

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

磁性ナノ球状カプセル酵素と酵母による

バイオエタノールの製造および

相溶化処理した生分解性複合材料の創製に関する研究

(3K113018)

平成 26 年 3 月

公立大学法人秋田県立大学 邱 建輝

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 53,861,000 円（複数年度の総計）

研究課題名 磁性ナノ球状カプセル酵素と酵母によるバイオエタノールの製造および相溶化処理した生分解性複合材料の創製に関する研究

研究期間 平成 23 年 6 月 1 日～平成 26 年 3 月 31 日

研究代表者名 邱 建輝（秋田県立大学）

研究分担者 小林淳一（秋田県立大学）
境 英一（秋田県立大学）
高橋武彦（秋田県立大学）
伊藤一志（秋田県立大学）
工藤 素（秋田県産業技術センター）

目次

総合研究報告書概要	1
本文	
1. 研究背景と目的	5
1.1 はじめに	5
1.2 バイオエタノール製造技術の現状	7
1.2.1 酵素糖化法	7
1.2.2 酵素糖化前処理としての微粉碎加工	10
1.2.3 酵素の開発と固定化	11
1.3 生分解性複合材料	13
1.3.1 プラスチックの現状	13
1.3.2 生分解性プラスチックおよびその複合材料	15
1.4 研究の目的	15
2. 研究方法	17
2.1 材料	17
2.2 バイオマスの微粉碎加工とその微粉末の特性評価	18
2.2.1 微粉碎加工	18
2.2.2 微粉末の性状評価	19
2.2.3 微粉末の酵素糖化性および発酵性の評価	19
2.3 磁性ナノ球状カプセル酵素の作製および性能評価	20
2.3.1 作製方法	20
2.3.2 作製した酵素の特性評価	22
2.4 新規生分解性複合材料の作製および性能評価	23
2.4.1 バイオマスの表面処理	23
2.4.2 試験片の作製	25
2.4.3 物性評価および内部構造観察	25
2.4.4 実製品の試作	26
3. 低コストのバイオエタノール製造	28
3.1 タンデムリングミル [®] による粉碎の有効性	28
3.1.1 微粉末の性状	28
3.1.2 微粉末の酵素糖化性	30
3.1.3 大容量ミルによる微粉碎加工	32
3.2 バイオマスの酵素糖化および発酵性にかかる最適条件	33
3.2.1 基本酵素糖化条件	33
3.2.2 基本発酵条件	34
3.2.3 原料の影響	35
3.2.4 同時糖化発酵性	37
3.3 磁性ナノ球状カプセル酵素による糖化	38
3.3.1 キトサン担体結合法により作製した固定化酵素	38
3.3.2 シリカ被覆により作製した固定化酵素	44
3.3.3 固定化酵素による稲わらの糖化性	49
4. 環境に優しい新規生分解性複合材料	50
4.1 稲わら/生分解性樹脂複合材料の基本特性	50

4.1.1	熱特性および力学特性	50
4.1.2	分解特性	54
4.2	シランカップリング剤による表面処理の効果	57
4.3	アドミセル乳化重合によるポリマー表面被覆処理の効果	58
4.3.1	モノマーの選択	58
4.3.2	PMMA 被覆した稲わら粉末の性状	61
4.3.3	力学特性および内部構造	61
4.4	無水酢酸によるアセチル化表面処理の効果	63
4.4.1	稲わら粉末の性状	63
4.4.2	アセチル化表面処理複合材料の特性	70
4.5	糖化残渣/生分解性樹脂複合材料の特性	72
4.5.1	糖化残渣の無水酢酸によるアセチル化表面処理の効果	72
4.5.2	糖化残渣/PLA 複合材料の力学特性と内部構造	73
4.6	実製品の試作結果	75
4.6.1	押出シート	75
4.6.2	圧延加工による材料特性の変化	80
4.6.3	スマートフォン梱包用ケース	83
5.	結論	87
6.	参考文献	90
7.	研究発表	96
8.	研究概要図	101
9.	英文概要	102

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: 磁性ナノ球状カプセル酵素と酵母によるバイオエタノールの製造および相溶化処理した生分解性複合材料の創製に関する研究

研究番号 : 3K113018

国庫補助金清算所要額 : 53,861,000 円 (複数年度の総計)

研究期間 : 平成 23 年 6 月 1 日～平成 26 年 3 月 31 日

研究代表者名 : 邱 建輝 (公立大学法人秋田県立大学)

研究分担者 : 小林淳一 (公立大学法人秋田県立大学)、境 英一 (公立大学法人秋田県立大学)、高橋武彦 (公立大学法人秋田県立大学)、伊藤一志 (公立大学法人秋田県立大学)、工藤 素 (秋田県産業技術センター)

研究目的

資源の有効利用、地球環境問題、エネルギー問題は益々注目されつつある。そのため、一層の廃棄物・炭酸ガス削減およびカーボンニュートラルで再生可能なバイオマスの有効利用による循環型社会形成が強く求められている。

本研究では、バイオマスの総合利用として、回収・再利用できる磁性ナノ球状カプセル酵素と酵母、および稲わらなどの草本系バイオマスの表面処理技術(リグニンなどの残渣も含む)を開発・確立し、低コストのバイオエタノール製造技術と新規生分解性複合材料の開発および実用化を目指すことを全体目標とする。

研究方法

(1). 大容量振動ミルによるバイオマスの微粉碎加工

振動ミルをベースに開発した高効率粉碎機タンデムリングミル (中央化工機商事製) により各バイオマス (稲わら、麦わら、もみ殻) を 30min 粉碎加工した。このとき得られたバイオマス微粉末の性状と酵素糖化性について調べた。

(2). バイオマスの糖化およびエタノール発酵条件の確立

まず、磁性ナノ球状カプセル酵素によるバイオマスの糖化・発酵に関する基礎的知見を得るために、市販の酵素剤および酵母剤であるアクレモニウムセルラーゼおよび *Saccharomyces Cerevisiae* Fali を用いて、各バイオマスの最適な糖化条件およびエタノール発酵条件を検討した。

次に、3種類の方法で作製した磁性ナノ球状カプセル酵素（固定化酵素）について、ブラッドフォード法に基づき酵素結合率などを調べることで検討した。さらにカルボキシメチルセルロース（CMC）を基質として相対活性を調べた。また、pH や反応温度の影響を調査し、それより得られた最適条件で固定化酵素により糖化実験を行った後に磁石で回収した磁性ナノ球状カプセル酵素を用いて、再び糖化実験を行う再利用性を検討した。

(3). バイオマスの表面処理、複合材料の作製および性能評価

表面処理については2種類検討した。まず1つ目の方法として、稲わらにアドミセル乳化重合と呼ばれる表面処理によりポリ乳酸（PLA）と相溶性の良い高分子膜を被覆する方法を検討した。被覆する高分子膜の材料は、理論と実験的の両面から選択した。次に2つ目の方法として無水酢酸を用いたアセチル化表面処理について検討した。この表面処理については稲わらの酵素糖化残渣（主にリグニン）についても実施した。表面処理の前に4回遠心分離を行った残渣を「洗浄」、行っていない残渣を「未洗浄」とし、表面処理の有無を含めて4種類の残渣を用意した。

稲わらおよび残渣をバイオマス由来の生分解性プラスチックであるポリ乳酸（PLA）と二軸溶融混練し、コンパウンドペレットを作製した。次にこれをノズル温度 180~200°Cの射出成形機により JIS 基準の試験片に成形することで、力学特性評価用の試験片を作製した。条件は、射出速度 17.6mm/s、金型温度 30°Cとした。その界面構造の分析は、透過型電子顕微鏡（TEM）（日本電子（株）、JEM-1010、JEM-2000EX、JEM-2100F）により、破断面の分析は走査型電子顕微鏡（SEM）（（株）日立ハイテクノロジーズ製、S-4300）により行った。TEM 観察は、日本電子株式会社に委託して行った。

結果と考察

(1). タンデムリングミル[®]粉砕の有効性

タンデムリングミル[®]は、粉砕媒体が粉砕容器内壁に沿って転動することで遠心力を作用微粉砕を行うものである。アンバランスウェイトの回転を上下でカウンターさせることで水平方向の加振力を発生させて駆動するため、従来の粉砕機に比べてエネルギーを削減することができる。秋田県立大学では処理量 1000kg/h のタンデムリングミル[®]型大容量粉砕機を試作した。これより得られた微粉末は、時間の経過と共に粒径とセルロース結晶化指数が低下した。タンデムリングミル[®]により、30min 微粉砕することで粒径が約 10 μ m、結晶化指数が 54%でほぼ一定となることがわかった。また、その微粉末はカッターミル粉砕により作製した 20~106 μ m のものよりもホロセルロース糖化率が極めて高くなった（約 70%）。

(2). バイオマスの糖化およびエタノール発酵条件

稲わらの市販酵素剤による最適糖化条件は、酵素量 3%、温度 50°C、pH4.0~5.0 であることが示された。また、市販酵母剤による発酵条件については、温度 32°C、pH5.0 が最適条件であることが示された。原料による違いを検討した結果、グルコース収率については麦わら

で 312.3g/kg-biomass と最も高くなったが、エタノール収率は稲わらで 121.9 g/kg-biomass と最大となり、変換効率 0.42 と他よりも優れた結果を示した。

本研究では 3 種類の方法により固定化酵素を作製したが、ここでは紙面の都合上、キトサン担体結合法の結果について述べる。作製した固定化酵素の酵素結合率と相対活性を分析した結果、相対活性 5.23IU/mg の活性をもつ酵素を 112.3mg/g (結合率 72.4%) 固定化できたことがわかった。さらにその最適な反応条件を検討した結果、pH5.0、温度 50°C と酵素単体と同じとなった。その再利用性について検討した結果、活性は 2 回目以降で 30% 近く低下することが示されたが、通常行われる 24h の糖化ではグルコース濃度は 2 回目以降でも初回の 80% 以上の値を示した。したがって、作製した酵素は工業的には高い再利用性をもつことが明らかとなった。しかし、これらの結果は基質が CMC の場合であり、稲わらで行った場合、稲わらの高い吸着能が原因で酵素が脱落してしまい、非常に低い回収率を示した。

(3). 表面処理により作製したバイオマス/生分解性樹脂複合材料の力学特性

まず、稲わらをアドミセル乳化重合により表面処理し、PLA と相溶性の良い高分子膜を被覆した。被覆した高分子膜の材料には、ハンセン溶解度パラメータによる理論的検討とブレンド試料の材料物性および内部構造分析による実験的検討からポリメチルメタクリレート (PMMA) のモノマーであるメタクリル酸メチル (MMA) を選択した。アドミセル乳化重合処理を行った稲わらの表面には高分子の膜が形成されていることが SEM 観察により認められた。アドミセル乳化重合により PMMA 被覆表面処理した 30wt% 稲わら/PLA 複合材料の引張強度は、MMA 添加量がわずか 0.02% (v/v) で 60MPa 以上となり、未処理の複合材料 (約 40MPa) よりも大幅に向上した。その破断面および界面構造を分析した結果、稲わら-PLA の高い密着性を観察できたことから、それらの相溶性の改善を明確に認めることができた。

次に、無水酢酸によるアセチル化表面処理について検討した。無水酢酸による表面処理では、稲わら表面にエステル結合の形成を示唆する粒が形成される一方で、無水酢酸のモル濃度が高いと稲わらの主成分が加水分解されてしまうことがわかった。このモル濃度と強度の関係を検討した結果、0.001M と最も薄い濃度で 30wt% 稲わら/PLA 複合材料は最大引張強度 (約 62MPa) を示し、PLA 単体と同等までに回復した。

さらに、リグニンなどの残渣についても無水酢酸を用いて表面処理した。残渣の洗浄および無水酢酸による表面処理の併用により、複合材料の引張強度が向上した。また、その強度の向上は残渣添加量が多いもので高く現れた。さらに、残渣/PLA 複合材料の破断面を表面処理前後で比較した結果、表面処理により残渣-PLA の密着性が改善されていることを明確に観察できた。したがって、表面処理による効果を認めることができた。

最後に、実製品の試作として容器・包装材などの成形に用いられるシートを押出成形により作製し、その力学特性などを調べた。結果において、比較的 PLA と性質の近い硬質ポリ塩化ビニルシートの JIS 基準の要求値と比較したところ、十分な強度を得ていた。さらに、製品試作のための二次加工の前段階として、複合材料の力学特性改善の手段とした圧延加工を行う前段階として、その塑性変形について検討し、基礎的知見を得た。結果として、圧延加工による塑性変形は試料内部よりも表面で大きく発生することが示唆された。以上の知見

をもとに二次加工としてホットプレス成形を行うことでスマートフォン梱包用ケースを試作した。その外観は表面処理を行ったもので割れやキズなどはみられないものとなった。しかし、多くの筐体に求められる耐衝撃性や耐熱性、防水性や防塵性の評価は行っていないため、今後の検討が待たれる。

環境政策への貢献

- (1). バイオエタノール製造後の残渣なども環境に優しい生分解性複合材料に利用されるため、廃棄物の排出を最小限に抑えられる。
- (2). バイオマスを利用した生分解性複合材料はグリーンコンポジットと呼ばれ、低コストかつ大規模に工業化生産が可能であるので、プラスチック製の民生用品、容器包装材などに使用すれば、環境に悪い廃棄プラスチックの処理量を減少させることができる。

研究成果の実現可能性

本研究では磁性ナノ粒子に固定化された酵素を微粉碎された稲わら粉末に添加して糖化反応を行うと、ゼータ電位の違いなどにより、酵素が稲わら粉末に吸着され、磁性ナノ粒子から脱落してしまい、磁力による繰り返し回収が困難であることがわかった。この問題を解決するために、磁性ナノ粒子に酵素の固定化と吸着による酵素の回収方法および前処理として亜臨界水によるヘミセルロースの加水分解の方法を提案し、低粉碎コスト、低酵素添加量、酵素の回収・再利用可能な高効率の糖化効果が得られる糖化技術の開発を進めている。

一方、生分解性複合材料については実製品の試作に至っており、今後は大容量の表面処理などを検討することで早期の実用化が期待できる。

結論

本研究では低コストのバイオエタノール製造および環境に優しい新規生分解性複合材料の民生製品（例えば容器・包装材など）への実用化を目指し、新規生分解性複合材料については製品化の可能性が十分にあるが、上記のようにバイオエタノールの製造に関してはいくつかの課題が発生した。現在、解決策を提案し、研究を進めており、今後も引き続きその検討を行っていき、実用化を図る。

本文

1. 研究背景と目的

1.1 はじめに

現代社会において、化石資源の枯渇化や地球環境問題が益々深刻化している。このため、廃棄物や炭酸ガスの削減による地球温暖化の防止および循環型社会の形成などを狙いとして、化石資源依存型社会から再生可能な資源でカーボンニュートラルの特性をもつバイオマス (biomass) をエネルギーや材料 (製品) として用いるバイオマス利用型社会への移行が、世界的に求められている。本国でも、2002年12月27日にバイオマス・ニッポン総合戦略が閣議決定されて以来 (2006年3月31日改定)、バイオマスの活用推進に強く取り組む姿勢が示されてきた。この総合戦略では、2010年度を目途とする具体的な目標が設定され、「地球温暖化の防止」、「循環型社会の形成」、「競争力のある新たな戦略的産業の育成」および「農林漁業、農山漁村の活性化」の4つの効果の発現が目指されていたが、数値目標などの関係が明確でなかったことなどから、成果評価が困難となっていた。このため2009年9月12日にバイオマス活用推進基本法 (平成21年法律第52号) が施行され、その第20条に基づきバイオマス活用推進基本計画が2010年12月17日に閣議決定された。この基本計画では、全都道府県および600市町村において2020年を目標年とした地域のバイオマス活用推進計画を策定することを掲げており、その基本的方針や国が達成すべき目標、政府が総合的かつ計画的に講ずべき施策などが示されている⁽¹⁾。このような国の環境政策によるバイオマス活用への強い推進は、全国的な活用取組事例の増加につながっている。それらの事例は、先の総合戦略で目指されていた通り、地球温暖化の防止や循環型社会形成の推進のみならず、農山漁村の衰退が見られる近年、1次産業としての農林漁業と2次・3次産業との融合による地域ビジネスの展開と新たな業態の創出を促すという大きな効果が期待されるからこそ、増え続けているのである。

さて、一般にバイオマスは、家畜排せつ物や食品廃棄物のような「廃棄物系バイオマス」、林地残材や農作物非食用部 (稲わら、もみ殻など) のような「未利用バイオマス」、糖質資源 (さとうきびやてんさいなど) や油脂資源 (なたねなど) のような「資源作物」の3種類に大別できる。このうち、廃棄物系バイオマスと未利用バイオマスは、食料と競合することのない非可食性の資源として活用が期待されており、前述の基本計画においても利用が推進されている。それらのうちの本質系および草本系の (リグノ) セルロース資源は、主成分にセルロース、ヘミセルロース、リグニンをもつため、燃料用エタノールや石油代替化成品原

料、プラスチックなどの素材や複合材料などとして利用できる可能性があり、注目が集まっている。また、それらのほとんどは林地残材や農作物非食用部のような未利用バイオマスであるため、大きな期待が寄せられている。

草本系と木質系は、本国を含むアジア諸国において安定調達を期待できるバイオマスであり、中でも草本系バイオマス（あるいはソフトセルロースと呼ばれる）である稲わらや麦わら、もみ殻は、表 1-1 のように世界で各々およそ 7.3 億 t/year⁽²⁾、3.5 億 t/year⁽²⁾、1.4 億 t/year⁽³⁾ 発生しており、アジアでの発生量が極めて大きい。

表 1-1 世界の草本系バイオマス発生量 (unit: million ton)

Material	Africa	Asia	Europe	America	Oceania	World	Ref.
Rice straw	20.9	667.6	3.9	37.2	1.7	731.3	(2)
Wheat straw	5.3	145.2	132.6	62.6	8.6	354.3	(2)
Rice husk	-	125.0	-	-	-	137.0	(3)

国内でも草本系（農作物非食用部）はおよそ 1,400 万 t/year 発生しており⁽⁴⁾、すき込みを除くと約 30%しか利用されていない。前述の基本計画では、それらの全国平均の利用率を 2020 年までに約 45%までにすることとしており⁽¹⁾、その有効活用の方法や利用技術の確立に関する取組が強く望まれている。このため、米などの農業が盛んな都道府県や市町村への期待は大きい。研究代表者らの機関が位置する秋田県もまた、農林水産省大臣官房統計部が公表している「平成 25 年度産水陸稲の収穫量」⁽⁵⁾によると全国 3 位の米の原産地であるため、稲わらなどのソフトセルロース資源が豊富に存在する。秋田県の稲わら賦存量を表 1-2⁽⁶⁾に、秋田県 3 地域区分での賦存量を図 1-1 に示す。

表 1-2 秋田県の稲わら賦存量⁽⁶⁾

地域名	H21	H22	H23
県北	124	134	126
県央	226	232	228
県南	216	225	219
計	566	591	573

(風乾重 (水分 10~15%) 単位: 千 t/年)

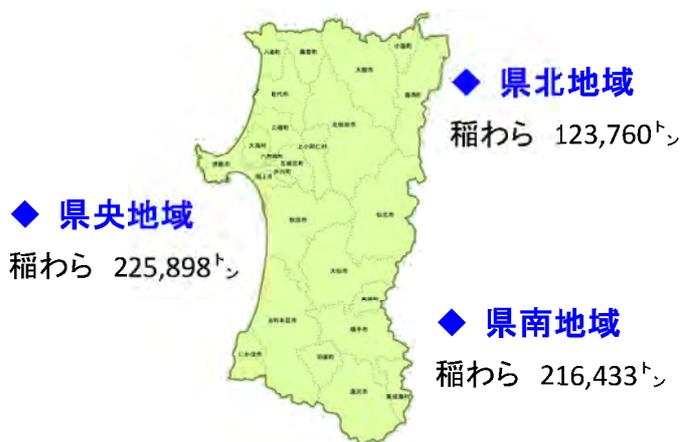


図 1-1 秋田県 3 地域の稲わら賦存量 (平成 21 年)

表 1-2 および図 1-1 のように、(水田の作付面積の変動や水稻の生育状況に左右されるが) 秋田県ではおよそ 60 万 t/year もの稲わらが生産されている。また、土づくり対策の一環として稲わらなどの有機物のすき込みを長年指導してきたため、現在発生している稲わらの 91%がすき込み利用となっている⁽⁶⁾。言い換えれば、秋田県はそれら稲わらなどのエネルギーや材料となる可能性をもつ重要な資源が多く眠っているということである。

この活用の検討として、秋田県では、バイオエタノール推進会議を設置し、「秋田県ソフトセルロース利活用プロジェクト」として平成 20 年度から平成 24 年度までの 5 年間、植物などのバイオマス为原料とするバイオエタノールの実用化について取り組んできた。その一環として社団法人秋田県農業公社を主体として県北地域に位置する大潟村で実施された「稲わらの収集・運搬実証事業」において、収集運搬システムや長期保管方法、収奪による土壌などへの影響などが検討された⁽⁶⁾。研究代表者らはこの事業担当者にヒアリングを行い、事業成果について調査を実施したところ、大潟村内中央地域でのプラント施設の設置や、農家自身が輸送することなどの前提条件が必要であるが、機械購入の補助などを行うことで稲わらの販売単価を 7 円/kg 以上と抑える方法があることがわかった⁽⁶⁾。

以上のように、本国、中でも秋田県では稲わらなどの草本系バイオマス（ソフトセルロース資源）の有効活用に対する期待が大きく、そのための収集・運搬システム確立のための先行事業なども行われている。したがって、次なる課題として、それらをバイオエタノールや材料などに利用するための要素技術の開発が非常に重要になってきている。

1.2 バイオエタノール製造技術の現状

1.2.1 酵素糖化法

バイオエタノールは現在、サトウキビ・シュガービートなどの糖質原料や、米・麦・トウモロコシなどのデンプン質原料から製造されており、食糧と競合するため問題となっている⁽⁷⁾。このため、稲わらのような非可食性セルロース資源からの製造が特に注目されている。

エタノールは、一般に糖を発酵させて生産されるが、通常エタノール生産に用いられる酵母である *Saccharomyces cerevisiae* は、一部の単糖や二糖にしか直接利用できない。セルロースは図 1-2 に示すような構造をもっており、六単糖であるグルコースを単一構成成分とする直鎖状の結晶性高分子である⁽⁸⁾。セルロース資源からバイオエタノールを製造するためには、このような高分子であるセルロースを構成糖であるグルコースまで分解する糖化(加水分解)行程が必要となる。この際の糖化方法には、酸糖化法と酵素糖化法の二つがあり⁽⁸⁾、そのう

この酸糖化法は、原料を硫酸のような強酸により加水分解することで糖化液を抽出する方法である。この方法には、反応時間が短いことや糖化に利用する硫酸が安価などのメリットがあるが、高温高圧下で強酸を用いて行うために安全性に不安があり、糖化後の酸回収や再利用が困難であることや、生成した糖が過剰に分解され、発酵阻害物質を生成してしまうなどのデメリットがある⁽⁸⁾。

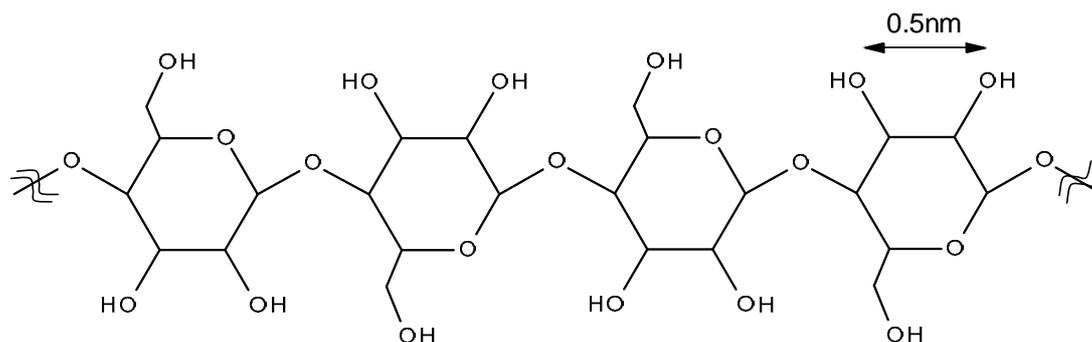


図 1-2 セルロースの構造⁽⁸⁾

このことから近年、非硫酸系である酵素糖化法が注目されている。しかし、セルロース資源に対して使用されるセルラーゼと呼ばれる複合酵素は、価格が高いという問題がある⁽⁹⁾。デンプン質原料の場合でもこの酵素糖化が行われるが、アミラーゼと呼ばれる安価な酵素により容易に糖化できるため大きな問題とならない。また、稲わらなどのリグノセルロース資源は、セルロースを、ヘミセルロース、リグニンが繊維状に複雑に絡んで強固に取り囲んでいる構造となっているため⁽¹⁰⁾、糖化酵素を直接加えてもほとんど反応が起こらない。例えば、表 1-3 に示すように、稲わらは、セルロース 32～47%、ヘミセルロース 19～27%、リグニン 5～24%の組成であり、ヘミセルロースとリグニンの占める割合が高いといわれている。

表 1-3 草本系バイオマスの化学組成 (unit: %)

Substrate	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	Ref.
Rice straw	32-47	19-27	5-24	(2)
Wheat straw	35-45	20-30	8-15	(2)
Rice husk	22-53	5-23	15-20	(11),(12)

ヘミセルロースは六単糖であるマンノース、五単糖であるキシロースを構成成分とした分岐構造を持つ非晶性高分子であり⁽⁷⁾、加水分解により構成糖にまで分解できる。近年ではキ

シロースからのエタノール発酵も研究されてきている⁽¹³⁾。しかし、芳香族化合物であるリグニンをエタノールに変換する技術については現状では報告がない。このヘミセルロースとリグニンの存在状態ゆえに、セルロース資源の糖化は反応時間が長く、大量の酵素を必要としてしまうという難点がある。特に、大量投入により高騰してしまう酵素コストは、セルロース資源由来のバイオエタノールの製造コストの割合の多くを占めてしまうことから、実用化に大きな障害となっている⁽⁸⁾。草本系は、木質系に比べてリグニンの量が少ないとされているが、高い糖化率を得るためには、リグニン、ヘミセルロースの構造を緩め、セルラーゼがセルロースと接触・反応しやすい状態を作るための(酵素糖化)前処理が必要となる^{(8),(14),(15)}。

また、数十本単位からなるマイクロフィブリルを構成して物理的・化学的に安定な状態で存在しているセルロースの構造を緩めることもまた、前処理には重要である。セルロース鎖は分子内で水素結合を形成することでねじれにくい直鎖状の構造を有しており、加えて互いのセルロース鎖間で水素結合することで強固な結晶構造を形成している。この結晶本体がマイクロフィブリルであり、その幅は3~5nm程度といわれている⁽¹⁴⁾。酵素(セルラーゼ)によるセルロースの糖化反応は、長さ1nm以下のグルコース同士間の結合が、タンパク質であるセルラーゼの活性部位によって切断されることであるが、その最初の段階として、セルラーゼはセルロースの本質であるマイクロフィブリルへ吸着する必要がある⁽¹⁵⁾。すなわち、球で換算すると直径5nm程度であるセルラーゼをより効率的にセルロースへ吸着させるためには、前述のようにリグニン、ヘミセルロースの構造を緩めるだけでなく、図1-3のようにセルロースをマイクロフィブリル単位で解繊(マイクロフィブリル化)させるほどの前処理が最も理想的というわけである。

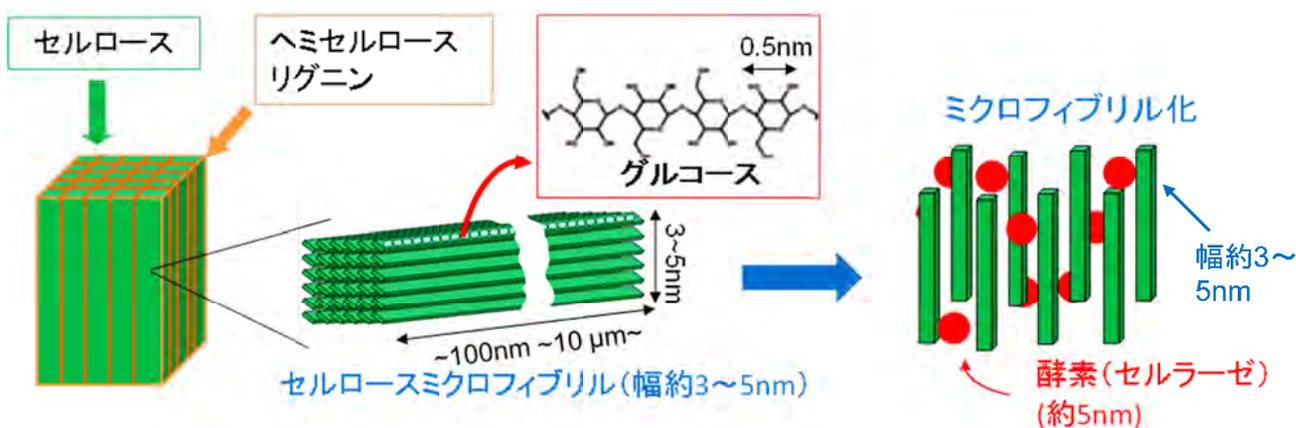


図 1-3 酵素糖化において理想的なセルロースの構造^{(14),(15)}

1.2.2 酵素糖化前処理としての微粉碎加工

前処理には、希酸やアルカリを用いる方法があるが、過剰分解により発酵阻害物質を生成してしまうため、微粉碎加工⁽¹⁶⁾や水熱処理⁽¹⁷⁾に注目が集まっている。特に微粉碎加工は、前処理として有効な手段になり得る。例えば、Inoue らは⁽¹⁶⁾、ユーカリのボールミルによる微粉碎処理物と加圧熱水処理物の糖化率に対する酵素量の影響を調査し、加圧熱水処理では糖化率が酵素量の低下により急激に低下するのに対し、微粉碎加工であればその低下を抑えることができ、少ない酵素量でも高い糖化率を得られることを報告している。

微粉碎加工の効果としてまず考えられるのは、表面積増大による酵素との接触面積の増加であり、それによる反応効率の向上である。しかし、遠藤らは⁽¹⁸⁾、木材をボールミルで粉碎したときの粉碎時間と糖化率の関係を調査した結果、粒径が 20 μm 程度から変化しなくなっても、粉碎を続けると糖化率が向上することを明らかにしている。これは、粉碎を続けることでセルロースの結晶化度が低下することが一因であるとしている。小林らは^{(19),(20)}、微粉碎木質バイオマスの粒径や結晶化度などの性状と酵素糖化性との関係を調査し、結晶化度の低下により糖化率が向上することを報告している。また、結晶化度低下の効率を高めるためには含水率を低下させることが重要であることを示唆した⁽²⁰⁾。しかし、一方で精製パルプの場合は未粉碎の結晶化度が高い状態においても高い糖化率を得られることから、結晶化度の低下が微粉碎による効果の本質ではないことが指摘されている⁽¹⁶⁾。遠藤は⁽¹⁵⁾、固体 NMR を用いた緩和時間測定によりセルロース分子の凝集サイズ（ドメインサイズ）を評価し、糖化率が最も高くなった微粉碎木粉粒子（粒径 20 μm 程度）内のドメインサイズが 5nm 程度となったことを報告した。これはすなわち、見かけ上 20 μm 程度の木粉でも、実際には 5nm のドメインから構成されていることを示すものである。また、このドメインサイズがセルロースマイクロフィブリルの幅と類似していたことから、粉碎を続けることによりセルロースマイクロフィブリルが稠密に集合・配列した構造が崩壊し、酵素が吸着できる表面積が増大した結果、酵素糖化が促進されることを示唆した。

このように、酵素糖化前処理としての微粉碎加工は有効な手段であるが、最も代表的な微粉碎方式であるボールミルは、エネルギー効率が良くないという大きな課題がある⁽²¹⁾⁻²⁶⁾。粉碎時間を長くすれば酵素糖化性が向上することは明らかであるが、その分コストが増大してしまう。このことから近年、ディスクミル⁽²¹⁾やコンバージミル（エネルギー集中型媒体ミル）⁽²²⁾⁻⁽²⁴⁾、振動ミル^{(25),(26)}など、高効率な微粉碎方式や技術、装置開発に関する研究が盛んになっている。微粉碎にかかるコスト削減は、機械工学の進歩により今後もさらなる発展が

期待できるが、燃料用エタノールの実現は容易ではない。一般に酵素糖化前処理はエタノール製造にかかるコストにおいておよそ 1/3 を占めるといわれているが⁽⁸⁾、酵素糖化コスト自体も 1/3~1/2 を占めるとされており⁽⁸⁾、さらなる削減が望まれる。

1.2.3 酵素の開発と固定化

酵素糖化に用いられるセルラーゼは単一の酵素ではない。前処理後のバイオマス構造中において、非晶質部のセルロース鎖にランダムに切れ目を入れるエンドグルカナーゼ (EG)、この切れ目からセロビオース単位で鎖を切っていくセロビオヒドラーゼ (CBH)、セロビオースをグルコースまでに分解する β -グルコシダーゼ (BGL) の 3 つの成分からなる混合酵素である⁽²⁷⁾。これまでセルラーゼは工業的には繊維の処理などで利用されていたため、繊維状をなさないグルコースまでの完全な分解は求められていなかった。このため、BGL 活性の低い *Trichoderma* 属の糸状菌 (*T. reesei*) 由来のセルラーゼが一般に使用されてきた⁽²⁸⁾。しかし、エタノール生産用酵母の *S. cerevisiae* ではセロビオースを利用できないことから、BGL 活性の高いセルラーゼが必要である。

この点を鑑み、米国の DOE (アメリカ合衆国エネルギー省) は、セルロース系原料による生産効率を高める酵素の開発を目指し、2000 年から糖化酵素の開発のため Novozymes 社と Genencor 社に 4 年間で合計約 40 億円の委託研究開発資金を提供した⁽²⁹⁾。近年、両社は遺伝子組み換え技術により *T. reesei* に BGL 遺伝子を導入して大量培養し、新しいセルラーゼを開発している (第 1 世代として Cellic Ctec - Novozymes 社と Accellerase 1500 - Genencor 社、第 2 世代として Cellic Ctec2 - Novozymes 社と Accellerase DUET - Genencor 社)⁽²⁸⁾。また、本国でも Yamanobe ら⁽³⁰⁾により日本の土壌から単離したセルラーゼ生産糸状菌 *Acremonium cellulolyticus* の研究開発が進められ⁽³¹⁾、現在では Meiji Seika ファルマによりアクレモニウムセルラーゼ (AC) として商業生産に至っている。これらは表 1-4⁽³²⁾のように BGL 活性が高く、特に、Cellic Ctec2 は非常に高い BGL 活性を有しながらも価格が低く、セルロース系原料用の酵素としての期待が大きい。しかし、未だ実用例は不十分であり、例えば微粉碎のような木粉中にリグニン成分が残存する前処理による影響を評価した報告例はほとんど見られない。また、ヘミセルロースの割合が比較的高いといわれている草本系バイオマスでは、セルロースを取り囲むそれを分解する酵素⁽³³⁾との併用も評価する必要がある。

表 1-4 市販酵素剤の活性⁽³²⁾

Company	Genencor		Novozymes		Meiji Seika Farma
	GC220	Accellerase 1500	Cellic Ctec	Cellic Ctec2	Acremonium cellulase
Protein (Bradford, mg/mL or g)	110	32	90	100	370
FPU (U/mL or g)	160	57	130	150	420
BGL (Cellobiose, U/mL or g)	69	180	1300	4000	1100

酵素開発が進む一方で、酵素を使い捨てにせず回収、再利用する方法として、酵素の固定化にも注目が集まっている⁽³⁵⁾⁻⁽⁴¹⁾。これは酵素を化学反的、物理的な手法によって固定化し、生産物と分離することで酵素を繰り返し使用してコストを削減するものである。酵素と生産物の分離だけであれば限外ろ過膜を用いることで可能であるが、酵素は複雑なタンパク質であり、有機溶媒、酸、アルカリや熱などの外的要因によって不可逆的な構造変化を受けると失活してしまう。固定化は酵素に新たな特性を与えることでその欠点を補うことができるものであるため⁽³⁴⁾、生産物との分離だけでなく失活の抑制にも有効であると考えられる。また、近年ではナノサイズの磁性粒子と結合させることで磁石により回収する方法も提案されており^{(35),(38),(39)}、セルロース資源の糖化コスト削減への期待は大きくなっている。

一般に酵素の固定化法は、1) 担体結合法：水溶性の担体に酵素を結合させる方法、2) 架橋法：酵素を2個以上の官能基を有する試薬と反応させて架橋する方法、3) 包括法：酵素をゲルの格子の中に包み込むかあるいは半透膜性のポリマーの皮膜で被覆する方法、の3つに大別される⁽³⁷⁾。各々の方法にはさらに細かい分類があり⁽³⁷⁾、これまで多様な固定化方法が古くから研究され、それぞれの長短所が指摘されてきた。例えば、反応性に富んだアミノ基残基やイオン性のアミノ基残基などと酵素を不溶性の担体に結合させる担体結合法には、単一の酵素だけでなく複数の酵素や微生物菌体および動植物細胞にも同様の手法で固定化できること、固定化操作中に酵素の修飾が起こりにくく自然な状態を保ったまま固定化できるなどの利点がある。しかし共有結合の場合、他のイオン結合や物理的吸着に比べて酵素の

固定化が強いため、酵素の自由な活動が制限され、基質との相互作用が起こりにくくなり、その結果酵素の変性失活がみられるという問題がある。また、樹脂を用いて酵素を取り囲み固定する包括法は、簡便に固定化できる反面、酵素によっては一度担体に保持されたものが再度漏出する場合があるという問題がある。

このように、固定化方法には各々一長一短があるため、その酵素の種類や適用範囲に合わせた適切な手法の選択が必要であるが、磁性粒子と市販セルラーゼ酵素剤を結合し、失活抑制を十分に行うことができる手法を検討した例は未だ見当たらない。また、糖化対象であるセルロース資源の成分は前処理の方法によって異なってくるため、それらを系統的にまとめるためにも、評価例はまだまだ必要である。

