

1 木質バイオマスの前処理及び糖化手法に関する研究

1-1 はじめに

地球温暖化防止に向けた二酸化炭素削減や循環型社会構築、環境産業の主導権確保という観点から石油代替となるバイオエタノールの生産が活発になっている。バイオエタノールは、燃焼時に発生する二酸化炭素を原料となるバイオマスが吸収するため、理論上二酸化炭素を発生させないカーボンニュートラルという特性を有する。現在、バイオエタノールは、アメリカやブラジルを中心として、サトウキビやコーン等の食糧資源から生産されているが、世界の人口増加に対応して、食糧から燃料を作ることへの批判が高まっている。食糧や飼料と競合しないリグノセルロースからのバイオエタノールは第二世代バイオエタノールと呼ばれ、その実用化が望まれており（図 1）、世界中で熾烈な研究開発が行われている。我が国では、土地利用問題や農作物生産コストの観点から、廃棄物系バイオマスの利用が妥当である。「バイオマス・ニッポン総合戦略」によれば、日本における廃棄物に関わる木質系バイオマスの年間発生量は、建設発生木材、林地残材や未利用樹を合わせて年間約 2400 万 t（図 2）になり、エタノールに換算すると約 540 万 kl に及ぶ。

リグノセルロースを主要構成成分とする木質系バイオマスからバイオエタノールを生産するには、前処理、糖化、発酵、蒸留精製工程が必要である（図 3）。前処理および糖化処理後に得られる単糖類は、再生可能エネルギーだけでなく、バイオマテリアルの原料にもなるため、両処理はバイオリファイナリー社会構築の基盤技術である。リグノセルロースは主にセルロースとヘミセルロースとリグニンなどが複雑な三次元構造を持っていて、セルロースにヘミセルロースやリグニンが強固に絡み合っている状態であるため、セルロースを分解する酵素の使用のみでは基質になかなか接近できず、加水分解することは困難である。そこで、図 4 に示すように、前処理をすることによって、リグノセルロースの繊維を離解し、リグニンの一部を除去し、酵素の接近性を高めることが重要である。前処理の成否により後段の糖化で用いられる酵素量や、そこで得られる糖化率も大きく変わる。

従来の前処理法の一つである濃硫酸法は、既に確立された技術であるが、糖の過分解、中和時に発生する石膏の処理、薬品耐性プラントの必要性、硫酸回収時の消費エネルギーが大ききことなどが問題になっていた（Sun and Cheng, *Bioresour. Technol.*, 2002）。希硫酸法も、硫酸中和による石膏発生の問題や薬品耐性プラントの必要性は同様に存在する。カナダにある Iogen 社の爆砕法（Tolan, *Clean Technol. Environ. Policy*, 2002）は、低濃度の硫酸を投入しており、基本的に上記と同様の問題を抱えている。アンモニア爆砕法（Teymouri et al., *Bioresour. Technol.*, 2005）は比較的糖化しやすい草本類の研究例が多いが、木材に対する効果は不明な点が多い。さらに、以上に挙げた手法では、下流工程に移行する際に pH 調整や、微生物の生育阻害物質を除く必要がでてくる。また、糖化酵素量を減らすための環境低負荷型前処理としては、ボールミル処理のようなエネルギー消費型前処理が必要であり、前処理コストが嵩むという問題を同様に抱えていた。

本研究では、リグノセルロースからのバイオエタノール生産を目指し、低コストで高糖化率を可能にする環境低負荷型前処理の開発を目的とした。木質系バイオマスのモデルとしてヒノキ（*Chamaecyparis obtuse*）を選択し、非硫酸処理法として効果の高い従来法の一つであるボールミル処理およびオルガノソルブ法の条件検討を行い、市販糖化酵素による加水分解試験を行った。

各種セルラーゼ酵素製剤およびアクセサリ酵素を用意し、酵素活性及びたんぱく量を明らかにしたうえで、酵素の組み合わせを検討し、本研究で得られる前処理物の糖化に適した酵素カクテルの開発を行った。

1-1-1 直接酸糖化法および酵素糖化法

木質系バイオマスから単糖を得る手法として、硫酸を用いた直接糖化法と酵素糖化法がある(図1-1-1)。

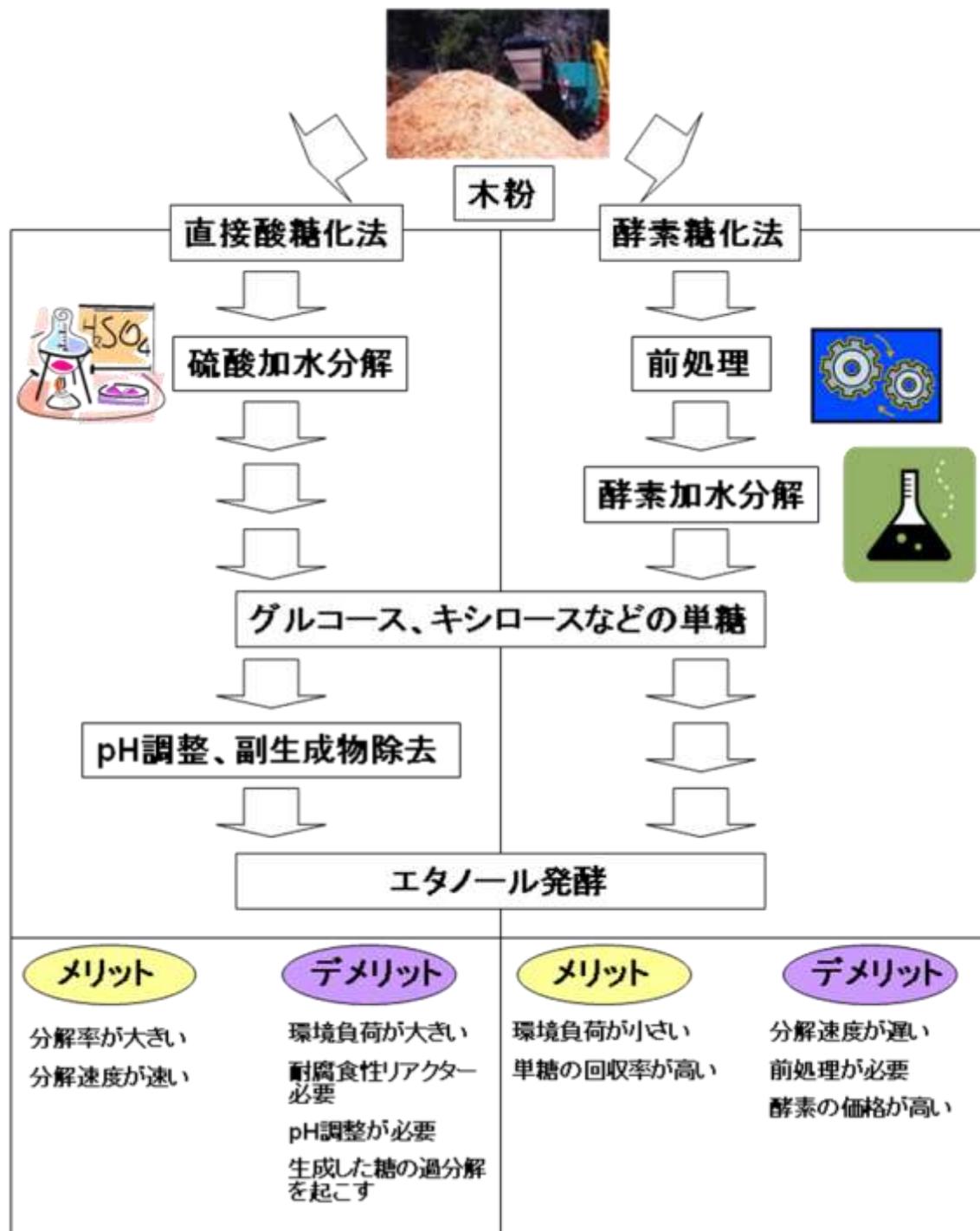


図 1-1-1 直接糖化法と酵素糖化法のフローチャート

図 1-1-1 の硫酸を用いた処理は最もよく知られている方法である(Grethlein and Converse et al.,1991) and (Knappert et al., 1980)。この前処理方法は農業残渣や木質バイオマス中のリグニン-ヘミセルロースの強固な構造を壊すことを可能にし、ヘミセルロース分解においてよく用いられるようになった。硫酸で直接糖化を行う方法は経済的などの観点から広く評価され続けてきた。しかし、この主流なプロセスはいくつかのデメリットがある(Teramoto et al., 2008)。まず、製造に用いた硫酸の回収や廃液処理は高コストであり、環境負荷も高い。また、単糖を生成したときにフルフラールのようなアルデヒドを形成することで、多糖の単糖への変換収率が低下し、EtOH 発酵プロセスを阻害する。そして、硫酸が反応容器を腐食させることも問題である。オートクレーブ製造メーカーによると、ステンレススチール(SUS304 and SUS316)の腐食率は 0.25%以下の硫酸を沸点まで使用したときでさえ 1.25mm / year 以上であり、一方で、20%以上の酢酸(AA)を沸点まで使用したときは 0.125mm / year 以下である。また、図 1-1-1 にも示すように pH 調整が必要でそれ以降のプロセスを複雑にさせる。

一方、酵素糖化法でも、反応速度が遅いことや酵素の価格が高いこと、前処理が必要なことが問題点として挙げられているが、硫酸などの鉱酸を用いたときのデメリットを払拭する環境負荷が低いことや単糖の回収率が高いなどのメリットがあり、近年では酵素糖化法を用いることが多くなっている(Ja Kyong Ko et al., 2009) and (Krisztina Kova'cs et al., 2009)。しかし、リグノセルロースは主にセルロースとヘミセルロースとリグニンなどが強固に絡み合っている状態であるため、酵素のみでは基質になかなか接近できず、加水分解することは困難である。そのため、前処理をすることによって、リグノセルロースの繊維を離解し、リグニンの一部を除去し、酵素の接近性を高めることが重要である。前処理には様々な種類がある。

1-1-2 前処理

ディスクミルを用いた物理的方法(Hideno et al., 2009)や、水蒸気爆砕のような物理化学的方法(Maekawa., 1996)、イオン液体を用いた化学的方法(Hua Zhaoa et al., 2009)、菌類を用いた脱リグニンのような生物学的方法(Sánchez, 2009)、オゾンによる方法(Rebecca, 2007)や、またそれらを組み合わせた方法など、現在までに多くの前処理方法が開発されており、個々の前処理は表 1-1-1 のようにメリット、デメリットを両方持ち、処理方法、処理条件や原料によって選択される。

表 1-1-1 様々な前処理方法のメリット、デメリット

Pretreatment method	Advantages	Disadvantages
Biological	- Degrades lignin and hemicellulose - Low energy consumption	- Low rate of hydrolysis
Milling	- Reduces cellulose crystallinity	- High power and energy consumption
Steam explosion	- Causes lignin transformation and hemicellulose solubilization - Cost-effective - Higher yield of glucose and hemicellulose in the two-step method	- Generation of toxic compounds - Partial hemicellulose degradation
AFEX	- Increases accessible surface area - Low formation of inhibitors	- Not efficient for raw materials with high lignin content - High cost of large amount of ammonia
CO ₂ explosion	- Increases accessible surface area - Cost-effective	- Does not affect lignin and hemicelluloses - Very high pressure requirements
Wet oxidation	- Do not imply generation of toxic compounds - Efficient removal of lignin - Low formation of inhibitors	- High cost of oxygen and alkaline catalyst
Ozonolysis	- Minimizes the energy demand (exothermic) - Reduces lignin content - Does not imply generation of toxic compounds	- High cost of large amount of ozone needed
Organosolv	- Causes lignin and hemicellulose hydrolysis	- High cost - Solvents need to be drained and recycled
Concentrated acid	- High glucose yield - Ambient temperatures	- High cost of acid and need to be recovered - Reactor corrosion problems - Formation of inhibitors
Diluted acid	- Less corrosion problems than concentrated acid - Less formation of inhibitors	- Generation of degradation products - Low sugar concentration in exit stream

(P. Alvira et al.,)

リグノセルロースに対する各前処理の効果を表 1-1-2 に示した。

表 1-1-2 リグノセルロースバイオマスに対する各前処理の効果

	Milling	Steam explosion	LHW	Acid	Alkaline	Oxidative	AFEX	ARP	Lime	CO ₂ explosion
Increases accessible surface area	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
Cellulose decrystallization	H	-	n.d.	-	-	n.d.	H	H	n.d.	-
Hemicellulose solubilization	-	H	H	H	L	-	M	M	M	H
Lignin removal	-	M	L	M	M	M	H	H	H	-
Generation of toxic compounds	-	H	L	H	L	L	L	M	M	-
Lignin structure alteration	-	H	M	H	H	H	H	H	H	-

H: high effect; M: moderate effect; L: low effect; n.d. not determined.

(P. Alvira et al.,)

LHW:水熱処理、AFEX:アンモニア爆砕処理、ARP:アンモニア浸漬処理

水熱処理やオルガノソルブ法は表面積の増大とヘミセルロースやリグニンの溶解に効果が高い。本研究は混合溶媒を用いたオルガノソルブ法とボールミルを組み合わせた前処理を中心に検討を行った。

1-1-3 スギ及びヒノキの糖組成

組成分析

スギ及びヒノキを木材の主成分分析の手法により分析した結果を表 1-1-3 に示す。表 1-1-3 には、比較のため、バガスの分析結果も示す。

表 1-1-3 スギ及びヒノキの主成分(wt%)

	セルロース	ヘミセルロース	リグニンなど	水分
スギ	53.2	11.8	24.1	10.9
ヒノキ	55.4	13.8	19.2	11.6
バガス	36.7	31.2	22.2	9.9

- ① スギとヒノキを比較すると、セルロース、ヘミセルロースの多糖はヒノキが多い。
- ② したがって、多糖を全てエタノールに改変できたとすると、各々の原料 1kg から最高で 474ml、505ml のエタノールを得ることが出来る。

1-2 亜臨界水処理による糖化法の検討

1-2-1 糖化試験方法

原料の糖化試験は、下記手順に従い、実施した。

- ① 各試料を 105℃の乾燥機中に恒量になるまで放置し、含水率を測定する。
- ② 湿潤試料を容量 7.5ml の反応管(写真.1)に封入する。
- ③ 所定のスラリー濃度となる様、試料に溶媒を投入し、空隙部分をアルゴンで置換した後、密封する。
- ④ 所定温度に保ったソルトバス(写真.2、Thomas 科学製)に、反応管を投入し、振とうしつつ所定時間保持した後、ソルトバスの手前にある水槽で急冷する。
- ⑤ 反応管を開放し、蒸留水で管内を洗浄するなどして処理物を試験管に移す。
- ⑥ 水相と固相を分離し、取り出した水相を蒸留水で 25ml にメスアップする。メスアップした水相は、そのまま或いはオリゴ糖を酸加水分解した後、HPLC により糖及びフルフラール類の分析を行う。



写真1 反応管の外観



写真2 ソルトバスの外観

1-2-1-(1) ヘミセルロース糖化

スギ及びヒノキに対し、溶媒を希薄な有機酸水溶液として 200℃で糖化試験を行った結果を図 1-2-1 及び図 1-2-2 に示す。

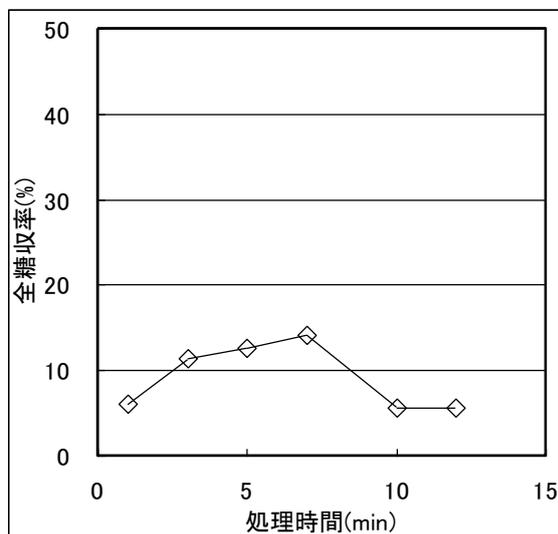


図 1-2-1 スギの糖化試験結果

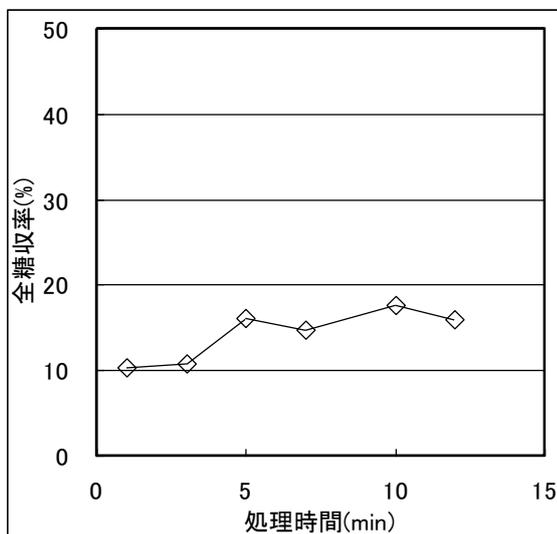


図 1-2-2 ヒノキの糖化試験結果

なお、全糖とは、検出された単糖及びオリゴ糖を合計したものであり、収率は処理に使用した乾燥ベースの原料を基準として算出した。

- ① 図から、スギよりもヒノキの方が糖化しやすい傾向が見られるが、それほど明確な傾向ではない。
- ② また、長時間の処理では発酵阻害物であるフルフラール類の生成するため、ヘミセルロースの糖化に適した時間は、スギは処理時間 7min、ヒノキは処理時間 5min がヘミセルロースの糖化に適していると考えられる。
- ③ ②の条件におけるスギ、ヒノキ各々からの糖収量は、140g/kg、164g/kg である。

1-2-1-(2) セルロース糖化

スギを 7min、ヒノキを 5min で処理した残渣に含まれるセルロースに対し、溶媒を希薄濃度の有機酸水溶液とし、260℃・4min で処理を行った。

その結果、スギからは 51g/kg、ヒノキからは 69g/kg の糖収量が得られた。

1-2-1-(3) エタノール収量

3 及び 4 で得られた糖が、完全にエタノールに改変できた場合の原料 1kg 当たりのエタノール収量は、スギ：125ml、ヒノキ：153ml である。

1-2-1-(4) まとめ

以上の結果をまとめると表 1-2-1 の通りとなる。

表 1-2-1 スギ、ヒノキからの生成エタノール量

	スギ	ヒノキ
ヘミセルロース由来糖収量 (g/kg)	140	164
セルロース由来糖収量 (g/kg)	51	69
糖収量合計 (g/kg)	191	233
生成エタノール量 (ml/kg)	125	153

ヘミセルロース、セルロースの処理条件の適正化は実施していない状態で、最大 150L/t のエタノールが得られる可能性がある。

但し、セルロースからの糖収量が低く、改善が必要である。

1-2-2 セルロースの糖化性向上 I

セルロースからの糖収量改善を目的とし、セルロースの構造面からの検討を行った。

1-2-2-(1) セルロースからの糖収率向上の検討について

1) セルロースの構造について

天然セルロースは、セルロース I 型であり、図 1-2-3 の構造である。

セルロース I 型には、図 1-2-3 中に示される様に、 $O(3)\cdot H\cdots O(5)$ 及び $O(2)\cdot H\cdots O(6)$ の二つの分子内水素結合が存在している。また、分子間水素結合も存在する。

ヘミセルロースの反応性に比べ、セルロースの反応性が低いのは、これらの水素結合が存在するためである。

したがって、これらの水素結合を切断することにより、セルロースの反応性の向上が期待できる。

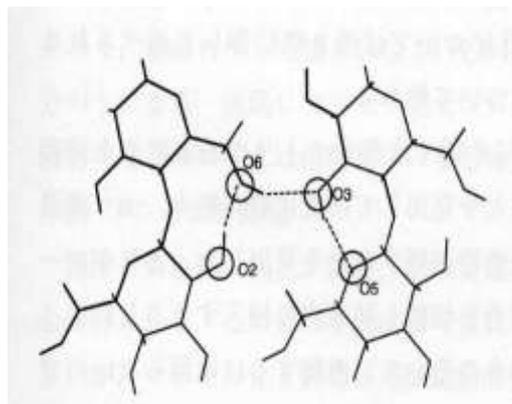


図 1-2-3 セルロース中水素結の模式図

2) セルロースの構造改変について

天然セルロースを溶解させ、再生して再生セルロースとすることで、セルロースの結晶形態を I 型から II 型へと改変することが可能である。

セルロース II 型は、 $O(2)\cdot H\cdots O(6)$ の分子内水素結合が存在せず、セルロース I 型より反応性が向上しているものと考えられる。

