

平成 24 年度

環境研究総合推進費補助金 K112007 研究報告書

木質系バイオマスの量子ビームによる高効率糖化处理技術の開発と評価

平成 25 年 4 月

研究代表者： 光産業創成大学院大学 富樫（太田）万理
研究分担者： 東京工業大学 中崎清彦

補助事業名	平成 24 年度環境研究総合推進費補助金研究事業
所 管	環境省
国庫補助金	16,568,000 円
研究課題名	木質系バイオマスの量子ビームによる高効率糖化处理技術の 開発と評価
研究番号	K112007
研究期間	平成 23 年 6 月 1 日～平成 25 年 3 月 31 日
研究代表者名	富樫（太田）万理（光産業創成大学院大学）
研究分担者名	中崎清彦（東京工業大学）

目次

1. 研究概要	1
2. 研究目的	6
3. 研究方法	9
4. 結果と考察	17
5. 結論	42
6. 研究発表 その他	43
7. 引用文献	44
8. ポンチ絵	46
9. 英文要旨	47

1. 研究概要

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=木質系バイオマスの量子ビームによる高効率糖化处理技術の開発と評価
- ・研究番号 =K112007

・国庫補助金精算所要額 (円) = 16,568,000 円

・研究期間 (西暦) = 2011-2013

・研究代表者名= 富樫 (太田) 万理 (光産業創成大学院大学)

・研究分担者名= 中崎清彦 (東京工業大学)

・研究目的

資源・エネルギー源としての活用が期待される木質系バイオマスのバイオエタノールへの高効率変換技術や非石油化学系バイオ素材の技術開発は、脱石油資源、非食糧・飼料の観点から社会的に必要とされる研究開発課題である。草や樹木を代表とするリグノセルロースを広範に利用するためには、三大成分であるセルロース、ヘミセルロース、リグニンからなる強固な構造を崩し、そこからセルロースなど目的成分を分離する処理が必要となる。

本研究では木質系バイオマスを量子ビーム (レーザーおよび電子線) による前処理により酵素処理と併せて効率良く単糖類に分解、エタノール発酵ならびに乳酸発酵を行い、高効率でバイオエタノールを生産する技術を開発し、その有効性の評価を行うことを目的とした。

・研究方法

本研究では光源としてパルスレーザーと電子線照射装置を用い、木質廃棄物として間伐材 (スギ、タケ) における高効率糖化光照射処理方法を検討し、固体培養の同時発酵におけるエタノールとL-乳酸生成への前処理の影響と最適条件を検討した。照射条件としてビーム強度と時間、水添加、過酸化水素添加量について重点的に検討した。具体的には生成糖分析 (還元糖、グルコース、オリゴ糖)、X線回折、¹³C-NMRによるセルロース結晶構造解析、HPLC-示差屈折検出による糖化处理後の糖組成解析、電子顕微鏡、走査型プローブ顕微鏡による木質の微細構造解析、FT-IR、ラマン分光によるリ

ゲニンの分光分析，微弱発光計測を行った。

光前処理後にセルラーゼ産生微生物とアルコール，乳酸発酵微生物の固体培養を行い，光前処理の発酵系に対する影響を解析し，最も効率よく発酵を行う条件を検討した。

素材照射に最適な光源，照射部の改良を行い，固体発酵法を用いてエタノール，乳酸発酵に対する光前処理の有効性を検討した。

・ 結果と考察

本研究では量子ビーム光源としてパルスレーザーと電子線照射装置を用い，木質（スギ，タケ）における糖化促進効果を検討し，電子線照射においてレーザーより高い糖化促進効果があることが明らかとなった（図 1-1）。木質粉末に電子線照射（照射時間 3 分間）を行った結果，水，過酸化水素（30%）共存下において電子線を照射した粉末にセルラーゼを作用させた際に還元糖量がタケにおいて対照区の 6.6 倍，スギで対照区の 3.6 倍高くなり，紫外レーザー照射より高い糖化向上効果が得られることが明らかとなった。

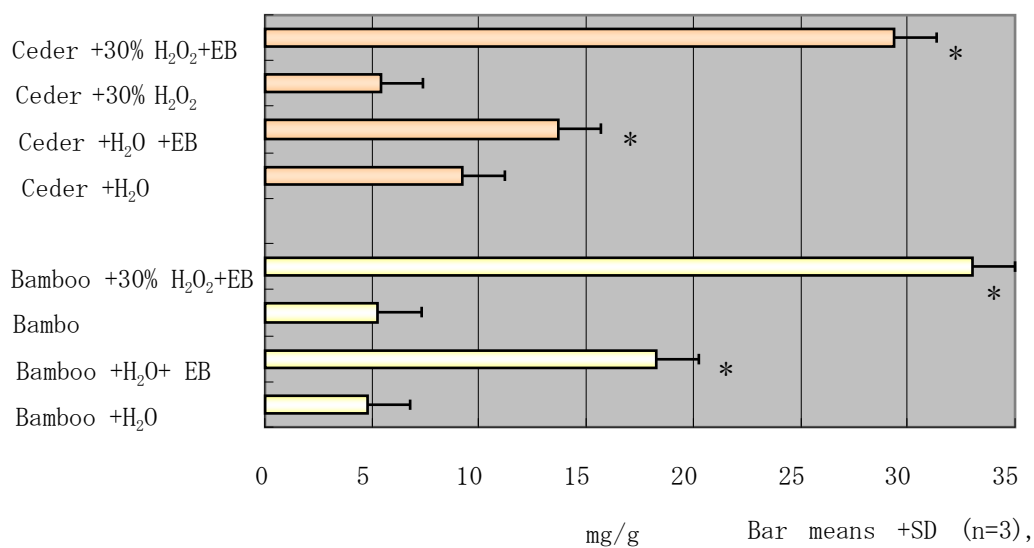


図 1-1 電子線照射処理（3 分間）木質粉末のセルラーゼ糖化変化

さらに過酸化水素水を添加し，5 分間電子線照射処理を行ったタケの液体クロマトグラムを図 1-3 に示す。電子線を照射していないクロマトグラム（図 1-2）と比較し，オリゴ糖やグルコース，キシロース，有機酸が電子線照射により生成していることが分かる。タケに含まれる不溶性多糖類であるセルロースやヘミセルロースが低分子に分解され，可溶化し検出されたと考えられる。

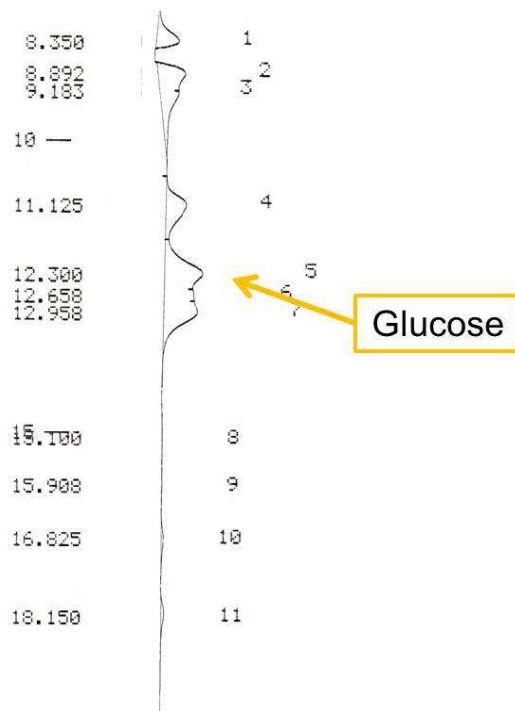


図 1-2 過酸化水素水を添加し 5 分間静置したタケ微細粉末の液体クロマトグラム

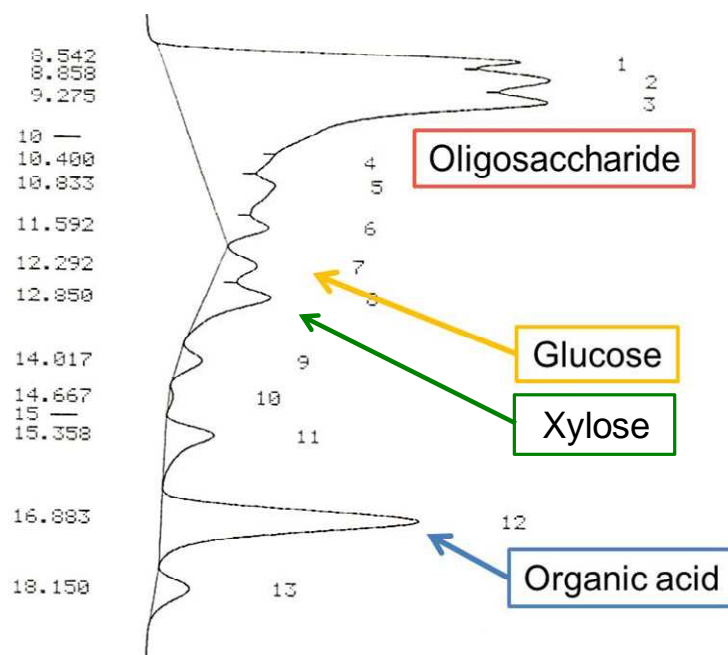


図 1-3 過酸化水素水を添加し, 5 分間電子線照射処理を行ったタケの液体クロマトグラム

過酸化水素水を添加し、5分間電子線照射処理を行ったタケ粉末の形態変化を電子顕微鏡にて分析した結果（図1-4）、過酸化水素と電子線処理を行ったタケ粉末では木質繊維がほぐれた状態が観察された。

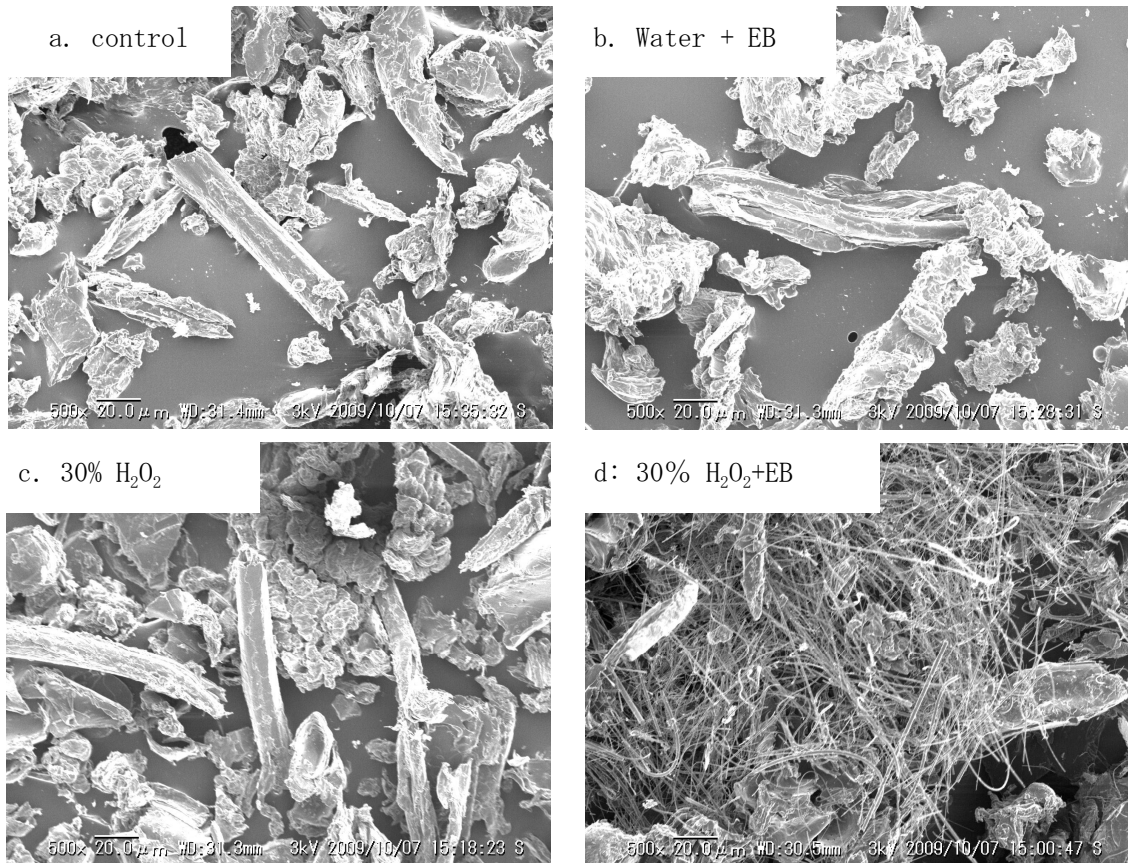


図1-4 電子線を照射した竹粉末のSEM画像

- a. 対照区：未処理, b. 水+電子線処理区, c. 30% 過酸化水素添加区,
d. 30%過酸化水素+電子線処理区

本研究において糖化効果の高かった電子線照射処理では、固体部にセルラーゼを反応させ酵素処理を行った結果、最大還元糖量は 378 mg/g であり、また電子線照射処理後の液体中の最大還元糖量は 150 mg/g であったことから、本研究で得られた電子線照射によるタケの糖化率は還元糖量から算出して 75%であった。この値は硫酸や水酸化ナトリウムを用いる他の前処理法と同等と考えられる。

- 環境政策への貢献

本研究において開発した量子ビームを用いた木質系バイオマスの前処理方法は酸やアルカリを用いないため、環境負荷の少ない方法である。また加熱や試薬の使用に伴うエネルギーやコストを抑えることが出来、糖化効率が電子線照射前処理により向上するため、その後の糖化工程に必要な酵素量やコストが削減される。また木質の電子線照射処理において副次的にオリゴ糖が生成されることから、付加価値の高い食用、医薬分野のオリゴ糖生産事業の可能性も考えられ、次世代につながる環境政策において価値があると考えられる。

- 研究成果の実現可能性

本研究では量子ビーム光源としてパルスレーザーと電子線照射装置を用い、木質廃棄物として間伐材（スギ、タケなど）における高効率糖化光照射処理を検討し、エタノールやL-乳酸生成のための前処理の影響と最適条件を検討した。本研究で得られた電子線を用いた木質前処理方法と酵素糖化法を組み合わせたセルロース糖化率（還元糖量）は75%以上であり、この値は、アルカリ処理などの加熱や試薬を必要とする前処理を組み合わせた酵素糖化におけるセルロース糖化率と同等の値である。

さらに光照射処理では、加熱や試薬の使用に伴うエネルギーやコストを抑えることができることから、光照射の高効率化や光照射装置の技術革新、量産化によるコスト削減が現実化されれば実現の可能性があると考えられる。

- 結論

本研究では、パルスレーザー（波長可変型）と電子線による木質廃棄物の糖化向上効果の高い条件を検討し、量子ビーム照射処理は電子線においてより効果が高く、過酸化水素と電子線照射処理には、酵素を用いずオリゴ糖や多糖を分解してグルコースやキシロースを生成する効果があることが確かめられた。過酸化水素添加条件下における電子線照射前処理を行った後、セルラーゼを加えた際の糖化率は75%であった。

電子線照射による木質の高効率糖化効果はラマン分光、NMR法、電子顕微鏡解析などの定性分析結果から、リグニンの変性や多糖類の低分子化に関与していることが示唆され、また木質繊維がほぐれその後の酵素処理の効果が高められたことによることが考えられた。

2. 研究目的

化石燃料である石油は、オイルリファイナリーと呼ばれる精製工程を経て、ガソリンや軽油などの燃料としてエネルギー利用されるだけでなく、プラスチックや合成繊維などの化学製品として人類の発展に大きく貢献してきた。現在、日本に限らず世界中で、エネルギー、および化学製品の多くを石油に依存している。しかしながら、石油はいずれ枯渇すると考えられることから、石油に代わる新たな原料の模索と、その原料のエネルギー、および化学製品への変換プロセスの開発が強く求められている。石油に代わる新たな原料としては、バイオマスが考えられている。バイオマスはかつて生きていたもの、現在生きているものを含む生物体量を表す言葉である。バイオマスは光合成の作用で再生される、再生可能な資源であり、これを原料として製造した燃料や化学製品は使用中、あるいは使用後に二酸化炭素に変換される。しかしながらこの二酸化炭素は、バイオマスが成長過程で光合成により大気中から吸収した二酸化炭素に由来するため、バイオマスを使用しても全体として見れば大気中の二酸化炭素量を増加させていないと考えてよい、すなわち、バイオマスはカーボンニュートラルな原料といえることができる。このため、バイオマスの使用は環境にも優しいと考えられている。バイオマスを原料とした燃料や化学製品の生産をオイルリファイナリーに対してバイオリファイナリーと呼ぶが、化学製品としては、乳酸やエタノールの他、酢酸、グリセロール、アセトン、ブタノール、グルコース、また、グルコースができれば、原理的には微生物の働きで様々な物質に変換可能であり、芳香族アミノ酸、カテコールなどを生成した例が報告されている。近年、これらの化学製品の中でもエタノールや乳酸の生成に関する研究が特に盛んであり、エタノールであれば、さらに様々な化学製品に変換可能な化学原料としてだけでなく、化石燃料に代替する燃料として用いることができる。バイオマスから製造されたエタノールであるバイオエタノールは、ガソリンに混合して、ガソリンの使用量を節約する燃料として利用される。また、乳酸であれば生分解性プラスチックなどの原料としての用途が期待される。