1.3 生分解性複合材料

1.3.1 プラスチックの現状

プラスチックは、安価で軽量かつその優れた機能性と広範な実用性から需要が大きく、さらなる用途展開への期待もますます高まっている。プラスチックは身のまわりのいたるところに存在しており、天然高分子も含めると「衣・食・住」の全てにおいて見かけないことはない。本国の経済産業省が発表している化学工業統計年報⁽⁴²⁾によれば、2012年度の樹脂生産量はおよそ1,054万tであり、その内訳を比率でまとめると、1位がポリエチレンで24.7%、2位がポリプロピレンで22.7%、次いで塩化ビニル樹脂（ポリ塩化ビニル）の12.6%、ポリスチレンの6.6%の順に続いていき、熱可塑性樹脂で88.5%を占めている。ポリエチレンとポリプロピレンで全体の約半分となっているのは、プラスチックの用途の多くが袋やフィルムなどの包装材や容器、シートであるために材料としてそれらが適していることからと考えられる⁽⁴³⁾。同じく経済産業省が取りまとめている紙・印刷・プラスチック・ゴム製品統計年報⁽⁴⁴⁾によると、国内生産量約586万t/year（二次加工品などを除外）のプラスチック製品の用途別生産比率は、図1-4⁽⁴⁴⁾に示すようにフィルムおよびシート類で41.1%、容器類で14.8%であり、同じく約半分を占めている。プラスチックの用途は、フィルムなどの他にも発泡製品、建材、日用品および雑貨などと多岐にわたっており、生活必需品やスポーツ用品、電子機器用絶縁材や自動車部品など幅広い分野で使用されている。近年では炭素繊維強化プラスチック（CFRP）の台頭が著しく、ボーイング787のような航空機にも適用され、自動車などの輸送機器への熱可塑性CFRPの展開も期待されている。今や、プラスチックなくして現代社会は成り立たないといっても過言ではない。

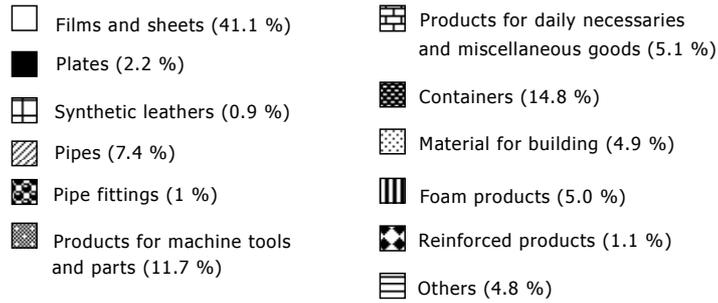
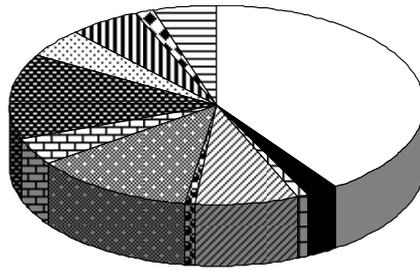


図 1-4 プラスチック製品の用途別生産比率⁽⁴⁴⁾

しかし、プラスチックは廃棄しても安定でそのまま残ってしまうため、廃棄後の環境負荷が課題となっている。一般社団法人 プラスチック循環利用協会（旧プラスチック処理促進協会）の報告によると⁽⁴⁵⁾、本国では、図 1-5 のように廃プラスチック総排出量がおよそ 1,000 万 t/year 近くにまで上っている。

前述のように、安定性が高いため変化することがないプラスチックは、使用中であればその性質が重宝されてきたが、使用後は逆にその丈夫さや強さが仇となる。プラスチック廃棄物は重量的には目立たないが、実際の廃棄物中での容積は高いため、それらの処理場や埋立地の不足を招いている⁽⁴⁶⁾。環境省など 5 省が共管の容器包装リサイクル法のような法律の整備によりリサイクルが推進されているが、研究代表者らがリサイクル業社にヒアリングしたところ、回収コストなどの課題があるようである。

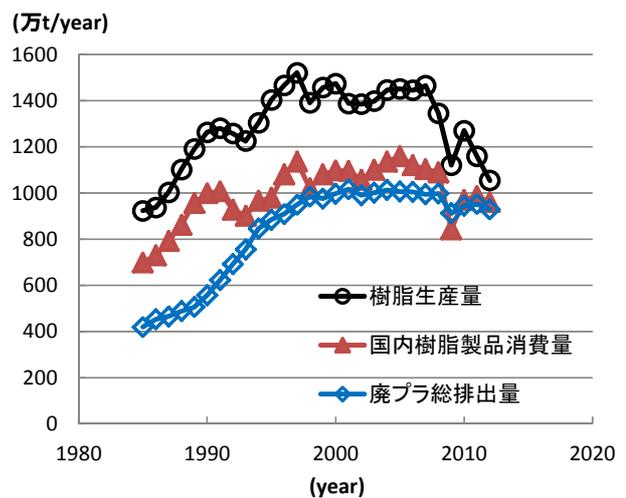


図 1-5 プラスチックの生産量と排出量の推移⁽⁴⁵⁾

1.3.2 生分解性プラスチックおよびその複合材料

プラスチックの廃棄が問題となっている状況下で、近年注目されているのが生分解性プラスチック（グリーンプラ）である。特に植物などのバイオマス由来のもの（バイオマスプラ）の関心が高い。生分解性プラスチックは使用後に地中に埋めると微生物により CO_2 と水に分解されるため、廃棄の問題の解決につながる可能性をもつ。また、植物由来であれば、 CO_2 と水に分解された後にその植物の光合成に用いられるため、ライフサイクルを通したカーボンニュートラルの考えから環境負荷を少なくすることができる。生分解性プラスチックには、ポリ乳酸（PLA）やポリカプロラクトン（PCL）、ポリビニルアルコール（PVA）やポリブチレンサクシネート（PBS）など様々にあるが、PLA がバイオマス由来であることと比較的高い力学特性をもつために注目されている。PLA はグリーンプラとして包装材や容器などに応用されてきており、さらにはバイオマスプラとして複合機・プリンタの外装部品やなどにも用いられ始めてきている。近年では、環境への影響の大きさから、自動車への適用の期待も大きくなっている⁽⁴⁷⁾。例えば、自動車に適用されているポリプロピレン（PP）を PLA に置き換えると、ライフサイクルでの CO_2 排出量を約 4 割削減できるといわれている。車体重量の約 10% 利用されている自動車用樹脂材料の全てを植物由来のものに代えるとした場合、1 台当たり約 200kg- CO_2e 、すなわち世界の年間生産台数 7 千万台 にバイオマスプラスチックの普及が進む単純な想定を置くと、年間約 1,400 万 t- CO_2e の削減につなげることができるようである⁽⁴⁷⁾。しかし、生分解性プラスチック、特に PLA は高価であるため、これまでは外科手術用の縫合糸や骨片接合用スクリューなどの医療材料以外では、広く普及するまでに至っていない。

このため、母材樹脂の割合低下による低コスト化などを狙いとして、生分解性樹脂に植物繊維を添加する生分解性複合材料（グリーンコンポジット）の開発が試みられている⁽⁴⁸⁾⁻⁽⁵⁵⁾。特に、1.1 節で述べたように、本国（あるいは秋田県）で大量に発生している稲わらのような草本系バイオマスとの複合化は、資源の有効活用の観点からも望ましいと思われる。しかし、植物繊維 - 生分解性プラスチック異相界面の接着性の問題などから、実用化している例はほとんど見当たらない。

1.4 研究の目的

ここまで述べてきたように、燃料用バイオエタノール製造では酵素糖化にかかるコストが、

生分解性複合材料は異相界面の難接着性による力学特性の低下が、それらの実用化を妨げている。そこで本研究では、稲わらなどの草本系バイオマスを用いた低コストのバイオエタノール製造技術と新規生分解性複合材料の開発および実用化を目指すことを全体目標として、回収・再利用できる磁性ナノ球状カプセル酵素と酵母、およびバイオマス（リグニンなどの残渣も含む） - 生分解性プラスチックを相溶化させる表面処理（相溶化処理）技術（リグニンなどの残渣も含む）の開発・確立を図ることを目的とする。本研究期間における年度ごとの達成目標を表 1-5 に示す。本事業ではこの年度ごとの達成目標にそって研究を実施した。本報はその成果をまとめたものである。

表 1-5 研究期間内における達成目標

全体	再生可能な草本系バイオマスからバイオエタノールをより高効率・低コストで製造する技術およびリグニンなどの残渣および草本系バイオマス/生分解性複合材料を作製する技術を確立し、大規模工業化生産への実用化を推進する。
平成 23 年度	<ol style="list-style-type: none"> 1. 粉碎装置の技術改造および最適なバイオマスの粉碎加工条件を確立する。 2. 磁性ナノ球状カプセル酵素を創製し、糖化と発酵試験を行い、その有効性を確認する。 3. 各種粒度・添加量のバイオマス/生分解性複合材料を作製し、その力学特性と内部構造の関係を明らかにする。
平成 24 年度	<ol style="list-style-type: none"> 1 酵素の糖化および酵母の発酵に関する最適な条件を検討し、その製造技術を確立する。 2. 表面処理の効果および圧延加工による複合材料の力学特性を明らかにする。
平成 25 年度	<ol style="list-style-type: none"> 1. バイオエタノールの工業化生産への移転に関する問題点を解決する。 2. 生分解性複合材料に関する民生用品、包装材などへの応用を検討し、製品を試作する。

2. 研究方法

2.1 材料

本研究では、草本系バイオマスとして稲わら、麦わら、もみ殻を用いることとした。平成23年度は中国産の稲わらおよび麦わら（粒度 106~300 μm 、300~1000 μm ）を、もみ殻は中日本商産製のゴールデンパウダー45M を用い、主に粉砕機の性能評価に用いた。平成24年度以降は秋田県産の稲わら（図 2-1）を購入し、押切にて5~10cm に裁断して粗粉砕に供した。秋田県産の稲わらについては、その後ウィレー式のカッターミル（(株)入江商会製、WM-3）により粗粉砕し、試験篩と電磁回転振とう機（ADOLF KUHNER AG 社製、LSR-V-50）を用いて、20~106 μm 、106~300 μm 、300~1000 μm に分級し、後述の実験に使用した。なお、加熱乾燥式水分計（AND（株）製、MX-50）を用いて105 $^{\circ}\text{C}$ の乾燥条件で試料の含水率を測定したところ、稲わらの含水率は7.3%~10.9%程度であった。



図 2-1 購入直後の稲わらの外観

生分解性プラスチックとして、ポリ乳酸（PLA）とポリブチレンサクシネート（PBS）を用いることとした。特に PLA は、バイオマス（植物）由来の生分解性プラスチックであることから、環境に優しい材料としての期待が大きい。PLA にはユニチカ製の TE-4000（脆性グレード）もしくは TE-1070（延性グレード）および NatureWorks LLC 製の標準グレード（Ingeo 3001D）を、PBS は昭和高分子製の 1020 を用いた。稲わらは、秋田県由利本荘市産のものを用いた。

2.2 バイオマスの微粉碎加工とその微粉末の特性評価

2.2.1 微粉碎加工

本研究では、バイオマスの酵素糖化前処理として、共同研究者らが開発した図 2-2 に示すような構造をもつ省エネルギー型振動ミル「タンデムリングミル[®]」(中央化工機商事製)を用いて微粉碎を行うこととした。これは、振動ミルをベースに開発されたものであり、粉碎媒体が粉碎容器内壁に沿って転動することで遠心力を作用させた粉碎を行うものである。粉碎筒内部にタンデムリング(インナーパワーリング)が複数枚設置されており、粉碎筒に振動振幅を与えることでこのリングが試料を粉碎する方式となっている。タンデムリングミルでは[®]、アンバランスウェイトの加振力によってベッドと粉碎筒が振動することで筒内部の媒体が転動する。これにより、対象を短時間で細かく粉碎できるため、大幅にエネルギーを削減できる⁽⁵⁶⁾⁻⁽⁵⁸⁾。

このタンデムリングミル[®]の小型機により、各バイオマス(稲わら、麦わら、籾殻)を粒径 $20\mu\text{m}$ 以下まで微細化することを目標とし、振幅 7.0mm 、振動数 1600cpm の条件で 30min 粉碎加工した。出発原料は粒度 $106\sim 300\mu\text{m}$ の粗粉碎試料 800g とした。

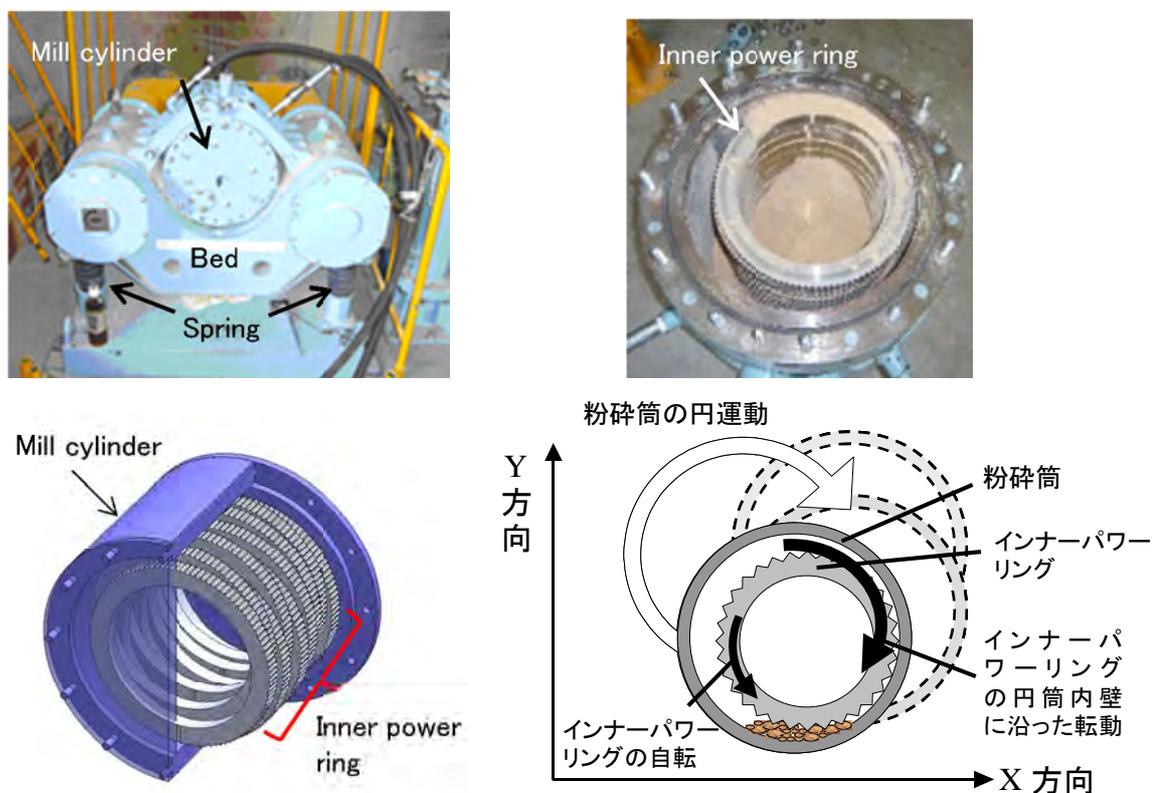


図 2-2 タンデムリングミル[®] (リング外径: $\Phi 252\text{cm}$ 、内径: $\Phi 198\text{cm}$)

2.2.2 微粉末の性状評価

微粉碎した試料の粒度分布を、レーザー回折・散乱式粒度分析計（日機装株式会社製、MT3300EXII）により測定し、50%平均径を得た。20ml ビーカーに試料を適量入れ、界面活性剤および精製水を加えて超音波を 10min 印加することで分散させた後に装置に投入した。

また、X 線回折装置（XRD）（パナリティカル社製、X'Pert Pro）を用いて、微粉末のセルロースの結晶構造を評価した。測定は 5~90° 走査範囲の範囲で行った。得られた結果から、Segal 法に基づき(1)式より $2\theta=18^\circ$ 、 22° のピークの高さから結晶化指数を算出した。

$$\text{セルロース結晶化度(\%)} = \frac{I_{22} - I_{18}}{I_{22}} \times 100 \quad (1)$$

さらに、走査型電子顕微鏡（SEM）（(株) 日立ハイテクノロジーズ製、S-4300）により微粉末の微細構造を観察した。観察用試料は、接触面をカーボン両面テープで観察部を傷つけないように固定し、Au コーティングしたものを用いた。

2.2.3 微粉末の酵素糖化性および発酵性の評価

(1) 酵素糖化実験

セルラーゼ酵素剤としてメイセラーゼおよびアクレモニウムセルラーゼ（Meiji Seika ファルマ製）、GC220（ジェネンコア協和株式会社製）、NS22086（ノボザイム社製）を使用した。

試料 10g と酵素 0.5g と 0.1M 酢酸バッファー（pH5.0）100ml を 250ml 三角フラスコに入れ、オイルバス中で温度を 50°C に保ちながら攪拌することで酵素糖化を行った。この際、糖化開始時から 24 時間後の糖化溶液を採取し、その遠心分離上澄を、酵素の活性を止めるために 5 分間煮沸し冷凍保存した。次に、これを 100 倍希釈したサンプル溶液 0.1ml、バッファー 0.9ml、純水 0.5ml、Schales 試薬 2.0ml を各々分注することで試験溶液を作製した。その後 15 分間煮沸した後室温（23±2°C）に戻し、分光光度計〔日立ハイテクノロジーズ（株）製、U-5100〕により波長 420nm の吸光度を得ることで糖量を測定し、(2)式により糖化率を算定した。ホロセルロースの割合は稲わらおよび麦わらを 0.7⁽²⁾、籾殻を 0.5 とした^{(11),(12)}。

$$\text{糖化率(\%)} = \frac{t\text{時間後の糖量} - \text{初期の糖量}}{\text{バイオマスの量} \times \text{ホロセルロースの割合}} \times 100 \quad (2)$$

(2) 酵母発酵実験

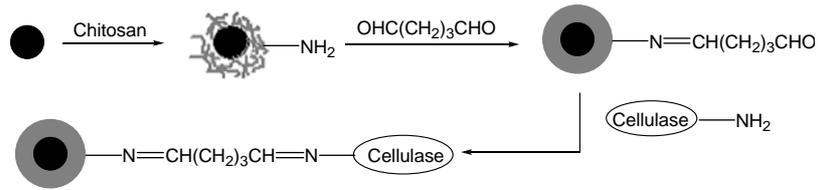
酵母には、エタノール発酵用酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Fali [AB Mauri 社製] を使用した。糖液 40mg と滅菌状態で培養した酵母 2mg を 500ml 三角フラスコに入れ、バイオシェイカーで温度 28~38°C にて静置させることで発酵させた。酵母植菌後 2~24 時間後で発酵溶液を採取し、その遠心分離上澄液を冷凍保存し、エタノール濃度測定に用いた。

エタノール濃度測定は、F-キットエタノール (Roche Diagnostics GmbH 製) を用いて行った。500 倍希釈したサンプル溶液 0.02ml、エタノール標準液(0.03g/l)0.02ml、バッファー0.6ml の分量でそれぞれキュベットに分注し、試験溶液を作製した。これを倒置攪拌し、室温で 3 分間静置させた後に分光光度計で波長 340nm の吸光度を測定した。その後、各キュベットに酵素懸濁液を 0.01ml ずつ加えパラフィルムで蓋をして攪拌させ、室温で 10 分間静置後、再び波長 340nm の吸光度を測定し、エタノール濃度を算定した。

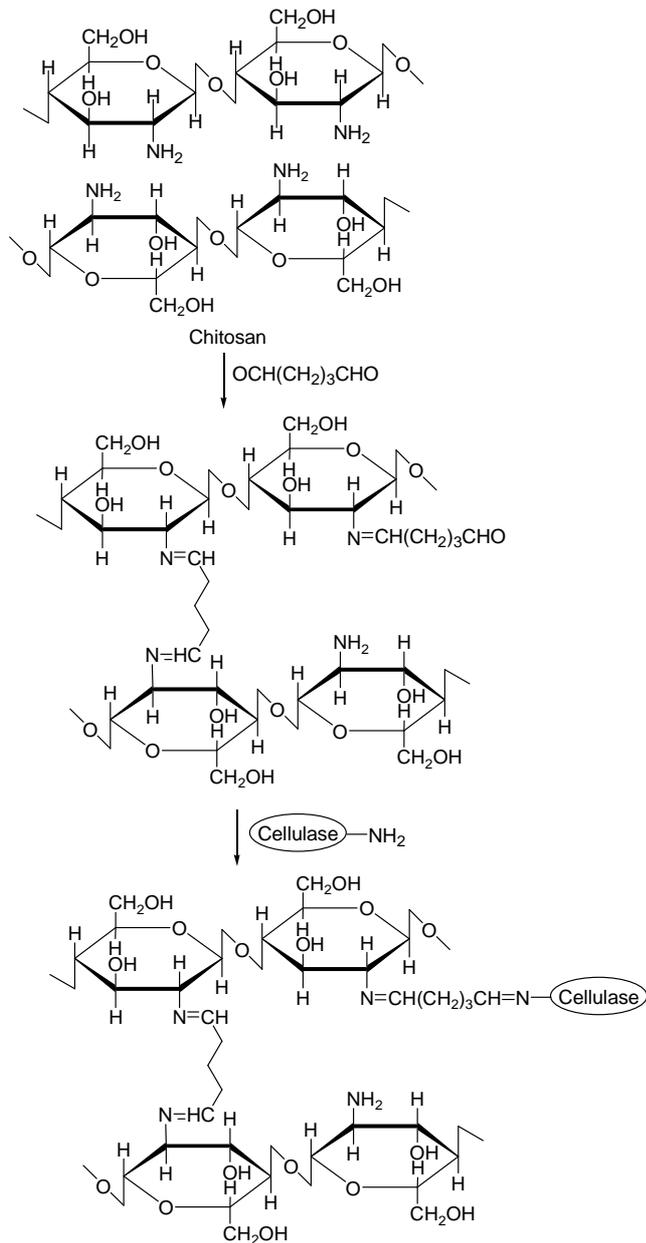
2.3 磁性ナノ球状カプセル酵素の作製および性能評価

2.3.1 作製方法

磁性ナノ粒子 (Fe_3O_4) へのセルラーゼ酵素の固定化はグルタルアルデヒド (GDA) による化学結合により行った。磁性ナノ粒子 (Fe_3O_4) は化学的共沈法により作製し、酵素は明治製菓ファルマ製のアクレモニウムセルラーゼを用いた。ただし、GDA との反応の前処理として行った磁性粒子への表面処理については、バイオセンサーなどの分野で研究されているキトサン担体結合法⁽⁵⁹⁾とシリカ被覆法⁽⁶⁰⁾の 2 種類とし、セルラーゼの固定化に応用した。キトサン担体法は、図 2-3⁽⁶¹⁾のように磁性粒子表面にキトサン担体を結合させ、キトサンと GDA とで縮合反応させる方法である。シリカ被覆法については、テトラエトキシシラン (TEOS) により磁性粒子表面にシリカ被覆を行う方法であり、その後に 3-アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES) により官能化を行い GDA と反応させる方法 (図 2-4⁽⁶²⁾) と、シリカ被覆磁性粒子のシリコン層を厚くすることで吸着能を高め、吸着と GDA との反応の両方を利用する方法 (図 2-5) の 2 種類について検討した。



(a) 磁性ナノ粒子 - キトサン担体への酵素固定化の模式図



(b) キトサン担体とグルタルアルデヒド(GDA)との縮合反応

図 2-3 磁性ナノ粒子 - キトサン担体との酵素固定化⁽⁶¹⁾

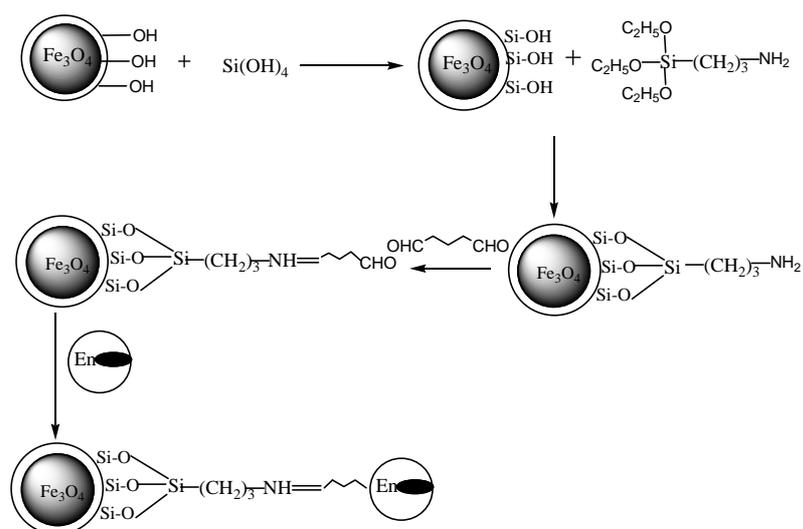


図 2-4 APTES によるシリカ被覆磁性ナノ粒子への酵素固定化⁽⁶²⁾

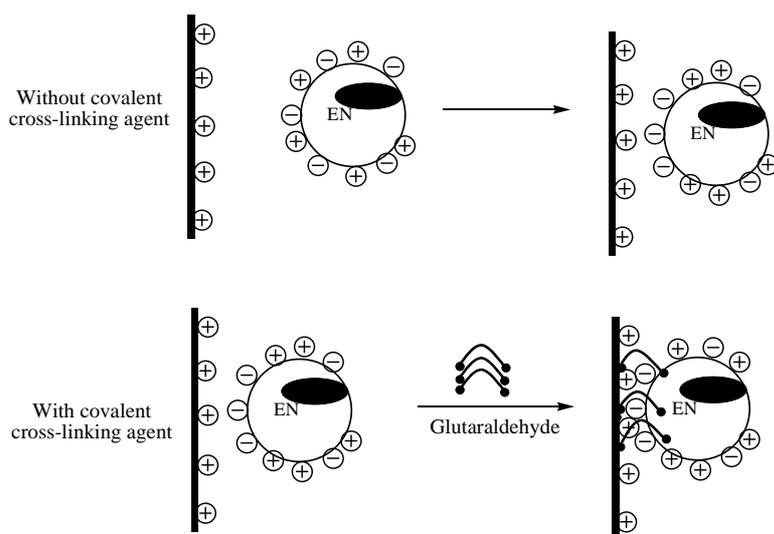


図 2-5 シリカへの吸着による酵素固定化

2.3.2 作製した酵素の性能評価

(1) 特性評価

作製した酵素などの構造を、透過型電子顕微鏡 (TEM) ((株) 日立ハイテクノロジーズ製、H-8100)、顕微フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) (日本分光株式会社製、IRT-7000)、および前述の XRD により分析した。さらに、磁化特性を試料振動型磁力計 (VSM) (理研電子株式会社製) により調べた。

(2) 結合率および相対活性の測定

固定化酵素作製時の溶液中の酵素濃度を、色素結合法の一種であるブラッドフォード法に基づきタンパク質の濃度を分析し、(3)式により固定化前後の酵素濃度から結合率 (Loading efficiency) を算定した。標準タンパク質には牛血清アルブミン (BSA) を用いた。

$$\text{Loading efficiency (\%)} = ((C_i V_i - C_f V_f) / C_i V_i) \times 100 \quad (3)$$

ここで、式中の C_i は固定化前のタンパク濃度を、 V_i は固定化前の酵素溶液の容積、 C_f 、 V_f は各々の固定化後のものを示している。固定化後の値はろ過後のものを用いた。

次に、カルボキシメチルセルロース (CMC) を基質として相対活性の測定を行った。測定は文献^{(60),(63)}を参考に、IUPAC に準拠して行った。活性については CMC を基質として酵素加水分解させたときに生成されたグルコース量 W より(4)式を用いて算定した。

$$\text{Activity of cellulose (IU)} = 1000W / (MV) \quad (4)$$

ここで、式中の M 、 V は各々グルコースの分子量と体積を示し、活性の単位 IU は $\mu\text{mol/mL}$ で定義される。CMC 基質の濃度は pH5.0 の 0.1M 酢酸バッファーに対して 1%(w/v) とし、0.5ml の基質溶液に対して酵素溶液 0.5ml を添加して、50°C 環境下で 30min 反応させた。

2.4 新規生分解性複合材料の作製および性能評価

2.4.1 バイオマスの表面処理

(1) アドミセル乳化重合によるポリマー被覆

アドミセル乳化重合は表面に極薄の高分子膜を重合することで材料表面の改質を行う方法である。アドミセルは“アド(吸着)”と“ミセル”から成る言葉であり、基質表面に吸着させた界面活性剤の濃度を臨界ミセル濃度まで高くしたときに形成される界面活性剤の二重層間でモノマーを重合させる方法である。一般的に、アドミセル重合はアドミセル形成、モノマー吸着、ポリマー形成および外層界面活性剤

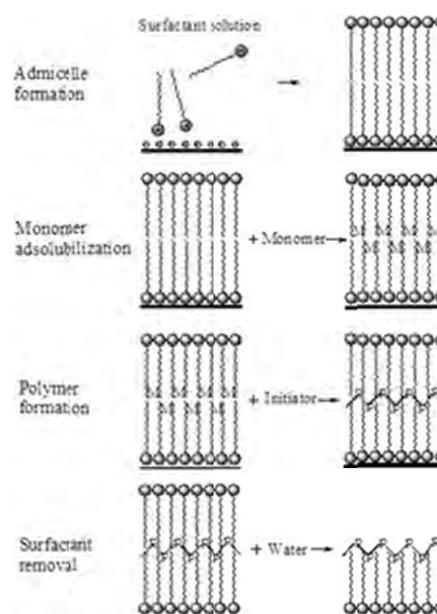


図 2-6 アドミセル乳化重合の原理⁽⁶⁶⁾

の除去の四つのステップから成る(図 2-6)⁽⁶⁶⁾。

まず、イオン交換により基質表面へイオン性界面活性剤が吸着する。このとき両親媒性分子の親水基が基質表面に接触し、一方で長い疎水基は疎水層を形成するために作用する。続いて、他の界面活性剤の疎水鎖が疎水基に吸着していき、界面活性剤の二重層を形成する。この系に有機モノマーを加えると優先的にアドミセル中に吸着するため、ここに開始剤を投入するとアドミセル中で基質表面にポリマー層を形成するための重合反応が起きる。この後、上層の界面活性剤を除去すると、ポリマー膜が露出される。

この処理により、稲わらの表面に生分解性樹脂であるポリ乳酸 (PLA) と相溶性の良い高分子を被覆させることができれば、稲わら-樹脂界面の接着性が向上し、力学特性が改善されると思われる。本研究では、材料同士の溶解性の指標であるハンセン溶解度パラメータ⁽⁶⁷⁾から PLA と相溶性の高い高分子を検討し、そのモノマーを表面処理に用いることとした。

(2) 無水酢酸によるアセチル化

図 2-7 に無水酢酸によるエステル結合の反応式を示す。無水酢酸はカルボン酸無水物の反応性をもつため、稲わらや糖化残渣中のセルロースもしくはリグニンがもつヒドロキシ基と脱水縮合を起こす。このとき、酢酸が生成される一方でセルロースにエステル結合が形成されるアセチル化反応が起こる。PLA はエステル結合によって乳酸が重合した高分子であるため、この表面処理を行うことによってエステル結合を得た稲わらはポリ乳酸に対して親和性が高くなる。よって、より強固に結合あるいは接着して生分解性複合材料の性能を未処理の稲わらを混合した場合よりも向上させることが期待される。

試料 50g を三口フラスコに投入し、モル濃度を 0.005M、0.01M、0.05M、0.1M、0.5M、もしくは 1M になるよう無水酢酸と蒸留水を加え、24 時間攪拌することでアセチル化表面処理を行った。反応中は温度 60°C となるようオイルバスにて制御した。

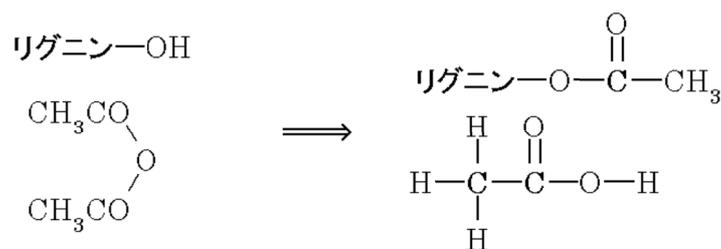


図 2-7 アセチル化の原理

2.4.2 試験片の作製

(1) 複合材料の作製

粒度 20~106 μm 、106~300 μm 、300~1000 μm の稲わらもしくは糖化残渣と樹脂を二軸押出機（テクノベル（株）製、KZX25TW-60MG-NH）で熔融混練した。

二軸押出機における熔融混練は、原料が二本のスクリーウの隙間に入り込み、そこでせん断作用を受けることで行われる。混練条件を表 2-1 に示す。各粒度の稲わら粉末もしくは糖化残渣を樹脂に対して 10、20、30wt% 添加し、両者のコンパウンドを押し出した。これをペレタイザーにより一定周期で切断することで稲わら/PLA 複合材料のコンパウンドペレットを作製した。

表 2-1 混練条件

押出温度	150~180°C
スクリーウ回転数	100rpm
コイルフィーダ回転数	18~22rpm

(2) 試験片の作製

作製したペレットを乾燥機にて、8 時間以上乾燥させた後、スクリーウ径 16mm の射出成形機射出成形機（日精樹脂工業（株）製、NP7-1F）により、図 2-8 に示す寸法の JIS K 7113 基準の 1 (1/2) 号ダンベル型試験片を成形した。そのときの成形条件は、射出温度 180~200°C、射出速度 17.6mm/s、金型温度 40°C とした。

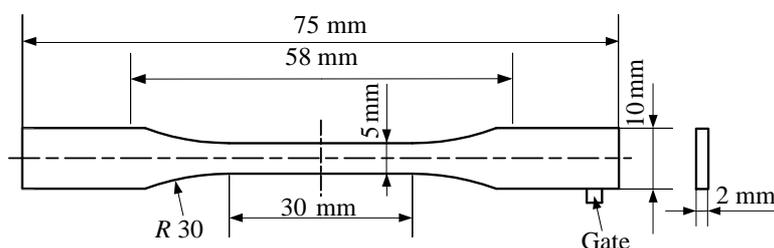


図 2-8 1 (1/2) 号ダンベル型試験片

2.4.3 物性評価および内部構造観察

(1) 熱物性、力学特性および内部構造観察

作製した複合材料の熱的特性を熱重量 - 示差熱同時測定装置（TG-DTA）（（株）島津製作

所製、DTG-60) により調査した。PLA は脆性グレードの TE-4000、もしくは Ingeo 3001D を用いた。また、JIS K 7113 基準に従って、万能材料試験機 (インストロン (株) 製、Series3360) により引張試験を行い、その内部構造および破断面を SEM および TEM により観察した。TEM 観察およびその試料作製は、日本電子株式会社 (JEOL) に委託して行った。観察には日本電子 (株) 製の JEM-1010、JEM-200EX、JEM-2100F を用いた。

(2) 分解性評価

作製した稲わら/PLA 複合材料の分解性を調査するために、秋田県 (由利本荘市) にて 42 ヶ月間の暴露試験および埋設試験を行った。これらの試験には、力学特性の変化が明確になるよう、延性グレードの TE-1070 を用いた。試験にはダンベル型試験片を用いた。暴露試験は、試験片を自作のステンレス製ラックに取り付け (図 2-9(a))、JIS 7219 A 法に基づき、仰角を 24° に設定して行った。埋設試験は、試験片を深さ 5cm の地中に埋めることで行った (図 2-9(b))。各試験片は毎月回収し、洗浄した後に引張試験および顕微鏡観察に供した。顕微鏡観察は、光学顕微鏡 (NIKON (株) 製、ECLIPSE ME600D) により屋外暴露および埋設試験による試験片表面の変化を調査した。観察は試験片の平行部中央で行った。



(a) 屋外暴露試験



(b) 埋設試験

図 2-9 分解試験の様子

2.4.4 実製品の試作

(1) 押出シートの作製

実製品の試作として、熔融二軸混練により作製した稲わら/PLA 複合材料を用いて、容器や包装材の成形にしばしば用いられるシートを押出成形により作製することとした。まず、前述の二軸押出機に、図 2-10 のようにシート成形用 T ダイと引取ロールを設置した。これ

を用いて表 2-2 に示す条件で厚さ約 1.0mm のシートを押し出成形した。

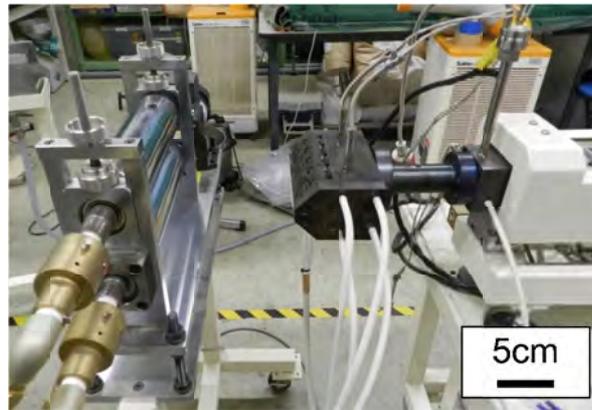


図 2-10 シート成形用 T ダイおよび引取りロール

表 2-2 シート成形条件

稲わら添加量[wt%]		10, 20, 30
予備乾燥	温度[°C]	80
	時間[h]	8 時間以上
押出条件	温度[°C]	190
	回転数[rpm]	100
	ダイ温度[°C]	170
	引取ロール温度[°C]	50

(2) 押出シートの性能評価

本研究では、押出シートの性能評価として、まず、JIS K 6734 の硬質ポリ塩化ビニル (PVC) シートの外観検査に準拠して外観検査を行った。次に、同じく JIS K 6734 に準拠して、図 2-11 のようにシートより押出方向 (0°) とそれに垂直な方向 (90°) から JIS K 7127 1B(1/2)ダンベル型試験片を打ち抜いた。これを用いて前述の万能材料試験機により引張速度 10mm/min、室温 23±2°C の条件で引張試験を行った。さらに試験後の破断面観察を SEM により観察した。

