

## 酵母による水圏バイオマスからのエタノール生産に及ぼす諸因子（糖／塩濃度・酵母種）の影響

小原 信夫（東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科, nobuchan1173@yahoo.co.jp）

岡井 公彦（東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科, mokai01@kaiyodai.ac.jp）

古川 彰（東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科）

石田 真巳（東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科, ishida@kaiyodai.ac.jp）

浦野 直人（東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科, urano@kaiyodai.ac.jp）

### Effect of various parameters (sugar/salt conc. and yeast sp.) on ethanol production from aquatic biomass with yeasts

Nobuo Obara (Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

Masahiko Okai (Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

Akira Furukawa (Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

Masami Ishida (Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

Naoto Urano (Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

#### 要約

筆者らは水圏バイオマスを原料とするバイオエタノール生産を行っており、原料糖化液の成分状態が酵母発酵能に著しい影響を及ぼすことを見出した。本論文では水圏バイオマスからのエタノール生産に及ぼす諸因子（糖化液糖/塩濃度、酵母種）の影響を解析する。原料は水圏由来のアオサとホテイアオイを使用した。粉末原料を希硫酸分解した後、NaOHまたはBa(OH)<sub>2</sub>を用いて分解液のpHを調整し、セルラーゼ処理により糖化原液を作製した。糖濃度増加のため、糖化原液から2.5～3.0倍の濃縮糖化液を作製した。NaOHを用いる濃縮糖化液①の塩濃度は、アオサ：5.14 % (w/v)、ホテイアオイ：5.48 % (w/v)であった。一方、Ba(OH)<sub>2</sub>を用いる濃縮糖化液②の塩濃度は、アオサ：1.05 % (w/v)、ホテイアオイ：0.25 % (w/v)と著しく低下した。次に、濃縮糖化液①と②を、5株の*Sacchomyces cerevisiae*と1株の*Pichia stipitis*を使用して各々発酵させた。*S. cerevisiae*では、①によるバイオエタノール生産量と比べて、②による生産量は1.1～1.4倍程度高かった。また、*P. stipitis*では①の生産量と比べて、②のそれは2～5倍程度高くなり、酵母種が持つ耐塩性差による影響が強く表れた。次に、高発酵能を持つ海洋由来*S. cerevisiae* C19株を用いて、発酵に及ぼす塩濃度の影響を詳しく調べた。アオサ糖化液（NaOH使用）の4倍濃縮液ではバイオエタノール生産量0 g/lとなったが、アオサ糖化液（Ba(OH)<sub>2</sub>使用）では10倍濃縮液でも5.52 g/Lのバイオエタノールを生産した。さらに、ホテイアオイ糖化液（Ba(OH)<sub>2</sub>使用）の7.2倍濃縮液では30.90 g/lの高濃度バイオエタノールを生産した。これらの結果から、高糖濃度かつ低塩濃度の糖化液を作製すること、酵母種/株を選択することが、効率的バイオエタノール生産にとって重要であることがわかった。

#### キーワード

ホテイアオイ, アオサ, 糖化, 発酵, バイオエタノール

#### 1. 目的

地球温暖化が主に化石燃料の大量消費に起因していることは改めて述べるまでも無いが、東日本大震災に伴う原発事故により石油代替エネルギーの中心である原子力開発が停滞し、温暖化の加速に追い打ちを掛けている。昨今の状況下で、カーボンニュートラルでクリーンな燃料であるバイオエタノール生産が、世界で急速に拡大している。2011年の時点で、アメリカは世界シェアの64%を占める年間542億klのバイオエタノールを生産し、ガソリン車は多くがE10対応になっている。ブラジルでは世界シェア24%を占める年間210億klを生産し、全車両がE25の対応車となっている（柴田, 2012）。そして日本でも、2030年までにE10全国実施量に相当するバイオエタノールの市場供給を見込んでおり、石油代替燃料としてのバイオエタノールの役割は益々大きくなっている。現在のバイオエタノールの主要原料はトウモロコシやサトウキビなどの糖質系・デンプン系バイオマスであり、これらの原

