

廃棄物処理等科学研究費補助金 総合研究報告書概要版

研究課題名・研究番号＝木材系微粉末からの並行複発酵技術による連続バイオエタノール
生産技術の開発 (K1915)

国庫補助金精算所要額 (円)＝10,197,000

研究期間＝2007

代表研究者名＝進藤 昌 (秋田県農林水産技術センター 総合食品研究所)

研究目的

日本では間伐材や林地残材が毎年760万トン発生しており、これらをバイオエタノールに変換することは資源の乏しい日本にとって有用なことである。木質系バイオマスは、6炭糖と5炭糖で構成されており、効率的にバイオエタノールに変換するためには、構成糖を全てバイオエタノールに変換することが不可欠である。しかし、5炭糖をバイオエタノールに変換することは困難であり未だ実用化の例はほとんど無い。実証試験で遺伝子組換え大腸菌を使用した例があるが、アルコール耐性が低くまた自然界に無い菌を用いるため、外部に菌が漏れないように発酵タンクの設備を厳重にする必要があり、コスト高となる。そこで、本研究では、自然界より5炭糖を発酵できる菌を取得し、バイオエタノール生産に適するように育種を行い、さらに発酵条件を検討し最適化条件を確立することを目的とした。

第1章 自然界からの5炭糖の発酵能を有する菌の検索

1.1.自然界からの菌の検索

研究方法

サンプリング：秋田県内の山の腐葉土や花をサンプリングした。

培地：集積用液体培地は、キシロース 2%、酵母エキス 1%、ポリペプトン 2%、クロラムフェニコール 0.005%を用いた。平板培地は、集積用液体培地に寒天 2%を添加した培地を用いた。

菌の培養：集積用液体培地 10ml の入った大型試験管にサンプルを入れ、28℃で3日間振盪培養を行った。次に混濁した液体培地 100μl を寒天培地に塗布し 28℃で3日間静置培養を行った。平板培地で増殖したコロニーからさらにシングルコロニーアイソレーションを行い、純粋な菌を分離した。

エタノール生産株の検索：エタノール生産菌の1次スクリーニングは、以下の方法で行った。即ち、キシロースを唯一の炭素源として平板培地に増殖した菌をエタノール生産用培地 200μl の入った 96 穴マイクロプレートに1白金耳植菌し、28℃で振盪を行った。この中で増殖した酵母を選抜しエタノール生産能を検討した。エタノール生産は、エタノール生産用液体培地 (キシロース 5%、酵母エキス 1%、ポリペプトン 2%) 20ml の入った

50ml 滅菌チューブに選抜された酵母を1白金耳植菌し、28℃で振盪培養を行った。

分析：エタノール濃度は、(株)JK インターナショナルの F キットによる酵素法で定量した。

キシロース濃度は、フェノール硫酸法により定量した。

結果

キシロースを唯一の炭素源として増殖可能な菌 39 株を選抜することができた。さらにその中でエタノールを生産する菌 2 株 (SS1-2,SS2-1) を選抜することができた。

1.2.菌の同定

26SrDNA-D1/D2 塩基配列の解析、簡易形態観察および生理・生化学的性状試験の結果より帰属分類群を推定した。

研究方法

培養条件：培地：Yeast extract-malt extract agar(YM agar) (Becton Dickinson,MD,USA)

培養温度：25℃、培養期間：1週間～1月間の好気培養

簡易形態観察：光学顕微鏡 BX51 (オリンパス 東京) による微分干渉観察を行った。

生理性状試験：Barnet et al および Kurtzman and Fell に準拠し、温度耐性試験を除き 25℃で行った。試験項目は、以下の通りである。糖類発酵性試験、炭素源資化性試験、窒素源資化性試験、ビタミン要求性試験、温度耐性試験(35,37,40℃)、薬剤耐性試験。

26S rDNA D1/D2

DNA 抽出：DNeasy Plant mini Kit (QIAGEN,Hilden,Germany)

