



宮崎大学学術情報リポジトリ

University of Miyazaki Academic Repository

アンモニアガス前処理 (LMAA)
および同時糖化共発酵 (SSCF)
プロセスによるネピアグラスからのバイオエタノール合成

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-06-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 保田, 昌秀 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10458/5720

アンモニアガス前処理 (LMAA) および同時糖化共発酵 (SSCF) プロセスによるネピアグラスからのバイオエタノール合成

(宮崎大学工学部・農学部) 保田昌秀・石井康之・太田一良

【要約】 本研究ではネピアグラス (*Pennisetum purpureum* Schumach) からの効率的なエタノール生産について研究を行なった。一般に、リグノセルロース系エタノール生産 (第二世代バイオエタノール) は、主に前処理、セルロース糖化 (SA) ヘキソース発酵 (HF)、およびペントース発酵 (PF) の4つのプロセスからなっている。多くの第二世代バイオエタノールの生産の研究は、これらのプロセスを様々に組み合わせることによって行われている。本研究では、ネピアグラスの低コストかつ低エネルギーの前処理法の開発を目指して、アンモニアガスを用いる改良型 LMAA 法を開発した。また、SA と HF を同時に行う並行複発酵 (SSF) および SSF で残存するキシロースを遺伝子組換え大腸菌 KO11 により PF を行なう二段階プロセス (SSF→PF) を行った結果、LMAA 前処理ネピアグラス (100 g) の SSF プロセスで 17.4 g、PF で 6.7 g、全体で 24.1 g のエタノールが生成した。前処理ネピアグラスの完全糖化で理論的に得られるキシロース (214 mg/g) とグルコース (397 mg/g) を基準とする総エタノール収率は 68.9% になった。さらに、反応プロセスの簡略化のために SA、HF 及び PF を同時に行う同時糖化共発酵 (SSCF) の一段階プロセスを検討した。前処理を行ったネピアグラス (3.0 g) から 777 mg のエタノールが生成し、エタノール収率は 74.1% に到達した。これは、今までに報告のあったネピアグラスからのエタノール生産の中で最高収率となっている。

キーワード： 矮性ネピアグラス、バイオエタノール、アンモニアガス、LMAA 法、SSF 法、SSCF 法、光触媒、バイオ水素、隣接酸素原子効果

1 緒言

1-1 第二世代バイオエタノール生産の課題

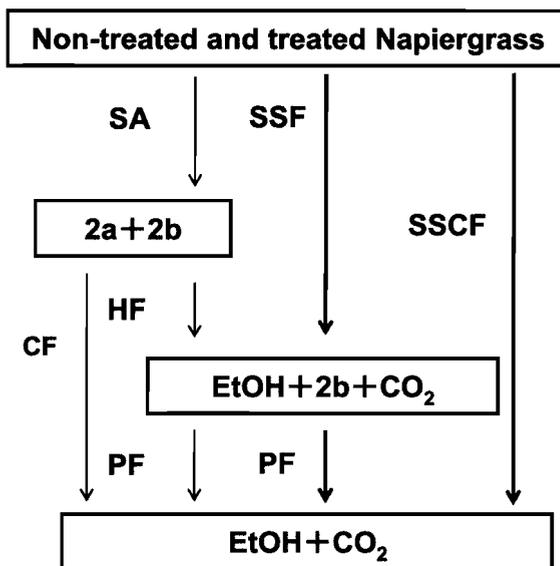
再生可能エネルギーの獲得は、地球温暖化防止の観点から重要となっている。その中で、食料と競合しない“リグノセルロース”からのエタノール生成が 2007 年ごろから注目され、Galbe および Zacchi (ルンド大学 スウェーデン) らによって、**第二世代バイオエタノール** (second-generation bioethanol) と呼ばれ、その重要性が増してきている。リグノセルロースは、グルコースだけで構成されるデンプン系原料とは異なり、難分解性のリグニンおよび難発酵性のペントースからなるヘミセルロースを多く含くみ、乾燥バイオマスあたりのエタノールの収率が最大でも 300~400 mg/g と、低いことが問題となっている。そのために、第二世代バイオエタノール研究では、克服すべき大きな課題として次の二つが挙げられる。

第一には、リグニンの除去および結晶構造の変化によって酵素糖化を促進させる様々な前処理工程が検討されているが、前処理にはしばしば生成されるバイオ燃料よりも多くのエネルギーとコストがかかる。そのために、低エネルギーおよび低コストの前処理方法の開発が

望まれている。第二に、リグノセルロースはペントースで構成されるヘミセルロースを 20-35 wt%程度含んでおり、通常の酵母発酵ではエタノール収率が低くなる。そのために、リグノセルロースを原料とするバイオエタノール生産では、ペントース発酵が不可欠であり、組み替え体などを用いてエタノール収率を最大値に近づける努力が払われている。

1-2 研究戦略

我々は、数多くあるバイオマスの中からリグニン含有量が低く、年当たり、単位面積当たりの収穫量が高いネピアグラス (*Pennisetum purpureum* Schumach) に注目した。最初のネピアグラスからのバイオエタノール報告が 2008 年に発表されてから今までに 13 報の論文が報告されている。Table 1 には各プロセスの前処理方法、糖化、発酵法と収率を示す。その中で 2011 年に Doran-Peterson らが高圧水熱前処理 (PBHW) したネピアグラスを 2 種類の酵素を用いた糖化 (SA) と組換え菌 *E. coli* LY01 を用いたヘキソースおよびペントースの共発酵 (CF) を組み合わせた二段階エタノール生産 (SA→CF) を報告している [6]。そこで、我々は、加水分解酵素と酵母による同時糖化発酵 (SSF) と組換え大腸菌 K011 を用いたペントース発酵 (PF) による二段階プロセス (SSF→PF) を 2013 年に報告した。さらに、今年度は加水分解酵素、酵母、組換え大腸菌 K011 を用いて、同時に糖化、ヘキソース発酵、ペントース発酵を行う同時糖化共発酵 (SSCF) による一段階プロセスについても検討を行ったので、報告する (Scheme 1)。



Scheme 1. Processes for bioethanol production: SA: saccharification, HF: hexose fermentation, PF: pentose fermentation, CF: cofermentation, SSF: simultaneous SA and HF, SSCF: simultaneous SA and CF, 2a: hexose, 2b: pentose

Table 1. Summary of pretreatment, saccharification, and fermentation of napiergrass.

Napiergrass	Pre-treatment	Process of saccharification and fermentation: Enzyme and microorganisms	Yield	Ref. (year)
Napiergrass (Merkeron)	H ₂ SO ₄	SSF: GC220 cellulase, Novozyme 118 cellobiase, <i>S. cerevisiae</i> D5A	Ethanol 107 mg/g	[1] (2008)
Napiergrass	Non	SA: cellulase from <i>Trichoderma reesei</i> (cellulase GC220), HF: <i>S. cerevisiae</i> TV2	SA: 91.8% HF: 50.7%	[2] (2010)
Napiergrass	Non	SSCF: <i>Klebsiella oxytoca</i> THLC0409	Ethanol 82 mg/g	[3] (2011)
Napiergrass	Acid (H ₂ SO ₄)	SSCF: <i>Clostridium</i> strain TCW1, <i>Bacillus</i> sp. THLA0409, <i>Klebsiella pneumoniae</i> THLB0409, <i>Klebsiella oxytoca</i> THLC0409, <i>Brevibacillus</i> strain AHPC8120	Ethanol 40 mg/g	[4] (2011)
Napiergrass	Non	SSCF: <i>Candida tropicalis</i> JH030	Xylitol 360 mg/g	[5] (2011)

(continued)

