

ヤナギバイオマスからのバイオエタノール生産に 関する研究 (第2報)

蒸煮, 温水処理したヤナギバイオマスの フラスコレベルでの酵素糖化

折橋 健, 檜山 亮*¹

Study on bioethanol production from willow biomass (II) Enzymatic saccharification of steam-treated and then warm water-treated willow biomass at a flask level

Ken ORIHASHI, Ryo HIYAMA

Keywords: バイオエタノール, 蒸煮, 酵素糖化, 温水処理, ヤナギ

ヤナギバイオマスの温水処理蒸煮物を用いた糖化実験を行い, 糖化温度, 緩衝液濃度, 基質濃度, 酵素添加量, 基質粒度のそれぞれと糖化性の関係について基礎知見を得た。また, 樹皮を15~17% (w/w) 含むヤナギチップから調製した温水処理蒸煮物 (樹皮含有基質) の糖化性を樹皮不含有基質と比較したところ, 両者に大差はなく, この程度の割合の樹皮が含まれていても, 特に問題なく糖化は進行すると考えられた。

1. はじめに

我々は, 北海道開発局が実施した「北海道に適した新たなバイオマス資源の導入促進事業」¹⁾において, ヤナギバイオマスをバイオエタノールへと効率的に変換するための技術について検討を行った。

その中で, ヤナギバイオマスの糖化に先立つ前処理 (糖化促進処理) として, 原料を高圧高温の蒸気にさらす蒸煮法を採用した。さらに, 蒸煮物を温水処理することで, キシロオリゴ糖を抽出するとともに, 処理残さを糖化発酵用の基質 (温水処理蒸煮物) とすることとした²⁾。この温水処理は, 蒸煮物に含まれる発酵阻害物質の洗浄効果もあるので, 処理残さの糖化発酵にとって都合のよい処理と考えられる³⁾。これら蒸煮, 温水処理の条件検討では, 林産試験場における既往の研究⁴⁾⁶⁾を参考とした。

上記の処理によって得られる温水処理蒸煮物の糖化性について基礎知見を得るために, 糖化温度, 緩衝液濃度, 基質濃度, 酵素添加量, 基質粒度の観点から糖化実験を行い, 評価を実施した。

また, 超短伐期で収穫されたヤナギバイオマスを原料として使用する場合, 木部に加えて樹皮が含まれる可能性もあることから, 樹皮の有無による基質の糖化性の違いについて検討した。

2. 実験方法

2.1 蒸煮物の調製

北海道旭川市近郊の河畔林で採取したオノエヤナギ (*Sarix udensis*) およびエゾノキヌヤナギ (*Sarix schwerinii*) の剥皮丸太もしくは樹皮付き丸太をチップ化した後, 容積500Lのオートクレーブ (日立造船製) で蒸煮した。蒸煮条件は, 温度200℃, 内圧1.46MPa, 時間10分とした。

2.2 温水処理蒸煮物の糖化実験

2.1で剥皮丸太のチップより得た蒸煮物をロートプレックス (富士産業製) にて粉碎し, さらに粒度分けを行った。その後, 温水処理を行って第1表に示す温水処理蒸煮物を得た。

温水処理蒸煮物 (第1表) を糖化基質とし, 糖化

第1表 供試した温水処理蒸煮物

	温水処理蒸煮物	
	No.1	No.2
原料	オノエヤナギ 剥皮チップ	
蒸煮処理		
温度 (°C)	200	200
時間 (min)	10	10
粉碎処理	蒸煮後に粉碎，粒度分け	
供試粒度 (mm)	< 0.84	4 - 2 0.5 - 0.25 2 - 1 0.25 - 0.1 1 - 0.84 0.1 - 0.074 0.84 - 0.5 < 0.074
温水処理		
固液比 (w : v)	1 : 50	1 : 50
温度 (°C)	100	100
時間 (min)	60	180
成分組成*		
水分 (%)	67.7	63 - 70
グルカン (%)	59.3	56.7
リグニン (%)	33.5	30.9