料を用いると、安価で効率的なエタノール変換が可能である。現状下で、アメリカでは全栽培トウモロコシの約30%、ブラジルではサトウキビから抽出される砂糖類の約50%がバイオエタノール原料に利用されているため、原料の燃料化が食糧化の減少に直結し、バイオエタノール生産の拡大は世界的な食糧難の一因ともなっている（Koh, 2008; 小泉, 2007）。そこで、第2次世代のバイオエタノール原料として、資源量が膨大で食糧化しないリグノセルロース系バイオマスの開発が始まっているが、現技術では原料の糖化効率や酵母による発酵効率が低いため、より安価で高変換効率となる技術開発が待望されている。図1にバイオエタノール原料の長所・短所をまとめる。筆者らはこれまで、廃糖蜜（Ueno et al., 2001; 2002; 2003）、ビール粕（小原他, 2009）、外来水草（Ogawa et al., 2008; Takagi et al., 2012）、海藻（浦野他, 2012）、シュレッダー裁断紙（Obara et al., 2012）などの様々なセルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産に関する研究を行って来た。筆者らによる水圏セルロース系バイオマスを原料とする効率的バイオエタノール生産研究を、以下に展望する。

日本の淡水圏では富栄養化湖沼でホテイアオイなどの外来

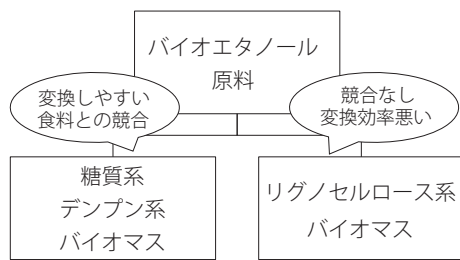


図1：バイオエタノール原料の長所・短所

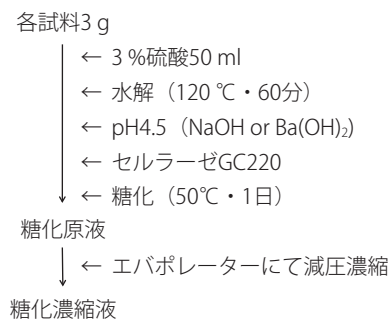


図2：原料の加水分解・糖化濃縮工程

水草が、海水圏では富栄養化沿岸域でアオサなどの緑藻が大繁殖している。こうした外来水草や緑藻は、資源量が多いが利用価値が乏しく、既存の自然生態系、養殖、レジャー産業などに深刻な影響を及ぼしている。しかも、回収が容易で安価なため、バイオマス資源としての有効利用法の開発が待望されている。そこで、これらバイオマスのエタノール変換を実用化に結びつけるためには、原料糖化液の糖濃度を増加させて高効率な発酵を実現する、高濃度エタノール生産が求められる。さて、研究の過程で筆者らは、糖化液の塩濃度増加が酵母発酵効率の著しい減少を誘因することを見出した。よって、高糖濃度かつ低塩濃度の糖化液を調製して、酵母発酵に供する技術開発の必要性が推定された。筆者らはバイオマス原料を希硫酸・加熱により加水分解して、塩基性物質によるpH調整を行った後に、セルラーゼ処理により糖化液の作製を行ってきた。そこで本研究では、ホテイアオイとアオサの加水分解液のpH調整にNaOHを用いる方法と、Ba(OH)<sub>2</sub>を用いる方法の二つを並行して糖化を行い、生じる塩濃度差が発酵に及ぼす影響を比較すること、さらに、糖化原液の濃縮度、酵母種を変化させて、効率的バイオエタノール生産の最適条件を探索することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 原料の採集

淡水圏の未利用バイオマスである外来水草ホテイアオイを原料化した。改良飼育株と異なり、野生のホテイアオイは葉部から根部まで2m以上に生長する。ホテイアオイは世界の熱帯域から温帯域にかけて異常繁殖し、日本では富栄養化した淡水圏で、夏季に繁殖して冬季に枯れる生態サイクルを持つ。筆者らは茨城県大利根町で栽培している野生ホテイアオイを採集した(Takagi et al., 2012)。

海水圏の未利用バイオマスである緑藻アオサを原料化した。アオサは富栄養化した内湾で夏季に大繁殖して、海岸に打ち上げられて腐敗し悪臭を放つため、自治体が大がかりな除去を行っている。筆者らは、静岡県浜名湖近郊のアオサ採集業者から購入して使用した(浦野他, 2012)。

