Original Paper

Alkaline-peroxide Treatment for Enzymatic Hydrolysis
of Japanese Cypress (*Chamaecyparis obtusa*)Akihiro HIDENO^{*1}, Ayato KAWASHIMA^{*2}, Masatoshi MORITA^{*2},
Katsuhisa HONDA^{*2}, Takashi ENDO^{*3}

(Received March 5, 2013)

ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) 酵素糖化のためのアルカリ - 過酸化水素法の検討秀野晃大^{*1}, 川嶋文人^{*2}, 森田昌敏^{*2}, 本田克久^{*2}, 遠藤貴士^{*3}

In Japan, softwood is one of the suitable materials for production of bio-fuels, since forest of softwood accounts approximately 90% in artificial forest in Japan, and it is widely used for constructing the traditional Japanese house. Japanese cypress (*Chamaecyparis obtusa*), which is known for its high quality lumber has been attracted a lot of interest as a potential feedstock in Japan. The conditions of alkaline peroxide pretreatment were investigated for the enzymatic hydrolysis of Japanese cypress in this study. The suitable condition of the pretreatment was as follows; at 70 °C with 2M sodium hydrate (NaOH) of and 6M hydrogen peroxide (H₂O₂). Almost of hemicellulose and approximately 60% of lignin were disappeared in the AP-pretreated sample. The AP-pretreated sample had the high-crystallinity and the cellulose nano fibers and nano scale "raising" on the surface. The suitable enzyme was Accellerase1500 resulted in approximately 60%-glucose yield with 20 mg-protein/g-substrate. These results suggest that the alkaline peroxide hydrogen treatment has the potential as the pretreatment for obtaining glucose from softwood such as Japanese cypress in enzymatic hydrolysis.

Key Words

Alkaline-peroxide treatment, Japanese cypress, Enzymatic hydrolysis

日本では、人工林の約9割が針葉樹林であり、針葉樹はバイオ燃料の原料として適している素材の一つである。中でもヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) は耐腐朽性の高い高品質建築材として、伝統的な日本家屋の建築で用いられてきた。本研究では、ヒノキの高効率酵素糖化を目指し、アルカリ - 過酸化水素法の単独処理を検討した。6 M 過酸化水素および 2 M 水酸化ナトリウムの混合試薬中で、70℃、12 時間以上反応させる条件がヒノキの酵素糖化に最適であった。本処理によって、ヒノキに含まれる大部分のヘミセルロースおよび 60% のリグニンが分解、溶出し、処理材表面にセルロースナノファイバーおよびナノスケールの「毛羽立ち」が露出することで、高結晶性を有するものの、高糖化率が可能な素材となった。本処理材の至適糖化酵素を検討した結果、Accellerase1500 が選択され、さらに酵素使用量の低減化が示された。本研究により、アルカリ - 過酸化水素法および Accellerase1500 の組み合わせが、針葉樹であるヒノキの高効率酵素糖化に有効であることが明らかになった。

キーワード

アルカリ - 過酸化水素法, ヒノキ, 酵素糖化

- ※1 Senior Research Fellow Center, Ehime University
3-5-7 Tarumi, Matsuyama, Ehime 790-8566, Japan
- ※2 Faculty of agriculture, Ehime University
3-5-7 Tarumi, Matsuyama, Ehime, 790-8566, Japan
- ※3 Biomass Refinery Technology Research Center,
National Institute of Advanced Industrial Science and
Technology (AIST)
3-11-32 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima
737-0046, Japan

- ※1 愛媛大学 上級研究員センター
〒790-8566 愛媛県松山市樽見 3-5-7
- ※2 愛媛大学農学部
〒790-8566 愛媛県松山市樽見 3-5-7
- ※3 (独) 産業技術総合研究所
バイオマスリファイナリー研究センター
〒737-0046 広島県東広島市鏡山 3-11-32

1. 緒言

地球温暖化防止に向けた二酸化炭素削減や循環型社会構築、環境産業の主導権確保という観点から石油代替となるバイオエタノールの生産が活発であった。最近になって、シェールオイルの登場や穀物価格の上昇を理由にサトウキビやトウモロコシといった可食資源を利用したバイオエタノール生産の減産が検討されている。しかし脱原発の流れもあり、食糧や飼料と競合しない第二世代バイオエタノールと呼ばれる、非食植物資源のセルロース系バイオマスを用いたバイオエタノールの開発が求められている¹⁾。

一方、デジタル機器類の発達や資源保護の観点から、情報媒体としての紙の役割が小さくなり、紙の消費量が減少するといわれている。国内でも、人口の減少や広告媒体の多様化から紙の需要減を避けることは困難である。国内に点在する約100カ所の製紙工場の多くは設備も古く、国外との競争力バランスから、いずれ収斂されることが予想される。競争力の無くなった旧型製紙工場を有効活用した木質系バイオエタノール生産の検討例もあり^{2)~4)}、バイオリファイナリープロセスに応用できる可能性を持っている。

