

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630399

研究課題名(和文)高活性水蒸気爆砕を用いたセルロース系バイオマスの水溶性糖類への直接変換

研究課題名(英文)Direct conversion of cellulosic biomass into water-soluble saccharides by high activity steam explosion

研究代表者

中村 嘉利(Nakamura, Yoshitoshi)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・教授

研究者番号：20172455

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に水蒸気爆砕処理あるいはマイクロ波処理を適用して前処理と直接糖化を試みた。水蒸気爆砕処理(蒸煮圧力55 atm、蒸煮時間5分)したタオル100 gからは、直接糖化されて得られたグルコースが18.8 gと処理残渣を酵素糖化して得られたグルコースが20.6 gの併せて39.4 gが得られた。一方、0.5 wt%の希硫酸を添加溶媒としたマイクロ波処理(200℃、処理時間2分)では、同様に、直接糖化および酵素糖化により得られたグルコースが37.7 gと41.5 gの併せて79.2 g得られた。

研究成果の概要(英文)：In order to produce glucose from cellulosic biomass directly, pretreatment using steam explosion or microwave irradiation treatment were carried out. In case of steam explosion (steam pressure 55 atm, steaming time 5 min), 18.8 g of direct hydrolyzed glucose and 20.6 g of enzymatic hydrolyzed glucose from steam exploded residue (solid phase), i.e. total 39.4 g of glucose, were obtained per 100 g of dry towel. In case of microwave irradiation treatment (irradiation temperature 200℃, irradiation time 2 min) using 0.5 wt% of dilute sulfuric acid as reaction solvent, 37.7 g of direct hydrolyzed glucose and 41.5 g of enzymatic hydrolyzed glucose from microwave irradiated residue (solid phase), i.e. total 79.2 g of glucose, were obtained per 100 g of dry towel.

研究分野：バイオマス変換工学

キーワード：バイオマス

1. 研究開始当初の背景

バイオマス由来製品(セルロース成分を原料としたバイオ燃料やバイオ化成品)の製造においてはセルロースをグルコースに変換することが必要であるが、従来までの硫酸法や酵素法では環境負荷やコストの面で問題があり、新規な方法の開発が望まれてきた。近年、亜臨界水(水と水蒸気の区別がなくなる臨界点より低い温度・圧力の高圧高温水)を用いて種々の有機物を溶解したり、迅速に分解・低分子化する研究が行われてきた。亜臨界水処理は水と熱のみを利用したクリーンな反応であり、環境保全型分解処理技術として注目されているが、セルロース系バイオマスのグルコース変換に適用する場合には、(1)試料の粉末化が必要、(2)セルロースの過分解によるグルコース生成量の低下、(3)装置のスケールアップが困難などの問題点があった。

本研究では、高活性水蒸気爆砕(従来の水蒸気爆砕よりもかなり高い 260-285 °C、5-7 MPa の温度・圧力での処理であり、セルロースの過分解が起らない急熱・急冷操作が可能)を用いてブレイクスルーし、セルロース系バイオマスから高収率で水溶性糖類(グルコースやセロオリゴ糖)を得るための最適操作方法を決定する。

2. 研究の目的

高活性水蒸気爆砕法および他の水熱処理法を用いたセルロース系バイオマスの水溶性糖類への直接変換法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 試料

セルロース系バイオマスの試料として、コットン製のタオルを裁断(縦 2 cm × 横 2 cm)したものを供した。本実験で使用したタオルはセルロース 89.87%とヘミセルロース 3.58%およびその他の水不溶性物質 6.54%から構成されている。

(2) タオルの水蒸気爆砕前処理

水蒸気爆砕処理装置(NK-2L, 日本化学機械製造(株))を用いた。処理方法は、タオル 50 g を反応器に入れ、内部の空気を水蒸気に置換した後、所定圧力の飽和水蒸気を反応器内に導入し、所定時間蒸煮後、瞬時に大気圧まで減圧し、水蒸気爆砕処理タオルを得た。処理に用いた水蒸気圧力は 50 (264 °C) および 60 (276 °C) atm とし、蒸煮時間は 1, 3, 5, 10, 15 および 20 分とした。ただし、水蒸気圧力 60 atm のみ蒸煮時間は 1, 3, 5 分とした。

