

マイクロ波を用いる木質系バイオマスの酵素的変換*

越 島 哲 夫**・真 柄 謙 吾**

Enzymatic Conversion of Woody Biomass by Using Microwave-Irradiation

Tetsuo KOSHIIJIMA and Kengo MAGARA

(昭和63年8月2日受付)

バイオマスという語は元々、生物現存量、生物量ともいわれる生態学の用語であって、一定空間内に現存する動植物など生物体の全てを有機物に換算した量を意味する。これが1970年代、世界的な資源不足、エネルギー不安の中で、資源・エネルギー源としての生物体に関心が寄せられるようになり、この用語が広く用いられるようになった。

バイオマスは太陽エネルギーを固定化する再生産可能資源であることが第一の特徴であって、利用分野としてはエネルギー、食糧、化学工業原料であり、現在利用されているものとしてはトウモロコシやキャッサバのデンプンからのアルコール生産、アミノ酸や抗生物質生産、生活廃棄物の発酵によるメタン生産などがある。

木質系バイオマスに関してはそのまま薪として容易に燃料となるところから、実用化されているものは少ない。現在、世界人口は約50億といわれている。人工増加率が年間5%とすると15年後には100億となる。そのときこれだけの人間を養えるだけの食糧はどうなるであろうか？ この人口増加に比例して食糧が生産されるには耕地面積に限度があり、それ故、人間が喰えるもの、すなわちデンプン質は全て食糧にまわし、アルコール類はセルロース質から得ることを考えておく必要がある。そのためには木質バイオマスからアルコール液体燃料を作り出すのに必要な技術を開発しておかねばならない。これは亦、燃料としての石油の消費を少しでも軽減し得ることにも通ずるのである。

I. リグノセルロースの変換システム

ここでいう木質系バイオマスの主体はセルロースであるが、木化植物ではセルロースは綿のように純粋な形で存在するのではなく、リグニンならびにヘミセルロースとマトリックスを形成するのでリグノセルロースと総称される。リグノセルロースは他の多糖と同様に光合成によって生産されるが、その生産量は年間、地球の全陸地上で生産される多糖量1,000億トンの約90%を占める。これに対し、作物としてつくられるデンプン量は9%にすぎない。これらの値からリグノセルロースの形で生産されるセルロース量が如何に多いかをうかがい知ることができる。

リグノセルロースは大部分が樹木の形で生産される。すなわち木材である。木材細胞は自然界ではリグニ

* 第43回木研公テ講演会（昭和63年5月20日、大阪）において講演

** 木材化学部門 (Research Section of Wood Chemistry)

Key words: Microwave, Woody biomass, enzymatic conversion ethanol, sugars

ンによって接着された形をとり、これによって機械的強度を保持する。従って、木材を住宅材料として利用する場合、リグニンは有効に働くが、紙・パルプとして利用したり、糖・アルコールに変換しようとする場合、むしろマイナス効果をもたらすことになる。すなわち、セルロースや多糖原料として利用するときはリグニンは夾雑物質、あるいは阻害剤として作用するのである。特にセルロースを酵素的に変換しようとするとき、リグニンはセルロース層を被覆するので酵素が直接セルロースに接触することを妨げることになり、酵素（セルラーゼ）の作用が十分に及ばない。この点がデンプンをその分解酵素であるアミラーゼで糖化する場合と比べ最も異なる点である。従って、リグノセルロースを酵素的に変換するためには必ず、前処理とよばれるリグノセルロースの活性化処理が必要となる。

リグノセルロースの変換系として図1に示した三つの系が考えられる。Aは前処理として爆砕、マイクロ波照射、あるいはリグニナーゼによるリグニンの部分分解を行って後、セルロースを酵素的に分解していく方法であり、被分解主体はセルロースである。ここでリグニンは副産物としてえられることになる。BとCでは被分解体はリグニンであって、Bでは加溶媒分解によって低分子化されたリグニンをハイドロクラッキ

