

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1報)

ヤナギバイオマス蒸煮物の糖化液に含まれる発酵阻害物質 およびその除去処理による発酵性の改善

折橋 健, 檜山 亮*¹, 佐藤 真由美*¹

Study on bioethanol production from willow biomass (I) Fermentation inhibitor in saccharified solution of steam-treated willow biomass and improvement of fermentability by inhibitor removal treatment

Ken ORIHASHI, Ryo HIYAMA, Mayumi SATO

Keywords: バイオエタノール, 発酵, 蒸煮, 阻害, ヤナギ

ヤナギバイオマスの蒸煮物の糖化液に含有される発酵阻害物質の定量を行うとともに、発酵阻害物質の除去処理による糖化液の発酵性の変化について調べた。コントロール（蒸煮物の糖化液）では、低分子フェノール4種が合計245.7mg/L、有機酸2種が合計4441.1mg/L、フラン2種が合計101.2mg/L含まれており、顕著な発酵阻害が確認された。一方、糖化液を活性炭処理した場合、あるいは蒸煮物を温水処理してから糖化した場合について比較実験を行ったところ、いずれの糖化液でも阻害物質濃度は低減し、発酵性は大幅に改善された。

1. はじめに

地球温暖化問題などを背景として、化石燃料消費の削減に向けた取り組みが活発となっている。その中で、植物バイオマスに由来するバイオエタノールは、輸送用のガソリン消費量を削減する観点から注目を集めている。バイオエタノールを工業生産するために、非食用で生産性に優れた植物を資源作物化し、これを工場周辺で集中的に生産して原料とすることが検討されている¹⁾。

ヤナギは、資源作物としての素質を備え、また北海道の環境に適応した植物であることから、本道での資源作物化^{2,3)} や活用方法⁴⁾ が検討されている。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」⁴⁾ において、ヤナギの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。

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、本研究では原料を高温高压の蒸気にさらす蒸煮法を採用した。蒸煮法は、酸やアルカリ等の薬剤を使用せず、環境負荷の少ない前処理方法である⁵⁾。また、蒸煮により原料中のヘミセルロースやリグニンが低分子化し、揮発性もしくは易水溶性成分となってセルロース周囲から脱離しやすくなるため、セルロースの糖化性が改善される⁵⁾。林産試験場では、1980年代に蒸煮法による木質飼料の製造技術について研究を行っており^{6,9)}、その際の知見をヤナギバイオマスの前処理条件の検討に活用した。

一方、蒸煮法では、処理時に糖類やリグニンの分解物が生成し、発酵を阻害することが知られている^{10,11)}。そこで本研究では、ヤナギバイオマスの蒸煮物に含まれる代表的な阻害物質の定量を行うとともに、阻害物質の除去処理とそれに伴う発酵性の変化について検討を行った。

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*) の木部をチップ化した後、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°C、内圧1.46MPa、時間10分とした。蒸煮チップは、ロートプレックス (富士産業製) にて粉碎し、蒸煮物 (平均粒径1.4mm) とした。

2.2 糖化液の調製

3通りの糖化液 (A~C) を調製した。このうち、糖化液Aはコントロール (蒸煮物の糖化液) である。一方、糖化液B, Cは処理群 (阻害物質の除去処理を行ったもの) であり、このうち糖化液Bは、A液と同様に調製した糖化液を粉末状活性炭にて処理したものである。また、糖化液Cは蒸煮物を温水処理して得た温水処理蒸煮物を糖化したものである。糖化液の調製から一連の実験は、4反復にて行った。糖化液の調製に使用した蒸煮物および温水処理蒸煮物の成分組成を第1表に示す。

2.2.1 糖化液A

セルラーゼとしてメイセラーゼ粗原末 (明治製菓製) を、緩衝液には0.1Mクエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH4.8) を使用した。酵素は蒸煮物 (絶乾) 1gあたり30FPU添加した。重量ベースで蒸煮物 (絶乾) 1に対し、酵素を溶かした緩衝液9を混合し、50°Cで48時間、120rpmの速度で水平回転振とうしながら糖化した。続いて固液分離を行い、糖化液Aを得た。

