

平成25年度 ものづくり中小企業連携支援事業

(戦略的基盤技術高度化支援事業)

「織染技術を高度化した綿繊維からの高効率バイオエタノール生産技術の開発」

研究開発成果等報告書

平成26年 3月

委託者 四国経済産業局

委託先 一般財団法人 四国産業・技術振興センター

目 次

第1章 研究開発の概要	1
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1-1-1 研究の目的	1
1-1-2 研究の概要	1
1-1-3 実施内容	2
① 繊維加工技術を応用した前処理技術の開発	2
② 酵素固定化技術を活用した酵素再使用技術の開発	2
③ 前処理技術および酵素再使用技術を利用できる実証装置の開発	3
④ プロジェクトの管理・運営	4
1-2 研究体制	5
1-2-1 研究組織及び管理体制	5
1-2-2 研究員及び管理員	7
1-2-3 経理担当者及び業務管理者	8
1-2-4 研究開発推進体制	9
1-3 成果概要	10
1-4 当該研究開発の連絡窓口	13
第2章 本論	13
① 繊維加工技術を応用した前処理技術の開発	13
①-1 前処理技術の開発	13
①-2 前処理技術効果の測定・検証	17
② 酵素固定化技術を活用した酵素再使用技術の開発	19
②-1 水溶性多糖の糖化に有効な酵素の選定	19
②-2 固定化酵素の製作・評価	20
②-3 固定化酵素を用いた糖化条件の確立および繰り返し使用回数の検証	22
③ 前処理技術および酵素再使用技術を利用できる実証装置の開発	25
③-1 装置の設計	25
③-2 装置の製造・設置	25
③-3 装置の運営	26
最終章 全体総括	32

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

1-1-1 研究の目的

綿繊維（故繊維）からバイオエタノールを製造する工程のコストを削減する。このために、織染技術を高度化し、綿繊維の結晶化度を低減する前処理技術や、酵素を繰り返し使用する技術（固定化酵素）を開発する。これらの技術は、従来の染色設備を使用し、低コストで実施できるため、国内外への普及も容易である。

綿繊維からバイオエタノールを製造するプロセスは Fig.1 のとおり、まず、酵素により綿繊維を単糖まで分解（糖化）し、単糖を発酵させてバイオエタノールとする。得られたバイオエタノールは、重油と混合することで、ボイラー燃料として繊維加工に使用する。

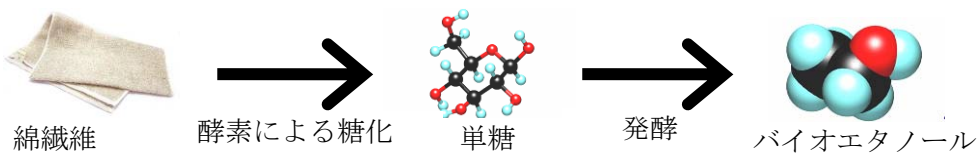


Fig.1 綿繊維からのバイオエタノール製造プロセス

綿繊維くずの調達経路とバイオエタノールの利用方法は Fig.2 のとおり想定している。タオル製造事業者から排出される綿繊維くずを活用して繊維リサイクル工場で作成したバイオエタノールは、販売せずに繊維染色工程等の燃料としてタオル加工用に利用することで、製品（タオル）は環境配慮型商品となる。

これまでの実験データから算出したバイオエタノール製造コストの内訳（Fig3）は、製造コストの78%を変動費が占め、そのうち、酵素費用が69%を占めている。この変動費を削減できれば、採算性が向上し、参画企業の増加が見込めるため、環境配慮商品の普及促進・低価格化が期待できる。

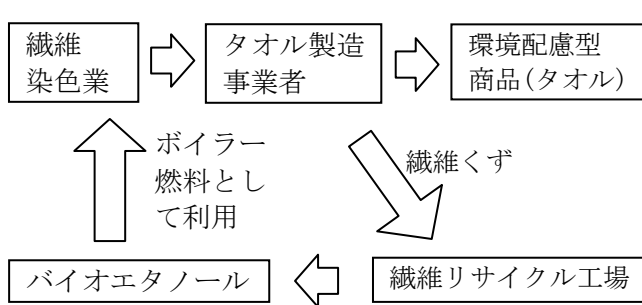


Fig.2 繊維くずの調達経路とバイオエタノールの利用方法

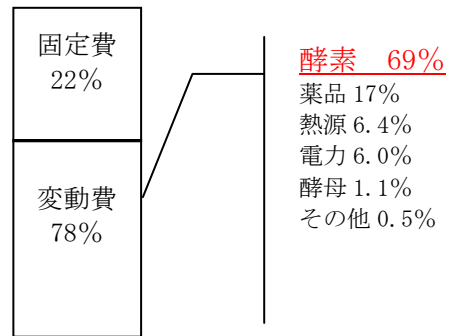


Fig.3 これまでの実験データから算出したバイオエタノール製造コストの内訳

1-1-2 研究の概要

焼却処分されている繊維くずの有効利用と環境配慮型のタオルの販売というタオル製造事業者のニーズがあるため、織染技術の高度化により、高効率なバイオエタノール製造技術を開発する。具体的には、綿繊維の結晶化度を低減して糖化率を向上させる前処理技術と酵素を繰り返し使用する技術（固定化酵素）を開発し、コストを大幅削減する。これにより、多くの繊維製品製造企業の賛同が得られるとともに、国内外の繊維産業への波及も期待できる。

1-1-3 実施内容

高度化目標は「エ. 生分解繊維、天然由来素材の開発や、故繊維のリサイクル技術の開発」として、酵素の使用量の低減により、バイオエタノールの製造コスト（変動費）を50%削減することを目標に、以下のサブテーマについて研究をおこなった。各サブテーマの目標は達成できたものの、変動費の削減は38.4%である。

① 繊維加工技術を応用した前処理技術の開発

(愛媛県繊維産業技術センター、日本環境設計株式会社、大和染工株式会社)

糖化を促進させる前処理技術を開発し、酵素の使用量を低減するために、a) 綿繊維の結晶化度を低下させる方法と b) 綿繊維を帯電させ、酵素の吸着を促進させる方法を検討した。

前処理方法として採用したアルカリ処理によって、今回の研究開発目標である糖化時間80hで糖化率80%を達成する糖化条件を確立した。さらにアルカリ処理による酵素使用量の削減効果を定量化した。

①-1 前処理技術の選定

a) 綿繊維の結晶化度の処理および、b) 酵素を綿繊維に効率的に吸着させる条件の検討

結晶化度を低減させる方法については、強漂白、オゾン処理、アルカリ処理を検討する。強漂白処理は、高温・高圧でアルカリ処理をおこなうことで、より高度な漂白をおこなう場合に用いられる方法である。また、オゾン処理法は、オゾンの酸化作用を利用して綿繊維を漂白する方法である。さらに、アルカリ処理は、綿繊維を高濃度の水酸化ナトリウム水溶液に浸漬する方法である。これらは、実際の染色工場で実施されている方法であり、コストが比較的安く抑えられるため、前処理方法としての実用化の可能性が高い。

酵素を綿繊維に吸着させる方法としては、綿繊維の界面活性剤処理を検討する。これまでのところ、アクチノール（ノニオン系界面活性剤）を添加することで、糖化率の向上を確認した。さらに、最適なアクチノールの添加量についても明らかにした。今後は、強漂白、オゾン処理、アルカリ処理と組み合わせることで、更なる糖化率の改善を目指す。

①-2 前処理技術効果の測定・検証

綿繊維の前処理技術を組み合わせて、綿繊維の糖化率を、糖化時間80hにおいて80%に向上させる。前処理方法としては、前述の、結晶化度を低減させる方法および、酵素の綿繊維への吸着の促進方法を検討した。

② 酵素固定化技術を活用した酵素再使用技術の開発

(愛媛県繊維産業技術センター、日本環境設計株式会社、東洋電化工業株式会社)

通常の酵素と固定化酵素を併用する糖化方法を開発する。固定化酵素は回収・再使用できるため、通常の酵素の使用量を低減できる。

酵素を不溶化した固定化酵素は、回収・再利用が可能で酵素コストを削減するのに効果がある。しかし、綿繊維のような固体に対しては固体の固定化酵素は効果がない。そこで、水溶性多糖類が蓄積される反応系において、その水溶性多糖類を分解するための補助剤としての固定化酵素を開発した。

現状行われている糖化反応に固定化酵素を加えたところ、酵素製剤のみの場合より単糖生成量が向上できることを確認した。また、セロビオースの分解に対する繰り返し利用性について、使用雰囲気での安定性・繰り返し反応回数・連続反応性の

観点から検討し、酵素自身の経時劣化による性能低下量を確認した。1ヶ月(10回利用相当)の使用後の性能から本検討で開発した固定化酵素の性能を算出したところ、原料が全てセロビオースとして蓄積した場合に対しても全てを分解できる試算ができた。

② - 1. 水溶性多糖の糖化に有効な酵素の選定

平成24年度に、NS22074およびM-ACを選定し一旦終了していたが、綿繊維の糖化過程を分析した結果、水溶性多糖類の90%以上が2糖のセロビオースであった。そこで、セロビオース加水分解酵素(セロビアーゼ)に着目し、セルラーゼ製剤中のタンパク質あたりのセロビアーゼ成分が多いものを選定した。但し、今後、新たな酵素が出現した場合には、さらに検討を行う予定である。

② - 2. 固定化酵素の作成・評価

平成24年度の検討にて作成した固定化酵素に関して、活性性能の向上や、繰り返し使用可能の向上などを目的とした改良を行った。また、固定化酵素のコストを削減するため、固定化酵素のリサイクル利用に関する検討を行った。

最もセロビアーゼの固定量が多く、セロビアーゼ活性発現が良かったものに対して、最も効率よく性能が発現できる条件を検討し、固定化酵素を設計した。

さらに、スケールアップ・担体の再利用・ロスの改善などの観点から固定化酵素製造に向けた検討を行い、製造できる目処が付いた。

② - 3. 固定化酵素を用いた糖化条件の確立および繰り返し使用回数の検証

作成した固定化酵素を用いて、水溶性多糖の単糖への分解実験を行い、固定化酵素が効率よく作用することの出来る糖化条件について検討を行う。②-2の検討にて改良を加えた固定化酵素に関して、繰り返し使用可能回数の検証を行った。

繰り返しの使用可能回数としては10回を目標とする。

1ヶ月(10回利用相当)の使用後の性能から本検討で開発した固定化酵素の性能を算出したところ、原料が全てセロビオースとして蓄積した場合に対しても全てを分解できる試算ができた。

③ 前処理技術および酵素再使用技術を利用できる実証装置の開発

(日本環境設計株式会社、大和染工株式会社)

①②で開発した技術を活用した実用的なバイオエタノール製造方法を確立するために、実証装置を製作・運転し、課題抽出、改良等を検討するとともに、ノウハウを集約する。平成25年度は、実証装置を用いた①②の実証試験を行い、機能の確認を行うとともに効率化を図る改良を実施した。

③ - 1. 装置の設計

平成23年度に、染色装置の技術を取り入れた1バッチ0.5トンの綿繊維を糖化できる実証装置を設計した。固定化酵素の充填槽、温調機能、フィルター機構、固定化酵素の交換やメンテナンスを考慮した設備となった。さらに、繊維くずだけでなく、一般の衣料品など、他繊維製品にも応用が可能な設備を検討できた。

③ - 2. 装置の製造・設置

平成24年度までに設計・製造した実証装置および固定化酵素充填槽について、作業性、メンテナンス性を検証し、実証実験を効率的に進めるための改良を実施した。

③ - 3. 装置の運営

③ - 2 で製造・設置した実証装置を運営し、①②の実証試験を実施する。①で開発した前処理技術により結晶化度を低減した綿繊維について糖化実験を実施する。さらに②で開発し、試作した固定化酵素担体を使用して固定化酵素の機能性の発現と繰り返し使用について実証実験を実施する。これらの実証実験の結果は適宜①②へフィードバックしながら進めた。

