

木材の酵素加水分解とその前処理*

越 島 哲 夫**

Enzymatic Hydrolysis of Wood and Its Pretreatment*

Tetsuo KOSHIJIMA**

はじめに

地球上のセルロース資源生産量は年間 1000 億トンに達すると推定されている。樹木の立木蓄積量は 3400 億 m^3 ¹⁾ と計算されていて、その生長量を年間 1 % とすると約 34 億 m^3 が一年を通じて生産されることになる。樹木は森林として人間社会の環境保全に役立つほか、住宅材料、紙・パルプ、衣料、燃料として古来人間生活と密接な関連をもちつづけてきた。この関連は現在もなお依然として続き、特に住宅材料、紙・パルプとしては他の追従を許さない特性をもつ。しかし他方、石油埋蔵量の減少とともにそれに替りうる他のエネルギー源の開発の必要性が迫られている現在、化石資源に対照的な再生可能資源としてのセルロース資源が認識され始め、エネルギー源としての利用²⁾ が検討されている。発酵によるアルコール生産を目標とする場合、当然のことながら、デンプン資源との比較が問題になるが、経済的立場からみれば現時点ではデンプン資源が有利である点は否めない。しかしながら近い将来、浮び上るであろう食糧問題との競合がない点はセルロース系資源を用いる糖化、アルコール発酵過程にとりプラスであり、その他利点としては季節によらず集荷が可能であり、また貯蔵が容易である点などがある。とくに鋸屑、チップ・ダスト、端材などの工場廃材を利用する場合、ある一定のルートをつくることにより比較的容易に未利用材を集めることが可能と思われる。林野庁の統計によれば木材工場よりの廃材に林地残材を加えるとわが国で年間 2600 万 m^3 ¹⁾ に上る未利用材が排出されるといわれる。

木材糖化の歴史は古く、第 1～第 2 次大戦にかけドイツのトルネッシュ工場、デッソー工場、スイスのエムズ工場など 10 社以上が稼働しており、Schollar 法により乾材 1 トン当り 240 l のアルコールを生産していた。アメリカでは 1945 年以降、マジソン法あるいは改良マジソン法により糖化工場を操業し、乾材 1 トン当りアルコール 232 l 、フルフラール 20 ポンドをえたという³⁾。これらの酸糖化法では生成した糖がヒドロキシメチルフルフラールからレブリン酸やギ酸へ 2 次分解をおこすためにグルコース収率が一般に低くなる欠点があった。さらに残渣として副生するリグニンが酸縮合をおこし、他に利用し難いこと、耐酸、耐圧性装置を必要とするため設備投資が高くつくことも重なってその後酸糖化はおこなわれなくなった。これに対し、セルラーゼ系酵素を用いる酵素糖化法では特殊な設備を必要とせず、常温附近で加水分解を行いうるがそのままではセルロースの分解率低く、反応に長時間を要する欠点がある。特にデンプンを原料とする場合に比べ、セルロース質一般にわたる問題として結晶性の不溶物であるセルロースを如何にして酵素分解に活性な susceptible cellulose に変換するかという問題が加わる。一般的には C_1 セルラーゼ成分が天然セルロース

* 第 36 回木研公開講演会（昭和 56 年 5 月 29 日、大阪）において講演

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

の結晶部分に作用し、susceptible cellulose に転換する⁵⁾と考えられている。この段階がセルロースからグルコースへ加水分解する際の律速段階になっている。微生物のもつセルラーゼは全てこの C_1 成分を含むのではなく、たとえば *Trichoderma* のように C_1 成分をもつ菌と *Pestalotiopsis* のように C_1 を殆んど生産しない菌がある⁴⁾。前者はセルロースの結晶部分も比較的よく分解するが後者は非晶部分のみ分解する。現在、 C_1 成分を含むセルラーゼを生産する菌であっても単独で高結晶性セルロースを十分に分解できる能力をもつ菌は未だ分離されていない。したがって天然セルロースのような高結晶性セルロースをセルラーゼが完全に分解しうる構造に変える物理的、化学的前処理法が必要となる。

