

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00669

研究課題名(和文) 環境低負荷かつ低エネルギー化型のバイオエタノール生産プロセスの開発

研究課題名(英文) Development of eco-friendly and low cost process for the production of bioethanol

研究代表者

佐々木 千鶴 (SASAKI, Chizuru)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・准教授

研究者番号：50452652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：リグノセルロース系バイオマス为原料としたバイオエタノール生産プロセスにおける「前処理」「酵素糖化」およびその後の「精製」について、低エネルギー化を目指した技術の開発を行った。セルロースモデルとしてタオルを用い、マイクロ波水熱処理により希硫酸を触媒としたセルロースの直接糖化での最適条件を見出した。また、マイクロ波処理と高濃度硫酸含浸を組み合わせることにより、さらに直接糖化率が向上することも明らかとした。一方、バイオエタノールの精製法について、環境低負荷な第三成分を添加した抽出蒸留法により高濃度のエタノールを得られることも明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リグノセルロース系バイオマス为原料としたバイオエタノール生産プロセスの実現に向けて、環境低負荷やコストダウンに繋がる研究の進展に寄与した。セルロースを酵素加水分解する方法の代替法として、水熱処理による直接糖化法を開発し、また、バイオエタノールの精製法として環境低負荷な物質を添加する方法を見出した。

研究成果の概要(英文)：To produce bioethanol at low cost and low energy, direct hydrolysis of cellulose (cotton towel) to glucose was investigated using microwave-assisted treatment. We found the optimal direct hydrolysis condition using diluted sulfuric acid as catalyst. Next, novel direct hydrolysis method for cotton towel was investigated using microwave combined with impregnation in concentrated sulfuric acid before the microwave treatment. This combination method proposed had some advantages such as higher hydrolysis glucose recovery yield and low input energy. Moreover, extractive distillation of bioethanol with additive was investigated, ethanol was concentrated at high purity (98mol%).

研究分野：バイオマス変換工学

キーワード：リグノセルロース バイオマス 加水分解 水熱処理 バイオエタノール 蒸留

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バイオエタノールを代表とする一般的な微生物発酵を用いた液体燃料製造プロセスは原料の調達から始まり「前処理」「酵素糖化」「微生物発酵」「蒸留・無水化」の各ステップを経る。原料にリグニンとセルロースから成るリグノセルロース系バイオマスを用いる場合、セルロースは強固なりグニンのネットワークに覆われており、セルロースへの酵素のアクセシビリティが妨げられるため、原料の微細化、解繊、リグニンの低分子量化および除去等の前処理が必須である。上記の各プロセスの中で大きなコストを占めるのは、高温高圧、化学(劇)薬品の添加、高電力料を要する「前処理」と高価な酵素を用いる「酵素糖化」、高電力料を要する「蒸留・無水化」であり、とくに、「酵素糖化」は場合によっては全コストの半分以上を占めるといわれる。しかし、リグノセルロース系試料を原料とした場合には、これらのステップは避けて通ることはできず、低環境負荷はもちろんのこと、低コスト・低エネルギーな技術の創出が求められる。そこで、本研究課題では、これら「前処理」「酵素糖化」および「蒸留・無水化」に焦点を当て、低コスト・エネルギーな技術開発を目指すこととした。