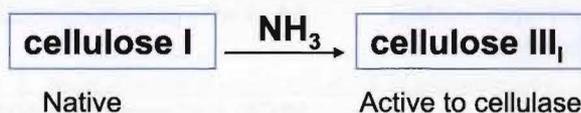
Napiergrass (Merkeron)	PBHW	SA: Novo 188 cellulase (Novozyme), NS50013 cellulase mixture (Novozyme) CF: <i>E. coli</i> LY01	Ethanol 73%	[6] (2011)
Napiergrass	Non	SSF: yeast (KY3 and KY-NpaBGS)	Ethanol 1.09 mg/mL	[7] (2012)
Napiergrass	Acid (H ₂ SO ₄)	SSCF: <i>Klebsiella oxytoca</i> THLC0409	230 mg/g	[8] (2011)
Dwarf type (Schumach)	Non	SSF: cellulase from <i>Acromonium cellulolyticus</i> (Acromozyme KM), <i>S. cerevisiae</i> NBRC 2044 PF: <i>E. coli</i> KO11	Ethanol 44.2%	[9] (2012)
Dwarf type (Schumach)	Non	SA: 3 wt% phosphoric acid at 160 °C for 15 min	Xylose 77% Glucose 50%	[10] (2013)
Napiergrass	Acid (H ₂ SO ₄)	SSCF: <i>Bacillus</i> sp. THLA0409, <i>Klebsiella pneumoniae</i> THLB0409	Ethanol 276 mg/g	[11] (2013)
Dwarf type (Schumach)	LMAA	SSF: cellulase from <i>Acromonium cellulolyticus</i> (Acromozyme KM), xylanase from <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (Sumizyme X), <i>S. cerevisiae</i> NBRC 2044 PF: <i>E. coli</i> KO11	Ethanol 68.9%	[12] (2013)
Dwarf type (Schumach)	LMAA	SSCF: cellulase from <i>Acromonium cellulolyticus</i> (Acromozyme KM), xylanase from <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (Sumizyme X), <i>S. cerevisiae</i> NBRC 2044, <i>E. coli</i> KO11	Ethanol 74.1%	[13] (2013)

- [1] William, F., B. S. Dien, S. K. Brandon, and J. D. Peterson, (2008) Assessment of bermudagrass and bunch grasses as feedstock for conversion to ethanol Anderson. Appl. Biochem. Biotechnol. 145: 13-21.
- [2] Kai, T., T. Tanimura, N. Nozaki, M. Suiko, and K. Ogawa (2010) Bioconversion of soft cellulosic resources into sugar and ethanol. Seibutsu-kogaku Kaishi 88: 66-72.
- [3] Lin, C.-W., D.-T. Tran, C.-Y. Lai, Y.-P. I, and C.-H. Wu, (2010) Response surface optimization for ethanol production from Pennisetum Alopecoider by *Klebsiella oxytoca* THLC0409. Biomass and Bioenergy 34: 1922-1929.
- [4] Lin, C.-W., C.-H. Wu, D.-T. Tran, M.-C. Shih, W.-H. Li, and C.-F. Wu (2011) Mixed culture fermentation from lignocellulosic materials using thermophilic lignocellulose-degrading anaerobes. Process Biochem. 46: 489-493.
- [5] Huang, C.-F., Y.-F. Jiang, G.-L. Guo, and W.-S. Hwang (2011) Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process., Bioresour. Technol. 102: 3322-3329.
- [6] Brandon, S. K., L. N. Sharma, G M. Hawkins, W. F. Anderson, C. K. Chambliss, and J. Doran-Peterson (2011) Ethanol and co-product generation from pressurized batch hot water pretreated T85 bermudagrass and Merkeron napiergrass using recombinant *Escherichia coli* as biocatalyst. Biomass Bioenergy 35: 3667-3673.
- [7] Chen, H.-L., Y.-C. Chen, M.-Y. J. Lu, J.-J. Chang, H.-T. C. Wang, H.-M. Ke, T.-Y. Wang, S.-K. Ruan, T.-Y. Wang, K.-Y. Hung, H.Y. Cho, W.-T. Lin, M.-C. Shih, and W.-H. Li (2012) A highly efficient β -glucosidase from the buffalo rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* W5. Biotechnol. Biofuels 5: 24: 1-10.
- [8] Tran, D.-T., C.-W. Lin, C.-Y. Lai, and C.-H. Wu (2011) Ethanol production from lignocelluloses by native strain *Klebsiella oxytoca* THLC0409. Waste and Biomass Valorization 2: 389-396.
- [9] Yasuda, M., A. Miura, T. Shiragami, J. Matsumoto, I. Kamei, Y. Ishii, and K. Ohta (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.
- [10] Takata, E., K. Tsutsumi, Y. Tsutsumi, and K. Tabata (2013) Production of monosaccharides from napier grass by hydrothermal process with phosphoric acid. Bioresour. Technol. 143: 53-58.
- [11] Tran, D.-T., Y.-P. I, and C.-W. Lin (2013) Developing co-culture system of dominant cellulolytic *Bacillus* sp. THLA0409 and dominant ethanolic *Klebsiella oxytoca* THLC0409 for enhancing ethanol production from lignocellulosic materials. J. Taiwan Inst. Chem. Eng. 44: 762-769.
- [12] Yasuda, M., K. Takeo, H. Nagai, T. Uto, T. Yui, T. Matsumoto, Y. Ishii, and K. Ohta (2013) Enhancement of ethanol production from napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach) by a low-moisture anhydrous ammonia pretreatment. J. Sustainable Bioenergy Sys, 3: 179-185.
- [13] Yasuda, M., H. Nagai, K. Takeo, Y. Ishii, and K. Ohta, Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of a low-moisture anhydrous ammonia (LMAA)-pretreated napiegrass (*Pennisetum purpureum* Schumach). Bomass and Bioenergy, xx, xxx-xxx (2014)

1-3 アンモニアのセルロース結晶への影響

バイオエタノール生産では、糖化促進のためにアルカリ処理によるリグニンの除去が行われているが、今までの当研究室での検討で、リグニン含量の少ないリグノセルロースでは、アルカリ処理が発酵を遅延することを明らかにしている。そこで、本研究では低エネルギー・低コストの前処理方法を開発するためにアンモニアガスを利用した前処理法の開発を行った。

セルロースには、化学反応性や性質が異なる数種の結晶相が組み込まれていることが知られている。天然には cellulose I α と I β の二つの構造が存在し、cellulose I と標記される。cellulose I は液体アンモニアや種々のアミンによる処理によって cellulose III_I型に変換する。アンモニアは結晶構造中の水素結合部位に浸出していき、結晶構造を cellulose I から cellulose III_I型に変化させていると思われる。



そのために、アンモニアはパルプや繊維の性質を改善するために工業的に用いられている。また、リグノセルロースの前処理として AFEX 法 (ammonia fiber explosion) が知られており、バイオ燃料およびその他の化成品への変換において、酵素糖化の効率向上が図られている (Table 2)。これは、アンモニアによって酵素活性な cellulose III_I型が増加するためである。しかし、AFEX は 90 °C 21 気圧の過酷な条件を必要とする。また、SAA (soaking in aqueous ammonia) は、固形物 : 水の割合が 1:6 - 1:10 で大気圧下 40-80 °C で行なわれている。これらのプロセスでは、過酷な条件の保持および水溶液からのアンモニアの回収にエネルギーを要することが問題となっている。一方、ガス状のアンモニアは低エネルギーでの回収が期待できる。本研究では、Kim らが報告している LMAA (Low-moisture anhydrous ammonia) 法を改良して、リグノセルロースを室温で長時間、大気圧のアンモニアガス雰囲気下に暴露する改良 LMAA 法について検討した。

Table 2. Pretreatment methods using ammonia

AFEX	Ammonia Fiber Explosion pretreatment at 90 °C under 21 atm	Ref. [14]
SAA	Soaking in Aqueous Ammonia pretreatment at 40-80 °C in a room atmosphere, solid-to-liquid ratio of 1:6 - 1:10	Ref. [15]
LMAA	Low-Moisture Anhydrous Ammonia pretreatment at 80 °C . 0.6 atm. for 84 h. C.G. Yoo et al., <i>Bioresour. Technol.</i> 102, 10028 (2011)	Ref. [16]
Modified LMAA	Low-Moisture Anhydrous Ammonia pretreatment at room temperature in a room atmosphere, solid-to-liquid ratio of 1:1. Use of NH ₃ (1.1 g) for 100 g napiergrass.	Ref. [17]

[14] F. Teymouri, L.Lauerano-Perez, H. Alizadeh, and B. E. Dale, "Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover," *Bioresource Technology*, 96 (2005) 2014-2018.