このようにバイオマスは再生可能な原料という利点があるが、一方では食糧としての用途と競合するという問題が指摘されている。穀物であるトウモロコシやサトウキビなどがエネルギーの原料として用いられるようになってこれらの農産物の価額が高騰する結果となった。そのため現在は食糧と競合しないバイオマスの利用が盛んに研究されるようになってきている。

食糧と競合しないバイオマスとしては、スギ¹、ポプラ²のような木質系バイオマス、稲ワラ³、麦ワラ⁴、サトウキビバガス⁵、スイッチグラス⁶のような草本系バイオマス、および海藻類¹などが利用されている。海藻はリグニン含有量が少ないため緩やかな前処理でよいが、大量に収穫するのが難しいという欠点がある。一方、木質系バイオマスや草本系バイオマスは、セルロースの糖化を妨害するリグニンが高濃度に含まれ

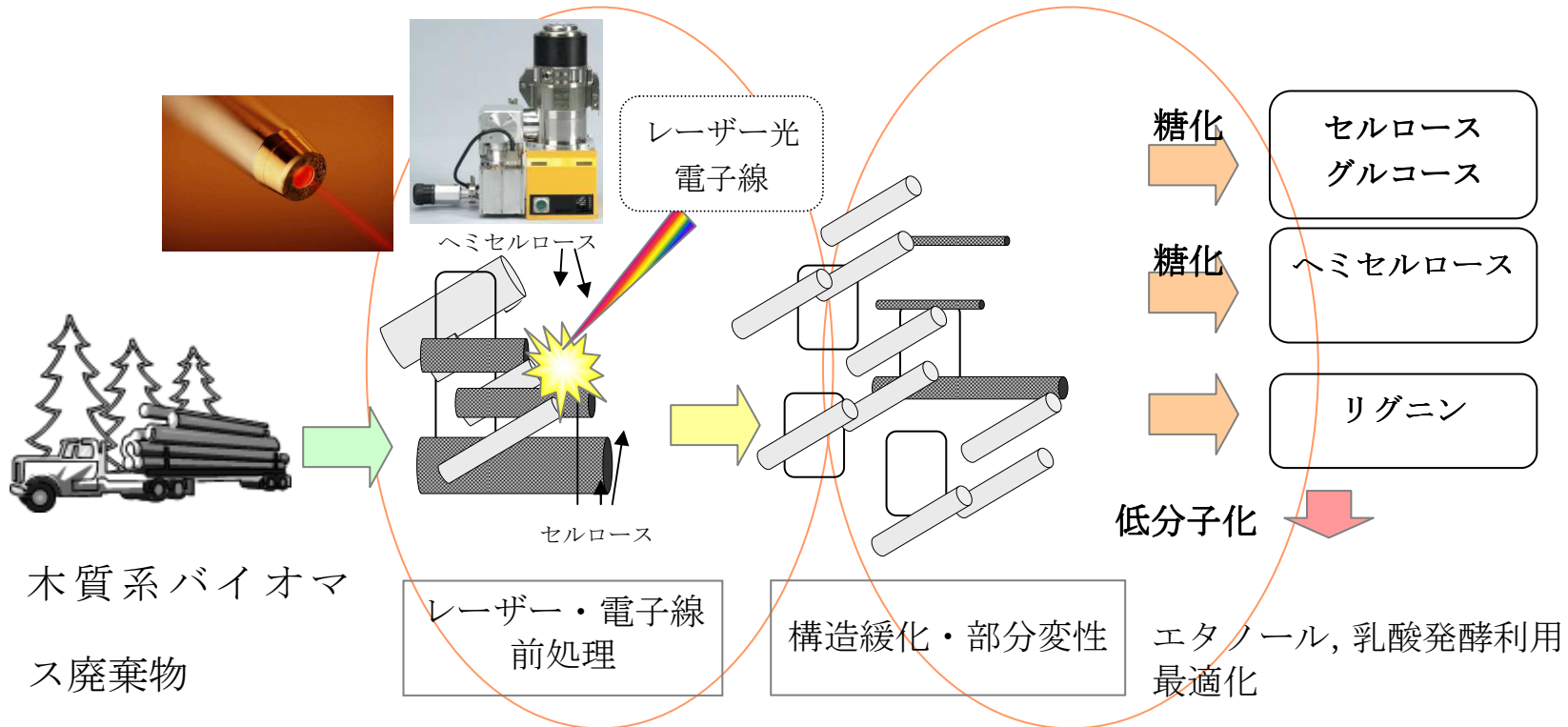
ており、バイオリファイナリーのためには厳しい前処理が必要である。前処理としては、硫酸やリン酸を使用した酸処理^{3, 5}、硫酸-亜硫酸水素ナトリウム処理²、アルカリ処理⁴、アンモニア爆砕処理⁶、有機溶媒処理⁷などが用いられているが、いずれも環境負荷が大きい試薬を使用しており、環境負荷が小さい前処理法の開発が求められている。

木質系バイオマスの一つであるタケは、日用品の材料としても人の生活に欠かせない存在であったが、生活様式の変化にともないプラスチックなどの代替品の普及によりタケ製品の需要は減少するようになった。また、栽培農家の高齢化もあって竹林を含めた里山は放置されるようになり、各地で繁殖力の旺盛なタケが勢力を拡げ、森林や農地などに侵入・拡大している。最近では、日本全国で竹林の放任による森林の荒廃が大きな問題になっている。

一方、光はその波長を選ぶことによって原子、分子の結合に選択的に作用させることが可能であるが、装置の特殊性からバイオ素材についての研究はあまり進んでいないのが現状である。電子線は物質の分子レベルの組成変化を生じさせる作用があり、本研究で開発を目的とする量子ビームを用いる光前処理法は、水または過酸化水素を用いるため環境負荷の少ない技術である。さらに最適な同時発酵法と組み合わせ、最終的に糖化効率 75%以上を見込んでいる。

本研究では、リグノセルロースとして森林や農地などに侵入・拡大することで放任林の問題を引き起こしているタケや間伐材として廃棄されるスギを用い、微細化処理と量子ビーム（レーザーおよび電子線）により酵素処理と併せ効率良く分解、エタノール発酵ならびに乳酸発酵を行い、高効率で環境負荷の少ないバイオエタノールを生産する技術を開発し、その有効性の評価を行うことを目的とした。

図2-1 木質系バイオマスの高効率糖化光処理技術開発の概略図



木質バイオマスのレーザー光，電子線前処理
とその評価：
光産業創成大学院大学 担当，
協力：浜松ホトニクス株式会社 中央研究所

光前処理木質バイオマスの固
体同時発酵とその評価：
東京工業大学 担当

3. 研究方法

3.1 使用した木質バイオマスと微細化処理

量子ビーム照射処理に際しては、予めタケとスギを微細化処理したものを用いた。タケ、スギには静岡県浜松市で採取した孟宗竹、天竜杉を用い、粉末製造機(PA-C, 丸大鉄工株式会社)で粉砕することで微細化した(図 3.1-1 参照)。竹粉製造機の切削部は歯数 20, 直径 19cm の円盤(図 3.1-1, 左上)が 44 枚重ねられた構造(図 3.1-1, 左下)をしており、回転軸に対して直角方向からタケを接触させることで粉砕するが、口径が 100mm から 180mm の生竹を粉砕可能となっている。切削された粉末は空気輸送され、サイクロンにより気固が分離されて、集粉機の袋に集められる。製造能力は最大 400kg/day である。得られた粉末は、食材乾燥機(MT-50G 型, 株式会社転生)により乾燥させ、超音波分級機(C701-35KHz, 株式会社ダルトン)により平均粒径が $50\mu\text{m}$ 以下のものを回収して、タケ微細粉末とし(図 3.1-2 参照)、常温で保存した。



図 3.1-1 微粉製造機 (PA-C, 丸大鉄工株式会社)



図 3.1-2 タケ微細粉末

3.2 木質バイオマス微細粉末中のセルロース含有率測定

木質バイオマス微細粉末中のセルロース含有率を測定するために、まず、木質微細粉末に含まれるセルロースを NREL の LAP-002 に従って酸加水分解し、引き続いて酸加水分解の結果生成したグルコースを定量した。LAP-002 の手順は以下の通りとなっている。最初に、木質微細粉末 0.3g を試験管に量りとり、72%の硫酸 3.0mL を加えて 1 分間よくかき混ぜる。引き続いて、硫酸を添加したタケ微細粉末を 30°C の水浴中で 2 時間加水分解する。このとき 15 分おきに攪拌する。加水分解の後、試験管内の反応物を 84mL の蒸留水で希釈しながら 100mL メジューム瓶に移し、軽く蓋をして、121°C で 1 時間オートクレーブ（高温蒸気滅菌器、ハイクレーブ HVN-50、(株) 平山制作所）する。オートクレーブ後反応物を 30 mL ビーカーに移し、炭酸カルシウムをゆっくり加えて pH 5 ~6 まで中和する。生成した硫酸カルシウムを静置沈殿させ、上澄みを 0.45 μ m メンブレンフィルタで濾過し、サンプル瓶に濾液を回収する。

得られた濾液中に含まれるグルコース濃度を HPLC で測定することによりセルロース含有率を定量した。HPLC 分析では、濾液 20 μ L を糖分析カラム SH1011 8.0 mm I. D. \times 300 mm（昭和電工株式会社）と RI 検出器（L-3300 型、株式会社日立製作所）を備えた HPLC に注入し、カラム温度 60°C で 0.01N 硫酸の溶離液を用いて液流速 0.6 mL/min で溶出させた。

グルコース濃度測定のための検量線は、濃度が 0.01~0.2g/L のグルコース溶液を調整して作成した。また、グルコースの保持時間は本実験で用いた HPLC の条件で 12.3 分であった。測定により得られたグルコース濃度に 0.9 を乗じることでセルロース濃度を算出した。

3.3 木質バイオマス微細粉末の電子線照射処理と装置改良

木質バイオマス微細粉末の電子線照射処理には図 3.3-1 に示す装置を用いた。木質バイオマス微細粉末 50mg に蒸留水または過酸化水素水（7.5, 15, 30%）180 μ L を加え、90kV, 200mA, 光源からの距離 11.5mm の条件で電子線を照射した。また電子線照射処理の効果を高めるために木質バイオマス微細粉末に過酸化水素水を加え、電子線を照射しないで照射処理に相当する時間、静置する実験も同時におこなった。過酸化水素水添加後に電子線照射処理したサンプルおよび過酸化水素水添加後静置したサンプルそれぞれを 1.5 mL マイクロチューブに採取し、超純水 500 μ L を添加した後、6,200 rpm で 5 分間、遠心分離した。遠心後上澄みを除き、チューブに残った沈殿物を 50°C で 24 時間乾燥させ、糖化に用いた。乾燥後の保存には -10°C の冷凍庫を用いた。



図 3.3-1 電子線照射源 浜松ホトニクス（株）社製

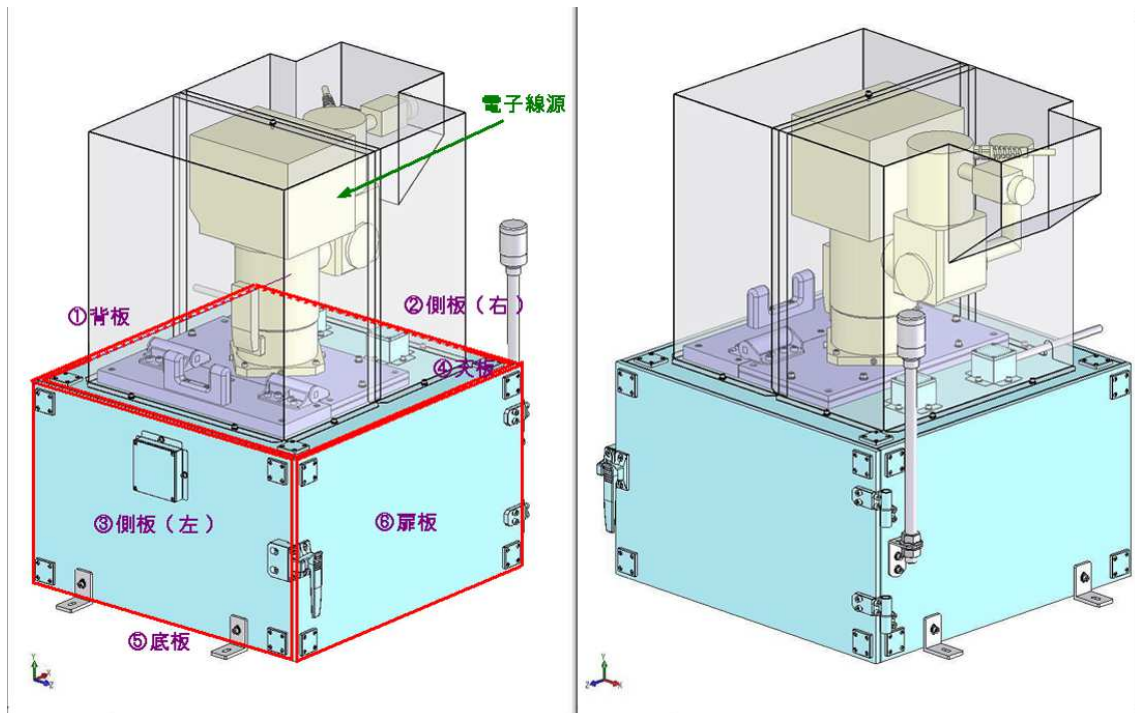


図 3.3-2 電子線照射源の改良型筐体図

3.4 木質バイオマス微細粉末のレーザー照射処理

木質バイオマス微細粉末に波長可変パルスレーザー光を照射するための装置系を組み立てた(図3.4-1)。実験に使用するレーザー光源にはQスイッチNd:YAGパルスレーザー(コンテニウム社製)の基本波(発振波長1064nm, 10Hz, 6-7ns)ならびにその高調波(532, 355, 266nm)を使用した。木質バイオマス微細粉末(タケ, スギ各1g), および粉末に溶媒(100 ml)を加えた懸濁液にそれぞれパルスレーザーを照射した。

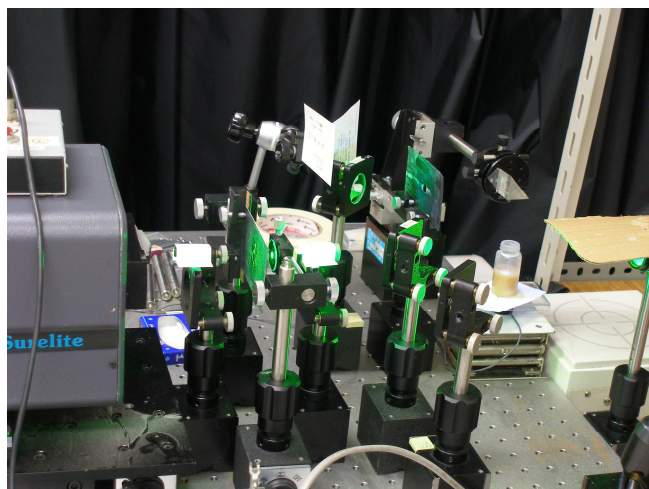
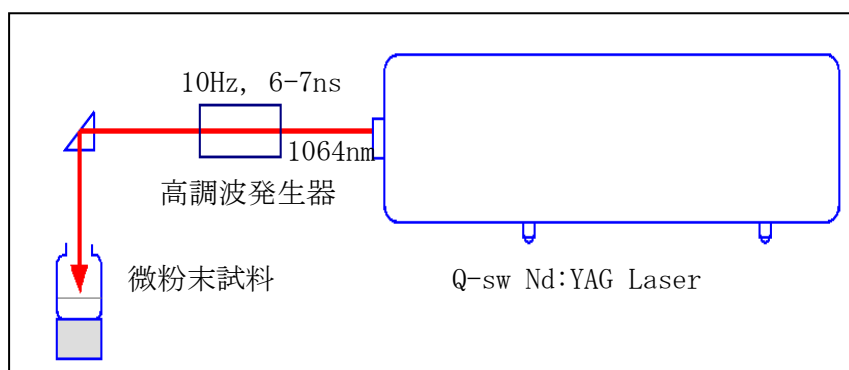


図3.4-1 波長可変パルスレーザー実験系

3.5 量子ビーム照射処理木質バイオマスの糖分析

木質微細粉末を量子ビーム照射処理して得られた処理液は還元糖分析またはグルコース分析に供した。還元糖分析は Park-Johnson 法にて，グルコース分析は SIGMA 社製グルコースアッセイ試薬を用いて行った。

