

3 研究方法

3.1 研究方法の概要

実験のフローシートを図5に示す。

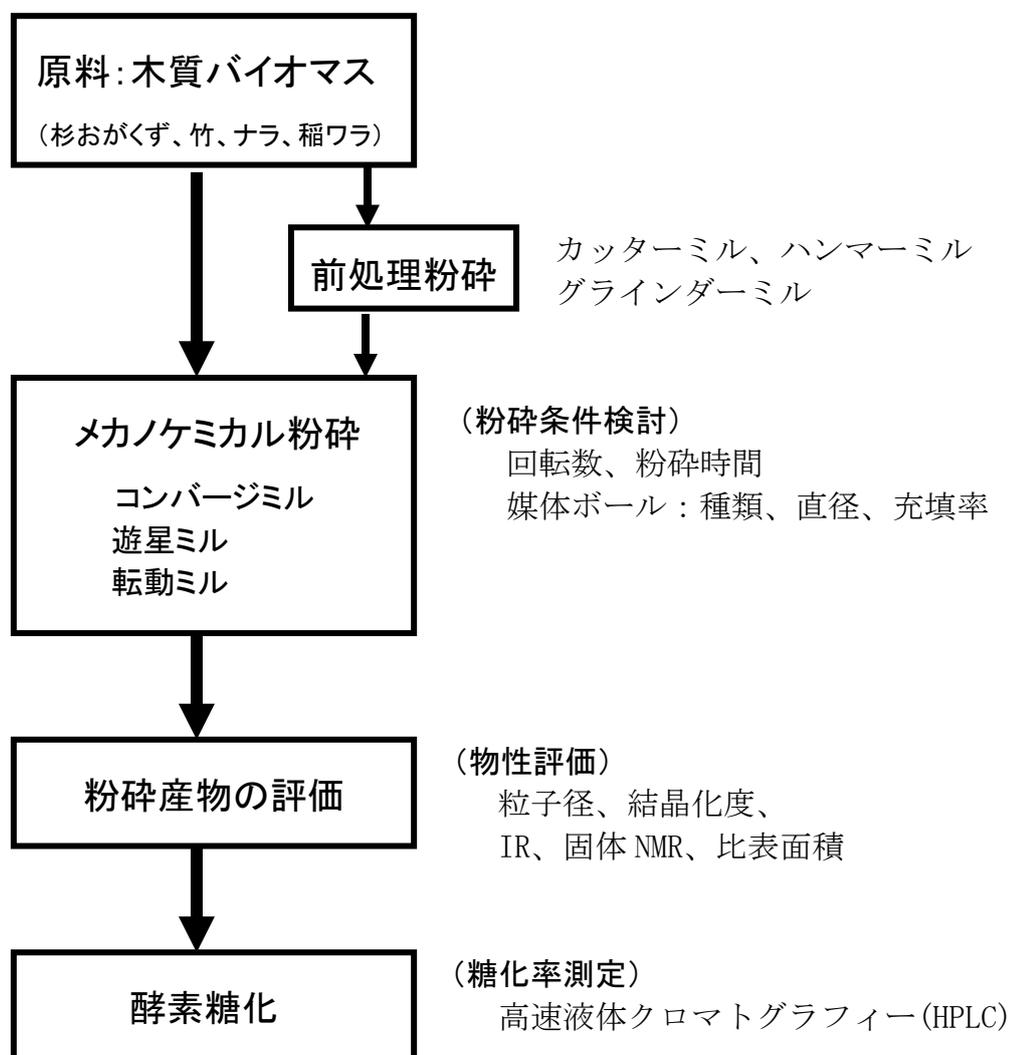


図5 原料の粉碎(メカノケミカル粉碎)と酵素糖化条件の検討

各種木質バイオマス試料（杉大鋸屑、なら、竹、稲わら等）を原料とし、コンバージミルを用いてメカノケミカル粉砕し、その後、セルラーゼ酵素を用いて糖化処理を行う。本研究では、①コンバージミルを用いたメカノケミカル粉砕条件の検討、②酵素糖化技術の最適化、③量産化に対応するためのコンバージミル連続粉砕装置の開発を実施する。

