

リグノセルロースのマイクロ波照射
(第3報) マイクロ波加熱された生材および
乾燥材チップの酵素反応性

東 順一*・越 島 哲 夫*

Microwave Irradiation of Lignocellulosic Materials

III. Enzymatic susceptibility of microwave-irradiated
green and dried wood chips

Jun-ichi AZUMA* and Tetsuo KOSHIIJIMA*

Microwave heating of poplar green wood and dried wood chips was attempted in the presence of water to enhance the rates of enzymatic saccharification. When these wood chips were subjected to microwave irradiation, pH of the water extract decreased with increasing temperature and reached 3.2~3.5 at about 230°C, while acidity and furfural production increased with increasing temperature and reached 0.8~1.8 meq and 0.2~0.5%, respectively at about 230°C. Hemicelluloses suffered acid-induced autohydrolysis and were degraded to oligomers consisting of dimeric to octameric saccharides and monosaccharides. Formation of the reducing sugars started at 180°C and the amount of the sugars had a maximum at 218~233°C, while the amount of the water-soluble components began to increase at 160°C but had no maximum below 240°C. Quite similar results were obtained with poplar wood meal and beech wood chips.

The enzymatic susceptibility of all samples was markedly improved by microwave treatment carried out above 160°C. Wood chips had a similar saccharification rate to that with wood meal and did not show a maximum degree of saccharification below 240°C. The poplar green wood chips as well as beech dried wood chips were resistant to enzymatic saccharification but their enzymatic susceptibility could be improved to the same order as in wood meal by increasing the temperature up to 240~260°C. The present results demonstrated that microwave heating is a useful pretreatment method for enzymatic saccharification of wood chips.

概 要

ポプラの生材および乾燥材チップをマイクロ波加熱し、酵素糖化に対する反応性を木粉の場合と比較検討した。マイクロ波の照射とともに試料温度が上昇し、酸とフルフラールが生成した。230°C では pH は

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

3.2~3.5に低下し、酸とフルフラールの生成量はそれぞれ 0.8~1.8 meq および 0.2~0.5% であった。ヘミセルロースはオートヒドロリシスをおこし、単糖と重合度が 8~2 のオリゴマーに分解した。マイクロ波加熱による還元糖の生成は、180°C 以上の温度でのみ認められ 218~233°C で最高値を与えた。一方、水可溶性成分量は 160°C より上昇し始めたが、240°C 以下の温度では最高値に達しなかった。同様の結果がポプラの木粉やブナの乾燥チップについても得られた。

次に、マイクロ波加熱後酵素糖化を試みたところ、いずれの試料においても 160°C 以上の温度で糖化率が上昇し、240°C 以下では最高値を与えなかった。ポプラの乾燥チップでは木粉の場合と同様に糖化されたが、ポプラの生材チップではブナの乾燥チップと同様酵素糖化に対し抵抗性を示した。しかしながら、これらの試料については、加熱温度を 10~30°C さらに上昇させ 240~260°C にすることにより木粉と同一レベルまで糖化率を向上させることができた。以上の結果から、マイクロ波加熱は木粉のみならずチップ状試料についても酵素糖化に先だつ前処理として有益であると結論された。

1. 緒 言

前二報^{1,2)}において、マイクロ波加熱前処理はバガス、イナワラやモミ殻等のリグノセルロース性農産廃棄物のみならず、アカマツ（針葉樹）、ブナ（広葉樹）やモウソウチク（イネ科植物）で代表される高度に木化された高等植物の酵素糖化率を極めて効果的に向上することを述べた。これまでは、マイクロ波による試料の均一な加熱を期するとともに、試料間の形状の差による効果を低減させるために、すべての試料を 60~80 メッシュの粉末に限定してマイクロ波加熱を行なった。しかし、マイクロ波加熱を一般木材の酵素糖化の前処理法として利用するためには試料の形状を大きくすることが不可欠である。そこで本研究では、生材や乾燥材のチップについてマイクロ波加熱を試み、マイクロ波加熱の及ぼす効果と酵素による糖化促進作用とを粉末試料の場合と比較検討した。その結果、生材や乾燥材のチップでは、マイクロ波加熱の及ぼす効果は粉末試料と類似していること、およびマイクロ波加熱処理後ひきつづいて酵素糖化を行なった場合、酵素作用を受けにくい場合があるにもかかわらず、約 10~30°C 加熱温度を高くすることによって酵素糖化率が改善されることが明らかになったので報告する。

