木質系バイオマス为原料としたバイオエタノール生産のための アルカリ前処理（第1報）

—アルカリ前処理としてのソーダ蒸解条件の検討—

独立行政法人森林総合研究所 池田 努, 杉元倫子, 野尻昌信
真柄謙吾, 細谷修二, 島田謹爾

Alkali Pre-treatment for the Bioethanol Fuel Production from Woody Biomasses

—Part 1 : Soda Cooking Conditions as an Alkali Pre-treatment—

*Tsutomu Ikeda, Tomoko Sugimoto, Masanobu Nojiri,
Kengo Magara, Shuji Hosoya and Kinji Shimada*
Department of Biomass Chemistry, Forestry and Forest
Products Research Institute

池田 努

杉元倫子

野尻昌信

真柄謙吾

細谷修二

島田謹爾

Bioethanol fuel for motor vehicle use is currently produced from sugar cane and corn starch. However, the production costs of such crops in Japan are much higher than in Brazil and North America. Therefore, Japanese bioethanol fuel production from such crops is very limited. On the other hand, lignocellulosic biomasses, especially woody biomasses, are abundant resources and large amounts of low-cost woody biomasses are available for the bioethanol fuel production in Japan. Bioethanol is produced from the fermentation of glucose and some oligo sugars. However, cellulose, which is the most abundant carbohydrate in wood, is a polymer of glucose linked by β -1,4-glucosidic bonds and cannot be fermented by yeast directly. Therefore, hydrolysis which converts cellulose to glucose is required for bioethanol fuel production from wood. In response, we have developed a new bioethanol fuel production process using alkali cooking and enzymatic hydrolysis as a pre-treatment. In this work, we discuss suitable soda cooking conditions for producing bioethanol fuel from wood.

Sugi wood contains more lignin, but less carbohydrate than does eucalyptus wood. However, the xylose content of eucalyptus, which comes from hemicelluloses, is higher than that of sugi; therefore, the overall hexoses contents of both sugi and eucalyptus are similar. In the present study, a relationship was investigated between the lignin contents and the enzymatic digestibility of sugi soda pulps. As the lignin content decreased, the enzymatic digestibility increased. However, the enzymatic digestibility of pulps reached mostly 100% without

complete lignin removal. Delignification was improved and the pulp yields were increased by the addition of 1, 4-dihydro-9, 10-dihydroxyanthracene disodium salt (AQ) to the soda cooking. Soda cooking with AQ around H-Factor (HF) 3, 000 were the best conditions for alkali pre-treatment of sugi for bioethanol fuel production. On the other hand, soda cooking with AQ around HF 350 were the best conditions for eucalyptus.

Keywords : bioethanol, lignocellulosic biomasses, soda cooking, AQ, pulp

分類 : L₂ASAQ および NSAQ 法, Y₂ 木材化学

1. 緒 言

地球環境の問題により、石油に代わるクリーンエネルギーの導入が強く求められている。バイオエタノールはこの代替エネルギーの一つとして注目されており、ブラジル、北米、中国では、ガソリンに混合した状態で自動車用燃料として用いられている。現在バイオエタノールは主に、食用作物であるサトウキビ、トウモロコシから製造されているが、これらの作物は、生産地に偏りがある、気候の影響により豊不作がある、年ごとの価格変動が大きい等の問題を抱えており、バイオエタノールの安定供給に不安がある。また最近、これらの作物では、バイオエタノール生産用途の増加に伴い食用・飼料用途が不足気味となり、この結果価格が急騰している。このために、食糧と競合しない原料を用いたバイオエタノール生産が強く求められている。

セルロース系資源は地球上における蓄積量が大変多く、サトウキビやトウモロコシよりも広い地域で入手可能であり、バイオエタノールの大量生産と安定供給の点で最適な材料であると言える。また食糧と競合することなく、未利用のセルロース系資源も多いために、これらを上手に利用すれば生産コストを低く抑えることが可能である。日本の場合、最も豊富に存在するセルロース系資源は木材であり 4,040 百万 m³ の蓄積量がある¹⁾。この中で、製材工場残材 (500 万トン/年)、建設発生木材 (460 万トン/年)、林地残材 (370 万トン/年)²⁾が、発生量および価格の点から、バイオエタノール生産用として利用できる可能性があると考えられている。バイオエタノールは、単糖やオリゴ糖を酵母で発酵させる手法により生産されているが、木材の主要炭水化物であるセルロースは、グルコースが β 型で結合した高分子であり、木材を酵母で直接発酵させることはできない。このために、木材からバイオエタノールを製造するためには加水分解 (糖化) を行い、木材中の炭水化物を単糖に変換する必要がある。

これまで、木質系バイオマスからバイオエタノールを生産するための糖化に関する研究は数多く発表されており、この中の一つである硫酸を用いた糖化法を採用した年産 1,400 kl のプラントが国内でも 2007 年より稼働している。

しかし我々は、より低コストでかつ大量生産に向けた新たなバイオエタノール生産法の開発を目指し、アルカリ蒸解によるパルプ化 (アルカリ前処理) を行った後、酵素糖化と発酵 (同時糖化発酵) を行う手法 (Fig.1) を提案してきた。本研究では、アルカリ前処理としてアルカリ蒸解の一種であるソーダ蒸解を行う場合の、最適な蒸解条件を明らかにすることを目的とした。

2. 実 験

2.1 原 料

原料として、国内に豊富な蓄積量がありかつ低価格で入手可能なスギ (*Cryptomeria japonica*) と、日本企業が参加して海外で植林され製紙用として輸入されたユーカリ (*Eucalyptus globulus*) を用いた。