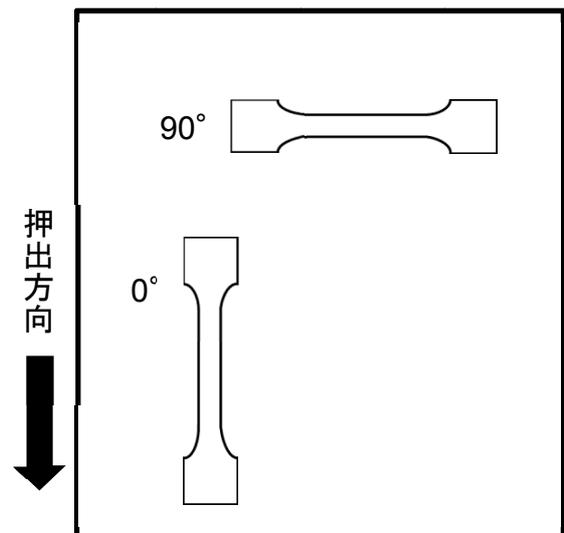


図 2-11 打ち抜きの模式図

3. 低コストのバイオエタノール製造

3.1 タンデムリングミル[®]による粉砕の有効性

3.1.1 微粉末の性状

(1) 粉砕条件と平均粒径および結晶化指数との関係

図 3-1 に省エネルギー型振動ミル「タンデムリングミル[®]」での粉砕における粉砕時間と 50% 平均粒子径および結晶化指数の関係を示す。出発原料は前述のように 106~300 μm まで粗粉砕した稲わら粉末である。図より、稲わらはわずか 5min で急激に粒径が 50 μm 以下まで低下し、30min で約 10 μm まで微粉砕されていることがわかる。一方、結晶化指数は粒径ほどではないが 10min 以上で大きく低下しており、30min でほぼ安定している。一般に、酵素であるセルラーゼは、セルロースの非晶領域に作用するため、10min 以降では粒径にほとんど変化はないが、30min ではそれよりも糖化率が向上するものと予想される。

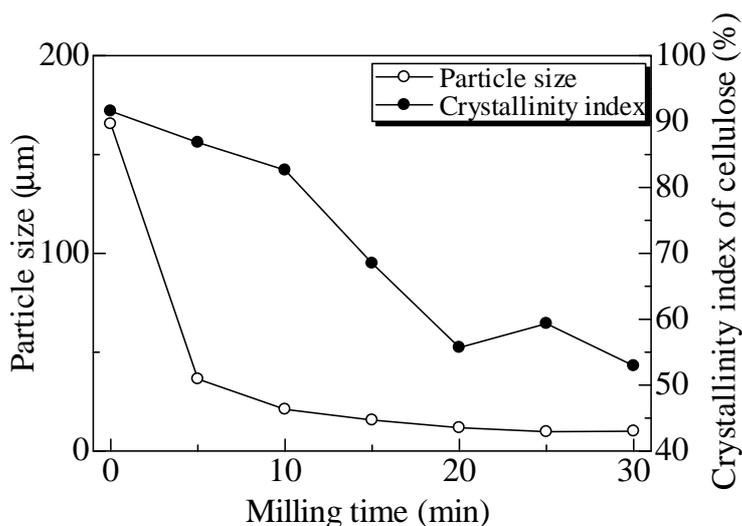


図 3-1 稲わらの平均粒径と結晶化指数の粉砕時間による変化

(2) 微細構造

図 3-2(a)にタンデムリングミル[®]での粉砕により得られた稲わら粉末の SEM 写真を示す。ここで比較として、カッターミル粉砕により得られた 20~106 μm 、106~300 μm 、300~1000 μm の粉末も図の(b)~(d)に示している。また、各々の粒度分布計により測定した平均粒径を図 3-3 に示す。

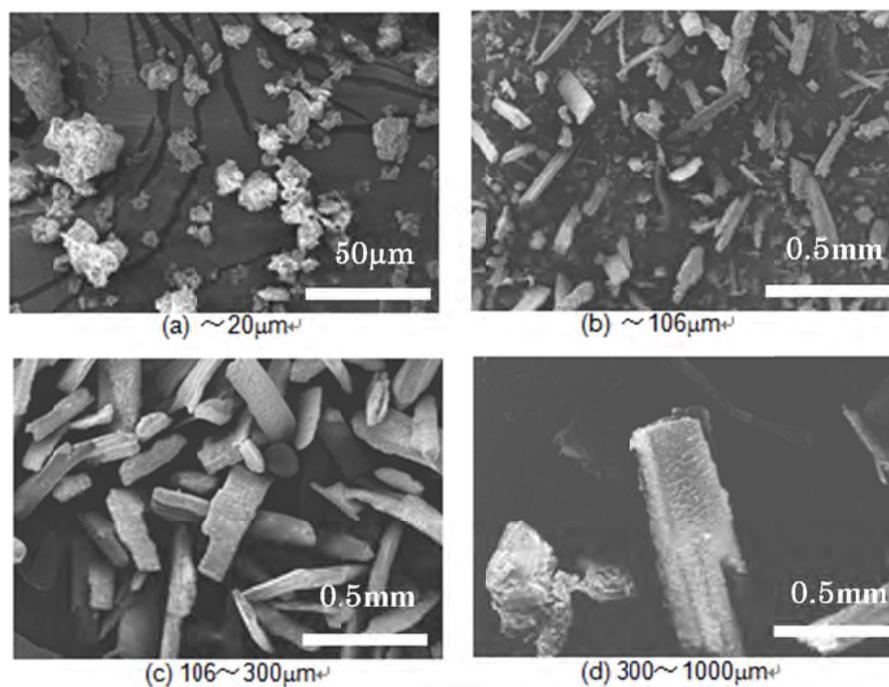


図 3-2 稲わら粉末の SEM 写真

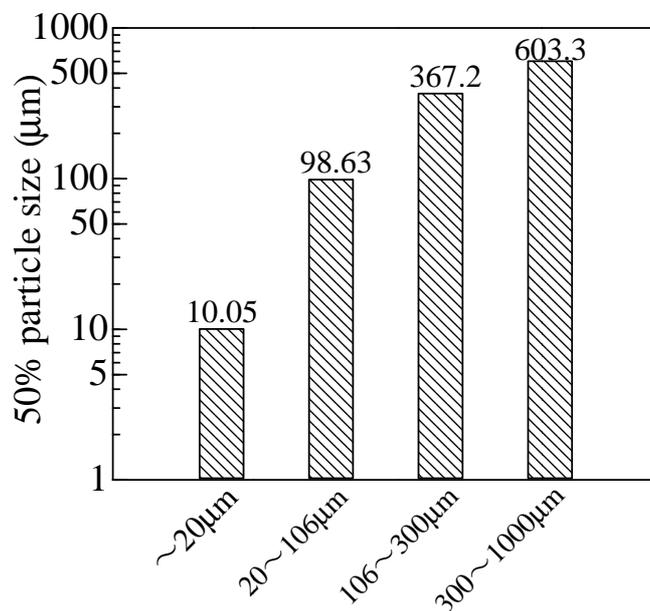


図 3-3 粒度区分ごとの稲わら粉末の 50% 粒子径

図の 3-2(a)および図 3-3 から、タンデムリングミル®で粉砕した稲わら粉末は平均的に 20μm 以下の粉末になっていることがわかる。また、図 3-2 の(b)~(d)のカッターミル粉砕後

の粉末では 106 μm 以下でも比較的繊維状で粒子先端が切断されている様子が認められるのに対し、タンデムリングミル[®]での粉砕後の粉末 (図 3-2(a)) は外皮が崩壊し、四方から衝撃を受けたためと思われる団子状を示している。これは、振動ミルの特徴を如実に現しているものと思われる。また、図はそれらの粉末がさらに小さい粒子の凝集体であることを示唆しており、稲わらの構造を大きく破壊していることが期待できる。前述の平均粒径が 10min 以降で大きな変化がなかったにもかかわらず結晶化度が低下したのは、この凝集が原因と目される。

3.1.2 微粉末の酵素糖化性

(1) 粒度の影響

本研究ではまず、タンデムリングミル[®]粉砕の効果の検討として、市販酵素剤である明治製菓ファルマ製のメイセラゼにより基本酵素糖化性を調べた。図 3-4 には 30min の粉砕加工により 20 μm 以下まで微細化した稲わらの糖化挙動を示す。比較として、カッターミル粉砕により得られた 20~106 μm 、106~300 μm 、300~1000 μm の粉末での結果も示している。

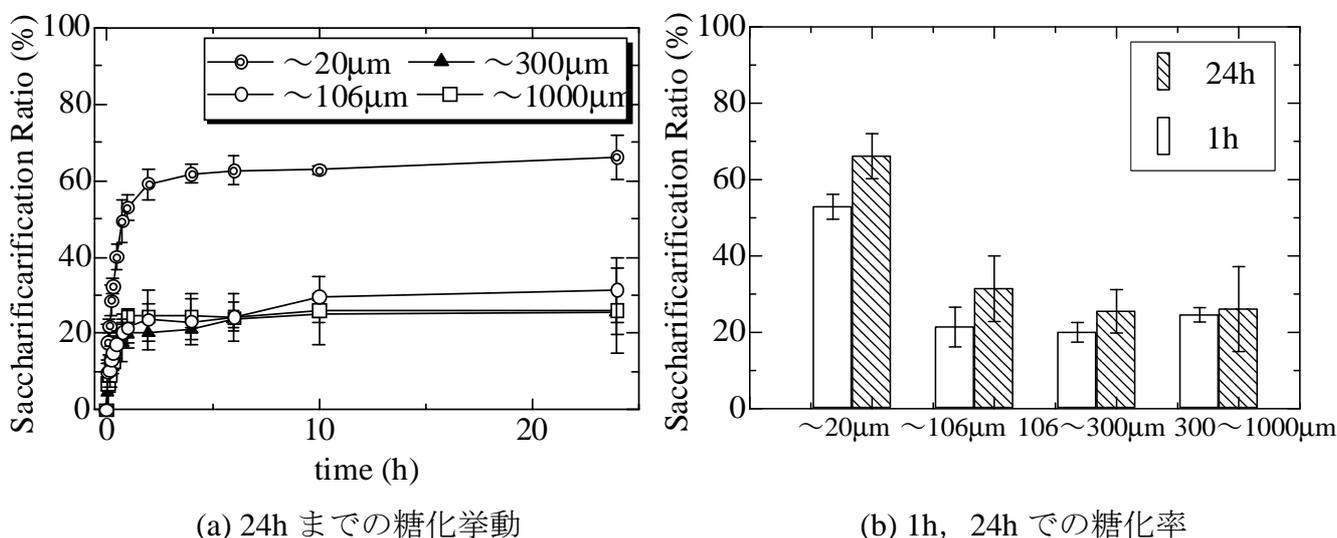


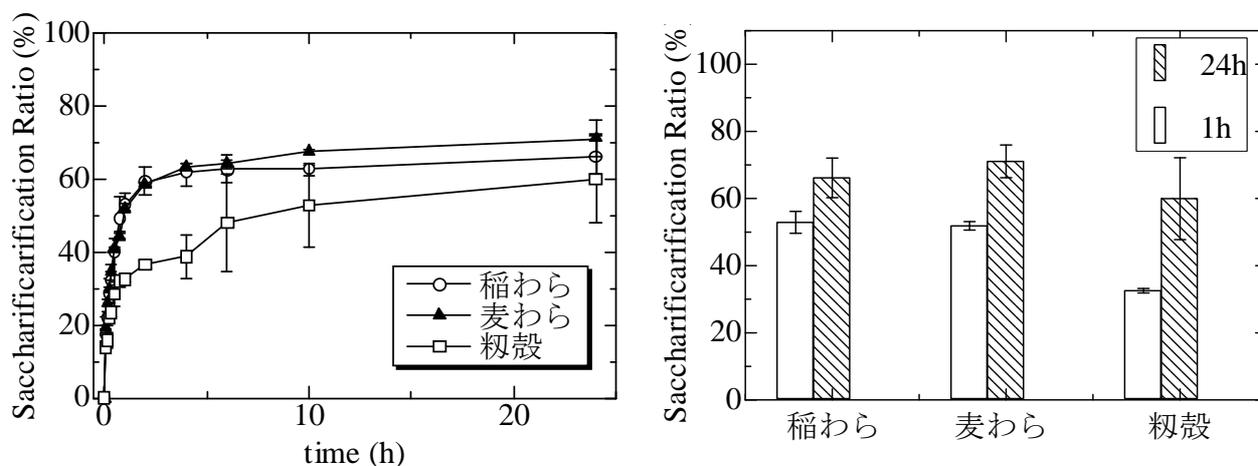
図 3-4 タンデムリングミル[®]粉砕された稲わら粉末の酵素糖化性 (サンプル数 : 5 個)

図より、カッターミルで粉砕された 106 μm 以下、106~300 μm 、300~1000 μm の粉末は、106 μm 以下で若干の上昇は見られるが糖化率約 20~30%でほとんど変化がないのに対し、タンデムリングミル[®]で粉砕された 20 μm 以下では、70%近くまで向上している。これは、

粒径が小さくなることで比表面積が増大し、セルラーゼの接触表面積が増大したことが一つの理由と考えられる。また、前述の結晶化指数の結果からも明らかなように、30min 粉砕することでセルロースの結晶構造が崩壊していることも一因だろう。特にこの構造破壊が急激な糖化率の向上を引き起こしたものと推測される。

(2) バイオマスの種類による変化

図 3-5 に 20 μm 以下まで微細化した各バイオマスの糖化挙動を示す。各バイオマスは共に約 1 h で急激な糖化率の上昇を示し、24 h 後には 50%以上の値を示した。また、用いたバイオマスのうち、麦わらで 70%以上と最も高い値を示したのに対して、もみ殻は、約 54%程度と比較的低い値となった。これは、もみ殻の主成分に、シリカのような堅固な成分が含まれているためと考えられる。また、図より、各バイオマスは共に 1 時間で 24 時間での最大糖化率の 5 割以上の糖化反応が確認された。すなわち、糖化反応は 1 時間以内の極めて短時間に激しく行われているということがいえる。



(a) 24h までの糖化挙動

(b) 1h, 24h での糖化率

図 3-5 タンデムリングミル[®]粉砕された稲わら、麦わら、もみ殻の酵素糖化性 (サンプル数: 5 個)

(3) セルラーゼ酵素剤の種類による変化

市販セルラーゼ酵素剤 4 種類を用いて、その種類が及ぼす 24 時間後の稲わらの糖化率への影響についても調べた。その結果を図 3-6 に示す。図より、明治製菓ファルマ製のアクレモニウムセルラーゼで最も高い値となっており、約 70%を示している。

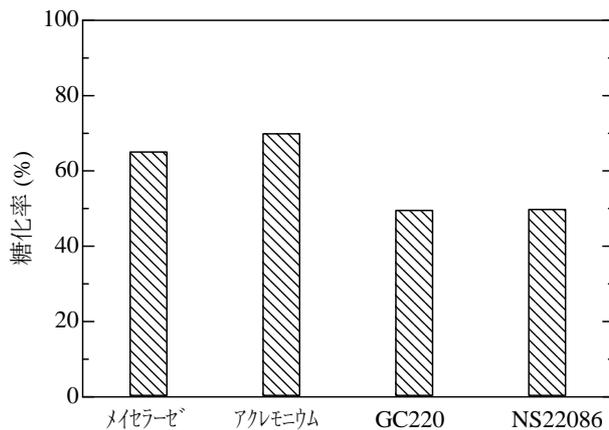


図 3-6 セルラーゼ酵素剤の種類による変化

以上より、粗粉碎の稲わらについてはタンデムリングミル[®]を用いて振幅 7.0mm、振動数 1600cpm の条件で 30min 粉碎加工することで高い酵素糖化性をもつ微粉末を製造できることが明らかとなった。

3.1.3 大容量ミルによる微粉碎加工

秋田県立大学では NEDO 新エネルギー革新事業 (H18-20、H22-24)⁽⁵⁶⁾⁻⁽⁵⁸⁾などにおいて、大学内に実験棟を設置し、処理量 1000kg/h を可能とするタンデムリングミル[®]型大容量乾式微粉碎機 (HV-70 改、中央化工機商事) の試作・検討を行ってきており、現在も検討・改良を続けているところである。図 3-7 にその装置を格納した建物や装置の写真ならびに粉碎機の性能を示す。

この微粉碎機は、ヘルツの接触理論⁽⁶⁸⁾から約 43MPa の接触面圧力を原料に与えることが可能である。これは一般にいわれている木材の圧縮強さ 26MPa⁽⁶⁹⁾の約 1.6 倍に値する。

本研究において、これまでと同条件で稲わら (粒度 106~300 μ m の粗粉碎原料) を 30min の予備的に粉碎加工に供したところ、小型機により近い粒径まで粉碎できる可能性が示された (しかし、度重なる装置故障により再現性がとれていないためデータは割愛する)。また、秋田県の稲わらの収集・運搬実証事業⁽⁶⁾では長さ約 20cm 程度に稲わらを裁断することで、保管や運搬に効率的と報告されているため、このサイズ (粗粉碎無し) からの粉碎についても検討を始めている。現在もいくつかの課題について改良を重ねているが、本研究での酵素糖化条件で得られる糖量を大型機でも可能となった場合、破碎動力を大幅に削減できる可能性があり、今後の実用化に大きな期待が寄せられる。



【バイオマス実験棟】

- ・建屋面積:144m²
- ・床下コンクリート厚さ:2m
- ・床下コンクリート重量:300t



【タンデムリングミル】 (中央化工機商事製:HV-70改)

- ・粉砕機サイズ:
奥行き3800mm, 幅2100mm
高さ2500mm
全重量30t, バネ上重量24t
- ・装置構成:粉砕筒 2基
(内径669mm, 長さ6000mm)
タンデムリング粉砕媒体 284枚
(外径632mm, 内径570mm,
厚さ42mm, 重さ24kg)
- ・電動機 132kW 2基
- ・モータ回転数:1516rpm
- ・粉砕能力:
処理量1000kg/hr, 投入粉末粒径1mm

図 3-7 タンデムリングミル[®]型大容量微粉砕機

3.2 バイオマスの酵素糖化および発酵性にかかる最適条件

本研究で開発する磁性ナノ球状カプセル酵素について検討する際の基礎段階として、前節で最も糖化率が高くなったアクレモニウムセルラーゼと酵母を用いて糖化・発酵に係わる反応条件の検討を行った。

3.2.1 基本酵素糖化条件

稲わら微粉末の糖化挙動に及ぼす酵素量の影響を図 3-8 に示す。このときの条件は、糖化温度 50°C、0.1M 酢酸バッファー(pH5.0)とした。図において、酵素量を 10%まで増やしていくと糖化率も高くなる傾向を示しているが、約 3%以上で差が小さくなっている。これより、以降では酵素量 3%を条件と

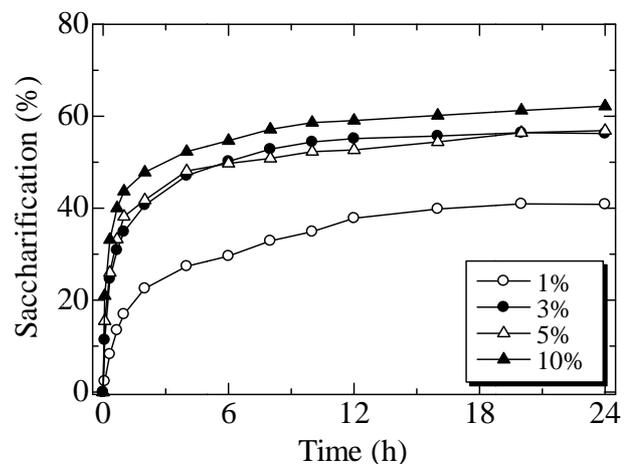


図 3-8 稲わらの糖化挙動に及ぼす酵素量の影響

した。

糖化挙動に及ぼす温度の影響を図 3-9 に示す。30~50°C の温度範囲では、温度が高くなるにつれて糖化率も上昇しており、50°C で最も高い糖化率を示している。しかし、55°C では糖化率が大きく低下している。したがって、55°C 以上の温度では酵素が失活することが示唆される。

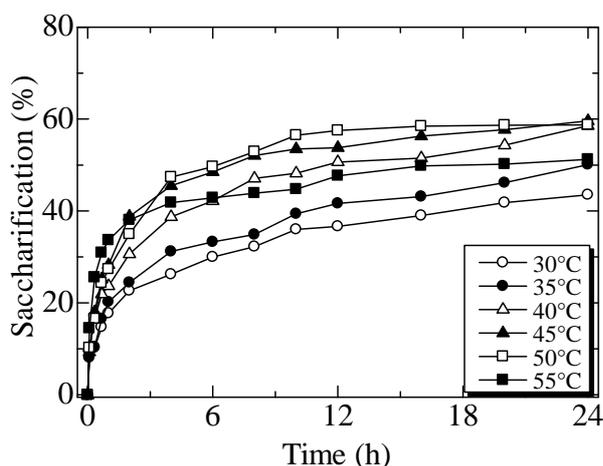


図 3-9 糖化挙動に及ぼす温度の影響

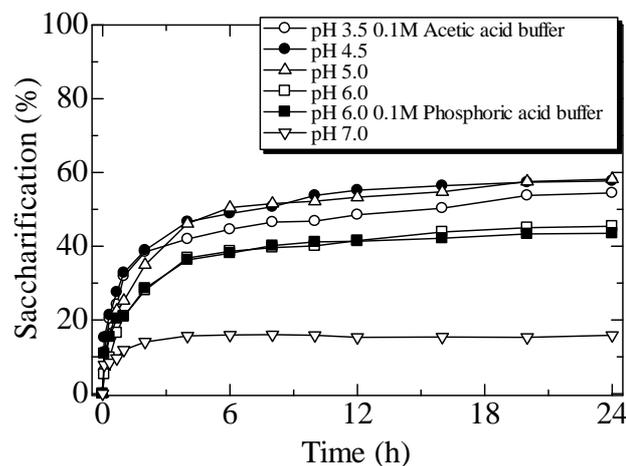


図 3-10 糖化挙動に及ぼす pH の影響

糖化挙動に及ぼす pH の影響を図 3-10 に示す。pH3.5~5.0 までの範囲では、ほぼ同等な糖化率を示しているが、pH5.0~7.0 までの範囲では pH が高くなるにつれ糖化率が低下しており、pH7.0 で 24 時間後の糖化率が約 17% と最も低い値となっている。したがって、pH は 5.0 以下とするのが望ましいと思われる。また、pH6.0 では 0.1M 酢酸とリン酸バッファの両方で糖化実験を行うことでバッファの種類の影響についても検討したが、ほぼ同等の挙動を示していることから、バッファの種類は酵素糖化にほとんど影響を及ぼさないと推定できる。

以上より、アクレモニウムセルラーゼを糖化酵素として用いた場合、酵素量 3%、バッファの pH3.5~5.0、反応温度 50°C が稲わらの最適糖化条件であることが示された。

3.2.2 基本発酵条件

前項で示した最適糖化条件で稲わら微粉末を糖化した糖液の発酵挙動に及ぼす温度の影響を図 3-11 に示す。図において、24 時間後のエタノール濃度は、温度を高くしていくと 32°C で最も高い値を示し、それ以上の温度では低下している。したがって、32°C が最適な温度であることが示唆される。同時糖化発酵を行うとしたときのことを考慮し、さらに高い 45°C

でも同様の実験を行ったが、エタノール濃度は大きく低下し、同時糖化発酵には課題が残された。

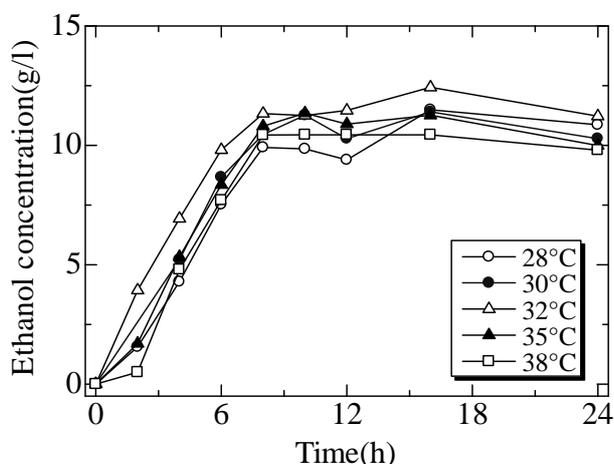


図 3-11 発酵挙動に及ぼす温度の影響

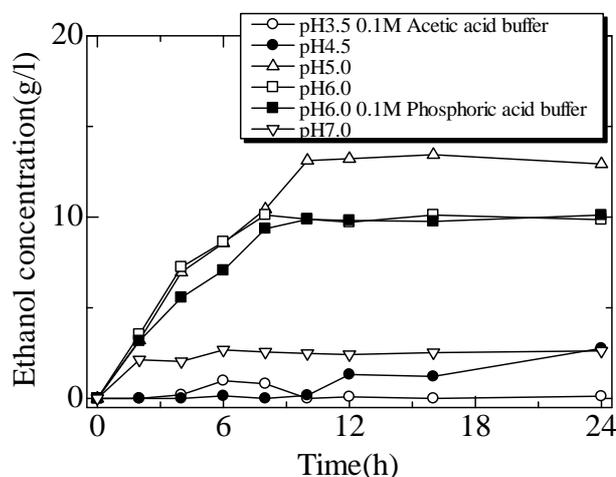


図 3-12 発酵挙動に及ぼす pH の影響

同様に最適糖化条件で稲わら微粉末を糖化した糖液の発酵挙動に及ぼす pH の影響を図 3-12 に示す。ここで、pH3.5~6.0 については 0.1M 酢酸バッファーを、pH6.0~7.0 のときは 0.1M リン酸バッファーを使用した。pH3.5 では発酵反応しなかったためか、エタノールはほぼ生成できていない。pH4.5 においても極少量となっている。前節の図 3-10 において、pH3.5~5.0 の範囲では高い糖化性を示していたが、発酵には不適切であると考えられる。しかし、糖化実験同様に 2 種類のバッファーで行った pH6.0 の場合については、バッファーの種類により変化していないことから影響はないことが確認できた。pH7.0 は約 2 時間辺りで酵母が死滅したためか反応が止まってしまった。

以上より、前項の最適糖化条件で得た糖液の発酵は、反応温度 32°C、バッファーの pH5.0 が最適条件であることが示された。

3.2.3 原料の影響

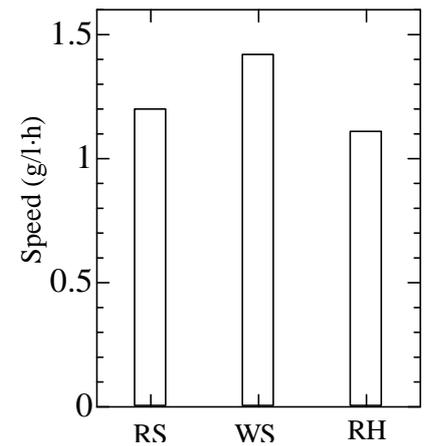
稲わら (RS)、麦わら (WS)、もみ殻 (RH) を用いて酵素添加量 3%、糖化温度 50°C、0.1M 酢酸バッファー(pH5.0)で糖化し、その糖液で発酵実験をしたときのエタノール生成の速度を図 3-13(a)に、各原料 1kg 当たりのグルコースとエタノールの収率を図 3-13 (b)に示す。ここで、収率で各原料を比較したのは、ホロセルロースの割合が文献を参考とした仮定の値であるからである。

図 3-13 (a)からエタノール生成の速度は、3 種類の原料で違いが現れ、麦わらが最も速く、

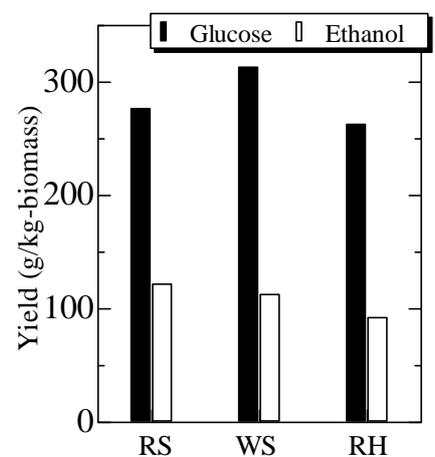
もみ殻が最も遅い結果となっている。これは、発酵阻害物質が存在している可能性を示唆している。一般に、酵素糖化では発酵阻害物質は生成されない。したがって、前処理時に生成された可能性が高い。発酵阻害物質は、セルロース、ヘミセルロースの過分解や、リグニンの部分分解により生成される。例えば、セルロースからはフラン誘導体(フルフラールなど)、ヘミセルロースからは酢酸、リグニンからはフェノール化合物が生じる。

本研究では、前処理を乾式の微粉碎で行っていることから、理論的には上記に示した発酵阻害物質は生成されないはずであるが、別目的で使用した際の残留物や何らかの環境因子などの影響を受け、生成された可能性がある。この速度の差が阻害物質によるものだとすると、もみ殻で最も生成されたといえる。一般に籾殻はこれら3種類の原料のうち最も多くのリグニンを含んでいることから、それ由来の阻害物質の影響が強く現れ、発酵速度に遅れが生じた可能性が高い。逆にいえば、麦わらはこの割合が低いため、最も反応が速かったことが示唆される。しかしながら、本実験では阻害物質を特定するには至らなかった。今後の課題としたい。

次にエタノール収率について述べる。図 3-13 (b)から各原料 1kg 当たりのグルコースの収率は、麦わらで最も高い値を示している。これは原料当たりの(ホロ)セルロース量に起因するものと思われる。エタノール発酵用酵母である *Saccharomyces Cerevisiae* は、グルコースを変換するものであることから、グルコース収率の最も高かった麦わらで一番高いエタノール収率を示すものと思われたが、図では稲わらで最も高い値を示していた。この収率をグルコース 1g 当たりで換算し、変換効率(= エタノール収率 / グルコース収率)を算定したところ、稲わらで 0.42、麦わらで 0.36、もみ殻で 0.35 となった。一般に、変換効率は理論的には最大で 0.51 であるが、通常の酵母では 0.37 程度と言われており⁽⁷⁰⁾、麦わらと籾殻はそれに近い。したがって、麦わらが低い値を示したというよりも稲わらで高い値を示したという方が相応しい。このように、稲わらのみ高くなった要因は現段階では不明であり、阻害物質同様、微粉碎との因果関係が疑われるが、追加実験の必要があり、その説明は今後の課題としたい。



(a) エタノール生成速度



(b) 収率

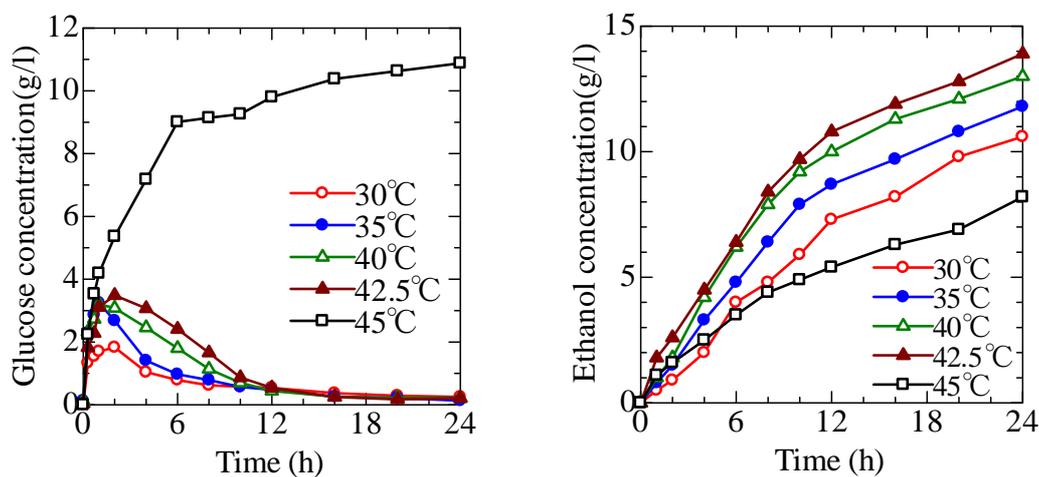
図 3-13 原料の影響

3.2.4 同時糖化発酵性

同時糖化発酵とは、糖化と発酵を一つの反応槽内で同時に並行して行うことでエタノール製造プロセスを簡略化する方法である。これは、セルラーゼによるセルロースの糖化と酵母などの発酵菌による糖化物のエタノール発酵が同時進行するので、生成された糖が蓄積して酵素活性が阻害される前に発酵菌が糖をエタノールに変換できるという利点もある。このため本研究でもこのプロセスについて検討を行った。

(1) 温度の影響

稲わらの同時糖化発酵性に及ぼす反応温度の影響を図 3-14 に示す。グルコース濃度は、30~42.5°C で、反応時間が 1~2 時間までは増加しているがその後は減少していき、反応開始から 12 時間以降はほぼ一定となり、さほど値に差はなくなっている。これは、1~2 時間ほどでグルコースが生成され、それ以降は徐々にエタノールが生成され始めたからである。また、長時間経つとほとんどのグルコースがエタノールとなったため一定となっている。しかし、45°C では減少せずに増加している。これは、45°C では酵素糖化の適温に近いことにより、発酵より糖化反応がより進んだからである。



(a) グルコース濃度

(b) エタノール濃度

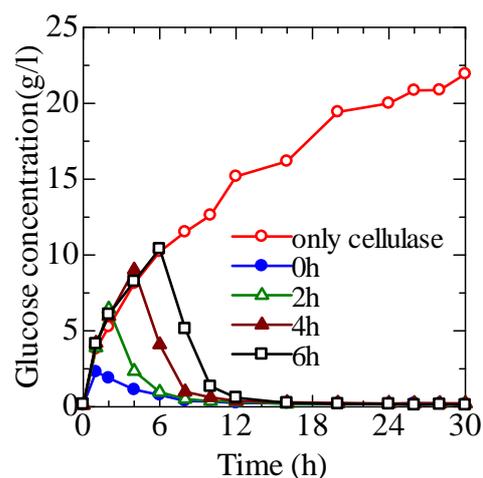
図 3-14 同時糖化発酵性に及ぼす反応温度の影響

(2) 酵母投入時間の影響

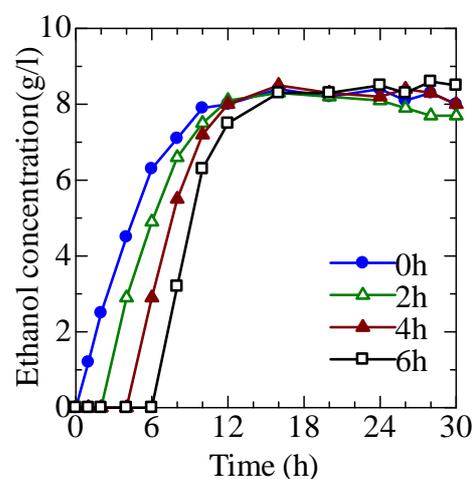
稲わらの同時糖化発酵性に及ぼす酵母投入時間の影響を図 3-15 に示す。

酵母の投入時間を遅らせていくと、グルコース濃度が高くなっていき、投入後は発酵が始まるのでグルコース濃度は低くなっていく。酵母を投入するまでは糖化反応しか働いていないため、酵母なしの場合をみてわかる通り、グルコースが純粋に生成されて増えていく。したがって、ピーク値は投入を遅らせるほど高くなっていき、6 時間後に投入したもので最も高いグルコース濃度となる。

しかし、酵母投入時間を遅らせてエタノール濃度を測定した結果、時間をずらしても最終的なエタノール濃度に変化はみられない。ここで、グルコース濃度と比較してみると、グルコース濃度は酵母投入時間を遅らせると高くなっているのに対して、エタノール濃度ではほとんど変化はない。すなわち、酵母を投入したことで酵素反応が抑制されるといったことは起きていないと考えられる。



(a) グルコース濃度



(b) エタノール濃度

図 3-15 同時糖化発酵性に及ぼす酵母投入時間の影響

3.3 磁性ナノ球状カプセル酵素による糖化

3.3.1 キトサン担体結合法により作製した固定化酵素

(1) 特性およびモルフォロジー

固定化酵素の XRD パターンを図 3-16⁽⁶¹⁾ に示す。図において全ての粒子で $2\theta=30.1^\circ$ 、 35.4° 、 43.1° 、 53.2° 、 56.9° 、 62.5° においてピークを示している。それらは各々、(2 2 0)、(3 1 1)、(4 0 0)、(4 2 2)、(5 1 1)、(4 4 0)面を意味しており、 Fe_3O_4 の結晶構造に見られるピークに対応する。すなわち、本研究で作製した全ての粒子がスピネル型結晶構造を持つ純粋な Fe_3O_4 であるといえる。それらはまた、キトサンの結合や酵素固定化により相変化を起こさないことを示している。

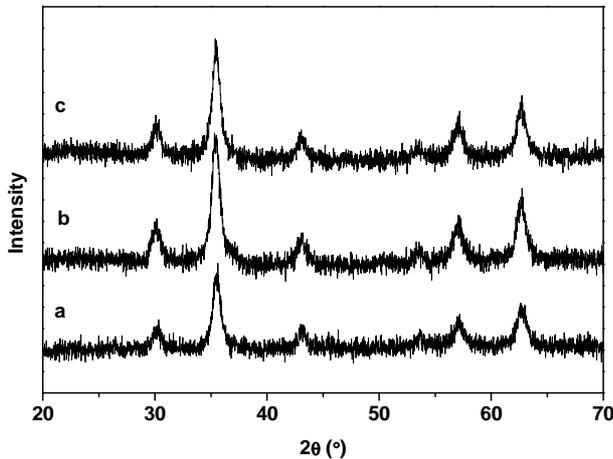


図 3-16 XRD パターン: (a) Fe₃O₄、(b) Fe₃O₄-キトサン、(c) 固定化酵素⁽⁶¹⁾

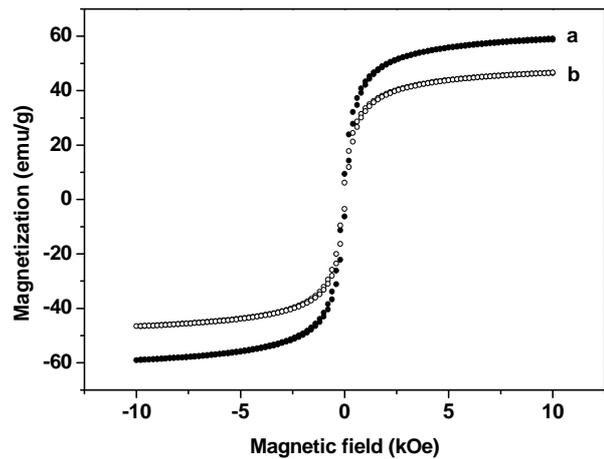


図 3-17 室温下での磁化曲線: (a) Fe₃O₄、(b)固定化酵素⁽⁶¹⁾

図 3-17⁽⁶¹⁾は試料振動型磁力計 (VSM) により測定した(a) 磁性ナノ粒子 (Fe₃O₄)、(b) Fe₃O₄-キトサン、(c) 固定化酵素の磁化曲線を示している。図より、単体の約 58.9emu/g よりは低くはなっているが、固定化酵素の飽和磁化は約 46.6emu/g と高い値を示している。したがって、開発した固定化酵素は磁力によりすばやく回収できるものと思われる。

