

4 実験結果および考察

4.1 粉砕機による違い

木質バイオマス試料(杉大鋸屑)を代表的な各種粉砕機で粉砕し粉砕性を評価した。図8(点線部)は各種粉砕機を用いた場合の粉砕時間と平均粒子径の関係を示す。粉砕条件はそれぞれの粉砕機の標準的条件を用い、コンバージミル(楕アーステクニカ製 ET2 型、容器:SUS 製内容積 1 L、媒体ボール:クロム鋼球 8mm、充填率 10%、試料投入量:30g、回転数:800rpm)、転動ボールミル(容器:アルミナ製 2L、媒体ボール:アルミナ製 17mm、充填率 33%、試料投入量:50g、回転数:100rpm)、遊星ミル(容器:SUS 製 45ml、媒体ボール:クロム鋼球 15mm、7個/ポット、試料投入量:3g、回転数:590rpm)である。遊星ミルとコンバージミルを用いた場合には、わずか 10 分間の短時間粉砕で粒子径は大きく減少し $50\mu\text{m}$ 程度の微粒子が得られている。粉砕時間 30min 程度で粒子径が最小になり(約 $20\mu\text{m}$)、それ以上粉砕時間を増加させると逆に粒子径は増加する。これは、一度微粒子化した粉体がメカノケミカル活性化のために少しずつ凝集することを示している。ただし、遊星ミルとコンバージミル粉砕を比較した場合においては、コンバージミルを用いた場合に凝集の程度は少なく微粒化に優れていることがわかる。一方、転動ボールミルを用いた場合には、微粒化には長時間を要し、 $20\mu\text{m}$ 以下にするためには 20 h 以上の長時間粉砕が必要であることがわかる。図 10(a) と図 10(b) には、図 8 中に示した遊星ミル 1 h とコンバージミル 1 h 粉砕物の SEM 写真を示す。遊星ミル粉砕では $20\mu\text{m}$ 程度の微粒子の他、 $100\mu\text{m}$ 以上の凝集粒子も確認できる。一方、コンバージミル粉砕物では、大きな凝集粒子の生成は少なく、 $20\sim 30\mu\text{m}$ 以下の微粒子になっていることが確認できる。このように SEM 写真観察からも、コンバージミルを用いた場合に凝集粒子が少なく微粒化に有利であることがわかる。

生合成されたセルロースは、水素結合や疎水結合によりお互いが規則的に凝集してセルロースマイクロフィブリルを形成する。このセルロース分子が数十本集まったマイクロフィブリルは結晶性を示す。しかし、100%結晶化したセルロースマイクロフィブリルはなく 3 割程度の非晶部分を持っている。セルロースの場合、連続したフィブリルの束において、分子内・分子間水素結合が揃っている部分が結晶部分、乱れている部分が非晶部分といわれている。

物性や反応性の改質などを目的として、非晶セルロースを調整する場合がある。非晶セルロースの調整には酢酸セルロースを脱アセチル化するなどの化学的方法や溶解後に再生する方法などがある。一方、本実験のように機械的粉砕(メカノケミカル効果)によって非晶質化することも可能である。木質原料のメカノケミカル処理では、機械的粉砕エネルギーにより木質を微細化するとともに非晶質化され、化学反応(酵素反応性)向上が期待される。木質原料(杉大鋸屑)のセルロース試料の結晶性の評価は、測定の容易さから XRD 測定により求めた。

図 8(実線部)には、各種粉砕機を用いた場合の粉砕時間と XRD 測定から求めた結晶化度との関係を示す。遊星ミルとコンバージミルの場合に 1~2 h 程度の粉砕で結晶化度が最小(約 10%)となり、その後は粉砕時間による変化がほとんどなくなる。図 8

(点線)の平均粒子径のデータと比較すると、粒子径は30分程度の短時間粉砕で最小粒子径(約 $20\mu\text{m}$)に達しているが、結晶化度の方は、それよりも粉砕時間の長い1~2h程度で最小値(約10%)を示している。つまり、粒子径がある一定レベル(約 $20\mu\text{m}$)以下の微粒子になってから、その後、更なる粉砕エネルギーが加わることで結晶化度がさらに低下することがわかる。転動ボールミルの場合も同様なことが言える。転動ボールミルの場合、24hの粉砕で約 $20\mu\text{m}$ 程度の最小値になりその後ほぼ一定値を示すが、結晶化度が最小値を示すのは約48h以降となっている。

図9には、粉砕時間と糖化率(対セルロース糖化率)との関係を示す。コンバージミルと遊星型ミルを用いた場合に、1~2h程度の短時間粉砕で大きく糖化率が向上している。図8と比較してみると、糖化率は粉砕産物の平均粒子径および結晶化度に関係してくるが、結晶化度との相関性の方が高いことがわかる。つまり、80%以上の糖化率を得るためには、微粒子化だけでは不十分であり、微粒子化と同時に結晶化度を低下させる必要があり、約20%以下の結晶化度にするのが重要となる。一方、転動ボールミル粉砕では、80%以上の糖化率を得るためには100h以上の長時間粉砕が必要であることがわかる。

以上のことから、糖化率を向上(糖化率90%以上が目標)させるためには、メカノケミカル粉砕処理が有効であり、粉末粒子径 $20\mu\text{m}$ 以下でかつ結晶化度10%程度の粉砕産物が望ましいことがわかる。また、短時間粉砕で糖化率を向上させるためには、粉砕機として、コンバージミルと遊星ミルが望ましいと言える。しかし、遊星ミルでは少量粉砕しかできなく、量産性を考えた場合には、多量粉砕可能なコンバージミルが最適であると言える。

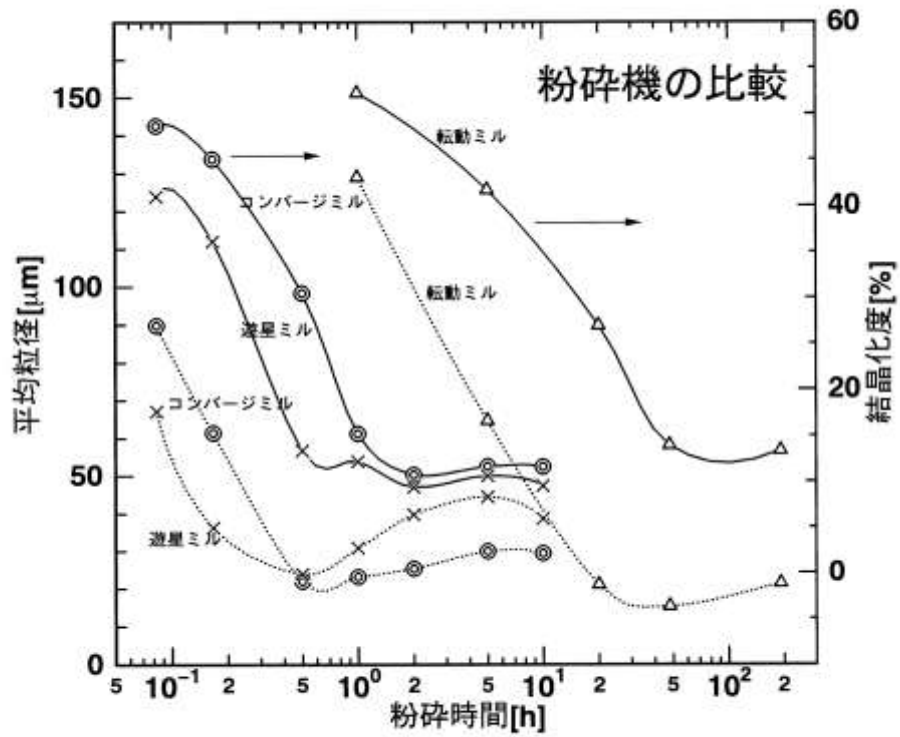


図8 粉砕時間と平均粒径および結晶化度との関係

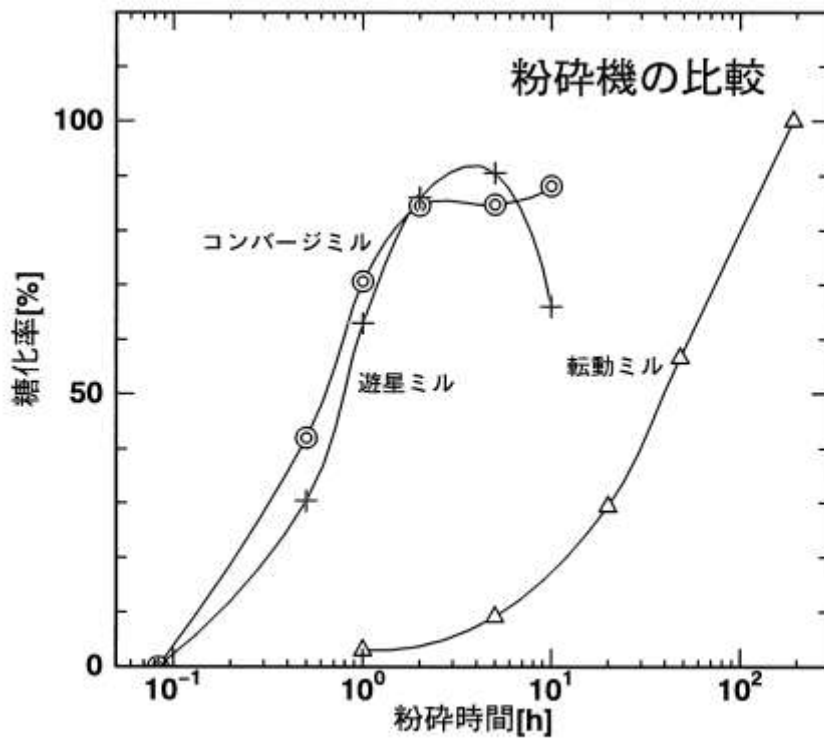


図9 粉砕時間と糖化率との関係

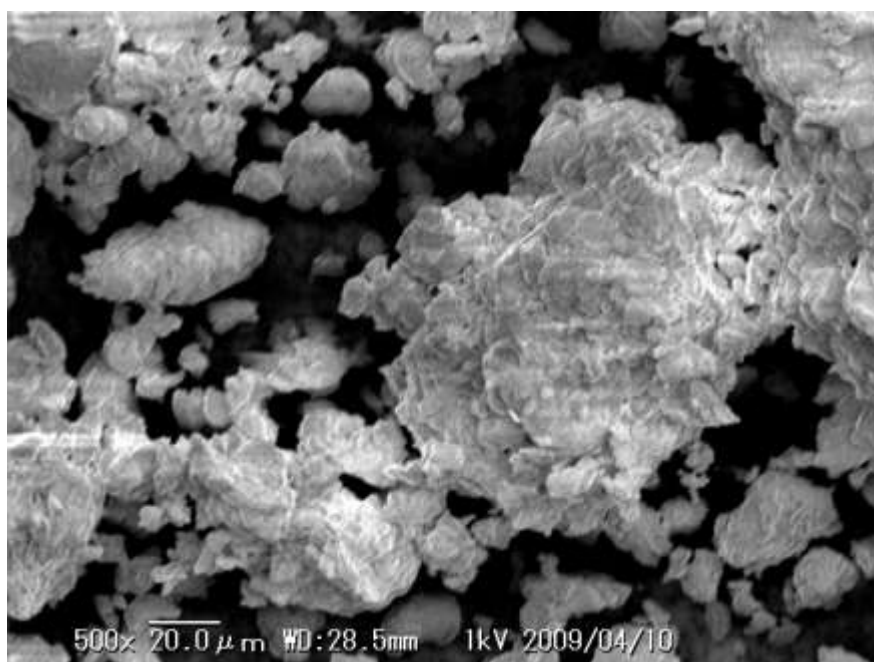


図10(a) おがくず粉碎産物の SEM 写真
(粉碎機:遊星ミル、1h粉碎)

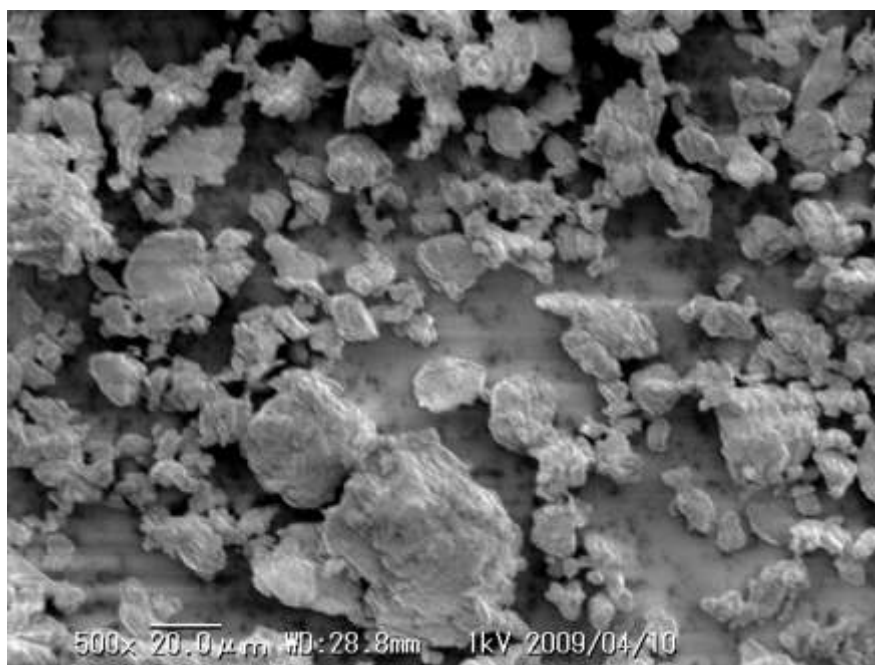


図10(b) おがくず粉碎産物の SEM 写真
(粉碎機:コンバージミル、1h粉碎)

4.2 コンバージミル粉碎条件の検討(1L機)

4.2.1 媒体ボール材質の違い

図11には、媒体ボール材質を変化させた場合の粉碎時間と粒子径および結晶化度の関係、図12には、粉碎時間と糖化率との関係を示す。ここでのコンバージミル粉碎条件は、容器：SUS製内容積1L、媒体ボール：ボール径8mm、充填率10%、試料投入量：30g、回転数：700rpmである。表5に粉碎条件を示す。密度の違う3種の媒体ボールを使用する。

表5. 粉碎条件

粉碎容器	内容量 1000ml (SUS 製)
媒体ボール	クロム鋼球, SUS304, YTZ
媒体ボール径	8 mm
ボール充填率	10%
試料量	30g (190ml)
回転速度	700rpm
粉碎時間	30min, 60min, 120min

表6. 媒体ボールの特性

	密度[g/cm ³]	硬度[HV]
クロム鋼球 (SUJ-2)	7.8	700~900
ステンレス球 (SUS304)	7.93	270~380
ジルコニア球 (YTZ)	6	1250

図11よりボール密度の高い金属球（ステンレス球やクロム鋼球）を使用した場合に、粉碎効率が良くなり、粒子径と結晶化度の減少に有利となる。図12の糖化率のデータにおいても、金属球を使用した場合に糖化率が大きくなり、その中でもクロム鋼球で糖化率が最も高くなる。これらのことより、以後の実験では、基本的に媒体ボールとしてはクロム鋼球を使用した。

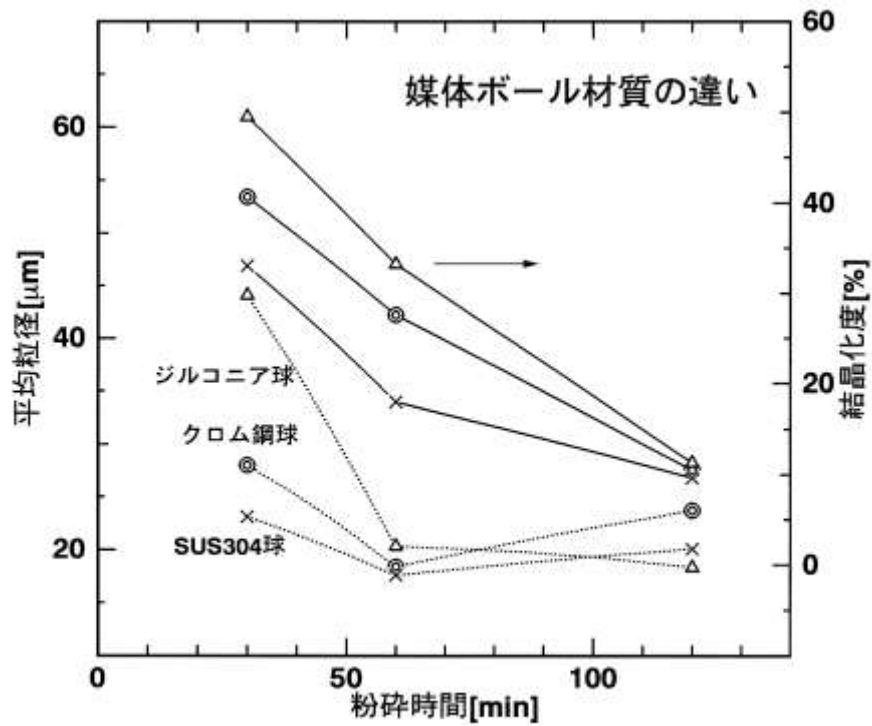


図11 粉砕時間と平均粒径および結晶化度との関係

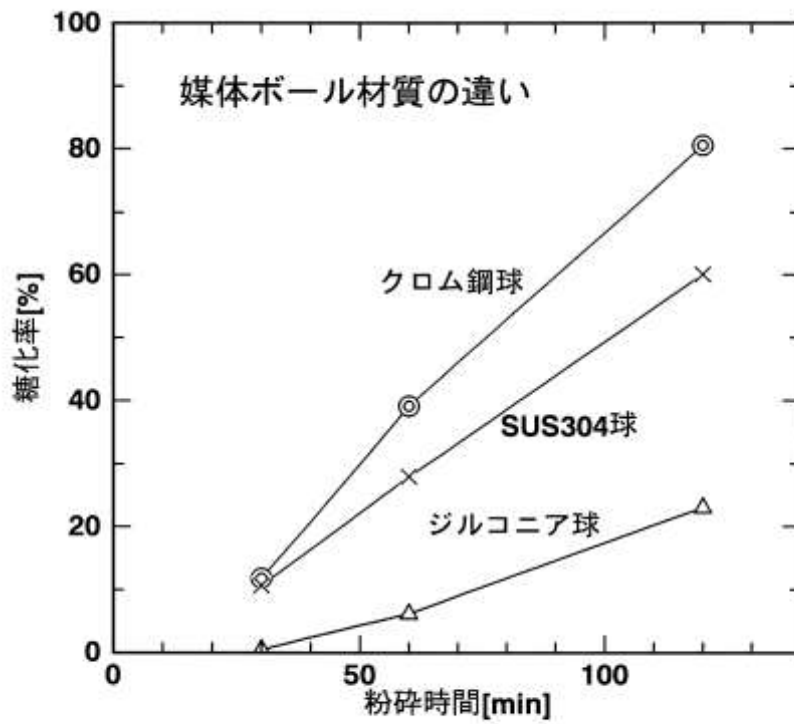


図12 粉砕時間と糖化率との関係

4. 2. 2 媒体ボール充填量

コンバージミル粉砕の検討として、まず、媒体ボール充填率の影響について調べる。表 7 には粉砕条件を示す。図 1 3 に、ボール径 6 mm において、粉砕容器中の媒体ボール充填率を変えた場合の粉砕時間と平均粒子径および結晶化度、図 1 4 には粉砕時間と糖化率との関係を示す。

