

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3報)

蒸煮, 温水処理したヤナギバイオマスの30Lスケールでの糖化発酵

折橋 健, 佐藤 真由美*¹, 原田 陽*¹, 菊地 伸一*²

Study on bioethanol production from willow biomass (III) Saccharification and fermentation of steam-treated and then warm water-treated willow biomass at 30-liter scale

Ken ORIHASHI, Mayumi SATO, Akira HARADA, Shin-ichi KIKUCHI

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基質とする糖化発酵プロセスを構築するために, 先行糖化-並行複発酵法によるエタノール生産実験を30Lスケールで実施した。その結果, エタノール生産を再現性良く実施することが可能となり, 先行糖化開始から48時間以内に全工程を終了可能であることが確認された。基質中のグルカン量に基づく理論値に対し, グルコース収率は74%程度, エタノール収率も74%程度であった。

1. はじめに

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⁾の一環として, 我々はヤナギバイオマスのバイオエタノールへの効率的な変換技術について検討を行った。その中で, ヤナギバイオマスを蒸煮, 温水処理して得られる温水処理蒸煮物を糖化発酵用の基質として調製し, その糖化性や発酵性を調査しており, 蒸煮条件と糖化率の関係²⁾や, 温水処理による発酵阻害物質の低減と発酵性の改善³⁾などについて明らかにしている。

糖化発酵プロセスの構築において, 糖化と発酵を同時に行う並行複発酵法は, 最も有効な方法の一つとされており⁴⁾, 我々も本法について検討を行ってきた。その中で, 基質の糖化よりも発酵の進行が速いと示唆されたことから, 一定時間, 先行的に糖化のみを行い (以下, 先行糖化とする), 途中から酵母を添加して並行複発酵へと移行する, 先行糖化-並行複発酵法に改変し, 実験を進めてきた。

ここでは, 先行糖化-並行複発酵法によるエタ

ノール生産実験を30Lスケールで実施し, 効率のよい安定生産条件を見出したので報告する。

2. 実験方法

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*), エゾノキヌヤナギ (*Sarix schwerinii*) の剥皮チップもしくは樹皮付きチップから, 第1表に示す条件で温水処理蒸煮物を調製した。これを基質とし, 50L容反応槽 (高杉製作所製) を使用して, 第2表に示す条件で計10回の先行糖化-並行複発酵実験を行った。糖化酵素にはメイセラ-ゼ粗原末 (明治製菓製) を, 酵母には乾燥酵母 Ethanol Red (*Saccharomyces cerevisiae*, Dry brewer's yeast, Fermentis製) を使用した。実験中, サンプル採取を行い, 前報の方法³⁾で高速液体クロマトグラフによるグルコースおよびエタノールの分析を行った。また, 実験終了時 (並行複発酵終了時) には, 採取サンプルの固液比 (重量ベース) を測定し, スラリー全体の固形分, 液分の重量を算出した。

第1表 供試した温水処理蒸煮物

原料	No.1: オノエヤナギ剥皮チップ No.2: オノエヤナギ樹皮付きチップ No.3: エゾノキヌヤナギ樹皮付きチップ
蒸煮処理	
温度 (°C)	200
時間 (min)	10
粉碎処理	蒸煮後にロートプレックスで粉碎, 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 (°C)	60
時間 (min)	60
成分組成 (原料No.1) *	
水分 (%)	54 - 64
グルカン (%)	56.7
リグニン (%)	30.9

* 水分は湿重ベースの値, グルカンとリグニンは乾重ベースの値,
 リグニンはクラークソン法による値, 原料No.2, 3の成分組成は
 No.1と同じとみなして取り扱った

