

バイオエタノール生産のための草本系リグノセルロースのアンモニアガス前処理 (LMAA) の走査電子顕微鏡による評価

松本 朋子¹⁾・新田 唯²⁾・竹尾 圭祐³⁾・保田 昌秀⁴⁾

Evaluation of LMAA-Pretreated Lignocelluloses by a Scanning Electron Microscope for Bio-ethanol Production

Tomoko MATSUMOTO,¹⁾ Yui NITTA,²⁾ Keisuke TAKEO,³⁾ Masahide YASUDA,⁴⁾

Abstract

Napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach), rice straw, silvergrass, and bamboo were treated with a low-moisture anhydrous ammonia (LMAA) pretreatment by adding an equal weight of water and keeping it under atmospheric ammonia gas at room temperature for one to four weeks. After the removal of ammonia and washing with water, a saccharification (SA) was conducted for the LMAA-pretreated napiergrass (10.0 g) in a buffer solution (60 mL) using an Acromozyme cellulase (1.0 g). From the results of SA, the LMAA-pretreatment for four weeks was suitable pretreatment. In the case of LMAA-pretreated napiergrass for four weeks, glucose and xylose yields were 83% and 44% yields, respectively. In SEM analysis of these lignocelluloses, many notches were observed in the fiber of the LMAA-pretreated napiergrass and rice straw.

Keywords: Napiergrass, Rice straw, Silvergrass, Bamboo SEM, LMAA

1. 緒言

1.1 第二世代バイオエタノール生産の課題

再生可能エネルギーの獲得は、地球温暖化防止の観点から重要となっている。その中で、食料と競合しないリグノセルロースからのエタノール生成が 2007 年ごろから注目されており、Galbe および Zacchi (ルンド大学、スウェーデン) らによって第二世代バイオエタノール¹⁾と呼ばれ、その重要性が増してきている。

リグノセルロースは、グルコースだけで構成されるデンプン系原料とは異なり、難発酵性のペントースからなるヘミセルロースおよび難分解性のリグニンを多く含み、乾燥バイオマスあたりのエタノールの収率が最大でも 200~300 mg/g と、低いことが問題となっている。そのために、第二世代バイオエタノール研究では、克服すべき大きな課題として次の二つが挙げられる。

第一に、酵素糖化を促進させるためには、リグニンの除去および結晶構造の変化をもたらす前処理が必要なことである。様々な前処理工程が検討されているが、しばしば生成されるバイオ燃料よりも多くのエネルギーとコストがかかる²⁾。そのために、低エネルギーおよび低コストの前処理方法の開発が望まれている。第二に、リグノセルロース

ースにはペントースで構成されるヘミセルロースを 20-35 wt%程度含んでおり、エタノール収率が低くなることである。そのゆえにリグノセルロースを原料とするバイオエタノール生産では、ペントース発酵が不可欠であり、エタノール収率を最大値に近づける努力が払われている^{3,4)}。

我々は、宮崎大学バイオエタノールプロジェクト⁵⁾として、草本系リグノセルロースの一種であるネピアグラス (*Pennisetum purpureum* Schumach) からのバイオエタノール生産を検討している。その中で、アンモニアガスを用いる前処理 (LMAA, low-moisture anhydrous ammonia) が、リグノセルロースの糖化・発酵工程を促進することを見出し⁶⁾、組換え大腸菌 KO11 を用いるペントース発酵も検討している^{6,7)}。

1.2 アンモニアのセルロース結晶への影響

セルロースには、化学反応性や性質が異なる数種の結晶相が組み込まれていることが知られている。天然には cellulose I α と I β の二つの構造が存在し、cellulose I と標記される⁸⁾。cellulose I は液体アンモニア⁹⁾や種々のアミン¹⁰⁻¹⁴⁾による処理によって cellulose III₁型に変換する。アンモニアは結晶構造中の水素結合部位に浸出していき、結晶構造を cellulose I から cellulose III₁型に変化させていると思われる。

