

平成23年度  
環境研究総合推進費補助金 研究事業  
総合研究報告書

水熱爆砕による草木質系バイオマスの省エネ高効率糖化前処理の研究  
(K2113,) k22076、k2327

平成24年3月

名古屋大学 堀添 浩俊

補助事業名	環境研究総合推進費補助金研究事業 (平成21年度～平成23年度)
所管	環境省
国庫補助金	20,868,000円(3年間合計)
研究課題名	水熱爆砕による草木質系バイオマスの省エネ高効率糖化前処理の研究
研究期間	平成21年4月1日～平成24年3月31日
研究代表者名	堀添浩俊(名古屋大学)
研究分担者名	なし

# 目次

## I. 平成21年度研究

1章 緒言	4
2章 原料バイオマスの構造と分析	1 3
3章 前処理試験	2 3
4章 酵素糖化試験	3 2
5章 破碎サイズの大きなバイオマスでの前処理・酵素糖化試験	4 7
6章 結言	7 6

## II. 平成22年度研究

1章 緒言 (省略)	
2章 原料バイオマスの構造と分析 (省略)	
3章 前処理試験装置と方法	7 8
4章 酵素糖化試験装置と方法	8 2
5章 バイオマスの前処理・酵素糖化実験結果	8 7
6章 発酵阻害物質の生成濃度分析評価	1 4 3
7章 結言	1 5 8

### Ⅲ. 平成23年度研究

1章 緒言	160
2章 原料バイオマスの構造と分析（省略）	
3章 前処理試験装置と方法（省略）	
4章 酵素糖化試験装置と方法（省略）	
5章 バイオマスの前処理・酵素糖化試験結果	191
6章 水熱処理における添加剤の効果	256
7章 エタノール発酵試験	281
8章 結言	285

### Ⅳ. 3年間の研究総括

292

# I. 平成21年度研究内容

## 1章 緒言

### 1-1 研究背景

現在、地球温暖化対策の一つとしてバイオエタノールが注目されている。Fig. 1-1-1にバイオエタノールの製造プロセスを示す。米国やブラジルでは、とうもろこしや、さとうきびなどの食料を原料としてエタノールを製造しているが、食料と競合しているという大きな問題がある。この対策として、非食料であるセルロース系のバイオマスを種々の方法で前処理して酵素糖化し、エタノールを製造する技術開発が国内外で行われている。本研究はこのセルロース系バイオマスの糖化前処理に関するものである。

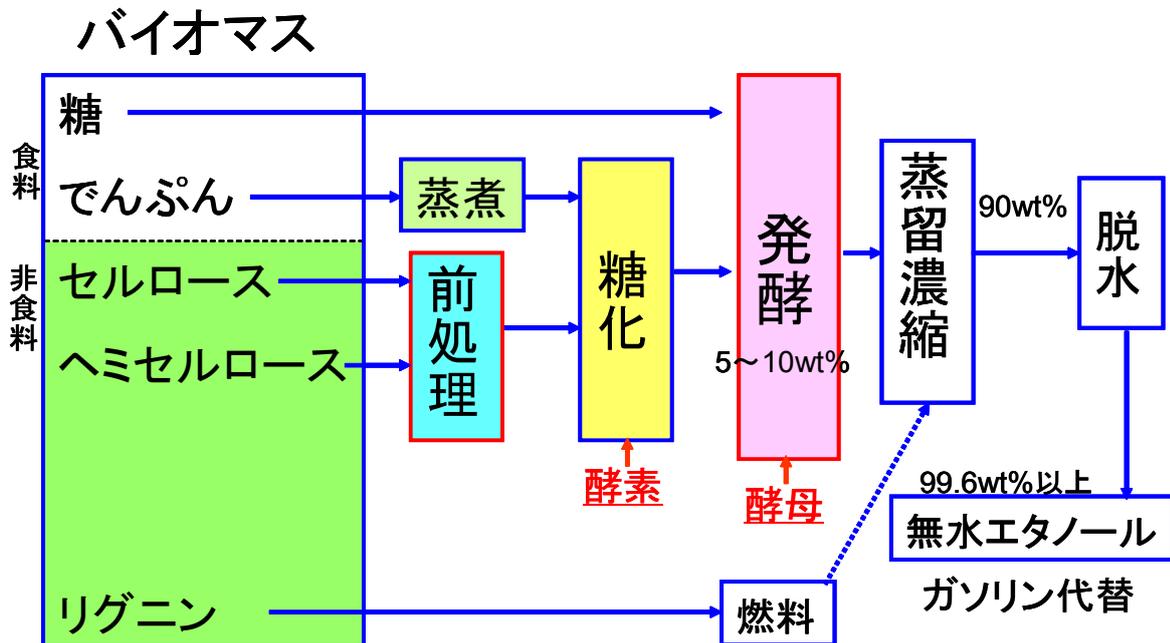


Fig. 1-1-1 バイオエタノール製造プロセス

## 1-2 従来技術

セルロース系バイオマスの主要な糖化技術を **Table 1-2-1** に示す。酵素糖化だけでは多量の酵素が必要であり、また、濃硫酸法では硫酸の回収エネルギー大、希硫酸法は副生石膏の処理費用大、水蒸気爆砕は多量のエネルギーが必要など、それぞれ課題がある。

Table 1-2-1 セルロースの主な糖化方法の比較

方法	酵素	濃硫酸法	希硫酸法	水熱	水蒸気爆砕	アンモニア爆砕
温度	常温	加温	加温	200-300℃	150-250℃	60-110℃
圧力	常圧	常圧	加圧	5-20 MPa	飽和蒸気圧	液体アンモニア または、 高濃度アンモニア 水溶液
特徴	酵素コスト大	<ul style="list-style-type: none"> <li>・硫酸の回収エネルギー大</li> <li>・耐食材料が必要</li> <li>・発酵阻害物質の生成</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・希硫酸は消石灰で中和するため、多量の石膏の処理コスト大</li> <li>・発酵阻害物質の生成</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・安価無害な水を用い、高圧。</li> <li>・選択性、収率向上、低エネルギー化が課題</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・加熱に必要なエネルギーが極めて大きい</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・発酵阻害物質の生成が少ない。</li> <li>・アンモニアの環境安全対策が必要</li> </ul>

### 1-3 本研究の特徴と目的

本研究では、水蒸気爆砕と水熱に注目し、両者を同時に実現することで従来の課題を解決することを試みた。即ち、水熱（中温、中圧）でバイオマス細胞膜内に熱水を浸透させ、その後一気に大気圧に減圧することで、下記が可能になると考えられる。

- 加熱時に蒸発潜熱が不要のため省エネプロセスになる。加熱に必要なエネルギーの試算結果を **Table 1-3-1**, **1-3-2** および **Fig.1-3-1** に示し、NEDO が想定しているバイオエタノール製造プロセス全体の実用的なエネルギー収支を **Fig.1-3-2** に示す。水熱爆砕に必要なエネルギーはバイオマス発熱量の約10%程度で、水蒸気爆砕の約1/3以下のエネルギーであり、熱回収を行えば更に小さくできることが示された。
- 熱水が一瞬に蒸気になるので大きな膨張エネルギーが得られる。その結果、リグニンが剥離し、セルロースの結晶化度が低下し、微細化され表面積が増大するので酵素が作用しやすくなる。膨張エネルギーの試算結果を **Table 1-3-3** に示す。水熱爆砕は水蒸気爆砕の約30倍の膨張エネルギーを有することが示された。

以上のことから、**Fig. 1-3-3** に水熱爆砕の原理と特徴を模式図で示し、水蒸気爆砕、水熱爆砕のプロセスイメージを **Fig.1-3-4**, **1-3-5** に示す。

以上の観点から、本年度の研究は以下を目的として行なった。

回分式の水熱爆砕装置を試作し、3種類の原料・種々の条件下で水熱爆砕処理、水蒸気爆砕処理、水熱除冷処理を施したサンプルをそれぞれ製造し、各々に対し酵素糖化実験を行ない、酵素糖化率から、水熱爆砕法が従来技術である水熱除冷処理・水蒸気爆砕より優位であることを検証する。

Table 1-3-1 水熱爆砕の加熱熱量推算

空隙を水で充填できる領域

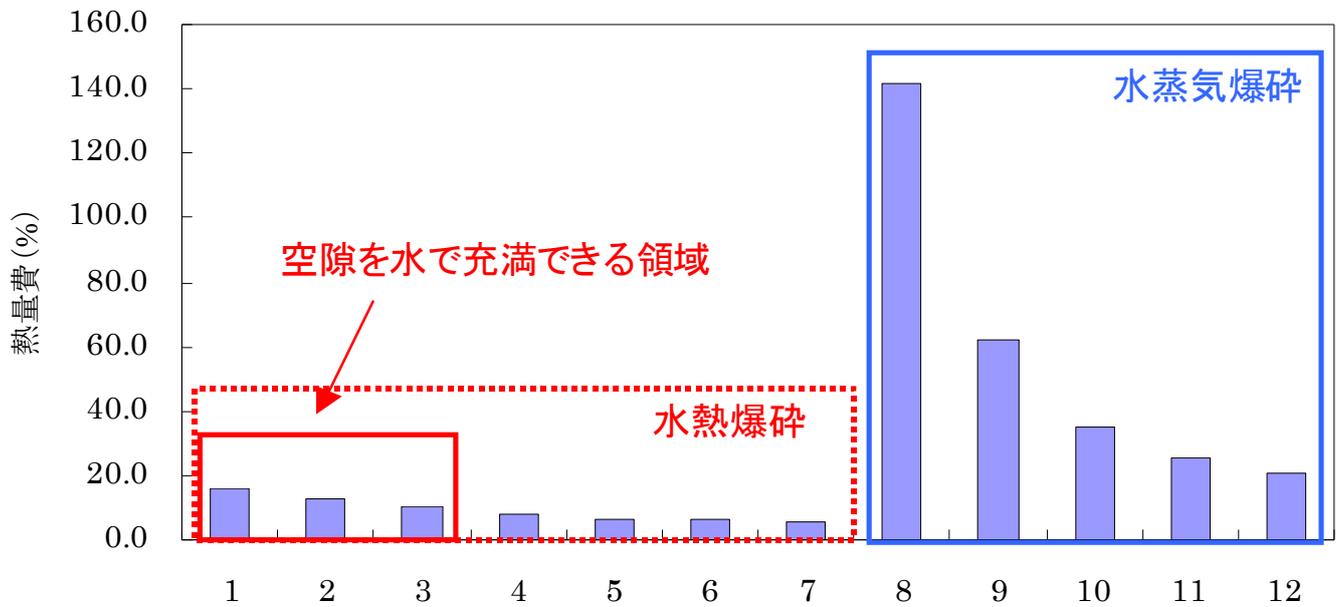
case no.			1	2	3	4	5	6	7
1. 原料	木質	kg/h	1	1	1	1	1	1	1
	含有水分	kg/h	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	木質比熱	kcal/kg	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31
	温度	°C	20	20	20	20	20	20	20
	木質密度	kg/l	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
	空隙率	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	H <sub>1IN</sub>	kcal/h	6	6	6	6	6	6	6
	H <sub>2IN</sub>	kcal/h	6	6	6	6	6	6	6
2. 加水分解条件	温度	°C	200	200	200	200	200	200	200
	圧力	MPa	3	3	3	3	3	3	3
	エンタルピー	MJ/kg	203.7	203.7	203.7	203.7	203.7	203.7	203.7
	H <sub>1OUT</sub>	kcal/h	62	62	62	62	62	62	62
	H <sub>2OUT</sub>	kcal/h	61	61	61	61	61	61	61
3. 供給熱水	温度	°C	230	230	250	260	280	300	320
	圧力	MPa	3	4	5	6	8	10	14
	エンタルピー	MJ/kg	236.5	247.8	259	283	308	321	347
	流量	kg/h	3.38	2.52	2.01	1.4	1.06	0.95	0.77
	H <sub>3IN</sub> (熱水)	kcal/h	799	624	521	396	326	305	267
熱量比 vs 原料発熱量	(%)	16.0	12.5	10.4	7.9	6.5	6.1	5.3	

(注) バイオマスの発熱量を 5000kcal/kg と仮定

Table 1-3-2 水蒸気爆砕の加熱熱量推

case no.			8	9	10	11	12
1. 原料	木質	kg/h	1	1	1	1	1
	含有水分	kg/h	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	木質比熱	kcal/kg	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31
	温度	°C	20	20	20	20	20
	木質密度	kg/l	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
	空隙率	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	H <sub>1IN</sub>	kcal/h	6	6	6	6	6
	H <sub>2IN</sub>	kcal/h	6	6	6	6	6
2. 加水分解条件	温度	°C	200	200	200	200	200
	圧力	MPa	1.55	1.59	1.59	1.59	1.59
	エンタルピー	MJ/kg	667.3	667.3	667.3	667.3	667.3
	H <sub>1OUT</sub>	kcal/h	62	62	62	62	62
	H <sub>2OUT</sub>	kcal/h	200	200	200	200	200
3. 供給熱水	温度	°C	240	300	400	500	600
	圧力	MPa	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
	エンタルピー	MJ/kg	691.7	725.4	777.7	830	883
	流量	kg/h	10.25	4.3	2.26	1.54	1.16
	H <sub>3IN</sub> (熱水)	kcal/h	7090	3119	1758	1278	1024
	熱量比 vs 原料発熱量	(%)	141.8	62.4	35.2	25.6	20.5

(注) バイオマスの発熱量を 5000kcal/kg と仮定



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
供給水温度(°C)	230	230	250	260	280	300	320	240	300	400	500	600
供給水圧力(MPa)	3	4	5	6	8	10	14	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6

Fig.1-3-1 水熱爆砕と水蒸気爆砕の加熱エネルギーの比較

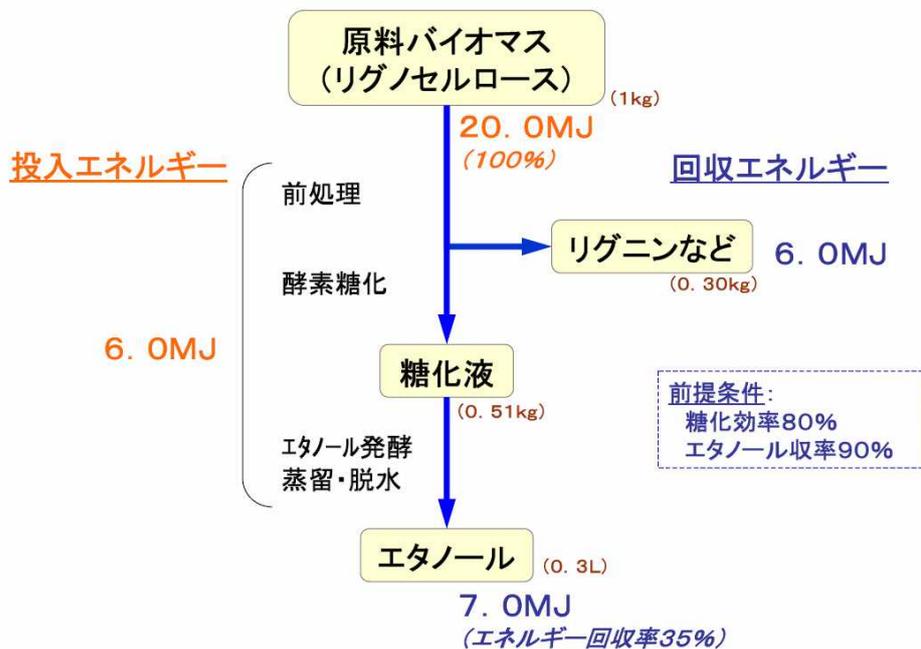


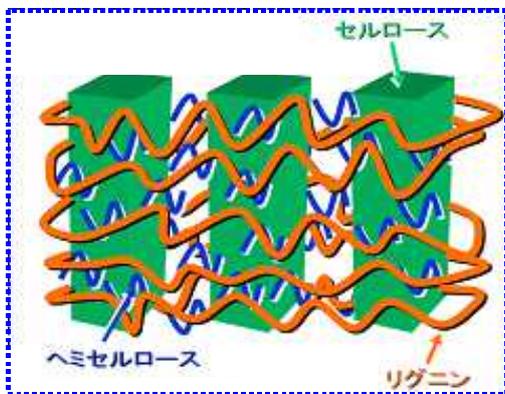
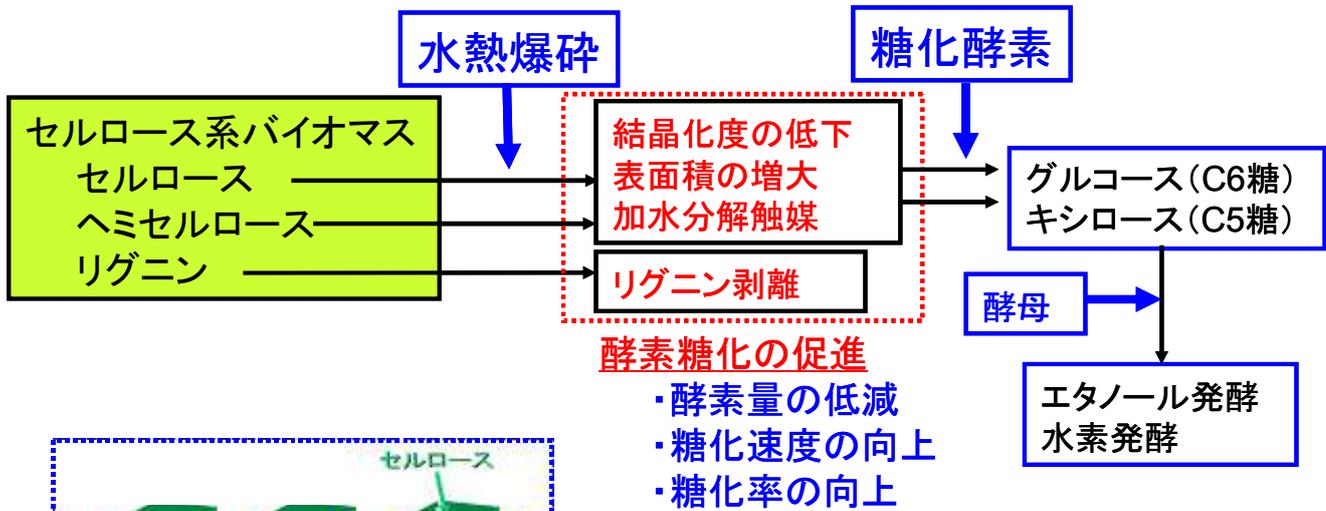
Fig.1-3-2 バイオマス自立型プロセスの考え方

Table 1-3-3 大気への膨張仕事量の推算

バイオマス : 1kg

バイオマス中の水分 : 0.4kg

	単位	水熱爆砕	水蒸気爆砕
温度	°C	200	200
圧力	MPa	3	1.6
膨張前の容積 $V_0$	$m^3$	0.004 (液体の水)	0.004 (水蒸気)
膨張後の容積 $V_1$	$m^3$	0.136	0.0049
容積変化 $\Delta V_1 - V_0$	$m^3$	0.1354	0.0045
膨張仕事 $W = P \Delta V$	J	$1.38 \times 10^4$	496



水熱爆砕

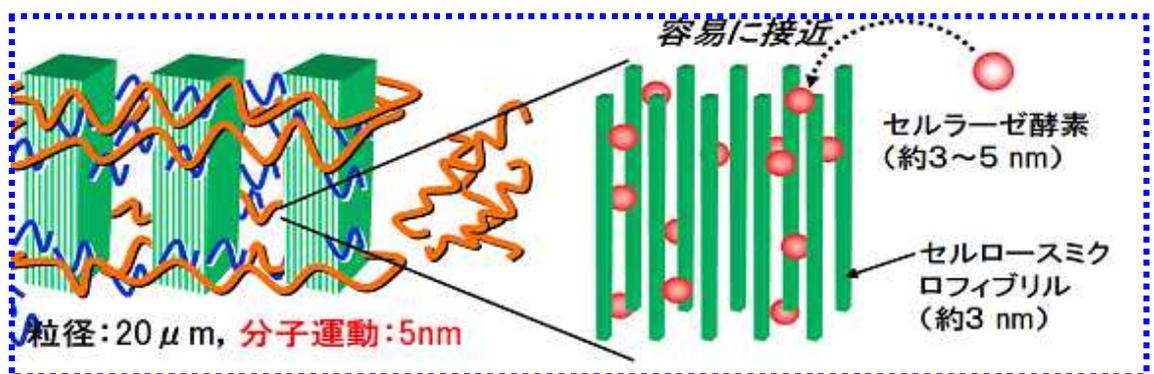


Fig. 1-3-3 水熱爆砕の原理と特徴

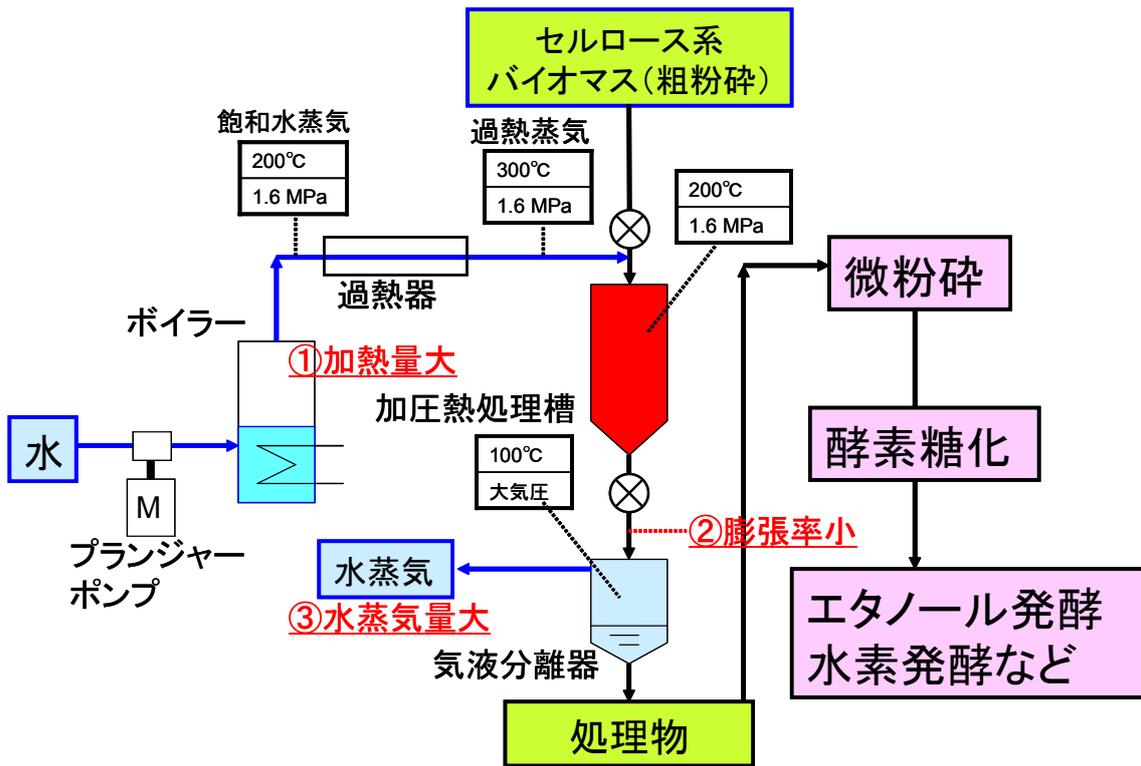


Fig.1-3-4 水蒸気爆砕プロセスイメージ

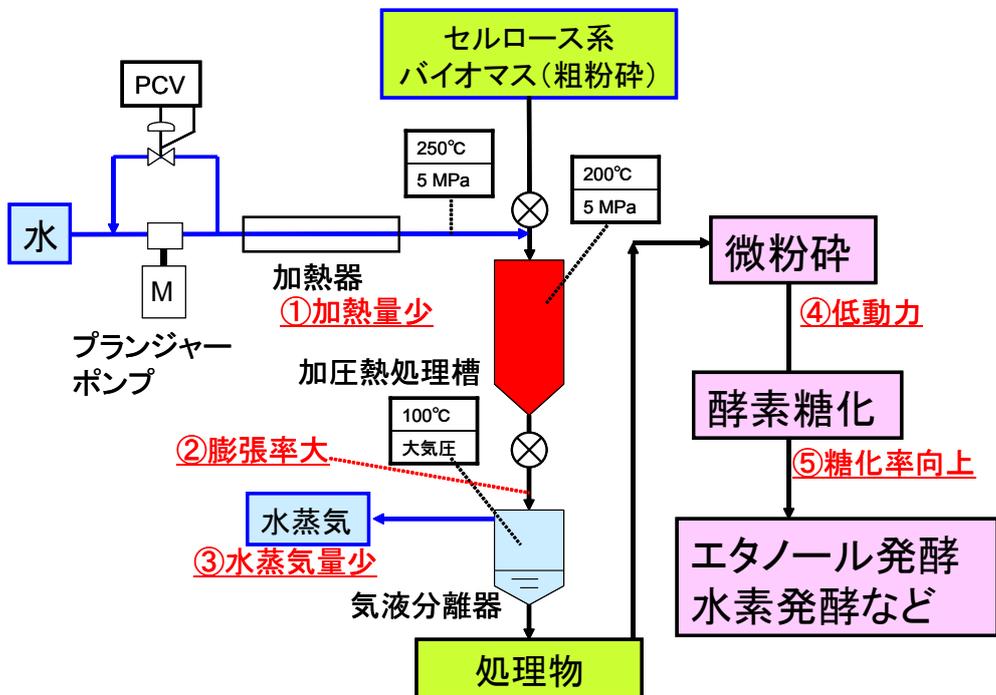


Fig.1-3-5 水熱爆砕プロセスイメージ

## 2章 原料バイオマスの構造と分析

### 2-1 バイオマスの主要成分

木材の主要成分は多糖類であるセルロース、ヘミセルロースと芳香族系高分子化合物であるリグニンからなる。セルロースは、 $\beta$ -グルコースが直鎖状に重合したものであり、バイオマスの構成成分の約 40%を占めている。このセルロースが大量に集まることにより結晶構造を形成し、これが酵素糖化する際の妨げとなっている。次に、細胞壁内のセルロースを除く水に不溶な多糖類の総称をヘミセルロースといい、構成成分比の約 30%を占める。ヘミセルロースの主成分はキシランであり、これはキシロースの主鎖に様々な側鎖がついた糖である。これらセルロース、ヘミセルロースを取り囲むようにして、物理的・化学的な作用から防御しているのがリグニンである。これをリグニンの包埋構造というが、この構造を破壊しない限り酵素はセルロース、ヘミセルロースにほとんど接触できず、酵素糖化したところで成果は得られない。原料構成成分表を **Table 2-1-1** に示す。

Table 2-1-1 原料構成成分表

原料成分	水分	
	灰分	
	アルコール・ベンゼン可溶分	
	ホロセルロース	$\alpha$ -セルロース
		$\beta$ -セルロース
		ヘミセルロース及び $\gamma$ -セルロース
	リグニン	酸不溶性リグニン
酸可溶性リグニン		

## 2-2 原料バイオマスの成分分析方法

### (1) 水分率・灰分率

#### 1) 水分率

試料

乾燥

105℃ 恒量まで

秤量

水分率 (%) =  $100 - \left[ \frac{\text{乾燥後試料重量 (g)}}{\text{試料採取量 (g)}} \times 100 \right]$

#### 2) 灰分率

試料

灰化

600℃ 恒量まで

秤量

灰分率 (%) =  $\frac{\text{灰化後試料重量 (g)}}{\text{試料採取量 (乾基準) (g)}} \times 100$

### (2) 試料の粉碎

#### 2. 試料の粉碎

生材

細断

はさみ、ニッパー等で5mm程度に粗く細断

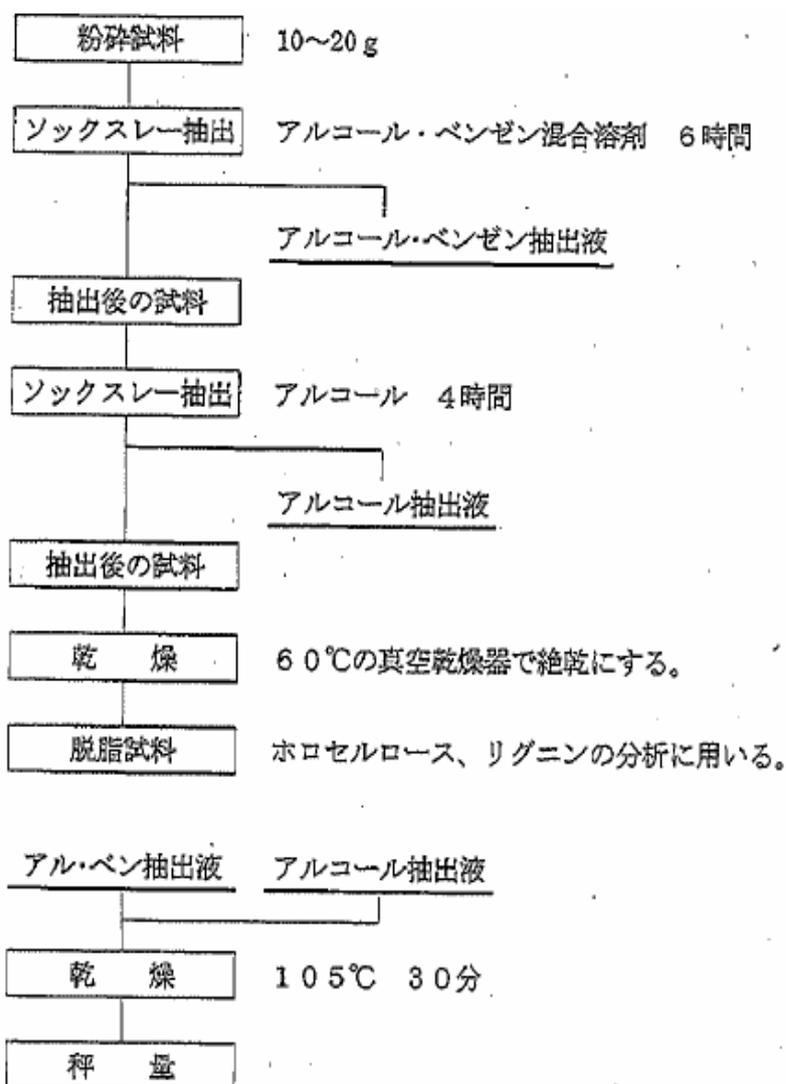
粉碎

プラスチックミル、ウイレーミル等粉碎器で

粉碎試料

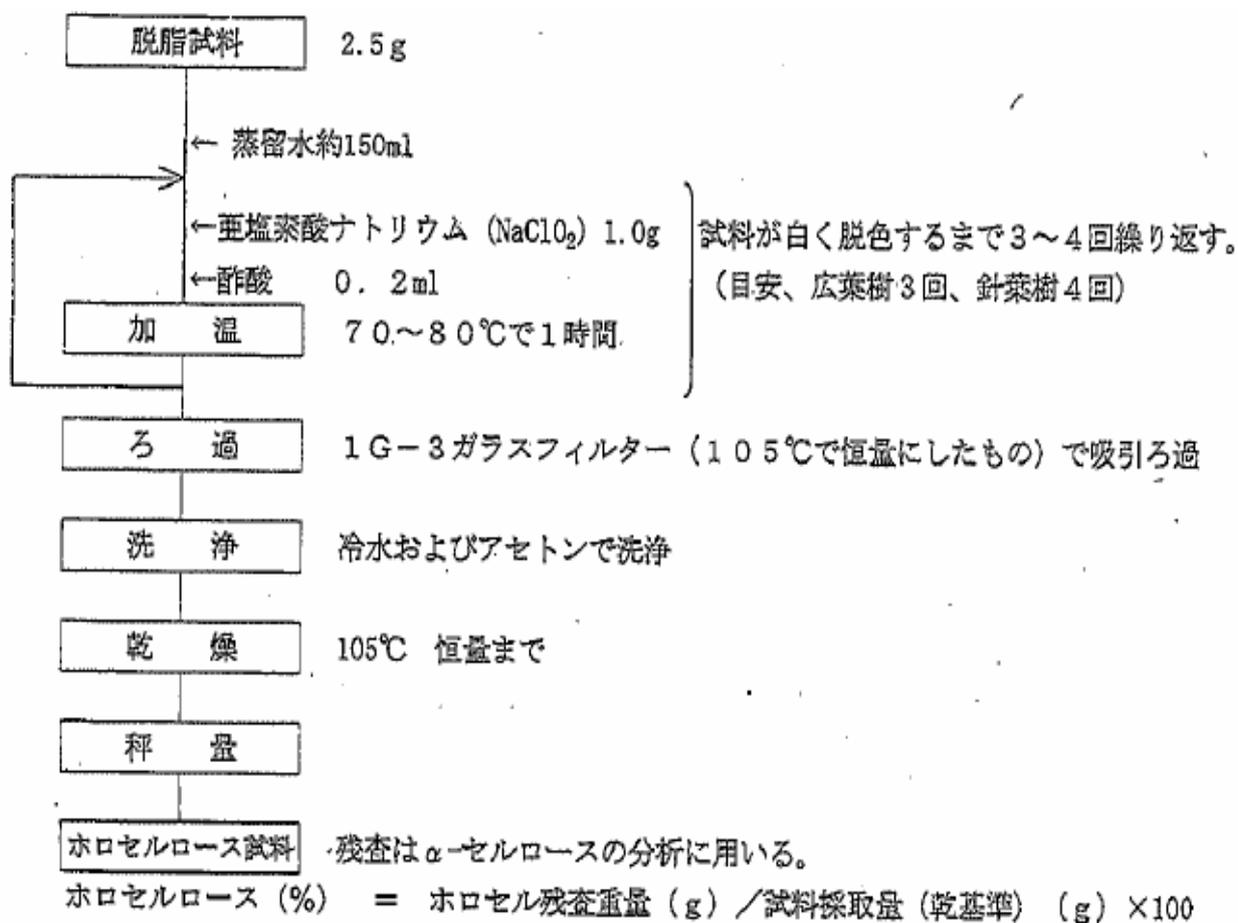
40~80メッシュ (約425~180μm) のものを分析に用いる。

(3) アルコール・ベンゼン可溶分

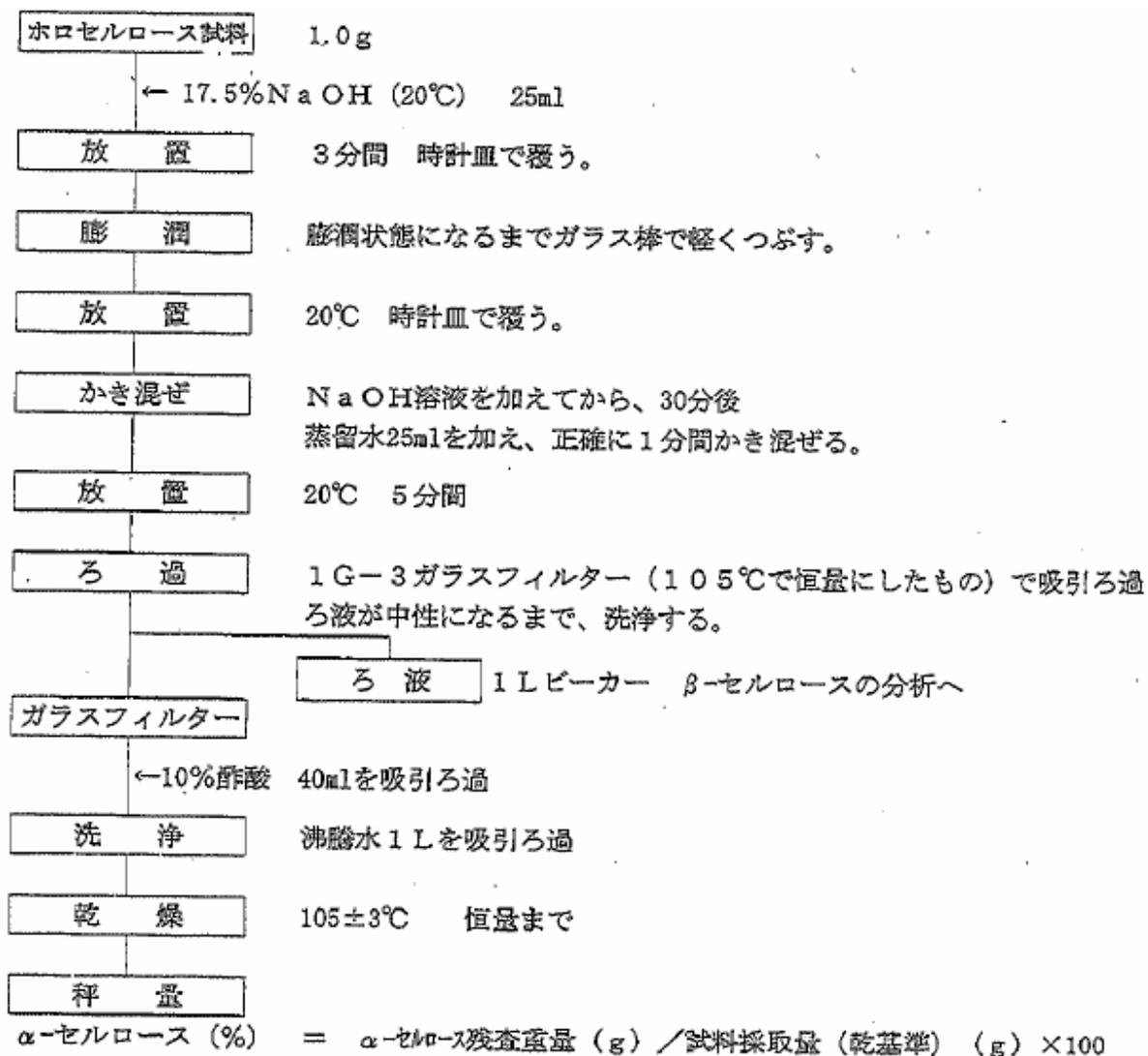


$$\text{アルコール・ベンゼン可溶分 (\%)} = \frac{\text{アルベン抽出物量 (g)}}{\text{試料採取量 (乾基準) (g)}} \times 100$$

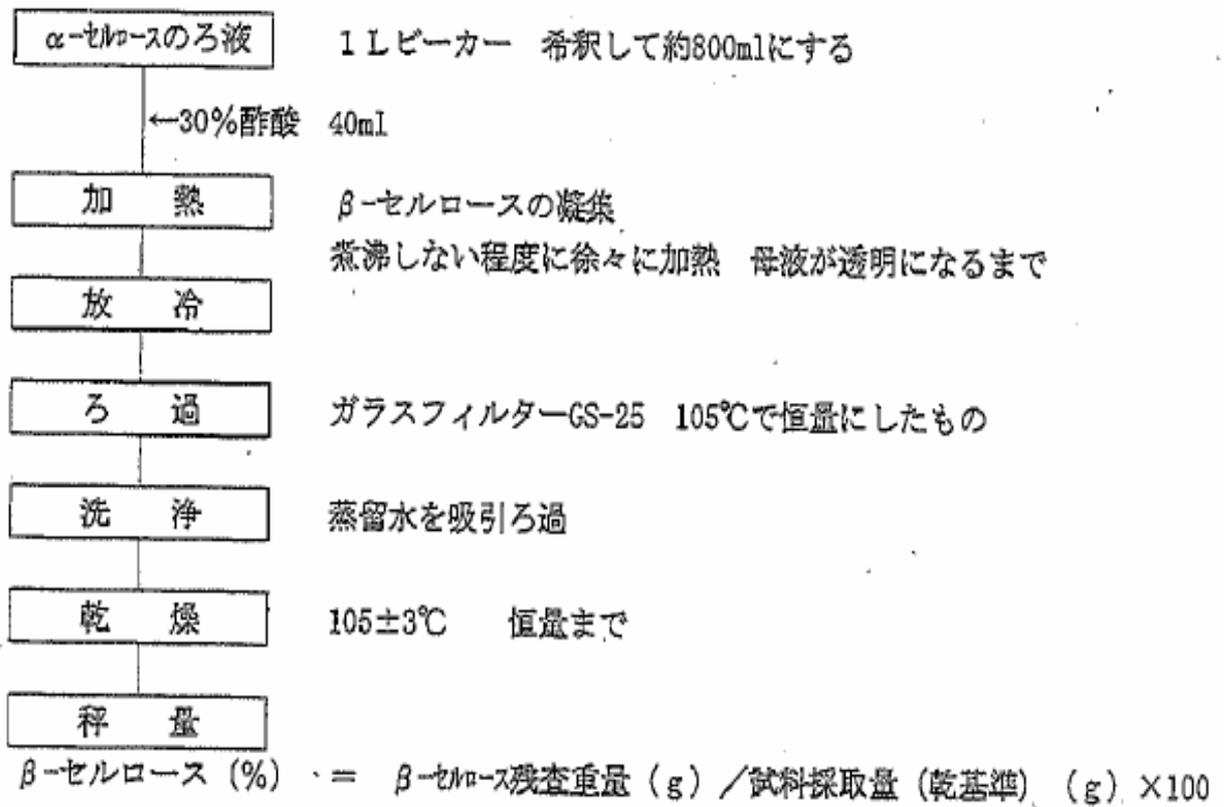
(4) ホロセルロース



(5) α-セルロース



(6) β-セルロース

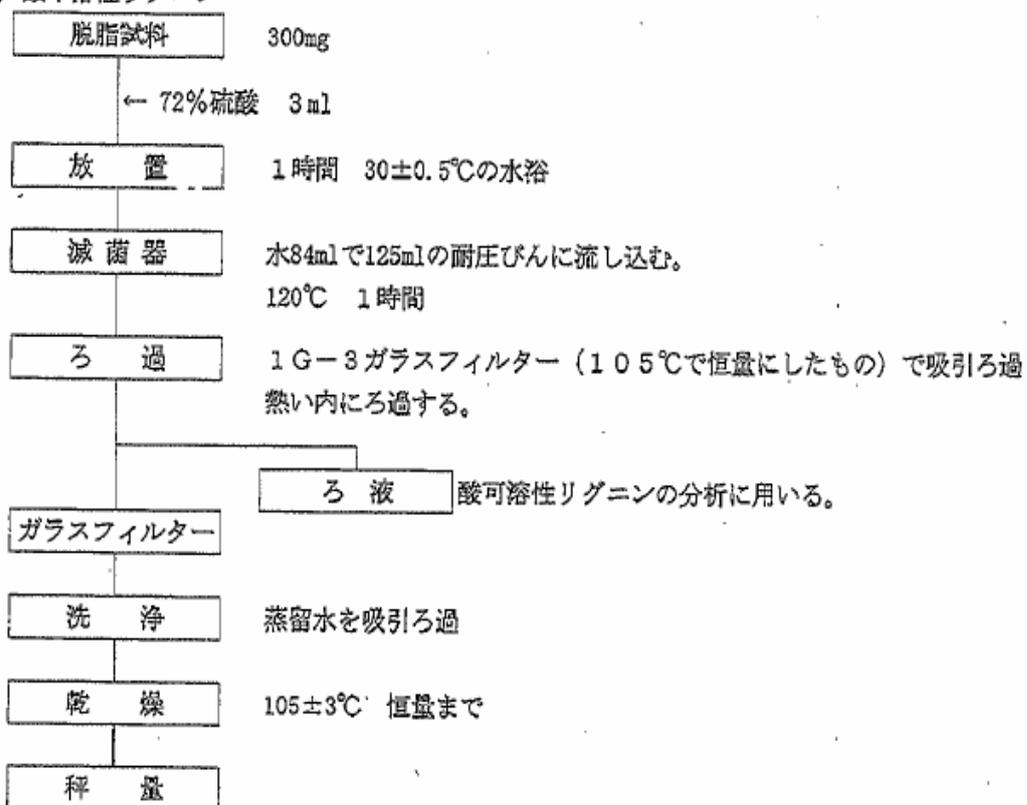


(7) γ-セルロース及びヘミセルロース

$$\gamma\text{-セルロース及びヘミセルロース}(\%) = \text{ホロセルロース}(\%) - (\alpha\text{-セルロース}(\%) + \beta\text{-セルロース}(\%))$$

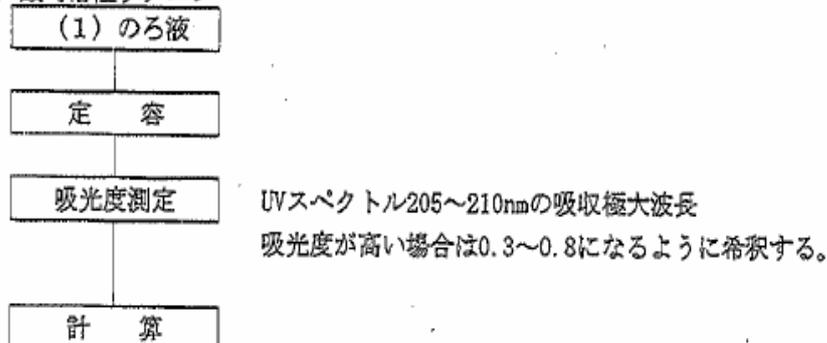
## (8) リグニン

### 1) 酸不溶性リグニン



$$\text{酸不溶性リグニン (\%)} = \frac{\text{リグニン残渣重量 (g)}}{\text{試料採取量 (乾基準) (g)}} \times 100$$

### 2) 酸可溶性リグニン



$$\text{酸可溶性リグニン (\%)} = \frac{d \times v \times (A_s - A_b)}{a \times w} \times 100$$

d : 希釈倍率

v : ろ液定容量 (L)

A<sub>s</sub> : 試料溶液の吸光度

A<sub>b</sub> : ブランク溶液の吸光度

a : リグニンの吸光係数

w : 試料採取量 (乾基準) (g)

\*リグニンの吸光係数および吸収極大波長は、樹脂によりわずかに変動する。

正確には単離した酸可溶性リグニンについてそれぞれ求める。

参考値 (カバ) : 1131g<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

### 2-3 原料バイオマスの成分分析結果

今回サンプルとして使用した粃殻、ケヤキ、スギの成分分析を行った（東レテクノ株式会社に委託分析）。本研究の糖化率計算は、この分析結果をもとに行った。

上記3つのバイオマスの成分分析結果を **Table 2-3-1, 2, 3** に示す。ただし、Table 内において、含水率以外は乾燥基準であり、単位は全て百分率(%)である。

Table 2-3-1 成分分析結果（粃殻）

測定項目	含有率(%)	平均値(%)	測定項目	含有率(%)	平均値(%)
水分率	8.22	8.22			
灰分率	20.4	20.4			
アルコール・ベンゼン可溶分	1.44	1.44			
ホロセルロース	58.12	58.11	$\alpha$ -セルロース	36.11	36.12
				36.14	
	58.1		$\beta$ -セルロース	0.14	0.13
		0.12			
リグニン		22.59	ヘミセルロース及 び $\gamma$ -セルロース	21.85	21.85
				21.85	
			酸不溶性リグニン	22.51	22.47
				22.43	
酸可溶性リグニン	0.12	0.12			
	0.12				
主成分合計		102.54			

(注)含水率以外は乾燥基準であり、単位は全て百分率(%)である

Table 2-3-2 成分分析結果 (ケヤキ)

測定項目	含有率(%)	平均値(%)	測定項目	含有率(%)	平均値(%)
水分率	6.43	6.43			
灰分率	1.03	1.03			
アルコール・ベンゼン可溶分	8.4	8.4			
ホロセルロース	67.62	67.22	$\alpha$ -セルロース	38.54	38.5
				38.46	
ホロセルロース	66.82	67.22	$\beta$ -セルロース	0.1	0.12
				0.14	
ホロセルロース		67.22	ヘミセルロース及び $\gamma$ -セルロース	28.58	28.61
				28.63	
リグニン		19.37	酸不溶性リグニン	19.08	19.08
				19.09	
リグニン		19.37	酸可溶性リグニン	0.29	0.29
				0.28	
主成分合計		102.54			

(注)含水率以外は乾燥基準であり、単位は全て百分率(%)である

Table 2-3-3 成分分析結果 (スギ)

測定項目	含有率(%)	平均値(%)	測定項目	含有率(%)	平均値(%)
水分率	7.9	7.9			
灰分率	0.51	0.51			
アルコール・ベンゼン可溶分	3.87	3.87			
ホロセルロース	70.03	70.22	$\alpha$ -セルロース	43.58	43.58
				43.57	
ホロセルロース	70.42	70.22	$\beta$ -セルロース	0.06	0.06
				0.06	
ホロセルロース		70.22	ヘミセルロース及び $\gamma$ -セルロース	26.59	26.59
				26.59	
リグニン		30.3	酸不溶性リグニン	30.24	30.25
				30.26	
リグニン		30.3	酸可溶性リグニン	0.05	0.05
				0.05	
主成分合計		104.9			

(注)含水率以外は乾燥基準であり、単位は全て百分率(%)である

## 2-4 まとめ

今回の分析結果と文献値との比較表を **Table 2-4-1** に示す。文献値<sup>1,2,3)</sup>ではケヤキ、スギ、籾殻の順にホロセルロース（セルロースとヘミセルロースをまとめた総称）の割合が多かったが、分析結果ではスギで最も多い結果が出た。各原料に関しては、まず籾殻では文献値とあまり違いがなかった。次に、ケヤキはセルロース、ヘミセルロース、リグニンの含有率はともに文献値より低い値になった。これは水分、アルコール・ベンゼン可溶分の割合が多かったからであると思われる。また、スギに関しては、セルロースは文献値より低い値だったが、ヘミセルロースは高い値を示した。これらの結果から判断すると、ホロセルロースの割合が最も多いスギを高効率で酵素糖化できれば一番多くの糖が得られることがわかる。糖化率の計算には本分析値を用いた。

Table 2-4-1 成分分析結果と分析結果の比較<sup>1,2,3)</sup>

原料	もみがら		ケヤキ		スギ	
	分析結果	文献値	分析結果	文献値	分析結果	文献値
セルロース[wt%]	36.25	33	38.62	44.9	43.58	43.6
ヘミセルロース[wt%]	21.85	21.3	28.61	30.2	26.59	29.7
リグニン[wt%]	22.59	23.6	19.37	27.1	30.3	32.3
灰分[wt%]	20.4	17.8	0.79	1.03	0.51	0.72

### 3章 前処理試験

#### 3-1 実験装置とプロセスフロー

**Fig.3-1-1** に前処理実験装置全体図, **Fig.3-1-2** に反応器写真, **Fig.3-1-3** に前処理実験装置プロセスフロー, **Fig.3-1-4** に反応器詳細図を示す。

本装置は水熱爆砕の他、水蒸気爆砕、水熱徐冷の試験ができるように設計した。

主な仕様は下記の通りである。

温度：最大 350℃

圧力：最大 10MPa

熱水流量：最大 40ml/min

反応器：内径約 10mm、長さ約 300mm

底部にボール弁（アクチュエータで遠隔操作）

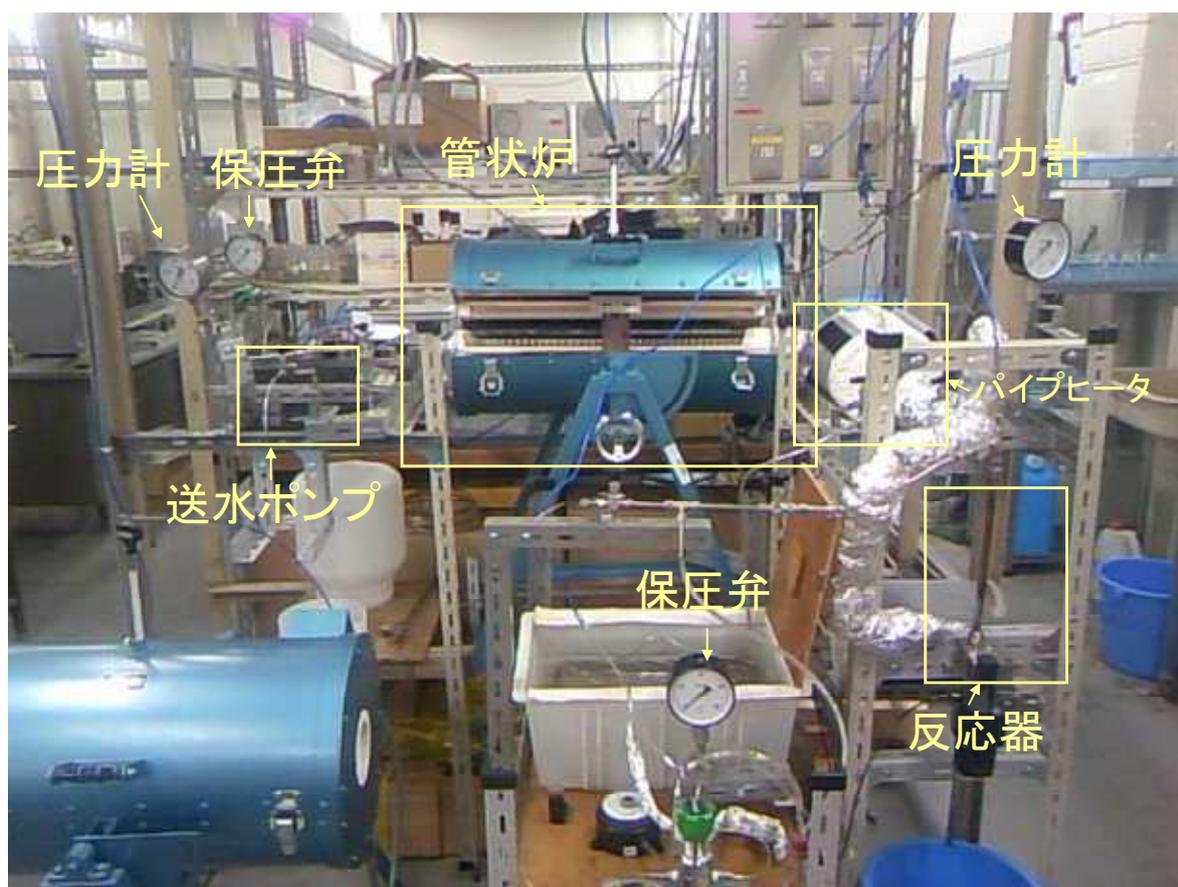
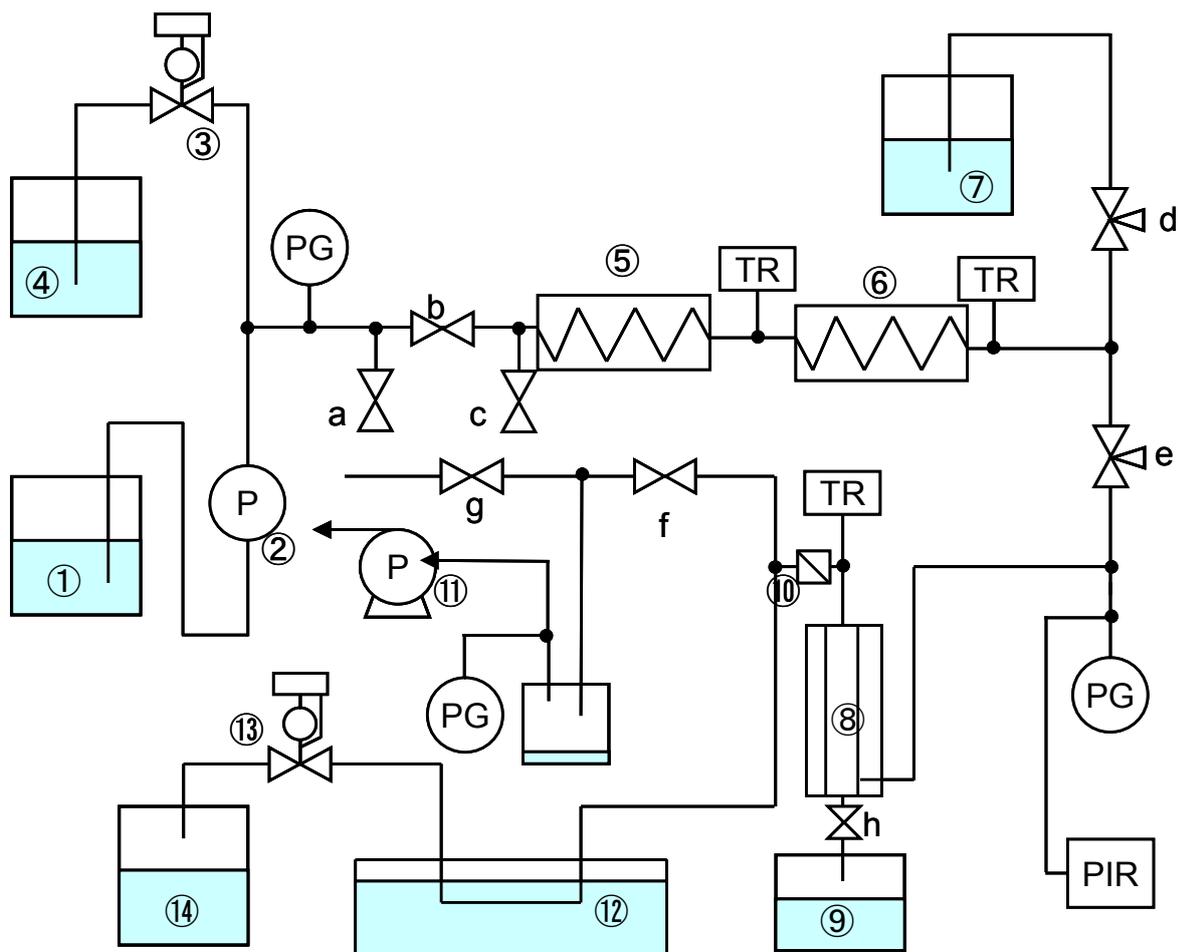


Fig.3-1-1 前処理実験装置全体図



Fig.3-1-2 反応器写真



- |             |               |
|-------------|---------------|
| ① : 供給水容器   | ⑪ : 真空ポンプ     |
| ② : 送水ポンプ   | ⑫ : 冷却水容器     |
| ③ : 保圧弁     | ⑬ : 保圧弁       |
| ④ : 受水容器    | ⑭ : 流出水受け容器   |
| ⑤ : 管状炉     | a~g : ニードルバルブ |
| ⑥ : パイプヒータ  | h : ボールバルブ    |
| ⑦ : 高温水受け容器 | TR : 熱電対      |
| ⑧ : 反応器     | PG : 圧力計      |
| ⑨ : 処理物受け容器 | PIR : デジタル圧力計 |
| ⑩ : フィルター   |               |

Fig.3-1-3 前処理実験装置プロセスフロー

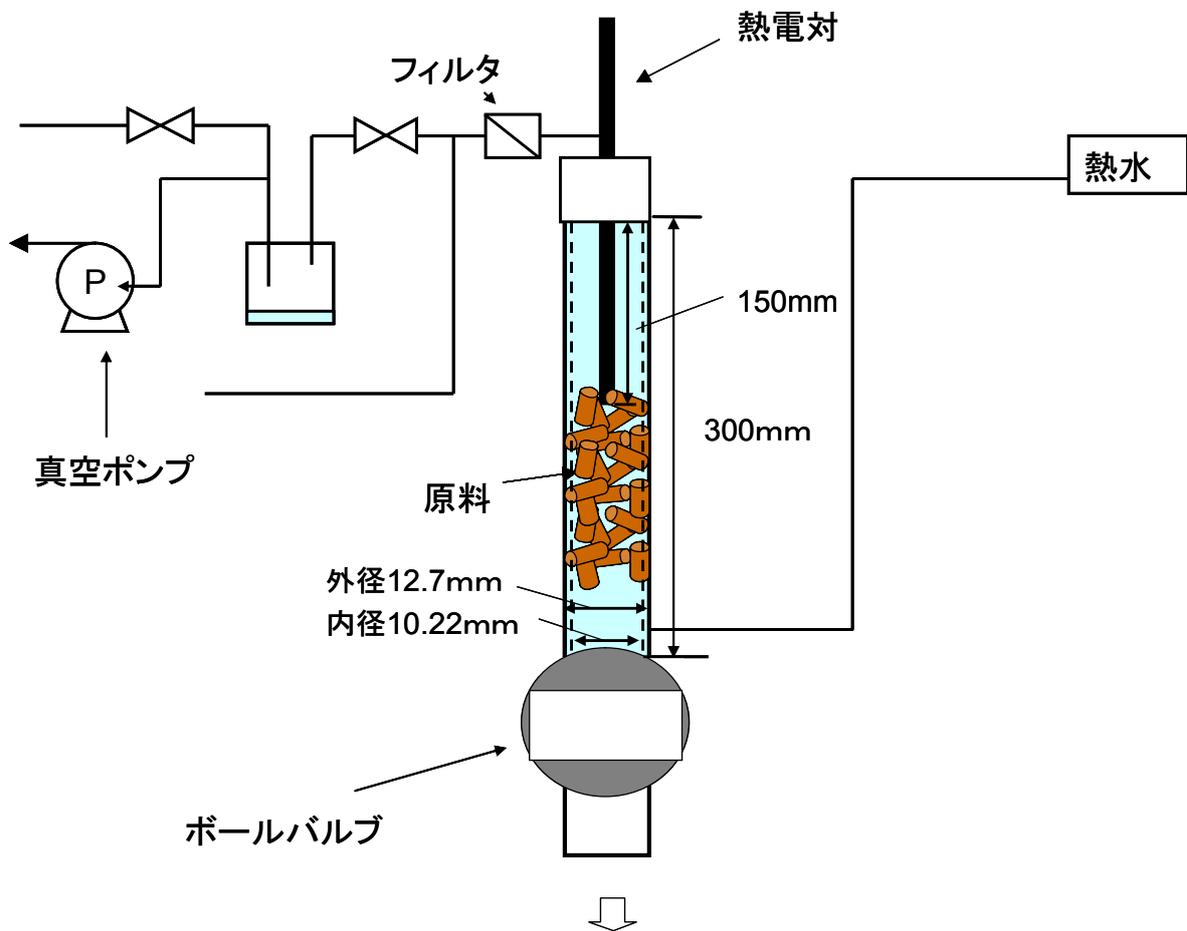


Fig.3-1-4 反応器詳細図

## 3-2 前処理実験方法

### 1) 水熱爆砕実験

- ①反応器内に原料（粃殻，ケヤキ，スギ）を仕込んだ後，反応器内を真空ポンプで減圧した．実験に使用した原料写真を **Fig.3-2-1**, **Fig.3-2-2**, **Fig.3-2-3** に示す．数ミリ以下に微粉碎したものである．
- ②送水ポンプの圧力を 7MPa（飽和水蒸気圧力より高く設定）、流量を 40ml/min に設定し，送水を始める．
- ③送水を始めたらヒータの電源をいれ，水温が 300℃になるまで加熱する．ただし，水温が所定温度になるまでは反応器に供給せず、外部に排出する．
- ④水温が上がったら，反応器入り口のバルブを開けて反応器内に熱水を入れ，原料と接触させる．ここで，反応器内が目的の温度に達するまでに原料と接触して反応器を通して出てくる熱水を流出液として採取した．反応器が目的温度に達するまでの温度経時変化例を **Fig.3-2-4**, **3-2-5** に，圧力経時変化例を **Fig.3-2-6**, **3-2-7** に示す．ただし，注水開始時刻を 0 秒とした．
- ⑤所定反応温度に到達後，一定時間保持して反応器底部のボー弁を約 0.1 秒で全開にして大気圧の容器内に膨張させて爆砕を行う．爆砕されて出てきたバイオマスを全量採取し、酵素糖化試験に供した．

## 2) 水熱除冷実験

- ①上記水熱爆砕実験操作①～④に準じた。水熱除冷実験における反応器温度の温度経時変化過例を **Fig.3-2-8, 3-2-9** に、圧力経時変化例を **Fig.3-2-10, 3-2-11** 示す。
- ⑤所定温度に到達後、全てのヒータの電源を切り、外部から空冷して温度と圧力をゆっくり下げた。以下この操作を「水熱徐冷」と定義した。

## 3) 水蒸気爆砕実験

- ①水熱爆砕実験操作 1～5 に準じた（ただし設定圧力を所定温度における水の飽和蒸気圧にした）。水蒸気爆砕実験における温度経時変化例を **Fig.3-2-12** に、圧力経時変化例を **Fig.3-2-13** に示す。

## 4) 実験条件

前処理実験条件を **Table 3-3-1** に示す。処理温度については、一般的に約 180℃がヘミセルロース分解開始温度であり、約 240℃がセルロース分解開始温度とされており、これらの温度を指標として設定した。



Fig.3-2-1 原料写真 (榲殼)



Fig.3-2-2 原料写真 (ケヤキ)



Fig.3-2-3 原料写真 (スギ)

Table 3-3-1 前処理実験条件

RUN No.	原料	処理方法	処理前重量[g]	設定圧力[MPa]	処理温度[°C]	昇温時間[s]	保持時間[s]
M-180-15A	もみがら	水熱爆砕	3	7	180	270	15
M-180-60A	もみがら	水熱爆砕	3	7	180	300	60
M-240-15A	もみがら	水熱爆砕	2	7	240	680	15
M-240-60A	もみがら	水熱爆砕	2	7	240	710	60
M-180A	もみがら	水熱除冷処理	3	7	240	430	1300
M-240A	もみがら	水熱除冷処理	3	7	240	230	600
M-240-60stA	もみがら	水蒸気爆砕	3	3	240	180	60
K-180-15A	ケヤキ	水熱爆砕	3	7	180	430	15
K-180-60A	ケヤキ	水熱爆砕	3	7	180	330	60
K-240-15A	ケヤキ	水熱爆砕	2	7	240	870	15
K-240-60A	ケヤキ	水熱爆砕	2	7	240	780	60
K-240-1800A	ケヤキ	水熱爆砕	3	7	240	240	1800
K-180A	ケヤキ	水熱除冷処理	3	7	240	240	500
K-240A	ケヤキ	水熱除冷処理	3	7	240	270	550
K-240-60B	ケヤキ	水熱爆砕	3	7	240	350	60
K-240-60B'	ケヤキ	水熱爆砕	3	7	240	300	60
K-240B	ケヤキ	水熱除冷処理	3	7	240	320	15
K-240B'	ケヤキ	水熱除冷処理	3	7	240	370	60
K-240-60stB	ケヤキ	水蒸気爆砕	3	3	240	90	60
K-240-60stB'	ケヤキ	水蒸気爆砕	3	3	240	100	60
S-180-15A	スギ	水熱爆砕	3	7	180	370	15
S-180-60A	スギ	水熱爆砕	3	7	180	580	60
S-240-15A	スギ	水熱爆砕	3	7	240	600	15
S-240-60A	スギ	水熱爆砕	3	7	240	730	60
S-180A	スギ	水熱除冷処理	3	7	240	570	430
S-240A	スギ	水熱除冷処理	3	7	240	210	610

捕捉 1：昇温時間は、反応器内が処理温度に到達するまでの時間と定義する

捕捉 2：処理温度到達時刻を保持開始時刻とする

## 4 章 酵素糖化実験

### 4-1 酵素糖化実験（方法 A）

#### 1) 実験方法と実験条件

各前処理によって得られた残渣，流出液，残液の酵素糖化を行った．酵素の働きが活発になる pH で一定に保つため，酢酸 0.058ml，酢酸ナトリウム 0.192g に蒸留水を加え 100ml とし，pH=5 の緩衝液を調製した．この中に残渣の一部，セルロース分解酵素，ヘミセルロース分解酵素を入れ，振湯装置にセットした．同様に，流出液，残液でも行うため，一つの条件に対して 3 つの実験溶液ができる．振湯装置湯浴部と全体の写真を **Fig.4-1-1**，**4-1-2** に示す．また，この酵素糖化実験（以下「方法 A」とする）の共通条件を **Table 4-1-1** に示し，前処理試験から酵素糖化用の振湯装置にセットするまでの概略フローを **Fig. 4-1-3** に示す．4 8 時間酵素糖化を行い，グルコース，キシロース，全糖（可能性の糖分）の分析を行い，各成分の物質収支より収率を算出し，その値より水熱爆砕の評価と適正条件を選定した．また，各前処理方法の酵素糖化に及ぼす影響についても比較検討した．

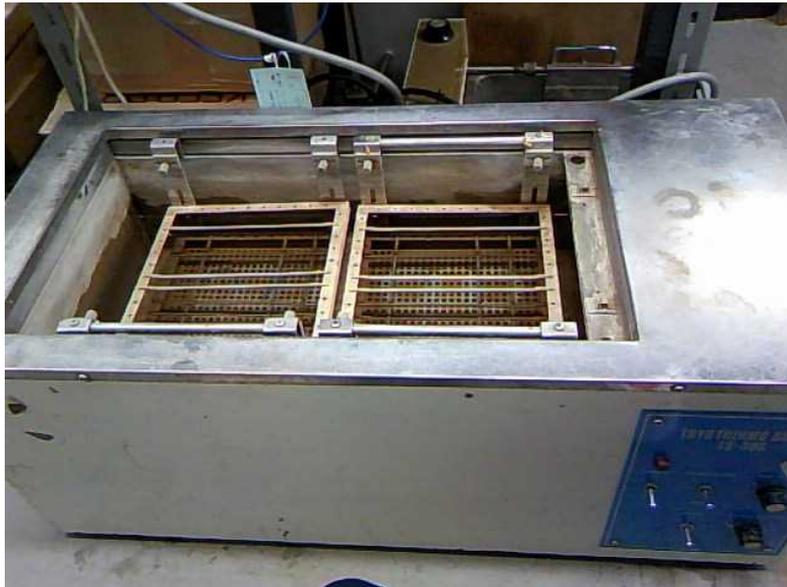


Fig.4-1-1 振湯装置全体（酵素糖化用）

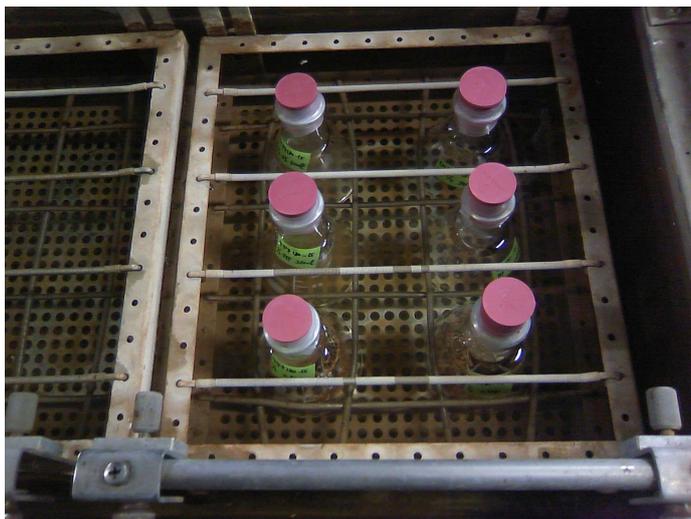


Fig.4-1-2 振湯装置湯浴部写真（酵素糖化状態）

Table 4-1-1 酵素糖化実験での共通条件（方法 A）

実験条件	サンプル分取量	g-dry	残渣	流出液	残液
		ml	0.5	-	-
	湯振装置温度	°C	50	50	50
	糖化時間	h	48	48	48
	緩衝液	ml	100	100	100
	pH	-	5	5	5
	セルロース分解酵素添加量	ml	0.04	0.04	0.04
	ヘミセルロース分解酵素添加量	ml	0.04	0.04	0.04

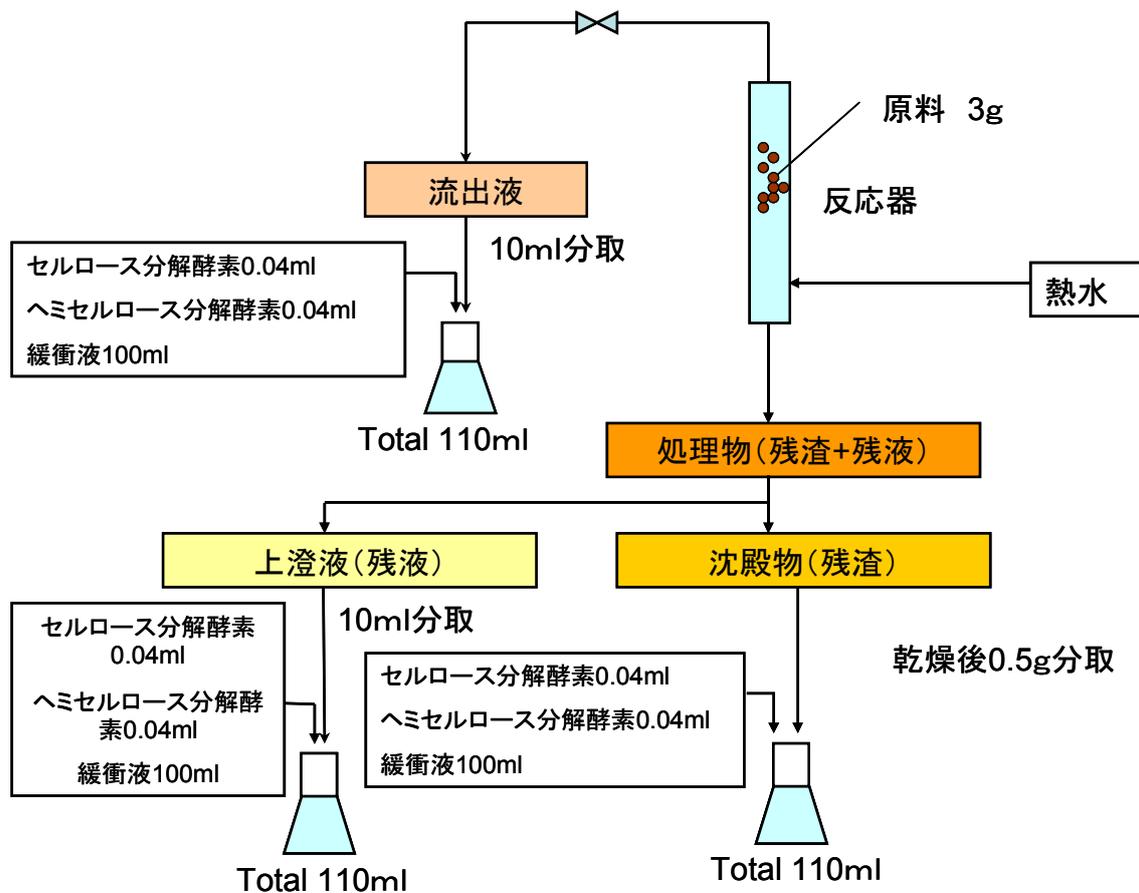


Fig.4-1-3 前処理試験から酵素糖化試験までの操作概略フロー（方法 A）

## 2) 糖の分析方法

### i) グルコース濃度測定

グルコース濃度測定は、「グルコースキット グルコース C-II テストワコー」を使用した。

#### 分析手順

- ① キット内の発色試液 3.0ml と濃度未知のサンプル溶液を 20  $\mu$ l セルに入れた。
- ② 37°C にセットしておいた恒温槽で 5 分間加温した後、分光光度計（島津紫外可視分光光度計 UV-1600）で、505nm の吸光度を測定した。
- ③ 測定した吸光度の値とグルコース検量線から、サンプル溶液のグルコース濃度を算出した。

検量線は、キットにある 2 種類のブドウ糖標準液から、グルコース濃度 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0g/l のグルコース水溶液を作り、上記②の操作を行い、各濃度における吸光度をプロットすることにより作成した。検量線を **Fig. 4-1-4** 示す。

## ii) キシロース濃度測定

キシロース濃度を測定する際には D-キシロース測定キット（日本バイオコン株式会社）を使用した。キットに同封されていた試薬を I～V で定義する。

- I. TEA 緩衝液+塩化マグネシウム
- II. NAD<sup>+</sup>+ATP
- III. ヘキソナーゼ
- IV.  $\beta$ -キシロースデヒドロゲナーゼ+キシロースムタロターゼ
- V. D-キシロース標準溶液 (5ml:0.25g/l)

### 分析手順

- ① 蒸留水 2ml+濃度未知のサンプル溶液 0.1ml+ I, II の試薬溶液各 0.4ml と III の懸濁液 0.02ml を分光光度計のセルに入れて攪拌した
- ② 5 分後に 340nm で吸光度を測定した
- ③ IV の懸濁液 0.02ml を加えて攪拌した
- ④ 6 分後に吸光度を測定した
- ⑤ ④と②で測定した吸光度の差を  $\Delta$ ABS として、この値と検量線からサンプル溶液のキシロース濃度を算出した

検量線は、V のキシロース標準溶液を使用して、0.001, 0.01, 0.1, 1., 10g/l のキシロース水溶液を作り、各水溶液で手順①～⑤の操作を行って、各キシロース濃度における  $\Delta$ ABS をプロットすることで作成した。途中でキシロースキットを新しいものにした。

### iii) 全糖濃度測定

全糖とは、グルコース、キシロースを含む可溶性の全ての糖と定義する。

実験手順

- ① 試験管に 5%(w/v)フェノール水溶液 0.5ml, サンプル溶液 0.5ml, 濃硫酸 2.5ml を入れて振り混ぜ, 30 分間放置した
- ② 30 分後, セルに①の溶液 0.5ml, 蒸留水 2.5ml を入れて希釈し, 分光光度計で 490nm の吸光度を測定し, 検量線から濃度を算出した

検量線はキシロース濃度 0, 1, 2, 3, 4, 5g/l のキシロース水溶液を調製し, 各水溶液で手順①, ②を行い, 各キシロース濃度における ABS の値をプロットすることで作成した。

### 3) 糖分析結果

Table 3-3-1 に示した各前処理条件で得られた処理物の酵素糖化試験結果を Fig.4-1-8,9,10 に示す.

グルコース糖化率, キシロース糖化率, 全糖糖化率の定義は下のとおりである.

$$GS = \frac{G}{M \times \frac{C}{100}} \times 100$$

$$XS = \frac{X}{M \times \frac{H}{100}} \times 100$$

$$TS = \frac{T}{M \times \frac{C+H}{100}} \times 100$$

G : グルコース生成量[g]

GS : グルコース糖化率[%]

M : 原料重量[g]

C : セルロース含有率[%]

X : キシロース生成量[g]

XS : キシロース糖化率[%]

H : ヘミセルロース含有率[%]

T : 全糖生成量[g]

TS : 全糖糖化率[%]

### a. 粃殻の場合

Fig 4-1-8 に粃殻前処理物の酵素糖化率を示す。セルロースからのグルコース糖化率は温度による差異はみられず、水熱徐冷の場合が大きい傾向がみられた。

ヘミセルロースからのキシロース糖化率も温度による差異はみられず、水熱爆砕と水蒸気爆砕の場合が大きい傾向が見られた。

可溶性多糖類は温度が240℃と高温の場合が大きく、更に水熱爆砕と水熱徐冷の場合が大きい傾向がみられた。

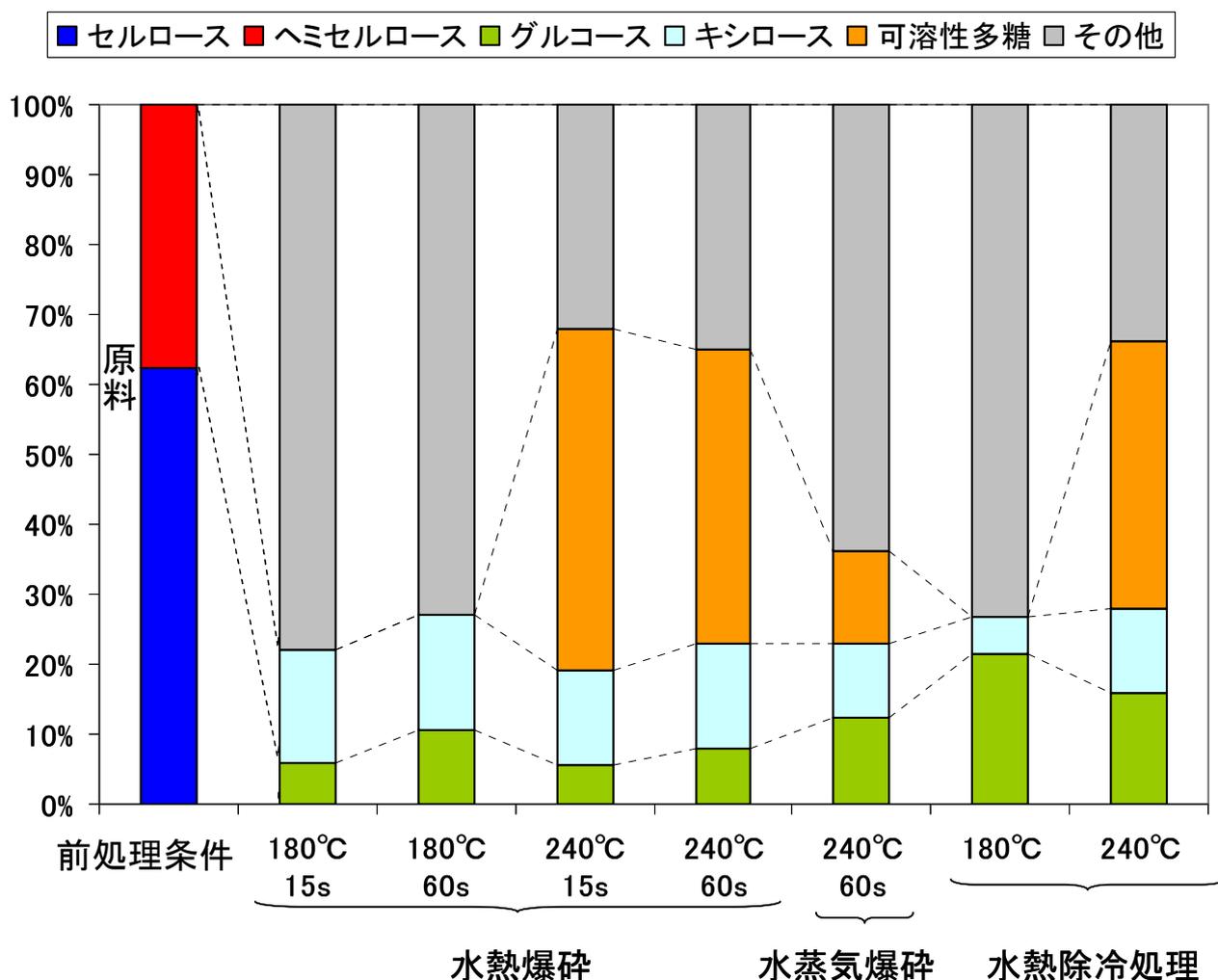


Fig. 4-1-8 酵素糖化試験結果（原料：粃殻、方法 A）

## b. ケヤキの場合

Fig 4-1-9 にケヤキ前処理物の酵素糖化率を示す。セルロースからのグルコース糖化率は240℃と高温のほうが大きく、水熱爆砕のほうが水熱徐冷よりも顕著に大きい傾向がみられた。

ヘミセルロースからのキシロース糖化率も温度による差異はみられず、水熱爆砕と水熱徐冷では大きな差異はみられなかった。

可溶性多糖類は温度が240℃と高温の場合が大きく、更に水熱爆砕のほうが水熱徐冷よりも顕著に大きな傾向がみられた。

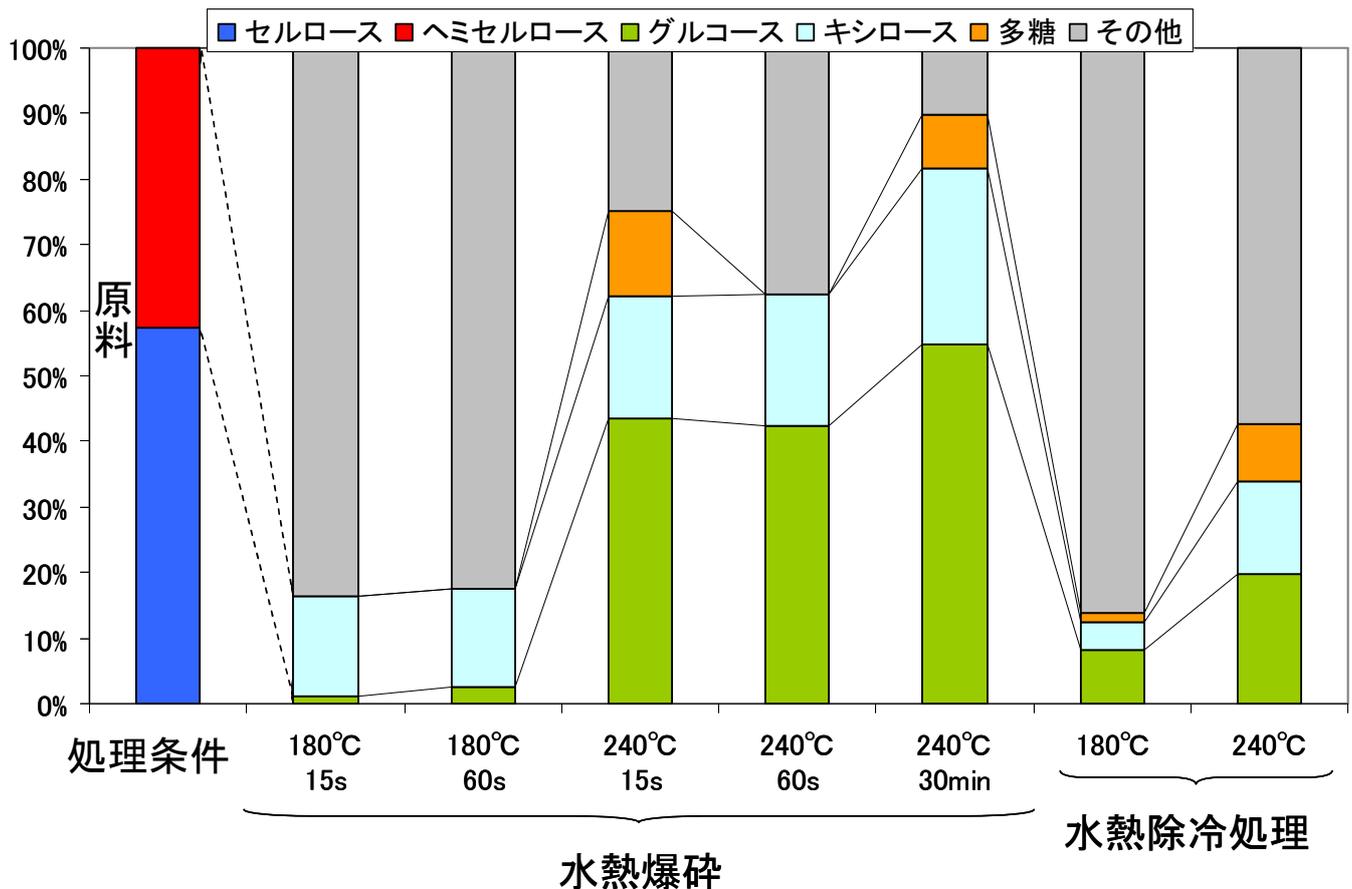


Fig. 4-1-9 酵素糖化試験結果 (原料：ケヤキ、方法A)

### c. スギの場合

Fig 4-1-10 にスギ前処理物の酵素糖化率を示す。セルロースからのグルコース糖化率は240℃と高温のほうが大きく、水熱爆砕のほうが水熱徐冷よりも大きい傾向がみられた。

ヘミセルロースからのキシロース糖化率は温度による差異は明確ではないが、水熱爆砕は水熱徐冷に較べて顕著に大きな傾向がみられた。

可溶性多糖類は温度が240℃と高温の場合が大きく、更に水熱爆砕のほうが水熱徐冷よりも顕著に大きな傾向がみられた。

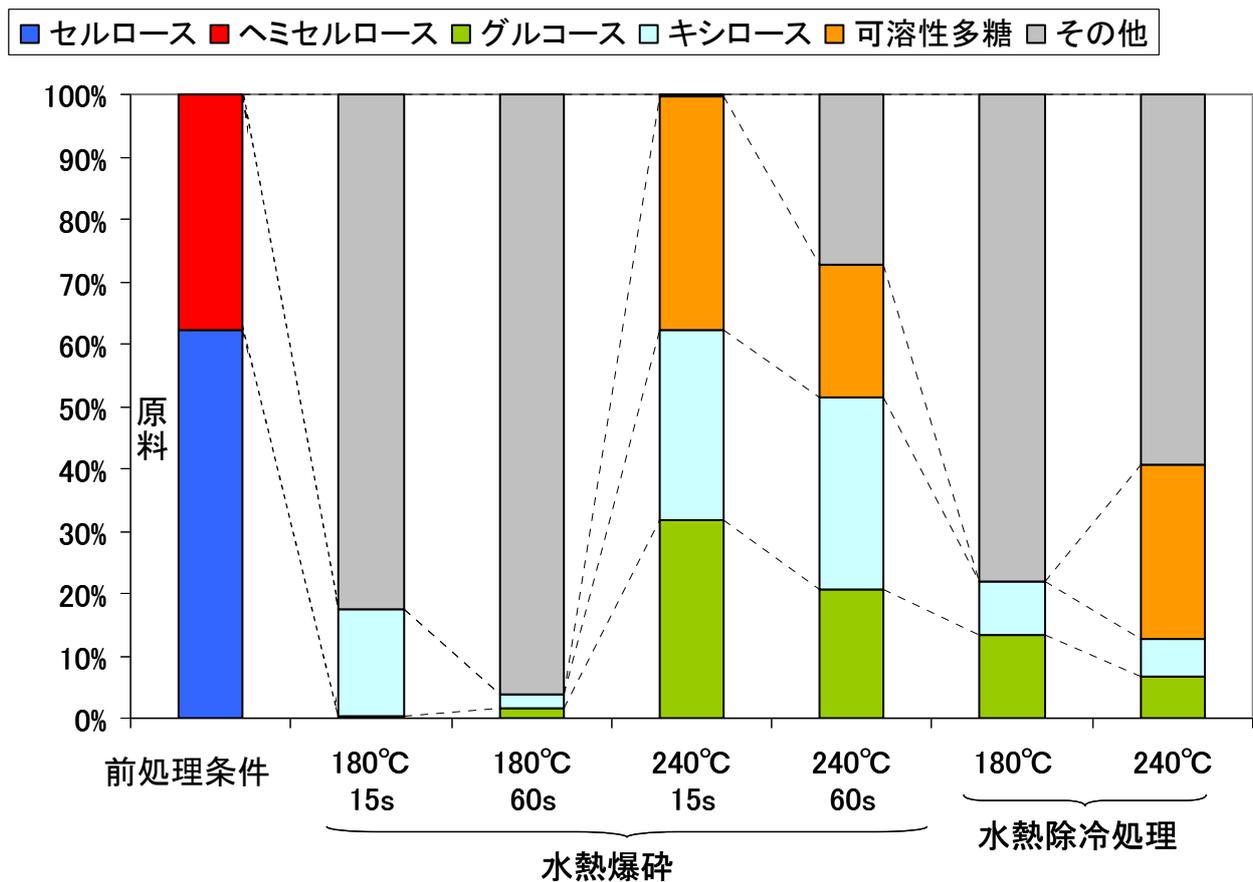


Fig. 4-1-10 素糖化試験結果 (原料：スギ、方法 A)

#### 4) まとめ

籾殻、ケヤキ、杉を約1mm以下に微粉碎したものを、水熱爆砕、水熱徐冷、水蒸気爆砕を温度180および240℃で行い、その処理物を48時間酵素糖化してセルロースからのグルコース収率、ヘミセルロースからのキシロース収率および可溶性多糖類の収率を測定評価した。その結果、

##### a. 籾殻の場合

セルロースからのグルコース糖化率は温度による差異はみられず、水熱徐冷の場合が大きい傾向がみられた。ヘミセルロースからのキシロース糖化率も温度による差異はみられず、水熱爆砕と水蒸気爆砕の場合が大きい傾向が見られた。可溶性多糖類は温度が240℃と高温の場合が大きく、更に水熱爆砕と水熱徐冷の場合が大きい傾向がみられた。

##### b. ケヤキの場合

セルロースからのグルコース糖化率は240℃と高温のほうが大きく、水熱爆砕のほうが水熱徐冷よりも顕著に大きい傾向がみられた。ヘミセルロースからのキシロース糖化率も温度による差異はみられず、水熱爆砕と水熱徐冷では大きな差異はみられなかった。可溶性多糖類は温度が240℃と高温の場合が大きく、更に水熱爆砕のほうが水熱徐冷よりも顕著に大きな傾向がみられた。

##### c. スギの場合

セルロースからのグルコース糖化率は240℃と高温のほうが大きく、水熱爆砕のほうが水熱徐冷よりも大きい傾向がみられた。ヘミセルロースからのキシロース糖化率は温度による差異は明確ではないが、水熱爆砕は水熱徐冷に較べて顕著に大きな傾向がみられた。可溶性多糖類は温度が240℃と高温の場合が大きく、更に水熱爆砕のほうが水熱徐冷よりも顕著に大きな傾向がみられた。

以上の結果、水熱爆砕は水蒸気爆砕や水熱徐冷よりも効果的な前処理方であることが認められた。

## 4-2 酵素糖化実験（方法 B）

前節の試験（方法 A）では、**Fig 4-1-3** に示したように前処理段階で 3 種類のサンプルを個別に回収したことにより、それぞれのバイオマスの含有量を把握できなかったため、回収液に対して一定量の酵素を添加量した。その結果、酵素添加量が過大条件であった。

従って、バイオマスに対する酵素添加量を明確にするために以下の実験をおこなった。この実験方法を「方法 B」と定義する。

### 1) 実験方法と実験条件

前処理後に出てきた残渣，流出液，残液を **Fig. 4-2-1** に示すように一つにまとめて酵素糖化を行った。まとめた液体に蒸留水を加えて全量 400ml の混合液を作り，酢酸 0.232ml，酢酸ナトリウム 0.77g とともに 500ml 三角フラスコに入れた。この液体が pH=5 の緩衝溶液となり，ここにセルロース分解酵素，ヘミセルロース分解酵素を加えて振湯装置で反応させた。また，前処理を行っていない原料の糖化率とも比較するために，前処理をせず粉砕したケヤキを入れて酵素糖化実験を行った。これにより，酵素量による糖化率の変化，各前処理の酵素糖化に及ぼす影響の比較を行った。**Table 4-2-1** に示す条件下でケヤキを水熱爆砕、水蒸気爆砕、水熱徐冷の前処理を行い、前節と同じ方法でその酵素糖化率を測定した。

### 2) 結果

各種前処理物の酵素糖化率の測定結果を **Fig.4-2-2** に示す。未処理の場合は殆ど糖化されなかった。セルロースからのグルコース糖化率、ヘミセルロースからのキシロース糖化率、可溶性多糖類収率に前処理による優位差が見られなかった。この結果は前節の結果と異なっており、その原因を解明する必要があることがわかった。次節でその検討結果を示す。

Table 4-2-1 酵素糖化実験条件（方法 B）

前処理条件	原料	ケヤキ	ケヤキ	ケヤキ	ケヤキ	ケヤキ	ケヤキ	ケヤキ	ケヤキ
	原料重量[g-dry]	3	3	3	3	3	3	3	3
処理方法	水熱爆砕	水熱爆砕	水熱処理	水熱処理	水蒸気爆砕	水蒸気爆砕	未処理	未処理	未処理
処理温度[°C]	240	240	240	240	240	240	-	-	-
昇温時間[s]	350	300	320	370	90	100	-	-	-
保持時間[s]	60	60	-	-	60	60	-	-	-
酵素糖化条件	緩衝液+サンプル[ml]	400	400	400	400	400	400	100	100
	湯振装置温度[°C]	50	50	50	50	50	50	50	50
	酵素糖化時間[h]	48	48	48	48	48	48	48	48
	pH[-]	5	5	5	5	5	5	5	5
	セルロース分解酵素添加量[ml]	0.15	0.3	0.15	0.3	0.15	0.3	0.15	0.3
	ヘミセルロース分解酵素添加量[ml]	0.15	0.3	0.15	0.3	0.15	0.3	0.15	0.3

捕捉 1：昇温時間は、反応器内が処理温度に到達するまでの時間と定義する

捕捉 2：処理温度到達時刻を保持開始時刻とする

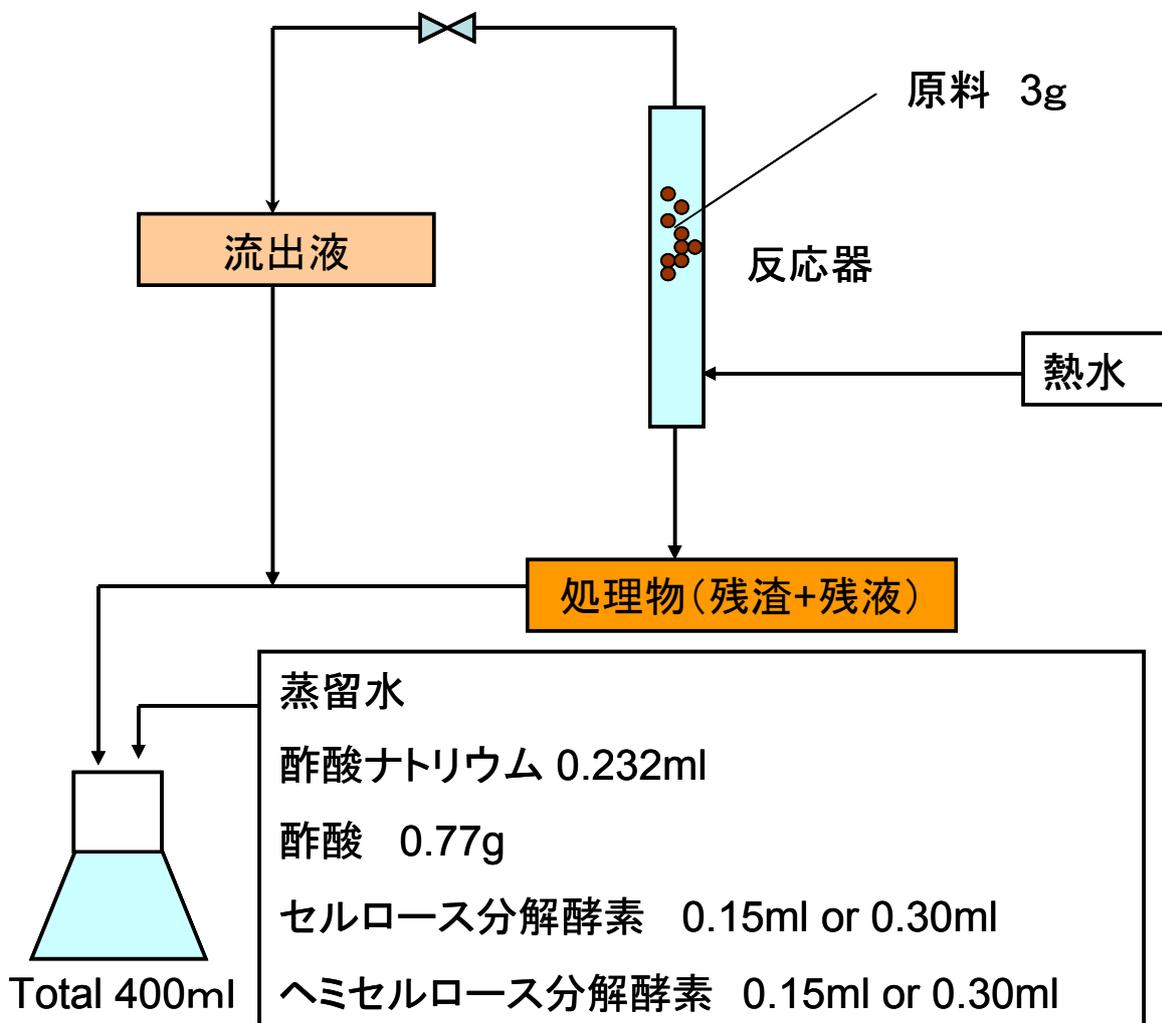


Fig.4-2-1 前処理後から振湯装置にセットするまでの概略フロー (方法 B)

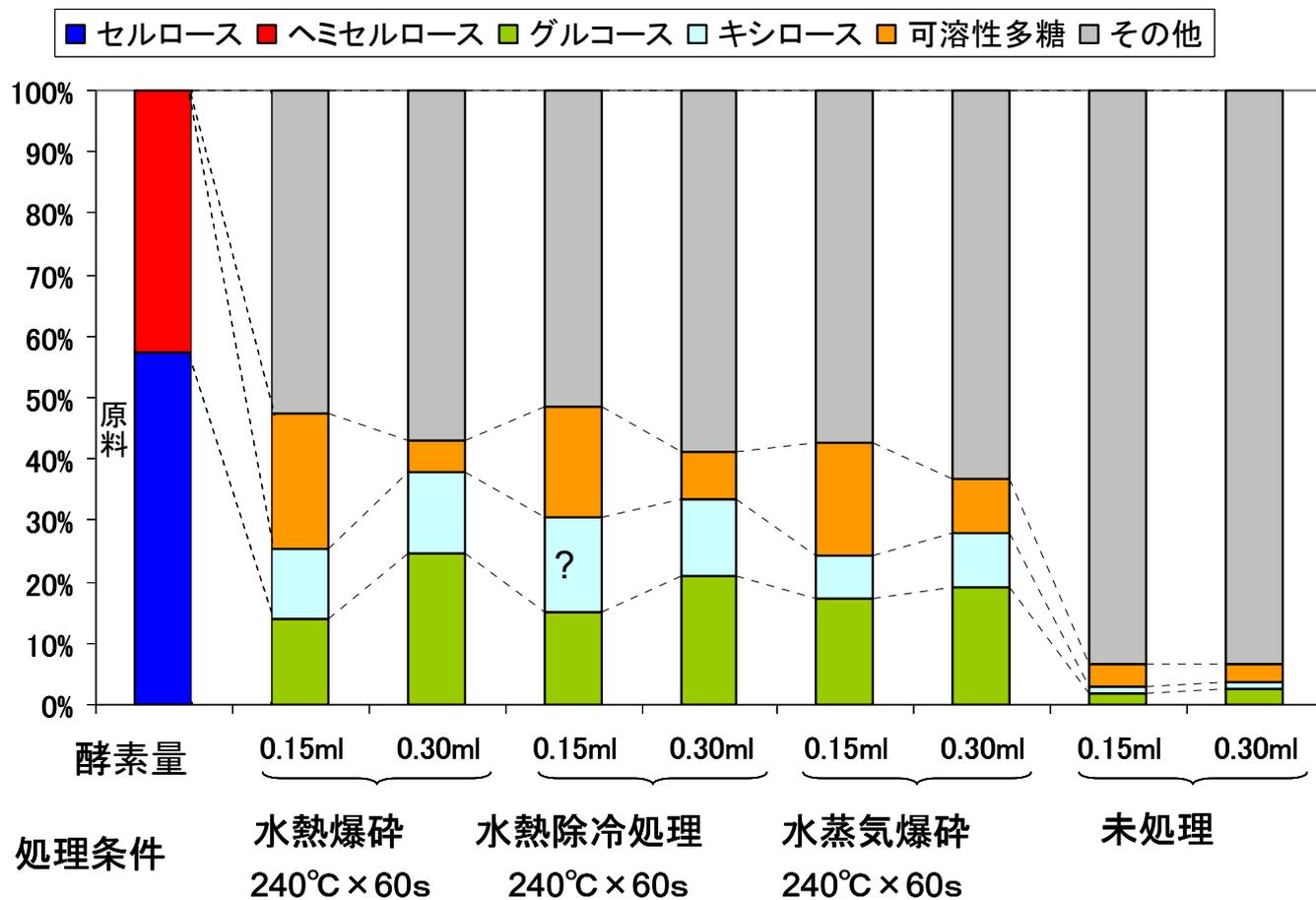


Fig. 4-2-2 酵素糖化試験結果（原料：ケヤキ、方法 B）

## 5章 破碎サイズの大きなバイオマスでの前処理・酵素糖化試験

水熱爆砕が水蒸気爆砕や水熱徐冷に較べて効果的であることを確認する方法は、それぞれの方法について広範囲の条件で最適条件を見出し、その最適条件下での糖化率を比較評価すべきと考えられるが、それには多大の時間と労力を要し、本研究の予算規模と目的から逸脱するので、次の手順とした。即ち、まず水熱爆砕の温度×時間の適正条件を把握し、それと同じ条件で水蒸気爆砕、水熱徐冷を行い比較評価することとした。また、水熱爆砕に期待される大きな特徴のひとつは、バイオマスを微粉碎する必要があることにあると考えられることから、比較的大きなサイズ（5 mmから10 mm）での前処理を行い、酵素糖化特性の評価を行った。