以上から、セルロース I 型とセルロース II 型で反応性が改善するか、実際に糖化試験を行い、検討した。

1-2-2-(2) セルロースⅡ型の反応性について

セルロースⅠ型とセルロースⅡ型の反応性の比較を行うに当たり、リグニンその他の影響を排除するため、セルロースⅠ型としては試薬セルロース(フナセルⅡ、フナコシ製)、セルロースⅡ型としては再生セルロースを試料として用いることとした。

糖化試験結果を図 1-2-4・図 1-2-6 に示す。

なお、パラメータは処理温度とし、220℃、240℃、260℃の3条件とした。但し、セルロースⅠ型については反応性が低く、250℃程度以下では殆ど反応しないため、260℃のみで試験を行った。

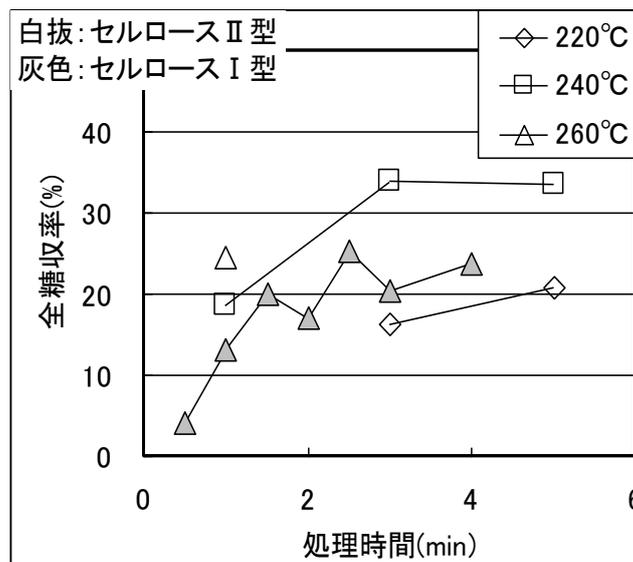


図 1-2-4 全糖収率に及ぼすセルロースの結晶形態の違いの影響

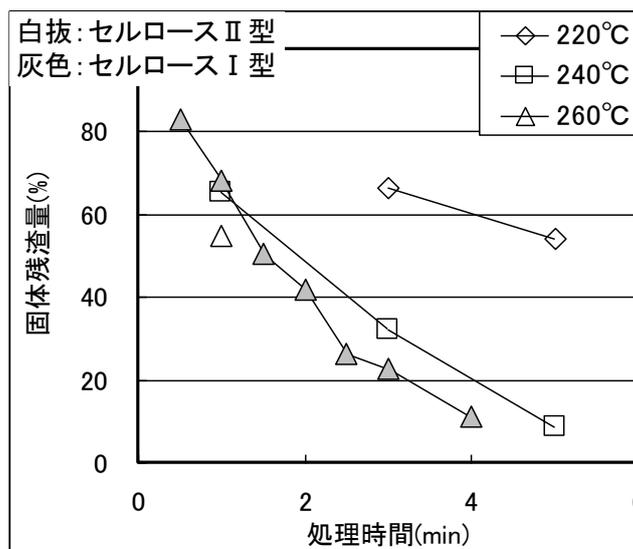


図 1-2-5 固体残渣量に及ぼすセルロースの結晶形態の違いの影響

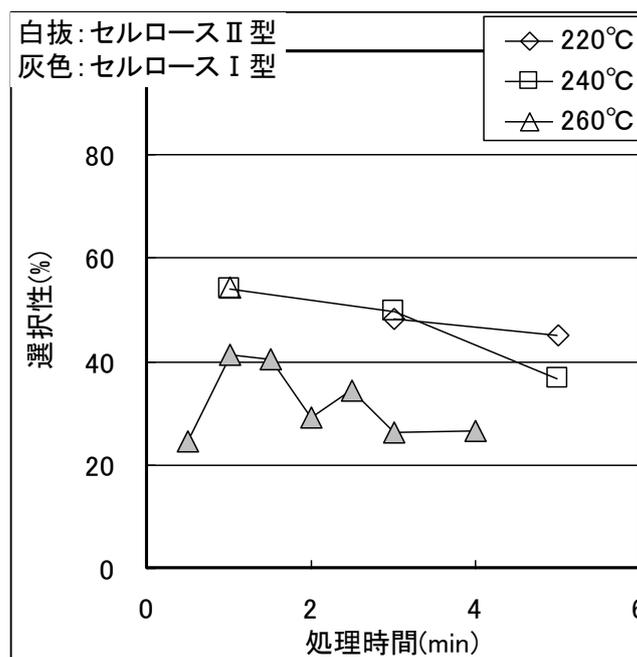


図 1-2-6 選択性に及ぼすセルロースの結晶形態の違いの影響

- ① セルロース II 型の方が、セルロース I 型より同一条件での全糖収率が高く、また、固体残渣量も少ない。したがって、セルロース II 型は、セルロース I 型より反応性が高くなっていることが確認できた。
- ② 更に、セルロース II 型では、240°C でもセルロース I 型を 260°C で処理した程度以上の糖収率が得られた。
- ③ 選択性(=可溶化した部分の内、糖に改変された割合)は、セルロース II 型の方が大幅に高い。これは、セルロース II 型の反応性が高くなって全糖収率が高くなる傾向にあると共に、低い反応温度では生成した糖の分解速度が小さくなるためである。

以上から、セルロース I 型である試薬セルロースを用い、セルロース II 型へと改変することにより反応性が向上するか、検討を行った。

1-2-2-(3) 薬剤前処理によるセルロース結晶形態改変の効果

試薬セルロースを薬剤前処理(薬剤に溶解させ、溶解液を貧溶媒へと投入)することで再生セルロースとし、試験に供した。なお、処理温度は240℃とした。

試験結果を図1-2-7、図1-2-8に示す。

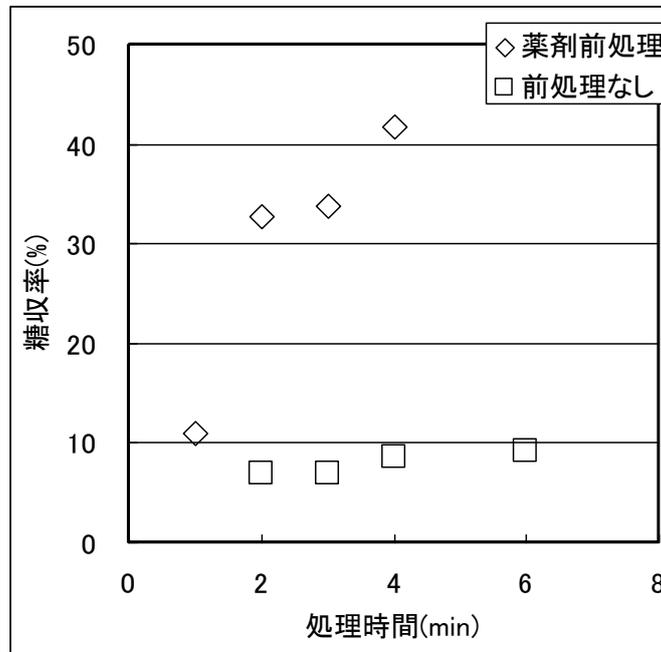


図1-2-7 薬剤前処理の効果の確認

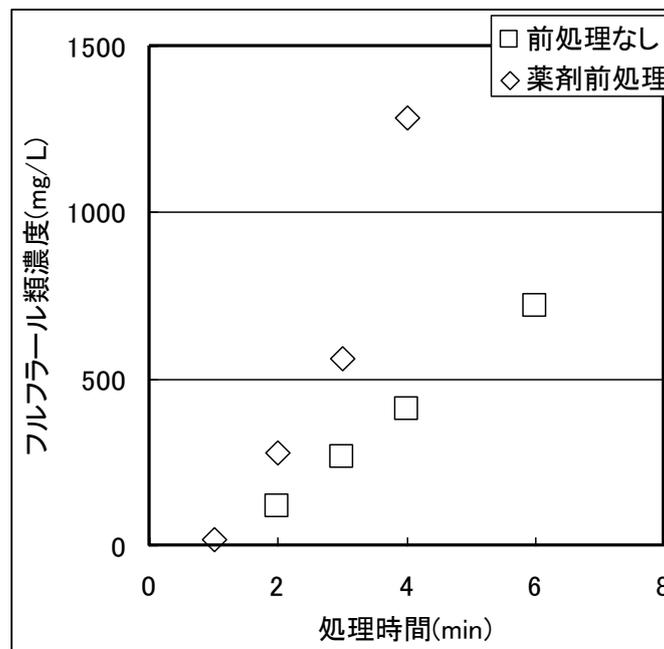


図1-2-8 フルフラール類濃度の変化

- ① 薬剤前処理することにより、2) の結果と同様、セルロースの反応性が向上し、比較的低温である 240℃で 40%以上の全糖収率が得られ、薬剤前処理の効果が確認できた。
- ② 但し、全糖収率の向上と共に、フルフラール類濃度が 1000mg/L を越えており、発酵など後工程への悪影響が懸念されるため、更なる低温での糖化を目指す必要がある。

1-2-2-(4) まとめ

今年度の検討の結果、セルロースの結晶形態を改変することで、エネルギー的に有利な低温で、高い糖収率が得られることを確認した。

1-2-3 セルロースの糖化性向上 II

セルロース結晶形態を I 型から II 型に改変することで、糖収率が向上することを確認したが、簡易な前処理方法について検討を行った。

1-2-3-(1) 試薬セルロースの結晶形態の改変について

試薬セルロースを酸性の薬剤 A に浸せきした後、冷暗所で一定時間保持し、その後、薬剤 A を除去することで、セルロース結晶形態を変化させた。

結晶形態の変化を XRD で確認した結果を図 1-2-9、図 1-2-10 に示す。

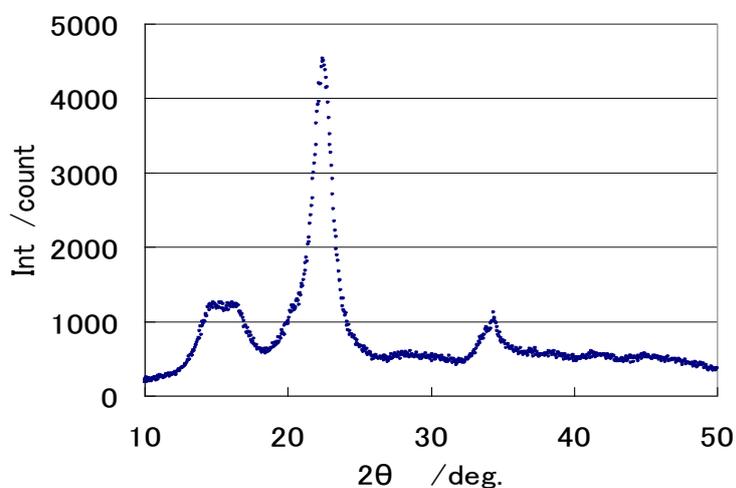


図 1-2-9 試薬セルロースの XRD 結果

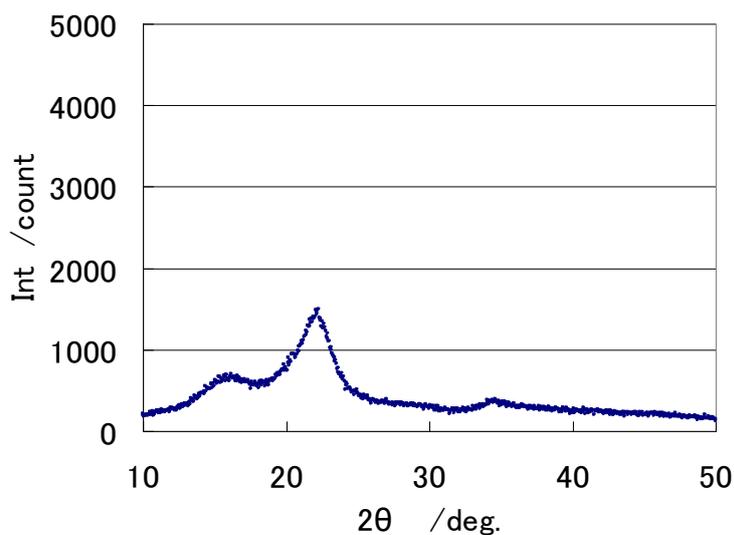


図 1-2-10 薬剤 A により前処理した試薬セルロースの XRD 結果
XRD から、セルロースの結晶形態が I 型から II 型に改変されていることが確認できた。

1-2-3-(2) 前処理した試薬セルロースの糖化試験について

1-2-3-(1)で処理した試薬セルロースに対し、240℃、及びコスト低減と過分解物生成抑制のため、より低温の200℃で糖化試験を行った。

なお、前処理効果の明確化のため、240℃での試験時には、薬剤Aを溶媒とした場合についても試験を行った。その結果を図1-2-11及び図1-2-12に示す。

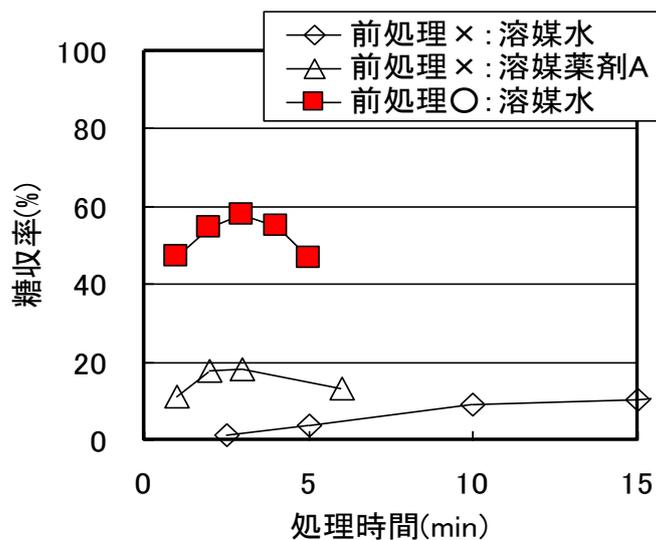


図 1-2-11 薬剤 A で前処理したセルロースの糖化試験結果(240℃)

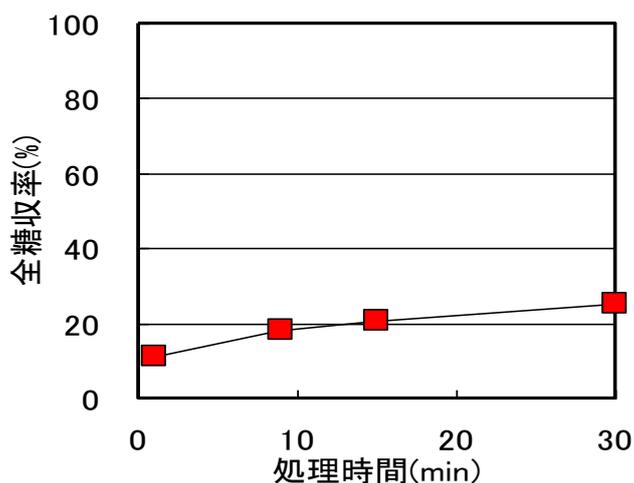


図 1-2-12 薬剤 A で前処理したセルロースの糖化試験結果(200℃)

- ① 前処理することで大幅に糖収率の改善を図ることが可能である。
- ② また、薬剤 A を溶媒にしても大幅な糖収率の向上が認められなかったことから、糖収率の向

上には、前処理によりセルロースの結晶形態を改変することが重要であることを確認した。

③ 処理温度は 200°Cでは不十分である。

1-2-3-(3) 前処理した試薬セルロースの反応性について

前処理の有無による反応後の試薬セルロースの残留割合を図 1-2-13.に示す。また、試薬セルロースの反応が一次反応と仮定した場合に想定される残渣割合を曲線で示す。

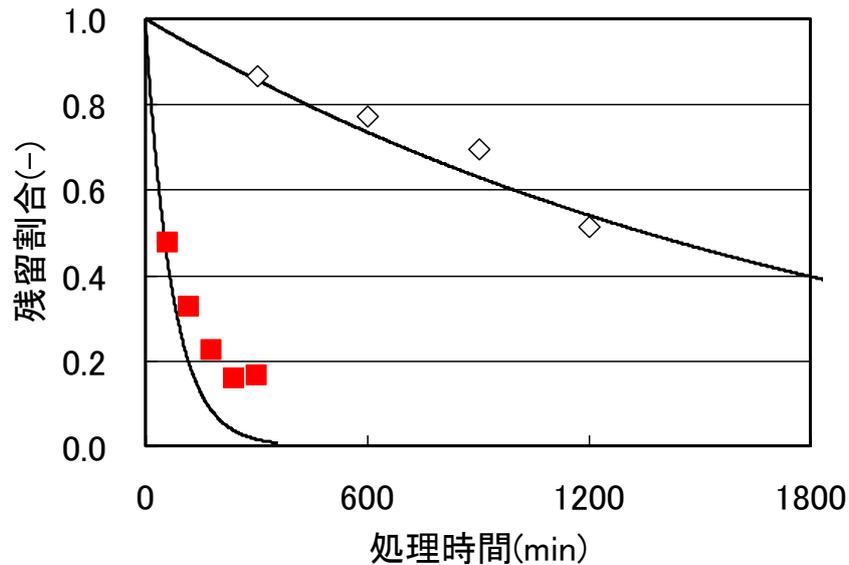


図 1-2-13 処理による残留割合の変化

① 反応速度定数は、前処理することで約 30 倍となり、反応性が大幅に向上することが定量的に確認できた。

1-2-3-(4) まとめ

今年度の検討の結果、薬剤 A を用いた比較的簡単な方法でセルロースの結晶形態を改変することで、240°C程度の温度で高い糖収率が得られることを確認した。

1-2-4 まとめ

これまでの検討により、以下のことが言える。

- ① スギ及びヒノキから、熱水法による糖化が可能であることを確認した。
- ② セルロースからの糖収量改善のためには、結晶形態を I 型から II 型に改変することが有効であることを確認した。

1-3 オルガノソルブ法の検討

【目的】

約 20~30 分間のボールミル処理により、ヒノキの糖化率が大きく増大したが、ボールミル処理にかかる消費エネルギーは大きい。そこで、ボールミル処理の短縮化または省略化を目的として、ボールミル処理の前段に消費エネルギーの小さい処理として知られているオルガノソルブ処理を検討した。オルガノソルブ処理条件としては、溶媒種、溶媒混合比率、反応温度、反応時間、添加する酸の種類について検討を行い、酵素糖化によって評価した。

1-3-1 各種溶媒の検討

【材料および方法】

ヒノキサンプルは 1-4 に準じた。マントルヒーターを装着した SUS316 製高圧容器(内径 1 cm、長さ 25 cm、図 1-3-1)を用いて、各種溶媒におけるオルガノソルブ法の条件検討を行った。溶媒としては、メタノール(MeOH)、エタノール(EtOH)、エチレングルコール(EG)、グリセロール(Gly)、トルエン(Tol)、水(W)を単独または混合して用いた。容器内に各種溶媒 10 ml、溶媒/木粉の質量比が 5/1 となるよう木粉を添加し、マントルヒーターにより 170°C、30 分間加熱した。反応終了後、100ml エタノールで洗浄し、50°C、3 時間真空乾燥を行った後、乾燥サンプル約 0.6 g、ボール(直径 5 mm) 約 30 g を用いて、400 rpm、10 min で微粉碎処理を行った。前処理物は酵素糖化による加水分解を行った。前処理サンプル 50mg、50mM 酢酸バッファー (pH5) 17ml にセルラーゼ T アマノ 4 (アマノエンザイム社製) を 31 mg (湿重) 添加し、45°C で 48 時間反応させた。反応液を遠心後、上澄み液をムタローゼ・GOD 法により、グルコースの定量を行った。

