

バイオ燃料を木材からナノテクで生産する

— セルロースの構造特性を利用した酵素糖化前処理技術 —

遠藤 貴士

現在、木質バイオマスを原料として、セルロース成分等を酵素加水分解して糖に変換した後、発酵してエタノールを製造する技術が注目されている。そのプロセスではセルロースの反応性を高める前処理が必要となる。粉碎処理は効果的な前処理技術の一つであるがコスト高が課題であった。近年我々は、経済的な粉碎前処理方法として湿式メカノケミカル処理技術を開発した。この技術ではセルロース成分をナノサイズの繊維にまでほぐしている。生成したナノ繊維は、セルロースの結晶性が保持され、さらにリグニンが残存しているにもかかわらず、高い酵素反応性を示した。我々が開発した前処理技術は、木材やセルロースが持つナノ構造の特徴を活用した方法である。

キーワード: バイオエタノール、酵素糖化、前処理、メカノケミカル処理、ナノファイバー

Bioethanol Production from woods with the aid of nanotechnology

– Pretreatment for enzymatic saccharification using natural structure of cellulose –

Takashi Endo

Bioethanol production from woody biomass by enzymatic hydrolysis of cellulosic components and fermentation has attracted much attention. In this process, pretreatment is important to improve enzymatic degradability of cellulose. A milling process is one of the most effective methods for pretreatment, but its high cost has been a problem. Recently we have developed the economically-feasible wet-mechanochemical process as milling pretreatment, which can unravel cellulosic components into nanoscale fibers. Thus-obtained nanofibrous product showed a high enzymatic accessibility, while keeping the cellulose crystalline structure and the lignin content. This process is based on the understanding of the nanoscopic structural characteristics of wood and cellulose.

Keywords: Bioethanol, enzymatic saccharification, pretreatment, mechanochemical treatment, nanofiber

1 はじめに

近年、地球温暖化対策やエネルギーセキュリティの観点から自動車用燃料としてのバイオエタノールに大きな関心が集まっている。アメリカやブラジルでは、年間 2,000 万キロリットル以上が生産されている。しかし、これらの原料は食料系バイオマスであるトウモロコシやサトウキビであるため、バイオエタノールの大規模生産により、競合する関連食料品や飼料の高騰が問題となっている。そのため、非食料系バイオマス（セルロース系バイオマス）である木材、稲ワラ、牧草等を原料にできる技術の確立が重要となってきた。セルロース系バイオマスはトウモロコシなどのデンプン系バイオマスと比較して、原料の生産からバイオエタノールの使用までのトータルの環境評価（LCA: Life Cycle Assessment）でも炭酸ガス削減効果が高いといわれている^[1]。

一般的にバイオエタノールは原料から得られた糖を酵母等で発酵することにより製造する。そのため、最初に木材中のセルロース等をグルコースにまで加水分解（糖化）す

る必要がある。現在は酵素糖化法が注目されているが、ここでは木材やセルロースの酵素反応性を向上させるための前処理が重要となっている。

粉碎処理は古くから酵素糖化のための前処理として高コストではあるが効果が高いことが知られている。そこで、新しい前処理技術を開発するにあたって、まず有効であることが判明している粉碎処理を再検証して、セルロース等の酵素糖化性が、どのような機構により向上するのかについて新しい分析手法も取り入れて明らかにした。次に、得られた知見に基づいて新技術の開発を進めた結果、新しいコンセプトに基づく効率的かつ経済的な前処理技術の構築を進めることができた。

2 木材・セルロースを知る

我々の開発した酵素糖化のための前処理技術は、木材やセルロースの構造的特徴を利用した方法である。そのためこの章では、本技術開発のプロセスで重要な視点となる木材やセルロースの組織構造についてその概要を述べる。

産業技術総合研究所 バイオマス研究センター 〒737-0197 呉市広末広 2-2-2
Biomass Technology Research Center, AIST 2-2-2 Suehiro, Hiro, Kure 737-0197, Japan E-mail: t-endo@aist.go.jp

Original manuscript received September 1, 2009, Revisions received October 13, 2009, Accepted October 14, 2009

2.1 セルロースの本質

木材の主要成分はセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンである。セルロースとヘミセルロースは分子が糖で構成されているが、リグニンは複雑な芳香族系化合物である。木材中ではセルロースがもっとも割合が多く、40～50%含まれている。セルロースはグルコースが鎖状に繋がった生体高分子であるが、木材におけるセルロースの本質は、セルロースマイクロフィブリルと呼ばれるセルロース分子の集合体である。セルロース分子は生合成されると直ぐに、分子の板を積み重ねるように規則正しく自己集合して、幅3～5 nmのセルロースマイクロフィブリルを形成する（図1右下）。このマイクロフィブリルがセルロース結晶の本体であり、非常に安定であるため水や一般的な有機溶媒には溶解しない。しかし、セルロース分子の集合力は一般的には弱いとされている水素結合と分子間力のみである。デンプンに含まれるアミロースは、構成糖がグルコースであるにもかかわらず、セルロースとは異なった化学的・物理的性質を持っており、熱水にも溶解する。そのため、アミラーゼによる酵素糖化も迅速に進行してバイオエタノールも容易に製造することができる。

2.2 木材組織はナノ構造体

木材では、図1右上に示すようにナノサイズの「セルロースマイクロフィブリル」がヘミセルロースやリグニンを接着剤のようにして集合してより大きな「木材繊維」を形成し、さらに水を運ぶ導管や仮導管を中心に層状に積層することにより「木材組織」（図1左上）が形成されている。木材の強靱さは、この層構造により発現している。そのイメージは樽や桶に例えられる。桶は円形に並べた縦方向の板の周囲を板とは90度異なった方向にタガが巻いてあることにより、

丈夫な道具となっている。木材組織ではナノサイズのセルロースマイクロフィブリルが桶の板やタガのように高度に積層したナノ構造体となっている。このような強靱な木材組織構造も酵素糖化のための前処理を困難なものにしている。

3 従来技術の課題と新技術開発のシナリオ

3.1 酸糖化と酵素糖化

木材中のセルロース等の糖化方法は、酸糖化法と酵素糖化法に大別される。図2にそれぞれの利点と課題を示した。最も古くから行われているのは硫酸を用いた酸糖化法であり、現在も新しい技術を取り入れた大規模なバイオエタノール製造試験が行われている。硫酸糖化の最大の長所は安価な硫酸を触媒として短時間で反応が進行することである。

しかし、設備は硫酸耐性にする必要があり、また、糖化液や廃液からの硫酸回収・除去も課題としてある。これらはエンジニアリング技術の進歩で解決可能であるが、最も問題となるのは、生成した糖が共存する硫酸により、さらにフルフラールなどに变化する過分解が原理的にも起こりやすいことである^[2]。過分解が起こると、エタノール発酵ができる糖の収量が減るとともに、過分解物は比較的少量（数%）でも酵母等の発酵阻害を引き起こす。

