



アンモニアガス前処理法の開発：  
ネピアグラスの辞素糖化および同時糖化発酵に対する効果

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2020-06-21 キーワード: 作成者: 保田, 昌秀 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10458/5719">http://hdl.handle.net/10458/5719</a>

# アンモニアガス前処理法の開発：

## ネピアグラスの酵素糖化および同時糖化発酵に対する効果

(宮崎大学工学部・農学部) 保田昌秀・石井康之・太田一良

**【要約】** ネピアグラス (*Pennisetum purpureum* Schumach) のアンモニアガス前処理 (EGA, Exposure to gaseous ammonia) について検討した。EGA は、乾燥ネピアグラス粉末を同重量の水で湿らせ、アンモニアを充満させたフラスコ中に室温で数週間暴露させる方法である。EGA の効果を酵素糖化 (SA) において検証し、アンモニアガス中に放置する最適時間を決定した。その結果、4 週間の EGA 処理が最適であることが分かった。4 週間 EGA 処理したネピアグラス (EGA-4) を *Acremonium cellulolyticus* 由来のセルラーゼ (Acremozyme KM) および *Trichoderma longibrachiatum* (reesi) 由来のキシラナーゼ (Sumizyme X) の混合酵素を用いて糖化を行なった結果、グルコースおよびキシロースがそれぞれ 100% および 60% の収率で得られた。さらに、同時糖化発酵 (SSF) によるエタノール生成においても、EGA の効果を検証した。EGA-4 処理したネピアグラス (1.33 g) に対して酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 溶液 (0.16 mL) および Acremozyme セルラーゼ (67 mg) および Sumizyme キシラナーゼ (67 mg) を用いる SSF では、収率 94% および 48% でエタノールおよびキシロースをそれぞれ得た。

## 1 緒言

### 1-1 第二世代バイオエタノール生産の課題

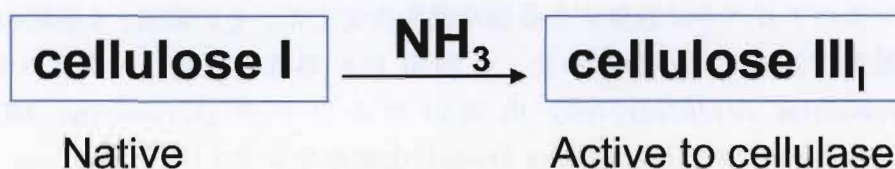
再生可能エネルギーの獲得は、地球温暖化防止の観点から重要となっている [1]。その中で、食料と競合しない“リグノセルロース”からのエタノール生成が 2007 年ごろから注目され、Galbe, M. および Zacchi, G. (スウェーデン ルンド大学) らによって、**第二世代バイオエタノール** (second-generation bioethanol) と呼ばれ、その重要性が増してきている [1]。リグノセルロースは、グルコースだけで構成されるデンプン系原料とは異なり、難分解性のリグニンおよび難発酵性のペントースからなるヘミセルロースを多く含み、乾燥バイオマスあたりのエタノールの収率が最大でも  $200\sim 300\text{ mg g}^{-1}$  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。

第一には、リグニンの除去および結晶構造の変化によって酵素糖化を促進させる様々な前処理工程が検討されているが、前処理には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、リグノセルロースはリグニンの他に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。そのために、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。昨年度(2011年度)の第二の課題の検討に続いて、今年度(2012年度)は第一の課題に取り組んだ。

## 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 $\alpha$  と I $\beta$ の二つの構造が存在し、cellulose I と標記される[3]。cellulose I は液体アンモニア[4]や種々のアミン[5-6]による処理およびそれに続くアミン類の減圧留去および極性溶媒による洗浄等によって cellulose III $_1$ 型に変換する[7-9]。また、Cellulose III $_1$  はか逆的に熱水[10]および空気下での加熱[11]によって cellulose I $\beta$  に戻すことができる。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 III $_1$ 型に変化させていると思われる[12]。



そのために、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 III $_1$ 型が増加するためである[13]。しかし、AFEX は 90 °C 21 気圧の過酷な条件を必要とする[14]。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[15,16]。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。

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、本研究では、リグノセルロースを大気圧、室温でアンモニアガス雰囲気下に数週間、暴露する **EGA (exposure to gaseous ammonia)** 法について検討した。

