

(51) ソフトバイオマスを原料とした酵素糖化 における各種前処理の糖化効率比較

前田 光太郎¹・赤尾 聡史^{2*}・細井 由彦²・永禮 英明³
前田 守弘³・藤原 拓⁴

¹国立環境研究所 (〒305-8506茨城県つくば市小野川16-2)

²鳥取大学大学院工学研究科 (〒680-8552鳥取県鳥取市湖山町南101番地)

³岡山大学大学院環境学研究科 (〒700-8530岡山県岡山市北区津島中3-1-1)

⁴高知大学教育研究部自然科学系農学部 (〒783-8502高知県南国市物部乙200)

* E-mail: akao@sse.tottori-u.ac.jp

バイオエタノールやL-乳酸などへの原料利用を目的に、クリーニングクロップとして栽培されたトウモロコシと異常繁茂が報告されるヒシの前処理・酵素糖化を検討した。比較として検討事例の多い稲わらを用意した。前処理として、Alkaline oxidation (AO) 処理、アンモニア処理、水熱処理およびイオン液体処理を実施した。前処理後の酵素糖化の結果、いずれのバイオマスについてもAO処理が効率的な糖化をもたらした。前処理前バイオマス重量あたりのグルコース回収率は、トウモロコシ、ヒシおよび稲わらでそれぞれ24.6%, 9.1%および25.0%であった。また、トウモロコシのセルロースあたりのグルコース回収率は89.3%であった。実験室規模でのコスト計算(減価償却費を除く)からもAO処理の優位性が示された。

Key Word: alkaline oxidation, corn stover, enzymatic saccharification, pretreatment, water caltrop

1. はじめに

施設園芸栽培では、降雨による塩類の流亡がなく施肥量も多いために塩類集積が問題となっており、塩類除去を目的とした湛水が一般的に行われている。しかし、湛水は硝酸性窒素による地下水汚染を引き起こすこと¹⁾や温室効果ガスである亜酸化窒素を放出することが明らかとなっている²⁾。そこで、湛水に代わる面的な対策として、クリーニングクロップと呼ばれる吸肥能力の高い植物を用いた浄化技術の開発が試みられている。クリーニングクロップ種として、窒素溶脱抑制の観点からトウモロコシが適しているとの報告もある³⁾。ところで、クリーニングクロップとして栽培されたバイオマスは、刈り取らなければ吸肥した成分を系外に除去できないため、これらバイオマスの有効活用が必要となる。

クリーニングクロップのようなソフトバイオマスの利用方法としては、バイオエタノール化などへ向けた糖化が盛んに検討されている。稲わらやコーンストバーなど、主要穀物生産に伴って発生する農業廃棄物の糖化に

関しては、前処理-酵素糖化技術が既に成熟の段階であり、実証実験が各地で行われている⁴⁾。一方で、原料となるバイオマスの輸送あるいは絶対量確保という課題が指摘されている。量確保の観点から地域に存在するバイオマスに目を向けると、例えば鳥取県の湖山池もそうであるが、日本各地で毎年水生植物ヒシの異常繁茂が報告されている。ヒシの異常繁茂は枯死・分解による悪臭発生や船舶航行の妨げになるなど問題となっており、実際にヒシ刈り取り・処分が行われている⁵⁾。また、水生植物は水質浄化にも応用されており⁶⁾、補完的なバイオマス源になり得ると考えられる。

ところで、水生植物の酵素糖化を検討しているMishima *et al.*⁷⁾によると、酵素糖化のための前処理効果はバイオマス種ごとに異なることが指摘されている。利用対象とするバイオマスについて、個別に前処理効果を確認しておく必要がある。ここで前処理とは、セルロースを覆っているリグニンの膨化・除去を行う操作である。これにより、糖化対象となるセルロースとヘミセルロースに対し、酵素が効率的に作用できるようになる。処理

法としては、アルカリ処理、Alkaline oxidation (AO) 処理、酸処理、水熱処理など各種方法が提案されている⁷⁾。

本研究では、クリーニングクroppとして栽培されたトウモロコシと異常繁茂するヒシを対象に、酵素糖化のための前処理の比較検討を行った。また、糖化効率の比較に留まらず、一連の作業に要した前処理・糖化工程における費用評価も行った。

2. 実験方法

(1) バイオマス

バイオマスは飼料用トウモロコシ (KD730)、ヒシおよび稲わらを用いた。トウモロコシは、高知大学でクリーニングクroppとして60日間栽培後、2009年12月に採取されたものである。成長的には実をつける前のものであり、根を除く地上部すべてを実験に用いた。ヒシは、湖山池から2010年7月に採取したもので、根を含むすべての部位を用いた。稲わらは、園芸用資材として販売されているものを2010年7月に購入し用いた。いずれのバイオマスも80℃で一晩乾燥後、ワンダーブレンダー (大阪ケミカル、WB-1) で1分間破碎した。その後、再度乾燥しデシケーターで保存した。