図 3-18⁽⁶¹⁾に磁性ナノ粒子、キトサン、磁性ナノ粒子 - キトサン、磁性ナノ粒子 - キトサン - GDA、未固定の酵素、固定化酵素の FT-IR スペクトルを示す。図の(a)磁性ナノ粒子では、630cm⁻¹において Fe-O を示すピークが見られる。また、図の(b)キトサンでは 1030、1149cm⁻¹において単糖類の構造を示すピーク、1595、1381cm⁻¹においてキトサン中の N-H、-C-O を意味するピークが見られる。これらと比較して、図の(d)磁性ナノ粒子 - キトサン - GDA でもそれらを見ることができ、さらに 1630cm⁻¹においてキトサンの C=N を意味するピークを検出していることから、それらのキトサン系酵素固定化用担体を問題なく作製できているといえる。また、図の(f)固定化酵素において、図の(e)未固定の酵素で見られる 1651、1541cm⁻¹のタンパク質の存在を示すピークを検出していることから、作製した担体により酵素の固定化ができたことが示唆される。

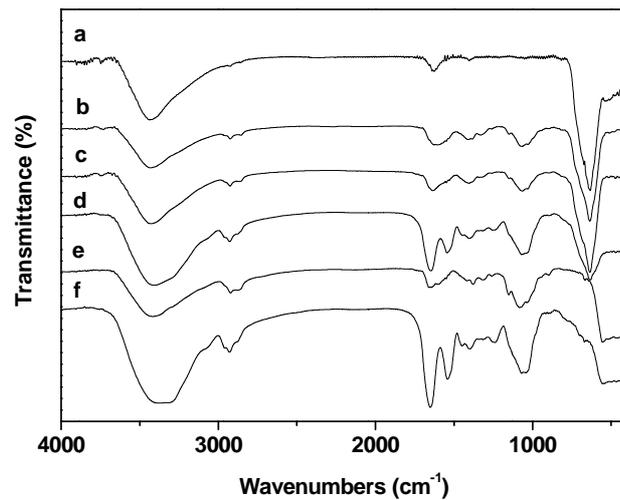


図 3-18 固定化酵素の FT-IR スペクトル⁽⁶¹⁾

図 3-19⁽⁶¹⁾ (a)に磁性ナノ粒子単体、(b)に磁性ナノ粒子 - キトサン、(c)に固定化酵素の TEM 写真を示す。図の(a)より、作製した磁性ナノ粒子の大きさは、粒径 8~20nm 程度であることがわかる。粒径が小さいほど比表面積は大きくなることから、基質への高い拡散性や反応性が期待できると思われる。また、磁性ナノ粒子単体では、粒子同士がその強い磁気双極子 - 双極子の結合により凝集しているのに対し、図の(b)磁性ナノ粒子 - キトサンおよび図の(c)固定化酵素は、磁性ナノ粒子単体よりも比較的分散しており、どちらも平均径が 10nm 以下になっている。したがって、酵素の固定化により磁性粒子の凝集やサイズの変化を発生させなくすることができるといえる。すなわちキトサン被覆は、磁性粒子表面に酵素を固定化するための官能基を与えるだけでなく、磁性粒子の安定性を高める効果があることが示唆される。

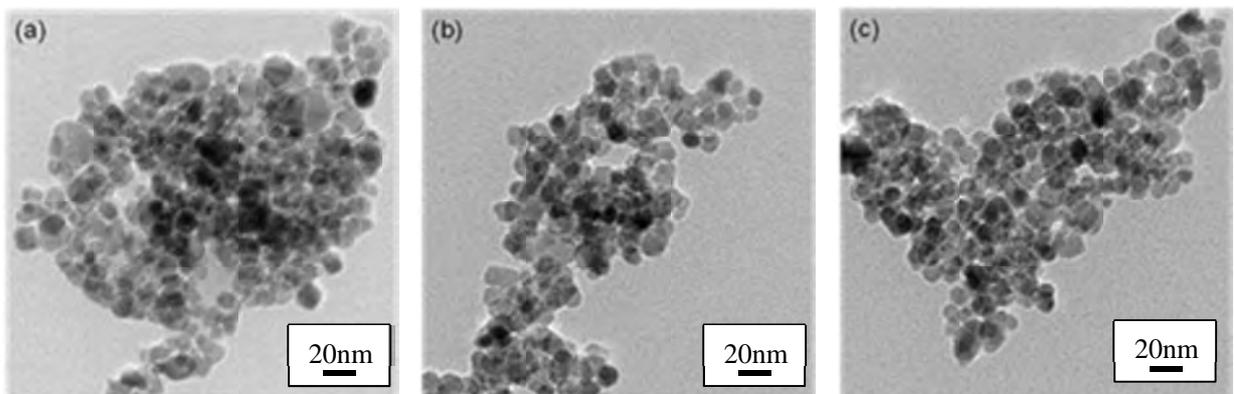


図 3-19 TEM 観察結果: (a) Fe_3O_4 、(b) Fe_3O_4 -キトサン、(c) 固定化酵素⁽⁶¹⁾

(2) 酵素結合率および相対活性

2.3.2(2) に示した(3)式より算定された酵素結合率は72.4%であり、キトサン担体に対して112.3mg/gの酵素が固定化されていることがわかった。また、その相対活性は5.23IU/mgとなった。さらに、後に(5)で再利用性について結果を述べるが、24hサイクルで回収、再利用を10回繰り返した後の残留活性は50%であった。この値は、表3-1⁽⁶¹⁾に示す他の文献と比較して遜色のない値といえる。

表 3-1 酵素固定量および再利用性における文献値との比較⁽⁶¹⁾

Support	Immobilizing technique	Cellulase loading amount	Reusability			Refs.
			Times	Time for each cycle	Residual activity	
Clay/PGMA	Adsorption	43.4 mg/g	12	1 h	37%	(65)
	Covalent	32.7 mg/g	12	1 h	79%	
Sol-gel matrix	Entrapment	43.9 mg protein/g	6	24 h	20%	(66)
Magnetoresponseive graphene	Covalent	2.5 mg protein/g	4	1 h	55%	(71)
Commercial activated carbon	Adsorption	1565 mg/g	5	1 h	70%	(72)
Modified PVA coated chitosan	Adsorption	0.144 mg protein/10 beads	8	5 min	52%	(73)
Magnetic chitosan	Covalent	112.3 mg/g	10	24 h	50%	The current work

(3) pH および反応温度の最適条件

図3-20⁽⁶¹⁾に固定化酵素の相対活性に及ぼす(a) pH および(b) 反応温度の影響を示す。図の(a)より、反応温度50°Cでは固定化酵素の最適pH値は5.0であることがわかる。pH5.0での活性はわずかに酵素単体で高い値を示しているが、pHの影響パターンは同じであり、磁性

粒子への固定化による影響は小さいといえる。pH5.0に固定して反応温度を変化させた図の(b)でも酵素単体と同じ温度で最適値(50°C)を示しているが、50°C以上では酵素単体よりも高い活性を示している。これは、磁性粒子と結合したことにより耐熱性が高くなったためと考えられる。

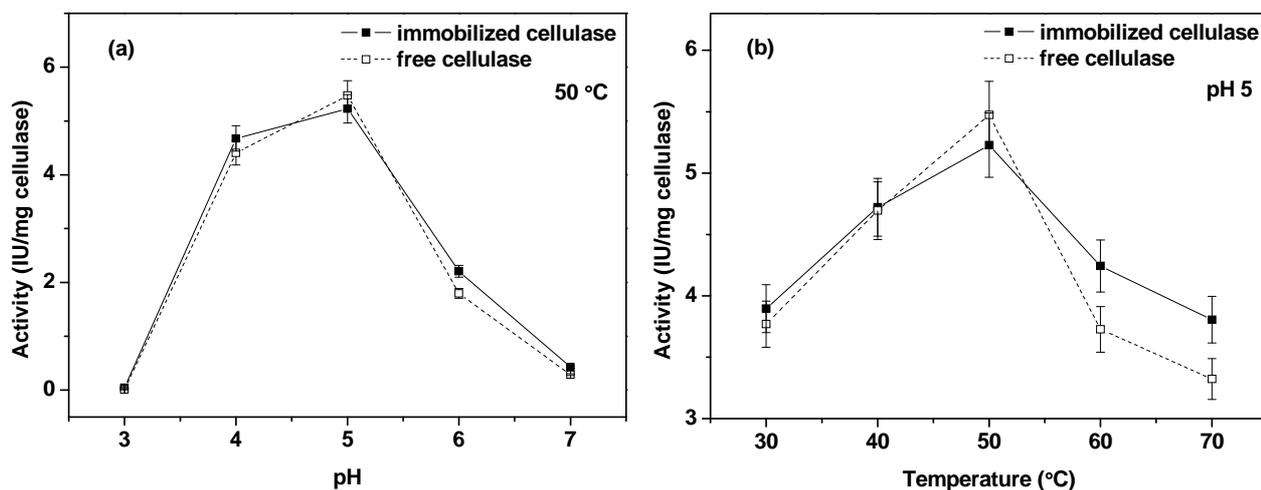


図 3-20 固定化酵素の相対活性に及ぼす(a) pH および(b) 温度の影響 (サンプル数: 3) ⁽⁶¹⁾

(4) 熱安定性

pH5.0、温度 60°C で反応させたときの固定化酵素の残留活性の時間変化を図 3-21 に示す。ここで、反応温度を 60°C としたのは、短時間で熱安定性の検討を行うためである。

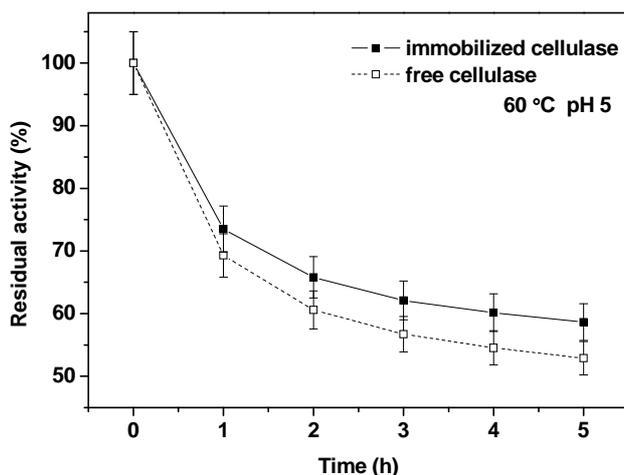


図 3-21 固定化酵素の残留活性に及ぼす(a) pH および(b) 温度の影響 (サンプル数: 3) ⁽⁶¹⁾

図より、固定化の有無にかかわらず、1h の経過で急激に残留活性が低下した後、徐々に

その低下が緩やかになっている様子がわかる。5h 経過後の残留活性は、酵素単体で 52.9% であるのに対し、固定化酵素で 58.7% を示している。これは恐らく、一部の文献^{(59),(74)}で報告されているように磁性粒子 - キトサン担体が熱を遮蔽する性質をもつためと考えられる。

(5) 再利用性

図 3-22⁽⁶¹⁾のように、固定化酵素の活性は 2 回目の使用で約 31.9% と大きく低下する。この活性の低下の要因には、タンパク質の変性や阻害物質の生成、固定化されている酵素量の減少など、多くの可能性が挙げられる。また、磁性粒子と酵素との固定化に利用したグルタルアルデヒドによる化学結合の形成が酵素構造を変化させたことも要因の可能性もある。固定化酵素を構成する個々の酵素は磁性粒子と結合することができる官能基を多くもっているが、それらはセルロース基質中のグルコースモノマー間の結合を切断するための活性部位に存在している可能性がある。担体 - 酵素の結合がこの活性部位で行われてしまうと、酵素の安定性が大幅に低下することが予測される。しかしながら、図 3-23⁽⁶¹⁾のように、24h 反応させたことにより生成されたグルコース量にはほとんど変化が見られず、1 回目ときの 80% 以上を保ち続けている。したがって、実用的な観点から考えれば、作製した固定化酵素は高い再利用性をもっているといえる。

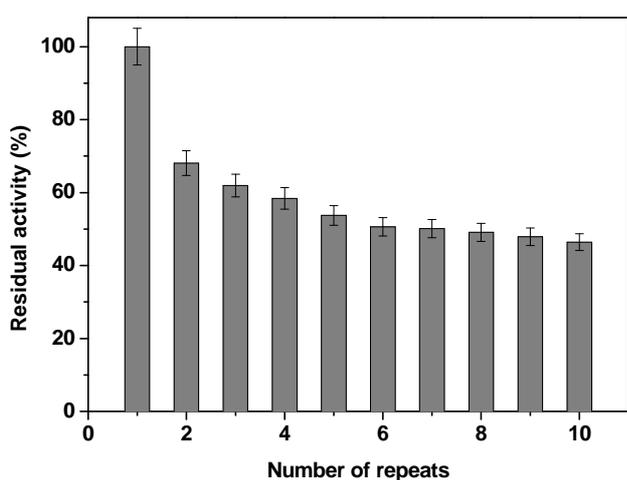


図 3-22 固定化酵素の残留活性に及ぼす再利用の影響 (サンプル数 : 3) ⁽⁶¹⁾

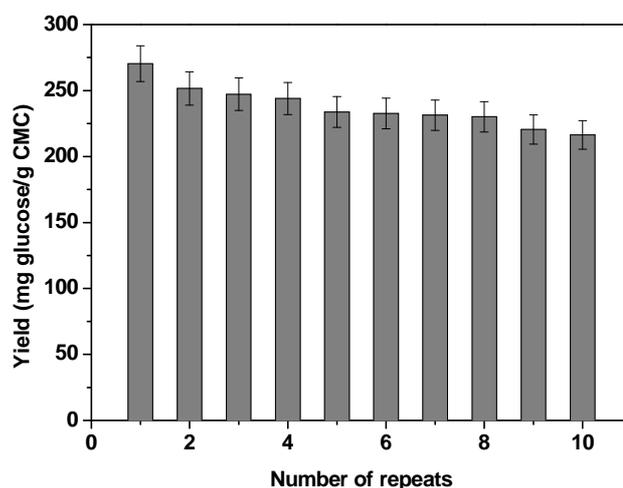


図 3-23 固定化酵素によるグルコース収率の再利用による変化 (pH5.0, 50°C, 24h 反応) (サンプル数 : 3) ⁽⁶¹⁾

3.3.2 シリカ被覆により作製した固定化酵素

(1) APTES 法

図 3-24⁽⁶²⁾にテトラエトキシシラン (TEOS) の量を変動させたときのシリカ被覆磁性粒子の TEM 写真を示す。以降、TEOS 量を 1mL として作製したシリカ被覆磁性粒子は MS₁、3、5、7mL としたときは各々 MS₃、MS₅、MS₇ と呼ぶこととし、図の(a)には磁性粒子単体、(b)には MS₃、(c)には MS₅、(d)には MS₇を示す。

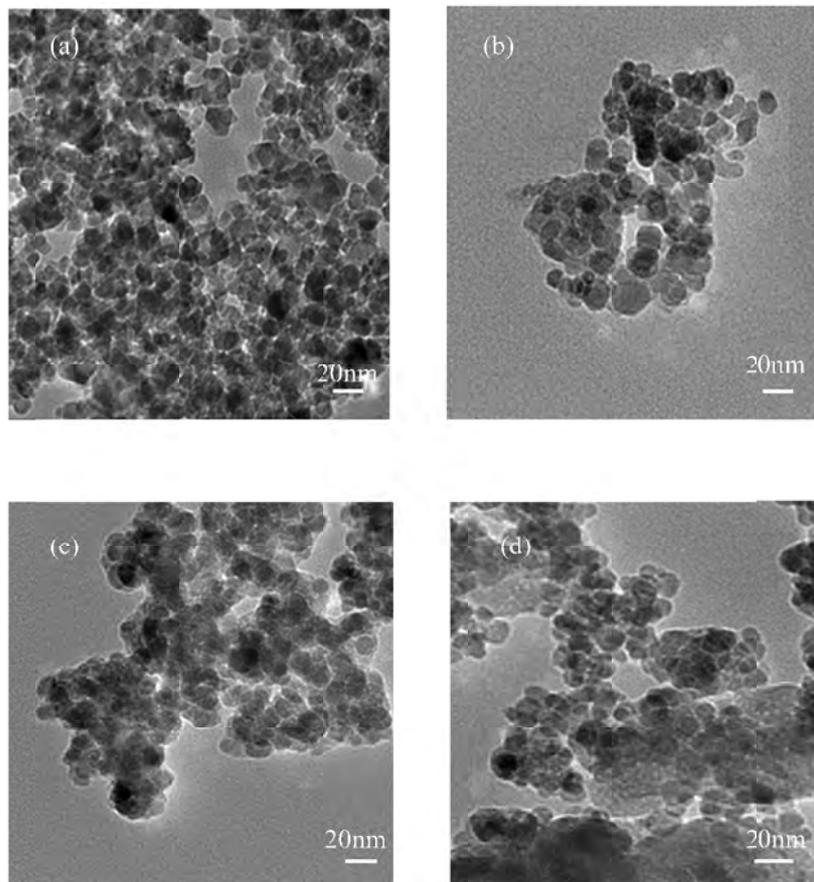


図 3-24 シリカ被覆磁性粒子の TEM 写真: (a) Fe₃O₄、(b)MS₃、(c) MS₅、(d) MS₇⁽⁶²⁾

図から TEOS 量が増加するにつれて磁性粒子表面に被覆されているシリカ層が明確に大きくなっていることが分かる。特に、図の(d)でシリカ層の肥大化が顕著に認められる。

図 3-25⁽⁶²⁾に VSM により測定されたこれらのシリカ被覆磁性粒子の磁化特性を示す。図において、TEOS 量が増えるにつれて飽和磁化が低下している。これは、前述のように TEOS 量が増えることでシリカ層が大きくなるためである。

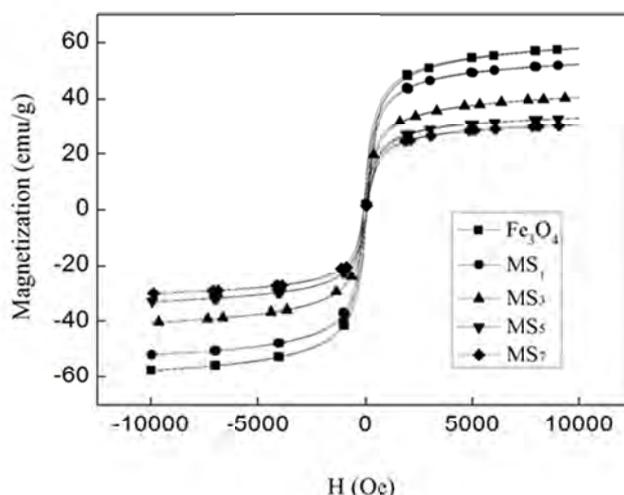


図 3-25 シリカ被覆磁性粒子の磁化特性⁽⁶²⁾

図 3-26⁽⁶²⁾に固定化酵素の酵素結合率と相対活性に及ぼす TEOS 量の影響を示す。結合率および相対活性は、TEOS 量が増えるにつれて上昇している。しかし、5mL と 7mL で固定化酵素の結合率に大きな差はなく、相対活性も 100%に近い値を示していることから、TEOS 量は 5mL で十分と思われる。

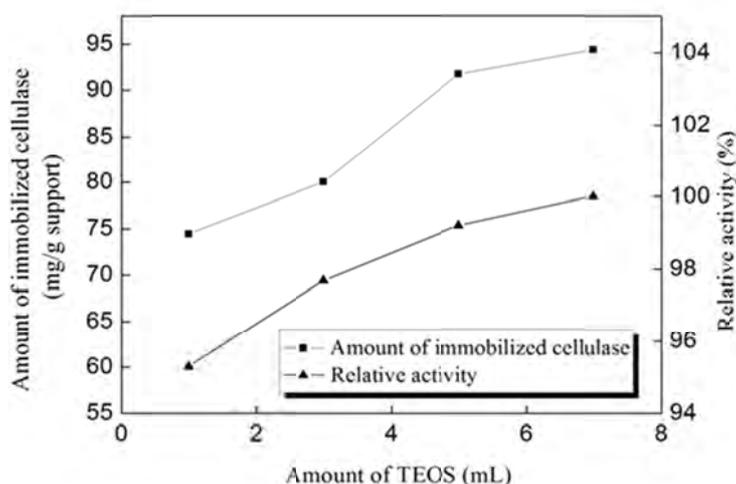


図 3-26 固定化酵素の酵素結合率と相対活性に及ぼす TEOS 量の影響⁽⁶²⁾

図 3-27⁽⁶²⁾に 3-アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES 量) による固定化酵素の酵素結合率と相対活性の変化を示す。このとき TEOS 量は 5mL としている。図のように、APTES 量を増加させると、2mL までで急激に上昇し、4mL 以上でほぼ飽和を示す。以上より、APTES を用いたシリカ被覆法では、TEOS 量 5mL、APTES 量 4mL が最適条件と考えられる。この

条件で作製した固定化酵素の酵素結合量は 92mg/g、相対活性は 80% となった。

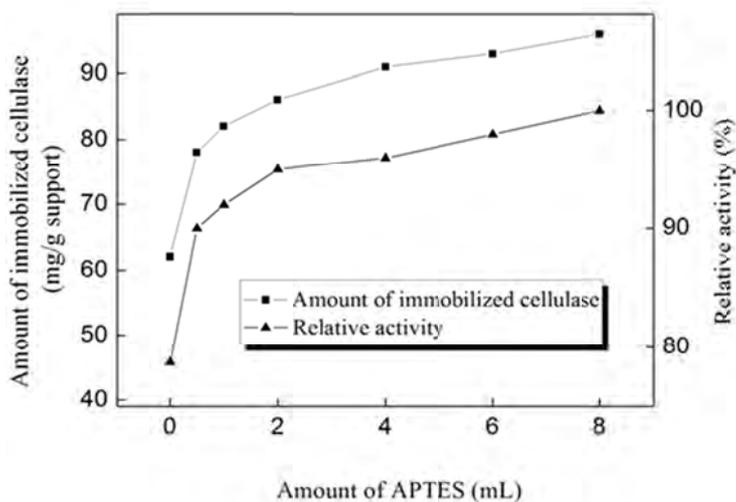


図 3-27 固定化酵素の酵素結合率と相対活性に及ぼす APTES 量の影響⁽⁶²⁾

図 3-28⁽⁶²⁾に作製した固定化酵素の再利用性を示す。図において、1~4 回までは残留活性は 80%を維持しており、10 回の再使用でも 63.2%を保つことができることがわかった。

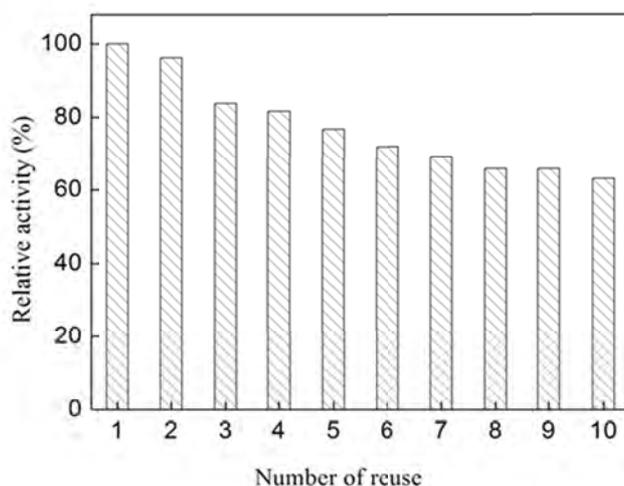


図 3-28 固定化酵素の再利用性⁽⁶²⁾

(2) シリカへの吸着による酵素固定化

図 3-29 に TEM により観察されたシリカ被覆固定化酵素のモルフォロジーを示す。図の(b) シリカ被覆磁性粒子は、TEOS の反応時間を長くすることにより、磁性粒子 (Fe_3O_4) を中心として大きな SiO_x コーティング層を形成させることができた。この大きな Fe_3O_4 表面上に堆積された SiO_x コーティング層は、高い吸着能をもつと考えられる。しかし、この(b)に

酵素を固定化したものについて TEM 観察を行ったが、図の(c)のように酵素の吸着を明確に判別することはできなかった。

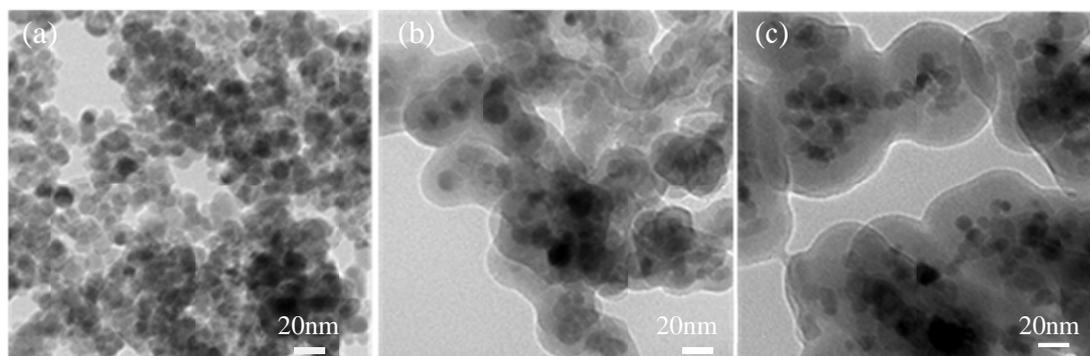


図 3-29 TEM 写真: (a) Fe₃O₄、 (b) シリカ被覆磁性粒子、 (c) 固定化酵素

図 3-30 に VSM により測定されたシリカ被覆固定化酵素の磁化特性を示す。図からわかるように、シリカ被覆磁性粒子の飽和磁化は大きく低下している。これは図 3-29 からわかるように SiO_x コーティング層が非常に厚いためと考えられる。したがって、回収には大きな磁力が必要と思われる。

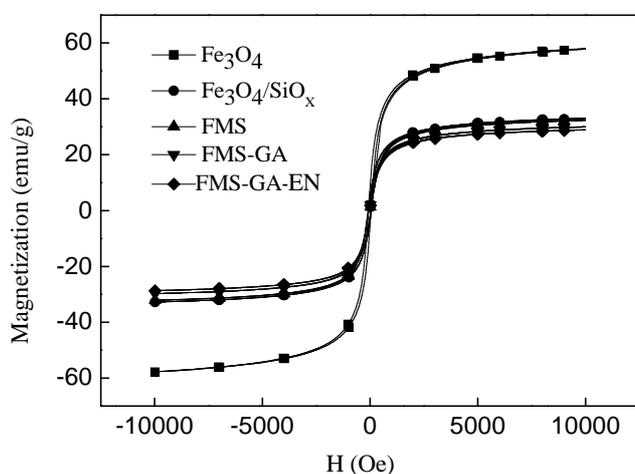


図 3-30 室温下での磁化曲線

図 3-31 に初期酵素濃度による本固定化酵素の酵素結合率の変化を、図 3-32 にその相対活性の変化を示す。ここで、比較としてグルタルアルデヒド (GDA) を用いず、酵素の SiO_x コーティング層への吸着のみを利用した場合 (without) についても示している。

図 3-31 からわかるように、酵素結合率は GDA も利用した場合の方が高くなるが、吸着の

みの場合でも結合量 80mg/g を超えている。したがって SiO_x コーティング層を大きくすることで固定化しやすくなるといえる。また、相対活性は吸着のみの場合の方が明らかに高く、初期酵素濃度 8mg/mL で 100%近い活性を得ることができている。これは、吸着のみの場合、酵素の制限が小さいためと考えられる。

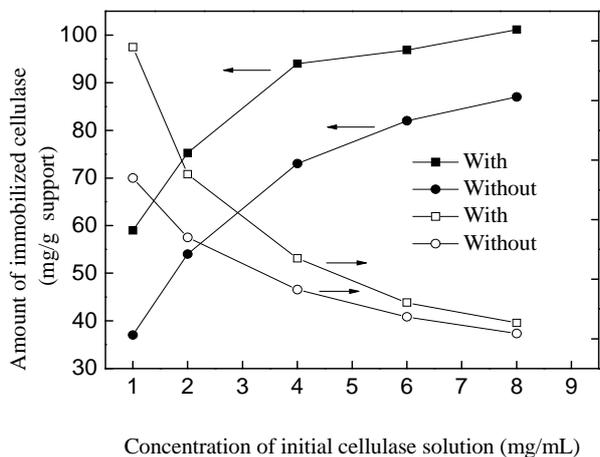


図 3-31 初期酵素濃度による酵素結合率の変化

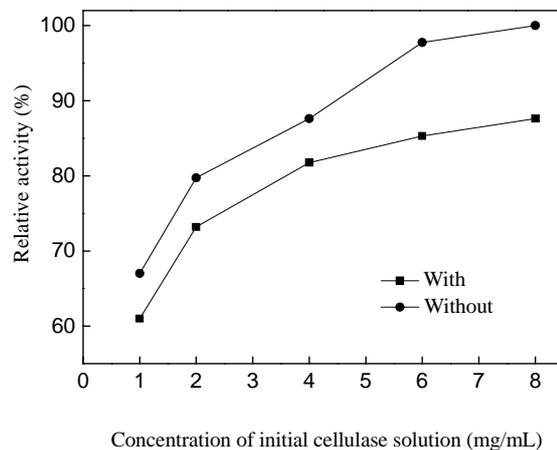


図 3-32 初期酵素濃度による相対活性の変化

図 3-33 に再利用性を示す。ここでもまた、比較としてグルタルアルデヒド (GDA) を用いず、酵素の SiO_x コーティング層への吸着のみを利用した場合 (without) についても示している。

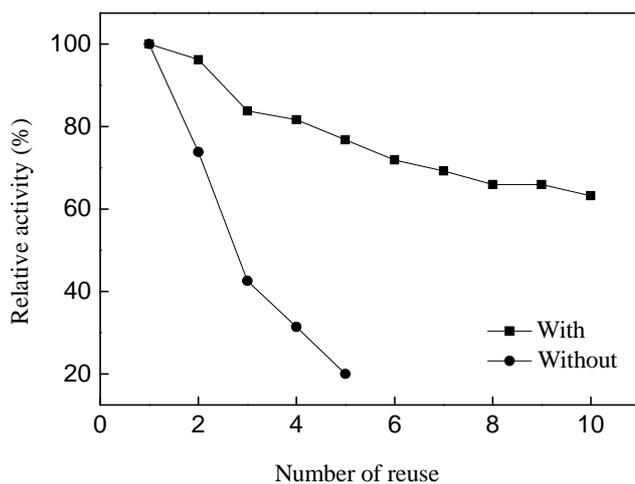


図 3-33 シリカ被覆固定化酵素の再生利用性 グルタルアルデヒド GDA の使用 (with)、非使用 (without)

図において、作製した固定化酵素は GDA を用いた場合では再使用の回数が増えるにつれ

ほぼ直線的に低下し、10回使用で残留活性が60%まで低下している。GDAなしの場合、その低下は顕著でありわずか5回の使用で残留活性が20%まで低下してしまった。これは、吸着を利用した方法では使用時に酵素がSiO_xコーティング層から脱着してしまうためと考えられる。逆にいえば、使用時に脱着してしまうため、図3-32のようにGDAで架橋させた場合よりも活性が高くなることが示唆される。

3.3.3 固定化酵素による稲わらの糖化性

最後に、検討した中でも最も期待できるキトサン担体結合法により作製した固定化酵素により稲わらの繰り返し糖化実験を行った。図3-34にその結果を示す。

図からわかるように、稲わらの場合では、CMCと異なりわずか1回の使用で大幅に糖化率が低下する。これはすなわち、糖化反応の際に酵素が脱落している可能性を示唆するものである。

この原因を追究するためにゼータ電位を測定したところ、稲わらの高い吸着能により酵素が脱落し、稲わらに吸着されてしまうことが示唆された。このため2回目以降の稲わらでは十分な糖化ができなかったものと思われる。

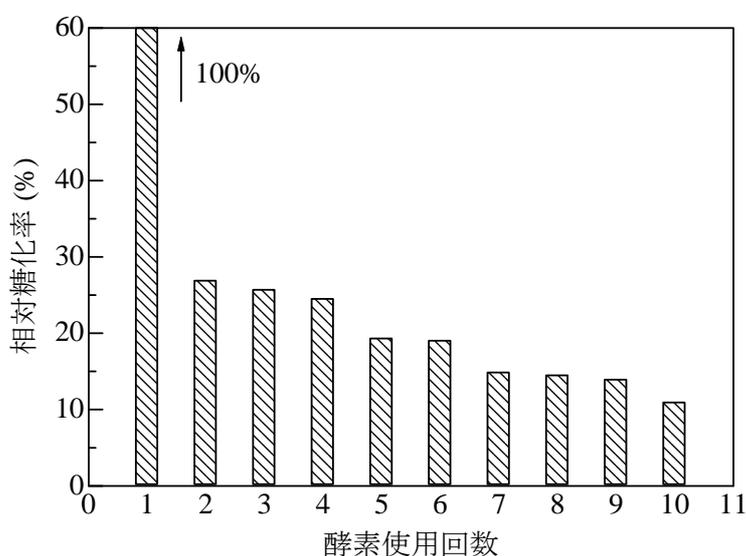


図 3-34 固定化酵素による稲わらの繰り返し糖化

4. 環境に優しい新規生分解性複合材料

4.1 稲わら/生分解性樹脂複合材料の基本特性

4.1.1 熱特性および力学特性

図 4-1 には稲わら/ポリ乳酸 (PLA) 複合材料の熱重量変化を、図 4-2 には稲わら/ポリブチレンサクシネート (PBS) 複合材料の熱重量変化を示す。

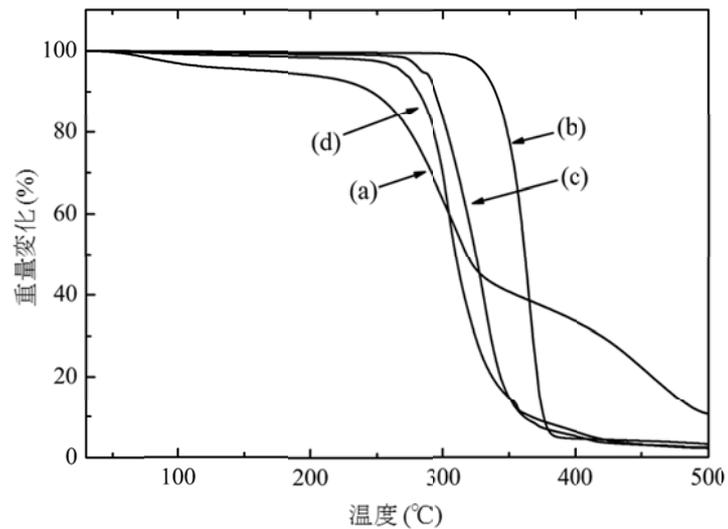


図 4-1 稲わら/PLA 複合材料の熱重量変化：(a) 稲わら、(b) PLA、(c) 10wt%稲わら/PLA 複合材料、(d) 30wt%稲わら/PLA 複合材料

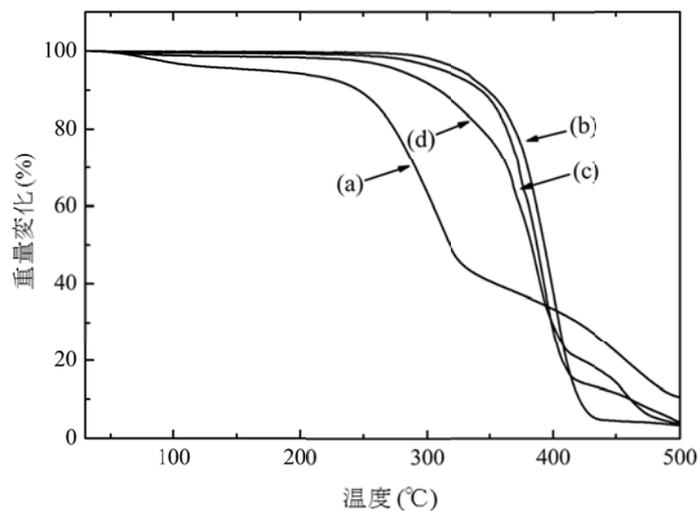


図 4-2 稲わら/PBS 複合材料の熱重量変化：(a) 稲わら、(b) PBS、(c) 10wt%稲わら/PBS 複合材料、(d) 30wt%稲わら/PBS 複合材料

PLA、PBS どちらの場合でも、稲わらの添加により熱分解温度が PLA 単体もしくは PBS 単体よりも低下した。しかしながら、それらは稲わら単体よりも高い温度であり、また、最も添加量の多い 30wt% の場合でも熱分解の開始が成形温度の 200°C よりも高いことから、成形には問題がないことが示唆される。

図 4-3 には粒度を 106 μm 以下、106 \sim 300 μm 、300 \sim 1000 μm に分けた稲わらと PLA との複合材料の引張特性と添加量の関係を示す。