PCR pure Taq Ready-To Go PCR beads (Amersham Biosciences,NJ,USA)

サイクルシーケンス：BigDye Terminator v3.1 Kit (Applied Biosystems, CA,USA)

使用プライマー：NL1,NL2,NL3 および NL4 (O'Donnell,1993)

シーケンス：ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer System (Applied Biosystems,CA,USA)

配列決定：ChromasPro 1.4 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, AUS)

相同性検索および簡易分子系統解析 ソフトウェア アポロン 2.0 (テクノスルガ・ラボ 静岡)、データベース アポロン DB-FU1.0 (テクノスルガ・ラボ、静岡) 国際塩基配列データベース(GenBank/DDBJ/EMBL)

結果

SS1-2 の同定試験結果

SS1-2 の 26S rDNA-D1/D2 塩基配列解析

塩基配列解析結果を用いた分子系統樹を図 1 に示した。

コロニー観察

YM 平板培地上で 25℃下、培養 4 日間において、SS1-2 のコロニーは以下の形状を示した。周縁の形状は、全縁。隆起状態は円錐状。表面の形状は平滑。光沢および性状は、輝

光、湿性。色調は、クリーム色

微視的観察（形態性状観察）

SS1-2 の形態観察の結果、YM 平板培地上で 25℃下において培養開始 3 日目に、栄養細胞は球形から広楕円形であり、増殖は多極出芽によることが確認された。また、偽菌糸の形成が認められた。さらに、YM 平板培地上で 25℃下において、培養開始 3 日目に、接合管の形成が認められ、培養開始 3 日目に、子嚢に 2 個の帽子型の子嚢胞子が認められた。また、培養開始 10 日目に、偽菌糸の形成が認められた。

生理性状試験

SS1-2 に対する生理性状試験の結果を表 1 に示した。表中の「+」は反応が陽性。「-」は反応が陰性、「W(weak)」は弱い陽性反応、「S(slow)」は試験開始後に 2 週間から 3 週間以上かけて徐々に陽性反応が認められたことを、「L(latent)」は試験開始 2 週間以降に急速に陽性反応が認められたことを示す。糖発酵性試験培地において、沈澱の形成が認められた。

考察

アポロン DB-FU に対する BLAST(Altschul *et al.* 1997) 同源性検索の結果、SS1-2 の 26SrDNA-D1/D2 塩基配列は、子嚢菌糸系酵母の 1 種である *Pichia stipitis* の基準株 NRRL Y-7124T (アクセッション番号 U45741) と 2 塩基の相違で 99.6% の相違率を示した。GenBank/DDBJ/EMBL などの国際塩基配列データベースに対する同源性検索の結果においては、SS1-2 の 26srDNA-D1/D2 塩基配列は *P.stipitis* の全ゲノム解読株 CBS 6054 (アクセッション番号 CP000497) に対し 1 塩基の相違で 99.8% の相違率を示した。アポロン DB-FU に対する同源性検索で得られた上位 10 塩基配列に *P.stipitis* の全ゲノム解読株 CBS 6054 の塩基配列を加えた総数 11 塩基配列をもとに系統樹を作成した。その結果、SS1-2 は、*Pichia* 属とそのアナモルフ酵母である *Candida* 属の系統群に含まれ、その中でも *P.stipitis* NRRL Y-7124T および CBS 6054、*Pichia segobiensis* の基準株 NRRL Y-1157T (アクセッション番号 U45742) からなる系統群の外側に系統枝を形成した (図 1)。一般に、酵母の 26S rDNA-D1/D2 塩基配列を用いた解析では、基準株との相違塩基数が 0-3 塩基であれば同種または姉妹種である可能性が高く、相違が 1% 以上である場合には別種である可能性が高い。その一方で、近縁種との相違が 2 塩基であっても、別種である例も報告されている。よって、検体と近縁種との相違塩基数のみに基づき、近縁種との同異を判断することは困難である。以上のことより、26S rDNA-D1/D2 塩基配列解析の結果において SS1-2 の種レベルの帰属分類群推定は困難であるが、*P.stipitis* に近縁な *Pichia* 属またはそのアナモルフ (無性時代) 酵母である *Candida* 属の一種であると推定される。