「バイオマス・ニッポン総合戦略」によれば、日本における廃棄物に関わる木質系バイオマスの年間発生量は、建設発生木材、林地残材や未利用樹を合わせて年間約2400万tになり、エタノールに換算すると約540万kLに及ぶため⁵⁾、国内では木質系バイオエタノール製造技術の開発が強く望まれる⁶⁾。日本では国土の約66%が森林で、その内約4割が人工林である⁷⁾。人工林の約9割は針葉樹林であり、針葉樹はバイオ燃料の原料として適している素材の一つである^{8) 9)}。

ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) は高品質建築材として伝統的な日本家屋の建築で用いられてきた。世界最古の木造建築物である法隆寺でもヒノキが用いられており、耐腐朽性の高い材である。我が国の2007年におけるヒノキの年間生産量は、65,000 m³であるが、その内約70%が不良品として使用されずうち捨てられている¹⁰⁾。しかしながら、ヒノキの高い耐腐朽性は加水分解の困難さを示しており、バイオエタノール生産の原料として利用する際の問題となるため、研究例は数少ない。

木質資源からバイオエタノールを生産するには、前処理、糖化、発酵、蒸留精製工程が必要である。強固な木材組織を脆弱にする前処理は重要な工程であり、本工程の成否により後段の糖化で用いられる酵素量や、そこで得られる糖化率も大きく変わる。酵素コストは、以前として製品のエタノール生産コストに占める割合が大きいため¹¹⁾、酵素使用量の削減化も極めて重要な課題である。

従来の前処理法の一つである濃硫酸法は、既に確立された技術であるが、糖の過分解、中和時に発生する石膏の処理、薬品耐性プラントの必要性、硫酸回収時の消費エネルギーが大きいことなどが問題になっていた¹²⁾。希硫酸法も、硫酸中和による石膏発生の問題や薬品耐性プラントの必要性は同様に存在する。カナダにあるIogen社の爆砕法は、低濃度の硫酸を投入しており、基本的に上記と同様の問題

を抱えている¹³⁾。アンモニア爆砕法については、比較的糖化しやすい草本類の研究例が多い¹⁴⁾が、木材に対する効果について不明な点が多い。

安定剤の入った過酸化水素を用いて行われる Alkaline peroxide 処理は、環境低負荷型のパルプ漂白として用いられてきた。一方、安定剤の入っていない過酸化水素は、各種の高反応性酸素分子（スーパーオキシドやヒドロキシラジカルなど）を発生しながら分解する。これら過酸化水素由来のラジカルは、リグニンの低分子化や分解に寄与すると考えられており、1984年にGouldによって、アルカリ条件下で安定剤の入っていない過酸化水素により酸化する Alkaline peroxide 前処理法 (AP 法) が提案された¹⁵⁾。これまでの数多くの研究がなされ、麦ワラやコーンコブ等のソフトバイオマスの酵素糖化に有効であることが示されている^{15)~18)}。木材等のハードバイオマスに対しては、希硫酸処理後の二次処理として、本法の有効性が示されている¹⁹⁾ものの、木材に対する AP 単独処理の効果は不明な点が多い。AP 処理で用いられる試薬は、NaOH および H₂O₂ の二種類のみであり、元々パルプ漂白で使われているため、本処理は製紙工場で適用可能である。木材への有効性が示されれば、競争力のなくなった旧型製紙工場を有効活用した木質系バイオエタノール生産を想定する際、AP 処理は簡易かつ有効な前処理法の一つとして提案できる。

そこで、本研究では、木質系バイオマスのモデルとしてヒノキを用いて、AP 法単独処理の条件検討に続き、AP 処理材の構成単糖解析および物性評価を行い、AP 処理材に適した糖化酵素の至適化を試みた。

2. 実験方法

2.1 ヒノキ (Japanese cypress : JC)

木質バイオマスとしてヒノキおが屑を用いた。おが屑を篩にかけ、125 μm 以上 500 μm 以下のサイズのものをサンプルとして用いた。ヒノキおが屑の構成単糖および酸不溶性リグニンの分析を Laboratory analytical procedure of the standard National Renewable Energy Laboratory (LAP-NREL)²⁰⁾ に準じて行った。グルコース (449 mg/ g-material)、キシロース (44 mg/g-material)、マンノース (105 mg/ g-material) であり、酸不溶性リグニンの割合は乾燥重量換算で 31.9%であった。

2.2 AP 法の条件検討

前報²¹⁾に従って、乾燥重量換算で約0.5gのヒノキ木粉が入った50mlのエrlenマイヤーフラスコに、0.25, 3 M 水酸化ナトリウム溶液 (和光純薬工業(株)) および 0.3, 6 M 過酸化水素 (和光純薬工業(株)) を合計5ml入れ、恒温振盪機 (TAITEC 社製) により 200 rpm で攪拌反応を行った。設定温度は 50, 70, 90℃を試し、3~21時間反応させた。各反応条件を Table 1 に示す。反応終了後、木綿布2枚を重ねた搾り袋に反応物を入れ、流水で約5分間洗浄し、イオン交換水で再洗浄後、エタノールに浸漬し、余分なエタノールを搾った後、55℃、約3時間の真空乾燥を

Table 1 Conditions and parameters of the alkaline-peroxide treatments, and the constituent monomeric sugars and percentage of Klason lignin in their residues