表 7. 粉砕条件

粉砕容器	内容量 1000ml (SUS 製)
媒体ボール	直径 6mm クロム鋼球
ボール充填率 (体積)	5~15%
回転速度	800rpm
粉砕時間	10min~120min
試料投入量	30g

図 1 3 は平均粒子径、結晶化度のデータを示す。粉砕時間によって粒子径は減少し約 $15\mu\text{m}$ ~ $20\mu\text{m}$ で最小値を示し、60 分間以上の長時間粉砕では逆に増加傾向にある。これは、粉砕のメカノケミカル効果による凝集のためと思われる。60 分間までの短時間粉砕では、ボール充填率が高いほど平均粒子径が小さくなっている。結晶化度のデータ (実線) に着目すると、粉砕時間増加によって結晶化度が減少するが、粒子径が最小になってから、更なる粉砕時間が経過して結晶化度が最小値を示している。つまり、メカノケミカル処理により最小粒径に到達した後も、結晶構造破壊は更に進行しているものと考えられる。図 1 4 には糖化率のデータを示す。ボール充填率が高いと短時間粉砕でも高い糖化率を示していることがわかる。これは、高ボール充填率では、粉砕物とボールの衝突頻度が高く、効率的にメカノケミカル粉砕 (微粒子化、非晶質化) が行われるためと推定する。また、ボール充填率が 12% および 15% の条件では、粉砕時間が長くなると糖化率が減少する傾向が見られた。これは前述のように、過度の粉砕による粉体物構造の変化が要因と考えられる。

これらのことより、ボール充填率を高くした場合に、短時間粉砕でも結晶化度が低下し糖化率が向上するが、これは、ボール充填率が高くなったことでボールと試料の接触回数が増加したことが要因と考える。ただし、過粉砕にならないような粉砕条件を選ぶ必要がある。以上のことから、ボール充填率は大 (15%) のときに粉砕性が向上し、短時間粉砕 (20~30 分間) で糖化率 80% 以上を達成できることがわかった。

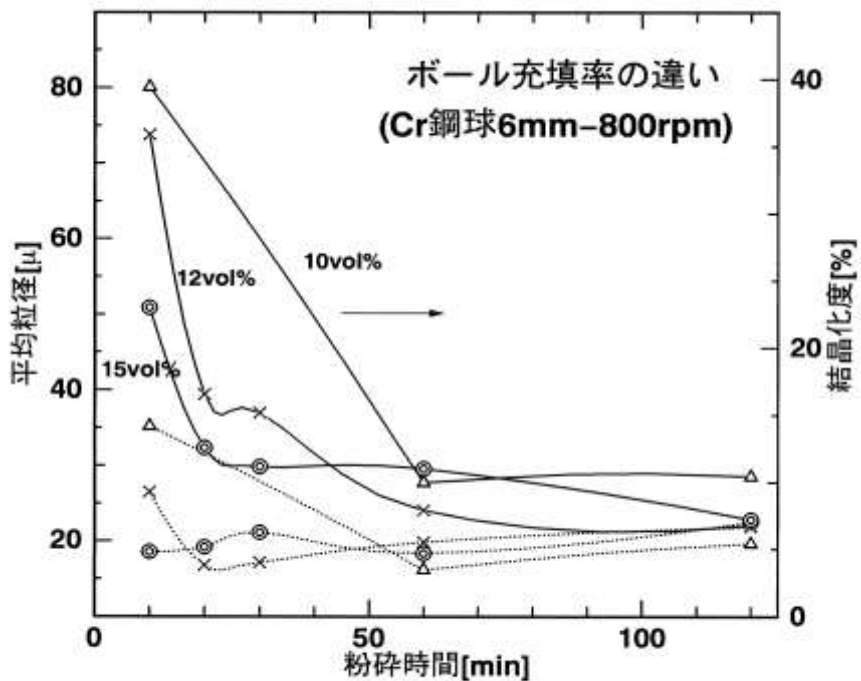


図13 粉砕時間と平均粒子径および結晶化度との関係

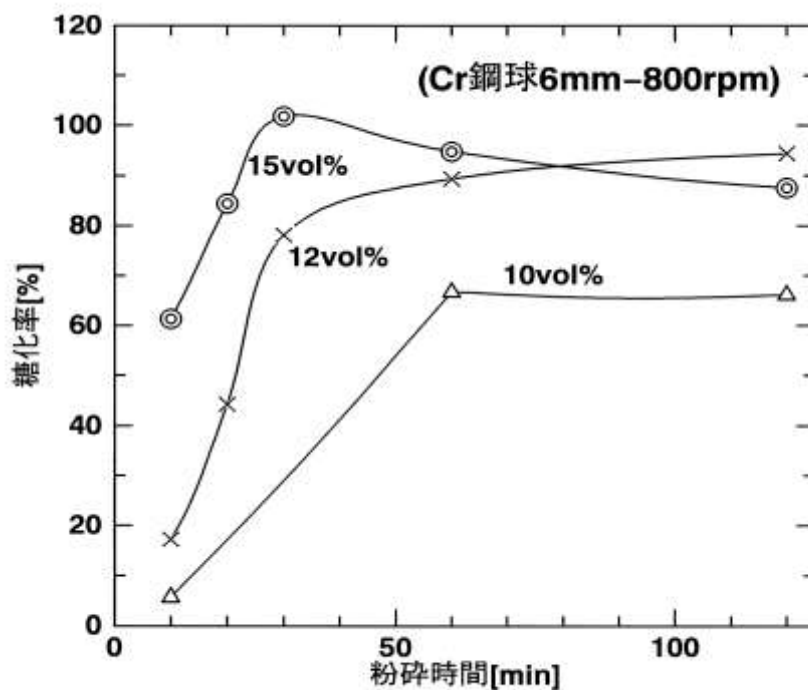


図14 粉砕時間と糖化率との関係

4.2.3 媒体ボール径

コンバージミル粉砕の検討として、次に、媒体ボール径の影響について調べる。表8には粉砕条件を示す。

表8. 粉砕条件

粉砕容器	内容量 1000ml (SUS 製)
媒体ボール(径)	クロム鋼球 (φ4, 5, 6, 8 mm)
ボール充填率	15%
回転速度	800rpm
粉砕時間	10min~120min
試料投入量	30g

図15にボール径の違った4種類の媒体ボール(φ4, 5, 6, 8)用いた場合の、粉砕時間と糖化率との関係を示す。図16では、30min 粉砕物に着目し、ボール径と糖化率との関係を示す。

図15、図16よりφ8よりφ4, 5, 6の小径ボールを使用すると、約20min~30min粉砕の短時間粉砕で糖化率が80%を超える値を示していることがわかる。これは、ボール径が小さい程、試料とボールの接触機会が増えることが要因と考える。

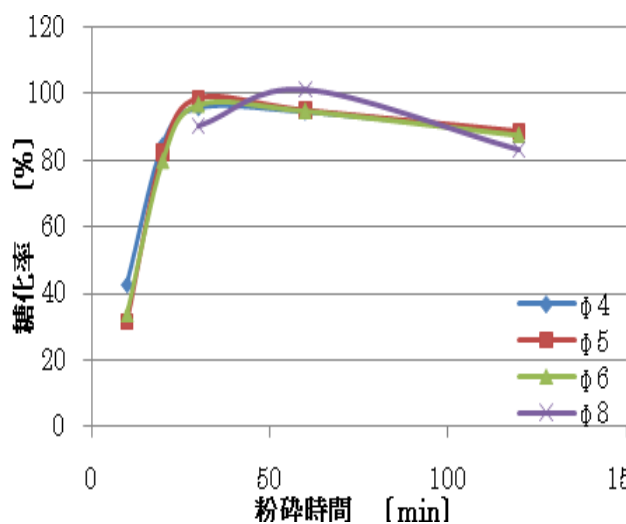


図15 .ボール径の影響

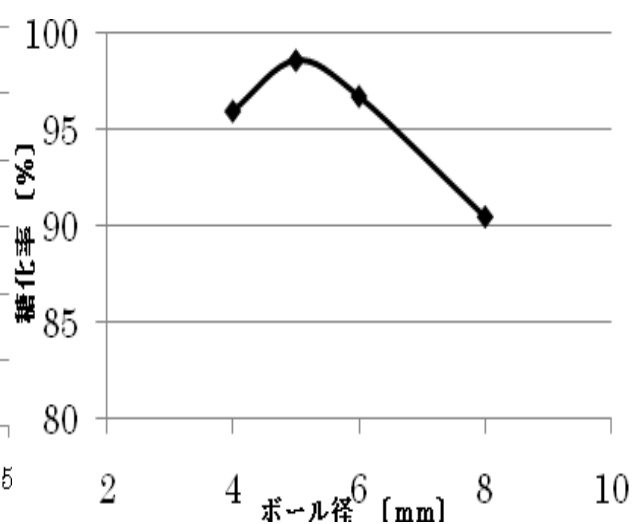


図16 ボール径の影響
(30min 粉砕物の比較)

4. 2. 4 媒体ボール量と試料投入量

上記(4. 2. 1)においてボール材質は比重の大きなクロム鋼球(SUJ-2)が望ましいことがわかった。次に、媒体ボールをクロム鋼球に限定し、試料投入量と媒体ボール量を変化させて実験を行った。表9に粉砕条件を示す。

表9. 粉砕条件

粉砕容器	内容量 1000ml (SUS 製)
媒体ボール	クロム鋼球 (SUJ-2)
媒体ボール径	5mm
媒体ボール充填率	15%、20%
出発原料	ハンマーミル前処理大鋸屑
試料量	30g、40g、50g
回転速度	800rpm
粉砕時間	10、20、30、60min

図17には、粉砕時間と平均粒子径との関係を示す。いずれの条件でも粉砕時間10分で粒子径が大きく低下し、それ以降は増粒現象が観察される。また、この増粒現象は試料投入量が少ない30gで大きくなっている。図18には、粉砕時間と結晶化度、グルコース生成量との関係を示す。同図より結晶化度が小さい方がグルコース生成量が大となることがわかる。粉砕条件的に一番過酷と考えられる条件(試料量30g、ボール量20%)においては、30分以上の粉砕になるとグルコース生成量が減少している。これは、過粉砕状態になったためと推定する。図19には、図18の結果において粉砕時間を20分に固定した場合の試料量/媒体ボール量の体積比とグルコース濃度の関係を示す。同図より、試料量/媒体ボール量の体積比は小ほどグルコース生成量は増大することがわかる。

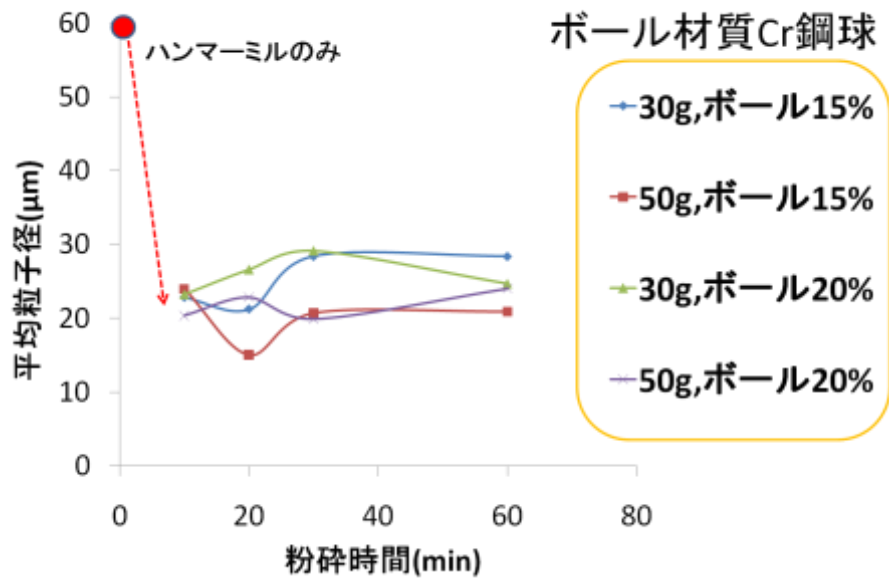


図17 粉砕時間と平均粒子径との関係（媒体ボール量、試料投入量の影響）（1L機）

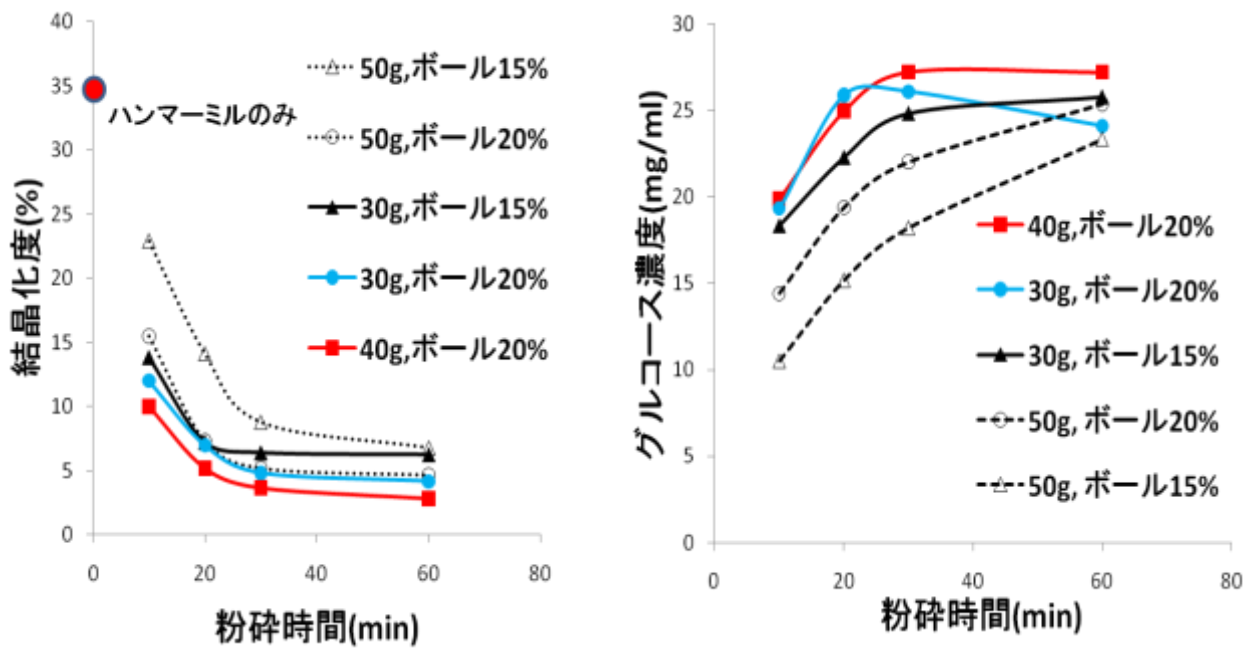


図18 粉砕時間と結晶化度、グルコース濃度との関係（媒体ボール量、試料投入量の影響）（1L機）

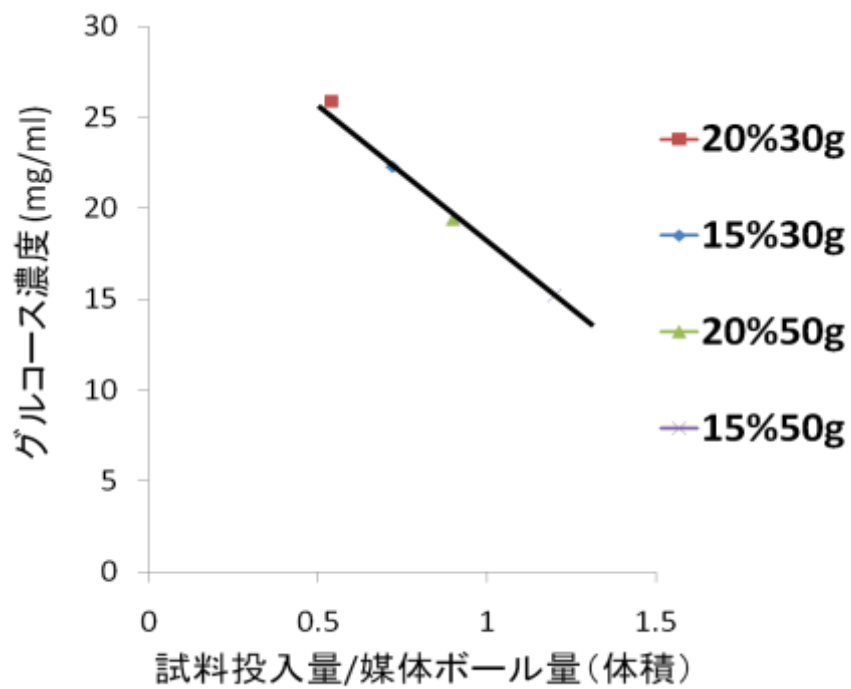


図19 試料投入量/媒体ボール量 比とグルコース濃度との関係
(試料投入量、媒体ボール量の影響) (1L 機)

4. 3 複合前処理粉碎(前処理粉碎機の検討)

4. 3. 1 前処理粉碎機だけの粉碎性

これまでの1Lバッチ式コンバージミルを使用しての検討より、糖化率80%以上を達成するための粉碎時間としては、約20~30分間が必要である。コンバージミル連続化を検討する場合、粉碎動力低減や原料粉体処理量を向上させるためには、粉碎時間の更なる短縮が必要である。目標値は粉碎時間10分以内で糖化率80%以上を達成させることである。

