ethanol Red は Glc、Fru、およびスクロースを約 90%の変換率でエタノールに変換できる（Imam and Capareda、2011）。

24 時間毎に pH を測定し、pH が 4.3–4.8 となるように固体の水酸化ナトリウムを加えた。また、発酵液の一部を 24 時間ごとに取り出し、HPLC で Glc 量とエタノール量を測定した。エタノール測定には、Aminex HPX-87H（Bio-Rad Laboratories 製）カラムを使用し、カラム温度を 60℃、溶離液として 0.005 M の

硫酸を用い、流速は 0.7 ml/min とした。検出器には、示差屈折計を使用し、エタノール濃度は下記の式（4-3）により算出した。

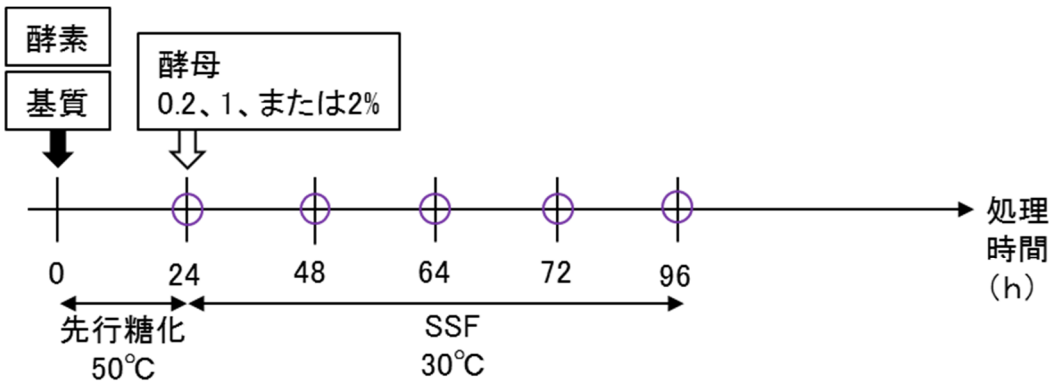
$$\text{エタノール濃度(g/L)} = \frac{\text{エタノール(g)}}{\text{基質中および緩衝液中の水量の合計(L)}} \qquad \text{式(4-3)}$$

エタノール収率の計算においてはグルコース 1 mol からエタノールが 2 mol が理論的に得られるとし［式（4-4)］、セルロースから得られるグルコースに 0.51 を乗じた値を基準にし、エタノール収率を式（4-5）により算出した。

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2 \qquad \text{式(4-4)}$$

$$\text{エタノール収率(\%)} = \frac{\text{糖化発酵により得られたエタノール(g)} \times 100}{\text{基質含有セルロースから得られるエタノール理論量(g)}} \qquad \text{式(4-5)}$$

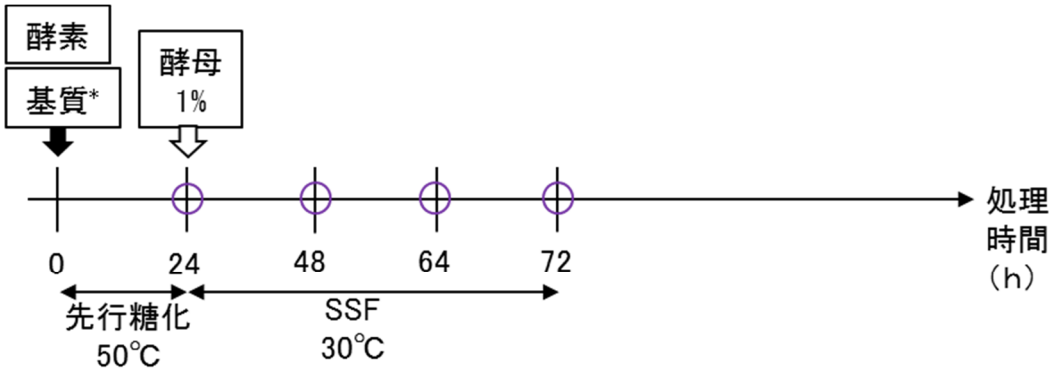
下記の**実験 4-1** に示す、酵母添加量を 0.2%、1%および 2%とした SSF 試験を行った。



実験4-1. 酵母添加量を変えたSSF試験の工程図.

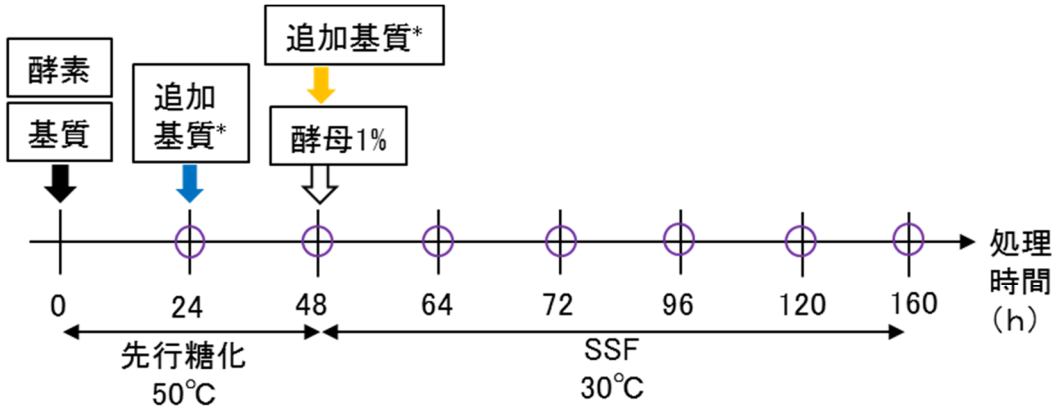
◯はGlcおよびEtOH濃度分析用試料採取を表す.

下記の**実験 4-2** に示す､基質にオノエ生廃菌床とオノエ保存廃菌床を用いた SSF 試験を行った。



実験4-2. オノエ生廃菌床とオノエ保存を基質としたSSF試験の工程図.
◯はGlcおよびEtOH濃度分析用試料採取を表す.*基質: オノエ生廃菌床または オノエ保存廃菌床.

下記の**実験 4-3** に示す、先行糖化時間を 48 時間とし、酵母添加前に基質を追加投入した SSF 試験を行った。



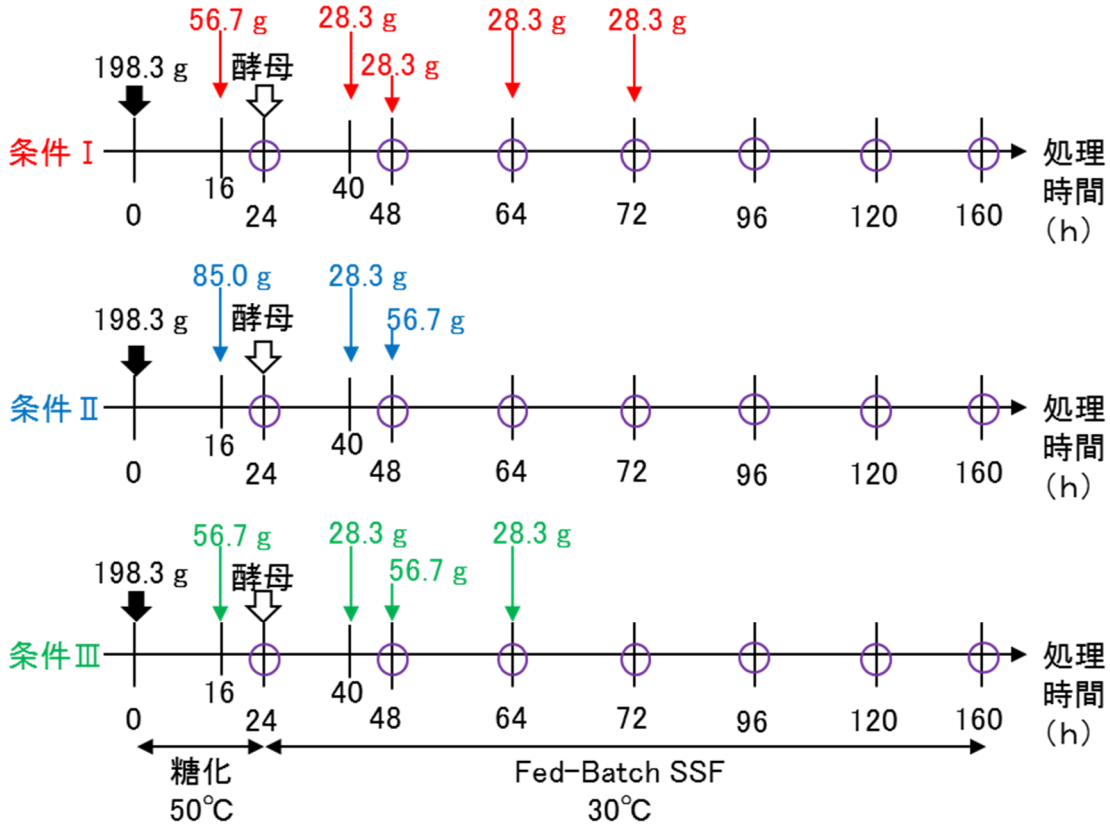
実験4-3. 先行糖化を48時間とし、基質を追加投入したSSF試験の工程図.
◯はGlcおよびEtOH濃度分析用試料採取を表す.* 追加基質は乾燥重量0または56.7 g(追加後基質濃度35%または44.6% w/v)で, 24または48 hに投入した.