Sample name	H ₂ O ₂ (M)	NaOH (M)	Temperature (°C)	Solid recovery (%)	Monomeric sugar content (mg sugar/g substrate)			Klason lignin content (%)
					Glucose	Xylose	Mannose	
Raw JC	-	-	-	100	449	44	105	31.9
H ₂ O ₂ 6M-50	6	0	50	83	321	36	91	27.0
H ₂ O ₂ 6M-70	6	0	70	77	394	23	57	24.7
NaOH 2M-70	0	2	70	71	566	33	35	34.0
NaOH 2M-90	0	2	90	66	517	42	24	39.3
H ₂ O ₂ 0.3M/NaOH 2M-70	0.3	2	70	69	427	12	50	27.8
H ₂ O ₂ 6M/NaOH 2M-50	6	2	50	63	382	36	84	24.1
H ₂ O ₂ 6M/NaOH 2M-70	6	2	70	55	460	16	16	21.8
H ₂ O ₂ 6M/NaOH 2M-90	6	2	90	42	453	25	5	37.5

Raw JC mean the non-treated sample. Other conditions of AP-treatment were the same as follows; reaction duration: 20-21 h, rotary speed: 200 rpm.

行った。乾燥試料の重量を測定し、式(1)を用いて固形分収率 (Solid recovery:SR) および式(2)を用いて重量損失 (Weight loss:WL) を算出した。

$$\begin{aligned} \text{固形分収率 (SR) (\%)} \\ = (\text{処理試料の乾燥重量} / \text{処理前の試料の乾燥重量}) \\ \times 100 \quad (1) \end{aligned}$$

$$\text{重量損失 (WL) (\%)} = 100 - \text{SR} (\%) \quad (2)$$

AP 処理試料の構成単糖および酸不溶性リグニン量の分析を先述と同様に LAP-NREL²⁰⁾ に準じて行い、単位乾燥重量の AP 処理残渣あたりに含まれる構成糖量として算出した。

2.3 市販糖化酵素による加水分解試験

前報²¹⁾に従って、ベース酵素としてアクレモニウムセルラーゼ (AC, 明治製菓(株)) および Accellerase1500 (ACC1500, ジェネンコア協和(株)), アクセサリー酵素として Optimash BG (OPBG, ジェネンコア協和(株)), Optimash XL (OPXL, ジェネンコア協和(株)) および Novozyme 188 (Nov, ノボザイム・ジャパン(株)) を用いて糖化試験を行った。ベース酵素単独で用いる場合は、40 mg-protein/g substrate (dry weight) で使用し、ベース酵素およびアクセサリー酵素の組み合わせでは、ベース酵素 30 mg-protein/g-substrate, アクセサリー酵素 10 mg-protein/g-substrate で計 40 mg-protein/g-substrate で用いた。2 mL セーフロックマイクロチューブに、乾燥重量で約 0.05 g の試料を入れ、上記投入量になるよう 0.05 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.8) で希釈調整した酵素液を 1 ml 添加し、45°C に設定した乾熱機 (ISUZU Drying Oven, (株) いすゞ製作所) 内に設置したマイクロチューブローテーター (MTR-103, アズワン(株)) を用いて、72 時間の酵素反応を行った。反応終了後、反応液を遠心分離 (20,000 × g, 10 分間) の後、上清を適宜希釈し、0.45 μm PTFE フィルター (Millex-LG, Millipore, USA) でろ過後、HPX-87P カラム (内径 7.8 mm, 長さ 30 cm, Bio Rad, USA) および示差屈折率検出器を装着した日本分光高速液体クロマトグラフィー システム (LC-2000 plus series, 日本分光(株)) に

よる生成糖分析を行った。カラムオープン温度を 80°C に設定し、高純度イオン交換水を溶離液として流速 1 ml/min で測定した。糖化率は、生成糖の収率として (3) - (4) 式を用いて算出した。

$$\begin{aligned} \text{糖化率 (Sugar yield) (\%)} \\ = \frac{\text{酵素糖化収率 (mg-sugar /g-residue)} \times \text{SR}/100}{\text{単位乾燥重量あたりのヒノキの構成単糖量 (mg-sugar/g-material)}} \times 100 \quad (3) \end{aligned}$$

ここで、

$$\begin{aligned} \text{酵素糖化収率 (Enzymatic saccharification rate)} \\ (\text{mg-sugar/g-residue}) \\ = \frac{\text{酵素糖化で得られた糖量 (mg)}}{\text{酵素糖化で用いた AP 処理残渣乾燥重量 (g)}} \quad (4) \end{aligned}$$

酵素糖化収率は、酵素糖化で用いた残渣 (AP 処理残渣) 1 g から生成する糖量 (mg) として算出した。

2.4 X 線結晶回折解析 (X-ray diffraction: XRD)

約 100 mg の試料を、高圧ポンプを用いて錠剤状に成形した後、Rigaku RINT-TTR3 X-ray diffractometer (Rigaku Co., Tokyo, Japan) を用いて X 線結晶回折分析を行った。X 線源として、CuKα を用いて、50 kV, 300 mA で照射し、スキャンレンジ 2-60°, スキャンスピード 2°/min で測定した。得られた回折強度から、Segal ら²²⁾ の方法に従い、式(5)を用いて結晶化度 (Crystallinity index: CrI) を求めた。

$$\begin{aligned} \text{結晶化度 (CrI\%)} &= [(I_{002} - I_{am}) / I_{002}] \times 100 \quad (5) \\ I_{002}: 2\theta = 22.5^\circ; I_{am}: 2\theta = 18.7^\circ \end{aligned}$$