ここでは、コンバージミル粉碎の前に、他の粉碎機で前処理粉碎を行うことでコンバージミル粉碎時間が短縮できるか否かを検討した。前処理として使用した粉碎機は、ハンマーミル、カッターミル、グラインダーミルの3種である。それぞれの粉碎機の特徴は以下の通りである。

1. ハンマーミル (東京アトマイザー製造(株)製、TASM-1型)

高速回転するスイングハンマーの衝撃力と空隙内における粒子相互による衝撃作用で瞬時に粉碎する。連続運転が可能である。

2. カッターミル (台湾製 MASTER-500cc、輸入元:(株)東京ユニコム)

高速回転するカッターにより粉碎原料を瞬時に細かく粉碎する。

3. グラインダーミル (株)グローエンジニアリング製、GM1-15)

上下2枚の砥石による石臼式粉碎機。砥石の隙間を通過する時に発生する衝撃、遠心力、せん断力によって粉碎する。連続運転が可能である。



ハンマーミル



カッターミル



グラインダーミル

図20には、それぞれの前処理粉碎機だけによる平均粒子径の比較を示す。カッターミルとグラインダーミルに比べ、ハンマーミルによる粒子径がかなり小さな値(約60 μ m)になっていることがわかる。コンバージミル1分粉碎とグラインダーミルでの粒子は、目で見ても粗いことが確認できる。

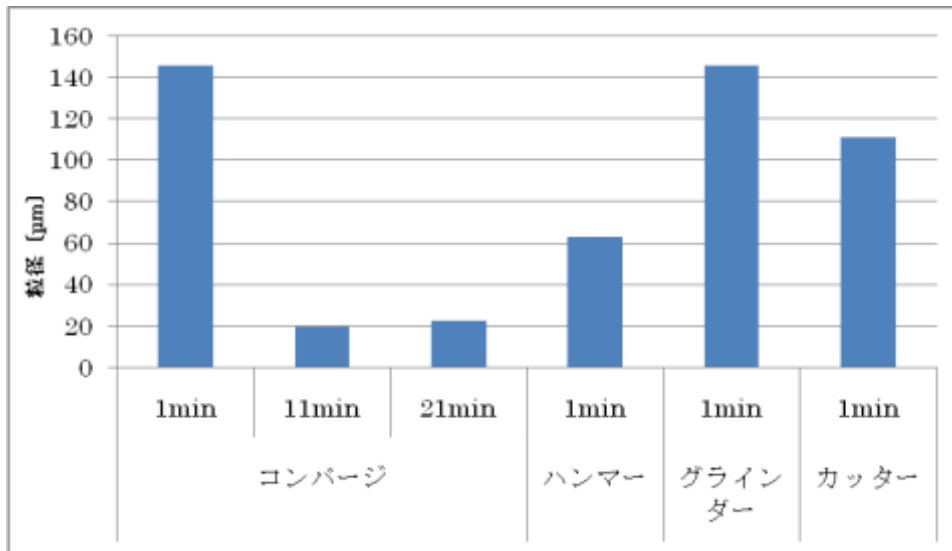


図20 前処理粉砕機だけによる平均粒子径の比較

図21には、それぞれの前処理粉砕機だけによる結晶化度の比較を示す。カッターミルとグラインダーミルに比べ、ハンマーミルによる結晶化度が低くなっていることがわかる。また、コンバージミル1分粉砕では結晶構造が破壊されないが、11分では結晶構造の破壊が進んでいることがわかる。

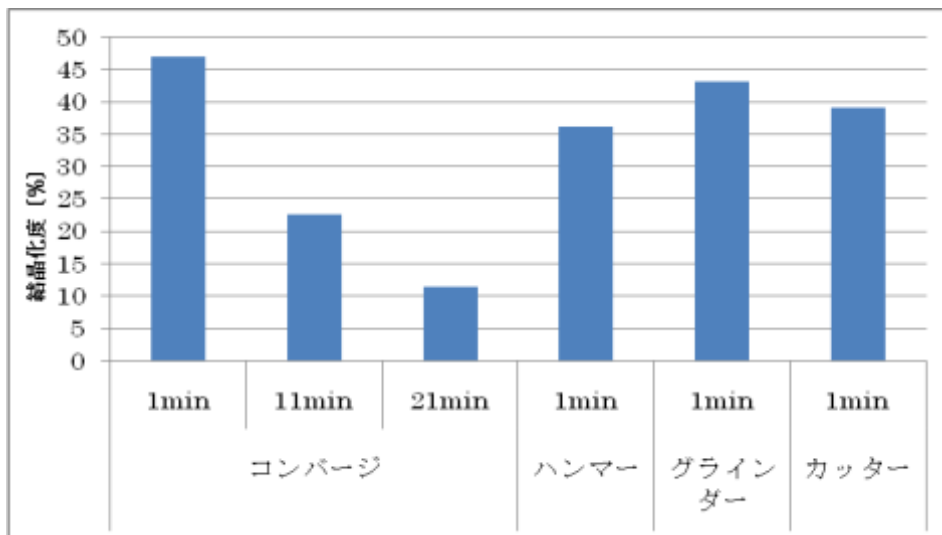


図21 前処理粉砕機だけによる結晶化度の比較

4.3.2 複合前処理粉碎の粉碎性(平均粒子径と結晶化度)

図22には、前処理粉碎機とコンバージミル粉碎を組合せた場合(複合前処理粉碎)のコンバージミル粉碎時間と平均粒子径(D_{50})と結晶化度の関係を示す。ここで、例えば、粉碎時間10分の場合は、前処理粉碎したものをコンバージミルで10分間粉碎したことを示す。

前処理粉碎の時間は以下の通りである。

カッターミル(バッチ式): 1分間/30g原料

ハンマーミル(連続式): 1分間/30g原料

グラインダーミル(連続式): 1分間/30g原料

また、コンバージミルの条件は、容器:SUS製内容積1L、媒体ボール:クロム鋼球、ボール径5mm、充填率15%、試料投入量:30g、回転数:800rpmである。

図22より、前処理なしに比べ、ハンマーミル前処理粉碎したものの粒子径が最も低下していることが分かる。それぞれの前処理粉碎したものにおいて、粉碎時間が20分のものでは、10分よりも粒子径が増加しており、粒子の凝集が起こっている。

結晶化度については、コンバージミル粉碎のみのもものと比較して、ハンマーミルを施したものが前処理の効果が大きく出ている。粉碎時間10分という短時間で結晶化度が大きく低下している。コンバージミル10分では結晶化度が5%付近の値を示しており、ハンマーミルの前処理効果(特に、短時間での微粒子化)が大きく関与している。これらことより、コンバージミルで結晶性を低下させる場合には、一度、微粒子化(約50 μ m程度)することが効果大であることがわかる。

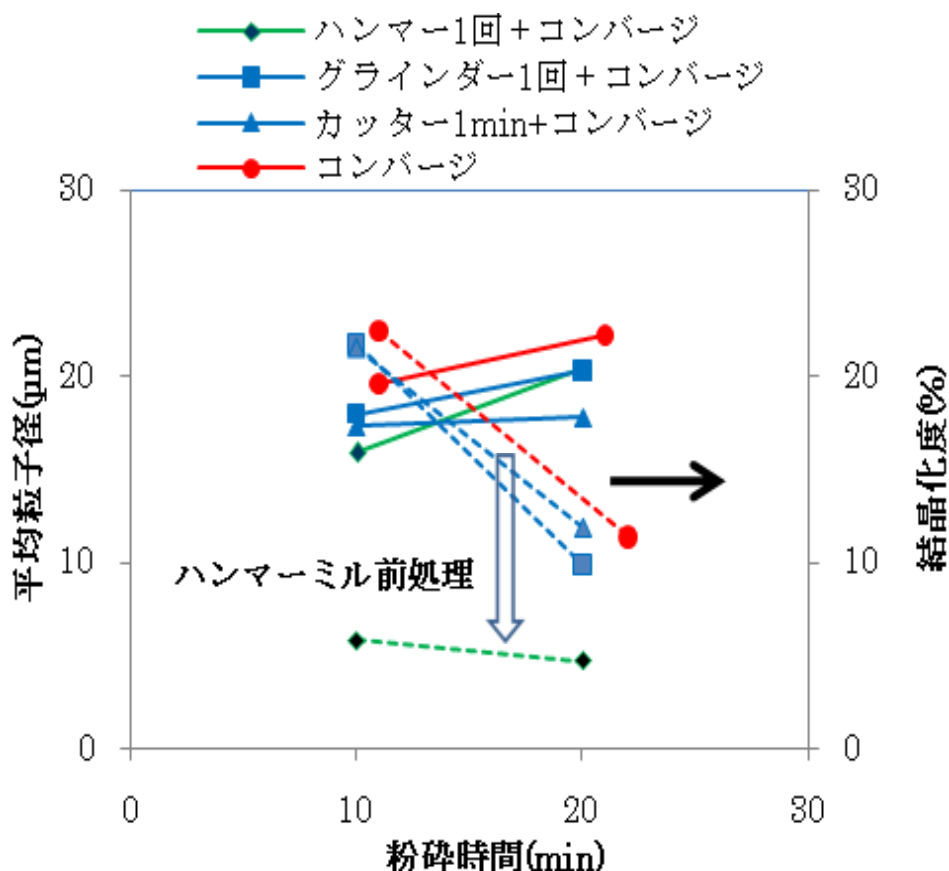


図22 複合前処理粉砕の場合の平均粒子径と結晶化度の関係

4. 3. 3 複合前処理粉砕の粉砕性(糖化率)

図23には、前処理粉砕を施した場合（複合前処理粉砕）のコンバージミル粉砕時間と糖化率との関係を示す。図22の結晶化度のデータでは、ハンマーミル前処理が効果的であったが、糖化率のデータにおいても、ハンマーミル前処理（1分間）が効果的であることがわかる。同図より、コンバージミル粉砕10分で顕著な差が現れ、未処理で糖化率30%程度のものが、ハンマーミル前処理がある場合には糖化率が約65%になることがわかる。以上のことよりハンマーミルによる前処理粉砕を施すことにより、コンバージミル粉砕の粉砕時間を短縮しても糖化率が向上することがわかる。つまり、前処理粉砕が無い場合は糖化率80%達成のためにはコンバージミル20分以上の粉砕が必要であったが、前処理粉砕（ハンマーミル処理1分）を施すと、コンバージミル10～20分粉砕で、糖化率80%が達成できることがわかる。

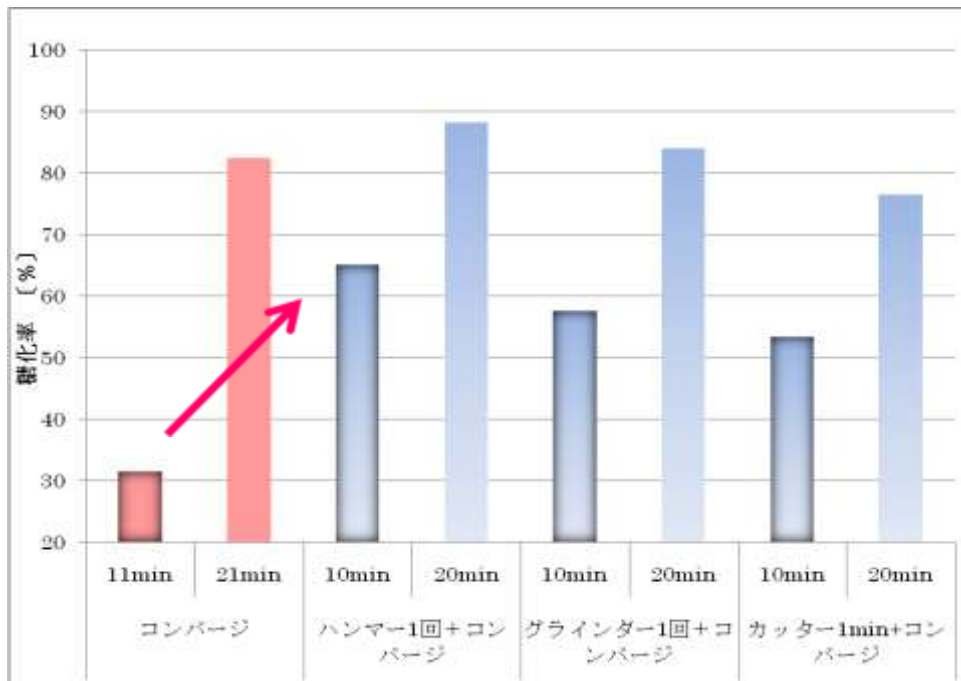


図23 複合前処理粉砕の場合の粉砕時間と糖化率との関係

4. 3. 4 コンバージミルとハンマーミルの粉砕性の比較

① 平均粒子径と結晶化度

図24には、コンバージミル粉砕とハンマーミル粉砕（長時間粉砕できるように、試料出口のメッシュを塞いでいる）の場合の平均粒子径の変化を、図25には結晶化度の変化を示す。図24よりハンマーミル粉砕では、粒子径を低くする効果はもっているが、図25より、粉砕による結晶化度はあまり変化せず構造破壊の効果が現れない。一方、コンバージミルは粉砕初期（1～5分程度）での微粒子化・結晶化度の低下は少ないが10分粉砕以上になると微粒子化と同時に結晶化度の低下が起こっている。これらのことは、コンバージミルが媒体ボールによる衝撃力を加えながら粉砕するのに対し、ハンマーミルの粉砕機構が媒体を要しない為、媒体ミルに比べ衝撃力が少なく結晶構造破壊が起こりにくいためと思われる。

② 糖化率

図26には、コンバージミル粉砕とハンマーミル粉砕による糖化率の比較を示す。ハンマーミル粉砕のみでは、20分、30分と連続して粉砕しても糖化率が20%辺りを示すのに対して、コンバージミル粉砕では20分で80%付近、30分で100%付近の糖化率を示している。つまり、糖化率を向上させるためには、結晶性の低下が重要であると言える。

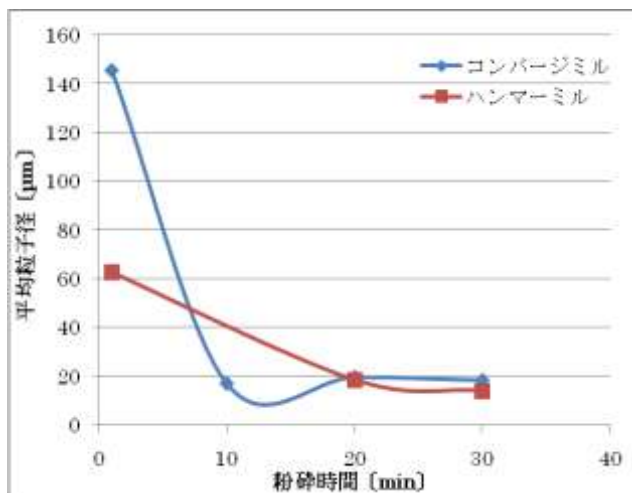


図24 平均粒子径の比較

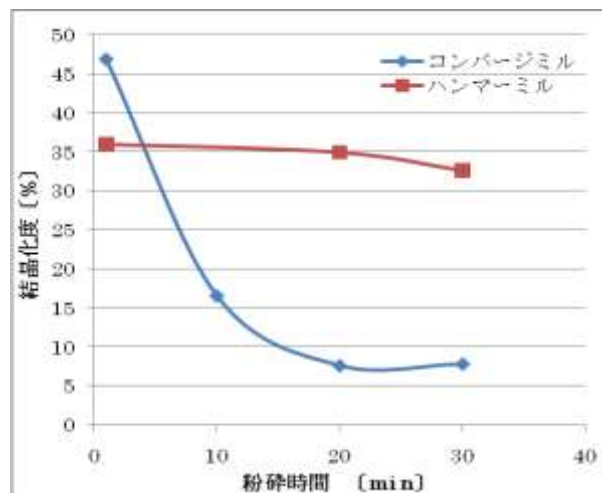


図25 結晶化度の比較

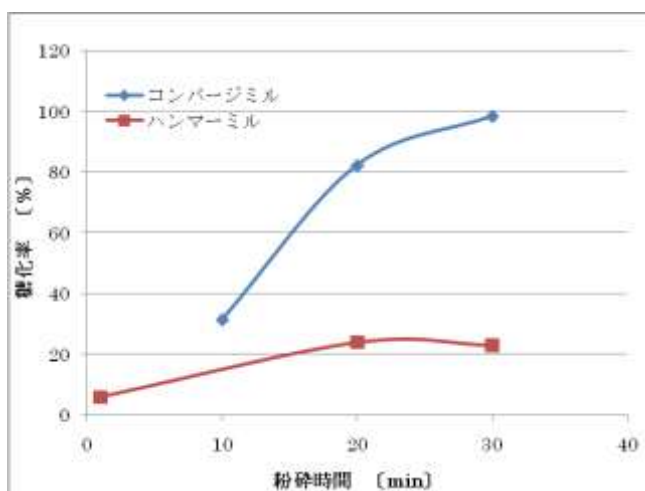


図26 糖化率の比較

4.4 1L小型コンバージミル粉砕条件のまとめ

原料として杉おがくずを用い、1 Lバッチ式コンバージミルでの粉砕条件の検討を行い以下の結論を得た。

- ① 杉おがくずをコンバージミルでメカノケミカル処理することで、原料の微粒子化・非晶質化が進行し、酵素糖化特性が大幅に向上した。
- ② 木質中セルロースの結晶化度が低いほど、糖化率が高くなる傾向にあった。
- ③ 媒体ボールは、比重の大きなクロム鋼球が良く、結晶化度小、生成グルコース濃度は大となった。また、試料投入量/媒体ボール量の体積比は小ほど生成グルコース濃度は大となった。
- ④ ボール径 4~6mm 程度の小径ボールを使用し、ボール充填率 15%では、20 分~30 分の短時間コンバージミル粉砕で糖化率 80%以上を達成できることがわかった。このときの粉体物性は、平均粒子径 (D_{50}) 20 μm 以下、結晶化度 (CrI) 約 10%となる。ただし、過度の粉砕は糖化率の低下を招き、最適な粉砕処理条件が存在すると言える。
- ④ コンバージミルで結晶性を低下させる場合には、一度、微粒子化 (約 50 μm 程度) することが効果大であることがわかった。
- ⑤ 前処理粉砕 (ハンマーミル処理 1 分) とコンバージミル粉砕の組みあわせを行うことにより (複合前処理粉砕)、コンバージミル 10~20 分粉砕で糖化率 80%以上を達成できることがわかった。