2. 実験方法

2.1 木材試料

京都大学木材研究所実験圃場のポプラ [*Populus euramericana* (DODE) GUIMIER], および京都大学芦生演習林のブナ [*Fagus crenata* BLUME] の二種の広葉樹を試料として用いた。ポプラについては生木チップ (1×1×0.8 cm), アルコール・ベンゼン (2:1, V/V) 抽出した乾燥材チップ (1×1×0.2 cm), および 60~80 メッシュの木粉の三種類の試料を調製した。ブナについては、ポプラの場合と比較検討のためにポプラと同一サイズのアルコール・ベンゼン抽出した乾燥材チップと木粉の二種の試料を調製した。

2.2 マイクロ波加熱

A-3-L₂ 型耐圧ガラス管（耐圧ガラス工業株式会社製）に 2 g の試料を入れ、これに蒸留水 14 ml を加えて減圧下充分脱気を行ない、封管した後既報の方法¹⁾に準じてマイクロ波加熱を行なった。マイクロ波の周波数と出力はそれぞれ 2,450±50 MHz, および 2.4 kW であり、1 ℓ の水を過剰のマイクロ波エネルギーのスカベンジャーとして用いた。

2.3 分析方法

マイクロ波照射した試料は 25°C で pH を測定後、1G4 のガラスフィルターを用いてろ過し、残渣を水で充分洗浄することにより水可溶性成分と不溶性残渣とに分別した。水可溶性成分中に含まれる還元糖（還元糖生成量）、フルフラール、酸の生成量は既報の方法^{1,2)}に準じて定量した。また、水不溶性の残渣の重量

を測定し、重量減少率を算出した。水可溶性成分中の中性糖画分は Dowex 50×8 (H⁺), および Dowex 1×8 (AcO⁻) の連立カラムを用いて脱塩することにより調製した。中性糖の分子量分布はトヨパール HW 40 S (95×1.4 cm) のカラムを用いたゲル洩過により分析し、中性単糖の組成はアルジトールアセテートに変換後ガスクロマトグラフィーにより分析した³⁾。カラムのカリブレーションはデキストラン T-10, T-20, および T-40 (ファルマシア (株) 製), 重合度 2~8 の β -(1→4) 結合したキシロオリゴマー, およびキシロースを用いて行なった。酵素糖化を行なう場合には, マイクロ波照射した試料を洩過せず少量の蒸溜水を用いて 200 ml 容三角フラスコへ移し, 酢酸緩衝液を最終濃度 0.05 M, pH 4.8 になるように添加後蒸溜水で 100 ml にした。この試料にメイセラゼ (CEPB-5042, 8,000 u/mg, 明治製菓 (株) 製) を 200 mg 加え, 40°C で 48時間糖化した。酵素糖化率は還元糖生成量と重量減少率を前述のように測定して評価した。その他の一般分析は既報^{1,2)}に準じて行なった。

3. 実験結果と考察

3.1 マイクロ波加熱のみの効果

3.1.1 マイクロ波加熱による酸とフルフラールの生成

ポプラの乾燥材チップ, 生材チップ, および木粉を含水下でマイクロ波加熱し, その効果を比較した (図 1~3 および表 1)。マイクロ波照射の開始と同時に試料の温度は上昇し, 5~8 分間の加熱で 230°C に到達した。加熱温度の上昇に伴ない酸の生成が認められ pH が低下した。この pH の低下は 160°C 以上の温度で特に著しい傾向が認められ, 230°C 付近では 0.8~1.8 meq の酸が生じ pH は 3.2~3.5 に低下し