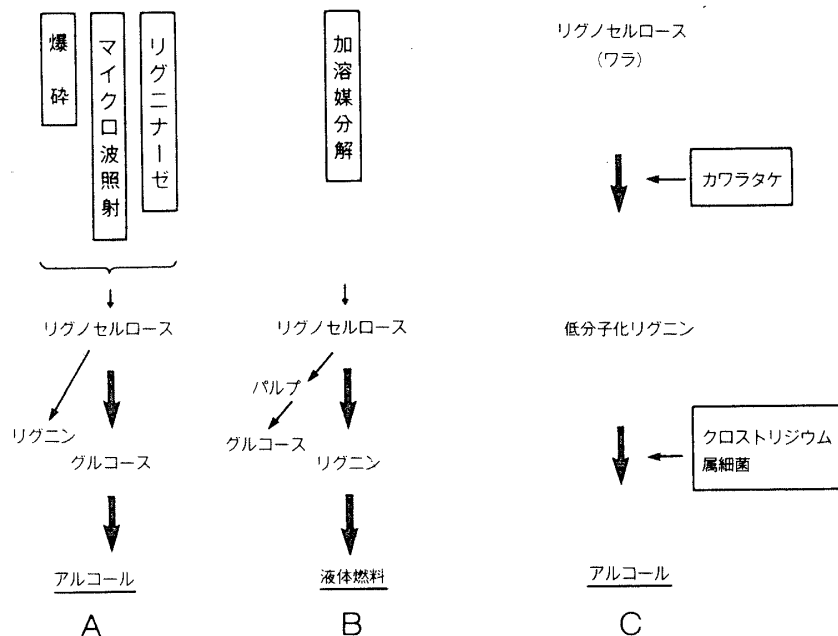


図1 リグノセルロースの変換システム

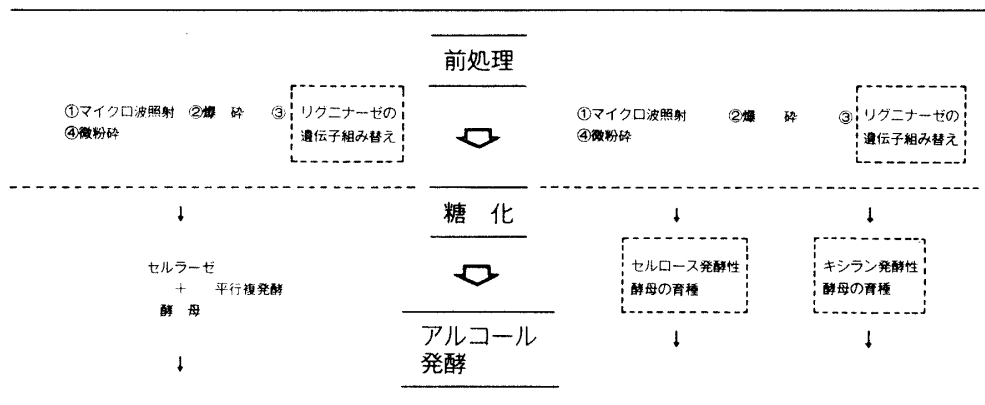


図2 リグノセルロースよりアルコール生産

ングによって液体燃料へもっていく方法である。北大の榊原、その後笹谷らによって行われている。この方法では勿論セルロースはパルプとして得られるので両者の利用が可能となる。Cは京大の松野らによって進められているプロセスであって、分子量200程度にまで低分子化したリグニンをクロストリジウムを用いてアルコールへもっていかうとする試みである。これらのうちセルロース→糖→アルコールのプロセスのみをとりあげ、現在試みられているそのアプローチの方法を挙げると図2のようになる。

ここでは①②③④の4種の前処理法があげられているが、これらのうち①～③はエネルギー重点領域研究で私の班で進められている方法である。前処理のあと、リグノセルロースはリグニンの存在下で糖化・発酵させ、直接アルコールを生産することができる(図2左側)。一方セルラーゼと酵母を作用させるかわりに、セルラーゼの機能を支配する遺伝子を酵母に組み込んだ、セルロース発酵性酵母をつくり、この新しい微生物をもちいて一挙にリグノセルロースをアルコールへ変換しようという努力が阪大の岡田らのグループにより続けられている(図2右側)。しかし、いずれにしても前処理を抜きにしてはセルロース質のアルコールへの転換は実施できないのが現状である。

現在から将来へ向けて、有効な方法として①～④が考えられるがここではマイクロ波照射を用いるリグノセルロースのアルコールへの変換につき述べる。

II. マイクロ波照射がリグノセルロースの糖化ならびにアルコール発酵に及ぼす効果

マイクロ波は波長1m以下の一種の電波であって2,450MHzと915MHzの二つがわが国では使用可能である。2,450MHzとは電場が1秒間に $2,450 \times 10^6$ 回変化するわけで、これに伴って電場内にある双極子をもつ分子、例えば水分子は回転・振動することになる。しかし、このあまりにも急速な回転に対応できない部分のエネルギーは熱の形に変換され温度が上昇する。言い方をかえれば分子の急速な運動はすなわち熱となって現れることになる。この点が外部加熱と異なる点で熱の伝導は外部加熱に比べ極めて円滑にすすむ。しかし、マイクロ波自体、水素結合や一部の共有結合さえも切断するため、単なる加熱手段であるに止