### 2.2 原料の加水分解・糖化

ホテイアオイとアオサは採集後、東京海洋大学品川キャンパスの海洋生化学研究室に輸送した。原料を水道水で洗浄後、60～70℃で乾燥した。フードプロセッサーで乾燥原料を粉末化して冷蔵保存した。粉末原料3gを3%(v/v)硫酸50mlに浸漬して、120℃、60minで加水分解した。加水分解試料に

セルラーゼGC200 (ジェネンコア協和) 400 IU/gを原料に添加して、50℃、24hrの糖化処理を行った。図2に原料の加工工程を示す。糖化原液をエバポレータにより減圧濃縮し、実験に応じて2.5倍～10倍の濃縮糖化液を作製した。

次に、糖化原液中の中性糖の組成を高速液体クロマトグラフィ LC-20AD、示差屈折計検出器RID-10A、カラムShim-pack SPR-Pb (粒子径8μm, サイズ250×7.8mm) (島津)、移動相: 蒸留水 (和光純薬)、流量: 0.6 ml/mn、カラム温度: 80℃にて計測した。糖化液の塩濃度はSALT METER B-71 (HORIBA Sci.)にて計測した。

### 2.3 選抜酵母による糖化液の発酵

使用酵母は、高発酵能を持つ*Saccharomyces cerevisiae* 種の、NBRC10217株 (Type strain)、日本酒酵母K7株、ビール酵母BSRIYB23-3株、水圏由来TY-2株 (Ogawa et al., 2008)、および海洋由来C19株 (Obara et al., 2012)、また、キシロース発酵能を持つ*Pichia stipitis* 種 (小原他, 2014) の、NBRC 1687株 (Type strain)、さらに海洋由来で高発酵が確認されているNo. 23株 (未同定) を使用した。酵母をYPD-平板培地 (2% グルコース、2% ペプトン、1% 酵母エキス、2% 寒天) に植菌、25℃、3日間培養した。増殖コロニーを種菌として冷蔵保存した。種菌をYPD-液体培地 (2% グルコース、2% ペプトン、1% 酵母エキス) 100 ml に植菌し、25℃、3日間培養した。培養液を遠心分離 (3,000 rpm, 5 min) 処理して、沈殿した酵母細胞を回収した。酵母細胞を蒸留水に懸濁して再遠心を行い、洗浄操作を2回繰り返して、以下の実験に供した。

酵母細胞を2%各中性単糖 (グルコース、キシロース、ガラクトース、マンノース、ラムノース) + 0.67% YNB (yeast nitrogen base without amino acids) 10 ml に植菌して、ダーラム管を入れた試験管30 ml にて、25℃で嫌気静置培養した。14日間後、ダーラム管内にCO<sub>2</sub>の蓄積の有無を目視判定して、酵母による単糖の発酵能を検定した。

図3に各酵母による発酵試験の工程を示す。酵母細胞0.1g (湿菌体) を植菌した原料糖化原液10 ml または濃縮糖化液10 ml を試験管に分注し、試験管をガスバックジャー内に設置して、嫌気下で25℃、5日間の発酵を行い、酵素法 (エタノール測定キット、Roche, USA) にて、生成エタノール量を計測した。同時に、発酵液のグルコース量 (グルコース測定キット、Roche, USA)、塩濃度を計測した。