(2) 酵素糖化のための前処理

検討した前処理は、実証実験でも採用されているAO処理⁸⁾、アルカリ処理の一種であるアンモニア (SAA) 処理⁹⁾、試薬を用いない水熱処理^{10) 11)}および近年前処理として活発に検討が行われているイオン液体 (IL) 処理である^{12) 13) 14)}。AO処理、SAA処理および水熱処理は各バイオマスについて2回実施した。IL処理は1回実施とした。

a) AO処理

バイオマス10 gを容積1 Lのビーカーに入れ、水酸化ナトリウムと過酸化水素の混合溶液を100 mL加え、マグネティックスターラーを用いて攪拌しながら24時間反応させた。混合溶液は、バイオマスと過酸化水素が重量比において1:0.25となるように35%過酸化水素水を用意し、水酸化ナトリウム溶液を用いてpH11.5に調整したものである。

b) SAA処理

バイオマス10 gを100 mL耐熱ビンに入れ、15%アンモニア水溶液を100 mL加えてフタを閉め、マグネティックスターラーを用いて攪拌しながら24時間反応させた。

c) 水熱処理

水熱処理には高圧マイクロリアクター (オーエムラボテック、MMJ-500) を用いた。リアクター内にバイオマス10 gと蒸留水を100 mL加えた。設定条件温度まで攪拌

しながら加温を行い、設定条件まで達した後15分間保持した。温度条件は160℃、190℃および220℃とした。

d) IL処理

バイオマス2 gとイオン液体 (1-Butyl-3-methylimidazolium Chloride, 東京化成) 約18 gをロータリーエバポレーターの試料器に加え、130℃、0.04 MPa¹⁵⁾で3時間攪拌反応させた。反応後に少量の蒸留水を加えた。

前処理後のバイオマスは遠心分離 (3500 rpm, 10分) で回収した。AO処理とSAA処理は回収した固体を0.1 M酢酸緩衝液 (pH4.5) で3回洗浄した。なお、3回目の洗浄液がほぼpH4.5になること確認した。IL処理では回収した固体を蒸留水で5回洗浄した。IL処理における洗浄回数は、イオン液体にセルロースを溶解させ回収・洗浄した際に確認された295 nmの吸光度 (セル長10 mm) が、検出されなくなる回数から決定した。洗浄したバイオマスはるつぽに受け、乾燥後 (105℃、一晩) その重量を求めた。前処理におけるバイオマス回収率を式 (1) により求めた。

$$\text{バイオマス回収率} = \frac{\text{前処理後バイオマス重量}}{\text{前処理前バイオマス重量}} \times 100 \quad (1)$$

(3) 酵素糖化

滅菌済み15 mLチューブに前処理済みバイオマス0.2 gを入れ、酵素溶液4 mLを添加した。酵素溶液は、0.1 M酢酸緩衝液 (pH4.5) に3 FPU (15 FPU/g基質) のメイセラゼ (明治製菓) を加えたものである。これらをインキュベーターで48時間振とう加水分解した。酵素糖化は3回実施した。グルコース回収率 (前処理前バイオマス重量あたり)、セルロースあたりのグルコース回収率 (前処理前バイオマス中のセルロース重量あたり)、単糖類回収率 (前処理前バイオマス重量あたり) およびホロセルロースあたりの単糖類回収率 (前処理前バイオマス中のホロセルロース重量あたり) をそれぞれ式 (2)、(3)、(4) および (5) を用いて求めた。ホロセルロースあたりの単糖類回収率は各単糖類の濃度に無水係数 (グルコース、ガラクトースおよびマンノースが0.90、キシロースとアラビノースが0.88)¹⁶⁾を掛けて求めた。

グルコース回収率 =

$$\frac{\text{グルコース濃度}}{\text{チューブ内バイオマス濃度}} \times \text{バイオマス回収率} \quad (2)$$

セルロースあたりのグルコース回収率 =

$$\text{グルコース回収率} \times 0.9 + \text{バイオマス中のセルロース割合} \quad (3)$$

単糖類回収率 =

$$\frac{Glc + Xyl + Ara + Gal + Man}{\text{チューブ内バイオマス濃度}} \times \text{バイオマス回収率} \quad (4)$$

Glc : グルコース濃度 Xyl : キシロース濃度

Gal : ガラクトース濃度 Ara : アラビノース濃度

Man : マンノース濃度

ホロセルロースあたりの単糖類回収率 =

$$\frac{\text{単糖類回収率} \times \text{各種無水係数}}{\text{バイオマス中のホロセルロース割合}} \quad (5)$$

(4) 前処理・酵素糖化コスト

各前処理の性能比較の一環として、実験に要したコストを比較した。図1に前処理・酵素糖化コストにおけるコスト試算範囲を示す。実験室規模で一定量のバイオマスから1 gのグルコースを生産する場合の前処理工程、酵素糖化工程および前処理廃液処理工程のコストを式(6)により算出した。表1に10 gのバイオマスを前処理・糖化(洗浄を含む)するために必要な試薬量(実測値)、前処理廃液の中和処理に必要な試薬量(理論値)および試薬価格を、表2に項目別使用電力量を示す。項目別使用電力量は、積算電力計を用いて計測した。

