

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22155

研究課題名（和文）ホロセルロース完全エネルギー化を目指した多段階塩触媒加圧型マイクロ波システム創成

研究課題名（英文）Development of a multi-step salt catalyst pressurized microwave treatment system for complete energy conversion of holocellulose

研究代表者

浅田 元子（ASADA, Chikako）

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）・教授

研究者番号：10580954

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：未利用サトウキビバガスからのエタノール製造のために、耐塩性セルラーゼ Meicelaseと耐塩性酵母 Saccharomyces cerevisiae BA11を用いて、無機塩類による加圧マイクロ波水熱処理と同時糖化発酵（SSF）を検討した。各種無機塩を添加した加圧マイクロ波処理サトウキビバガスを用いて、成分分析、酵素糖化、アルコール発酵を実施した。2wt%のMgCl₂、200℃、5 minの加圧マイクロ波処理と無機塩の洗浄処理を行わないSSFにより、最大グルコース収率0.392 g/g-原料と最大エタノール収率0.18 g/g-原料を得た。それらは糖化率99%とエタノール変換率90%に相当した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既往のバイオマス利用には、収率、設備、廃液処理やランニングコスト等さまざまな問題がある。応募者らも水蒸気爆砕等を用いた木質バイオマスの処理を行ってきたが超高温高圧条件でないと前処理効果が小さいことやアルコール発酵阻害物（フルフラールや5-HMF）の大量発生などの問題点があった。バイオマスはこれまで、ペレット燃料がセルロース成分のみに注目されていたが、本提案システムによりすべての原料構成成分を有効に利用できることになる。

研究成果の概要（英文）：To utilize cellulose contained in un-utilized sugarcane bagasse as a substrate for ethanol production, an ecotype system, i.e. pressurized microwave hydrothermal treatment with inorganic salts, and simultaneous saccharification and fermentation (SSF) were studied using salt-tolerant cellulase, i.e. Meicelase, and salt-tolerant yeast, i.e. Saccharomyces cerevisiae BA11. The component analysis, enzymatic saccharification, and alcohol fermentation were carried out using pressurized microwave treated sugarcane bagasse with various inorganic salts. The pressurized microwave treatment using 2 wt% MgCl₂ at a treatment temperature of 200°C for a treatment time of 5 min followed by SSF without washing treatment of inorganic salts provided the maximum glucose and ethanol yields, i.e. 0.392 and 0.18 g/g-raw material, those corresponded to 99 and 90 % of saccharification and ethanol conversion ratios, respectively.

研究分野：生物化学工学

キーワード：バイオエタノール

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食料と競合しない未利用バイオマス(非可食セルロース系バイオマス)の総合的有効利用(バイオ燃料のみでなくバイオ化成品の製造などによる全成分利用)を目指したバイオリファイナリーシステムの開発は、新エネルギーと新高分子マテリアルの需要増加に伴い注目を集めている。国内外で研究が進められているにもかかわらず、実用化・産業化に耐え得るシステムはほとんど無い。その理由は石油由来と比較した際の製造過程と製造費用の過大と製品自体の優劣にある。それゆえ、高品質製品製造利益創出型のシステムを構築することは、将来の日本のエネルギーバランスに関わる一つの大きな課題であるため、これに挑戦したい。既往のバイオマス利用には、収率、設備、廃液処理やランニングコスト等さまざまな問題がある。そのなかで、低環境負荷の水熱処理がバイオマスの前処理法として注目される中、加圧型マイクロ波水熱処理は内部加熱方式のため、装置の大型化時(実用化時)において原料の均一な処理が期待される。また、この処理は同温度の水熱処理と比較して消費エネルギーが極めて小さい。さらに、塩触媒による前処理効果や様々な塩がどのように作用するかは判明しておらず、最適条件も不明であるため、塩触媒による前処理効果の究明が望まれている。

2. 研究の目的

本研究は、未利用バイオマスである草本類を原料として実用化・産業化が可能な製品を製造し、利益創出・エコ型のバイオリファイナリーシステムを開拓することを目的とする。本提案システムは、燃料と同時に高付加価値物質を生産できる、塩触媒加圧型マイクロ波水熱処理、耐塩耐熱性の酵素と酵母による糖化と発酵、発酵残渣からの有用製品産出を併合した、省エネ、低コスト、低環境負荷かつ減工程型システムである。