*水分は湿重ベース，グルカンとリグニンは乾重ベースの値，
 リグニンはクラフソン法による

温度，緩衝液濃度，基質濃度，酵素添加量，基質粒度の5項目に関して第2表に示す条件での糖化実験を行った。緩衝液として，酢酸／酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.8)（以下，緩衝液とする）を用いた。緩衝液濃度に関する実験では第2表に示す濃度の緩衝液を，それ以外の実験では0.1M緩衝液を用いた。抗菌剤として，アジ化ナトリウムを緩衝液に溶かし，2% (w/v) 濃度としたものを使用した。酵素には，メイセラーゼ粗原末（明治製菓製）を使用した。緩衝液を用いて濃度1～2% (w/v) の液（以下，酵素液とする）としてから供試した。50もしくは100mL容の三角フラスコを使用し，基質，緩衝液，抗菌剤，酵素液の順に入れた。全液量（基質中の水分を含み，固形分は含まない）がフラスコ容量の6割（30もしくは60mL）となるように投入量を設定した。すなわち，基質および酵素液に関しては実験条件（第2表）に応じた量，抗菌剤は全液量の1% (v/v) 量とし，緩衝液は，設定した全液量から基質に含まれる水分，酵素液および抗菌剤の量を差し引いた量を入れた。なお，緩衝液濃度に関する実験では，糖化液

を別実験に使用する事情から抗菌剤を加えなかった。これらの投入後，フラスコにゴム栓をし，インキュベーター内で水平回転振とう（140rpm）して糖化を行った。経時的に糖化液の一部を秤取し，液に含まれるグルコースを前報の方法³⁾により高速液体クロマトグラフ（以下，HPLC）（La Chrom Elite L2000 series，日立ハイテクノロジーズ製）にて定量した。糖化の度合を示す値として，基質に含まれるグルカンがグルコース化された割合，すなわちグルカン変換率を次式より算出した。グルカン変換率 (%) = 糖化液中のグルコース量 (g) × 0.9 × 100 / 投入した基質中のグルカン量 (g)。

2.3 樹皮含有基質の糖化実験

2.1で剥皮丸太および樹皮付き丸太の各チップより得た蒸煮物をロートプレックス（富士産業製）にて粉碎した後，温水処理を行って第3表に示す温水処理蒸煮物を得た。緩衝液および酵素は2.2と同様である。100mL容の三角フラスコを使用し，全液量（基質中の水分を含み，固形分は含まない）は60mLとなるように投入量を設定した。基質濃度

第2表 温水処理蒸煮物を用いた糖化実験の項目と条件

	実験項目				
	糖化温度	緩衝液濃度	基質濃度	酵素添加量	基質粒度
検討条件 (水準)	30℃	0M	2% (w/v)	10FPU/g基質	4 - 2 mm 0.5 - 0.25 mm
	40℃	0.01M	5%	15FPU/g基質	2 - 1 mm 0.25 - 0.1 mm
	50℃	0.05M	7.5%	20FPU/g基質	1 - 0.84 mm 0.1 - 0.074 mm
		0.1M	10%	30FPU/g基質	0.84 - 0.5 mm < 0.074 mm
	0.2M				
その他の条件					
基質 (サンプルNo.) *	No.1	No.1	No.1	No.1	No.2
基質粒度 (mm)	<0.84	<0.84	<0.84	<0.84	上記
基質濃度 (% , w/v)	2	5	上記	2	2
緩衝液濃度 (M)	0.1	上記	0.1	0.1	0.1
酵素添加量 (FPU/g基質)	20	20	20	上記	20
糖化温度 (℃)	上記	50	40	40	40
糖化時間 (hr)	72	72	72	72	72

* 第1表を参照のこと

(w/v) は10%, 酵素添加量は20FPU/g基質とし、緩衝液量は全液量から基質含有水分と酵素液の量を差し引いた量とした。なお、得られた糖化液を別実験に使用する事情から抗菌剤は加えなかった。フラスコはゴム栓をし、インキュベーター内で水平回転振とう (140rpm) した。糖化温度は50℃、時間は72時間とした。経時的に糖化液の一部を秤取し、2.2と同様にグルコースの定量を行った。

3. 結果と考察

3.1 温水処理蒸煮物の糖化性

5つの実験項目 (糖化温度, 緩衝液濃度, 基質濃

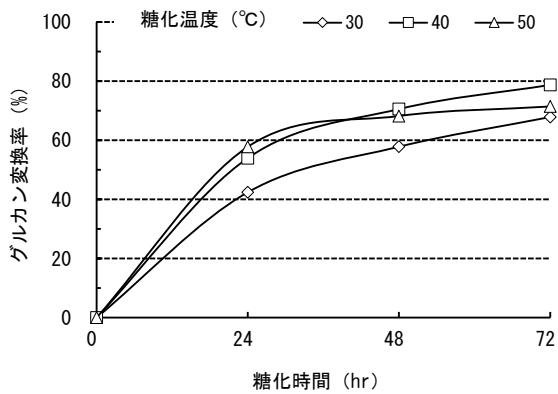
度, 酵素添加量, 基質粒度) におけるグルカン変換率を第1~3図, 第5, 6図に示す。グルカン変換率は、糖化の進み具合を示す指標であり、数値が高いほど糖化が進行していることを意味する。