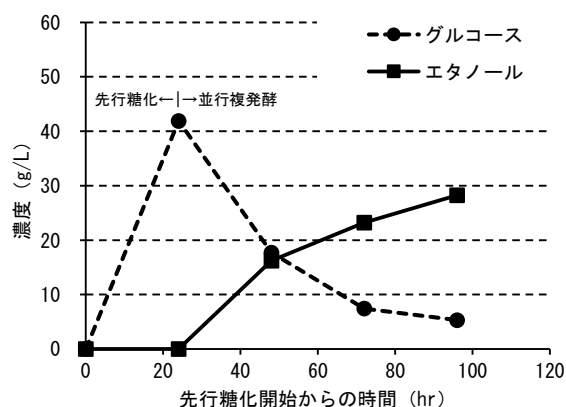
3. 結果と考察

3.1 温度, pH調整に関する検討 (第2表: 実験1~3)

供試前に基質 (温水処理蒸煮物) の十分な水洗を行い, 温水処理後も残存する発酵阻害物質や微生物の除去を図った。また, 先行糖化時の温度を50°Cとし, 糖化中の微生物の増殖抑制を図った。加えて, 酵母活性を十分確保できるように, 酵母添加量を乾燥酵母換算で0.2% (w/w) とした。このような対策を講じて実験1を行ったところ, 発酵は進んだが, グルコース濃度の低下やエタノール濃度の上昇は緩慢であった (第1図)。そこで, 酵母活性をさらに高めるために, 実験2では並行複発酵時に通気を行ったが, 状況は改善されず, 糖化により生成したグルコースは培養液に残存し, エタノールへと十分には変換されないまま推移した (第2図)。

両実験結果から, 酵母活性が十分に高まっていないと推察され, その要因について検討したところ, 並行複発酵時の温度とpHが可能性として考えられた。

前者について, 酵素糖化に適する温度が40~50°C付近であるのに対し, 発酵に適する温度が30~35°C付近であることから, 並行複発酵時の温度を中間の40°Cに設定した。フラスコレベルでの発酵実験において40°Cでも発酵が速やかに進むことを事前に確認



第1図 実験1におけるグルコースおよびエタノール濃度の推移

第2表 先行糖化—並行複発酵実験の条件および結果

a) 実験条件	実験1	実験2	実験3	実験4	実験5
検討項目	温度, pH調整			基質濃度	酵素量
総量 (g) *1	33,155	30,240	32,608	29,993	31,302
基質 *2 種類	No.1	No.1	No.1	No.2	No.1
濃度 (% , w/w, 対総量)	11.8	12.0	13.0	19.1	12.0
絶乾重量 (g)	3,916	3,615	4,251	5,715	3,763
温水処理後の水洗	あり	あり	あり	あり	あり
先行糖化					
緩衝液 種類	酢酸/酢酸ナトリウム		クエン酸/クエン酸ナトリウム		
濃度 (M)	0.04	0.05	0.03	0.10	0.04
酵素量 (FPU/g基質)	20.5	21.9	18.7	20.9	20.0
温度 (°C)	50	50	50	50	50
時間 (hr)	24	24	12	24	24
攪拌回転数 (rpm) *3	80	80	65	80	70
並行複発酵					
酵素量 (FPU/g基質) *4	39.9	43.8	28.0	31.5	20.0
酵母量 (% , w/w, 対総量)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
温度 (°C)	40	40	30	30	30
時間 (hr)	72	72	72	72	96
攪拌回転数 (rpm)	50	50	50	50	50
通気	なし	あり	なし	なし	なし
b) 結果					
	実験1	実験2	実験3	実験4	実験5
理論値					
グルコース収量 (g)	2,467	2,278	2,679	3,601	2,371
エタノール収量 (g) *5	1,261	1,164	1,369	1,840	1,212
実験値 *6					
固形分 (g)	1,989	1,887	2,531	3,755	2,125
液分 (g≒mL)	31,166	28,353	30,077	26,238	29,176
エタノール濃度 (g/L)	28.2	22.5	32.2	40.6	25.8
グルコース収量 (g) *7	1,888	1,674	1,895	2,085	1,477
エタノール収量 (g)	880	637	968	1,065	752
グルコース収率 (%) *8	76.5	73.5	70.8	57.9	62.3
エタノール収率 (%) *8	69.8	54.8	70.8	57.9	62.1

*1 培養液の総量 (基質, 緩衝液, 酵素, 酵母量の総和)