①（メカノケミカル粉砕条件の検討と粉砕物の評価）

原料として、様々な木質バイオマス試料（杉大鋸屑、なら、竹、稲わら等）について、まずは1L 小型コンバージミルで粉砕条件の検討を行う。粉砕条件としては、原料充填率、媒体ボール充填率、粉砕時間、回転数、添加剤（硫酸、酢酸、アルコールなど）添加などを検討する。また、高効率粉砕化のために、コンバージミル粉砕と他の粉砕機の併用による乾式複合前処理粉砕を検討する。さらに、様々な木質原料についてメカノケミカル粉砕による原料のナノレベルでの構造変化を XRD 測定、IR 測定、固体 NMR 測定により評価する。これらの粉体物性評価と②での酵素糖化性データとの相関性を定量的に把握し、酵素糖化特性におよぼす粉砕効果（メカノケミカル効果）を明らかにする。

②（酵素糖化技術）

各種セルラーゼを用いて酵素反応を行い、生成した糖濃度の分析を HPLC 法（グルコースやその他の生成糖の分析）、DNS 法（還元糖量）で行う。酵素条件として、酵素の種類、酵素量、反応時間、pH、温度などを検討する。また、通常セルラーゼ酵素への β -グルコシダーゼの添加についても検討する。

③（連続粉砕処理システムの開発）

粉砕機メーカー（株アーステクニカ）との共同作業でコンバージミル連続粉砕装置を設計・開発する。内容積は9L(6L+3L)とする。糖化率80%以上、粉末処理量10kg/day、エタノール製造単価 60~100 円/L（研究3年目に60円/Lに変更）（粉砕工程）を目標とする。

3.2 試料

本研究で用いた木質原料は、和歌山県産の杉おがくず（針葉樹）、竹（孟宗竹、岩手県産）、ナラ（広葉樹）、稲ワラ、微結晶セルロース（アビセル、旭化成ケミカルズ(株)製 PH-101）である。参考までに各種木質原料の一般に公開されている組成値を表 1 に示す。

表 1. 各種木質原料の組成

木質試料	セルロース	ヘミセルロース	リグニン	備考
杉大鋸屑	46%	22%	30%	
竹	43%	35%	22%	孟宗竹
ナラ	48%	29%	23%	
稲ワラ	48%	24%	4.4%	
アビセル試薬	100%			微結晶セルロース

杉おがくずは自然乾燥したものをそのまま使用する（含水率は 12.6%）。微結晶セルロース（以下、アビセルと呼称）は試薬をそのまま使用する。竹、ナラ、稲ワラについては、中型の切断式粉砕機にて荒粉砕した後、乾燥機で乾燥（60℃、48h 以上）し、カッターミル（60S）で予備粉砕したものを試料に用いた。

3.3 1L バッチ式コンバージミル粉砕(図3)

粉砕機としては、まずは 1L バッチ式コンバージミルを用いた。粉砕容器はステンレス製で、有効内容積は 1L（ $\phi 150 \times 64$ 、内容積は厳密には 0.88dm³）である。媒体ボールには主にクロム鋼球（SUJ-2）を使用し、直径 5~8mm のものを使用した。

3.4 コンバージミル連続粉砕装置(図3)

粉砕機メーカー（株アーステクニカ）との共同作業によりコンバージミル連続粉砕装置（内容積 6L + 3L）を完成させた。表 2 に連続粉砕装置の主な仕様を示す。

表 2. コンバージミル連続粉砕装置の仕様

形式	ET-09-1 型 コンバージミル
バレル（粉砕容器）	内容積 6L + 3L（SUS 製）、2 個並列に設置 6L（ $\phi 150 \times 340$ ）、3L（ $\phi 150 \times 170$ ）
所要動力	1 Kw/200V/3 ϕ
駆動方式	V ベルト駆動
回転数	可変速
原料供給	手動（スクリュウ式）
原料排出	自動
ガイドベーン	幅 58mm、材質 SKH51

