

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780166

研究課題名(和文)新規発酵糸状菌を用いたペーパースラッジからの効率的バイオ燃料生産プロセスの開発

研究課題名(英文)Development of effective biofuel production from paper sludge by novel fermenting-fungus

研究代表者

高野 真希 (Takano, Maki)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・助手

研究者番号：10444192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：製紙汚泥であるペーパースラッジ(PS)は、焼却処理されるため、二酸化炭素の排出量や焼却灰の過多が問題となっている。そこでPSの有効利用法として、PSからのエタノール生産について検討した。まずPSの成分分析により、PSの組成を確認した。次にPSから効率よく発酵糖を生成できる最適酵素カクテル剤を検討した。また、PSからのエタノール生産に適した糸状菌を選択した。さらに、NaOHおよびHClへの浸漬により無機物および有機物を削減することに成功した。以上の検討をふまえ、100 g/LのNaOH-HCl処理PSの同時糖化発酵によるエタノール生産を行った結果、21.3 g/Lのエタノールを生産できた。

研究成果の概要(英文)：Paper sludge (PS) is discharged from paper-making mill and the incineration of it is one of major CO₂ emission resource. For reduction of CO₂ emission and efficient use of PS, the ethanol production from PS was investigated. First, the components ratio of various PSs was analyzed in detail. Next, three cellulases for hydrolysis were selected among several commercial cellulase reagents and then the optimal mixture ratio of them was decided by using DOE method. An optimal fermenting-fungus was selected from our Mucor sp. library based on growth and fermentation ability in PS. Furthermore, soaking PS in NaOH and HCl solution in series could reduce pulping reagents and inorganic materials so that they cannot inhibit hydrolysis and fermentation. Finally, the simultaneous saccharification and fermentation with an optimal cellulase cocktail and a fermenting-fungus from NaOH-HCl treated PS was performed. As a result, 21.3 g/L ethanol could be produced and the fermenting-efficiency was 67.2 %.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：バイオエタノール ペーパースラッジ 発酵糸状菌

1. 研究開始当初の背景

化石燃料の枯渇や原油価格の高騰、さらにCO₂の過剰排出による温暖化を背景に、世界中で様々な石油代替燃料の開発が行われている。特に植物であるバイオマスを原料としたバイオエネルギーはCO₂の固定と発生が平衡しているとみなされることから、カーボンニュートラルなエネルギーとして注目されている。バイオマスからの再生可能エネルギーの生産は廃棄物などの未利用資源の有効活用という利点も併せ持ち、地球環境の保全と循環型社会の構築という両面において有益なエネルギーとなることが期待されている。未利用バイオマス資源のひとつとしてペーパーラッジ(PS)が挙げられる。製紙会社で回収された古紙は脱墨や漂白などの工程を経て再生紙となるが、その工程において再生不可能な微細繊維やタルク、カオリン、および古紙混入異物などは製紙汚泥、PSとして排出される。日本国内においてPSは年間550万トン発生しており、減容化および熱量の確保を目的として焼却によりPS灰へ変換される。しかしPSは50%以上が水分であるため熱効率が悪く、獲得できる熱量は木材や石炭と比較して半分以下の約8,400 kJ/kgでしかない。また、焼却の際には多くの化石燃料を消費するとともに、多量のCO₂を排出しており、日本国内のCO₂発生量の約5%を占めるといわれている。また、CO₂のみならずNO_xやSO_xが発生することも環境に対する懸念事項である。さらに、PS灰の一部は炭化物製品として利用されているものの、大部分は埋め立て処分となっているのが現状である。

このような背景からPSの新たな有効利用法の開発が急務となり、また、含まれる繊維はセルロースおよびヘミセルロースであることから、PSからのバイオエタノール生産が注目されている。エタノールの燃焼熱は29,700 kJ/kgであり、最終的にエタノールを分離せず発酵物をそのまま焼却してもPSを直接焼却する場合に比べて高い熱量が獲得できる。さらに、PSに含まれる無機成分を回収しリサイクルすることで、パルプ製造工程のコストダウンが期待できる。

