

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21199

研究課題名（和文）リサイクルシステムを元にした未利用植物性バイオマスの低エネルギー・コスト型活用法

研究課題名（英文）Utilization of plant biomass with low energy and cost based on the recycle system

研究代表者

佐々木 千鶴 (Sasaki, Chizuru)

徳島大学・大学院生物資源産業学研究部・講師

研究者番号：50452652

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：セルロース系バイオマスである砂糖黍の絞りかすから効率的にセルロースを得るための生物的前処理として白色腐朽菌処理の効果を検討し、処理物を酵素糖化したところ、高い酵素糖化率を得た。また、化学的前処理の一つとして、細胞低毒性のイオン液体を用いて前処理の効果を検討し、高い酵素糖化率を得たことと、前処理にかかるエネルギー利益比は他の粉碎や水酸化ナトリウムを用いたアルカリ処理と比較して高いことが明らかとなった。さらに、イオン液体の使用量削減のため、ジメチルスルホキシドをイオン液体に混合したところ、重量比1:1で混合しても、同量のイオン液体単独で使用して処理した残渣とほぼ同等の酵素糖化率を得た。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the production of glucose from unutilized plant biomass, sugarcane bagasse was used in this study, via enzymatic saccharification. At first, biological treatment using white rot fungi was investigated. After the treatment, the treated residue was applied to enzymatic saccharification, high enzymatic saccharification ratio was achieved. Next, chemical treatment using ionic liquid (IL) was investigated and high enzymatic saccharification ratio was obtained. Furthermore, it was revealed that EPR with the treatment using IL in this study was higher than that of the other pretreatment method such as grinding and alkaline treatment using NaOH. To reduce the use amount of the IL for the pretreatment, DMSO was mixed into the IL (weight ratio, 1:1). As a result, similar high enzymatic saccharification rate relative to the value from only IL was obtained.

研究分野：バイオマス利用

キーワード：バイオマス利用

1. 研究開始当初の背景

未利用のリグノセルロースバイオマスを利用した種々の有用化学物質の生産に関する研究開発はこれまで多く行われており、試料の前処理、糖化、発酵の各プロセスに関する様々な新技術の提案も進んでいる。しかし、大規模工業化に発展している例は少なく、これはプロセス全体にかかる費用対効果の低さがボトルネックとなっているためである。これを克服するためには、個々のプロセスの新規技術開発と共に、原料調達 前処理 糖化 (発酵阻害物除去) 発酵 精製までにかかる全エネルギー・コストの削減が必須となる。現在報告される国内外での開発技術についても個々の新技術の開発に特化したものが多く、それらをプロセスに組み込んだ上でのエネルギー・コストまでをも考慮しているものは少ない。そこで本研究では、エネルギーコスト削減に重きを置いた「前処理 糖化」にかかる技術開発を目的として、「環境に優しい」かつ「低コスト化」をキーワードに研究を実施した。

2. 研究の目的

- (1) セルロース系バイオマスからセルロースを効率良く分離し、取り出すための白色腐朽菌前処理によるリグニン減少量の調査と酵素糖化
- (2) セルロース系バイオマスのイオン液体を反応溶媒として用いた水熱処理のエネルギー利益比
- (3) セルロース系バイオマスのイオン液体と有機溶媒併用前処理による酵素糖化への影響の調査

3. 研究の方法

(1) 試料

セルロース系バイオマス試料としてサトウキビの絞り滓であるバガスを裁断したものの (1 mm 幅×5 cm 長、琉球バイオリソース (株)、沖縄より供与) を使用した。

(2) バガスの白色腐朽菌前処理

バガスの白色腐朽菌前処理には 4 種 (*Ceriporiopsis subvermispota* ATCC 90467, *Coriolus versicolor* IFO 9791, *Lentinus edodes* IFO 6654, *Phellinus* sp. SK M 2102) の白色腐朽菌を使用した。腐朽処理の手順は以下とした。

バガスを三角フラスコに乾燥重量で 5.0 g はかり取り、そこへ小麦ふすまを 0.5 g と蒸留水を 15 ml 添加し、オートクレーブ処理 (121 °C、20 分) した。室温まで冷やした後、上記の白色腐朽菌が生育したポテトデキストロース寒天培地シャーレから直径 1.0 cm のサイズのコルクボーラーでくり抜いた試