3.5 粉砕産物の評価

木質バイオマス原料をメカノケミカル粉砕すると粒子径およびセルロースの結晶性が変化する。図6はXRDを用いて測定した杉おがくずコンバージミル粉砕物の結晶構造変化を示す。粉砕時間の経過とともに、木質中のセルロースの結晶性が低下し非晶質化することがわかる。本研究では、粉砕産物の評価として、平均粒子径(メジアン径、 D_{50})、粉末X線回折(XRD)測定によるセルロースの結晶化度を求めた。

3.5.1 平均粒子径の測定

平均粒子径の測定には、レーザー回折・散乱式粒度分布測定装置(マイクロトラック社製、X-100)を使用し、メタノールを分散媒として、超音波照射(5分間)後に測定した。

3.5.2 結晶化度の測定

XRD測定では、X線回折装置(日本電子(株)製、JDX-3530)を使用し、X線にはCu-K α 線を用い、管電圧30kV、管電流30mAで測定した。木質中のセルロースの結晶化度の計算には、XRD測定よりSegalら¹⁶⁾が提案した結晶化度指数(CrI)を用いた。

3.5.3 固体¹³C-NMR分析(外部分析センター委託で測定)

[目的] 原料のマイクロレベルでの構造変化を固体NMRにより解析する
[装置] Chemagnetics製 CMX300 7.5mmプローブ
[測定方法] CPMAS法(共鳴周波数 75.5563MHz)
[測定条件] 90° pulse 3.4 μ s, 帯域幅: 30Hz、繰り返し時間:5s
回転数:5kHz、積算回数:1200~2000回

3.5.4 FT-IR分析(外部分析センター委託で測定)

[目的] 原料のマイクロレベルでの構造変化を調べる。
[装置] FTS-165 (Biorad製 FT-IR)
[測定方法] FT-IR/ATR法(Geプリズム)、FT-IR/透過法
[積算回数] 32回(ATR法)、16回(透過法)

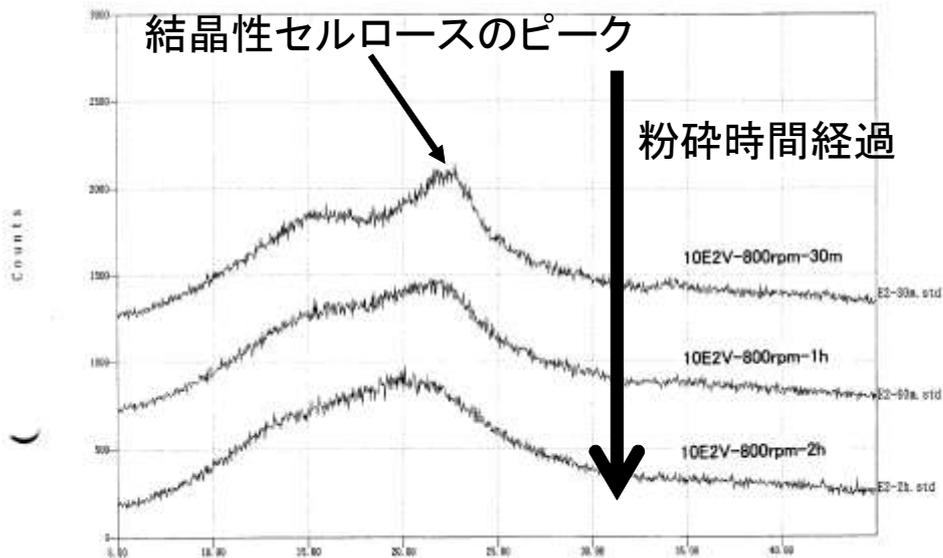


図6 コンバージミル粉碎物のXRD図

3. 6 酵素糖化試験

3. 6. 1 セルラーゼについて

(セルラーゼによるセルロースの分解様式について)(図7)