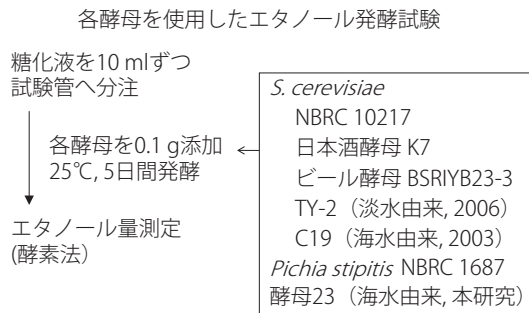


図3：酵母発酵試験工程

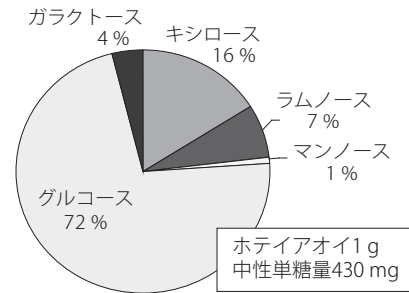


図5：原料ホテイアオイの中性単糖含量

### 3. 結果および考察

#### 3.1 原料糖化液の中性単糖含量

アオサ糖化液の中性単糖の含量を、アオサ乾燥重量に換算した結果を図4に示す。アオサ糖化液の中性単糖量を、乾燥原料1g当たりの単糖量に換算したところ、132.5 mg (総重量の13.25 % (w/w)) であった。総中性単糖中の各単糖の比率は、グルコース65 %、キシロース22 %で、総中性糖量の87 %を両単糖が占めていた。酵母は主に原料中の単糖を資化発酵してバイオエタノールを生産するが、特にグルコースを好んで発酵する (Barnett et al., 2000)。従って、使用酵母としてグルコース高発酵能やグルコースとキシロース両発酵能を持つ酵母を適用することが、効率的バイオエタノール生産にとって重要である。また、単糖にマンノースとラムノースを各5 %、ガラクトースを3 %含有しているため、さらなる効率化のためには、これら3種単糖の発酵能を有する酵母の適用も有効であることがわかった。

次に、ホテイアオイ糖化液の中性単糖の含量を、ホテイアオイ乾燥重量に換算した結果を図5に示す。ホテイアオイ

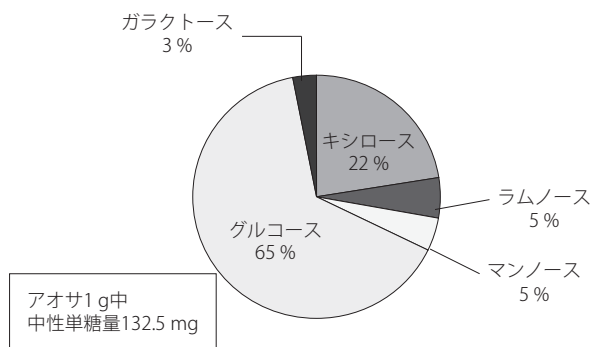


図4：原料アオサの中性単糖含量

糖化液中の単糖量を、乾燥原料1g当たりの単糖量に換算したところ、430 mg (総重量の43.00 % (w/w)) であった。全単糖中の各単糖の比率は、グルコース72 %、キシロース16 %とアオサと比べてグルコースの比率が高く、酵母の発酵により適した原料であることがわかった。また、その他の単糖はラムノース7 %、ガラクトース4 %、マンノース1 %であった。よって、ホテイアオイとアオサの含有単糖は種類が同一、比率も類似しているが、ホテイアオイの総単糖量はアオサのその3.25倍であり、バイオマス原料としてのホテイアオイの優位性が明らかになった。

#### 3.2 酵母による中性単糖の発酵特性

表1に各酵母による中性単糖の発酵能を示す。7株の酵母はいずれもグルコース発酵能を保持していた。一方、キシロース発酵能を保持しているのは *P. stipitis* のみであり、本菌は効率的バイオエタノール生産の有望種であることがわかった。また、全酵母株がガラクトースとマンノースを発酵するが、ラムノースは全酵母株が発酵できなかった。これらの結果から、*S. cerevisiae* はアオサとホテイアオイ中の総単糖の73 ~ 77 %を発酵する能力が有り、*P. stipitis* は93 ~ 95 %を発酵する能力が有ることがわかった。しかし、これらは各単糖を唯一の炭素源とした酵母発酵能の検定結果であり、総単糖が共存しているバイオマス原料の酵母発酵能に関しては、3.3で記述する。

