木質原料のコンバージミル粉碎と酵素糖化特性

Effective Utilization of Woody Biomass Using Converge Mill and Enzymatic Saccharification Characteristics

二階堂 満^{a*}, 戸谷 一英^a, 福村 卓也^a,

Mitsuru Nikaido, Kazuhide Totani, Takuya Fukumura,

長田 光正^a, 梁川 甲午^a, 粉川 潤^b

Mitsumasa Osada, Kogo Yanagawa, Jun Kogawa

Received 27 March 2012; Accepted 11 June 2012

In the area of bioethanol production based on enzymatic saccharification and fermentation of wood raw materials, enzymatic saccharification methods have attracted attention because of small environmental loads. It is of great importance to establish a reliable preprocessing technique for wood raw materials for efficient enzymatic saccharification. We have developed converge mills-mechanochemical mills with high energy application-and revealed that they were capable of high-efficiency milling of wood raw materials in a short time. The multistage pre-milling processes in combination with hammer milling for pulverization and converge milling for amorphization (complex dry mechanochemical milling) were more efficient, and the enzymatic saccharification properties were remarkably improved. Another new development was the 6-liter semi-continuous type converge mill, which achieved milling performance equivalent to the conventional 1-liter batch type converge mill.

Keywords: Bioethanol, Enzymatic saccharification, Pretreatment, Grinding, Mechanochemical treatment

1. 緒 言

石油の代替エネルギーとして、食料と競合しない間伐材や木くずなどのセルロース系木質原料からのバイオエタノールに注目が集まっている。従来、木質バイオマスからの糖化・発酵によるバイオエタノール製造では、硫酸を用いた酸加水分解が主流であったが、この硫酸法では、糖化速度は高速であるが、高発熱反応であるため反応の制御が困難であり、糖の過分解が進行し収率が低下してしまうなどの問題がある。また、

劇物である硫酸を使用していることから環境負荷が大きい。このような理由から、最近では硫酸を用いない環境負荷の少ないセルラーゼ酵素を用いた酵素糖化法に期待が寄せられている。しかし、この酵素糖化法では、木質原料はセルロース結晶が強固であるほか、ヘミセルロース、リグニンなども存在し、それらが物理的にも化学的にも複雑にからみ合っており、そのままでは反応性が極めて悪い。効率よく酵素糖化を行うためには前処理技術開発が極めて重要である^{1, 2)}。粉碎処理は、古くから酵素糖化のための前処理として効果が高いことが知られているが、消費電力が大きいという問題を有していた。

我々は、コンバージミルという高エネルギー付加型のメカノケミカル粉碎装置を開発し、木質原料を高効率・短時間で粉碎処理できることを見出した^{3, 4)}。また、最近では半連続式コンバージミルも開発した。本研究では、木質原料のコンバージミル粉碎と酵素糖化特性について検討し、酵素糖化法によるバイオエタノール

a 一関工業高等専門学校 物質化学工学
(〒021-8511 岩手県一関市萩荘字高梨)
Department of Chemical Engineering, Ichinoseki National College of Technology
(Takanashi, Hagisho, Ichinoseki, Iwate 021-8511, Japan)

b ㈱アーステクニカ 八千代工場
(〒276-0022 千葉県八千代市上高野1780番地)
Yachiyo Plant, Earthtechnica Co., Ltd.
(178, Kamikoya, Yachiyo, Chiba 276-0022, Japan)

* 責任著者連絡先 nikaido@ichinoseki.ac.jp

Fig. 1 Schematic illustration of converge mill

Fig. 2 Snapshot of the batch type converge mill ET-2, internal capacity of 1 liter

ル製造のための高効率粉砕を目指した。

2. 実 験

2. 1 コンバージミルの特徴

コンバージミルの原理図を Fig. 1 に示す。今回は、1L 小型バッチ式コンバージミル (Fig. 2) と新たに開発した 6L 半連続式コンバージミル (Fig. 3) を使用した。どちらのコンバージミルも回転する円筒容器とその内部に固定されたガイドベーンを設けた単純な構造になっている。粉砕容器中に媒体ボールと試料を投入し、容器を高速 (800 rpm) で回転させる。媒体ボールと粉体は、Fig. 1 に示すように高速回転する容器により遠心力を受け、容器内壁面に押しつけられて

