

平成 25 年度  
環境研究総合推進費補助金 研究事業  
総合研究報告書

農産廃棄物カスケード型循環利用  
バイオエタノール製造システムに関する研究  
(3K113019)

平成 26 年 3 月

(地独) 北海道立総合研究機構 北口 敏弘

補助事業名	環境研究総合推進費補助金研究事業（平成 23 年度～平成 25 年度）
所管	環境省
国庫補助金	74,091,000 円（複数年度の総計）
研究課題名	農産廃棄物カスケード型循環利用バイオエタノール製造システムに関する研究
研究期間	平成 23 年 4 月 1 日～平成 25 年 3 月 31 日
研究代表者名	北口敏弘（地方独立行政法人 北海道立総合研究機構）
研究分担者	近藤昭彦（神戸大学） 宮下和夫（北海道大学）

# 目次

研究報告書概要	1
本文	
1 原料収集、保存に関する検討	11
1. 1 研究目的	
1. 2 研究方法	
1. 3 研究結果および考察	
1. 4 結論	
1. 5 参考文献	
2 原料に含まれる有用成分評価	22
2. 1 研究目的	
2. 2 研究方法	
2. 3 研究結果および考察	
2. 4 結論	
2. 5 参考文献	
3 原料の前処理	34
3. 1 研究目的	
3. 2 研究方法	
3. 3 研究結果および考察	
3. 4 結論	
3. 5 参考文献	
4 同時糖化発酵	
4. 1 進化工学的手法による温度ストレス耐性機能性酵母の最適化	46
4. 1. 1 研究目的	
4. 1. 2 研究方法	
4. 1. 3 研究結果および考察	
4. 1. 4 結論	
4. 1. 5 参考文献	
4. 2 酵素生産、同時糖化発酵の装置的課題の実験的検証	53
4. 2. 1 研究目的	
4. 2. 2 研究方法	
4. 2. 3 研究結果および考察	

4. 2. 4 結論	
5 エタノール蒸留残渣焼却灰の成分評価 -----	60
5. 1 研究目的	
5. 2 研究方法	
5. 3 研究結果および考察	
5. 4 結論	
6 プロセスの検討 -----	67
6. 1 研究目的	
6. 2 研究方法	
6. 3 研究結果および考察	
6. 4 結論	
6. 5 参考文献	
7. 総まとめ -----	79
8. 学会発表等 -----	80
9. 知的財産取得状況 -----	81
10. 研究概要図 -----	82
11. Outline -----	83

## 環境研究総合推進費補助金 研究事業 総合研究報告書概要

研究課題名：農産廃棄物カスケード型循環利用バイオエタノール製造システムに関する研究

研究番号：3K113019

国庫補助金清算所要額：74,091,000 円（複数年度の総計）

研究期間：平成 23 年 4 月 1 日～平成 26 年 3 月 31 日

研究代表者名：北口敏弘（地方独立行政法人 北海道立総合研究機構）

研究分担者：近藤昭彦（神戸大学）、宮下和夫（北海道大学）

### 研究目的

北海道十勝地方などで大量に発生するビートトップ（収穫の際に事前に切り取られる葉部、茎部、根の一部=クラウン）、麦稈、ジャガイモ地上部、豆殻などのセルロース系農産廃棄物を対象とし、それら廃棄物から有価物を回収して廃棄物のカスケード利用を図り、安価なバイオエタノール製造技術体系を確立することで二酸化炭素排出削減に寄与するとともに、エタノール蒸留残渣のサーマルリサイクル後に得られる焼却灰を肥料等として圃場還元する農業廃棄物カスケード型循環利用エタノール製造システムを確立することを目的とする。

この目的を達成するために（1）原料収集、保存に関する検討、（2）原料に含まれる有用成分評価、（3）原料の前処理、（4）同時糖化発酵、（5）エタノール蒸留残渣焼却杯の成分評価、（6）プロセスの検討を行った。

### 研究方法

#### （1）原料収集、保存に関する検討

数種の農産廃棄物について、現在の排出状況や実利用のための収集・運搬方法などに関して、文献調査および関係機関へのヒアリングなどによる情報収集を行い、賦存量を推計するとともに、収集・運搬方法について検討を行った。

エタノール水溶液噴霧ビートトップの長期間の保存時の糖含有量の経時変化、ビートトップエタノール抽出液での長期間の保存時のカロテノイド含有量の経時変化を調べた。NREL/TP-510-42618 で糖類の含有量を求め、その合計値を糖含有量とした。また、液体クロマトグラフで 9'-シス-ネオキサンチン、ピオラキサンチン、ルテインを定量し、その合計値をカロテノイド含有量とした。

エタノールによる抽出条件を決定するため、抽出液のエタノール濃度を 31-85wt%と変えて、抽出液の糖類、カロテノイド類の抽出率を検討した。

## (2) 原料に含まれる有用成分評価

ビートトップからのエタノール抽出物の成分分析、栄養機能性の解明、素材として活用する場合の安定性の分析および工業的に適用できる素材回収法の確立を図った。

ビートトップをエタノールで抽出した脂溶性成分について、脂肪酸組成や含まれるカロテノイドについて成分を分析した。抽出した脂溶性成分と活性本体と思われるカロテノイド（ネオキサンチン）について肥満/糖尿病病態マウスを用いて動物実験を行い、血中グルコース含量、肝臓コレステロール重量などを測定し、機能性について調べた。ビートトップ脂質中に多く含まれている $\alpha$ -リノレン酸などのオメガ3高度不飽和脂肪酸(PUFA)の酸化安定性の特徴を明らかにするために、ビートトップグリセロ糖脂質(GL)を分離し、その酸化安定性について検討した。

ビートトップ油脂を製品化するためには暗褐色を呈するクロロフィルを除去する必要があるため、吸着剤やろ過剤を用いたクロロフィルの除去方法について検討した。

## (3) 原料の前処理

セルロース系農産廃棄物から有用物質を抽出した後の残渣や他のセルロース系農産廃棄物から高効率なバイオエタノール製造を行うために原料特性の解明、前処理条件の最適化、蒸煮・爆砕処理の連続処理装置の開発を行った。

ビートトップ、麦稈、ジャガイモ地上部、大豆殻、小豆殻、長いも茎を対象として、水・アルコール抽出物質、糖類、リグニン、灰分、たんぱくについて分析を行った。

賦存量の多い麦稈、豆殻を対象として水酸化ナトリウムを用いたアルカリ処理と蒸煮・爆砕処理を組み合わせた前処理方法について、主にアルカリ処理条件を変えて最適前処理条件の検討を行った。

爆砕処理はバッチ処理となり効率的ではないため、連続爆砕処理装置の設計、試作を行い、不具合点を逐次改良しながら、連続処理装置の開発を行った。

## (4) 同時糖化発酵

### ①進化工学的手法による温度ストレス耐性機能性酵母の創製

セルラーゼが最も活性のある温度域は40~50℃であるが、酵母の活性温度は30℃である。同時糖化発酵においてセルラーゼの活性温度域により近い温度で活性のある酵母（温度ストレス耐性酵母）の創製と同時糖化発酵能の評価、最適化を行った。

実験室酵母株に対し、UVを照射して変異を導入し、YPD培地上、35℃で良好な生育を示した変異株をスクリーニングし、再度UVを照射した。スクリーニング温度を2℃ずつ上昇させて温度ストレス耐性酵母YPH499/UV39、BY4741/UV41を作出した。

YPH499/UV39に対しカクテル $\delta$ インテグレーション法を用いてセルラーゼ生産発現遺伝子を組み込み、セルロース分解能力を付与したYPH499/UV39/coc $\delta$ BECを作出した。それを用いてリン酸膨潤セルロース、麦わら爆砕試料からの糖化発酵試験(30~39℃)を行った。

接合法による二倍体酵母YPH499-500/UV39/coc $\delta$ BECと、セルラーゼ提示二倍体に進化工学的手法により温度ストレス耐性を付与した酵母MNII/coc $\delta$ BEC/UV39を作出し、麦わら爆砕処理試料からの同時糖化発酵試験を行った。

### ②酵素生産、同時糖化発酵のプロセス化

糖化・発酵工程におけるエタノール終濃度の増加を目的として、同時糖化発酵における二次原料の固形分増加による影響を調査し、高固形分で高い糖化発酵効率が得られる方法を検討した。まず、同時糖化発酵に

おける固形分濃度の糖化・発酵に対する影響を調査するため 100mL の小型糖化発酵試験（図 1）を用いて、固形分 5-10%に対する同時糖化発酵試験を行った。次に、高固形分での同時糖化発酵における酵素・酵母液との混合について、①培地・緩衝液・酵素・酵母混合液への浸漬、②酵素製剤量、③振盪攪拌による効果を検証し、同時糖化発酵装置の混合方式に関する基礎検討を行った。最後に、高固形分の原料で酵素、酵母を効果的に原料に接触させるため、ジャケット式セパラブルフラスコ（内容量 1L）を用いて、上部から攪拌機で攪拌する反応装置を用いた検討を行った（図 2）。

#### （5）エタノール蒸留残渣焼却灰の成分評価

エタノールを製造した後に生じる各種残渣は、サーマルリサイクルによるエネルギー回収に用いる。最終的な残渣であるサーマルリサイクル後のこれらの焼却灰に関して、肥料としての有用成分を把握するとともに、廃棄物の有効利用となることから、安全性を担保するための有害物質の量および溶出性について検討した。

ビート茎葉部、麦稈、大豆殻について 600℃あるいは 815℃で灰化、粉碎して試料とした。得られた粉碎物をプレス成形し、波長分散型蛍光 X 線分析装置により、定性分析およびファンダメンタルパラメーター法（以下 FP 法）による半定量分析を行った。

また、安全性の評価のために、溶出試験と含有量試験を行った。溶出試験は土壤の汚染に係る環境基準に準拠して行った。含有量試験は焼成汚泥肥料の含有量基準での全分解法を考慮して分解し、分解試料について ICP 発光分光分析法（標準添加法併用）などにより定量した。

#### （6）プロセスの検討

ビートトップからビートトップ油を生産し、その残渣と他のセルロース系バイオマスからバイオエタノールを生産するシステムについて、最適と思われるプロセスを提案し、そのプロセスにおける LCA 評価および経済性評価を行った。

北海道十勝地方でビートトップ、麦稈、豆殻の収集に最適な市町村を選定し、工場建設予定地を定めた。また、原料の保存性や収穫時期、可能収集量などからバイオエタノール生産量、時期による最適な原料の選択とプロセスの提案を行った。

上記の最適化されたプロセスについて、これまでの研究成果や文献値などを用いてそれぞれの工程に係る投入エネルギー量を算出し、CO<sub>2</sub>排出量やエネルギー収支について検討を行った。

各原料の収集運搬費、電力費、ユーティリティ費、薬品費、廃水処理費など変動費を、これまでの成果や文献値から推算した。ビートトップ油の生産費および販売収入などを予測し、バイオエタノール価格低減額を算出した。

### 結果と考察

#### （1）原料収集、保存に関する検討

本研究でターゲットとしている麦わら、豆殻、ビートトップ、スイートコーン茎葉などについて北海道内および十勝管内の廃棄物排出量を推算した(表 1)。

収集運搬方法については、麦わら、小豆殻、スイートコーン茎葉は、既に方法が確立されており、ビートトップについては、過去に装置を製造し、現在、装置を試作しているメーカーがあり、それらの装置で収集は可能であることがわかった。

各種バイオマスの保存については、麦わら、小豆殻、スイートコーン茎葉は、既往の研究成果であるアルカリ浸漬保存を適用可能で、ビートトップ中の糖類は、高濃度のエタノール水溶液を噴霧した状態で、低温下

で保存すれば、9ヶ月間経過後も初期値と同程度の糖含有量を維持することができ、長期間保存することは可能であることがわかった(表2)。ビートトップ中のカロテノイドおよび脂質の保存については、高濃度のエタノール抽出液で、低温下で遮光保存することで、長期間にわたり初期値と同程度の含有量を維持できることがわかった(図3)。また、エタノール濃度が低下すると保存性は悪くなるため、少なくとも75%程度より高い濃度での保存が望ましく、より長期間の保存のためには85%以上が好ましいことがわかった(表3)。

エタノール抽出条件について、基礎検討を行った。エタノール濃度が高いほど脂質およびカロテノイドの抽出率は高くなり、75%では、原料ビートトップの15%のカロテノイド、30%の脂質を抽出することができた(図4および図5)。また、抽出時の糖の損失は少なく、90%以上の糖が抽出残渣に残存しており、エタノール溶液で抽出することで効率的に脂質およびカロテノイドなどの有効成分のみを抽出できることがわかった。以上のことから実プロセスでは、少なくとも75%以上のエタノール濃度で抽出し、抽出液をそのままの状態 で保存するのが好ましいことがわかった。

## (2) 原料に含まれる有用成分評価

本事業では、まず、ビートトップには比較的多量の脂質成分が含まれており、エタノール抽出により、脂質を主体とする素材の得られることを明らかにした。ついでこのエタノール抽出物(BT-EtOH)中の主な活性成分として、オメガ3系高度不飽和脂肪酸(PUFA)とカロテノイド類(ルテインとネオキサンチン)を認め、その特徴的な生理作用として、脂質代謝改善作用や血糖値改善作用を明らかにした。特に、BT-EtOHに含まれるカロテノイド、ネオキサンチンの生理活性は強く、抗肥満作用、抗糖尿病作用の他、強い血中中性脂質低下作用を示した。また、BT-EtOHの主要成分である $\alpha$ -リノレン酸(18:3n-3)は、ネオキサンチンなどのカロテノイドと同時に摂取させると、生体内で効率的にDHA(22:6n-3)へと変換されるため、BT-EtOHが効果的なオメガ3PUFAの供給源として活用できることも明らかにした。

ところで、 $\alpha$ -リノレン酸(18:3n-3)などのオメガ3PUFAは極めて酸化されやすく、これが利用の面での障害となると予想される。ただし、油糧種子や動物脂質中のオメガ3PUFAはトリアシルグリセロール(TAG)やリン脂質(PL)として存在するが、ビートトップ脂質中のオメガ3PUFAの主要存在形態はこれらの場合とは異なり、グリセロ糖脂質(GL)である。GL中のPUFAの酸化安定性については、TAGやPLの場合とは異なりこれまで検討例がない。そこで、ビートトップGL中のオメガ3PUFAの酸化安定性について検討したところ、ビートトップGLには酸化されやすい18:3n-3と16:3n-3が合計で80%以上含まれているにもかかわらず、酸化安定性が他の脂質クラス(TAGやPL)と比較して極めて高いことを初めて明らかにした。以上の成果により、ビートトップ脂質を安定性の高い機能性脂質素材として活用可能なことが分かった。

以上より、BT-EtOHが機能性素材として高いポテンシャルを有していることが明らかになったので、最後に、濾過助剤を用いた工業的な製造方法についても検討した。濾過助剤を用いた工程では、まず含水BT-EtOH中の脂質を濾過助剤に吸着させ、水溶性成分を除去した後、エタノールで機能性脂質素材を回収した。この際、素材の品質に悪影響を与えるクロロフィルは、最終的に濾過助剤に吸着させることで取り除くことができた。こうした工程は、経済的にも優れた方法であり、ビートトップからの有用脂質素材の製造に活用できるものと考えられた。

## (3) 原料の前処理

ビート葉部およびビートクラウンともに抽出物質が非常に多く、ビート葉部で55~58%、ビートクラウンで70%強であり、両者ともグルカンが少なく10%弱であった。また、リグニンが10%以下で非常に少なかった。麦稈および豆殻類は抽出物質が15~20%、グルカンが30%台、リグニンは20%程度(図8)で他の草本

類と同程度であった。一方、ビートトップ茎葉およびクラウンには多くの可溶糖が含まれていることが明らかとなり、これをエタノール原料とすべきであることが分かった。また、十勝地方の農産廃棄物の賦存量はビートトップ、豆殻、麦稈がそれぞれ 18.2 トン、2.7 トン、16.4 トン（いずれも乾物ベース）と多く、上記結果と併せて考えると、これらの廃棄物が原料として有望であることが分かった。

麦稈の糖化効率には 90%以上で良好な結果を得た。大豆殻については、麦稈と同じ前処理条件（アルカリ処理条件：13%、60℃、6h）で 65%程度であったので、条件を変えて検討した結果、アルカリ処理条件：13%、75℃、6h で糖化効率 77%を得た（図 9、大豆 5。大豆 8 の糖化効率が高いが微粉砕によるものであり、エネルギー的に不利と思われた）。グルカンのほぼ全て、キシランの 86%が固形分として残り、良好な残存率を得た。この結果から、前処理条件の最適化がなされた。

初年度試作した連続爆砕装置について、逐次改良を行った。アルカリ処理を施した固形分濃度 10%のコーン茎葉を基質として連続運転を行った結果、問題なく運転が可能であることを確認した。また、効率化のため、高固形分濃度（30%）の基質に対しても安定した運転ができた。改造の結果、処理能力は約 0.43 から 0.57kg-dry/h/L に改善された（図 10）。

#### （4）同時糖化発酵

##### ①進化工学的手法による温度ストレス耐性機能性酵母の創製

独自に開発したカクテル $\delta$ -integration 法によるセルロース分解能の付与と、進化工学的手法による温度ストレス耐性の付与を組み合わせることにより、39℃付近で効率的にセルロースをエタノールに変換できる温度ストレス耐性機能性酵母の創製に成功した（図 11）。また、二倍体酵母の利用はエタノールの生産効率を高めることを明らかにした（図 12）。高温で発酵可能な菌株の育種はセルラーゼによる分解速度を促進し、麦わら爆砕処理物からのエタノール生産に際して必要な酵素量を低減できることを明らかにした（図 13）。

##### ②酵素生産、同時糖化発酵のプロセス化

100mL の小型糖化発酵試験では、固形分の増加に従い、同時間での糖化発酵効率が低く、エタノール生成速度が低下していることが認められた（図 14）。固形分の増加による糖化発酵速度の低下は、流動性の低下による混合不足によることが要因と思われた。

同時糖化発酵装置の混合方式に関する基礎検討では、酵素製剤量の増加や振盪攪拌により処理物全体を揺動させることが糖化発酵効率の向上に影響することを確認した（図 15）。また、初期に酵素の至適温度にて糖化（液化）を進行させてから、発酵に適した温度に下げた発酵進めたと、高固形分での糖化発酵効率の向上が見られた。さらに、攪拌の効果により初期の酵素による液化が速やかに進むのが観察され、これまでより短時間で発酵が進むことが分かり、発酵効率は 70%以上を示した（図 16）。

以上、蒸留工程におけるエネルギー消費量低減および糖化発酵工程における設備コスト低減のため、高固形分での糖化発酵方法を検討し、糖化発酵効率の向上につながる条件を確認した。

#### （5）エタノール蒸留残渣焼却灰の成分評価

本研究での植物系原材料について単独で灰化処理を行い、得られた灰について肥効成分を中心に成分分析を行った結果、窒素およびリンの含有量は低いが、すべての試料にカリウムが多量に含まれることが分かった。X 線回折により、得られた灰の化学形態について調べた結果、水溶性カリウム塩が同定された。安全性の評価の観点から各種焼却灰の溶出試験を行った結果、すべての焼却灰で、汚泥焼却肥料の規格を満足していることが分かった。有害物質の含有量に関して定量した結果、各種焼却灰の含有量の定量を行った結果、焼成汚泥肥料の含有量基準および土壤環境基準値を下回るということが分かった。

以上のことから、サーマルリサイクル後の植物系残渣焼却灰は有害物質の少なさおよびカリウム含有量の観点から、加里肥料として有望であることが分かった。

## (6) プロセスの検討

北海道十勝地方の各市町村の各作物（ビートトップ、大豆、小豆、麦）の収穫量から農産廃棄物量を計算し、ビートトップ油およびバイオエタノール生産工場を芽室町に建設することを想定して、平均収集距離が往復で25kmの3市町からなる収集範囲を設定した。

この収集範囲から22万トン（水分87%）のビートトップおよび3.5万トン（水分15%）の麦稈、豆殻を収集し、ビートトップ油5.2トン、バイオエタノールを1.5万kL製造するプロセスを提案した。

プロセスのLCA評価では、農産廃棄物であるビートトップおよび豆殻・麦稈を原料としたBE生産におけるCO<sub>2</sub>排出量は81kgCO<sub>2</sub>/GJであるが、蒸留残渣（リグニン）および豆殻・麦稈を燃焼して投入エネルギーに利用することにより約50%削減され、39kgCO<sub>2</sub>/GJとなった。また、ビートトップ油の生産規模がBEに比較して小さいため、CO<sub>2</sub>排出量への影響は僅かであった。

経済性評価では、原料費が59円/L-BEと最も高かった。しかし、蒸留残渣（リグニン）の発電、熱源利用により12円/L-BE、さらにビートトップ油カプセルの販売により31円/L-BE低減されることが分かった。結局BE生産価格は71円/L-BE（変動費のみ）となり、100円/L-BEを大幅に下回る価格となることが分かった。

## 環境政策への貢献

持続可能な低炭素社会を実現するために、化石燃料からバイオマスの利活用など再生可能エネルギーへの転換が求められている。本研究では、食料と競合しないセルロース系バイオマスを原料（ビートトップ、豆殻、麦わらなど）とし、さらにビートトップから抗肥満性有価物を回収、商品化するカスケード利用により、安価なバイオエタノール製造技術が確立され、農業廃棄物の有効利用による廃棄物処理と同時に、二酸化炭素排出量削減による地球温暖化防止に貢献できる。

農業廃棄物のカスケード利用、循環利用が可能となり、廃棄物の鋤込みあるいは野焼きが抑制され、亜酸化窒素などの地球温暖化ガス発生抑制に貢献できる。

（詳細はサマリー参照のこと）

## 研究成果の実現の可能性

現在まで得られたデータからプロセスの検討を行い、ビートトップ22万トン-wet/年、麦稈+豆殻3.5トン-wet/年の廃棄物を処理しながら、有用成分であるビートトップ油脂が約5.2トン/年とバイオエタノール約15,000kL/年生産できることが示された。ビートトップ油脂の生産によりバイオエタノールの生産価格は約30円/L-BE低減できると見込まれた。ビートトップ油脂の生産量によってはさらにバイオエタノールの生産価格が低減され、競争力のあるバイオエタノールの価格設定が可能であり、実用化は可能と考えられる。

現状の課題としては、ビートトップ回収機の改良、原料収集システムの実証化、焼却灰の圃場還元による輪作体系への影響評価、ビートトップ油脂製造の実証化、バイオエタノール製造プロセスの実証化があげられる。

## 結論

原料収集、保存に関する検討では、原料の賦存量を明らかにした。また、企業が開発しているビートトップ

回収機によるビートの回収が可能であることが分かった。また、糖類、カロテノイドについて9ヶ月まで長期保存できる条件を見いだした。また、カロテノイドは、遮光+低温により著しく保存性が改善された。

原料に含まれる有用成分評価では、ビートトップ脂質量や成分を明らかとし、ビートトップ脂質中のネオキシサンチンの生物活性とその分子機構の一端を解明すると共に、グリセロ糖脂質の酸化安定性が格段に高いことを見出した。さらに、製品化プロセスを確立した。

原料の前処理では、グルコース収率は麦稈が90%、大豆殻は77%となる前処理条件を見いだした。安定した運転が可能な連続前処理装置の開発を行った。

同時糖化発酵では、創製した機能性温度ストレス耐性酵母は高温におけるセルロース原料からの同時糖化発酵において高いエタノール生産性を示した。また、高温糖化により液化が早期に進行し、糖化発酵効率が向上することが認められた。

エタノール蒸留残渣焼却灰の成分評価では、ビートトップ灰、麦稈灰、大豆殻灰の全てが粗製加里塩の基準以上の酸化カリウムを含有しており、肥料として安全に利用できることが分かった。

以上の研究結果を踏まえて、北海道十勝地方にモデルを設定しビートトップ油とバイオエタノールの生産プロセスを提案し、そのプロセスについてLCA評価、経済性評価を行った。

これらより、農産廃棄物から有用物質を生産し、その残渣を利用したバイオエタノール生産プロセスを構築し、価格競争力のあるバイオエタノール生産体系を確立できた。



図1 小型糖化発酵試験装置



図2 攪拌反応装置

表1 北海道内と十勝管内の農業残渣排出量  
(※スイートコーン茎葉以外は乾物ベース)

農業残渣	作付面積あたりの乾物重量 (kg/ha)	作付面積(ha)		賦存量(万t)	
		北海道	十勝管内	北海道	十勝管内
小豆殻+茎葉	1107	23200	12500	3	1.4
大豆殻+茎葉	3141	24400	4160	8	1.3
麦わら(小麦)	3583	116300	45700	42	16.4
スイートコーン茎葉	-	9640	3190	12	3.7
ビートトップ	6800	62600	26800	43	18.2

表2 長期保存試験での糖含有率の変化(単位: wt%、無水ベース)

保存温度 (°C)	噴霧エタノール濃度(wt%)	初期値	保存期間								
			2日	1週間	2週間	1月	2月	3月	4月	6月	9月
3	0	30	26	27	33	32	33	30	29		
	1		28	29	32	34	34	30	25	24	23
	10		27		28		31	30	27	31	33
	90		29	21	27	29	32	30	27	31	34
25	0		28	30	28	0	27	24	17	15	14
	1		30	30	27	32	26	20	16	16	13
	10		27		24		27	27	22	21	15
	90		26	27	29	31	29	29	27	27	31

表3 いくつかのエタノール抽出液での保存試験結果 (3°C、遮光)

抽出液エタノール濃度 (wt%)	7.6	7.1	6.5	6.1	5.5	参考 85%60日
51日後のカロテノイド残存率 (wt%)	7.6	5.2	4.9	5.9	4.4	8.7

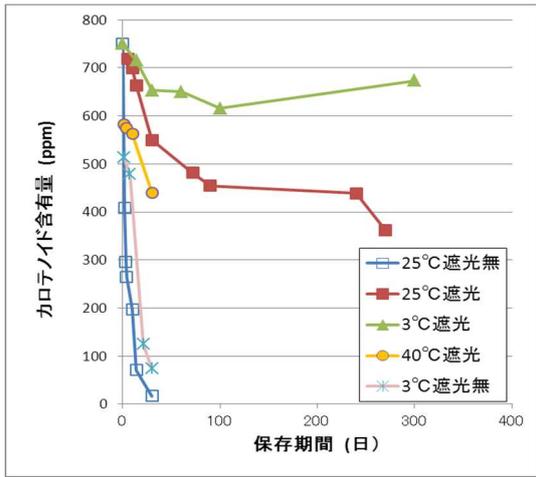


図3 長期保存試験でのカロテノイド抽出率の変化

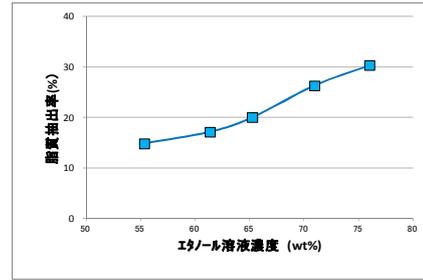


図4 脂質含有量の変化

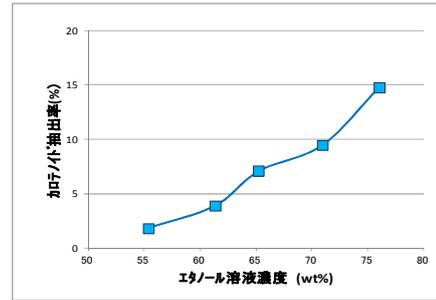


図5 脂質含有量の変化

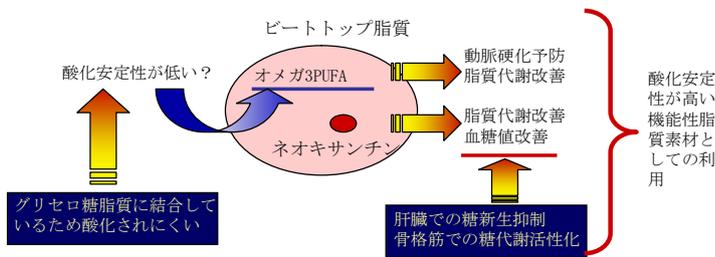


図6 ビートトップ脂質の機能性

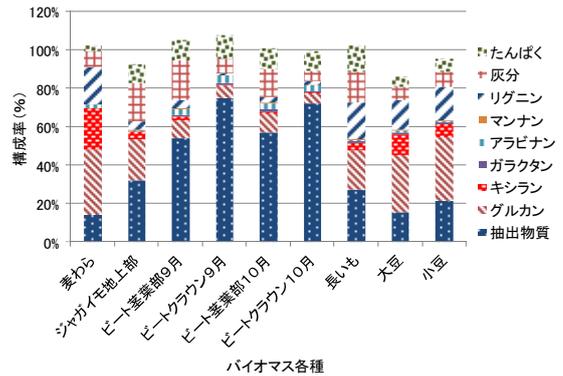


図8 各種バイオマス組成

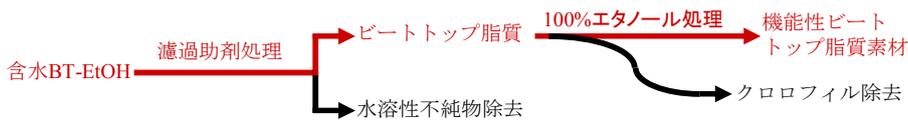


図7 ビートトップ脂質の製造工程

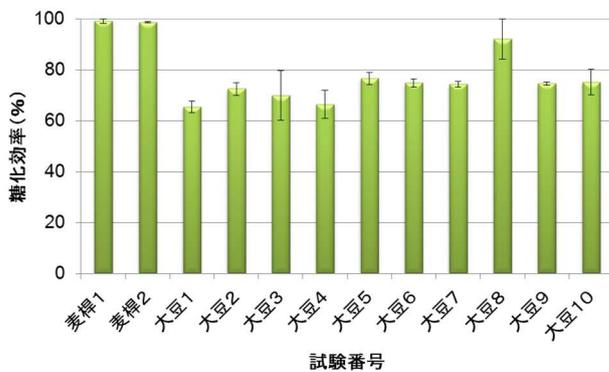


図9 酵素糖化効率



図10 連続爆砕装置(改造後)

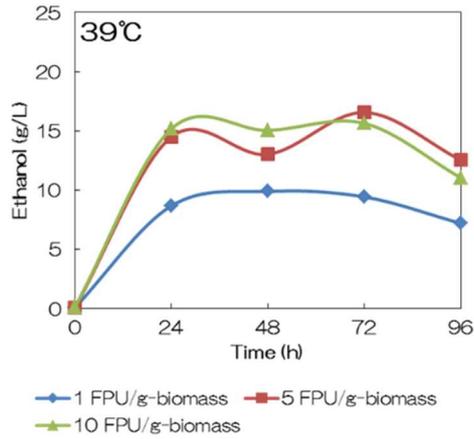


図 11 39°Cにおける麦わらからの  
エタノール生産

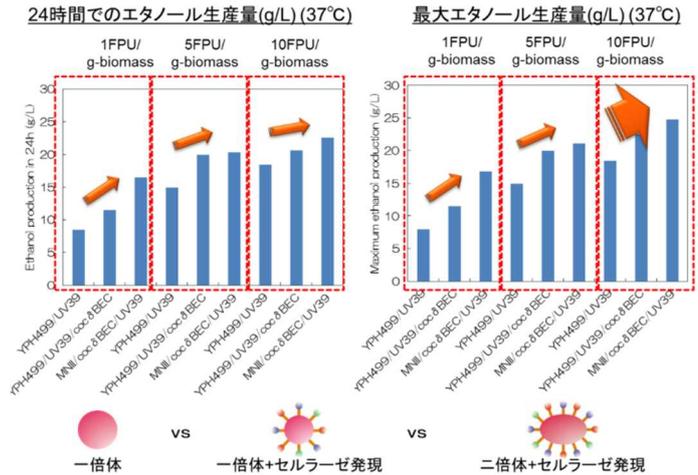


図 12 温度ストレス耐性酵母による麦わらからの  
同時糖化

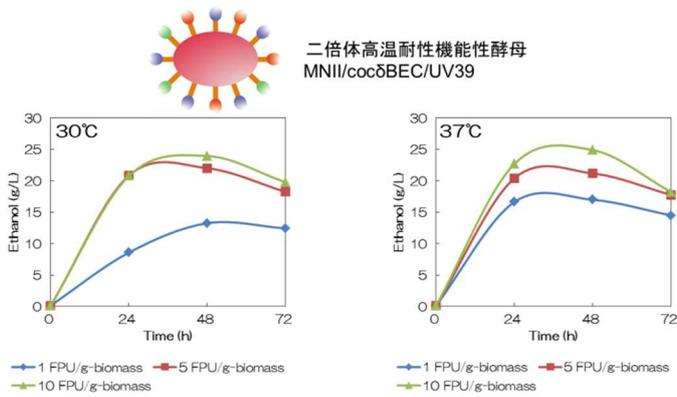


図 13 温度ストレス耐性酵母による  
麦わらからの同時糖化発酵

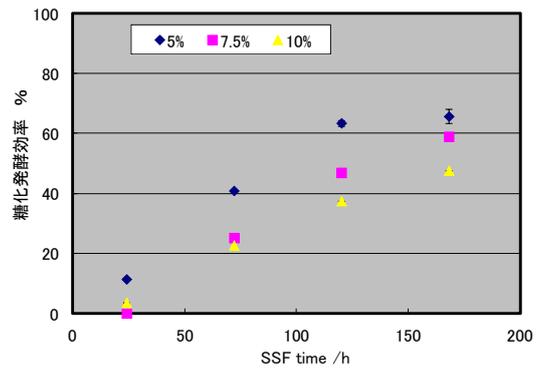


図 14 固形分に対する糖化発酵効率

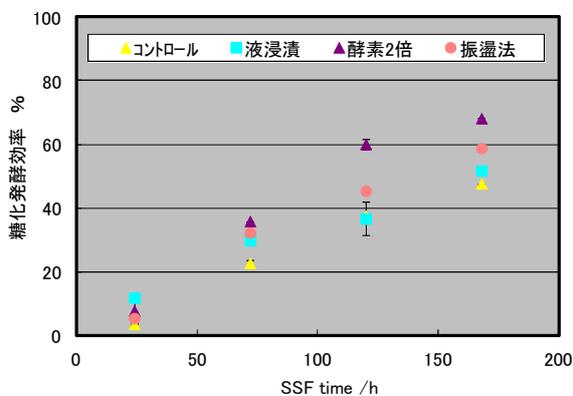


図 15 混合方式・酵素量に対する  
糖化発酵効率

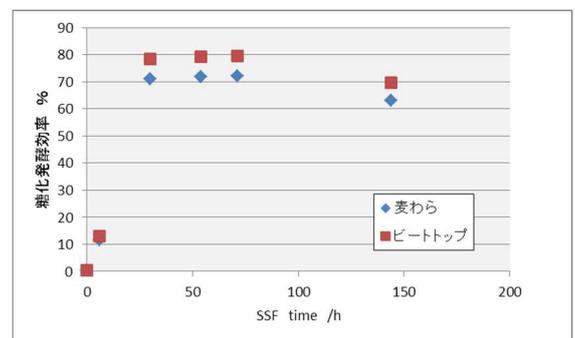


図 16 攪拌反応装置による糖化発酵効率  
(TS:10%-dry)

表 4 各試料焼却灰の組成

CO <sub>2</sub>	14.	2.2	20.
Na <sub>2</sub> O	8.3	0.25	0.24
MgO	6.	1.92	10.
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.74	0.3	0.54
SiO <sub>2</sub>	1.5	33.	2.2
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	4.5	3.2	3.4
SO <sub>3</sub>	3.9	15.	4.1
Cl	8.5	0.39	0.28
K <sub>2</sub> O	47.	38.	42.
CaO	4.2	5.1	17.
TiO <sub>2</sub>	0.05	N.D.	0.2
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	N.D.	0.03	N.D.
MnO	0.05	0.03	0.06
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.57	0.27	0.4
CuO	0.02	0.01	0.01
ZnO	0.02	0.01	0.01
Br	0.05	<0.01	<0.01
Rb <sub>2</sub> O	0.03	0.01	0.02
SrO	0.01	0.01	0.08
ZrO <sub>2</sub>	<0.01	N.D.	N.D.
MoO <sub>3</sub>	N.D.	<0.01	N.D.
BaO	0.03	0.06	0.06

単位(%)

表 5 各種焼却灰の溶出試験分析結果と基準値

試料	単位: μg/L					
	Cr(VI)	Cd	Pb	As	Se	Hg
ビート茎葉灰	96	<1	<2	60	8	<0.05
麦藁灰	<40	<1	<3	13	<2	<0.05
大豆殻灰	47	<1	<2	13	7	<0.05
土壤環境基準	50	10	10	10	10	0.5

表 6 各種焼却灰の含有量分析結果と基準値

試料	Cr	Ni	Cu	As	Se	Cd	Pb	Hg
ビート茎葉灰	7	4	150	<13	<15	<2.5	<11	<0.01
麦藁灰	8	6	160	<13	<15	<2.3	<11	<0.01
大豆殻灰	3	3	49	<13	<15	<2.4	<11	<0.01
焼成汚泥肥料基準	500	300	-	50	-	5	100	2.
土壤環境基準	*250	-	-	150	150	150	150	15.