それにより、アンモニアはパルプや繊維の性質を改善するために工業的に用いられている。また、リグノセルロースの前処理として AFEX 法 (ammonia fiber explosion) が知られており、バイオ燃料およびその他の化成品への変換

1) 産学・地域連携センター助教

2) 物質環境化学科学部生

3) 物質環境化学専攻大学院生

4) 環境応用化学科教授

において、酵素糖化の効率向上が図られている。これは、アンモニアによって酵素活性な cellulose III₁ 型が増加するためである¹⁵⁻¹⁶。しかし、AFEX は 90 °C 21 気圧の過酷な条件を必要とする¹⁷。また、SAA (soaking in aqueous ammonia) は、固形物：水の割合が 1:6 ~ 1:10 で大気圧下 40~80 °C で行なわれている^{18,19}。これらのプロセスでは、過酷な条件の保持および水溶液からのアンモニアの回収にエネルギーを要することが問題となっている。一方、ガス状のアンモニアは低エネルギーでの回収が期待できる。そこで、Kim らはリグノセルロースをアンモニアガスに暴露する LMAA 法 (Low-Moisture Anhydrous Ammonia) を開発した²⁰。我々は、Kim らの 80°C 84 h の条件を改良して、大気圧下室温で 4 週間アンモニアガスに暴露する改良 LMAA 法を開発して報告した⁷。これらの前処理条件の比較を Table 1 に示す。

Table 1 Pretreatment methods using ammonia.

Method and conditions	Ref.
AFEX Ammonia fiber explosion pretreatment at 90 °C under 21 atm	15
SAA Soaking in aqueous ammonia pretreatment at 40-80 °C in a room atmosphere, solid-to-liquid ratio of 1:6 - 1:10	19
LMAA Low-Moisture Anhydrous Ammonia pretreatment at 80 °C in a room atmosphere for 84 h solid-to- liquid ratio of 1:1.	20
Modified LMAA Low-Moisture Anhydrous Ammonia pretreatment at room temperature in a room atmosphere for one to four weeks, solid-to-liquid ratio of 1:1. Use of NH ₃ (1.1 g) for 100 g lignocellulose	7

1.3 研究目的

当研究室では、改良 LMAA 法がリグニン含量の少ないリグノセルロースの糖化および発酵に有効な前処理であることを明らかにしている⁶。そこで、本研究では、リグニン含量の異なる 4 種のリグノセルロース (ネピアグラス、イナワラ、ススキ、タケ) について LMAA 処理の効果を走査電子顕微鏡測定で評価を行なったので報告する。

2. 実験

2.1 使用機器

イオンスパッタ (日立製、E-1030) を用いて、試料を炭素蒸着し、走査電子顕微鏡 (日立 S-4100M) にて、400 倍の SEM 画像を得た。糖分析は液体クロマトグラフィー (島津 ISA-08/S2504) にて行なった。

2.2 草本系リグノセルロース

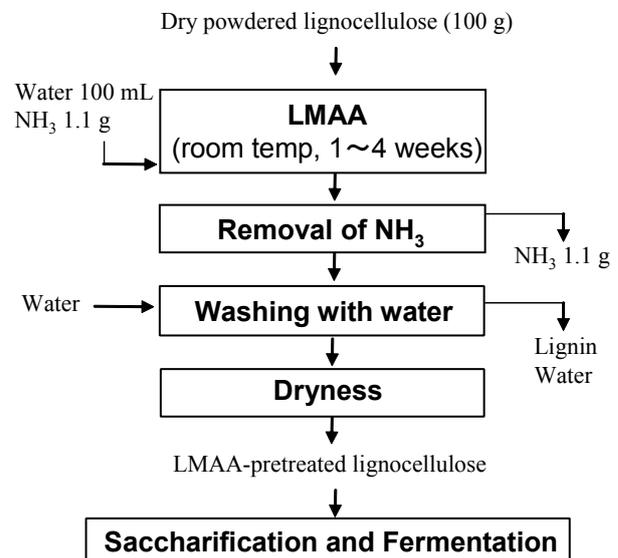
草本系リグノセルロースであるネピアグラスは本学農学部圃場で収穫され農学部石井康之教授から提供された。イナワラ (rice straw)、およびタケ (bamboo) は市販品を