一方、酵素糖化では原理的に副反応が起きないため、最終製品であるエタノールの収率向上が期待できる。酵素反応は50℃程度の穏和な条件で進行し、また、大量の薬品を必要としないため環境負荷も低い。一般的に、セルロースの糖化に関連する酵素は総称してセルラーゼと呼ばれ、これまでに500種以上が見出されているが、種類によってセルロースの結晶性や構造により反応性が大きく影響を

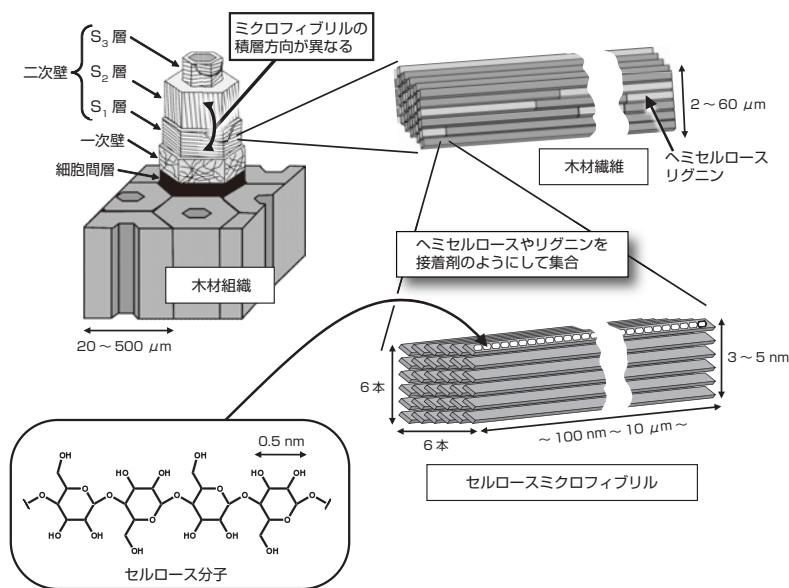


図1 セルロースマイクロフィブリルおよび木材組織の模式図

受ける。実際の酵素糖化は、単一の酵素ではなくヘミセルロースの糖化酵素も含めた複数の酵素の混合系が用いられている。

しかし、酵素糖化にも課題はある。酵素糖化反応は酸糖化と比べると極めて長時間を必要とする。また、セルラーゼは食品や繊維分野などで工業的にも利用されているが、現状はそれほど安価ではない。前述のようにセルロースの構造により酵素反応が影響を受け、大量の酵素を必要とする場合もある。

3.2 酵素糖化のための前処理技術

木材は未処理のままではほとんど酵素と反応しないため、酵素糖化を進行させるには、木材やセルロースの反応性を高める前処理が重要である。過去の研究開発などからまとめられた前処理の経験則は、木材の微細化による表面積増大、結晶性の高いセルロースの非晶化による反応性向上、酵素活性を阻害すると考えられる異質なリグニン成分の分解・除去が前処理のポイントとされてきた。これらに則った前処理技術としては、粉碎処理、蒸煮処理、爆砕処理などが知られている^[3]が、いずれの方法も課題がある（図2下段の表）。粉碎処理では、ボールミルなどの粉碎機が用いられ、操作も単純で前処理物の酵素糖化性も高い。しかし、電力消費が大きく、また、多くの場合バッチ処理であるために処理効率が低くコスト高になる課題があった。蒸煮処理は、薬品と水を用いて木材中のリグニンやヘミセルロースを分解・除去する方法であり、製紙におけるパルプ化方法と類似である。処理物の糖化性は高いが、廃液処理や樹種への依存性が課題としてあった。

爆砕処理は、原料を高温高压の蒸気中に一定時間保持した後、一気に大気圧に開放して、蒸気の急激な体積増大により木材を繊維状にほぐす方法であるが、高耐圧の設備や熱回収、樹種への依存性が課題となっていた。近年は、100℃以上の加圧熱水を用いる水熱処理も注目されている。この方法は、加圧熱水の加水分解作用を利用しているが、200℃以上の高温では、酸糖化と同様の過分解が起こりやすい。

そこで我々は、単純な操作であるが効果の高い粉碎処理について再実験を行い、木材化学やセルロース化学の観点から糖化性の向上機構について解析・評価を行った。さらに、得られた知見を基にして複数の技術を組み合わせることによって、最適な前処理技術の開発を目指した。

4 メカノケミカル処理技術

我々はこれまで、粉碎時の生成粒子の凝集を抑制（水素結合の形成抑制）してパルプ等のセルロース系物質を微粒子化する技術やパルプや木粉を樹脂と複合化する技術について研究開発を行ってきた^{[4]-[7]}。粉碎処理により物質が微細になっていく過程では、かならず化学結合の切断などの反応が起こっている。また、粉碎時の圧力やせん断力は結合を形成させて新物質を合成することもできる。このように、粉碎処理は機械的処理で化学的反応を起こすことから、メカノケミカル処理ともいわれている。我々は水素結合や疎水結合（分子間力）等の弱い結合までを広く含めた結合の形成や切断をメカノケミカル処理と捉えている。メカノケミカル処理は、元々無機物や金属の複合化やアロイ化技

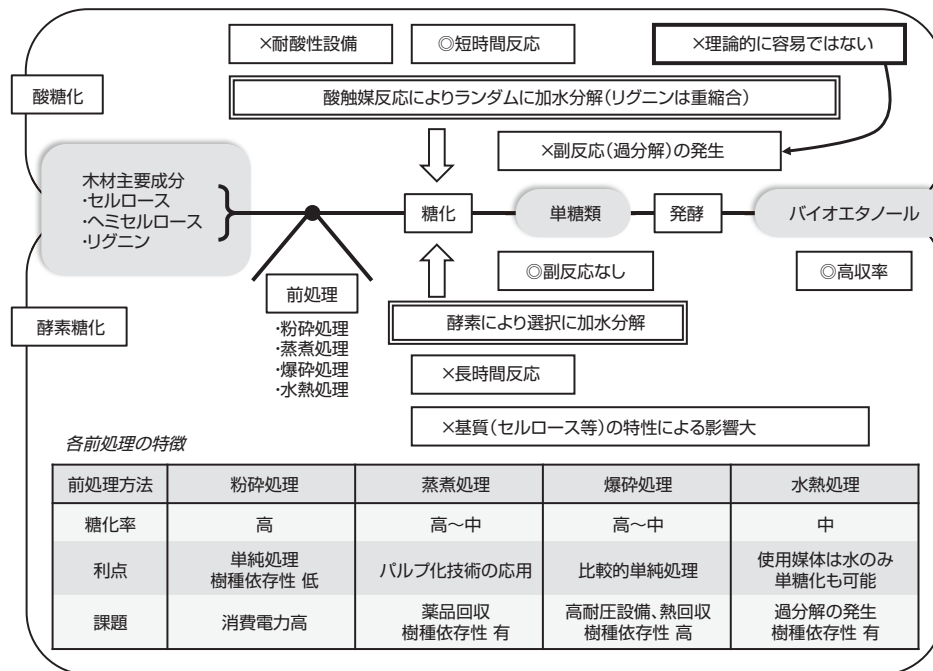


図2 酸糖化法および酵素糖化法の特徴

術として発展している。有機物についても、エステル化反応などの共有結合形成を起こすことができる。ただし、粉碎で起こる物質の変化には「しきい値」があり、化学反応を起こせるだけの粉碎エネルギーが印加されなければ、長時間粉碎しても微細化や複合化は進行しない。