3. 研究の方法

非可食性バイオマス利用に不可欠である前処理工程(強固なネットワークを解すための様々な方法が試されており最有効手段は確立されていない)には塩触媒型マイクロ波水熱前処理(処理後に中和の必要のないNaClやMgCl₂などの塩を触媒とする)を用いる。従来水熱処理(高温高圧水処理や水蒸気爆砕など)よりも低温低圧処理が可能であり、既往システムの問題点をクリアできる。草本類の一つであるサトウキビバガス(砂糖黍の絞り滓)に対する効果を明らかにし、前処理効果の高い最適処理条件(目標値:リグニンの分解率80%以上)を決定する。また、効果的な塩触媒を検討する。耐熱耐塩である酵素と酵母を利用することにより、工程のスキップが可能であり、酵素比による相乗効果も大きいためその最適比も明らかとする。現在使用している耐熱耐塩性酵母にキシロース並行発酵性を付与し1種のみを使用により発酵を行うことにより最適条件確立を試みる。アルカリや酸を使用していない処理物より得られた糖化工程で単糖となっていないオリゴ糖は生理機能性食品としての使用が可能である。全成分有効利用のためにはホロセルロース(セルロース、ヘミセルロースの総称)以外の主成分リグニンが課題となるが電子基板材料として使用可能である低分子量リグニン(エポキシ樹脂原料)を分離するための最適な抽出溶媒および抽出方法について検討する。

4. 研究成果

図1は種々の塩触媒を2wt%添加し、200°C、5minで加圧マイクロ波水熱処理を行ったサトウキビバガスの組成を示す。成分分析の結果、水のみを用いてサトウキビバガスに加圧マイクロ波処理を行った場合でも、未処理のサトウキビバガス(コントロール)と比較して、ヘミセルロースと酸不溶性物質(高分子リグニン)の比率が大幅に減少していることがわかった。また、加圧マイクロ波処理のみでも、200°C、5分間でサトウキビバガス中のヘミセルロースとリグニンを分解する効果があることがわかった。このことから、加圧マイクロ波処理によってサトウキビバガスから多量の溶解成分、すなわちフルフラール、5-HMF(5-hydroxyl methyl furfural)、その他の分解物(酢酸、ギ酸、レブリン酸)が生成し、加圧マイクロ波処理による分解過程で溶解していたことが推測される。溶解した成分の大部分は、ヘミセルロースが分解され、セルロースがセルラーゼに接近しやすくなることで生成されると思われる。無処理試料と比較して、加圧マイクロ波アシスト無機塩処理では、溶存分量が著しく増加した。その量は、NaCl、MgCl₂、CaCl₂、FeCl₃、H₂SO₄の順で増加した。特にMgCl₂、CaCl₂、FeCl₃、H₂SO₄では、ほとんどのヘミセルロースが溶解成分に分解され得る。各無機塩は水に溶解すると、水中で陽イオンと陰イオンに分離する。無機塩が溶解した溶液にリグノセルロース系バイオマスを含浸させると、無機塩が分離して生じたカチオンがルイス酸として働き、ヘミセルロース分子のみならずセルロース分子鎖間のグリコシド結合の切断が促進される。ヘミセルロースを溶出させて植物組織を多孔質にすることで、酵素とセルロースの接触面積を増やし、糖化効率を高めることが知られている。水のみではセルロースの減少はほとんど見られず、減少率は1%程度であった。水のみを用いた加圧マイクロ波処理でセルロースの直接糖化を行うためには、200°C、5minの条件ではセルロース分子と分子鎖のグリコシド結合を切断することができないことが考えられる。触媒を用いた場合、サトウキビバガス中のセルロース含有量は、NaCl、MgCl₂、CaCl₂ではほとんど減少しなかった。