また、前処理では温度の経時変化パターンが重要な因子であることから、1 段昇温の他、2 段昇温も検討した。

## 5-1 水熱爆砕条件選定試験

### 1) 実験方法

前処理は **Fig.5-1-1** に示す温度×時間のパターンで行った。その他は「方法 B」と同じである。**Table 5-1-1** に前処理条件を示すように、1, 2段目の温度と保持時間をパラメータとしてケヤキの水熱爆砕の前処理をおこない、酵素糖化をおこなった。

### 2) 結果

**Fig. 5-1-2** から **5-1-13** に各前処理物の酵素糖化率の経時変化を示す。糖化率は時間とともに増加するが、途中で減少する場合もみられた。ここでは、一般的に採用されている48時間後の糖化率で評価することとした。

**Fig.5-1-14** に12種類の前処理条件の酵素糖化率を一括して示した。この中で、RUN K-8 (1段目: 180°C×10min. 2段目: 260°C×10min.) がグルコース糖化率が最も高く、キシロース糖化率および可溶性多糖類収率も高く、この条件が適正条件であると考えられた。

**Fig. 5-1-15** から **Fig.5-1-21** に1段目および2段目の条件と各糖化率との関係を示した。

Table 5-1-1 ケヤキの水熱爆砕処理条件一覧表

	RUN NO	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7	K-8	K-9	K-10	K-11	K-12
処理温度(1段目)	°C	180	180	180	180	180	180	180	180	200	200	200	200
保持時間(1段目)	min	0	0	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10
処理温度(2段目)	°C	240	240	260	260	240	240	260	260	240	240	260	260
保持時間(2段目)	min	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10

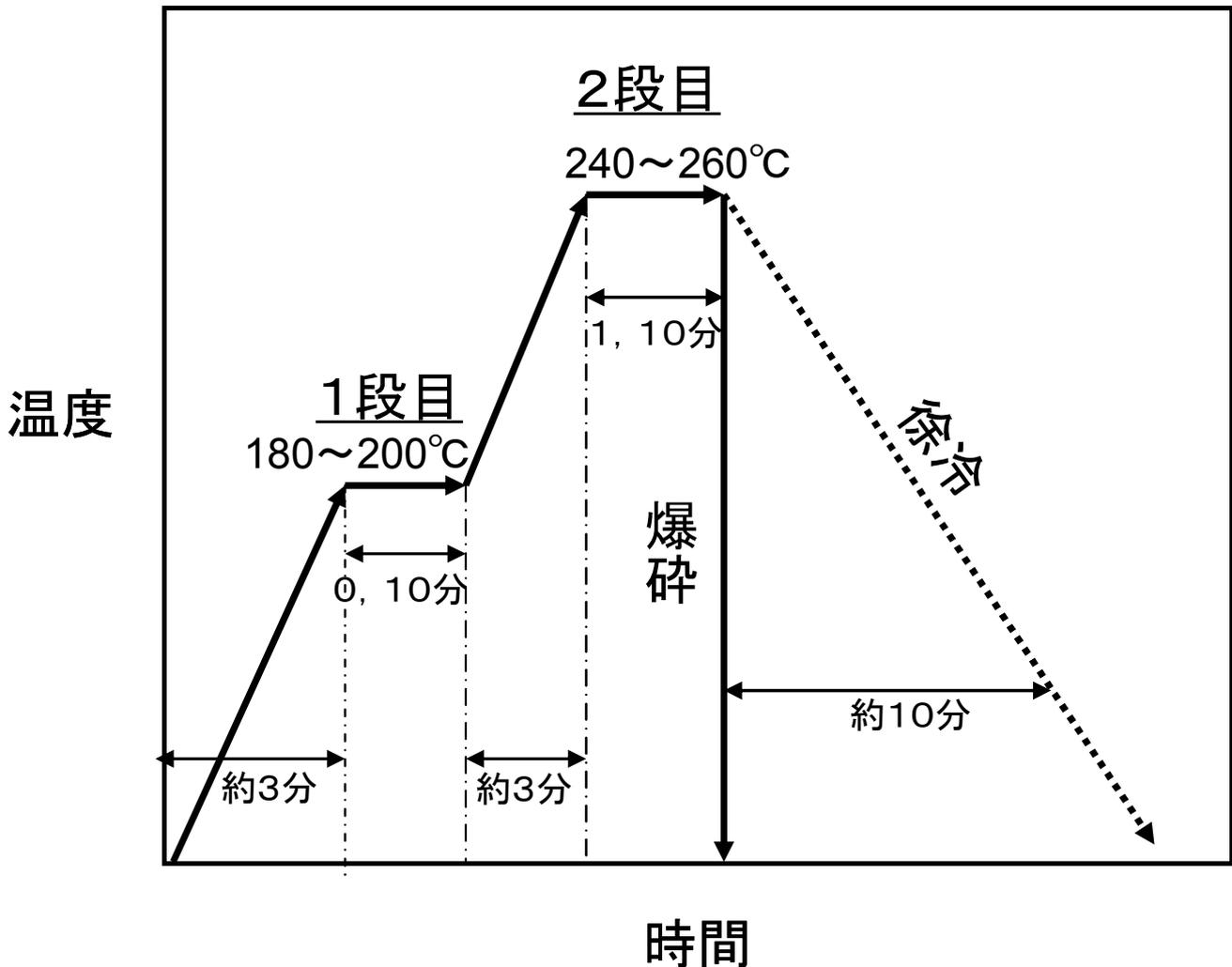


Fig.5-1-1 ケヤキ水熱爆砕前処理昇温・降温パターン

RUN K-1

1段目 : 180°C × 0min

2段目 : 240°C × 1min

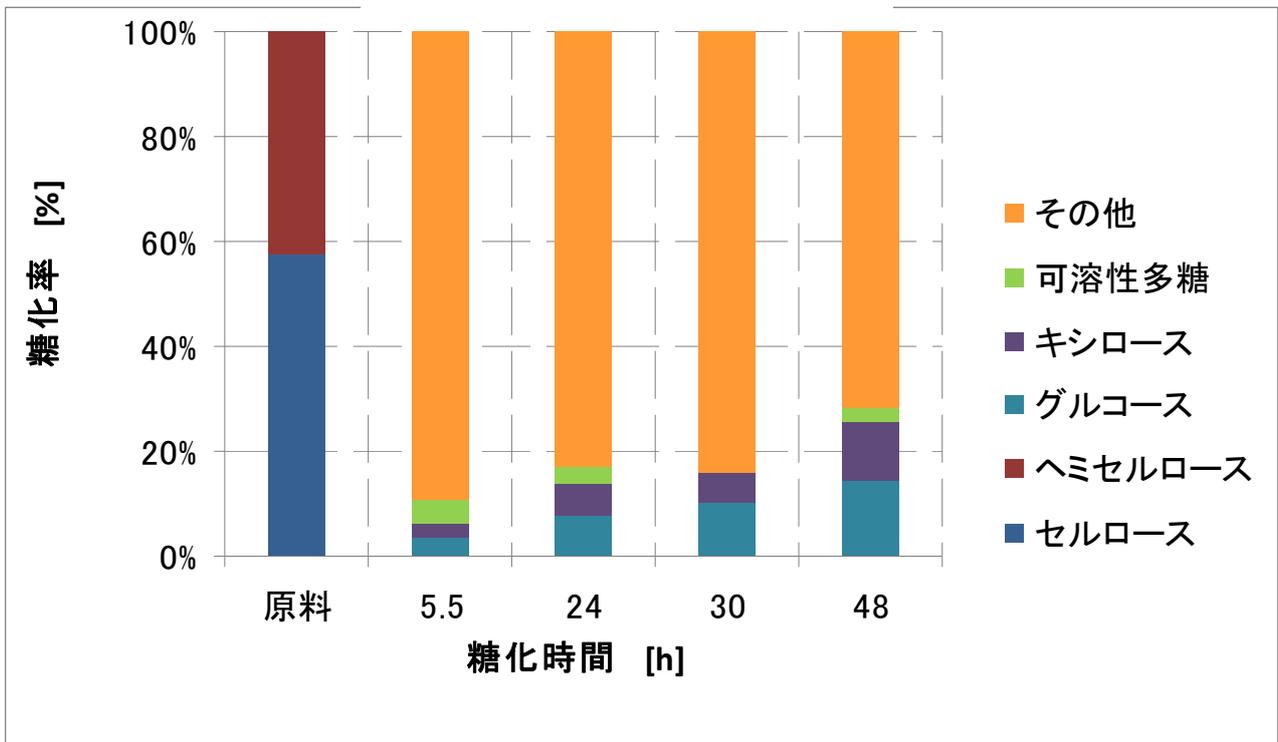


Fig.5-1-2 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-1)

### RUN K-2

1 段目 : 180°C × 0min

2 段目 : 240°C × 10min

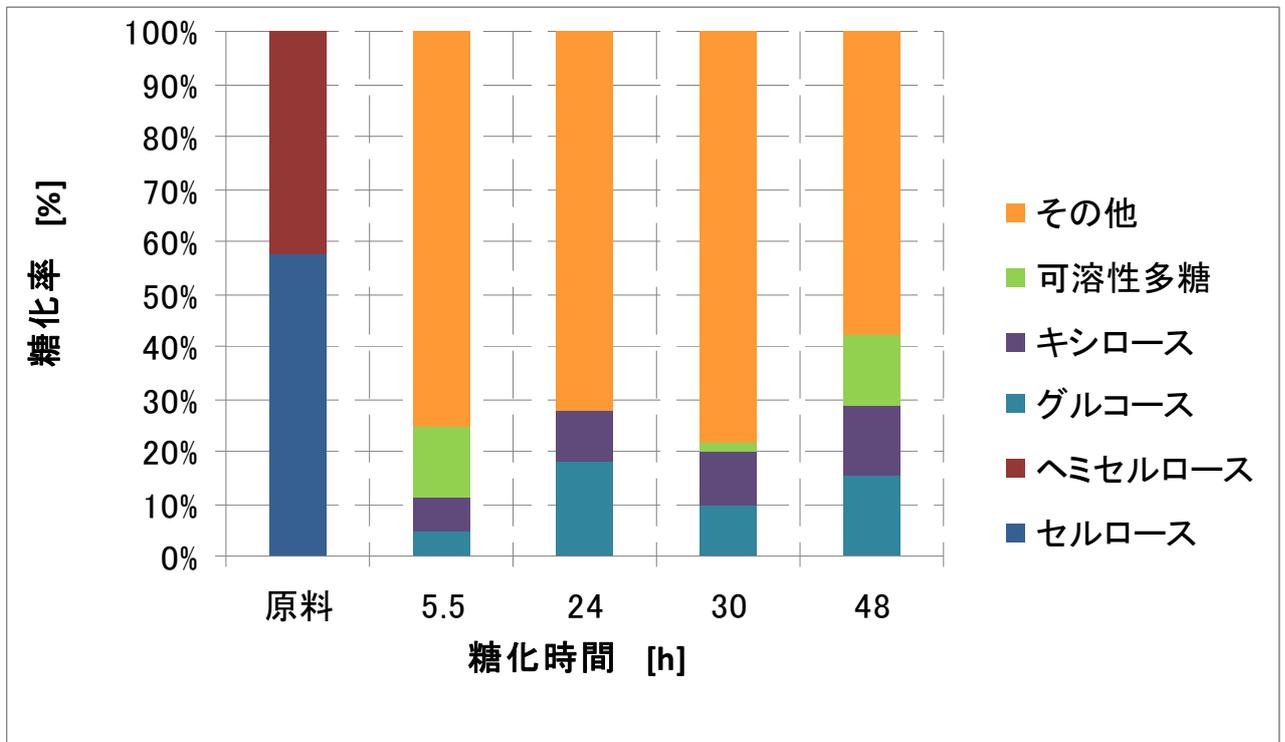


Fig.5-1-3 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-2)

### RUN K-3

1段目 : 180°C × 0min

2段目 : 260°C × 1min

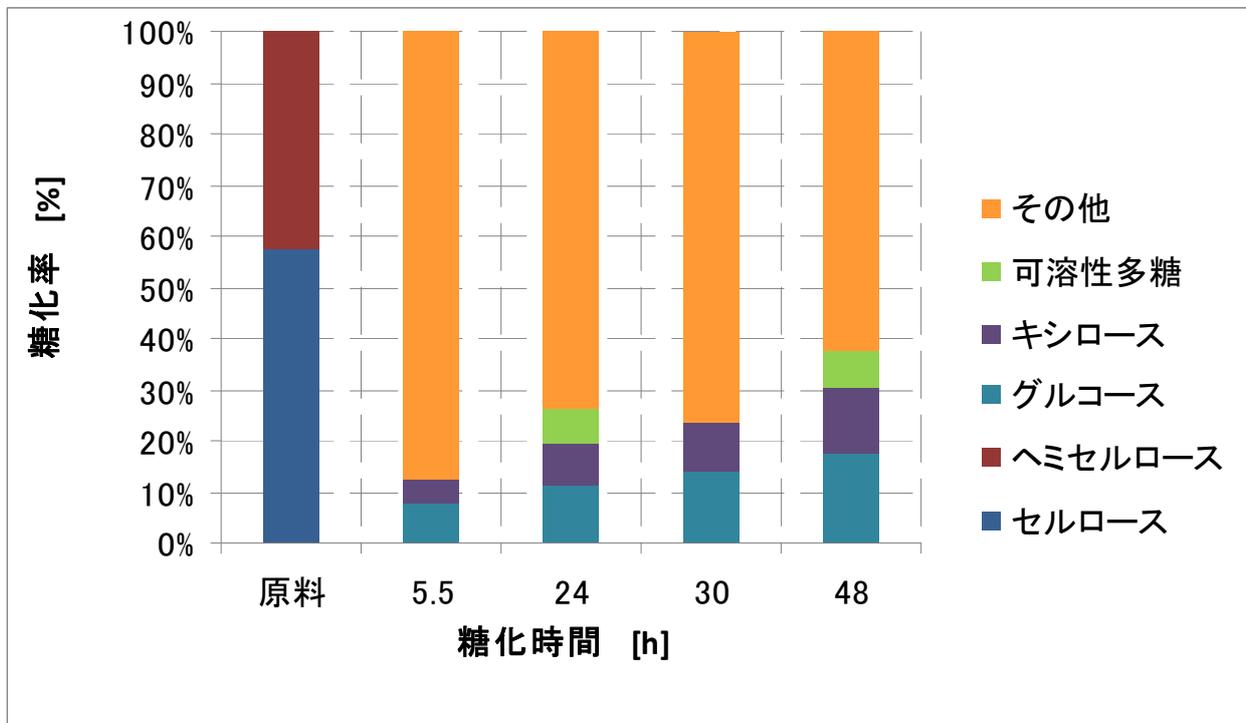


Fig.5-1-4 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-3)

### RUN K-4

1段目: 180°C × 0min

2段目: 260°C × 10min

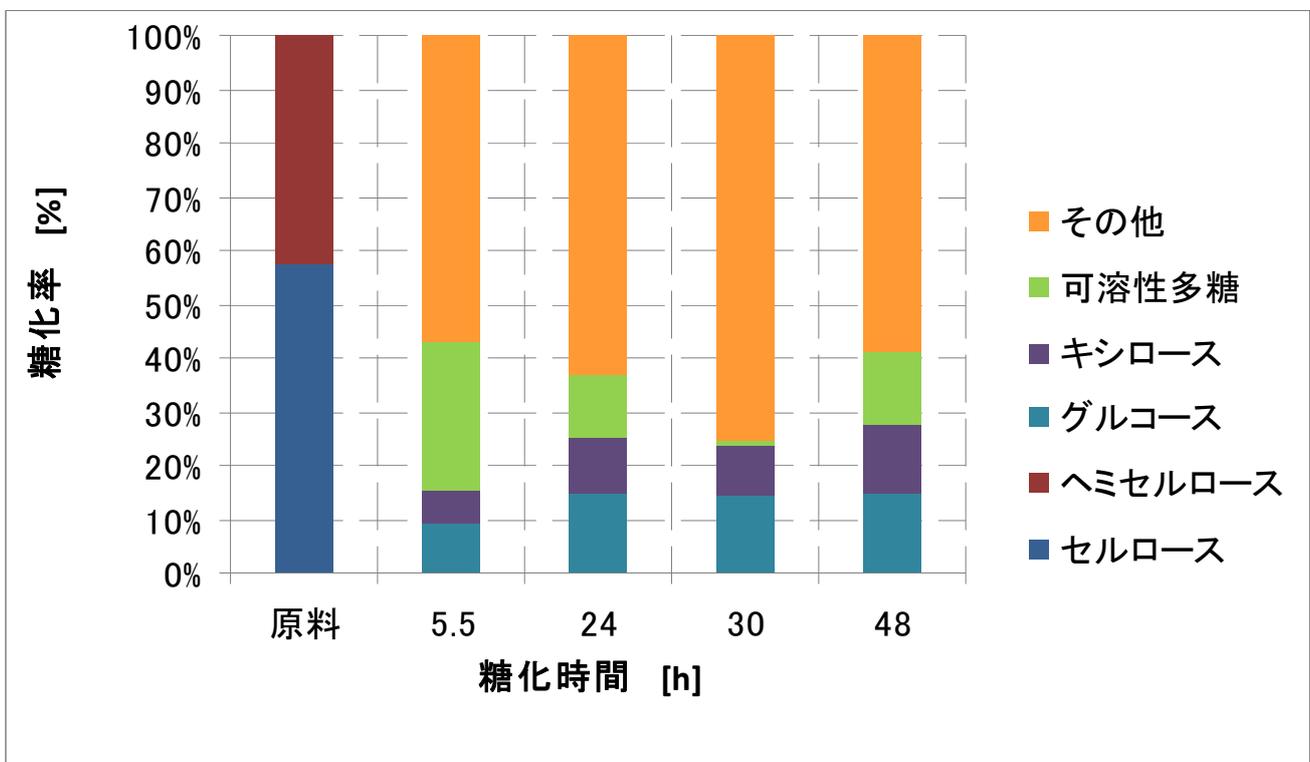


Fig.5-1-5 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-4)

### RUN K-5

1段目: 180°C × 10min

2段目: 240°C × 1min

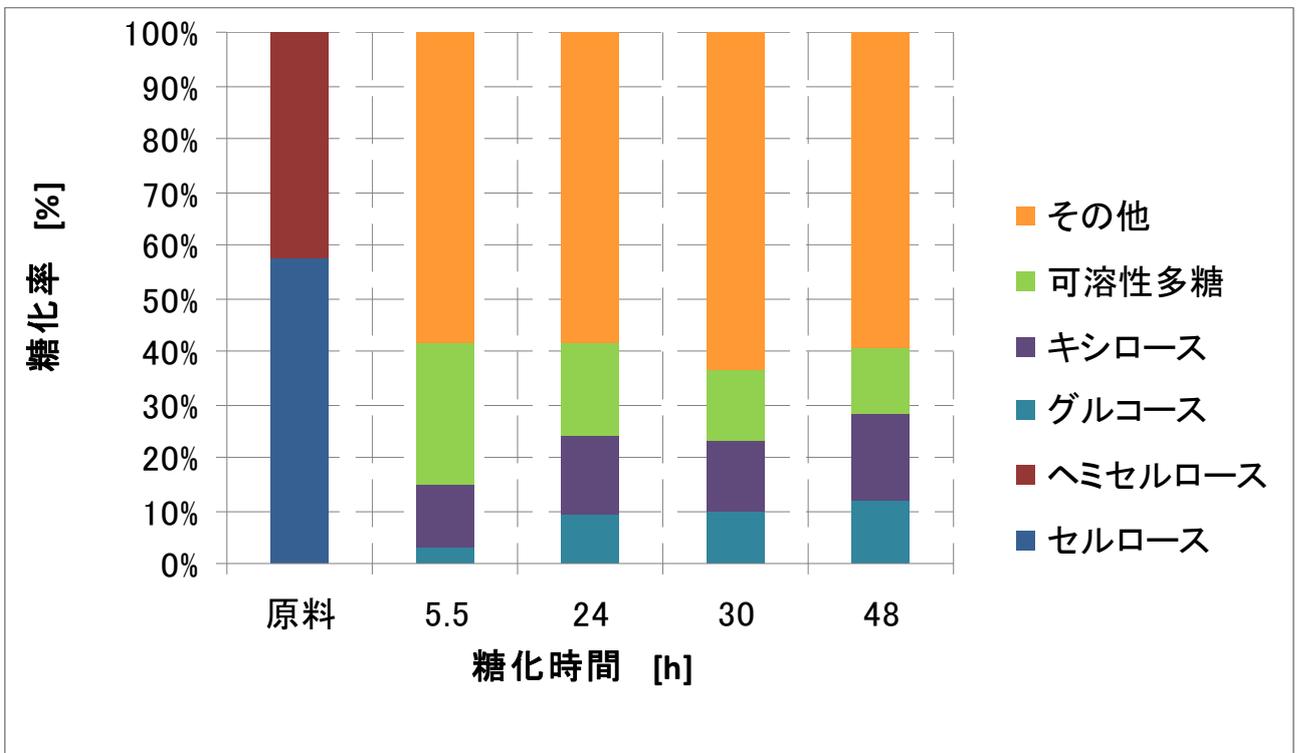


Fig.5-1-6 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-5)

### RUN K-6

1 段目 : 180°C × 10min

2 段目 : 240°C × 10min

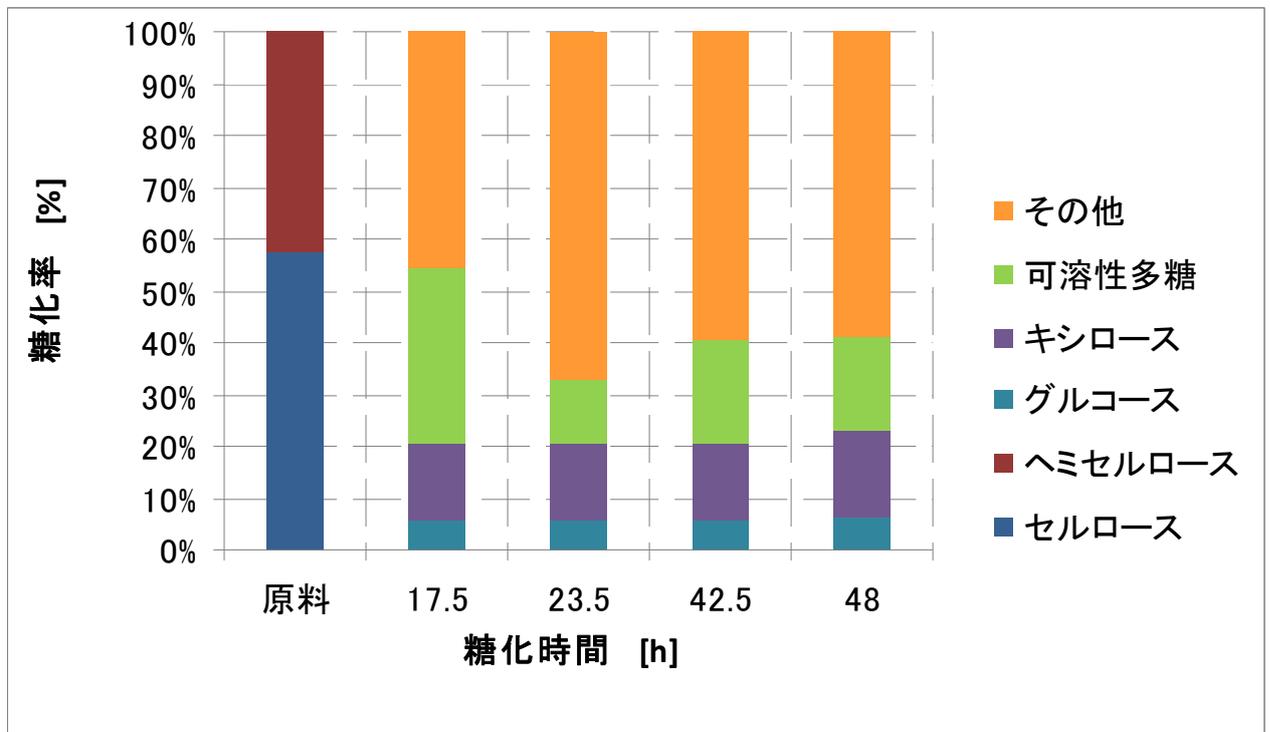


Fig.5-1-7 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-6)

### RUN K-7

1段目 : 180°C × 10min

2段目 : 260°C × 1min

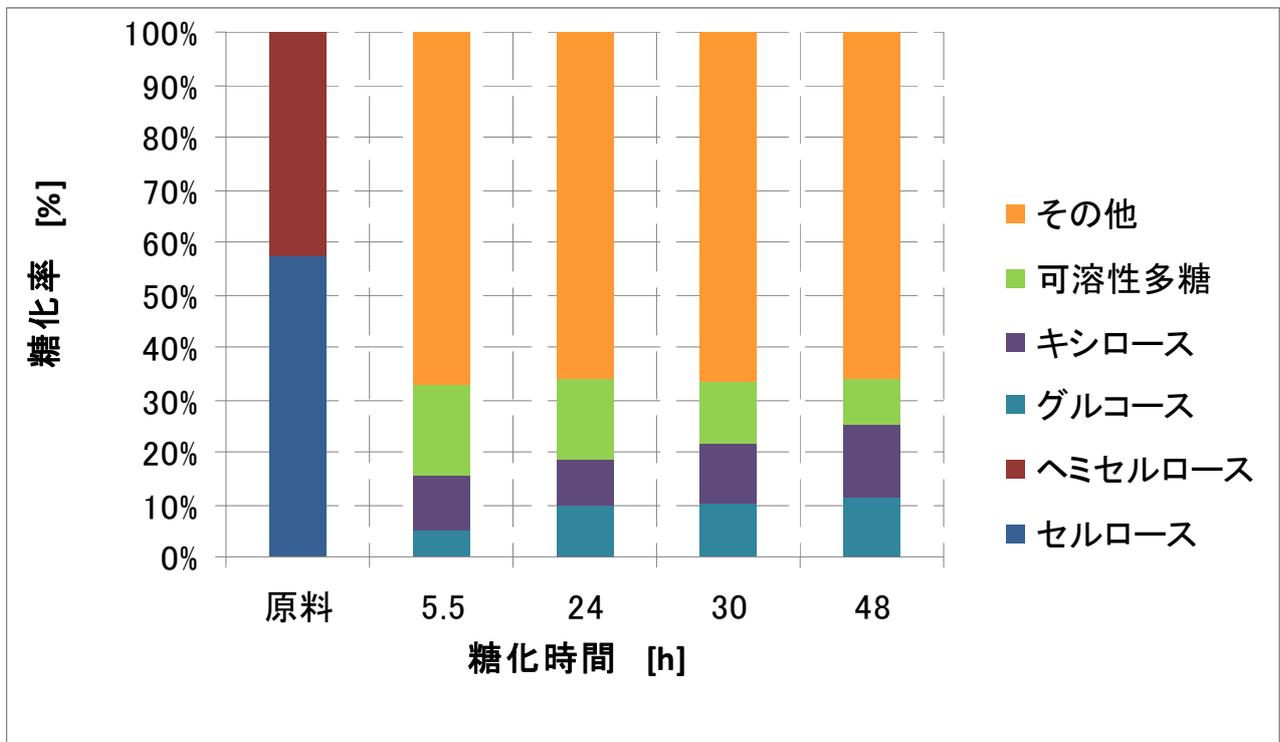


Fig.5-1-8 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-7)

### RUN K-8

1 段目 : 180°C × 10min

2 段目 : 260°C × 10min

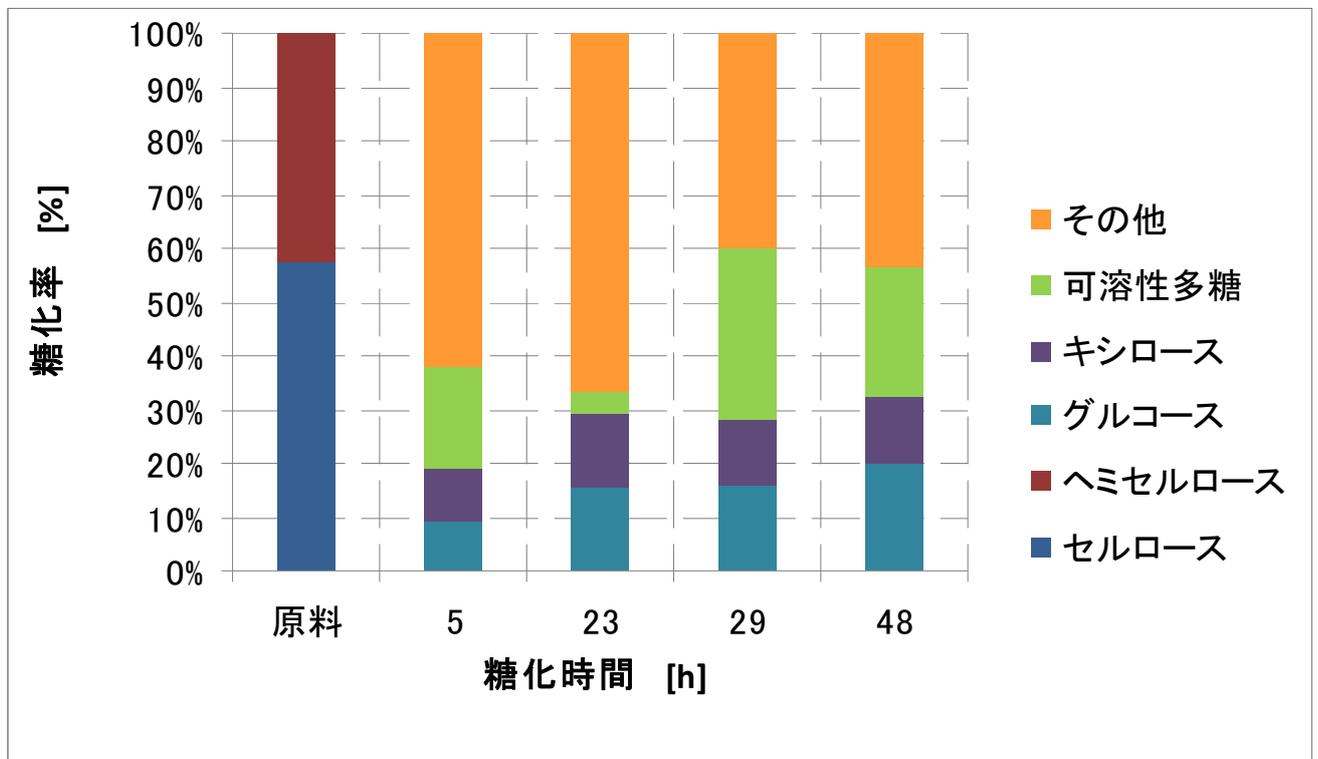


Fig.5-1-9 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-8)

### RUN K-9

1段目 : 200°C × 10min

2段目 : 240°C × 1min

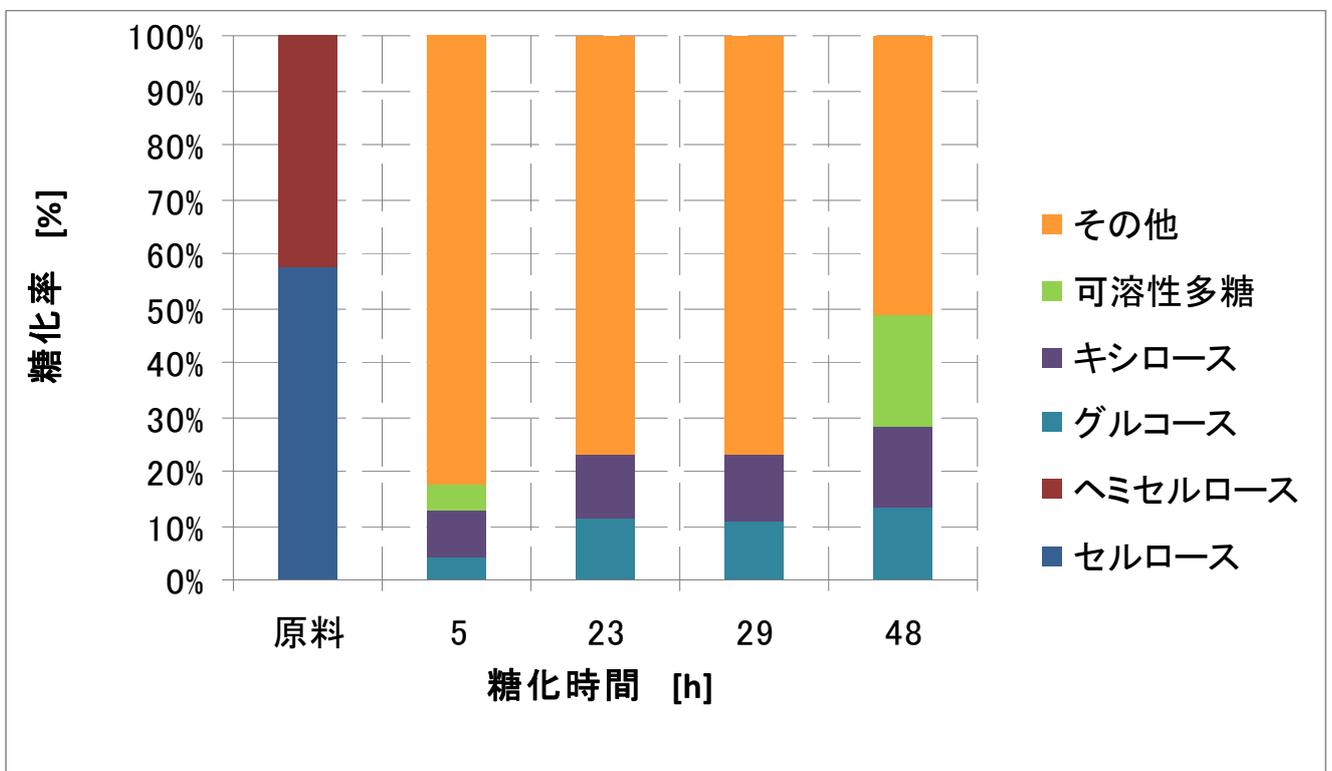


Fig.5-1-10 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-9)

RUN K-10

1段目 : 200°C × 10min

2段目 : 240°C × 10min

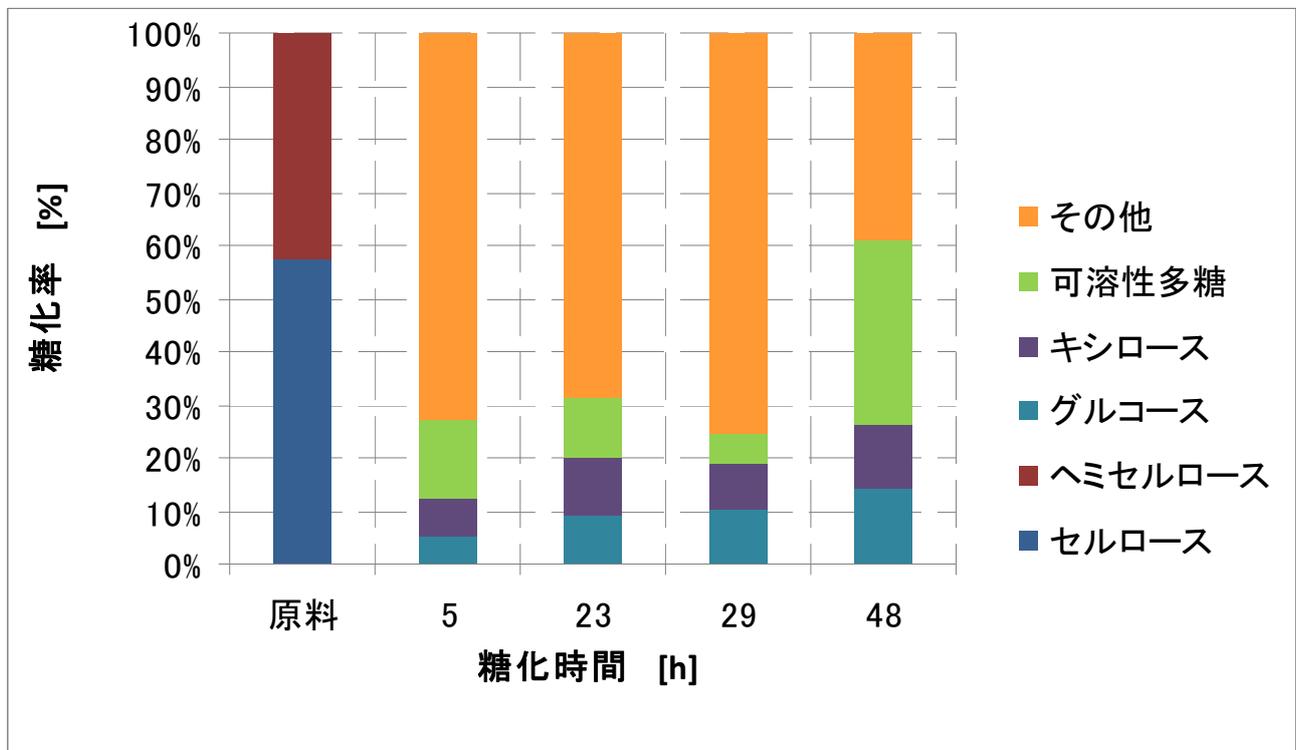


Fig.5-1-11 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-10)

RUN K-11

1段目 : 200°C × 10min

2段目 : 260°C × 1min

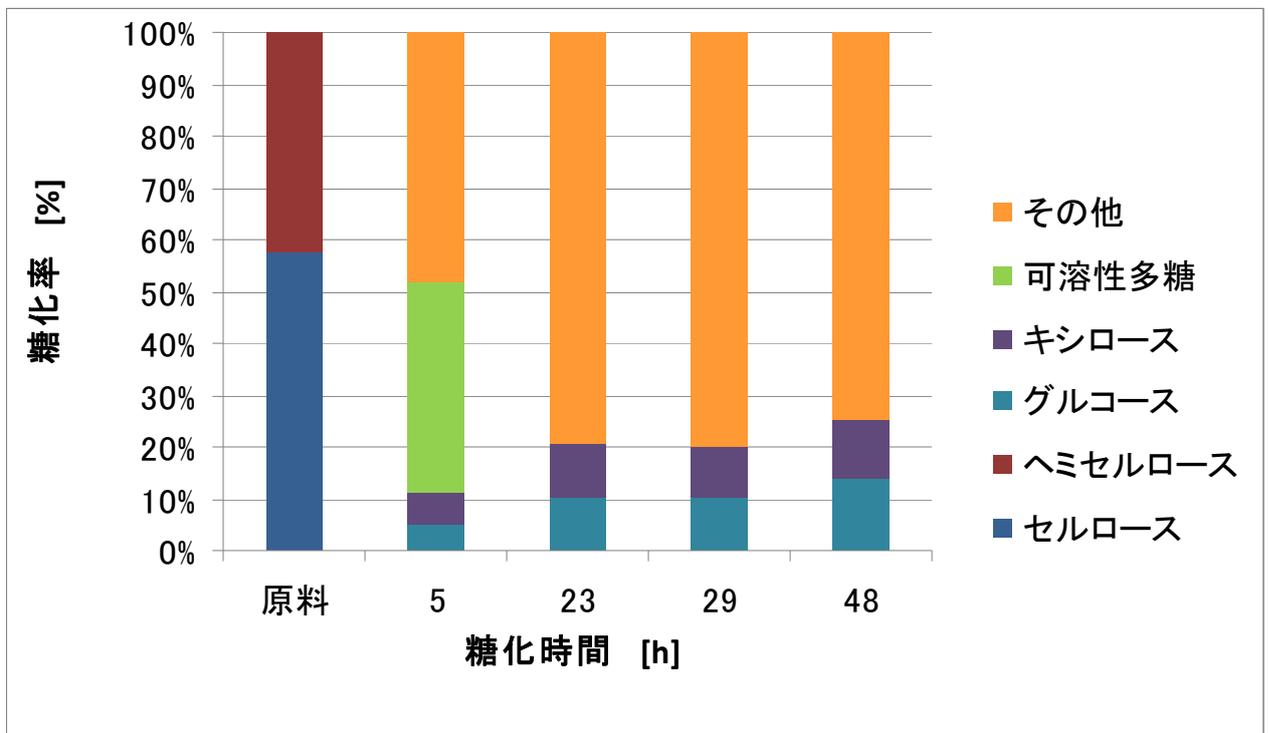


Fig.5-1-12 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-11)

### RUN K-12

1段目 : 200°C × 10min

2段目 : 260°C × 10min

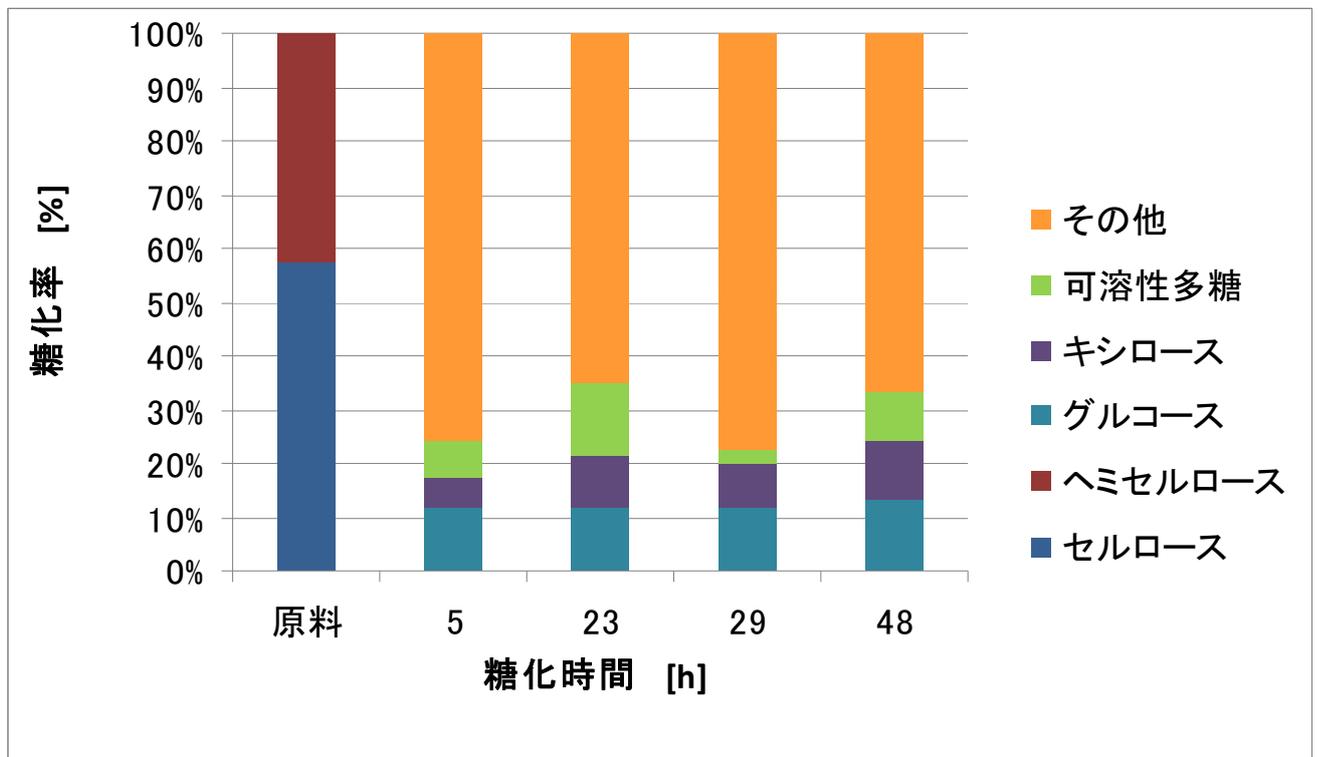


Fig.5-1-13 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-12)

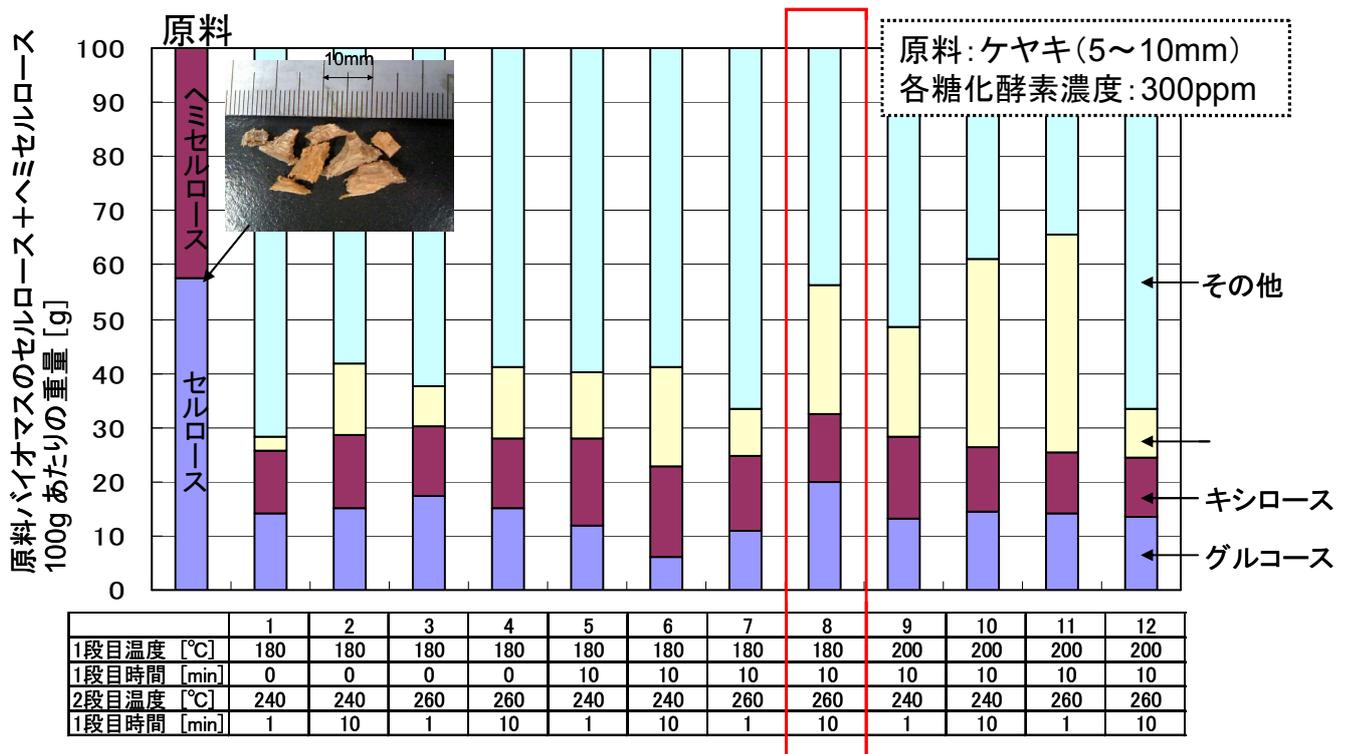
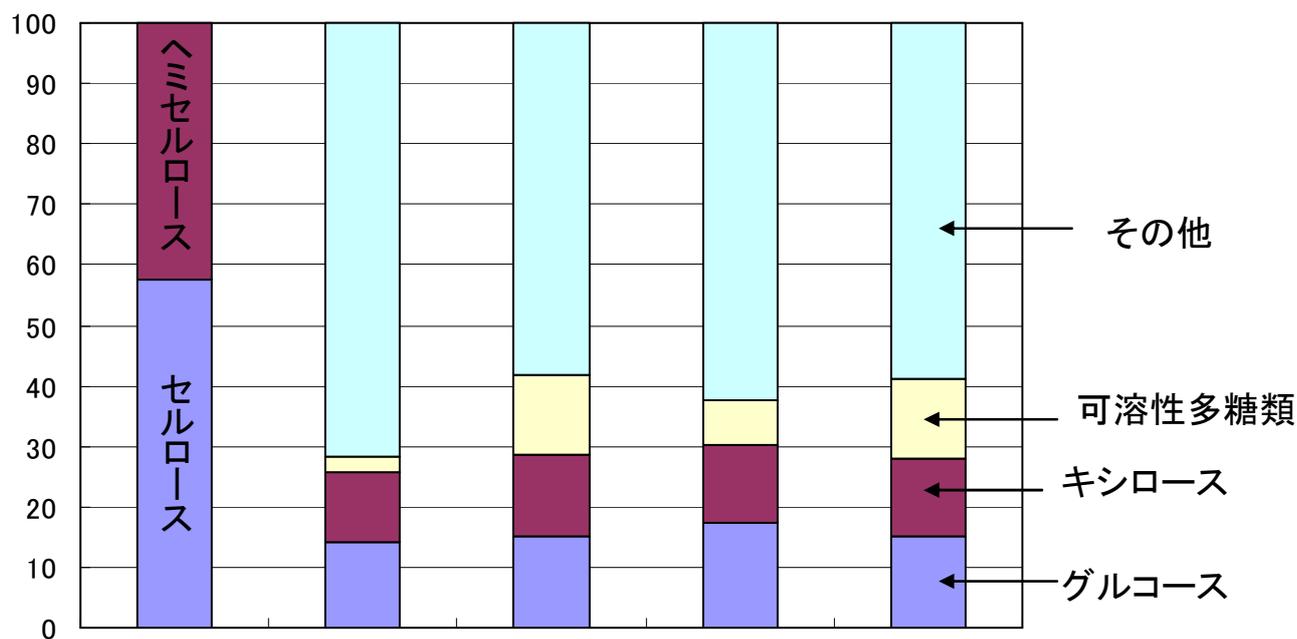


Fig.5-1-14 ケヤキの水熱爆砕前処理物の酵素糖化試験結果

酵素糖化時間：48時間

原料:ケヤキ



RUN NO.	K-1	K-2	K-3	K-4
2段目温度 [°C]	240	240	260	260
2段目時間 [min]	1	10	1	10

Fig.5-1-15 2段目の温度×時間の影響 (1段目: 180°C×0min の場合)

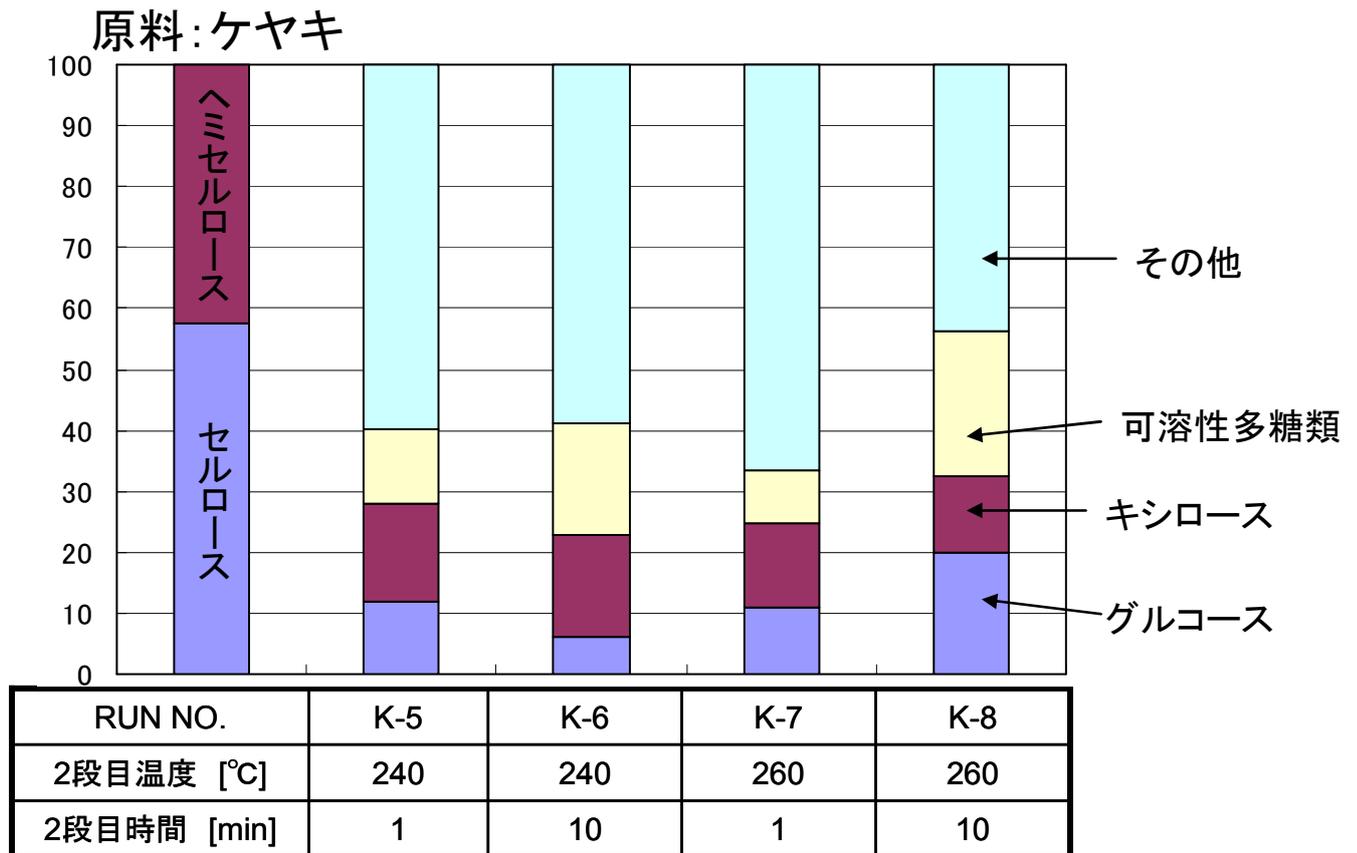


Fig.5-1-16 2段目の温度×時間の影響 (1段目: 180°C×0min の場合)

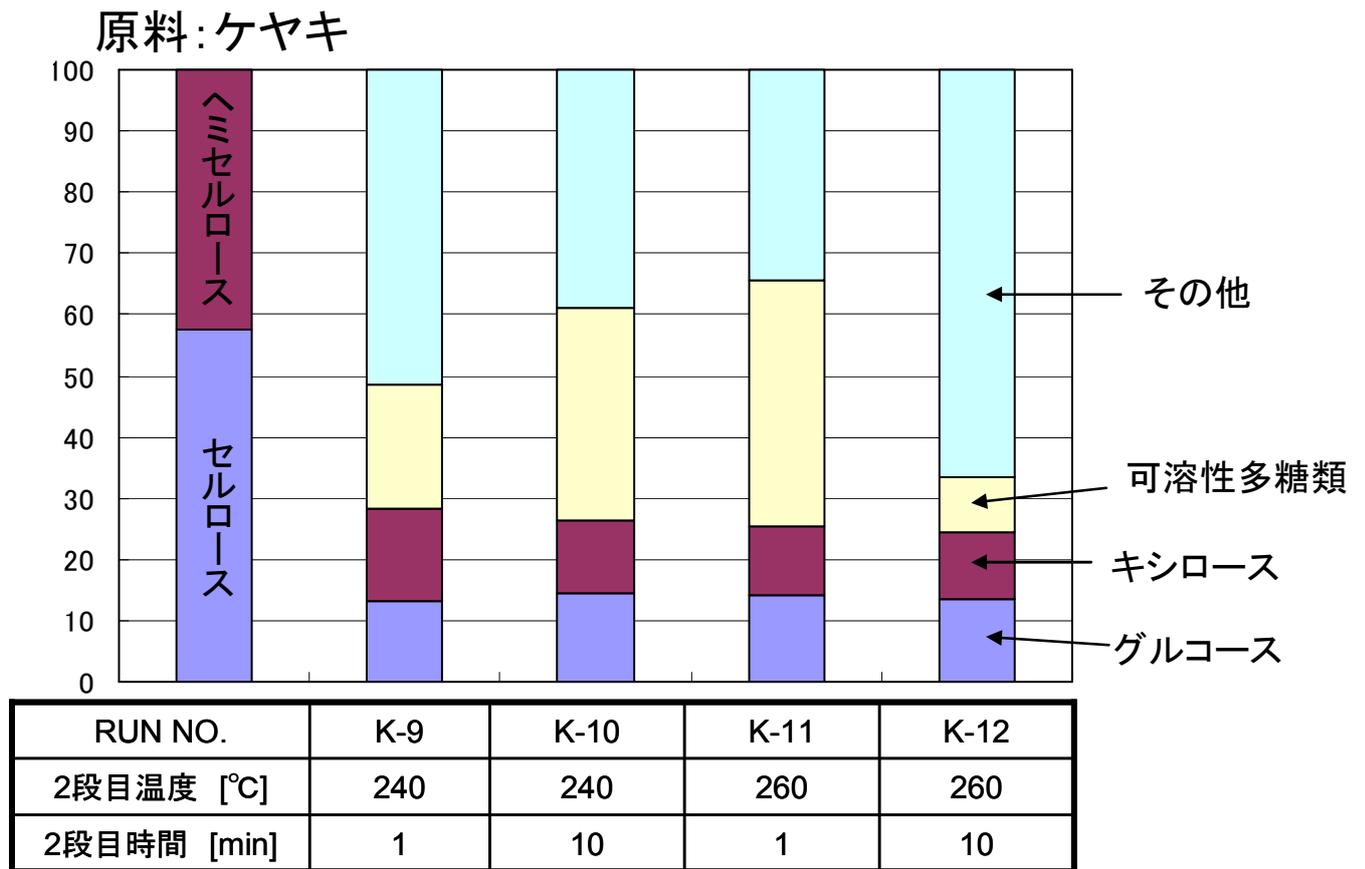
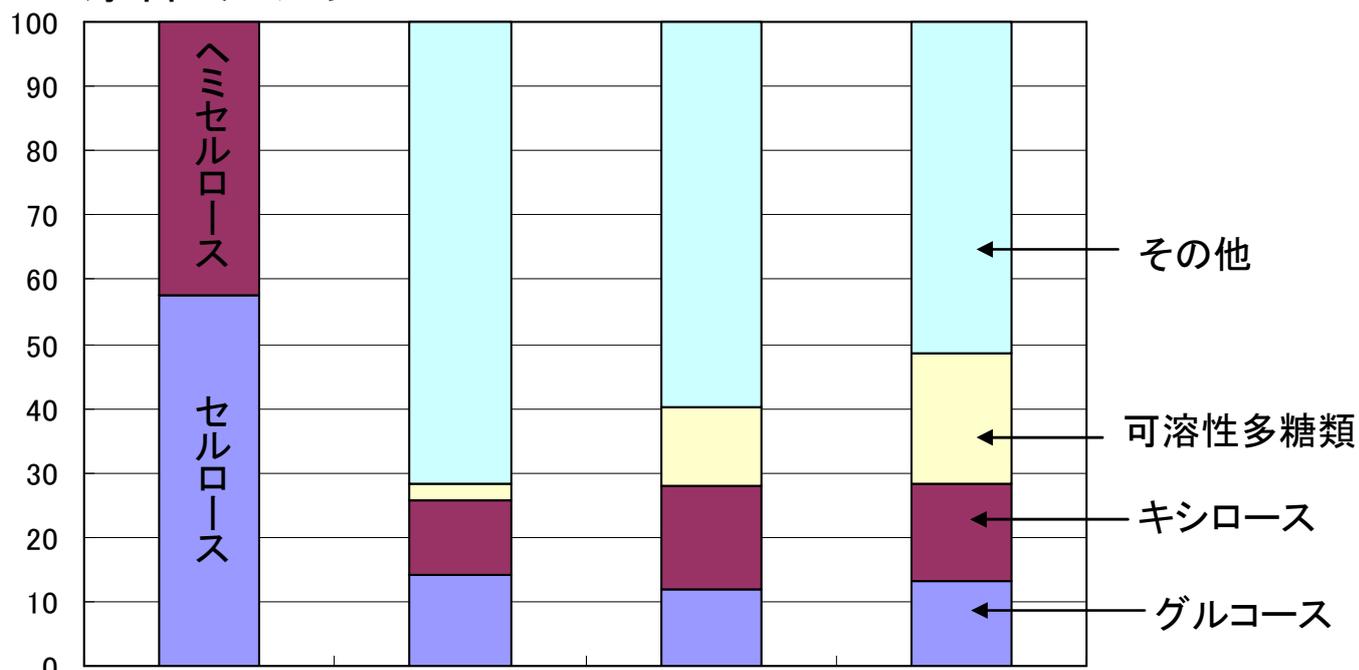


Fig.5-1-17 2段目の温度×時間の影響 (1段目: 200°C×10min の場合)

原料:ケヤキ



RUN NO.	K-1	K-5	K-9
1段目温度 [°C]	180	180	200
1段目時間 [min]	0	10	10

Fig.5-1-18 2段目の温度×時間の影響 (1段目: 240°C×1min の場合)

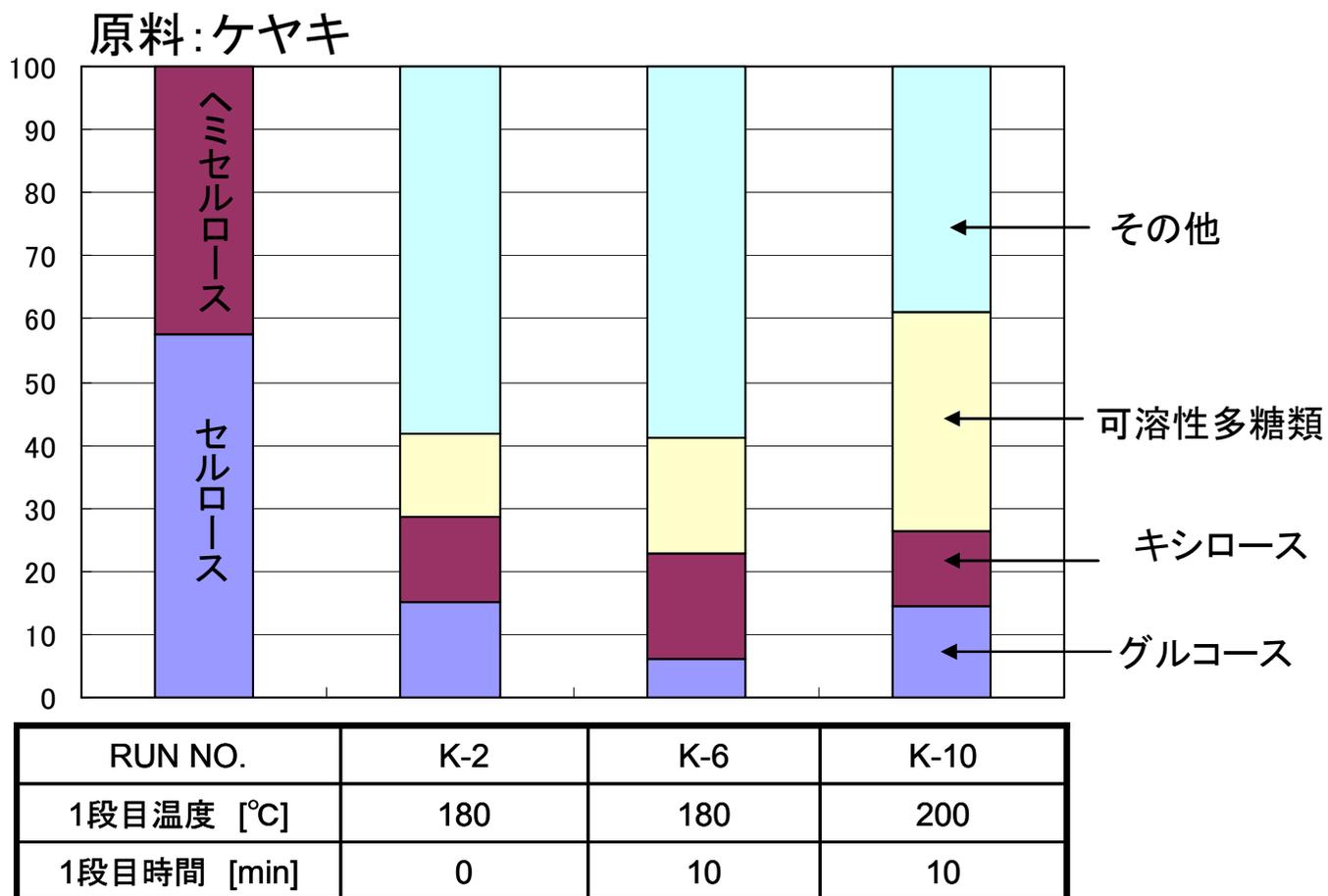


Fig.5-1-19 2段目の温度×時間の影響 (1段目: 240°C×10min の場合)

原料:ケヤキ

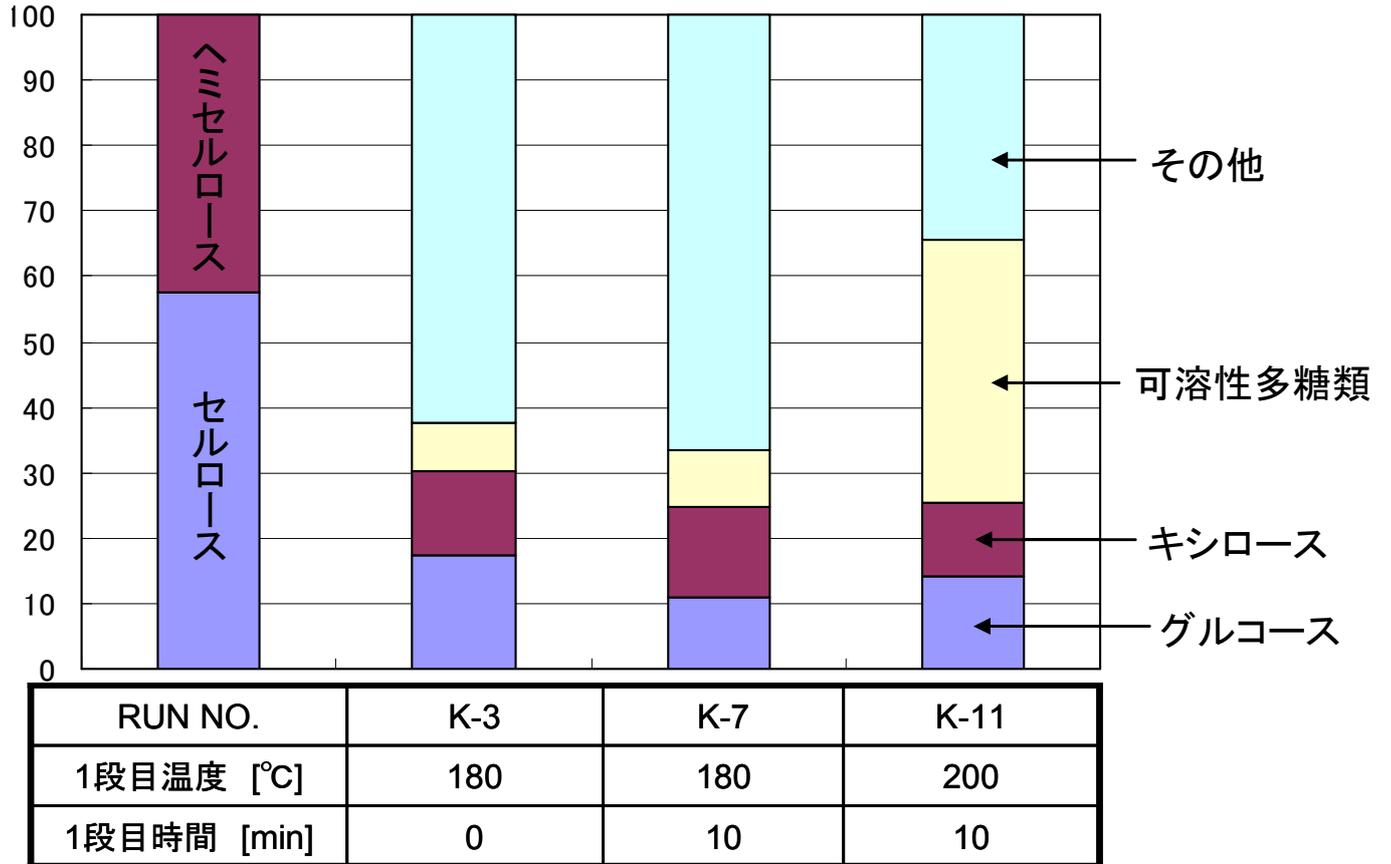


Fig.5-1-20 2段目の温度×時間の影響 (1段目: 260°C×1min の場合)

原料:ケヤキ

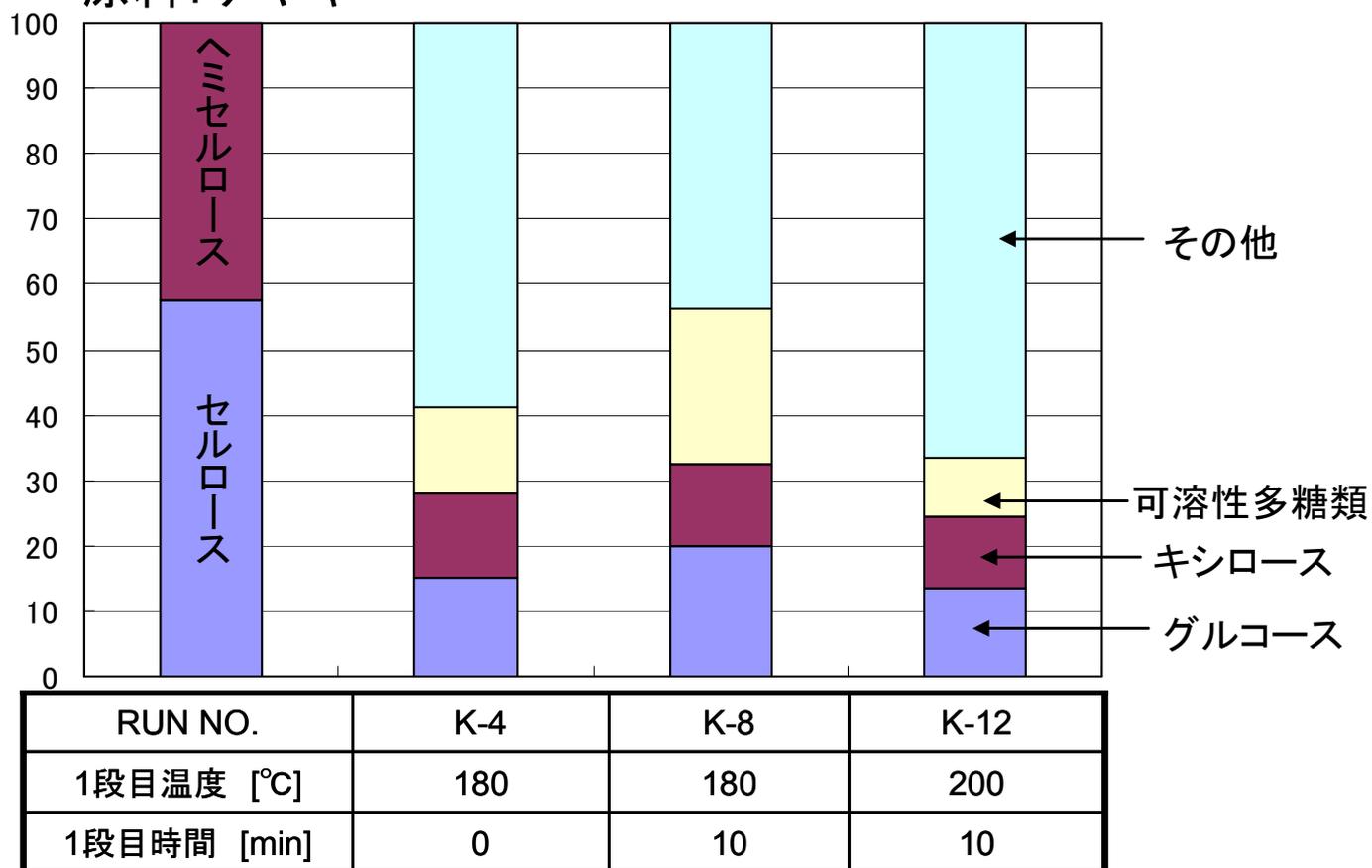


Fig.5-1-21 2段目の温度×時間の影響 (1段目: 260°C×10min の場合)

## 5-2 適正条件下での前処理方法の比較評価

### 1) 実験方法

前節で水熱爆砕の適正条件が見出されたので、その条件下で水蒸気爆砕および水熱爆砕との比較評価を行った。比較的原料サイズが大きい場合は原料の片寄りが予想されたので、前節で最も酵素糖化率のよかった K-8 の条件下で水熱爆砕、水蒸気爆砕、水熱徐冷の前処理を各 3 回行い、それぞれ酵素糖化を行い再現性の評価を行うとともに前処理方法の比較を行った。

### 2) 結果

**Fig.5-2-1,2,3** に水熱爆砕、水蒸気爆砕、水熱徐冷前処理物の酵素糖化の経時変化を示す。また、**Fig. 5-2-4** に酵素糖化時間 48 時間後の結果を一括して示す。各前処理とも同一条件でそれぞれ 3 回行い、それぞれの前処理物の酵素糖化をおこなった。少々のばらつきはあるが、比較的再現性があることが認められた。

**Fig. 5-2-5** に水熱爆砕、水蒸気爆砕、水熱徐冷前処理物の 48 時間後酵素糖化率の各 3 回の平均値を示す。この結果、水熱爆砕はグルコース糖化率が最も大きく、可溶性多糖類も最も大きいことから、水蒸気爆砕や水熱徐冷よりも効果的な前処理方法であると考えられる。

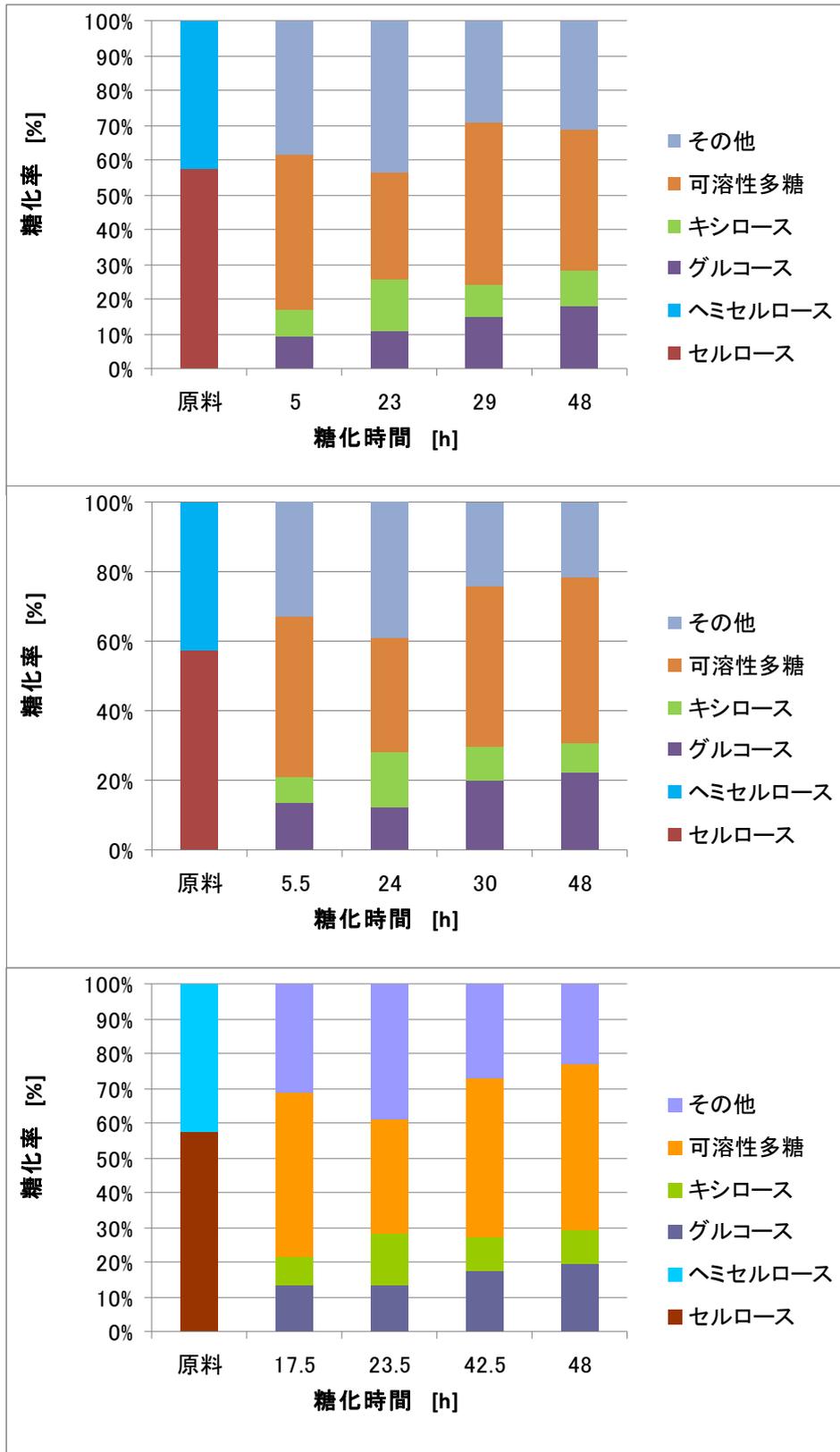


Fig. 5-2-1 ケヤキの水熱爆砕再現性試験結果

水熱爆砕条件 : K-8 ( 180°C × 10min + 260°C × 10min )

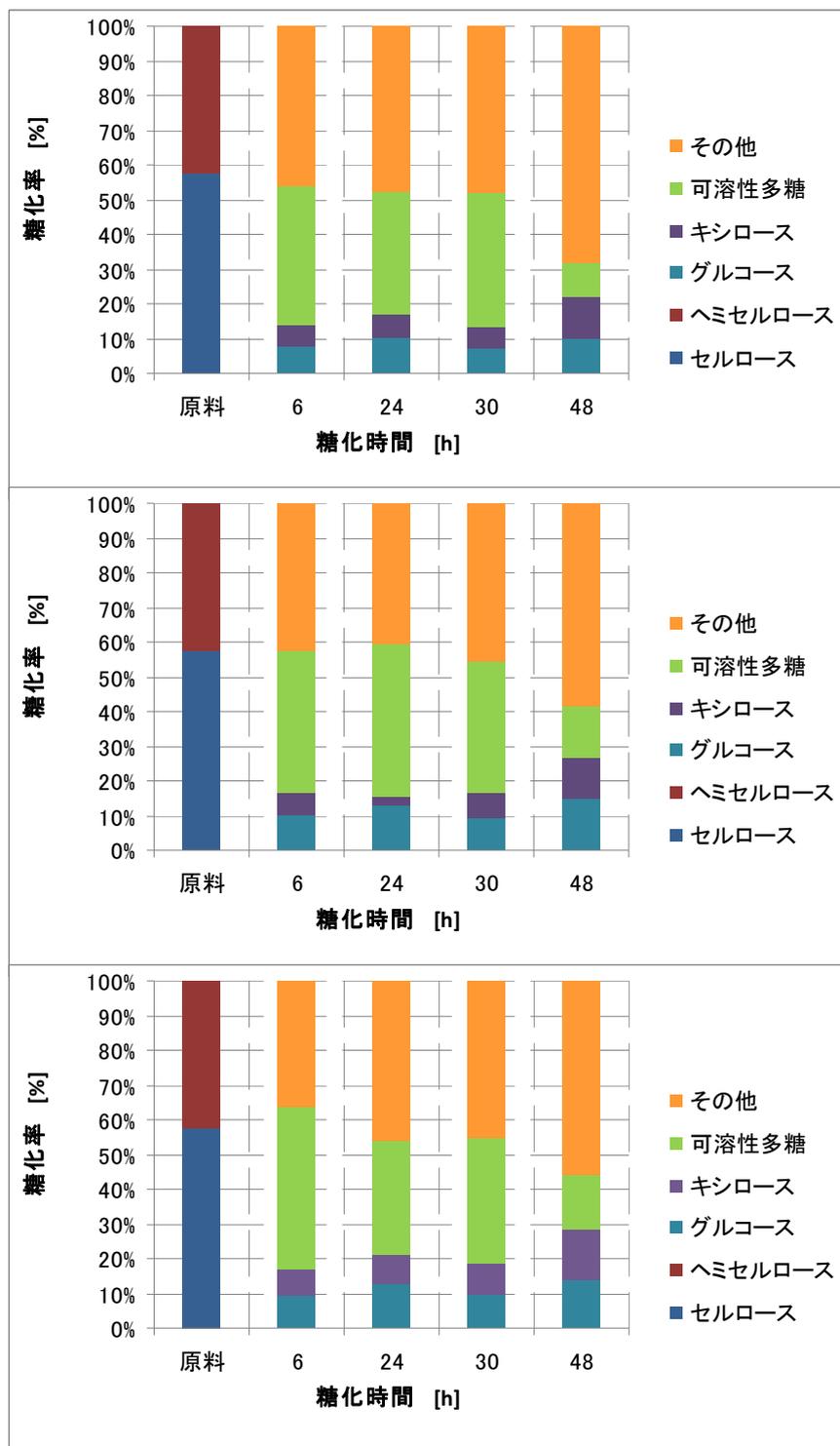


Fig. 5-2-2 ケヤキの水蒸気爆砕再現性試験結果

水蒸気爆砕条件 : K-8 ( 180°C × 10min + 260°C × 10min )

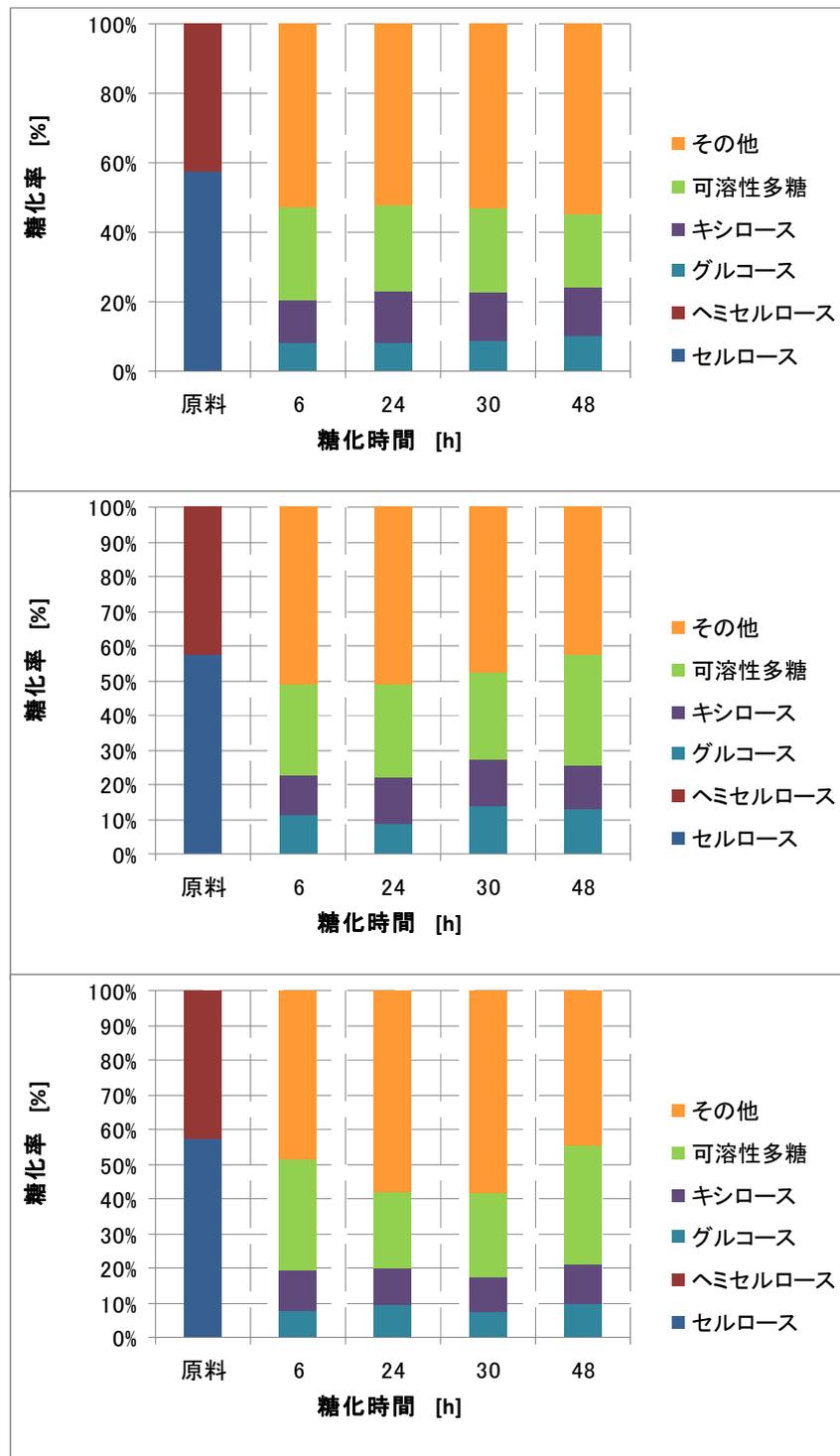


Fig. 5-2-3 ケヤキの水熱爆砕再現性試験結果

水熱徐冷爆砕条件：K-8（180℃×10min + 260℃×10min）

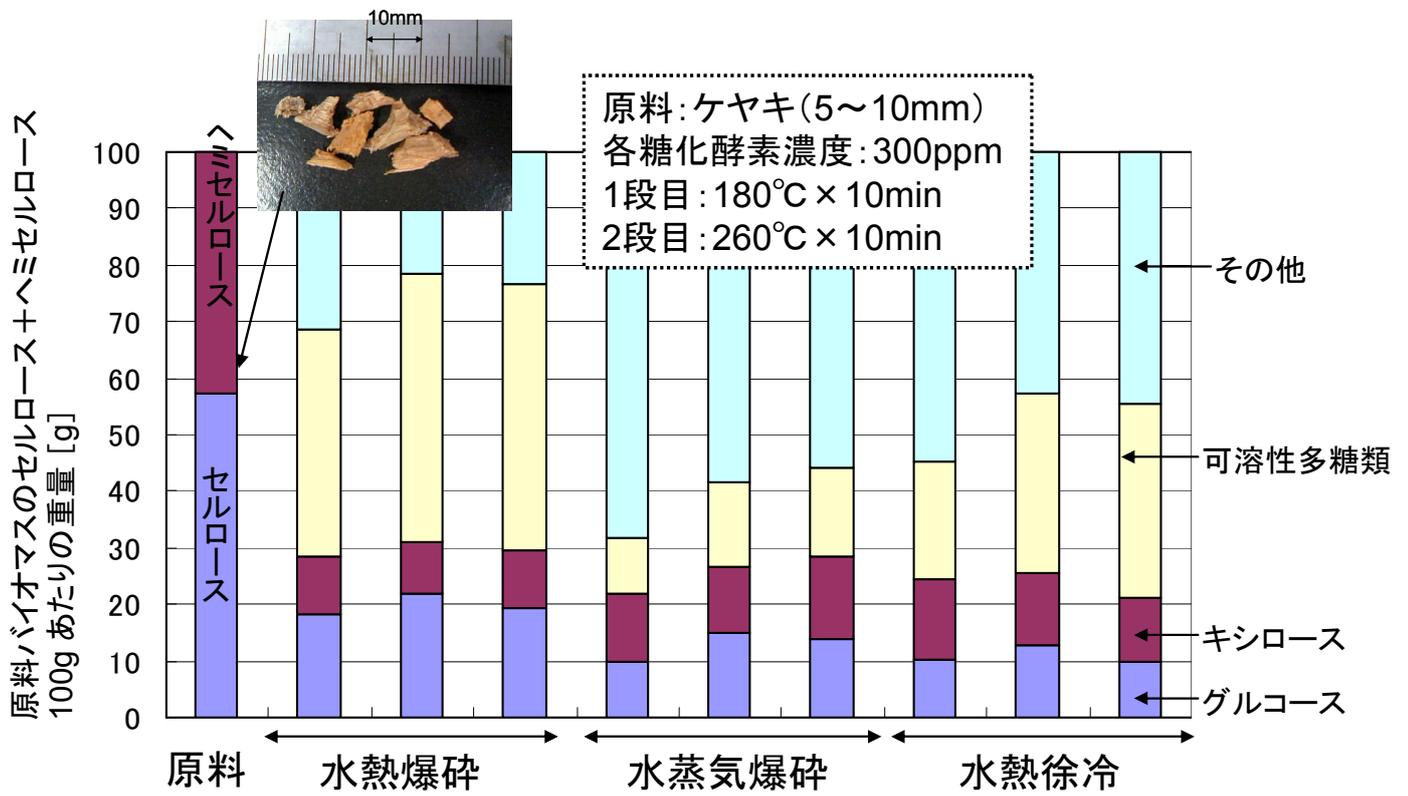


Fig.5-2-4 ケヤキの水熱爆砕と水蒸気爆砕および水熱徐冷前処理物の酵素糖化試験（48 時間後）の再現性（各 3 回）

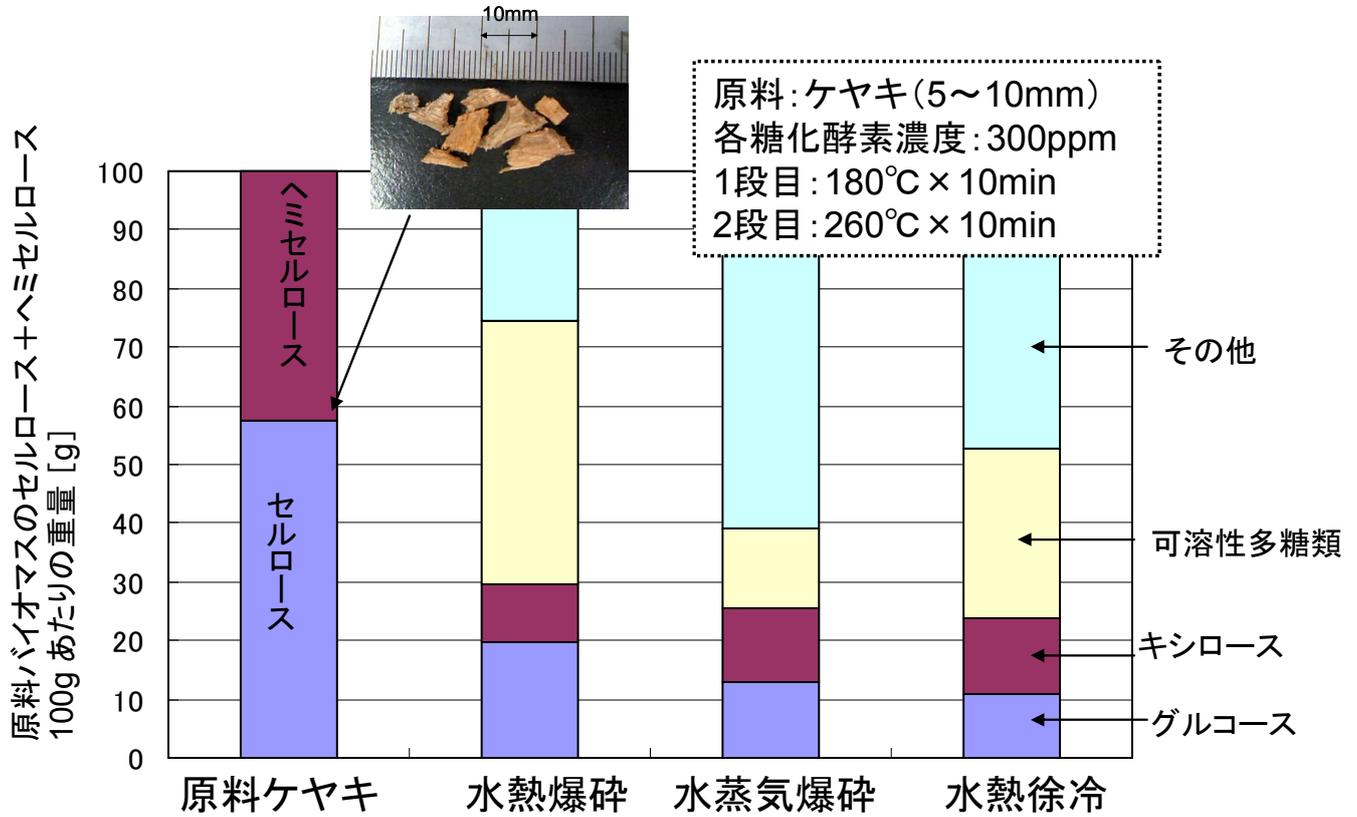


Fig.5-2-5 ケヤキの水熱爆砕と水蒸気爆砕および水熱徐冷前処理物の  
酵素糖化試験（48時間後）各3回平均値の比較

## 6章 結言

本研究の本年度の主目的は水熱爆砕が水蒸気爆砕や水熱徐冷に較べて効果的であることを検証することであった。

### 1) 検証方法

- a. 水熱爆砕、水蒸気爆砕および水熱徐冷の前処理が可能な試験装置を試作した。
- b. 水熱爆砕の温度×時間の適正条件を把握し、それと同じ条件で水蒸気爆砕、水徐冷を行い比較評価した。水熱爆砕に期待される大きな特徴のひとつは、バイオマスを微粉碎する必要があることにあると考えられることから、比較的大きなサイズ（5 mmから10 mm）のバイオマスを用いた。前処理では温度の経時変化パターンが重要な因子であることから、1段昇温の他、2段昇温も検討した。

### 2) 検証結果

- a. ケヤキの水熱爆砕の適正条件は1段目：180℃×10min. 2段目：260℃×10min. であることを見出した。
- b. 次にその条件下で水熱爆砕、水蒸気爆砕および水熱徐冷の前処理と前処理物の酵素糖化をそれぞれ3回行い、再現性に問題がないことを確認して糖化率を比較評価した。その結果、水熱爆砕がグルコース糖化率と可溶性多糖類収率が最も大きく、この3方法の中で最も効果的な前処理方法であることを確認した。

## 参考文献

- 1) 熊谷聡、太田真由美、岡宏圭、林信行、山田則行、坂木剛、  
「加圧熱水処理における籾殻中のセルロースの成分分離と可溶化、および可溶化物の酵素糖化によるグルコース生産」、  
化学工学論文集、第 34 巻、第 4 号、458-462(2008)
- 2) 志水一充 他、木材成分総合利用研究成果集（森林総合研究所）、  
9-33(1990)
- 3) 熊谷聡、林信行、山田則行、坂木剛、  
「種々のリグノセルロース系バイオマスの水熱分解・糖化特性、および得られた水熱処理残渣の酵素糖化」、日本エネルギー学会誌、86 巻、712-717(2007)

## Ⅱ. 平成 22 年度の研究内容

### 1 章 緒言 (省略)

### 2 章 原料バイオマスの構造と分析 (省略)

### 3 章 前処理実験装置と方法

#### 3-1 実験装置 (省略)

#### 3-2 前処理実験方法

前処理実験条件を Table.3-2-1,3-2-2 に示す。処理温度については、一般的に約 180°C がヘミセルロース分解開始温度であり、約 240°C がセルロース分解開始温度とされており、これらの温度を指標として設定した。

##### 3-2.1 水熱爆砕実験

- ① 反応器内に原料（ケヤキ、杉）を仕込んだ後、反応器内を真空ポンプで減圧した。  
実験に使用した原料写真を Fig.3-2-1,3-2-2 に示す。いずれも数ミリ以下に粉碎したものである。
- ② 送水ポンプの圧力を 8MPa（飽和水蒸気圧より高く設定）、流量を 20ml/min に設定し、送水を始めた。
- ③ 送水を始めたらヒータの電源を入れ、水温が 300°C 付近で安定するまで加熱した。  
ただし、水温が所定温度に安定するまでは反応器に供給せず、外部に排出した。
- ④ 水温が十分に上がり、安定したところで反応器入口のバルブを開けて反応器内に熱水を入れ、原料と接触させた。ここで、反応器内が目的の温度（一段目）に達するまでに原料と接触して出てくる熱水を流出液として採取した。
- ⑤ 所定反応温度（一段目）に到達後、一定時間温度を保持した後ヒータの設定温度を上げ、反応器内が目的の温度（二段目）に達するまで再び流出液を採取した。

- ⑥ 所定反応温度（二段目）に到達後、一定時間温度を保持した後、反応器底部のボール弁を約 0.1 秒で全開にして大気圧の容器内に膨張させて爆砕を行った。爆砕されて出てきたバイオマスを全量採取し、それらを基質として酵素糖化試験を行った。

### 3-2.2 水蒸気爆砕実験

- ① 水熱爆砕実験操作①～⑥に準じた（ただし設定圧力を所定温度における水の飽和蒸気圧にした）。

### 3-2.3 水熱徐冷実験

- ① 上記水熱爆砕実験操作①～⑤に準じた。
- ② 所定温度に到達後、全てのヒータの電源を切り、外部から空冷して温度と圧力をゆっくり下げた。以下この操作を「水熱徐冷」と定義した。

Table.3-2-1 前処理実験条件（ケヤキ）

Run No.	原料	処理方法	処理前重量 [g]	設定圧力 [MPa]	一段目		二段目	
					処理温度 [°C]	保持時間 [sec]	処理温度 [°C]	保持時間 [sec]
K-1	ケヤキ	水熱爆砕	3.00	8	180	0	240	60
K-2	ケヤキ	水熱爆砕	3.00	8	180	0	240	600
K-3	ケヤキ	水熱爆砕	3.00	8	180	0	260	60
K-4	ケヤキ	水熱爆砕	3.00	8	180	0	260	600
K-5	ケヤキ	水熱爆砕	3.00	8	180	600	240	60
K-6	ケヤキ	水熱爆砕	3.00	8	180	600	240	600
K-7	ケヤキ	水熱爆砕	3.00	8	180	600	260	60
K-8	ケヤキ	水熱爆砕	3.00	8	180	600	260	600
K-9	ケヤキ	水熱爆砕	3.00	8	200	600	240	60
K-10	ケヤキ	水熱爆砕	3.00	8	200	600	240	600
K-11	ケヤキ	水熱爆砕	3.00	8	200	600	260	60
K-12	ケヤキ	水熱爆砕	3.00	8	200	600	260	600
Ke-1	ケヤキ	水熱爆砕	3.00	8	180	600	260	600
Ke-2	ケヤキ	水熱爆砕	3.00	8	180	600	260	600
Ke-3	ケヤキ	水熱爆砕	3.00	8	180	600	260	600
Ke-4	ケヤキ	水蒸気爆砕	3.00	4	180	600	260	600
Ke-5	ケヤキ	水蒸気爆砕	3.00	4	180	600	260	600
Ke-6	ケヤキ	水蒸気爆砕	3.00	4	180	600	260	600
Ke-7	ケヤキ	水熱徐冷	3.00	8	180	600	260	600
Ke-8	ケヤキ	水熱徐冷	3.00	8	180	600	260	600
Ke-9	ケヤキ	水熱徐冷	3.00	8	180	600	260	600

Table.3-2-1 前処理実験条件（杉）

Run No.	原料	処理方法	処理前重量 [g]	設定圧力 [MPa]	一段目		二段目	
					処理温度 [°C]	保持時間 [sec]	処理温度 [°C]	保持時間 [sec]
S-1	杉	水熱爆砕	1.50	8	180	0	240	60
S-2	杉	水熱爆砕	1.50	8	180	0	240	600
S-3	杉	水熱爆砕	1.50	8	180	0	260	60
S-4	杉	水熱爆砕	1.50	8	180	0	260	600
S-5	杉	水熱爆砕	1.50	8	180	600	240	60
S-6	杉	水熱爆砕	1.50	8	180	600	240	600
S-7	杉	水熱爆砕	1.50	8	180	600	260	60
S-8	杉	水熱爆砕	1.50	8	180	600	260	600
S-9	杉	水熱爆砕	1.50	8	200	600	240	60
S-10	杉	水熱爆砕	1.50	8	200	600	240	600
S-11	杉	水熱爆砕	1.50	8	200	600	260	60
S-12	杉	水熱爆砕	1.50	8	200	600	260	600
Su-1	杉	水熱爆砕	1.50	8	180	0	260	600
Su-2	杉	水熱爆砕	1.50	8	180	0	260	600
Su-3	杉	水熱爆砕	1.50	8	180	0	260	600
Su-4	杉	水蒸気爆砕	1.50	4	180	0	260	600
Su-5	杉	水蒸気爆砕	1.50	4	180	0	260	600
Su-6	杉	水蒸気爆砕	1.50	4	180	0	260	600
Su-7	杉	水熱徐冷	1.50	8	180	0	260	600
Su-8	杉	水熱徐冷	1.50	8	180	0	260	600
Su-9	杉	水熱徐冷	1.50	8	180	0	260	600



