

平成 25 年度
環境研究総合推進費補助金 研究事業
総合研究報告書

エタノール発酵糸状菌を活用した製紙廃棄物からの
効率的バイオエタノール製造法の開発
(3K122017)

平成 26 年 3 月

国立大学法人 富山大学 星野一宏

補助事業名	環境研究総合推進費補助金研究事業（平成 24 年度～平成 25 年度）
所管	環境省
国庫補助金	32,776,000 円（複数年度の総計）
研究課題名	エタノール発酵糸状菌を活用した製紙廃棄物からのバイオエタノール製造法の開発
研究期間	平成 24 年 6 月 8 日～平成 25 年 3 月 31 日
研究代表者名	星野 一宏（国立大学法人 富山大学）
研究分担者	高野 真希（国立大学法人 富山大学）

目 次

総合研究報告書概要	1
本文	
1. 研究背景と目的	10
1.1 研究背景	10
1.2 未利用バイオマス資材によるエタノール発酵研究の現状と課題	12
1.3 研究の目的	16
2. 研究方法	21
2.1 実験材料	21
2.2 ペーパーズラッジの前処理	25
2.3 ペーパーズラッジの成分評価	28
2.4 セルラーゼを用いたペーパーズラッジの加水分解	30
2.5 エタノール発酵系状菌のスクリーニング	32
2.6 同時糖化発酵プロセスによるペーパーズラッジからのエタノール生産	32
2.7 培養液中のセルラーゼ活性	34
3. 結果と考察	35
3.1 ペーパーズラッジの成分分析	35
3.2 ペーパーズラッジの前処理法の確立	40
3.3 ペーパーズラッジの加水分解の最適化	46
3.4 エタノール発酵系状菌の検索および同時糖化発酵プロセス	56
4. 結論	70
5. 参考文献	73
6. 研究発表	79
論文発表	
学会等発表	
7. 知的財産権の取得状況	82
研究概要図	83
英文概要	84

環境研究総合推進費補助金 研究事業 総合研究報告書概要

研究課題名：エタノール発酵糸状菌を活用した製紙廃棄物からの効率的
バイオエタノール製造法の開発

番号：3K122017

国庫補助金清算所要額：32,776,000 円（複数年度の総計）

研究期間：平成 24 年 6 月 8 日～平成 26 年 3 月 31 日

研究代表者名：星野 一宏（国立大学法人 富山大学）

研究分担者：高野 真希（国立大学法人 富山大学）

目的

日本国内において、製紙製造工程で年間 550 万トンのペーパースラッジ (Paper Sludge, 以下 PS と略称する) が発生している。その大半は中間処理として焼却より処理されており、これが CO₂ 発生の源となっている。この削減を目指しつつ PS からバイオエタノールの生産を達成させるために、PS の前処理法を確立するとともに、PS に対して耐性を有する新規なエタノール発酵糸状菌と PS 中の繊維質を効率よく加水分解できるように最適化した酵素カクテル剤と組み合

わせた同時糖化発酵プロセス (Simultaneous Sacchrification Fermentation, 以下 SSF プロセスと略称する) を確立し、1 トンの湿潤最終 PS から 50 kg のエタノールを生産させること (エタノール濃度 10 - 30 g/L の生産) を目標とする。

研究方法

本研究に使用した PS は、主に富山県高岡市の中越パルプ工業 (株) 能町事業所と二塚事業所の廃水処理装置から排出され、燃焼処理を行う前の PS (以下、最終 PS と略称する) と、能町事業所の抄紙機より排出された PS 残渣 (以下、抄紙テールと略称する) を主に使用した。また、各 PS の加水分解には、安価で入手が容易な 14 種類の市販セルラーゼ剤を使用した。さらに、最終 PS が微生物の生育にとって過酷な状態であることから、最終 PS 中で生育が可能で、かつ効率的なエタノール生産を達成できるエタノール発酵糸状菌を、本研究室で保存している接合菌 *Mucor* 属およびその近縁種ライブラリー 84 株からスクリーニングした。

さらに、高温耐性変異株は、選択したエタノール発酵糸状菌の分生子に対してカーボンイオンビームを照射し、40℃で生育する菌株を得た。両 PS の成分分析は、水分含量、カルソナーリグニン、酸可溶性ーリグニン、繊維成分 (セルロースおよびヘミセルロース)、灰分含量をセルロース系バイオマスの成分分析法¹⁾に準じて求めた。また、無機成分の分析は、灰中の無機成分は蛍光 X 線分析 (スペクトリス、PW2404) により行った。

最終 PS の前処理は、水洗浄法、酸処理法、アルカリ法、アルカリ-酸処理法により実施した。これら処理 PS の加水分解は、各種セルラーゼ剤を用いて、pH 5.5 に調整した 反応液 ((NH₄)₂SO₄ 7.5 g/L、KH₂PO₄ 3.5 g/L、CaCl₂ · 2H₂O 1.0 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 0.75 g/L、Yeast extract 5.0 g/L) 中に行った。基質濃

度は 50 - 100 g-dry/L とし、反応体積は 25 mL、28℃のインキュベーター（高崎科学器機、TB- C-50RS）内で 120 rpm の振盪反応により実施した。さらに、PS を効率良く加水分解させるためにセルラーゼ剤の配合比の最適は、14 種類の市販の酵素剤を用いて試料である最終 PS を加水分解させ、生成した発酵糖より、加水分解活性を求める。加水分解の結果が望ましい酵素剤を 3 種類選択した後、実験計画法（DOE）を用いて応答曲面法（RSM）²⁾を実施し、配合比の最適化を実施した。さらに、SSF プロセスによる PS からのエタノール生産は、100 mL の培養瓶（培養体積 25 mL）に、各種処理 PS 濃度が 50 - 100 g-dry/L となるよう入れ、さらに、最適化した酵素カクテル剤とエタノール発酵糸状菌を植菌することにより行った。培養は、28℃、120 rpm の振盪条件で 96-144 時間行った。、酵素による加水分解反応およびエタノール発酵における培地中のエタノールおよび糖質濃度は液体クロマトグラフィー（島津製作所、LC-10 System）を用いて分析した。

結果と考察

PS からエタノールを効率良く製造するためには、その成分を詳細に分析することが必要である。そこで、中越パルプ工業（株）の 2 事業所より排出された最終 PS と抄紙テールについて成分分析を実施した。初めに、最終生成物がエタノールであることから、PS 中の繊維質（セルロースおよびヘミセルロース）の含量を中心に分析に行った。最終 PS の繊維質含量は乾燥物基準で 14-18%がセルロース、7 - 10%がヘミセルロースであり、抄紙テール中の繊維質含量は約 47 - 48%がセルロース、約 17 - 18%がヘミセルロースであったことから、いずれもエタノールを生産させるためのバイオマス源として有望な資源であることがわかった。さらに、最終 PS からエタノールを生産する際、酵素反応への阻害や発酵

阻害を引き起こすと考えられる無機成分（炭酸カルシウムなど）と繊維質以外の有機成分（界面活性剤、脱墨剤など）を除去する方法として、アルカリ－酸処理法を開発した。本処理により、最終 PS 中の無機成分を未処理の状態から約 52%にまで除去することができ、特に、カルシウム含量は未処理の場合の約 30%から 3%にまで減少させることができた。

次に、PS からエタノールへの発酵プロセスは、PS 中に含まれる繊維質からグルコースおよびキシロースなどの発酵糖を生成する糖化段階と、生成した発酵糖を発酵微生物によりエタノールへ変換する発酵段階の組合せにより進行する。この逐次反応において、前者の糖化段階が律速であり、この反応性の向上が生成エタノール量を左右する。すなわち、この加水分解を効率化し、使用酵素量を削減させることが実用化へ一つの鍵となっている。そこで、市販のセルラーゼ剤を組み合わせた酵素カクテル剤の最適化を試みた。各種前処理を行った PS に対して 14 種類の市販セルラーゼ剤を用いて加水分解を行い、生成した還元糖より最適と考えられる酵素剤を 3 種類選択した。次に、PS 加水分解において選択した 3 種類の酵素剤の配合条件を DOE を用いて決定し、この実験計画に従い加水分解反応を行い生成した発酵糖量を求めた。生成発酵糖量の結果を元に RSM³⁾を実施し、酵素配合比に対して得ることが可能な発酵糖量を予測した。その結果、抄紙テールの場合、Cellulase T : Cellulase Onozuka 3S : Accellerase の混合比を、0.310 : 0.348 : 0.342 とした加水分解において、最大の発酵糖が生産できると予測できた。さらに、アルカリ－酸処理最終 PS の場合、Accellerease : Pectinase : Meicelase の混合比が、1.907 : 0.710 : 0.384 とした加水分解反応において、生成発酵糖量を最大にできると予測できた。

そこで、最適化した酵素カクテル剤を用いて、80 g-dry/L の抄紙テールに対して 120 時間の加水分解反応を行った結果、グルコースは 41.4 g/L、キシロースは

3.3 g/L、セルトリオースは 2.8 g/L、セロビオース 6.7g/L と利用可能な可溶糖として合計 54.1 g/L 生成させることができた。同様に、最適な酵素カクテル剤を用いて 50 g/L の最終 PS を用いて加水分解反応を行った結果、反応 96 時間目にグルコース 12.3 g/L、1.2 g/L キシロース、1.0 g/L セロビオースと利用可能な可溶糖を合計 14.5 g/L 生成させることができた。

次に、最適な PS からエタノールを生産させるために、本研究室の接合菌 *Mucor* ライブラリーから PS に対してエタノール発酵に優れた菌株のスクリーニングを実施した。その結果、*Mucor circinelloides* NBRC 4563 株を見出した。そこで、使抄紙テールおよびアルカリ-酸処理最終 PS に対して最適化した酵素カクテル剤と本菌株を組み合わせた SSF プロセスにより、それぞれの培養 96 時間で 21.3 g/L および 30.2 g/L のエタノールを得ることができた。このアルカリ-酸処理 PS を基質とした SSF プロセスにより、湿潤最終 PS 1 トン（処理 PS 257.6 kg）から 54.9 kg のエタノールが生産できることが示された。さらに、本研究開発で見出したエタノール発酵糸状菌 *M.circinelloides* NBRC 4563 の機能向上を図り、エタノールの生産性を向上させるために、イオンビーム変異⁴⁾を実施し 40°C でエタノール発酵が可能な耐熱性エタノール発酵株の取得に成功した。本菌株を用いて 100 g-dry/L の抄紙テールの SSF プロセスを行った結果、培養 96 時間で 32.5 g/L のエタノールを生産することができた。さらに、100 g-dry/L のアルカリ-酸処理最終 PS の SSF プロセスにより、培養 96 時間で 32.5 g/L のエタノールを生産することができた。

環境政策への貢献

近年、地球温暖化対策、原油の高騰化、電力供給の安定化等の国家的問題を解決するための一つの方策として、未利用再生可能バイオマス資源を開拓し、

その利用法を開発することが急務となっている。特に、我が国のような貧資源国では、新規エネルギーの開発は国家的な課題である。地球環境の保全と資源循環型社会の実現のためには、食品廃棄物、家畜排せつ物、廃木材、工業廃棄物などの再生産可能でカーボンニュートラルのバイオマス廃棄物の有効利用が不可欠である。特に、平成 18 年 3 月に閣議決定された「バイオマス・ニッポン総合戦略」や平成 17 年 4 月に閣議決定された「京都議定書目標達成計画」、また、平成 21 年 6 月に成立した「バイオマス活用推進基本法」に基づき、未利用バイオマスのエネルギー化、化学原料化、発酵原料などへ活用するための技術開発が大いに注目されている。この中で、日本国内において、紙を製造する過程で年間 550 万トンの PS と呼ばれる製紙汚泥が発生する。この PS の処理は、多大なエネルギーの消費と共に、多量の炭酸ガス、発生、悪臭の発生、排水の悪化など、環境を多大に害していることが古くより指摘されてきた。また、その改善方法の確立もまた国家的な問題である。本研究課題は、産業廃棄物である PS を未利用バイオマス資源として活用し、次世代型の発酵技術である SSF プロセスへ適応させることにより、備蓄可能なエネルギーを生産させると共に、産業廃棄物の削減と化石燃料の使用量の抑制を実現せしめようとする新規な取り組みであり、環境政策への貢献は大きい。本研究の根幹となる技術は、従来の発酵微生物では成し遂げられなかった多種多様なバイオマスの成分であるアミロース、セルロース、ヘミセルロース、キチンなど多糖類を構成する糖質を発酵できるエタノール発酵糸状菌による SSF プロセスであり、オンリーワンの技術である。この菌株の耐熱発酵、セルラーゼ高分泌などさらに高機能化を図ることで、PS のみならず農産廃棄物、生活廃棄物、工業廃棄物などに対して有効かつ簡便に利用でき、最終的に多種多様な原料からバイオエタノールを生産できる環境改善型システムの構築できると期待される。本研究開発は、これら

複合的な環境問題を解決する方策を提案しており、「国家規模」で開発すべきである。

研究成果の実現可能性

我が国における草本系及び木質系バイオマスからのエタノール生産は、経済産業省を中心に 2020 - 2030 年を目指し開発が進んでいる。本研究は、ソフトバイオマスと同等あるいはそれ以上の資源^{5,6)}である PS を使用している点で、実用化は可能と考えられる。現在、本研究開発で開発した PS の前処理法（アルカリ－酸処理法）を適応し、さらに、高温発酵系状菌を活用し、PS からバイオエタノールを製造するため、某製紙工場内でベンチスケールの実証試験装置を設置し、実証試験を実施する計画が産学間で進んでいる。現状、唯一の問題点は採算性である。セルラーゼ剤は高価であり、その使用量の削減が必要である。本研究開発では達成できないが、エタノール発酵系状菌の高度機能化、特に、セルラーゼの飛躍的な分泌株の開発を進めている。このようなエタノール発酵系状菌が開発できれば、酵素剤を添加しない糖化発酵同時進行（CBP）プロセスを構築でき、PS からのエタノール生産のみならず、リグノセルロースからのエタノールが実用化されるであろう。

結論

製紙製造から発生する廃棄物の削減および有効利用を目的として、PS を原料としたバイオエタノール生産技術の開発を検討した。この PS の成分分析を行った結果、優れたバイオマス資源であることが判明した。そこで、最終 PS の前処理法としてアルカリ－酸処理法を開発するとともに、本処理 PS を効率良く加水分解させるための DOE を用いた酵素カクテル剤の調製法を確立した。さらに、

最終 PS からエタノールを生産させるための菌株として *M.circinelloides* NBRC 4563 株を見出した。この菌株と酵素カクテル剤を組み合わせた SSF プロセスにより、50 g/L の処理 PS から培養 96 時間で 21.3 g/L のエタノールを得ることができた。また、本プロセスを 40℃で SSF プロセスができるエタノール発酵変異株を構築し、活用することで処理 PS からのエタノール生産量を 23.5 g/L へ向上できた。

参考文献

- 1) 担子菌を用いた脱リグニン処理法の開発による農産廃棄物の利用法の拡大に関する研究(K1818, K1931)、谷口正之、星野一宏、酒井謙二、平成 19 年度廃棄物処理等科学研究総合研究報告書, 環境省, p.150 (2008).
- 2) Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of oxalic acid pretreated corncob assessed with response surface methodology, J. W. Lee, R. C. Rodrigues, T. W. Jeffries, *Bioresour Technol.*, 100, 6307-6311 (2009).
- 3) Optimization of enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw and ethanol production., A. Singh, N. R. Bishnoi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93, 1785-93 (2012).
- 4) A new approach for improving cordycepin productivity in surface liquid culture of *Cordyceps militaris* using high-energy ion beam irradiation, S. K. Das, M. Masuda, M. Hatashita, A. Sakurai, M. Sakakibara, *Lett. Appl. Microbiol.*, 47, 534-538 (2008).
- 5) Bioconversion of paper sludge to biofuel by simultaneous saccharification and fermentation using a cellulase of paper sludge origin and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* TJ14, J. Prasetyo, K. Naruse, T. Kato, C. Boonchird, S. Harashima, E.Y. Park, *Biotechnol. Biofuels.*, 4, 35-48 (2011).

- 6) Efficient production of cellulase in the culture of *Acremonium cellulolyticus* using untreated waste paper sludge, J. Prasetyo, J. Zhu, T. Kato, E. Y. Park, *Biotechnol. Prog.*, 27, 104-110 (2011).

知的財産権の取得状況

- 1) 製紙廃棄物からのエタノール製造方法、星野一宏、高野真希、
特願 2013-200843.
- 2) 糸状菌を用いる木質系バイオマスからのエタノール製造方法、星野一宏、
高野真希、特願 2013-202539.

研究概要図

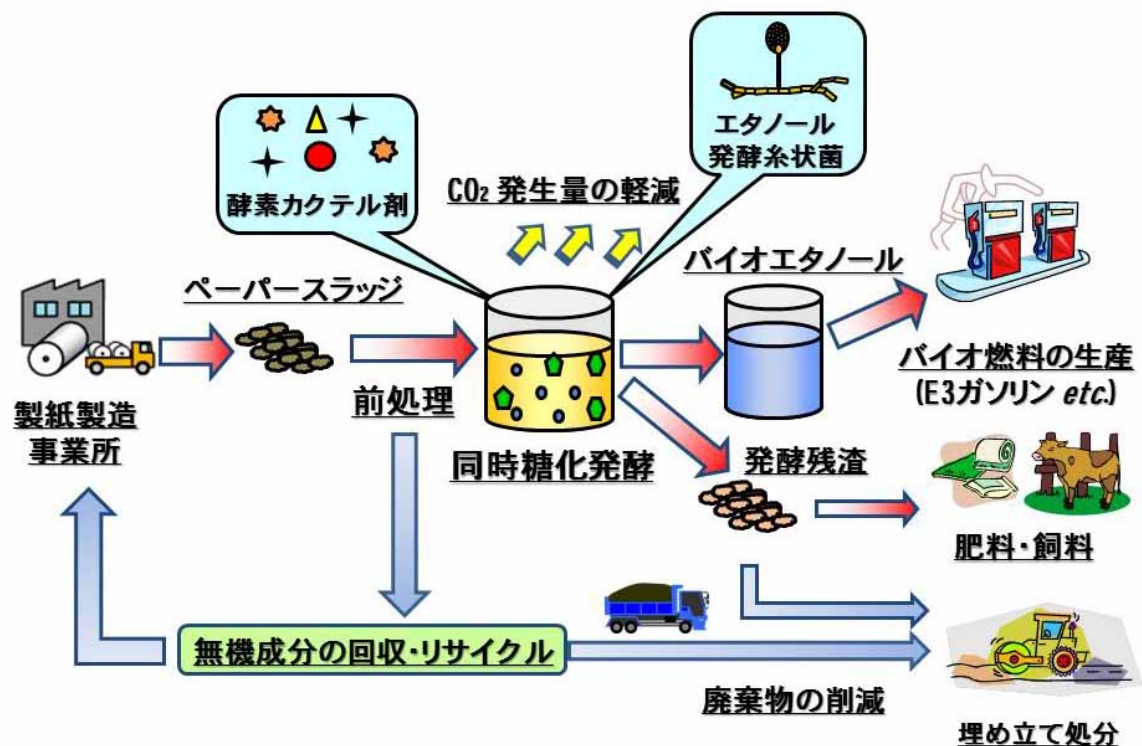


Fig. エタノール発酵糸状菌を活用した同時糖化発酵プロセスによる
ペーパースラッジからのバイオエタノール生産プロセスのフロー

1. 研究背景と目的

1.1 研究背景

我が国の紙・パルプ産業は、年間 2,774 万トンの紙・板紙を製造する巨大製造業である¹⁾。また、化学工業、鉄鋼業に続く、我が国製造業の第 4 位を占めるエネルギー多消費型産業²⁾でもある (Fig.1)。さらには、同産業は大量の産業廃棄物排出事業でもある。それゆえ、1980 年代より廃棄物を原料とするサーマルリサイクルを行い化石燃料使用量の削減などの省エネルギー化の努力を進めて来た (Fig.2)。一方、CO₂ の大量排出産業でもある紙・パルプ産業は、国内排出量の 4.2% に当たる年間 2,282 万トン-CO₂³⁾を排出しているが、1997 年の京都議定書の温暖化抑策を受けて発生抑制の努力をしている⁴⁾。

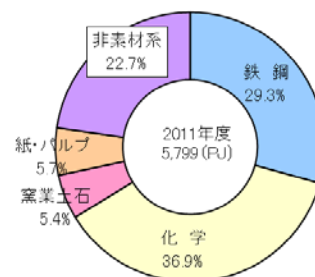


Fig.1 製造業業種別エネルギー消費

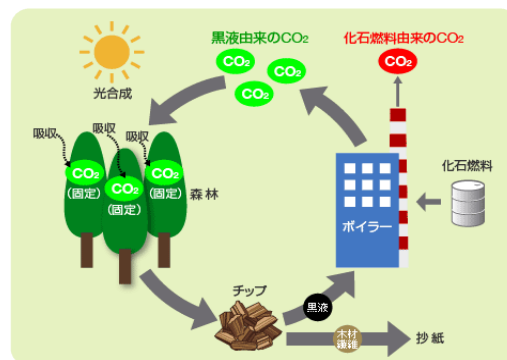


Fig.2 製紙事業所の環境対策
王子ホールディングス HP より

近年、地球温暖化対策、化石燃料の高騰化、さらには、東日本大震災による原子力発電所事故の影響もあり、カーボンニュートラルな未利用バイオマス資源を開拓し、その利用法を構築することが急務となってきた。特に、我が国のような貧資源国では、新規エネルギー資源の開発は国家的な課題である。地球環境の保全と資源循環型社会の実現のためには、食品廃棄物、家畜排せつ物、廃木材などの再生可能でカーボンニュートラルなバイオマス廃棄物の有効利用が不可欠である。さらに最近、これらの廃棄物の適正処理と資源化を促進する

法律⁵⁻⁸⁾が次々と施行されていることもあり、これらの物質をエネルギー資源、化学原料、発酵原料等として活用するための技術開発が大いに注目されている。

現在、日本国内では、紙を製造する過程で年間550万トンのPSと呼ばれる産業廃棄物、すなわち製紙汚泥が発生している (Fig.3)。



Fig.3 ペーパースラッジ

製紙事業所では、この産業廃棄物の減容化と

サーマルリサイクルを目的として主に焼却処理を実施している。しかし、排出されるPSが50%以上の水分を含んでいるため焼却処理時に多大な化石燃料を必要としている。したかつて現状ではPSの有効な利用方法はほとんど無く、焼却した後、灰の一部をセメント原料として再利用し、残りの大半は埋め立てられている。また、この際にPSの燃焼により発生する二酸化炭素は、わが国のCO₂排出の一要因である (Fig.4)。

経済産業省は2005-2009年まで「エネルギー使用合理化ペーパースラッジ有効利用技術開発」プロジェクト⁹⁾を実施し、その有効利用技術の開発を推進している。現在、PS灰は主にセメント原料¹⁰⁾として再利用されているが、セメントの国内需要減少もあり、PS灰の新規用途の開発が不可欠となっている。そのため土壌改良材製造技術の開発を行うとともに、高温で自燃させ熱エネルギーを回収し、得られたPS焼却灰を板紙の内填材に再利用する技術開発¹¹⁾、さらには、ガス化してエネルギー源として活用する技術開発¹²⁾が行われきた。すなわち、紙・パルプ産業においては、化石燃料の消費量を削減しCO₂の発生量を削減すること、ならびに産業廃棄物の排出量を削減することが重大な課題となっており、これら問題を早急に解決することが求められている。