\* Cr(VI)として

## 1. 原料収集、保存に関する検討

(①原料の効率的な収集、運搬方法についての提言のまとめ、②各原料の長期保存方法の確立)

### 1. 1 研究目的

近年、未利用バイオマスの有効活用が注目されており、多種多様なバイオマスをターゲットとして様々な研究が行われている。北海道内には未利用の農産廃棄物が多量に存在し、それらの有効活用方法の開発が望まれている。本研究は日本有数の農業地帯である北海道十勝地方において大量に発生するセルロース系農産廃棄物を対象とし、農産廃棄物カスケード型循環利用エタノール製造システムを確立することを目的としている。本研究では、ビートトップ、麦わら、豆殻、スイートコーン茎葉などの農産廃棄物をターゲットとしているが、それらの排出期間は、秋から冬にかけての3ヶ月である。そのため、プラントの通年稼働を想定した場合は、それらを9ヶ月以上保存する手法の開発が必要である。本項では、ターゲットとしている農産廃棄物について圃場から効率的に収集、運搬する方法について検討を行うとともに、農産廃棄物を安定した状態で長期保存する方法について検討を行った。

### 1. 2 研究方法

#### (1) 農産廃棄物の効率的な収集方法、運搬方法に関する調査

いくつかの農産廃棄物について、現在の排出状況や実利用のための収集・運搬方法などに関する調査および検討を行った。文献調査および関係機関へのヒアリングなどによる情報収集を行い、調査結果を基にターゲットとしている農産廃棄物の賦存量を推計するとともに、収集・運搬方法について検討を行った。

#### (2) 農産廃棄物（ビートトップ）の長期保存方法に関する検討

##### 1) 供試試料

過去の試験において、我々はデントコーンの茎葉では、アルカリ溶液に浸漬して保存することで糖含有量を減少させずに長期保存できることを見いだしており、今回ターゲットとしている農産廃棄物のうち麦わら、豆殻、スイートコーン茎葉については、糖質の保存が目的であるため、同様の方法で保存が可能である。

もうひとつのターゲットであるビートトップは高付加価値物質(カロテノイドや $\omega$ -3脂肪酸)を高濃度で含有しており<sup>2)</sup>、本研究では、それらの物質を抽出し、カスケード利用することを目的のひとつとしている。脂質はアルカリ水溶液下では、加水分解などの反応により、変質してしまう可能性があり、またカロテノイドも化学反応により消失してしまう可能性もある。そのため、アルカリ浸漬以外の保存方法の検討が必要である。本研究では、システム内で循環可能なエタノールをカロテノイドなどの脂溶性物質抽出剤として使用する予定としている。そこで工程をシンプルにするためにも、エタノールを用いた保存について検討を行った。ビートは、図1.1に示すように、ビート葉部、茎部、クラウン、根部からなり、収穫時に根部の上部を切断するため、葉部、茎部、クラウンからなるビートトップ(図1.2)が残渣として生じる。

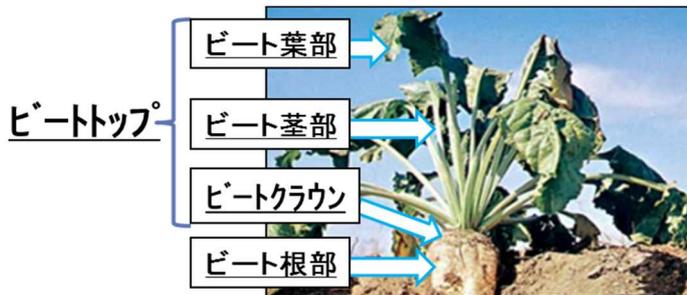


図1.1 ビートの部位



図1.2 ビートトップ

試験の供試試料としては、平成23年9月、平成24年8月、平成25年10月に（地独）北海道立総合研究機構十勝農業試験場で採取したサンプルを使用した。なお、供試ビートトップは、必要に応じて包丁などでビート葉部、茎部、クラウンに分離し、重量、含水率、糖、カロテノイドおよび脂質含有量を次項以降に示す方法で測定した。

また、後述のエタノールでの抽出試験および長期保存試験には、ビートトップをディスクミル（増幸産業（株）スーパーマスコロイダー、MKZA6-3、ディスク間隙1.3mm、回転数約400rpm）で粉碎したものを使用した。

## 2) 糖含有量の分析

NREL/TP-510-42618<sup>3)</sup>で糖含有量を測定した。グルコース、キシロース、ガラクトース、アラビノース、マンノース含有量を求め、その合計値を糖含有量とした。なお、値はNREL/TP-510-42621<sup>4)</sup>で固形分量を測定し、無水ベースとした。

## 3) 脂質量の測定

サンプルに対して、クロロホルム-メタノール溶液（2:1、vol%）を4倍量(v/w)加え、振盪器（タイテック(株)、BR-40LF）を用いて、20°Cで遮光し、振盪速度120min<sup>-1</sup>で12時間振盪した。その後、クロロホルム:メタノール:水が10:5:3(vol%)になるように水を加えて、攪拌後静置し、分離した下層をロータリーエバポレータ（柴田科学(株)、B-480）で乾固させ、その乾固物の重量を脂質量とした。なお、値は、NREL/TP-510-42621で固形分量を測定し、無水ベースとした。

## 4) カロテノイド含有量の定量

前項で得られた乾固物を所定量の液体クロマトグラフ溶媒（A溶媒、アセトニトリル/メタノール/水（84:9:7、v/v/v））に溶かし分析サンプルとした。

分析には、液体クロマトグラフ（(株)東ソー、LC8020）を使用した。カラムは、Devesoil ODS-UG-5（4.6 i.d.×250 mm；5.7 μm particle size、野村化学(株)）を用いた。カラム温度は25°Cに設定した。移動相には、A 溶媒とB溶媒（メタノール/酢酸エチル（68:32、v/v））を使用し、0～8分はA溶媒のみで、8～18分はA溶媒からB溶媒へ液の組成を一定割合で変化させ、18-28分はB溶媒のみで、28～29分はB溶媒からA溶媒へ液の組成を一定割合で変化させ、29～35分はA溶媒のみで試料を流出させた。なお、流速は1.2ml/min、検出波長は0～10minまでは、437nm、10～28minは、444nmとした。

内部標準物質としてパラレッドを用い、9'-シス-ネオキササンチン、ビオラキササンチン、ルテインを定量し、その合計値をカロテノイド含有量とした。なお、値は、NREL/TP-510-42621で固形分量を測定し、無水ベースとした。

#### 5) 脂肪酸組成の測定

1. 2 (2) 3) で得られた乾固物30mgに0.5Mナトリウムメトキシドメタノール溶液2mlを加え、容器の上部を窒素置換後、55°Cのウォーターバスで30分間加温した（加温中10分おきにボルテックミキサーで30秒攪拌）。放冷後ヘキサン2mlを加えて攪拌し、静置後分離した上層を採取した。さらにヘキサン2mlを加えて攪拌し、上層を採取液に加えた。その後、遠心分離をかけ、上層を分析サンプルとした。

分析はガスクロマトグラフ（株式会社島津製作所、GC2014、検出器FID）で行った。カラムは、TC-WAX（株式会社ジーエルサイエンス）を使用した。

#### 6) エタノール抽出試験

抽出は、抽出液のエタノール濃度が所定の値（31-85wt%）となるように、被抽出物に所定濃度のエタノール水溶液を4倍当量(w/v)加え、25°Cで遮光して96時間静置もしくは振盪器（タイテック株式会社、BR-40LF）を用いて20°Cで遮光し、振盪速度120min<sup>-1</sup>で16時間以上振盪し、その後静置することで行った。静置後濾過して固形分を除去することで抽出液を得た。なお、抽出液のエタノール濃度は液体クロマトグラフで測定した。

#### 7) ビートトップの長期保存試験

##### a) エタノール水溶液噴霧サンプルでの保存試験

保存試験用サンプルは、ビート茎葉部に対して蒸留水およびエタノール水溶液(1,10,90wt%)を霧吹きで50wt%噴霧し、混合することで調製した。試験では、5g程度ずつポリエチレン製の袋に小分けしたものを多数作製し、遮光して室温(25°C)および低温(3°C)下で最大9ヶ月間保存した。所定期間経過後にサンプリングしてそれらの糖とカロテノイドの含有量を測定し、経時変化を調べることで、保存方法の有効性を評価した。

##### b) エタノール水溶液サンプル（抽出液）での保存試験

1. 2 (2) 6) の操作で得られた抽出液を用いて、温度や遮光の有無等の条件を変えて保存試験を行い、カロテノイド含有量の経時変化を調べた。

### 1. 3 研究結果および考察

#### (1) 農産廃棄物の効率的な収集方法、運搬方法に関する調査

##### 1) 農産廃棄物の道内での排出量

本研究でターゲットとしている農産廃棄物は、麦わら、豆殻、ビートトップ、スイートコーン茎葉などであるが、それらの廃棄物の排出量については、いくつかの調査結果がある<sup>5)8)</sup>。それらの中には、単位面積あたりのそれぞれの廃棄物の発生量が示されており、それらに北海道内のそれぞれの作物の作付

面積を乗ずることで、廃棄物量を推定することができる。農林水産省の作物統計<sup>9)</sup>の作付面積を用いて推算した結果を表1.1に示す。

小豆(殻+茎葉)、大豆(殻+茎葉)、小麦(麦わら)については、単位面積あたりの搬出可能重量は、それぞれ、1,107 kg/ha、3,141 kg/ha、3,583kg/haと推計されており<sup>7)</sup>、それらに作付面積23,200ha、24,400ha、116,300haを乗ずると、それぞれの量は3万t、8万t、42万tとなった。

スイートコーンについては、出荷重量の1.2倍相当の茎葉部が発生すると言われている<sup>6)</sup>。そのため、作物統計の出荷重量101,400tからスイートコーン茎葉部の量は12万t程度と推算された。

ビートトップについては、単位面積あたりのビートトップ排出量は、6.8t/ha程度であるとの報告があり<sup>9)</sup>、その値に作物統計の作付面積62,600haを乗ずると、排出量は43万t程度と推計された。また、表には、十勝管内の各作物の作付面積および出荷量<sup>10)</sup>を基に算出した十勝管内のそれぞれの残渣の排出量も掲載した。

表1.1の値は、あくまで推計の域を出ないが、含水率なども勘案すると、これまで行われている農産廃棄物排出量の推計値<sup>6),8),11)</sup>とおおよそ同程度で、道内では、多量の農産廃棄物が排出されていることが確認できた。

表1.1 北海道内および十勝管内の農業残渣排出量 (推算値)

農業残渣	作付面積あたりの乾物重量(kg/ha)	作付面積(ha)		賦存量(万 t)	
		北海道	十勝管内	北海道	十勝管内
小豆殻+茎葉	1107	23200	12500	3	1.4
大豆殻+茎葉	3141	24400	4160	8	1.3
麦わら(小麦)	3583	116300	45700	42	16.4
スイートコーン茎葉	—	9640	3190	12	3.7
ビートトップ	6800	62600	26800	43	18.2

※スイートコーン茎葉以外は乾物ベース。

## 2) 農産廃棄物の排出状況および収集・運搬

豆殻については、これまでに、(財)十勝圏振興機構や芽室町などが中心となって有効活用に向けた検討を行っており、その中で収集・運搬についても検討している<sup>12)-15)</sup>。排出後の小豆殻は、図1.3に示すように畑に一列に積まれており、平成22年度にとち財団が実施した事業においては、小豆殻をロールベアラーでロール状にして、それらをトラックで収集運搬している<sup>15)</sup>。この方法は、本事業の提案しているシステムでも適用可能と思われる。



図1.3 排出後の小豆殻  
(左一畑に積まれた小豆殻、中一ロール状にした小豆殻、右一小豆殻の運搬)

ビートトップについては、これまでに飼料としての有効利用を検討した事例があり、収集装置についての検討も行われている<sup>16)・17)</sup>。また、東洋農機株式会社では、昭和43年から昭和60年にかけてビートトップ回収機械を製造販売しており（図1.3左）、近年も帯広畜産大学と共同でビートトップ回収機械を試作している<sup>18)</sup>（図1.3右）。それらの機械は、本事業の提案するシステムでも使用可能である。

また、運搬についても、通常ビートをトラックで運搬しており、それと同じ形での運搬が可能と思われる。実際に試作ビートトップ回収機械で回収したビートトップもサイレージ製造現場までトラックで運搬しており、本研究の場合も、ビートトップの運搬は、通常のトラック輸送で問題ないものと思われる。

スイートコーン茎葉については、これまでもフォーレージハーベスタで収集が行われている<sup>9)</sup>。麦わらについても、ロールベアラーで収集し、トラックで畜産農家などに運搬されており、収集運搬は既存技術で対応可能であり、問題は無い。

以上のことから本研究で対象としているセルロース系廃棄物の再利用のための収集運搬方法については、既存の方法や過去の検討事例があり、本研究のシステムでもそれらを適用可能であることがわかった。



図1.4 ビートトップ回収機械（左：過去に販売されていた機械、右：試作機）

(2) ビートトップの性状

1) ビートトップの各部分の重量

ビートトップは、図1.1に示したようにビート葉部、茎部およびクラウンからなる。採取したサンプルの各部の重量比率を表1.2に、脂質含有量を表1.3に、糖含有量を表1.4に、カロテノイド含有量を表1.5に示す(4つの表はすべて無水ベース)。平成25年10月採取サンプルは、平成24年8月採取サンプルに比べて葉の比率が低かった。年度が異なるため厳密な評価はできないものの、夏から秋にかけての2ヶ月の間に葉が枯れてしまうことが一因と想定される。また、脂質の含有量は時期による違いはほとんどないが、カロテノイド含有量は、8月採取サンプルの方が多かった。これも葉が枯れて含有量が減少したものと推定される。

本研究では、ビート収穫時に発生する農産廃棄物がターゲットであるため、10月採取サンプルが実際に利用するものに近い状態である。10月サンプルのカロテノイド含有量は、前述のように8月サンプルよりは若干低い値ではあるものの、いくつかのバイオマス中のカロテノイド文献値<sup>2)</sup>と比較してもかなり高い値であり、有用成分の抽出原料としては十分なものであることがわかった。

表1.2 ビートトップ各部分の重量比(単位:wt%、無水ベース)

採取時期	サンプル No.	根	茎	葉
H25.10	1	23	52	25
	2	18	52	29
	3	17	54	29
	4	25	43	32
	5	26	46	27
	6	28	46	26
	7	45	29	26
	8	28	43	30
	9	25	40	35
	平均	26	45	29
H24.8	1	37	36	26
	2	20	39	40
	3	19	44	37
	平均	26	40	35

表1.3 ビートトップ各部分の脂質含有量(単位:wt%、無水ベース)

採取時期	サンプル No.	根	茎	葉	ビートトップ
H25.10	1	14.3	9.5	16.4	12.3
	2	10.3	9.5	12.0	10.3
	3	11.2	9.6	12.0	10.5
	4	12.2	10.0	14.0	11.8
	5	15.4	9.8	13.3	12.1
	6	4.2	8.2	11.0	7.8
	7	3.7	7.6	14.1	7.5
	8	16.7	8.0	11.7	11.6
	9	6.4	8.1	12.0	9.0
	平均	10.5	8.9	12.9	10.5
H24.8	1	5.1	8.0	13.9	8.4
	2	10.0	8.2	12.1	10.0
	3			13.3	
	平均	7.6	8.1	13.1	9.8

表1.4 ビートトップの糖含有量 (H25.10サンプル、wt%、無水ベース)

	グルコース	キシロース	ガラクトース	アラビノース	マンノース	合計
葉	11.7	1.7	3.2	6.0	0.0	22.6
茎	17.1	2.1	3.4	7.9	0.1	30.7
根	31.1	0.6	2.9	6.2	2.5	43.4
ビートトップ	19.3	1.6	3.2	7.0	0.7	31.7

表1.5 ビートトップ各部のカロテノイド含有量 (単位: wt%、無水ベース)

(Nx: 9cisネオキササンチン、V: ビオラキサンチン、L: ルテイン)

採取時期	サンプル No.	根			茎			葉			ビートトップ		
		Nx	Vx	L	Nx	Vx	L	Nx	Vx	L	Nx	Vx	L
H25.10	1	4	1	15	33	15	163	1041	323	2560	278	89	728
	2	4	1	17	56	22	247	1138	301	2396	360	99	826
	3	3	1	10	64	27	238	940	334	2092	307	112	737
	4	10	3	31	63	23	227	1050	362	2210	366	127	813
	5	6	1	20	33	12	147	999	288	2216	286	84	671
	6	6	1	20	45	20	215	728	179	1638	212	56	531
	7	10	2	30	57	24	235	990	352	2268	278	100	672
	8	3	1	10	54	23	227	901	334	2119	295	110	736
	9	11	2	37	38	16	178	684	271	1713	257	102	680
	平均		7	1	21	49	20	208	941	305	2135	297	98
H24.8	1				142	13	287	1168	261	2449			
	2				135	13	270	1312	306	2708			
	3				150	16	290						
	平均				138	13	278	1240	284	2578			

### (3) ビートトップの長期保存方法に関する検討

#### 1) エタノール噴霧での保存試験

長期保存試験時の糖含有量の変化を表1.6に示す。25°C保存では、エタノール濃度が10wt%以下のサンプルでは、3月以降から含有量が減少し始め、9ヶ月で半分程度になったのに対し、90wt%のエタノールを噴霧したサンプルでは、9ヶ月経過後でも初期値と同程度を維持しており、高濃度のエタノールの噴霧は、有効であることがわかった。3°C保存では、10wt%以上のエタノール濃度で9ヶ月経過後も初期値を維持しており、温度を低温にすることで、より低いエタノール濃度でも保存が可能になることがわかった。なお、90wt%エタノール噴霧後のサンプルを搾り、その液のエタノール濃度を測定したところ、265mg/mlであった。エタノールでの抽出については、後述するが、ビートトップからカロテノイドをエタノールで抽出した後に保存することを想定した場合、ビートトップは、それをほろかに上回る高濃度のエタノールに含浸した状態になるので、実システムにおいても糖分は、長期間にわたって問題なく保存できるものと思われる。

カロテノイド含有量(9cisネオキササンチン、ビオラキサンチン、ルテインの合計量)の経時変化を表1.7に示す。保存温度3°Cでのカロテノイド含有率の減少は、25°Cと比較すると緩やかであり、低温下での保存が有効であることがわかった。しかしながら、保存温度3°Cでも、1ヶ月後には、大幅に減少しており、エタノール溶液の噴霧では、長期保存が難しいことがわかった。

表1.6 長期保存試験での糖含有率の変化 (単位: wt%、無水ベース)

保存温度 (°C)	噴霧エタノール濃度(wt%)	保存期間									
		初期値	2日	1週間	2週間	1月	2月	3月	4月	6月	9月
3	0	30	26	27	33	32	33	30	29		
	1		28	29	32	34	34	30	25	24	23
	10		27		28		31	30	27	31	33
	90		29	21	27	29	32	30	27	31	34
25	0		28	30	28	0	27	24	17	15	14
	1		30	30	27	32	26	20	16	16	13
	10		27		24		27	27	22	21	15
	90		26	27	29	31	29	29	27	27	31

表1.7 長期保存試験でのカロテノイド含有量の経時変化 (ppm、無水ベース)

保存温度 (°C)	エタノール濃度(%)	保存期間 (カロテノイド含有率(ppm))				
		0日(初期値)	2日	1週間	2週間	1月
3	0	161	180	112	118	45
	1	115	147	105	82	53
	10	145	119		39	—
25	0	161	55	24	42	12
	1	115	90	—	33	13
	10	145	28	19	22	—

## 2) エタノール抽出液での保存試験

エタノール抽出後の液 (エタノール濃度85wt%) で保存した場合のカロテノイド含有量の経時変化を図1.5に示す。遮光しない3°C、25°C保存サンプルでは、含有率の減少は、著しく速く、3°Cでも1ヶ月で初期値の10%程度になった。遮光によりカロテノイド含有量の減少は著しく抑制され、9ヶ月経過後でも、25°Cで初期値の約半分、3°Cでは、初期値と同程度の値を維持していた。以上のことから遮光の有無は非常に大きい因子であり、加えて保存温度を低温にすることで、さらに減少を抑えることができることがわかった。

ビートの収穫は11月上旬から行われるため、ビートトップの排出も同時期となる。ビート生産地は寒冷地であり、例えば特産地である十勝管内芽室町の過去10年の気温を調べると、11月中旬から4月上旬の5ヶ月弱は1日の平均気温は3°C以下であった。雪氷など利用すると、さらに長期間3°C以下に保つことも可能であることが想定される。本研究の結果から、寒冷外気などの自然エネルギーを積極的に利用することで、効率よく保存できる可能性があることが示唆された。

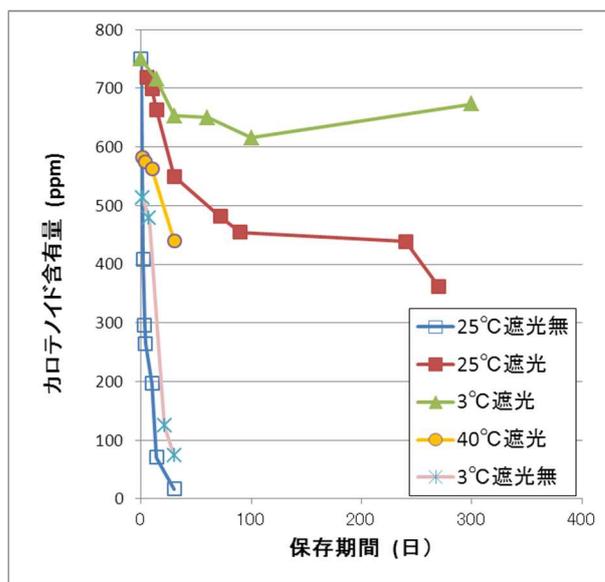


図 1.5 カロテノイド含有量の経時変化

### 3) エタノール抽出条件と保存性に関する検討

前項でカロテノイドの保存には、エタノール溶液で抽出後の液での保存が有効であることがわかった。本章は、保存に関する検討を行う章であるが、抽出工程の後に保存工程があるシステムを検討する場合、抽出条件とその結果得られる抽出液の保存性についても検討が必要と考えられる。そのため、エタノール濃度を様々に変えた場合の抽出状況を調べるとともに、得られた抽出液でのカロテノイドおよび脂質の長期保存性について検討した。

抽出液のエタノール濃度を変えた場合のカロテノイド抽出率の変化を図1.6に、ネオキサンチン抽出率の変化を図1.7に、脂質抽出率の変化を図1.8に示す(いずれも元原料ビートトップの無水ベース重量に対する値、単位: wt%)。カロテノイドも脂質もエタノール濃度の増加に伴い抽出量は増加しており、ネオキサンチンはカロテノイドとほぼ同じ値であった。例えば抽出液濃度が55%程度の時は、抽出率は原料ビートトップ中に含まれるカロテノイドの2%、脂質の15%程度にとどまるが、約76%の時は、カロテノイドの15%、脂質の30%程度を抽出できている。また、抽出された脂質の脂肪酸組成を調べたところ、40%程度の $\alpha$ リノレン酸を含んでいた。ビートトップには茎部、クラウンが入っているため、ビート葉部だけの文献値<sup>2)</sup>と比べてやや低い値であるものの、他のバイオマスと比較しても十分に高い $\omega$ -3脂肪酸含有量であった。なお、エタノールでの抽出工程での抽出残渣への糖の残存量を調べたところ、原料ビートトップの無水物重量をベースとすると5-8%程度の糖が抽出液に取り込まれ、残りの90%以上は抽出残渣に残存することがわかった。この残存率は、多少のばらつきはあったものの、55-76%の抽出液濃度では、ほぼ一定値で、抽出残存率への抽出液濃度の影響はなかった。このことから、エタノール抽出時の糖の損失は少なく、今回試験を行った範囲のエタノール濃度では、90%以上の糖が抽出残渣に残存しており、効率的に脂質およびカロテノイドなどの有効成分のみを抽出できることがわかった。次にカロテノイドなどを抽出した後の55-76%のエタノール濃度の抽出液で保存試験を行った結果を表1.8に示す。抽出液濃度が高いほどカロテノイドの保

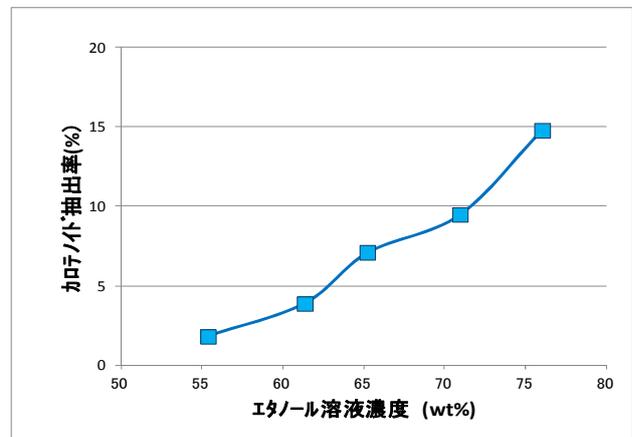


図 1.6 カロテノイド抽出率の変化

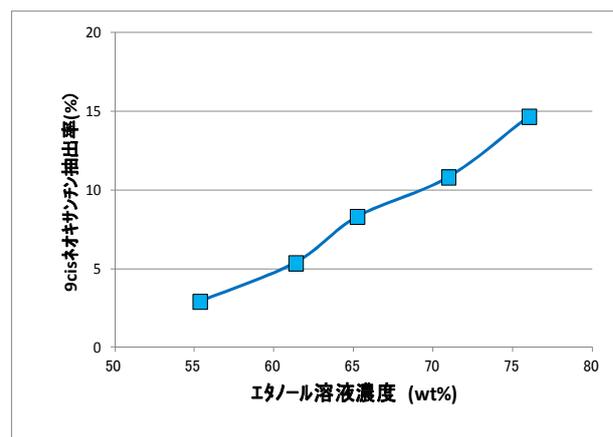


図1.7 ネオキサンチン抽出率の変化

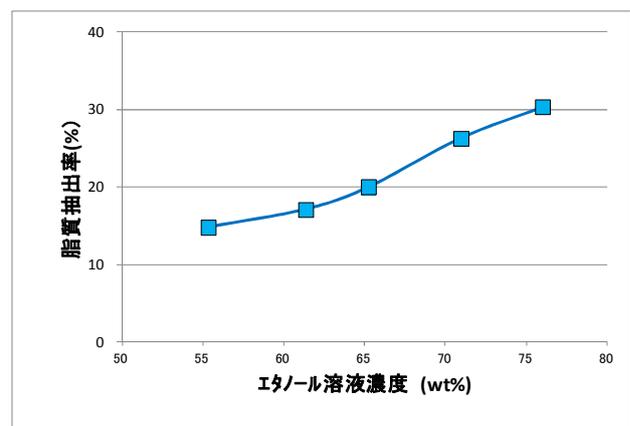


図1.8 脂質含有量の変化

存後の残存率は高かった。また、表には示さなかったが、脂質量はどの濃度でも51日後も初期値と同程度であった。

実システムにおける保存期間は、ビートトップからどの程度有用成分の回収を行い、また、それをどれだけの期間をかけて製品を製造するかによって変わってくるものと思われる。保存は、長期間可能なほうが好ましいのだが、現時点で想定している有用部物質の市場規模はそれほど大きくなく、後段のプロセスの章で検討を行うが、実際の処理量はかなり少ないものと思われる。

50日の保存期間が、抽出後の有用成分の製造工程に十分なものかどうかは議論が必要なところであるが、表の51日時点での残存率で判断すると、抽出液濃度はより高い方が望ましく、少なくとも75%程度より高いことが望ましいものと思われる。

表1.8 いくつかのエタノール抽出液での保存試験結果 (3°C、遮光)

抽出液エタノール濃度(wt%)	76	71	65	61	55	参考 85%60日
51日後のカロテノイド残存率(wt%)	76	52	49	59	44	87

#### 1. 4 結論

本章では、麦わら、豆殻、ビートトップ、スイートコーン茎葉等の農産廃棄物の収集・運搬方法および農産廃棄物の長期保存方法について検討を行った。

まず、農産廃棄物の北海道内、十勝管内での賦存量の推計を行い、道内では、多量の農産廃棄物が排出されていることを確認した。

次に、農産廃棄物の収集運搬について、既存の収集・運搬方法の調査を行い、それらが本課題でも適用可能であることがわかった。麦わら、小豆殻、スイートコーン茎葉の収集運搬については、概ね方法が確立されており、本研究の場合にも適用可能である。ビートトップの収集については、現在市販の収集装置はないが、過去に装置を製造し、現在新たな装置の試作も行っているメーカーもあり、若干の改良は必要なものの、それらの装置で収集は可能であると思われる。ビートトップの運搬についても通常のトラック輸送で問題ないものと思われる。

各種バイオマスの保存については、麦わら、小豆殻、スイートコーン茎葉は、既往の研究成果であるアルカリ浸漬保存を適用可能と想定されるので、ビート茎葉部の保存に重点を置き試験を行った。ビート茎葉部の糖類の保存については、高濃度のエタノール水溶液を噴霧した状態で、低温下で保存すれば、9ヶ月間経過後も初期値と同程度の糖含有量を維持することができた。このことから、ある程度の濃度のエタノールを共存させた状態で保存すれば、長期間保存することは可能であることがわかった。

カロテノイドおよび脂質の保存については、高濃度のエタノール抽出液で、低温下で遮光保存することで、長期間にわたり初期値と同程度の含有量を維持できることがわかった。また、エタノール濃度が低下すると保存性は悪くなるため、少なくとも75%程度より高い濃度での保存が望ましく、より長期間の保存のためには85%以上が好ましいことがわかった。

カロテノイドなどの保存には、エタノール抽出した液の状態が好ましいことがわかったので、エタノール抽出条件についても基礎検討を行った。エタノール濃度が高いほど脂質およびカロテノイドの抽出率は高くなり、75%では、原料ビートトップの15%のカロテノイド、30%の脂質を抽出することができた。

また、抽出時の糖の損失は少なく、90%以上の糖が抽出残渣に残存しており、エタノール溶液で抽出することで効率的に脂質およびカロテノイドなどの有効成分のみを抽出できることがわかった。