これまで述べてきたように、前処理方法の中でメカノケミカル処理は比較的単純な機械的処理であるが、古くからセルロース等の酵素糖化性を大きく向上させることが知られている^[8]。そのポイントとしては、木材等を乾式でボールミルなどを用いて十分に粉碎し、微細な木粉を製造するとともにセルロースの結晶構造を破壊（非晶化）することが重要とされてきた。

このようなメカノケミカル処理による糖化性向上機構についてサイズの観点から考えると次のようになる。セルラーゼによるセルロースの糖化反応は、長さ1 nm 以下のグルコース同士の間での結合が、タンパク質であるセルラーゼの活性部位によって切断されることであるが、最初のステップとしてセルラーゼはセルロースに吸着する必要がある。つまり、セルロースの本質はマイクロフィブリルであるため、セルラーゼは最初にマイクロフィブリルに吸着することになる。セルラーゼは球に換算すれば5 nm 程度であるが、乾式粉碎によって得られる木粉は遙かに大きい。一般的な乾式メカノケミカル処理で得られる木粉は、処理条件を最適化しても10 μm 程度であり、長時間処理してもサブミクロンあるいはナノサイズの木粉はほとんど生成しない^[9]。この理由は、メカノケミカル処理により木材が微細になると同時に生成した粒子の凝集が起こるためであり、原料などによっ

ては逆に粒子径が大きくなる場合もある。

もう一つのサイズの観点としてセルロースの結晶性がある。その評価は粉末 X 線回折により行われる場合が多いが、前項 2.1 で述べたようにセルロースの結晶本体はマイクロフィブリルであるため、セルロースの非晶化は、3 ~ 5 nm 以下の領域での長さ1 nm 以下の水素結合の乱れを見ているに過ぎない。セルロースの結晶から非晶への変化はセルラーゼのサイズから見ると、より小さい領域の変化である。セルロースの酵素糖化については、これまで多くの報告がなされているが、セルロースとセルラーゼのサイズの観点からの反応機構については明確にされていなかった。

図 3 に従来から行われている前処理技術のポイントをサイズの観点からまとめた。これまでの認識では、図に示すように数10 μm レベルでの木材組織の破壊や繊維化、ヘミセルロースやリグニンの分解・除去による組成変化およびナノレベルでの結晶性の変化などが重要とされてきた。しかし、酵素糖化反応の最初の段階（セルラーゼのセルロースマイクロフィブリルへの吸着）である数 nm の領域での議論はほとんどなされておらず、マイクロフィブリルからの視点は希薄であった。

以上のことから、メカノケミカル処理によって、木材の酵素糖化性が向上する要因について、マイクロフィブリルレベルからの解析を含めて種々の観点から詳細に分析すれば、最適な前処理技術を構築するための指針が得られると考えられた。

4.1 古典技術の再検証

木材のメカノケミカル処理については遊星型ボールミルを

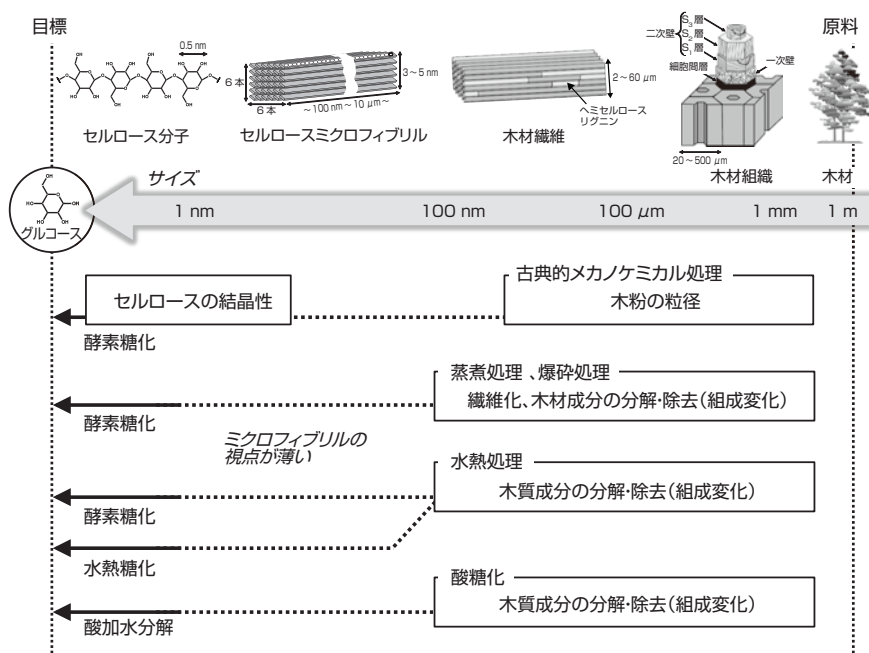


図 3 酵素糖化のための前処理技術（従来技術）のサイズイメージ

用いて基盤的な実験を行い、生成物の物性と糖化性の関係について調べた^[10]。まず、粗粉碎した広葉樹木粉(ユーカリ、 $<0.2\text{ mm}$)を原料としてメカノケミカル処理を行った結果、原料木粉の微細化は進行したが1時間以上粉碎しても生成物の平均粒径は $20\text{ }\mu\text{m}$ 程度から変化しなくなった。このことは、微細化と生成粒子の凝集による平衡値が $20\text{ }\mu\text{m}$ 程度ということを示している。得られた生成物の酵素糖化性を調べたところ、未処理原料は 0.2 mm 以下の微細な粉末にもかかわらず、その糖化性は極めて低かった。しかし、メカノケミカル処理時間が長くなるのに従って糖化性は向上し、粒径の変化がなくなった1時間以降も処理時間とともに糖化性は向上した。4時間後では、その糖化性は原料と比較して20倍以上となった。針葉樹である米松についても同様の傾向であった。しかし、比較実験として精製木材パルプ(繊維状、幅 $20\text{ }\mu\text{m}$ -長さ $200\text{ }\mu\text{m}$ 程度)を原料としてメカノケミカル処理を行ったところ、結果には大きな違いがみられた。パルプの場合、未処理試料でも糖化性は高く、メカノケミカル処理の効果はわずかであった(図4)。これらのことから、試料サイズのみから酵素糖化性は評価できないことが分かった。