*2 先行糖化開始時に一括投入, ただし実験4では8時間かけて分割投入, 種類は第1表を参照のこと

*3 最初の1時間 (実験4では最初の8時間) は150~200rpmとした

*4 並行複発酵時に酵素を追加添加, 数値は添加後の値

*5 グルコース収量 (理論値) × 0.511

*6 固形分, 液分は実験終了時点の値, その他はエタノールの最高濃度を計測した時点の値

*7 培養液中のグルコース残存量 (実験値) + エタノール収量 (実験値) / 0.511

*8 収量 (実験値) × 100 / 収量 (理論値)

第2表 先行糖化—並行複発酵実験の条件および結果(つづき)

a) 実験条件	実験6	実験7	実験8	実験9	実験10
検討項目	基質の水洗		樹皮の有無	再現性	
総量 (g) *1	21,787	23,001	33,295	33,535	33,165
基質 *2	種類	No.1	No.1	No.1	No.3
	濃度 (% , w/w, 対総量)	12.1	12.1	12.0	12.2
	絶乾重量 (g)	2,626	2,773	4,004	4,107
	温水処理後の水洗	なし	なし	あり	あり
先行糖化					
緩衝液 種類	クエン酸/クエン酸ナトリウム				
濃度 (M)	0.04	0.08	0.03	0.05	0.05
酵素量 (FPU/g基質)	18.3	17.3	19.8	19.2	19.5
温度 (°C)	50	50	50	50	50
時間 (hr)	24	24	18	18	18
攪拌回転数 (rpm) *3	70	70	60	75	60
並行複発酵					
酵素量 (FPU/g基質) *4	30.0	30.0	29.7	28.8	29.2
酵母量 (% , w/w, 対総量)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
温度 (°C)	30	30	30	30	30
時間 (hr)	72	72	72	48	48
攪拌回転数 (rpm)	50	50	50	50	50
通気	なし	なし	なし	なし	なし
b) 結果					
理論値					
グルコース収量 (g)	1,655	1,747	2,523	2,588	2,559
エタノール収量 (g) *5	845	893	1,289	1,322	1,308
実験値 *6					
固形分 (g)	1,392	1,396	2,382	2,443	2,419
液分 (g≒mL)	20,395	21,605	30,913	31,093	30,747
エタノール濃度 (g/L)	27.7	30.2	30.7	31.2	31.6
グルコース収量 (g) *7	1,107	1,277	1,857	1,904	1,902
エタノール収量 (g)	564	652	949	971	971
グルコース収率 (%) *8	66.9	73.1	73.6	73.6	74.3
エタノール収率 (%) *8	66.8	73.1	73.6	73.4	74.2

*1 培養液の総量 (基質, 緩衝液, 酵素, 酵母量の総和)