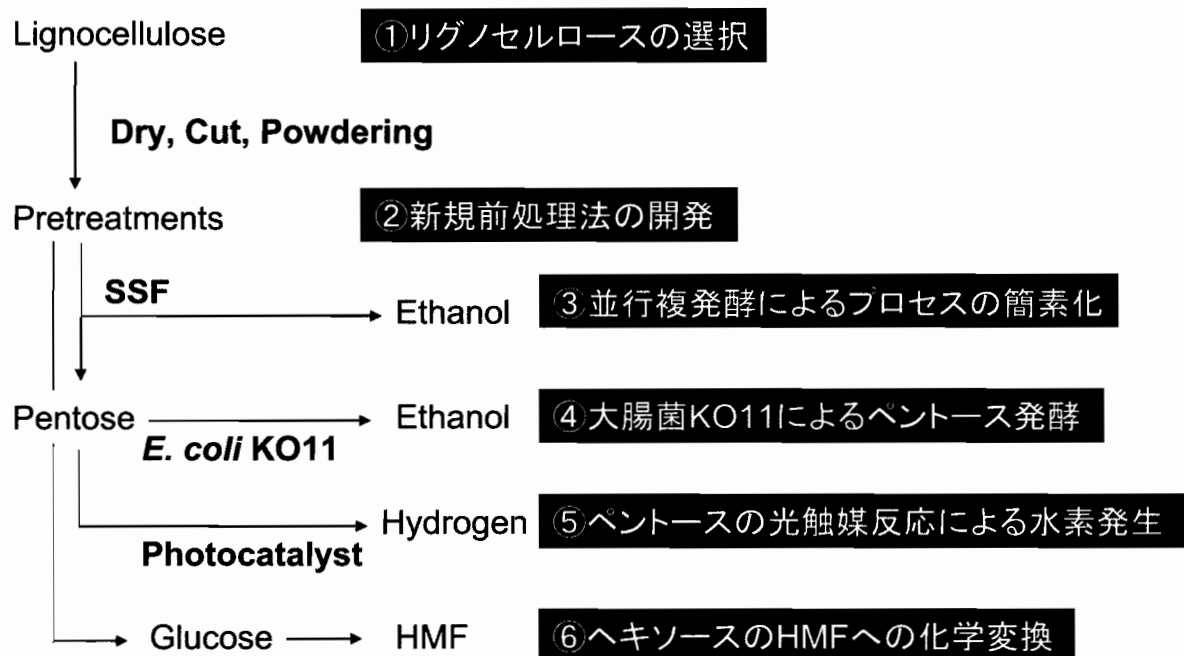
Pretreatment methods using ammonia	
<b>AFEX</b>	<b>ammonia fiber explosion pretreatment at 90 °C under 21 atm</b>
<b>SAA</b>	<b>soaking in aqueous ammonia pretreatment at 40-80 °C in a room atmosphere, solid-to-liquid ratio of 1:6 - 1:10</b>
<b>EGA</b>	<b>exposure to gaseous ammonia pretreatment at room temperature in a room atmosphere, solid-to-liquid ratio of 1:1. Use of NH<math>_3</math> (1.1 g) for 100 g napiergrass.</b>

## 1-3 研究計画

宮崎大学では、リグノセルロースからのエタノール生産における様々な課題を解決するために、「バイオ触媒および光触媒を用いるネピアグラスの高効率バイオ燃料化」の検討を行っている。「糖化発酵グループ」では、草本系リグノセルロースとして宮崎大学農学部で矮性

化された“矮性ネピアグラス”をバイオマス原料にして、次の①から⑥の六つの観点から物質変換を検討した (Scheme 1)。

平成 24 年度は「②新規前処理法の開発」について、アンモニアガスを用いる新規前処理方法の開発について検討を行った。



Scheme 1.

各課題に対する今までの進捗状況を下記に示す。

工程	研究課題	進捗状況
原料	①リグノセルロースの選択	論文 7
前処理	②新規前処理法の開発	論文 2, 9
糖化発酵	③並行複発酵によるプロセスの簡素化	論文 5
ペントース発酵	④大腸菌 KO11 によるペントース発酵	論文 5
新規バイオ燃料の開拓	⑤ペントースの光触媒反応による水素発生	論文 3, 4, 6, 8
	⑥ヘキソースの HMF への化学変換	論文 1

1. Transformation of Glucose to 5-Hydroxymethyl-2-furfural by SiO<sub>2</sub>-MgCl<sub>2</sub> Composite, M. Yasuda, Y. Nakamura, J. Matsumoto, H. Yokoi, and T. Shiragami, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **84**, 416-418 (2011).
2. The effect of TiO<sub>2</sub>-photocatalytic pretreatment on the biological production of ethanol from lignocelluloses, M. Yasuda, A. Miura, R. Yuki, Y. Nakamura, T. Shiragami, Y. Ishii, and H. Yokoi, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **220** 195-199 (2011)
3. Pentose acting as a sacrificial multi-electron source in photocatalytic hydrogen evolution from water by Pt-doped TiO<sub>2</sub>, T. Shiragami, T. Tomo, H. Tsumagari, R. Yuki, T. Yamashita, and M. Yasuda, *Chem. Lett.*, **41**, 29-31 (2012).
4. Hydrogen evolution from napiergrass by the combination of biological treatment and a Pt-loaded

- TiO<sub>2</sub>-photocatalytic reaction, T. Shiragami, T. Tomo, H. Tsumagari, Y. Ishii, M. Yasuda, *Catalyst*, **2** 56-67 (2012)
- Ethanol production from non-pretreated napiergrass through a simultaneous saccharification and fermentation process followed by a pentose fermentation with *Escherichia coli* KO11, M. Yasuda, A. Miura, T. Shiragami, J. Matsumoto, I. Kamei, Y. Ishii, K. Ohta, *J. Biosci. Bioeng.* **114**, 188-192 (2012)
  - 草本系パルプの生化学反応および触媒反応によるバイオ燃料化、保田昌秀、中村泰久、三浦昭晃、松本朋子、松本仁、白上努、*宮崎大学工学部紀要*, **41**, 17-21 (2012)
  - Effectiveness of lignin-removal in simultaneous saccharification and fermentation of napiergrass, rice straw, silbergrass, and bamboo with different lignin-contents, M. Yasuda, a, K. Takeo, T. Matsumoto, T. Shiragami, Y. Matsushita, K. Sugamoto, and Y. Ishii, *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*, Edited by A. K. Chandel and S. Silverio da Silva, InTech (2013).
  - Structural dependence of alcoholic sacrificial agents on TiO<sub>2</sub>-photocatalytic hydrogen evolution, T. Shiragami, T. Tomo, T. Matsumoto, and M. Yasuda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, in press (2013).
  - Exposure to gaseous ammonia pretreatment of napiergrass for bioethanol production through a simultaneous saccharification and fermentation, M. Yasuda, K. Takeo, H. Nagai, J. Sakasegawa, T. Uto, T. Yui, T. Matsumoto, Y. Ishii, and K. Ohta, *J. Biosci. Bioeng.* **115**, submitted (2013).