以上のことから実プロセスでは、少なくとも75%以上のエタノール濃度で抽出し、抽出液をそのままの状態で作成するのが好ましいことがわかった。

#### 1. 5 参考文献

- 1)北口敏弘、近藤昭彦、山田敏彦、秋葉隆ほか、地球温暖化対策技術開発事業資源用トウモロコシを利用した大規模バイオエタノール製造拠点形成推進事業成果報告書、2010
- 2)加茂川寛之、陸上植物由来カロテノイドに分析方法の確立とその応用、平成22年度北海道大学修士論文
- 3)A.Sluiser, B.Hames, D.Hyman, C.Payne, R.Ruiz, C.Scarlata, J.Sluiser, D.Templeton and J.Wolfe, Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Sample, NREL/TP-510-42621, National Renewable Energy Laboratory (2008)
- 4) A. Sluiser, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiser, D. Templeton, and D. Crocker, Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, NREL/TP-510-42618, National Renewable Energy Laboratory (2008)
- 5)建部雅子、花井雄次、テンサイ各部位における糖の消長、てん菜研究会報、24、pp.57-63 (1982)
- 6)北海道十勝地域の規格外農産物および農産化工残渣物利用におけるバイオエタノール変換システムに関する事業化可能性調査報告書、財団法人十勝圏振興機構、平成17年3月
- 7)小川和夫、竹内豊、片山雅弘、北海道の耕草地におけるバイオマス生産量および作物による無機成分吸収量、北海道農業試験場研究報告、149号、pp.57-91 (1988)
- 8)北海道バイオマス利活用マスタープラン、北海道、平成18年3月
- 9)平成22年度農林水産省作物統計、<http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/index.html>
- 10)2011 十勝の農業、北海道十勝総合振興局、平成 23 年 12 月
- 11)「十勝圏資源循環型社会形成検討調査」、帯広開発建設部、平成 16 年 1 月
- 12)農産物収穫残渣燃料化新システム協議会平成 19 年度事業実績報告書、平成 20 年 3 月
- 13) 農業残さからのエネルギー！豆殻、ながいもつる・ネットペレットプロジェクト報告書、北海道芽室町、平成 21 年 3 月
- 14) 芽室町の公共施設を活用したバイオマス資源の町内循環推進事業報告書、北海道芽室町、平成 22 年 3 月
- 15) 平成 22 年度 産学連携道産低炭素化技術振興モデル事業委業務報告書、「地域に賦存する畑作関連バイオマス由来のペレットボイラの開発・実証」、畑作関連バイオマスペレットボイラ研究開発コンソーシアム、平成 23 年 2 月
- 16)村井信仁、齊藤亘、高畑英彦、ビートトップの飼料化に関する試験、てん菜研究会報、21 号、pp.155-170 (1980)
- 17)高橋潤一、ビートトップの飼料化の取り組みについて、独立行政法人農畜産業振興機構 HP、[http://www.alic.go.jp/joho-s/joho07\\_000487.html](http://www.alic.go.jp/joho-s/joho07_000487.html) (2012)
- 18)十勝毎日新聞社 Web ニュース、平成 22 年 9 月 14 日、<http://www.tokachi.co.jp/news/201009/20100914-0006610.php>

## 2. 原料に含まれる有用成分評価

### 2. 1 研究目的

ビートトップなどの農産物の葉部中にも脂質は少なからず存在（例えばビートトップで乾燥重量あたり5～10%）する。これらの葉部脂質には、カロテノイドや糖脂質などといった機能性成分が含まれており、これらの機能性脂質は中性脂肪と比較して高極性のため、エタノールを用いることで効率良く抽出できる。したがって、本事業で農業廃棄物から得たエタノールを、これら機能性脂質の抽出に活用し、付加価値の高い抽出物を得ることができれば、ビートトップからのバイオエタノール製造コストの低減化を図ることができると考えられる。こうした背景のもと、本事業では、北海道で毎年大量に発生する農業廃棄物のうち、特にビートトップに着目し、ビートトップから有価物を回収して廃棄物のカスケード利用を図り、市場競争力の高いバイオエタノール製造技術体系を確立することを目的とする。

### 2. 2 研究方法

#### 1) ビートトップエタノール抽出物(BT-EtOH)の成分分析

BT-EtOHに含まれる脂肪酸の組成や色素成分（カロテノイド）などについて分析した。また、この際、BT-EtOHの脂溶性成分組成を、他の植物葉部からのエタノール抽出物中のそれと比較した。

①試料：用いたビートトップは十勝農業試験場から得た。また、比較のため用いた各種野菜は函館市内のストアで購入した。

②エタノール抽出：試料は冷凍庫にて一晩凍結させた。凍結後粉碎し、これを解凍後に、試料重量の10倍量のエタノールに浸漬し、一晩放置することで抽出を行った。抽出液をろ過後、残渣に再び試料重量の10倍量のエタノールを加え一晩抽出した。2回の抽出で得られたろ液を濃縮し、エタノール抽出物を得た。また、このエタノール抽出物中の脂質含量を分析するために、以下の方法<sup>1)</sup>で脂質を分離し、重量を測定した。すなわち、エタノール抽出物に蒸留水を加え、クロロホルム/メタノール/蒸留水(10:5:3, v/v/v)の混合比とした後、よく振り混合した。混合液は一晩遮光静置して2層に分離させた後に、下層を回収し、脂質成分を得た。

③HPLCによるエタノール抽出物中のカロテノイド分析<sup>2)</sup>：HPLCのカラムには逆相系のODS(DevesoilODS-UG-5, 野村化学(株))を用いた。カラム温度は25°Cに設定した。移動相には、A溶媒（アセトニトリル/メタノール/水(84:9:7, v/v/v)）とB溶媒（メタノール/酢酸エチル(68:32, v/v)）を用意し、0-8分はA溶媒のみで、8-28分はB溶媒のみで、また、28-29分はA溶媒のみで試料を流出させた。なお、流量は1.2ml/min、検出波長は440nmとした。予備分析により、各エタノール抽出物には3種のカロテノイド（ルテイン、9'-シス-ネオキササンチン（ネオキササンチン）、ビオラキササンチン）が主として含まれていたことが分かったので、これら3種のカロテノイドを購入し、それぞれのカロテノイドの検量線を作成した後、試料中のカロテノイドの定量を行った。なお、内部標準物質としてパラレッドを用いた。

④脂肪酸組成分析：エタノール抽出物に含まれる脂肪酸の組成分析にはガスクロマトグラフィー(GC)を用いた。脂肪酸を定法<sup>3)</sup>によりメチルエステルとし、キャピラリーカラム(Fused Silica Capillary Column Omegawax320, Supelco)に導入した。なお、キャリアガスにはヘリウムを用い、流量は1mL/s、カラム温度は200°C、試料導入温度は250°C、検出器温度は260°Cとした。

#### 2) ビートトップエタノール抽出物(BT-EtOH)の肥満/糖尿病病態マウス(KK-*A*<sup>y</sup>)に対する投与実験

BT-EtOH の脂質代謝改善作用を明らかにするために、糖尿病・肥満病態マウスを用いた検討を行った。

①動物と飼料：動物には日本クレア(株)より購入したⅡ型糖尿病・肥満モデルマウス (KK-*A* マウス、4 週齢、雄)を用いた。試験飼料は AIN-93G 組成<sup>4)</sup>に従って調製した。なお、コントロール群用の飼料中の大豆油は 14%(w/w)とした。BT-EtOH 投与群では大豆油 14%のうち、4%を BT-EtOH で置換した。また、各飼料から脂質を抽出し、その脂肪酸組成を上述の 1) の④により分析した。

②動物の飼育：動物実験は北海道大学動物実験委員会による北海道大学動物実験指針に基づいて行った。室温 23±1℃、湿度 45~60%、明暗周期 12 時間の条件下で滅菌ウッドチップを入れたプラスチックケージに、1 ケージあたり 1 匹となるように飼育した。固形試料 MF 試料を用いて 1 週間予備飼育を行った後、平均体重および体重の標準偏差が同等となるよう、各群 6 匹に群分けし、26 日間上述の実験飼料を与えて飼育した。

③採血および臓器の摘出と血清成分の分析：飼育期間中の体重、摂餌量を測定した。血糖値は 26 日間の実験飼育最終日に、非絶食状態で尾静脈より採血を行い、血液中の血糖値を自己検査用グルコースキット・サイクリック GB センサーにより測定した<sup>5)</sup>。飼育期間終了後、12 時間の絶食を行い、その後、エーテル麻酔下で大静脈より採血を行い、血液中の各成分の分析に供した。採血終了後直ちに頸椎脱臼により安楽死させ、その後臓器を摘出した。摘出した臓器は-20℃で保存した。また RNA の分析に用いたサンプルは RNA later(シグマアルドリッチジャパン)を用いて保存した。

④肝臓脂質の抽出と分析：-40℃で保存した肝臓中の脂質を、クロロホルム/メタノール (2:1,v/v)を用いて抽出した<sup>6)</sup>。得られた肝臓脂質中のコレステロールとトリアシルグリセロール(TAG)の測定には、コレステロール:E-テストワコーと TAG:E-テストワコー(和光純薬工業)を用いた。

⑤肝臓脂質中の脂肪酸分析：肝臓脂質中の脂肪酸のメチルエステル化はアルカリ触媒下で行った。得られたメチルエステルをケイ酸カラムクロマトグラフィーにより精製し、上述の 1) の④で示した条件にて GC 分析した。

⑥血清インスリン濃度の測定：血清中のインスリン濃度の測定には、ELISA キットを用いた<sup>7)</sup>。血清(原液)と標準インスリン溶液を 96 穴抗体固相化プレートのウェルに分注し、あらかじめ各ウェルに添加してあるビオチン結合抗インスリン抗体と反応させた。反応終了後、反応液を捨て、洗浄後、ペルオキシダーゼ・アビジン結合物と反応させ、マイクロプレート用分光光度計を用いて 450 nm での吸光値を測定した。試料検体の吸光値から検体ブランクの吸光値を引いた値を検量線に当てはめ、検体のインスリン濃度を算出した。

⑦統計計算：得られた数値から、各群の平均値および標準誤差を算出した。数値の比較には多重比較法のシェッフエを用い、有意水準は  $p<0.05$  および  $p<0.01$  とした。

### 3) ネオキササンチンの肥満/糖尿病病態マウスに対する投与効果

BT-EtOH には葉部脂質に特徴的なカロテノイド、ネオキササンチンが含まれている。ネオキササンチンは分子内にアレン構造を有する特殊なカロテノイドで、これまでその生理作用については知られていなかった。本事業では、BT-EtOH の栄養機能性を理解する上で、ネオキササンチンが鍵となると推測し、動物を用いたネオキササンチンの生理作用に関する検討を行った。

①ネオキササンチンの調製：ネオキササンチンを動物に投与できる量分別した例はこれまでにない。ネオキササンチンは光合成を活発に行う陸上植物葉部や緑藻類に多く含まれている。幾つかの素材について検討したところ、市販のクロレラ粉末がネオキササンチンを分別するのに最も適した原料となることが分かった。そこで、クロレラ粉末からの有機溶剤抽出、液-液分配分画、カラムクロマトグラフィー分画を用いたネオキササンチ

ン分別法をまず確立した。この方法により、純度 75%以上のネオキサンチン濃縮物（残りの 25%は糖脂質）を得た。

②動物実験とその解析方法：動物実験は、上述 2) の項で述べた方法と同じとした。飼料中のネオキサンチン添加量は 0.2wt%とした。また、ネオキサンチンの投与実験では、エネルギー制限食を用いた検討も行った。

#### 4) BT-EtOH の酸化安定性の分析

BT-EtOH などの植物葉部脂質には酸化されやすい  $\alpha$ -リノレン酸が多く含まれる。一方で、葉野菜などの植物葉部は、乾燥粉末などで流通することも多いが、この場合、特に、不活性化ガスの充填や冷凍保存などの酸化防止措置は行わなくても酸化劣化は見られない。この高い酸化安定性の原因として、植物葉部脂質の主要クラスがグリセロ糖脂質(GL)であることに起因している可能性を考え、BT-EtOH 中の GL の酸化安定性について検討した。

①酸化に用いた脂質：BT-EtOH からの GL と比較に用いたコンブ GL、イワシ油トリアシルグリセロール (TAG)、大豆油 TAG、サケ卵ホスファチジルコリン(PC)は、各原料から複数の方法を用いて分別・精製した。いずれの試料油にも、トコフェロール、カロテノイド、ポリフェノールなどの抗酸化物質やクロロフィル、酸化物、金属などの酸化促進物質が含まれていないことを確認した。

②酸化実験：各脂質 20mg をバイアル瓶に入れブチルセプタムゴムおよびアルミシールバイアルで栓をし、37°C、暗所にてインキュベートした。バイアル瓶中の脂質の酸化は、酸化に伴うバイアル瓶上部空気中の酸素の減少速度、過酸化物の増大および高度不飽和脂肪酸(PUFA)の減少速度などにより比較した。

#### 5) ビートトップ脂質素材の開発

BT-EtOH には特徴的な機能性のあることを本事業で明らかにできた。しかし、BT-EtOH にはクロロフィルが含まれているため、素材の色は暗褐色となり、食品素材への応用が難しい。また、クロロフィルは油脂の安定性に悪影響を及ぼす。そこで、ビートトップからのクロロフィルの除去法について検討した。

①吸着剤を用いたクロロフィルの除去：活性炭や合成吸着剤(ダイヤイオン HP-20)などの各吸着剤をカラムに充填し、BT-EtOH をこのカラムで処理した。得られた処理物中のクロロフィル a、クロロフィル b、クロロフィル c の含量を、400~800nm での吸光値を測定することにより定量した。また、処理物中のカロテノイド含量を HPLC により定量した。

②濾過助剤を用いたクロロフィルの除去：図 2.1 に示したように、まず水を 50%以上含む BT-EtOH を濾過助剤で処理する（バッチ式）。同じ操作をさらに 2 回行った後、次に 100%のエタノールで抽出後、濾液を活性炭で処理した。



表 2.1 ビートトップおよび各種野菜可食部から得たエタノール抽出物中の主要脂肪酸組成

試料名	脂肪酸 (重量%)				
	16:0	18:0	18:1n-9	18:2n-6	18:3n-3
ビートトップ	13.3	0.8	2.5	9.3	64.6
小松菜	10.5	1.3	0.6	4.3	52.5
水菜	12.1	1.3	0.8	5.5	50.8
大葉	12.4	1.3	1.6	9.1	52.3
バジル	13.0	1.7	1.9	10.4	56.8
ミツバ	10.5	0.5	1.4	18.7	35.0
パセリ	11.8	0.8	0.6	0.6	30.5
シュンギク	8.2	0.4	0.3	7.9	68.3
ニラ	17.6	1.3	0.8	23.2	48.6
長ネギ	13.8	1.5	1.9	26.0	47.2
ピーマン	16.2	4.3	1.7	46.2	22.9
ササゲ	17.1	3.3	1.9	20.0	49.5
アスパラガス	23.1	1.3	1.1	51.5	16.4

表 2.2 ビートトップおよび各種野菜可食部のカロテノイド含量 ( $\mu\text{g/g}$  抽出物)

試料名	ルテイン	9'-シス-	
		ネオキササンチン	ビオラキサンチン
ビートトップ	1320.0	400.0	187.6
小松菜	2048.6	679.0	158.2
水菜	1917.9	430.1	126.3
大葉	2191.7	842.8	268.6
バジル	1461.3	331.5	71.3
ミツバ	2543.3	623.9	522.4
パセリ	1425.2	352.0	162.7
シュンギク	1748.7	462.0	459.5
ニラ	1167.2	157.0	70.3
長ネギ	1225.2	201.4	49.8
シシトウ	193.1	47.9	32.9
ササゲ	107.1	未検出	5.9
ブロッコリー	105.0	4.2	5.1

特に、ネオキササンチンとビオラキサンチンの含量の低さがピーマン、ササゲやブロッコリーなどで際立っていた。これは、ルテインやネオキササンチンの主な役割が光合成の補助色素であり、これらのカロテノイドは主として葉緑体に存在しているが、実や蕾は光合成を行う器官ではないためにこれらのカロテノイドが少なかったためと考えられる。

BT-EtOHに含まれるカロテノイドとして含量の最も多いルテインの栄養学的な意義としては、網膜に対する酸化ストレスからの防御が良く知られている<sup>9)</sup>。ただ、次に多いネオキササンチンについては、その生理作用はこれまでほとんど研究がなされていない。しかし、類似の構造を有する褐藻由来のカロテノイド、フコキササンチンが独特の分子機構に基づく抗肥満作用や血糖値低下作用を示す<sup>10)</sup>ことから、ネオキササンチンの機能性にも興味を持たれる。

以上、ビートトップが脂質素材原料として活用できること、そのエタノール抽出物の特徴として、オメガ3PUFAに富むこと、主なカロテノイドとしてルテインやネオキササンチンを含むことが明らかになった。オメガ3PUFAは脂質代謝改善作用を有することが知られている。また、ネオキササンチンについては*in vitro*系の実験ではあるが、脂肪細胞における脂肪蓄積の抑制作用が見出されている<sup>11)</sup>。そこで、次に、BT-EtOHを肥満/糖尿病病態マウスに投与した場合の栄養機能について検討した。

## 2) BT-EtOHの肥満/糖尿病病態マウス(KK-*A<sup>y</sup>*)に対する効果

肥満/II型糖尿病・肥満モデルマウス (KK-*A<sup>y</sup>* マウス) に BT-EtOH を 4%投与した場合について種々の検討を行った。総摂餌量は BT-EtOH 投与群の方がコントロール群よりも高かったにもかかわらず、体重は BT-EtOH 投与群で若干低下傾向を示した。また、内臓白色脂肪組織(WAT)重量も BT-EtOH 投与群で、コントロール群と比較して低下傾向を示した (図 2.2(A))。一方、筋肉重量はビートトップ脂質投与で、コントロール群と比較して有意に増加した (図 2.2(B))。こうしたことからビートトップ脂質中には、肥満病態マウスに対して、脂肪減少効果を示す成分の含まれている可能性が考えられた。

一方、血中脂質には BT-EtOH 投与群とコントロール群とで大きな違いは見られなかったが、血糖値 (図 2.2(C))とインスリンが、BT-EtOH 投与群でコントロールと比較して低下傾向を示した。また、肝臓について分析したところ、肝臓重量には BT-EtOH 投与群とコントロール群で違いがなかったにもかかわらず、肝臓中

の脂質含量は、ビートトップ脂質投与群でコントロール群に比べて低下傾向を示した (図 2.3(A))。これに伴い、肝臓中のトリアシルグリセロール(TAG) (図 2.3(B)) とコレステロール含量 (図 2.3(C)) が低下し、特にコレステロール含量には有意な低下が見られた。

BT-EtOH 中の脂肪酸の主要構成成分は、 $\alpha$ -リノレン酸(18:3n-3)であったため(表 2.1)、BT-EtOH を添加した餌脂質中の  $\alpha$ -リノレン酸含量はコントロールの約 1.7 倍となった (表 2.3)。その結果、BT-EtOH を 4% 投与した動物の肝臓脂質においても変化が見られ、BT-EtOH 投与群でコントロール群に比べ、オメガ 3 系 PUFA の  $\alpha$ -リノレン酸(18:3n-3)、EPA(20:5n-3)、DHA(22:6n-3)の有意な増大が見られた (表 2.4)。BT-EtOH を投与したマウス肝臓脂質中の  $\alpha$ -リノレン酸の増加は餌中に含まれる  $\alpha$ -リノレン酸の影響を受けたものと考えられる。また、DHA の有意な増加は、 $\alpha$ -リノレン酸からの生体内変換反応に起因していると考えられた。

以上のように、BT-EtOH を肥満/糖尿病病態マウスに投与すると、脂質代謝の改善と糖代謝の改善傾向が見られた。また、肝臓中の DHA 含量の有意な増大も見られ、BT-EtOH はオメガ 3PUFA の優れた供給源であることも分かった。

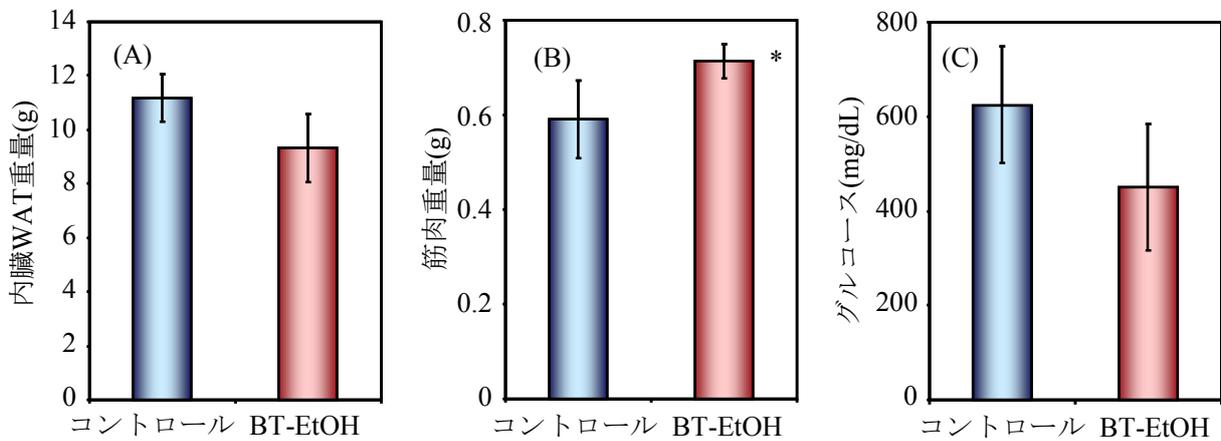


図 2.2 コントロール群と BT-EtOH 投与群の内臓 WAT 重量 (A)、筋肉重量 (B)、血中グルコース含量 (C)

\*コントロールと比較して有意差あり。(P<0.05)

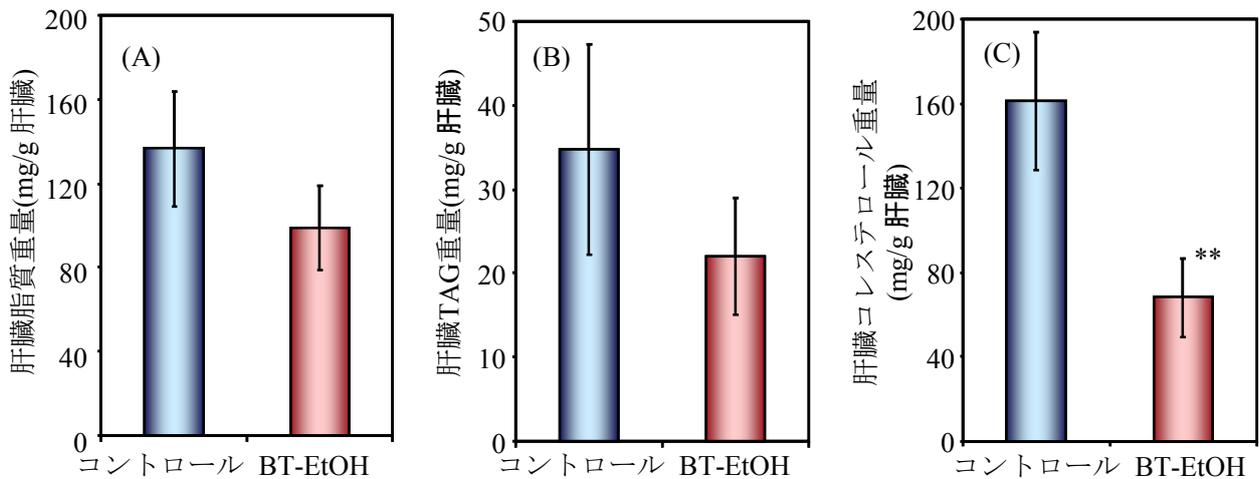


図 2.3 コントロール群と BT-EtOH 投与群の肝臓脂肪 (A)、TAG (B)、コレステロール含量 (C)

\*\*コントロールと比較して有意差あり。(P<0.01)

表 2.4 マウス肝臓脂質の主な脂肪酸組成

脂肪酸 (wt%)	コントロール	BT-EtOH
16:0	18.22±2.20	20.32±0.87
18:0	8.65±1.67	11.68±1.92
18:1n-9	19.06±2.61	14.53±2.62
18:2n-6	32.28±5.64	27.92±2.85
18:3n-3	1.60±0.50	2.49±0.57*
20:4n-6	7.23±1.62	8.49±1.51
20:5n-3	0.38±0.08	0.60±0.06**
22:6n-3	4.48±0.41	6.52±1.13**

\*\*\*コントロールと比較して有意差あり。  
(\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ )

表 2.3 飼料脂質の脂肪酸組成

脂肪酸 (wt%)	コントロール	BT-EtOH
16:0	9.91	11.12
18:0	4.06	3.67
18:1n-9	22.85	22.47
18:2n-6	52.23	48.02
18:3n-3	6.81	11.74

### 3) ネオキサンチンの効果

ネオキサンチンは、ビートトップのような植物葉部に特徴的に含まれているカロテノイドである。ネオキサンチンの栄養機能性についての報告例はこれまでにないが、構造的に褐藻カロテノイド、フコキサンチンと似ていること、フコキサンチンには抗肥満効果と抗糖尿病効果がこれまでに認められていることなどから<sup>10)</sup>、ネオキサンチンにもこうした作用があり、これが、本事業で見出された BT-EtOH の栄養機能性に影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで、ネオキサンチンを分別し、その機能性について検討した。

ネオキサンチン濃縮物を用いて動物実験を行ったところ、ネオキサンチンにはフコキサンチンと同等の抗肥満効果および抗糖尿病作用が見られた。すなわち、肥満・糖尿病病態マウスにネオキサンチンを投与すると、体重増加が抑制され、その抑制度合いは内臓 WAT の有意な低下 (図 2.4(A)) と一致した。また、実験飼料投与後 19 日 (図 2.4(B)) と 29 日後 (図 2.4(C)) の血糖値も、ネオキサンチン投与によりコントロールと比較して有意な低下が見られ、ネオキサンチン投与で糖尿病の病態が改善されることが示された。

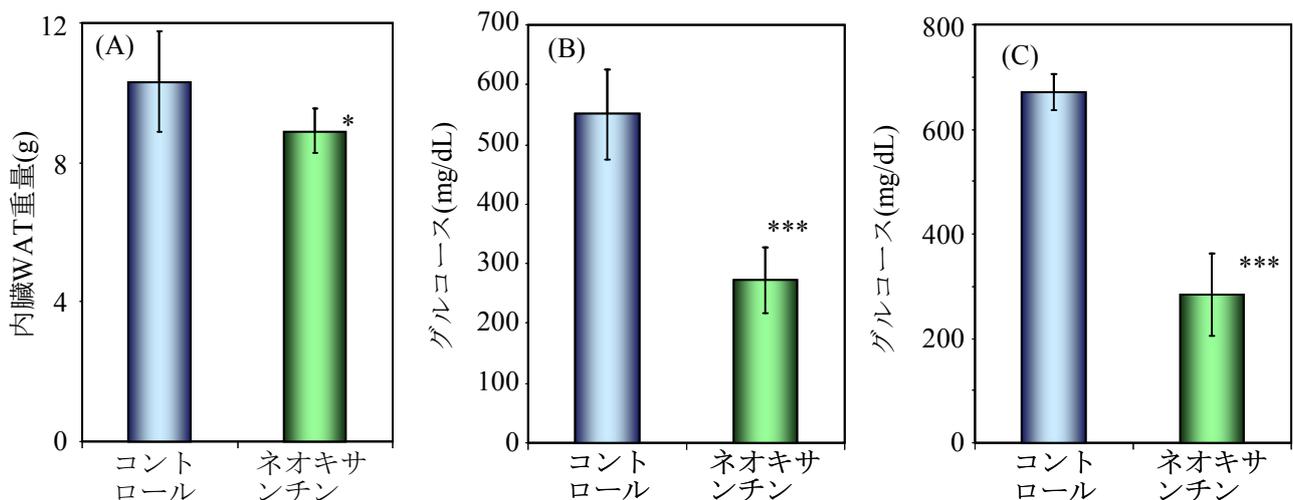


図 2.4 ネオキサンチン投与の内臓 WAT 重量 (A)、19 日飼育後 (B) と 29 日飼育後 (C) の血中グルコース濃度に及ぼす影響

\*, \*\*\*コントロールと比較して有意差あり。(\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$ )

KK-*A*のような肥満マウスでは、内臓 WAT から過剰な遊離脂肪酸が血中に分泌され、様々な悪影響を生体に及ぼす。しかし、ネオキサンチン投与により、血中の遊離脂肪酸と中性脂肪(TAG)の顕著な減少も見られた(図 2.5)。こうした効果は褐藻由来カロテノイドのフコキサンチンではなく、ネオキサンチン独特の作用といえた。

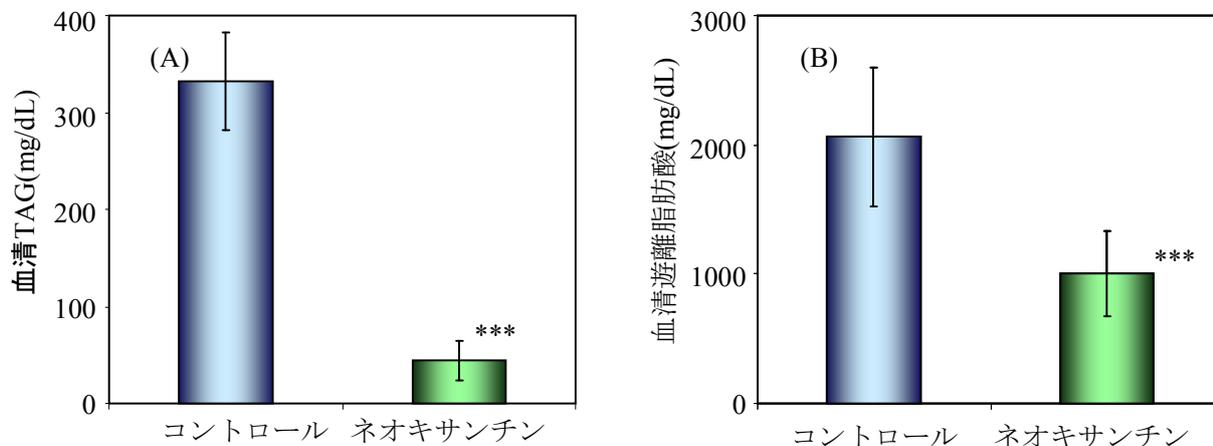


図 2.5 ネオキサンチン投与の血清 TAG 濃度(A)と血清遊離脂肪酸濃度(B)に及ぼす影響  
\*\*\*コントロールと比較して有意差あり。(P<0.001)

ネオキサンチンの抗肥満作用と血糖値改善作用は、コントロール群とネオキサンチン群のエネルギー摂取量を厳密に同等とした制限食においても見られた。図 2.6 に示したように、ネオキサンチンを肥満・糖尿病病態マウスに投与し、エネルギーを一定量とした場合にも、内臓 WAT 重量の減少傾向、血糖値と血中 TAG (中性脂肪) の有意な減少が確認できた。制限食としたため、コントロール群の血糖値(B)は飼育と共に減少したが、ネオキサンチン投与群では7日目から低値を示した。

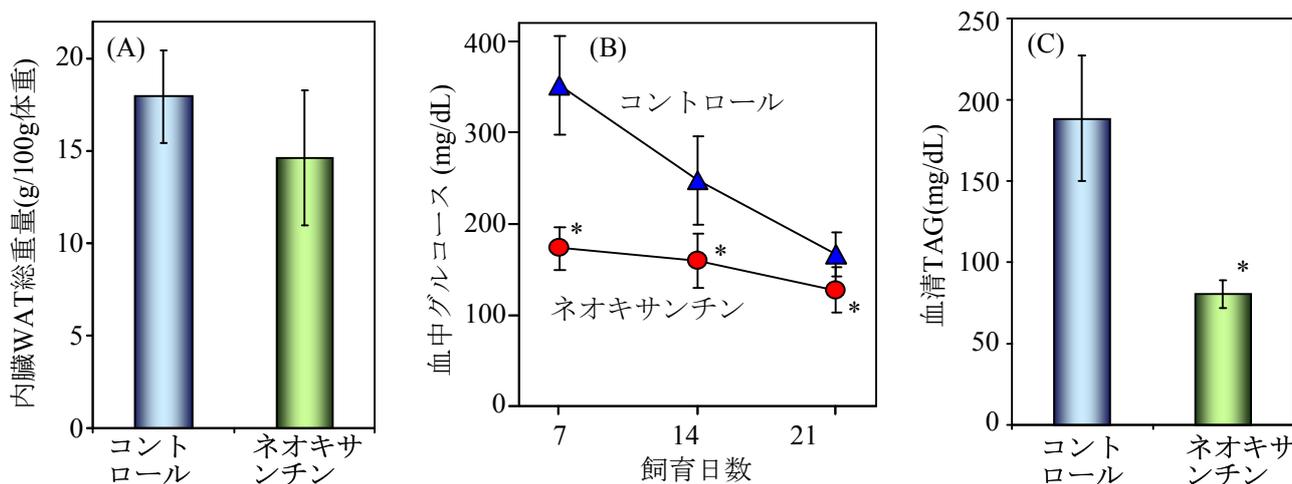


図 2.6 制限食下における肥満・病態マウスに対するネオキサンチン投与の内臓 WAT 重量(A)、血糖値(B)、血清 TAG 含量に及ぼす影響  
\*コントロールと比較して有意差あり。(P<0.05)