4. 2. 4 基質随時追加型同時糖化発酵(Fed-Batch Simultaneous Saccharification and Fermentation; Fed-Batch SSF)

所定時間毎に基質およびメイセラーゼを追加して行う同時糖化発酵（Fed-Batch SSF）では、50℃の先行糖化を 24 時間行い、ジャーファーメンター内の温度を 30℃に下げて、1%の酵母添加量で行った。

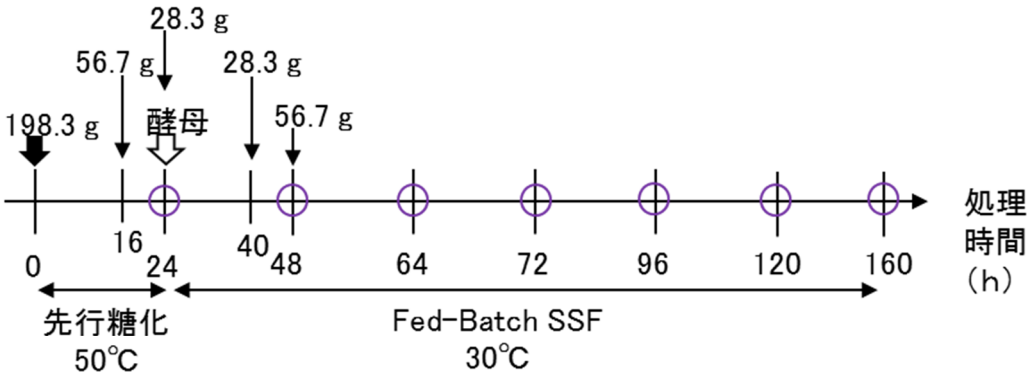
全ての実験において、最初の基質濃度は 35%（w/v）で、最終的には、基質濃度が 72%（w/v）になるまで、基質を加えた。基本的には、24 時間毎にジャーファーメンター内の液（以下、発酵液）を取り出し、Glc 量とエタノール量を HPLC で測定し、これらの濃度変化を追跡した。

下記の**実験 4-4** に示す、基質の投入時期を変えた Fed-Batch SSF 試験を行った。



実験4-4. 基質の投入時期を変えたFed-Batch SSF試験の工程図..
○はGlcおよびEtOH濃度分析用試料採取を表す.

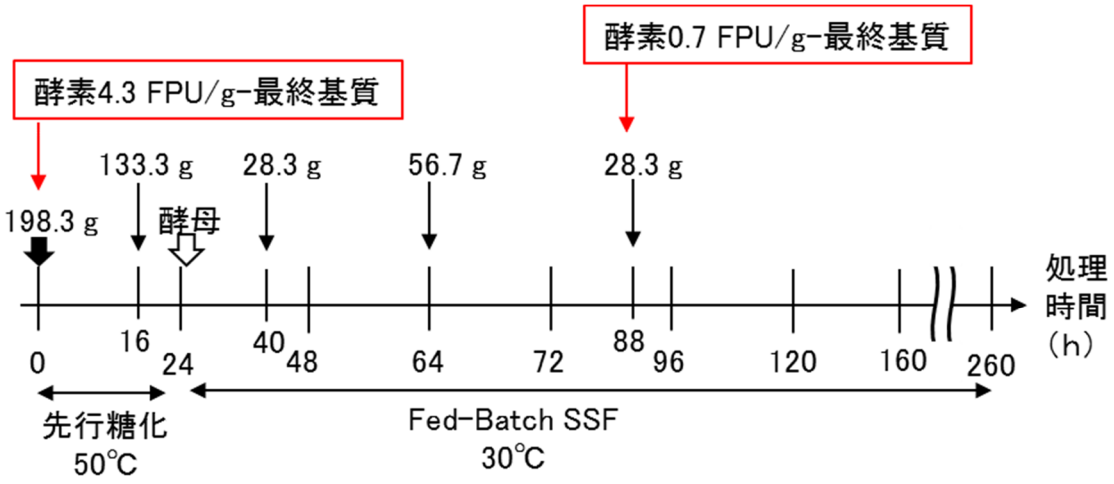
下記の**実験 4-5** に示す、酵素の投入時期と量を変えた Fed-Batch SSF 試験を行った。



実験4-5. 酵素の量と投入時期を変えたFed-Batch SSF試験の工程図.

○ はGlcおよびEtOH濃度分析用試料採取を表す. 図中の重量(g)は投入した基質の乾燥重量を示す. 以下の3条件の酵素投入方法を行った. 条件a: 5 FPU/g-初発基質 の酵素を開始時に加え酵素の追加はなし(2.7 FPU/g-最終基質), 条件b: ジャーファメンター内が常に5 FPU/g-基質 となるように基質追加に合わせ随時酵素投入, 条件c: 5 FPU/g-最終基質 となる酵素量を開始時に投入.

下記の**実験 4-6** に示す、基質濃度を 72%とした Fed-Batch SSF 試験を行った。



実験4-6. 基質濃度を72%としたFed-Batch SSF試験の工程表.

図中の重量(g)は投入した基質の乾燥重量を示す.

4. 2. 5 統計処理

異なる基質濃度における糖化率の等分散性を Bartlett's test により検定した。等分散性が認められた、異なる基質間の糖化率の有意差を一元配置分散分析および Tukey-Kramer test により検定した。等分散性が認められなかった、異なる基

質間での糖化率の有意差は Games-Howell test により検定した。

実験 4-2 の Glc およびエタノールの濃度の等分散性を F test により検定した。等分散性が認められた同時間における基質間の有意差を Student's t test により検定した。

4.3 結果と考察

4.3.1 粒度分布

手でほぐしただけのオノエ生廃菌床の粒度分布、およびロートプレックスで粉砕したオノエ保存廃菌床の粒度分布を**表 4-1** に示す。手でほぐしただけの廃菌床は、微粉砕しない試料でも SSF が進行することを確認するために準備した試料であり、意図したとおり、31.5 mm 以上の画分が 94%を占めた。一方、オノエ保蔵廃菌床は、3 章（3.3 項）で示した保存期間を設けないオノエの廃菌床と類似の粒度分布を示した。したがって、低温の 5℃で 1 か月保存しても、粉砕性は向上しなかった。

表4-1 オノエヤナギ材廃菌床の粒径別割合

	粒度別割合(%)	
粒径 (mm)	生廃菌床*	保存廃菌床*
> 40	69.3 ± 2.6	
40–31.5	25.3 ± 2.3	
31.5–20	2.6 ± 0.7	
20–4.0	0.9 ± 0.8	4.0 ± 1.0
4.0–2.0	0.4 ± 0.3	17.7 ± 1.9
2.0–1.0	0.4 ± 0.1	18.9 ± 1.0
1.0–0.5	–	19.5 ± 0.6
0.5–0.25	–	17.7 ± 0.9
0.25–0.125	–	12.4 ± 0.6
0.125–0**	1.1 0.3	9.8 ± 0.3

* 図4-1参照. ** オノエ生廃菌床においては1.0–0 mmの値を示す. 数値は粒度別割合の平均±標準偏差(n = 3)を示す.

4. 3. 2　基質濃度を変えた酵素糖化

SSF は高基質濃度での反応を意図しているが、一般に、基質濃度が上昇すると、糖化率が低下する（Viikari ら、2012）。そこで、SSF の初期基質濃度を設定する目的で、高濃度基質に対する糖化性を検討した。

図 4-2 に、オノエ乾燥廃菌床を基質とし、種々の基質濃度で 96 時間まで糖化を行った時の、糖化率を示す。これまで行ってきた基質濃度 2%の場合が、24 時間糖化までは最も糖化速度が速かった。しかし、基質濃度 30%および 35%でも糖化が進行し、基質濃度 35%では、72 時間糖化で基質濃度 2%と同等の糖化率を示すようになった。72 時間以降も糖化は継続され、96 時間では糖化率が 50%を越えた。このときの Glc 濃度は 77 g/L となり、同じ糖化率のときの Glc 濃度（4 g/L）の 19 倍となっているが、今回の実験条件における廃菌床の糖化では、

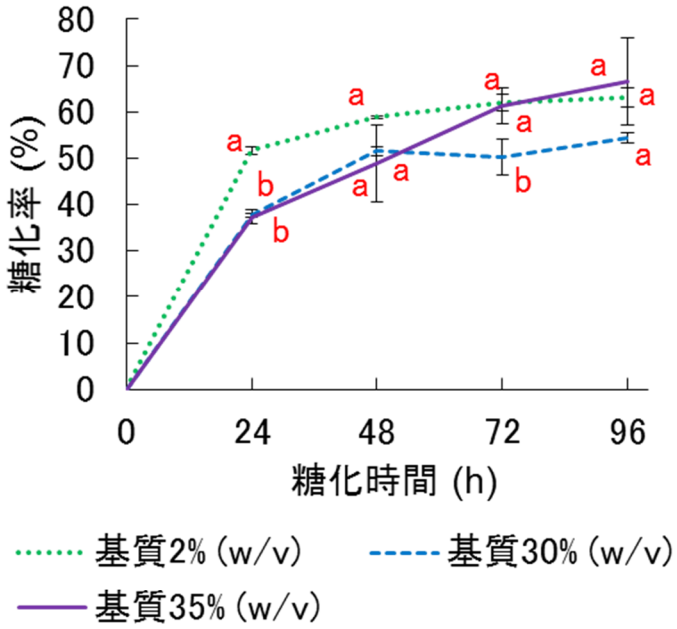


図4-2　基質濃度を変えたときのオノエ材廃菌床の糖化率
n = 3, エラーバーは標準偏差を示す. アルファベットは基質濃度間の有意差を示す（48時間はGames-Howell test, それ以外はTukey-Kramer test, 有意水準は5%）. 糖化条件: 50℃、酵素量5 FPU/g-基質.

危惧された生成物による生成物阻害は顕著には起きていないことが推測された。この結果から、以降の SSF 試験では、初期の基質濃度を 35%とすることにした。

4.3.3 SSF 試験

4.3.3.1 酵母添加量の最適化

先行糖化を行った培地に酵母を加え、発酵を試みた。先行糖化を行う SSF は、厳密には、Semi SSF と呼ばれ、SSSF という略号が用いられる。そこで、まず、SSSF における廃菌床の発酵性と、最適酵母添加量を検討した（**図 4-3**）。この実験では、24 時間後に 0.2～2%の酵母を加えている。図から明らかなように、酵母の添加によって、Glc 量が減少し、エタノールの濃度が上昇している。このことは、廃菌床の酵素糖化液が、発酵原料となることを意味している。リグノセルロース系の SSF では、酵素糖化前処理中に生じるフルフラール類が発酵阻害にを引き起こすことが示唆されており（(財) 地球環境産業技術研究機構、2008）、この物質の生成を抑制することに注意が払われているが、この廃菌床では、この危惧がないことが示された。

次いで、最適酵母量について、考察する。酵母量 1%の条件が、72 時間で最も高いエタノール量（濃度）を与えた。エタノール濃度はその後減少するために、多くの酵母の存在が生成したエタノールの消費または分解を引き起こすと考え、以下の SSSF 実験は、1%酵母量で行うことにした。

4.3.3.2 オノエ生廃菌床の SSSF

子実体収穫後で湿潤状態を維持している廃菌床を SSF に供することができるか、さらに、この廃菌床を手で荒くほぐすだけでエタノール製造できるかといった観点から、オノエ生廃菌床を SSSF 実験に供し、前項の乾燥粉砕した廃菌床