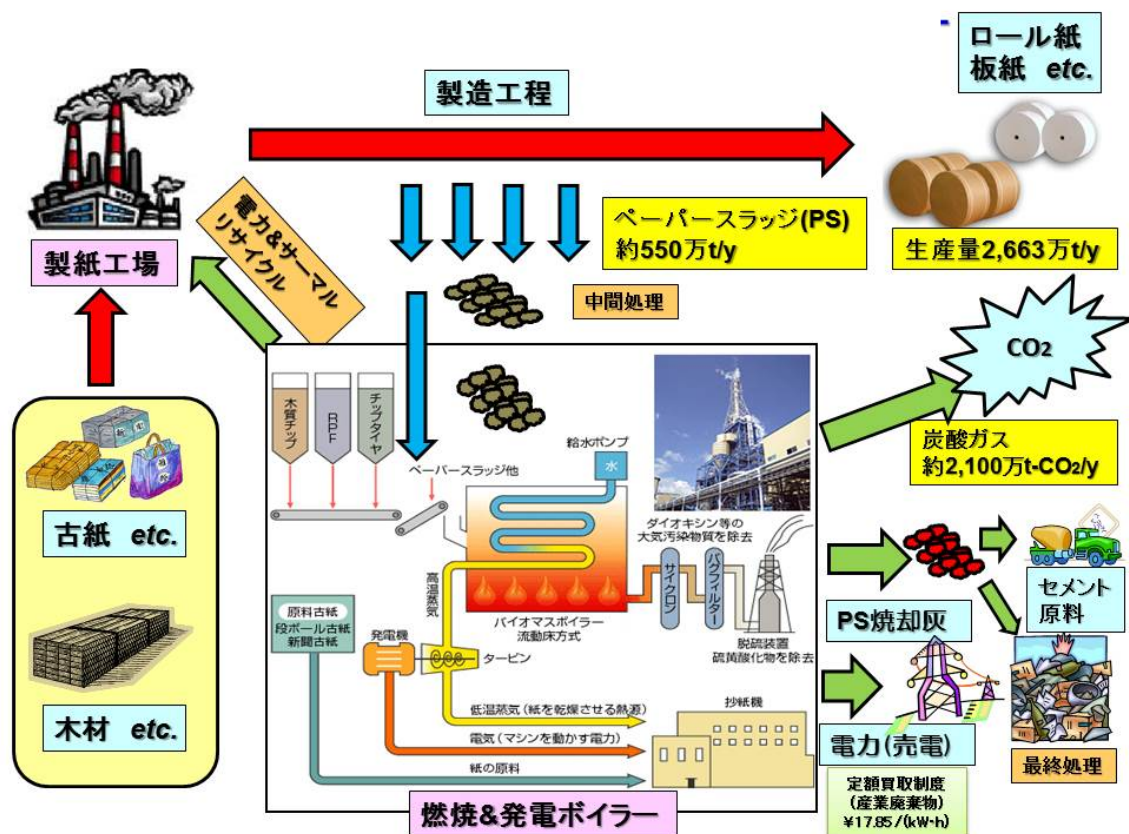


Fig.4 製紙事業所におけるペーパースラッジ等廃棄物処理フロー

1.2 未利用バイオマス資材によるエタノール発酵研究の現状と課題

近年、原油の高騰化とともに、未利用なバイオマス資源を開拓し、その利用法を開発することが急務となってきた。特に、我が国のような貧資源国では、新規エネルギー資源の開発は国家的な課題である。このような観点から、我が国ではバイオマス・ニッポン¹³⁾を旗印に官民を挙げてバイオマス資源の開発およびその有効な変換技術の開発が進められている。中でもカーボンニュートラルなエネルギーの利用が高まっている。その一つとして、ガソリンの一部をエタノールに置き換えたバイオ燃料が普及し始めている。そのため世界のエタノール生産量は年々増加し、2010年には200億ガロン¹⁴⁾を超えた。エタノールの

主な生産国はブラジルと米国であり、世界の全生産量の 8 割以上を占める。現在、エタノールの主な原料は豊富な糖質を含むトウモロコシやサトウキビであるため、これらを広大な土地で生産してきた米国やブラジルが必然的にエタノール生産大国となった。しかしながらトウモロコシなどは本来食糧として生産されるものであり、エタノールの原料として使用することで競合が起これ、これらの資源作物の価格高騰という新たな問題も発生している。一方、我が国はバイオエタノール製造に関する制度の施行や製造設備の開発が極めて遅れている。欧米諸国のように資源作物を豊富に生産することもできず、これら農産物からのバイオエタノール生産は食糧自給率の低い日本では不可能に近い。農林水産省のバイオマス・ニッポン総合戦略では 2030 年度までに原油換算で 58 億リットルの生産を目標¹⁵⁾としているが、2007 年度以降いくつかの企業が日本各地で大規模プラントによるエタノール生産を開始^{16,17)}したものの、目標に達するため原料として使用するのは規格外穀物や多収穫穀物に限られており、量的には甚だ不十分である。さらに、未利用バイオマスである稲わら、もみ殻、刈草、廃木材、間伐材などからのエタノール生産は残念ながらほとんど実用化に至っていないのが実状である。また、ソフトバイオマスとほぼ同様の繊維質を有する PS からのエタノール生産に関する基礎研究は^{18,19)}は若干行われているが、実用化を目指した研究開発は検討されていない。

このような背景から、PS から省エネルギー的にバイオエタノールを製造する技術開発が進められようとしている。我々は、1980 年代後半から現在まで穏和な条件でバイオマス資源をエネルギー資源へ変換することが可能な発酵技術の研究を手がけ、省エネルギー的にエネルギー資源であるバイオエタノール²⁰⁻²⁵⁾やプラスチックの原材料である乳酸²⁶⁾の生産技術の開発を行ってきた。

現在、ブラジルやアメリカなどで行われているエタノールの製造は、トウモ

ロコシやサトウキビから得られた 6 炭糖を主成分とする糖液に対して酵母 (*S.cerevisiae*) を用いて発酵させる方法である。トウモロコシやサトウキビは、生産が容易で加工がしやすく、豊富な糖が得られる。また酵母は高濃度の糖存在下で優れた成長能力を持ち、エタノール生産収率も高い。しかし食料を燃料に替えるという倫理観の問題に始まり、食料としての供給の減少などの重大な問題を抱えている。このような背景から、未利用なバイオマス資源である農産廃棄物（稲わら、もみ殻など）^{27,28)}、林産廃棄物（間伐材、廃木材）^{29,30)} や産業廃棄物（PS など）^{31,32)} からエタノールを高収率で得る研究が進められている。

PS は、高水分含量であり、バイオマス成分である糖質（セルロースとヘミセルロース）を含み、さらに、リグニン および無機分を多量に含んでいる。この成分中の糖質を有効利用するためには、5 炭糖および 6 炭糖とともに効率よくエタノールへ変換することが望まれる。しかし、*S.cerevisiae* は 5 炭糖を資化できるものの発酵性を有しないことから、古くは、キシロース発酵酵母である *Candida sheatae* や *Pichia stipites*³³⁾ を用いたセルロース系バイオマスの加水分解物のエタノール発酵が検討されている。さらに、近年、キシロース代謝酵素遺伝子を組換えた *S.cerevisiae*³⁴⁾、*Z.palmaes*³⁵⁾ や RITE による組換えコリネ菌³⁶⁾ の開発などが国家プロジェクトの一環として行われている。しかし、これらエタノール発酵微生物を用いて 5 炭糖の代表であるキシロースからエタノール発酵を行う場合、培養が難しい、副生成物が生成する、エタノール耐性が低い、発酵阻害物質により強く発酵が阻害されるなど多くの問題を抱えている。さらに、組換え微生物を用いた場合には、高いエタノール生産性を達成できるものの、組換え菌を使用する際の安全性の問題や倫理的問題を解決していく必要がある。これらのことから、我々は、2008 年より従来エタノール微生物として考えられていなかった糸状菌の探索を行い、全く新しいキシロース発酵糸状菌を発見す

ると共に、この微生物を用いたソフトバイオマス(特に、稲わら、刈り芝)からのバイオエタノール製造システムの開発³⁷⁻³⁹⁾を行ってきた (Fig.5)。

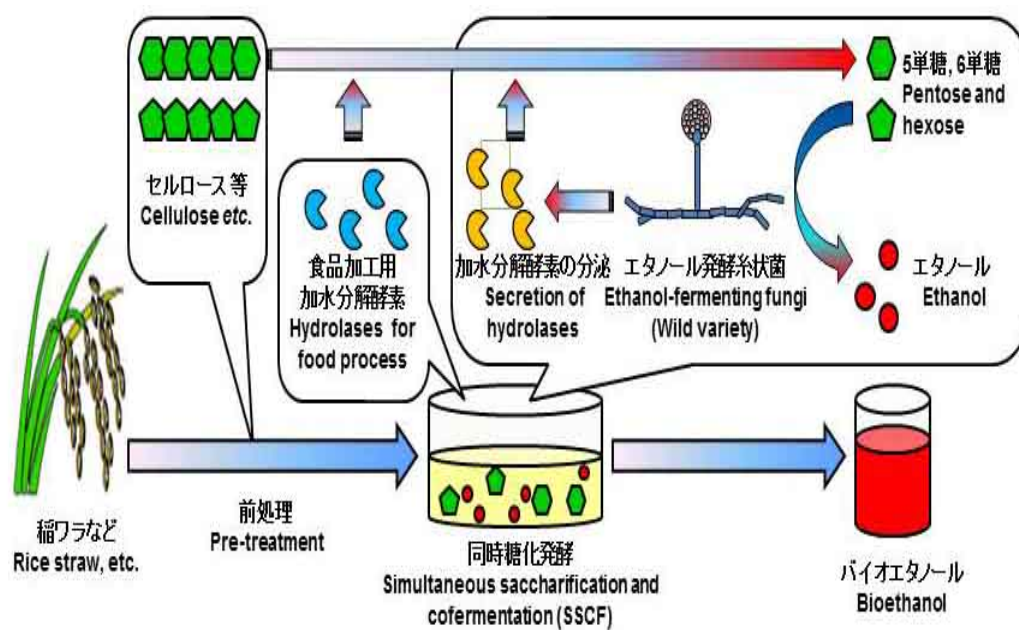


Fig. 5 エタノール発酵糸状菌と加水分解酵素を組み合わせた同時糖化発酵による稲わら糖からのバイオエタノールの製造の概略

以上の研究開発により、接合菌 *M.javanicas* に属する特異的な株が、好気条件下でグルコース発酵効率（発酵微生物が消費した単糖をすべてエタノールへ変換した場合を 100%とした値であり、理論上 1 mol の炭素源から 2 mol のエタノールが生成する。*S.cerevisiae* を用いたグルコース培養の場合、最適培養条件で 85%程度、また、キシロースの場合、発酵効率は 0%である）90%、またキシロース発酵効率 28%を示し、最大エタノール生産量はいずれも約 70 g/Lであることを明らかにした。さらに、このエタノール発酵糸状菌の他の発酵微生物との最大の素意は、糸状菌自身がバイオマス加水分解酵素を分泌する点にある。この分泌量を向上できれば、発酵糖を得るために使用する酵素添加量を軽減させ

ることが可能となる。そこで、選択したエタノール発酵系状菌の加水分解酵素分泌生産の可能性を検討した結果、選択したエタノール発酵系状菌は、セルロースおよびヘミセルロースを加水分解する *endo*- β -Glucanase、Cellobiohydrolase、 β -Glucosoidase、Xylanase、 β -Xylosidase などを分泌することが判明した。

さらに、ソフトバイオマスからのエタノール生産において、微細化等の前処理を行った後、酵素加水分解により発酵糖を生産した。本系状菌が分泌する酵素量は、その際に添加する酵素量の 5 - 20% であった。この事実から本系状菌を用いた場合、エタノール発酵に必要なエネルギー量を若干軽減させる効果があることがわかった。稲わらを基質とした場合、低コストでエタノールを生産させるためには、糖化反応と発酵を一つの発酵槽で行う次世代型のエタノール発酵システム、SSF プロセスが有望である。そこで、稲わらを原料として最適化した市販の酵素剤を組み合わせた SSF プロセスを行った結果、最大発酵収率 85% でエタノールをできることを実証した。

1.3 研究目的

PS からのバイオ燃料であるエタノール生産に関する研究は、国際的には極めて少なく、Cellulase と *S.cerevisiae* を組み合わせた SSF プロセス⁴⁰⁾、Cellulase とキシロース代謝遺伝子を組換えた *E.coli* による SSF プロセス⁴¹⁾、さらに、Cellulase と耐熱性 *S.cerevisiae* を組み合わせた SSF プロセス⁴²⁾の例があるのみで、天然のエタノール発酵微生物を用いて、PS 中の糖質をすべて活用しエタノールを効率よく生産させようとする試みは皆無である。

我々が開発するエタノール発酵系状菌を用いた PS からのエタノール製造技術は、PS の加水分解において、高温高压の装置は必要とせず、また、Cellulase 等

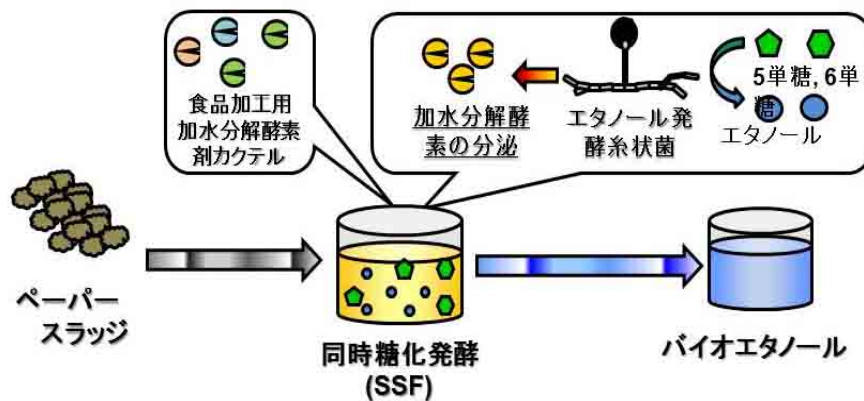


Fig.6 エタノール発酵系状菌を用いた PS からの同時糖化発酵プロセスによるエタノール生産

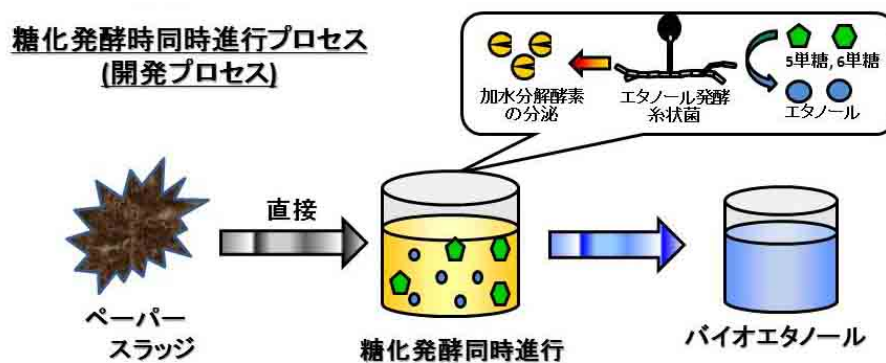


Fig.7 エタノール発酵系状菌を用いた PS からの糖化発酵同時進行プロセスによるエタノール生産

の添加量を軽減できる。さらに、セルロースの加水分解物であるグルコースの発酵のみならず、従来、天然のエタノール発酵微生物 *S.cerevisiae* では発酵が不可能であったヘミセルロース加水分解物であるキシロースを効率よく発酵できる省エネルギー型のシステムである (Fig.6)。一方、省エネルギー型の発酵システムとして、現在、神戸大学の近藤グループが精力的に取り組んでいる数種の *Cellulase* を細胞表層に提示できるように遺伝子組換えを行った酵母によりセルロースから直接エタノールを生産させる糖化発酵同時進行 (CBP) プロセス^{43,44)} がある (Fig.7)。これは一つの微生物により *Cellulase* の細胞表層での発現、セル

ロースの加水分解、さらにエタノール発酵へ行おうとする画期的な変換プロセスであり、次世代型の発酵技術として期待されている。しかし、この技術は遺伝子組換え技術を用いており、我が国ではカルタヘナ法^{*1}に基づく「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」⁴⁵⁾の適応を受けることから生産現場での利用は難しく、また培養環境により発酵が阻害されると云った問題点が指摘されている。一方、このプロセスの観点から本報告書で提案する野生のエタノール発酵糸状菌は、Fig.7 のように容易に糖化発酵同時進行 CBP プロセスを達成できる可能性を秘めていることから、将来に向けて検討していく必要がある。

紙・パルプ産業において、多くの問題を生じさせている製紙廃棄物の有効利用を目的として、PS から備蓄可能なバイオ燃料製造法を開発する。具体的には、我々がこれまで開発してきたエタノール発酵糸状菌およびソフトバイオマスからエタノールを生産させるための培養技術を活用し、PS 中の繊維質を効率よく加水分解できる酵素カクテル剤と新規なエタノール発酵糸状菌を組み合わせた SSF プロセスを開発し、効率よく PS からエタノールを生産させるために、下記の 4 テーマについて実施する。

① PS の成分分析

製紙工場から排出される PS 中の糖質、有機成分、無機成分などを詳細に分析し、PS 発生源の相違による成分分布を明らかにする。

② PS の前処理法の確立

PS 中の糖質成分および無機成分を踏まえて、最適な PS 前処理法を開発する。

③ PS の加水分解の最適化

^{*1} カルタヘナ法：遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律、平成 15 年 6 月 18 日法律第 97 号）は、遺伝子組換えなどのバイオテクノロジーによって作製された生物の使用等を規制するための法律である。通称として遺伝子組換え（生物等）規制法。

統計学的手法（実験計画法、DOE）を用いて PS から発酵糖を効率よく生産するための最適酵素カクテル剤の開発を行う。

④ エタノール発酵系状菌を利活用した PS からのバイオエタノール生産

酵素カクテル剤とエタノール発酵系状菌を組み合わせた SSF プロセスにより、PS からエタノールを直接高収率で生産させることを検討するとともに、省エネルギー的観点から本プロセスの有用性を実証する。さらに、無機成分の回収・リサイクル法を検討する。

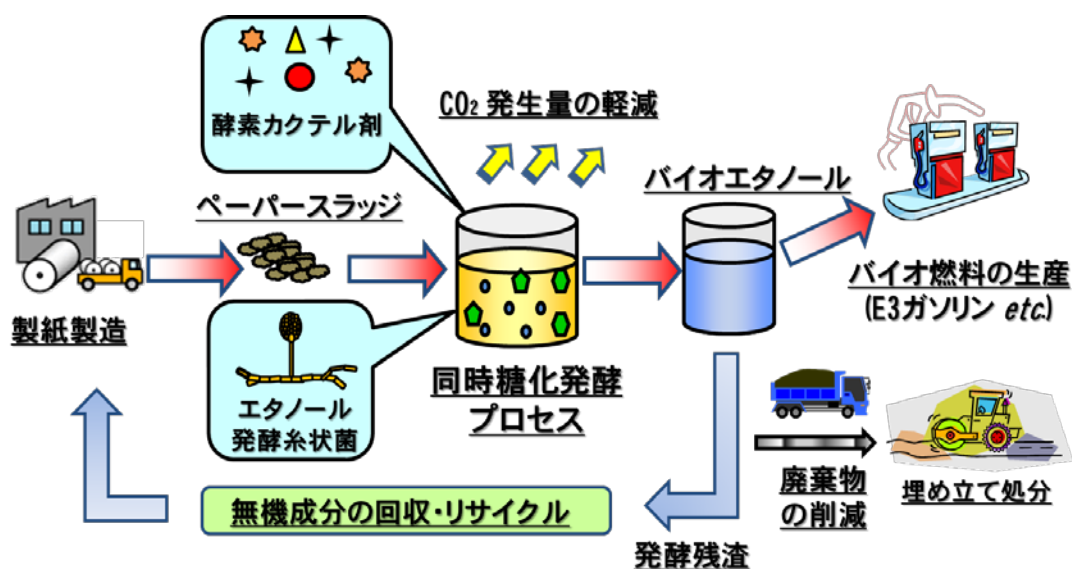


Fig.8 エタノール発酵系状菌を用いた糖化発酵同時進行プロセス
による PS からのエタノール生産

これらのテーマを実施することにより最終的に、湿潤最終 PS 1 トンから 50 kg のエタノールを生産させること（エタノール濃度 10 - 30 g/L）を目標とする。さらに、PS 中の繊維質を効率良く抽出するための前処理、繊維質を効率良く加水分解させるための酵素カクテル剤、エタノール発酵系状菌の機能向上を目指

した耐熱化を検討する。PS 前処理工程から分離される無機成分を分析し、製紙製造プロセスへ再利用する方法を検討する。

2. 研究方法

2.1 実験材料

2.1.1 ペーパースラッジ (PS)

本研究では、富山県高岡市の中越パルプ工業（株）より分譲してもらった PS を使用した。それぞれの PS 名称と由来を下記に示す。

最終 PS （能町）：能町事業所排出の最終 PS (Fig.9)

最終 PS （二塚）：二塚事業所排出の最終 PS

抄紙テール ：能町事業所の抄紙機より排出された PS (Fig.10)

中越パルプ工業（株）は、木質パルプおよび古紙などから再生紙の製造を主に行い、年間 4.5 万トンの廃棄物を排出している。その内、約 4.0 万トンの最終 PS が焼却処分され、その内 5 千トンが埋め立て等に最終処分されている。同製紙事業所より分譲してもらったすべての PS は腐敗が速いことから、分析および試験に使用するまで、ビニール袋に入れ-30℃の冷凍庫内で保存した。また、使用する際には、PS が入ったビニール袋を水洗することにより自然解凍させ使用した。



Fig.9 最終 PS (能町)



Fig.10 抄紙テール

2.1.2 セルラーゼ剤

PS の加水分解のための使用した市販のセルラーゼ剤は、下記の 14 種類である。

これらは食品加工用および胃腸薬として利用する消化剤およびソフトバイオマス加水分解用に開発された酵素剤である。使用した酵素剤は、Meiselase（明治製菓）、Cellulase T、Cellulase A、Hemicellulase、Pectinase（天野エンザイム）、Cellulase Y-NG、Cellulase Onozuka 3S、Cellulase Onozuka R-10（ヤクルト薬品工業）、Sumyzyme AC、Sumyzyme X、Sumyzyme SNX（新日本化学工業）、Cellulase from *Trichoderma* ATCC 26921、Novozyme 188（SIGMA）、Accellerase 1500（GENRNCOR）、Vecelix（合同酒精）である。

2.1.3 エタノール発酵糸状菌

エタノール発酵糸状菌は、我々が発見した *Mucor* 属接合菌（Fig.11）を元に最終 PS に耐性のある菌株をスクリーニングするために、以下に示す 84 株の菌株を NBRC（独立行政法人 製品評価技術基盤機構）より分譲いただいた。

Mucor circinelloides fsp. *circinelloides*

Mucor domorphosporus

Mucor circinelloides van tieghem fsp.
griseo-cyan

Mucor javanicus

Mucor plumbeus

Mucor racemosus fsp. *racemosus*

Mucor genevensis

Mucor hiemalis fsp. *hiemalis*

Mucor circinelloides fsp. *janssenii*

Mucor rouxianus

Mucor circinelloides van tieghem fsp. *circinelloid*

Mucor mucedo

Mucor subtilissiformis



Fig.11 *M.javanicus*

Mucor bacilliformis
Mucor fragilis
Mucor ambiguus
Mucor racemosus fsp. *sphaerosporus*
Mucor petrinsularis
Mucor hiemalis fsp. *silvaticus*
Mucor hiemalis wehmer fsp. *silvaticus*
Mucor albo-ater
Mucor oblongisporus
Mucor plasmaticus
Mucor odoratus
Mucor recurvus
Mucor inaequisporus
Mucor bacilliformis
Mucor tuberculisporus
Mucor oblongiellipticus
Mucor hiemalis fsp. *luteus*
Mucor abundans
Mucor hiemalis fsp. *Corticulus*
Mucor guilliermondii
Mucor hiemalis Wehmer fsp. *hiemalis*
Mucor hiemalis Wehmer fsp. *luteus*
Mucor piriformis
Mucor flavus
Mucor saturninus
Mucor strictus
Rhizomucor pusillus
Rhizomucor miehei