2.2.2 糖化液B

糖化液Aと同様の方法にて調製した糖化液に対し、5% (w/w) の粉末状活性炭 (和光純薬製) を加え、

20°Cで1時間、120rpmの速度で水平回転振とうした。続いて固液分離を行い、糖化液Bを得た。

2.2.3 糖化液C

重量ベースで蒸煮物 (絶乾) 1に対して水9を加え、40°Cで30分、400rpmの速度で撹拌した。続いて固液分離した後、残さをさらに9倍量の温水で洗浄、脱水して温水処理蒸煮物を得た。この温水処理蒸煮物を基質として、糖化液Aと同様の方法にて糖化液Cを調製した。

2.3 発酵

酵母として、乾燥酵母 Ethanol Red (*Saccharomyces cerevisiae*, Dry brewer's yeast, Fermentis製) を使用した。糖化液に対して0.2% (w/w) の酵母を加え、30°Cで72時間、静置発酵した。発酵状況を経時的に把握するため、発酵開始から0, 6, 24, 48, 72時間後にサンプル採取を行った。

2.4 分析

2.4.1 糖化液の分析

糖化液のpHをpHメーター (AUT-701に付属、東亜ディーケーケー製) にて測定した。

糖化液に含まれる中性糖 (グルコース, セロビオース, キシロース) を、示差屈折率検出器を有する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) にて分析した。カラムにはAminex HPX-87P (φ7.8mm×300mm, 2本連結, Bio-Rad製) を、溶離液には蒸留水を使用し、カラムオープン温度は80°C、流速は1.0mL/minとした。ピークの同定は保持時間を標準物質と比較して行い、内部標準法 (内部標準物質はmeso-エリトリトール) にて定量した。試料 (原液を10倍希釈したもの) の注入量は10μLとした。

発酵阻害物質として知られる低分子フェノール4種 (バニリン, シリンガアルデヒド, 4-ヒドロキシ安息香酸, 4-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸), 有機酸2種 (ギ酸, 酢酸), フラン2種 (2-フルアルデヒド, 5-ヒドロキシメチル-2-フルアルデヒド) を定量した。

低分子フェノール4種は、ガスクロマトグラフ-質量分析計 (以下、GC-MS) (JMS-600H, 日本電子製) にて分析した。糖化液1mLを凍結乾燥した後、酢酸エチルと5% (w/w) 塩酸をそれぞれ2mL加え、さらに内部標準物質としてベラトロールを添加した。これを撹拌後、遠心分離し、上層を回収し

第1表 糖化液の調製に用いた試料の成分組成 (%) *1

	蒸煮物	温水処理 蒸煮物
グルカン	45.9	56.7
キシラン	12.0	6.1
マンナン	2.7	2.7
リグニン*2	29.2	30.9

*1 乾重ベースでの値

*2 リグニンはクラークソンリグニン

た。酢酸エチルによる抽出を計3回行い、集めた上層を水洗後、濃縮して抽出物を得た。抽出物は窒素気流下で乾固し、ジアゾメタンによりメチル化した。GCカラムにはDB-1MS (φ0.25mm×30m, 膜厚0.25μm, アジレント・テクノロジー製) を、キャリアガスにはヘリウムを使用した。GC注入口温度は270℃とし、カラムオープンは40℃から240℃まで4℃/minの割合で昇温した。また、MSのイオン化エネルギーは70eVとした。ピークの同定は保持時間およびマススペクトルを標品と比較して行い、内部標準法により定量した。試料注入量は1μLとした。なお、シリングアルデヒドについては、シリングアルデヒドおよびそのメチル化物である3,4,5-トリメトキシベンズアルデヒドの測定により、また4-ヒドロキシ安息香酸、4-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸については、それぞれのメチルエステルの測定により定量した。