装置は機能の維持管理のために定期的に保守・点検を実施した。

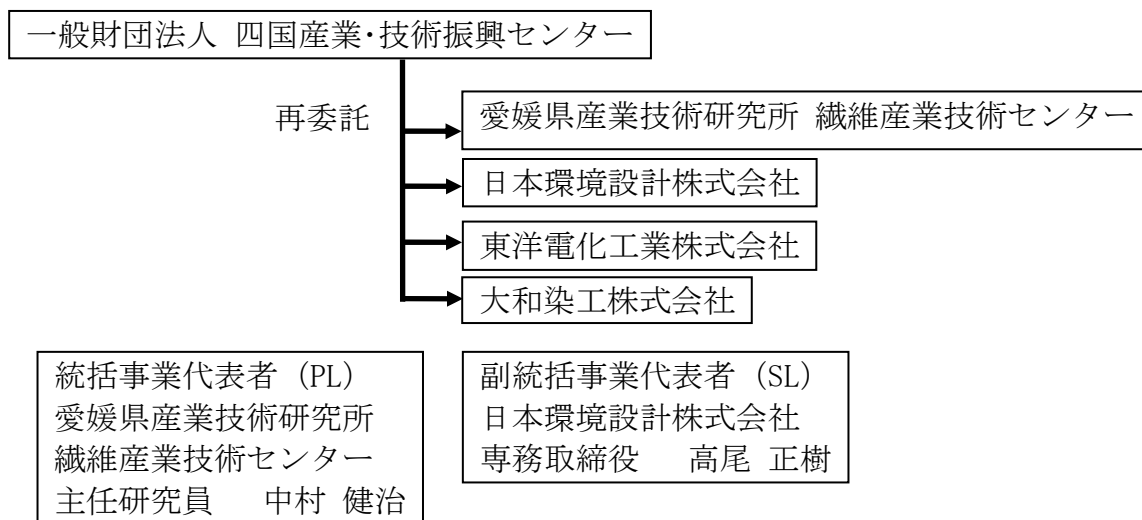
④ プロジェクトの管理・運営 (一般財団法人 四国産業・技術振興センター)

本プロジェクトの効率的かつ円滑な推進を図るため、研究計画全体の企画、進捗管理、研究推進会議の開催、研究成果のとりまとめを行う等研究開発を統括する。

1-2 研究体制

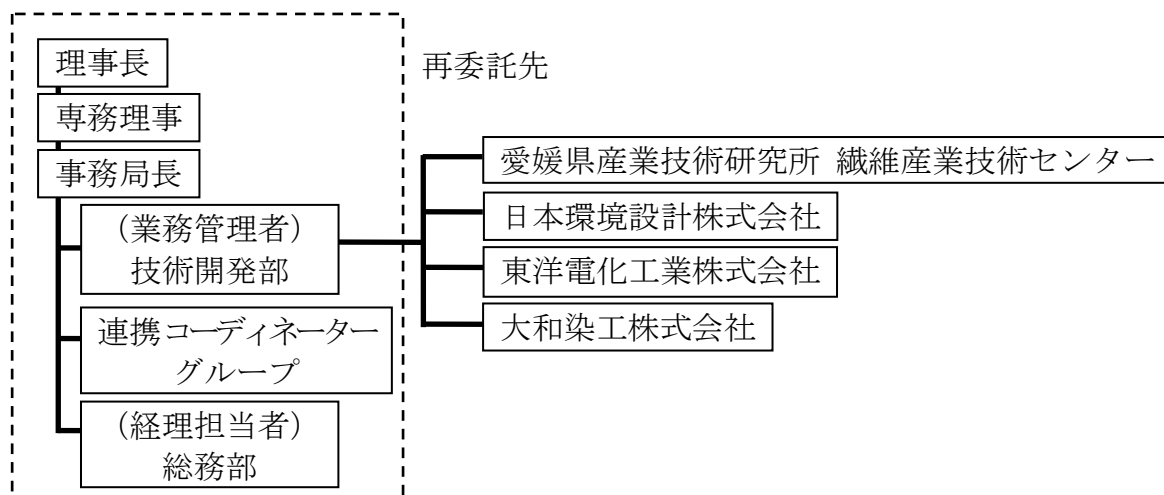
1-2-1 研究組織及び管理体制

1) 研究組織 (全体)



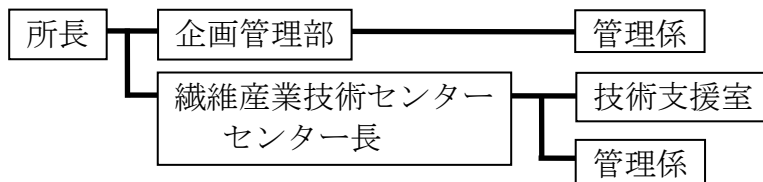
2) 管理体制

① 事業管理者 [一般財団法人 四国産業・技術振興センター]

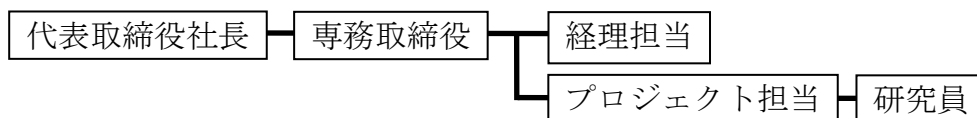


② 再委託先

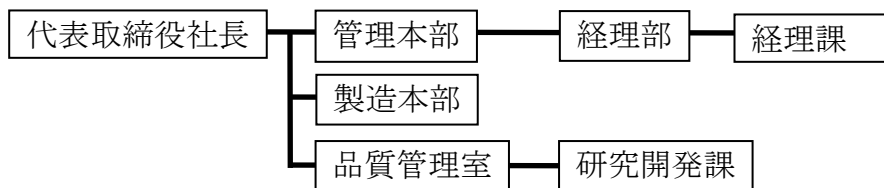
- ・ 愛媛県産業技術研究所



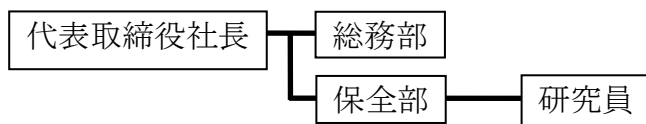
- ・ 日本環境設計株式会社



- ・ 東洋電化工業株式会社



- ・ 大和染工株式会社



1-2-2 研究員及び管理員

【事業管理者（管理員）】 一般財団法人 四国産業・技術振興センター

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
白石 宏志	事務局長	④
武知 隆男	副事務局長	④
兵頭 正洋	連携コーディネーター	④
田村 洋	連携コーディネーター	④
工藤 陽一	連携コーディネーター	④
森 久世司	連携コーディネーター	④
三好 純二	技術開発部長	④
成瀬 英明	技術開発部 部部长	④
濱野 奉彦	技術開発部 副部长	④
川越 伸吾	技術開発部 課長	④
瀬戸 昌子	技術開発部	④

【再委託先（研究員）】

- ・愛媛県産業技術研究所

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
中村 健治	繊維産業技術センター 技術支援室 主任研究員	① ②
新谷 智吉	繊維産業技術センター 技術支援室 主任研究員	① ②
坂本 勝	繊維産業技術センター 技術支援室 主任研究員	① ②

- ・日本環境設計株式会社

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
岩本 美智彦	代表取締役社長	① ② ③
高尾 正樹	専務取締役	① ② ③
吉村 歩	プロジェクト担当 主任研究員 兼 務経理担当	① ③
伊賀 大悟	プロジェクト担当 主任研究員	① ③
中村 崇之	プロジェクト担当 主任研究員	① ③
越智 哲男	研究員	① ③

- ・東洋電化工業株式会社

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
中西 淳一	品質管理室 次長	②
横澤 和憲	品質管理室 研究開発課 主任	②
山本 都志子	品質管理室 研究開発課 研究員	②
日垣 貴文	品質管理室 研究開発課 研究員	②

- ・大和染工株式会社

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
井上 稔也	保全部 工場長	① ③
餌原 裕吉	研究員	① ③

1-2-3 経理担当者及び業務管理者

【管理法人】

一般財団法人 四国産業・技術振興センター
(経理担当者) 総務部長 松岡 義史
(業務管理者) 技術開発部長 三好 純二

【再委託先】

- ・愛媛県産業技術研究所
(経理担当者) 繊維産業技術センター 管理係 係長 三好 正剛
(業務管理者) 繊維産業技術センター センター長 今井 琢磨
- ・日本環境設計株式会社
(経理担当者) 経理担当 吉村 歩
(業務管理者) 専務取締役 高尾 正樹
- ・東洋電化工業株式会社
(経理担当者) 経理部次長 兼 経理課長 中澤 和哉
(業務管理者) 取締役 製造本部長 池田 功
- ・大和染工株式会社
(経理担当者) 総務部 西原 稔博
(業務管理者) 工場長 井上 稔也

1-2-4 研究開発推進体制

① 研究開発推進体制

【研究推進会議】

本研究開発を推進するために重要な事項を審議、決定等を行う。

役割	氏名	所属・役職	備考
委員長	中村 健治	愛媛県産業技術研究所 繊維産業技術センター 技術支援室 主任研究員	PL
副委員長	高尾 正樹	日本環境設計株式会社 専務取締役	SL
委員	新谷 智吉	愛媛県産業技術研究所 繊維産業技術センター 技術支援室 主任研究員	
委員	坂本 勝	愛媛県産業技術研究所 繊維産業技術センター 技術支援室 主任研究員	
委員	伊賀 大悟	日本環境設計株式会社 プロジェクト担当 主任研究員	
委員	中西 淳一	東洋電化工業株式会社 品質管理室 次長	
委員	横澤 和憲	東洋電化工業株式会社 品質管理室 研究開発課 主任	
委員	山本 都志子	東洋電化工業株式会社 品質管理室 研究開発課 研究員	
委員	日垣 貴文	東洋電化工業株式会社 品質管理室 研究開発課 研究員	
委員	井上 稔也	大和染工株式会社 保全部 工場長	

【アドバイザー】

上記研究推進会議へ出席するとともに、研究開発の実効性向上、成果の市場適合性向上等に対する助言を適宜行う。

機関名	所在地・代表者	主な指導・協力事項
四国タオル工業組合	愛媛県今治市東門町 5-14-3 理事長 平尾 浩一郎	事業化に係る業務内容、価格条件、契約条件はじめ各組合員との調整など
愛媛県繊維染色工業組合	愛媛県今治市蒼社町 2-1-4 理事長 山本 敏明	バイオエタノールを安定利用するための装置仕様、価格条件、契約条件など

1-3 成果概要

酵素法による、綿繊維からのバイオエタノール製造において、酵素（セルラーゼ）使用量の削減を試みた。我々のバイオエタノール製造プロセスにおいて、酵素コストは変動費の約70%を占めており、酵素使用量を削減することで、採算性を大きく改善することができる。

この酵素使用量の削減のために、今回の研究開発では、以下の内容を実施した。

① 繊維加工技術を応用した前処理技術の開発

繊維加工技術を応用して、酵素による糖化（綿繊維から単糖への変換）を効率的に進める技術を開発した。これにより、少量の酵素で糖化を進めることが可能となるため、酵素使用量の削減が見込まれる。選定した前処理技術は、実証試装置での実証試験に反映させる。

この前処理技術に関して、今回の研究開発では、以下の内容を実施した。

①-1. 綿繊維の結晶化度を低下させる方法

綿繊維の結晶化度を低下させ、酵素による糖化を促進するために、アルカリ処理を実施した。結晶化度を低減させることで、酵素が作用できる部位が露出するため、糖化を促進させることが可能となると考えた。

アルカリ処理を実施した綿繊維を糖化した結果、未処理の場合と比較して、得られる単糖濃度が顕著に上昇することを明らかにした。さらに、アルカリ処理の前に、強漂白処理およびオゾン処理を実施することで、単糖濃度がさらに上昇することを明らかにした。