セルラーゼは主に、セルロース鎖に対しランダムに作用してセロオリゴ糖を生産するエンド型セルラーゼ(エンドグルカナーゼ)と、セルロース鎖の端から作用してセロビオースを生産するエキソ型セルラーゼ(セロビオヒドロラーゼ)の2つに分類される。さらに、これらの酵素によって生産されたセロビオースに対し β -グルコシダーゼが作用し、最終的に構成単糖であるグルコースにまで分解される。

今回は、通常のセルラーゼである合同酒精(株)製セルラーゼGODO TCD-H13(各種の酵素が入る)を主に用い、 β -グルコシダーゼの添加効果を見るときには、合同酒精(株)製セルラーゼ(GODO TCD-H13)にノボザイム製の β -グルコシダーゼ(Novozyme 188)を少量添加している。

(実験で使用した酵素の仕様)

① セルラーゼ

- 合同酒精(株)製 GODO TCD-H13(Lot No. 040602) *Trichoderma reesei* 由来
FPase : 592 U/g、CNCCase : 13,800 U/g、 β -GDase : 227 U/g
- ジェネンコア協和(株)製 Accellerase 1000 (Lot No. 1600844643)
Cellulase : 2707 CMCU/g、 β -glucosidase : 431 U/g

② ベータグルコシダーゼ

● Novozyme 社製 Novozyme 188 (Lot No. 060m1775v)

Aspergillus niger 由来セロビアーゼ、酵素活性：269 U/g (CBU/g)

エンド型

β -1,4-エンドグルカナーゼ (EG)

→ セルロース鎖をランダムに切断

エキソ型

セロビオヒドロラーゼ I (CBH I)

→ セルロース鎖の還元性末端からセロビオース単位で切断

セロビオヒドロラーゼ II (CBH II)

→ セルロース鎖の非還元性末端からセロビオース単位で切断

β -グルコシダーゼ (BGL)