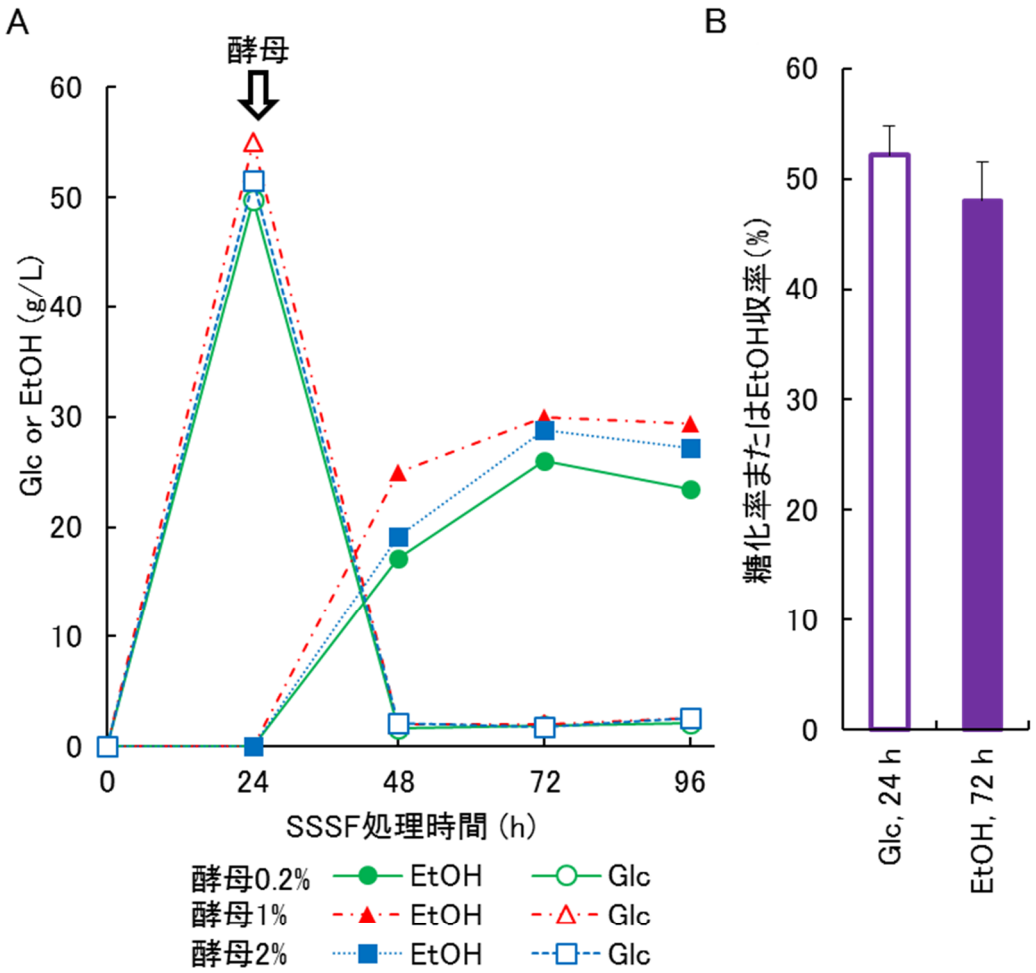


図4-3 酵母添加量を変えたSSSFによって得られたGlc量および生成エタノール濃度. (A), SSSF96時間までの変化; (B), 24時間後の糖化率と72時間後のエタノール収率(B)

SSSF条件: 基質濃度35%(w/v), 酵素量5 FPU/g-基質, 50℃で24時間の先行糖化の後に30℃に温度を下げて乾燥酵母を添加(実験4-1). Bは3条件の平均を示し, エラーバーは標準偏差を表す.

(オノエ保存廃菌床)との結果と比較した(**図 4-4**)。

この両者の 24 時間後 Glc 生成量、および 48-72 時間後のエタノールの濃度を比較すると、統計的な有意差が認められず(Student's t test、有意水準 5%)、未粉砕廃菌床が乾燥粉砕廃菌床と同等の糖化発酵性を有することがわかった。

SSF の工業化を想定した時、粉砕の必要がないことは大きな利点である。しかし、実験室で、SSF の有効性を確認するには、水分管理や保存性といった面から乾燥粉砕物の方が取り扱いやすいので、以降の実験では乾燥粉砕物を用いた。

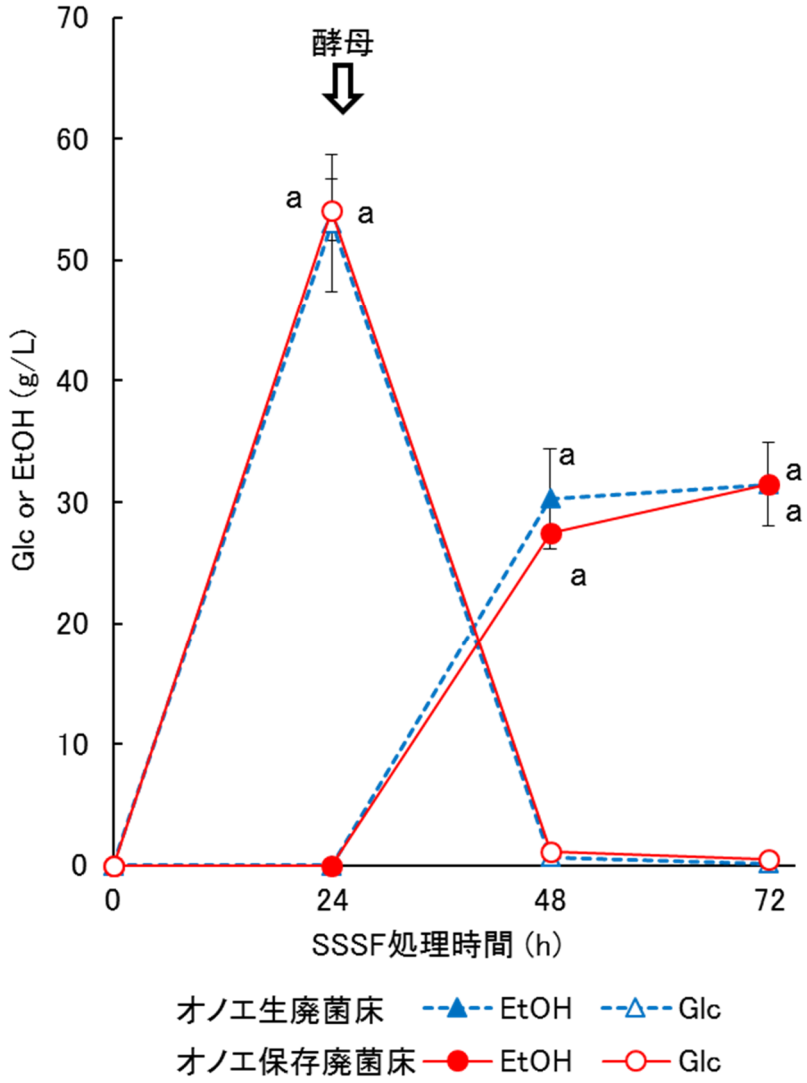


図4-4 オノエ材廃菌床のSSSFによって得られたGlc量および生成エタノール濃度. SSSF条件: 基質濃度35%(w/v), 酵素量5 FPU/g-基質, 50℃24時間の先行糖化の後に温度を30℃に下げて乾燥酵母を添加(実験4-2). n = 3, エラーバーは標準偏差を表す. アルファベットは基質間のGlcあるいはEtOH濃度の有意差を示す(Student's t test, 有意水準5%).

4. 3. 3. 3 SSSF における基質濃度の上昇と先行糖化時間の延長効果

前項までの SSSF 試験では基質濃度 35%で先行糖化時間を 24 時間とた、酵母の投入で 24 時間以内に生成した Glc が消費されていた。そこで、先行糖化時に、基質を追加し、さらに、糖化時間を延長することで、生成 Glc 量が増加し、得ら

れるエタノール濃度が高まると考えた。そこで、基質を追加投入して、最終基質濃度を 44.6%まで増加させると共に、先行糖化時間も 48 時間に延長した SSSF 試験を行った。この結果を、**図 4-5** に示す。基質を追加しないで、先行糖化時間