木化植物ではこれにリグニンの問題が加わる。リグニンは木材細胞間を埋めるとともに細胞壁の大半を占める2次壁中にもその70~80%が分布する。フェニルプロパン単位の種々の結合体から構成されるこれらリグニンポリマーは当然セルラーゼにより分解をうけないのみならずセルラーゼが2次壁中のセルロース層へ侵入するのを阻む。従ってセルラーゼを用いて加水分解を行う場合、解繊された場合でも細胞表面を覆うリグニン層の除去が必要であり、前処理としてこの効果をも含むことが要求される。それ故、酵素系を用いて木材糖化を行う場合 (1)高結晶性セルロースを十分に分解する能力をもつ C_1 成分を含むセルラーゼを取得すること (2)脱リグニン処理を行わずにセルラーゼが作用しうる物理的、化学的なセルロースの状態をもたらす有効な前処理法を開発することが必要となる。今までに試みられた前処理法として化学的前処理法と物理的前処理法があり、セルロース原料の種類により一方または両者を組み合わせて用いられる。

化学的前処理について

化学的前処理法としては酵素分解を行う前に H_3PO_4 , H_2SO_4 , $ZnCl_2$, $NaOH$, カドキセン^{6~8)}, メタノール・塩酸¹⁰⁾等により予め処理してセルロースの結晶性を低下させ、あるいは脱リグニンを部分的に行う。セルロースの結晶構造は H_3PO_4 で処理することにより著しく変化する。田中ら⁹⁾はX線回折図の変化からリン酸濃度68%以上ではセルロース粉末の結晶構造は急激に破壊が進み、76%では完全に無定形になることを認めた。また、結晶化度の低下に比例してセルラーゼによる加水分解率は直線的に増大した。外山ら⁹⁾はイネわらならびにバガスを *Trichoderma viride* (Meicelase CED-233) で糖化した。前処理として1% $NaOH$ 溶液と100℃で3hr加温して脱リグニンを行ったものを基質濃度10%, 酵素濃度3%で分解したとき分解率84.3%, 基質濃度25%のとき分解率65.7%がえられたが、後者の場合えられた糖液濃度は22%に達した。また、志水ら¹⁰⁾は木粉をメタノール・塩酸を用いて前処理し脱リグニンと共にヘミセルロースの除去も試みた。0.2% HCl 含有60~80%メタノール水溶液で170℃, 45 min 処理することによりアカマツリグニンの70~80%, 0.1% HCl 含有50%メタノール液により160℃, 45 min 加熱の場合、ブナリグニンの90%が除去できた。残渣セルロースを *Trichoderma viride* セルラーゼで完全加水分解するにはアカマツではリグニンの70%, ブナでは80%以上を除去することが必要であった。そのほか、希アルカリ処理は Cotton の酵素分解には全く効果がなかったが、アスペン材では著しい効果がみられた¹¹⁾ことが報告されている。

物理的前処理について

物理的前処理法としては電子線やガンマ線照射による微粉末化とボールミルやロールミルを用いる粉砕がある。ワラ、バガス等のセルロース質の場合、 1×10^8 レントゲンの電子線照射によりセルロースの分子量は1/100に低下し、指圧により簡単に300メッシュ以下の微粉末に粉砕される。この微粉末は容易に水に分散し、30%までの濃度のスラリーとすることができ、この状態で酵素加水分解を行うと加水分解速度はワラ、木粉の場合非照射原料の20倍、故紙で5倍に加速された¹²⁾と報告されている。しかし Moore¹¹⁾が指摘しているように高速電子線で前処理を行ったとき、重量減少と還元糖量の差が50%を越える場合があり、セルロースを糖以外の成分に分解する可能性があることは留意すべきである。振動式ボールミル粉砕がセルロ

ース質の酵素分解能の改良に非常に有効であることは Pew および Weyna (1962)¹³⁾ によりはじめて証明され、結晶性の減少と比表面積の増大がセルロース質のセルラーゼに対する親和性を増大させることが知られた。Mandels ら^{14,15)} はパルプを基質とし、*Trichoderma reesei* (QM9414) 起源セルラーゼを用い基質濃度 5 %, 酵素濃度 0.08 %, 50℃, 48 hr 分解したとき、前処理として基質をハンマーミルで 40 メッシュに粉碎したとき分解率 37 %, ボールミルで 270 メッシュに粉碎したとき分解率 92 % であった。田中、越島ら¹⁶⁾ はアカマツ脱脂木粉 (28-80 メッシュ) を用いて酵素分解に対する振動式ボールミルによる粉碎効果をしらべた。粉碎は外套を有する 3 l 容ステンレススチール製ポット中で外部冷却しながら容器と同質のステンレス球を用い乾燥状態で行った。この場合、ポットの容積とステンレス球の量と木粉量の比率が粉碎速度を決定する重要な因子となる。水道水による冷却によって 24 時間の粉碎木粉の温度は盛夏でも 30℃ 以下に保持できた。酵素は *Aspergillus niger* 起源の Cellulosin AC 単独、またはこれと *Trichoderma* 系の Onozuka R-10 を混用した。図 1 は脱脂アカマツ木粉を振動式ボールミルで 1-120 hr 粉碎後、酵素 (Cellulosin