2.1.4 イオンビーム変異による高温耐性エタノール発酵糸状菌の構築

PS からエタノールを製造するために選択した *Mucor* 属糸状菌の実用化を目指して、耐熱性菌株の取得のために、イオンビーム変異法を実施した。イオンビーム変異の方法を以下に示す。ペトリディッシュ（培養体積 12 mL）に、Potato Dextrose Agar（PDA）39 g/L の寒天培地を調製し、滅菌後、冷却保存しておいた選択した *Mucor* 属糸状菌スラントから植菌した。培養は、28℃に設定したインキュベーター内で約 3 日間暗所静置することにより行った。得られた培養プレートから菌糸をはぎ取り、100 mL の滅菌生理食塩水に懸濁させた。この懸濁液を、滅菌したミキサー内で 30 秒間破碎した。この菌懸濁液を、OptiCell（Thermofisher Scientific Lab.）に 6 mL 入れ凍結した。このサンプルを(公財)若狭湾エネルギー研究センター（Fig.12）に送り、シンクロトロン装置（Fig.13）でプロトンイオンビームを 3,000 Gy 強度で照射（2 秒間隔で 0.2 Gy 照射、総照射時間 500 分）し変異誘導を行った（簡単な手順を Fig.14 に示した）⁴⁶⁾。照射サンプルを PDA ペトリディッシュ上に播種し、40℃のインキュベーター内で生育した菌株コロニーを回収することにより、3 株変異体を得た。



Fig.12 若狭湾エネルギー
研究センター



Fig.13 シンクロトロン装置

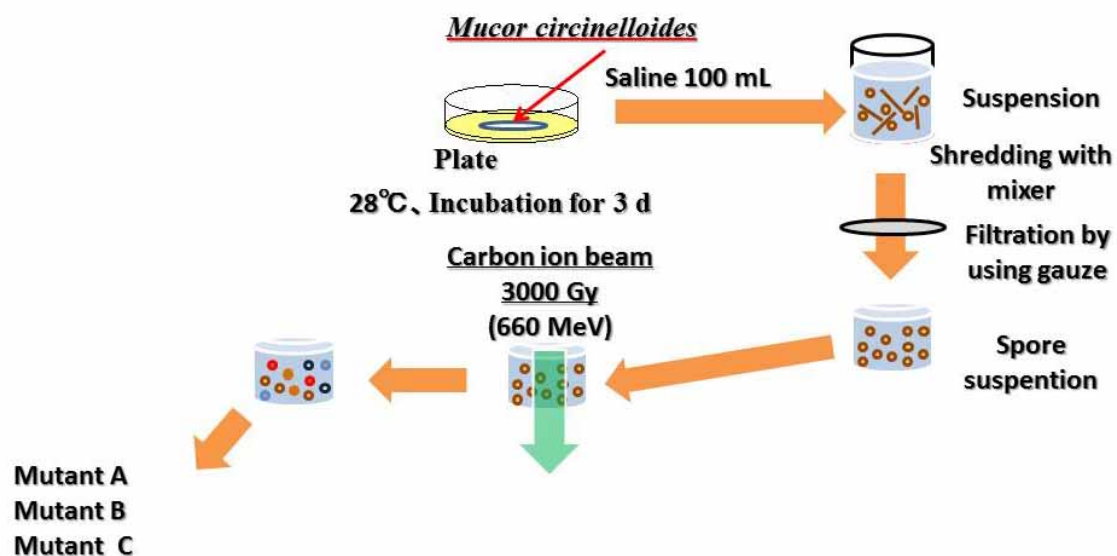


Fig.14 *Mucor* 属糸状菌分生子に対するイオンビーム照射
およびスクリーニング手順

2.2 ペーパースラッジの前処理

2.2.1 ペーパースラッジの酸処理

最終 PS 中の繊維質から酵素反応により発酵糖を得るためには、PS 中の無機成（填料、凝集剤の大半）や有機性成分（インク、界面活性剤、廃水処理装置内の微生物叢）を除去する前処理を回すことが必要である。特に、製紙製造工程において炭酸カルシウム（ CaCO_3 ）、カオリン（ $\text{Al}_4\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8$ ）、やタルク（ $\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ ）が填料として添加されており、最終 PS 中にも填料由来の無機成分が含まれている。特に、PS 中に大量に含まれる CaCO_3 の除去は、 $\text{CaCO}_3 + 2\text{HCl} \rightarrow \text{CaCl}_2 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ の反応式にしたがい、PS 懸濁液の pH を酸性にすることにより溶出することができる。そこで、最終 PS の前処理として、塩酸を用いた酸処理法を実施した。具体的な酸処理法の手順を以下に記す。400 g-dry の最終 PS 懸濁液に対して 1 M HCl 水溶液を 1 L 注ぎ、室温で攪拌しながら一昼夜浸漬した。その後、PS 懸濁液をサラシに取り絞った後、水洗いを数回行った。

絞り液の pH が中性になるまで十分に水洗いし、サラシ内の固形物を回収した。前処理されたスラッジを 90℃に設定した乾燥器内で乾燥した。その後、破砕機（ASONE, NH-34S）を用いて、200 - 500 μm の分画スクリーンを通過したサンプルを回収し実験に供した。Fig.15 は簡単に前処理の手順と処理前後の PS の写真を示す。

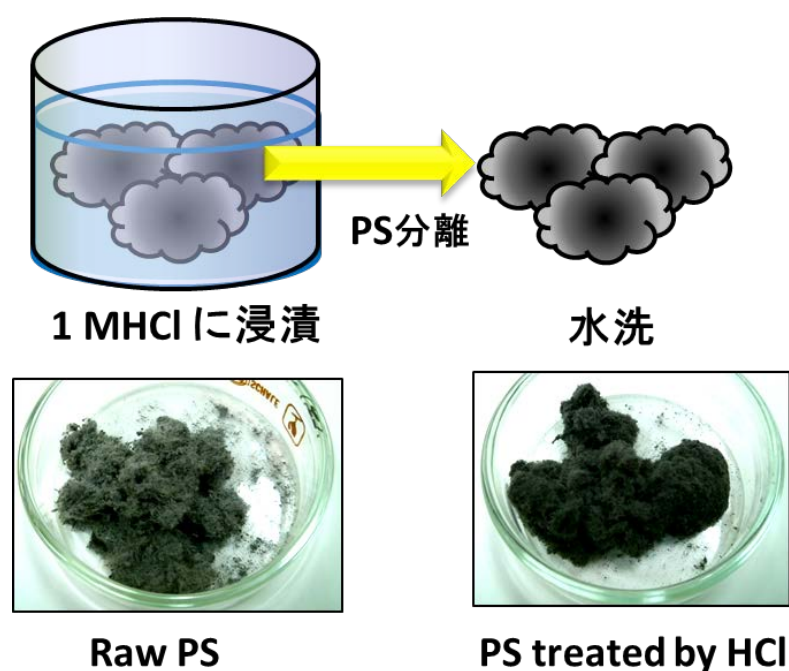


Fig.15 最終ペーパースラッジの酸による前処理

2.2.2 ペーパースラッジのアルカリ－酸処理

最終 PS 中の繊維質以外の有機物質（界面活性剤、インクなど）および、無機成分（填料成分、凝集剤）をともに除去するために、最終 PS に対してアルカリ処理を行った後、2.2.1 節に示した方法にしたがって酸処理を行った。

具体的には、400 g-dry の最終 PS を 1 L の 1M NaOH 水溶液に一昼夜浸漬した後、サラシを用いて固形分（アルカリ処理 PS）を絞り、NaOH 水溶液を除去した。この回収した固形分に対して 1 L の 1 M 酸水溶液中に一昼夜浸漬した。使用

した酸水溶液は、主に塩酸を使用した。その後、固形分（アルカリ－酸処理 PS）をサラシに取り、絞った後、水洗いを十分行った。各処理 PS の懸濁液の pH が中性になったら、90℃に設定した乾燥器内で乾燥した。その後、2.2.1 節に示した方法にしたがってサンプルを調製した。Fig16 はアルカリ－酸処理の手順と PS の写真を示す。

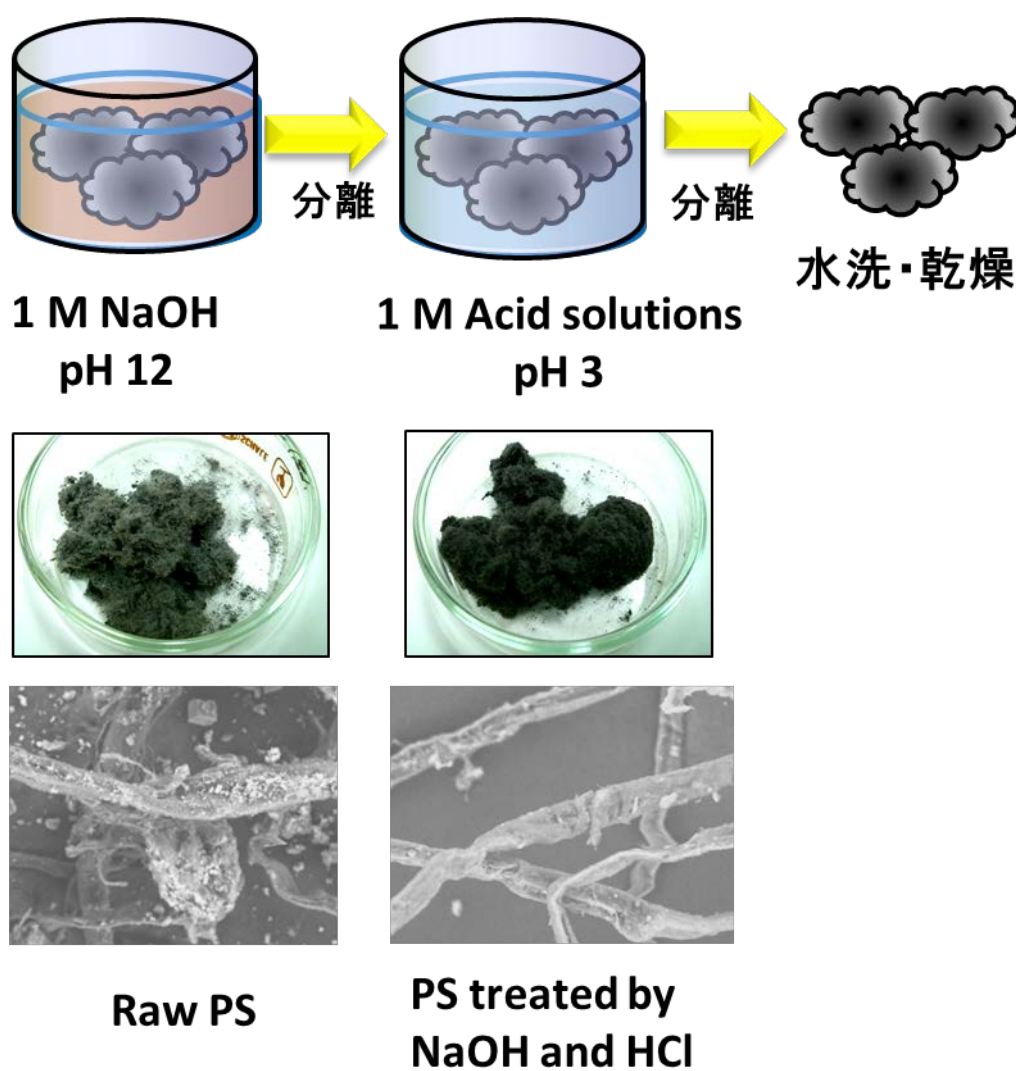


Fig.16 最終 PS のアルカリ－酸による前処理

2.3. ペーパーズラッジの成分評価

2.3.1 ペーパーズラッジの水分含量

PS の水分含量は、水分計（MOC-120H, 島津製作所）を用いた赤外線加熱乾燥質量測定法により測定した。水分計で PS の重量を正確に測定した後、赤外線加熱により乾燥させる。重量の変化が無くなった時の重量を測定する、PS と乾燥 PS の重量差より、PS の水分含量を求めた。

2.3.2 ペーパーズラッジの成分分析

製紙製造工程から発生する PS は、木材パルプや古紙パルプの微細な繊維質、填料、漂白剤、凝集剤、廃水処理施設内の曝気槽内の生物叢など多様な有機物と無機物質を含んでいる^{48,49)}。PS からエタノールを生産する場合、パルプ由来の有機成分（セルロース、ヘミセルロースや、パルプ中に含まれるフェニルプロパン化合物の重合体であるリグニン）含量を把握することは重要である。特に、多糖類であるセルロースおよびヘミセルロースは、発酵糖の原料となる。一方、PS 中に存在する無機物は、エタノール生産の原料にはならないが、繊維質から発酵糖を生産する際の酵素反応への影響、エタノール発酵糸状菌による発酵糖からのエタノール生産への影響が懸念される。また、PS から填料的原料となる無機物質を回収できれば、将来、製紙製造工程への再利用も期待できる。以上のことから、実製紙事業所から発生している PS 中の有機成分および無機成分を分析し、各成分の有効利用を検討する必要がある。そこで、PS 中のパルプ由来の有機物の分析⁵⁰⁾は、稲わらや木材中などのリグノセルロース分析法を用いて分析を行った。この分析により、PS 中のセルロース、ヘミセルロース、およびリグニン（Klason lignin と Acid-soluble Lignin）の含量を求めた。さらに、PS を直接灰化法により得た無機物質の成分は、イオンクロマトグラフィー法および蛍光 X 線法により求めた。

2.3.2.1 Klason lignin の定量

PS の各部位に含まれている有機成分（糖質）、Lignin、無機成分（灰分）を定

量するため以下の分析を行った。まず、PS 試料 0.3 g を 30 mL 容のビーカーにとり、氷上（2℃）で冷やしながら 4.5 mL の 72% H₂SO₄ を加え、ガラス棒で磨砕した後、15℃で 3 時間攪拌し、多糖成分の溶解と加水分解を行った。その混合液を 300 mL 容の三角フラスコに移し、さらに 171 mL の蒸留水を加えてオートクレーブ（121℃、30 min）を行い、希釈溶解液中で硫酸エステルグループやセロデキストリンを加水分解した。冷却後、加水分解液を濾過（ADVANTEC Co., ガラス繊維濾紙 GA-200）して不溶性の成分を得た。この不溶性の乾燥重量を測定することにより、Klason lignin 含量を求めた。

2.3.2.2 Acid-soluble lignin の定量

Klason lignin を定量する際に得られた濾液の 205 nm の波長における吸光度を、3 % H₂SO₄ を対照液として分光光度計を用いて測定し、次式を用いて酸可溶性 lignin（Acid-soluble lignin）含量を算出した。

$$\text{酸可溶性 lignin 含量 (\%)} = D \times A \times V / (d \times a \times W)$$

ただし、D：希釈倍率（-）、A：吸光度（-）、V：濾液の液量（L）、d：光路長（1 cm）、a：Lignin 吸光係数（94.5 L/g/cm）、W：サンプルの乾燥重量（g）である。

2.3.2.3 ペーパーセラッジ中のセルロースおよびヘミセルロース含量

Klason lignin を定量する際に得られた濾液を pH 7.0 に調整し、濾液中のグルコースおよびその他の糖質濃度を Glucose-CII テストおよびフェノール硫酸法によって測定した。このとき Glucose-CII テストより得られたグルコース量は、PS 中のセルロース量を示す。また、フェノール硫酸法により得られ全糖量より、このグルコース量を引くことにより、ヘミセルロース量を求めた。このヘミセルロースは主に Xylose の重合物 Xylan である⁴⁶⁾。

2.3.2.4 ペーパーセラッジ中の灰含量（直接灰化法）

2 事業所の最終 PS（能町および二塚）および抄紙テール（スクリーン）や各種処理最終 PS のサンプルを 90℃で 24 時間乾燥させた。その後、各試料を 3.0 g

ずつるつばに量りとり、電気炉（ASONE：小型プログラム電気炉 MMF-1）を用いて 500℃で 2 時間加熱灰化し、残渣を灰分とした。酸素供給量は 100 mL/min とした。

2.3.2.5 ペーパースラッジ中の無機分析

灰化処理済のサンプル中の陽イオン成分を調べるためにイオンクロマトグラフィ法により分析した。PFA 容器に灰化試料を 50 ± 2 mg ずつ量り取り、濃硝酸 20 mL、過塩素酸（60%）0.3 mL、6 N 塩酸 0.15 mL の溶液を 4.0 mL 加えた。次に、この容器を SHF 試料分解容器に入れ、電子レンジ（200 W、10 分間）で熱分解させた。分解後の溶液を使用したクロマト用試料とした。HPLC システムは LC-10ADvp（島津製作所、LC-10 System）であり、陽イオン分離カラムとして、TSKgel IC-Cation I/II HR（東ソー）を用いて電気伝導度検出器（島津製作所、CDD-10）により検出した。また、PS の前処理において、PS に残留している無機成分を定量するために、波長分散型蛍光 X 線装置（XRF）（スペクトリス、PW2404R）による元素分析を行った。初めに、各種 PS を電気炉を用いて 500℃で 2 時間処理し灰化した。その後、XRF 装置により分析し、灰分に含まれる元素およびその含量比を解析した。

2.4 セルラーゼを用いたペーパースラッジの加水分解

2.4.1 PS からの発酵糖の生産

PS 中に存在している有機成分は、前処理の有無にかかわらずその大半がセルロースを主成分とする繊維である。特に、抄紙工程において抄紙にできなかった成分や古紙から繊維分とインクなどをフローターで除去する際に、回収できなかった短い繊維分である。これら繊維成分は、主にセルロースおよびヘミセルロースであり、微生物の発酵により物質変換を行う際には、発酵糖の原料となる。すなわち、PS から効率良く発酵糖を簡便かつ効率よく生成することが、有用物質を生産する上での重要な検討事項である。

そこで、国内で入手可能な食品製造用セルラーゼ剤を用いて、各種 PS の加水分解反応を行った。PS からのエタノール製造を想定し、pH を 5.5 に調整した反応溶液 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7.5 g/L, KH_2PO_4 3.5 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75 g/L, Yeast extract 5.0 g/L) 中に濃度 50 - 100 g-dry/L となるように PS を加え、全量を 25 mL にしてインキュベーター内で 28°C、120 rpm の振盪条件で加水分解を行った。反応容器から PS 懸濁液を遠沈管に回収した後、煮沸により酵素を失活させた。その後、遠心分離処理を行い、その上清を分析サンプルとした。酵素濃度は主に 3 g-protein/L で行った。生成したグルコース、キシロースなどの糖質は、示差屈性計（島津製作所、RID-10）を備えた高速液体クロマトグラフィー（島津製作所、LC-10 System）を用いて分析した。使用したカラムは IcSep WAI Wine Analysis Column（Transgenomics Co.）を使用した。キャリアには 1.25 mM の H_2SO_4 を用い流速 0.6 mL/min で HPLC へ供給した。

2.4.2 PS 加水分解のための酵素剤の最適化

市販のセルラーゼ剤は、各種活性を有していることから、単一の酵素剤では、加水分解能力が乏しく、複数の市販酵素剤を混合したカクテル剤の開発が必要である。しかし、現在まで酵素カクテル剤の最適な調製方法がないことから、本研究では統計学的手法を活用し配合比に関して最適化を行った。具体的には、市販のセルラーゼ剤を単独で用いて各種酵素活性を得る。次にそれらの酵素剤を用いて、PS を加水分解し生成した発酵糖より加水分解活性を求める。このときに、加水分解に望ましい酵素剤を 3 種類選択する。次に、実験計画法（DOE）ソフトである Design Expert[®] 8（Stat-Ease, Inc.）を用いて応答曲面法（RSM）解析を行い、最適配合比を求めた。最適なセルラーゼ酵素剤を用いた PS の加水分解試験は、2.4.1 節に記述した方法に準じて行った。

2.5 エタノール発酵糸状菌のスクリーニング

最終 PS に対して耐性を有し SSF プロセスを行うためのエタノール発酵糸状菌を選択するために、84 株の *Mucor* 属接合菌のスクリーニングを行った。具体的には、前培養は、ペトリディッシュ（培養体積 12 mL）に、39 g/L の濃度で PDA 寒天培地を調製し、滅菌後、冷却保存しておいたスラントから植菌することにより行った。28℃に設定したインキュベーター内で約 3 日間の暗所静置培養を行った。本培養で使用した培地組成は、(NH₄)₂SO₄ 7.5 g/L、KH₂PO₄ 3.5 g/L、MgSO₄・7H₂O 0.75 g/L、CaCl₂・2H₂O 1.0 g/L、Yeast extract 5 g/L、Chloramphenicol 50 mg/L であり、最終 PS 濃度が 50 g-dry/L となるように添加した。さらに、培地の pH は 1 HCl を用いて 5.5 に調製した。その発酵用培地にセルラーゼ剤 Acellulrease を 6.9 PFU/g-PS となるように添加し、さらに前培養した PDA 寒天培地から菌糸を植菌し、SSF プロセスを開始した。培養は嫌気条件下で 28℃とし 120 rpm の振盪で 120 時間行った。培養終了後、培養液中の生成エタノール濃度を比較することにより、エタノール発酵微生物を選択した。

2.6 同時糖化発酵プロセスによる PS からのエタノール生産

選択したエタノール発酵糸状菌を用いた発酵能の検討および SSF プロセスによるエタノールの生産は以下のように行った。まず組成（Glucose 20 g/L、(NH₄)₂SO₄ 7.5 g/L、Yeast extract 5.0 g/L、KH₂PO₄ 3.5 g/L、CaCl₂・2H₂O 1.0 g/L、MgSO₄・7H₂O 0.75 g/L、寒天 15 g/L）の培地を pH 5.5 に調整した。次に調製した寒天培地を 121℃で 15 分間オートクレーブを行い、ペトリディッシュに 12 mL 加えて寒天培地とし、スラントにて 4℃保存しておいた菌体を寒天培地上に植菌した。その後、28℃に設定したインキュベーター内で 4 日間静置培養を行った。本培養は、次のように行った。まず、1.25 - 2.5 g の最終 PS、抄紙テール、あるいは処理最終 PS を入れた 100 mL 容の三角フラスコに、上記の培地を 25 mL となるように添加し、オートクレーブを行った。その後、クリーンベンチ内で、フィルター滅菌を行った酵素剤あるいは最適化した酵素カクテル剤をタンパク質濃度として 3 g-protein/L となるように培地中に添加した。そこへ前培養してい

たエタノール発酵糸状菌の寒天プレートを 100 mL の生理食塩水に懸濁させ、滅菌したミキサー内で破碎した。この懸濁液を三角フラスコ内へ 1.0 mL 添加し、培養を開始した。培養は、28℃に設定したインキュベーター内で 120 rpm で振盪することにより行った。エタノール糸状菌とセルラーゼ剤を組み合わせた SSF を行った際の概略を Fig.17 に表す。

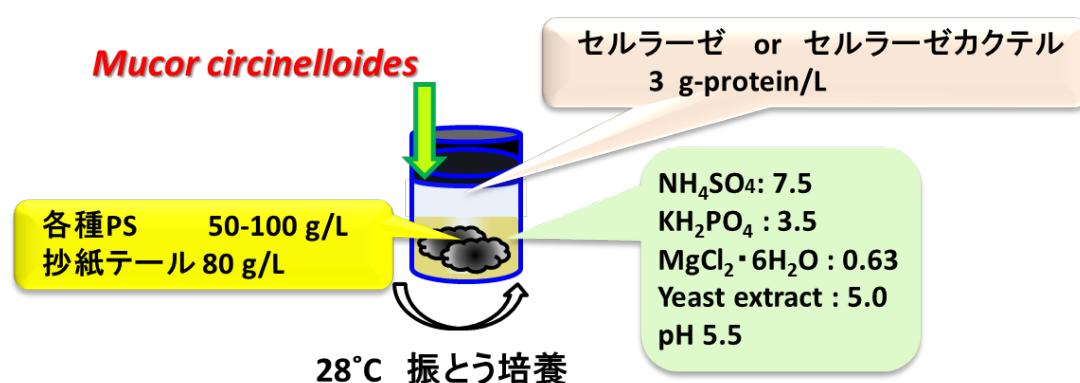


Fig.17 エタノール発酵糸状菌とセルラーゼ剤を組み合わせた SSF プロセス

酵素反応により生成した生成したグルコース、キシロースなどの糖質や発酵により生じたエタノール、副生成物である酢酸、グリセリンなどは、示差屈性計を備えた高速液体クロマトグラフィー（島津製作所、LC-10 System）を用いて分析した。使用した分析カラムは IcSep WAI Wine Analysis Column（Transgenomics Co.）である。