[15] T.-H. Kim and Y.Y. Lee, "Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia," *Applied Biochemistry and Biotechnology Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 124 (2005) 1119-1132.

[16] C. G. Yoo, N. P. Nghiem, K. B. Hicks, T. H. Kim, "Pretreatment of Corn Stover by Low Moisture Anhydrous Ammonia (LMAA) Process," *Bioresource Technology*, Vol. 102, (2011) 10028-10034.

[17] M. Yasuda, K. Takeo, H. Nagai, T. Uto, T. Yui, T. Matsumoto, Y. Ishii, and K. Ohta, Enhancement of ethanol production from napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach) by a low-moisture anhydrous ammonia pretreatment, *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 3 (2013) 179-185

2 実験方法

2.1 リグノセルロースの成分分析

ネピアグラス葉部の分析は次のようにして行なった。未処理または EGA 処理のネピアグラス (30 g) を 1%NaOH 水溶液 (400 mL) とともに 95°C で 1 時間過熱した。黄色沈殿物としてホロセルロースが遊離した。これを遠心分離と濾過によって分離し、重量を測ることでホロセルロース量とした。ろ液を希塩酸で中和して、pH 5.0 に調製した。生成した褐色の沈殿を遠心分離 (10,000 rpm, 1 min) で分離して集めた。これをリグニン量とした。ホロセルロースを構成する糖の分析は、NREL 法に従って分析した。ホロセルロース (300 mg) に濃硫酸 (72wt%, 3.0 mL) を加え、30°C で 1 時間放置した。その後、水 (84mL) を加えて、硫酸の濃度を 4.0 wt% に調製した。これをオートクレーブ中で 121°C で 1 時間反応させることで完全糖化した。糖化液を CaCO₃ で中和して、遠心分離で上澄み液 (約 87 mL) を得た。エバポレーターで 30 mL まで濃縮して、LC で分析によって糖成分を求めた。成分分析結果を表 1 に示す。灰分は、ネピアグラス (2.0 g) をるつぼに入れ、電気炉 (KBF784N1, Koyo, Nara, Japan) で 850°C で 2 時間にて燃焼させて、残渣物の重量を灰分量とした。

2.2 加水分解酵素

セルラーゼとしては、*Acremonium cellulolyticus* 由来の Acremozyme KM (Kyowa Kasei, Osaka) を用いた、Acremozyme は *Meycellase* (Meiji Seika)、*Trichoderma viride* 由来のセルラーゼ (Wako chemicals)、*Aspergillus niger* 由来のセルラーゼ (Fluka) などの他の酵素よりも高活性であった。また、キシラナーゼとして、市販の *Trichoderma longibrachiatum* (*reesi*) 由来の Sumizyme X (Shin Nihon Chemicals, Anjyo, Japan) を用いた。

2.3 酵母および組換え大腸菌 K011 の前培養

Saccharomyces cerevisiae NBRC 2044 は グルコース (20.0 g/L), ペプトン (1.0 g/L), 酵母溶液 (1.0 g/L), NaHPO₄ (1.0 g/L), MgSO₄ (3.0 g/L) を含む培養液 (初発 pH 5.5) 中で 30 °C, 24 時間培養した。24 時間の培養後、細胞濃度が 7.7×10^7 cells/mL の酵母溶液が得られた。

また、組換え大腸菌 K011 の前培養は次のように行なった。LB 培地 (トリプトン 2.0 g、酵母エキス 1.0 g、NaCl 2.0 g、蒸留水 200 mL) に寒天 3.0 g を入れ、オートクレーブで滅菌し、シャーレに 20 mL とり、クリーンベンチ内で殺菌灯を当てながら冷やし寒天培地を調製した。次に K011 を -80°C の冷凍庫から出し、寒天培地に波状形に植菌した。30°C の培養機に培地面が上になるように置き 24 h 培養した。LB 培地をオートクレーブで滅菌しクリーンベンチで殺菌灯を当てながら冷やし、プレートに生えた K011 株を白金耳ですくい入れた。その後 37°C、150 rpm で 24 h、振とう培養し、K011 乾燥菌体量が 0.52 mg/mL の前培養液を得た。

2.4 分析方法

エタノールは 2-プロパノールを内部標準とするガスクロマトグラフ分析 (分析装置、Shimadzu GC-2014、カラム、5% Thermon 1000/Sunpak-A (Shimadzu)) によって行った。ヘキソースおよびペントース量はアニオン交換型カラム (Shodex Asahipak NH2P-50 4E 250 mm × 4.6 mm in ID) を用いて液体クロマトグラフ (Shimadzu LC-20AD) で定量した。

3 結果と考察

3.1 アンモニアを用いる前処理(LMAA法)

ネピアグラスは、宮崎大学木花圃場で栽培したものを、葉部を使用した。切断後、70 ° C で 72 時間乾燥し、粉末化した。乾燥ネピアグラス粉末 (100 g, 体積 320 mL) をフラスコ (1 L) に入れ、水 (100 g) を液滴にしてゆっくりと加えて、湿気を帯びさせた。真空ポンプで脱気を行い、次のアンモニアガスを充填した。この操作を三回繰り返し、内容のガスを完全にアンモニアに置換した。フラスコ内に充填されたアンモニア重量は 1.1 g であり、既報の SAA 処理に比べて使用するアンモニア量が極めて少ない。また、固形物と水との比は 1:1 であるが、水溶液部分は全く含まず、SAA とは異なる前処理法である。このようにして調製したネピアグラス粉末を 1 週間から 4 週間室温で放置した。処理後、アンモニアガスをエバポレーターで留去し、処理物は水 (2 L) で 3 回 洗浄し、淡褐色の水溶液を分離した。処理したネピアグラス粉末は 60 ° C で乾燥し、次の糖化発酵工程に用いた。このプロセスを **LMAA-n** と名付け、n は処理時間の週を表している。また、ネピアグラス粉末に水を加えないでアンモニアガス雰囲気暴露させる前処理方法を LMAA(dry) とした。**Table 3** に成分分析の結果および構成糖から生産可能な糖量およびエタノールの理論収量を示す。

Table 3 Components of napiergrass and theoretical amounts of saccharide and ethanol produced from 100 g of napiergrass

Pretreatment	Component (wt%) ^{a)}				Theoretical amounts (g)		
	Hc	Lg	Ash	X	Glucose	Xylose	Ethanol ^{b)}
Non-treatment	48.2	12.6	13.9	25.3	34.8	19.2 g	27.6
LMAA-4 pretreatment	61.1	7.1	7.1	24.7	44.1	24.3	35.0

a) Hc: holocellulose, Lg: lignin, X: others. B) Maximum yield of ethanol from SSF

3.2 LMAA の評価

3.2.1 糖化工程(SA)による評価

LMAA 前処理の効果を糖化反応(SA)で検証した。ホロセルロース (10.0 g) を酢酸緩衝液 (60 mL, pH 5.0) に分散し、オートクレーブにて 120 ° C で滅菌操作を行った。セルラーゼ (1.0 g) を溶液に加えて、45 ° C で激しく攪拌しながら糖化を行った。反応溶液は 12000 rpm で遠心分離を行い、上澄みを液の HPLC 分析を行なった。**Figure 1** には、LMAA で処理したネピアグラスの糖化反応における経時変化を示す。アンモニア処理時間を変化させたネピアグラスを用いて SA を行った結果、糖量は LMAA-4 において最も早く最大値に到達した。4 週間の LMAA-4 を最適な前処理とした。また、LMAA-4 前処理は LMAA-4(dry)前処理よりも優れていることが確かめられた。水を用いると LMAA 前処理の効率が向上することが分かった。