用いた。ススキ (silvergrass) はキャンパス内で採取した。すべてのリグノセルロースは乾燥後、裁断し、粉碎機で粉末にして用いた。

3. 結果と考察

3.1 アンモニアガス前処理

アンモニアガスを用いる LMAA 前処理は、既報²⁰を改良して行なった。乾燥リグノセルロース粉末 (100 g, 体積約 300 mL) をフラスコ (1 L) に入れ、水 (100 g) を液滴にしてゆっくりと加えて、湿気を帯びさせた (Scheme 1)。真空ポンプで脱気を行い、アンモニアガスを充填した。この操作を三回繰り返す、フラスコ内部のガスを完全にアンモニアに置換した。フラスコ内に充填されたアンモニア重量は 1.1 g であり、既報の SAA 処理¹⁹に比べて使用するアンモニア量が極めて少ない。また、固形物と水との比は 1:1 であるが、水溶液部分は全く含まず、SAA とは異なる前処理法である。このようにして調製したネピアグラス粉末を 1 週間から 4 週間、室温で放置した。本法は、80°C、84 h で行う既報²⁰の LMAA 法に比べて省エネルギーとなっている。処理後アンモニアガスをエバポレーターで留去し、処理物は水 (2 L) で 3 回洗浄し、淡褐色の水溶液を除去した。処理したネピアグラス粉末は 60 °C で乾燥し、次の糖化反応に用いた。処理後に水洗しない LMAA 処理を LMAA-n(dry) と表した。



Scheme 1 LMAA-pretreatment using ammonia gas.

3.2 リグノセルロースの成分分析

リグノセルロースの成分分析は NREL 法²¹にしたがって、次のように行なった。粉末化したリグノセルロース (30 g) はメタノールで洗浄して脂分を取り除き、1% NaOH 水溶液 (400 mL) で 95° C、1 時間処理を行なった。黄色沈殿物としてホロセルロースが遊離した。これを遠心分離と濾過によって収集し、重量を測ることでホロセルロース量と

