

20. 竹一本からとれるエタノール量の推定

静岡県立科学技術高等学校

2年 河村泰希 加納武 佐藤 裕 北川 玲

1 動機

私たち自然科学部では、科学技術高校の北側にある放置竹林を使ってバイオエタノールを作ろうと考えた。一昨年の研究で、谷津山東側斜面の竹の本数、重量、昨年の研究で竹一本からとれる還元糖の量の推定をした。本年度では竹からとれるエタノールの量を調べようと考えた。

2 目的

竹から効率よく糖を取り出し、竹一本からとれるエタノールの量を推定する。

3 竹の粉の大きさの違いによる糖化効率の検討

用いた竹の粉の大きさ

竹の粉の大きさによって糖化の効率に違いがみられるのではないかと考え、粉を、目の大きさ $425\mu\text{m}$ 、 $250\mu\text{m}$ の2種のふるいをつかって以下の3種類に分けた。この3種類の粉粒子の大きさの平均を、顕微鏡によりマイクロメーターを用いて調べた結果、粒子100個当たり長径は小さいほうから $185\mu\text{m}$ 、 $550\mu\text{m}$ 、 $991\mu\text{m}$ であった。以後、 $185\mu\text{m}$ を小、 $550\mu\text{m}$ を中、 $991\mu\text{m}$ を大と表記する。



4 方法

図1 3段階の大きさに分けた竹粉

竹から糖を取り出すまでの工程は、図2に従って行った。

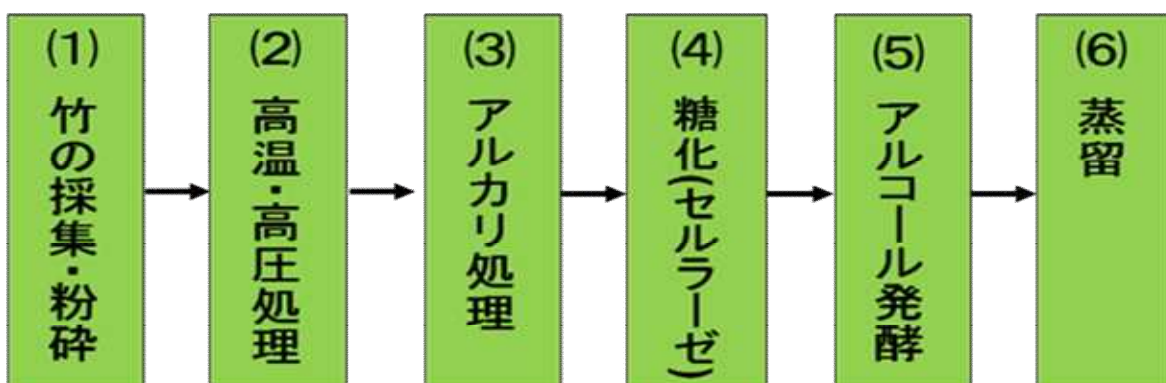


図2 エタノールを取り出すまでの工程

- (1) 竹の採集・粉砕 谷津山から竹を採取し、のこぎりで薄く切り、竹粉を採取する。
- (2) 高温・高圧処理 (3) で行うアルカリ処理を進みやすくするために、竹の粉 50g を三角フラスコに少量の脱イオン水とともに加え、オートクレーブで20分間高温高圧処理をする。
- (3) アルカリ処理 (2) で処理したものに 0.25mol/L の NaOH 溶液を加え、加熱したのち1時間静置する。この処理は、竹に多く含まれる構成成分で、アルコール発酵に不必要なリグニン等を取り除くために行う。

冷却後、リグニン等が抽出された上澄み液を捨て、再度水を加え濁りがなくなるまで繰り返し洗浄をする。濁りがある程度消えたら HCl を加え中和する。小分けして乾燥させる。