2.7 培養液中のセルラーゼ活性

Mucor 属およびその近縁種の糸状菌は、各種セルラーゼを分泌生産することができる。特に、PS 中のセルロース成分を加水分解させ、効率良く発酵糖を生産させるためには、*endo*-β-Glucanase, Cellobiohydrolase, および β-Glucosidase の分

泌が必須である。さらに、これら菌株から多くのセルラーゼが分泌できれば、SSF プロセスにおいて酵素剤の添加は不要となり、エタノール製造に係わるコストの削減につながる。そこで、糸状菌の培養経過に伴うセルラーゼの分泌を検討した。 β -Glucosidase および Cellobiohydrolase の酵素活性は、それぞれ 4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside および 4-Nitrophenyl β -D-cellobioside を基質とし、28℃の振盪反応で生じた Nitrophenol 量より求めた。また、*endo*- β -Glucanase 活性は、酵素反応により Azo-CM Cellulose (Megazyme Co.) から生じた Azo 色素量を元に求めた。

3. 結果と考察

3.1.ペーパースラッジの成分分析

最終ペーパースラッジ（最終 PS）は、製紙製造事業所において、木質パルプから繊維質を抽出する際の、蒸解工程・漂白工程等から排出される廃棄物、古紙をパルプに再生する際にインキは填料などを繊維分から取り除く際に使用する各種薬剤と填料成分などの無機物質、抄紙工程において抄紙機から漏れ出した低分子の繊維分（抄紙テール）、および、工場全体から

排出される廃水処理施設の生物叢や沈降分離により使用される凝集剤（ポリ鉄、PAC など）など多種多様な成分を含んでいる。これらのことから、最終 PS の成分は、その事業所が製造する紙製品の種類により大きく異なっていると予想される。

本研究開発で使用する PS は、産業用紙、新聞紙用紙などを主に製造する事業所から発生している。該当事業所において発生する最終 PS は、スクリーンプレスによる脱水後、廃棄物焼却炉（2002 年



Fig.18 最終ペーパースラッジ焼却炉



Fig.19 最終ペーパースラッジ炭化装置

稼動、焼却量 10.3 トン/h) で焼却、減容化されている。この時発生する熱を回収し、工場内で有効なエネルギーとして活用している。実際の製紙事業所における最終 PS 燃焼現場を Fig.18 に示した。また、Fig.19 は最終 PS の炭化装置の現場写真である。しかしながら、最終 PS の燃焼処理には水分含量が多いことから補助燃料として、湿潤最終 PS 1 トン当たり約 27 L の重油を必要とする。それゆえ、PS の成分を明確に把握することが求められる。そこで、事業所の各製紙製造工程から発生している PS (最終 PS、抄紙テール) の成分分析を行った。最終生成物がエタノールであることから、初めに、各 PS の発酵原料となるセルロースおよびヘミセルロース成分の含量を中心に分析を行った。Fig.20 は各 PS サンプルの水分含量を示す。能町事業所と二塚事業所の最終 PS の水分含量は約 54-55%、また、能町工場の抄紙テール (スクリーンおよびクリーナー) の水分含量は 81-91%とかなり高いことがわかった。Fig.21 は各種 PS の成分を示す。Fig.21 に示したように能町事業所の最終 PS の繊維質含量 (セルロースとヘミセルロースの和) は乾燥物基準で 28%、また、二塚事業所の場合、21%であることがわかる。また、木質パルプ由来のリグニン (Lignin と Acid-soluble lignin の和) は、能町事業所の場合 9%、二塚事業所では 18%と、事業所の製造する紙製品、古紙パルプと木質パルプの配合比などにより、PS 中の成分比が異なっていることがわかった。しかし、最終 PS の乾燥物に占める無機成分は約 60%であることがわかった。一方、抄紙機からの廃水でクリーナーとスクリーンから回収される抄紙テールは、事業所内の廃水が集まる最終 PS とは異なり、抄紙製造機から排出される PS のため、繊維質の割合が高く、クリーナーおよびスクリーンで回収された抄紙テールの含量が 64-66%と高く、また、無機成分をほとんど含まないことがわかった。これらの結果から、製紙事業所により最終 PS 中の有機成分の割合が異なること、最終 PS 中には約 60%無機成分を含んでいること、さらに

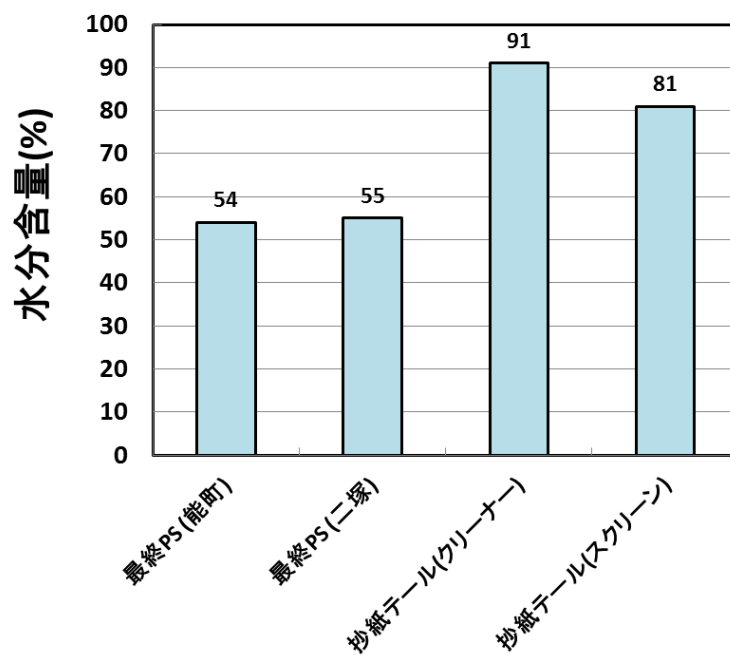


Fig.20 ペーパーズラッジの水分含量

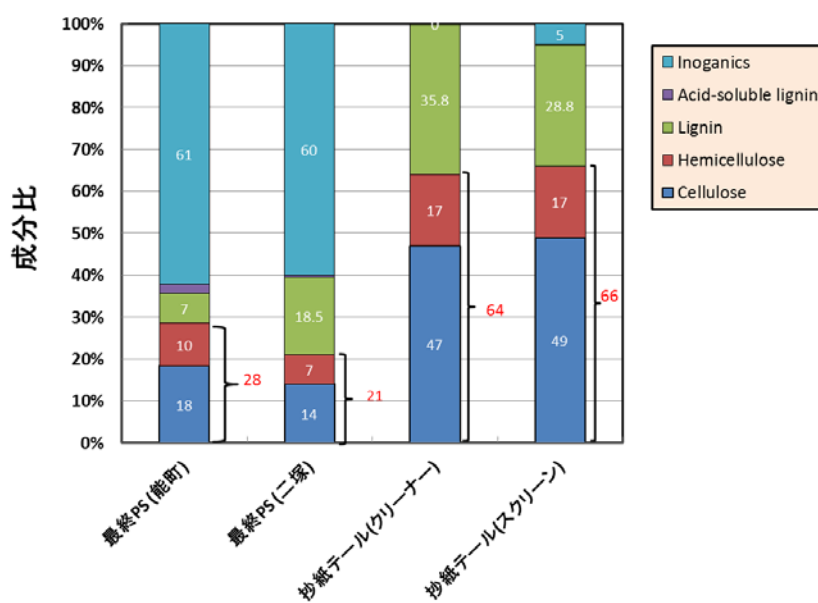


Fig.21 各ペーパーズラッジの成分分析

抄紙テールは繊維質含量が高く発酵基質として適していることがわかった。実際の事業所内で抄紙テールは、この純度の高いセルロース繊維は、事業所内の廃水と混ざり、最終的に最終 PS として、焼却炉で燃焼処理されている。現在、サンプル提供事業所では、0.3%程度の抄紙テールが継続的に 1 日当たり 900 トン程度発生していることから、この物質の有効利用が強く求められている（抄紙テールのエタノール発酵の検討は後で述べる）。

Fig.21 の PS 成分分析の結果から、エタノールの生産の可能性を検討する。一般のエタノール発酵微生物を用いたエタノール発酵の場合、グルコースなどの単糖から得られるエタノールの理論収量は、微生物の増殖のため炭素源の消費を無視すると 51.1%となる。繊維質含量の低い最終 PS（55%水分含量、21-28%の繊維分）からエタノールを生産した場合、湿潤最終 PS 1 トンから $(450 \text{ kg} \times 0.21 \sim 0.28 \times 0.511 =) 48.3 - 64.4 \text{ kg-ethanol}$ が生産できる可能性があることがわかる。湿潤最終 PS（能町）100 kg を基質として 1 m^3 の発酵槽でエタノール生産させた場合、発酵効率 100%と仮定すると理論上 $46 \text{ kg-dry/L} \times 0.28 \times 0.511 = 6.58 \text{ g/L}$ のエタノールが生産できることがわかる。一方、この抄紙テール(スクリーン)の場合、湿潤抄紙テール（スクリーン）1 トンから $(190 \text{ kg} \times 0.66 \times 0.511 =) 64.1 \text{ kg-ethanol}$ が生産できると試算できる。最終 PS と同様に 100 kg のテールを基質として 1 m^3 の発酵槽でエタノール生産させた場合、理論上 $19 \text{ kg-dry/L} \times 0.66 \times 0.511 = 6.40 \text{ g/L}$ のエタノールが生産できることがわかる。

以上の結果から、PS 中に含まれている繊維質は、極めて有用なバイオマス資源であり、効率良く発酵糖を得る方法が確立できれば、良好なエタノール発酵の原料になると考えられる。さらに、現在、各製紙事業所で実施されている最終 PS の焼却処理に取って変わることでできる新規な処理法になると期待される。しかし現時点では、PS 中の繊維質を効率良く回収する方法が確立することが難

しいこと。廃棄物の減容化およびエネルギーの回収の点を考えると燃焼による方法もやむを得ないだろう。最終 PS からの繊維質の分離回収と回収した繊維分を効率良く有用物質へ変換できるかが鍵となる。

次に、最終 PS および抄紙テール（スクリーンおよびクリーナー）の無機成分はイオンクロマトグラフィーを用いて分析した。Fig.21 の分析結果から最終 PS 中の無機成分の含量は、約 60%とかなり高含量であり、抄紙テールも、0 - 8%の無機成分を含んでいることがわかる。

そこで、無機成分中の成分を把握するために最終 PS と抄紙テールを水分計を用いて乾燥させ、その後、硝酸水溶液中で電磁波により PS 中の有機質を分解し分解し、無機物を無機イオンとして溶出させた。その後、電気伝導度計を備えたイオンクロマトにより主要な陽イオンを分析した。乾燥 PS グラム当たりの陽イオン含量の結果を Fig.22 に示す。

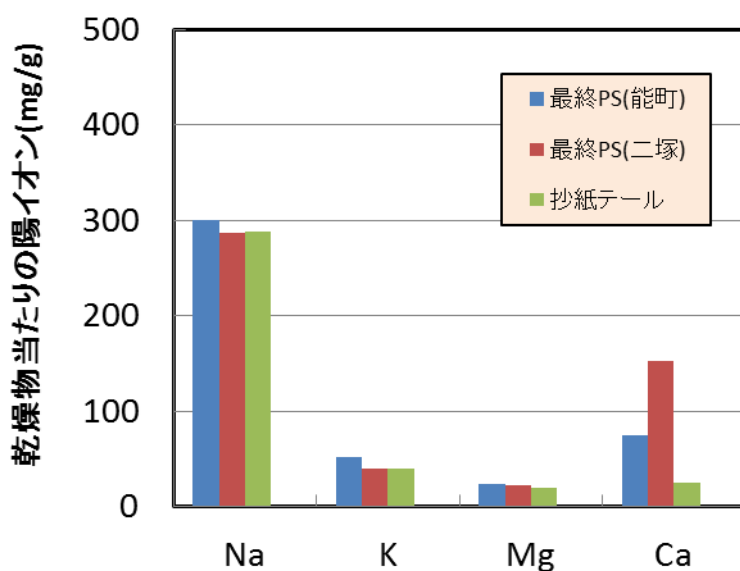


Fig.22 各種ペーパースラッジ焼却灰中の無機成分

2 事業所の最終 PS（能町および二塚）および抄紙テールの結果を示す。いずれの PS にも、主に Na、K、Mg、Ca イオンが含まれ、特に Na イオンと Ca イオンが多量に含まれていることがわかる。Na イオンは、木質パルプを蒸解させ繊維質を得る工程で使用した水酸化ナトリウム（NaOH）と硫酸ナトリウム（Na₂SO₄）に由来し、PS 中の有機物や無機物に結合していると考えられる。Ca イオンは、紙を抄造するときに使用される炭酸カルシウム（CaCO₃）などに由来し、Mg イオンは、填料として使用されるタルクに由来すると考えられる。

これらの物質は、PS 中の繊維質から発酵糖を得る加水分解プロセスや、発酵糖からエタノールを生産する発酵プロセスに影響を与える可能性があるため、抄紙工程や製紙事業所の排水処理工程でこれら物質を除去することが望ましいと考えられる。しかし、このような観点で PS の前処理法を検討した報告は無い。

3.2 ペーパースラッジの前処理技術の確立

これらの結果を踏まえ、PS の前処理法について詳細に検討した。最終 PS は、パルプの蒸解や再生紙からのセルロースの繊維回収でアルカリ処理が行われている。それ故、一般の最終 PS の懸濁液は pH 8.0 - 9.0 の弱アルカリ性を示す。この最終 PS 中に含まれる繊維分を原料としてエタノールへの物質変換を行う場合、加水分解酵素による発酵糖の生成およびその後の発酵プロセスが必要である。しかし、繊維質から発酵糖を得るためのセルラーゼは、通常至適 pH は 4.0-5.5 である。さらに、また、エタノール発酵微生物である酵母などは、至適発酵 pH は 4.0 - 5.0 である。したがって、通常の逐次的な糖化・発酵プロセスにおいて、最終 PS を原料とした場合、加水分解反応は起こらず、さらに発酵微生物は死滅してしまう。そこで、塩酸などの酸により反応液や培養液の pH を弱酸性に低下させる必要があるが、PS 懸濁液は含有成分のために緩衝作用が強く、容易に pH

を低下させることはできない。

そこで、最終 PS 中の繊維質以外の有機成分や無機成分を除去し、効率良く酵素剤により加水分解による可溶糖の生産などを行うための最適な前処理法の確立を目指した。具体的には、2.3 節にしたがってパルプ由来のセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンと、填料由来の無機成分について検討した。

初めに、最終 PS の前処理として最も簡便な水による洗浄法を検討した。最終 PS をサラシの中に入れ、一昼夜、水に浸漬し水を流しながら洗浄した。その後、洗浄物を乾燥し各種分析を行った。水洗浄処理 PS は、最終 PS と比較して見た目にはほとんど変化は認められなかった。水洗浄処理処理 PS 乾燥物の成分分析を行った結果を Fig.23 に示す。

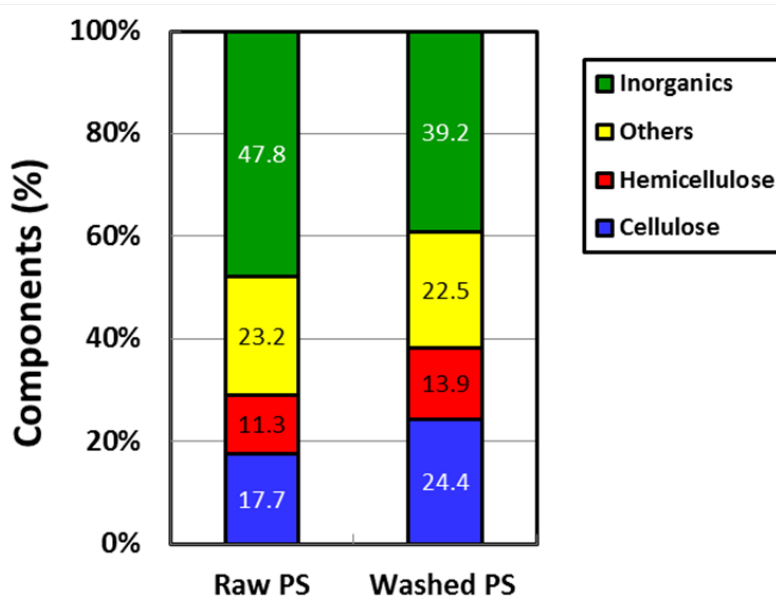


Fig.23 水洗浄処理ペーパースラッジの成分含量

最終 PS の水洗い処理により、無機成分は 47.8 から 39.2%へ減少でき、セルロース は 17.7%から 24.4%、また、ヘミセルロース 11.3%から 13.9%と向上させることができた。すなわち、最終 PS の水洗浄により繊維質に吸着していた無機成分を溶出し、発酵糖の原料であるセルロースとヘミセルロースを 29.0%から 38.3%へ向上させることができた。また、PS 中の糖質以外の有機成分含量（界面活性剤など）はほとんど変化していないことから、これら成分は水洗いでは除去できないことも判明した。また、水洗浄処理 PS についてセルラーゼを用いた加水分解を実施したが、未処理の最終 PS と同等量の発酵糖しか得ることはできなかった。

そこで、最終 PS 中に含まれる無機成分の除去や繊維質以外の有機成分の除去に着目した各種処理法を検討した。Fig. 24 は、最終 PS および酸処理、アルカリ処理、およびアルカリ-酸処理を行った成分分析の結果である。初めに最終 PS 中に含まれる無機成分の除去に着目した酸処理法を検討した。特最終 PS 中に多量に存在する無機成分、特に Ca 塩の除去を試みた。最終 PS 懸濁液が緩衝作用を示す原因は、填料中の CaCO_3 が原因であると考えられる。このことから、最終 PS から Ca 塩の除去することにより PS 懸濁液の pH 調整も容易になり、エタノール生産を行う際の酵素反応および発酵効率を向上できると期待できる。一般に Ca 塩は塩化物にすることで水に溶解することから、最終 PS 懸濁液に塩酸を加える酸処理法を検討した。2.2 節に示した方法で最終 PS 懸濁液に酸処理を施し一昼夜浸漬した。塩酸を加えると PS 中の CaCO_3 が溶解し、 CO_2 ガスが発生した。調製した酸処理 PS の成分を分析した結果を Fig.23 の 2 列目の棒グラフに示した。

酸処理後の PS の成分は、セルロース 36.3%、ヘミセルロース 18.6%、他の有機成分 17.3%、無機成分 27.8%に変化した。この塩酸処理によって、無機成分

はかなり減少し、反対にセルロースとヘミセルロースは増加した。その結果発酵糖含量が約 32.6%から 54.9 %に増加し、PS 中の繊維質含量を高めることができた。以上の結果から最終 PS の前処理として、塩酸を用いた酸処理が有効であり、無機成分の除去と繊維成分含量の向上を達成できることがわかった。しかし、塩酸処理では繊維成分に吸着している有機成分（界面活性剤など）の除去は、十分にできない（残留割合: 16.3%）ことも判明した。付着有機成分が、エタノール製造へどのように影響するかは、SSF プロセスのところで説明する。

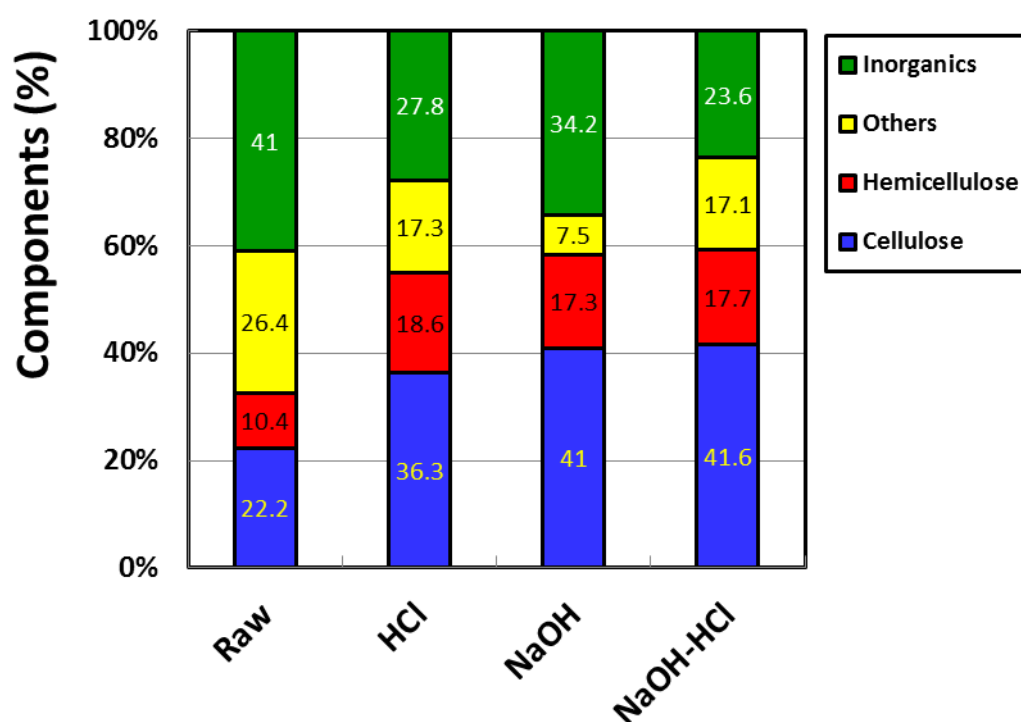


Fig.24 各種処理ペーパースラッジの成分成分

次に、最終 PS 中に含まれる繊維質以外のアルカリ溶解性の有機物質の除去に着目したアルカリ処理法を行った (Fig.24, 右から 2 列目の棒グラフ)。アルカリ酸処理後の PS の成分は、セルロース 41.0%、ヘミセルロース 17.2%、他の有機成分 7.5 %、無機成分 34.5%に変化した。アルカリ処理により、未処理の最終 PS 中のセルロース含量を向上させることができ、さらに、繊維質以外の有機物質を大幅に軽減できることがわかった。しかし、処理 PS 中の無機成分を大幅に軽減することはできなかった。

そこで、繊維質以外の有機化合物と無機成分を最終 PS からする 2 段階の処理法「アルカリー酸処理」を検討した。アルカリー酸処理を行った最終 PS は、未処理の最終 PS と比較して見た目は黒くなった。さらに、Fig.25 は最終 PS の SEM 写真とアルカリー酸処理最終 PS の SEM 写真である。写真から明らかなように最終 PS 中の繊維質は多くの物質を吸着しているが、アルカリー酸処理 PS ではほとんど吸着していないことがわかった。

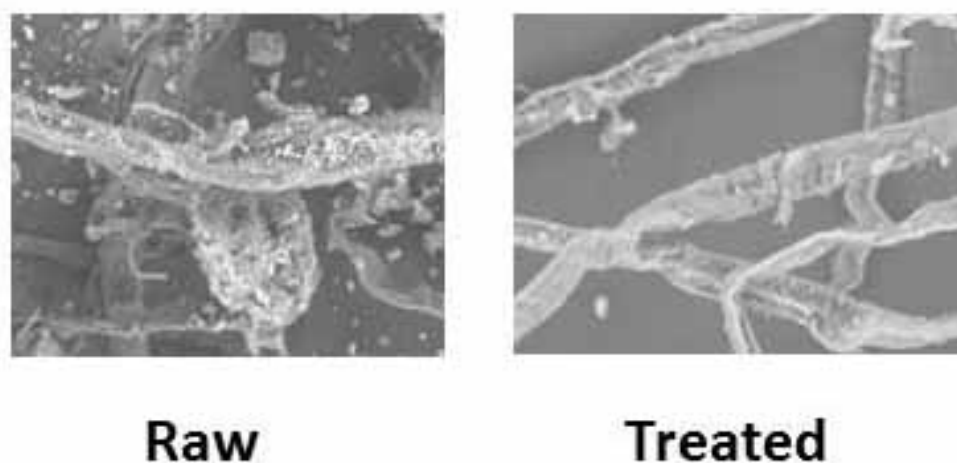


Fig.25 最終ペーパースラッジとアルカリ・酸処理
ペーパースラッジの SEM 写真

Fig.24 (右 1 列目の棒グラフ) に示したアルカリ－酸処理の成分分析の結果から、無機成分は未処理の 41%から 22.5%にまで減少できた。これとは逆にエタノール発酵の原料となる PS 中の繊維質 (セルロースおよびヘミセルロース含量) を、未処理の 32.6 %からアルカリ－酸処理後 59.3%にまで向上できることがわかった。さらに、糖質以外の有機成分は、未処理の 26.3%からアルカリ－酸処理 PS の 17.1%まで軽減できた。