糖化温度に関してみると、30℃では、40℃、50℃の場合と比べて変換率が緩やかに上昇した (第1図)。40℃と50℃では、48時間までは両者の変換率は同程度であったが、72時間では40℃での変換率が高くなった。糖化時間が短い場合には、40~50℃での糖化が効率的と考えられるが、時間をかけられる場合には30℃の設定も可能と考えられる。

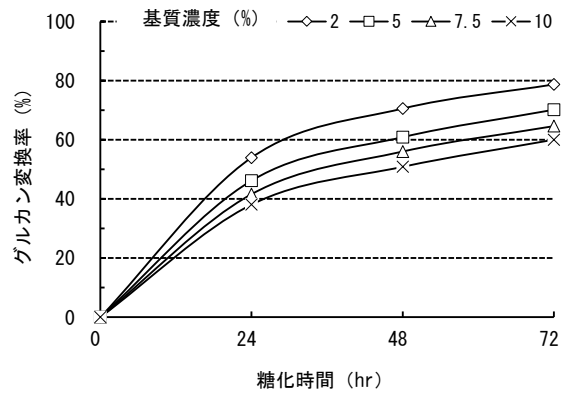
緩衝液濃度については、0Mつまり緩衝液を用い

第3表 供試した樹皮含有の温水処理蒸煮物

	温水処理蒸煮物		
	No.3	No.4	No.5
原料	オノエヤナギ 樹皮付きチップ	エゾノキヌヤナギ 樹皮付きチップ	オノエヤナギ 剥皮チップ
	樹皮率15~17% (w/w)		
蒸煮処理	温度200℃, 時間10分		
粉碎処理	蒸煮後に実施, 粒度分けは未実施 (平均粒径1.4mm)		
温水処理	固液比 (w:v) 1:10, 温度60℃, 時間60分		



第1図 糖化温度別のグルカン変換率の推移



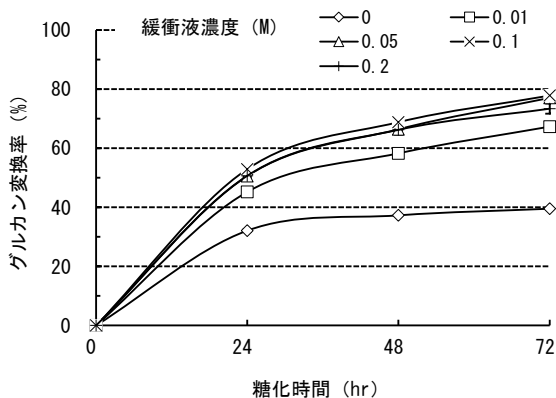
第3図 基質濃度別のグルカン変換率の推移

なくても変換率の上昇が認められた（第2図）。ただし、他の水準と比べると常に変換率は低く、時間が経過するほど差が開いた。基質である温水処理蒸煮物には有機酸や低分子フェノールといった酸性成分が含まれている³⁾。これらの成分は糖化時に溶出し、糖化液のpHを下げる作用をすると考えられる。供試酵素の糖化作用における至適pHは4.5付近とされる⁷⁾が、緩衝液を用いない場合には酸性成分の溶出によるpHの低下を抑えることができず、至適pHを維持できないために酵素活性が落ちるものと考えられる。したがって、効率的な糖化のためには、緩衝液を用いる方がよいと考えられる。緩衝液濃度0.01～0.2Mにおける変換率は、0.01Mにおいて他よりも若干低かったが、概ね同様の推移を示した。緩衝液は、糖化液のpHの状況に応じて濃度選択がで