また，セルラーゼ糖化処理においては SIGMA 社製，*Trichoderma reesei* 由来のセルラーゼを使用した。

3.6 量子ビーム照射処理木質バイオマスの HPLC 分析

タケ微細粉末を電子線照射処理して得られた処理液は 0.45 μm メンブレンフィルタで濾過した後，2 倍希釈した濾液をオリゴ糖，グルコース，グルコースの過分解の結果生ずると考えられる有機酸を分析するために HPLC 分析に供した。HPLC 分析は 3.2 のセルロース含有率測定のところ述べてのと同様の条件でおこなった。

3.7 量子ビーム照射処理液に含まれるオリゴ糖の定量

量子ビーム照射処理液を HPLC で分析したところ，オリゴ糖と思われるピークが検出されたことから，処理液を酵素で糖化して増加したグルコース濃度とキシロース濃度を定量することにより，処理液に含まれるセロオリゴ糖，キシロオリゴ糖を定量した。酵素には，明治製菓に提供を受けた *Trichoderma viride* 由来のメイセラゼ (Meicelase CEPB-5394) を用いた。

まず，それぞれの処理を施したサンプルに蒸留水を添加し，遠心分離により処理液を回収した。さらに，沈殿物の蒸留水への懸濁と遠心分離を繰り返すことにより，沈殿物に含まれる可溶性成分を洗いながら回収した。回収した処理液は，クエン酸緩衝液（表 3.7-1 参照）と混合してから 0.45 μm のメンブレンフィルタで濾過し，別途濾過滅菌したメイセラゼ溶液と混合して糖化を開始した。振盪培養機 (Bio-ShakerBR-15, TAITEC Co. Ltd.) を用いて 35°C，100 rpm で 96 時間糖化し，糖化後のグルコース濃度，およびキシロース濃度を HPLC により測定した。さらに，糖化前のグルコース濃度，およびキシロース濃度は，3.4 で定量したそれぞれの処理液に含まれるグルコース濃度，およびキシロース濃度から換算し，糖化前後のグルコース濃度，およびキシロース濃度の差から，それぞれセロオリゴ糖，キシロオリゴ糖の生成濃度を計算した。

表 3.7-1 クエン酸緩衝液の組成

Citric acid	0.96g
Sodium citrate	1.47g
Distilled water	50mL

Adjust pH at 5.5

3.8 量子ビーム照射処理サンプルの糖化

量子ビーム照射処理液に単糖やオリゴ糖が含まれていることから、処理後の固体成分と処理液の両方を酵素で糖化することにより、高収率で単糖を得ることが可能ではないかと予想された。そこで、量子ビーム照射処理後の処理液と固体成分の両方を含むサンプルを酵素糖化することにより、生成するグルコース濃度を定量した。

まず、それぞれの処理を施したサンプルを遠心分離することにより処理液を回収した。さらに、沈殿物の蒸留水への懸濁と遠心分離を繰り返すことにより、沈殿物に含まれる可溶性成分を洗いながら回収した。回収した処理液には可溶性の単糖やオリゴ糖が含まれており、オートクレーブ処理により過分解してしまう恐れがあったため、メンブレンフィルタで濾過することにより滅菌した。また、固体成分である遠心分離における沈殿物はオートクレーブ処理により滅菌し、その後、濾過滅菌した処理液と混合した。この混合物は、処理前のタケ微細粉末で 0.2g 相当の処理サンプルを混合したものであり、蒸留水、クエン酸緩衝液、および酵素溶液を添加して糖化を開始した。なお、反応液は、処理前のタケ微細粉末基準で 20g/L、酵素濃度が 1g/L となるように調製し、振盪培養機を用いて 35°C、100 rpm で 96 時間糖化した。また、糖化後のグルコース濃度を HPLC により測定した。

3.9 量子ビーム照射処理サンプルの固体成分の酵素糖化と発酵

木質系バイオマスや草本系バイオマスの前処理には、リグニン等を除去することにより酵素糖化におけるセルロースの分解を促進する効果がある。セルロース以外の成分を除去することによりセルロース含有率を上昇させる効果も期待できる。電子線照射処理においても、同様にセルロース含有率が上昇するのであれば、処理液を除去して固体成分を酵素糖化することにより、セルロース濃度が上昇するため生成するグルコースを高濃度化することができると考えられる。そこで、電子線照射処理した木質微細粉末の処

理液を除去し、固体成分のみを酵素糖化に用いることを試みた。

まず、電子線照射処理したサンプルを、6200 rpm で 5 分間遠心分離することにより固液を分離した。遠心後、上澄みを除き、チューブに残った沈殿物を 50°C で 24 時間乾燥させ、糖化に用いた。乾燥後の保存には -10°C の冷凍庫を用いた。

量子ビーム照射処理粉末の糖化には、明治製菓に提供を受けた *Trichoderma viride* 由来のメイセラゼ (Meicelase CEPB-5394) を用いた。糖化に際しては、最初に 0.1 M クエン酸緩衝液 (表 3.7-1 参照) 30 mL を調製し、pH が 5.5 になるように調整する。その後、50 mL 三角フラスコに pH を 5.5 に調整した 0.1 M クエン酸緩衝液 9 mL をはかりとり、量子ビーム照射処理後の微細粉末 0.2g を添加し、オートクレーブで 121°C, 20 min 滅菌した。引き続き、クエン酸緩衝液 10 mL をはかりとり、0.1g のメイセラゼを添加して溶解した。メイセラゼの溶液はメンブレンフィルタ (ADVANTEC, Cellulose Acetate 0.45 μm) で濾過滅菌し、オートクレーブを滅菌した後のサンプルに 1 mL を添加した。ここで、基質濃度が 20g/L, 酵素濃度が 1g/L となる。酵素と基質の混合溶液は振盪培養機 (Bio-ShakerBR-15, TAITEC Co. Ltd.) を用いて 35°C, 100 rpm で 96 時間糖化し、生成したグルコース濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定した。また糖化の後にエタノール発酵をおこなった。発酵をおこなう酵母としてパン酵母である Baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いた。発酵に使用する酵母の保存は一旦 30°C で 3 日間、YM 寒天培地上で培養し、その後 4°C の冷蔵庫でおこなった。YM 寒天培地の組成を表 3.9-1 に示す。

表 3.9-1 YM 寒天培地の組成

Glucose	10g
Polypepton	5g
Yeast extract	3g
Malt extract	3g
Agar	20g
Distilled water	1000mL

Adjust pH at 6.8

3.10 量子ビーム照射処理木質バイオマス粉末の電子顕微鏡観察

量子ビーム処理を行った木質バイオマス粉末の粒子状態観察を電子顕微鏡を用い行った。走査型電子顕微鏡観察にはキーエンス社製 VE8800 を用いた。

電子顕微鏡サンプルは電子線照射後の木質粉末を乾燥後、カーボンコーティングし、観察を行った。

3.11 量子ビーム照射処理粉末のラマン分光分析

電子線処理を行った木質バイオマス粉末の状態比較分析をラマン分光分析法により行った（株式会社東レリサーチセンターへ委託）。

分析サンプルには電子線照射処理（対照区, EB 区）を用い, 分析装置は PDP320 (Photon Design 社製) 顕微ラマン装置を使用した. 分析条件は, 対物レンズ 100 倍, ビーム径 1 μm , 光源 Ar レーザー /514.5 nm, レーザーパワー 0.5 mW, 回折格子 single 600 gr/mm, スリット 100 μm , 検出器 CCD/日本ローパー 1340 x 100 である.

3.12 量子ビーム処理リグニンの¹³C-NMR 測定

¹³C-NMR 解析には BRUKER 社製核磁気共鳴装置を用いた.

分析サンプルは可溶化リグニン（パールレックス, 日本製紙）に 15% 過酸化水素存在下で電子線照射を 5 分間行ったもの, 対照区として可溶化リグニンに 15%過酸化水素のみ反応させたものとした.

測定条件は, 測定核種 ¹³C (100.62 MHz), 観測周波数範囲 -10~220 ppm, 定性分析では積算回数 15,000 回の条件で, 定量分析ではパルス待ち時間 60 秒, 積算回数 4,000 回の条件で解析を行った（日立化成テクノサービス株式会社へ委託）。

4. 結果と考察

4.1 タケ微細粉末のセルロース含有率

タケ微細粉末に含まれるセルロースを酸加水分解し、生成したグルコースを HPLC により定量した結果、グルコース濃度は 1.62g/L であった。このグルコース濃度から乾燥重量基準のセルロース含有率を以下の式により算出した結果、乾燥重量基準のセルロース含有率は 44.6% と計算された。

$$\text{セルロース含有率 (\%)} = \frac{C \times V \times F}{W \times (1 - M)} \times 100$$

ここで、C は上述のグルコース濃度 (g/L) = 1.62g/L, V は酸加水分解後の総液量 (L) = 0.087L, F はグルコース量からセルロース量への変換係数 (-) = 0.9, W は酸加水分解に使用したタケ微細粉末の湿重量 (g) = 0.3g, M はタケ微細粉末の含水率 (-) である。

4.2 量子ビーム照射処理液の還元糖分析

量子ビーム (レーザー, 電子線) 照射条件の違い (照射時間, 強度一定, 過酸化水素添加濃度の違いなど) による糖化変化の検討を行った。図 4.2-1 に波長可変レーザーで処理した木質バイオマス粉末における還元糖の変化を示す。

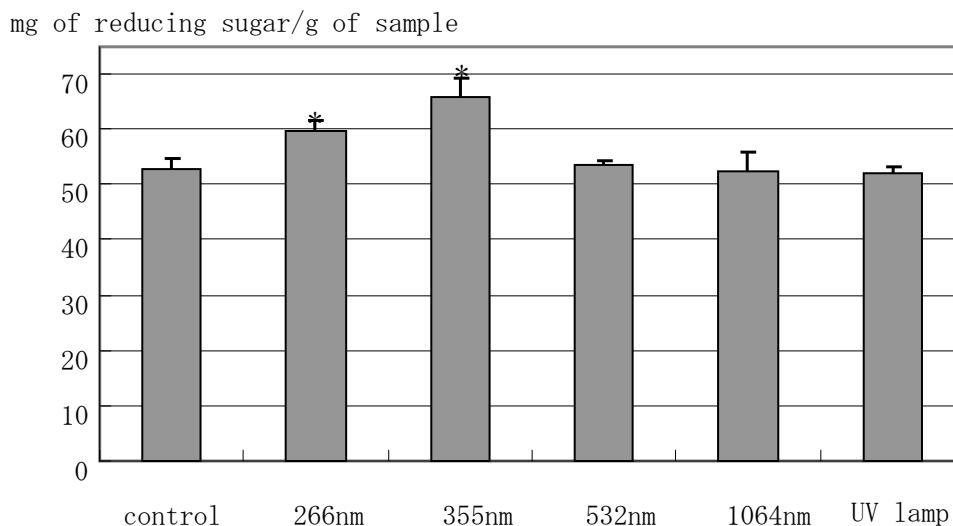


図4.2-1 パルスレーザー照射後のセルラーゼによる糖化率変化, 基本波, 高調波による糖化の違い
セルラーゼ3時間処理後の還元糖量. * $P < 0.05$, bar means SD (n=3)

対照区と比較し、355 nm, 266 nm の紫外波長域パルスレーザーの照射区において糖化向上効果が認められた。532 nm, 1064 nm のパルスレーザー照射区では対照区との差は認められなかった。

紫外線ランプ照射区では紫外域のパルスレーザーと同様の傾向は認められず、紫外線のエネルギーはランプ照射の場合、熱になることが考えられた。

さらに木質バイオマス粉末（タケ，スギ）に電子線照射（照射時間3分間）を行った結果（図 4.2-2），水，過酸化水素（30%）共存下において電子線を照射した粉末にセルラーゼを作用させた際に還元糖量がタケにおいて対照区の 6.6 倍，スギで対照区の 3.6 倍高くなり，紫外レーザー照射より高い糖化向上効果が得られることが明らかとなった。

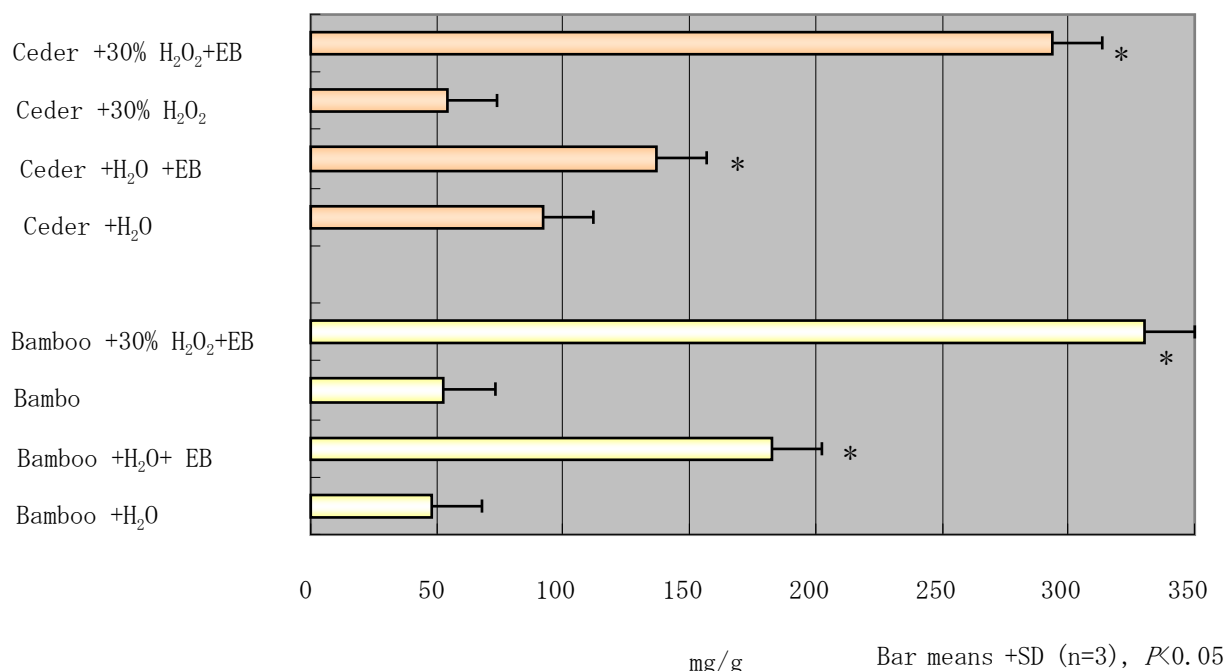


図4.2-2 電子線照射処理（3分間）木質粉末のセルラーゼ糖化変化

図 4.2-3, 4 に電子線照射時間の違いによる過酸化水素存在下での還元糖量の変化，沈殿粉末にセルラーゼを作用させたものと上清液を分析した結果を示す。

沈殿粉末においては電子線照射4分間以降，上清液においては電子線照射3分以降において還元糖量が低下する傾向が認められた。

このことから電子線と過酸化水素処理において，4分以上の照射は糖の過分解等，条件が強い可能性が推察された。

また，電子線処理後の木質粉末に水を添加後，遠心分離したセルラーゼ未処理の上清中にも還元糖が含まれることが明らかとなった。

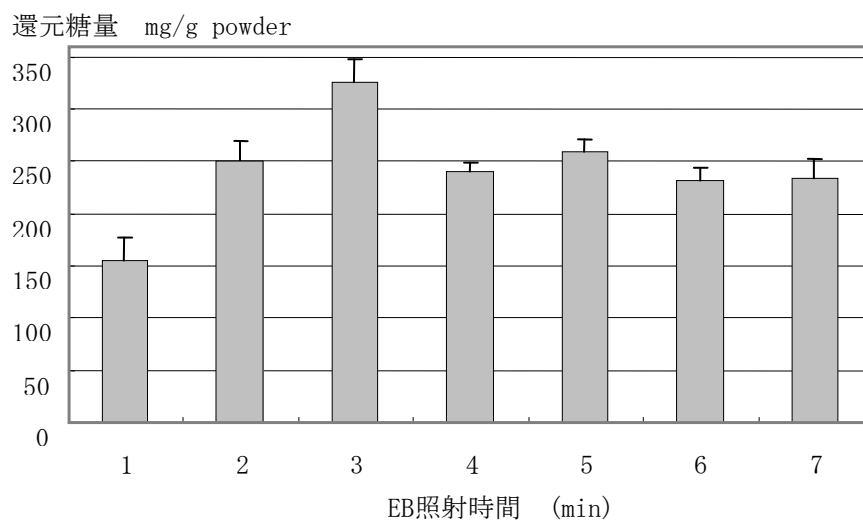


図4.2-3 電子線照射時間の違いによる糖化変化（沈殿粉末）

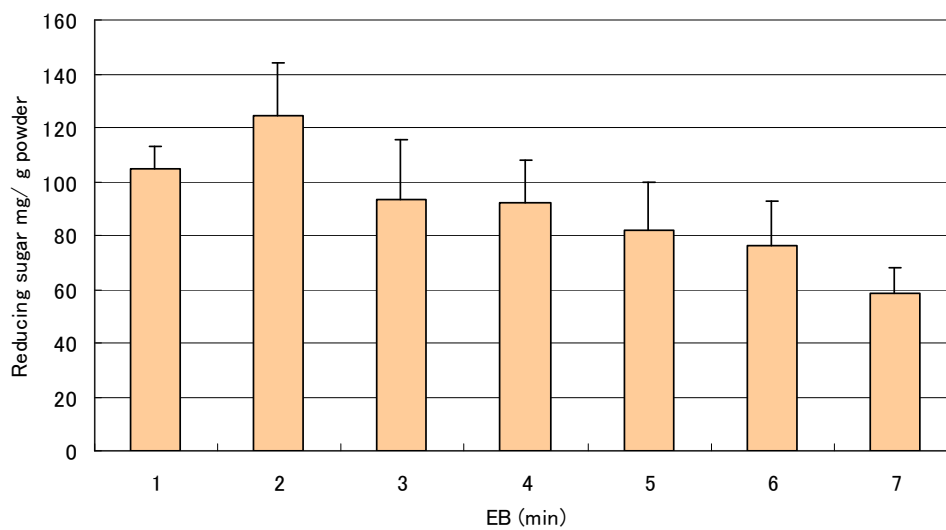


図 4.2-4 電子線照射時間の違いによる糖化変化（上清液中）

次に、添加する過酸化水素濃度を変えて電子線照射を行った結果を図 4.2-5 に示す。過酸化水素存在下で電子線照射した竹粉末のセルラーゼ処理粉末のグルコース量は30%で最も高い値となった。