(3) 水蒸気爆砕処理タオルの成分分析

処理タオルの乾燥重量 0.2 g に対して 300 ml の蒸留水を添加し、24 時間攪拌後、吸引濾過によりろ別し、ろ紙ごと 105 °C オープン

で 24 時間乾燥しその重量を測定し、水不溶性物質とした。水不溶性物質に含まれるセルロース量は硫酸加水分解法(乾燥試料 0.2 g に 3.0 ml の 72 wt%硫酸を添加し、室温にて 4 時間静置する。その後 73.1 ml の蒸留水を添加し、硫酸濃度を 4 wt%とし、121 °C にて 60 分間オートクレーブ処理)にて得られたグルコース量をセルロース量に換算した。ろ液に含まれる全糖量はフェノール硫酸法にて、グルコースおよびセロピオースについては高速液体クロマトグラフィーで分析した。分析温度は 65 °C、溶離液および溶出速度はそれぞれ 5.0 mM の硫酸水溶液、0.6 ml/min とし、カラムは Aminex HPX-87H (Bio-Rad) を用いた。

(4) 水蒸気爆砕処理タオルの形態観察

水蒸気爆砕処理タオルは卓上顕微鏡(Miniscop[®] TM3030、(株)日立ハイテクノロジー)により形態観察を行った。観察に用いた試料は、水蒸気爆砕処理したタオルを乾燥させずにそのまま用いた。

(5) タオルのマイクロ波照射処理

マイクロウェーブ合成装置(2.45 GHz, Initiator+, バイオタージジャパン(株))を用いた。タオル 0.5 g を Initiator+ 専用の 20 ml スケールの反応試験管に入れ、添加溶媒を 10 ml 添加し、200 °C にて所定の時間照射し、マイクロ波処理タオルを得た。ただし、タオルは 2 cm × 2 cm に裁断したものを試験管サイズに適合させるためにさらにミル処理(2 分, ワンダークラッシュミル, D3V-10 (大阪ケミカル(株)))して粉碎したものを使用した。マイクロ波照射時間は 2 分と 5 分を検討し、溶媒の検討として、蒸留水と希硫酸(0.5 および 1.0 wt%)を用いた。

(6) マイクロ波照射処理タオルの成分分析

反応試験管のすべてを吸引ろ過し、ろ紙に残ったものを 105 °C オープンで 24 時間乾燥し、その重量を測定し、水不溶性物質とした。ろ液に溶解したものは水可溶性物質とし、含まれる全糖量、グルコース量は 3-3 と同じ方法により測定した。

(7) 各処理物の水不溶性物質の酵素糖化

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(48 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を用いて算出した。

$$\text{糖化率(\%)} = [\text{生成グルコース量(g)} / 1.11 \times \text{セルロース量(g)}] \times 100$$

4. 研究成果

(1) タオルの水蒸気爆砕処理

タオルを水蒸気爆砕処理した結果、蒸煮時間、温度の上昇に伴い、試料の繊維が確認されなくなり、液化が見られた。さらに、これらのうち、未処理のものおよび各水蒸気圧力の蒸煮時間5分のものについてSEM観察を行ったところ、未処理でははっきりとタオルの繊維が確認できるのに対し、水蒸気爆砕処理を施すことにより、繊維が解繊され、その度合いは条件が厳しくなるほど大きいことがわかった(図1)。次に、水蒸気爆砕処理したタオルの成分の分析を行った。結果を図2に示す。いずれの蒸煮圧力においても蒸煮時間が長くなるのに伴い、成分中の水不溶性物質が減少し、可溶化したグルコース量が増加した。可溶化した水溶性糖量の最大値が得られたのは、55atmの蒸煮圧力で5分処理したものであり、処理物の44.4%を示し、このうちグルコースは18.8%を占めていた。また、このとき水不溶性物質は処理物全体の43.2%にまで減少し、そのうちセルロースの占める割合は56.8%であった。しかし、50atmであれば10分、55atmであれば5分を境にそれ以上の蒸煮時間処理を行うと、再び水不溶性物質の割合が増大し、可溶化したグルコースも観測されなくなり、一方で糖類以外の水可溶性物質の増大が見られた。これらは、グルコースの過分解による5-ヒドロキシメチルフルフラール(HMF)や有機酸の産生およびこれらによる糖類やHMFとの再重合による水不溶性物質の産生等に起因していると考えられる。さらに、水蒸気爆砕処理と酵素糖化によりタオルから得られる全グルコース量を調査するために、水不溶性物質の酵素糖化を行った。反応時間72hにおいて、酵素糖化率84.1%を達成し、一方で処理していないタオルを酵素糖化したものの酵素糖化率は30.1%であった。この結果は、先の図1のSEM写真に示したとおり、水蒸気爆砕処理を行ったタオルでは、繊維が解繊され、表面積が増えたことにより酵素が基質であるセルロースに、より接