Fig.3-2-1 原料 (ケヤキ)



Fig.3-2-2 原料 (杉)

## 4章 酵素糖化実験装置と方法

### 4-1 実験装置（省略）

### 4-2 酵素糖化実験方法

- ① 酵素糖化実験装置湯浴部を水で満たした、後ヒータの電源を入れ水温が所定温度で安定するまで加熱した。
- ② 前処理試験により得られた残渣および流出液を Fig.4-2-1 に示すように三角フラスコにひとまとめに移し、pHを調整した後セルロース分解酵素、ヘミセルロース分解酵素を添加した。
- ③ 三角フラスコを酵素糖化実験装置に設置し、一定温度を保持したまま振蕩させた。
- ④ 酵素糖化開始から6時間、24時間、30時間、48時間経過後に、三角フラスコから試料をサンプリングし、糖濃度の測定を行った。

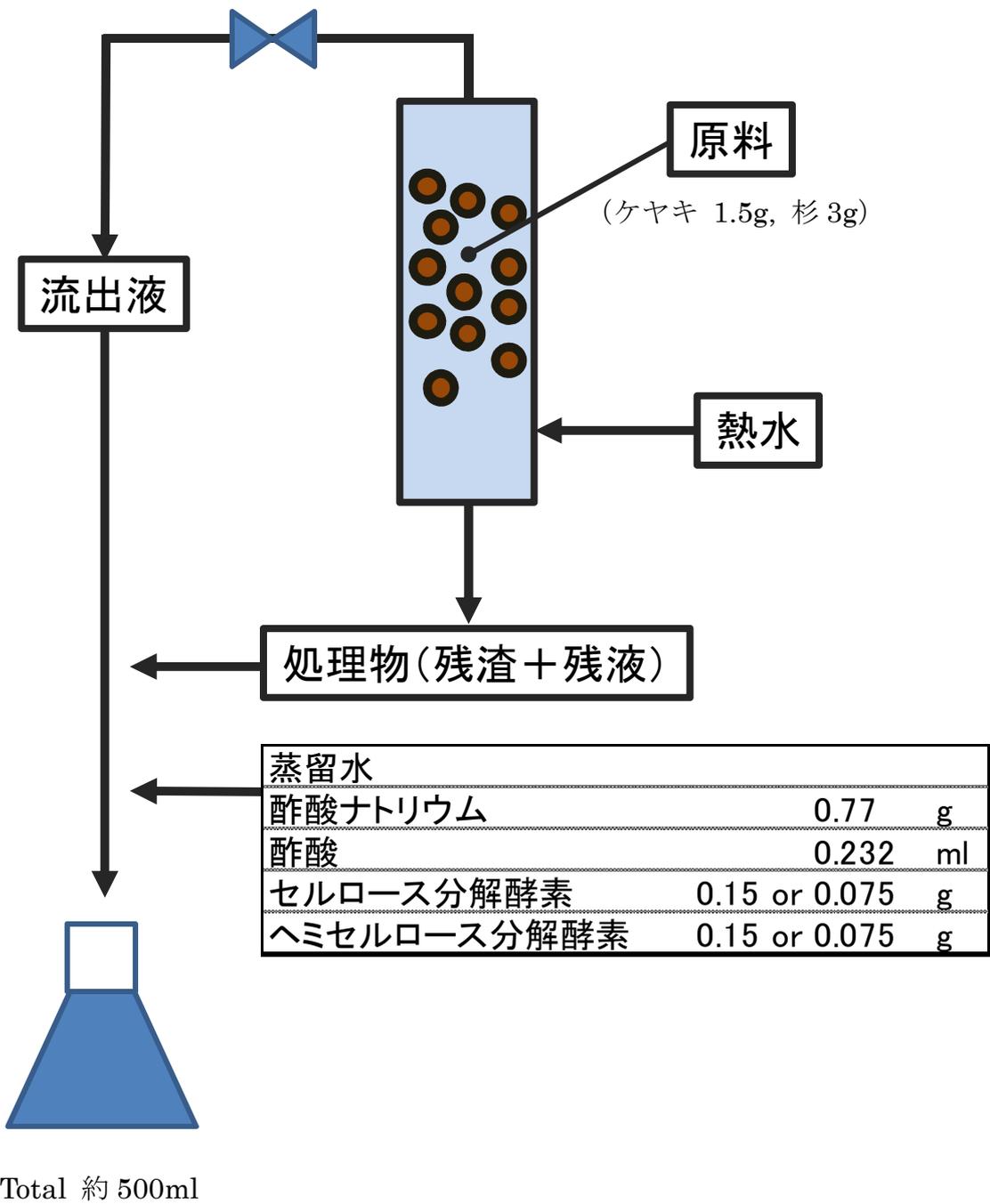


Fig.4-2-1 前処理から酵素糖化実験装置にセットするまでの概略フロー

#### 4-3 酵素糖化条件

酵素糖化条件を Table.4-3-1 に示す。

Table.4-3-1 酵素糖化条件

原料	ケヤキ	杉
原料重量[g-dry]	3.00	1.50
サンプル[ml]	500	550
酵素糖化実験装置 湯浴部温度[°C]	50	50
酵素糖化時間[h]	48	48
pH[-]	5	5
セルロース分解酵素 添加量[g]	0.150	0.075
ヘミセルロース分解酵素 添加量[g]	0.150	0.075

#### 4-4 糖の分析方法

糖の分析方法を以下に示す。i) ~iv) の方法を確認したが、iv) の方法で精度の確認がとれなかったため、本研究では前任者にならい、i) ~III) の方法を採用した。

##### i) グルコース濃度測定

グルコース濃度測定は、「グルコースキット グルコース C-II テストワコー」を使用した。

##### ii) キシロース濃度測定

キシロース濃度を測定する際にはD-キシロース測定キット（日本バイオコン株式会社）を使用した。キットに同封されていた試薬をI ~Vで定義する。

##### iii) 全糖濃度測定

全糖とは、グルコース、キシロースを含む可溶性の全ての糖と定義する。全糖濃度を測定する際にはフェノール硫酸法を用いた。

##### iv) オリゴ糖類分析方法

糖分離カラムおよびRI 検出器を用いた液体クロマトグラフィーでオリゴ糖（セロビオース、ラクトース、マルトース）の分析が可能である。液体クロマトグラフィーの仕様および分析条件をTable . 4-4-1に、オリゴ糖のピーク事例をFig.4-4-4に示す。

Table.4-4-1 液体クロマトグラフィーの仕様および分析条件

検出器	日本分光 RI-2031
溶離液	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N(75vol%)
カラム	Shodex Asahipak NH2P-50 4E

溶離液流量 [ml/min]	0.5
カラム温度 [°C]	40
測定時間 [min]	30
サンプル注入量 [μl]	5

	試料	保持時間[min]
1段目	ケヤキ水熱爆砕 1段目:180°C×10min 2段目:260°C×10min	-
2段目	セロビオース	22.425
3段目	ラクトース	23.425
4段目	マルトース	21.867

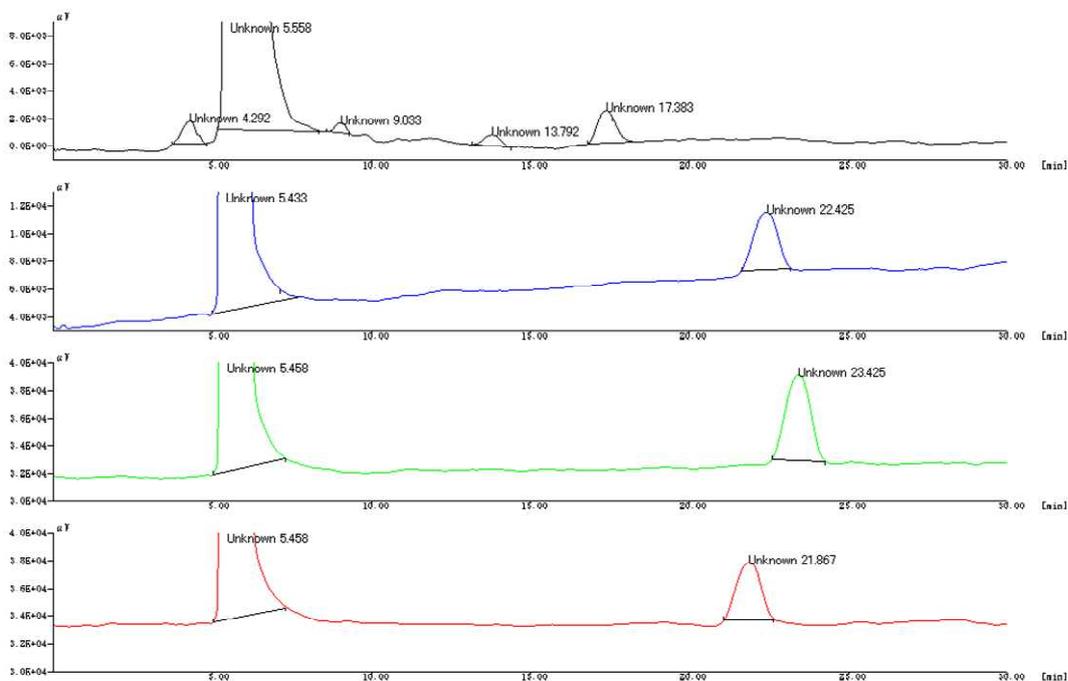


Fig.4-4-4 オリゴ糖ピーク事例

## 5章 バイオマスの前処理・酵素糖化実験結果

### 5-1 水熱爆砕条件選定試験結果

Table.5-1-1 に前処理条件を示すように、1、2 段目の温度と保持時間をパラメータとしてケヤキ・杉の水熱爆砕の前処理を行い、酵素糖化を行った。前処理は Fig.5-1-1 に示す温度×時間のパターンで行った。また、ケヤキと杉では密度が異なるため、反応器に詰める原料の重量をケヤキ 3.0g-dry、杉 1.5g-dry として実験を行った。

#### 5-1.1 ケヤキ

Fig.5-1-2 から Fig.5-1-13 に各前処理物の酵素糖化率の経時変化を示す。糖化率は時間とともに増加するが、途中で減少する場合もみられた。ここでは、一般的に採用されている 48 時間後の糖化率で評価することとした。

Fig.5-1-14 に 12 種類の前処理条件の酵素糖化率を一括して示した。この中で、RUN K-8（1 段目：180°C×10min. 2 段目：260°C×10min.）におけるグルコース糖化率が最も高く、キシロース糖化率および可溶性多糖類も高い値を示したため、この条件が適正条件であると考えられた。

Fig.5-1-15 から Fig.5-1-21 に 1 段目および 2 段目の条件と各糖化率との関係を示した。

Table.5-1-1 ケヤキの水熱爆砕処理条件一覧表

RUN NO		K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6
処理温度(1段目)	°C	180	180	180	180	180	180
保持時間(1段目)	min	0	0	0	0	10	10
処理温度(2段目)	°C	240	240	260	260	240	240
保持時間(2段目)	min	1	10	1	10	1	10
RUN NO		K-7	K-8	K-9	K-10	K-11	K-12
処理温度(1段目)	°C	180	180	200	200	200	200
保持時間(1段目)	min	10	10	10	10	10	10
処理温度(2段目)	°C	260	260	240	240	260	260
保持時間(2段目)	min	1	10	1	10	1	10

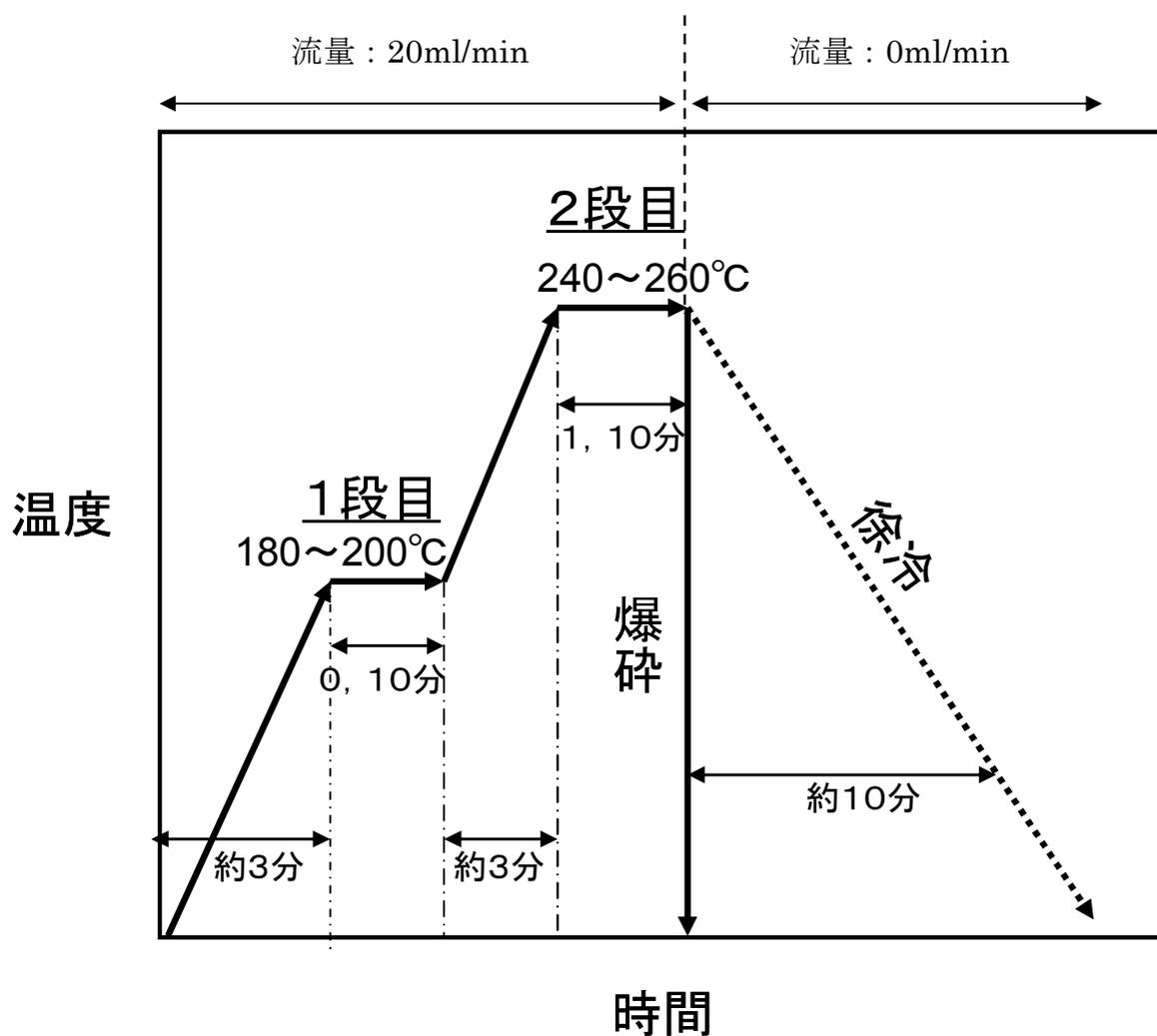


Fig.5-1-1 ケヤキ水熱爆砕前処理昇温・降温パターン

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		K-1		原料[g]		3.00	
1段目	温度[°C]	180		溶液量[ml]		500	
	時間[min]	0		酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)		0.15
2段目	温度[°C]	240			Cellic HTec (ヘミセルロース分解)		0.15
	時間[min]	1		糖化温度[°C]		50	

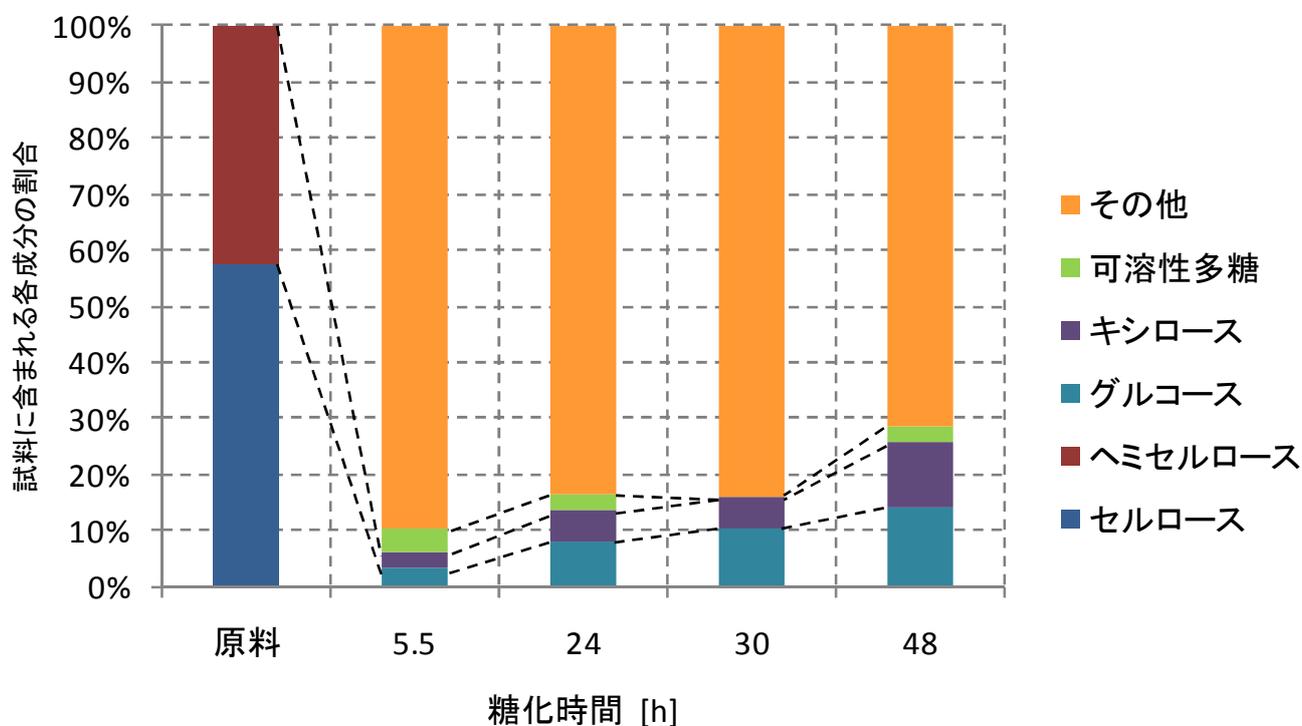


Fig.5-1-2 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-1)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		K-2
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	0
2段目	温度[°C]	240
	時間[min]	10

原料[g]		3.00
溶液量[ml]		500
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]		50

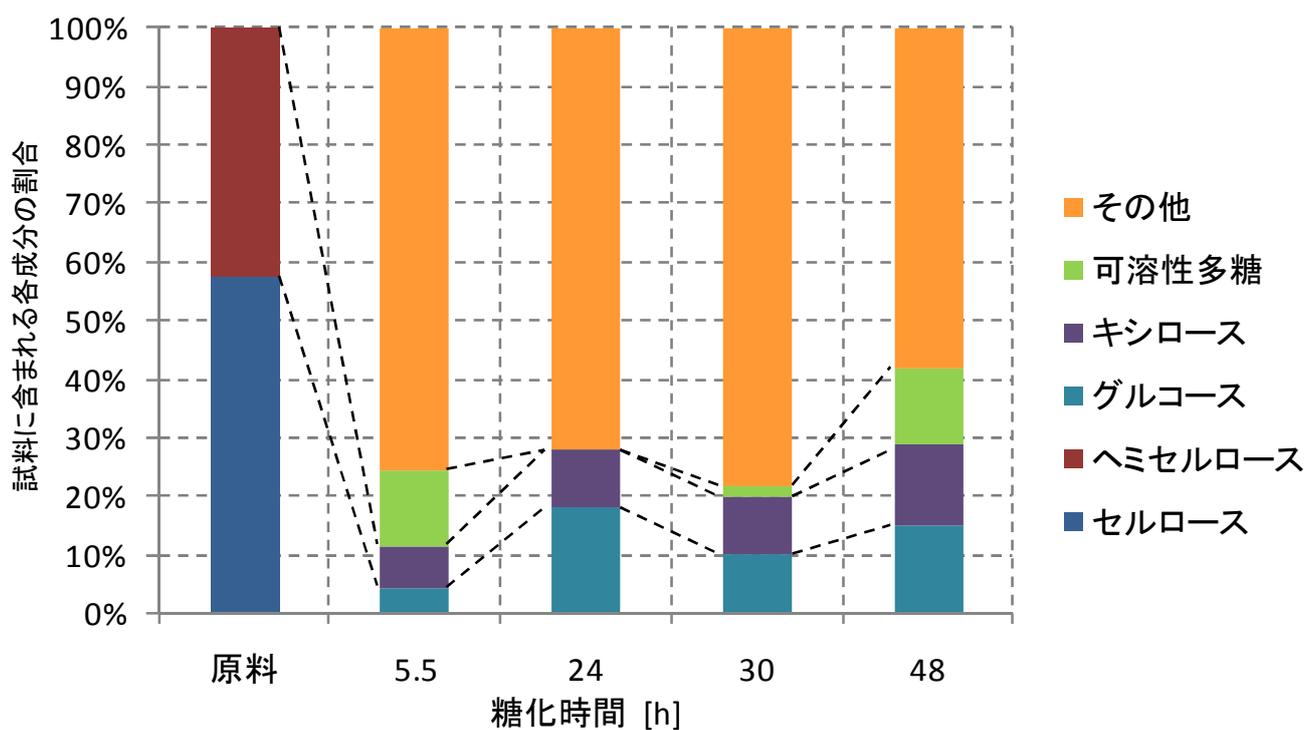


Fig.5-1-3 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-2)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		K-3
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	0
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	1

原料[g]		3.00
溶液量[ml]		500
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]		50

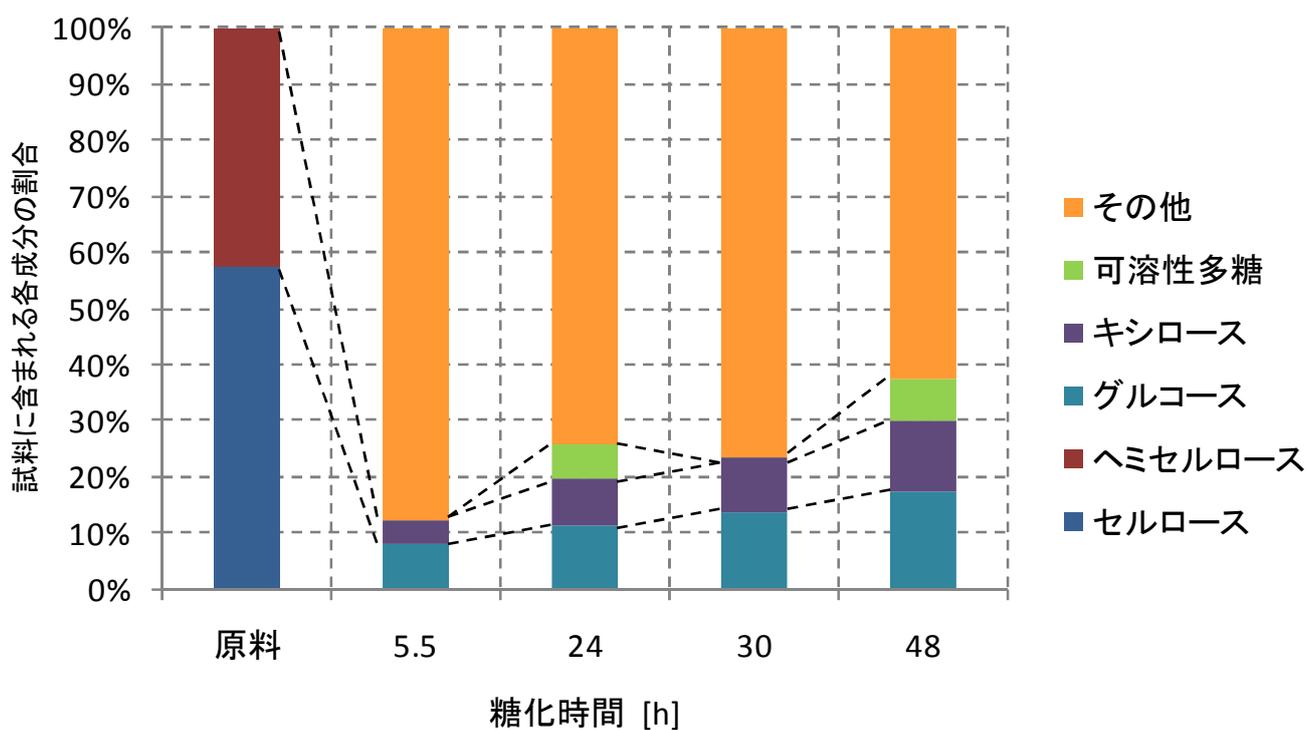


Fig.5-1-4 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-3)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		K-4
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	0
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

原料[g]		3.00
溶液量[ml]		500
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]		50

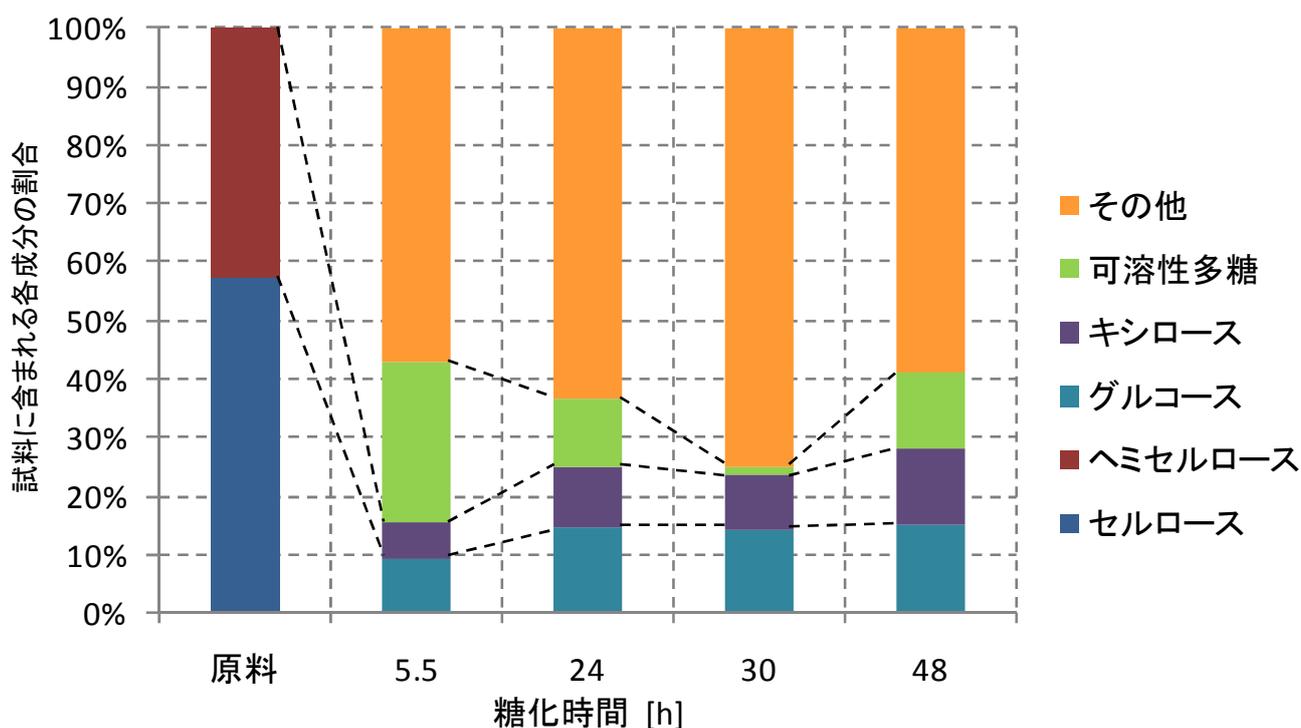


Fig.5-1-5 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-4)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		K-5
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	240
	時間[min]	1

原料[g]		3.00
溶液量[ml]		500
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]		50

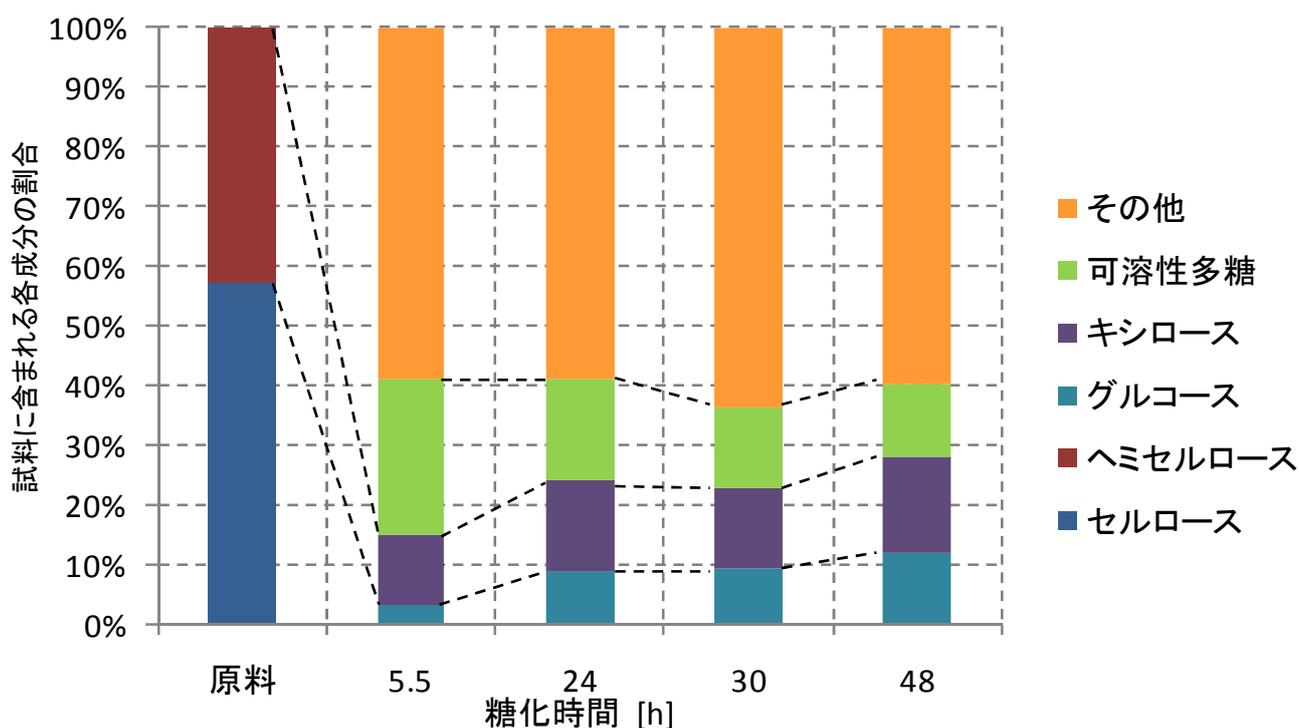


Fig.5-1-6 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-5)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		K-6
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	240
	時間[min]	10

原料[g]		3.00
溶液量[ml]		500
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]		50

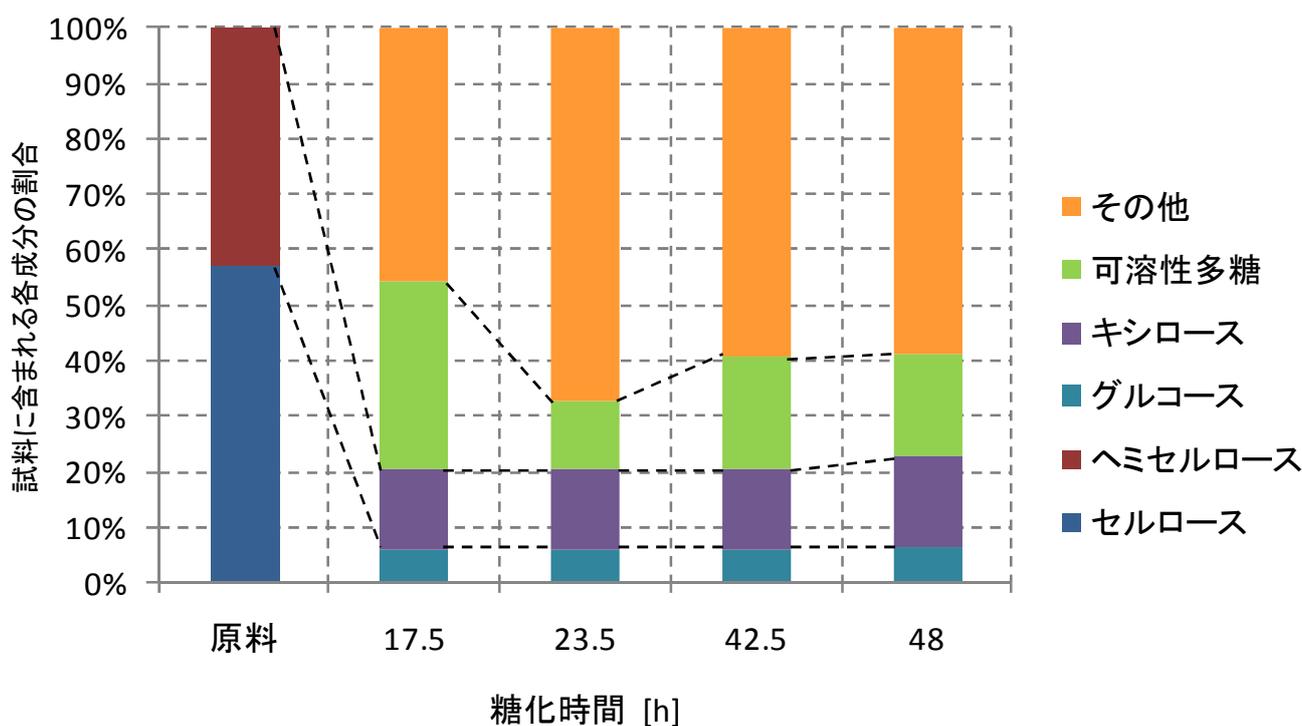


Fig.5-1-7 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-6)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		K-7
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	1

原料[g]		3.00
溶液量[ml]		500
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]		50

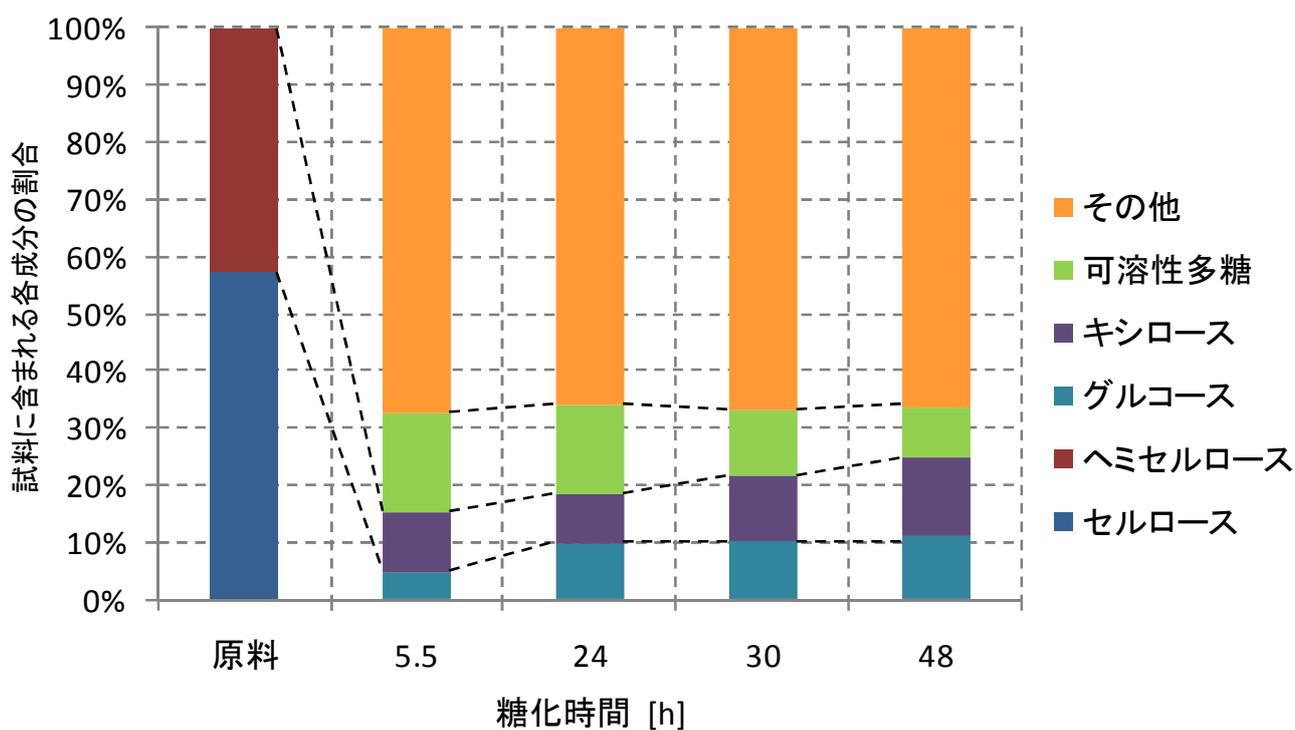


Fig.5-1-8 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-7)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		K-8
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

原料[g]		3.00
溶液量[ml]		500
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]		50

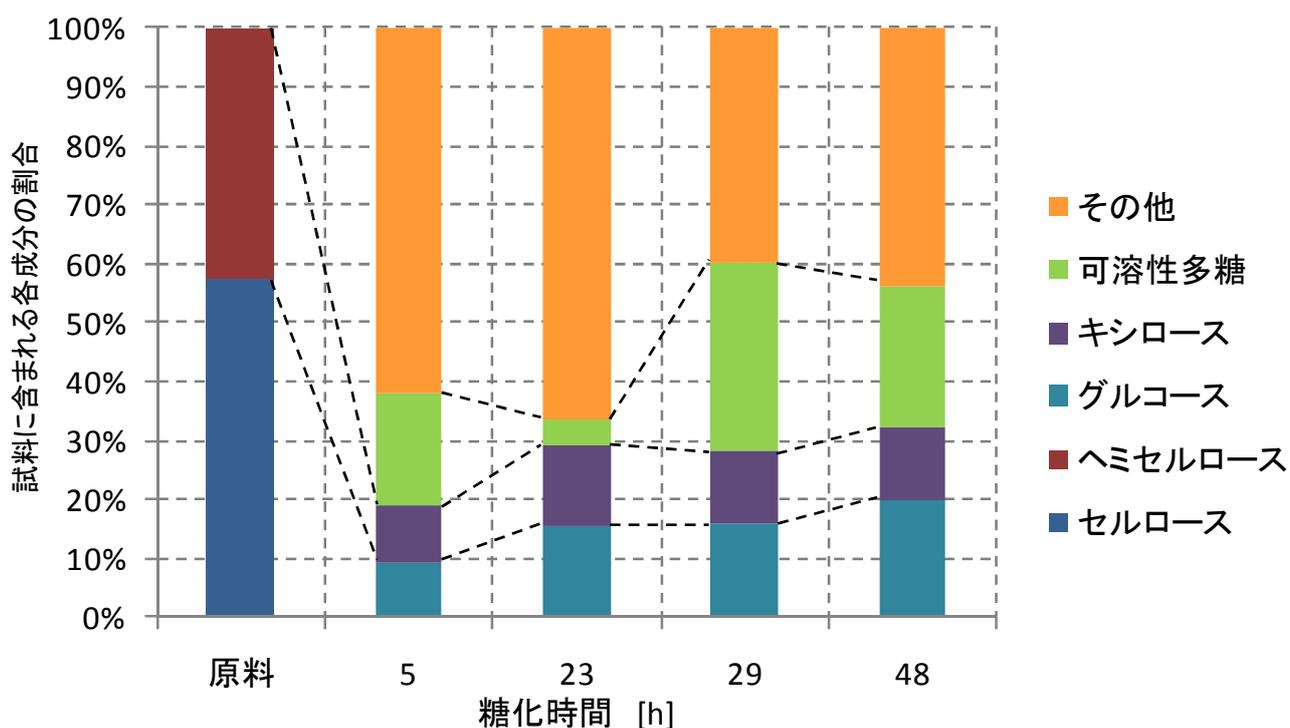


Fig.5-1-9 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-8)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		K-9
1段目	温度[°C]	200
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	240
	時間[min]	1

原料[g]		3.00
溶液量[ml]		500
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]		50

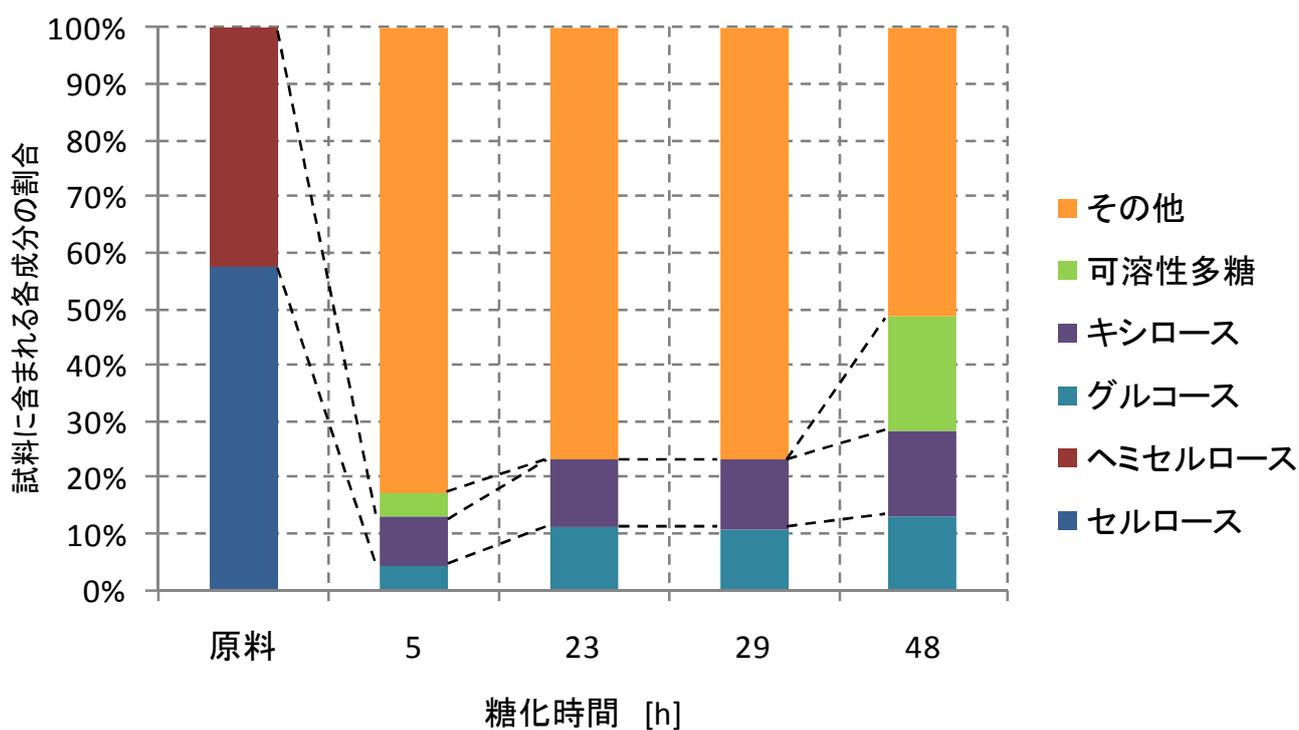


Fig.5-1-10 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-9)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		K-10
1段目	温度[°C]	200
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	240
	時間[min]	10

原料[g]		3.00
溶液量[ml]		500
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]		50

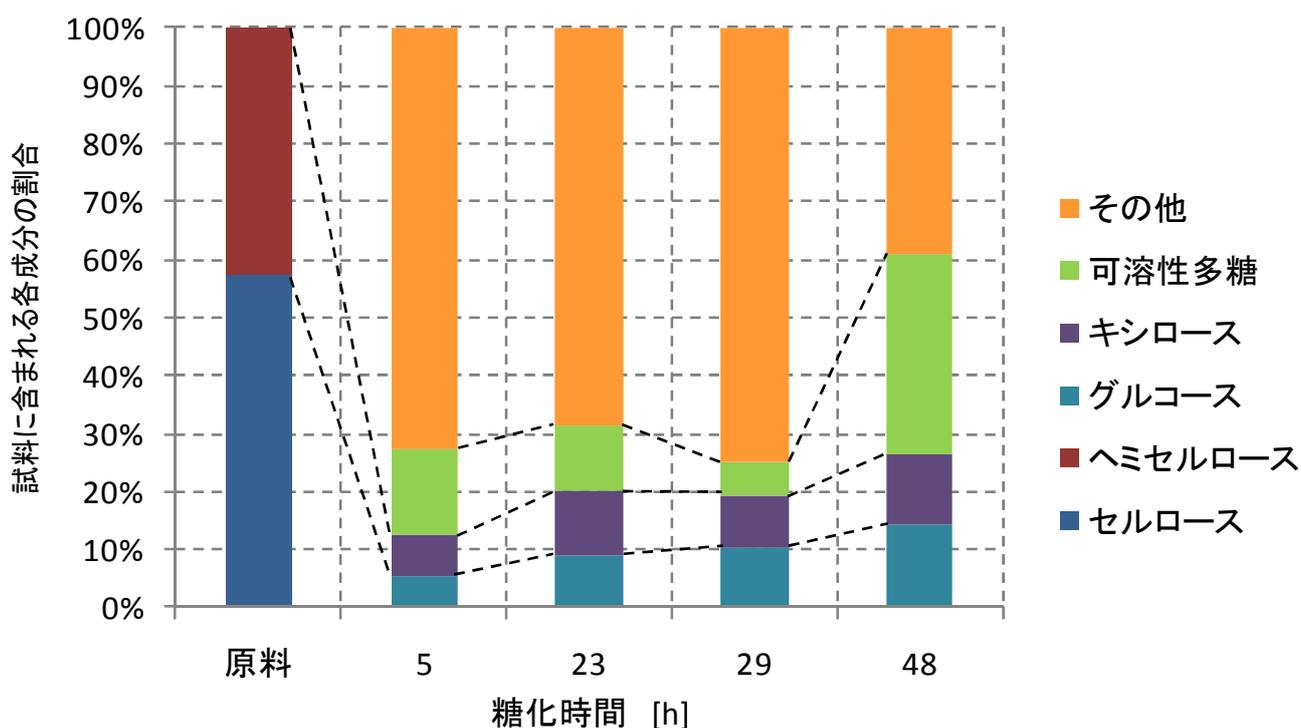


Fig.5-1-11 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-10)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		K-11
1段目	温度[°C]	200
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	1

原料[g]		3.00
溶液量[ml]		500
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]		50

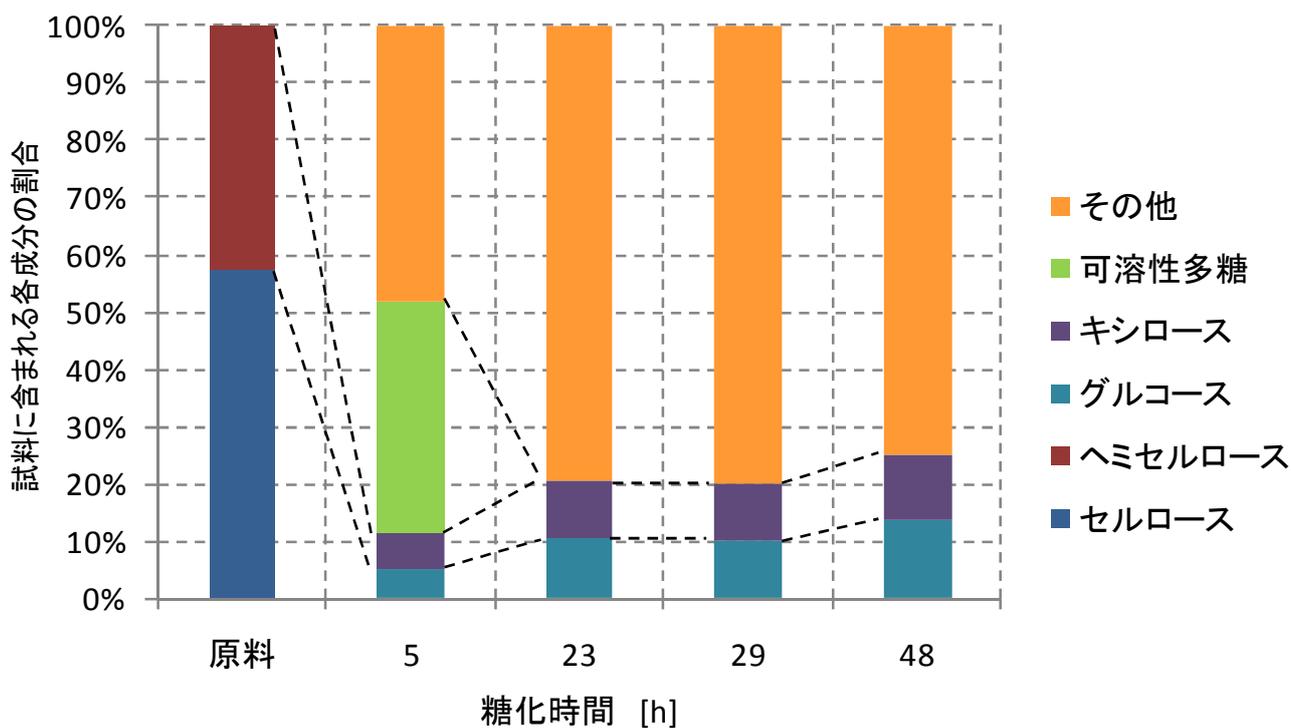


Fig.5-1-12 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-11)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		K-12
1段目	温度[°C]	200
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

原料[g]		3.00
溶液量[ml]		500
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]		50

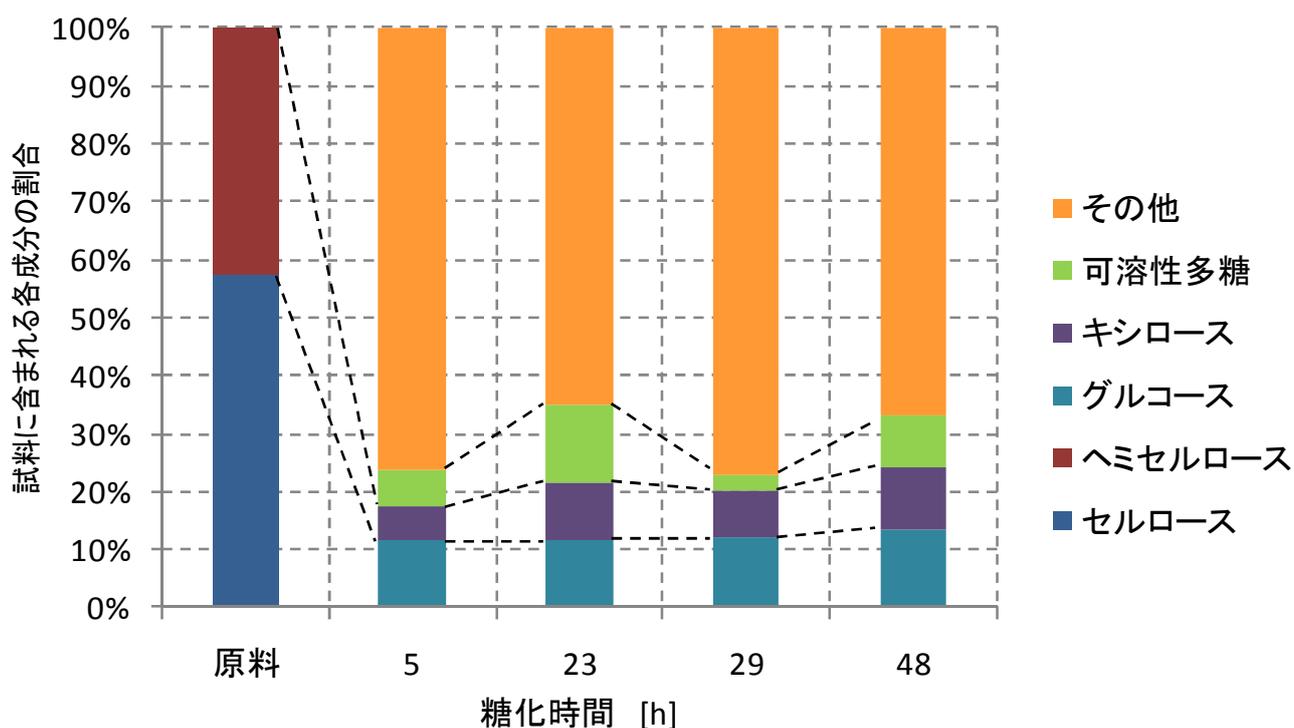
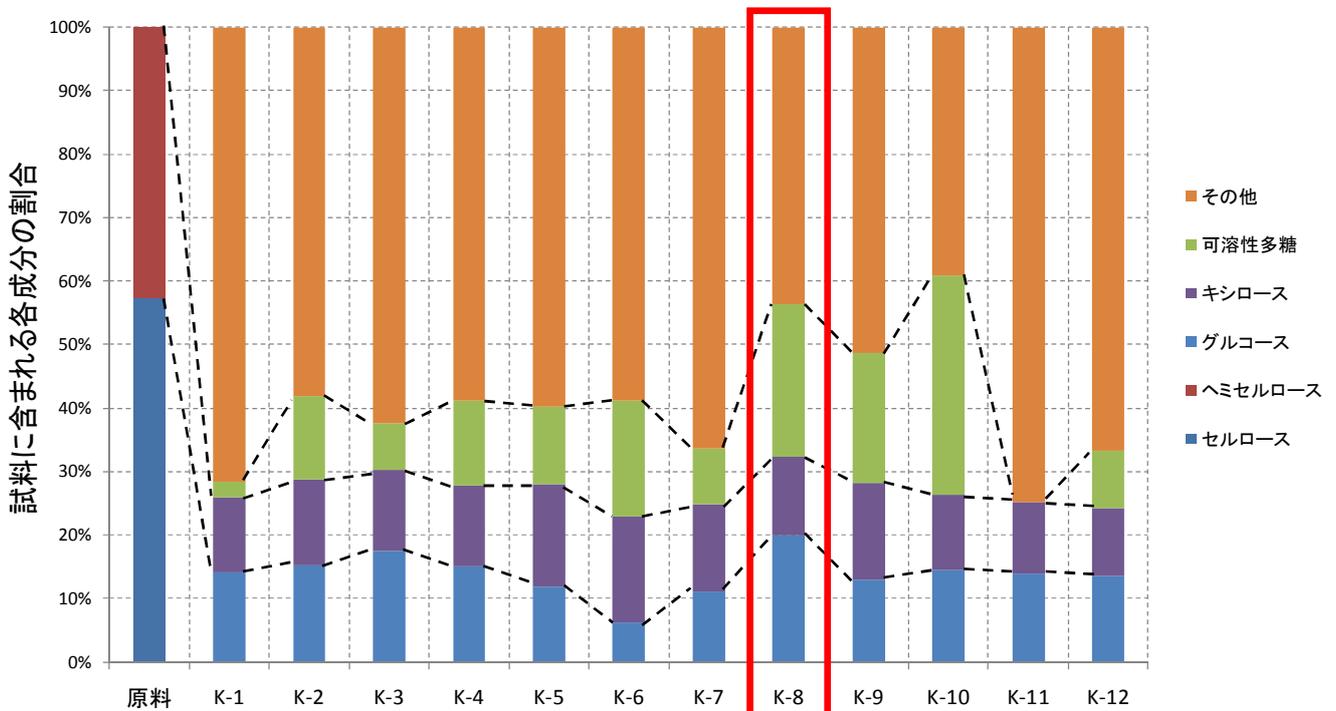


Fig.5-1-13 ケヤキ水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN K-12)

酵素糖化条件

原料(ケヤキ)[g-dry]	3.00	
溶液量[ml]	500	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	



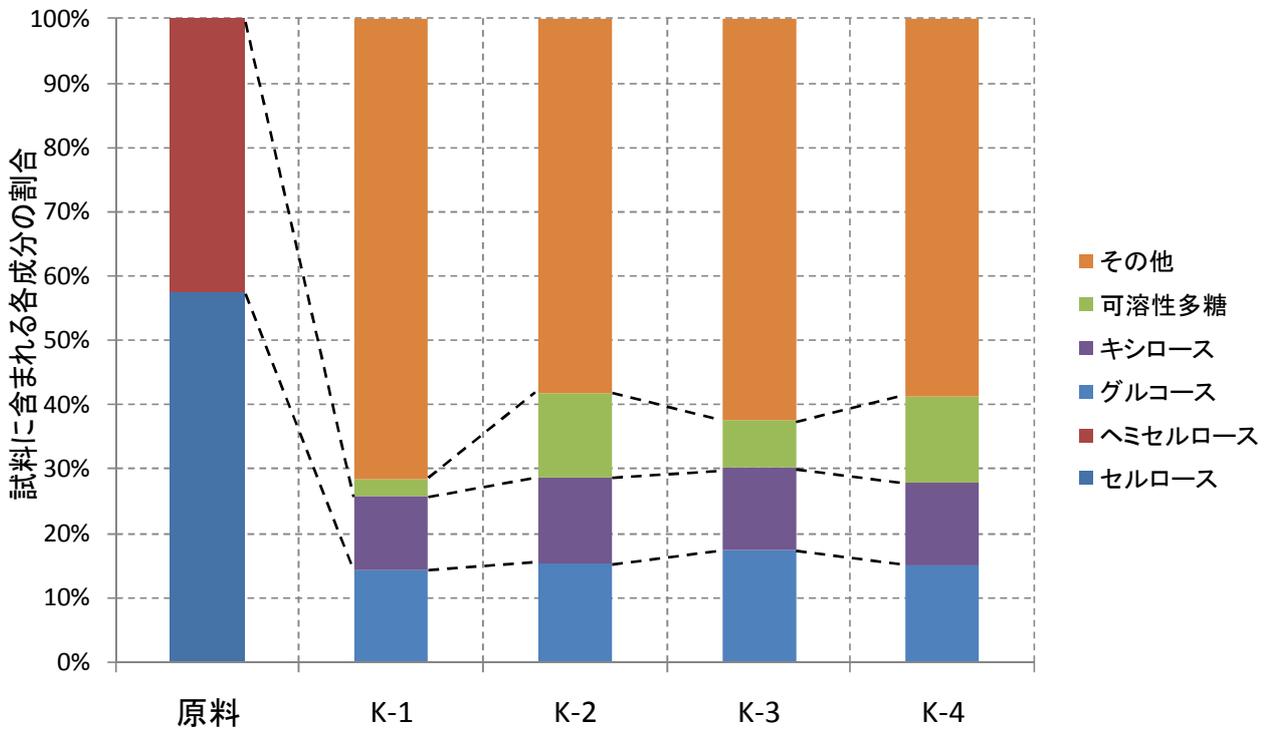
前処理条件

RUN No.		K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7	K-8	K-9	K-10	K-11	K-12
1段目	温度[°C]	180	180	180	180	180	180	180	180	200	200	200	200
	時間[min]	0	0	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10
2段目	温度[°C]	240	240	260	260	240	240	260	260	240	240	260	260
	時間[min]	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10

Fig.5-1-14 ケヤキの水熱爆砕前処理の酵素糖化実験結果

酵素糖化条件

原料(ケヤキ)[g-dry]	3.00	
溶液量[ml]	500	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	

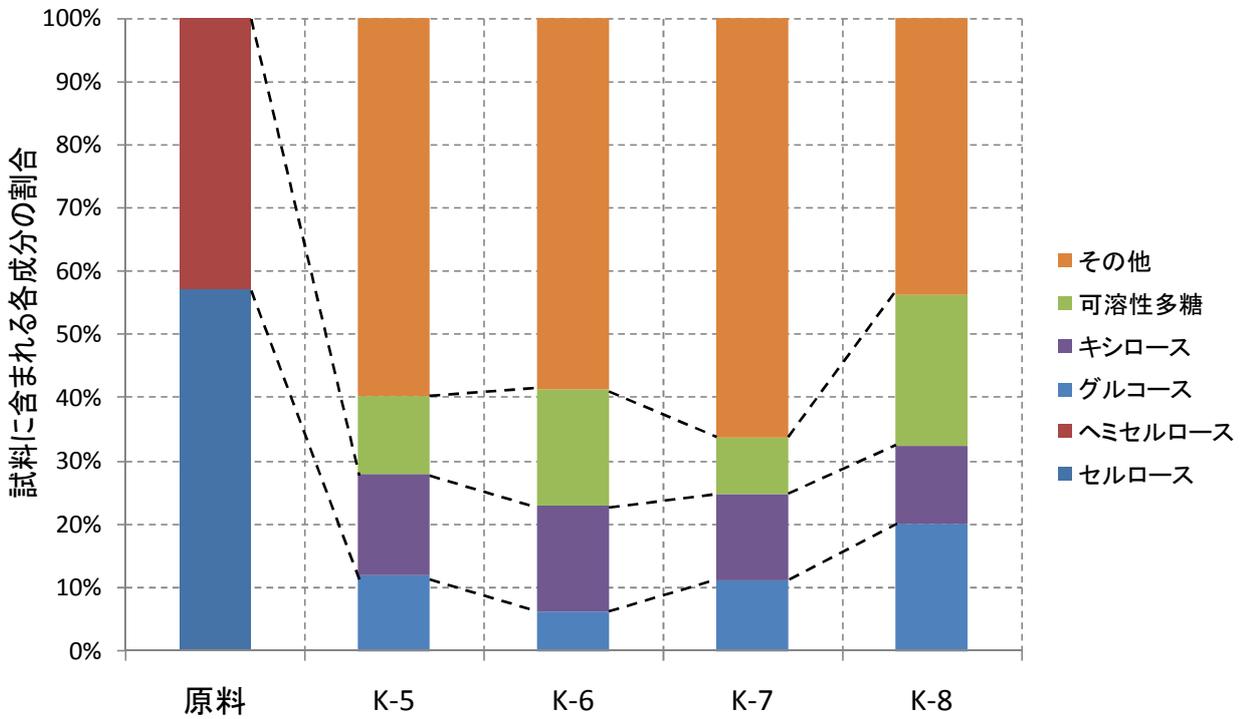


RUN No.		K-1	K-2	K-3	K-4
1段目	温度[°C]	180	180	180	180
	時間[min]	0	0	0	0
2段目	温度[°C]	240	240	260	260
	時間[min]	1	10	1	10

Fig.5-1-15 2段目の温度×時間の影響（1段目：180°C×0minの場合）

酵素糖化条件

原料(ケヤキ)[g-dry]	3.00	
溶液量[ml]	500	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	

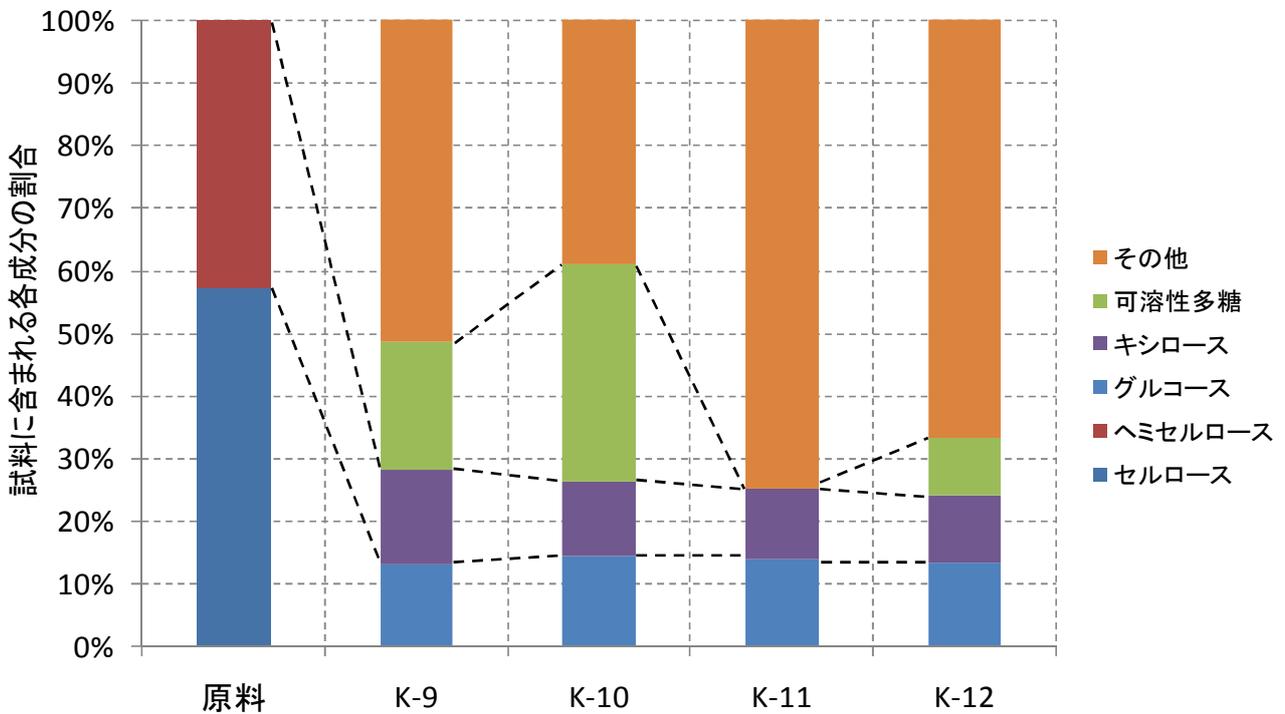


RUN No.		K-5	K-6	K-7	K-8
1段目	温度[°C]	180	180	180	180
	時間[min]	10	10	10	10
2段目	温度[°C]	240	240	260	260
	時間[min]	1	10	1	10

Fig.5-1-16 2段目の温度×時間の影響 (1段目: 180°C×10min の場合)

酵素糖化条件

原料(ケヤキ)[g-dry]		3.00
溶液量[ml]		500
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]		50
糖化時間[h]		48

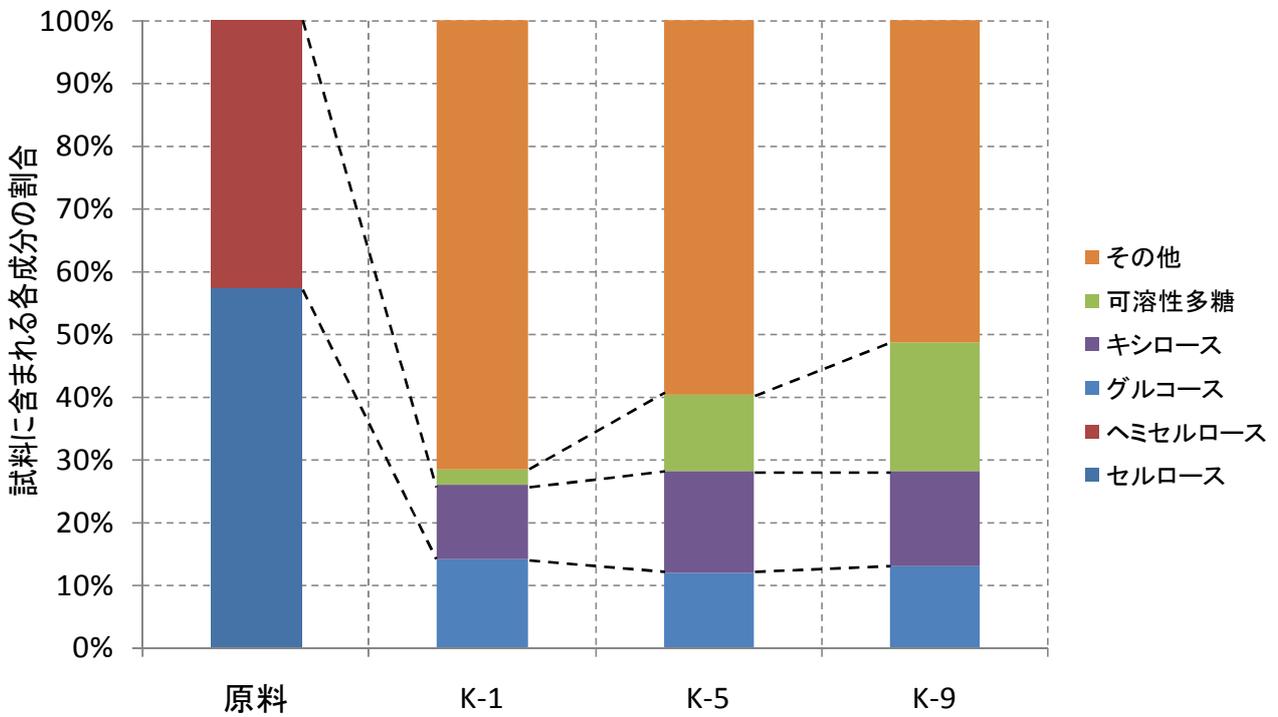


RUN No.		K-9	K-10	K-11	K-12
1段目	温度[°C]	200	200	200	200
	時間[min]	10	10	10	10
2段目	温度[°C]	240	240	260	260
	時間[min]	1	10	1	10

Fig.5-1-17 2段目の温度×時間の影響 (1段目: 200°C×10min の場合)

酵素糖化条件

原料(ケヤキ)[g-dry]	3.00	
溶液量[ml]	500	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	

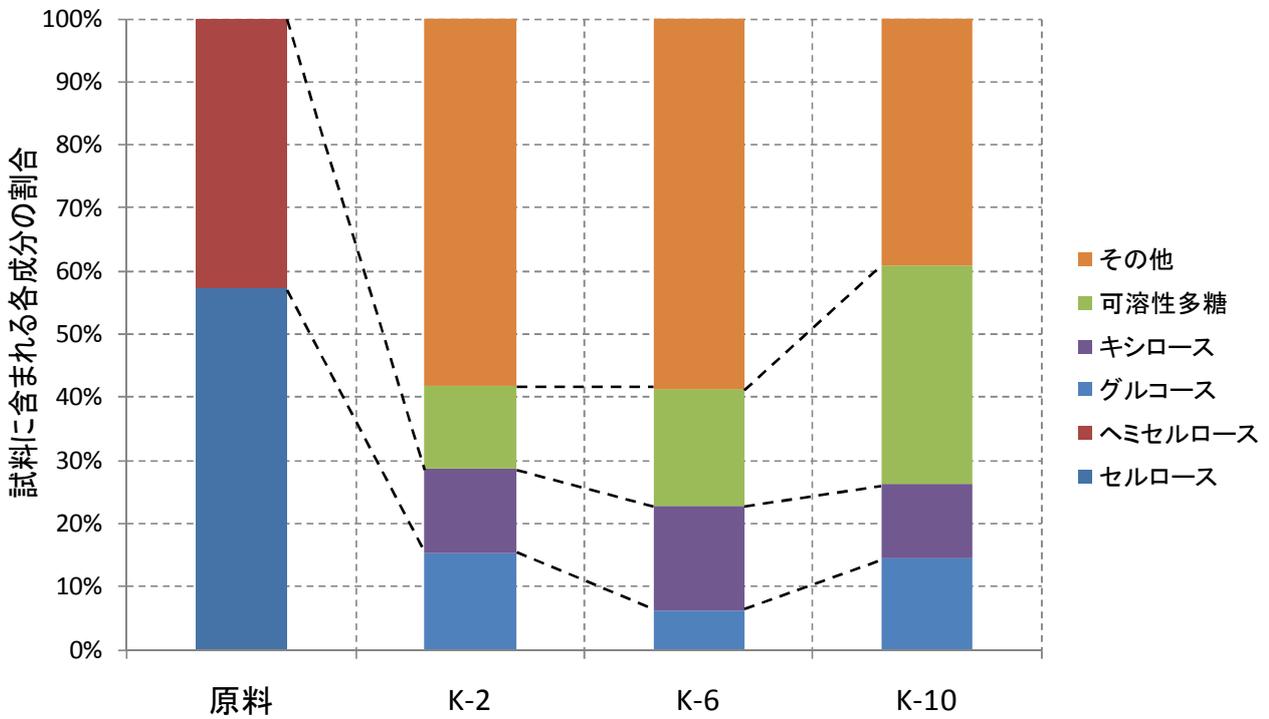


RUN No.		K-1	K-5	K-9
1段目	温度[°C]	180	180	200
	時間[min]	0	10	10
2段目	温度[°C]	240	240	240
	時間[min]	1	1	1

Fig.5-1-18 1段目の温度×時間の影響 (2段目: 240°C×1minの場合)

酵素糖化条件

原料(ケヤキ)[g-dry]	3.00	
溶液量[ml]	500	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	

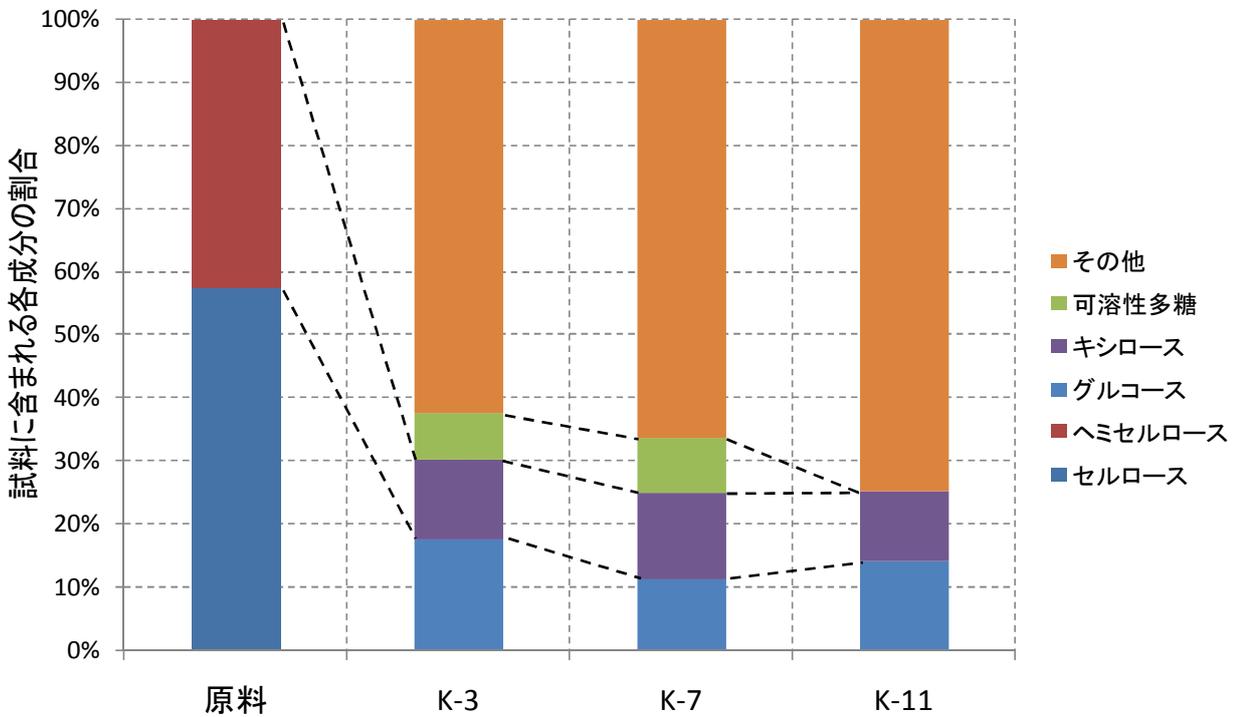


RUN No.		K-2	K-6	K-10
1段目	温度[°C]	180	180	200
	時間[min]	0	10	10
2段目	温度[°C]	240	240	240
	時間[min]	10	10	10

Fig.5-1-19 1段目の温度×時間の影響 (2段目: 240°C×10min の場合)

酵素糖化条件

原料(ケヤキ)[g-dry]	3.00	
溶液量[ml]	500	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	

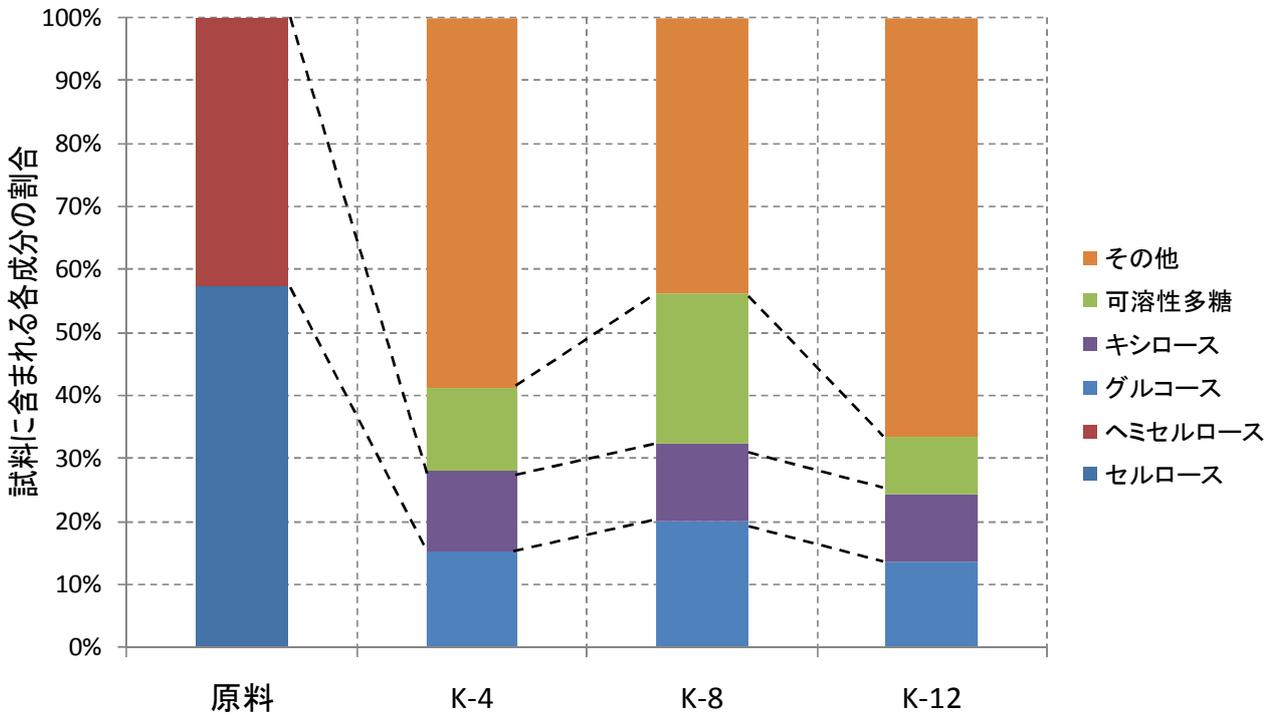


RUN No.		K-3	K-7	K-11
1段目	温度[°C]	180	180	200
	時間[min]	0	10	10
2段目	温度[°C]	260	260	260
	時間[min]	1	1	1

Fig.5-1-20 1段目の温度×時間の影響 (2段目: 260°C×1minの場合)

酵素糖化条件

原料(ケヤキ)[g-dry]	3.00	
溶液量[ml]	500	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	



RUN No.		K-4	K-8	K-12
1段目	温度[°C]	180	180	200
	時間[min]	0	10	10
2段目	温度[°C]	260	260	260
	時間[min]	10	10	10

Fig.5-1-21 1段目の温度×時間の影響 (2段目: 260°C×1minの場合)

## 5-1.2 杉

Fig.5-1-22 から Fig.5-1-33 に各前処理物の酵素糖化率の経時変化を示す。糖化率は時間とともに増加するが、ケヤキと同様に杉も途中で減少する場合もみられた。また、ここでも一般的に採用されている 48 時間後の糖化率で評価することとした。

Fig.5-1-34 に 12 種類の前処理条件の酵素糖化率を一括して示した。この中で、RUN S-4（1 段目：180℃×0min. 2 段目：260℃×10min.）におけるグルコース糖化率が最も高く、キシロース糖化率および可溶性多糖類も高い値を示したため、この条件が適正条件であると考えられた。

Fig.5-1-35 から Fig.5-1-41 に 1 段目および 2 段目の条件と各糖化率との関係を示した。

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		S-1
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	0
2段目	温度[°C]	240
	時間[min]	1

原料(杉)[g-dry]		1.50
溶液量[ml]		550
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]		50

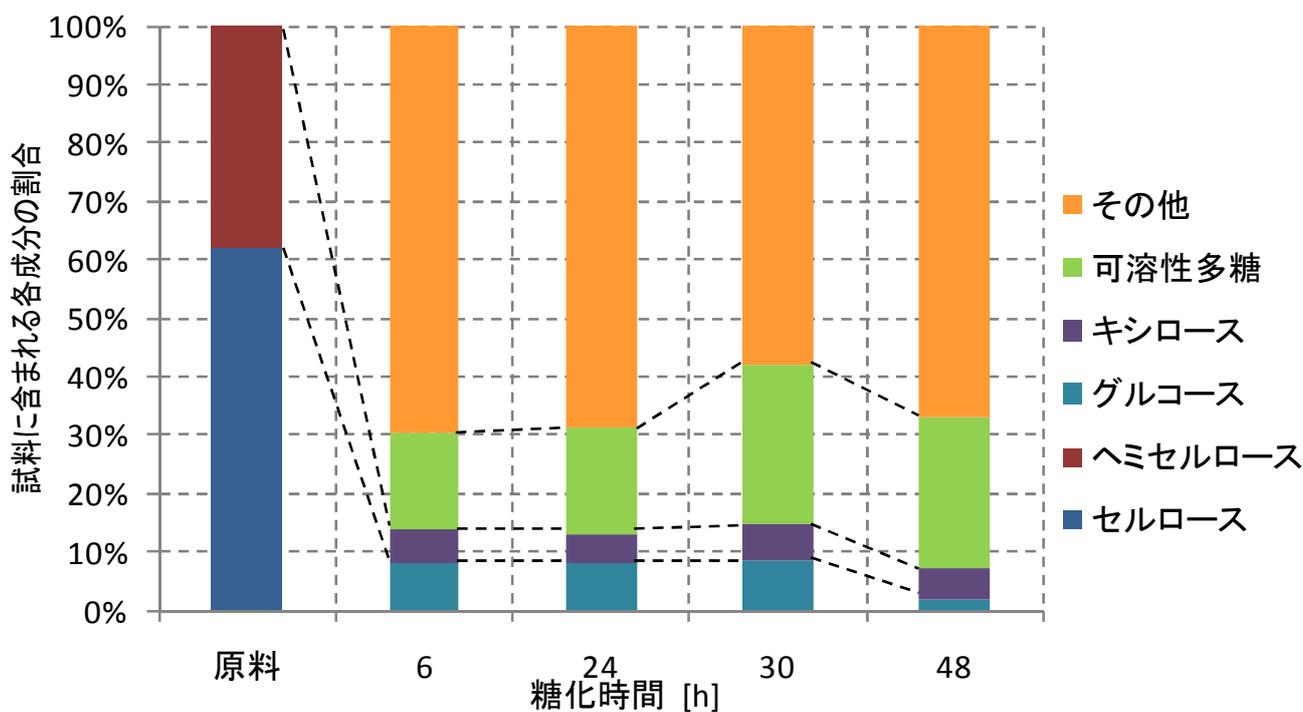


Fig.5-1-22 杉水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN S-1)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		S-2
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	0
2段目	温度[°C]	240
	時間[min]	10

原料(杉)[g-dry]		1.50
溶液量[ml]		550
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]		50

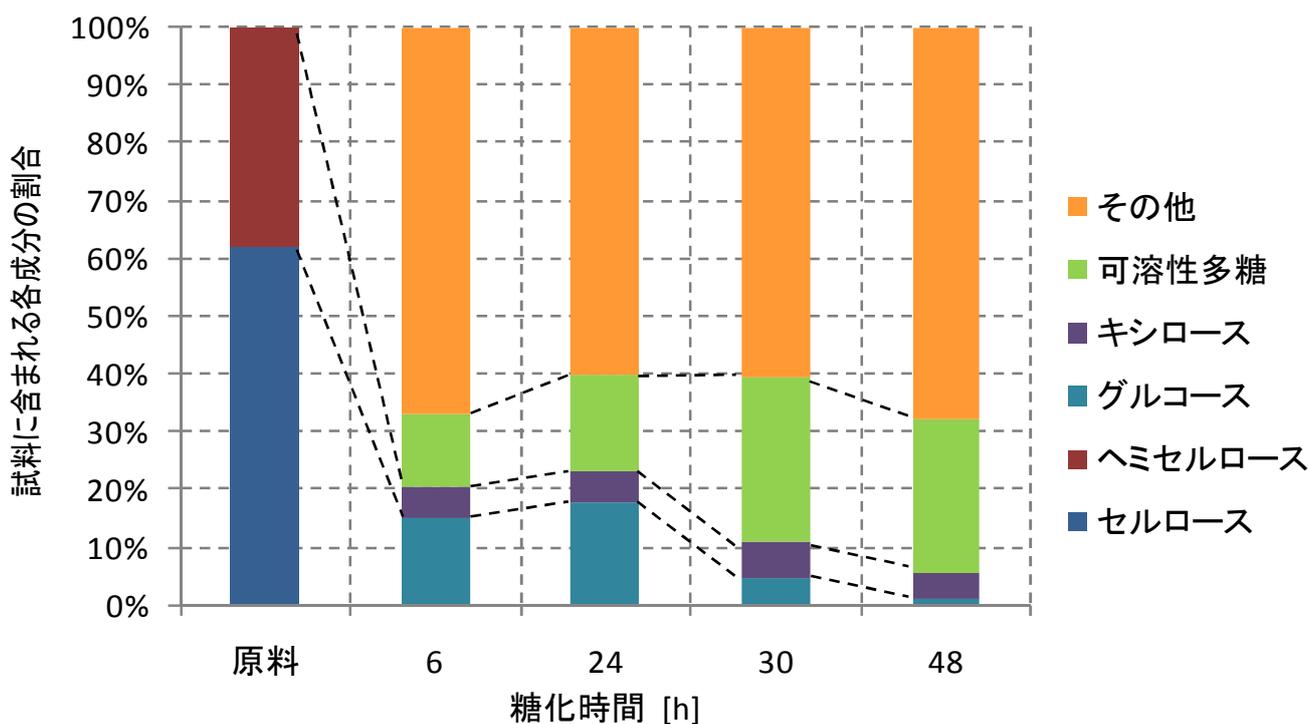


Fig.5-1-23 杉水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN S-2)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		S-3
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	0
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	1

原料(杉)[g-dry]		1.50
溶液量[ml]		550
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]		50

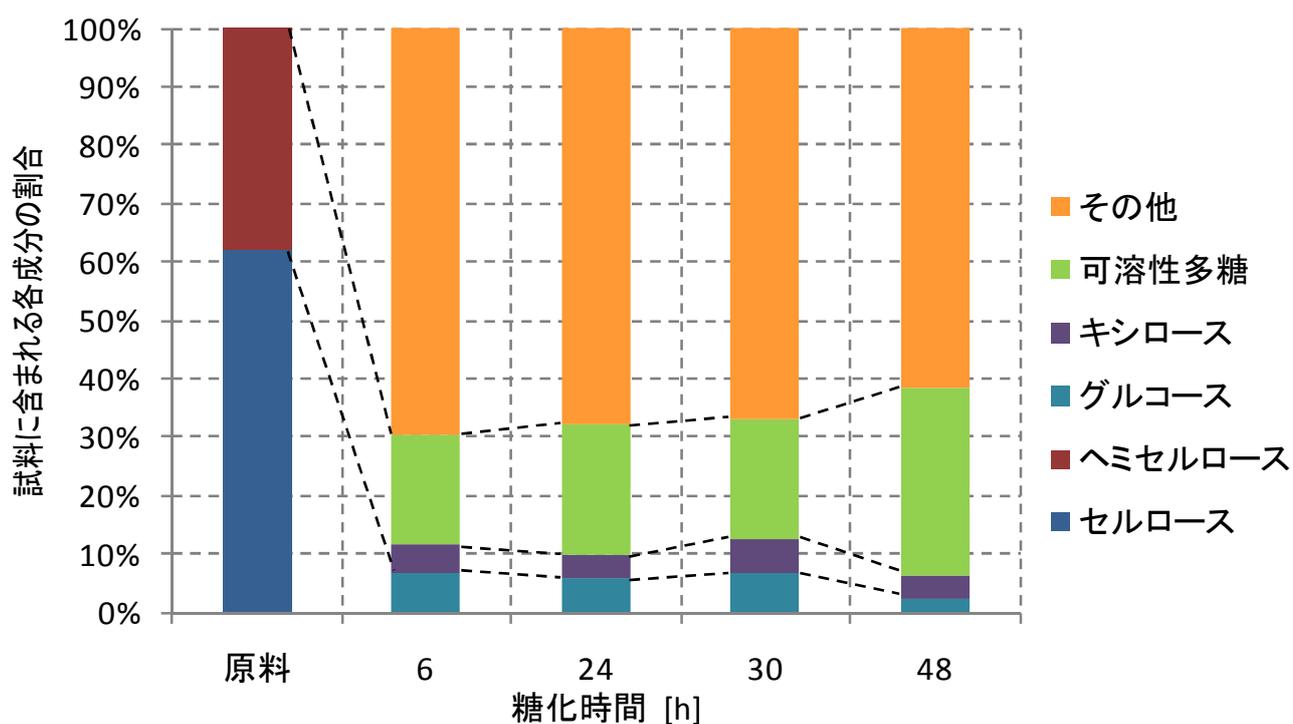


Fig.5-1-24 杉水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN S-3)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		S-4
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	0
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

原料(杉)[g-dry]		1.50
溶液量[ml]		550
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]		50

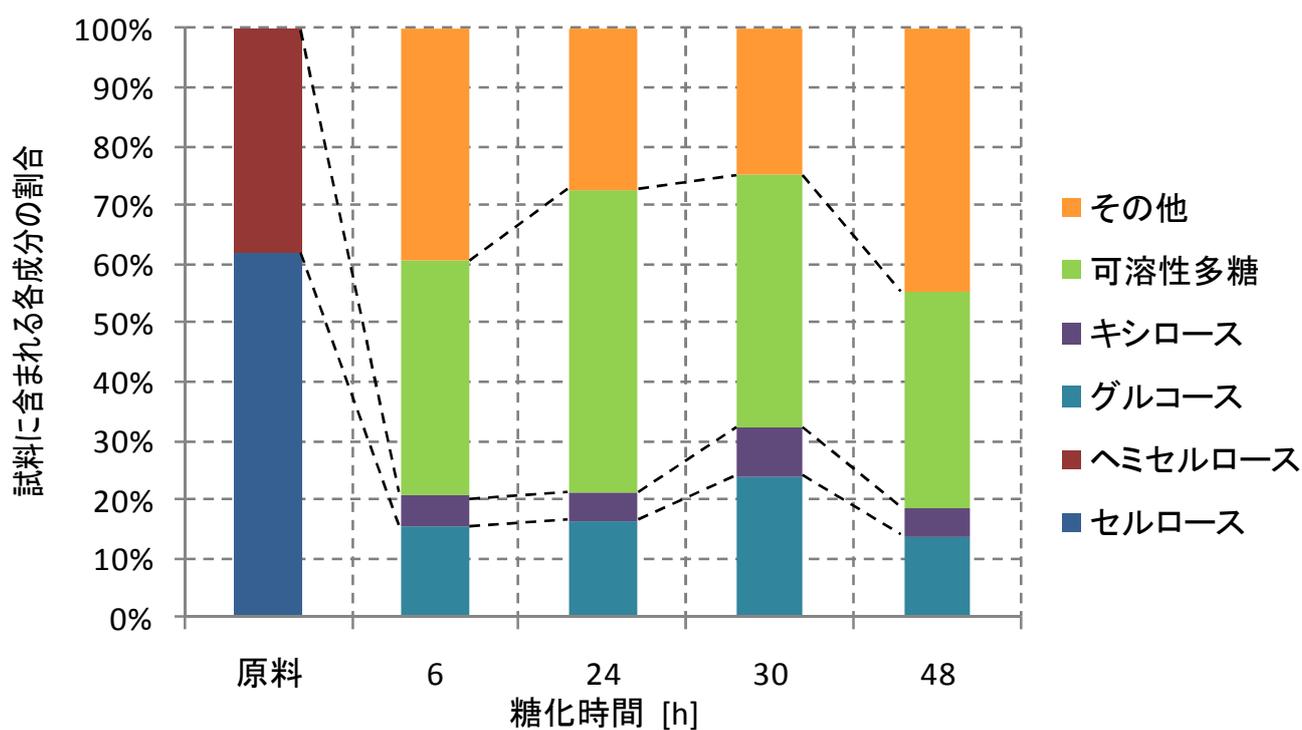


Fig.5-1-25 杉水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN S-4)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		S-5
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	240
	時間[min]	1

原料(杉)[g-dry]		1.50
溶液量[ml]		550
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]		50

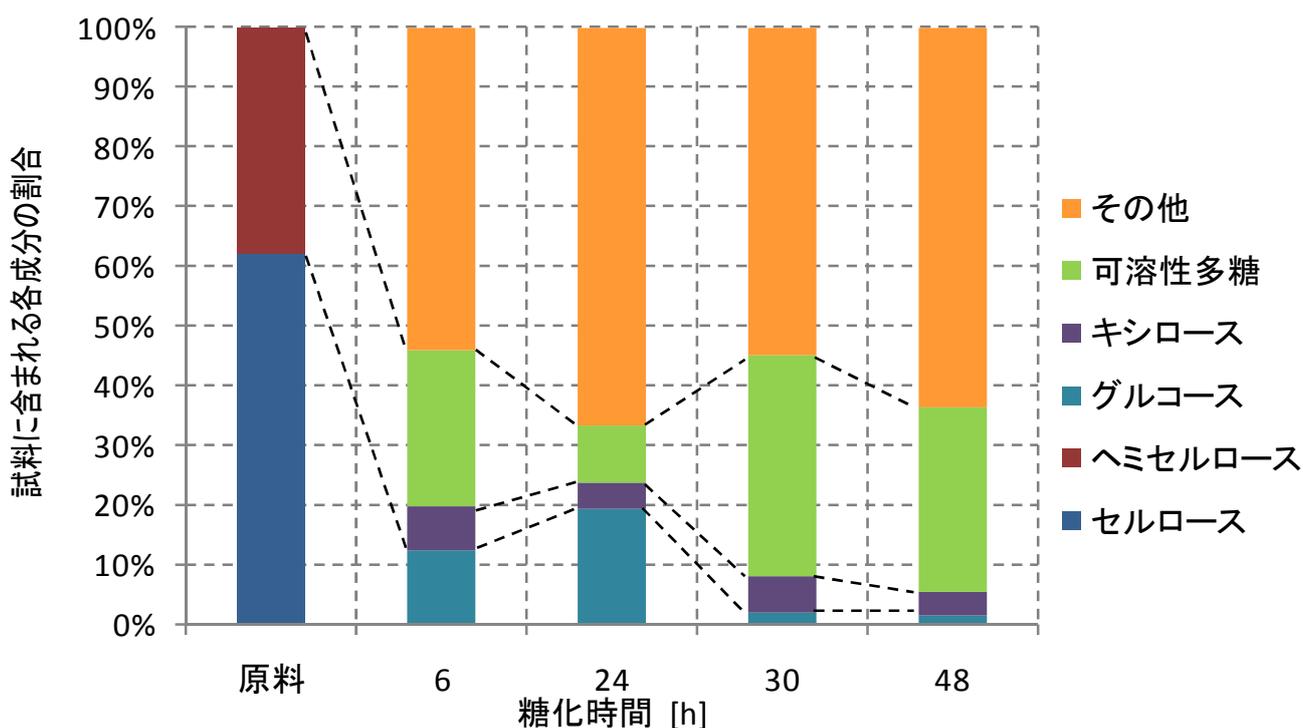


Fig.5-1-26 杉水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN S-5)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		S-6
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	240
	時間[min]	10

原料(杉)[g-dry]		1.50
溶液量[ml]		550
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]		50

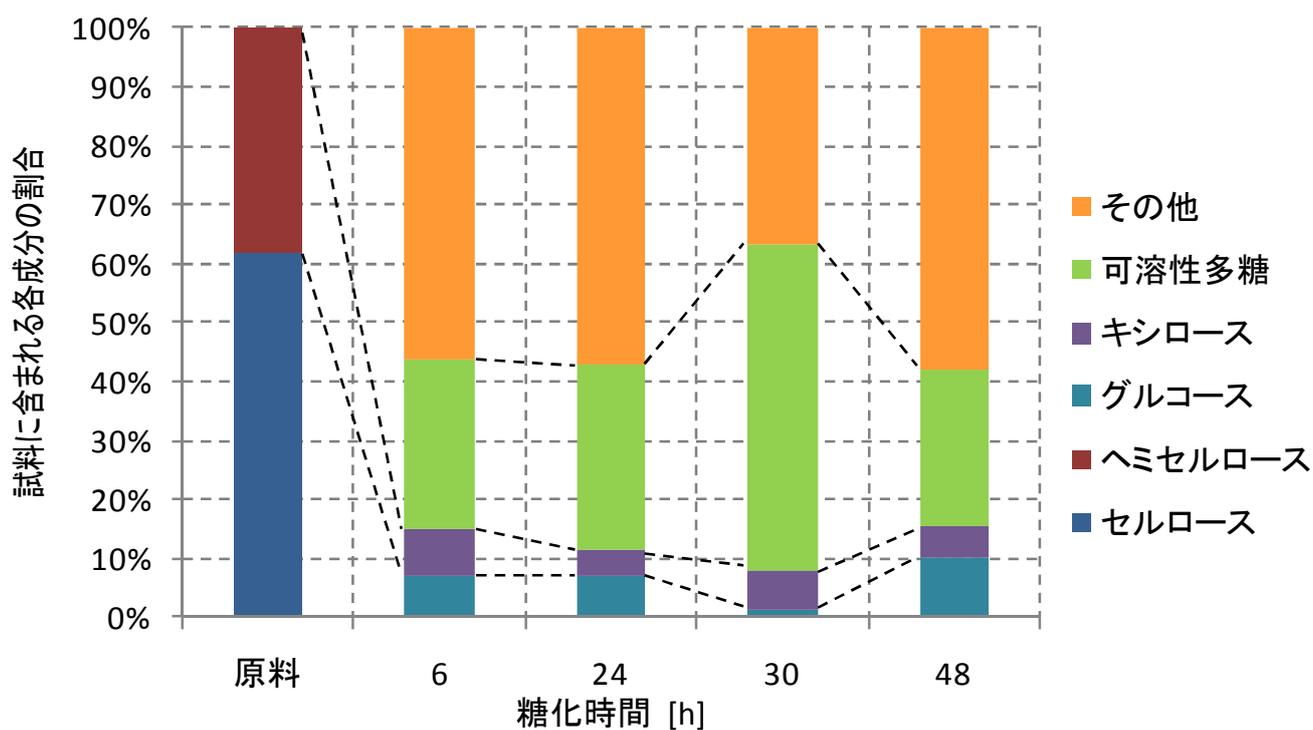


Fig.5-1-27 杉水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN S-6)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		S-7
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	1

原料(杉)[g-dry]		1.50
溶液量[ml]		550
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]		50

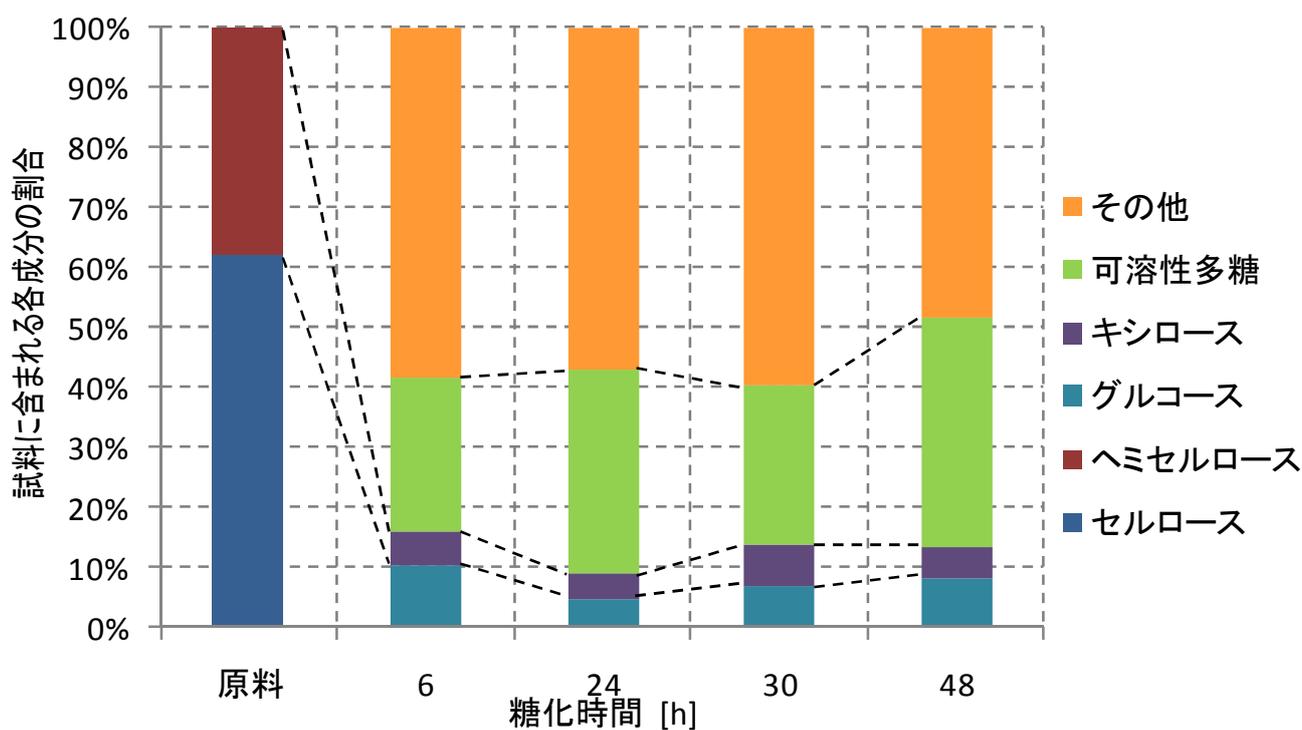


Fig.5-1-28 杉水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN S-7)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		S-8
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

原料(杉)[g-dry]		1.50
溶液量[ml]		550
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]		50