*2 先行糖化開始時に一括投入, 種類は第1表を参照のこと

*3 最初の1時間は150~200rpmとした

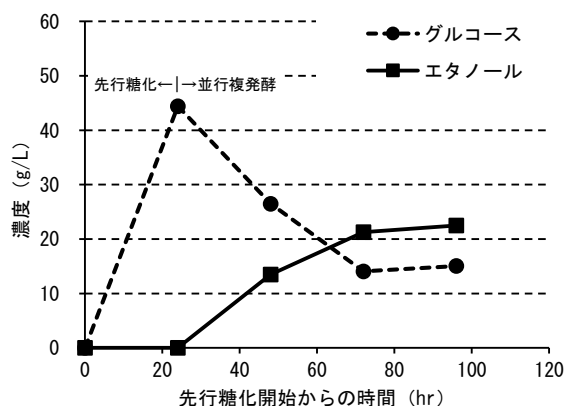
*4 並行複発酵時に酵素を追加, 数値は添加後の値

*5 グルコース収量 (理論値) × 0.511

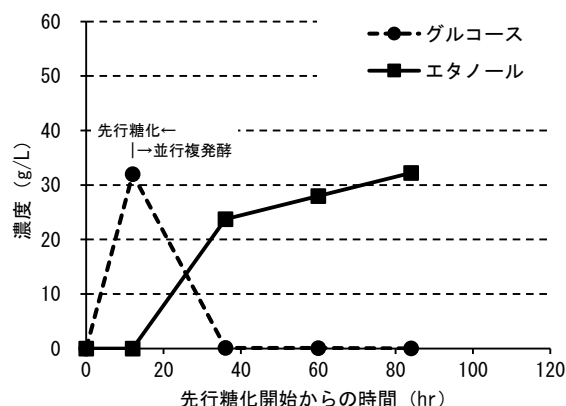
*6 固形分, 液分は実験終了時点の値, その他はエタノールの最高濃度を計測した時点の値

*7 培養液中のグルコース残存量 (実験値) + エタノール収量 (実験値) / 0.511

*8 収量 (実験値) × 100 / 収量 (理論値)



第2図 実験2におけるグルコースおよびエタノール濃度の推移



第4図 実験3におけるグルコースおよびエタノール濃度の推移

していたので問題はないと考えていたが、酵母活性が高まらない要因になったのではないかと考えた。

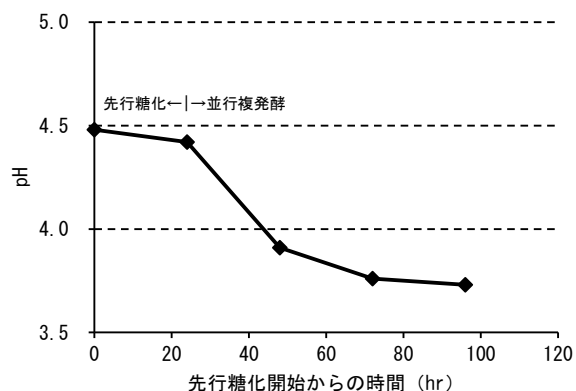
後者について、実験2におけるpHの推移をみると、pHは並行複発酵時に大きく低下しており、最終的には3.7となった(第3図)。これより、緩衝液によるpH制御が十分ではないことが示唆された。供試酵母である *Saccharomyces cerevisiae* の増殖には pH5.0~5.5が至適であり⁵⁾、pHの低下は酵母活性に悪影響を与えたのではないかと考えられる。また、弱酸成分はpHが低下すると非解離分子の割合が増えるが、この非解離分子が微生物の増殖抑制に作用するとされ、酢酸は特に抑制効果が高いとされる⁶⁾。酵母の活性に対して、水洗してもなお基質から溶出する弱酸成分の影響の他、緩衝液に使用した酢酸の影響もあり得るのではないかと考えた。

そこで、実験3では並行複発酵時の温度を30℃に下げた。また、pH低下の抑制と酢酸による悪影響

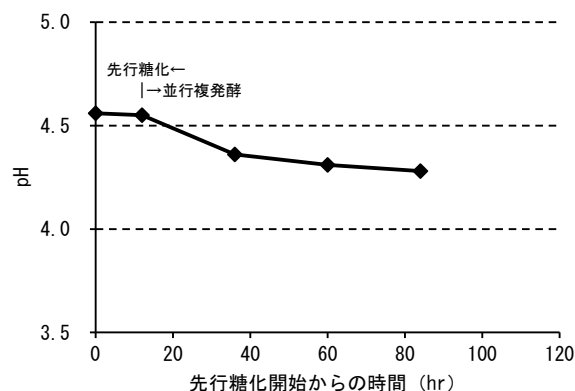
の低減を期待して、緩衝液の種類を酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液からクエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液に変更した。その結果、酵母添加後のグルコース濃度は0g/L近くまで低下し、実験1, 2で見られたようなグルコースが残存する状況は解消された。エタノール濃度の上昇も速くなり、収率は70.8%に達した(第4図, 第2表)。また、実験中のpHは、4.6~4.3の間に維持できることが確認された(第5図)。

3.2 基質濃度、酵素量の検討(第2表: 実験4, 5)