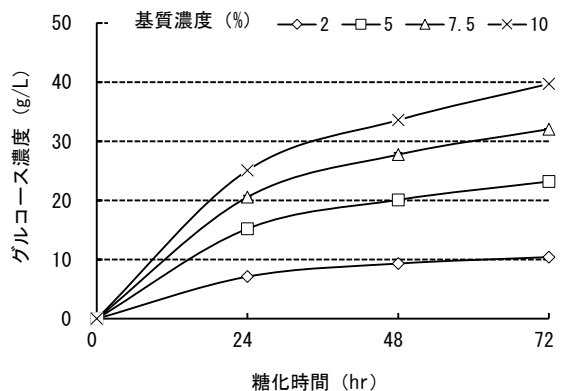
きると考えられる。

基質濃度に関しては、その濃度が高くなるほど同一時点における変換率が低くなった（第3図）。基質単位量あたりの酵素添加量が同じであっても、基質濃度の違いにより酵素の作用が変化することが示唆された。糖化液におけるグルコースの高濃度化は、酵素活性を低下させる要因となる⁸⁾。第4図に示すように、実験におけるグルコース濃度は、基質濃度が高いほど高濃度であり、これが変換率の低下（第3図）に帰結した可能性がある。

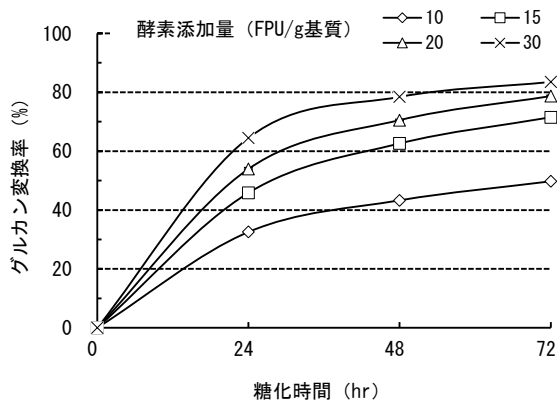
酵素添加量についてみると、添加量10FPU/g基質での変換率が低く推移し、時間の経過とともに他の水準との開きが大きくなった（第5図）。15～30FPU/g基質では、酵素添加量が多いほど同一時点における変換率が高くなった。これらの結果から、



第2図 緩衝液濃度別のグルカン変換率の推移



第4図 基質濃度別のグルコース濃度の推移



第5図 酵素添加量別のグルカン変換率の推移

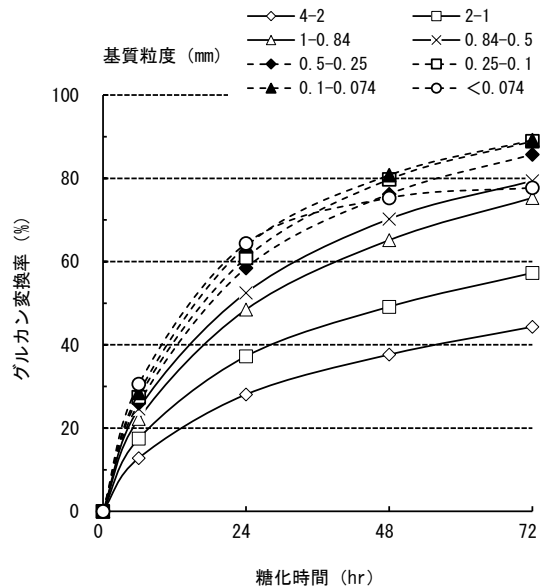
糖化時間が短い場合には、効率的な糖化のために添加量を多くする必要があるが、時間をかけられる場合には添加量を少なくすることも可能と考えられる。

基質粒度に関しては、粒度4-2mmと2-1mmでは変換率が他水準よりも低く、その差は時間の経過とともに大きくなった(第6図)。一方1mm未満の粒度では、細くなるほど変換率が高くなる傾向が認められた。なお、粒度0.074mm未満については、24時間までは変換率が最も高かったが、72時間の変換率は粒度0.84-0.074mmを下回った。粒度が1mm以上になると糖化性の悪さが明瞭となったことから、粒度が1mm未満となるように粉碎することが効率的な糖化につながると考えられる。ただし、粒度0.074mm未満の結果から、粒度をどこまで細かくしたらよいのかという点については、検討の余地が残された。

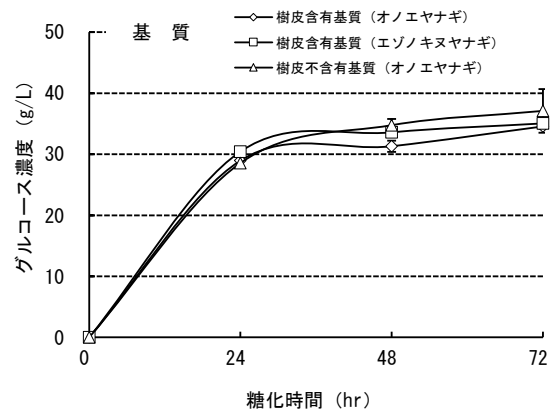
3.2 樹皮含有基質の糖化性

樹皮含有基質については、グルカン量を測定していないため、3.1のようにグルカン変換率による結果を示すことができない。そこで第7図には、樹皮含有基質の糖化における液中グルコース濃度の推移を対照(樹皮不含有基質)の結果と合わせて示した。