得られたグルコース量から、基質に含まれるホロセルロース量をサンプルに含まれる糖量に対する収率で評価した。計算式を(式 1)に示す。

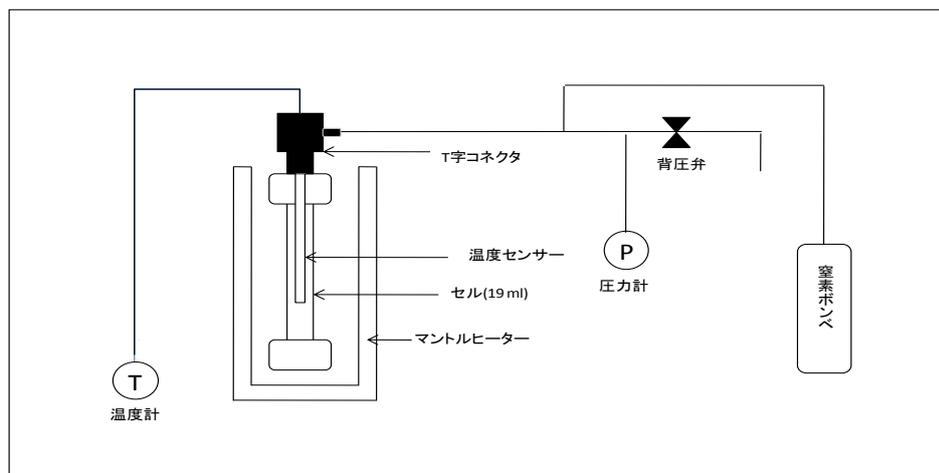


図 1-3-1 水熱処理装置

$$\text{グルコース収率 (\%)} = 100(0.9a)/b \quad (\text{式 1})$$

a: 生成グルコース量(mg)

b: サンプル中に含まれるホロセルロース量(mg)

【結果および考察】

各種溶媒を用いたオルガノソルブ処理物の糖化試験の結果を図 1-3-2 に示す。140℃の反応温度では、EG や Gly といった粘性の高い溶媒を用いた場合、前処理の後水洗することでグルコース収率の増加が確認された。しかしながら、EG については 200℃で反応させた場合、水洗工程を省略できることがわかった。反応溶媒としては一定の割合で W を含む EtOH または EG が適していた。また、酢酸 (A) の添加もグルコース収率の増加に効果があった。

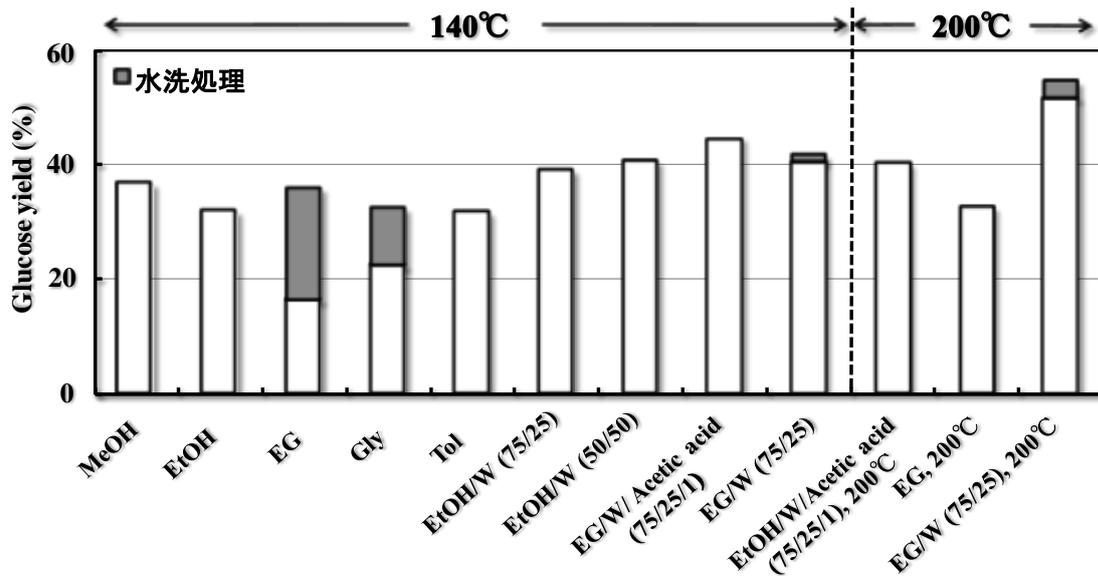


図 1-3-2 各種溶媒を用いたオルガノソルブ処理物の糖化試験

1-3-2 溶媒混合比率の検討

【材料および方法】

ヒノキサンプルは 1-4 に準じた。溶媒としては、EG、EtOH、W を任意の混合比率で混ぜ、A を微量添加したものをを用い、1-3-1 の方法に準じてオルガノソルブ処理を行った。前処理物の糖化試験には、アクレモニウムセルラーゼ（明治製菓株式会社）を用いた。基質 1 g に対し、酵素蛋白質質量 40mg を用いて、45℃、72 時間の酵素反応を行った。反応終了後、反応液の上清を適宜希釈し、1-2 の方法に準じて各単糖の収率を算出した。

【結果および考察】

溶媒の混合比率を変えたオルガノソルブ処理物の糖化試験結果を図 1-3-3 に示す。グルコース収率においては、EtOH100/A1_B10 が最も低く約 42%であった。それ以外の混合溶媒による差は小さかったが、[W100/A1_B10]及び[EG75/W25/A1_B10]が最も高く、それぞれ約 58%であった。キシロース収率では、全体的に低い値を示した。マンノース収率では、混合溶媒による差が大きく、最も低かったのが[W100/A1_B10]で約 19%であった。最も高い値を示した溶媒は、[EtOH75/W25/A1_B10]で約 51%であった。EtOH をベースに混合溶媒を比較したところ、W の比率が高くなるにつれて、マンノース収率が減少する傾向にあった。ヘミセルロース中のマンナンがマンノースやその過分解物にまで加水分解され、反応液中に流出した可能性がある。マンノースは野生型酵母の発酵可能な糖であるため、混合溶媒中の W の割合を 75%未満に抑えることが望ましいと考えられる。

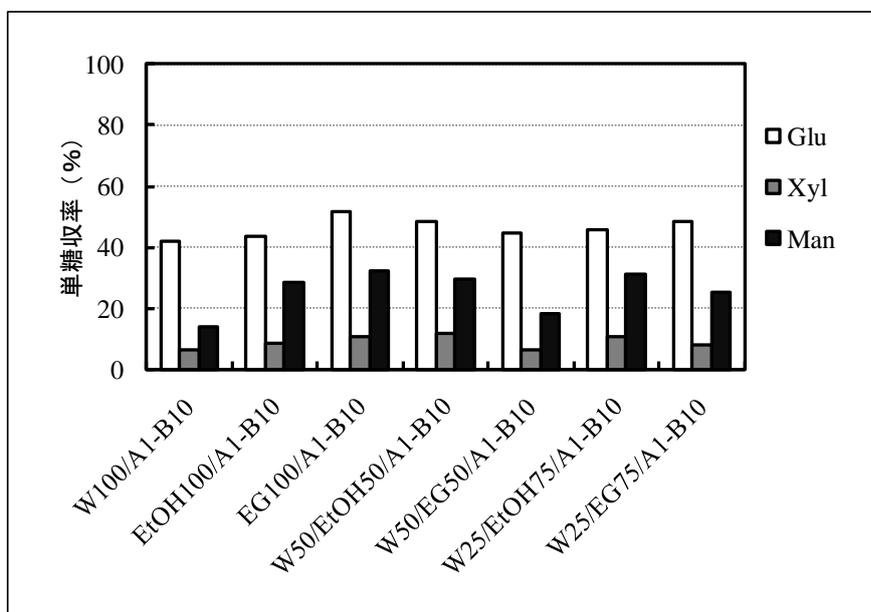


図 1-3-3 溶媒の混合比率が酵素糖化に与える影響

1-3-3 反応温度条件の検討

【材料および方法】

ヒノキサンプルは 1-4 に準じた。オルガノソルブ処理および糖化試験に関しては、1-3-2 の方法に準じた。反応温度条件の検討では、混合溶媒[EtOH75/W25/ or EG75/A1]を用いて、110, 140, 170, 200, 230°C, 30 分間のオルガノソルブ処理をそれぞれ行った。

【結果および考察】

二種類の混合溶媒[EtOH75or EG75/W25/A1]を用いて、オルガノソルブ処理の反応温度を比較した結果を図 1-3-4 に示す。反応溶媒として[EtOH75/W25/A1]を用いた場合、ボールミル処理をしないと、反応温度を増加させても全ての単糖収率において低い値を示した。一方、[EG75/W25/A1]を用いた場合、200°C以上の反応温度であればオルガノソルブ処理のみで 30%以上のグルコース収率が得られた。しかし、さらに温度を増加させると、マンノース収率の低下が起こった(図 1-3-4 (a))。[EtOH75/W25/A1]を用いた水熱処理後にボールミル処理を行った場合では、反応温度 140°C で約 54%のグルコース収率が得られた。[EG75/W25/A1]を用いた場合では、反応温度 140°C で約 60%のグルコース収率が得られたが、マンノース収率の低下も確認された(図 1-3-4 (b))。以上の結果から、混合溶媒を用いた水熱処理条件として、溶媒[EtOH75/W25/A1]では、140°C、溶媒[EG75/W25/A1]では 170°C が反応温度として適していると考えられる。

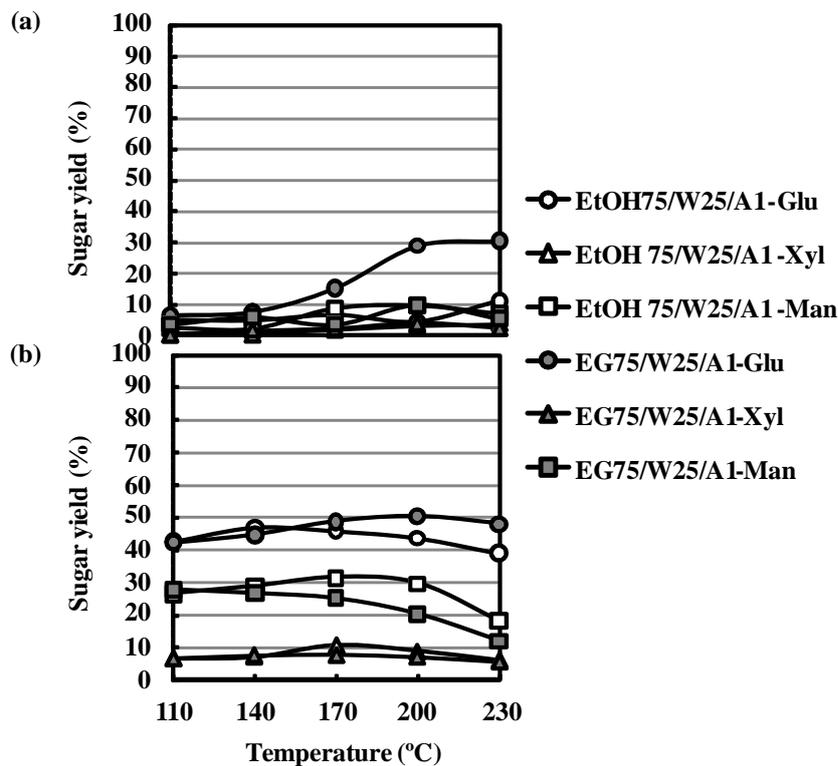


図 1-3-4 各反応温度における単糖比率

1-3-4 反応時間条件の検討

【材料および方法】

ヒノキサンプルは 1-4 に準じた。オルガノソルブ処理および糖化試験に関しては、1-3-2 の方法に準じた。反応時間条件の検討では、混合溶媒[EtOH75 or EG75/W25/A1]を用いて、15、30、60、120 分間のオルガノソルブ処理を行った。

【結果および考察】

溶媒比率の変化と温度変化の最適条件である EG75/W25/A1、170°Cのボールミル 10 分処理を行っていないもの、行ったものそれぞれの時間を変化させてオルガノソルブ処理を行った結果を図 1-3-5 に、その後ボールミル 10 分処理を行った結果を図 1-3-6 に示す。

時間を変化させた結果、ボールミル処理の有無に関わらず 30 分以降は糖収率は増加しなかった。グルコース、キシロース、マンノースを全て加味したトータル糖収率は、ボールミル処理を行わなかった場合、120 分のときに最大となった。しかし、トータル糖収率は 120 分のとき 14.6%、30 分のとき 13.5%と 1.1%しか差がなく、120 分反応させることは高コストに繋がるため、最適な時間は 30 分であるといえる。また、ボールミル 10 分処理を行った場合 30 分から糖収率が下がったのは、オルガノソルブ法によりフルフラールなどが生じたためと考えられる。

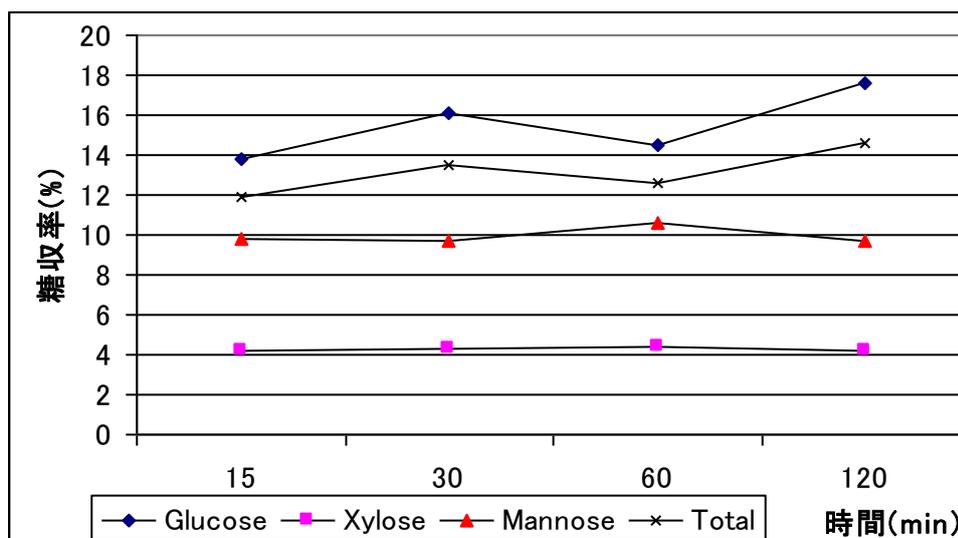


図 1-3-5 核反応時間における単糖比率 (ボールミルなし)

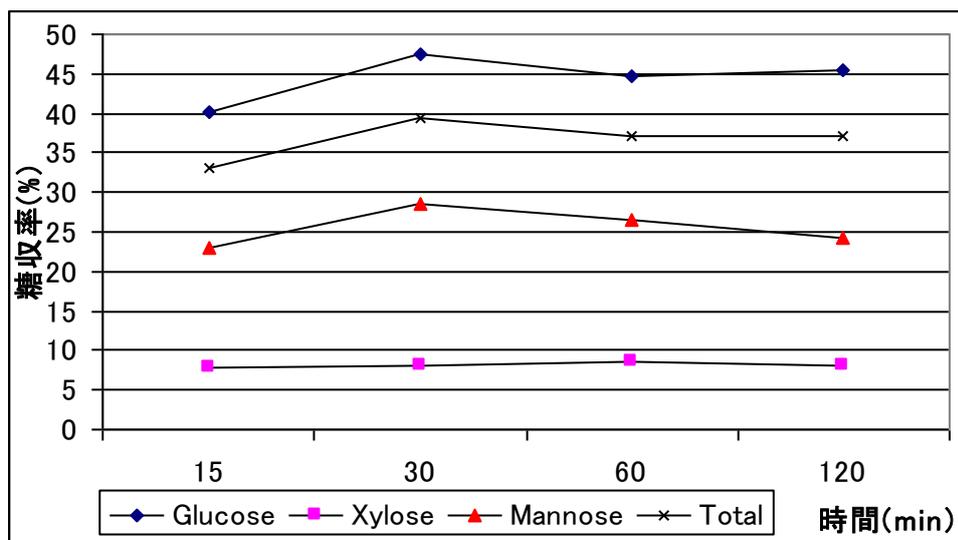


図 1-3-6 各反応時間における単糖比率（ボールミルあり）

1-3-5 微量の酸を用いたオルガノソルブ法の検討

【材料および方法】

ヒノキサンプルは 1-2 に準じた。約 15 g のヒノキおが屑（125~500 μm ）及び反応溶媒 80 ml を入れたガラス内筒（100 cm^3 ）を、TPR-1 型ポータブルリアクター（図. 1-3-7）の金属容器に入れ、所定の位置に取り付けた後、リアクター内部のヘッドスペースを窒素で置換し、0.2 MPa まで窒素を充填した。温度コントローラーを用いて種々の温度、時間で反応を行った後、空冷した。約 400 ml のエタノールを用いてサンプルの洗浄および吸引濾過を行い、残渣を回収し、55 $^{\circ}\text{C}$ 、20~21 時間の真空乾燥を行った後、重量を測定し、固形分収率を求めた。各反応条件を表 1-3-1 に示す。昨年度行った酢酸添加のオルガノソルブ処理物は、ボールミル粉碎処理を行った。サンプル約 1.8 g、ボール（直径 5 mm）約 90 g を用いて、400 rpm, 10 min で微粉碎処理を行った。糖化試験に関しては、1-3-2 の方法に準じた。



図 1-3-7 前処理に使用した反応装置（耐圧硝子工業株式会社、<http://www.taiatsu.co.jp/products/index.htm>）

表 1-3-1 オルガノソルブ処理反応条件

反応液	酸濃度 (%)	時間 (min)	温度 (°C)
EtOH75/W25/AA1	1	30	140
EG75/W25/AA1	1	30	170
EtOH50/W50/SA0.05	0.05	60	200
EtOH50/W50/TFA2	2	60	170
MeOH50/W50/HCl0.4	0.4	45	170

EtOH: エタノール; EG: エチレングルコール; MeOH: メタノール; W: 水; AA: 酢酸; SA: 硫酸; TFA: トリフルオロ酢酸; HCl: 塩酸

【結果および考察】

耐圧リアクターを用いて微量の酸を加えたオルガノソルブ処理の最大圧力および固形分収率を表 1-3-2 に、残渣の構成糖および酸不溶性リグニンの結果を図 1-3-8 に示す。酢酸を添加した昨年度の処理では、固形分収率が高く、重量損失が少なかったが、強酸（硫酸、トリフルオロ酢酸、塩酸）を添加した今年度の処理では固形分収率が低かった。トリフルオロ酢酸および塩酸添加の処理では、約 50%の重量損失があった。

酢酸を添加した昨年度のオルガノソルブ処理物と生ヒノキの構成糖の割合を比較すると、わずかにキシロースおよび酸不溶性リグニンが減少した。一方で、酸を微量添加した今年度のオルガノソルブ処理物では、キシロースやマンノース等のヘミセルロース由来の構成糖が大きく減少（硫酸添加）または消失した（トリフルオロ酢酸、塩酸添加）。その分、セルロース由来の構成糖であるグルコースの割合が増加した。硫酸およびトリフルオロ酢酸添加のオルガノソルブ処理物では、ヘミセルロース由来の構成糖とともに酸不溶性リグニンも減少したが、塩酸添加の処理物ではその割合は生ヒノキとほぼ同じであった。

微量の酸を添加したオルガノソルブ処理物の酵素糖化の結果を図 1-3-9 に示す。72 時間後の糖化液の濃度では、EtOH50/W50/TFA 及び EtOH50/W50/HCl0.4 の結果が最も高く、30 g/l に達し、昨年度の酢酸添加オルガノソルブ処理とボールミル粉碎処理を組み合わせた二種、MeOH50/W50/HCl0.4 と続いた（図 1-3-9 (a)）。ボールミル処理を組み合わせた処理物は、糖化速度が早いものの、20~25 g/l で頭打ちとなった。しかしながら、生ヒノキに含まれる糖を基に算出した糖収率、すなわち固形分収率を考慮した糖収率では、昨年度の二種が 40~45%と高く、EtOH50/W50/TFA 及び EtOH50/W50/HCl0.4 は約 30%であった（図 1-3-9 (b)）。今年度の処理物は、微量の強酸が添加されることで、前処理での重量損失が大きく、固形分収率が低くなり（表 1-3-1 - 1-3-2）、結果的に糖収率も低い結果であった。

表 1-3-2. 各種オルガノソルブ処理の最高到達圧力および残渣の固形分収率

反応液	酸 (%)	時間 (min)	温度 (°C)	最大圧力 (Mpa)	固形分収率 (%)
EtOH75/W25/AA1	1	30	140	0.9	97.00
EG75/W25/AA1	1	30	170	0.5	91.45
EtOH50/W50/SA0.05	0.05	60	200	2.4~2.5	65.02
EtOH50/W50/TFA2	2	60	170	1.3~1.4	52.17
MeOH50/W50/HCl0.4	0.4	45	170	1.5	51.61
EtOH50/W50/HCl0.4	0.4	45	170	1.2	47.73