Table 4 には 168 h の糖化反応で得られるグルコースおよびキシロース量および収率を示す。未処理のネピアグラスからは、全糖を収率 54% で生成した (Run 1)。LMAA 前処理をしたネピアグラスでからグルコース収率は 66-76% に向上した (Runs 2-4)。しかし、キシロース収率は 51% と低いままであった。**Figure 2** には長時間の糖化実験の結果を示す。LMAA-4 処理を行うことによりグルコースの生成量が短時間で 80% まで向上することが確認されたが、キシロースの生成には通常反応時間よりも数倍多い 360 時間以上を要し、収率も 60% に留まった。

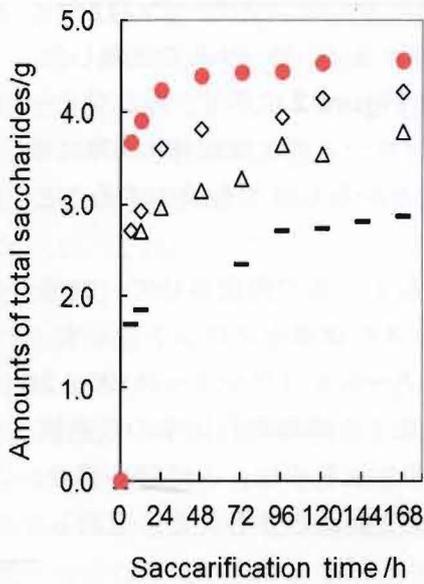


Figure 1. Time-conversion plots of the total yields of saccharides in the saccharification of the pretreated napiergrass using Acromozyme: LMAA-1 (Δ), LMAA-2 (\diamond), LMAA-4 (\bullet), LMAA-4 (dry) (\circ), and non-treatment (\blacksquare).

Table 4 Saccharification of LMAA-pretreated napiergrass. ^a

No	PT ^b	F_X ^c	Product/g (yield/%) ^d		
			Glucose	Xylose	Total
1	NO	0.0	2.20 (63)	0.68 (36)	2.88 (54)
2	LMAA-1	0.0	2.89 (66)	0.91 (38)	3.80 (63)
3	LMAA-2	0.0	3.07 (70)	1.16 (49)	4.23 (63)
4	LMAA-4	0.0	3.36 (76)	1.20 (51)	4.57 (67)
5	LMAA-4	0.3	3.23 (73)	1.13 (48)	4.36 (64)
6	LMAA-4	0.4	3.56 (81)	1.49 (63)	5.05 (74)
7	LMAA-4	0.5	4.14 (94)	1.60 (68)	5.74 (85)
8	LMAA-4	0.6	4.25 (96)	1.48 (62)	5.73 (86)
9	LMAA-4	0.7	3.92 (90)	1.51 (64)	5.43 (81)
10	LMAA-4	0.8	3.72 (84)	1.47 (62)	5.20 (78)
11	LMAA-4	0.9	3.63 (82)	1.30 (55)	4.93 (73)
12	LMAA-4	1.0	3.05 (69)	0.95 (40)	4.00 (59)
13	NO	0.5	2.20 (63)	0.96 (50)	3.16 (59)

^a Saccharification was performed for napiergrass (10.0 g) using the hydrolytic enzyme (1.0 g) in an acetate buffer (60 mL) at 45°C for 168 h.

^b Pretreatment (PT). NO: non-treatment. LMAA: a low-moisture anhydrous ammonia pretreatment. The value was the period in week for LMAA-pretreatment.

^c F_X value was the fraction of xylanase in the mixture (1.0 g) of cellulase and xylanase.

^d The amounts of saccharides obtained from the saccharification of 10 g of the pretreated napiergrass.

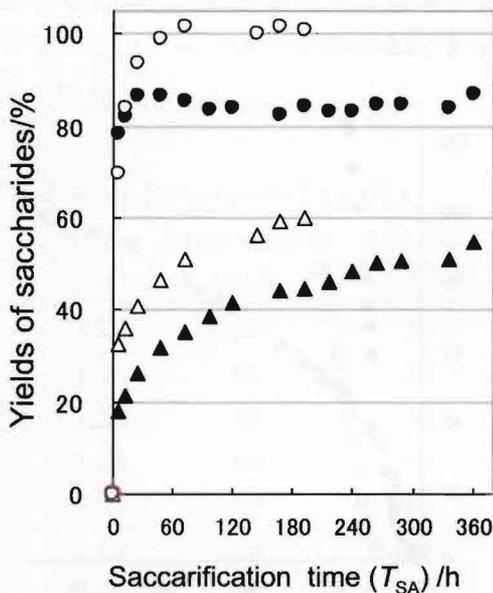


Figure 2. Time-conversion plots of the amounts of saccharide in saccharification of LMAA-4 treated napiergrass (10.0 g) using Acromozyme (C) and/or Sumizyme (H): Glucose (\bullet) and xylose (\blacktriangle) from the saccharification using C (1.00 g). Glucose (\circ) and xylose (\triangle) from the saccharification using C (0.50 g) and H (0.50 g)

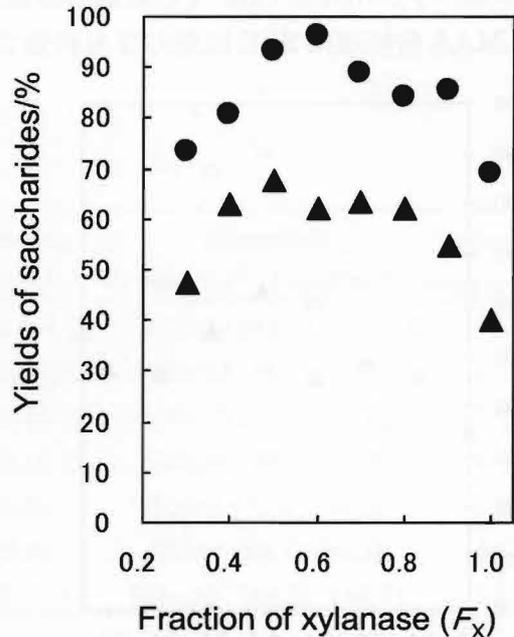


Figure 3. The effects of the F_X on the yields of glucose (\bullet) and xylose (\blacktriangle) in the saccharification of LMAA-4 treated napiergrass (10.0 g) for 192 h using a mixed enzymes

そこで、キシロースの生成量の向上と反応時間の短縮を目指して、キシラナーゼ (X) をセルラーゼ (C) に添加して SA を行った。X の混合比率 (F_X) を $F_X = X/(C+X)$ の式で定義した。LMAA-4 前処理ネピアグラスを $F_X=0.5$ の条件で糖化した結果を **Figure 2** に示す。キシラナーゼの混合によってグルコースの生成収率は 95% まで向上し、キシロースの生成収率も 67% に増加した。さらに、糖化時間も 168 時間に短縮できた。以上のことから C に X を添加することにより糖生成量の向上、また、SA 時間の短縮が可能となった。

次に、酵素混合比率 (F_X) の最適化を行なった。 F_X を 0.3 から 1.0 まで変化させて、SA を 168 h 行った。**Figure 3** に各 F_X 値でのグルコースおよびキシロースの収率をプロットを示す。 $F_X=0.5$ でグルコース (93%) およびキシロース (67%) が得られ、 $F_X=0.6$ はグルコース (96%) およびキシロース (61%) となった。キシロースの収率の高い $F_X=0.5$ を酵素混合比率の最適値と決定した。また、 $F_X=0.5$ でのグルコースおよびキシロースの生成収率は、未処理の場合 63% および 50% であり (run 13)、LMAA 処理では 94% および 68% まで向上させることに成功し (run 7)、LMAA は SA に対して有効であることが示された。