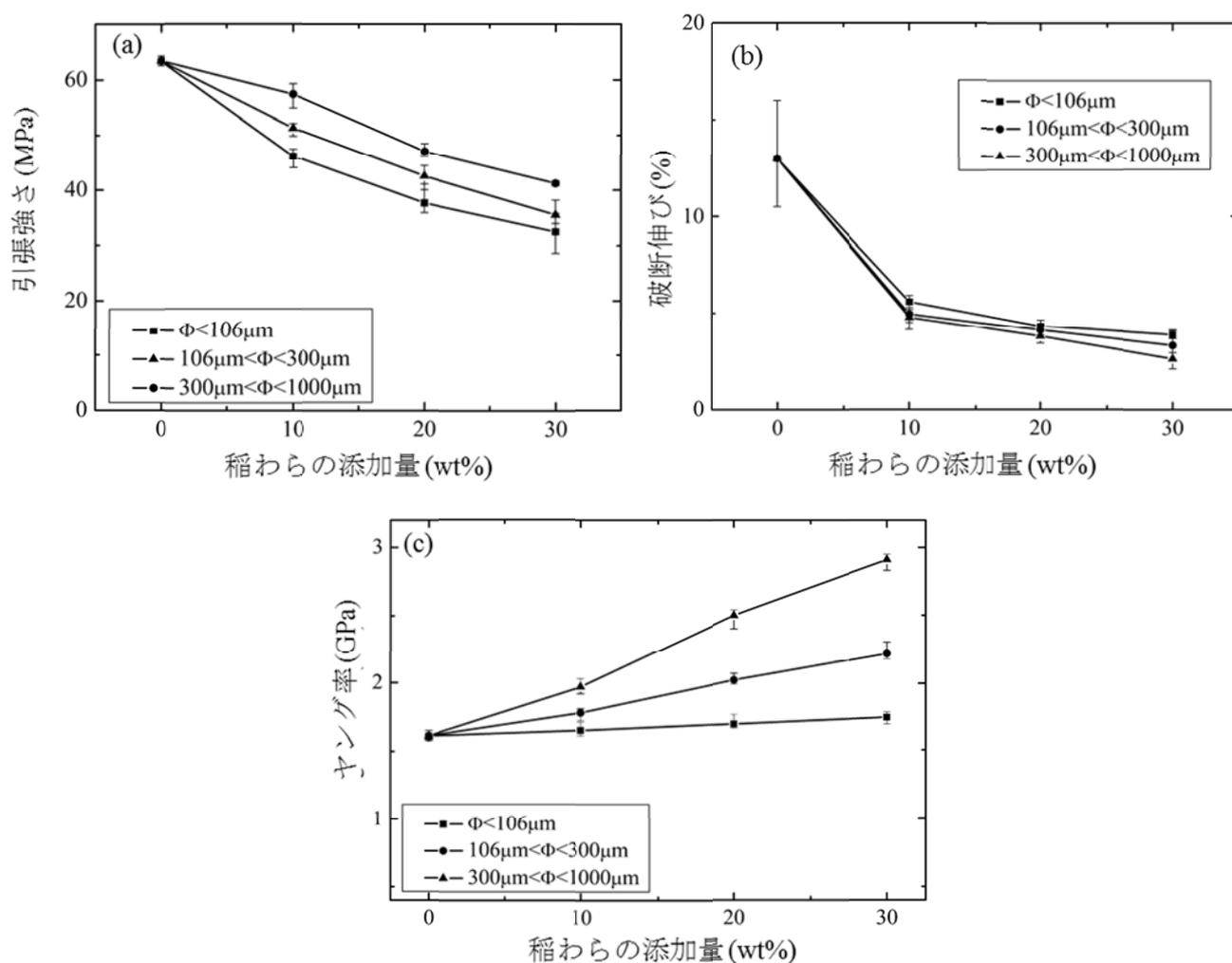


図 4-3 稲わら/PLA 複合材料の引張特性：(a) 引張強さ、(b) 破断伸び、(c) ヤング率（サンプル数：5）

稲わらの添加量を増加させると、引張強度と破断伸びは低下した。しかし、その低下は粒度の最も大きい 300 \sim 1000 μm で小さくなった。一方、ヤング率は添加量の増大と共に上昇した。すなわち、稲わらの添加により脆性が大きくなったことが示唆される。この破断面を

SEMにより観察した結果を図4-4に示す。図からわかるように、稲わらと樹脂との界面に隙間があることから、これを起点としてき裂が発生したことが推測される。このため、引張強度と破断伸びは低下したと考えられる。したがって、PLAと稲わらで相溶性が良くないことがいえる。粒度が大きいもので引張特性の低下が小さくなったのは、稲わらが引き抜かれるときの摩擦が大きくなるためと推察される。

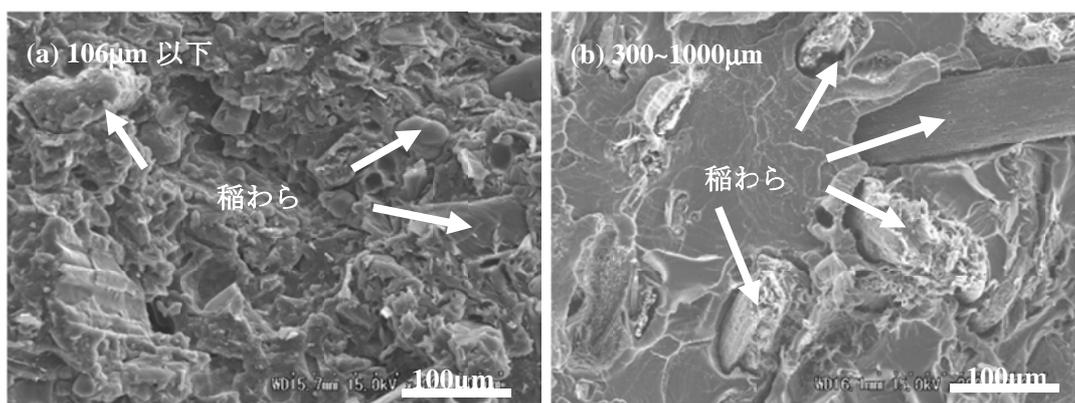


図4-4 30wt%稲わら/PLA 複合材料の引張破断面

図4-5には粒度を106 μm 以下、106~300 μm 、300~1000 μm に分けた稲わらとPBSとの複合材料の引張特性と添加量の関係を示す。稲わらの添加量を増加させると、PLAのときと同様にPBS複合材料の引張強度および破断伸びは低下した。また、その低下もPLAと同様に粒度の最も大きい300~1000 μm で小さくなり、ヤング率は添加量の増大と共に上昇した。すなわち、PBSの場合でも稲わらの添加により脆性が大きくなったことが示唆される。この破断面をSEMにより観察し、図4-6に示す。図からわかるように、PBSの場合でも、稲わらと樹脂との界面に隙間があることから、これを起点としてき裂が発生したことが推測される。このため、引張強度および破断ひずみは低下したものと考えられる。したがって、PBSもまた、稲わらと相溶性が良くないことがいえる。

以上より、稲わらの添加は、樹脂と稲わらとで相溶性が良くないため、単体よりも力学特性を低下することが示された。しかしながら、逆に言えばこれらの相溶性を改善することで、物性の向上が期待できる。

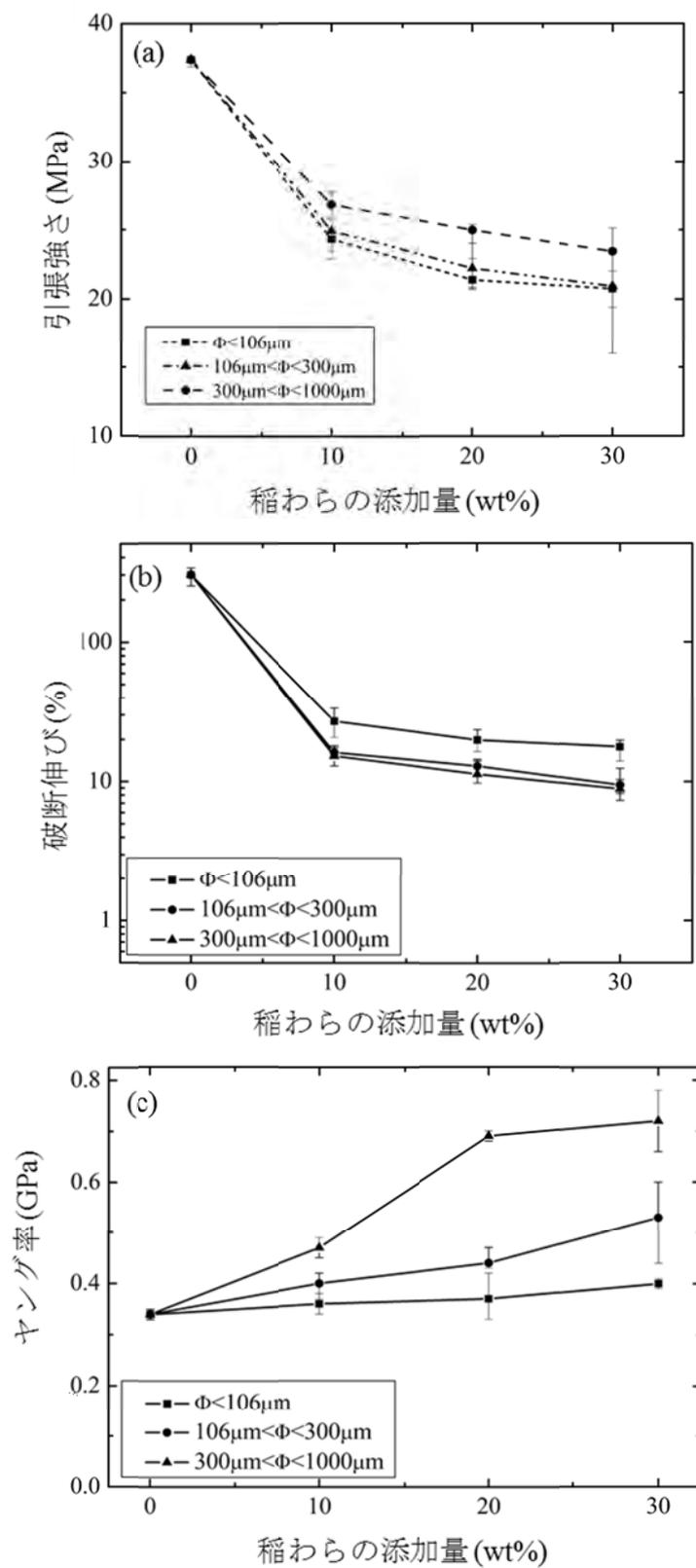


図 4-5 稲わら/PBS 複合材料の引張特性：(a) 引張強さ、(b) 破断伸び、(c) ヤング率 (サンプル数：5)

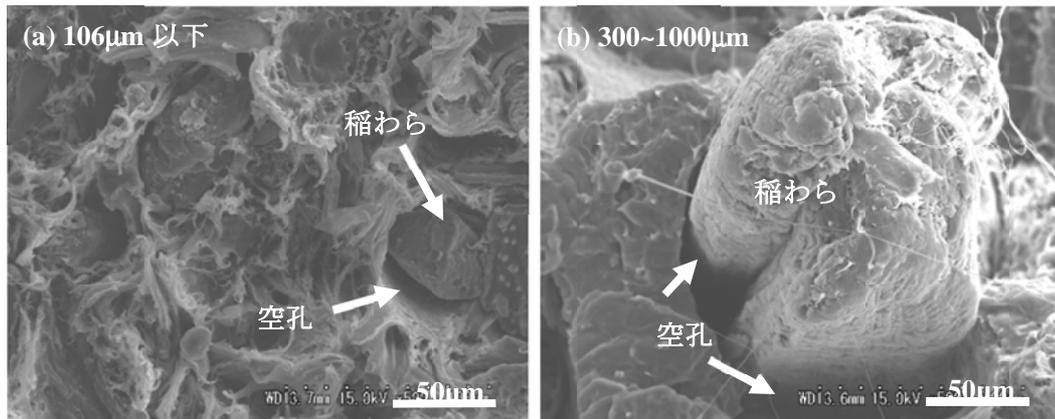


図 4-6 30wt%稲わら/PBS 複合材料の引張破断面

4.1.2 分解特性

図 4-7 に分解試験前の PLA および稲わら添加量 30wt%の光学顕微鏡写真を示す。試験前の試験片表面はなめらかで、き裂や変色はなかった。

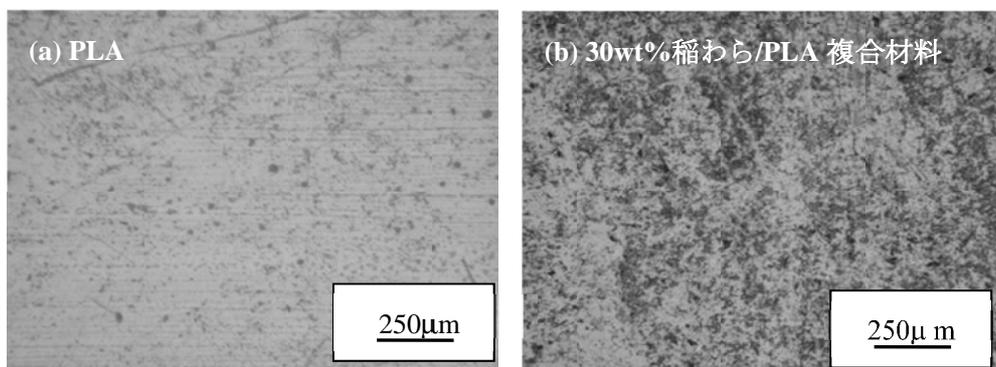


図 4-7 分解性試験前の様子

図 4-8 に屋外暴露試験 42 ヶ月後の PLA および稲わら添加量 30wt%の表面光学顕微鏡写真、図 4-9 に引張強さの変化を示す。比較として、代表的な汎用プラスチックであるポリプロピレン (PP) とエンジニアリングプラスチックであるポリカーボネイト (PC) の試験結果も併せて示した。42 ヶ月後の PP は、形状を維持していなかったため試験ができなかった。

屋外暴露試験により、試験前には見られなかった傷やき裂、変色などが現れた (図 4-8)。これは、紫外線によって光化学反応を起こし、高分子の硬化や変色、劣化が起こったためと考えられる。それらの引張強さは、図 4-9 に見られるように時間の経過により全ての試験片

で低下したが、PP、PCが6ヶ月～12ヶ月で急激に低下するのに対し、PLAおよび複合材料は、比較的緩やかな低下を示した。また、42ヶ月後の引張強さは、稲わら添加量10wt%の複合材料で最も高い値を示した。したがって、稲わらを添加させることにより、屋外暴露による引張強さの低下を抑えられることが示唆される。

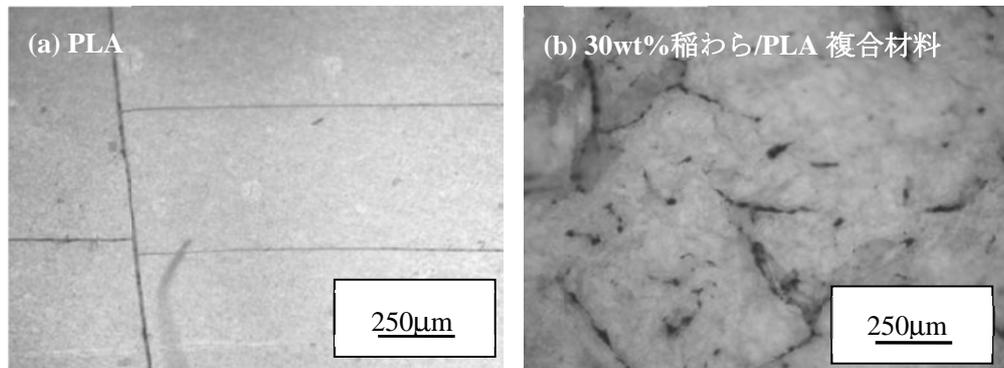


図 4-8 屋外暴露試験 42 ヶ月後の表面光学顕微鏡写真

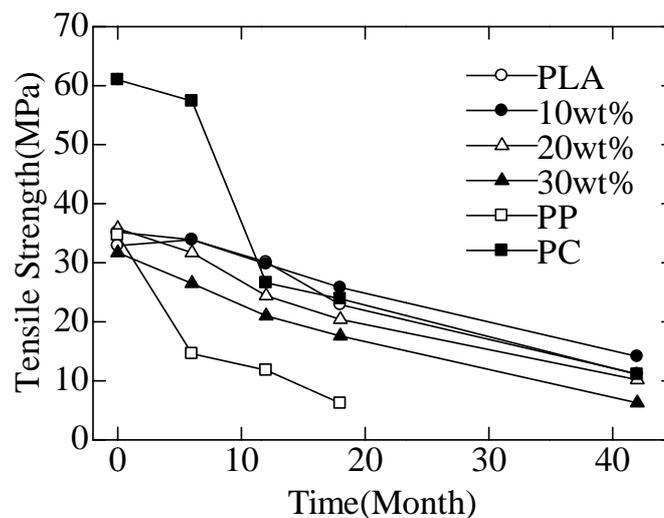


図 4-9 暴露時間による引張強さの変化

図 4-10 に埋設試験 42 ヶ月後の PLA および稲わら添加量 30wt%の表面光学顕微鏡写真、図 4-11 に引張強さの変化を示す。

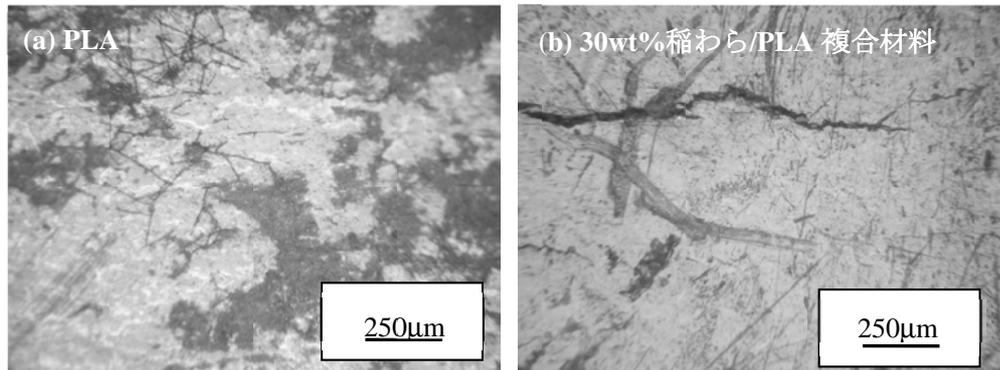


図 4-10 埋設試験 42 ヶ月後の表面光学顕微鏡写真

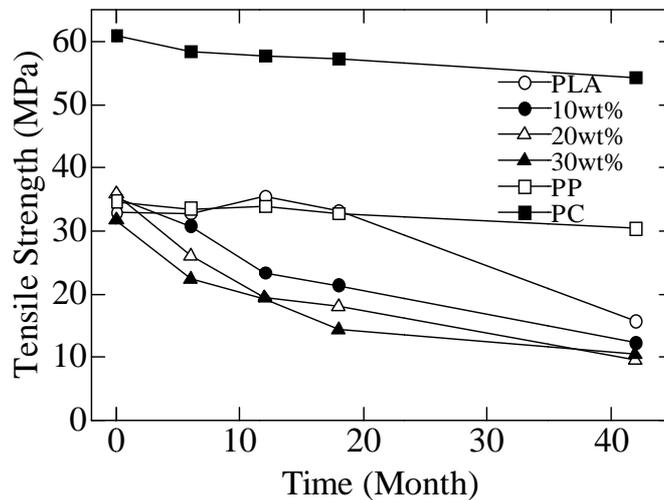


図 4-11 埋設時間による引張強さの変化

PLA および複合材料の試験片表面は、18 ヶ月までは白いまだら模様が目立っていたが、42 ヶ月経過したものでは図 4-10 のように黒く変色した部分が目立つようになっていた。これは、稲わら添加量が少ない試験片のほうがはっきり表れていること、複合材料に比べ PLA 単体の変化が大きいことから、地中で PLA の分解が進んだことにより変色したものと推測される。

また、引張強さは図 4-11 に見られるように、生分解性を有していない PP、PC には引張強さの変化はほとんど見られなかったのに対し、PLA および複合材料は明らかな低下を示した。以上の結果はそれらの生分解を示唆するものである。また、PLA は生分解性プラスチック

ックの中でも、分解速度が比較的遅く、1~2年の埋設では分解があまり進まない性質を持っているが、42ヶ月後の結果を見てみると、複合材料は、PLA単体よりも引張強さの低下の割合が大きい。したがって、稲わらを添加することによって試料の分解期間を短縮できたことが示された。これは、稲わら添加により母材(PLA)の占める割合が減ったことに起因するものと考えられる。また、親水性である稲わらによりPLA単体よりも水分吸収が加速されたことなどにより分解が進んだ可能性も挙げられる。

4.2 シランカップリング剤による表面処理の効果

アミノ系シランカップリング剤の物理的な混合(乾式処理)による稲わらの表面改質について検討し、主にその相溶化剤の添加量の影響を調査した。図4-12には30wt%稲わら/PBS複合材料の引張強さに及ぼすシランカップリング剤の影響を示す。

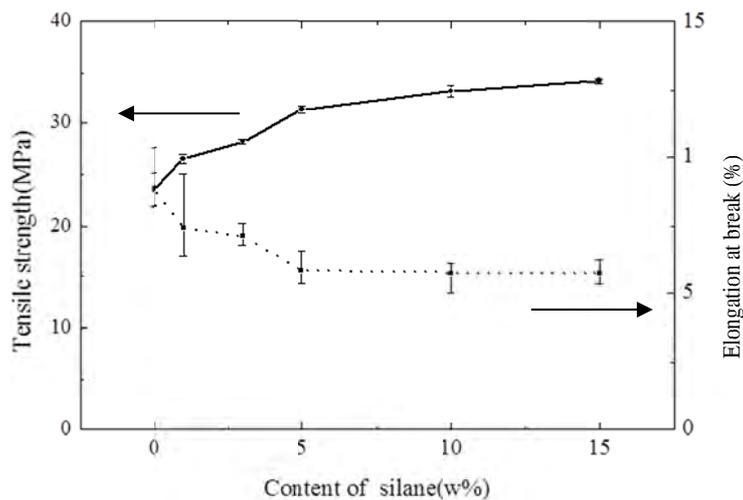


図 4-12 30wt%稲わら/PBS 複合材料の引張強さに及ぼすシランカップリング剤の影響 (サンプル数 : 5)

図からわかるように、シランカップリング剤の添加により、複合材料の引張強度は向上し、PBS単体(37MPa)に近い35MPaの値を示した。また、その界面構造をTEM観察した結果(図4-13)、樹脂と稲わらとの接合界面が改善されていることが明らかとなった。しかしながら、図4-12から、シランカップリング剤の添加は、一方で破断ひずみ(Elongation at break)を低下させることも明らかになった。したがって、アミノ系シランカップリング処理では、複合材料が脆くなるという問題があることがわかった。

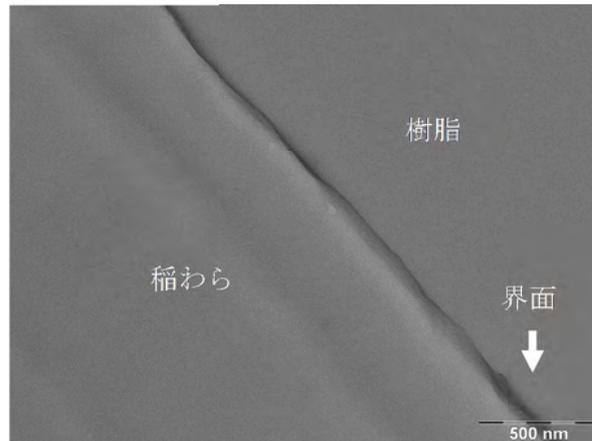


図 4-13 稲わらの表面処理後の界面 TEM 写真

4.3 アドミセル乳化重合によるポリマー表面被覆処理の効果

4.3.1 モノマーの選択

まず、アドミセル乳化重合に用いるモノマーを選択するために、ハンセン溶解度パラメータ (HSP) の理論⁽⁶⁷⁾から PLA と相溶性の良い樹脂について検討した。図 4-14 に PLA の HSP 値より得られたハンセンの溶解球と各種材料の HSP 値の関係を示す⁽⁶⁴⁾。比較材料として一般的な高分子材料であるポリスチレン

(PS)、ポリメチルメタクリレート (PMMA)、ポリアクリロニトル (PAN)、ポリビニルピロリドン (PVP) と、稲わらの主成分であるセルロースやリグニンも示した。ここで、 δ_D はファンデルワールス力による分散項、 δ_P は双極子モーメントの力による極性項、 δ_H は水素結合の力による水素結合項を示している。

図において、溶解球内にプロットされている材料は PLA との溶解性が高いことを表しており、球の中心に近い材料ほど高くなる。すなわち、PLA と溶解性の良い材料は PMMA、PS、PAN であり、アドミセル乳化重合で稲わら表面に被覆する高分子としては PMMA が最

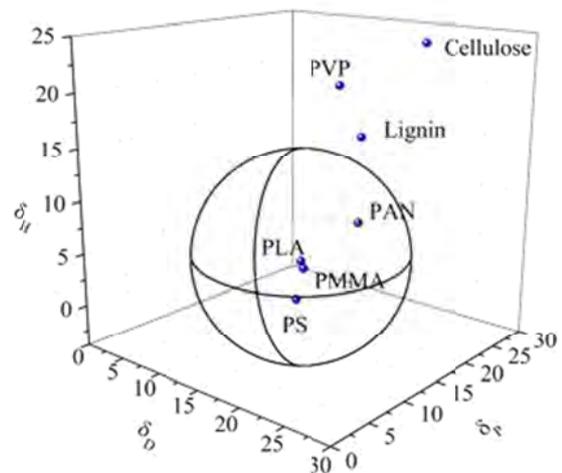
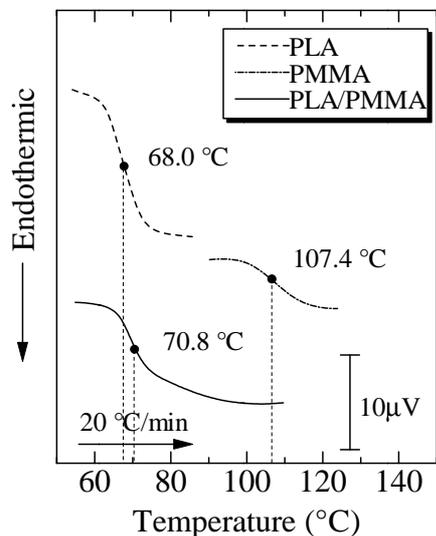


図 4-14 PLA のハンセン溶解球とポリスチレン (PS)、ポリメチルメタクリレート (PMMA)、ポリアクリロニトル (PAN)、ポリビニルピロリドン (PVP)、セルロース、リグニンのハンセン溶解度パラメータ (HSP) 値の関係⁽⁶⁴⁾

も相応しいことが示唆される。この理論的検討によって引き出された結果の妥当性を PLA-PMMA ブレンドの熱物性および力学特性、内部構造の分析により検証した。図 4-15 に DTA により測定されたブレンド(1:1)のガラス転移温度を示す。



学術的な立場から相溶性を議論するには、500nm よりも小さな大きさでの組成の均一性を考慮する必要があるが、その場合に有力な研究指針となるのが高分子のセグメントという概念である。このセグメントが重心をずらさずに回転により熱運動を起こす状態をゴム状態、これが凍結されている状態をガラス状態と呼び、一般にガラス状態からゴム状態へ遷移する温度をガラス転移温度 T_g と呼ぶ。 T_g はセグメントが存在する相内の粘度や摩擦因子に影響されるため、この温度を測定することで数 nm~10nm の大きさの組成の均一性、すなわち相溶性の評価が可能となる⁽⁷⁵⁾。

図 4-15 PLA-PMMA ブレンド(1:1)材のガラス転移温度

図において、PLA/PMMA ブレンドのガラス転移は、PLA および PMMA 単体の中間程度の温度範囲で現れている。また、その曲線を微分することで勾配の変化を調べたところ、勾配の変化を表すピークが一つのみであった。これは熱力学的に相溶なブレンドに認められる特徴であることから、PLA-PMMA は相溶性が良いことが示唆される。

次に引張試験により得られた力学特性を図 4-16⁽⁶⁴⁾に示す。

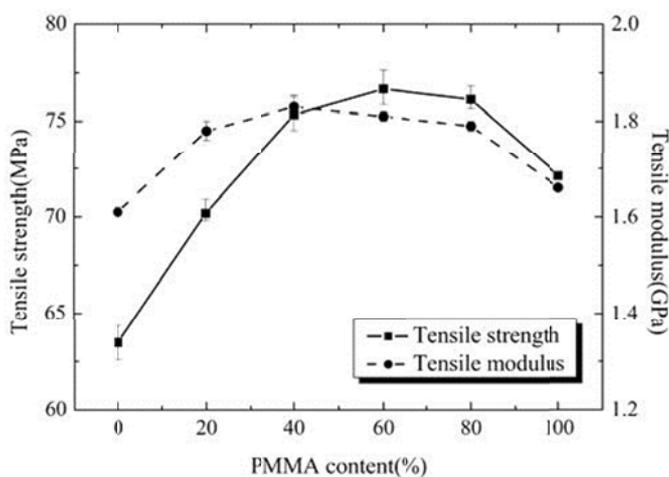


図 4-16 PLA-PMMA ブレンドの力学特性 (サンプル数 : 5) ⁽⁶⁴⁾

図より、PLA-PMMA ブレンドはブレンド比 4:6 で母材よりも高い強度を示すことがわかる。また、その破断面 SEM 観察の結果、両材料の界面はほとんど見られなかった (図 4-17⁽⁶⁴⁾)。

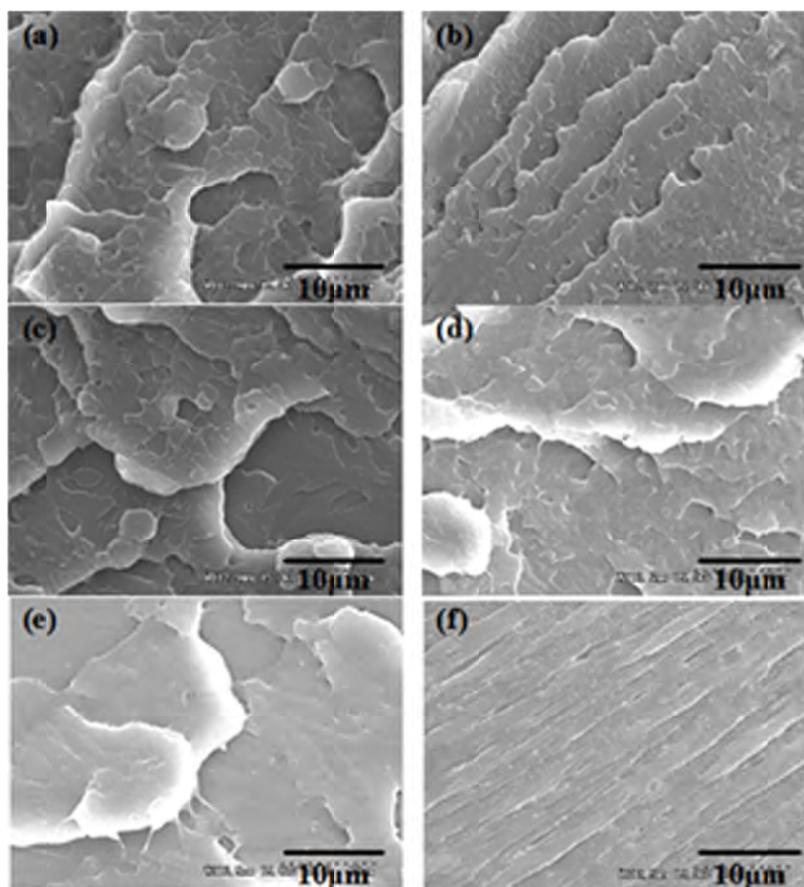


図 4-17 PMMA/PLA 複合材料の引張破断面写真: (a)100/0、 (b)80/20、
(c)60/40、 (d)40/60、 (e)20/80、 (f)0/100⁽⁶⁴⁾

理論的にはブレンドの強度が母材よりも高くなることは考えられないが、その高い相溶性からブレンド時に PMMA 鎖の切断が局所的に生じ、PLA 中で PMMA がナノから分子レベルで分散することで、想定以上の強度を示したものと推定される。PMMA がナノレベルで分散していれば、それが結晶核剤として機能し、PLA の結晶化速度を高めている可能性がある。結晶化度については本研究では分析していないが、TG により熱分解挙動を測定した結果、分子量の低い PMMA が存在している可能性が示された。以上の結果より、PMMA は PLA と相溶性が良く、アドミセル乳化重合により被覆する高分子に最適であることが検証された。

4.3.2 PMMA 被覆した稲わら粉末の性状

図 4-18⁽⁶⁴⁾にアドミセル乳化重合 (MMA 添加量 0.1%(v/v)) により PMMA 被覆された稲わら表面の SEM 写真を示す。

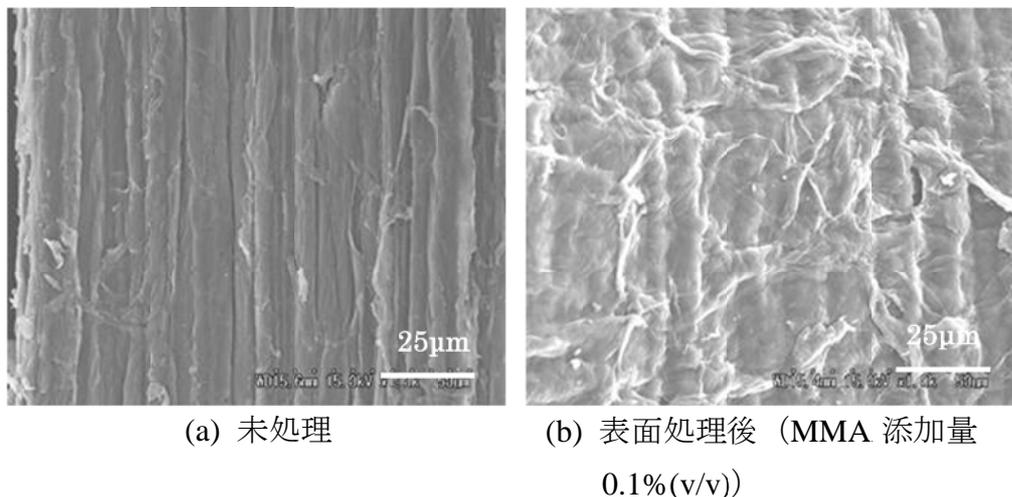


図 4-18 PMMA 被覆による稲わら表面の変化⁽⁶⁴⁾

図からわかるようにアドミセル乳化重合後の稲わら表面を PMMA と思われる高分子膜が明確に被覆している。したがって、この表面処理の効果が認められる。図 4-19⁽⁶⁴⁾に顕微 FT-IR により測定した赤外吸収スペクトルを示す。

図の(a)は未処理の稲わら、(b)は表面処理後、(c)は PMMA を示している。表面処理後の稲わらには、PMMA の特徴を示す赤外吸収ピークが現れている。したがって、MMA モノマーを用いたアドミセル乳化重合により稲わら表面に被覆した高分子膜が PMMA であることが示された。したがって、この処理により稲わらと PLA との相溶性を改善できることが示唆される。

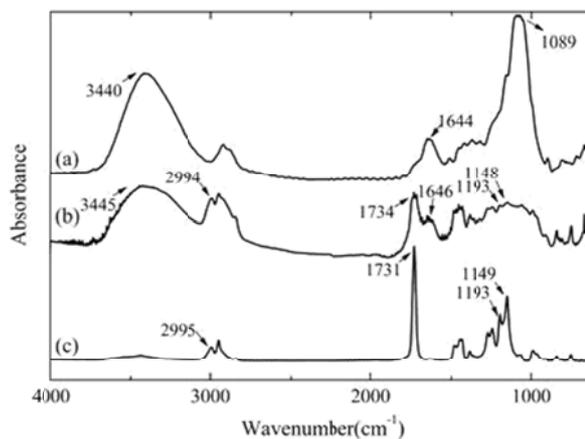


図 4-19 PMMA 被覆した稲わらの FT-IR スペクトル⁽⁶⁴⁾

4.3.3 力学特性および内部構造

図 4-20 にアドミセル乳化重合により表面処理した 30wt% 稲わら/PLA 複合材料の引張特性を示す。図より、MMA 添加量 0.02%(v/v) で 60MPa 以上の強度を示しており、前述の未処理

の複合材料の強度（約 40MPa）よりも大幅に改善されている。したがってアドミセル乳化重合により稲わら - PLA の相溶性が向上したと思われる。また、MMA の量が 0.02% 以上ではほとんど変化がないことから少量の添加で大きな効果が得られるといえる。さらに、前節のシランカップリング剤による表面処理では得られなかった延性の回復が破断ひずみの向上から認められる。図 4-21(a)に破断面の SEM 写真を、(b)に稲わら-PLA 界面構造 TEM 写真を示す。図の(a)破断面写真からわかるように、稲わらと PLA は密着しており 4.1 節に示した未処理の複合材料で認められたようなはく離の形跡はない。また図の(b)TEM 写真においても、PLA と稲わらの界面が密着している様子が認められる。すなわちこの界面接着性の向上により力学特性が改善されたものと推定される。以上より、稲わら/PLA 複合材料における PMMA 被覆により相溶性の改善を図ることができた。

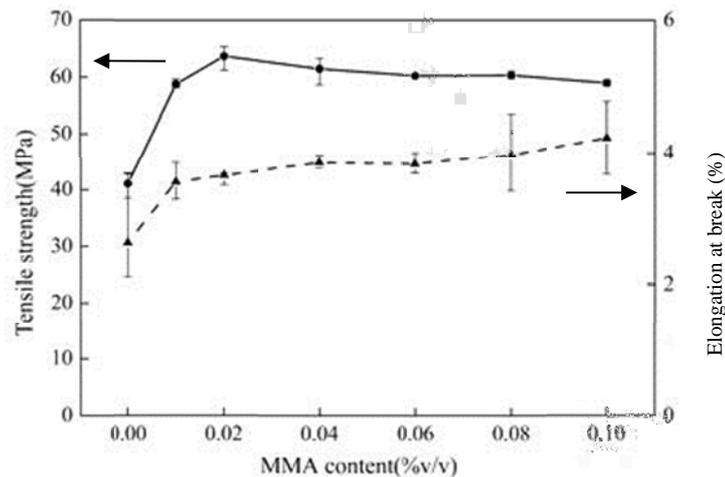
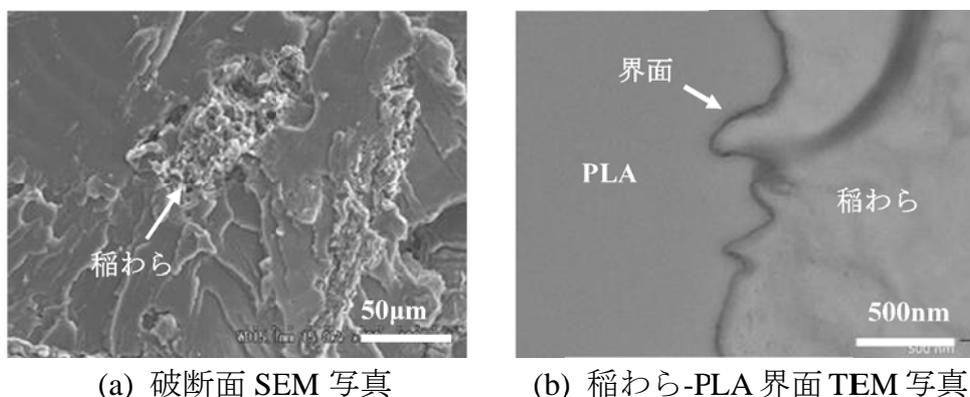


