

研究論文

農産廃棄物系バイオマス酵素糖化のための 1-n-ethyl-3-methylimidazolium acetate Ionic liquid-heat 法による前処理最適条件の検討

高山 勝己^{*1}, 松野 敏英¹, 川島 尚大², 仁宮 一章², 高橋 憲司²

¹福井工業高等専門学校 物質工学科 (〒916-8507 福井県鯖江市下司町)

²金沢大学 理工学域 生命理工学類 (〒920-1192 石川県金沢市角間町)

*takayama@fukui-nct.ac.jp

Pretreatment of enzymatic saccharification for inedible biomass by 1-n-ethyl-3-methylimidazolium acetate ionic liquid-heat method

Katsumi TAKAYAMA,^{*1} Toshihide MATSUNO,¹ Naohiro KAWASHIMA,¹
Kazuaki NINOMIYA² and Kenji TAKAHASHI²

¹Department of Chemistry & Biology Engineering, National Institute of Technology, Fukui College
(Geshi-cho, Sabae 916-8507, Japan)

²School of Biological Science and Technology, Kanazawa University
(Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192, Japan)

(Received August 30, 2019; Accepted October 8, 2019)

Abstract

Ionic liquid heat (IL-heat) pretreatment for the downstream processing of enzymatic saccharification was tested in this study. Three lignocellulosic materials—bagasse, rice straw, and rice husk—were treated in 1-n-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim]OAc) under conditions of various temperatures and reaction times. The cellulase saccharification ratio was 70% for bagasse powders after IL-heat pretreatment at 110°C for 2 hr.

Keywords: ionic liquid, enzymatic pretreatment, lignocellulosic biomass, saccharification, 1-n-ethyl-3-methylimidazolium acetate

1. はじめに

気候変動に関する政府間パネル (Intergovernmental Panel on Climate Change) による報告によると気候変動は現実問題であり、その原因は化石燃料の燃焼と森林伐採にある。このまま温暖化が進めば世界平均の海水面は2100年までに1m上昇すると予測されている。温暖化に起因するガスは二酸化炭素、メタン、亜酸化窒素が主要であるが特に二酸化炭素濃度と気温上昇の相関は周知である。よって二酸化炭素の排出削減は温暖化防止解決策の優先課題と言える。持続可能な社会構築に向けて太陽光、地熱、風力の利用とともに、カーボンフリーである未利用バイオマスの積極的な利用は必然である。

未利用バイオマスいわゆる草本木類は主にセルロース、ヘミセルロース、リグニンの3成分から構成されている。ゆえに草本木を原料とするためには、リグニンの溶解除去とセルロースの結晶性領域の破壊処理を行ってからセルラーゼによる酵素糖化を経て、続くバイオプロセス工程で様々な有用物質に変換される (バイオリファイナリー)。なおヘミセルロースやリグニン成分の有効利用に

ついて併せて検討されている。

このように、バイオマスの有効利用の工程は前処理→糖化→発酵 (有用物質生産) の3工程からなり、初段階の前処理工程はその後の工程に大きく影響する。前処理には従来からの硫酸などを用いる酸処理法、オルガノソルブ法、水熱法、メカノケミカル法など多様である。

大野らはセルロースとリグニンの複合体 (ブラン粉末) からセルロースを温和な条件で抽出できるイオン液体を開発し有望な前処理法として提唱した [1-3]。適当なイオン液体中に粉末化したバイオマスを投入し攪拌しながら加熱処理 (Ionic liquid heat 法; IL-heat 法) することで、リグノセルロースが溶解し、リグニン構造の緩和並びにセルロース分子鎖間の水素結合が切断され非晶化が進み、後の糖化工程でセルロースに対するセルラーゼの作用が容易になる [4-6]。

高橋らは、市販に入手可能なリグノセルロース溶解性を持つ各種イオン液体を用いて、ケナフパウダーの酵素糖化前処理の最適化を報告した [7]。ここで [Emim]OAc (図 1) の適用がその後の糖化効率が最も高く、加熱法

による処理条件では 110°C, 2 hr でほぼ糖化率 100% となることを報告した。さらに超音波法との組み合わせであれば 30 min で達成できることを合わせて報告した。

本論文ではケナフの前処理で得られた知見に基づき, 3 つの代表的な農産廃棄物系バイオマス (バガス, 稲わら, もみ殻) を対象に, [Emim]OAc を用いる IL-heat 前処理反応条件 (処理時間, 温度, バイオマスの粒径) の最適化を検討したので報告する。