3.2.2 SSF による評価

次に発酵過程に対する LMAAA 前処理の効果を SSF によって検証した。SSF は、ネピアグラス (1.33 g)、加水分解酵素 (133 mg)、および酵母水溶液 (0.16 mL) を酢酸緩衝液 (8mL, pH 5.0) に加え、36 °C で反応を行なった。反応液から発生する二酸化炭素量で、反応を追跡した。まず、最初に、SSF での酵素混合比率 (F_X) の最適化を行った。 $F_X=0.0$ から $F_X=0.7$ まで酵素比率を変えて SSF を行った時のキシロースおよびエタノールの収率を **Figure 4** に示す。 $F_X=0.4$ および 0.5 でエタノールが 85% 以上の高い収率を示した。以上の事から、最もキシロース収率の高い $F_X=0.4$ を SSF での最適酵素混合比率であることが分かった。これらのことから、LMAA 前処理は SSF に対しても有効であることが分かった。

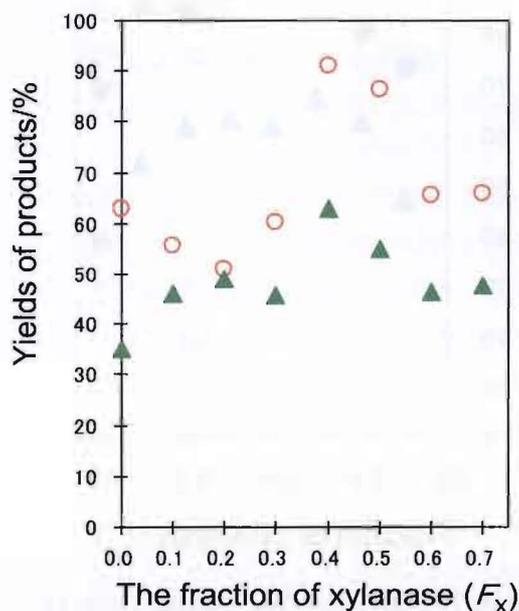


Figure 4. Dependence of yields of glucose (○) and ethanol (▲) in the SSF of LMAA-4 pretreated napiergrass.

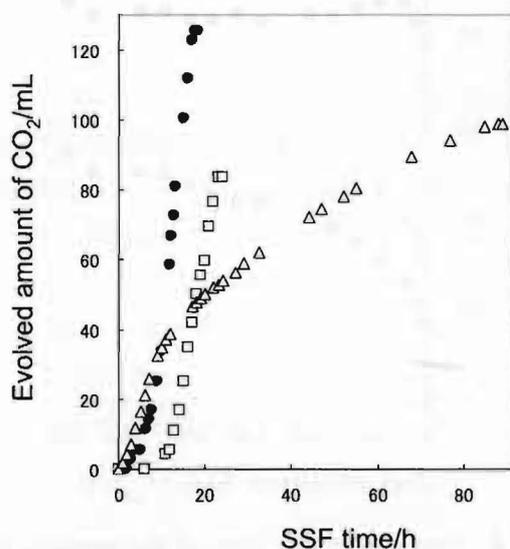


Figure 5. The time-conversion of CO₂ evolved from the SSF reaction of LMAA-treated (●), non-treated (□), and alkali-treated (△) napiergrass. The amounts of CO₂ were presented as the evolved CO₂ from 1.0 g of holocellulose

3.2.3 LMAA とアルカリ前処理の比較

リグノセルロースの一般的な前処理は、アルカリ前処理によってリグニン成分を除去する方法で行われてきた。しかし、我々の検討（発表論文 6）により、リグニン含量の少ないネピアグラスの前処理方法としてはアルカリ前処理が有効でなく、Figure 5 に示す二酸化炭素発生量の経時変化の比較から分かるように、他のプロセスに比べて発酵工程を遅いことが分かった。これは、アルカリ前処理による発酵阻害物質の遊離または発酵に必要な栄養素の溶出が原因と考えられている。しかし、今回報告した LMAA 前処理では、そのような発酵工程での抑制が起こらず、未処理のネピアグラスの経時変化と同様の挙動となっている。さらに、AFEX および SAA ではアンモニア水溶液を使うために、アンモニアの回収にはエネルギーが必要であるが、LMAA 前処理ではガス状のアンモニアを用いるため低コスト・低エネルギーでアンモニアの回収・リサイクルが容易であると思われる。結果として、LMAA 前処理はリグノセルロースの SSF プロセスを高効率化できる有用な前処理方法の一つであり低コスト低エネルギーで行なうことができると思われる。

3.3 ネピアグラスからの効率的バイオエタノール生産

3.3.1 SSF→PF 法による二段階法

最初に、大容量培養機を用いて大量スケールでの SSF を行なった。LMAA 前処理したネピアグラス (100 g) を大容量培養機に入れ、酢酸緩衝液 300 mL を入れオートクレーブした。クリーンベンチ内で酵素 10 g (セルラーゼ 6.0 g、キシラナーゼ 4.0 g) を緩衝液 300 mL に溶かし滅菌フィルターによりろ過し、*S. cerevisiae* の懸濁液 12 mL とともに培養機内に入れた。窒素置換を行った後 34°C で 150 rpm で攪拌しながら反応した。二酸化炭素発生終了を発酵終了時間とし、エタノールをガスクロマトグラフィー (GC) で、グルコースを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。結果として 17.4 g のエタノールと 12.6 g のキシロースを得た。

Table 5. Pentose fermentation by KO11

No.	Xylose /g	KO11 solution /mL ^{a)}	SSFsoln. /mL ^{b)}	Xylose/mg (yield/%) ^{c)}	ethanol/mg (yield/%) ^{d)} [yield/%) ^{e)}	ethanol conc./g L ^{-1 f)}
1	1.26	50	50	807±9 (64.0)	352±28 (46.5) [37.2]	3.52
2	1.26	60	50	457±122 (36.3)	440±75 (58.1) [50.8]	4.00
3	1.28	70	50	60±10 (4.7)	594±77 (77.5) [73.6]	4.95
4	1.28	80	50	86±38 (6.7)	540±59 (70.4) [65.4]	4.15
5	0.75	70	40	0 (0.0)	309±3 (72.0) [68.6]	3.09
6	1.00	70	40	0 (0.0)	531±4 (88.4) [86.3]	4.82
7	1.50	70	40	771±23 (51)	566±10 (66.2) [54.7]	5.15

a) The volume of the cell suspension of *E. coli* KO11 in ml.

b) Pentose fermentation was performed for the SSF solution which contained 25.2 g L⁻¹ of xylose and 4.4 g L⁻¹ of glucose.

c) Recovered xylose.

d) The values in parenthesis are ethanol yields from both xylose and glucose.