以上の結果より、アルカリ－酸処理法が最終 PS の前処理に有効な方法であることがわかった。また、処理 PS 中の無機成分を検討することで各処理 PS 法により除去できた物質を決定することができる。さらに、アルカリおよび酸処理後の洗浄液の分析結果から、有益な化合物を回収・再利用する可能性を見出すことができる。そこで、各種前処理後の PS 灰化物に存在する元素比を蛍光 X 線分析により求めた (Fig.26)。未処理の PS 中の無機成分の総量 100%として示した。PS 中の無機成分は、塩酸処理、アルカリ処理、およびアルカリ－酸処理と減少し、アルカリ－酸処理において約 52%にまで除去することができた。特に、Ca の変化が顕著で、アルカリ－酸処理の場合、最終 PS の Ca 含量約 30%から 3%にまで減少させることができた。また、PS に存在する A (主に、カオリン由来) も最終 PS 含量約 32%から 13%にまで低減できたが、Si、Mg (主に、タルク由来)、Na (パルプ蒸解 NaOH 由来) に関しては、いずれの処理法も除去効果は低いことがわかった。

以上の結果より、製紙製造から発生する最終 PS は、多種多様な有機・無機成分を多く含むため、この中から繊維質を取り出すこと極めて難しい。本研究で開発したアルカリ－酸処理法は、アルカリ条件下で繊維質などに吸着している界面活性剤などの有機成分を除去でき、次の塩酸処理により、繊維質に吸着している Ca 塩を粗除去できる優れた前処理法である。アルカリ－酸処理法で使用

するアルカリおよび酸は、製紙製造事業所では、日常的に多量に使用している薬剤であり、入手も容易であるため実用化に向けても有利である。また、アルカリ-酸処理の酸処理工程において、高濃度の Ca 塩を含む廃液が回収でき、さらには製紙製造事業所には CO₂ 発生源が多く存在していることから、この廃液から填料として再利用できる CaCO₃ を回収するプロセスを構築することは容易であると考えられる。

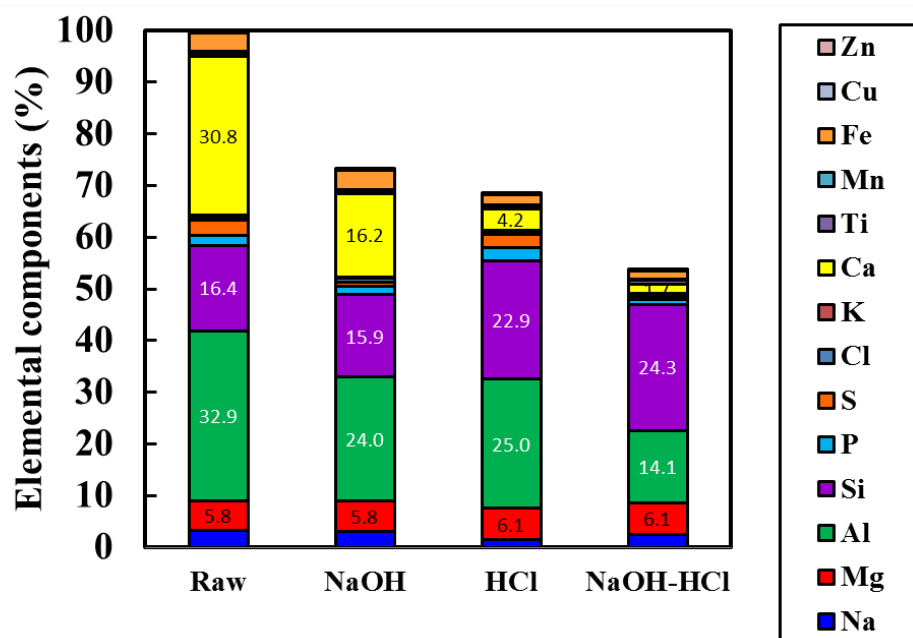


Fig.26 XRF 解析による各種処理ペーパースラッジ
灰中の無機成分含量

3.3 ペーパースラッジの加水分解の最適化

PS から効率よくエタノールを得るためには、PS 中に含まれる繊維質（セルロースおよびヘミセルロース）からグルコースおよびキシロースなどの発酵糖

を生成する糖化段階と、生成した発酵糖を発酵微生物によりエタノールへ変換する発酵段階の組合せ検討することが重要である。この逐次反応においては、一般に前者の繊維質の加水分解反応が律速であり、この反応の向上が生成エタノール量を左右する。一方、加水分解の触媒は、高価な酵素剤が必須であり、リグノセルロースからエタノールを製造させる際、この使用量を削減させることが実用化へ一つの鍵となっている。

Fig.27 は PS 中に含まれる繊維質が、セルラーゼにより加水分解される発酵糖であるグルコースおよびキシロースが生成されるメカニズムを示す。PS 中の繊維質は、主鎖であるセルロースの束の横に、ヘミセルロースであるキシロースからなるペントースの糖鎖からなる。特に、セルロースの束は、強固な結

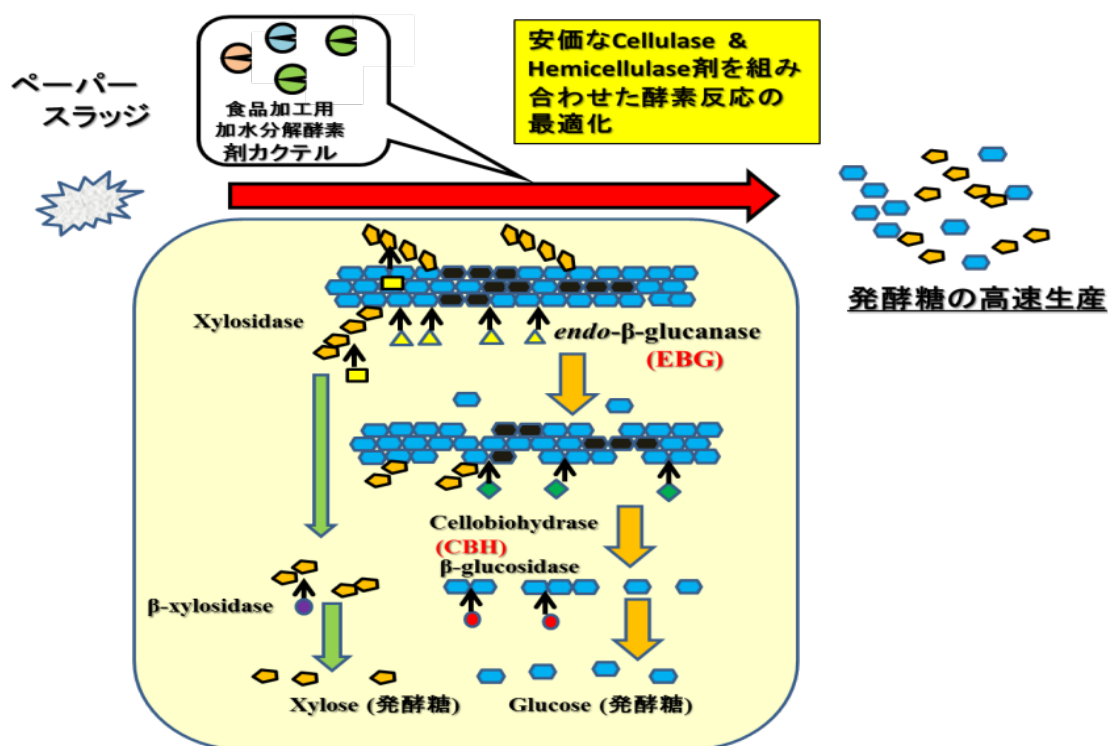


Fig.27 ペーパースラッジ中の繊維質の各種酵素による加水分解のメカニズム

晶構造を有しており、これがセルロースの加水分解の妨げとなっている。この結晶性のセルロースは、Cellobiohydrolase (CBH) により、セルロースの末端から加水分解されるとともに、 β -Gluconase (EGB) の作用により、ランダムに切断を受ける。また、キシロースからなる側鎖は、Xylanase の作用により、ランダムに切断される。このようにしてセルロースおよびヘミセルロースは低分子化される。グルコース 2 分子からなるセルビオースは、最終的には β -Glucosidase の作用により、発酵糖であるグルコースへ加水分解される。また、キシロース 2 分子からなるキシロビオースは、 β -Xylosidase の作用により非発酵糖であるキシロースへ変換される（キシロースは通常の発酵微生物である酵母などでは発酵できない）。我々が開発している糸状菌は、キシロースの発酵も可能である。繊維質の加水分解は、上記で述べたように CBH、EGB、 β -Glucosidase、Xylosidase、および β -Xylosidase の作用による。迅速なセルロースの加水分解を達成させるためには各加水分解酵素の最適な成分比の最適化が必要になる。市販のセルラーゼ剤は、これらの酵素の複合剤であり、必ずしも PS 中の繊維質を加水分解するために最適化されていない。

また PS は、パルプ蒸解工程や再生紙からの繊維質の蒸溶にアルカリ処理を施していることから、セルロース結晶構造の大半が既に壊されており、さらに、パルプ中のリグニンの大半を黒液という形で除去しているため優れた基質になると想定できる。しかし、3.1 節に示したように最終 PS は、繊維質以外の有機成分と填料成分である無機成分を多く含むことから、セルラーゼにより PS を直接加水分解することは難しいと考えられる。

そこで、PS 中の繊維質から発酵糖を得るためのセルラーゼ剤について検討した。初めに繊維質含量が多い抄紙テール（スクリーン）を基質として 6 時間の加水分解を行い、14 種類の市販セルラーゼ剤の生成還元糖量を比較した (Fig.27、

右上図)。市販のセルラーゼ剤は CBH、EGB、 β -Glucosidase Xylobiose、および β -Xylosidase を含む混合物で有り、薬剤中の配合比や各酵素の比活性により、生成する還元糖量は異なる。加水分解反応の結果、基質乾燥重量当たり 0.05 から 0.35 g/g の還元糖が生成し、セルラーゼ剤によりその分解能は大きく異なることが判明した。特に、Meicellase (A)、Cellulase T “Amano” (B)、Cellulase Onozuka 3S (E)、Cellulase from *Trichoderma viride* (L)、Accellerase (N)の還元糖生成量が高いことがわかる。これら酵素剤の中で、セルロースをランダムにセロビオースにまで加水分解する *endo*- β -Glucoanase 活性が高く、非発酵性セルビオースから発酵糖グルコースを得るための β -Glucosidase 活性が高い 3 種類の酵素剤 B、E、および N を選択した。そこで、この 3 種類の市販の酵素剤を個々に用いて、

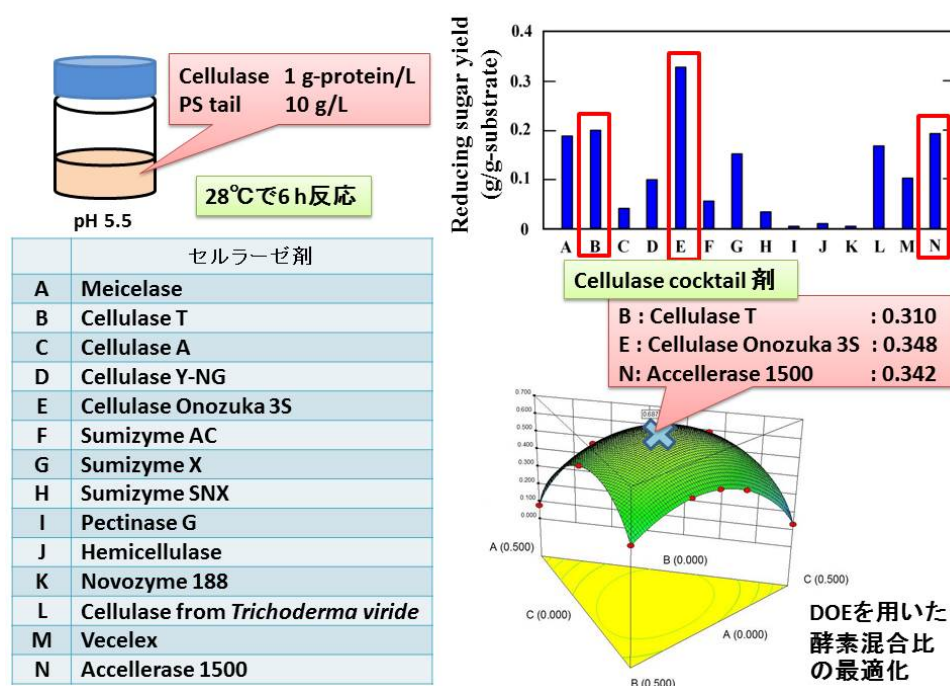


Fig.27 市販のセルラーゼ剤による抄紙テールの加水分解と
応答曲面法による酵素混合比の最適化

80 g/L の抄紙テールに対して 120 時間の加水分解反応を行った。使用した酵素剤の酵素タンパク質濃度は 1.0 g-protein/L とした。この酵素濃度は、一般のセルロース系バイオマスを酵素加水分解する際に用いる酵素濃度（15～30 PFU/g-Substrate）よりかなり低く 3.8～7.1 PFU/g であった。Cellulase T、Cellulase Onozuka 3S、および Accellerase を使用した場合、反応 120 時間で生成したグルコース濃度はそれぞれ 28.1、44.6、31.6 g/L、また、キシロース濃度はそれぞれ 2.5、3.1、0.1g/L となり、酵素剤により発酵糖の生成量が大きく異なることがわかった。

そこで、これら市販の酵素剤を組み合わせた酵素カクテル剤を作成し、PS から発酵糖を最大限に生成させるための酵素混合比を検討した。具体的には、今回のように抄紙テールの加水分解に必要な酵素活性（特に、EGB および β -Glucosidase）を有する酵素剤を 3 種類選択した。次に、実験計画法（Design of Experiments, DOE）ソフトである Design Expert® 8 を用いて、酵素混合比について実験計画を立てた。その計画にしたがって抄紙テールの加水分解実験を実施し、各配合比で加水分解を行ったときの結果を分析した。得られた分析結果に対して応答曲面法（Response Surface Methodology, RSM）を実施し配合比の最適化を実施した。実際に、実験計画法にしたがって先の 3 種類の酵素剤を用いて抄紙テールの加水分解反応を 48 時間行った。Fig.27（右下図）は実験計画法で設定された反応条件で加水分解反応を行い生成した発酵糖量（グルコース量 + キシロース量）を基に応答曲面を行い三次元で示した結果である。この結果から、Cellulase T : Cellulase Onozuka 3S : Accellerase の混合比を、0.310 : 0.348 : 0.342 としたときに、最大の発酵糖が得られると予測できた。そこで、この混合比で調製した酵素カクテル剤を用いて、80 g/L の抄紙テールに対して 120 時間の加水分解反応を行った。このときの酵素量は、4.7

PFU/g-Substrate である。反応 120 時間で生成した発酵糖はグルコース 41.4 g/L、キシロース 3.32 g/L、セロトリオース 2.79 g/L、セロビオース 6.71 g/L となり、利用可能な可溶糖として合計 54.1 g/L を生成させることが示された (Fig.28)。

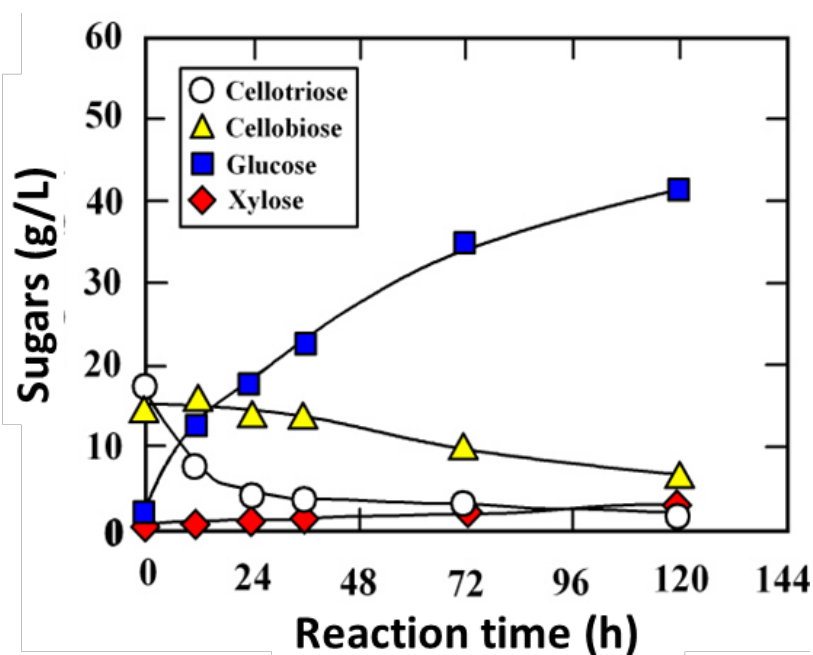


Fig.28 酵素カクテル剤を用いた抄紙テールの加水分解

この結果から、RSM は抄紙テールから少量のセルラーゼ剤を用いて効率よく発酵糖を得るために酵素混合比を決定するための有望な手法になることがわかった。さらに、本最適化法は、SSF プロセスによるセルロース系バイオマスからのエタノール生産において、加水分解速度の改善や使用酵素の削減などへ応用できると期待される。

そこで、次に RSM を活用した最終 PS の加水分解について酵素カクテル剤の最適化を試みた。基質濃度は、50 g-dry/L となるように調製した。本研究開発で使用した最終 PS は、先に述べたように水に懸濁すると pH 8.0 - 9.0 を示す。

そこで、1 M 塩酸を添加し懸濁液の pH を 5.0 程度まで下げた最終 PS を基質として 120 時間の加水分解反応を実施した。使用した市販のセルラーゼ剤は 13 種類で、加水分解時の濃度はすべて 1.0 g-protein/L とした。

Fig.29 は、各市販のセルラーゼ剤を用いて最終 PS を加水分解を行った時のグルコース、キシロース、およびセロビオース濃度の変化を示す。反応終了後生成したグルコース濃度は、Meicelase と Accellerase が高く約 4.0 g/L であった。また、キシロースの生成濃度は、いずれの酵素も低く、最大でも 0.5 g/L であった。さらに、セロビオース濃度は、Pectinase を使用した際反応液中に確認できなかったことから、 β -Glucosidase の活性を有していることがわかった。

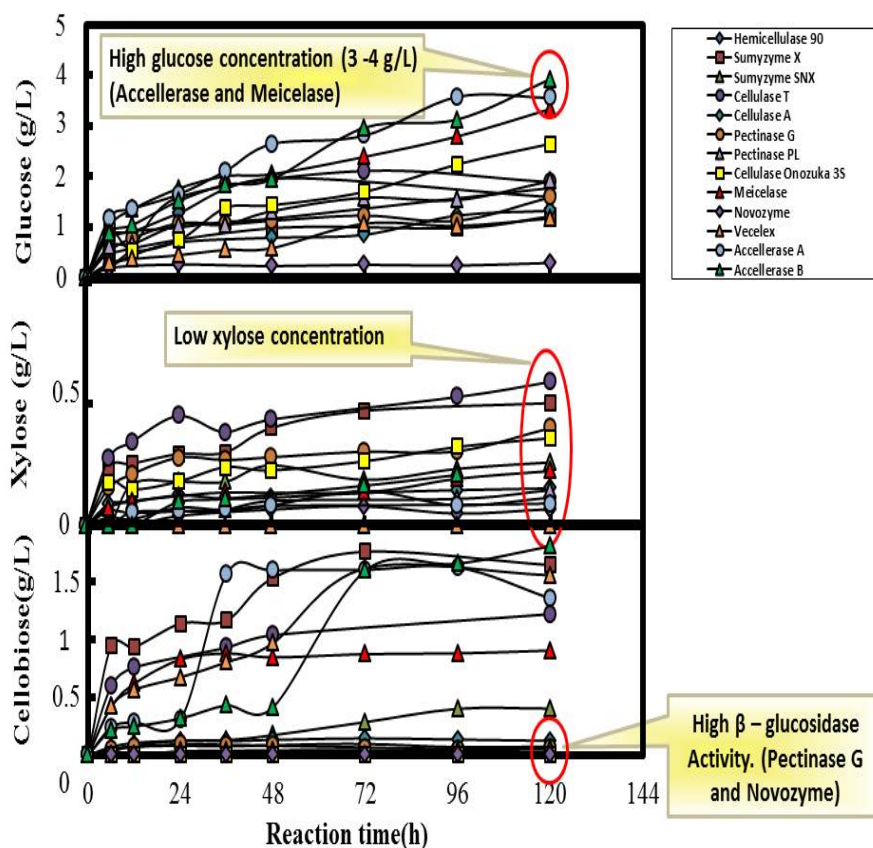


Fig.29 市販のセルラーゼによる最終ペーパースラッジの加水分解

以上の結果から、最終 PS の加水分解のためのセルラーゼ剤としてグルコース生成濃度と β -Glucosidase 活性の高い、Meicelase、Accellerase、および Pectinase を選択した。次に、3 種類の酵素剤混合比を DOE により 14 条件の混合比で調製した酵素ブレンド剤を用いて最終 PS の加水分解反応を 96 時間行い、生成した発酵糖（グルコース + キシロース）を元に RSM を用いて解析した（Fig.30）。その結果、Accellerease : Pectinase G : Meicelase の比が、1.907 : 0.710 : 0.384 の時、生成する発酵糖量を最大できることがわかった。そこで、この結果を元に調製した最適酵素カクテル剤を用いて 50 g-dry/L の最終 PS を用いて 96 時間の加水分解反応を行った（Fig.31）。その結果、加水分解反応は 48 時間目頃までス