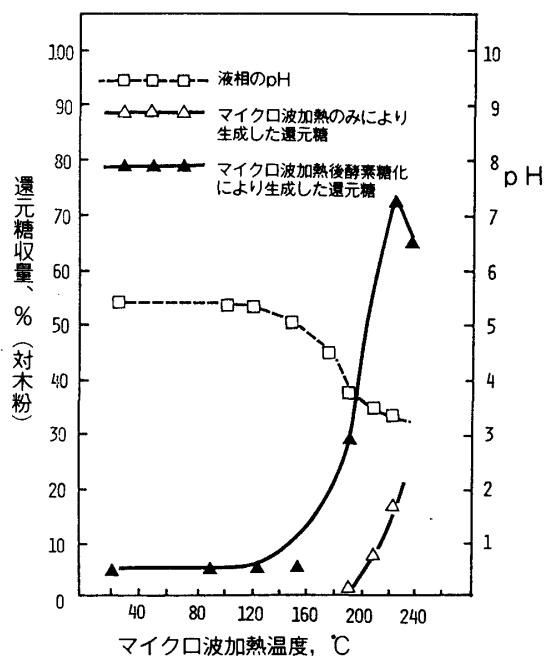


図3 マイクロ波加熱したブナ木粉の酵素糖化

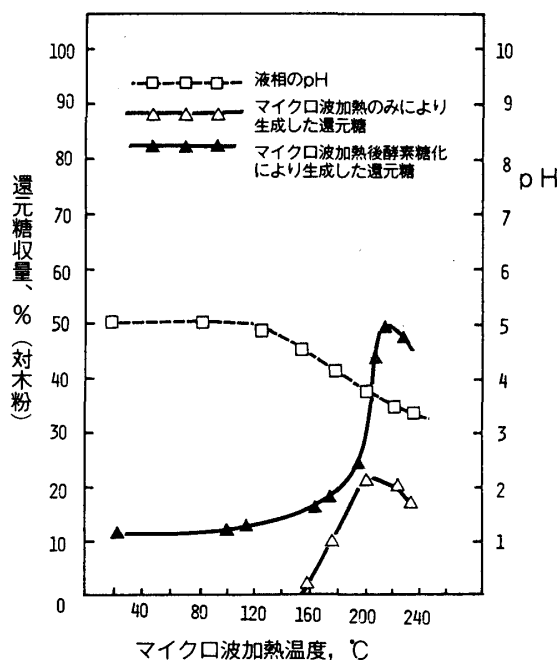


図4 マイクロ波加熱したアカマツ木粉の酵素糖化

まらずリグニン、ヘミセルロース、あるいはセルロース間の水素結合を切り、リグニン、ヘミセルロースについては高温の水による分解をさらに助長するものと考えられる。

図3と図4はブナおよびアカマツを水の共存下、密閉系でマイクロ波を照射したときの温度と照射した木粉をその後、市販セルラーゼ製品であるメイセラゼで48時間糖化したときのブドウ糖生成量の関係を図示したものである。この量はヘミセルロース由来の糖もブドウ糖に換算し、木粉あたりの百分率で生成量を表わしたものであって、ブナ木粉で約77%、アカマツ木粉では約50%と両者の間にかなりの差がある¹⁾。温度の上昇とともにヘミセルロースに結合するアセチル基が遊離して酢酸を生成し、その酸性と糖から生じる有機酸の酸性が合わさって pH が低下し、200°C では pH=3 付近までになる。このプロトンの作用がヘミセルロースやリグニンを加水分解するのみならずセルロースの重合度さえも低下させる。これはオートヒドリシスとよばれる現象であって、水蒸煮のみでも起こることが知られている。しかし上述のようにマイクロ波照射によりリグノセルロース全般の活性化はめざましいものがありオートヒドリシス+ α が予測できる。その事実は図5の例によっても示される。

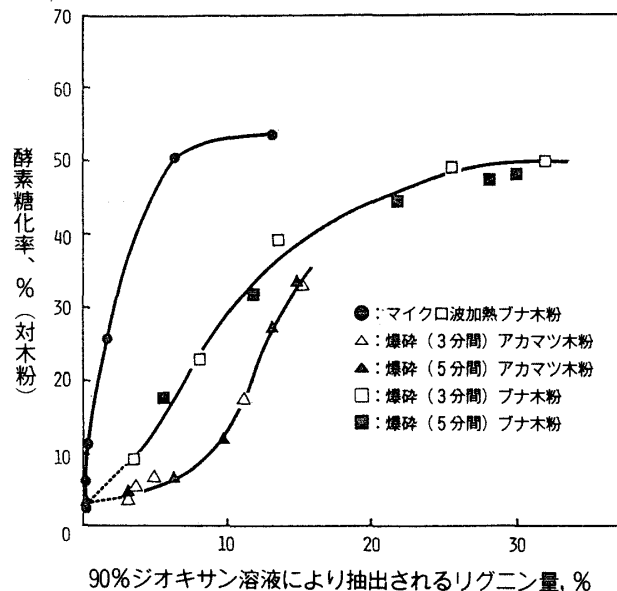


図5 マイクロ波加熱ならびに爆砕におけるリグニンの低分子化率と酵素糖化率の関係

図5は木材を爆砕、あるいはマイクロ波照射し、これによって90%ジオキサンに溶解・抽出されるようになったリグニン量を横軸により、処理木材をメイセラゼで糖化したとき得られるブドウ糖収率を縦軸にとったとき、それらの点を結んだ曲線を示したものである。抽出リグニン量はそのままリグニンの分解の度合いを示すものであるが故に、図から同じリグニン分解度で較べるとマイクロ波照射の方が高い糖化率を示し、その差はリグニン分解が進む程近接するが一致することはない。また、同じ糖化率ではマイクロ波処理の方が、リグニン分解度が低くてもその糖化率に達しうること示している。これらの関係から、マイクロ波照射には単なる加熱のみならず、酵素糖化を助ける他の作用が加わるものとみなすことができよう。この作用が水素結合の切断や共有結合の部分的開裂に相当するものであると考えられる。