2. 研究の目的

(1) セルロース分解のための酵素使用量削減を目的とした「前処理」と「酵素糖化」を融合したマイクロ波水熱処理を用いた「糖化能を有する前処理」の開発

(2) バイオエタノールの効率的精製を目的とした環境低負荷な添加剤を用いた抽出蒸留とプロセスシミュレーション

3. 研究の方法

(1) セルロース分解のための酵素使用量削減を目的とした「前処理」と「酵素糖化」を融合したマイクロ波水熱処理を用いた「糖化能を有する前処理」の開発

マイクロ波水熱処理

セルロースモデル物質として市販のタオルをカッターミルで粉砕して実験に用いた。本試料をマイクロ波照射装置(Initiator⁺, バイオタージジャパン(株))の専用反応試験管(10-20 ml 用)に入れ、溶媒を 15 ml 添加し、所定の温度と時間についてマイクロ波処理を行った。マイクロ波処理後は、遠心分離により上清と固形分に分離し、上清、固形分ともに乾燥機にて乾燥し、重量を測定した。上清に含まれるグルコース量はムタロターゼ GOD 法により定量した。一方、固形分はさらにセルラーゼ(メイセラゼ, 明治製菓ファルマ(株))により酵素糖化(酵素加水分解)した。反応終了後は、遠心分離により固形分と上清を分離し、上清に含まれるグルコース量をムタロターゼ GOD 法により定量した。

硫酸水溶液への含浸前処理

マイクロ波水熱処理による効果向上のため、マイクロ波水熱処理する前に試料を硫酸水溶液へ含浸する処理を併用した。タオルを 0.5 g ビーカーにとり、20 ml の 36, 51 あるいは 55 wt% の硫酸水溶液に含浸したのち、遠心分離して硫酸水溶液を取り除き 40 ml の水を添加した。再び遠心分離をして上清を取り除き、固形分を実験に使用した。

マイクロ波処理したタオルを用いた同時糖化発酵によるエタノール生産

マイクロ波処理したタオルを基質としてメイセラゼと酵母を用いて同時糖化発酵法によりエタノールを生産した。使用した基質は、51 wt% の硫酸水溶液にタオルを 30 分含浸後にマイクロ波処理(処理条件は 180 にて 3 分)したものを用い、生産されたエタノールの定量は高速液体クロマトグラフィーにより行った。

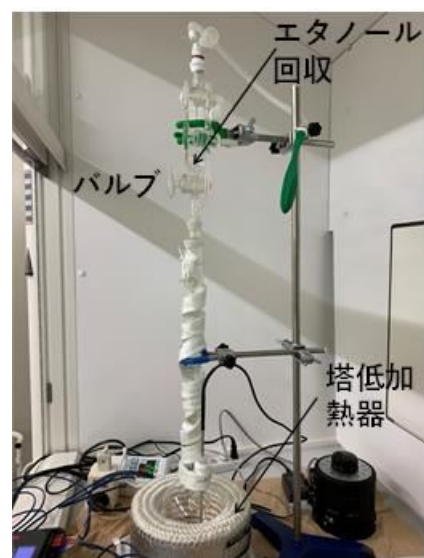


図 1 抽出蒸留装置

(2) バイオエタノールの効率的精製を目的とした環境低負荷な添加剤を用いた抽出蒸留とプロセスシミュレーション

バイオエタノールモデルとして水・エタノール混合試料を作成し、エタノールは3段階に分けて精製した。工程1では、蒸留装置で希釈混合物(5%体積)を52%体積までに濃縮した。工程2では、工程1で濃縮された混合物を、蒸留装置でその共沸点(96.3%体積)近くまでさらに濃縮した。工程3では、環境に優しく無害な添加剤(塩、等)を添加し、共沸混合物を除去し、純粋なエタノール(99.5%体積以上)とした。図1は、抽出蒸留装置のセットアップを示す。水・エタノール混合物を分離し、カラム(蒸留塔)に供給する添加剤の量を変更した。塔底を加熱することで試料液が蒸発し、蒸気は塔内を上方に移動し、上部で凝縮した。液体が凝縮してから、上部のバルブを閉じて液体を収集した。採取したエタノール濃度は、密度、液体ガスクロマトグラフィー及び¹H-NMRにより測定した。