さらに、ネオキサンチンの脂質・糖代謝改善作用の分子機構を知るために、主として脂質・糖代謝の主要器官

である肝臓と骨格筋中の関連遺伝子の発現について検討したところ（図 2.7）、肝臓での糖新生の抑制と骨格筋における糖代謝の促進がネオキサンチンにより遺伝子レベルで制御されていることが示された。

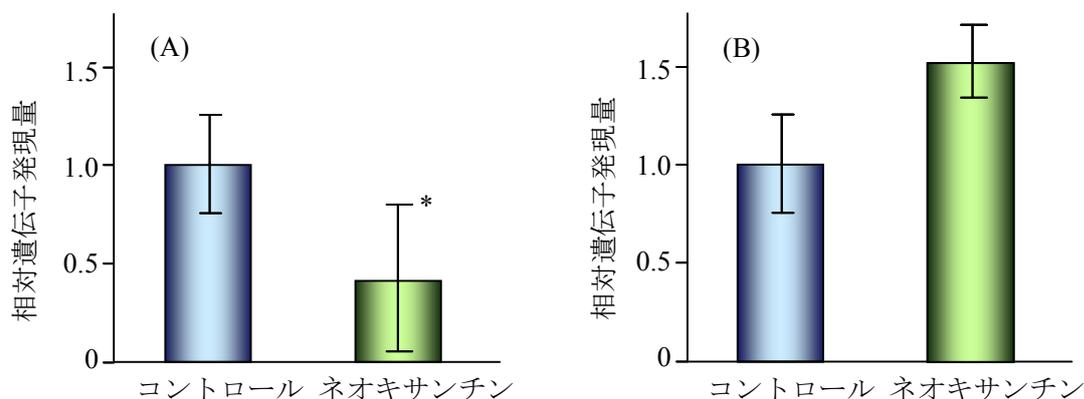


図 2.7 制限食下における肥満・病態マウスに対するネオキサンチン投与の肝臓での Glucose-6-Phosphatase 遺伝子発現(A)と骨格筋でのインスリンレセプター基質の遺伝子発現(B)に及ぼす影響  
\*コントロールと比較して有意差あり。(P<0.05)

#### 4) BT-EtOH に含まれるグリセロ糖脂質の酸化安定性

BT-EtOH 脂質の主な構成成分である GL には酸化されやすい 18:3n-3 ( $\alpha$ -リノレン酸) や 16:3n-3 が多く (表 2.5)、酸化安定性の目安となるビスアリル位数 (この値が高いほど酸化安定性が低くなる) から判断すると、BT-EtOH 中の脂質は極めて酸化されやすいと考えられる。酸化により脂質の栄養機能性は失われるばかりか毒性成分が生成し、風味の劣化も引き起こされるため、脂質の酸化はその利用を図る上で大きな問題点といえる。一方、BT-EtOH を実験室で取り扱った経験からは、特別な酸化防止策を講じなくても、BT-EtOH は常温で極めて酸化されにくいことが推測できた。もし、BT-EtOH が、何らかの理由で高い酸化安定性を示すことを実験的に証明できれば、BT-EtOH を活用する上で大きな利点といえる。そこで、BT-EtOH の主要クラスであり、酸化されやすいオメガ 3PUFA が多く存在するグリセロ糖脂質(GL)の酸化安定性について、他の脂質 (表 2.5) と比較した。表 2.5 示したビスアリル位数から、試験に供した脂質の中では、サケ卵 PC が最

表 2.5 酸化実験に用いた各種脂質の高度不飽和脂肪酸組成

脂肪酸(重量%)	大豆油TAG <sup>a</sup>	イワシ油TAG <sup>a</sup>	サケ卵PC <sup>a</sup>	ビートトップGL <sup>a</sup>	コンブGL <sup>a</sup>
16:3n-3	ND	ND	1.3	12.2	ND
18:2n-6	46.2	1.5	2.0	7.0	7.8
18:3n-3	3.2	0.7	ND	69.0	2.9
18:3n-6	ND	ND	ND	ND	8.1
18:4n-3	ND	2.0	0.1	ND	18.0
20:4n-6	ND	1.6	1.9	ND	7.8
20:5n-3	ND	19.5	10.3	ND	12.8
22:6n-3	ND	12.3	29.4	ND	ND
ビスアリル位数 1分子あたり:	0.55	1.71	2.11	1.83	1.60

<sup>a</sup>TAG, トリアシルグリセロール; PC, ホスファチジルコリン; GL, グリセロ糖脂質

も酸化されやすく、ついで、ビートトップ GL、イワシ油 TAG、コンブ GL、大豆油 TAG の順となると推測された。実際、図 2.8 に示したように、サケ卵 PC とイワシ TAG では、一定温度でインキュベートすること

により、反応容器上部の酸素は脂質との反応により時間とともに直線的に減少し（図 2.8(A)）、また、含まれる総 PUFA 含量も酸化劣化を受けたため明らかに減少した（図 2.8(B)）。これに対して、ビスアシル位数の低い大豆油 TAG では、この酸化条件では比較的安定であり、酸化に伴う酸素や PUFA の減少はほとんど起こらなかった。一方、ビートトップ GL とコンブ GL では、ビスアシル位数が高いにもかかわらず、酸化安定性に優れており、大豆油 TAG と同様に、酸素や PUFA の減少はなかった。これらの結果は、GL が分子構造的に TAG や PC よりも酸化安定性が高い構造をとることを示唆しており、GL を主要構成成分とするビートトップ脂質は、酸化されやすいオメガ 3 系の 18:3n-3 ( $\alpha$ -リノレン酸) や 16:3n-3 を多く含むにもかかわらず、酸化劣化を受けにくいことが初めて明らかになった。

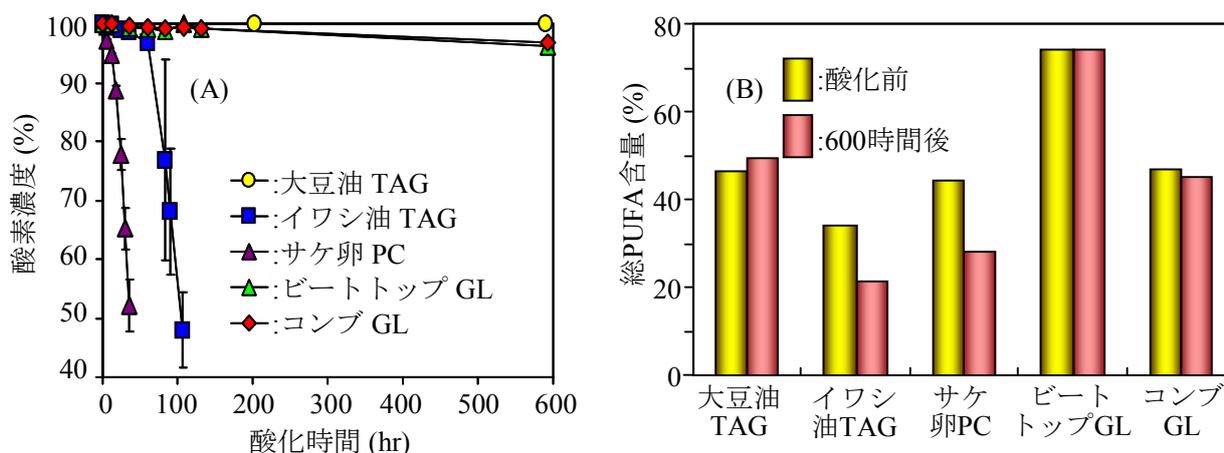


図 2.8 酸素吸収速度 (A) と総 PUFA 含量の測定 (B) による各種脂質の酸化安定性の分析

### 5) ビートトップ脂質素材の開発

以上のように、BT-EtOH には脂質代謝改善作用などの機能性があり、また、オメガ 3PUFA の供給源としても活用できることが分かった。オメガ 3PUFA を含む油脂としては、魚油やアマニ油などが知られている。しかし、これらの油脂は極めて酸化安定性が低く、サプリメントのようにカプセル化して用いることはできても、食用油として利用することは難しい。一方、BT-EtOH の場合には、オメガ 3PUFA が主としてグリセロ糖脂質として存在することで、酸化安定性が格段に高くなり、一般の食用油として利用することも本事業で明らかになった。ただ、BT-EtOH はクロロフィルを含むために暗褐色をしており、食用油としてそのまま利用しにくいいため、クロロフィルの除去を試みた。

まず、活性炭や合成吸着剤(ダイヤイオン HP-20)などを充填したカラムを用いた BT-EtOH からのクロロフィル除去法について検討したところ、クロロフィルは吸着除去できたが、同時にネオキサンチンや糖脂質などの極性の高い機能性脂質も一部除去されてしまうことが明らかになった。そこで、次に、珪藻土を主体とした濾過助剤を用いた精製を検討した。この場合、エタノールを比較的自由に使用できるという本事業の利点に着目し、濾過助剤の濾過性ではなく、その適度な吸着能力を活用した精製法を開発した。すなわち、本事業で開発した方法（図 2.1）では、まず水を 50%以上含む BT-EtOH を濾過助剤で処理する（バッチ式）。こうすることで、脂溶性成分は水を多く含む濾液に移行せず、濾過助剤にそのほとんどが吸着されることが分かった。一方、濾液には水溶性成分が移行し、これらの不純物を除去することができた。同じ操作をさらに 2 回行った後、次に 100%のエタノールで処理することで、ネオキサンチンを始め、糖脂質などの脂質成分を溶液

中に回収できた。しかし、クロロフィルなどはその高い極性のために、濾過助剤に吸着された状態で残渣に残っていた。以上の操作により、クロロフィルなどの不純物は除去され、必要な機能性脂質成分のみを濃縮する方法を開発できた。濾過助剤は食品工業を始め工業的に広く用いられており、ビートトップ脂質素材の工業的な生産に応用できると考えられる。

## 2. 4 結論

本事業では、ビートトップが機能性脂質素材原料として活用できること、そのエタノール抽出物 (BT-EtOH) の特徴としてオメガ 3PUFA が多いこと、ルテインやネオキサンチンなどのカロテノイドが含まれていることを明らかにした。BT-EtOH は、肥満/糖尿病病態マウスに対する脂質・糖代謝改善作用や、肝臓中の DHA 含量の増大効果を示し、これらの作用が、含まれるネオキサンチンなどのカロテノイドやオメガ 3PUFA に起因することも明らかにした。特に、植物の葉に特徴的に含まれるカロテノイド、ネオキサンチンの機能性とその分子機構の一端を解明し、ネオキサンチンが BT-EtOH の栄養機能性を特徴づける重要な機能性成分であることを示した。また、BT-EtOH にはオメガ 3PUFA が主要構成成分として含まれているが、これらの PUFA が主としてグロセロ糖脂質(GL)として存在するために、酸化安定性が格段に高くなることを見出し、BT-EtOH が酸化されやすいオメガ 3PUFA を多く含むにもかかわらず、安定性の高い機能性脂質素材として活用できることを示した。さらに、BT-EtOH に含まれるクロロフィルなどの不純物の除去法を確立し、ビートトップからの工業的な機能性脂質素材の製造法を確立した。

以上より、本事業で得られるエタノールを利用し、ビートトップから機能性素材を効率的に生産できることが分かった。得られる素材は、脂質代謝制御作用を示す他、オメガ 3PUFA の新たな供給源となるため、市場価値は高く、こうした素材の製造工程を本事業でのエタノール製造システムに組み込むことで、本事業で目的とする農業廃棄物からのエタノール製造のコストダウンが期待できた。

## 2. 5 参考論文

- 1) Bligh, E. G., Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Biophysiol.*, 37, 911-917 (1959).
- 2) Terasaki, M., Narayan, B., Kamogawa, H., Nomura, M., Nimish Mol Stephen, N.M., Kawagoe, C., Hosokawa, M., and Miyashita, K. Carotenoid profile of edible Japanese seaweeds: an improved HPLC method for separation of major carotenoids. *J. Auat. Food Prod. Tech.*, 21, 468-479 (2012).
- 3) Prevot, A.F., Mordret, F.X. Utilisation des colonnes capillaires de verre pour l'analyse des corps gras par chromatographie en phase gazeuse. *Rev. Fse. Corps. Gras.*, 23, 409-423 (1976).
- 4) Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Phycol.*, 123, 1939-1951 (1993).
- 5) Hosokawa, M., Miyashita, T., Nishikawa, S., Emi, S., Tsukui, T., Beppu, F., Okada, T., Miyashita, K. Fucoxanthin regulates adipocytokine mRNA expression in white adipose tissue of diabetic/obese KK-Ay mice. *Arch. Biochem. Biophys.*, 504, 17-25 (2010).
- 6) Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509 (1957).

- 7) Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Miyashita, K. Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decrease blood glucose in obese/diabetic KK-A<sup>y</sup> mice. *J. Agric. Biol. Chem.* 55, 7701-7706 (2007).
- 8) 宮下和夫. 脂肪酸およびカロテノイド. 「マリンバイオテクノロジーの新潮流」(伏谷伸宏監修), シーエムシー出版, 東京. pp. 109-128 (2011).
- 9) Ma, L., Lin, X.-M. Effects of lutein and zeaxanthin on aspects of eye health. *J. Sci. Food Agric.* 90, 2-12 (2010).
- 10) Miyashita, K., Nishikawa, S., Beppu, F., Tsukui, T., Abe, M., Hosokawa, M. Allenic carotenoid, fucoxanthin, as a novel marine nutraceutical from brown seaweed. *J. Sci. Food Agric.*, 91, 1166-1174 (2011).
- 11) Okada, T., Nakai, M., Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Miyashita, K. Suppressive effect of neoxanthin on the differentiation of 3T3-L1 adipose cells. *J. Oleo Sci.*, 57, 345-351 (2008).

### 3 原料の前処理

#### 3. 1 研究目的

バイオエタノールの原料はサトウキビやビートなどから生産される糖類、米や麦などのでんぷん類、稲わらやコーンストーバーなどのセルロース類である。バイオエタノールは主にグルコースなどの糖類を酵母やバクテリアなどの発酵作用によって生産されるが、セルロースやでんぷんなどからバイオエタノールを生産する際には、原料を酵母などが代謝しやすい単糖類に予め変換する必要がある。でんぷん類は蒸煮処理後、アミラーゼなどの酵素によって比較的短時間に糖に変換することが容易であるが、セルロースは水素結合による強固な結晶構造を有しており、でんぷん類に比べて糖への変換が容易ではない。

以上のことから、セルロース系バイオマスをバイオエタノール生産の原料として利用する際には、何らかの前処理が必要となる。現在、前処理方法としては濃硫酸法、希硫酸法、アルカリ蒸解・酵素糖化法、湿熱メカノケミカル粉砕・酵素糖化法など<sup>1)</sup>が検討されているが、どの方法も一長一短があり決め手を欠いているのが現状である。

筆者らは、前処理方法として構造、制御が簡便で微粉砕工程が必要のない蒸煮・爆砕方法を中心として、アルカリ処理を組み合わせた方法について、過年度より検討を加え、数種の草本類について高い糖化効率の得られる処理条件を見いだしてきた。

本研究では、上記の成果を踏まえ、以下の項目について検討を加え、さらに前処理の高効率化を図ることを目的とする。

- ①原料特性の解明
- ②前処理条件の最適化
- ③蒸煮・爆砕処理の連続処理装置の開発

#### 3. 2 研究方法

##### (1) 原料特性の解明

##### 1) 試料調製および原料分析

農産廃棄物として地方独立行政法人北海道立総合研究機構農業技術研究本部十勝農業試験場の圃場から採取されたビートトップ（葉部+茎部）（以後ビート茎葉部と称する）、ビートトップ（根部）（以後ビートクラウンと称する）、麦稈、ジャガイモ地上部、大豆殻、小豆殻、長いも茎を対象とした。なお、ビートトップについては9月および10月の2回サンプリングを行った。

ビートトップは当場に到着後、冷凍室で保存した。その他の試料については水分が10%台であったため、そのまま常温で保存した。

ビートトップ以外の水分の少ない試料はφ5mmスクリーンのカッターミルで一次粉砕し、さらにφ2mmスクリーンとして二次粉砕した。粉砕された試料をふるいで20~80メッシュに分級したものを供試試料とした。

ビートトップは解凍、洗浄後、70℃で衡量になるまで乾燥した。ビートトップの一部は葉部+茎部と根部に切り分けて乾燥前後の重量を測定し、水分およびビート茎葉部とビートクラウンの重量比を計算した。乾燥した試料の粉砕、分級については、上記の粉砕方法と同様とした。

これらの原材料について特性を把握するため、固形分はNREL/TP-510-42621<sup>2)</sup>、水・アルコール抽出物質はNREL/TP-510-42619<sup>3)</sup>、炭化水素およびリグニン<sup>4)</sup>はNREL/TP-510-42618<sup>4)</sup>、灰分はNREL/TP-510-42622<sup>5)</sup>、

タンパク質はケルダール法に準拠して分析を行った。

## 2) ビートトップの水、アルコールへ抽出される糖類抽出量試験

ビートトップは有用物質をエタノールで抽出する際に有用物質と共に糖分がエタノール中へ抽出されることが予想されるため、糖類抽出試験を行った。

試験はソックスレー抽出器を用いて行った。その抽出方法を以下に示す。

ビート茎葉部およびビートクラウンをφ28×100の円筒ろ紙に6~8g投入した。蒸留水または100%エタノール150mLを150mL容の平底フラスコに入れた。それらをソックスレー抽出器に取り付け、10~15分に一回サイフォンによる溶媒の循環が起こるようにして、最低12h以上抽出した。

脂溶成分が抽出されたエタノールのうち5~10mLを、予め乾燥し、重量を計測したなすフラスコに入れ、ロータリーエバポレーターでエタノールを蒸発させ、乾固した。なすフラスコをさらに40℃の減圧乾燥機に入れ、乾燥した後、重量を計測し、抽出された脂溶成分重量を計算した。乾固したなすフラスコにヘキサン10mL、蒸留水計20mLを入れ、良く攪拌後、分液ロートに移し、静置した。分液ロート内の水相を分液し、NREL/TP-510-42623<sup>6)</sup>に従って処理を行った後、液体クロマトグラフィーにてグルコースを定量した。

## (2) アルカリ処理+蒸煮・爆砕処理

下記に示すアルカリ処理を行った後、アルカリ処理産物全量を蒸煮・爆砕装置に投入し、蒸煮・爆砕処理を行った。

### 1) アルカリ処理試験

アルカリ種として水酸化ナトリウム (NaOH) を用いた。250mLのポリプロピレン製の容器に対象物12.5g (乾物) と NaOH 13% (対基質、3.2mol/kg) を投入し、処理温度60℃の場合は振とう培養機 (図3.1)、75℃の場合は恒温振とう水槽 (図3.2) を用いて、振とう速度150~200rpmで6~24h振とうした。

糖化効率の向上を図ることを目的として、アルカリ処理時の基質とアルカリの混合改善を図るために内容積1Lのセパラブルフラスコを利用した培養攪拌機 (図3.3) を用いて、アルカリ処理を行った。セパラブルフラスコは二重構造となっており、ジャケット部に温水を通して内部を所定の温度に維持できるようになっている。また、高温 (90℃) におけるアルカリ処理は容量2Lのオートクレーブ (図3.4) を用いた。



図 3.1 振とう培養機

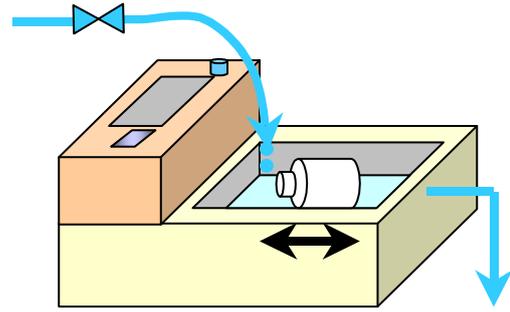


図 3.2 恒温振とう水槽



図 3.3 培養攪拌機



図 3.4 オートクレーブ

## 2) 蒸煮・爆砕試験

蒸煮・爆砕試験装置のフローシートおよび写真を図 3.5、図 3.6 にそれぞれ示す。装置はおもに、熱源用高圧ボイラ、蒸煮・爆砕反応器本体（容量約 4L）、爆砕産物受け容器、制御機器から構成される。受け容器本体は爆砕産物の重量などを定量するため、装置から簡単に取り外せる構造とした。爆砕装置の最高温度および最高圧力は、それぞれ 255°C、4.4MPa であり、加熱時間の短縮のため、蒸気による直接加熱および間接加熱がともにできる構造とした。

試験方法は以下の通りである。

試験に先立ち、蒸気ボイラを所定の圧力で運転し、反応容器ジャケットに蒸気を導入して反応容器の暖機を行った。次に、反応容器内の金網にアルカリ処理後のバイオマスを全量投入し、反応容器の蓋を閉め、蒸気ボイラから 195°C の飽和蒸気を反応容器内に供給し、昇温した。反応容器内の温度が 190°C に達した後、2～20 分間、その状態を保持し、その後、圧力開放弁にて圧力を開放し、受け容器内あるいは反応容器内に残留した処理産物を回収した。

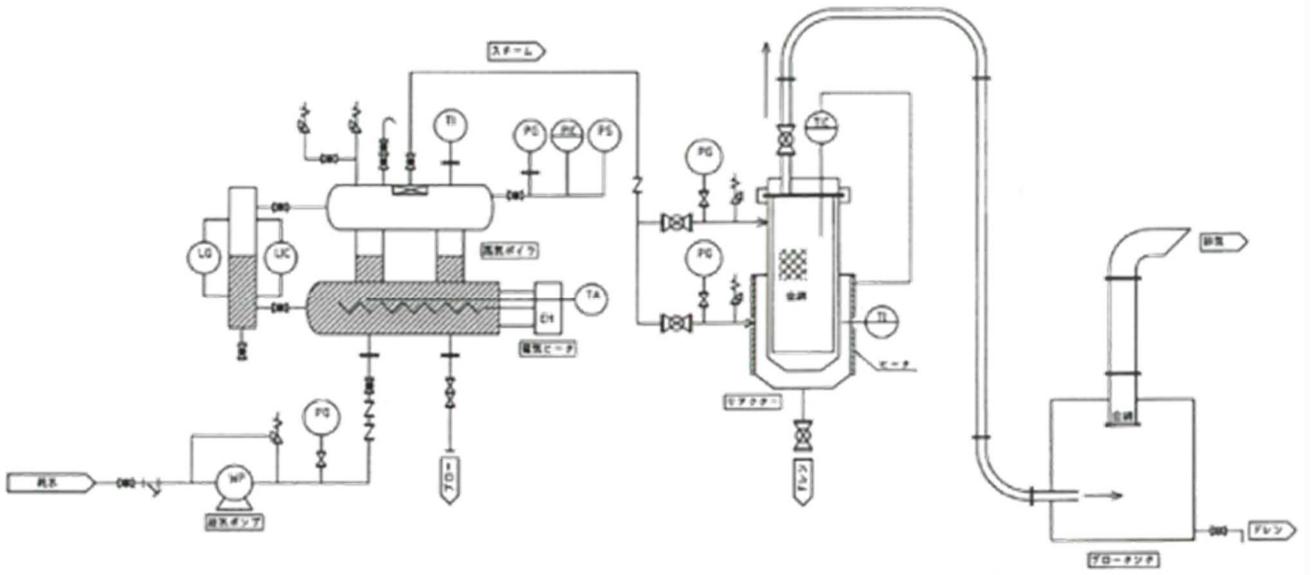


図 3.5 蒸煮・爆砕装置フロー



図 3.6 蒸煮・爆砕装置

アルカリ処理および蒸煮・爆砕処理の試験条件を併せて、表 3.1 に示す。

表 3.1 アルカリ処理、爆砕処理試験条件

試験番号	粒度	アルカリ処理						爆砕処理	
		処理方法	NaOH 濃度	NaOH 温度	NaOH 時間	アルカリ 処理TS	攪拌速度	爆砕温度	爆砕時間
	mm	—	%(対基質)	°C	h	%	rpm	°C	min
麦稈1	0.18~0.85	振とう 培養機 or恒温 振とう 水槽	13	60	6	10	150	190	2
麦稈2	0.18~0.85		13	60	6	22	200	190	2
大豆1	0.18~0.85		13	60	6	10	150	190	2
大豆2	0.18~0.85		13	60	6	22	200	190	2
大豆3	0.18~0.85		13	60	6	22	200	190	20
大豆4	0.18~0.85		13	60	0	22	200	190	20
大豆5	0.18~0.85		13	75	6	10	150	190	2
大豆6	0.18~0.85		13	60	24	22	200	190	2
大豆7	0.18~0.85		13	60	48	22	200	190	2
大豆8	0.18>		13	60	6	10	150	190	2
大豆9	0.18~0.85	攪拌培養機	13	75	6	25	50	190	2
大豆10	0.18~0.85	オートクレーブ	13	90	6	10	50	190	2

### 3) 蒸煮・爆砕産物のマスバランス等の測定方法

蒸煮・爆砕産物の各特性の測定要領を図 3.7 に示す。受け容器内の蒸煮・爆砕産物を、容器を含めて重量測定した後、内容物をプラスチック容器に移した。固形物を通すことができるように先端をカットしたチップを装着したマイクロピペットによって懸濁、攪拌しながらスラリーをサンプリングし、スラリー濃度測定を行った。回収されたスラリーを硫酸で中和した後、遠心分離機で固形分をペレット状にしてから、予め乾燥し質量を計測した 5A のろ紙を用いてブフナーファンネルによって減圧吸引ろ過した。ろ過後、ろ紙上の固形分をなるべく回収し、そのうち 6~10g を水分計測に、残りを酵素糖化試験に用いた。水分計測後の試料を炭化水素、リグニン測定用の試料として供した。ろ紙上に付着した固形分の残りはろ紙ごと乾燥器で乾燥し、重量を計測し、マスバランスを得た。

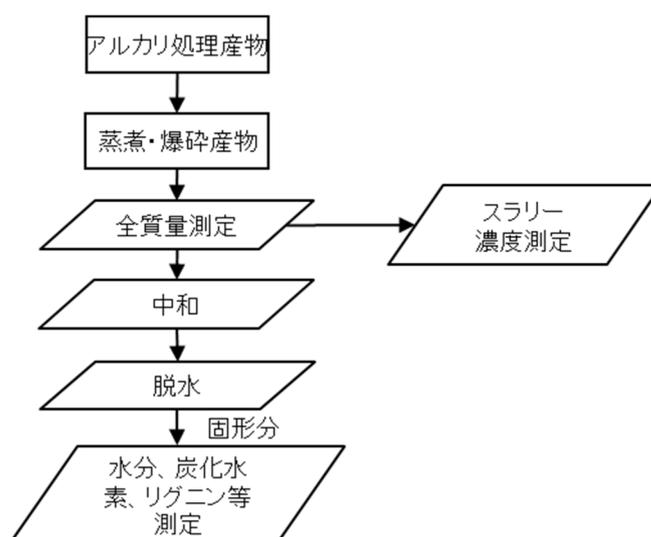


図 3.7 蒸煮・爆砕産物測定フロー

### (3) 前処理産物の糖化試験

アルカリ処理と蒸煮・爆砕処理を施した産物がセルラーゼ等の酵素により糖化され得るかを確認するため、NREL/TP-510-42629<sup>7)</sup>に準拠して酵素糖化試験を行った。セルロース 0.1g 相当を 30ml のスクルー管

瓶に量りとり、クエン酸バッファー5mL、抗生物質（テトラサイクリン:40 $\mu$ L、シクロヘキシミド:30 $\mu$ L）を添加した後、蒸留水を全体で10mLとなるよう入れ、さらに酵素群を投入した。試験に使用したセルラーゼおよび $\beta$ -グルコシダーゼの組み合わせは以下の通りである。

酵素群：セルラーゼ；ノボザイム製 N50013(84FPU/ml),25FPU/g-セルロース

$\beta$ -グルコシダーゼ；ノボザイム製 N50010(300CBU/ml), 42CBU/g-セルロース

酵素糖化試験条件は50 $^{\circ}$ C、72h、150rpmとし、振とう培養機を用いて振とうした。糖化試験後の溶液を液体クロマトグラフィーで糖類を分析した。

#### (4) 蒸煮・爆砕処理の連続処理装置の開発

蒸煮・爆砕処理は所定の圧力、温度で保持した後、圧力解放弁を解放して産物を得るため、一般的にバッチ処理となる。高効率化のためには爆砕処理を連続的に処理することが望まれることから蒸煮・爆砕連続処理装置の開発を行った。

初年度に連続前処理装置を設計、製作した。図 3.8、図 3.9、図 3.10 に連続前処理装置の写真、フロー図、配置図をそれぞれ示す。装置は主に、スラリータンク、スラリーポンプ、反応器 A、B（容量約 4.8L）、受け容器、制御機器で構成される。装置の最高使用圧力は 2MPa、最高使用温度は 212 $^{\circ}$ Cとした。処理の流れは以下の通りである。スラリータンク内のスラリーはポンプにより反応器 A へ移送され、余分なスラリーはスラリータンクに戻る。原料供給弁 V1 が開くと反応器 A 内にスラリーが供給され、蒸気によって直接加温されて所定の温度になるまで滞留する。反応器 A 内のスラリーは所定の温度、時間に達した後、原料移送弁 V2 が開き反応器 B へ送られる。反応器 B では反応器 A 同様、蒸気によって設定された温度、時間に達した後スラリーが圧力解放弁 V3 の解放によって産物受け容器に移送される。反応器 A を予熱、反応器 B を本爆砕処理として運転を行った。

装置の開発にあたっては、連続的な安定運転を目指して、逐次装置の改造を施しながら研究を進めた。

前項で得られた最適と思われる前処理条件を設定（表 3.2）し、連続運転の確認と連続爆砕の処理能力を確認した。



図 3.8 連続前処理装置（改造前）

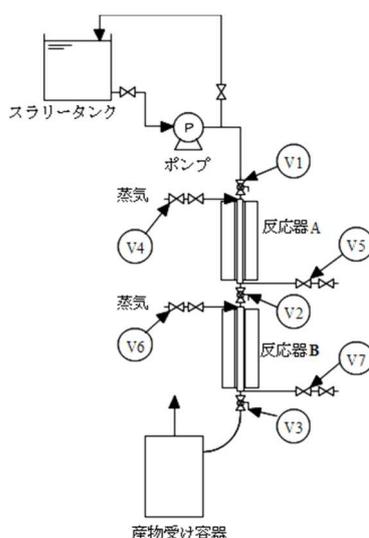


図 3.9 フロー図

表 3.2 試験条件

条件設定項目	設定値
BM種	コーン茎葉、 麦わら
処理回数	3回
BM投入時間	180s
反応器A処理時間	10s
A→B移送時間	3s
反応器B処理時間	120s
排出時間	3s
反応器A設定温度	170 $^{\circ}$ C
反応器B設定温度	190 $^{\circ}$ C



### 3. 3 研究結果および考察

#### (1) 原料特性の解明

##### 1) 各バイオマスの組成

原料の組成分析結果を図 3.11 に示す。ビート葉部およびビートクラウンともに抽出物質が非常に多く、ビート葉部で 55~58%、ビートクラウンで 70%強であり、両者ともグルカンが少なく 10%弱であった。また、リグニンが 10%以下で、ススキなど他の草本類の 20%程度<sup>9)</sup>と比較すると非常に少なかった。ジャガイモ地上部および長いもは、抽出物質が約 30%、グルカンが約 20%、リグニンが 20%程度で、グルカンが他の草本類 30%台と比較して少なかった。麦稈および豆殻類は抽出物質が 15~20%、グルカンが 30%台、リグニンは 20%程度で他の草本類と同程度であった。また、キシランについては麦稈が約 20%で他の草本類と同様であった他は、10%以下で少なかった。

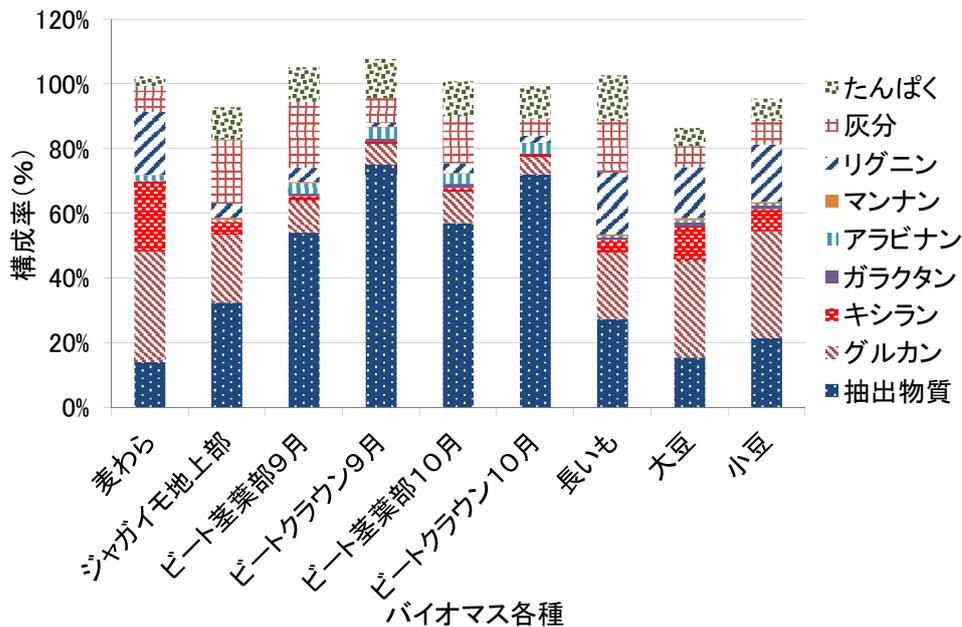


図 3.11 各種バイオマスの組成

表 3.3 に各種バイオマスの全道の賦存量を示す。ビートトップ、麦わらの賦存量が 42 万トンと多く、次に大豆、小豆などの豆殻類が多いことが分かった。麦わらは、敷料などとして再利用されていることが多いが、最新の報告では麦わらの賦存量、利用可能量がそれぞれ 73.2、19.3 万トンとの報告がある<sup>9)</sup>。また、大豆殻、小豆殻なども合計で 11 万トンの賦存量があることが分かった。

