

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21 世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	柑橘果皮のバイオ由来燃料化に関する研究	
研究者所属・氏名	研究代表者：工学部 生物化学工学科 教授 野村 正人 共同研究者：工学部 機械工学科 教授 旗手 稔 工学部 生物化学工学科 准教授 渡邊 義之 工学部 機械工学科 准教授 玉木 伸茂	

1. 研究目的・内容

化石燃料の枯渇問題と地球温暖化の環境改善から、糖質、澱粉から成る農作物ならびにセルロース系の間伐材からの再生可能な代替エネルギーとしてバイオエタノール製造が注目されている。そこで、日本国内では約 160 万 t (世界的には約 850 万 t) が生産されている温州蜜柑の果皮(通常廃棄処理)を利用し、バイオエタノール生成に最適な糖化酵素ならびに発酵酵母を見出し、そのエタノールの利用についても検討した。また、バイオエタノール化後に残渣として得られる滓の利用として、生分解性をともなうバイオプラスチックの試作とその生分解性についても検討した。

2. 研究経過及び成果

はじめに

この度(平成 21 年度採択研究)の廃棄物活用に関わる研究の一環として、代替エネルギーになり得るか下記の図-1 に示した糖化・発酵に使用する酵素および酵母を選定し、廃棄蜜柑果皮から生産されるバイオエタノールの諸条件について検討した。

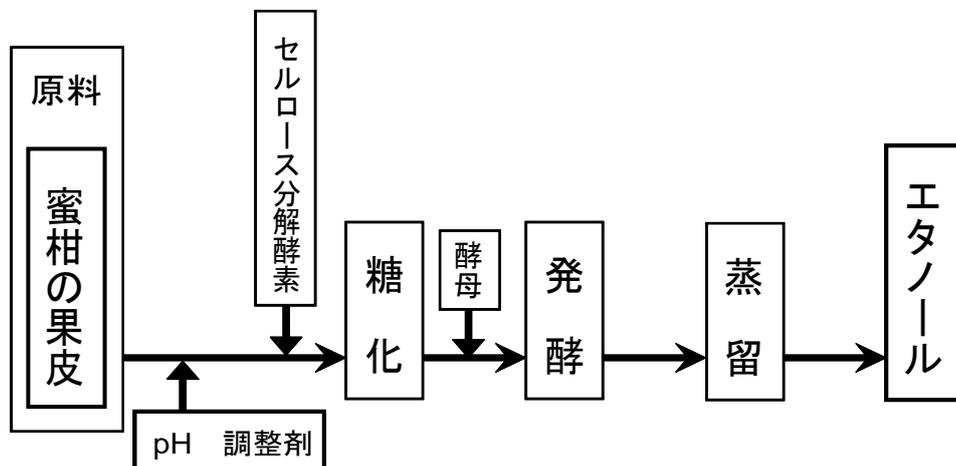


図-1 蜜柑果皮からのバイオエタノール製造工程

## 実験操作

### 1. 試料の調製

完熟期に収穫した温州蜜柑から果皮を剥ぎ、天日で乾燥(含水率 5%)し精油を取り除き、粉碎機を用いて微粉末化し、バイオエタノール製造原料とした。

### 2. 反応操作

#### 1) 糖化方法(最適条件)

100mL の蒸留水に 1%, 5% および 10% 重量(w/w)の酵素を投入した混合溶液に, 5%, 10% および 20% 重量(w/v)の乾燥した蜜柑果皮を投下し, 緩衝液として 10M-NaOHaq. を加えて, 混合溶液の pH を 4.0 付近に調整した。ついで, バイオシェーカーを用いて, 内温  $55 \pm 2^\circ\text{C}$ , 振とう数 120r/min に設定した恒温槽で 96 時間反応(糖化)を行った。

#### 2) 糖化(グルコース)濃度測定

糖化液を遠心分離(6000rpm/5 min)し, 上澄み液に  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}=1/1(\text{v/v})$ の混合溶液を加えて, 2 倍量に希釈した。糖化濃度の測定には, 高速液体クロマトグラフィー[HPLC: 島津製;SPD-10A/LC-10AT 型 (Column:YMC-Pack  $\text{NH}_2(4.6 \times 150 \text{ mm I.D.})$ ), 溶離液: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} = 75/25(\text{v/v})$ , 流量:1.00 ml/min)]を用いて, 検出器は示差屈折計を用いて分析した。