また、簡易形態観察の結果、SS1-2 の栄養細胞は球形から広楕円形であり、栄養増殖は多極出芽によった。さらに SS1-2 は子嚢に 2 個の帽子型の子嚢胞子を形成し、偽菌糸を形成

することが確認され、*P. stipitis* と類似した形態学的特徴を示した。よって、簡易形態観察の結果においては、SS1-2 は *Pichia* 属の一種であると推定される。

26S rDNA-D1/D2 塩基配列解析の結果において SS1-2 が帰属すると推定された *Pichia* 属については、The Yeasts, a taxonomic study の第 4 版では 91 種が記載されている。*Pichia* 属のこれらの 91 種は、生理性状に基づき 5 つのグループに分けられている。26S rDNA-D1/D2 塩基配列解析の結果において、SS1-2 が近縁であると推察された。*P. stipitis* は、唯一の炭素源としてヘキサデカンを資化するグループに分類されており、本グループには *P. stipitis* を含む 16 種 2 変種が含まれている。生理性状試験の結果、SS1-2 は炭素源としてヘキサデカンを資化し、*Pichia* 属生理性状グループの内、‘ヘキサデカンを資化するグループ’ に *P. stipitis* と同様に分類されると推定された。また、‘ヘキサデカンを資化するグループ’ に属する 16 種 2 変種の区別に有効とされる生理・生化学的特徴においては、SS1-2 は *P. stipitis* と類似した特徴を示したが、一部で異なる特徴を示した。具体的には、SS1-2 が *P. stipitis* と同様の特徴を示した項目は以下の通りである、マルトースおよびトレハロース発酵性を示し、ガラクトース、L-アラビノース、スクロース、マルトース、メレジトース、可溶性澱粉、エリスリトール資化性を示し、メリビオースおよびラフィノースを資化しませんでした。一方で、*P. stipitis* がグルコースを発酵し、ガラクトースの弱い発酵性を示し、ビタミン欠乏培地で生育しないとされることに対し、SS1-2 はグルコース発酵性が弱く、ガラクトースを徐々にではあるが発酵するが、ビタミン欠乏培地で弱いながらも生育し、*P. stipitis* とは明らかに異なる性質を示した。また、‘ヘキサデカンを資化するグループ’ に分類されている種の区別に重要な項目以外にも SS1-2 と *P. stipitis* について生理生化学的特徴を比較すると、ほとんどの項目で類似した性つつが認められたが、SS1-2 は 35°C では生育せず、ガラクトースを資化する点で *P. stipitis* と相違が認められた。以上のことから生理性状試験の結果において、SS1-2 は *P. stipitis* と大まかには類似した性状を示したが‘ヘキサデカンを資化するグループ’ で重要な生理生化学的特徴とされるグルコースおよびガラクトース発酵性、ビタミン欠乏培地での生育性で *P. stipitis* とは異なる特徴が認められ、さらに 35°C 下での生育性とガラクトース資化性においても *P. stipitis* とは明らかに異なる特徴を示した。よって、生理性状試験の結果は、26S rDNA-D1/D2 塩基配列解析から推定された、SS1-2 は *P. stipitis* と近縁ではあるが、*P. stipitis* とは若干異なる分子系統学的位置を示すという結果を指示した。

以上の 26S rDNA-D1/D2 塩基配列解析、簡易形態観察および生理性状試験の結果より、SS1-2 の種レベルの帰属分類群の推定は困難であるが、SS1-2 は、*P. stipitis* に近縁な、*P. stipitis* とは別種、すなわち新種の可能性がある *Pichia* 属の一種であると推定される。