表 3.3 各種バイオマス賦存量

農業残渣	作付面積あたりの乾物重量(kg/ha)	作付面積(ha)		賦存量(万t)	
		北海道	十勝管内	北海道	十勝管内
小豆殻+茎葉	1107	23200	12500	3	1.4
大豆殻+茎葉	3141	24400	4160	8	1.3
麦わら(小麦)	3583	116300	45700	42	16.4
スイートコーン茎葉	—	9640	3190	12	3.7
ビートトップ	6800	62600	26800	43	18.2

※スイートコーン茎葉以外は乾物ベース

これらのことから、バイオエタノールの原料としてビートトップ、麦稈、豆殻類が有望であることが分かった。

## 2) ビート茎葉部、ビートクラウンの抽出特性

ビートトップの水・エタノール抽出物質が非常に多かったため、抽出物質中のグルカン量を知る目的で、ソックスレー抽出によって水のみ、エタノールのみでの抽出試験を実施した（表 3.4）。

表 3.4 グルカン抽出量（水のみ、エタノールのみで抽出）

	水抽出		エタノール抽出	
	グルカン量		グルカン量	抽出率
	mg/g-dry		mg/g-dry	%
ビート茎葉部	193		179	34
ビートクラウン	247		664	76

水のみで抽出した場合のグルカン抽出量はビート茎葉部で 193mg/g-dry、ビートクラウンで 247 mg/g-dry、エタノールのみで抽出した場合のグルカン抽出量は前者で 179 mg/g-dry、後者で 664mg/g-dry であった。また、エタノールのみで抽出した場合の抽出率は、ビート茎葉部で 34%、ビートクラウンで 76%であった。エタノール抽出で抽出した場合の全抽出量に対するグルカン量はビート葉部で 5 割強、ビートクラウンでは 9 割弱であった。一方、ビート茎葉部とビートクラウンの重量比は 59:41 であったことを併せて考えると、ビートトップ（茎葉部+クラウン）に含まれる糖類の存在形態はエタノールに可溶性グルカンであり、これをバイオエタノールの原料として利用すべきであることが示唆された。

## (2) アルカリ処理+爆砕処理による糖化試験

筆者らは過年度より、数種類の草本系バイオオマスのアルカリ処理と蒸煮・爆砕処理を組み合わせる方法について検討を行ってきた。その結果、ススキ、ヨシなどの草本類について酵素糖化効率が 90%程度となる良好なアルカリ処理+蒸煮・爆砕処理条件を見いだした<sup>8)</sup>。その前処理条件を、本研究での対象物のうちバイオエタノール生産に有望であると思われる麦稈および大豆殻について適用して前処理を行い、得られた前処理産物を用いて酵素糖化発酵試験を行った。ススキなどに対する良好な前処理条件を表 3.5 に示す。また、酵素糖化試験結果を図 3.12 に示す。

表 3.5 前処理条件

処理名	処理条件
アルカリ処理	NaOH13%(対基質、3.2mol/kg)、60°C、6h
蒸煮・爆砕処理	190°C、2分

酵素糖化効率は麦稈で 98%と良好な結果が得られた。また、高効率化のためには蒸煮・爆砕処理時のバイオオマス水分は極力低いことが求められるので、固形分濃度（Total Solids : TS）を 22%とした場合についても検討を行った結果、酵素糖化効率は 98%と良好な結果が得られた。

一方、大豆殻では試験番号：麦稈 1 と同じ前処理条件における酵素糖化効率は 65%であった。大豆殻の酵素糖化効率の改善を図るため、アルカリ処理温度を 75°Cとしたところ（試験番号：大豆 5）、酵素糖化効率は 77%に上昇した。また、攪拌速度を 150rpm から 200rpm 高めた場合（同：大豆 2）、固形分濃度が高いにもかかわらず高糖化効率は上昇した。しかし、爆砕処理時の保持時間を 2 分から 20 分に延ばしても（同：大豆 3）、アルカリ処理時間を 6h から 24h、48h と延ばしても（同：大豆 6,7）酵素糖化効率に大きな改善は認められなかった。アルカリ処理時の攪拌回転数高と処理温度高で糖化効率の向上が認められたので、より

効率的に攪拌ができる攪拌培養機によるアルカリ処理（同：大豆 9）とより高い処理温度で処理ができるオートクレーブによってアルカリ処理（同：大豆 10）試験を行った。しかし、酵素糖化効率はほとんど変わらなかった。振とう培養器の装置的制約から他の装置を用いた試験となったため、一概に比較できないかも知れない。さらに、原料の粒度を 80 メッシュ（0.18mm）アンダーとしたとき（同：大豆 8）、酵素糖化効率は約 90%と良好な値を得た。しかし、原料を 80 メッシュアンダーまで粉碎するエネルギーは多大であり、エネルギー収支を悪化させる要因となるため現実的ではないと思われた。以上の結果から、大豆殻の最適な前処理条件はアルカリ処理 NaOH 13%、75°C、6h、爆砕処理：190°C、2min と判断した。そのときの酵素糖化効率は 77%であった。

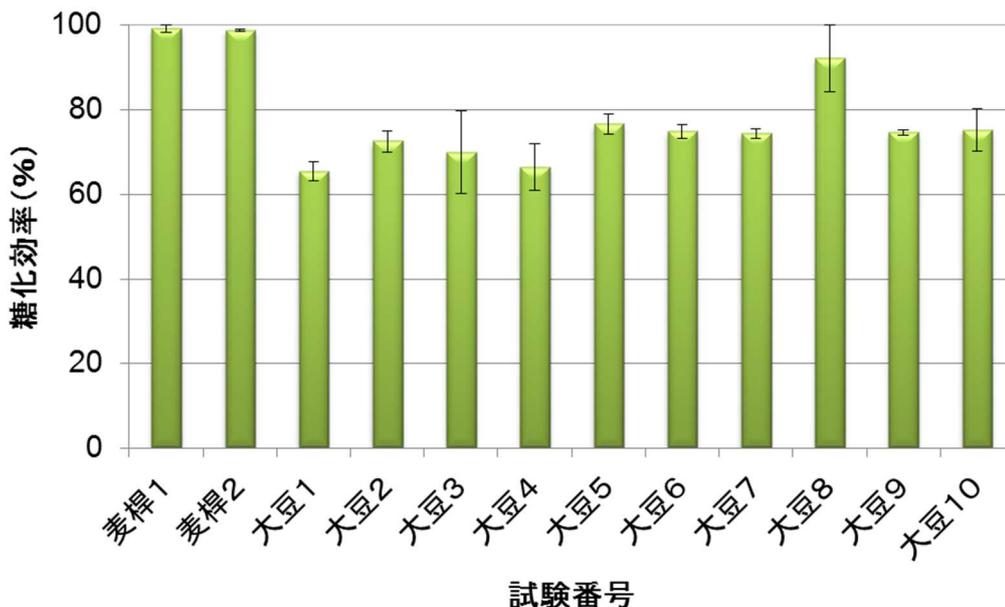


図 3.12 前処理産物の酵素糖化効率

次に、前処理前後における糖の収支について検討を行った。

最適な処理条件を得るための蒸煮・爆砕処理では、投入する原料バイオマス量は 12.5g と少ないため、爆砕後の配管付着物による損失が大きくなった。そこで、産物の損失がなるべく少なくなるよう原料量を 6.4 倍（バイオマス投入量=80g）、10 倍（同 125g）に増加させて一連の試験を行った。その結果、投入グルカン量のほぼ全量を回収できることを確認した（表 3.6）。また、キシラン、リグニンの残存率は平均で 86%、71%であった。そのうち、可溶化したグルカン、キシランはそれぞれ、0.6%、7.7%（バイオマス投入量=125g）でほとんど固形分として残存していることが分かった。

表 3.6 前処理産物（麦稈）の残存率

	残存率 (%)	
	投入量 =80g	投入量 =125g
グルカン	99	101
キシラン	85	87
リグニン	72	70

### (3) 連続爆砕装置の開発

#### 1) 装置の改良

初年度に試作した連続爆砕処置の試運転を行った結果、下記のような改良すべき点が明らかとなり、平成 24 年度に改造を行った。

- ①高効率化のため、基質と熱媒（蒸気）の接触改善

- ②受け容器出口配管の拡大
- ③背圧弁 V 5 の後段に流量調節用バルブの追加
- ④蒸気止め弁 V 4, V 6 の取り替え、および流量調節バルブの追加工事
- ⑤原料移送ポンプの発停タイミングの改善

これらの改造の結果、アルカリ処理を施した固形分濃度 10%のコーン茎葉を基質として連続運転を行った結果、問題なく運転が可能であることを確認した。しかし、固形分濃度 10%程度のスラリーは水分が多くエネルギー的に不利であること、処理する固形分量が少ないことが懸念されたため、高固形分濃度に対応した装置とすること中心とした下記のような改造を平成 25 年度に行った。

- ⑥高固形分濃度の原料を投入するため、ホッパ、架台、階段などの設置。
- ⑦反応器 A への原料投入の際、原料が原料投入弁 V1 から吹き出さないよう V1、原料移動弁 V2 に先行して背圧弁 V5、V7 を開ける（タイマーにより調整可能とする）。
- ⑧原料移動弁 V2 は、反応器 B の原料が排出された後に開ける(V2、圧力解放弁 V3 を同時に開けない)。
- ⑨反応器 A,B に原料があるとき、反応器 A,B ともに加熱する。
- ⑩原料投入弁 V1 が漏れるため、バルブを逆に取り付け直し、加圧面を逆にする。

改造後の写真を図 3.13 に示す。

これらの改造の結果、固形分濃度 30%弱の基質の運転が可能となった。ただし、原料は上部に設けられたホッパから手動で投入した。連続運転時の反応器 A、B の温度履歴を図 3.14 に、処理能力を表 3.7 に示す。各反応器に蒸気を供給し、各反応器の温度が所定の温度（190℃）に達し、所定時間（2min）経過後、解放バルブを開けているため、急激に温度が下がっているが、再度蒸気を供給すると速やかに温度が回復した。1 回当たりの処理時間は平均で 4 分半程度であった。装置の単位容積当たりの処理能力は平成 24 年度の 0.43 kg-dry/h/L から 0.57 kg-dry/h/L へ 33%改善された。蒸気消費量は 9.3kg/h で、乾物原料 1kg 当たりでは 3.4kg/kg-dry であり、195℃飽和蒸気として熱量に換算すると消費熱量は 9.5MJ/kg-dry であった。装置が小さく、駆動バルブ近傍の保温ができなかったことと容積当たりの表面積が大きいため放熱量が大きくなったと考えられた。装置の大型化が図られ放熱損失を 10%程度に抑えられれば、必要熱量は 3.5MJ/kg-dry 程度に低減できると思われる。



図 3.13 連続爆砕装置（改造後）

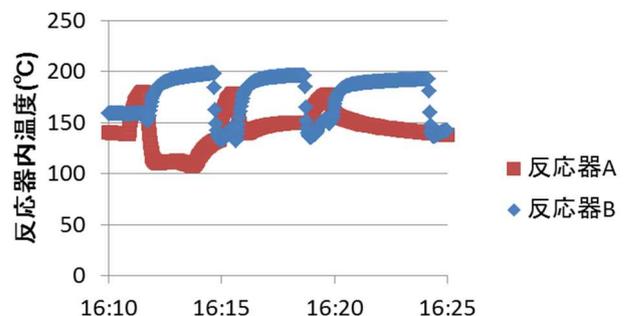


図 3.14 各部温度経過

表 3.7 連続爆砕処理能力

項 目		H24年度	H25年度
BM投入量/回	kg-dry/回	0.15	0.21
総処理時間	min	13	13.85
処理量	kg-dry/h/L	0.43	0.57

### 3. 4 結論

原料分析の結果、ビートトップは抽出物質が多く、セルロースが少ないが、抽出物質には糖類が多く含まれ、それをエタノール原料として利用することが重要であることが分かった。また、他のセルロース系バイオマスでは、麦稈と豆殻類がエタノール原料として有望であることが示唆された。

原料に合わせた前処理条件では、アルカリ処置と蒸煮・爆砕処理を組み合わせた前処理について検討した結果、グルコース収率は麦稈が90%以上、大豆殻は77%となる前処理条件を見いだすことができた。また、アルカリ処理と爆砕処理を組み合わせた方法は糖類の残存率が高く、グルカンではほぼ全量固形分として残ることが明らかとなった。

蒸煮・爆砕処理の連続装置の開発では、装置の改造を行った結果、処理能力は最終的に約30%上昇して0.57 kg-dry/h/Lとなり、かつスムーズな連続運転が可能であることが確認されたことにより連続爆砕装置の基本的なシステムが確立された。

### 3. 5 参考文献

- 1)近藤昭彦・上田充美監修、セルロース系バイオエタノール製造技術、NTS 7-11(2010)
- 2) A.Sluiser, B. Hames, D. Hyman, C. Payne, R.Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiser, D. Templeton and J. Wolf Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples NREL/TP-510-42621(2008)
- 3) A.Sluiser, R.Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiser, and D. Templeton Determination of Extractives in Biomass NREL/TP-510-42619(2008)
- 4) A. Sluiser, B. Hames, R.Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiser, D. Templeton and D. Crocker Determination of Carbohydrates and Lignin in Biomass NREL/TP-510-42618(2008)
- 5) A.Sluiser, B. Hames, R.Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiser, and D. Templeton Determination of Ash in Biomass NREL/TP-510-42622(2008)
- 6) A.Sluiser, B. Hames, R.Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiser, and D. Templeton Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples NREL/TP-510-42623(2008)
- 7) M. Seig, N. Weiss, and Y. Ji Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass NREL/TP-510-42629(2008)
- 8)北口敏弘、鎌田樹志他、戦略研究報告書「地球温暖化と生産構造の変化に対応できる北海道農林業の構築」 58-61(2014)
- 9)中辻敏朗他、戦略研究報告書「地球温暖化と生産構造の変化に対応できる北海道農林業の構築」 45-47(2014)

#### 4. 同時糖化発酵

##### 4. 1 進化工学的手法による温度ストレス耐性機能性酵母の最適化

###### 4. 1. 1 研究目的

化石資源の枯渇や地球温暖化等の環境問題に伴い、農産廃棄物などのセルロース系バイオマスから微生物の発酵によって作られるバイオエタノールが注目されている。しかしながら、セルロース系バイオマスは非常に強固かつ複雑な構造を有しており、バイオエタノールへと変換するためには、前処理工程、酵素生産工程、糖化工程、発酵工程など、多段階のプロセスが必要となり、高コスト型のプロセスとなっている。特に、糖化に必要な酵素量が莫大となる点がボトルネックとなっている。そこで、プロセスを効率化するとともに酵素添加量を低減するために、発酵菌である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* にセルラーゼを発現させ、糖化と発酵を同時に行う技術の開発が進められている。一方で、同時糖化発酵を極力短時間で終わらせ、高収率でエタノールを生産するためには、セルラーゼ発現酵母による糖化速度を向上させることが必要不可欠である。

セルロース分解能を有する糸状菌は作用機作の異なる複数のセルラーゼ遺伝子を発現し、その発現比率を変化させることにより構造の異なる多様なセルロース基質の分解を可能にしている。結晶化領域の残る実バイオマスを用いる場合、少なくとも3種類のセルラーゼとして、 $\beta$ -グルコシダーゼ (BGL)、エンドグルカナーゼ (EG)、セロビオヒドロラーゼ (CBH) の遺伝子を発現させる必要

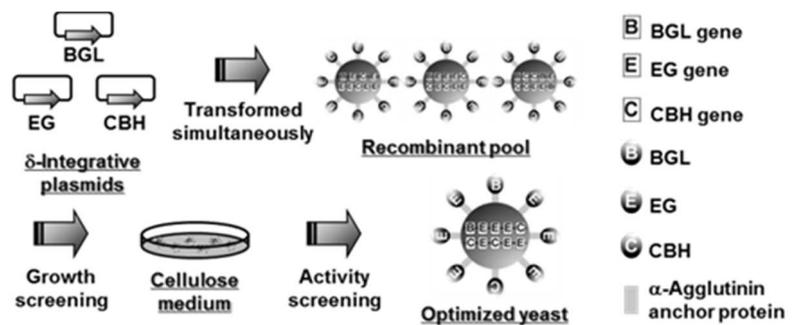


図 4.1 カクテル  $\delta$ -integration 法の概要

がある。しかしながら、セルラーゼ遺伝子を酵母で異種発現させる場合、複数遺伝子の発現は可能であっても発現比率を人為的に調節することは困難である。そこで本研究では、ランダムなコピー数で各セルラーゼ遺伝子を導入した遺伝子組換え酵母の中から、セルロース基質の分解に最適な割合でセルラーゼ遺伝子を発現する酵母をスクリーニングする技術、カクテル  $\delta$ -integration 法 (図 4.1) を用いて、セルロース分解能を高度化した酵母を創製することとした。一方で、糸状菌由来のセルラーゼはその至適温度が  $40\sim 50^{\circ}\text{C}$  程度であり、酵母の至適発酵温度である  $30^{\circ}\text{C}$  付近では酵素の比活性が大幅に低下してしまう。従って、酵母に温度ストレス耐性を付与することが出来れば、糖化速度を向上させることが出来ると考えられる。そこで、本研究では進化工学的な変異育種により酵母の高温耐性を高め、高効率な同時糖化発酵プロセスの開発を目指した。

###### 4. 1. 2 研究方法

###### (1) 進化工学的手法による温度ストレス耐性酵母の創製

実験室酵母株 YPH499 に対し、UV を照射して変異を誘導し、YPD 培地上、 $35^{\circ}\text{C}$  で良好な生育を示した変異株をスクリーニングし、再度 UV を照射した。図 4.2 に示すようにスクリーニング温度を  $2^{\circ}\text{C}$  ずつ上昇させて高温耐性酵母 YPH499/UV39 を作出した。

実験室酵母株 BY4741 についても、UV を照射して変異を誘導し、YPD 培地上、41°C で良好な生育を示した変異株のシングルコロニーを単離して BY4741/UV41 を得た。

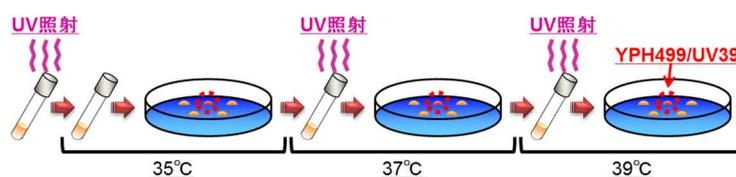


図 4.2 温度ストレス耐性酵母 YPH499/UV39 の作出

YPD 培地 (10 g/L yeast extract, 20 g/L bacto-peptone, 20 g/L glucose) 中、30°C、200 rpm にて 24 時間振とう培養した菌体を、新しい YPD 培地 (5~7 mL) に初期 OD600 が 0.05 になるように植菌し、好気条件化での培養を行った。

同様の条件で前培養した菌株を、100 g/L グルコースを含む YP 培地 (10 g/L yeast extract, 20 g/L bacto-peptone) に初期 OD600 が 0.5 になるように植菌し、微好気条件化でのエタノール生産試験を行った。

### (2) 温度ストレス耐性酵母へのセルロース分解能力の付与

カクテル $\delta$ -integration法を用いて、*T. reesei* 由来エンドグルカナーゼ EGII およびセロビオヒドロラーゼ CBHII、*A. aculeatus* 由来  $\beta$ -グルコシダーゼ BGL1 を、YPH499/UV39 に導入し、YPH499/UV39/coc $\delta$ BEC を作出した。

YPD 培地中、30°C、200 rpm にて 24 時間振とう培養した菌体を、10 g/L リン酸膨潤セルロース (PASC) と 5 FPU/g-biomass Celic CtecII を含む YP 培地に初期菌体濃度が 50 g-wet weight/L になるように植菌し、微好気条件化でのエタノール生産試験を行った。ワーキングボリュームは 20 mL とし、39°C での実験を行った。

同様の条件で前培養した菌体を 200 g-wet weight/L の麦わら爆砕処理試料と 1~10 FPU/g-biomass Celic CtecII を含む YP 培地に初期菌体濃度が 200 g-wet weight/L になるように植菌し、微好気条件化でのエタノール生産試験を行った。ワーキングボリュームは 20 mL とし、30, 37, 39°C での実験を行った。

### (3) 温度ストレス耐性二倍体酵母へのセルロース分解能力の付与

カクテル $\delta$ -integration法を用いて、*T. reesei* 由来エンドグルカナーゼ EGII およびセロビオヒドロラーゼ CBHII、*A. aculeatus* 由来  $\beta$ -グルコシダーゼ BGL1 を、YPH500 に導入し、YPH500/coc $\delta$ BEC を作出した。YPH500/coc $\delta$ BEC と YPH499/UV39/coc $\delta$ BEC を接合法により掛け合わせ、二倍体酵母 YPH499-500/UV39/coc $\delta$ BEC を作出した。

一方、これまでに作出したセルラーゼ提示二倍体酵母 MNII/coc $\delta$ BEC に対し、進化工学的手法により温度ストレス耐性を付与し、温度ストレス耐性二倍体セルロース資化性酵母 MNII/coc $\delta$ BEC/UV39 を作出した。

創製した酵母株を用い、麦わら爆砕処理試料から同時糖化発酵試験を実施した。

### 4. 1. 3 研究結果および考察

#### (1) 進化工学的手法による温度ストレス耐性酵母の創製

YPH499 と YPH499/UV39 の好気条件下における培養試験の結果を示す (図 4.3)。30℃では YPH499 の方が高い細胞増殖能を示したが、39℃では YPH499/UV39 の方が優れた細胞増殖能を示した。微好気条件下でのグルコース発酵能を比較した結果を図 4.4 に示す。39℃において、YPH499/UV39 は親株と比べてわずかに高いグルコース資化能とエタノール生産能を有することが明らかとなった。

これまでの研究から、同じ実験室酵母であるが、BY4741 株は YPH499 株よりも高い高温耐性能を有することが分かってきた。そこで、BY4741 に変異育種を導入し、41℃で生育可能な BY4741/UV41 を作出した。図 4.5 に好気条件下での増殖能を示す。#1 から #3 のシングルコロニーを単離して親株との比較を行ったところ、いずれの株においても 41℃で増殖能の向上が見られた。YPH499/UV39 株が生育可能な 39℃での好気培養を行ったところ (図 4.6)、BY4741/UV41 株は優れた高温耐性能を有していることが明らかとなった。一方で、高温耐性能の付与は 30℃での増殖能を低下させる傾向があることが明らかとなった。

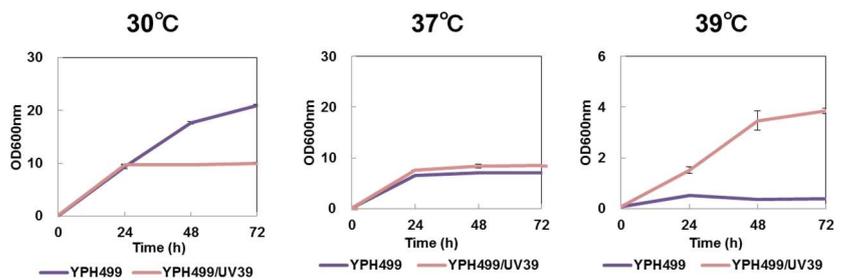


図 4.3 好気条件下の細胞増殖能の比較

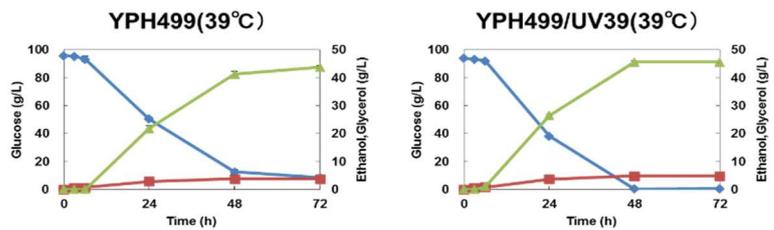


図 4.4 微好気条件下におけるエタノール生産能の比較

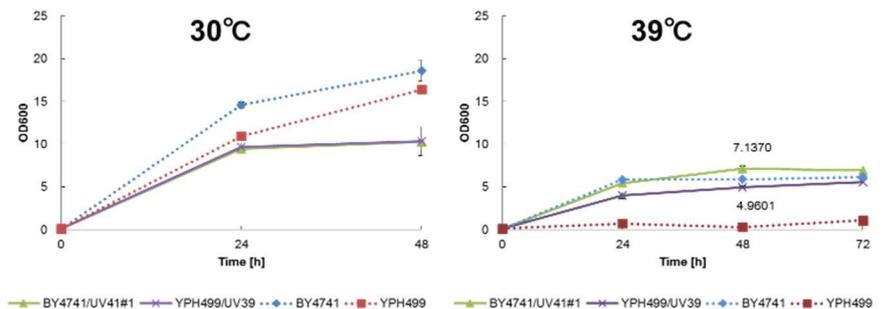


図 4.5 好気条件下における BY4741 系統株の細胞増殖能の比較

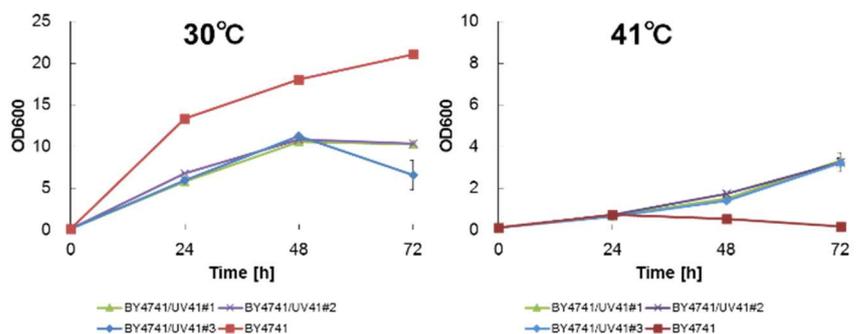


図 4.6 YPH499 系統株と BY4741 系統株の好気条件下の細胞増殖能の比較

(2) 温度ストレス耐性酵母へのセルロース分解能力の付与

野生酵母 YPH499 および変異育種酵母 YPH499/UV39 に対し、カクテル $\delta$ -integration 法によりセルラーゼ (*A. aculeatus* BGL, *T. reesei* CBHII, *T. reesei* EG) 遺伝子群を導入した遺伝子組換え酵母 YPH499/coc $\delta$ BEC および YPH499/UV39/coc $\delta$ BEC を用いて、高温条件 (42°C)におけるリン酸膨潤セルロース(PASC)からの発酵試験を実施した (図 4.7)。発酵の際にはセルラーゼ剤は添加しなかった。

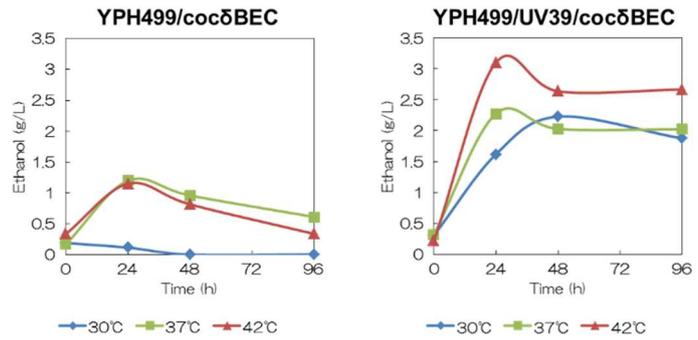


図 4.7 PASC 発酵におけるエタノール生産

YPH499/coc $\delta$ BEC 株では 30°Cでは微量のエタノールしか生産せず、37°Cおよび 42°Cでは最大で約 1.3g/L のエタノールを生産した。これに対し、高温耐性を有する YPH499/UV39/coc $\delta$ BEC 株では、温度を上昇させる毎にエタノール生産性が向上し、42°Cでは約 3.1g/L のエタノールを生産した。これは YPH499/coc $\delta$ BEC 株と比較して、約 2.4 倍のエタノール生産量となった。各温度におけるエタノール収率およびエタノール生産速度を表 4.1 に示す。この結果から、PASC からの同時糖化発酵において、高温耐性能の効果が示された。

表 4.1 PASC 発酵におけるエタノール収率とエタノール生産速度

酵母	発酵温度 (°C)	仕込み糖に対するエタノール収率 (%)	エタノール生産速度 (g/L/h)
YPH499/coc $\delta$ BEC	30	-	-
	37	11.9	0.043
	42	9.4	0.034
YPH499/UV39/coc $\delta$ BEC	30	22.2	0.055
	37	22.6	0.082
	42	33.3	0.120

次に、前述の 2 種類の酵母株を用いて、麦わら爆砕処理試料からの同時糖化発酵試験を行った。本試験では、セルラーゼ剤として、CelicCTec2 を用いた。酵素剤添加量を変化させた同時糖化発酵試験における、24 時間後のエタノール生産量を図 4.8 に示す。いずれの条件においても温度ストレス耐性酵母 YPH499/UV39/coc $\delta$ BEC を用いた方が通常のセルラーゼ提示酵母 YPH499/coc $\delta$ BEC よりも高いエタノール生産性を示すことが確認された。また、YPH499/UV39/coc $\delta$ BEC において、発酵温度を 37°Cまで上昇させるとエタノール生産性は向上するが、39°Cまで上昇させると低下することが確認された。この結果から、実バイオマスである麦わら爆砕処理物 [38.8%グルカン、18.4%キシラン、1.7%アラビナン、16.6%リグニン (以上無水ベース)、含水率は 75.2%]からの同時糖化発酵においても、高温耐性能の付与が有用であることが示された。39°Cにおける YPH499/UV39/coc $\delta$ BEC の発酵結果を図 4.9 に示す。

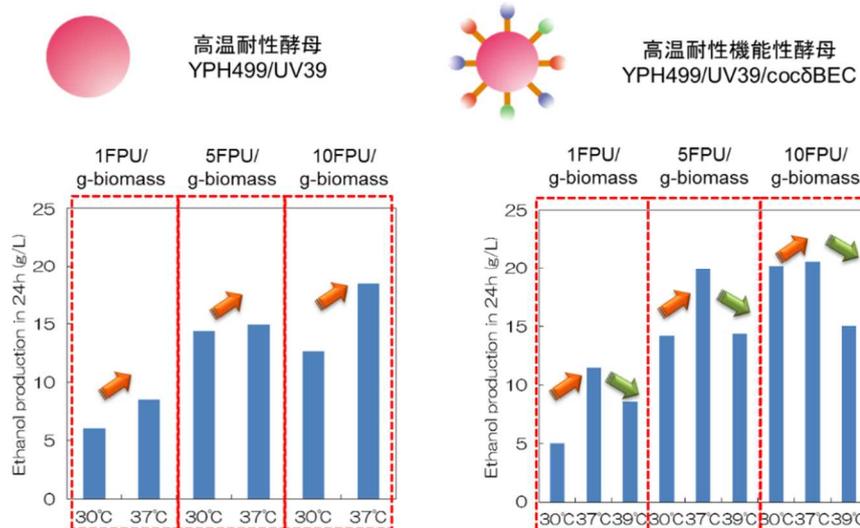


図 4.8 温度ストレス耐性酵母による麦わらからの同時糖化発酵

(3) 進化工学的手法による機能性二倍体酵母への温度ストレス耐性付与

セルラーゼ資化性二倍体酵母に高温耐性能を付与した MNII/cocδBEC/UV39 を作出した (図 4.10)。次に、b) で用いた麦わら爆砕試料からの同時糖化発酵試験を実施した (図 4.11)。30°C における発酵ではセルラーゼ添加量 1FPU/g-biomass において、開始 24 時間で約 8g/L 程度のエタノールを生産したのに対し、37°C における発酵では約 16g/L と約 2 倍のエタノール生産性を示した。この結果から、温度耐性を付与することにより低いセルラーゼ添加量でも高いエタノール生産性を達成することに成功した。

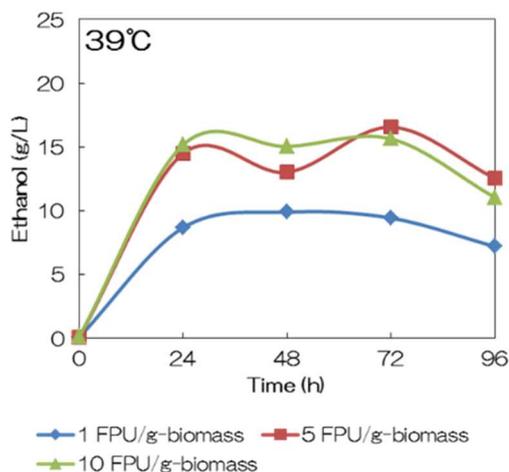


図 4.9 温度ストレス耐性型セルロース資化性酵母による、39°C における麦わらからのエタノール生産

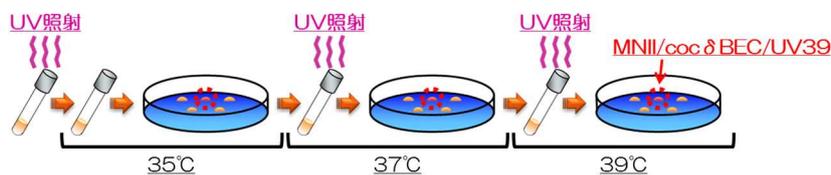
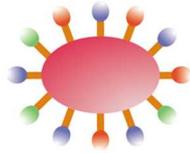