図6はわれわれの研究室で試作した連続式マイクロ波加熱装置である。2,450 MHz のマイクロ波を用いている関係上、被照射部のセラミックチューブは直径 4 cm に制限され、そのため通常のチップは使用できないという欠点はあるが木粉を用いるならば必要な実験は全て行うことができる。

表1は各種リグノセルロースをマイクロ波処理後、酵素を用いて糖化したときの糖化率を示す。一般的に

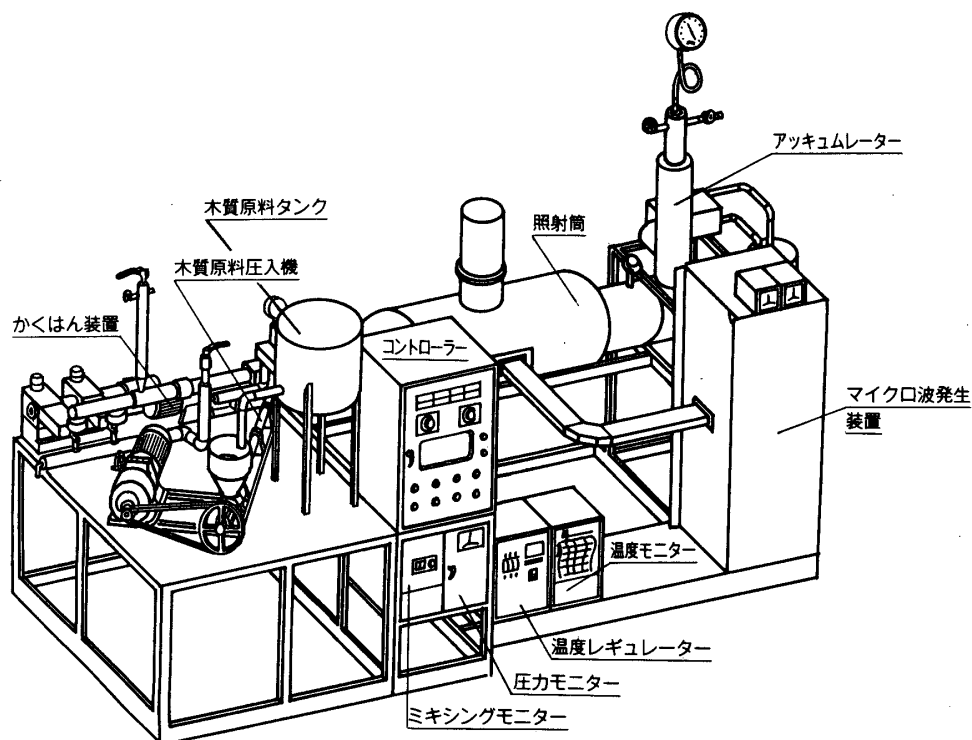


図6 連続式マイクロ波加熱装置（改良型）

表1 種々のリグノセルロースが含む多糖 100 g よりえられるブドウ糖収量

リグノセルロース源	最高ブドウ糖 収量, g	リグノセルロース源	最高ブドウ糖 収量, g
針葉樹		広葉樹	
アカマツ	66	ブナ	93
	95*1		100*2
	90*2	ポプラ	88
エゾマツ	60	ユーカリ	93
ヒノキ	61	シラカバ	90
カラマツ	61	レッドラワン	69*1
スギ	36	イエロウラワン	92*1
トドマツ	54	イネ科植物	
テーダマツ	59	バガス	84
メタセコイア	46	イネワラ	80
スラッシュパイン	62	モミガラ	77
針葉樹樹皮			
アカマツ	74		
エゾマツ	74		
ヒノキ	56		
カラマツ	60		
スギ	42		

*1: 微粉碎前処理

*2: マイクロ波加熱後10分間叩解したもの。無印はマイクロ波加熱処理のみ

言えることは針葉樹は広葉樹に比べ、遙かに糖化率が低い点である。これは水蒸煮や爆砕についても同じことが言える。これを改善するには水中での軽い解繊作用を加えるだけで十分である。実際には約10分間の叩解によって表1 (*2) や図7に示すような著しい糖化率の向上が得られる。この事実は広葉樹に比べ針葉樹ではセルロースとリグニンまたはリグニン・糖結合体の間の水素結合が、より広い範囲でより多い頻度で起こっていることを予測させる。