→ セロビオースをグルコースに分解

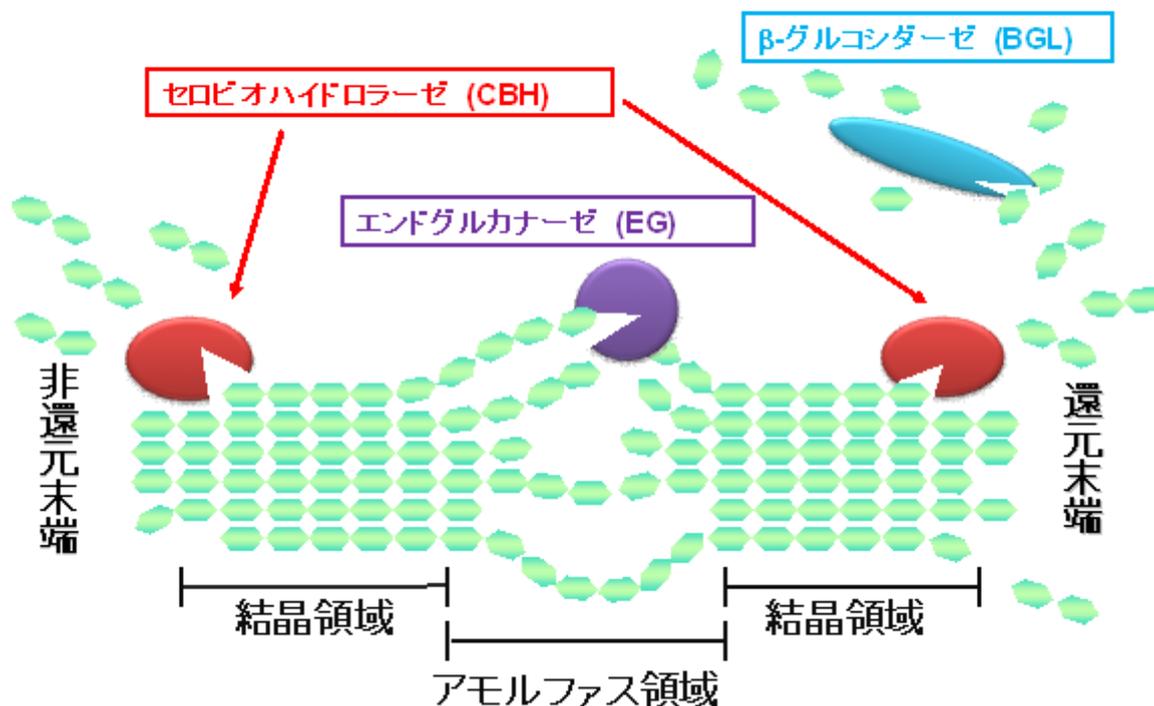


図7 セルラーゼによるセルロースの分解様式について

3.6.2 酵素糖化条件

杉おがくずのコンバージミル粉碎物を原料とした場合の標準的な酵素糖化条件は以下の通りである。メカノケミカル処理された粉碎産物 1.5g を 200ml フラスコ中で 20ml の蒸留水 (pH5.8) 中にけん濁・分散させ、セルラーゼ酵素 (合同酒精(株)製、GODO TCD-H3、*Trichoderma reesei* 由来) を加えて、40°C で加水分解した。反応開始後、所定時間後 (48h) に溶液をサンプリングし、90°C に設定した高温水中に 10 分間浸すことで酵素を失活させた。その後、アドバンテック製の限外ろ過膜 USY-1 (分画分子量 10,000) を用いて回収溶液中のセルラーゼを除去し、反応溶液中のグルコース濃度を示差屈折率検出器を備えた液体クロマトグラフ (HITACHI 社製、AS-4000) を用いて分析した。

表3. 糖化条件 (杉おがくず)

反応容器	200ml フラスコ
反応液	蒸留水 (pH5.8)
反応体積	20ml
基質	大鋸屑 1.5g
酵素	セルラーゼ (合同酒精 GODO TCD-H3)
酵素濃度	100mg(セルラーゼ)/20ml (反応液)
反応温度	30°C, 40°C, 50°C
振とう速度	120rpm
反応処理時間	48h

また、様々な木質原料 (杉おがくず、竹、ナラ、稲ワラなど) の比較実験においては、酵素糖化試験は以下のように行う。

粉碎産物を 50ml 広口ポリ容器 ((有) プラス川口社製) 中で酢酸緩衝水溶液 (pH5.0) 中にけん濁・分散させ、セルラーゼ酵素 (合同酒精(株)製を使用、*Trichoderma reesei* 由来酵素濃度; 15mg/10ml) を加えて 50°C で加水分解した。所定時間後 (5h, 24h, 48h, 72h) に溶液をサンプリングし、回収溶液中のグルコース濃度を HPLC(島津製作所製、LCsolution LC-20AD) で測定した。

表4. 糖化条件 (様々な木質原料)

反応容器	50ml 広口ポリ容器 (プラス川口社製)
反応液	酢酸緩衝水溶液 (pH5.0)
反応液量	10ml
基質	1.0g
酵素	セルラーゼ (合同酒精 GODO TCD-H3)
酵素濃度	15mg (セルラーゼ) /10ml (反応液)
反応温度	50°C
反応処理時間	5h, 24h, 48h, 72h

3. 6. 3 糖化率の計算

生成したグルコース濃度から糖化率の計算のときには、木質試料中の含水率 (12.6%) とセルロース含有率 (39.6%) を考慮し、次式によって算出した。

$$\text{対セルロース糖化率 [\%]} = \frac{\text{生成したグルコース重量} \times 100}{\text{おがくず重量} \times (1 - \text{含水率}) \times 0.396}$$

参考文献

- 16) L. Segal, J. J. Creely, A. E. Martin, Jr., and C. M. Conrad: "An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer", Textile Research Journal, **29**, 786-794 (1959)