(4) 糖化 竹の細胞壁に含まれるセルロースをグルコースに糖化するために糖化酵素セルラーゼを用い濃度が 0.03%、基質濃度が 2.5%になるように調整し、0.2mol/L の酢酸緩衝液を加え、最適 pH4.8 としインキュベーターにより 45℃で 6 日間振とうを行う。

HPLC によるグルコース濃度測定

3 種の粉を用いて糖化を行った後、HPLC（高速液体クロマトグラフィー）により生成されたグルコース濃度を測定する。HPLC は 0.1%濃度グルコース標準液(2uL)を射ち、現れたピークのエリア（面積）をもとに、同量の試料液を射ちあらわれたピークの面積比から算出した。

5 結果および考察

図 3 が HPLC により求めた各粒子ごとのグルコース濃度である。図 3 より粉の大きさが大、中、小と小さくなるにつれ生成されるグルコース濃度 0.18%、0.36%、0.57%と、大きくなり、糖化が進んでいることがわかる。よって、粉の大きさが小さいほど糖化の効率が良いと考えられる。

糖化率の算出 表 1 に粉の大きさごとに糖化したグルコース量をもとに糖化率を算出した。

糖化率

(糖化率＝グルコース/アルカリ処理後の竹粉の重量×100%)

乾燥竹粉を、高温高压処理・アルカリ処理を行い、そのあと、析出されたリグニンを十分水洗し取り除く。そのあと乾燥させた各粒子重量を測定した。糖化率はアルカリ処理後の乾燥重量から糖化によりどれだけグルコースが得られたかの割合を求めたものである。昨年の生徒理科研究論文によると稗の糖化率は 31.0%という値が出ている。今回は、小粒子で 19%、中粒子で 12%、大粒子で 5.8%と昨年に比べ低い値となったが、昨年は還元糖量で今年はグルコース量なので糖化率の値が小さくなったと考えられる。粒子が小さいほど糖化率が大きい結果となったことの原因として、粉の大きさが小さいほど糖化酵素セルラーゼとの接触面積が大きくなり、糖化が進みやすくなるからだと考えられる。

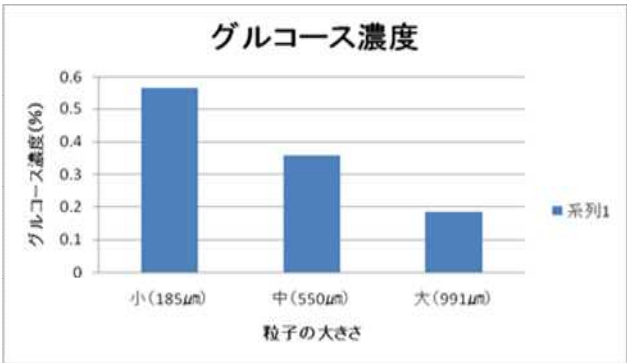


図 3 HPLC によるグルコース濃度の測定

表 1 糖化率

	乾燥竹重量	アルカリ処理後	グルコース濃度	グルコース量	糖化率
小 (185 μ m)	2.9g	2.0g	0.57%	0.38g	19%
中 (550 μ m)	3.3g	2.0g	0.36%	0.23g	12%
大 (991 μ m)	3.6g	2.0g	0.18%	0.12g	5.8%

6 ドライイースト、酵素セルラーゼの pH 発酵反応域、セルラーゼの処理日数の検討

(1) ドライイーストの酸性側 pH 発酵反応域の検討

ア 方法 糖化は最適 pH4.8 付近で実験を行うが、アルコール発酵に用いるドライイーストが pH 5.0 でも反応するなら、糖化とアルコール発酵を同時に行うことができ効率化を図れるのではと考えた。そこで、pH4.8 の酢酸緩衝液に NaHCO₃ の飽和水溶液を加え pH5.5～pH7.0 に調整し、グルコース溶液 (グルコース 4g) にドライイースト (0.4 g) を加え 45 分間発酵し、発生した CO₂ を水上置換法で捕集した。捕集した CO₂ からドライイーストの pH 発酵反応域を調べた。