Pichia 属に帰属すると推察される SS1-2 の分類学的位置は、Kirk *et al.*(2001)に基づく子囊菌門(Ascomycota)

子囊菌綱(Ascomycetes)

サッカロミセス亜綱(Saccharomycetidae)

サッカロミセス目(Saccharomycetales)
サッカロミセス科(Saccharomycetacea)
Pichia 属

となる。

結論

SS1-2は、子囊菌系酵母の *Pichia stipitis* Pignal に近縁な、*Pichia stipitis* Piganal とは、別種、すなわち新種の可能性がある *Pichia* 属の一種であると推定された。

第二章 アルコール耐性変異株の取得

2.1. UV 処理によるエタノール耐性株の取得

キシロース生産能を有する酵母は、エタノール耐性が低いため高濃度エタノールを生産することが困難である。そこで、エタノール耐性株を取得するため、自然界より選抜された酵母のうち SS1-2 および菌株保存機関より入手した酵母 *Pichia stipitis* NBRC1687 の 2 株を用いて UV 変異処理によるエタノール耐性株の取得を試みた。

研究方法

培養：増殖用培地（キシロース 5%、酵母エキス 1%、ポリペプトン 2%）に酵母を 1 白金耳植菌し 28℃で 1 日間培養を行った。集菌、洗浄後滅菌水にて希釈した酵母懸濁液を UV ランプで 20 秒から 60 秒間照射し変異処理を行った。次に UV 照射後の酵母懸濁液 100 μ l 平板培地（キシロース 5%、酵母エキス 1%、ポリペプトン 2%、エタノール 1~5%）に塗布した。

エタノール生産試験：5%エタノール含有平板培地で増殖したコロニーをエタノール生産用液体培地（キシロース 15%、酵母エキス 1%、ポリペプトン 2%）にてエタノール生産試験を行った。

分析：エタノール濃度は、(株)JK インターナショナルの F キットによる酵素法で定量した。キシロース濃度は、フェノール硫酸法により定量した。

結果

5%エタノール含有培地で増殖した変異株 6 株を取得した。この変異株を用いてキシロース 15%含有液体培地で *Pichia stipitis* NBRC1687 の変異株 3 9 - 1 が 4.87%のエタノールを生産することができた。元株の生産量が 3.9%であったことより、1.25 倍高いエタノール耐性株を取得したことになる。一方、SS1-2 株では、有意にエタノール生産能の上昇した変異株を取得することが出来なかった。

2.2. 馴用培養によるアルコール耐性株の取得

エタノール耐性株を取得するため、自然界より選抜された酵母のうち SS1-2 および菌株保存機関より入手した酵母 *Pichia stipitis* NBRC1687 の 2 株を用いて馴用培養によるエタノール耐性株の取得を試みた。

研究方法

エタノール生産用液体培地（キシロース 5%、酵母エキス 1%、ポリペプトン 2%、エタノール 1~8%）を用いて、初めに 1%エタノール含有液体培地に酵母を 1 白金耳植菌し、酵母が増殖したら懸濁液 1ml を 2%エタノール含有液体培地に植菌した。この操作を 8%エタノール含有培地まで繰り返しエタノール耐性株の取得を行った。

結果

P. stipitis NBRC1687 のアルコール耐性酵母として 7.5%(w/v)で生育できる耐性酵母を取得することができた。この酵母のアルコール生産能を図 2 に示した。グルコース濃度 10.7%、キシロース濃度 5.3%に調整した合成培地でエタノール生産を行わせたところ、オリジナル酵母の最終アルコール濃度が 4.8%に対してアルコール耐性酵母は 5.7%まで生産することができた。一方、SS1-2 株は、7.0%(w/v)アルコール含有培地で生育できる酵母の取得に成功した。

第 3 章 廃菌床及び広葉樹の微粉碎方法の検討

本研究では、木質系バイオマスを原料とした酵素と酵母による並行複発酵技術の開発を目指している。酵素による糖化を効率よく行わせるためには、木質バイオマスを構成しているセルロース、ヘミセルロースと酵素が反応しやすい構造に変換させる必要がある。我々は、微粉碎による構造変換を試みた。