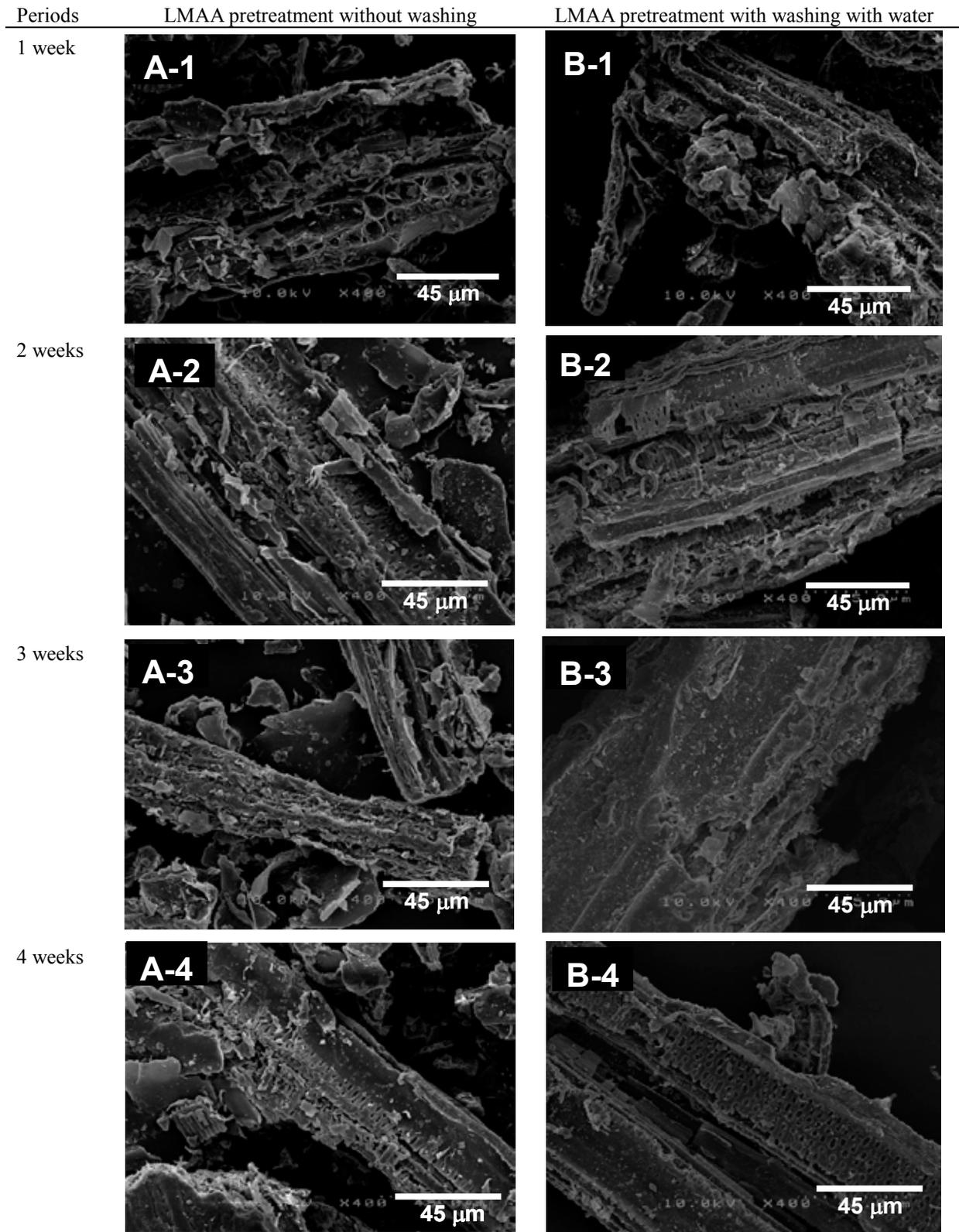


Fig. 1 SEM images of LMAA-pretreated napiergrass for given periods The napiergrass underwent to the LMAA-pretreatment without and with washing with water. The SEM images were taken under the magnification of 400.

した。ろ液は希塩酸で中和して、pH 5.0 に調製し、生成した褐色の沈殿を遠心分離 (10,000 rpm, 1 min) で分離して集めた。これをリグニン量とした。灰分量は、粉末ネ

ピアグラス (2.0 g) をるつぼに入れ、電気炉 (KBF784N1, Koyo, Nara, Japan) で 850 °C で 2 時間加熱することで求めた。成分分析の結果を **Table 2** に示す。

Table 2 Components of herbaceous lignocellulosic materials.

PT ^{a)}	LC	Components/g ^{b)}			
		HC ^{c)}	Lignin	Ash	Others
Non	Napiergrass	48.2	12.6	13.9	25.3
Non	Rice straw	61.3	18.2	17.7	2.8
Non	Silvergrass	41.0	21.7	4.0	33.3
Non	Bamboo	66.5	26.2	1.4	5.9
LMAA-1	Napiergrass	53.7	11.0	13.0	22.0
LMAA-2	Napiergrass	60.4	9.9	9.5	20.2
LMAA-4	Napiergrass	61.1	7.1	7.1	24.7

a) PT= pretreatment. Non: non-treatment, LMAA-n: LMAA pretreatment where n denotes the treatment time in week

b) The amounts of components derived from 100 g of lignocellulose.

c) HC= holocelulose

3.3 ネピアグラスの LMAA 処理における処理時間の糖化収率に対する影響

ネピアグラスを用いて、処理時間を1から4週間で変化させて LMAA 処理を行なった処理物の成分分析の結果を **Table 2** に示す。LMAA 処理によってリグニンが溶出し、処理時間の増加とともに溶出量が増加した。その結果、処理されたネピアグラス中に残存するリグニン量は減少し、ホロセルロースの含有割合が高まっている。