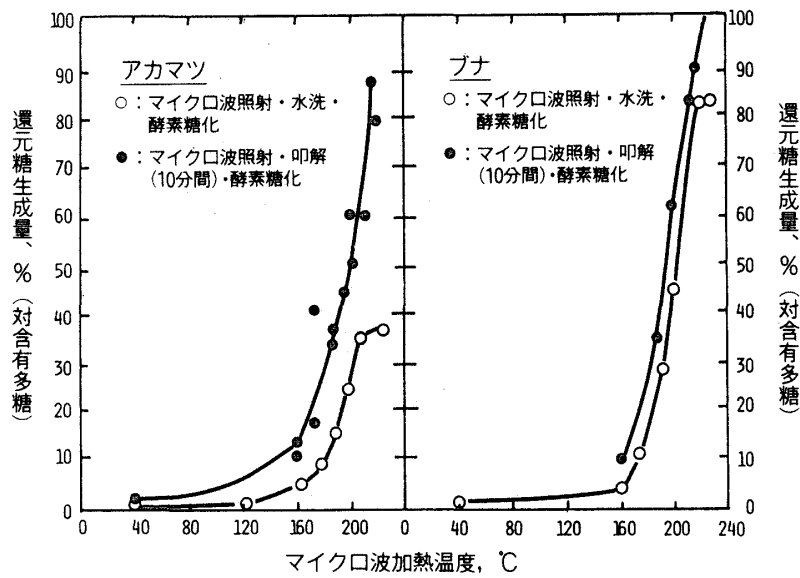


図7 マイクロ波照射したアカマツおよびブナ木粉の酵素糖化に及ぼす叩解の効果

表2 マイクロ波加熱したリグノセルロース 1 kg あたり生成するアルコール量*1

糖 化 法	原 料	生成アルコール量 (ml)	アルコール収量 (%)
酵 素 糖 化	アカマツ		
	加熱媒体：水	154 (244*2)	36.6 (57.9*2)
	加熱媒体：0.5%酢酸	129 (51)	31.6 (12.5)
	ブナ		
	加熱媒体：水	275 (285)	57.1 (59.2)
	加熱媒体：0.5%酢酸	294 (333)	62.0 (70.1)
	バガス		
	加熱媒体：水	285 (284)	56.5 (56.1)
	イネワラ		
	加熱媒体：水	378 (307)	80.8 (65.1)
マイクロ波加熱 酸 糖 化	モミガラ		
	加熱媒体：水	103 (135)	28.2 (37.1)
	アカマツ	124	44.1
	ブナ	190	48.9

*1：95%アルコール量, ml

*2：平行複発酵を行った場合の値

逆のことがボールミル摩砕した木粉の酵素糖化についても言える。すなわち、この場合は針葉樹の糖化率が著しく向上するが、広葉樹ではさほど効果が上がらない。表1のアカマツの*1印はこのような前処理を施したときの糖化率を示している。この場合は広葉樹の密度が針葉樹より総じて高いため、粉碎効率が低いことに帰因する。それ故、広葉樹の場合でもボールミルポットの器壁に対するボールの衝突頻度を上げたり、やや大きめのボールを用いることによって衝撃強度を大きくすると広葉樹でも満足できる前処理効果をあげることができる²⁾ (表1参照)。このように同じ前処理でも樹種によって効果にかなり差があることは注意しなくてはならない。

表2は水または0.5%酢酸共存下で各種リグノセルロースにマイクロ波を照射後、糖化・発酵させたとき生成するアルコール量を95%エタノールの容量として示したものである。ここでメイセラゼ糖化後、糖液を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で発酵させた逐次発酵とメイセラゼと酵母を共存下で作用させた併行複発酵 (表2カッコ内数値) を試み、両者を比較した。後者ではリグニン共存下でアルコール発酵を行ったことになる。

その結果、木質バイオマスでは針葉樹でも広葉樹でも併行複発酵がより高いアルコール生成量を与える。ただし、アカマツではマイクロ波加熱媒体として水を用いたとき、ブナでは0.5%酢酸を用いた場合が良い³⁾。この相違はアカマツでは高温下ではたとえ希酢酸でもリグニンの縮合を促進する率が大きいためと考えられる。いずれにしろ反応時間が約半分で終了する併行複発酵が有利であり、リグニンの共存が微生物作用を阻害しないことを明らかにした例といえる。

アルコール収量からいえばイネワラの生産量が最大であり、とくに群を抜く点が注目される。

マイクロ波照射時に強酸を共存させた例を最下段にまとめてあるが、やはり分解反応も起こるらしく、アルコール収量としてはかなり低いものであった。

Ⅲ. マイクロ波照射によるリグノセルロースの形態的变化と酵素糖化率向上との関連

マイクロ波照射はリグノセルロースと水の共存する密閉系で行うため、数分以内に温度が 200°C 前後に上昇する。この過程において、既述のように木材ヘミセルロースに結合する酢酸は遊離し、他の酸性物質と共に液の pH を3付近にまで低下させるのでヘミセルロースは加水分解をうけてその大部分が溶出し、また一方リグニンの、とくに β -O-4 結合が切断されてリグニンの低分子化がおこることはよく知られている。とくにヘミセルロースの溶出が木材組織を多孔質化することは容易に想像できるが、どのような細孔がどの