有機酸2種とフラン2種の分析は、フォトダイオードアレイ検出器を有するHPLC (La Chrom Elite L2000 series, 日立ハイテクノロジーズ製) にて行った。カラムには Aminex HPX-87H (φ7.8mm×300mm, Bio-Rad製) を、溶離液にはアセトニトリル: 9mmol/L H₂SO₄水溶液=90:10 (体積ベース) を使用し、カラム温度は60℃, 流速は0.7mL/minとした。ピークの同定は保持時間を標準物質と比較して行い、外部標準法にて定量した。その際の波長は有機酸2種が205nm, フラン2種が280nmとした。試料 (原液) の注入量は10μLとした。

2.4.2 発酵液の分析

発酵液に含まれるグルコースおよびエタノールを分析した。このうちグルコースは、2.4.1と同様の方法で分析した。ただし、原液は2~13倍希釈し、外

部標準法で定量した。またエタノールは、示差屈折率検出器を有するHPLC (2.4.1に同じ) にて分析した。カラムにはAminex HPX-87H (2.4.2に同じ) を、溶離液には5mmol/L H₂SO₄水溶液を使用し、カラム温度は70℃, 流速は0.8mL/minとした。ピークの同定は保持時間を標準物質と比較して行い、外部標準法にて定量した。試料 (原液) の注入量は10μLとした。

3. 結果と考察

3.1 糖化液のpH, 糖濃度

糖化液のpHは4.0~4.5であり (第2表), 糖化液CよりもA, BのpHが低かった。後述するが, 糖化液A, BではCよりもギ酸や酢酸濃度が高い。その差がpHに反映されていると考えられる。

糖化液の中性糖分析では, 定量可能な成分はグルコース, セロビオース, キシロースであった (第2表)。このうちキシロースについては, 蒸煮時に生成したキシロースやキシロオリゴ糖が糖化時に (分解) 溶出したものと考えられる。糖化液A, Bでは, 中性糖3種の濃度はほぼ同じであった。チシマザサ稈水解液に対する活性炭処理では, 液中の単糖類濃度は大きな変化はなかったとされる¹²⁾。今回の結果はこれと同様であり, 中性糖3種は活性炭処理の影響を受けず, 糖化液に概ね残存することが確認された。糖化液Cでは, A, Bに比べグルコース濃度が高く, キシロース濃度が低い。このうちグルコースについては, グルカンの割合が蒸煮物よりも温水処理蒸煮物において高いためと考えられる (第1表)。また, キシロースについては, 蒸煮物の温水処理時にキシロースやキシロオリゴ糖が溶出し, 処理残さ (温水処理蒸煮物) から糖化時に (分解) 溶出する

第2表 糖化液のpHおよび中性糖 (g/L) の実測値, エタノールの計算上の最大値 (g/L)

	糖化液A		糖化液B		糖化液C	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
pH	4.0	0.0	4.1	0.0	4.5	0.0
グルコース	43.8	0.2	43.3	0.4	53.7	0.8
セロビオース	1.9	0.1	1.2	0.1	1.5	0.0
キシロース	6.3	0.1	6.2	0.3	2.1	0.2
エタノール (最大値) *	23.4	0.1	22.8	0.3	28.2	0.4

* 各糖化液に含まれるグルコースおよびセロビオースがエタノールに変換された場合の計算上の最大値 [= (グルコース実測値 + セロビオース実測値 × 360 / 342) × 0.511]

第3表 糖化液に含まれる発酵阻害物質(mg/L)

	糖化液A		糖化液B		糖化液C	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
低分子フェノール4種	245.7	39.3	検出されず		100.5	12.9
(内訳) バニリン	29.6	3.4	検出されず		13.3	0.8
シリンガアルデヒド	81.4	10.1	検出されず		45.8	6.5
4-ヒドロキシ安息香酸	122.1	28.1	検出されず		33.1	5.8
4-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸	12.6	1.1	検出されず		8.3	0.3
有機酸2種	4441.1	36.7	4166.7	100.4	713.4	6.6
(内訳) ギ酸	569.8	12.0	470.2	16.6	検出されず	
酢酸	3871.3	25.4	3696.5	84.4	713.4	6.6
フラン2種	101.2	4.3	9.3	0.1	8.1	0.1
(内訳) 2-フルアルデヒド	21.8	1.1	4.7	0.0	6.2	0.1
5-ヒドロキシメチル-2-フルアルデヒド	79.5	4.0	4.6	0.1	1.9	0.0