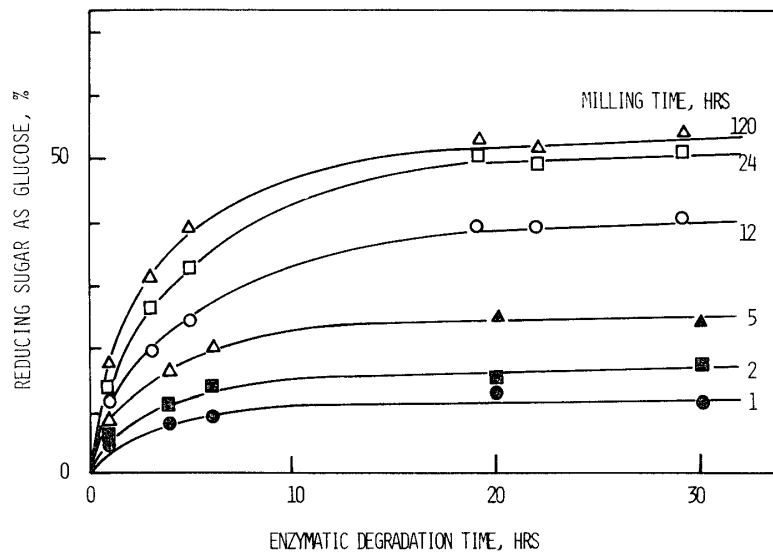


図 1 Effect of ball-milling on enzymatic degradation rate of wood meal by Cellulosin AC
Enzyme conc., 0.1%; substrate conc., 1 g/100 ml; pH, 4.0;
reaction temp., 40°C

AC) 濃度 0.1 %, 基質濃度 1 %, pH 4, 反応温度 40℃ で 3, 5, 10, 20, 30 hr 反応させたときの還元糖生成量を木粉に対する百分率で示したものである。この図から用いた粉碎条件下では 24 hr 後の還元糖生成量は 55.6 %, これは木粉に含まれる還元糖に転化しうる中性糖の 80 % に相当する。120 hr 粉碎によってこの値は 81 % に増加したにすぎないことから、24 hr 以上の粉碎は効果が少いと云える。粉碎時間を 12 hr としてタイプの異なる 2 種のセルラーゼ製品、すなわち Cellulosin AC と Onozuka R-10 をそれぞれ単独に用い、40℃, pH 4 で酵素分解をおこなったときの還元糖生成量を表 1 に、両酵素を混用したときの結果を表 2 に示す。図 2 と図 3 はセロビオースを 2 % 添加したときの分解率の低下を比較した結果である。Cellulosin AC はセロビオース添加により分解率の低下は少いが Onozuka R-10 ではこれが著しいことから、前者では Endo 型セルラーゼが少く、後者では比較的多く含まれると考えられる。この両者を混用して振動式ボールミル処理 (12 hr) を行った木粉につき酵素分解を行った結果が表 2 である。基質濃度 5 % の場合を比較すると還元糖生成量および重量減少量共に両酵素製品を単独で使用した場合に比べ酵素分解率は増大し両者の併用によって相乗効果が現われる。表 2 よりアカマツ木粉を使用したとき基質濃度 10 % の場合で

表1 Effects of substrate concentration and enzyme source on degradation rate of milled wood

Substrate conc., g/100 ml	Enzyme	Degradation rate from	
		Reducing power, %	Weight loss, %
1	Cellulosin AC	39.3	42.4
	Cellulase-Onozuka R-10	46.1	58.4
5	Cellulosin AC	34.8	41.2
	Cellulase-Onozuka R-10	44.2	57.1
10	Cellulosin AC	32.0	35.0
	Cellulase-Onozuka R-10	36.3	52.6

表2 Enzymatic degradation of finely divided wood meal by the mixture of two types of enzyme preparations

Substrate conc., g/100 ml	Enzyme conc., %	Degradation rate from	
		Reducing power, %	Weight loss, %
1	Cellulosin AC, 0.25	58.2	61.0
	Cellulase-Onozuka R-10, 0.25	(61.6 ¹⁾)	(64.3 ¹⁾)
5	Cellulosin AC, 0.05	51.2	56.2
	Cellulase-Onozuka R-10, 0.05		
10	Cellulosin AC, 0.05	37.3	41.7
	Cellulase-Onozuka R-10, 0.05		
	Cellulosin AC, 0.25	52.3	55.3
	Cellulase-Onozuka R-10, 0.25		

1) Milling time, 120hrs. Others 12 hrs.