糖化実験⁴⁾は、未処理および LMAA 処理されたネピアグラス (10.0 g) を大型試験管に詰め、そこへ、酢酸緩衝液 (pH 5.0、60 mL) を加え、さらにセルラーゼ (Acromozyme, 1.0 g) を加えて、45 °C に保った。これを攪拌しながら、168 h、糖化反応を行った。反応後、生成物を遠心分離器にかけ、上澄み液を採取し HPLC 分析によって糖量を決定した。その結果を **Table 3** に示す。未処理のネピアグラスからは、全糖を収率 54% で生成した (run 1)。LMAA 処理をしたネピアグラスでは収率が向上し、63~67% に達した (runs 2-4)。さらに LMAA 処理時間が長くなるほど、糖化収率が向上していることが分かる。

Table 3 Saccharification of non-treated and LMAA-pretreated napiergrass using Acromozyme cellulase.^{a)}

Run	Pretreatment ^{b)}	Products/g (yield/%) ^{c)}		
		Glucose	Xylose	Total
1	Non-treatment	2.20 (70)	0.68 (31)	2.88 (54)
2	LMAA-1	2.89 (81)	0.91 (38)	3.80 (63)
3	LMAA-2	3.07 (77)	1.16 (43)	4.23 (63)
4	LMAA-4	3.36 (83)	1.20 (44)	4.57 (67)
5	LMAA-4 (dry)	2.05 (59)	0.83 (43)	2.88 (53)

a) Saccharification was performed for pretreated napiergrass (10.0 g) using the Acromozyme cellulase (1.0 g) in an acetate buffer (60 mL) for 168 h.

b) Pretreatment (PT). Non: non-treatment. LMAA-n: LMAA pretreatment for n weeks. LMAA-4 (dry) is LMAA-4 pretreatment without washing with water.

c) The amounts of saccharides obtained from the saccharification of 10 g of the pretreated napiergrass.

次に、ネピアグラスの LMAA 前処理による物理的な変化を SEM を用いて検討した。LMAA 処理したネピアグラス (**Fig. 1**) には、未処理ネピアグラス (**Fig. 2**) には見られない繊維上に無数の切れ込みが観察された。**Table 3** において LMAA 処理後に水洗をしないネピアグラス (LMAA-4(dry)) の糖化収率 (run 5) は、水洗した場合 (run 4) に比べて低下することが示された。しかし、水洗をしなかった LMAA 処理ネピアグラスの SEM 画像 (A-1 から A-4) は水洗をした LMAA 処理ネピアグラスの SEM 画像 (B-1 から B-4) と大きな変化はなかった。したがって、水洗によってネピアグラスの構造が変化するのではなく、LMAA 処理で遊離したリグニンを除去することで糖化の効率化につながったと思われる。

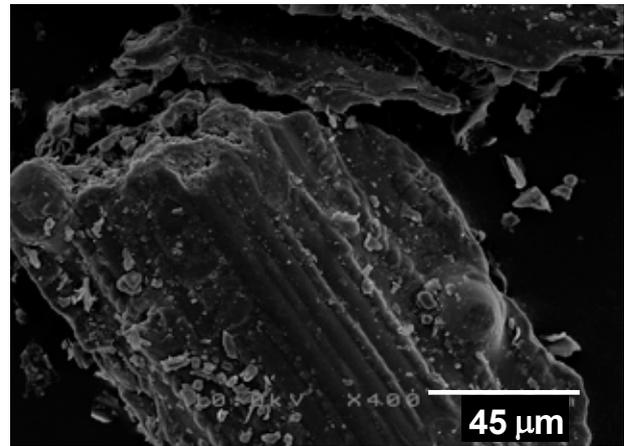


Fig. 2 SEM images of non-treated napiergrass. The SEM images were taken under the magnification of 400.