Fig. 3 Snapshot of the semi-continuous type converge mill ET-09-01, internal capacity of 6 liters

ミルの回転に伴い移動する。同伴移動する粉体と媒体ボールはガイドベーン (図中 A 点) によってその運動方向が変えられ、図中の右上方向 (図中 B 点) に打ち出される。粉体は媒体ボールと同じ方向に飛散するが、一部はガイドベーンと容器内壁とのクリアランスを通過し、容器内壁に粉体層が形成される。図中 B 点においては、試料粉体層と飛行してきた媒体ボールが 1 点で集中的に衝突し、高エネルギーを材料に付加できる。コンバージミルの基本性能についてはすでに報告している^{3~5)}。

2. 2 木質原料

実験に用いた木質原料は、和歌山県産の杉おがくず (メディアン径: 100~2,000 μm 程度) を用いた。自然乾燥した試料をそのまま用いたが、含水率は 12.6% であった。

2. 3 1L バッチ式コンバージミル粉砕

粉砕機は、まずは 1L バッチ式コンバージミル (株式会社アーステクニカ製, ET-2 型) を用いた。粉砕容器はステンレス製で、有効内容積は 1L ($\phi 150 \text{ mm} \times 60 \text{ mm}$, 内容積は厳密には 0.88 dm^3) である。コンバージミル粉砕条件は、媒体ボール (クロム鋼球 SUJ-2, ボール径: 5 mm, ボール投入量: ミル容積の 15 vol%), 試料投入量: 30 g (ミル容積の 20 vol%), 回転数: 800 rpm である。

2. 4 ハンマーミルと 1L バッチ式コンバージミルによる多段式粉砕

ハンマーミルとコンバージミルを併用する多段式粉砕を検討した。ハンマーミルは東京アトマイザー製造 (株) 製のサンプルミル (TASM-1 型, 内容積 0.66 L, 回転数 12,000 rpm) であり、粉砕物出口の金属スクリーンメッシュは 0.5 mm を使用した。原料処理時間

は約1分間/(30g原料)である。コンバージミル粉碎条件は、媒体ボール(クロム鋼球SUJ-2, ボール径: 5mm, ボール投入量: ミル容積の15~20vol%), 試料(ハンマーミル処理物)投入量: HAM30~50g(ミル容積の10.8~18vol%), 回転数: 800rpmである。

2.5 ハンマーミルと6L半連続式コンバージミルによる多段式粉碎

ハンマーミルと6L半連続式コンバージミル(㈱アーステクニカ製, ET-09-01型)を併用した多段式粉碎を検討した。ハンマーミル処理は2.4と同様である。6L半連続式コンバージミルの粉碎容器はステンレス製で、有効内容積は6L($\phi 150\text{mm} \times 340\text{mm}$)である。コンバージミル粉碎条件は、媒体ボール(クロム鋼球SUJ-2, ボール径: 6mm, ボール投入量: ミル容積の15vol%), 試料(ハンマーミル処理物)投入量: HAM180g(ミル容積の10.8vol%), 回転数: 800rpmである。

2.6 粉碎物の粒子径測定

粉碎産物の平均粒子径(メディアン径, D_{50})の測定には、レーザー回折・散乱式粒子径分布測定装置(マイクロトラック社製, X-100)を使用し、メタノールを分散媒として、超音波照射(5min)後に測定した。