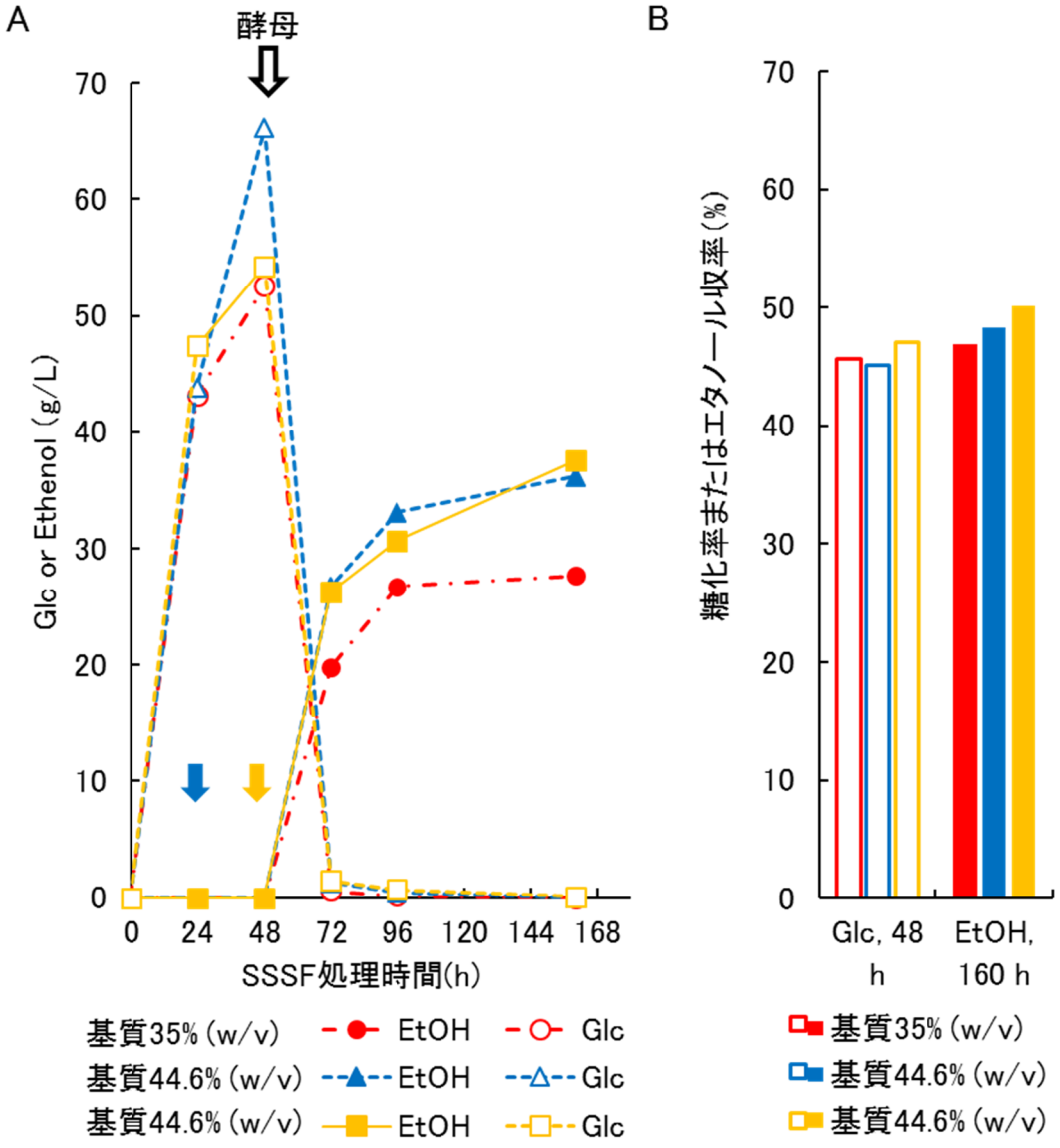


図4-5. 48時間先行糖化のSSSFによって得られたGlc量と生成エタノール濃度. (A), SSSF160時間までの変化; (B), 48時間後の糖化率と160時間後のエタノール収率.

⬇ および⬇ : 基質の追加投入を示す. 基質濃度: 初発の基質濃度を35% (w/v)とし, 追加投入した条件では44.6% (w/v)とした. 酵素量: 開始時に5 FPU/g-最終基質 の酵素を添加. SSSF: 50℃で48時間先行糖化した後に30℃に温度を下げて乾燥酵母を加えた(実験4-3)

のみを延長しても効果がなかった。基質を 24 時間目に追加した実験（図中の青線）と、48 時間目に追加した実験（黄色線）では、顕著にエタノール濃度（図 4-5A）が上昇した。エタノール収率（図 4-5B）も若干増加し、基質投入が有効に働いていることが確認された。投入時期は、エタノール生成にほとんど影響を与えなかった。

4. 3. 3. 4 基質の投入時期を変えた Fed-Batch SSF

前項の基質を先行糖化時に追加しても、酵母には 24 時間以内に消費され、その後のエタノール濃度の向上を期待できなかった。そこで、酵母投入後にも基質を投入する Fed-Batch SSF を検討した。エタノールを短時間で製造する観点から、先行糖化時間は 24 時間とした。この実験では、酵素の追加は行わなかった。

実験 4-4 に示すように基質の投入時期を変え、最終基質濃度が 63%なるようにした（**図 4-6**）。いずれの方法でも、160 時間の処理で、約 45 g/L のエタノールを与えた。35%基質濃度では、25 g/L のエタノール濃度であったことから、基質濃度の上昇がエタノールの濃度の上昇に大きく寄与することが示された。

図 4-6 中の赤い線において、エタノール濃度の減少が現れているが、ジャーファーメンターの撹拌が不十分であり、系内のエタノール濃度が均一でなかったことに起因している。そこで、以降の試験では、基質追加投入時および分析用試料採取時に、手動による撹拌を行うことにした。

4. 3. 3. 5 Fed-Batch SSF における酵素の分散投入

酵素添加量の低減を目的に、前項の実験の約半分量（2.7 FPU/g-最終基質）の酵素と、総酵素添加量は 5 FPU/g-最終基質と同じだが、基質投入に連動して系内の酵素量を常に 5 FPU/g-最終基質とする分散投入について検討した（**図 4-7**）。

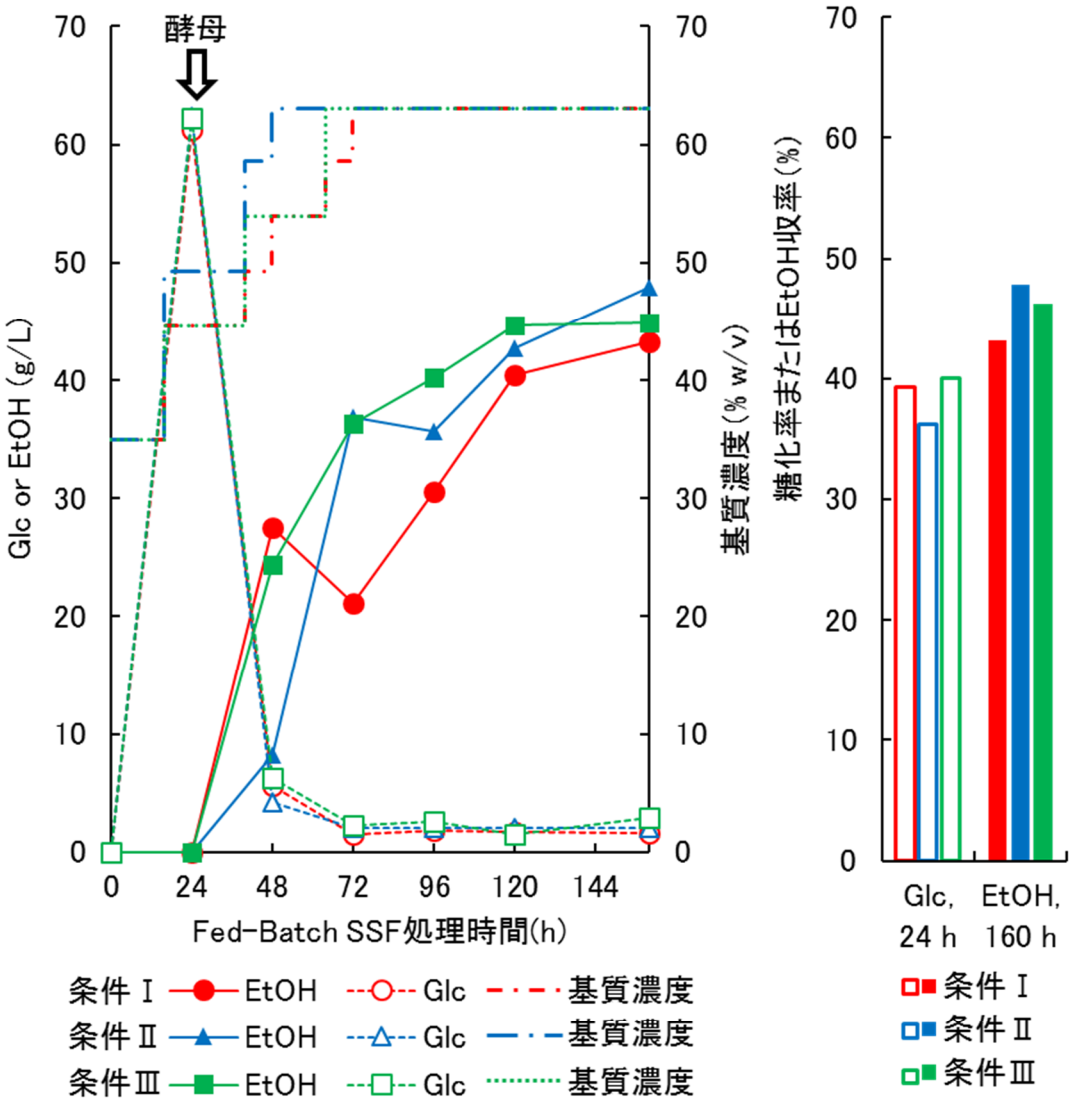


図4-6 基質濃度の上昇によるFed-Batch SSFによって得られたGlc量と生成エタノール濃度.(A), 160時間までの変化; (B), 24時間後の糖化率と160時間後のエタノール収率.
条件 I ～III では実験4-4のスケジュールで基質を追加投入した. 酵素量: 開始時に5 FPU/g-最終基質 の酵素を添加. Fed-Batch SSF: 50℃で48時間先行糖化した後に30℃に温度を下げて乾燥酵母を加えた.

酵素量を半分にすると、エタノール濃度も減少し、酵素量の低下は図れなかった。分散投入でも、エタノール濃度は図 4-6 と同じであり、エタノール濃度の向上は達成できなかった。