一般的なバイオエタノール生産ではトウモロコシやサトウキビなど穀物を原料として製造されるが、食料供給などの問題から、農産廃棄物である稲わらや産業廃棄物であるPSのようなセルロース系バイオマスを原料としたバイオエタノールが注目されている。これらは穀物とは異なりリグニンやその他の成分と複雑で強固な構造を形成しており、バイオマスを発酵糖へと変換する際は、化学的(酸、アルカリなど)または物理的(爆砕、放射線など)な前処理によりセルロースを露出させた後にセルラーゼなど加水分解酵素による糖化により発酵糖を得る。しかし前処理には高温、高圧、薬剤の添加および除去など高いエネルギーを要求するため、この削減が重要な課題となっている。一方、PS

の場合、パルプ製造において脱リグニン処理されていることに加え、古紙の再生工程ではインクの除去や漂白の際にアルカリ処理を行うため、PSは既に前処理を行ったバイオマスと同等なセルロース原料として扱うことができる。つまりPSは高エネルギーな前処理を必要とせず、他のバイオマスより格段に低コストなバイオエタノール生産が可能な原料であるといえる。

2. 研究の目的

製紙事業所で行われる古紙パルプ製造工程では漂白や製紙のために様々な薬剤が添加される。そのため、一般的なセルロース系バイオマスからのエタノール生産とは環境が大きく異なり、セルロース加水分解酵素や発酵微生物にとって過酷な条件下でのエタノール生産となる。そこで本研究ではまず、PSに含まれる成分をセルロースなどの糖質のみならず、無機成分に含まれる物質を詳細に分析する。また、これらの成分の存在下でも効率的にPS中の多糖類を発酵糖に変換できる加水分解酵素を選択し、その最適化を行う。一方、これまでの研究により、*Mucor*属糸状菌にはセルロースの主成分であるグルコースのみならずヘミセルロースの主成分であるキシロース等様々な糖質をエタノールへ変換できる菌株がいることがわかっている。また、*Mucor*属糸状菌はセルラーゼやヘミセルラーゼなど種々の加水分解酵素を分泌することもわかっている。そこで、無機物および有機物の存在する環境下でもPSを効率よくエタノールへ変換できる*Mucor*属糸状菌の検索を行う。これらを踏まえ、培地成分、培養温度などを最適化することでPSからの効率的なエタノール生産プロセスの開発を行う。

3. 研究の方法

本研究で使用したPSは富山県の某製紙会社の事業所で排出されている製紙残渣である。PSの成分はKlason lignin法を用いて分析し、セルロース、ヘミセルロース、無機成分およびその他の有機物の含有量を決定した。また、PS灰分を波長分散型蛍光X線装置(XRF)を用いて分析し、無機成分の詳細な組成を解析した。

PSの糖化には16種類の市販加水分解酵素剤を用いた。pH5.0の緩衝液にPSを懸濁し、それぞれの酵素を添加することで加水分解反応を行い、96時間後のグルコースおよびキシロースの生成量を分析した。その結果より選択した3種類の酵素剤を混合し酵素カクテルを調製した。その混合比はDesign Expert 8を用いた実験計画法(DOE)により最適化した。

本研究室保有の84種類の*Mucor*属糸状菌である。これらを用い、100 g/L PSを炭素源として28°Cにて120時間振とう培養を行った。その後、エタノール生成量を比較し、最適な1株を選択した。培地成分は7.5 g/L

(NH₄)₂PO₄, 3.5 g/L KH₂PO₄, 0.75 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 5.0 g/L Yeast extract である。

最適化酵素カクテルと選択した菌株を用いた PS の同時糖化発酵によるエタノール生産は、酵素カクテルの濃度を 3g-protein/L とし、100 g/L の PS 懸濁培地に糸状菌を植菌し、28°C にて振とう培養することにより行った。