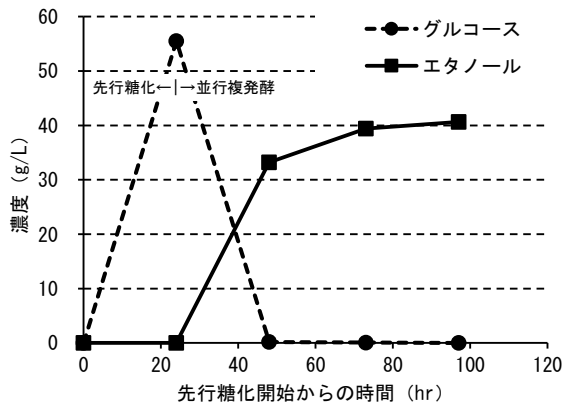
実験3により発酵を速やかに進行させることが可能となったことから、実験4では基質濃度を19.1% (w/w) とし、実験3 (13.0%, w/w) よりも濃度を高めて検討を行った。その結果、高基質濃度においても発酵は進み、エタノール濃度は40.6g/Lに達した(第6図)。しかしその一方で、グルコース収率は57.9%に低下した(第2表)。高基質濃度では酵素の運動性が制限され糖化活性が低下すると報告さ



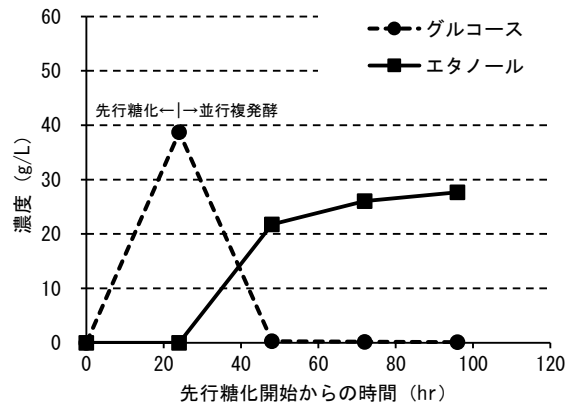
第3図 実験2におけるpHの推移



第5図 実験3におけるpHの推移



第6図 実験4におけるグルコースおよびエタノール濃度の推移



第8図 実験6におけるグルコースおよびエタノール濃度の推移

れており、グルコース収率の低下はこのことが一因と考えられた。

実験5では並行複発酵時における酵素量を20.0FPU/g基質とし、実験3（28.0FPU/g基質）よりも添加量を減らして検討したところ、発酵は進んだものの（第7図）グルコース収率は62.3%に低下した（第2表）。

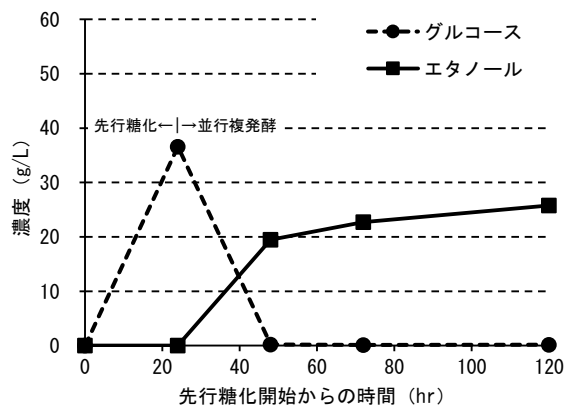
このように、実験4、5では発酵は順調に進行したものの、実験3と比べて基質の糖化が十分に進まなかった。そこで、これらの結果を踏まえて実験6～10では、エタノールの生産効率を考慮し、基質濃度（12%，w/w）、酵素量（並行複発酵時30FPU/g基質）ともに実験3と同水準にて実験を行った（第2表）。