4.5 各種木質原料のコンバージミル粉碎と酵素糖化試験

4.5.1 温度と酵素糖化時間の影響

図27に酵素糖化時間と糖化率の関係を示す。酵素は合同酒精製(GODO TCD-H3)を用いる。溶媒として蒸留水(pH5.8)を使用した。いずれの糖化時間においても温度が高いほどグルコース生成濃度が向上しており、酵素糖化温度は50℃が望ましいことがわかる。また、温度40℃においては、48hの糖化時間、また温度50℃においては、24hの糖化時間で糖化率ほぼ100%になることがわかる。このことより、温度50℃で糖化時間24hを標準にすることにした。

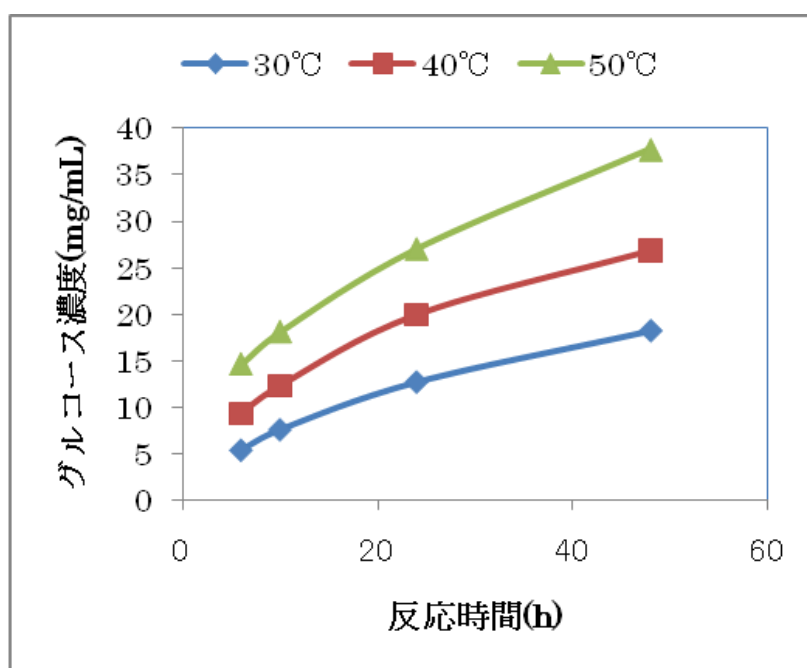


図27 酵素糖化時間とグルコース濃度との関係

4.5.2 pHの影響

図28には、反応溶液のpH(各種緩衝溶液を使用する)と糖化率の関係を示す。なお今回使用した緩衝液は、酢酸緩衝水溶液を使用した。ここでの反応温度は40℃、反応時間は48hである。同図より今回の系での最適pHは5付近であることがわかり、pH7以上のアルカリ側になると大きく糖化率が低下することがわかる。

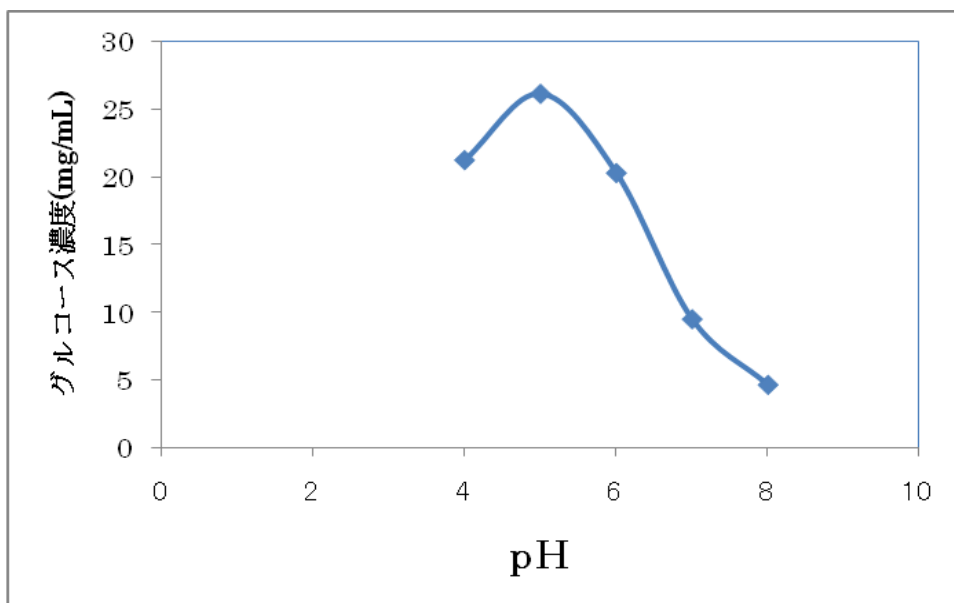


図28 pHと糖化率の関係

4. 5. 3 酵素種類と酵素投入量、糖化時間の検討

ここでは、酵素の種類についても検討する。用いた酵素は以下の2種類である。

合同酒精製、(GODO TCD-H13)

ジェネンコア協和製 (Accellerase 1000)

図29には、グルコース測定キットで測定した各酵素（合同酒精製、ジェネンコア製）の投入量と、グルコース生成濃度の関係を示す。ユニットは、CMC（カルボキシメチルセルロース）活性を測定したものである。また、ユニット(U)とは、1分間に1 μ mol のグルコース相当の還元力を示した時を1Uと定めている。

図29より、グルコース測定キットで測定した結果、酵素投入量は、500Uが最適投入量だと考えられる。酵素種類の検討では、図30より、同じユニット数においてジェネンコア製の酵素の方がグルコース生成量が多いことがわかる。

図30には、酵素糖化の反応時間とグルコース生成濃度量（グルコース測定キットで測定）の関係を示す。試料は、コンバージミル30min粉砕物を使用した。同図では反応時間48hあたりで曲線が頭打ちになっているので、糖化時間48hが最適糖化時間と判断できる。

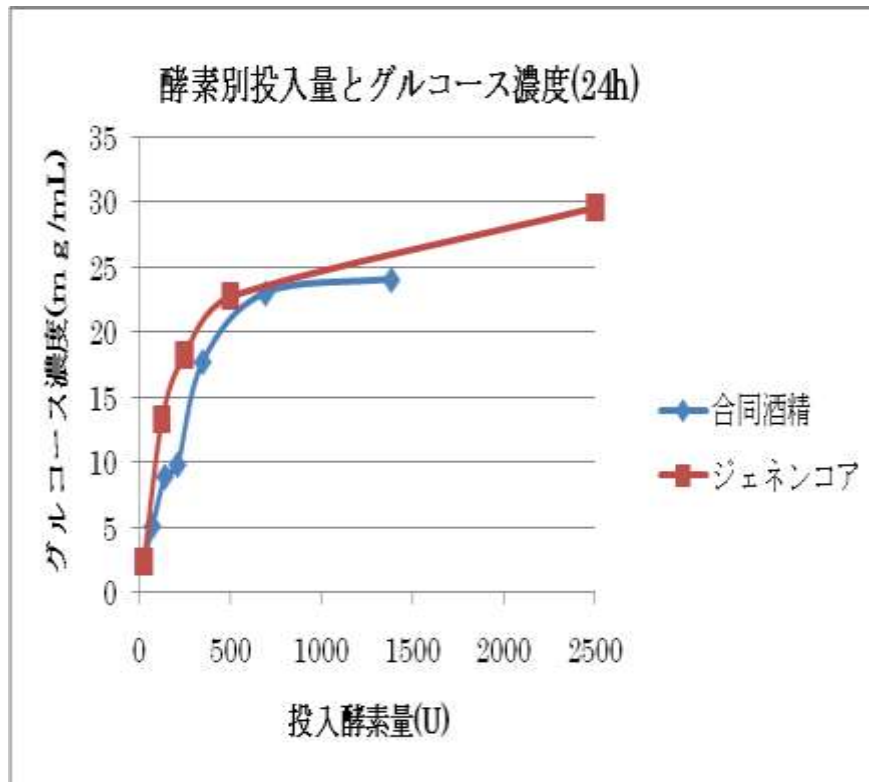


図29 各酵素の投入量とグルコース生成濃度量の関係

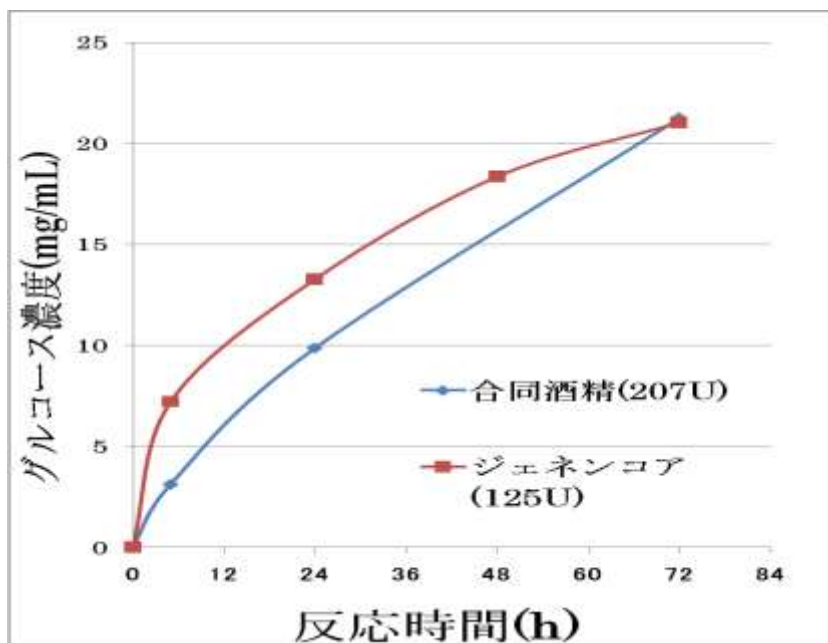


図30 各酵素の反応時間とグルコース生成濃度量の関係

これらの酵素糖化条件の検討より、以降の酵素糖化条件は以下のように定める。
 基質量：1g、酵素：セルラーゼ（合同酒精製）、酵素量：15mg/10ml、温度 50℃、
 反応液：酢酸緩衝水溶液(pH5.0)、反応時間:5h~24h

4.5.4 各種木質原料の粉体物性の評価

図31に、各種木質原料（杉、竹、ナラ、稲ワラ）のコンバージミル粉砕時間と平均粒子径（ D_{50} ）との関係を示す。同図より、杉とナラは粉砕時間 10min 付近、稲ワラと竹は粉砕時間 30min 付近で粒子径が著しく減少し、その後は、粒子同士の凝集効果により平均粒子径の値が若干上昇する傾向にある。長時間粉砕による粒子径の増加は、メカノケミカル活性による粒子の凝集のためと思われる。

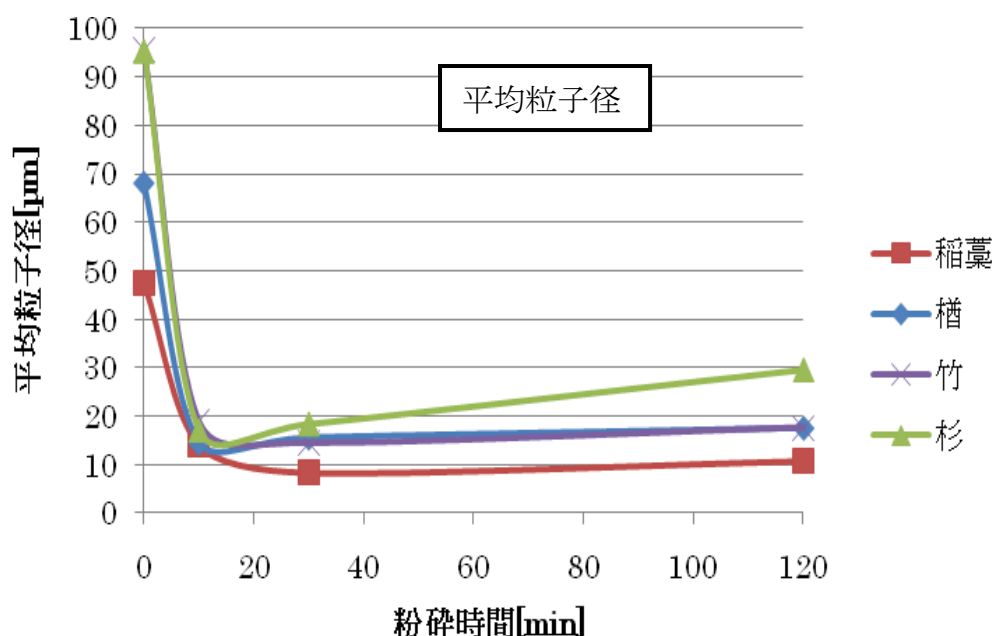


図31 粉砕時間と平均粒子径の関係

図32に各種木質原料の粉砕時間と結晶化度の関係を示す。粉砕時間によって結晶化度が大幅に減少する傾向が見られた。どの試料とも粉砕時間 10min まで著しく結晶化度が減少し、その後も緩やかに減少することがわかる。また、平均粒子径のデータ（図31）と比較すると、粉砕時間増加によって結晶化度が減少するが、粒子径が最小になってから、更なる粉砕時間が経過して結晶化度が最小値を示している。つまり、メカノケミカル処理により最小粒径に到達した後も、結晶構造破壊は更に進行しているものと考えられる。

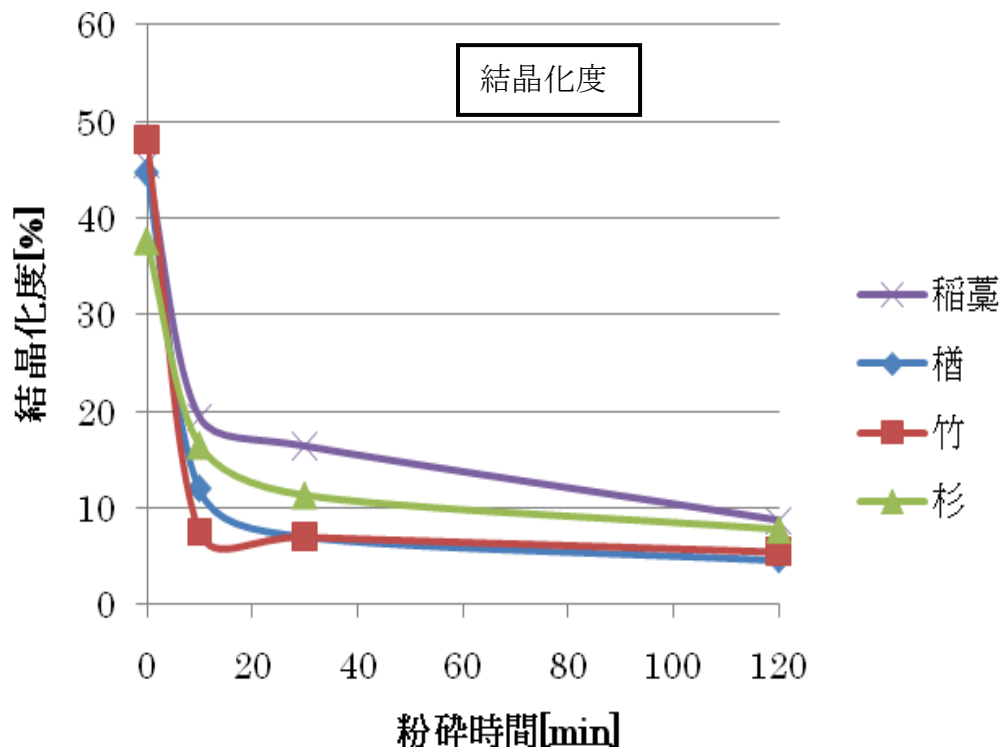


図 3 2 粉砕時間と結晶化度の関係

4. 5. 5 各種木質原料の粉体物性と糖化特性

図 3 3～図 3 6 には、各種木質粉砕物の糖化時間とグルコース生成濃度の関係を示す。グルコース生成量は、HPLC（高速液体クロマトグラフィー）で測定した。なお図中の時間はコンバージミル粉砕時間を示す。また図 3 7 には各種木質原料の粉砕時間とグルコース生成濃度の関係を示す。ここでは、各試料の糖化時間は 24h のものを使用した。杉おがくず（針葉樹）、竹、ナラ（広葉樹）などのハードバイオマス試料においては、粉砕処理無し（0h）よりもコンバージミル粉砕することでグルコース生成濃度が大幅に増加していることがわかる。図 3 5 にはソフトバイオマスの稲ワラのコンバージミル粉砕した場合の粉砕時間とグルコース生成量の関係を示す。稲ワラでは粉砕時間 0min でもある程度糖化するが、コンバージミル粉砕でさらに酵素糖化率が向上する。ソフトバイオマスの稲ワラは未粉砕（カッターミル処理あり）でもある程度糖化することがわかったが、稲ワラはリグニンの組成がごく微量であること（表 1）から未粉砕でもある程度糖化するものと推定する。

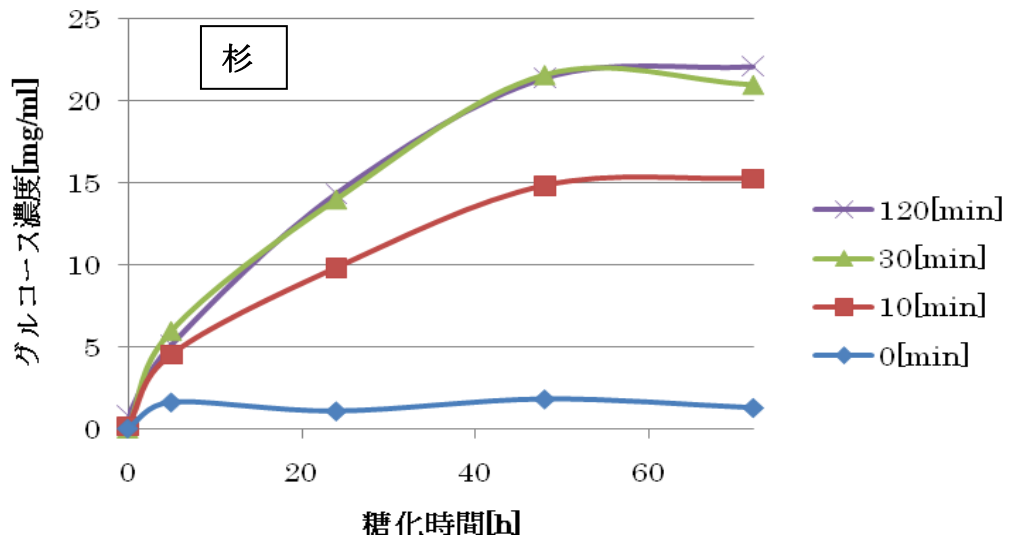


図 3 3 糖化時間とグルコース生成濃度の関係 (杉おがくず)