無機成分除去 PS は、PS を 1M NaOH に一晚浸漬した後、1M HCl に一晚浸漬し、水洗、乾燥することにより作成した。

グルコース、キシロース、グリセロール、エタノールの分析は HPLC を用いて行った。

4. 研究成果

(1) ペーパーセラッジの成分分析

ペーパーセラッジ(PS)の有効利用のため、使用した PS の成分分析を行った。その結果、セルロース 22.5%、ヘミセルロース 10.2%、無機物 41.9%およびその他有機物 25.4%であった。32.7%が糖質であり、PS を原料としたエタノール生産では乾燥重量あたり理論最大値として 15%以上のエタノールを得ることが期待できる。しかし、木質や稲わらなどのリグノセルロースバイオマスと異なり、填料由来の無機物および薬剤由来の有機物が大半を占めていることから、これらが加水分解やエタノール発酵を阻害する可能性がある。そこで、この無機物の構成成分を詳細に分析するため、PS の灰分を XRF に供した。その結果、無機物中には Al 32.8%、Ca 30.6% を主成分とし、その他 Na、Mg、Si、Fe などが含まれていた。これらの成分が加水分解および発酵に与える影響は未知であるため、このような環境下でも効率的に加水分解およびエタノール発酵が可能な酵素および菌株の選択が必須である。

(2) PS の加水分解の最適化

PS からのエタノール生産において、PS 中のセルロースおよびヘミセルロースを発酵糖であるグルコースおよびキシロースへ速やかに変換することがプロセス全体の効率に影響する。そのため、効率的な加水分解反応の可能な酵素を選択する必要がある。そこで、市販の酵素剤を組み合わせた PS の最適酵素カクテルの調製を試みた。まず、16 種類の市販セルラーゼ剤を PS 懸濁緩衝液に添加し、96 時間加水分解反応を行い、生成したグルコースおよびキシロース量を比較した。その結果から、Accellerase、Meicerase および Pectinase が PS からの発酵糖生成に適していると考えられた。次にこの 3 種類の酵素剤の最適混合比を求めるため、DOE ソフト Design Expert 8 を用いた。DOE で作成した混合比における加水分解を行い、生成した発酵糖量を応答局面法にて解析し、最適な混合比を求めた。その結果、Accellerase : Meicerase : Pectinase = 0.636 : 0.116 : 0.237 の割合で混合した際に発酵糖の最大生成量が得られることが求められた。そこでこの酵素カクテル剤を用い、100 g/L の PS の加水分解反応を行っ

た。この際、後の糸状菌を用いた同時糖化発酵を考慮し、PS は培地に懸濁して反応を行った。その結果、72 時間で 11.4 g/L のグルコース、1.5 g/L のキシロースを得ることができた。しかしこれらの収率はそれぞれ 50.7%および 14.7%と低かった。この原因として PS 中に含まれる多量の Ca がセルロース繊維を覆っており、酵素の接触が阻害されていることが考えられる。さらに、培地成分中の SO₄ とともにオートクレーブ滅菌の際に加熱されることによって石膏 (CaSO₄) が形成され、セルロース繊維表面で凝固していたと考えられる。このような状態のセルロース繊維を加水分解することは困難であり、また、石膏に酵素が吸着してしまう可能性もある。そこで、反応溶液である培地成分のうち、(NH₄)₂SO₄ および MgSO₄ を代替成分で置き換えることを検討した。(NH₄)₂SO₄ の代わりに (NH₄)₂CO₃、NH₄Cl、NH₄NO₃、KNO₃、NH₄H₂PO₄ を、MgSO₄ の代わりに MgCl を用い、PS の加水分解反応を行った。その中で NH₄H₂PO₄ の場合に最も加水分解が良好に進み、反応 72 時間目に 18.6 g/L のグルコース、3.46 g/L のキシロースを生成させることができた(Fig. 1)。