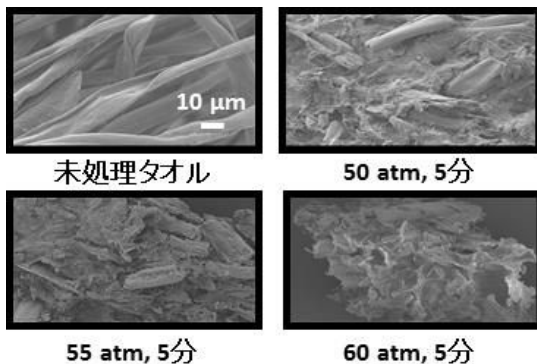


図1 種々の水蒸気爆砕処理条件で処理したタオルの顕微鏡による形態観察

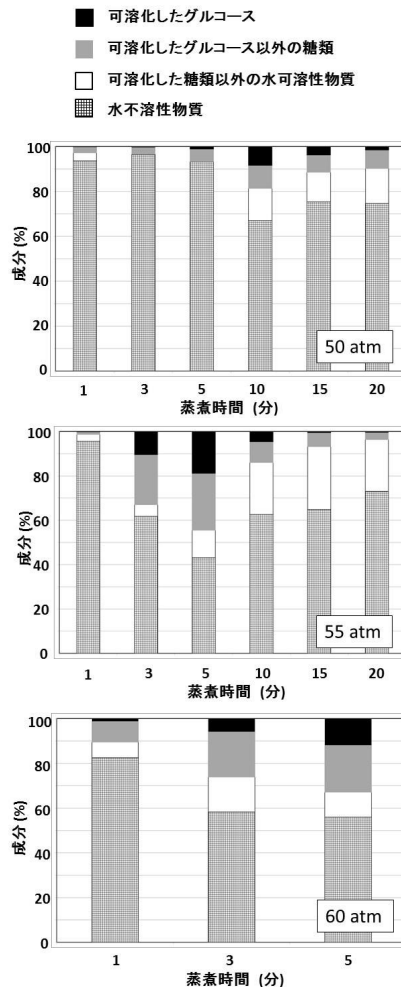


図2 種々の水蒸気爆砕処理条件で処理したタオルの成分

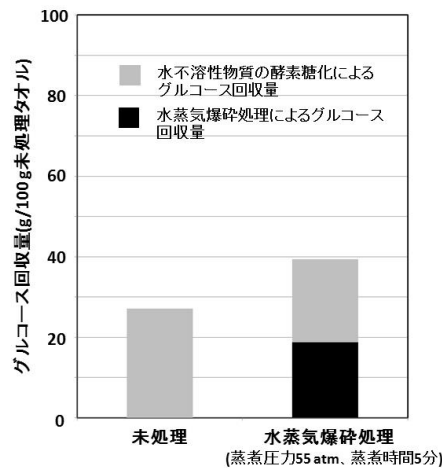


図3 水蒸気爆砕処理したタオルから得られる総グルコース量

触しやすくなったためだと考えられる。以上の結果から、未処理タオル100gから水蒸気爆砕処理と水不溶性物質の酵素糖化の双方から得られる総グルコース量を図3に示す。未処理のタオルを酵素糖化したものからは、タオル100gあたり27.1g得られるのに対し、水蒸気爆砕処理と酵素糖化を併用したものは、水蒸気爆砕処理からは可溶化したグルコースは18.8g、水蒸気爆砕処理後の水不溶