2.5 電界放出型電子顕微鏡 (Field emission scanning electron microscopy: FE-SEM) 観察

試料に四酸化オスミウム処理をした後、電界放出型電子顕微鏡 (Field-emission scanning electron microscopy; S-4800, Hitachi High-Technologies Co.) を用いて、印加電圧 1.4 kV で試料表面の形態観察を行った。

3. 結果および考察

3.1 種々条件のAP処理ヒノキの酵素糖化試験および主要組成

各条件のAP処理で調製したヒノキ試料をACによって糖化した結果をFig. 1に示す。前報²¹⁾のとおり、ヒノキを6 M過酸化水素、2 M水酸化ナトリウムとなる混合液中で70℃、20時間以上反応させた条件で高い糖化率を得た。過酸化水素または水酸化ナトリウムのどちらか一方では、温度条件を変えても糖化率はほとんど増加しなかった。また、90℃の反応では、糖化率が減少した。本実験で用いた過酸化水素のMSDSによると、熱分解速度は、10℃の温度上昇で、約2.2倍高まるため、90℃の反応では過酸化水素の分解が速やかに起こり、ヒノキ試料の酸化分解が十分に起こらなかったと考えられる。処理前の重量に対して、AP処理後に得られた固形分の重量を百分率で示したSR(%)に着目すると、SRが低い、すなわちAP処理で重量損失が大きい試料ほど糖化率が高い傾向にあったが、例外もあり、重量損失に関わる溶出成分が重要であると示唆される。

各条件で得たAP処理試料の重量損失に対して、試料に含まれる構成単糖および酸不溶性リグニン量をプロットした結果をFig. 2に示す。酸不溶性リグニン量およびヘミセルロース由来のキシロースおよびマンノースは、AP処理における重量損失の増加とともに緩やかに減少し、グルコースのみ増加

Fig. 1 Enzymatic hydrolyses of AP-treated Japanese cypress in various condition
Open bars: glucose yield; gray bars: xylose yield; closed bars: mannose yield; open triangles: solid recovery

Fig. 2 Relationship between weight loss in AP-treatment and main components of residue
Open circles: glucose content; gray circles: xylose content; closed circles: mannose content; closed triangles: Klason lignin content

傾向にあった。これは重量損失が、主にリグニンとヘミセルロースの溶出によるものであり、AP処理残渣中に含まれるセルロースの割合が増加したことを示している。酸不溶性リグニン量の割合が処理前の31.9%を有意に超える試料(NaOH 2M-90, H₂O₂ 6M/NaOH 2M-90)があった。本試料は、ヘミセルロースの構成単糖であるキシロースおよびマンノースの値が他の試料に比べ相対的に低い(Table 1)。本試料の処理条件では、ヘミセルロースの溶出が優先的に起こる一方で、大部分のリグニンが残存し、残渣中に含まれる見かけのリグニン割合が増加したと考えられる。先述のとおり、過酸化水素の熱分解温度は、10℃の温度上昇で、約2.2倍高まるため、90℃の反応では過酸化水素の分解が速やかにおこると考えられる。そのため、H₂O₂ 6M/NaOH 2M-90の反応後半は、NaOH 2M-90と類似した状態になると予想される。結果的に両処理残渣には、ヘミセルロース由来の構成単糖の割合が低く、リグニンの割合が高いという類似した化学的組成になっている。

最も糖化率の高い試料(H₂O₂ 6M/NaOH 2M-70)の全構成単糖の約93%がグルコースであり、ヘミセルロース由来のキシロースおよびマンノースはわずか3%および4%であった。AP処理によって溶出される成分割合と糖化率の関係を明らかにするため、最も糖化率の高かった試薬および温度条件を用いて、AP処理時間に対する主要成分の残存率およびグルコース収率の経時変化をFig. 3に示す。なお、主要成分の残存率は、AP処理前に含まれる成分の絶対量を100とした時の値であり、SRを考慮し算出された。反応3時間で最も残存率の低い成分はマンノースであり、次いでキシロースとなり、リグニンおよびグルコースはほぼ同じ値であった。これらの成分の減少に伴い、酵素糖化におけるグルコース収率は約4倍増加した。さらにAP処理反応時間を6時間にすると、マンノースだけでなくキシロースの大部分も溶出し、わ

Fig. 3 Time course of remain-percentage of remain components and glucose yield of enzymatic hydrolysis in AP-treatment

Open circles: glucose; gray circles: xylose; closed circles: mannose; closed triangles: Klason lignin; closed circles: glucose yield in the enzymatic hydrolysis
Solid lines show the percentages of remain content in residues based on the content of started material: dashed-line show the glucose yield in the enzymatic hydrolysis. The percentage of remain component was calculated inconsideration of solid recovery.