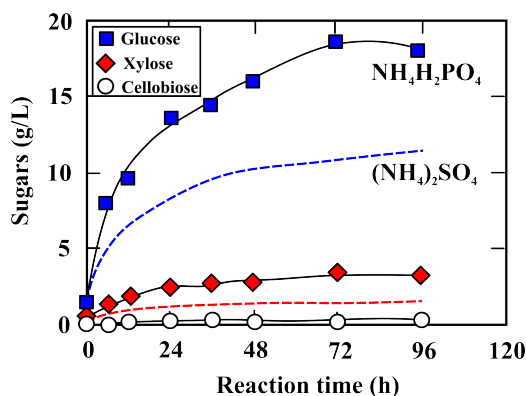


Fig.1 酵素カクテル剤による PS の加水分解

(3) PS 発酵糸状菌の選択と同時糖化発酵

次に PS からのエタノール生産に適した糸状菌の選択を行った。前述の通り、PS には様々な無機物や薬剤が含まれており、それらが発酵阻害物となる可能性がある。そこで、本研究室保有の *Mucor* 属糸状菌ライブラリー 84 菌株から PS の発酵に適した菌株の選択を行った。100 g/L の PS を基質として培地を調製し、Accellerase およびそれぞれの菌糸を植菌することにより同時糖化発酵を実施した。嫌気条件下で 28°C、120 時間の振とう培養を行った。培養後、エタノール生成量を比較した。その結果、*Mucor circinelloides* NBRC 4563 株が 6.32 g/L と最も高いエタノール生成量を示したため、4563 株を PS 発酵糸状菌として選択した。この菌株と、(2)において最適化した酵素カクテル剤および培地成分を用い、PS の同時糖化発酵によるエタノール生産について検討した。100 g/L の PS を基質とし、酵素カクテル剤を 3 g-protein/L (5.52 FPU/g-PS) 添加した培地に前培養した 4563 株を植菌し、

28°C にて振とう培養することにより同時糖化発酵を行った。その結果、エタノール生成速度は向上し、Fig. 2 に示すように培養 36 時間で 6.97 g/L のエタノールが生成できた。しかしこのときの収率は 41.7%と低い結果となった。培地や酵素を最適化することで初期の発酵糖生成やエタノール生産はスムーズに進行するものの、酵素および糸状菌が無機物や有機物による阻害を受けるため、培養後期は発酵糖およびエタノールの生産が滞ったと考えられる。さらに、エタノール量の最大値を示した 36 時間目以降はエタノール量が減少していることから、酵素により生成されるグルコースほとんどないため、糸状菌がエタノールを炭素源として消費していたと考えられる。