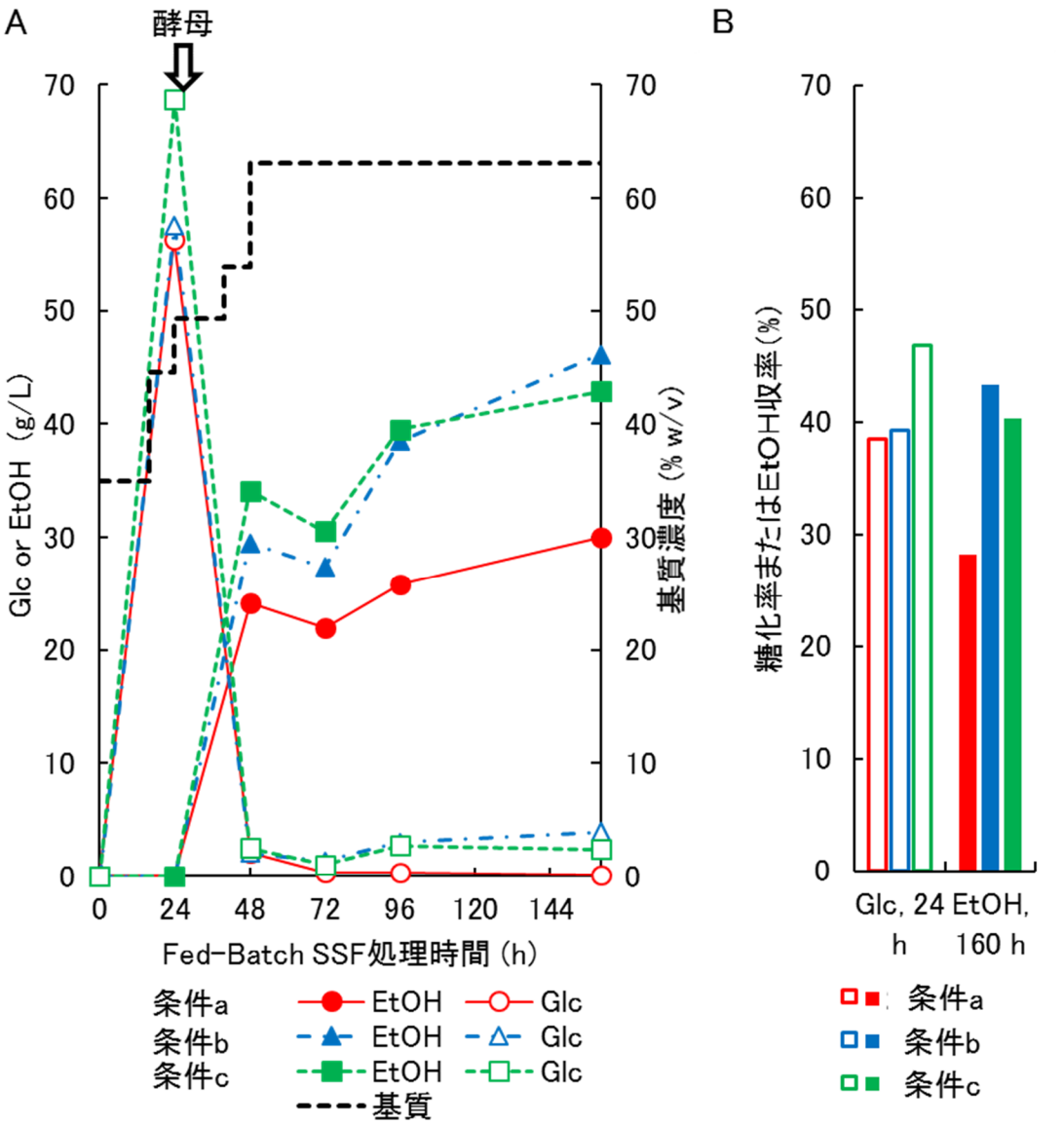


図4-7 酵素分散投入のFed-Batch SSFにより得られたGlc量と生成したEtOH濃度.(A),160時間までの変化;(B),24時間後の糖化率と160時間後のエタノール収率.

条件a: 5 FPU/g-初発基質 の酵素を開始時に加え酵素の追加はなし(2.7 FPU/g-最終基質), 条件b: ジャーファメンター内が常に5 FPU/g-基質 となるように基質追加に合わせ随時酵素投入, 条件c: 5 FPU/g-最終基質 となる酵素量を開始時に投入. Fed-Batch SSF: 50℃で48時間先行糖化した後に30℃に温度を下げて乾燥酵母を加えた(実験4-5).

4.3.3.6 基質濃度 72%を用いた Fed-Batch SSF

エタノール濃度を目標値とした 50 g/L に上昇させるために、より高濃度基質

での Fed-Batch SSF の試みとして、この項では、最終基質濃度を 72.1%に設定した SSF を試みた。セルラーゼの使用量は、最終基質量に対し 5 FPU/g-基質 になるように設定し、最初の先行糖化時に 4.3 FPU/g-最終基質、96 時間後に残りの 0.7 FPU/g-基質 を加えた。この結果を**図 4-8** に示す。160 時間の SSF で、エタノール濃度が目標値を超えた 53 g/L となり、232 時間経過時の最大エタノール濃度の 56 g/L に達した。160 および 232 時間のエタノール収率はそれぞれ 41 および 46%であった。46%のエタノール収率を得るには、72.1%の高基質濃度において理論的には約 50%の糖化率が必要であり、Fed-Batch SSF では高い糖化率も達成されている。

4.4 小括

基質濃度 35% (w/v)で酵素糖化を行っても、基質濃度 2% (w/v)よりも時間はかかるが 50%以上の糖化率を達成した。廃菌床の糖液は酵母添加から 24 時間で速やかにエタノールに変換され、発酵原料となることが示された。

ジャーファーメンターに入れるために手でほぐしただけの生の廃菌床もからも、SSF によりエタノール製造が可能であることを明らかにした。Fed-Batch SSF では、基質を最終濃度 72.1% (w/v)まで追加投入することで、処理 160 時間でエタノール濃度が 50 g/L を超え、232 時間の時点で最高の 56 g/L に達した。また、この実験からも、有効な最小酵素量は 5 FPU/g-基質 であることが示された。

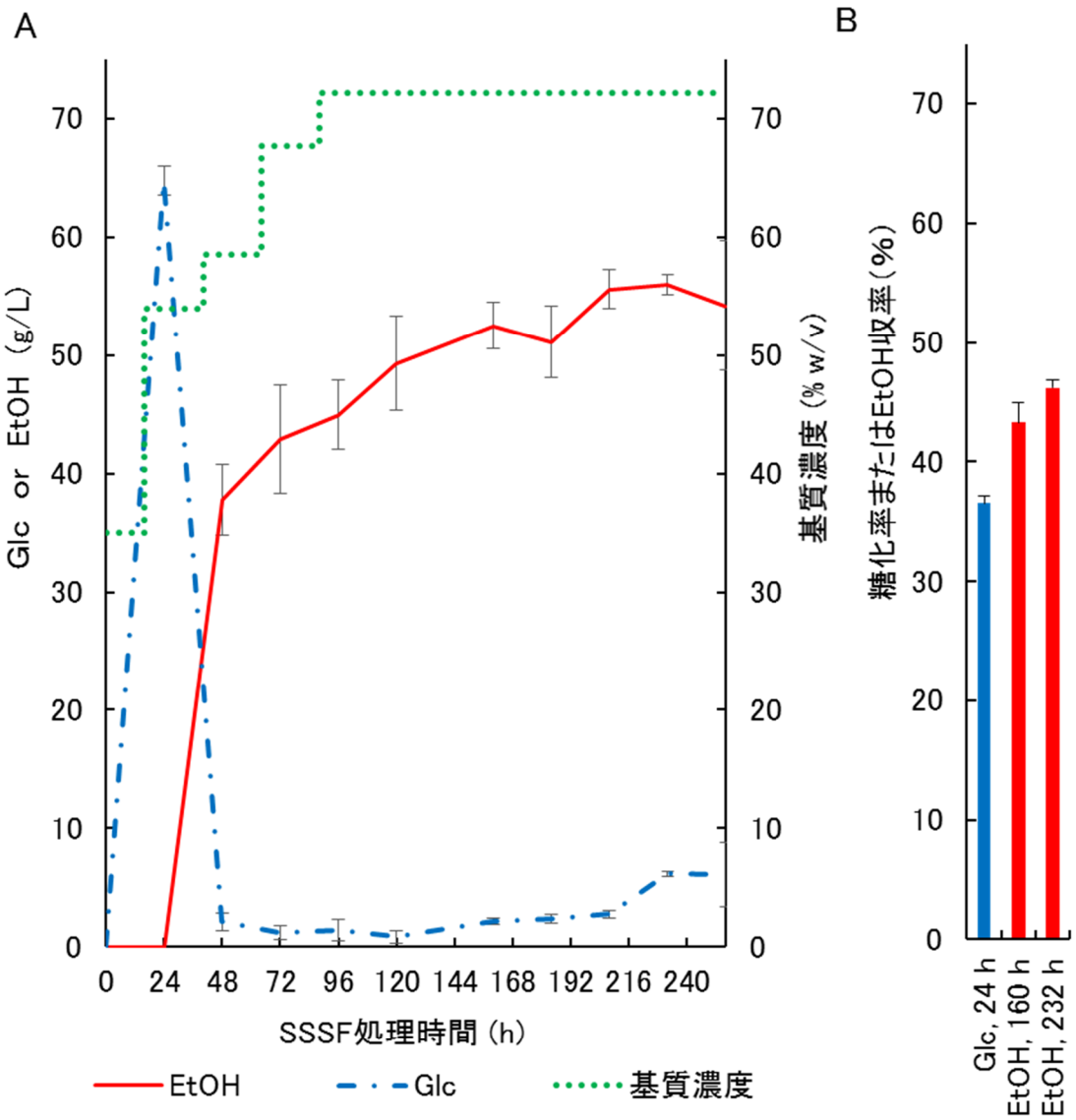


図4-8. 基質濃度を72.1%(w/v)としたFed-Batch SSFにより得られたGlc量と生成したエタノール濃度.(A), 256時間までの変化;(B), 24時間後の糖化率と, 160および232時間後のエタノール収率..

酵素: 開始時および88時間後にそれぞれ酵素量4.3および0.3 FPU/g-最終基質 となる酵素を添加. Fed-Batch SSF: 50℃で48時間先行糖化した後に30℃に温度を下げて乾燥酵母を加えた(実験4-6).

第 5 章　総括

本論文では、北海道における非可食資源由来のバイオエタノール製造に対して、調達費用が安く、供給安定性が高いことから、原料供給面で優位性があるシイタケ廃菌床について、まず廃菌床の成分特性を調べ、その酵素糖化適性を評価した。廃菌床には酵素糖化の原料になり得るセルロースが乾燥重量の 27%残存していることが示された。培地中のセルロースはシイタケ栽培により絶対量は減少するが、栽培前後の菌床における含有割合は不変であった。廃菌床に残存するセルロースは 24 時間の酵素（セルラーゼ）処理で 39%が糖化されてグルコース（Glc）となり、栽培前の培地と比べて糖化率は 2.8 倍と大きく向上していた。この糖化性向上は、シイタケ栽培によるリグニンとヘミセルロース量の減少および、粉砕性の向上による菌床内の木質の酵素に対する受容性の向上に起因すると考えられた。

次に、廃菌床の糖化率の向上と酵素使用量低減のための前処理について検討した。酵素糖化法によるバイオエタノール製造においては、可能な限り簡易な前処理で糖化率を向上させること、および酵素コストを低減することが重要である。そこで、(1) 菌糸の活動期間を延長して木質の生分解を進める処理、(2) 廃液処理の観点から水蒸気のみを用いる蒸煮処理、および (3) 早生で軽軟なヤナギ材を培地基材とした廃菌床を酵素糖化の原料とする 3 項目の検討を行った。(3)のヤナギ材の培地では、現在北海道で主流のナラ-カンバを培地基材とした菌床より、大粒のシイタケが多数得られ、長期の収穫も可能な利点があり、これを考慮してシイタケ栽培とバイオエタノール製造を一体化したコンビナートの設立を企図して行った。