2.7 粉碎物の結晶性の評価法

セルロース結晶の結晶化度は、XRD測定(日本電子㈱社製, JDX-3530)結果よりSegalら⁶⁾が提案した次式の結晶化度指数(CrI)を用いた。

$$\text{結晶化度 } CrI = \frac{(I_b - I_a) \times 100}{I_b} (\%) \quad (1)$$

ここで、 I_b は(002)面でのピーク強度、 I_a セルロースの非結晶部分である $2\theta = 18^\circ$ におけるピーク強度を表す。

2.8 粉碎物のFT-IR分析

IR測定では、FT-IR装置(Thermo Fisher SCIENTIFIC製, NICOLET iZ 10)を使用し、ATR法で行った。

2.9 粉碎物の酵素糖化によるグルコース濃度測定

標準的な酵素糖化は、反応容器: 50mLポリ容器、反応液量: 10mL (pH5), 基質: 1g, 酵素: 合同酒精(㈱)製GODO TCD-H3 (*Trichoderma reesei* 由来) 15mg/10mL(これは、酵素活性(CMCCase) 183Uに相当する)の条件下で行った。振とう速度 120rpm, 50℃の恒温槽中で反応させ、反応開始後、所定時間(24hあるいは48h)後に溶液をサンプリングし、熱湯中に15min浸すことで酵素を失活させた。その後、

アドバンテック製の限外ろ過膜USY-1(分画分子量10,000)を用いて回収溶液中のセルラーゼを除去し、ろ液中のグルコース濃度を示差屈折率検出器を備えた高速液体クロマトグラフィー(㈱島津製作所製, Prominence)により測定した。

酵素反応の基質濃度は1g/10mL(つまり100mg/mL)であり、酵素糖化後は、回収溶液中のグルコース濃度を測定している。木質試料中の含水率(12.6%)とセルロース含有率(39.6%)を考慮すると、セルロースが100%糖化した場合、セルロース(分子量162)が1の質量に対して加水分解でグルコース(分子量180)が1.11倍生成すると考えると、理論生成グルコース濃度は38.4mg/mLとなる。つまり、

$$(100\text{mg}) \times (1 - 0.126) \times (0.396) \times 1.11 = 38.4\text{mg}$$

となる。

3. 結果および考察

3.1 1Lバッチ式コンバージミルの検討

3.1.1 1Lバッチ式コンバージミルのみでの検討

杉おがくずを原料とし、1Lバッチ式コンバージミル(㈱アーステクニカ製, ET-2型)のみを用いた場合の検討結果について説明する。Fig. 4は粉碎時間と平均粒子径(メディアン径)および結晶化度の関係、Fig. 5は粉碎時間と生成グルコース濃度との関係を示す。Fig. 4より、コンバージミル粉碎時間によって平均粒子径は大きく減少し約10min粉碎で最小粒子径(約20 μm)となり、それ以上の粉碎では逆に増加傾向にあることがわかる。これは、一度微粒子化した粉体がメカノケミカル活性化のために少しずつ粒子が凝集するためと推測する。一方、結晶化度のデータを見ると、粒子径が一定(約10min)になった後も結晶化度の低下が観測される。つまり、杉おがくずのコンバージミル粉碎では、はじめに粒子径の減少が起こり、その後の粉碎エネルギーの蓄積で結晶性の低下(非晶質化の進行)が起こることがわかる。

Fig. 5の生成グルコース濃度とFig. 4のセルロース結晶化度のデータを比較すると、コンバージミル粉碎によるセルロース結晶の非晶質化に伴いグルコース濃度が増加することがわかる。つまり、コンバージミル粉碎すると木質原料の粒子径および結晶性の両者が変化するが、糖化性の向上には結晶性の低下が重要であることが示唆される。遠藤ら¹⁾は、パルプを原料とした場合は、高結晶性試料でも高糖化性を示すと報告しており、セルロース結晶性だけでは単純に糖化性を評価できないものと推察されるが、少なくとも、杉おが

Fig. 4 Relationship among median diameter of product, crystallinity of product, and milling time

Fig. 6 Relationship among median diameter of product, crystallinity of product, and milling time
Grinding condition of hammer mill: sample mass 30g, milling time 60s