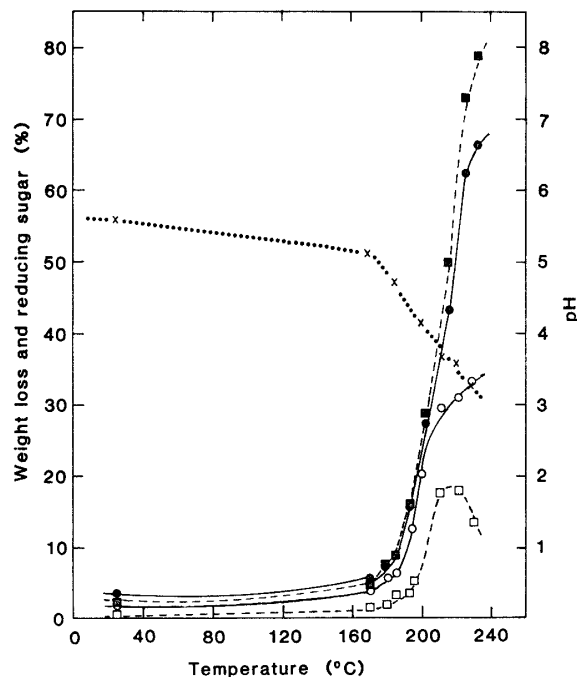


Fig. 1. Microwave heating and enzymatic saccharification of poplar wood meal.

Symbols: ○, ●, weight loss; □, ■, reducing sugar production; ×, pH. Open symbols are for microwave pretreatment alone, and closed, for enzymatic saccharification after microwave pretreatment.

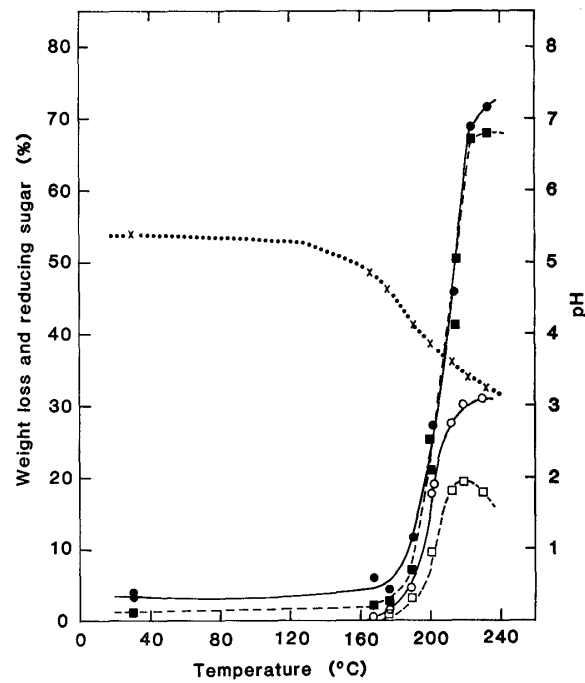


Fig. 2. Microwave heating and enzymatic saccharification of poplar dried wood chips.
Symbols: see Fig. 1.

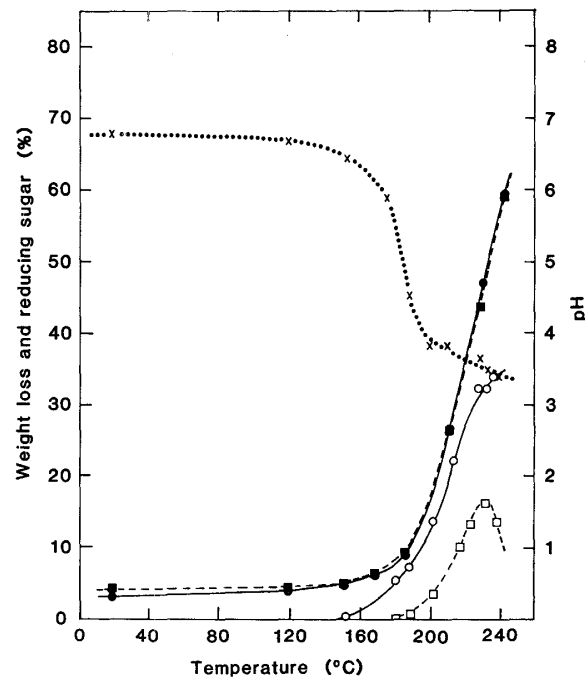


Fig. 3. Microwave heating and enzymatic saccharification of poplar green wood chips.
Symbols: see Fig. 1.