が、 FeCl_3 、 H_2SO_4 では大きく減少した。これは、2 wt% FeCl_3 水溶液 (pH 1.8) および 2 wt% H_2SO_4 水溶液 (pH 0.6) の酸性により、セルロースのほとんどがグルコースに加水分解され、その後 5-HMF などの分解生成物が生じるためである。1 g のサトウキビバガスを FeCl_3 および H_2SO_4 で加圧マイクロ波処理した後の濾液には、それぞれ 0.16 および 0.15 g のグルコースが含まれていた (データは示されていない)。1 g のサトウキビバガスのセルロース含有量は 0.39 g であるので、 FeCl_3 および H_2SO_4 を用いた加圧マイクロ波処理により、それぞれ 40.0 および 34.7% の糖化率を直接得ることができた。これらの方法では、酵素を使用せずに直接ある程度のグルコースが得られたことから、酵素の使用量を減らすことができ、サトウキビバガスの酵素糖化とアルコール発酵の前処理として有効であると考えられる。しかしながら、 FeCl_3 および H_2SO_4 で処理した試料 1 g の濾液中のアルコール発酵阻害物質である 5-HMF およびフルフラールの量は、それぞれ 0.014 と 0.065 g、0.0086 と 0.067 g となった。5-HMF とフルフラールの濃度は、 FeCl_3 ではそれぞれ 0.93 と 4.33 g/l、0.57 と 4.47 g/l に相当した。これらの値は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の成長を阻害する濃度を超過しているため、処理後のサトウキビバガス混合物をそのままエタノール発酵に使用することはできない。したがって、 FeCl_3 や H_2SO_4 を触媒として使用する場合は、活性炭やイオン交換樹脂、過剰石灰処理などによりこれらの阻害物質を除去し、運転条件の最適化により糖化率を高めることが必要であることがわかった。

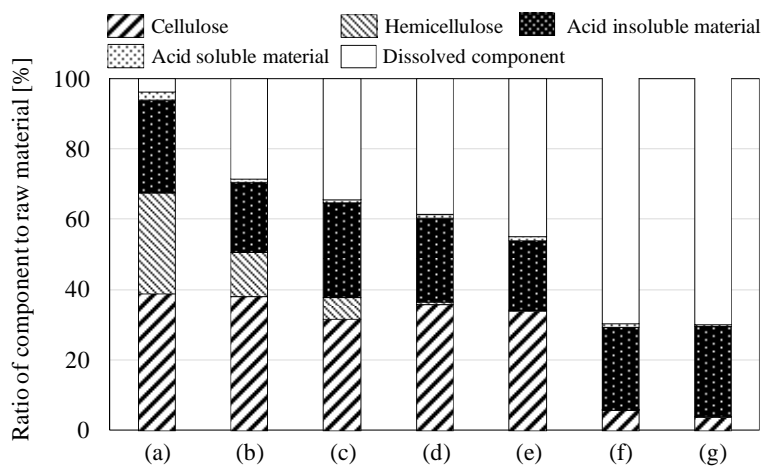


図1 種々の塩触媒を 2 wt% 添加し、200 °C、5 min で加圧マイクロ波水熱処理を行ったサトウキビバガスの組成、(a) 未処理 (コントロール), (b) 水のみ, (c) NaCl, (d) MgCl_2 , (e) CaCl_2 , (f) FeCl_3 , (g) H_2SO_4 .