2.2 リグニンおよび木材構成糖分析

スギ材およびユーカリ材をそれぞれ粉碎した後、40 メッシュ (孔径 355 μ m) 通過画分を有機溶媒 (ベンゼン: エタノール/2:1) 抽出し、分析に使用した。木粉または、ソーダ蒸解により得られたパルプ 1.0 g に 72% 硫酸 15 ml を加え室温下で 4 時間かくはんした後、水 560 g を加え硫酸濃度を 3% に調製し、さらに 120℃ で 1 時間の加水分解を行った。硫酸加水分解物をガラスフィルター (1 GP 16, 孔径 10-16 μ m) でろ過し、ろ過物を乾燥させた後重量を測定し、クラソンリグニン量とした。木材構成糖分析は、ろ過後のろ液を用いて常法により行った。ろ液に水酸化バリウムの飽和水溶液を加え pH 6.0 に中和した後遠心分離を行い、上澄み液 50 ml をとり水素化ホウ素ナトリウム 150 mg を加え室温下で 2 時間反応させた。減圧乾固した後、ピリジン 5 ml と無水酢酸 10 ml を加え 120℃ で 3 時間反応させた。減圧乾固後メタノール 10 ml を加え、ガスクロマトグラフで分析した。

2.3 ソーダ蒸解

ソーダ蒸解は、スギチップ (約 20 mm × 20 mm) 150 g (絶乾重量) に水酸化ナトリウム水溶液 900 g (NaOH 添加量 25.8 wt% on wood, 液比 1:6) を加え、90 分間で 170℃ にまで昇温した後、170℃ で保持する時間を変えて行った。さらに、アントラキノン系蒸解助剤である 1,4-di-

Fig.1 Bioethanol production process from lignocellulosic biomass using alkali cooking

Table 1 Klason lignin content and sugar composition of woods

	Klason lignin (wt%) ¹⁾	Sugar composition (wt%) ²⁾				
		Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
Sugi	31.5	3.3	8.2	11.5	2.3	74.7
Eucalyptus	20.6	0.7	25.3	3.4	2.3	68.3

¹⁾Based on the wood²⁾Based on the carbohydrates in wood

hydro-9,10-dihydroxyanthracene disodium salt (AQ, 川崎化成工業株式会社) を添加 (0.1 wt% on wood) した同様のソーダ蒸解も行った。

ユーカリのソーダ蒸解は, ユーカリチップ (約 20 mm × 20 mm) 150 g (絶乾重量) に水酸化ナトリウム水溶液 600 g (NaOH 添加量 22.7% on wood, 液比 1:4) を加え, 90 分間で 155℃ にまで昇温した後, 155℃ で保持する時間を変えて行った。AQ を添加 (0.1% wt% on wood) した同様のソーダ蒸解も行った。

2.4 酵素処理

ソーダ蒸解後のパルプ (含水率約 70%) 0.2 g (O. D.) に pH 4.8 の酢酸バッファー 10 ml とセルラーゼ 50 mg を加え, 40℃ で 60 時間の酵素糖化を行った。ガラスフィルター (1 GP 16) で酵素糖化液をろ過した後, ろ過物 (酵素糖化されなかった部分) を乾燥させ重量を測定した。酵素処理により可溶化された部分の重量は, 全体の重量からろ過物の重量を差し引くことにより求めた。パルプ中の炭水化物重量に対する酵素処理により可溶化された部分の重量比を, 可溶化率とした。

2.5 H-Factor

150℃ 以上の高温で蒸解を行う場合, 蒸解過程での 1℃ の温度変化が蒸解結果に大きな影響を与える。このために, 蒸解過程における蒸解温度を精密にコントロールすることができない場合には, 設定した蒸解温度と蒸解時間が同じでも, 異なる結果が得られる場合がある。そこで本研究では, 蒸解条件をより正確に表すために, 全過程の蒸解温度を記録し, 蒸解時間と蒸解温度から求められる H-Factor (HF) を計算した後, 蒸解条件はこの HF で示した。蒸解時の全過程の温度を記録し, 各蒸解の HF を計算した。また全ての蒸解において, 脱リグニン反応の活性化エネルギーとして便宜上 32 kcal/mol の値を使用した³⁾。

2.6 粕率

蒸解後のパルプをフラットスクリーン (スリット幅 0.125 mm) にかけた後, スクリーンを通過しなかったスクリーンノットの絶乾重量を求め, チップ重量に対するスクリーンノット重量を粕率とした。

2.7 カッパー価測定

パルプのカッパー価は, Tappi standard T 236 cm-85 に準じて行った。

Table 2 Sugar composition of soda and soda-AQ pulps

Pulp	Sugar composition (wt%) ⁵⁾				
	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
Sugi ¹⁾	0.1	5.7	5.7	0.2	88.3
Sugi ²⁾	0.3	6.8	5.2	0.3	87.4
Eucalyptus ³⁾	0.1	17.6	0.2	0.1	82.0
Eucalyptus ⁴⁾	0.1	12.9	0.3	0.2	86.5

¹⁾Soda cooked at 170℃ for 3 hours without AQ²⁾Soda cooked at 170℃ for 2.5 hours with AQ³⁾Soda cooked at 155℃ for 2.5 hours without AQ⁴⁾Soda cooked at 155℃ for 1 hour with AQ⁵⁾Based on the carbohydrates in pulp