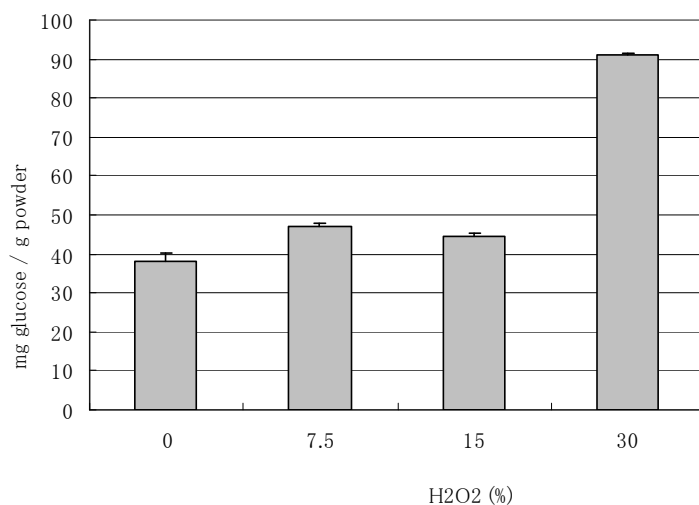


図4.2-5 過酸化水素存在下で電子線照射した竹粉末のセルラーゼ処理粉末のグルコース量

また、図 4.2-6 に酸化水素存在下で電子線照射した竹粉末上清液中のグルコース量測定結果を示す。

過酸化水素存在下で竹粉末に電子線処理を行うと、セルラーゼを処理しない状態でグルコースが水溶液中に検出されることが明らかとなった。またその濃度は過酸化水素濃度が 15%において最も高い結果であった。

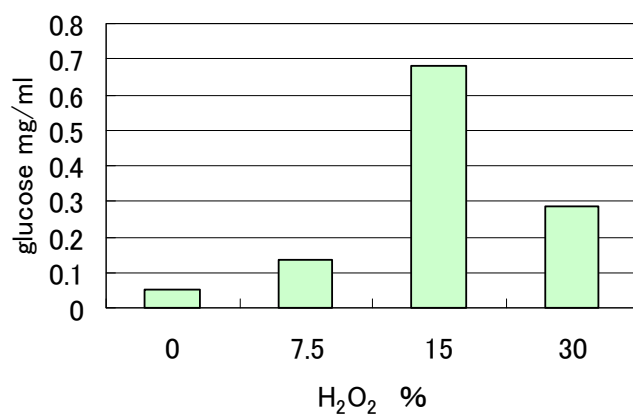


図4.2-6 過酸化水素存在下で電子線照射した竹粉末上清液中のグルコース量

量子ビームの照射により木質粉末の糖化率が向上することが明らかとなり、電子線処理はレーザー処理に比べ糖化率向上効果が高かった。

これまで、量子ビーム照射処理条件スクリーニングのためセルラーゼ糖化反応時間が 3 時間であったため、セルラーゼ反応時間を長くし、還元糖量の変化を調べた(図 4.2-7)。還元糖量は電子線処理区 (EB) で高く、48 時間のセルラーゼ処理で上限に達する傾向

であった。

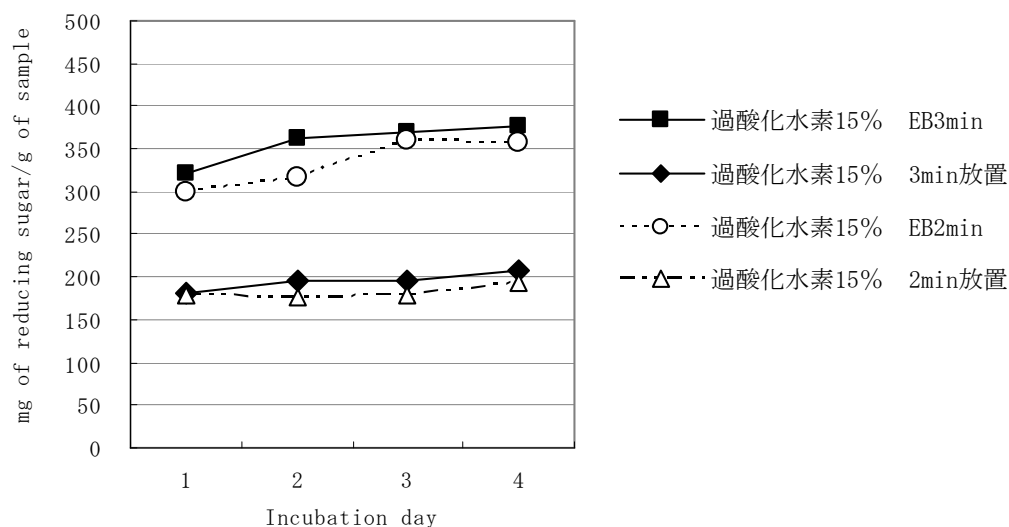


図 4.2-7 過酸化水素 (15%) + 電子線照射処理竹粉末のセルラーゼ反応時間による還元糖量の違い

4.3 木質粉末の量子ビーム処理液に含まれる単糖濃度

木質粉末に過酸化水素を添加してから 5 分間放置後に回収した処理液, および過酸化水素水を添加して 5 分間電子線照射処理をおこなった後に回収した処理液のグルコース濃度, およびキシロース濃度を, 前処理なしと比較してそれぞれ図 4.3-1 に示す. これらの処理液はいずれも, 処理後に超純水 500 μ L を添加し, その後に回収したものである. また, 前処理なしのサンプルは, 過酸化水素の代わりに同量の蒸留水を添加して同様の操作をおこなった.

前処理なし, 過酸化水素処理, および電子線照射処理におけるグルコース濃度はそれぞれ, 0.74, 1.01, および 1.36g/L となり (図 4.3-1, a), キシロース濃度はそれぞれ 0.46, 0.87, および 1.05g/L となった (図 4.3-1, b). グルコース濃度, キシロース濃度どちらも, 前処理なしよりも過酸化水素処理, 過酸化水素処理よりも電子線照射処理の方が高くなっていることから, 過酸化水素処理や電子線照射処理に, オリゴ糖や多糖を分解して単糖を生成する効果があることが確かめられた. なお, これらのグルコース濃度, およびキシロース濃度は, 過酸化水素処理や電子線照射処理をおこなった後に, 500 μ L の超純水を添加した後の濃度となっている. そのため, それぞれの処理直後, すなわち, 超純水を添加する前にはさらに高濃度のグルコースやキシロースが含まれていたことになる. そこで, 超純水を添加する前のグルコース濃度, キシロース濃度を計算したところ, 過酸化水素処理直後にはグルコースが 3.84g/L, キシロースが 3.29g/L

生成しており、電子線照射処理直後にはグルコースが 5.14g/L、キシロースが 3.98g/L 生成していたと計算された。

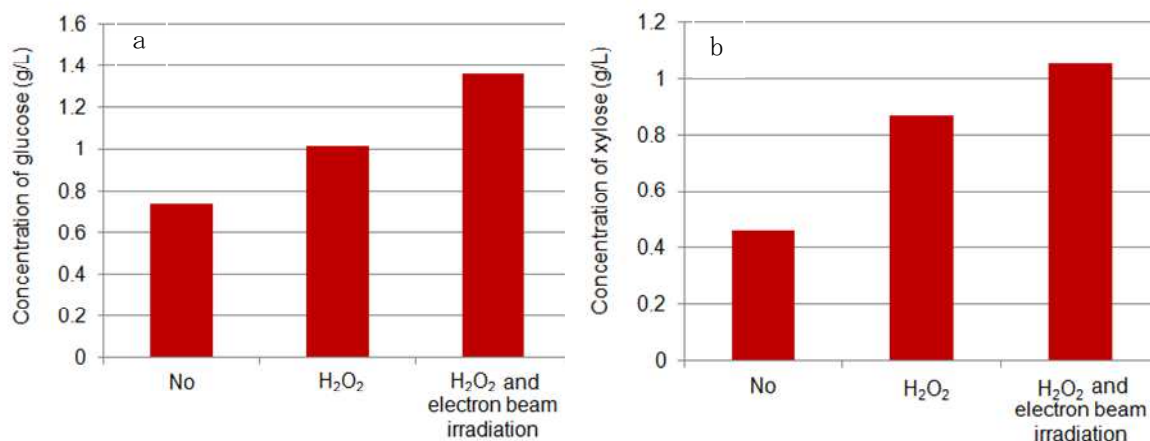


図 4.3-1 前処理なし、過酸化水素処理、および電子線照射処理タケ微細粉末の処理液のグルコース濃度 (a) とキシロース濃度 (b) の比較

4.4 電子線照射処理液の定性分析

過酸化水素処理後、および電子線照射処理後に回収した処理液の HPLC クロマトグラムを図 4.4-1 および 4.4-2 に比較する。

電子線照射処理後に回収した処理液において、保持時間 8~10 分の位置に大きなピークが検出された (図 4.4-2)。これらのピークに相当する物質は、保持時間が短いことから、分子量が大きい物質、セロオリゴ糖やキシロオリゴ糖等のオリゴ糖ではないかと考えられた。なお、過酸化水素処理後に回収した処理液においては、これらのピークが検出されなかったことから (図 4.4-1)、電子線照射処理によってオリゴ糖が生成したことが示唆された。なお、オリゴ糖はグルコースやキシロースなどの単糖にまでは分解されなかったものの、この後に酵素を用いた糖化をおこなえばグルコースやキシロースなどの単糖を生成することが可能と考えられた。

さらに、過酸化水素処理後、および電子線照射処理後に回収した処理液どちらにもグルコースやキシロースに相当するピークが検出されたが、電子線照射処理後の方が大きなピークとなっていることから、電子線照射処理により、多糖やオリゴ糖の一部がグルコースやキシロースにまで分解されたものと考えられた。また、電子線照射処理後には高濃度の有機酸が検出され、電子線照射処理によって、糖類が過分解されたことがわかった。

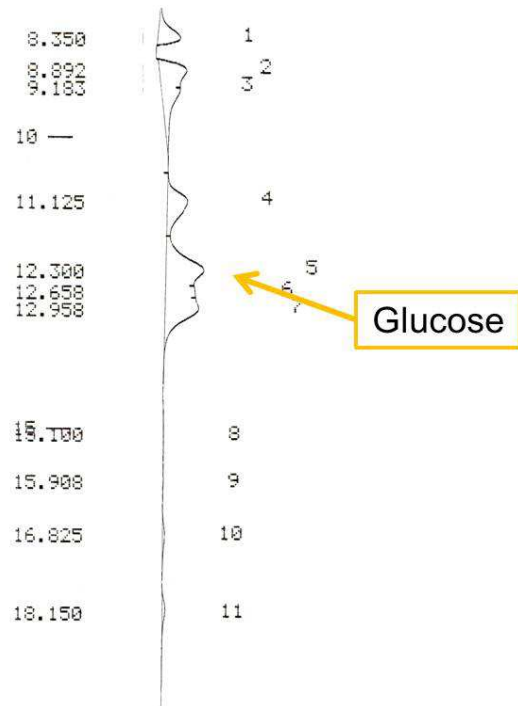


図 4.4-1 過酸化水素水を添加して 5 分間電子線照射処理後の液体クロマトグラム (2 倍希釈した溶液を測定)

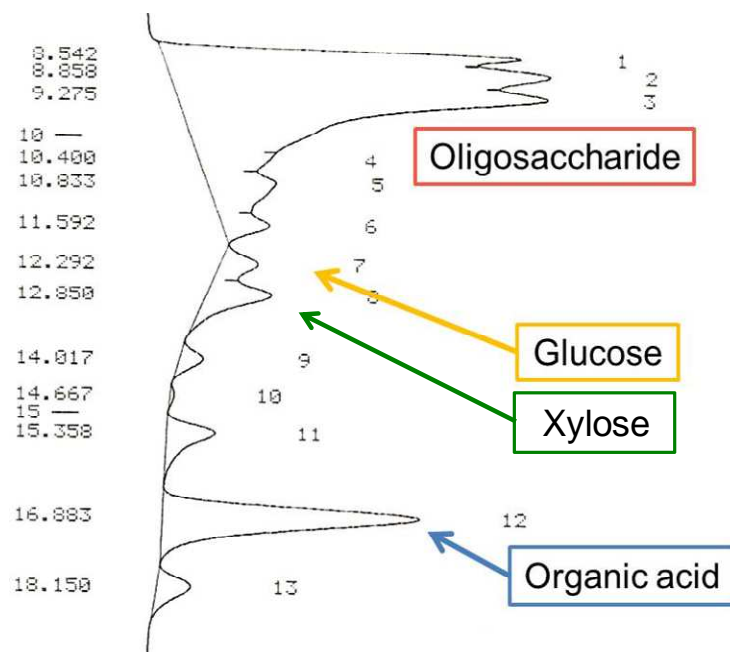


図 4.4-2 過酸化水素水を添加し 5 分間静置したタケ微細粉末の液体クロマトグラム (2 倍希釈した溶液を測定)

4.5 処理液の酵素糖化によるオリゴ糖の算出

前処理なし，過酸化水素処理，および電子線照射処理タケ微細粉末の処理液の酵素糖化における，糖化前後のグルコース濃度とその差から計算したセロオリゴ糖濃度を比較して図 4.5-1 に示す。

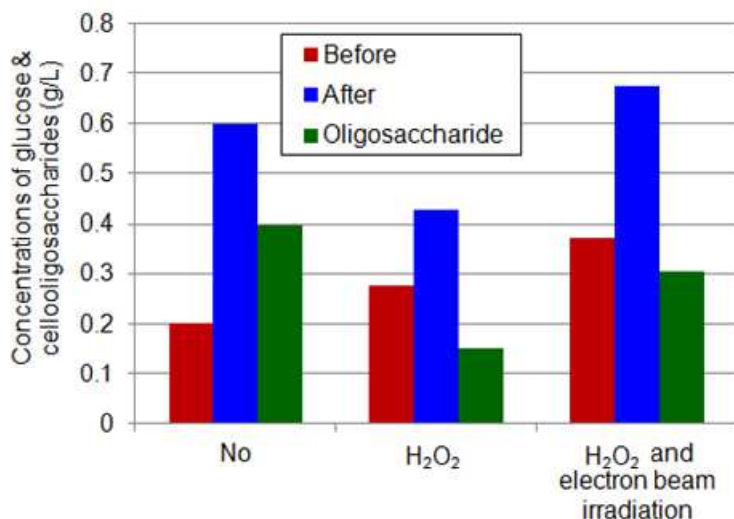


図 4.5-1 タケ微細粉末の処理液の酵素糖化における、糖化前後のグルコース濃度とセロオリゴ糖濃度の比較

前処理なしと過酸化水素処理を比較すると，過酸化水素処理によりグルコースが生成したことから，糖化前のグルコース濃度は過酸化水素処理の方が高くなっていることがわかる。一方，糖化後のグルコース濃度は過酸化水素処理の方が低くなった。このことから，過酸化水素による酵素反応への阻害，あるいは過酸化水素処理によりセロオリゴ糖が分解してグルコースが生成するものの，それ以上にグルコースの過分解も同時に起こってしまっている可能性が示唆された。結果として，過酸化水素処理と酵素糖化を組み合わせても，生成するグルコース濃度は，前処理なしよりも低い値となることが考えられた。

次に，過酸化水素処理と電子線照射処理を比較すると，電子線照射処理によって多くのグルコースが生成したことから，糖化前のグルコース濃度は電子線照射処理の方が高くなり，糖化後のグルコース濃度も電子線照射処理の方が高い値となった。このことから，電子線照射処理では，過酸化水素処理でグルコースが過分解してしまう量以上にセルロースがセロオリゴ糖に分解していることが予想された。なお，電子線照射処理タケ微細粉末の処理液に含まれるセロオリゴ糖の濃度は 0.30g/L と計算された。さらに，本実験では，電子線照射処理後に超純水を添加し，その後，蒸留水，クエン酸緩衝液，