3.1. 廃菌床および広葉樹の微粉碎方法の検討

研究方法

試料：廃菌床および広葉樹（アカシア、ナラ、ブナの混合チップ）

粉碎：粉碎は震動型粉碎機 MB-1 型（中央加工機株式会社 愛知県）を用いた。粉碎通筒全容量 3.6L で粉碎媒体は 1 次粉碎は SS ロッドを使用し、2 次粉碎はカーボン鋼球を用いた。粉碎物の分析は、マイクロトラック MT 3 300EX(日機装製品)を用いた。

結果

廃菌床のロッドによる 1 次粉碎では、粉碎時間が長くなると粒子同士による凝集が起り、最適処理時間は 30 分であることが判明した。また、ボールミルによる 2 次粉碎を 30 分間行うことにより平均粒径 19.01 μm の粉碎物を得ることができた。

一方、広葉樹のロッドによる 1 次粉碎は、凝集現象を起こさなかったため、1 時間の処

理を行った。ボールミル2次粉碎は、1時間と2時間の2パターンで行ったところ、2時間処理の時、平均粒径 $18.71\ \mu\text{m}$ の粉碎物を得ることができた。

第四章 廃菌床微粉末及び広葉樹微粉末の酵素糖化

4.1.廃菌床微粉末および広葉樹微粉末の酵素糖化

研究方法

酵素剤: 本試験では以下の酵素剤を用いて糖化試験を行った。メイセラージェ (明治製菓株)、ヘミセルラーゼ (アマノエンザイム株)、セルラーゼ S50010, NS50012, NS50013, NS50014, NS50029, NS50030, Celluclast, novozyme188, VisocozymeL (novozymes)、ヘミセルラーゼ(ヤクルト株)、ラッカーゼ Y120 (大和化成株) キシラナーゼ Fluka(BioChemika)。

糖化: 廃菌床および広葉樹の粉碎物を pH5.5 の 0.2M 酢酸緩衝液に懸濁し、 121°C 15 分のオートクレーブ滅菌後、酢酸緩衝液に溶解した各種酵素剤を滅菌フィルターを用いて無菌的に添加し、糖化を行った。

分析: 全糖量は、フェノール硫酸法、各種単糖は、DIONEX を用いて定量を行った。

結果

各種酵素剤の組み合わせによる糖化試験の結果を表 2 に示した。廃菌床では、novozyme 2、novozyme3、メイセラージェ、ラッカーゼを同時に作用させることにより 1 g の廃菌床よりグルコースを 0.27g 得ることができた。しかし、キシロースは、0.01 g と低い収率であった。また、広葉樹でも、novozyme 2、novozyme3、メイセラージェ、ラッカーゼを同時に作用させたときに、1 g の広葉樹よりグルコースを 0.337g 得ることができた。

第五章 廃菌床糖化液及び広葉樹糖化液からのバイオエタノール生産

5.1. 廃菌床糖化液および広葉樹糖化液からのバイオエタノール生産

研究方法

糖化液の作成は、novozyme 2、novozyme3、メイセラージェ、ラッカーゼを用いて作成した。発酵は、*Saccharomyces cerevisiae* および *Pichia stipitis* を用いた。YPD 液体培地で前培養を行い、集菌洗浄後、糖化液に酵母を 1.5×10^7 cells/ml になるように植菌し 25°C でエタノール生産を行わせた。

結果

図 3 に *S. cerevisiae* による糖化液からのバイオエタノール生産の経時変化を示した。廃菌床と広葉樹のいずれの糖化液からもバイオエタノールを生産することができた。しかし、広葉樹の糖化液では、発酵が遅く阻害物の存在が示唆された。図 4 に *P. stipitis* による糖化液からのバイオエタノール生産の経時変化を示した。廃菌床と広葉樹のいずれの糖化液