## 2 実験方法

### 2.1 リグノセルロースの成分分析

ネピアグラスの成分分析は次のように行った。粉末化したネピアグラス (30 g) はメタノールで洗浄して油脂分を取り除き、1% NaOH 水溶液 (400 mL) で 95 °C、1 時間処理を行った。処理物の遠心分離によって、ホロセルロースを黄色沈殿物として単離した。濾液は希塩酸で中和して、pH 5.0 にした。得られた茶色の沈殿物を遠心分離を 10,000 rpm で 10 分間行い、リグニンを単離した。

ホロセルロースの成分分析は、National Renewable Energy Laboratory (NREL) 法[17]に従って行った。ホロセルロース (300 mg) に濃硫酸 (72%, 3.0 mL) を加えて、溶解させ、30 °C で 1 時間放置した。次に、硫酸の濃度が 4 % になるまで水 (84 mL) を加えた。これをオートクレーブに入れ、121 °C で 1 h 反応した。液体クロマトグラフで糖分析を行い、糖量からグルカン及びキシラン量を求めた。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。

### 2.2 セルラーゼによる糖化

ホロセルロース (10.0 g) を酢酸緩衝液 (60 mL, pH 5.0) に分散し、オートクレーブにて 120 °C で滅菌を行った[18]。加水分解酵素 (1.0 g) を溶液に加えて、45 °C で激しく攪拌しながら糖化を行った。反応溶液は 12000 rpm で遠心分離を行い、上澄みを液の HPLC 分析を行なった。セルラーゼとしては、*Acremonium* 由来のセルラーゼ (*Acremozyme KM*, Kyowa kasei) を用いた、*Acremozyme* は *Meycellase* (Meiji Seika)、*Trichoderma viride* 由来のセルラーゼ (Wako chemicals)、*Aspergillus niger* 由来のセルラーゼ (Fluka) などの他の酵素よりも高活性であった。また、キシラナーゼとして、市販の *Trichoderma longibrachiatum*

(*reesei*) 由来のキシラーナーゼ (Sumizyme X, Shin Nihon Chemicals, Anjyo, Japan, 5,000 u g<sup>-1</sup>) を用いた。

酵素名	起源 製造会社
Acremozyme KM	A cellulase from <i>Acremonium cellulolyticus</i> Kyowa Kasei, Osaka
Sumizyme X	A xylanase from <i>Trichoderma longibrachiatum (reesei)</i> Shin Nihon Chemicals, Anjyo, Japan

## 2.3 加水分解酵素および酵母を用いる同時糖化発酵

*Saccharomyces cerevisiae* NBRC 2044 は グルコース (20.0 g L<sup>-1</sup>), ペプトン (1.0 g L<sup>-1</sup>), 酵母溶液 (1.0 g L<sup>-1</sup>), NaHPO<sub>4</sub> (1.0 g L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub> (3.0 g L<sup>-1</sup>) を含む培養液 (初発 pH 5.5) 中で 30 °C, 24 時間培養した。24 時間の培養後、細胞濃度が 7.7 × 10<sup>7</sup> cells mL<sup>-1</sup> の酵母溶液が得られた[19]。同時糖化発酵は (SSF) は次のように行った。リグノセルロース (1.33 g) を酢酸緩衝液 (5.0 mL, pH 5.0) 中に分散させ、酢酸緩衝液 (3.0 mL) に分散させた加水分解酵素 (133 mg) および酵母懸濁液 (0.16 mL) を加えた。窒素置換を行なった後、激しく攪拌しながら 34 °C で反応を行った。発生した二酸化炭素はメスシリンダーの捕集し、二酸化炭素の発生量で反応を追跡した。実験結果は、3 回の実験の平均として求めた。

## 2.4 分析方法

エタノールは 2-プロパノールを内部標準とするガスクロマトグラフ分析によって行った：分析装置、Shimadzu GC-2014、カラム、5% Thermon 1000/Sunpak-A (Shimadzu)。ヘキソースおよびペントース量はアニオン交換型カラム (Shodex Asahipak NH2P-50 4E 250 mm × 4.6 mm in ID) を用いて液体クロマトグラフ (Shimadzu LC-20AD) で定量した。走査電子顕微鏡 (SEM) 像は、Hitachi S-4100 (Tokyo, Japan) で撮影した。

## 3 結果と考察

### 3.1 ネピアグラス

草本系リグノセルロースとして、リグニン含量が少ない矮性ネピアグラス (*Pennisetum purpureum* Schumach) [20, 21] を選択した。ネピアグラスは、宮崎大学木花圃場で栽培したものをを用い、葉部を使用した。切断後、70 °C で 72 時間乾燥し、粉末化した。

### 3.2 アンモニアガス前処理

乾燥ネピアグラス粉末 (100 g, 体積 320 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。真空ポンプで脱気を行い、次のアンモニアガスを充填した。この操作を三回繰り返す、内容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 か

ら 4 週間室温で放置した。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、淡褐色の水溶液を分離した。処理したネピアグラス粉末は 60 °C で乾燥し、次の生物化学反応に用いた。このプロセスを **Explosre to gaseous ammonia, EGA-n** と名付け、n は処理時間の週を表している。さらに、乾燥粉末を直接、アンモニアガスに暴露させる方法を EGA-n (dry) とした。Table 1 に、未処理(NO)、EGA-1 (wet)、EGA-2 (wet)、EGA-4(wet) 処理したネピアグラスの成分を示す。

Table 1. Components of the EGA-pretreated napiergrass

Pretreatment <sup>a)</sup>	Components/wt%			
	Holocellulose (glucane : xylane)	Lignin	Ash	Others
NO	48.2 (28.2:20.0)	12.6	13.9	25.3
EGA-1	53.7 (32.1:21.6)	11.0	13.0	22.3
EGA-2	60.4 (36.1:24.3)	9.9	9.5	20.2
EGA-4	61.1 (36.6:24.4)	7.1	7.1	24.7

a) NO: no-treatment. EGA-n: the exposure to gaseous ammonia pretreatment for n weeks under wet conditions.