イ 結果および考察

実験を2回行った計測値は、平均 pH が 5.5、6.0、6.5、7.0 のとき発生した CO₂ 量はそれぞれ 42ml、80ml、74.5ml、60ml となった。

図4よりドライイーストの最適 pH は 6.0~6.5 と推定できる。また、pH5.5 では pH6.0 の半分程度しか発酵が進まないとわかった。よって、糖化とアルコール発酵を連続して行うのは難しいと考えられる。

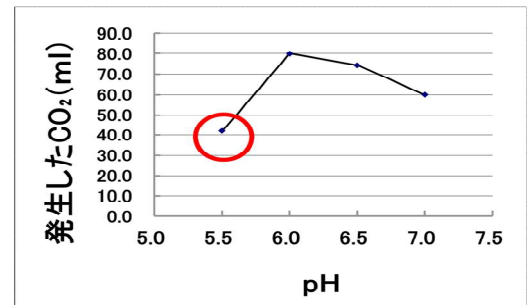


図4 pH と発生した二酸化炭素量

(2) 酵素セルラーゼ(糖化の効率化)

ドライイーストと同様に、セルラーゼによる糖化反応が pH により変化するのかを調べることにした。

ア 方法 pH5.0~pH6.0 に調整したフラスコに酢酸緩衝液 (50ml)、刻んだろ紙 (セルロース) (2.0 g) を入れる。各溶液にセルラーゼ (0.10g) を加え、40℃に保ちインキュベーターで1日糖化处理を行う。各フラスコ中のグルコース濃度を糖度計を用いて測定をする。

イ 結果及び考察 図6は左から pH5.0、5.5、6.0 で一番右にあるのが対照実験の結果である。糖度計による測定の結果は、pH5.0 が 3%、pH5.5 が 3%、pH6.0 が 2%、対照実験が 1%。これをグラフにしたのが図5である。

対照実験の糖度が 1%前後でその値を考慮せず考えると pH 6.0 は最適 5.0 pH~pH5.5 の半分程度しか進まなかった。よって最適 pH が 6.0~pH 6.5 のアルコール発酵とは並行して実験できないと考えられる。



pH 5.0 5.5 6.0 対照



図6 セルラーゼ処理

セルラーゼ処理前

セルラーゼ処理後

(3) セルラーゼの処理日数の検討

ア 方法 フラスコに pH 4.8 酢酸緩衝液 100ml、セルラーゼ 0.03g、竹の粉小 2.0g を加えたものを 4 つ用意し、インキュベーターにかけ 45℃に保ち 4 日間糖化を行う。1 日ごとに 10ml ずつ液を採取しグルコース濃度を HPLC を用いて測定する。

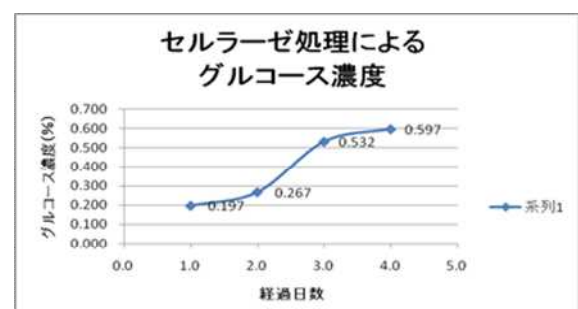


図7 セルラーゼ処理によるグルコース濃度

イ 結果 1日目でグルコース濃度が0.197%、2日目で0.267%、3日目で0.532%、4日目で0.597%だった。この結果とグラフからわかるように、3日目、4日目でグルコース濃度の上昇が大きいことがわかる。

7 発生した CO₂量、ガスクロによるエタノールの推定値

(1) 目的 4の(4)の糖化で得られたグルコース液を用いてアルコール発酵を行い、発生する CO₂量を求める。また、発生した CO₂量からエタノール量を算出する。