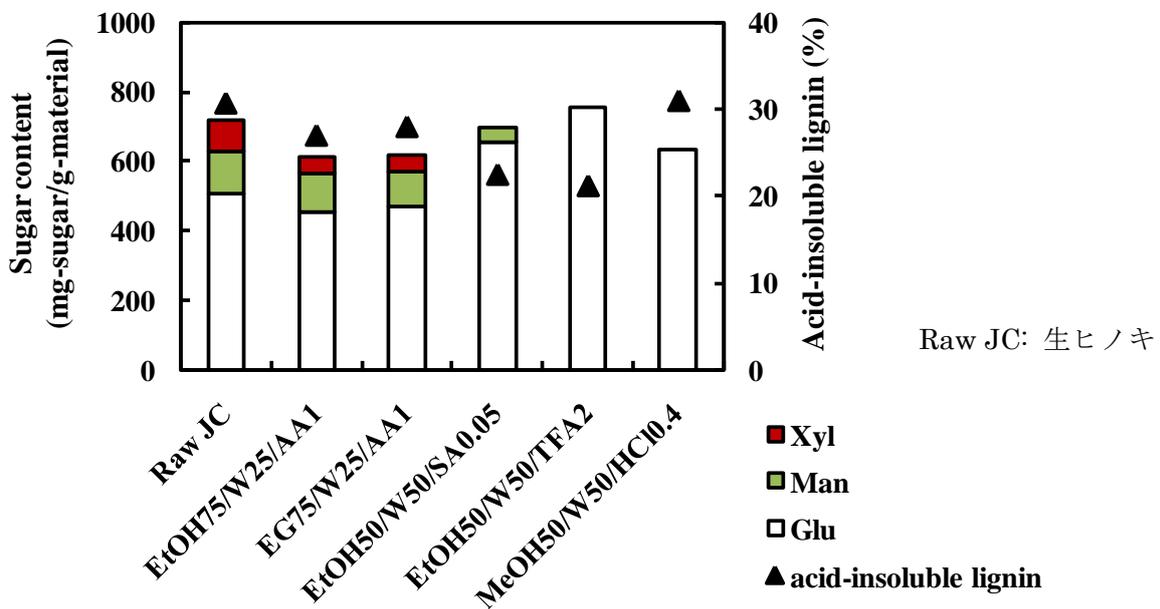


図 1-3-8 各種オルガノソルブ処理物中の構成糖および酸不溶性リグニン

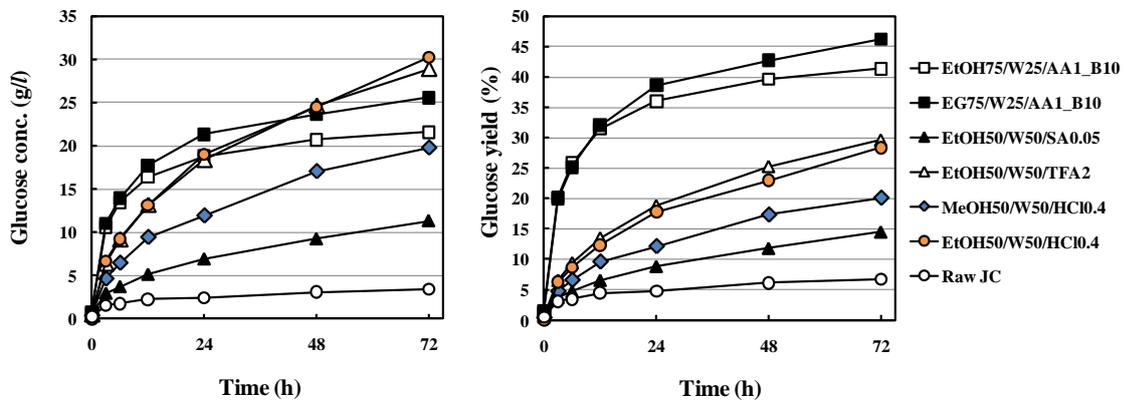


図 1-3-9 各種オルガノソルブ処理物中の酵素糖化

1-4 遊星型ボールミルを用いた微粉碎処理法の検討

【目的】

木質系バイオマスの利用には、前処理が重要な工程であり、本工程の成否により後段の糖化で用いられる酵素量や、そこで得られる糖化率も大きく変わる。従来の前処理法の一つである濃硫酸法は、既に確立された技術であるが、糖の過分解、中和時に発生する石膏の処理、薬品耐性プラントの必要性、硫酸回収時の消費エネルギーが大きいことなどが問題になっていた (Sun and Cheng, Bioresour. Technol., 2002)。希硫酸法も、硫酸中和による石膏発生の問題や薬品耐性プラントの必要性は同様に存在する。濃硫酸や希硫酸、塩酸などの鉱酸を用いない前処理法の開発が求められている。

鉱酸を用いない処理の一つとして、ボールミル処理が知られている。ボールミル処理は、サンプルの微粉化および結晶性セルロースの非晶化により、幅広いバイオマス原料の酵素糖化性を高めることができる。使用時の消費エネルギーが大きく実用的ではないものの、実験室段階の標準的な前処理として有効である。

そこで、木質系バイオマスとしてヒノキを用いて、ボールミル処理が酵素糖化性に与える効果を確認することを目的とした。

【材料および方法】

木質系バイオマスとしてヒノキの木粉を用いた。木粉を電動篩にかけ、125~500 μ m のサイズのもをサンプルとして用いた。本サンプルの組成分析結果を表 1-4-1 に示した。

ヒノキサンプル約 0.6g およびセラミック製ボール 30g を、セラミック製容器に投入し、遊星型ボールミル粉碎機 (フリッチュジャパン株式会社) を用いて、400 rpm でそれぞれ 5, 10, 20, 30 分間の微粉碎処理を行った。

微粉碎処理後のサンプル 0.05 g に対し、蛋白質量 2 mg のアクレモニウムセルラーゼ (40mg-蛋白質/g-基質、明治製菓株式会社) を用いて酵素を用いて、45 $^{\circ}$ C, 72 時間の酵素反応を行った。反応終了後、1, 5000rpm、10 分間遠心分離を行い、反応液の上清を適宜希釈し、反応液の上清を適宜希釈し、ULTRON PS-80P カラム (信和化工株式会社製) および示差屈折検出器 (Jasco 社製) を装着した高速液体クロマトグラフィー (HPLC, Jasco 社製) により分析した。溶離液はイオン交換水を使用し、流速 1 ml/min で、カラムオープン温度 80 $^{\circ}$ C で分析を行った。

糖化率は、生成糖の収率として(1)式を用いて算出した。

$$\text{糖化率 (\%)} = a \cdot b \cdot 100 / c \cdot d \quad (1)$$

$$b = e / f$$

a: 生成単糖量(mg); b: 水熱処理の固形分収率; c: 基質の乾燥重量 (g); d: 単位乾燥重量あたりのヒノキに含まれる単糖量(mg/g); e: 水熱処理および洗浄後の残渣の乾燥重量(g); f: 水熱処理前のヒノキの乾燥重量(g)

【結果および考察】

ボールミルの処理時間が酵素糖化性に与える効果を図 1-4-1 に示す。粉碎時間の増加とともに全ての単糖収率が増加し、20 分間の処理でグルコース収率、キシロース収率は横ばいとなった。

最終的に 30 分間の処理でそれぞれグルコース収率 44%、キシロース収率 6%に達した。マンノース収率については、20 分間まで直線的に増加し、20 分間から 30 分間にかけてゆるやかな増加を示し、最終的に 28%まで達成した。セラミック製ボールを用いた本実験系では、20 分間処理が最適であったが、30 分間まで行うことでマンノース収率が増加した。しかしながら、本処理ではキシロース収率が低いうえ、グルコースおよびマンノース収率も 50%未満で頭打ちとなった。それぞれの単糖収率が 100%に達しない原因については、確たる証拠がないものの、セラミック製ボールの粉碎力不足や、含有するリグニンの存在が考えられる。

表 1-4-1

組成	Wt%
グルカン	43.5
キシラン	7.7
マンナン	10.1
リグニン	30.8
油脂	2.8
灰分	0.3

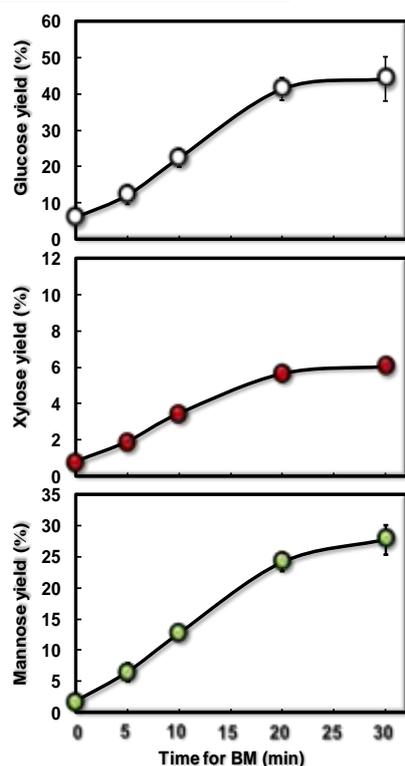


図 1-4-1 ボールミル処理時間の異なるサンプルの糖化試験

1-5 市販糖化酵素の検討

【目的】

低コストな木質系バイオエタノール生産を目指す上で、糖化工程の改善も前処理と同様に重要である。本研究では、糖化酵素として *Acremozyme* (明治製菓株式会社) を中心に使ってきた。本酵素は我が国で育種された *Acremozyme cellulolyticus* TN 株由来であり、従来の *Trichoderma reesei* 由来の市販酵素より、 β -glucosidase 比活性や耐熱性が高いことで知られている。そのため、50°C付近で長時間の糖化を行っても、セロビオースの蓄積が少なく効率良くセルロースを糖化できる。そこで本酵素と従来から使われてきた市販酵素との比較を行うとともに、本酵素をベースとして、ヒノキの前処理物に適した酵素カクテルの開発を試みた。

一方で 21 世紀に入り、NOVOzyme 社や Genencor 社等が *T.reesei* の遺伝子工学的育種や培養法の開発等を行い、従来よりも β -glucosidase 比活性が高い酵素の生産や、大幅な低コスト化を実現している。そこで、今後の我が国における糖化酵素生産戦略を考える上でも、これらの会社が開発した酵素を用いて、オルガノソルブ処理物の糖化を行い、*Acremozyme* との比較を行った。

1-5-1 酵素種および投入量の検討 I

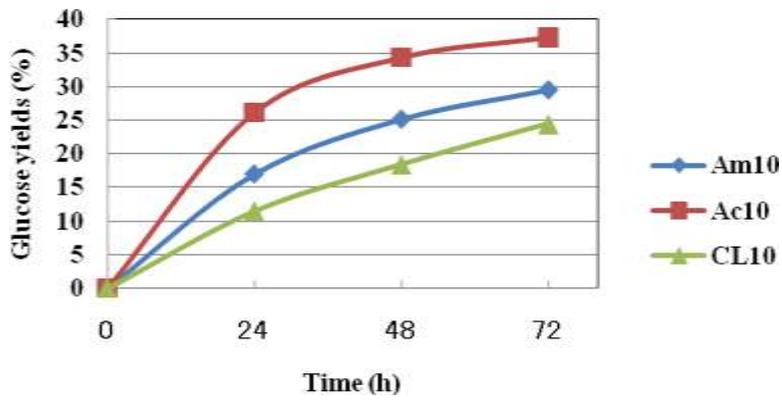
【材料および方法】

1-4 の方法に準じて調製したヒノキを混合溶媒[EtOH75/W25/A1]、170°C、30 分間で、オルガノソルブ処理を行ったサンプルを基質として用いた。三種類の市販セルラーゼ製剤、アクレモザイム (Ac、明治製菓株式会社)、セルラーゼアマノ T4 (Am、アマノエンザイム株式会社)、Celluclast 1.5L (CL、ノボザイムジャパン株式会社) を用いて、それぞれ 1-4 の手法に準じてタンパク質量を揃えて (10 mg-protein/g-substrate) 酵素糖化を行った。

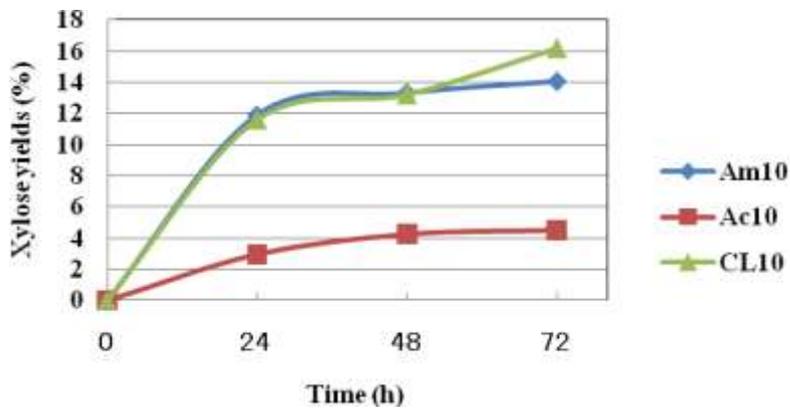
【結果および考察】

市販セルラーゼ製剤 3 種を用いた糖化試験結果を図 1-5-1 (a)~(c)に示す。グルコース収率では Ac が最も高く、次いで Am、CL であった (図 1-5-1 (a))。キシロース収率では、Am 及び CL が Ac の約 3 倍の値を示した (図 1-5-1 (b))。マンノース収率では、いずれの酵素を用いても、48 時間目まで増加せず、72 時間目にマンノースが反応液中に確認された。最終的なマンノース収率としては Ac が最も高く、Am、CL の順であった (図 1-5-1 (c))。これらの結果から、オルガノソルブ処理のヒノキの酵素糖化には Ac が適すると結論づけた。

(a)



(b)



(c)

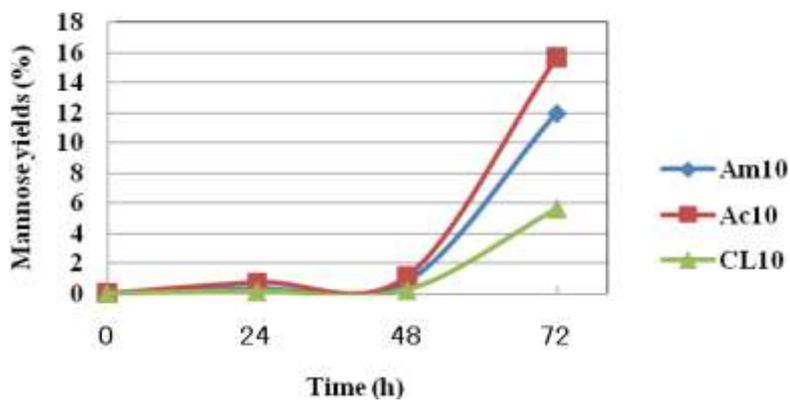


図 1-5-1 三種類の市販セルラーゼ製剤によるオルガノソルブ処理ヒノキの酵素糖化

1-5-2 アクセサリー酵素種の検討

【材料および方法】

糖化試験の基質として EtOH 系 (EtOH75/W25/A1、140℃、30 分間) 及び EG 系 (EG75/W25/A1、170℃、30 分間) の二種を用いた。アクレモザイム (Ac) の添加酵素 (アクセサリー酵素) として、Optimash BG (OPBG、ジェネンコア株式会社)、Optimash XL (OPXL、ジェネンコア株式会社)、Novozyme188 (N-188、ノボザイムジャパン株式会社)、スミチーム ACH (ACH、新日本化学工業株式会社)、セルロシン GM5 (GM5、エイチアイビィ株式会社) の 5 種を用いて、1-4 の方法に準じて酵素糖化を行った。酵素量は、1g の基質に対して、アクレモザイムおよびアクセサリー酵素の総量が 40 mg となるように反応させた。検討した酵素カクテルの組成及び基質の調製条件を表 1-5-1 に示す。収率はそれぞれ基質の単位重量あたりに得られる単糖量として百分率で算出した。

表 1-5-1 酵素カクテルの組成及び基質の調製条件

Sample No.	基質(オルガノソルブ処理条件)			酵素液 (mg-protein/g-substrate)					
	溶媒	温度(℃)	時間(分間)	Ac	OPBG	OPXL	N-188	ACH	GM5
1	EtOH75/W25/A1	140	30	40					
2	EtOH75/W25/A1	140	30	30	10				
3	EtOH75/W25/A1	140	30	30		10			
4	EtOH75/W25/A1	140	30	30			10		
5	EtOH75/W25/A1	140	30	30				10	
6	EtOH75/W25/A1	140	30	30					10
7	EG75/W25/A1	170	30	40					
8	EG75/W25/A1	170	30	30	10				
9	EG75/W25/A1	170	30	30		10			
10	EG75/W25/A1	170	30	30			10		
11	EG75/W25/A1	170	30	30				10	
12	EG75/W25/A1	170	30	30					10

【結果および考察】

アクセサリー酵素種の検討結果を図 1-5-2 に示す。

EtOH 系の基質を用いた場合、グルコース収率では 3 (OPXL 添加) が、Ac 単一使用 (187 mg-glucose/g-substrate) よりも高い結果が得られた (204 mg-glucose/g-substrate)。キシロースの収率は全体的に低い値であったが、アクセサリー酵素を添加した全カクテルで Ac 単一使用 (4.7 mg-xylose/g-substrate) よりも高い結果 (6-9 mg-xylose/g-substrate) が得られた。マンノース収率では、5 (ACH 添加)、6 (GM5 添加) においてアクレモザイム単一使用よりも高い値が得られた。

EG 系の基質を用いた場合、グルコース収率では 9 (OPXL 添加) で最も高く、222 mg-glucose/g-substrate であった。キシロース収率については、全体的に低かったものの、EtOH 系を基質にした場合より、わずかに高い結果が得られた。マンノース収率では、EtOH 系の基質と同様に ACH および GM5 添加のカクテルで Ac 単一使用より高い値であった。

以上の結果から鑑みると、オルガノソルブ処理のヒノキに対しては、Ac および OPXL の酵素カクテルが効果的であった。

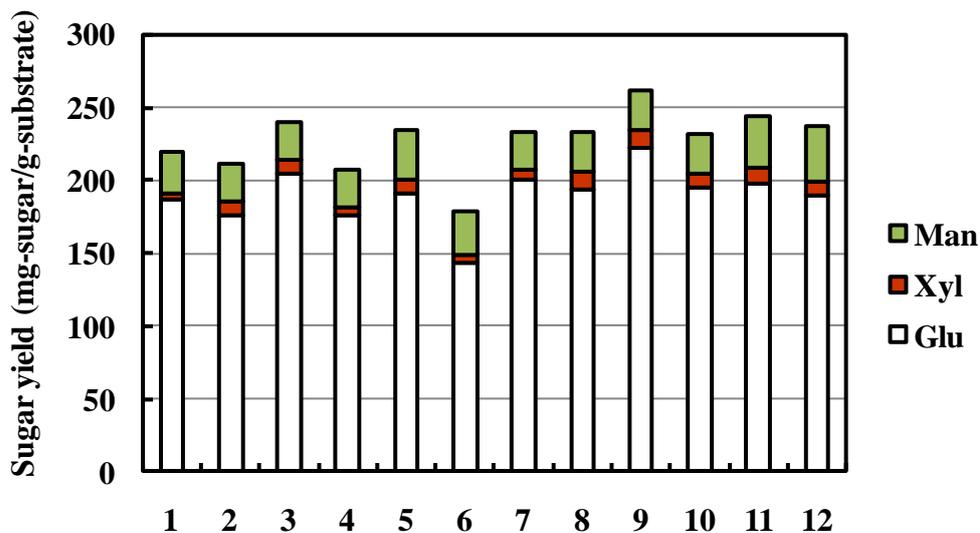


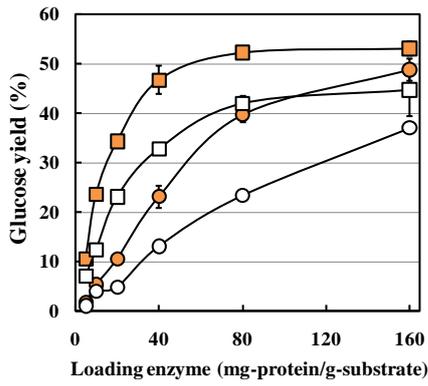
図 1-5-2 アクセサリー酵素添加の効果

1-5-3 酵素種および投入量の検討 II

【結果および考察】

酵素の種類および投入蛋白質量がオルガノソルブ処理物（MeOH50/W50/HCl0.4 及び EtOH50/W50/HCl0.4）の糖化に与える影響を図 1-5-3 に示す。基質を MeOH50/W50/HCl0.4 にした場合、どの投入量に対しても Accellerase1500 のグルコース収率は Acremozyme のそれよりも高かった。Acremozyme では、投入蛋白質量に対し、直線的にグルコース収率が増加したのに対し、Accellerase1500 では 80 mg-protein/g-substrate 以上の投入量では糖化効率が落ち、160 mg-protein/g-substrate まで緩やかにグルコース収率が増加し、約 50%の値となった。仮に Acremozyme を用いて 80 mg-protein/g-substrate で得られたグルコース収率を達成するのに、Accellerase1500 を用いると半量の 40 mg-protein/g-substrate の使用量で済む。また、基質を EtOH50/W50/HCl0.4 にした場合でも同様の傾向が確認され、グルコース収率は MeOH50/W50/HCl0.4 を基質にした時よりも全て上回る結果となった。基質と酵素の組み合わせを EtOH50/W50/HCl0.4 及び Accellerase1500 にした場合、40 mg-protein/g-substrate で約 50% 弱のグルコース収率を達成した。