キシロース量が減ったためと考えられる。

糖化液中の中性糖濃度より、発酵試験によって生成するエタノールの最大値を算出した(第2表)。一般に*Saccharomyces cerevisiae*は、グルコースを資化しエタノールを生成するが、キシロースは資化しない¹³⁾。そこで、キシロースは濃度計算から除外した。また、セロビオースについては資化されないと考えられるが、本研究では酵素失活処理を行わずに糖化液を発酵試験に供しており、残存するメイセラゼ由来のβ-グルコシダーゼ活性によりセロビオースのグルコース変換が起こり、資化される可能性があったことから、セロビオースについては濃度計算に含めた。その結果、エタノールの最大値は22.8~28.2g/Lになると算出された。

3.2 発酵阻害物質の定量

リグノセルロース由来の糖化液の発酵において阻害物質として知られる8種類の成分を定量した(第3表)。

糖化液Aでは、低分子フェノール4種が合計245.7mg/L、有機酸2種が合計4441.1mg/L、フラン2種が合計101.2mg/L含まれていた。低分子フェノールやフランに比べ、有機酸の濃度が一桁高かった。

糖化液Bでは、低分子フェノール4種は検出されなかった。一方、有機酸2種は合計4166.7mg/L、フラン2種は合計9.3mg/L含まれていた。糖化液Aと比較した際の阻害物質の濃度減少量は、低分子フェノール、有機酸、フランの順に245.7、274.4、91.9mg/Lであった。糖化液Bの調製では、蒸煮物の

糖化液に対して5% (w/w) の活性炭を添加して処理を行ったが、この処理は低分子フェノール4種の除去に対して十分な効果があったと言える。また、フラン2種についても、糖化液Aと比べて9割程度減少しており、効果があったと考えられる。一方、有機酸に関しては、低分子フェノールと同程度の濃度減少が認められたが、処理前の糖化液の有機酸濃度が高いため、割合的には糖化液Aと比べて1割未満の濃度減少にとどまった。チシマザサ稈水解液の活性炭処理(添加量10~20g/L)による阻害物質除去の検討例では、酢酸濃度(6g/L)に大きな変化はなかったとされる¹²⁾。今回は、この検討例よりも多くの活性炭を添加した(5% (w/w) ≒ 50g/L)が、除去効果はわずかであった。

糖化液Cでは、低分子フェノール4種が合計100.5mg/L、有機酸2種が合計713.4mg/L、フラン2種が合計8.1mg/L含まれていた。糖化液Aに対する阻害物質の濃度減少量は、低分子フェノール、有機酸、フランの順に145.2、3727.7、93.1mg/Lであり、減少割合は低分子フェノールが6割、有機酸が8割、フランが9割程度であった。この結果から、蒸煮物の温水処理は、測定した阻害物質全般に関してある程度の除去効果があったと判断される。また、活性炭処理の場合と異なり、温水処理は有機酸の大幅な濃度減少に効果的であると考えられた。

3.3 発酵阻害物質の除去処理とそれに伴う発酵性の変化

発酵試験におけるエタノール変換率の推移を

第4表 72時間発酵後の試料における中性糖とエタノール(g/L)およびエタノール変換率(%)

	糖化液A		糖化液B		糖化液C	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
グルコース	36.0	0.9	0.7	0.2	0.2	0.0
セロビオース	1.5	0.0	0.8	0.1	0.4	0.0
キシロース	6.8	0.1	6.3	0.1	2.6	0.0
エタノール（実測値）	4.0	0.5	19.0	0.1	24.7	0.1
エタノール変換率*	17.0	2.1	83.2	0.7	87.7	1.1

*エタノールの計算上の最大値（第2表）に対する実測値の割合（%）

第1図に示す。なお、エタノール変換率は、第2表に示したエタノールの計算上の最大値に対するエタノール実測値の割合（%）である。また、この第1図には、参考として栄養源（酵母エキス、ペプトン）を含むグルコース溶液（51.6g/L）を48時間発酵させた時のエタノール変換率（85.0±0.6%）を◇印で示した。

