

機関番号：26402  
 研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20550116  
 研究課題名 (和文) セルロース結晶領域の加水分解によるアルコール発酵用セロオリゴ糖の合成  
 研究課題名 (英文) Synthesis of Cello-Oligosaccharides for Alcohol Fermentation by Hydrolysis of Crystalline-Region Cellulose  
 研究代表者：  
 瓜生 敏之 (TOSHIYUKI URYU)  
 高知工科大学・工学部・副学長  
 研究者番号：80011005

## 研究成果の概要 (和文)：

結晶セルロースを加水分解する方法を見出した。結晶セルロースの水懸濁液を、水素結合が弱くなる  $260^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$  の高温高压に加熱し、直ちに水蒸気爆砕した。表面のみが加水分解されただけであった。カセイソーダ溶液によってマーセル化したセルロースも同様であった。結晶構造を変化させたセルロースを酸性条件下、高温高压で水蒸気爆砕した時、内部にも主鎖切断が起った。この処理セルロースは酵素分解を容易に受けた。

## 研究成果の概要 (英文)：

A practical method to hydrolyze crystalline cellulose was found out. After crystalline cellulose suspension in water was heated at  $260^{\circ} \pm 10^{\circ}\text{C}$  in which temperature the hydrogen bond is weakened, it was steam-exploded. The obtained cellulose showed that hydrolysis occurred only at its surface. Mercerized cellulose showed the same phenomenon. For the crystalline cellulose converted into a different crystalline state, an acidic hydrolysis around  $200^{\circ}\text{C}$  gave mono- and oligo-saccharide derivatives, indicating the occurrence of main-chain scission. The converted cellulose was easily hydrolyzed by enzymes into mono- and oligo-saccharides.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

## 研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：セルロース・結晶領域セルロース・高温高压処理・水蒸気爆砕・エタノール・酸加水分解・結晶構造変化・酵素分解

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ポリ-1,4-β-グルコースである高分子セ

ルロースを加水分解して作ったグルコースおよびセロオリゴ糖を、酵母で発酵させてエ

タノールを製造する研究は、1980年代から盛んである。我が国では、建築廃材に約20%含まれる副成分のキシランを組替え大腸菌でエタノールへ変換するプラントが稼働している(佐藤正則、セルロース学会関東支部ミニシンポジウム講演予稿集、P. 32, 2007.5.17, 東京)。約50%含有のセルロースは利用されていない。

(2) 瓜生らは、大量の濃硫酸を用いる二段階加水分解法によって、木粉や紙などのセルロース原料から高収率でエタノールへ変換出来る方法を発表した。この時、 $\beta$ -グルコシダーゼ発現組換え酵母を用いて、オリゴ糖もエタノール変換出来た。しかし、濃硫酸の大量使用は実用には適さない(T. Uryu et al., *Appl. Biochem. Biotech.*, 135, 15 (2006))。

(3) 酵素加水分解を行うと、木材原料中のアモルファスセルロースは加水分解されるが、全体の約20~25%の結晶セルロースが未反応のまま残る。結晶セルロースの加水分解こそがエタノール化の鍵を握っている。

## 2. 研究の目的

(1) 結晶セルロースの格子中へ  $H^+$ ですら侵入出来ないのは、強固な分子間および分子内水素結合である。分子間水素結合は、分子運動が盛んになる高温では弱くなることが知られている。本研究では、水素結合を弱めるためにオートクレーブ中  $260^\circ \pm 10^\circ C$  の高温高圧状態にした結晶セルロース一水懸濁液に、水蒸気爆砕を行うことによりずりを生じさせ、格子中に  $H^+$ を侵入させて主鎖切断を起こさせようと考えた。

(2) 高温でセルロースを加水分解した場合、生成したグルコースは更に分解される可能性が高い。我々は二段階加水分解法の一段階目でオリゴ糖を得るのが望ましいことを見出している。オートクレーブを利用する高温高圧加水分解は、この一段階目に相当する条件を探すのが本研究の目的である。

(3) 二段階目加水分解としては希硫酸による加水分解がグルコースを得るのに適当であるので、これを採用し、最終的にグルコースおよびセロオリゴ糖を高収率で得ることが目的である。