図2は種々の塩触媒を 2 wt% 添加し、200 °C、5 min で加圧マイクロ波水熱処理を行った場合に得られたサトウキビバガス残渣の酵素糖化におけるグルコース生成量の経時変化を示す。水による加圧マイクロ波処理では、72 h 後に 0.270 g/g-原料 (糖化率: 64.1%) のグルコース生成量が得られ、未処理のバガスから得られる 0.091 g/g-原料 (糖化率: 21.1%) に比べて 3 倍以上の糖化率となった。触媒を使用した場合、糖化率は大幅に上昇した。NaCl、 MgCl_2 、 CaCl_2 、 FeCl_3 、 H_2SO_4 を用いた場合の糖化率は、それぞれ 60.0、91.0、91.4、93.5、93.3% である。 MgCl_2 、 CaCl_2 、 FeCl_3 を用いた場合の糖化率は、NaCl を用いた場合の糖化率よりはるかに高い。これは、各塩の陽イオンの価数が関係していると思われる。この実験で使用した塩の価数は、1 価 (NaCl) 、2 価 (MgCl_2 、 CaCl_2) 、3 価 (FeCl_3) である。カチオンは価数が高いほど電荷が大きくなり、リグニンの α -O-4 結合や β -O-4 結合だけでなく、バガスに含まれるセルロースのグリコシド結合も切断され、高い糖化率が得られる。したがって、塩触媒を用いたバガスのマイクロ波処理において、糖化率を高めるためには、2 価以上のカチオンからなる塩が必要であると考えられる。また、 FeCl_3 および H_2SO_4 を用いた場合、糖化率は 93.5% および 93.3% と比較的高いが、グルコース収率はそれぞれ 0.062 および 0.041 g/g-原料という非常に小さい値であった。この値は、未処理のバガスの値、すなわち 0.091 g/g-原料よりも低い。これは、前述したように、 FeCl_3 や H_2SO_4 の強酸性により、バガス中のセルロースが分解され、グルコースや 5-HMF などの溶解成分として濾液に流出したためである。すなわち、 FeCl_3 および H_2SO_4 を用いた固形分回収率は、図1に示すように、それぞれ 29.7% および 28.9% と非常に低いものであった。その結果、マイクロ波処理後の残渣には少量のセルロースが含まれており、酵素糖化を行ったとしても、分解されるセルロースがほとんど存在しないため、必然的にグルコースの生成量が極めて少なくなってしまった。一方、NaCl、 MgCl_2 、 CaCl_2 を用いた場合、グルコース収量はそれぞれ 0.207、0.360、0.347 g/g-原料であった。以上の結果から、バガスのマイクロ波処理に最適な無機塩触媒は、グルコース収量が最も高い、すなわち 0.360 g/g-原料である MgCl_2 であると考えられる。そこで、以下の実験では、 MgCl_2 を用いた加圧マイクロ波処理を行った。

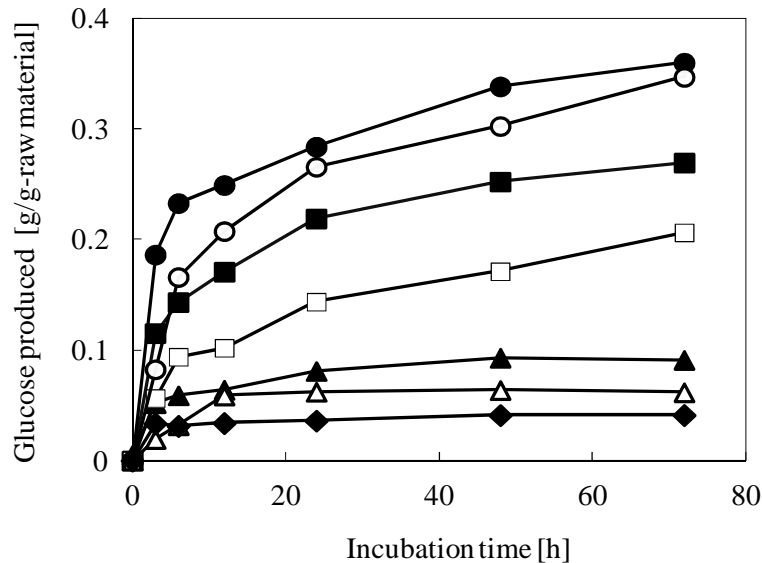


図2 種々の塩触媒を2 wt%添加し、200 t、5 min で加圧マイクロ波水熱処理を行った場合に得られたサトウキビバガス残渣の酵素糖化におけるグルコース生成量の経時変化、○：未処理（コントロール）、□：水のみ、■：NaCl、●：MgCl₂、△：CaCl₂、▲：FeCl₃、◆：H₂SO₄。

図3は種々の処理温度と処理時間で MgCl₂ を添加して加圧マイクロ波処理を行った場合に得られたサトウキビバガス残渣の酵素糖化におけるグルコース生成量の経時変化を示す。MgCl₂ 濃度、処理温度、処理時間の増加に伴い、グルコース生成量は増加した。最大グルコース生成量、すなわち 0.36 g/g-原料は、2 wt% MgCl₂、200t、5 min で得られ、糖化率[グルコース生成量(g)/(試料中のセルロース量(g) × 1.11)] × 100] は91%と高い値になった。したがって、サトウキビバガスの効果的な糖化には、加圧マイクロ波処理として MgCl₂ 濃度や処理温度を高くし、処理時間を長くする必要はない(消費エネルギーやコスト削減可能)と思われる。