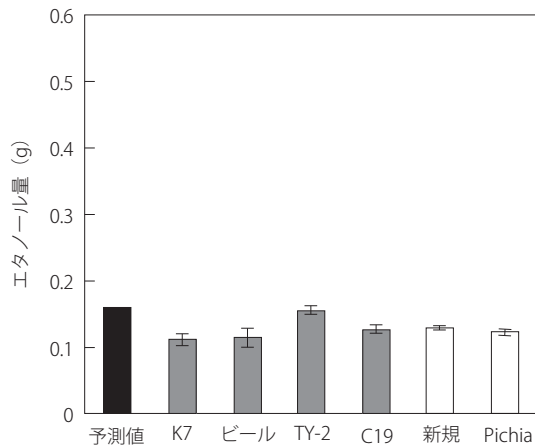
#### 3.3 アオサとホテイアオイの酵母発酵

アオサとホテイアオイの糖化原液を各酵母株で発酵させ、使用原料乾燥重量(3g)当りの生産エタノール量に換算した結果を図6に示す。なお、糖化後のpH調整剤にはBa(OH)<sub>2</sub>を使用し、糖化液が低塩濃度状態で発酵に供した。

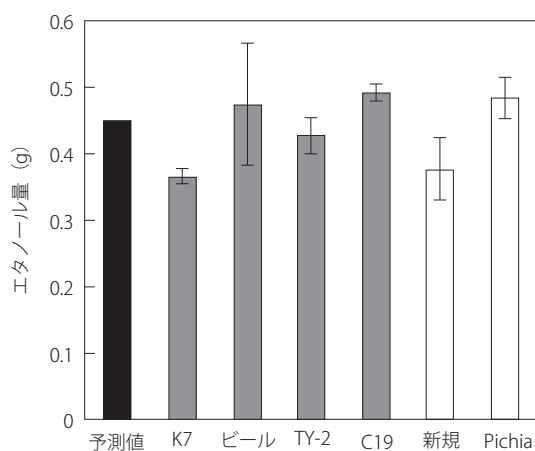
図6の予測値とは、(1)式によりアオサ/ホテイアオイの含

表1：酵母による中性単糖の発酵能

	10217	K7	ビール	TY-2	C19	Pichia	23
グルコース(73%)	+	+	+	+	+	+	+
キシロース(13%)	-	-	-	-	-	+	-
ガラクトース(6%)	+	+	+	+	+	+	+
マンノース(5%)	+	+	+	+	+	+	+
ラムノース(3%)	-	-	-	-	-	-	-



(a) アオサ



(b) ホテアオイ

図6：バイオマス糖化原液の酵母発酵

有グルコースからの発酵収率を100%と仮定した際の、生成エタノールを予測した結果である。



アオサを原料とすると予測値0.16gであり、各酵母株によるエタノール生産量は予測値近傍の0.12~0.16gであった。また、ホテアオイを原料とすると予測値0.45gであり、各酵母株によるエタノール生産量は予測値近傍の0.37~0.49gであった。従って、エタノール生産量は原料単糖総量にほぼ比例して増大し、ホテアオイからの生産量はアオサからのその約3.1倍になった。酵母種による比較では、*S. cerevisiae*と*P. stipitis*の生産量に大きな差が無いため、*P. stipitis*のみが保持するキシロース発酵能は、直接的にバイオエタノール生産の優位性につながらないことが明らかになった。従って、バイオマス発酵に*P. stipitis*と*S. cerevisiae*のどちらを適用するかに関しては、原料の状態に合わせて決定することが有効であると判断された。

次に、アオサ糖化原液および3倍濃縮糖化液が酵母発酵に及ぼす影響を図7に示す。pH調整剤がNaOHの場合には、濃縮糖化液のグルコース濃度0.79%であり、塩濃度は5.14%

エタノール量測定(アオサ)

約3倍濃縮	グルコース濃度(%)	塩濃度(%)
NaOH処理濃縮液	0.79	5.14
Ba(OH) <sub>2</sub> 処理濃縮液	0.64	1.05

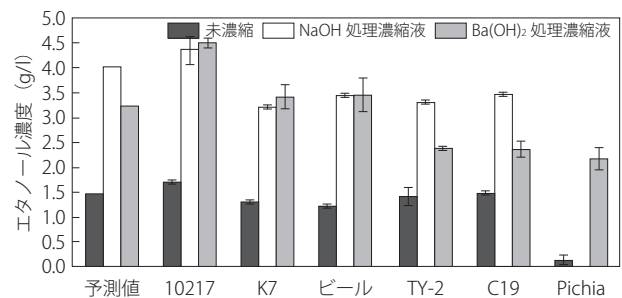


図7：アオサ糖化原液・濃縮糖化液の酵母発酵

あった。一方、pH調整剤Ba(OH)<sub>2</sub>の場合には、濃縮糖化液のグルコース濃度0.64%であり、塩濃度は1.05%と、塩濃度が大きく減少した。