Table 1. Production of acid and furfural caused by microwave heating

Samples	Temperature (°C)	Acidity ^a (meq)	Furfural ^b (%)
Poplar meal	191	0.24	0.01
	201	0.32	0.05
	212	1.31	0.22
	221	1.49	0.20
	229	1.83	0.22
Poplar green wood chips	192	0.04	0.01
	207	0.14	0.01
	217	0.30	0.14
	227	0.36	0.27
	232	0.76	0.57
Poplar dried chips	189	0.15	0.01
	200	0.24	0.03
	212	0.60	0.11
	229	0.70	0.22
	235	1.06	0.54
Beech dried chips	189	0.08	0.01
	204	0.16	0.01
	214	0.24	0.03
	225	0.89	0.54
	233	1.29	0.74

a: Values of the filtrated water-soluble fraction after microwave heating.

b: Based on the dry matter of original sample.

た。ペントースの二次分解によって生じるフルフラールの生成は 230°C を越えてはじめて顕著となるが、値そのものは小さく 230°C 付近においても 0.2~0.7% であった。生材チップと乾燥材チップの場合は木粉の場合と比較すると酸の生成量、pH 変化、およびフルフラールの生成量いずれにおいても大きな変化は認められなかった。生成した酸はヘミセルロースのアセチル基由来の酢酸が主成分であったが、ポプラの場合、リグニン中にエステルやエーテル結合している *p*-ヒドロキシ安息香酸の存在が知られている⁴⁾ので、マイクロ波加熱によってこれらのフェノール酸が遊離している可能性も考えられる。従って、これらのフェノール酸の及ぼす効果を明らかにする目的で、フェノール酸を含みぬ プナ材乾燥チップを選びポプラと同様にマイクロ波加熱を行なった(図4)。その結果、酸の生成量、フルフラールの生成量いずれの場合においてもチップと木粉間で大きな差は認められなかった。また、以下で述べるように、マイクロ波加熱のヘミセルロースに及ぼす効果においてもポプラとプナで目立った差は認められなかった。以上の結果から、詳細はなお検討を必要とするが、ポプラのマイクロ波加熱におけるフェノール酸の及ぼす作用は特筆するにあたらなと思われる。

3.1.2 マイクロ波加熱のヘミセルロース分子鎖に及ぼす効果

マイクロ波加熱により生じた水可溶性の成分量(重量減少率)と還元糖生成量とを定量した(図1~4)。その結果、重量減少率は 160°C 以下の温度では問題とならず、160°C を越えてはじめて温度の上昇に対応

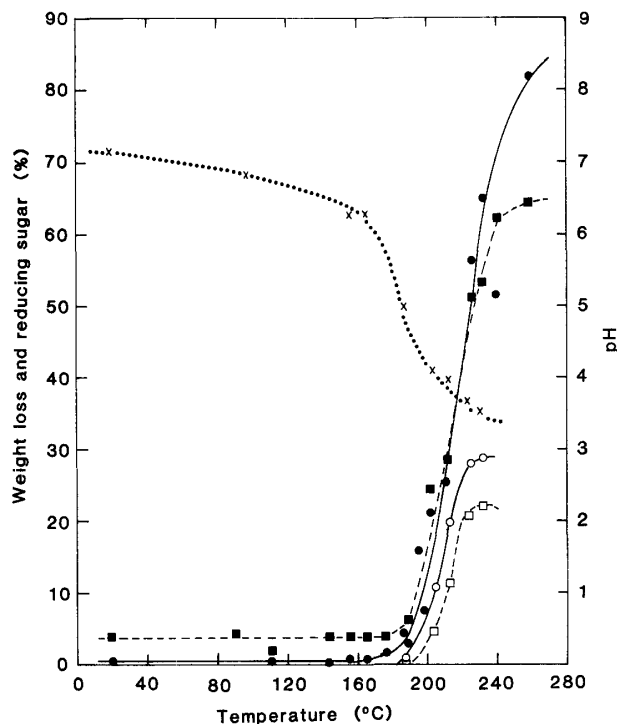


Fig. 4. Microwave heating and enzymatic saccharification of beech dried wood chips.
Symbols: see Fig. 1.