これまでに調製した各種オルガノソルブ処理物に対する Acremozyme 及び Accellerase1500 の加水分解特性を図 1-5-4 に示す。生ヒノキや、昨年度の酢酸添加オルガノソルブ処理及びボールミル処理を組み合わせた処理物に対しては Acremozyme に比べ Accellerase1500 の方が高いグルコース収率であったが、その差は小さかった。一方、微量の塩酸添加オルガノソルブ処理物に対しては、Accellerase1500 を用いることで、ボールミル処理と同等以上のグルコース収率が得られた。微量の酸を添加したオルガノソルブ処理物には Accellerase1500 が有効であることが示された。



		酵素	
		Acremozyyme	Accellerase 1500
基質	MeOH50/W50/HCl0.4	○	●
	EtOH50/W50/HCl0.4	□	■

図 1-5-3 オルガノソルブ処理物に対する酵素投入蛋白質量の変化が糖化率に与える影響

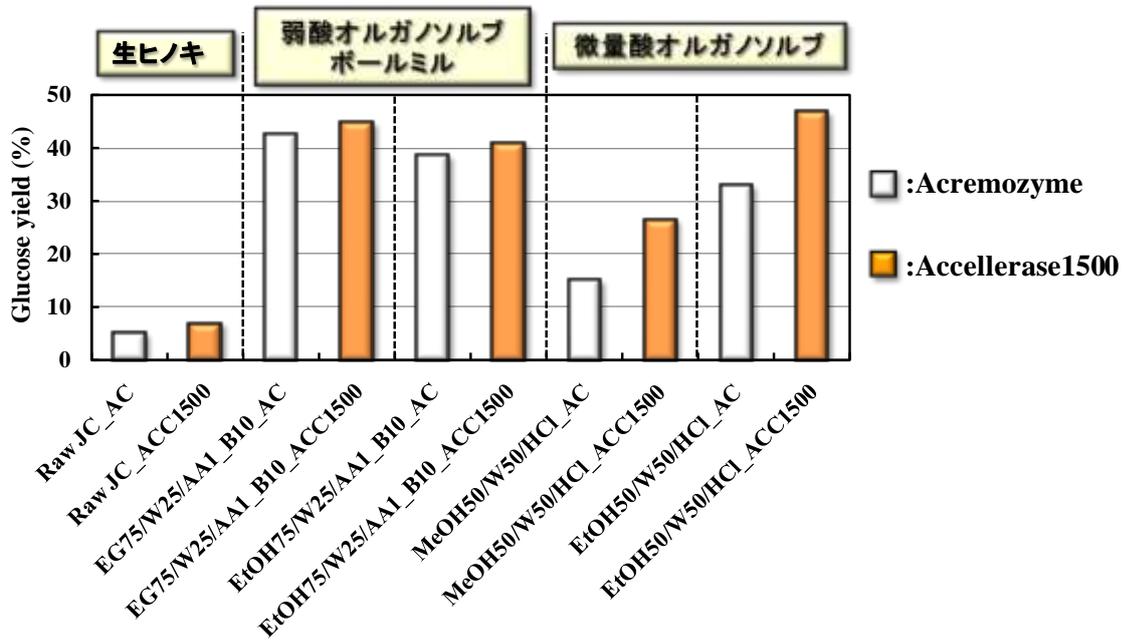


図 1-5-4 各種オルガノソルブ処理物に対する Acremozyyme 及び Accellerase1500 の加水分解特性

1-6 希酸による結晶性セルロース加水分解条件の検討

これまで本検討ではひのきの水熱処理、ボールミルによる前処理とその後の酵素による糖化について検討を行ってきた。酵素による糖化は化学薬剤による糖化よりも温和な条件で効率的に反応できるメリットがあるものの、酵素阻害物質の影響を受けやすく、数 10 時間の反応時間が必要なうえ、酵素が高価であるなどの問題を有している。一方、化学薬剤処理による木質材料の糖化はかねてより様々な検討が行われている。日本においても過去に濃硫酸を用いた糖化プロセスの実用化例があるものの、石膏など廃棄物処理や高コストなどの問題を有しており、1 年ほどの操業で停止した歴史がある。そこで本検討では希酸による糖化について検討を行った。各種希酸ならびに有機溶媒や塩の添加によるセルロースのグルコースへの加水分解の影響について検討を行った。また、同条件におけるグルコースの分解挙動についても検討を行った。

【材料および方法】

内径 6mm、肉厚 2mm のガラスセル内に、セルロース (micro crystalline, Alfa Aesar 社製) 25mg と溶質、酸またはアルカリ触媒を入れた。これを 100°C~200°C に保ったオイルバス中で 10~1440 分間加熱し、分解反応を行った。反応後、ガラスセルを取り出し、冷水につけ冷却した。サンプルをセルから 15mL チューブにうつし、水酸化カルシウムで中和した後、蒸留水を使って 12 mL までメスアップした。この溶液を 3500rpm で 10 分間、遠心分離し、その上澄み溶液を 1 mL をさらに 10000 rpm で 10 分間遠心分離した。その上澄み液を HPLC により分析し、生成したグルコース、ヒドロキシメチルフルフラール、ならびにフルフラールの定量を行った。以下に HPLC の分析条件を示す。なおグルコースの測定は RI 測定装置にて、ヒドロキシメチルフルフラールとフルフラールの分析は UV 測定装置 (波長 280nm) にて行った。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の測定条件

分析機器	Multiwavelength Detector MD-2015 Plus (JASCO 社製) Intelligent RI Detector RI-2031 Plus (JASCO 社製) Quaternary Gradient Pump PU-2089 Plus (JASCO 社製) Intelligent Sampler AS-2057 Plus (JASCO 社製) Intelligent Column Oven CO-2065 Plus (JASCO 社製)
カラム	ULTRON PS-80P (300L×8.0m mL.P) SINWA (CHEMICAL 社製) Aminex HPX-87P (300mm×7.8mm) (Bio-Rad 社製)
オープン温度	80°C
測定時間	30 分
注入量	10µL
溶出液	イオン交換水(1.0mL/min)

【結果および考察】

本検討においては以下の 5 項目について検討を行った。

- 1 : 酸種の影響
- 2 : 硫酸の濃度、反応温度の影響
- 3 : 反応系へのエタノールの添加効果
- 4 : 反応系への各種溶媒、塩の添加効果
- 5 : トリフルオロ酢酸の効果

以下に検討結果を示すが、図の縦軸はモル%、横軸は時間（分）、◆はグルコース、■はヒドロキシメチルフルフラール、▲はフルフラールの濃度を表している。

1-6-1 酸種の影響

硫酸、塩酸、リン酸それぞれ数%の溶液中でのセルロースならびにグルコースの 200°Cにおける分解挙動を測定した。表 1-6-1、1-6-2 に反応条件とグルコース、ヒドロキシメチルフルフラール、フルフラールの生成量を、図 1-6-1、1-6-2 にこれらの時間変化のグラフを示す。

0.092%硫酸において 27%、0.092%塩酸において 31%のグルコースがセルロースの加水分解により得られた。この時、グルコースは図 1-6-2 にあるようにおよそ 10 分で半減しており、かなり分解速度が速いことが分かる。したがってセルロースの加水分解により生成したグルコースがさらに脱水物やフルフラール類、さらにはレブリン酸などの酸に分解しているものと考えられる。上記よりも高濃度の酸においては速やかに分解反応が進んでおり、1.84%の塩酸ではグルコース、ヒドロキシメチルフルフラール、フルフラール、いずれもその生成は確認できなかった。

表 1-6-1 セルロースの加水分解条件

実験 番号	反応溶媒	組成 (g)	溶媒の量 (mL)	時間 (分)	温度 (°C)	グルコースの割合 (%)	HMFの割合 (%)	フルフラールの割合 (%)
No. 41	硫酸/水	0.092/100	1	10	200	23.1	4.1	1.6
	硫酸/水	0.092/100	1	20	200	27.3	6.2	2.3
	硫酸/水	0.092/100	1	40	200	24.1	6.8	3.0
No. 42	硫酸/水	0.368/100	1	10	200	26.0	6.3	3.0
	硫酸/水	0.368/100	1	20	200	11.4	3.0	3.0
	硫酸/水	0.368/100	1	40	200	1.1	0.4	2.1
No. 53	塩酸/水	0.092/100	1	10	200	14.5	2.5	1.0
	塩酸/水	0.092/100	1	20	200	31.4	7.7	2.8
	塩酸/水	0.092/100	1	40	200	16.3	5.8	3.1
No. 54	塩酸/水	0.368/100	1	10	200	1.7	0.8	2.5
	塩酸/水	0.368/100	1	20	200	19.3	5.9	3.5
	塩酸/水	0.368/100	1	40	200	0.0	0.0	1.4
No. 55	塩酸/水	1.84/100	1	10	200	0.0	0.0	0.9
	塩酸/水	1.84/100	1	20	200	0.0	0.0	0.2
	塩酸/水	1.84/100	1	40	200	0.0	0.0	0.0
No. 56	リン酸/水	3.68/100	1	10	200	24.6	6.0	2.0
	リン酸/水	3.68/100	1	20	200	21.4	7.3	2.4
	リン酸/水	3.68/100	1	40	200	5.0	2.5	2.0

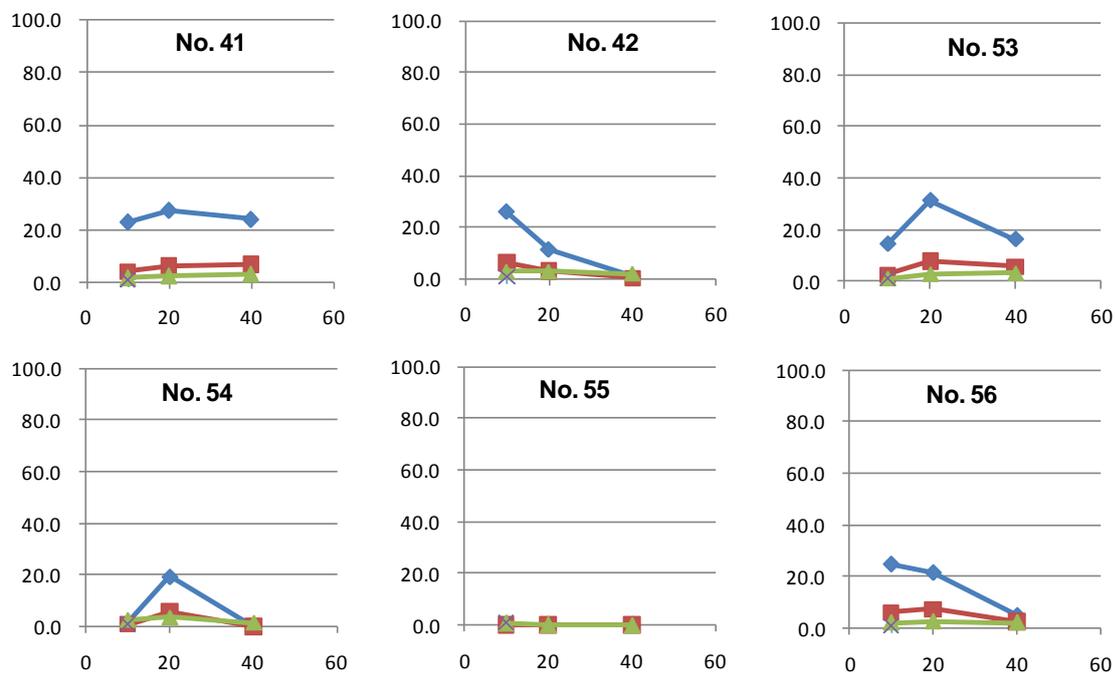


図 1-6-1 セルロースの希酸による加水分解で生成したグルコース (◆)、ヒドロキシメチルフルフラール (■)、フルフラール (■) の濃度

表 1-6-2 グルコースの加水分解条件

実験 番号	反応溶媒	組成 (g)	溶媒の量 (mL)	時間 (分)	温度 (°C)	グルコースの割合 (%)	HMFの割合 (%)	フルフラールの割合 (%)
No. 41G	硫酸/水	0.092/100	1	10	200	44.6	12.2	1.6
	硫酸/水	0.092/100	1	20	200	27.6	9.0	2.0
	硫酸/水	0.092/100	1	40	200	12.1	4.5	2.3
No. 42G	硫酸/水	0.368/100	1	10	200	16.1	5.2	2.3
	硫酸/水	0.368/100	1	20	200	5.0	1.5	2.1
	硫酸/水	0.368/100	1	40	200	0.6	0.2	1.5
No. 53G	塩酸/水	0.092/100	1	10	200	50.7	11.7	1.3
	塩酸/水	0.092/100	1	20	200	29.1	9.6	2.1
	塩酸/水	0.092/100	1	40	200	8.2	3.5	2.3
No. 54G	塩酸/水	0.368/100	1	10	200	9.1	3.0	1.7
	塩酸/水	0.368/100	1	20	200	0.6	0.3	1.5
	塩酸/水	0.368/100	1	40	200	0.0	0.0	0.8
No. 55G	塩酸/水	1.84/100	1	10	200	0.0	0.0	0.5
	塩酸/水	1.84/100	1	20	200	0.0	0.0	0.2
	塩酸/水	1.84/100	1	40	200	0.0	0.0	0.0
No. 56G	リン酸/水	3.68/100	1	10	200	26.2	10.0	1.5
	リン酸/水	3.68/100	1	20	200	8.7	4.4	1.6
	リン酸/水	3.68/100	1	40	200	1.0	0.7	1.1

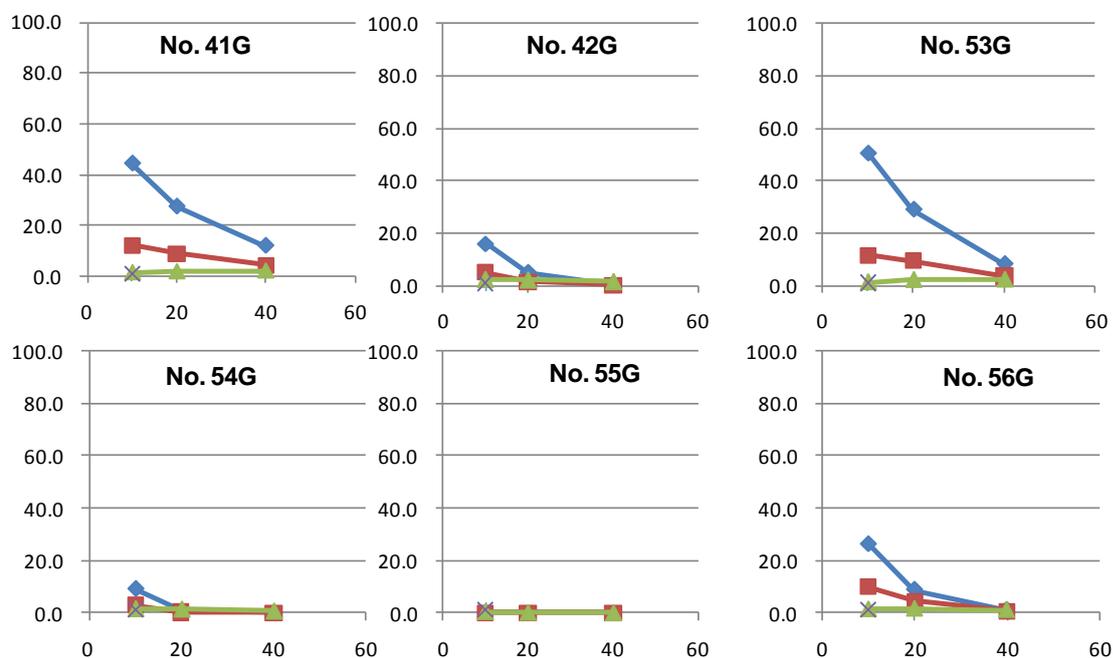


図 1-6-2 グルコースの希酸による分解で生成したヒドロキシメチルフルフラール (■)、フルフラール (▲) の濃度とグルコース (◆) の濃度

1-6-2 硫酸の濃度、反応温度の影響

硫酸 (0.092–0.92%) 溶液中でのセルロースならびにグルコースの 100–200°C における分解挙動を測定した。表 1-6-3、1-6-4 に反応条件とグルコース、ヒドロキシメチルフルフラール、フルフラールの生成量を、図 1-6-3、1-6-4 にこれらの時間変化のグラフを示す。

100–130°C においてはセルロースの加水分解速度は遅く、0.92% においてもグルコース濃度は 13% 程度であった。

表 1-6-3 セルロースの加水分解条件

実験 番号	反応溶媒	組成 (g)	溶媒の量 (mL)	時間 (分)	温度 (°C)	グルコースの割合 (%)	HMFの割合 (%)	フルフラールの割合 (%)
No. 137	硫酸/水	0.368/100	1	120	100	0.0	0.0	0.0
	硫酸/水	0.368/100	1	300	100	0.1	0.0	0.0
	硫酸/水	0.368/100	1	420	100	0.1	0.0	0.0
	硫酸/水	0.368/100	1	600	100	0.2	0.0	0.0
	硫酸/水	0.368/100	1	1440	100	0.8	0.0	0.0
No. 139	硫酸/水	0.92/100	1	120	100	0.2	0.0	0.0
	硫酸/水	0.92/100	1	300	100	0.3	0.0	0.0
	硫酸/水	0.92/100	1	420	100	0.5	0.0	0.0
	硫酸/水	0.92/100	1	600	100	0.8	0.0	0.0
	硫酸/水	0.92/100	1	1440	100	1.4	0.0	0.0
No. 138	硫酸/水	0.368/100	1	120	130	1.2	0.0	0.0
	硫酸/水	0.368/100	1	300	130	2.5	0.0	0.1
	硫酸/水	0.368/100	1	420	130	2.8	0.1	0.1
	硫酸/水	0.368/100	1	600	130	4.0	0.1	0.2
	硫酸/水	0.368/100	1	1440	130	6.7	0.2	0.4
No. 140	硫酸/水	0.92/100	1	120	130	3.1	0.1	0.1
	硫酸/水	0.92/100	1	300	130	5.0	0.1	0.3
	硫酸/水	0.92/100	1	420	130	6.8	0.2	0.4
	硫酸/水	0.92/100	1	600	130	8.7	0.2	0.5
	硫酸/水	0.92/100	1	1440	130	13.2	0.3	0.7
No. 45	硫酸/水	0.092/100	1	10	180	6.6	0.4	0.3
	硫酸/水	0.092/100	1	20	180	11.9	1.0	0.8
	硫酸/水	0.092/100	1	40	180	17.0	2.0	1.2
No. 115	硫酸/水	0.184/100	1	10	180	8.6	0.4	0.4
	硫酸/水	0.184/100	1	20	180	13.1	0.9	0.8
	硫酸/水	0.184/100	1	40	180	22.3	2.2	1.4
	硫酸/水	0.184/100	1	60	180	26.1	2.9	1.7
	硫酸/水	0.184/100	1	80	180	29.7	3.5	2.0
No. 116	硫酸/水	0.368/100	1	10	180	12.3	0.8	0.8
	硫酸/水	0.368/100	1	20	180	21.4	1.6	1.3
	硫酸/水	0.368/100	1	40	180	29.7	3.1	1.9
	硫酸/水	0.368/100	1	60	180	29.2	3.2	2.0
	硫酸/水	0.368/100	1	80	180	32.3	3.2	2.1
No. 117	硫酸/水	0.552/100	1	10	180	21.1	1.6	1.3
	硫酸/水	0.552/100	1	20	180	17.9	1.5	1.2
	硫酸/水	0.552/100	1	40	180	33.3	3.5	2.3
	硫酸/水	0.552/100	1	60	180	31.0	3.0	2.1
	硫酸/水	0.552/100	1	80	180	20.0	2.0	1.9
No. 41	硫酸/水	0.092/100	1	10	200	23.1	4.1	1.7
	硫酸/水	0.092/100	1	20	200	27.3	6.2	2.3
	硫酸/水	0.092/100	1	40	200	24.1	6.8	3.1
No. 42	硫酸/水	0.368/100	1	10	200	26.0	6.3	3.0
	硫酸/水	0.368/100	1	20	200	11.4	3.1	3.0
	硫酸/水	0.368/100	1	40	200	1.1	0.4	2.1