ずかにリグニンも減少したが、セルロース由来のグルコース成分はほとんど変わらなかった。酵素糖化のグルコース収率はさらに大きく増加し、最高値付近まで達した。しかし、反応時間が12時間以上になると、各成分の減少も確認されず、酵素糖化におけるグルコース収率もほぼ一定となった。AP処理では、まず初めにヒノキに含まれるヘミセルロースの大部分が短時間で溶出し、その後リグニンの減少が起こることで、酵素糖化性が高まったと示唆される。AP処理によって分解および溶出されやすいヒノキの主要成分を順に並べると、ヘミセルロース、リグニン、セルロースとなった。

Huijgen ら²³⁾やHideno ら²⁴⁾は、キシランの減少およびリグニンの変性が確認された試料で、酵素糖化性が増加したと報告しており、AP処理ヒノキにおいても同様の傾向が確認された。ヒノキのような針葉樹のリグニンは、コニフェリルアルコールを基本構造単位とし、リグニン分子鎖を形成しており、リグニン分子鎖の化学結合の約50%は、 β -O-4結合である。さらにリグニン分子鎖は互いに α -アリルエーテル結合を介し、3次元網目構造を形成している。AP処理では、過酸化水素イオン(HOO $\cdot$)が強力な求核試薬として働き、 $\cdot$ OHやO $_2^{\cdot-}$ 等のラジカルを発生させる^{15) 18)}。これらのイオンやラジカルが、上記リグニンの β -O-4結合や α -アリルエーテル結合を切断し、低分子化するとともに、一部は低分子リグニンの縮重を引き起こすと考えられている^{25) 26)}。リグニンはヘミセルロースと共有結合を有しており²⁷⁾、AP処理によってリグニンの低分子化や、リグニン周辺に存在するヘミセルロースの溶出が引き起こされることで、残渣中のセルロースの割合が高まると同時に、セルロースに対する酵素のアタックが容易になり、糖化率が高まったと考えられる。

3.2 X線結晶回折解析

X線結晶回折解析では、固体試料表面の数nmオーダーの状態を解析しており、XRDスペクトラムから算出される見かけの結晶化度を指標にすることによって、結晶性セルロースの露出状態を大まかに推測できる。無処理ヒノキおよびAP処理ヒノキのX線回折強度スペクトラムをFig. 4に示す。各試料のスペクトルに大きな違いは確認できず、いずれの処理においても非晶化が起こらなかったことを示している。本スペクトラムから算出した無処理ヒノキおよびAP処理ヒノキの結晶化度をTable 2に示す。全体的な傾向として、結晶化度はH $_2$ O $_2$ 濃度に影響を受けず、主にNaOH濃度に影響を受けており、NaOH濃度が高い処理において、結晶化度も高くなる傾向があった。糖化率の最も高い(f) H $_2$ O $_2$ 6 M/NaOH 2 M-70の結晶化度は、アルカリ処理のみの(c) NaOH 2 M-70よりわずかに低かったものの、無処理に比べ高かった。一般的にボールミル処理物については、セルロースの結晶化度低下と糖化性の向上に正の相関関係がある。しかし、リグノセルロースの酵素糖化に関わる要素は複雑であり、結晶化度の影響だけで考察するのは適切でないという報告もある²⁸⁾。Endoは、木材のナノ構造の特性を活用するメカノケミカル処理により、セルロースナノファイバーを形成し、結晶性を保

Fig. 4 Relative intensity in the X-ray diffraction spectrum of treated samples

(a) Raw JC, (b) H $_2$ O $_2$ 6 M-70, (c) NaOH 2 M-70, (d) H $_2$ O $_2$ 6 M/NaOH 1 M-70, (e) H $_2$ O $_2$ 3 M/NaOH 2 M-70, (f) H $_2$ O $_2$ 6 M/NaOH 2 M-70

Table 2 Crystallinity index (CrI) of AP-treated samples

Sample name	CrI (%)
(a) Raw JC	60.2
(b) H $_2$ O $_2$ 6 M-70	60.5
(c) NaOH 2 M-70	70.8
(d) H $_2$ O $_2$ 6 M/NaOH 1 M-70	63.7
(e) H $_2$ O $_2$ 3 M/NaOH 2 M-70	68.4
(f) H $_2$ O $_2$ 6 M/NaOH 2 M-70	68.6