して上昇した。また、チップ状試料と木粉試料間で重量減少率の温度依存性に有意な差は認められなかった。なお、今回の加熱温度内ではいずれの試料においても重量減少率は最大値を与えなかった。一方、還元糖の生成は重量減少率の閾値より約 20°C 高い 180°C 以上の温度から認められた。さらに、還元糖の生成は重量減少量とは異なり、 $218\sim 233^{\circ}\text{C}$ 間で最大値を示した後急激に低下した。これは、いったん生成した還元糖（ペントース）が二次分解をおこしていることを示している。事実、フルフラールの生成量も 230°C 付近になって急激に増大している（表1）。なお、還元糖生成量は重量減少量の場合と同様に、乾燥材チップと木粉の場合間に差は認められなかった。しかしながら、生材チップの場合は還元糖生成量がその他の場合（最高18.5～22.0%）と比較してやや低くおさえられ、最高でも16.5%であり、最高還元糖生成量を示す温度も 233°C とその他の場合に比較して $8\sim 12^{\circ}\text{C}$ 高い。ブナ材の乾燥チップの場合においても、木粉¹⁾の場合と同様の還元糖の生成パターンを示し、ポプラの結果と一致した（図4）。なお、今回用いた試料の還元糖の最高生成量16.5～22.0%は、粉末状試料について得られたこれまでの結果^{1,2)}（11～27%）内に入り、チップ状試料による特異性は認められなかった。

次に、マイクロ波加熱によって生成した単糖の組成をガスクロマトグラフィーを用いて分析した（表2）。 190°C 以下の場合、生成単糖はアラビノースとキシロースで、このうち90%以上をキシロースが占めており、ヘキソースの生成は問題とならない。しかしながら、 190°C 以上の温度では、ヘキソースの生成が徐々に認められ 230°C 付近になるとグルコースの生成が無視できなくなってくる。これらのグルコースの由来は大部分がヘミセルロース性の多糖と考えられるが、ヘミセルロースの糖組成と比較してグルコースの生成量が幾分多い。今、セルロースのガラス転移点が 230°C ⁵⁾であることを考慮に入れるとセルロース、特に非晶領域のセルロースが分解した結果生成したグルコースも含まれていると推定される。なお、表2から明らかなように、チップ状試料と木粉試料間で遊離してくる単糖に差は認められなかった。

Table 2. Neutral monosaccharide composition of the water-soluble fractions

Samples	Temperature (°C)	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Yield ^a (%)
Poplar meal	191	9.4	81.2	2.7	3.1	3.6	0.74
	201	9.9	81.4	2.5	2.2	4.0	0.89
	212	8.9	77.7	4.3	2.7	6.4	1.20
	221	9.7	67.4	12.1	3.4	7.5	4.80
	229	9.3	49.1	16.5	2.5	22.6	5.08
Poplar green wood chips	192	9.0	84.5	2.1	1.9	2.5	0.60
	207	17.0	69.9	3.0	3.6	6.5	0.90
	217	7.5	78.5	3.5	4.1	6.4	2.28
	227	9.1	77.4	4.9	4.4	4.3	6.10
	232	6.2	71.1	8.2	2.0	12.5	5.48
Poplar dried chips	189	8.0	85.9	2.0	2.0	2.1	0.50
	200	8.2	82.5	2.7	3.1	3.5	0.85
	212	9.7	77.1	3.5	2.9	6.8	2.37
	229	10.4	62.4	7.8	10.5	8.8	3.90
	235	8.9	66.6	2.4	4.0	18.2	4.42
Beech dried chips	189	5.4	94.6	—	—	—	0.85
	204	15.4	75.4	2.3	4.3	2.9	1.16
	214	9.8	74.8	5.3	7.2	2.9	2.66
	225	6.8	77.6	7.4	2.4	5.8	4.00
	233	7.8	65.0	7.4	10.4	9.4	5.02

a: Based on the dry matter of original sample.