Fig. 5 Relationship between glucose concentration and milling time

Fig. 7 Relationship between glucose concentration and milling time

くず原料の乾式メカノケミカル粉碎においては、糖化性の向上には結晶性の低下が重要であると考えられる。

3. 1. 2 ハンマーミルと1Lバッチ式コンバージミルによる多段式粉碎の検討

3.1.1の結果より、木質材料のコンバージミル粉碎では、木質材料は、微粒子化の後、さらなる粉碎エネルギーの受容によって非晶質化が起こる2段階のプロセスを経ることがわかった。そこで、あらかじめ原料を微粒子化することで、迅速な非晶質化が起こるものと予想され、微粒子化に有利なハンマーミル前処理粉碎を行う多段式粉碎の検討を行った。Figs. 6, 7には、ハンマーミル処理（試料量 30g, 処理時間 1min, 回転数 12,000rpm）を施した後にコンバージミル粉碎を

行う多段式粉碎（図中には HAM-CONV と示す）の結果について示す。Fig. 6 の粒子径のデータより、ハンマーミル処理 1min を併用することで迅速な微粒子化（1,000μm 前後のおがくず原料を一気に約 46μm まで微粒子化できる）が達成され、その後、短時間（約 5min）のコンバージミル粉碎で最小粒子径（約 20μm）になることがわかる。結晶化度についても、コンバージミル単独粉碎の場合（Fig. 4）に比べ、多段式粉碎ではより短時間で非晶質化が起きていることがわかる。Fig. 7 には生成グルコース濃度と粉碎時間の関係を示すが、コンバージミル単独粉碎の場合（CONV, 図中点線で示す）も比較して示す。同一の粉碎時間では多段式粉碎（HAM-CONV）の方がコンバージミル単独の粉碎（CONV）に比べて酵素糖化性

Fig. 8 Effects of ball charge and sample mass on glucose concentration

Fig. 9 Relationship between glucose concentration and volume charge ratio (sample/ball)

も良くなっていることがわかる。

3. 1. 3 多段式粉碎での媒体ボール量と試料投入量の検討

前項までの結果より、多段式粉碎が木質原料の酵素糖化に効果的であることがわかったが、次に、ハンマーミル処理杉おがくずを原料とし、コンバージミル粉碎での媒体ボール量と試料投入量の検討を行った。

Fig. 8 には、媒体ボール（クロム鋼球）と試料（ハンマーミル前処理杉おがくず）の充填量を変えた場合のコンバージミル粉碎時間と生成グルコース濃度の関係を示す。媒体ボール量は多く、試料量は少ないほど酵素糖化に有効であることがわかる。また、**Fig. 9** には粉碎時間 20 min における試料と媒体ボールの体積比（試料/媒体ボール）と生成グルコース濃度の関係を示す。同図より、この体積比（試料/媒体ボール）が小さくなるほど生成グルコース濃度が大きくなる傾向が確認でき、実験の範囲内では、媒体ボール量：20 vol% (938 g)、試料投入量：HAM 30 g (108 mL) が粉碎前処理条件として有効であることがわかった。

また、従来のコンバージミル単独粉碎（CONV）（**Fig. 5**）ではグルコース濃度 22 mg/L（糖化時間 48 h）に達するためには、30 min 以上の CONV 粉碎時間が必要であるが、1 min のハンマーミル処理を併用する多段式粉碎（HAM-CONV）の最適条件では、約 20 min（合計 21 min）の粉碎時間で同等のグルコース濃度が得られることがわかった。

3. 1. 4 多段式粉碎での最適粉碎条件の検討

上記の 1L バッチ式コンバージミル粉碎条件の検討結果から、これ以降の 1L バッチ式粉碎機の検討では、

媒体ボール量：20 vol%，試料量：HAM 30 g とした多段式粉碎（HAM-CONV）で試料を調製した。**Fig. 10** はコンバージミル粉碎時間と平均粒子径の関係を示す。粉碎時間 10 min で粒子径が最小になり（約 20 μ m）、これ以上粉碎時間を増やすと粒子径は少しずつ増加し、メカノケミカルによる活性化が生じると考えられる。**Fig. 11** はコンバージミル粉碎時間と生成グルコース濃度、結晶化度の関係を示す。ここで、酵素糖化条件は、酵素量が 183 U、糖化時間は 24 h である。粉碎時間 0 min はハンマーミル処理のみのデータを表し、結晶化度は 37%，生成グルコース濃度は 3.5 mg/L となっている。この図より生成グルコース濃度の増加は、3. 1. 1 でも述べたように結晶性の低下とよい相関性があり、また、20 min 以上粉碎してもグルコース濃度と結晶化度はほとんど変化しなくなっていることがわかる。これより、HAM-CONV 20 min の粉碎が本実験において最適であり、この粉碎条件では、結晶化度は 5 % 程度、平均粒子径は約 20 μ m（**Fig. 10**）となっている。