前処理・糖化コスト =

$$\left(\begin{array}{l} \text{破碎} + \text{前処理試薬} + \text{前処理使用電力} \\ + \text{前処理廃液処理コスト} + \text{固液分離コスト} \\ + \text{洗浄試薬} + \text{洗浄使用電力} \\ + (\text{糖化試薬} + \text{糖化使用電力}) \times \text{バイオマス回収率} \end{array} \right) \times 10 \text{ g} \times \text{グルコース回収率} \quad (6)$$

(5) 分析項目

a) 粒度分布

粉碎後バイオマスの粒度を粒度分布計 (SHIMADZU, SALD II) で測定した。粒度は3回測定とし、溶媒はイソブチルアルコールを用いた。メディアン値では、トウモロコシ: 545 μm, ヒシ: 22 μmおよび稲わら: 162 μmとなり、ヒシは他のバイオマスと比べて細かく破碎された。

b) 組成分析

セルロース、ヘミセルロースおよびリグニンの分析は、NRELメソッド¹⁰⁾を一部改め実施した。試料0.9 gを100 mL耐熱ビンに入れ、72%硫酸3.0 mLを加え、5~10分ごとに攪拌し60分間反応させた。反応後、蒸留水を84 mL加え、オートクレーブ (121℃, 60分) を行った。オートクレーブ後、ガラス濾過器 (17GPI6) を用いて固液分離し、固形物は105℃で一晩乾燥後重量(酸不溶性リグニン)を測定した。ろ液は吸光度測定 (UV: 320 nm, 酸溶解性リグニン) と単糖分析を行った。単糖分析では、

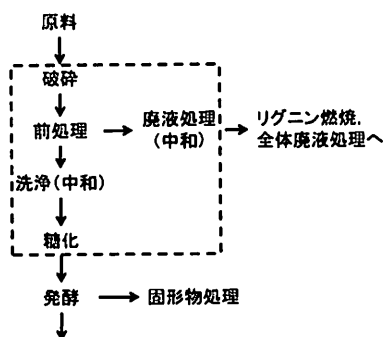


図1 前処理・酵素糖化におけるコスト試算範囲(点線内)

表1 試薬価格と使用量

試薬・電力	価格(円)	使用量
25% アンモニア水 1kg ¹⁷⁾	70	54g
水酸化ナトリウム 1kg ¹⁷⁾	55	2g
35% 過酸化水素水 1kg ¹⁸⁾	75	7.1g
酢酸 1kg ¹⁷⁾	210	0.66g
酢酸ナトリウム 1kg ¹⁷⁾	220	0.66g
濃硫酸(A/O処理) 1kg ¹⁷⁾	15.8	2.5g
濃硫酸(SAA処理) 1kg ¹⁷⁾	15.8	39.8g
セルラーゼ 1kg	10000	0.4g
電力 1kWh ¹⁹⁾	13.84	

表2 使用電力量

大項目	小項目	使用電力(kWh)
破碎		0.01
攪拌(AO処理, SAA処理)		0.02
	加温	0.37
	攪拌	0.07
水熱処理(190)	攪拌軸冷却	0.68
	冷却	0.13
	加温	0.49
水熱処理(220)	攪拌	0.08
	攪拌軸冷却	0.85
	冷却	0.15
遠心分離(1回)		0.09
加温(糖化液1Lあたり)		1.15

イオン交換樹脂 (OnGuard, ダイオネックス) で脱塩処理後、遠心分離(1500×g, 5分)した上澄みを用いた。組成分析は2回実施した。

c) デンプン分析

トウモロコシ、ヒシおよび前処理後のヒシについてデンプンを測定した。測定はF-キットスターチ (JKインターナショナル) を用い、3回測定した。

d) 単糖分析

グルコースの測定はグルコースキット-CIIテストワ

表3 バイオマス組成

バイオマス	セルロース (%)	ヘミセルロース (%)	酸溶解性リグニン (%)	酸不溶性リグニン (%)	灰分 (%)	その他 (%)
トウモロコシ	24.8(±0.8)	14.9(±4.4)	3.1(±0.0)	14.6(±0.5)	18.0(±0.9)	24.6
ヒシ	18.1(±0.1)	8.6(±0.6)	5.0(±0.0)	12.8(±0.8)	11.1(±0.0)	44.6
稲わら	36.6(±0.3)	18.5(±0.5)	1.1(±0.3)	23.4(±0.2)	12.0(±0.1)	8.4
成熟トウモロコシ	38.5(±0.2)	25.0(±0.9)	2.1(±0.0)	22.1(±0.5)		12.2