4. 研究成果

(1) セルロース分解のための酵素使用量削減を目的とした「前処理」と「酵素糖化」を融合したマイクロ波水熱処理を用いた「糖化能を有する前処理」の開発

マイクロ波水熱処理によるタオルセルロースの直接糖化

まずはじめに、水を溶媒として用いてタオルのマイクロ波処理をして、グルコースが可溶化してくるのかを調べたところ(処理温度は200、処理時間は5分)、グルコースはほとんど定量されなかった。そこで、溶媒を1wt%の硫酸水溶液に置き換え、同条件にてマイクロ波処理を行ったところ、タオル重量に対して28.4%のグルコースが直接糖化されることがわかった。そこで、この条件を中心に、触媒濃度、マイクロ波処理温度や時間を変化させ、より多くのグルコースをマイクロ波処理により直接生産するための条件を探索した。また、直接産生するグルコースと併せて、マイクロ波処理した後に残った残渣を酵素糖化して得られるグルコース量も定量し、総合的に得られるグルコース量を調査した(図2)。その結果、マイクロ波処理により直接糖化されるグルコース量が最大であったのは、マイクロ波処理温度200にて7分、溶媒を1wt%の硫酸水溶液としたときであり、100gのタオルから28.9gのグルコースが得られ

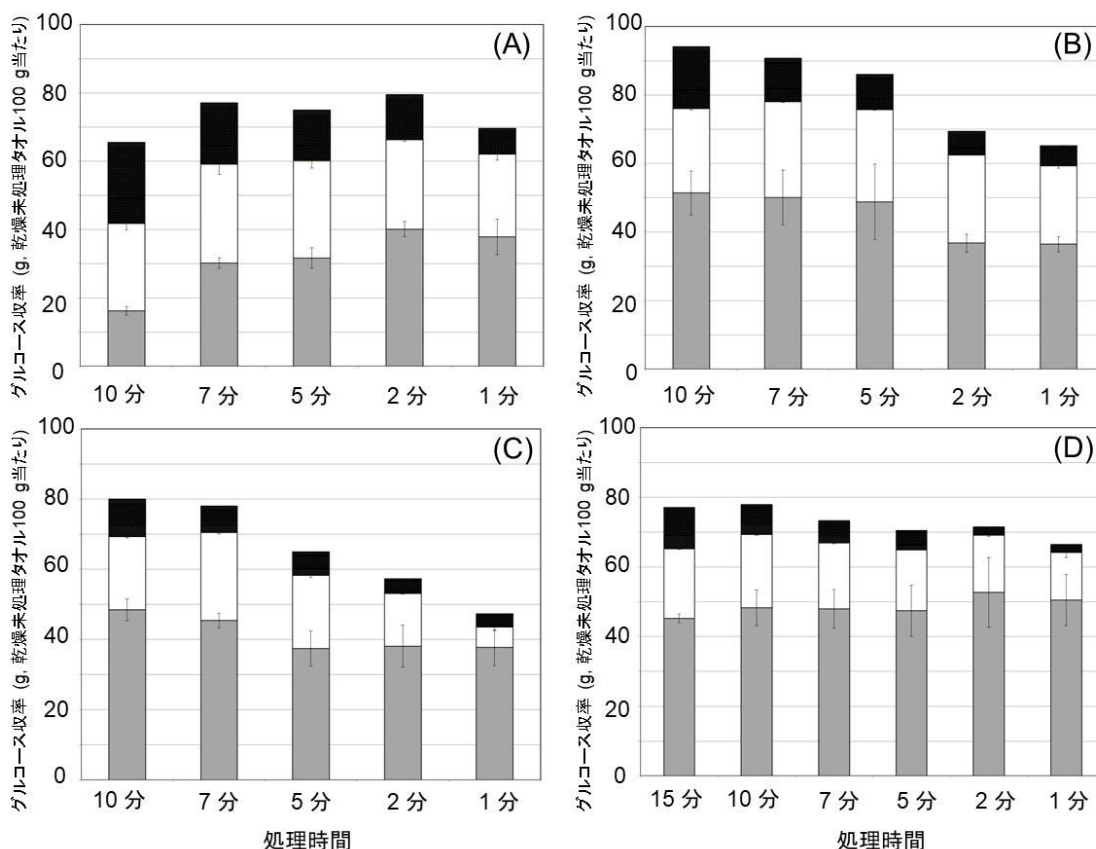


図2 タオルのマイクロ波処理による直接糖化されたグルコース(), マイクロ波処理残渣を酵素糖化により産生したグルコース(), マイクロ波処理後のその他の水可溶性物質()