#### 3) 発酵方法(最適条件)

2)の項で糖化された反応液を室温まで放冷し, ついで, 使用した果皮重量に対して, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% および 3%(v/v)の発酵酵母を添加した後, バイオシェーカーを用いて, 内温  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , 振とう数 120r/min に設定した恒温槽で 48~72 時間反応(発酵)を行った。

#### 4) エタノール濃度測定

3)の項で得た発酵液を遠心分離(6000rpm/5 min)し, 上澄み液に  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}=1/1(\text{v/v})$ の混合溶液を加えて, 2 倍量に希釈した。エタノール濃度の測定には, ガスクロマトグラフィー [GC:島津製;GC-8AT 型, Column:Shimazu C-R5A, Carrier gas:He (150kPa), Inj/Det Temp.: $300^\circ\text{C}$ , Column Temp.: $130^\circ\text{C}$ ]を用いて分析した。

#### 5) 燃焼実験

製造した粗エタノールを常圧蒸留(bp. $75 \sim 78^\circ\text{C}$ )し, 燃焼実験の試料とした。燃焼装置は, 家庭用暖房装置であるストーブを使用して, エタノール/灯油の混合比率を 0 : 100, 10 : 90 および 25 : 75(vol%)に調製したものを燃料とした。

#### 6) バイオプラスチック製造

##### 6.1 マスターバッチ

発酵後の乾燥した固形残渣物(粒子  $100 \mu$ )をポリプロピレンに 3.3% 重量練込んだ後,  $90^\circ\text{C}$ で 3 時間乾燥した。ついで,  $230^\circ\text{C}$ でペレット(茶褐色)に加工した。(図-3)

##### 6.2 フィルムの成型

直鎖状低密度ポリエチレン(LLDPE)に 0.08% 重量の固形残渣物をドライブレンドし練込んだ後, インフレ製膜機を使用し膜厚  $35 \mu$  に設定して袋を試作した。(図-4)

#### 7) バイオプラスチックの生分解

6)の項で試作した四種類のフィルム(グリーンポリ袋)について, 平成 23 年 5 月 31 日から 11 月 28 日までの約 6 カ月間, 屋外のコンテナ箱( $68 \times 45 \times 27\text{cm}$ )に土壌を入れ, その中に埋めた(図-5)。実験開始時の土壌中の菌と実験終了時点での土壌中の菌を採取し, 生分解に及ぼす土壌中の個体数の変化を求めた。(図-6)

## 結果および考察

### 1. バイオエタノール生成について

乾燥蜜柑果皮からバイオエタノールを製造する過程で重要な糖化条件について、種々の酵母を用いて検討したところ、現時点では下記のような考察を得ることができた。

- 1) 使用する乾燥蜜柑果皮の重量は、恒温振とう機(バイオシェーカー)の型式から 5g が最大量であると判断し、使用した酵母は *Onozuka*(Ono.), *Cellulase from Aspergillus niger*(Asp.)および *Trichoderma reesei*(Ree.)で 5%および 10%(v/v)を添加し、糖化溶液の pH を 4.5 に調整(10M NaOHaq.)することにより、グルコース濃度の生成割合が向上した。なお、最適な本反応スケールでの使用可能な蜜柑果皮の重量は、30%(v/v)であった。
- 2) 糖化に用いる酵素濃度は、いずれも 10%(v/v)が最も効率良く糖化(約 33~70%)が進行した。また、反応時間は 72 時間が最適(図-2 および表 1)であることも分かった。
- 3) 発酵に用いる酵母濃度は、昨年度(平成 21 年)に見いだした 3%(w/w)が最も効率良く発酵が進行(再確認)し、得られたエタノール回収率は最大で約 23%(v/w)程度となった。なお、反応時間としては 48 時間が最適であることも見いだした。