3. 結果および考察

3.1 材およびパルプのリグニン・木材構成糖分析

材のリグニン分析の結果, クラーソンリグニン量は, スギ 31.5%, ユーカリ 20.6% であり, スギはユーカリに比べ, 木材重量あたりのリグニン含有量が高かった (Table 1)。リグニンは, ソーダ蒸解後の黒液や同時糖化発酵後の残渣として回収した後, エネルギーとして利用することが可能であるために, リグニン回収を十分に行えば, スギのほうが多く回収エネルギーを利用できると推定された。一方, 炭水化物の割合はユーカリのほうが高かったが, 材の木材構成糖分析の結果, ユーカリはヘミセルロース由来であるキシロースの比率が高く, 通常の酵母が発酵によりエタノールを生産することができるヘキソース (グルコース, マンノース, ガラクトース) の比率はスギよりも低かった。この結果, 乾燥材重量あたりのヘキソース含有率は, スギ 60.6%, ユーカリ 58.8% であり, 両者に大きな差はみられなかった。

また, ソーダ蒸解後に得られたパルプの木材構成糖分析の結果, スギ, ユーカリともに, 材に比べグルコースの比率が高くなり, 逆にキシロースやマンノースの比率は低下した (Table 2)。これは, ソーダ蒸解の過程でセルロースに比べヘミセルロースのほうが多く溶出したため, 相対的にセルロースを構成する糖であるグルコースの比率が高まり, 逆にヘミセルロースを構成する糖であるキシロースやマンノースの比率が低下したためと考えられた。スギパル

プでは、グルコース比率はスギ材に比べ 13-14% 増加し、ヘキソースの比率は 93-94% に達した。ユーカリパルプでも、グルコース比率はユーカリ材に比べ 14-18% 増加したが、依然 13-18% のキシロースが残存していたために、パルプ中のヘキソース比率は 82-87% にとどまった。材およびパルプの構成糖分析結果より、ユーカリをバイオエタノール生産に使用する場合には、ヘミセルロース由来であるペントース（キシロース、アラビノース）から高効率でエタノールを生産することができる酵母または菌を使用することが、エタノール収量を上げるために重要であると考えられた。

3.2 ソーダ蒸解条件の検討

リグニンは酵素の炭水化物へのアクセスを阻害するために、木材の酵素糖化を進めるためには、あらかじめリグニンがある程度除去する、または木材を爆砕⁴⁾、微粉砕⁵⁾する等の処理を行い、酵素が炭水化物に十分に作用できるようにする必要がある。本研究では、ソーダ蒸解でリグニンの除去を行うことにより酵素糖化を進める手法を試みたが、どの程度リグニン除去を進めれば、十分な酵素糖化を進めることができるかについて明らかにされていない。そこで、異なる条件でソーダ蒸解を行いリグニン含有量が異なるパルプを作った後、それぞれのパルプに対して酵素処理を行い、パルプ中のリグニン含有量と酵素処理後の可溶化率との関係を明らかにした。

3.2.1 スギソーダ蒸解

スギでは、蒸解後に得られたパルプのクラソンリグニン量と、パルプを酵素糖化した後に得られた可溶化物量の割合を示す可溶化率との間に相関関係がみられ、クラソンリグニン量 23.4% のパルプの可溶化率は 66.1% であったが、クラソンリグニン量 10.6% のパルプの可溶化率は 98.8% であり、クラソンリグニン量の減少に伴い可溶化率は上昇した (Fig. 2)。この結果より、リグニンを完全に除去しなくても、得られたパルプの酵素糖化を十分に進められると考えられた。しかし、ソーダ蒸解によりパルプ中のクラソンリグニン量を 13% 程度にまで減らし可溶化率 90% を達成するためには 170℃ での保持時間を

3 時間、パルプ中のクラソンリグニン量を 10% 程度にまで減らし可溶化率を 100% 近くにまで上げるためには 170℃ での保持時間を 4 時間にすることがあり、このようなソーダ蒸解を行う場合にはエネルギーコストがかなりかかると考えられた。そこで、より短時間のソーダ蒸解でリグニン除去を行うために、アントラキノン系蒸解助剤 (AQ) を添加したソーダ蒸解を行った。

この結果、AQ を添加した場合も AQ を添加しない場合と同様に、蒸解後に得られたパルプのクラソンリグニン量と、パルプを酵素糖化した後に得られた可溶化物量の割合を示す可溶化率との間に相関関係がみられ、クラソンリグニン量の減少に伴い可溶化率は上昇し、クラソンリグニン量が 18.1% のパルプの場合には可溶化率は 69.7% であったが、クラソンリグニン量が 8.7% にまで低下したパルプの場合には、可溶化率は 99.5% にまで上昇した (Fig. 2)。また AQ を添加した場合も、添加しない場合と同様に、ソーダ蒸解後のパルプ中に含まれるクラソンリグニンを完全に除かなくても、酵素糖化を十分に進められると考えられた。

クラソンリグニン量が同程度のパルプで比較すると、AQ を添加しないパルプのほうが、添加したパルプに比べ高い可溶化率を示した。AQ を添加すると脱リグニンが促進されるために、リグニン量が同じパルプを得るために必要な蒸解時間を短縮することが可能であるが、この結果、パルプ中の炭水化物はアルカリによる分解を受ける時間が短くなり、セルロースへのダメージが少ないパルプを得ることができる。しかし酵素糖化は、セルロースへのダメージが大きいパルプのほうが進みやすいと考えられ、クラソンリグニン量が同程度のパルプの場合には、AQ を添加しないパルプのほうが、添加したパルプに比べ高い可溶化率を示したと考えられた。AQ 添加の有無による可溶化率の差は、クラソンリグニン量が多く含まれるパルプの場合では大きかったが、リグニン量の減少に伴い小さくなり、クラソンリグニン量が 10% 以下のパルプの場合にはわずかであった (Fig. 2)。