そこで、糖化原液(pH調整剤:NaOH)、3倍濃縮糖化液(pH調整剤:NaOHまたはBa(OH)<sub>2</sub>)の3種類の糖化液を酵母発酵に供した(図7)。糖化原液では、*S. cerevisiae* 5株のエタノール生産量は1.2-1.7g/lであったが、*P. stipitis*のそれは0.17g/lであった。さらに、濃縮糖化液(NaOH)では、*S. cerevisiae* 5株のエタノール生産量は3.2~4.4g/lであり、糖化原液のその約2.7倍となり、濃縮に伴う生産量は顕著に増大した。一方、*P. stipitis*のエタノール生産量は0.12g/lで、濃縮によりさらに低下した。従って、*P. stipitis*は塩耐性が低く、pH調整剤にNaOHを使用することが、エタノール生産能の著しい低下につながるということがわかった。次に、濃縮糖化液(Ba(OH)<sub>2</sub>)では、*S. cerevisiae* 5株のエタノール生産量は2.4~4.5g/lであり、濃縮糖化液(NaOH)のそれと比べて、大きな差は無かった。また、*P. stipitis*は濃縮糖化液(Ba(OH)<sub>2</sub>)では、エタノール生産量2.2g/lと高レベルであり、低塩耐性の酵母にはBa(OH)<sub>2</sub>の使用が有効であることがわかった。さらに、水圏由来の天然酵母であるTY-2株やC19株では、濃縮糖化液(NaOH)の場合にエタノール生産能が高く、高度塩耐性が明らかになった。

ホテアオイ糖化原液および2.5倍濃縮糖化液が酵母発酵に及ぼす影響を図8に示す。pH調整にNaOHを使用した際には、濃縮糖化液のグルコース濃度1.94%、塩濃度5.48%であった。一方、Ba(OH)<sub>2</sub>を使用した際には、濃縮糖化液のグルコース濃度は2.24%とNaOHに比べて増加し、塩濃度は0.25%と著しく減少した。この結果から、ホテアオイ原料ではpH調整剤にBa(OH)<sub>2</sub>を使用することで、大幅な塩濃度減少につながるということがわかった。

そこで、未濃縮の糖化原液(pH調整剤にNaOH使用)、2.5倍濃縮糖化液(pH調整剤にNaOHまたはBa(OH)<sub>2</sub>を使用)の3種類の糖化液を酵母発酵に供した(図8)。糖化原液では、酵母6株のエタノール生産量は4.0~4.8g/lといずれも同レベルであった。*P. stipitis*のそれも4.7g/lと高く、ホテアオイ原料の場合には、高塩濃度下でもエタノール生産能の低下は無かった。濃縮糖化液(NaOH)では、*S. cerevisiae* 5株のエタ

エタノール量測定(アオサ)		
約2.5倍濃縮	グルコース濃度(%)	塩濃度(%)
NaOH 処理濃縮液	1.94	5.48
Ba(OH) <sub>2</sub> 処理濃縮液	2.24	0.25

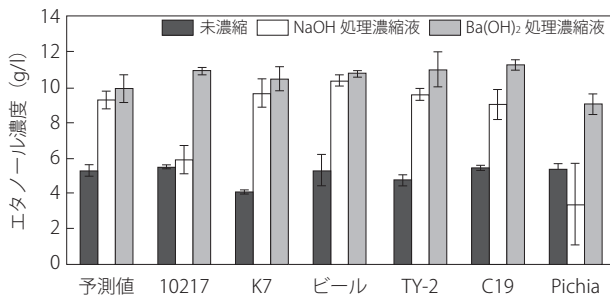


図8：ホテイアオイ糖化原液・濃縮糖化液の酵母発酵

ノール生産量は6.0～10.1 g/lで、糖化原液のその1.5～2.1倍となり、濃縮に伴う生産量増加が顕著であった。一方、*P. stipitis* のエタノール生産量は2.7 g/lと低下し、塩濃度の増加による生産活性の低下が現れた。次に、濃縮糖化液(Ba(OH)<sub>2</sub>)では、*S. cerevisiae* 5株のエタノール生産量は10.0～10.7 g/lであり、濃縮糖化液(NaOH)のそれと比べて高くなった。また、*P. stipitis*のエタノール生産量は9.5 g/lであり、濃縮糖化液(NaOH)のそれと比べて3.5倍も増大した。