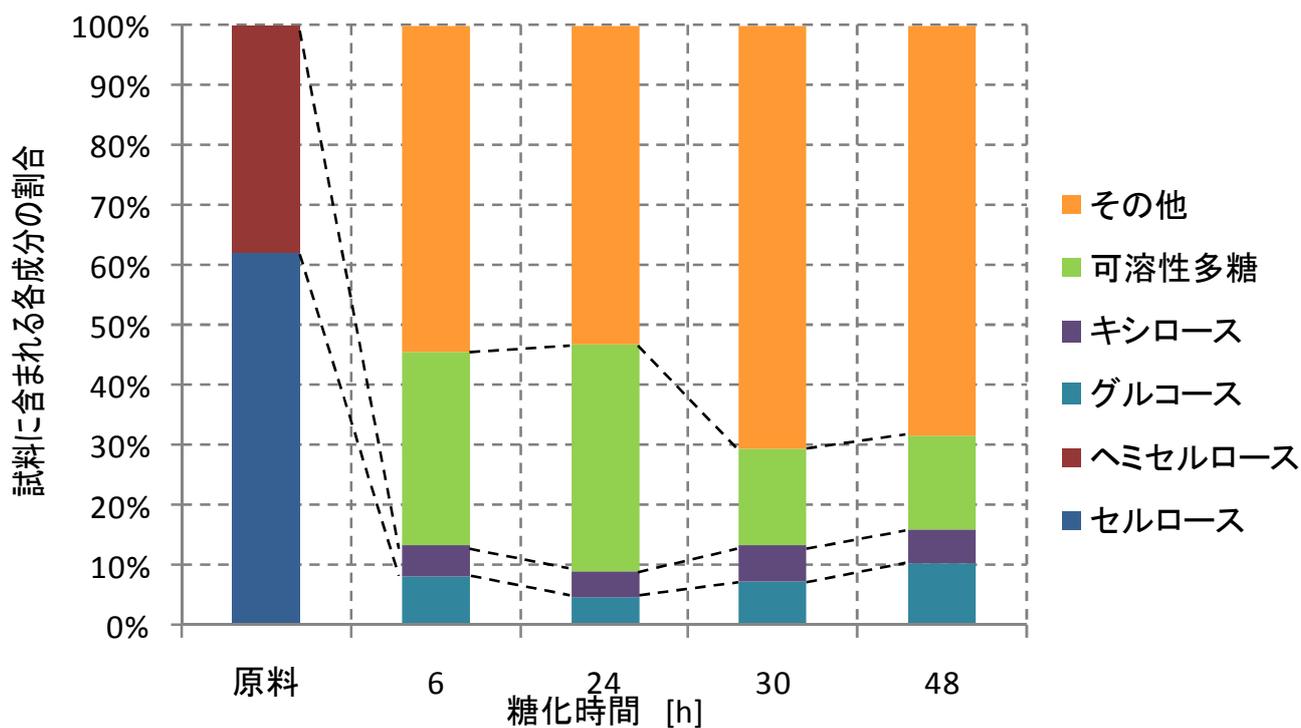


Fig.5-1-29 杉水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN S-8)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		S-9
1 段目	温度[°C]	200
	時間[min]	10
2 段目	温度[°C]	240
	時間[min]	1

原料(杉)[g-dry]		1.50
溶液量[ml]		550
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]		50

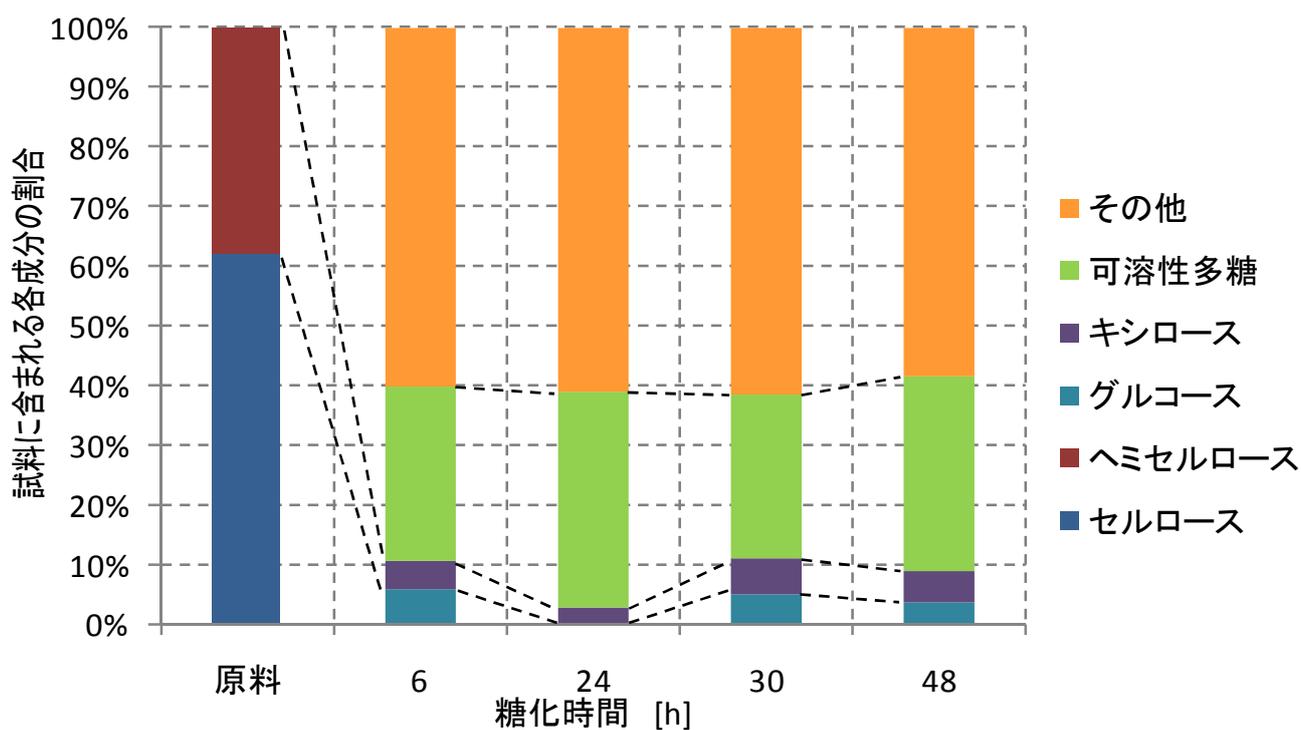


Fig.5-1-30 杉水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN S-9)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		S-10
1段目	温度[°C]	200
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	240
	時間[min]	10

原料(杉)[g-dry]		1.50
溶液量[ml]		550
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]		50

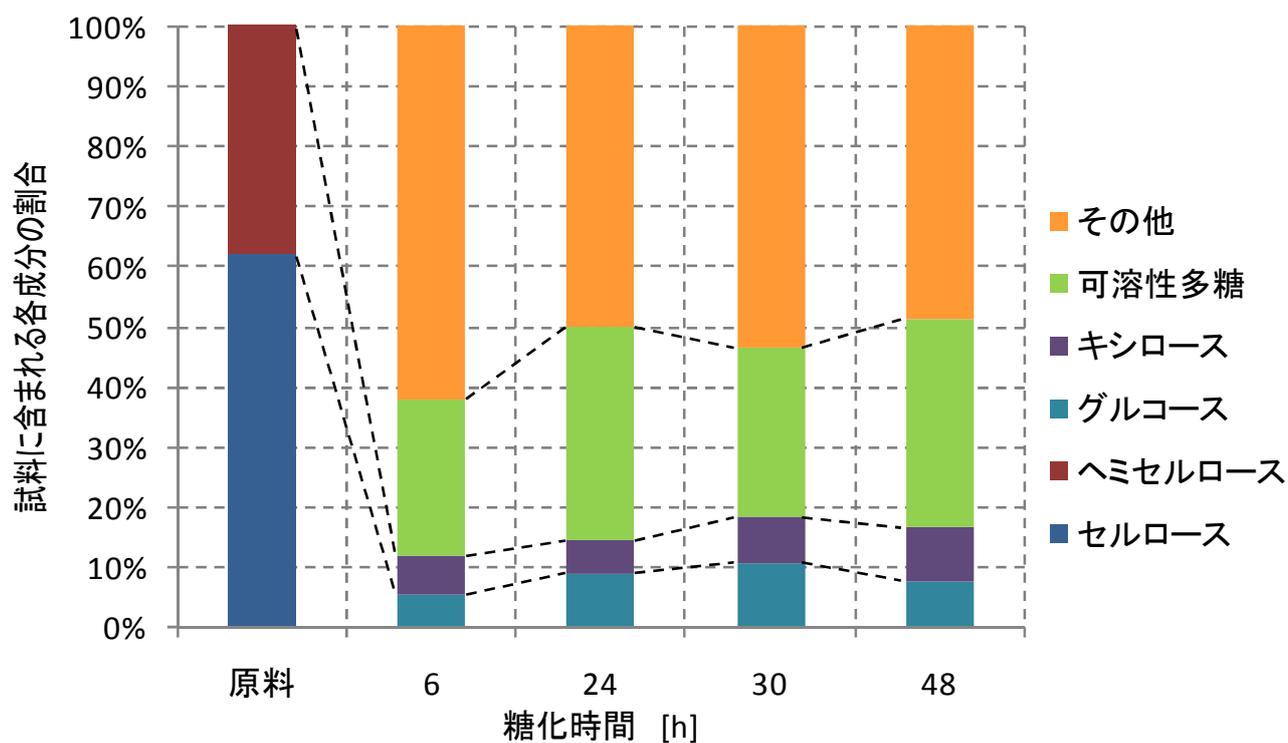


Fig.5-1-31 杉水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN S-10)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		S-11
1段目	温度[°C]	200
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	1

原料(杉)[g-dry]		1.50
溶液量[ml]		550
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]		50

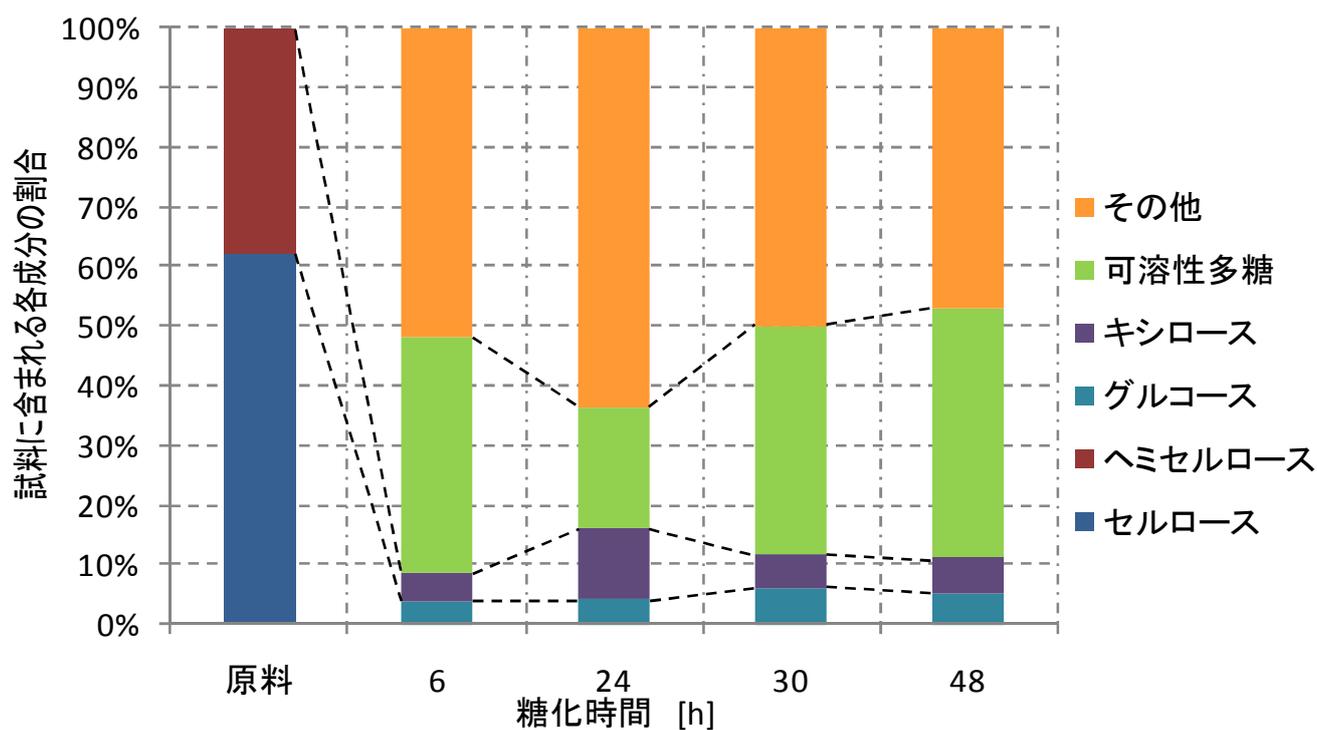


Fig.5-1-32 杉水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN S-11)

前処理条件

酵素糖化条件

RUN No.		S-12
1段目	温度[°C]	200
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

原料(杉)[g-dry]		1.50
溶液量[ml]		550
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]		50

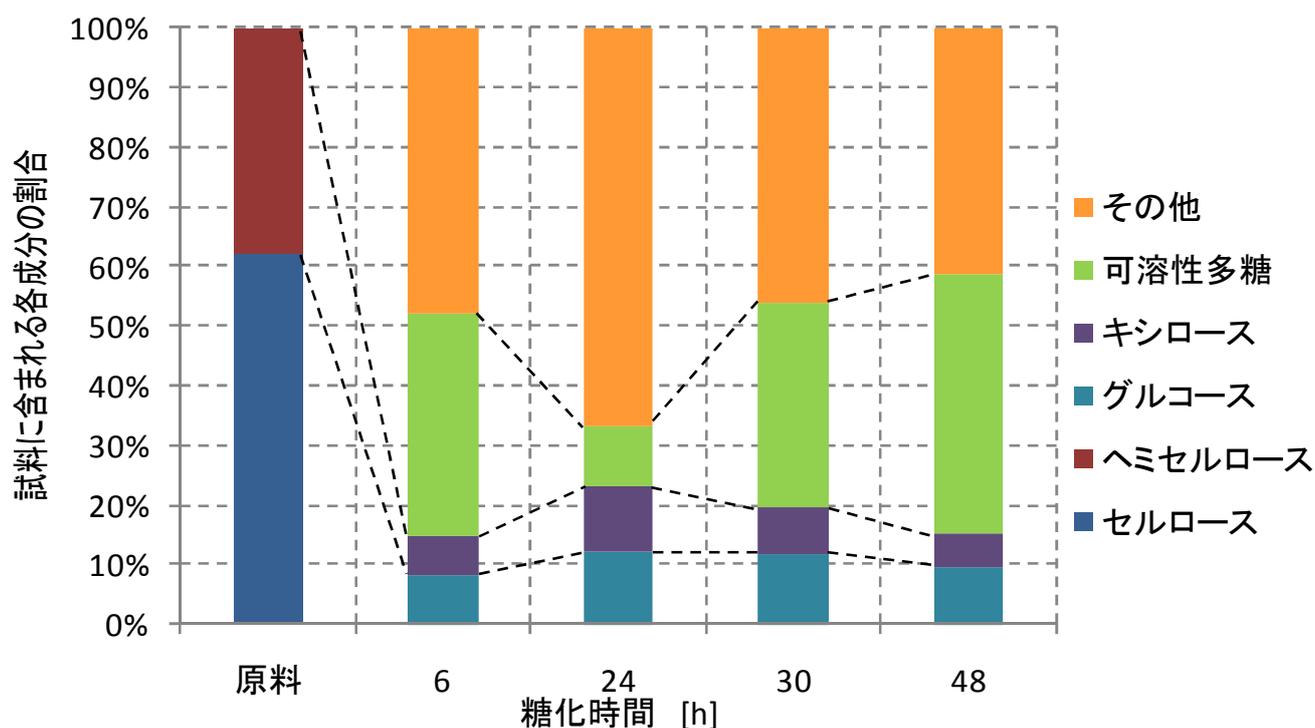
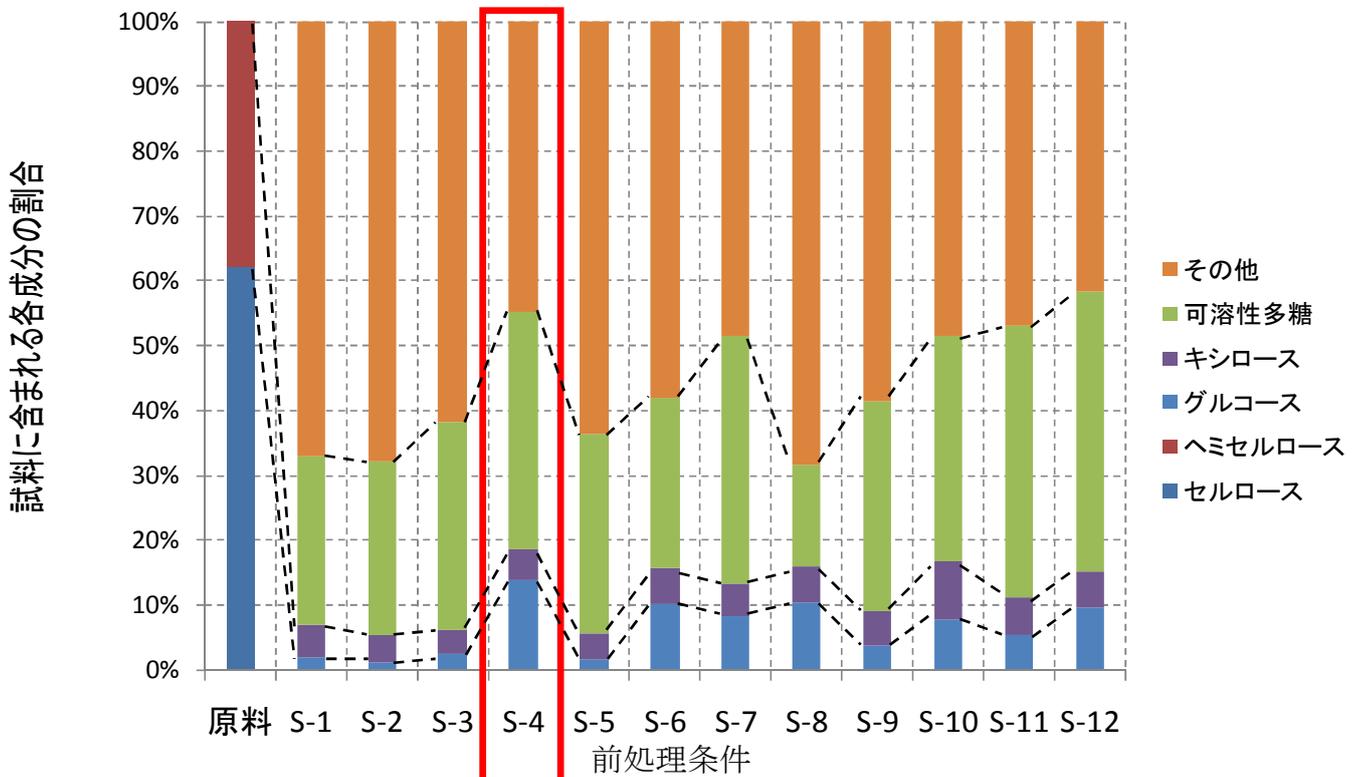


Fig.5-1-33 杉水熱爆砕前処理物の酵素糖化率経時変化 (RUN S-12)

酵素糖化条件

原料(杉)[g-dry]	1.50	
溶液量[ml]	550	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	

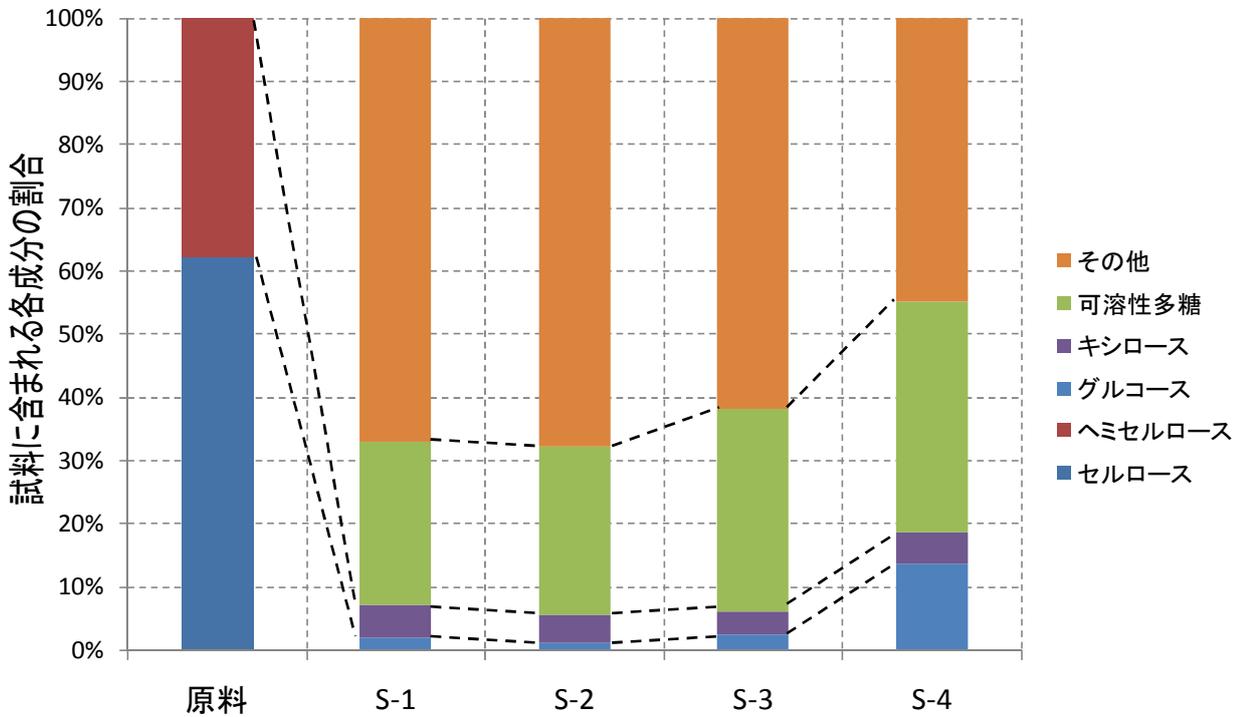


RUN No.		S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9	S-10	S-11	S-12
1段目	温度[°C]	180	180	180	180	180	180	180	180	200	200	200	200
	時間[min]	0	0	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10
2段目	温度[°C]	240	240	260	260	240	240	260	260	240	240	260	260
	時間[min]	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10

Fig.5-1-34 杉の水熱爆砕前処理の酵素糖化実験結果

酵素糖化条件

原料(杉)[g-dry]	1.50	
溶液量[ml]	550	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	

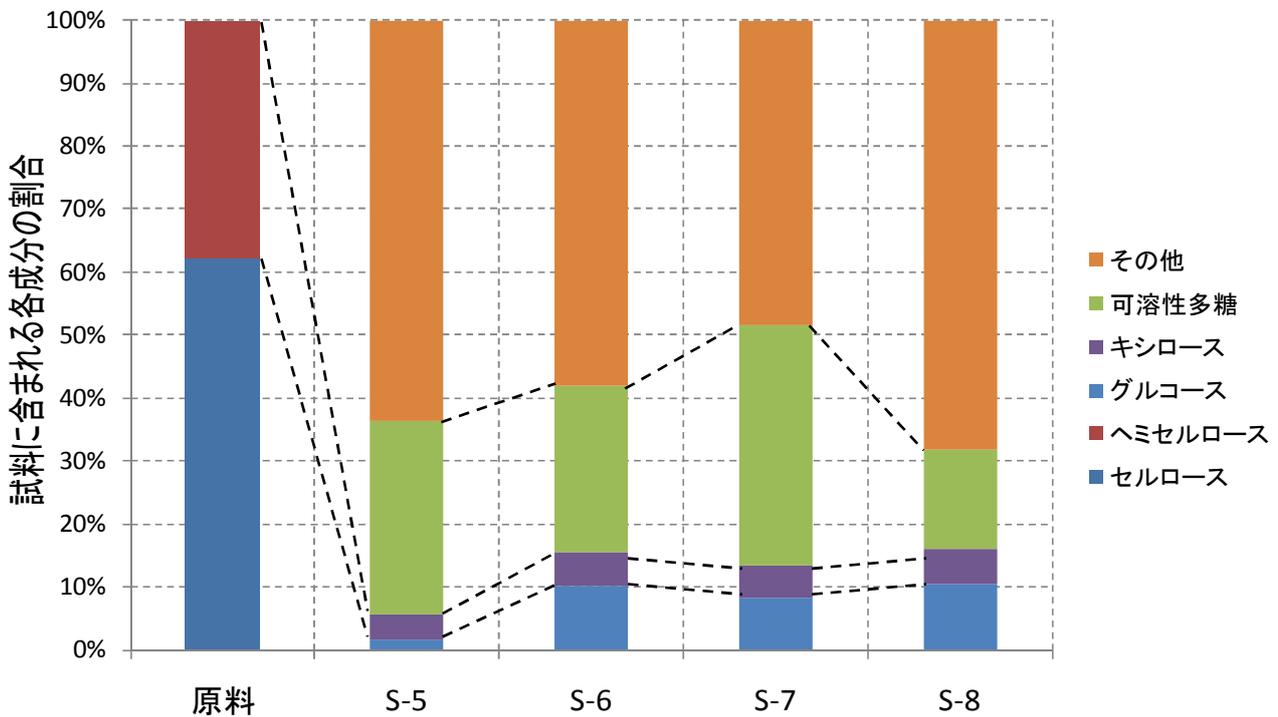


RUN No.		S-1	S-2	S-3	S-4
1段目	温度[°C]	180	180	180	180
	時間[min]	0	0	0	0
2段目	温度[°C]	240	240	260	260
	時間[min]	1	10	1	10

Fig.5-1-35 2段目の温度×時間の影響 (1段目: 180°C×0minの場合)

酵素糖化条件

原料(杉)[g-dry]	1.50	
溶液量[ml]	550	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	

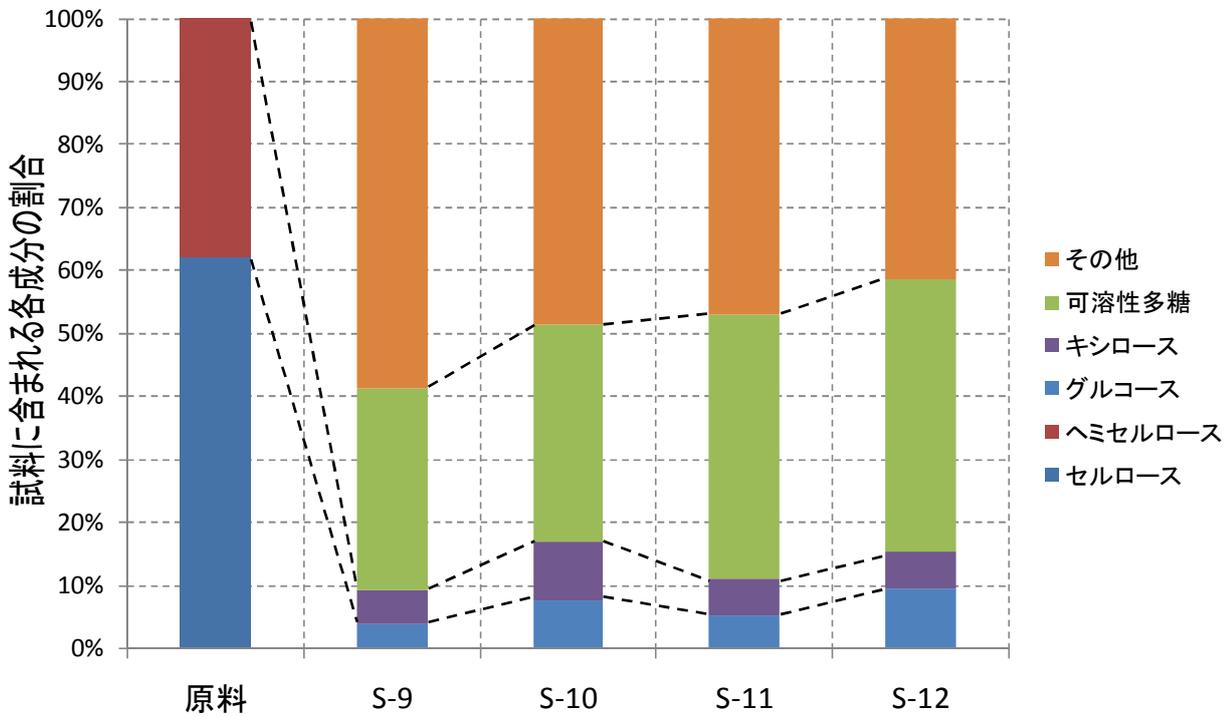


RUN No.		S-5	S-6	S-7	S-8
1段目	温度[°C]	180	180	180	180
	時間[min]	10	10	10	10
2段目	温度[°C]	240	240	260	260
	時間[min]	1	10	1	10

Fig.5-1-36 2段目の温度×時間の影響 (1段目: 180°C×10minの場合)

酵素糖化条件

原料(杉)[g-dry]	1.50	
溶液量[ml]	550	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	

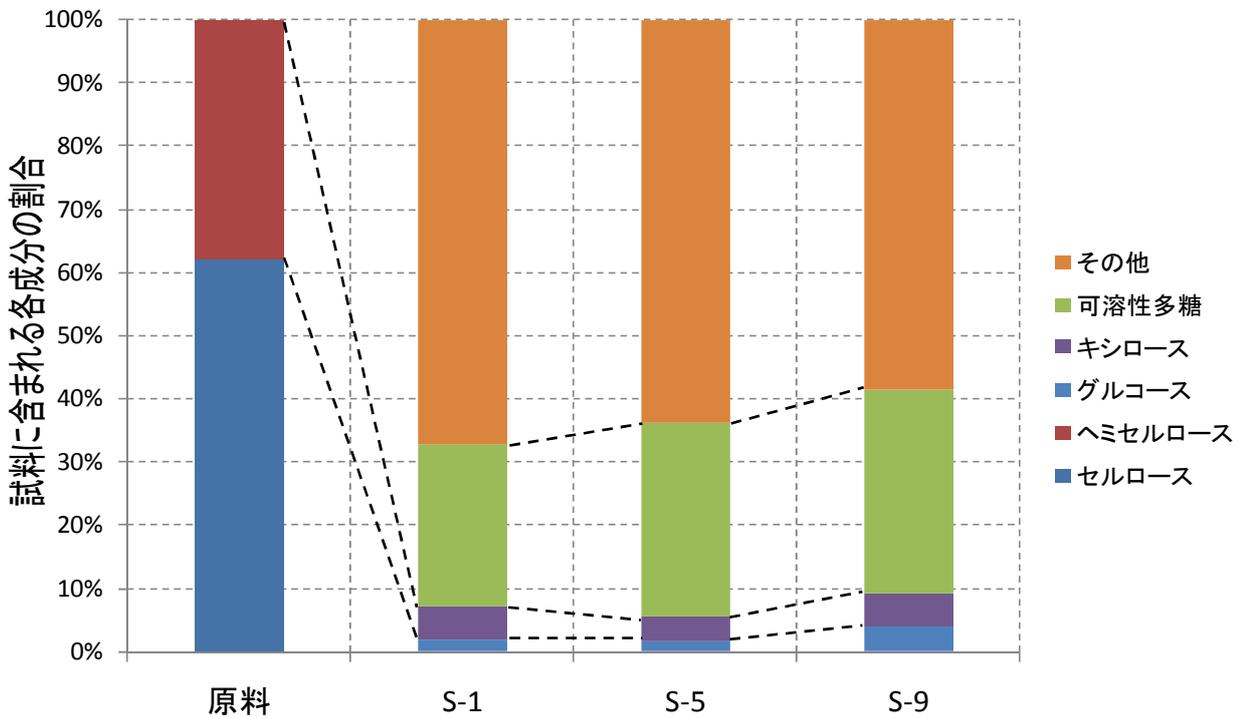


RUN No.		S-9	S-10	S-11	S-12
1段目	温度[°C]	200	200	200	200
	時間[min]	10	10	10	10
2段目	温度[°C]	240	240	260	260
	時間[min]	1	10	1	10

Fig.5-1-37 2段目の温度×時間の影響 (1段目: 260°C×10min の場合)

酵素糖化条件

原料(杉)[g-dry]	1.50	
溶液量[ml]	550	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	

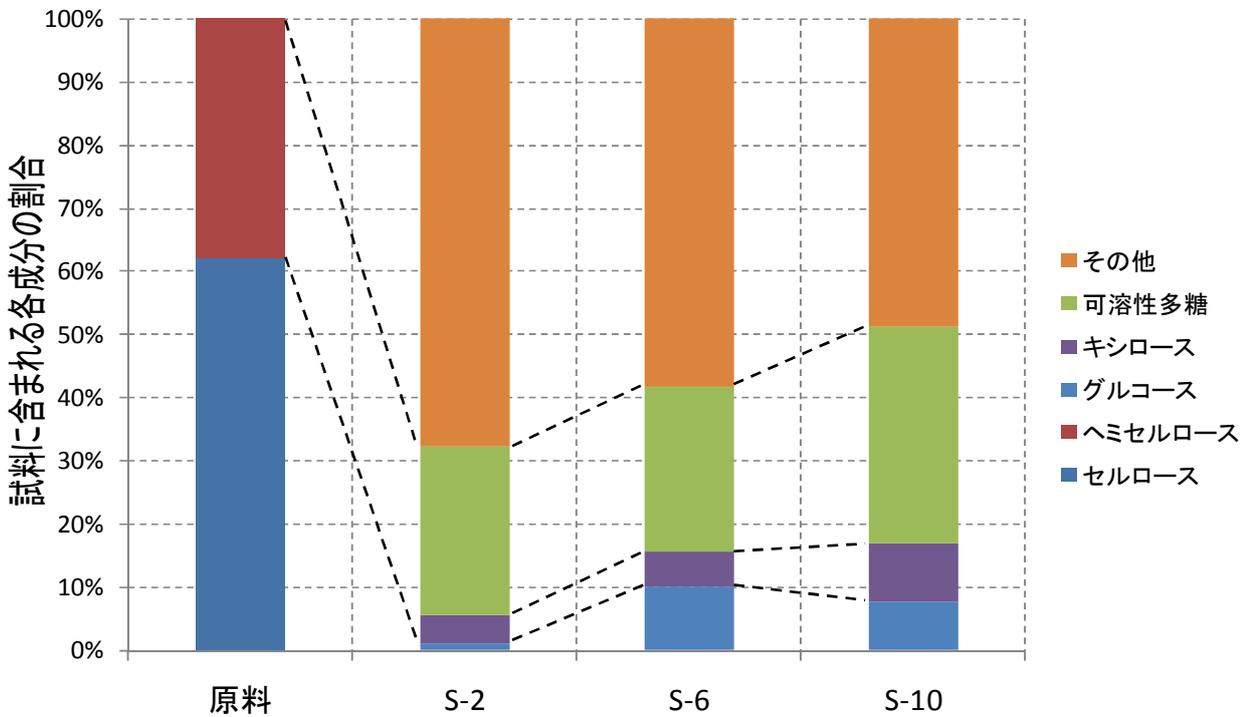


RUN No.		S-1	S-5	S-9
1段目	温度[°C]	180	180	200
	時間[min]	0	10	10
2段目	温度[°C]	240	240	240
	時間[min]	1	1	1

Fig.5-1-38 1段目の温度×時間の影響 (2段目: 240°C×1minの場合)

酵素糖化条件

原料(杉)[g-dry]	1.50	
溶液量[ml]	550	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	

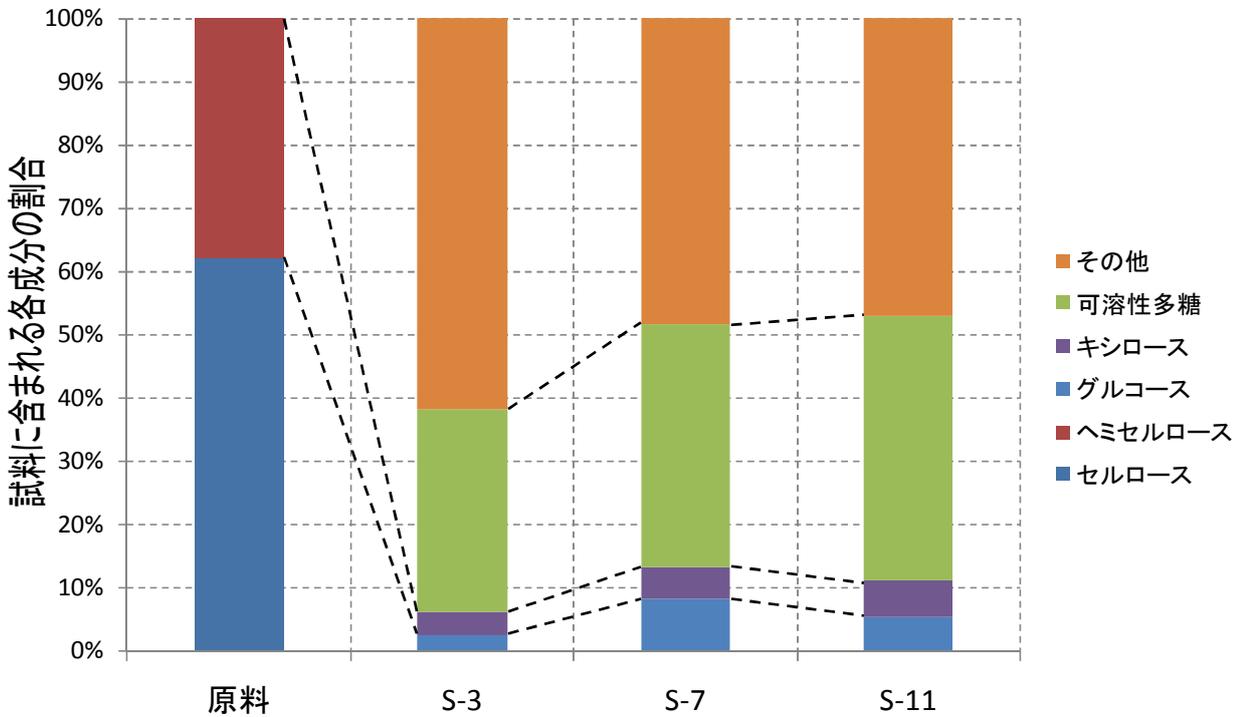


RUN No.		S-2	S-6	S-10
1段目	温度[°C]	180	180	200
	時間[min]	0	10	10
2段目	温度[°C]	240	240	240
	時間[min]	10	10	10

Fig.5-1-39 1段目の温度×時間の影響 (2段目: 240°C×10min の場合)

酵素糖化条件

原料(杉)[g-dry]	1.50	
溶液量[ml]	550	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	

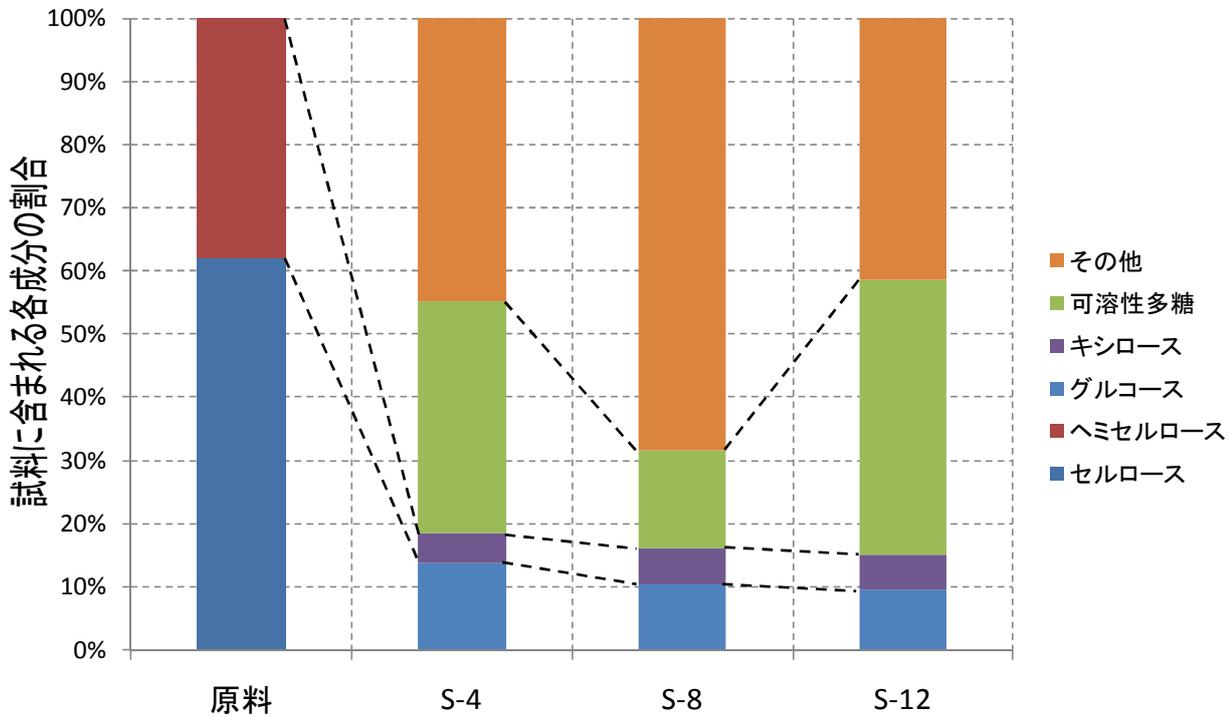


RUN No.		S-3	S-7	S-11
1段目	温度[°C]	180	180	200
	時間[min]	0	10	10
2段目	温度[°C]	260	260	260
	時間[min]	1	1	1

Fig.5-1-40 1段目の温度×時間の影響 (2段目: 260°C×1minの場合)

酵素糖化条件

原料(杉)[g-dry]	1.50	
溶液量[ml]	550	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	



RUN No.		S-4	S-8	S-12
1段目	温度[°C]	180	180	200
	時間[min]	0	10	10
2段目	温度[°C]	260	260	260
	時間[min]	10	10	10

Fig.5-1-41 1段目の温度×時間の影響 (2段目: 260°C×10min の場合)

## 5-2 適正条件下での前処理方法の比較評価結果

### 5-2.1 ケヤキ

Fig.5-2-1,5-2-2,5-2-3 に水熱爆砕、水蒸気爆砕、水熱徐冷前処理物の酵素糖化の経時変化を示す。また、Fig. 5-2-4 に酵素糖化時間4 8時間後の結果を一括して示す。各前処理とも同一条件でそれぞれ3回行い、それぞれの前処理物の酵素糖をおこなった。少々のはらつきはあるが、比較的再現性があることが認められた。

前処理条件

前処理方法		水熱爆砕
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

酵素糖化条件

原料(ケヤキ)[g-dry]	3.00	
溶液量[ml]	500	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]	50	

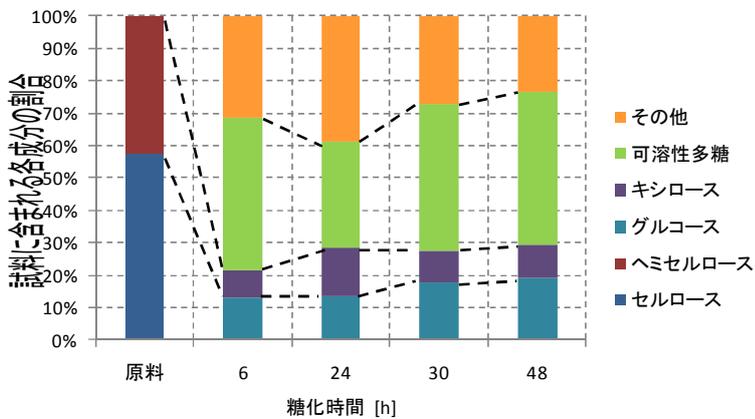
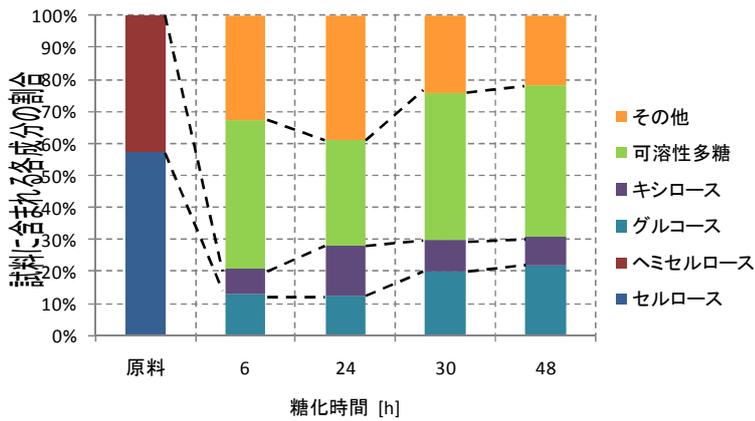
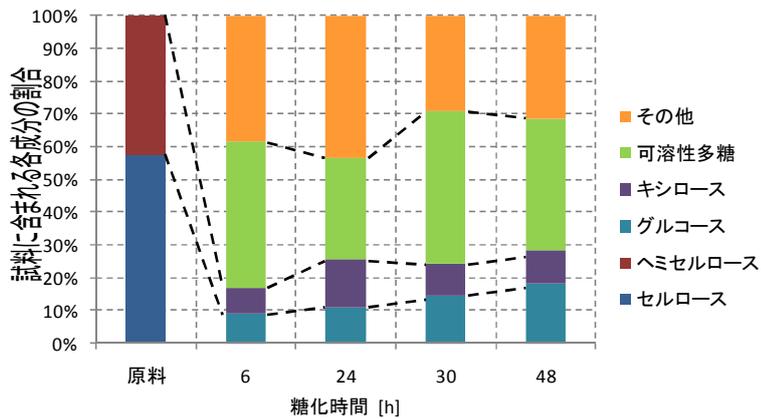


Fig.5-2-1 ケヤキの水熱爆砕再現性試験結果

前処理条件

前処理方法		水蒸気爆砕
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

酵素糖化条件

原料(ケヤキ)[g-dry]	3.00	
溶液量[ml]	500	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]	50	

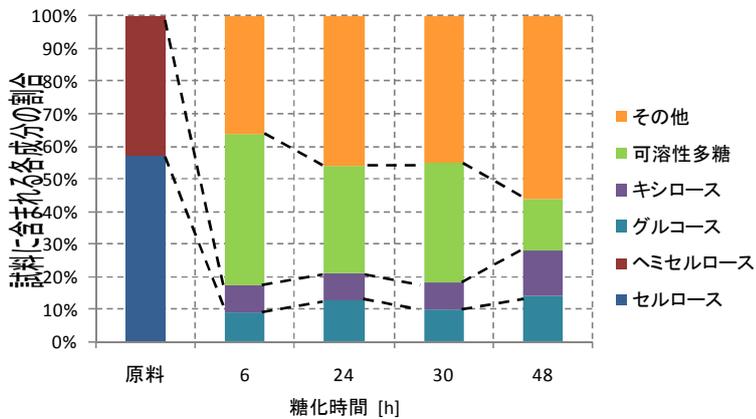
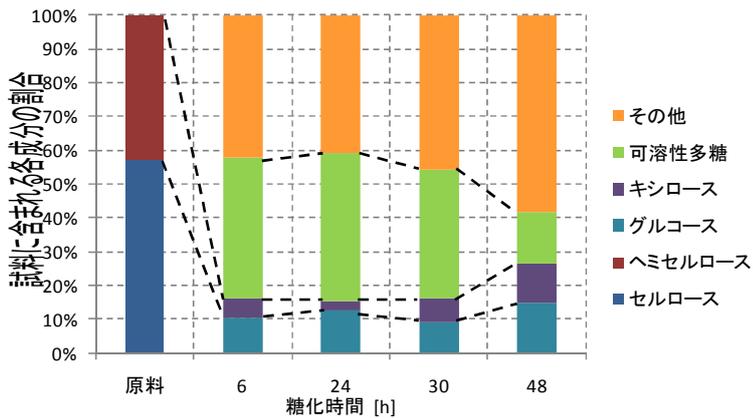
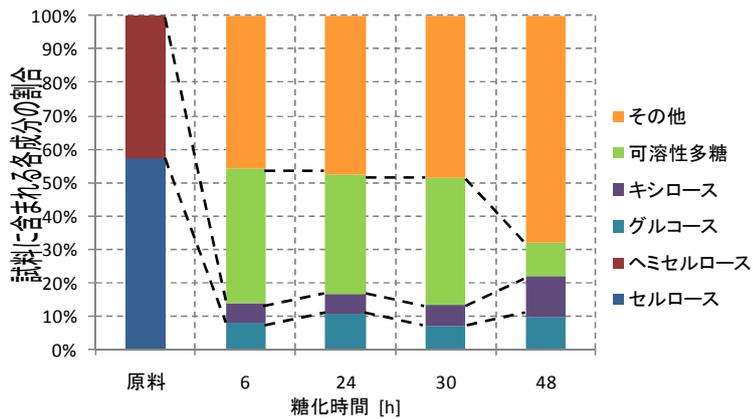


Fig.5-2-2 ケヤキの水蒸気爆砕再現性実験結果

前処理条件

前処理方法		水熱徐冷
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

酵素糖化条件

原料(ケヤキ)[g-dry]	3.00	
溶液量[ml]	500	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]	50	

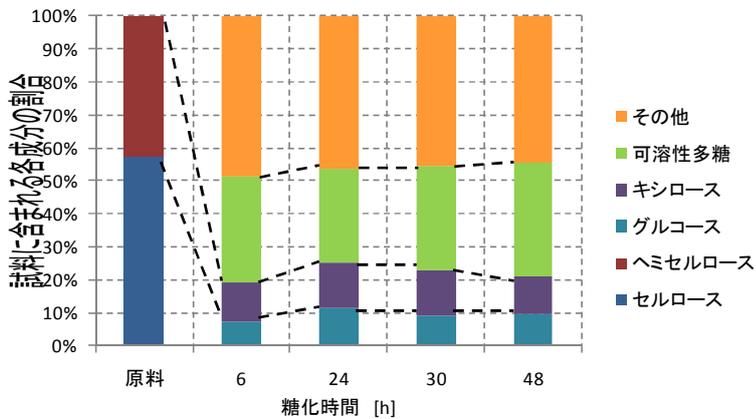
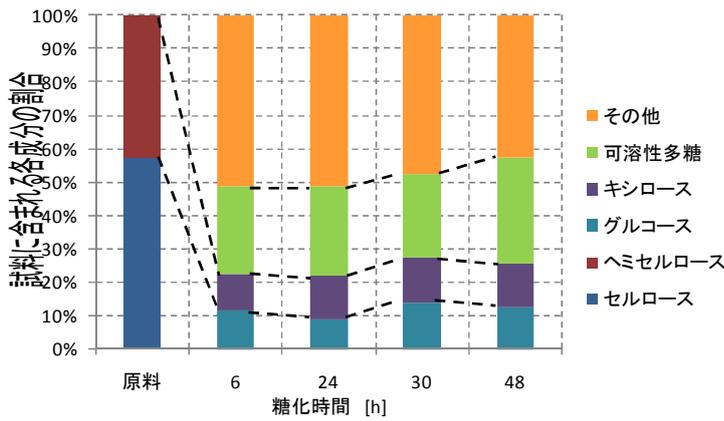
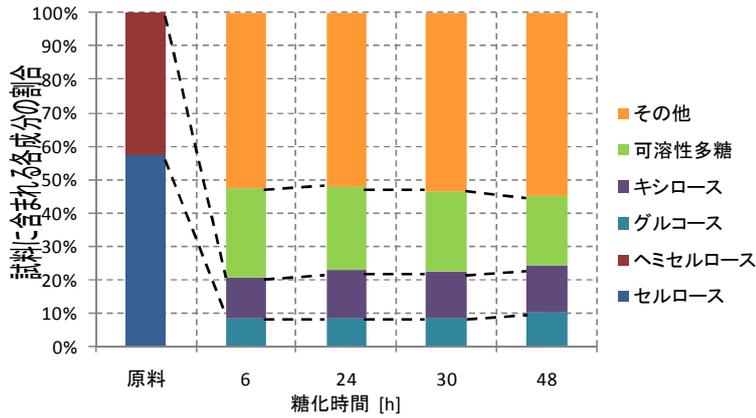


Fig.5-2-3 ケヤキの水熱除冷再現性実験結果

前処理条件

酵素糖化条件

前処理方法		共通
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

原料(ケヤキ)[g-dry]	3.00	
溶液量[ml]	500	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	

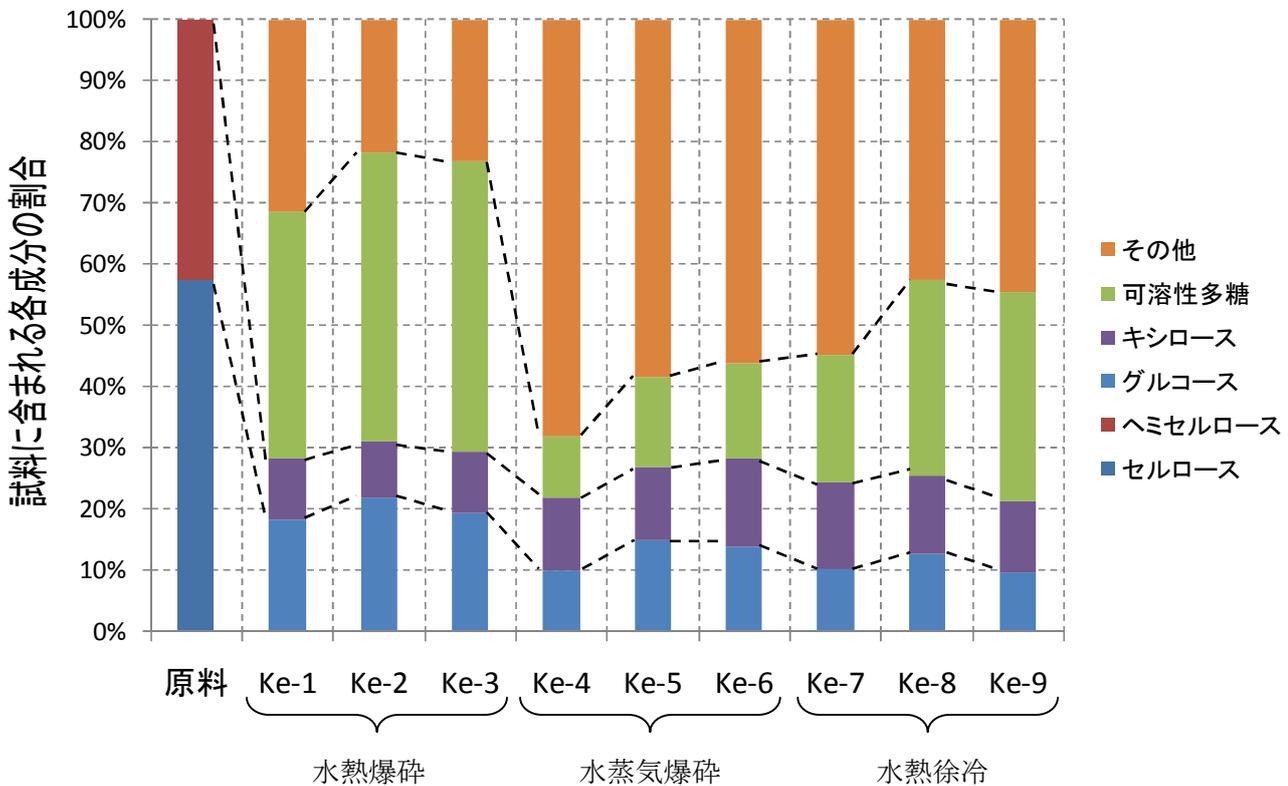


Fig.5-2-4 ケヤキの水熱爆砕と水蒸気爆砕および水熱徐冷前処理の酵素糖化試験（48 時間後）の再現性（各 3 回）

前処理条件

前処理方法		共通
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

酵素糖化条件

原料(ケヤキ)[g-dry]	3.00	
溶液量[ml]	500	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	

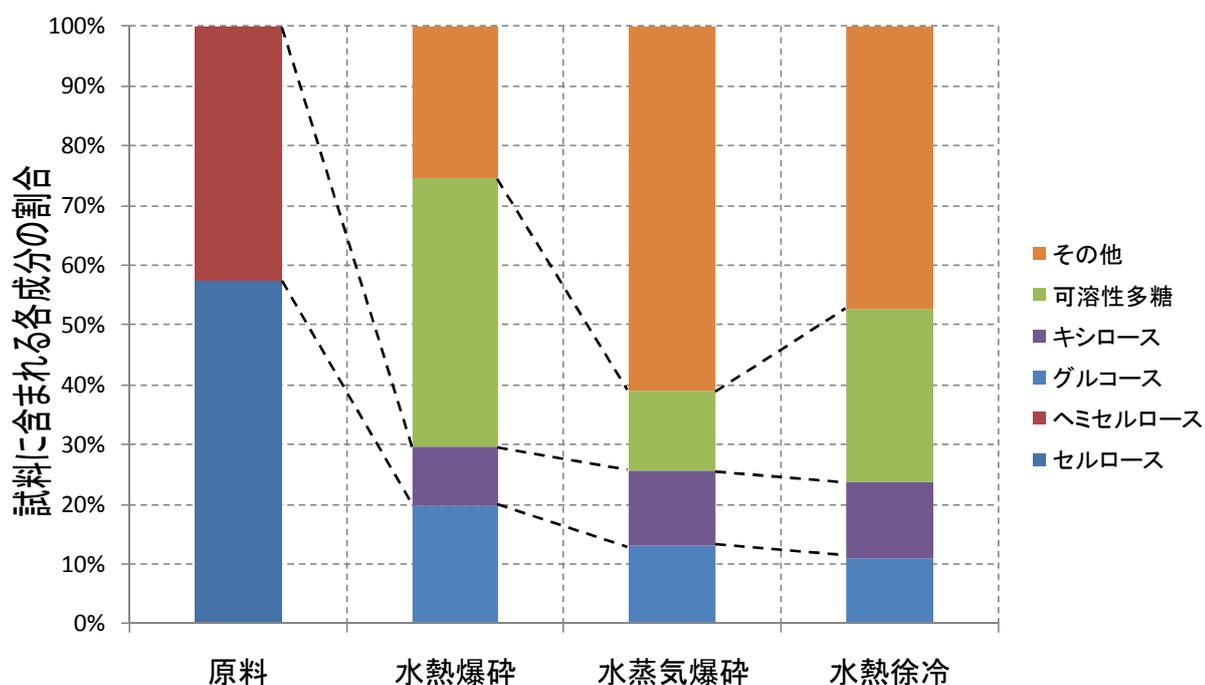


Fig.5-2-5 ケヤキの水熱爆砕と水蒸気爆砕および水熱徐冷前処理の酵素糖化試験（48時間後）各3回平均値の比較

## 5-2.2 杉

Fig.5-2-6,5-2-7,5-2-8 に水熱爆砕、水蒸気爆砕、水熱徐冷前処理物の酵素糖化の経時変化を示す。また、Fig. 5-2-9 に酵素糖化時間48時間後の結果を一括して示す。各前処理とも同一条件でそれぞれ3回行い、それぞれの前処理物の酵素糖をおこなった。少々のはらつきはあるが、比較的再現性があることが認められた。

Fig. 5-2-10 に水熱爆砕、水蒸気爆砕、水熱徐冷前処理物の48時間後酵素糖化率の各3回の平均値を示す。

前処理条件

前処理方法		水熱爆砕
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	0
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

酵素糖化条件

原料(杉)[g-dry]		1.50
溶液量[ml]		550
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]		50

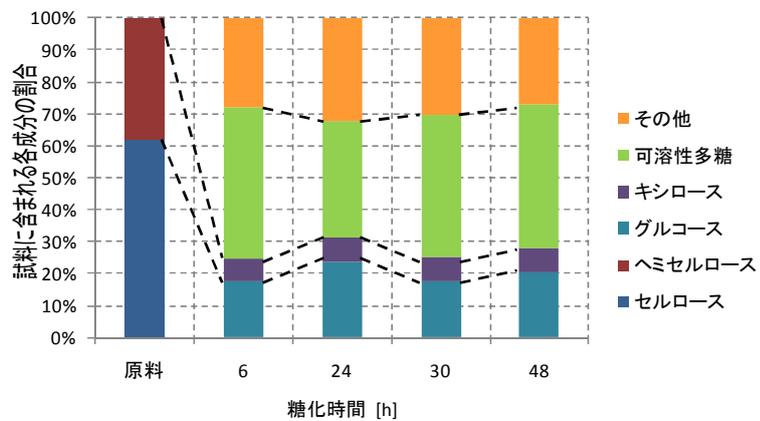
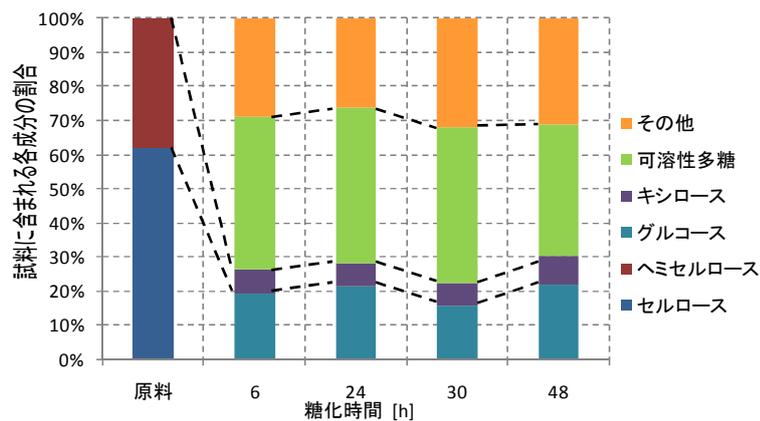
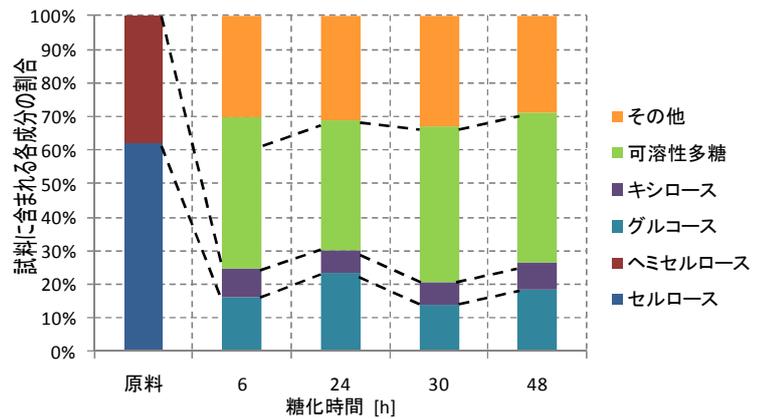


Fig.5-2-6 杉の水熱爆砕再現性試験結果

前処理条件

前処理方法		水蒸気爆砕
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	0
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

酵素糖化条件

原料(杉)[g-dry]		1.50
溶液量[ml]		550
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]		50

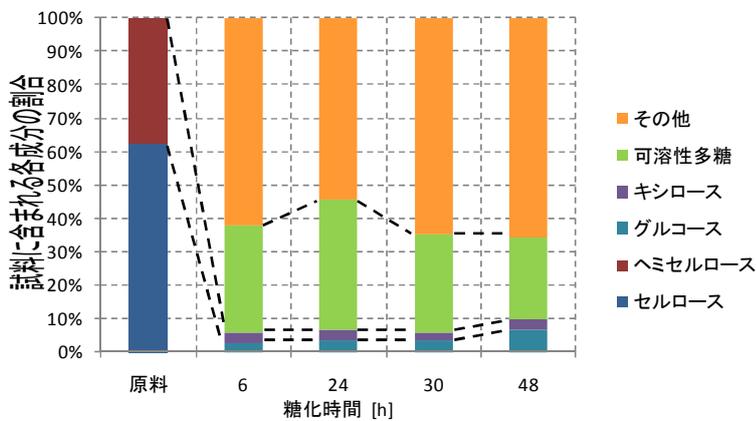
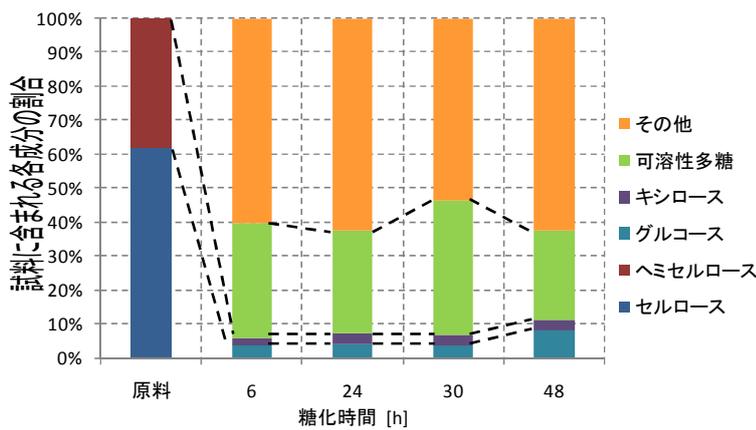
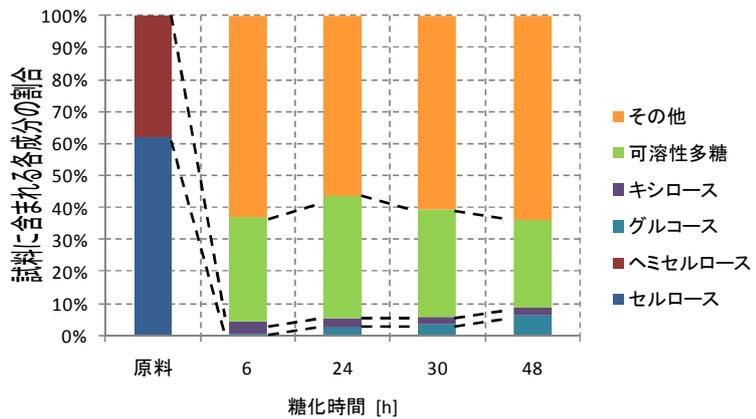


Fig.5-2-7 杉の水蒸気爆砕再現性試験結果

前処理条件

前処理方法		水熱徐冷
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	0
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

酵素糖化条件

原料(杉)[g-dry]		1.50
溶液量[ml]		550
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]		50

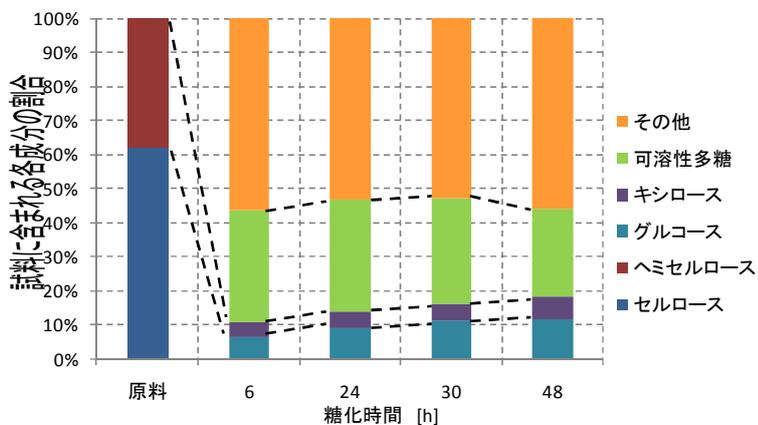
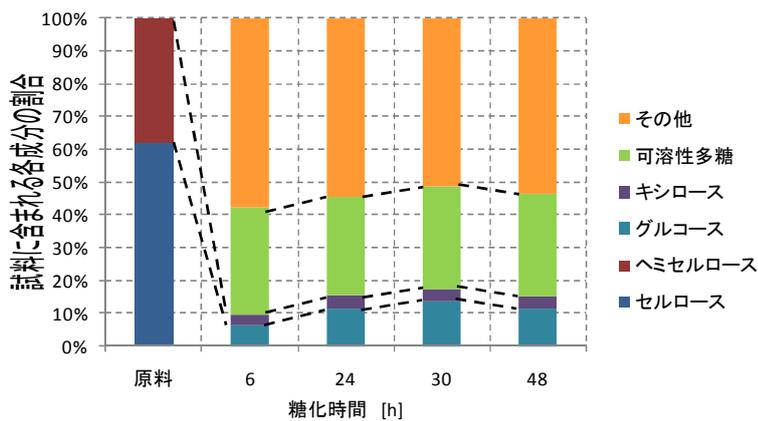
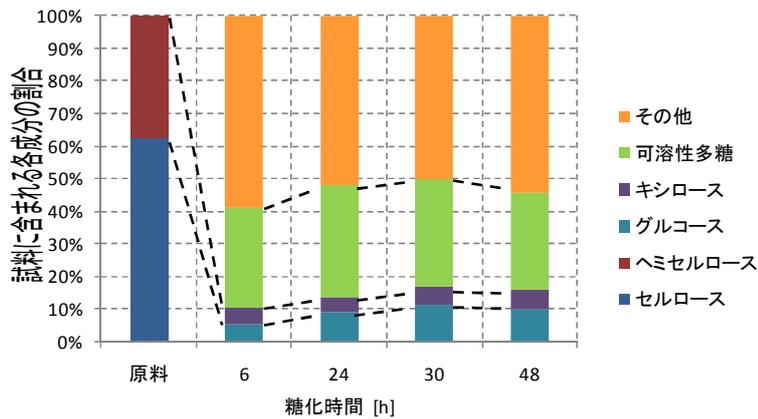


Fig.5-2-8 杉の水熱徐冷再現性試験結果

前処理条件

前処理方法		共通
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	0
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

酵素糖化条件

原料(杉)[g-dry]	1.50	
溶液量[ml]	550	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	

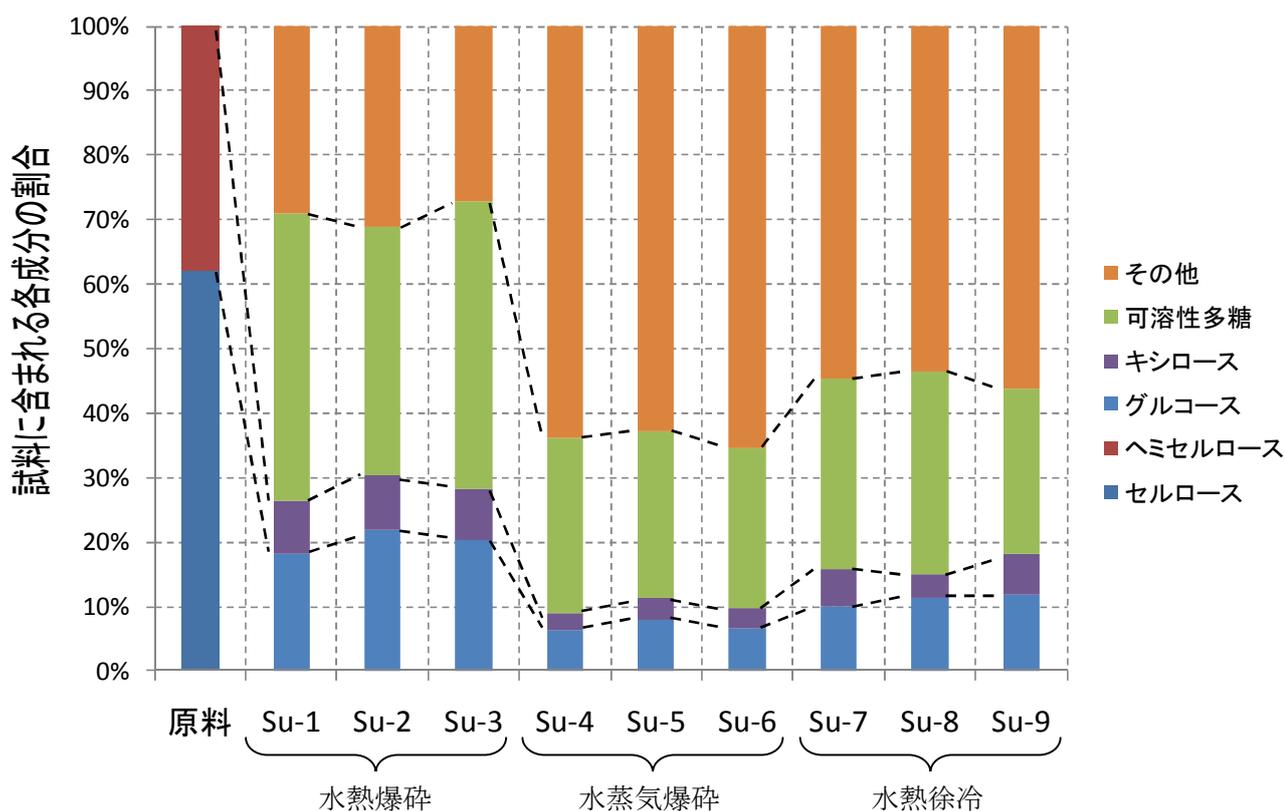


Fig.5-2-9 杉の水熱爆砕と水蒸気爆砕および水熱除冷前処理の酵素糖化試験（48時間後）の再現性（各3回）

前処理条件

前処理方法		共通
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	0
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

酵素糖化条件

原料(杉)[g-dry]	1.50	
溶液量[ml]	550	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	

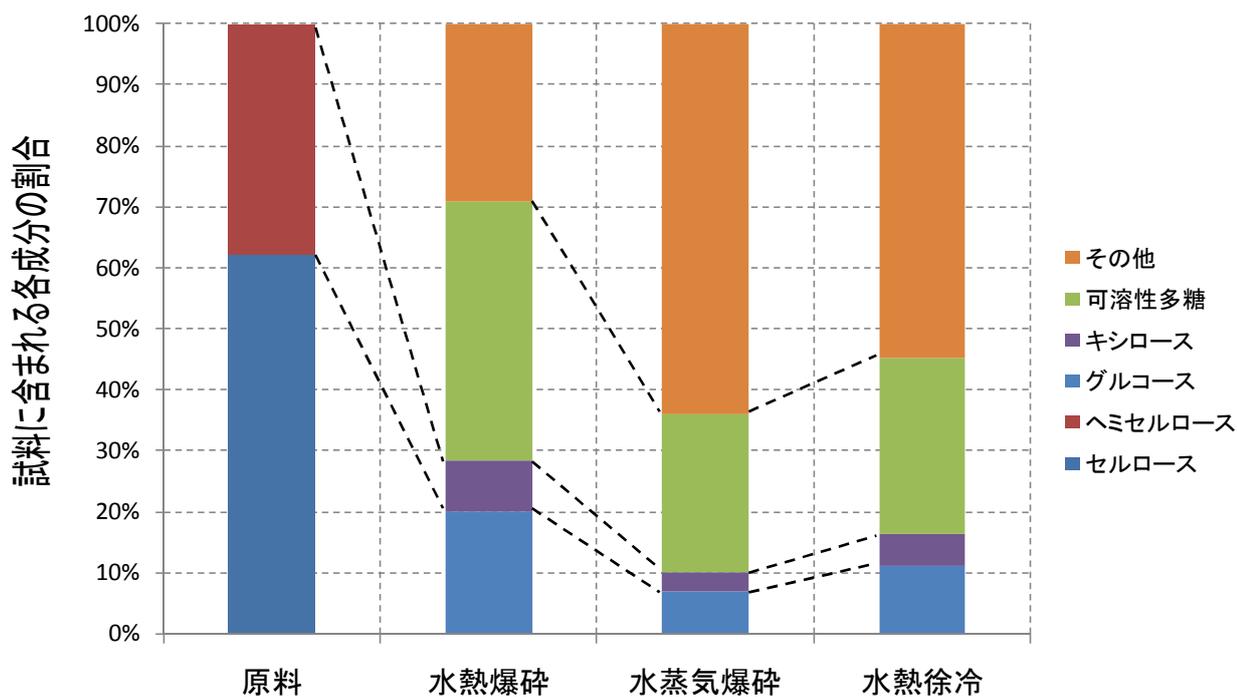


Fig.5-2-10 杉の水熱爆砕と水蒸気爆砕および水熱徐冷前処理物の酵素糖化試験（48時間後）各3回平均値の比較

### 5-3 まとめ

原料にケヤキと杉を用いて水熱爆砕の温度×時間の適性条件をセルロース生成率、キシロース生成率および可溶性多糖類生成率を比較して求めた。その結果ケヤキの水熱爆砕の適性条件は1段目：180℃×10min. 2段目：260×10min.であり、杉の水熱爆砕の適性条件は1段目：180℃×0min. 2段目：260℃×10min であることを確認した。

次にケヤキと杉それぞれの水熱爆砕の適性条件と同じ温度パターンで、水熱爆砕処理、水蒸気爆砕処理および水熱除冷処理し、その後酵素糖化を行いグルコース生成率、キシロース生成率および可溶性多糖類生成率により比較した。その結果、水熱爆砕はグルコース糖化率が最も大きく、可溶性多糖類も最も大きいことから、ケヤキと杉のどちらを原料に用いても、この3方法の中で水熱爆砕が酵素糖化前処理方法として最も効果的であると考えられる。

## 6章 発酵阻害物質の生成濃度分析評価

### 6-1 発酵阻害物質の成分と分析方法

代表的な発酵阻害物質を Table.6-1-1 に示す。

本研究では陰イオン分離カラムおよび電気伝導度検出器を用いたイオンクロマトグラフィーで分析可能であるギ酸および酢酸を分析した。分析の対象は前処理直後の杉の試料を用いた。

前処理直後の杉の資料を 2ml のバイアル瓶にとり、イオンクロマトグラフィーで分析を行った。イオンクロマトグラフィーの仕様および分析条件を Table. 6-1-2 に示す。

Table.6-1-1 代表的な発酵阻害物質

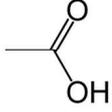
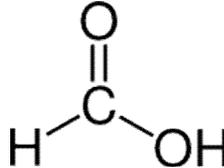
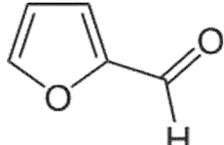
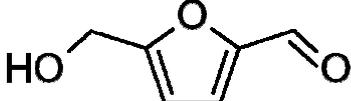
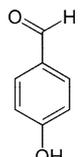
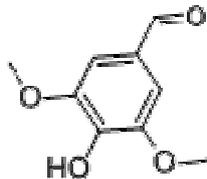
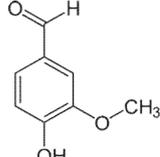
名称	組成式	構造式
ギ酸	HCOOH	
酢酸	CH <sub>3</sub> COOH	
フルフラール	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	
5HMF	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	
p-HBA	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	
シリングアルデヒド	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	
バニリン	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	

Table.6-1-2 イオンクロマトグラフィーの仕様および分析条件

検出器	島津電気伝導度検出器 CDD-10Asp
溶離液	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3.2mM) NaHCO <sub>3</sub> (1.0mM)
カラム	Shodex IC SI-50 4E 4mm × 250mm
溶離液流量 [ml/min]	0.7
カラム温度 [°C]	25
測定時間 [min]	15
サンプル注入量 [ $\mu$ l]	5

## 6-2 発酵阻害物質分析結果

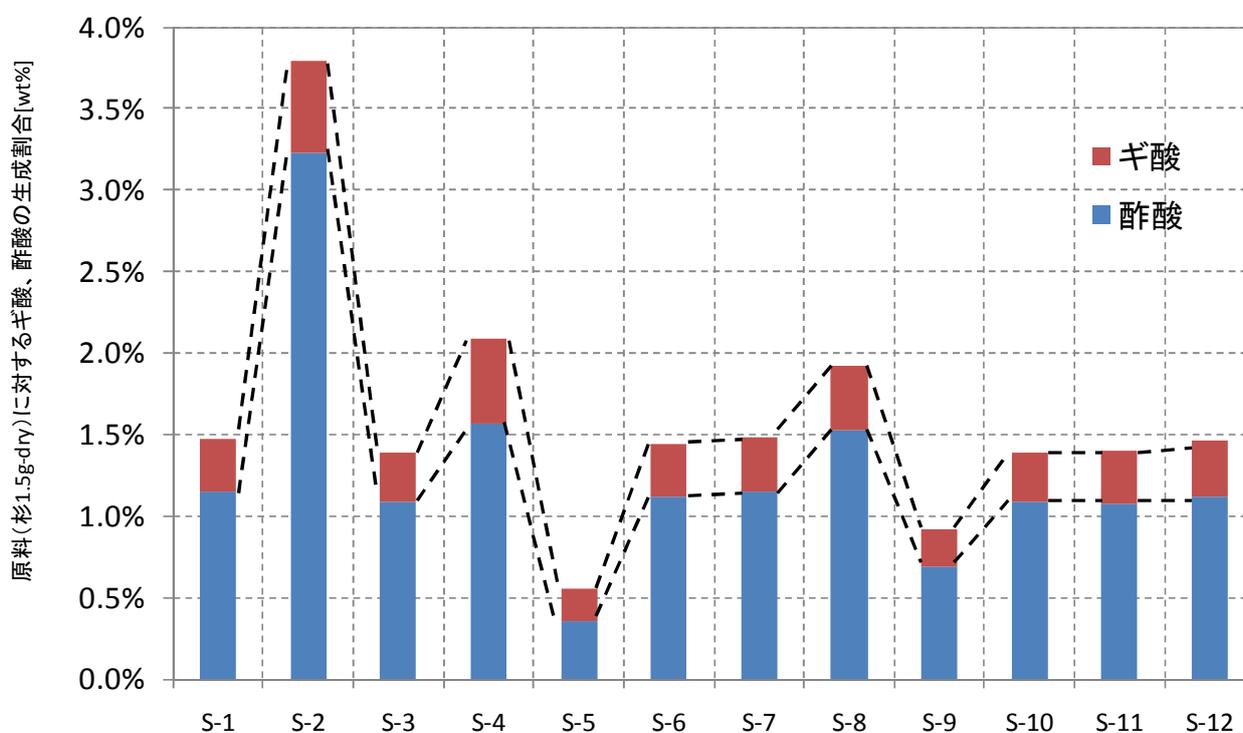
Fig.6-2-1 に杉の水熱爆砕前処理物についてギ酸、酢酸を分析した結果を一括して示す

Fig.6-2-2 から Fig.6-2-8 に 1 段目および 2 段目の条件と各糖化率とギ酸及び酢酸生成率との関係を示した。

Fig.6-2-9 に杉の 1 段目 :  $180^{\circ}\text{C} \times 0\text{min}$ . 2 段目 :  $260^{\circ}\text{C} \times 10\text{min}$  における水熱爆砕、水蒸気爆砕、水熱除冷前処理物について、ギ酸、酢酸を分析した結果を一括して示す。さらに Fig.6-2-10 にはギ酸、酢酸の分析結果の前処理ごとの平均値を示す。

分析条件

検出器	島津電気伝導度検出器 CDD-10Asp	溶離液流量 [ml/min]	0.7
溶離液	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3.2mM) NaHCO <sub>3</sub> (1.0mM)	カラム温度 [°C]	25
カラム	Shodex IC SI-50 4E	測定時間 [min]	15
		サンプル注入量 [μl]	5



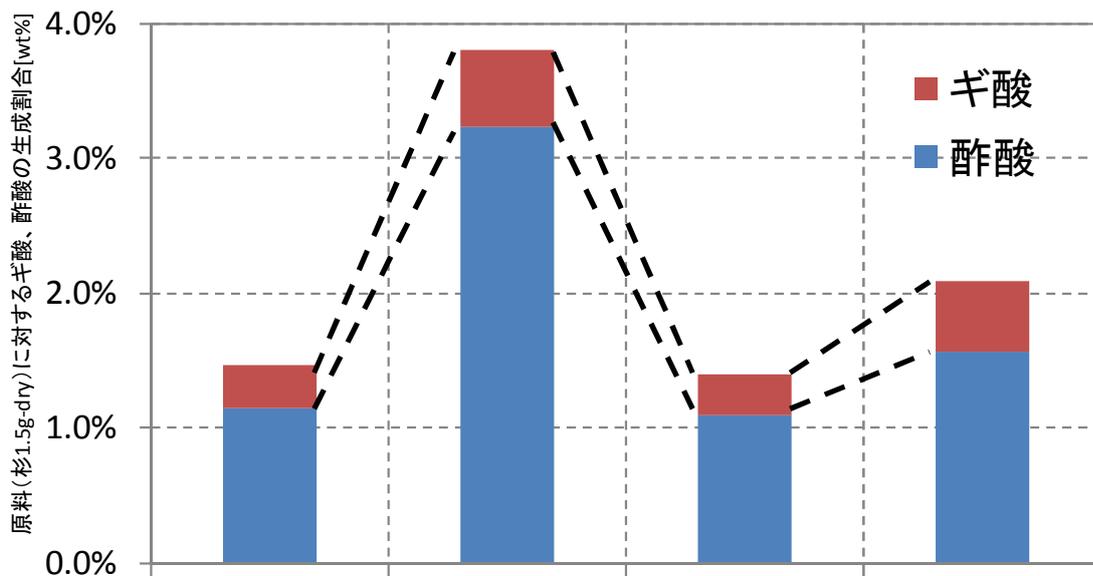
RUN No.		S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9	S-10	S-11	S-12
1段目	温度[°C]	180	180	180	180	180	180	180	180	200	200	200	200
	時間[min]	0	0	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10
2段目	温度[°C]	240	240	260	260	240	240	260	260	240	240	260	260
	時間[min]	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10

Fig.6-2-1 水熱爆砕処理後の杉試料におけるギ酸、酢酸分析結果

分析条件

検出器	島津電気伝導度検出器 CDD-10Asp
溶離液	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3.2mM) NaHCO <sub>3</sub> (1.0mM)
カラム	Shodex IC SI-50 4E

溶離液流量 [ml/min]	0.7
カラム温度 [°C]	25
測定時間 [min]	15
サンプル注入量 [μl]	5



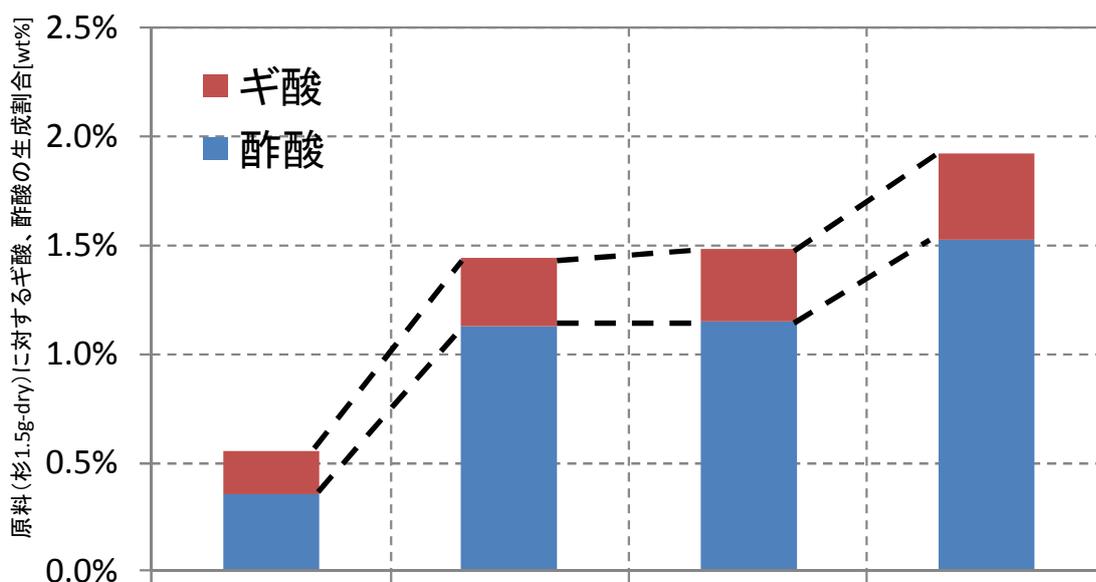
RUN No.		S-1	S-2	S-3	S-4
1段目	温度[°C]	180	180	180	180
	時間[min]	0	0	0	0
2段目	温度[°C]	240	240	260	260
	時間[min]	1	10	1	10

Fig.6-2-2 2段目の温度×時間の影響（1段目：180°C×0minの場合）

分析条件

検出器	島津電気伝導度検出器 CDD-10Asp
溶離液	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3.2mM) NaHCO <sub>3</sub> (1.0mM)
カラム	Shodex IC SI-50 4E

溶離液流量 [ml/min]	0.7
カラム温度 [°C]	25
測定時間 [min]	15
サンプル注入量 [ $\mu$ l]	5



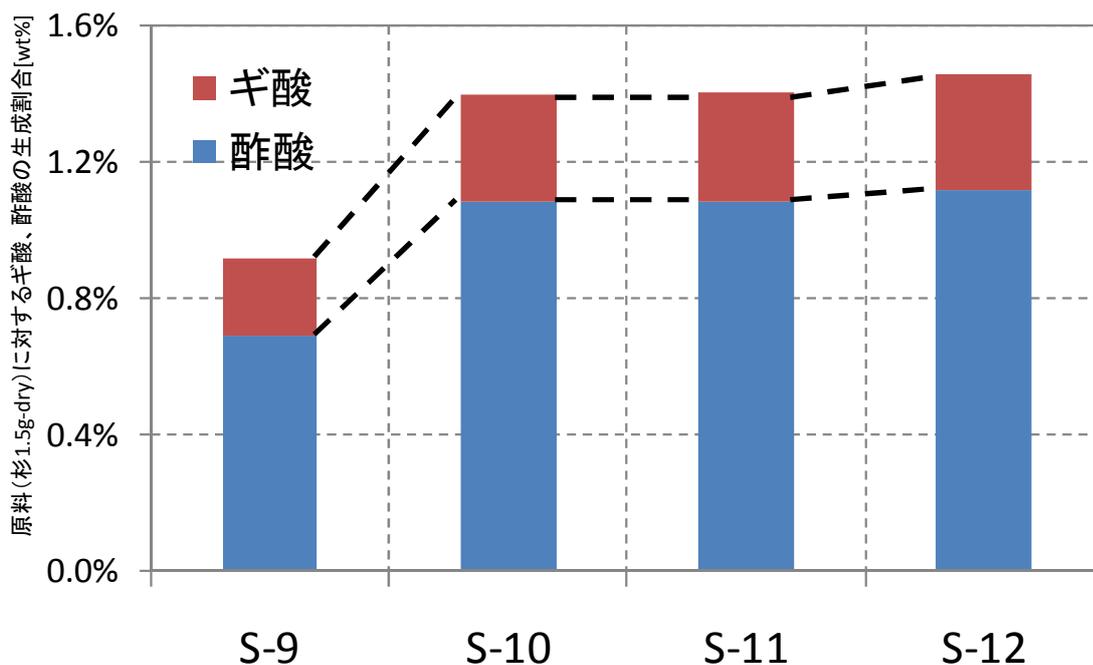
RUN No.		S-5	S-6	S-7	S-8
1段目	温度[°C]	180	180	180	180
	時間[min]	10	10	10	10
2段目	温度[°C]	240	240	260	260
	時間[min]	1	10	1	10

Fig.6-2-3 2段目の温度×時間の影響（1段目：180°C×10minの場合）

分析条件

検出器	島津電気伝導度検出器 CDD-10Asp
溶離液	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3.2mM) NaHCO <sub>3</sub> (1.0mM)
カラム	Shodex IC SI-50 4E

溶離液流量 [ml/min]	0.7
カラム温度 [°C]	25
測定時間 [min]	15
サンプル注入量 [μl]	5



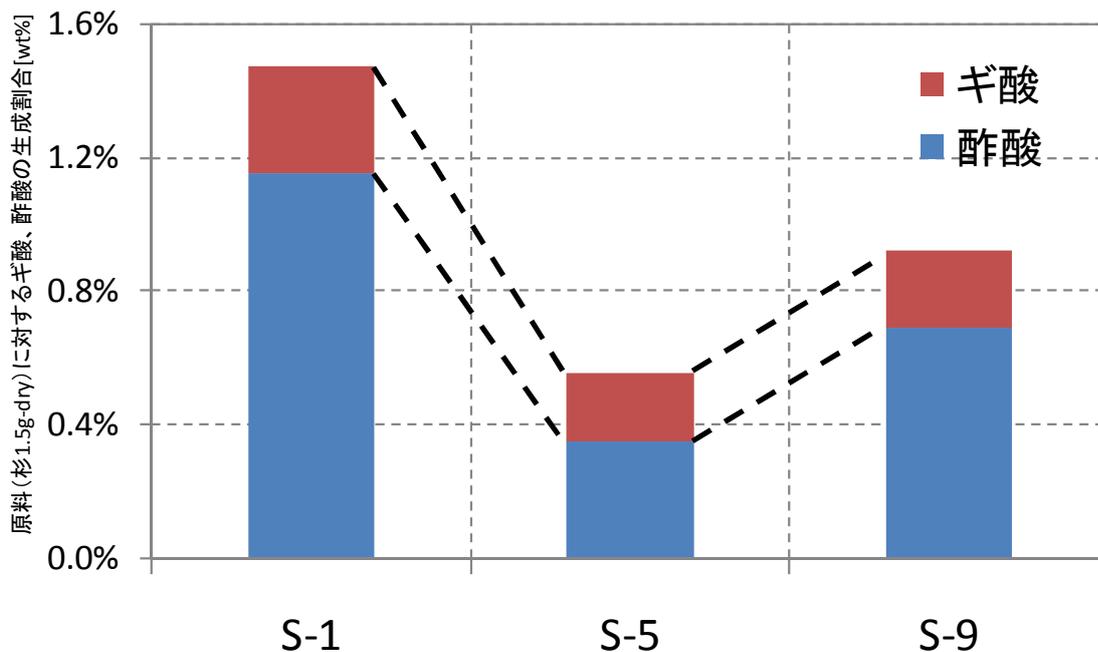
RUN No.		S-9	S-10	S-11	S-12
1段目	温度[°C]	200	200	200	200
	時間[min]	10	10	10	10
2段目	温度[°C]	240	240	260	260
	時間[min]	1	10	1	10

Fig.6-2-4 2段目の温度×時間の影響（1段目：200°C×10minの場合）

分析条件

検出器	島津電気伝導度検出器 CDD-10Asp
溶離液	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3.2mM) NaHCO <sub>3</sub> (1.0mM)
カラム	Shodex IC SI-50 4E

溶離液流量 [ml/min]	0.7
カラム温度 [°C]	25
測定時間 [min]	15
サンプル注入量 [μl]	5



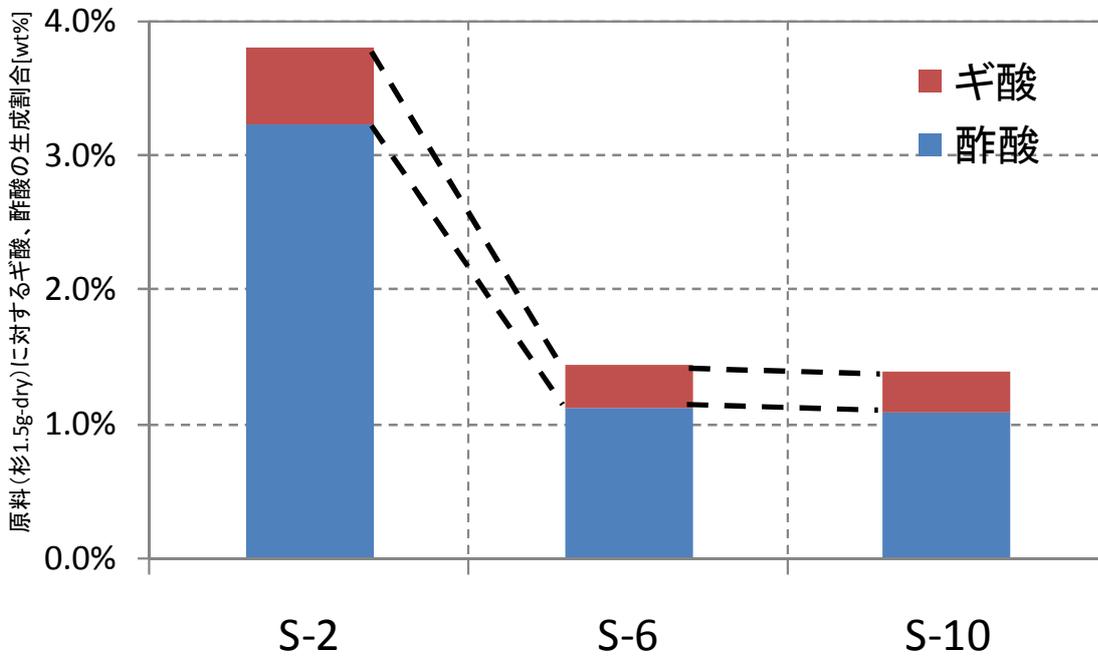
RUN No.		S-1	S-5	S-9
1段目	温度[°C]	180	180	200
	時間[min]	0	10	10
2段目	温度[°C]	240	240	240
	時間[min]	1	1	1

Fig.6-2-5 1段目の温度×時間の影響（2段目：240°C×1minの場合）

分析条件

検出器	島津電気伝導度検出器 CDD-10Asp
溶離液	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3.2mM) NaHCO <sub>3</sub> (1.0mM)
カラム	Shodex IC SI-50 4E

溶離液流量 [ml/min]	0.7
カラム温度 [°C]	25
測定時間 [min]	15
サンプル注入量 [ $\mu$ l]	5



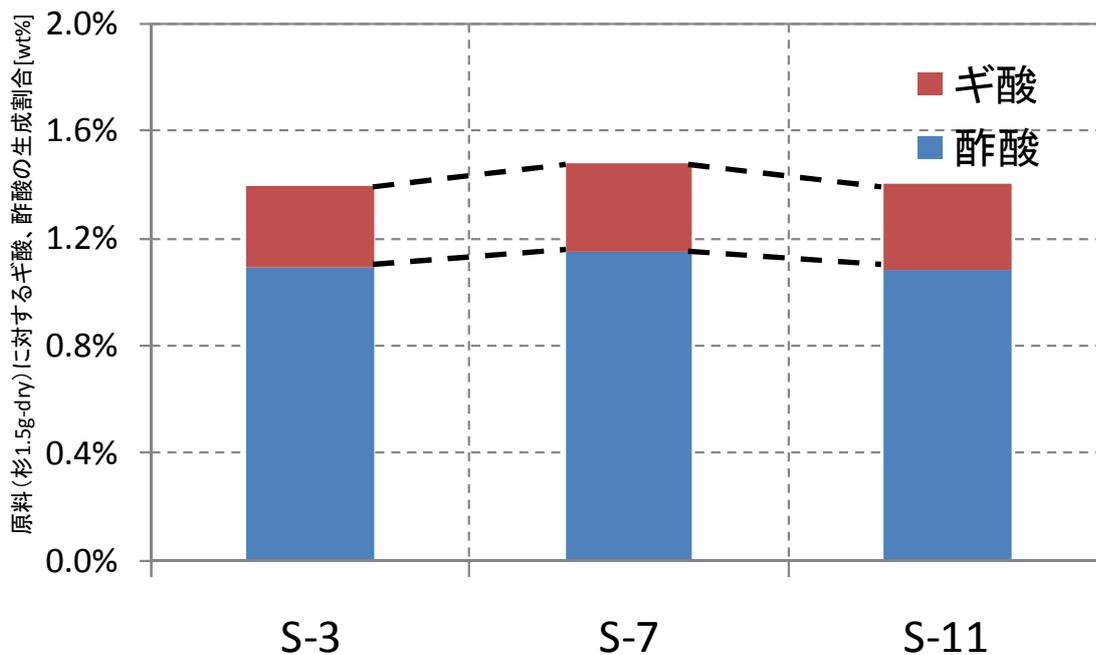
RUN No.		S-2	S-6	S-10
1段目	温度[°C]	180	180	200
	時間[min]	0	10	10
2段目	温度[°C]	240	240	240
	時間[min]	10	10	10

Fig.6-2-6 1段目の温度×時間の影響 (2段目: 240°C×10min の場合)

分析条件

検出器	島津電気伝導度検出器 CDD-10Asp
溶離液	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3.2mM) NaHCO <sub>3</sub> (1.0mM)
カラム	Shodex IC SI-50 4E

溶離液流量 [ml/min]	0.7
カラム温度 [°C]	25
測定時間 [min]	15
サンプル注入量 [μl]	5



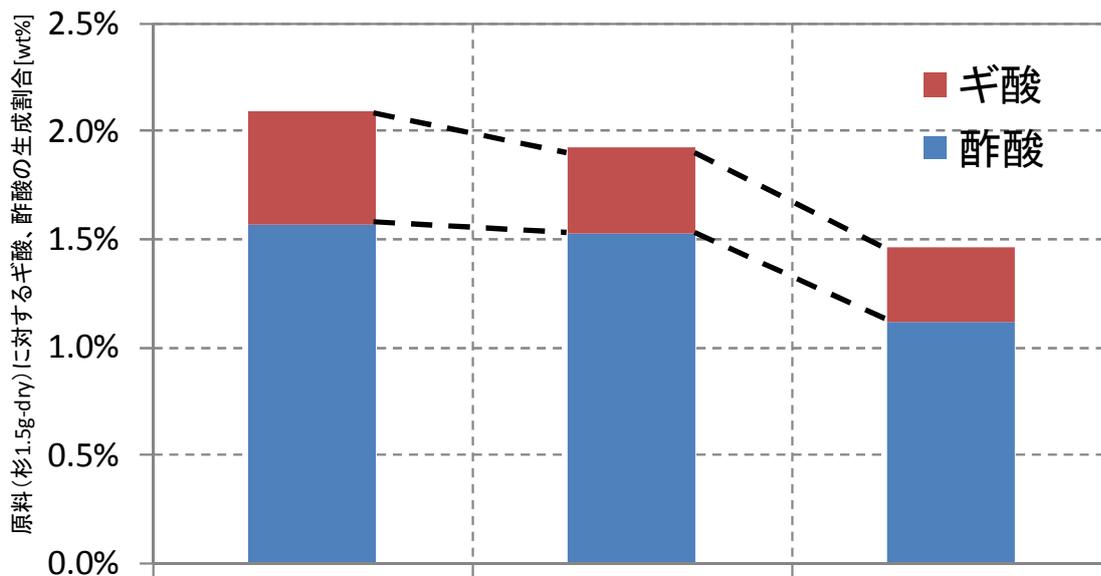
RUN No.		S-3	S-7	S-11
1段目	温度[°C]	180	180	200
	時間[min]	0	10	10
2段目	温度[°C]	260	260	260
	時間[min]	1	1	1