次にX線回折によりセルロースの結晶性と糖化性との関連について調べた。その結果、木材の場合、メカノケミカル処理とともに結晶性は急激に低下したが、糖化性はゆるやかに上昇した。一方、パルプの場合、原料は高結晶性にもかかわらず糖化性は高く、木材と同様にメカノケミカル処

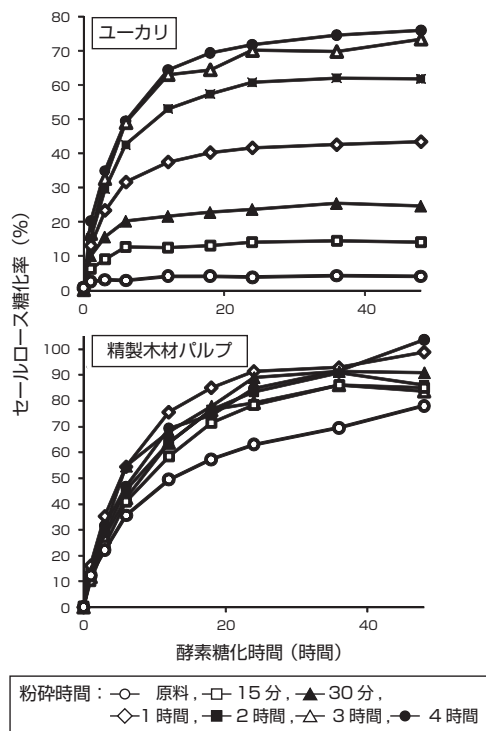


図4 粉碎時間による酵素糖化率の変化

理により結晶性は急激に低下したが、結晶性と糖化性との関連性は低かった(図5)。ユーカリなどの木材を原料として行ったメカノケミカル処理試験の結果は、従来からいわれているセルロースの非晶化が酵素糖化のために重要という認識と大きな矛盾はない。しかし、パルプを原料とした場合は、高結晶性試料でも高糖化性であり、矛盾している。メカノケミカル処理により非晶化したセルロースをさらに長時間処理すると、非晶にもかかわらず次第に酵素糖化性が低下してくる現象も従来から知られている。

以上のことから、メカノケミカル処理による生成物の粒径やセルロースの結晶性のみからでは酵素糖化性を十分に説明できないことが示された。上記の実験では、メカノケミカル処理物の精製等を行わずに酵素糖化試験を行っているが、酵素糖化性は高い。つまり、酵素反応を阻害するといわれているリグニンなどの木材成分がそのまま残存した状態でも酵素糖化は進行している。さらに他の実験から、メカノケミカル処理後もリグニン成分は未処理の木材中の構造と同様の高分子量体であることも分かった。また、固体NMR(核磁気共鳴)測定や赤外分光分析測定から、メカノケミカル処理では酸化などによる木材成分の変質もほとんど起こっていないことも確認された。

4.2 高分子化学のテクニックを応用

前述の実験結果は、従来技術の経験則である木材の微細化、セルロースの非晶化、リグニンの分離が木材の酵素糖化性を向上させるための重要ポイントではないということを示したものであることから、新しい視点からの解析が必要となった。

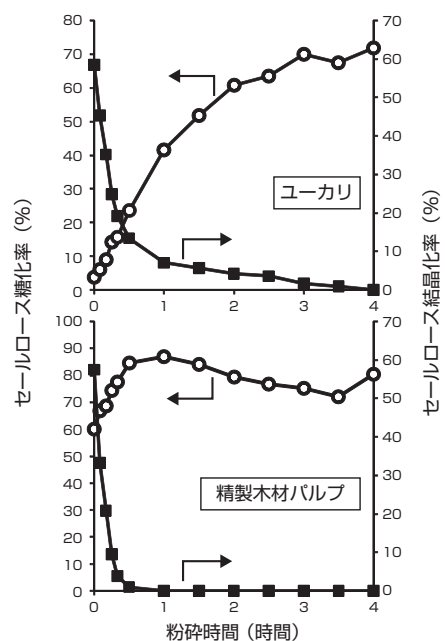


図5 結晶化度と酵素糖化率の関係

NMRは有機化学分野では分子構造解析装置として活躍しているが、高分子分野では固体NMRを用いた緩和時間測定により複合体における分子同士の混合の程度や分子の凝集サイズ（ドメインサイズ）の評価が行われている。緩和時間測定とは、ある物質にNMR装置によりパルス信号を照射し、その信号がどのようなスピードで減衰するかを調べる方法である。物質の集合体（ドメイン）が大きければパルス信号は遠くまで長い時間をかけて伝搬していく。ドメインサイズが小さければパルス信号は早く減衰する。また、異なる物質が分子レベルで混合して同じ環境に置かれている場合には、異なる物質でも同じ緩和時間をもつようになる。このような手法をメカノケミカル処理物の評価に用いた結果を次に示す。

固体NMR測定は酵素糖化反応と類似の湿潤条件で行い、セルロース分子等がもっている水素原子の緩和時間 (T_{1H}) を計測した。その結果、メカノケミカル処理とともに緩和時間は減少（セルロースのような高分子物質では分子運動性が向上）し、最も糖化性が高くなった4時間粉碎後では0.05秒になった（図6）。この値からドメインサイズを計算すると5.5 nmとなる^[11]。つまり、木材はメカノケミカル処理により見かけ上20 μ m程度の本粉になっているが、その本粉は実際にはさらに微細な5 nm程度のドメインから構成されていることになる。この5 nmというサイズは、セルロースマイクロフィブリルの幅と類似していたことから、メカノケミカル処理によってマイクロフィブリルが互いに分離し、酵素が吸着できる表面積が増大したことが、酵素糖化促進のために重要な要因であると推測された。以後の研究ではこの作業仮説に基づいて酵素糖化に有効なメカノケミカル処理を解明しつつ、新規な前処理手法を開発した。メカノケミカル処理によってセルロースは非晶化するが、実際にはマイクロフィブリルのようなセルロース分子の配列は残っていると考えられている^[12]。このフィブリルの

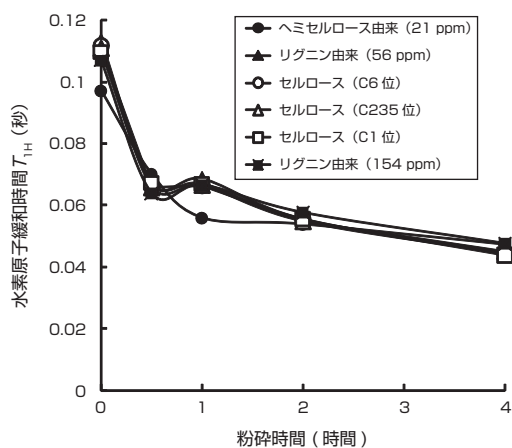


図6 粉碎時間による緩和時間 T_{1H} の変化（括弧内はNMRでの各木材成分の帰属）

分離というサイズレベルからみると、セルロースの結晶性はさらに下のレベルのこととなり、高結晶性か非晶かという問題は特に重要ではなくなる。

5 ミクロフィブリル化処理

セルロースの酵素糖化反応は、固体状のセルロースと水に溶けた酵素との固液反応である。一般的に、固液反応を効率的に進めようとするれば、固体を微細にし、液体との接触面積を大きくすればよい。木材中でマイクロフィブリルはセルロースの固体としての最小集合単位である。もし、セルロースを溶かして分子1本単位で分離できれば、酵素糖化はスムーズに進行すると考えられるが、セルロースを溶解できる溶剤中では酵素は容易に失活してしまう。