3.4 LMAA 処理したリグノセルロースの SEM 観察

イナワラ、ススキ、タケの三種類のリグノセルロースの走査電子顕微鏡 (SEM) を用いて、SEM 像測定を行なった (**Fig. 3**)。イナワラの LMAA 処理物ではネピアグラスと同様に、未処理物には見られない繊維上に無数の切れ込みが観察された。しかし、ススキおよびタケの LMAA 処理物は、未処理物と大差がなく繊維状の切れ込みも見られなかった。このことは三種のリグノセルロースの中でイナワラの糖化反応において LMAA 前処理の効果が現れると予想される。つまり、**Table 2** の成分分析において、リグニン含量が少ないリグノセルロースであるネピアグラスおよびイナワラの糖化および発酵工程に対して LMAA 前処理が有効であることが示唆された。

最近、高速原子間力顕微鏡を用いて、cellulose 結晶上での *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I 酵素の観察を行い、cellulose III₁ 型結晶において酵素が結晶表面の側面に沿ってスライドして、接近可能な溝の数を cellulose I の場合よりも増やしていることが分かっている²²⁾。LMAA 前処理されたリグノセルロースにおいても、酵素がセルロースに接近しやすくなっていると思われる。

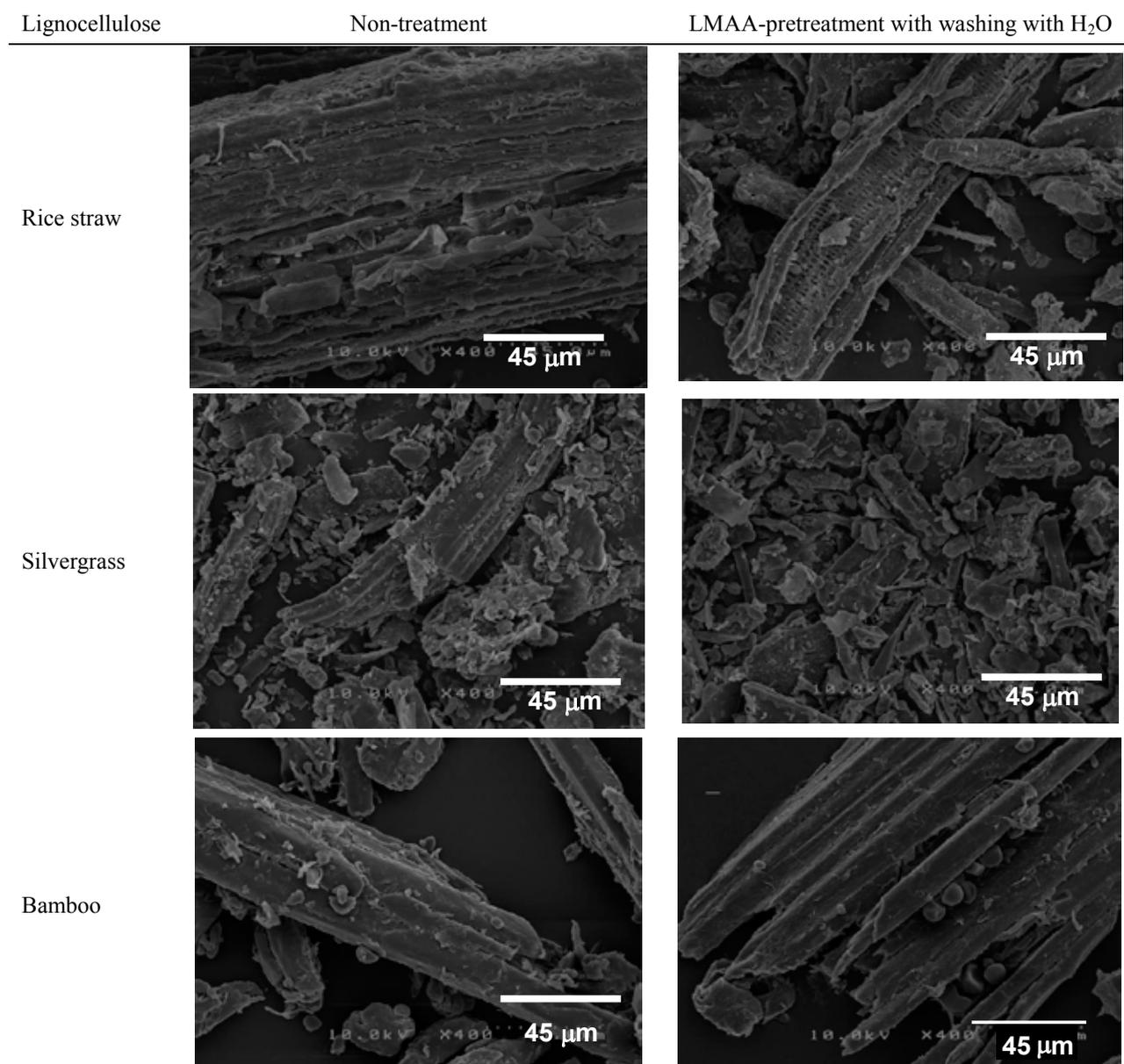