性物質の酵素糖化からは 20.6 g の併せて総グルコース量として 39.4 g であった。これにより、タオルの水蒸気爆砕処理により、得られるグルコース量は増加し、水蒸気爆砕処理には酵素糖化のための前処理と直接セルロースのグルコースへの可溶化の二つの意義があることが明らかとなった。次に、同じ水熱前処理法であるマイクロ波照射処理との比較を行うこととした。

(2) タオルのマイクロ波照射処理

タオルを裁断したものをさらにカッターミルにより粉碎したものを試料として用い、マイクロ波照射処理を行った。照射条件は 200 において 5 分間保持し、添加溶媒は蒸留水と希硫酸(0.5 および 1.0 wt%)を用いた。それぞれの添加溶媒により処理したタオルの成分分析結果を図 4 に示す。希硫酸溶媒を用いたものでは水不溶性物質の減少が見られ(0.5 wt%では 49.4%、1.0 wt%では 27.4%、そのうちセルロース成分はそれぞれ 89.5%と 85.2%)、それは硫酸濃度が高い方が顕著であった。また、可溶化したグルコースは硫酸 0.5 wt%では、34.1%、また、硫酸 1.0 wt%では 37.7%得られた。これらの値は、水蒸気爆砕処理で可溶化したグルコース量よりも多いことがわかった。水蒸気爆砕処理と同様に、マイクロ波照射処理と水不溶性物質の酵素糖化によりタオルから得られる総グルコース量を調査するために、水不溶性物質の酵素糖化を行った。反応時間 72 h において、硫酸 0.5 wt%と 1.0 wt%を添加してマイクロ波処理したタオルの水不溶性物質の酵素糖化率はそれぞれ 99.5%および 84.5%であり、この結果をもとに未処理タオル 100 g からマイクロ波照射処理と水不溶性物質の酵素糖化の双方から得られる総グルコース量を算出したところ、78.1 g(硫酸 0.5 wt%)と 57.4 g(硫酸 1.0 wt%)

