

セルロース性バイオマスの酵素糖化前処理 —ミルによる機械的非晶化法—

清水祐一*・遠藤俊二**・出蔵俊哉***・日西大介****

涌井はるか*****・葛西健一*****

Pretreatment of Cellulosic Biomass for Enzymatic Saccharification. -Decrystallization method by mechanical milling-

Yuichi SHIMIZU, Shunji ENDO, Toshiya DEKURA, Daisuke HINISHI,
Haruka WAKUI, and Ken-ichi KASAI

Abstract

To increase the rate of enzymatic saccharification, cellulosic biomass was decrystallized by mechanical milling. Waste papers, reed and sugar beet residue were decrystallized progressively by the milling, and reached to almost amorphous state after 10 minutes. With the progress of decrystallization, the enzyme digestibility of samples increased apparently as compared with the original. Samples almost amorphous were digested completely for 48 hr. The milling pretreatment was confirmed to be very effective for the saccharification. Glucose production was also increased by the pretreatment. The yields of glucose ranged from 30% to 73% after 48 hr digestion. These values indicated that 60~75% of the digested samples changed to glucose, except for 32% of sugar beet residue.

1. 緒 言

現在、我々の生活に必要なエネルギー資源、化学資源は石油、石炭、天然ガス等の化石資源に大きく依存している。しかし、これらの資源は遠くない将来に枯渇することは避けられず、省資源・省エネルギーとともに新たな資源の開発が必要となっている。一方、化石資源消費に伴うCO₂の大量排出が地球温暖化をもたらし、地球規模での様々な環境破壊が顕在化しつつある。また、都市ゴミ、各種産業廃棄物によるゴミ・環境問題も危惧され、これらをリサイクルする取り組みが推進

されつつある。

このような状況下、各国で化石資源の代替かつ環境負荷の少ないエネルギーとして、太陽光、太陽熱、風力等の自然エネルギーの導入や廃棄物の有効利用によるエネルギーへの変換等の取り組みが進んでいる。我が国でも、各種リサイクル法制定と共に、平成9年に「新エネルギー利用などの促進に関する特別措置法」施行され、各地で新エネルギー導入への取り組みが始まっている。この中で、平成14年1月、この新エネルギーの対象としてバイオマスが雪氷とともに追加され、燃焼によるバイオマス発電、汚泥や家畜糞尿のメタン発酵によるバイオガス化などの研究がなされている。

セルロース性バイオマスは稲ワラ、もみガラ、バガス、トウモロコシ茎、野菜くずなどの農産廃棄物、製材残渣、間伐材などの林産廃棄物、大豆粕、ビート滓、果皮などの食品加工廃棄物、葎、竹などの未利用物および廃紙などの生活系廃棄物など、廃棄物系だけでも大量の資源量が存在している。そして、これらの有効利用としては直接燃

* 教授 物質工学科

** 技官 (技術専門職員・物質工学科)

*** ハリマ化成(株)

**** 室蘭工業大学

***** 三菱住友シリコン(株)

***** 東レ(株)

焼の他、熱化学的プロセスによる炭化、液化、ガス化によるエネルギー変換と糖化(加水分解)によるグルコース等への変換があげられる¹⁾。糖化により生成したグルコースはそれ自身が食料、飼料となるが、微生物代謝を利用したアセトンや各種有機酸の製造、さらに発酵によりエタノールへ変換することにより燃料、化学資源としての利用が可能となる。実際、ブラジルではサトウキビの絞り滓であるバガスの糖化、発酵によりエタノールを製造し、自動車用燃料として実用化している。

セルロースを糖化する方法は酸法と酵素法に大別されるが、近年は穏和な条件下で進行し、生成したグルコースの二次分解がない酵素法が注目されている。しかし、セルロースは水に不溶でかつ結晶性が高いため、また、多くのセルロース性バイオマスは夾雑物質としてリグニン等がその周りを囲んでいるため、酵素による基質への反応性が非常に低いという問題点がある。これを、改善するために、高い活性を持つ酵素の探索とともにセルロースの反応性を向上させるための前処理^{2), 3)}が研究されている。前処理方法には微粉末化、蒸煮・爆砕、マイクロ波照射などの物理的方法や酸アルカリによる膨潤、脱リグニンをを行う化学的方法、木材腐朽菌を用いたりグニン分解法などがある⁴⁾。

本研究では、セルロース性バイオマスとして段ボール等の古紙、未利用資源の葦および砂糖製造工程で大量に排出されるビート滓を取り上げ、これらを効果的に酵素糖化するための前処理として、ミルを用いた機械的非晶化を行い、その有効性を検した。