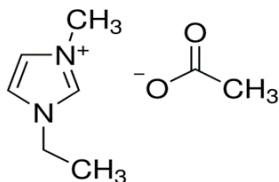


図 1 [Emim]OAc の化学構造式

2 実験

2.1 各種バイオマスの前処理

100-mL ビーカーに [Emim]OAc (関東化学) 50 g を入れ, 任意の温度に加熱 (80, 110, 140°C) し, 粉碎処理 (0.25 mm 以下, 1.0 ~ 1.7 mm, 1.7 ~ 2.8 mm) したバイオマス原料 (生産農家から入手したバガス, 稲わら, もみ殻) 5 g を加えて (IL/Biomass 比 = 1:10), 160 rpm で所定の時間 (1~24 hr) 攪拌した。イオン液体処理後, アセトン 50 wt% 水溶液 500 mL に全量を加え, さらに室温で 1 hr 攪拌した。その後 8000 rpm, 25°C で 10 min 遠心分離し, 沈殿物を 90°C で 24 hr 乾燥して前処理バイオマス分画を得た。ここで前処理バイオマス分画の回収率を (1) 式で定義した。上澄み液からエバポレーター (200 Torr, 60°C) を用いてアセトンを回収し, 残留物 (主にイオン液体, 水, リグニンからなる混合物) を 8000 rpm, 25°C で 10 min 遠心分離し, 沈殿物を 50°C で乾燥してリグニン分画とした (上澄みは再利用イオン液体となる)。ここで分画リグニン収率を (2) 式で定義した。

$$\text{前処理バイオマス分画回収率}[\%] = \left(\frac{\text{前処理バイオマス分画重量}[\text{g}]}{\text{原料重量}[\text{g}]} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{分画リグニン収率}[\%] = \left(\frac{\text{リグニン分画の重量}[\text{g}]}{\text{原料重量}[\text{g}]} \right) \times 100 \quad (2)$$

ここで原料重量は 5[g] となる。

2.2 硫酸加水分解を用いた各種バイオマスの組成分析

25-mL ガラス容器に分析対象原料 0.1 g と 72% (V/V) 硫酸水溶液 2 mL を入れ, 室温下で 15 分毎に 8 回ボルテックスミキサーで攪拌した。その後, 蒸留水 75 mL を入れた 200-mL フラスコに全量を移し, オートクレーブ (121°C, 15 min) 処理を行った。オートクレーブ後, 濾過し沈殿物を 100°C で 12 hr 乾燥させ, 酸不溶性リグニンとして重量を測定した。上清中に含まれる酸可溶性リグニン量は波長 205 nm の吸光度から見積もった。なお, 酸可溶性リグニン重量の算出は (3) 式を用いた。

$$M_a = (\Delta A_{205} \times V \times D \times L) / \epsilon \quad (3)$$

M_a : 酸可溶性リグニン重量 [g]

ΔA_{205} : サンプルとブランクに対する測定値の差

V: ろ液体積 [L]

D: 希釈倍率 [-] で本実験では 5 である。

L: セル長 [cm] で本実験では 1 である。

ϵ : 酸可溶性リグニンのモル吸光係数 (= 110 [L/g·cm])

さらに, ろ液に含まれるグルコース (原料中のセルロース由来) とキシロース濃度 (原料中のヘミセルロース由来) を高速液体クロマトグラフィー (ナカライ社カラム: COSMOSIL Sugar D 4.6 mm i. d. x 250 mm L., 移動相: アセトニトリル: 水 = 8:2, 流速 0.5 mL/min, 検出器: RI) を用いて測定し, 硫酸加水分解処理液に含まれるグルコースとキシロースの重量を算出した後, (4), (5) 式を用いてセルロース量とヘミセルロース量を算出した。

$$\text{セルロース重量}[\text{g}] = \text{グルコース重量}[\text{g}] \times 0.9 \quad (4)$$

ここで 0.9 = 162/180

$$\text{ヘミセルロース重量}[\text{g}] = \text{キシロース重量}[\text{g}] \quad (5)$$

2.3 各種バイオマス酵素糖化

50-mL フラスコに 0.1 M 酢酸バッファー (pH 5.0) 20 mL と前処理バイオマス 0.12 g, セルラーゼオノヅカ 3S (ヤクルト社製) 0.41 g, 雑菌増殖を防ぐ為のトルエン 0.2 mL を加え 50°C, 120 rpm で 24 hr 振とうした。糖化反応液を濾過し, ろ液に対して 2.2 に記載した HPLC 分析を行い, 糖化液中のグルコース含有量を求め, (4) 式からセルロース量を算出した。なお, セルラーゼオノヅカ 3S に含まれているデキストリン由来のグルコースが生成するので, 原料 (基質) を含まないブランク実験を行い補正した。糖化率は (6) 式を用いて算出した。

$$\text{糖化率}[\%] = \left(\frac{\text{糖化液中のグルコース含有量から算出したセルロース量}[\text{g}]}{\text{原料中のセルロース含有量}[\text{g}]} \right) \times 100 \quad (6)$$