酵素溶液を添加して酵素糖化をおこなっているため、セロオリゴ糖の濃度は、電子線照射処理直後よりも希釈されて低い値となってしまう。このことから、超純水を添加する前の電子線照射処理直後の処理液には 4.17g/L のセロオリゴ糖が含まれていると計算された。

前処理なし、過酸化水素処理、および電子線照射処理タケ微細粉末の処理液の酵素糖化における、糖化前後のキシロース濃度とその差から計算したキシロオリゴ糖濃度を比較して図 4.5-2 に示す。

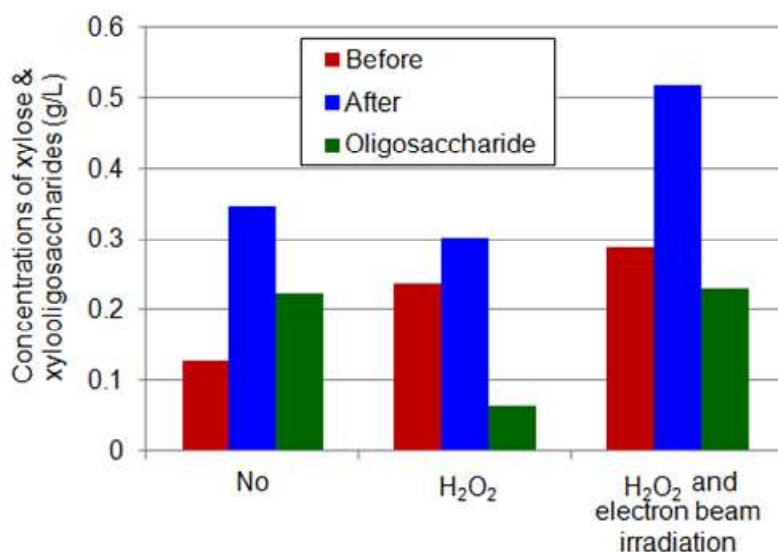


図 4.5-2 タケ微細粉末の処理液の酵素糖化における、糖化前後のキシロース濃度とキシロオリゴ糖濃度の比較

キシロース濃度も上述のグルコース濃度と同様に、過酸化水素処理によりキシロオリゴ糖が分解してキシロースが生成するものの、それ以上にキシロースの過分解も同時に起こってしまっている可能性が示唆された。また、電子線照射処理では、過酸化水素処理でキシロースが過分解してしまう量以上にキシランがキシロオリゴ糖に分解していることが予想された。なお、電子線照射処理タケ微細粉末の処理液に含まれるキシロオリゴ糖の濃度は、0.23g/L と計算され、超純水を添加する前の電子線照射処理直後の処理液には 3.19g/L のキシロオリゴ糖が含まれていると計算された。

以上の結果、過酸化水素処理における過酸化水素の濃度を最適化する等により、グルコースやキシロースの過分解を抑えることができれば、電子線照射処理後の単糖やオリゴ糖の濃度をさらに高めることができると考えられた。

さらに、電子線照射処理タケ微細粉末の処理液の酵素糖化における糖化前後の HPLC クロマトグラムを比較して図 4.5-3 に示す。糖化前の処理液ではオリゴ糖と思われる大

きなピークが複数検出されたが、糖化後にはそれらのピークのうちのいくつかは小さくなっていることが確かめられた。このことから、これらのピークがオリゴ糖に相当し、酵素糖化によりそのオリゴ糖が分解していることが考えられた。また、糖化後の処理液におけるグルコースやキシロースに相当するピークが、糖化前の処理液におけるそれらよりも大きくなっていることも確認された。

<糖化前>

<糖化後>

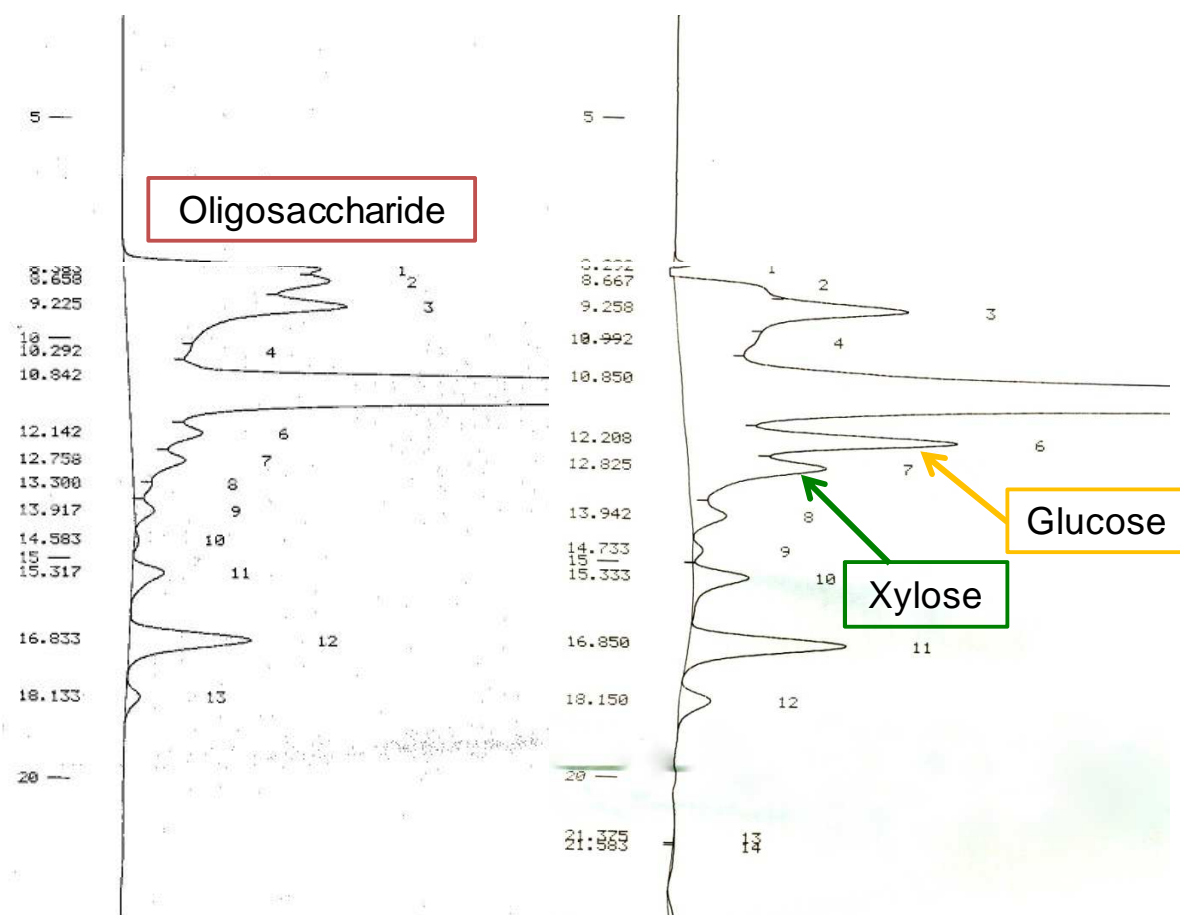


図 4.5-3 電子線照射処理タケ微細粉末の処理液の酵素糖化における、糖化前後の液体クロマトグラム

4.6 電子線照射処理タケ微細粉末の固体成分の酵素糖化

電子線照射処理タケ微細粉末の固体成分の酵素糖化, および引き続く発酵におけるグルコース濃度を比較して図 4.6-1 に示す.

電子線照射処理タケ微細粉末の固体成分の酵素糖化により 2.32g/L のグルコースが生成した. この値は, 処理液と固体成分の両方を含むサンプルの糖化よりも高い値であり, 電子線照射処理によりタケに含まれるセルロース以外の成分が除去され, 処理後の固体成分を使用したことによりセルロースの濃度を高めることができたのではないかと予想された. なお, 固体成分を利用するのであれば, 糖化におけるタケ微細粉末の濃度を高濃度にする事ができるため, さらに高濃度のグルコースを生成することが可能であるとも考えられた.

また, 糖化液を引き続いて発酵することでグルコースは消費され, それに見合った量のエタノールが生成すると期待したが, エタノールは生成しなかった. このため, 発酵後も糖化で生成したグルコースが残存しており, 発酵後のグルコース濃度は, 2.82g/L となった. この値は, 糖化後の 2.32g/L よりも高い値となっているが, これは酵母の接種時に前培養液に含まれているグルコースが同伴したことや発酵中に糖化が進行していたことが考えられた. これらの結果, 糖化液にはエタノール発酵を阻害する物質が含まれていることが考えられた.

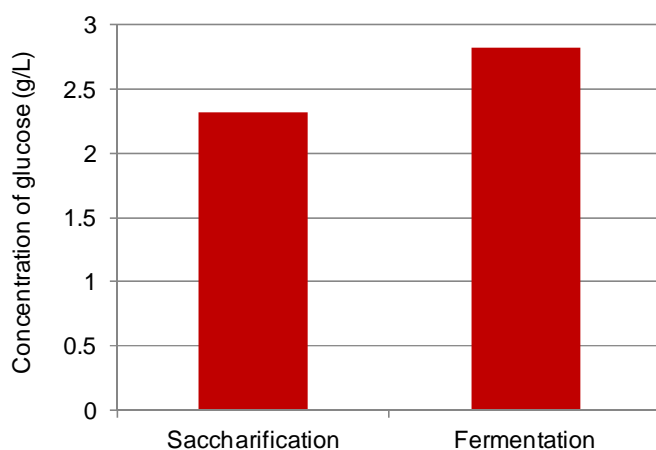


図 4.6-1 電子線照射処理タケ微細粉末の固体成分の糖化と引き続く発酵におけるグルコース濃度

4.7 量子ビーム照射処理粉末のラマン分光分析

量子ビームのうち過酸化水素水共存下で電子線処理を行った木質バイオマス粉末の状態比較分析をラマン分光分析法により行った結果を示す (図 4.7-1).

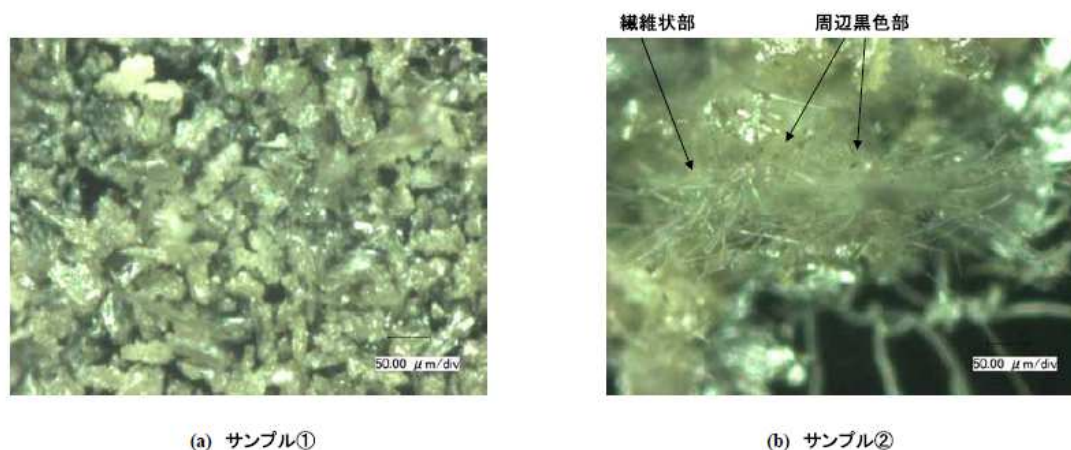


図 4.7-1 試料概観と測定場所

対照区と異なり、電子線照射区には繊維状部とその周辺に塊部が見られたため、それぞれについてラマン分光分析を行った。

図 4.7-2 より、対照区ではダイヤモンド状炭素 (DLC) に類似したラマンスペクトルに重畳して、 1604cm^{-1} や 1631cm^{-1} 付近にシャープなラマン線 (ベンゼン環や共役の小さな C=C 結合と推定) が認められる。また、ラマンスペクトルはベースラインが上昇しており、試料にはリグニン構造や有機物の劣化構造のような蛍光成分が存在していると考えられる。よって対照区であるコントロールサンプルには、DLC 構造と共に、C=C 結合を含む有機物成分が存在していると考えられる。

また、図 4.7-3 より、電子線照射区の繊維状部では DLC に由来するラマンスペクトルが検出された。ただし、対照区とは異なり、メインピークのピーク波数が対照区より高波数側で検出され、ショルダーバンドが明瞭に認められた。

一方、ベースラインの上昇は認められない。このようなスペクトル変化は、DLC に熱処理を加えた場合などに見受けられ、DLC 中の sp^2 結晶サイズや sp^2 性の増大を反映した結果と推定される⁸ (引用文献⁸)。さらに、繊維状部周辺の黒色部では、 1350cm^{-1} 付近と 1580cm^{-1} 付近に先鋭化したラマン線、 2700cm^{-1} 付近に比較的シャープなラマン線が検出された。これらはそれぞれ結晶性カーボンに由来する D バンド、G バンド、2D

バンドに相当し、本場所では結晶性カーボンが形成されているものと考えられる。電子線処理を行った結果、有機物成分が減少し、低分子化が進行した可能性が示唆された。なお、ラマンスペクトルは sp^2 構造に対して感度が高い手法であり、 sp^2 構造が少量であっても、強調して検出されている可能性もある。一方、FT-IR は官能基に対して感度が高い手法であることから、併用すれば本試料のより詳細な構造変化を捉えることが出来る可能性がある。