樹皮含有基質の糖化によるグルコース濃度は、対照とほぼ同様に推移した。樹皮含有基質の原料となった樹皮付き丸太の樹皮率は15~17% (w/w)であったが、この程度の割合の樹皮が含まれていても、糖化の進行に影響がないことが確認された。なお、実験終了時の糖化液は、基質を問わずpH4.6強であり、樹皮の有無による差はなかった。



第6図 基質粒度別のグルコース濃度の推移



第7図 樹皮含有基質の糖化におけるグルコース濃度の推移

4. まとめ

温水処理蒸煮物を用いて、糖化温度、緩衝液濃度、基質濃度、酵素添加量、基質粒度に関する72時間の糖化実験を行い、グルカン変換率を調べた結果、次のことが明らかになった。

- 糖化温度に関しては、30℃では40℃、50℃の場合と比べて変換率の上昇が緩やかであった。40℃、50℃では、48時間までは両者の変換率は同程度であったが、72時間では40℃での変換率が高くなった。
- 緩衝液濃度については、緩衝液を用いなくても変換率の上昇が認められたが、他の水準と比べると常に変換率は低く、時間が経過するほど差

が開いた。緩衝液濃度0.01～0.2Mでの変換率は、0.01Mにおいて他よりも若干低かったが、概ね同様の推移を示した。

- ・基質濃度に関しては、濃度が高くなるほど同一時点における変換率が低くなった。
- ・酵素添加量については、添加量10FPU/g基質での変換率が低く推移し、時間の経過につれて他水準との差が開いた。15～30FPU/g基質では、添加量が多いほど同一時点における変換率が高くなった。
- ・基質粒度に関しては、粒度4-2mm、2-1mmでは変換率が他水準よりも低く、その差は時間の経過とともに大きくなった。1mm未満の粒度では、細くなるほど変換率が高くなる傾向が認められた。ただし、粒度0.074mm未満については、24時間までは変換率が最も高かったが、72時間の変換率は粒度0.84-0.074mmを下回った。

樹皮率15～17%（w/w）の樹皮付き丸太から調製した温水処理蒸煮物（樹皮含有基質）の糖化実験を行った結果、その糖化性は樹皮不含有基質の糖化性と大差がなかった。基質の樹皮割合が上記程度までであれば、糖化の進行に影響がないことが示唆された。

付 記

本研究は、北海道開発局「北海道に適した新たなバイオマス資源の導入促進事業」の一環として、日本データサービス（株）と共同実施した。

引用文献

- 1) 北海道開発局開発調査課：“北海道開発計画調査「北海道に適した新たなバイオマス資源の導入促進事業（平成20～22年度）の概要」”，北海道開発局，札幌，2011.
- 2) 折橋健，菊地伸一：国土交通省北海道開発局第54回（平成22年度）北海道開発技術研究発表会（<http://thesis.ceri.go.jp/db/giken/h22giken/h22notice.html>），札幌，2011，環19.
- 3) 折橋健，檜山亮，佐藤真由美：林産試験場報544，7-13（2016）.
- 4) 安久津久，松本章，吉田兼之，斎藤直人，葛西章：林産試験場月報413，14-20（1986）.
- 5) 斎藤直人，大宮康則，遠藤展，松本章：林産試験場報1（3），18-22（1987）.
- 6) Aoyama M, Seki K, Saito N：Holzforschung 49，193-196（1995）.
- 7) 藤川弘之，滝沢登志夫，日高秀昌：“木材成分総合利用研究成果集”，木材成分総合利用技術研究組合，東京，1990，pp. 229-247.
- 8) 田村真紀夫，山本以佐雄，鳴戸智，伊藤嘉吉，田辺円，清水美和，高橋治：“木材成分総合利用研究成果集”，木材成分総合利用技術研究組合，東京，1990，pp. 273-287.

ー利用部 バイオマスグループ
ー*1：利用部 微生物グループ
（原稿受理：15.11.27）