ここで原料中のセルロース含有量は, 2.2 の硫酸加水分解実験により求められたセルロース成分の割合に原料 (基質) 投入量を乗じて算出した。

酵素糖化処理液を 8000 rpm, 25°C で 10 min 遠心分離して糖化残渣を回収した。その後 24 hr 乾燥後, 重量測定し糖化残渣回収率を (7) 式から算出した。

$$\text{糖化残渣回収率}[\%] = \left(\frac{\text{糖化残渣回収量}[\text{g}]}{\text{糖化に用いた原料の重量}[\text{g}]} \right) \times 100 \quad (7)$$

ここで, 糖化に用いた原料の重量は 0.12[g] である。

2.4 イオン液体の再利用実験 (バガスのみ対象)

2.1 の方法に従って 1 度使用した後, 回収されたイオン液体を再度前処理に用い糖化率への影響を検討した。

3 結果と考察

3.1 各種バイオマスに対する前処理

[Emim]OAc を用いて各種バイオマス (バガス, 稲わら, もみ殻) に対し各条件において前処理を行った。

図 2 にバガスに対する前処理バイオマス分画回収率の検討結果を示した。イオン液体による処理時間が長くなるにつれ回収率は 82% から 73% に減少し, 処理温度が高くなるにつれ回収率は 86% から 65% に減少することがわかった。バガスの粒径サイズ (粒径 0.25 mm 以下, 1.0 ~ 1.7 mm, 1.7 ~ 2.8 mm) の影響について 110°C, 6 hr の処理条件で比較したところ, 約 80% と一定であり殆ど影響しないことがわかった (データ未記載)。

次に稲わら (粒径 0.25 mm 以下) と, もみ殻 (粒径 0.25 mm 以下) に対して反応条件を 110°C, 6 hr で処理し, それぞれの前処理バイオマス分画回収率を求めたところ, 稲わらは 89%, もみ殻は 135% となった。もみ殻の値が 100% を超えたのは, イオン液体処理後のアセトン 50 wt% 水溶液によるイオン液体の洗浄除去が他 2 つのバイオマスに比べ困難であり, 処理後のもみ殻にイオン液体が吸着したままの状態になってしまったことによる。

バガスに対する各処理条件での分画リグニン収率を図 3 に示した。イオン液体による処理時間が長くなるにつれ, あるいは処理温度が高くなるに従って分画リグニン収率は 1.2 から 3.5% まで増加傾向にある事がわかった。なお, 図 4 に示したようにバガスの粒径が小さくなるにつれ, 分画リグニン収率は, 2.2% から 3.1% に増加傾向にあることもわかった。稲わら (粒径 0.25 mm 以下) に対しては, 110°C, 6 hr 処理で 1.5% であった。もみ殻については 41% となったがイオン液体が吸着した状態であり正確に評価できたとは言えない。

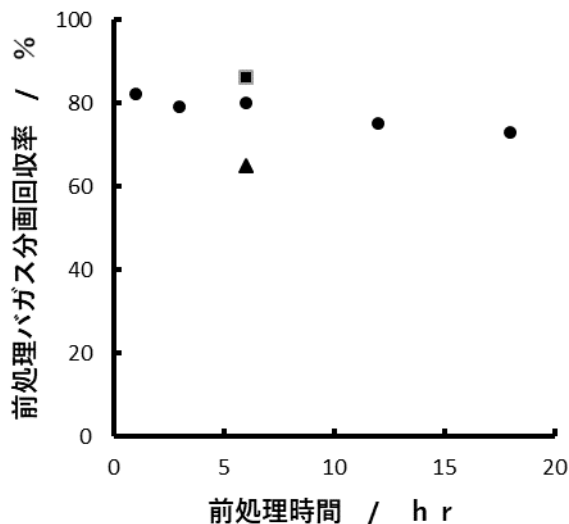


図 2 バガス (粒径 0.25 mm) に対する各条件で前処理を行った後の前処理バガス分画回収率
反応温度 ■ : 80°C, ● : 110°C, ▲ : 140°C