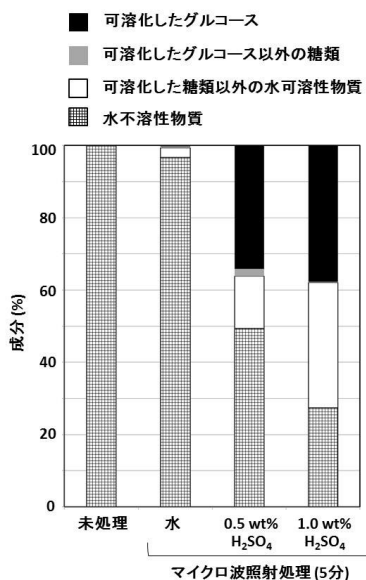


図 4 マイクロ波照射処理したタオルの成分

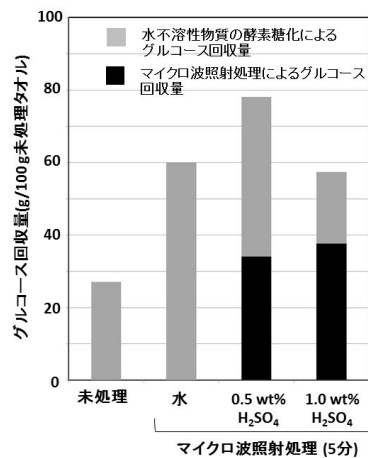


図 5 マイクロ波照射処理したタオルから得られる総グルコース回収量

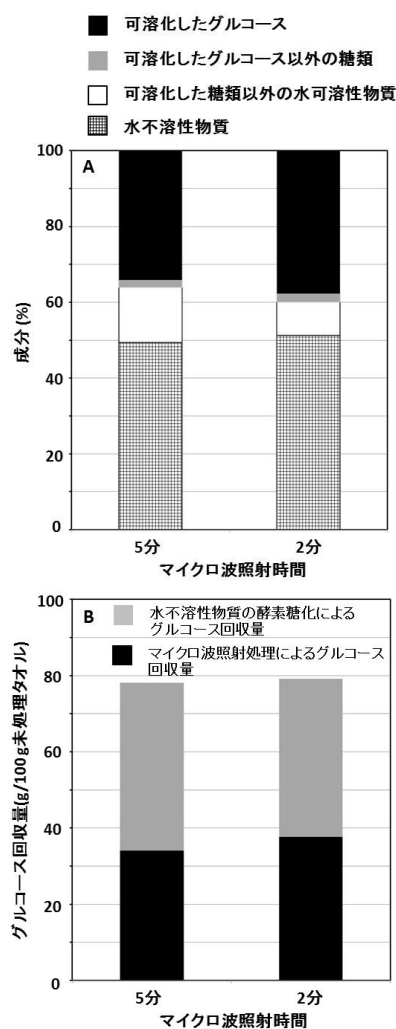


図 6 タオルのマイクロ波照射処理における照射時間の影響

であった(図 5)。この二条件間で得られる総グルコース量の差は、マイクロ波照射処理後の水不溶性物質の残存量と糖類以外の水可溶性物質の存在割合に起因している。これは、(1)水蒸気爆砕処理の項でも述べたとおり、セルロースが加水分解されてグルコースとなった後、さらにグルコースの過分解が起

り、水溶性の HMF や有機酸を遊離していることが考えられる。以上の結果から、マイクロ波照射処理の際には、希硫酸を添加溶媒として用いた方がより多くのグルコースを得ることができるが、至適な硫酸濃度が存在することが示唆された。さらに、マイクロ波照射処理における照射時間を 2 分に短縮してそれぞれの処理物の成分と得られる総グルコース量を比較した。結果を図 6 に示す。この結果、照射温度 200、添加する希硫酸濃度が 0.5 wt% の場合には、照射時間を 5 分から 2 分としても得られる総グルコース量には差はないことが明らかとなった(可溶化 37.7 g と酵素糖化 41.5 g の併せて総グルコース量 79.2 g)。これにより、本研究での 200 での最適マイクロ波照射条件は添加溶媒として 0.5 wt% 希硫酸、照射時間 2 分と決定した。本研究課題で用いた条件でのマイクロ波照射処理と酵素糖化を組み合わせることによってセルロース試料から多くのグルコースを得ることが可能であることがわかったが、今後はさらなる条件の最適化が必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

(1) 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, 245-250, 2015

DOI:10.1016/j.biortech.2015.02.005

(2) 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, 63-72, 2015

DOI:10.1016/j.indcrop.2015.03.091

(3) 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, 413-419, 2015

DOI:10.1016/j.ijbiomac.2014.12.039

(4) 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, 203-209, 2015

DOI:10.1016/j.biortech.2014.11.039

(5) Chizuru Sasaki, Yohei Kushiki, Chikako Asada and Yoshitoshi Nakamura

Acetone-butanol-ethanol production by separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SSF) methods using acorns and wood chips of *Quercus acutissima* as a carbon source, *Industrial Crops and Products*, 査読有, 62, 286-292, 2014

DOI:10.1016/j.indcrop.2014.08.049

(6) Chizuru Sasaki, Masaki Ichitani, Ko-Ki Kunimoto, Chikako Asada and Yoshitoshi Nakamura

Extraction of arbutin and its comparative content in branches, leaves, stems, and fruits of Japanese pear *Pyrus pyrifolia* cv. Kousui, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 78(5), 874-877, 2014

DOI:10.1080/09168451.2014.893185

(7) Chizuru Sasaki, Ryosuke Okumura, Chikako Asada and Yoshitoshi Nakamura

Steam explosion treatment for ethanol production from pear tree prunings by simultaneous saccharification and fermentation, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 78(1), 160-166, 2014

DOI:10.1080/09168451.2014.877818

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) 平野健, 浅田元子, 佐々木千鶴, 中村嘉利, 木質物質の性状変化と酵素糖化に及ぼす高温飽和水蒸気処理の影響, 2015年3月16-18日, 第65回日本木材学会大会, タワーホール船堀, (東京都江戸川区)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中村 嘉利 (NAKAMURA YOSHITOSHI)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・教授

研究者番号：20172455

(2) 研究分担者

浅田 元子 (ASADA CHIYUKO)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・講師

研究者番号：10580954

佐々木 千鶴 (SASAKI CHIZURU)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・講師

研究者番号：50452652