図4-20 アドミセル乳化重合により PMMA 被覆処理した 30wt%稲わら/PLA 複合材料の引張特性（サンプル数：5）⁽⁶⁴⁾



(a) 破断面 SEM 写真

(b) 稲わら-PLA 界面 TEM 写真

図 4-21 アドミセル乳化重合により表面処理した 30wt% 稲わら/PLA 複合材料の微細構造

4.4 無水酢酸によるアセチル化表面処理の効果

4.4.1 稲わら粉末の性状

(1) 熱特性

図 4-22 にアセチル化表面処理前後の稲わら粉末の TG 曲線の変化を示す。TG 曲線において、80°C 付近から重量減少が生じているが、これは水分の蒸発が生じたためと考えられる。図において、未処理の稲わらは、粒度に関わらず 220°C 付近で熱分解を開始し、重量が急激に減少している。これに対して、表面処理後の稲わらは、どの粒度でも熱分解の開始温度が 270°C 付近まで上昇している。図 4-23 に 5% 分解温度の変化を示す。5% 分解温度は明らかに向上している。分解温度は、粒度 300~1000 μm の表面処理で最も高い値を示しているが、その未処理からの上昇量は、20~106 μm で最も大きい。この熱分解温度の向上は、表面処理により形成された稲わら表面のエステル結合の量に依存すると思われる。そのように想定すると、粒度 20~106 μm で最も多くのエステル結合が形成されている可能性がある。

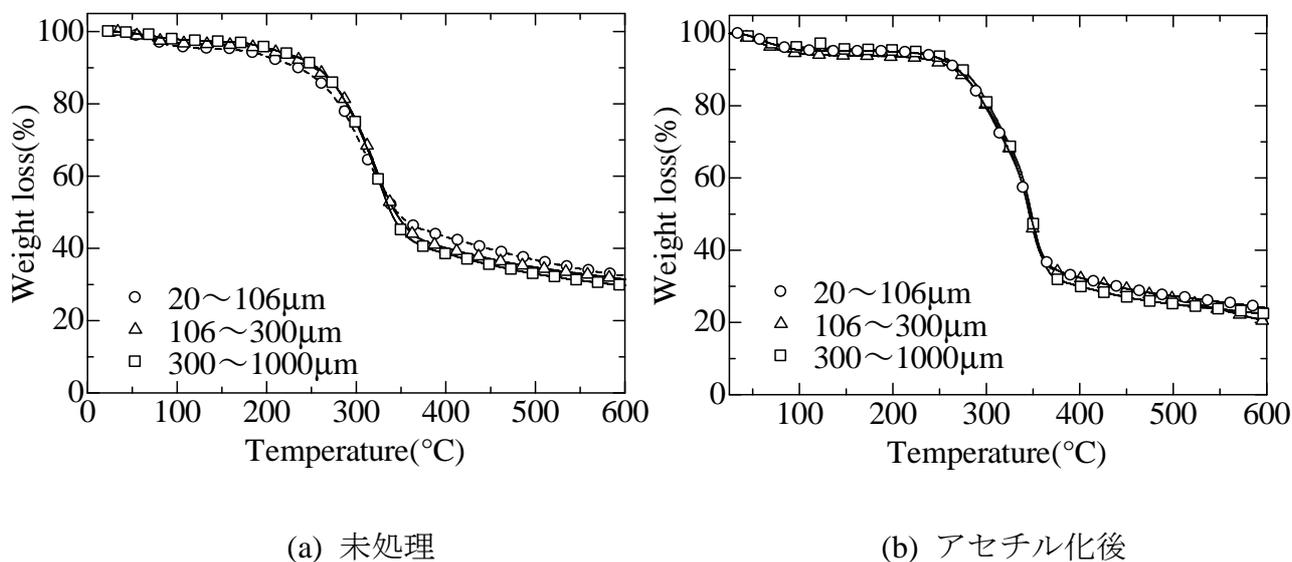


図 4-22 表面処理前後の稲わら粉末の TG 曲線の変化

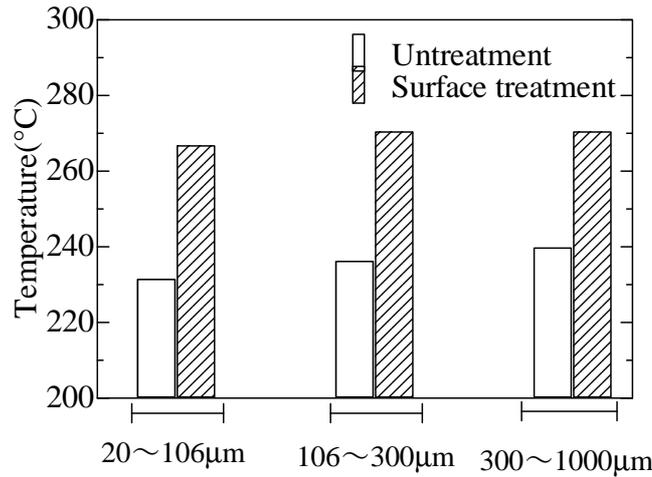


図 4-23 稲わら粉末の 5%分解温度

図 4-24 に粒度 106~300 μm の稲わらの 5%分解温度に及ぼす無水酢酸溶液のモル濃度の影響を示す。図において、無水酢酸溶液のモル濃度を高くすると、分解温度が低下していることがわかる。これは、恐らくモル濃度の増大に伴う pH の低下（強酸化）によるものと思われる。一般に、溶液の酸性度が強いと、稲わらの主成分であるセルロースは加水分解される。すなわちアセチル化が進行する一方で、主成分の部分分解のような構造破壊が起きた可能性がある。実際、無水酢酸処理後の稲わら粉末は、酸の影響により粉末が割れた形跡が見られた。特に、無水酢酸処理 1M の場合には pH が 1.0 近くまで低化するため、非常に強い酸性を有している。このためモル濃度の増大により熱分解温度は低下したことが示唆される。

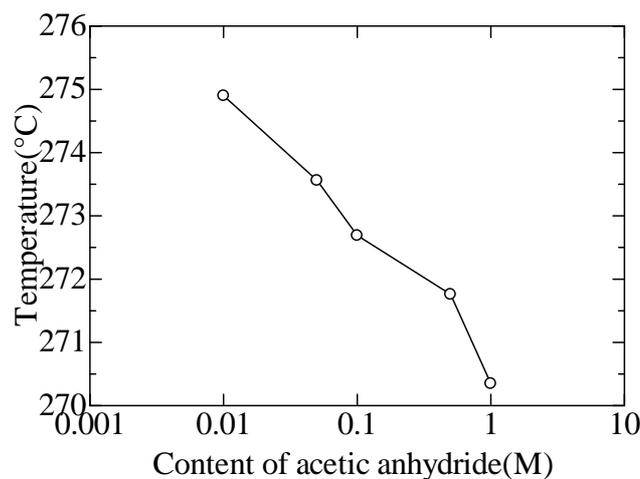


図 4-24 モル濃度による稲わら（粒度 106~300 μm ）の 5%分解温度の変化

(2) 表面構造

図 4-25 に SEM により観察した未処理の稲わらの表面構造を、図 4-26 にアセチル化表面処理（無水酢酸のモル濃度：1M）した示す。未処理、表面処理に関わらず、どの稲わら粉末も、カッターミルの特徴である粒子の先端部が刃物で切断されたような形状を多く観察することができる。

未処理の稲わらは、20～106 μm で一部に小さなき裂を見ることができたが、全体的に見て表面が滑らかであり、外皮が大きく破壊されているものも少ない。

これに対して、表面処理後の稲わらには、処理前とは明らかな違いを認めることができる。粒度 20～106 μm では、稲わらの表面に小さな粒が形成されている様子がわかる。これは、恐らくアセチル化表面処理により形成されたエステル結合部位であると推測される。また、その粒の大きさは、稲わら粒度の小さい 20～106 μm で約 3 μm であるのに対し、稲わら粒度 106～300 μm では約 1.5 μm であった。したがって、粒度の小さいものほど表面処理の効果が大きく現れることが示唆される。これは、比表面積との相関関係を示唆するものと考えられ、ここまでで論じた内容と一致している。

しかしながら、粒度 300～1000 μm では、表面処理後においても粒をはっきりとは観察することができない。その一方で、他の粒度に比べて外皮がほとんどないことを明確に観察できる。これまで、粒度 300～1000 μm では比表面積が最も小さいためにアセチル化の効果が小さく、さらに高濃度（1M）無水酢酸溶液のもつ強い酸により稲わらの主成分が分解している可能性を述べてきた。表面構造におけるこれらの現象は、これまでの我々の主張を強く示唆するものといえる。

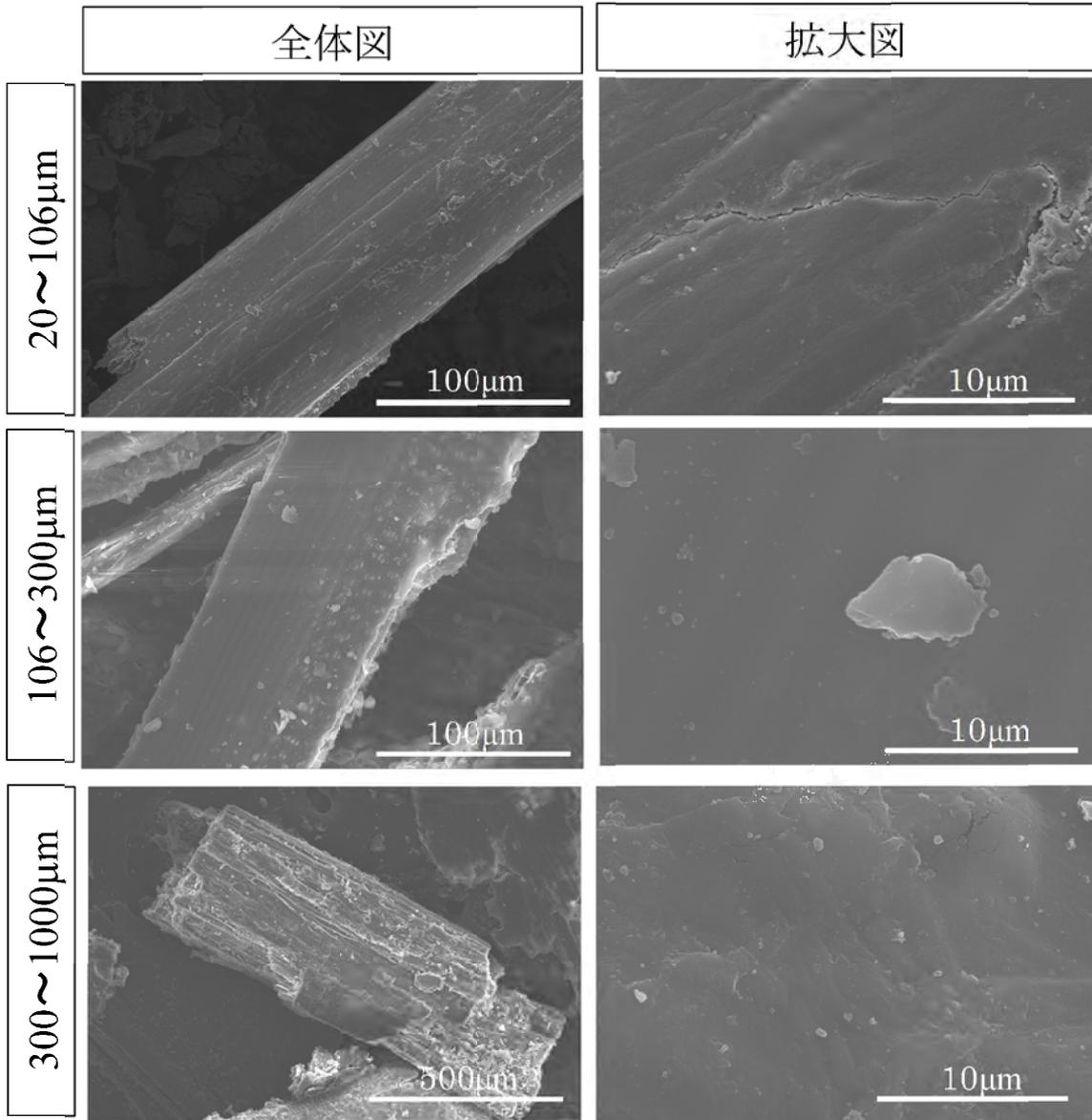


図 4-25 未処理の稲わら粉末の表面構造 (SEM 写真)

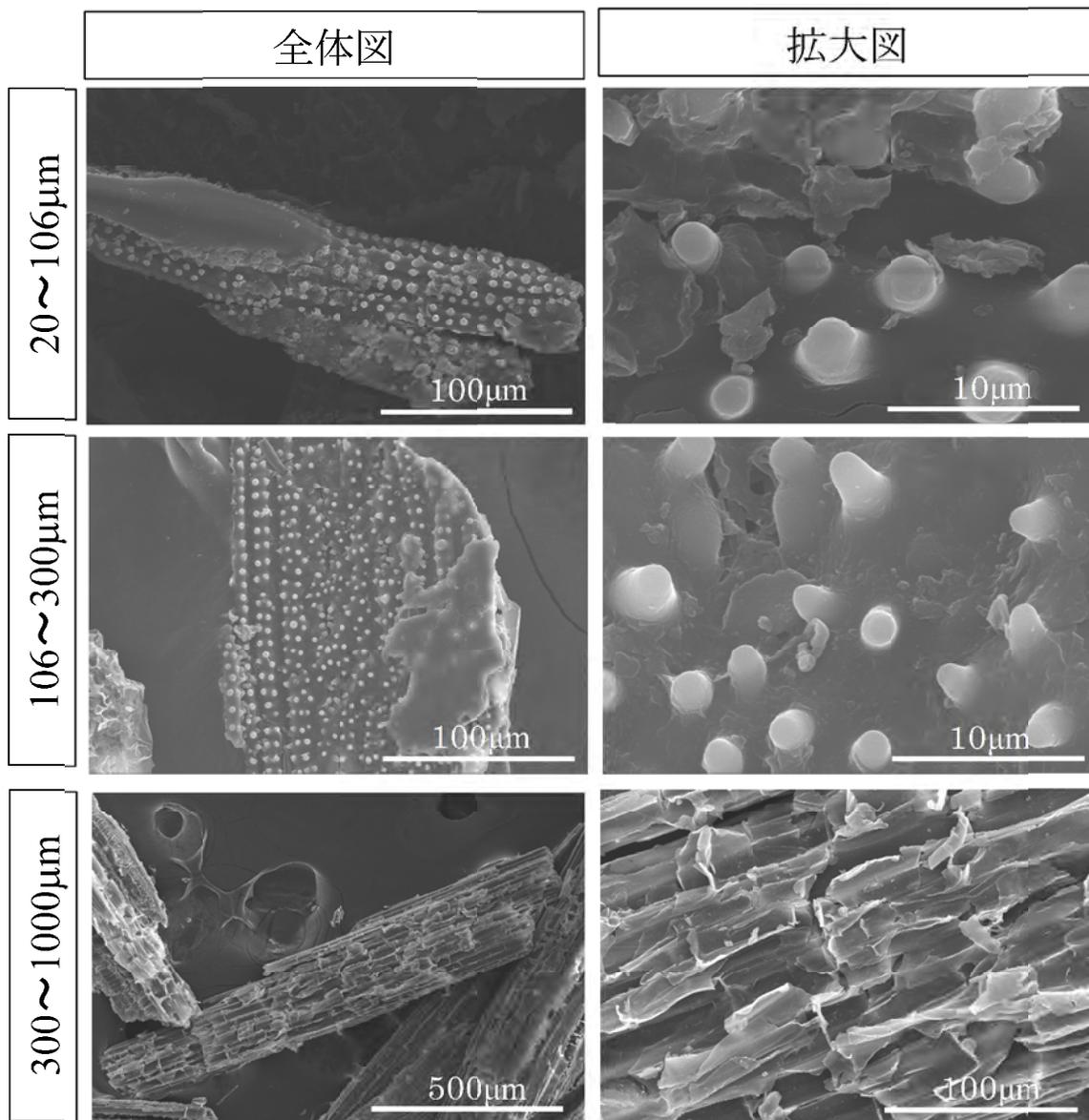


図 4-26 アセチル化表面処理後（無水酢酸のモル濃度：1M）の稲わら粉末の表面構造（SEM 写真）

図 4-27 にモル濃度 0.001M、0.01M、0.1M、1M の無水酢酸溶液により表面処理した粒度 106~300 μm の稲わら粉末の表面構造を示す。

図からわかるように、最も低いモル濃度 0.001M で処理した稲わら表面においても、1M 処理に見られるような粒の存在が認められる。しかしながら、0.001M に比べて 0.1M と 1M では稲わら粉末に厚みが無くなっており、ほとんど外皮のみの状態であったことがわかる。これらは、ここまでの議論と同様に、アセチル化によるエステル結合生成と、無水酢酸の強酸性による主成分の部分分解との協同効果を指し示すものと思われる。

前者のエステル結合生成は、モル濃度 0.1M でも観察することができる。0.1M では表面に 0.001M よりも多量の粒が形成されており、粒同士が重なってそれらの層を形成している様子も認められる。したがって、アセチル化による効果はモル濃度が高いほど大きくなると考えられる。しかしながら、強酸性による分解が明らかに 0.001M よりも大きく現れており、粒が形成された外皮が剥がれ、内部が露出している様子が認められる。言い換えると、エステル結合が形成されているのは剥がれて残留している外皮の碎片のみであり、稲わら粉末の本体には影響がない。むしろ、内部が露出することで分解が進行しているようである。モル濃度 1M では、存在しているのはほとんど外皮であり、内部がほとんど分解してしまっている様子がわかる。

このエステル結合形成と主成分の（加水）分解との協同効果におけるモル濃度に伴う大小関係は、両者ともに稲わら表面のヒドロキシ基（OH）との反応が主であることから、恐らくは複雑を極める。その反応単独で見た場合、どちらも濃度が高くなることで活性が大きくなると考えられるが、両者の反応が複合的になると、その大小はある閾値をもって逆転すると思われる。実際、モル濃度 0.001M ではエステル結合の粒が見られるのに対し、0.01M では明確に観察することができず、分解が進行している様子のみが認められ、外皮の碎片もほとんど見当たらない。つまり、0.01M 以上ではアセチル化よりも加水分解反応が大きくなることが示唆される。しかしながら、それよりもモル濃度が高い 0.1、1M では、本体から剥がれてはいるが粒が形成された外皮を再び観察できるようになる。本質的にアセチル化は稲わらの疎水化であるため、粒が形成された部位では加水分解の進行を妨げられる。すなわち、0.1、1M では加水分解が大きく進む一方で外皮がアセチル化される速度が速かったため、それのみが残留するものと推測される。

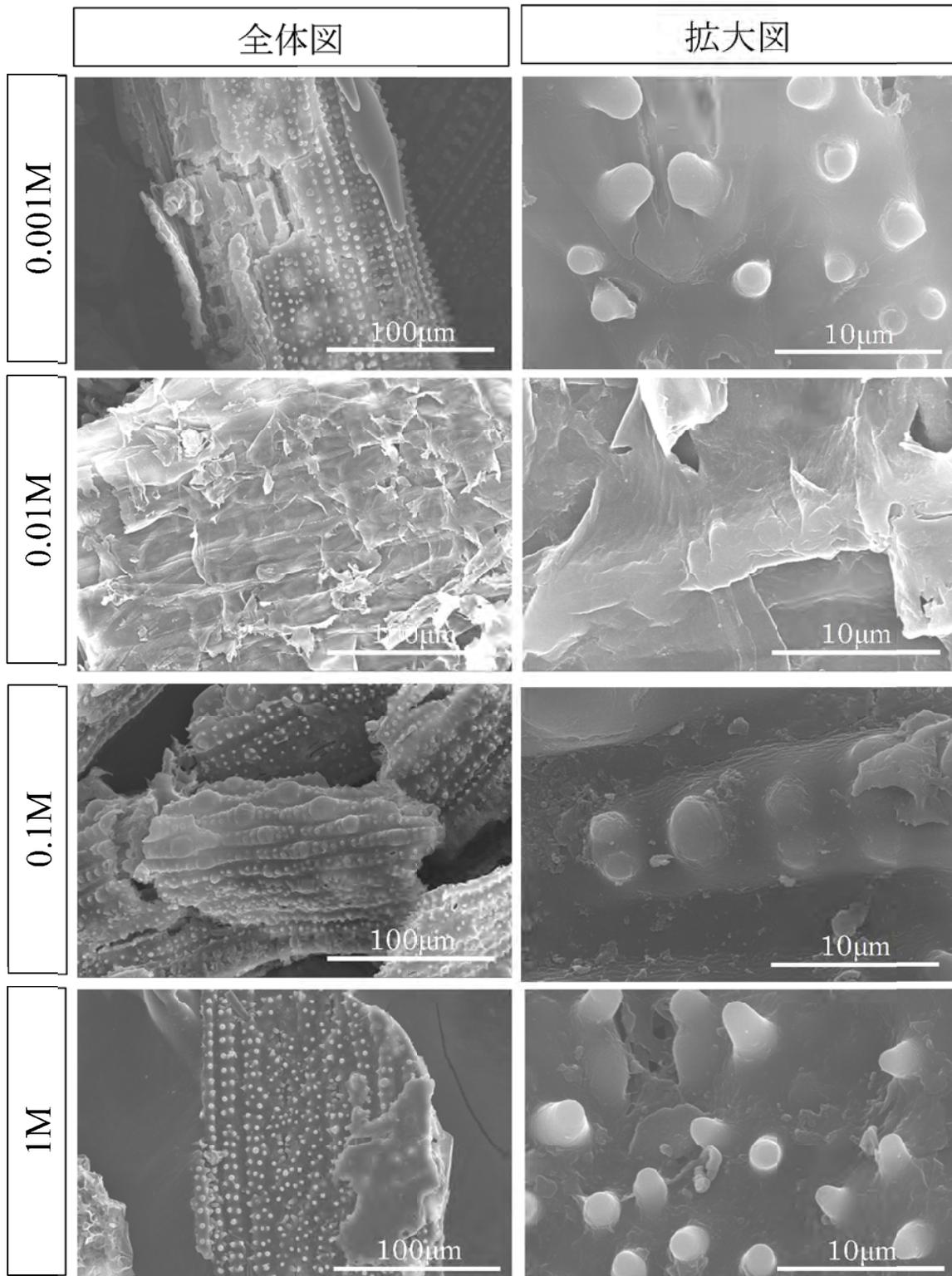


図 4-27 表面処理後の稲わら粉末表面構造に及ぼす無水酢酸のモル濃度の影響 (SEM 写真)

4.4.2 アセチル化表面処理複合材料の特性

(1) 熱特性

図 4-28 にアセチル化表面処理複合材料の 5% 重量減少温度を示す。5% 重量減少温度は、稲わら粒度や添加量に関わらず表面処理により上昇しており、特に添加量 30wt% で約 32.5°C 上昇している。これは表面処理により稲わらの分解温度が増加したためと考えられる。この温度上昇は、20~106 μm で 32.5°C、106~300 μm で 29.2°C、300~1000 μm で 27.9°C と、エステル結合が多数形成されていると思われる粒度 20~106 μm で大きい。これは粒度が小さいほど表面処理の効果が大きくなるためと思われる。

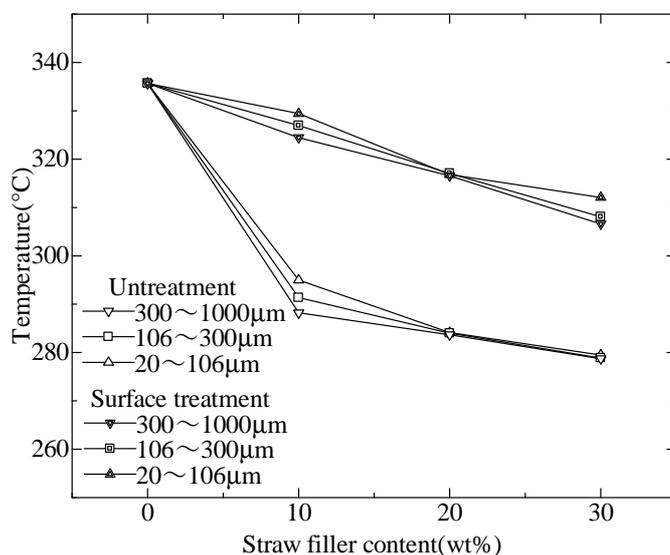


図 4-28 稲わら/PLA 複合材料の 5% 重量減少温度(無水酢酸のモル濃度 1M)

(2) 力学特性

図 4-29 にアセチル化表面処理前後の稲わら/PLA 複合材料の引張強度を示す。ここで図の(a)は未処理の場合、(b)はアセチル化表面処理後(1M)、(c)は表面処理前後で比をとることでその効果を示したものである。

表面処理により引張強度は向上しており、図の(c)からわかるように粒度 20~106 μm の添加量 30wt% で最も大きな効果が示されている。この向上は、稲わらのアセチル化により複合材料内部での分散性や稲わら-PLA 界面の接着性が改善されたことを示唆する。粒度 300~1000 μm で強度向上が小さいのは、比表面積が小さくエステル結合の形成が少ないためと考えられる。複合材料の引張強度に及ぼすモル濃度の影響を図 4-30 に示す。0.001M で強度が

最も高く、約 62MPa と PLA 単体とほぼ同程度までになっている。これは、図の(b)のようにほとんど加水分解せずにアセチル化できたためと考えられる。また強度はモル濃度 0.01M までいったん低下した後、0.1M まで上昇し、再び低下している。粉末を SEM 観察したところ、0.01M では粒を明確に観察することができず、分解が進行している様子のみが認められ、外皮の碎片もほとんど見当たらなかった。つまり、0.01M 以上ではアセチル化よりも加水分解反応が大きいといえる。それよりもモル濃度が高い 0.1M では、本体から剥がれてはいるが粒が形成された外皮を再び観察できるようになった。すなわち、この強度の変動は、アセチル化と加水分解との協同効果における大小関係の変化に依存することが示唆される。

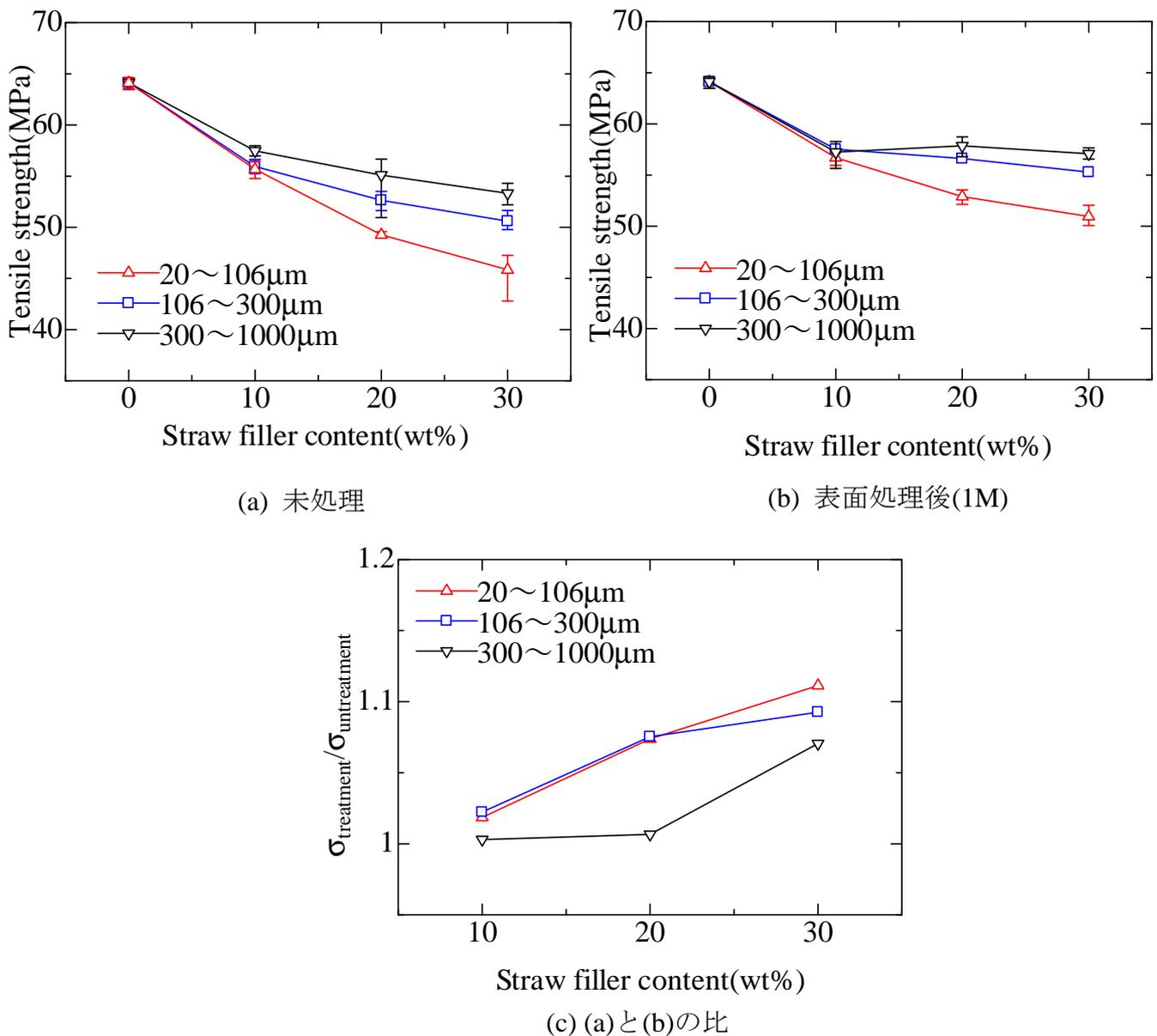


図 4-29 アセチル化表面処理による引張強度の変化 (サンプル数 : 5)

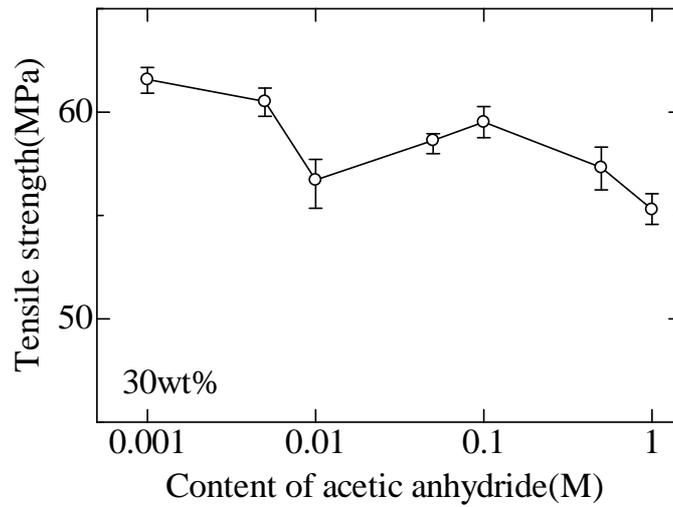


図 4-30 アセチル化表面処理における無水酢酸濃度の引張強度への影響 (サンプル数 : 5)

4.5 糖化残渣/生分解性樹脂複合材料の特性

4.5.1 糖化残渣の無水酢酸によるアセチル化表面処理の効果

図 4-31 に TG により測定した無水酢酸で表面処理した糖化残渣の熱安定性分析結果を示す。

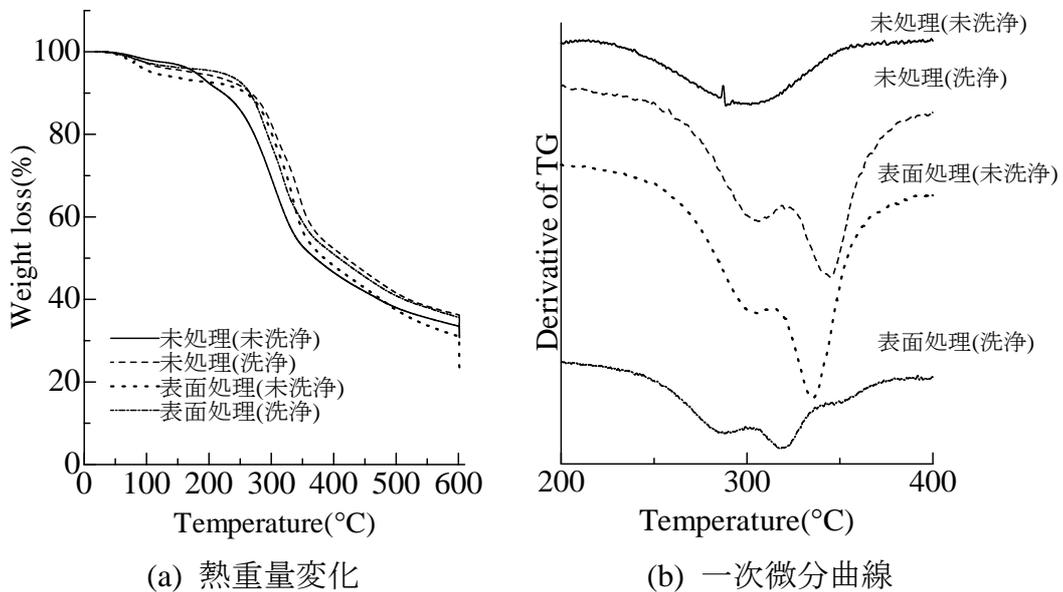


図 4-31 糖化残渣の熱分析結果

図の(b)の一次微分曲線は、勾配の変化をピークで示している。図の(b)より、未処理 (未洗浄) の稲わら残渣では 300°C 付近でブロードなピークが見られる。これは、リグニンの α

およびβ-アリアルアルキルエーテルの熱分解に由来すると思われる。それらのピークは未処理（洗浄）でも見られるが、一方で320°C付近にもピークが現れている。これはリグニンのC-C結合の分解であると思われる。未処理（未洗浄）の残渣では恐らく混合物が多いためにそのピークがブロードになり、明確に見られなかったものと思われる。表面処理（未洗浄）もこれとほぼ同様の傾向であったのに対し、表面処理（洗浄）では350°C付近にもピークが現れている。これは、アセチル化により形成されたエステル結合内のC-C結合に起因していると思われる。したがって、表面処理（洗浄）では化学修飾の効果が認められる。一方で、表面処理（未洗浄）でこのピークが見られないことから、アセチル化の効果が洗浄したものよりも低い可能性が示唆される。これは、酵素糖化のバッファーとして用いた酢酸が、残渣表面に残留していたことで無水酢酸と優先的に反応し、稲わらと無水酢酸との反応を阻害したためと推定される。これらの糖化残渣の赤外吸収スペクトルを図4-32に示す。

図より、どの残渣でも3400cm⁻¹付近に-OHの伸縮運動に起因するピーク、2850cm⁻¹付近には-CH₂-の伸縮運動に起因するピーク、1175cm⁻¹付近にはC-O-Cの非対称伸縮振動、890cm⁻¹付近でピラノース環C1の立体配座が認められる。しかし、表面処理を行った残渣でのみ、1750cm⁻¹付近にC=Oの伸縮振動に起因するピークが確認できる。またそれは、洗浄、未洗浄によらず現れている。これは、エステル結合内のC=Oに由来すると考えられる。これは前述の残留酢酸でも現れるが、未処理（未洗浄）のもので現れなかったことから、表面処理（未洗浄）でもエステル結合内のものに起因している可能性が高い。

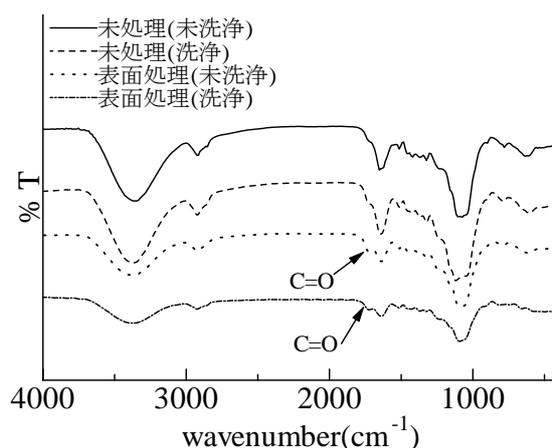


図4-32 残渣のFT-IRスペクトル

4.5.2 糖化残渣/PLA 複合材料の力学特性と内部構造

図4-33に無水酢酸によりアセチル化表面処理した糖化残渣（ER）/PLA 複合材料の引張強度を示す。図中の(w)は洗浄、EROORは表面処理残渣を示している（以降も同様の表記とする）。

未処理（未洗浄）残渣の複合材料の引張強さには大きなばらつきが見られる。事前に残渣

の走査型電子顕微鏡観察を行ったところ、未処理（未洗浄）の残渣の大きさや形状は不均質であり、このため射出成形でも上手く混合せず、困難を極めた。したがってこのばらつきは、試料ごとの実際の残渣含有量に大きな差があるためと思われる。射出成形の困難さは、表面処理（未洗浄）でも認められる。その結果のばらつきが小さくなったのは化学修飾の効果による表面形状の改善によるものと考えられるが、強度が他に比べて低いのはこのためと思われる。これに対して、洗浄した場合のものはばらつきも少なく、強度も未処理（未洗浄）より高くなった。したがって残渣との複合化には洗浄が重要であるといえる。また、表面処理（洗浄）のもので最も高い値を示していることから、無水酢酸によるアセチル化表面処理の効果が認められた。