料片を 3 つバガスが入ったフラスコへ入れ、培養を開始した。培養期間は 10 週間とし、リグニン量の定量用試料とした。

(3) 成分分析

リグニンの定量：未処理のバガス、白色腐朽菌処理後のバガスのそれぞれ乾燥重量で 0.25 g とり、72%(w/w) の硫酸を 4 ml 加え、ガラス棒でよく攪拌し、室温に 4 時間静置した。その後、内容物を 150 ml の蒸留水と共に三角フラスコに移し、オートクレーブ装置内にて 120 °C、60 分反応させた。冷却後、兵糧 済みのガラス繊維ろ紙 (ADVATEC GA-100) を用いて吸引ろ過を行い、ろ紙とろ紙上の残渣を回収した。回収した残渣は蒸留水で十分に洗浄し、105 °C の乾燥器にて重量変化がなくなるまで乾燥し、ろ紙ごとの重量を測定した。

- セルロースの定量：まず、ホロセルロースを以下のように得た。未処理のバガス、白色腐朽菌処理後のバガスをそれぞれ乾燥重量 0.5 g とり、そこへ蒸留水を 30 ml と亜塩素酸ナトリウムを 0.2 g と酢酸を 40 μl 加えた。ドラフト内にて水浴を 80 °C に設定し、試料が漂白されるまでゆっくりと振とうした。その間、1 時間ごとに亜塩素酸ナトリウムを 0.2 g と酢酸 40 μl を添加した。秤量済みのガラス繊維ろ紙 (GA-100) を用いて内容物をすべて吸引ろ過し、回収した残渣を蒸留水 200 ml とアセトン 20 ml で十分に洗浄し、105 °C の乾燥器にて重量変化がなくなるまで乾燥し、ろ紙ごとの重量を測定した。続いて、得られたホロセルロース 0.2 g をはかりとり、そこへ 17.5%(w/v) の水酸化ナトリウムを 5 ml 添加した。4 時間静置後、ガラス棒を用いて試料を 5 分間押し潰した。20 分間静置後、秤量済みのガラス繊維ろ紙 (GA-100) を用いて吸引ろ過し、残渣を回収した。残渣を 200 ml の蒸留水で洗浄後、10%(v/v) 酢酸水溶液を添加し、5 分間静置した。その後、200 ml の蒸留水で洗浄し、105 °C の乾燥器にて重量変化がなくなるまで乾燥し、ろ紙ごとの重量を測定した。

(4) 酵素による糖化およびその評価

試料 (乾燥重量 0.3 g) を秤量し、0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0、10 ml) を加え、メイセラゼ (明治製菓ファルマ (株)) を基質量の 1/10 になるように添加し、50 °C、140 rpm にて振盪し酵素糖化した。所定の時間 (72 時間) 反応終了後、ろ過により糖化残渣とろ液とに分別した。ろ液は、90 °C の熱水に 10 分間保持し、酵素を失活させた後、グルコース量の定量に供試した。グルコース量はグルコースオキシターゼを用いる酵素法を用いて定量した。酵素糖化率 (%) は以下の式により算出した。酵素糖化率 (%) = { 産生グルコース量 (g/L) × 0.9 / 処理試料中のセルロース量 (g/L) } × 100

(5) イオン液体を用いたバガスの水熱処理

イオン液体は酢酸コリン(シグマアルドリッチジャパン(株))を使用した。カッターミルにより1分間粉碎した1.5 gのバガスを300 mlのナス型フラスコに入れ、4.5 gの酢酸コリンを入れ、110 にて360分、130 にて180分処理した。反応後、135 mlの蒸留水を添加し、吸引ろ過によりろ液と残渣を分離した。吸引ろ過の際、135 mlの蒸留水での残渣の洗浄を4回行った。残渣を酵素糖化に供した。

(6) エネルギー利益比(Energy Profit

Ratio(EPR))の算出

EPRは以下の式で算出した。

$EPR = \frac{\text{エネルギー生産量(kJ/g-バガス)}}{\text{前処理にかかるエネルギー必要量(kJ/g-バガス)}}$

酵素糖化で得られたグルコースがすべてエタノールへ変換されたと仮定し、未処理の乾燥バガス1.0 gからのエネルギー生産量を以下の式を用いて算出した。

$\text{理論エタノール収量(g/g-バガス)} = \frac{\text{グルコース収量(g/g-バガス)}}{0.511}$

$\text{エネルギー生産量(kJ/g-バガス)} = \text{理論エタノール収量(g/g-バガス)} \times 29.75 \text{ (kJ/g)}$