Fig.6-2-7 1段目の温度×時間の影響（2段目：260°C×1minの場合）

分析条件

検出器	島津電気伝導度検出器 CDD-10Asp
溶離液	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3.2mM) NaHCO <sub>3</sub> (1.0mM)
カラム	Shodex IC SI-50 4E

溶離液流量 [ml/min]	0.7
カラム温度 [°C]	25
測定時間 [min]	15
サンプル注入量 [μl]	5



RUN No.		S-4	S-8	S-12
1段目	温度[°C]	180	180	200
	時間[min]	0	10	10
2段目	温度[°C]	260	260	260
	時間[min]	10	10	10

Fig.6-2-8 1段目の温度×時間の影響（2段目：260°C×10minの場合）

前処理条件

前処理方法		共通
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	0
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

分析条件

検出器	島津電気伝導度検出器 CDD-10Asp
溶離液	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3.2mM) NaHCO <sub>3</sub> (1.0mM)
カラム	Shodex IC SI-50 4E

溶離液流量 [ml/min]	0.7
カラム温度 [°C]	25
測定時間 [min]	15
サンプル注入量 [μl]	5

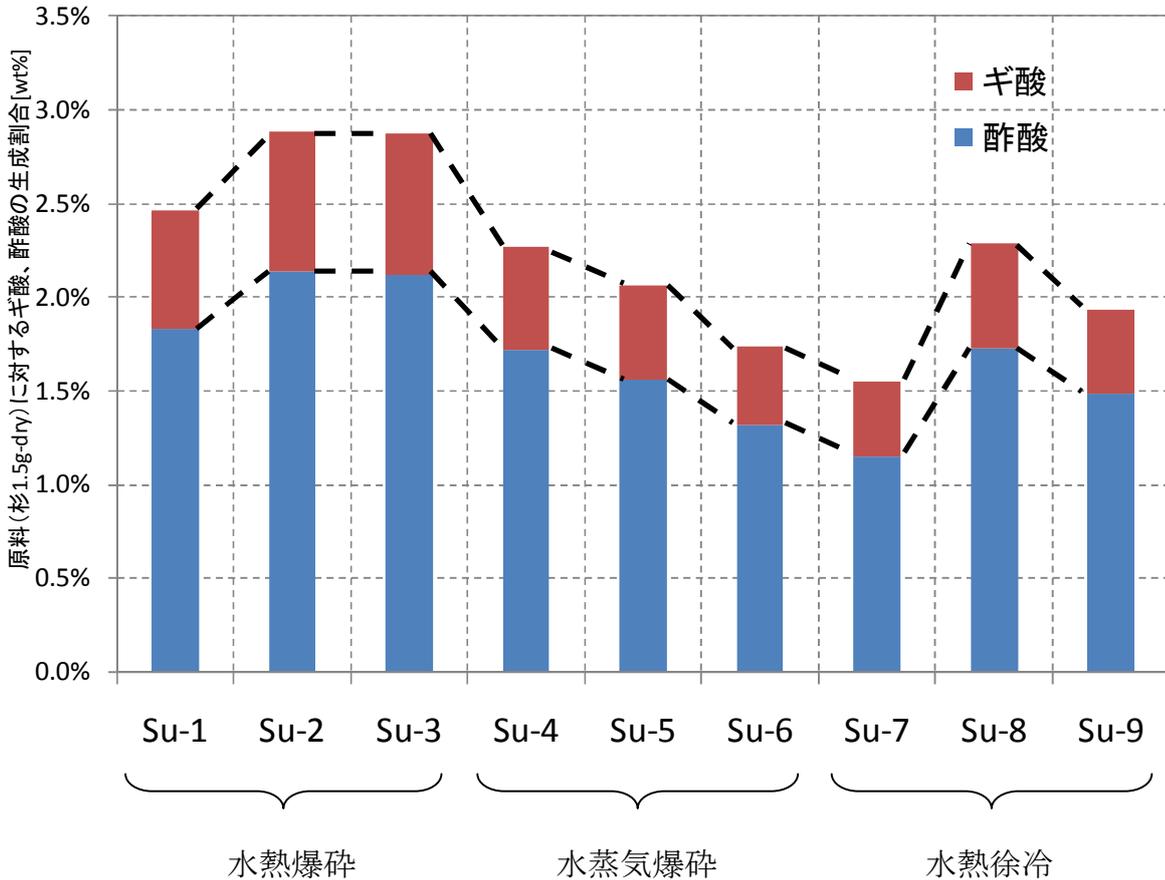


Fig.6-2-9 水熱爆砕処理、水蒸気爆砕処理、水熱徐冷処理後の杉試料におけるギ酸、酢酸分析結果

前処理条件

前処理方法		共通
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	0
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

分析条件

検出器	島津電気伝導度検出器 CDD-10Asp
溶離液	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3.2mM) NaHCO <sub>3</sub> (1.0mM)
カラム	Shodex IC SI-50 4E

溶離液流量 [ml/min]	0.7
カラム温度 [°C]	25
測定時間 [min]	15
サンプル注入量 [μl]	5

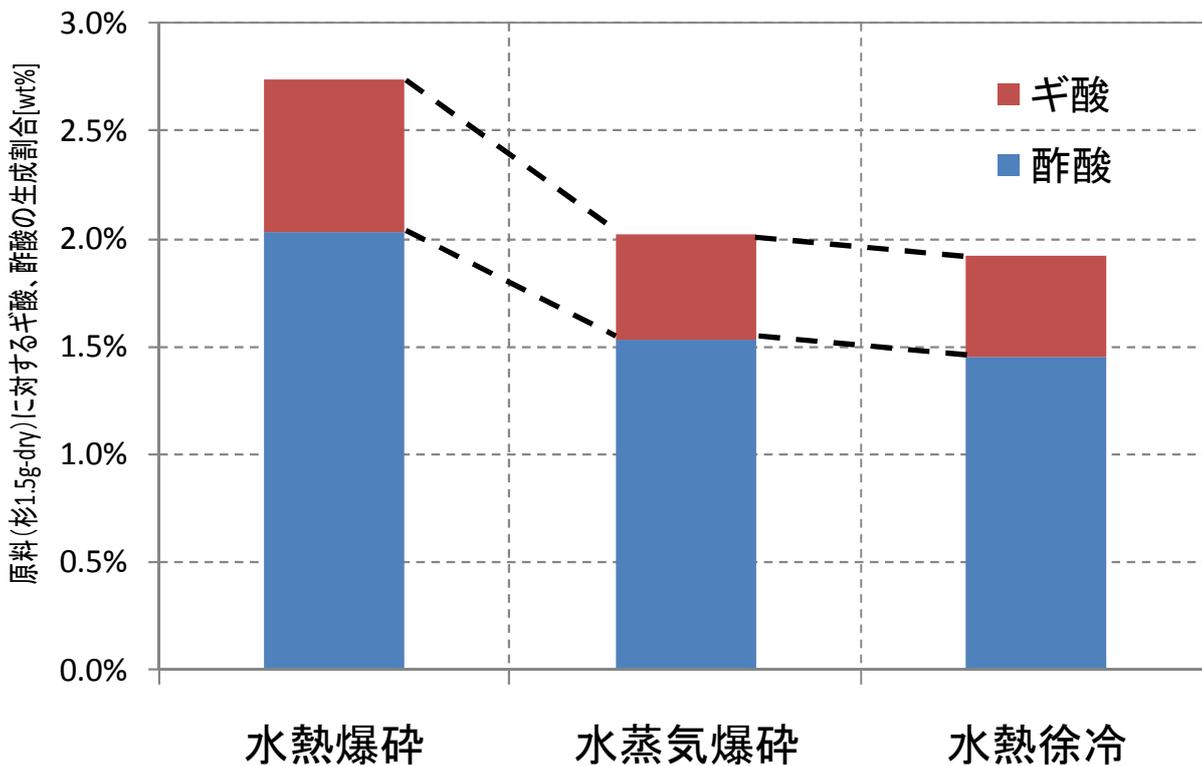


Fig.6-2-10 水熱爆砕処理、水蒸気爆砕処理、水熱徐冷処理後の杉試料におけるギ酸、酢酸分析結果 (平均値)

### 6-3 まとめ

原料に杉を用いて1 2条件で水熱爆砕処理を行い、得られた試料に含まれるギ酸および酢酸の量を求めた。Fig.6-2-1より、ギ酸と酢酸の生成量が最も少ない条件は1段目：180℃×10min. 2段目：240℃×1min.であり、最も多い条件は1段目：180℃×0min. 2段目：240℃×10min.であることがわかった。さらに、ギ酸と酢酸の生成量が二番目に少ない条件は1段目：200℃×10min. 2段目：240℃×1min.であり二番目に多い条件が1段目：180℃×0min. 2段目：260℃×10min.であることから、同じ前処理法を用いる場合、高温にさらす時間を短くした方が、ギ酸酢酸の生成量は抑えられる傾向にあるといえる。

また Fig.6-2-9 と Fig.6-2-10 より、同じ温度、時間の条件であれば本研究で用いた3つの方法の中でギ酸酢酸生成量を最も抑えられるのは水熱徐冷であり、以下水蒸気爆砕、水熱爆砕の順であることがわかった。

## 7章 結言

本研究の本年度の主目的は水熱爆砕が水蒸気爆砕や水熱徐冷に較べて草木質系バイオマスの酵素糖化前処理法として効果的であることを検証することであった。

### 1) 検証方法

- a. ケヤキと杉について水熱爆砕の温度×時間の適正条件を把握し、それと同じ温度パターンで水蒸気爆砕、水徐冷を行った。水熱爆砕に期待される大きな特徴のひとつは、バイオマスを微粉碎する必要があることにあると考えられることから、比較的大きなサイズ（5mm から 10mm）のバイオマスを実験に用いた。
- b. 前処理した原料について、糖類（グルコース、キシロース、全糖）の分析を行い比較評価した。杉に関しては発酵阻害物質（ギ酸、酢酸）の分析も行った。

### 2) 検証結果

- a. ケヤキの水熱爆砕の適正条件は1段目：180°C×10min. 2段目：260°C×10min. であり、杉の水熱爆砕の適正条件は1段目：180°C×0min. 2段目：260°C×10min. であった。
- b. ケヤキと杉のどちらを原料にした場合も、水熱爆砕処理物は水蒸気爆砕及び水熱徐冷処理物より高い糖化率を示した。
- c. 杉の場合、水熱爆砕は水蒸気爆砕と水熱徐冷に比べて発酵阻害物質であるギ酸、酢酸の生成量はやや多くなる傾向がみられた。

### 3) 今後の課題

今後に残された課題は以下の通りであり、平成23年度はこれらの課題を中心に組み組む予定である。

- a. 草本質系バイオマスの前処理物及び酵素糖化物の組成分析を詳細に行い、水熱爆砕の効果をもより定量的に評価する必要がある。糖の分析においては、従来のRI（屈折率）検出器のHPLCに比べて約10倍高精度で溶離液のグラジエントにより、オリゴ糖も分析可能な「ポストカラム蛍光誘導体化法HPLC」により単糖類およびオリゴ糖の生成率を高精度で測定評価する計画である。また、発酵阻害物質の分析では今年度イオンクロマトで測定した蟻酸、酢酸以外の成分については、UV検出器を用いたHPLCで分析する計画である。これらの分析値からエタノール収率を概略推定してプロセスの1次評価を行う予定である。
- b. 水熱爆砕処理物を酵素糖化して酵母でエタノール発酵を行い、エタノール収率に及ぼす水熱爆砕条件との関係を明らかにする必要がある。ただし、エタノール発酵酵母には多くのものがあり、また遺伝子組み換え等により高性能の酵母や菌体が見出される可能性があるが、入手できる酵母はごく限られた従来のものしかなく、限定した酵母によるエタノール収率の評価にならざるを得ないと考えられる。

### Ⅲ. 平成23年度研究

#### 1章 緒言

##### 1. 1 前年度までの研究成果

前年度は水熱爆砕の適正条件の探索と、その適正条件による水熱爆砕の優位性の検証を行った。

##### 1) 水熱爆砕適正条件の探索

この試験ではケヤキと杉を原料に用い、Fig. 1.1-1 に示す二段階の昇温により水熱爆砕処理を行い、温度×時間の適性条件をグルコース、キシロース及び可溶性多糖類の生成量の比較によって求めた。その結果、ケヤキの水熱爆砕の適性条件は1段目：180℃×10 min. 2段目：260×10 min.であり、杉の水熱爆砕の適性条件は1段目：180℃×0 min.2段目：260℃×10 minであった。

##### 2) 適正条件による水熱爆砕の優位性の検証

上記試験結果より明らかになった水熱爆砕適正条件にて、ケヤキ、杉を用いて水熱爆砕、水蒸気爆砕、水熱除冷による前処理を施したサンプルをそれぞれ製造し、各々に対し酵素糖化試験を行ない、酵素糖化後のグルコース、キシロース及び可溶性多糖類の生成量を比較することで水熱爆砕の優位性を検証した。また、杉については、酵素糖化前のサンプルに対して、イオンクロマトグラフィーによる発酵阻害物質（有機酸）の測定を行った。なお、これらの試験については、再現性を確認するために、各前処理、酵素糖化試験を三回ずつ行い、その分析結果の平均により比較を行った。その結果を Fig. 1.1-2, 1.1-3 に示す。ケヤキにおいては、水熱爆砕でグルコースと可溶性多糖類の生成量が最も大きいことから、この三つの方法の中で最も効果的であることを確認した。また杉においても、水熱爆砕処理でグルコース、キシロース及び可溶性多糖類生成量が最も大きいことから、この三つ方法の中で水熱爆砕が最も効果的であることを確認した。しかし一方で、Fig. 1.1-4 に示すように、水熱爆砕を施したサンプルは、有機酸の生成量がやや大きいことを確認した。

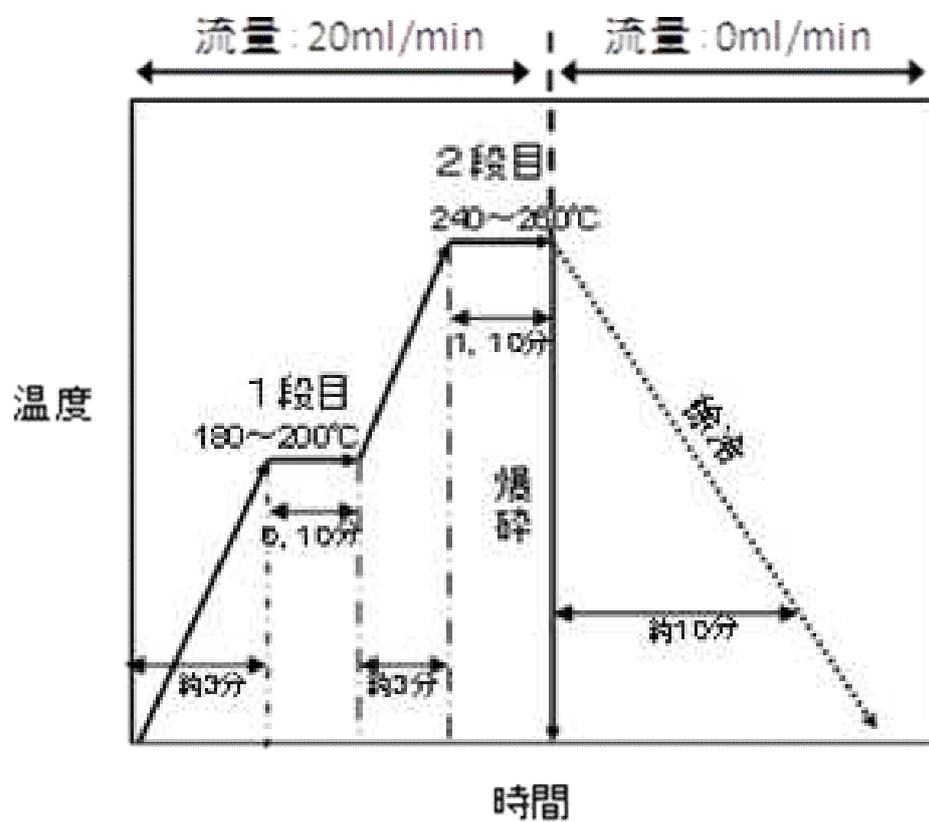


Fig. 1.1-1 前処理試験昇温パターン

前処理方法		共通
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	10
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

原料(ケヤキ)[g-dry]	3.00	
溶液量[ml]	500	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.15
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.15
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	

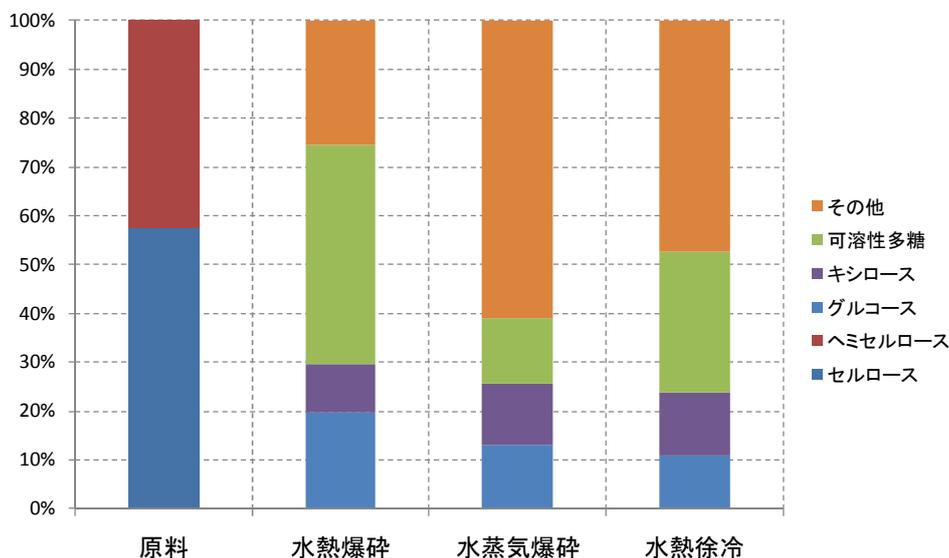


Fig. 1.1-2 各前処理方法による酵素糖化 48 時間後の糖生成量の比較 (ケヤキ)

前処理方法		共通
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	0
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

原料(杉)[g-dry]	1.50	
溶液量[ml]	550	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
糖化温度[°C]	50	
糖化時間[h]	48	

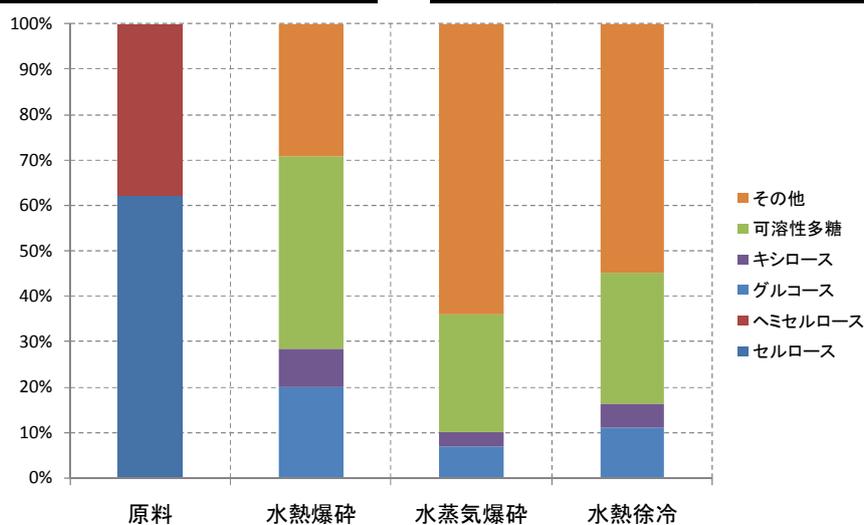


Fig. 1.1-3 各前処理方法による酵素糖化 48 時間後の糖生成量の比較 (杉)

前処理方法		共通
1段目	温度[°C]	180
	時間[min]	0
2段目	温度[°C]	260
	時間[min]	10

検出器	島津電気伝導度検出器 CDD-10Asp
溶離液	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3.2mM) NaHCO <sub>3</sub> (1.0mM)
カラム	Shodex IC SI-50 4E

溶離液流量 [ml/min]	0.7
カラム温度 [°C]	25
測定時間 [min]	15
サンプル注入量 [ $\mu$ l]	5

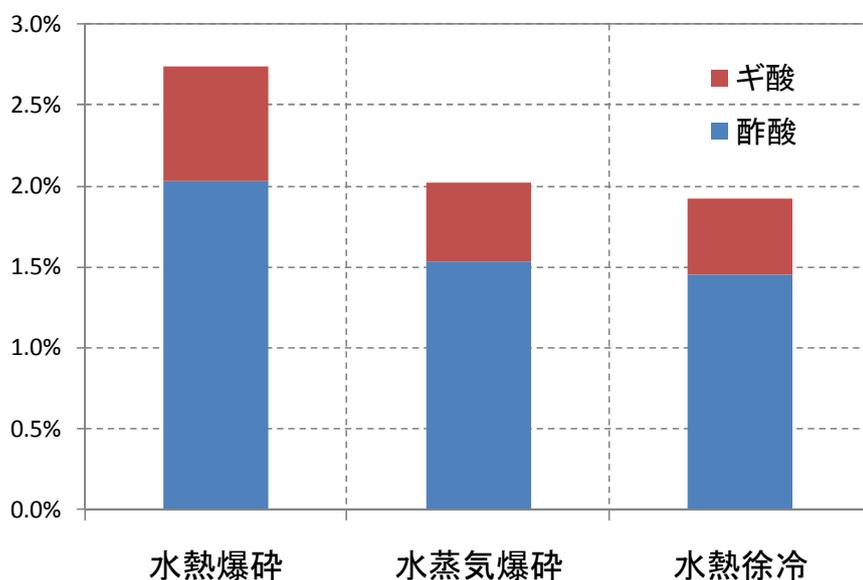


Fig. 1.1-4 各前処理方法による発酵阻害物質生成量の比較 (杉)

## 1. 2 本年度の目的と実施内容

本年度の目的と実施内容（計画）は以下のとおりである。

- ・ 前年度までは試薬法によりグルコース、キシロースおよび可溶性全糖類を分析して前処理＋酵素糖化の性能を評価したが、本年度はその精度を向上させるため、エタノール発酵可能な単糖とオリゴ糖（二糖から六糖）を含む 16 種類の糖の分析技術を確立する。また、酢酸、蟻酸、フルフラール類、フェノール類など 8 種類種類の発酵阻害物質分析技術を確立する。
- ・ これまで明らかにした最適前処理＋酵素糖化サンプルに対して上記にて確立した分析を適用し、分析方法の変更による差異の有無を確認するとともに、水熱爆砕の優位性をより詳細に評価する
- ・ 杉、けやき、稲わらの前処理温度を低温から高温まで幅広く変化させて、それぞれのバイオマスに適した前処理温度を明らかにする。
- ・ 発酵エタノール濃度が希薄であると、エタノール濃縮エネルギーは大きくなり好ましくないので、基質（バイオマス）濃度の高い前処理物の酵素糖化特性を評価検討する。
- ・ 水熱処理時に二酸化炭素、過酸化水素を添加し、水熱のみに較べて糖収率向上と発酵阻害物質生成抑制の可能性を検討する。
- ・ 市販酵母を入手して培養増殖し、グルコースとキシロースから約 80%以上のエタノール収率となるエタノール発酵基本条件を検討選定する。
- ・ 上記で選定したエタノール発酵条件下で、高濃度前処理物の酵素糖化液のエタノール発酵を行い、エタノール収率を測定評価する。

## 2章 原料バイオマスの構造と分析 (省略)

## 3章 前処理試験装置と方法 (省略)

## 4章 酵素糖化試験装置と方法

### 4. 1 試験装置 (省略)

### 4. 2 酵素糖化試験方法 (省略)

### 4. 3 酵素糖化条件

酵素糖化条件を Table. 4-3-1 に示す.

Table. 4-3-1 酵素糖化条件

原料	杉 1.5 g	ケヤキ 1.5 g
酵素糖化実験装置 湯浴部温度[°C]	50	50
酵素糖化時間[h]	48	48
pH[-]	5	5
セルロース分解酵素 添加量[g]	0.075 (基質の5%)	0.07 (基質の5%)
ヘミセルロース分解酵素 添加量[g]	0.075 (基質の5%)	0.075 (基質の5%)

#### 4. 4 生成糖の種類と分析方法

##### 4. 4. 1 糖の種類と構造

前年度までは試薬法によりグルコース、キシロースおよび可溶性全糖類を分析して前処理+酵素糖化の性能を評価したが、本年度はその精度を向上させるため、エタノール発酵可能な単糖とオリゴ糖（二糖から六糖）を含む16種類の糖の分析技術を確立した。分析対象の糖の種類と構造を単糖，二糖，三糖，多糖に分けて Table. 4-4.1-1 から Table 4-4.1-4 に示す。

Table. 4-4 .1-1 単糖の種類と構造

	名称	構造	エタノール 発酵酵母	保持時間 [min]
1	Rhamnose ラムノース C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>			9.57
2	Xylose キシロース C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>		Pachysolen tannophilus	13.20
3	Arabinose アラビノース C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>			15.42
4	Fructose フルクトース C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		S.cerevisiae	17.72
5	Mannose マンノース C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		S.cerevisiae	23.14
6	Glucose グルコース C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		S.cerevisiae	25.62
7	Galactose ガラクトース C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		S.cerevisiae	28.56

Table. 4-4 .1-2 二糖の種類と構造

	名称	エタノール 発酵酵母	保持時間 [min]
8	スクロース グルコース+フルクトース 	S.cerevisiae	31.69
9	セルビオース グルコース+グルコース(β1-4) 		32.99
10	マルトース グルコース+グルコース(α1-4) 	S.cerevisiae	33.49
11	ラクトース ガラクトース+グルコース(β1-4) 		34.73

Table. 4-4 .1-3 三糖の種類と構造

	名称	保持時間 [min]
12	セロトリオース グルコース+グルコース+グルコース (β1-4)	41.26
13	マルトリオース グルコース+グルコース+グルコース (α1-4)	41.98

Table. 4-4 .1-4 多糖の種類と構造

	名称	保持時間 [min]
14	セロテトラオース(β1-4)	49.37
15	セロペンタオース(β1-4)	51.37
16	セロヘキサオース(β1-4)	53.16

#### 4. 4. 2 HPLC による糖類の分析方法

単糖およびオリゴ糖（二糖から六糖）の分析を行うには、高速液クロマトグラムで分離し、反応液で蛍光物質に変化させて蛍光を検出する「HPLC+蛍光誘導体化法」を検討した。この方法は溶離液のグラジエントが可能で高精度である。屈折率検出器はグラジエントが不可能でまた精度も低く適用できない。

分析装置全体，オープン内反応管，カラムオープン内冷却管写真を Fig. 4-4.2-1, 4-4.2-2, 4-4.2-3 に、プロセスフローを Fig. 4-4.2-4 に示す。Table 4-4.2-1 に溶離液のグラジエントパターンを示す。

糖 16 種の糖分析結果を Fig. 4-4.2-5, 水熱爆砕酵素糖化後の試料の分析結果を Fig. 4-4.2-6 に示す。各標準物質について検量線を作成し，十分な直線性を確認した。

Table. 4-4 .2-1 分析条件

1. カラム Asahipak NH2P-50 4E 250×4.6mmI.D. (プレカラム付)
2. 溶離液 (A) アセトニトリル/水=90/10 0.5%リン酸  
(B) アセトニトリル/水=75/25 0.5%リン酸  
(C) アセトニトリル/水=60/40 0.5%リン酸

3. ポンププログラム

時間(min)	(A) %	(B) %	(C) %	流量(mL/min)
0	100	0	0	1.0
20	100	0	0	
25	0	100	0	
40	0	100	0	
45	0	0	100	
55	0	0	100	
55.1	100	0	0	
75	100	0	0	

4. 反応液 リン酸/酢酸/フェニルヒドラジン=220/180/6
5. 反応液流量 0.4 mL/min
6. カラム温度 50°C
7. 反応温度 146°C
8. 蛍光検出器 Ex 330nm Em 470nm



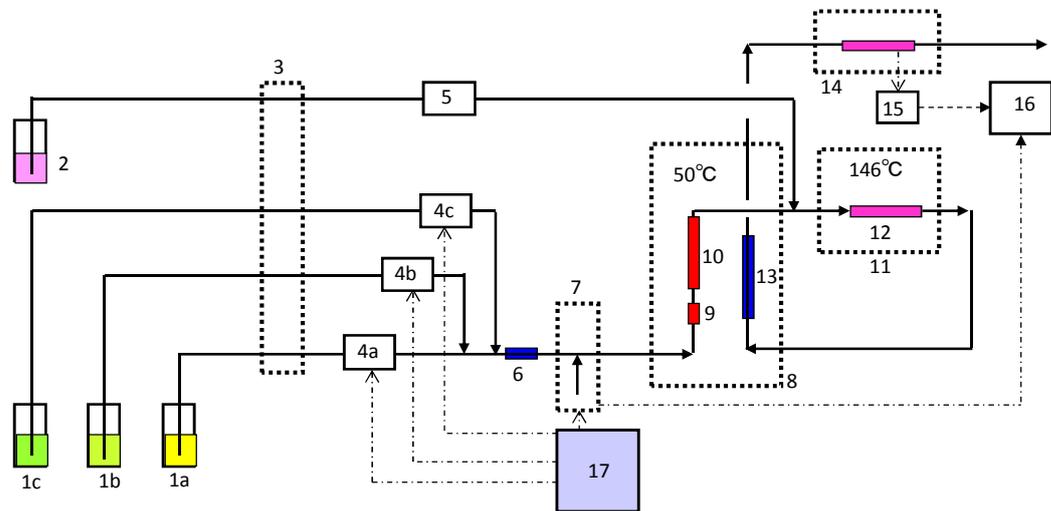
Fig. 4-4 .2-1 分析装置全体写真



Fig. 4-4 .2-2 反応オーブン内写真



Fig. 4-4 .2-3 カラムオーブン内写真



- |                   |                        |                           |
|-------------------|------------------------|---------------------------|
| 1a. 溶離液A          | 5. ポンプ LC-10ADvp       | 12. ピーク製反応管 0.5mmid×10m   |
| 1b. 溶離液B          | 6. インラインミキサー           | 13. 冷却管 SUS316 0.5mmid×7m |
| 1c. 溶離液C          | 7. オートサンプラー SIL-10ADvp | 14. 蛍光検出器 RF-10AXL        |
| 2. 反応液            | 8. カラムオープン CTO-10ACvp  | 15. クロマト信号変換機 (LAソフト社製)   |
| 3. デガッサ DGU-14A   | 9. ガードカラム              | 16. クロマト解析用PC             |
| 4a. ポンプ LC-10ADvp | 10. 分離カラム              | 17. システムコントローラ SCL-10Avp  |
| 4b. ポンプ LC-10AD   | 11. オープンGC-8A          |                           |
| 4c. ポンプ LC-10ADvp |                        |                           |

Fig. 4-4 .2-4 糖分析機器プロセスフロー

五炭糖	2.キシロース
	3.アラビノース
六炭糖	6.グルコース
	7.ガラクトース
	4.フルクトース
	5.マンノース
	1.ラムノース
二糖	10.マルトース
	9.セロビオース
	8.スクロース
	11.ラクトース
三糖	12.セロトリオース
	13.マルトトリオース
四糖	14.セロテトラオース
五糖	15.セロペンタオース
六糖	16.セロヘキサオース

Report.rtf

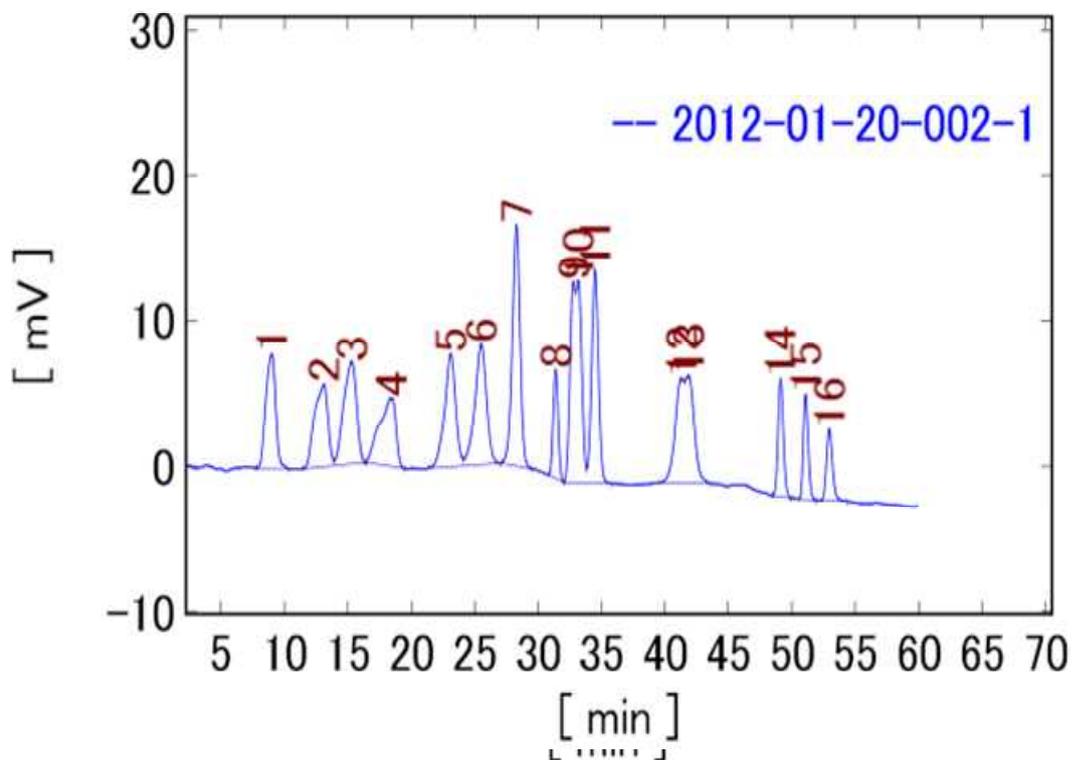


Fig. 4-4 .2-5 HPLC による糖 16 種の分析結果

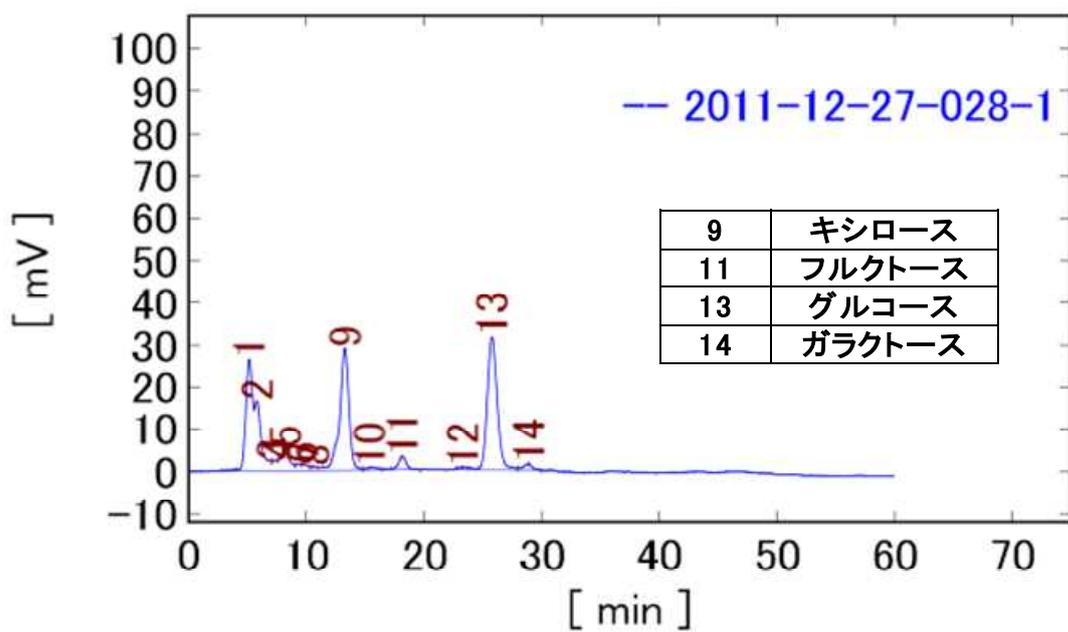


Fig. 4-4 .2-6 水熱爆砕処理物の酵素糖化 48 時間後の糖分析結果  
ケヤキ×260°C

#### 4. 4. 3 試薬による分析方法（省略）

#### 4. 4. 4 試薬法と HPLC 法による分析結果の比較

糖の種類と濃度が既知の同一試料に対して、試薬法と HPLC 法により生成糖の分析を行いその精度を比較検討した。

##### 1) 試験方法

下記①～④の操作を行った。なお、これらの試験は三回行い、再現性を確かめた。

##### ① グルコース水溶液による比較

濃度既知のグルコース水溶液を作成し、試薬法（グルコース CII-テストワコー）と HPLC 法で測定を行い、既定濃度との誤差を比較した。

##### ② キシロース水溶液による比較

濃度既知のキシロース水溶液を作成し、試薬法（キシロース測定キット）と HPLC 法で測定を行い、既定濃度との誤差を比較した。

##### ③ グルコース+キシロース水溶液による比較

濃度既知のグルコース+キシロース水溶液を作成し、試薬法（グルコース CII-テストワコー、キシロース測定キット、フェノール硫酸法）と HPLC 法で測定を行い、既定濃度との誤差を比較した。

##### ④ 糖 10 種混合水溶液による比較

グルコース、キシロースを含む濃度既知の糖 10 種混合水溶液を作成し、試薬法（グルコース CII-テストワコー、キシロース測定キット、フェノール硫酸法）と HPLC 法で測定を行い、既定濃度との誤差を比較した。

## 2) 結果

本試験の結果を Table. 4-4.4-1, 4-4.4-2, 4-4.4-3 に示す.

- ・グルコース分析では、試薬法は既知濃度との誤差が大きく精度が低いことを確認した。特に 10 種糖混合水溶液での分析ではその誤差が大きく、他の糖の存在によって結果が大きく変動していた。これは、グルコース以外の糖と試薬が反応したことが原因と考えられる。
- ・キシロース分析では、試薬法および HPLC 法の誤差は小さく問題ないことを確認した。
- ・全糖分析では、試薬法および HPLC 法の誤差は小さく問題ないことを確認した。

以上の結果から、グルコース試薬法は誤差が大きく前年度までの結果は再検討する必要がある。今後は糖類の分析は HPLC 法にて行い、補完的に試薬法で可溶性全糖分析を行うこととした。

Table. 4-4.4-1 グルコース分析の精度比較

条件			G	X	G+X	G+X+他8種の糖		
G濃度			g/l	0.1	0	0.1		
X濃度			g/l	0	0.1	0.1		
全糖濃度			g/l	0.1	0.1	0.2		
グルコース検量線			ABS/濃度[g/l]	0.2603	0.2603	0.2603		
キシロース検量線			ABS/濃度[g/l]	1.3749	1.3749	1.3749		
全糖検量線			ABS/濃度[g/l]	0.6688	0.6688	0.6688		
グルコース検量線			ピーク/濃度[g/l]	7233429	7233429	7233429		
キシロース検量線			ピーク/濃度[g/l]	4484405	4484405	4484405		
結果(試薬)	グルコースCII テストワコー	1	G ABS	-	0.04	-	0.032	0.064
			G濃度	g/l	0.154	-	0.123	0.246
		2	G ABS	-	0.033	-	0.031	0.043
			G濃度	g/l	0.127	-	0.119	0.165
		3	G ABS	-	0.027	-	0.026	0.028
			G濃度	g/l	0.104	-	0.100	0.108
平均	g/l	0.128	-	0.114	0.173			
結果(HPLC)		1	ピーク面積	-	799613	-	771468	650792
			G濃度	g/l	0.111	-	0.107	0.090
		2	ピーク面積	-	772268	-	820652	944761
			G濃度	g/l	0.107	-	0.113	0.131
		3	ピーク面積	-	727977	-	807705	861288
			G濃度	g/l	0.101	-	0.112	0.119
		平均	g/l	0.106	-	0.111	0.113	

注) G:グルコース

X:キシロース

Table. 4-4.4-2 キシロース分析の精度比較

条件			G	X	G+X	G+X+他8種の糖		
G濃度			g/l	0.1	0	0.1		
X濃度			g/l	0	0.1	0.1		
全糖濃度			g/l	0.1	0.1	0.2		
グルコース検量線			ABS/濃度[g/l]	0.2603	0.2603	0.2603		
キシロース検量線			ABS/濃度[g/l]	1.3749	1.3749	1.3749		
全糖検量線			ABS/濃度[g/l]	0.6688	0.6688	0.6688		
グルコース検量線			ピーク/濃度[g/l]	7233429	7233429	7233429		
キシロース検量線			ピーク/濃度[g/l]	4484405	4484405	4484405		
結果(試薬)	キシロース 測定キット	1	1回目 X ABS1	-	-	0.074	0.034	0.156
			X ABS2	-	-	0.212	0.175	0.297
			X濃度	g/l	-	0.100	0.103	0.103
		2	1回目 X ABS1	-	-	0.079	0.047	0.015
			X ABS2	-	-	0.217	0.186	0.152
			X濃度	g/l	-	0.100	0.101	0.100
		3	1回目 X ABS1	-	-	0.057	0.021	0.042
			X ABS2	-	-	0.194	0.155	0.178
			X濃度	g/l	-	0.100	0.097	0.099
平均	g/l	-	0.100	0.100	0.100			
結果(HPLC)		1	ピーク面積	-	463864	404239	325582	
			X濃度	g/l	-	0.103	0.090	0.073
		2	ピーク面積	-	518224	448575	486390	
			X濃度	g/l	-	0.116	0.100	0.108
		3	ピーク面積	-	476569	450761	448405	
			X濃度	g/l	-	0.106	0.101	0.100
		平均	g/l	-	0.108	0.097	0.094	

注) G:グルコース

X:キシロース

Table. 4-4.4-1 全糖分析の精度比較

			G	X	G+X	G+X+他8種の糖				
条件			G濃度	g/l	0.1	0	0.1	0.1		
			X濃度	g/l	0	0.1	0.1	0.1	0.1	
			全糖濃度	g/l	0.1	0.1	0.2	1		
			グルコース検量線	ABS/濃度[g/l]	0.2603	0.2603	0.2603	0.2603		
			キシロース検量線	ABS/濃度[g/l]	1.3749	1.3749	1.3749	1.3749		
			全糖検量線	ABS/濃度[g/l]	0.6688	0.6688	0.6688	0.6688		
			グルコース検量線	ピーク/濃度[g/l]	7233429	7233429	7233429	7233429		
			キシロース検量線	ピーク/濃度[g/l]	4484405	4484405	4484405	4484405		
結果(試薬)	フェノール 硫酸法	1	全糖 ABS	-	-	-	0.142	0.621		
			全糖濃度	g/l	-	-	0.212	0.929		
		2	全糖 ABS	-	-	-	0.124	0.651		
			全糖濃度	g/l	-	-	0.185	0.973		
		3	全糖 ABS	-	-	-	0.146	0.76		
			全糖濃度	g/l	-	-	0.218	1.136		
		平均		g/l	-	-	0.205	1.013		
		結果(HPLC)		1	全糖濃度	g/l	-	-	0.197	0.804
				2	全糖濃度	g/l	-	-	0.213	1.328
3	全糖濃度			g/l	-	-	0.212	1.141		
平均				g/l	-	-	0.207	1.091		

注) G:グルコース

X:キシロース

#### 4. 5 エタノール発酵阻害物質分析方法

##### 4. 5. 1 エタノール発酵阻害物質の種類と構造

エタノール発酵を阻害する物質として、Fig. 4-5.1-1 に示す 8 成分を分析対象とした。

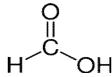
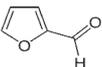
	名称	組成式	構造式
有機酸	ギ酸	HCOOH	
	酢酸	CH <sub>3</sub> COOH	
有機酸以外	フルフラール	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	
	5HMF	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	
	p-HBA	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	
	シリンガアルデヒド	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	
	グアイアコール	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	
	バニリン	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	

Fig. 4-5.1-1 発酵阻害物質の構造と種類

#### 4. 5. 2 有機酸（酢酸，ギ酸）分析方法

##### 1) 分析装置

Fig. 4-5.2-1, 4-5.2-2 に示す HPLC（高速液クロマトグラフ）を用いた.

##### 2) 分析条件

有機酸分析条件を Table. 4-5.2-1 に示す.

##### 3) 検量線の作成

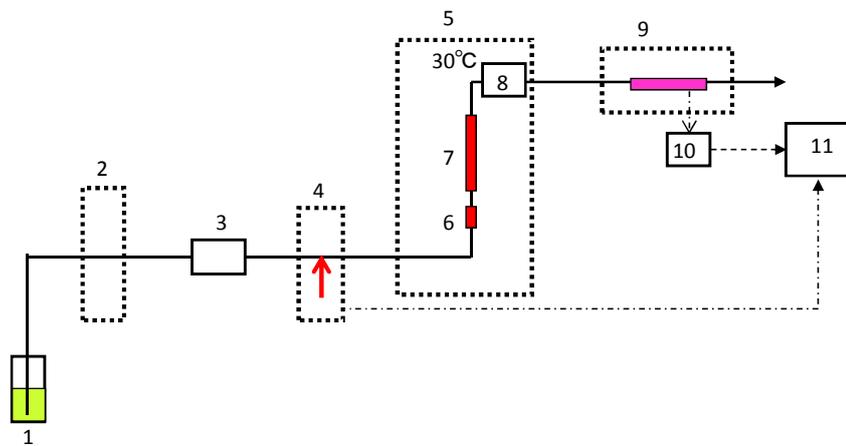
濃度既知の標準物質水溶液の打ち込み重量とピーク面積の関係をプロットし検量線を作成した. 水熱爆砕酵素糖化前試料の分析例を Fig. 4-5.2-3 に示し, ギ酸, 酢酸の検量線を Fig. 4-5.2-4, 4-5.2-5 に示.

Table. 4-5.2-1 有機酸分析条件

溶離液	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3.2mM) NaHCO <sub>3</sub> (1.0mM)
溶離液流量[ml/min]	0.50
測定時間[min]	20
試料注入量[ $\mu$ l]	10
カラム	Shodex IC SI-50 4E 4mm $\times$ 250mm(サブレッサ用)
検出器	島津電気伝導度検出器 CDD-10Asp
カラム温度[ $^{\circ}$ C]	50
出口圧力[MPa]	0



Fig. 4-5.2-1 装置全体写真



- |                        |                        |
|------------------------|------------------------|
| 1. 溶離液                 | 6. ガードカラム              |
| 2. デガッサ DGU-20A3       | 7. 分離カラム               |
| 3. ポンプ LC-20ADvp       | 8. サプレッサー HIC-10Asuper |
| 4. オートサンプラー SIL-20Aasp | 9. 電気伝導度検出器 CDD-10Aasp |
| 5. カラムオープン CTO-20ACsp  | 10. クロマト信号変換機(LAソフト社製) |
|                        | 11. クロマト解析用PC          |

Fig. 4-5.2-2 有機酸分析機器プロセスフロー

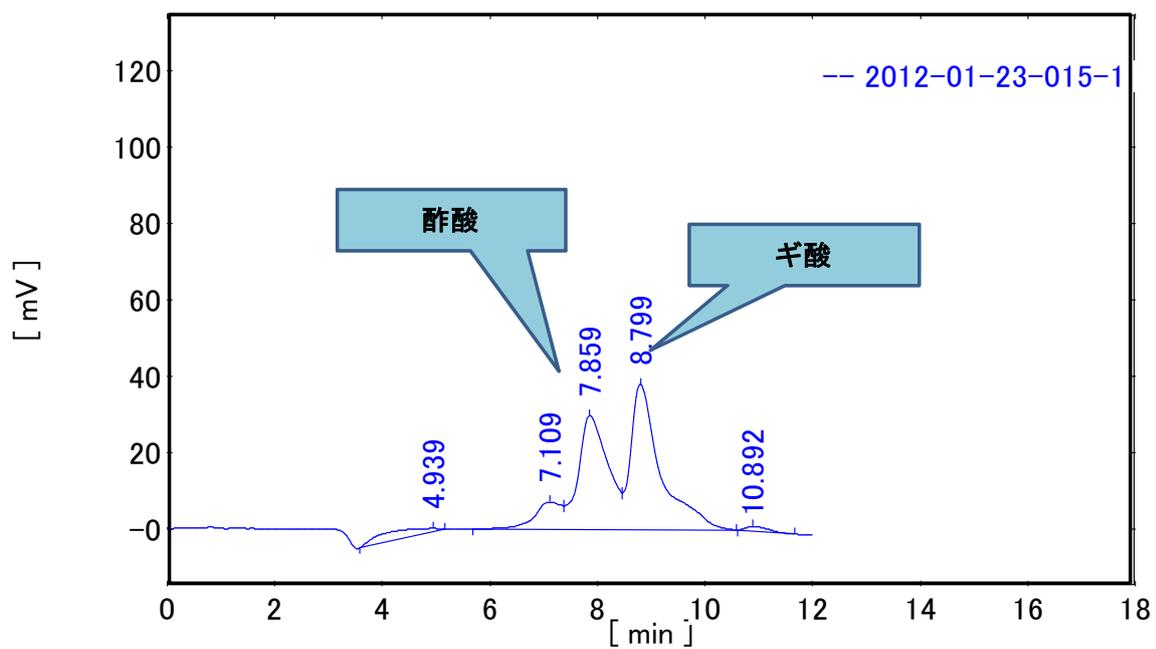


Fig. 4-5.2-3 水熱爆砕酵素糖化前試料の有機酸分析ピーク  
杉×280°C

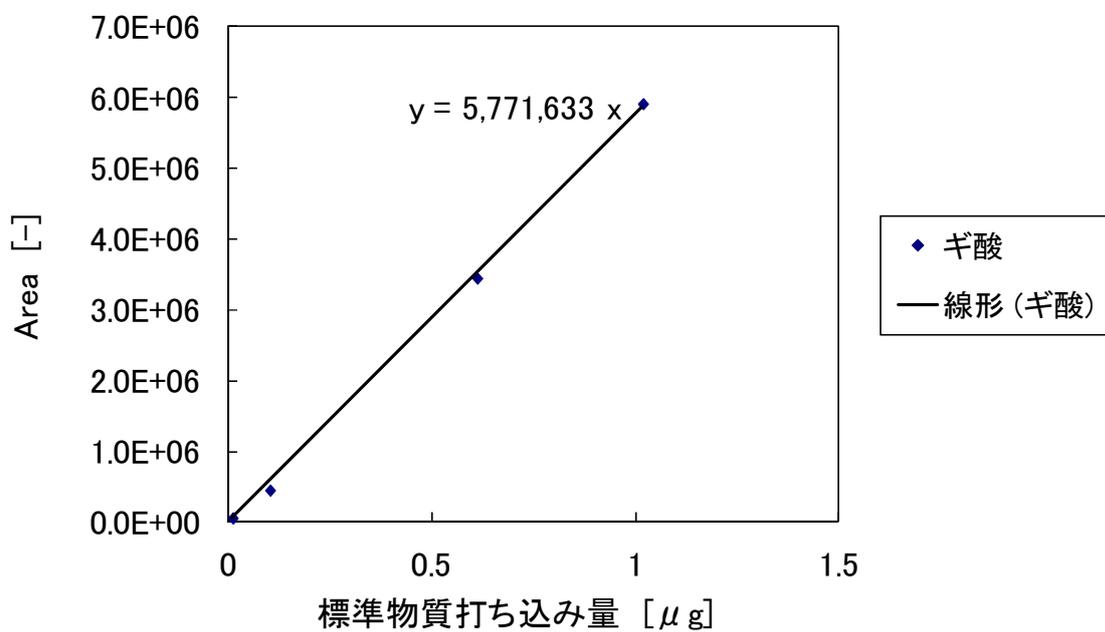


Fig. 4-5.2-4 検量線 (ギ酸)

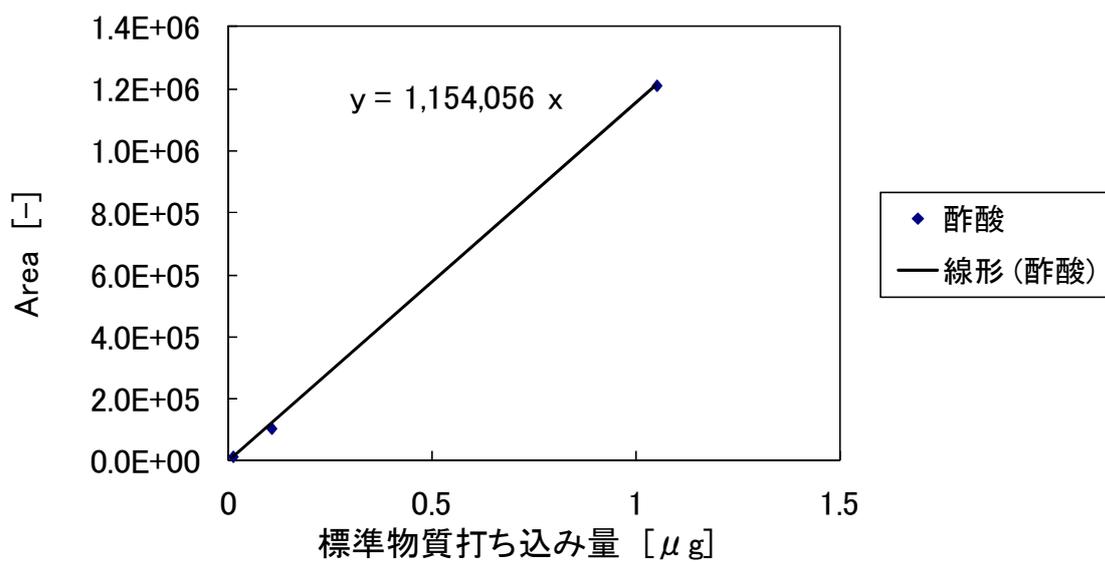


Fig. 4-5.2-5 検量線 (酢酸)

#### 4. 5. 3 発酵阻害物質（フェノール類，フルフラール類）の分析方法

##### 1) 分析装置

Fig. 4-5.3-1, 4-5.3-2 に示す HPLC（高速液クロマトグラフ）を用いた。

##### 2) 分析条件

分析条件を Table. 4-5.3-1 に示す。

##### 3) 検量線の作成

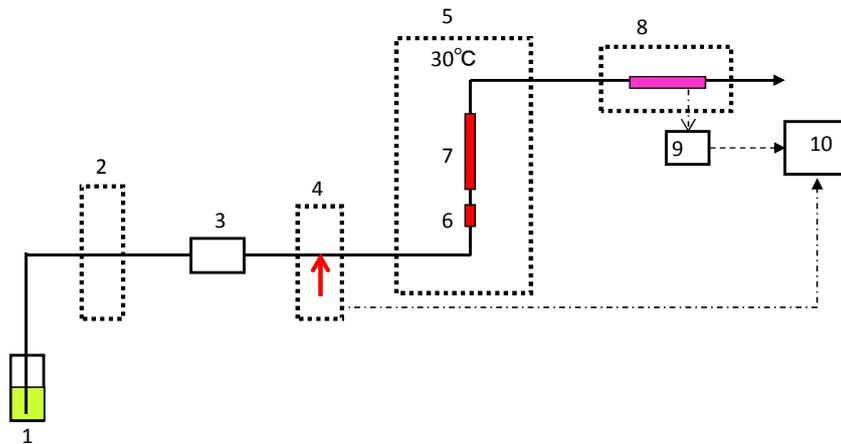
濃度既知の標準物質水溶液を打ち込み、その重量とピーク面積の関係をプロットし検量線を作成した。水熱爆砕酵素糖化前試料の分析例を Fig. 4-5.3-3 に、各物質の検量線を Fig. 4-5.3-3 から 4-5.3-8 に示す。

Table. 4-5.3-1 有機酸を除く発酵阻害物質分析条件

溶離液	水/メタノール/硫酸テトラブチルアンモニウム =714/245/0.6(重量比)
溶離液流量 [ml/min]	0.50
測定時間 [min]	40
試料注入量 [ $\mu$ l]	5
カラム	ODS HYPERSIL Dim(mm) 250 × 4.6
検出器	日本分光 SPD-10A
カラム温度 [°C]	30
波長 [nm]	280
出口圧力 [MPa]	0



Fig. 4-5.3-1 装置全体写真



- |                        |                        |
|------------------------|------------------------|
| 1. 溶離液                 | 6. ガードカラム              |
| 2. デガッサ DGU-14A        | 7. 分離カラム               |
| 3. ポンプ LC-10ADvp       | 8. 蛍光検出器 RF-10AXL      |
| 4. オートサンプラー SIL-10ADvp | 9. クロマト信号変換機 (LAソフト社製) |
| 5. カラムオーブン CTO-10ACvp  | 10. クロマト解析用PC          |

Fig. 4-5.3-2 有機酸を除く発酵阻害物質分析機器プロセスフロー

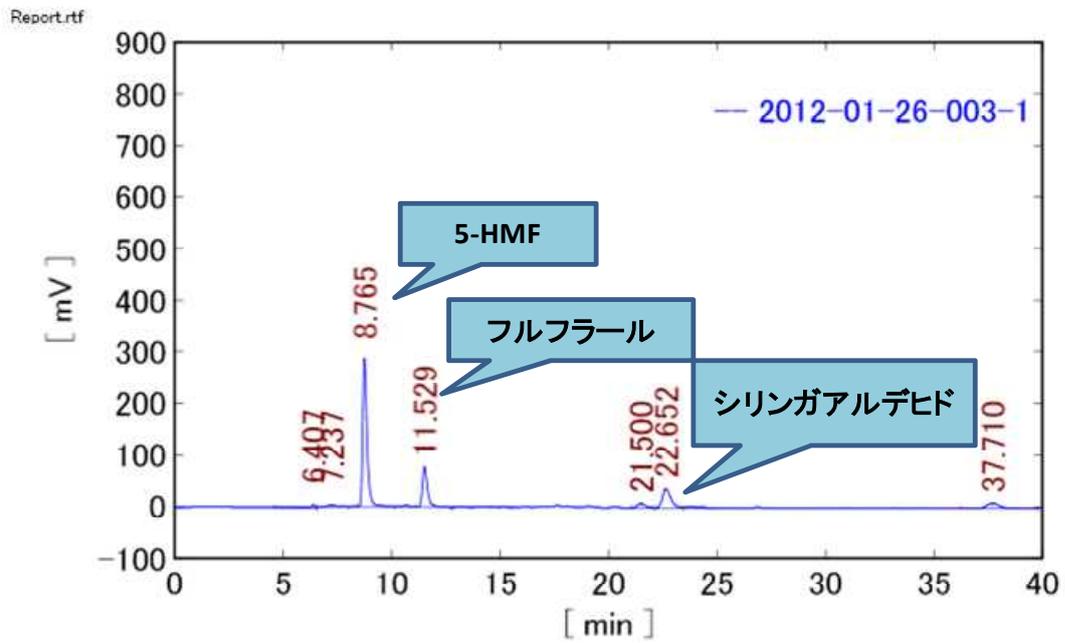


Fig. 4-5.3-3 水熱爆砕酵素糖化前試料の発酵阻害分析ピーク表示  
杉×260℃

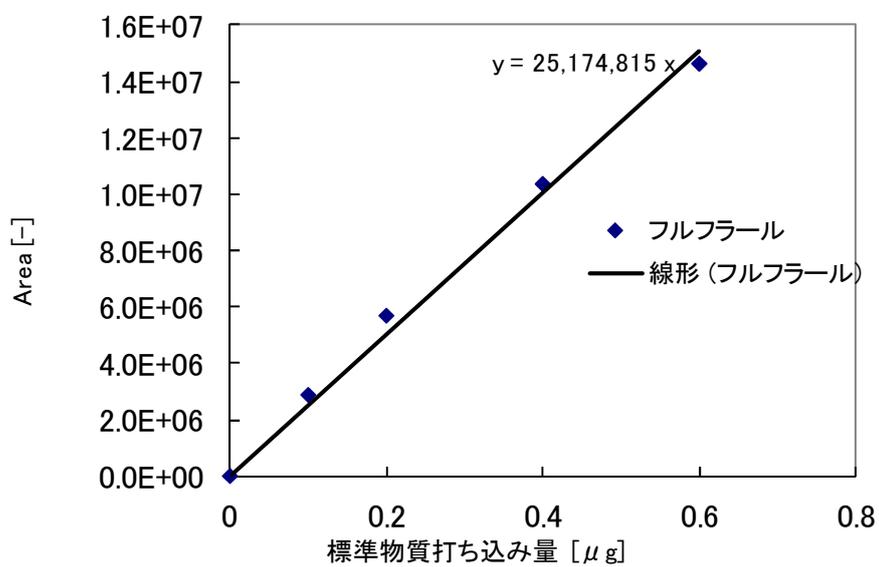


Fig. 4-5.3-3 検量線 (フルフラール)

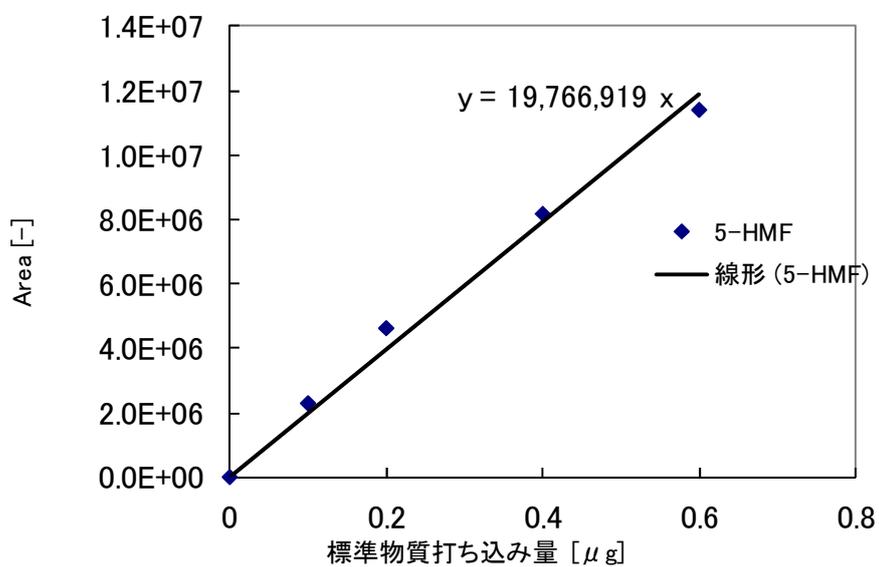


Fig. 4-5.3-4 検量線 (5-HMF)

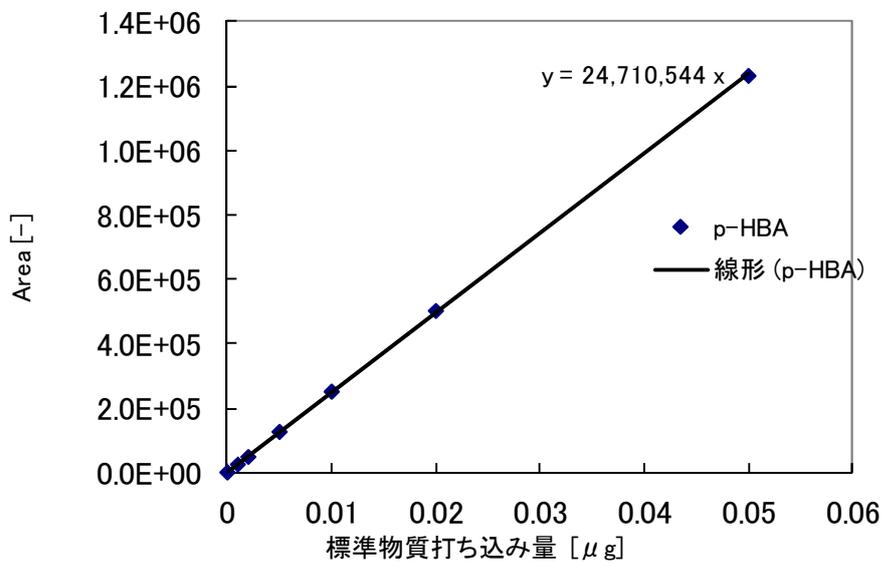


Fig. 4-5.3-5 検量線(p-HBA)

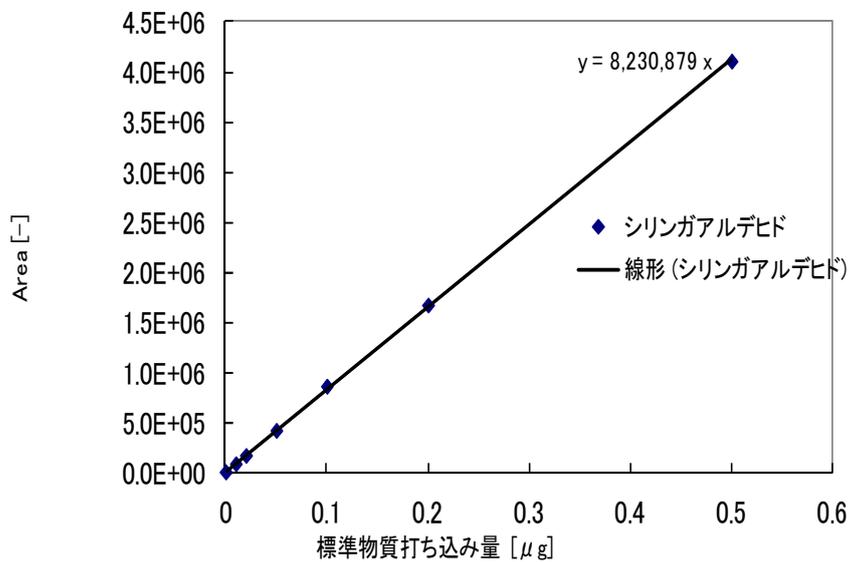


Fig. 4-5.3-6 検量線(シリンガアルデヒド)

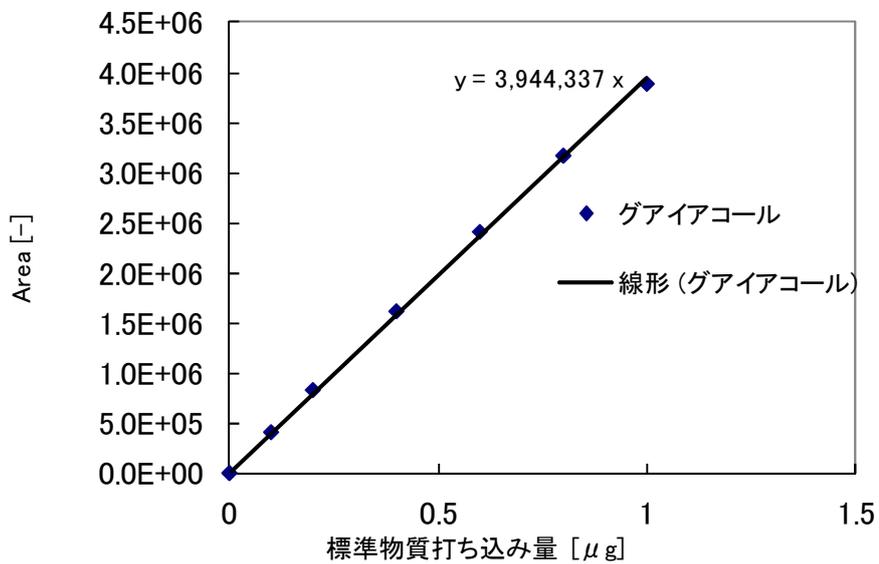


Fig. 4-5.3-7 検量線(グアイアコール)

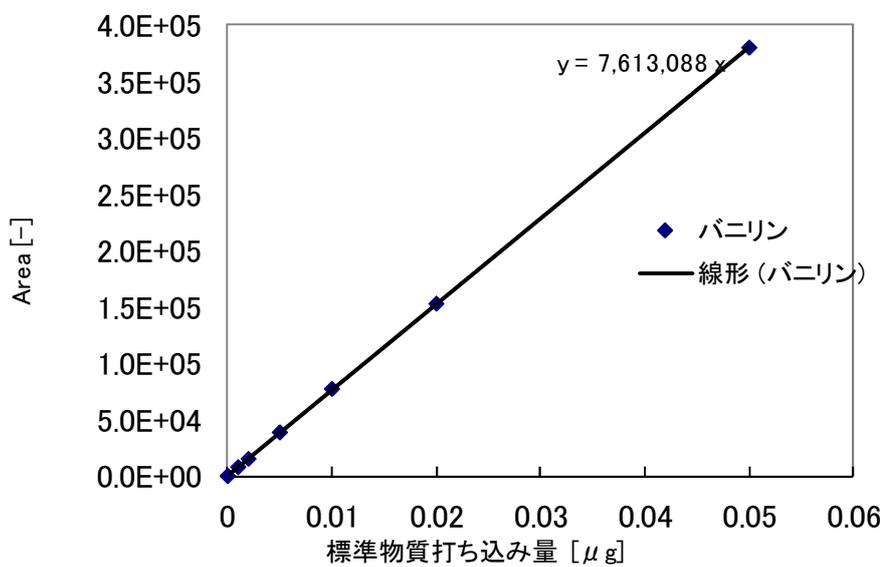


Fig. 4-5.3-8 検量線(バニリン)

## 5章 バイオマスの前処理と酵素糖化試験結果

### 5.1 前年度までの結果の比較試験（杉、ケヤキ）

前年度までに明らかにした最適前処理+酵素糖化サンプルに対して前章で確立した分析を適用し、分析方法の変更による差異の有無を確認するとともに、水熱爆砕の優位性をより詳細に評価した。

前年度選定した最適前処理条件下にて、水熱爆砕、水蒸気爆砕、水熱徐冷処理物の酵素糖化をそれぞれ3回行い、酵素糖化液の糖分析を試薬法とHPLC法で行いその差異を比較した。杉およびケヤキの最適前処理条件と昇温パターンをTable. 5.1-1, 5.1-2, Fig. 5.1-1, 5.1-2に示す。

Table. 5.1-1 杉酵素糖化前処理試験条件

Run No.	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9
原料	杉	杉	杉	杉	杉	杉	杉	杉	杉
処理方法	水熱爆砕	水熱爆砕	水熱爆砕	水蒸気爆砕	水蒸気爆砕	水蒸気爆砕	水熱徐冷	水熱徐冷	水熱徐冷
処理前重量 [g]	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
設定圧力 [MPa]	8.0	8.0	8.0	4.5	4.5	4.5	8.0	8.0	8.0
1段目	処理温度 [°C]	180	180	180	180	180	180	180	180
	保持時間 [sec]	0	0	0	0	0	0	0	0
2段目	処理温度 [°C]	260	260	260	260	260	260	260	260
	保持時間 [sec]	600	600	600	600	600	600	600	600

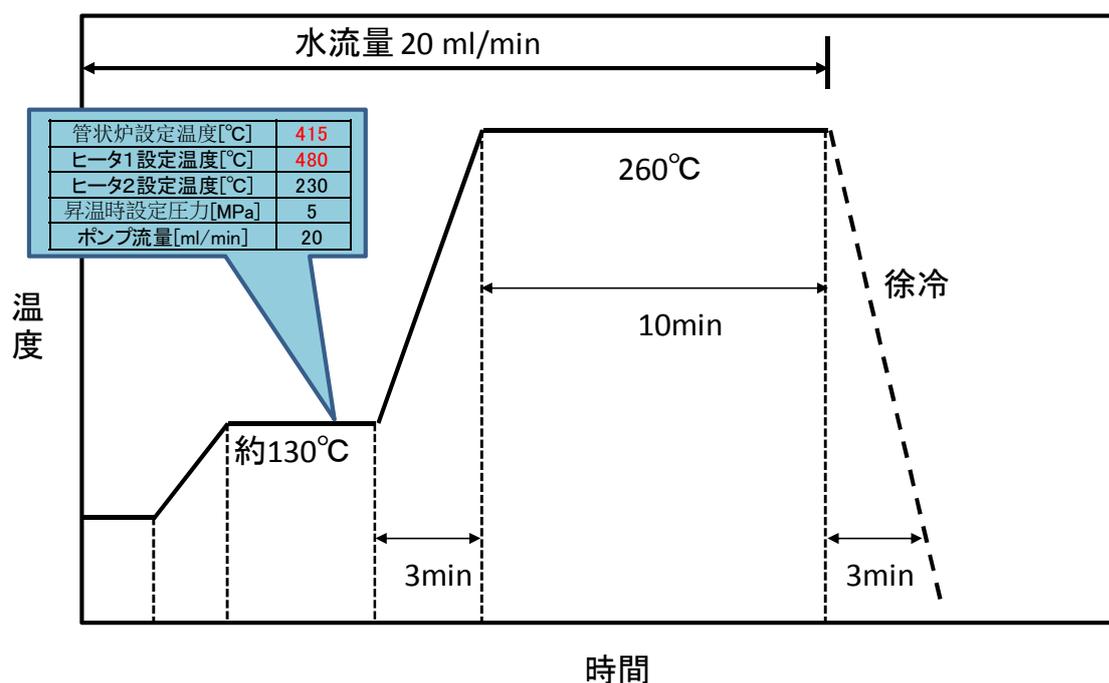


Fig. 5.1-1 杉前処理試験昇温・降温パターン

Table. 5.1-2 ケヤキ酵素糖化前処理試験条件

Run No.	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7	K-8	K-9
原料	ケヤキ	ケヤキ	ケヤキ	ケヤキ	ケヤキ	ケヤキ	ケヤキ	ケヤキ	ケヤキ
処理方法	水熱爆砕	水熱爆砕	水熱爆砕	水蒸気爆砕	水蒸気爆砕	水蒸気爆砕	水熱徐冷	水熱徐冷	水熱徐冷
処理前重量 [g]	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
設定圧力 [MPa]	8.0	8.0	8.0	4.5	4.5	4.5	8.0	8.0	8.0
1段目	処理温度 [°C]	180	180	180	180	180	180	180	180
	保持時間 [sec]	600	600	600	600	600	600	600	600
2段目	処理温度 [°C]	260	260	260	260	260	260	260	260
	保持時間 [sec]	600	600	600	600	600	600	600	600

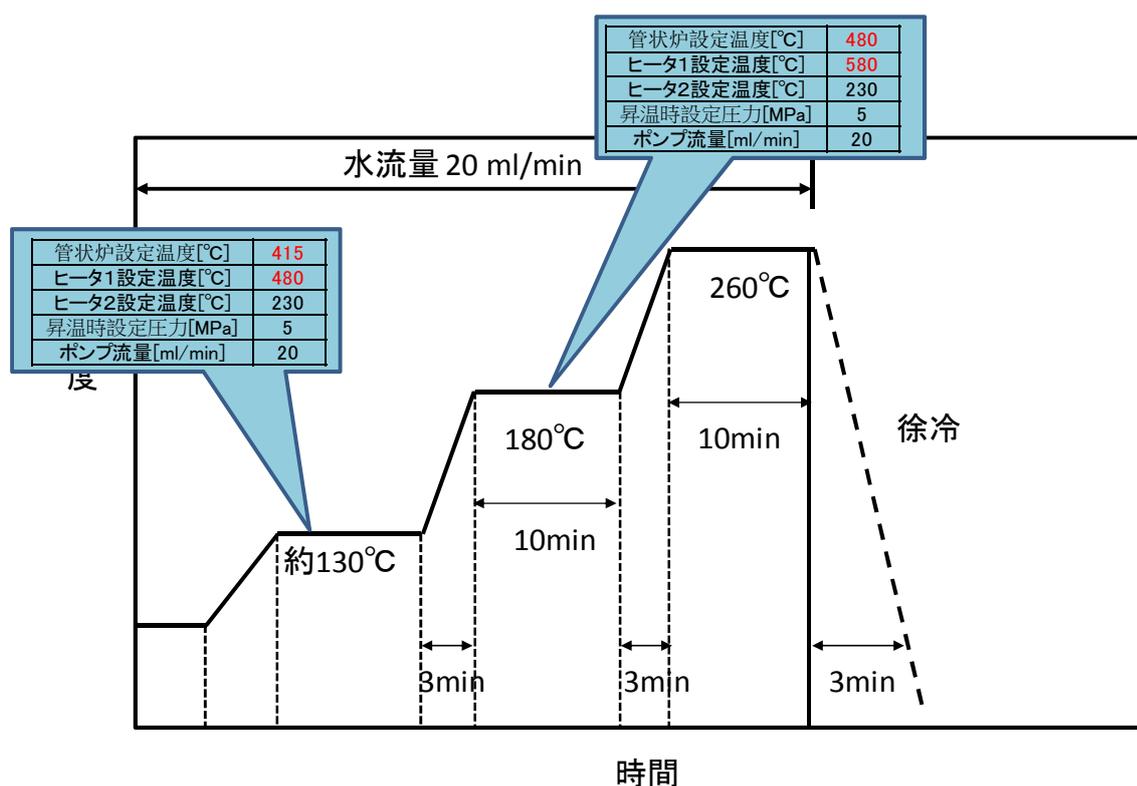


Fig. 5.1-2 ケヤキ前処理試験昇温・降温パターン

## 5. 1. 1 杉の場合

### (1) 生成糖分析

杉について水熱爆砕、水蒸気爆砕および水熱徐冷の前処理を同一温度でそれぞれ3回行い、それぞれ酵素糖化を行った。糖収率と糖化時間の関係をそれぞれ Fig. 5.1.1-1 から 5.1.1-3 に示す。それぞれの酵素糖化 48 時間後の糖収率を Fig. 5.1.1-4 に示す。

また、試薬による糖分析を行った前年度までの試験結果と HPLC で糖分析を行った結果の比較を Fig.5.1.1-5 に示す。

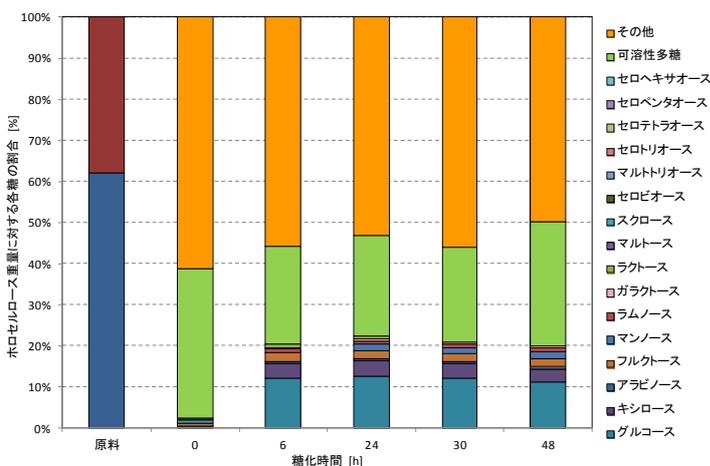
### (2) 発酵阻害物質分析

杉について水熱爆砕、水蒸気爆砕および水熱徐冷の前処理を同一温度でそれぞれ3回行い、それぞれ酵素糖化を行った。48時間後の酵素糖化液中の9の発酵阻害物質分析結果を Fig. 5.1.1-6 に示す。また、各前処理方法別に発酵阻害物質成量の平均値を 5.1.1-7 に示す。

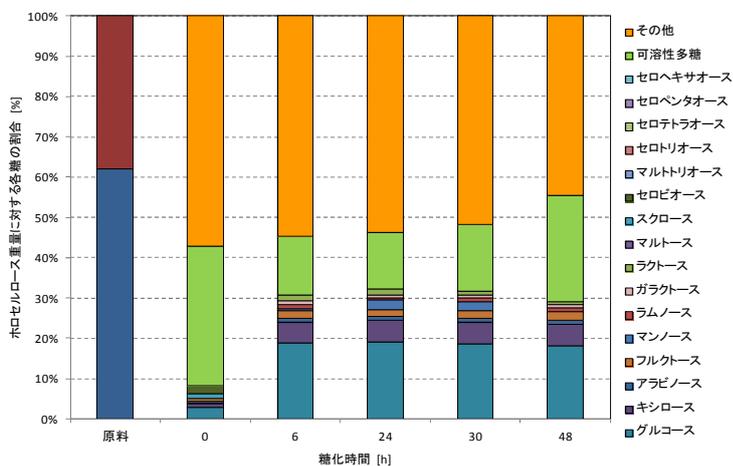
### (3) 考察

- ・前年度選定した最適前処理条件において、分析方法によらず水熱爆砕前処理が他の前処理より糖主率が大きく優位であることが確認できた。
- ・本年度から新たに分析を始めた発酵阻害物質の生成量は、水熱爆砕と水熱徐冷でやや大きくなっており、前年度までの発酵阻害物質（有機酸）の測定結果の傾向と類似していた。以上のことから、分析方法の変更に伴う糖、発酵阻害物質生成量の傾向に変化はないことを確認した。

RUN No.		S-1	
原料(杉) [g-dry]		1.50	
処理方法		水熱爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	260
		時間[min]	10
溶液量[ml]		500	
基質濃度[wt%]		0.300	
糖化温度[°C]		50	
糖化条件	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理		無



RUN No.		S-2	
原料(杉) [g-dry]		1.50	
処理方法		水熱爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	260
		時間[min]	10
溶液量[ml]		500	
基質濃度[wt%]		0.300	
糖化温度[°C]		50	
糖化条件	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理		無



RUN No.		S-3	
原料(杉) [g-dry]		1.50	
処理方法		水熱爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	260
		時間[min]	10
溶液量[ml]		500	
基質濃度[wt%]		0.300	
糖化温度[°C]		50	
糖化条件	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理		無

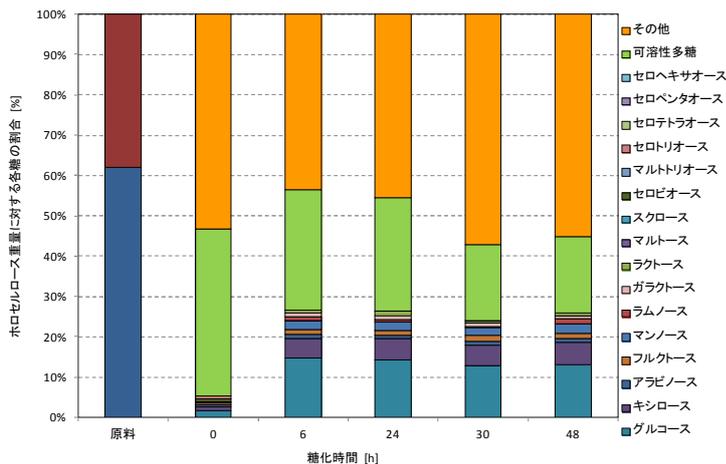
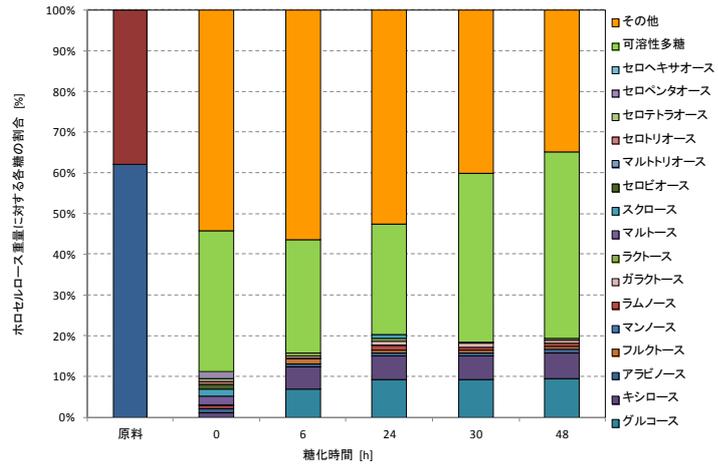
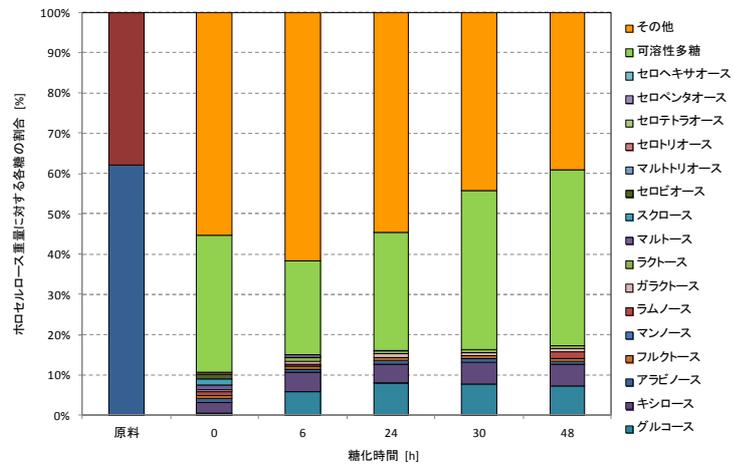


Fig. 5.1.1-1 水熱爆砕前処理物の酵素糖化結果 (杉×260°C)

RUN No.		S-4		
原料(杉)[g-dry]		1.50		
前処理条件	処理方法		水蒸気爆砕	
	1段目	温度[°C]	180	
		時間[min]	0	
	2段目	温度[°C]	260	
時間[min]		10		
糖化条件	溶液量[ml]	500		
	基質濃度[wt%]	0.300		
	糖化温度[°C]	50		
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075	
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075	
	サンプル煮沸処理	無		



RUN No.		S-5		
原料(杉)[g-dry]		1.50		
前処理条件	処理方法		水蒸気爆砕	
	1段目	温度[°C]	180	
		時間[min]	0	
	2段目	温度[°C]	260	
時間[min]		10		
糖化条件	溶液量[ml]	500		
	基質濃度[wt%]	0.300		
	糖化温度[°C]	50		
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075	
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075	
	サンプル煮沸処理	無		



RUN No.		S-6		
原料(杉)[g-dry]		1.50		
前処理条件	処理方法		水蒸気爆砕	
	1段目	温度[°C]	180	
		時間[min]	0	
	2段目	温度[°C]	260	
時間[min]		10		
糖化条件	溶液量[ml]	500		
	基質濃度[wt%]	0.300		
	糖化温度[°C]	50		
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075	
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075	
	サンプル煮沸処理	無		

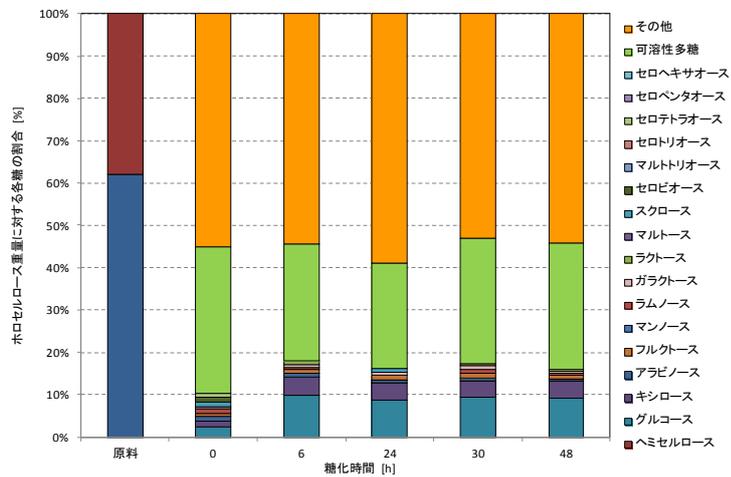
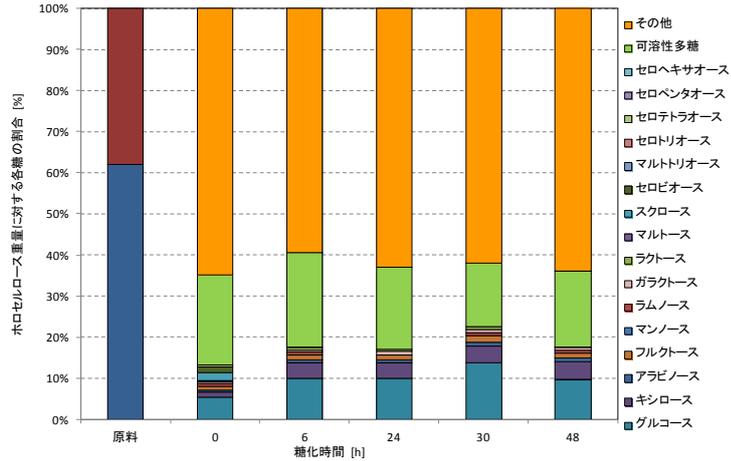
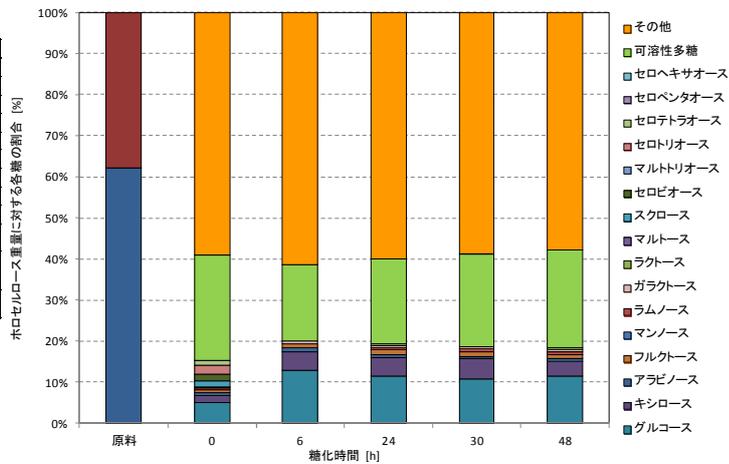


Fig. 5.1.1-2 水蒸気爆砕処理物の酵素糖化結果 (杉×260°C)

RUN No.		S-7	
原料(杉)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱徐冷	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	260
		時間[min]	10
糖化条件			
溶液量[ml]		500	
基質濃度[wt%]		0.300	
糖化温度[°C]		50	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075	
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075	
サンプル煮沸処理		無	



RUN No.		S-9	
原料(杉)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱徐冷	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	260
		時間[min]	10
糖化条件			
溶液量[ml]		500	
基質濃度[wt%]		0.300	
糖化温度[°C]		50	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075	
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075	
サンプル煮沸処理		無	



RUN No.		S-8	
原料(杉)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱徐冷	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	260
		時間[min]	10
糖化条件			
溶液量[ml]		500	
基質濃度[wt%]		0.300	
糖化温度[°C]		50	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075	
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075	
サンプル煮沸処理		無	

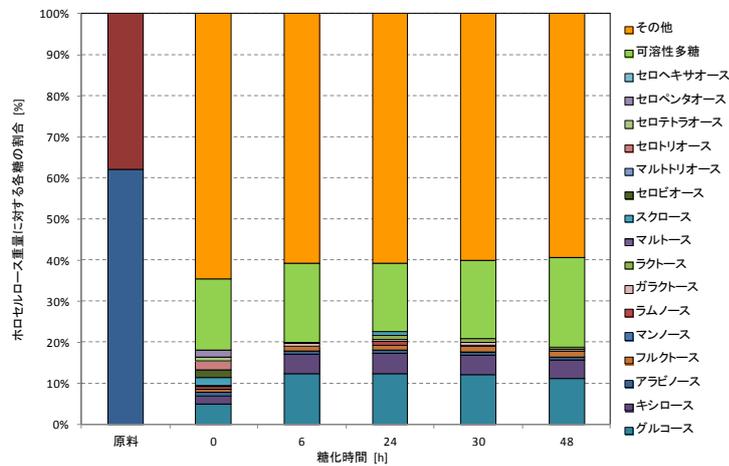


Fig. 5.1.1-3 水熱徐冷前処理物の酵素糖化結果 (杉×260°C)

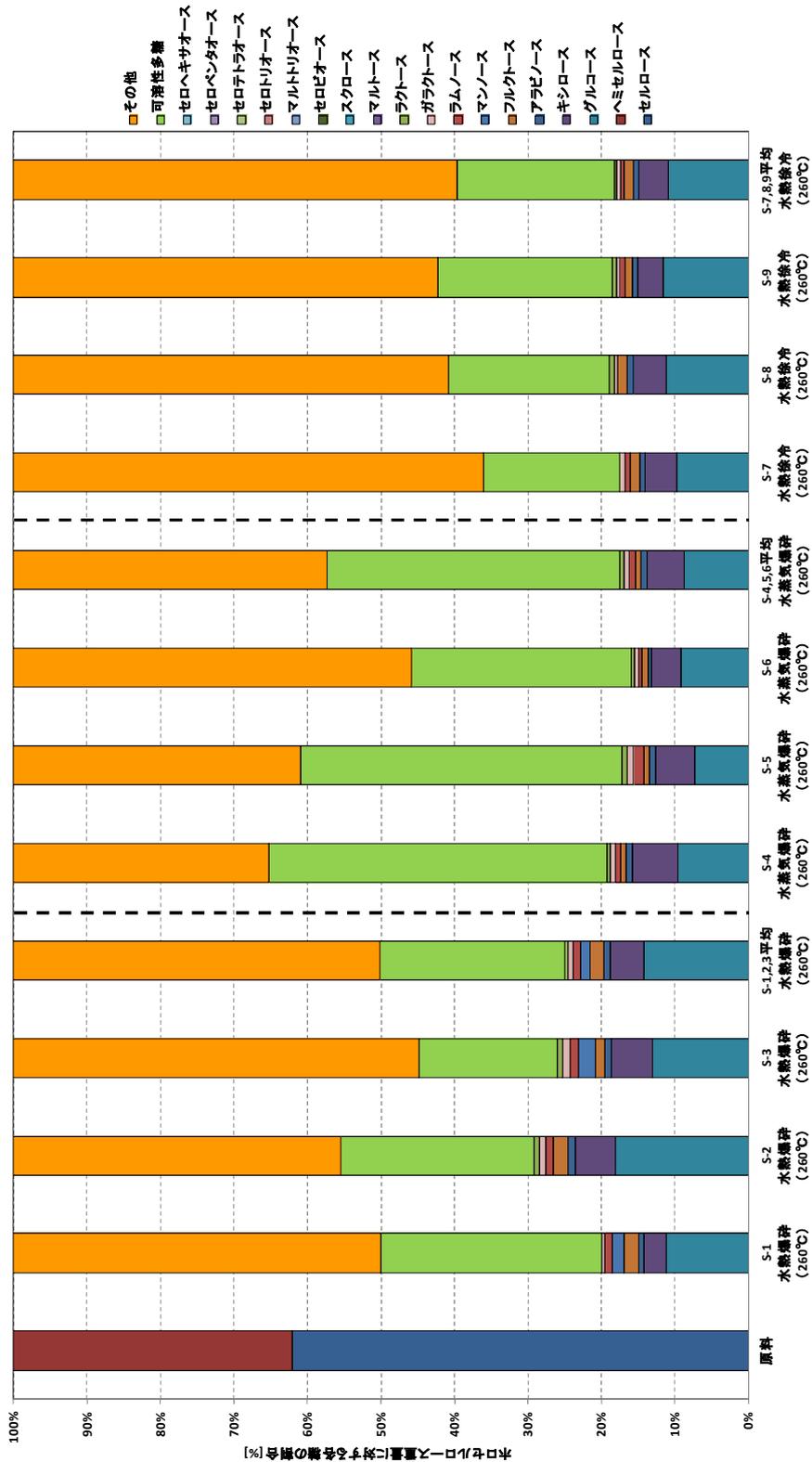


Fig.5.1.1-4 各種前処理物の酵素糖化結果(杉、前処理温度260°C)

前処理条件			糖化条件			
前処理条件	原料(杉)[g-dry]		溶液量[ml]		500	
	1段目	温度[°C]	基質濃度[wt%]		0.300	
		時間[min]	糖化温度[°C]		50	
	2段目	温度[°C]	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)		0.075
		時間[min]		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)		0.075
				サンプル煮沸処理		無

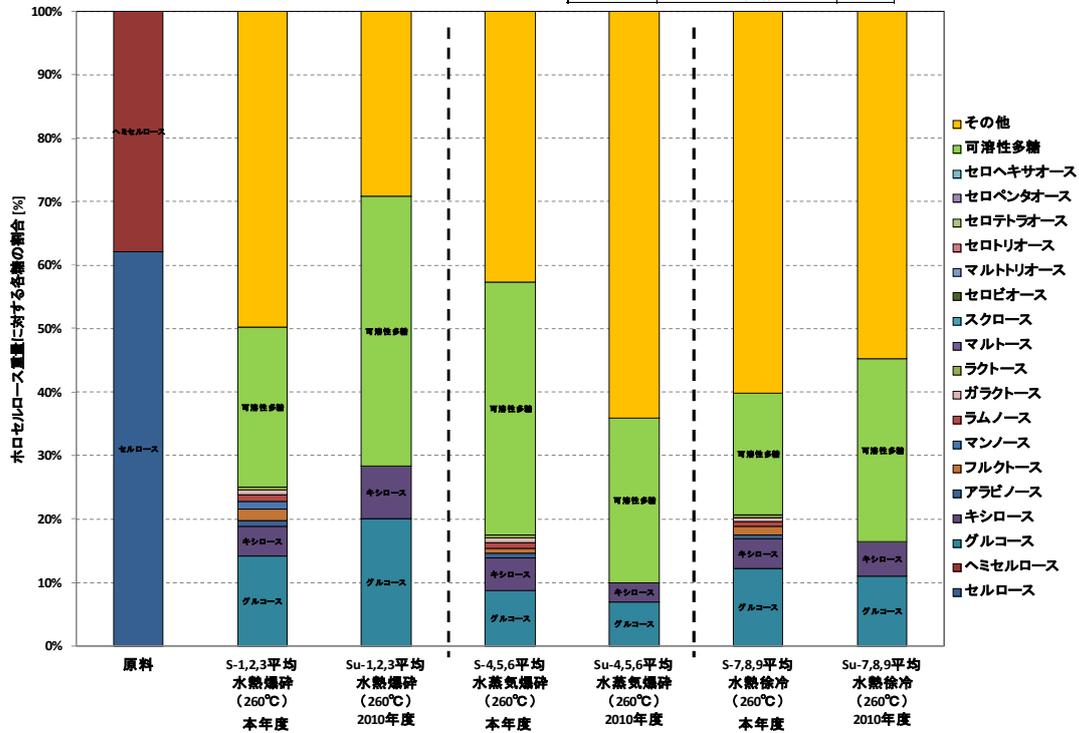


Fig. 5.1.1-5 HPLC 法（本年度）と試薬分析法（2010 年度）の比較

原料：杉

前処理温度：260°C

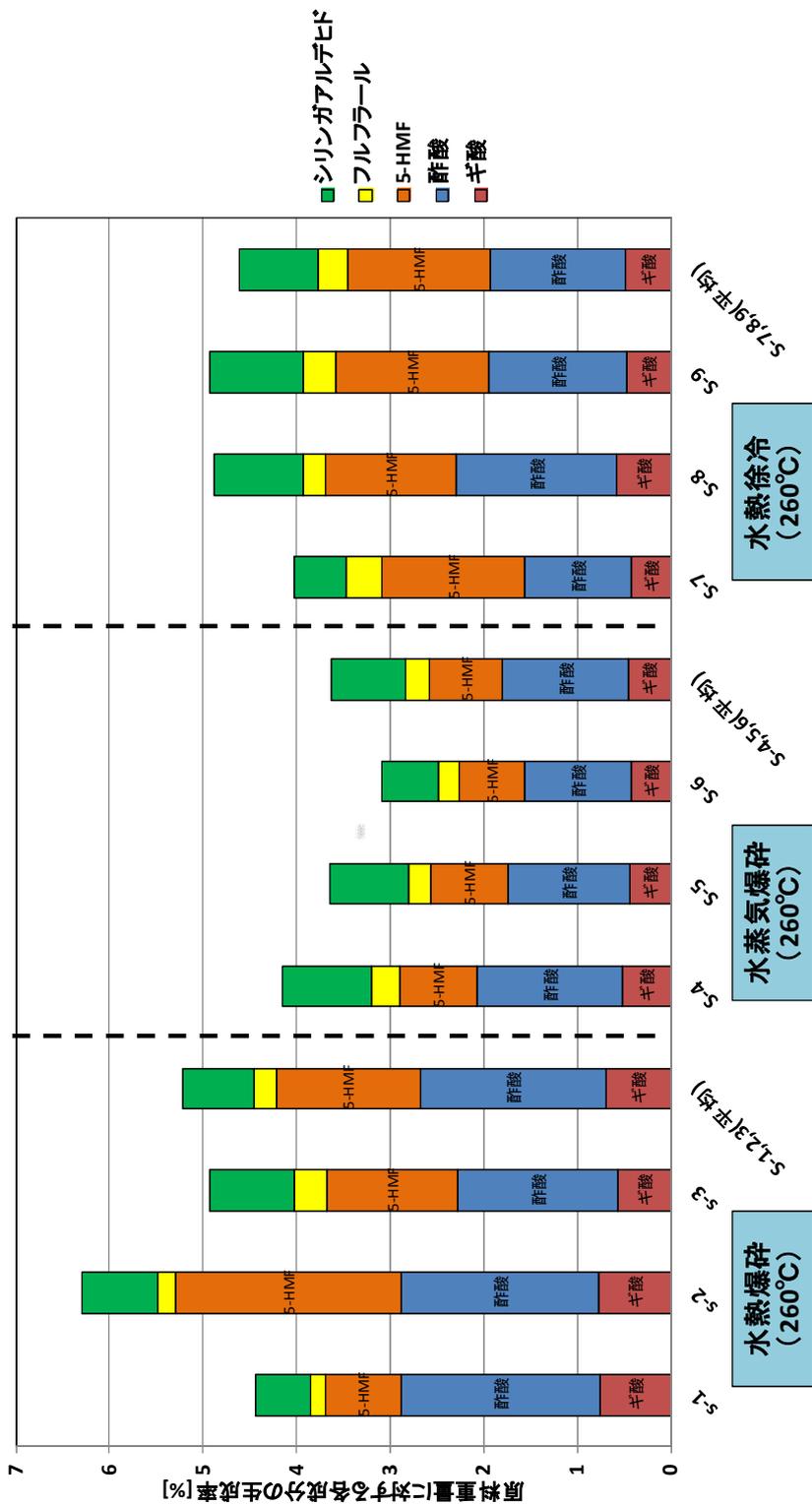


Fig.5.1.1-6 各種前処理物の酵素糖化液中の発酵阻害物質の生成量 (杉 × 260°C)