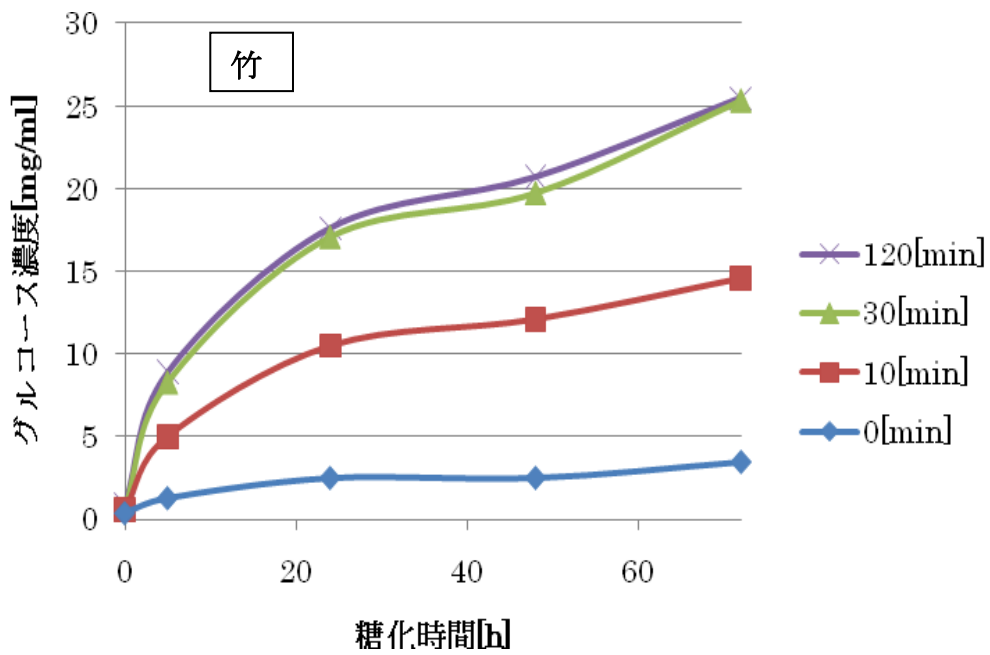


図 3 4 糖化時間とグルコース生成濃度の関係 (竹)

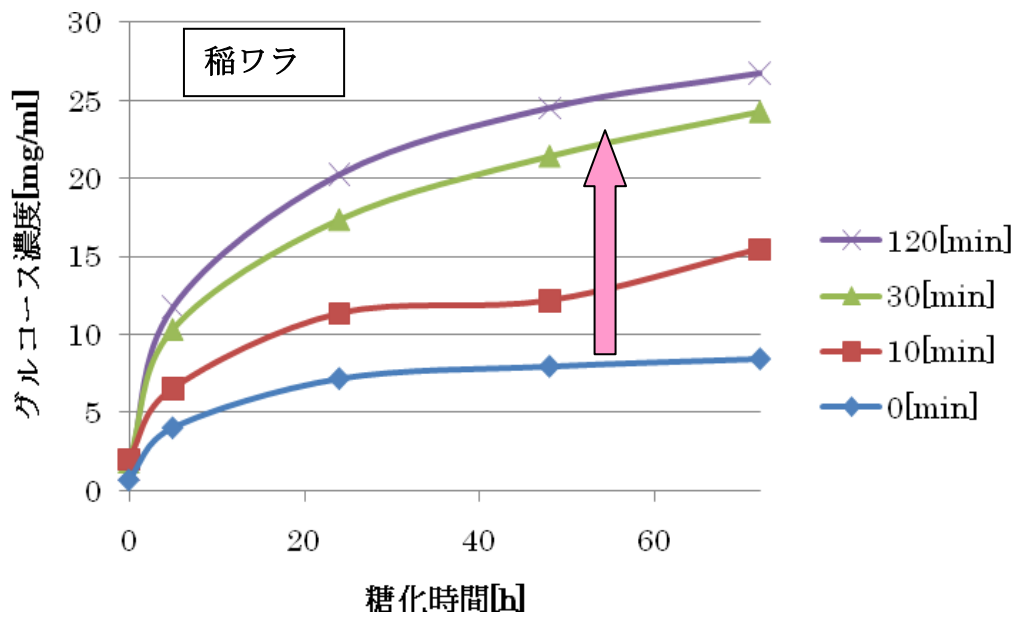


図 3 5 糖化時間とグルコース生成濃度の関係(稲ワラ)

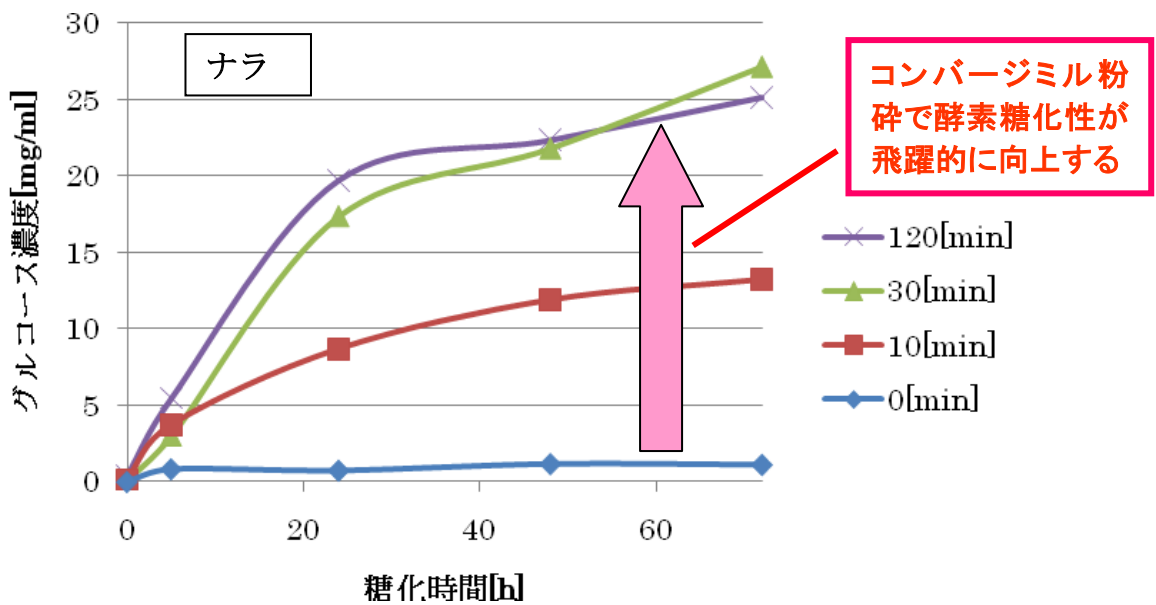


図 3 6 糖化時間とグルコース生成濃度の関係(ナラ)

- ソフトバイオマス (稲ワラ) およびアビセル → 粉砕 0min でもある程度糖化する。コンバージミル粉砕で糖化特性が向上する。
- ハードバイオマス (杉、竹、ナラ) → 粉砕 0min では糖化しない。コンバージミル粉砕で糖化特性が飛躍的に向上する。

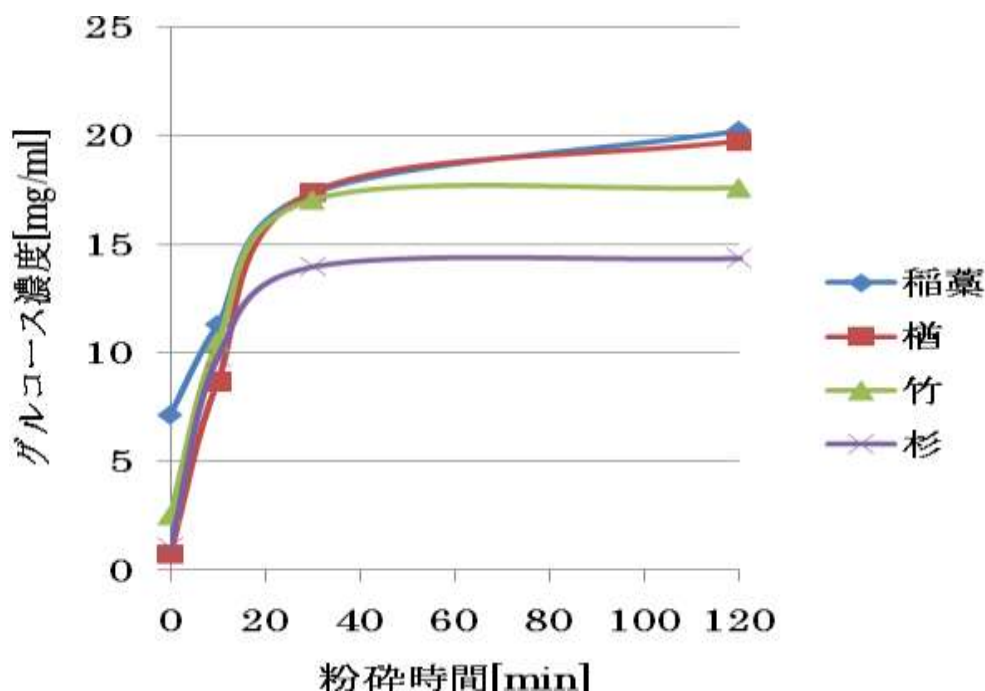


図 3 7 粉砕時間とグルコース生成濃度関係（糖化時間：24h）

図 3 7 の各種木質原料の粉砕時間と糖化率の関係の図（糖化時間は 24 h に固定）をみると、どの試料においても粉砕時間 20～30min で糖化率は最大となり、それ以上の粉砕では糖化率は向上しない。逆に杉や竹は粉砕時間が長くなると糖化率は減少している。長時間粉砕による糖化率の減少は過粉砕による木質組織の変性などが考えられるが、現段階ではよくわからない。

4. 5. 6 各種木質原料とアビセル試薬の比較

(a) 平均粒子径の比較

図 3 8 に、コンバージミル粉砕時間と平均粒子径 (D_{50}) との関係を示す。同図より、アビセル以外の各試料は、粉砕時間 10min 付近で粒子径が著しく減少していることがわかる。その後は、粒子同士の凝集効果により平均粒子径の値が上昇する傾向にある。アビセルの場合には、原料試薬の段階で微粒子化しており、コンバージミル粉砕することで逆に粒子径が増加している。これも、メカノケミカル活性による粒子の凝集のためと思われる。

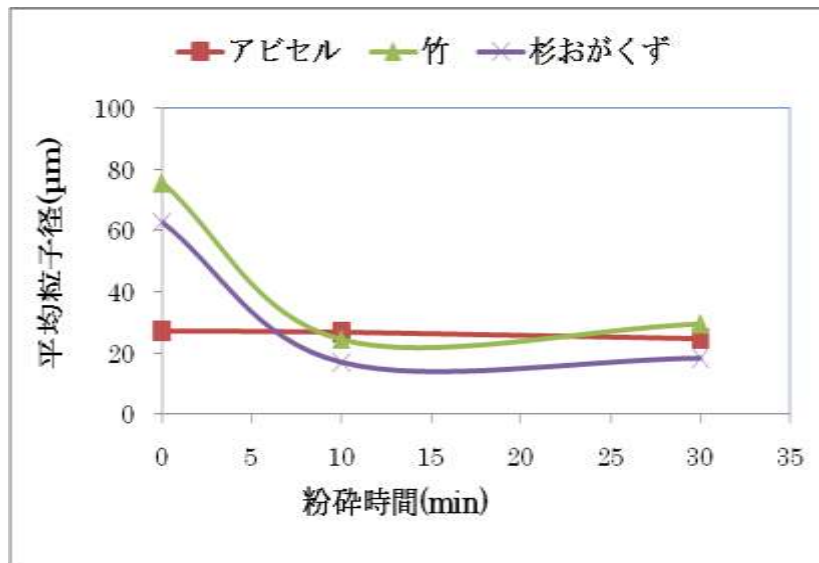


図38 各種試料の粉砕時間と平均粒子径の関係

(b) 結晶化度の比較

図39に各種試料の粉砕時間と結晶化度の関係を示す。粉砕時間によって結晶化度が大幅に減少する傾向が見られた。特にセルロース含有率100%のアビセルの変化量が大きかった。どの試料においてもコンバージミル10min粉砕では結晶化度20%前後、30min粉砕では結晶化度15%前後まで減少していることがわかる。

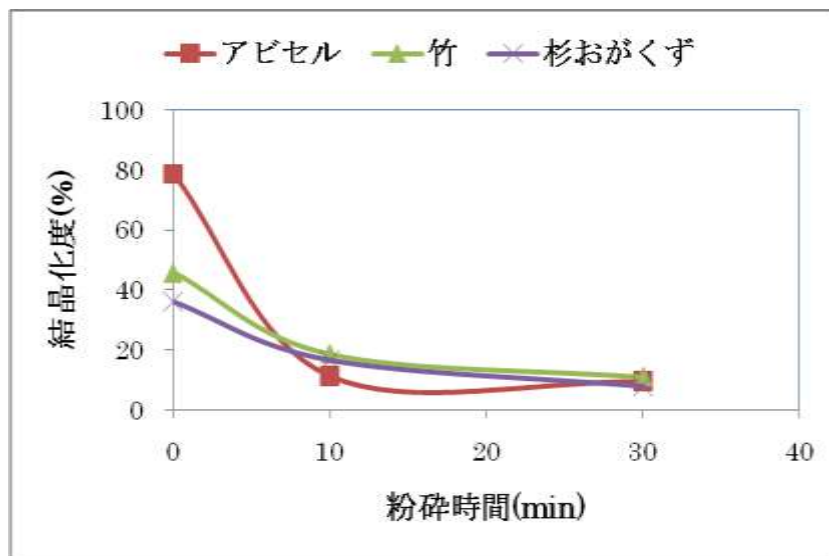


図39 各種試料の粉砕時間と結晶化度の関係

(c) 糖化特性

図40には、アビセル試薬での糖化時間とグルコース生成濃度の関係を示す。また図41には各種試料の粉砕時間とグルコース生成濃度の関係を示す。アビセルにおい

ては、未処理でもある程度の糖化率を示しているが、やはりコンバージミル粉砕することで糖化率が向上している。図4-1の各種木質原料の粉砕時間と糖化率の関係の図（糖化時間は24hに固定）をみると、アビセルでは粉砕時間30minで糖化率は最大となり、それ以上の粉砕では糖化率は逆に減少している。長時間粉砕による糖化率の減少は過粉砕によるためと推定する。

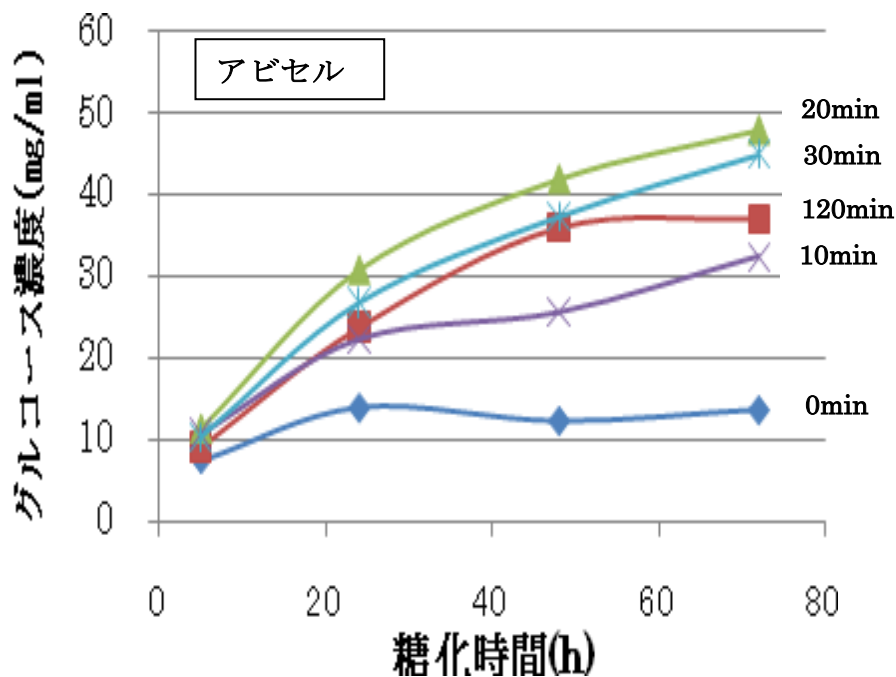


図4-0 糖化時間とグルコース生成濃度の関係(アビセル)

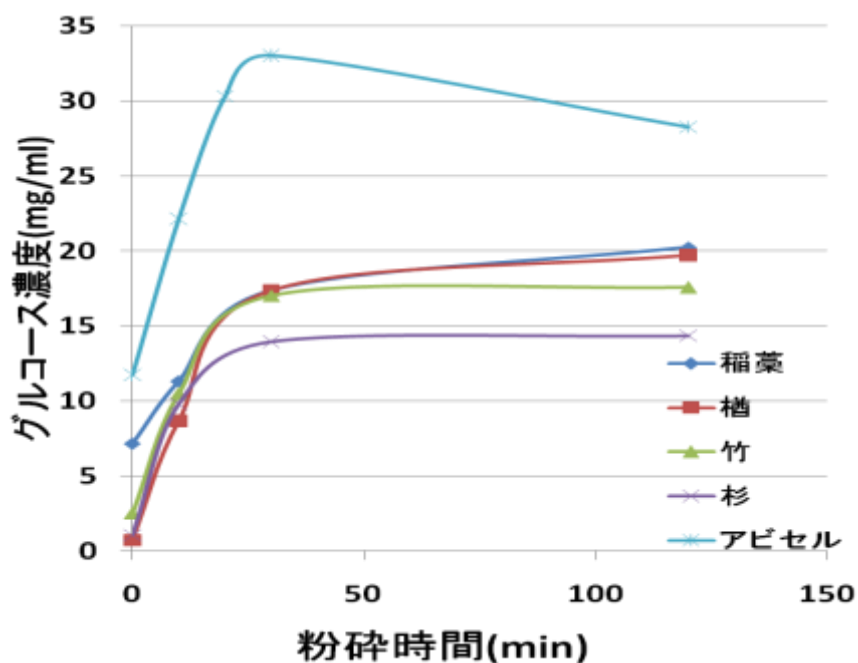


図4-1 粉砕時間とグルコース生成濃度との関係 (糖化時間:24h)