2. 実験方法

2. 1 試料

試料は、古紙としてコピー用紙(ホワイト再生紙)、段ボール、白板紙(ティッシュ箱)および新聞紙を、未利用資源として葦を、そして廃棄物として製糖工場から廃棄されるビート滓を用いた。これらの試料は古紙についてはシュレッダーで細断後、葦、ビート滓についてはコーヒー豆用ミルで粉碎した後使用した。

2. 2 リグニンの定量⁵⁾

試料中のリグニンの定量は硫酸法(Klason法)により行った。試料約1gを精秤し、72%硫酸20mlを加えて十分攪拌後、室温で時々攪拌しな

がら4時間放置した。これを1リットル三角フラスコに定量的に移し、蒸留水765mlを加え(硫酸濃度3%)、還流冷却器を取り付けて2時間沸騰処理した。その後、恒量済み1G3ガラスフィルターで残渣(リグニン)を吸引ろ過し、105℃で恒量になるまで乾燥した。リグニン率(%)は、用いた試料の絶乾重量と残渣の絶乾重量の比から算出した。

2. 3 灰分の定量⁵⁾

試料約1gを精秤して恒量値既知のるつぽに採り、ガスバーナーで最初は弱く次第に強くして3時間灼熱し、放冷後重量を測定した。灰分率(%)は、用いた試料の絶乾重量と灰分の絶乾重量の比から算出した。

2. 4 機械的非晶化

試料をタングステンカーバイトミル(平工製作所(株)、TI-100、以下WCミル)に1g/ポットで充填し、それぞれ1、2、3および10分間摩砕して非晶化し、酵素糖化前処理とした。

2. 5 X線回折

前処理試料の結晶性を調べるため、粉末反射法により各時間摩砕した試料のX線回折(日本電子(株)製、JDX-3532X線回折装置)を測定した。測定条件は出力40kV、20mA、スキャン速度1°(2θ)で5~30°(2θ)の範囲をスキャンした。

2. 6 酵素糖化

前処理試料約1gを精秤して100ml三角フラスコに採り、酵素溶液(ヤクルト製セルラーゼONOZUKA R-10、0.5%溶液、pH5.0)20mlを加えてシリコ栓をした。これを50℃の恒温槽中にて、2、4、8、24および48時間振とうして糖化した。糖化終了後、恒量値既知の1G3ガラスフィルターでろ過し、糖化残渣を105℃で乾燥恒量化した。酵素糖化前後の絶乾重量差から、酵素により水溶化した割合を「糖化率」として算出した。

$$\text{糖化率}(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: 試料の絶乾重量

B: 糖化残渣の絶乾重量

ろ液は水を加えて100mlとした後、グルコスタッ

ト法（和光純薬工業(株)製グルコース測定用キット：グルコースCⅡ-テストワコー）により生成グルコース量を定量し、次式により「グルコース収率」を求めた。

$$\text{グルコース収率}(\%) = \frac{C}{A} \times 100$$

C：生成グルコース重量

3. 結果および考察

3. 1 試料のリグニンおよび灰分含有量

用いた試料のリグニンおよび灰分の含有量は表1の通りである。

表1.各試料のリグニンおよび灰分分析値

	リグニン(%)	灰分(%)
コピー用紙	1.1	4.5
段ボール	14.3	11.1
白板紙	17.6	20.4
新聞紙	20.8	10.6
葦	28.7	10.4
ビート滓	6.8	5.0

古紙では、再生紙ながら漂白パルプを原料としているコピー用紙のリグニンおよび灰分が最も少なく、それぞれ1.1%および4.5%であった。段ボール、白板紙および新聞紙はそれぞれのリサイクル古紙や未晒しの碎木パルプ等が原料であるためリグニン含有量が多く、特に新聞紙は約21%であった。また、灰分についてもコピー用紙に比べると高い値を示した。しかし、これらの灰分量は本来の原料に由来する灰分のほかに、後述するように、抄紙時に添加されている填料（タルク等の無機化合物）を含んでいる。特に、白板紙では填料の割合が高い。

葦のリグニンは約29%で針葉樹と同程度であったが、灰分は10%で木材（0.1～1%）よりかなり多い。なお灰分の約80%がシリカであることが報告されている⁶⁾。ビート滓のリグニン、灰分はそれぞれ6.8%、5.0%で葦に比べると少なかった。

