

【緒言】

木材の主要構成成分であるセルロースはグルコースにより構成される高分子であり、バイオエタノールの生産原料として有望である。また、日本は豊富な木材資源を保有しつつも十分に活用できていないという現状がある。そこで、国内木材資源の利用促進の手段の一つとして木材からのバイオエタノール生産が考えられる。木材からバイオエタノールを生産するためには、前処理、糖化、発酵といった工程を経る必要があり、それぞれの工程における収率向上が重要である。近年木材の前処理技術としてイオン液体処理が注目されており、様々な樹種および条件について研究が進められている。

本研究ではバイオエタノール生産工程である前処理、糖化工程に着目し、日本の代表的な針葉樹であるスギの木材に対して、Fig. 1 に示すイオン液体 1-エチル-3-メチルイミダゾリウム アセテート ([Emim]Ac) 処理を施し、処理後の試料について酵素糖化を行った。その上で、[Emim]Ac 処理後の試料の化学構成成分、酵素糖化効率、酵素吸着量などを明らかにした。

【実験方法】

Cryptomeria Japonica の木粉 1.25 g 及び [Emim]Ac 25 g をナス型フラスコに入れ、オイルバスにて 80 °C、所定時間加熱した。反応混合物をジメチルスルホキシド (DMSO) で洗浄しつつ 1GP16 ガラスフィルターで吸引濾過した。DMSO で数回洗浄した後、残渣 (Photo 1.右) をアセトンで洗浄し回収した。[Emim]Ac 処理により得られた濾液に過剰な水を加えることで再生セルロース (Photo 1.左) を得た。また、簡易プロセスとして再生セルロースと残渣を混合した状態での試料回収も行った。その際には蒸留水のみで洗浄を行った。回収した残渣、再生セルロースおよび混合試料について残留 [Emim]Ac を調べるために有機元素分析を行い、窒素含有率から [Emim]Ac 残留量を算出した。残渣中には高い濃度の [Emim]Ac が確認できたため、蒸留水で再度洗浄し、別途試料として回収した。また、残渣、再生セルロース、ろ液および混合試料はそれぞれ硫酸法により酸加水分解し、ろ液中の単糖をイオンクロマトグラフィーで分析し、加水分解残渣をクラウンリグニンとして定量した。また、残渣及び再生セルロースに対し 45 °C



Photo. 1 Regenerated cellulose (left) and Residue (right)

で 24 時間酵素糖化処理を施した。酵素は GC220 (ジェネンコア協和株式会社) を使い、添加量は約 32 FPU/g sample であった。酵素糖化処理後に生成したグルコースはイオンクロマトグラフィーにて分析した。その後、Py-GC/MS を用いて酵素糖化残渣に対する酵素吸着量を定量した。

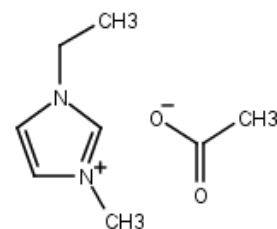


Fig.1 [Emim]Ac

【結果および考察】

1. 試料の化学構成成分および酵素糖化処理

[Emim]Ac 処理後に回収した再洗浄後残渣および再生セルロースの化学構成成分を分析した。[Emim]Ac 処理は 80 °C で 72 時間施した。[Emim]Ac 処理によりリグニン、セルロース、ヘミセルロースの一部溶出が確認できた。再洗浄後残渣および再生セルロースの収率は 75.3 %, 12.6 % であり、[Emim]Ac 吸着量はそれぞれ 3.9 %, 5.3 % であった。再生セルロースは純粋なセルロースではなくリグニンやヘミセルロース由来のマンナンも含まれていた。

ろ液中にはキシロースが最も多く含まれており、他にもアラビノースやガラクトースなどのヘミセルロース由来の単糖が含まれていた。このことから、[Emim]Ac 処理によりスギのヘミセルロースであるアラビノグルクロノキシランおよびグルコマンナンが溶出し、グルコマンナンの一部は再生セルロースとして回収され、アラビノグルクロノキシランはろ液中に残留したのではないかと考えられる。

