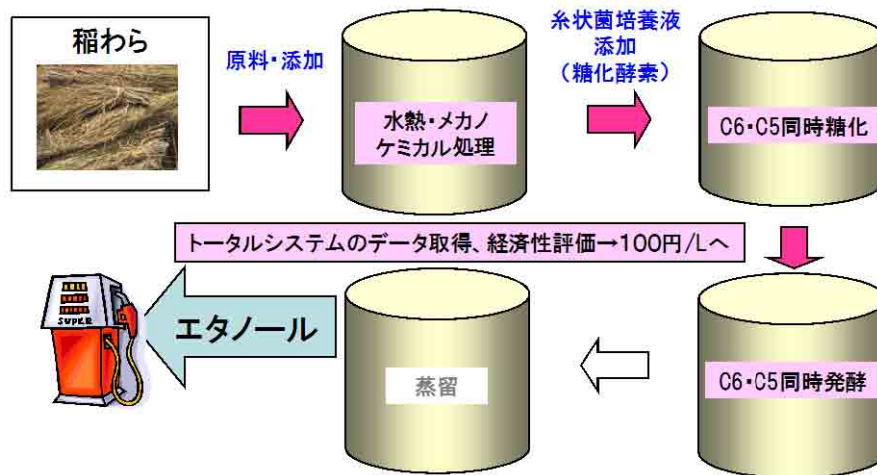


# 稲わら水熱・酵素糖化・エタノール発酵基盤技術研究開発

(独)産業技術総合研究所・バイオマス研究センター

## 1. 研究目的

環境負荷が低く経済的で効率の高い、稲わらからのバイオエタノール製造技術の確立を目指し、稲わらからのバイオエタノール製造原価 100 円/L以下を達成する技術の開発を行っています。前処理・糖化・発酵について得られた実験データから稲わらバイオエタノール技術開発のポートフォリオを作成するとともに、当該システムの経済性シミュレータを構築し、経済性の解析を行って技術開発にフィードバックしています。



研究内容:環境負荷が低く経済的なバイオエタノール生産技術確立を目指し、稲わらに適した水熱、酵素糖化、発酵法について基盤技術の研究開発を行い、当該システムの経済性を検討する。



## 2. これまでの研究期間における主な研究成果

平成19年度：

トータル単糖量（キシロースおよびグルコース）の観点から、稲わら（2mm以下）の水熱処理では160～180℃の水熱処理が最も効率よく酵素糖化が進行する処理であることが明らかになりました。糖化処理に用いる酵素を検討した結果、市販セルラーゼもしくは、セルラーゼ生産糸状菌の培養液のみを用いた糖化処理ではキシロースの収率が低く、それらに市販ヘミセルラーゼを加えたカクテルを調製することでキシロース収率が改善されることがわかりました。酵素カクテルを用いた水熱処理試料の糖化評価の結果、グルコース収量については180℃の処理が高かったが、キシロース収量が低く、全体の糖収量については160℃の処理の方が高いことがわかりました。これは、180℃の水熱処理により、キシロースの過分解が起こったためと考えられます。

本プロセスを評価するためのプロセスシミュレーションの確立を目的として、まず基本となるプロセスフローを考え、プロセス設計を行い、現状でのエタノールの製造コストを計算すると403円/Lとなることがわかりました。さらに、本結果の内訳を検討したところ、製造コストの64%が酵素調達費用であることがわかりました。したがって、開発の第一ステップとして、必要酵素使用量を低下させる技術の開発、あるいはオンサイト酵素生産等の安価な酵素供給手法の開発等が必要であることがわかりました。そこで、以上の点を考慮し、オンサイト酵素生産を行うことを検討しました。その結果、酵素調達費用がエタノール製造コストに占める割合は35%に低減し、エタノール製造コストも223円/Lに低下することが確認できました。さらに、五炭糖の発酵を行えるものと仮定して検討を行ったところ、エタノール製造コストは164円/Lにまで低下することがわかりました。