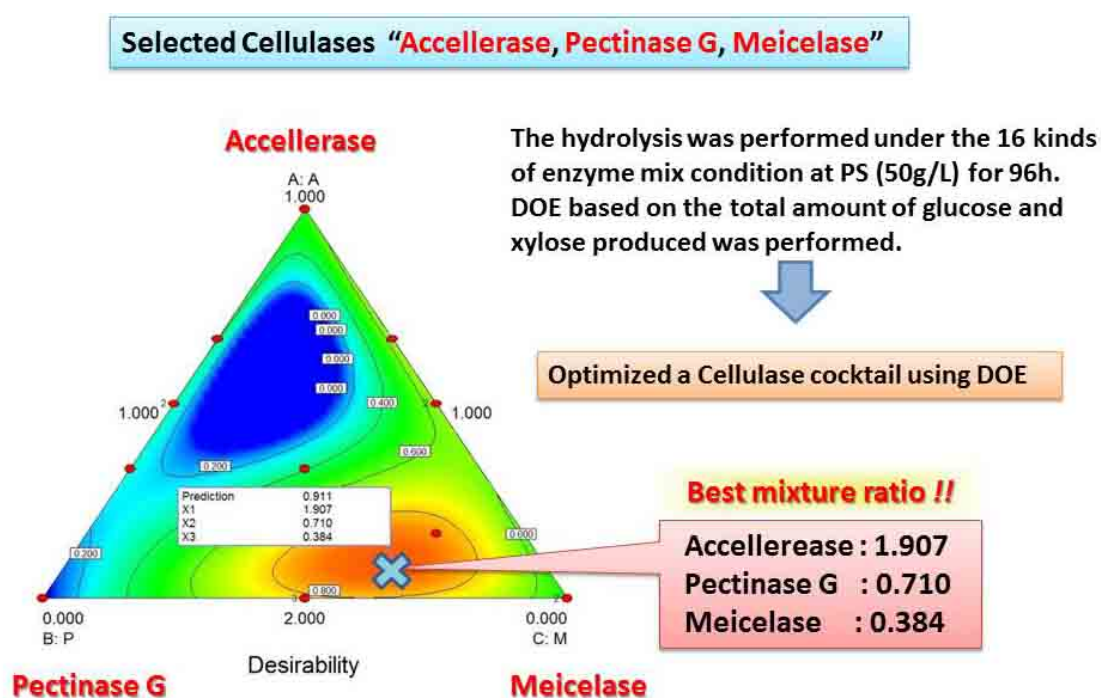


Fig.30 最終ペーパーラッジの加水分解のための酵素剤の最適化適化

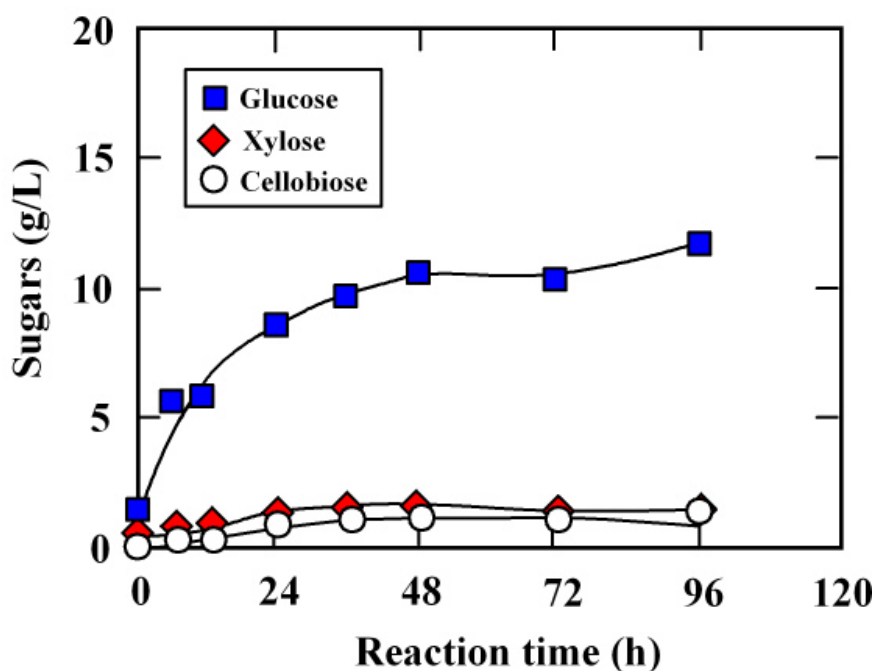


Fig.31 酵素カクテル剤を用いた未処理最終ペーパースラッジの加水分解

ムーズに進行し、その後、反応は緩やかになり反応 96 時間目に 12.3 g/L のグルコースを得ることができた。一方、キシロースの生成量は培養 48 時間以降 1.2 g/L とほぼ停止しすることがわかった。

これは、3.1 節で示したように最終 PS 中に含まれている Ca 塩と、反応液中に含まれている硫酸 $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ が反応し、不溶性の Ca_2SO_4 (石膏) が生成したことが一因と考えられる。このような難分解性の物質が絡み合った繊維質を酵素反応により加水分解させることは難しく、さらに、石膏にセルラーゼが吸着し失活する可能性も否定できない。

そこで、先ず初めに、反応溶液成分を変更することによる石膏の生成抑制について検討した。SSF プロセスによる PS からのエタノール生産を想定し、酵素カクテル剤による PS 加水分解に反応液として培地成分を使用する。通常培地中

の窒素源として硫酸 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を使用している。この中に硫酸イオンを含んでいるため最終 PS 中の Ca イオンと反応し石膏が生成することが懸念される。そこで、培地成分中の窒素源として $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 、 NH_4Cl 、 HN_4NO_3 、 KNO_3 、および $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ を使用した。最適酵素カクテル剤を用いて 50 g-dry/L の最終 PS となるように窒素源の異なる培地中で 96 時間の加水分解反応を行った。窒素源として $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ を使用した時、加水分解反応は良好に進行し、反応 96 時間目に理論収量に匹敵するグルコース 18.6 g/L を得ることができた。さらにキシロースの生成量も向上させることを明らかにした。

次に第 2 の対策として、最終 PS の前処理として、3.2 節で開発したアルカリ-酸処理法を開発した。Fig.32 は、アルカリ-塩酸処理 PS を加水分解した時の生成した発酵糖濃度の変化を示す。セルラーゼカクテル剤は、RSM を用いて計算した最適な酵素混合比 $\text{Accellerase} : \text{Meicelase} : \text{Pectinase} = 1.393 : 0.943 : 0.664$ を用いた。50 g-dry/L のアルカリ-塩酸処理 PS を用いて、エタノール発酵を想定し、pH 5.5 に調整した培地中で加水分解反応した実施した。アルカリ-酸処理 PS の懸濁液は、緩衝作用が無く、容易に pH 調整が可能であった。また、窒素源として、石膏の生成を防ぐために $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ を用いた。この加水分解反応 96 時間で、35.4 g/L のグルコースを、5.6 g/L のキシロースを得ることができた。この値は、アルカリ-塩酸処理 PS 中の繊維質が、80.8%が加水分解できたことを意味する。

以上の結果より、反応溶液中の成分である硫酸をリン酸水素アンモニウム $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ へ変更する戦略 1)では、最終 PS から生成する発酵糖量を 1.5 倍向上させることができた。一方、最終 PS 中の Ca 塩を除去するアルカリ-酸処理法、戦略 2)は、単独のセルラーゼ剤を用いて未処理の最終 PS を加水分解したときに得られたグルコース濃度が 120 時間で 3 - 4 g/L であったことと比較して約 10 倍、

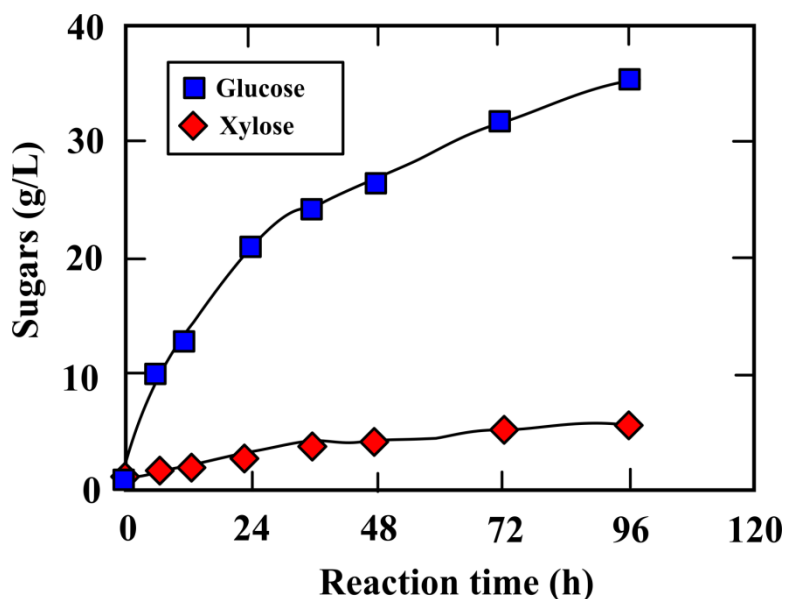


Fig.32 酵素カクテル剤を用いたアルカリ-酸処理
ペーパースラッジの加水反応

また、酵素カクテル剤を用いた最終 PS の加水分解において得られた発酵糖量を 2.9 倍向上させることができた。すなわち、戦略 2)で行った最終 PS からの Ca 塩の除去は、最終 PS からセルラーゼにより発酵糖を得るためには必ず実施しなければならない前処理であることがわかった。本事業で開発したアルカリ-酸処理法により、最終 PS に含まれている繊維質から 80%以上の収率で発酵糖を得ることができたことは、最終 PS をエタノールなどへ変換させるための第一段階を克服できたと考えられる。

3.4 エタノール発酵糸状菌の検索および同時糖化発酵プロセス

3.4.1 ペーパースラッジからエタノールのためのエタノール発酵糸状菌

我々が新規に発見したエタノール発酵糸状菌 *Mucor* 属は、ソフトバイオマスであり稲わらからのエタノール生産菌として構築した菌株である。特に、*Mucor*

javanicus 株^{51,52)}は、好気条件下でグルコースからの効率的なエタノール発酵のみならず、通常の醸造製造に使用されている酵母 *Sacchromyces cerevisiae* やテキーラの製造に用いられている発酵微生物 *Zyomonas mobilis*⁵³⁾では発酵が不可能なキシロースを高収率で発酵することができる。さらに、糸状菌であることからアミラーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼなどを分泌する特徴を有する高性能な発酵微生物である。そこで、PS からエタノールが製造できるのか、稲わらからのエタノール生産の結果を元に検証した。初めに、80 g-dry/L 抄紙テールを基質として、3.3 節で最適化したセルラーゼカクテル剤と *M.javanicus* 株を組み合わせた SSF プロセスを実施した (Fig.33)。その結果、培養初期より酵素による加水分解が進むと共に、エタノールが生産され始め、培養 120 時間目に 30.2 g/L のエタノールを得ることができた。このときのエタ

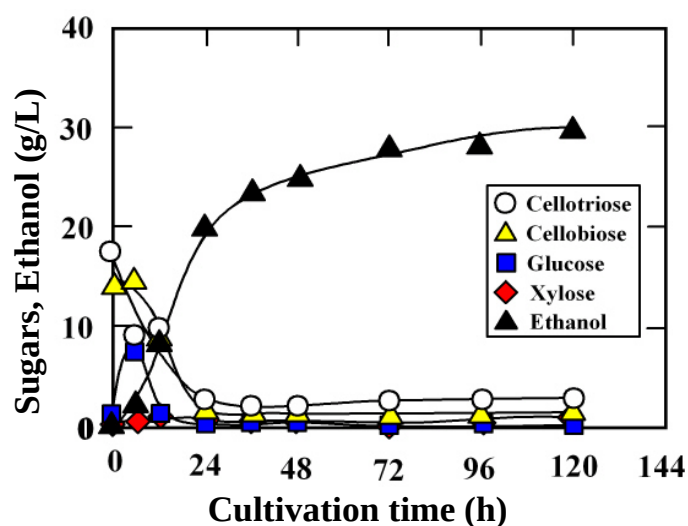


Fig.33 酵素カクテル剤とエタノール発酵糸状菌 *Mucor javanicus* を用いた同時糖化発酵によるエタノール生産

ノール発酵効率は 86.3%、また、培養時間および培養体積当たりのエタノール生産量で示されるエタノール生産性は、0.25 g/L/h と極めて優れたエタノール生産能を示した。一方、最終 PS からのエタノール生産に関しての能力は、全くの未知数である。3.1 節で分析したように、最終 PS の繊維質以外にもその他有機物質と填料成分である無機成分を大量に含む。また 3.2 節で示したように各種前処理方法により調製した PS に対して、それぞれ最適なセルラーゼカクテル剤が存在し、その種類および混合比により生成する発酵糖が異なる。さらに、我々のエタノール発酵糸状菌が一般の酵母と比較して、環境に対する耐性が強い⁵⁴⁾ことが判明しているが、PS や前処理に使用した薬剤が、エタノール発酵糸状菌の生育阻害やエタノール発酵阻害物質を含む可能性は否めない。そこで、これらの問題を解決するために、本研究室の接合菌 *Mucor* ライブラリーから PS の発酵に優れた菌株を新規にスクリーニングした (Fig.34)。調査した *Mucor* 属の菌種および近縁種合計 84 株である。50 g/L の未処理の最終 PS を基質として、発酵培地を調製した。培養液の pH は、HCl を用いて強制的に 5.5 に調整した (発酵糸状菌にとって極めて劣悪な環境である)。その培地にセルラーゼ剤 Acellulrease を 6.9 PFU/g-PS となるように添加し、さらに保存スラントから各種菌株を植菌し、SSF プロセスを開始した。培養は嫌気条件下で 28℃とし 120 rpm の振盪で 120 時間行った。また、同時に、醸造用酵母 *S.cerevisiae* Kyokai 7 を用いて同様な SSF プロセスを行ったが、菌体の増殖は確認できず、さらにエタノールの生産も認められなかった。なお、*Mucor* 属を用いた培養では、セルラーゼの反応により生成したグルコースとキシロースの培養液中の残存量と、エタノール発酵糸状菌により生成したエタノール量を比較した。その結果、エタノール生成量が高い菌株は、最終 PS に対して耐性を有し、さらに、エタノール生産に対して阻害を受けていないことがわかった。その結果、*Mucor circinelloides*

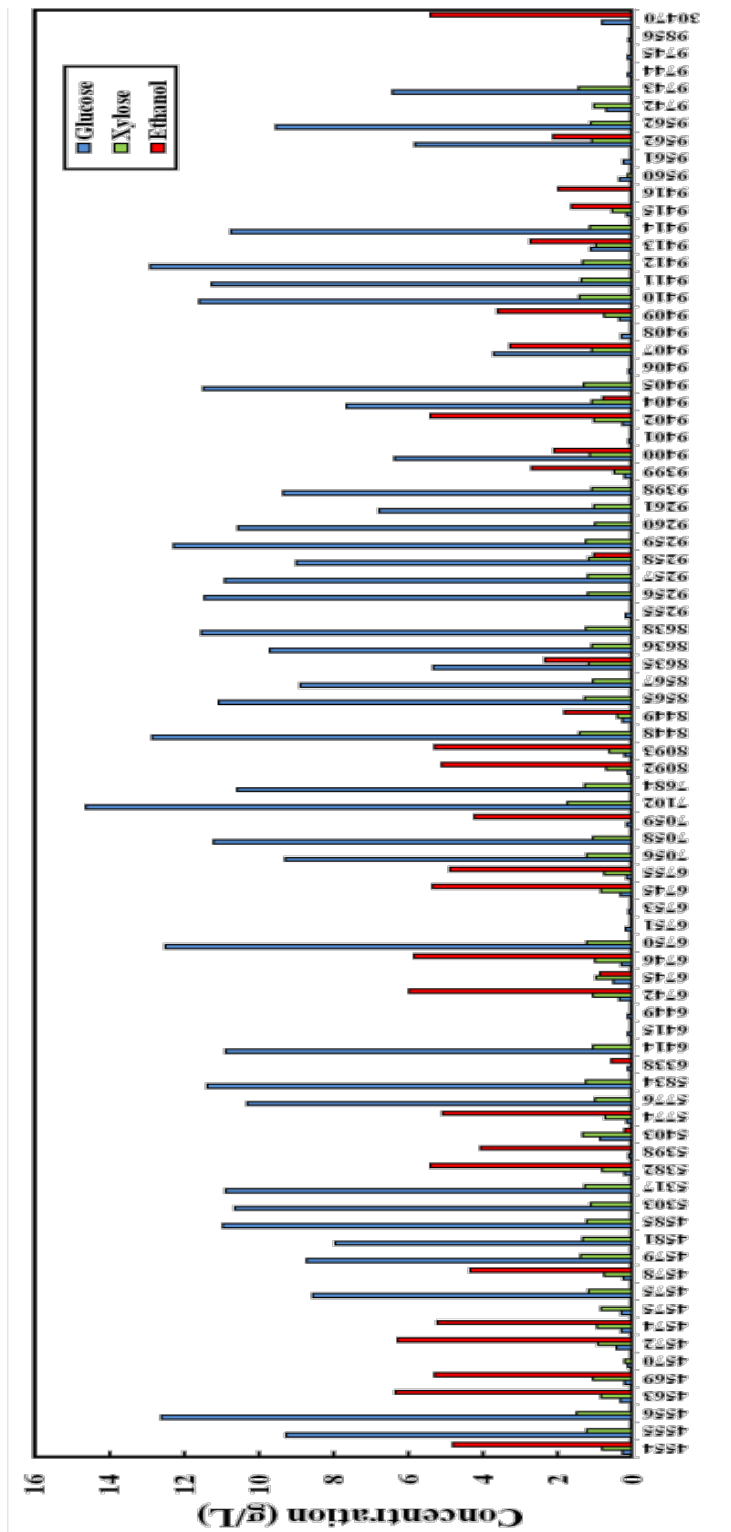


Fig.34 *Mucor* 属ライブラリーとセルラーゼ剤を組み合わせた
最終ペーパープロセスの同時糖化発酵

f. griseo-cyanus NBRC 4563、*Mucor circinelloides f. circinelloides* NBRC 4572、*Mucor circinelloides f. circinelloides* NBRC 5382、*Mucor circinelloides f. circinelloides* NBRC 30470、*Mucor circinelloides f. janssenii* NBRC 6746、*Mucor ambiguus* NBRC 8092、*Mucor recurvus* NBRC 8093、および *Mucor fragilis* NBRC 9402 が 5 – 6 g/L のエタノールを生産できることが示された。これらの菌株の中で、特に、*Mucor circinelloides f. griseo-cyanus* NBRC 4563 株は、約 6.0 g/L のエタノール生産ができる優れた株であることが判明した。このときの培養条件は、最適化を行っていない培養環境であるにもかかわらず発酵効率は約 84%に達した。そこで以下の研究では、*M. circinelloides* NBRC 4563 を使用した。

3.4.2 エタノール発酵糸状菌を用いた同時糖化発酵プロセスによるペーパースラッジからのエタノールの生産

100 g-dry/L の抄紙テールを基質として、3.3 節において確立した最適化した酵素カクテル剤と、*M.circinelloides* NBRC 4563 (Fig.35) を組み合わせた SSF プロセスを実施した。SSF プロセスの概略を Fig.36 に示す。Fig.37 に示すこの培養結果から酵素反応により生成した発酵糖は急激に減少し、それと反対にエタノールは急激に生成され、培養 36 時間目には 20 g/L に達した。その後、徐々にエタノール生成量は増加し、培養 120 時間目に 30.0 g/L のエタノールに達した。このときの発酵収率は 93%、エタノール生産性は、0.25 g/L/h である。バイオマスからのエタノール生産においては、得られたエタノール濃度が 30 g/L 以上になることが、蒸留によるエネルギーコスト面の実用化の鍵となっている。この値をクリアできたことは、発酵に関して実用化への第一歩になると考えられる。さらに、抄紙機から排出される抄紙テールの場合、湿潤抄紙テール 1 トン (81% 水分含量) から約 57 kg (71.3 L) のエタノールを生成できることが示された。

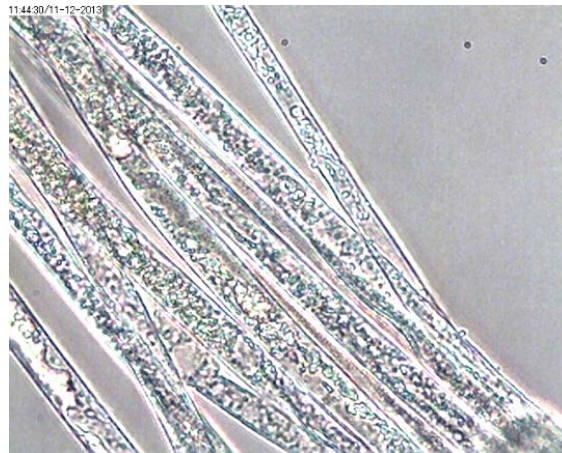


Fig.35 エタノール発酵糸状菌 *Mucor circinellides* NBRC 4563

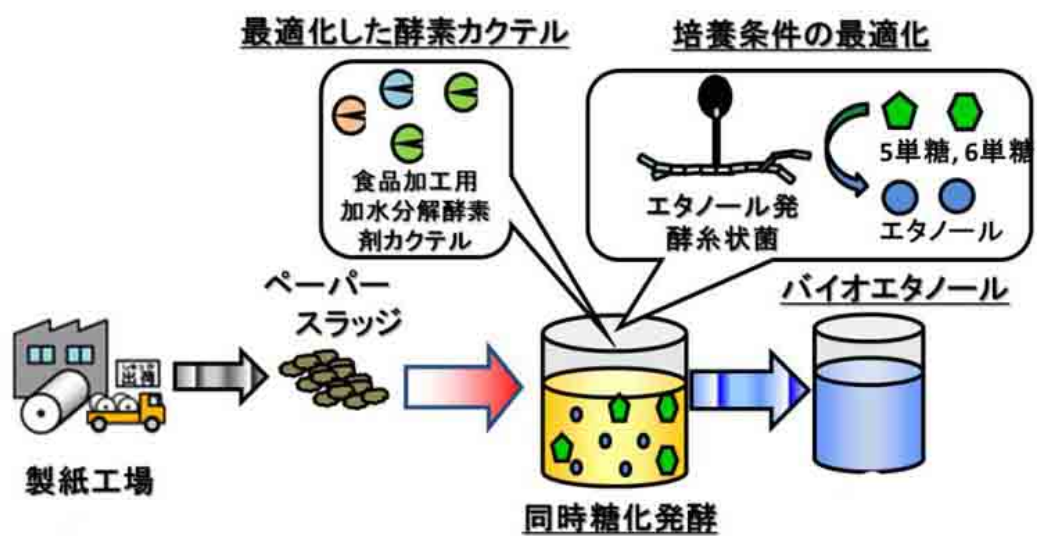


Fig.36 エタノール発酵糸状菌と酵素カクテル剤により
同時糖化発酵プロセス

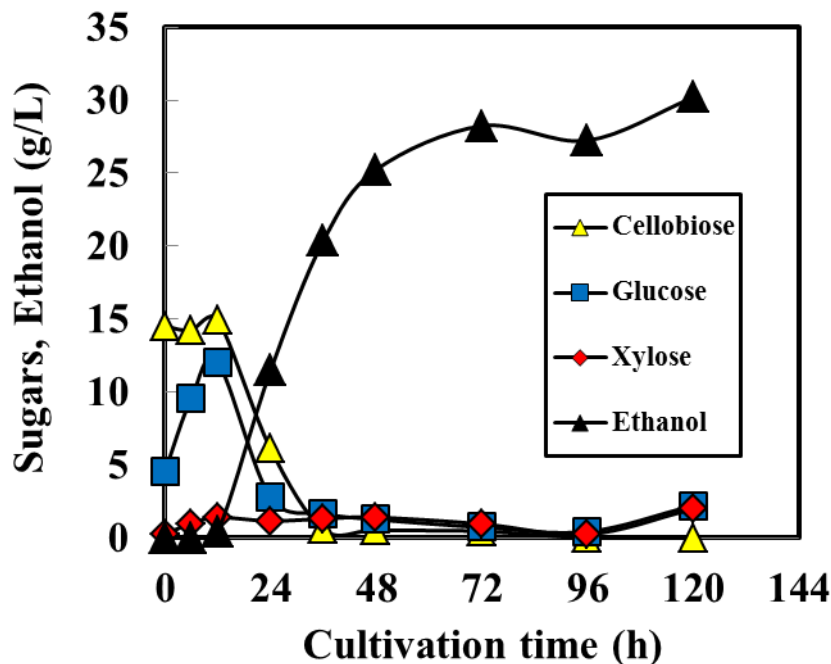


Fig.37 酵素カクテル剤とエタノール発酵糸状菌 *M.circinelloides* NBRC 4563 を用いた同時糖化発酵によるエタノール生産

この値は、本研究開発の目標値 50 kg をクリアする有益な結果である。そこで、次に不純物質として有機物質および無機物質を含む最終 PS からのエタノール製造へ適応した。3.2 節において実施した各種処理により調製した PS に対して、抄紙テールの実験条件と同様にして SSF プロセスを実施した。Fig.38 は、未処理の最終 PS を基質として SSF プロセスを行った培養の結果である。基質濃度は 100 g-dry/L とした。未処理の PS の場合、培養 12 時間目まで酵素反応によりグルコースが生成し、その後減少した。一方、培養 12 時間目からエタノールは生産され始め、培養 72 時間目にエタノール 8.9 g/L に達した。この結果から、*Mucor circinellides* NBRC 4563 株と最適化したセルラーゼカクテル剤を用いた SSF プロセスにより、未処理の最終 PS から直接エタノールが生成できることを実証した。しかし、この成果は、発酵効率 60% と高いものの、生産性は 0.111 g/L/h