糖化液Aの変換率は、一貫して上昇したものの、糖化液BやCと比べて低く、72時間時点でも20%弱であった。この結果は、ヤナギ蒸煮物の糖化液を未処理のまま発酵させた場合、明らかな発酵阻害が起きることを示すものである。糖化液Bについてみると、変換率は24時間時点までは糖化液Aと大差なかったが、その後急激に上昇し、72時間時点で83.2%に達した。また、糖化液Cに関しては、他と比べて変換率の上昇が速く、48時間時点の変換率は87.7%となった。これらの結果は、活性炭処理や温

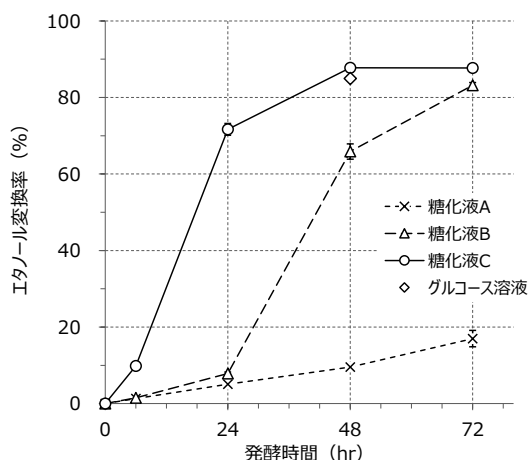
水処理を通して糖化液中の阻害物質濃度を低減させることにより、糖化液の発酵性が良好になることを示すものである。栄養源を含むグルコース溶液（51.6g/L）のエタノール変換率と比べ、糖化液BおよびCの変換率は同程度の水準になった。このことから、活性炭処理や温水処理により、阻害物質を含まない糖液の発酵性と同等の水準にまで糖化液の発酵性を改善させることができると考えられる。

糖化液BとCを比較した場合、Cの方が発酵の進行が速いと言える。先述のように、糖化液Cに含まれる阻害物質の濃度についてみると、低分子フェノールやフランの濃度は糖化液Aよりも低いが高Bよりも高く、有機酸の濃度はAやBよりも大幅に低い（第3表）。したがって、Cの発酵が速やかであったのは、有機酸の除去による効果ではないかと考えられる。ヤナギ蒸煮物の糖化液では、有機酸濃度が低分子フェノールやフランの濃度に比べて一桁高いために、有機酸による阻害作用も強く現れている可能性がある。糖化液BとCの発酵性の違いは、このことを反映した結果ではないかと推測される。

3.4 発酵試験におけるグルコースのマスフロー

発酵試験の終了時（72時間後）における発酵液中の糖類について定量した結果を第4表に示す。グルコースは、糖化前（第2表）に比べて減少しており、エタノール変換が盛んであった糖化液B、Cでは、残存量が少なかった。セロビオースについても、糖化前より減少しており、グルコース化の上、資化されたことが示唆される。一方キシロースは、糖化前と同程度の濃度であり、供試酵母による資化はなかったことが確認された。これらの結果と合わせて、第4表には最終的なエタノールの定量結果、およびエタノール変換率を示した。

以上の第4表における発酵後の定量値および第2表



第1図 発酵試験におけるエタノール変換率*

*エタノールの計算上の最大値（第2表）に対する実測値の割合（%）

第5表 発酵試験におけるグルコースのマスフロー*1

	糖化液A		糖化液B		糖化液C	
	g/L	%	g/L	%	g/L	%
発酵前	45.8	100.0	44.6	100.0	55.2	100.0
エタノール化*2	7.8	17.0	37.1	83.2	48.4	87.7
エタノール化以外の消費*3	0.5	1.0	6.0	13.3	6.2	11.2
発酵後残存	37.5	82.0	1.6	3.5	0.6	1.1