以上までの粒子径、結晶化度と糖化率（図 4 1）との相関性を考えると、粒子径小で結晶化度も減少しているときに糖化率は向上することがわかる。アビセルでの結果からは、粒子径よりも結晶化度と糖化率の相関性が大であることがわかり、糖化率を向上させるためには結晶性を低下させることが重要であることが示唆される。

4. 5. 7 粉体物性と糖化特性の相関性

図 4 2 は、各種木質試料の平均粒子径とグルコース濃度の関係を示した。一見粒度分布が低いほどグルコース濃度が上がっているように感じるが、凝集が起り平均粒子径が再び大きくなった後にもグルコース濃度は上がっていることがわかり、平均粒子径とグルコース濃度の相関性が弱いということがわかる。一方、図 4 3 の結晶化度とグルコース濃度の関係では結晶化度が小さいほどグルコース濃度が増加することが読み取れ、結晶化度とグルコース濃度の相関性が強いことがわかる。

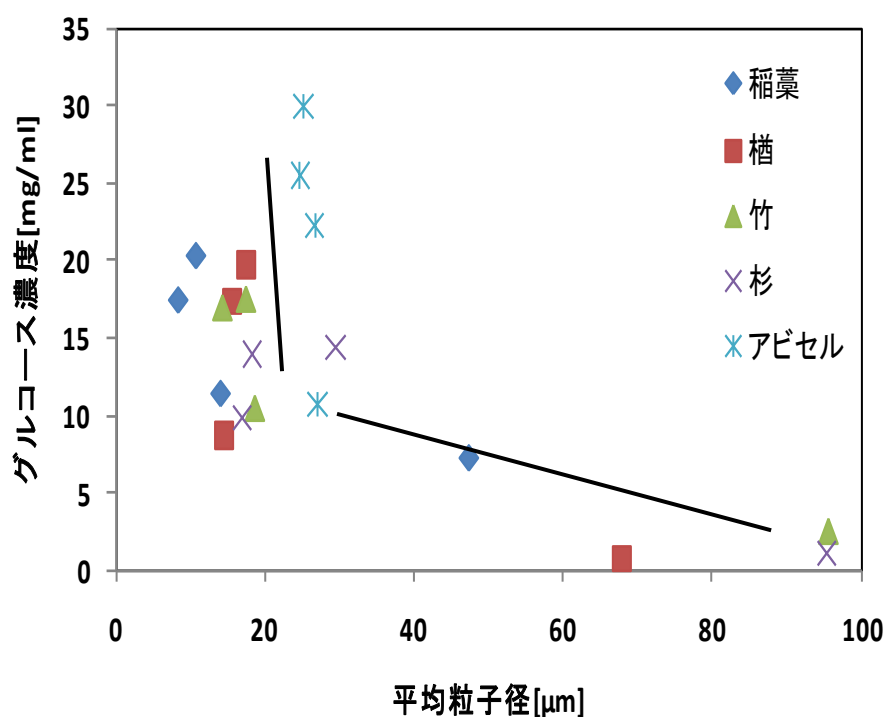


図4.2 コンバージミル粉碎の粉体物性(平均粒子径)とグルコース生成濃度との関係

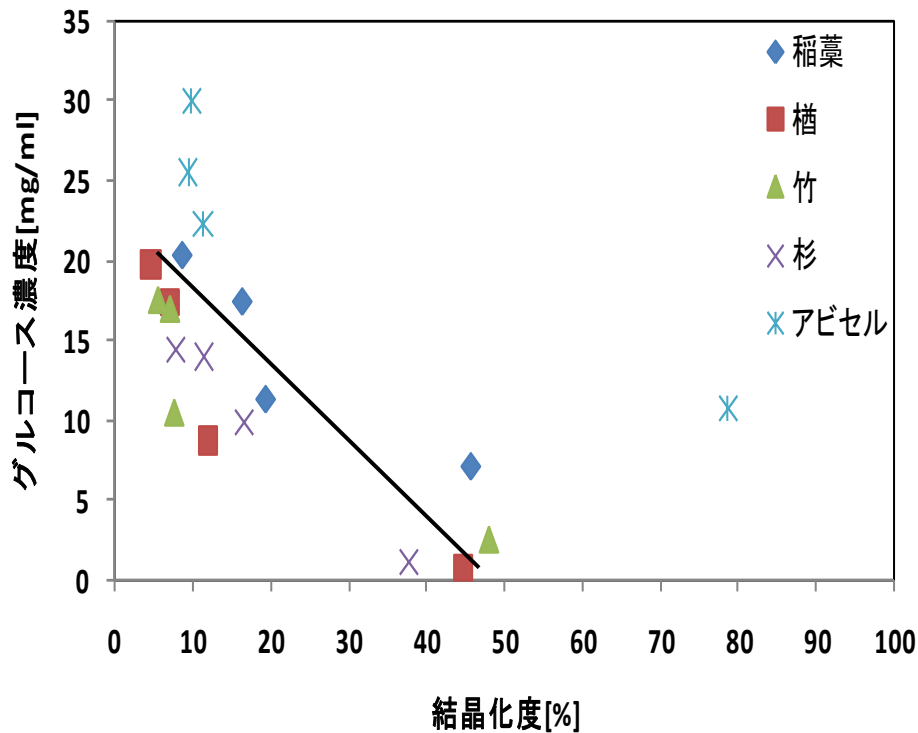


図43 コンバージミル粉碎の粉体物性(結晶化度)とグルコース生成濃度との関係

4. 5. 8 各種木質原料における生成糖の分析

木質バイオマスにはセルロースに匹敵するほどのヘミセルロースが含まれる。ヘミセルロースの含有量は針葉樹よりも広葉樹や竹において多くなっている(表1)。

主要なヘミセルロースとしてキシランがある(その他、グルコマンナン、アラビノガラクトサン、キシログルカン、など多様)。キシランの主要な構成単糖はC5糖のキシロースで、セルロース由来のC6糖のグルコースと並んで有効利用されなければならない。

図44は *Trichoderma reesei* PC-3-7 株の培養上清(多様なセルラーゼやヘミセルラーゼを含む)により各種バイオマスを24時間糖化した場合の生成物の分析結果である。左側の「還元糖」はDNS法で測定した総還元糖量を示す。「グルコース」はキットで測定する。右側はHPLCによる糖組成分析の結果である。ナラ、タケ、イナワラで無視できない量のヘミセルロース由来の単糖(主にキシロース(緑)、マンノース)が生成していることがわかる。

以上のように、各種バイオマスの4時間の糖化試験により、ナラ、タケ、イナワラで無視できない量のヘミセルロース由来の単糖(主にキシロース(緑)、マンノース)が生成した。したがってコンバージミルはセルロース(C6糖類)の糖化だけでなく、ヘミセルロース(C5糖類)の糖化にも効果があることが示唆された。

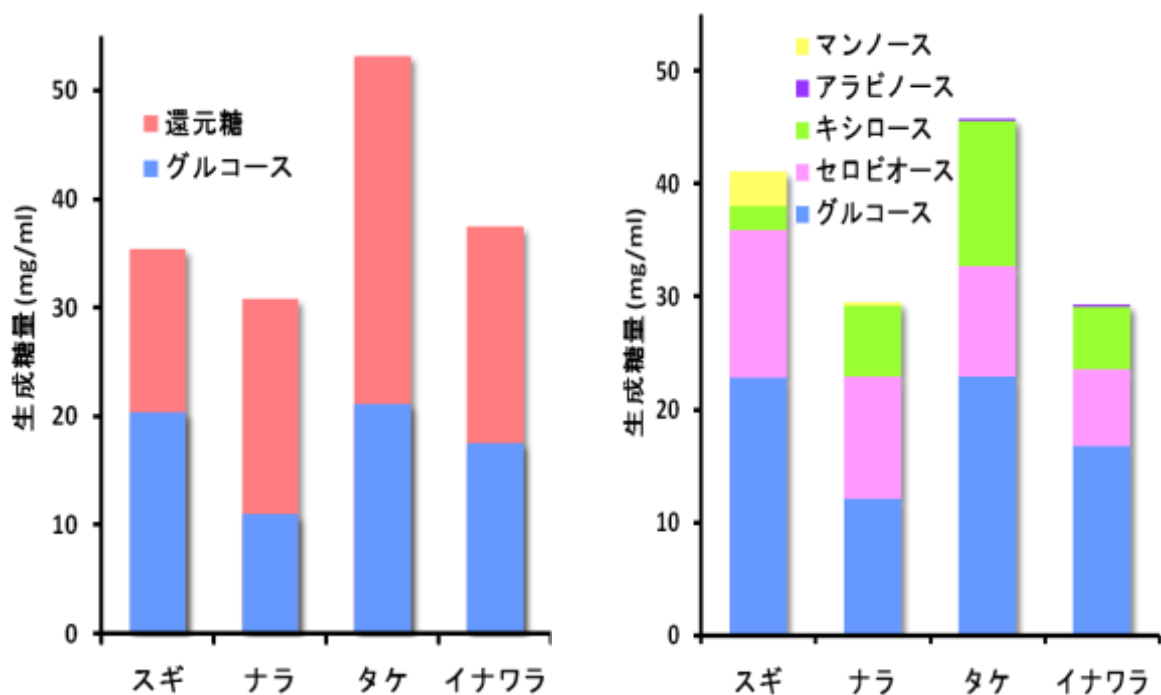


図44 様々な木質原料における生成糖の分析

4.6 各種木質原料のコンバージミル粉砕と酵素糖化試験のまとめ

今回の実験では、木質バイオマス試料として杉おがくず、竹、ナラ、稲ワラ、アビセルを使用した。粉砕産物特性と酵素糖化特性の相関性を考察すると、杉おがくず、竹、イナワラ、ナラ試料ではメカノケミカル粉砕すると粉砕産物の平均粒子径と結晶化度が低下し、グルコース生成量も大きく向上する。一方、アビセル試薬の場合は、粉砕により粒子径の変化はほとんど無いが（図3 8）、結晶化度には大きな変化がみられ（図3 9）、糖化率も大きく増加している（図4 0、4 1）。このことは、メカノケミカル粉砕すると木質原料の粒子径および結晶性の両者が変化するが、糖化率向上には結晶性を低下させることが重要であることが示唆される。これは粉砕することで酵素との接触領域が増加したため、あるいは酵素との反応性向上が要因と考えられる。このことは、機器分析測定（4. 8）からメカノケミカル粉砕することで木質原料のセルロース構造の分子内・分子間の水素結合が弱くなっていることでセルラーゼによる加水分解が起りやすくなったためとも考えられる。

糖化条件の検討では、図3 0（各酵素の投入量とグルコース生成濃度の関係）の曲線は、はっきりと飽和状態になっているところがなかった。これは合同酒精製もジェネンコア製もまだ糖を分解し続けていることが考えられる。ただし、どちらのセルラーゼもβ-グルコシターゼの含有量が少ないためセロビオース(2糖)の分解があまりできない。そのため投入酵素量を増やすとグルコース生成量も増えるがセロビオースの量も増える。そして、セロビオースが蓄積するとセルラーゼの働きを阻止することか

ら、投入酵素量が増えるに伴いグルコース生成量の増加量も減少しているものと考えられる。

- ① ソフトバイオマスである稲ワラは、粉砕 0min でもある程度糖化する。コンバージミル粉砕で糖化特性がさらに向上する。
- ② ハードバイオマス（杉、竹、ナラ）は、粉砕 0min ではほとんど糖化しない。コンバージミル粉砕で糖化特性が飛躍的に向上する。
- ③ アビセル試薬の場合は、コンバージミル粉砕すると、粒子径は変化しないが結晶化度は大きく低下し、糖化率も大きく向上した。
- ④ これらのことより、木質原料をメカノケミカル粉砕すると糖化率が向上するのは、粒子径変化よりも結晶性低下が要因であることがわかった。

4.7 β -グルコシダーゼ添加の検討

4.7.1 通常の振とう条件における糖化時間と生成糖量の関係

図45には、通常の振とう条件における糖化時間と生成糖量との関係を示す。酵素は合同酒精製 (GODO TCD-H13) を用いている。生成糖量の定性・定量分析は液体クロマトグラフにより行っているが、糖化により生成する糖は、ほとんどがグルコースとセロビオースであることを確認している。図45より、糖化時間が長くなるにつれ、グルコース濃度は上昇し、逆に2糖のセロビオースは減少することが分かる。6日間の糖化でもグルコース濃度が依然として増加しており、6日間の糖化で約 35mg/mL のグルコース濃度となる。

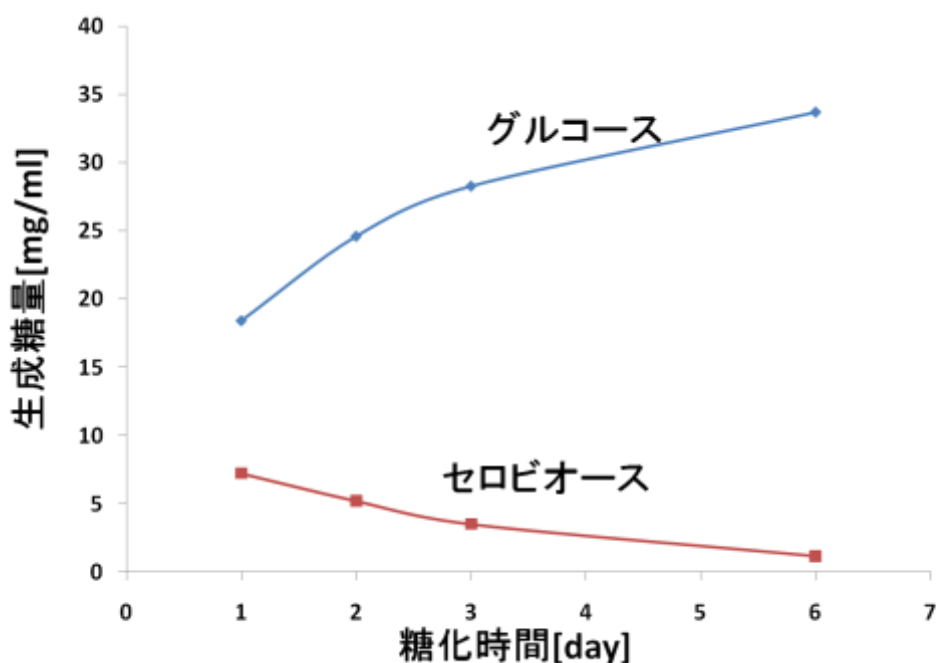


図45 酵素時間と生成糖量との関係
(通常の振とう条件)

4. 7. 2 β -グルコシダーゼ添加量の影響

図46には、合同酒精セルラーゼ（100U）に、 β -グルコシダーゼ（セロビオース、2糖を単糖に変える）を添加した場合のグルコース生成濃度の変化を示す。 β -グルコシダーゼ無添加の場合より、添加することでセロビオースは減少し、グルコース生成濃度が増加し（無添加に比べて約2倍）することが分かる。また、約5[U]の添加量でほぼ飽和に達することが分かる。以降の実験では β -グルコシダーゼの添加量は5Uに固定して糖化実験を行った。

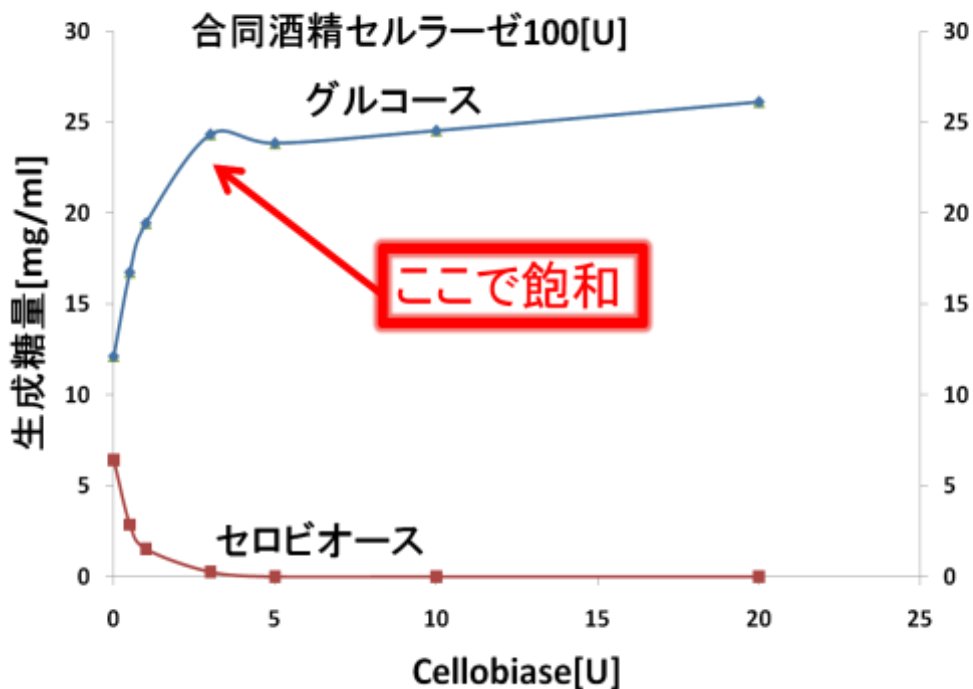


図46 β -グルコシダーゼ添加量と生成糖濃度の関係
(Novozyme 188 の添加)

4.7.3 糖化時間の影響

図47には、糖化時間を変えた場合の生成糖量の関係を示す。試料には、ハンマーミル粉砕のみを用いた。青色の線は、 β -グルコシダーゼを添加せずに、100[U]の合同酒精セルラーゼのみを添加した場合の結果を示す。これに β -グルコシダーゼ（添加量5U）を添加することと赤色で示している線のようになる。ハンマーミル粉砕物はある程度微粒子化（粉末粒子径は約 $60\mu\text{m}$ ）しているが、結晶性はかなり高い。この場合、合同酒精セルラーゼ100Uの添加では、グルコース生成は極めて低い。また、セロビオースも生成しない。これに β -グルコシダーゼを添加してもグルコースは若干増加するが、グルコース生成量は極めて低いところで止まっている。つまり、2日間の糖化時間でグルコース生成は飽和状態になっており、それ以上の糖化時間でもグルコース生成は増加しないということが分かる。