そこで前項の固体NMR測定により得られた結果を基にした作業仮説を確かめるため、実際に木材を微細な繊維であるマイクロフィブリルにほぐす方法について検討した。製紙技術では、紙の強度を増すために、パルプの水分散スラリーに機械的にせん断力を加えて繊維を毛羽立たせる叩解（こうかい）という処理が行われる。このプロセスではせん断力により水がパルプ繊維の微細な隙間に入り込みクサビのように作用して繊維をほぐすとともに周囲の水は毛羽立った微細な繊維の凝集を抑制している。このような叩解プロセスと類似の方法を用いれば木材をマイクロフィブリルにほぐすことができると考えられた。そこで、基盤実験として木粉を重量比で20倍量の水に分散させてボールミルを用いて湿式メカノケミカル処理したところ、粘性の高いクリーム状の生成物が得られた。生成物を乾燥して電子顕微鏡で観察したところ、マイクロフィブリル化が進行しており、100 nm以下、細い部分では20 nm程度の微細な繊維が生成していた（図7）。X線回折によりセルロースの結晶性を調べたところ、原料とほぼ同一の結晶性が保持されていることが分かった。マイクロフィブリルそのものがセルロース

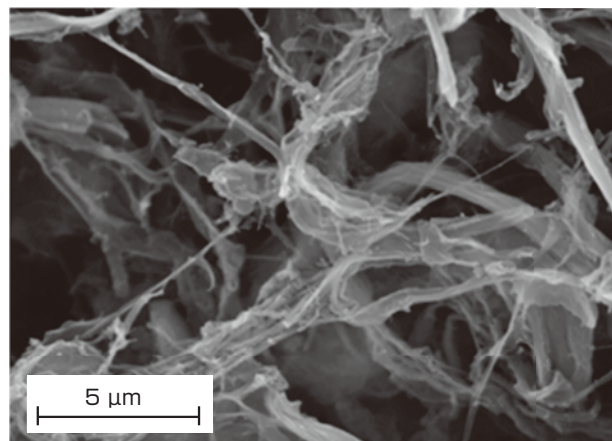


図7 湿式メカノケミカル処理物の電子顕微鏡写真

の結晶本体であるため、結晶性の保持はマイクロフィブリルがあまり損傷を受けることなくほぐれたことを示している。この湿式メカノケミカル処理物（マイクロフィブリル化物）は高結晶性であるが糖化率は70%以上あった。この結果は、酵素糖化性を向上させるためには、セルロースの結晶性を低下させることが重要なのではなく、マイクロフィブリルをお互いに分離することにより、酵素が反応できる表面積を増大することが重要ということを示している。また、この湿式処理物は固形分濃度が5%程度にもかかわらず、比重が1.5のセルロースマイクロフィブリルは、その周囲に水分子を保持して沈殿することなく分散している。そのためマイクロフィブリルの周囲には酵素が自由に活動できる空間も形成されていることになる。湿式処理が不十分で糖化率が低い試料では、糖化試験後の主な残渣は大きな繊維組織であったことから、木材を十分にマイクロフィブリル化すれば酵素糖化性を大きく向上できることが分かった。

以上のように、マイクロフィブリルの分離が酵素糖化に効果的であるという固体NMRに基づく作業仮説を、湿式メカノケミカル処理によって実際に木材をマイクロフィブリル化することにより証明することができた。この前処理では、セルロースの結晶性は重要ではない。前章4.1で、精製木材パルプは高結晶性にもかかわらず、酵素糖化性は高かったが、この場合、ヘミセルロースやリグニンを分解・除去する精製過程で、マイクロフィブリルはお互いに分離して、酵素が接近して反応できる面積が大きくなっていったものと考えられる。木材組織はマイクロフィブリルの集合体であり、その集合力は水素結合などの弱い結合のみである。そのため、湿式メカノケミカル処理により水分子をクサビのように利用して、集合力の元であるマイクロフィブリル間の水素結合を切断すれば、構成単位であるマイクロフィブリルに容易にほぐすことができる。この方法は木材化学的な観点からも無理がない。

6 実用化を目指したマイクロフィブリル化技術

6.1 連続・大量処理方法の検討

マイクロフィブリル化処理として基盤実験で用いたボールミルは少量の試料でも実験が可能であるが、バッチ処理であり大型化・低コスト化の点では実際的ではない。そこで、ボールミルのように湿式で原料にせん断力や圧力を印加できる処理方法を検討した結果、石臼と同様の粉碎機構を持つディスクミルを用いることにより連続・大量生産が可能と考えられた。

ディスクミル（増幸産業（株）スーパーマスコロイダー）を用いて木粉スラリー（木粉濃度5 wt%）を繰り返し粉碎処理したところ、ボールミルの場合と同様にマイクロフィブリル

化が進行し、生成物の酵素糖化性も大きく向上することが分かった。ディスクミル処理では上下のディスクを10 μm程度まで接近させて行ったが、処理効率はボールミルの10～20倍以上あった。しかし、ディスクミルでは、ボールミルでは顕著でなかった樹種への依存性が現れ、針葉樹と比較して広葉樹ではマイクロフィブリル化が十分に進行せず糖化性が向上しない場合があった。これはボールミルと比較してディスクミルでは、粉碎エネルギーが小さいためと考えられた。そこで、ディスクミル処理前に木材組織を脆弱化させる処理が必要と考えられた。

6.2 木材組織を脆弱化させる複合処理

木材の強度発現は、前述のようにその強固な積層構造にある。マイクロフィブリルは水素結合などの弱い結合で集合しているが、桶のような積層構造のためにマイクロフィブリル単位への分離は容易ではない。そこで、最初に桶のタガに相当するような組織を破壊し、内部への水の浸透性を向上させ、さらにマイクロフィブリル同士を接着しているヘミセルロースを取り除けば、木材組織は脆弱化して効果的にディスクミル処理が進行すると考えられた。