からもバイオエタノールを生産することができた。しかし、広葉樹の糖化液では、発酵が遅く阻害物の存在が示唆された。また、本酵母は、キシロースからバイオエタノールを生産する能力を持っており、糖化液中のキシロースも利用されていた。

第六章 廃菌床微粉末及び広葉樹微粉末からの並行複発酵技術によるバイオエタノール生産

6.1.廃菌床微粉末および広葉樹微粉末からの並行複発酵技術によるバイオエタノール生産研究方法

廃菌床または広葉樹の粉碎物を pH6.0 の 0.1M リン酸緩衝液に懸濁し、酵素と *P. stipitis* を無菌的に同時に添加し、28℃で振盪発酵を行った。

結果

並行複発酵におけるエタノール生産の経時変化を図 5 に示した。並行複発酵では、廃菌床および広葉樹からグルコースの生産は、行われるもののエタノール変換が阻害されることが判明した。使用した酵素剤による酵母への阻害が無いことより、廃菌床および広葉樹由来の成分が発酵阻害を起こすことが推察された。しかし、酵素糖化液では、発酵阻害を起こさなかったことより、その阻害成分は不安定なものであることが推察される。

第7章 *P. stipitis* のキシリトール生産を抑制するための最適発酵条件の検討

研究方法

P. stipitis を液体培地（キシロース 2%、酵母エキス 1%、ポリペプトン 2%）に 1 白金耳植菌し、常法に従い酵母を増殖させた。酵母培養液を集菌後発酵用液体培地に植菌し、25℃でバイオエタノールの生産を行った。

結果

P. stipitis は、発酵中間代謝産物であるキシリトールを、菌体内に取り込むことが困難であることが判明した(not data shown)。従って、発酵中にキシリトールを産生させない条件を確立する必要がある。そこで、回転数、窒素源、初発酵母濃度の影響について検討を行った結果、いずれもキシリトールの生成抑制に効果ないことが判明した。

結論

木質系バイオマスである廃菌床と広葉樹からのバイオエタノール生産技術の開発を行った。バイオマスの前処理方法として、ボールミルを用いた微粉碎条件を確立した。さらに酵素糖化条件を検討し、グルコースおよびキシロースを生産することができた。得られた酵素糖化液を *P. stipitis* で発酵を行わせ、エタノールを生産することに成功した。しかし、並行複発酵を行わせると発酵阻害を起こし、効率良くエタノールを生産できず発酵阻害成

分の存在が示唆された。

英語概要

・研究課題名 = 「Simultaneous saccharification and bioethanol production from wood biomass」

・研究代表者名及び所属 = Sho Shindo

Akita Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries
Research Center. Research Institute for Food and Brewing

要旨 = We used the wood biomass as a material for bioethanol production in this investigation. The wood biomass was treated as follows; firstly, wood biomass was crushed until 20 micron of particle size using Cogwheel Mill in order to degrade the lignin. Secondary, the powder of wood biomass was saccharified by various saccharification enzymes. To confirm the sugar production ability from wood biomass powder by enzyme treatment, various commercial cellulases were tested. When dry powder of wood biomass was treated with Meicellase (Meiji Seika Co., Ltd) novozyme2, novozyme3 (Novozymes) and laccase (Daiwakasei K.K.), glucose, was produced under the optimum conditions. When bioethanol production from wood biomass hydrolysate using *Saccharomyces cerevisiae* was done, a bioethanol concentration of 15 g/L was produced after 1 day. When bioethanol production from wood biomass powder suspension was carried out by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) using *Pichia stipitis* and commercial cellulase, a bioethanol concentration of 3.0 g/L was produced after 1 day. It was considered that the wood biomass contained any inhibitor for bioethanol production activity of yeast cells.

