

## B-13 亜臨界水処理と生物反応による 未利用海藻のエタノール転換

○二階堂 健吾<sup>1</sup>・佐藤 正義<sup>1</sup>・椎名 亮太<sup>1</sup>・安井 肇<sup>2</sup>・  
張 俗喆<sup>1</sup>・菊池 慎太郎<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 室蘭工業大学大学院工学研究科応用理化学系専攻 (〒050-8585 室蘭市水元町27番1号)

<sup>2</sup> 北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物資源科学部門 (〒041-8611 北海道函館市港町3丁目1番)

\* E-mail: shintaro@mmm.muroran-it.ac.jp

### 1. はじめに

植物バイオマスを構成する多糖類を糖化してエタノール発酵原料とする試みが行われており、既にトウモロコシなどのデンプン ( $\alpha$ -1,4-グリコシド結合重合体) 系バイオマスを原料とするバイオエタノール製造が実用化されている。しかし草本類や農水産物加工残渣などのセルロース系バイオマスを構成する主要な多糖類は、デンプンよりも化学的に安定なセルロース ( $\beta$ -1,4-グリコシド結合重合体) であり、さらにセルロース層表面がプロピルベンゼン誘導体を構成単位とするリグニン層で被覆されて機械的・化学的に強固であるため、実用的な発酵原料としては未だ十分には利用されていない。

他方、水を密閉容器内に封入して 100°C 以上の温度で加熱して亜臨界状態の水熱 (亜臨界水) とすると、水分子間の水素結合が破壊されて親水性と親油性の両親水性を示すようになると共に、酸と同様の特性を獲得して強い加水分解能を発現する<sup>1)</sup>。このような水熱の特性を利用したセルロース系バイオマスの糖化も試みられてはいるが、選択的にセルロースのみを糖化することが困難であり、また水熱によって糖化少糖類やグルコースの熱化学的過分解が生じるなどの問題が指摘されている<sup>2)</sup>。以上から、竹中工務店 (株) のグループは、リグニンとセルロースから成る馬鈴薯澱粉製造残渣を水熱で処理した後、熱化学的な糖類の過分解物質とグルコース分子とを分子ふるい (篩) によって分離してエタノール発酵を行い、良好な成績でバイオエタノール製造に成功した<sup>3)</sup>。

本研究では、水熱処理の温度と時間を変えて細胞壁セルロースを被うリグニン層のみを選択的に分解除去した後、露出したセルロースを酵素によってグルコースへ糖化し、これを発酵基質としてセルロース系バイオマスをエタノールへ変換する事を試みると共に、水熱処理に伴

うリグニンと糖類の分子挙動について検討した。その結果、セルロース系バイオマスを比較的低温の水熱で短時間処理するとリグニン層のみが低分子化してセルロース層から遊離し、セルロース層の酵素糖化濃度が大きく上昇すると共に、水熱処理に起因するエタノール発酵阻害物質は生成しないことを見出した。また従来の *exo* 型セルラーゼに加えて *endo* 型セルラーゼを用いるなら糖化効率が大きく上昇することから、セルロース系バイオマス中のセルロースの結晶構造について考察した。

### 2. 材料及び実験方法

北海道・東北地方の浅海域に自生するエジノネジモク (蝦夷振子藻屑、*Sargassum yezeense*) を供試材料とした。この海藻はリグニン含有量が極めて高く (約 40%w/w)、難生分解性であるため未利用セルロース系バイオマスと位置付けられる。供試材料を函館湾で採取して乾燥した後、その摩砕物の水懸濁液を鋼鉄管に入れて密封し、セラミック電熱炉を用いて所定温度で所定時間加熱して水熱処理 (亜臨界水処理) とした。水熱処理によって低分子化し水溶性画分に遊離するリグニン濃度は 270nm から 280nm の吸収によって測定し、また糖化酵素による生成グルコース (発酵原料) 濃度は高速液体クロマトグラフで測定した。またビール酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 野生株を培養した後、細胞洗浄と飢餓操作によって調製した休止菌を用いて絶対嫌気環境下でエタノール発酵を行った<sup>4, 5)</sup>。

### 3. 実験結果と考察

#### (1) 水熱処理によるリグニンの低分子化と遊離

前述のように、リグニン類はプロピルベンゼン誘導体を構成単位とすることから、270nm から 280nm の波長

領域にベンゼン環に由来する吸収極大を有すると推定される。事実、供試材料を種々の温度の水熱で処理した後、水溶性画分の吸収を測定したところ、波長 277nm 付近に吸収極大が観察され、さらにこの吸収極大は水熱温度の上昇と処理時間の経過に伴って増大した。

この結果は、水熱処理によってセルロース層を被覆するリグニンが低分子化して遊離する反応（脱リグニン反応）が進行すること、並びに吸収極大の面積から遊離リグニン濃度の測定が可能であることを示すものである。以下においては水熱処理によるリグニンの低分子化と遊離を脱リグニンと呼ぶ。

## (2) 脱リグニンと酵素糖化

供試材料を種々の温度の水熱で種々の時間にわたって処理した場合の脱リグニン濃度を図 1 に示した。

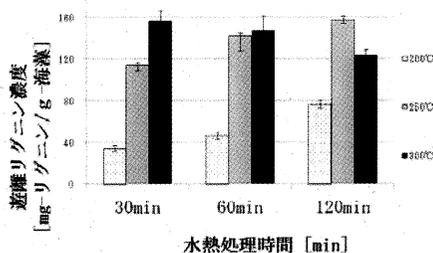


図 1 水熱処理による供試材料の脱リグニン

図 1 に示すように 200°C 及び 250°C の温度範囲の亜臨界面水熱処理における脱リグニン濃度は処理時間に比例して増加したが、300°C では処理時間の経過に伴って検出される脱リグニン濃度が減少した。これは過剰な水熱反応によるリグニンの過分解に起因すると推定される。