### 3.3 アンモニアガス前処理の糖化工程に対する効果

糖化反応に対する EGA 前処理の効果を検証した。糖化反応は、酢酸緩衝液(60 mL)に分散させたネピアグラス (10.0 g) を Acremozyme (1.0 g)を用いて 45 °C で行なった。**Figure 1** には、EGA-n で処理したネピアグラスの糖化反応における経時変化を示す。糖量は EGA-4 において、EGA-1 および EGA-2 よりも最も早く最大値に到達した。それゆえに、4 週間の EGA-4 を最適な前処理とした。また、EGA-4 前処理は EGA-4 (dry)前処理よりも優れていることが確かめられた。水を用いると EGA 前処理の効率が向上することが分かった。

**Table 2** には糖化反応で得られるグルコースおよびキシロース量および収率を示す。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)。EGA 前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)。**Figure 2** には、EGA-4 前処理から得られるグルコースおよびキシロースの転化率曲線を示す。キシロースの生成は遅く、360 時間まで緩やかに増大した。一方はグルコース生成量はすばやく増加し、48 時間までに最高収率に到達した。そこで、ヘミセルロースの糖化反応を速めるために、Arcemozyme セルラーズ (C) にキシラナーゼを添加した。Sumizyme キシラナーゼ (H) を  $1.0 \times F_H$  グラム添加した。ここで、 $F_H$  値は混合酵素中の H の分率を表す。**Figure 3** は 192 時間の糖化によって生成するグルコースおよびキシロース収率に対する  $F_H$  の効果を示している。この図から、キシロースの収率が最大となる 0.50 が  $F_H$  の最適値とした。**Figure 2** に示すように、混合酵素 ( $F_H=0.50$ ) を用いることで、糖化時間が大幅に短縮されている。

EGA-4 前処理したネピアグラス(10.0 g) を C (0.50 g) および H (0.50 g) で糖化する最適条件では、グルコースおよびキシロースの収率はそれぞれ 100% および 60%となった (Run 5)。未処理のネピアグラスの混合酵素による糖化の場合 (Run 6)、グルコースおよびキシロースの収率はそれぞれ 65% および 40%と低いままであった。

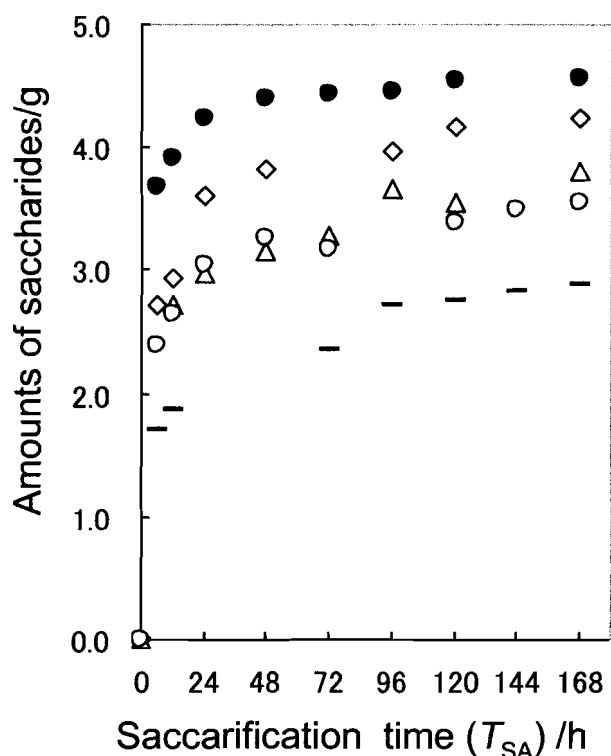


Figure 1. Time-conversion plots of the total yields of saccharides in the saccharification of the pretreated napiergrass using Acromozyme cellulase. EGA-1 ( $\Delta$ ), EGA-2 ( $\diamond$ ), EGA-4 ( $\bullet$ ), EGA-4 (dry) ( $\circ$ ), and no-treatment ( $-$ ).

Table 2. The effects of EGA-pretreatment on the saccharification of napiergrass with hydrolytic enzymes. <sup>a)</sup>

Run	PT <sup>b)</sup>	Enzyme <sup>c)</sup> (weight/g)	$T_{SA}/h$ <sup>d)</sup>	Product/g (yield/%) <sup>e)</sup>		
				Glucose	Xylose	Total
1	NO	C (1.0)	168	2.20 (70)	0.68 (31)	2.88 (54)
2	EGA-1	C (1.0)	168	2.89 (81)	0.91 (38)	3.80 (63)
3	EGA-2	C (1.0)	168	3.07 (77)	1.16 (43)	4.23 (63)
4	EGA-4	C (1.0)	168	3.36 (83)	1.20 (44)	4.57 (67)
5	EGA-4	C (0.5)+H (0.5)	168	4.15 (100)	1.60 (60)	5.75 (81)
6	NO	C (0.5)+H (0.5)	168	2.20 (70)	0.96 (43)	3.16 (59)

a) Saccharification was performed for pretreated napiergrass (10.0 g) using the hydrolytic enzyme (1.0 g) in an acetate buffer (60 mL).

b) Pretreatment (PT). NO: no-treatment. EGA-n: the exposure to gaseous ammonia pretreatment for n weeks under wet conditions.

c) Hydrolytic enzyme. C: Acromozyme, H: Sumizyme.

d) Saccharification time.