Fig. 3 SEM images of no-treated and the LMAA-treated lignocelluloses such as rice straw, silvergrass and bamboo. The SEM images were taken under the magnification of 400.

4. 結論

一般的に、リグノセルロースの前処理は、アルカリ前処理によってリグニン成分を除去する方法で行われてきた。しかし、我々の以前の検討より、リグニン含量の少ないネピアグラスの前処理方法としてアルカリ前処理が有効でなく、発酵工程を遅くする弊害があることを報告した²²⁾。これは、アルカリ前処理による発酵阻害物質の遊離または発酵に必要な栄養素の溶出が原因と考えられている。しかし、今回報告した LMAA 前処理では、そのような発酵工程での抑制が起こっていない。さらに、AFEX および SAA ではアンモニア水溶液を使うために、アンモニアの回収にはエネルギーが必要であるが、LMAA 前処理ではガス状の

アンモニアを用いるあため低コスト・低エネルギーでアンモニアの回収・リサイクルできると思われる。

最近、我々は、遺伝子組換え大腸菌 KO11 による LMAA 前処理したネピアグラスのペントース発酵がほぼ定量的に進行する最適条件を見出している^{6,7)}。これらのネピアグラスの結果から、LMAA 前処理はリグノセルロースの糖化を促進できる有用な前処理方法の一つであると思われる。一部のリグノセルロースの SEM 像観察においても、LMAA の効果が観測されたことから、これらのリグノセルロースの糖化および発酵工程においても有効であると思われる。