図 4.10 温度ストレス耐性酵母 MNII/cocδBEC/UV39 の作出



二倍体高温耐性機能性酵母  
MNII/coc $\delta$ BEC/UV39

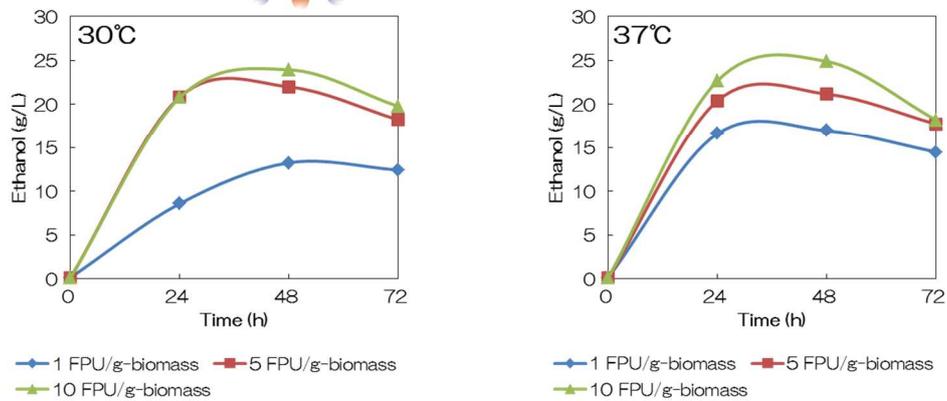


図 4.11 温度ストレス耐性酵母 MNII/coc $\delta$ BEC/UV39 による麦わらからの同時糖化発酵

(1) で作出した YPH499/UV39/coc $\delta$ BEC と YPH500/coc $\delta$ BEC を掛け合わせて作出した二倍体酵母、YPH499-500/UV39/coc $\delta$ BEC についても PASC からの発酵試験を行ったが、親株である YPH499/UV39/coc $\delta$ BEC のエタノール生産能を上回ることにはできなかった。

#### 4. 1. 4 結論

YPH499/UV39 にセルラーゼを提示させた高温耐性型セルロース資化性酵母 YPH499/UV39/coc $\delta$ BEC を作出した。YPH499/UV39/coc $\delta$ BEC は高温における PASC および爆砕処理麦わらからの同時糖化発酵において高いエタノール生産性を示した。さらにセルラーゼ提示二倍体酵母 MNII/coc $\delta$ BEC に対して温度ストレス耐性を付与し、機能性温度ストレス耐性二倍体酵母 MNII/coc $\delta$ BEC/UV39 を作出した。MNII/coc $\delta$ BEC/UV39 は YPH499/UV39/coc $\delta$ BEC よりもさらに高いエタノール生産性を示した (図 4.12)。この結果から、実バイオマスである麦ワラ爆砕処理物からの同時糖化発酵において、セルラーゼを細胞表層に提示した二倍体酵母がエタノール生産を効率化することを明らかにした。



## 4. 2 酵素生産、同時糖化発酵の装置的課題の抽出、対策方法

### 4. 2. 1 研究目的

農産廃棄物等ソフトセルロース系原料からのバイオエタノール製造では、前処理により脱リグニンした二次原料中の多糖類（セルロースやヘミセルロース）を酵素および酵母により糖化・発酵し、生成したエタノールを蒸留により90%以上にする。ここで糖化・発酵工程におけるエタノール終濃度を数%以上にする必要があり、濃度が高いほど蒸留工程における設備コストや投入エネルギー量が低減する。高いエタノール終濃度を得るためには、二次原料の投入濃度を高くする必要があり、例えば二次原料固形物中のセルロース含量を40%とすると、糖化・発酵工程におけるエタノール終濃度2%を得るためには、二次原料を固形分10%以上で投入する必要がある。しかし、農産廃棄物からの二次原料は吸水し易く、固形分10%以上では塊状となるため混合不足による糖化・発酵速度の低下が懸念される。

そこで、糖化・発酵工程におけるエタノール終濃度の増加を目的として、同時糖化発酵における二次原料の固形分増加による影響を調査し、高固形分で高い糖化発酵効率が得られる方法を検討した。

### 4. 2. 2 研究方法

#### (1) 固形分増加による同時糖化発酵への影響

同時糖化発酵における固形分濃度の糖化・発酵に対する影響を調査するため、図4.13に示す小型糖化発酵試験を用いて、固形分5-10%に対する同時糖化発酵試験を行い、エタノール等の生成物濃度を測定して糖化発酵状況を判断した。

同時糖化発酵試験はNRELのSSF Experimental Protocolsに準拠して行った。原料は、トウモロコシ茎葉の粉碎物(20-80mesh)をアルカリ処理(1.4%NaOH, 60°C, 6hr. 浸漬)および爆砕処理(190°C, 2min)により前処理し、これを硫酸により中和し、固形分約30%まで圧搾脱水して準備した。100mL小型糖化発酵容器に原料を5, 7.5, 10%-dry相当、YP培地、クエン酸緩衝液を一定量入れ蒸留水で全量100mLに調整後、高圧蒸気滅菌した。セルラーゼ(Novozymes, NS50013)製剤を5FPU/g-Celluloseで添加後、ただちにOD600=1相当で機能性酵母(神戸大学)を接種した。温水浴中においてマグネティックスターラーで攪拌しながら、30°C、168h糖化発酵試験を行い、所定時間ごとに発酵容器を振盪により均一化した後、試料の一部を採取して高速液体クロマトグラフ(日立ハイテクノロジー製LaChrom Eliteおよび東ソー製LC-8020)により糖類、有機酸、エタノール濃度を測定した。



図 4.13 小型糖化発酵試験装置

#### (2) 高固形分での同時糖化発酵における装置的課題の抽出とその対策方法

高固形分での同時糖化発酵における酵素・酵母液との混合方法について、以下の3方式による効果を糖化発酵状況から判断し、同時糖化発酵装置に関する基礎検討を行った。

##### ① 酵素製剤量の増加

高固形分での同時糖化発酵が液化(酵素糖化)により進行することを確認するとともに、発酵阻害物質の生成について検討する

## ②培地・緩衝液・酵素・酵母混合液への原料の浸漬

原料の投入時に混合液を吸水させることで塊状となる前に酵素・酵母と接触させることをねらいとする

## ③振盪攪拌

塊状となる二次原料全体を揺動し、酵素・酵母との接触を促進し、糖化発酵速度を向上させることをねらいとする

同時糖化発酵試験は前項と同様に、トウモロコシ茎葉を粉碎、アルカリ処理および爆砕処理後に中和、脱水した原料を用いて、NREL のSSF Experimental Protocols に準拠して行なった。

## 試験方法

①酵素製剤量の増加：100mL 小型糖化発酵容器に二次原料を 10%-dry 相当、YP 培地、クエン酸緩衝液を一定量入れ蒸留水で 100mL に調整後、高圧蒸気滅菌した。セルラーゼ (Novozymes, NS50013) 製剤を 10FPU/g-Cellulose で添加後、ただちに OD600=1 相当で機能性酵母(神戸大学)を接種した。温水浴中においてスターラーで攪拌しながら、30℃、168h 糖化発酵試験を行った。

②酵素・酵母希釈液へ原料の浸漬：所定量の YP 培地、クエン酸緩衝液および蒸留水の混合液をろ過滅菌(孔径 0.2 μm)に 100mL 小型糖化発酵容器に入れ、セルラーゼ (Novozymes, NS50013) 製剤を 5FPU/g-Cellulose、OD600=1 相当で機能性酵母(神戸大学)を添加して混合した。この混合液に高圧蒸気滅菌した原料を 10%-dry 相当で浸漬し、温水浴中においてスターラーで攪拌しながら、30℃、168h 糖化発酵試験を行った。

③振盪攪拌：200mL ポリ瓶(PP 製)に原料を 10%-dry 相当、YP 培地、クエン酸緩衝液を一定量入れ蒸留水で 100mL に調整後、高圧蒸気滅菌した。セルラーゼ (Novozymes, NS50013) 製剤を 10FPU/g-Cellulose で添加後、ただちに OD600=1 相当で機能性酵母(神戸大学)を接種した。恒温振盪培養器を用いて 150rpm で振盪攪拌しながら、30℃、168h 糖化発酵試験を行った。

同時糖化発酵試験では所定時間ごとに発酵容器を振盪により均一化した後、試料の一部を採取して高速液体クロマトグラフ(日立ハイテクノロジー製 LaChrom Elite および東ソー製 LC-8020)により糖類、有機酸、エタノール濃度を測定した。

## (3) 酵素製剤による高温糖化と糖化発酵効率への影響

酵素の反応速度は、温度とともに上昇し、至適温度で最大となることから、高温で糖化を行うことにより早期に液化が進行することが期待できる。そこで、高固形分での高温糖化による糖化発酵効率への効果を検討した。

至適温度は高温であるため酵母の活性が低下することから、試験は一定時間の高温糖化後に 36℃まで冷却し、酵母を添加して行った。原料はトウモロコシ茎葉の粉碎物(20-80mesh)をアルカリ(1.4%NaOH, 60℃, 6hr.)+爆砕(190℃, 2min)により前処理して用いた。図 4.14 に示す小型試験容器に前処理後の原料を 10%-dry 相当、YP 培地、クエン酸緩衝液を一定量入れ蒸留水で 60ml とした。高圧蒸気滅菌後、室温まで冷却し、セルラーゼ (Novozymes, NS50013) 製剤を 5FPU/g-Cellulose で添加した。同酵素製剤の至適温度は 50℃であることから 50℃、24hr. で図 4.15 に示す回転攪拌により糖化させた後、36℃に冷却して OD600=1 相当で機能性酵母(神戸大学)を接種した。恒温槽内で回転攪拌しながら、36℃で同時糖化発酵試験を行い、所定時間ごとに発



図 4.14 小型試験容器

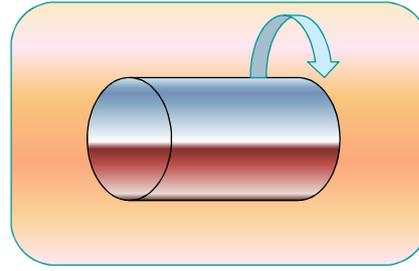


図 4.15 回転攪拌

酵容器を振盪により均一化した後、試料の一部を採取して高速液体クロマトグラフ（日立ハイテクノロジー製 LaChrom Elite および東ソー製 LC-8020）により糖類、有機酸、エタノール濃度を測定した。エタノール等の生成物濃度を測定して糖化発酵状況から判断した。

#### （4）効率的な攪拌による同時糖化発酵への影響

高固形分の原料で酵素、酵母を効果的に原料に接触させるため、ジャケット式セパラブルフラスコ（内容量 1L）を用いて、上部から攪拌機で攪拌する反応装置を用いた検討を行った。通常の攪拌羽根ではフラスコ内で空回りすることから、フラスコ内壁との隙間が数 mm 以下となる攪拌羽根を製作した。

この反応装置を用いて、原料として麦わら（アルカリ処理+爆砕処理）、ビートトップについて同時糖化発酵試験を行った。

同時糖化発酵はこれまでと同様に NREL の SSF Experimental Protocols に準拠して行った。セパラブルフラスコに所定量の原料（10～15%-dry 相当）、YP 培地、クエン酸緩衝液を入れ蒸留水で濃度調整後、高圧蒸気滅菌した。セルラーゼ(Novozymes, Cellic CTec2)製剤を 10FPU/g-Cellulose で添加後、ただちに OD600=1 相当で機能性酵母(神戸大学)を接種した。80～100rpm で攪拌するとともに、ジャケットに 36℃の温水を循環し発酵温度制御した。所定時間ごとに試料の一部を採取して高速液体クロマトグラフ（日立ハイテクノロジー製 LaChrom Elite および東ソー製 LC-8020）により糖類、有機酸、エタノール濃度を測定した。

### 4. 2. 3 研究結果および考察

#### （1）固形分増加による同時糖化発酵への影響

投入多糖類量から算出される理論エタノール量に対する生成エタノール量を糖化発酵効率とし、その経時変化を図 4.16 に示す。固形分 5%では 24hr. 後からエタノールが生成しており、120hr. で糖化発酵効率が 65% に達している。固形分の増加に従い、同時間での糖化発酵効率が低く、エタノール生成速度が低下していることが認められる。原料固形分 5、7.5、10%の初期外観性状はそれぞれスラリー状、泥状、塊状であり、10%ではほとんど流動性が見られなかった。これは固形分の増加により原料が自由水を吸水したためと考えられる。固形分の増加による糖化発酵速度の低下は、流動性の低下による混合不足により①原料中の多糖類と酵素および酵母との接触が不十分であったため見かけの比活性が低下した、あるいは②局所的に多糖類と酵素および酵母が多く接触することで高糖圧迫または発酵阻害物質による阻害などの生産物阻害により活性が低下したことが要因と思われる。

## (2) 高固形分での同時糖化発酵における装置的課題の抽出とその対策方法

固形分の増加による糖化発酵速度の低下は混合不足が要因と思われるが、スターラーを用いた混合方法ではトルクや回転数等の回転力を増強しても回転体が空転するのみで混合されない。これは処理規模を大きくするとより顕著となり、30L 規模の三連回転翼式混合攪拌槽を用いて同時糖化発酵試験を試みたが、図 4.17 に示すように回転翼がいずれも空転し、糖化発酵速度が固形分 5% 時の 1/4 以下まで低下した。

高固形分での同時糖化発酵における糖化発酵速度を向上させるためには、塊状である原料に酵素・酵母を効率的に混合させる方法を検討する必要がある。そこで、酵素・酵母との混合方法に関し以下の基礎検討を行った。

### ① 酵素製剤量の増加

本研究で用いる機能性酵母はセルラーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼを含む酵素を生産するが、酵母増殖に必要な基質を得るために酵素製剤を少量添加する必要がある。セルロース量に対して添加しているが、高固形分での同時糖化発酵で糖化による液化が進行しなかったことから、添加量を 2 倍に増加して液化を進行させる方法を試みた。

同時糖化発酵試験の結果を図 4.18 に示す。試験容器中の原料は一時期塊状となっているが、24hr. 後から液化の進行が目視で確認できた。糖化発酵効率が高く推移し、168hr. 時は固形分 5% の試験では糖化発酵効率 65% 以上に達するなど、糖化発酵効率の向上に対する顕著な効果が認められた。また、HMF(ヒドロキシメチルフルフラール)や有機酸等の発酵阻害物質は 2mg/ml 以下であった。

酵素製剤量の増加による糖化・液化の進行がさらに酵素・酵母との接触を高め、糖化発酵効率が向上したと考えられる。しかし、酵素製剤コストが高いことから、添加量を低く抑えることが必要であり、添加量の最適化および他方法との組み合わせによる低減化が必要である。また、高固形分における糖化発酵効率の低下が局所的な糖化発酵による高糖圧迫や発酵阻害物質の増加が要因ではないことが明らかになった。

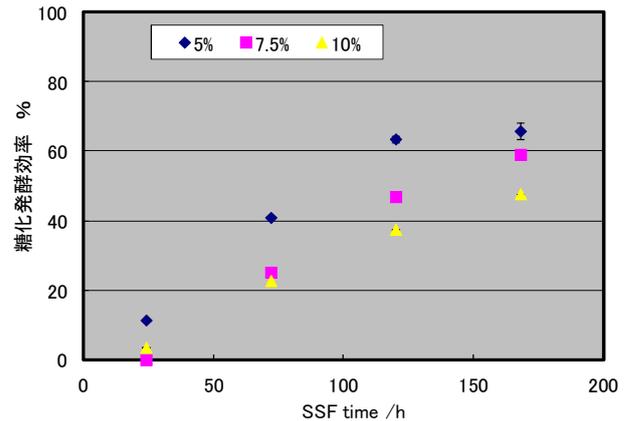


図 4.16 固形分に対する糖化発酵効率

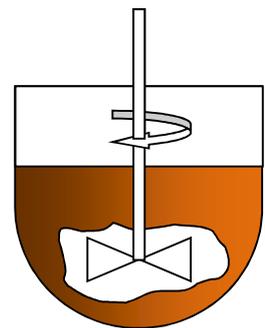


図 4.17 混合攪拌槽

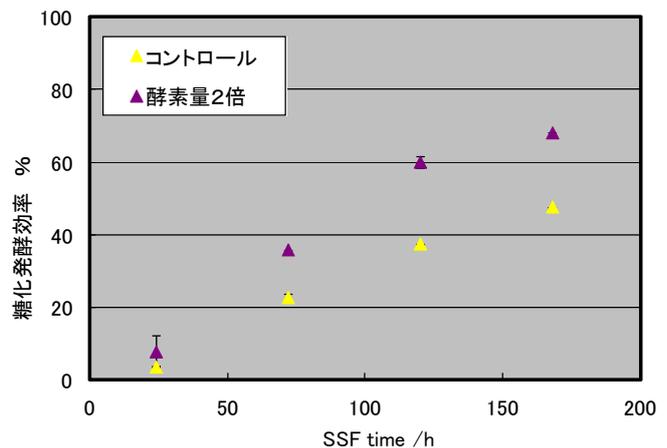


図 4.18 酵素量 2 倍における糖化発酵効率

## ②培地・緩衝液・酵素・酵母混合液への浸漬

糖化発酵工程では培地および緩衝液、原料を装置に投入後、乳酸菌などの雑菌による汚染を防ぐため高圧蒸気滅菌後に酵素と酵母を添加する。しかし、高固形分では酵素・酵母を添加する前に原料が塊状となることから、原料を培地・緩衝液・酵素・酵母の混合液に浸漬させることにより、原料に酵素・酵母を接触させる方法を試みた。同時糖化発酵試験の結果を図 4.19 に示す。原料の性状は浸漬後数時間以内に塊状となっていたが、初期(24hr.)で糖化発酵効率の向上が見られ、液浸漬方法により原料と酵素・酵母との接触面積が増加したことを示した。その後も糖化発酵効率は増加し、液浸漬法による効果が認められたが、168hr.後の糖化発酵効率は55%程度であり、5%固形分での糖化発酵効率65%には達しなかった。

原料と酵素・酵母は塊状となる前に接触しており、塊状物の内部に酵素・酵母は存在していると思われるが、液浸漬法単独での糖化発酵効率の向上に対する顕著な効果は得られなかった。

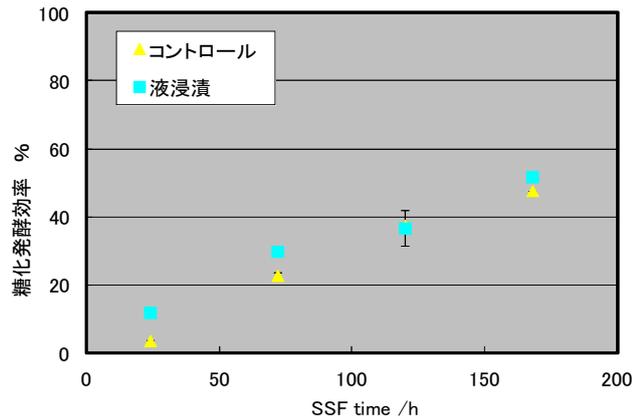


図 4.19 液浸漬方法に対する糖化発酵効率

## ③振盪撹拌を用いた処理物の揺動による効果

高固形分における糖化発酵効率の低下は、流動性の低下による混合不足により酵素および酵母の見かけの比活性が低下したことが要因である可能性が高いことから、塊状である原料を含む処理物全体を揺動し、酵素・酵母との接触を促進させる方法を試みた。

同時糖化発酵試験の結果を図 4.20 に示す。試験容器中の原料を含む塊状の処理物は往復振盪により容器内部で移動し、容器内面に衝突を繰り返す状態で経過し、72hr.後にはスラリー状まで液化していることを目視で確認した。糖化発酵効率も72hr.後から高く推移し、168hr.時は約60%となり、糖化発酵効率の向上に対する効果が認められた。処理物全体を揺動させることで糖化発酵効率が向上しており、高固形分における糖化発酵効率の低下は、流動性の低下による混合不足が要因であると推察される。しかし、工業装置として振盪機構を有する工業装置は設備コストが高く、振盪に要するエネルギーコストも高いことから、他の揺動手法を検討する必要がある。

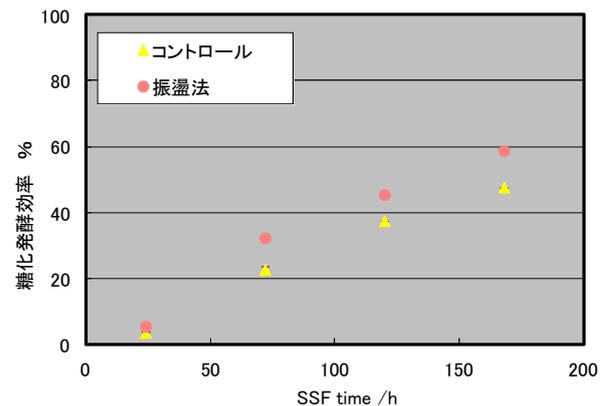


図 4.20 振盪法における糖化発酵効率

## (3) 酵素製剤による高温糖化と糖化発酵効率への影響

投入多糖類量から算出される理論エタノール量に対する生成エタノール量を糖化発酵効率とし、その経時変化を図 4.21 に示す。高温糖化(5FPU、50°C糖化)のほか、比較として Control(5FPU、36°C糖化)の結果を同時に示した。高温糖化では196時間後の糖化発酵効率が60%であり、Controlの49%に比べ高く、高温糖化による糖化発酵効率の向上が認められた。図 4.22 に高温糖化24時間後の原料外観を Control と比較して示した。

Control で容器内面全体に原料が付着しているのに対し、高温糖化では内面に付着する原料が少なく、容器下面に液状化が進行していることが認められる。高温糖化により早期に液状化が進行し、Control に比べ混合状態が改善したことから酵素や酵母と原料との接触効率が上がったことで、糖化発酵効率が高くなったものと考えられる。

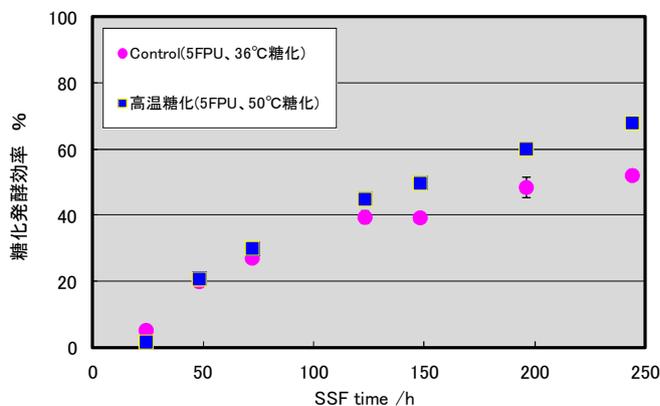


図 4.21 高温糖化による糖化発酵効率



高温糖化

Control

図 4.22 試料容器外観 (高温糖化時)

#### (4) 効率的な攪拌による同時糖化発酵への影響

ジャケット式セパラブルフラスコを用いて行った同時糖化発酵試験の様子を図 4.23 に示す。試験初期にはフラスコ内壁面に薄く原料が付着したが酵素による液化が進むにつれて解消した。

この反応装置を用いて、麦わら、ビートトップを原料とし、原料 10%-dry、酵素 10FPU/g-cellose、機能性酵母 OD600 1 相当の条件で同時糖化発酵を行った時の発酵効率を図 4.24 に示す。攪拌の効果により初期の酵素による液化が速やかに進むのが観察され、これまでより短時間で発酵が進むことが分かった。またどちらの原料も発酵効率 70%以上を示した。

次に原料濃度を高めた試験として麦わらで、原料 15%-dry、酵素 10FPU/g-cellose、機能性酵母 OD600 1 相当の条件で同時糖化発酵を行ったところ、固形物濃度 10%-dry 時と変わらず、同時糖化発酵が進行した (図 4. 25)。これらのことから攪拌の効率を高めることで高濃度の原料に対応できることが確認できた。



図 4. 23 攪拌反応装置

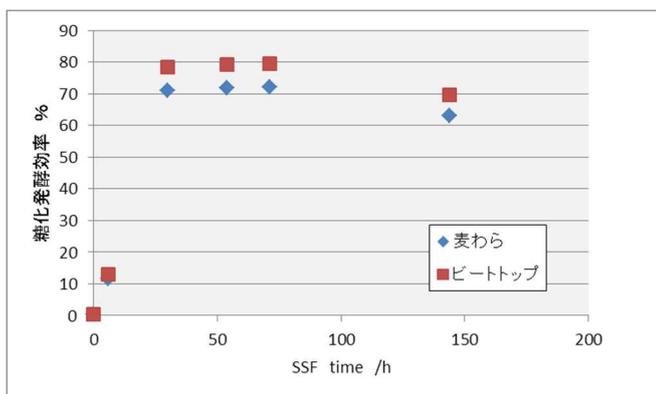


図 4. 24 攪拌反応装置による糖化発酵効率 (10%-dry)

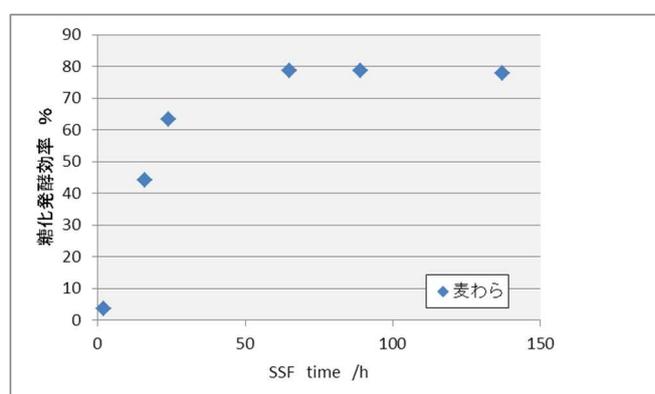


図 4. 25 攪拌反応装置による糖化発酵効率 (15%-dry)

#### 4. 2. 4 結論

蒸留工程におけるエネルギー消費量低減および糖化発酵工程における設備コスト低減のため、高固形分での糖化発酵方法を検討した。農産廃棄物を原料として前処理した後の原料を高固形分で糖化発酵させる場合、原料が吸水して自由水が減少して塊状となり、一般的な混合攪拌装置では糖化発酵効率が低下することが認められた。そこで基礎検討として①酵素製剤量、②培地・緩衝液・酵素・酵母混合液への浸漬、③振盪攪拌による糖化発酵効率の向上に対する効果を調査した。その結果、高固形分における糖化発酵効率の低下は、塊状により流動性が低下して混合不足となり、原料中の多糖類と酵素および酵母との接触が不十分であったため見かけの比活性が低下したことが要因であると推察された。

混合状態を改善する手法として酵素の至適温度における高温糖化を行い、その後機能性酵母による同時糖化発酵を検討した。その結果、高温糖化により液化が早期に進行し、高固形分での混合状態が良好となり、糖化発酵効率が向上することが認められた。

攪拌混合方法として試料全体を攪拌できるような攪拌羽根を製作し同時糖化発酵を行ったところ、初期の酵素による液化が進行し、糖化発酵効率が向上した。

## 5 エタノール蒸留残渣焼却灰の成分評価

### 5. 1 研究目的

本研究において検討しているプロセスでは、有用物質を回収およびエタノールを製造した後に生じる各種残渣は、サーマルリサイクルによるエネルギー回収に用いる。最終的な残渣であるサーマルリサイクル後のこれらの焼却灰は植物由来であることから、主にカリウム等の肥効成分を含有していると考えられ、肥料としての有効利用を想定している。そのため、これらの焼却灰に関して、肥料としての有用成分を把握するとともに、廃棄物の有効利用となることから、安全性を担保するための有害物質の量および溶出性についても検討することとした。

平成 24 年度は肥料としての利用の可能性を明らかにすることを目的に、本プロセスで用いられている植物起源原料を単独に灰化し、それぞれに対して肥効成分を中心に主成分元素の分析等を行った。また、平成 25 年度は安全性の評価のため、含有が懸念される各有害物質の含有量および溶出量分析を行い、安全性について考察した。

### 5. 2 研究方法

#### (1) 肥効性成分評価

本プロセスで使用される 3 種類の植物由来原料であるビート茎葉部、麦藁、大豆殻を試料として使用した。それぞれ、磁性蒸発皿に試料をとり、電気炉を用いて酸化雰囲気条件において加熱分解灰化した。JISK0102 工場排水試験方法の強熱残留物の測定法を参考に、灰化温度は、未燃分がなく灰の融着が起こらない 600℃としたが、麦藁に関しては 600℃では未燃分が多く見られたことから、麦藁のみ JIS M8812 石炭類およびコークス類-工業分析方法の灰分測定に準じて 815℃処理とした。なお、これらの灰は、有害元素の溶出試験の検討にも用いることから、各試料ごとに 50g 程度の灰を確保するために数十回の灰化を行い、瑪瑙乳鉢を用いる攪拌潰機により 10min 粉碎混合し、十分な均一混合を行った。

得られた粉砕物をプレス成形し、波長分散型蛍光 X 線分析装置 (RIGAKU Primus II、管球ターゲット: Rh、加速電圧: 30~50kV) により、炭素~ウランの元素について定性分析およびファンダメンタルパラメーター法 (以下 FP 法) による半定量分析を行った。なお、炭素の濃度計算に用いる K $\alpha$  線はカリウム L $\beta$  線の干渉を受けることから、あらかじめ塩化カリウム (試薬) のカリウム L $\beta$  線の基準波形を測定し、基準波形分離処理により真の炭素 K $\alpha$  X 線強度を算出し PF 法の濃度計算を行った。

また、化学形態を明らかにするため、粉碎混合後の灰試料に対して、粉末 X 線回折法による分析を行い、蛍光 X 線分析で検出された元素を含む化合物 (結晶相) について検索し、含有する化合物を同定した。

#### (2) 安全性評価

安全性の評価のためには、溶出試験と含有量試験を行った。まず、各種原料灰化物を粉碎してから分析に供した。「肥料取締法に基づき普通肥料の公定規格を定める等の件」(昭和 61 年 2 月 22 日農林水産省告示第 284 号、最終改正平成 24 年 8 月 8 日) での普通肥料の内、「焼成汚泥肥料」での規格では、「1. 金属等を含む産業廃棄物に関する判定基準を定める省令別表第一の基準に適合する原料を使用したもの、2. 植害試験の調査を受け害が認められないものである」とあり、指定されている試験は昭和 48 年環境庁告示第 13 号(「産業廃棄物に含まれる金属等の検定方法」、最終改定平成 25 年 2 月 21 日) となっている。また、より厳しい基

準として「土壌の汚染に係る環境基準」(平成3年8月23日環境庁告示第46号)も参考に図5.1に示すフローにより分析した。溶出量に関しては環境庁告示13号では燃え殻などは有姿のまま溶出することになっており、環境省告示46号では試料から異物を取り除いた後、粗砕し篩目2mmの非金属製篩を通過させて溶出操作を行うことになっている。しかし、試料が少量のため均一性を得るためと、より安全側で評価することを考慮し、全量を粉碎して溶出操作に供した。ビート茎葉灰は規定通り50g以上得られたが麦藁灰や大豆殻灰は灰分が少ないことからそれぞれ47g、34gと規定量が得られなかったが、粉碎後溶出試験を行っていることなどから、規定量以下になっている問題は小さいと考えられる。

試料溶液を一定量分取しCr(VI)はジフェニルカルバジド吸光度法により、Cd、Pbは硝酸添加後、煮沸して定容後、キレート樹脂による分離濃縮法でマトリックスを除去し、ICP質量分析法(内標準法併用)により、As、Seは硫酸、硝酸、過塩素酸で分解

後、水素化合物発生ICP発光分光分析法(Seは標準添加法併用)により、Hgは硝酸、硫酸、過マンガン酸カリウム添加後、還元気化原子吸光法により定量した。主な測定条件について表5.1に示す。

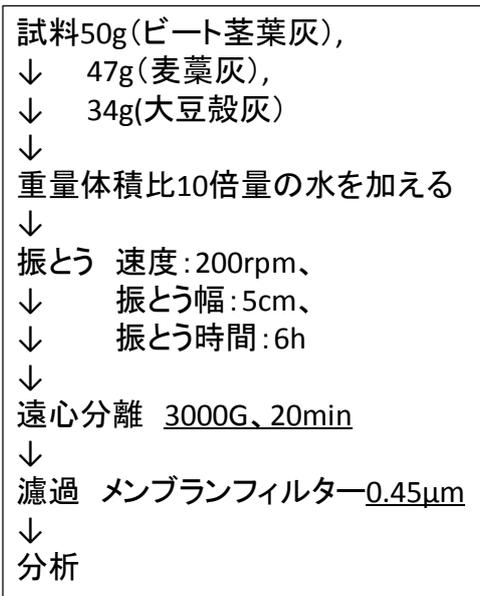


図5.1 溶出試験フロー

表5.1 溶出試験測定条件

<b>吸光度法(Cr(VI))</b>	
装置	島津製作所 UV-3100PC型
測定波長(nm)	543.0
スリット幅(nm)	2.0
光路長(mm)	10.0
<b>ICP質量分析法(Cd, Pb)</b>	
装置	アジレントテクノロジー 7700x型
コリジョンセルガス種類	He
コリジョンセルガス流量(mL/min)	4.3
測定質量数	111(Cd), 208(Pb)
内標準元素および質量数	115(In for Cd), 205(Tl for Pb)
積分時間(s)	1.0
測定回数	3
マトリックス分離(前処理)	キレート樹脂法(日立ノビアスキレートPA-1型)
<b>水素化合物発生ICP発光分光分析法(As, Se)</b>	
装置	島津製作所 ICPS-8100型、HVG-1型
水素化合物生成試薬	0.4%水素化硼素ナトリウム、6M塩酸
測定波長(nm)	193.696(As), 196.026(Se)
バックグラウンド補正位置(nm)	-0.0125, +0.0117(As), -0.0109, +0.0116(Se)
積分時間(s)	3.0
測定回数	3
予備還元試薬	KI、塩化ヒドロキシルアンモニウム、L-アスコルビン酸
<b>還元気化原子吸光法(Hg)</b>	
装置	日本インスツルメント RA-2型
測定法	ピーク高さ