ここで、0.511はグルコースからの理論エタノール変換率であり、29.75 kJ/gはエタノールの燃焼熱である。

イオン液体水熱処理の比較対照として、他の前処理法(粉碎と0.5%NaOHを用いたアルカリ処理(121、15分))のエネルギー必要量も算出した。

$\text{粉碎にかかるエネルギー必要量(J/g-バガス)} = \frac{\text{電力消費(W)} \times \text{処理時間(秒)}}{\text{試料量(g)}}$

アルカリ処理にかかるエネルギー必要量は、バガスと溶媒(水)の加熱のためのエネルギー必要量の総計とした。

$\text{バガス加熱のためのエネルギー必要量(J/g-バガス)} = \text{バガスの比熱(J/g} \cdot \text{K)} \times \{\text{処理温度(K)} - \text{室温(K)}\}$

$\text{バガスの比熱(J/g} \cdot \text{K)} = \frac{\text{含水率(\%)} + 32.4}{100 + \text{含水率(\%)}}$ [本実験では含水率は3.6%を使用した]

$\text{溶媒加熱のためのエネルギー必要量(J/g-蒸留水)} = \text{処理温度における水の比エンタルピー(J/g)} - \text{室温での水の比エンタルピー(J/g)}$

また、酢酸コリンの比熱容量はDSC測定に

より求めた。

(7) イオン液体を用いたバガスの水熱処理
有機溶媒添加前処理

用いた有機溶媒は以下の5種とした。

グリセリン(G)、エチレングリコール(EG)、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、N,N-ジメチルアセトアミド(DMA)、N-メチル-2ピロリジン(NMP)、ジメチルスルホキシド(DMSO)

カッターミルによりバガスを粉碎し(1分)、酢酸コリンによる処理は上記3.5と同様にし、130にて180分反応させた。有機溶媒の種類を検討では、有機溶媒と酢酸コリンを体積比で1:1とし、また、DMSOを用いた混合比率の検討では、DMSOと酢酸コリンの重量比を7:3、5:5、3:7、1:9および0:10(DMSOのみ)とした。処理後の蒸留水により洗浄は上記3.5と同様に行った。洗浄後の残渣を酵素糖化に供した。

4. 研究成果

(1) セルロース系バイオマスからセルロースを効率良く分離し、取り出すための白色腐朽菌前処理によるリグニン減少量の調査と酵素糖化

バガスを4種の白色腐朽菌(*Ceriporiopsis subvermispora* ATCC 90467, *Coriolus versicolor* IFO 9791, *Lentinus edodes* IFO 6654, *Phellinus* sp. SK M 2102)により10週間腐朽処理したバガスのリグニン減少率を調査した。未処理(未腐朽)のバガス中に含まれるリグニンは33.4%であり、この値から減少した割合を減少率として%で表した(表1)。いずれの白色腐朽菌についても、30%前後のリグニンの減少が見られた。また、それぞれを酵素糖化した結果、腐朽処理しないものでは、2.7%の糖化率であったのに対し、白色腐朽菌処理をすると35.1~46.5%の酵素糖化率を得た。これにより、白色腐朽菌処理の酵素糖化前処理としての有効性を示した。さらなる酵素糖化率の上昇のためには、白色腐朽菌処理と水熱処理や粉碎処理との併用処理が必要であると考えられる。また、白色腐朽菌を接種する際に必要である121、15分下の高温高圧滅菌にかかるエネルギー削減を目的として、滅菌温度を105に下げ、食品保存料を添加し、白色腐朽菌を10週間培養し、得られた腐朽材の酵素糖化結果を調査したところ、通常の121条件下と同程度の酵素糖化率を得たことにより、滅菌温度は105まで下げてもその後の腐朽処理は可能であることがわかった。しかし、食品保存料を添加しても、滅菌温度80まで下げると、カビの生育が確認され、酵素糖化への腐朽効果は低下した。