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

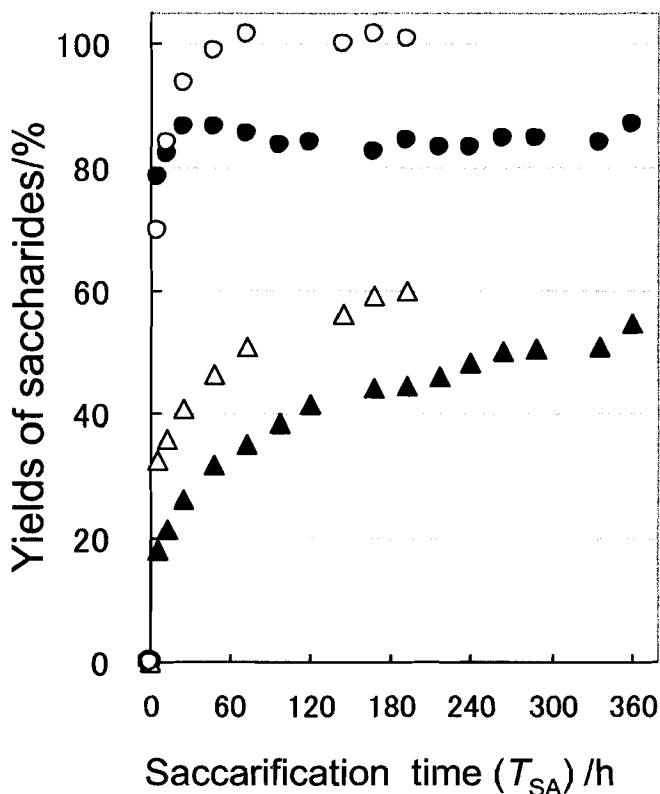


Figure 2. Time-conversion plots of the amounts of glucose and xylose in saccharification of EGA-4 treated napiergrass (10.0 g) using Acremozyyme (C) and/or Sumizyme (H).  
 Glucose (●) and xylose (▲) from the saccharification using C (1.00 g).  
 Glucose (○) and xylose (△) from the saccharification using C (0.50 g) and H (0.50 g)

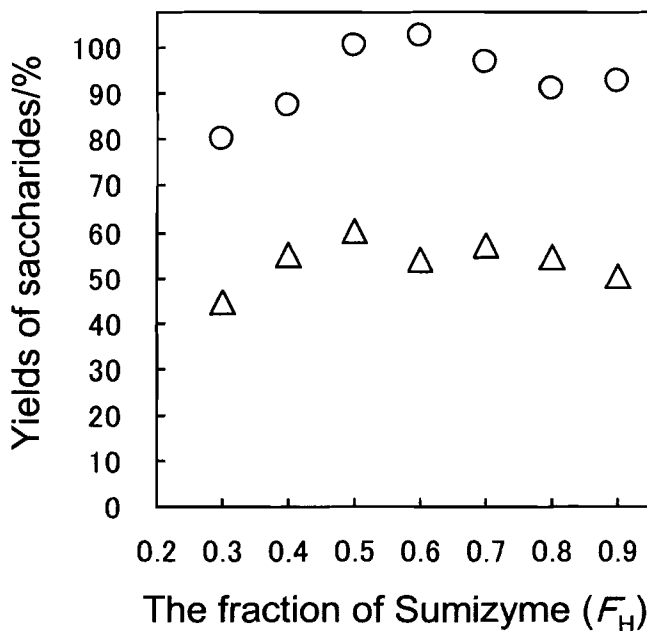


Figure 3. The effects of the fraction of Sumizyme ( $F_H$ ) on the yields of glucose (○) and xylose (△) in the saccharification of EGA-4 treated napiergrass (10.0 g) for 192 h using a mixed enzyme of Acremozyyme and Sumizyme.

### 3.4 アンモニアガス前処理の同時糖化発酵工程に対する効果

EGA 前処理の効果を、同時糖化発酵 (SSF) [19]において次のように検証した。酢酸緩衝液 (3.0 mL, pH 5.0) に溶かした加水分解酵素 (133 mg)および酵母懸濁液 (0.16 mL) を酢酸緩衝液 (5.0 mL, pH 5.0)に懸濁させたリグノセルロース (1.33 g)に加えた。酸素を窒素で脱気した後、35 °C で激しく攪拌しながら反応を行なった。二酸化炭素の発生が止まってから (通常 24 時間)、さらに 24 時間反応を続け、ヘミセルロースの糖化を完結させた。Table 3 に、リグノセルロース 1.33 g の SSF から得られるエタノール、グルコース、キシロースの重量を示す。

前処理を行なわなかった場合、C を用いる SSF 反応によって、エタノールおよびキシロースをそれぞれ 57%および 26%の収率で生成した (Run 7)。EGA-2 前処理したネピアグラスでは、エタノールおよびキシロースをそれぞれ 80% および 52%の収率で生成した (Run 8)。このように EGA 前処理は SSF を効果的に進める効果があることを示している。C と H の混合酵素を用いた SSF では、キシロース収率をわずかに向上させたが、収率は依然 50 %程度に留まっている (Runs 9-10)。Figure 4 には、エタノールおよびキシロース収率を比較した図を示す。

以上のように、EGA-4 前処理したネピアグラス (1.33 g) を酢酸緩衝液 (8 mL) 加えた懸濁液にセルラーゼ (C, 67 mg) およびキシラナーゼ (H, 67 mg) の混合酵素と酵母培養液 (0.16 mL) を加えた最適条件において、エタノールおよびキシロース収率はそれぞれ 94%および 48%に到達した (Run 10)。

Table 3. The effects of pre-treatment on SSF process of napiergrass <sup>a)</sup>