図5にマイクロ波加熱によって生成した中性糖画分のゲル透過曲線を示した。木粉の場合とチップの場合とで分子量分布に差は認められず、重量平均分子量2万から単糖にいたる分子量分布を示し、加熱温度の上昇に伴ない単糖と低分子オリゴマーの生成が顕著になり単糖の分析結果(表2)と一致した。230°C付近の温度においてもなおオリゴマーの生成が認められた。以上の結果から、チップの場合においても木粉の場合にみられた^{1,2)}と同程度のヘミセルロースのオートヒドロリシスがおこっていると結論された。

3.2 マイクロ波加熱の酵素糖化に及ぼす効果

マイクロ波加熱前処理後酵素糖化を行ないチップ状試料と木粉試料との糖化率を比較検討した(図1~4)。いずれの試料も、約160°C以上温度が上昇しなければ糖化は促進されなかった。160~190°Cにおいては糖化率は徐々に上昇し、190°C以上においては重量減少率は直線的に上昇した。この直線性はポプラ乾燥材チップと木粉およびブナ乾燥材チップの場合は約220°Cまで続き、ポプラ生材チップの場合のみ240°Cを越えてもなお直線性を保持していた。木粉の場合、還元糖の生成量は重量減少量と同様の傾向を示したが、240°C以上の温度ではプラトーに達し、最高還元糖生成量68%を示すのに対し、チップ状試料については240°Cに到っても最高値を示さずなお増大する傾向が認められた。ポプラの場合、乾燥材チップと木粉とはほぼ同一の糖化曲線を示したが、ポプラの生材チップとブナの乾燥チップの場合は230°Cでの還元糖生成量がそれぞれ47.6%および52.5%と木粉の場合(それぞれ67.6%および73.5%)より低い。温度をさらに10~30°C上昇させ240~260°Cにすることによってそれぞれ59.7%および65.0%と木粉の場合に