①-2. 綿繊維を帯電させ、酵素の吸着を促進させる方法

綿繊維の糖化中に界面活性剤を添加することで、糖化特性の改善を試みた。従来より、綿生地を毛羽を切断・除去するために「セルラーゼ処理」が実施されており、この際には界面活性剤が添加されている。このため、界面活性剤の添加は糖化に有効であると考えた。

この界面活性剤の添加を糖化に適用した結果、特定の酵素を使用した場合には、糖化特性が向上することを明らかにした。

これらの結果を踏まえて、共同研究企業と協議した結果、実証装置で利用する前処理方法としてアルカリ処理を採用した。また、このアルカリ処理で、今回の研究開発の目標である、糖化時間80hで糖化率80%を達成する糖化条件を確立した。さらに、アルカリ処理による酵素使用量の削減効果を定量した。

② 酵素固定化技術を活用した酵素再使用技術の開発

酵素を不溶化した固定化酵素は、回収・再利用が可能で酵素コストを削減するのに効果がある。しかし、綿繊維のような固体に対しては固体の固定化酵素は効果がない。そこで、水溶性多糖類が蓄積される反応系において、その水溶性多糖類を分解するための補助剤としての固定化酵素を開発した。

②-1. 水溶性多糖類の糖化に有効な酵素の選定

綿繊維の糖化過程を分析した結果、水溶性多糖類の90%以上が2糖のセロビオースであった。そこで、セロビオース加水分解酵素（セロビアーゼ）に着目し、セルラーゼ製剤中のタンパク質あたりのセロビアーゼ成分が多いものを選定した。

②-2. 固定化酵素の作製・評価

一般的な酵素固定方法のうち、担体結合法に着目し、物理吸着法・イオン結合法・共有結合法・疎水性結合法による酵素固定化を検討した。その中で最もセロビアーゼの固定量が多く、セロビアーゼ活性発現が良かったものに対して、最も効率よく性能が発現できる条件を検討し、固定化酵素を設計した。

さらに、スケールアップ・担体の再利用・ロスの改善などの観点から固定化酵素製造に向けた検討を行い、製造できる目処が付いた。

②-3. 固定化酵素を用いた糖化条件の確立および繰り返し使用回数の検証

現状行われている糖化反応に固定化酵素を加えたところ、酵素製剤のみの場合より単糖生成量が向上できることを確認した。

また、セロビオースの分解に対する繰り返し利用性について、使用雰囲気での安定性・繰り返し反応回数・連続反応性の観点から検討し、酵素自身の経時劣化による性能低下量を確認した。1ヶ月(10回利用相当)の使用後の性能から本検討で開発した固定化酵素の性能を算出したところ、原料が全てセロビオースとして蓄積した場合に対しても全てを分解できる試算ができた。

③ 前処理技術および酵素再使用技術を利用できる実証装置の開発

①②で開発した技術を活用した実用的なバイオエタノール製造方法を確立するために、実証装置を製作・運転し、課題抽出、改良等を検討するとともに、ノウハウを集約する。

このために、今回の研究開発では、以下の内容を実施した。

③-1. 装置の設計

染色装置の技術を取り入れた0.5トンの綿繊維を糖化できる実証装置を設計した。

これは、繊維加工技術を応用した前処理が容易に実施できるだけでなく、均一な攪拌や、厳密な温度管理も可能となり、糖化を効率的に進めることができる。

固定化酵素の充填槽を設計した。温調機能、フィルター機構、固定化酵素の交換やメンテナンスを考慮した設置方法を検討した。

繊維くずだけでなく、一般の衣料品など、他繊維製品にも応用が可能な設備を検討した。

③-2. 装置の製造・設置

③-1の設計に基づく実証装置を製造し設置した。

設計・製造した実証装置および固定化酵素充填槽について、実証実験を効率的に進めるための適切な改造工事を実施した。

作業性、メンテナンス性を検証し、改良のための改造工事を実施した。

③-3. 装置の運営

③-2で製造・設置した実証装置を運営し、①②の実証試験を実施した。①で開発した前処理技術により結晶化度を低減した綿繊維について糖化実験を実施した。さらに②で開発し、試作した固定化酵素担体を使用して固定化酵素の機能性の発現と繰り返し使用について実証実験を実施する。これらの実証実験の結果は適宜①②へフィードバックしながら進めた。

装置は機能の維持管理のために定期的に保守・点検を実施した。

1 - 4 当該研究開発の連絡窓口

一般財団法人 四国産業・技術振興センター 技術開発部 三好、濱野
Tel 087-851-7081、Fax 087-851-7027、E-mail : step@tri-step.or.jp

第2章 本論

① 繊維加工技術を応用した前処理技術の開発

(実施機関：愛媛県繊維産業技術センター、日本環境設計株式会社、大和染工株式会社)

酵素法による、綿繊維からのバイオエタノールの製造プロセスにおいて、酵素（セルラーゼ）使用量の削減を試みた。我々のバイオエタノール製造プロセスにおいて、酵素コストは変動費の約 70%を占めており、酵素使用量を削減することで、採算性を大きく改善させることができる。

この酵素使用量の削減のために、今回の研究開発では、以下の実験を実施した。

①-1. 前処理技術の選定

酵素による綿繊維の糖化（綿繊維から単糖への変換）を促進させる前処理技術を開発した。このために、以下の手法を検討した。

①-1-a. 綿繊維の結晶化度を低下させる方法

①-1-b. 綿繊維を帯電させ、酵素の吸着を促進させる方法

①-2. 前処理技術の効果の測定・検証

実証装置における前処理として採用したアルカリ処理について、目標（糖化時間 80 h で糖化率 80%）を達成する条件を確立した。また、アルカリ処理を実施したことによる、酵素使用量の削減効果を定量した。

①-1. 前処理技術の選定

①-1-a. 綿繊維の結晶化度を低下させる方法

①-1-a-1. 実験方法

①-1-a-1-1. 試料

常法で精練漂白した綿繊維を利用した。糖化実験の際には、この試料をはさみで 1 cm 程度に裁断して使用した。

①-1-a-1-2. アルカリ処理

15 wt%水酸化ナトリウム水溶液 1 L に試料 40 g を加え、ガラス棒で 5 min 攪拌した。この操作は常温で実施した。その後、試料を水洗し、室温で乾燥させた。

①-1-a-1-3. オゾン処理+アルカリ処理

大和染工株式会社が保有するオゾン漂白装置で試料を漂白した。オゾン漂白装置を利用して製造したオゾン水溶液に綿繊維を浸漬したのち、室温にて乾燥させた。その後、2-2 と同様にアルカリ処理を実施した。

①-1-a-1-4. 強漂白処理

試料を通常の精練漂白よりも強い条件で漂白した。漂白液の組成は、35%過酸化水素水 20 g、水酸化ナトリウム 4 g、デスパート MC-31（株式会社日新化学研究所製）5 g、蒸留水 171 g である。この漂白液に試料 5 g を浸漬させ、105°Cで 3 h 漂白した。この試料でアルカリ処理する場合は、2-2 の操作で実施した。

①-1-a-1-5. 糖化

試料に酵素を加えて糖化し、その糖化特性を調べた。50 mL の遠沈管（チューブ：ポリプロピレン製、フタ：ポリエチレン製）に、試料を 1.00 g、酵素としてアクセルレース 1500、CX-15L および Cellic CTec2 のいずれか、さらに 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を加え、50°C で静置した。このとき、酵素および酢酸緩衝液の添加量はさまざまに変化させた。また、酵素の添加量は試料の重量に対するパーセント表記で記載した。

糖化中の単糖濃度の変化は、ケアシスト（ロシュ・ダイアノティックス株式会社製）で経時的に測定した。

①-1-a-1-6. X線回折測定

試料の結晶化度を測定するために、未処理の試料およびアルカリ処理した試料について、X線回折測定をおこなった。測定は θ - 2θ 法で、X線としてはCuの $K\alpha$ 線を用いた。

X線回折測定は、円盤状に成形した試料に対して実施した。成形は、細かく切断した試料 0.5 g を、直径 2 cm の円筒金型に入れたのち、2 トンの荷重を 15 min 印加することで実施した。

結晶化度は、X線回折測定で得られた(110)ピークについて、ベースラインからの高さおよびスロープからの高さの比率で決定した。この結晶化度を、アルカリ処理した試料および無処理の試料について算出し、これらの結晶化度を比較した。

①-1-a-1-7. 単糖濃度の測定

糖化中に、ケアシストを用いて単糖濃度を測定した。ケアシストは、グルコースデヒドロゲナーゼを固定化した膜に単糖水溶液を作用させて単糖を加水分解し、その際に生じる溶存酸素の生成量を測定することで、元の単糖濃度を算出する。この手法は、単糖のみに作用する酵素を使用していることから、さまざまな多糖類が溶解している水溶液中で、単糖のみを選択的に定量できる。

このケアシストで、単糖濃度が 100、200 および 300 mg/dL の標品を測定し、その測定値で検量線を作成した。この検量線を利用して、糖化中の単糖濃度を定量した。

①-1-a-2. 実験結果および考察

①-1-a-2-1. 結晶化度の測定結果

未処理の試料およびアルカリ処理した試料について X 線回折測定を実施した結果を Fig. 1-1 および Fig. 1-2 に示した。いずれの場合も、 $2\theta=27^\circ$ 付近のピークはシリコン由来である。

Fig. 1-1 および Fig. 1-2 から、アルカリ処理を実施することにより、(110)のピークが低下しており、I型セルロースの含量が低下していることがわかる。

また、Fig. 1-1 および Fig. 1-2 を用いて、それぞれの結晶化度を定量した結果を Fig. 1-3 および Fig. 1-4 に示した。結晶化度は、無処理の場合は 75%、アルカリ処理した場合は 18% と求めた。このことから、アルカリ処理により、結晶化度が著しく低下することがわかった。

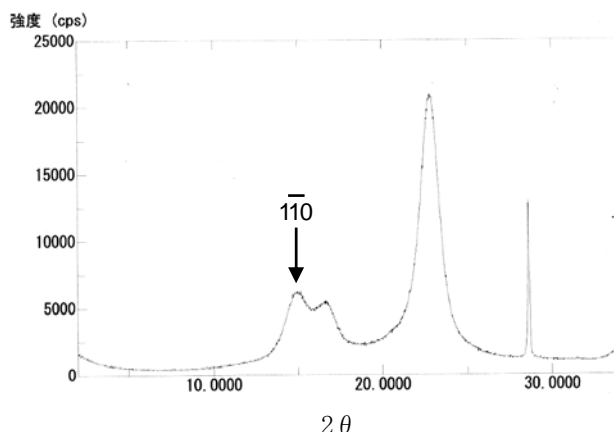


Fig. 1-1 未処理の試料のX線回折測定結果

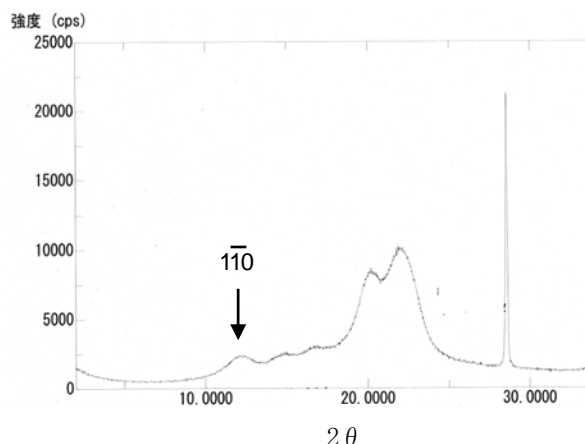
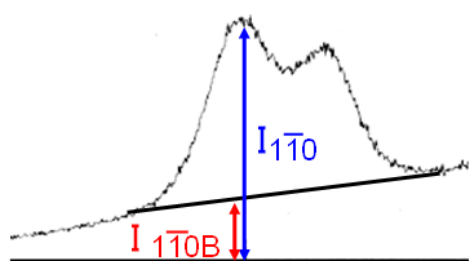
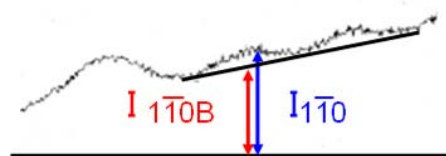