原料(杉)[g-dry]			1.50
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	260
		時間[min]	10
測定条件	溶離液流量 [ml/min]		0.50
	測定時間 [min]		40
	試料注入量 [μl]		5
	カラム温度 [°C]		30

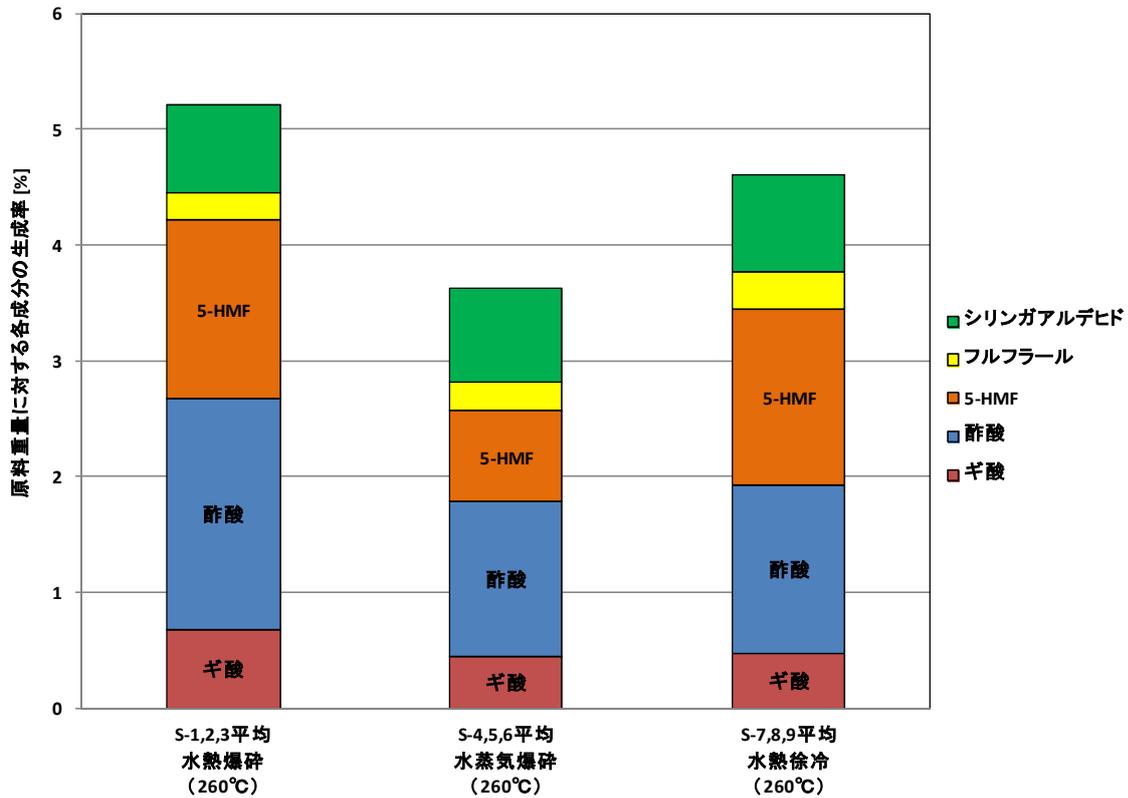


Fig. 5.1.1-7 前処理別の発酵阻害物質生成量の比較  
杉×260°C

## 5. 1. 2 ケヤキの場合

### (1) 生成糖分析

ケヤキについて水熱爆砕、水蒸気爆砕および水熱徐冷の前処理を同一温度でそれぞれ3回行い、それぞれ酵素糖化を行った。糖収率と糖化時間の関係をそれぞれ Fig. 5.1.2-1 から 5.1.2-3 に示す。それぞれの酵素糖化 48 時間後の糖収率を Fig. 5.1.2-4 に示す。

また、試薬による糖分析を行った前年度までの試験結果と HPLC で糖分析を行った結果の比較を Fig.5.1.2-5 に示す。

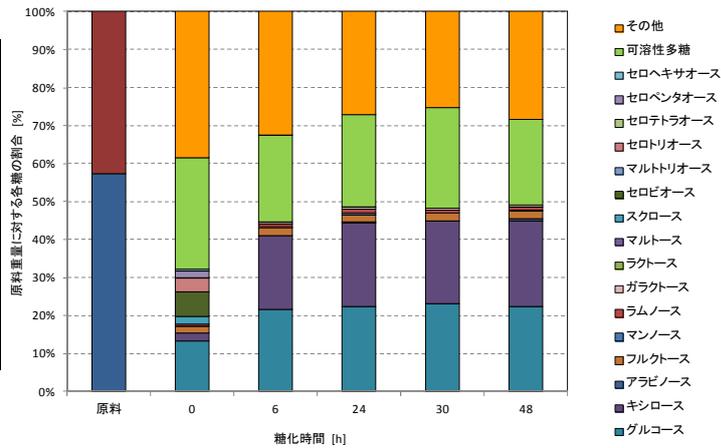
### (2) 発酵阻害物質分析

ケヤキについて水熱爆砕、水蒸気爆砕および水熱徐冷の前処理を同一温度でそれぞれ3回行い、それぞれ酵素糖化を行った。48時間後の酵素糖化液中の9の発酵阻害物質分析結果を Fig. 5.1.2-6 に示す。また、各前処理方法別に発酵阻害物質成量の平均値を 5.1.2-7 に示す。

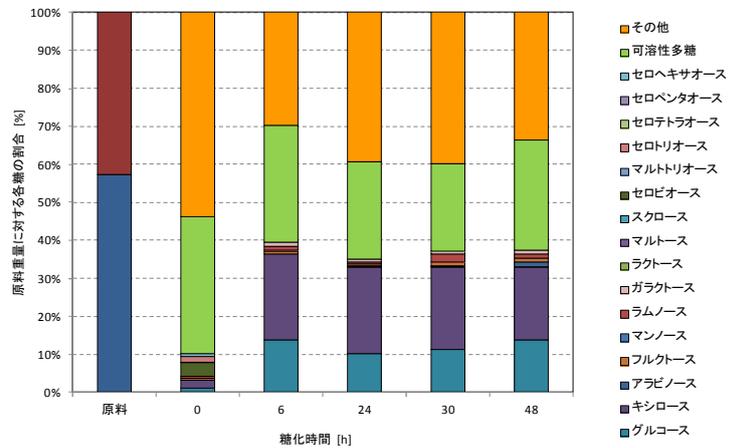
### (3) 考察

- ・前年度選定した最適前処理条件において、分析方法によらず水熱爆砕前処理が他の前処理より糖主率が大きく優位であることが確認できた。
- ・本年度から新たに分析を始めた発酵阻害物質の生成量は、水熱爆砕と水熱徐冷でやや大きくなっており、前年度までの発酵阻害物質（有機酸）の測定結果の傾向と類似していた。以上のことから、分析方法の変更に伴う糖、発酵阻害物質生成量の傾向に変化はないことを確認した。

RUN No.		K-1	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	10
	2段目	温度[°C]	260
		時間[min]	10
溶液量[ml]		500	
基質濃度[wt%]		0.300	
糖化温度[°C]		50	
糖化条件	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理		無



RUN No.		K-2	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	10
	2段目	温度[°C]	260
		時間[min]	10
溶液量[ml]		500	
基質濃度[wt%]		0.300	
糖化温度[°C]		50	
糖化条件	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理		無



RUN No.		K-3	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	10
	2段目	温度[°C]	260
		時間[min]	10
溶液量[ml]		500	
基質濃度[wt%]		0.300	
糖化温度[°C]		50	
糖化条件	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理		無

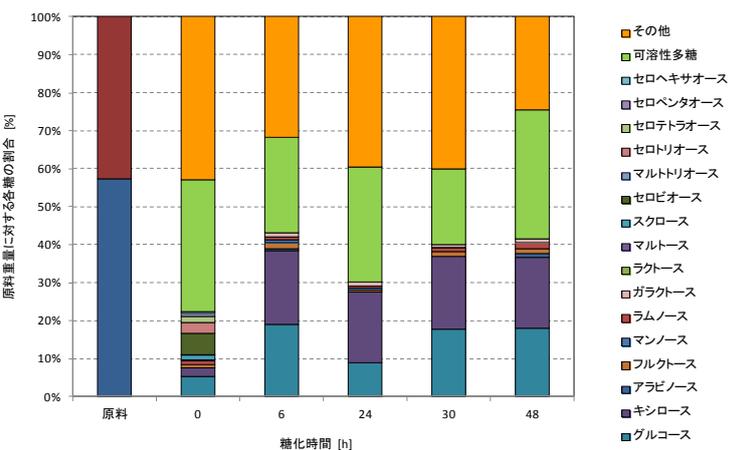
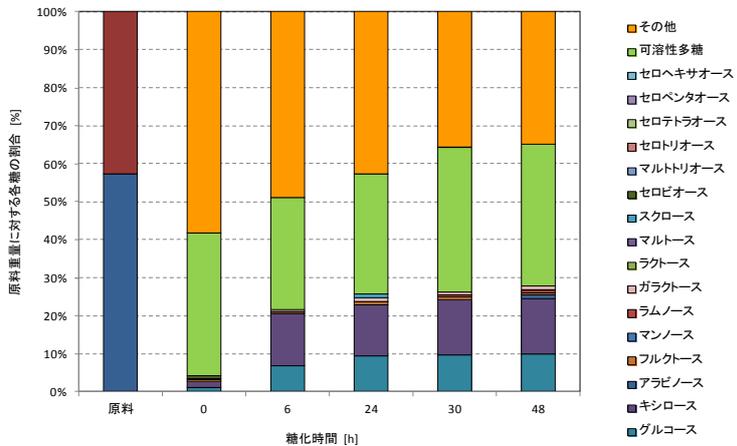
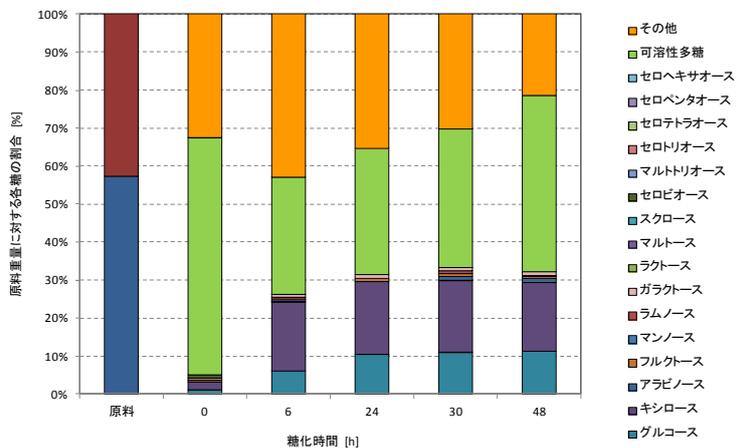


Fig. 5.1.2-1 水熱爆砕前処理物の酵素糖化結果 (ケヤキ×260°C)

RUN No.		K-4	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
前処理条件	処理方法		水蒸気爆砕
	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	10
	2段目	温度[°C]	260
時間[min]		10	
糖化条件	溶液量[ml]	500	
	基質濃度[wt%]	0.300	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理	無	



RUN No.		K-5	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
前処理条件	処理方法		水蒸気爆砕
	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	10
	2段目	温度[°C]	260
時間[min]		10	
糖化条件	溶液量[ml]	500	
	基質濃度[wt%]	0.300	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理	無	



RUN No.		K-6	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
前処理条件	処理方法		水蒸気爆砕
	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	10
	2段目	温度[°C]	260
時間[min]		10	
糖化条件	溶液量[ml]	500	
	基質濃度[wt%]	0.300	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理	無	

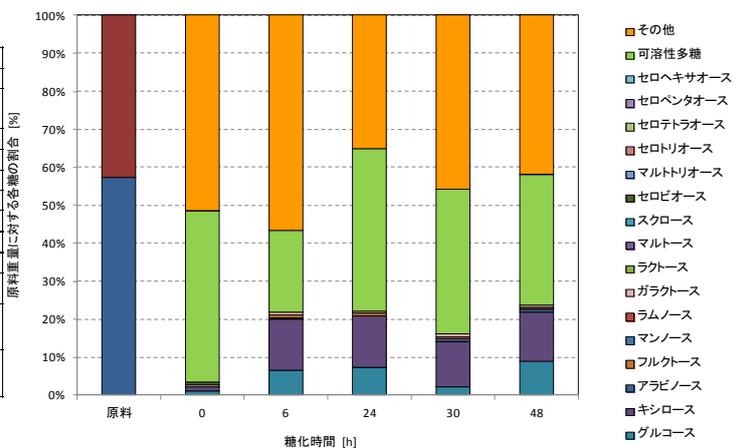
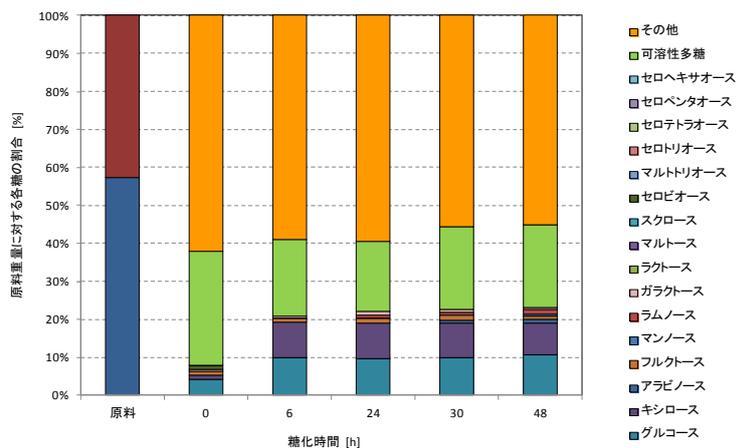
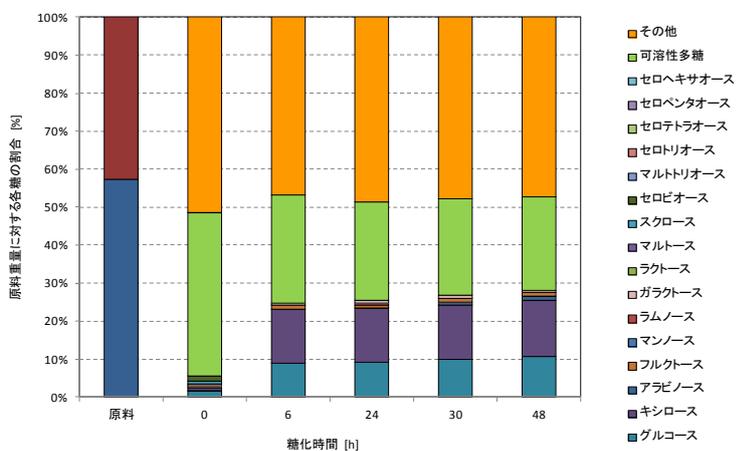


Fig. 5.1.2-2 水蒸気爆砕前処理物の酵素糖化結果 (ケヤキ×260°C)

RUN No.		K-7	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱徐冷	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	10
前処理条件	2段目	温度[°C]	260
		時間[min]	10
糖化条件	溶液量[ml]		500
	基質濃度[wt%]		0.300
	糖化温度[°C]		50
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
サンプル煮沸処理		無	



RUN No.		K-8	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱徐冷	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	10
前処理条件	2段目	温度[°C]	260
		時間[min]	10
糖化条件	溶液量[ml]		500
	基質濃度[wt%]		0.300
	糖化温度[°C]		50
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
サンプル煮沸処理		無	



RUN No.		K-9	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱徐冷	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	10
前処理条件	2段目	温度[°C]	260
		時間[min]	10
糖化条件	溶液量[ml]		500
	基質濃度[wt%]		0.300
	糖化温度[°C]		50
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
サンプル煮沸処理		無	

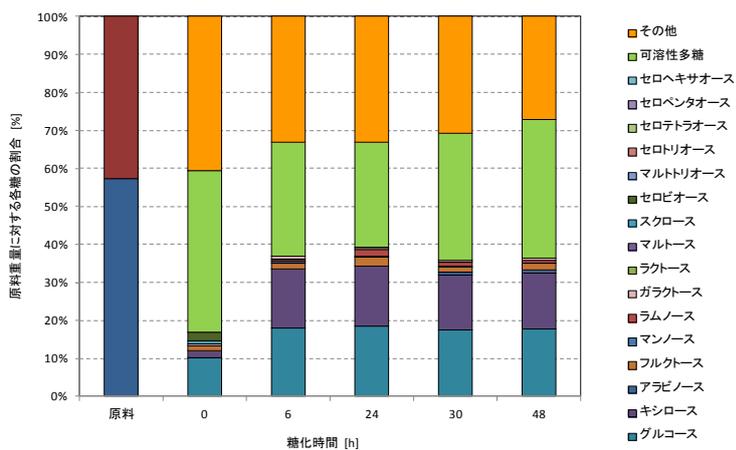


Fig. 5.1.2-3 水熱徐冷前処理物の酵素糖化結果 (ケヤキ×260°C)

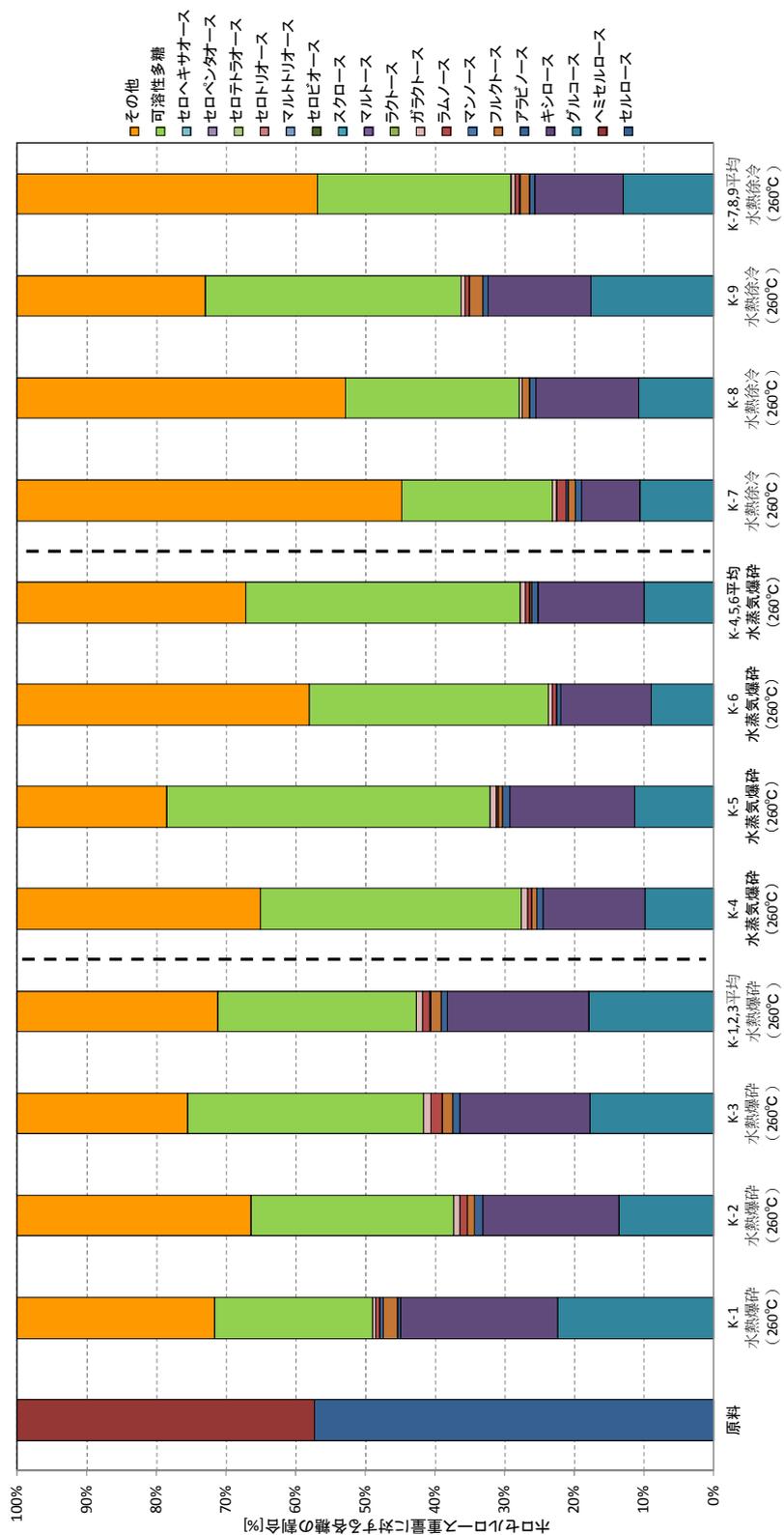


Fig.5.1.2-4 各種前処理物の酵素糖化結果(けやき、前処理温度260°C)

前処理条件	原料(ケヤキ) [g-dry]	1.50	
	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	10
	2段目	温度[°C]	260
		時間[min]	10

糖化条件	溶液量[m]	500	
	基質濃度[wts]	0.000	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル蒸発処理	無	

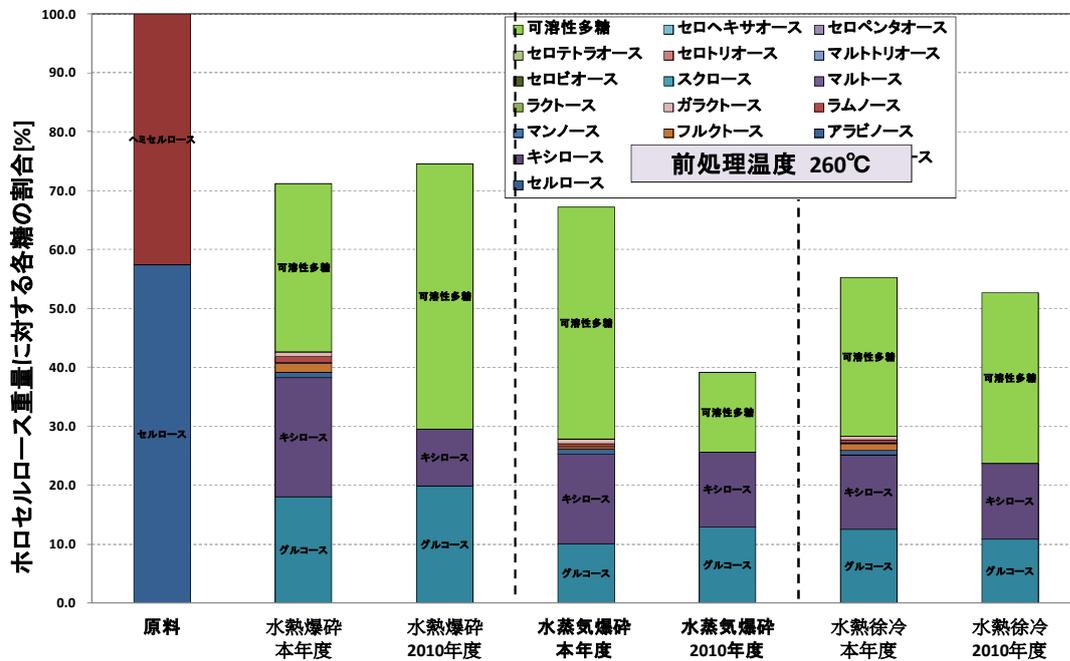


Fig. 5.1.2-5 HPLC 法（本年度）と試薬分析法（2010年度）の比較

原料：ケヤキ

前処理温度：260°C

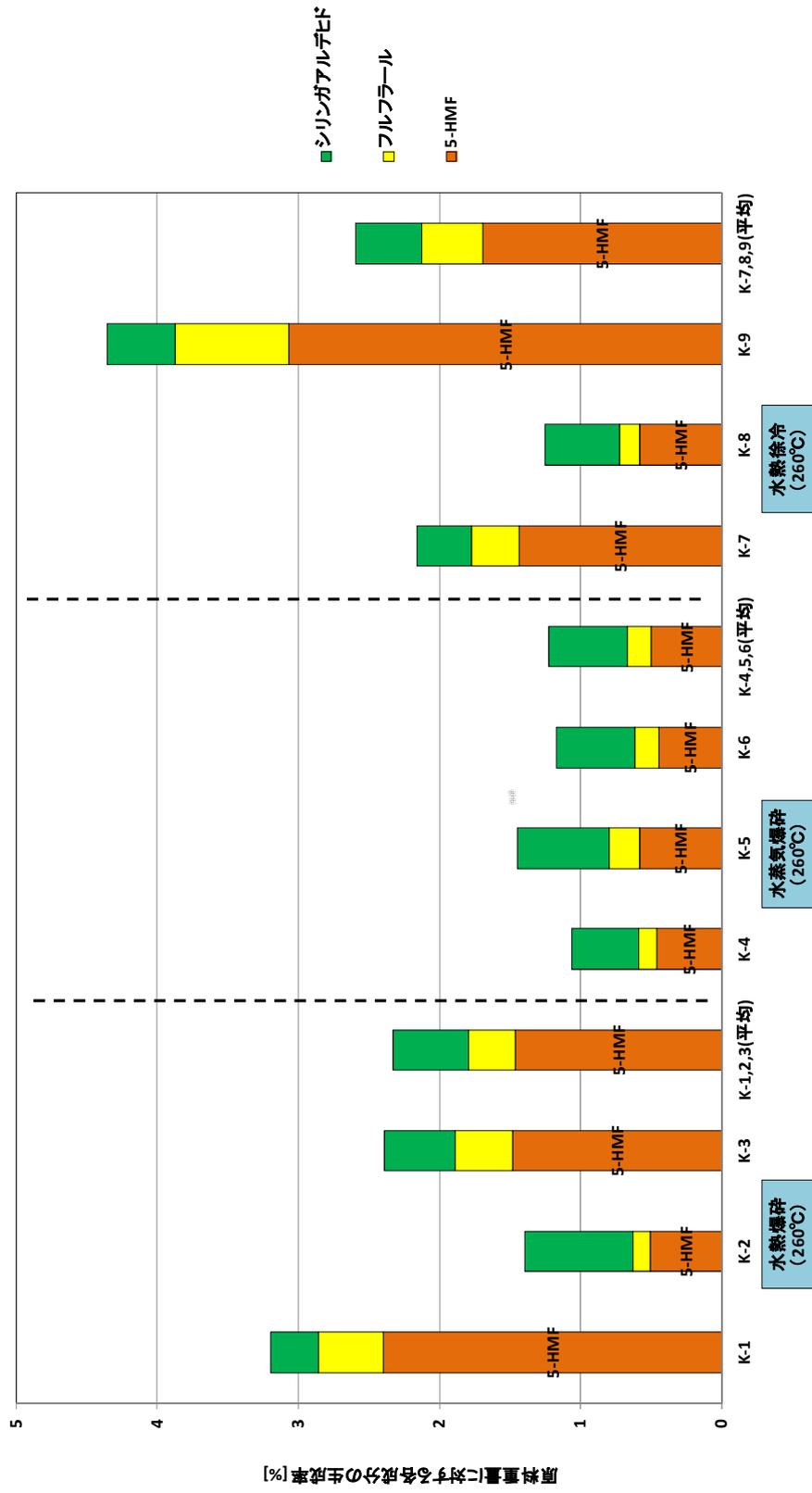


Fig.5.1.2-6 各種前処理物の酵素糖化液中の発酵阻害物質の生成量  
(けやき、前処理温度260°C)

原料(ケヤキ)[g-dry]			1.50
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	10
	2段目	温度[°C]	260
		時間[min]	10
測定条件	溶離液流量 [ml/min]		0.50
	測定時間 [min]		40
	試料注入量 [μl]		5
	カラム温度 [°C]		30

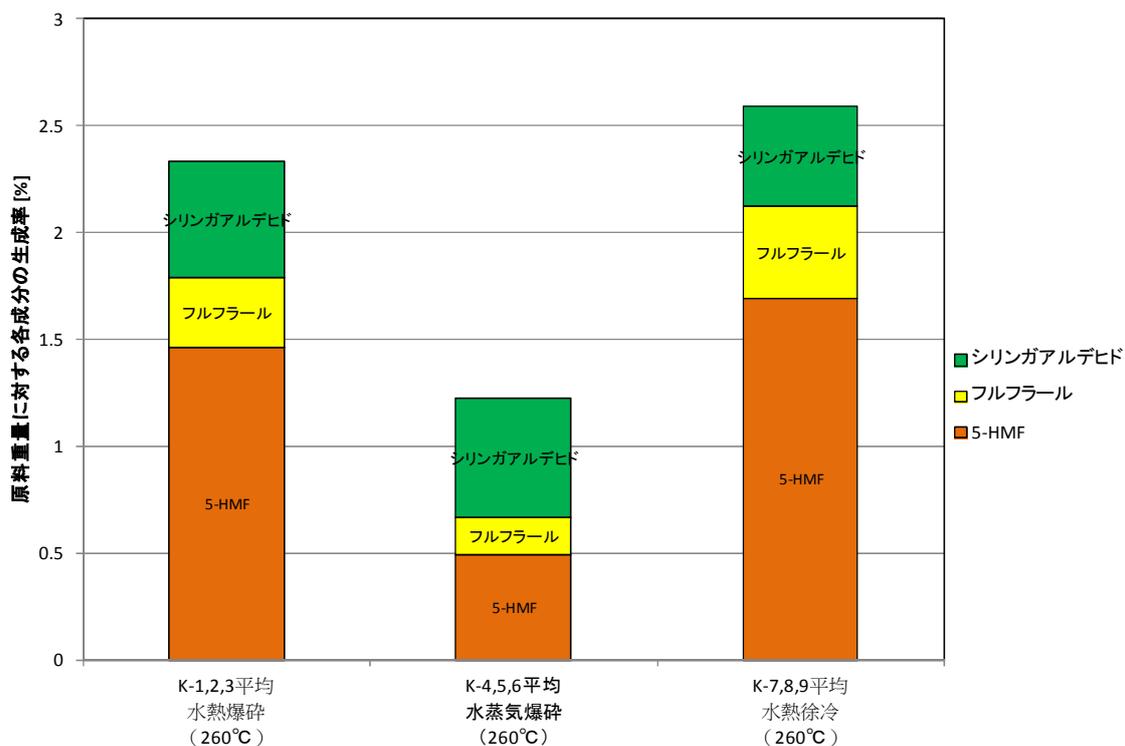


Fig. 5.1.2-7 前処理別の発酵阻害生成量（有機酸以外）の比較  
原料：ケヤキ

## 5. 2 高温域での前処理試験（杉、ケヤキ）

これまで未実施の高温条件下（260℃以上）で前処理試験を行い，前処理温度による糖，発酵阻害物質生成への影響を調べた．温度280、300℃で，水熱爆砕，水蒸気爆砕，水熱徐冷処理をそれぞれ3回行い，それぞれ酵素糖化を行った．Table. 5.2-1, 5.2-2 に杉およびケヤキの前処理条件を， Fig. 5.2-1 に昇温パターンを示す．

Table. 5.2-1 杉酵素糖化前処理試験条件

Run No.	原料	処理方法	処理前重量 [g]	設定圧力 [MPa]	1段目		2段目	
					処理温度 [°C]	保持時間 [sec]	処理温度 [°C]	保持時間 [sec]
Sb-1	杉	水熱爆砕	1.50	8.0	180	0	280	600
Sb-2	杉	水熱爆砕	1.50	8.0	180	0	280	600
Sb-3	杉	水熱爆砕	1.50	8.0	180	0	280	600
Sb-4	杉	水熱爆砕	1.50	8.0	180	0	300	600
Sb-5	杉	水熱爆砕	1.50	8.0	180	0	300	600
Sb-6	杉	水熱爆砕	1.50	8.0	180	0	300	600
Sb-7	杉	水蒸気爆砕	1.50	4.5	180	0	280	600
Sb-8	杉	水蒸気爆砕	1.50	4.5	180	0	280	600
Sb-9	杉	水蒸気爆砕	1.50	4.5	180	0	280	600
Sb-10	杉	水蒸気爆砕	1.50	4.5	180	0	300	600
Sb-11	杉	水蒸気爆砕	1.50	4.5	180	0	300	600
Sb-12	杉	水蒸気爆砕	1.50	4.5	180	0	300	600
Sb-13	杉	水熱徐冷	1.50	8.0	180	0	280	600
Sb-14	杉	水熱徐冷	1.50	8.0	180	0	280	600
Sb-15	杉	水熱徐冷	1.50	8.0	180	0	280	600
Sb-16	杉	水熱徐冷	1.50	8.0	180	0	300	600
Sb-17	杉	水熱徐冷	1.50	8.0	180	0	300	600
Sb-18	杉	水熱徐冷	1.50	8.0	180	0	300	600

Table. 5.2-2 ケヤキ酵素糖化前処理試験条件

Run No.	原料	処理方法	処理前重量 [g]	設定圧力 [MPa]	1段目		2段目	
					処理温度 [°C]	保持時間 [sec]	処理温度 [°C]	保持時間 [sec]
Kb-1	ケヤキ	水熱爆砕	1.50	8.0	180	0	280	600
Kb-2	ケヤキ	水熱爆砕	1.50	8.0	180	0	280	600
Kb-3	ケヤキ	水熱爆砕	1.50	8.0	180	0	280	600
Kb-4	ケヤキ	水熱爆砕	1.50	8.0	180	0	300	600
Kb-5	ケヤキ	水熱爆砕	1.50	8.0	180	0	300	600
Kb-6	ケヤキ	水熱爆砕	1.50	8.0	180	0	300	600
Kb-7	ケヤキ	水蒸気爆砕	1.50	4.5	180	0	280	600
Kb-8	ケヤキ	水蒸気爆砕	1.50	4.5	180	0	280	600
Kb-9	ケヤキ	水蒸気爆砕	1.50	4.5	180	0	280	600
Kb-10	ケヤキ	水蒸気爆砕	1.50	4.5	180	0	300	600
Kb-11	ケヤキ	水蒸気爆砕	1.50	4.5	180	0	300	600
Kb-12	ケヤキ	水蒸気爆砕	1.50	4.5	180	0	300	600
Kb-13	ケヤキ	水熱徐冷	1.50	8.0	180	0	280	600
Kb-14	ケヤキ	水熱徐冷	1.50	8.0	180	0	280	600
Kb-15	ケヤキ	水熱徐冷	1.50	8.0	180	0	280	600
Kb-16	ケヤキ	水熱徐冷	1.50	8.0	180	0	300	600
Kb-17	ケヤキ	水熱徐冷	1.50	8.0	180	0	300	600
Kb-18	ケヤキ	水熱徐冷	1.50	8.0	180	0	300	600

前処理温度 280°C	水熱爆砕・徐冷	水蒸気爆砕
管状炉設定温度[°C]	500	530
ヒータ1設定温度[°C]	580	610
ヒータ2設定温度[°C]	230	230
昇温時設定圧力[MPa]	6	6
ポンプ流量[ml/min]	20	20

前処理温度 300°C	水熱爆砕・徐冷	水蒸気爆砕
管状炉設定温度[°C]	580	620
ヒータ1設定温度[°C]	600	620
ヒータ2設定温度[°C]	230	230
昇温時設定圧力[MPa]	6	6
ポンプ流量[ml/min]	20	20

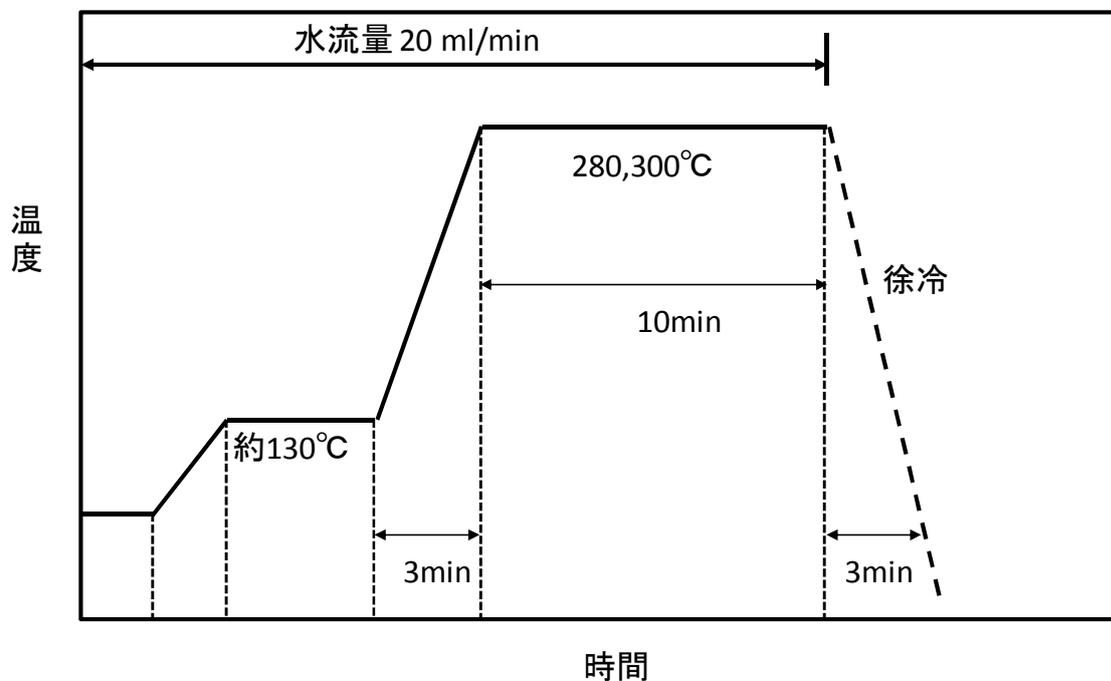


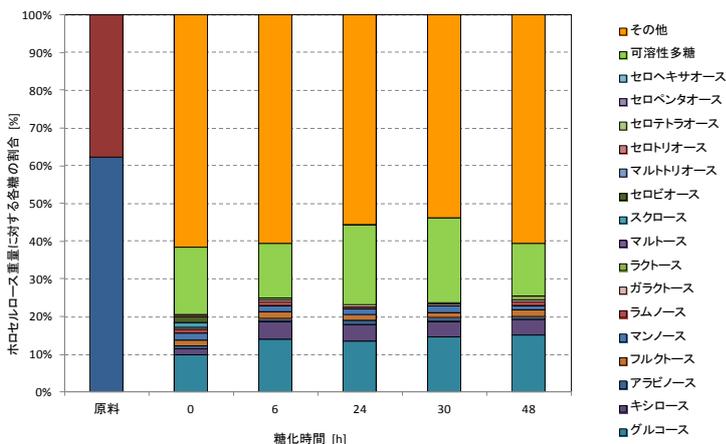
Fig. 5.2-1 高温前処理試験昇温・降温パターン

### 5. 2. 1 杉の場合

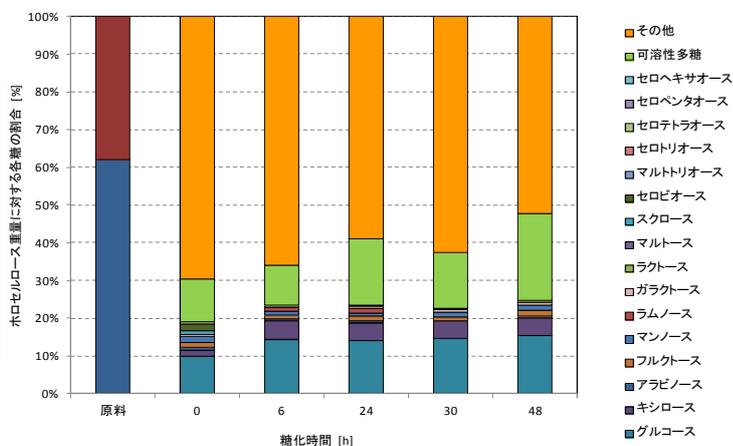
280および300℃で杉の水熱爆砕、水蒸気爆砕および水熱徐冷をそれぞれ3回行い、それぞれを酵素糖化した際の糖収率と発酵阻害物質収率を Fig.5.2.1-1 から Fig.5.2.1-10 に示す。

前処理方法によらず、いずれの場合も前処理温度の上昇により糖の過分解のため糖生成量が減少し、発酵阻害物質生成量が増加した。

RUN No.		Sb-1	
原料(杉)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	280
		時間[min]	10
糖化条件			
溶液量[ml]		500	
基質濃度[wt%]		0.300	
糖化温度[°C]		50	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075	
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075	
サンプル煮沸処理		有	



RUN No.		Sb-2	
原料(杉)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	280
		時間[min]	10
糖化条件			
溶液量[ml]		500	
基質濃度[wt%]		0.300	
糖化温度[°C]		50	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075	
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075	
サンプル煮沸処理		有	



RUN No.		Sb-3	
原料(杉)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	280
		時間[min]	10
糖化条件			
溶液量[ml]		500	
基質濃度[wt%]		0.300	
糖化温度[°C]		50	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075	
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075	
サンプル煮沸処理		有	

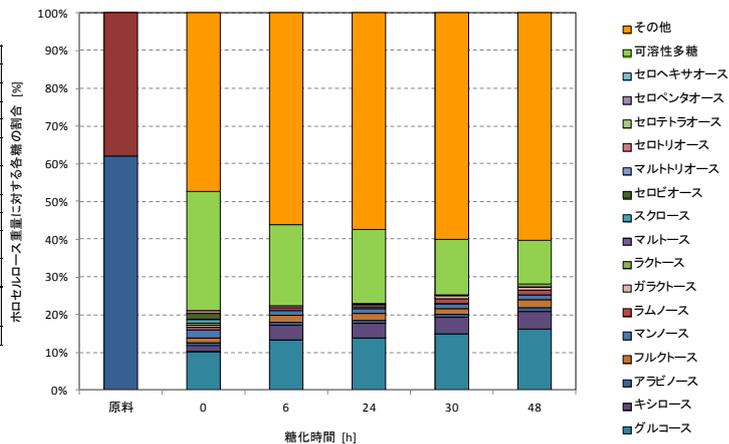
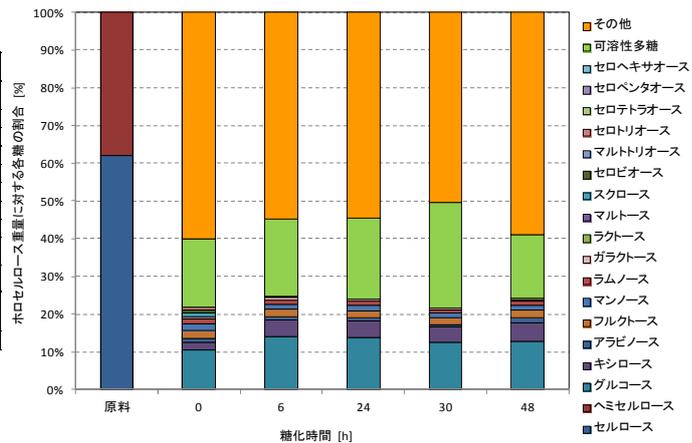
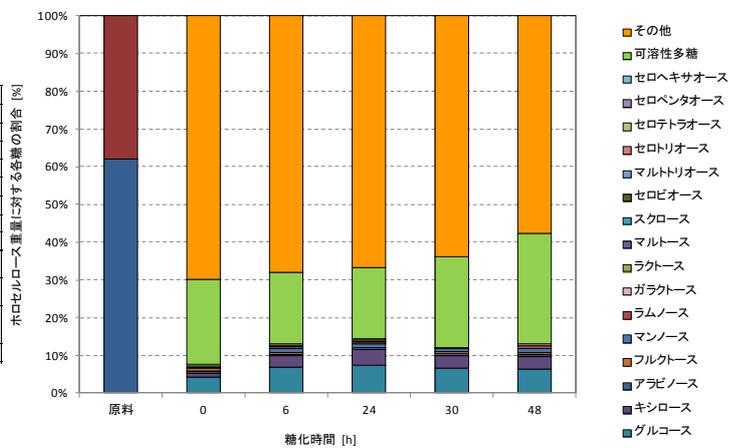


Fig. 5.2.1-1 水熱爆砕前処理物の酵素糖化結果 (杉×280°C)

RUN No.		Sb-4	
原料(杉)[g-dry]		1.50	
前処理条件	処理方法		水熱爆砕
	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	300
時間[min]		10	
糖化条件	溶液量[ml]	500	
	基質濃度[wt%]	0.300	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理	有	



RUN No.		Sb-5	
原料(杉)[g-dry]		1.50	
前処理条件	処理方法		水熱爆砕
	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	300
時間[min]		10	
糖化条件	溶液量[ml]	500	
	基質濃度[wt%]	0.300	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理	有	



RUN No.		Sb-6	
原料(杉)[g-dry]		1.50	
前処理条件	処理方法		水熱爆砕
	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	300
時間[min]		10	
糖化条件	溶液量[ml]	500	
	基質濃度[wt%]	0.300	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理	有	

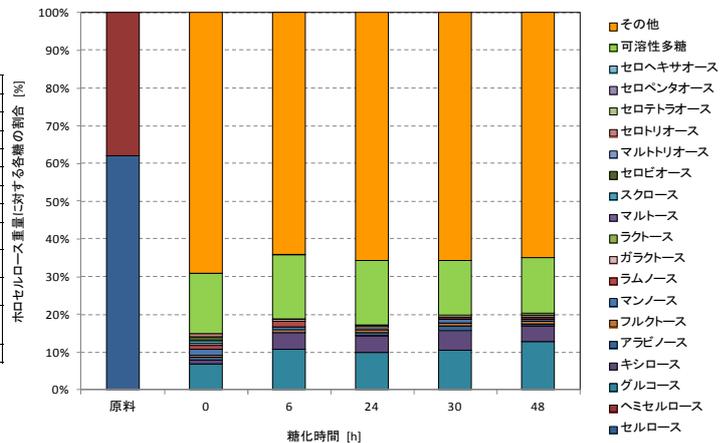
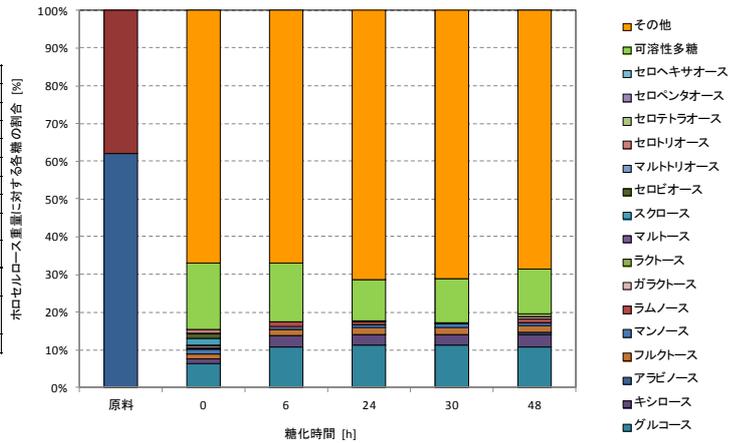
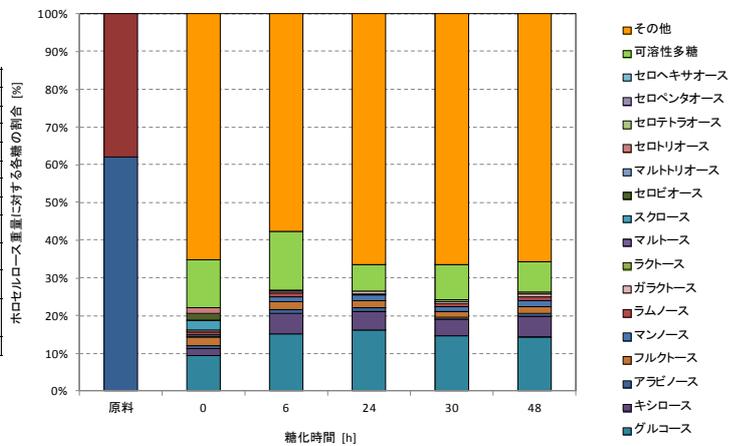


Fig. 5.2.1-2 水熱爆砕前処理物の酵素糖化結果 (杉×300°C)

RUN No.		Sb-7	
原料(杉)[g-dry]		1.50	
処理方法		水蒸気爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	280
		時間[min]	10
溶液量[ml]		500	
基質濃度[wt%]		0.300	
糖化温度[°C]		50	
糖化条件	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理		有



RUN No.		Sb-8	
原料(杉)[g-dry]		1.50	
処理方法		水蒸気爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	280
		時間[min]	10
溶液量[ml]		500	
基質濃度[wt%]		0.300	
糖化温度[°C]		50	
糖化条件	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理		有



RUN No.		Sb-9	
原料(杉)[g-dry]		1.50	
処理方法		水蒸気爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	280
		時間[min]	10
溶液量[ml]		500	
基質濃度[wt%]		0.300	
糖化温度[°C]		50	
糖化条件	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理		有

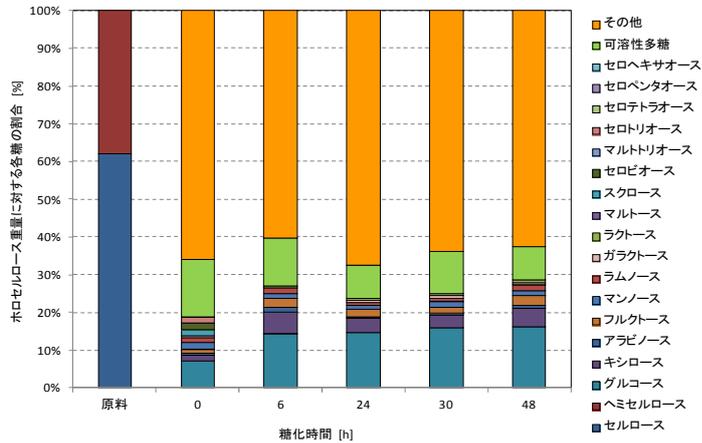
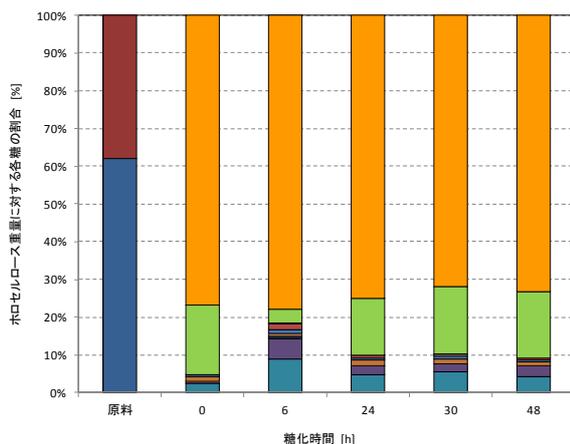


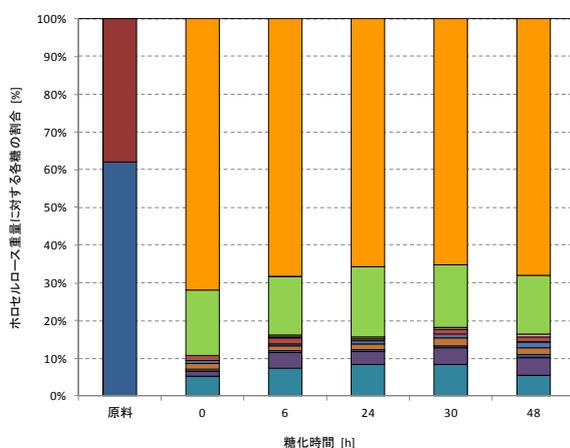
Fig. 5.2.1-3 水蒸気爆砕前処理物の酵素糖化結果 (杉×280°C)

RUN No.		Sb-10	
原料(杉)[g-dry]		1.50	
処理方法		水蒸気爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	300
		時間[min]	10
糖化条件	溶溶液量[ml]	500	
	基質濃度[wt%]	0.300	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理	有	



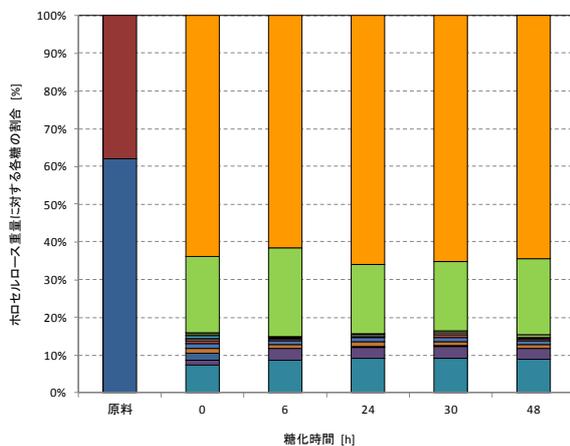
- その他
- 可溶性多糖
- セロヘキサオース
- セロペンタオース
- セロテトラオース
- セロトリオース
- マルトリオース
- セロビオース
- スクロース
- マルトース
- ラクトース
- ガラクトース
- ラムノース
- マンノース
- フルクトース
- アラビノース
- キシロース
- グルコース

RUN No.		Sb-11	
原料(杉)[g-dry]		1.50	
処理方法		水蒸気爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	300
		時間[min]	10
糖化条件	溶溶液量[ml]	500	
	基質濃度[wt%]	0.300	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理	有	



- その他
- 可溶性多糖
- セロヘキサオース
- セロペンタオース
- セロテトラオース
- セロトリオース
- マルトリオース
- セロビオース
- スクロース
- マルトース
- ラクトース
- ガラクトース
- ラムノース
- マンノース
- フルクトース
- アラビノース
- キシロース
- グルコース

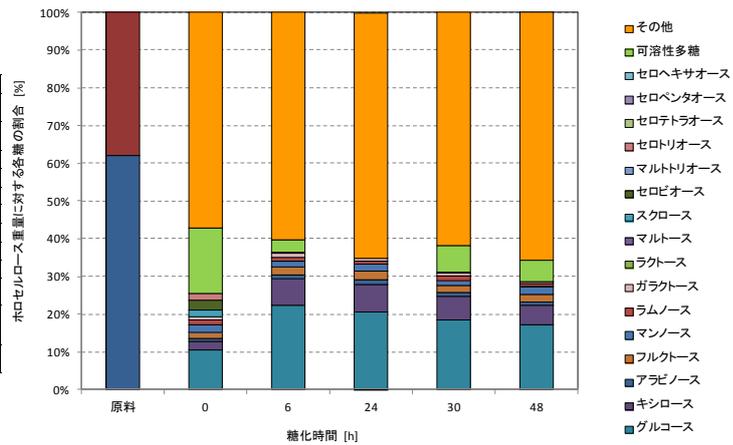
RUN No.		Sb-12	
原料(杉)[g-dry]		1.50	
処理方法		水蒸気爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	300
		時間[min]	10
糖化条件	溶溶液量[ml]	500	
	基質濃度[wt%]	0.300	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理	有	



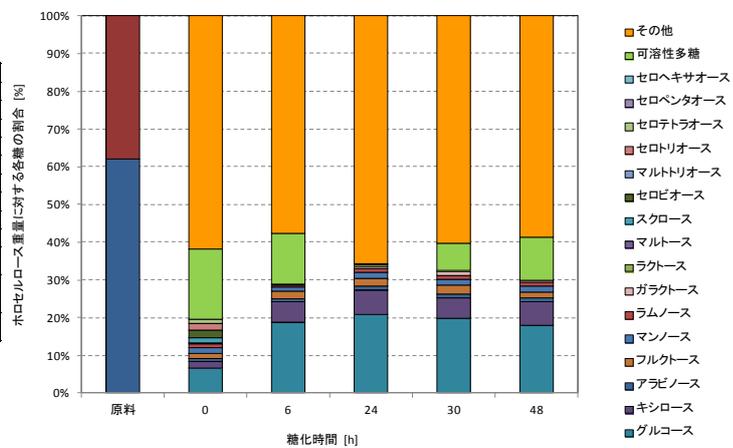
- その他
- 可溶性多糖
- セロヘキサオース
- セロペンタオース
- セロテトラオース
- セロトリオース
- マルトリオース
- セロビオース
- スクロース
- マルトース
- ラクトース
- ガラクトース
- ラムノース
- マンノース
- フルクトース
- アラビノース
- キシロース
- グルコース

Fig. 5.2.1-4 水蒸気爆砕前処理物の酵素糖化結果 (杉×300°C)

RUN No.		Sb-13	
原料(杉) [g-dry]		1.50	
処理方法		水熱徐冷	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	280
		時間[min]	10
糖化条件	溶液量 [ml]	500	
	基質濃度 [wt%]	0.300	
	糖化温度 [°C]	50	
	酵素量 [g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理		有



RUN No.		Sb-14	
原料(杉) [g-dry]		1.50	
処理方法		水熱徐冷	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	280
		時間[min]	10
糖化条件	溶液量 [ml]	500	
	基質濃度 [wt%]	0.300	
	糖化温度 [°C]	50	
	酵素量 [g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理		有



RUN No.		Sb-15	
原料(杉) [g-dry]		1.50	
処理方法		水熱徐冷	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	280
		時間[min]	10
糖化条件	溶液量 [ml]	500	
	基質濃度 [wt%]	0.300	
	糖化温度 [°C]	50	
	酵素量 [g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理		有

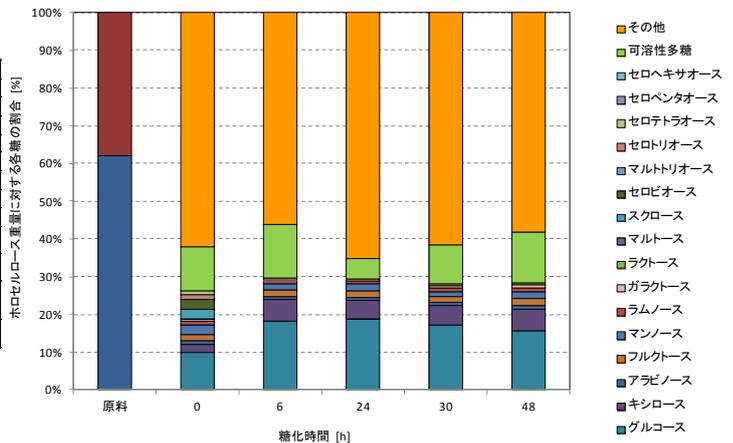
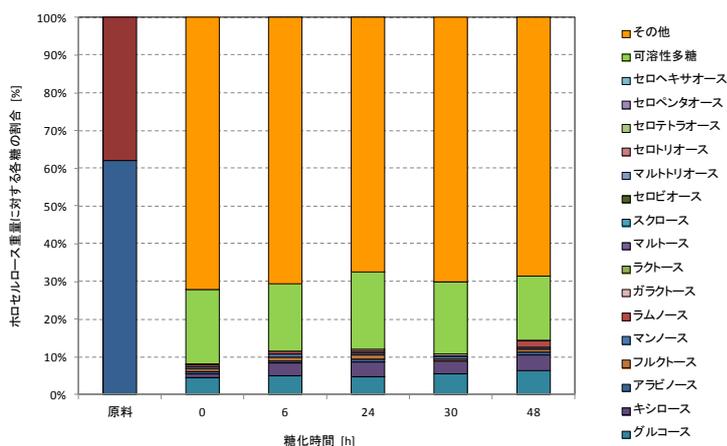
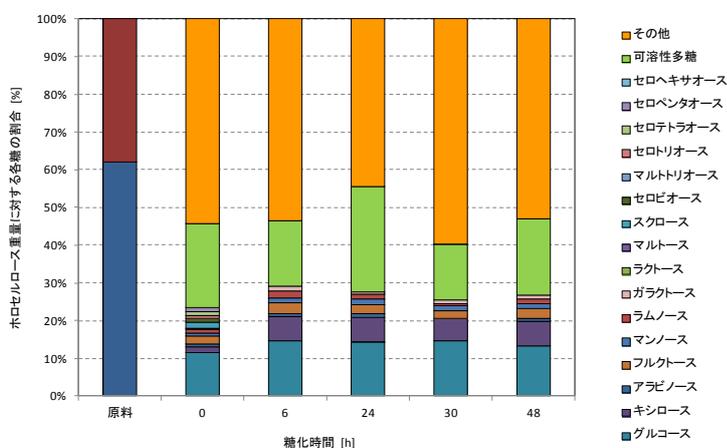


Fig. 5.2.1-5 水熱徐冷前処理物の酵素糖化結果 (杉×280°C)

RUN No.		Sb-16	
原料(杉)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱徐冷	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	300
		時間[min]	10
糖化条件	溶液量[m]	500	
	基質濃度[wt%]	0.300	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理	有	



RUN No.		Sb-17	
原料(杉)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱徐冷	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	300
		時間[min]	10
糖化条件	溶液量[m]	500	
	基質濃度[wt%]	0.300	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理	有	



RUN No.		Sb-18	
原料(杉)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱徐冷	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	300
		時間[min]	10
糖化条件	溶液量[m]	500	
	基質濃度[wt%]	0.300	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理	有	

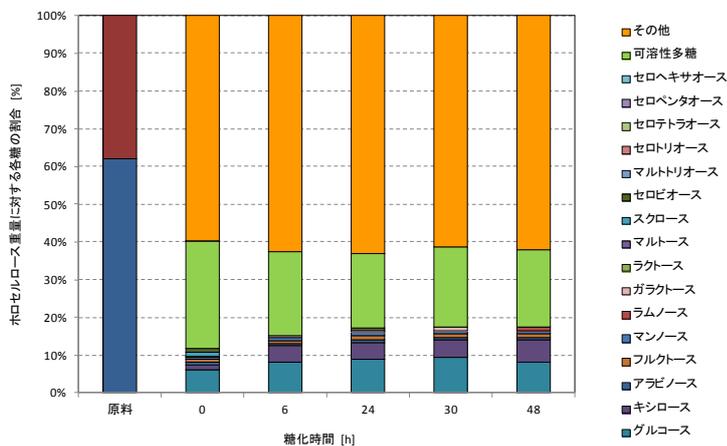


Fig. 5.2.1-6 水熱徐冷前処理物の酵素糖化結果 (杉×300°C)

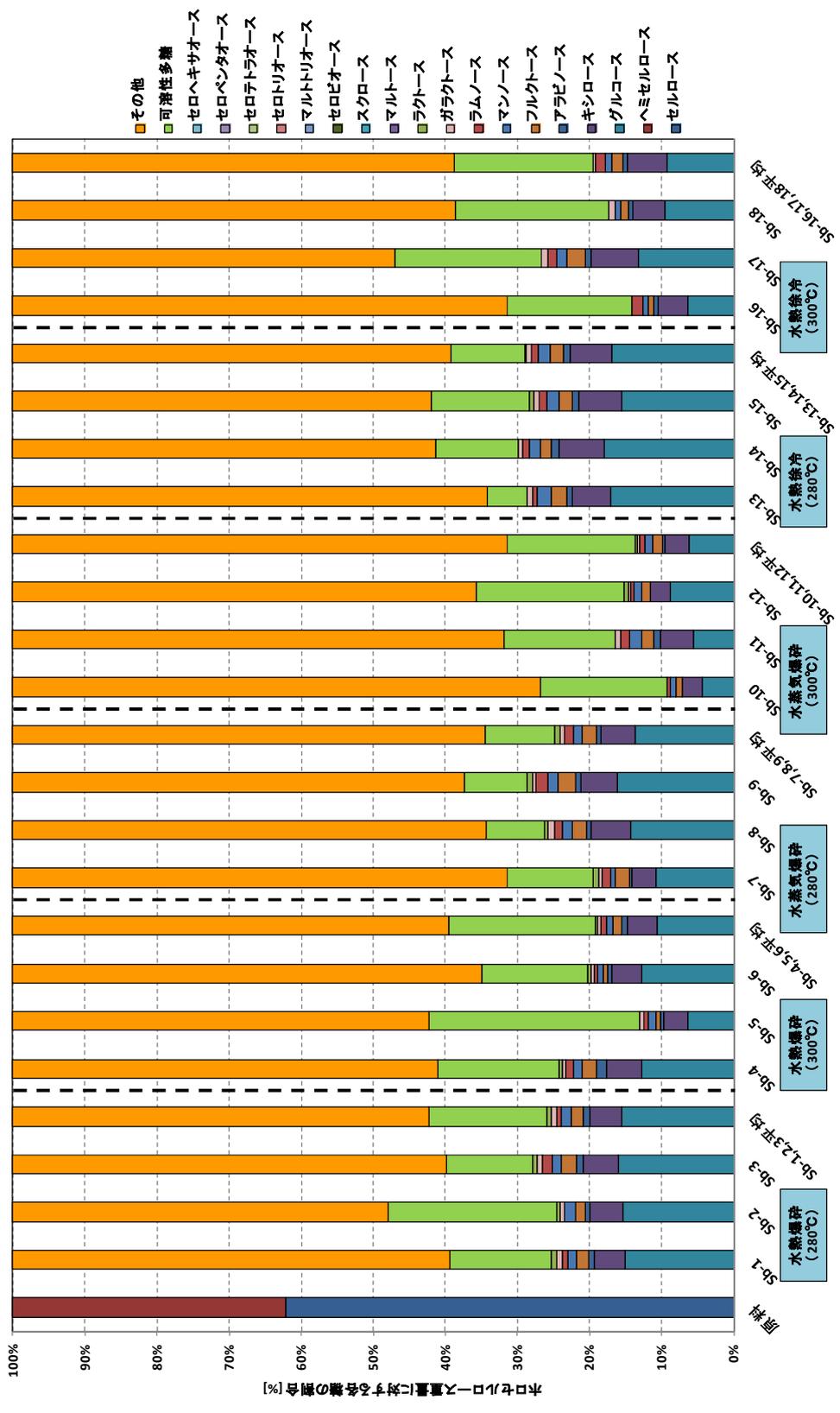


Fig.5.2.1-7 高温における各種前処理物の酵素糖化の再現性(原料:杉)

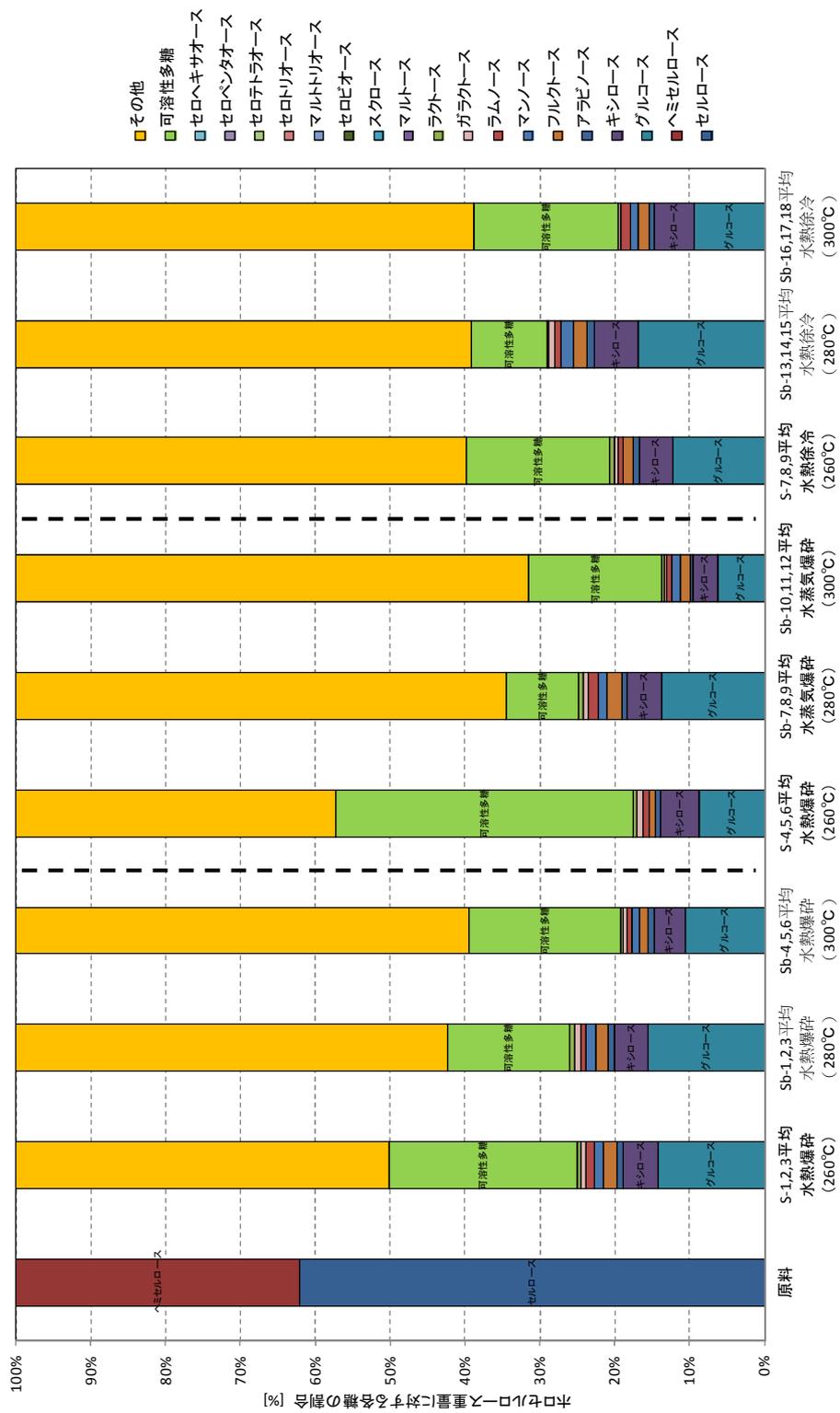


Fig.5.2.1-8 260から300°Cの高温における各種前処理物の酵素糖化結果(原料:杉)

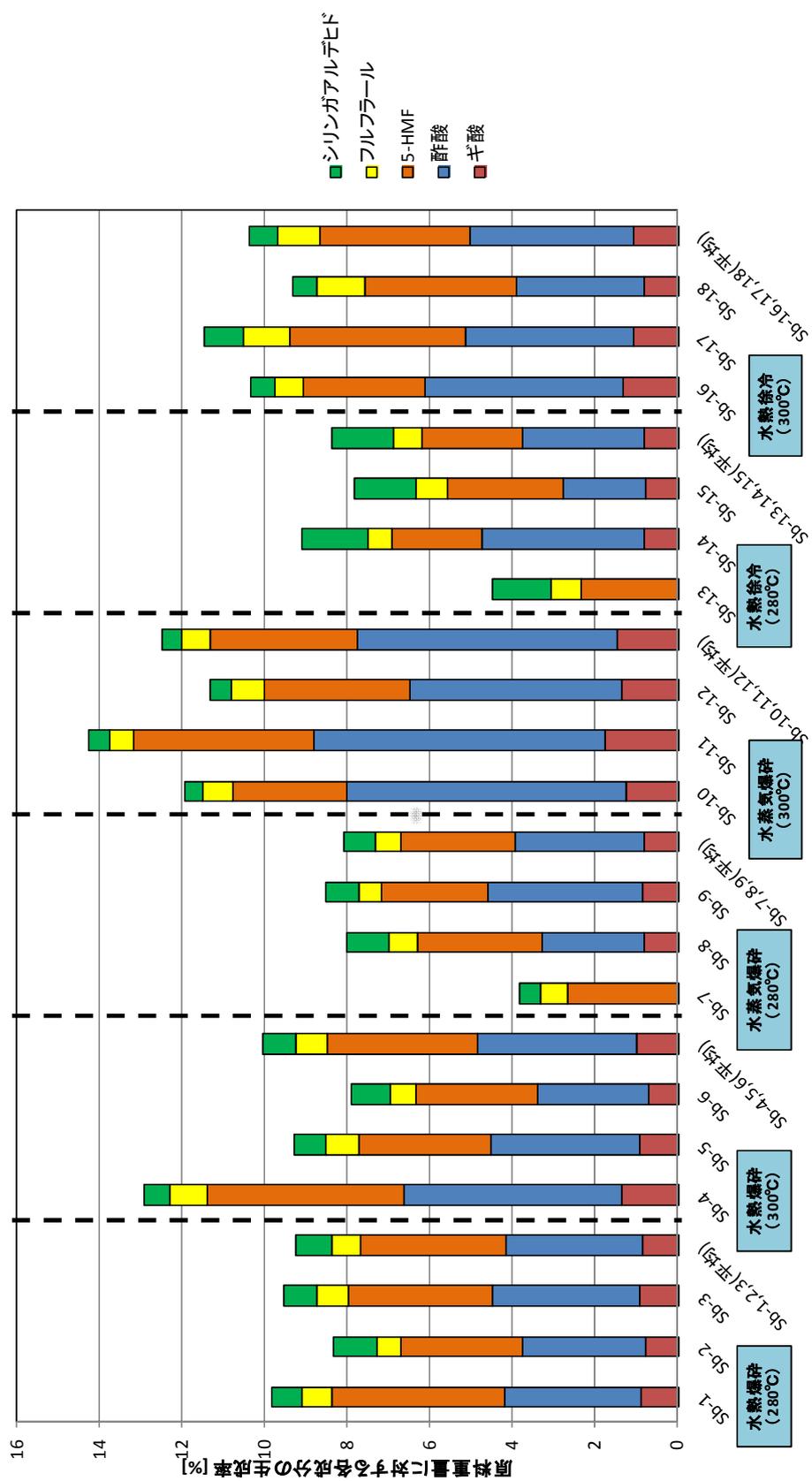


Fig.5.2.1-9 高温おける前処理温度と発酵阻害物質収率再現性(原料:杉)

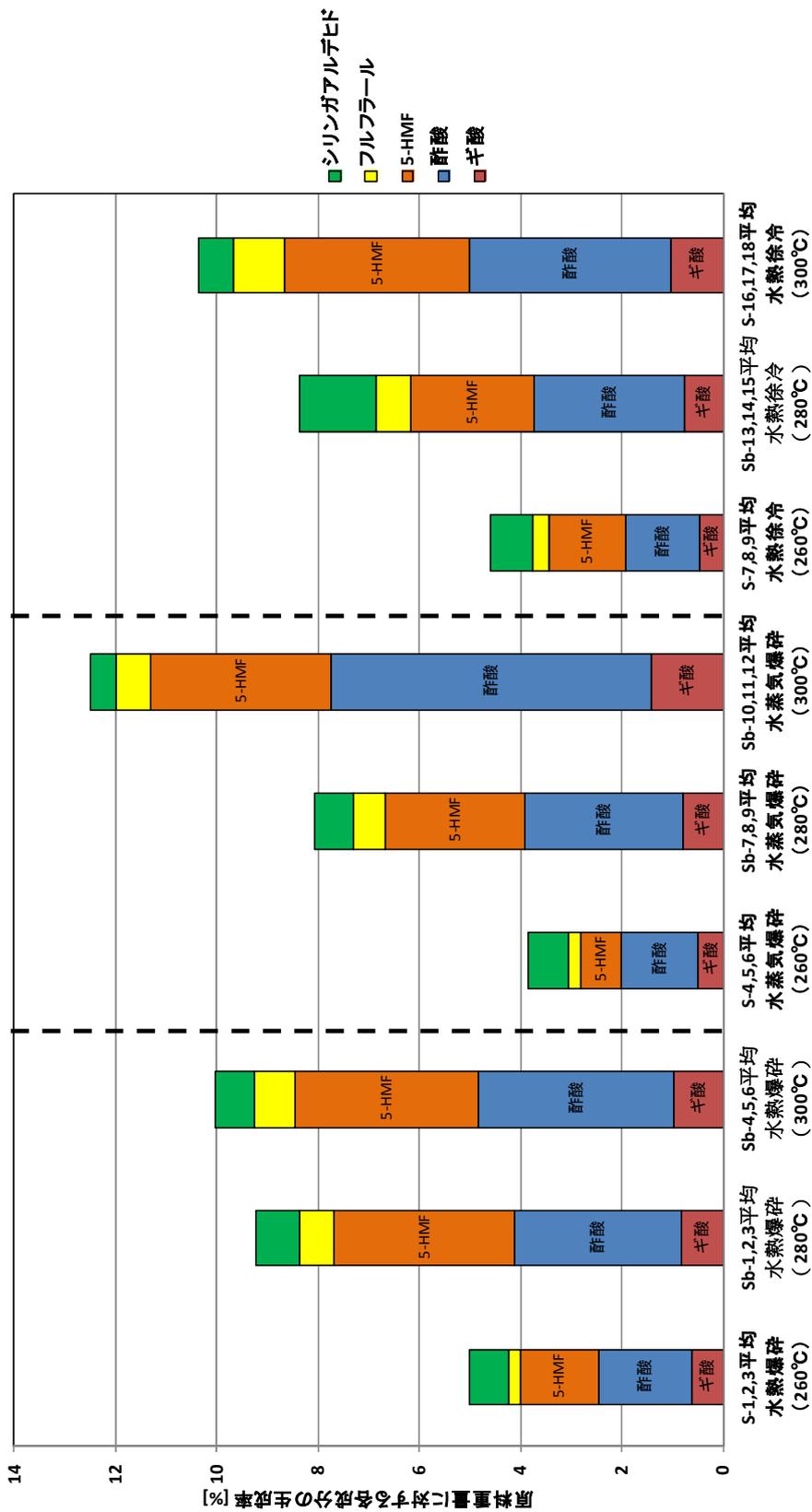


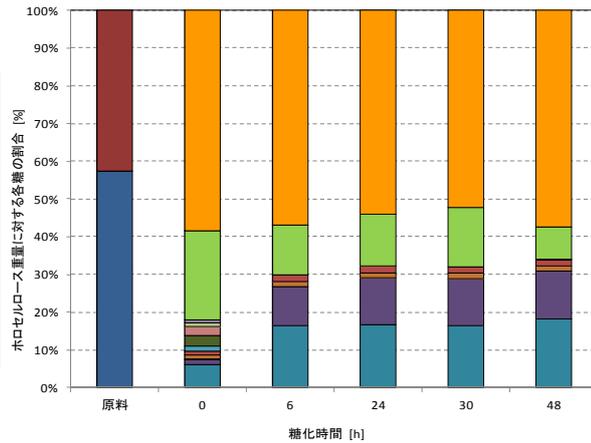
Fig.5.2.1-10 260から300°Cにおける前処理温度と発酵阻害物質との関係(原料:杉)

### 5. 2. 2 ケヤキの場合

280および300℃でケヤキの水熱爆砕、水蒸気爆砕および水熱徐冷をそれぞれ3回行い、それぞれを酵素糖化した際の糖収率と発酵阻害物質収率を Fig.5.2.2-1 から Fig.5.2.2-11 に示す。

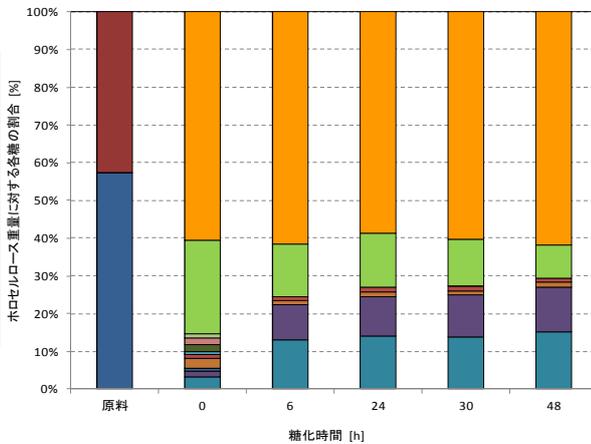
杉の場合と同様に、前処理方法によらず、いずれの場合も前処理温度の上昇により糖の過分解のため糖生成量が減少し、発酵阻害物質生成量が増加した。

RUN No.		Kb-1	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
前処理条件	処理方法	水熱爆砕	
	1段目	温度[°C] 時間[min]	180 0
	2段目	温度[°C] 時間[min]	280 10
	2段目	温度[°C] 時間[min]	280 10
糖化条件	溶液量[ml]	500	
	基質濃度[wt%]	0.300	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分 解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロー ス分解)	0.075
サンプル煮沸処理	有		



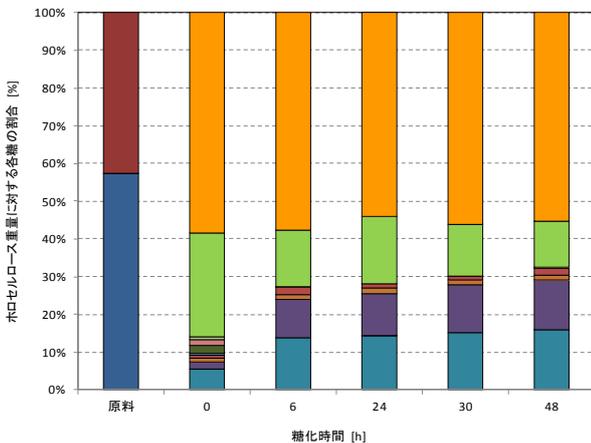
- その他
- 可溶性多糖
- セロヘキサオース
- セロペンタオース
- セロテトラオース
- セロトリオース
- マルトリオース
- セロビオース
- スクロース
- マルトース
- ラクトース
- ガラクトース
- ラムノース
- マンノース
- フルクトース
- アラビノース
- キシロース
- グルコース

RUN No.		Kb-2	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
前処理条件	処理方法	水熱爆砕	
	1段目	温度[°C] 時間[min]	180 0
	2段目	温度[°C] 時間[min]	280 10
	2段目	温度[°C] 時間[min]	280 10
糖化条件	溶液量[ml]	500	
	基質濃度[wt%]	0.300	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分 解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロー ス分解)	0.075
サンプル煮沸処理	有		



- その他
- 可溶性多糖
- セロヘキサオース
- セロペンタオース
- セロテトラオース
- セロトリオース
- マルトリオース
- セロビオース
- スクロース
- マルトース
- ラクトース
- ガラクトース
- ラムノース
- マンノース
- フルクトース
- アラビノース
- キシロース
- グルコース

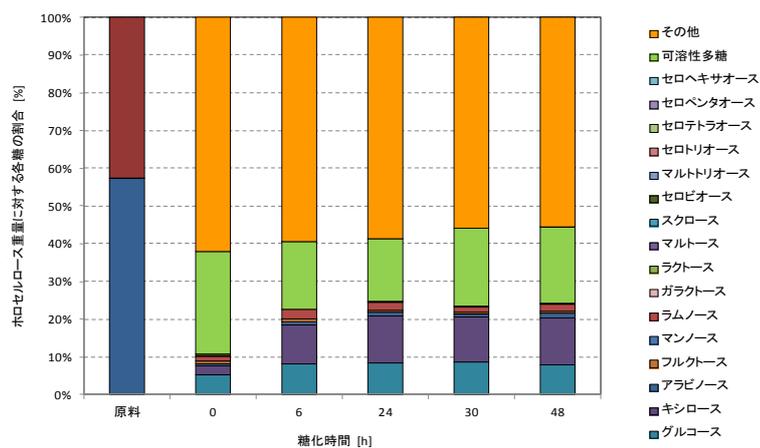
RUN No.		Kb-3	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
前処理条件	処理方法	水熱爆砕	
	1段目	温度[°C] 時間[min]	180 0
	2段目	温度[°C] 時間[min]	280 10
	2段目	温度[°C] 時間[min]	280 10
糖化条件	溶液量[ml]	500	
	基質濃度[wt%]	0.300	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分 解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロー ス分解)	0.075
サンプル煮沸処理	有		



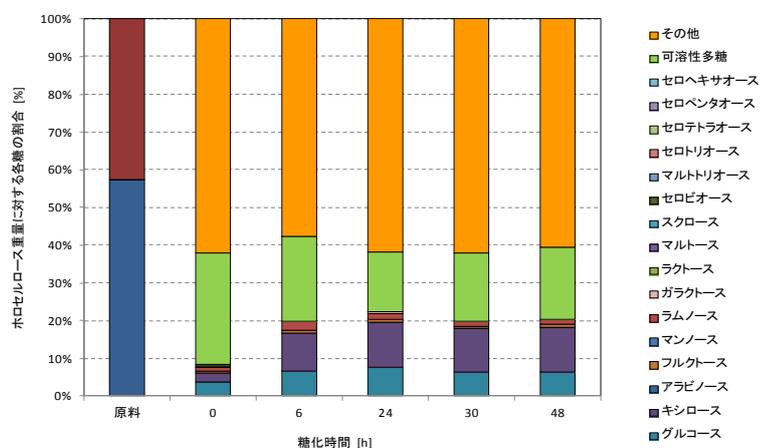
- その他
- 可溶性多糖
- セロヘキサオース
- セロペンタオース
- セロテトラオース
- セロトリオース
- マルトリオース
- セロビオース
- スクロース
- マルトース
- ラクトース
- ガラクトース
- ラムノース
- マンノース
- フルクトース
- アラビノース
- キシロース
- グルコース

Fig. 5.2.2-1 水熱爆砕前処理物の酵素糖化結果 (ケヤキ×280°C)

RUN No.		Kb-4	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	300
		時間[min]	10
糖化条件	溶液量[m]		500
	基質濃度[wt%]		0.300
	糖化温度[°C]		50
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分 解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロー ス分解)	0.075
	サンプル煮沸処理		有



RUN No.		Kb-5	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	300
		時間[min]	10
糖化条件	溶液量[m]		500
	基質濃度[wt%]		0.300
	糖化温度[°C]		50
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分 解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロー ス分解)	0.075
	サンプル煮沸処理		有



RUN No.		Kb-6	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	300
		時間[min]	10
糖化条件	溶液量[m]		500
	基質濃度[wt%]		0.300
	糖化温度[°C]		50
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分 解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロー ス分解)	0.075
	サンプル煮沸処理		有

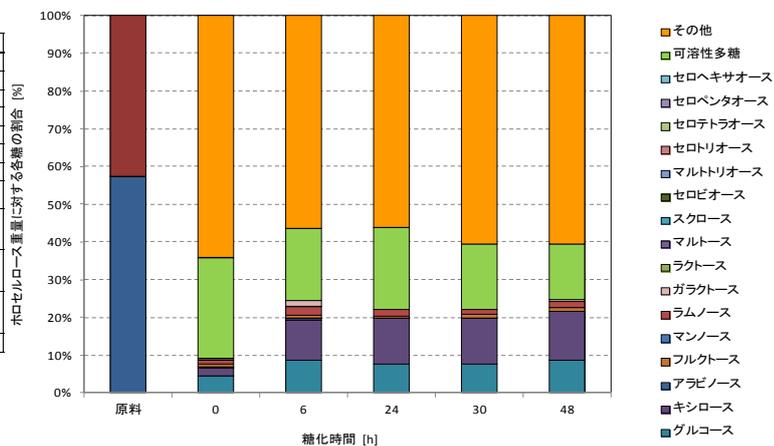
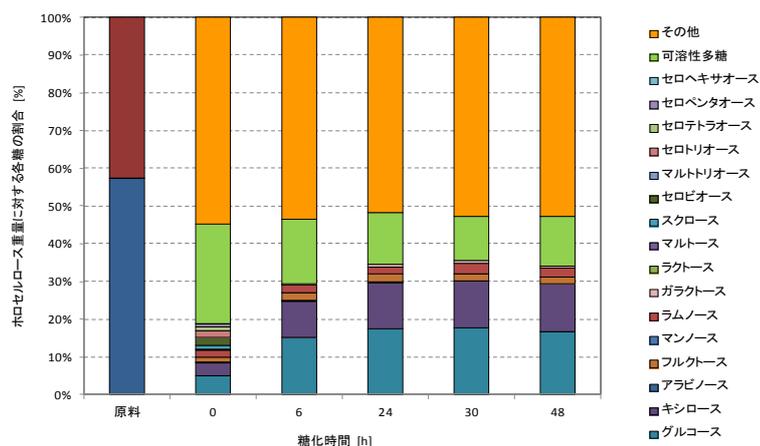
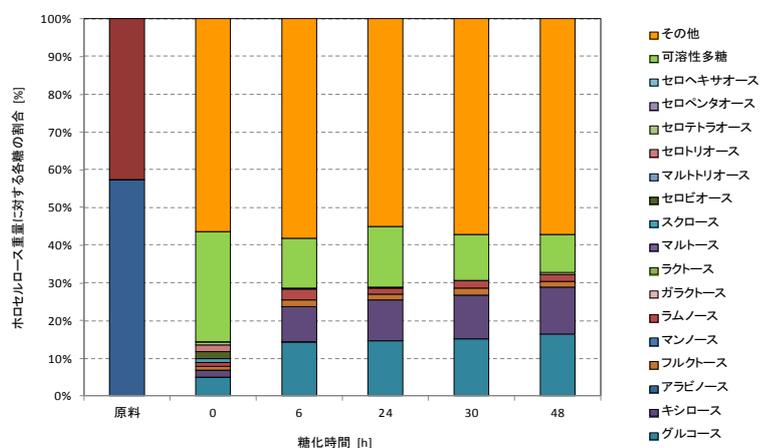


Fig. 5.2.2-2 水熱爆砕前処理物の酵素糖化結果 (ケヤキ×300°C)

RUN No.		Kb-7	
原料(ケヤキ) [g-dry]		1.50	
処理方法		水蒸気爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	280
		時間[min]	10
糖化条件			
溶液量[m]		500	
基質濃度[wt%]		0.300	
糖化温度[°C]		50	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075	
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075	
サンプル煮沸処理		有	



RUN No.		Kb-8	
原料(ケヤキ) [g-dry]		1.50	
処理方法		水蒸気爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	280
		時間[min]	10
糖化条件			
溶液量[m]		500	
基質濃度[wt%]		0.300	
糖化温度[°C]		50	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075	
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075	
サンプル煮沸処理		有	



RUN No.		Kb-9	
原料(ケヤキ) [g-dry]		1.50	
処理方法		水蒸気爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	280
		時間[min]	10
糖化条件			
溶液量[m]		500	
基質濃度[wt%]		0.300	
糖化温度[°C]		50	
酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075	
	Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075	
サンプル煮沸処理		有	

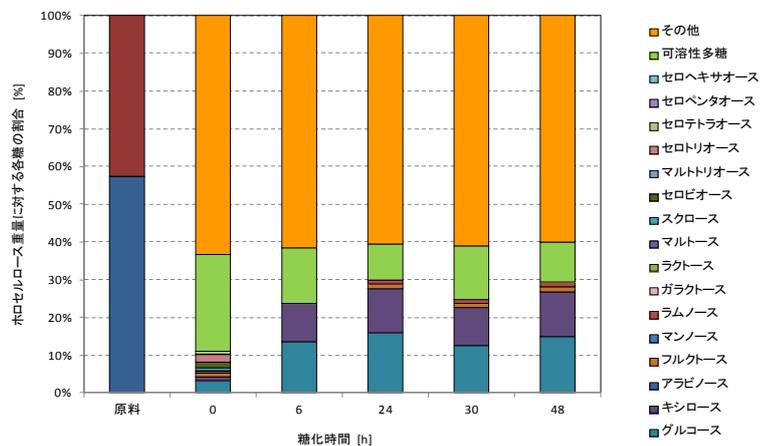
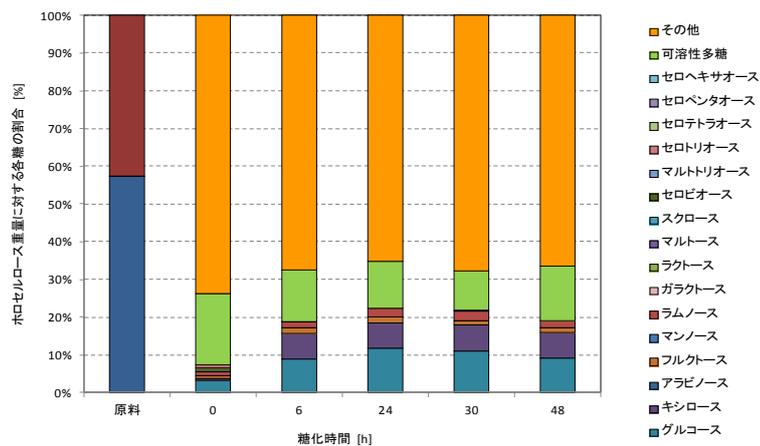
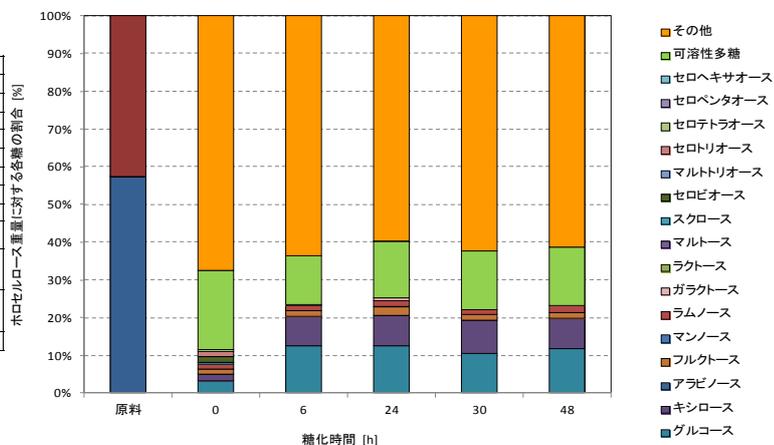


Fig. 5.2.2-3 水蒸気爆砕前処理物の酵素糖化結果 (ケヤキ×280°C)

RUN No.		Kb-10	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
処理方法		水蒸気爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	300
		時間[min]	10
糖化条件	溶液量[m]	500	
	基質濃度[wt%]	0.300	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理	有	



RUN No.		Kb-11	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
処理方法		水蒸気爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	300
		時間[min]	10
糖化条件	溶液量[m]	500	
	基質濃度[wt%]	0.300	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理	有	



RUN No.		Kb-12	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
処理方法		水蒸気爆砕	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
	2段目	温度[°C]	300
		時間[min]	10
糖化条件	溶液量[m]	500	
	基質濃度[wt%]	0.300	
	糖化温度[°C]	50	
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075
	サンプル煮沸処理	有	

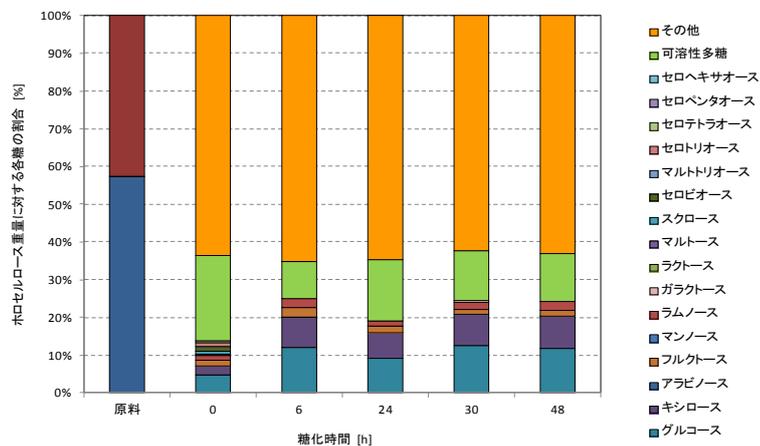
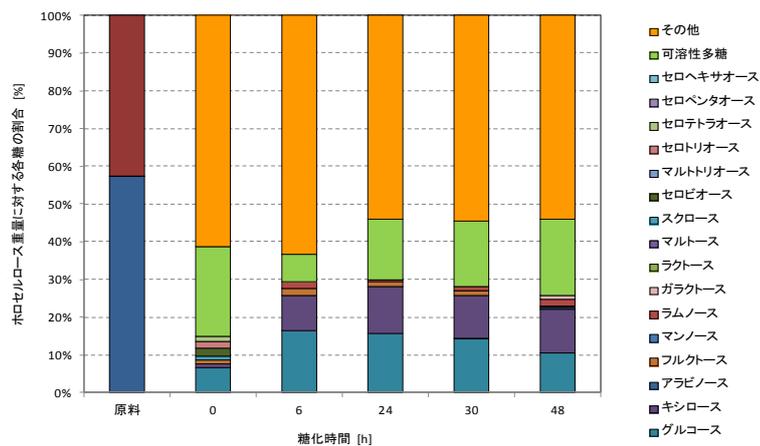
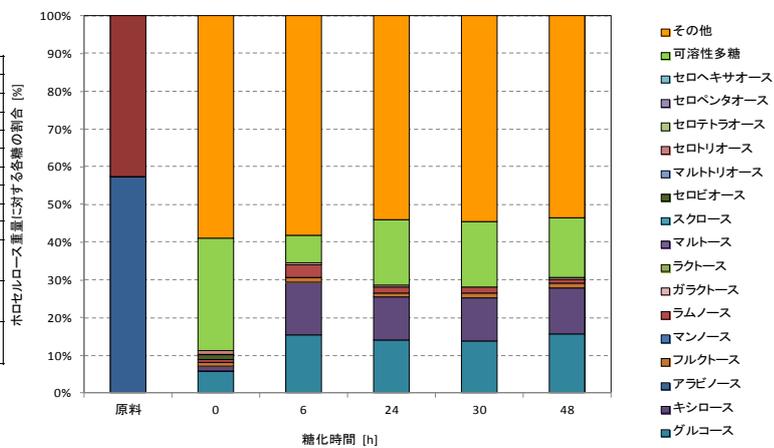


Fig. 5.2.2-4 水蒸気爆砕前処理物の酵素糖化結果(ケヤキ×300°C)

RUN No.		Kb-13		
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50		
前処理条件	処理方法	水熱徐冷		
	1段目	温度[°C]	180	
		時間[min]	0	
	2段目	温度[°C]	280	
時間[min]		10		
糖化条件	溶液量[ml]	500		
	基質濃度[wt%]	0.300		
	糖化温度[°C]	50		
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075	
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075	
	サンプル煮沸処理	有		



RUN No.		Kb-14		
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50		
前処理条件	処理方法	水熱徐冷		
	1段目	温度[°C]	180	
		時間[min]	0	
	2段目	温度[°C]	280	
時間[min]		10		
糖化条件	溶液量[ml]	500		
	基質濃度[wt%]	0.300		
	糖化温度[°C]	50		
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075	
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075	
	サンプル煮沸処理	有		



RUN No.		Kb-15		
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50		
前処理条件	処理方法	水熱徐冷		
	1段目	温度[°C]	180	
		時間[min]	0	
	2段目	温度[°C]	280	
時間[min]		10		
糖化条件	溶液量[ml]	500		
	基質濃度[wt%]	0.300		
	糖化温度[°C]	50		
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分解)	0.075	
		Cellic HTec (ヘミセルロース分解)	0.075	
	サンプル煮沸処理	有		

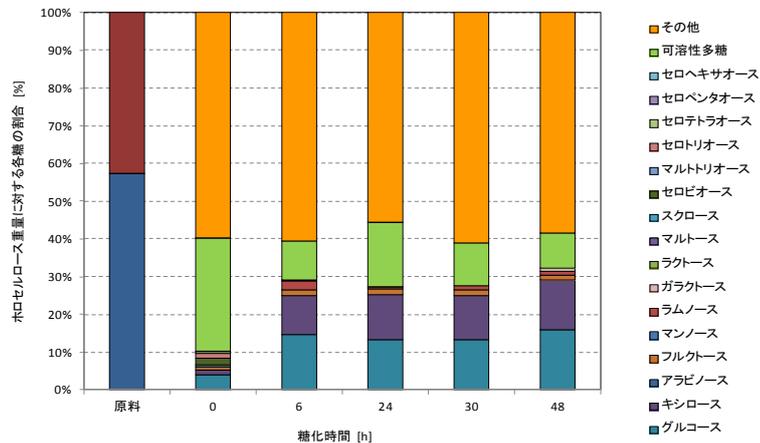
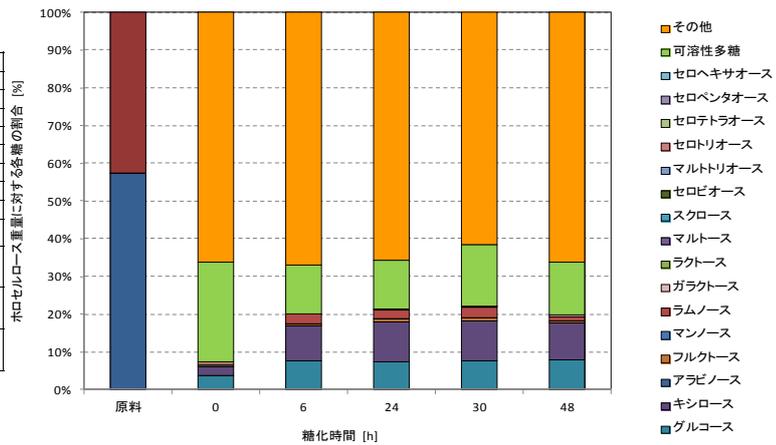
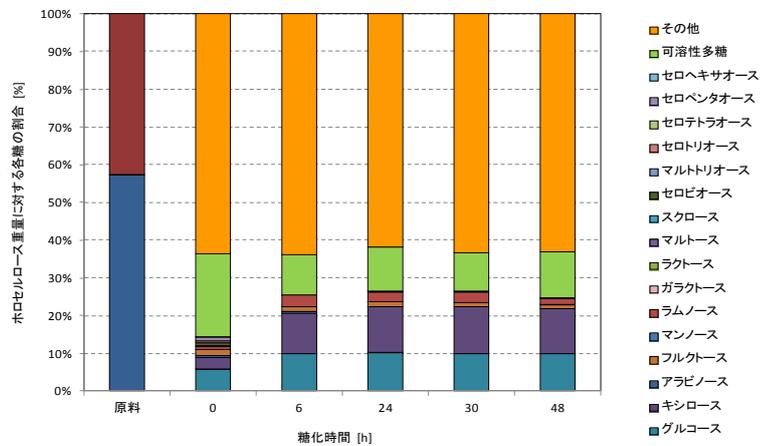


Fig. 5.2.2-5 水熱徐冷前処理物の酵素糖化結果 (ケヤキ×280°C)

RUN No.		Kb-16	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱徐冷	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
2段目		温度[°C]	300
		時間[min]	10
糖化条件	溶液量[ml]		500
	基質濃度[wt%]		0.300
	糖化温度[°C]		50
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分 解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロー ス分解)	0.075
	サンプル煮沸処理		有



RUN No.		Kb-17	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱徐冷	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
2段目		温度[°C]	300
		時間[min]	10
糖化条件	溶液量[ml]		500
	基質濃度[wt%]		0.300
	糖化温度[°C]		50
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分 解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロー ス分解)	0.075
	サンプル煮沸処理		有



RUN No.		Kb-18	
原料(ケヤキ)[g-dry]		1.50	
処理方法		水熱徐冷	
前処理条件	1段目	温度[°C]	180
		時間[min]	0
2段目		温度[°C]	300
		時間[min]	10
糖化条件	溶液量[ml]		500
	基質濃度[wt%]		0.300
	糖化温度[°C]		50
	酵素量[g]	Cellic CTec (セルロース分 解)	0.075
		Cellic HTec (ヘミセルロー ス分解)	0.075
	サンプル煮沸処理		有