3.3 基質の水洗に関する検討（第2表：実験6、7）

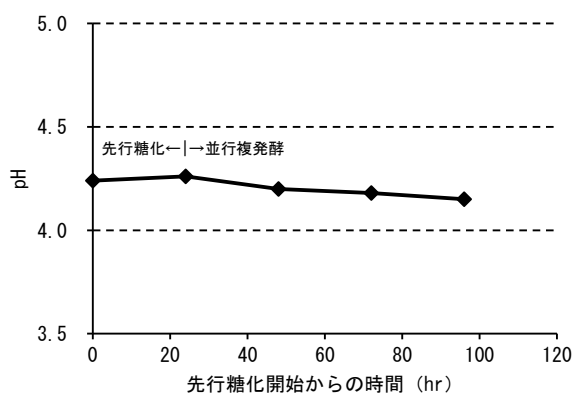
実験1～5では供試前に水洗した基質を用いてきた

が、実験6では温水処理後に固液分離を行っただけで水洗を行っていない基質を供試した。その結果、水洗せずとも糖化発酵は進むことが確かめられた（第8図）が、グルコース収率は66.9%，エタノール収率は66.8%となり、実験3（グルコース収率70.8%，エタノール収率70.8%）と比較して低かった（第2表）。培養液のpHは、基質を投入した段階から4.3程度であり（第9図）、実験3（第5図）と比較して先行糖化の段階から酸性化していた。これは、水洗していない基質を使用したために、基質に残存している酸性成分が多く、その溶出により起こったと考えられる。

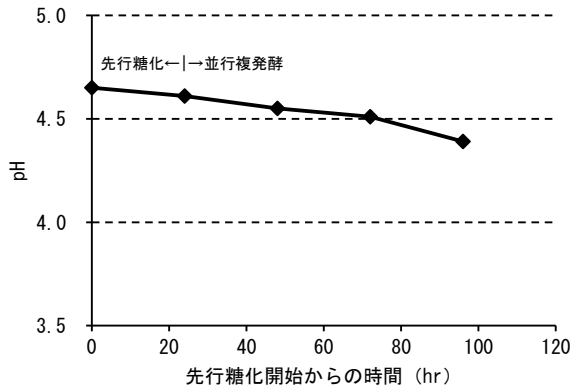
この結果を受けて、緩衝液の濃度を高め、緩衝能を大きくすることで、糖化発酵性が改善されるのではと考え、緩衝液濃度を高めて実験7を行った。その結果、pHは4.7～4.4に維持され（第10図）、グル



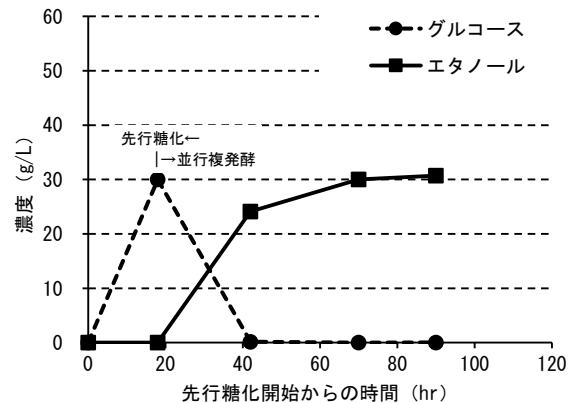
第7図 実験5におけるグルコースおよびエタノール濃度の推移



第9図 実験6におけるpHの推移



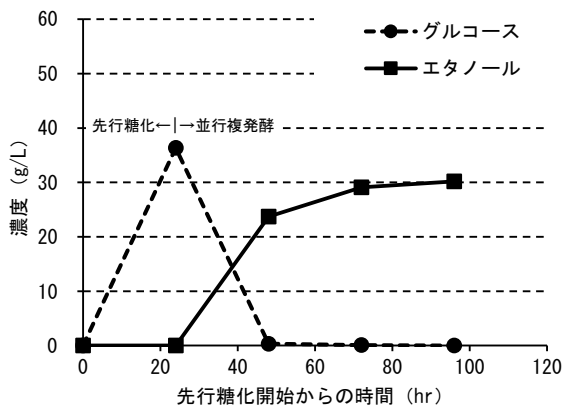
第10図 実験7におけるpHの推移



第12図 実験8におけるグルコースおよびエタノール濃度の推移

コース収率は73.1%に、エタノール収率も73.1%に改善された(第11図, 第2表)。

実験3では、緩衝液の種類を酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液からクエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液に変更することで実験2と比べて並行複発酵時のpH低下を緩和し(第5図)、水洗した基質でのエタノール収率を高めることが可能となった(第2表)。また実験7では、同様にクエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液を用い、その濃度調整を行うことで、水洗していない基質におけるグルコース収率やエタノール収率を高めることができた(第2表)。これらの実験から、クエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液を用いて培養液のpHを制御することで、供試する基質の水洗の有無を問わずに収率よくエタノール生産が可能と考えられた。