(4) 結晶構造の異なるセルロースについても、加水分解条件を探す。

## 3. 研究の方法

オートクレーブ加熱による1段階目と希硫酸による2段階目加水分解から成る、二段階加水分解法を使って、ミクロクリスタリンセルロース(MC)を加水分解した。攪拌器付きオートクレーブ(栗原製作所製、東京)を用い、 $250-280^\circ C$ の範囲で $3-5^\circ$ 刻みで温度設定し、100 mlの水に懸濁させた5 gのMCを短時間で加熱昇温した。設定温度に到達後、水蒸気爆砕管を通して約50気圧から大気圧へ解放した。続いて、2.5または5 N HCl中 $100-105^\circ C$ で約30 min加熱した。NaOHで中和後、濾別物および濾過物を集め、それぞれ構造解析した。希硫酸水を使う1段階目加水分解の場合は、攪拌なしのオートクレーブ(耐圧ガラス社製、東京)を使用した。コピー紙、レーヨンおよび希薄カセイソーダによるマーセル化したセルロースについても同様に加水分解した。MC、コピー紙、および脱脂綿につき、構造変化セルロースを作成した。得られた加水分解物の構造は赤外スペクトルおよび高速液体クロマトグラフで解析した。

## 4. 研究成果

### 1) 構造変化セルロースのオートクレーブ加水分解

結晶領域セルロースの主鎖が切断出来たのは、今の所、構造変化セルロースのみであった。I型セルロース結晶は、酸加水分解や酵素分解を殆ど受けないことはよく知られている。一方、II型セルロース結晶はI型よりも加水分解されやすいことは一部では知られていた。しかし、セルロースのエタノール化研究が起るまで、セルロース構造と加水分解性の相関は調べられていなかった。2)以下で述べるように、結晶領域の水素結合を弱める筈のオートクレーブによる高温処理とそれに続く水蒸気爆砕によっても、結晶領域セルロースの主鎖切断は起らなかった。そこで、水素結合を弱める手段として、セルロース結晶を構造変化させた。

構造変化セルロースを1.5-4.3%の希硫酸に懸濁させて、オートクレーブ中 $180-200^\circ C$ で第1段階加水分解した。第2段階加水分解には10%の希硫酸を用い $85-90^\circ C$ に加熱した。第2段階加水分解後、加水分解液は $Ca(OH)_2$ で中和した。続いて、大量に生成した $CaSO_4$

に包含されている加水分解物を水で抽出した。抽出後、凍結乾燥したところ、加水分解物は水不溶になった。

加水分解物の構造は元素分析および赤外吸収スペクトルで調べた。表1に元素分析結果を示す。H1とH4はマイクロクリスタリンセルロースを、そしてH2とH3は脱脂綿をセルロース原料として使用した加水分解物である。マイクロクリスタリンセルロースを加水分解したH1は、31.27%のC、4.26%のHおよび0.34%のNを含むことが示された。H1が乾燥前は水溶性であったことを考慮すると、H1はセルロース主鎖切断により生成したグルコースおよびセロオリゴ糖が更に反応した化合物であると考えられる。H1がセルロースの組成比(C:44.44%; H:6.17%)より低いCとH値を示すことは、中和の際生成したCa塩および水を含むことが推察される。H2~H4はH1よりも更に低いCとH値を示したが、これらは強い吸湿性を持っていた。加水分解を希硫酸水中で行ったので、一部のOHが硫酸化され、高吸湿性の硫酸エステル化合物が生成したのであろう。

表1. セルロース原料の二段階加水分解の結果

No.	出発セルロース サンプル	wt., g	収率 g (%)	元素分析 %
H1 <sup>1)</sup>	MC <sup>2)</sup>	2.50	1.74 (69.6)	C: 31.27 H: 4.26 N: 0.34
H2 <sup>1)</sup>	AC <sup>3)</sup>	1.73	1.36 <sup>4)</sup> (78.4)	C: 27.70 H: 4.52 N: 0.66
H3 <sup>1)</sup>	AC <sup>3)</sup>	1.73	1.63 <sup>4)</sup> (94.2)	C: 23.47 H: 4.40 N: 0.62
H4 <sup>5)</sup>	MC <sup>2)</sup>	2.60	2.08 (80.0)	C: 21.35 H: 3.86 N: 0.26

- 1) オートクレーブ温度: 200°C; 時間: 5 min. 2) ミクロクリスタリンセルロース. 3) 脱脂綿. 4) 水を不純物として含む. 5) オートクレーブ温度: 180°C; 時間: 20 min.