タガに相当する組織の破壊方法については、ボールミルを用いて予備検討した。実験は原料木粉を一定時間乾式メカノケミカル処理した後、水を添加して湿式メカノケミカル処理を行い、生成物のマイクロフィブリル化および糖化性を調べた。その結果、乾式メカノケミカル処理が15分以下の場合には特に大きな変化はみられなかったが、20分以上乾式処理を行った後に得られた湿式処理物では糖化性が著しく向上した。乾式メカノケミカル処理後の生成物を電子顕微鏡観察した結果、20分間の乾式メカノケミカル処理により、原料木粉の大きな木材組織はほとんど破壊されることが分かった。タガ相当の組織の破壊方法としてボールミル処理は実際的ではないため、比較的粉碎エネルギーが大きく大量処理が可能な方法について検討した結果、湿式カッターミルが効果的であることが分かった。我々が採用した湿式カッターミル（増幸産業（株）ミクロマイスター）は、1万rpm以上の超高速で回転するローター刃と固定刃による強いせん断力で、水に分散させた原料を1 mm以下に瞬時に微細化できる。この場合、水は粉砕物を流動化させて滞留を防止し、効率的に微細化を進行させる。また、処理中に水が木材組織内に浸透することにより、後段のオートクレーブ処理やディスクミル処理にも効果的に作用する。

次に、ヘミセルロースの接着剤効果を減少させる方法としては、オートクレーブを用いた水熱処理により行うこととした。水熱処理では、温度条件によりヘミセルロース成分を選択的に加水分解できる^[13]。これら湿式カッターミル

処理とオートクレーブ処理を組み合わせた複合処理方法について検討した結果、粗粉碎した原料木粉を湿式カッターミル処理（1 mm 以下）した後、オートクレーブ処理（135℃）を行い、最終段階としてディスクミル処理を行うことにより、樹種によらず効率的に前処理できることが分かった。3 mm 以下に粗粉碎したユーカリ原料を複合処理した場合の糖化率は、原料としてより微細な 0.25 mm の木粉をディスクミル単独で処理した場合と比較しても 4 倍以上になり、長時間の乾式ボールミル粉碎と同程度の糖化性を発揮させることができた（図 8）。

6.3 複合湿式メカノケミカル処理による酵素糖化性向上機構

前述の複合湿式メカノケミカル処理で酵素糖化性が向上する機構は次のように考えられる（図 9）。木材の細胞組織

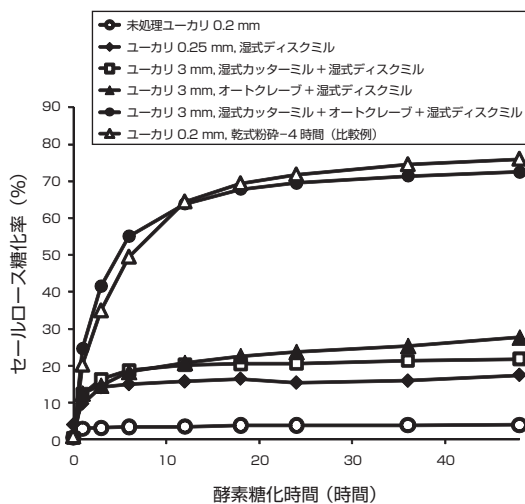


図 8 複合処理によるディスクミル処理の効率化

は 20-500 μm であるが、湿式カッターミルによる強いせん断力で木材組織は破壊され、タガに相当するマイクロフィブリルも部分的に切断される。次いでオートクレーブ処理によりマイクロフィブリル同士を接着しているヘミセルロースは部分的に加水分解（分解量は全ヘミセルロースの数%）される。オートクレーブ処理物を電子顕微鏡により高倍率で観察するとヘミセルロースが脱離したと考えられる数 10 nm の細孔が多数観察された。これらのステップを経て木材組織は脆弱になっているため最終段階のディスクミルにより容易にマイクロフィブリルにほぐすことができ、酵素糖化性も大きく向上したと考えられる。

以上はセルロース成分の酵素糖化性向上機構を中心に述べたが、バイオエタノール製造では、発酵原料としての糖の収量を増大させるためヘミセルロースの糖化も重要である。木材組織中でヘミセルロースはセルロースマイクロフィブリルの表面を覆うように存在しているため、我々が開発したマイクロフィブリルをお互いに分離する前処理プロセスでは、セルロースとともに、ヘミセルロースの糖化も容易に進行する。また、我々の前処理では過激な化学反応は起こっていないため、前処理後もリグニンが未処理の木材中の構造から大きく変化はしていない。酵素糖化後には、そのまま残渣として残ることになる。

7 メカノケミカル処理の利点

7.1 酵素糖化の低コスト化

前述のようにディスクミル処理は、処理効率が高く比較的 low cost 処理ではあるが、単純な熱処理と比較するとモーター等の駆動電力は回収も再利用できないため、劇的

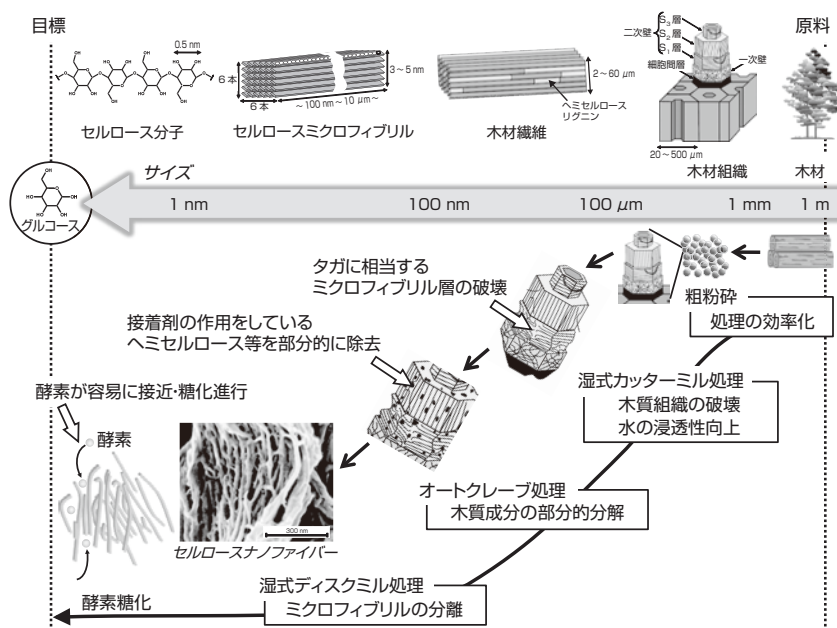


図 9 複合湿式メカノケミカル処理のサイズイメージ

な低コスト化は困難である。しかし、メカノケミカル処理ではバイオエタノール製造での他の工程のコストを大きく低減できる利点もある。メカノケミカル処理物は脱リグニンなどの化学的処理を行わなくても酵素糖化や発酵が高効率で進行する。また、原料への依存性も低く、広葉樹や針葉樹あるいは稲ワラ等の前処理として適応可能である。最も大きな利点は、バイオエタノール製造コスト中、場合により半分以上を占めるといわれるセルラーゼ等の酵素コストを低減できることにある。メカノケミカル処理物は比較的少量の酵素でも十分に糖化できる。図10に、異なる前処理による生成物について酵素添加量と糖化率の関係について示した^[14]。メカノケミカル処理と比較して、200℃の高温水熱処理では酵素量が少ない場合に大きく糖化率が低下する。この現象は、高温水熱処理の場合に木材成分の変性などにより、阻害物質が生成したためと考えられる。酸処理も水熱処理と類似反応のため同様の結果になると考えられる。比較的低温（160℃）の処理では、メカノケミカル処理時間を短縮できる効果もあるうえ、少量の酵素でも糖化は進行する。