キーワード : Bioethanol, Wood biomass, Xylose, *Pichia stipitis*

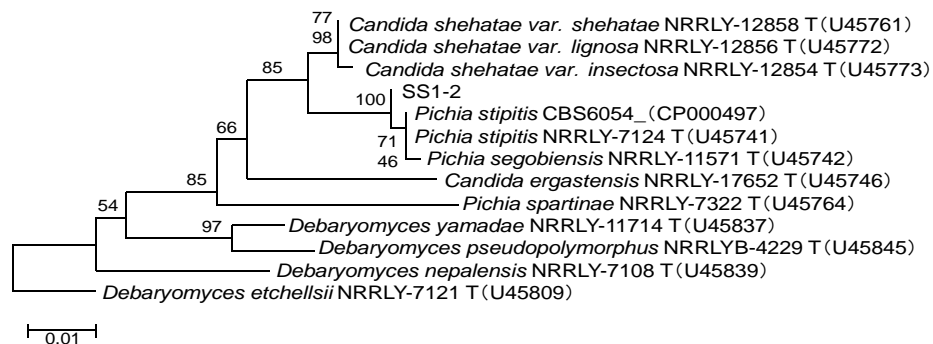


図1. SS1-2の26S rDNA-D1/D2塩基配列を用いた分子系統樹

表1 SS1-2株の生理性状

糖類発酵性試験

Glucose	W	Maltose	S
Galactose	S	Trehalose	L

炭素源資化性試験

Glucose	陽性	Salicin	陽性	D-Glucitol	陽性
Galactose	陽性	Melibiose	陰性	Galactitol	弱い陽性
D-Glucosamine	陽性	Lactose	弱い陽性	Inositol	陰性
D-Xylose	陽性	Raffinose	陰性	2-Keto-D-gluconate	陽性
L-Arabinose	弱い陽性	Mlezitose	陽性	DL-Lactate	陰性
L-Rhamnose	陽性	Soluble starch	陽性	Succinate	陽性
Sucrose	陽性	Glycerol	陽性	Ethanol	陽性
Maltose	陽性	Erythritol	陽性	Hexadecane	弱い陽性

表2 廃菌床および広葉樹の糖生産に及ぼす酵素処理の影響

	項目	粉碎物 [g]	Glc 絶対量 [g]	Xyl 絶対量 [g]
廃菌床	N1	1	0.162	0.031
	N2	1	0.256	0.005
	N3	1	0.153	0.035
	N23m.l	1	0.27	0.01
	mXF	1	0.123	0.032
	Cell 188 Visco	1	0.09	0.021
アカシア	N3	1	0.239	0.08
	N23m.l	1	0.337	0.068
	MnPMn23	1	0.332	0.085
	m N23	1	0.306	0.076
	mXF	1	0.212	0.074
	Cell 188 Visco	1	0.154	0.045