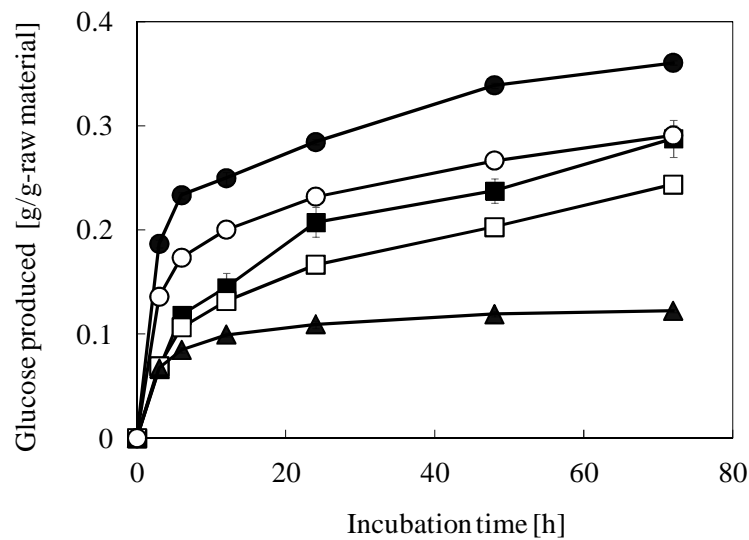


図3 種々の処理温度と処理時間で MgCl₂ を添加して加圧マイクロ波処理を行った場合に得られたサトウキビバガス残渣の酵素糖化におけるグルコース生成量の経時変化、●：2 wt%, 180°C, 5 min, ○：2 wt%, 190°C, 5 min, ■：2 wt%, 200°C, 5 min, □：1 wt%, 200°C, 5 min, ▲：2 wt%, 200°C, 2 min。

図4は MgCl₂ を除去するための洗浄処理を行わないサトウキビバガス処理物と、MgCl₂ を除去するための洗浄処理を行ったサトウキビバガス処理物の残渣との酵素糖化の比較である。洗浄処理を行わない場合、72 h の培養で最大グルコース生成量 (0.39 g/g-原料) が得られ、この値は糖化率 99% に相当する。一方、洗浄を行った場合、72 h の培養で最大 0.36 g/g-原料のグルコースが得られた。さらに、阻害作用が認められなかったことから、2 wt% MgCl₂ はメイセラゼの酵素活性を阻害しないと考えられる。その結果、サトウキビバガスの処理物を洗浄処理せずに酵素糖化することは、グルコースの生成量を増加させるために非常に有効であることが判明した。

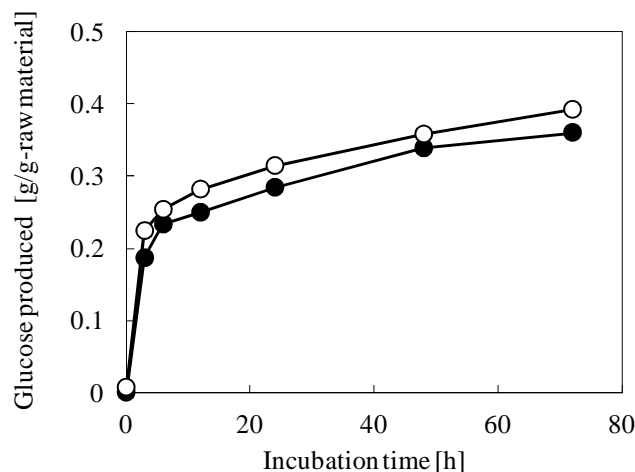


図4 2 wt% MgCl₂を添加した加圧マイクロ波水熱処理(200℃, 5 min)したサトウキビバガスの酵素糖化、○: 無機塩除去のための洗浄処理を行わないサトウキビバガス処理物、●: 無機塩除去のための洗浄処理を施したサトウキビバガス処理物の残渣。