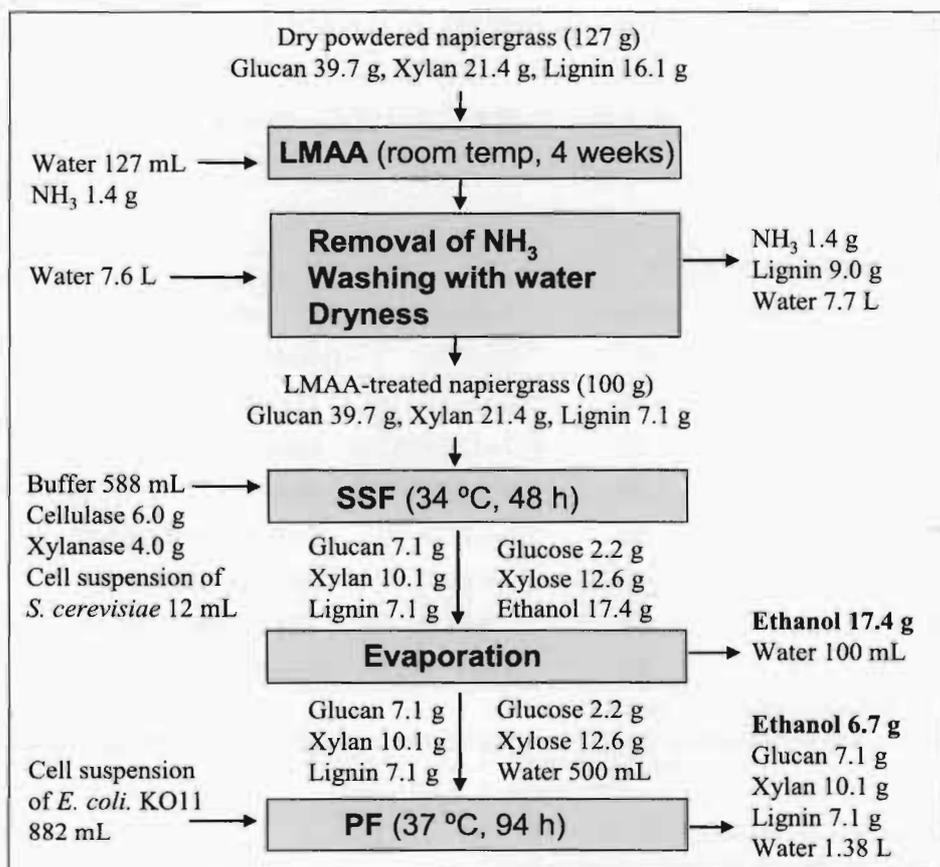
e) The values in blanket are the ethanol yields from xylose.

f) Concentration of ethanol in g L⁻¹.

キシロースを含むSSF溶液に対して大腸菌K011によるペントース発酵を様々な条件で行った。最初に、K011量の最適化を行なった。SSF溶液中のキシロース量を変化させて発酵収率の変化を観察した。SSF終了後の溶液をエバポレーターでエタノールの除去と濃縮を行い、濃度25.2 g/Lのキシロースと濃度4.4 g/Lのグルコースを含む水溶液を得た。その試料50 mLに上記のK011前培養液を50 mL~80 mL加えて37°C、150 rpmで振とう培養した。結果をTable 5に示す。K011量を増加させるにしたがってエタノール量及び収率が向上したが、80 mL加えた場合は70 mLの場合に比べてエタノール量及び収率が低下した。これらのことからキシロース発酵における最適K011量は70 mLであると決定した。

次に、PFにおけるキシロース量の最適化を行なった。SSF終了後の溶液をエバポレーターからエバポレーターでエタノールを除いて濃縮し、キシロース量がそれぞれ0.75、1、1.25、1.5 g含まれた溶液を調製した。それぞれの試料40 mLに最適量のK011培養液量である70 mLを加え37°C、150 rpmで振とう培養した。キシロース量は増加させるにしたがってエタノール量及び収率が向上したが、1.25 g加えた場合は1.0 g加えた場合よりエタノール量及び収率が低下した。これらのことからキシロース発酵での最適キシロース量は1.0 gであると決定された。以上の検討から、濃縮SSF溶液(40 mL, キシロース量1.0 g)にK011溶液(70 mL)を加えてPFを行うことで、収率88.4%でエタノールが生成した。

以上の結果から、前処理されたネピアグラス(100 g)からのSSF→PFの二段階プロセスによるエタノール生産工程のマスバランスをScheme 2に示す。前処理によってリグニン成分の56%を除去することができている。SSFプロセスでのエタノールとキシロースの収率はそれぞれ、



Scheme 2. Total mass balance from LMAA-pretreated napiergrass (100 g).

77.2%および52.8%であった。グルコースが2.2 g残っており、これが発酵されなかったためエタノール収率は目標より低くなっている。またキシロースの糖化のためにキシラナーゼを配合し、キシロース収率は未配合のものより改善されたがその収率は50%にとどまった。何らかの方法でキシロースの糖化を促進させる必要があることが分かる。

Table 6. SSCF of LMAA-treated napiergrass ^a

No	Napiergrass		Enzyme /mg ^d	KO11 /mL ^e	Yeast /mL ^f	Products/mg (Yield/%) ^b			Ethanol /gL ^{-1g}
	PT ^c	Weight/g				Xylose	Glucose	Ethanol	
1 ^h	NO	3.0	300	21	0.36	216±38 (38)	19±2 (2)	353±31 (43)	8.8
2	LMAA	3.0	300	21	0.36	73±25 (10)	47±10 (4)	777±15 (74)	19.4
3	LMAA	3.0	300	21	0	148±11 (20)	43±2 (3)	731±12 (70)	18.3
4 ⁱ	LMAA	3.0	300	0	0.36	473±43 (65)	29±10 (2)	576±39 (55)	14.4
5	LMAA	2.5	250	21	0.36	304±15 (50)	37±6 (3)	547±41 (63)	13.7
6	LMAA	3.5	350	21	0.36	385±45 (53)	37±2 (3)	719±13 (59)	18.1
7	LMAA	4.0	400	21	0.36	438±37 (60)	39±8 (3)	829±28 (60)	21.4

a SSCF was performed for buffer (40 mL) containing napiergrass (3.0–4.0 g), cellulase (150–200 mg) and xylanase (150–200 mg), *E. coli* KO11 (21 ml), and *S. cerevisiae* (0.36 mL) at 36°C for 96 h.

b The maximum amounts of xylose, glucose, and ethanol were 729 mg, 1323 mg, and 1049 mg obtained from 3.0 g of LMAA-pretreated napiergrass, respectively.

c Pretreatment (PT). NO: non-treatment. LMAA: a low-moisture anhydrous ammonia pretreatment for four weeks.

d Weight of total hydrolytic enzyme (cellulase and xylanase) in mg. The fraction (F_x) of xylanase in the mixture of cellulase and xylanase was 0.50

e Volume of the cell suspension of *E. coli* KO11 in mL.

f Volume of the cell suspension of *S. cerevisiae* in mL

g Concentration of ethanol in g L⁻¹.

h The maximum amounts of xylose, glucose, and ethanol obtained from non-treated napiergrass (3.0 g) were 576 mg, 1043 mg, and 827 mg, respectively.

i The simultaneous saccharification and fermentation (SSF) using cellulase (150 mg) and xylanase (150 mg), and *S. cerevisiae* (0.36 mL) at 36°C for 96 h.

3.3.2 同時糖化共発酵(SSCF)による一段階法

SSCFによる一段階法でエタノール生産は次のように行なった。LMAA前処理したネピアグラス(2.5~4.0 g)を100 mLバイアルビンに入れ、緩衝液13 mLを加えた。酵母用ピペットチップとともにオートクレーブで滅菌操作を行なった。次にクリーンベンチ内でバイオマスの10%に相当する酵素(通常、0.3 g; セルラーゼ0.15 g、キシラナーゼ0.15 g)を緩衝液3 mLに溶かし滅菌フィルターによってろ過しバイアルビンに加えた。さらに、酵母培養液0.36 mLとKO11培養液を21 mL加えた。pHを6.0に調整した後、窒素置換を十分にを行い、36°Cの恒温槽で攪拌しながら反応させた。二酸化炭素の発生の確認はメスシリンダーで行ない、二酸化炭素発生終了時間を反応終了時間とし、糖をHPLCでエタノールをGLCでそれぞれ測定した。その結果をTable 6に示す。最適化の結果、LMAA処理ネピアグラス(3.0 g)に対して10%の混合加水分解酵素と酵母培養液(0.36 mL)とKO11培養液(21 mL)を併用して96 h反応することで収率74%でエタノールが生成した(run 2)。