酵素糖化処理により得られたグルコースの収率は、再生セルロース>再洗浄後残渣>フィルターペーパー>残渣>未処理木粉となった。このことから[Emim]Ac 処理による糖化効率の向上が確認された。また、残渣を再洗浄することで[Emim]Ac 含有率を約 25 %から約 4 %に低下させたところ、グルコース収率は約 51 %から約 90 %に向上した。これにより[Emim]Ac 存在下における酵素活性の低下が示唆された。さらに、再洗浄後残渣と未処理木粉のリグニン含有率には大幅な違いがないにも関わらずグルコース収率には大幅な違いがあった。[Emim]Ac 処理による酵素糖化効率の向上は脱リグニンではなく、別の要因が強く影響していると推測できる。

2. 酵素吸着量

試料に吸着した酵素量を Table 1 に示す。再生セルロースおよび再洗浄後残渣中のセルロースは酵素処理により大部分がグルコースへと分解されたため、リグニンおよびヘミセルロースにより構成さ

Table 1 The amount of enzyme adsorption and lignin content determined by Py-GC/MS

Sample	Estimated residue yield (%)	Glucose conversion (%)	Lignin content on sample(%)		FPU/g enzyme treated sample	FPU/g lignin in enzyme treated sample
			Before treatment	After treatment		
Filter paper	38	62.2	-	-	64	-
Wood meal	97	6.1	31.6	31.0	4	14
Regenerated cellulose	31	> 100	8.7	28.3	98	345
Re-washed residue	61	90.1	34.8	58.4	29	50

れていると考えられる。酵素はそれら成分に吸着したものと考えられる。再洗浄後残渣中のリグニン含有率は木粉と同程度であり、酵素吸着量は木粉よりも高いが、糖化効率は高かった。酵素糖化効率の低下は、酵素とリグニンの非特異的な吸着、リグニンによる酵素のセルロースへの物理的なアクセスの阻害により引き起こされることが知られており、未処理木粉においては後者の作用が強く影響したと推測できる。再生セルロースはの高い糖化効率はリグニンとセルロースが形成していた高分子網目構造が変化し、酵素のアクセスが容易になったことで酵素糖化がスムーズに進行したためと考えられる。さらに、セルロース分解後の酵素がヘミセルロースおよびリグニンに吸着し濃縮されたことで酵素吸着量が高くなったと推測できる。再洗浄後残渣に対する酵素吸着量は再生セルロースよりも低いことから、木粉同様に物理的なアクセスの阻害が少し生じていると考える。しかし、[Emim]Ac 処理を施したことによりセルロースの結晶構造および結晶性の低下が生じ、酵素分解性が高まったことで、アクセスできた少しの酵素により効果的に糖化が生じたと考えられる。

3. [Emim]Ac 簡易プロセス

再生セルロースと残渣を混合して回収する簡易プロセスを施した。混合試料に酵素糖化して得られたグルコースの収率を Table 2 に示す。通常のプロセスに比べ、いずれの処理時間においてもグルコース収率は劣っている。しかし未処理木粉よりはグルコース収率が向上していることから、簡易プロセスも酵素糖化前処理として有用である。また、いずれの混合試料もリグニン含有率に大

Table 2 Enzymatic saccharification for samples treated with [Emim]Ac for fixed time

Sample	Glucose content in initial sample (mg)	Lignin content (%)	[Emim]Ac content (%)	Liberated glucose (mg)	Yield (%), based on glucose from starting material)
Filter paper	22.3	-	-	7.0	31.4
Wood meal	9.2	34.5	-	0.4	4.8
2h treatment	7.5	31.4	4.6	1.9	25.8
4h treatment	8.4	30.5	4.4	2.3	27.5
8h treatment	6.7	30.9	3.0	2.3	34.1

幅な違いがないが処理時間に比例してグルコースの収率は増加していた。これは、処理時間が長くなるほど、セルロース結晶構造の変化およびセルロースの結晶性の低下が進行するためであると考えられる。以上のことから、酵素量が十分に存在しており、かつある程度（本章では約 10 %）の脱リグニンが生じている条件において、試料の酵素糖化性はリグニン含有量に依存せず、セルロースの結晶構造の変化や結晶性の低下などの要因に依存することが示唆された。