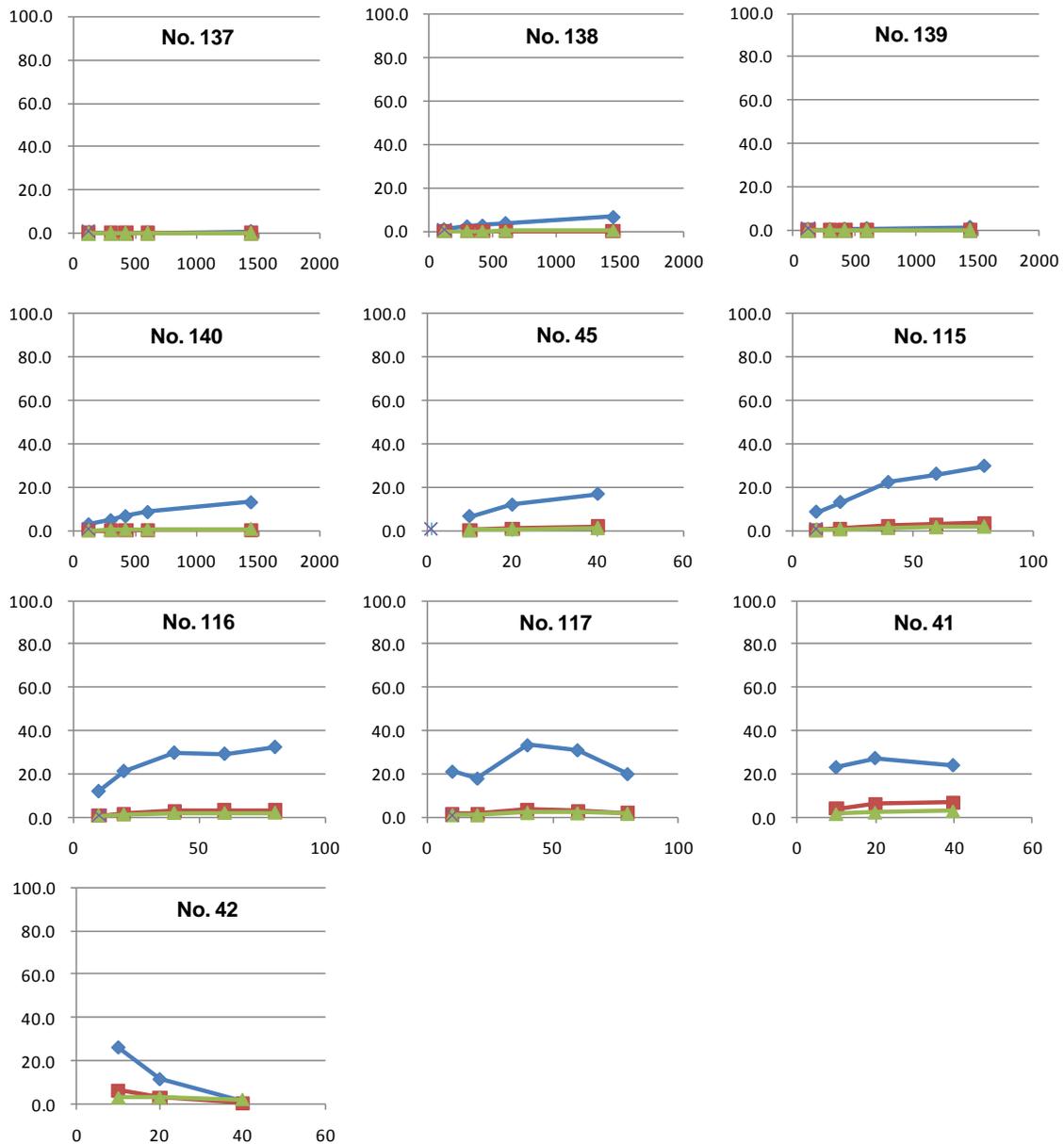


図 1-6-3 セルロースの希酸による加水分解で生成したグルコース（◆）、ヒドロキシメチルフルフラール（■）、フルフラール（■）の濃度

温度の上昇とともに加水分解速度は上昇し、180℃では 0.368%、0.552%の硫酸で 33%程度のグルコース濃度が得られた。しかしながら、さらに温度が上昇すると 0.368%硫酸では 10 分で 26%のグルコース濃度が得られるものの、その後は低い値となった。グルコースの分解速度は、0.368%硫酸、180℃の反応条件でその半減期がおよそ 30 分であり、この反応条件ではセルロースの加水分解速度が大きく、グルコースの分解速度が小さくなり、その結果として高いグルコース濃度を得られたものと考えられる。

表 1-6-4 グルコースの加水分解条件

実験 番号	反応溶媒	組成 (g)	溶媒の量 (mL)	時間 (分)	温度 (°C)	グルコースの割合 (%)	HMFの割合 (%)	フルフラールの割合 (%)
No. 129G	硫酸/水	0.368/100	1	120	100	96.1	0.0	0.0
	硫酸/水	0.368/100	1	300	100	95.6	0.1	0.0
	硫酸/水	0.368/100	1	420	100	94.8	0.2	0.0
	硫酸/水	0.368/100	1	600	100	92.6	0.2	0.0
	硫酸/水	0.368/100	1	1440	100	88.7	0.5	0.0
No. 131G	硫酸/水	0.92/100	1	120	100	93.4	0.1	0.0
	硫酸/水	0.92/100	1	300	100	91.0	0.2	0.0
	硫酸/水	0.92/100	1	420	100	90.1	0.3	0.0
	硫酸/水	0.92/100	1	600	100	92.1	0.4	0.0
	硫酸/水	0.92/100	1	1440	100	91.8	0.7	0.0
No. 130G	硫酸/水	0.368/100	1	120	130	89.0	0.9	0.0
	硫酸/水	0.368/100	1	300	130	86.5	1.6	0.1
	硫酸/水	0.368/100	1	420	130	83.4	1.8	0.1
	硫酸/水	0.368/100	1	600	130	80.5	2.0	0.1
	硫酸/水	0.368/100	1	1440	130	70.0	1.8	0.2
No. 132G	硫酸/水	0.92/100	1	120	130	86.2	1.5	0.0
	硫酸/水	0.92/100	1	300	130	85.8	1.9	0.1
	硫酸/水	0.92/100	1	420	130	79.8	1.7	0.1
	硫酸/水	0.92/100	1	600	130	71.6	1.6	0.2
	硫酸/水	0.92/100	1	1440	130	49.0	1.1	0.3
No. 45G	硫酸/水	0.092/100	1	10	180	71.9	4.6	0.3
	硫酸/水	0.092/100	1	20	180	65.8	7.4	0.5
	硫酸/水	0.092/100	1	40	180	52.3	7.9	0.8
No. 112G	硫酸/水	0.184/100	1	10	180	76.8	4.8	0.3
	硫酸/水	0.184/100	1	20	180	72.1	6.7	0.5
	硫酸/水	0.184/100	1	40	180	53.5	6.7	0.8
	硫酸/水	0.184/100	1	60	180	45.1	5.6	1.1
	硫酸/水	0.184/100	1	80	180	36.5	4.8	1.2
No. 113G	硫酸/水	0.368/100	1	10	180	68.9	6.2	0.5
	硫酸/水	0.368/100	1	20	180	57.1	6.3	0.8
	硫酸/水	0.368/100	1	40	180	41.5	4.5	1.2
	硫酸/水	0.368/100	1	60	180	24.4	2.9	1.3
	硫酸/水	0.368/100	1	80	180	15.6	2.1	1.2
No. 114G	硫酸/水	0.552/100	1	10	180	60.9	6.4	0.7
	硫酸/水	0.552/100	1	20	180	42.1	5.2	1.3
	硫酸/水	0.552/100	1	40	180	22.8	2.7	1.4
	硫酸/水	0.552/100	1	60	180	14.2	1.7	1.2
	硫酸/水	0.552/100	1	80	180	6.9	0.9	1.0
No. 41G	硫酸/水	0.092/100	1	10	200	44.6	12.2	1.6
	硫酸/水	0.092/100	1	20	200	27.6	9.0	2.0
	硫酸/水	0.092/100	1	40	200	12.1	4.5	2.3
No. 42G	硫酸/水	0.368/100	1	10	200	16.1	5.2	2.3
	硫酸/水	0.368/100	1	20	200	5.0	1.5	2.1
	硫酸/水	0.368/100	1	40	200	0.6	0.2	1.5

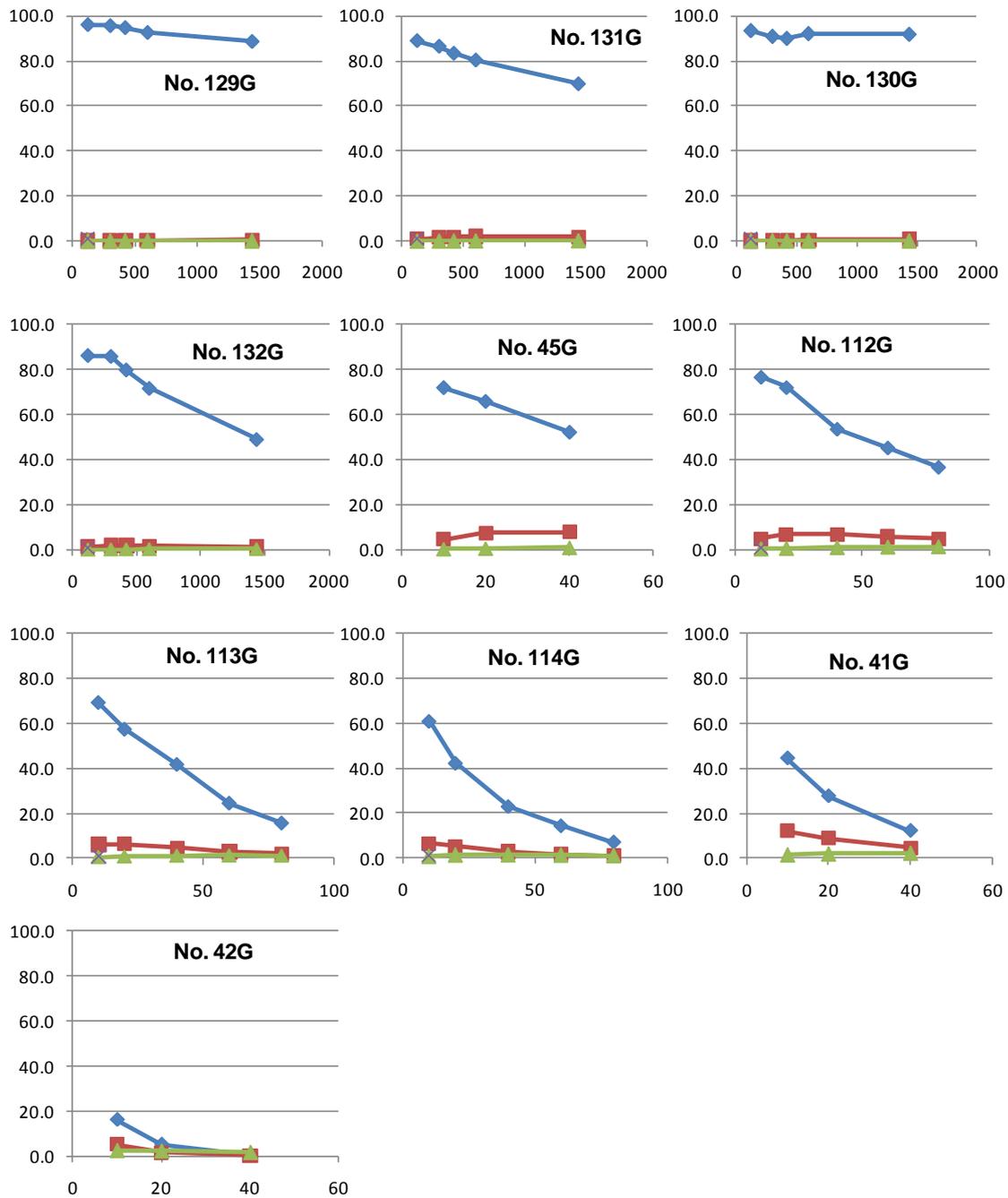


図 1-6-4 グルコースの希酸による分解で生成したヒドロキシメチルフルフラール (■)、フルフラール (▲) の濃度とグルコース (◆) の濃度

1-6-3 反応系へのエタノールの添加効果

硫酸 (0.05–0.4%) とエタノール混合溶液中でのセルロースならびにグルコースの 170、200℃ における分解挙動を測定した。表 1-6-5、1-6-6 に反応条件とグルコース、ヒドロキシメチルフルフラール、フルフラールの生成量を、図 1-6-5、1-6-6 にこれらの時間変化のグラフを示す。

表 1-6-5 セルロースの加水分解条件

実験 番号	反応溶媒	組成	溶媒の量	時間	温度	グルコースの割合	HMFの割合	フルフラールの割合
		(g)	(mL)	(分)	(℃)	(%)	(%)	(%)
No. 179	硫酸/EtOH/水	0.05/50/50	1	15	170	0.3	0.0	0.0
	硫酸/EtOH/水	0.05/50/50	1	30	170	2.3	0.1	0.0
	硫酸/EtOH/水	0.05/50/50	1	60	170	2.8	0.2	0.1
No. 180	硫酸/EtOH/水	0.05/25/75	1	15	170	0.9	0.0	0.0
	硫酸/EtOH/水	0.05/25/75	1	30	170	2.3	0.1	0.1
	硫酸/EtOH/水	0.05/25/75	1	60	170	2.9	0.2	0.2
No. 181	硫酸/EtOH/水	0.1/50/50	1	15	170	0.7	0.0	0.0
	硫酸/EtOH/水	0.1/50/50	1	30	170	3.2	0.1	0.1
	硫酸/EtOH/水	0.1/50/50	1	60	170	4.8	0.4	0.3
No. 182	硫酸/EtOH/水	0.1/25/75	1	15	170	1.1	0.0	0.0
	硫酸/EtOH/水	0.1/25/75	1	30	170	3.5	0.1	0.1
	硫酸/EtOH/水	0.1/25/75	1	60	170	6.2	0.3	0.3
No. 183	硫酸/EtOH/水	0.2/50/50	1	15	170	2.3	0.0	0.0
	硫酸/EtOH/水	0.2/50/50	1	30	170	5.3	0.3	0.3
	硫酸/EtOH/水	0.2/50/50	1	60	170	9.5	0.7	0.6
No. 184	硫酸/EtOH/水	0.2/25/75	1	15	170	2.0	0.0	0.0
	硫酸/EtOH/水	0.2/25/75	1	30	170	5.6	0.2	0.2
	硫酸/EtOH/水	0.2/25/75	1	60	170	9.9	0.7	0.8
No. 185	硫酸/EtOH/水	0.4/50/50	1	15	170	3.9	0.1	0.1
	硫酸/EtOH/水	0.4/50/50	1	30	170	10.3	0.7	0.7
	硫酸/EtOH/水	0.4/50/50	1	60	170	18.1	1.6	1.3
No. 186	硫酸/EtOH/水	0.4/25/75	1	15	170	4.3	0.1	0.1
	硫酸/EtOH/水	0.4/25/75	1	30	170	10.9	0.8	0.8
	硫酸/EtOH/水	0.4/25/75	1	60	170	15.3	1.4	1.3
No. 187	硫酸/EtOH/水	0.05/50/50	1	15	200	9.6	1.2	0.7
	硫酸/EtOH/水	0.05/50/50	1	30	200	19.2	5.0	2.2
	硫酸/EtOH/水	0.05/50/50	1	60	200	20.8	8.6	3.6
No. 188	硫酸/EtOH/水	0.05/25/75	1	15	200	8.2	1.1	0.6
	硫酸/EtOH/水	0.05/25/75	1	30	200	15.0	5.0	1.9
	硫酸/EtOH/水	0.05/25/75	1	60	200	16.7	10.2	3.4
No. 189	硫酸/EtOH/水	0.1/50/50	1	15	200	16.1	2.1	1.2
	硫酸/EtOH/水	0.1/50/50	1	30	200	25.0	7.2	3.3
	硫酸/EtOH/水	0.1/50/50	1	60	200	11.9	7.4	4.7
No. 190	硫酸/EtOH/水	0.1/25/75	1	15	200	15.6	1.7	1.0
	硫酸/EtOH/水	0.1/25/75	1	30	200	24.6	7.2	2.9
	硫酸/EtOH/水	0.1/25/75	1	60	200	17.2	7.9	4.3
No. 191	硫酸/EtOH/水	0.2/50/50	1	15	200	24.7	4.1	2.3
	硫酸/EtOH/水	0.2/50/50	1	30	200	16.7	6.7	4.5
	硫酸/EtOH/水	0.2/50/50	1	60	200	1.2	2.0	4.7
No. 192	硫酸/EtOH/水	0.2/25/75	1	15	200	24.3	3.5	1.9
	硫酸/EtOH/水	0.2/25/75	1	30	200	22.0	7.2	4.0
	硫酸/EtOH/水	0.2/25/75	1	60	200	4.4	2.3	4.3
No. 193	硫酸/EtOH/水	0.4/50/50	1	15	200	27.2	5.2	3.2
	硫酸/EtOH/水	0.4/50/50	1	30	200	3.0	2.5	4.6
	硫酸/EtOH/水	0.4/50/50	1	60	200	0.0	0.1	3.7
No. 194	硫酸/EtOH/水	0.4/25/75	1	15	200	30.9	5.9	3.3
	硫酸/EtOH/水	0.4/25/75	1	30	200	7.6	3.0	4.3
	硫酸/EtOH/水	0.4/25/75	1	60	200	0.1	0.1	3.1