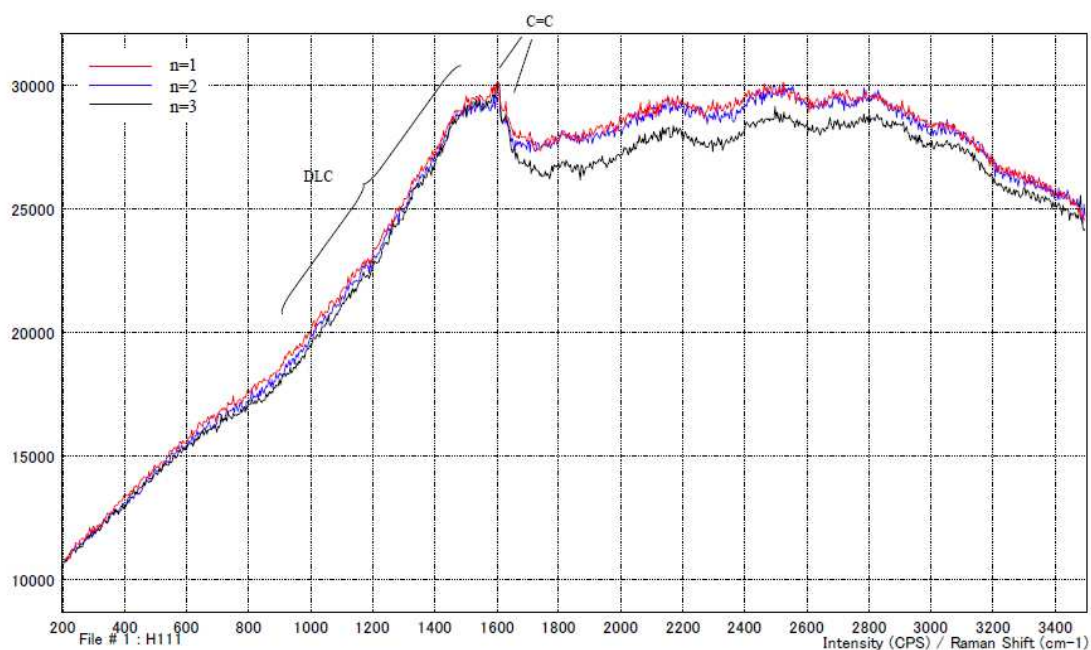


図 4.7-2 タケ粉末のラマンスペクトル 対照区

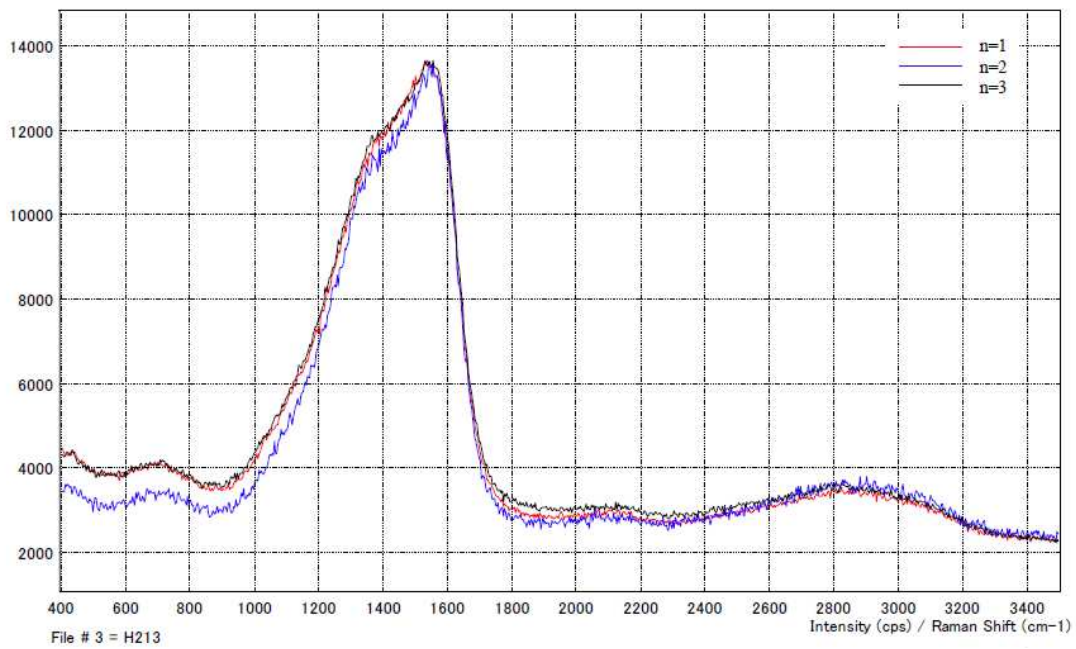


図 4.7-3 タケ粉末のラマンスペクトル 電子線照射区 繊維状部

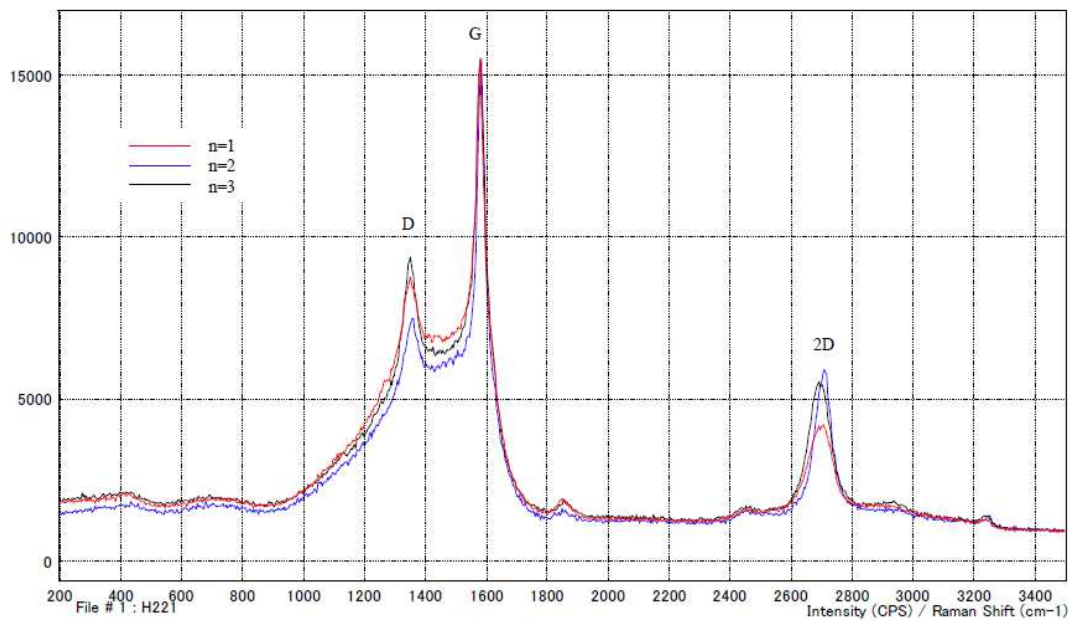


図 4.7-4 ラマンスペクトル 電子線照射区 繊維状周辺黒色部

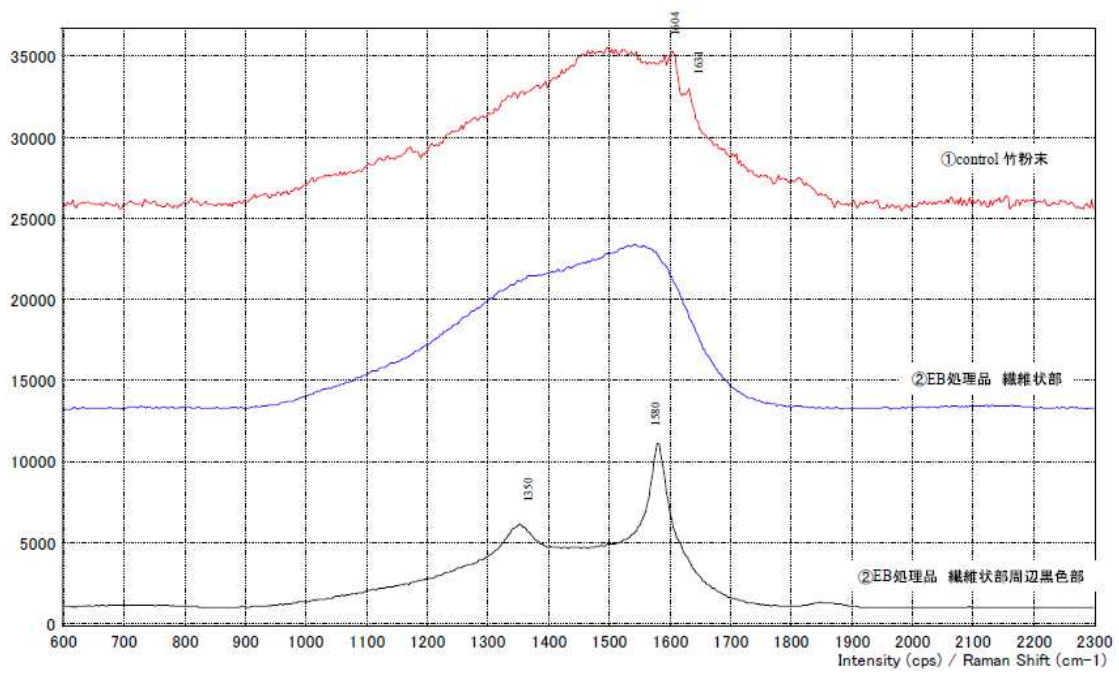


図 4.7-5 ラマンスペクトルの比較 ベースライン補正後

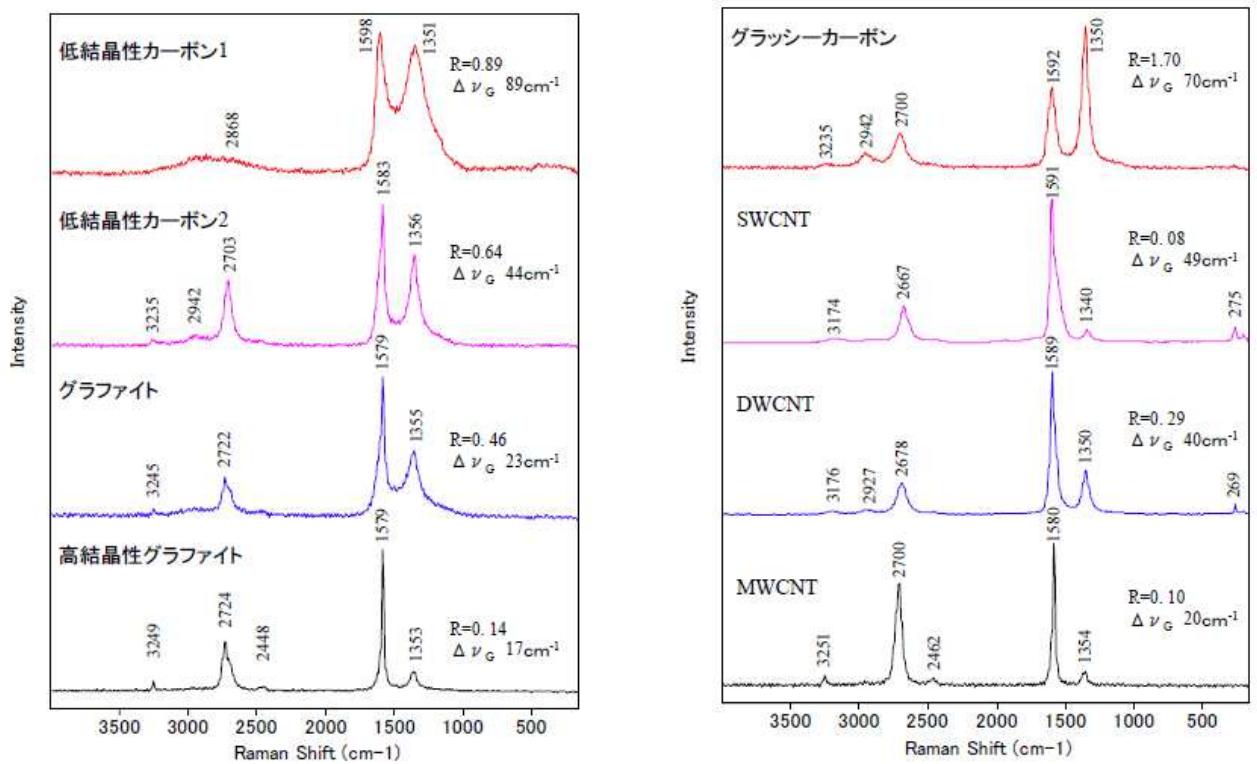


図 4.7-6 各種カーボン材料のラマンスペクトル

4.8 量子ビーム照射処理木質バイオマス粉末の電子顕微鏡観察

量子ビーム照射処理を行った木質粉末の形状を調べるため、電子顕微鏡観察を行った。紫外線レーザー（355nm）を照射した竹粉末の画像を対照区と共に図 4.8-1 に示す。対照区の粉末は平滑な表面構造が観察され、レーザー処理区では表面が対照区と比較して粗く、5000 倍画像では表面に繊維状の溝が観察された。

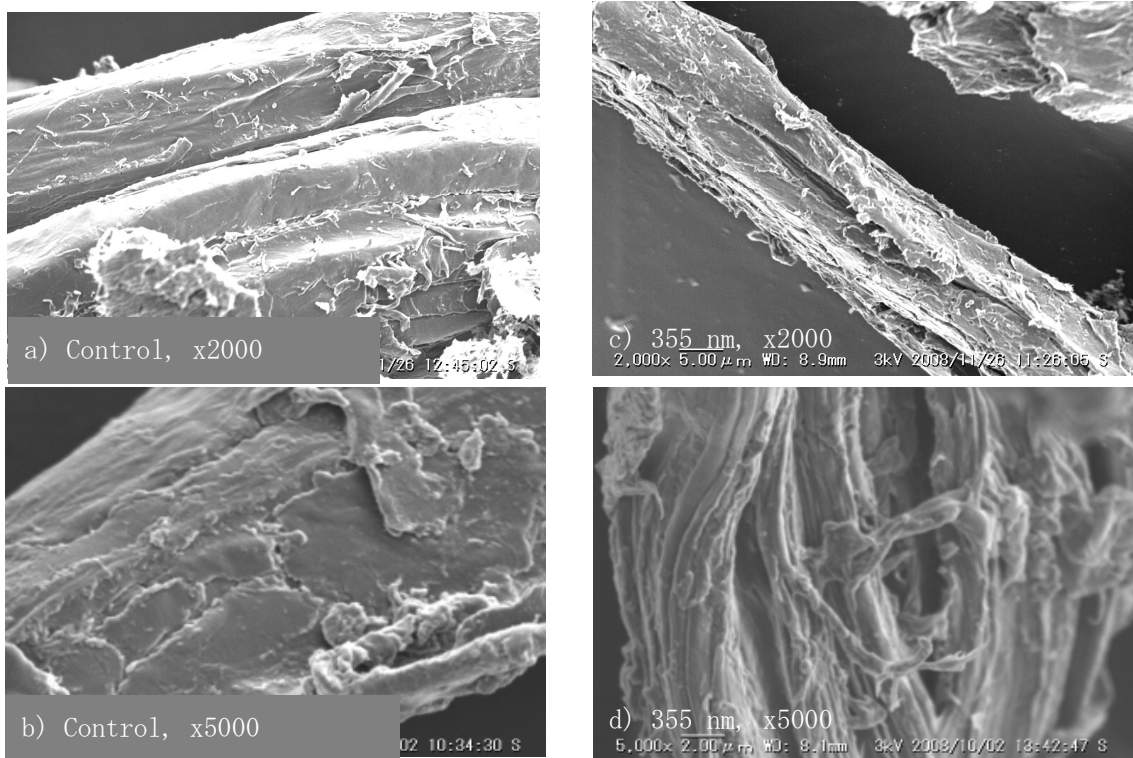


図 4.8-1 355nm のパルスレーザーを照射した竹粉末の SEM 画像

- a) 対照区, 2000 倍, b) 対照区 5000 倍, c) レーザー処理区 2000 倍,
d) レーザー処理区 5000 倍

また過酸化水素を添加後、電子線処理を行った竹粉末の画像を対照区と共に図 4.8-2 に示す。

水を添加後、電子線を照射した竹粉末には表面にわずかに繊維状の凹凸が観察された。30%過酸化水素+電子線処理区においてはさらに繊維がほぐれた塊状の構造が観察された。