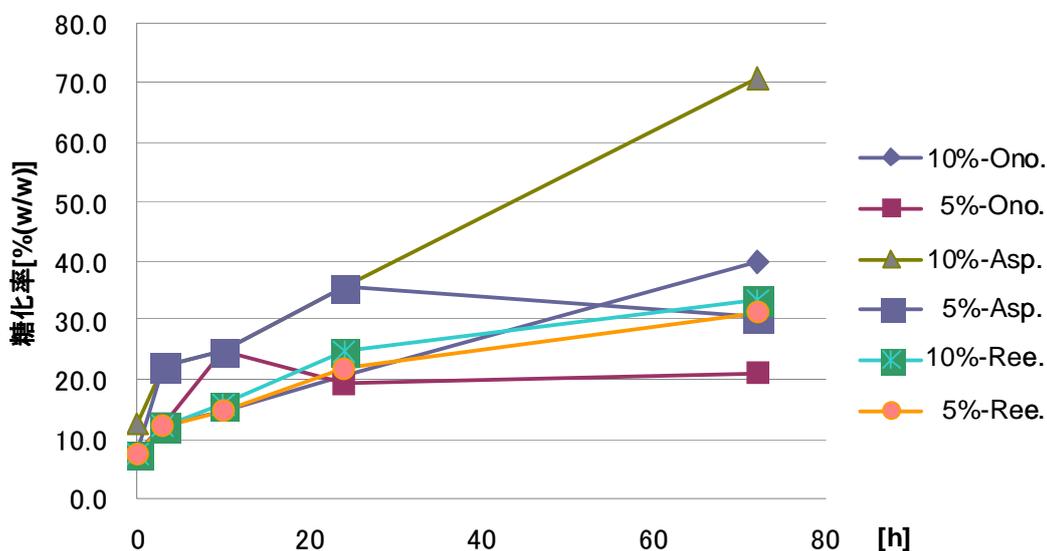


図-2 乾燥蜜柑果皮の糖化率

表 1 乾燥蜜柑果皮の糖化率 (%(v/v))

Time (h)	酵母添加量(%)					
	10% - Onozuka	5% - Onozuk	10% - Asper.	5% - Asper.	10% - Reesei.	5% - Reesei.
0	7.4	7.4	12.6	7.4	7.4	7.4
3	12.6	12.6	22.4	22.4	12.3	12.3
10	14.8	24.9	24.9	24.9	15.9	14.7
24	20.9	19.5	35.5	35.5	24.6	21.9
72	39.7	21.0	70.6	30.3	33.3	31.3

- 4) 酵母である *Aspergillus niger* にペクチナーゼ G と  $\alpha$ -Amylase from porcine pancreas Type V1-B を添加混合し、すでに著者が平成 21 年度に見いだした既存の糖化反応の条

件で行なったところ、フルクトース、スクロース、グルコースおよびマルトースの生成を確認することができ、その中でも主にスクロースがグルコースとフルクトースに分解されることも確認した。また、糖化率としては 100%を超し、副反応が生じたものと考えている。

## 2. バイオエタノールの燃焼実験について

燃焼用の原料として常圧蒸留し得たバイオエタノールの純度を GC-MS 分析装置で行ったところ、85.5%であることを確認した。その他の成分として、水分 7.2%、2-アミノ-1-プロパノール 5.2%、2-メチル-3-ブテン-2-オン 0.3%、フルフラール 0.8%およびリモネン 1.0%であったことから、これら不純物の除去については、簡便手法を導入して純度向上を検討する予定(平成 22 年度)である。そこで、比較データとして、市販品のエタノール(98%純度)に灯油を任意の割合(0:100, 10:90, 25:75(vol%))で混合し家庭用暖房装置(石油ストーブ)を用いて燃焼実験を行い、その結果を表 2 に示す。

表 2 バイオエタノールの燃焼試験結果(市販品エタノールを代替使用)