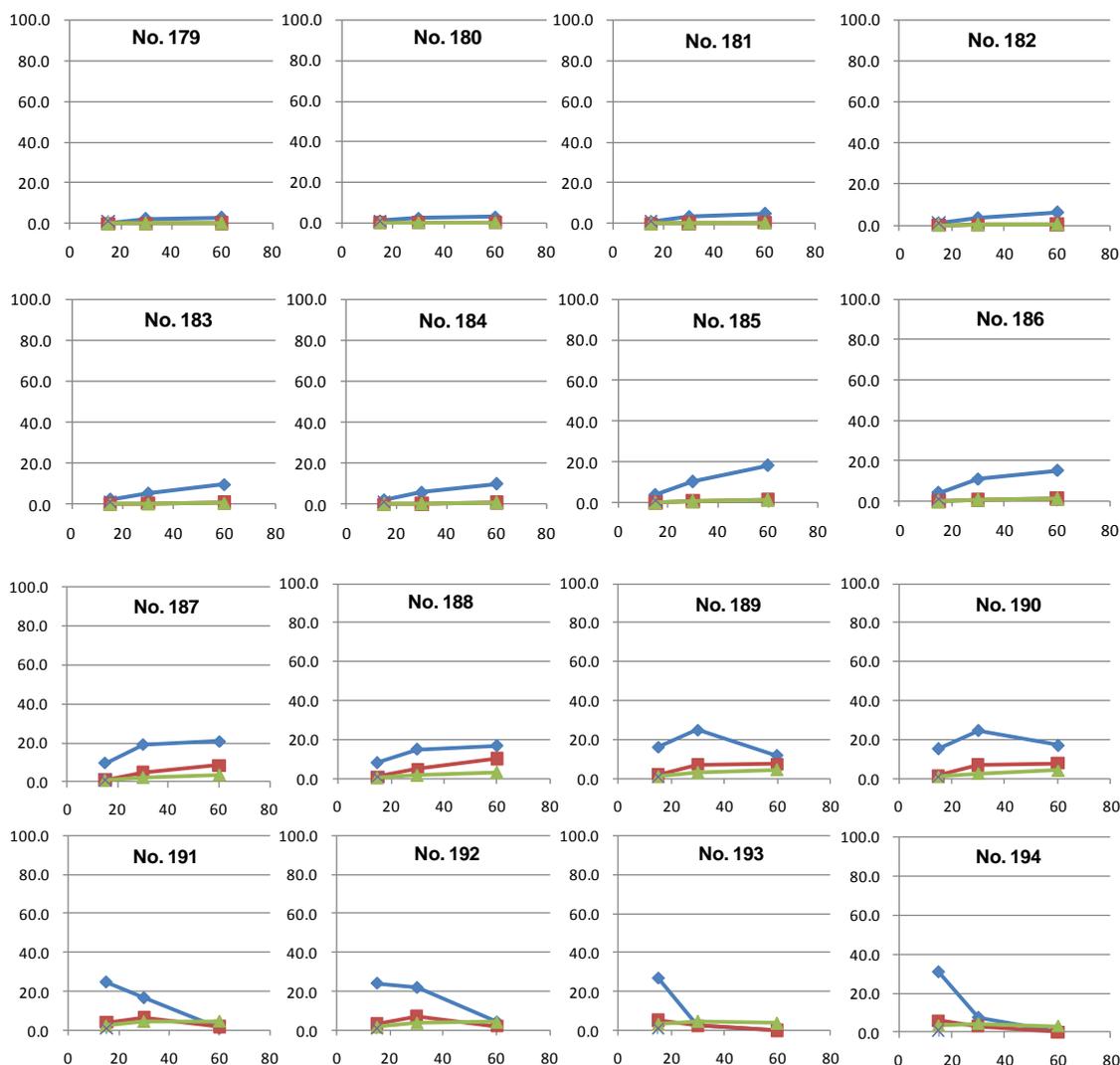


図 1-6-5 セルロースの希酸による加水分解で生成したグルコース (◆)、ヒドロキシメチルフルフラール (■)、フルフラール (■) の濃度

170℃でのセルロースの加水分解はいずれの硫酸濃度においてもその反応は緩やかであり、0.4%硫酸、60分の反応におけるグルコース濃度は15–18%であった。170℃でのグルコースの分解速度もその半減期がおよそ60–120分であり、緩やかであった。また、エタノール25%添加溶液中においては50%添加溶液中よりも早く反応が進行した。一方、200℃においては0.4%硫酸、15分の反応で27–31%のグルコース濃度が得られた。グルコースの分解速度はその半減期がおよそ数分から10分と速く、170℃の時と同様にエタノール添加量が少ないほどその分解速度が若干速い傾向が見られた。また、200℃で硫酸0.092%のエタノールを添加していない反応系(表3-4-1、No. 41)とエタノール添加系(No. 189、No. 190)とを比較してみると、エタノールの添加により分解反応速度は若干遅くなるもののその反応挙動に大きな差異は見られなかった。

表 1-6-6 グルコースの加水分解条件

実験 番号	反応溶媒	組成	溶媒の量	時間	温度	グルコースの割合	HMFの割合	フルフラールの割合
		(g)	(mL)	(分)	(°C)	(%)	(%)	(%)
No. 155G	硫酸/EtOH/水	0.05/50/50	1	15	170	66.0	0.7	0.0
	硫酸/EtOH/水	0.05/50/50	1	30	170	64.7	2.0	0.1
	硫酸/EtOH/水	0.05/50/50	1	60	170	63.2	4.5	0.2
No. 156G	硫酸/EtOH/水	0.05/25/75	1	15	170	77.1	1.0	0.0
	硫酸/EtOH/水	0.05/25/75	1	30	170	75.6	2.5	0.1
	硫酸/EtOH/水	0.05/25/75	1	60	170	70.3	5.6	0.2
No. 157G	硫酸/EtOH/水	0.1/50/50	1	15	170	64.1	1.4	0.1
	硫酸/EtOH/水	0.1/50/50	1	30	170	62.6	2.6	0.1
	硫酸/EtOH/水	0.1/50/50	1	60	170	61.2	5.0	0.3
No. 158G	硫酸/EtOH/水	0.1/25/75	1	15	170	80.7	1.4	0.1
	硫酸/EtOH/水	0.1/25/75	1	30	170	75.7	2.9	0.1
	硫酸/EtOH/水	0.1/25/75	1	60	170	69.6	5.1	0.3
No. 159G	硫酸/EtOH/水	0.2/50/50	1	15	170	62.3	2.1	0.1
	硫酸/EtOH/水	0.2/50/50	1	30	170	57.2	3.5	0.2
	硫酸/EtOH/水	0.2/50/50	1	60	170	53.9	5.4	0.5
No. 160G	硫酸/EtOH/水	0.2/25/75	1	15	170	78.7	2.6	0.1
	硫酸/EtOH/水	0.2/25/75	1	30	170	70.0	4.3	0.3
	硫酸/EtOH/水	0.2/25/75	1	60	170	62.8	6.1	0.5
No. 161G	硫酸/EtOH/水	0.4/50/50	1	15	170	60.7	3.5	0.2
	硫酸/EtOH/水	0.4/50/50	1	30	170	53.7	4.7	0.4
	硫酸/EtOH/水	0.4/50/50	1	60	170	41.5	5.3	0.8
No. 162G	硫酸/EtOH/水	0.4/25/75	1	15	170	74.1	4.4	0.2
	硫酸/EtOH/水	0.4/25/75	1	30	170	69.9	5.9	0.5
	硫酸/EtOH/水	0.4/25/75	1	60	170	51.8	5.9	0.8
No. 163G	硫酸/EtOH/水	0.05/50/50	1	15	200	40.8	12.2	1.6
	硫酸/EtOH/水	0.05/50/50	1	30	200	24.2	13.6	2.8
	硫酸/EtOH/水	0.05/50/50	1	60	200	7.3	9.4	3.8
No. 164G	硫酸/EtOH/水	0.05/25/75	1	15	200	42.0	14.6	1.8
	硫酸/EtOH/水	0.05/25/75	1	30	200	24.2	16.6	2.9
	硫酸/EtOH/水	0.05/25/75	1	60	200	6.0	10.5	3.7
No. 165G	硫酸/EtOH/水	0.1/50/50	1	15	200	33.8	11.1	2.2
	硫酸/EtOH/水	0.1/50/50	1	30	200	14.3	8.9	3.4
	硫酸/EtOH/水	0.1/50/50	1	60	200	3.0	3.6	3.8
No. 166G	硫酸/EtOH/水	0.1/25/75	1	15	200	39.9	11.3	1.9
	硫酸/EtOH/水	0.1/25/75	1	30	200	20.0	9.9	3.2
	硫酸/EtOH/水	0.1/25/75	1	60	200	3.0	3.6	3.4
No. 167G	硫酸/EtOH/水	0.2/50/50	1	15	200	19.1	8.5	3.2
	硫酸/EtOH/水	0.2/50/50	1	30	200	4.0	3.5	3.7
	硫酸/EtOH/水	0.2/50/50	1	60	200	0.0	0.5	3.4
No. 168G	硫酸/EtOH/水	0.2/25/75	1	15	200	24.8	9.3	2.9
	硫酸/EtOH/水	0.2/25/75	1	30	200	6.7	3.8	3.6
	硫酸/EtOH/水	0.2/25/75	1	60	200	0.0	0.4	2.9
No. 169G	硫酸/EtOH/水	0.4/50/50	1	15	200	5.5	3.8	3.7
	硫酸/EtOH/水	0.4/50/50	1	30	200	0.0	0.5	3.5
	硫酸/EtOH/水	0.4/50/50	1	60	200	0.0	0.0	2.6
No. 170G	硫酸/EtOH/水	0.4/25/75	1	15	200	7.9	3.8	3.6
	硫酸/EtOH/水	0.4/25/75	1	30	200	0.0	0.4	3.0
	硫酸/EtOH/水	0.4/25/75	1	60	200	0.0	0.0	2.1

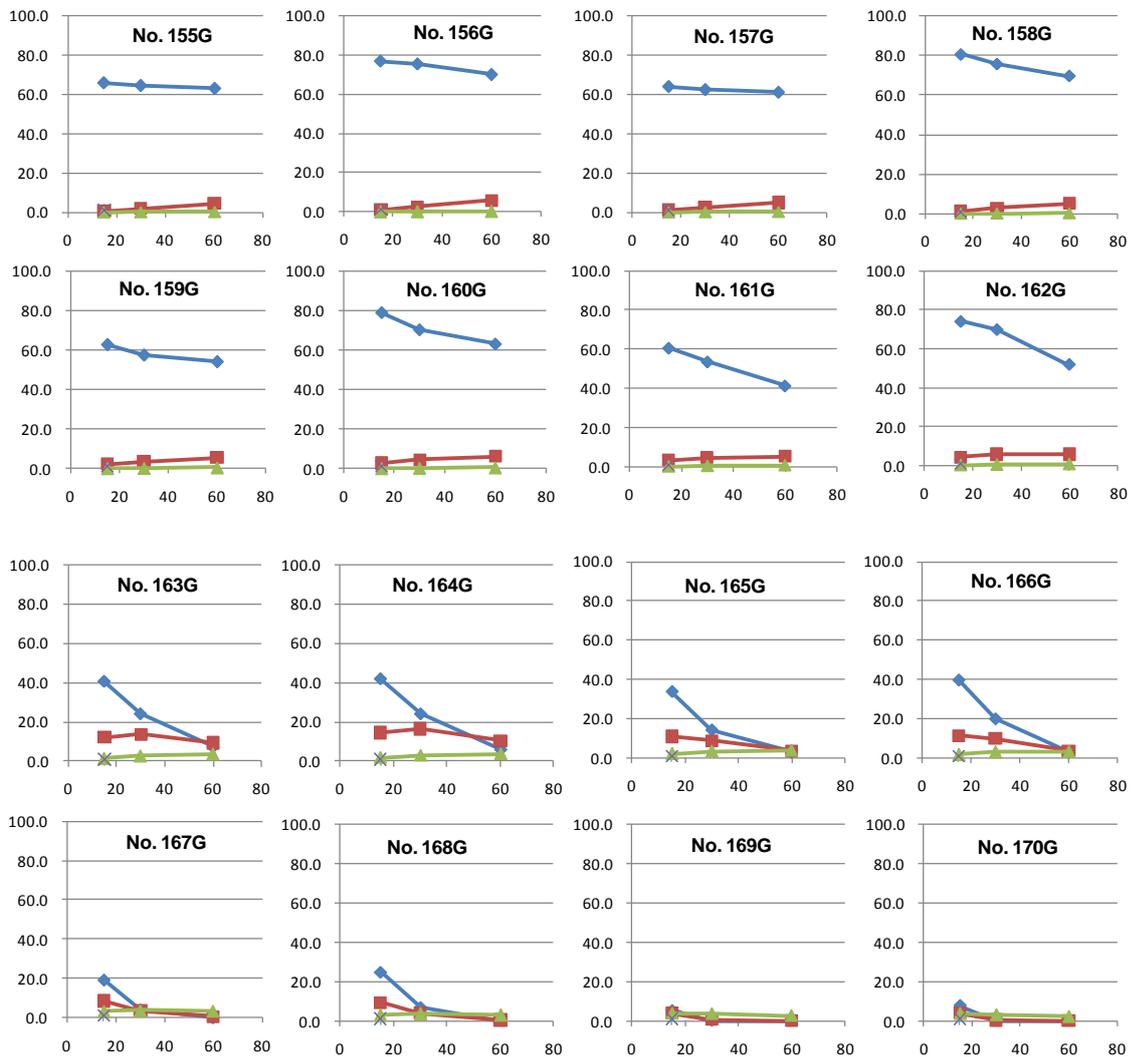


図 1-6-6 グルコースの希酸による分解で生成したヒドロキシメチルフurfural (■)、furfural (▲) の濃度とグルコース (◆) 濃度

1-6-4 反応系への各種塩、溶媒の添加効果

硫酸 0.368%溶液にリチウムクロライド、ジオキサン、スルホラン、グリセリン、エチレングリコール、2プロパノールをそれぞれ添加し、200℃におけるセルロースならびにグルコースの分解挙動を測定した。表 1-6-7、1-6-8 に反応条件とグルコース、ヒドロキシメチルフルフラール、フルフラールの生成量を、図 1-6-7、1-6-8 にこれらの時間変化のグラフを示す。リチウムクロライド添加系ではセルロース、グルコースともにグルコース濃度が低く、分解反応が加速された可能性がある。

表 1-6-7 セルロースの加水分解条件

実験 番号	反応溶媒	組成 (g)	溶媒の量 (mL)	溶質 溶媒	溶質/溶媒 (mg)/(mL)	時間 (分)	温度 (°C)	グルコースの割合 (%)	HMFの割合 (%)	フルフラールの割合 (%)
	硫酸/水	0.368/100	1	リチウムクロライド	50	20	200	0.0	1.1	1.8
	硫酸/水	0.368/100	1	リチウムクロライド	50	40	200	0.0	0.0	0.8
No. 63	硫酸/水	0.368/100	0.5	ジオキサン	0.5	10	200	30.9	13.5	3.9
	硫酸/水	0.368/100	0.5	ジオキサン	0.5	20	200	11.5	13.2	5.3
	硫酸/水	0.368/100	0.5	ジオキサン	0.5	40	200	0.0	3.4	4.6
No. 70	硫酸/水	0.368/100	0.5	スルホラン	0.5	10	200	24.0	9.5	4.1
	硫酸/水	0.368/100	0.5	スルホラン	0.5	20	200	11.3	7.0	4.2
	硫酸/水	0.368/100	0.5	スルホラン	0.5	40	200	0.0	2.1	4.7
No. 61	硫酸/水	0.368/100	0.5	グリセリン	0.5	10	200	16.2	0.3	1.1
	硫酸/水	0.368/100	0.5	グリセリン	0.5	20	200	9.2	1.2	2.8
	硫酸/水	0.368/100	0.5	グリセリン	0.5	40	200	0.0	0.4	1.9
No. 62	硫酸/水	0.368/100	0.5	エチレングリコール	0.5	10	200	21.2	1.0	1.7
	硫酸/水	0.368/100	0.5	エチレングリコール	0.5	20	200	16.5	1.5	2.6
	硫酸/水	0.368/100	0.5	エチレングリコール	0.5	40	200	8.6	0.8	2.7
No. 274	硫酸/水	0.368/100	0.5	2プロパノール	0.5	10	200	30.7	5.2	2.1
	硫酸/水	0.368/100	0.5	2プロパノール	0.5	20	200	24.3	10.3	4.0
	硫酸/水	0.368/100	0.5	2プロパノール	0.5	40	200	3.8	3.4	4.2

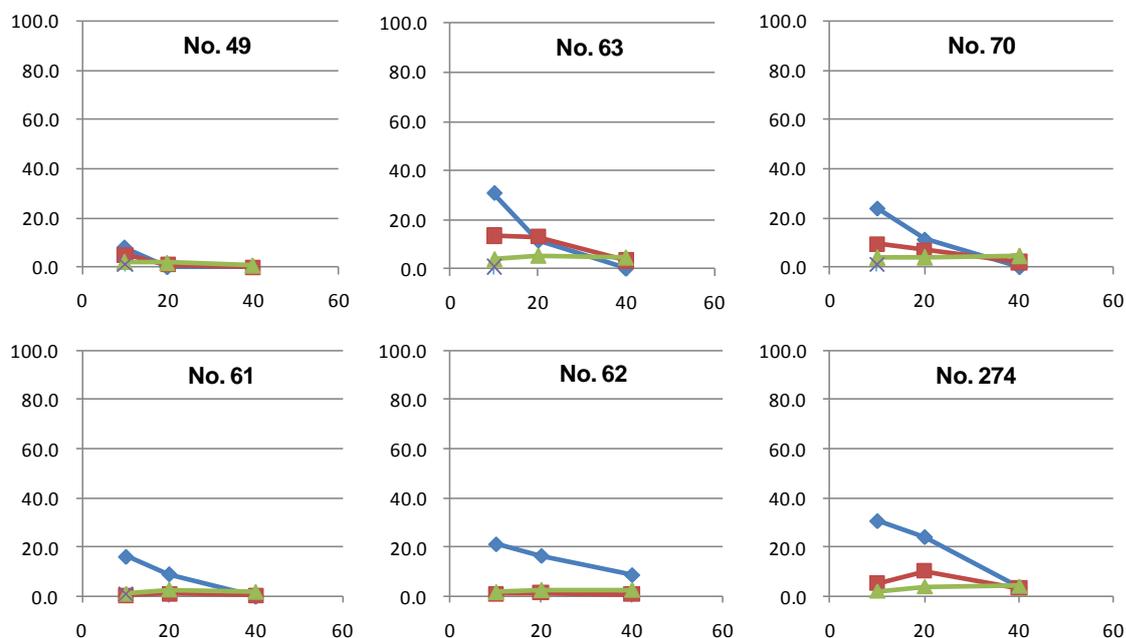


図 1-6-7 セルロースの希酸による加水分解で生成したグルコース (◆)、ヒドロキシメチルフルフラール (■)、フルフラール (■) の濃度

表 1-6-8 グルコースの加水分解条件

実験 番号	反応溶媒	組成 (g)	溶媒の量 (mL)	溶質 溶媒	溶質/溶媒 (mg)/(mL)	時間 (分)	温度 (°C)	グルコースの割合 (%)	HMFの割合 (%)	フルフラールの割合 (%)
No. 49G	硫酸/水	0.368/100	1	リチウムクロライド	50	10	200	2.1	1.9	1.0
	硫酸/水	0.368/100	1	リチウムクロライド	50	20	200	0.0	0.2	0.8
	硫酸/水	0.368/100	1	リチウムクロライド	50	40	200	0.0	0.0	0.4
No. 63G	硫酸/水	0.368/100	0.5	ジオキサン	0.5	10	200	29.2	18.6	3.2
	硫酸/水	0.368/100	0.5	ジオキサン	0.5	20	200	7.2	12.4	4.5
	硫酸/水	0.368/100	0.5	ジオキサン	0.5	40	200	0.0	2.6	4.2
No. 67G	硫酸/水	0.368/100	0.5	スルホラン	0.5	10	200	21.0	14.9	4.1
	硫酸/水	0.368/100	0.5	スルホラン	0.5	20	200	6.7	7.7	4.9
	硫酸/水	0.368/100	0.5	スルホラン	0.5	40	200	0.0	1.1	4.5
No. 61G	硫酸/水	0.368/100	0.5	グリセリン	0.5	10	200	17.1	0.8	1.2
	硫酸/水	0.368/100	0.5	グリセリン	0.5	20	200	12.9	0.5	1.7
	硫酸/水	0.368/100	0.5	グリセリン	0.5	40	200	0.0	0.1	1.2
No. 62G	硫酸/水	0.368/100	0.5	エチレングリコール	0.5	10	200	30.3	2.2	1.5
	硫酸/水	0.368/100	0.5	エチレングリコール	0.5	20	200	17.9	1.5	2.0
	硫酸/水	0.368/100	0.5	エチレングリコール	0.5	40	200	0.0	0.4	1.5
No. 69G	硫酸/水	0.368/100	0.5	27ロハノール	0.5	10	200	16.5	15.5	2.3
	硫酸/水	0.368/100	0.5	27ロハノール	0.5	20	200	3.8	11.8	3.1
	硫酸/水	0.368/100	0.5	27ロハノール	0.5	40	200	3.8	5.0	3.4