バイオマス組成は2回測定した。()内に最大と最小を示す。

コー（和光純薬）を用いた。単糖類の測定はHPLC（カラム, Shodex SUGAR SP0810；検出器, RI）により行った。グルコース回収率におけるグルコース濃度はグルコースキット値を、単糖類回収率におけるグルコースを含む単糖類濃度はHPLC値を用いた。なお、グルコースについて、グルコースキット値とHPLC値は同程度であることを確認した。

e) フルフラールと5-ヒドロキシメチルフルフラール分析

糖分解物で発酵阻害物質であるフルフラールと5-ヒドロキシメチルフルフラール（HMF）の分析を行った。フルフラール濃度とHMF濃度の測定は、遠心分離（15000×g, 5分）し、HPLC（カラム, Inertsil ODS-3；検出器, UV：275nm）で行った。

3. 結果および考察

(1) 対象バイオマスの組成

表3に使用したバイオマスの組成を示す。比較として用意した稲わらは、熊谷ら²⁰と同程度のセルロース・ヘミセルロースの割合を示した。ヒシについても、セルロース割合は南部ら（20.0%²¹）と同程度であった。なお、ヒシは29±0.1%（標準偏差）のデンプンを含んでいた。一方、トウモロコシはXuan *et al*（セルロース：38.2%，ヘミセルロース：25.8%⁹）と比べてセルロース・ヘミセルロースの割合が低かった。デンプンも含まれていなかった。バイオマス中のセルロースとヘミセルロースの割合は、稲わらが最も高く、続いてトウモロコシ、ヒシの順であり、本研究の対象バイオマスは比較的ホロセルロースの少ないバイオマスであった。

トウモロコシのホロセルロース割合が低い点について、今回用いたトウモロコシはクリーニングクロープとして栽培されたもので、慣例より密植のもと栽培期間が晩秋にかけての60日と短いものである。既存研究で用いられているトウモロコシは、農業廃棄物として排出されたもので成熟したものである。比較的不成熟なトウモロコシと成熟トウモロコシでは組成が異なると考えられた。成熟トウモロコシ（デントコーン, KD375）を入手し、茎・

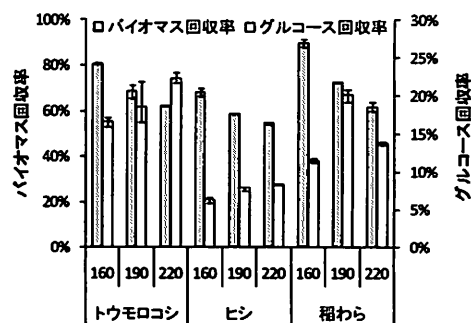


図2 水熱処理におけるバイオマス回収率とグルコース回収率。バイオマス回収率は2回測定した。グルコース回収率はグルコース濃度を3回測定し、糖化前のチューブ内バイオマス濃度で除し、バイオマス回収率（平均値）を掛けた。Barはバイオマス回収率とグルコース回収率の最大と最小を示す。

葉部の組成分析を行った結果（表3）、成熟トウモロコシのセルロース・ヘミセルロースの割合は既存報告⁹と同程度であった。植物体は細胞伸長過程で形成される一次細胞壁と細胞伸長終了後に一次細胞の裏側に形成される二次細胞壁の主成分が異なり、二次細胞壁の主成分がセルロースである²²。ここで用いたクリーニングクロープは未成熟のトウモロコシであり、二次細胞壁が十分に発達していないことも考えられる。

(2) 水熱処理の条件設定

温度条件を決定するため、160℃、190℃および220℃の3段階で水熱処理を行った。各バイオマスについてバイオマス回収率とグルコース回収率の変化を図2に示す。バイオマス回収率は温度が高まるほど低下する一様の傾向を確認したが、グルコース回収率はバイオマス間で効果的な温度条件が異なった。グルコース回収率の高かった温度条件は、稲わらは既存報告¹⁰と同じ190℃であったが、トウモロコシとヒシは稲わらよりも高く220℃であった。なお、それぞれの温度条件までの到達時間は約29分（稲わら、190℃）と約36分（トウモロコシとヒシ、220℃）であった。