も還元糖量より計算すると75~80%の糖化率が兩種酵素の併用によりえられることが示されている。また、酵素濃度 0.5 %, 基質濃度 1 % の条件下では84~88%の糖化率がえられている。兩種酵素の併用効果をさらに詳しく調べた結果¹⁷⁾が表3である。基質濃度 1 % の場合、ボールミル前処理 2 hr の木粉を用い Cellulosin AC を作用させて約17%の還元糖がえられる条件下で兩酵素を併用すればこの値は60%に上昇し糖化率(分解率)として86%がえられた。基質濃度が 4 % になると還元糖生成量は 42.5%に下るがボールミル粉碎

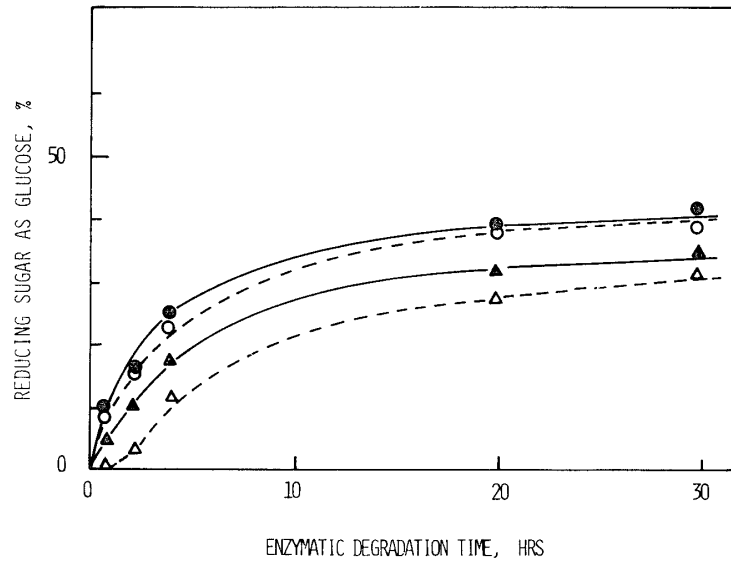


図2 Effect of cellobiose addition on enzymatic degradation rate of ball-milled wood meal by Cellulosin AC
Substrate conc., —●— 1 g/100 ml; ---○--- 1 g/100 ml + 2% cellobiose; —▲— 5 g/100 ml; ---△--- 5 g/100 ml + 2% cellobiose; the wood meal divided for 12 hr. before enzymatic degradation

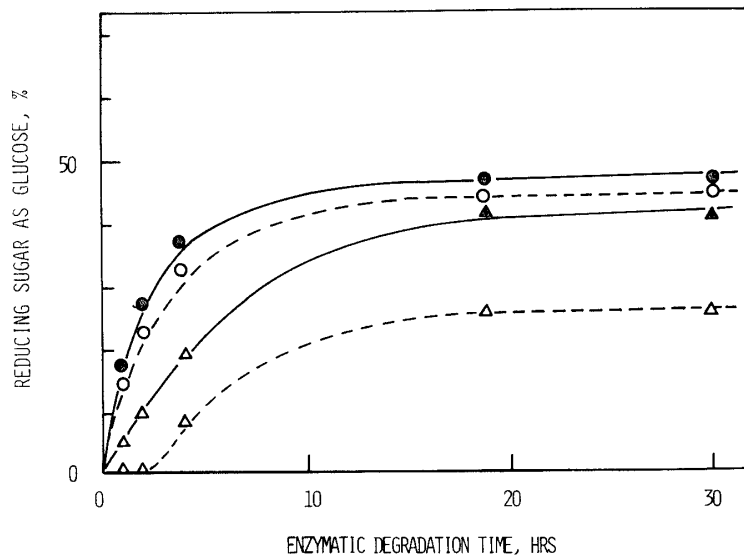


図3 Effect of cellobiose addition on enzymatic degradation rate of ball-milled wood meal by Cellulase Onozuka R-10
Substrate conc., —●— 1 g/100 ml; ---○--- 1 g/100 ml + 2% cellobiose; —▲— 5 g/100 ml; ---△--- 5 g/100 ml + 2% cellobiose; the wood meal divided for 12 hr. before enzymatic degradation