AQ を添加したソーダ蒸解の場合には、パルプ中のクラソンリグニン量を 11% 程度にまで減らし可溶化率 90% を達成するためには 170℃ での保持時間を 2 時間、パルプ中のクラソンリグニン量を 9% 程度にまで減らし可溶化率を 100% 近くにまで上げるためには 170℃ での保持時間を 3 時間にすることがあった。AQ を添加しない場合には、それぞれ 3 時間、4 時間の蒸解を行う必要があったために、AQ を添加してソーダ蒸解を行うことにより、添加しない場合に比べ、酵素糖化後の可溶化率が同程度のパルプを得るために必要な蒸解時間を 1 時間短縮することが可能であり、蒸解に必要なエネルギーコストを大きく低下させることができると考えられた。

エタノール収量を上げるためには、酵素糖化後の可溶化率を上げるとともに、蒸解後のパルプ収率を上げることも重要である。そこで、それぞれの蒸解について蒸解後に得られたパルプのパルプ収率を測定し、蒸解条件とパルプ収率について検討を行った。AQ を添加しないで HF 2469 の

Fig. 2 Relationship between Klason lignin content and enzymatic digestibility of sugi soda and soda-AQ pulps

Table 3 Pulp yield, Klason lignin, screen knot and kappa number of soda cooked sugi pulps under various cooking conditions and without AQ

	H-Factor	Cooking time ¹⁾ (hour)	Pulp yield ²⁾ (%)	Klason lignin ³⁾ (%)	Screen knot ²⁾ (%)	Kappa number
Without AQ	1703	1.5	52.2	23.4	2.1	132.0
	2201	2.0	48.9	22.5	0.5	109.0
	2469	2.0	47.1	18.6	0.6	97.5
	2701	2.5	45.8	16.2	0.8	95.8
	3234	3.0	41.9	13.3	0.3	62.8
	4115	4.0	39.9	10.6	0.3	51.3
With AQ	954	0.8	48.6	18.1	4.5	110.0
	1296	1.0	47.3	13.1	0.7	74.5
	2023	2.0	44.0	11.3	0.5	55.9
	3144	3.0	41.1	8.7	0.2	38.2

¹⁾Cooking time at 170°C²⁾Based on the wood³⁾Based on the pulp

蒸解を行った場合、得られたパルプのクラソンリグニン量は18.6%であり、これはAQを添加してHF 954の蒸解を行った場合に得られたパルプのクラソンリグニン量18.1%と近い値であった (Table 3)。両者のパルプ収率を比べると、AQを加えた場合のほうが1.5%高かった。この他にもHF 3243とHF 1296, HF 4115とHF 2023の蒸解後に得られたパルプのクラソンリグニン量は近い値であったが、どちらもAQを添加した場合の方がパルプ収率は高かった。また酵素糖化後の可溶化率で比較すると、HF 2469とHF 1296, HF 3234とHF 2023, HF 4115とHF 3144がそれぞれ近い値を示したが (Fig. 2), AQを添加した場合のほうがクラソンリグニン量は少ないにもかかわらず、パルプ収率は高かった。したがって、AQを添加してソーダ蒸解を行うことにより、AQを添加しない場合に比べより高いパルプ収率を達成することが可能であった。以上の結果よりスギの場合には、AQを添加してHF 3000程度で行う蒸解が、最適なソーダ蒸解条件であると考えられた。

3.2.2 ユーカリソーダ蒸解

ユーカリはスギに比べソーダ蒸解によるリグニン除去が容易であり、AQ未添加の場合には、155°Cでの保持時間が1時間の蒸解でパルプのクラソンリグニン量は6.6%にまで減少し、酵素糖化後の可溶化率は95.1%に達した (Fig. 3)。可溶化率95.1%は高い値であるが、蒸解後の未蒸解部分の比率を示す粕率が5.1%と高い値であったために、この条件では蒸解が十分に進まなかったと考えられた (Table 4)。そこで蒸解時間を延長したところ、スギと同様に、蒸解時間の延長に伴いリグニン除去が進み可溶化率は上昇し、155°Cでの保持時間を2時間にまで延長した場合、クラソンリグニン量3.0%、可溶化率99.4%で、粕率は1%以下に低下した。

AQを添加した場合にはさらにリグニン除去が容易になり、155°Cでの保持時間が0.5時間程度 (HFで示すと143

Fig. 3 Relationship between Klason lignin content and enzymatic digestibility of eucalyptus soda and soda-AQ pulps

-253)の蒸解で、パルプのクラソンリグニン量は2.8-9.5%にまで減少した。クラソンリグニン量が9.5%と高い値のパルプであっても酵素糖化後の可溶化率は100%近い値に達したが、蒸解後の粕率が9.7%と高い値であったために高いパルプ収率を期待できず、蒸解時間を延長する必要があった。蒸解時間の延長 (HF値の増加)に伴い粕率は低下し、逆にパルプ収率は増加し、155°Cでの保持時間が1時間であったHF 350の蒸解では、粕率は1%以下であり、パルプ収率は51.9%に達した。したがって、AQを添加する場合でも、155°Cで1時間程度の蒸解条件は必要であると考えられた。

AQ添加の有無で蒸解結果を比較すると、AQを添加しない場合には155°Cで2時間の保持時間が必要 (HF 663)であったが、AQを添加した場合には、155°Cで1時間の保持時間 (HF 350)で十分であった。AQを添加してソーダ蒸解を行うことにより蒸解時間を1時間短縮することが