Fig. 1-2 アルカリ処理した試料のX線回折測定結果



$$\text{結晶化度} = \frac{I_{\bar{1}10} - I_{\bar{1}10B}}{I_{\bar{1}10}} \times 100 = 75\%$$

Fig. 1-3 未処理の試料の結晶化度の測定結果



$$\text{結晶化度} = \frac{I_{\bar{1}10} - I_{\bar{1}10B}}{I_{\bar{1}10}} \times 100 = 18\%$$

Fig. 1-4 アルカリ処理した試料の結晶化度の測定結果

①-1-a-2-2. アルカリ処理した試料の糖化特性

試料をアルカリ処理した場合およびオゾン処理+アルカリ処理した場合の糖化特性を Fig. 1-5 に示した。比較のために、未処理の試料も同時に糖化した。この実験では、酵素として Cellic CTec2 を 5% 添加し、浴比は 1 : 10 で実施した。この結果、アルカリ処理を実施することにより、未処理の場合と比較して単糖濃度が向上していることがわかる。また、オゾン処理+アルカリ処理を実施することにより、アルカリ処理の場合よりも単糖濃度が向上していることが分かる。

①-1-a-2-3. 強漂白処理した試料の糖化特性

強漂白処理+アルカリ処理を実施した場合の糖化特性を Fig. 1-6 に示した。強漂白処理を実施することで、無処理およびアルカリ処理の場合と比較して、単糖濃度が向上していることがわかる。この実験は、酵素として アクセルレース 1500 を 5% 添加し、浴比は 1 : 10 で実施した。なお、Fig. 1-6 の単糖濃度は、検量線による補正を実施していない。

このとき、強漂白処理のみの場合も同時に糖化したが、未処理の場合よりも糖化性能が低下している。この原因は、過剰な漂白処理により、綿繊維が酸化し、酵素の攻撃部位が減少したためと考えている。しかし、この試料をアルカリ処理すると、結晶化度の低下の際に、アルカリ処理のみの場合よりも酵素の攻撃部位が露出するため、糖化が容易となったと考えている。

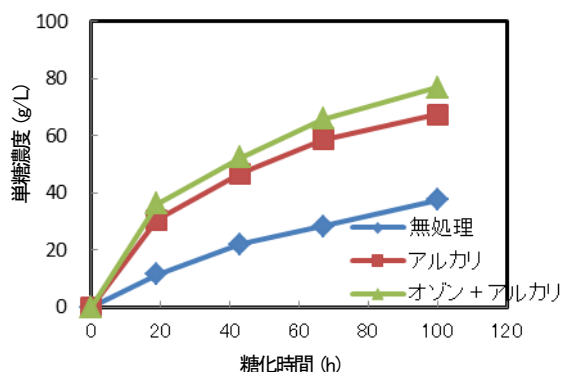


Fig. 1-5 アルカリ処理、オゾン処理+アルカリ処理、および無処理の試料の糖化特性

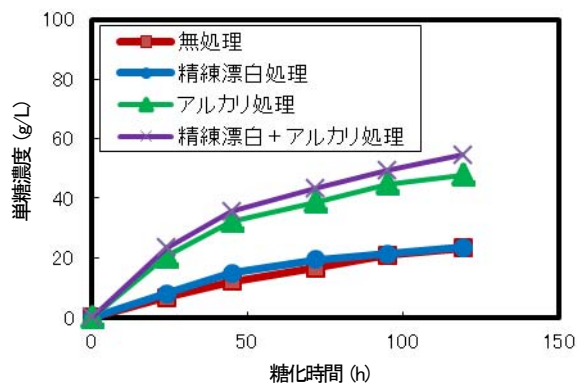


Fig. 1-6 アルカリ処理、強漂白+アルカリ処理、強漂白のみ、および無処理の試料の糖化特性

①-1-b. 綿繊維を帯電させ、酵素の吸着を促進させる方法

①-1-b-1. アクチノールの添加効果

酵素としてCX-15LおよびCellic CTec2を使用した場合において、アクチノールの添加量を変化させて糖化した場合の糖化特性をFig. 1-7およびFig. 1-8にそれぞれ示した。試料はアルカリ処理し、酵素添加量は5%、50 mM 酢酸緩衝液(pH 5.0)の添加量は10 mlとした。

Fig. 1-7に示すように、CX-15Lについては、アクチノールを10~20 mg/L添加することで単糖濃度が向上することがわかった。しかし、Fig. 1-8に示すように、Cellic CTec2の場合は単糖濃度の向上が確認できなかった。なお、Fig. 1-7の結果は、検量線による補正を実施していない。

今回の研究開発では、使用する酵素をCX-15LからCellic CTec2に変更したため、アクチノールの添加は無効と判断し、これ以上の検討は実施しなかった。

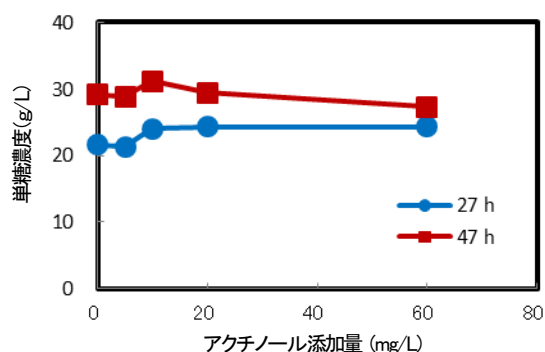


Fig. 1-7 アルカリ処理した試料についてアクチノール添加量を変化させて糖化した場合の糖化特性 (酵素: CX-15L)

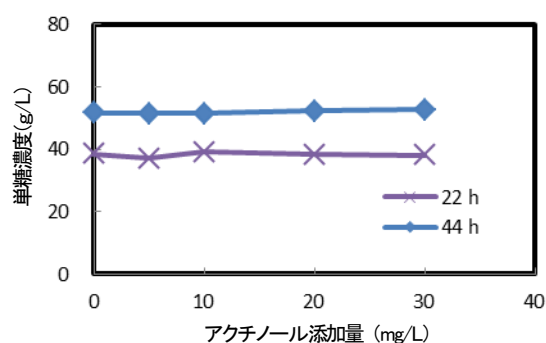


Fig. 1-8 アルカリ処理した試料についてアクチノール添加量を変化させて糖化した場合の糖化特性 (酵素: Cellic CTec2)

3-5. 前処理技術の選定

これまでに、前処理として、オゾン+アルカリ処理および強漂白+アルカリ処理、およびアルカリ処理などの有効性を確認してきた。これらの結果から、アルカリ処理（結晶化度の低減処理）に、オゾン処理や強漂白処理を加えることで、糖化特性が向上することを明らかにした。

これらの結果を受けて、今後の実験および実証装置における実証試験で利用する前処理技術を共同研究企業と選定した。この際には、糖化特性の他に、処理コスト、処理時間および既存設備の稼働状況などを考慮した。

この検討の結果、オゾン+アルカリ処理および強漂白+アルカリ処理は有効性が高いものの、コスト、設備の稼働状況などから、実用化は困難であると判断し、前処理としてアルカリ処理を採用することとした。アルカリ処理は、アルカリを繰り返し利用できるため、処理コストが低いこと、さらにエネルギーコストも低く、既存の設備が活用できる点で有利と判断した。

このため、以降における実験は、アルカリ処理をおこなった試料について実施した。

①-2. 前処理技術の効果の測定・検証

①-2-1. 糖化率80%を達成する糖化条件の確立

Fig. 1-9 および Fig. 1-10 は、アルカリ処理した試料について、Cellic CTec2 の添加量を変化させて糖化した場合の糖化特性である。糖化率は、綿繊維が単糖に変換された比率（重量%）を示している。

Fig. 1-9 および Fig. 1-10 から、糖化時間 80 h で糖化率が約 80% を達成しているのは、酵素添加量が 20% 以上の場合と判断した。このため、糖化率 80% を達成するための必要最低限の酵素添加量を 20% と設定した。我々のバイオエタノール製造プロセスにおいて、酵素コストは、変動費の約 70% を占めるため、酵素添加量は可能な限り低いほうが望ましい。

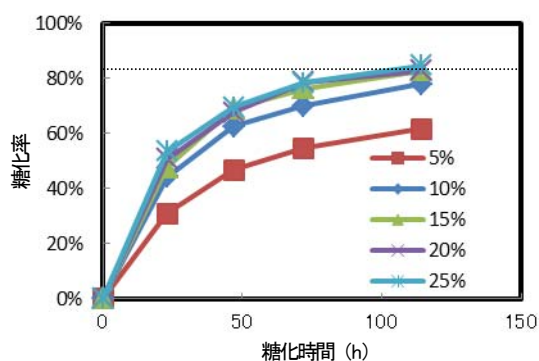


Fig. 1-9 アルカリ処理した試料について Cellic CTec2 の添加量を変化させた場合の糖化率の変化（横軸は糖化時間）

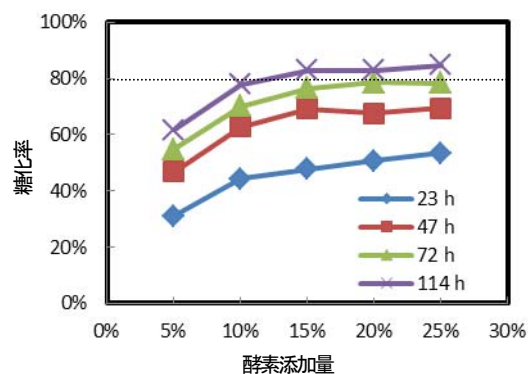


Fig. 1-10 アルカリ処理した試料について Cellic CTec2 の添加量を変化させた場合の糖化率の変化（横軸は酵素添加量）

①-2-2. アルカリ処理による酵素使用量の削減効果の検証

試料をアルカリ処理したことによる酵素使用量の削減効果を定量した。アルカリ処理することで、少量の酵素で糖化を効率的に進めることができる。これにより、酵素使用量を削減

することができる。

酵素使用量の削減効果の定量には、未処理の試料およびアルカリ処理した試料について、同じ酵素添加量で糖化を実施し、得られる単糖濃度を比較する必要がある。前節において、アルカリ処理した試料で、糖化率 80%を達成する最低限の酵素添加量は 20%であることを明らかにした。

このため、酵素削減量の定量にあたり、未処理の試料およびアルカリ処理した試料について、酵素添加量を 20%として糖化特性を比較するのが望ましいが、以下の問題点が生じた。

無処理の試料について、Cellic CTec2 の添加量を変化させて糖化した場合の糖化率の変化を Fig. 1-11 および Fig. 1-12 に示した。これらの結果から、酵素添加量を 15%以上に増加させても単糖濃度が向上しないことがわかった。これは、酵素の添加量に対して、酵素が攻撃できる部位が少ないためと考えている。

この結果から、酵素添加量が 15%以上では、酵素添加量と糖化率に相関関係がなく、酵素添加量が 20%において、未処理の試料およびアルカリ処理した試料との単糖濃度を比較することは無意味と判断した。

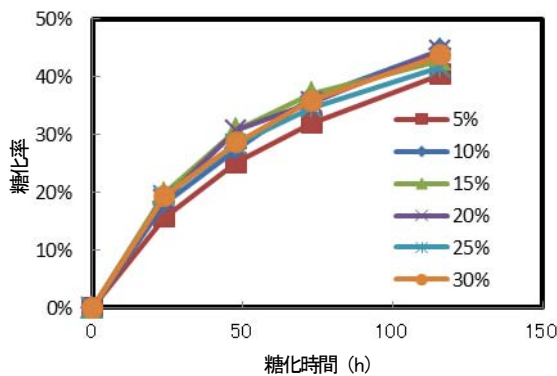


Fig. 1-11 未処理の試料について Cellic CTec2 の添加量を変化させて糖化した場合の糖化率の変化 (横軸は糖化時間)