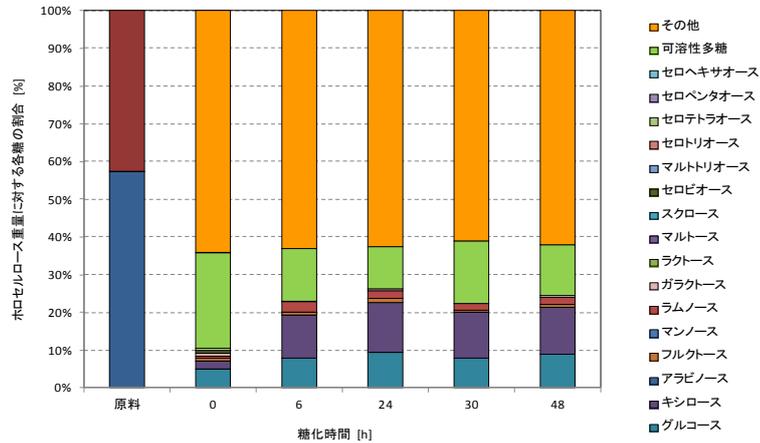


Fig. 5.2.2-6 水熱徐冷前処理物の酵素糖化結果 (ケヤキ×300°C)

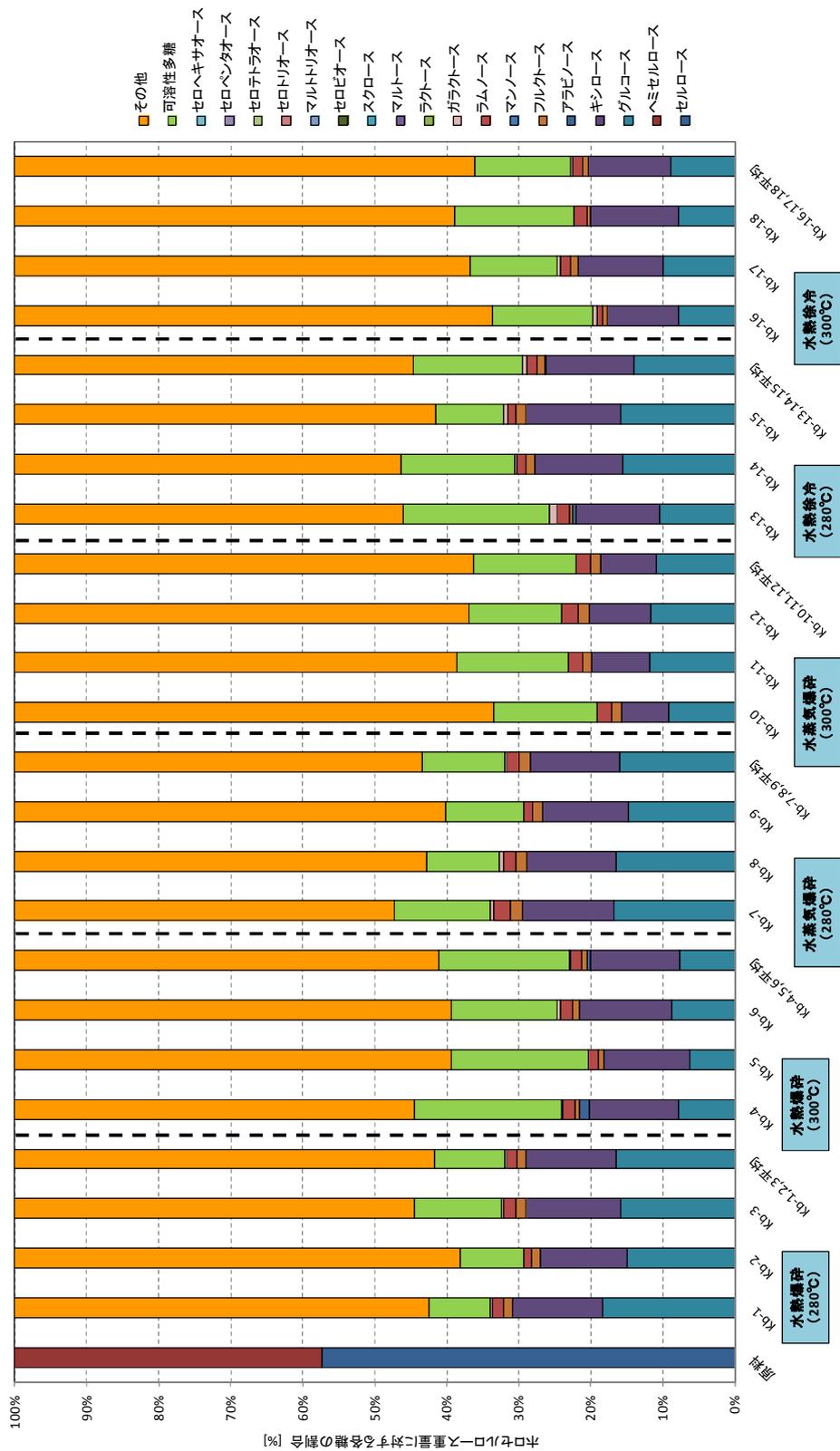


Fig.5.2.2-7 高温における各種前処理物の酵素糖化の再現性(原料:ケヤキ)

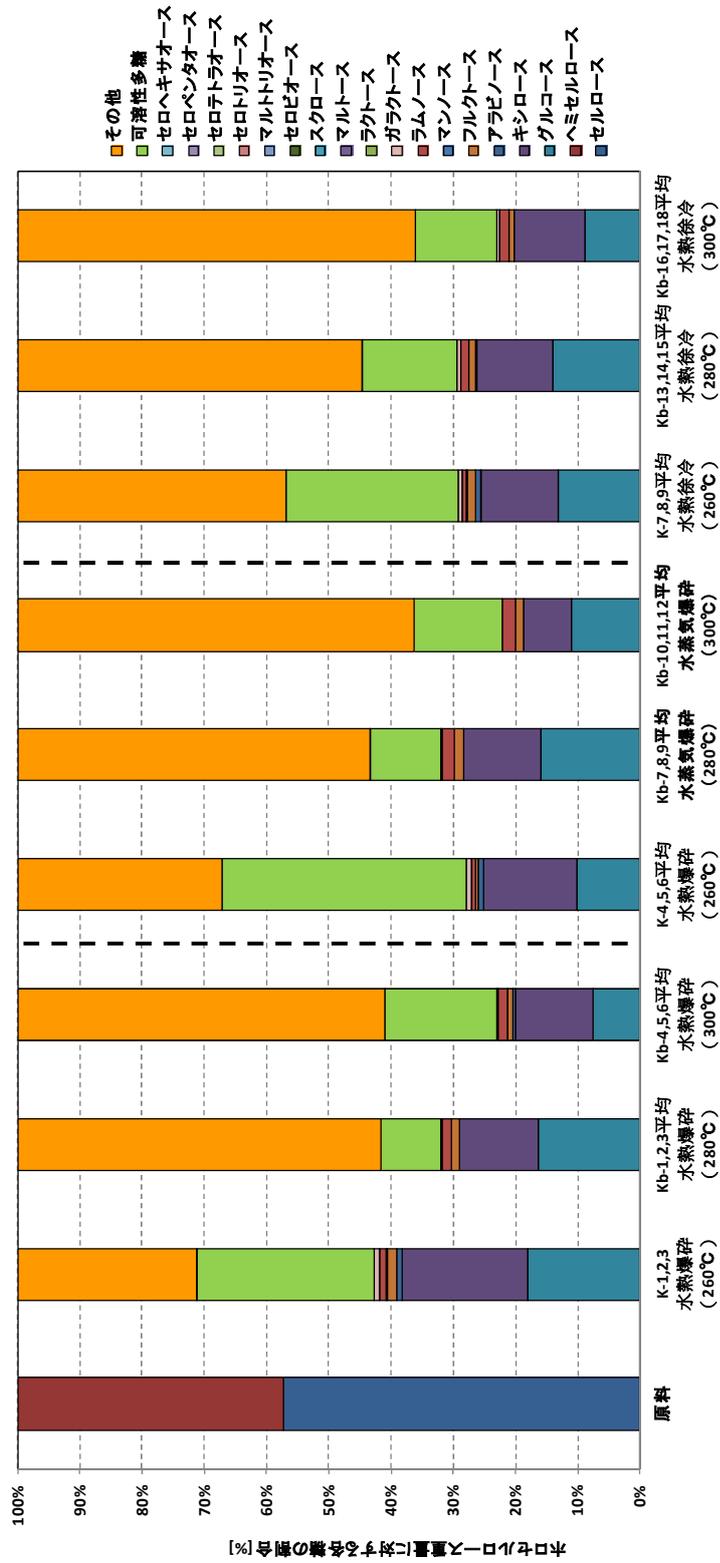


Fig.5.2.2-8 260から300°Cの高温における各種前処理物における各種前処理物の酵素糖化結果(原料:ケヤキ)

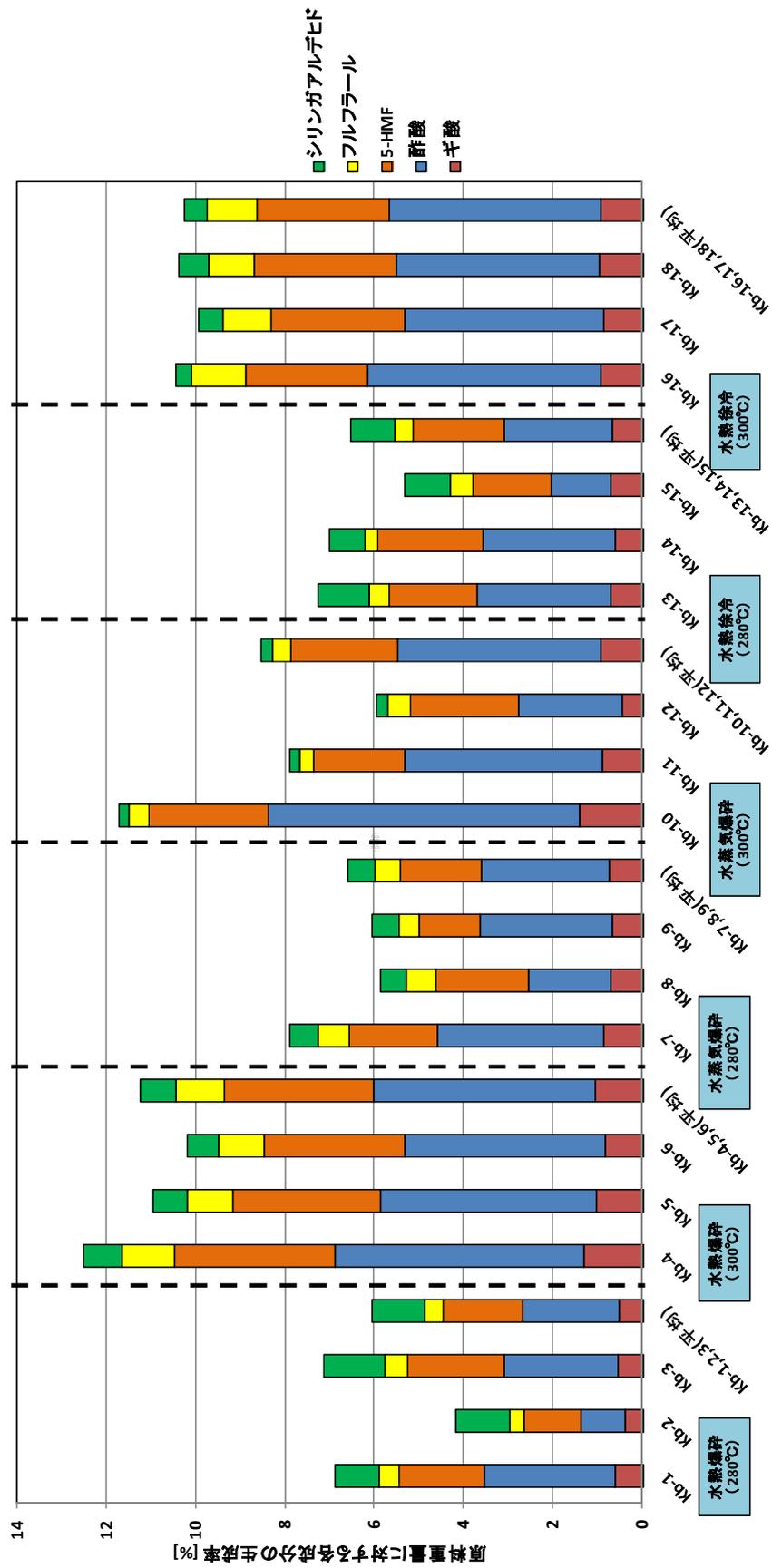


Fig.5.2.2-9 高温おける前処理温度と発酵阻害物質収率再現性(原料:ケヤキ)

	原料(ケヤキ)[g-dry]	1.50
サンプル	溶液量[ml]	500
	基質濃度[wt%]	0.3
	溶離液流量[ml/min]	0.50
測定条件 (有機酸)	測定時間[min]	20
	試料注入量[ $\mu$ l]	10
	カラム温度[ $^{\circ}$ C]	50
	溶離液流量[ml/min]	0.50
測定条件 (有機酸以外)	測定時間[min]	40
	試料注入量[ $\mu$ l]	5
	カラム温度[ $^{\circ}$ C]	30

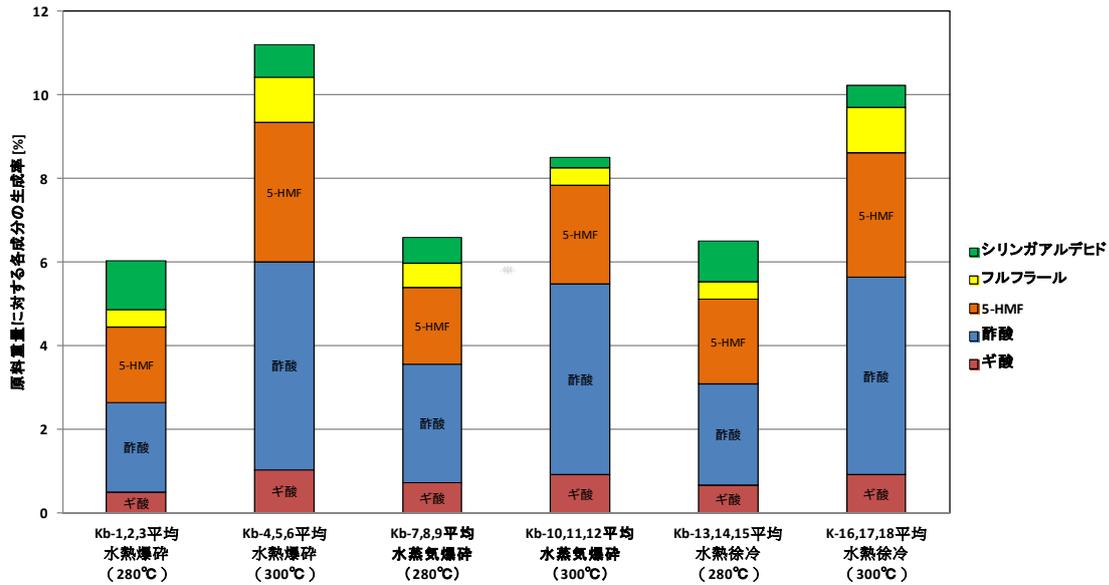


Fig. 5.2.2-10 280 から 300 $^{\circ}$ Cにおける前処理温度と発酵阻害物質との関係 (原料: ケヤキ)

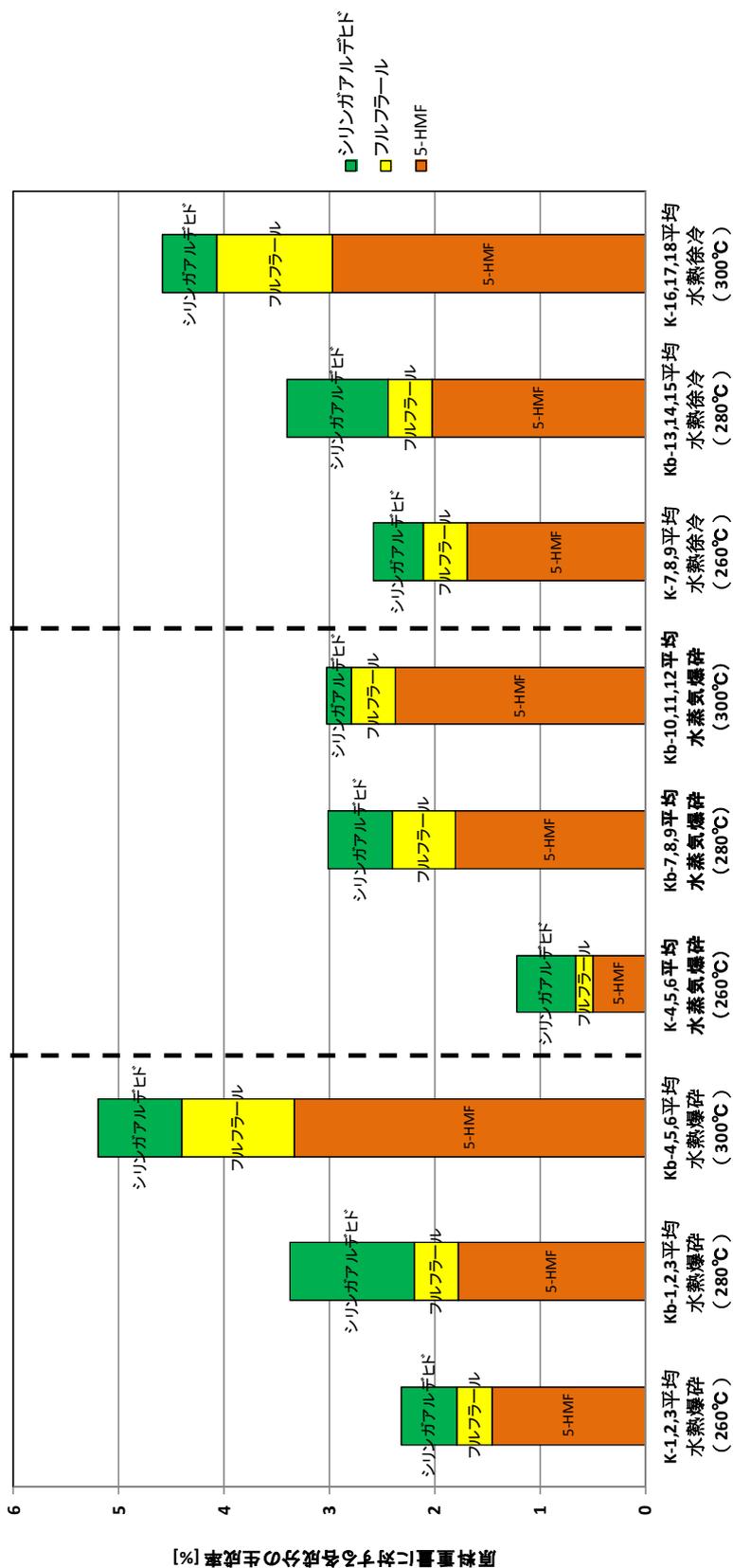


Fig.5.2.2-11 260から300°Cにおける前処理温度と発酵阻害物質との関係(原料:ケヤキ)

### 5. 3 バイオマス高濃度前処理物の酵素糖化（杉、けやき）

これまでの前処理試験では、前処理物中のバイオマス濃度は約 0.3wt%と希薄な状態で酵素糖化試験を実施したものである。その酵素糖化液をそのままエタノール発酵すると、エタノール収率が 90%としてもエタノール濃度は約 0.14wt%となり、エタノールの濃縮・脱水にかなりのエネルギーを要するので、前処理物中のバイオマス濃度は約 10~20wt%程度の高濃度にする必要がある。

前処理物の高濃度化は、必要最小限の熱水で前処理して製造すべきであるが、ここでは希薄な前処理液の水分を蒸発させて濃度に調整を行ない、酵素糖化を行なった。

Fig. 5. 3-1 にケヤキ及び杉を水熱爆砕後に高濃度化した処理物の酵素糖化率を示すが、基質濃度（バイオマス濃度）が高くなると酵素糖化率の大きな低下がみられた。

これは、酵素が糖以外の成分に吸着された影響が大いと考えられる。再現性の確認を行なう必要があるが、原らが開発中の炭素系個体酸は逆に基質が高濃度ほど糖化率は高くなるので、その適用も含めて検討する必要があると考えられる。

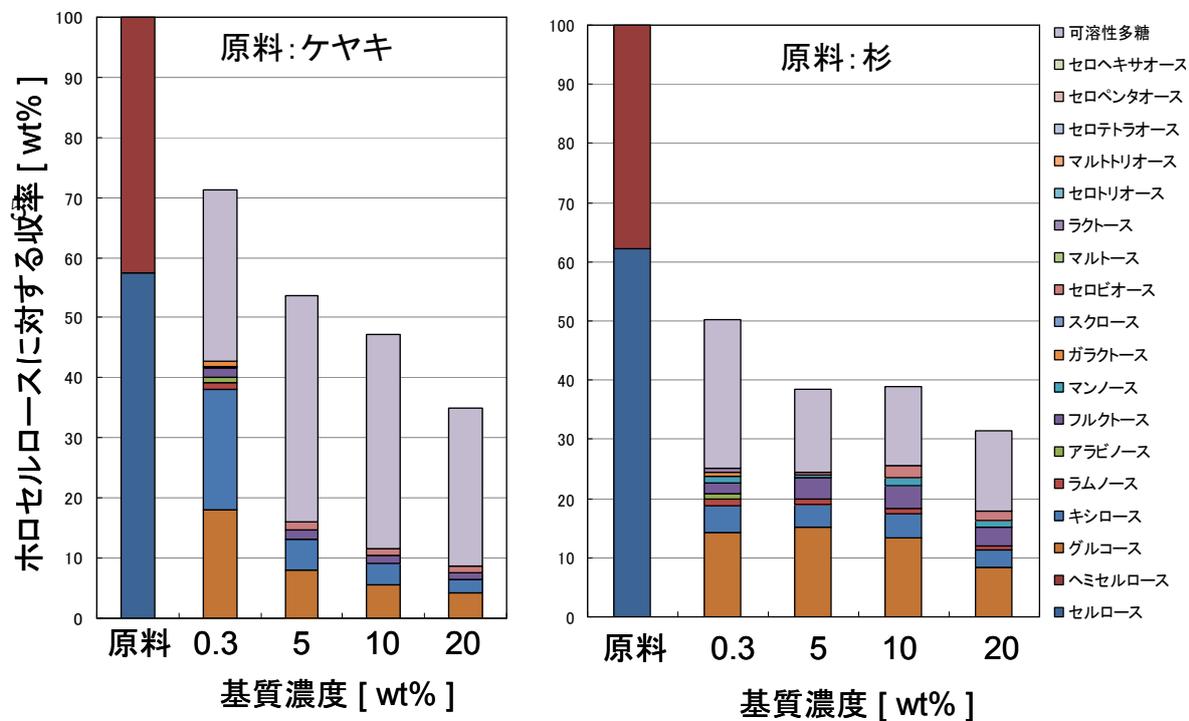


Fig. 5.3-1 水熱爆砕前処理物の基質濃度と酵素糖化率の関係  
(糖化時間：48h)

#### 5. 4 稲わらの前処理・酵素糖化試験結果

これまででは木質系（いわゆるハードバイオマス）を主体に試験を行なったが、ここでは草質系（いわゆるソフトバイオマス）廃棄物である稲わらについて水熱爆砕および水熱徐冷前処理物の酵素糖化試験を行ない、水熱爆砕の優位性の検証と適正条件の検討を目的とした。試験装置と方法は前節までのものと同じである。

稲わらの水熱爆砕前処理物の酵素糖化率と前処理温度との関係を、糖化時間別に Fig. 5. 4-1 から Fig. 5. 4-4 に示す。水熱徐冷前処理物についても同様に Fig. 5. 4-5 から Fig. 5. 4-8 に示す。

水熱爆砕、水熱徐冷いずれも前処理温度が 180～200℃で糖化率は最大となり、水熱爆砕の糖化率は水熱徐冷より明らかに大きいことが認められた。

発酵阻害物質の収率を Fig. 5. 4-9 から Fig. 5. 4-12 に示すが、水熱爆砕と水熱徐冷での差異は少なくほぼ同等である。

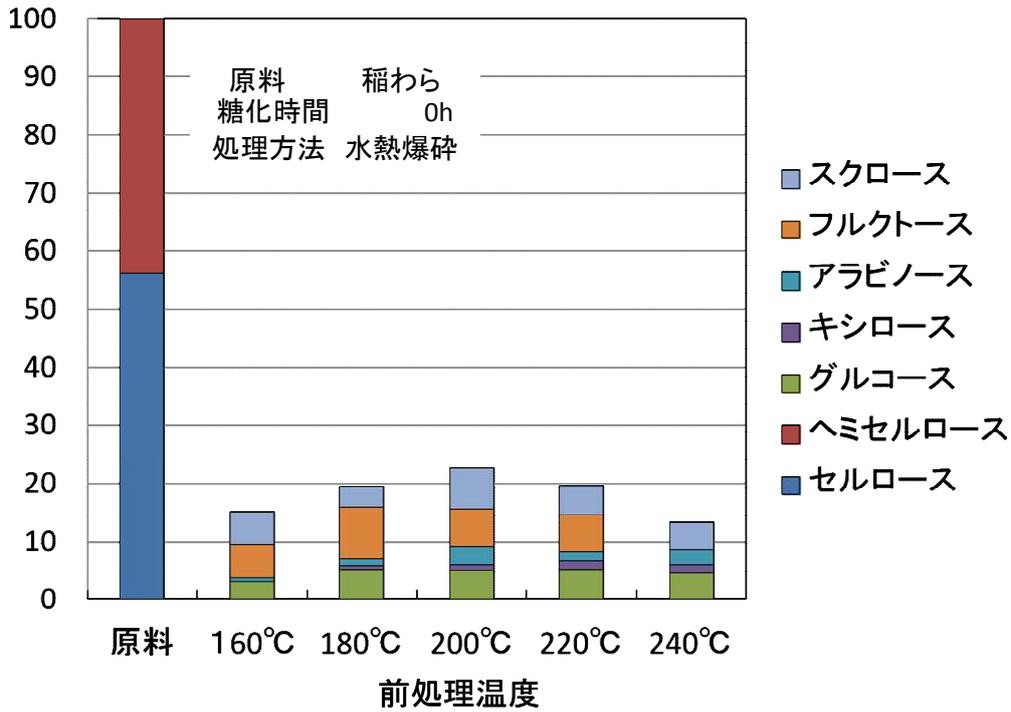


Fig. 5. 4-1 稲わらの水熱爆砕前処理物の糖収率（糖化時間：0 h）

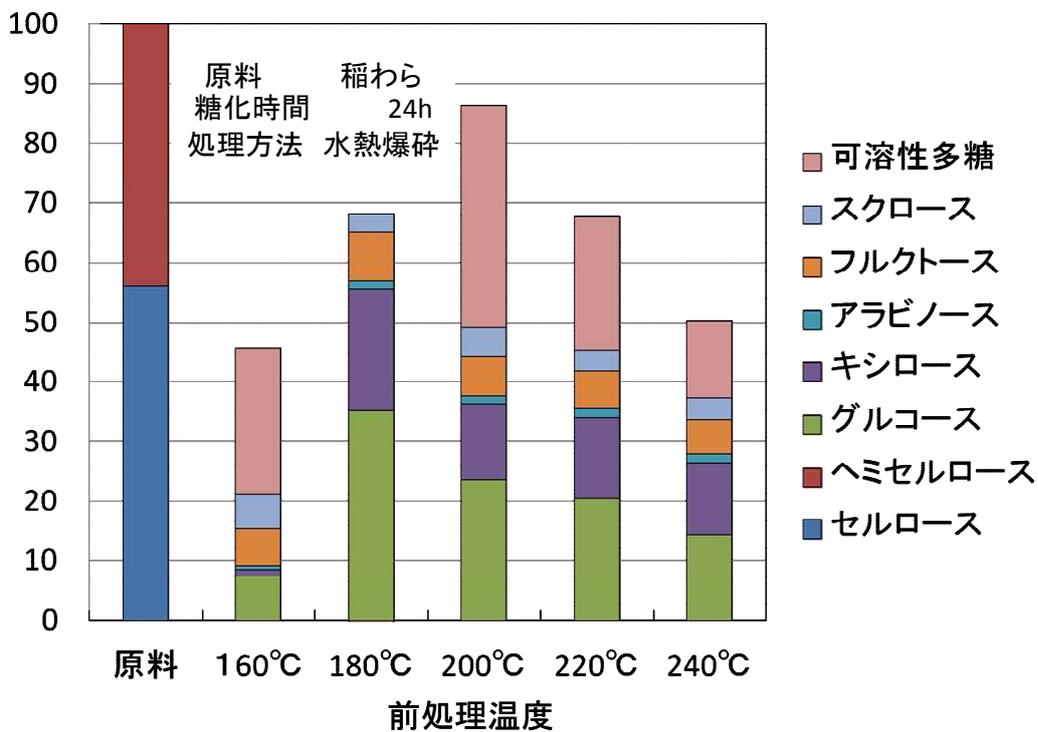


Fig. 5. 4-2 稲わらの水熱爆砕前処理物の酵素糖化率（糖化時間：24 h）

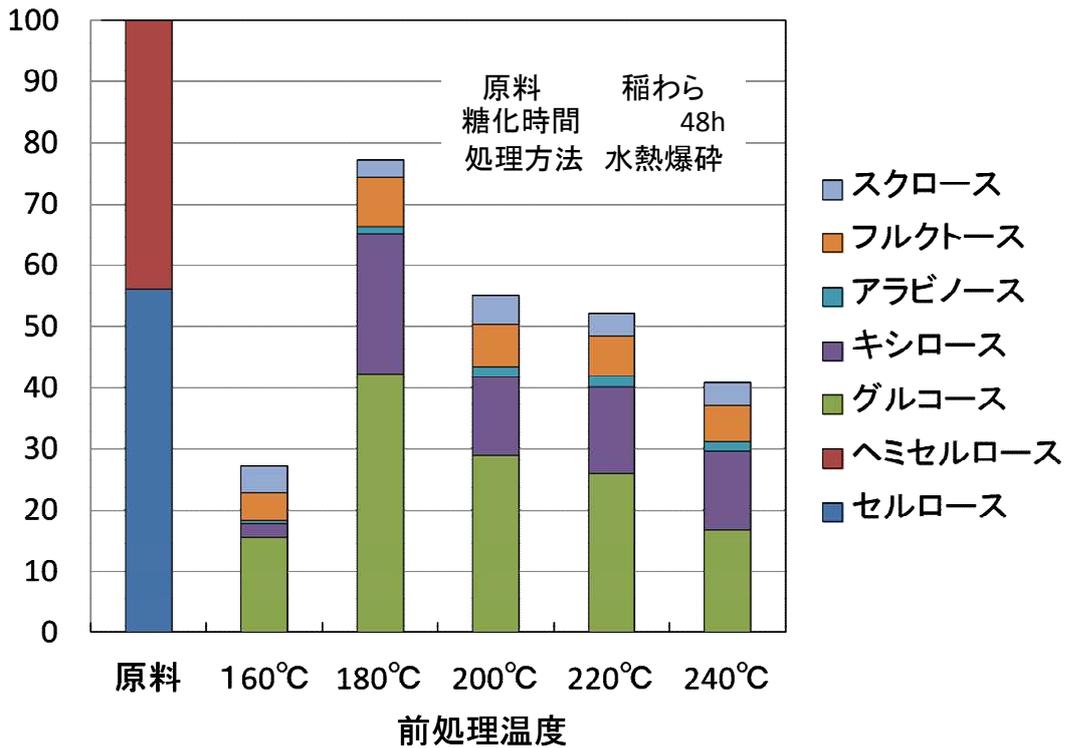


Fig. 5. 4-3 稲わらの水熱爆砕前処理物の酵素糖化率（糖化時間：48h）

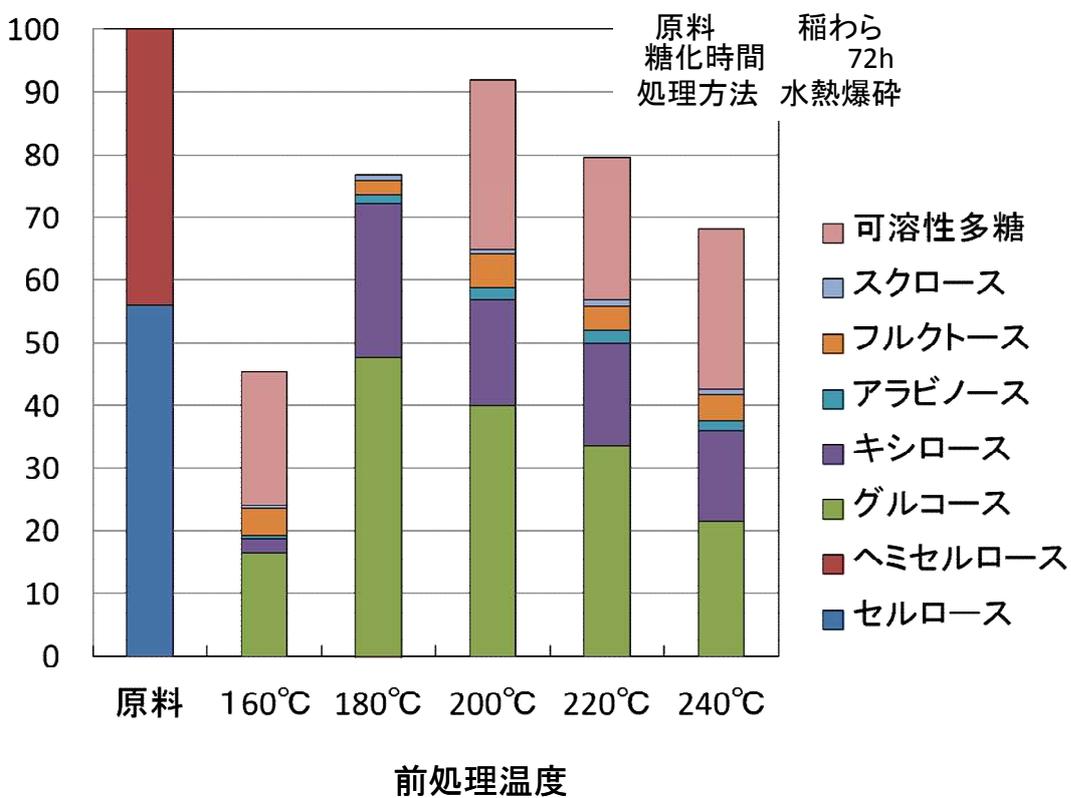


Fig. 5. 4-4 稲わらの水熱爆砕前処理物の酵素糖化率（糖化時間：72h）

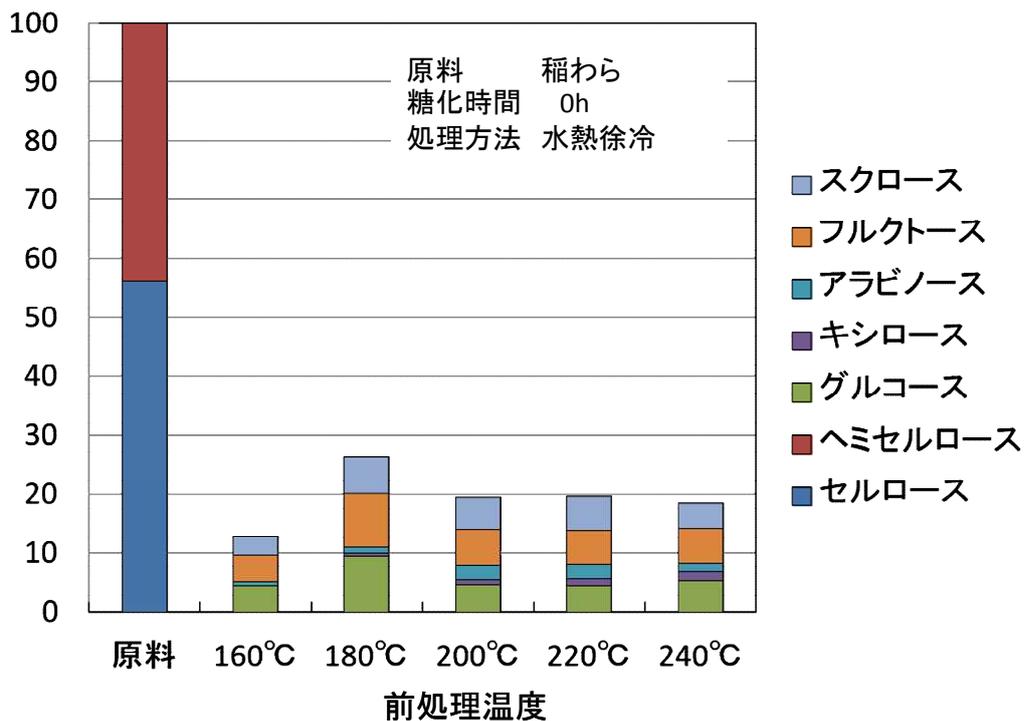


Fig. 5. 4-5 稲わらの水熱徐冷前処理物の収率（糖化時間：0 h）

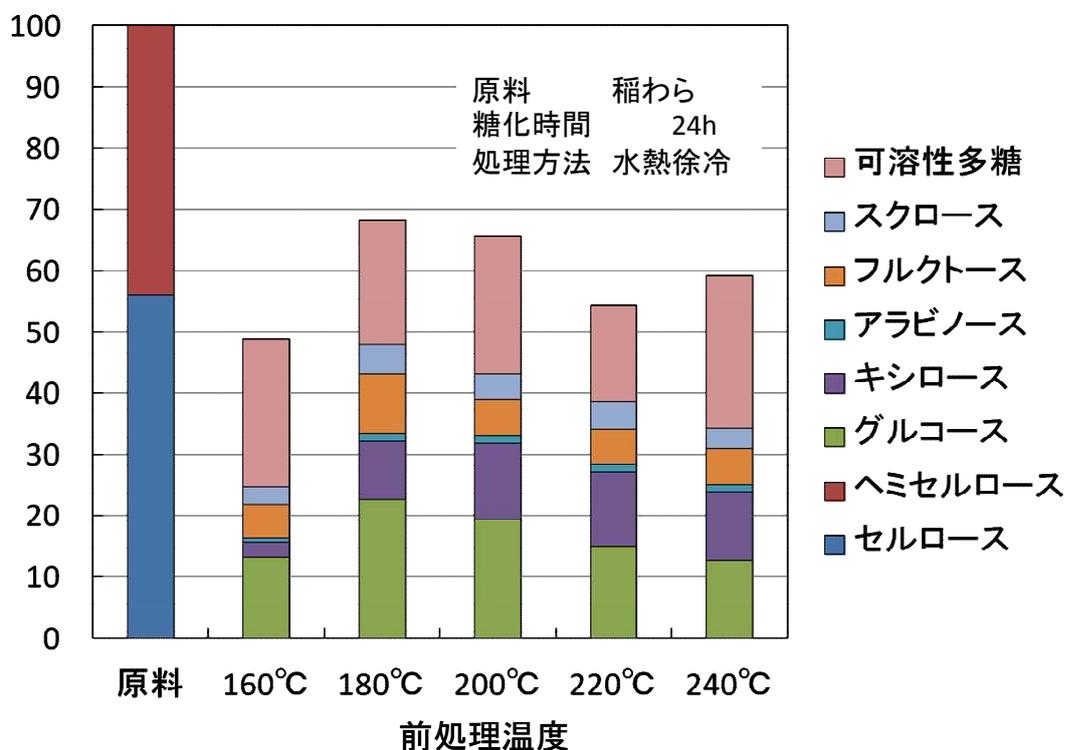


Fig. 5. 4-6 稲わらの水熱徐冷前処理物の酵素糖化率（糖化時間：24 h）

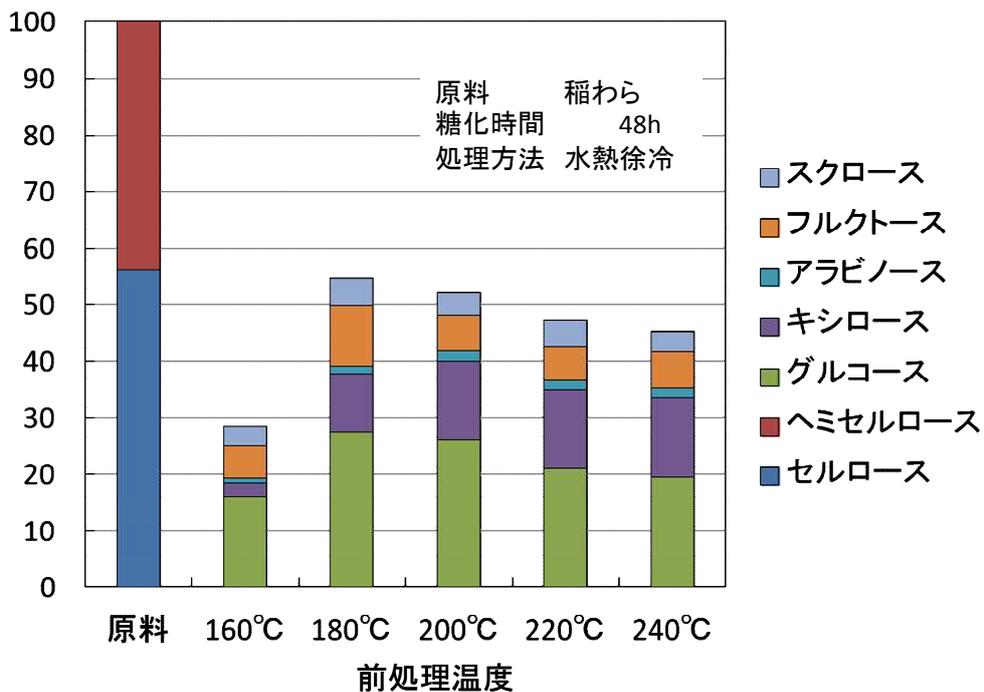


Fig. 5. 4-7 稲わらの水熱徐冷前処理物の酵素糖化率（糖化時間：48h）

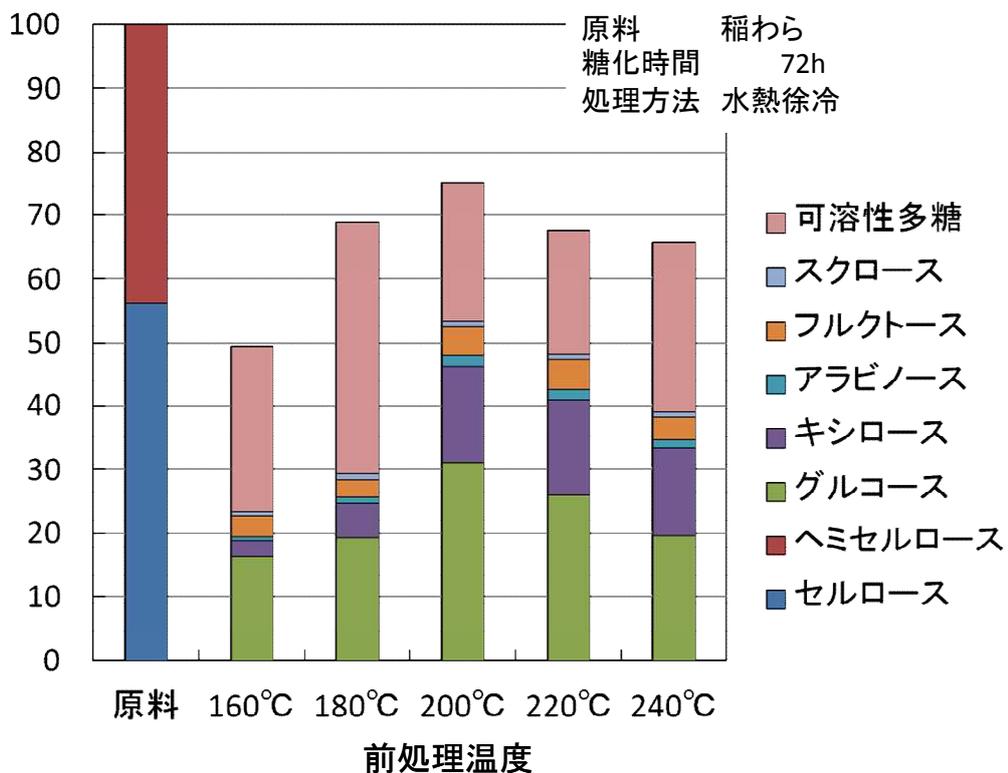


Fig. 5. 4 -8 稲わらの水熱徐冷前処理物の酵素糖化率（糖化時間：72h）

)

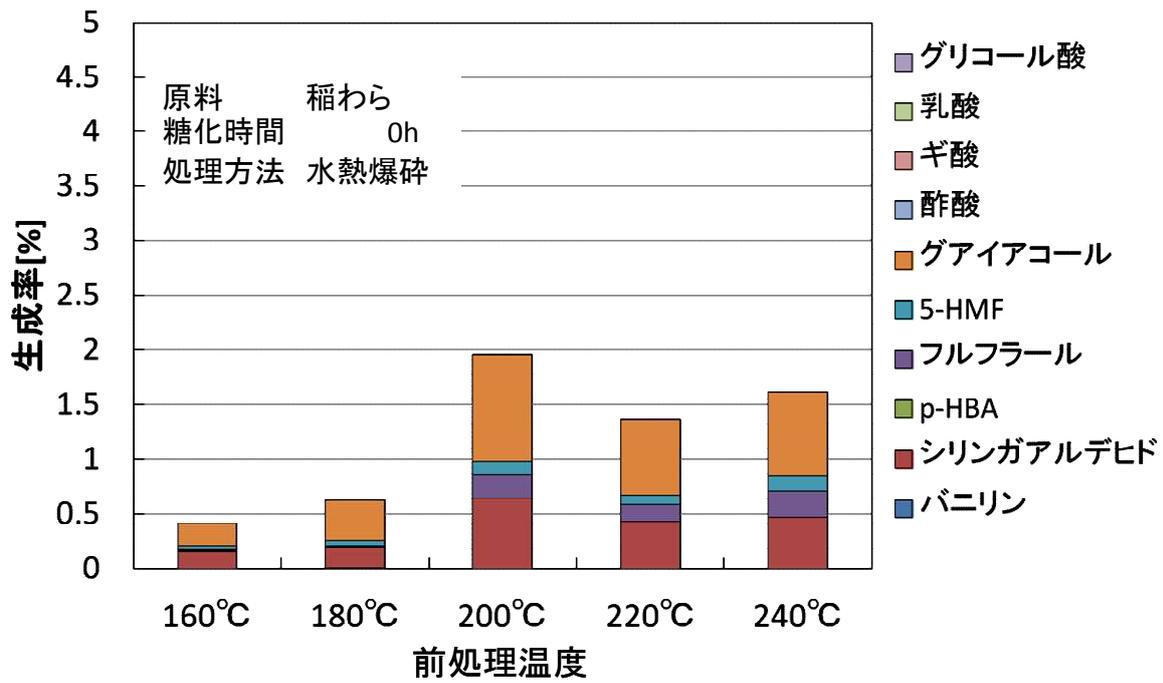


Fig. 5. 4-9 稲わらの水熱爆砕前処理物中の発酵阻害物収率 (糖化：0 h)

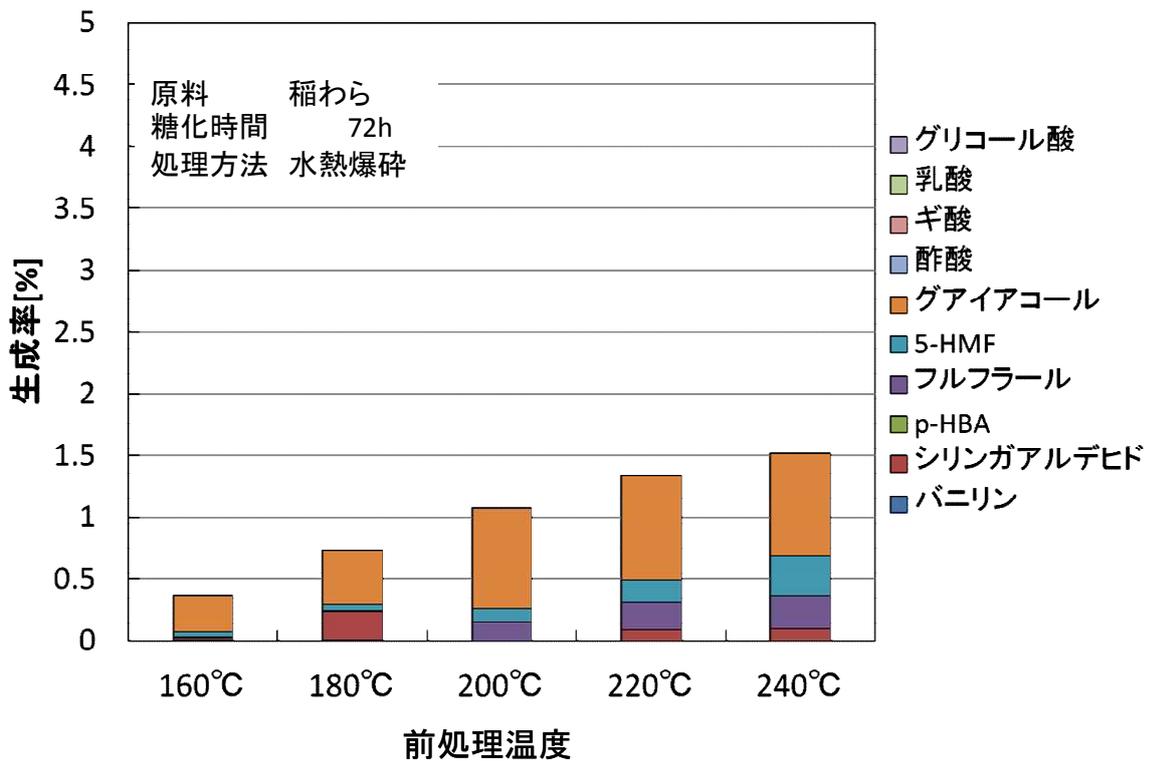


Fig. 5. 4-10 稲わらの水熱爆砕前処理物中の発酵阻害物収率 (糖化：72 h)

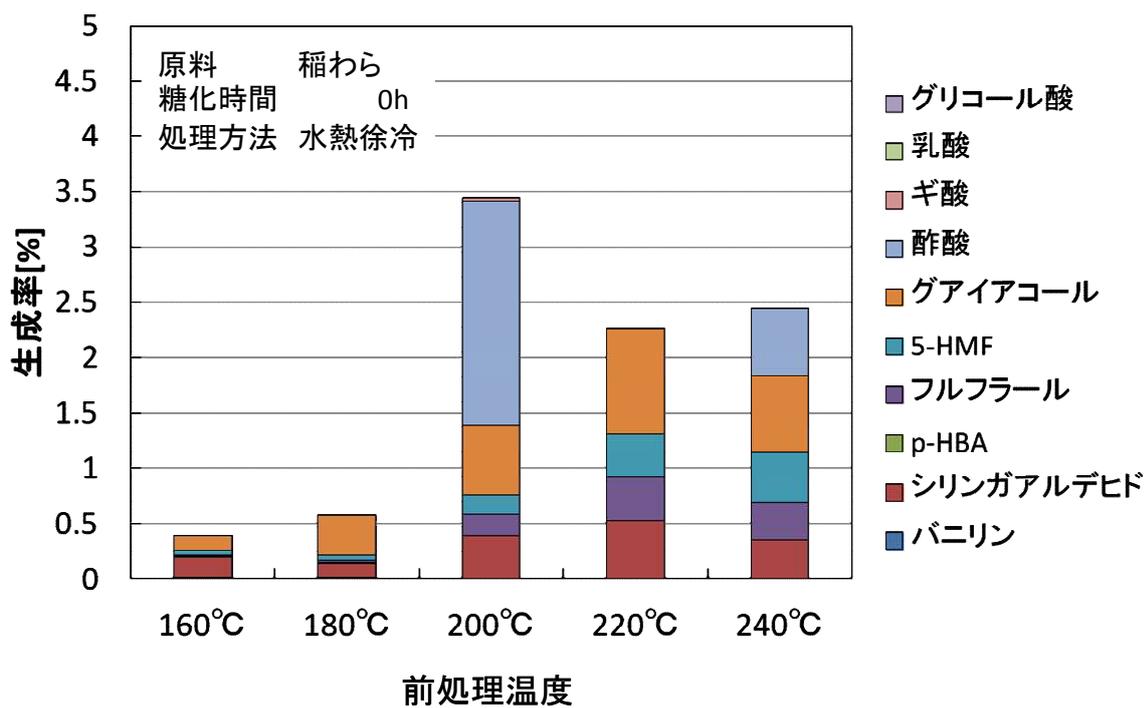


Fig. 5. 4-11 稲わらの水熱徐冷前処理物中の発酵阻害物収率 (糖化 : 0 h)

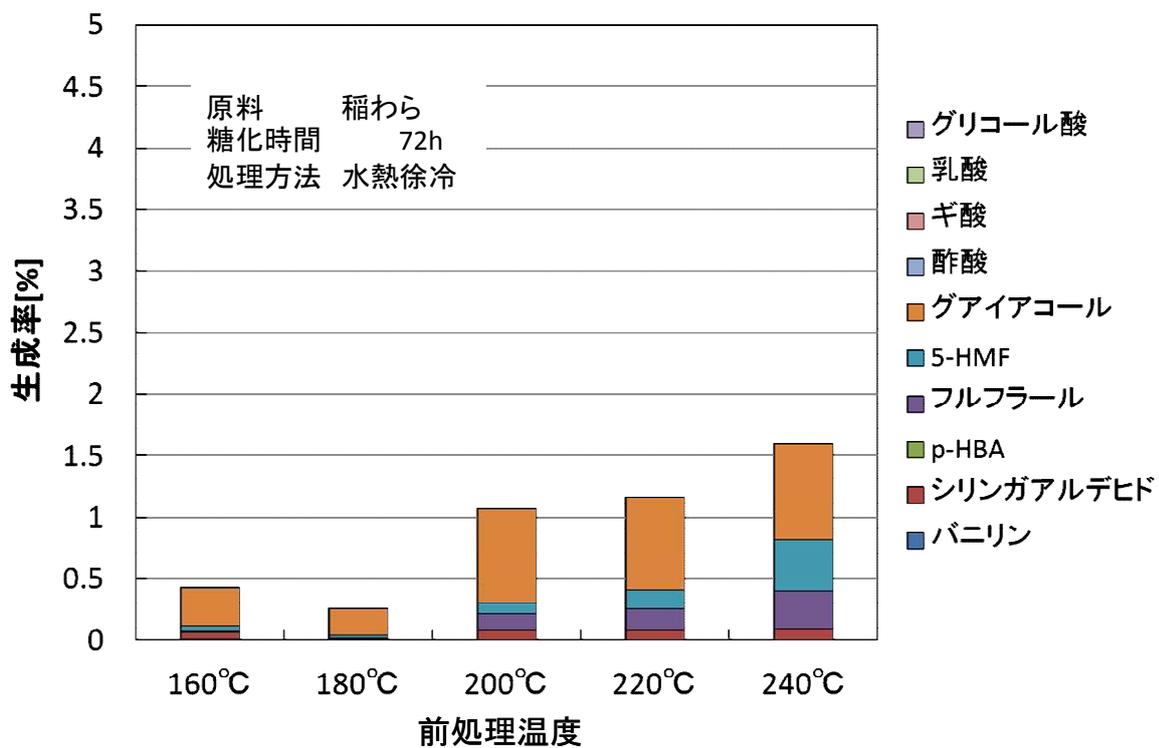


Fig. 5. 4-12 稲わらの水熱徐冷前処理物中の発酵阻害物収率 (糖化 : 72 h)

## 5. 5 低温域での前処理試験（杉、ケヤキ）

5. 3節では高温域での可能性を検討したが、稲わらで比較的低温が良好であったので、杉とけやきについて低温域での可能性を検討した。

### （1）杉の場合

水熱爆砕前処理物の酵素糖化試験結果を Fig. 5. 5-1 から Fig. 5. 5-3 に、水熱徐冷前処理物の酵素糖化試験結果を Fig. 5. 5-4 から Fig. 5. 5-6 に示す。また、それぞれの発酵阻害物質の収率を Fig. 5. 5-7 から Fig. 5. 5-8 に示す。尚、いずれも高温域の結果を合わせ示した。

酵素糖化率は約 260℃近傍で最大となっており、低温域は好ましくないと考えられる（ただし、低温×長時間の条件は可能性があり今後検討予定）。

### （2）けやきの場合

水熱爆砕前処理物の酵素糖化試験結果を Fig. 5. 5-9 から Fig. 5. 5-11 に、水熱徐冷前処理物の酵素糖化試験結果を Fig. 5. 5-12 から Fig. 5. 5-14 に示す。また、それぞれの発酵阻害物質の収率を Fig. 5. 5-15 から Fig. 5. 5-16 に示す。尚、いずれも高温域の結果を合わせ示した。

杉と同様に酵素糖化率は約 260℃近傍で最大となっており、低温域は好ましくないと考えられる（ただし、低温×長時間の条件は可能性があり今後検討予定）。

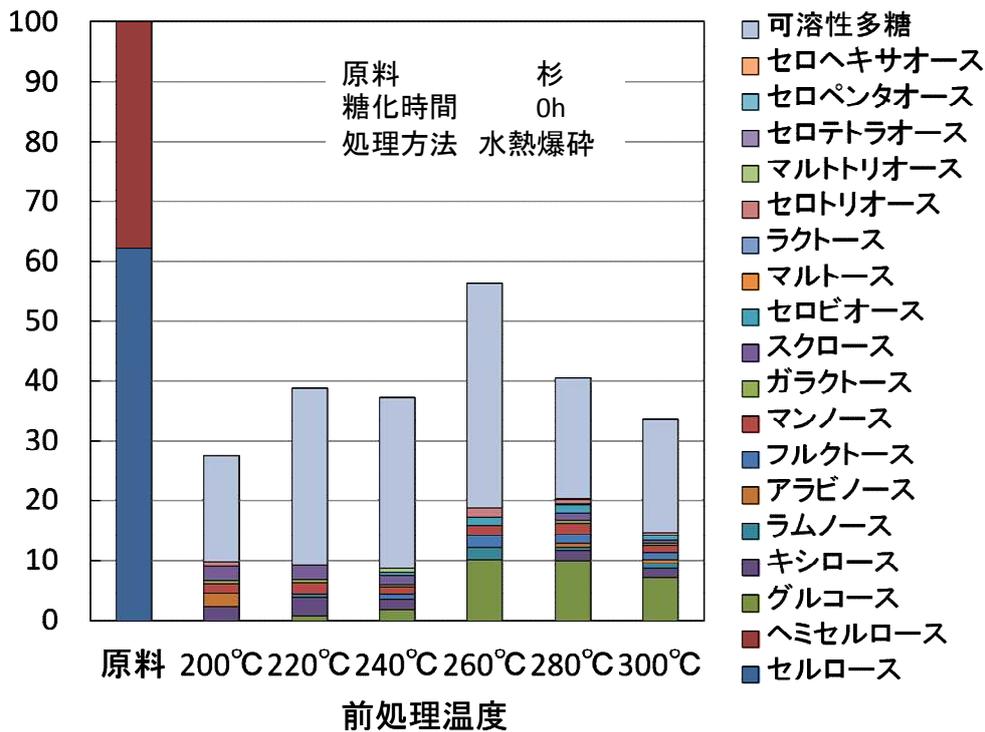


Fig. 5. 5-1 杉の水熱爆砕前処理物の糖収率（糖化時間：0 h）

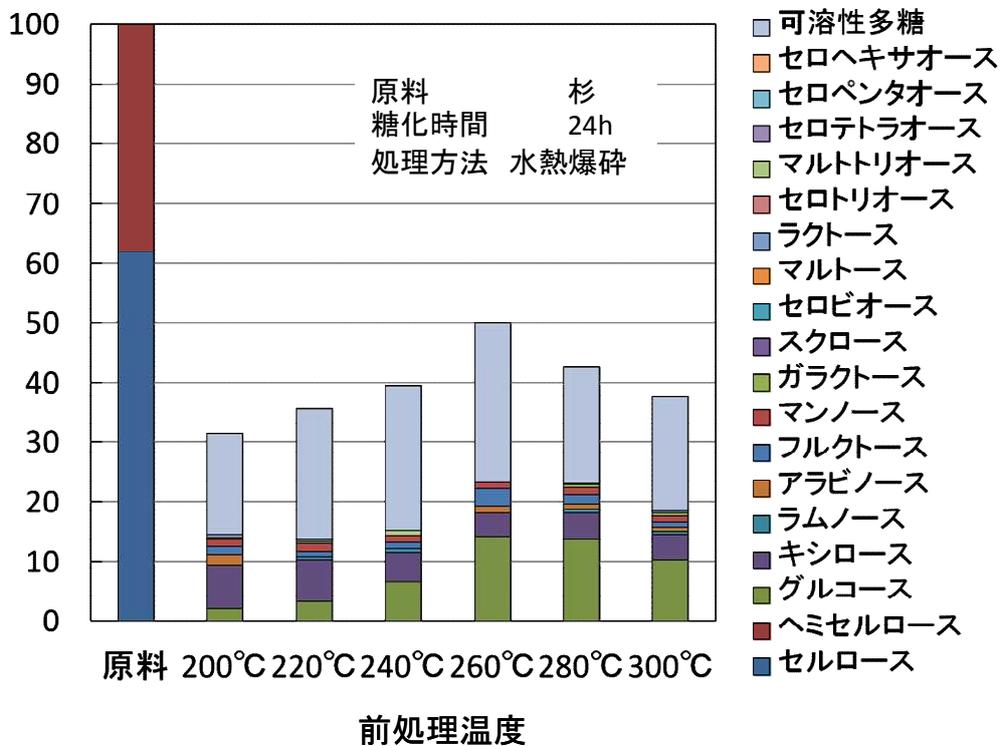


Fig. 5. 5-2 杉の水熱爆砕前処理物の酵素糖化率（糖化時間：24 h）

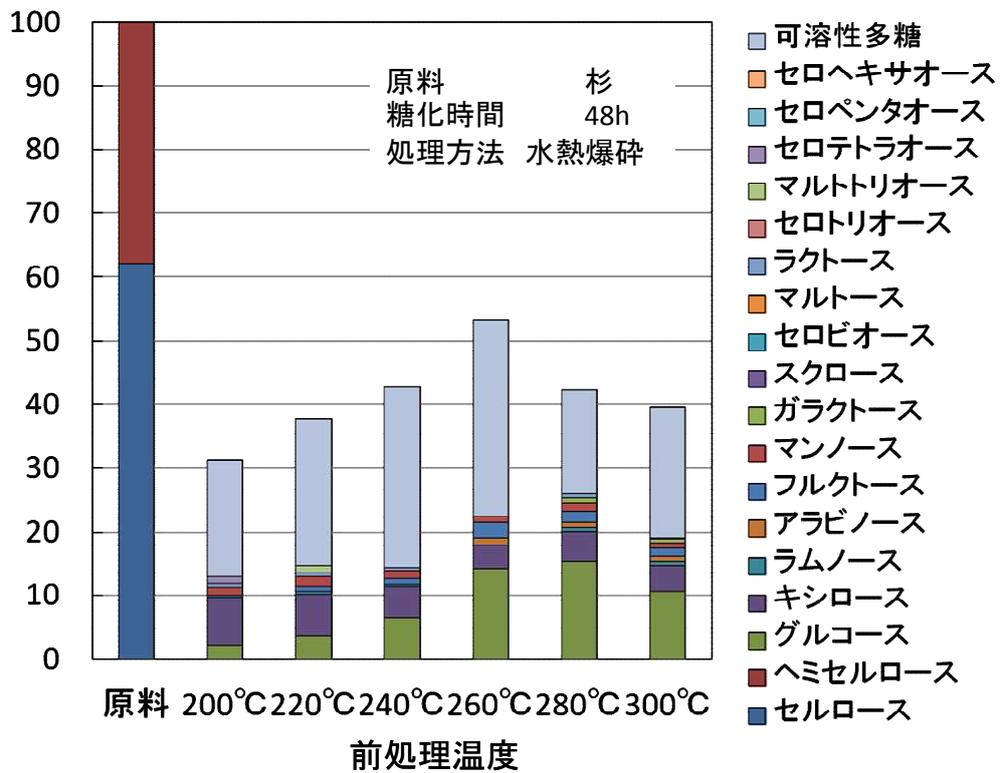


Fig. 5.5-3 杉の水熱爆砕前処理物の糖化率（糖化時間：48h）

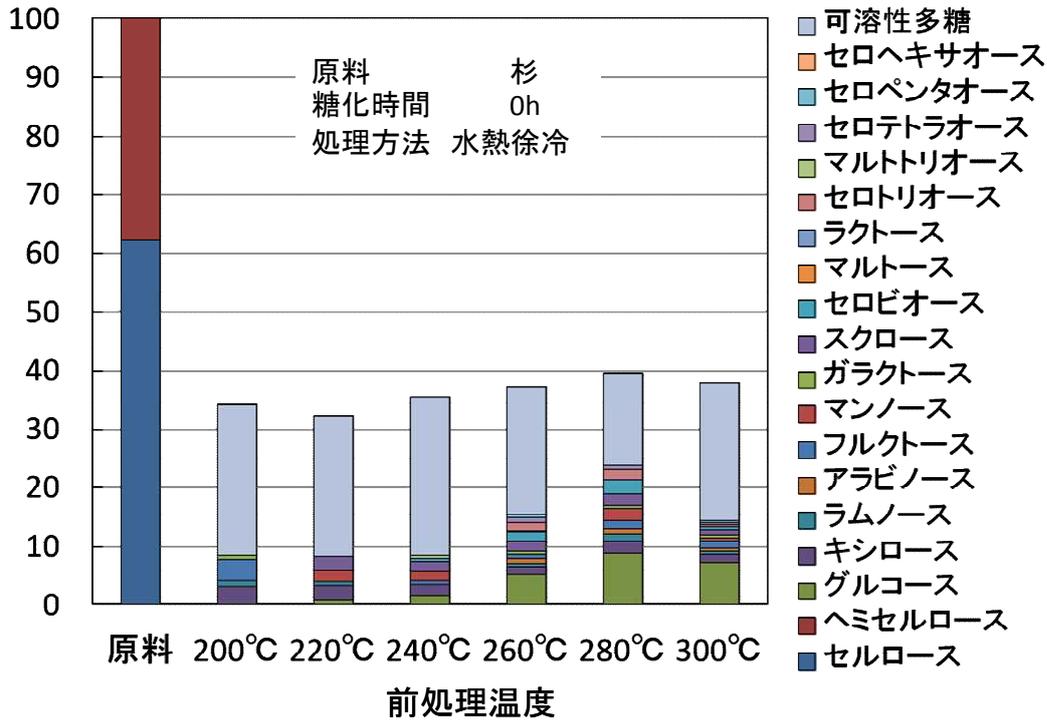


Fig. 5.5-4 杉の水熱徐冷前処理物の糖化率（糖化時間：0 h）

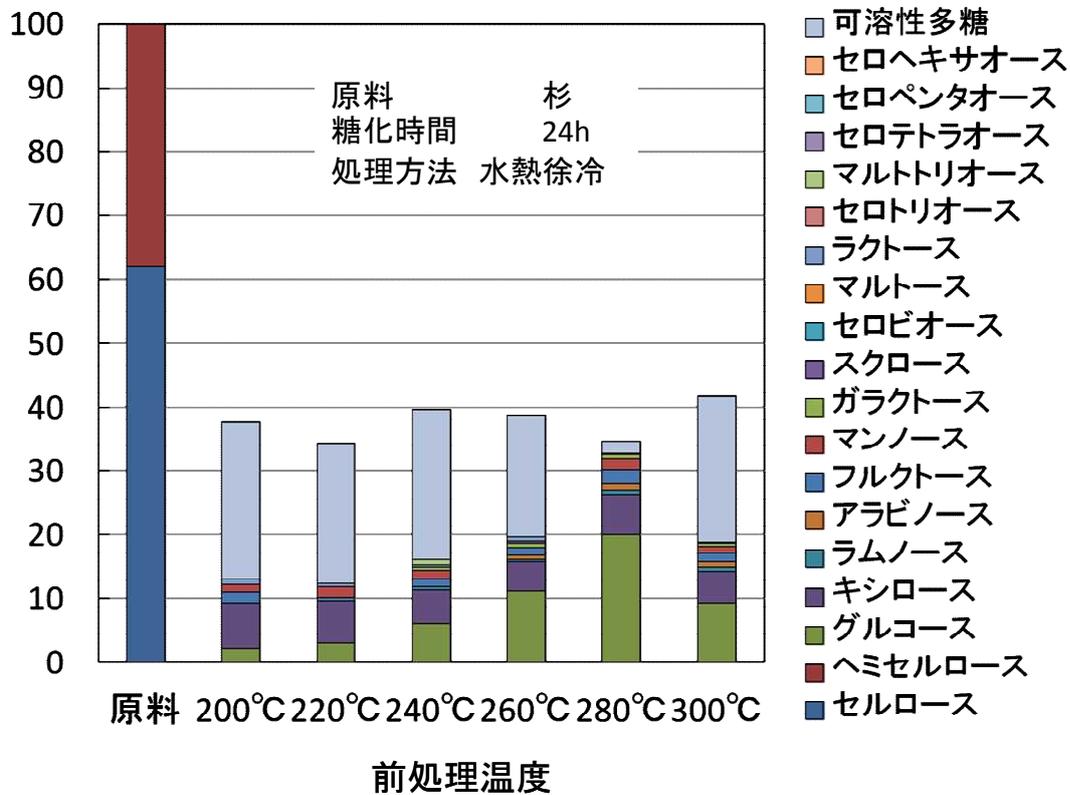


Fig. 5.5-5 杉の水熱徐冷前処理物の酵素糖化率（糖化時間：24 h）

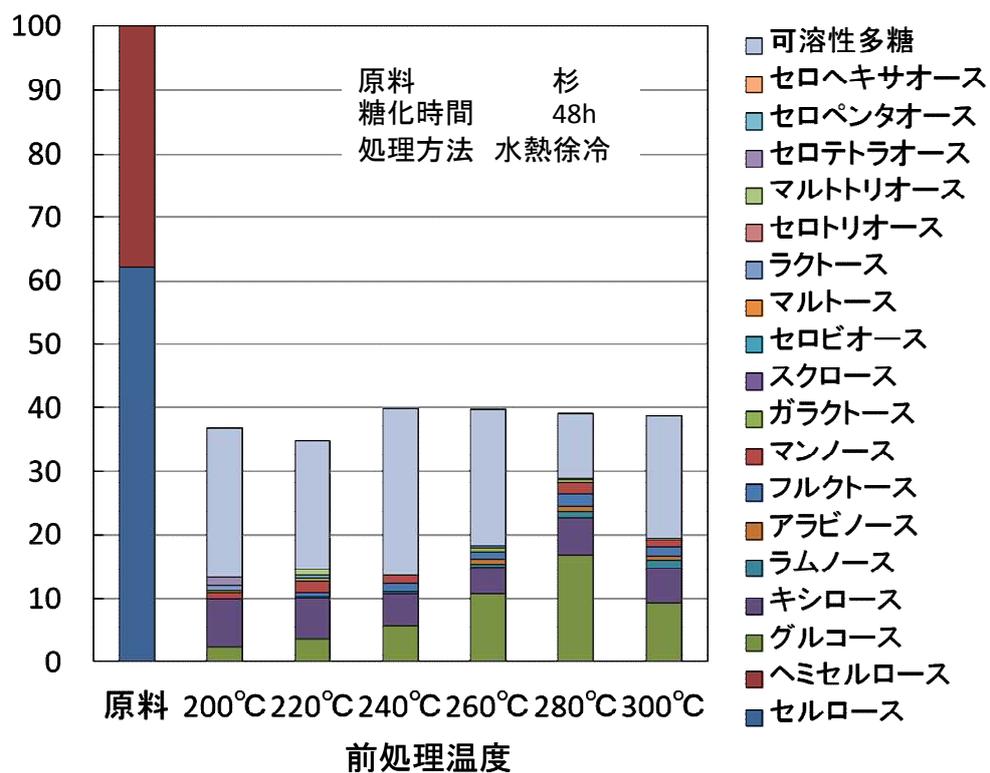


Fig. 5.5-6 杉の水熱徐冷前処理物の酵素糖化率 (糖化時間: 48 h)

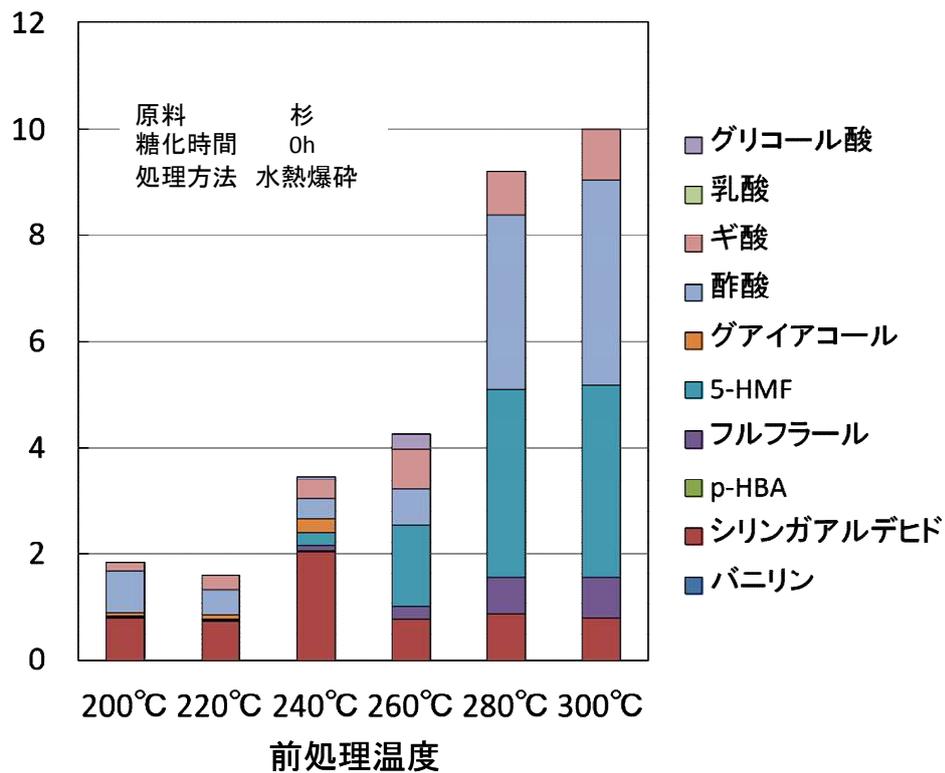


Fig. 5.5-7 杉の水熱爆砕前処理物中の発酵阻害物収率（糖化：0 h）

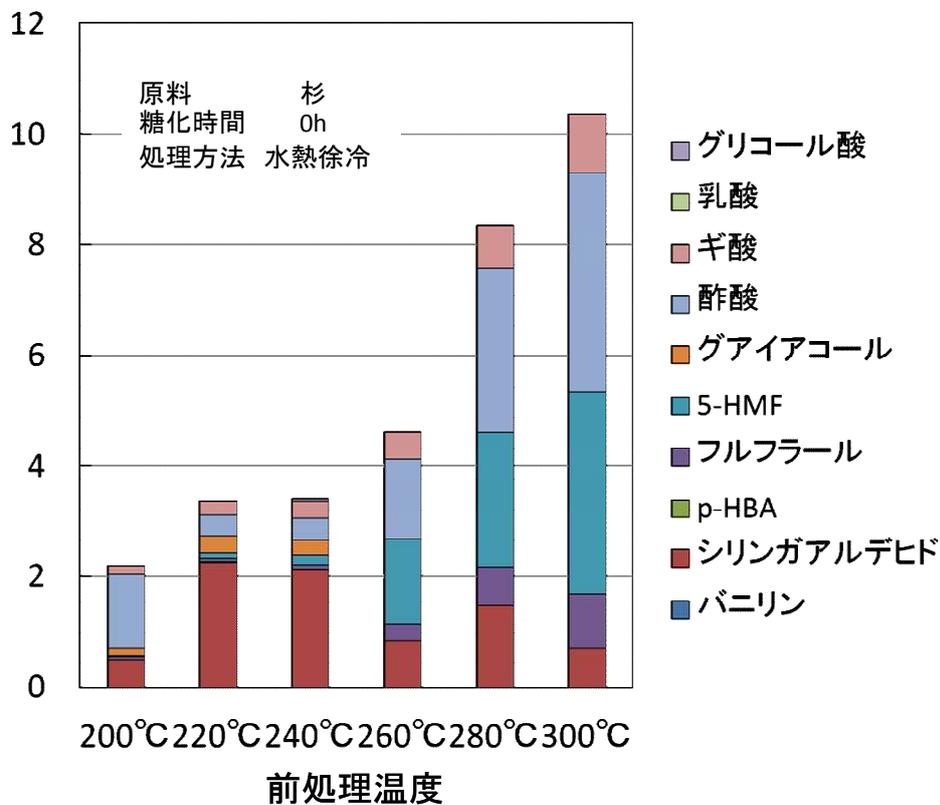


Fig. 5.5-8 杉の水熱徐冷前処理物中の発酵阻害物収率（糖化：0 h）

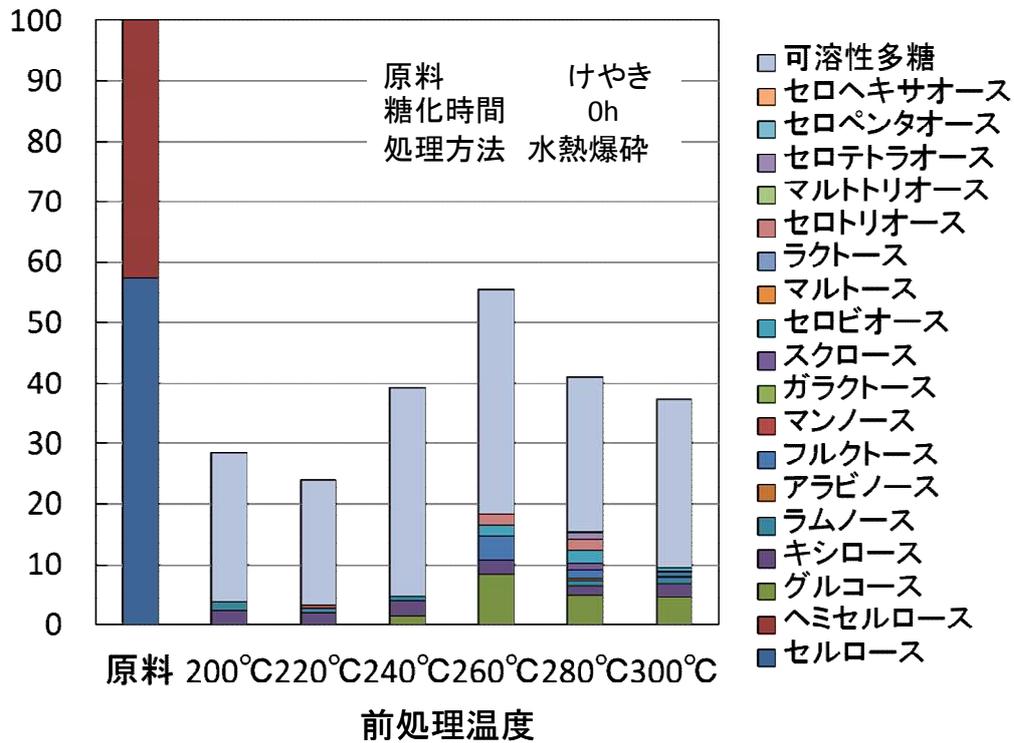


Fig. 5.5-9 ケヤキの水熱爆砕前処理物の糖化率（糖化時間：0 h）

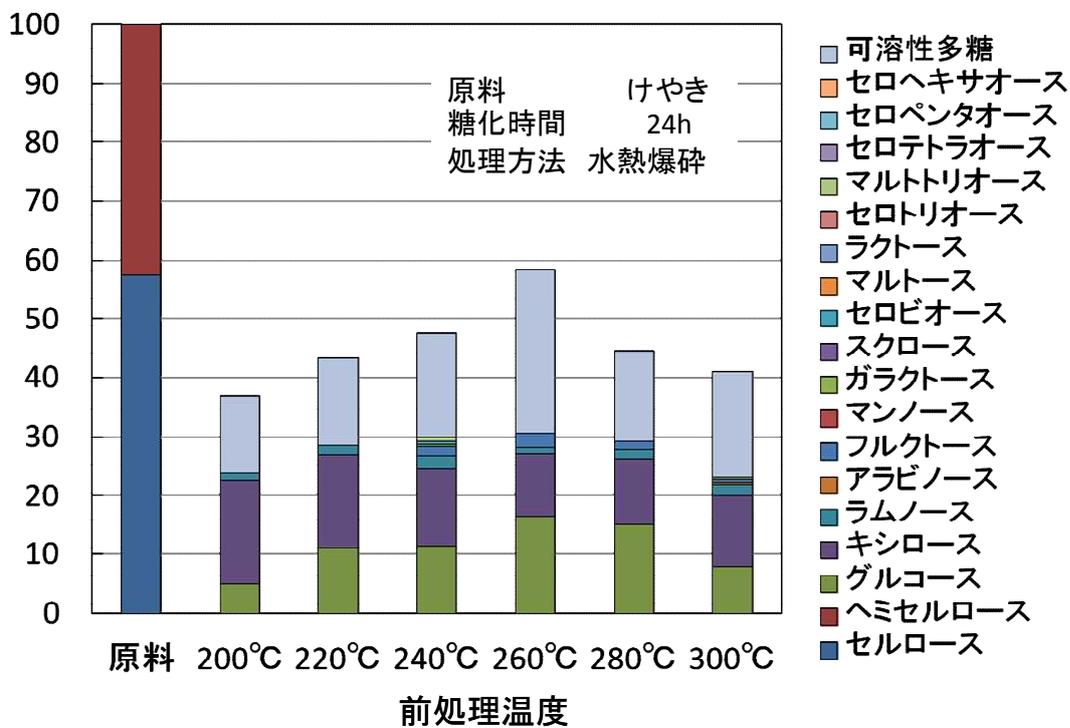


Fig. 5.5-10 ケヤキの水熱爆砕前処理物の酵素糖化率（糖化時間：24 h）

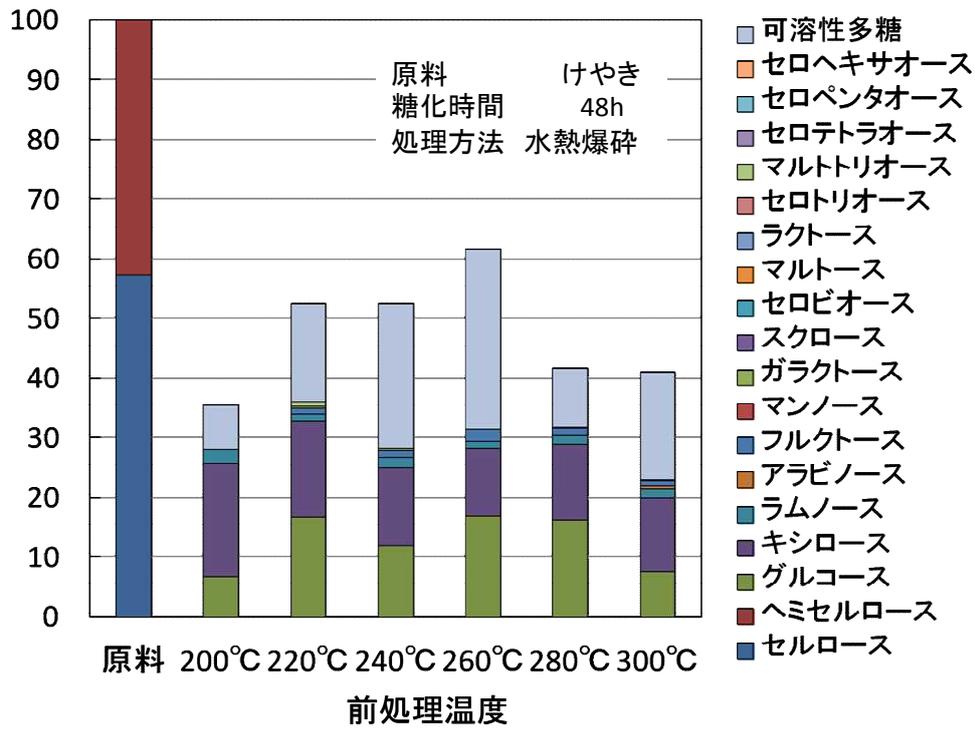


Fig. 5.5-11 ケヤキの水熱爆砕前処理物の酵素糖化率（糖化時間：48h）

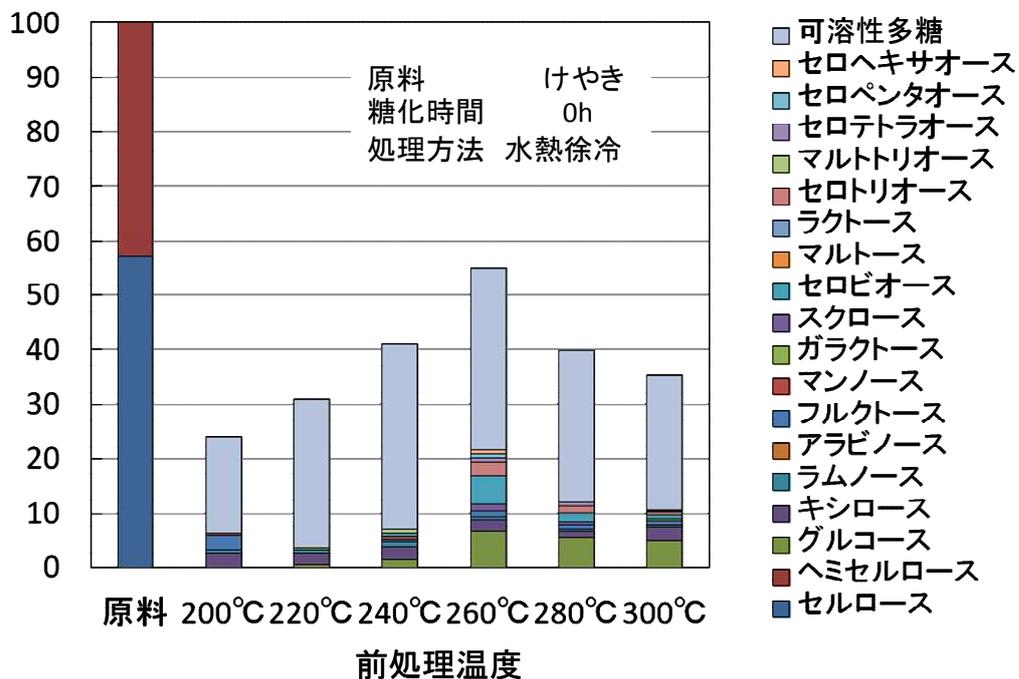


Fig. 5.5-12 ケヤキの水熱徐冷前処理物の糖化率（糖化時間：0 h）

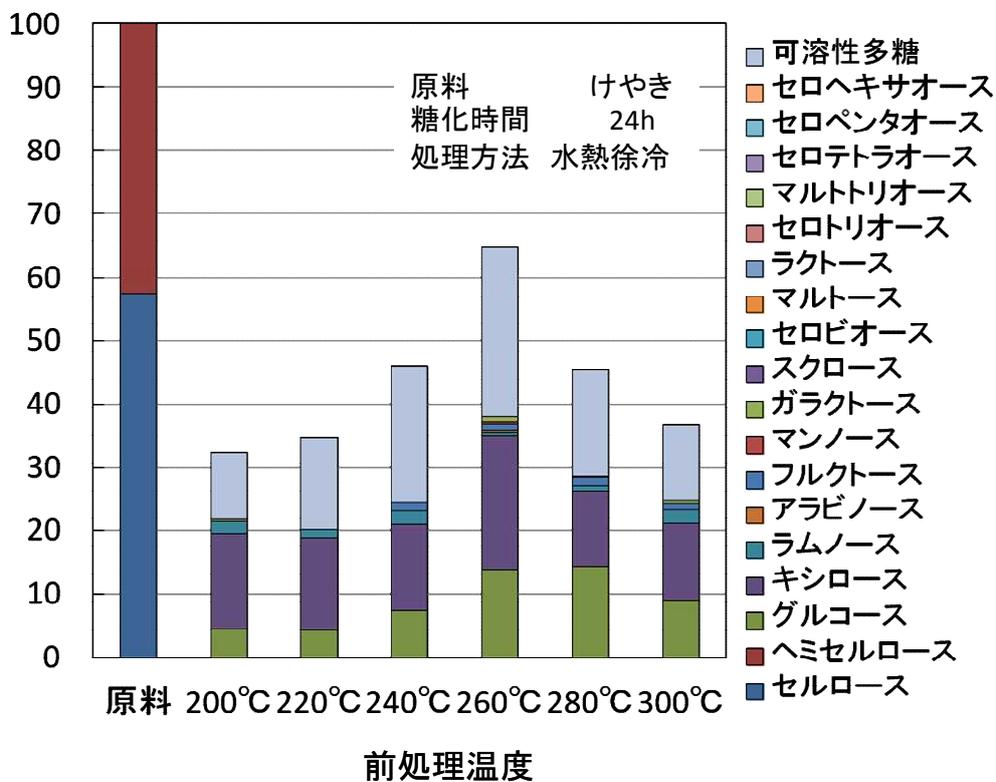


Fig. 5.5-13 ケヤキの水熱徐冷前処理物の酵素糖化率（糖化時間：24 h）

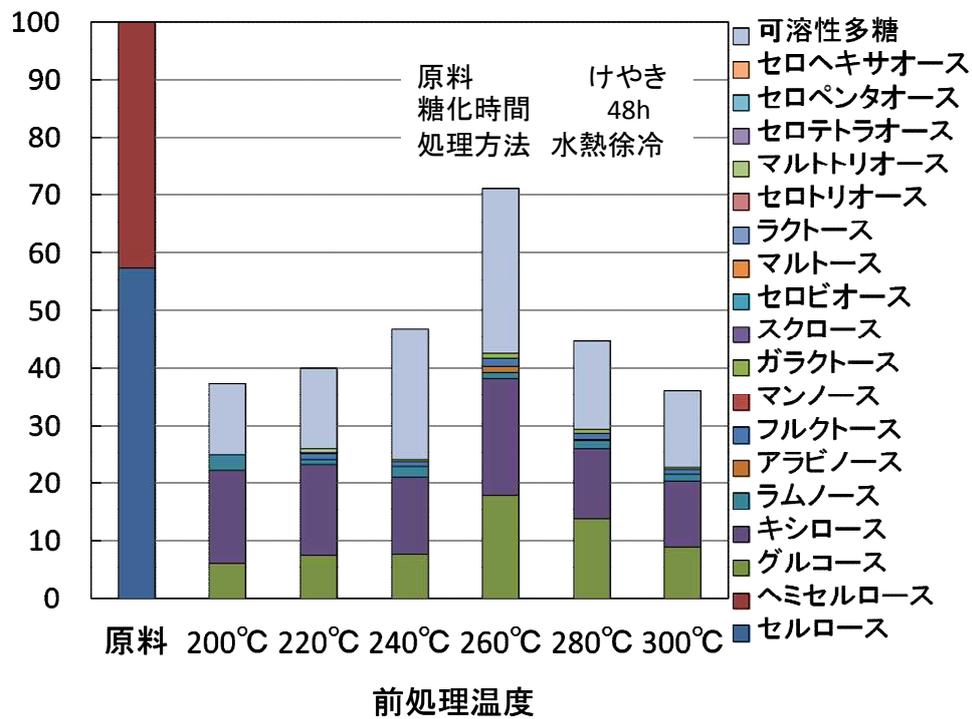


Fig. 5.5-14 ケヤキの水熱徐冷前処理物の酵素糖化率（糖化時間：48h）

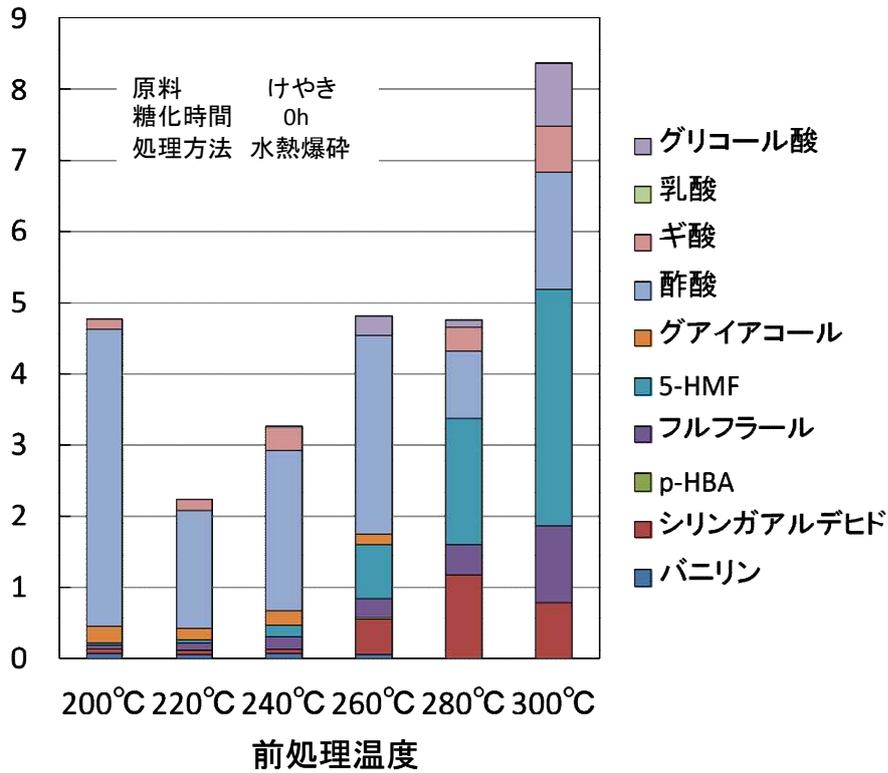


Fig. 5.5-15 ケヤキの水熱爆砕前処理物中の発酵阻害物収率 (糖化：0 h)

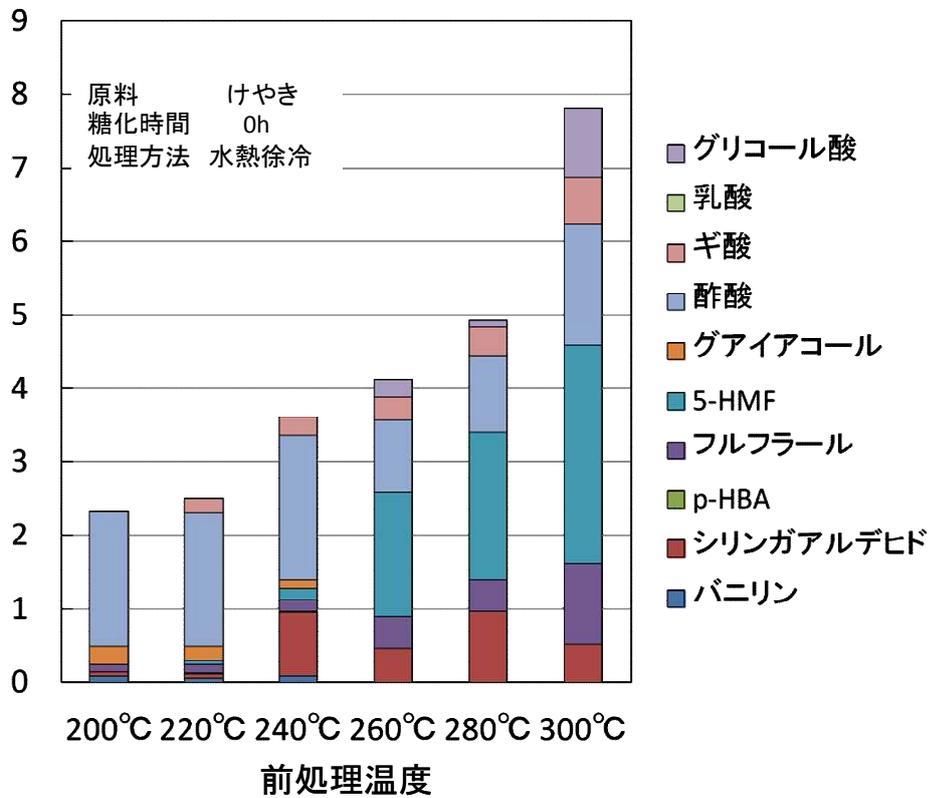


Fig. 5.5-16 ケヤキの水熱徐冷前処理物中の発酵阻害物収率 (糖化：0 h)

## 6章 水熱処理における添加剤の効果

水熱処理時に二酸化炭素や過酸化水素を添加することにより、糖化率の向上と発酵阻害物質の生成抑制の可能性を検討した。

### 6. 1 実験装置と方法

#### 1) 実験装置

Fig. 6.1-1 に実験装置プロセスフロー, Fig. 6.1-2 に反応管の仕様を示す。また, Fig. 6.1-3, Fig. 6.1-4 に実験装置全体図 (前部), (後部), Fig. 6.1-5 にシリンジポンプ, Fig. 6.1-6 に蒸留水加熱炉, Fig. 6.1-7 にコイル型供給管の接続部, Fig. 6.1-8 に反応管, Fig. 6.1-9 に反応炉出口, Fig. 6.1-10 に冷却槽を示す。

#### 2) 試験方法

##### a. 蒸留水との水熱反応の場合

- ①反応管に乾燥させたバイオマスを 1.00g 充填させた。
- ②蒸留水を送水ポンプにセットし, 10 g/min で送水した。
- ③管内圧力が 20 MPa になるように保圧弁で調節した。
- ④蒸留水供給管, 反応管それぞれのヒーターの電源を入れ加熱を開始した。
- ⑤4°C/min の速度で温度が上昇し, なおかつ反応炉前と反応炉表面の温度がほぼ同じ温度で安定するように蒸留水供給管, 反応管それぞれのヒーターを適宜調節した。
- ⑥反応炉後セル内の温度が実験条件の温度分布内になったら空の回収瓶をセットし, 測定を開始した。
- ⑦一定温度内に回収瓶に溜まった生成液の重量を測った。
- ⑧生成液は, 回収瓶より液を抜き取り, フィルターを通して濾過した液を, 液クロマトグラフィにかけた。
- ⑨測定が終了したらそれぞれのヒーターを停止し, すべての管の温度が 200°Cを下回った時点で管内圧力を大気圧にし, 送水ポンプを止めた。
- ⑩温度が十分に低下したら, 反応炉直後と冷却槽後のフィルターを取り外して洗浄し

た.

b. 過酸化水素添加の場合

- ①反応管に乾燥させたバイオマスを 1.00g 充填させた.
- ②35wt%過酸化水素水を蒸留水で薄めて 0.5wt%過酸化水素水を作成した.
- ③過酸化水素水を送水ポンプにセットし, 10 g/min で送水した.
- ④管内圧力が 20 MPa になるように保圧弁で調節した.
- ⑤蒸留水供給管, 反応管それぞれのヒーターの電源を入れ加熱を開始した.
- ⑥4°C/min の速度で温度が上昇し, なおかつ反応炉前と反応炉表面の温度がほぼ同じ温度で安定するように蒸留水供給管, 反応管それぞれのヒーターを適宜調節した.
- ⑦反応炉後セル内の温度が実験条件の温度分布内になったら空の回収瓶をセットし, 測定を開始した.
- ⑧一定温度内に回収瓶に溜まった生成液の重量を測った.
- ⑨生成液は, 回収瓶より液を抜き取り, フィルターを通して濾過した液を, 液クロマトグラフィにかけた.
- ⑩測定が終了したらそれぞれのヒーターを停止し, すべての管の温度が 200°Cを下回った時点で管内圧力を大気圧にし, 送水ポンプを止めた.
- ⑪温度が十分に低下したら, 反応炉直後と冷却槽後のフィルターを取り外して洗浄した.

c. 二酸化炭素添加の場合

- ①反応管に乾燥させたバイオマスを 1.00g 充填させた.
- ②蒸留水を送水ポンプにセットし, 10 g/min で送水した.
- ③管内圧力が 20 MPa になるように保圧弁で調節した.
- ④シリンジポンプのシリンジが一番下まで下がっていることを確認し, シリンジポンプ冷却器の電源を入れ, 冷却水温度を 5°Cに設定し, 冷却を開始した.
- ⑤二酸化炭素ポンベの圧力より大きくなるようにシリンジポンプ直後の背圧弁が閉

- めてあるのを確認し、ポンベの栓を開け、シリンジポンプ内に二酸化炭素を満たした。
- ⑥ポンベの栓を開けてから 30 分以上経ったら栓を閉め、シリンジポンプ制御板の電源を入れシリンジポンプを吐出させた。
- ⑦シリンジポンプを 10Hz で作動させ、圧力が 25MPa で安定するように背圧弁を調整した。このときの流量は 3.319 g/min (セロビオース水熱改質試験と同様) である。
- ⑧蒸留水供給管、反応管それぞれのヒーターの電源を入れ加熱を開始した。
- ⑨4°C/min の速度で温度が上昇し、なおかつ反応炉前と反応炉表面の温度がほぼ同じ温度で安定するように蒸留水供給管、反応管それぞれのヒーターを適宜調節した。
- ⑩反応炉後セル内の温度が実験条件の温度分布内になったら空の回収瓶をセットし、測定を開始した。
- ⑪一定温度内に回収瓶に溜まった生成液の重量を測った。
- ⑫生成液は、回収瓶より液を抜き取り、フィルターを通して濾過した液を、液クロマトグラフィにかけた。
- ⑬測定が終了したらそれぞれのヒーターを停止し、すべての管の温度が 200°Cを下回った時点で管内圧力を大気圧にし、送水ポンプを止めた。
- ⑭温度が十分に低下したら、反応炉直後と冷却槽後のフィルターを取り外して洗浄した。