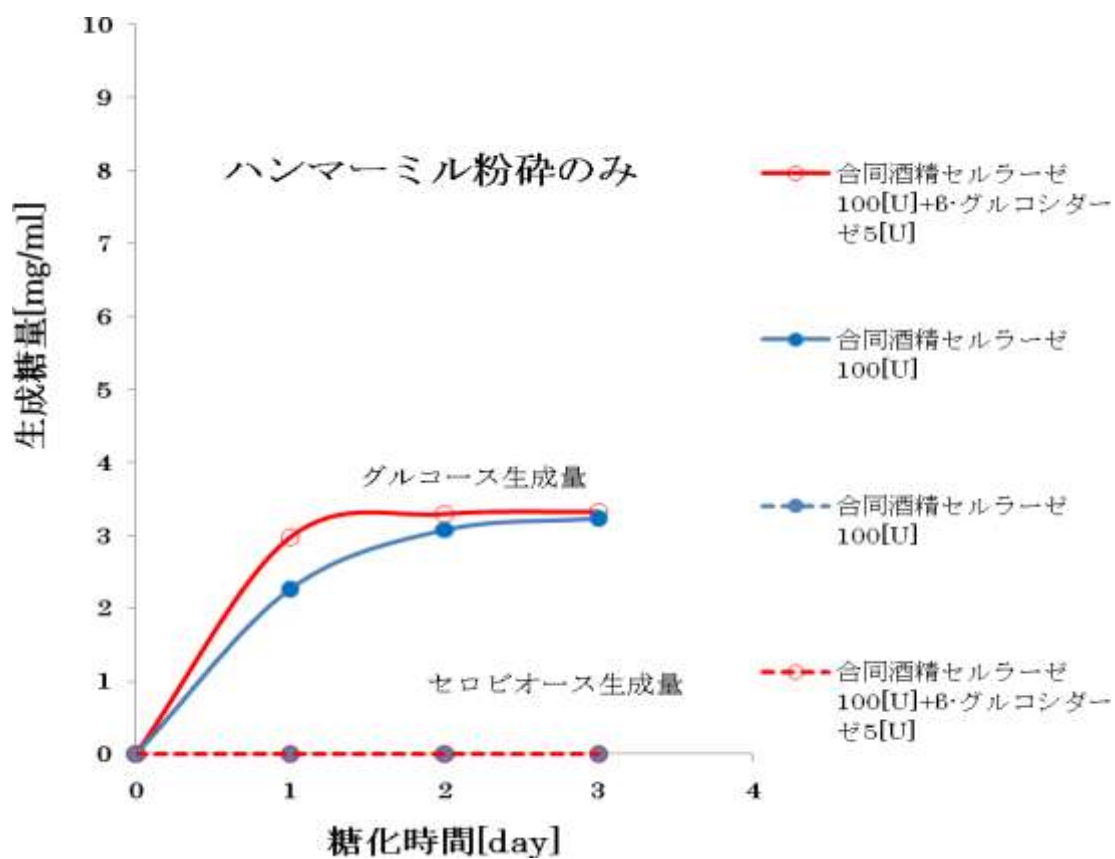


図47 糖化時間と生成糖量の関係（ハンマーミル粉砕のみ）

図48には、試料としてコンバージミル 20min 粉砕したものを示す。青色の線は、 β -グルコシダーゼを添加せずに、100[U]の合同酒精セルラーゼのみを添加した場合の結果を示す。ハンマーミル粉砕のみ場合よりコンバージミル処理を施すことで、グルコース生成は極めて増加し、ハンマーミル処理（2day 糖化）でグルコース生成 3mg/mL が約6倍の 18mg/mL まで増加している。また、セロビオースも 5~10mg/mL の濃度で生成することが分かる。これに β -グルコシダーゼを添加させると（赤色の線）、セロビオースは減少し、グルコースは約2倍に増加する。つまり、 β -グルコシダーゼを添加させることにより、グルコースは大きく増加することがわかる。これについては2つの理由が考えられ、1) セロビオースがグルコースに変換された、2) セロビオースが蓄積されるとセルラーゼの働きを阻害するが、セロビオースが減少することでセルラーゼの活性が向上した、ということが予想される。

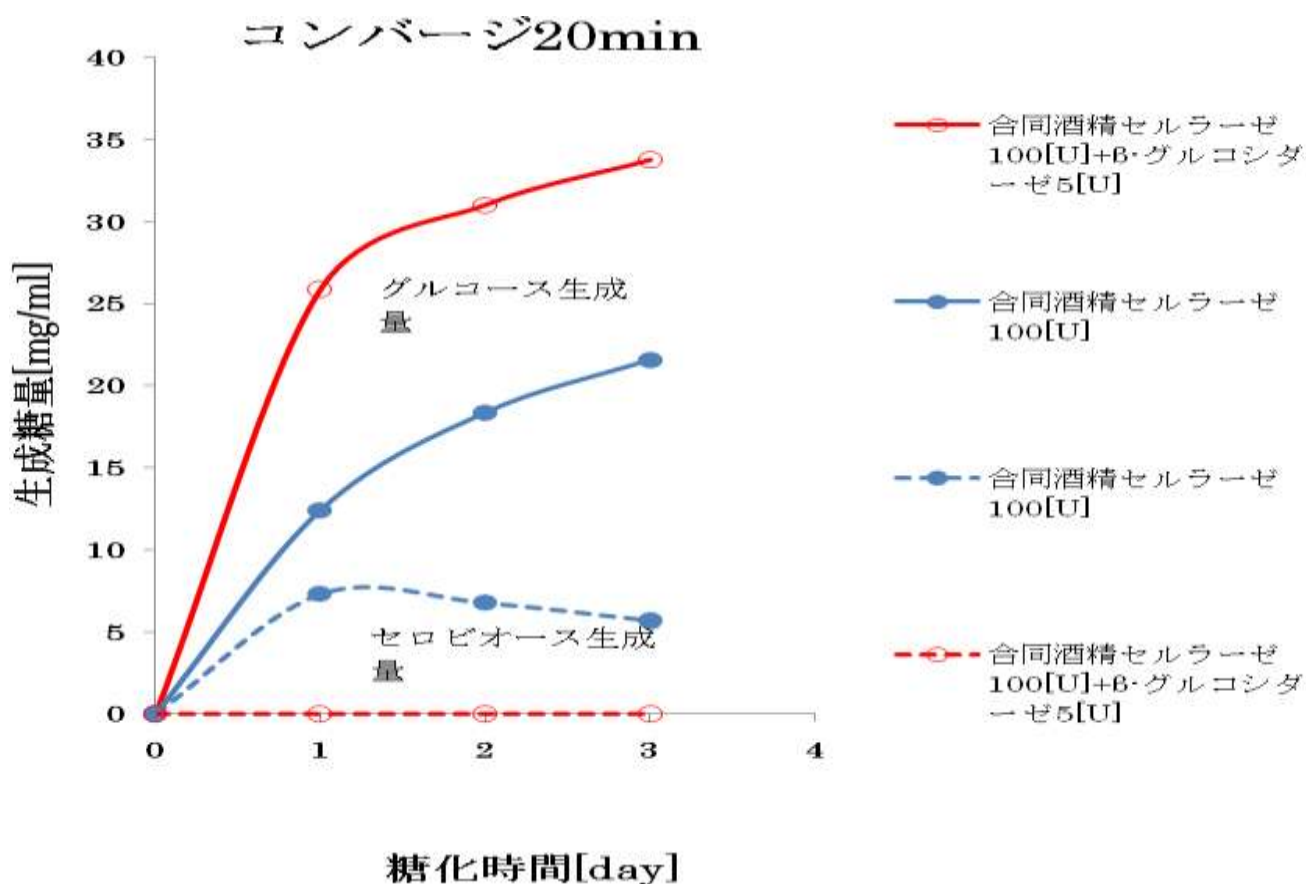


図48 糖化時間と生成糖量の関係（コンバージミル 20min 粉砕物）

4. 8 粉砕産物の機器分析測定

4. 8. 1 各種木質試料の固体 NMR、IR 測定

木質バイオマス原料のメカノケミカル粉砕によるナノレベルでの構造解析を、IR 分析（外部委託）や固体 NMR 分析（外部委託）で調査し、酵素糖化特性との関連性について検討してみた。図 4 9（左）には、杉おがくずコンバージミル粉砕物の固体 ^{13}C -NMR 測定結果を示す。ここでのコンバージミル粉砕条件は、容器：SUS 製内容積 1 L、媒体ボール：クロム鋼球 5mm、充填率 15%、試料投入量：30g、回転数：800rpm である。図中のセルロース構造の C1 から C6 までの帰属は純粋なセルロースで測定された文献によるものである。C6 および C4 位は結晶部分と非晶部分で異なったケミカルシフトを示すことが知られている。C6 位の 66ppm のシャープなシグナルは結晶部分由来、63ppm は非晶部分由来である。C4 位では 89ppm のシグナルは結晶部分由来、85ppm は非晶部分由来とされている¹⁷⁾。図 4 9（左）から木質原料をメカノケミカル粉砕すると粉砕物のスペクトルが変化することがわかり、コンバージ 10min、コンバージ 30min、コンバージ 5h と粉砕時間が長くなるに従ってスペクトルがブロード化している。これらの変化はセルロース構造の結晶性低下に由来するものと推測され、このことは XRD からの結晶化度の変化と同様である。特に顕著な変化は C4 および C6 位である。コンバージ 0min（未粉砕物）、コンバージ 10min とコンバージ 30min 粉砕を見てみると結晶部分由来のシグナル強度は減少し、非晶部分由来のシグナル強度は増加している。わずか 10min のコンバージミル粉砕で原料が非晶質に変化することは注目し値する。図 4 9（右）には、竹試料のコンバージミル粉砕物での結果を示す。竹試料の場合も杉おがくずとほぼ同様の結果であることが確認できる。これらのことから、粉砕により木質中セルロースの分子内・分子間の水素結合が切断され、結晶構造が非晶構造に変化していることが確認できた。

杉おがくず試料のコンバージミル粉砕産物を、IR 分析で調査し、酵素糖化特性との関連性について検討してみた。図 5 0（左）には、杉おがくずコンバージミル粉砕物の IR 測定結果（ATR 法）を示す。図には 3350 cm^{-1} 近傍（O-H 伸縮振動）での測定結果を示す。コンバージミル粉砕物はピークが高波数側にシフトしている。通常、水素結合が弱いほどピークは高波数に検出されるため、コンバージミル処理することで、セルロース構造の分子内・分子間の水素結合が弱くなっているものと推測できる。図 5 0（右）には、竹試料の場合を示すが、竹試料でも同様の結果となった。

以上の固体 NMR および IR 測定結果より、木質原料のコンバージミル粉砕物はセルロース構造の分子内・分子間の水素結合が切断されていることが予想できる。これは、ハードバイオマスの杉、竹試料で確認できた。

参考文献

17) 遠藤貴士, 北川良一, 広津孝弘, 細川純, 高分子論文集, vol. 56(3), 166(1999)

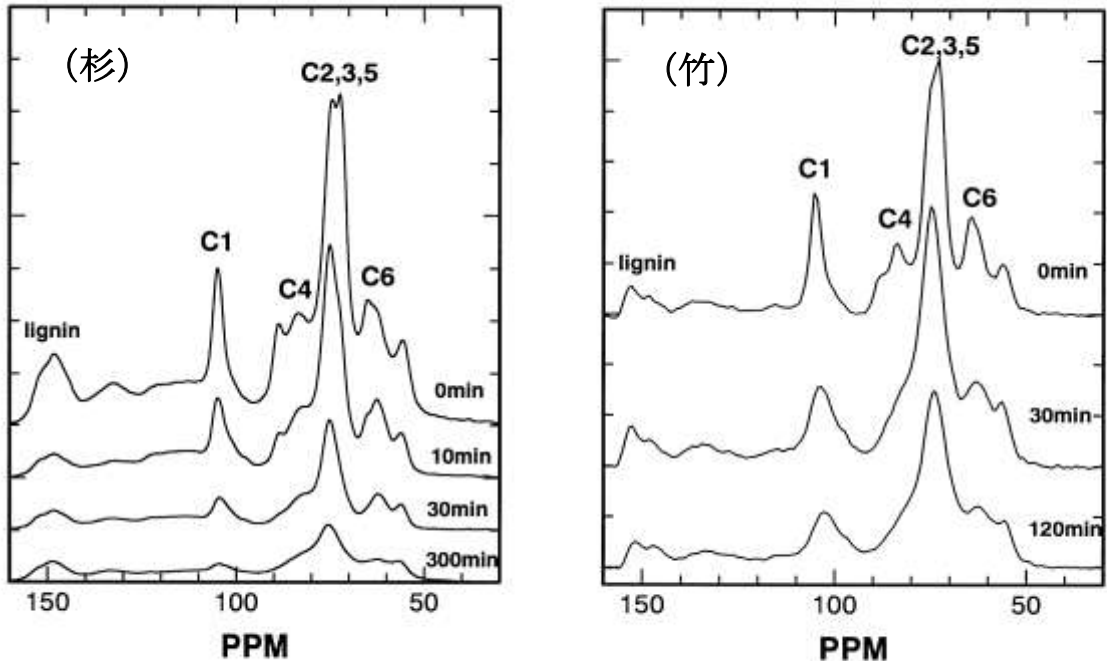


図49 コンバージミル粉砕産物の固体 NMR スペクトル

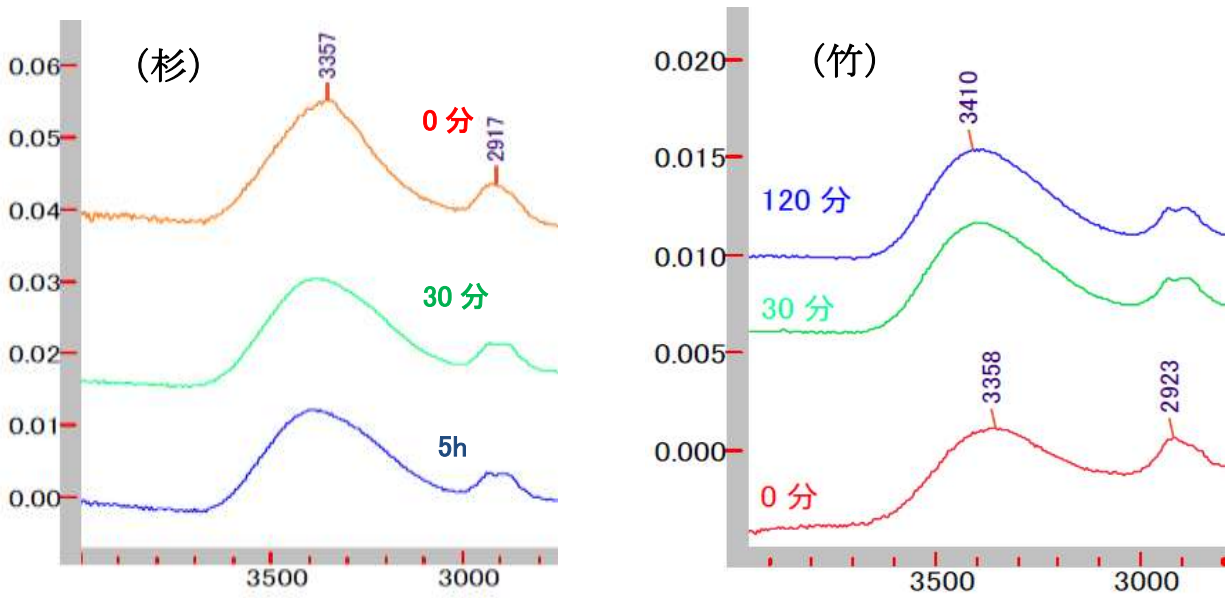


図50 コンバージミル粉砕産物の IR スペクトル(ATR)

4.8.2 杉粉碎産物のIR分析結果

杉粉碎産物についてIR分析(ATR法)を実施した。図51には杉大鋸屑原料、ハンマーミル処理物、コンバージミル粉碎物のIRスペクトルを示す。未粉碎の原料のスペクトルで1591波数、1110波数、1318波数の3つの波数で明瞭なピークが観測されている。これらの3つのピークは、ハンマーミル処理ではまだ残っているが、コンバージミル粉碎10min、20min処理では消えてなくなっている。これは、コンバージミル処理により、木質中のセルロースの構造がコンバージミル粉碎によって壊れていることを表している。

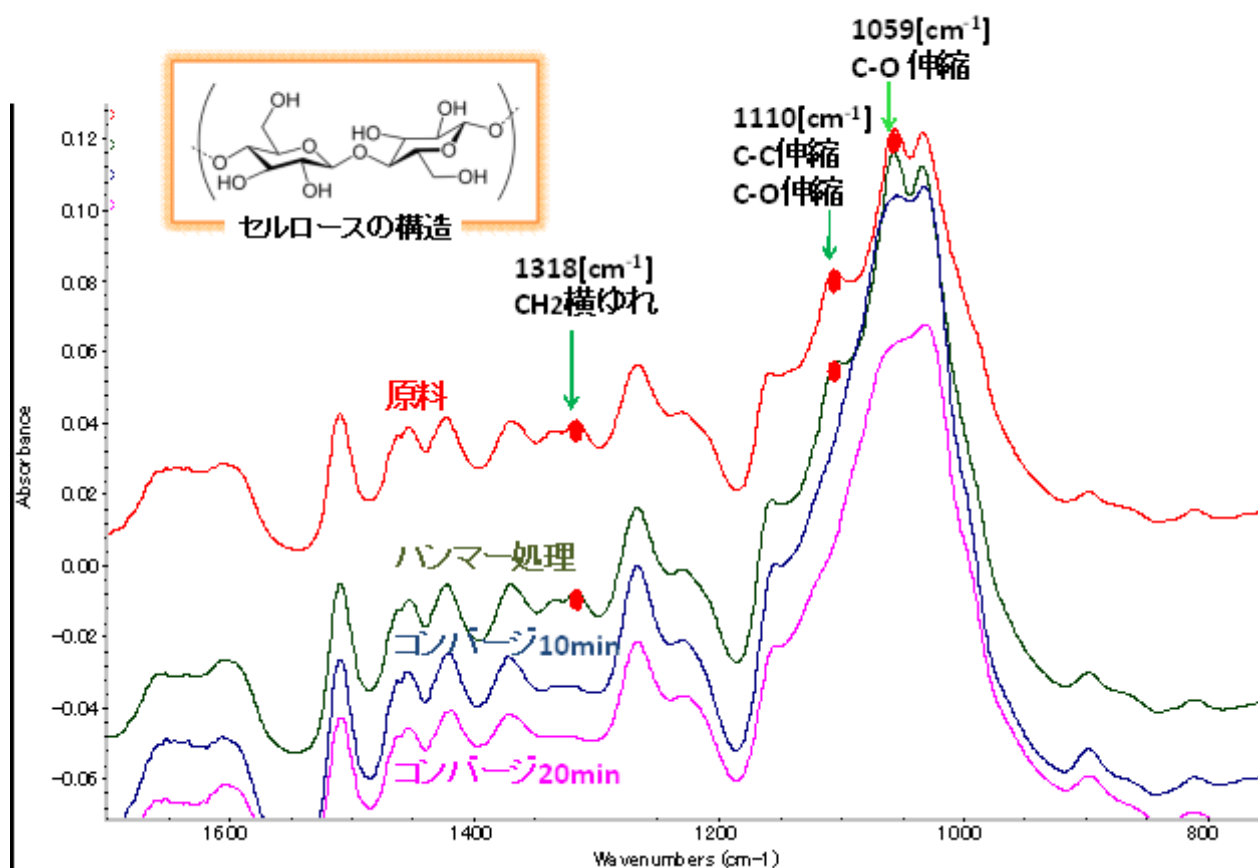


図51 杉大鋸屑粉碎物のIR分析結果

図5 2は、3370 波数付近を拡大したもので、O-H 伸縮振動の吸収ピークである。これより、未粉碎では 3370 波数でピークが観測されているが、コンバージ処理すると高波数側にシフトしていることが分かる。これは、コンバージミル粉碎により、微粒子と同時に結晶構造破壊が進行し、木質中セルロースの分子内、分子間水素結合の強度が弱くなっているためだと推測できる（図5 3）。

