

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780292

 研究課題名（和文） 鉄系触媒を研磨剤として用いた木質系バイオマスの環境低負荷型  
前処理法の開発

 研究課題名（英文） Development of environmentally friendly pretreatment using ferric  
catalyst as abrasive for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass

研究代表者

秀野 晃大（HIDENO AKIHIRO）

愛媛大学・上級研究員センター・講師

研究者番号：30535711

研究成果の概要（和文）：木質バイオマスとして針葉樹のヒノキを中心に用いて、研磨剤添加乾式ディスクミル処理物に、アルカリ-過酸化水素処理を組み合わせることにより、ヒノキに含まれる大部分のヘミセルロースおよび60%のリグニンが分解または溶出し、処理材表面にセルロースナノファイバーおよびナノスケールの"毛羽立ち"が露出することで、高結晶性を有するものの、高糖化率が可能な素材となることが明らかになった。さらに本処理物の至適糖化酵素を検討し、酵素使用量の低減化が示された。

研究成果の概要（英文）：To achieve highly effective enzymatic hydrolysis of Japanese cypress (*Chamaecyparis obtusa*), softwood, the combination of dried disk milling with abrasives and alkaline-peroxide treatment was investigated, and their suitable conditions were decided. The treated sample had highly enzymatic digestibility because this combination caused the degradation of almost of hemicellulose and 60% of lignin, and the exposing cellulose nanofiber and nano scale "raising" on the surface. Moreover, the suitable enzyme was decided, and it was possible to reduce the amount of loading enzymes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：バイオマス

## 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化防止に向けた二酸化炭素削減や循環型社会構築、エネルギー安全保障、環境産業の主導権確保という観点から石油代替となる次世代エネルギーの開発が活発になっている。中でも、食糧と競合しない木質系バイオマスからのバイオエタノールは第二世代バイオエタノールと呼ばれ、早急な実用化が望まれている。木質系バイオマスから

バイオエタノールを生産するには、前処理、糖化、発酵、蒸留精製工程が必要である。木質系バイオマスの利用には、前処理が重要な工程であり、本工程の成否により後段の糖化で用いられる酵素量や、そこで得られる糖化率も大きく変わる。酵素コストは、以前として製品のエタノール生産コストに占める割合が大きい(Hamelinck et al., Biomass Bioenergy, 2005)ため、酵素使用量の削減化

は極めて重要な課題である。従来の前処理法の一つである濃硫酸法は、既に確立された技術であるが、糖の過分解、中和時に発生する石膏の処理、薬品耐性プラントの必要性、硫酸回収時の消費エネルギーが大きいことなどが問題になっていた (Sun and Cheng, *Bioresour. Technol.*, 2002)。希硫酸法も、硫酸中和による石膏発生の問題や薬品耐性プラントの必要性は同様に存在する。カナダにある Iogen 社の爆砕法 (Tolan, *Clean Technol. Environ. Policy*, 2002)は、低濃度の硫酸を投入しており、基本的に上記と同様の問題を抱えている。アンモニア爆砕法 (Teymouri et al., *Bioresour. Technol.*, 2005)は比較的糖化しやすい草本類の研究例が多いが、木材に対する効果は不明な点が多い。さらに、以上に挙げた手法では、下流工程に移行する際に pH 調整や、微生物の生育阻害物質を除く必要がでてくる。また、糖化酵素量を減らすための環境低負荷型前処理としては、ボールミル処理のようなエネルギー消費型前処理が必要であり、前処理コストが嵩むという問題を同様に抱えていた。木質系バイオマスから実用的なバイオエタノールを生産するには、“省エネ型前処理×少量の酵素=高い糖化率”という難題を解く必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまで研究例が少なかった研磨剤による粉砕処理および触媒反応を組み合わせた環境低負荷型前処理の開発を行うことで、できるだけマイルドな条件下で消費エネルギーおよび発酵阻害物質の生成を抑えつつ、少量の酵素量で糖の回収率を上げることを目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、できるだけマイルドな条件下で糖化酵素量及び消費エネルギーを抑えつつ、糖の回収率を上げることを可能にする前処理法の開発を目指し、3つのサブテーマ：(1) 研磨剤を用いたディスクミル処理の最適化、(2) 触媒反応を利用した処理条件の最適化、(3) 前処理物に適した酵素カクテルの開発を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 研磨剤を用いたディスクミル処理の最適化