持した状態で、糖化率を増加するという報告をしている²⁹⁾。さらにHidenoらは、稲わらの水熱処理物¹⁷⁾や、ヒノキのオルガノソルブ処理物の結晶化度が増加することを報告している²⁴⁾。AP処理物においても、無処理ヒノキよりもわずかに高い結晶化度の値を示した。水熱処理やオルガノソルブ処理と同様、AP処理によって、リグノセルロース表面のヘミセルロースやリグニンといった非結晶物が除去されることで、高結晶性セルロースが露出したと考えられる。一方、NaOH 2 M-70試料のSRは56%と、溶出量が大きく、セルロースの構成単糖であるグルコースの割合も比較的高い(Table 1)ことから、高結晶セルロースが露出している頻度が高いと考えられる。しかしながら、糖化率はH $_2$ O $_2$ 6 M/NaOH 2 M-70に比べ低かった。Table 1の結果から、NaOH 2 M-70試料のキシロースの割合は、その他試料の値よりも高く、酸不溶性リグニン量については、H $_2$ O $_2$ 6 M/NaOH 2 M-70に比べてわずかに高い値であった。キシロースを構成糖とするキシランは、リグニンとは共有結合、セルロースとは非共有結合で繋がっており、植物細胞壁の頑健性を保つ機能を果たすとともに、セルラーゼによる酵素糖化を阻害すると考えられている²⁷⁾。アルカリ処理のみのNaOH 2 M-70試料では、結晶性セルロースが露出しているものの、キシロースを構成単糖とするキシランが、リグニンと強固に結びつきながらセルロース周辺に存在しているため、H $_2$ O $_2$ 6 M/NaOH 2 M-70に比べて糖化率が低くなったと考えられる。

3.3 ヒノキ前処理物表面の形態観察

無処理ヒノキおよびAP処理ヒノキのFE-SEM写真を

Fig. 5 に示す。無処理ヒノキの表面は滑らかで、小孔や微小繊維は見当たらなかった (Fig. 5 a)。一方で、AP 処理物の表面には、ナノスケールの毛羽立ち (Fig. 5 b, 黒矢印) や、ナノファイバー (Fig. 5 c, 白矢印) が観察された。ヒノキのオルガノ処理物表面においても、セルロースナノファイバーの露出が観察されており (Fig. 5 d), 糖化率増加の要因と考えられている²⁴⁾。Endo は、湿式メカノケミカル処理により、リグニンが残存し、高結晶性を保持した状態であってもナノ繊維まで解すことで高糖化率が可能であると報告している²⁹⁾。AP 処理物でも同様のファイバーが確認されており、結晶化度および糖化率増加の要因であることが示唆される。しかし、AP 処理物では、このようなナノファイバーよりナノスケールの毛羽立ちがより多く観察された。この形態は AP 処理物特有であり、糖化率増加の要因として考えられる初めてのナノ形態である。

オルガノソルブ処理物表面では、セルロースナノファイバーの他に、リグニン球が確認されている²⁴⁾ (Fig. 5 e, 白矢印)。リグニン球は、木材中のリグニンが溶解、固化したリグニン変性物と考えられている¹⁸⁾。これらリグニン球の存在もあり、オルガノソルブ処理物に残存する酸不溶性リグニンは約 70% と多く、処理試料の外見は焦げ茶色であった。一方、本研究の AP 処理物表面には、そのようなリグニン球は確認されず、SR を考慮した残存リグニンも約 40% 程度であり (Fig. 3), 外見もほぼ白色であった。AP 処理では、過酸化水素イオン ($\text{HOO}\cdot$) や $\cdot\text{OH}$ や $\text{O}_2^{\cdot-}$ 等のラジカルが、リグニンの芳香環

やアリルエーテル結合を分解していると考えられており²⁵⁾、本処理で低分子化されたリグニンは再び固化することなく、さらに低分子溶解物または CO_2 まで酸化分解されたと示唆される。

3.4 AP 処理物に対する糖化酵素の至適化

低コストな木質系バイオエタノール生産を目指す上で、糖化工程の改善も前処理と同様に重要である。本研究では、糖化酵素として AC を中心に使ってきた。本酵素は我が国で育種された *Acremonium cellulolyticus*³¹⁾ の変異株由来であり、従来の *Trichoderma reesei* 由来の市販酵素より、 β -glucosidase 比活性や耐熱性が高いことで知られている。そのため、 50°C 付近で長時間の糖化を行っても、セロビオースの蓄積が少なく効率良くセルロースを糖化できる。しかし、最近、世界的な酵素メーカーが *T. reesei* の遺伝子工学的育種や培養法の開発を行い、従来よりも β -glucosidase 比活性が高い酵素の生産や、大幅な低コスト化を実現している³²⁾。そこで、AP 処理物の糖化に適した酵素カクテルを調製するため、これまで用いてきた AC に加え、2009 年に Genencor 社が発売した ACC1500 をベース酵素として、それらにアクセサリー酵素 3 種をそれぞれ組み合わせた糖化試験を行った (Fig. 6)。AC に対して相乗効果を示すアクセサリー酵素は、OPXL および ACC1500 であり、ACC1500 の添加効果が最も効果が高かった。しかし、ACC1500 を単独で用いた結果、さらに糖化率は増加した。一方、ACC1500 に対するアクセサリー酵素の添加効果は確認できなかった。以上の結果から、AP 処理物の至適糖化酵素は、ACC1500 単独であった。

さらに ACC1500 の酵素添加量を減らしても、AC より高い糖化率を示した (Fig. 7)。AC では 80 mg-protein/g-substrate で達成した糖化率を、ACC1500 では 1/4 の 20

Fig. 5 Field emission scanning electron microscope photographs of AP-treated samples
a: Raw JC ($\times 30,000$), b: H_2O_2 6M/NaOH 2M-70 ($\times 30,000$), c: H_2O_2 6M/NaOH 2M-70 ($\times 45,000$), d: EtOH50/W50/HCl0.4 ($\times 30,000$), e: EtOH50/W50/HCl0.4 ($\times 3,000$)
The photos of d and e are the modified citations of Hiden *et al.*²⁴⁾.