Figure 6にはSSCFにおけるエタノールおよび糖量の経時変化を示す。収率はLMAA処理物

(3 g) が理論的に反応して発生すると考えられるエタノール量 (1048 mg) と糖量 (キシロース: 729 mg、グルコース: 1323 mg) を基準にして算出したものである。グルコースは反応直後に高濃度で生成し、その後数時間でほとんど消費されている。一方、キシロースの生成は遅く、6 h で最大値に達し、27 h 以上経過して徐々に減少している。エタノールの収率は最初の 24 h で大きく増加し、その後は緩やかに増加している。これは、まず、ネピアグラスのグルコースへの糖化が先行し、グルコース発酵が先に起こっていることを示している。その後、ネピアグラスのキシロースへの糖化が次第に進み、キシロースの発酵が起こっている。また、K011 のみを用いる SSCF に比べて酵母菌を併用した方が、エタノールの立ち上がり早いことも別の実験で明らかになっている。

SSCF のマスバランスを **Scheme 3** に示す。SSCF ではキシロースとグルコースの大部分が消費されているにもかかわらずエタノール収率は 74% にとどまった。これはキシロースの糖化にかかる時間が非常に長いことが原因だと考えられる。SSCF による発酵は 96 h 行うが、キシロースの糖化は 96 h 以降も続いている。そのため発酵収率の改善にはキシロースの糖化を迅速に行う必要があると考えられる。

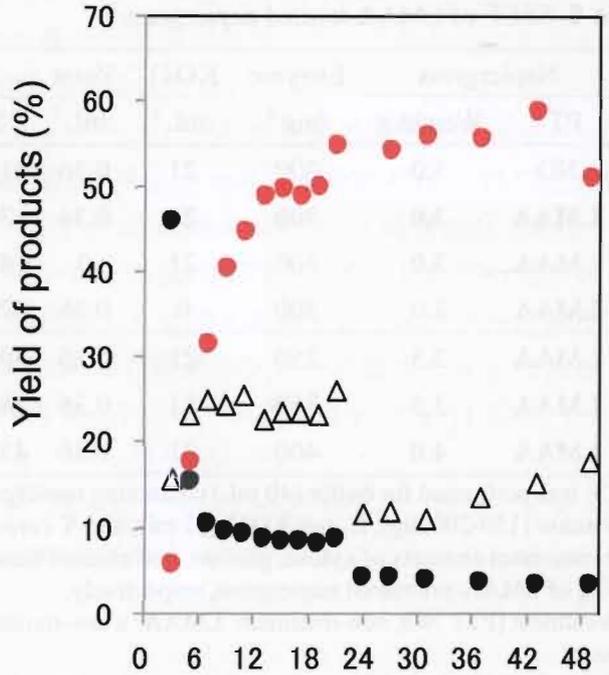
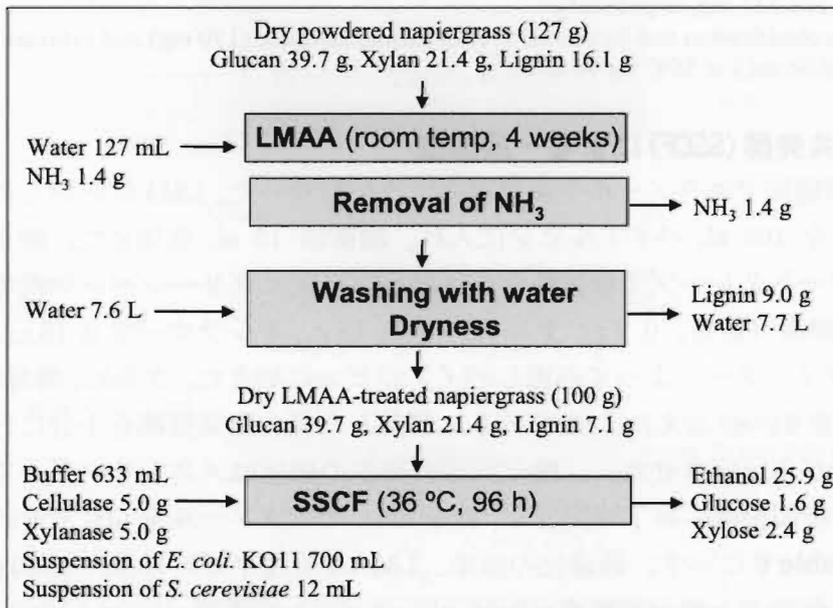


Figure 6. Time-conversion of ethanol of yields (◆), glucose (●), and xylose (△) in the SSCF using *S. cerevisiae*, *E. coli* KO11, cellulase and xylanase.



Scheme 3 Mass balance of SSCF process.

3.3.3 既報のネピアグラスからのバイオエタノール生産との収率の比較

SSF→PF 及び SSCF の2つのプロセスの比較を行うと、SSCF は反応プロセスを一段階反応なので雑菌のコンタミネーションを防ぎ、反応の効率化を行うことができ、反応時間も 24 h に短縮された。また、今回の結果と代表的な文献の結果と比較したものを **Table 7** に示す。未処理のネピアグラスの場合、SA→CF プロセスの収率は 36% であり、これに比べて SSCF では 42% と高い値を示している。また、高圧水熱処理 (PBHW) [6] または LMAA 前処理したネピアグラスでは、SA→CF プロセスの収率は 73% であり、本研究の SSCF ではそれと同等の収率 (74.1%) を得ることができた。これらのことから、LMAA 前処理と SSCF を組み合わせることで低エネルギーと低コストのバイオエタノールプロセスの構築に成功した。

Table 7 Comparison of ethanol yields

Napiergrass	Glucan + Xylane	Process	PT ^{a)}	Ethanol yield (%)	Rel
Merkeron	39.2 + 25.8	SA + CF	NO	108.7 mg/g (36%)	[6]
Merkeron	47.4 + 18.0	SA + CF	PBHW	224.5 mg/g (73%)	[6]
Schumach	37.5 + 26.5	SSF + PF	NO	144.0 mg/g (44%)	[12]
Schumach	39.7 + 21.4	SSF + PF	LMAA	241.0 mg/g (69%)	[12]
Schumach	39.7 + 21.5	SSCF	NO	117.2 mg/g (42%)	present
Schumach	39.7 + 21.4	SSCF	LMAA	259.1 mg/g (74%)	present

a) Pretreatment. NO: non-pretreatment, PBHW: Using of pressureized water at 230°C for 2h.

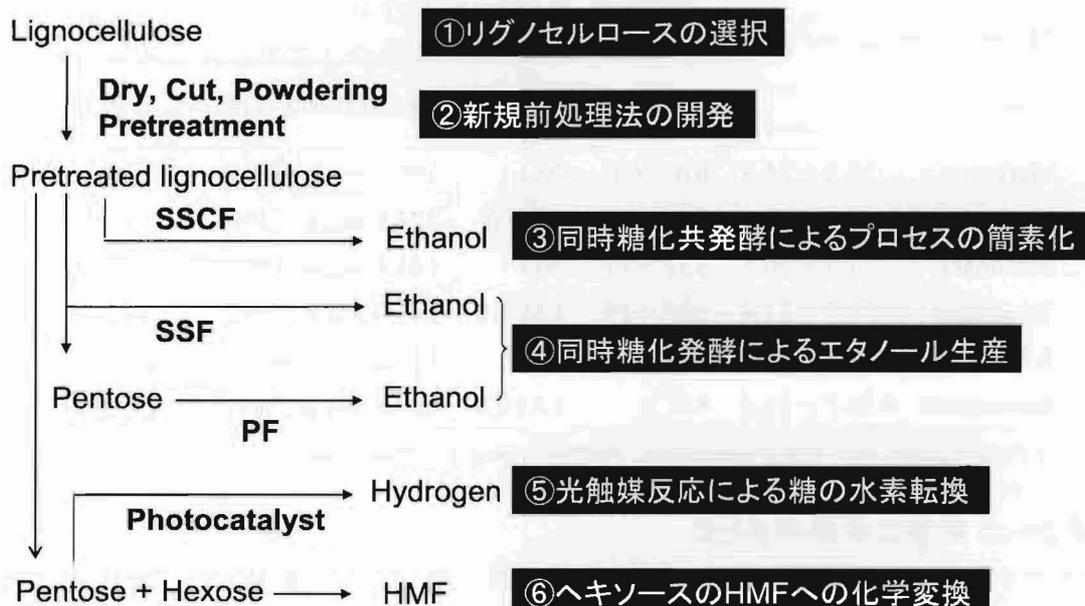
4. 平成 20–25 年度の成果のまとめ

宮崎大学オリジナルの技術として、石井康久教授 (農学部) の開発した“矮性ネピアグラス” および太田一良教授 (農学部) の開発したペントース発酵可能な組換え大腸菌 K011 の技術がある。これらの二つの基本技術を結びつけて高効率にバイオエタノールを生産できる前処理、糖化、および発酵方法を見出すことで本プロジェクト研究の最も大きな研究目的であった。