(A) マイクロ波処理温度200、溶媒として1wt%硫酸水溶液、(B) 200、0.5wt%硫酸水溶液、(C) 200、0.25wt%硫酸水溶液、(D) 180、1wt%硫酸水溶液

た。一方、タオルから得られるグルコースの総和量、すなわちマイクロ波処理により直接的に糖化されるグルコース量とその処理残渣を酵素糖化して得られるグルコース量の総計については、マイクロ波処理温度 200 にて 7 分、溶媒を 0.5 wt% の硫酸水溶液としたときにタオル 100 g 当たり最大量 78.0 g (直接糖化にて 27.9 g, 酵素糖化にて 50.1 g) であった。以上の結果から、マイクロ波処理によりタオルから直接グルコースを生産できる条件を見出した。直接糖化により酵素で加水分解するべき固形分が減ったことで、固形分に対する酵素必要量も削減できることへ繋がった。

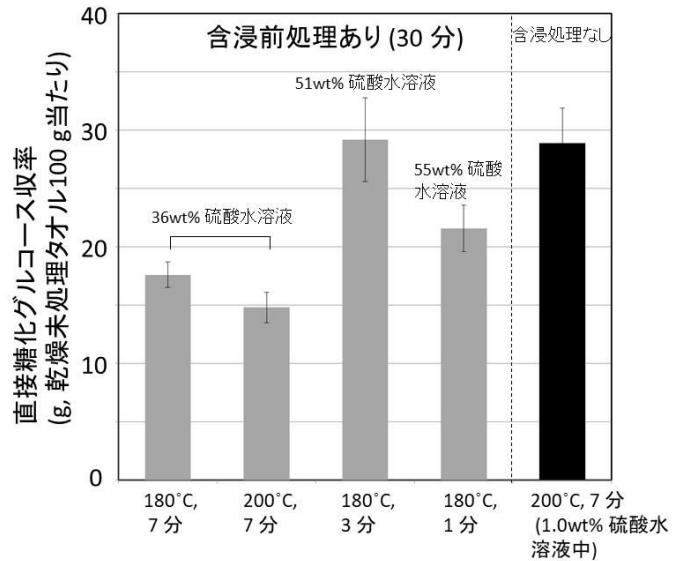


図3 高濃度硫酸水溶液への含浸前処理を組み合わせたマイクロ波水熱処理によるタオルの直接糖化

高濃度硫酸水溶液への含浸前処理を組み合わせたマイクロ波処理によるタオルセルロースの直接糖化

マイクロ波処理によるタオルの直接糖化量のさらなる向上を目指して、マイクロ波処理する前にタオルを高濃度の硫酸水溶液に含浸した。36-55 wt%の高濃度の硫酸水溶液にタオルを含浸し、これを非結晶化工程とした。この含浸前処理を組み合わせたタオルのマイクロ波処理によるグルコースの直接糖化グルコース収率を図3に示す。含浸処理をしないタオルの直接糖化グルコース量はマイクロ波処理温度 200、処理時間 7 分、1wt%の硫酸水溶液を溶媒として用いた場合であり、タオル 100 g 当たり 28.9 g であったのに対し、51wt%の高濃度硫酸に含浸したタオルから得られる直接糖化グルコース量はタオル 100 g 当たり 29.2 g と同等であった。しかし、この値を得たのは、マイクロ波処理温度は 200 よりも 20 低い 180 においてであり、かつ