(1) シイタケ菌による木質の生分解を進める処理では、1～2 か月間定温保持す

る保蔵処理および、通常の 3 回の収穫回数を 5 回に延長する収穫延長処理の 2 処理を行った。保蔵処理では、木質の生分解により全体重量が減少し、セルロースの絶対量も減少したが、セルロース含有率は処理前と比較して 30%前後と微増した。保蔵処理によるヘミセルロース（キシラン）含有量の減少により糖化率が向上し、25℃2 か月の保蔵処理では酵素量 20 FPU/g-基質 の条件で糖化率が最大 60%となった。元の廃菌床当り得られる Glc 量を計算すると、糖化率の向上効果が Glc の原料となるセルロース量の減少で相殺され、実質的には Glc 収量は同程度となる。しかしながら、保蔵処理は酵素使用量の低減に効果を示した。具体的には、酵素量を 20 FPU/g-基質から 5 FPU/g 基質へと 1/4 に減らした時に無処理の廃菌床では、酵素糖化基質あたり得られる Glc 量が 26%減少したのに対し、25℃2 か月保蔵では 10%の減少に留まった。保蔵処理の結果から次のような利点が考えられた。エタノール製造工場を想定した際に、廃菌床は得られる Glc 量を減らすことなく 5–25℃で 2 か月程度保存可能であることから、一定量の廃菌床を保管しておき、工場の操業に合わせて使用することが可能であり、使用する酵素量も低減される。

収穫延長処理でも保蔵処理と同様に菌床の乾燥重量の減少と酵素糖化率の向上が見られ、収穫延長前後の菌床から得られる Glc 量が同程度となった。収穫延長処理が煩雑であるのに子実体収穫がほとんど望めないことを考慮すると、実質的には、保蔵処理に利点が多い。

（2）酵素糖化による Glc 収量が最大となる蒸煮処理時間は、栽培前の培地では 10 分であったのに対し、廃菌床では 3 分へと短縮された。また、蒸煮後は廃菌床の方が速やかに酵素糖化されたことから、廃菌床は蒸煮効果が高い原料であると評価された。蒸煮前後でセルロース率は減少せず、ヘミセルロース（キシラン）量が減少した。保蔵した廃菌床を蒸煮処理することで糖化率は大幅に向上し、

20 FPU/g-基質の糖化条件で最大で 95%となった。酵素量を 1/4 の 5 FPU/g-基質 に減らしても、糖化時間は 120 時間かかるものの、87%と高い糖化率が得られた。

（3）収穫期間を延長し 5 回収穫を行ったヤナギ材廃菌床には、酵素糖化原料として十分な約 30%のセルロースが残存していた。このヤナギ材廃菌床糖化には、粉砕コストの低減を企図して、粗く粉砕した廃菌床を用いた。具体的には、ナラ-カンバ材廃菌床で行っていた 2 mm 以下から 10 mm 以下へと粉砕条件を変更して、粗粒廃菌床の酵素糖化を行った。この結果、糖化率はナラ-カンバ材廃菌床に対して保蔵処理、収穫延長処理等の前処理を行った場合と同程度であった。このことから、ヤナギ材廃菌床はナラ-カンバ材廃菌床と比較して、糖化適性の高い原料と言える。

バイオエタノール製造にとって重要な課題であるエタノール蒸留にかかるエネルギーを低減するために、50 g/L 以上の高いエタノール濃度を目標値として、ヤナギ材廃菌床を基質とした同時糖化発酵法の開発を行った。まず、予備試験として、高基質濃度での酵素糖化性を調べた。これまでの酵素糖化実験は、酵素反応が容易な高液比条件の基質濃度 2%（w/v）で行っていたが、この予備実験から、基質濃度を 35%（w/v）として、酵素処理時間を延長することにより 50%以上の糖化率を達成した。基質濃度 35%（w/v）で酵素糖化したスラリー中の Glc は、酵母添加により 24 時間で速やかにエタノールに変換され、発酵が順調に進行することが示された。このことは、廃菌床糖化液には、発酵阻害物質が含まれていないことを示唆する。収穫終了直後、40 mm 程度に粗く解しただけの廃菌床は、乾燥後粗粉砕（10 mm 以下）した廃菌床と同等の糖化発酵性を示し、ヤナギ材廃菌床はジャーファーメンターに入る程度に小形化するだけで、糖化発酵に供することができる原料であることが明らかとなった。糖化発酵中に基質

を追加投入する Fed-Batch SSF により、最終基質濃度を 72.1%（w/v）まで高めた結果、160 時間の糖化発酵処理でエタノール濃度が目標値の 50 g/L を超え、232 時間の処理で最高の 56 g/L に達した。この時のエタノール収率は 46%であり、含有セルロースの 50%程度が消費されたと考えらえた。この高基質濃度の糖化発酵実験では酵素量 5 FPU/g-最終基質 で行われており、比較的少ない酵素添加量で廃菌床から高濃度のエタノールを製造することが可能であることが明示された。

以上の結果から、シイタケ廃菌床にはエタノールの出発物質となるセルロースが、酵素糖化性が向上した状態で残存し、簡易な前処理、少ない酵素添加量で高濃度のエタノールを得ることが可能な、非常に優れた原料であることが示され、実用化の可能性を提示することができた。廃菌床由来のバイオエタノール製造の実用化のためには、廃菌床の発生地域を考慮に入れてバイオエタノール工場の立地や規模、操業条件を検討すると共に、コスト試算、採算性分析および LCA による環境負荷削減量の把握を行う必要がある。本研究は、糖化と発酵に関する諸条件、すなわち原料の保存性、化学組成、粉砕性、菌床基材（おが粉）の樹種、基質濃度、酵素添加量、糖化温度、酵母添加量、糖化発酵時間、蒸煮前処理の有無を検討したものである。これら諸条件の検討結果は、実用化に向けた試算やシステム設計を行うための有用な基礎データを与えるものであり、地域資源を有効に利活用したバイオエタノール製造を実用化するための一助となると考えている。

謝辞

本論文の作成にあたり、主査として多大なるご指導を賜りました、北海道大学農学研究院の浦木康光教授に心からお礼申し上げます。同　玉井　裕准教授にも論文のまとめ方に対して多数の的確なるご助言をいただきましたこと、深くお礼申し上げます。同　佐野　雄三教授、幸田　圭一講師には文章の精度を高めるご助言をいただき、厚くお礼申し上げます。

本論文の審査論文の共著者である北海道立総合研究機構　林産試験場の原田陽博士、折橋　健博士、同森林研究本部の宜寿次　盛生氏には甚大なるご協力および非常に有益なご助言の数々をいただきましたことをお礼申し上げます。

本論文の研究にあたり、実験材料である廃菌床を快く提供していただきました（株）北海道きのこ総合研究所様、白糠町様、（有）森川ファーム様に厚くお礼申し上げます。

本論文の執筆にあたり、職場の上司、先輩である北海道立総合研究機構　林産試験場の菊地　伸一博士、森　満範博士、安久津　久氏、米山　彰造氏、関　一人氏、山田　敦氏、石川佳生氏、岸野正典博士、佐藤真由美博士、西宮　耕栄氏には多大なるご支援、ご激励をいただきました。ここに記し、お礼申し上げます。同　古俣寛隆博士、北橋善範博士には公私ともにお付き合いいただき、温かいサポートをいただきました。

本論文の作成において、妻と二人の子供たちには生活面や精神面におけるサポートに深く感謝します。本論文の作成のため子育てを何日もサボらせてもらった際にご協力いただいた義両親にもお礼を申し上げます。

最後に、私を生み育て、ここまで支えてくれた両親と兄に深謝します。

引用文献

Adney B, Baker J（1996） Measurement of cellulase activities. Technical Report NREL/TP-510-42628

Ahmed IN, Nguyen PLT, Huynh LH, Ismadji S, Ju YH（2013）Bioethanol production from pretreated *Melaleuca leucadendron* shedding bark – Simultaneous saccharification and fermentation at high solid loading. Bioresour Technol 136: 213–221

安久津 久, 松本 章, 吉田 兼之, 斎藤 直人, 葛西 章（1986）木質飼料の製造に関する研究（第 2 報）―適用樹種の拡大について―. 林産試月報 413 1986 年 6 月号

Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ（2010）Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresour Technol 101: 4851–4861

Asada C, Kita A, Sasaki C, Nakamura Y（2011）Ethanol production from disposable aspen chopsticks using delignification pretreatments. Cabohydr Polym 85: 196–200

Asakawa A, Sasaki C, Asada C, Nakamura Y（2012）Evaluation of waste mushroom medium as a fermentable substrate and bioethanol production. Int J Mod Phys: Conference series 6: 745–750

バイオ燃料技術革新協議会（2008）バイオ燃料技術革新計画.
（http://www.meti.go.jp/committee/materials/downloadfiles/g80326c05j.pdf）
2014 年 12 月 29 日アクセス

Balat M （2011） Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the

biochemical pathway: A review. Energ Convert Manage 52: 858–875

Balat M, Balat H, Öz C（2008）Progress in bioethanol processing. Prog Energ Combust 34: 511–573

Bari ID, Cuna D, Matteo VD, Liuzzi F（2014）Bioethanol production from steam-pretreated corn stover through an isomerase mediated process. New Biot 31: 185–195

Binod P, Sindhu R, Singhania RR, Vikram S, Devi L, Nagalakshmi S, Kurein N, Sukumaran RK, Pandey A（2010）Bioethanol production from rice straw: an overview. Bioresour Technol 101: 4767–4774

Blottnitz H, Curran MA（2007）A review of assessments conducted on bio-ethanol as a transpotation fuel from a net energy, greenhouse gas, and environmental life cycle perspective. J Clean Prod 15: 607–619

Borrion AL, McManus MC, Hammond GP（2012）Environmental life cycle assessment of bioethanol production from wheat straw. Bioma Bioe 47: 9–19

BP（2014）BP Statistical Review of World Energy June 2014 (http://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/Energy-economics/statistical-review-2014/BP-statistical-review-of-world-energy-2014-full-report.pdf) 2015 年 3 月 24 日アクセス

Chang ST（1999）World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on Lentinus edodes (Berk.) Sing. in China. Int J Med Mushrooms 1: 291–300

Chang ST（2002）Past and present trends in the production of *Lentinula edodes* in Asia. Mushroom Biology and Mushroom Products. Sánchez ら 編 ISBN 968-878-105-3

Chen CW, Fan Y（2012）Bioethanol supply chain system planning under supply and demand uncertainties. Trans Res E 48: 150–164