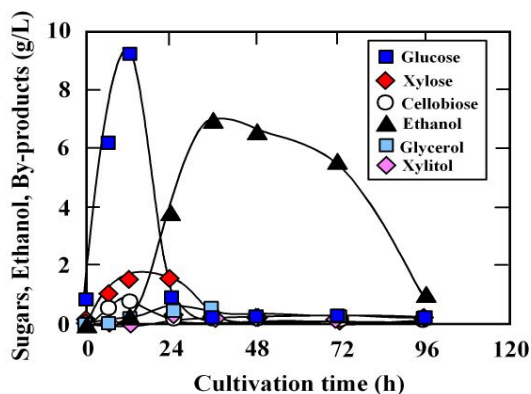


Fig. 2 *M.circinelloides* NBRC 4563 と酵素カクテルを用いた PS の同時糖化発酵

(4) PS からの無機物および有機物の除去およびその処理 PS からのエタノール生産

最適化した酵素カクテルおよび培地成分を適用した PS の同時糖化発酵では、生産速度は向上したものの、エタノール収率は変化しなかった。この原因として考えられるのは、PS に含まれる無機物や有機物による酵素反応および発酵の阻害である。そこで、エタノール生産量を向上させるためには PS から無機物や有機物を除去することが有効であると考えられる。そこでまず、酸を用いた PS からの無機物の除去について検討した。使用した酸は HCl、H₂SO₄、HNO₃、CH₃COOH、HClO₄ である。これらの酸に PS を一晩浸漬し、PS 繊維を分離、水洗、乾燥した後それぞれ成分分析を行った。その結果、これらの処理のうち PS から最も無機物を除去できたのは HCl であった。無機物の大部分を占めるのは填料由来の炭酸カルシウムであるため、HCl を用いた炭酸カルシウムの溶出が最も効果的であったと考えられる。HCl 処理 PS の成分は未処理の PS と比較して無機成分が 13.2%、有機成分が 6.2%減少し、それに伴いセルロースが 13.9%、ヘミセルロースが 8.4% 上昇した(Fig.3)。XRF 解析により無機物に占める Ca の割合が 30.7%から 6.09%まで減少したことも確認できた。

次に、HCl 処理 PS からのエタノール生産

について検討した。100 g/L の HCl 処理 PS を炭素源とし、最適化酵素カクテルと 4563 株を用いた同時糖化発酵を行った。その結果、培養初期の加水分解は未処理 PS の場合よりさらに速やかに進行し、それに伴いエタノール生産量も向上し、120 時間目に 12.5 g/L に達した。HCl を用いた処理により無機物による阻害が軽減されるとともに、セルロースおよびヘミセルロース含量が増加したため、エタノール生産量を向上させることができた。しかし、この時のエタノール収率は 44.6%であり、未処理 PS と比較してほとんど変化していなかった。これは、HCl を用いた処理により無機物（特に Ca）を除去できたものの、残存する有機物（薬剤等）による増殖または発酵への阻害があるためと考えられる。

有機物による阻害を軽減することを目的とし、HCl 浸漬の前に NaOH に浸漬することを検討した。1 M NaOH に PS を一晩浸漬し、次にその溶液から分離した PS を 1 M HCl に一晩浸漬した。さらに HCl 溶液から PS を分離、水洗、乾燥した後、この NaOH-HCl 処理 PS の成分分析を行った。Fig. 3 に示すように、未処理の PS と成分を比較すると、無機物を 19.4%、有機物を 10.1%減少させることができた。それに伴いセルロースおよびヘミセルロースはそれぞれ 21.3%および 8.2%増加した。PS を NaOH に浸漬した後に HCl に浸漬することで、アルカリで薬剤を溶解するとともに PS が膨潤し、より効率的に HCl による無機物の溶解させることができたと考えられる。

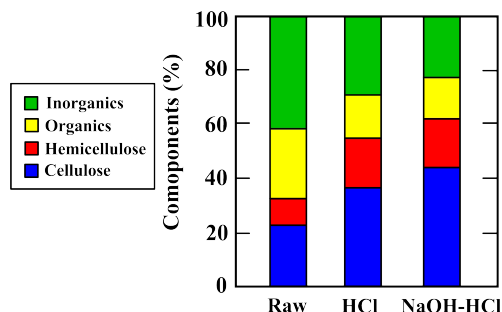


Fig. 3 各処理 PS の成分比

作成した NaOH-HCl 処理 PS を原料とし、4563 株を用いたエタノール生産を検討した。最適化酵素カクテルおよび 4563 株を用い、NaOH-HCl 処理 PS の同時糖化発酵を行った。その結果、Fig. 4 に示すように培養初期の加水分解はさらに効率化し、エタノール生産量も大幅に上昇した。最大エタノール生産量は 21.3 g/L に達し、その収率は 67.2%へ向上した。さらに、培養後期にエタノールが消費されていないことから、PS の加水分解は阻害されることなく継続しており、PS からグルコースが長期的に生産できていると考えられる。