時間を増加させることにより糖化率は上昇する。この場合、糖化率80%以上をうるにはボールミル処理は24 hr 以上が必要となる。これらの結果から両タイプの酵素を併用することが有利であることが証明された。

表3 Enzymatic degradation of vibratory ball-milled wood meal

Substrate conc., g/100ml	Enzyme conc., %	Reducing sugar, % wood		
		2hr-ball milled	12hr-ball milled	More than 24hr-ball milled
1	Cellulosin AP, 0.1 %	16.9	39.3	56.1 ¹⁾
	Mixture of Cellulosin AP-Cellulase Onozuka R-10 (1:1), 0.2%	60.0	58.2	61.6 ²⁾
4	Mixture of Cellulosin AP-Cellulase Onozuka R-10 (1:1), 0.2%	42.5	51.2	57.0 ¹⁾

PH, 4.0 ; reaction time, 48hr ; reaction temp., 40 °C

1) From wood meal milled for 24 hr.

2) From wood meal milled for 120 hr.

振動式ボールミル粉碎はこのように脱リグニン処理を行わない木材試料であっても高い分解率をもって糖化しうることがわかったが、前処理段階におけるエネルギー消費が大きいのでやや経済性に欠ける。この点を補うために三本ロールをもつロールミルによる磨砕をおこなった。3本ロールミルは回転速度の異なる3本のロールの間をペースト状にした粉末を通過させて磨砕する装置で、通常無機物を微粉末化するために使用される。この装置ではボールミルと異り、 $\sim$ すりつぶし $\sim$ に $\sim$ ひきちぎり $\sim$ の作用が加わり、木粉をコロイド状分散液に近い状態にもたらしうることが可能である。三本ロールを通すには木粉をペースト状にする分散剤が必要である。分散剤としては木粉に対し、強い膨潤能をもつジメチルスルホキシド (DMSO)、全く膨潤能をもたない流動パラフィンおよびその中間に位置する水を用いた。図4は流動パラフィンを用いたときのロールミルによる磨砕回数が磨砕後におこなった Cellulosin AP-Onozuka R-10 (1:1) 混合酵素による加水分解率に如何なる影響をおよぼすかを還元糖生成量経時変化をとって調べた結果^{2,18)}である。このときの基質濃度は1%, 酵素濃度は0.2%, pH 4, 反応温度40°Cである。図4の結果からわかることは、基質濃度が低い場合は、ロールミル処理回数が多いほど最高分解率(86%)に達する時間は短い、ロールミル磨砕回数が少ない場合でも長時間の酵素加水分解をおこなえば最高分解率に到達しうることである。図4のロールミル磨砕は、これに先立って2hrのボールミル粉碎をおこなっている。図5¹⁷⁾は基質濃度を高くした場合のロールミル磨砕効果を示す。この場合基質濃度のみ4%に上げ他の条件は図4と同じときの、酵素加水分解の度合を示す。ロールミル処理をおこなわない木粉では還元糖生成量40%, DMSO 中で6回磨砕したものは約50%, 流動パラフィン中で22回磨砕したとき60% (糖化率86%) の分解が達成できる。この結果から三本ロールミル磨砕処理は基質濃度の高いところで分解率を上げるのに極めて有用であるといえる。図6¹⁷⁾はロールミル磨砕回数によって酵素系による木材糖化の初期反応速度が如何に変化するかをみたものである。これは、単位時間に遊離する還元糖のミリモル数であらわした初期反応速度をロールミル磨砕回数に対してプロットした結果である。22回磨砕により木粉の酵素加水分解速度は1:1混合酵素を用いた場合、2倍に上昇する。しかしながら Cellulosin AC を用いたとき、このような現象がみられない