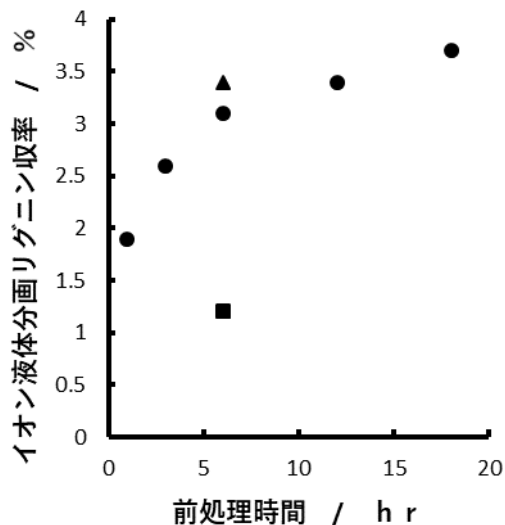


図 3 バガスに対する各条件での分画リグニン収率
反応温度 ■ : 80°C, ● : 110°C, ▲ : 140°C

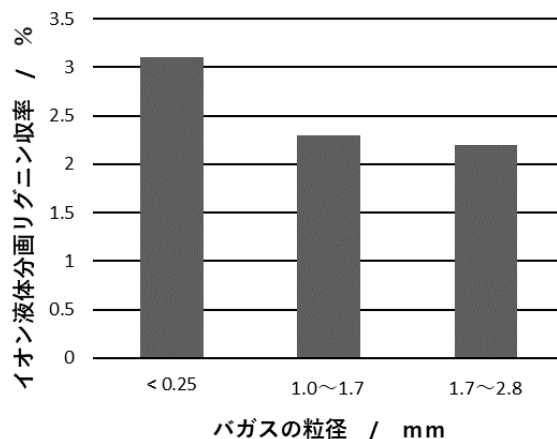


図 4 バガス粒径による分画リグニン収率変化 (反応温度 : 110°C, 6 hr)

3.5 バガスの組成分析結果

各種バイオマスを温度 110°C に固定して処理時間のみを変えた時の前処理前後における主成分の成分割合の分析結果を表 1~3 に示した。いずれのバイオマスも前処理前 (0hr) と後 (処理時間 1~24hr) での各成分の構成割合に大きな変化は見られなかった。なお, もみ殻には大量のその他の成分 (全体の 15~20% 程度がシリカ [8] である) が含まれており, これがイオン液体のもみ殻への強固な吸着の要因となっているものと推測される。

表1 バガスの前処理前後の主な成分割合[%]

処理時間(hr)	セルロース	ヘミセルロース	総リグニン	その他
0.0	37.4	29.6	35.4	7.6
1.0	36.5	26.1	28.1	9.3
3.0	37.1	28.4	27.4	7.1
6.0	39.6	30.4	24.3	5.7
12.0	41.1	31.2	21.3	6.4
18.0	37.1	38.0	19.6	5.3

表2 稲わらの前処理前後の主な成分割合[%]

処理時間(hr)	セルロース	ヘミセルロース	総リグニン	その他
0.0	37.6	12.8	34.6	15.0
3.0	34.8	10.2	39.2	15.8
6.0	35.2	12.0	31.8	21.0
24.0	29.0	12.2	33.6	25.2

表3 もみ殻の前処理前後の主な成分割合[%]

処理時間(hr)	セルロース	ヘミセルロース	総リグニン	その他
0.0	14.5	8.6	35.4	42.8
1.0	8.4	4.7	34.4	52.6
3.0	11.1	3.4	35.6	49.9
6.0	9.0	3.1	32.3	55.6
24.0	7.3	2.0	20.1	70.5

3.6 酵素糖化結果

バガスと稲わらに対して、温度を110℃に固定し、時間を1~24 hrの範囲で任意時間前処理を行った後、前処理バイオマス分画に対して酵素糖化处理した時の糖化率の変化を図5に示した。0 hrのデータはイオン液体処理を行わずに原料をそのまま糖化した場合である。バガス、稲わら(0.25 mm以下)ともに処理温度110℃、6 hrの条件でそれぞれ90.7%、77.9%となり、IL-heat法による前処理の効果が示された。

なお、バガスを対象として処理時間6 hrとし処理温度を80℃と140℃に変えた場合は、糖化率はそれぞれ47.2%、90.7%になった。さらに処理時間6 hr、処理温度110℃にて粒径の影響を検討したところ、0.25 mm以下の時90.7%であったのに対して1.0~1.7mmでは86.5%、1.7~2.8 mmでは81.1%となり、原料を微粉化するほど糖化効率が向上できる事がわかった。もみ殻はイオン液体の除去が不完全であったため酵素糖化実験は実施しなかった。