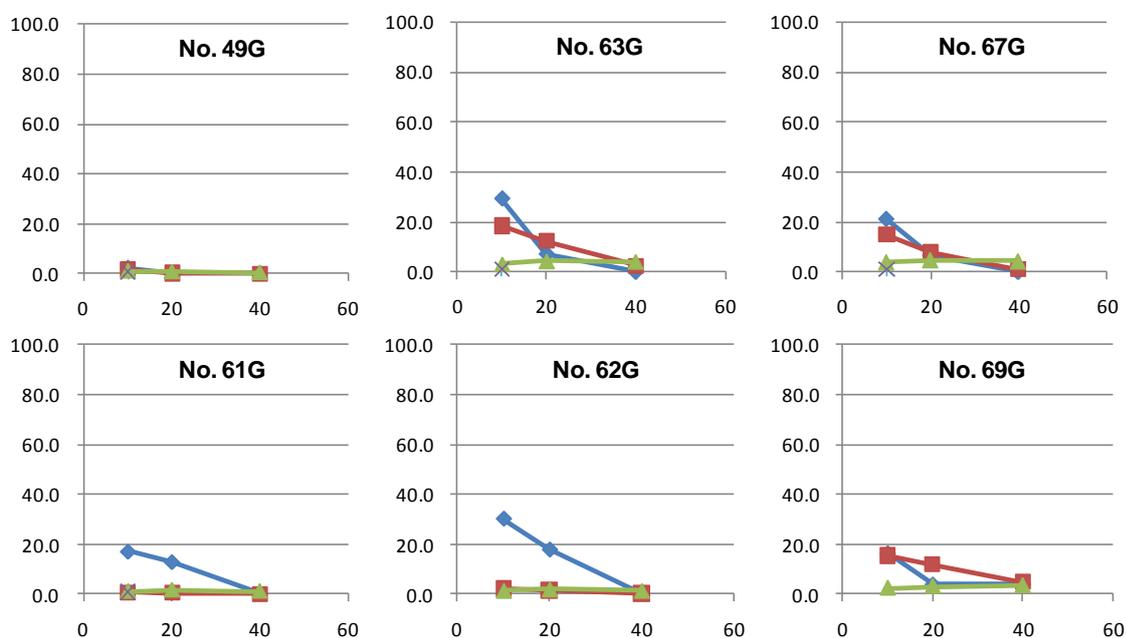


図 1-6-8 グルコースの希酸による分解で生成したヒドロキシメチルフルフラール (■)、フルフラール (▲) の濃度とグルコース (◆) 濃度

一方、セルロースの加水分解反応ではジオキサン、2プロパノールの系でそれぞれ 31%のグルコース収率が得られた。これは未添加の系(表 3-4-3、No. 42、26%)よりも若干高い濃度であった。またこれらの系ではヒドロキシメチルフルフラールの濃度も 14、10%と未添加系の 6%よりも高い濃度を示した。グルコースの分解でも同様の傾向が見られ、ジオキサンの系では 19%のヒドロキシメチルフルフラールが得られた。これらの結果から、ジオキサンや2プロパノールの添加はセルロースの加水分解への効果は若干であり、むしろ分解生成物であるヒドロキシメチルフルフラールの生成に効果が高い可能性が考えられた。

1-6-5 トリフルオロ酢酸の効果

トリフルオロ酢酸は強酸であるうえ沸点も 72.4 °C と低いため、蒸留による酸触媒の回収が可能であり、プロセスコストの低減の可能性がある。そこで、トリフルオロ酢酸 (0.9–16%)、エタノール混合溶液中でのセルロースならびにグルコースの 200°C における分解挙動を測定した。表 1-6-9、1-6-10 に反応条件とグルコース、ヒドロキシメチルフルフラール、フルフラールの生成量を、図 1-6-9、1-6-10 にこれらの時間変化のグラフを示す。

表 1-6-9 セルロースの加水分解条件

実験 番号	反応溶媒	組成	溶媒の量 (mL)	時間 (分)	温度 (°C)	グルコースの割合 (%)	HMFの割合 (%)	フルフラールの割合 (%)
		(g)						
No. 85	TFA/水/EtOH	0.9/27.3/71.8	1	10	200	8.7	1.1	0.6
	TFA/水/EtOH	0.9/27.3/71.8	1	20	200	13.8	2.8	1.2
	TFA/水/EtOH	0.9/27.3/71.8	1	40	200	18.3	6.1	2.1
No. 84	TFA/水/EtOH	1.8/28.3/69.9	1	10	200	0.0	0.4	0.2
	TFA/水/EtOH	1.8/28.3/69.9	1	20	200	7.6	1.1	0.5
	TFA/水/EtOH	1.8/28.3/69.9	1	40	200	11.4	2.6	1.1
No. 86	TFA/水/EtOH	3.4/53.0/43.6	1	10	200	20.2	3.6	1.8
	TFA/水/EtOH	3.4/53.0/43.6	1	20	200	19.3	5.0	2.2
	TFA/水/EtOH	3.4/53.0/43.6	1	40	200	16.6	6.9	3.6
No. 77	TFA/水/EtOH	6.7/50.2/43.1	1	10	200	23.4	5.9	2.6
	TFA/水/EtOH	6.7/50.2/43.1	1	20	200	18.8	6.8	2.9
	TFA/水/EtOH	6.7/50.2/43.1	1	40	200	5.2	3.3	3.6
No. 87	TFA/水/EtOH	8.3/48.9/42.8	1	10	200	20.6	5.0	2.1
	TFA/水/EtOH	8.3/48.9/42.8	1	20	200	15.8	6.4	3.0
	TFA/水/EtOH	8.3/48.9/42.8	1	40	200	3.2	2.4	2.9
No. 78	TFA/水/EtOH	16.2/42.2/41.6	1	10	200	10.1	6.3	4.0
	TFA/水/EtOH	16.2/42.2/41.6	1	20	200	0.0	2.7	3.7
	TFA/水/EtOH	16.2/42.2/41.6	1	40	200	0.0	0.2	2.8

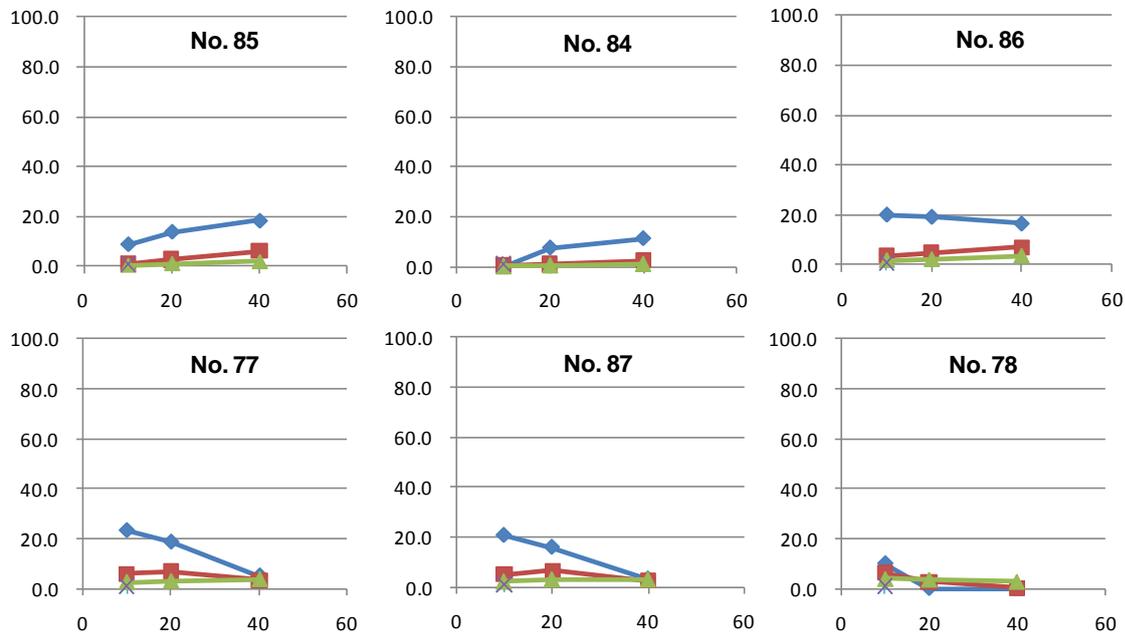


図 1-6-9 セルロースの希酸による加水分解で生成したグルコース (◆)、ヒドロキシメチルフルフラール (■)、フルフラール (■) の濃度

表 1-6-10 グルコースの加水分解条件

実験 番号	反応溶媒	組成	溶媒の量	時間	温度	グルコースの割合	HMFの割合	フルフラールの割合
		(g)	(mL)	(分)	(°C)	(%)	(%)	(%)
No. 81G	TFA/水/EtOH	0.9/27.3/71.8	1	10	200	43.0	7.8	0.4
	TFA/水/EtOH	0.9/27.3/71.8	1	20	200	36.7	9.3	0.7
	TFA/水/EtOH	0.9/27.3/71.8	1	40	200	24.7	9.5	1.1
No. 80G	TFA/水/EtOH	1.8/28.3/69.9	1	10	200	40.7	5.8	0.3
	TFA/水/EtOH	1.8/28.3/69.9	1	20	200	46.6	8.7	0.5
	TFA/水/EtOH	1.8/28.3/69.9	1	40	200	30.7	11.2	1.0
No. 82G	TFA/水/EtOH	3.4/53.0/43.6	1	10	200	37.6	11.0	1.6
	TFA/水/EtOH	3.4/53.0/43.6	1	20	200	20.4	8.5	2.0
	TFA/水/EtOH	3.4/53.0/43.6	1	40	200	7.5	4.5	2.4
No. 75G	TFA/水/EtOH	6.7/50.2/43.1	1	10	200	24.0	8.9	2.0
	TFA/水/EtOH	6.7/50.2/43.1	1	20	200	9.9	5.8	2.5
	TFA/水/EtOH	6.7/50.2/43.1	1	40	200	0.0	1.5	2.3
No. 83G	TFA/水/EtOH	8.3/48.9/42.8	1	10	200	19.0	8.4	2.0
	TFA/水/EtOH	8.3/48.9/42.8	1	20	200	8.0	4.9	2.3
	TFA/水/EtOH	8.3/48.9/42.8	1	40	200	0.0	0.9	2.1
No. 76G	TFA/水/EtOH	16.2/42.2/41.6	1	10	200	5.8	5.3	2.3
	TFA/水/EtOH	16.2/42.2/41.6	1	20	200	0.0	1.2	2.4
	TFA/水/EtOH	16.2/42.2/41.6	1	40	200	0.0	0.1	1.7

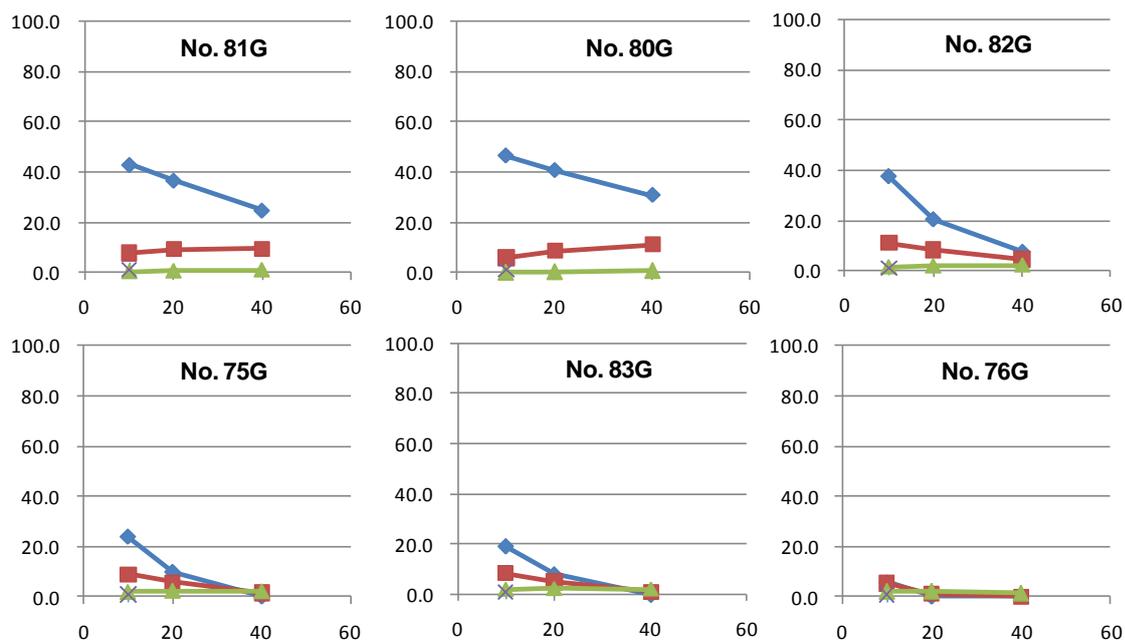


図 1-6-10 グルコースの希酸による分解で生成したヒドロキシメチルフルフラール (■)、フルフラール (▲) の濃度とグルコース (◆) 濃度

トリフルオロ酢酸の添加量の増加に伴い、セルロースの加水分解が進み、6.7%の添加時に23%のグルコース濃度が得られた。さらに添加量が増加すると、生成したグルコースの分解反応が速くなるため、グルコース収率は低下した。これらの挙動は硫酸の時と同様であるが、硫酸のpKaは-3、トリフルオロ酢酸のpKaは0.3であるため、同じ加水分解速度を得るためには硫酸よりも多くのトリフルオロ酢酸添加量が必要であった。セルロースのグルコースへの加水分解に対する効果は硫酸とそれほど変わらないものと思われた。

1-7 小括

本章では、ヒノキをサンプルとし、遊星型ボールミル処理およびオルガノソルブ処理を単独または組み合わせで行い、酵素糖化により評価するとともに酵素カクテルの検討を行った。酵素糖化に効果の高かったオルガノソルブ処理の至適条件は、「EtOH75/W25/A1、140°C、30 分間」または「EG75/W25/A1、170°C、30 分間」の処理であった。至適条件下のオルガノソルブ処理が、ボールミル処理とその後の酵素糖化に与える効果を図 1-5-5 に示す。

ボールミル単一処理の場合、約 20 分間で頭打ちとなり、30 分間まで処理するとマンノース収率がわずかに増加する。一方、オルガノソルブ処理をボールミル処理の前段に行った場合、10 分間のボールミル処理で、全ての単糖収率で 30 分間のボールミル単一処理よりも高い値が得られた。すなわち、オルガノソルブ処理を行うことでボールミル処理時間を 1/3 以下に短縮可能であった。オルガノソルブ処理では、30 分間の処理を行っているため、前処理の総時間を合わせると 40 分間である。しかしながら、ボールミル処理は消費エネルギーが大きく、短縮化またはオルガノソルブ処理に置き換えることはコスト面で有利である。

オルガノソルブ処理の溶媒種を比較すると、グルコースおよびキシロース収率において EG 系（EG75/W25/A1、140°C、30 分間）が EtOH 系（EtOH75/W25/A1、170°C、30 分間）よりも高い結果となった。

未処理ヒノキ、ボールミル 10 分処理、水熱処理のみ、水熱処理とボールミル 10 分処理を行った糖化収率の比較を行ったところ、未処理サンプルの糖収率は 4.6%と低く、EtOH 系でのオルガノソルブ処理も同様に 3.9%と低い値であった。EG 系で 10.3%と、EG 系でのみわずかに効果があった。10 分間のボールミル単一処理で 18.3%と、生ヒノキの約 4 倍の値が得られ、オルガノソルブ処理およびボールミル 10 分間処理を組み合わせることにより、約 8~10 倍の値という高い値が得られた（EtOH75/W25/A1_B10: 37.0%; EG75/W25/A1_B10: 43.8%）。

EG (b.p.: 197.3°C) は高沸点溶媒であるため、高温下でも圧力上昇が抑制できる半面、エタノール (b.p.: 78.4°C) のような低沸点溶媒で可能な蒸留による回収が困難である。一方でエタノールは蒸留回収が容易であるものの、高温下における圧力上昇が短所である。

ボールミル処理はオルガノソルブ処理に比べ高消費エネルギー型処理であり、オルガノソルブ処理のみで高糖化率を得る処理法の開発が必要であった。そこで、ヒノキをエタノール、水に微量の強酸（硫酸、トリフルオロ酢酸、塩酸）を添加した混合液を用いて、種々の条件にて処理し、それらをセルラーゼにより糖化することにより、前処理の反応条件について検討を行った。その結果、トリフルオロ酢酸を微量添加した EtOH50/W50/TFA の溶媒を用いた処理物で、昨年度の弱酸オルガノソルブ処理にボールミル粉碎処理を組み合わせたものの約 7 割の糖化率を得た。

糖化酵素について、これまで用いてきた Acremzyme に代わりに、Accellerase1500 を用いることで同じ酵素投入量でも大きく糖化率が増加し、微量の酸を添加したオルガノソルブ処理だけでも、ボールミル処理および弱酸オルガノソルブ処理の組み合わせと同等以上のグルコース収率を達成した。

リグノセルロースの希酸による糖化反応効率についての知見を得るために希酸を用いて結晶性セルロースのグルコースへの加水分解反応ならびに同条件下でのグルコースの分解反応を行い、グルコース、ヒドロキシメチルフルフラール、フルフラールの生成量を測定した。その結果、以

下の反応条件においてセルロースの加水分解により 30%以上のグルコース濃度が得られた。

0.184%硫酸、180℃：30%（180分）

0.368%硫酸、180℃：32%（180分）

0.092%塩酸、200℃：31%（20分）

0.4%硫酸 75/エタノール 25、200℃：31%（15分）

0.368%硫酸 50/ジオキササン 50、200℃：31%（10分）

0.4%硫酸 50/2プロパノール 50、200℃：31%（10分）

酸の種類の違いや有機溶媒の添加はセルロースの加水分解によるグルコースの生成に若干の影響を与えるものの、硫酸の場合に比べ大きな変化は見られなかった。しかしながら、特にジオキササンの反応系への添加は、グルコースの分解生成物であるヒドロキシメチルフルフラールの生成を促進し、0.368%硫酸 50/ジオキササン 50、200℃の反応系では 14%のヒドロキシメチルフルフラールの生成が確認された。一方、リチウムクロライドを添加した反応系ではグルコースがほとんど検出されず、グルコースの分解反応が促進されたものと考えられた。

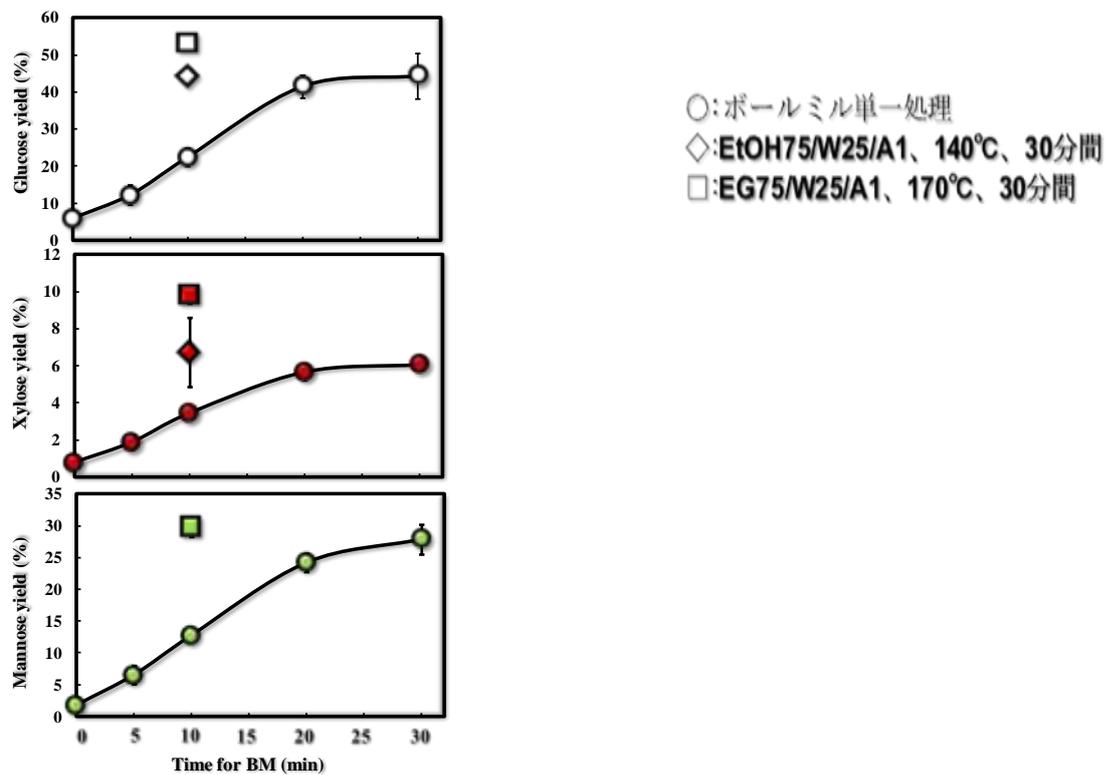


図 1-5-5 オルガノソルブ処理がボールミル処理に与える効果