次に引張強さに及ぼす糖化残渣添加量の影響を図 4-34 に示す。残渣の添加は、PLA 単体の強度よりも低下している。これは、恐らく残渣-PLA 界面の接着性に起因するものと思われる。破断面を SEM により観察した結果（図 4-35）、未処理（洗浄）試料では界面に大きな空孔が認められたが、表面処理（洗浄）では密着性が向上していた。また、残渣添加率 20wt% は 10wt% よりも高い強度を示した。これは、残渣が増えたことにより内部の不均質さが減少したためと思われる。また、20wt% では 10wt% よりも表面処理後の強度向上が大きく現れている。したがって、残渣の量が多いほど表面処理の効果が強く現れることが示唆される。

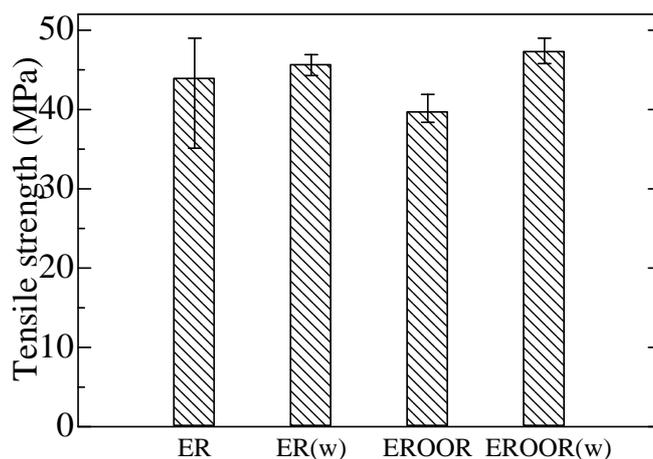


図 4-33 ER（未処理残渣）、ER(w）（洗浄後）、EROOR（洗浄せずにアセチル化表面処理した残渣）、EROOR(w）（洗浄後にアセチル化表面処理した残渣）を 10wt% 添加した PLA 複合材料の引張強度（サンプル数：5）

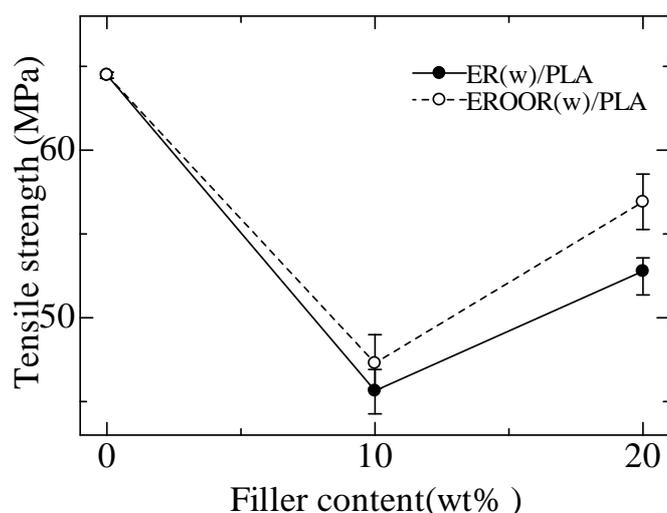


図 4-34 アセチル化表面処理した残渣/PLA 複合材料の引張強度に及ぼす残渣添加量の影響 (サンプル数 : 5)

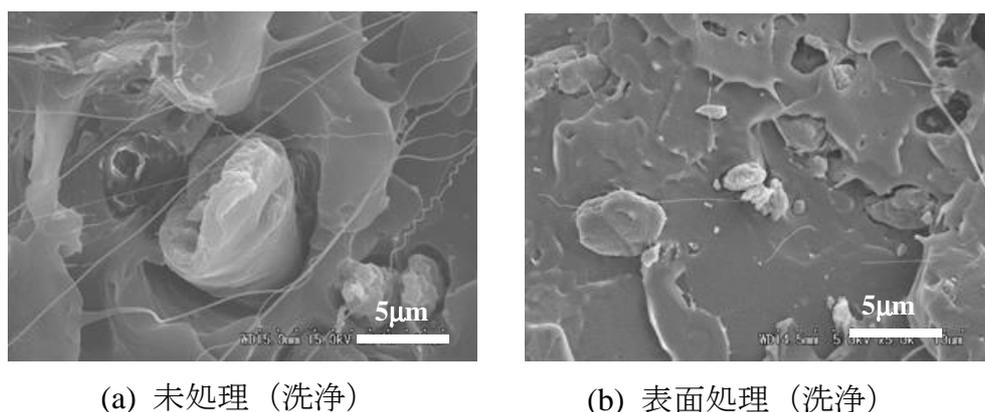


図 4-35 アセチル化表面処理した残渣/PLA 複合材料の破断面 SEM

4.6 実製品の試作結果

4.6.1 押出シート

(1) 外観

PLA 単体シートの表面は平滑で、気泡も見られない (図 4-36)。しかし、未処理の稲わら 30wt% のシートはボイド (空気層) が見られ、表面には凹凸がある。これは稲わらと PLA との界面接着性が良くないことに起因すると思われる。JIS K 6734 では外観の要求事項として、割れやボイドなどの欠陥があってはならないとあり、このシートは外観の要求事項を満たしていない。しかし、表面処理を行った 20~106 μm の稲わら/PLA シートの表面にはボイ

ドが見られず、滑らかである。表面処理により稲わら/PLA の界面の接着性が向上したためと考えられる。

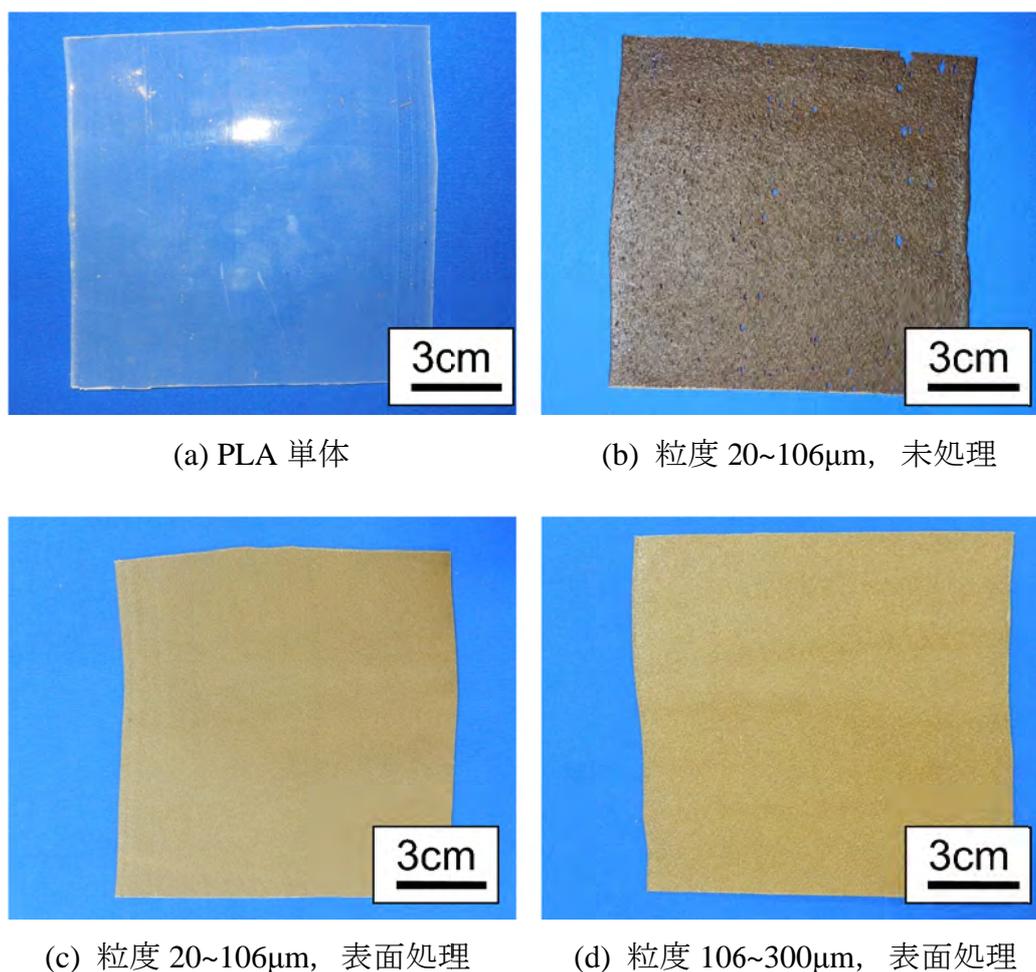


図 4-36 30wt%稲わら/PLA 複合材料から成形した押出シートの外観

(2) 押出シートの力学特性と内部構造

図 4-37 に稲わら/PLA シートの引張特性を示す。図の(a)、(b)の引張強度は、粒度や方向に関わらず稲わら添加量の増大とともに低下している。未処理の場合では、押出方向 (0°) より垂直方向 (90°) で強度が低い。これらは稲わらが押出方向に配向しているためと推察される。しかし、アスペクト比の高い粒度 106~300 μm で強度は低い。これは恐らく、厚さ 1mm の試料断面に対して稲わらの占有面積が大きすぎるためと思われる。表面処理を行うと、添加量 10wt% までは未処理とほとんど差がないが、20wt% 以上で強度が向上している。これは、表面処理により稲わら-PLA 界面の接着性が向上したためと考えられ、添加量が多いほどその効果が大きく現れるようになったと推測される。また、接着性の向上は、押出方

向より垂直方向で大きい。これは、稲わらが押出方向に配向されているため垂直方向の方が引張方向に対して接着面が大きく、表面処理による効果が現れやすくなるからである。また、粒度が大きい方が表面処理の効果が大きい。これは、表面処理により稲わらの分散性が改善され、試料厚さ方向の稲わらの占有面積が減少したことに起因しているものと推測される。

図の(c)、(d)は破断ひずみを示している。垂直方向より押出方向で破断ひずみが大きく、添加量増大とともに破断ひずみは低下しているが、表面処理により向上する傾向が認められる。これらは上記同様、稲わらの配向と界面接着性の改善によるものと推察される。

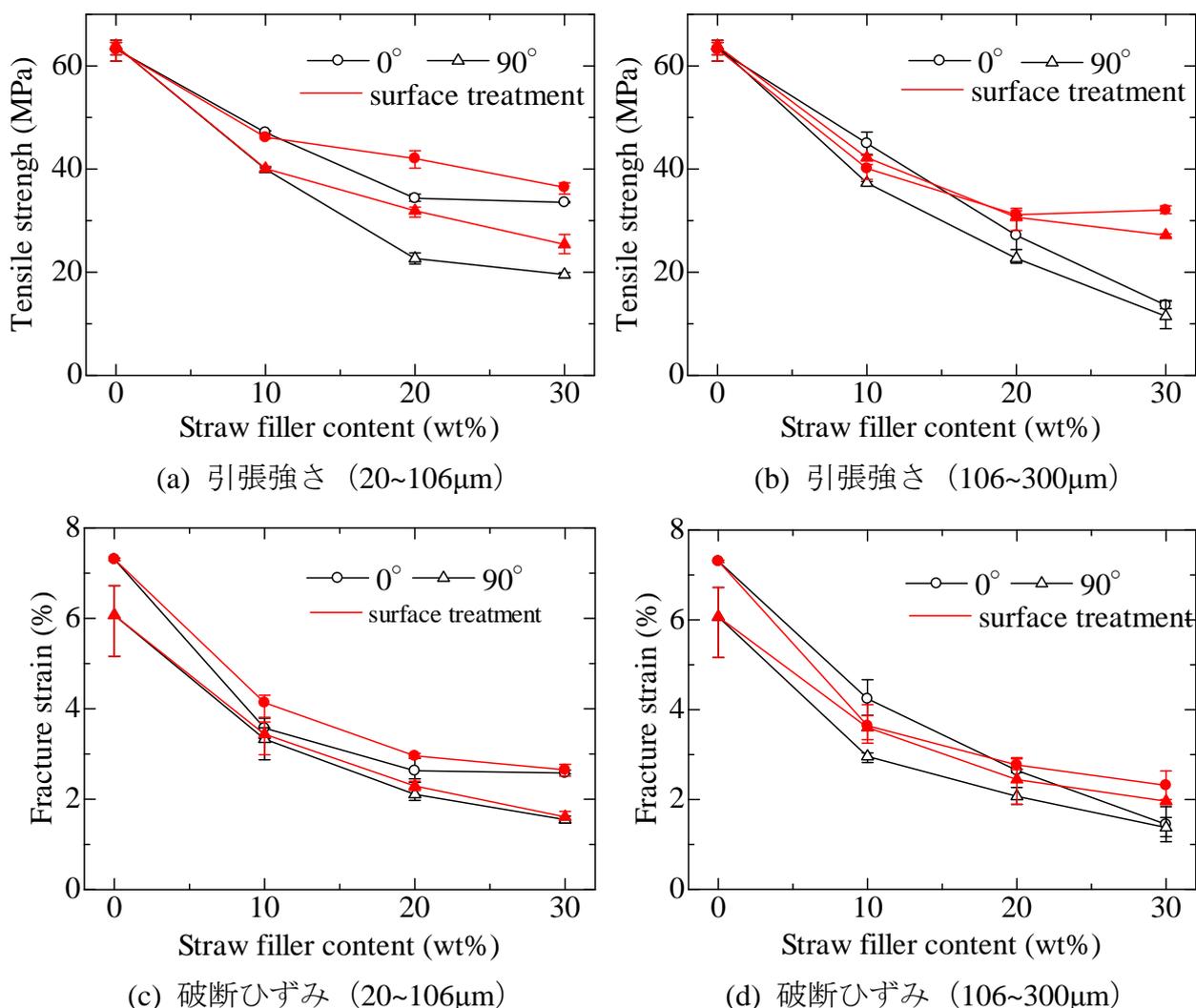
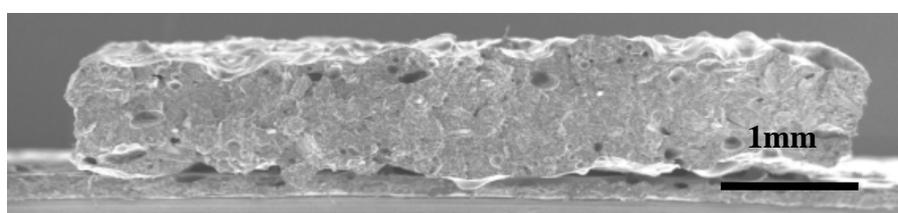


図 4-37 稲わら/PLA 押出シートの引張特性 (サンプル数 : 5)

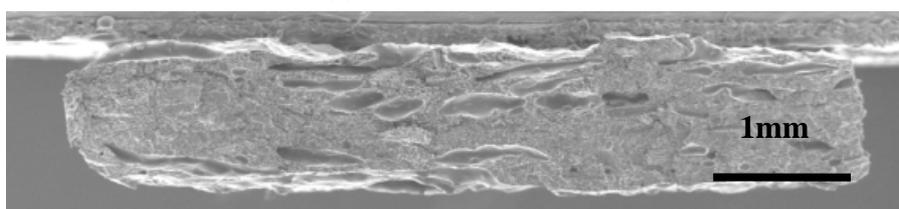
図 4-38 に SEM 観察により得られた添加量 30wt% (粒度 20~106μm) の破断面写真を示す。未処理の場合、表面に凹凸が認められる一方で、表面処理を行うと平滑になっている。また、

未処理では稲わらが抜けた跡が見られる一方で、表面処理ではそれがほとんど見られないことから、稲わら-PLA 界面の接着性が改善されたことがわかる。また、稲わらが押出方向へ配向がしている様子を明確に観察することができることから、 0° と 90° での強度の差が配向に依存していることを確認できた。

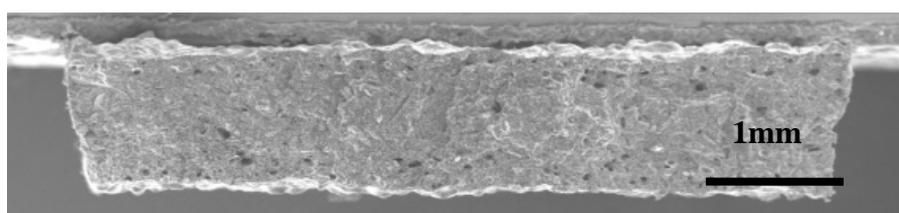
図 4-39 に稲わら-PLA 界面の拡大写真を示す。未処理では、稲わらと PLA との間に隙間が見られるが、表面処理を行った場合、隙間がなくなっている。また、表面処理の場合には稲わら-PLA 界面で延性破壊が生じたことを示唆する PLA の細かい糸が確認できる。以上より、稲わら-PLA 界面の接着性が表面処理により向上していることを確認することができた。



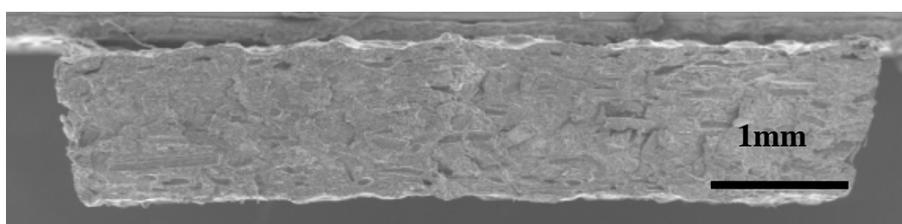
(a) 0° 方向, 未処理



(b) 90° 方向, 未処理

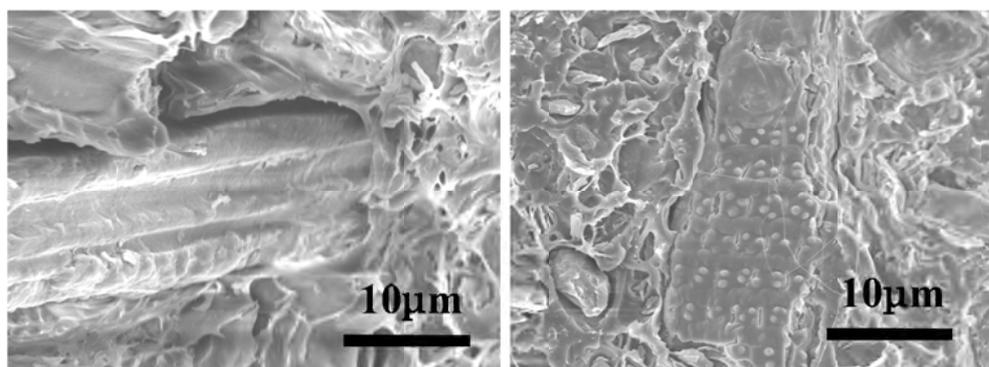


(c) 0° 方向, 表面処理



(d) 90° 方向, 表面処理

図 4-38 稲わら/PLA シートの破断面の SEM (粒度 20~106 μ m)



(a) 粒度 20~106 μm , 表面処理 (b) 粒度 106~300 μm , 表面処理

図 4-39 押出シートにおける稲わら-PLA 界面の拡大写真

(4) 一般シート材料の強度要求値との比較

複合材料シートの性能を一般シート材料に求められる性能と比較した。硬質シートとして、硬質ポリ塩化ビニル (PVC) シート (JIS K 6734)、軟質シートとして包装用無延伸ポリエチレンテレフタレート (PET) シートおよびフィルム (JIS Z 1716) の JIS 規格を参照し、その要求性能と比較した。

表 4-1 硬質ポリ塩化ビニル (PVC) シートの要求値 (JIS K 6734)

性能	要求値						
	グループ 1		グループ 2		グループ 3		グループ 4
	クラス 1	クラス 2	クラス 1	クラス 2	クラス 1	クラス 2	
引張強さ (MPa)	≥40	≥40	≥40	≥40	≥40	≥40	≥40
破断ひずみ (%)	≥20	≥20	≥20	≥20	≥20	≥20	≥20
引張衝撃強さ (kJ/m ²)	—	—	≥300	≥300	≥400	≥400	—
ビカット軟化温度(°C)	≥60	≥70	≥60	≥70	≥60	≥70	≥90

注) グループとクラスは引張衝撃強さとビカット軟化温度で分類される。

表 4-2 包装用無延伸ポリエチレンテレフタレート (PET) シート
およびフィルムの要求値 (JIS Z 1716)

性能	要求値	
引張強さ(MPa)	押出方向	≥45
	垂直方向	≥45

PVC シートの要求値は引張強さ 40MPa 以上、PET シートおよびフィルムの要求値は引張強さ 45MPa 以上である。本研究で作製した稲わら/PLA 複合材料シート (粒度 20~106 μ m) は表面処理により引張強度が向上し、添加量 20wt% で約 42MPa、30wt% でも 40MPa に近い値を示した。すなわち、PVC 硬質シートの強度要求値は満足できる。しかし、破断ひずみは PVC シートの要求値である 20% 以上に大きく及ばなかった。したがって、今後の延性改善に関する検討が待たれる。

4.6.2 圧延加工による材料特性の変化

圧延加工は、高分子材料の高次構造を変化させることにより、材料の内部構造や力学特性に大きな影響を与え、材料の二次加工 (深絞り、プレス成形など) 特性を向上させる可能性がある。本研究において押出成形で作製した稲わら/PLA 複合材料シートを容器・包装材などに製品化するためには、ホットプレス成形などの二次塑性加工が必要となる。したがって稲わら/PLA 複合材料の二次塑性加工 (圧延加工) による材質の改善が必要になると考えられるが、その基礎的知見として、まず、塑性加工による材料の内部構造の変化や塑性変形メカニズムなどを明らかにする必要がある。

しかし、PLA は比較的新しい材料であり、その塑性変形メカニズムに関わる微小領域の高次構造 (分子配向性、結晶化度など) の評価方法は、まだ確立されていない。そこで、同じ結晶性高分子材料であり、かつこれまで多くの研究がなされている PP を用いてその検討を行い、基本的な塑性変形特性を PLA およびその複合材料に適用することを考えた。

実験には厚さ 5mm の PP 押出成形板材を用い、その圧延加工領域における圧延特性、内部構造、分子配向性、結晶化度の変化について調べ、その結果から材料内部における塑性変形メカニズムを検討した。

図 4-40 には圧延途中の試料 (圧延率 70%) の圧延加工領域における全体写真を示す。本

研究で用いた PP 板は、押出成形により作製されたものであり、熔融樹脂が金型から押出される際に、成形品表面は金型と接しているため、わずかであるが押出方向への配向が生じることが観察された。結晶化度では、試料表面において内部よりも低くなっている。これは、製品成形時に成形品表面から冷却されるためであり、試料内部よりも表面において結晶化度が低くなることが確認された。また、引張特性においても各方向による降伏応力の差がほとんど見られない。したがって、この試料両表面に生じた配向はわずかであることから、試料はほぼ等方性であるといえる。

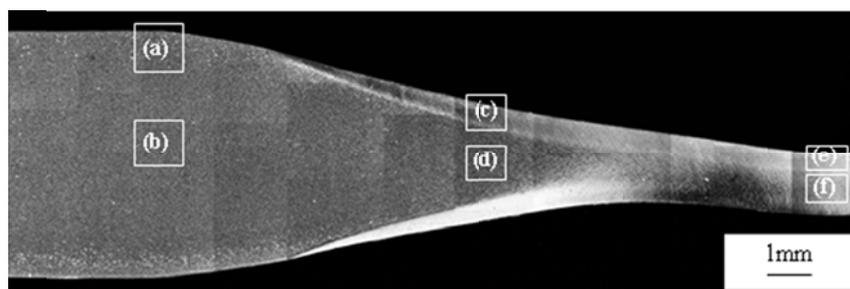


図 4-40 圧延途中の試料（圧延率 70%）の圧延加工領域における全体写真

試料の塑性変形挙動において、圧延加工領域における試料厚さの分布曲線は凸から凹に変化し、その途中に変曲点を有する形状になっており、圧延率と回復率における変化の傾向から三つの段階に分けられることが確認された。

試料断面方向における結晶の変形は、金属ロールと接触している試料の表面（図 4-40 の (a)、(c)、(e)）において内部より先に塑性変形が生じており、筋状の層が形成される。この表面層では結晶が壊れ、高い分子配向度を示す。また、ロール入口から出口に向かって試料の厚さが減少するとともに、塑性変形領域が試料の進行方向に向かって次第に大きくなり、試料の中心部（図の (b)、(d)、(f)）へ拡大する。その塑性変形された上下両表面層は次第に厚くなり、分子配向度も向上し、最終的にロール出口付近で合流することが観察された。さらに、分子配向度はその塑性変形域において遥かに高い値を有し、ロールの出口に向かって次第に向上することが認められた。

試料がある程度ロールに入ってから、その試料断面における最大分子配向度はロールと接触している試料の表面ではなく、表面から少し離れた位置で現れているため、試料の塑性変形もこの位置で最も大きいことが考えられる。圧延率が 70%になると、試料全断面に圧延の影響を与えるが、厚さ方向の変化においては中心部より表面付近の方がより強い塑性変形が

生じ、その分子配向性が強く現れることが判明した。なお、これらの分子配向性の分布と変化傾向は内部構造の変化とほぼ一致している。

以上より、内部構造、分子配向性、および結晶化度における変化の特徴はほぼ一致しており、圧延加工領域における塑性変形は試料中心部よりも表面で大きくなることが示された。

また、圧延温度が高いほど、圧延加工領域におけるスプリングバック量が大きくなるとともに、その最大となる位置はロール出口側へと移動しており、弾性変形域が拡大することが示された。また、分子配向性においても、温度が高いほど試料内部における分子配向性が低くなることが観察された。したがって、温度を高くすることにより、変形がしやすくなる一方でスプリングバックも大きく、分子配向性が緩和することが示された。結晶化度については、高温での圧延により元の値より高くなっており、圧延加工中に再結晶化が生じることが示された。

その他にも、内部構造の調査および力学的異方性の評価を行った。以下に得られた主な知見を示す。

- 1) 圧延加工による試料の変形は、ロールの回転による一軸延伸であるため、幅方向の変形は少なく、長さ方向の変形が主である。特に、変形に占める塑性変形の割合が大きくなる圧延率 30%以上では、長さ方向の変化が幅方向の変化に比べ著しく大きくなることが確認された。
- 2) 試料がロールを通過した直後にスプリングバックが生じたことが確認された。また、圧延温度が高くなると、弾性変形の占める割合が高くなり、スプリングバックが大きくなることが判明した。
- 3) 試料の厚さと圧延ロール間の距離の比で表される圧下率が低い場合、スプリングバックにより変形が戻るため、結晶の変化がほとんど観察されない。しかしながら、圧下率が高くなるにつれて、結晶が圧延方向へと引延ばされ、最終的に結晶構造が観察されないほど変形が生じる。このとき、結晶化度が低下しており、結晶が破壊されていることが認められた。圧延温度を変えた場合、圧延温度が高いほど結晶化度の低下が抑えられており、特に、熱間圧延においては一部で再結晶化が生じていることが確認された。
- 4) 圧延後の試料は、圧延方向に分子配向が生じており、分子鎖方向である圧延方向の引張強さが最も向上する。しかしながら、圧延温度を高くすると、加工後の回復により試料内部の分子配向性が低下するため圧延方向の引張強さが低下することが示された。

以上に示した押出成形結晶性高分子材料の塑性変形特性は PLA だけでなく、ほかの熱可塑性結晶性高分子材料にも適用できると考えられる。したがって、これらの基本特性は、目的製品のプレス塑性加工のような二次成形の際に、成形条件の設定、圧延加工の利用などに十分に活用する価値がある。

4.6.3 スマートフォン梱包用ケース

最後に、作製したシートから実製品の試作を行った。本研究では、スマートフォンの梱包ケースを試作することとした。まず、梱包ケースの形状および寸法を測定し、プレス成形用の金型を自作した。次に、この金型を利用してホットプレス成形機により稲わら/PLA 複合材料製の梱包ケースを試作した。図4-41にPLA 単体、図4-42に粒度 20~106 μm の稲わら/PLA 複合材料、図4-43に粒度 106~300 μm の稲わら/PLA 複合材料で作製した試作品の外観を示す。



図 4-41 PLA 単体で試作したスマートフォン梱包ケース外観

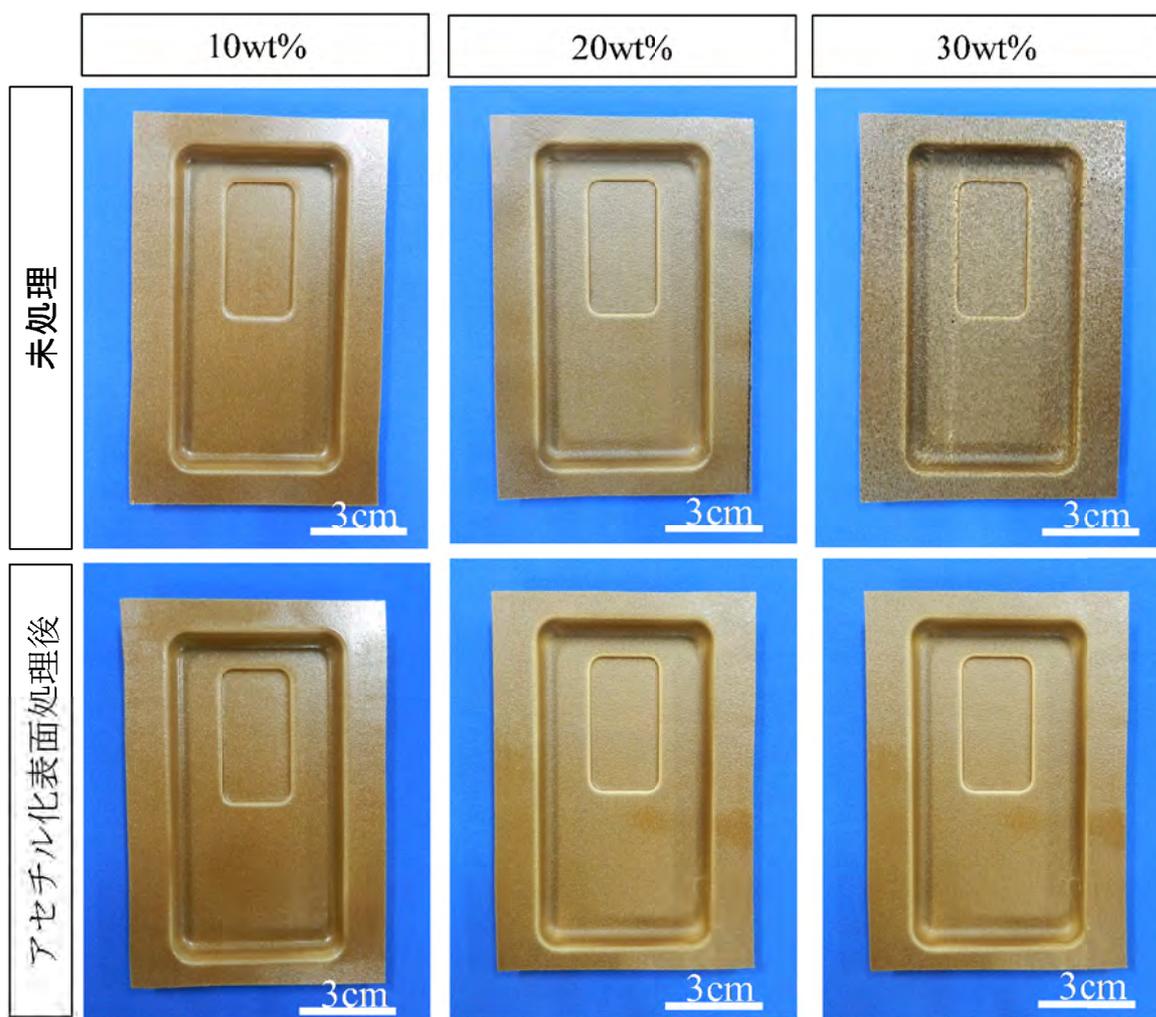


図 4-42 粒度 20~106 μ m の稲わら/PLA 複合材料で試作したスマートフォン梱包ケース外観

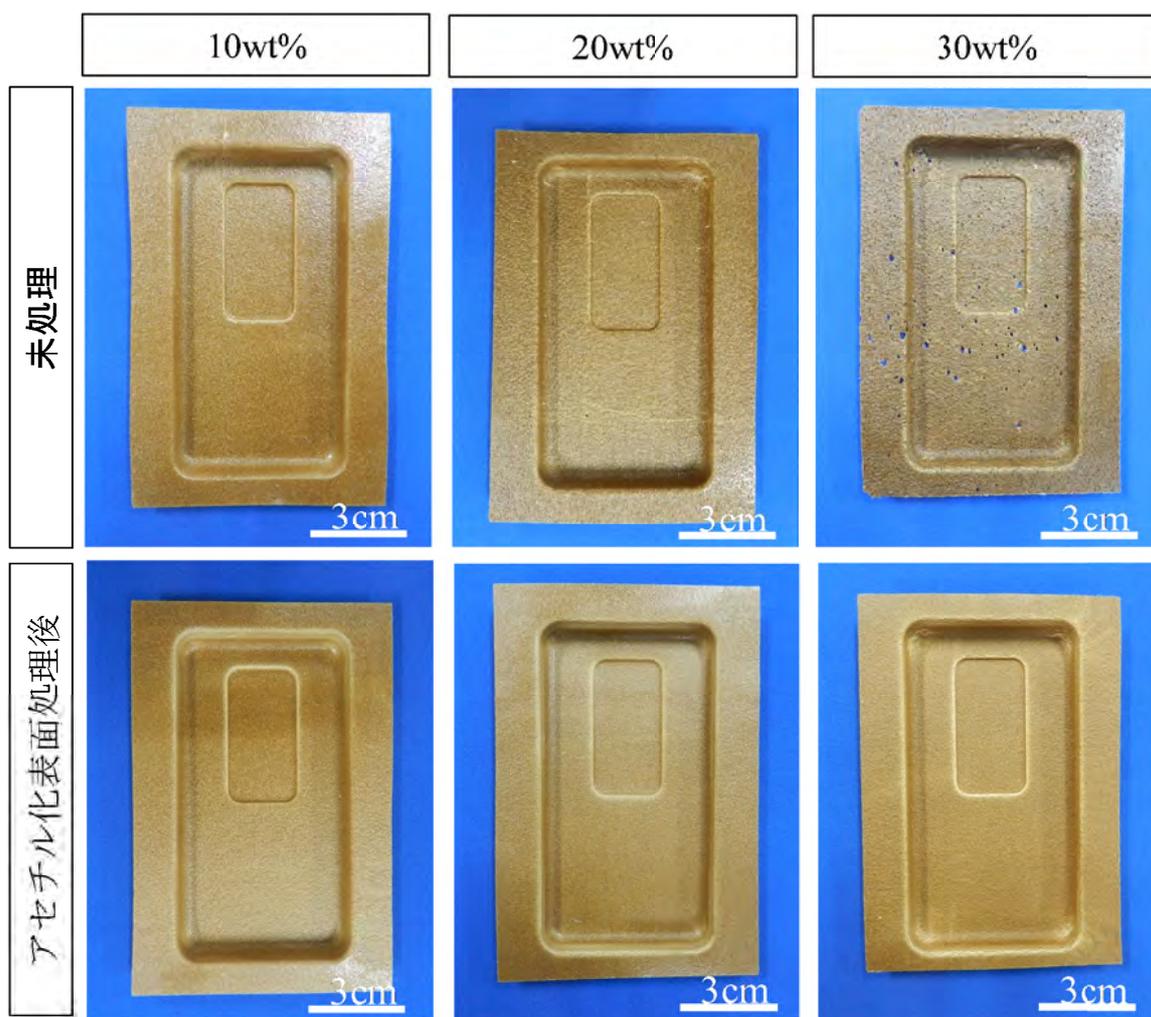


図 4-43 粒度 106~300 μ m の稲わら/PLA 複合材料で試作したスマートフォン梱包ケース外観

各々の図からわかるように、複合材料シートでも割れや傷などを発生させることなくきれいに成形することができた。しかし、稲わらの添加量が多くなると成形はできているが、白化している部分が大きくなった。これは予備加熱が十分でなく、さらに温度を上げて成形する必要がある。作製した稲わら/PLA 複合材料は、カーボンニュートラルの特性をもつため、二酸化炭素排出量を抑制することができる。

以上より、本研究で作製した複合材料は製品として応用できる可能性を十分にもつといえる。しかし、多くの筐体に求められる耐衝撃性や耐熱性、防水性や防塵性の評価は行っていないため、今後の検討が待たれる。

5. 結論

本研究は、再生可能な草本系バイオマスからバイオエタノールをより高効率・低コストで製造する技術およびリグニンなどの残渣および草本系バイオマス/生分解性複合材料を作製する技術を確立し、大規模工業化生産への実用化を推進することを全体目標として、回収・再利用できる磁性ナノ球状カプセル酵素と酵母、およびバイオマス（リグニンなどの残渣も含む）-生分解性樹脂を相溶化させる表面処理技術の開発・確立することを目的として行った。以下に得られた結論を示す。

(1). タンデムリングミル[®]粉砕の有効性

タンデムリングミル[®]は、振動ミルをベースに開発した装置であり、粉砕媒体が粉砕容器内壁に沿って転動することで遠心力を作用させた微粉砕を行うものである。これは、アンバランスウェイトの回転を上下でカウンターさせることで水平方向の加振力を発生させて駆動するため、従来の粉砕機に比べてエネルギーを削減することができる。秋田県立大学では処理量 1000kg/h のタンデムリングミル[®]型大容量粉砕機を試作した。これより得られた微粉末は、時間の経過と共に粒径とセルロース結晶化指数が低下した。タンデムリングミル[®]により、30min 微粉砕することで粒径および結晶化指数がほぼ一定となることがわかった。また、その微粉末はカッターミル粉砕により作製した 20~106 μm のものよりもホロセルロース糖化率が極めて高くなった。

(2). バイオマスの糖化およびエタノール発酵条件

稲わらの市販酵素剤による糖化性は、酵素量 3%、温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 、pH4.0~5.0 の範囲で高いことが示された。また、市販酵母剤による発酵性については、温度 32 $^{\circ}\text{C}$ で最も高く、高糖化率だった pH3.5~4.5 の範囲では発酵性が低下することが明らかとなった。原料による違いを検討した結果、グルコース収率については麦わらで最も高くなったが、エタノール収率は稲わらで最大となり、変換効率 0.42 と他よりも優れた結果を示した。