3. 2 非晶化試料のX線回折図

コピー用紙、段ボールおよび葦を各時間摩砕処理したときのX線回折図を図1～図3に示した。未処理試料の回折図にはいずれも2θ = 15.5°

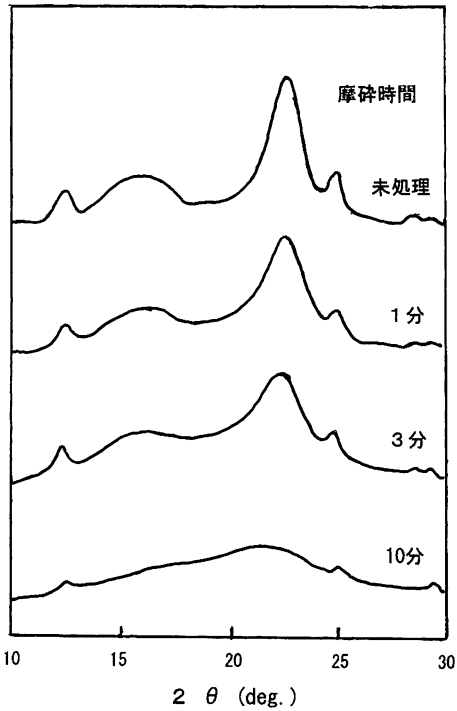


図1. 非晶化したコピー用紙のX線回折図

および22.5° を中心に天然セルロースの結晶に基づくブロードな回折ピークがみられる。また、コピー用紙および段ボールでは2θ = 12.5°、25° および29° 付近に小さなピークが認められるが、これは3.1で述べた填料による回折と考えられる。摩砕時間が長いほど非晶化が進行してセルロースの回折強度は減少し、10分間の摩砕でいずれの試料もほぼ完全に非晶化することが確認された。また、非晶化の進行とともに試料が微粉末化した。

白板紙、新聞紙についても同様な傾向を示したが、灰分含量が多かった白板紙では填料に基づく回折ピークが最も強かった。したがって白板紙中の灰分の相当量は填料である可能性が高い。

未処理ビート滓は葦に比べてセルロースの回折強度が弱いことから、試料中のセルロースの結晶性が低いと考えられる。

3. 3 前処理試料の酵素糖化

図4～図9にそれぞれの試料を酵素糖化した場合の糖化率およびグルコース収率を示した。

いずれの試料も糖化初期に速い速度で反応が進行するが、糖化時間8時間以降は速度が低下し、24時間以降は平衡に達しているものもみられる。特にビート滓では糖化8時間で糖化率がほぼ平衡に達した。

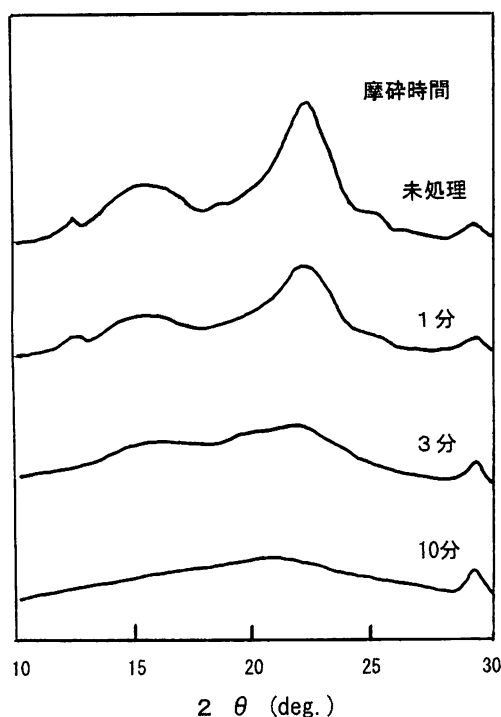


図2. 非晶化したダンボールのX線回折図

グルコース収率は、糖化時間とともに、糖化率とはほぼ同様な傾向で増加していることから、糖化の進行に伴ってグルコースが生成しているのがわかる。

コピー用紙(図4a)は未処理の場合、8時間の糖化率が53.7%、48時間が73.5%であったが、前処理の摩砕時間が長くなるにつれて糖化率が向上し、X線回折図からほぼ完全に非晶化していた10分摩砕物では8時間で88%に達し、48時間でほぼ完全に糖化(水溶化)した。したがって機械的摩砕による非晶化および微粉末化が酵素糖化の前処理として非常に有効であることが確認された。コピー用紙にはリグニン1.1%および灰分4.5%が含まれているにもかかわらず、10分摩砕物が完全に糖化した、すなわち分解残渣が残らなかったのは、これらが微粉末化により1G3ガラスフィルターを通過した可能性が考えられる。