水熱処理では、前処理後の固液分離における液側に単

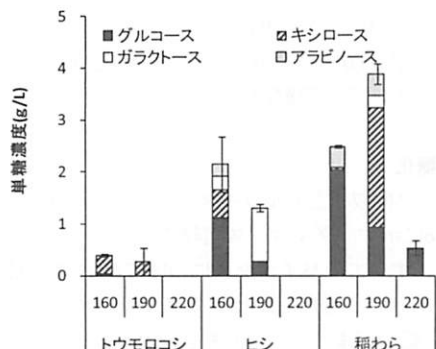


図3 水熱処理の液部の単糖濃度。単糖濃度は2回測定した。Barは各単糖濃度合計の最大と最小を示す。

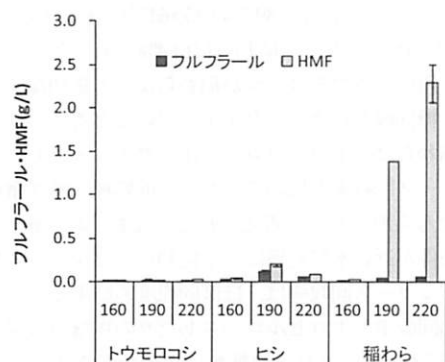


図4 水熱処理の液部のフルフラール濃度とHMF濃度。フルフラール濃度とHMF濃度は2回測定した。Barはフルフラール濃度とHMF濃度の最大と最小を示す。

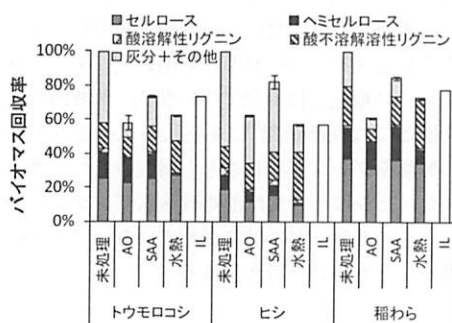


図5 バイオマス回収率とバイオマス組成。バイオマス回収率はAO, SAAおよび水熱は2回, ILは1回測定した。バイオマス組成(ILを除く)は2回測定した。Barはバイオマス回収率の最大と最小を示す。

糖類が溶出すると報告されている¹⁰⁾。酸・アルカリなどの試薬が使用されていないため、単糖類を含む液体をそのまま酵素糖化・発酵に用いることができる。一方で、高温で処理することにより単糖類から生成するフルフラ

ールやHMFが液側に存在することも知られている。本研究でも、前処理後の固液分離における液中の単糖類(図3)およびフルフラールとHMF(図4)を測定した。

トウモロコシとヒシでは、処理温度を上昇させるに従い水熱処理の液部単糖類濃度が低下した。一方、フルフラールとHMF濃度が増加することから、単糖類の分解が示唆された。160°Cにおける単糖類溶出量の前処理前バイオマスに対する重量割合(水熱処理の液部の単糖類回収率)はトウモロコシ:0.2%, ヒシ:1.4%であった。ヒシについて、図2の160°Cにおけるグルコース回収率(6.3%)と図3の160°Cにおける単糖類溶出割合(1.4%)を比較すると、水熱処理における液部溶出量が無視できないことが分かる。

稲わらはグルコース回収率が最も高かった190°Cにおいて液部の単糖類濃度もピークとなり、220°Cでは同濃度が減少した。Guo *et al.*¹⁰⁾と同じような挙動を示した。なお、既存報告^{20), 21)}によると、ヘミセルロースは140°Cで溶出し始め、187°Cでは容易に溶出するようになるとされる。一方、フルフラールとHMF濃度は、190°Cから上昇しており、220°Cでも減少せずに増加した。

高温条件を採用すると単糖類の溶出・分解が進行すると考えられるが、本研究では前処理後バイオマスからのグルコース回収率を優先し、トウモロコシとヒシでは220°C、稲わらでは190°Cを以後の実験で採用した。

(3) 前処理による組成変化

図5にバイオマス回収率と組成変化を示す。バイオマス回収率は、トウモロコシと稲わらではAO処理が最も低く60%程度であった。AO処理はリグニンを効率的に除去しており、もともとのリグニン量のトウモロコシ:32.3%, 稲わら:67.4%を除去していた。しかし、AO処理はセルロースやヘミセルロースなどの回収対象物質も僅かに溶出していた。一方、ヒシでは水熱処理が最もバイオマス回収率を低くした(54.8%)。

水熱処理では、全てのバイオマスにおいてヘミセルロースが高い割合で溶出し、熱変性によるものカリグニン量の増加も招いた。既存報告^{20), 21)}においても、水熱処理では大部分のヘミセルロースが溶出するとされている。セルロース由来のグルコースとヘミセルロース由来の糖の回収は、水熱処理ではトレードオフの関係と言える。本研究ではバイオマス中で最も存在量の多い単糖であるグルコースの回収を優先に水熱処理条件を検討した。しかし、ヘミセルロース含有率の高いバイオマスを対象とする場合は、水熱処理後の固液分離における液中の糖質も考慮に入れ、単糖類全体の回収率を高める条件を探索する必要がある。

なお、ヒシはデンプンを含むことから、前処理後に

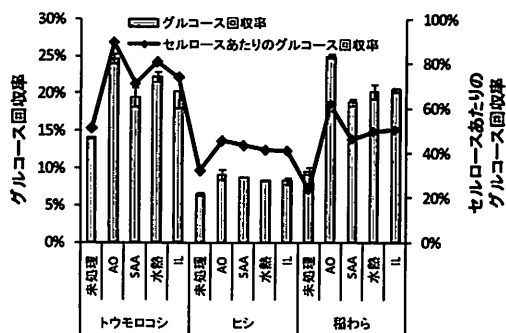


図6 グルコース回収率とセルロースあたりのグルコース回収率。セルロースあたりのグルコース回収率はグルコース回収率をセルロース割合(平均値)で除した。Barはグルコース回収率の標準偏差を示す。