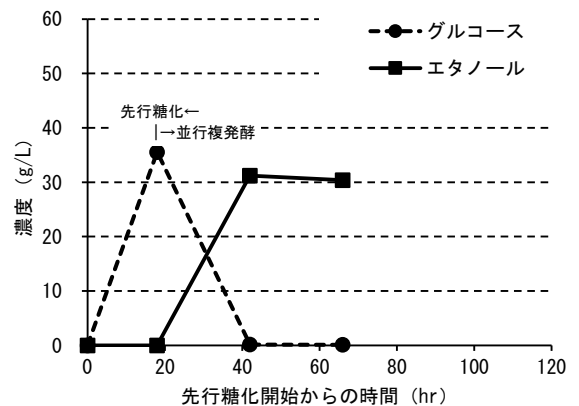
第11図 実験7におけるグルコースおよびエタノール濃度の推移

3.4 樹皮含有基質に関する検討(第2表: 実験8)

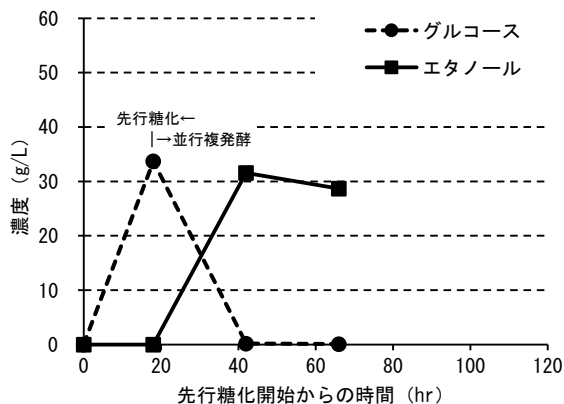
実験8では、樹皮付きの基質を供試した。その結果、グルコース収率、エタノール収率ともに73.6%と良好であり(第12図, 第2表)、樹皮付きであっても基質として用いることが可能と判断された。

3.5 再現性の検討(第2表: 実験9, 10)

実験9, 10では、実験1~8にて明らかになった様々な改善点を取り込み、十分に水洗した基質を用いて再現性を検討した。その結果、発酵は酵母添加から24時間以内に終了し、先行糖化開始から48時間以内に全工程を終了可能であることが確認された(第13図, 第14図)。グルコース収率は73.6~74.3%、エタノール収率は73.4~74.2%、エタノール濃度は31.2~31.6g/Lを示し、再現性は良好であった。



第13図 実験9におけるグルコースおよびエタノール濃度の推移



第14図 実験10におけるグルコースおよびエタノール濃度の推移

3.6 安定的で効率のよい生産条件

以上のように、50L容反応槽を用いた30Lスケールでの一連の実験を通して、先行糖化ー並行複発酵法によるエタノール生産を安定的に実施することが可能となった。その安定的な生産条件は第3表のとおりである。この条件では最短で48時間以内に工程

を終えることが可能であり、時間効率性を兼備していると考えられる。

一連の実験におけるグルコースの収率は、エタノール収率から逆算したグルコース量と培養液中に残存するグルコース量とを合算して算出したものであり、酵母によってエタノール産生以外に消費されたグルコースについては考慮していない。したがって、実際のグルコース収率は、第2, 3表の値よりも幾分高いものと推測される。一方、フラスコレベルでの糖化実験では、温水処理蒸煮物のグルコース収率が80%台後半を記録する場合もあり⁸⁾、30Lスケールでのグルコース収率にはさらに伸びしろがある可能性がある。糖化を左右する条件としては、温度、酵素量、基質濃度、基質粒度などが挙げられるが、単純な糖化とは異なり、並行複発酵では酵母活性や最終エタノール濃度の面から温度や基質濃度の条件が制約を受ける。また、酵素量はコストに大きく影響するため制限を受ける。したがって、グルコース収率を改善する糖化条件に関しては、検討困難な部分が多い。一方、本実験では粒度分けをして