Table 4 Pulp yield, Klason lignin, screen knot and kappa number of soda cooked eucalyptus pulps under various cooking conditions with and without AQ

	H-Factor	Cooking time ¹⁾ (hour)	Pulp yield ²⁾ (%)	Klason lignin ³⁾ (%)	Screen knot ²⁾ (%)	Kappa number
Without AQ	435	1.0	49.6	6.6	5.1	48.5
	489	1.5	51.9	4.5	2.2	38.7
	663	2.0	52.0	3.0	0.5	31.5
	684	2.5	51.5	2.3	0.6	28.6
With AQ	143	0.5	47.4	9.5	9.7	52.0
	208	0.5	50.5	5.2	3.9	33.5
	253	0.5	50.9	2.8	2.5	27.6
	350	1.0	51.9	0.4	0.7	22.7

¹⁾Cooking time at 155°C²⁾Based on the wood³⁾Based on the pulp

可能であるために、蒸解に必要なエネルギーコストを大きく低下させることができると考えられた。またパルプ収率は、AQを添加しなかった場合 HF 663 で 52.0%，HF 684 で 51.5%，AQを添加した場合には HF 350 で 51.9% であり近い値であった。しかしこの場合、AQ 無添加の蒸解後に得られたパルプは、AQ 添加の蒸解後に得られたパルプに比べリグニン含有量が高かったために、パルプ中の炭水化物量で比較を行えば、AQを添加した場合のほうが 1% 程度高かった。以上の結果より、ユーカリの場合には、AQを添加して HF 350 程度で行う蒸解が、最適なソーダ蒸解条件であると考えられた。

4. ま と め

木質系バイオマスから低コストでかつ大量生産に向けた新たなバイオエタノール生産法を開発するために、アルカリ前処理としてソーダ蒸解を行う場合の最適な蒸解条件を明らかにすることを目的とし、様々な条件で蒸解を行った。

スギ材はユーカリ材に比べ、リグニン含有率が高く炭水化物含有率は低かった。しかし、ユーカリはキシロース含有率が高かったために、ヘキソース含有率で比較すると、どちらも材あたり 60% 程度で大きな差はみられなかった。ソーダ蒸解後に得られたパルプの木材構成糖分析を行った結果、スギパルプのヘキソース含有率は 93–94% であったが、ユーカリパルプには依然 13–18% のキシロースが残存しており、ヘキソース含有率は 82–87% にとどまった。

スギでは、ソーダ蒸解後に得られたパルプに含まれるクラウンリグニン量と、パルプの酵素処理により可溶化した部分の割合を示す可溶化率との間に相関関係がみられ、クラウンリグニン量の減少に伴い可溶化率は上昇した。この場合、パルプ中のリグニン量をゼロにしなくても可溶化率はほぼ 100% に達した。バイオエタノール生産のためのアルカリ前処理としてソーダ蒸解を行う場合、スギでは、AQを添加し HF 3000 程度で行う条件が、最適な条件であ

ると考えられた。

ユーカリはスギに比べソーダ蒸解によるリグニン除去が容易であり、スギよりも低温かつ短時間の蒸解で、高い可溶化率を達成することが可能であった。しかし短時間の蒸解では、可溶化率は高かったが粕率も高かったために、極端に短時間な蒸解は、可溶化率が高くても好ましくないと考えられた。バイオエタノール生産のためのアルカリ前処理としてソーダ蒸解を行う場合、ユーカリでは、AQを添加し HF 350 程度で行う条件が、最適な条件であると考えられた。

スギ、ユーカリともに、AQを添加してソーダ蒸解を行うことにより、蒸解時間を短縮しかつパルプ収率の増加を達成することが可能であった。

謝 辞

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地球温暖化が農林水産業に及ぼす影響の評価と高度対策技術の開発、農林水産バイオマスエネルギー生産技術の開発」として実施した。また、川崎化成工業株式会社から 1,4-dihydro-9,10-dihydroxyanthracene disodium salt (AQ) をご恵いただいた。ここに記して謝意を表する。

References

- 1) Forest Agency, Annual report on trends of forest and forestry, (2004)
- 2) Biomass Nippon Strategy, The Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of JAPAN, (2007)
- 3) JAPAN TAPPI : New Pulp and Paper Manufacture Vol. 1 Kraft Pulping, JAPAN TAPPI, 41–45 (1996)
- 4) Y. Ado : Mokuzai Gakkaishi 35 (12) 1067–1072 (1989)
- 5) S. Yano, H. Inoue, T. Endo, T. Sakaki and S. Sawayama : Biomass science meeting, Proceedings. The Japan institute of energy, Hiroshima, 2007, p 24–25

(受理：'07.5.11)

JAPAN TAPPI JOURNAL accepts scientific papers written either in Japanese or in English. We, JAPAN TAPPI, translate them into the other of the two languages (Japanese into English and English into Japanese) and print them in addition to the originals under the permission of the authors. We believe that this service of translation will help our subscribers to find and understand the scientific value of the original paper more clearly, and will contribute to the development of science and technology in the paper industry.

- Regarding figures and tables, refer to the original article in Japanese.
- The copy right of the translated version belongs to JAPAN TAPPI.
- If there is any inconsistency between the two versions, the original is always true.
- JAPAN TAPPI is not responsible to any outcomes based on the translated version.