本研究では3種類の方法により固定化酵素を作製した。キトサン担体結合法で作製した固定化酵素の酵素結合率と相対活性を分析した結果、相対活性 5.23IU/mg の活性をもつ酵素を 112.3mg/g（結合率 72.4%）固定化できたことがわかった。さらにその最適な反応条件を検討した結果、pH5.0、温度 50 $^{\circ}\text{C}$ と酵素単体と同じとなった。しかし、50 $^{\circ}\text{C}$ 以上では酵素単体よりも高い活性を維持でき、長時間の使用にも比較的耐えうるということがわかった。その再利用性

について検討した結果、活性は2回目以降で30%近く低下することが示されたが、通常行われる24hの糖化ではグルコース濃度は2回目以降でも初回の80%以上の値を示した。したがって、作製した酵素は工業的には高い再利用性をもつことが明らかとなった。しかし、これらの結果は基質がCMCの場合であり、稲わらで行った場合、稲わらの高い吸着能が原因で酵素が脱落してしまい、非常に低い回収率を示した。

(3). 表面処理により作製したバイオマス/生分解性樹脂複合材料の力学特性

まず、稲わらをアドミセル乳化重合により表面処理し、PLAと相溶性の良い高分子膜を被覆した。被覆した高分子膜の材料には、ハンセン溶解度パラメータによる理論的検討とブレンド試料の材料物性および内部構造分析による実験的検討からPMMAのモノマーであるMMAを選択した。アドミセル乳化重合処理を行った稲わらの表面には高分子の膜が形成されていることがSEM観察により認められた。アドミセル乳化重合によりPMMA被覆表面処理した30wt%稲わら/PLA複合材料の引張強度は、MMA添加量がわずか0.02%(v/v)で60MPa以上となり、未処理の複合材料(約40MPa)よりも大幅に向上した。その破断面および界面構造を分析した結果、稲わら-PLAの高い密着性を観察できたことから、それらの相溶性の改善を明確に認めることができた。

次に、無水酢酸によるアセチル化表面処理について検討した。無水酢酸による表面処理では、稲わら表面にエステル結合の形成を示唆する粒が形成される一方で、無水酢酸のモル濃度が高いと稲わらの主成分が加水分解してしまうことがわかった。このモル濃度と強度の関係を検討した結果、0.001Mと最も薄い濃度で30wt%稲わら/PLA複合材料は最大引張強度(約62MPa)を示し、PLA単体と同等までに回復した。

さらに、リグニンなどの残渣についても無水酢酸を用いて表面処理した。残渣の洗浄および無水酢酸による表面処理の併用により、複合材料の引張強度が向上した。また、その強度の向上は残渣添加量が多いもので高く現れた。さらに、残渣/PLA複合材料の破断面を表面処理前後で比較した結果、表面処理により残渣-PLAの密着性が改善されていることを明確に観察できた。したがって、表面処理による効果を認めることができた。

最後に、実製品の試作として容器・包装材などの成形に用いられるシートを押出成形により作製し、その力学特性などを調べた。結果において、比較的PLAと性質の近い硬質ポリ塩化ビニルシートのJIS基準の要求値と比較したところ、十分な強度を得ていた。さらに、製品試作のための二次加工の前段階として、複合材料の力学特性改善の手段とした圧延加工

を行う前段階として、その塑性変形について検討し、基礎的知見を得た。結果として、圧延加工による塑性変形は試料内部よりも表面で大きく発生することが示唆された。以上の知見をもとに二次加工としてホットプレス成形を行うことでスマートフォン梱包用ケースを試作した。その外観は表面処理を行ったもので割れやキズなどはみられないものとなった。

以上までにおいて、本研究では低コストのバイオエタノール製造および環境に優しい新規生分解性複合材料の民生製品（例えば容器・包装材など）への実用化を目指したが、上記のようにいくつかの課題が発生した。今後はその検討を行っていき、実用化を図る。以下はその解決のためのアイデアである。

解決策：

亜臨界水加水分解と磁性粒子吸着酵素による糖化技術の開発

前述のように磁性ナノ粒子に固定化された酵素を微粉碎された稲わら粉末に添加して糖化反応を行うと、ゼータ電位の違いなどにより、酵素が稲わら粉末に吸着され、磁性ナノ粒子から脱落してしまい、磁力による繰り返し回収が困難であることがわかった。この問題を解決するために、磁性ナノ粒子に酵素の固定化と吸着による酵素の回収方法および前処理として亜臨界水によるヘミセルロースの加水分解の方法を提案し、低粉碎コスト、低酵素添加量、酵素の回収・再利用可能な高効率の糖化効果が得られる糖化技術の開発を進めている。これにより得られた糖は発酵処理によりバイオエタノールにすることができる。

6. 参考文献

- (1) “バイオマス活用推進計画”、農林水産省、(2010)。
- (2) N. Sarkar, S. K. Ghosh, S. Bannerjee, K. Aikat, “Bioethanol production from agricultural wastes : An overview”, *Renewable Energy*, 37, pp.19-27 (2012).
- (3) T. N. Ang, G. C. Ngoh, A. S. M. Chua, “Comparative study of various pretreatment reagents on rice husk and structural changes assessment of the optimized pretreated rice husk”, *Bioresource Technology*, doi: 10.1016/j.biortech.2012.09.045 (2012).
- (4) “使おう！広げよう！バイオマス！”、社団法人 日本有機資源協会、(2010)。
- (5) “農林水産統計 平成 25 年度産水陸稲の収穫量”、農林水産省大臣官房統計部、(2013)。
- (6) “収集・運搬実証事業実績報告書”、ソフトセルロース利活用技術確立事業、秋田県ソフトセルロース利活用プロジェクト、(2013)。
- (7) “バイオリファイナリーの研究開発動向”、(株) 東レリサーチセンター、第 1 章 バイオマスとバイオリファイナリー、(2011)、pp. 1-25。
- (8) “粉砕技術とエコリサイクル”、遠藤貴士編、明誠企画株式会社(2010)、第 3 章 1.木質からのバイオエタノール製造における粉砕技術、pp. 119-129。
- (9) “バイオリファイナリーの研究開発動向”、(株) 東レリサーチセンター、第 4 章 リグノセルロース系バイオマスの糖化促進法、(2011)、p. 110。
- (10) EM Rubin, “Genomics of cellulosic biomass”, *Nature*, 454(2008), pp. 841-845., doi:10.1038/nature07190
- (11) Megawatia, Wahyudi B. Sediawanb, H. Sulistyob, M. Hidayatb, *Bioresource Technology*, 102 (2011), pp. 2062-2067.
- (12) T. N. Ang, G. C. Ngoh, A. S. M. Chua and M. G. Lee, *Biotechnol Biofuels*, (2012), doi: 10.1186/1754-6834-5-67
- (13) Y. Li, J. Park, R. Shiroma and K. Tokuyasu, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, (2011), doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.01.018
- (14) “セルロースナノファイバーの樹脂への分散技術と応用事例”、杉山淳司編、第 1 章 第 1 節 セルロースの基本的な構造と天然分布、株式会社技術情報協会、(2012)、pp. 3-11。
- (15) 遠藤貴士、“バイオ燃料を木材からナノテクで生産する セルロースの構造特性を利用した酵素糖化前処理技術”、*Synthesiology*、2 (2009)、pp. 310-320。
- (16) H. Inoue, S. Yano, T. Endo, T. Sakai and S. Sawayama, “Combining hot-compressed water and

- ball milling pretreatments to improve the efficiency of the enzymatic hydrolysis of eucalyptus” , *Biotechnology for Biofuels*, (2008), pp. 1-9.
- (17)熊谷聡・山田則行・坂本剛・林信行、“種々のリグノセルロース系バイオマスの水熱分解・糖化特性、および得られた水熱処理残渣の酵素糖化”、*Journal of the Japan Institute of Energy*、86 (2007)、pp. 712-717。
- (18)遠藤貴士・矢野伸一・井上宏之・澤山茂樹、“木質系バイオマスからのバイオエタノール製造技術の現状”、*Journal of the Japan Institute of Energy*、87 (2008)、pp. 430-437。
- (19)小林信介・牛越淳太郎・稲野稔・高岡一栄・板谷義紀、“微細木質バイオマスの性状と酵素糖化に関する研究”、*Journal of the Japan Institute of energy*、89 (2010) 、pp. 975-981。
- (20)小林信介・牛越淳太郎・竹内広将・稲野稔、高岡一栄・板谷義紀、“粉碎原料の粒度と含水率が木質バイオマスに与える影響”、*化学工学*、38 (2012) 、pp. 345-350。
- (21)A. Hiden, H. Inoue, K. Tsukahara, S. Fujimoto, T. Minowa, S. Inoue, T. Endo, S. Sawayama, “Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw” , *Bioresource Technology* , 100 (2009), pp. 2706-2711.
- (22)真壁英一・丹野浩一・二階堂満・戸谷一英・浅田格・佐藤友章・猪股尚治、“エネルギー集中型高速高純度反応粉碎機、コンバージミル”、*Journal of the Japan Society of Powder and Powder Metallurgy*、55 (2008) 、pp. 67-69。
- (23)竹田匠・二階堂満・戸谷一英・小原実広・中野友貴・内宮博文、“コンバージミル(エネルギー集中型媒体ミル)によるイナワラ等の糖化効率の評価”、*Journal of Applied Glycoscience*、56 (2009)、pp. 71-76。
- (24)福村卓也・長田光正・戸谷一英・二階堂満、“木質原料の酵素糖化特性に及ぼすコンバージミル粉碎の影響”、*Journal of the Japan Institute of Energy*、89 (2010)、pp. 968-974。
- (25)小林信介・佐藤豊幸・岡田信彦・小林潤・羽田野重信・板谷義紀・森滋勝、“振動ミルによる微粉碎木粉の性状評価”、*Journal of the Japan Institute of Energy*、86 (2007)、pp. 730-735。
- (26)小林信介・稲野稔・坂倉慶春・板谷義紀、“木質バイオマス粉碎における振動ミルのスケールアップ効果”、*化学工学*、37 (2011)、pp. 468-472。
- (27)V. Arantes, J. N Saddler, “Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis” , *Biotechnology for Biofuels*, (2010)
- (28) “バイオマス分解酵素研究の最前線 セルラーゼ・ヘミセルラーゼを中心として”、森

- 川康編、第1編 第1章 糸状菌・担子菌の酵素、(2012)、pp. 10-19。
- (29) 森川康、“セルロース系バイオマスの酵素糖化の現状と将来”、第9回酵素応用シンポジウム特別講演資料、<https://www.amano-enzyme.co.jp/jp/company/kyuu.html>
- (30) T. Yamanobe, Y. Mitsuishi and Y. Takasaki, “Isolation of a Cellolytic Enzyme Producing Microorganism, Culture Conditions and Some Properties of the Enzymes” , *Agricultural and Biological Chemistry*, 51 (1) (1987), pp. 65-74.
- (31) T. Fujii, X. Fang, H. Inoue, K. Murakami and S. Sawayama, “Enzymatic hydrolyzing performance of *Acremonium celluliticus* and *Trichoderma reesei* against three lignocellulosic materials” , *Biotechnology for Biofuels*, (2009), pp. 1-8.
- (32) “バイオマス分解酵素研究の最前線 セルラーゼ・ヘミセルラーゼを中心として”、小林良則編、第7編 第23章 バイオマス酵素糖化反応の解析、(2012)、pp. 233-241。
- (33) 矢野伸一・喜多尾千秋・井上宏之・澤山茂樹・芋生憲司・横山伸也、“バイオマスからの次世代型エタノール製造技術に有用な新規ヘミセルラーゼ生産菌 *Asperillus aculeatus* KIF 78 株”、*Journal of Environmental Biotechnology*、9 (2009)、pp. 81-87。
- (34) P. R. Oswald, R. A. Evans, W. Henderson, R. M. Daniel and C. J. Fee, *Enzyme and Microbial Technology* , 23 (1998), pp. 14-19.
- (35) M. Namdeo, S. K. Bajpai, “Immobilization of α -amylase onto cellulose-coated magnetite (CCM) nanoparticles and preliminary starch degradation study” , *Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic* , 59 (2009), pp. 134-139.
- (36) 野中寛・H. Ariffin・船岡正光、“リグノフェノールを担体とする固定化セルラーゼの基礎的特性”、*高分子*、68 (2011)、pp. 315-319。
- (37) 宮田直紀・藤島礼佳、“酵素の固定化および固定化した酵素の再利用特性”、*塗料の研究*、152 (2010)、pp. 17-21。
- (38) J. Jordan, Challa S. S. R. Kumar, C. Teegala, “Preparation and Characterization of cellulose-bound magnetite nanoparticles” , *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* , 68 (2011), pp. 139-146.
- (39) K. Khoshnevisan, A. Bordbar, D. Zare, D. Davoodi, M. Noruzi, M. Barkhi, M. Tabatabaei, *Chemical Engineering Journal*, 171 (2011), pp. 669-673.
- (40) S. Das, D. Berke-Schlessel, H. Ji, J. McDonough, Y. Wei, “Enzymatic hydrolysis of biomass with recyclable use of cellobiase enzyme immobilized in so -gel routed mesoporous silica” ,

Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic , 70 (2011), pp. 49-54.

- (41) 小林亜衣・野中寛・船岡正光、“針葉樹および広葉樹リグノクレゾール固定化セルラーゼの特性比較”、*Journal of the Japan Institute of Energy*、91 (2012)、pp. 992-997。
- (42) 喜多見淳一、“化学工業統計年報”、経済産業省大臣官房調査統計グループ編、(2012)。
- (43) “プラスチックリサイクルの基礎知識”、一般社団法人プラスチック循環利用協会編、(2013)
- (44) 喜多見淳一、“紙・印刷・プラスチック・ゴム製品統計年報”、経済産業省大臣官房調査統計グループ編、(2012)。
- (45) “プラスチック製品の生産・廃棄・再資源化・処理処分の状況”、一般社団法人プラスチック循環利用協会編、(2012)。
- (46) “グリーンプラ（生分解性プラスチック）入門”、日本バイオプラスチック協会ホームページ、<http://www.jbpaweb.net/gp/gp.htm>
- (47) “平成 23 年度 環境白書 循環型社会白書/生物多様性白書 地球との共生に向けた確かな知恵・規範・行動”、環境省編、第 1 部 第 4 章 持続可能な社会の実現に向けた日本の貢献、(2011)、pp. 134-136。
- (48) 大窪和也・高木均・合田公一、“実用化期の複合材料技術と課題 4.グリーンコンポジットとその研究の新展開”、*材料*、55-4 (2006)、pp. 438-444。
- (49) 位地正年、“電子機器用ケナフ繊維/ポリ乳酸複合材料の開発”、*成形加工*、19-4 (2007)、pp. 213-217。
- (50) 岡田賢治・山田正道、“ケナフ繊維を充填した PLA 複合材料の特性”、*繊維機械学会誌*、54-12 (2007)、pp. 433-470。
- (51) 高木均・田倉隆輝、“生分解性プラスチックー竹粉複合ボードの試作とその強度評価”、*材料*、52-4 (2003)、pp. 357-361。
- (52) 北川和男、“竹繊維エコ・コンポジット”、*成形加工*、19-4 (2007)、pp. 208-212。
- (53) 山下直也・大窪和也・藤井透、“マイクロフィブリル化セルロースの添加による竹繊維強化複合材料の曲げ強度、破壊じん性および衝撃強度の向上”、*Bamboo Journal*、22 (2005)、pp. 35-45。
- (54) 高橋宣也・大窪和也・藤井透、“マイクロフィブリル化した竹繊維を用いたグリーンコンポジットの開発”、*Bamboo Journal*、22 (2005)、pp. 81-92。
- (55) 柴田信一・曹勇・福本功、“バガス繊維と生分解性樹脂による複合材料の作製と強度の

検討”、日本機械学会論文集 (C 編)、704 (2005)、pp.288-293。

- (56) “平成 18 年度成果報告書 バイオマスエネルギー高効率転換技術開発/バイオマスエネルギー先導技術研究開発/バイオエタノール製造用機械的粉碎技術の研究開発”、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)、(2007)。
- (57) “平成 21 年度～平成 22 年度のうち平成 21 年度分中間年報 新エネルギー技術研究開発/新エネルギーベンチャー技術革新事業 (バイオマス) /バイオマス微粉末生成用省エネルギー型高衝撃粉碎機の技術開発”、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)、(2010)。
- (58) “平成 21 年度～平成 23 年度のうち平成 22 年度分中間年報 新エネルギー技術研究開発/新エネルギーベンチャー技術革新事業 (バイオマス) /バイオマス微粉末生成用省エネルギー型高衝撃粉碎機の技術開発”、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)、(2011)。
- (59) J. Z. Wang, G. H. Zhao, Y. F. Li, X. Liu, P. P. Hou, “Reversible immobilization of glucoamylase onto magnetic chitosan nanocarriers”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97 (2013), pp.681-692.
- (60) K. Khoshnevisan, A. K. Bordbar, D. Zare, D. Davoodi, M. Noruzi, M. Barkhi, M. Tabatabaei, “Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability”, *Chem. Eng. J.*, 171 (2011), pp.669-673.
- (61) Limin Zang, Jianhui Qiu, Xueli Wu, Wenjuan Zhang, Eiichi Sakai, Yi Wei, “Preparation of magnetic chitosan nanoparticles as support for cellulase immobilization”, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, Vol.53, (2014), pp.3448-3454.
- (62) Wenjuan Zhang, Jianhui Qiu, Huixia Feng, Xueli Wu, Limin Zang, Wei Yi, Eiichi Sakai, “Preparation and characterization of functionalized magnetic silica nanospheres with the immobilized cellulase”, *Applied Mechanics and Materials*, Vols.543-547, (2014), pp.3892-3895.
- (63) T. K. Ghose, “Measurement of cellulase activities”, *Pure & Appl. Chem.*, 59 (1987), pp.257-268.
- (64) Yang Zhao, Jianhui Qiu, Huixia Feng, Min Zhang, Lin Lei, Xueli Wu, “Improvement of tensile and thermal properties of poly(lactic acid) composites with admicellar-treated rice straw fiber”, *Chem. Eng. J.*, 173 (2011), pp.659-666.
- (65) G. Bayramoglu, B. F. Senkal, Y. M. Arica, “Preparation of clay-poly(glycidyl methacrylate) composite support for immobilization of cellulose”, *Appl. Clay Sci.*, 85 (2013), pp. 88-95.
- (66) M. Ungurean, C. Paul, F. Peter, “Cellulase immobilized by sol-gel entrapment for efficient hydrolysis of cellulose”, *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, 36 (2013), pp. 1327-1338.

- (67) 向井淳二・金城徳幸、“技術者のための実学高分子”、講談社サイエンティフィック編、(1981)、pp.57-87。
- (68) S.P.ティモシェンコ・J.N.グーディア、“弾性論”、金多潔監訳、(1973)、pp.423-428。
- (69) “木材興業ハンドブック”、農林水産省林業試験場監修、(1991)、pp.188-1819。
- (70) “バイオリファイナリーの研究開発動向”、(株) 東レリサーチセンター、第5章 バイオマスからの燃料生産、(2011)、pp. 138-159。
- (71) A. A. Gokhale, J. Lu, I. Lee, “Immobilization of cellulase on magneto-responsive graphene nano-supports”, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 90 (2013), pp. 76-86.
- (72) F. B. Daoud, S. Kaddour, T. Sadoun, “Adsorption of cellulase *Aspergillus niger* on a commercial activated carbon: Kinetics and equilibrium studies”, *Colloid Surf. B-Biointerfaces*, 75 (2010), pp. 93-99.
- (73) A. Dinçer, A. Telefoncu, “Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads”, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 45 (2007), pp. 10-14.
- (74) Y. X. Bai, Y. F. Li, L. Lin, “Synthesis of a mesoporous functional copolymer bead carrier and its properties for glucoamylase immobilization”, *Appl. Microbiol. Biot.*, 83 (2009), pp. 457-464.
- (75) “レオロジーの測定とコントロール 一問一答集”、株式会社技術情報協会、(2010)。

7. 研究発表

➤ 論文発表（二重線は研究代表者）

- 1) Xueli Wu, Jianhui Qiu, Lin Lei, Yang Zhao and Eiichi Sakai, “The Mechanical Characteristics of Straw/poly(Lactic Acid) Composite Materials” , **Advanced Materials Research**, Vols.335-336, (2011), pp.153-156.
- 2) Yang Zhao, Jianhui Qiu, Huixia Feng, Min Zhang, Lin Lei, Xueli Wu, “Improvement of tensile and thermal properties of poly(lactic acid) composites with admicellar-treated rice straw fiber” , **Chemical Engineering Journal**, Vol.173 (2011), pp.659-666.
- 3) Lijun Qin, Jianhui Qiu, Mingzhu Liu, Shenglong Ding, Liang Shao, Guohong Zhang, Yang Zhao, “Composites of Poly (lactic acid) with Rice Straw Fibers Modified by Poly (butyl acrylate)” , **Materials Science Forum**, Vol.675-677 (2011), pp.357-360.
- 4) Yang Zhao, Jianhui Qiu, Huixia Feng, Guohong Zhang, Liang Shao, “Study on the Application of Silane Coupling Agent in Rice Straw/Poly(butylene succinate) Composites” , **Materials Science Forum**, Vol.675-677 (2011), pp.361-364.
- 5) Mingliang Ding, Min Zhang, Jinming Yang, Jianhui Qiu, “Study on the Enzymatic Degradation of Aliphatic Polyester-PBS and Its Copolymer” , **Journal of Applied Polymer Science**, Vol.124, No.4, (2012), pp.2902-2907.
- 6) Jianhui Qiu, Takuya Murata, Kenji Takahashi, Xueli Wu, “The Plastic Deformation Characteristics of Crystalline Polymer Materials via Rolling Process” , **Advanced Materials Research**, Vols.391-392, (2012), pp.585-589.
- 7) Rie Nobe, Jianhui Qiu, Eiichi Sakai, Makoto Kudo, Min Zhang, “Mechanical Properties and Morphology of Poly(Lactic Acid) Composites with Oyster Shell Particles” , **Advanced Materials Research**, Vols.391-392, (2012), pp.590-594.
- 8) Takuya Murata, Jianhui Qiu, Eiichi Sakai, Xueli Wu, Makoto Kudo, “Morphology Change of Extrusion Molded Crystalline Polymer by Rolling Process” , **Advanced Materials Research**, Vols.391-392, (2012), pp.595-599.
- 9) Eiichi Sakai, Jianhui Qiu, Takuya Murata, Kazushi Ito, Junichi Kobayashi, Takehiko Takahashi, “Degradation Characteristics of Rice Straw/Poly(Lactic Acid) Composites” , **Advanced Materials Research**, Vols.391-392, (2012), pp.1268-1272.
- 10) Yang Zhao, Jianhui Qiu, Huixia Feng, Min Zhang, “The Interfacial Modification of Rice Straw

Fiber Reinforced Poly(Butylene Succinate) Composites: Effect of Aminosilane with Different Alkoxy Groups” , **Journal of Applied Polymer Science**, Vol.125, No.4, (2012), pp.3211-3220.

- 11) Jie Song, Min Zhang, Zhenghao Ge, Shasha An, Miling Gan, Jianhui Qiu, “Study on the Performance Influence of PBS By Adding Natural Polygonum Cuspidatum Sieb.et Zucc Pigments” , **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, Vol.51, No.7, (2012), pp.724-728.
- 12) Lin Lei, Jianhui Qiu, Eiichi Sakai, “Preparing Conductive Poly(Lactic Acid) (PLA) with Poly(Methyl Methacrylate) (PMMA) Functionalized Graphene (PFG) by Admicellar Polymerization” , **Chemical Engineering Journal**, Vol.209, No.15, (2012), pp.20-27.
- 13) Jianhui Qiu, Takuya Murata, Xueli Wu, Masayoshi Kitagawa, Makoto Kudo, “Plastic Deformation Mechanism of Crystalline Polymer Materials in the Equal Channel Angular Extrusion Process” , **Journal of Materials Processing Technology**, Vol.212, No.7, (2012), pp.1528-1536.
- 14) Jianhui Qiu Takuya Murata, Xueli Wu, Makoto Kudo, Eiichi Sakai, “Plastic Deformation Mechanism of Crystalline Polymer Materials During the Rolling Process” , **Journal of Materials Science**, Vol.48, No.5, (2013), pp.1920-1931.
- 15) Ying Zhao, Min Zhang, Mingming Shang, Dan He, Jianhui Qiu, “Enzymatic Degradation of the Copolyester P(BS-co-DGS)” , **Materials Science Forum**, Vols.743-744, (2013), pp.649-654.
- 16) Limin Zang, Jianhui Qiu, Xueli Wu, Wenjuan Zhang, Eiichi Sakai, Yi Wei, “Preparation of magnetic chitosan nanoparticles as support for cellulase immobilization” , **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Vol.53, (2014), pp.3448-3454.
- 17) Wenjuan Zhang, Jianhui Qiu, Huixia Feng, Xueli Wu, Limin Zang, Wei Yi, Eiichi Sakai, “Preparation and characterization of functionalized magnetic silica nanospheres with the immobilized cellulase” , **Applied Mechanics and Materials**, Vols.543-547, (2014), pp.3892-3895.
- 18) Peng Liu, Pengcheng Du, Longxiang Zhu, Zhihui Wu, Hongmei Wang, Ming Chen, Xueli Wu, Jianhui Qiu, “Attapulгите/polylactide nanocomposites: Effect of polymer brush length” , **Materials Letters**, Vol.117, (2014), pp.214-216.

➤ 国際会議発表（二重線は研究代表者）

- 1) Xueli Wu, Jianhui Qiu, Lin Lei, Yang Zhao and Eiichi Sakai, “The Mechanical Characteristics

- of Straw/poly(Lactic Acid) Composite Materials” , **2011 International Conference on Materials and Products Manufacturing Technology**, Chengdu, China, October 28-30, 2011.
- 2) Eiichi Sakai, Jianhui Qiu, Takuya Murata, Kazushi Ito, Junichi Kobayashi and Takehiko Takahashi, “Degradation Characteristics of Rice Straw/Poly(Lactic Acid) Composites” , **ISCEMP2011** Shenyang,China, November 4-6, 2011.
 - 3) Jianhui Qiu, Takuya Murata, Kenji Takahashi and Xueli Wu, “The Plastic Deformation Characteristics of Crystalline Polymer Marerials via Rolling Process” , **ISCEMP2011** Shenyang,China, November 4-6, 2011.
 - 4) Takuya Murata, Jianhui Qiu, Kengo Uchiya, Eiichi Sakai, Xueli Wu and Makoto Kudo, “Microstructure of VGCF/PC Conductive Composites Prepared By Injection Molding And Its Effects of Rolling Process” , **Proceedings of the 10th China-Japan Joint Conference on Composites (CJJCC-10)**, Chengdu, China, September 7-9, 2012.
 - 5) Jianhui Qiu, Xueli Wu, Yang Zhao, Eiichi Sakai, Min Zhang, Kazushi Ito, Junichi Kobayashi, “Investigation of the Solubility Between Polylactic Acid and Poly(Methyl Methacrylate) and Morphology of Their Composite” , **Proceedings of the 10th China-Japan Joint Conference on Composites (CJJCC-10)**, Chengdu, China, September 7-9, 2012.
 - 6) Min Zhang, Qi Qiang, Dan Xu, Jianhui Qiu, “Preparation and Performance of Wheat Staw Fibers/PBS Matrix Composites” , **Proceedings of the 10th China-Japan Joint Conference on Composites (CJJCC-10)**, Chengdu, China, September 7-9, 2012.
 - 7) Takuya Murata, Jianhui Qiu, Eiichi Sakai, Xueli Wu and Makoto Kudo, “Deformation Mechanism of Polypropylene During Rolling Process and Its Tensile Properties” , **Proceedings of the 10th China-Japan Joint Conference on Composites (CJJCC-10)**, Chengdu, China, September 7-9, 2012.
 - 8) Xueli Wu, Jianhui Qiu, Eiichi Sakai, Min Zhang, Kazushi Ito, Makoto Kudo, Junichi Kobayashi, “Acetic Acid Modification of Straw and Its Composition with Polylactic Acid” , **Proceedings of the 10th China-Japan Joint Conference on Composites (CJJCC-10)**, Chengdu, China, September 7-9, 2012.
 - 9) Wenjuan Zhang, Jianhui Qiu, Huixia Feng, Xueli Wu, Limin Zang, Wei Yi, Eiichi Sakai, “Preparation and characterization of functionalized magnetic silica nanospheres with the immobilized cellulose” , **2014 2nd International Conference on Materials and Manufacturing Research**, Guilin, China, March 29-30, 2014.

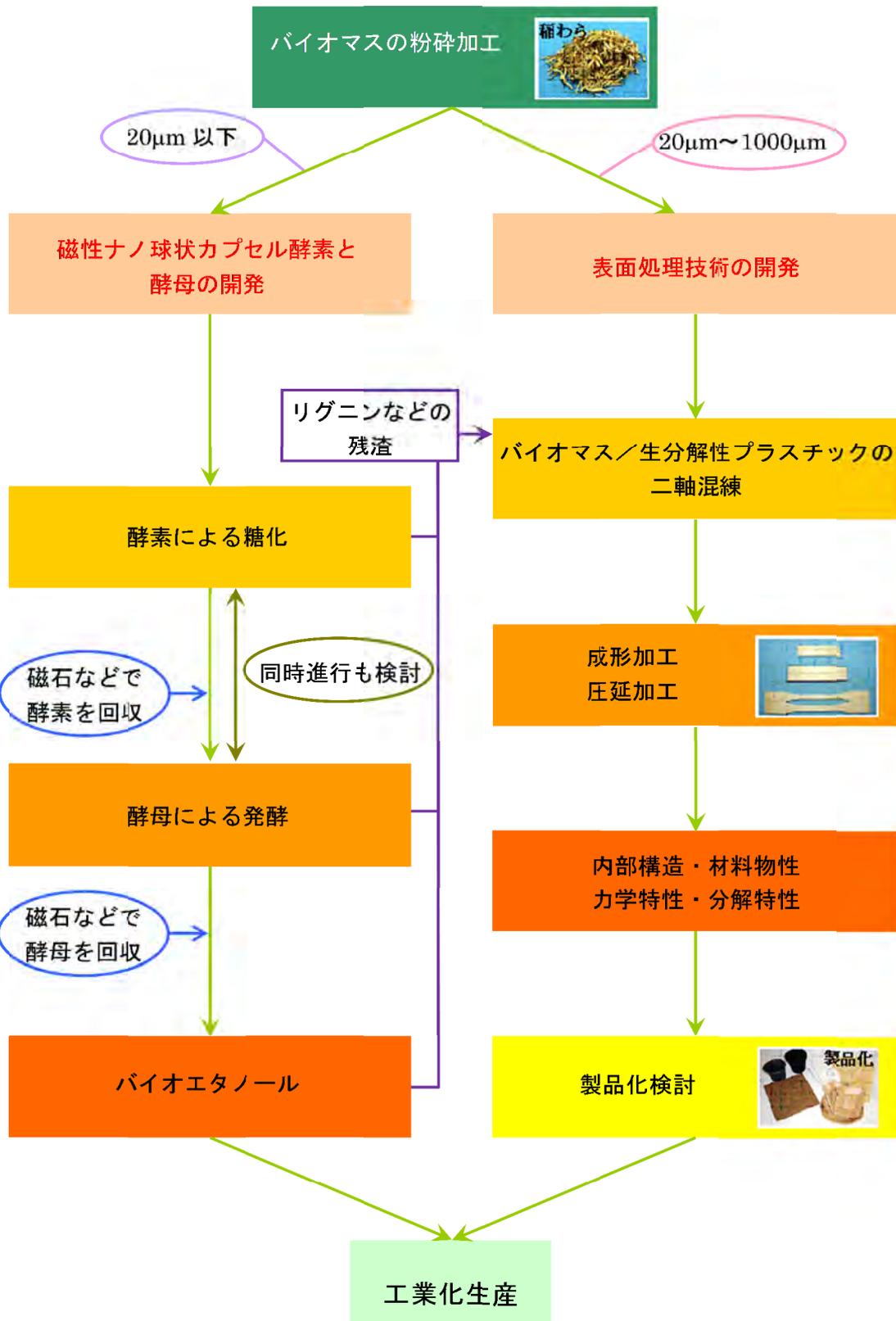
➤ 国内学会発表（二重線は研究代表者）

- 1) 境 英一、福田 泰士、邱 建輝、安保 悠一郎、“圧延加工したポリアミド6における力学特性および吸水特性の評価”、**第19回プラスチック成形加工学会秋季大会、成形加工シンポジア’11** (2011年10月14日～15日、秋田)
- 2) 村田 拓哉、邱 建輝、境 英一、工藤 素、鎌田 悟、“PPの圧延加工における高次構造の変化と圧延温度の関係”、**第19回プラスチック成形加工学会秋季大会、成形加工シンポジア’11** (2011年10月14日～15日、秋田)
- 3) 邱 建輝、加藤 秀規、境 英一、工藤 素、鎌田 悟、“稲わら/ポリ乳酸複合材料の力学特性および吸水特性の評価”、**第19回プラスチック成形加工学会秋季大会、成形加工シンポジア’11** (2011年10月14日～15日、秋田)
- 4) 趙 陽、邱 建輝、境 英一、“PLA/PMMA複合材料の相溶性及び力学特性の検討”、**第19回プラスチック成形加工学会秋季大会、成形加工シンポジア’11** (2011年10月14日～15日、秋田)
- 5) 村田 拓哉、邱 建輝、打矢 健吾、境 英一、渡辺 高士、“圧延加工によるVGCF/PC複合材料のモルフォロジーおよび電気抵抗特性の変化”、**平成24年度 化学系学協会東北大会** (2012年9月15日～16日、秋田)
- 6) 張 文娟、邱 建輝、武 学麗、境 英一、小宮山 崇夫、青山 隆、“固定化酵素の作製およびその性能評価”、**平成24年度 化学系学協会東北大会** (2012年9月15日～16日、秋田)
- 7) 邱 建輝、川井 拓也、加藤 秀規、境 英一、村田 拓哉、伊藤 一志、工藤 素、“稲わらを添加したポリ乳酸複合材料の長期フィールドテスト”、**平成24年度 化学系学協会東北大会** (2012年9月15日～16日、秋田)
- 8) 邱 建輝、今野 智博、福田 泰士、境 英一、高橋 武彦、小林 淳一、“稲わらの酵素糖化特性に及ぼす粒度の影響”、**平成24年度 化学系学協会東北大会** (2012年9月15日～16日、秋田)
- 9) 邱 建輝、清水 輝、福田 泰士、境 英一、高橋 武彦、小林 淳一、“微粉碎処理したリグノセルロース系バイオマスの酵素糖化挙動”、**平成24年度 化学系学協会東北大会** (2012年9月15日～16日、秋田)
- 10) 岩瀬 悠貴、武 学麗、邱 建輝、境 英一、小林 淳一、森 英明、高橋 武彦、伊藤 一志、工藤 素、“無水酢酸処理による稲わら/生分解性樹脂複合材料の創製”、**日本**

機械学会東北支部第49期秋季講演会 (2013年9月20日、盛岡市)

- 11) 小林 康平、邱 建輝、川井 拓也、境 英一、小林 淳一、森 英明、高橋 武彦、伊藤 一志、工藤 素、“微粉碎加工した草本系バイオマスの糖化および発酵特性”、日本機械学会東北支部第49期秋季講演会 (2013年9月20日、盛岡市)
- 12) 松村 祐弥、近藤 克紀、邱 建輝、境 英一、“機械的粉碎加工による稲わら粉末の作製と酵素糖化性の評価”、日本機械学会東北支部第49期秋季講演会 (2013年9月20日、盛岡市)
- 13) 張 文娟、邱 建輝、境 英一、“アミノシランにより改質した磁性粒子に固定化されたセルラーゼの安定性”、日本機械学会東北支部第49期秋季講演会 (2013年9月20日、盛岡市)
- 14) 長谷川 透夢、邱 建輝、境 英一、“in situ 合成法による HA/PLA 複合材料の力学特性”、日本機械学会東北支部第49期秋季講演会 (2013年9月20日、盛岡市)
- 15) 藤本 友章、武 学麗、邱 建輝、今野 智博、境 英一、小林 淳一、森 英明、高橋 武彦、伊藤 一志、工藤 素、“木質系バイオマスの酵素糖化残渣を添加した生分解性複合材料の創製”、日本機械学会東北支部第49期秋季講演会 (2013年9月20日、盛岡市)
- 16) 臧 利敏、邱 建輝、境 英一、“ Fe_3O_4 -キトサンナノ粒子へのセルラーゼの固定化およびその活性評価”、日本機械学会東北支部第49期秋季講演会 (2013年9月20日、盛岡市)

8. 研究概要図



9. 英文概要

Title of Cooperative Research Project

“Bio-ethanol producing with nano-magnetic spherical carriers immobilized biocatalysts and biodegradable composites preparation with surface modified lignin”

Research leader (organization)

Jianhui Qiu (Akita Prefectural University)

Co-workers (organization)

Junichi Kobayashi (Akita Prefectural University), Eiichi Sakai (Akita Prefectural University), Kazushi Ito (Akita Prefectural University), Takehiko Takahashi (Akita Prefectural University), and Makoto Kudo (Akita Research and Development Center)

Abstract

Effective use of biomass with carbon neutral features is becoming increasingly important for biological resources application, environmental issues and energy problems, because developing countries had put urgent targets to prevent global warming. However, there is still little research on the application of biomass resources at present. The preparation of bio-ethanol and biodegradable composites with biomass materials could reduce plastic waste, carbon dioxide emissions and conservation of oil resources, and as a result, promote the establishment of a recycling society. In this work, to realize the comprehensive utilization of biomass, the high efficiency bio-ethanol producing with nano-magnetic spherical carriers immobilized biocatalysts have been proposed. In addition, the biodegradable composites were also prepared with surface modified lignin. The biomass such as rice straw, wheat straw and chaff can be crushed into 20 μ m particles by a tandem ring mill[®]. Especially, Because of the high adsorption between rice straw and cellulase, nano-magnetic spherical carriers immobilized cellulase was developed for its recycling. Moreover, the mechanical properties of biomass/biodegradable composites decreased as the content and particle sizes of rice straw increasing. Therefore, the rice straw was surface modified and the mechanical properties of its composites can be as high as biodegradable plastic. The obtained biodegradable composites can be extruded as sheet with good mechanical properties, and can also be used as actual products.

Keywords: Biomass; Bio-ethanol; Biodegradable composites; Nano-magnetic spherical carriers; Surface modification