他方、図 2 に水熱処理で脱リグニンした標品を酵素 (exo 型セルラーゼ) で糖化して生成するグルコース濃度を示した。

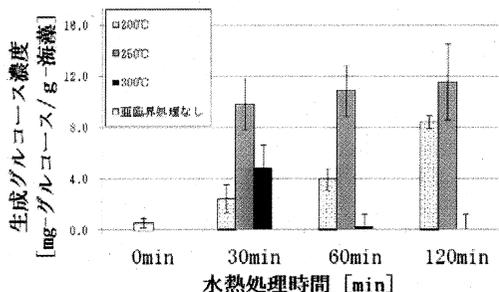


図 2 exo 型酵素による脱リグニン標品の糖化

水熱で処理しなかった場合 (対照系), セルロー

スはリグニンで被覆されているため酵素糖化はほとんど進行せず、また高温 (300°C) の水熱で処理すると生成グルコース濃度は著しく減少した。これは過剰な水熱処理によって生成したリグニンの過分解物が糖化酵素活性を阻害したことに起因すると推定される。

他方、セルロースは exo 型セルラーゼによって糖化しやすい結晶型セルロースと, endo 型セルラーゼによって分解される非結晶型セルロースに大別される。このことから、250°C で 30 分間水熱処理して脱リグニンした標品を exo 型セルラーゼ単独, あるいは endo 型セルラーゼ単独, または両者を混合した条件下で糖化した。その結果を図 3 に示したが, exo 型及び endo 型糖化酵素の両者で処理した場合に発酵原料となるグルコースの生成濃度は著しく増加した。

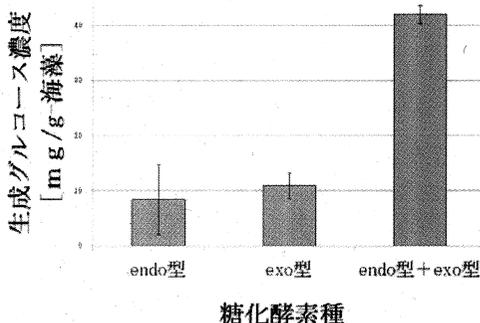


図 3 exo 型及び endo 型糖化酵素による脱リグニン標品の糖化

なお同様の結果はエゾノネジモクソウに限らず、水稻籾殻やピーナッツ殻などでも観察された (data not shown)。これらの結果は、セルロース系バイオマスにおけるセルロースが結晶型と非結晶型の両者で構成されていることを示すものであり、従来の exo 型糖化酵素のみによる糖化では不十分であることを示すものである。

## (3) エタノール発酵

他方、200°C の水熱で脱リグニンした後、exo 型酵素で糖化した標品を原料とし、*S. cerevisiae* 休止菌によるエタノール発酵を行った。その結果、200°C で 30 分間のみの水熱処理の場合には、対糖モル収率は理論値 (約 51.1%) に極めて近似した。しかし 60 分間以上の水熱処理を行うと、生成グルコース濃度はほぼ 30 分間処理のそれとほぼ等しいものの、生成エタノール濃度は著しく減少し、また対糖モル収率も低下した (表 1)。

以上の結果は、過剰の水熱反応によってセルロースから直接的にグルコースが生成し、さらにグルコースや低分子化遊離リグニンが、それぞれ、レトロアルドール化合物や未同定の熱化学反応物質に変化し、これらが発酵

に阻害的に作用した結果と推定される<sup>5,6)</sup>。

**表1 長時間の水熱処理による発酵阻害**

水熱処理 時間 [min]	原料	生成	対糖モル収率※ [%]
	グルコース 濃度 [mM]	エタノール 濃度 [mM]	
30	16.4	29.2	46
60	16.9	14.4	22
120	17.3	14.7	22

※ 対モル収率 (%) = { (生成 ETOH モル重量) / (原料 Glc.モル重量) } x 100

以上から、農水産廃棄物や未利用資源などのセルロース系バイオマスをエタノールへ転換するためには、比較的低温の水熱で短時間処理して脱リグニンした後、exo型及びendo型糖化酵素で糖化することが適当であると推定された。

なお本研究の一部は平成20年度-22年度「農林水産省：新たな農林水産政策を推進する実用開発事業」（竹中工務店、室蘭工業大学大学院、北海道大学大学院、中央大学大学院など）によって実施した研究成果を参考に実施したものであり、また本研究の一部は文部科学省平成25年度科学研究費補助金によって実施した。

#### 参考文献

- 1) M. Minami, T. Ohashi, M. Suzuki, T. Aizawa, T. Adschiri and K. Arai: Anal/ Sci, Vol. 22, pp.1417-1419 (2006).
- 2) M. Sasaki, Z. Fang, Y. Fukushima, T. Adschiri and K. Arai: Ind. Eng. Chem. Res., Vol.39, pp.2883-2884 (2000).
- 3) 竹中工務店技術研究所 他：農林水産省「新たな農林水産政策を推進する実用開発事業：水熱糖化による馬鈴しょ澱粉製造残渣のエタノール変換技術の開発」成果報告書(2010年)。
- 4) 菊池慎太郎編著：微生物工学, pp.57-58 (2004), 三共出版。
- 5) 菊池慎太郎編著：微生物の科学と応用, pp.31-34 (2012), 三共出版。
- 6) W. S. Ok and M. J. Antal: Ind. Eng. Chem., Res., Vol.31, pp.1157-1162 (1992).