(2) セルロース系バイオマスのイオン液体を反応溶媒として用いた水熱処理のエネルギー利益比

バガスの酢酸コリンによる前処理におけるEPRの比較対照として、カッターミルによる粉碎(30分)と0.5% NaOHによるアルカリ処理(121、20分)のEPRを算出した。未処理のバガスを酵素糖化しても得られるグルコース量は乾燥バガス1gあたり0.091gであるのに対し、いずれの前処理においても得られるグルコース収量は増大し、酢酸コリンを用いた反応では、0.346g(110、360分)、0.355g(130、180分)であった(粉碎とアルカリ処理ではそれぞれ0.415gと0.40g)。また、理論エタノール収量は、各前処理物を酵素糖化して得られたグルコース量から算出すると、0.046g(未処理)、0.176g(酢酸コリン110、360分)、0.181g(酢酸コリン130、180分)、0.211g(粉碎)、0.204g(アルカリ処理)。また、これらから、エネルギー生産量(kJ/g-乾燥バガス)は、1.38(未処理)、5.25(酢酸コリン110、360分)、5.38(酢酸

表1 白色腐朽菌と植菌後10週間後のリグニン減少率と酵素糖化率

白色腐朽菌	リグニン減少率 (%)	酵素糖化率 (%)
腐朽処理なし (オートクレーブ滅菌のみ)	-	7.9 ± 1.8
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> ATCC 90467	28.9 ± 3.2	43.5 ± 1.3
<i>Lentinus edodes</i> IFO 6654	31.3 ± 1.7	46.5 ± 2.3
<i>Phellinus</i> sp. SK M 2102	30.8 ± 0.6	35.1 ± 0.4
<i>Coriolus versicolor</i> IFO 9791	30.1 ± 0.1	36.4 ± 0.7

コリン130、180分)、6.29(粉碎)、6.06(アルカリ処理)と算出した。さらに、エネルギー必要量(kJ/g-乾燥バガス)は、0.45(未処理)、1.30(酢酸コリン110、360分)、1.45(酢酸コリン130、180分)、13.50(粉碎)および8.99(アルカリ処理)となった。以上の数値からEPRを算出すると、粉碎とアルカリ処理では、それぞれ0.47と0.67と1.0を下回る結果となったが、一方で、酢酸コリンを用いた前処理では、反応温度110、360分、反応温度130、180分のいずれ条件においても4.04と3.72の高い値が得られた。これにより、酢酸コリンを用いたバガスの前処理法は効率的な酵素糖化前処理であることが示唆された。

(3) セルロース系バイオマスのイオン液体と有機溶媒併用前処理による酵素糖化への影響の調査

次に、酢酸コリンを用いたバガスの前処理において、酢酸コリンの使用量を削減する目的で、酢酸コリンと各種有機溶媒の併用前処理を検討した。処理条件は前述4-(2)でグルコース収量が最大であった、反応温度110、時間180分とした。また、酢酸コリンと有機溶媒の使用比率は体積比で1:1とした。結果を表2に示す。酢酸コリン単独で使用した場合の酵素糖化率は91%であり、Gを用いた場合では、70.9%と低い酵素糖化率であったが、それ以外の有機溶媒では、80.7~95.7%と高い酵素糖化率が得られた。最も高い酵素糖化率を得たのは、DMSOであり、95.7%であった。この結果を用いて、次に、酢酸コリンとDMSOの最適混合比率(重量比)の検討を行った。比率は、酢酸コリン:DMSOを7:3、5:5、3:7、1:9および0:10(DMSOのみ)とした。結果を表3にまとめた。酢酸コリンとDMSOの重量比率3:7や5:5では、酢酸コリン単独の酵素糖化率と同等の酵素糖化率が得られ、それぞれ93.3%と95.7%が得られた。しかし、重量比率3:7では、88.4%、また、1:9では58.6%とDMSOを単独で使用した場合の酵素糖化率の29.2%へと近づき、低下した。以上の結果より、酢酸コリンを用いてバガスを酵素糖化前処理する際には、DMSOのような安価な有機溶媒を添加溶媒として酢酸コリンに重量比で1:1で添加することで高い酵素糖化率を得ることが、前処理コストの低コスト化に繋がることが明らかとなった。