Run	PT <sup>b)</sup>	Enzyme (weight/mg) <sup>c)</sup>	$T_{SSF}$ /h <sup>d)</sup>	Product /mg (Yield/%)		
				Glucose	Xylose	EtOH
7	NO	C (133)	21-28	13±2 (2.4)	77± 6 (26)	122± 6 (57)
8	EGA-2	C (133)	26-31	16±2 (3.0)	188±4 (52)	219±11 (80)
9	EGA-2	C (67)+H (67)	30	16±1 (3.0)	180±5 (50)	215±10 (79)
10	EGA-4	C (67)+H (67)	30	14±1 (2.5)	173±2 (48)	259±10 (94)

a) The SSF was performed for the EGA-treated and no-treated napiergrass (1.33 g) in buffer solution (8 mL) using hydrolytic enzyme (total amount 133 mg) and the cell suspension of *S. cerevisiae* (0.16 mL) at 35 °C.

b) Pretreatment (PT). NO: no-treatment. EGA-4: the exposure to gaseous ammonia pretreatment for 4 weeks under wet conditions.

c) Hydrolytic enzyme. C: Acremozyme, H: Sumizyme.

d)  $T_{SSF}$  was SSF reaction time until the CO<sub>2</sub> evolution ceased. The reaction continued for more 24 h after the CO<sub>2</sub> evolution ceased.

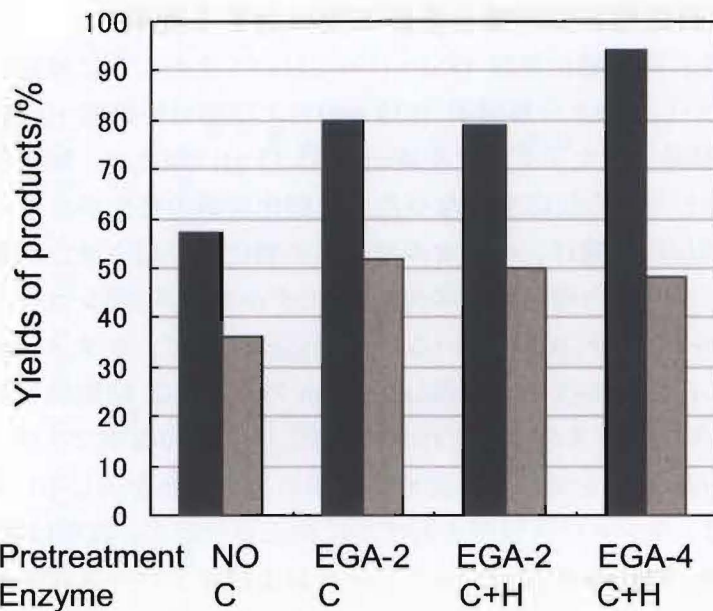


Figure 4. The yields of ethanol (black bar) and xylose (gray bar) in the SSF process.

### 3.5 アンモニアガス前処理の効果

未処理ネピアグラスと EGA 前処理したネピアグラスにおける物理的な変化を SEM を用いて検討した (Figure 5)。EGA 前処理したネピアグラスでは、繊維に対する無数の切れ込みが観察された。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 III<sub>1</sub> 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た [23]。EGA-前処理によって、酵素がセルロースに接近しやすくなったと思われる。

リグノセルロースの一般的な前処理は、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 [20]。しかし、今回報告した EGA 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、EGA 前処理ではガス状のアンモニアを用いるため低コスト・低エネルギーでアンモニアの回収・リサイクルが容易であると思われる。