1. Introduction

There is an urgent need for developing clean energy in replacement to petroleum to preserve global environment. Bioethanol is attracting attention as one of prospective substitutes, and is used as motor vehicle fuel in Brazil, North America and China by being mixed with gasoline. At present, it is manufactured from sugar cane and corn which are crops for food. These crops are grown in rather restricted areas, and their harvests are dependent on weather so much that their prices troublesomely fluctuate every year. Therefore, the supply of bioethanol is not expected to be steady in the future. As the crops are being consumed to produce bioethanol in bigger and bigger volume these days, they are getting less available in food and feed markets, and their prices are increasing very rapidly. So, it is needed to develop resources for bioethanol production that will not compete with food and feed.

Cellulosic resources are accumulated on the earth in quite a large volume, and are available almost anywhere, compared with sugar cane and corn that are restricted in their producible area. They are best candidates which make it feasible to produce bioethanol in big volume and to promise their steady supply. Moreover, they will not compete with food demand. Some of cellulosic resources are not commercially used yet. They will be converted to bioethanol in a relatively low cost with expertised knowledge. In Japan, the most abundant cellulosic resource is wood, and its accumulation is 4.040 million m³¹⁾. Calculating the available volume and price of wood resources, the candidates are residues from saw mills (5 million tons/year), residues from construction sites (4.6 million tons/year) and residues at logging sites (3.7 million tons/year). Bioethanol is usually produced from the fermentation of glucose and some oligo sugars. However, cellulose, which is the most abundant carbohydrate in wood, is a polymer of glucose linked by β -1,4-glucosidic bonds and cannot be fermented by yeast directly. To produce bioethanol from wood, the carbohydrate should be hydrolyzed (saccharification) and be converted to sugar units beforehand.

Many papers have been published on saccharification of woody biomass for producing bioethanol. One plant using

sulfuric acid for saccharification has been running since 2007 at the capacity of 1,400 kl/year in Japan. We, however, are aiming to develop a new bioethanol production process which will be feasible for mass production with minimal costs, and are proposing a process capable of doing enzymatic saccharification and fermentation at the same time (simultaneous saccharification and fermentation) using pulp produced by alkaline cooking (an alkaline pre-treatment) (Fig. 1). The paper will clarify the most favorable cooking condition of soda cooking, one of alkaline cooking family, as an alkaline pre-treatment.

2. Experiment

2.1 Wood species

We selected sugi (*Cryptomeria japonica*) that had huge inventory in Japan and could be obtained with cheap price, and one of eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) that was afforested overseas by Japanese companies for their pulp resource.

2.2 Lignin and sugar composition of woods

Sugi and eucalyptus were grounded to wood powder. Their 40 mesh pass fractions were extracted with organic solvent (benzene : ethanol/2 : 1) and used for further analysis. Klason lignin content was measured by a following process. Wood powder or pulp that was produced by soda cooking, equivalent to 1 g, was immersed with 15 ml of 72% sulfuric acid, and was kept for 4 hours at a room temperature under stirring. Then, by adding 560 g of water to it, which reduced its sulfuric acid concentration to 3%, it was further hydrolyzed for 1 hour at 120°C. It was filtered through a glass filter (1 GP 16, pore size 10–16 μ m). The residue on the filter was dried and was weighted, that was Klason lignin. The filtrate was used for sugar composition analysis as usual. It was neutralized to pH 6.0 by saturated solution of barium hydroxide, and was centrifuged. Taking out 50 ml from the upper clear portion, and adding 150 mg of sodium borohydride to it, it was kept for 2 hours for reaction. After dried under vacuum, it reacted with pyridine (5 ml) and acetic anhydride (10 ml) for 3 hours at 120°C. After vacuum drying, it was added with 10 ml of methanol and was analyzed by gas chromatography.

2.3 Soda cooking

Soda cooking for sugi chips was as follows. 150 g (O. D.) of sugi chips (about 20 mm x 20 mm in size) were immersed in 900 ml of sodium hydroxide solution (NaOH : 25.8 wt. %/wood, liquor ratio : 1 : 6). It was heated up to 170°C in 90 minutes, and then was kept at that temperature for designed hours. Soda cooking with anthraquinone addition was under the same condition with adding AQ (1,4-dihydro-9,10-dihydroxyanthracene disodium salt) (by Kawasaki Chemicals Co, Ltd.) at the rate of 0.1 wt. %/wood.

Soda cooking for eucalyptus was as follows. 150 g O. D. of eucalyptus chips were immersed in 600 ml of sodium hydroxide solution (NaOH : 22.7%/wood, liquor ratio : 1 : 4). It was heated up to 155°C in 90 minutes, and was kept at that temperature for designed hours. Soda cooking with AQ addition was under the same condition with adding AQ at the addition rate of 0.1%/wood.

2.4 Enzymatic treatment

Pulp (0.2 g O. D.) produced by soda cooking was saccharified by 50 mg of cellulase at the pH of 4.8 buffered by 10 ml of acetic acid at 40°C for 60 hours. Then, it was filtered through a glass filter (1 GP 16). The residue on the filter that had not become soluble by the treatment was dried and weighted. By subtracting it from the total weight, the weight that became soluble by the treatment was calculated. The ratio of that weight to the weight of carbohydrate in the original pulp was named "enzymatic digestibility".

2.5 H-Factor

When cooking is carried out over 150°C, temperature fluctuation of just 1°C during the cooking greatly affects the result. In case when temperature was unable to be controlled precisely as designed, an actual condition was not identical to what it should be. To represent the actual cooking condition more truly, H-factor was used, which was calculated from a temperature-time chart of the whole cooking procedure. Every cooking condition was converted to H-Factor (abbreviated as HF). The activation energy of delignification was assumed to be 32 kcal/mole in the experiment.

2.6 Screen knot

Pulp after cooked was put through a flat screen (slit width : 0.125 mm). The reject on a screen was dried and weighted (O. D.). The ratio of it to the original pulp weight was called screen knot.