*1 セロビオースはグルコース換算の上、マスフロー計算に含めた

*2 エタノールの実測値（第4表）からの計算値（=実測値/0.511）

*3 発酵前のグルコース量よりエタノール化したグルコース量と発酵後の残存グルコース量を差し引いたもの

における発酵前の定量値より、発酵試験におけるグルコースのマスフローを作成し第5表に示した。セロビオースについては、グルコースに換算した上でマスフローに加えた。糖化液Aでは、発酵試験前に存在したグルコースの82.0%が発酵後も残存していた。阻害物質の影響により、グルコースの資化が進まなかったものと考えられる。一方糖化液B、Cでは、発酵後の残存グルコースはわずか数%であった。阻害物質の除去により、グルコースの資化が進み、効率的にエタノール生産が行われたことを示すものと言える。

4. まとめ

木質バイオマスからのエタノール製造にあたり、前処理として蒸煮を行うと、糖類やリグニンから分解物が生成し、発酵を阻害することが知られている。そこで、ヤナギバイオマスの蒸煮物に含まれる代表的な阻害物質の定量を行うとともに、阻害物質の除去処理による糖化液の発酵性の変化について調査した。蒸煮物の糖化液（糖化液A）、蒸煮物の糖化液を活性炭処理したもの（糖化液B）、蒸煮物を温水処理してから糖化したもの（糖化液C）を調製し、比較検討した結果、以下のことが明らかとなった。

- ・糖化液のpHは4.0~4.5であり、糖化液CよりもA、BのpHが低かった。
- ・糖化液の中性糖分析では、グルコース、セロビオース、キシロースが定量された。糖化液AとBでは、上記3種の濃度はほぼ同じであり、これらの糖は活性炭処理の影響を受けず、糖化液に概ね残存することが確認された。また糖化液Cでは、A、Bに比べグルコース濃度が高く、キシロース濃度が低かった。

- ・糖化液Aの阻害物質濃度は、低分子フェノール4種が合計245.7mg/L、有機酸2種が合計4441.1mg/L、フラン2種が合計101.2mg/Lであり、低分子フェノールやフランに比べ、有機酸の濃度が一桁高かった。糖化液Bでは、Aと比べて低分子フェノールが10割、フランが9割程度減少していたが、有機酸は1割の減少にとどまった。糖化液Cでは、Aと比べて低分子フェノールが6割、有機酸が8割、フランが9割程度減少していた。
- ・糖化液Aにおけるエタノール変換率は、糖化液BやCと比べて低く、ヤナギ蒸煮物の糖化液を未処理のまま発酵させた場合、明らかな発酵阻害が起きることが示された。糖化液Bでは、変換率は24時間時点までは糖化液Aと大差なかったが、その後急激に上昇し、72時間時点で83.2%に達した。また、糖化液Cに関しては、他と比べて変換率の上昇が速く、48時間時点の変換率は87.7%となった。
- ・糖化液Aでは、発酵前に存在したグルコースの82.0%が発酵後も残存していた。一方糖化液B、Cでは、試験後の残存グルコースはわずか数%であった。

付 記

本研究の一部は、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) バイオ燃料技術革新協議会：“バイオ燃料技術革新計画”，経済産業省資源エネルギー庁，東京，

2008.

2) 森林総合研究所北海道支所：“北海道におけるエネルギー作物「ヤナギ」の生産の可能性”，札幌，2014.

3) 北海道開発局開発調査課：“北海道におけるヤナギ栽培マニュアル平成22年度版”，北海道開発局，札幌，2011.

4) 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.

5) 志水一允：“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. 9-33.

6) 斎藤直人，大宮康則，安久津久，葛西章：林産試験場月報 410，7-14 (1986).

7) 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).

8) 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).

9) 遠藤展，葛西章，森山実，中村繁夫，大宮康則：林産試験場報 1 (6)，27-33 (1987).

10) Palmqvist E，Hahn-Hägerdal B：Bioresource Technology 74，25-33 (2000).

11) Sassner P，Galbe M，Zacchi G：Enzyme and Microbial Technology 39，756-762 (2006).

12) 三浦正弘，妹尾朋暁，霜鳥慈岳，青山政和：日本木材学会北海道支部講演集 44，1-2 (2012).

13) 食品総合研究所：“食糧—その科学と技術—第51号”，つくば，2013.

—利用部 バイオマスグループ—

—*1：利用部 微生物グループ—

（原稿受理：15.11.24）