最後に、草本系パルプを提供して頂きました宮崎大学農学部石井康之教授に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) M. Galbe, and G. Zacchi: Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production, *Advances Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 108, pp. 41–65, 2007
- 2) P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, and M. J. Negro: Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review,” *Bioresource Technology*, Vol. 101, pp. 4851–4861, 2010
- 3) S. A. Underwood, M. L. Buszko, K. T. Shanmugam, and L. O. Ingram: Flux through citrate synthase limits the growth of ethanologenic *Escherichia coli* KO11 during xylose fermentation, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, pp. 1071–108, 2002.
- 4) A. Matsushika, H. Inoue, T. Kodaki, and S. Sawayama: Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 84, pp. 37–53, 2009.
- 5) 特別経費大学の特性を生かした多様な学術研究機能の充実(2009–2013) 高機能触媒反応によるバイオマス資源のバイオ燃料およびバイオ有価物への変換プロセスの開発、成果報告書(2014)
- 6) M. Yasuda, K. Takeo, H. Nagai, T. Uto, T. Yui, T. Matsumoto, Y. Ishii, and K. Ohta: Enhancement of ethanol production from napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumacher) by a low-moisture anhydrous ammonia pretreatment, *J. Sustainable Bioenergy Systems*, Vol. 3, pp. 179–85, 2013
- 7) M. Yasuda, A. Miura, T. Shiragami, J. Matsumoto, I. Kamei, Y. Ishii, K. Ohta: Ethanol production from non-pretreated napiergrass through a simultaneous saccharification and fermentation process followed by a pentose fermentation with *Escherichia coli* KO11, *J Biosci Bioeng*, Vol. 114, pp. 188–192, 2012
- 8) R. H. Attala and D. L. VanderHart: Native cellulose: A composite of two distinct crystalline forms, *Science*, Vol. 223, pp. 283–285, 1984.
- 9) M. A. Rousselle, M. L. Nelson, C. B. Hassenboehler Jr., and D. C. Legendre: Liquid-ammonia and caustic mercerization of cotton fibers: Changes in fine structure and mechanical properties, *Textile Research Journal*, Vol. 46, pp. 304–310, 1976.
- 10) J. J. Creely, and R. H. Wade: Complexes of diamines with cellulose: Study of symmetrical and unsymmetrical terminal group effects, *Textile Research Journal*. Vol. 45, pp. 240–246, 1975.
- 11) J. J. Creely and R. H. Wade: Complexes of cellulose with cyclic amines and diamines, *Journal of Polymer Science Part C Polymer Letters*, Vol. 16, pp. 291–295, 1978.
- 12) M. Wada, L. Heux, A. Isogai, Y. Nishiyama, H. Chanzy, and J. Sugiyama: Improved structural data of cellulose III prepared in supercritical ammonia, *Journal of Macromolecules*, Vol. 34, pp. 1237–1243, 2001
- 13) M. Wada, H. Chanzy, Y. Nishiyama, and P. Langan: Cellulose III₁ crystal structure and hydrogen bonding by synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction, *Macromolecules*, Vol. 37, pp. 8548–8555, 2004
- 14) H. Chanzy, B. Henrissat, M. Vincendon, S. Tanner, and P. S. Belton: Solid-state ¹³C-N.M.R. and electron microscopy study on the reversible cellulose I→cellulose III transformation in Valonia, *Carbohydrate. Research*, Vol. 160, Issue C, pp. 1–11, 1987.
- 15) F. Teymouri, L. Lauerano-Perez, H. Alizadeh, and B. E. Dale: Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover, *Bioresource Technology*, Vol. 96, pp. 2014–2018, 2005.
- 16) M.W. Lau, B.E. Dale, and V. Balan: Ethanolic fermentation of hydrolysates from ammonia fiber expansion (AFEX) treated corn stover and distillers grain without detoxification and external nutrient supplementation, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 99, pp. 529–539, 2008.
- 17) K. Igarashi, M. Wada, and M. Samejima: Activation of crystalline cellulose to cellulose III results in efficient hydrolysis by cellobiohydrolase, *FEBS Journal*. Vol. 274, pp. 1785–1792, 2007.
- 18) T.-H. Kim and Y.Y. Lee: Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia, *Applied Biochemistry and Biotechnology Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, Vol. 124, pp. 1119–1132, 2005.
- 19) J.-K. Ko, J.-S. Bak, M.-W. Jung, H.-J. Lee, I.G. Choi, and T.-H. Kim: Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes, *Bioresource Technology*, Vol. 100, pp. 4374–4380, 2009.
- 20) C. G. Yoo, N. P. Nghiem, K. B. Hicks, T. H. Kim: Pretreatment of Corn Stover by Low Moisture Anhydrous Ammonia (LMAA) Process, *Bioresource Technology*, Vol. 102, No. 21, pp. 10028–10034, 2011.
- 21) A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templaton, and D. Crocker: Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, Technical Report NREL/TP-510–42618, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. 2010.
- 22) M. Yasuda, K. Takeo, T. Matsumoto, T. Shiragami, Y. Matsushita, K. Sugamoto, and Y. Ishii: Effectiveness of lignin-removal in simultaneous saccharification and fermentation of napiergrass, rice straw, silbergrass, and bamboo with different lignin-contents, Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization, Edited by A. K. Chandel and S. Silverio da Silva, InTech, Croatia, Chapter 4, pp. 91–104, 2013.