エタノール ： 灯油 (vol%)	ガス温度 (°C)	燃焼ガス成分									
		有機系					無機系				
		CH <sub>4</sub> *	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> *	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> *	iso-C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> *	n-C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> *	No <sub>x</sub> *	O <sub>2</sub> **	CO*	CO <sub>2</sub> **	N <sub>2</sub> **
0 : 100	420~440	4	<1	<1	<1	<1	30	13	40	5.4	81.4
10 : 90	360~380	4	<1	<1	<1	<1	20	15	30	4.5	80.9
25 : 75	260~270	4	<1	<1	<1	<1	10	16	10	3.3	80.4

\*vol ppm      \*\* vol%

その結果、エタノールの配合割合が増加するごとにガス温度は低下(420→ 260°C)する傾向が認められ、有害物質である無機系の排気成分 NO<sub>x</sub>, CO および CO<sub>2</sub> の量が 1/3~1/4 程度に抑えられることが分かった。なお、今回製造したバイオエタノールと市販品エタノールの発熱量(cal)を比較すると、バイオエタノールでは 6340cal, 市販品エタノールでは 6940cal であることを測定した。

## 3. 燃焼実験(草刈払機)について

草刈払機の燃焼用原料として常圧蒸留し得たバイオエタノールの純度を GC-MS 分析装置で行ったところ、純度 93.6%であることを確認した後、ガソリンとの混合割合についても検討し、表 3 に示した混合割合でそれぞれの燃焼実験を行い、その時の排出ガスの成分分析を行なった結果を表 4 に示す。また、各混合割合の発熱量(JIS K2301)およびガス比重について分析した結果を表 5 に示す。

表 3 エタノールとガソリンの混合割合(体積比)

条件	バイオエタノールの割合(%)	ガソリン(vol%)	バイオエタノール(vol%)	2サイクルエンジンオイル(vol%)
1	0	25	0	1
2	8	23	2	1
3	12	22	3	1
4	20	2	5	1

その結果、2サイクルエンジンである草刈払機の混合燃料として、ガソリンにバイオエタノールを体積比(表 3)として 8 から 20%添加(条件 2(8%), 条件 3(12%), 条件 4(20%))し、

燃焼を行なったところ、いずれの条件でも草刈払機は始動した。その時の排出ガスについて分析を行なったところ、バイオエタノール無添加の場合と比べて、有機系排ガス(vol. ppm)では、とくにメタン(CH<sub>4</sub>)の排出割合が約 20~30%、エタン(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)では約 10~15%増加した以外は、ほぼ同程度の排出濃度であった。一方、無機系排ガスでは、ととくに窒素酸化物(NO<sub>x</sub>)の排出量に大きな変化が見られ、バイオエタノールの添加量が増加するにしたがって、約 1.5~2 倍量に増加した。それ以外の成分については、無添加の場合とほぼ同程度の数値を示し大きな変化は認められなかった。(表 4 参照) また、ガス温度(無添加の場合 89℃)についても測定したところ、いずれの混合燃料においても 96℃を示し、当初懸念していた過熱(オーバーヒート)による草刈払機のエンジン部分への負荷影響もないものと判断した。

表 4 各混合比における有機系と無機系排出ガスの分析結果

成分		単位	条件 1 (0%)	条件 2 (8%)	条件 3 (12%)	条件 4 (20%)
有機系	CH <sub>4</sub>	volppm	560	710	680	700
	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	volppm	330	370	360	680
	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	volppm	40	40	40	40
	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	volppm	80	80	80	80
	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	volppm	10	10	10	10
	i-C <sub>4</sub> H <sub>10</sub>	volppm	380	440	440	430
	n-C <sub>4</sub> H <sub>10</sub>	volppm	240	270	270	270
	i-C <sub>5</sub> H <sub>12</sub>	volppm	900	990	960	980
	n-C <sub>5</sub> H <sub>12</sub>	volppm	730	800	770	790
無機系	H <sub>2</sub>	vol%	0.9	1.2	1.3	1.4
	NO <sub>x</sub>	volppm	18	30	32	36
	O <sub>2</sub>	vol%	15.2	14.5	14.2	13.2
	CO	vol%	2.6	3.1	3.1	3.4
	CO <sub>2</sub>	vol%	3.1	3.3	3.5	3.9
	N <sub>2</sub>	vol%	77.8	77.5	77.6	77.6
	-	ガス温度	℃	89	96	96