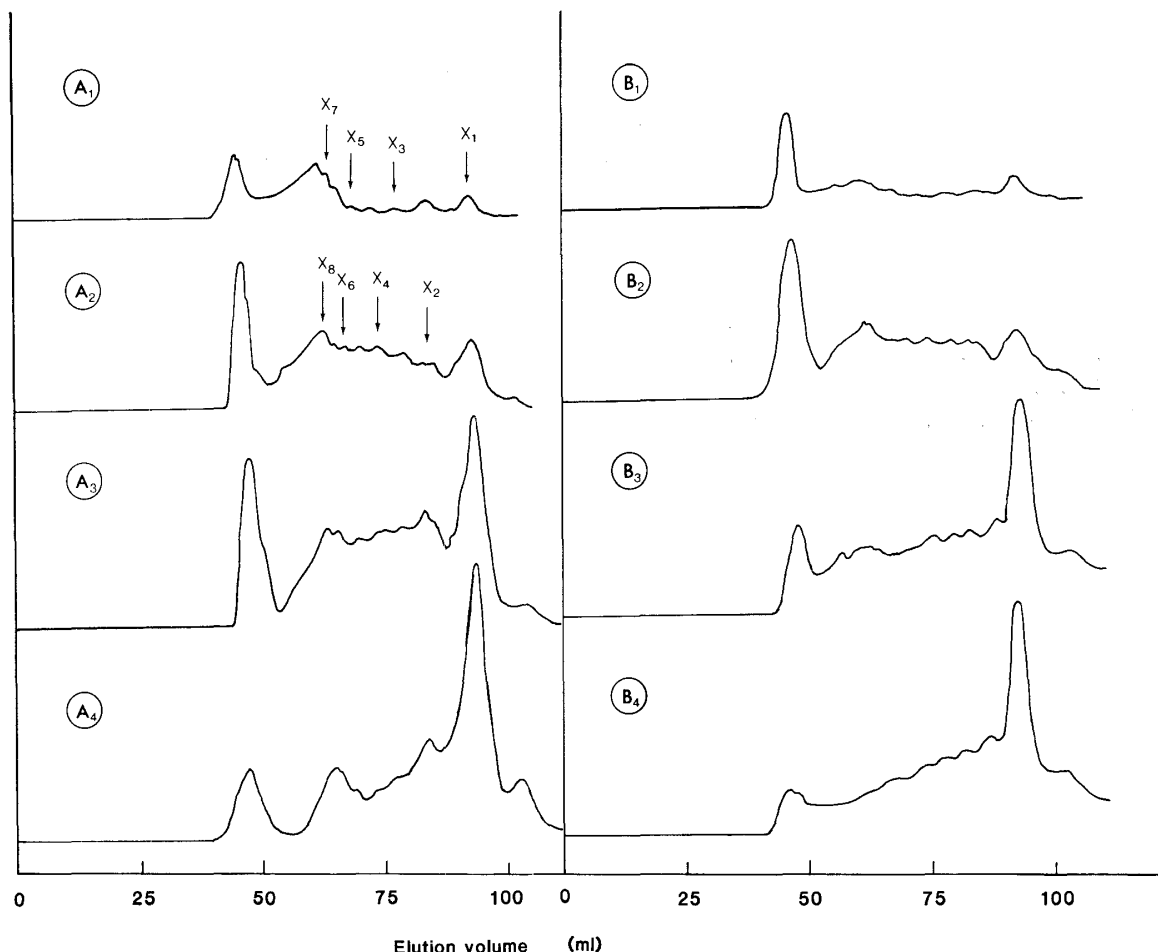


Fig. 5. Gel-filtration chromatography of the water-soluble components of poplar dried wood meal and chips.
 Symbols: A₁₋₄, poplar wood meal (A₁, 210°C; A₂, 212°C; A₃, 221°C; A₄, 229°C); B₁₋₄, poplar dried wood chips (B₁, 200°C; B₂, 212°C; B₃, 229°C; B₄, 235°C); X₁₋₈, Eluting positions of xylose and xylo-oligosaccharides having degree of polymerization of 2 to 8.

かなり近くまで糖化率を高めることができた。

ここで問題となるのは加熱の温度である。すなわち、マイクロ波加熱後糖化する場合もしない場合も、還元糖の生成を期待するには 160°C という閾値が存在し、160~180°C 以上の温度まで加熱することが必要であった。この閾値領域温度はリグニンやヘミセルロースの乾燥状態での熱軟化点（それぞれ 127~193°C, および 167~181°C)⁹⁾ に極めて近い。そのため、この閾値以上の温度下では、リグニンやヘミセルロース分子のミクロブラウン運動が激化し、これらの分子のオートヒドロシスによる低分子化と同時にリグニンとヘミセルロース間の結合の開裂が容易ならしめられた結果、リグニン分子によるセルロースの被覆作用が低下し、セルロースに対する酵素糖化作用が上昇したと解釈される。

以上、マイクロ波加熱前処理によってチップ状試料の場合も木粉の場合と遜色なく酵素糖化率が向上されることが実証されたわけで、マイクロ波加熱を用いた木材糖化の実用化をめざして今後の研究が期待される。

謝 辞

本研究にあたって，御助言，御協力をいただいた本研究所木材物理部門 則元 京助教授，本学林産工学科
林産機械教室の野口昌己教授，および服部順昭助手に深謝する。

なお，本研究の一部は文部省のエネルギー特別研究（Ⅰ）（58040047 および 59040043）によった。

文 献

- 1) 東 順一，田中文男，越島哲夫：木材誌，**30**，501（1984）
- 2) 東 順一，田中文男，越島哲夫： *J. Ferment. Technol.*，**62**，477（1984）
- 3) J. AZUMA, N. TAKAHASHI and T. KOSHIJIMA: *Carbohydr. Res.*，**93**，91（1981）
- 4) D.C.C. SMITH: *J. Chem. Soc.*，**1955**，2347
- 5) E. L. BACK, E.I.E. DIDRICKSSON: *Svensk. Papperstidn.*，**72**，687（1969）
- 6) D.A.I. GORING: *Pulp Paper Mag. Can.*，**64**，T-517（1963）