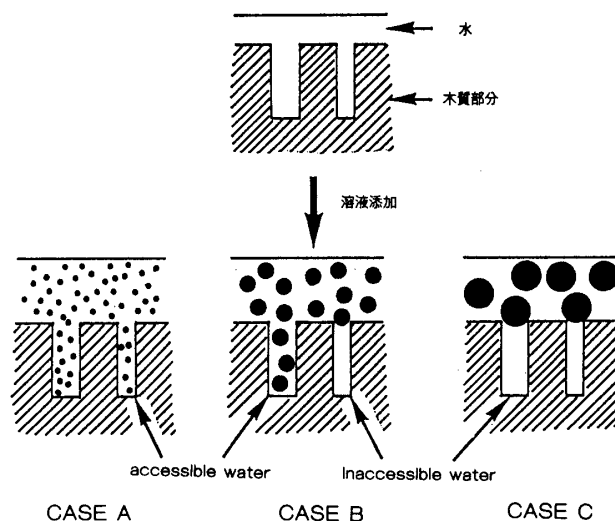


図8 細孔分析

位生成し、これらと酵素作用との関連が果して存在するのかどうかという点を詳細に検討した。

細孔の大きさならびにその量は STONE らの方法⁴⁾により測定した。その方法の大略は図8に示すように、溶液中の溶質の大きさを変えていくと、細孔内に入ることができない溶質の溶液では、その細孔内の水 (inaccessible water) は溶液中の溶質濃度を希釈することに参加していない。すなわち、溶液濃度はその分だけ高くなることになる。したがって、溶質の大きさと、その溶液を細孔分析に用いたときの濃度変化から、ある細孔径を有する細孔量の積算値を inaccessible water 量から求めることができる。

いま、 d_i を溶質の分子直径 i に相当する inaccessible water 量 (ml/g), w を溶液の重量, q を木粉に含まれる水の重量, p を木粉の絶乾重量, C_i を溶液の溶質濃度, C_f を溶液を含水木粉に加えた後の上澄の溶質濃度とするとつぎの関係が成り立つ⁵⁾。

$$d_i = \left(\frac{w+q}{p} \right) - \left(\frac{w}{p} \right) \left(\frac{C_i}{C_f} \right)$$

ここで d_i は乾燥木粉 1 g あたりの inaccessible water 量である。表3に、用いた溶質分子の分子直径を示した。これらはいずれも糖オリゴマーであるので、その濃度変化は旋光計によって読みとることができる。また、細孔内表面積 A は STONE らの式¹⁰⁾から算出した。

表3 溶質分子の特性

溶 質 分 子	分 子 量 ($\bar{M}_w$)	$\bar{M}_w/\bar{M}_n$	分子直径 (Å)
α -Methyl-D-glucoside	194	1.0	8
Raffinose	505	1.0	12
Dextran T-4	5000	—	35
Dextran T-10	9500	1.9	51
Dextran T-40	39400	1.7	90
Dextran T-70	66300	1.8	110
Dextran T-500	506000	2.7	270
Dextran T-2000	2×10^6	—	560

ここで Δv は細孔直径 ω における細孔容積を示す。

$$A = \frac{2\Delta v}{\omega}$$

このような方法を用いて、種々の温度までマイクロ波加熱したブナ木粉の細孔分布を示したのが図9である。

図から各種細孔の分布は 120°C までは加熱による大きい変化は認められないが 190°C から 35~110 Å の直径を有する細孔量が急激に増加しており、特に 210°C, 220°C 加熱では 35 Å 以下の直径をもつ細孔量が著しく減少し、それに相応して 110 Å 以上の細孔量が増加していることがわかる。

この 190°C のマイクロ波加熱温度は図10から理解できるように酵素糖化率の急激な上昇点であることから重要な意義をもつ。すなわち、190~200°C にかけてリグノセルロースが酵素反応に対し活性化することを図は示している。

この活性化が何に起因するのかを知るために、マイクロ波加熱木粉の水抽出物、90%ジオキサン抽出物ならびに β -セルロース生成量と種々の細孔直径を有する細孔量との相関を求めた。表4, 6, 8は各加熱温度における収量(生成量)であり正表5, 7, 9はそれらと、生成した細孔量との相関係数をまとめたものである。これらの結果から、木粉に元々存在していた 8~12 Å の細孔は、ヘミセルロースがマイクロ波加