表2 酢酸コリンへの各種添加溶媒による酵素糖化率とグルコース生産量

添加溶媒	Glc 生産量	
	[未処理バガス1gあたり]	
	Glc 生産量	酵素糖化率(%)
酢酸コリン(単独)	0.36	91.0
G	0.26	70.9
EG	0.30	90.7
DMF	0.33	80.7
DMA	0.31	83.2
NMP	0.34	91.6
DMSO	0.41	95.7

表3 酢酸コリンへの各種 DMSO 添加比率による酵素糖化率

酢酸コリン:DMSO	Glc 生産量 [未処理バガス 1g あたり]	酵素糖化率(%)
7:3	0.38	93.3
5:5	0.41	95.7
3:7	0.37	88.4
1:9	0.23	58.6
DMSO のみ	0.10	0.10

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Ai Asakawa, Tomohiro Oka, Chizuru Sasaki, Chikako Asada, Yoshitoshi Nakamura, Cholinium ionic liquid/cosolvent pretreatment for enhancing enzymatic saccharification of sugarcane bagasse, *Industrial Crops and Products*, 査読有, 86, 2016, 113-119.

Chizuru Sasaki, Yusuke Yoshida, Chikako Asada and Yoshitoshi Nakamura, Total utilization of Japanese pear tree prunings: extraction of arbutin and production of bioethanol, *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 査読有, 18(2), 2016, 385-392.

Ai Asakawa, Misato Kohara, Chizuru Sasaki, Chikako Asada, Yoshitoshi Nakamura, Comparison of choline acetate ionic liquid pretreatment with various pretreatments for enhancing the enzymatic saccharification of sugarcane bagasse, *Industrial Crops and Products*, 査読有, 71, 2015, 147-152.

Chikako Asada, Chizuru Sasaki, Takeshi Hirano, Yoshitoshi Nakamura, Chemical characteristics and enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass treated using high-temperature saturated steam: Comparison of softwood and hardwood, *Bioresource Technology*, 査読有, 182, 2015, 245-250.

Sunita Basnet, Masaya Otsuka, Chizuru Sasaki, Chikako Asada, Yoshitoshi Nakamura, Functionalization of the active ingredients of Japanese green tea (*Camellia sinensis*) for the synthesis of bio-based epoxy resin, *Industrial Crops and Products*, 査読有, 73, 2015, 63-72.

Chikako Asada, Sunita Basnet, Masaya Otsuka, Chizuru Sasaki, Yoshitoshi Nakamura, Epoxy resin synthesis using low molecular weight lignin separated from various lignocellulosic materials, *International Journal of Biological Macromolecules*, 査読有, 74, 2015, 413-419.

Chikako Asada, Chizuru Sasaki, Tomoki Takamatsu, Yoshitoshi Nakamura, Conversion of

steam-exploded cedar into ethanol using simultaneous saccharification, fermentation and detoxification process, *Bioresource Technology*, 査読有, 176, 2015, 203-209

〔学会発表〕(5件)

Chizuru Sasaki, Yusuke Yoshida, Chikako Asada, Yoshitoshi Nakamura Extraction of polyphenol and production of bioethanol from unutilized pear tree prunings, *International Symposium on Life Science & Biological Engineering (ISLSBE 2016)*, 2016.8.25, 池袋サンシャインシティ(東京都豊島区)

香川博之, 岡部義昭, 佐々木千鶴, 中村嘉利, 水蒸気爆砕リグニンの高耐熱電気絶縁樹脂への適用研究, 2015.10.9, 第65回ネットワークポリマー講演討論会, 新潟大学(新潟県新潟市)

古谷卓也, 平野健, 浅田元子, 佐々木千鶴, 中村嘉利, 高活性水蒸気を用いたバイオマス前処理における蒸煮と破碎の効果, 2015.10.27, 第67回生物工学会, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

岡知寛, 佐々木千鶴, 浅田元子, 中村嘉利, イオン液体と有機溶媒を併用したバガスの前処理と酵素糖化, 2015.10.27, 第67回生物工学会, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

香川博之, 岡部義昭, 佐々木千鶴, 中村嘉利, 水蒸気爆砕リグニンを適用した樹脂コンポジット, 2016.3.16, 第7回日本複合材料会議, 京都府民総合交流プラザ京都テルサ, (京都府京都市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 千鶴 (SASAKI CHIZURU)

徳島大学・大学院生物資源産業学研究所・講師

研究者番号 : 50452652