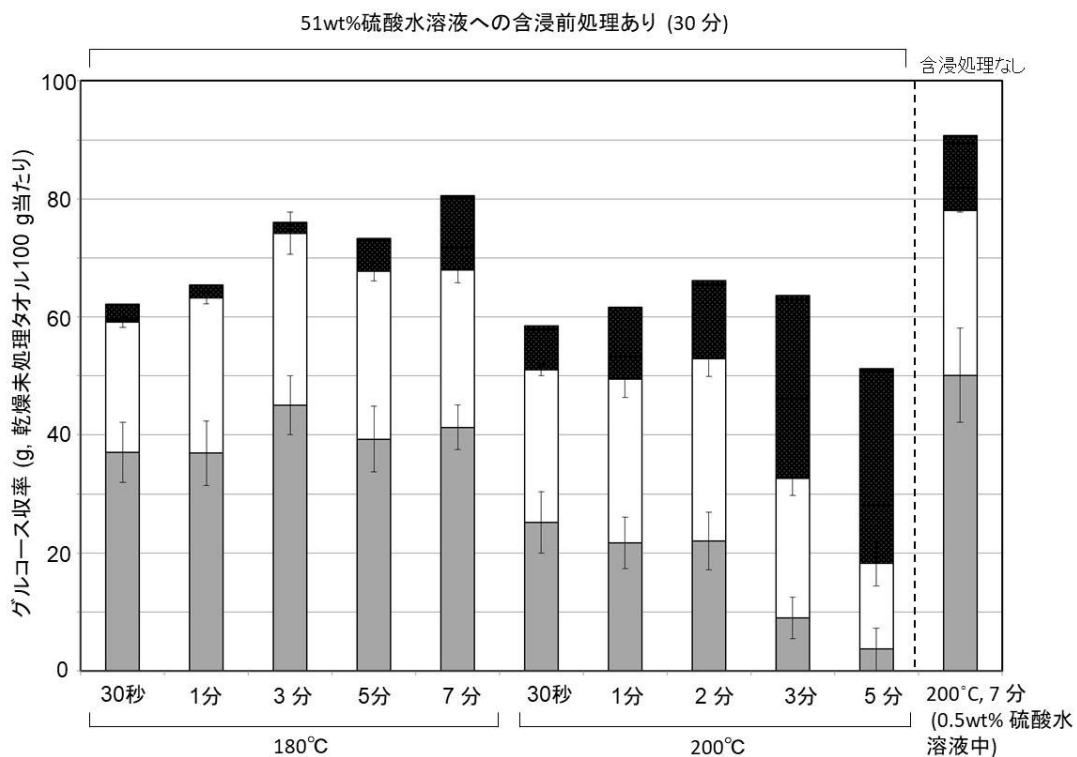


図4 51 wt%硫酸水溶液に含浸したタオルのマイクロ波処理による直接糖化されたグルコース(), マイクロ波処理残差固形分の酵素糖化により産生したグルコース(), マイクロ波処理後のその他の水可溶性物質()

短時間の3分の処理であった。これにより、51wt%の硫酸水溶液にタオルを含浸する前処理は、マイクロ波処理により直接グルコースを得るための処理温度と時間の緩和に効果的であることがわかった。さらに詳細にマイクロ波処理条件を変えて、直接糖化グルコース量、処理後の残渣固形分を酵素糖化して得られるグルコース量およびこれらの総計を調査した(図4)。この結果より、タオルを51wt%の硫酸水溶液に含浸(30分)し、その後マイクロ波処理して最大の直接糖化グルコース量を示したのは、200℃において2分処理した場合にタオル100g当たり30.9gであり、また、直接的に糖化されるグルコース量とその処理残渣を酵素糖化して得られるグルコース量の総計についての最大量は、処理温度180℃にて3分の処理であり、タオル100g当たり74.2gであった。以上のように、マイクロ波処理を行う前に試料を51wt%ほどの高濃度の硫酸水溶液に含浸することで、その後のマイクロ波処理にかかるエネルギーが緩和されることが明らかとなった。