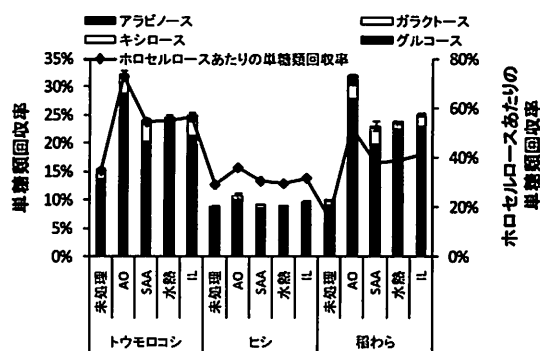


図7 単糖類回収率とホロセルロースあたりの単糖類回収率。ホロセルロースあたりの単糖類回収率は単糖類回収率をセルロースとヘミセルロースの合計割合(平均値)で除した。Barは単糖類回収率の標準偏差を示す。

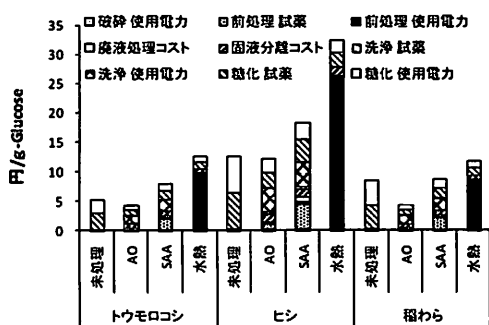


図8 前処理・糖化コスト。前処理・糖化コストは各工程の費用をグルコース回収率で割ること求めた。

おけるデンプン含有量を別途求めた。AO処理, SAA処理および水熱処理(220℃)におけるデンプン含有量は,

それぞれ $1.7 \pm 0.0\%$, $2.8 \pm 0.1\%$ (いずれも標準偏差) および定量下限(1.0%)未満となった。AO処理とSAA処理ではデンプンが一部残存した。

(4) 酵素糖化

グルコース回収率とセルロースあたりのグルコース回収率を図6に示す。グルコース回収率は、比較した前処理の中で、すべてのバイオマスについてAO処理が最も効率的であった。ただし、ヒシのグルコース回収率は10%未満と低く留まった。もともとのセルロース割合が低かったこともあるが、主要な原因は不明である。

セルロースあたりのグルコース回収率についても、AO処理がすべてのバイオマスにおいて最も効率的であった。トウモロコシは、89.3%とGould®と同程度の高い結果となった。一方で、稲わらは61.4%であった。この結果は、用いたトウモロコシが稲わらよりも緩和な前処理条件で糖回収が行えることを示していると考えられる。また、稲わらは、トウモロコシと比べセルロースあたりのグルコース回収率が低いことから、前処理や酵素糖化を改善する余地があると考えられる。なお、既存報告²⁰⁾と処理条件が近い水熱処理による稲わらのセルロースあたりのグルコース回収率は、ほぼ同程度の結果であった。

単糖類回収率とホロセルロースあたりの単糖類回収率を図7に示す。回収される単糖類の大部分がグルコースであったことから、単糖類回収率は全てのバイオマスでAO処理が効率的となった。また、トウモロコシと稲わらからはヘミセルロース由来の糖が回収された。ただし、ホロセルロースあたりの単糖類回収率はトウモロコシで72.8%とセルロースあたりのグルコース回収率と比べて低下した。本研究では、セルロース糖化を中心に考えて糖化酵素としてメイセラゼのみを用いた。メイセラゼはセルロース糖化には有効²⁰⁾であるが、単糖類回収率の改善を図るには既存研究²⁰⁾にあるようにヘミセルラーゼなどの酵素をブレンドすることも選択肢として考えられる。また、ヒシについては前処理後もデンプンを含むことから、メイセラゼには含まれていないアミラーゼ活性を補うことも有効と考えられる。

(5) 実験室規模での前処理・酵素糖化コスト

検討したバイオマスの前処理について、IL処理以外の前処理・酵素糖化コスト(図8)を求めた。IL処理はイオン液体自体が高価であり、再利用方法も確立されていないことから対象外とした。図8より、各バイオマスともAO処理が最もコストが低く、トウモロコシ: 4.4 Yen/g-Glucose, ヒシ: 12.0 Yen/g-Glucoseおよび稲わら: 4.4 Yen/g-Glucoseとなった。AO処理は単糖類回収率で優れるだけでなく、実験室規模ではあるがコスト面でも優位である

ことを確認した。また、トウモロコシと稲わらは、未処理と比べてAO処理など前処理を行うことでコストが低下することから、前処理を行うことの効果を費用面からも確認できた。あるいは、ヒシのようなセルロース分の少ないバイオマスを原料とする場合は、前処理を行わないことも選択肢の一つと考えられた。