7.2 従来技術との比較

我々の開発した酵素糖化のための前処理プロセスの特徴を従来技術（図2下段の表）と比較すると次のようになる。処理物の糖化率は古典的メカノケミカル処理と同程度に高い。利点としては、薬品を用いた化学処理のような高度な反応制御が必要なく、また、処理に用いるのは水のみであるため、薬品回収も必要なく廃液処理も容易である。同一の処理量で比較すると消費電力は従来型のボールミル処理の10から20分の1以下である。オートクレーブ処理も高温高圧処理ではないため消費エネルギーも低く、装置も高耐圧にする必要もない。前述のように、原料バイオマス種への依存性も低い。また、我々が開発した前処理プロセス

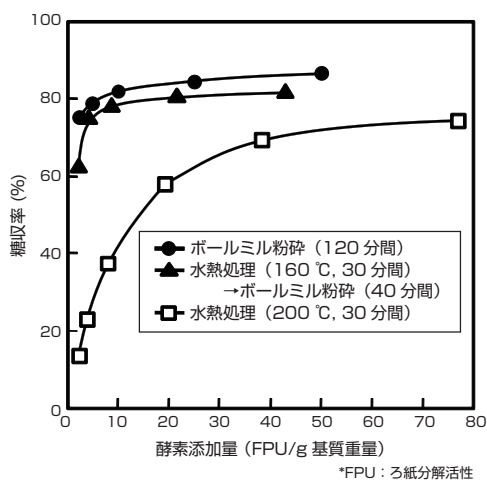


図10 前処理の違いによる酵素添加量と糖化性の関係

は湿式処理が基本であり、原料の乾燥等は必要なく、含水量の多い生原料でもそのまま用いることができる。濃硫酸糖化などでは、硫酸の希釈による発熱を防ぐために原料の乾燥が必要となる場合があり効率が悪い。

以上のように我々の開発した前処理プロセスは、従来技術が持っていた種々の課題を克服できるとともに、それらの利点も損なうことなく応用展開している。新たに発生した課題としては、本研究開発で用いた湿式カッターミルやディスクミルが比較的精密な粉碎機であるため、そのまま大型化するのが容易ではないことが挙げられる。しかし、我々の前処理プロセスは、製紙における機械パルプ化技術と類似点も多いため、製紙技術を応用・発展させることによる大規模化・実用化は進めやすいと考えられる。

8 まとめと今後の展開

産総研では、我々が開発した前処理プロセスと、これまで研究開発を進めてきた糖化・発酵プロセスを組み入れたバイオエタノールの一貫製造ミニプラント（1回200kgの多種多様なバイオマスが処理可能）を建設した。ここでは、各要素技術やプロセスの連続化における課題抽出、バイオマス種による課題、経済性評価等を実施している。現在、大規模プロセスによる商業化を目指して企業とともに研究開発を進めているが、そのプロセスでは製紙技術を取り入れている。

バイオエタノール製造技術の実用化では、残渣や副産物の高付加価値化も重要である。木材を前処理して得られるマイクロファイブリル化物は、ナノサイズの微細繊維であるためセルロースナノファイバーとも呼ばれている。同サイズの鋼鉄と比較すると5分の1の軽さで強度は5倍とされている。現在、この特性を生かした軽量高強度材料の開発が進められている^[15]。また、光学材料や化粧品への応用も研究されている。その他、濾過材や食品添加物としては以前より一部実用化もされている。また、我々の開発した前処理では、木材成分の大きな分子構造の変化などは起きない。そのため酵素糖化後のリグニン残渣は、製紙工程で排出される黒液（リグニン分解物）とは異なり、木材中と同様の構造や高い分子量を保持していると考えられる。そのため、このリグニン残渣は従来型の燃料としての利用以外に、黒液リグニンなどでは不可能であった高分子材料への転換や高付加価値素材としての活用も大いに期待できる。以上のことからセルロースナノファイバー製造を共通基盤プロセスとしてバイオエタノール（主）と高付加価値材料（副）の併産を行えば、極めて高い経済性を発揮させられると考えられる。

図11に我々の前処理技術開発の流れをまとめた。従来

技術を調査した結果、実用化できる前処理技術の開発には、対象としている木材についての木材化学やセルロース化学からの視点が重要であることが分かった。さらに高分子化学や製紙など他分野の知見や技術を組み合わせることにより、新しいコンセプトに基づいた前処理技術の構築を進めることができた。しかし、前処理により得られるセルロースナノファイバーについては、その特性や酵素の反応機構など未解明の部分が多く、先端的分析技術も必要としている。今後、バイオ技術、化学工学や熱工学、LCA 評価、さらには社会科学の分野など多分野の技術や知見の融合が進み、実際のバイオ燃料技術が確立されることが期待される。

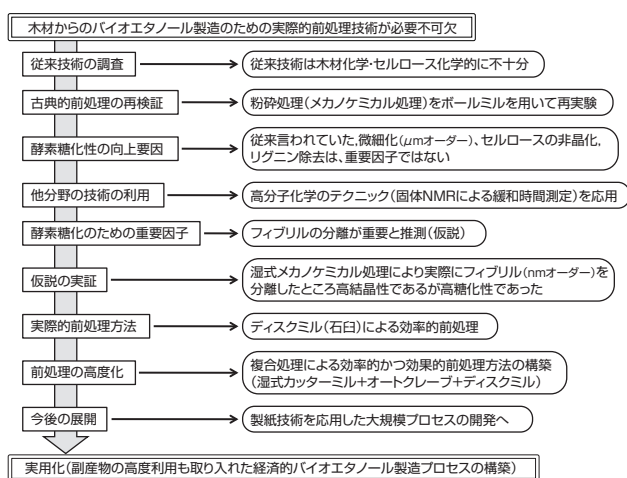


図 11 前処理技術開発の流れ

参考文献

[1] A. E. Farrell, R. J. Plevin, B. T. Turner, A. D. Jones, M. O'Hare and D. M. Kammen: Ethanol can contribute to energy and environmental goals, *Science*, 311, 506-508 (2006).

[2] J. F. Saeman: Kinetics of wood saccharification-Hydrolysis of cellulose and decomposition of sugars in dilute acid at high temperature, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 37, 43-52 (1945).

[3] 志水一充: セルロース系物質の酵素加水分解, *機能性セルロース*, 195-229, シーエムシー出版, 東京 (1985).