※※※ 酵素剤の標記

m:メイセラゼ

N1,2,3 等:novozyme ヘミセルラーゼ

XF:キシラーゼ Fluka

MnP:Manganese Peroxidase

l:ラッカーゼ

188:novozyme188

Cell: Celluclast

Visco: ViscozymeL

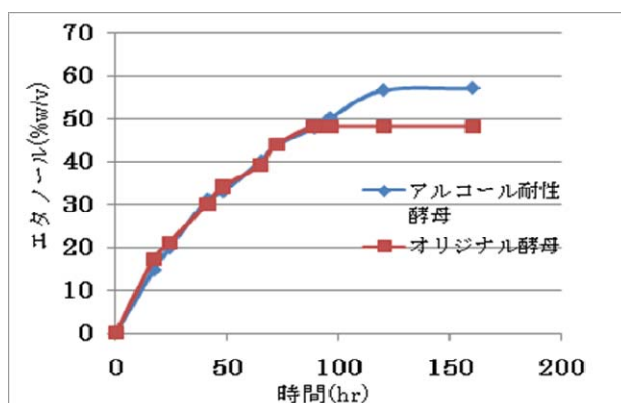


図2. アルコール耐性酵母のエタノール生産の経時変化

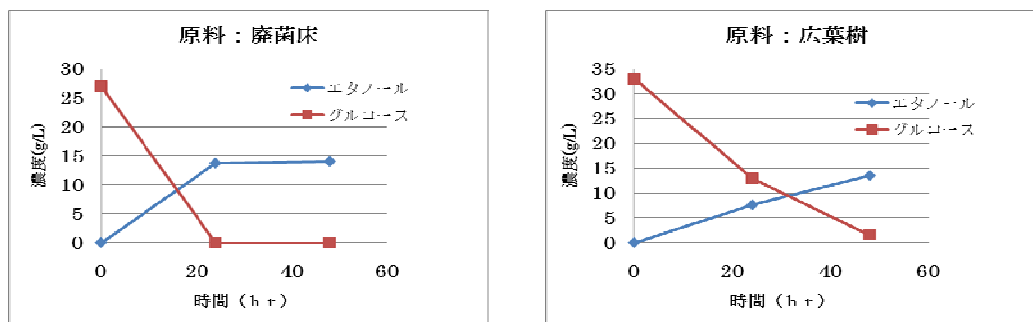


図3. *Saccharomyces cerevisiae* による廃菌床及び広葉樹の糖化液からのバイオエタノール生産

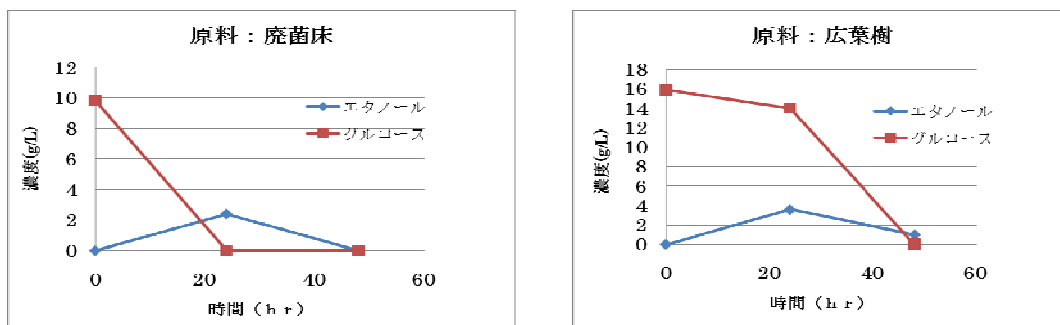


図4. *Pichia stipitis* による廃菌床及び広葉樹の糖化液からのバイオエタノール生産

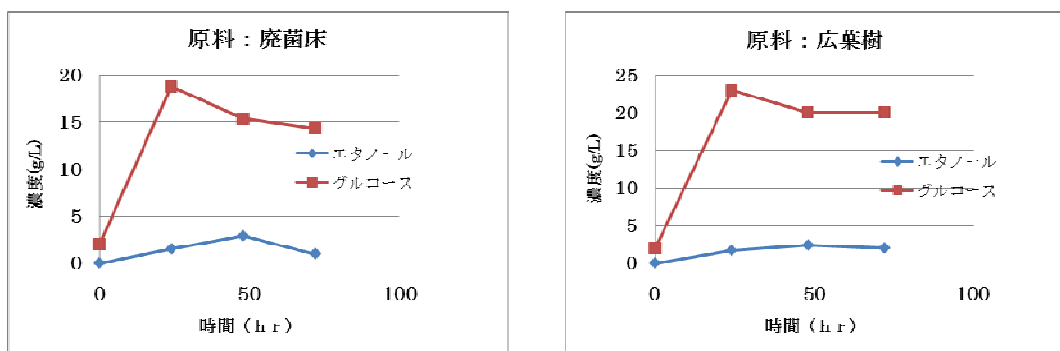


図5. *Pichia stipitis* を用いた廃菌床及び広葉樹からの並行複発酵によるバイオエタノール生産