グルコース収率(図4b)は未処理の場合、糖化時間48時間で53.6%であった。このときの糖化率が73.5%であることから、糖化(水溶化)した分の約73%(グルコース収率÷糖化率)がグルコースになったことになる。非晶化前処理によりグルコース収率も、糖化率と同様な向上がみられ、10分摩砕物の48時間糖化で72.5%となった。また、いずれのグルコース収率の値も糖化(水溶化)した分の

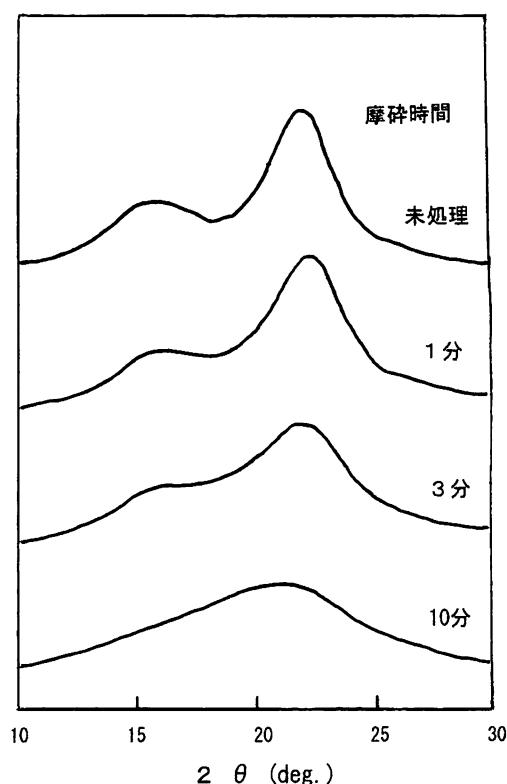


図3. 非晶化した葦のX線回折図

70%前後がグルコースであることを示した。残りは主としてグルコース以外の単糖およびオリゴ糖と考えられる。

また、糖化率の場合と同様に24時間でほぼ平衡値に達した。24時間以降は糖化(水溶化)ばかりでなく、グルコースの生成もほとんど起らないことが明らかになった。したがって非晶化前処理したコピー用紙の場合、糖化時間は24時間で十分であるといえる。

段ボール(図5a)、白板紙(図6a)および新聞紙(図7a)の未処理試料の糖化率は糖化48時間で、それぞれ38.8%、35.1%および31.5%であった。コピー用紙の比べると低い値であるが、これらの試料は酵素糖化では水溶化されない多量のリグニンおよび灰分を含んでいる。このリグニンおよび灰分を試料から差し引いて考えてみると、糖化率はそれぞれ約52%、57%および46%に相当する。

前処理の摩砕時間とともにこれら3者の糖化率は同様な傾向で向上し、特に10分摩砕(完全非晶化物)では各糖化時間で未処理の約2倍前後の糖化率を示した。48時間の糖化率はそれぞれ72%、67.3%および65.5%に達した。この値は、上記のリグニンおよび灰分を考慮した場合、それぞれ約97%、108%および96%に相当する。すなわち、試料からリグニンおよび灰分を差し引いた値を糖