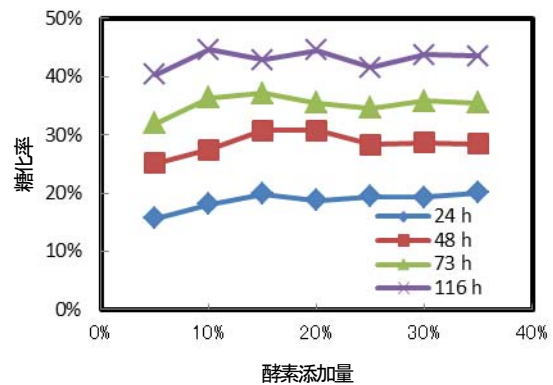


Fig. 1-12 未処理の試料について Cellic CTec2 の添加量を変化させて糖化した場合の糖化率の変化 (横軸は酵素添加量)

このため、今回の研究開発では、より低い酵素添加量において両者の糖化特性を比較し、酵素削減量を定量した。まず、アルカリ処理した試料について、Cellic CTec2 の添加量を 1~5%まで変化させて糖化特性を測定した。この結果を Fig. 1-13 に示した。

Fig. 1-13 より、酵素添加量が 1~5%においては、酵素の添加量と糖化率とに相関が確認できた。さらに、このグラフに、未処理の試料で Cellic CTec2 の添加量が 15%の場合の糖化特性を併記した結果を Fig. 1-14 に示した。

Fig. 1-14 より、アルカリ処理で酵素添加量が 2%の場合と、無処理で酵素添加量が 15%の場合の糖化特性が最も近かった。このため、この場合の酵素の削減効果は 87%と結論した。

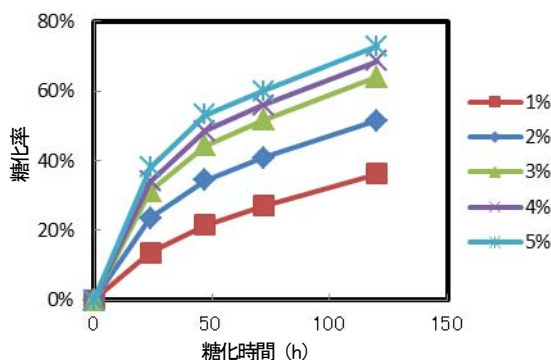


Fig. 1-13 アルカリ処理した試料について Cellic CTec2 の添加量を変化させた場合の糖化率の変化

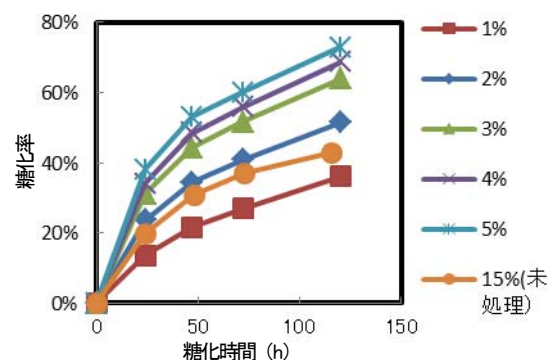


Fig. 1-14 アルカリ処理した試料および未処理の試料について Cellic CTec2 の添加量を変化させた場合の糖化率の変化

②酵素固定化技術を活用した酵素再利用技術の開発

(実施機関：愛媛県繊維産業技術センター、日本環境設計株式会社、大和染工株式会社)

通常の酵素と固定化酵素を併用する糖化方法を開発する。固定化酵素は回収・再利用できるため、通常の酵素の使用量を低減が期待できる。Fig. 2-0-1 に示すように、不溶性多糖を分解する酵素成分を固定化した固定化酵素は綿繊維を糖化させることができない。そこで、セルラーゼ製剤を用いて不溶性多糖を分解し、その際に蓄積する水溶性多糖を固定化酵素で分解するモデルを考えた。

本課題の目的は、水溶性多糖の糖化に効果のある酵素を固定し繰り返し使用できる固定化酵素を開発することである。

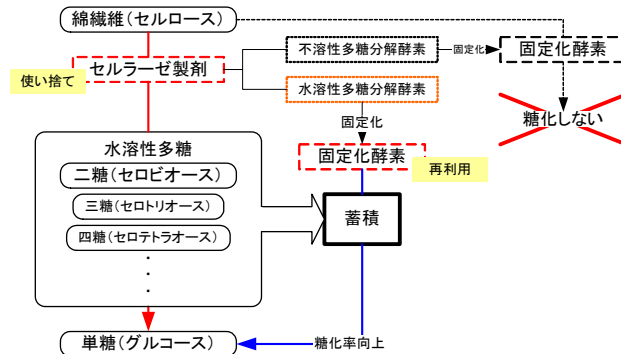


Fig. 2-0-1 セルラーゼ製剤と固定化酵素(水溶性多糖分解)の反応モデル

②-1. 水溶性多糖類の糖化に有効な酵素の選定

本検討の目的は、水溶性多糖を90%以上の効率で糖化可能な酵素を選定することである。

綿の糖化過程において蓄積される中間体の90%以上は2糖のセロビオースであった。そこで、セロビオースを加水分解する酵素(セロビアーゼ)を固定することを考えた。酵素単価を考慮して精製したセロビアーゼを使用せず、市販のセルラーゼ酵素製剤に含まれているセロビアーゼを利用することを検討した。酵素固定化においてセロビアーゼ以外の酵素を含むタンパク質群も固定してしまうため、総タンパク質中のセロビアーゼ含有量が高い酵素製剤が好ましい。Fig. 2-1-1 に市販のセルラーゼ酵素製剤のセロビアーゼ含有量の比較を示す。グラフ中の酵素③のセロビアーゼ含有量が高く、Fig. 2-1-2 に示す酵素固定例のように多くのセロビアーゼを固定できる。セロビアーゼの分解速度はセロビアーゼを含むセルラーゼ製剤の量に比例するため、多くのセロビアーゼを固定できれば高いセロビオース分解性能が期待できる。

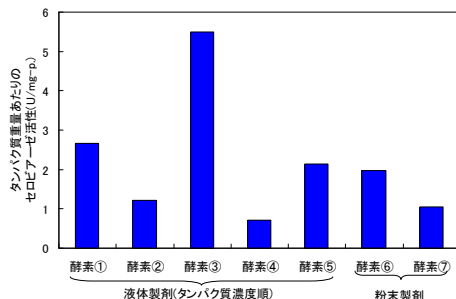


Fig. 2-1-1 市販セルラーゼ酵素製剤のセロビアーゼ含有量比較

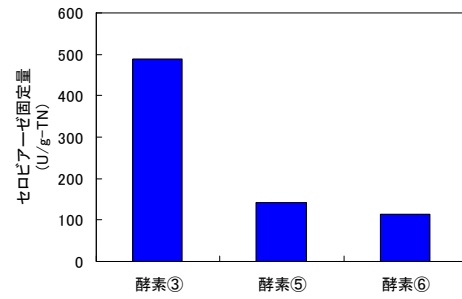


Fig. 2-1-2 市販セルラーゼ酵素製剤のセロビアーゼ固定量比較例

¹ セロビアーゼ量の単位：本検討中において、1Uは5g/Lの濃度時に1分間あたりに1molのセロビオースを分解できる性能(量)と定義する。また、mg-p.はタンパク質量、g-TNは担体重量、g-iEzは固定化酵素重量の単位と定義する。

②-2. 固定化酵素の作製・評価

本検討の目的は、②-1で選定した酵素を有効に固定化できる方法・条件を検討し、製造できる技術を開発することである。

一般的な酵素固定化方法には、担体結合法、架橋法、包括法、複合法という手法があり、繊維との比重差、摩耗強度を考慮すると Toyonite のようなセラミックス多孔体に固定する担体結合法が好ましい。また、Fig. 2-2-1 に示すように、担体結合法には、物理吸着法、イオン結合法、共有結合法、疎水結合法、生化学的特異結合法があるが、生化学的特異結合法に関しては原材料単価が酵素製剤単価と比較すると非常に高くなるため、本検討からは除外した。

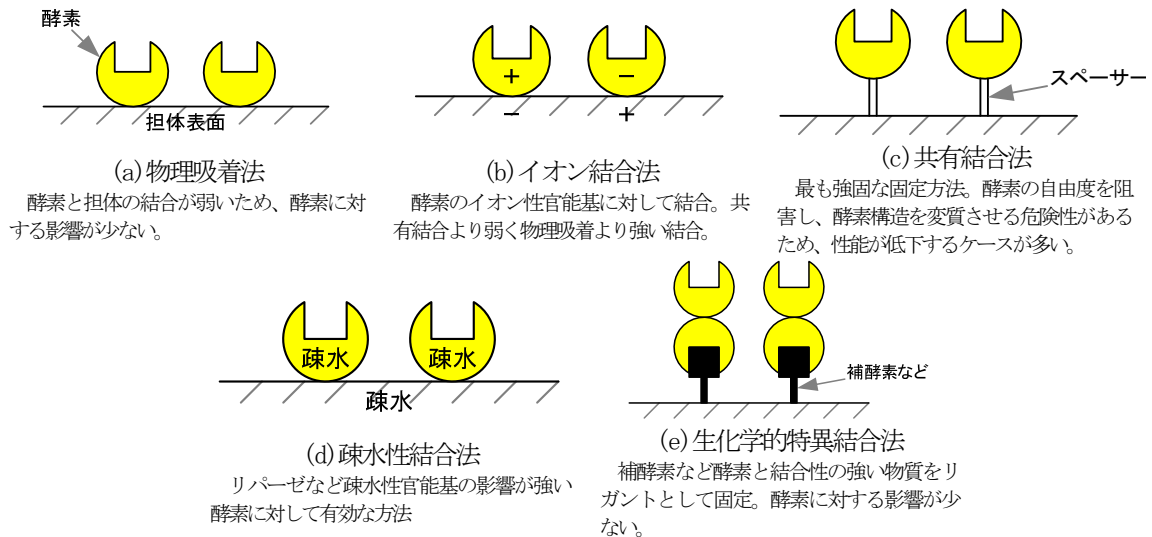


Fig. 2-2-1 担体結合法

Fig. 2-2-2 に各固定化方法の最大セロビアーゼ固定量とセロビアーゼの選択性の比較を示す。共有結合法で固定すると、粗雑タンパク質からセロビアーゼを選択的に固定する能力が優れていたが、セロビアーゼの固定量は物理吸着法が優れていたが、タンパク質の固定量が少なかったために、セロビアーゼの固定量は低くなった。一方、低比表面積品 (Toyonite200) への物理吸着法による固定は共有結合法に次いでセロビアーゼ選択性が高く、タンパク質固定量が高かったため、セロビアーゼを最も多く固定した。また、高比表面積品への物理吸着法による固定はタンパク質固定量が最も高かったが、セロビアーゼの選択性が低かったために、セロビアーゼ固定量は Toyonite200 より低くなった。

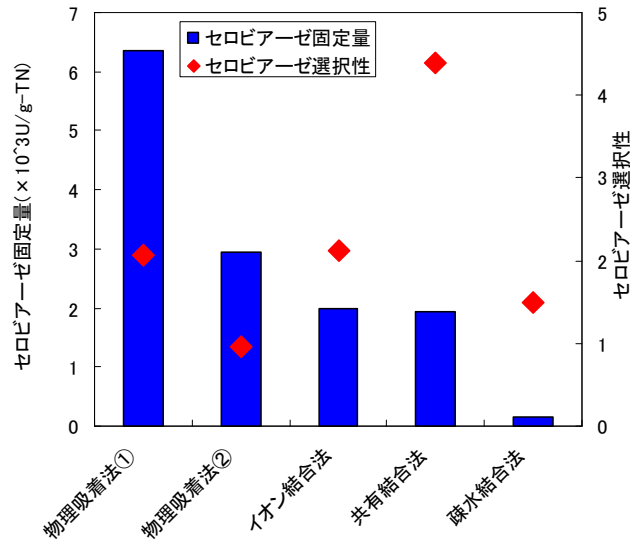


Fig. 2-2-2 各酵素固定化方法によるセロビアーゼ固定量とセロビアーゼ選択性²
 (物理吸着法①: 低比表面積担体、物理吸着法②: 高比表面積担体)