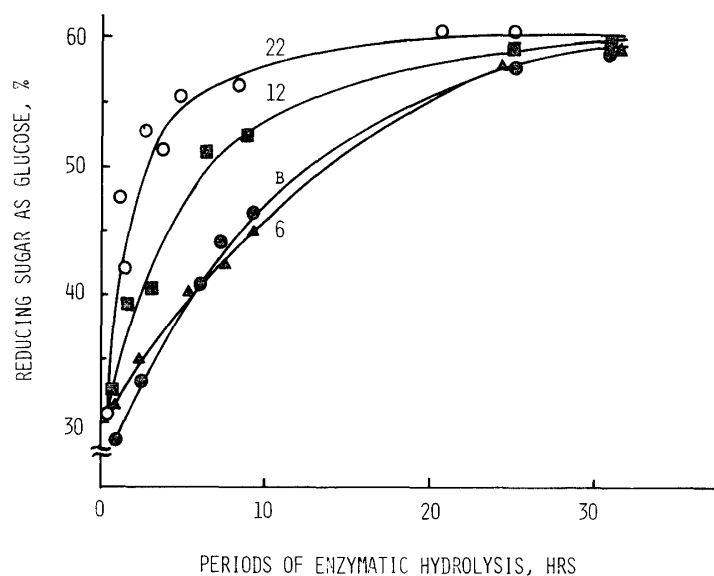


図4 Effect of three-rolls milling on enzymatic degradation by the mixed enzyme (1: 1) preparation
Number indicates frequency of milling, B, reference.
Enzyme conc., 0.2%; substrate conc., 1 g/100 ml; pH, 4.0; reaction temp., 40°C.

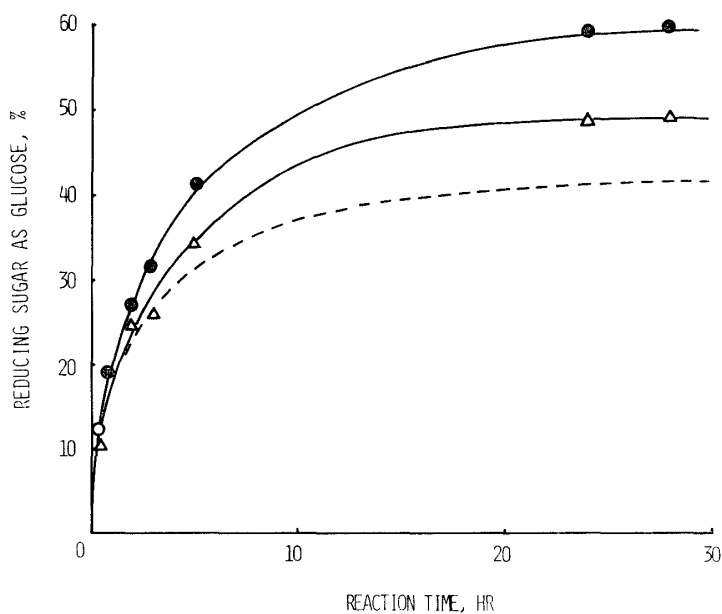


図5 Enzymatic degradation of roll-milled wood meal by the mixed enzyme (1: 1) preparation at higher substrate concentration
—●— Roll-milled 22 times in liq. paraffin; —△— 6 times in DMSO; ---- not roll-milled.
Hydrolyzed with mixed enzyme (1: 1) preparation; substrate conc., 4 g/100 ml; enzyme conc., 0.2%; pH, 4.0; reaction temp., 40°C.

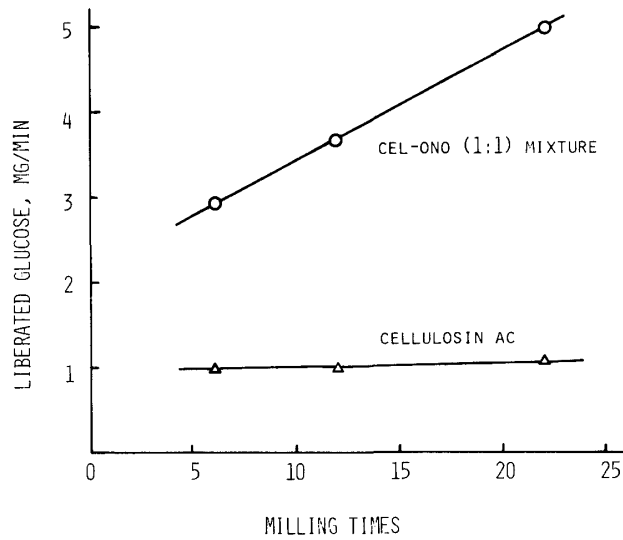


図6 Relationship of reaction rates of enzymatic hydrolysis of roll-milled wood to milling times when mixed enzyme (1: 1) preparation and Cellulosin AC are used as enzyme sources