[4] 遠藤貴士: メカノケミカル反応による新規セルロース系複合材料, *Cellu. Commun. (セルロース学会機関誌)*, 7 (2), 63-66 (2000).

[5] 遠藤貴士, 張 発饒, 篠原由寛: 成形材料としてのセルロース, *Cellu. Commun. (セルロース学会機関誌)*, 9 (2), 86-92 (2002).

[6] 遠藤貴士, 吾郷万里子: メカノケミカル処理によるセルロースの構造変化, *Cellu. Commun. (セルロース学会機関誌)*, 11 (2), 74-78 (2004).

[7] 遠藤貴士, 磯貝 明監修: 微粉砕化セルロースとプラスチックの複合化, *セルロース利用技術の最先端*, 298-309, シーエムシー出版, 東京 (2008).

[8] R. Tanaka, F. Yaku, E. Murai and T. Koshijima: Enzymatic degradation on finely divided wood meal of *Pinus densiflora*, *Cell. Chem. Technol.*, 14, 859-868 (1980).

[9] 遠藤貴士, 北川良一, 細川純: 機械的粉砕によるセルロース繊維の微粒子形成挙動, *高分子論文集*, 56 (3), 166-173 (1999).

[10] 藤本真司, 井上宏之, 矢野伸一, 坂本 剛, 美濃輪智朗, 遠藤貴士, 澤山茂樹, 坂西欣也: リグノセルロース系バイオマスからの非硫酸バイオエタノール製造法の開発ーメカノケミカル前処理・酵素糖化法ー, *石油学会誌*, 51 (5), 264-273 (2008).

[11] D. Ishii, D. Tatsumi and T. Matsumoto: Effect of solvent exchange on the solid structure and dissolution behavior of cellulose, *Biomacromol.*, 4, 1238-1243 (2003).

[12] M. Ago, T. Endo and T. Hirotsu: Crystalline transformation of native cellulose from cellulose I to cellulose II polymorph by a ball-milling method with a specific amount of water, *Cellulose*, 11 (2), 163-167 (2004).

[13] H. Ando, T. Sasaki, T. Kokusho, M. Shibata, Y. Uemura and Y. Hatate: Decomposition behavior of plant biomass in hot-compressed water, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 39 (10), 3688-3693 (2000).

[14] H. Inoue, S. Yano, T. Endo, T. Sakaki and S. Sawayama: Combining hot-compressed water and ball milling pretreatments to improve the efficiency of the enzymatic hydrolysis of eucalyptus, *Biotechnol. Biofuels* 1:2 1-9 (2008).

[15] 矢野浩之, 磯貝 明監修: セルロースナノファイバー複合材料, *セルロース利用技術の最先端*, 258-269, シーエムシー出版, 東京 (2008).

執筆者略歴

遠藤 貴士 (えんどう たかし)

1992年広島大学大学院理学研究科化学専攻博士課程修了(博士(理学))。同年4月工業技術院四国工業技術試験所入所。以来現在まで、粉砕技術を用いたセルロースや木材の微細化や高付加価値化技術の開発を行う。2003年までは主に材料分野、2004年に現職場に異動後はバイオエタノール関連の研究開発に従事。2006年よりバイオマス研究センター研究チーム長、現在に至る。本論文は、入所以来研究してきたセルロースの粉砕に関する成果の一部をまとめたものである。



査読者との議論

議論1 従来法(蒸煮法、爆砕法、水熱法)と比較した利点

質問(水野 光一:産業技術総合研究所環境管理技術研究部門) 酵素糖化に限定した場合、木材からエタノールへの転化プロセス全体の中で、今回開発した湿式カッターミル/オートクレープ処理/湿式ディスクミルの組み合わせは他の従来法(蒸煮法、爆砕法、水熱法)と比較した図2が示されています。これについて、利点や長所がどの程度進展し、また欠点や課題をどの程度克服したことになるのかを定量的または定性的に示して下さい。

回答(遠藤 貴士)

我々が開発した複合処理の長所は、低環境負荷で樹種によらず糖化性の高い前処理物が得られることにあります。従来技術であるボールミル粉砕と比較して消費エネルギーは10から20分の1以下です。また、我々の方法による前処理物は少量の酵素でも糖化が進行するため、酵素コストも低減できます。原料には伐採直後の水分含有量の高い木材も利用することができ、薬品等を大量に使用することもないため、将来的には原料が採取できる現地(東南アジア等も想定されます)での商業的バイオエタノール製造も可能性が高いと思っています。

ます。私の所属するバイオマス研究センターには経済性を専門に評価する研究チームがあります。このチームにおいて我々が実際に実験室で行った前処理プロセスと酵素糖化・発酵プロセスのデータを用いて、大規模商業化レベル（原料1,500トン/日）での経済性試算を行った結果では、従来最も低コストとされてきたNEDO濃硫酸法（他の方法は確度の高い経済性試算のデータが十分には公開されていません）よりも最終製品であるバイオエタノールを低価格化できる可能性が示されています。複合処理は多段処理であるため、設備はコスト高になるように思われますが、実際には濃硫酸法と同程度の設備償却費にすることができます。例えば、我々の前処理には水熱処理工程がありますが、温度は150℃（0.48 MPa）程度で十分であり、高圧ガス保安法の厳しい規制（1 MPa以上）も受けないため、実プラントを設備した際の維持管理も容易になります。今後、さらにプロセスを最適化すると共に、低コストで環境負荷が小さく、後段の糖化発酵等にも影響しない薬品等の使用による効率化についても検討する予定です。

議論2 バイオマスの総合的な利用

質問・コメント（水野 光一）

本研究では木材を出発原料として、セルロースやヘミセルロースが酵素糖化を経てエタノールへの発酵が示される一方で、リグニンから

高分子などの材料製造の道筋が示されました。これは、原油に代わるバイオマスリファイナリーの概念につながるものです。今後、バイオマスの利用を総合的に発展させるためには、どのような研究開発を進めることが最も有効であるかという考え方をお教えください。

回答（遠藤 貴士）

リグニンの利用技術については長い研究の歴史がありますが、決定的な技術や製品は未だに現れていません。しかし、本技術のようなバイオエタノール製造が商業化されると、従来の製紙プロセスとは異なる新しいリグニンが大量に生み出されることになります。現在の石油化学製品を見た場合、原油はアスファルトからガソリン、プラスチックまで無駄なく使用されています。これからのバイオマスリファイナリーにおいても、木材成分を無駄なく利用できる技術の開発やそれを受け入れられる社会システムの構築が大切だと思っています。それらを達成するためには、石油製品の代替ではない、バイオマス系のみで実現可能な特徴的な製品群の創成を目指すことも大切と思っています。そのためには、前処理により得られるセルロースナノファイバーや残渣リグニンの基本的な特性を機器分析等も駆使することによって正確に把握し、得られた知見や既に解明されている理論や原則に基づいて、革新的な製品化技術の確立を目指すことが重要だと思っています。