固定化セロビアーゼ性能は、どの固定化方法を用いてもほとんど差がなかったために、最も固定量の多かった Toyonite200 への固定品を採用した。Fig. 2-2-3 に Toyonite200 へのセロビアーゼ固定量に対する固定化セロビアーゼ活性³の相関を示す。固定量が 4,000U/g-TN 以上では、固定化セロビアーゼ活性は変化しなかった。ゆえに、Toyonite200 にセロビアーゼを 4,000U/g-TN の割合で固定したものがセロビオースを分解する最適な固定化セロビアーゼであると考える。この際の固定化セロビアーゼ活性は 300U/g-iEz となり 1g の固定化酵素で 0.1g/min. のセロビアーゼ分解性能になる。

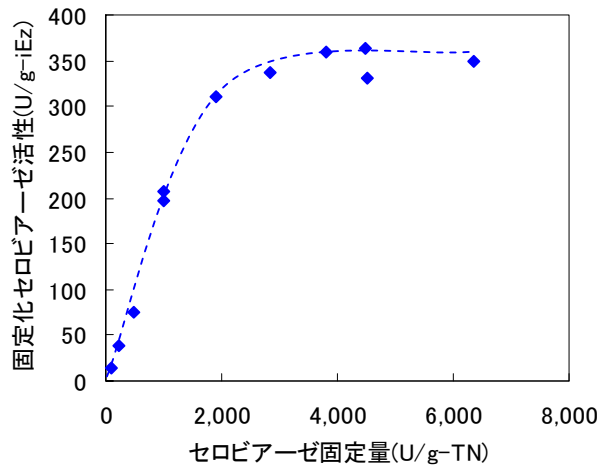


Fig. 2-2-3 セロビアーゼ固定量と固定化酵素性能の相関

²セロビアーゼ選択性: タンパク質群からセロビアーゼを選択的に固定する性能。本検討では、固定されたタンパク質あたりのセロビアーゼ量 ÷ 酵素原液タンパク質あたりのセロビアーゼ量として定義する。

³ 固定化セロビアーゼ活性: セロビアーゼを固定した固定化酵素のセロビアーゼを分解する性能

この固定化酵素を製造するにあたり、酵素のロスを最小限にするためのセロビアーゼ固定化率向上検討と生産性向上のためのスケールアップの検討を行った結果、**最大生産量 200kg/年まで可能**となった。しかし、製造原価のうち労務費の占める割合が50%と高いため製造原価が高くなった。コスト削減のためには、これ以上の生産性の向上が必要である。最も時間と面積のかかった乾燥工程を小スケールにて効率化を検討した結果、工程時間を15%まで短縮できると試算した。ただし、スケールを上げたときの乾燥のバラツキや設備としての組込方など課題は残った。また、Fig. 2-2-4 に固定前の酵素溶液と固定後のろ液の電気泳動結果を示すが、必要なセロビアーゼを選択的に固定しているため、ほとんどのセロビアーゼ以外の酵素を含むタンパク質が残存しており、排水のBODが法令基準値を遙かに上回った。そのため排水処理方法(コスト)も課題として残った。

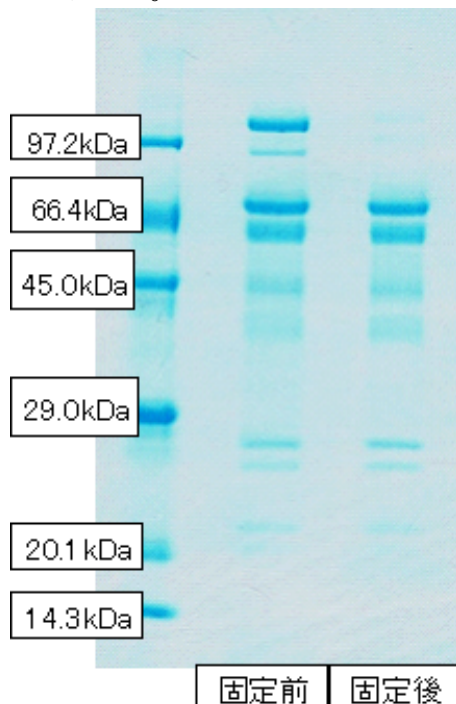


Fig. 2-2-4 固定前と固定後の溶液中タンパク質成分比較
 固定前と固定後の溶液を同じ倍率で希釈したものを電気泳動させた。
 97.2kDaのマーカ付近のバンドが固定前おぼろげに2本見えるが、固定後はほとんど見えなくなっている。他のバンドの濃淡には変化が見られない。

②-3. 固定化酵素を用いた糖化条件の確立および繰り返し使用回数の検証

本検討の目的は、セルラーゼ酵素製剤と開発した固定化酵素を併用した際の効果を検討することと、固定化酵素を10回以上繰り返し利用できることを確認することである。

原料である綿繊維の質・形状などで、セロビオースの蓄積が異なるため、固定化酵素添加による効果は一定ではないことが予想される。Fig. 2-3-1 に固定化酵素併用した場合のグルコース生成量の経時変化の一例を示すが、**固定化酵素を添加することでグルコースの生成量が最大40%増加した。**

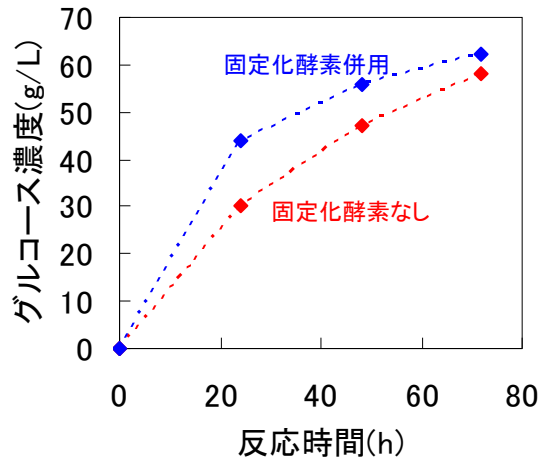


Fig. 2-3-1 固定化酵素と併用した場合の糖化

固定化酵素の温度安定性を検討した結果を Fig. 2-3-2 に示すが、室温以下であれば、1 ヶ月間性能を維持し、反応温度である 50°C 条件下では約 70% になった。この性能低下は固定していない酵素原液に対しても同等であったため、酵素自身の経時劣化によるものと推測できる。

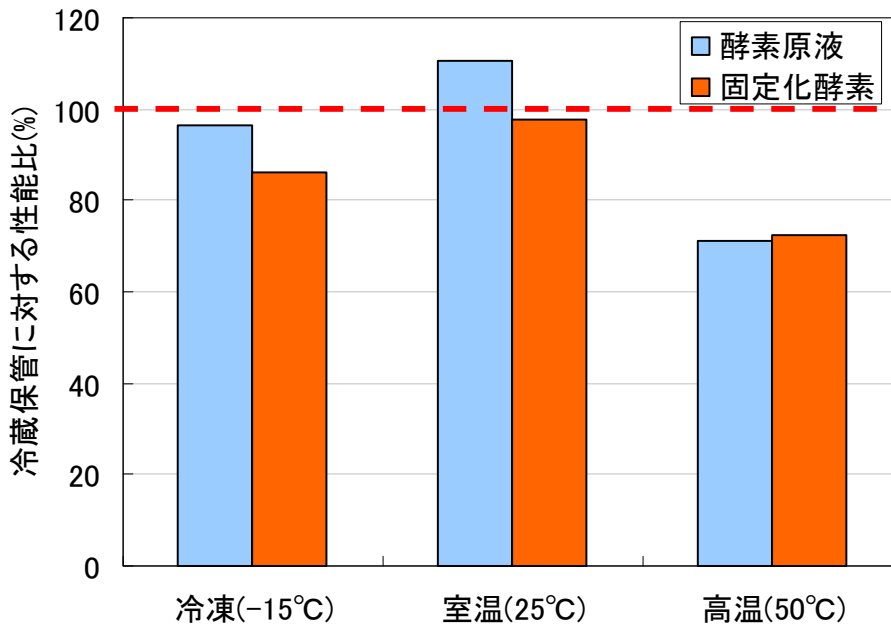


Fig. 2-3-2 各温度条件下での保管性能(静置 4 週間)
冷蔵(6°C)保管時の性能を 100% として各温度保管条件の性能を比較。

Fig. 2-3-3 にセロビオースの分解反応を繰り返し行った際の固定化酵素性能の変化を示す。反応を繰り返すと徐々に固定化酵素性能は減少していき、300U/g-iEz のセロビオース分解性能をもった固定化酵素は 10 回目の反応時には 250U/g-iEz (初期と比較して約 80%) まで低下した。また、Fig. 2-3-4 にカラム反応装置を用いた連続反応に対する性能変化を示すが、これも同様の傾向を示した。性能低下量から推測すると酵素自身の経時劣化によるものである。**10 回繰り返し利用する場合**の本開発の成果品の固定化セロビアーゼ活性は 250U/g-iEz となり、

固定化酵素 1g/L の割合で添加すると 24 時間でセロビオース約 120g/L 分解できる性能であるため、全ての綿がグルコースにならずにセロビオースが蓄積する反応(予測セロビオース蓄積量 100g/L)を想定しても十分にグルコース化できる性能を有している。

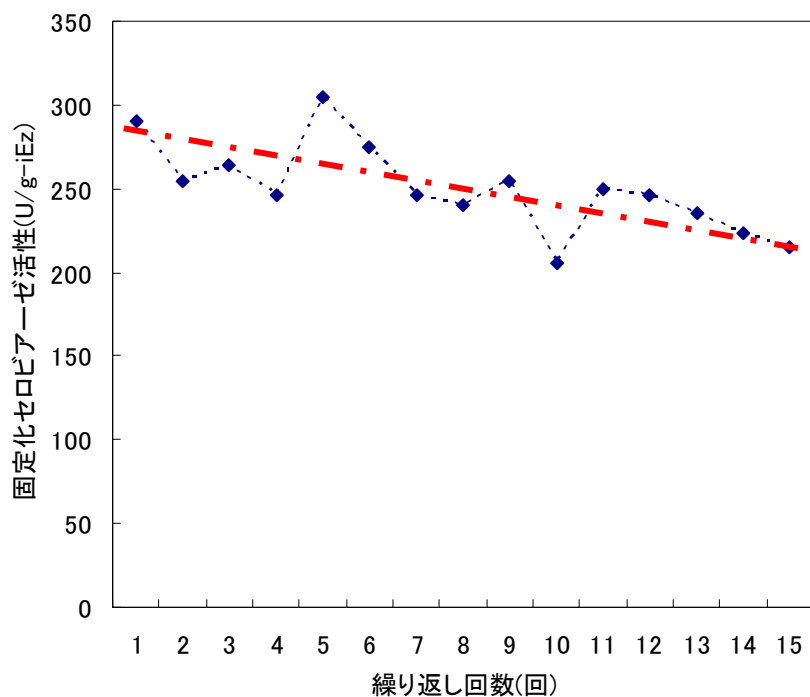


Fig. 2-3-3 固定化酵素の繰り返し利用時の性能変化

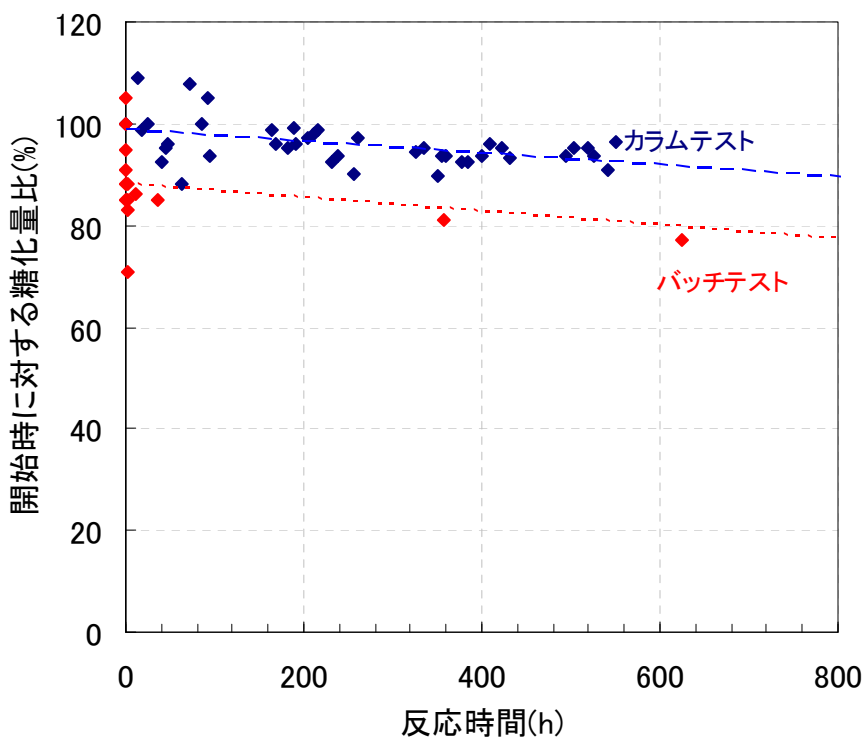


Fig. 2-3-4 固定化酵素のカラム反応装置による連続反応性

③ 処理技術および酵素再使用技術を利用できる実証装置の開発

(実施機関：日本環境設計株式会社、大和染工株式会社)