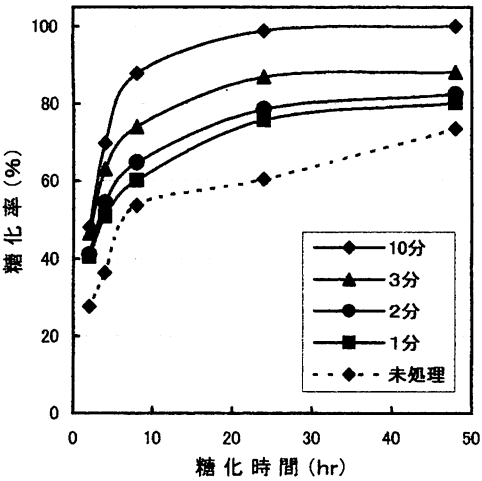


図 4 a. コピー用紙の酵素糖化における糖化率

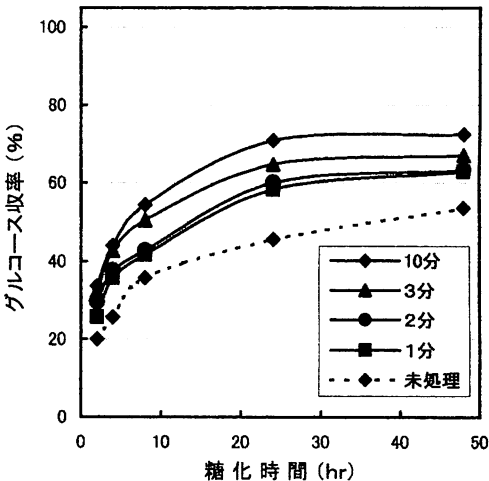


図 4 b. コピー用紙の酵素糖化におけるグルコース収率

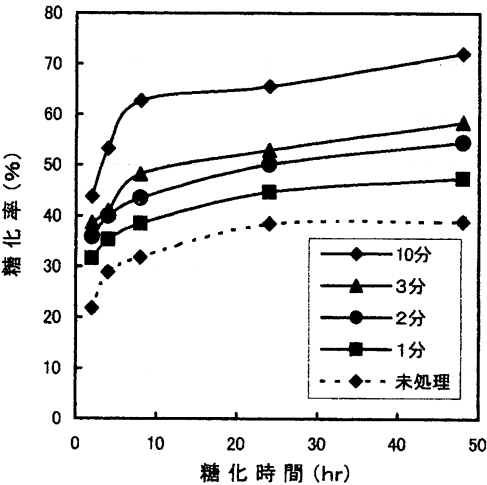


図 5 a. ダンボールの酵素糖化における糖化率

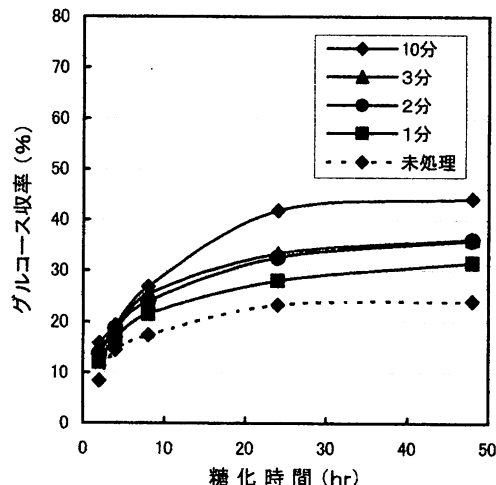


図 5 b. ダンボールの酵素糖化におけるグルコース収率

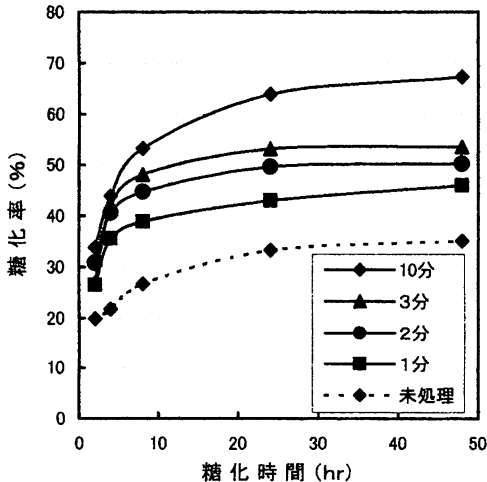


図 6 a. 白板紙の酵素糖化における糖化率

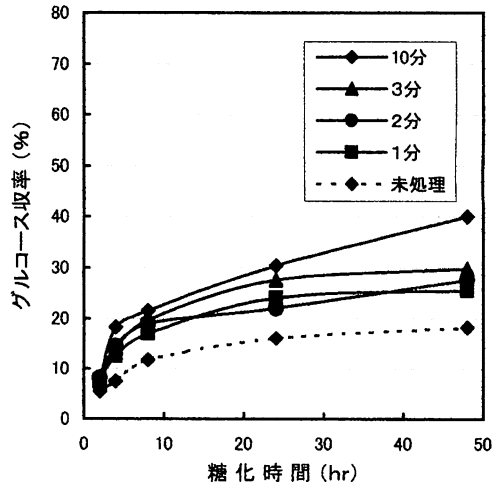


図 6 b. 白板紙の酵素糖化におけるグルコース収率

化対象成分と仮定すると、10分摩砕物を48時間糖化した場合、コピー用紙の場合と同様、試料はほぼ完全に糖化(水溶化)したと見ることができる。白板紙の糖化率が100%を越した理由は、他の2者に比べて多い白板紙中の填料(灰分)が摩砕により微粉化したため、糖化残渣をろ過する際に1G3ガラスフィルターを通過してしまった可能性が高い(コピー用紙の場合と同じ)。いずれにしても、機械的非晶化は古紙の酵素糖化前処理として非常に有効である。