(2) 方法

ア 小中大粒子からとったグルコース液に NaHCO₃ 液を滴下し pH6.0 にしてドライイーストを加えインキュベーターを用いて振とうし発酵させ発生した CO₂を水上置換法で捕集する。

(グルコース液 30mlドライイースト 0.3g)

イ アで発酵させたグルコース液を蒸留し、ガスクロマトグラフィーを用いてエタノール量を測定する。ガスクロはメタノール、エタノールの標準液(1 μL)を射ち、現れたピークのエリア(面積)をもとに、同量の蒸留した液を射ちあらわれたピークの面積比から算出した。

ウ 結果及び考察 発生した CO₂量はグルコース濃度 0.57%由来が 31.8ml(2 回行った内、1 回は明らかに水上置換による CO₂の捕集ミスと考えられ 1 回の値を使用)、0.36%由来が 28.2ml、0.18%16.7ml(0.36、0.18%由来の値は 2 回の実験の平均)。グルコース濃度が大きいほうが CO₂発生量も多くなると考えた。この実験の結果からもわかる通り、CO₂の発生量が一番多くなったのはグルコース濃度が最も大きい 0.57%由来で、推測通りであった。

また、エタノールの蒸留を行ったときの温度と経過時間の関係を表したものが図9である。蒸留は 88℃くらいが温度上限で 45 分間行った。エタノールの沸点は 78℃付近であるため、予備実験では、80℃上限で行ったがエタノールが採取できなかった。温度計球部が 80℃あってもさらにフラスコの上部でリービッヒ冷却器に気体が入る部分では温度が低下し、液体となってしまうと考えられたため、蒸留温度を 88℃で行った。そして、これらの実験の結果をまとめたのが下の表である。

表2 エタノール量の比較

	HPLC によるグルコース量 測定からのエタノールの推 定値(ml)	発生した CO ₂ 量からの エタノールの推定値(ml)	ガスクロによるエタノール量の 測定値(ml)
小(0.57%)	0.100	0.0753	0.0757

小粒子由来のグルコース液(0.57%)から、アルコール発酵の化学反応式にもとづいて、推定したエタノール量は、0.1ml、また、水上置換により同様にアルコール発酵の化学反応式を用いて、比例計算した値が 0.0753ml また、蒸留した液をガスクロマトグラフィーにより測定した値が 0.0757ml である。CO₂量から推定した値に対し、ガスクロマトグラフィーの実測値が同程度であったため、この値が信頼