と低く、実用化にはほど遠いことが示された。そこで、水洗浄法による前処理を行った PS を基質として同様に SSF プロセスを実施した。水洗浄法により、無機成分が若干低下するとともに繊維質含量は僅かに向上した。その結果、エタノールの生成速度は速くなったが、エタノールは培養 48 時間で未処理のものと同じ濃度 (8.9 g/L) にしか達しなかった。このときの生産性は、0.172 g/L/h となり、未処理 PS を用いた SSF プロセスを実施したときの生産性を 1.55 倍へ向上させることができた。しかし、この処理法はエタノール生産量が少ないことが欠点である。

そこで、次に最終 PS 中の無機成分、特に Ca 塩を除去するために塩酸処理を行った PS を基質として、SSF プロセスを実施した。本前処理では最終 PS 中の無機成分、特に Ca 塩の除去が顕著であり、処理 PS 中の繊維質含量は 50%を上回った。培養 12 時間目まで酵素反応によりグルコースが生成し、その後菌体の

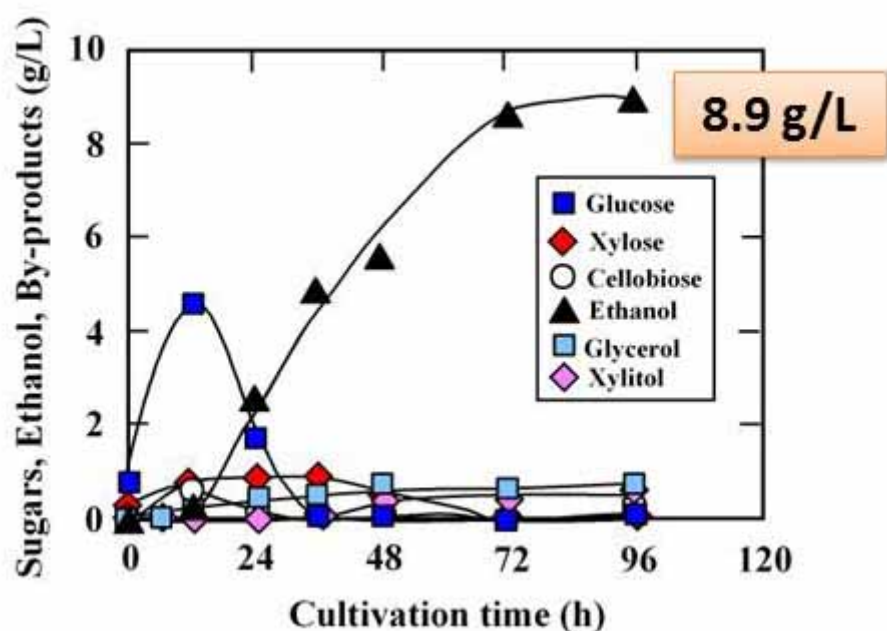


Fig.38 酵素カクテル剤とエタノール発酵糸状菌 *M.circinelloides* NBRC 4563 を用いた未処理最終ペーパースラッジの同時糖化発酵

増殖とともに消費された。一方、エタノールは徐々に生産され、培養 72 時間目に 17.8 g/L まで生産されたこのときの発酵効率は 69%、エタノール生産性は、0.242 g/L/h に達し、PS の前処理による無機成分の除去の効果が顕著であることが判明した。この培養の結果から PS に吸着している無機成分の除去は、セルラーゼ剤による加水分解の促進、さらに、エタノール発酵糸状菌の発酵効率の改善できることがわかった。

最後に、今回の研究開発で開発したアルカリ-酸処理により調製した最終 PS の SSF プロセスの結果を Fig.39 に示した。本処理法により、PS 中の繊維質に吸着している有機成分や無機成分を可能な限り除去することができる。この処理 PS を用いて SSF プロセスを実施した結果、培養 72 時間目で、21.3 g/L のエタノールを生産できた。このときの発酵効率は 67%と、塩酸を用いた酸処理と比較してほぼ同等の値である。しかし、エタノール生産性は、0.295 g/L/h と未処理の最終 PS を基質とした SSF プロセスの生産性を 2.7 倍向上できた。

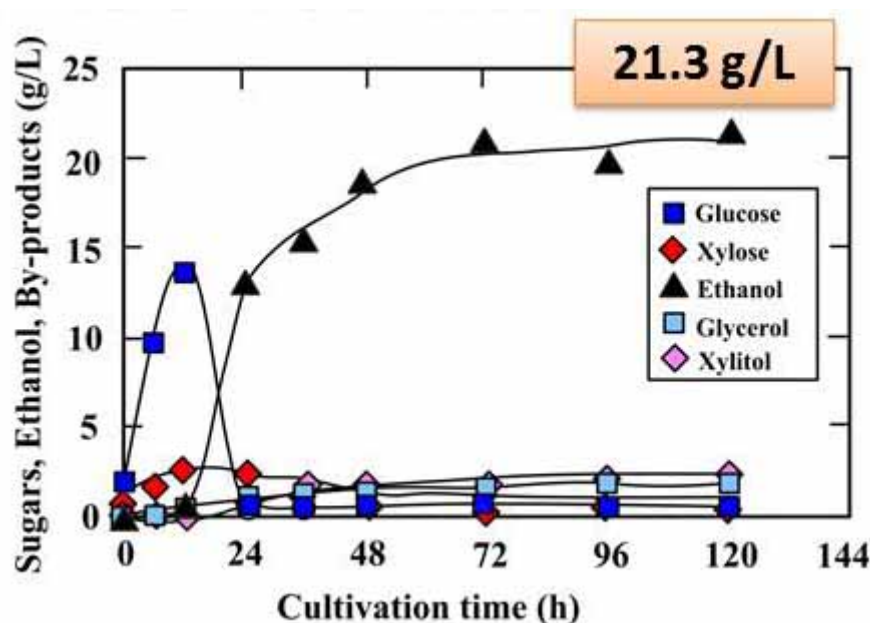


Fig.39 酵素カクテル剤とエタノール発酵糸状菌 *M.circinelloides* NBRC 4563 を用いたアルカリ-酸処理ペーパースラッジの同時糖化発

このエタノール生産性は、無機成分をほとんど含まず、繊維質が豊富な抄紙テールからのエタノール生産濃度を上回る優れた値である。

湿潤最終 PS 1 トン（54%水分含量）の乾燥物に対してにアルカリ－酸処理を実施した場合、無機成分の除去により処理 PS の乾燥物重量は初期の 56%に減少する。このとき得られる乾燥処理 PS の重量は $(1,000 \times (1 - 0.54) \times 0.56 =)$ 257.6 kg である。この内、本処理により繊維質含量は 59.3%であるから、152.8 kg の繊維質が回収される。Fig.39 に示したように 100 g-dry/L アルカリ－酸処理 PS を基質として SSF を実施した結果、21.3 g/L のエタノールが生産できた。この結果は、処理 PS 257.6 kg-dry から $(21.3 \text{ g/L} \times 257.6 \text{ kg-dty} \div 100 \text{ g/L} =)$ 54.9 kg のエタノールが生産できたことを示す。この値は、本開発の設定値であるエタノール濃度 10 から 30 g/L に入り、さらに、湿潤最終 PS 1 トンからエタノール生産量 50 kg を上回る。

3.4.3 高温発酵型エタノール発酵糸状菌の開発

3.4.1.項において PS からのエタノール生産に適したエタノール発酵糸状菌として *M.circinelloides* NBRC 4563 株を見出した。さらに、本菌株と最適化したセルラーゼカクテル剤を組み合わせた SSF プロセスにより、アルカリ－酸処理最終 PS からエタノールを効率良く生産できることが判明した。しかし、一般のセルラーゼ剤の至適温度は 40 - 50℃であるが、一般のエタノール発酵微生物の増殖温度やエタノール発酵温度は 30℃前後であり、本菌株の最適培養温度も同様である。すなわち、SSF プロセスにおいて酵素加水分解の至適温度と微生物の最適発酵温度が異なるため、SSF プロセスは発酵微生物の至適培養温度で実施しなければならない。一般のエタノール発酵微生物でも 40℃でエタノール発酵が実施できる株は、*Kluyvermyces marxianus* DMKU3-1042⁵⁵⁾など限られている。

現在、バイオマスからのバイオエタノール製造において、バイオマスの殺菌を必要とせず、さらに、SSF プロセスの際の加水分解速度を向上させるために、耐熱性菌株の開発が行われているが、未だに優れた菌株は見出されていない。また、本研究開発で得られた *M.circinelloides* NBRC 4563 株は、36℃での発酵は可能だが、40℃では生育することすらできない。しかし、このような菌株に対して一般の変異法を用いても、耐熱性を有する変異株を得ることは極めて難しい。高温で発酵可能な菌株を得るためには、高温状態で菌体が増殖でき、さらにエタノール発酵に係わる酵素群の高温発現および活性化を可能とする広範囲な変異誘導が必要である。我々は、以前 *Mucor javanicus* 高キシロース発酵株を得た方法に準じて 2.1.4 項に示すイオンビーム変異法による *M.circinelloides* NBRC 4563 株耐熱化を試みた。そこで、*M.circinelloides* NBRC 4563 株に対してカーボンイオンビーム変異を実施し、40℃以上で生育できる菌株を 3 株得ることに成功した。Fig.40 は、40℃寒天培地上での増殖の様子を示す写真である。40℃の寒天培地上で Wild 株は増殖できなかったが、変異株 A（40℃増殖株）、B（44℃増殖株）、および C（48℃増殖株）はすべて良好に増殖していることがわかる。

初めに、3 種の変異株 A、B、C 株の 28℃におけるグルコースおよびキシロースの発酵能を検討した。

さらに、Wild 株と Mutant A 株を用いて 50 g/L グルコースを 28、36、40℃で培養した結果を示す (Fig.41)。Wild 株は 40℃で増殖することができなかったが、Mutant A 株はすべての培養温度下で培養 24 時間に 22-23 g/L のエタノールを生産可能であった。すなわち、今回開発した *Mucor circinelloides* NBRC 4653 株の Mutant は、世界で初めて構築された 40℃以上発酵糸状菌である。現在、2 回目のイオンビーム変異を実施し、液体培地中 50℃以上で発酵可能な菌株の取得に成功している。

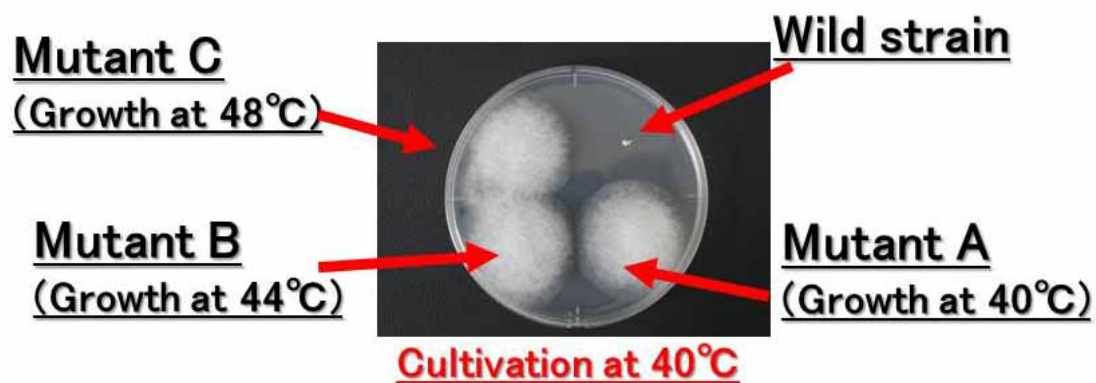


Fig.40 イオンビーム変異誘導により構築したエタノール発酵系状菌 *M.circinelloides* NBRC 4563 変異株の 40°Cでの増殖

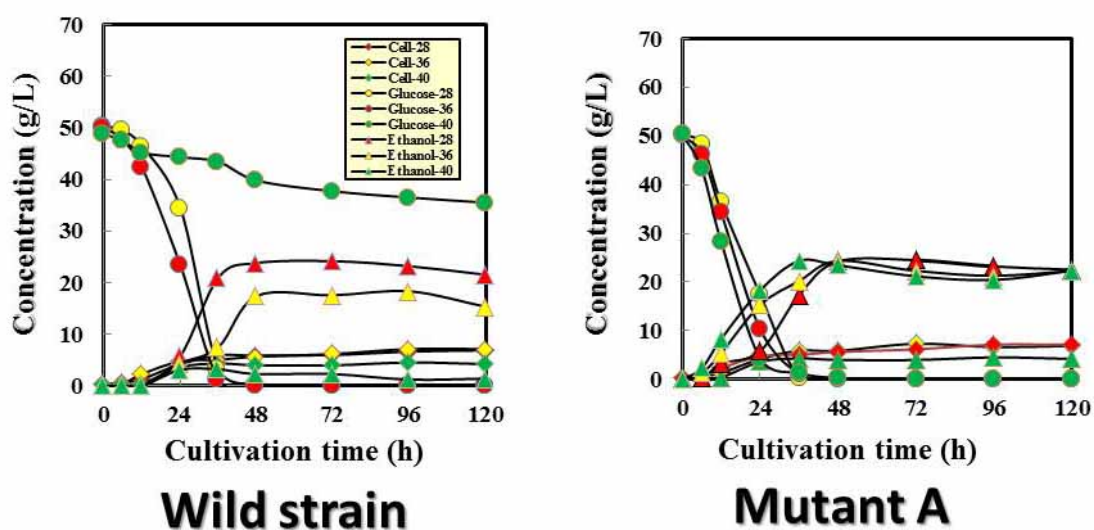


Fig.41 Wild 株および Mutant A 株を用いたグルコースのエタノール発酵(28, 36, 40°C)

この新規に構築した菌株を用いて、抄紙テールの SSF プロセスを実施した (Fig.42) 。40℃の培養温度の場合、培養 96 時間目に 32.4 g/L のエタノールを生産することができた。この値は、Wild 株を用いて 28℃で同時発酵を実施した培養 120 時間目のエタノール濃度 (30.2 g/L) と比較してさらに向上し、生産速度も速まることがわかった。次に、アルカリ-酸処理最終 PS に対して 40℃で SSF プロセスを実施した。Fig.43 は、40℃で SSF プロセスを行った結果を表す。培養 96 時間目で 23.1 g/L のエタノールを生産でき、エタノール濃度および生産速度とも向上することがわかった。すなわち、SSF プロセスを 40℃で実施できるエタノール発酵系状菌を構築できたことから、本 SSF プロセスは、PS の酵素加水分解反応および発酵速度を向上できることが明らかとなった。

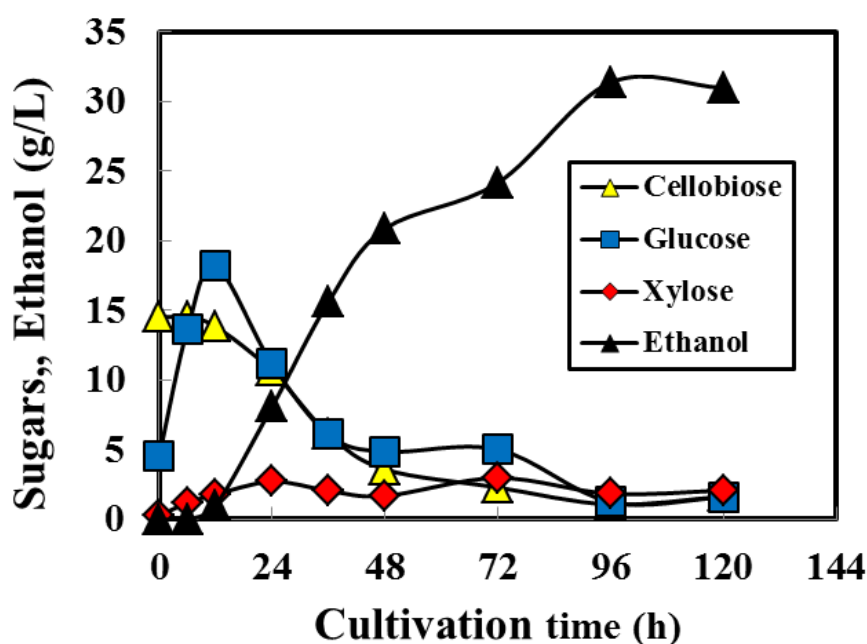


Fig.42 Mutant A 株を用いた 40℃での抄紙テールの同時糖化発酵

今回開発した高温発酵型エタノール発酵系状菌は、PS のみならず、未利用のリグノセルロース物質からバイオエタノールを製造するための新規生体触媒としての応用が期待される。

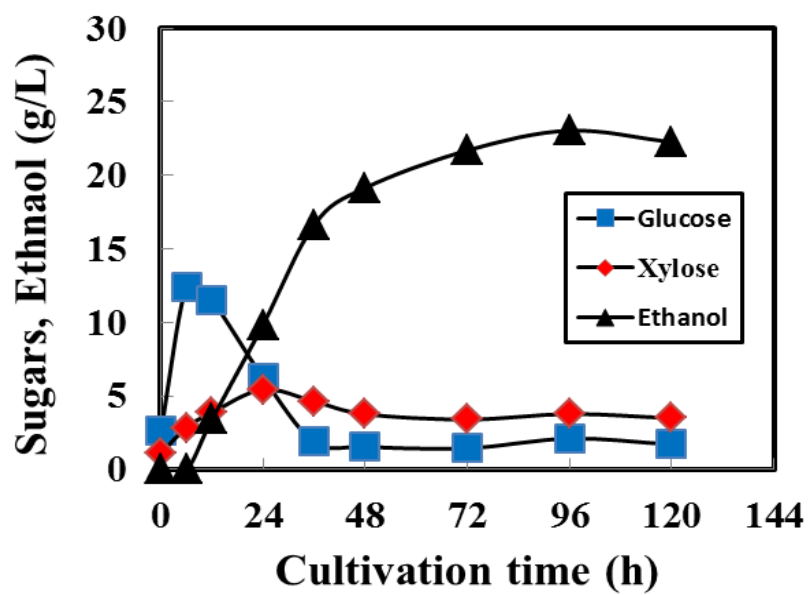


Fig.43 Mutant A 株を用いた 40℃でのアルカリ-酸処理 PS の同時糖化発酵

4. 結論

本研究では、製紙製造業界において多くの問題を引き起こしている製紙廃棄物の削減および有効利用を目的として、主な廃棄物であるペーパースラッジ(PS)を原料として備蓄可能なバイオエタノールをさせるための新規な発酵技術の開発を行った。この開発を進めるために、下記の4サブテーマを実施し、

- ① PS の成分分析
- ② PS の前処理の確立
- ③ PS の加水分解物の最適化
- ④ エタノール発酵糸状菌を利活用した PS からのバイオエタノール生産

以下の結論を得た。

- ① 製紙事業所から発生する最終 PS の繊維質含量は乾燥物基準で 14 - 18%がセルロース、約 7 - 10 がヘミセルロースであり、また、抄紙テール中の繊維質含量は約 47 - 48%がセルロース、約 17 - 18%がヘミセルロースであることがわかった。これらの結果から、PS はエタノールを生産させるためのバイオマス源として有望な資源であることがわかった。
- ② 最終 PS からエタノールを生産する際、酵素反応への阻害やび発酵阻害を引き起こすと考えられる無機成分（炭酸カルシウムなど）と繊維質以外の有機成分（界面活性剤、脱墨剤など）を除去する方法として、アルカリ－酸処理法を開発した。処理法により、最終 PS 中の無機成分を未処理の状態から約 52%にまで除去することができ、特に、カルシウム含量は未処理の場合の約 30%から 3%にまで減少させることができた。
- ③ 最終 PS および抄紙テールを効率良く加水分解させるために、各種酵素活

性を複合的に有す市販のセルラーゼ剤を組み合わせた酵素カクテル剤を調製することが必要である。そこで、実験計画法（DOE）を用いて決定し、その実験計画に従い加水分解実験を実施し、各配合比で加水分解を行ったとき生成した発酵糖量を求めた。得られた分析結果に対して応答曲面法（RSM）を実施し最適な酵素配合比を決定した。その結果、抄紙テールの場合、Cellulase T : Cellulase Onozuka 3S : Accellerase の混合比を、0.310 : 0.348 : 0.342 とした、また、アルカリ-酸処理最終 PS の場合、Accellerease : Pectinase : Meicelase の比が、1.907 : 0.710 : 0.384 の時、生成発酵糖量を最大にすることができると予測できた。そこで、最適化した酵素カクテル剤を用いて、80 g/L の抄紙テールに対して 120 時間の加水分解反応を行った結果、生成したグルコースは 41.4 g/L、キシロースは 3.3 g/L、セロトリオースは 2.8 g/L、セロビオース 6.7g/L と利用可能な可溶糖として合計 54.1 g/L 生成させることができた。同様に、最適な酵素カクテル剤を用いて 50 g/L の最終 PS を用いて加水分解反応を行った結果、反応 96 時間目に 38.0 g/L の Glucose を生成できた。

- ④ PS からエタノールを生産させるために、接合菌 *Mucor* ライブラリーから PS に対してエタノール発酵に優れた菌株のスクリーニングを実施した結果、*Mucor circinelloides* NBRC 4563 株を見出した。アルカリ-酸処理最終 PS に対して最適化した酵素カクテル剤と、*M.circinelloides* NBRC 4563 を組み合わせた SSF プロセスにより、50 g/L のアルカリ-酸処理 PS から培養 96 時間で 21.3 g/L のエタノールを生産できた。このアルカリ-酸処理 PS を基質とした SSF プロセスにより、湿潤最終 PS 1 トン（処理 PS 257.6 kg）から 54.9 kg のエタノールが生産できることが示された。

さらに、本研究でサブテーマに挙げていなかったが、本研究で見出したエタ

ノール発酵糸状菌 *M.circinelloides* NBRC4563 の機能向上を図り、エタノールの生産性を向上させるために、イオンビーム変異法を実施し 40℃でエタノール発酵が可能な高温発酵株の構築を行い、有益な変異株を 3 株得た。本菌株を用いてアルカリー酸処理最終 PS の SSF プロセスを行った結果、培養 96 時間で 23.6 g/L のエタノールを生産できることを実証した。

5. 参考文献

- 1) 日本製紙連合会 資料 (<http://www.jpa.gr.jp/states/paper/index.html>).
- 2) 資源エネルギー白書 2013、第 2 節 部門別エネルギー消費の動向資源エネルギー庁、(<http://www.enecho.meti.go.jp/about/whitepaper/2013html/2-1-2.html>).
- 3) 地球温暖化対策推進に関する法律に基づく温室効果ガス排出算定・報告・公表による平成 22 (2010)年度温室効果ガス排出量の集計結果、環境省・経済産業省、(2013).
- 4) 製紙産業における地球温暖化対策の取り組み、日本製紙連合会、(http://www.meti.go.jp/committee/sankoushin/sangyougijutsu/chikyu_kankyo/seishigarasu_wg/pdf/001_04_01.pdf) (2013).
- 5) 食品循環資源の再生利用等の促進に関する法律 (平成 12 年 6 月 7 日法律第百十六号)
- 6) 食品循環資源の再生利用等の促進に関する法律 (平成 12 年法律第 116 号, 平成 13 年 5 月 1 日施行。改正平成 19 年 6 月 13 日) .
- 7) 家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律 (平成 11 年 7 月 28 日法律第百十二号) .
- 8) 廃棄物の処理及び清掃に関する法律施行規則等の一部を改正する省令 (平成 23 年環境省令第 1 号) .
- 9) エネルギー使用合理化ペーパースラッジ有効利用技術開発事後評価報告書、産業構造審議会産業技術分科会評価小委員会、(2010).
- 10) ペーパースラッジ灰水熱固化技術開発の概要について、経済産業省製造産業局紙業生活文化用品課・日本製紙株式会社、第 1 回エネルギー使用合理化高効率抄紙技術開発等事後評価検討会(資料 7-1)、(2010).
- 11) エネルギー使用合理化ペーパースラッジ有効利用技術開発、製造産業局紙業生活文化用品課、第 1 回エネルギー使用合理化高効率抄紙技術開発等評価検討会プロジェクト事後評価検討会(資料 7-0)、(2010).
- 12) ペーパースラッジガス化技術開発の概要について、経済産業省製造産業局紙業生活文化用品課・大王製紙株式会社、第 1 回エネルギー使用合理化高効率抄紙技術開発等事後評価検討会(資料 7-4)、(2010).
- 13) バイオマス・ニッポン総合戦略」(平成 18 年 3 月 31 日策定) .