2.7 Kapper number

The kapper number of pulp was measured according to Tappi Standard T 236 cm-85.

3. Result and discussion

3.1 Lignin and sugar composition analysis

Klason lignin contents of sugi and eucalyptus were 31.5% and 20.6% respectively. Sugi had more lignin than eucalyptus on wood weight basis (Table 1). Lignin, that will be recovered after soda cooking as well as after simultaneous saccharification and fermentation, can be used to generated energy. So, sugi has a chance of recovering more energy from the process. Eucalyptus, on the other hand, was rich in carbohydrate. Regarding sugar composition, eucalyptus was richer in xylose that came from hemicellulose, and was less in hexose (glucose, mannose and galactose) that could be used for ethanol production by yeast fermentation than sugi. Calculated on wood O. D. basis, the hexose content of sugi was 60.6% and that of eucalyptus was 58.8%. There was not much difference between them.

From the sugar composition analysis of soda cooked pulp, both sugi and eucalyptus pulps were higher in glucose content, and were less in xylose and mannose contents than their original woods (Table 2). It suggested that, during soda cooking, hemicellulose dissolved into cooking liquor more easily than cellulose, and the ratio of glucose in the pulp, that was a component of cellulose, comparatively increased and the ratios of xylose and mannose in the pulp, which were components of hemicellulose, decreased. The glucose content in sugi pulp was higher than that of sugi wood by 12–13%. The hexose content in sugi pulp reached to 93–94%. Eucalyptus behaved in the same way as sugi. Its glucose content was higher than that of the wood by 14–18%. However, xylose was still remaining in the eucalyptus pulp by 13–18% and the hexose ratio in the pulp was 82–87%. If you want to produce bioethanol from eucalyptus in high efficiency, it will be important to use a type of yeast or bacteria which can digest pentose (xylose and mannose) originated from hemicellulose.

3.2 Soda cooking conditions

As lignin obstructs the access of enzyme to carbohydrate, pre-treatments which make the access possible such as removing lignin beforehand or fragmenting wood by explosion⁴⁾ or milling⁵⁾ are necessary. We were interested in removing lignin by soda cooking to help enzymatic digestion. However, how much lignin should be removed to carry on sufficient saccharification by enzyme has not been clear yet. So, we prepared several pulps of different lignin contents, treated them with enzyme, and made clear a relationship between the residual lignin content and the enzymatic digestibility.

3.2.1 Soda cooking of sugi

With sugi soda pulp, there was a correlation between Klason lignin content and enzymatic digestibility that was the ratio of soluble fraction by enzymatic treatment. A

pulp whose Klason lignin was 23.4% had the enzymatic digestibility of 66.1%, and one whose Klason lignin was 10.6% showed the enzymatic digestibility of 98.8%. The enzymatic digestibility increased with decreasing Klason lignin content (Fig. 2). It would not be needed to remove lignin completely to get high digestibility. The cooking condition for pulp whose Klason lignin was about 13% and which promised the enzymatic digestibility of 90% was 170°C for 3 hours. The pulp whose Klason lignin content was about 10% and whose digestibility was almost 100% required the condition which was 170°C for 4 hours. The energy needed in these cookings was expensive. To accelerate delignification in less hours for saving the energy, anthraquinone (AQ) was added to soda cooking.

In the cooking with AQ, there was a correlation between residual Klason lignin and enzymatic digestibility like one observed in the cooking without AQ. The enzymatic digestibility increased with decreasing Klason lignin. The pulp whose Klason lignin was 18.1%, had the digestibility of 69.7%. The pulp whose Klason lignin was 8.7% had the digestibility of 99.5% (Fig. 2). It was suggested that the residual Klason lignin would not be necessarily removed completely, to get high enzymatic digestibility just like the case of cooking without AQ.

When pulps of the same Klason lignin content were compared, pulp cooked without AQ gave higher digestibility than pulp with AQ. The AQ addition accelerated delignification, and shorted the time needed to reach the same Klason lignin content. It meant that carbohydrate in the pulp was kept in alkaline for lesser time, and cellulose, one of carbohydrate, was less damaged during the cooking. It is reasoned that pulp whose cellulose is more damaged will be digested by enzyme faster than one less damaged. When compared at the same Klason lignin content, pulps cooked without AQ showed higher enzymatic digestibility than those cooked with AQ. The difference in the digestibility between with AQ and without AQ was relatively large in the range of high Klason lignin content, and was getting smaller with decreasing lignin content. It was very small with pulps whose Klason lignin content was less than 10% (Fig. 2).

In the cooking with AQ, the condition to get the pulp, whose Klason lignin content was about 11% which was equivalent to the enzymatic digestibility of 90%, was 170°C for 2 hours. The condition needed to get pulp whose Klason lignin content was about 9% and whose digestibility was close to 100% was 170°C for 3 hours. In the cooking without AQ, the cooking times needed for pulps of the same qualities were 3 hours and 4 hours respectively. So, the AQ addition shorted the cooking time by one hour if the pulp of the same digestibility was wanted. It would be large saving in cooking energy cost.

To increase the yield of ethanol, increasing pulp yield at cooking is as important as improving enzymatic digestibility of pulp. The relation between cooking condition and pulp yield was studied in two cases, with and without AQ. The cooking of HF 2469 without AQ produced pulp whose Klason lignin content was 18.6%. The cooking of HF 954 with AQ got pulp whose Klason lignin content was 18.1%

Former was close to the latter in the lignin content (Table 3). When their pulp yields were compared each other, the pulp with AQ was higher by 1.5% than that without AQ. The pulp of HF 3243 and the pulp of HF 1296 were close to each other in the Klason lignin content, and the pulp of HF 4115 and the pulps of HF 2023 were also close each other. In both cases, the pulps with AQ were higher in pulp yield than the counterpart pulps without AQ.