Fig. 6 Enzymatic hydrolysis of AP-treated sample using various commercial enzymes
Open bars: glucose yield; gray bars: xylose yield; closed bars: mannose yield
AC: *Acremonium cellulolyticus*; ACC1500: Accellease 1500; OPBG: Optimash BG; OPXL: Optimash XL; Nov: Novozyme 188
The numbers mean the loading protein amounts (mg-protein) per g-substrate.

Fig. 7 Comparison of Acremonium cellulase and Accellerase 1500 with different loading protein
Open circles: AC; open squares: ACC1500
The substrate was used H₂O₂ 6M/NaOH 2M-70

mg-protein/g-substrate で超える結果となった。酵素コストはバイオエタノール生産プロセス全体に占める割合が大きく¹¹⁾、酵素使用量の削減はコスト低下に繋がるため、AP 処理物に対して ACC1500 を使用することで、コスト低減に寄与できると考えられる。

AP 処理物では、大部分のヘミセルロースおよび半量以上のリグニンが分解され、その表面に高結晶性セルロースが、ナノスケールの繊維または毛羽立ちとなって現われている (Figs. 4, 5)。同様に、結晶化度が高く、その表面上にセルロースナノファイバーが露出しているオルガノソルブ処理物でも、至適酵素として ACC1500 が選択されている²⁴⁾。ACC1500 はこのような高結晶性セルロースが露出した基質の糖化に適している組成を有していると考えられる。AC および ACC1500 の酵素比活性を比較すると、FPU 比活性はほぼ同じであり、 β -glucosidase 比活性については ACC1500 がわずかに AC より高く、微結晶セルロースを基質としたセルラーゼ比活性の比較では、ACC1500 が AC の約 3 倍高かった (Data not shown)。 β -glucosidase 比活性の高い Nov を AC に添加しても糖化率が増加しなかったことや、AC の添加量を増やしても、1/4 量の ACC1500 の糖化率に及ばないことから、結晶性セルロース分解に関して、ACC1500 特異的に含まれる酵素や、酵素 1 分子の機能差が重要な役割を果たしていると考えられる。濾紙分解活性である FPU は、セルラーゼ活性の指標としてよく用いられてきたが、必ずしもバイオマスの糖化性と一致するわけではない。今後、Cel7A のような結晶性セルロース分解酵素 1 分子の詳細な解析や、生産菌株間における酵素分子の性能比較が必要であろう。

本研究により、木材に対する AP 単独処理の有効性および AP 処理物の糖化に適した酵素が明らかになった。競争力の無くなった旧型製紙工場を有効活用した木質系バイオエタノール生産を想定する際、AP 処理法は簡易かつ有効な前処理法の一つとして提案できる。

4. 結 論

ヒノキの高効率酵素糖化を目指し、AP 処理条件として 6M H₂O₂ および 2 M NaOH の混液中にて 70℃、12 時間以上の反応が最適であることが明らかとなり、それぞれ AP 処理物の化学組成および物性を解析し、至適酵素を検討した結果、以下の知見が得られた。

- (1) AP 処理後の重量損失が大きい試料が高糖化率を示す傾向にあった。AP 処理によって分解および溶出されやすいヒノキの主要成分を順に並べると、ヘミセルロース、リグニン、セルロースとなった。特に酵素糖化率増加に影響が大きかったのは、ヘミセルロースのキシランおよびリグニンの分解および溶出であった。
- (2) AP 処理物の結晶化度は無処理試料よりもわずかに高く、表面はナノスケールの毛羽立ちおよびセルロースナノファイバーが観察された結果から、高結晶セルロースが表面に露出していることが明らかになった。ナノスケールの毛羽立ちは、AP 処理特有の形態であり、糖化率増加に寄与するものと示唆された。
- (3) AP 処理物の酵素糖化に際し、ACC1500 が至適酵素であり、AC の 1/4 量で同等以上の糖化率が得られたことから、酵素コスト低減化が可能となった。

謝 辞

本研究は、(1) 平成 21～24 年度科学技術振興調整費「若手研究者の自立的な研究環境整備促進」プログラム、(2) 平成 22 年度松籟科学技術振興財団研究助成金、(3) 平成 22～24 年度科学研究費補助金 (若手 B, 22780292) の支援で行われた。酵素については、明治製菓(株)、ジェネンコア協和(株)、ノボザイム・ジャパン(株)、並びに産業技術総合研究所 井上宏之研究員、愛媛大学 渡辺誠也准教授に御提供頂いた。ここに記して謝意を表する。