IR スペクトルには、3600-3200 cm<sup>-1</sup>に CH, OH によるブロードな吸収、1710, 1580, 1550 cm<sup>-1</sup>に C=O 吸収、および 1450-500 cm<sup>-1</sup>に糖化合物特有の吸収が見られた。

1710 cm<sup>-1</sup>にシャープな吸収を持つ化合物はグルコノ-1,5-ラクトンである。また、1580, 1550 cm<sup>-1</sup>, および 1450-500 cm<sup>-1</sup>に現れる類似の吸収を持つ化合物としてカルシウムセロオリゴ糖がある。

表2に、H1につき、78%のカルシウムセロテトラオシルグルコネート(Calcium cellotetraosyl gluconate)と22%のグルコノ-1,5-ラクトンの混合物として計算した推定構造物の元素分析値を示す。また、Cの元素分析値から不純物の割合を計算した。推定混合物の元素分析値は、H1の実測値と良く一致した。

表2. 結晶構造変化セルロースの加水分解物 H1 の推定構造と元素分析値の比較<sup>1)</sup>

サン	収量, <sup>2)</sup> g	元素分析 実測値	推定構造の 元素分析値 <sup>3)</sup>
	1.74	C: 31.27	C: 31.07
H1	53.9	H: 4.26 N: 0.34	H: 4.39 N: 0
			O: 38.19 Ca: 1.36

1) 元素分析および赤外吸収スペクトルを基に計算。収率は不純物を除いた修正値である。2) 2.5 gの結晶構造変化セルロースを加水分解。3) 赤外および乾燥後の低い水溶性より、78%のカルシウムセロテトラオシルグルコネート(Calcium cellotetraosyl gluconate)と22%のグルコノ-1,5-ラクトンの混合物と推定。含有率はそれぞれのC=Oの赤外吸収より求めた。炭素の元素分析値より純度を求めた。

この結果は、今まで如何なる条件下でも主鎖切断が起らなかった結晶領域セルロースが、構造変化させればオートクレーブによる高温下では加水分解できることを明白に示している。しかしながら、過酷な条件を使用したため、生成したグルコースの更なる分解が起った。従って、酸性条件下でのオートクレーブ加水分解は実用化には適さないであ

ろう。

構造変化セルロースを予備的に酵素分解したところ、完全にグルコースおよびセロオリゴ糖へ加水分解された。これも初めて見出された。

2) 結晶領域セルロース (=ミクロクリスタリンセルロース) のオートクレー

ブ加水分解

350°Cまで急速に昇温できる、水蒸気爆砕管を備えた攪拌器付きオートクレーブを別の研究費で購入した。この装置を用いて、250-280°Cの温度範囲で水とミクロクリスタリンセルロースの混合物を室温から所定温度まで 30-45 min かけて昇温した。所定温度に到達後直ちにバルブを開いて、高温高压 (約 50 atm) 状態のミクロクリスタリンセルロース-水混合物を水蒸気爆砕した。

黒褐色粉末状、ふわふわした薄茶色浮遊物、などの生成物が得られた。これらを分離精製後、構造解析したところ、すべて表面のみに反応が起っていることが分かった。表面を剥がした内部は元のミクロクリスタリンセルロースのままであった。また、オートクレーブ処理ミクロクリスタリンセルロースに第2段階の希酸加水分解を行っても、結晶内部に何の変化も起らなかった。

この結果、ミクロクリスタリンセルロースの内部構造はグルコース残基当り 2、3 個の水素結合で堅固な結晶構造になっており、高温でも水素結合は弱くならず、膨張もしていないことが分かった。

水蒸気爆砕は、高温下で膨張したミクロクリスタリンセルロース結晶が、爆砕管のらせん内部を通過する間に摩擦によるずり応力で破壊され微細化されることを期待した。しかし、高温における結晶構造の膨張は起らなかった。

3) マーセル化処理ミクロクリスタリンセルロースのオートクレーブ加水分解

ミクロクリスタリンセルロースを低温で 10%以下の希薄な苛性ソーダ水溶液に浸漬するマーセル化した。その後、ジメチルスルホキシド (DMSO) 中へ沈殿させて、DMSO を含むマーセル化ミクロクリスタリンセルロースを作った。これを 2.5 N (9%) の HCl 中で 101-104°Cで 15 min-2 h 加熱還流したが、加水分解は起らなかった。