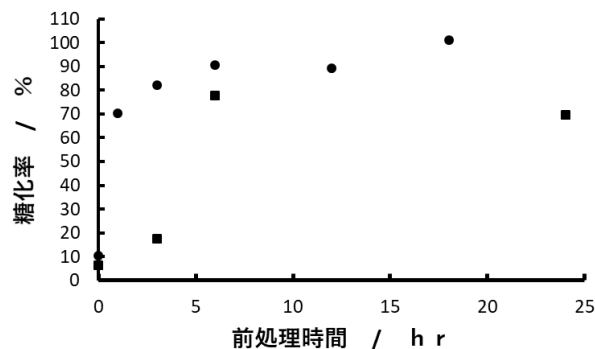


図5 前処理時間のバガス糖化率に対する効果

● : バガス, ■ : 稲わら

バガス(0.25 mm以下)を対象として、前処理時間と温度が糖化残渣回収率(セルロース成分が酵素糖化されるので固形分(残渣)は前処理時間が長くなるにつれて減少することが予想される)に及ぼす影響を図6に示した。

前処理時間を6 hrとして、前処理温度110℃で13.5%であったのに対して、80℃で53.2%、140℃で6.3%となった。さらに110℃、6 hrの前処理条件で粒径の影響を検討したところ、0.25 mm以下の場合13.5%に対して1.0~1.7mmのものは15.0%、1.7~2.8mmのものは16.0%となり微細化が残渣低減に寄与することが分かった。

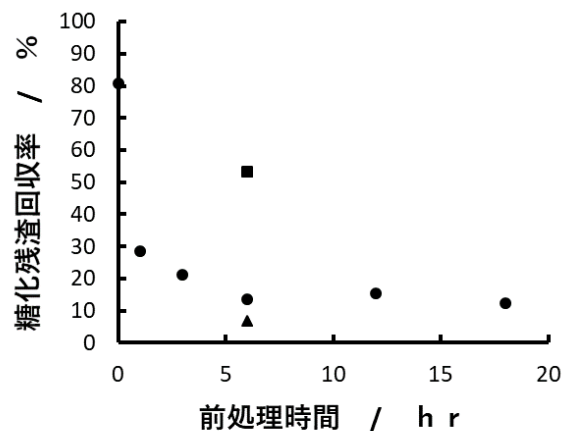


図6 前処理時間と温度因子によるバガス糖化残渣回収率の変化

反応温度 ■ : 80℃, ● : 110℃, ▲ : 140℃

3.7 イオン液体の繰り返し利用

バガス(粒径 0.25 mm以下)を対象に、110℃、6 hrの前処理を行い糖化处理した。再度回収したイオン液体を繰り返し用いた。回収イオン液体は黒褐色に着色(図7)し明らかにリグニン由来の成分が溶け込んだ色調となり2度目の糖化率は初回の1/10に減少した。



使用前

使用后(回収後)

図7 [Emim]OAc イオン液体の使用前後の色調変化

4 結論

[Emim]OAcによるIL-heat法を用いて3つのバイオマス(バガス, 稲わら, もみ殻)の酵素糖化に対する前処理条件(温度と時間)の検討を行った。もみ殻は他の2つのバイオマスに比較して処理後にイオン液体の強固な付着問題が生じたため糖化処理工程への移行が円滑に行うことができなかった。

バガスと稲わらの最適前処理条件は110°C, 6 hrである。特にバガスについては, 2 hrの処理で70%の糖化率

が得られると考えられ, かつ原料の細粉化は糖化効率や最終残渣の減少に寄与する。

参考文献

- 1) M. Abe, Y. Fukaya, and H. Ohno. *Green Chem.* 2010, vol. 12, p. 1274-1280.
- 2) 大野弘幸, イオン液体. 高分子学会編, 2012, p. 129.
- 3) 深谷幸信, 大野弘幸. イオン液体の科学, イオン液体研究会 監修, 2012, p. 374.
- 4) Anantharam P. Dadi, S. Varanasi and Constance A. Schasll. *Biotechnol. Bioeng.* 2006, vol. 95, p. 904-910.
- 5) S. Singh, Blake A. Simmons and Kenneth P. Vogel. *Biotechnol. Bioeng.* 2009, vol. 104, p. 68-75.
- 6) N. Sun, M. Rahman, Y. Qin, M. L. Maxim, H. Rodriguez and R. D. Rogers. *Green Chem.* 2009, vol. 11, p. 646-655.
- 7) K. Ninomiya, K. Kamide, K. Takahashi and N. Shimizu. *Bioresour. Technol.* 2012, vol. 103, p. 259-265.
- 8) J. Umeda, R. Takada, Y. Michiura and K. Kondoh. スマートプロセス学会誌. 2014, vol. 3, p. 323-327.