

## D117

## セルラーゼ表面提示酵母を用いた イオン液体前処理セルロースからの直接エタノール発酵

(神大院工) ○(正)中島一紀・荒井章吾・山口剛示・山田亮祐・  
(豊田中研) 片平悟史・石田亘広・高橋治雄・(神大院工) (正)荻野千秋\*・(正)近藤昭彦

### 【緒言】

稲わらや廃木材などの非可食性セルロース系バイオマスから燃料・化成品を製造するバイオリファイナリー技術は持続可能な社会を構築するためのコア技術として現在世界的な注目を集めている。しかし、本来構造を保つための役割を果たしているセルロースは剛直で難分解性の高分子であり、酵素による分解速度は非常に遅く、これがセルロース利用の大きな障害になっている。セルロース分解酵素（セルラーゼ）は、エンドグルカナーゼ（EG）、セロビオハイドロラーゼ（CBH）、 $\beta$ -グルコシダーゼ（BGL）に大きく分類され、これら3者が協奏的・相乗的に働くことによってセルロースが効率的に分解される。我々はこれまでに、上記3種類のセルラーゼを酵母の細胞表面に提示したアーミング酵母を開発してきた。このアーミング酵母は、細胞表面に提示したセルラーゼ群によってセルロースを効率的に分解し、生成するグルコースを用いて発酵を行うことで、ワンステップでエタノールを生産することが可能な機能性酵母である。しかしながら、もともとセルロースが難分解性であることに加え、アーミング酵母とセルロースの反応は固-固反応であるため、その反応速度は非常に遅い。そこで、我々はアーミング酵母によるセルロース分解性の向上を目的とし、イオン液体を用いたセルロースの前処理に着目した。イオン液体は不揮発性の有機塩であり、電気化学分野を中心に様々な応用が研究されている機能性溶媒である。最近ではセルロースを溶解できることも報告されており、バイオリファイナリー分野における応用も大変興味深い。

本研究では、セルロースの前処理溶媒としてイオン液体を利用し、結晶構造が緩和されたセルロースからのアーミング酵母による高効率ワンステップエタノール生産について検討した（Fig. 1）。

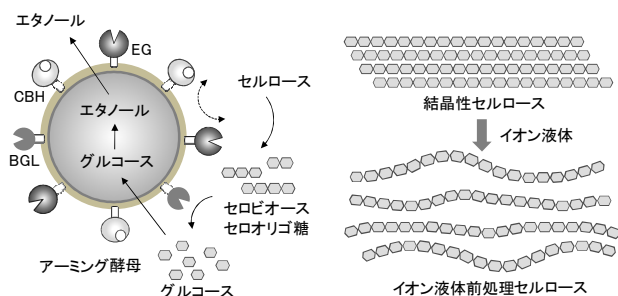


Fig. 1 セルラーゼを細胞表面に提示したアーミング酵母によるイオン液体前処理セルロースからのエタノール発酵

### 【実験】

#### 1. イオン液体によるセルロースの前処理

結晶性セルロース(Avicel PH-101) 100 mg にイオン液体 1-ethyl-3-methylimidazolium diethylphosphate ([Emim][DEP]) 1.056 g を加え、80°C で2時間加熱・攪拌することでセルロースを溶解した。室温まで放冷後、200 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0) 5 ml を加え、セルロースを再生させた。

#### 2. アーミング酵母による糖化・発酵

上記再生セルロースに脱イオン水、4×YP 培地、アーミング酵母を OD=20 となるように加え、30°C、200 rpm で発酵を行った。24 時間毎にサンプリングを行い、エタノール濃度をガスクロマトグラフィーにより定量した。

#### 【結果および考察】

Fig. 2A にアーミング酵母によるイオン液体前処理セルロースからのエタノール発酵を示す。アーミング酵母はイオン液体[Emim][DEP]で前処理したセルロースを効率的に糖化・発酵し、エタノールを生産した。また、反応の進行とともに、再生セルロースが減少していく様子が目視により確認された。一方、イオン液体処理していない結晶性セルロースからはエタノールは生産されなかった。したがって、セルロースをイオン液体に溶解し、強固な結晶構造を緩和させることで、アーミング酵母による同時糖化発酵の効率が大幅に向上することが明らかとなった。また、イオン液体共存下での発酵における酵母の生菌数を Fig. 2B に示す。この結果より、アーミング酵母はイオン液体共存下においても生存しており、継続的にエタノール発酵を行えることが示された。

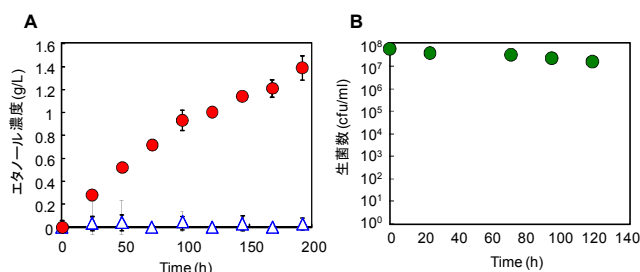


Fig. 2 セルラーゼ表面提示アーミング酵母によるセルロースからのエタノール発酵

- A. エタノール濃度 (●: イオン液体前処理セルロース, ▲: 結晶性セルロース)  
B. イオン液体共存下での発酵における酵母の生菌数

\*TEL: 078-803-6193, FAX: 078-803-6193

E-mail: ochiaki@port.kobe-u.ac.jp