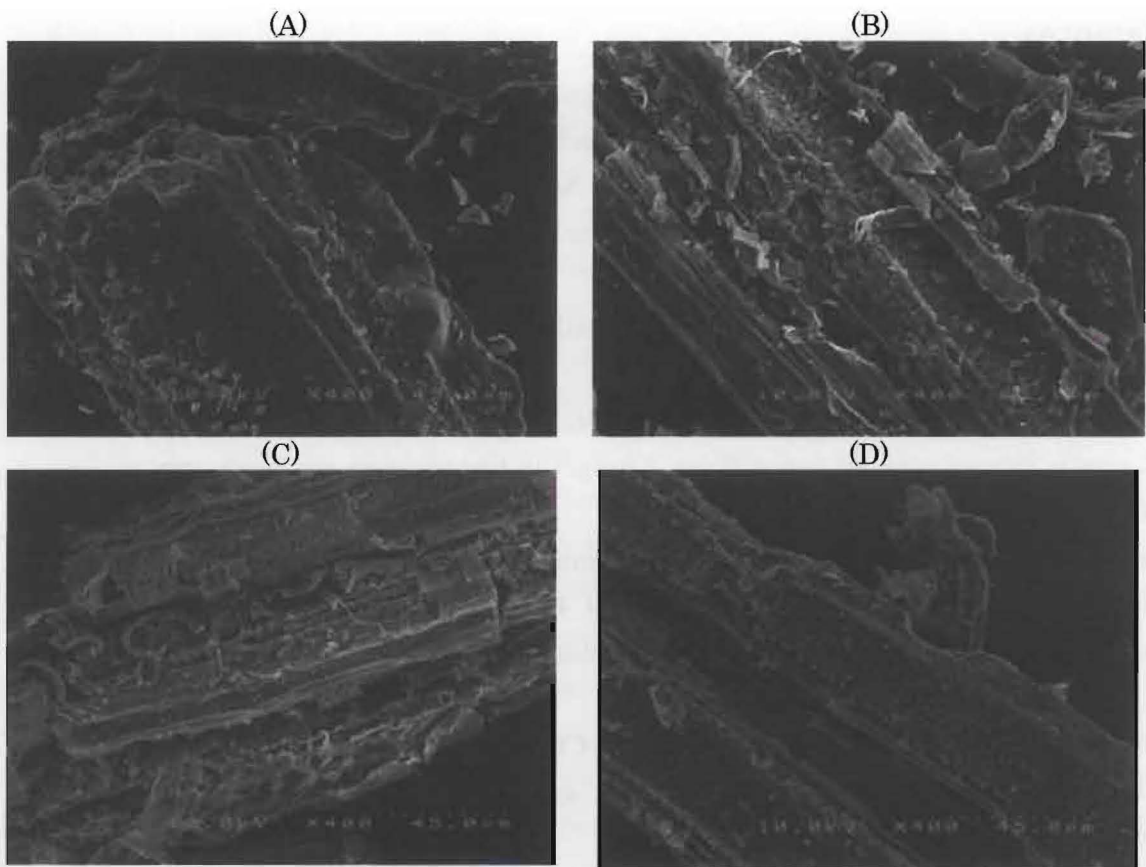


Figure 5. SEM images of no-treated napiergrass (A), EGA-treated napiergrass under dry conditions for 1 week (B), EGA-treated napiergrass under wet conditions for 2 weeks (C) and 4 weeks (D). The SEM images were taken under the magnification of 400.

結果として、EGA-前処理はリグノセルロースのSSFプロセスを高効率化できる有用な前処理方法の一つであり低コスト低エネルギーで行なうことができると思われる。キシロースは遺伝子組換え大腸菌 K011 によるペントース発酵によってエタノールに変換することができる[20]。最近、我々は、*E. coli* K011 による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。

このようにして、EGA-前処理、混合酵素を用いるSSF、および *E. coli* K011 によるペントース発酵の組み合わせによって、ネピアグラスからバイオエタノールを高効率で生成する方法（宮崎大学法、UM method）を開発した。



## 4. References

1. **Galbe, M. and Zacchi, G.:** Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production, *Advances Biochem. Engineering Biotechnol.*, **108**, 41–65 (2007).
2. **Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., and Negro, M. J.:** Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review, *Bioresour. Technol.*, **101**, 4851–4861 (2010).
3. **Attala R.H. and VanderHart D.L.:** Native cellulose: A composite of two distinct crystalline forms, *Science*, **223**, 283–285 (1984).
4. **Rousselle, M.A., Nelson, M.L., Hassenboehler Jr., C.B., and Legendre, D.C.:** Liquid-ammonia and caustic mercerization of cotton fibers: Changes in fine structure and mechanical properties, *Textile Res. J.*, **46**, 304–310 (1976).
5. **Creely, J.J. and Wade, R.H.:** Complexes of diamines with cellulose: Study of symmetrical and unsymmetrical terminal group effects, *Text. Res. J.* **45**, 240–246 (1975).
6. **Creely, J.J. and Wade, R.H.:** Complexes of cellulose with cyclic amines and diamines, *J. Polym. Sci.; Polym. Lett. Ed.* **16**, 291–295 (1978).
7. **Wada, M.; Heux, L.; Isogai, A.; Nishiyama, Y.; Chanzy, H., Sugiyama, J.:** Improved structural data of cellulose III prepared in supercritical ammonia, *J. Macromolecules*, **34**, 1237–1243 (2001).
8. **Wada, M.; Chanzy, H.; Nishiyama, Y.; Langan, P.:** Cellulose III I crystal structure and hydrogen bonding by synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction *Macromolecules*, **37**, 8548–8555 (2004).
9. **Chanzy, H.; Henrissat, B.; Vincendon, M.; Tanner, S.; Belton, P.S.:** Solid-state <sup>13</sup>C-N.M.R. and electron microscopy study on the reversible cellulose I→cellulose III transformation in Valonia, *Carbohydr. Res.* **160**, 1–11 (1987).
10. **Sarko, A.; Southwick, J.; Hayashi, J.:** Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides. 7. Crystal structure of cellulose III and its relationship to other cellulose polymorphs, *Macromolecules* **9**, 857–863 (1976).
11. **Wada, M.:** In situ observation of the crystalline transformation from cellulose III I to I β, *Macromolecules*, **34**, 3271–3275 (2001).
12. **Wada, M.; Nishiyama, and Y.; Langan, P.:** X-ray structure of ammonia-cellulose I: New insights into the conversion of cellulose I to cellulose III I, *Macromolecules* **39**, 2947–2952 (2006).
13. **Teymouri, F.; Lauerano-Perez, L.; Alizadeh, H.; Dale, B.E.:** Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover, *Biosour. Technol.* **96**, 2014–2018 (2005).
14. **Igarashi, K.; Wada, M.; Samejima, M.:** Activation of crystalline cellulose to cellulose III results in efficient hydrolysis by cellobiohydrolase, *FEBS J.* **274**, 1785–1792 (2007).
15. **Lau, M.W., Dale, B.E., Balan, V.:** Ethanol fermentation of hydrolysates from ammonia fiber expansion (AFEX) treated corn stover and distillers grain without detoxification and external nutrient supplementation, *Biotechnol. Bioeng.*, **99**, 529–539 (2008).