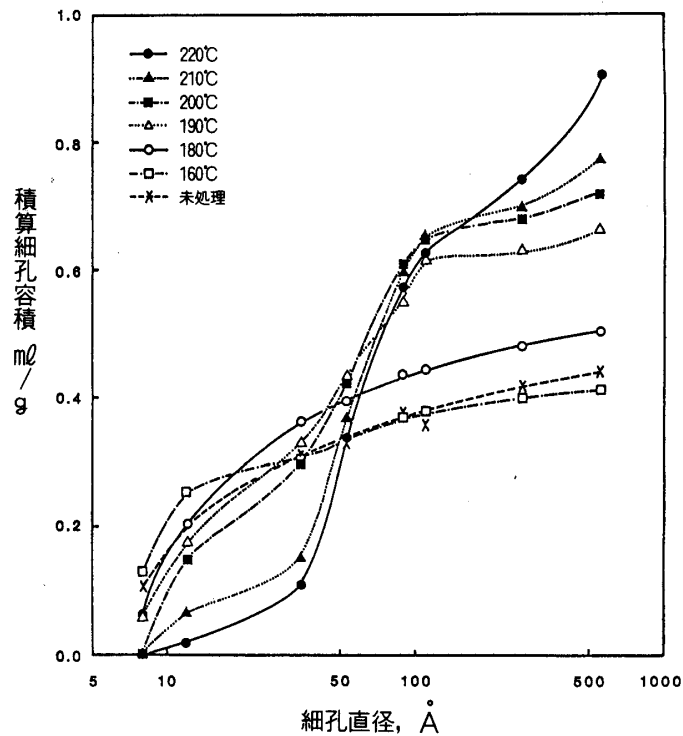


図9 種々の温度にマイクロ波加熱した木粉の細孔分布

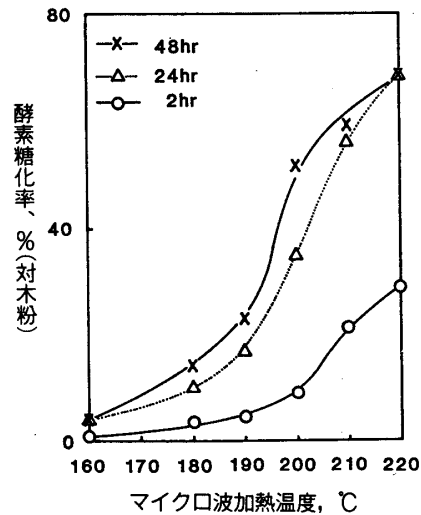


図10 プナ木粉のマイクロ波加熱温度と酵素糖化率の関係

熱により加水分解し、単糖やオリゴ糖となって液相へ溶出することによって細孔径が増大するため、8～12 Å の直径をもつ細孔は減少し、口径の孔となっていくものと推定することができる。同じことは、リグニンの分解度合いを示す90%ジオキサン抽出物量との関係でもみられる。しかしながらリグニンが低分子化して溶出するという現象は糖鎖が結合したリグニンオリゴマーの場合では起り得ようが、モノリグノールやジリグノールが水溶液中へ溶出するとは少し考え難い。また、 β -セルロースの生成は 190°C で著しく増大するため、たとえこれが系外へ溶出するのでもなくとも、細胞壁の脆弱化とこれに伴う細胞壁の割裂の進行と細孔量との関連はみいだされるかもしれない。細孔量を表10のように細孔内表面積として表したとき 35 Å 径

表4 マイクロ波加熱木粉（ブナ）の冷水抽出物*

加熱温度 °C	収 率 %
178	0.68
189	0.86
201	1.15
214	6.59
223	7.49
235	6.98

* バッチ式マイクロ波加熱による

表6 90%含水ジオキサン抽出物の収率

加熱温度 °C	収 率 %*
160	0.73
180	2.60
190	4.37
200	7.59
210	9.64
220	12.44

* マイクロ波加熱木粉に対するパーセント

表8 β セルロース生成量

加熱温度 °C	収 率 %
160	0.15
180	0.27
190	9.10
200	13.43
210	15.37
220	20.00

表5 冷水抽出物の収率と積算細孔容積 (ml/g) の相関

細孔直径 Å	相関係数 r
8	-0.69
12	-0.97
51	0.27
90	0.45
110	0.44
270	0.71
560	0.84

表7 90%含水ジオキサン抽出物と積算細孔容量の相関

細孔直径 Å	相関係数 r
8	-0.90
12	-0.98
51	0.06
90	0.70
110	0.80
270	0.93
560	0.98

表9 β セルロース生成量と積算細孔容積の相関

細孔直径 Å	相関係数 r
8	-0.87
12	-0.94
51	0.08
90	0.89
110	0.84
270	0.97
560	0.99

以上の細孔の積算表面積とブナ木粉の酵素糖化率の間には表11, 図11に示すような極めて高い相関関係が存在する (相関係数0.93~0.99)。35 Å 以上の径をもつ細孔がリグノセルロースのセルラーゼによる糖化に不可欠であることはつぎの実験結果によっても裏付けられる。すなわちブナ材木粉を 200°C にマイクロ波加熱したとき, 酵素糖化率は34.8%であった。これを同じ処理後, 105°C で乾燥後, 糖化するとき糖化率は20.9%に止まる。この両者の細孔分布 (図12) をみると, 後者では 35~110 Å の細孔がほぼ消失している。すなわちこの範囲の径をもつ細孔がリグノセルロースを加水分解するセルラーゼの攻撃に非常に好都合な形態的条件を付与するといえる⁷⁾。Y.H. LEE らの報告⁶⁾によればセルラーゼの見掛けの寸法はそれが球形であれば直径約 60 Å, 楕円体であれば 33×200 Å と測定されており, この事実から直径 35 Å 以上の径をも