これまで研磨剤を利用した粉砕処理の検討例は少なく、基礎的な知見が不足している。省エネ型前処理であるディスクミル処理の粉砕効果を高めるための研磨剤として、アルミナ、酸化セリウム、酸化鉄、還元鉄の三種を用いて、乾式ディスクミル粉砕処理を繰り返し5回行い、市販セルラーゼによる糖化試

験により評価した。いずれの処理においても、ディスクミル処理の回数を重ねるごとに糖化率が増加したが、研磨剤を入れない場合とアルミナ添加において最も糖化率が高く、5回の乾式ディスクミル処理で、1gのサンプルから約100mgのグルコースが得られた。

(2) 触媒反応を利用した処理条件の最適化  
乾式ディスクミル粉砕処理のみでは、糖化率が低かったため、乾式ディスクミル処理物に対し、アルカリ-過酸化水素法を組み合わせた処理の検討を行った。いずれの処理物でも糖化率が大幅に増加し、酸化アルミナ添加で、1gの基質から最大で約590mgのグルコースが得られた。還元鉄を入れた場合は、他の処理に比べ常に糖化率が低かったが、固形分収率も最も低く、アルカリ-過酸化水素処理により、糖類もかなり分解されたと示唆された。

フェントン反応を出来るだけ人為的に抑制し、前処理として効果的に機能させることを目的として、ヒノキを原料として、フェントン処理の至適化を行った。鉄粉または還元鉄粉と18%過酸化水素溶液の組み合わせで、70℃、21時間、200rpmの回転振とう反応し、処理物の酵素糖化試験を行ったところ、1gの基質から約423mgのグルコースが生成された。しかしながら、乾式ディスクミル処理後のアルミナ添加のアルカリ-過酸化水素処理物1gから約590mgのグルコースが得られていることから、酵素糖化率増加の要因を探るべく、X線回折解析を行い、スペクトルからアルカリ-過酸化水素処理物の結晶化度を算出したところ、無処理よりも増加していた。ボールミル処理では、結晶化度の減少に伴って糖化率の増加が起こっていたが、本処理物の解析結果から、必ずしも糖化率と結晶化度の相関が取れないことがわかった。そこで、電界放出型電子顕微鏡による観察を行ったところ、表面がナノスケールで毛羽立っており、処理物表面のナノスケールの構造が酵素糖化性に重要であることが示唆された。以上の結果から、乾式ディスクミル処理物に、アルカリ-過酸化水素処理を組み合わせることにより、ヒノキに含まれる大部分のヘミセルロースおよび60%のリグニンが分解、溶出し、処理材表面にセルロースナノファイバーおよびナノスケールの"毛羽立ち"が露出することで、高結晶性を有するものの、高糖化率が可能な素材となることが明らかになった。さらに本処理物の至適糖化酵素を検討した結果、*Acellerase1500*が選択され、さらに酵素使用量の低減化が示された。また、アルカリ-過酸化水素処理の後に行う洗浄及び乾燥方法によって、糖化率が増減することが明らかになりつつある。副次的な結果としては、セルラーゼに対して、鉄粉または鉄イオンの阻

害効果が大きいことが判明し、フェントン反応後に鉄を除去する必要性を明らかにした。反応後に沈殿する大部分の鉄を回収するには、磁石の利用が有効であったが、木材繊維内部に浸透した鉄を除去するまでには至らず、セルラーゼに対する阻害を完全に排除することは困難であった。

そこで、鉄を用いずとも、同様のラジカル酸化分解を期待できるアルカリ-過酸化水素法の詳細な条件検討を行った。国内の自生地域から収集し育成したススキ (*Miscanthus sinensis*) 3 品種およびジャイアントミスカンサス (*Miscanthus × giganteus*) を原料として用いた。温度条件の予備的検討の結果、ヒノキと同様 70°C が最適であった。アルカリ-過酸化水素法による溶出成分の大部分がヘミセルロースおよびリグニンであり、処理物のリグニン含量とグルコース収率に負の相関があった。さらに、*M. sinensis* (Shiozuka) を用いた場合、リグニン含量 10-15% の間でグルコース収率に大きな増加が確認され、脱リグニンの閾値が存在することが明らかになった。