Regarding enzymatic digestibility, the pulp of HF 2469 and the pulp of HF 1296, the pulp of HF 3234 and the pulp of HF 2023, and the pulp of HF 4115 and the pulp of HF 3144 were taken as a set. In every set, one was close to the other in the digestibility (Fig. 2). However, the pulps cooked with AQ showed higher yields than the pulps without AQ, though they were less in Klason lignin contents. In conclusion, the AQ addition in soda cooking fairly improved pulp yield. The best cooking condition for sugi was about HF 3000 with AQ.

3.2.2 Soda cooking of eucalyptus

Eucalyptus was more easily delignified by soda cooking than sugi. Its Klason lignin content went down to 6.6% by soda cooking at 155°C for 1 hour without AQ. The enzymatic digestibility of that pulp was up to 95.1% (Fig. 3). Though the value of 95.1% was high enough, the reject ratio or screen knot of that cooking that represented uncooked portion of wood was 5.1%, which meant that the cooking was not carried on enough (Table 4). So, its cooking time was prolonged. With prolonged cooking time, the lignin content was reduced and the enzymatic digestibility increased just as observed with sugi cooking. The cooking at 155°C for 2 hours produced the pulp whose Klason lignin content and enzymatic digestibility were 3.0% and 99.4% respectively with the screen knot of less than 1%.

AQ addition further accelerated delignification. The cooking at 155°C for a half hour (whose HF was 143–253) reduced the Klason lignin content to 2.8–9.5%. Even the pulp that had 9.5% in Klason lignin showed the enzymatic digestibility of almost 100%. However, the screen knot of that cooking was so high to be 9.7%, and good pulp yield was not expected. So, the cooking time had to be prolonged. As cooking time was increased, which meant increased HF, the screen knot went down and the pulp yield increased. At the cooking of HF 350, that was equivalent to 155°C for 1 hour, the screen knot was less than 1%, and the pulp yield was up to 51.9%. We believed

that a cooking condition of 155°C for 1 hour was required even with AQ addition.

Let us summarize comparison between cooking results with AQ and without AQ. While a cooking condition of 155°C for 2 hours (HF 663) was needed without AQ, it was 155°C for 1 hour (HF 350) with AQ. This shortened cooking time by 1 hour with AQ addition will reduce the energy cost for cooking. Regarding pulp yield, the cooking of HF 663 and the cooking of HF 684, both of which were without AQ, produced pulp yields of 52.0% and 51.5% respectively. The cooking of HF 350 that was with AQ gave pulp yield of 51.9%, which was close to yields obtained by the cookings without AQ. The pulps cooked without AQ contained more lignin than that with AQ. When they were compared on carbohydrate content basis, the pulp with AQ was rich by about 1%. It was concluded that the best cooking condition for eucalyptus was about HF 350 with AQ addition.

4. Conclusion

In order to develop a process of bioethanol production feasible for mass production with minimal cost from wood biomass, soda cooking was taken as an alkaline pretreatment. Cooking conditions were studied to find the best as pretreatment.

Sugi wood was higher in lignin content and was less in carbohydrate content than eucalyptus wood. On the other hand, eucalyptus was abundant in xylose. When they were compared on hexose content basis, both woods had almost the same hexose content, that was about 60%. After soda cooking, sugar composition analysis of their pulps was carried out. The hexose content of sugi pulp was 93–94%. In eucalyptus pulp, xylose still resided to 13–18%, and hexose content was 82–87%.

After cooking, Klason lignin content and enzymatic digestibility that was a ratio of digested weight of pulp by enzyme to its original weight were determined. There was good a correlation between them, and the enzymatic di-

gestibility increased with decreasing Klason lignin content. The digestibility reached almost 100%, before the lignin was removed completely to zero. The best soda cooking condition for sugi wood was that HF was about 300 with AQ addition.

Eucalyptus was more easily delignified by soda cooking than sugi. Eucalyptus pulp was able to give high enzymatic digestibility by cooking that was less in temperature and cooking time than those for sugi. When the cooking time was shortened, the screen knot increased despite of the high digestibility. Therefore, too short cooking time was not favorable. The best soda cooking condition for eucalyptus as an alkaline pretreatment for bioethanol production was that HF was around 350 with AQ addition.

Soda cooking with AQ addition reduced cooking time and increased pulp yield for sugi as well as for eucalyptus.

Acknowledgement

This research was a project sponsored by the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan as “Evaluation on the effect of global warming on agriculture, forestry and fisheries and the development of the counter measures : Development of energy production from biomass in agriculture, forestry and fisheries” We thanks to Kawasaki Chemicals Co. Ltd. for giving us 1,4-dihydroxy-9,10-dihydroxyanthracene disodium salt (AQ).

References

- 1) Forest Agency, Annual report on trends of forest and forestry, (2004)
- 2) Biomass Nippon Strategy, The Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of JAPAN, (2007)
- 3) JAPAN TAPPI : New Pulp and Paper Manufacture Vol. 1 Kraft Pulping, JAPAN TAPPI, 41–45 (1996)
- 4) Y. Ado : Mokuzai Gakkaishi 35 (12) 1067–1072 (1989)
- 5) S. Yano, H. Inoue, T. Endo, T. Sakaki and S. Sawayama : Biomass science meeting, Proceedings. The Japan institute of energy, Hiroshima, 2007, p 24–25