マーセル化するとセルロース主鎖の再配

列が起ると考えられている。ミクロクリスタリンセルロース-希薄苛性ソーダ水溶液は白濁している。従って、溶解状態と言うよりむしろマイクロフィブリル化したセルロースバンドルが、懸濁液を形成していると考えられる。1) で述べた結晶構造変化はマーセル化では起らない。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) T. Uryu, K. Katsuraya, K. Okuyama, H. Kato, C. Uchiyama, A. Oka, N. Kubo, M. Takahashi, M. Kudo, M. Kawabe, T. Kobayashi, S. Ohnishi, M. Aida, K. Shishikura, H. Iefuji, K. Kobiro, Y. Tsutsui, and T. Yoshida,  
Two-Step Cellulose Hydrolysis Using Modest Amount of Concentrated Sulfuric Acid or Autoclave and Fermentation of the Hydrolyzates into Ethanol Utilizing Recombinant Yeast, *Bulletin of Kochi University of Technology*, **7**, 101-108 (2010).
- 2) S. Han, D. Yoshida, T. Kanamoto, H. Nakashima, T. Uryu, and T. Yoshida,  
Sulfated Oligosaccharide Cluster with Polylysine Core Scaffold as a New Anti-HIV Dendrimer, *Carbohydr. Polym.*, **80**, 1111 - 1115 (2010).
- 3) M. Okimoto, T. Yoshida, M. Hoshi, K. Ohashi,  
Novel Application of Electrooxidative Method for the Cyclization of N-Benzyl-2-(hydroxyl-methyl)- and N-benzyl-2-(2-hydroxyethyl)-piperidines, *Heterocycles*, **81**, 2471 - 2478 (2010).
- 4) Y. Wan, R. Lu, K. Akiyama, K. Okamoto, T. Honda, Y. Du, T. Yoshida, T. Miyakoshi, C. J. Knill, and J. F. Kennedy,  
Effects of Lacquer Polysaccharides, Glycoproteins and Isoenzymes on the

Activity of Free and Immobilized Laccase from *Rhus vernicifera*,  
*Intern. J. Biol. Macromol.*, **47**, 76-81 (2010).

- 5) M. Tegshi, S. Han, T. Kanamoto, H. Nakashima, and T. Yoshida,  
Synthesis and Specific Influenza A Virus-Adsorptive Functionality of Alkyl Curdlan Sulfate-Coated Membrane Filter,  
*J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, submitted.

[学会発表] (計 8 件)

#### 2010 年度エタノール 学会発表

- 1) ○梁 鮮香、吉田 孝、瓜生 敏之、  
形質転換酵母によるセロオリゴ糖からのバイオエタノール合成、  
第 45 回高分子学会北海道支部研究発表会 (H23 年 1 月 31 日、札幌)、ポスター。
- 2) ○梅田 篤、森 文香、沖本 光宏、石澤 真也、吉田 孝、瓜生敏之、  
セルロースの前処理と糖化、発酵、  
第 45 回高分子学会北海道支部研究発表会 (H23 年 1 月 31 日、札幌) ポスター。
- 3) ○Xianxiang Liang, Takashi Yoshida, Toshiyuki Uryu,  
Direct Ethanol Fermentation of Cello-oligosaccharides by Recombinant Yeast pYBGA1",  
Pacifichem 2010 (December 17, 2010, Honolulu). ポスター。
- 4) ○梁 鮮香、吉田 孝、瓜生 敏之、  
形質転換酵母によるセロオリゴ糖のエタノール発酵条件の検討、  
第 59 回高分子討論会 (H22 年 9 月 16 日、札幌)、ポスター。
- 5) ○梅田 篤、吉田 孝、瓜生敏之、  
セルロースのセロオリゴ糖への前処理法の検討、  
第 59 回高分子討論会 (H22 年 9 月 16 日、札幌)、ポスター。
- 6) ○梁 鮮香、吉田 孝、  
セロオリゴ糖の直接発酵によるバイオエタノールの合成、

2010 年度日本化学会北海道支部夏季研究発表会 (H22 年 7 月 24 日、函館)、口頭発表。

- 7) ○梅田 篤、森 文香、沖本 光宏、石澤 真也、吉田 孝、瓜生敏之、  
遺伝子組換酵母によるセルロース系バイオエタノールの合成、  
日本化学会北海道支部夏季研究発表会 (H22 年 7 月 24 日、函館)、口頭発表。
- 8) ○梁 鮮香、吉田 孝、瓜生 敏之、  
セロオリゴ糖の直接発酵によるバイオエタノールの合成、  
第 59 回高分子学会年次大会 (H22 年 5 月 23 日、横浜)、ポスター。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

瓜生 敏之 (TOSHIYUKI URYU)  
高知工科大学・工学部・副学長

##### (2) 研究分担者

吉田 孝 (TAKASHI YOSHIDA)  
北見工業大学・工学部・副学長