平成20年度：湿式ディスクミルと水熱処理を組み合わせた前処理法の検討を行ったところ、酵素糖化性が向上することがわかりました。また、稲わらをカッターミルで2mm以下に裁断したものを出発原料とし、水熱およびボールミル、ディスクミル処理をそれぞれ行い、これらの前処理物を炭素源として含む培地を用い、本研究室で取得された *Acromonium cellulolyticus* CF2612 株による糖化酵素生産をそれぞれ行いました。その結果、カッターミル処理および水熱処理では低い生産性を示したのに対し、ボールミル処理及びディスクミル処理では高い酵素生産性を達成しました。また、市販酵素とアクレモニウム培養液の糖化性比較を行ったところ、ディスクミル処理が優れていることがわかりました。これらのことから、稲わらをバイオ燃料の原料としてだけでなく、糸状菌由来の糖化酵素生産の炭素源にも利用する一貫した生産体系を築くことにより、バイオ燃料生産の低コスト化が可能になると考えられます。

プロセスシミュレーションから得られた熱・物質収支のデータを用いて、昨年度よりも詳細な経済性シミュレーションを行うと同時に各工程の実験データ、コストデータを収集してシミュレーションに組み入れました。その結果、前処理・糖化・発酵等の各工程のエタノール製造コストに占める割合等の推算、および本プロセスで求められるエネルギー量を見積もることが可能となりました。

平成21年度：

通常の水熱処理時(180℃)では、糖化酵素量を削減するとグルコースの生成が大きく減少して

しまいが、リン酸を添加することにより、少ない酵素量でも効率よくグルコースが生成することがわかりました。さらに、リン酸を加えると最適な温度条件が160℃に下げられることも明らかになりました。一方、キシランに対してはリン酸水熱処理のみで約70%がキシロースとして単糖化されていますが、さらに酵素糖化処理を用いると、グルコースの収率も向上することが明らかになりました。これらのことから、リン酸水熱処理により、少ない酵素量でも糖化が進行し、酵素量の低減に寄与できる可能性が示されました。水熱処理を行う際の固液比は、前処理エネルギーの削減に大きく寄与する部分です。もし、高濃度での水熱処理が可能になれば、後段の糖化・発酵も高濃度化が可能になり、エネルギー削減が可能になります。水熱処理時の固形分割を増やし、リン酸水熱処理を行ったところ、固液比=1:7.5程度まで固形分濃度を高めても糖化後に得られる単糖収率にほとんど影響がないことがわかりました。昨年度の研究結果より、10回以上のディスクミル処理を行うことにより高収率で単糖が得られることがわかったため、水熱処理とディスクミル処理を組み合わせた前処理の検討を行ったところ、水熱処理温度135℃で糖化率80%を達成することができました。さらに、ディスクミル処理と140~160℃の水熱処理を組み合わせることで、ディスクミルの処理回数を5回程度にまで減らすことが可能であることが明らかとなりました。

稲わらをカッターミルで2 mm以下に裁断したもののディスクミル処理物を炭素源として含む培地を用い、*A. cellulolyticus* CF2612株による糖化酵素生産の検討を昨年度に引き続き行ったところ、ディスクミル処理で10.4 FPU/mlの酵素生産性を達成しました。また、*A. cellulolyticus* 培養液によるディスクミル処理稲わらの酵素糖化性も優れていました。したがって、糸状菌糖化酵素および発酵性糖生産のための稲わらの前処理には、ディスクミル処理が効果的であることが明らかとなりました。また、稲わら酵素糖化のためのヘミセルラーゼ生産菌を探索するために、ディスクミル処理稲わらを炭素源にしたスクリーニングを行い、稲わら中のヘミセルロースを効率的に分解するヘミセルラーゼ生産糸状菌3株(KIF78, 109, 125)を見出しました。これらの株は、いずれもキシロシダーゼ生産性が高かった。市販セルラーゼに0.2 U/g-基質キシロシダーゼ相当の培養液を添加することによって、60-70%のキシランがキシロースとして回収されました。6%ディスクミル処理稲わら培地で培養した各候補株の稲わら1 gあたりのキシロシダーゼ生産性は、KIF78株(11 U, 35 mg)、KIF109株(30 U, 42 mg)、KIF125株(56 U, 17mg)と見積もられ、50-280 gの稲わらの糖化処理に利用できます。これらの株はヘミセルラーゼのオンサイト生産に有望な株と考えられます。稲わら糖化液のグルコース及びキシロースを効率よく発酵する酵母を育種するために宿主としてキシロースからのエタノール発酵に優れた実用酵母IR-2株を用い、本株からキシロースからのエタノール発酵に優れた1倍体を単離し、キシロース代謝遺伝子を導入した結果、親株に遺伝子を導入した株よりも優れたキシロース発酵性を示す株を取得することができました。さらに、キシロース代謝遺伝子を導入した組換え1倍体同士とのメイティングを行い、5%グルコース、2%キシロースの培地で発酵収率85%を超える2倍体を数株取得することができた。

