



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Production of high concentration bioethanol by fed-batch type simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosics with amphipathic lignin derivatives [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Cheng, Ningning
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第12883号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67677
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Ningning_Cheng_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（農学）	氏 名	Ningning Cheng
審査担当者	主査	教 授	浦木康光
	副査	教 授	森 春英
	副査	准教授	玉井 裕
	副査	講 師	幸田圭一

学位論文題名

Production of high concentration bioethanol by fed-batch type simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosics with amphipathic lignin derivatives

(両親媒性リグニン誘導体を用いたリグノセルロースの同時糖化発酵による高濃度バイオエタノールの製造)

本論文は図 20、表 8 の 5 章、89 頁からなる英文論文で、参考論文 2 編が付されている。

脱化石資源による資源循環型社会の構築のために、石油に代わる液体燃料およびケミカルス原料となるプラットフォーム化合物として、バイオエタノールが注目されている。21 世紀に入り食糧生産と競合しないバイオエタノール原料として、木質バイオマスが注目され、この原料から安価で環境負荷が少ない製造法の開発が世界的に活発となった。その代表例は、酵素糖化を経て、アルコール発酵させる方法である。しかし、糖化に用いる酵素“セルラーゼ”が依然として高価なことと、酵素が非生産的な不可逆的吸着を基質と行い、再利用できないなどの問題が生じ、低コスト製造法の開発には、この課題の解決が急務である。

Cheng 氏が所属する研究室では、木質バイオマス主要成分の一つであるリグニンを水溶性誘導体に変換して、酵素糖化時に添加することで、糖化率の向上と残存酵素活性を高めることを見出した。そこで、Cheng 氏は、高濃度バイオエタノールの製造を目的に、酵素糖化と発酵を同一バッチで行う同時糖化発酵（SSF）反応にリグニン誘導体（A-LD）を添加して、その有効性を確認すると共に、使用条件の最適化を検討した。

1.100-mL スケールにおける同時糖化発酵条件の最適化

Cheng 氏は、予備実験として、グルコースのエタノール発酵に及ぼす A-LD の影響を検討した。その結果、A-LD はアルコール発酵を阻害せず、寧ろ加速する効果があることを見出した。そこで、SSF 実験として、Fed-batch SSF（FB-SSF）と呼ばれる反応条件における A-LD の機能について、検討を進めた。FB-SSF とは、基質を断続的に追加しつつ行う SSF で、大量の基質の SSF を可能にする方法である。

本研究で用いた酵母と酵素の至適温度が異なるために、まず、SSF における至適温度を調べた。その結果、38℃ での SSF により最も高濃度、高効率でバイオエタノールが生成することが分かった。さらに、A-LD 濃度とバイオエタノール生成と

の関係について調べた。研究当初は、バイオエタノール生成は、A-LD 濃度に依存すると考えていた。しかし、実験の結果、至適濃度が存在することが明らかとなった。

2. 1.5-L スケール FB-SSF における条件の最適化

基質の攪拌も、SSF の重要なパラメータである。発酵は嫌氣的条件が好ましく、酵母と基質が最小限接触する攪拌が望ましいが、酵素糖化を進めるには、激しい攪拌が必要である。攪拌条件を検討するために、先ず、強力なモーターと大型の攪拌羽が附置された 3.5 L 容のジャーファメンターを作製した。この機器を用いて、4 条件の攪拌プログラムにおける優位性を比較検討した。この結果、前加水分解時には 40 rpm、SSF 初期は 20 rpm、後期には、1 時間の内 5 分間のみ 5 rpm で攪拌することが最も効果的であることを示した。

セルラーゼとしてメイセラゼを用い、至適の A-LD 濃度(3 g/L) および至適 SSF 温度条件下で、1.5 L の SSF 緩衝液に対し 360 g の基質（市販の未漂白針葉樹クラフトパルプ；総基質濃度 24%）を随時添加して、FB-SSF を行った。その結果、81 g/L のエタノールが生成した。A-LD が無添加の場合は 63.3 g/L であり、添加により約 30%のエタノール濃度および生産効率の向上が図られた。酵素を Genencor GC220 に変えると、83 g/L へとエタノール濃度がさらに向上した。別の対照実験として、酵素糖化率を向上させるとの報告がある PEG 4000 を、A-LD と同じ条件で添加して FB-SSF を行った。その結果、エタノール濃度の向上は観測されなかった。このことより、短期間の酵素糖化率を向上させる PEG 400 は FB-SSF には有効な添加剤ではなく、長期間酵素活性を維持する A-LD の方が、FB-SSF には有用な添加剤であることが明示された。

また、このジャーファメンターの使用により、更に高基質濃度での FB-SSF が可能となった。総基質濃度を 30%に上昇させると、87.9 g/L のエタノールを得ることができた。この濃度は、古紙を原料とし、特殊なセルラーゼと超強力攪拌機を用いて得られた結果（91.5 g/L）と遜色がなく、A-LD を添加することで、市販のセルラーゼと酵母のみで高濃度バイオエタノールが生産可能であることを明らかにした。

以上、本研究では、パルプ産業の副産物で燃料用途以外にほとんど利用されていないリグニンを、水にも有機溶媒にも可溶な両親媒性誘導体に変換することで、セルラーゼの糖化活性を向上されるだけでなく、アルコール発酵にも有用であることを見出し、それらの組み合わせた同時糖化発酵にとっても有効な添加物であることを証明した。これらの成果は、リグニンの高付加価値化に寄与すると共に、低質木質系バイオマスの利用促進・拡大、さらには、脱化石燃料を目指した資源純化型社会の構築にも貢献と考えられ、今後の社会的波及効果が大きいと期待されるものである。

よって審査員一同は、Ningning Cheng 氏が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。