なお、当然ながら実験室規模と商業ベースでは、各工程において掛かる費用が異なってくる。図8において大きなウェートを占めた固液分離（洗浄工程を含む）は、実験室規模では遠心分離を用いたが商業ベースではフィルタープレス等を用いており、処理コストの削減が予想される。試薬費についても、商業ベースでは酵素添加量の削減、試薬の再利用（AO処理におけるアルカリ再利用²⁶⁾、SAA処理におけるアンモニア再利用²⁷⁾など）など費用削減が行われるものと考えられる。さらに、実プラントではプロセス全体でのエネルギーの有効利用²⁸⁾が図られることから、例えば水熱処理では、大きな費用ウェートを占めた加熱電力に代表される熱エネルギーを、糖化・発酵などの加温に再利用することが可能となる。

4. 結論

本研究では、クリーニングクロップとして栽培されたトウモロコシと環境中で異常繁茂するヒシの酵素糖化を目的とする前処理の検討を行った。検討した前処理は、Alkaline oxidation (AO) 処理、アンモニア (SAA) 処理、水熱処理およびイオン液体 (IL) 処理である。比較対象として、稲わらも併せて検討した。本研究で得られた主な結果を以下に記す。

- (1) 効率的に単糖類（特にグルコース）を回収できた前処理はAO処理であった。AO処理後のグルコース回収率（前処理前バイオマス重量あたり）はトウモロコシ：24.6%、ヒシ：9.1%および稲わら：25.0%であった。実験室規模での前処理・酵素糖化コストを算出したが、AO処理が最も安価となった。
- (2) 前処理前バイオマス中のセルロースあたりグルコース回収率は、AO処理したトウモロコシで89.3%となった。一方、稲わらは61.4%と低い結果であった。同じAO処理を施した結果から、用いたトウモロコシは比較的前処理効果を得やすいと考えられた。ホロセルロースあたりの単糖類回収率は、トウモロコシで72.8%とヘミセルロースの回収について課題が残った。
- (3) 前処理によるバイオマス組成の変化を確認した。比較した中では、AO処理が最も効率的にリグニンを除去していた。水熱処理は、ヘミセルロースを前処

理過程で溶出していた。水熱処理について、グルコース回収率に基づく適当な温度条件はバイオマス間で異なった（トウモロコシとヒシ：220℃、稲わら190℃）。

謝辞：本研究はJST、CRESTおよび科学研究費補助金基盤研究(B)(21310054)の補助により行われた。高知大学の山根信三講師よりトウモロコシの、明治製菓株式会社よりメイセラーゼの提供を受けた。記して謝意を表す。

参考文献

- 1) Fujiwara T., Ohtoshi K., Tang X., Yamabe K.: Sequential Variation of Groundwater Quality in an Agricultural Area with Greenhouses near the Coast, *Water Science and Technology*, Vol.45, No.12, 2002.
- 2) 貞松篤志, 藤原拓, 大年邦雄, 前田守弘: 施設園芸ハウスにおける湛水が亜酸化窒素の生成・放出に及ぼす影響, *環境工学研究論文集*, 第45巻, pp.459-466, 2008.
- 3) 近藤圭介, 藤原拓, 大年邦雄: クリーニングクロップによるハウス土壌集積窒素の除去に関する基礎的検討, *環境工学研究論文集*, 第46巻, pp.313-319, 2010.
- 4) 農林水産省: ソフトセルロース利活用技術確立事業 <http://www.maff.go.jp/nousin/zyunkan/biomass/sofi06/index.html>
- 5) 鳥取県: 平成 21 年度予算 湖山池ヒシ対策事業 http://db.pref.tottori.jp/yosan/21Yosan_Koukai.nsf/048571d82ae64ccf8492575490063a583?OpenDocument
- 6) Mishima D., Kumiki M., Sei K., Soda S., Ike M., Fujita M.: Ethanol production from candidate energy crops: Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes* L.), *Bioresource Technology*, Vol.99, No.7, pp.2495-2500, 2008.
- 7) Farid T., Dimitar K., Irini A.: Production of biethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation, *Bioresource Technology*, Vol.101, pp.4744-4753, 2010.
- 8) Gould J.M.: Alkaline Peroxide Delignification of Agricultural Residues to Enhance Enzymatic Saccharification, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.28, pp.46-52, 1984.
- 9) Xuan L., Tea H. K., Nhan P. N.: Bioethanol production from corn stover using aqueous ammonia pretreatment and two-phase simultaneous saccharification and fermentation (TPSSF), *Bioresource Technology*, No.101, pp.5910-5916, 2010.
- 10) Guoce Y., Shimichi Y., Hiroyuki I., Seichi I., Takashi E., Shigeki S.: Pretreatment of Rice Straw by a Hot-Compressed Water Process for Enzymatic Hydrolysis, *Appl Biochem Bioethanol*, No.160, pp.539-551, 2010.
- 11) Nathan M., Richard H., Nancy H., Miroslav S., Micheal R. L.: Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover, *Bioresource Technology*, No.96, pp.1986-1993, 2005.