こうして、バイオマス原料、酵母、pH調整剤などの種類により、バイオエタノールの生産量が大きく変化することがわかり、効率的なバイオエタノール生産を行うためには、より最適な発酵条件を検討することが必要と判断された。

図8の結果から、エタノール生産量10.7 g/lと発酵能が最も高いC19株を選抜した。C19株の発酵能に及ぼす原料・pH調整剤・糖化液濃縮率の影響を図9に示す。アオサのpH調整剤にNaOHを使用し糖化液の濃縮倍率を増大させると、3.0倍ではエタノール生産量5.0 g/l、4.3倍ではエタノール生産量0 g/lとなった。アオサのpH調整剤にBa(OH)<sub>2</sub>を使用して糖化液の濃縮倍率を増大させると3.0倍でエタノール生産量5.0 g/lとなり、それ以上に倍率を増大させても生産量がほぼ横ばい

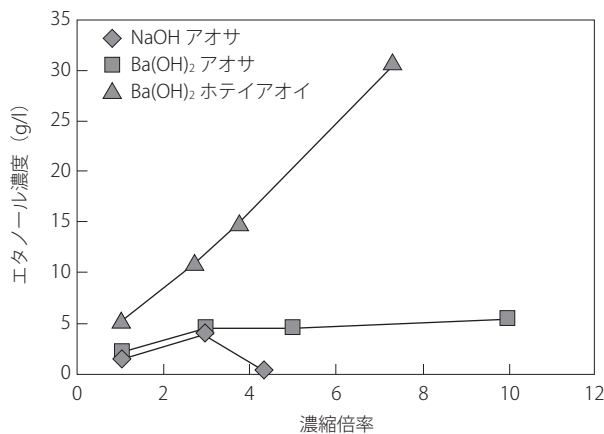


図9：S. cerevisiae C19株の発酵能に及ぼす原料・pH調整剤・糖化液濃縮率の影響

になり、10倍でもエタノール生産量は5.52 g/lにとどまった。一方、ホテイアオイのpH調整剤にBa(OH)<sub>2</sub>を使用すると、糖化液の増大に比例してエタノール生産量も増大し、7.2倍濃縮糖化液では、30.90 g/lとエタノール生産量が最大になった。以上の結果から、本報におけるバイオエタノール生産条件は、原料：ホテイアオイ、pH調整剤：Ba(OH)<sub>2</sub>、糖化液濃縮度：7.2倍、酵母：海洋由来*S. cerevisiae* C19株が最適であると判定された。

バイオマス原料として有望と判定されたホテイアオイは、南アメリカ原産の浮遊性水草で、現在では世界の熱帯淡水圏を中心に大繁殖している。自然生態系やヒトの生活に大きな悪影響を及ぼし、世界レベルの害草となっている(Buckingham, 1997; 石井, 1992)。日本には19世紀末に持ち込まれた。小型に育種改良されたホテイアオイは、日本家庭の睡蓮鉢や庭池で水質安定化や観賞用に栽培されているが、天然の富栄養化淡水圏では野生の大型ホテイアオイが、夏から秋にかけて水面を覆い尽くすほど大繁殖している。日本においても、他の水棲生物の生活を著しく阻害し、従来の自然生態系を大きく変動させる原因となっている。ホテイアオイの根は、重金属や有機物の吸収力が強く、夏季には富栄養化水圏の浄化に貢献するため、富栄養化湖沼の浄化に利用している自治体がある(本郷他, 2004)。しかし、冬季には枯れて腐敗が始まり、ホテイアオイの存在がさらなる水質悪化を誘引する危険性があり、枯れる直前の秋季にホテイアオイを回収する必要がある。そこで、筆者らは回収したホテイアオイをバイオマスエネルギー変換原料として利用することを計画している。本論文では、ホテイアオイの糖化・発酵に及ぼす諸因子を検討し、ホテイアオイ原料からの効率的バイオエタノール生産の可能性を示すことができた。