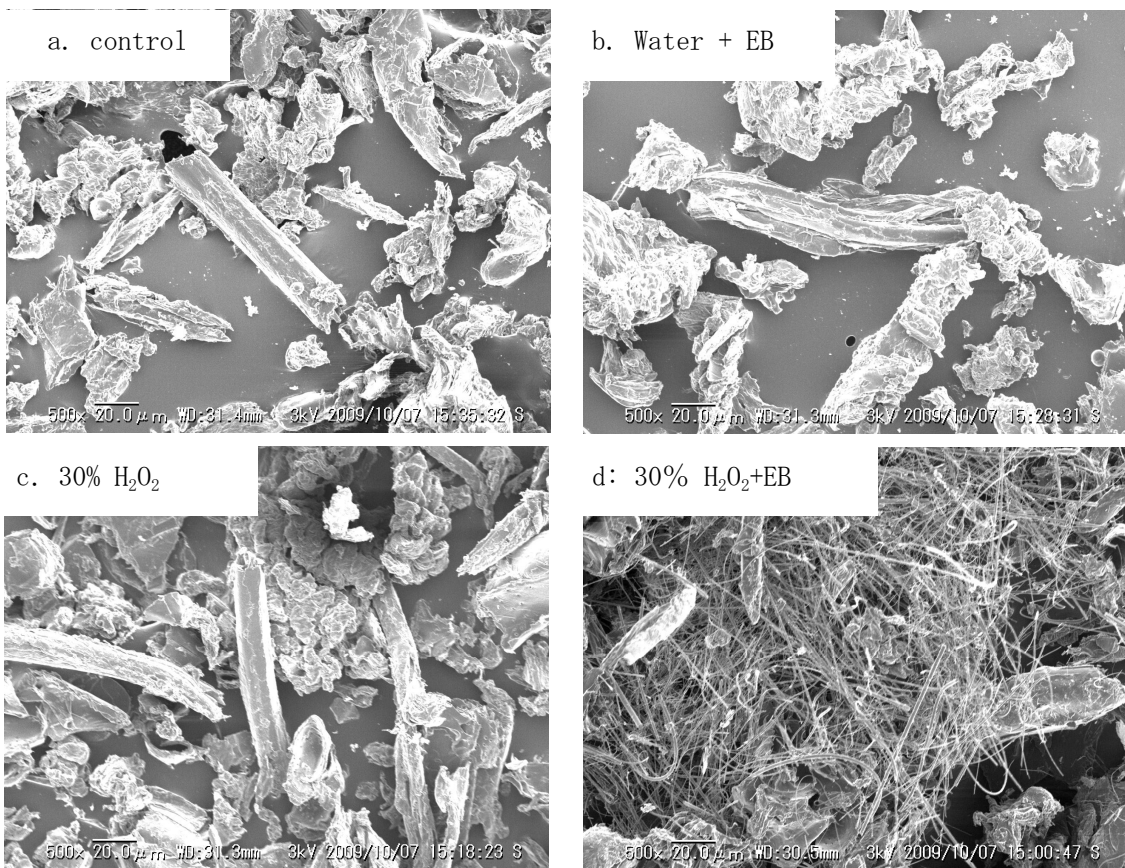


図 4.8-2 電子線を照射した竹粉末の SEM 画像

- a. 対照区：未処理, b. 水+電子線処理区, c. 30% 過酸化水素添加区,
d. 30%過酸化水素+電子線処理区

4.9 フロログルシノール染色によるリグニン分析

量子ビーム照射によるリグニンの変化を調べるためフロログルシノール染色を行った結果を図 4.9-1 に示す。

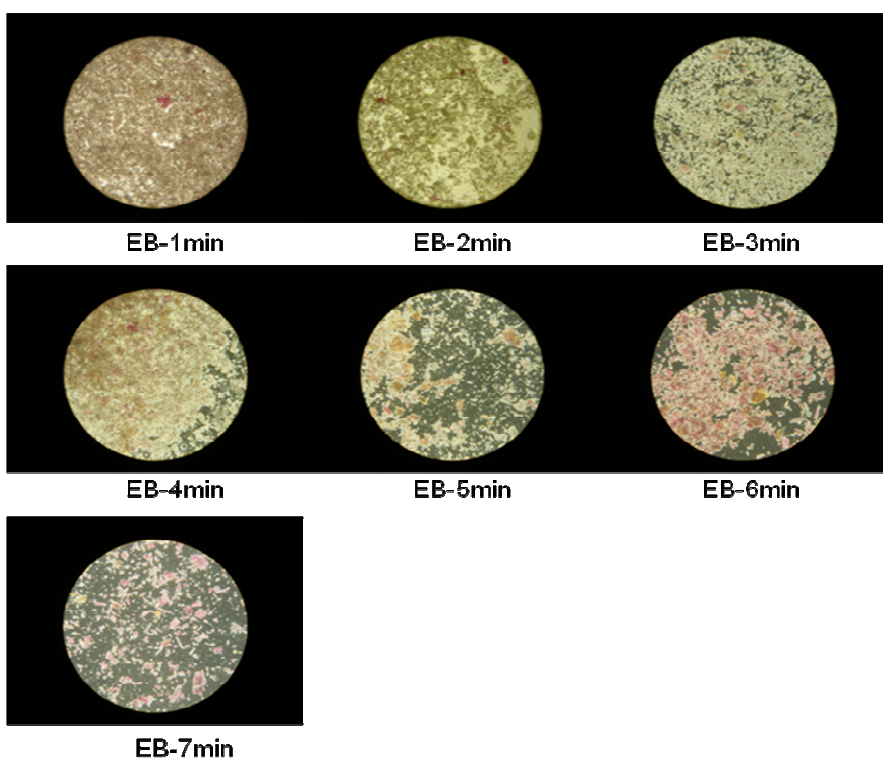


図 4.9-1 電子線照射処理竹粉末のフロログルシノール染色結果

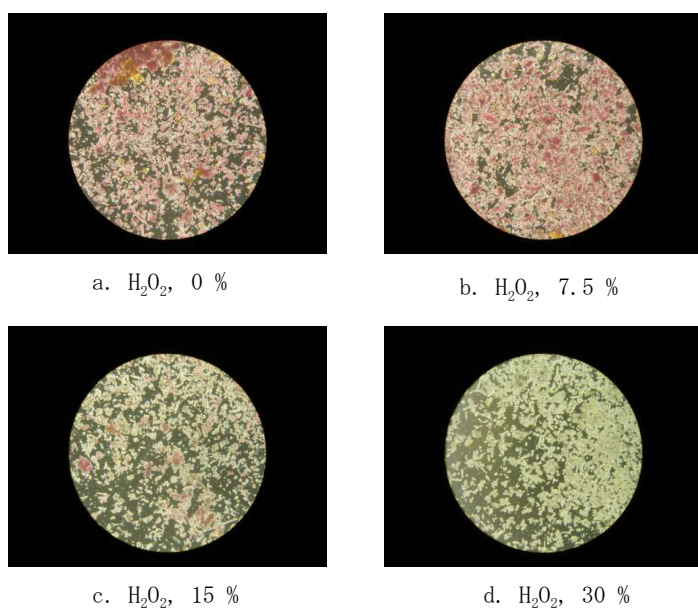


図 4.9-2 過酸化水素濃度の違いによるフロログルシノール染色の違い

4.10 量子ビーム処理リグニンの¹³C-NMR測定

量子ビーム照射処理において、木質バイオマス成分のうちリグニン成分への影響が大きいことが示唆されたため、さらに詳細なリグニンの変化を¹³C-NMR測定法により検討した結果を図4.10-1~5に示す。また、参考データとして竹由来リグニンの¹³C-NMR測定ピーク表とリグニンの構造式を示す(表4.10-1, 図4.10-6)⁹。

本測定ではリグニンへの電子線の影響を調べるため、可溶化リグニンを用い電子線照射による変化を検討した。¹³C-NMR法において定量、定性分析を行った結果、対照区のピーク強度に対し、過酸化水素共存下で電子線照射処理した可溶化リグニンにおいて、56ppm付近のメトキシル、125ppm付近のグアヤシル基とシリングル基のC₁部分、155-142ppmのグアヤシル基のC₃/C₄部分のピーク強度が低下する傾向が認められた。電子線照射によりリグニンの一部の構造が減少したものと推察された。

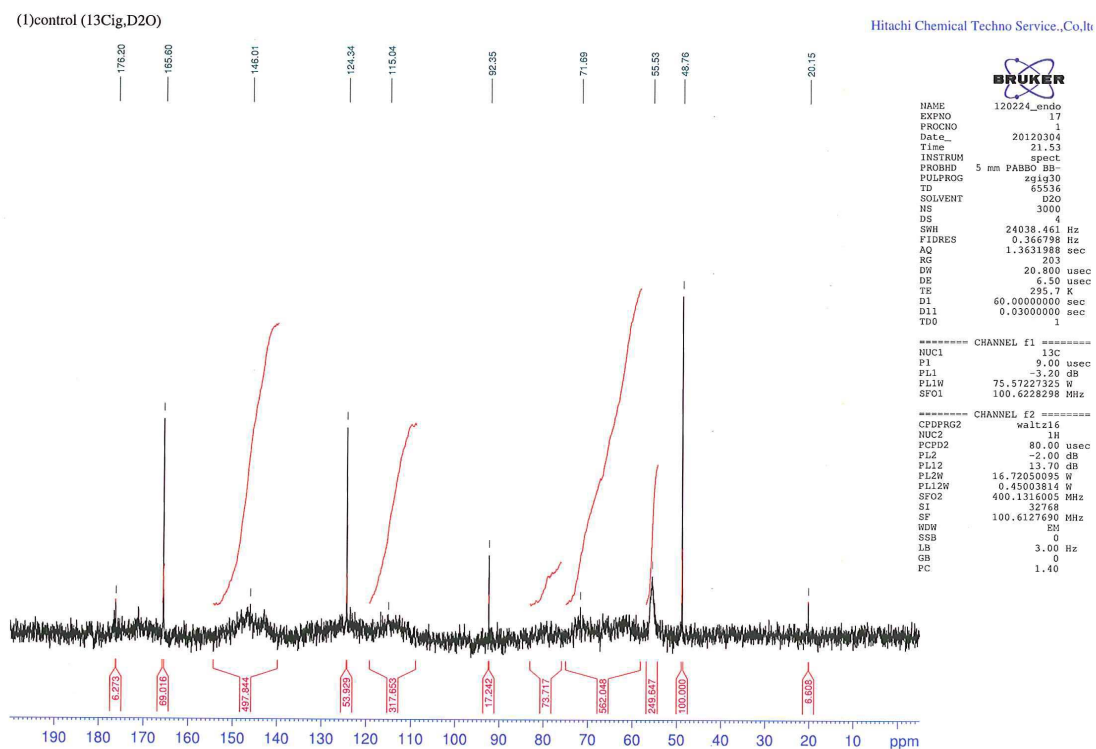


図4.10-1 ¹³C-NMR測定による可溶化リグニン定量分析結果(対照区)

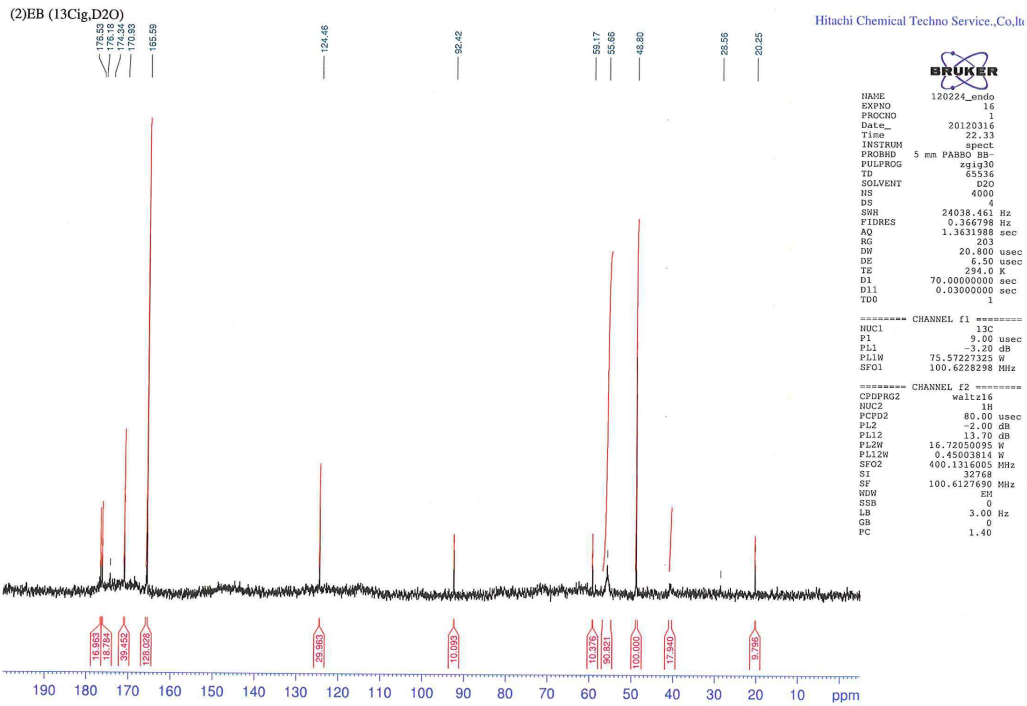


図 4.10-2 ^{13}C -NMR 測定による可溶化リグニン定量分析結果 (電子線照射区)

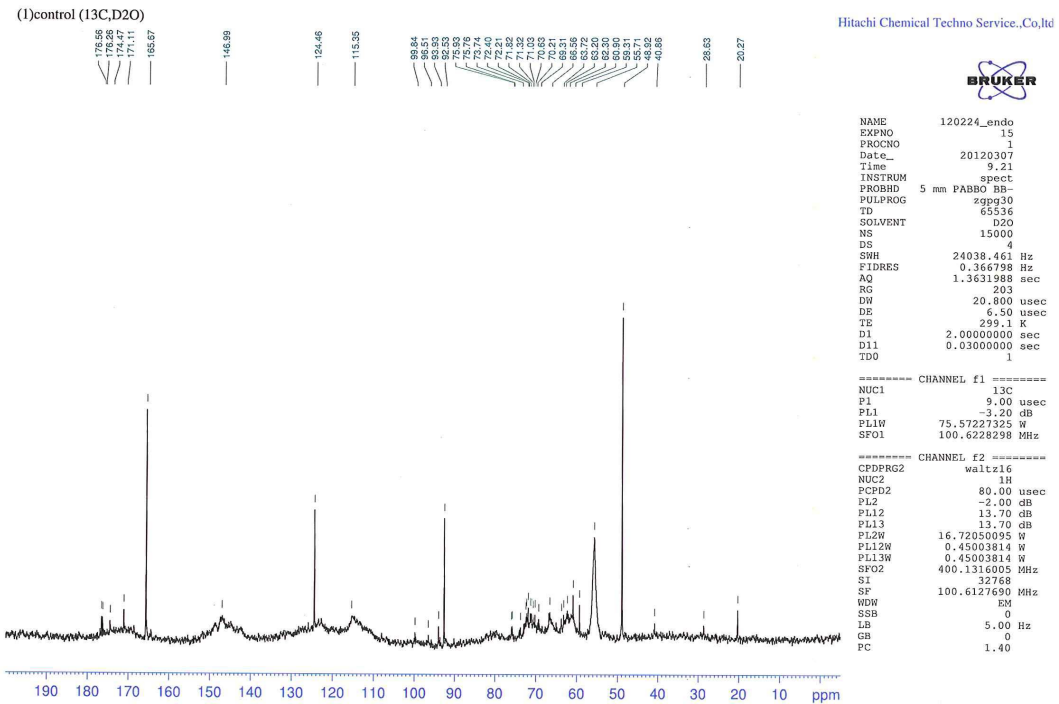
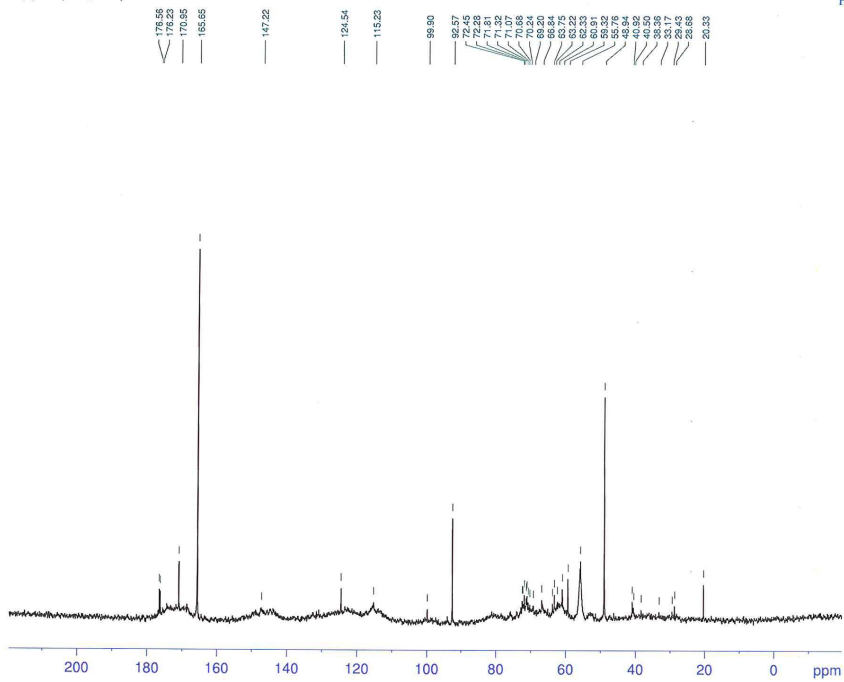


図 4.10-3 ^{13}C -NMR 測定による可溶化リグニン定性分析結果 (対照区)

(2)EB (13C,D2O)



Hitachi Chemical Techno Service, Co., Ltd



```
NAME 120224_endo
EXPNO 14
PROCNO 1
Date_ 20120308
Time 12.08
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 15000
DS 4
SWH 24038.461 Hz
FIDRES 0.366798 Hz
AQ 1.3631988 sec
RG 203
DW 20.800 usec
DE 6.50 usec
TE 299.2 K
D1 2.0000000 sec
D11 0.0300000 sec
TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 9.00 usec
PL1 -3.20 dB
PL1W 75.57227325 W
SFO1 100.6228298 MHz

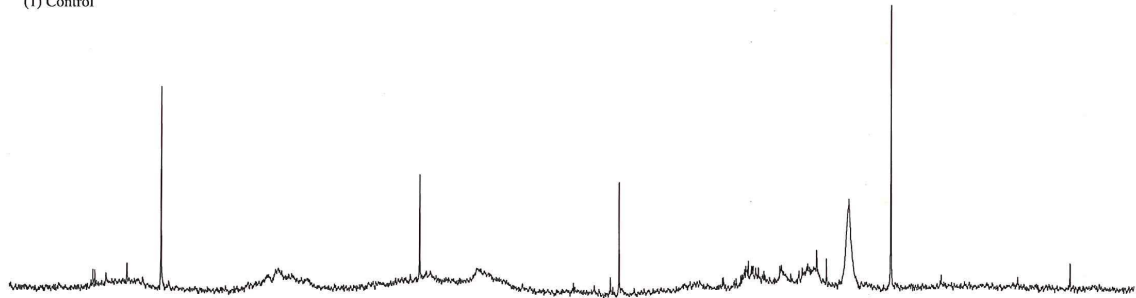
===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -2.00 dB
PL12 13.70 dB
PL13 13.70 dB
PL2W 16.72050095 W
PL12W 0.45003814 W
PL13W 0.45003814 W
SFO2 400.1316005 MHz
SI 32768
SF 100.6127690 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 5.00 Hz
GB 0
PC 1.40
```

図 4.10-4 ^{13}C -NMR 測定による可溶化リグニン定性分析結果 (電子線照射区)

重ね書き

Hitachi Chemical Techno Service.,Co.,Ltd

(1) Control



(2)EB

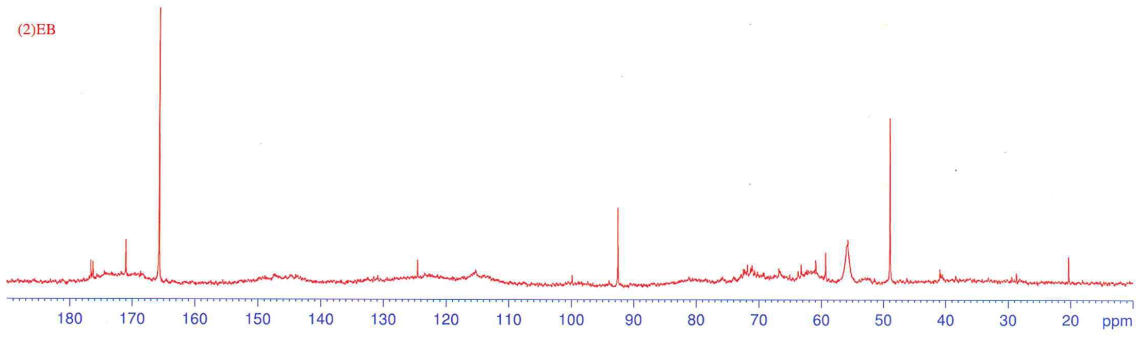


図 4.10-5 ^{13}C -NMR 測定による可溶化リグニン分析結果 重ね書き

Table 3. Signal Assignment of ¹³C NMR Spectrum of Bamboo lignin (L4)

Chemical Shift Range (ppm)	Assignments
183–181	C=O in spirodienone unit
168–166	C=O in conjugated COOR
162–158	C ₄ in H unit
155–142	C ₃ /C ₄ in G units, C ₃ /C ₅ in S units, C ₉ in cinnamate
140–123	C ₁ in G, S, and H units, C ₄ in S, C _{2/6} in H
123–118	C ₆ in G units
117–113	C ₅ in G, C _{3/5} in H, C ₈ in cinnamate
113–110	C ₂ in G units
109–103	C ₂ /C ₆ in S units
90–78	C _β in β-O-4, C _α in β-5 and β-β
78–67	C _α in β-O-4
65–62	C _γ in β-5 and β-O-4 with C _α =O in G and S units
61–57	C _γ in β-O-4 without C _α =O
56–54	Methoxyl
53–51	C _β in β-β and C _β in β-5 structures

The peak at δ 160 ppm is indicative of *p*-hydroxyphenyl (H) units. The characterization of guaiacyl (G) and syringyl (S) units in the lignin is identified by the peaks in the regions 125–110 ppm and 109–103 ppm, respectively. Tai et al. (1990) reported that the bamboo MWL and Kraft lignin were composed of syringyl, guaiacyl, and *p*-hydroxycinnamic acids, and this was consistent with these previous findings. The relatively strong signals at 78 to 76 ppm correspond to β-O-4' linkages, which are the major linkage types in bamboo (Shao et al. 2008; Tai et al. 1990).