Cheng N,, Yamamoto Y, Koda K, Tamai Y, Uraki Y（2013） Amphipathic lignin derivatives to accelerate simultaneous saccharification and fermentation of unbleached softwood pulp for bioethanol production. Bioresour Technol 173: 104–109

Dence CW（1994）リグニンの定量. リグニン化学研究法　Lin YS, Dence CW 編（中野 準三, 飯塚 堯介 翻訳・監修）　ユニ出版　発行 pp 21–39

土居 祥允（1991）きのこの分類と培養. きのこの基礎科学と最新技術 きのこ技術集談会編集委員会 編 農村文化社発行

独立行政法人　産業技術総合研究所（2009）きちんとわかる木質バイオマス. 白日社 発行

独立行政法人　森林総合研究所（2013）平成 24 年度成果報告書　平成 24 年度森林整備効率化支援機械開発事業のうち「木質バイオマスの大規模利用技術の開発」　林野庁委託事業

Ehara K, Saka S（2005）Dicomposition behavior of cellulose in supercritical water, subcritical water, and their combined treatments. J Wood Sci 51: 148–153

Elliston A, Collins SRA, Wilson DR, Roberts IN, Waldron KW （2013） High concentrations of cellulosic ethanol achieved by fed batch semi simultaneous saccharification and fermentation of waste-paper. Bioresour Technol 134: 117–126

Fujimoto S, Inoue H, Yano S, Sakaki T, Minowa T, Endo T, Sawayama S, Sakanishi K（2008）Bioethanol production from lignocellulosic biomass requiring no sulfuric acid: mechanochemical pretreatment and enzymatic saccharification. J Jpn Petrol Inst 51: 264–273

Galbe M, Zacchi G（2002）A review of the production of ethanol from softwood. Appl Microbiol Biotechnol 59: 618–628

Goldstein IS, Easter JM（1992）An improved process for converting cellulose to ethanol.

Tappi J 1992(8): 135–140

バイオマス・ニッポン総合戦略推進会議（2007）国産バイオ燃料の大幅な生産拡大.（www.maff.go.jp/j/shokusan/biomass/b_energy/pdf/kakudai01.pdf） 2007 年 2 月 27 日アクセス

Han M, Kang KE, Kim Y, Choi GW（2013）High efficiency bioethanol production from barley straw using a continuous pretreatment reactor. Process Biochem 48: 488–495

原田 陽, 折橋 健, 檜山 亮, 宜寿次 盛生, 棚野 孝夫（2014）シイタケ菌床栽培における早生樹「ヤナギ」の利用. 日本きのこ学会誌 22: 24–29

原田 浩（1968）木材の組織構造. 木材化学 右田 伸彦, 米沢 保正, 近藤 民雄編 共立出版発行 pp1–26

原 亨和（2010）炭素固体触媒を利用した前処理技術. セルロース系バイオエタノール製造技術—食料クライシス回避のために— 近藤 昭彦, 植田 充美監修 エヌ・ティー・エス 発行 pp155–166

畑佐 伸英（2013）第 3 章 その他非在来型資源開発の可能性. 平成 24 年度外務省国際問題調査研究・提言事業「技術革新と国際秩序の変化」非在来型資源開発による地政学的変化 —日本のエネルギー戦略と資源外交を考える— 公益財団法人 日本国際問題研究所 発行

八丁 信正（2008）アフリカにおける食糧・環境問題. 農林水産省農業情報調査分析報告書

Hideno A, Aoyagi H, Isobe S, Tanaka H（2007）Utilization of spent sawdust matrix after cultivation of *Grifola frondosa* as substrate for ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. Food Sci Res 13: 111–117

北海道（2010）平成 21 年北海道特用林産統計

北海道（2015）平成 25 年北海道特用林産統計

北海道開発局（2011）北海道開発計画調査 北海道に適した新たなバイオマス資源の導入促進事業（平成 20～22 年度）の概要.
（http://www.hkd.mlit.go.jp/topics/toukei/chousa/h22keikaku/04_1.pdf）2014 年 12 月 29 日アクセス

北海道農政事務所（2014）北海道農林水産統計年報（総合編）. 北海道農政事務所統計部 発行

本田 収, 越島 哲夫（1968）ヘミセルロース. 木材化学 右田 伸彦, 米沢 保正, 近藤 民雄編 共立出版発行 pp239–316

星田 尚司, Sanom Nonklang, 阿野 明彦, 三谷 優, 赤田 倫治（2010）耐熱性酵母による高温エタノール発酵システムの開発. セルロース系バイオエタノール製造技術—食料クライシス回避のために— 近藤 昭彦, 植田 充美監修 エヌ・ティー・エス発行 pp 263–276

Imam T, Capareda S（2011）Fermentation kinetics and ethanol production from different sweet sorghum varieties. Int J Agric & Biol Eng 4: 33–40

Ingram T, Rogalinski T, Bockemühl V, Antranikian G, Brunner G（2009）Semi-continuous liquid hot water pretreatment of rye straw. J Supercrit Fluids 48: 238–246

井上 誠一, 村上 克治, 坂木 剛, 村松 由記子, 八木 勇三, 原 高明（2011）加圧熱水・酵素糖化処理を利用したクマイザサ茶粕からのエタノール製造.

IPCC Working Group 1（2013）Climate Change 2013: The Physical Science Basis.

IPCC Working Group 2（2014）Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability

株式会社三菱総合研究所 環境・エネルギー研究本部（2012）資源エネルギー庁委託調査平成 23 年度エネルギー消費状況調査（民生部門エネルギー消費実態調査）報告書

Kang KE, Han M, Moon SK, Kang HW, Kim Y, Cha YL, Choi GW（2013）Optimization of alkali-extrusion pretreatment with twin-screw for bioethanol production from *Miscanthus*. Fuel 109: 520–526

Kang L, Wang W, Lee YY（2010）Bioconversion of kraft paper mill sludges to ethanol by SSF and SSCF. Appl Biochem Biotechnol 161: 53–66

Katagiri N, Tsutsumi Y, Nishida T（1997）Biobleaching of softwood kraft pulp by white-rot fungi and its related enzymes. 木材学会誌 43: 678–685

片平 忠實（2000）石油資源開発の現状と将来. 地学雑誌 109 (3): 483–485

片倉 啓雄（2010）前処理および糖化の評価とプロセスの最適化. セルロース系バイオエタノール製造技術―食料クライシス回避のために― 近藤 昭彦, 植田 充美監修 エヌ・ティー・エス発行 pp97–110

加藤 幸浩, 中谷 誠, 山村 忠明（2000）シイタケ菌床栽培技術の確立（第 2 報）―おが粉の樹種が子実体の生産に及ぼす影響―. 林産試験場報 14: 5–9

河田 弘（2000）バーク（樹皮）堆肥 製造・利用の理論と実際. 博友社 発行 p 80

鮎沢 澄夫, 藤田 寿（2010）北研型による菌床シイタケ栽培の最新技術. 2010 年度版きのこ年鑑別冊 最新きのこ栽培技術 株式会社特産情報 発行 pp 133–142

Keshwani DR, Cheng JJ（2009）Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: a review. Bioresour Technol 100: 1515–1523

小泉 達治（2008）米国のバイオエタノール需要が国際とうもろこし需給に与える影響. 世界食料プロジェクト研究資料 第 1 号 平成 20 年度世界の食料需給の中長期的な見通しに関する研究 研究報告書 農林水産政策研究所 pp. 12–25

是石 真友子, 今中 洋行, 今村 維克, 狩山 昌弘, 中西 一弘（2009）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. 生物工学会誌 87: 216–223

黒田 健一（2000）主成分分析. 木質科学実験マニュアル 日本木材学会 編 文永堂出版 発行 pp 92–97

Lee JW, Koo BW, Choi JW, Choi DH, Choi IG（2008）Evaluation of waste mushroom logs as a potential biomass resource for the production of bioethanol. Bioresour Technol 99: 2736–2741

Lee S, Teramoto Y, Endo T（2010）Enhancement of enzymatic accessibility by fibrillation of woody biomass using batch-type kneader with twin-screw elements. Bioresour Technol 101: 769–774

Littlewood J, Murphy RJ, Wang L（2013）Importance of policy support and feedstock prices on economic feasibility of bioethanol production from wheat straw in the UK. Renew Sust Energ Rev 17: 291–300

Lo TCT, Kang MW, Wang BC, Chang CA (2007) Glycosyl linkage characteristics and classifications of exo-polysaccharides of some regionally different strains of *Lentinula edodes* by amplified fragment length polymorphism assay and cluster analysis. Anal Chim Acta 592; 146–153

松永 一彦, 下野 かおり, 瀬戸口 眞治（2011）食品加工副産物の発酵特性に関する研究. 鹿児島県工業技術センター研究報告 25: 9–14

南 公隆, 阿尻 雅文（2010）高温・高圧水を用いたバイオマス前処理技術. セルロース系バイオエタノール製造技術―食料クライシス回避のために― 近藤昭彦, 植田 充美監修 エヌ・ティー・エス 発行 pp 125–132

三井造船株式会社（2007）平成 18 年度成果報告書 バイオマス等未活用エネル

ギー実証試験事業「木質系バイオマスを主原料とするエタノール製造技術実証試験事業」報告書. （独）新エネルギー・産業技術総合啓発機構

Miyafuji H, Nakata T, Ehara K, Saka S（2005）Fermentability of water-soluble portion to ethanol obtained by supercritical water treatment of lignocellulosics. Appl Biochem Biotechnol 121–124: 963–971

Mood SH, Golfeshan AH, Tabatabaei M, Jouzani GS, Najafi GH, Gholami M, Ardjmand M（2013）Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. Renew Sust Energ Rev 27: 77–93

Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, Ladisch M（2005）Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour Technol 96: 673–686

中野 準三, 林 晄, 榊原 彰, 樋口 隆昌（1968）リグニン. 木材化学 右田 伸彦, 米沢 保正, 近藤 民雄編 共立出版発行 pp317–432

日本貿易振興機構（2012）米国食糧及びバイオ燃料生産の現状と課題.