グルコース収率(図5b、6b、7b)についても、各試料同様な傾向を示し、摩砕時間とともに生成グルコース量は増加した。10分摩砕物、糖化48時間のグルコース収率は、段ボール、白板紙および新聞紙でそれぞれ44.1%、40%および50.2%であった。これらの数値をそれぞれ同じ条件の糖化率と比べてみると、糖化(水溶化)した分の61.3%、59.4%および76.6%(グルコース収率÷糖化率)がグルコースということになる。新聞紙が段ボール、白板紙に比較してグルコースの割合が高いのは、原料に使われるパルプの種類に関係していると考えられる。また、このグルコースの割合と糖化時間との関係を検討した結果、三者とも、糖化時間2時間のときグルコースの割合が最も低く、時間とともにそれが増加する傾向を示した。一例として段ボール10分摩砕物を酵素糖化した場合の結果を表2に示した。

表2. 糖化(水溶化)分中のグルコースの割合
(段ボール、10分摩砕物)

糖化時間(hr)	グルコースの割合(%)
2	35.8
4	36.0
8	42.7
24	63.7
48	61.3

このことは、初期に試料中のヘミセルロース分の糖化が優先的に進むためグルコースの割合が低く、その後はセルロースの糖化がメインとなってグルコースの割合が増加したためと考えられる。コピー用紙の場合は、先に述べたように、糖化時間に関係なく糖化(水溶化)した分中のグルコースの割合は70%前後で一定であった。これは、コピー用紙の原料が漂白パルプであるため、他の古紙に

比べてヘミセルロース分が少ないためであろう。

葦(図8a)の場合、未処理試料の糖化率は糖化48時間で12.9%にすぎず、古紙に比べるとかなり低い値であった。しかも、糖化2時間で9.2%に達した後は、ほとんど糖化が進行せず、特徴的であった。前処理した試料では非晶化時間とともに糖化率は向上し、10分摩砕物、48時間糖化では51.7%に達した。葦は、3.1で示したように28.7%のリグニンと10.4%の灰分を含んでいる。したがってこのリグニンと灰分を差し引いて考えると、この糖化率は約85%に相当する。しかし、非晶化した場合でも2～4時間以降の糖化率の増加は非常に小さく、未処理試料と同様な傾向を示した。これは、糖化されやすい部分は非常に速やかに糖化されが、その後の糖化が困難であることを示している。そして、前処理によってその糖化されやすい部分の割合が少しずつ増えていると見ることができる。多量のリグニンの存在が、このような糖化結果に関連している可能性も考えられる。

グルコース収率(図8b)の結果は、糖化率と全く同様な傾向を示した。10分摩砕物、48時間糖化のグルコース収率は30.4%で、このときの糖化率51.7%と比べると、糖化(水溶化)した分の59%がグルコースになったことになる。また、このグルコースの割合は、段ボール、白板紙、新聞紙の場合と同様に、糖化2、4時間では低く、その後に増加することから葦の場合も、試料中のヘミセルロース分が優先的に糖化している可能性が高い。

ビート滓(図9a)では、未処理試料の糖化率は糖化48時間で34.6%であった。前処理により糖化率は向上するものの、摩砕時間による差は他の試料に比べて小さく、糖化24時間以降はほとんど同じ糖化率を示し、48時間でいずれの前処理物も約41%となった。この理由として、X線回折の結果で述べたように、ビート滓中のセルロースの結晶性は他の試料に比べて低いことがあげられる。すなわち、最初から結晶性が低いために短時間の摩砕でも10分摩砕と同様の効果が得られたと考えられる。また、前処理による糖化率の向上が6ポイント程度しかなく、その効果が小さい点についても同様に低い結晶性に起因すると思われる。すなわち、ビート滓は未処理でも比較的高い酵素糖化性を有しているからである。

糖化率が約41%以上に増加しない理由としては、ビート滓のグニン、灰分含有量はそれぞれ6.8%、5.0%と少ないものの、その他にかなりのタンパク質、ペクチン質を含んでいるためと考えられる。