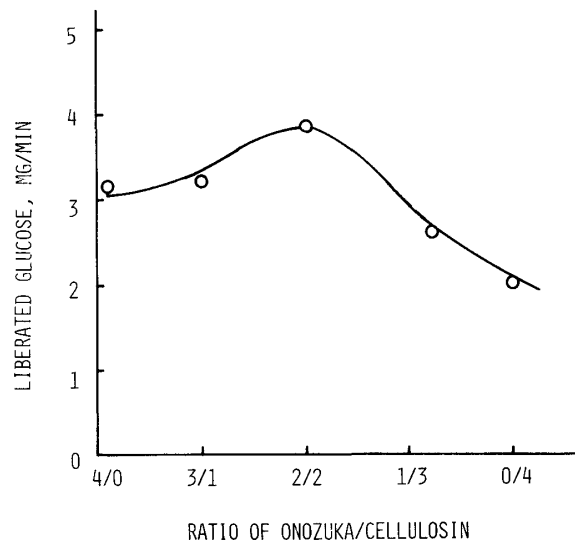


図7 Plotting of reaction rates of enzymatic hydrolysis against ratios of Cellulase Onozuka R-10 to Cellulosin AC used

ことは注目に価する。図7¹⁷⁾は Cellulosin AC と Onozuka R-10 の混合割合が1 : 1 のとき最も初期反応速度が大きくなることを示したものである。図8¹⁷⁾は1 : 1 混合酵素系を用いたときの基質濃度と反応速度の関係をみた図である。ロールミル処理をしていない木粉は基質濃度4%でレベルオフに達し、それ以上の濃度では初期反応速度は変化しないが、流動パラフィンを用いて22回、三本ロールミルで処理した木粉では基質濃度10%まで初期反応速度は増加しつづけることを示している。これに反し、セルロースを基質として同じ前処理を施した場合、基質濃度2%までは初期反応速度はかなり急激に増加するがそれ以上では上昇率は極めてわずかとなって、リグニンを含む木粉と較べ低い初期反応速度しかえられないことがわかった。

これらの結果から、アカマツについて云うならばロールミル磨砕は、比較的高い基質濃度のところで高い酵素分解率と分解速度がえられることが分り、脱リグニンを行なわない木粉の酵素糖化の前処理としては極

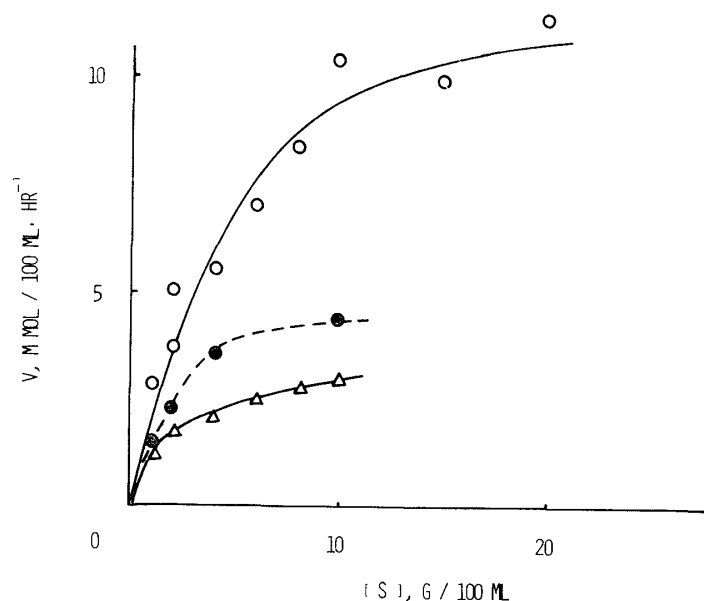


図8 Relationship of reaction rate of enzymatic hydrolysis to substrate concentration of roll-milled wood meal
 —○—, 22 times roll-milled wood; ---●--- 2 hours ball-milled wood; —△—, 22 times roll-milled cellulose.
 Hydrolyzed with mixed enzyme (1: 1) preparation; enzyme conc., 0.2%; pH, 4.0; reaction temp., 40°C

めて有効であることが証明された。

セルラーゼについて

前処理と並んで重要な課題はさきに述べたようにセルロースに対し高分解能をもつセルラーゼの分離、取得である。Natick グループにより分離された *Trichoderma* 系セルラーゼ、とくに *Trichoderma reesei* (QM9414) 起源のものはすぐれたセルラーゼとして知られており、最近になってさらに活性のつよいものが NG 14¹⁹⁾、および MCG 77²⁰⁾よりえられている。しかし故紙や新聞紙のみでなく、リグニンを除去することなく木材を糖化するためには、なお強力なセルラーゼの発見が望まれる。その試みの一つとして、強力な木材分解能をもつことが知られているシロアリよりセルラーゼを分離する研究を、われわれの研究室でおこなっている。これは未だ研究途上にあるが、東ら¹⁸⁾によるその結果の一部を紹介する。