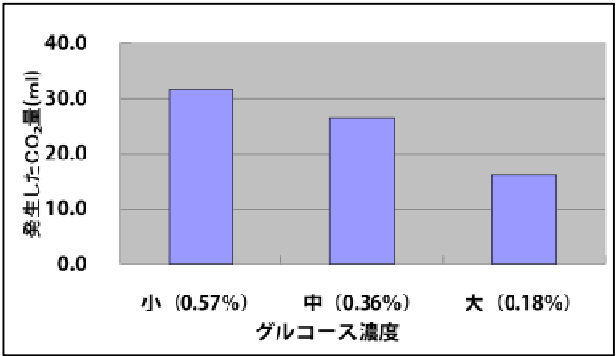


図8 粉の大きさの違いによる発生した CO₂量

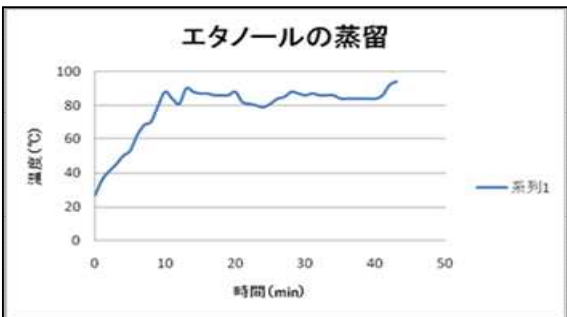


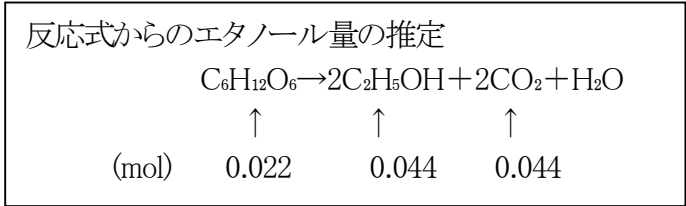
図9 蒸留のグラフ

できると考え、この値を用いて次の計算を行った。

8 全体考察(竹一本からとれるグルコース・エタノールの量の推定)

7の(2)ウのガスクロマトグラフィーでの結果から竹一本からとれるエタノール量を推定した。

ガスクロマトグラフィーから求めた結果より、発酵液 28.3ml からエタノールを 0.0757ml 取れると考えられるので、発酵液の全量 68ml で比例計算をするとアルカリ処理後の竹 2g からエタノールが 0.182ml 取れると推定した。



そして、先ほど出した値を使って比例計算をすると、アルカリ処理後の竹一本から取れるエタノールの量は 1.3L と推定される。

そして、求めたグルコース量、エタノール量、を昨年度求めた谷津山東斜面全体の竹の総重量にかけて計算したところ次の表のようになった。

28.3ml	:	68ml	=	0.0757ml	:	0.182ml
蒸留に使った 発酵液量		発酵液 の全量		ガスクロで 求めた エタノール量		アルカリ処理の 竹 2g からとれ エタノール量
↓						
2g	:	14.3×10 ³ g	=	0.182ml	:	1.3×10 ³ ml
アルカリ処理 後の竹粉の質量		竹一本のアル カリ処理後の 質量		アルカリ処理 後の竹 2g から とれたエタノール量		竹一本から とれる エタノール量

図10 エタノール量の計算

表3 竹一本と谷津山東斜面の値

	重量(kg)	グルコース量(kg)	エタノール量(ml)
竹1本(粉・小) 平均(稈のみ)	20.8	2.7	1.3×10 ³
谷津山東斜面(3936 本)	8.19×10 ⁴	1.06×10 ⁴	5.12×10 ³

竹一本(稈のみ)をすべて竹粉粒子平均 185 μm 程度に粉碎し、糖化处理で行うと、グルコース、2.7kg 取り出せ、それをすべて発酵に用いると、エタノールが 1.3×10³ml 得られる。その値を、谷津山東斜面の竹の本数 3936 本で推定する。重量は 8.19×10⁴kg。そこからとれるグルコース量は 1.06×10⁴kg それをすべてアルコール発酵すると、5.12×10³ml 得られると推定できる。(これはドラム缶約 26 個分に相当する)

9 まとめ

- ① 糖化において、竹の粉の粒子の大きさが小さいほうが効率がよい。これは、粒子が小さいほうが酵素セルラーゼと基質との接触面積が広くなり糖化が進みやすくなるからだと考えられる。
- ② ドライイーストの最適pHは pH 6.0～6.5、酵素セルラーゼの最適pHは pH 5.0～5.5 なので、糖化とアルコール発酵の同時並行はできないと考えられる。
- ③ セルラーゼ処理によるグルコース濃度は、糖化開始から3、4日目で大きく上昇すると考えられる。
- ④ 竹一本(20.8kg)からとれるエタノール量は 1.3L また、谷津山全体でとれるエタノール推定値は、ドラム缶約 26 個分相当になる。

10 反省と課題

CO₂の捕集など実験を繰り返しより正確なデータを取る、糖化、発酵の効率をさらにあげる

11 参考文献

- ・今優太ら 竹の高さ、重量を推定する計算式の考察 H25 生徒理科学研究論文
- ・小林祐一郎ら 竹一本からとれる糖の量の測定 H26 生徒理科学研究論文
- ・小川喜八郎 セルロースのバイオコンバージョン 大阪公立共同出版社