3. 2 ハンマーミル粉碎物とコンバージミル粉碎物の比較

3. 2. 1 酵素糖化特性

①糖化時間の影響

1L バッチ式コンバージミルの多段式粉碎による試料（HAM-CONV 20 min）とハンマーミル処理のみの試料（HAM）を用い酵素糖化性の比較を行った。**Fig. 12** は生成グルコース濃度と酵素糖化時間の関係を示す。セルラーゼ酵素量は 183 U である。ハンマーミル処理のみの試料（HAM）では、糖化時間を増やしてもグルコース濃度は約 3.5 mg/L とほとんど変化しな

Fig. 10 Relationship between median diameter of product and milling time

Fig. 12 Relationship between glucose concentration and saccharification time

Fig. 11 Glucose concentration and crystallinity relative to milling time

Fig. 13 Relationship between glucose concentration and enzyme concentration

いが、多段式粉碎を行った試料 (HAM-CONV 20 min) では、糖化時間の増加とともにグルコース濃度が大きく増加し、6 日間の糖化時間で約 40 mg/mL のグルコース濃度に達し、HAM 試料に比べて10倍以上も酵素糖化性が向上した。

②酵素量の影響

Fig. 13 は糖化時間を 24 h とし、セルラーゼ酵素量を変えたときの生成グルコース濃度の変化を示す。**Fig. 12** と同様に、ハンマーミル処理のみ (HAM) では酵素量を増やしてもグルコース濃度を増やすことは難しいが、多段式粉碎 (HAM-CONV 20 min) を行うことにより、大幅にグルコース濃度が増加した。①の糖化時間の検討結果とあわせて考えると、3.1.4 に示したように、酵素糖化性の向上にセルロースの結晶性の低下が大きく寄与していると考えられる (ハンマー

ミル処理のみ：結晶化度37%，HAM-CONV 20 min：結晶化度5％)。さらに、過去の我々の研究⁷⁾では、ハンマーミル処理を長時間 (約 10 min) 行うことで、コンバージミルと同等の平均粒子径 (約 20 μm) の木質粉体を調製したが、結晶化度が大きいために糖化性は向上しないという結果も得ている。

以上の①、②の糖化条件の検討より、コンバージミル粉碎物は酵素との反応性が極めて向上し、酵素量の低減も期待できることがわかった。

3. 2. 2 粉碎産物の IR 分析結果

Fig. 14 には杉おがくず原料、ハンマーミル処理物、コンバージミル粉碎物の FT-IR スペクトル (ATR 法) を示す。未粉碎の杉おがくず原料では 1059 cm⁻¹ (C-O 伸縮振動)、1110 cm⁻¹ (C-C 伸縮振動、C-O 伸縮振動)、1318 cm⁻¹ (CH₂ 横ゆれ振動) の 3 つの波数で明

Fig. 14 FT-IR spectra of product of wood material ground

瞭なピークが観測されている。これらの3つのピークは、ハンマーミル処理物 (HAM) においても見られるが、多段式粉碎処理物 (HAM-CONV 10 min と 20 min) では消失している。これは、コンバージミル処理により、木質中のセルロースの構造が破壊されたことを表している。また、未粉碎物と粉碎物の 3370 cm^{-1} 付近では、O-H 伸縮振動の吸収ピークが確認できるが、コンバージミル処理すると、このピークが徐々に高波数側にシフトしていることがわかる。これは、コンバージミル粉碎により、微粒子化と同時に結晶構造の破壊が進行し、木質中のセルロース分子およびセルロース分子間の水素結合強度が弱くなっているためと推察される。したがって、木質試料をコンバージミルで粉碎すると、木質の細胞壁を破壊しセルロース結晶を非晶質化すると同時に、マイクロフィブリルを構成するセルロース分子の水素結合を脆弱にし、酵素との反応性が向上したものと考えられる。