①②で開発した技術を活用したビジネスベースでの実用的なバイオエタノール製造方法を確立するために、実証装置を製作・運転し、①②で開発した技術の再現性検証、課題抽出、改良等を検討するとともに、ノウハウを集約する。

このために、今回の研究開発では、以下の内容を実施した。

③-1. 装置の設計

染色装置の技術を取り入れた1バッチ0.5トンの綿繊維を糖化できる実証装置を設計した。この装置は、①で検討している繊維加工技術を応用した前処理を容易に実施することができ、また糖化を効率的に進めるための均一な攪拌や厳密な温度管理を可能とするものである。

②で検討している固定化酵素の充填槽を設計した。これは溶液を槽内に循環させ固定化酵素に均一に接触させることで、糖化の効率を向上させることを可能とした装置であり、固定化酵素の流出を防止するためのフィルター機構を備えている。また固定化酵素の交換やメンテナンスを考慮した装置となっている。

③-2. 装置の製造・設置

③-1で設計した実証装置を製造し、設置した。(Fig. 3-1)

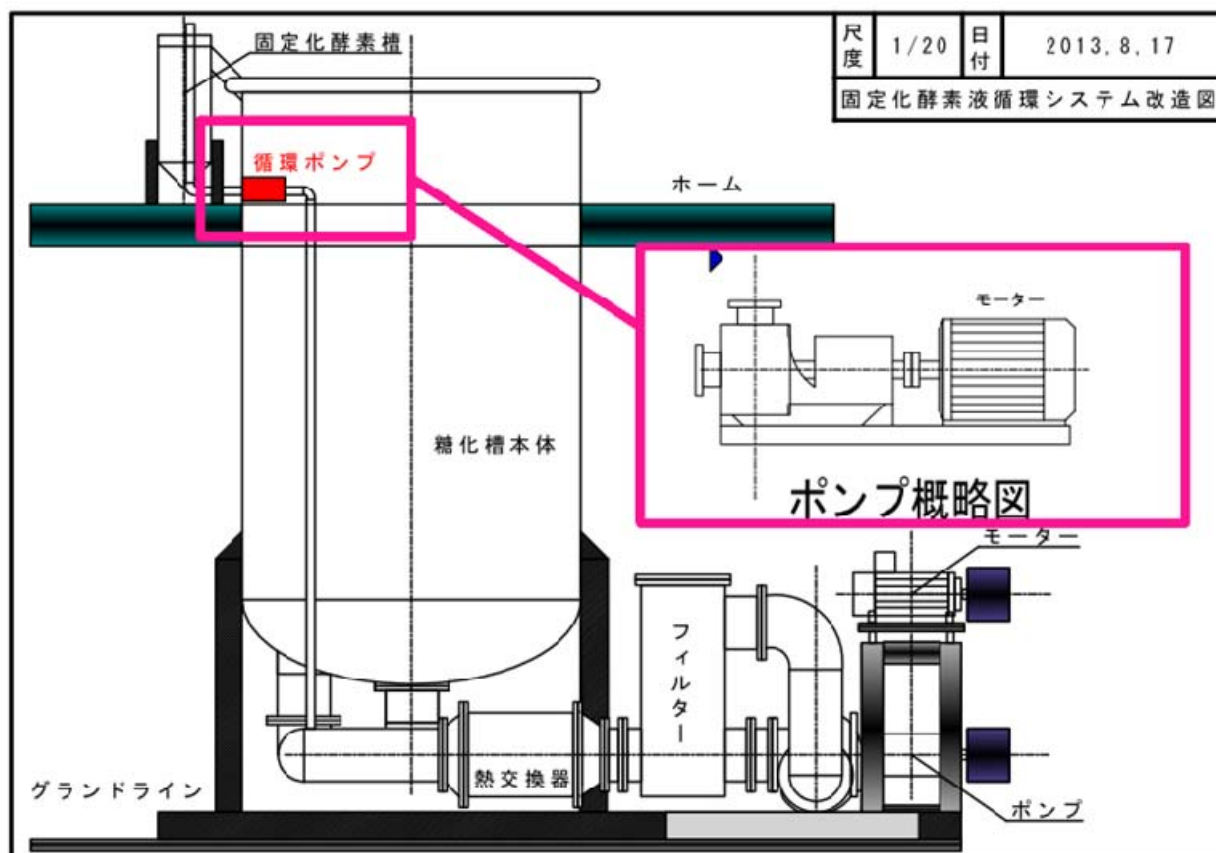


Fig. 3-1 実証装置全体図

なお、①で開発したアルカリ処理を用いた前処理技術を実証するための前処理槽およびアルカリ回収槽と、糖化槽での糖化プロセスの後、エタノールの発酵プロセスで使用する発酵槽は、日本環境設計(株)が保有する既存の設備を使用することとし、それぞれ配管で接続している。また、実証試験において不具合が発見された場合は、適宜改造工事を実施した。

③-3. 装置の運営

①②で開発した技術を活用した実用的なバイオエタノール製造方法を確立するために、平成24年度までに製作・設置した実証装置を運営し、

③-3-1. ①で開発したアルカリ処理技術効果の検証

③-3-2. 酵素添加量低減効果の検証

③-3-3. ②で開発した固定化酵素担体併用効果の検証

③-3-4. 新規酵素 (Cellic Ctec2) 使用による糖化特性改善効果の検証

③-3-5. 本研究開発によるバイオエタノール製造コスト削減効果の検証
を目的とした、実証試験を実施した。

③-3-1. ①で開発したアルカリ処理技術効果の検証

①で開発し、糖化効率の向上が顕著であったアルカリ処理技術の効果を検証した。

1. 試験方法

1-1. 試料

タオル製造工程で発生した繊維くずを使用した。

1-2. アルカリ処理

試料を濃度 15 wt%以上の水酸化ナトリウム水溶液にて 40min 浸漬したのち、95°Cの熱水で 90min 湯洗した。この処理は、常温で実施した。

1-3. 糖化方法

アルカリ処理した試料および未処理の試料に対して、酵素を加え、生じた単糖濃度を定量し、糖化率を算出した。酵素は Optimase CX15-L(ジェネンコア(株)製)を使用した。糖化は、繊維くず 500kg に、酢酸緩衝液 4000L と酵素を試料の wt25% (125kg) 添加し、50°Cに調温しながら液循環を行った。

1-4. 単糖濃度の測定

糖化中の単糖濃度は、ケアシストを用いて測定した。

2. 試験結果と考察

アルカリ処理した試料について、糖化実験を実施した結果を Fig. 3-10 に示した。あわせて、未処理の場合についても示した。

アルカリ処理した試料は、未処理の場合に比べて糖化が促進され、糖化率が約5倍に向上していることが分かった。このため、①で開発したアルカリ処理により綿繊維の結晶化度を低下させる前処理は、実証装置においても有効であることが確認できた。

また、以降の実証試験におけるアルカリ処理は全て同じ条件(濃度 15wt%以上の水酸化ナトリウム水溶液にて 40min 浸漬したのち、95°Cの熱水で 90min 湯洗する)で実施した。

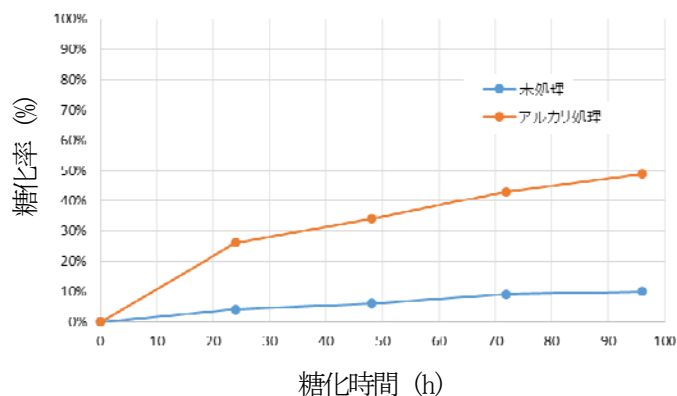


Fig. 3-10 アルカリ処理した試料と未処理の試料についての糖化率の変化

③-3-2. 酵素添加量低減効果の検証

本研究開発以前、綿繊維の古着を原料としてバイオエタノールを製造する場合の酵素の添加量は基質に対して 25 wt%であった。ここでは、タオル製造工程で発生した繊維くずを原料として、アルカリ処理を行うことによる酵素添加量の低減効果を検証した。

1. 試験方法

1-1. 試料

タオル製造工程で発生した繊維くずをアルカリ処理して使用した。

1-2. 糖化方法

アルカリ処理した試料に対して、酵素を加え、生じた単糖濃度を定量し、糖化率を算出した。酵素は Optimase CX15-L (ジェネンコア (株) 製) を使用した。糖化は、繊維くず 500kg、酢酸緩衝液 4000L に対し、酵素を試料の 15 wt% (75kg)、20 wt% (100kg)、25 wt% (125kg) と変化させて実施した。

1-3. 単糖濃度の測定

糖化中の単糖濃度は、ケアシストを用いて測定した。

2. 試験結果と考察

酵素の添加量を試料の 15 wt% から 25 wt% まで変化させて糖化した場合の糖化特性を Fig3-11 に示した。酵素の添加量が wt15% の場合と 20 wt% の場合では糖化率に大きな差分が見られたが、添加量が 20 wt% の場合と 25 wt% の場合では糖化率に差分は見られなかった。

このように、実証装置においては酵素添加量を 20 wt% 以上に増やすことは無意味であり、必要最低限の酵素添加量を 20 wt% と設定した。前述のとおり酵素コストは、我々のバイオエタノール製造プロセスにおいて、変動費の約 70% を占めており、酵素添加量は可能な限り低いほうが望ましい。

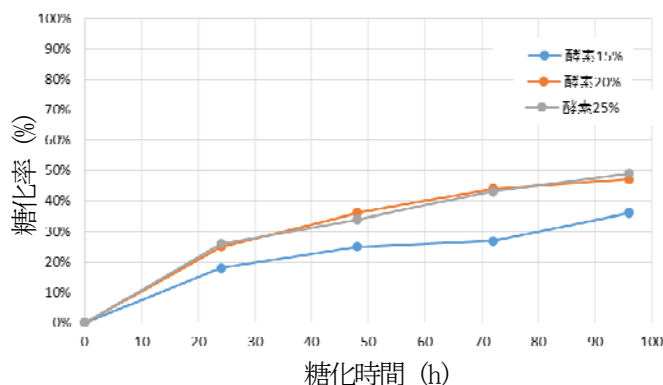


Fig. 3-11 酵素添加量を15 wt%~25 wt%まで変化させた場合の糖化率の変化

③-3-3. ②で開発した固定化酵素担体併用効果の検証

②で開発した固定化酵素担体を液体酵素と併用して、糖化試験を実施した。

固体の固定化酵素は、綿繊維のような固体に対しては効果がない。そこで、水溶性多糖類が蓄積される反応系において、その水溶性多糖類を分解するための補助剤として液体酵素と併用することとした。