含有量に関しては、以下のように分析した。土壌環境基準では、主に直接摂取時のリスクが考えられており、指定された検液調製法は、試料から異物を取り除いた後、粗砕し篩目2mmの非金属製篩を通過させ、胃液を念頭に置いた1M塩酸による抽出濃度(試料量6g以上、固液比3%、2h振とう、孔径0.45μmメンブランフィルターで固液分離)から計算することになっているが、本試験ではより安全側で検討するため、および焼成汚泥肥料の含有量基準での全分解法を考慮して分解した。すなわち、試料をまず硝酸、過塩素酸により可溶性塩および残存有機物などを分解して濾過し、定容して主液とした。残渣をPTFE皿に移しふっ化水素酸、硝酸、過塩素酸を加え珪酸塩等を分解し、ふっ化水素酸を揮散させて濾過を行い定容して第二液とした。そ

の残渣を白金坩堝に移し灰化後、二硫酸カリウム溶融により完全分解して定容し、第三液とした。酸分解時の留意点として、特にビート茎葉灰など塩素を多く含む試料があることから、Crが塩化クロミルとして揮散するのを防ぐため、硝酸による分解を十分行い塩素を揮散させた後、過塩素酸を添加するようにした。各試料の分解主液、第二液、第三液それぞれについて、Cr, Ni, Cu, As, Se, Cd, Pbの各元素をICP発光分光分析法（標準添加法併用）により定量した。Hgは固体のまま、加熱気化後（管状炉、800℃、酸化コバルト触媒使用）、過マンガン酸カリウム溶液に吸収させ、還元気化原子吸光法（標準添加法併用）により定量した。主な測定条件については表5.2に示す。

表 5.2 含有量試験測定条件

ICP発光分光分析法 (Cr, Ni, Cu, As, Se, Cd, Pb)				
装置	島津製作所 ICPS-8100型			
測定波長及びバックグラウンド補正位置(nm)	元素			
	Cr	276.716	-0.0192	+0.0127
	Ni	231.604	-0.0107	+0.0093
	Cu	327.396	-0.0141	+0.0114
	As	193.696	-0.0117	+0.0101
	Se	196.026	-0.0112	+0.0089
	Cd	226.502	-0.0123	+0.0091
	Pb	220.351	-0.0103	+0.0121
バックグラウンド補正位置(nm)	石英製同軸型、高塩濃度用			
ネブライザー及びビトーチ				
積分時間(s)	1.0			
測定回数	3			
還元気化原子吸光法(Hg)				
装置	日本インスツルメント RA-2型			
測定法	ピーク高さ			

### 5. 3 実験結果および考察

#### (1) 肥効性成分

今回の試験で得られた灰（粉碎前）の写真を図5.2に示す。大豆殻は粉末状で、麦藁とビート茎葉部は形状を維持した灰が得られた。蛍光X線分析による分析結果を表5.3に示す。いずれの焼却灰もカリウムが主成分であり、単純に単独の灰の濃度としては肥料取締法「粗製加里塩」の基準値レベル（水溶性酸化カリウム換算で30%以上）を大きく超える高濃度であることが分かった。



図 5.2 各種原料焼却灰

カリウム以外の元素としては、ビート茎葉部灰にはナトリウム、マグネシウム、塩素が多く含まれていた。麦藁灰はけい素、硫黄を、大豆殻灰はカルシウム、マグネシウムを多く含むなど、これら3種類の植物灰は組成が大きく異なっていることが分かった。ビート茎葉部灰に含まれる塩素は、農用地での蓄積が問題視される元素であり、加里肥料の規格に「硫酸加里」など塩素含有量について5%以下の規定があるものがあるが、ビート茎葉灰単独の場合は、この規格の塩素の含有許容濃度を超過している。ただし、実際には焼却時に複数の原料が混合されるため、塩素含有量は低くなることが想定される。また、加里肥料には「塩化加里」の項目も規定されているなど塩素を含有してもカリウム濃度が十分高ければ使用可能であると考えられる。

また、本試験で検討した試料はすべて焼却物であることから窒素はいずれの試料からも検出されなかった。さらに、りんはすべての試料から検出されたが、りん酸濃度はさほど高くなく、最も含有量が低い規格である「鉍さいりん酸肥料」でもく溶性りん酸として3%以上含有となっており、本試料はりん酸肥料としての規格を満たすの

には濃度が低い難しいことも分かった。以上の組成分析の結果より、本焼却灰はどの試料も含有量としては加里肥料として期待できることが分かった。

次に、粉末X線回折の測定結果を図5.3~5.5に示す。ビート茎葉部灰のX線回折パターンからは塩化カリウム (sylvite) が同定され、明確ではないが、酸化マグネシウム (periclase) の存在が推定された。麦藁灰からは硫酸カリウム、炭酸カリウムが同定され、二酸化けい素 (cristobarite) の存在も推定された。大豆殻灰からは炭酸カルシウムカリウム (fairchildite)、酸化マグネシウム (periclase) が同定され、炭酸カルシウム (calcite) の存在が推定された。ビート茎葉部および大豆殻灰は、強度の比較的大きな回折線も含め帰属できないピークが残っており、化合物をすべて同定できなかった。しかし、同定されたカリウム含有化合物はいずれも水溶性であることから、肥効成分として寄与すると考えられる。

表 5.3 各試料焼却灰の組成

元素(酸化物換算)	ビート茎葉部灰	麦藁灰	大豆殻灰
CO <sub>2</sub>	14.	2.2	20.
Na <sub>2</sub> O	8.3	0.25	0.24
MgO	6.	1.92	10.
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.74	0.3	0.54
SiO <sub>2</sub>	1.5	33.	2.2
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	4.5	3.2	3.4
SO <sub>3</sub>	3.9	15.	4.1
Cl	8.5	0.39	0.28
K <sub>2</sub> O	47.	38.	42.
CaO	4.2	5.1	17.
TiO <sub>2</sub>	0.05	N.D.	0.2
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	N.D.	0.03	N.D.
MnO	0.05	0.03	0.06
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.57	0.27	0.4
CuO	0.02	0.01	0.01
ZnO	0.02	0.01	0.01
Br	0.05	<0.01	<0.01
Rb <sub>2</sub> O	0.03	0.01	0.02
SrO	0.01	0.01	0.08
ZrO <sub>2</sub>	<0.01	N.D.	N.D.
MoO <sub>3</sub>	N.D.	<0.01	N.D.
BaO	0.03	0.06	0.06

単位(%)

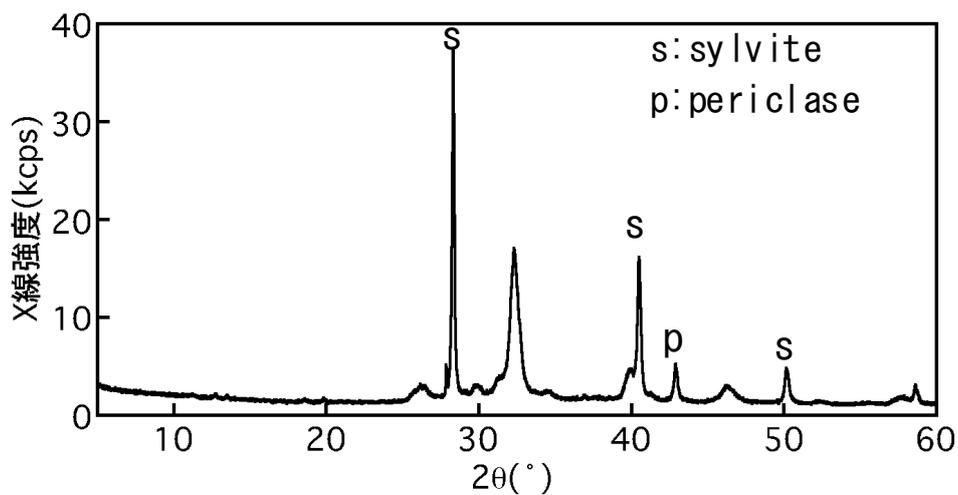


図 5.3 ビート茎葉部灰の X 線回折チャート

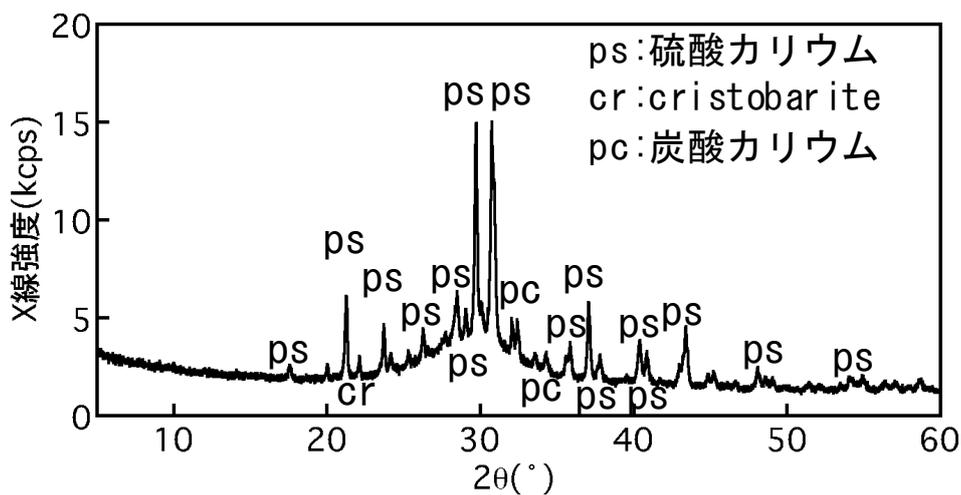


図 5.4 麦藁灰の X 線回折チャート

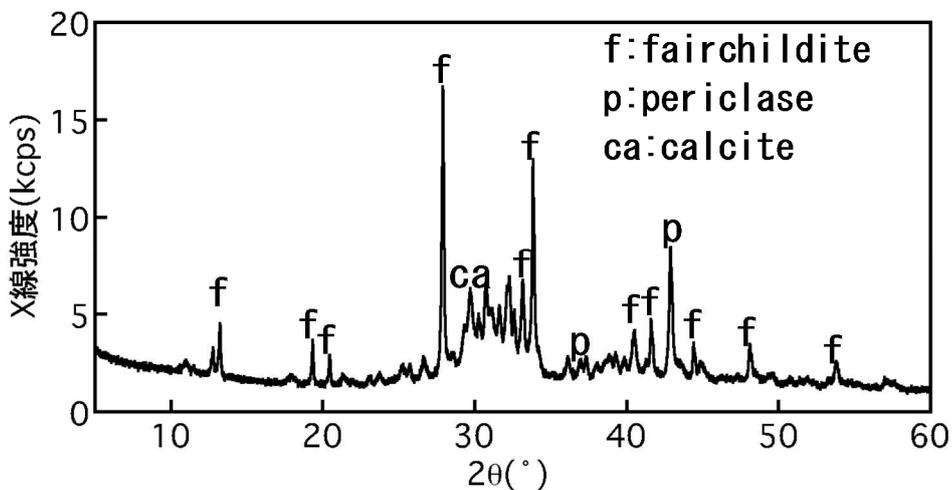


図 5.5 大豆殻灰の X 線回折チャート

(2) 安全性評価

1) 溶出試験

表 5.4 に溶出試験結果および各種基準値を示す。全試料について Cd, Pb, Se, Hg は告示 13 号試験および告示 46 号試験の基準値を下回っている。また、As は全試料について、告示 46 号の基準値を上回っているが、告示 13 号（汚泥焼却灰試料の溶出試験規制値）は下回っている。Cr (VI) はビート茎葉灰について告示 46 号の基準値を上回っているが、告示 13 号（汚泥焼却灰試料の溶出試験規制値）は下回っている。この原因として焼却灰回収に使用したステンレス製の薬匙からの汚染が疑われたことから、プラスチック製の薬匙を使用して灰の回収を行い再度溶出試験を行ったが、定量値は Cr(VI) : 166 $\mu$ g/L となった。これより、Cr はビート茎葉試料に含有されており、多量のアルカリ元素と強熱されたことにより Cr(VI) に酸化されたと考えられる。その他の試料についても Cr(VI) は検出されているが、告示 46 号の基準値も下回っている。告示 46 号の基準値は水道水などと同様の非常に厳しい基準値であり、Cr(VI) および As については留意する必要があるが、すべて告示 13 号（汚泥焼却灰肥料の溶出試験規制値）を下回っていることから、有害物質の溶出量に関しては大きな問題はないと考えられる。

表 5.4 溶出試験分析結果

試料	単位: $\mu$ g/L					
	Cr(VI)	Cd	Pb	As	Se	Hg
ビート茎葉灰	96	<1	<2	60	8	<0.05
麦藁灰	<40	<1	<3	13	<2	<0.05
大豆殻灰	47	<1	<2	13	7	<0.05
<b>土壤環境基準</b>	<b>50</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>0.5</b>

2) 含有量試験

表 5.5 に各種試料の有害元素含有量および基準値を示す。全試料について Cr, Ni, As, Se, Cd, Pb, Hg および Cu について焼成汚泥肥料および土壤環境基準の両基準値を下回っている。これより今回調べた植物灰はすべて重金属類の含有量も十分低く重金属等含有量に関する安全性に関しては問題ないと考えられる。ただし、

表 5.5 含有量分析結果

試料	単位: mg/kg							
	Cr	Ni	Cu	As	Se	Cd	Pb	Hg
ビート茎葉灰	7	4	150	<13	<15	<2.5	<11	<0.01
麦藁灰	8	6	160	<13	<15	<2.3	<11	<0.01
大豆殻灰	3	3	49	<13	<15	<2.4	<11	<0.01
焼成汚泥肥料基準	500	300	-	50	-	5.	100	2.
土壤環境基準	*250	-	-	150	150	150.	150	15.

\* Cr(VI)として

本サーマルリサイクルプロセスで排出される灰は、現在の肥料取締法において、どの項目に分類されるかはプロセスが確定しないと確定できない。植物の灰としてもっとも近いものとしては特殊肥料の一種である「草木灰」が考えられる。草木の灰は一般には成分が安定していないことが多いことから、カリウム含有量が高いが特殊肥料としての分類となり、農林水産大臣が指定している。現在のところ、特殊肥料は基本的に有害元素の規制値は無い。また、都道府県によっては上乗せ基準がある場合があるが、北海道では草木灰特殊肥

料に対して上乘せ基準はないことから、このプロセスで排出される焼却灰が草木灰と認められれば重金属類の規制は無い。しかし、本焼却灰は植物体に酵母を添加、発酵処理、中和処理など薬剤の添加を行っていることから草木灰として解釈できるか問題になる。もし、このプロセスの灰が草木灰と見なされなければ、本焼却灰を新たな特殊肥料として申請して、農林水産大臣からの指定を受けなければならない。一方、普通肥料として、製造プロセスが確立してから、肥料登録手続きにおいて、「生産工程の概要」に製造プロセスを明示した申請書を提出し、この認定を行っている独立行政法人農林水産消費安全技術センターおよび都道府県の農政部の協議によりを経て、肥料の登録が行われる。焼却施設で原料や混合比率が管理されていることから成分が安定していることを主張して化学工業における副産物ということで副産加里肥料として認められるか、このプロセスで排出される灰を新たな普通肥料として項目設定するようにする必要があるなど、肥料と認定されるまで多くの手続きが必要になる。

#### 5. 4 まとめ

検討結果をまとめると、

- ①本研究での植物系原材料について単独で灰化処理を行い、得られた灰について肥効成分を中心に成分分析を行った結果、窒素およびリンの含有量は低いが、すべての試料にカリウムが多量に含まれることが分かった。
- ②X線回折により、得られた灰の化学形態について調べた結果、水溶性カリウム塩が同定された。
- ③安全性の評価として溶出試験を行った結果、各種焼却灰単独では土壤環境基準を超過したCr(VI)やAsなど留意する必要がある元素はあるが汚泥焼却肥料の規格は満足しており、有害元素の溶出量はほぼ問題ないと考えられる。
- ④有害物質の含有量に関して定量した結果、すべての試料の焼却灰に関して、焼成汚泥肥料の含有量基準および土壤環境基準を下回ったことから、有害元素の含有量は十分低く問題ないと考えられる。
- ⑤以上のことから、サーマルリサイクル後の植物系残渣焼却灰は加里肥料として期待できることが分かった。

しかし、実際のプロセスでは処理工程中での水酸化ナトリウムの添加(中和)や、サーマルリサイクル時も各種の原料が混合されて燃焼することから、原料のマスバランスからカリウム濃度を見積もることが必要である。また、有害性の評価の観点からも、水酸化ナトリウムを添加されることにより、残渣にもナトリウムが混入するが、燃焼時または焼却灰が水に溶出するときのpHも変わることが予想される。そのため、Cr(VI)の生成が促進されたり、他の有害元素の溶出量が変化することも考えられるので、最終的には、実プロセスから排出された灰を用いて再度溶出試験を行い評価する必要がある。

また、本研究により各種肥効成分および有害物質の溶出量および含有量など技術的な安全性については明らかになったが、実際に肥料として農地還元使用する場合は肥料としての登録を含め、関係法律上の取り扱いに関しても十分留意する必要がある。

## 6 プロセスの検討

### 6.1 目的

これまで原料収集、保存に関する検討、原料に含まれる有用成分評価、バイオエタノール製造のための原料の前処理、同時糖化発酵、エタノール蒸留残渣の焼却灰の成分評価について研究を行った結果を踏まえて、ビートトップからビートトップ油を生産し、その残渣と他のセルロース系バイオマスからバイオエタノールを生産するシステムについて、最適と思われるプロセスを提案し、そのプロセスにおけるLCA評価および経済性評価を行うことを目的とする。

### 6.2 方法

#### (1) プロセスの最適化

##### 1) 原料収集対象範囲

対象となる農産廃棄物は収穫量に比例して発生すると考えられるので、農産物収穫量から対象となる収集範囲を検討した。北海道十勝地方の各市町村の各作物（ビート、大豆、小豆、麦）の収穫量を表 6.1 に示す。また、表 6.1 から算出した各市町村の生産割合を表 6.2 に示す。収穫割合が 10%を超える市町村は音更町、芽室町、帯広市の 3 市町である。これら 3 市町から収穫される十勝地方の各農産物の割合はそれぞれ、てんさい 37.8%、大豆 53.9%、小豆 44.4%、麦 46.3%で、収穫量は同 64.0 万トン、7.3 万トン、18.3 万トン、12.2 万トンである（全て湿物ベース）。この結果と表 1.1 の十勝全体の農産残渣賦存量から 3 市町の農産残渣賦存量を推算すると、ビートトップ 6.9 万トン、大豆殻 0.7 万トン、小豆殻 0.6 万トン、麦わら 7.6 万トン（全て乾物ベース）である。また、他の最新の報告では 3 市町の麦わらの利用可能量は 3 万トン以上であるとされている<sup>2)</sup>。このことから、3 市町の農産廃棄物の排出量は十分な量であると判断した。

表 6.1 北海道十勝地方各市町村の農産物収穫量 (H24)<sup>1)</sup>

	てんさい	大豆	小豆	麦
音更町	197,000	4050	6680	43700
士幌町	138,800	1070	2530	14700
上士幌町	50,900	647	867	3540
鹿追町	72,000	98	1330	8270
新得町	16,500	219	340	3350
清水町	84,000	821	2300	15700
芽室町	209,400	1630	6010	37800
中札内	81100	375	1130	5430
更別村	113,500	262	2470	11900
大樹町	32,300	20	824	2190
広尾町	4,760	—	—	100
幕別町	150,100	578	3210	26400
池田町	68,500	199	1820	13400
豊頃町	36,000	462	2290	7680
本別町	81,800	1150	2200	14800
足寄町	25,900	43	820	5560
陸別町	1780	241	706	735
浦幌町	95,900	—	—	8380
帯広市	233,500	1600	5570	40700
合計	1,694,000	13500	41097	264200

表 6.2 北海道十勝地方各市町村の農産物収穫割合 (H24)

	てんさい	大豆	小豆	麦
音更町	11.6%	30.0%	16.3%	16.5%
士幌町	8.2%	7.9%	6.2%	5.6%
上士幌町	3.0%	4.8%	2.1%	1.3%
鹿追町	4.3%	0.7%	3.2%	3.1%
新得町	1.0%	1.6%	0.8%	1.3%
清水町	5.0%	6.1%	5.6%	5.9%
芽室町	12.4%	12.1%	14.6%	14.3%
中札内	4.8%	2.8%	2.7%	2.1%
更別村	6.7%	1.9%	6.0%	4.5%
大樹町	1.9%	0.1%	2.0%	0.8%
広尾町	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%
幕別町	8.9%	4.3%	7.8%	10.0%
池田町	4.0%	1.5%	4.4%	5.1%
豊頃町	2.1%	3.4%	5.6%	2.9%
本別町	4.8%	8.5%	5.4%	5.6%
足寄町	1.5%	0.3%	2.0%	2.1%
陸別町	0.1%	1.8%	1.7%	0.3%
浦幌町	5.7%	0.0%	0.0%	3.2%
帯広市	13.8%	11.9%	13.6%	15.4%
合計	100%	100%	100%	100%

図 6.1 に原料収集範囲を示す。ビートトップ油図 6.1 に原料収集範囲を示す。ビートトップ油およびバイオエタノール生産工場を芽室町に建設するものと想定すると、収集距離は最長で片道 25km 程度であるので、平均収集距離は片道 12.5km、往復で 25km とした。



図 6.1 原料収集範囲

## 2) プロセスの概要と検討範囲

ビートトップ油とバイオエタノール生産の概要を図 6.2 に示す。プロセスの検討範囲は各原料の受け入れからビートトップ油およびバイオエタノール生産までとした。

原料はビートトップ、麦稈、豆殻とし、ビートトップ油を約 5t/y、バイオエタノールを約 1 万 5 千 kL/y 生産できる規模とした。小麦の収穫時期は 7 月下旬から 8 月中旬<sup>3)</sup>、小豆は 9 月下旬～10 月下旬<sup>4)</sup>、大豆は 10 月中旬～下旬<sup>5)</sup>、ビートは 10 月～11 月中旬<sup>6)</sup>である。麦稈、豆殻については天日乾燥によって水分 20%以下となることが期待できるので、長期保存が可能である。しかし、ビートトップ油は水分が多く、かつ壊れやすいカロテノイドを含有しているため、長期保存には第 1 項の結果より低温環境下が良いとされた。そこで、

ビートトップからのビートトップ油およびバイオエタノール生産をビート収穫時期の 10 月から冬季を挟む 150 日間とし、その後の 150 日間で麦稈、豆殻からのバイオエタノールを生産することとした。

ビートトップ油の生産では、ビートトップを受け入れ、粉碎後、粉碎物の一部を固液分離し、固形分からエタノールによってビートトップ油を抽出する。粉碎されたビートトップの一部は固液分離されることなく、糖化・発酵工程へ導入される。また、固液分離後の液分も糖化・発酵工程へ移される。エタノール抽出されたビートトップ油と固形分は再び固液分離され、ビートトップ油を含む液の状態でも長期保存し、生産に応じてビートトップ油の分離精製を行う。2 段目の固液分離工程で分離された固形分は糖化・発酵工程へ移動される。

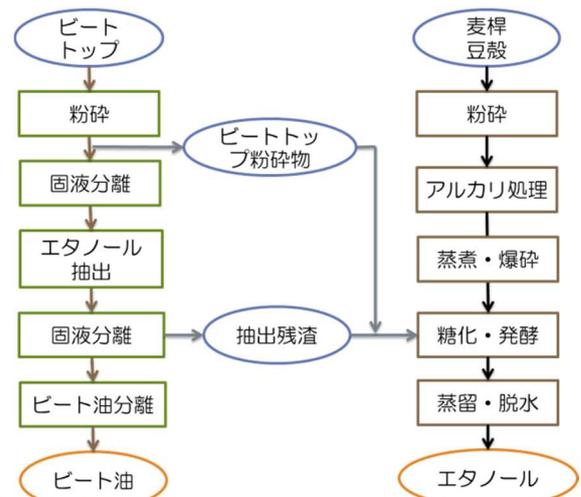


図 6.2 ビートトップ油とバイオエタノール生産の概要

一方、麦稈、豆殻からのバイオエタノール生産工程は、粉碎後、水酸化ナトリウムによるアルカリ処理、蒸煮・爆砕処理を施し、前処理産物を糖化・発酵する。生成したエタノールを蒸留・脱水して製品エタノールを得る。

### 3) プロセスの前提条件

これまでに検討してきた成果を踏まえ、ビートトップ油を 5t/y、バイオエタノールを 1.5 万 kL/y 生産する製造プロセスを検討する。その各種仕様設定を表 6.3 に示す。

表 6.3 ビートトップ油およびバイオエタノール製造プロセスの各種仕様設定

項 目		仕 様 設 定
ビ ー ト ト ッ プ 油 生 産	粗粉碎	カッターミルによる素粉碎
	破碎	マスコロイダーによるゲル化
	ビートトップ初期水分	87%
	ビートトップ初期脂溶成分含有量	100mg/g-dry
	抽出エタノール/基質比	4kg/kg-wet
	抽出エタノール初期濃度	85%
	抽出エタノール最終濃度	76%
	抽出段数	1段
	抽出時間	16h
	固液分離後固形分濃度	25%
固液分離による脂溶成分の液側への亡失率	46%	
エ タ ノ ー ル 生 産	粗粉碎	カッターミルに供給可能な素粉碎
	破碎	スクリーンφ5mm通過
	アルカリ処理	アルカリ種: NaOH、濃度: 13%、固形分濃度: 25%、温度: 60~75℃、時間: 6h
	蒸煮爆砕処理	温度: 190℃、時間: 2分、アルカリ処理+蒸煮爆砕処理の物質回収率: グルカン100%、キシラン86%、処理後のTS: 20%
	糖化発酵	セルラーゼ使用量: 5FPU/g-セルロース、36℃、糖化発酵効率: グルカン80%、キシラン: 25%、収率: ビートトップ200L/t、麦稈等220L/t
蒸留・脱水	蒸留: エタノール回収率99.5%、製品濃度92%wt、脱水: ゼオライト膜脱水、エタノール回収率98%、製品濃度99.5%wt	

### (2) LCA 評価

バイオエタノール(BE)プラントにおいて、ビートトップ(BT)からビート油を生産し、その残渣と他のセルロース系バイオマスからバイオエタノール(BE)を生産するシステムについて原料調達から製品製造に至るプロセスの LCI を算出した。BT および豆殻・麦稈を圃場における廃棄物とし、システム境界は図 6.3 に示すように、圃場におけるビートトップおよび豆殻・麦稈の回収から BE プラントまでの輸送、BE 製造、ビート油の製造とした。BE プラントは芽室町に建設、周辺 3 市町から原料を調達すると設定し、ビート油も BE プラントにて製造するとした。土地利用の変化に伴う排出および建設に係る排出は除外した。

機能単位はBE生産量(kL)当たりのCO<sub>2</sub>排出量(t/kL)とした。各プロセスのユーティリティおよび資材量のデータは、本研究における試験データおよび既設BEプラントのプロセスデータから収集した。さらに原料回収・運搬、ビート油製造プロセスのデータは文献や類似工程の事例報告<sup>7-11)</sup>を参照して作成した。排出原単位はJEMAI-LCAデータベースおよび文献<sup>12-14)</sup>の排出源単位表、産業連関表より得た。

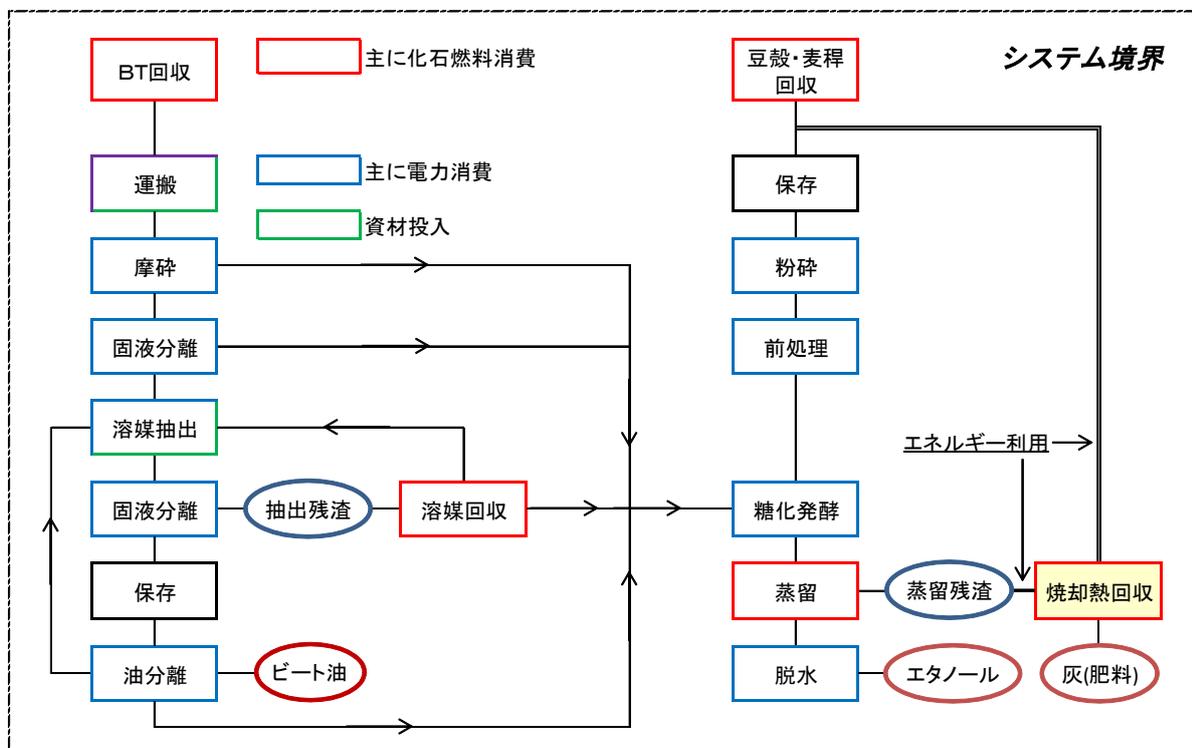


図 6.3 システム境界

上記を基本シナリオとし、環境負荷低減シナリオでは、蒸留残渣をBE製造プロセスにおける重油代替燃料としてエネルギー利用した場合のCO<sub>2</sub>排出量を検討した。さらに、収穫した豆殻・麦稈の一部も重油代替燃料として利用する場合を検討した。利用形態はバイオマスボイラーにて発生した蒸気を最大限に電力に変換し、他を蒸気として熱源利用することとし、変換効率を電力13%、熱67%とした。

### (3) 経済性評価

6.2(1) プロセスの最適化の項で設定されたビートトップ油およびバイオエタノール生産プロセスの変動費(原料費、薬品類費用、ユーティリティ費用、ビートトップ油生産費用等)について概算し、経済性評価を行った。ビートトップ油の生産費用、販売利益をバイオエタノールの生産費用に換算し、バイオエタノールの生産価格がどの程度低減できるかについて検討を行った。以下に費用別の設定仕様を示す。

#### 1) 原料費

麦稈の収集、運搬にかかる費用は、農林水産省が実施したソフトセルロース利活用技術確立事業での大型ロールバール(φ1.5m×高さ1.2m)を用いた稲わらに関する検討結果<sup>15)</sup>から、麦稈も同様と考え、

13.7 円/kg-dry（運搬費用 16km 分含む）とした。また、豆殻のうち大豆殻は一般に圃場に鋤込まれている場合が多く、小豆殻は病害防止のため、野焼きされていることが多い。特に小豆殻は農家による収集、運搬が期待されるため、機器のメンテナンス等に係る経費を計上した値 2.4 円/kg-dry<sup>16)</sup>を豆殻の収集運搬費とした。

ビートトップについては、民間企業が開発中のビートハーベスタを改良したビートトップハーベスタで収集が可能であることが分かった。収集コストはビートハーベスタと同等とすると 1 畦牽引式で 171,248 円/ha<sup>17)</sup>、ビートトップの発生量はビート収穫量と同じであるとする、帯広市、芽室町、音更町のビート栽培面積 9,350ha<sup>1)</sup>、同ビート収穫量 639,900 トンから、ビートトップの収穫費用を 2.5 円/kg-wet とした。また、ビートトップの運搬費用は、10 トントラック 1 ヶ月、1 台当たりの運送単価 850,976 円 / (台・月)<sup>18)</sup>を用いた。3 市町内での往復移動距離 25km、1 日輸送可能回数 8 回、ビートトップ輸送量を 22 万トンとすれば輸送経費は 0.4 円/kg-wet となる。よって、ビートトップの収集費用を 2.9 円/kg-wet とした。

## 2) 電力費

このシステムでは、バイオエタノール発酵工程で排出される蒸留残渣を脱水後、バイオマスボイラで燃焼させ発電（出力約 1.6MW）と余剰の蒸気を所内の熱源として利用することとした。リグニンの含有率から供給熱量を算出し、発電効率を 13%（熱利用率 67%）と仮定して、単位バイオマス当たりの電力取得量をビートトップ：213kWh/t-dry 麦稈：115kWh/t-dry、豆殻：99kWh/t-dry とした。電力料金は 11 円/kWh とした。所内で使用する電力を超過する場合に売電を行うこととし、固定価格買い取り制度 (FIT) のバイオマス廃棄物（木質以外）燃焼発電買い取り料金 17.85 円/kWh を売電単価とした。バイオエタノールの生産に消費する電力使用量は、LCA の検討結果を使用した。