図5は MgCl₂ 除去のための洗浄処理を行わないサトウキビバガス処理物と MgCl₂ 除去のための洗浄処理を行ったサトウキビバガス処理物の残渣の同時糖化発酵SSFの比較である。培養時間の増加とともにエタノール生成量が急増し、MgCl₂の添加にかかわらずグルコースの蓄積は認められなかったことから、本実験で用いたアルコール発酵微生物が耐塩性酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* BA11) のため、MgCl₂の細胞増殖阻害作用がないSSFが実施されたと考えられる。さらに、従来の酵母である *Saccharomyces cerevisiae* 101557 を用いた場合、洗浄処理を行わないサトウキビバガス処理物のSSFでは、細胞増殖だけでなくアルコール生産も観察されなかった(データは示されていない)。洗浄処理を行った場合、最大エタノール生産量は0.13 g/g-原料であった。一方、洗浄処理を行わない場合の最大エタノール生産量は約1.5倍、すなわち0.18 g/g-原料であった。この値は、エタノール変換率 $\left[\frac{\text{エタノール生産量 (g)}}{\text{前処理バガス中のセルロース含有量 (g)} \times 1.1 \times 0.51} \right] \times 100$ が約90%に相当する。洗浄処理を行わなかった場合のエタノール生産量が洗浄処理を行った場合よりもはるかに高かった理由は、洗浄処理を行わなかったサトウキビバガスは、洗浄処理を行った場合と比較してセルロースの加水分解により生成するグルコースを多く含んでいたためと考えられる。この結果から、耐塩性酵母を用いれば、サトウキビバガス処理物の洗浄処理なしのSSFは非常に有効であり、MgCl₂除去工程を省くことができる。したがって、処理時間や処理エネルギーを短縮できるだけでなく、洗浄処理によるサンプルの損失を回避することが可能である。

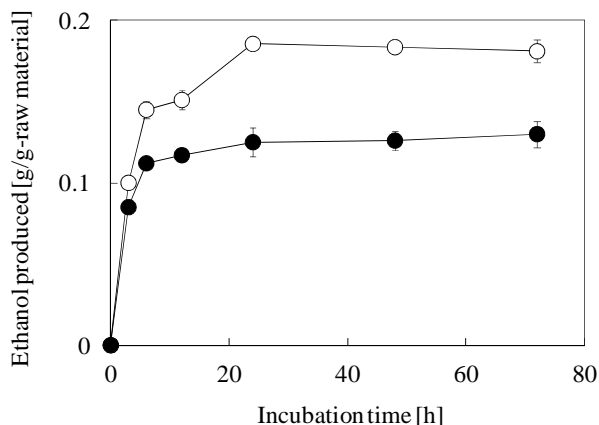


図5 2 wt% MgCl₂を添加した加圧マイクロ波水熱処理(200℃, 5 min)したサトウキビバガスのSSF、○: 無機塩除去のための洗浄処理を行わないサトウキビバガス処理物、●: 無機塩除去のための洗浄処理を施したサトウキビバガス処理物の残渣。

未利用植物性バイオマスであるサトウキビバガスからのエタノール製造について、無機塩を添加した加圧マイクロ波水熱処理と耐塩性酵母によるアルコール発酵について検討した。サトウキビバガスの酵素糖化を促進する塩触媒加圧マイクロ波処理において、MgCl₂が最適な無機塩触媒であった。本エタノール製造法は、省エネルギー、低コスト、低環境負荷、殺菌処理不要など多くの利点を有しており、実用化を目指した有効なエタノール製造システムとして期待される。また、発酵残渣中の低分子量リグニンは樹脂の原料として利用可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Asada Chikako, Sasaki Chizuru, Oka Chihiro, Nakamura Yoshitoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Ethanol Production from Sugarcane Bagasse Using Pressurized Microwave Treatment with Inorganic Salts and Salt-Tolerant Yeast	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Waste and Biomass Valorization	6. 最初と最後の頁 2001～2007
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12649-018-0527-z	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅田 元子
2. 発表標題 木質バイオマスの総合的有効利用法の検討
3. 学会等名 日本防水工法開発協議会冬季研究開発会議（Web会議）（招待講演）
4. 発表年 2022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	中村 嘉利 (NAKAMURA Yoshitoshi) (20172455)	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）・教授 (16101)	
研究分担者	阪本 鷹行 (SAKAMOTO Takayuki) (90740332)	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）・講師 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------