1. 試験方法

1-1. 試料

タオル製造工程で発生した繊維くずをアルカリ処理して使用した。

1-2. 糖化方法

アルカリ処理した試料に対して、酵素を加え、生じた単糖濃度を定量し、糖化率を算出した。酵素は Optimase CX15-L (ジェネンコア (株) 製) と②で製作した固定化酵素担体を使用した。糖化は、繊維くず 500kg、酢酸緩衝液 4000L に対し、酵素を試料の 20 wt% (100kg)、と固定化酵素槽に充填した固定化酵素担体 5kg を併用し、浴比 1:10 で糖化試験を実施した。固定化酵素槽への液循環は固定化酵素槽への循環ポンプの回転数をインバーターで調整し、十分な流量を確保して実施した。

また、固定化酵素槽の構造を Fig. 3-12 に示す。

1-3. 単糖濃度の測定

糖化中の単糖濃度は、ケアシストを用いて測定した。

2. 試験結果と考察

酵素のみを添加して糖化を行った場合と、固定化酵素担体を併用した場合の糖化特性を Fig. 3-13 に示した。しかしながら、両者に糖化率に差分は見られず、また繰り返し使用による発現性能の検証には至らなかった。

ただし、②の研究開発においては固定化酵素担体を併用することの有効性が確認されているため、その使用条件の最適化や装置の改良など課題を残す結果となった。

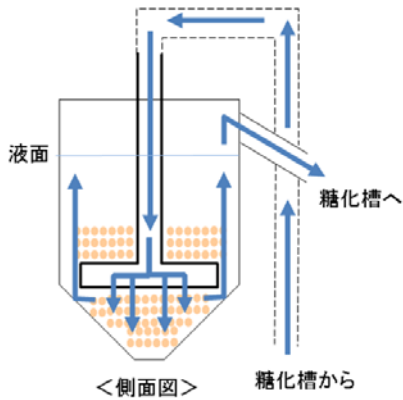


Fig. 3-12 固定化酵素槽の構造

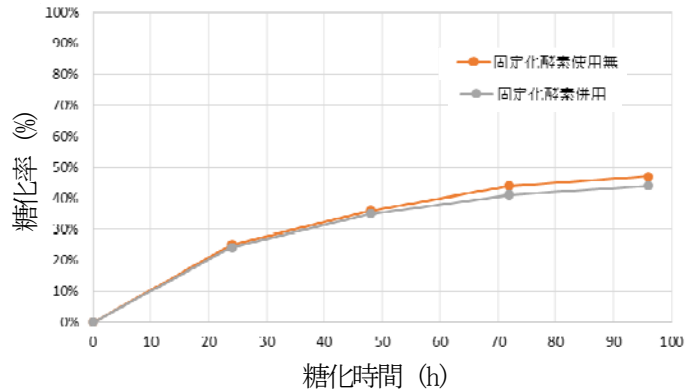


Fig. 3-13 固定化酵素併用の有無による糖化率の変化

③-3-4. 新規酵素 (Cellic Ctec2) 使用による糖化特性改善効果の検証

①②では新規酵素である Cellic Ctec2 を使用することで、綿繊維からバイオエタノールを製造するコストを大きく削減できる可能性があることが明らかになった。従来使用してきた酵素である Optimase CX15-L と比較し、糖化特性改善の可能性を検証するために実証試験を実施した。

1. 試験方法

1-1. 試料

タオル製造工程で発生した繊維くずをアルカリ処理して使用した。

1-2. 糖化方法

アルカリ処理した試料に対して、酵素を加え、生じた単糖濃度を定量し、糖化率を算出した。酵素は①②で発見した新規酵素である Cellic Ctec2 (Novozymes 社製) の添加量を試料の 5 wt% (25kg)、10 wt% (50kg)、15 wt% (75kg)、wt20% (100kg) まで変化させて実施し、Optimase CX15-L (ジェネンコア (株) 製) を試料の wt20% (100kg) 添加した場合と比較した。繊維くず 500kg、酢酸緩衝液 4000L に対し、前述の酵素を添加した。

1-3. 単糖濃度の測定

糖化中の単糖濃度は、ケアシストを用いて測定した。

2. 試験結果と考察

新規酵素 (Cellic Ctec2) の添加量を試料の 5 wt% から 20 wt% まで変化させて糖化した場合と、従来の酵素 (Optimase CX15-L) を試料の 20 wt% 添加した場合の糖化特性を Fig3-14 に示した。

Ctec2 の場合においても CX-15L の場合と同様に、酵素の添加量を増加させることで糖化率が向上する。しかし、添加量 15 wt% の場合と 20 wt% の場合においては糖化率の向上が見られなかった。これは、CX-15L の場合と同様に、単糖が生成したことによる酵素反応の生成物阻害や、糖化の進行により綿繊維が減少し、糖化が進みにくくなったことが原因と考えられる。

また、Ctec2 を 15 wt% 添加した場合と、CX-15L を 20 wt% 添加した場合の糖化率がほぼ等しくなった。Ctec2 は CX-15L と比較すると若干安価である上、Ctec2 のほうがより高性能で

あるため、使用する酵素を変更することで、バイオエタノール製造コストの低減が実現できることが分かった。

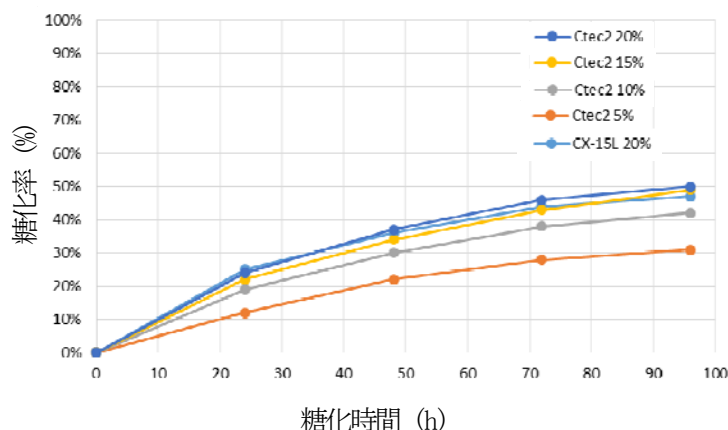


Fig. 3-14 CX-15L と Ctec2 による糖化率の変化の比較

③-3-5. 本研究開発によるバイオエタノール製造コスト削減効果の検証

本研究開発において、次の技術は実証装置レベルでも糖化効率の改善効果があることが分かった。

- ・アルカリ処理
- ・新規酵素 (Cellic Ctec2) の使用

糖化効率を改善することは、タオルメーカーから排出される繊維くずを原料にバイオエタノールを製造する上での酵素使用量を低減することに直結する。酵素コストが変動費の約70%を占める我々のバイオエタノール製造プロセスにおいて、酵素使用量の低減は至上命題である。

ここでは、本研究開発前の製造コストと、前述の技術を導入した場合の製造コストを試算し比較することで、コスト削減効果を検証した。

1. 試算条件

- ・年間処理量 50 トン (稼働時間 2,400 時間)
- ・固定費 (設備償却費/保全費/人件費) 7,250,000 円/年

2. コスト削減効果検証と考察

- ・本研究開発前の変動費

	使用量 (kg/トン)	単価 (円/kg)	処理単価 (円/トン)	年間費用 (円)
酵素	250	1,100	275,000	13,750,000
酵母	20	500	10,000	500,000
薬品	300	200	60,000	3,000,000
電力	30	15	450	1,080,000
蒸気	200	2.4	480	1,152,000
水	100,000	0.034	3,400	170,000
			計	19,652,000

・本研究開発後（現状）の変動費

	使用量 (kg/トン)	単価 (円/kg)	処理単価 (円/トン)	年間費用 (円)
酵素	150	800	120,000	6,000,000
酵母	20	500	10,000	500,000
薬品	320	200	64,000	3,200,000
電力	30	15	450	1,080,000
蒸気	200	2.4	480	1,152,000
水	100,000	0.034	3,400	170,000
			計	12,102,000

本研究開発前に年間 19,652,000 円であった変動費は、本研究開発による技術を導入することで、12,102,000 円まで削減できるという試算結果となった。つまり、現状では変動費を 38.4%削減できているということである。

最終章 全体総括

我々の最終的なビジネスモデルは、タオル屑を原料としてバイオエタノールを製造し、得られたバイオエタノールをエネルギーとして利用したタオルを販売することである。このビジネスモデルでは、バイオエタノールの販売を目指さないことから、バイオエタノールをいかに安価に製造するかが重要となる。

今回の研究開発は、我々のバイオエタノール製造プロセスの中で大きなコストを占める酵素コストの低減を目的とした。このために、酵素使用量の削減を目指した。

酵素使用量の削減には、2つの方法を検討した。ひとつは、綿繊維を前処理することで、糖化を促進させ、少ない酵素添加量でも糖化を効率的に実施する技術の開発である。もうひとつは、酵素をセラミックス担体に固定化し、このセラミックス担体を回収・再利用することで、全体の酵素使用量の削減を目指した。

さらに、これらの技術を適用できる実証装置を開発し、実証試験を実施した。

綿繊維の前処理方法としては、既存の綿繊維加工技術を応用した手法を検討した。これらの前処理技術は、通常の染色工場で容易に実施できるため、実用化が容易であり、低コストで実施できるのが利点である。

各種前処理技術—アルカリ処理、オゾン処理、強漂白処理および界面活性剤添加など—についてそれぞれの糖化特性を検討し、経済性なども考慮した結果、最終的にはアルカリ処理を採用することとした。このアルカリ処理で、当初の目標である、糖化時間 80 h で糖化率 80%を達成する条件は、酵素 (Cellic CTec2) の添加量が 20 wt%、浴比は 1 : 10 と決定した。

もうひとつの目標である、固定化酵素の開発については、まず、固定化することが望ましい酵素 (セロビアーゼ) を選定した。さらに、ビーカーレベルにおいては、セロビオース (2 糖) を単糖に変換できることを確認した。また、この固定化酵素を利用して、長期間の繰り返し糖化が可能であることを確認した。

実証装置の開発においては、500 kg の綿繊維を糖化できる装置を設計・製造した。この実証装置で、アルカリ処理した綿繊維を糖化したところ、未処理の場合と比較して、糖化特性が顕著に向上することを確認した。

この実証装置で固定化酵素を使用したか、未使用の場合と同様の糖化特性であり、現在のところ、固定化酵素の利用による糖化特性の向上は確認できなかった。

課題として残っている点として、実証装置の糖化率が 50%程度から向上しないことや、実証装置において固定化酵素の効果がかくにんできないことが挙げられる。糖化率が向上しない原因に関しては、現在のところ、アルカリ処理が均一にできていないことや、タオル屑に酵素反応を阻害する不純物が残っていることが考えられる。

アルカリ処理に関する対策としては、アルカリ処理時間を延ばすことや、浸透剤の添加などが考えられる。

タオル屑に不純物が付着していることに関しては、精練漂白処理、糊抜き処理などを実施することにより、不純物の除去が考えられる。

固定化酵素を利用した際に、糖化率が改善しない原因は、綿繊維の種類・形状と酵素の組合せによって中間体である水溶性多糖類の蓄積量が少ないことが考えられる。

また、この対策としては、実証装置にて綿繊維の種類・形状による中間体の生成挙動を検討することが考えられる。

これらの問題に関しては、今後の補完研究にて取り組む予定である。