## 3) A 重油、工業用水

LCA の検討結果より、ビートトップ油、バイオエタノール生産ラインで消費される A 重油量はそれぞれ 1,540kL/y、4,290kL/y で、合計 5,830kL/y であった。サーマルリサイクルした際に得られる熱回収量を A 重油換算し、A 重油使用量から差し引いた。A 重油の単価は 77 円/L とした。

工業用水については、工場建設を想定している芽室町の工業団地では地下水の利用が一般的であるので、経済的な評価は行わないこととした。

## 4) 薬品類

麦稈、豆殻の前処理で使用する水酸化ナトリウムや硫酸については、これまでの試験結果に基づいて使用量を決定した。水酸化ナトリウムおよび硫酸の単価はそれぞれ、55 円/kg（液状、固形 97%換算）、23 円/kg である。糖化・発酵過程で使用するセルラーゼについては、工場内で生産する。そのための生産コストは NREL/TP-5100-47764<sup>19)</sup>で示された 5 円/L-ethanol とした。

## 5) 排水処理

排水処理に係る費用については、NREL/TP-5100-47764<sup>19)</sup>で示された 1 円/L-ethanol とした。

## 6) ビートトップ油生産

2. 2 5) で示されたビートトップ油素材の製造工程において、バッチ処理で精製ビートトップ油 20kg を生産するものとして費用等を見積もった。生産に必要な吸着剤、活性炭は 250kg、100kg であり、それらの単価は 400 円/kg、500 円/kg である。抽出に必要なエタノールはバイオエタノール製造で得られたものを使用する。排水処理などの費用を 10,000 円/20kg とした。

精製されたビートトップ油を抗酸化材などと混合させてソフトカプセルを製造した場合、1 カプセルを 200mg、内ビートトップ油 50mg 含有すると 20kg の原料油から約 40,000 カプセル製造することができる。その製造コストを 50 万円とした。一月分 60 カプセルを一箱とすると、40,000 カプセルは約 650 箱に相当し、4,000 円/箱で販売できると想定した。

## 6. 3 結果

### (1) プロセスの最適化

22 万トン（水分 87%）のビートトップおよび 3.5 万トン（水分 15%）の麦稈、豆殻からビートトップ油 5.2 トン、バイオエタノールを 1.5 万 kL 製造するプロセスを提案した（図 6.4）。以下にその概要を示す。

ビートトップからの油およびバイオエタノール製造はビート収穫開始時期の 10 月から 150 日間とし、保存が比較的容易な麦稈・豆殻からのバイオエタノール製造は、それに続く 150 日間とした。ビートトップは摩砕されたのち一部が固液分離され、得られた固形分から脂溶性物質がエタノールによって抽出される。抽出に必要なエタノールは糖化・発酵によって製造されたエタノールとし、ビートトップ油生産後、再利用する。脂溶成分を含むエタノール溶液は固液分離され、得られた液分を低温環境下（寒冷外気を利用）で遮光しながら保存する。必要に応じて保存された脂溶成分を含むエタノール溶液をビートトップ油精製工程に導入し、3 月までの寒冷時期にビートトップ油を精製する。ビートトップ油精製工程の詳細は 2. 2 5) 項を参照のこと。ビートトップ摩砕後のほとんどの原料は、そのままバイオエタノール製造の糖化・発酵工程へ導入される。また、摩砕されたビートトップの固液分離後の液分、脂溶成分抽出エタノール溶液の固液分離後の固形分、ビートトップ油精製後の糖を含んだ廃液はともに、バイオエタノール糖化・発酵工程へ導入される。

一方、麦稈、豆殻は粉碎、前処理（アルカリ処理+爆砕処理）後に同時糖化・発酵され、蒸留、脱水を経て 99.5%のエタノールとして製品化される。蒸留残渣は脱水後、発電、余熱回収される。排出される灰分は再び圃場へと還元される。

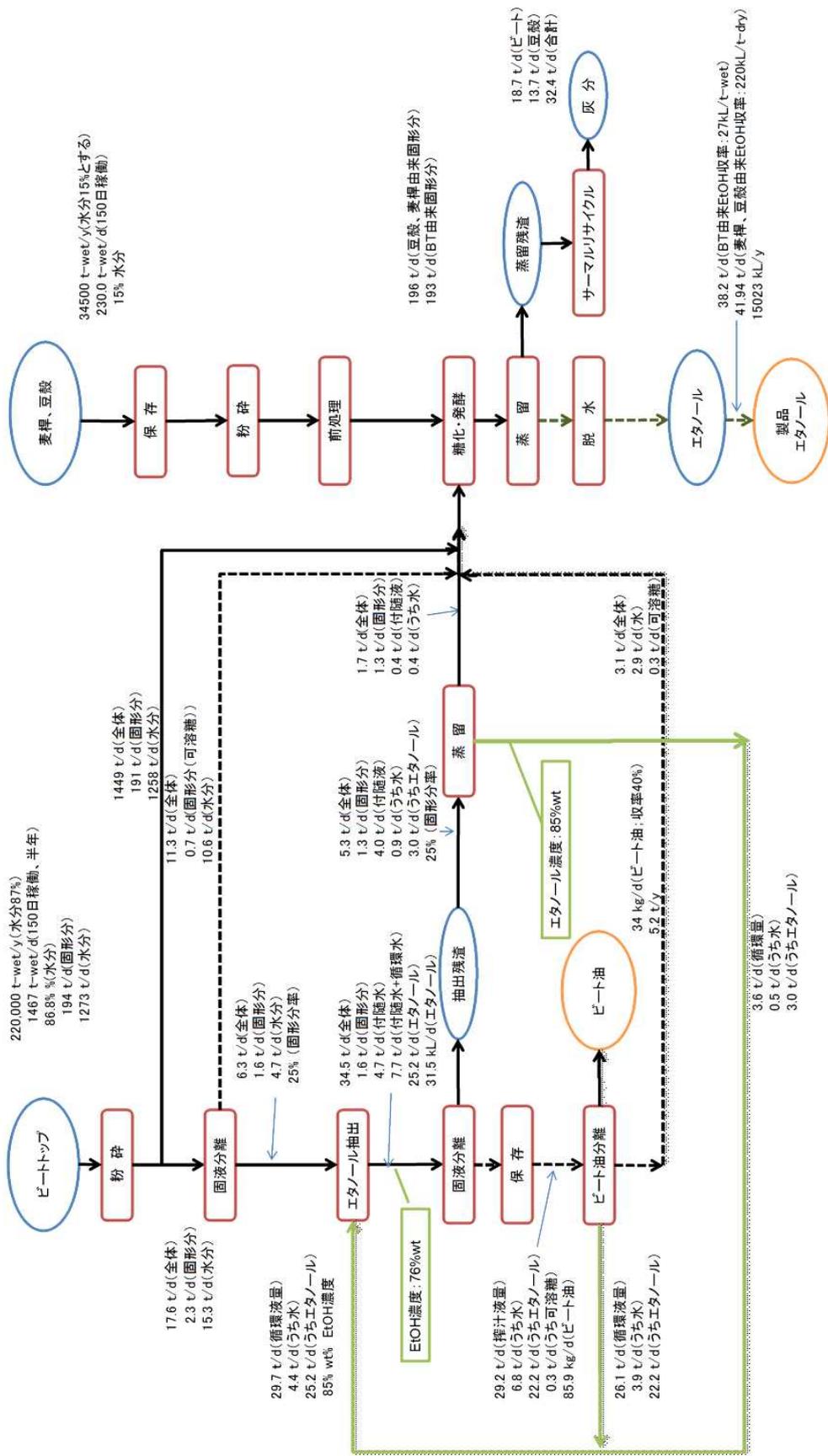


図6.4 ビートトップ油5.2t/yとバイオエタノール1.5万kL/y生産プロセス

(2) LCA 評価

図 6.5 に BE 生産量 15,000kL/y と想定した場合の機能単位あたりの CO<sub>2</sub> 排出量を示した。比較として示した事例データは 15,000kL/y 規模の稲わら (事例 1) および規格外小麦 (事例 2) からの BE 製造である。本研究での CO<sub>2</sub> 排出量は 81kg-CO<sub>2</sub>/GJ-BE であり、事例データの 31~50kg-CO<sub>2</sub>/GJ-BE に比較して高い排出量となっている。特に豆殻・麦稈エタノール化工程における排出量が高く、63kg-CO<sub>2</sub>/GJ-BE であり、その 70%以上がアルカリ処理および蒸煮爆砕処理の前処理に投入される重油由来の排出であった。

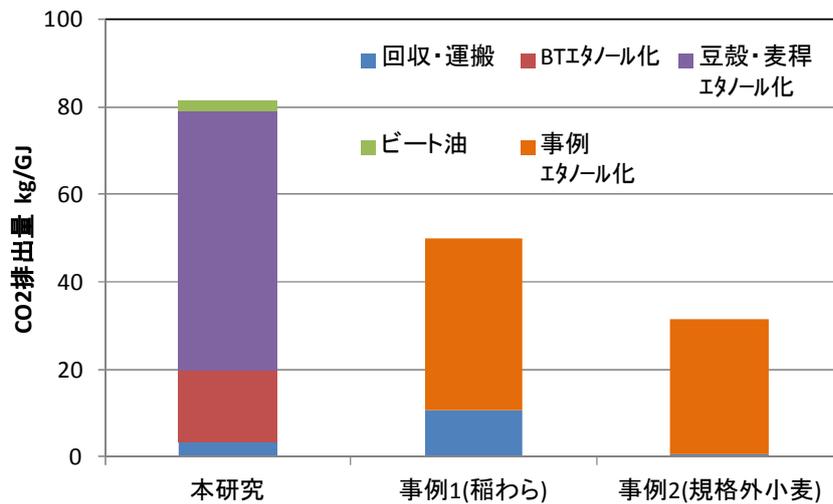


図 6.5 機能単位あたり CO<sub>2</sub> 排出量 (化石燃料投入時)

そこで、環境負荷低減シナリオでは、エタノール化工程の蒸留廃液を脱水した蒸留残渣 (リグニン) をバイオマスボイラーにて燃焼し、工程に必要なエネルギーに全量を使用して、重油および電力消費量を削減した。さらに、負荷低減方策として一部の豆殻・麦稈を、粉碎後にバイオマスボイラーの燃料として使用し、重油および電力消費量を削減した場合の CO<sub>2</sub> 排出量を算出した。

表 6.4 に各環境負荷低減シナリオにおける蒸留残渣および豆殻・麦稈の使用量を示した。各シナリオにおける CO<sub>2</sub> 排出量を図 6.6 に示した。

全エネルギーを化石燃料投入により生産したシナリオ 1 に対し、蒸留残渣のみを燃焼利用したシナリオ 2 では CO<sub>2</sub> 排出量が 56kg-CO<sub>2</sub>/GJ-BE であり、30%の CO<sub>2</sub> 排出が削減された。さらに、豆殻・麦稈の燃焼利用では利用率にしたがい CO<sub>2</sub> 排出量は削減され、25%燃焼利用では 39kg-CO<sub>2</sub>/GJ-BE となった。BE 原料である豆殻・麦稈の燃焼利用により重油使用量が削減されたほか、BE 原料量の減少により前処理に投入されるエネルギー量が削減されたためである。しかし、工程所要エネルギー量も減少することから、25%を超えた燃焼利用では、CO<sub>2</sub> 排出量の削減効果は得られなかった。

表 6.4 環境負荷低減シナリオ

	蒸留残渣利用	豆殻・麦稈利用
シナリオ1	利用なし	利用なし
シナリオ2	全量利用	利用なし
シナリオ3	全量利用	5%利用
シナリオ4	全量利用	10%利用
シナリオ5	全量利用	25%利用

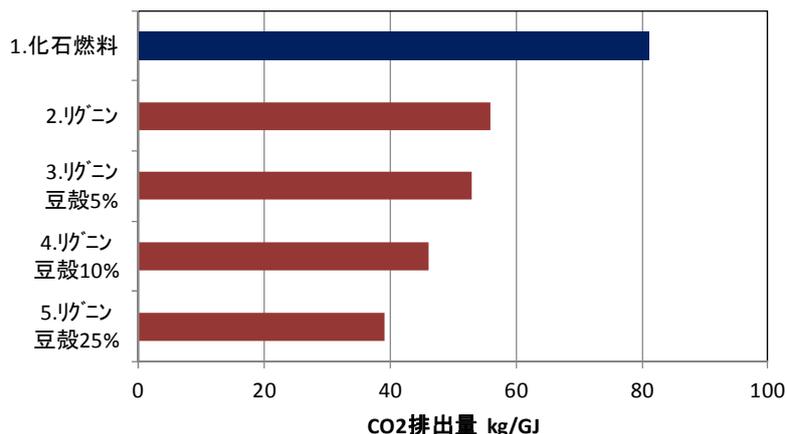


図 6.6 機能単位あたり CO<sub>2</sub> 排出量 (蒸留残渣および豆殻等燃焼)

### (3) 経済性評価

表 6.5 に経済性評価 (変動費のみ) の結果を示す。各原料の設定した収集価格で計算した結果、原料費は 59 円/L-BE であり、そのうち 42 円/L-BE はビートトップの収集費用であった。1 畦収集から複数畦収集などビートトップハーベスタの改良により、収集にかかる費用を低減できると思われた。リグニン燃焼ボイラによる発電が行われない場合、所内で消費される電力料金は 9 円/L-BE と推算されたが、発電により 7 円/L-BE 安くなり 2 円/L-BE に軽減されている。今回想定された発電出力が 1.6MW と小さいため想定される発電効率が 13%程度と低かった。エタノール生産規模を大きくすることによって発電規模を大きくできれば、発電効率が上昇するのでさらに電力料金が低減できると思われた。リグニン燃焼ボイラによる熱供給がない場合、A 重油使用料は 22 円/L-BE であった。リグニン燃焼ボイラによる熱供給によりその費用は 14 円/L-BE に軽減された。このように、リグニンの燃焼による電気、熱の回収は経済上重要であることが分かった。

ビートトップ油の生産費用はエタノール 1L 当りに換算すると 11 円/L-BE であった。一方、ビートトップ油カプセルの販売により 42 円/L-BE の収入が見込まれ、全体として 31 円/L-BE の価格が低減できることが示された。

以上のことから今回、提案したプロセスにおけるバイオエタノールの変動費は 71 円/L-BE となり、100 円/L-BE を大幅に下回る価格となることが分かった。

表 6.5 経済性評価結果

項目		単位	数値	備考	
計画生産規模	規模	kL/y	15000		
	麦わら、豆殻	kL/y	7830		
	ビートトップ	kL/y	7170		
処理量	麦わら、豆殻	t/y	35591		
	ビートトップ	t/y	28160		
変動費	原料費	円/L	59	麦等13.7円/kg-dry、豆殻2.4円/kg-dry、ビートトップ(BT): 2.9円/kg-wet	
	電力売電	円/L	0	FIT/バイオマス廃棄物(木質以外)燃焼発電17.85円/kWh	
	電力使用	円/L	2		
	A重油	円/L	14		
	工業用水	円/L	0		
	薬品類	NaOH	円/L	14	
		硫酸	円/L	3	
		酵素	円/L	5	NRELの酵素生産の5.1円/L
		その他	円/L	5	日本アルコール協会ベース、軟水剤など
	小計	円/L	27		
	排水処理	円/L	1	NRELベース	
ビート	生産費用	円/L	11	3.3万円/kg-BT油	
トップ油	売油収入	円/L	-42	13万円/kg-BT油	
合計	円/L	71			

#### 6. 4 結論

北海道十勝地方の各市町村の各作物（ビートトップ、大豆、小豆、麦）の収穫量から農産廃棄物量を推定し、ビートトップ油およびバイオエタノール生産工場を芽室町に建設して平均収集距離が往復で25kmの3市町からなる収集範囲を設定した。

この収集範囲から22万トン（水分87%）のビートトップおよび3.5万トン（水分15%）の麦稈、豆殻を収集し、ビートトップ油5.2トン、バイオエタノールを1.5万kL製造するプロセスを提案した

プロセスのLCA評価では、農産廃棄物であるビートトップおよび豆殻・麦稈を原料としたBE生産におけるCO<sub>2</sub>排出量は81kgCO<sub>2</sub>/GJであるが、蒸留残渣（リグニン）および豆殻・麦稈を燃焼して投入エネルギーに利用することにより約50%削減され、39kgCO<sub>2</sub>/GJとなった。また、ビートトップ油生産におけるCO<sub>2</sub>排出量は、生産規模がBEに比較して小さいため、全体に対する影響は僅かであった。

経済性評価では、原料費が59円/L-BEと最も高かった。しかし、蒸留残渣（リグニン）の発電、熱源利用により12円/L-BE、さらにビートトップ油カプセルの販売により31円/L-BE低減されることが分かった。結局BE生産価格は71円/L-BE（変動費のみ）となり、100円/L-BEを大幅に下回る価格となることが分かった。

## 6. 5 参考文献

- 1) 北海道十勝総合振興局、「十勝の農業」資料編 平成 25 年 12 月  
[http://www.tokachi.pref.hokkaido.lg.jp/ss/num/2013tokachi\\_siryou.pdf](http://www.tokachi.pref.hokkaido.lg.jp/ss/num/2013tokachi_siryou.pdf)
- 2) 中辻敏朗他、戦略研究報告書「地球温暖化と生産構造の変化に対応できる北海道農林業の構築」 45-47(2014)
- 3) 北海道農政部生産振興局農産振興課ホームページ、「5. 麦ができるまで」  
[http://www.pref.hokkaido.lg.jp/ns/nsk/mamemugi/mugi\\_change\\_mugigadekirumade.htm](http://www.pref.hokkaido.lg.jp/ns/nsk/mamemugi/mugi_change_mugigadekirumade.htm)
- 4) (公財) 日本豆類協会ホームページ、「あずきー産地における栽培概要ー総論」  
[http://www.mame.or.jp/saibai/azu\\_souron.html](http://www.mame.or.jp/saibai/azu_souron.html)
- 5) (地独) 北海道立総合研究機構農業研究本部十勝農業試験場大豆科ホームページ、「北海道におけるダイズ栽培の地帯区分と品種選択」  
<http://www.agri.hro.or.jp/tokachi/soy/doc/chitaikubun.htm>
- 6) ホクレン農業協同組合連合会ホームページ「てんさい糖ができるまで」  
<http://www.tensaito.com/process/>
- 7) 北海道バイオ燃料地域協議会：“バイオ燃料地域利用モデル実証事業平成 2 1 年度事業評価報告書”  
[http://www.maff.go.jp/j/shokusan/zyunkan/biomass/bio\\_model01/pdf/haihu\\_siryo05.pdf](http://www.maff.go.jp/j/shokusan/zyunkan/biomass/bio_model01/pdf/haihu_siryo05.pdf)
- 8) 折笠貴寛ら：“稲わらのバイオエタノール資源としての評価”、第 4 回日本 LCA 学会研究発表会講演要旨、(2009)、pp.300-301
- 9) 楊翠芬ら：“稲わらからのバイオエタノール生産システムに関する評価”、日本 LCA 学会誌、vol5、No4(2009)、pp.501-509
- 1 0) 十勝圏振興機構：“北海道十勝地域の規格外農産物および農産加工残渣物利用におけるバイオエタノール変換システムに関する事業化可能性調査報告書”、(2005)
- 1 1) 増田清敬ら：“各種技術の導入によるバイオエタノール生産の温室効果ガス削減効果の評価”、第 3 回日本 LCA 学会研究発表会講演要旨、(2008)、pp.168-169
- 1 2) 三津橋浩行：LCA の実務、産業環境管理協会、(2005)、pp.42-54
- 1 3) 環境省：“バイオ燃料の温室効果ガス削減効果に関する LCA ガイドライン”、(2010)
- 1 4) 国立環境研究所地球環境研究センター：“産業連関表による環境負荷原単位データブック (3EID) ”、(2005)
- 1 5) (社) 地域環境資源センター 第一部ソフトセルロース利活用技術確立事業 (2) 兵庫県ソフトセルロース利活用プロジェクト No.7、8-17 (2011)
- 1 6) 芽室町 農業残渣からのエネルギー！豆殻、長いもつる・ネットペレットプロジェクト (平成 20 年度) 報告書、63-67 (2008)
- 1 7) (社) 北海道てん菜協会 てん菜自走式多畦ハーベスタの導入による低コスト精算に向けて、特産種苗 No.11、54-57(2011)
- 1 8) 国土交通省自動車局貨物課、(社)全日本トラック協会 トラック運送事業の運賃・原価に関する調査報告書、44-47(2010)

1 9 ) D.Humbird, R.Davis, L. Tao, C. Kinchin, D. Hsu, and A. Aden Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover NREL/TP-5100-47764 (2011)

## 7. 総まとめ

原料収集、保存に関する検討では、原料の賦存量を明らかにした。また、企業が開発しているビートトップ回収機によるビートの回収が可能であることが分かった。また、糖類、カロテノイドについて9ヶ月まで長期保存できる条件を見いだした。また、カロテノイドは、遮光+低温により著しく保存性が改善された。

原料に含まれる有用成分評価では、ビートトップ脂質量や成分を明らかとし、ビートトップ脂質中のネオキサンチンの生物活性とその分子機構の一端を解明すると共に、グリセロ糖脂質の酸化安定性が格段に高いことを見出した。さらに、製品化プロセスを確立した。

原料の前処理では、グルコース収率は麦稈が90%、大豆殻は77%となる前処理条件を見いだした。安定した運転が可能な連続前処理装置の開発を行った。

同時糖化発酵では、創製した機能性温度ストレス耐性酵母は高温におけるセルロース原料からの同時糖化発酵において高いエタノール生産性を示した。また、高温糖化により液化が早期に進行し、糖化発酵効率が向上することが認められた。

エタノール蒸留残渣焼却灰の成分評価では、ビートトップ灰、麦稈灰、大豆殻灰の全てが粗製加里塩の基準以上の酸化カリウムを含有しており、肥料として安全に利用できることが分かった。

以上の研究結果を踏まえて、北海道十勝地方にモデルを設定しビートトップ油とバイオエタノールの生産プロセスを提案し、そのプロセスについてLCA評価、経済性評価を行った。

これらより、農産廃棄物から有用物質を生産し、その残渣を利用したバイオエタノール生産プロセスを構築し、価格競争力のあるバイオエタノール生産体系を確立できた。

## 8. 学会発表等

### 学会発表等

- 1) 前多隼人・阿部美菜子・細川雅史・宮下和夫・片方陽太郎. 小松菜に含まれるネオキシサンチンによる脂肪細胞での代謝調節作用. 第25回カロテノイド研究談話会, 2011年9月13日~9月14日.
- 2) Yamaguchi, T., Shimajiri, J., Abe, M., Hosokawa, M. and Miyashita, K. Oxidative stability of glyceroglycerolipids containing high levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids. International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods 2011, November 14-17, 2011, Sapporo.
- 3) Kamogawa, H., Hosokawa, M., Abe, M. and Miyashita, K. Anti-obesity effect of vegetable allenic-carotenoid, neoxanthin. 103<sup>th</sup> AOCS Annual Meeting & Expo, April 29-May 2, 2012, Long Beach, USA. (Poster)
- 4) Miyashita, K., Yamaguchi, T., Suda, M., Shimajiri, J., Abe, M. and Hosokawa, M. Oxidative characteristics of omega-3 PUFA in glyceroglycerolipids. 10th Euro Fed Lipid Congress. November 23-26, 2012, Cracow, Poland.
- 5) Miyashita, K., Yamaguchi, T., Shimajiri, J., Abe, M. and Hosokawa, M. Oxidative stability of omega-3 PUFA in polar lipids. World Congress on Oleo Science & 29th ISF Congress. September 30-October 4, 2012, Sasebo, Japan.
- 6) Miyashita, K., Yamaguchi, T., Yamane, K., Abe, M., Hosokawa, M. Oxidative characteristics of glyceroglycerolipids. 2013 The 80<sup>th</sup> Annual Meeting of KoSFoST, August 28-30, 2013, Cheonan, Korea. (Invited)
- 7) Miyashita, K., Hosokawa, M. Antioxidant characteristics of polar amino lipids. 2013 International Conference on Nutraceuticals and Functional Foods, November 5-9, 2013, Taipei, Taiwan.
- 8) 加茂川寛之・細川雅史・宮下和夫, 糖尿病/肥満モデル KK-Ay マウスの血糖値に対するアレンカロテノイドの影響. 平成25年度日本水産学会春季大会, 2013年3月26~3月30日.
- 9) 北口敏弘・三津橋浩行・山越幸康・富田恵一・近藤昭彦・宮下和夫. 農産廃棄物循環利用バイオエタノール製造システムの構築. 第23回廃棄物資源循環学会研究発表会, 2012年10月22日~10月24日, 仙台
- 10) 北口敏弘・三津橋浩行・山越幸康・富田恵一・近藤昭彦・宮下和夫. 農産廃棄物循環利用バイオエタノール製造システムの構築(第二報). 第24回廃棄物資源循環学会研究発表会, 2013年11月2日~11月4日, 札幌.
- 11) 北口敏弘, 三津橋浩行, 山越幸康, 富田恵一, 高橋 徹. カスケード型バイオエタノール製造システムの構築、(地独)北海道立総合研究機構工業試験場技術移転フォーラム、2013年5月、札幌
- 12) 北口敏弘, 三津橋浩行, 山越幸康. 農産廃棄物カスケード型循環利用バイオエタノール製造システムの開発. 平成24年度産業技術連携推進会議東北地方部会秋季合同分科会、2013年10月31日、仙台
- 13) 北口敏弘, 三津橋浩行, 山越幸康. 農産廃棄物カスケード型循環利用バイオエタノール製造システムの開発. 平成24年度産業技術連携推進会議北海道地域部会合同分科会、2014年2月18日、札幌

### 論文発表

- 1) Yamaguchi, T., Sugimura, R., Shimajiri, J., Suda, M., Abe, M., Hosokawa, M., Miyashita, K. Oxidative stability of glyceroglycerolipids containing polyunsaturated fatty acids. *J. Oleo Sci.*, 61, 505-513 (2012).
- 2) 加茂川寛之・細川雅史・阿部真幸・宮下和夫. クロレラに含まれるカロテノイドの定量とケン化反応による濃縮. *北大水産彙報*, 62, 83-88 (2012).

9. 知的財産取得状況

なし

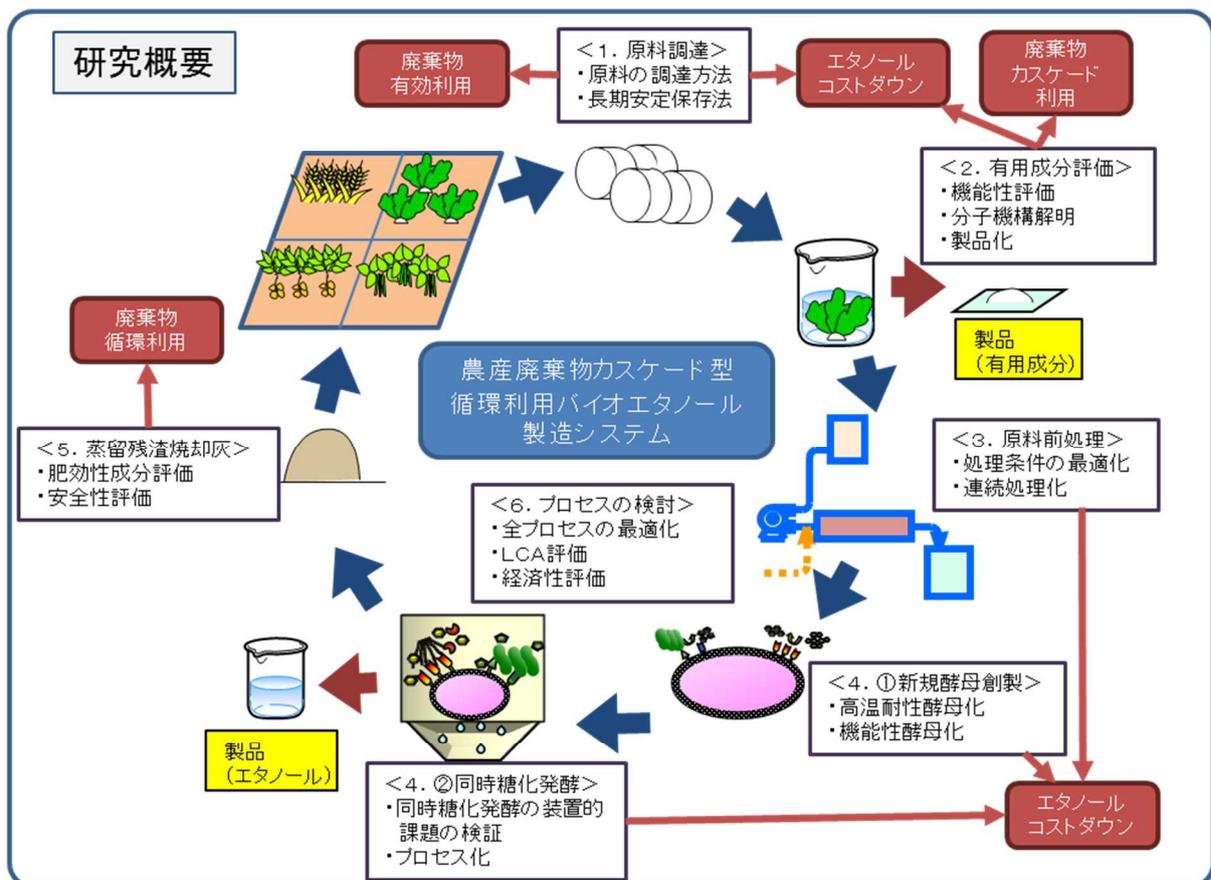
「農業廃棄物カスケード型循環利用バイオエタノール製造システムに関する研究」

背景

- 化石燃料からの脱却  
→セルロース系バイオマスを利用したバイオエタノール製造コストの削減
- 農産廃棄物の圃場への鋤込み  
→地球温暖化ガスの発生
- 持続可能型地域バイオマス利用システム技術の確立が望まれている

目的

- ビートトップなどのセルロース系農業廃棄物から有価物を回収して廃棄物のカスケード利用を図り、効率的なエタノール製造方法を検討し、安価なバイオエタノール製造技術体系を確立し、地球温暖化防止に貢献する。
- エタノール蒸留残渣のサーマルリサイクル後に得られる焼却灰を肥料等として圃場還元する廃棄物循環利用システムを構築する。



期待される成果

- 農業廃棄物のカスケード利用、循環利用が可能となり、廃棄物の鋤込みあるいは野焼きが抑制され、亜酸化窒素などの地球温暖化ガス発生抑制に貢献。
- セルロース系廃棄物を原料とすること及び有価物を回収、商品化するカスケード利用により、安価なバイオエタノール製造技術が確立され、地球温暖化ガス抑制に貢献。
- このシステムは北海道オホーツク、道北、道南地方など他の畑作地域にも応用展開が可能。
- 農業廃棄物からエタノール抽出した有用物質の機能性、活性成分の同定、その作用機序が明確化。
- エタノールによる有用物質抽出後の残渣を対象とした新たな前処理技術に関する知見の取得。
- 高温耐性を持つ細胞表面提示酵母の創製は、省エネルギー、低コストな糖化発酵プロセスが実現可能。さらに、高温耐性遺伝子の特定は、様々な機能性酵母への人為的な高温耐性の付与が可能。
- バイオエタノール蒸留残渣のサーマルリサイクル後に得られる焼却灰の肥効性や安全性に関する知見の取得。

## 1.1. Outline in English

The purpose of this study is construction of economically competitive bio-ethanol production system by cascading of the agricultural residue. Cascading of the agricultural residue lowers the expence of bio-ethanol production. The top of the sugar beet (beettop) is a candidate for the cascading residue. It has considerable content of Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) and carotenoids. It was found that abundance of beettop is 430,000t-dry/y in Hokkaido. We studied on producing bio-ethanol from agricultural residues such as wheat straws, bean stalks and pods in combination with the cascading of beettops. The research outline is shown below.

Omega-3 PUFA and carotenoids such as neoxanthin were found as major compounds in ethanol extracts from beettops. Omega-3 PUFA is known to reduce the risk of cardiovascular diseases. In addition, we have found that neoxanthin effectively decreased the abdominal fat weight and improved lipid metabolism of obese-model animals. Therefore, the present study suggested that ethanol extracts from the beettops will apply to functional food materials.

Storage tests for beettops were performed for the sugar and the carotenoid contents. Contents of sugars were constant values by spraying high concentration ethanol after 9 months storage. Contents of carotenoids were almost initial values by storage of ethanol solutions extracted from beettops without light after 9 months.

We found that water and ethanol extractives from the beettops were major compounds and there was much sugar in it. So it was suggested that the construction of a process combined with the residual substance of extracts was important.

Sugar residual ratios of agricultural residues were high values by pretreatments of immersion in alkaline aqueous solution followed by steam explosion.

We developed the cellulase expression-optimized diploid yeast *Saccharomyces cerevisiae* for efficient degradation of cellulose using our novel cocktail  $\delta$ -integration method. By using the yeast strain, we succeeded in producing ethanol directly from agricultural residues without the addition of exogenous enzymes. Besides, we constructed a thermotolerant *S. cerevisiae* by ultra violet irradiation. The mutant yeast strain could grow at 39 °C.

In order to reduce the energy consumed in a distillation process, we investigated the influence on the saccharification simultaneously and fermentation (SSF) by the increase in solid content. It is found that the mixing of reactant is key factor to proceed saccharification and fermentation.

Potassium content in the ash of the beettops was enough high to utilize as fertilizers.

Finally, we proposed commercially sustainable system to produce both bio-ethanol and functional food material from agricultural residues.