- 14) バイオ燃料の最新動向、トレンドウォッチ
(<https://www.ecologyexpress.jp/content/trend/20120629trend.html>).
- 15) バイオマスをめぐる現状と課題、第4回バイオマス活用推進会議資料、バイオマス活用推進会議 (2014).
- 16) 国産バイオ燃料推進と国産バイオマス生産拡大について、平成19年11月、全国農業協同組合連合会 (JA 全農) 資料5 (2007).
- 17) 国産バイオエタノールの利活用の推進について (モデル実証事業の実施等) 遠藤 順也、農林水産省 (2009).
- 18) Production of ethanol from recycled paper sludge using cellulase and yeast, *Kluyveromyces marxianus*, N. Lark, Y. Xia, C.-G. Qin, C. S. Gong, G. T. Tsao, *Biomass Bioenergy*, 12(2), 135–143 (1997).
- 19) Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor, Z. Fan, C. South, K. Lyford, J. Munsie, P. van Walsum, L. R. Lynd, *Biopro. Biosys. Eng.*, 26 (2), 99-101, (2003).
- 20) Repeated hydrolysis of raw starch using amylase immobilized on a reversibly soluble-insoluble carrier, K. Hoshino, M. Taniguchi, Y. Netsu, M. Fujii, *J.Chem.Eng.Jpn.*, 22, 54-59 (1989).
- 21) repeated batch conversion of raw starch to ethanol using amylase immobilized on a reversible soluble-autoprecipitating carrier and flocculating Yeast Cells, K.Hoshino, M. Taniguchi, H. Marumoto, M. Fujii, *Agric. Biol. Chem.*, 53, 1961-1967 (1989).
- 22) Repeated simultaneous saccharification and fermentation of raw starch by a combination of a reversibly soluble-insoluble smylase and yeast cells, M. Taniguchi, K. Hoshino, Y. Netsu, M. Fujii, *J.Chem. Eng. Jpn.*, 22, 313-314 (1989).
- 23) Continuous ethanol production from raw starch using a reversibly soluble-autoprecipitating amylase and flocculating yeast cells, K. Hoshino, M. Taniguchi, H. Marumoto, M. Fujii, *J. Ferment. Bioeng.*, 69, 228-233 (1990).
- 24) Production of ethanol from reclaimed paper using a combination a reversible-autoprecipitating cellulase and flocculating yeast cells, K. Hoshino, T. Sasakura, K. Sugai, M. Taniguchi, M. Fujii, *J.Chem.Eng. Jpn.*, 27, 260-262 (1994).
- 25) Continuous simultaneous saccharification and fermentation of delignified rice straw by a combination of two reversibly soluble-autoprecipitating enzymes and

- pentose-fermenting yeast *Cecells*, K. Hoshino, H. Yamazaki, C. Chida, T. Sasakura, M. Taniguchi, M. Fujii, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 29, 1060-1063 (1997).
- 26) Continuous lactic acid production from raw starch in a fermentation system using a reversibly soluble-autoprecipitating amylase and immobilized cells of *Lactobacillus casei*, K. Hoshino, M. Taniguchi, H. Marumoto, K. Shimizu, M. Fujii, *Agric. Biol. Chem.*, 55, 479-485 (1991).
 - 27) Ethanol production by repeated-batch simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of alkali-treated rice straw using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. I. Watanabe, N. Miyata, A. Ando, R. Shiroma, K. Tokuyasu, T. Nakamura, *Bioresour Technol.*, 123, 695-678 (2012).
 - 28) Simultaneous pretreatment and saccharification of rice husk by *Phanerochete chrysosporium* for improved production of reducing sugars. R. Potumarthi, R. R. Baadhe, P. Nayak, A. Jetty, *Bioresour Technol.*, 128, 113-117 (2013).
 - 29) Ethanol production from Eucalyptus plantation thinnings, S. McIntosh, T. Vancov, J. Palmer, M. Spain, *Bioresour Technol.*, 110, 264-272 (2012).
 - 30) Ethanol production from residual wood chips of cellulose industry: acid pretreatment investigation, hemicellulosic hydrolysate fermentation, and remaining solid fraction fermentation by SSF process., N. L. Silva, G. J. Betancur, M. P. Vasquez, E. B. Gomes, N. Pereira Jr., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 163, 928-936 (2011).
 - 31) Bioconversion of kraft paper mill sludges to ethanol by SSF and SSCF. L. Kang, W. Wang, Y. Y. Lee, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 161, 53-66 (2010).
 - 32) Ethanol production of semi-simultaneous saccharification and fermentation from mixture of cotton gin waste and recycled paper sludge, J. Shen, F. A. Agblevor, *Bioprocess Eng.*, 34, 33-43 (2011).
 - 33) Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*, J. P. Delgenes, R. Moletta, J. M. Navarro, *Enzyme Microb. Technol.*, 19(3), 220-225 (1996).
 - 34) Improved ethanol production by a xylose-fermenting recombinant yeast strain constructed through a modified genome shuffling method, W. Zhang, A. Geng,

- Biotechnol. Biofuel.*, 5, 46-56 (2012).
- 35) Genetic engineering of *Zymobacter palmae* for production of ethanol from xylose, H. Yanase, D.Sato, K. Yamamoto, S. Matsuda, S. Yamamoto, K. Okamoto, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (8), 2592-2599 (2007).
- 36) Metabolic engineering of *corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen-deprivation conditions, M. Inui, H. Kawaguchi, S. Murakami, A. A. Vertès, H. Yukawa, *Microbiol. Biotechnol.*, 8, 243–254 (2004).
- 37) 新規エタノール発酵糸状菌を活用した稲わら等からの同時糖化発酵システムの開発、星野一宏, 米田英伸, 平成 21 年度バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発(先導、要素)成果報告会, 予稿集, NEDO, p.292-293 (2009).
- 38) 新規エタノール発酵糸状菌を活用した稲わら等からの同時糖化発酵システムの開発、星野一宏, 米田英伸, 平成 22 年度バイオマスエネルギー関連事業成果報告会、燃料化およびリファイナリー技術開発, 予稿集, NEDO, p.81-89 (2011).
- 39) 新規エタノール発酵糸状菌を活用した稲わら等からの同時糖化発酵システムの開発、星野一宏, 米田英伸, 平成 24 年度 NEDI 新エネルギー成果報告会, バイオマスエネルギー利用技術の実用化に向けて, 予稿集, NEDO, p.127-140 (2012).
- 40) Bioconversion of kraft paper mill sludges to ethanol by SSF and SSCF, L. Kang, W. Wang W, Y. Y. Lee, *Appl.Biochem.Biotechnol.*, 161(1-8), 53-66 (2010).
- 41) Conversion of paper sludge to ethanol. I: impact of feeding frequency and mixing energy characterization, Z. Fan, L. R. Lynd, *Biopro. Biosyst. Eng.*, 30, 27-34 (2007).
- 42) Bioconversion of paper sludge to biofuel by simultaneous saccharification and fermentation using a cellulase of paper sludge origin and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* TJ14, J. Prasetyo, K. Naruse, T. Kato, C. Boonchird, S. Harashima, E.Y.Park, *Biotechnol. Biofuel.*, 29(4), 35-41 (2011).
- 43) Consolidated bioprocessing of highly concentrated Jerusalem artichoke tubers for simultaneous saccharification and ethanol fermentation, L.Guo, J.Zhang, F.Hu, D. Dy Ryu, J.Bao., *Biotechnol. Bioeng.*, 110(10), 2606-2615 (2013).
- 44) Endowing non-cellulolytic microorganisms with cellulolytic activity aiming for

- consolidated bioprocessing, R. Yamada, T. Hasunuma, A. Kondo, *Biotechnol Adv.*, 31(6), 754-63 (2013).
- 45) 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成 15 年 6 月 18 日法律第九十七号）.
- 46) Production of cordycepin by a repeated batch culture of a *Cordyceps militaris* mutant obtained by proton beam irradiation, M. Masuda, S. K. Das, S. Fujihara, M. Hatashita, A. Sakurai, *J.Biosci.Bioeng.*, 111(1), 55-60 (2010).
- 47) Enzyme-aided alkaline extraction of oligosaccharides and polymeric xylan from hardwood kraft pulp, T. K. Hakala, T. Liitiä, A. Suurnäkki, *Carbohydr. Polym.*, 93, 102-108 (2013).
- 48) 古紙スラッジのリサイクル、内山智幸、蓑嶋裕典、松嶋景一郎、尾谷 賢、鈴木善人、野田良巳、北海道立工業試験場報告、No.298, 125-132 (1999).
- 49) Dynamics of water-soluble carbon substances and microbial populations during the composting of de-inking paper sludge., M. H. Charest, H. Antoun, C. J. Beauchamp, *Bioresour Technol.*, 91(1), 53-67 (2004).
- 50) 担子菌を用いた脱リグニン処理法の開発による農産廃棄物の利用法の拡大に関する研究(K1818,K1931), 谷口正之, 星野一宏, 酒井謙二、平成 19 年度廃棄物処理等科学研究総合研究報告書, 環境省, p.150 (2008).
- 51) Production of biofuel from waste lignocellulosic biomass materials based on energy saving viewpoint, M. Takano, K. Hoshino, *Adv. Mater. Dev. Perform.*, 6, 715–720 (2012).
- 52) Direct ethanol production from rice straw by coculture with two high-performing fungi, M. Takano, K. Hoshino, *Front. Chem. Sci. Eng.*, 6, 139–145 (2012).
- 53) Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration, J. L. Zaldivar, J. Nielsen, L. Olsson, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56(1-2), 17-34 (2001).
- 54) 製紙廃棄物からのエタノール製造方法、星野一宏、高野真希、特願 2013-200843 (2013).
- 55) High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042, S. Nonklang, B. M.

Abdel-Banat, K. Cha-aim, N. Moonjai, H. Hoshida, S. Limtong , M. Yamada, R. Akada, *Appl.Environ.Microbiol.*, 74(24), 7514-7521 (2008).

6. 研究発表

6.1 論文発表及び学会発表

- 1) Direct bioethanol production from paper sludge by consolidated bioprocessing with new fusion cell of *Mucor* sp. K. Hoshino, M. Takano, 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (ISB2012), Daegu, Republic of Korea, September 16-21 (2012).
- 2) Bioethanol production from paper sludge using high-performing fungus, M. Takano, K. Hoshino, 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (ISB2012), Daegu, Republic of Korea, September 16-21 (2012).
- 3) Ethanol production from raw paper sludge by SSF with cellulases cocktail and ethanol-producing fungi, M. Takano, Y. Seto, K. Hoshino, 3rd International Cellulose Conference, Sapporo, Japan, October 10-12 (2012).
- 4) *Mucor javanicus* を用いた糖化発酵同時進行による未利用繊維残渣からのエタノール生産、高野真希、星野一宏、第 64 回日本生物工学大会, p.140, 神戸国際会議場、4Bp24、 10/26 (2012).
- 5) エタノール発酵糸状菌を用いた同時糖化発酵によるペーパースラッジからのバイオエタノール生産、瀬戸裕介、高野真希、星野一宏、第 64 回日本生物工学大会, 神戸国際会議場、4Ip01、 10/26 (2012).
- 6) 接合菌を用いた製紙廃棄物からの効率的エタノール生産、高野真希、星野一宏、第 76 回化学工学会年会、大阪大学豊中キャンパス、J102、 3/17 (2013).
- 7) 糸状菌を用いたペーパースラッジ類からのバイオエタノールおよび乳酸の生産、瀬戸裕介、高野真希、星野一宏、東北大学川内北キャンパス、2C12p09、 3/25 (2013).

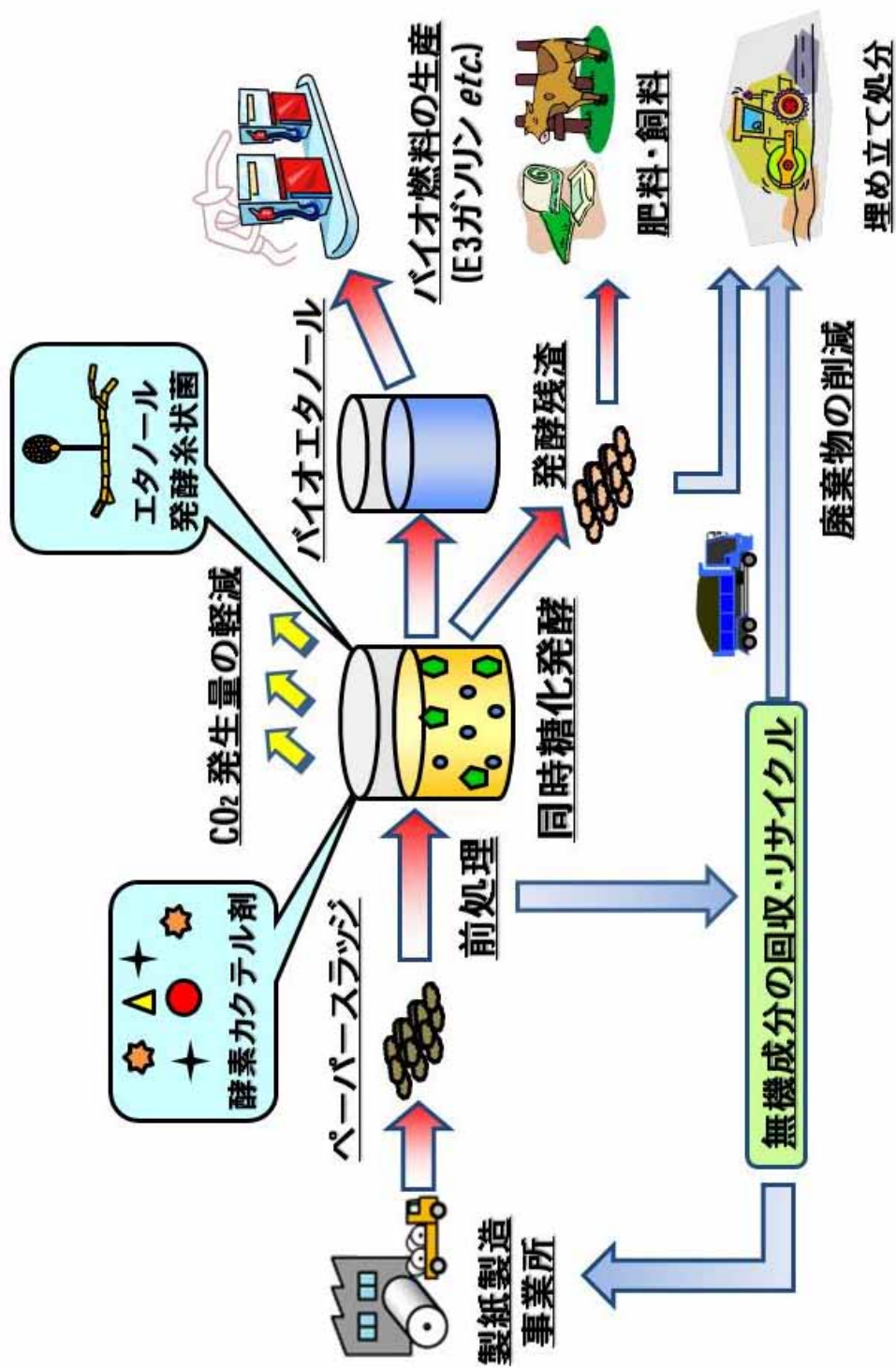
- 8) エタノール発酵接合菌を用いたペーパースラッジからの直接バイオエタノール生産高野真希、星野一宏、東北大学川内北キャンパス、2C12p09、3/26 (2013).
- 9) 接合菌 *Rhizopus oryzae* と Cellulase を組み合わせた同時糖化発酵によるペーパースラッジからのエタノール及び乳酸の生産、瀬戸裕介、高野真希、星野一宏、セルロース学会第 20 回年次大会、京都大学宇治キャンパス、P086、7/18 (2013).
- 10) *Rhizopus oryzae* と Cellulase を組み合わせた同時糖化発酵によるペーパースラッジからの選択的な Ethanol および Lactate の生産、瀬戸裕介、高野真希、星野一宏、第 65 回日本生物工学大会、広島国際会議場、1P-202、9/18 (2013).
- 11) *Mucor* 属接合菌を用いた製紙廃棄物からの効率的エタノール生産、高野真希、星野一宏、第 65 回日本生物工学大会、広島国際会議場、2P-145、9/19 (2013).
- 12) *Absidia* 属糸状菌の酵母化およびエタノール生産への応用、飯田 貴大、高野真希、星野一宏、第 65 回日本生物工学大会、広島国際会議場、3P-188、9/20、(2013).
- 13) Development of thermotolerant ethanol-producing fungus for bioethanol production from lignocellulose, K. Hoshino, M. Takano, M. Hatashita, Asian Congress on Biotechnology 2013 (ACB2013), New Delhi (India), PC02, 12/17 (2013).
- 14) Development of efficient ethanol production from paper sludge by ethanol-producing *Mucor* sp. M. Takano, K. Hoshino, Asian Congress on Biotechnology 2013 (ACB2013), New Delhi (India), PC3, 12/17 (2013).
- 15) Selective production of ethanol or lactate from paper sludge by SSF with *Rhizopus oryzae*, Y.Seto, M. Takano, K. Hoshino, Asian Congress on Biotechnology 2013 (ACB2013), New Delhi (India), PC5, 12/17 (2013).

- 16) Construction of yeast-like *Abisidia* sp. and its application on ethanol production, T.Iida, M. Takano, K. Hoshino, Asian Congress on Biotechnology 2013 (ACB2013), New Delhi (India), PC7, 12/17 (2013).
- 17) エタノール発酵接合菌を用いたアルカリ-酸処理ペーパースラッジからの効率的バイオエタノール生産、高野真希、星野一宏、日本農芸化学会 2014 年度大会、第 65 回日本生物工学大会、明治大学生田キャンパス、3A01a13、3/29 (2014).

7. 知的財産権の取得状況

- 1) 製紙廃棄物からのエタノール製造方法、星野一宏、高野真希、
特願 2013-200843.
- 2) 糸状菌を用いる木質系バイオマスからのエタノール製造方法、星野一宏、
高野真希、特願 2013-202539.

8. 研究概要図



9. 英文概要

Development of Efficient Bioethanol Process from Paper Manufacture Waste by Using Ethanol-producing Fungi

エタノール発酵糸状菌を活用した製紙廃棄物からの効率的バイオエタノール製造法の開発

Kazuhiro Hoshino, Graduate School of Science and Engineering, Universtiy of Toyama, 3190 Gofuku, Toyama 930-8555, Japan

星野一宏、富山大学大学院 理工学研究部、930-8555 富山市五福 3190

Maki Takano, Graduate School of Science and Engineering, Universtiy of Toyama, 3190 Gofuku, Toyama 930-8555, Japan

高野真希、富山大学大学院 理工学研究部、930-8555 富山市五福 3190

Abstract :

To achieve the production of bioethanol from paper sludge aiming at this reduction, the preprocessing method of paper sludge (PS) was investigated. In addition, the simultaneous saccharification fermentation (SSF) process combined with the optimized cellulase cocktail for sacchrificatiom of fiber in paper sludge and a new ethanol-producing fungus that has the resistance for raw PS was achieved. In particular, the alkaline-acid treatment method as a pretreatment method of removing organic components other than the mineral was first developed based on componential analysis of raw and pretmented PS. Next, the method for decision of the best mix ration of cellulase reagents for sacchirfication of PS was achieved by using Response

Suface Method (RSM). Moreover, *Mucor circinelloides* NBRC 4563 was discovered as a new ethanol-fermenting fungi to product ethanol from PS. In the SSF combined the optimized enzyme cocktail with the fungi, 21.3 g/l of ethanol was able to product from 50 g-dry/L of alkaline-acid treatmented PS for 96 h.

Key Words :

Paper sludge, Bioethanol, Simultaneous saccharification fermentation, *Mucor circinelloides*, Ion beam mutation

Summary :

Paper sludge (PS) of 5.5 million tons per a year has been generated by paper manufacturing process in Japan. In most of the generated waste, the incineration processing is done as a intermediate process, and this is one of a large amount of sources of CO₂ gas. To achieve the production of bioethanol from PS aiming at this reduction, the preprocessing method of paper sludge is investigated. In addition, the simultaneous saccharification fermentation (SSF) process combined with the optimized cellulase cocktail for sacchrificatiom of fiber in PS and a new ethanol-producing fungus that has the resistance for raw final PS is achieved. It aims having to produce ethanol of 50 kg with wet raw final PS of one ton by the SSF process (ethanol concentration of 10-30 g/L). It is necessary to analyze the element in detail to produce ethanol from PS efficiently. Then, the compositional analysis of final PS and the papermaking tail having been carried out by two offices Chuetsu Pulp & Paper Ltd. was performed. The analysis was performed centering on fiber (cellulose and hemicellulose) in PSs and elemental constituent in PS ash. The fiber

in final paper sludge contained 14-18 % cellulose and 7-10 % hemicellulose. In fiber in the papermaking tail, 47-48% cellulose and 17-18% hemicellulose are existed. It was found that it is promising as the source of biomass to produce ethanol with those consequences. In addition, the alkaline-acid treatment method was developed as a method of removing organic components (surfactant, deinking agent, *etc.*) other than the mineral (calcium carbonate *etc.*) thought to cause the inhibition of enzyme reaction and fermentation when ethanol were produced from final PS by using SSF process. The content of the mineral in the final PS was able to be removed from the state of the untreated to about 52% by the preprocessing. Especially, the calcium content could be decreased from about 30% to 3% for the untreated.

In efficitive ethanol production from PS, it is a key to practical use to improve this hydrolysis reaction, and to reduce the use enzyme level. Then, the optimization of the enzyme cocktail reagent that combined a cellulase on the market was attempted. 14 kinds of cellulase reagents on the market medicines are used and have been hydrolyzed for various pretreated PS. Three kinds of reagent based on the generated amount of reducing sugar were selected. Next, the experiment was designed by using experimental design (DOE), the hydrolysis experiment was performed according to the experimental design, and a bast desired enzyme mix ratio was obtained for hydrolysis of PS by using Response Surface Methold (RSM) from reducing sugar obtained by hydrolysis of PS with designed experimental conditions. The hydrolysis reaction for 80 g/L the papermaking tail was done at 28 ° C for 120 h by used the optimized enzyme cocktail. As a result, glucose and xylose generated were 41.4 and 3.3 g/L and moreover cellotriose and cellobiose were 2.8 and 6.7g/L. Similarly, by hydrolyzing 50 g/L of raw final PS by using the best enzyme cocktail 35.4 g/L of

glucose was able to obtain for 96 h. Next, to produce effectively ethanol from PS, the screening of an excellent strain for ethanol fermentation from PS was performed from *Mucor* library in our laboratory. As a result, *Mucor circinelloides* NBRC 4563 was discovered as a new ethanol-producing fungus. Then, by the SSF combined the optimized enzyme cocktail to the alkaline-acid pretreated final PS with *M.circinelloides* NBRC 4563, 21.3 g/l of ethanol was able to obtain from 50 g-dry/L of alkaline-acid treatment PS for 96 h. In addition, to aim at the functional improvement of ethanol producing *M.circinelloides* NBRC4563 found by this research and development, and to improve the productivity of ethanol, the fungus which was able to grow and ferment more than 40 ° C was achieved by ion beam mutation method. In SSF of alkaline-acid treatment PS was done by using the mutant, 23.1 g/L of ethanol was able to produce for 96 h at 40 ° C.