マイクロ波処理したタオルを用いた同時糖化発酵によるエタノール生産

51wt%の硫酸水溶液にタオルを含浸し、マイクロ波処理(180℃にて3分)して得られるグルコースおよび処理残渣に含まれるセルロースがバイオエタノールを生産する酵母の栄養源となりうるかどうかを検証した。生産されるエタノール量の比較をするため、硫酸水溶液への含浸なしのタオルを200℃にて7分、0.5wt%の硫酸水溶液中でマイクロ波処理したものを基質(グルコースの総生産量はタオル100g当たり78.0g)としてエタノール発酵実験を行った。結果として、エタノールの生産量は、マイクロ波処理の前に含浸をしたものはタオル100g当たり22.4gであり、一方で含浸をしないものでは、タオル100g当たり13.2gであった。以上のことから、51wt%の硫酸水溶液に含浸してマイクロ波処理したタオルから生成されるグルコースは、エタノール発酵生産のための基質として利用できることがわかり、また、マイクロ波処理の条件が穏やかなため、発酵を妨げる阻害物質が少ないため、含浸をせずにマイクロ波処理したタオルを基質とするよりも多くのエタノールが生産されたと考えられる。

(2) バイオエタノールの効率的精製を目的とした環境低負荷な添加剤を用いた抽出蒸留とプロセスシミュレーション

プロセスシミュレーション結果では、分離性能及びエネルギー消費の観点から、グリセリンがより良い添加剤であった。しかし、エタノール精製実験では、塩がより良い選択肢であることが明確となった。これは、プロセスシミュレーションでは、水分子とイオン間の強い相互作用を適切に考慮することができなかったためである。したがって、気液平衡におけるイオンの影響を考慮した正確なモデルが必要であることが明らかとなった。現在、市販プロセスシミュレーションにはそのようなモデルはなく、本研究成果からプロセスシミュレーションの改良が必要であることがわかった。一方、エタノールの抽出蒸留の工程3について、塩を添加剤としてエタノールがその共沸点(つまり約89%モル)を超えて精製される条件を見出し、添加剤はグリセリンの場合よりも少量で済むことがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akihiro Suzuki, Chizuru Sasaki, Chikako Asada and Yoshitoshi Nakamura	4. 巻 194
2. 論文標題 Production of cellulose nanofibers from Aspen and Bode chopsticks using a high temperature and high pressure steam treatment combined with milling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Carbohydrate Polymers	6. 最初と最後の頁 303-310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.carbpol.2018.04.047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chikako Asada, Chizuru Sasaki, Akihiro Suzuki and Yoshitoshi Nakamura	4. 巻 9
2. 論文標題 Total biorefinery process of lignocellulosic waste using steam explosion followed by water and acetone extractions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Waste and Biomass Valorization	6. 最初と最後の頁 2423-2432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12649-017-0157-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akihiro Suzuki, Chizuru Sasaki, Chikako Asada, Yoshitoshi Nakamura	4. 巻 12
2. 論文標題 Characterization of cellulose nanofiber from steam exploded Japanese cedar	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BioResources	6. 最初と最後の頁 7628-7641
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chizuru Sasaki, Ami Kiyokawa, Chikako Asada and Yoshitoshi Nakamura	4. 巻 10
2. 論文標題 Glucose and Valuable Chemicals Production from Cotton Waste Using Hydrothermal Method	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Waste and Biomass Valorization	6. 最初と最後の頁 599-607
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12649-017-0084-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chikako Asada, Chizuru Sasaki, Yoshitoshi Nakamura	4. 巻 10
2. 論文標題 High concentration ethanol production from mixed softwood sawdust waste	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Waste and Biomass Valorization	6. 最初と最後の頁 433-439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12649-017-0073-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chikako Asada, Chizuru Sasaki, Akihiro Suzuki, Yoshitoshi Nakamura	4. 巻 9