※( ) 内はバイオエタノールの混合割合である。

つぎに、それぞれの混合割合で調整した燃料(条件 2, 条件 3 および条件 4)を燃焼した時の排出ガスの発熱量と比重などについて無添加(通常の燃料)と比較したところ、いずれもバイオエタノールを添加すると、総発熱量(kJ/m<sup>3</sup>)は約 15~20%増加し、真発熱量(kJ/m<sup>3</sup>)も約 16~22%増加する傾向が認められた。その他、排出ガスの比重(空気=1)および密度(kJ/m<sup>3</sup>)についても検討したところ、大きな相違が認められなかったことから十分に混合燃料への添加し使用可能であることが示唆された。

表 5 各混合割合における排気ガスの発熱量および比重

成分	単位	条件 1 (0%)	条件 2 (8%)	条件 3 (12%)	条件 4 (20%)
総発熱量	kJ/m <sup>3</sup>	870	1030	1010	1060
真発熱量	kJ/m <sup>3</sup>	820	960	950	1000
比重	空気=1	1.001	0.999	0.999	0.999
密度	kJ/m <sup>3</sup>	1.295	1.292	1.292	1.291

#### 4. バイオエタノール生成後の残渣活用

##### 4-1 グリーンプラスチック成型原料

環境に優しい生分解性を持つプラスチックの成形を目的に、下記の二種類のプラスチックを試作するための条件を検討した。

- 1) マスターバッチによるグリーンプラスチックのペレット作製は、ポリプロピレン(PP)に 3.3%量の滓(100 ミクロン程度の粒度)を練込む条件を検討したところ、230℃で混練を行い加工したところ、外観が茶褐色のペレットを試作することができた。用途としては、工作材あるいは杭などの材料として成型可能である知見を得ることができた。(図-3)
- 2) フィルムの成型はインフレ製膜機を使用して、超低温、耐熱および帯電防止などの特性を持ち、一般に米袋用に汎用されている LLDPE(Linear low-density polyethylene)に 3.3%量の滓をドライブレンドして試作(グリーンポリ袋 No.1~No.4)した。グリーンポリ袋 No.1 では、成型途中で表面に穴があき製膜が上手くいかなかった。



図-3 グリーンプラスチックペレット

そこで、滓の添加量を 1/10 に減量したグリーンポリ袋 No.2(0.33%量)を試作した。また、滓を 0.16%添加したグリーンポリ袋 No.3 と 0.08%添加したグリーンポリ袋 No.4 を試作した。試作袋の厚みはいずれも 35 ミクロンに設定した。その結果、滓の粒度が大きいほど含水率が高く目的のフィルムの試作は難しいことから、フィルムの製膜を 35 ミクロンに設定する場合であれば、滓の粒度を 10 ミクロン以下に処理し、十分な乾燥を行うことにより成型すれば、グリーンプラスチックとして、最大滓の練込み量として 20%程度まで可能となり、十分に使用可能な環境に優しいプラスチック袋になるものと考察した。(図-4)

##### 4-2 試作グリーンポリ袋 No.1~No.4 の生分解性

今回試作した蜜柑果皮由来(バイオエタノール発酵後の残渣)の四種類のグリーンプラスチックについて、一般土壌中に生育している土壌菌によるグリーンプラスチックの生分解性を検討した。(図-5)

生分解の実験では、試験体の表示をグリーンポリ袋 No.1~No.4 に対応する名称として、試料①から④に変更し比較試験体として市販品であるポリプロピレン(PP)とポリエチレン(PE)を用いた。使用した土壌の中に存在している菌の好気性細菌、嫌気性細菌、

放線菌および酵母の生育変化を表 6 の下記に付記として記載した A, B, C および D の条件を用いて検討した。その結果, 四種類のグリーンプラスチック袋を土壤に埋め込んだ際の土と約 6 ヶ月経過した土を採取し細菌の分析を行ない表 6 に示した。好気性細菌および嫌気性細菌は, いずれも約 6 ヶ月を経過すると減少した数値が得られた。しかし, 放線菌の生育数値には大きな数値の変化は認められなかった。