- 12) 岸野正典, 谷口倨, 中川明子, 大井洋: イオン液体 1-*n*-ブチル-3-メチルイミダゾリウムクロライドを用いて処理された木質材料の化学的特徴, 木材学会誌, Vol.5, No.4, pp.243-248, 2009.
- 13) Li C., Knierim B., Manisseri C., Arora R., Scheller H. V., Auer M., Vogel K. P., Simmons B. A., Singh S.: Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification, *Bioresour Technol.*, No.101, pp.4900-4906, 2010.
- 14) Ikka K., Haibo X., Alistair K., Mari G., Sami H., Dimitris S.A.: Dissolution of wood in Ionic Liquids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.55, No.22, pp.9142-9148, 2007.
- 15) 高田晃彦, 高橋良彰: イオン液体中のセルロースの溶液物性, *Cellulose communications*, Vol.14, No.4, pp.142-145, 2007.
- 16) Shuter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Shuter J., Templeton D., Crocker D.: Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, NREL, <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42618.pdf>
- 17) 15710 の化学商品, 化学工業日報社, 2010.
- 18) 14303 の化学商品, 化学工業日報社, 2003.
- 19) 中国電力: 料金単価表<特別高圧のお客さま> <http://www.energia.co.jp/business/free/high-1a.html>
- 20) 熊谷聡, 山田則行, 坂木剛, 林信行: 種々のリグノセルロース系バイオマスの水熱分解・糖化特性, および得られた水熱処理残渣の酵素糖化, 日本エネルギー学会誌, Vol.86, No.9, pp.712-717, 2007.
- 21) 南部浩孝, 片谷千恵子, 石田敏一, 小川綾子: ヨシ群集を利用した湖沼の水質改善とヨシの有効利活用技術(バイオエタノール等)に関する研究, 廃棄物資源循環学会研究発表会講演論文集, Vol.21, pp.165-166, 2010.
- 22) 幸田泰則, 桃木芳枝, 三宅博, 大門弘幸: 植物の細胞構造, 植物生理学 分子から固体へ, 三共出版, pp.24-27, 2003.
- 23) Oetwin B.: Hydrothermal Degradation of Polymers Derived from Plants, *prog. polym.Sci.*, Vol.19, pp.797-841, 1994.
- 24) 是石真友子, 今中洋行, 今村維克, 狩山昌弘, 中西一弘: 酵素糖化と発酵を併用した小麦フスマからの効率的エタノール生産, 生物工学会誌, Vol.87, No.5, pp.216-223, 2009.
- 25) Saha B.C., Cotta M.A.: Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw, *Biotechnol. Prog.*, Vol. 22, No. 2, pp.449-453, 2006.
- 26) 野尻昌信, 池田努, 杉元倫子, 眞柄謙吾: アルカリ処理した木質系バイオマスをを用いた糖化酵素生産, 日本エネルギー学会誌, Vol.87, No.1, pp.68-71, 2008.
- 27) Charles E.W., Bruce E.D., Richard T.E., Mark H., Michael R.L., Y.Y. Lee: Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies, *Bioresource Technology*, Vol.96, pp.1959-1966, 2005.
- 28) 佐賀清崇, 藤本真司, 柳田高志, 多田千佳, ベスピャトコリュドミラ ユリイブナ, バティスタ エルマー, 美濃輪 智明: 前処理・糖化法の違いを考慮したセルロース系バイオエタノール製造プロセスの比較評価, エネルギー資源循環論誌, Vol.30, No.2, pp.9-14, 2009.

(2011.5.30 受付)

Comparative Evaluation of Different Pretreatment Methods for Enzymatic Saccharification of Lignocellulose

Koutarou MAEDA¹, Satoshi AKAO², Yoshihiko HOSOI², Hideaki NAGARE³,
Morihiro MAEDA³ and Taku FUJIWARA⁴

¹National Institute for Environmental studies

²Graduate School of Engineering, Tottori University

³Graduate School of Environmental Science, Okayama University

⁴Agriculture unit, Research and Education Faculty, Kochi University

We investigated several pretreatments of biomass, which were prematured corn cultivated as a catch crop, water caltrop and rice straw, for enzymatic saccharification. Using alkaline oxidation, ammonia, hot compressed water and ionic liquid were compared as the pretreatments. Enzymatic saccharification using Meiselase after each pretreatment provided that alkaline oxidation was the most efficient pretreatment method on the tested biomass; glucose yields based on before-pretreatment biomass weight were 24.6 (corn), 9.1 (water caltrop) and 25.0% (rice straw), respectively. Glucose yield based on cellulose weight in before-pretreatment biomass was 89.3% in the corn case. Alkaline oxidation pretreatment was confirmed to be cost-efficient by the actual cost in the laboratory scale investigation.