(3) 前処理物に適した酵素カクテルの開発  
アルカリ-過酸化水素処理の *M. sinensis* (Shiozuka) を基質として、酵素カクテルを検討した。市販セルロースを炭素源として *Trichoderma reesei* ATCC66589 株およびスクリーニングで得られた *Penicillium pinophilum* の培養液混液を粗酵素液として用いることにより、バイオマス糖化用として市販されているセルラーゼ (Acclerace1500) と比べ同等のグルコース収率 (残渣に含まれる構成糖の約 83%) および高いキシロース収率 (残渣に含まれる構成糖の約 95%) を得ることが可能になった。副次的な結果として、ヒノキを原料として、微量の酸を添加したオルガノソルブ処理の検討および酵素の至適化を行うことで、高いグルコース収率を達成するとともに、リグノセルロースの酵素糖化に重要な因子として、リグニンの変性および表面のナノスケール構造変化を提案した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Akihiro Hiden\*, Ayato Kawashima, Takashi Endo, Katsuhisa Honda, Masatoshi Morita (2013) Ethanol-based organosolv treatment with trace hydrochloric acid improves the enzymatic digestibility of Japanese cypress (*Chamaecyparis obtusa*) by exposing nanofibers on the surface, *Bioresource Technology*, 査読有, vol.132: 64-70.

(<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.048>)

2. Akihiro Hiden, Ayato Kawashima, Masayoshi Fukuoka, Takashi Endo, Katsuhisa Honda, Masatoshi Morita (2013) Effect of alcohol organosolv treatment combined with short-time ball milling on the enzymatic hydrolysis of Japanese cypress (*Chamaecyparis obtusa*), *Wood Science and Technology*, 査読有, vol. 47: 381-393. (DOI: 10.1007/s00226-012-0504-9)
3. Akihiro Hiden, Hiroyuki Inoue, Takashi Yanagida, Kenichiro Tsukahara, Takashi Endo and Shigeki Sawayama (2012) Combination of hot compressed water treatment and wet disk milling for high sugar recovery yield in enzymatic hydrolysis of rice straw, *Bioresource Technology*, 査読有, vol. 104, 743-748. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.014>)

[学会発表] (計 21 件)

1. 秀野晃大、ミスカンサスの高効率酵素糖化法の検討、第 8 回バイオマス科学会議、2013/1/9、東広島市 (日本エネルギー学会バイオマス部会ポスター受賞)
2. 秀野晃大、木質系バイオエタノール生産の為の要素技術開発、第 1 回環境放射能除染研究発表会、2012/5/21、福島市
3. 秀野晃大、リグノセルロース系バイオマスの高効率酵素糖化の為の前処理法の検討、第 7 回バイオマス科学会議、2012/1/18、盛岡市
4. 秀野晃大、木質系バイオエタノール生産の為の前処理法を中心とした要素技術開発、第 20 回日本エネルギー学会大会、2011/8/10、吹田市
5. 秀野晃大、セルロース系バイオエタノール生産技術の開発：前処理および糖化技術を中心として、第 20 回植物バイオテクノロジーシンポジウム (招待講演)、2011/6/16、京都市
6. Hiden, A.、Investigation of alkaline peroxide treatment for enzymatic hydrolysis of Japanese cypress, 33rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2011/5/2, Seattle, WA (USA)
7. 秀野晃大、木質系バイオエタノール生産のためのアルコールオルガノソルブ処理

法の検討、2011年度日本農芸化学会大会、  
2011/03/26、京都市（震災の影響で要旨発表）

8. 秀野晃大、リグノセルロースを原料にしたエタノール製造のための Alkaline peroxide 前処理条件の検討、第6回バイオマス科学会議、2011/01/12、吹田市
9. 秀野晃大、木質系バイオエタノール製造のための水熱前処理法及び酵素糖化法の開発、2010年度日本農芸化学会大会、2010/03/29、東京都
10. Hideno, A.、Development of compressed hot water-treatment with mixed organic solvent for ethanol production from lignocelluloses、RENEWABLE ENERGY 2010 Joint with 4th International Solar Energy Society Conference Asia Pacific Region、2010/6/27-7/2、Yokohama

〔その他〕

ホームページ等

<http://kenqweb.office.ehime-u.ac.jp/Profiles/0028/0002484/profile.html>

<http://www.ccr.ehime-u.ac.jp/srf/profile07.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秀野 晃大 (HIDENO AKIHIRO)  
愛媛大学・上級研究員センター・講師  
研究者番号：30535711

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者(スーパーバイザー)

森田 昌敏 (MORITA MASATOSHI)  
愛媛大学・農学部・客員教授

川嶋 文人 (KAWASHIMA AYATO)  
愛媛大学・農学部・准教授

澤山 茂樹 (SAWAYAMA SHIGEKI)  
産総研・バイオマス研究センター・チーム長  
(現：京都大学・農学研究科・教授)

遠藤 貴士 (ENDO TAKASHI)  
産総研・バイオマス研究センター・チーム長  
(現：バイオマスリファイナリー研究センター・チーム長)