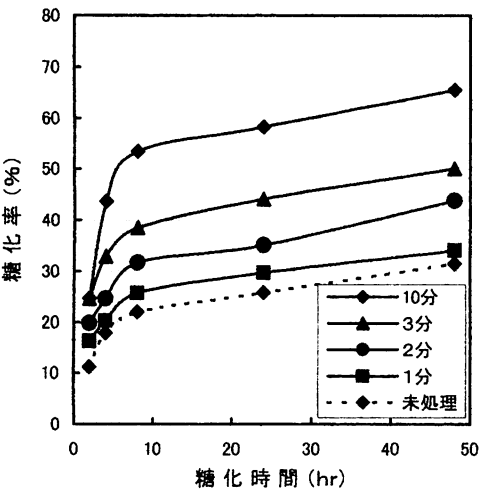


図 7 a. 新聞紙の酵素糖化における糖化率

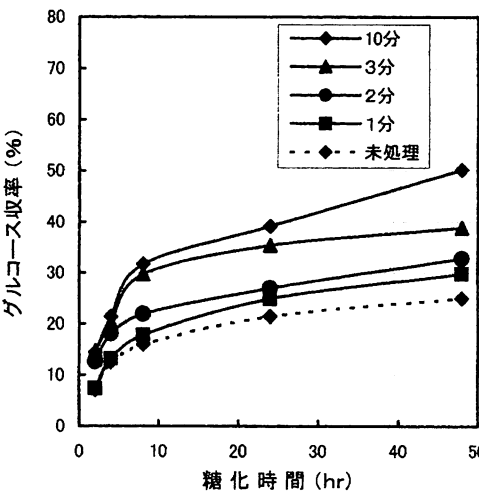


図 7 b. 新聞紙の酵素糖化におけるグルコース収率

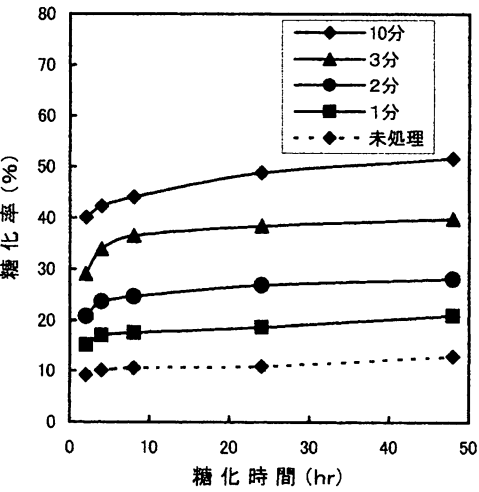


図 8 a. 葦の酵素糖化における糖化率

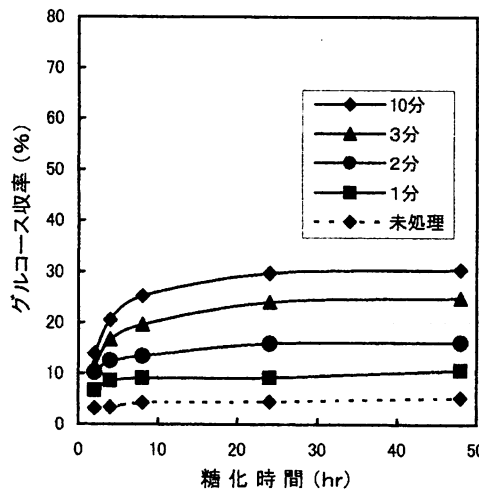


図 8 b. 葦の酵素糖化におけるグルコース収率

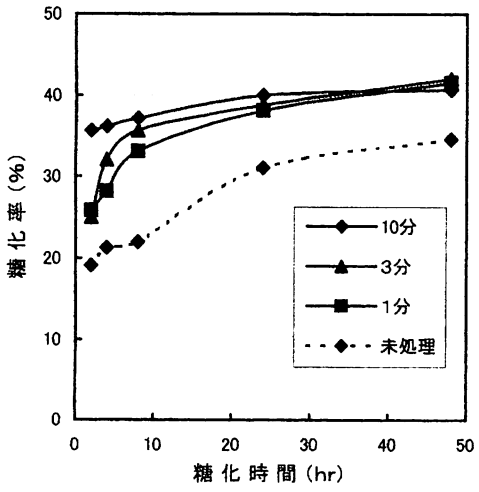


図 9 a. ビート滓の酵素糖化における糖化率

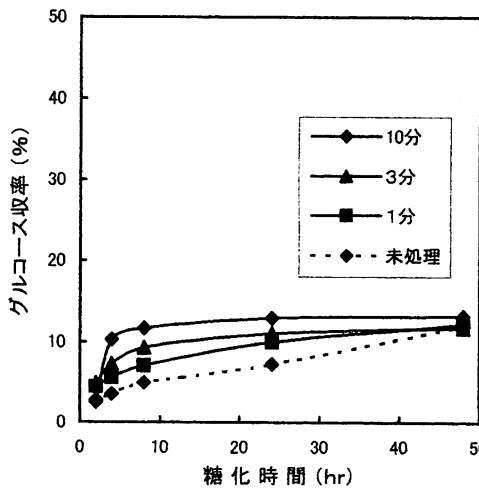


図 9 b. ビート滓の酵素糖化におけるグルコース収率

これらの成分を差し引いた試料についてみると、約41%はかなり高い糖化率に相当すると考えられる。

グルコース収率(図9b)については、いずれも低い値を示し、糖化48時間で未処理試料および各時間摩砕物は全て約12%で平衡に達した。糖化48時間の糖化率と比較すると、いずれも糖化(水溶化)した分の約30%がグルコースであった。この割合は他の試料と比べると半分程度でしかない。これは、ビート滓中の成分に原因があり、セルロース含有量よりヘミセルロース分が多いためと考えられる。このことは、全還元糖収率がグルコース収率の2倍以上であったことから推定される。

以上より、各試料の酵素糖化前処理として摩砕による機械的非晶化が有効であることが確認された。また、これらの試料は糖化対象成分であるセルロース、ヘミセルロース以外に相当量のリグニン、灰分等を含んでいたが、前処理により糖化対象成分がほとんど糖化されたことから、これらの存在が酵素糖化反応自体を阻害するものではないことも確認された。

4. ま と め

古紙、未利用資源および農産廃棄物系のセルロース性バイオマスの酵素糖化前処理として、機械的摩砕によるセルロースの非晶化を検討した結果、以下のことが明らかになった。

1) 古紙は、その種類により含有するリグニン、灰分の割合に大きな違いが見られたが、これはそれぞれの原料として使われるパルプの違いによるものである。また、填料として紙に添加される無機化合物の量が灰分含有量に大きく影響している。葦はリグニンの含有量が約29%で最も多く、木材に匹敵する量であった。ビート滓はリグニン、灰分がともに5~7%程度で、コピー用紙を除いた中では最も少ない量であった。