イエシロアリの職蟻と兵蟻がもつ酵素活性を分析すると、両者共に α および β -ガラクトシダーゼ、 α および β -グルコシダーゼ、 α および β -キシロシダーゼ、 α および β -マンノシダーゼの 8 種のグリコシダーゼ活性をもち、さらにアビセラーゼとカルボキシメチルセルラーゼ活性をもつことが明らかになった。職蟻の方が兵蟻より、いづれの酵素活性についても 2～6 倍高く、とくにアビセラーゼ活性とカルボキシメチルセルラーゼ活性は、腸部分に特に高く、これは後腸内に生棲する大型の原生動物に由来することが確認された。分離したシロアリセルラーゼは 25 倍程度に精製された段階で、市販セルラーゼと比較すると、アビセラーゼ活性はセルロシン AC の 1.1 倍、Onozuka R-10 の 0.38 倍、カルボキシメチルセルラーゼ活性はそれぞれ 1.0 倍、0.86 倍であった。シロアリセルラーゼについては、なお分離・精製実験を継続中であるが以上の結果からわかることは、シロアリセルラーゼは少なくとも C_1 と C_x 成分をもち、これらは共生する原生動物に由来することである。今後このセルラーゼの精製とともに、原生動物の人工培養の検討を進めていくことが必要と思われる。

お わ り に

セルラーゼによる木材糖化については、なお多くの解決しなければならない問題が残っている。酵素の回収をはかるための固定化、あるいは前処理の経済性の評価、などであるが、これらは有効な前処理法の開発と、強力なセルラーゼの取得後の問題であり、この両者の解決を近い将来に焦点を絞り、その時点までに完了しておかなければならないように思われる。

文 献

- 1) 林野庁研究普及課：“木材のエネルギー活用について” (1979)
- 2) 越島哲夫：エネルギー・資源 **2** (3), 242 (1981)
- 3) 古谷 剛：材料“木質材料特集号” (1981) 印刷中.
- 4) 田中三男：醸酵工学 **58** (3), 145 (1980)
- 5) 佐々木堯：食品工業 **19** (24), 23 (1976)
- 6) M. TANAKA, M. TANIGUCHI, T. MORITA, R. MATSUNO, T. KAMIKUBO : J. Ferment. Technol., **57**, 186 (1979)
- 7) M. A. MILLETT, A. J. BAKER, L. D. SATTER : Biotechnol. Bioeng. Symp. No.6, 125 (1976)
- 8) 松村義人, 須藤賢一, 志水一允：木材誌 **23** (11), 562 (1977)
- 9) 外山信男：Precedings of the Tenth Research Conference p.33 (1978)
- 10) 志水一允, 宇佐見国典：木材誌 **24** (9), 632 (1978)
- 11) W. E. MOORE, M. J. EFFLAND, M. A. MILLETT : J. Agr. Food Chem., **20** (6), 1173 (1972)
- 12) 当間正雄：バイオマス有効利用に関する開発動向調査資料, 産業情報サービス p.81 (1980)
- 13) J. C. PEW and P. WEYNA : Tappi, **45**, 247 (1962)
- 14) M. MANDELS, D. STERNBERG : J. Ferment. Technol., **54**, 267 (1976)
- 15) M. MANDELS, L. HONTZ, J. NYSTROM : Biotechnol. Bioeng., **16**, 1471 (1974)
- 16) R. TANAKA, F. YAKU, E. MURAKI, T. KOSHIJIMA : Cellulose Chem. Technol., **14**, 859 (1980)
- 17) 村木永之介, 夜久富美子, 田中龍太郎, 越島哲夫：木材誌, 投稿中.
- 18) 東順 一, 越島哲夫：エネルギー特別研究“生物エネルギーの利用と開発” 昭和55年度研究成果報告 p.75 (1981)
- 19) B. S. MONTENECOURT, D. E. EVELEIGH : Appl. Environ. Microbiol., **34**, 777 (1977)
- 20) B. J. GALLO, R. ANDREOTTI, C. ROCHE, D. RYU, M. MANDELS : Biotechnol. Bioeng. Symp. No.8, 89 (1978)