図-4 各種のグリーンプラスチック袋



図-5 生分解性実験の様子

表-5 グリーンプラスチック生分解実験で使用した土壌中の微生物変化

採取年月日	検査項目	土 壤			検査方法	備考
		試料①/②	試料③/④	市販品P.P/P.E		
平成23年 5月31日	好気性細菌 (CFU/g)	$2.8 \times 10^8$	$1.3 \times 10^8$	$2.7 \times 10^8$	A	1
	嫌気性細菌 (CFU/g)	$2.4 \times 10^6$	$2.1 \times 10^6$	$2.1 \times 10^6$	B	
	放線菌 (CFU/g)	$2.6 \times 10^6$	$5.6 \times 10^6$	$4.6 \times 10^6$	C	
	酵母 (CFU/g)	不検出	不検出	不検出	D	
平成23年 11月28日	好気性細菌 (CFU/g)	$6.1 \times 10^7$	$9.0 \times 10^7$	$8.9 \times 10^7$	A	1
	嫌気性細菌 (CFU/g)	$9.0 \times 10^4$	$2.8 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	B	
	放線菌 (CFU/g)	$7.4 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$	$7.4 \times 10^6$	C	
	酵母 (CFU/g)	不検出	不検出	不検出	D	

※ A --- YG培地, 28°C, 14日間培養(土壌微生物実験法・土壌微生物研究会編)

B --- VL培地, 30°C, 30日間培養(土壌微生物実験法・土壌微生物研究会編)

C --- 酵母エキス・澱粉寒天培地, 30°C, 14日間培養(土壌微生物実験法・土壌微生物研究会編)

D --- PDA培地 + YM培地, 25°C, 14日間

備考: 1 --- 不検出とは10 CFU/g未満のことである。

一方、今回試作したグリーンプラスチック袋の生分解の様子を観察した。一般的には生分解用プラスチックを試作する際には、生分解を推し進める添加剤として用いられているデグラ・ノボン(褐変化澱粉)を20%程度添加するのが普通であるが、今回は蜜柑果皮(乾燥)のバイオエタノール生成後に残渣として回収した滓の有効利用という観点から添加せずに生分解の実験を行なった。



図-6 グリーンプラスチック袋の分解実験経過の様子

その結果、試作したグリーンプラスチックに添加したバイオエタノール生成後の滓がデグラ・ノボンと同様な生分解の触媒となり得ることを期待したが、顕著な効果は観察されなかった。しかし、その中でも試料③(グリーンポリ袋 No.3)および④(グリーンポリ袋 No.4)では、表面が幾分ざらつき、添加した蜜柑由来の滓(植物由来)の表面が幾分分解した様子が観察された。今回は生分解期間を6ヶ月間に設定したが、更なる生分解を進行させるためには、多少の過酸化剤とでんぷん由来のデグラ・ノボンなどを添加する必要があることを考察した。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

本研究は、大学の 21 世紀奨励研究課題として取り上げられ、3 年を経過しバイオエタノール生成の反応条件を検討し、最大 20 数%に達する添加率でバイオエタノールを製造することができた。また、生成したバイオエタノールの暖房器具を用いた燃焼実験を行い、排出ガスの分析ならびに熱量等についても検討し代替エネルギーとしての可能性を明らかにした。同時にこれらの実験データに基づき、農耕器具の一つである草払い機の混合燃料として使用し、部品に及ぼす劣化等についても検討したところ、十分に使用可能であることを明らかにした。また、バイオエタノール生成後の残渣である滓の利用として、ポリプロピレンに滓を配合し生分解性をともなうバイオプラスチックを試作(分解促進剤添加なし)し土壌中での生分解性を検討したところ、遅いながらも分解が生起している様子を確認することができた。今後は、更なるバイオエタノール化への添加率向上とプラスチックとしての分解性の向上に関わる条件等について検討する予定である。

### 4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
国際学会・ICBT 2012(中国・南京)	口頭発表	2012年10月22日～24日