第3表 実験1~10を通して得られた安定的で効率の良いエタノール生産条件

基質種類	温水処理蒸煮物
濃度 (% , w/w, 対総量)	12
先行糖化	
緩衝液種類	クエン酸/クエン酸ナトリウム
濃度 (M)	0.05 - 0.10
酵素量 (FPU/g基質)	20
温度 (°C)	50
時間 (hr)	24
攪拌回転数 (rpm)	70 (最初の1時間は150 - 200)
並行複発酵	
酵素量 (FPU/g基質) *1	30
酵母量 (% , w/w, 対総量)	0.2
温度 (°C)	30
時間 (hr)	24 - 48
攪拌回転数 (rpm)	50
生産性	
エタノール濃度 (g/L)	32
グルコース収率 (%) *2	74
エタノール収率 (%) *2	74

*1 並行複発酵時に酵素を追加添加, 数値は添加後の値

*2 第2表*8を参照のこと

いない基質を使用した，フラスコレベルの実験では基質の粒度を細かくすることで糖化性が高まることが確認されている⁸⁾。このため，基質粒度に関しては検討の余地があると言え，微細化した基質を用いることで，グルコース収率のさらなる向上が期待できる。

4. まとめ

ヤナギバイオマスの温水処理蒸煮物を基質とする糖化発酵プロセスを構築するために，先行糖化ー並行複発酵法によるエタノール生産実験を30Lスケールで実施した結果，次のことが明らかになった。

- ・酢酸／酢酸ナトリウム緩衝液を使用し，温度40℃にて並行複発酵を行ったところ，糖化により生成したグルコースがエタノールへと十分には変換されなかった。そこで，緩衝液をクエン酸／クエン酸ナトリウム緩衝液に，また温度を30℃に変更したところ，グルコースが残存する状況は解消され，発酵が良好に進行するようになった。
- ・基質濃度を13% (w/w) から19% (w/w) へ引き上げたところ，グルコース収率が低下した。また，酵素量を28FPU/g基質から20FPU/g基質へ引き下げたところ，同様にグルコース収率が低下した。なお，いずれの場合も発酵は進んだ。
- ・温水処理後に固液分離のみを行い，水洗を行っていない基質を供試した場合，基質を投入する段階からpHが低くなり，グルコース収率やエタノール収率が下がった。そこで，緩衝液濃度を高めたところ，これらの収率は改善した。
- ・クエン酸／クエン酸ナトリウム緩衝液を用い，培養液のpHを制御することで，供試する基質の水洗の有無を問わず，収率よくエタノール生産できることが確認された。
- ・樹皮付きの基質を用いた場合でも，樹皮を含まない基質と同等の糖化性，発酵性が確認された。
- ・先行糖化ー並行複発酵法によるエタノール生産を再現良く実施することが可能となり，発酵は酵母添加から24時間以内に終了し，先行糖化開始から48時間以内に全工程を終了可能であることが確認された。基質中のグルカン量に基づく理論値に対し，グルコース収率は74%程度，エタノール収率も74%程度を示し，エタノール濃度は31～32g/Lとなった。

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) Taherzadeh M J, Karimi K : BioResources 2 (4), 707-738 (2007).
- 5) Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B : Bioresource Technology 74, 25-33 (2000) .
- 6) 清水潮：アサマパートナーニュース（<http://www.asama-chemical.co.jp/PN/PN5.HTM>），No.138，1-2 (2010).
- 7) テウク・ベウナ・バルダント，及川千皓，野尻昌信，幸田圭一，ヤニ・スディヤニ，山田竜彦，浦木康光：木材学会誌56 (6)，420-426 (2010).
- 8) 折橋健，檜山亮：林産試験場報544，14-19 (2016).

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