- 16 **Kim, T.-H. and Lee, Y.Y.:** Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia, *Appl. Biochem., Biotechnol.*, **121-124**, 1119–1132 (2005)
- 17 **Ko, J.-K., Bak, J.-S., Jung, M.-W., Lee, H.-J., Choi, I.G., and Kim, T.-H.:** Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes, *Bioresource Technology*, **100** 4374-4380 (2009).
- 18 **Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templaton, D., and Crocker, D.:** Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, Technical Report NREL/TP-510-42618, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO (2010).  
[http://www.nrel.gov/biomass/analytical\\_procedures.html](http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html)
- 19 **Yasuda, M., Miura, A., Yuki, R., Nakamura, Y., Shiragami, T., Ishii, Y., Yokoi, H.:** The effect of TiO<sub>2</sub>-photocatalytic pretreatment on the biological production of ethanol from lignocelluloses, *J. Photochem. Photobiol., A: Chem.*, **220**, 195–199 (2011).
- 20 **Yasuda, M., Miura, A., Shiragami, T., Matsumoto, J., Kamei, I., Ishii, Y., and Ohta, K.:** 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.*, **114**, 188–192 (2012).
- 21 **Ishii, Y., Yamaguchi, N., Idota, S.:** Dry matter production and *in vitro* dry matter digestibility of tillers among napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach) varieties, *Grassl. Sci.* **51**, 153–163 (2005).
- 22 **Rengsirikul, K., Ishii, Y., Kangvansaichol, K., Pripanapong, P., Sripichitt, P., Punsuvon, V., Vaithanomsat, P., Nakamane, G., and Tudsri, S.:** Effects of inter-cutting interval on biomass yield, growth components and chemical composition of napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach) cultivars as bioenergy crops in Thailand, *Grassl. Sci.*, **57**, 135-141 (2011).
- 23 **Igarashi, K., Uchihashi, T., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Okamoto, T., Penttilä, M., Ando, T., and Samejima, M.:** Traffic jams Reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface, *Science* **333**, 1279–1282 (2011).

## 5. 平成 24 年度の成果

### 論文発表 (2012 年度)

1. Ethanol production from non-pretreated napiergrass through a simultaneous saccharification and fermentation process followed by a pentose fermentation with *Escherichia coli* KO11, M. Yasuda, A. Miura, T. Shiragami, J. Matsumoto, I. Kamei, Y. Ishii, K. Ohta, *J. Biosci. Bioeng.* **114**, 188-192 (2012)
2. Effectiveness of lignin-removal in simultaneous saccharification and fermentation of napiergrass, rice straw, silbergrass, and bamboo with different lignin-contents, M. Yasuda, K. Takeo, T. Matsumoto, T. Shiragami, Y. Matsushita, K. Sugamoto, and Y. Ishii, *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*, Edited by A. K. Chandel and S. Silverio da Silva, InTech (2013).
3. 草本系パルプの生化学反応および触媒反応によるバイオ燃料化、保田昌秀、中村泰久、三浦昭晃、松本朋子、松本仁、白上努、*宮崎大学工学部紀要*, **41**, 17-21 (2012)
4. Structural dependence of alcoholic sacrificial agents on  $\text{TiO}_2$ -photocatalytic hydrogen evolution, T. Shiragami, T. Tomo, T. Matsumoto, and M. Yasuda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, in press (2013)
5. Exposure to gaseous ammonia pretreatment of napiergrass for bioethanol production through a simultaneous saccharification and fermentation, M. Yasuda, K. Takeo, H. Nagai, J. Sakasegawa, T. Uto, T. Yui, T. Matsumoto, Y. Ishii, and K. Ohta, *J. Biosci. Bioeng.* submitted.

### 口頭発表 (2012 年度)

- 1) 「アルカンポリオールを犠牲剤とする光触媒水素生成反応: 二酸化炭素発生に対する犠牲剤の構造効果」(宮崎大工) 塘 貴幸・白上 努・保田昌秀、1P047, 光化学討論会 平成 24 年 9 月 12-14 日 (東京工業大学、東京)
- 2) “Hydrogen evolution from napiergrass by the combination of biological treatment and a Pt-loaded  $\text{TiO}_2$ -photocatalytic reaction” M. Yasuda and T. Shiragami, 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2012), Poster presentation, September 16-21, 2012 EXCO, Daegu, Korea.
- 3) “Ethanol production from napiergrass through a SSF and a pentose fermentation with *Escherichia coli* KO11” H. Nagai, T. Shiragami, K. Ohta, M. Yasuda, 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2012), Poster presentation, September 16-21, 2012 EXCO, Daegu, Korea.
- 4) “Hydrogen Evolution from Lignocellulosic Biomass by the Combination of Biological and a Pt-Loaded  $\text{TiO}_2$ -Photocatalytic Reactions” M. Yasuda and T. Shiragami, OA-04, The 7th Asian Photochemistry Conference 2012, November 12-15, 2012, Osaka University, Osaka, Japan
- 5) 「UM 法によるネピアグラスからの効率的エタノール生産」(宮崎大学工学部、農学部) 保田昌秀、石井康之、太田一良、2B1-32, 日本化学会第 93 春季年会、平成 25 年 3 月 22-25 日 (立命館大学、草津市)

- 6) 「リグノセルロースからの高効率バイオエタノール生産のためのアンモニアガス前処理の開発」(宮崎大学 工学部、農学部、産学地域連携センター) 竹尾圭祐、石井康之、松本朋子、保田昌秀、2PA-167, 日本化学会第93春季年会、平成25年3月22-25日(立命館大学、草津市)

## 研究体制(糖化発酵グループ)

### 【グループ長】

太田一良

### 【班員】

保田昌秀

白上 努

### 【研究協力者】

平成24年度

津曲 光(修士2年生)

竹尾圭祐、塘 貴幸、永井駿人(修士1年生)

逆瀬川純輝、平田翔一(学部4年生)

## 6 今後の課題

### 1) EGA 前処理法から K011 ペントース発酵までの一貫大量生産

原料を100gを用いる大量合成プロセスを、アンモニアガス前処理から、SSF, K011 ペントース発酵までを一貫した系について検討を行う。

### 2) キシロース糖化効率の向上

平成24年度セルラーゼおよびキシラナーゼの混合酵素を用いる糖化反応を行なったが、キシロースの収率は60%に留まっている。SSFにおいては、セルラーゼ単独の収率と変わっていない。そこで、さらにキシロースの収率を向上する検討を行う。