文 献 : References

- 1) Yoshimura, T.; Inoue, S.: *J. Jpn. Inst. Energy*, **90**(3), 268(2011)
- 2) Philips, R. B.; Jameel, H.; Chang, H.: *Research Progress in Pulp and Papermaking*, p. 11 (2006)
- 3) Nonaka, H.: *The Bulletin of the Graduate School of Bioresources, Mie University*, **35**, 71 (2008) : 野中寛, 三重大学大学院生物資源学研究科紀要, **35**, 71 (2008)
- 4) Nonaka, H.; Nakagawa, A.: *J. Jpn. Inst. Energy*, **89** (10), 962 (2010)
- 5) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries homepage (for Japanese) : バイオマス・ニッポン総合戦略, http://www.maff.go.jp/j/biomass/pdf/riyo_zyokyo.pdf (2013/3/4 参照)
- 6) Kobayashi, N.; Ushikoshi, J.; Inano, M.; Takaoka, K.; Itaya, Y.: *J. Jpn. Inst. Energy*, **89**, 975 (2010)
- 7) Forestry Agency in Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan, Heisei 24 nendo shinrin ringyou hakusyo, pp. 85 : 林野庁, 平成 24 年度森林・林業白書,

- pp. 85
- 8) Uemura, T.; Mizuishi, H.; Kano, H.: *Chitekisansouzou*, Apr., 54 (2010) : 植村哲士, 水石仁, 科野宏典, 知的資産創造, 4月号, 54 (2010)
 - 9) Okuda, N.; Ninomiya, K.; Takao, M.; Katakura, Y.; Shioya, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 350 (2007)
 - 10) Ohtsuki, T.; Noda, S.; Ui, S.: *Canadian J. Pure Appl. Sci.*, **5**, 1333 (2011)
 - 11) Hamelinck, C. N.; Hooijdonk, G. V.; Faaij, A. P. C.: *Biomass Bioenerg.*, **28** (4), 384 (2005)
 - 12) Sun, Y.; Cheng, J.: *Bioresour. Technol.*, **83**, 1 (2002)
 - 13) Tolan, J. S.: *Clean Techn. Environ. Policy*, **3**, 339 (2002)
 - 14) Teymouri, F.; Laureano-Perez, L.; Alizadeh, H.; Dale, B. E.: *Bioresour. Technol.*, **96**, 2014 (2005)
 - 15) Gould, J. M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 893 (1984)
 - 16) Banerjee, G.; Car, S.; Liu, T.; Williams, D. L.; Meza, S. L.; Walton, J. D.; Hodge, D. B.: *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 922 (2011)
 - 17) Monte, J. R.; Brienzo, M.; Milagres, A. M. F.: *Appl. Energ.*, **88**, 403 (2011)
 - 18) Selig, M. J.; Viamajala, S.; Decker, S. R.; Tucker, M. P.; Himmel, M. E.; Vinzant, T. B.: *Biotechnol. Prog.*, **23**, 1333 (2007)
 - 19) Yamamoto, T.; Saitou, Y.; Taki, H.; Terashima, K.; Kaneko, S.: *Taiseikenshutsu gijyutsusenntahou*, **40**, 1 (2007) : 山本哲史, 斎藤祐二, 瀧寛則, 寺島和秀, 金子誠二, 大成建設技術センター報, **40**, 1 (2007)
 - 20) Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Crocker, D.: Laboratory analytical procedure (LAP), Technical report NREL/TP-510-42618 (2008)
 - 21) Hiden, A.; Kawashima, A.; Honda, K.; Morita, M.: 6th Biomass kagaku kaigi happyou ronbunshuu, (The Japan Institute of Energy), p. 96 (2010) : 秀野晃大, 川嶋文人, 本田克久, 森田昌敏, 第6回バイオマス科学会議発表論文集, (日本エネルギー学会), p. 96 (2010)
 - 22) Segal, L.; Creely, J. J.; Martin, A. E.; Conrad, C. M.: *Text. Res. J.*, **29**, 786 (1959)
 - 23) Huijgen, W. J. J.; Smit, A. T.; Wild, P. J. D.; Uil, H. D.: *Bioresour. Technol.*, **114**, 389 (2012)
 - 24) Hiden, A.; Kawashima, A.; Endo, T.; Honda, K.; Morita, M.: *Bioresour. Technol.*, **132**, 64 (2013)
 - 25) Xiang, Q.; Lee, Y. Y.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **84-86**, 153 (2004)
 - 26) Li, M.; Foster, C.; Kelkar, S.; Pu, Y.; Holmes, D.; Ragauskas, A.; Saffron, C.; Hodge, D. B.: *Biotechnol. Biofuel.*, **5**, 38 (2012)
 - 27) Zhang, Y. H. P.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 367 (2008)
 - 28) Park, S.; Baker, J. O.; Himmel, M. E.; Parilla, P. A.; Johnson, D. K.: *Biotechnol. Biofuels*, **3**, 10 (2010)
 - 29) Endo, T.: *Synthesiology*, **2**, 310 (2009)
 - 30) Hiden, A.; Inoue, H.; Tsukahara, K.; Fujimoto, S.; Minowa, T.; Inoue, S.; Endo, T.; Sawayama, S.: *Bioresour. Technol.*, **100** (10), 2706 (2009)
 - 31) Yamanobe, T.; Mitsuishi, Y.; Takasaki, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 65 (1987)
 - 32) Sustainable Business.com., <http://www.sustainablebusiness.com/index.cfm/go/news.display/id/19769> (Accessed on 2013/3/4)
-