2) WCミルによる摩砕では、試料により程度の差があるものの摩砕時間とともに非晶化が進行し、10分間の摩砕でいずれの試料もほぼ完全に非晶化できた。

3) 未処理試料の酵素糖化率は、48時間糖化でコピー用紙が最高の73.5%を示し、段ボール、白板紙、新聞紙はそれぞれ、38.8%、35.1%、31.5%でいずれも30%台だった。また、葦は12.9%で最も低く、ビート滓は34.6%だった。非晶化した試料の糖化率は摩砕時間とともに向上し、ほぼ完全

に非晶化した10分間摩砕物の48時間糖化では、コピー用紙が完全に糖化(水溶化)したのをはじめ、他の古紙でも未処理試料の2倍前後の72~66%、葦では約4倍の51.7%に達した。これらの値は、試料に含まれているリグニン、灰分含有量を考慮すると、糖化対象成分のほとんどが糖化(水溶化)されたことを示している。ビート滓は41%と、大きな向上が見られなかったが、この場合も糖化対象成分の大部分は糖化(水溶化)していると考えられる。したがって機械的非晶化は、酵素糖化前処理としていずれの試料にも非常に有効であることが確認できた。

4) グルコース収率についても糖化率と全く同様に、非晶化前処理により向上した。糖化(水溶化)した試料のうちグルコースを生成した割合は、試料により異なるが、古紙ではコピー用紙、新聞紙が70数%、段ボール、白板紙が60%であった。また、コピー用紙以外では、糖化初期にヘミセルロースの糖化が起こり、その後セルロースの糖化によるグルコースの増加が見られた。葦、ビート滓のグルコース収率も糖化率と同様に増加したが、ビート滓の場合、糖化(水溶化)した試料のうちグルコースとなったのは30%程度と低かった。これは、ビート滓のセルロース含有量が少ないためと考えらる。

参考文献

- 1) 総説として、“バイオマスエネルギーの特性とエネルギー変換・利用技術”，(株)NTS (2002)
- 2) Y. Shimizu, Y. Hukumori, M. Takai and J. Hayashi, SEN-I GAKKAISHI, 40, 9, pT-359 (1984)
- 3) M. Takai, Y. Shimizu, K. Tanno and J. Hayashi, Cell. Chem. Technol., 19, p217 (1985)
- 4) 越島哲夫，“セルロース資源”，学会出版センター，p79 (1991)
- 5) 高分子学会編，“高分子材料試験法Ⅱ(高分子実験学講座8)，共立出版，p162 (1961)
- 6) 遠藤俊二，清水祐一，澤内千智，苫小牧工業高等専門学校紀要，37, p151 (2002)

(平成14年11月29日受理)