糖化率の向上が期待されるリン酸水熱前処理について、リン酸の購入費用や回収費用によるコストアップと糖化率向上によるコストダウンのトレードオフ関係を水熱のみの前処理と比較し評価しました。その結果、リン酸の使用と糖化率向上、酵素削減(ヘミセルラーゼが不要)

の間の経済的トレードオフの関係において、リン酸購入費用の負の要因が強くなりましたが、リン酸を回収・再利用することで経済的優位性が担保されました。また、糖収量の約3%以上の増加が見込まれる場合にはリン酸水熱前処理が有利になることが明らかになりました。次に、経済性シミュレーションに脱水工程を組み込んでその効果を検討したところ、全体の製造コストは6~15%の削減、必要なエネルギーは12~19%の削減が可能になるとの試算結果を得ることができました。

平成22年度：

リグニン含有率の酵素糖化性への影響について検討を行いました。稲わらに対し、脱リグニン処理のみ、あるいは脱リグニン処理と水熱処理を組み合わせることでそれぞれの稲わら基質に対し2 FPU/gの酵素量で糖化を試みたところ、リグニン含有率を1.7%まで減少させることによって水熱処理を行わない場合でも酵素糖化処理のみで77.5%のグルコースおよび66.1%のキシロースが得られました。また、水熱処理を組み合わせる場合、リグニン含有率13.9%(未処理)の稲わらを用いた際の最適水熱処理温度は180℃であったのに対し(グルコース収率:69.8%、キシロース収率:66.1%)、リグニン含有率1.7%の稲わらを用いた際には最適水熱処理温度は140℃でした(グルコース収率:94.6%、キシロース収率:82.5%)。これらのことから、水熱処理を行う際に、あらかじめリグニン含有量を少なくすることによって、処理温度の低温化と糖収率の向上が可能になることが明らかになりました。

稲わらをディスクミル処理した前処理物を炭素源として含む培地を用い、本研究室で取得された *A. cellulolyticus* CF2612 株による糖化酵素生産をジャー培養により検討したところ、フラスコレベルと同等の酵素生産性を達成しました。稲わらをディスクミル処理した前処理物を炭素源として含む培地を用いて、昨年度までの研究で取得したヘミセルラーゼ生産菌 KIF125 株による糖化酵素生産を行ったところ、150 U/g-C6 のキシロシダーゼ生産性を達成しました。セルラーゼとヘミセルラーゼをオンサイト生産する際に必要な実験データを得るため、*A. cellulolyticus* CF2612 株と KIF125 株を用いて糖化実験を行ったところ、組み合わせることによる効果が認められました。また、キシロース発酵が可能な酵母株を稲わらを炭素源として得られた糖化液により増殖させることができ、低コスト培養の可能性が示されました。

酵素添加量の効果について、酵素添加量増加によるコストアップと糖化率増加によるコストダウンとのトレードオフ関係を検討し結果、水熱前処理では酵素量4FPU/g-稲わらで、リン酸水熱前処理では酵素量2FPU/g-稲わらで、それぞれ最小となりました。リン酸水熱前処理-酵素糖化(酵素量2FPU/g-稲わら)の条件での物質収支とエネルギー収支から、エネルギー使用量4.7 MJ/kg-稲わら(ベンチマーク6 MJ/kg-バイマス以内)、エタノール収率0.267 L/kg-稲わら(ベンチマーク0.26 L/kg-バイマス以上)、エネルギー回収率42.8%(ベンチマーク35%以上(エタノール/稲わら))と試算されました。

最終年度では、これまでの実験データや解析結果を踏まえ、使用エネルギーのベンチマーク等の目標が達成できるかどうか検証を進めるとともに、原料数10kg程度の稲わらを出発原料とした実験データの取得を行うことにより、最終的な目標である稲わらからのバイオエタノール製造原価100円/L以下を達成する製造プロセスの構築を目指しています。