そこで、**Scheme 4** に示す研究計画にしたがって 5 年間、ネピアグラスの前処理、糖化、および発酵の研究を行なった。まず、リグニン量の異なる 4 種のリグノセルロース (ネピアグラス、イナワラ、ススキ、タケ) を用いたバイオエタノール生産実験を行い、ネピアグラスがバイオエタノールの原料として最も優れていることを見出した (研究課題①)。次に、新しい前処理法として改良 LMAA 法を開発した (研究課題②)。これは使用量が少量で、リサイクルが低エネルギーで可能なアンモニアガスを用いる新しい前処理方法である。この方法で前処理したネピアグラスをセルラーゼ、キシラナーゼ、大腸菌 K011 および酵母の 4 種混合系による同時糖化共発酵 (SSCF) を行い、原料基準エタノール収率 74.1% を達成した (研究課題③、④)。この値は **Table 1** に示す今までネピアグラスで報告されているエタノール収率で最高収率となっている。

一方、リグノセルロースの糖化発酵プロセスで生産されるエタノールは濃度は通常 4% 未満であり、エタノールの分離には多くのコストを要すると思われる。そこで、バイオマスの糖化で生産される糖類を光触媒反応で水素ガスに変換すれば、蒸留操作なしで自発的に分離回

取することができる。このことに着目して、本プロジェクトでは酸化チタン光触媒によるバイオ水素の製造についても研究を行なった（研究課題⑤）。その結果、水酸基が炭素に連続的に置換した糖およびグリセロールなどのバイオマス由来物質は光触媒水素発生反応において優れた犠牲剤として働き、糖からほぼ100%の収率で水素を生産できることが分かった。また、同時に構造の異なるポリアルコールを犠牲剤に用いる光触媒水素発生反応の結果、“隣接酸素原子効果”という新しい概念を見出した。さらに、当研究グループが独自に開発した塩化マグネシウム担持シリカゲルを用いてグルコースからHMF（5-ヒドロキシメチルフural）への変換についても検討し、高い変換効率を達成した（研究課題⑥）。



Scheme 4

工程	研究課題	研究成果
原料	①リグノセルロースの選択	論文 6
前処理	②新規前処理法の開発	論文 2, 9, 12
糖化発酵	③同時糖化共発酵によるプロセスの簡素化	論文 10
	④同時糖化発酵によるエタノール生産	論文 5, 9
新規バイオ燃料の開拓	⑤光触媒反応による糖の水素転換	論文 3, 4, 7, 8, 11
	⑥ヘキソースのHMFへの化学変換	論文 1

【当研究課題で発表した論文リスト】

1. M. Yasuda, Y. Nakamura, J. Matsumoto, H. Yokoi, and T. Shiragami, Transformation of Glucose to 5-Hydroxymethyl-2-furfural by SiO₂-MgCl₂ Composite” *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **84**, 416-418 (2011).
2. M. Yasuda, A. Miura, R. Yuki, Y. Nakamura, T. Shiragami, Y. Ishii, and H. Yokoi, The effect of TiO₂-photocatalytic pretreatment on the biological production of ethanol from lignocelluloses, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **220** 195-199 (2011)
3. T. Shiragami, T. Tomo, H. Tsumagari, R. Yuki, T. Yamashita, and M. Yasuda, Pentose acting as a sacrificial multi-electron source in photocatalytic hydrogen evolution from water by Pt-doped TiO₂. *Chem. Lett.*, **41**, 29-31 (2012).

4. T. Shiragami, T. Tomo, H. Tsumagari, Y. Ishii, M. Yasuda, Hydrogen evolution from napiergrass by the combination of biological treatment and a Pt-loaded TiO₂-photocatalytic reaction, *Catalyst*, **2** 56-67 (2012)
5. M. Yasuda, A. Miura, T. Shiragami, J. Matsumoto, I. Kamei, Y. Ishii, K. Ohta, 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 (2012)
6. M. Yasuda, K. Takeo, T. Matsumoto, T. Shiragami, Y. Matsushita, K. Sugamoto, and Y. Ishii, Effectiveness of lignin-removal in simultaneous saccharification and fermentation of napiergrass, rice straw, silbergrass, and bamboo with different lignin-contents, *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*, Edited by A. K. Chandel and S. Silverio da Silva, InTech (2013).
7. 保田昌秀、中村泰久、三浦昭晃、松本朋子、松本仁、白上努、草本系パルプの生化学反応および触媒反応によるバイオ燃料化、*宮崎大学工学部紀要*, **41**, 17-21 (2012)
8. T. Shiragami, T. Tomo, T. Matsumoto, and M. Yasuda, Structural dependence of alcoholic sacrificial agents on TiO₂-photocatalytic hydrogen evolution, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **86**, 382-389 (2013)
9. M. Yasuda, K. Takeo, H. Nagai, T. Uto, T. Yui, T. Matsumoto, Y. Ishii, and K. Ohta, Enhancement of ethanol production from napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach) by a low-moisture anhydrous ammonia pretreatment, *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, **3**, 179-185 (2013)
10. “審査中” M. Yasuda, H. Nagai, K. Takeo, Y. Ishii, and K. Ohta, Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of a low-moisture anhydrous ammonia (LMAA)-pretreated napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach), *Biomass and Bioenergy*, (2014)
11. “審査中” M. Yasuda, T. Tomo, S. Hirata, T. Shiragami, and T. Matsumoto, Neighboring hetero-atom assistance of sacrificial alcohols and amines to TiO₂-photocatalytic hydrogen evolution, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* (2014)
12. “投稿中” 松本朋子・新田唯・竹尾圭祐・保田昌秀、バイオエタノール生産のための草本系リグノセルロースのアンモニアガス前処理物の走査電子顕微鏡による評価、*宮崎大学工学部紀要*, **43** (2014)
13. “投稿中” 【総説】 M. Yasuda, Y. Ishii, and K. Ohta, Pretreatment, saccharification, and fermentation processes of napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach) for bioethanol production, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, special issue (2014)

【研究体制（糖化発酵グループ）】

【グループ長】	【研究協力者】	平成 21 年度	22 年	23 年	24 年	25 年
太田一良	結城竜大	○	○			
【班員】	中村泰久、三浦昭晃	○○	○○	○○		
保田昌秀	津曲 光		○	○	○	
白上 努	長谷川朋矢		○			
	竹尾圭祐、塘 貴幸、永井駿人			○○○	○○○	○○○
	逆瀬川純輝				○	
	平田翔一				○	○
	新田 唯					○
	合計（延べ 25 名）	2 名	5 名	6 名	6 名	5 名

5. 謝辞

本研究は、文部科学省特別経費「大学の特性を生かした多様な学術研究機能の充実（2009-2013）：高機能触媒反応によるバイオマス資源のバイオ燃料およびバイオ有価物への変換プロセスの開発」として実施されたものである。また、組換え大腸菌 KO11 の使用を許可して頂いた Lonnie O. Ingram 教授（フロリダ大学）に感謝申し上げます。