以上の結果より、NaOH および HCl を用いた PS の処理を行うことで、PS に含まれる無機物と有機物（薬剤）を効率的に除去することができることがわかった。また、この処理 PS を原料とし、最適化した酵素カクテルおよ

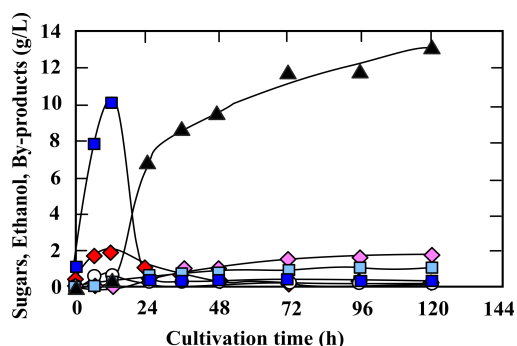


Fig. 4 4563 株と酵素カクテルを用いた

NaOH-HCl 処理 PS の同時糖化発酵

び PS 発酵に適した *M.circinelloides* NBRC 4563 株を用いた同時糖化発酵を行うことにより、PS から効率的にエタノールを生産できることがわかった。一方、処理に使用した NaOH および HCl には PS から溶出した Ca が含まれている。Ca のリサイクルは製紙工程における課題でもあり、今後、この溶液からの炭酸カルシウムの再生について検討を行う予定である。

製紙工場ではパルプの製造にアルカリや酸を使用するため、これらの確保は容易であり、PS の処理には使用済みのアルカリや酸を再利用することも可能である。また、PS 浸漬後の圧搾も既存のプレス機が利用できるため新設する必要がない。このような好条件を活用し、本研究で開発した PS からのエタノール生産プロセスの実用化ができれば、製紙工場における廃棄物の軽減およびエネルギーの生産が同時に可能となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) Bioethanol production from paper sludge using high-performing fungus, Maki Takano and Kazuhiro Hoshino, 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS 2012), Daegu, Republic of Korea, September 16-21 (2012)

(2) Direct bioethanol production from paper sludge by consolidated bioprocessing with new fusion cell of *Mucor* sp., Kazuhiro Hoshino and Maki Takano, 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS 2012), Daegu, Republic of Korea, September 16-21 (2012)

(3) Ethanol production from raw paper sludge by SSF with cellulase cocktail and ethanol-producing fungi, Maki Takano, Yusuke Seto and Kazuhiro Hoshino, 3rd International Cellulose Conference ICC2012, Sapporo, Japan, October 10-12 (2012)

(4) *M.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 回日本生物工学会大会、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 回日本生物工学会大会、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、化学工学会第 78 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、日本農芸化学会 2013 年度大会、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、日本農芸化学会 2013 年度大会、東北大学川内北キャンパス、3C11p07、3/26 (2013)

(9) *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 回日本生物工学会大会、広島国際会議場、2P-145、9/19 (2013)

(10) Development of efficient ethanol production from paper sludge by ethanol-producing *Mucor* sp., Maki Takano and Kazuhiro Hoshino, Asian Congress on Biotechnology 2013, New Delhi, India, December 15-19 (2013)

(11) 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糖化エタノール生産、高野真希、星野一宏、日本農芸化学会 2014 年度大会、明治大学生田キャンパス、3A01a13、3/29 (2014)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：糸状菌を用いる木質系バイオマスからのエタノールの製造方法

発明者：星野一宏、高野真希

権利者：国立大学法人富山大学

種類：特許

番号：特願 2013-202539

出願年月日：25 年 9 月 23 日

国内外の別：国内

名称：製紙廃棄物からのエタノールの製造方法

発明者：星野一宏、高野真希

権利者：国立大学法人富山大学

種類：特許

番号：特願 2013-300843

出願年月日：25 年 9 月 23 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 真希 (TAKANO, Maki)

富山大学・大学院理工学研究部・助手

研究者番号：10444192