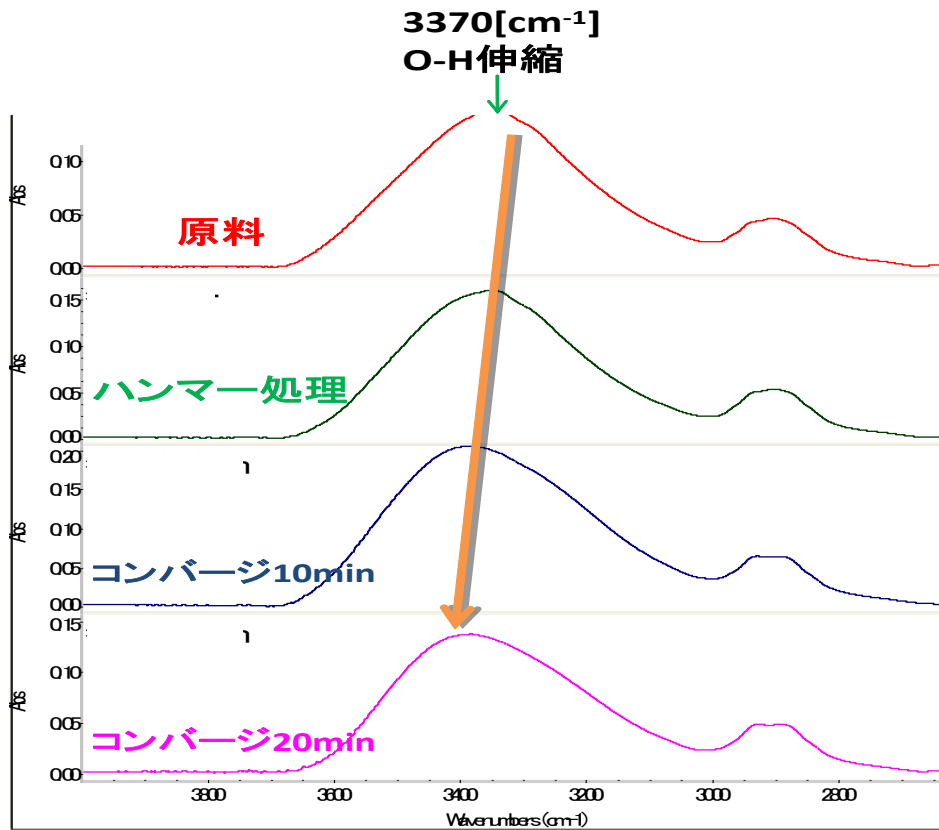
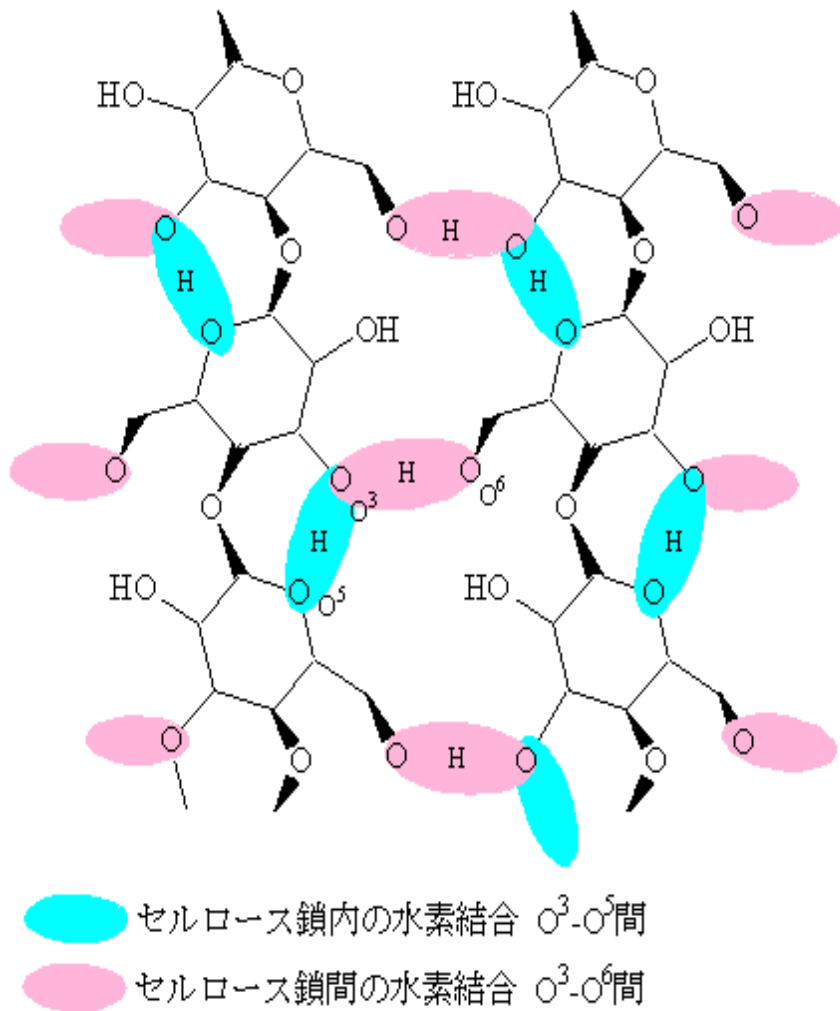


図52 杉大鋸屑粉碎物の IR 分析結果(拡大図)



○ セルロース繊維内の水素結合
 セルロース分子は、分子内の水素結合が O3-O5 巻で形成され、剛直な板状分子である。これらが更に分子間水素結合で結ばれて層状構造を形成しているとされる。

図53 セルロースの水素結合

4.9 コンバージミル連続粉碎装置の検討

4.9.1 6L 連続粉碎装置と1L バッチ式粉碎装置の粉碎性の比較

6L 連続装置と1L バッチ式装置の使用した場合の基本的な粉碎性について比較する。表10、11には、それぞれの粉碎の粉碎条件を示す。

表10. 粉碎条件(1L バッチ式装置)

粉碎容器	内容量 1000ml (SUS 製)
媒体ボール	クロム鋼球 (SUJ-2)
媒体ボール径	5mm
媒体ボール充填率	20% (938g)
試料量	30g (120ml)、40g(160ml)
回転速度	800rpm
粉碎時間	10、20、30、60min
出初原料	ハンマーミル前処理大鋸屑

表11. 粉碎条件(6L 連続装置)

粉碎容器	内容量 6L (SUS 製)
媒体ボール	クロム鋼球 (SUJ-2)
媒体ボール径	6mm
媒体ボール充填率	15% (4162g)
試料量	190g (760ml)、250g(1000ml)
回転速度	800rpm
粉碎時間	10、20、30、60、90min
出初原料	ハンマーミル前処理大鋸屑

図54にはそれぞれの粉碎装置での粉碎時間と結晶化度、平均粒子径との関係を示す。ここでの粉碎原料はハンマーミル前処理粉碎(1分間)物である。同図より、結晶化度および平均粒子径とも6L 連続装置は1L バッチ式装置とほぼ同様な値を示していることがわかる。

図55には、6L 連続装置と1L バッチ式装置の使用した場合の粉碎時間とグルコース濃度との関係を示す。粉碎時間10分間で比較すると、1L バッチ式装置では糖化率80%に達していないが、6L 連続装置では80%に達している。6L 連続粉碎装置では10分という短時間粉碎でも十分な粉碎性を示すことがわかる。このことより、8hの運転で12kgを処理できることになり、粉末処理量は10kg/dayを達成できると言える。以上より、ハンマーミル前処理粉碎(1分間)を併用し、6L 連続式コンバージミル10分間粉碎で糖化率80%以上を達成できることがわかる。

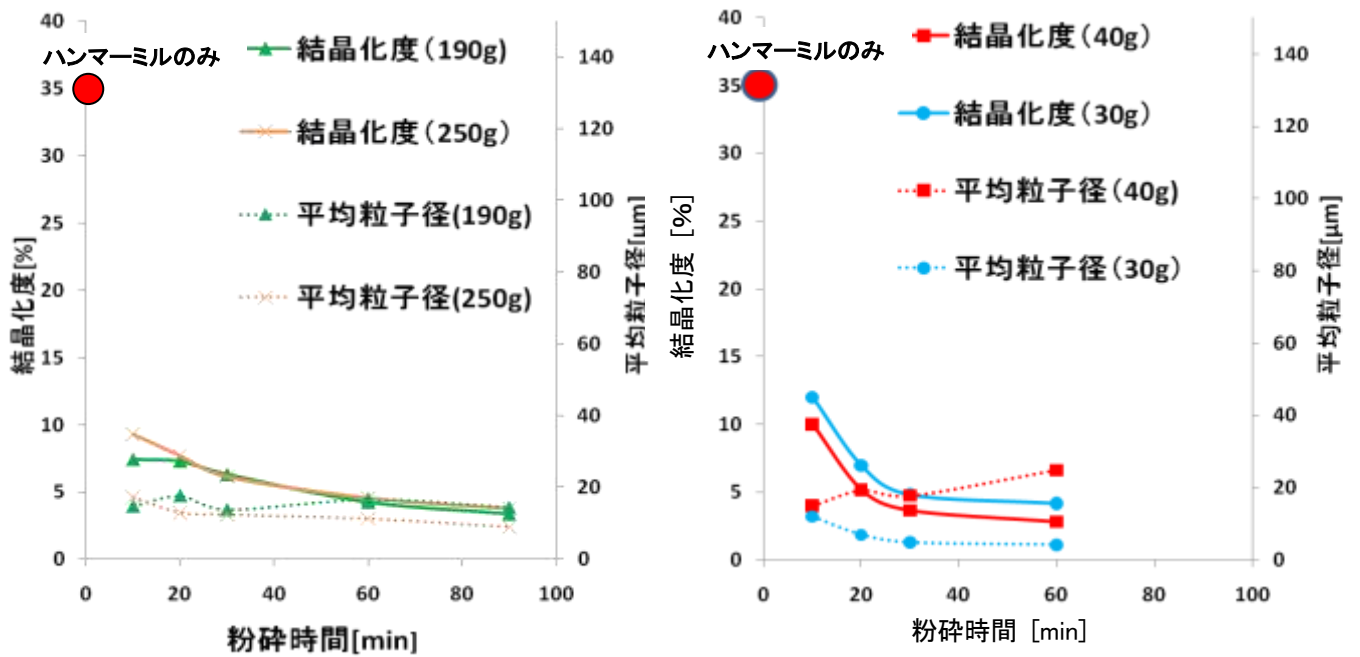


図54 粉砕時間と結晶化度、平均粒子径との関係（6L連続装置(左)と1Lバッチ式(右)との比較)

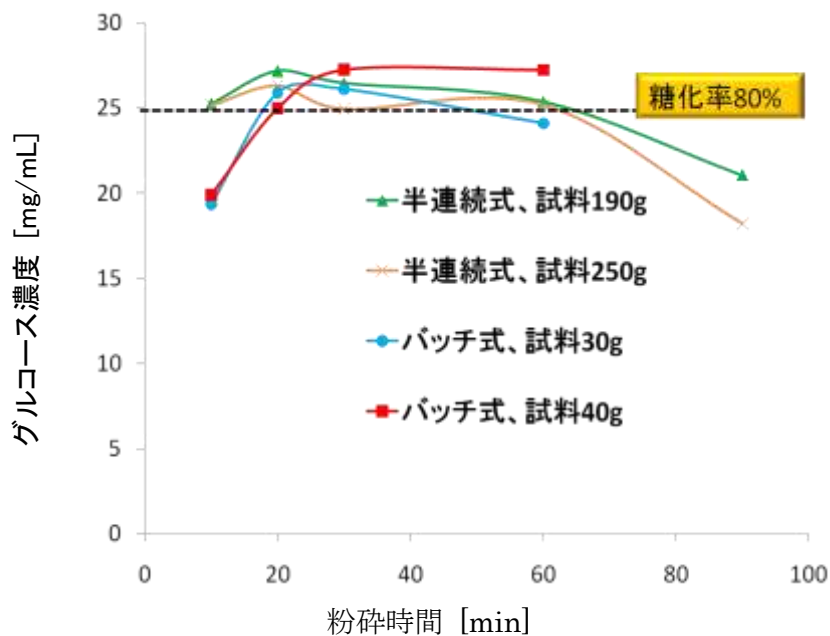


図55 粉砕時間とグルコース濃度との関係（6L連続装置と1Lバッチ式との比較）

4.9.2 6L 連続粉碎装置の粉碎動力について

6 L連続コンバージミル装置を用いた場合の動力について測定する。図56には、負荷あり（試料と媒体ボール有り）の場合と負荷なし（試料と媒体ボールなし）の場合の粉碎時間と動力の関係を示す。負荷ありの場合においても、粉碎による消費電力の変動はほとんどなく、ほぼ一定値の3,700Wを示すことがわかる。

ここで、1 tonの木質原料から300LのEtOHを製造可能とし、電気料金は12円/kWhと仮定すると、以下のような計算根拠により、

○ 6L 連続式コンバージミル

試料：大鋸屑 250 g（ハンマーミル処理）

消費電力：3,700W × 10 min

動力原単位：2,467 kWh/ton

製造コスト（粉碎工程）：98 円/L

粉碎工程のみでのエタノール製造単価は98円/Lとなる。

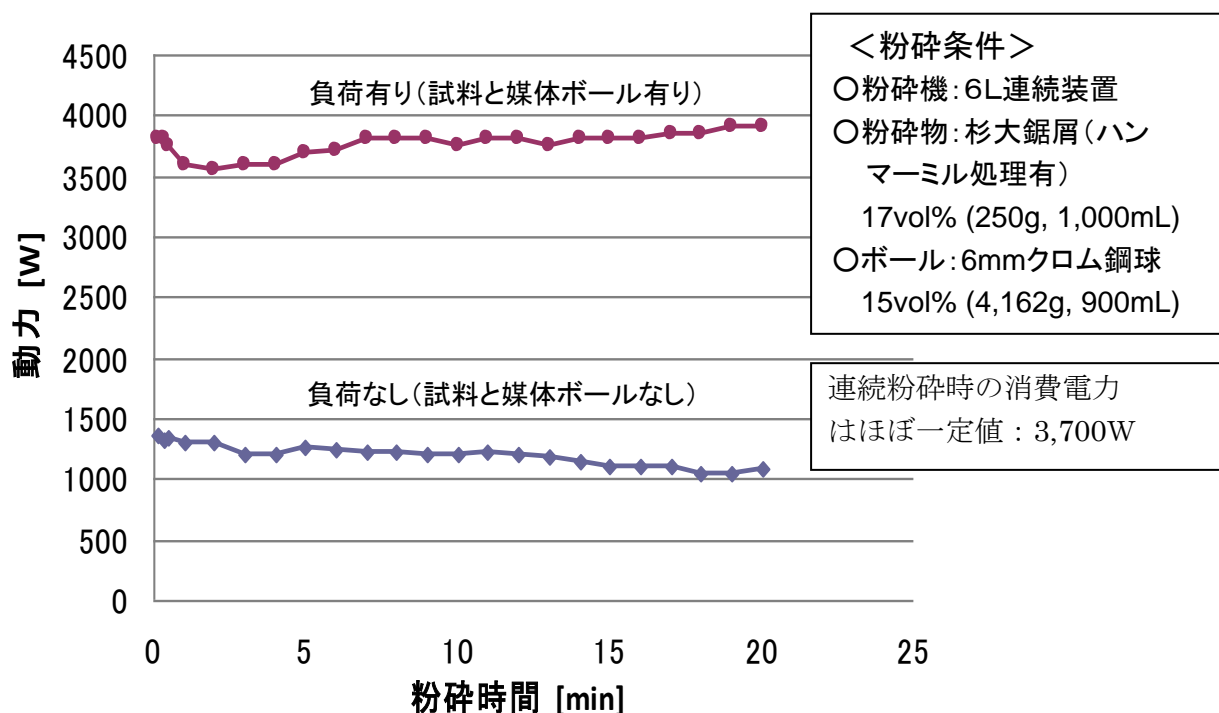


図56 粉碎時間と動力の関係 (6L連続装置)

- 前提：1 tonの木質原料 → 300LのEtOHを製造可能
- 電気料金：12 円/kWh

○ 1 L バッチ式コンバージミル
試料：大鋸屑 30 g
消費電力：450W × 30 min
動力原単位：7,500 kWh/ton
製造コスト（粉砕工程）：360 円/L

○ 6L 連続式コンバージミル
試料：大鋸屑 250 g
（ハンマーミル処理）
消費電力：3,700W × 10 min
動力原単位：2,467 kWh/ton
製造コスト（粉砕工程）：98 円/L