2. 論文標題 Total biorefinery process of lignocellulosic waste using steam explosion followed by water and acetone extractions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Waste and Biomass Valorization	6. 最初と最後の頁 2423-2432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1007/s12649-017-0157-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chizuru Sasaki, Tomoya Nakagawa, Chikako Asada, Yoshitoshi Nakamura	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Microwave-assisted hydrolysis of cotton waste to glucose in combination with the concentrated sulfuric acid impregnation method	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Waste and Biomass Valorization	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12649-019-00768-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chizuru Sasaki, Haruka Negoro, Chikako Asada, Yoshitoshi Nakamura	4. 巻 21
2. 論文標題 Microwave-assisted glucose production from bode (Styrax tonkinensis) woody biomass for bioethanol production	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Material Cycles and Waste Management	6. 最初と最後の頁 201-204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10163-018-0783-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 橋本和紀、浅田元子、佐々木千鶴、中村嘉利
2. 発表標題 高活性水蒸気処理を用いたセルロースナノファイバーの製造とバイオマスコンポジットへの応用
3. 学会等名 生物工学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木昭浩、浅田元子、佐々木千鶴、中村嘉利
2. 発表標題 高活性水蒸気処理と粉碎処理を併用したバイオリファイナリーシステムの開発
3. 学会等名 生物工学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihiro Suzuki, Chikako Asada, Chizuru Sasaki, Yoshitoshi Nakamura
2. 発表標題 Synthesis of ecomaterial from plant biomass and its physical properties
3. 学会等名 International Conference on Ecomaterials (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuta Danura, Chikako Asada, Chizuru Sasaki, Yoshitoshi Nakamura
2. 発表標題 Comparison of steam explosion and steaming followed by milling treatment for bioethanol production from woody biomass
3. 学会等名 International Conference on Ecomaterials (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takuya Yamamoto, Chikako Asada, Chizuru Sasaki, Yoshitoshi Nakamura
2. 発表標題 Organosolv lignin extracted from hydrolyzed residue of steam exploded hardwood: a potential candidate for epoxy resin
3. 学会等名 International Conference on Ecomaterials (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Chizuru Sasaki, Chikako Asada, Yoshitoshi Nakamura
2. 発表標題 Glucose production from cotton-waste using hydrothermal methods
3. 学会等名 The 4th International Cellulose Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高田弥生、浅田元子、佐々木千鶴、中村嘉利
2. 発表標題 バイオマスへの応用を考慮した耐熱性セルラーゼ利用のための酵素カクテルの相乗効果検討
3. 学会等名 第9回日本醸造学会 若手シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 妹尾政都、浅田元子、佐々木千鶴、中村嘉利
2. 発表標題 ファルカタを原料としたバイオエタノール製造のための水蒸気爆砕前処理の最適条件の検討
3. 学会等名 第9回日本醸造学会 若手シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤井萌、浅田元子、佐々木千鶴、中村嘉利
2. 発表標題 バイオエタノール残渣となるモデルリグニンを用いたエポキシ樹脂合成の抽出溶媒検討
3. 学会等名 第9回日本醸造学会 若手シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toma Gabriel, Alcantara Avila J. Rafael, 佐々木 千鶴
2. 発表標題 塩含有溶媒を用いた抽出蒸留によるバイオエタノール脱水プロセスに関する研究
3. 学会等名 化学工学第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 友紀, Alcantara Avila J. Rafael, 佐々木 千鶴
2. 発表標題 塩による効果を用いたエタノール精製プロセスの開発
3. 学会等名 化学工学第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小田島海、佐々木千鶴、浅田元子、中村嘉利
2. 発表標題 アルカリ凍結融解と水熱処理を併用した木質バイオマス中のセルロースの糖化に関する研究
3. 学会等名 2019年日本化学会中国四国支部大会徳島大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	ALCANTARA J. RAFAEL (ALCANTARA J. Rafael) (50709219)	京都大学・工学研究科・講師 (14301)	