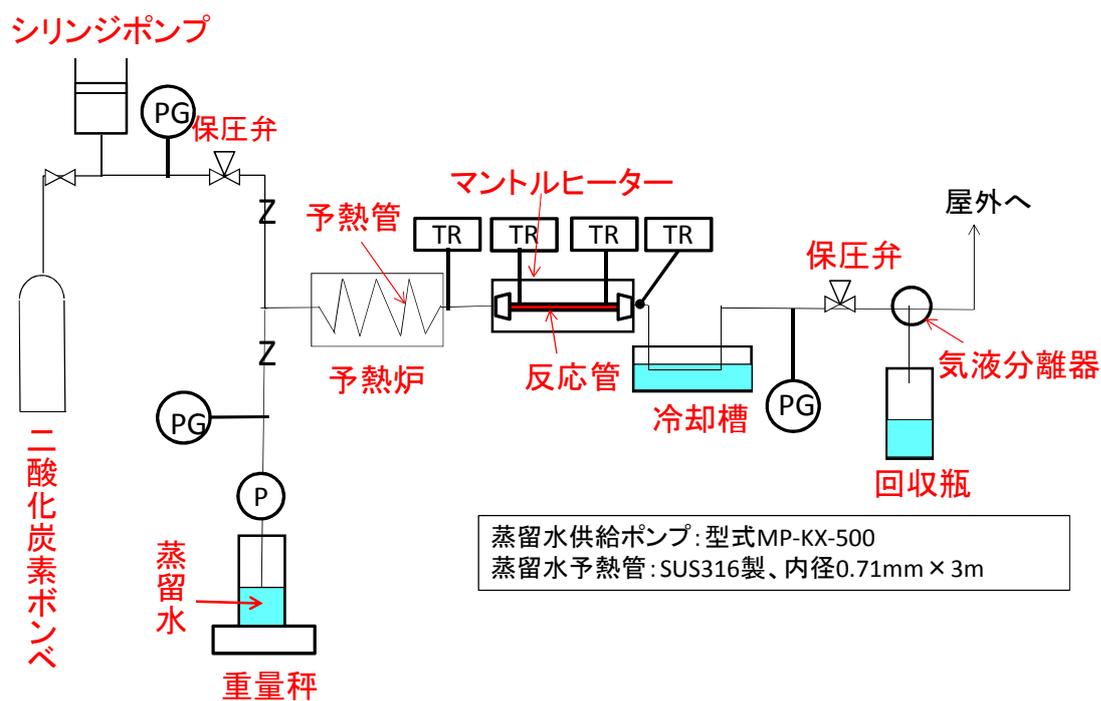


Fig. 6.1-1 実験装置プロセスフロー

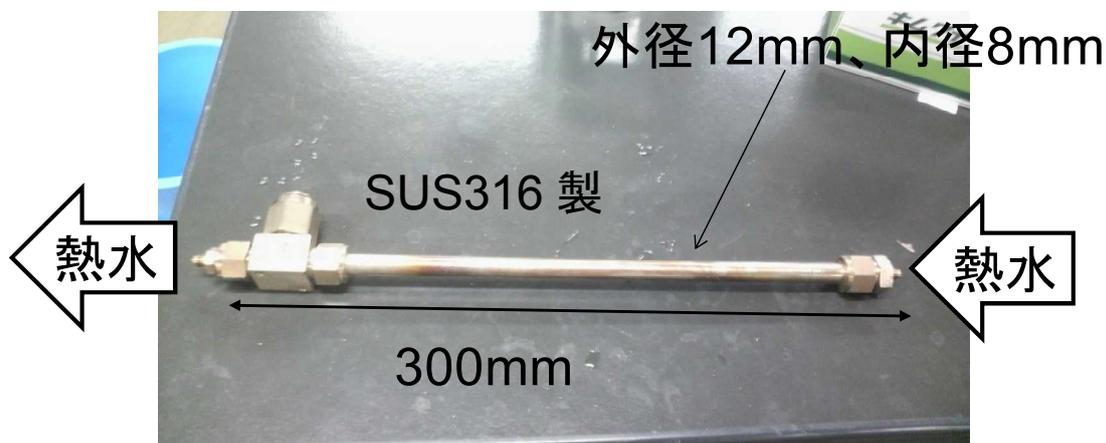


Fig. 6.1-2 反応管の仕様

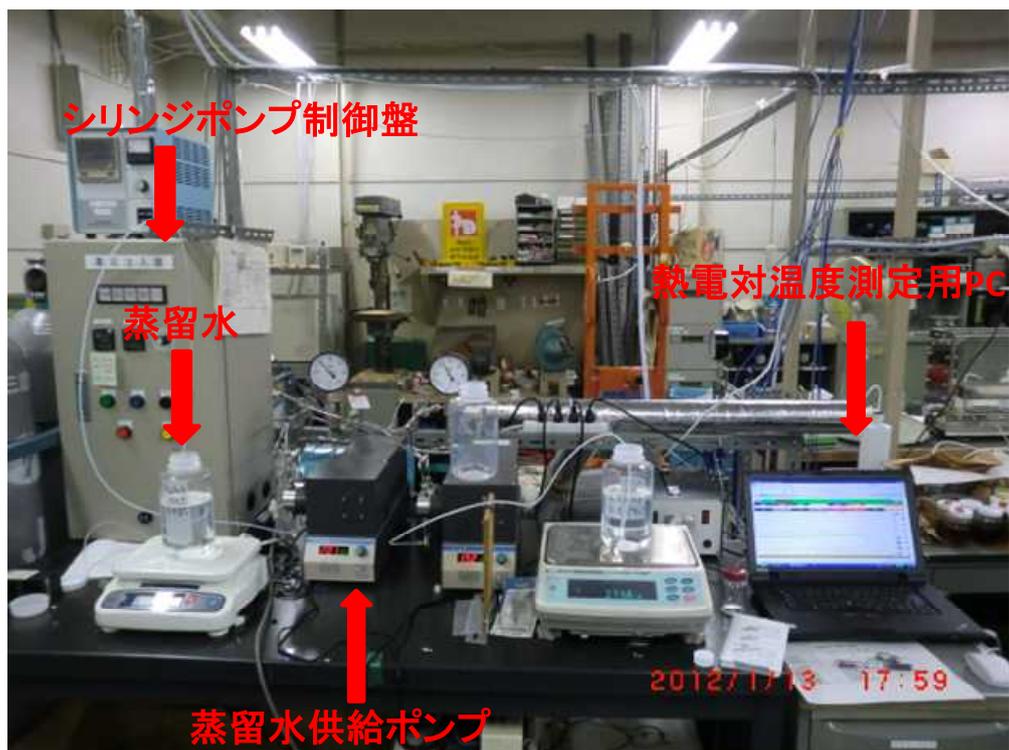


Fig. 6.1-3 実験装置全体図 (前部)

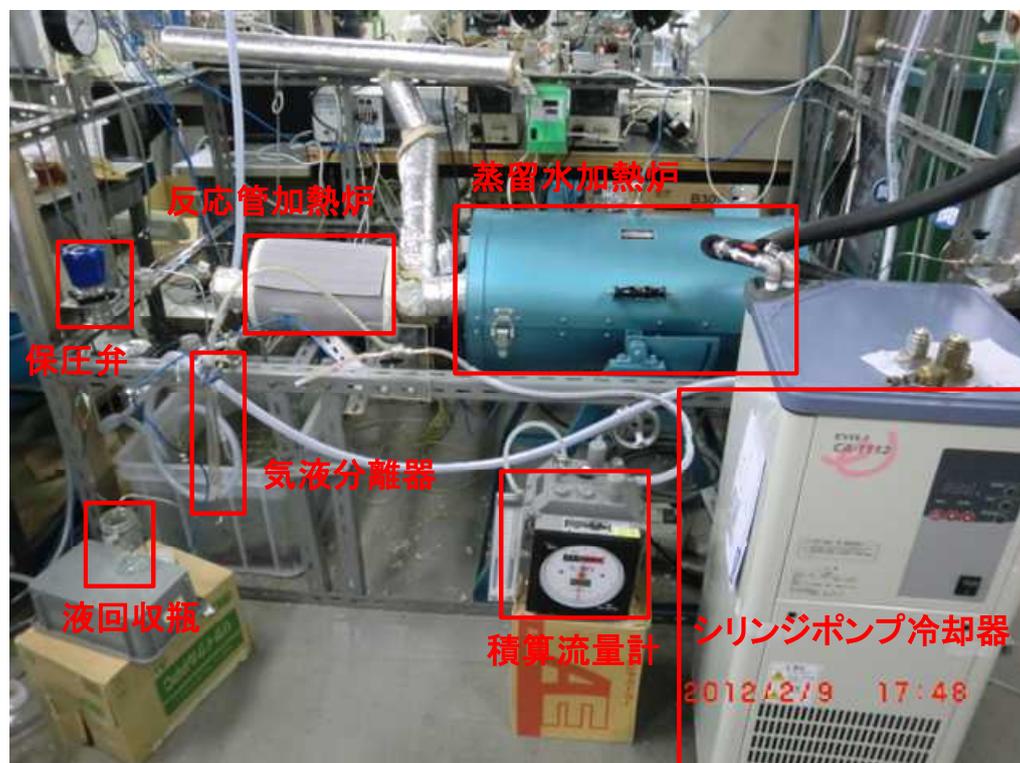


Fig. 6.1-4 実験装置全体図 (後部)

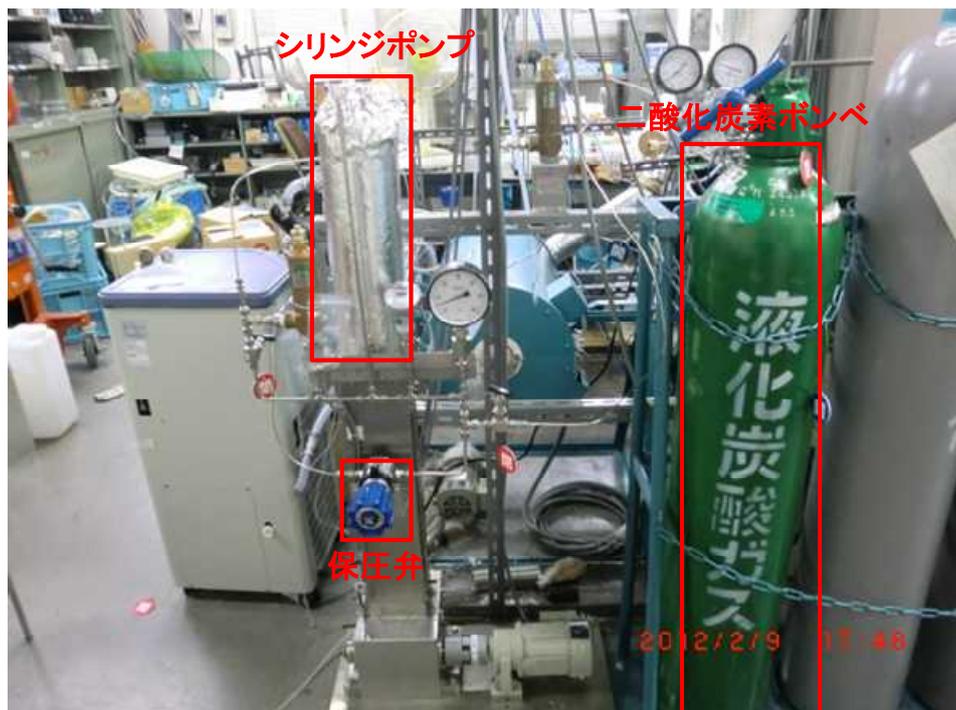


Fig.6.1-5 シリンジポンプ



Fig. 6.1-6 蒸留水加熱炉

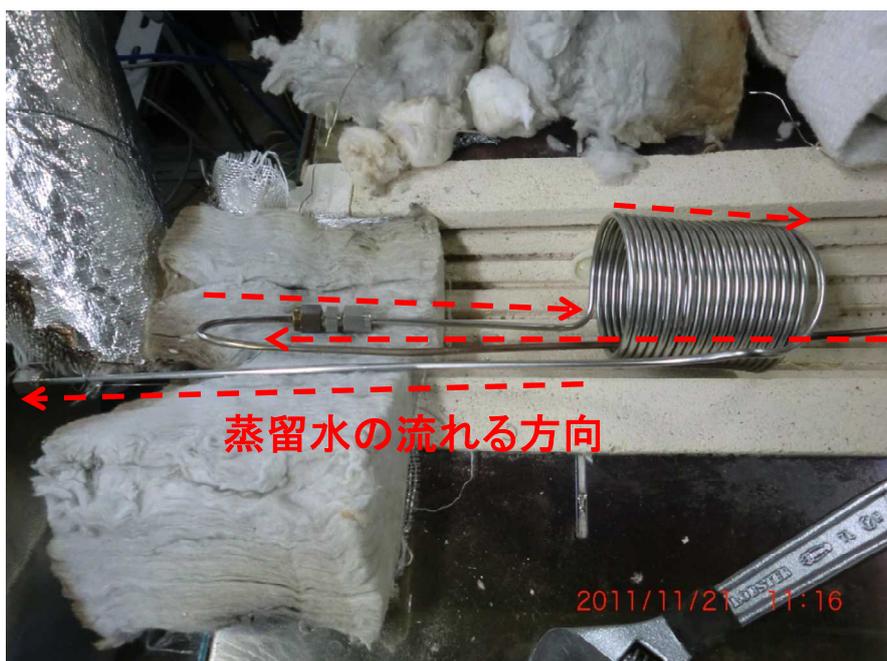


Fig.6.1-7 コイル型供給管の接続部

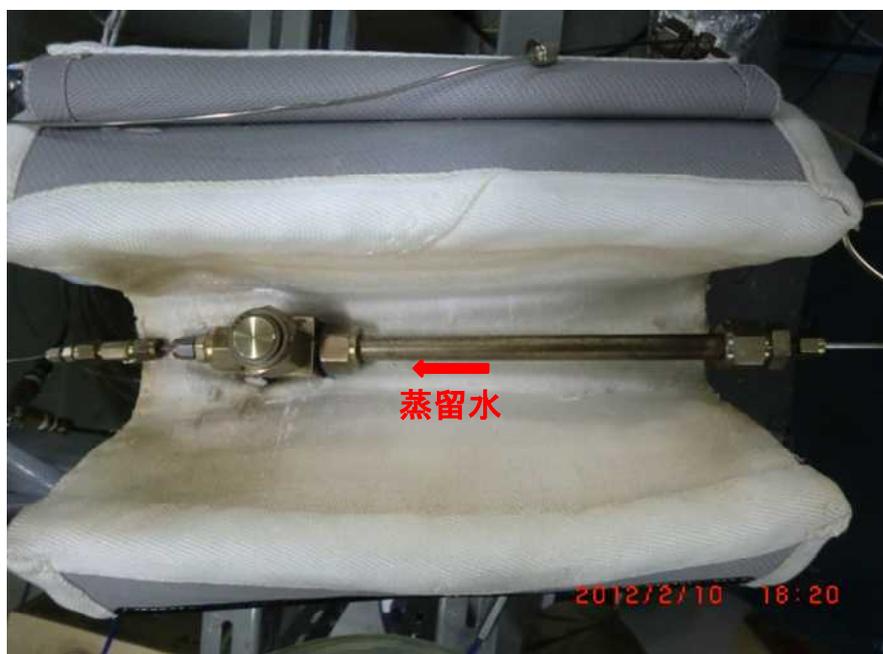


Fig. 6.1-8 反応管



Fig. 6.1-9 反应炉出口

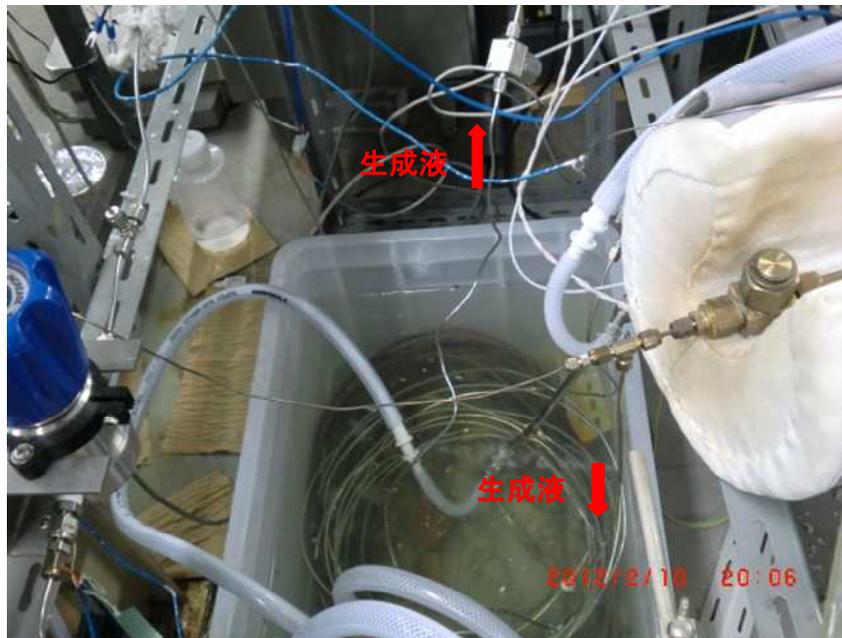


Fig. 6.1-10 冷却槽

## 6. 2 実験結果と考察

### 6. 2. 1 杉の場合

#### 1) 生成糖分析

水熱のみ、水熱+過酸化水素及び水熱+二酸化炭素の各条件において、各温度域での流出サンプル写真、生成糖収率および生成糖収率積算値を Fig. 6. 2. 1-1 から Fig. 6. 2. 1-9 に、原料のスギ形状外観を Fig. 6. 2. 1-10, 実験後の反応管内残留物を Fig. 6. 2. 1-11 に示す。

#### 2) 発酵阻害物質分析

水熱のみ、水熱+過酸化水素及び水熱+二酸化炭素の各条件において、各温度域での流出液中の発酵阻害物質収率及び発酵阻害物質収率積算値を Fig. 6. 2-1-12 から Fig. 6. 2-1-17 に示す。

Fig. 6. 2. 1-18 に流出液積算液の糖収率及び発酵阻害物質収率と添加剤との関係を示す。

#### 3) 考察

水熱のみの場合は、約 200℃から 240℃でキシロースが流出し、約 220℃から 280℃でグルコースが流出し、260℃近傍でグルコースは最大である。一方、発酵阻害物質は高温ほど増加している。これらのことは前章までに述べた前処理操作方法とその結果の妥当性を裏付けている。

水熱+過酸化水素の場合、キシロースは約 160℃から 200℃で流出し、グルコースは 200℃から 240℃で大量に流出した。一方、発酵阻害物質は過酸化水素添加により約 1/6 に減少した。これらの結果から、過酸化水素添加により、発酵阻害物質の生成抑制と糖への分解促進効果が確認された。

水熱+二酸化炭素は過酸化水素ほどの効果はなかった。

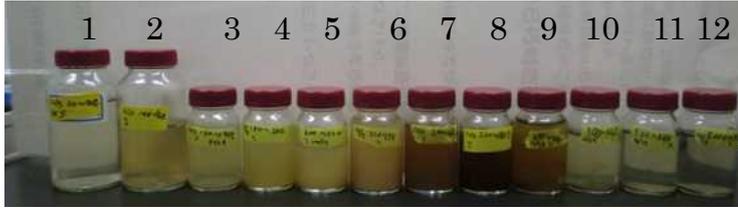


Fig. 6.2.1-1 スギの水熱試験サンプル（添加なし）

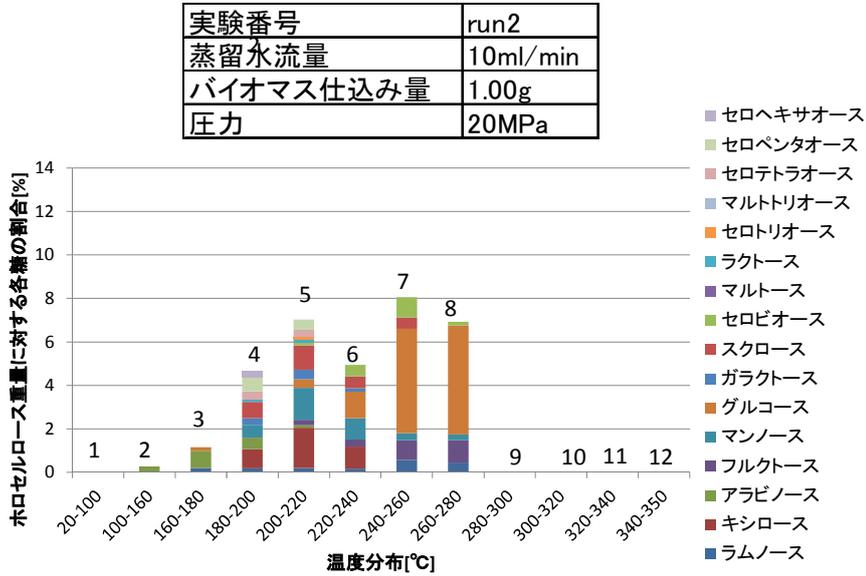


Fig. 6.2.1-2 スギの水熱試験糖分析結果（添加なし）

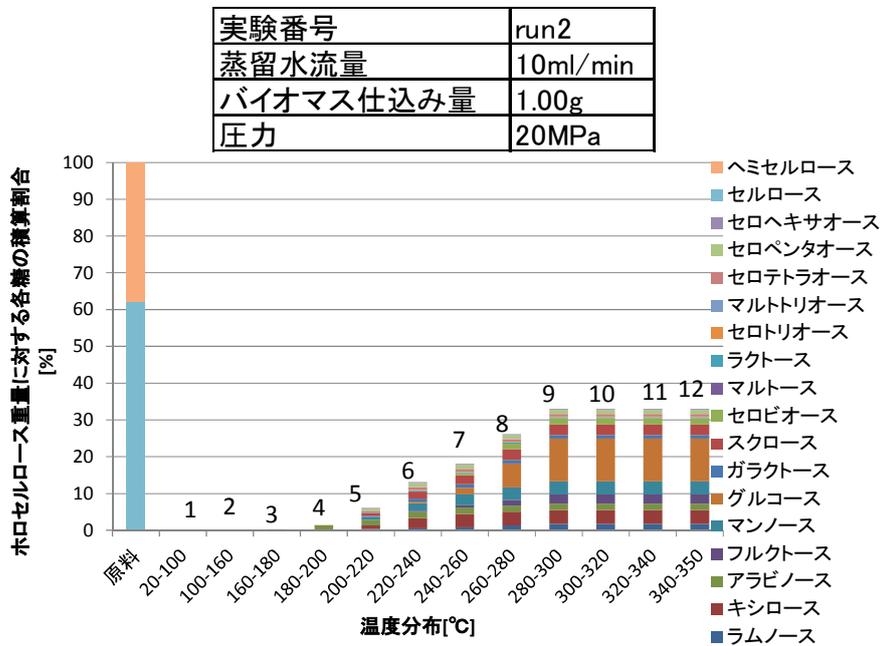


Fig. 6.2.1-3 スギの水熱試験糖分析結果積算値（添加なし）



Fig. 6.2.1-4 スギの水熱試験サンプル (0.5wt%過酸化水素添加)

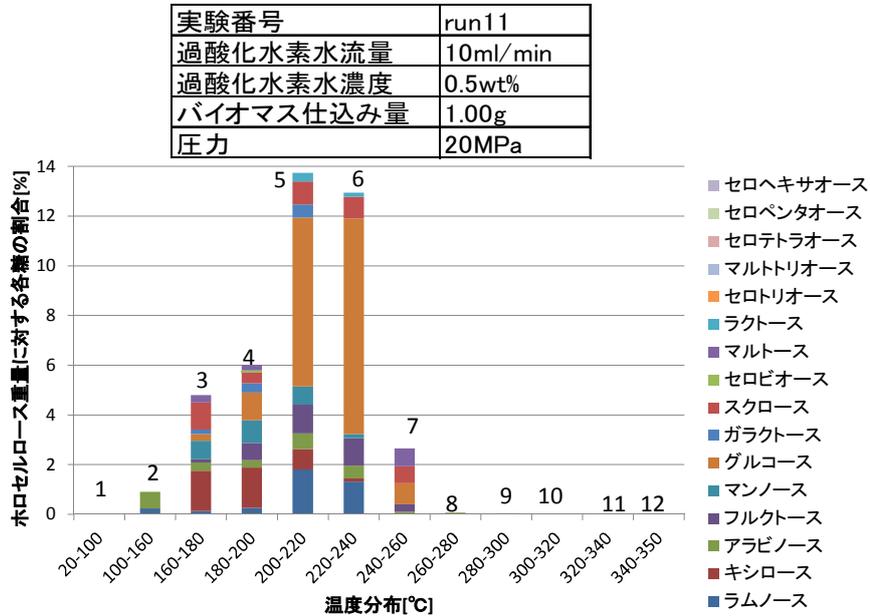


Fig. 6.2.1-5 スギの水熱試験糖分析結果 (0.5wt%過酸化水素添加)

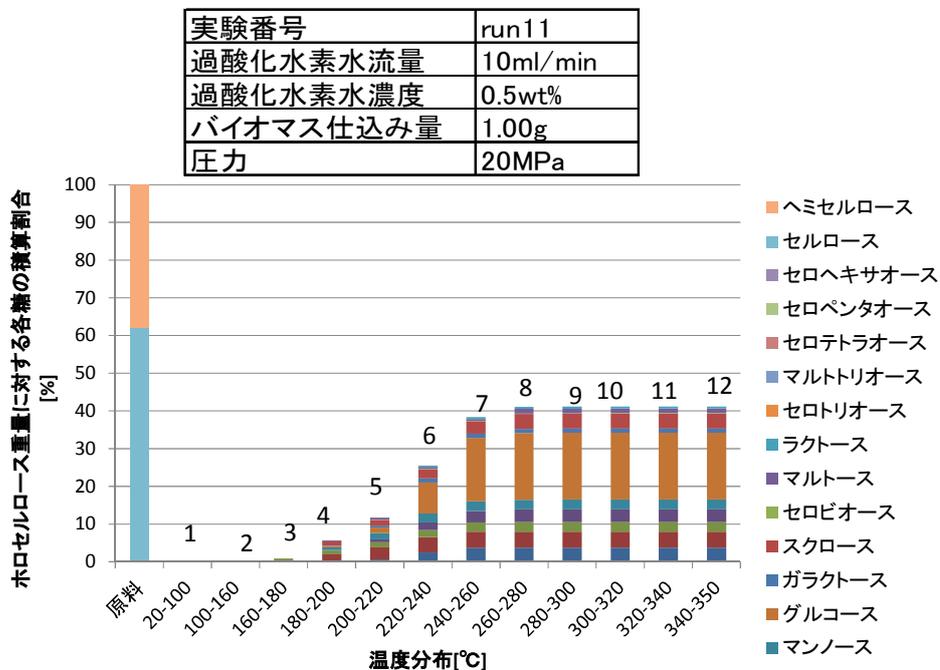


Fig. 6.2.1-6 スギの水熱試験糖分析結果積算値 (0.5wt%過酸化水素添加)

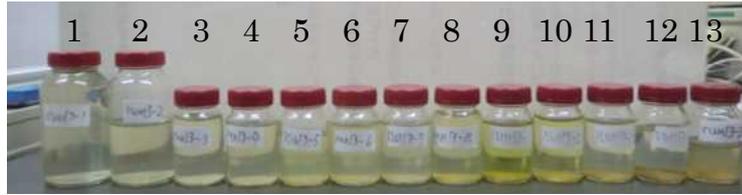


Fig. 6.2.1-7 スギの水熱試験実験サンプル（二酸化炭素添加）

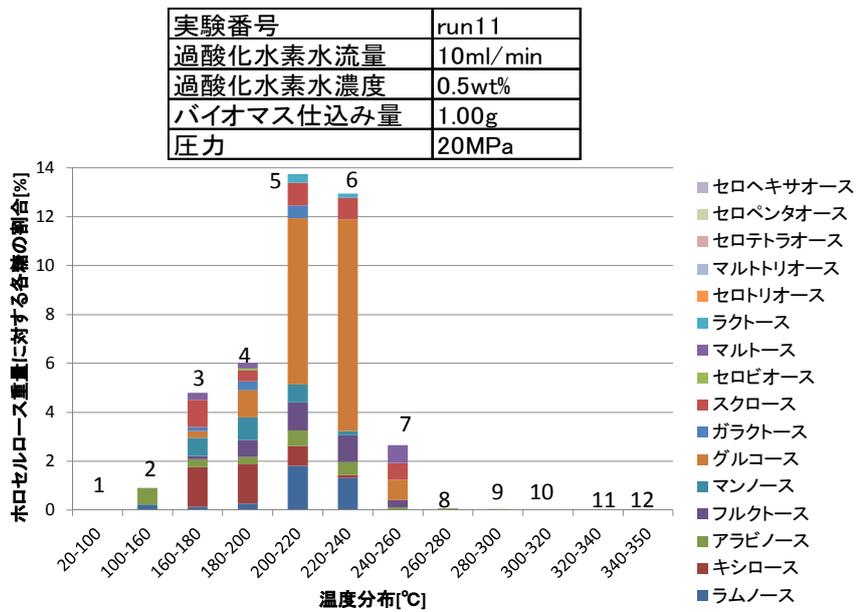


Fig. 6.2.1-8 スギの水熱試験糖分析結果（二酸化炭素添加）

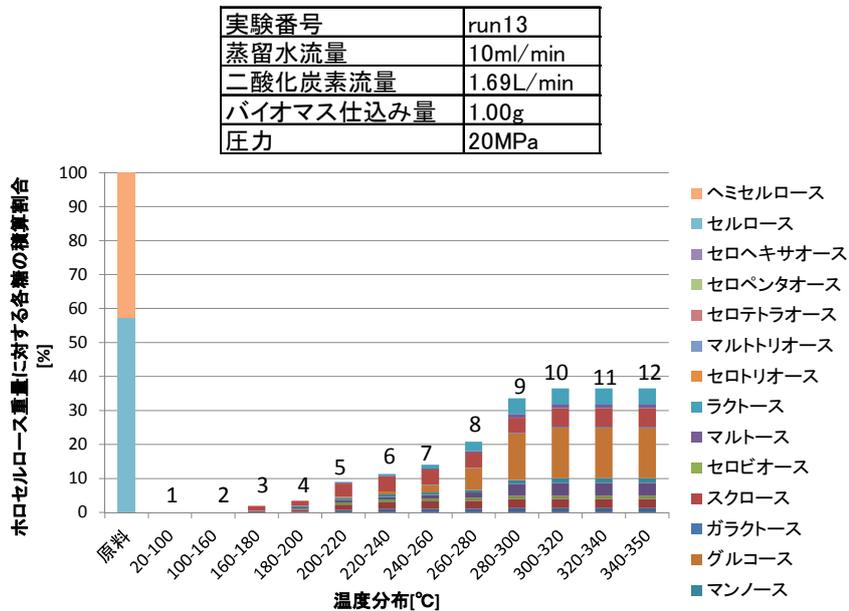


Fig. 6.2.1-9 スギの水熱試験糖分析結果積算（二酸化炭素添加）



Fig. 6.2.1-10 原料スギの外観



Fig. 6.2.1-11 スギの水熱試験（添加なし）（左）とスギの水熱試験（二酸化炭素添加）（右）の反応管内残留物

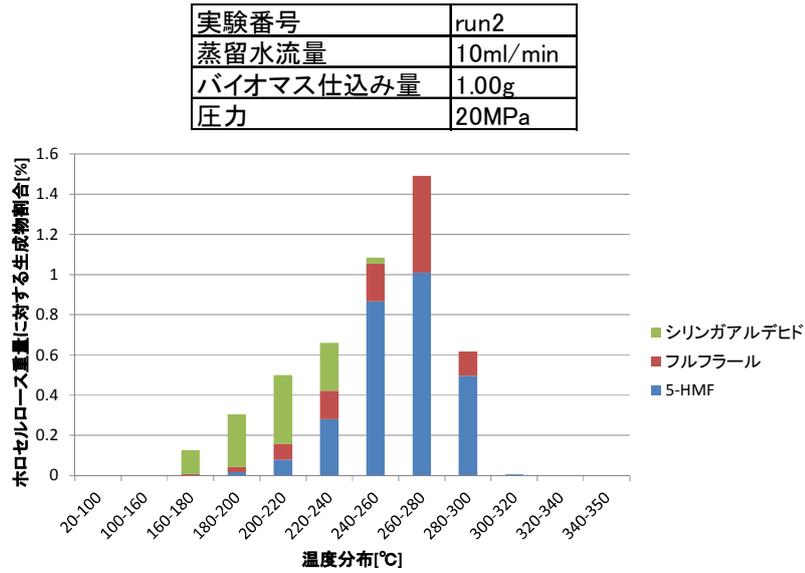


Fig. 6.2.1-12 スギの水熱試験発酵阻害物質分析結果（添加なし）

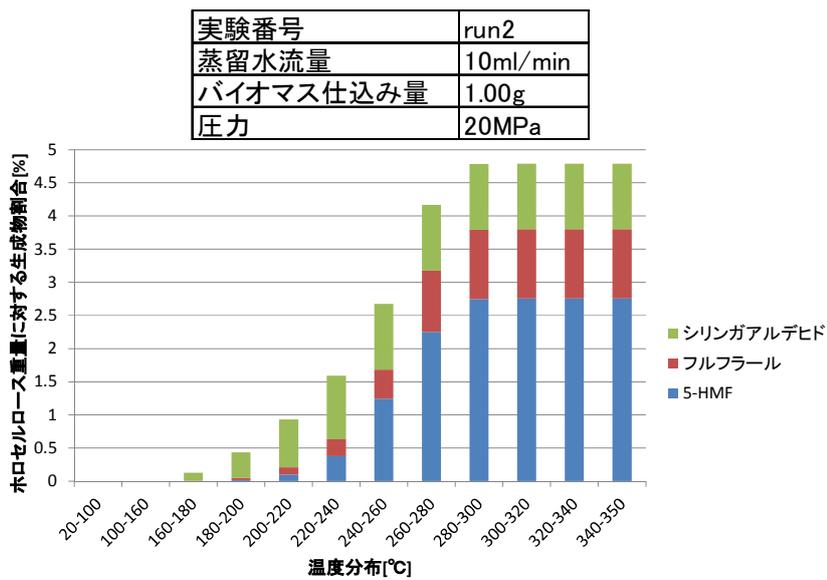


Fig. 6.2.1-13 スギの水熱試験発酵阻害物質分析結果積算値（添加なし）

実験番号	run11
蒸留水流量	10ml/min
バイオマス仕込み量	1.00g
圧力	20MPa

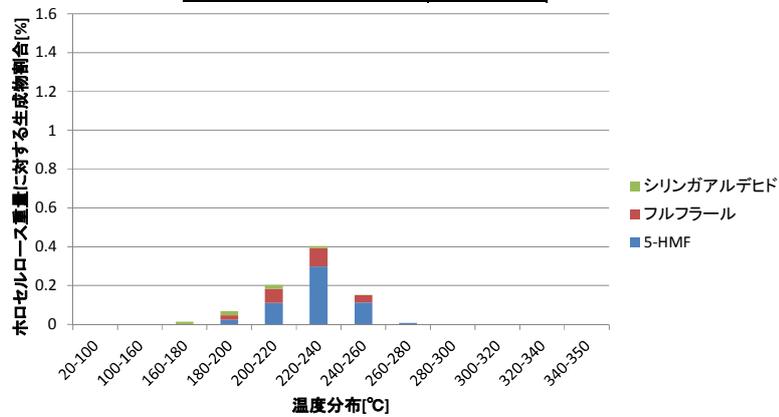


Fig. 6.2.1-14 スギの水熱試験発酵阻害物質分析結果  
(0.5wt%過酸化水素水添加)

実験番号	run11
蒸留水流量	10ml/min
バイオマス仕込み量	1.00g
圧力	20MPa

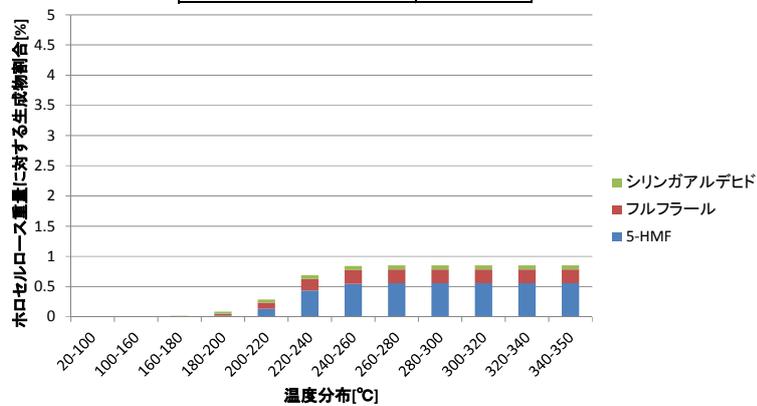


Fig. 6.2.1-15 スギの水熱試験発酵阻害物質分析結果積算値  
(0.5wt%過酸化水素水添加)

実験番号	run13
蒸留水流量	10ml/min
二酸化炭素流量	1.73L/min
バイオマス仕込み量	1.00g
圧力	20MPa

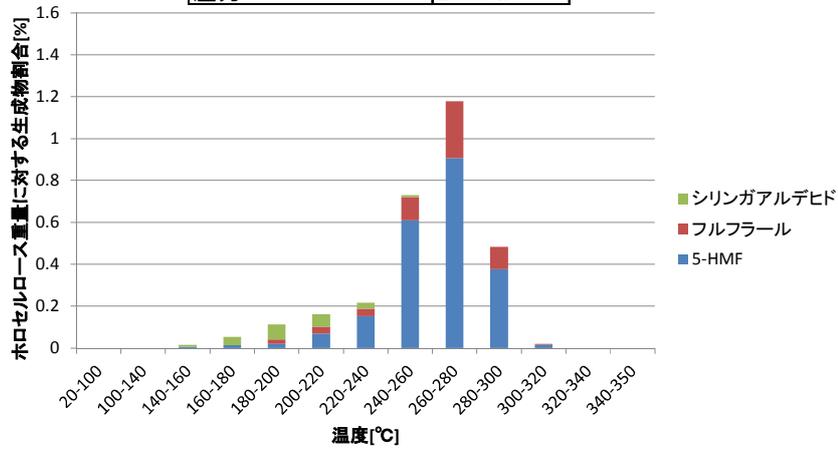


Fig. 6.2.1-16 スギの水熱試験発酵阻害物質分析結果 (二酸化炭素添加)

実験番号	run13
蒸留水流量	10ml/min
二酸化炭素流量	1.73L/min
バイオマス仕込み量	1.00g
圧力	20MPa

スギ+CO2

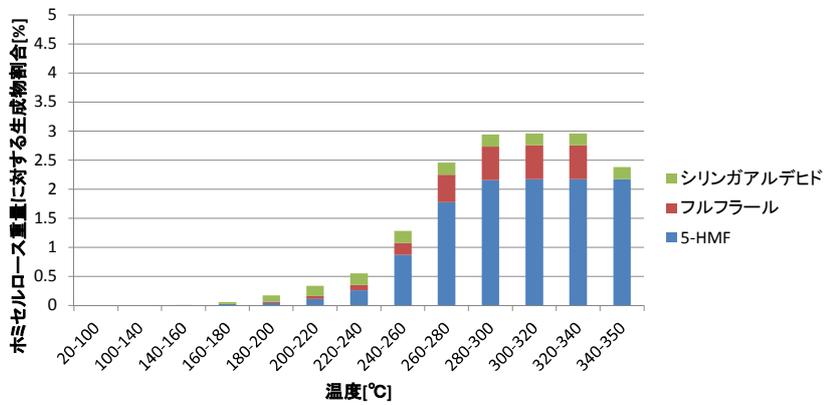


Fig. 6.2.1-17 スギの水熱試験発酵阻害物質分析結果積算値 (二酸化炭素添加)

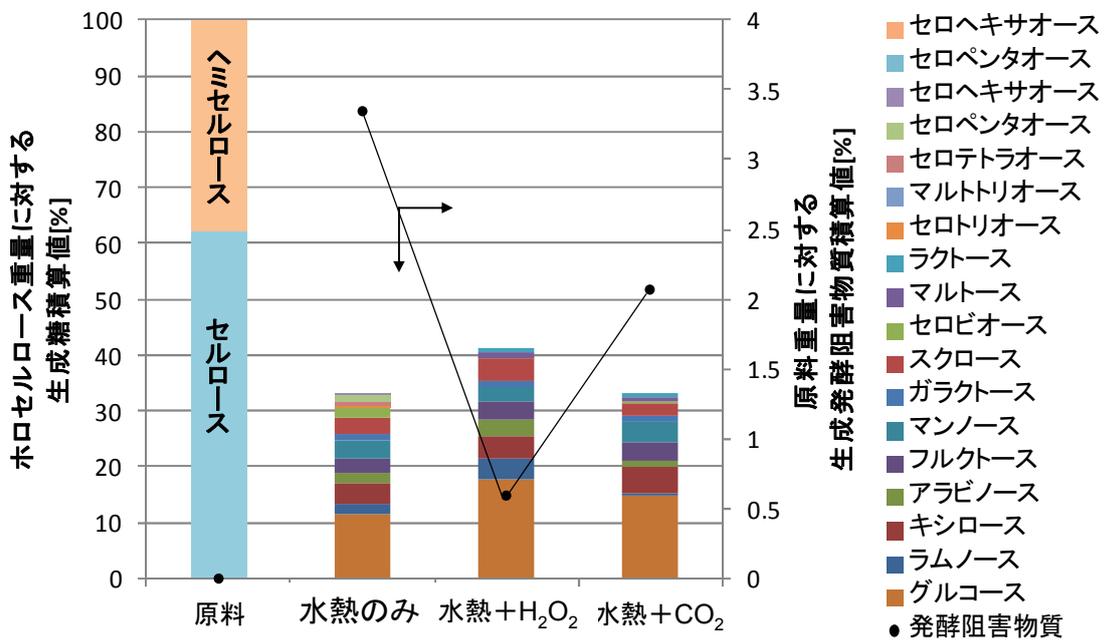


Fig. 6. 2. 1-18 杉の水熱処理流出液積算物の組成と収率に及ぼす添加剤の効果

## 6. 2. 2 ケヤキの場合

### 1) 生成糖分析

水熱のみ、水熱+過酸化水素及び水熱+二酸化炭素の各条件において、各温度域での流出液のサンプル写真、生成糖収率、生成糖収率積算値を Fig. 6.2.2-1 から Fig. 6.2.2-2 に、原料のケヤキを Fig. 6.2.2-10, 実験後の残留物を Fig. 6.2.2-11 に示す。残留物を Fig. 6.2.2-11 に示す。

### 2) 発酵阻害物質分析

水熱のみ、水熱+過酸化水素及び水熱+二酸化炭素の各条件において、各温度域での流出液の発酵阻害物質収率、発酵阻害物質収率積算値を Fig. 6.2.2-12 から Fig. 6.2.2-17 に示す

### 3) 考察

水熱のみの場合は、約 180℃から 220℃でスクロース等が流出し、約 220℃から 280℃でグルコースが流出し、260℃近傍でグルコースは最大である。一方、発酵阻害物質は高温ほど増加している。これらのことは前章までに述べた前処理操作方法とその結果の妥当性を裏付けている。

水熱+過酸化水素の場合、スクロース等が約 160℃から 200℃で大量流出し、グルコースは 200℃から 260℃で大量に流出した。一方、発酵阻害物質は過酸化水素添加により約 1/8 に減少した。これらの結果から、過酸化水素添加により、発酵阻害物質の生成抑制と糖への分解促進効果が確認された。

水熱+二酸化炭素は過酸化水素ほどの効果はなかった。

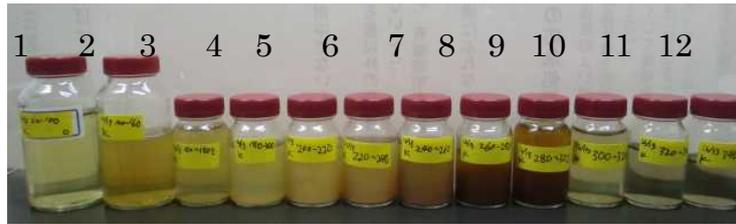


Fig. 6.2.2-1 ケヤキの水熱試験実験サンプル（添加なし）

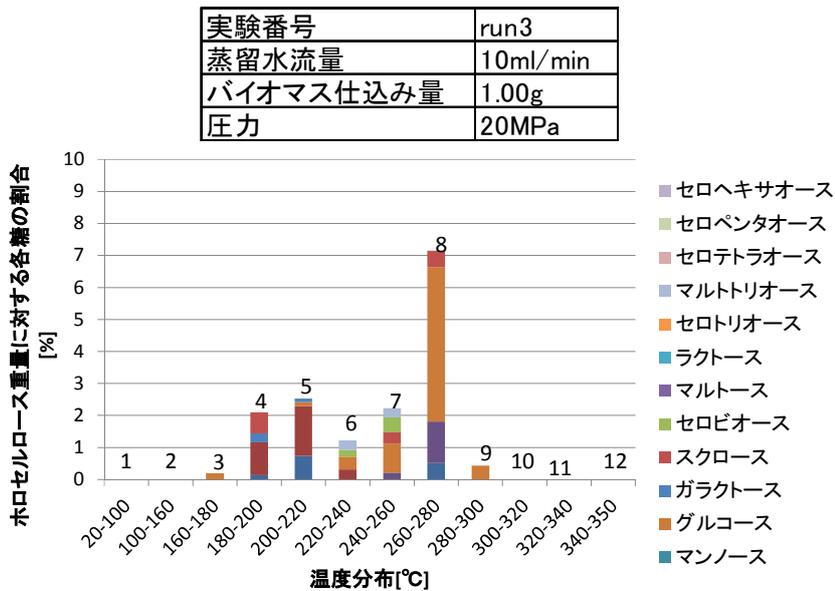


Fig. 6.2.2-2 ケヤキの水熱試験糖分析結果（添加なし）

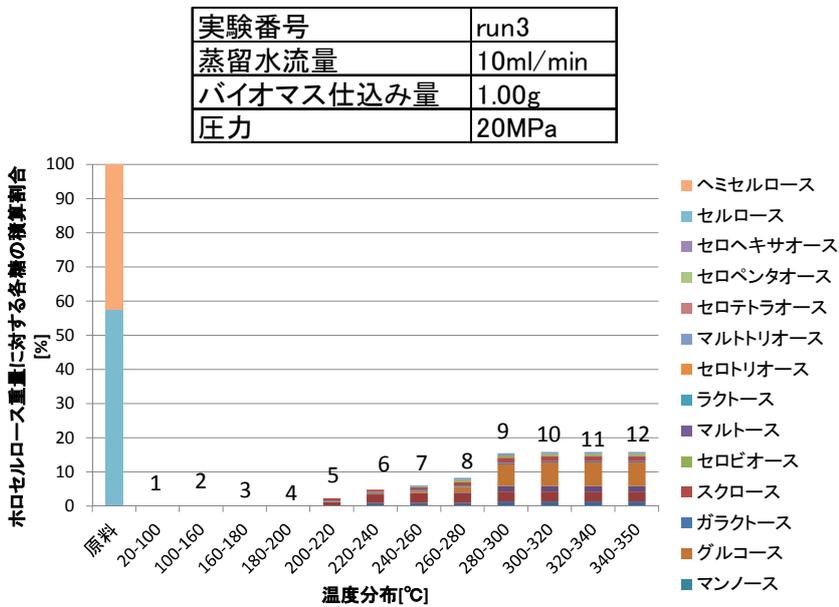


Fig. 6.2.2-3 ケヤキの水熱試験糖分析結果積算値（添加なし）

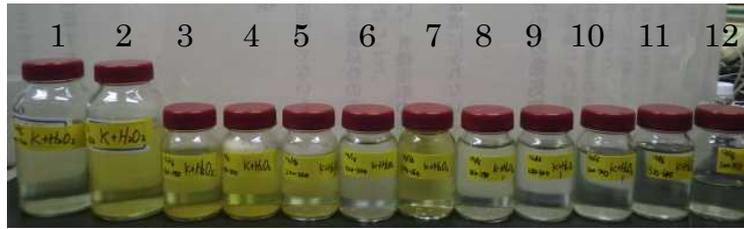


Fig. 6.2.2-4 ケヤキの水熱試験実験サンプル (0.5wt%過酸化水素水添加)

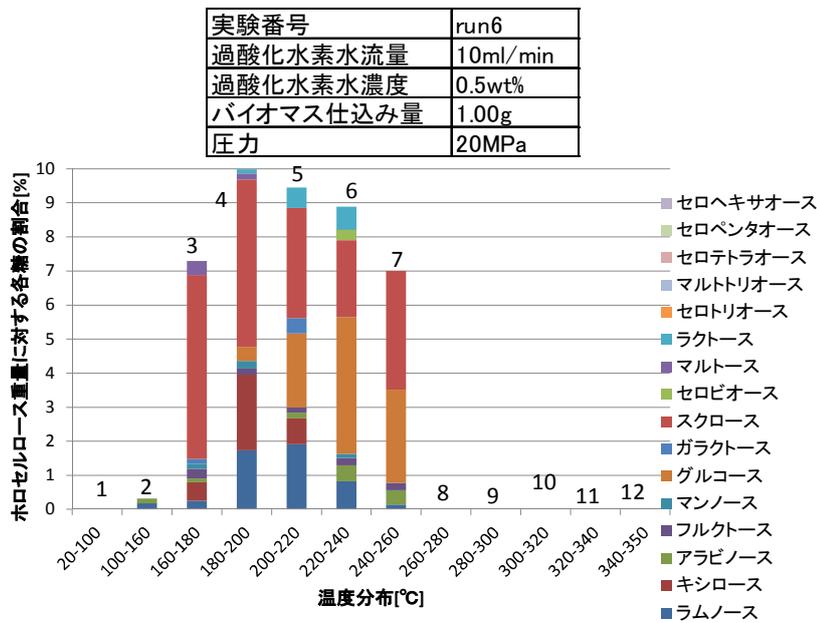


Fig. 6.2.2-5 ケヤキの水熱試験糖分析結果 (0.5wt%過酸化水素水添加)

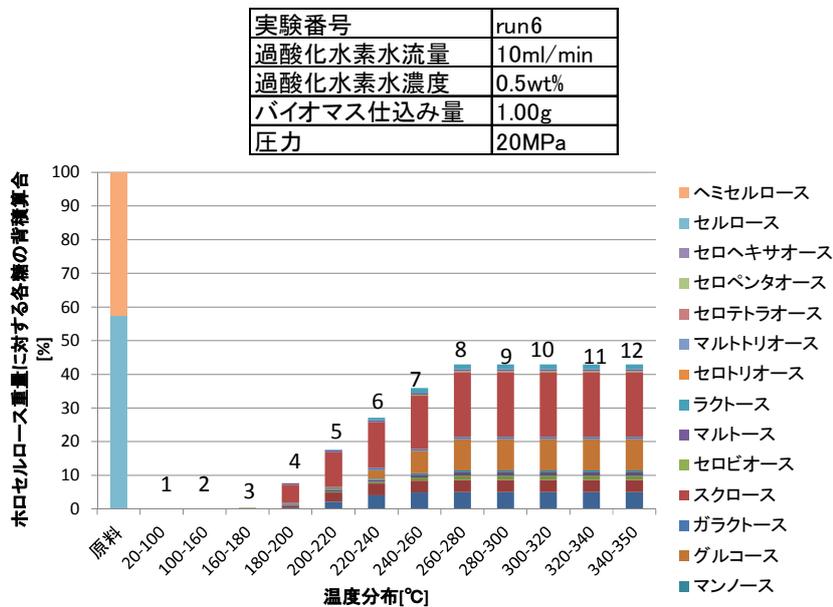


Fig. 6.2.2-6 ケヤキの水熱試験糖分析結果積算値 (0.5wt%過酸化水素水添加)

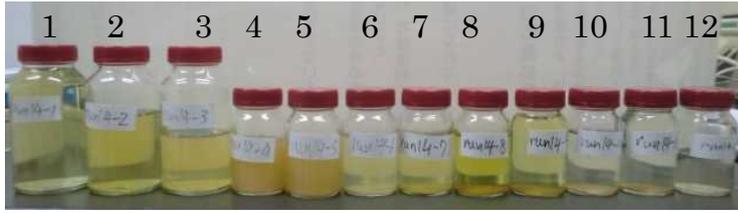


Fig. 6.2.2-7 ケヤキの水熱試験実験サンプル（二酸化炭素添加）

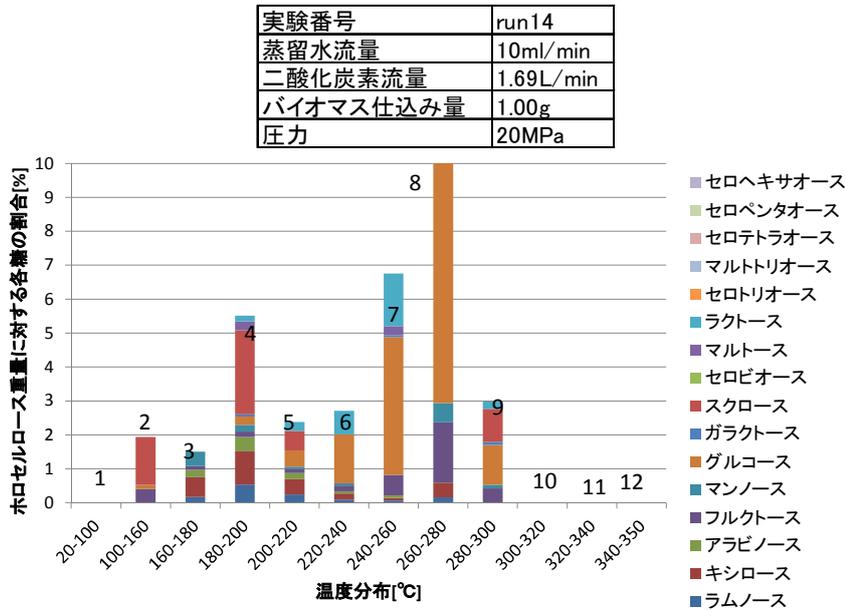


Fig. 6.2.2-8 ケヤキの水熱試験糖分析結果（二酸化炭素添加）

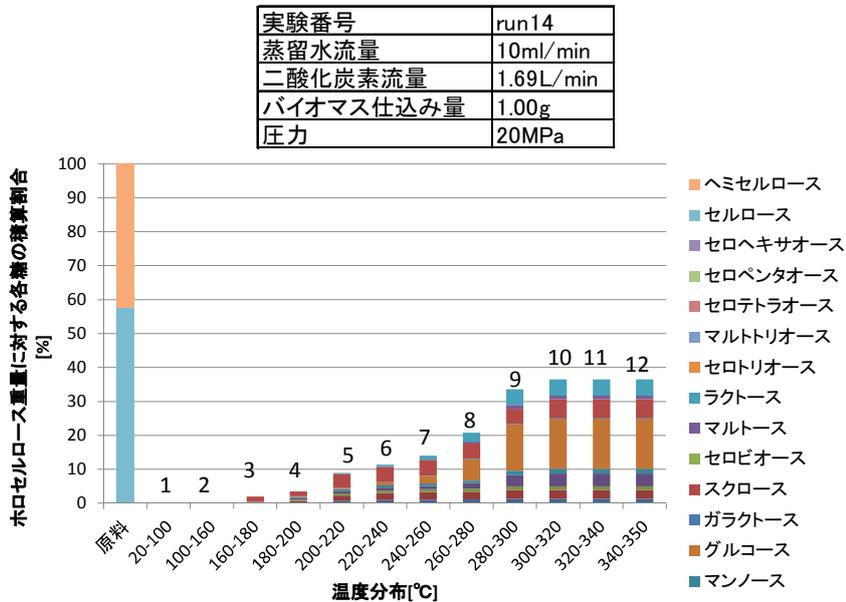


Fig. 6.2.2-9 ケヤキの水熱試験糖分析結果積算値（二酸化炭素添加）



Fig. 6.2.2-10 原料となるケヤキ



Fig. 6.2.2-11 ケヤキの水熱試験（添加なし）（左）とケヤキの水熱試験（二酸化炭素添加）（右）の残留物

実験番号	run3
蒸留水流量	10ml/min
バイオマス仕込み量	1.00g
圧力	20MPa

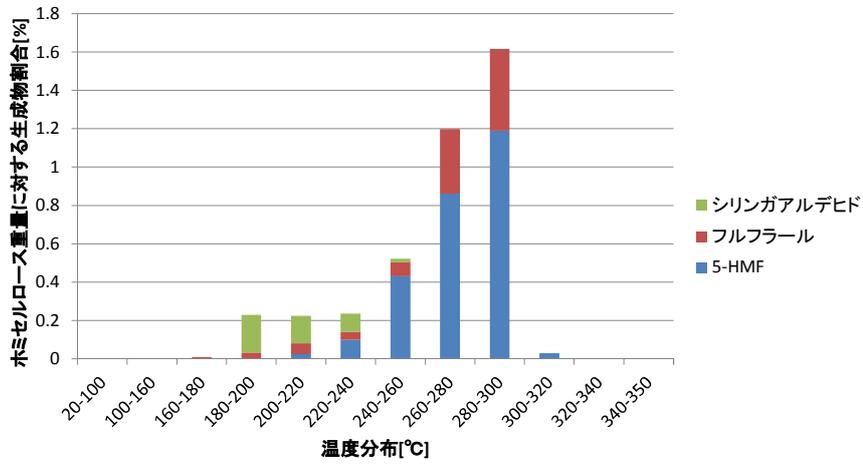


Fig. 6.2.2-12 ケヤキの水熱試験発酵阻害物質分析結果（添加なし）

実験番号	run3
蒸留水流量	10ml/min
バイオマス仕込み量	1.00g
圧力	20MPa

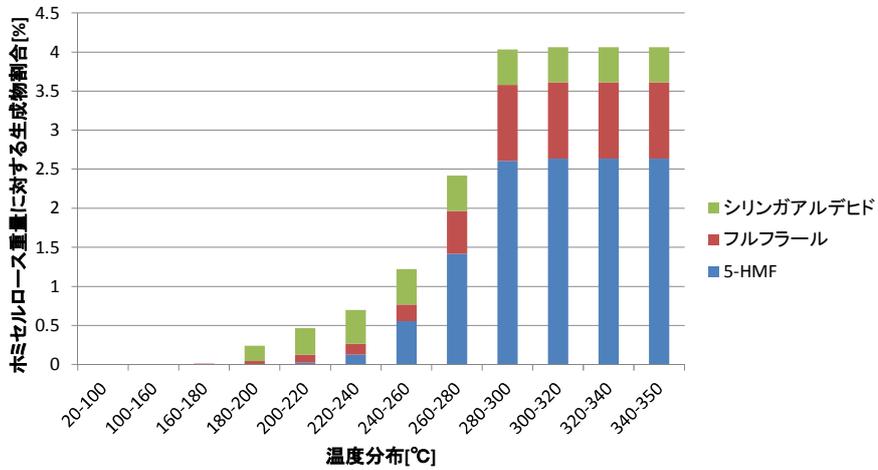


Fig. 6.2.2-13 ケヤキの水熱試験発酵阻害物質分析結果積算値（添加なし）

実験番号	run6
過酸化水素水流量	10ml/min
過酸化水素水濃度	0.5wt%
バイオマス仕込み量	1.00g
圧力	20MPa

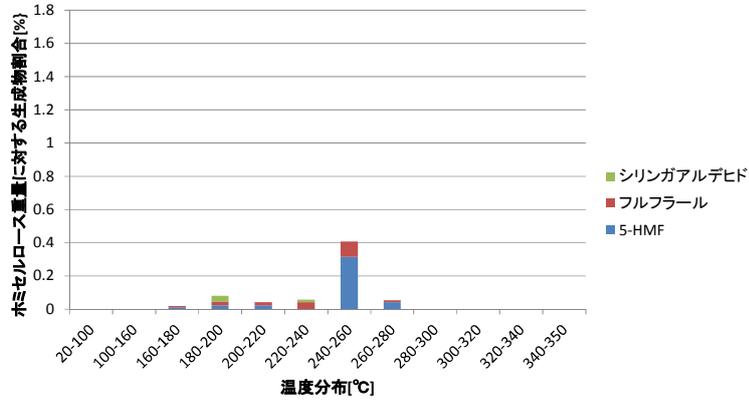


Fig. 6.2.2-14 ケヤキの水熱試験発酵阻害物質分析結果  
(0.5wt%過酸化水素水添加)

実験番号	run6
過酸化水素水流量	10ml/min
過酸化水素水濃度	0.5wt%
バイオマス仕込み量	1.00g
圧力	20MPa

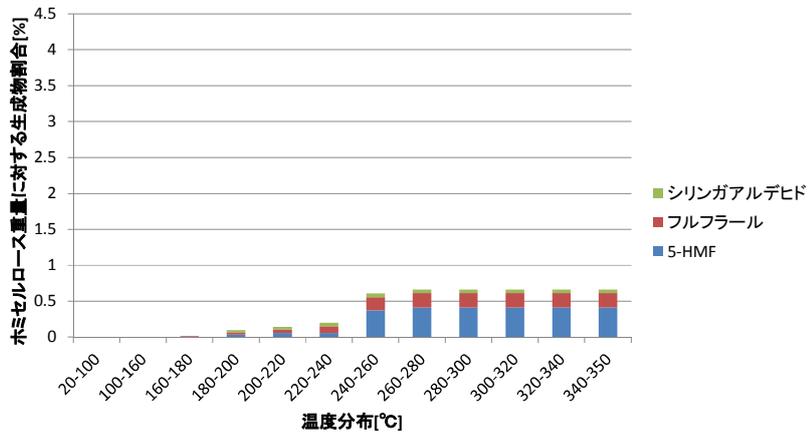


Fig. 6.2.2-15 ケヤキの水熱試験発酵阻害物質分析結果積算値  
(0.5wt%過酸化水素水添加)

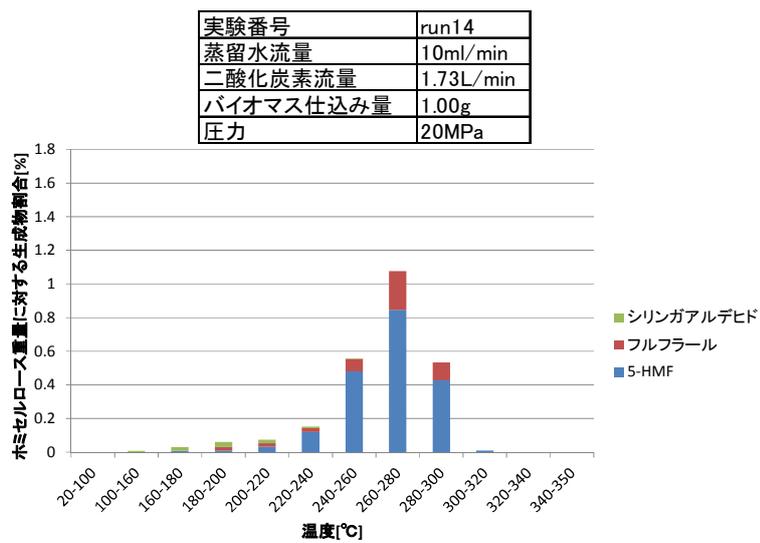


Fig. 6. 2. 2-16 ケヤキの水熱試験発酵阻害物質分析結果  
(二酸化炭素添加)

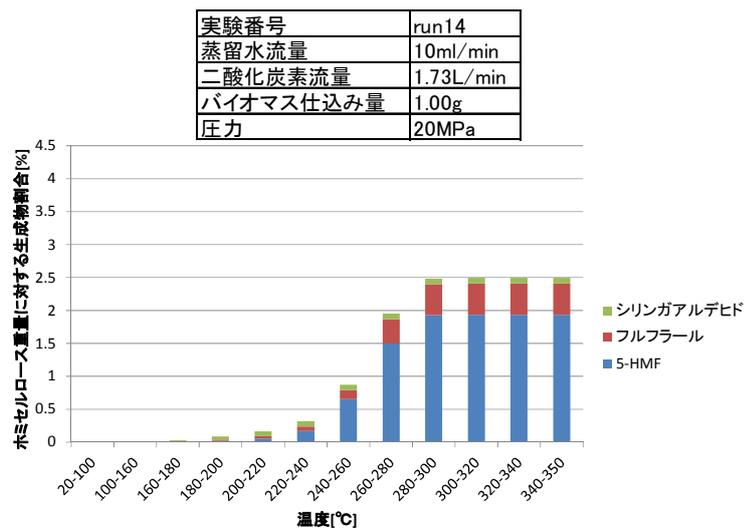


Fig. 6. 2. 17 ケヤキの水熱試験発酵阻害物質分析結果積算値  
(二酸化炭素添加)

## 7章 エタノール発酵試験

前章までは、各種バイオマス前処理物の酵素糖化試験結果により、前処理条件の評価をおこなってきたが、本章では前処理物の酵素糖化液を市販酵母でエタノール発酵し、エタノール収率で最終評価することを目的とした。そのために、まず代表的な糖であるグルコースとキシロースを用いてエタノール発酵条件の検討をおこなった。

### 7. 1 酵母の前培養

C6 糖および C5 糖のエタノール発酵が可能な市販の酵母を入手し、以下の前培養により酵母を増殖保管した。

#### 1) 入手した酵母

##### ① 酵母 : *Saccharomyces cerevisiae* (NBRC233)

一般的な酵母で、C6 単糖（グルコース、フルクトース、マンノースなど）をエタノール発酵する能力を有する。以下、酵母 2 3 3 と記す。

##### ② 酵母 : *Pachysolen tannophilus* (NBRC1007)

C6 単糖に加え、C5 単糖であるキシロースをエタノール発酵する能力を有するが、C5 単糖のアラビノースは発酵できない。以下、酵母 1007 と記す。

#### 2) 前培養装置と方法

上記酵母は入手時は固体状であるので、復水液（YM 培地 : Table 7. 1-1 に示す）で溶解希釈後その一部を寒天培地で復元増殖させ、Fig. 7. 1-1 に示す方法により酵母を増殖させる前培養を行った。

Table 7.1-1 YM (Yeast and Malt) 培地の組成

成分	濃度 [g / L]
グルコース	10
ペプトン	5
酵母エキス	3
麦芽エキス	3

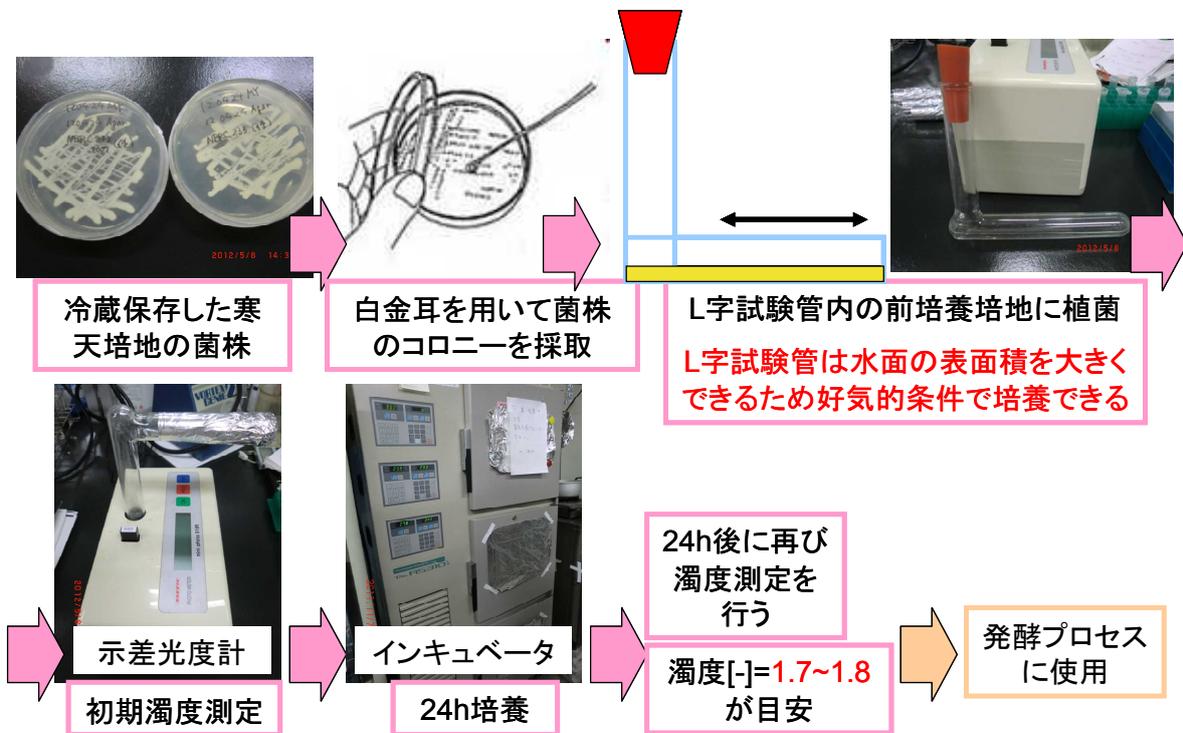


Fig. 7.1-1 前培養装置と方法

## 7. 2 エタノール発酵試験

前節で作成した前培養液の添加量、基質（グルコース、キシロース）の仕込み濃度を変化させて、エタノール収率が概ね80%以上となる条件を選定した。

### 1) 試験装置と方法

Fig. 7.2-1 に示す装置と方法でエタノール発酵を行い、生成エタノールと未反応糖の分析を行いエタノール収率を求めた。

### 2) 結果

前培養液の添加量と基質（グルコース、キシロース）の仕込み濃度に対するエタノール収率を Fig. 7.2-2 から Fig. 7.2-8 に示す。

この結果、糖化液10mL に対して酵母233と1007をそれぞれ50 $\mu$ L 添加して温度37 $^{\circ}$ Cで約48h発酵することにより、エタノール収率を約80%にできることがわかった。

各種バイオマスの水熱爆砕前処理物を酵素糖化し、その糖化液を本条件下でエタノール発酵してエタノール収率を評価する計画であったが、5.3節で示したようにバイオマス高濃度処理では酵素糖化率が大きく低下するという問題があり、これが解決した後にエタノール発酵を実施する必要がある。これは今後の課題である。

発酵培地	
成分	濃度 [g / L]
ペプトン	5
酵母エキス	5
硫酸マグネシウム七水和物	0.5

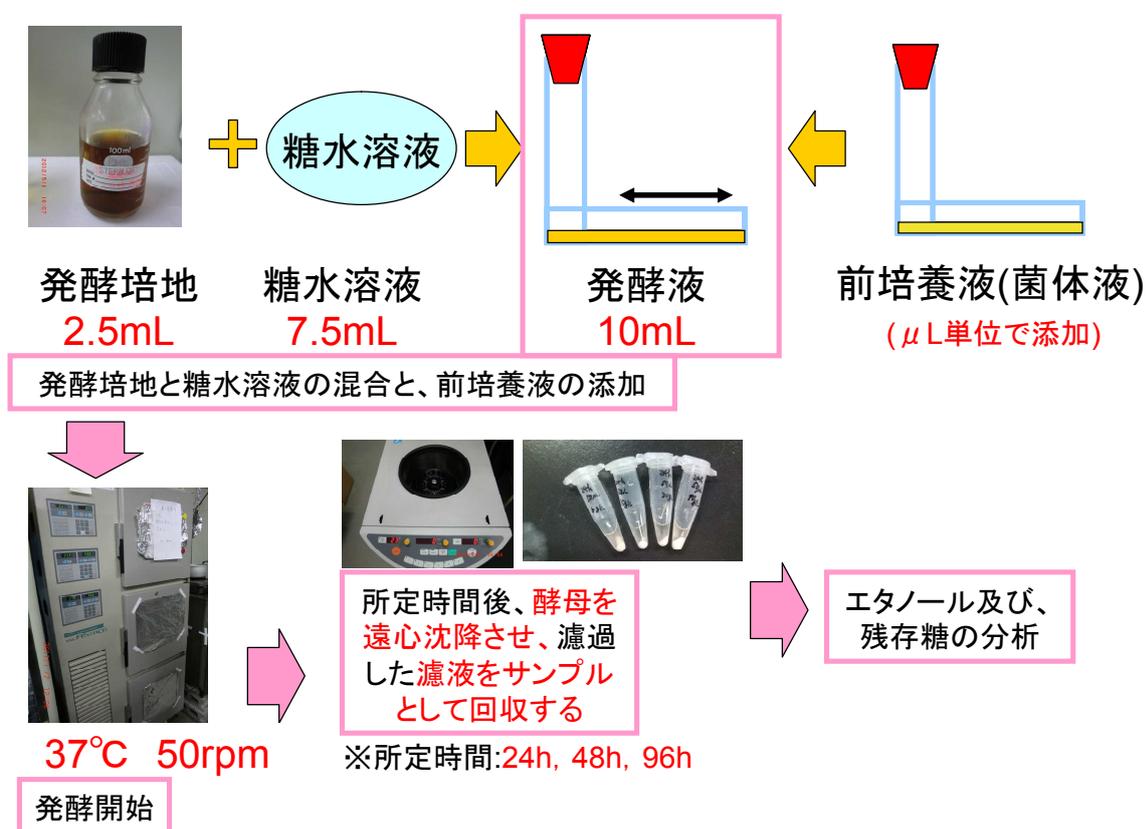


Fig. 7. 2-1 本培試験装置と方法

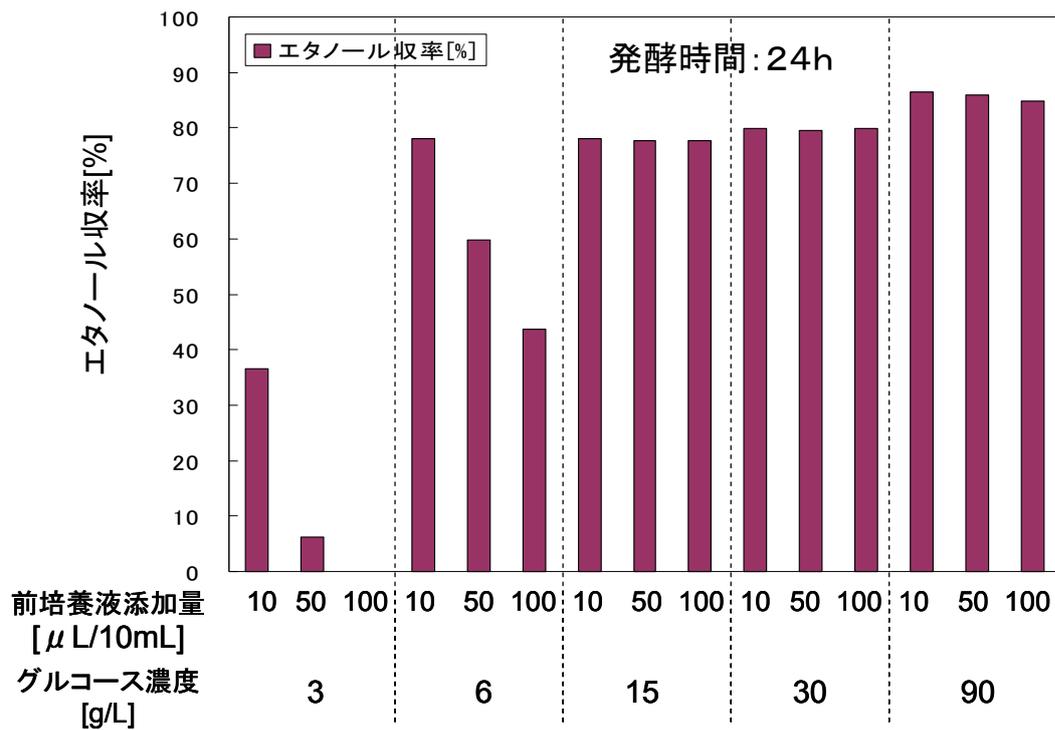


Fig. 7.2-2 グルコースのエタノール発酵試験結果 (発酵時間: 24 h)

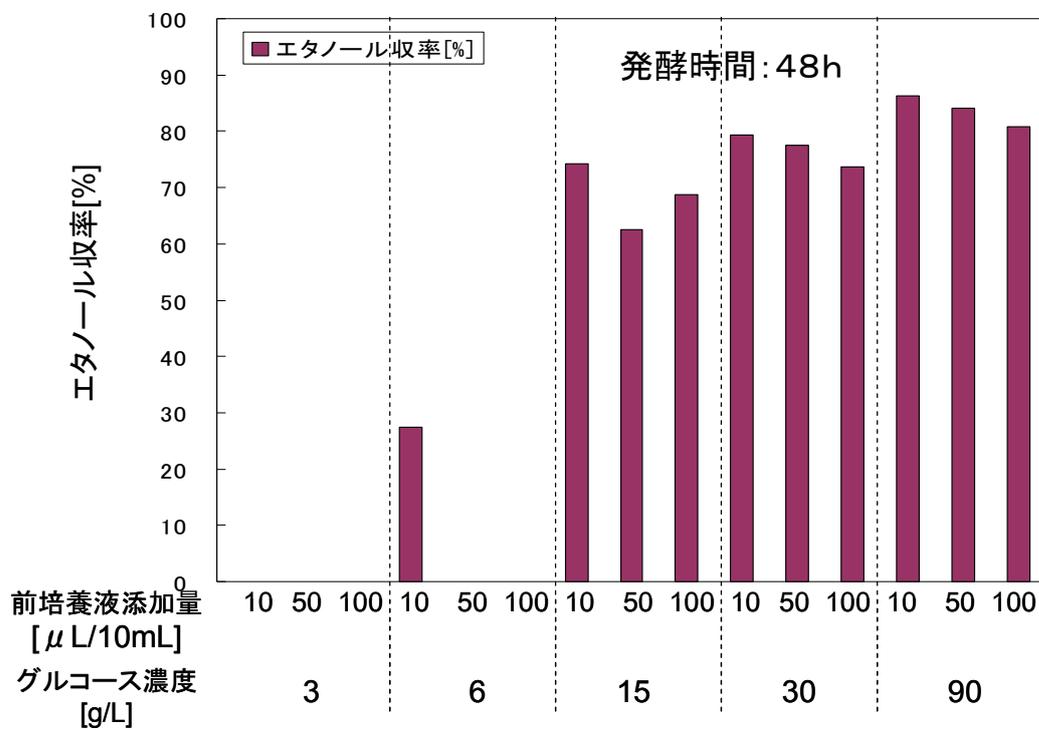


Fig. 7.2-3 グルコースのエタノール発酵試験結果 (発酵時間: 48 h)

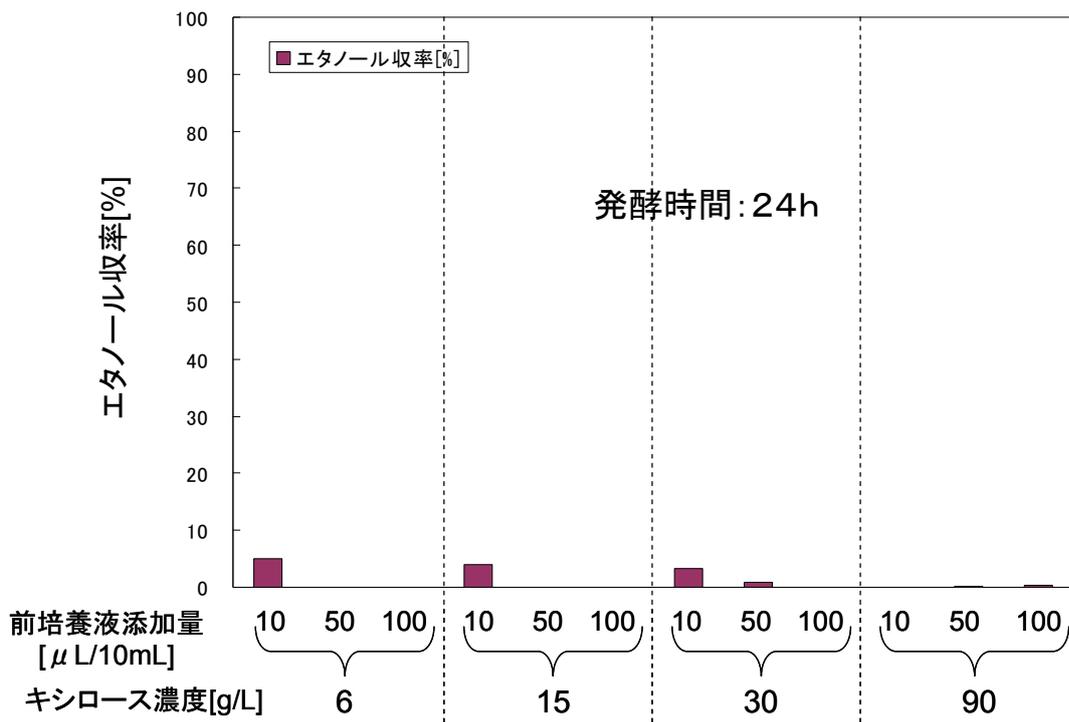


Fig. 7.2-4 キシロースのエタノール発酵試験結果（発酵時間：24h）

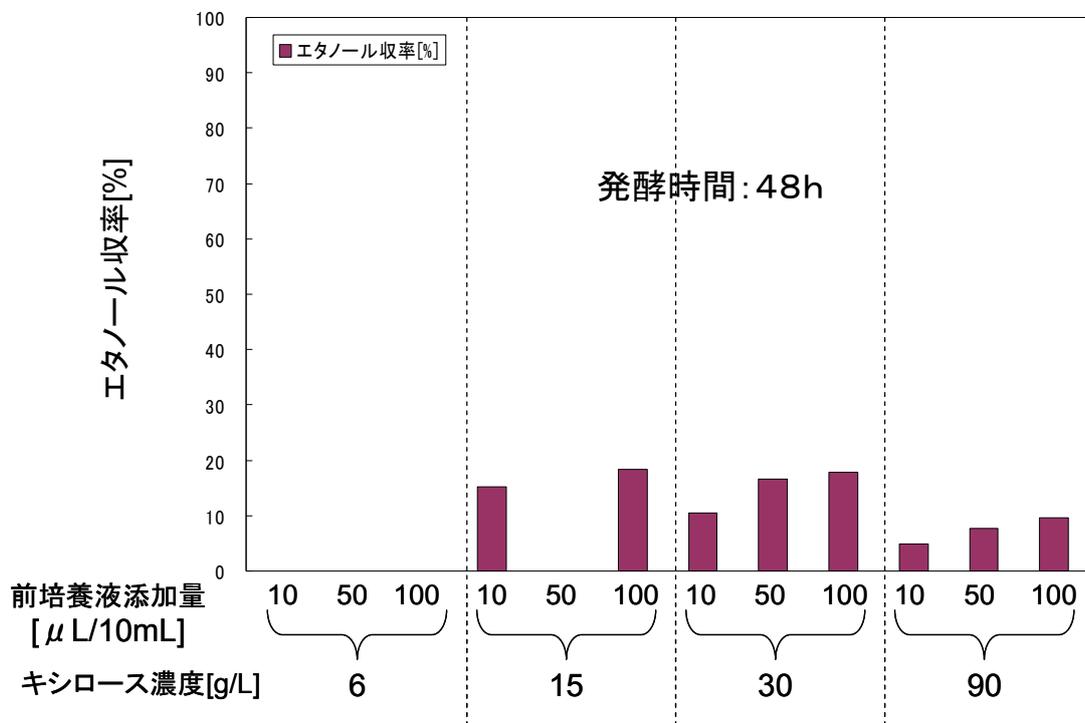


Fig. 7.2-5 キシロースのエタノール発酵試験結果（発酵時間：48h）

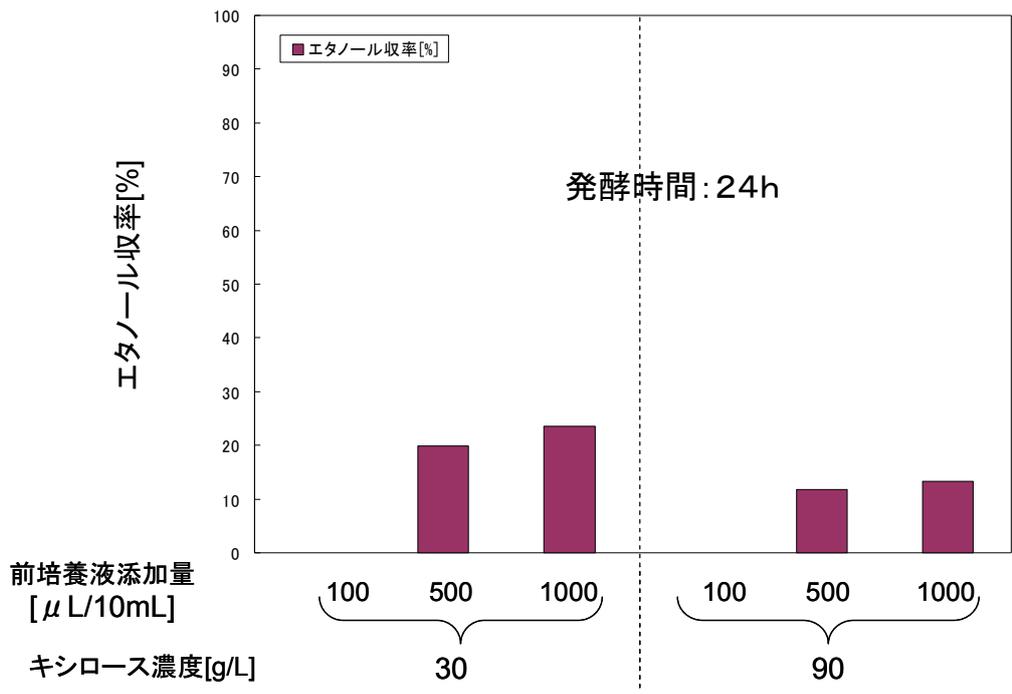


Fig. 7.2-6 キシロースのエタノール発酵試験結果 (発酵時間: 24 h)

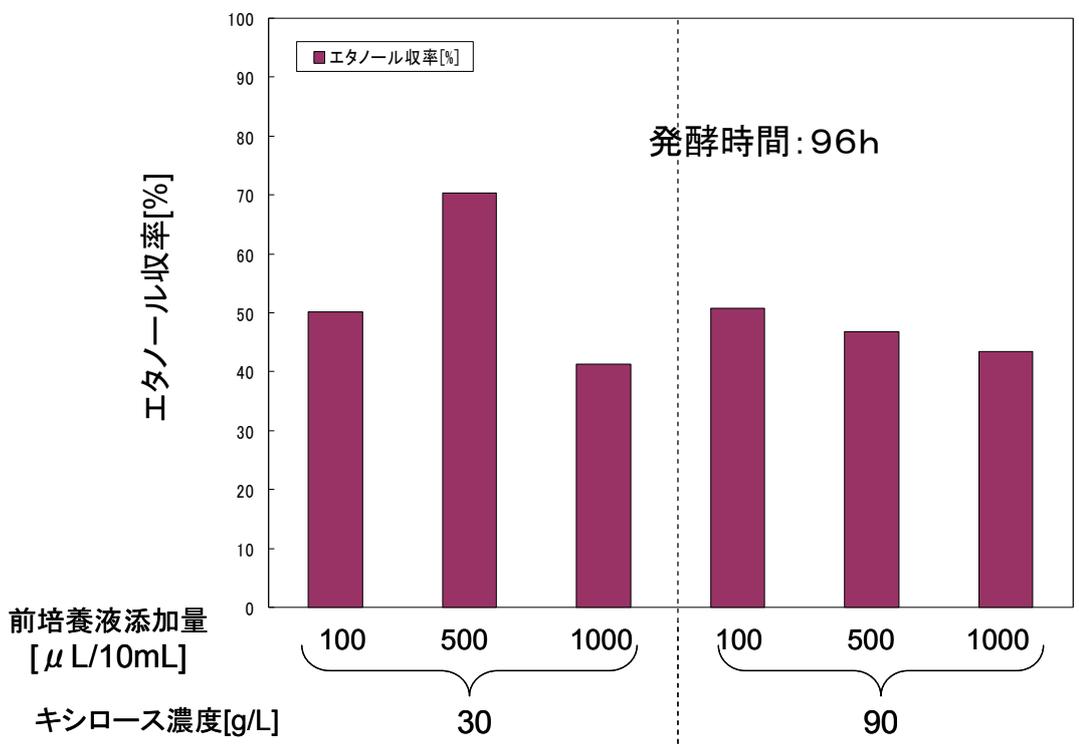


Fig. 7.2-7 キシロースのエタノール発酵試験結果 (発酵時間: 96 h)

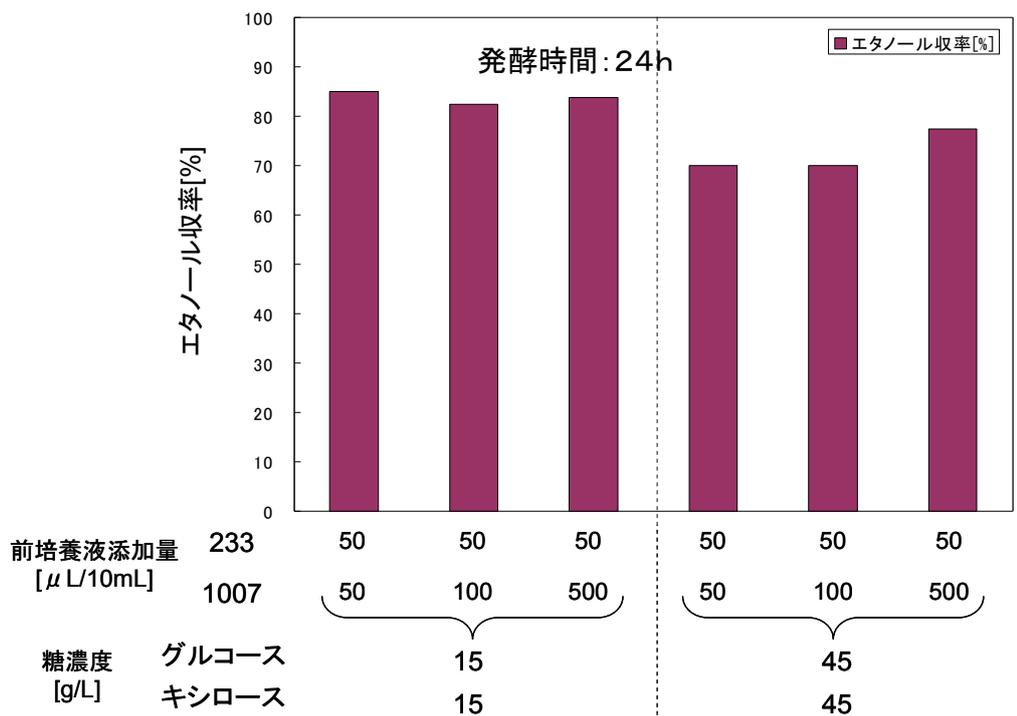


Fig. 7. 2-8 グルコースとキシロース混合物のエタノール発酵試験結果 (発酵時間: 24 h)

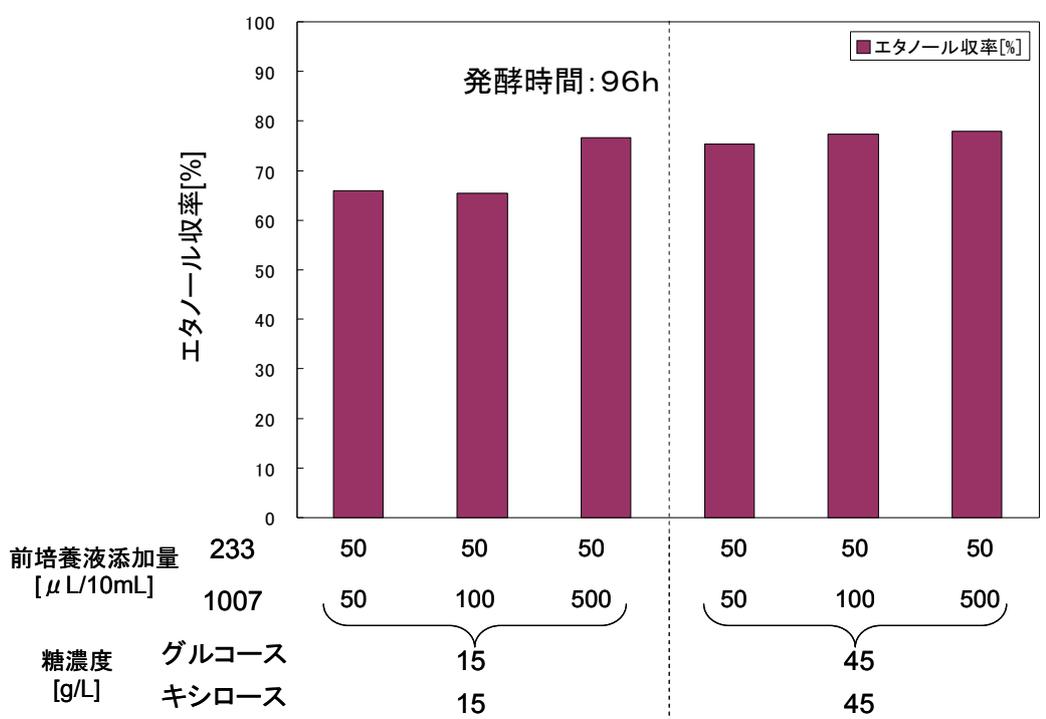


Fig. 7. 2-8 グルコースとキシロース混合物のエタノール発酵試験結果 (発酵時間: 96 h)

## 8章 結言

### 1) 糖分析方法の改善結果

昨年までは試薬法によりグルコース、キシロース及び全糖（可溶性）の分析を行なったが、今年度はHPLC+蛍光誘導体化法（以下液クロ法）によりグルコースやキシロースなどの単糖およびオリゴ糖（2から6糖）など16種類の糖分析を行ない、糖分析精度の向上を図った。標準試料で両者を比較したところ、グルコース試薬法では他の糖の存在により測定値が実際より大きくなる傾向がみられた。各種前処理物の酵素糖化率の試薬法と液クロ法の比較を行ない、両者には多少の差異は見受けられるが、水熱爆砕は水熱徐冷や水蒸気爆砕より糖化率が高い傾向は分析方法によらず同じであった。

### 2) 杉、ケヤキの高温前処理物の酵素糖化試験結果

ケヤキおよび杉を260、280、300℃の高温で水熱爆砕、水熱徐冷及び水蒸気爆砕した前処理物の酵素糖化率を比較した。いずれの場合も、高温ほど糖の過分解が進行して酵素糖化率は低下し前処理法による差異はみられず、260℃では水熱爆砕の糖化率が最も高くなった。

### 3) 稲わら前処理物の酵素糖化試験結果

稲わらを温度160～240℃で水熱爆砕および水熱徐冷した前処理物の酵素糖化率を行なった。いずれの場合も高温では糖の過分解が進行して酵素糖化率は低下し、温度180から200℃近傍で高い糖化率を示した。水熱爆砕前処理物はいずれの温度でも高い糖化率を示しており優位性を確認した。発酵阻害物質の収率は水熱爆砕と水熱徐冷に差異はみられなかった。

### 4) 水熱前処理時の添加剤による糖化促進試験結果

半回分式装置を用いて、杉およびけやきの水熱前処理時に過酸化水素または二酸化炭素を少量添加した場合の糖化性能におよぼす効果を温度ごとに検討した。その結果、過酸化水素を微量添加することにより、糖化温度が約20℃低下して

糖化率も向上し、さらに発酵阻害物質の大幅な減少がみられその効果が認められた。

#### 5) 水熱爆砕前処理物の基質高濃度化による酵素糖化性能評価試験結果

発酵エタノールの濃縮脱水エネルギーはエタノール濃度が希薄なほど大きなエネルギーを要するので、基質である糖の濃度は20wt%程度にする必要がある。水熱爆砕前処理物（基質）を高濃度化した場合の酵素糖化率を測定し、基質濃度が高くなると酵素糖化率の大きな低下がみられた。これは、酵素が糖以外の成分に吸着された影響が大きいと考えられる。再現性の確認を行なう必要があるが、原らが開発中の炭素系個体酸は逆に基質が高濃度ほど糖化率は高くなるので、その適用も含めて検討する必要があると考えられる。

#### 6) エタノール発酵の条件選定試験結果

糖化液のエタノール発酵効率を測定するための準備として、酵母233及び酵母1007によるグルコースおよびキシロースのエタノール発酵条件選定試験を行ない、それぞれエタノール収率80%及び50%とほぼ満足できる条件が設定できた。実用性評価のためには高い糖濃度でのエタノール発酵を行なう必要があるが、前項記載のように高濃度での糖化率が低いという問題点が解決できるまで、実液でのエタノール発酵試験は断念した。

## 【結論】

HPLC+蛍光誘導体化検出法により16種類の糖分析技術を確立し、昨年までの結果を見直したが、水熱爆砕処理物は水蒸気爆砕や水熱徐冷処理物より酵素糖化率が高い傾向は同じであった。杉およびけやきの水熱爆砕前処理温度は過分解反応の少ない260℃近傍が、稲わらの水熱爆砕前処理温度は過分解の少ない200℃近傍が好ましいことを確認した。

杉の水熱処理時に過酸化水素を添加することにより、前処理温度を約20℃低減可能で、糖収率の増大および発酵阻害物質の大幅な低減が可能であることを見出した。

市販酵母を入手してグルコース及びキシロースのエタノール発酵条件を確認し、濃縮脱水に有利な高濃度糖化液でのエタノール発酵を計画したが、約20%の高濃度処理では酵素糖化率の低下がみられたので、その原因と対策を今後検討する必要がある。

## IV. 3年間の研究総括

研究期間3年間の成果と課題を以下にまとめて示す。

### 1) 水熱爆砕の所要エネルギーの試算

水熱爆砕は蒸発潜熱が不要なため水蒸気爆砕より大幅に少ないエネルギーで省エネプロセスである。

### 2) 糖分析方法の改善結果

2009, 2010年度は試薬法によりグルコース、キシロース及び全糖（可溶性）の分析を行なったが、2011年度はHPLC+蛍光誘導体化法（以下液クロ法）によりグルコースやキシロースなどの単糖およびオリゴ糖（2から6糖）など16種類の糖分析を行ない、糖分析精度の向上を図った。標準試料で両者を比較したところ、グルコース試薬法では他の糖の存在により測定値が実際より大きくなる傾向がみられた。各種前処理物の酵素糖化率の試薬法と液クロ法の比較では、両者には多少の差異は見受けられたが、水熱爆砕は水熱徐冷や水蒸気爆砕より糖化率が高い傾向は分析方法によらず同じであった。

### 3) 杉、ケヤキ前処理物の酵素糖化試験結果

杉およびケヤキを200から300℃の温度範囲で水熱爆砕、水熱徐冷及び水蒸気爆砕した前処理物の酵素糖化率を比較した。いずれの場合も、温度の上昇とともに糖収率は増加するが、260℃を超える高温では糖の過分解が進行して酵素糖化率は低下する傾向は前処理法による差異はみられず、260℃では水熱爆砕の糖化率が最も高くその優位性が認められた。

### 4) 稲わら前処理物の酵素糖化試験結果

稲わらを温度160から240℃で水熱爆砕および水熱徐冷した前処理物の酵素糖化率は、いずれの場合も高温ほど糖の過分解が進行して酵素糖化率は低下し、180から200℃近傍で酵素糖化率は最大となった。いずれの温度でも水熱爆砕前処理物は高い酵素糖化率を示しておりその優位性を確認した。発酵阻害

物質の収率は、水熱爆砕と水熱徐冷に差異はみられなかった。

#### 5) 水熱前処理時の添加剤による糖化促進試験結果

半回分流通式装置を用いて、杉の水熱前処理時に過酸化水素または二酸化炭素を少量添加した場合の糖化性能におよぼす効果を温度ごとに検討した。過酸化水素を微量添加することにより、杉の糖化温度が約20℃低下して糖化率も向上し、さらに発酵阻害物質の大幅な減少がみられその効果が認められた。

#### 6) 水熱爆砕前処理物の基質高濃度化による酵素糖化性能評価試験結果

発酵エタノールの濃縮脱水エネルギーはエタノール濃度が希薄なほど大きなエネルギーを要するので、基質である糖の濃度は10から20wt%にする必要がある。水熱爆砕前処理物（基質）を高濃度化した場合の酵素糖化率を示すが、基質濃度が高くなる

とは酵素糖化率の大きな低下がみられた。これは、酵素が糖以外の成分に吸着された影響が大きいと考えられる。再現性の確認を行なう必要があるが、原らが開発中の炭素系個体酸は逆に基質が高濃度ほど糖化率は高くなるので、その適用も含めて検討する必要があると考えられる。

#### 7) エタノール発酵の条件選定試験結果

糖化液のエタノール発酵効率を測定するための準備として、酵母233及び酵母1007によるグルコースおよびキシロースのエタノール発酵条件選定試験を行ない、それぞれエタノール収率80%及び50%とほぼ満足できる条件が設定できた。実用性評価のためには高い糖濃度でのエタノール発酵を行なう必要があるが、その前に前項記載のように高濃度での糖化率が低いという問題点を解決する必要がある。

## 【結論】

- 1) ケヤキ（広葉樹）、杉（針葉樹）及び稲わらを水熱爆砕、水蒸気爆砕及び水熱徐冷の前処理を広範囲の温度で行い、その前処理物を酵素糖化して HPLC+蛍光誘導体化検出法による 16 種類の糖分析の他、可溶性多糖類やエタノール発酵阻害物質 6 種の分析を行い比較評価した。
- 2) 水熱爆砕前処理物は他の水熱徐冷や水蒸気爆砕の前処理物より酵素糖化率は高く、約 10mm の粗破砕物でも高濃度で水熱爆砕前処理可能で、本提案技術の有効性が示唆された。また、水熱爆砕の適正温度条件を明らかにするとともに、水熱爆砕は水蒸気爆砕の約 30 倍の膨張エネルギーを有しながら、蒸発潜熱不要で省エネプロセスであることを確認した。
- 3) 杉の水熱処理時に過酸化水素を添加することにより、前処理温度を約 20℃低減可能で、糖収率の増大および発酵阻害物質の大幅な低減が可能であることを見出した。
- 4) 市販酵母によりグルコース及びキシロースのエタノール発酵条件を確認し、濃縮脱水に有利な高濃度前処理糖化液でのエタノール発酵を計画したが、高濃度前処理液では不活性固体への酵素吸着増大に起因すると考えられる酵素糖化率の低下がみられたので、その原因と対策を今後検討する必要がある。最近開発された炭素系固体酸は高濃度ほど糖化率が高く、容易に分離回収して繰り返し使用できる可能性を有しており、今後は酵素糖化以外に炭素系固体酸糖化も視野に入れて検討する必要がある。

研究発表：なし

論文発表：なし（平成 24 年度から発表予定）

学会発表：なし（平成 24 年度から発表予定）

特許：なし（平成 24 年度に出願予定）