付記

本論文の責任著者(Corresponding author)の連絡先を以下に示す。

氏名：浦野直人(教授)

〒108-8477 東京都港区港南4-5-7

東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科 海洋環境学部門

Tel: 03-5463-0588 E-mail:urano@kaiyodai.ac.jp

引用文献

Barnett, J. A., Payne, R. W., and Yarrow, D. (2000). *YEASTS: Characteristic and identification*, 3rd Edition, Cambridge Univ. Press.

Buckingham G. R. (1997). Exotic weeds and their biocontrol agents in aquatic ecosystems in the United States. *Biological Invasions of Ecosystem Pests and Beneficial Organisms*, National Institute of Agro-Environmental Science.

石井猛(1992). ホテイアオイは地球を救う. 内田老鶴圃.

本郷敬之助・立本英機(2004). 湖沼・河川・排水路の水質浄化—千葉県の開発辞令—. 海文堂出版.

Koh, L. P. and Ghazoul, J. (2008). Biofuels, biodiversity, and people: Understanding the conflicts and finding opportunities. *Biological Conservation*, Vol. 141, 2450-2460.

小泉達次(2007). バイオエタノールと世界の食糧事情. 筑波

---

書房.

- Obara, N., Ishida, M., Hamada-Sato, N. and Urano, N. (2012). Efficient bioethanol production from paper shedder scrap by a marine-derived *Saccharomyces cerevisiae* C-19. *Studies in Science and Technology*, Vol. 2, No. 2, 127-132.
- 小原信夫・濱田奈保子・浦野直人・浅沼進 (2009). ビール粕を原料としたバイオエタノール生産条件の検討—食品製造廃棄物のエネルギー変換—. *日本フードシステム学会誌*, Vol. 16, 112-117.
- 小原信夫・榎牧子・岡井公彦・上田孝太郎・石田真巳・浦野直人 (2014). キシロース発酵能を持つ新奇酵母によるバイオエタノール生産. *科学・技術研究*, Vol. 3, No. 1, 55-60.
- Ogawa, G., Ishida, M., Usui, Y. and Urano, N. (2008). Ethanol production from the water hyacinth *Eichhornia crassipes* by yeast isolated from various hydrosphere. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 2, No. 2, 110-113.
- 柴田明夫 (2012). ブラジルのバイオエタノールをめぐる動向. 独立行政法人農畜産振興機構. [http://www.alic.go.jp/johos/joho07\\_000557.html](http://www.alic.go.jp/johos/joho07_000557.html).
- Takagi, T., Uchida, M., Matsushima, R., Ishida, M. and Urano, N. (2012). Efficient bioethanol production from water hyacinth *Eichhornia crassipes* by both preparation of the saccharified solution and selection of fermenting yeasts. *Fisheries Science*, Vol. 78, Issue 4, 905-910.
- Ueno, R., Urano, N. and Kimura, S. (2001). Characterization of thermotolerant, fermentative yeasts from hot spring drainage. *Fisheries Science*, Vol. 67, Issue 1, 138-145.
- Ueno, R., Urano, N. and Kimura, S. (2002). Effect of temperature and cell density on the ethanol fermentation by a thermotolerant, aquatic yeast strain isolated from hot spring environment. *Fisheries Science*, Vol. 68, Issue 4, 571-578.
- Ueno, R., Hamada-Sato, N. and Urano, N. (2003). Fermentation of molasses by several yeasts from hot spring drain and phylogeny of the unique isolates producing ethanol at 55°C. *Journal of the Tokyo University of Fisheries*, Vol. 90, 23-30.
- 浦野直人・高木俊幸 (2012). 水圏バイオマスの有効利用—効率的バイオエタノール生産方法の確立へ向けて—. *日本エネルギー学会誌*, Vol. 91, No. 11, 1189-1196.

(受稿：2014年11月17日 受理：2014年12月8日)