西山 義春(2003)結晶構造. 木質の形成 バイオマス科学への招待 pp103–120 福島 和彦・船田 良・杉山 淳司・高部 圭司・梅澤 俊明・山本 浩之 編 海青社 発行

野神 隆之（2013）第 2 章 シェールガス革命がもたらす変化. 平成 24 年度外務省国際問題調査研究・提言事業「技術革新と国際秩序の変化」非在来型資源開発による地政学的変化 ―日本のエネルギー戦略と資源外交を考える― 公益財団法人 日本国際問題研究所 発行

大江 徹男（2008）エタノールとアメリカ産トウモロコシ. 燃料か食料か バイオエタノールの真実 日本経済評論社 pp. 235–262

Öhgren K, Vehmaanperä, Siika-Aho M, Galbe M, Viikari L, Zacchi G（2007）High

temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production. Enzyme Microb Technol 40: 607–613

沖 妙, 渡部 広行, 石川 久雄（1981）シイタケ菌 Lentinus edodes (Berk.) Sing.によるリグニンの生分解について. 木材学会誌 27: 696–702

折橋 健, 菊地 伸一（2011）短伐期収穫ヤナギを原料とするバイオエタノールの製造技術. 寒地土木研究所 平成 22 年度技術研究発表会

Pimentel D, Patzek TW（2005）Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower. Nat Resour Res 14: 65–76

Renewable Fuels Association （ 2014 ） World Fuel Ethanol Production.（http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production）2015 年 3 月 20 日アクセス

Roy P, Tokuyasu K, Orikasa T, Nakamura N, Shiina T（2012）A techno-economic and environmental evaluation of the life cycle of bioethanol produced from rice straw by RT-CaCCO process. Biomass Bioenergy 37: 188–195

Royse DJ（2009）Cultivation of shiitake on natural and synthetic logs. Pennsylvania State University

（http://pubs.cas.psu.edu/FreePubs/pdfs/ul203.pdf）2015 年 1 月 18 日アクセス

斉木 隆（2009）エタノール発酵. バイオマスハンドブック第 2 版 社団法人日本エネルギー学会編 オーム社 pp164–178

佐々木 堯（1986）植物試料中の澱粉の定性および定量. 生物化学実験法 19 澱粉・関連糖質実験法 瓜谷 郁三, 駒野 徹, 志村 憲助, 中村 道徳, 船津 勝 編 学会出版センター 発行 pp 1–8

鮫島 一彦（1993）リグニン. 木材科学講座 4 化学 城代 進, 鮫島 一彦 編 海

青社 発行 pp 53–62

社団法人アルコール協会, 日揮株式会社, 関西ペイント株式会社, 独立行政法人産業技術総合研究所, 株式会社物産ナノテク研究所（2006）開発項目「バイオマスエネルギー高効率転換技術開発／セルロース系バイオマスを原料とする新規なエタノール醗酵技術等により燃料用エタノールを製造する技術の開発」平成 13 年度～平成 17 年度成果報告書. 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構

資源エネルギー庁（2014）平成 25 年度エネルギーに関する年次報告（エネルギー白書 2014）

清水 純一(2008)ブラジルにおけるエタノール生産. 坂内　久・大江　徹男(編)燃料か食料か　バイオエタノールの真実　日本経済評論社 pp.23–58

Shimizu K, Sudo K, Nagasawa K, Ishihara M（1983）Enzymatic hydrolysis of woods. VII –Enzymatic susceptibility of autohydrolyzed woods. 木材学会誌 29: 428–437

志水 一允（2009）セルロース系バイオマスのアルコールへの変換技術. 熱帯農業研究 2: 95–99

清水 豊, 赤石 博（2010）森産業型による菌床シイタケ栽培の最新技術. 2010 年度版きのこ年鑑別冊 最新きのこ栽培技術　株式会社特産情報 発行　pp 124–132

Shimokawa T, Nakamura M, Nagasawa N, Tamada M, Ishihara M（2007）Effect of gamma-ray irradiation of enzymatic hydrolysis of spent corncob substrates from edible mushroom, enokitake (*Flammulina velutipes*) cultivation. Bull FFPRI 6: 27–34

Sipos B, Szilágyi M, Sebestyén Z, Perazzini R, Dienes D, Jakab E, Crestini C, Réczey K（2011） Mechanism of the positive effect of poly(ethylene glycol) addition in enzymatic hydrolysis of steam pretreated lignocelluloses. C R Biol 334: 812–823

Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Croker D（2008）Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Technical Report NREL/TP-510-42618

Sun ZY, Tang YQ, Iwanaga T, Sho T, Kida K（2011）Production of fuel ethanol from bamboo by concentrated sulfuric acid hydrolysis followed by continuous ethanol fermentation. Bioresour Technol 102: 10929–10935

鈴木 宏之（2000）バイオマス科学的転換利用エンジニアリングアプローチ —加水分解・工業化技術 100 年の軌跡とこれからの展望—. 株式会社パピルスエンジニアリング考える葦の会 発行

Synytsya A, Novàk M (2013) Structural diversity of fungal glucans. Carbohyd Polym 92: 792–809

高部 圭司（2003）ヘミセルロース. 木質の形成 バイオマス科学への招待 福島和彦・船田 良・杉山 淳司・高部 圭司・梅澤 俊明・山本 浩之 編 海青社 発行 p 155

瀧澤 南海雄（1986）キノコは菌類であり、菌類は植物では無い ‥…という話。そして菌食のすすめ. 林産試だより 1986 年 3 月号: 1–6

Tengborg C, Galbe M, Zacchi（2001）Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. Enzyme Microbial Technol 28: 835–844

Teratani F, Tanzawa S, Ogawa Y, Kai Y, Nishida T, Maekawa E（1997）Hydrolysis of water-soluble cellulose acetate prepared from waste newspapers by immobilized cellulase. 木材学会誌 43: 956–964

徳島県立農林水産総合技術センター 森林林業研究所（2002）シイタケ廃菌床の堆肥化技術 堆肥原料としての有利性と利用（http://www.pref.tokushima.jp/_files/00212304/shitakehaikinnsyou.pdf） 2015 年 3

月 29 日アクセス

津田 真由美、関 一人、青山 正和（1998）ササ稈の触媒添加蒸煮物の酵素糖化. 林産試験場報 第 12 巻 5 号 pp 13–16

上原 徹（1993）セルロース. 木材科学講座 4 化学 pp38–46 城代 進・鮫島 一彦 編 海青社 発行

氏原 邦博, 吉元 誠, 和田 浩二, 永井 竜児, 広瀬 直人, 照屋 亮（2009）黒砂糖の色調と品質に及ぼすサトウキビ搾汁機ローラーの材質とライミング処理の影響. 日本食品科学工学会誌 56: 343–349

U. S. Energy Information Administration （ 2015 ） Short-term energy outlook. （http://www.eia.gov/forecasts/steo/realprices/） 2015 年 3 月 20 日アクセス

Viikari L, Vehmaanperä J, Koivula A（2012）Lignocellulosic ethanol: From science to industry. Biomass Bioenergy 46: 13–24

和田 昌久（2003）セルロースミクロフィブリルの構造. 木質の形成 バイオマス科学への招待 福島 和彦・船田 良・杉山 淳司・高部 圭司・梅澤 俊明・山本 浩之 編 海青社 発行 pp91–102

Wang L, Sharifzadeh M, Templer R, Murphy RJ（2013）Bioethanol production from various waste papers: economic feasibility and sensitivity analysis. Appl Energy 111: 1172–1182

渡辺 隆司（2000）発酵生産物. ウッドケミカルスの最新技術 飯塚 堯介監修 シーエムシー発行 pp66–84

渡辺 隆司（2007）バイオリファイナリーの最近の展開と白色腐朽菌によるリグノセルロース前処理. 木材学会誌 53: 1–13

Xiao Z, Zhang X, Gregg DJ, Saddler JN（2004）Effects of suger inhibition on cellulases and β–glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. Appl Biochem

Biotechnol 113–116: 1115–1126

山口 彰 (1993) ヘミセルロース. 木材科学講座 4　化学　城代 進, 鮫島 一彦 編 海青社 発行 pp 47–52

山田 敏彦（2008）エネルギー作物開発のためのイネ科草類資源作物の評価と実用化への課題. セルロース系バイオエタノール製造技術―食料クライシス回避のために―　近藤 昭彦, 植田 充美監修 エヌ・ティー・エス 発行 pp17–26

山田 敏彦（2009）エネルギー作物としてのススキ属植物への期待. 日本草地学会誌 55: 263–269

山内 隆弘（2012）シイタケ菌床栽培の安定化に関する基礎的研究. 宇都宮大学農学部演習林報告 48: 1–34

柳田 高志, 藤本 真司, 秀野 晃大, 井上 宏之, 塚原 建一郎, 澤山 茂樹, 美濃輪 智朗（2009）稲わらからのエタノール生産における非硫酸前処理法のプロセスエネルギーおよび経済性評価. エネルギー・資源 30: 8–14

Yasuda M, Miura A, Shiragami T, Matsumoto J, Kamei I, Ishii Y, Ohta K（2012）Ethanol production from non-pretreated napiergrass through a simultaneous saccharification and fermentation process followed by a pentose fermentation with Escherichia coli KO11. J Biosci Bioeng 114: 188–192

横田 信三（2003）リグニンの機能、植物の進化との関連. 木質の形成 バイオマス科学への招待　福島 和彦・船田 良・杉山 淳司・高部 圭司・梅澤 俊明・山本 浩之 編　海青社 発行 p 189–198

横山 伸也（2010）非食料系・セルロース系原料からのバイオエタノール製造技術における現状と課題. セルロース系バイオエタノール製造技術―食料クライシス回避のために―　近藤 昭彦, 植田 充美監修 エヌ・ティー・エス発行 pp3–14

Yokota S, Nakajima R, Suzuki D, Ishiguri F, Iizuka K, Yoshizawa N（2007）Enzymatic saccharification and ethanol fermentation with the cultural waste from edible mushroom cultivation using wood meals of unused tree species, *Alnus Japonica* and *Zelkova serrata*. Cell Chem Technol 41: 575–582

吉原 一年, 赤松 勲, 上嶋 洋, 藤井 利郎（1985）リグニン分解能の強力な白色腐朽菌のスクリーニング. 紙パ技協誌 39:65–74

（財）地球環境産業技術研究機構 編（2008）図解バイオリファイナリー最前線. 工業調査会 発行

財団法人 発酵工業協会（1984）バイオマス資源の生産・利用に関するフィージビリティ調査 ―酸糖化発酵プロセスによるアルコール生産システムの調査研究―.

Zhang X, Qin W, Paice MG, Saddler JN（2009）High consistency enzymatic hydrolysis monomer and oligomer sugar yields for aspen, balsam, and switchgrass. Bioresour Technol 100: 5890–5897