表10 細孔の積算表面積

細孔直径 Å	積 算 細 孔 面 積 m ² /g					
	加熱温度 °C					
	160	180	190	200	210	220
270	0.4	1.0	1.6	1.8	3.9	8.6
110	3.3	5.5	3.0	5.3	8.1	20.3
90	4.5	6.1	17.2	12.5	19.5	31.7
51	12.7	20.3	47.6	64.4	83.6	90.4
35	27.6	33.8	96.4	121.4	185.0	210.4
12	70.2	168.3	234.3	249.9	255.6	281.9
8	322.2	448.3	454.3	553.9	391.6	323.9
4*	765.5	661.6	657.6	553.9	391.6	323.9

* 水分子の分子直径

表11 酵素糖化率と積算表面積の相関

細孔直径 $\text{\AA}$	相 関 係 数 r			
	糖化時間	2 hr	24 hr	48 hr
12		0.72	0.81	0.88
35		0.95	0.98	0.96
51		0.90	0.96	0.98
90		0.90	0.90	0.84
110		0.90	0.84	0.74
270		0.95	0.90	0.82

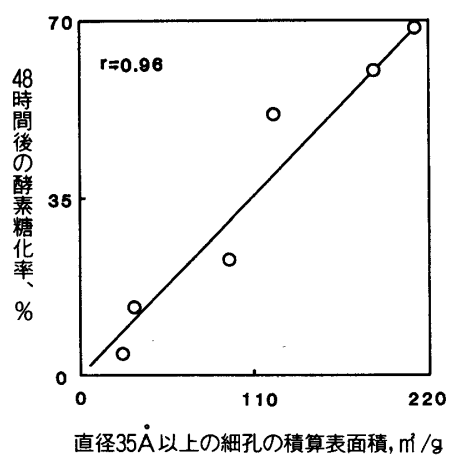


図11 マイクロ波照射によりブナ木粉に生成した直径35オングストローム以上の細孔表面積と酵素糖化率の相関 (r : 相関係数)

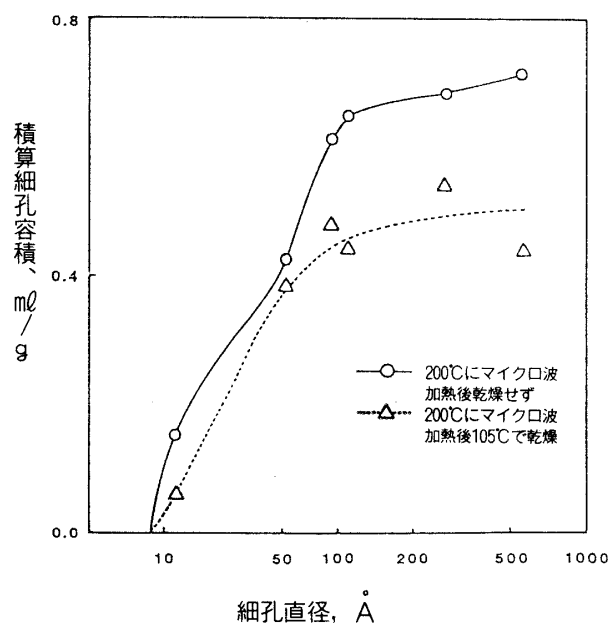


図12 マイクロ波照射後乾燥した木粉と乾燥しない木粉の細孔分布

つ細孔がセルラーゼがはまり込んでセルラーゼ鎖を加水分解するのに必要な時間、セルロース層と接触し続け得る環境をつくるという意味で酵素糖化率の向上に寄与しているものと考えられる。

β -セルロースの生成が 190°C 近辺から極端に高まり、また、マイクロ波加熱温度が 190°C 付近より上で糖化速度が急速に大きくなるのは β -セルロースの生成によって表わされるセルロース層の脆弱化がこの温度からおこり、多孔質化がすすむからであると思われるが、一方、この温度はリグニンの可塑化が既に始まっており、セルロース鎖に対するリグニンの制約もこの温度でより一層解放され、セルロース鎖へ酵素が作用しやすい物理的状態にもたらされることが β -セルロース収量向上の一因をなすと思われるのである。

引用文献

- 1) J. AZUMA, F. TANAKA and T. KOSHIIJIMA: Mokuzai Gakkaishi, **30**, 501~509 (1984)
- 2) 夜久富美子, 田中龍太郎, 藤島 静, 村木永之介, 美馬精一: 昭和60年度版通商産業省工業技術院特別研究報告集, p. 352~363 (1985)
- 3) K. MAGARA, S. UEKI, J. AZUMA and T. KOSHIIJIMA: Mokuzai Gakkaishi, **34**, 462~468 (1988)
- 4) J.E. STONE and A.M. SCALLAN: Cellulose Chemi. Technol., **2**, 343 (1968)
- 5) H.E. GRETHLEIN and A.O. CONVERSE: Biotechnol. Bioeng. **27**, 1498 (1984)
- 6) Y.E. LEE and L.T. FAN: Adv. Biochem. Eng., **17**, 101 (1980)
- 7) 越島哲夫: “多様なエネルギー資源の利用” 昭和62年度研究成果報告書, 143~146 (1988)