

氏名(国籍)	李	源(中国)	
学位の種類	博士(生物工学)		
学位記番号	博甲第5040号		
学位授与年月日	平成21年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<b>Study on Improvement of Hemicellulose Fermentation and Development of a New Process for Lignocellulose-to-Ethanol Bioconversion</b> (ヘミセルロース発酵の改善及び生物学的変換法によるリグノセルロースからのバイオエタノール生産プロセスの開発)		
主査	筑波大学教授	農学博士	杉浦則夫
副査	筑波大学教授	博士(農学)	山口智治
副査	筑波大学教授	博士(農学)	張振亜
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	北村豊

### 論文の内容の要旨

本研究では生物化学的手法を用い、リグノセルロースからエタノールの生産を行うとともに、特にヘミセルロースの発酵を目的とし、下記の研究を行った。

まず、キシロース発酵菌を選択し、その株の発酵条件を最適化した。また、五つの菌株を比較した結果によって、*Pichia stipitis* (PsA) には極めて高いキシロースの発酵能力を有していることがわかった。PsA はエタノールの生産能が最も高く、キシリトールの生産能が最も低かったことが判明した。25℃, 10g L<sup>-1</sup> のキシロース, 100 rpm の振動で、エタノールの生産率は最大で 0.39g g<sup>-1</sup> であった。30℃, 30g L<sup>-1</sup> のキシロース, 170 rpm の振動でエタノールの生産は最も速く 0.12g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> であった。

次に、PsA について、キシリトールの減量と嫌氣的発酵を行った。アルデヒドは PsA にほとんど影響を及ぼさなかったが、アセトインには PsA の糖の消費、エタノールの生産とバイオマスの増殖抑制に影響を与えた。抑制率はそれぞれ 21.8%, 26.3%, 6.7% であった。キシリトールの添加によって、アセトインの吸収が増加したが、アセトインの添加はキシリトールの代謝に影響がなかったと考えられた。

微量金属が PsA に及ぼす影響では、PsA 細胞の成分を分析したところ、培地とリグノセルロースの加水分解液の中に、Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> と Co<sup>2+</sup> が不足し、Al<sup>3+</sup> が過剰だったことがわかった。その四つの金属イオンが PsA に与える影響では、低濃度の Cu<sup>2+</sup> と Al<sup>3+</sup> の添加によって PsA の増殖が促された。これに対して、Ni<sup>2+</sup> と Co<sup>2+</sup> を添加したことによって、PsA の増殖が抑制され、エタノールの生産も大きく減少した。

希硫酸での稲わらの加水分解液の発酵では、希硫酸加水分解の最適条件が、1.6% の H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 藁対分解液の比率が 1:10 (w/v), 稲わらの粒度が 5-7mm で、このような最適条件のもとでキシロースの生産率が最も高かった。また、5分間沸騰させ、デトックスしたところ、エタノールの生産率が 0.25 から 0.29 まで上昇した。しかし、生産率は合成培地に比べまだ低かったため、菌株の馴化が必要と考えられる。

最後に、加水分解液の発酵とセルロースの同時糖化発酵 (SSF) の組み合わせについて研究を行った。PsA と *Saccharomyces cerevisiae* の相互関係についても検討した。PsA の存在が全体のエタノールの生産に悪影響

がなかったと判明した。また、PsA を添加したことによって、SSF 酵素加水分解から得られたキシロースが発酵された。前加水分解(糖化)は全体のエタノールの生産にほとんど影響がなかったことが明らかとなった。SSF プロセスにおいて、希硫酸での稲わらの加水分解がエタノール生産の制限因子であることがわかった。

本研究はキシロースを発酵する酵母の選択に価値を見出した。また、PsA について詳しく研究したことは、今後の *P. stipitis* を用いたキシロース発酵の最適化のために資する。加水分解液の発酵とセルロースの同時糖化発酵 (SSF) の組み合わせは、新たな方法で、リグノセルロース系バイオマスを発酵した際に、グルコースとキシロースの同時利用の問題を回避し、エタノールの生産を改善した利点が挙げられる。

## 審査の結果の要旨

生物化学的手法を用い、リグノセルロースからエタノールの生産を行うとともに、特にヘミセルロースの発酵を目的とし、下記の研究を行った。

まず、キシロース発酵菌を選択し、その株の発酵条件を最適化した。また、五つの菌株を比較した結果によって、*Pichia stipitis* (PsA) には極めて高いキシロースの発酵能力を有していることがわかった。PsA はエタノールの生産能が最も高く、キシリトールの生産能が最も低かったことが判明した。25°C、10g L<sup>-1</sup> のキシロース、100 rpm の振動で、エタノールの生産率は最大で 0.39g g<sup>-1</sup> であった。30°C、30g L<sup>-1</sup> のキシロース、170 rpm の振動でエタノールの生産は最も速く 0.12g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> であった。

次に、PsA について、キシリトールの減量と嫌氣的発酵を行った。アルデヒドは PsA にほとんど影響を及ぼさなかったが、アセトインには PsA の糖の消費、エタノールの生産とバイオマスの増殖抑制に影響を与えた。抑制率はそれぞれ 21.8%、26.3%、6.7% であった。キシリトールの添加によって、アセトインの吸収が増加したが、アセトインの添加はキシリトールの代謝に影響がなかったと考えられた。

微量金属が PsA に及ぼす影響では、PsA 細胞の成分を分析したところ、培地とリグノセルロースの加水分解液の中に、Cu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup> と Co<sup>2+</sup> が不足し、Al<sup>3+</sup> が過剰だったことがわかった。その四つの金属イオンが PsA に与える影響では、低濃度の Cu<sup>2+</sup> と Al<sup>3+</sup> の添加によって PsA の増殖が促された。これに対して、Ni<sup>2+</sup> と Co<sup>2+</sup> を添加したことによって、PsA の増殖が抑制され、エタノールの生産も大きく減少した。

希硫酸での稲わらの加水分解液の発酵では、希硫酸加水分解の最適条件が、1.6% の H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、藁対分解液の比率が 1:10 (w/v)、稲わらの粒度が 5-7mm で、このような最適条件のもとでキシロースの生産率が最も高かったことがわかった。また、5 分間沸騰させ、デトックスしたところ、エタノールの生産率が 0.25 から 0.29 まで上昇した。しかし、生産率は合成培地に比べまだ低かったため、菌株の馴化が必要と考えられる。

最後に、加水分解液の発酵とセルロースの同時糖化発酵 (SSF) の組み合わせについて研究を行った。PsA と *Saccharomyces cerevisiae* の相互関係についても検討した。PsA の存在が全体のエタノールの生産に悪影響がなかったと判明した。また、PsA を添加したことによって、SSF 酵素加水分解から得られたキシロースが発酵できた。前加水分解(糖化)は全体のエタノールの生産にほとんど影響がなかったことが明らかとなった。SSF プロセスにおいて、希硫酸での稲わらの加水分解がエタノール生産の制限因子であることがわかった。

本研究はキシロースを発酵する酵母の選択に価値を見出した。また、PsA について研究したことは、今後の *P. stipitis* を用いたキシロース発酵の最適化のために有用であると判断される。加水分解液の発酵とセルロースの同時糖化発酵 (SSF) の組み合わせでは、新たな方法で、リグノセルロース系バイオマスを発酵した際に、グルコースとキシロースの同時利用の問題を回避し、エタノールの生産を改善した利点があることが高く評価される。

よって、著者は博士(生物工学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。