3. 3 ハンマーミルと 6L 半連続式コンバージミルの多段式粉碎の検討

6L 半連続式コンバージミル (ET-09-01 型) を使用し、1L バッチ式コンバージミル (ET-2 型) (試料量: HAM 30g) と同等の原料充填率 (試料量: HAM 180g) における多段式粉碎 (HAM-CONV) の検討結果を Fig. 15 に示す。ここで、媒体ボール充填率は粉碎機動力の都合上、15vol% としている。6L 半連続式粉碎機は、1L バッチ式粉碎機とほぼ同等の粉碎性を示すことがわかり、粉碎による結晶化度の変化および生成グルコース濃度の変化もほぼ同じような挙動を

Fig. 15 Glucose concentration and crystallinity relative to milling time

示すことがわかった。また、ここでの実験結果は、大型連続式装置を目指した指針にもなる。

4. まとめ

本研究では、杉おがくず原料のコンバージミル粉碎と酵素糖化特性について検討し、酵素糖化法によるバイオエタノール製造のための高効率粉碎を目指した。その結果、以下の結論を得た。

- ① 木質原料をコンバージミル粉碎すると微粒子化・非晶質化するが、酵素糖化性は非晶質化と相関性があった。
- ② ハンマーミル (微粒子化) とコンバージミル粉碎 (非晶質化) を組み合わせた多段式粉碎 (乾式複合

メカノケミカル粉碎) が効果的であり, 短時間での高効率粉碎が達成できた。

- ③ハンマーミル処理物は微粒子化(メディアン径: 約 46 μm) が達成されるが, 高結晶性であるため酵素糖化性が低い。一方, HAM-CONV 20 min 粉碎物は結晶性が大きく低下し酵素糖化性も大きく向上した。
- ④6L 半連続式コンバージミルを新たに開発し, 1L バッチ式コンバージミルとほぼ同等の粉碎性を示すことが確認できた。

以上のように, コンバージミル粉碎物は, 杉おがくず等のハードバイオマスの非晶質化を伴う高効率粉碎が達成でき, 酵素量の低減も期待できることがわかった。

[謝辞] 本研究は, 環境省・循環型社会形成推進科学研究費「木質系バイオエタノール製造のためのコンバージミル連続粉碎技術開発」, および JSPS 科研費 23560914 の助成を受けた。ここに謝意を表する。

References

- 1) Endo, T.: "Bioethanol Production from woods with the aid of nanotechnology", *Synthesiology*, **2** (4), 310-320 (2009)
- 2) Inoue, H., 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)
- 3) Nikaido, M., K. Totani, T. Fukumura, M. Osada and K. Tanno: "Efficient Grinding of Woody Biomass by Converge Mills", *FUNTAI GIJUTSU*, **2** (8), 17-24 (2010)
- 4) Fukumura, T., M. Osada, K. Totani and M. Nikaido: "Effect of Convette Mill Grinding on the Enzymatic Saccharification Characteristics of Woody Materials", *J. Japan. Inst. Energy*, **89** (10), 968-974 (2010)
- 5) Tanno, K., T. Sato, A. Maruyama, Y. Yanbe and Y. Fujitaka: "Basic Performance of High Speed, High Purity and High Intensive Ball Mill", *J. Japan. Soc. Powder Powder Metallurgy*, **53** (1), 68-75 (2006)
- 6) Segal, L., J. J. Creely, A. E. Martin, Jr. and C. M. Conrad: "An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer", *Text. Res. J.*, **29**, 786-794 (1959)
- 7) Nikaido, M., K. Totani: "Effective Utilization of Woody Biomass Using Converge Mill", *Cellulose Commun.* **18** (3), 115-118 (2011)