表 4.10-1 竹リグニン ¹³C-NMR スペクトルにおける化学シフトの特性値⁹

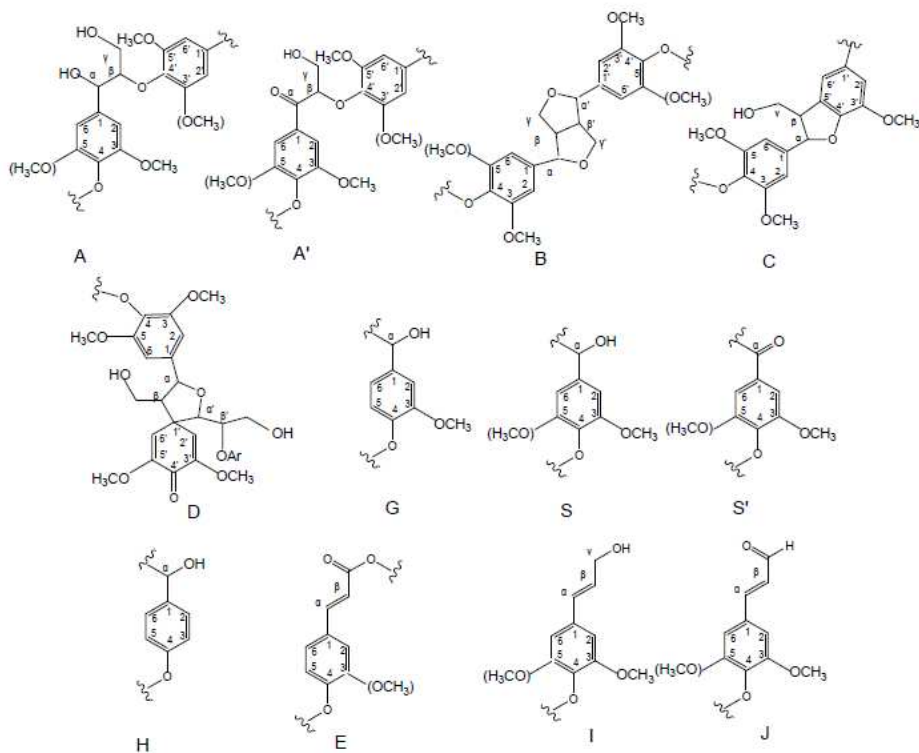


Fig. 6. Main structures of bamboo lignin (L4) involving different side-chain linkages, and aromatic units identified by HSQC. (A) β -O-4 linkages; (A') β -O-4 linkages with a carbonyl group at C_a; (B) resinol structures formed by β - β' / α -O- γ' / γ -O- α' linkages; (C) phenylcoumaran structures formed by β -5'/ α -O-4' linkages; (D) spirodienone structures formed by β -1'/ α -O- α' linkages; (E) cinnamate unite; (I) cinnamyl alcohol end-groups; (J) cinnamaldehyde end-groups; (G) guaiacyl unit; (S) syringyl unit; (S') oxidized syringyl unit with a carbonyl group at C_a (phenolic). (H) *p*-hydroxyphenyl unit

図 4.10-6 竹リグニンの主要化学構造⁹

4.11 量子ビームによる木質の糖化効果

本研究で得られたデータから量子ビーム照射処理による糖化率の算出を行った。木質への量子ビーム（電子線，レーザー）照射は乾式では一部が炭化してしまうため，本研究では湿式を用いた。量子ビーム照射後の木質サンプルは固体の沈殿した液体状態となり，固体部と液体部が存在する。本研究において糖化効果の高かった電子線照射処理では，固体部にセルラーゼを反応させ酵素処理を行った結果，最大還元糖量は 378 mg/g であった（図 4.2-7）。また電子線照射処理後の液体中の最大還元糖量は 150 mg/g であった（図 4.2-4）。

還元糖とは，塩基性溶液中でアルデヒド基またはケトン基を形成する糖のことであり，グルコースやフルクトースなどの全ての単糖，オリゴ糖が含まれる。

本研究で得られた還元糖の分析値にはセルロース由来とヘミセルロース由来が混在していることが考えられる。4.1 の結果より，タケセルロース含有率が 44.6%であり，ヘミセルロースは 26%と報告¹⁰されていることから，タケのセルロースとヘミセルロースが全て還元糖に分解されたと仮定すると，タケに含まれる総還元糖量は 706 mg/g となるため，本研究で得られた電子線照射によるタケの糖化率は 75%と算出された。

5. 結論

本研究課題における目標は、量子ビーム、パルスレーザーと電子線、による木質廃棄物のリグニン分離、糖化向上効果の高い条件を決定すること(糖化率の達成目標 70%)、量子ビームを導光・照射する管体の設計を行い、量子ビームの効率のよい照射系を作成すること、光前処理後にセルラーゼ産生微生物とアルコール発酵微生物の固体培養を行い、光前処理の発酵系に対する影響を解析し、最も効率よく発酵を行う前処理条件を見出すことである。

本研究において過酸化水素処理や電子線照射処理には、オリゴ糖や多糖を分解してグルコースやキシロースを生成する効果があることが確かめられた。さらに、電子線照射処理には、グルコースが直接生成することに加えオリゴ糖を生成する効果もあることがわかった。また、電子線照射処理直後にはグルコースが 5.14g/L、キシロースが 3.98g/L、セロオリゴ糖が 4.17g/L、キシロオリゴ糖が 3.19g/L 生成していたと計算され、処理後に水で希釈することなくその後の糖化等に利用することが重要であることもわかった。ただし、過酸化水素処理では、グルコースやキシロースの過分解も起こっていることが示唆され、過酸化水素の濃度を最適化する等により、グルコースやキシロースの過分解を抑制することが必要であると考えられた。本研究で得られた電子線照射による糖化率は還元糖量から算出して 75%であった。タケの濃度が 250g/L に相当するように調製して酵素糖化をおこなえば、17.3g/L のグルコースが生成可能であるとも計算された。電子線照射による木質の高効率糖化効果はラマン分光、NMR 法、電子顕微鏡解析などの定性分析結果から、リグニンの変性や多糖類の低分子化に関与していることが示唆され、また木質繊維がほぐれその後の酵素処理の効果が高められたことによることが考えられた。

本研究の成果は、パルスレーザー(波長可変型)と電子線による木質廃棄物のリグニン分離、糖化向上効果の高い条件を選定し、レーザーにも糖化を高める効果はあるものの、量子ビーム照射処理は電子線においてより効果が高く、セルラーゼ添加による糖化効率を高める効果があることが認められたこと、過酸化水素添加条件下における電子線照射前処理を行った後、セルラーゼを加えた際の糖化率は 75%となったこと、酵素を用いず電子線と過酸化水素による前処理で木質に含まれる多糖類をオリゴ糖まで直接分解できたこと、電子線を導光・照射する管体を設計し効率のよい照射系が確立出来たことである。

6. 研究発表

6.1 学会発表

1. 太田万理, 増田早苗, 藤田勝吉, 柳沢雄太郎, 本澤洋江, 鈴木英夫, 鈴木鐵也
電子線照射によるリグノセルロースのセルラーゼ糖化向上効果
日本農芸化学会 2012 年大会, 2012 年 3 月 23-25 日, 京都
2. 徐芸萌, 松尾遼, 中村奏美, 富樫万理, 鈴木鐵也, 藤田勝吉, 柳沢雄太郎, 鈴木英夫, 中崎清彦
電子線照射処理したタケ微細粉末からのエタノール生成
日本化学工学会第 44 回秋季大会, 2012 年 9 月 19-21 日, 仙台

6.2 知的財産権の取得状況

特許

特開 2011-182646 リグノセルロース系バイオマスの処理方法

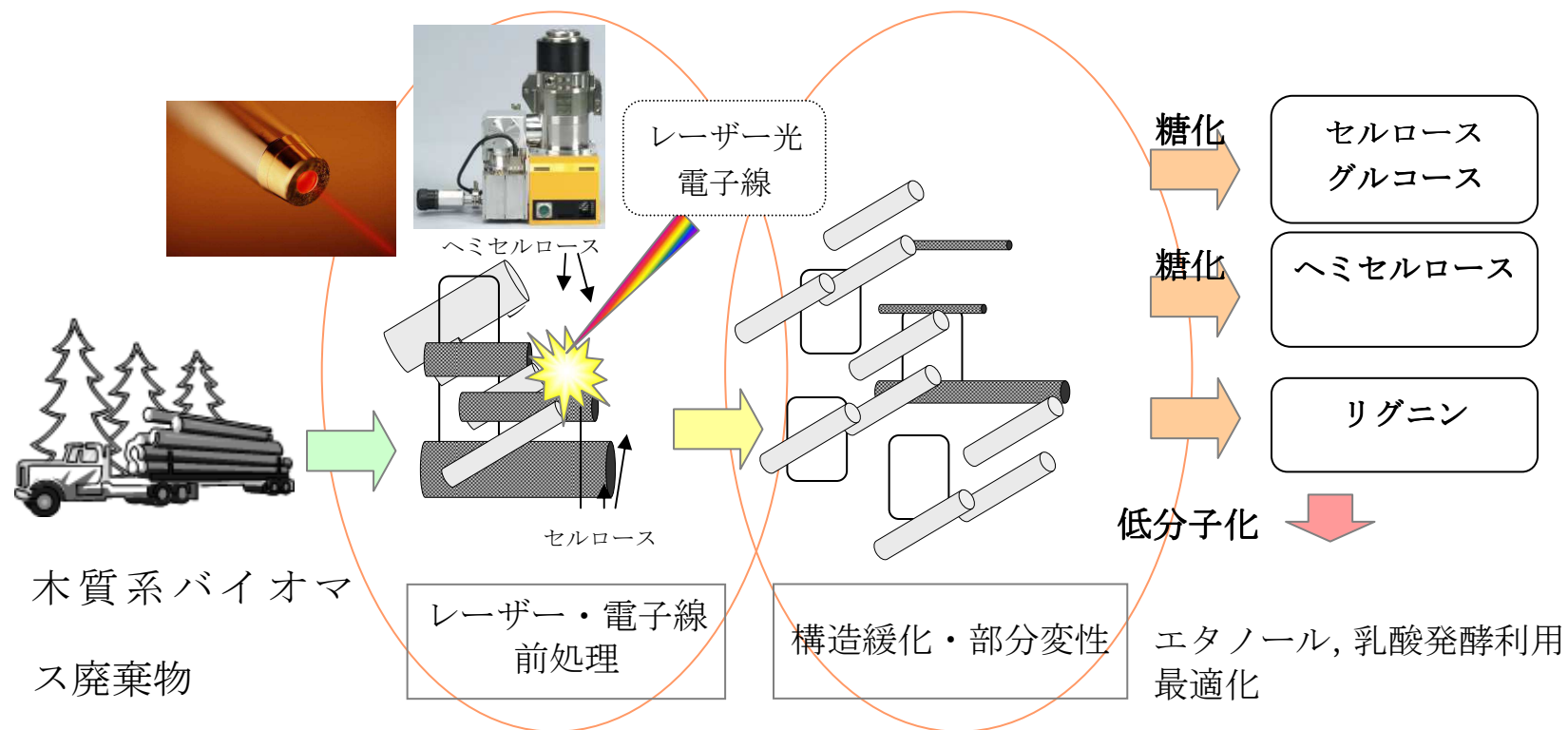
発明者：太田 万理, 鈴木 鐵也, 柳沢 雄太郎, 藤田 勝吉, 鈴木 英夫

7. 引用文献

- 1 Yanagisawa, M., Nakamura, K., Ariga, O., Nakasaki, K., Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides. *Process Biochemistry* 46, 2111-2116 (2011)
- 2 Zhu, J.Y., Gleisner, R., Scott, C.T., Luo, X.L., Tian, S., High titer ethanol production from simultaneous enzyme saccharification and fermentation of aspen at high solids: A comparison between SPORL and dilute acid pretreatments. *Bioresource Technology* 102, 8921-8929 (2011)
- 3 Oberoi, H.S., Vadlani, P.V., Brijwani, K., Bhargav, V.K., Patil, R.T., Enhanced ethanol production via fermentation of rice straw with hydrolysate-adapted *Candida tropicalis* ATCC 13803. *Process Biochemistry* 45, 1299-306 (2010)
- 4 Chen, H., Han, Y., Xu, J., Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. *Process Biochemistry* 43, 1462-1466 (2008)
- 5 Geddes, C.C., Mullinnix, M.T., Nieves, I.U., Peterson, J.J., Hoffman, R.W., York, S.W., et al., 2011. Simplified process for ethanol production from sugarcane bagasse using hydrolysate-resistant *Escherichia coli* strain MM160. *Bioresource Technology* 102, 2702-2711 (2011)
- 6 Jin, M., Lau, M.W., Balan, V., Dale, B.E., Two-step SSCF to convert AFEX-treated switchgrass to ethanol using commercial enzymes and *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST). *Bioresource Technology* 101, 8171-8178 (2010)
- 7 Yamashita, Y., Sasaki, C., Nakamura, Y., Effective enzyme saccharification

- and ethanol production from Japanese cedar using various pretreatment methods.
Journal of Bioscience and Bioengineering 110, 79-86 (2010)
- 8 吉川正信, ダイヤモンド状炭素膜のラマンスペクトル, NEW DIAMOND, vol. 4, No. 2, 16-21 (1988)
 - 9 M-F. Li, Y-M. Fan, R-C. Sun and F. Xu, Characterization of bamboo lignin, BioResources, vol.5 (3), 1762-1778 (2010)
 - 10 大垣佳寛, 原孝佳, 一國伸之, 島津省吾, 固体触媒を用いた竹バイオマス中のヘミセルロースの選択的分解, 東京都立産業技術研究センター研究発表会要旨集, vol.2010, 62 (2010)

図 木質系バイオマスの高効率糖化光処理技術開発の概略図



9. 英文概要 (Brief Summary)

Research title: Development and evaluation of high-efficient saccharification processing of lignocellulosic biomass by irradiation with quantum beams

Project reader: Mari Ohta Togashi, PhD. (Graduate School for Creation of New Photonics Industries)

Project member: Kiyohiko Nakasaki, PhD. (Tokyo Institute of Technology)

Abstract:

In this study, we aimed for development high efficiency bioethanol production techniques by degradation of lignocelluloses biomass into monosaccharide by the preprocessing with the quantum beam (a laser and electron beam) in conjunction with enzyme processing and performed ethanol fermentation.

The high saccharification effect was observed in preprocessing of the electron beam, and the pretreatment method of electron beam with hydrogen peroxide generates glucose and xylose without using enzymes.

After having preprocessed the electron beam irradiation under the hydrogen peroxide, the saccharification rate was 75% when using cellulase.

From the results of qualitative analysis such as Raman spectrum, the NMR method, the electron microscope analysis, it was suggested that the degradation of polysaccharide and denaturation of lignin participated in the high efficiency saccharification effect by the electron beam irradiation.

Key words: lignocellulose, saccharification, quantum beam, electron beam