

標準セルロース粉末と木材のマイクロフィブリルの構造

後藤 俊幸・原田 浩・佐伯 浩

Microfibrillar Structure of Standard Cellulose Powder
and Wood (*Pinus densiflora* SIEB. et ZUCC.)

Toshiyuki GOTO, Hiroshi HARADA and Hiroshi SAIKI

目 次

要 旨	176	3. 結果と考察	177
1. ま え が き	176	引用文献	179
2. 試料と方法	177	Résumé	180

要 旨

X線回折法より計算されるセルロース・ミセル幅と、電子顕微鏡により求められるそのマイクロフィブリル幅について、標準セルロース粉末 (Whatman セルロース) とアカマツとを比較すると、前者の方がミセル幅・マイクロフィブリル幅ともに大きく、これはマイクロフィブリル自体の結晶芯の差異によるものと推察される。

また、アカマツのホロセルロースでは、マイクロフィブリルに折れ曲がり部分があることから、高結晶性が推定される。さらに同試料の加水分解およびセルラーゼ処理によるマイクロフィブリルの幅の変化から、マイクロフィブリル結晶芯のまわりのパラクリスタリン領域は加水分解の条件により、結晶化したり、取り除かれたりすると考えられる。

1. ま え が き

セルロース分子が集合した結晶性のミセル (micelle) あるいはマイクロフィブリル (microfibril) とよばれるものは、最初 HENGSTENBERG¹⁾らによりX線的に測定されて以来、数多く研究されている。その中で、ミセル幅が本綿・麻などと、木材^{1,2,3)}とでは異なる結果が出されている。また、電子顕微鏡⁴⁾的にも各セルロース材料によりマイクロフィブリル幅は異なるという考え方と、そのようなマイクロフィブリル幅の大きさの相違はある決まった単位 (エレメンタリー・フィブリル, elementary fibril)^{5,6)}の集まり方の相違であるという考え方が対立している。

本研究では、X線回折法から求められたミセル幅が、セルロースの材料により異なる意味を電子顕微鏡的観察により検討し、さらに試料の加水分解やセルラーゼ処理による変化の観察からマイクロフィブリルの内部構造について知見を得ようとするものである。

この研究の実施にあたり、試料を提供していただいた九州大学農学部近藤民雄、張豊吉両氏、セルラーゼを提供していただいた京都大学農学部農芸化学科山田康之氏また実験方法について適切な助言と示唆を与えられた元京都大学農学部林産工学科谷口譚氏 (現在三菱油化株式会社樹脂

研究所勤務), さらに研究全般にわたり援助を与えられた木材構造学研究室の各位に深く感謝致します。

なお, 本研究の概要は第 21 回日本木材学会(昭和 46 年 4 月)において口頭発表した。

2. 試料と方法

1) 試料

アカマツ (*Pinus densiflora* SIEB. et ZUCC.) の粉末試料と, 標準セルロース試料としてセルロース粉末 (Whatman 社製カラムクロマト用 CF-11, 以下 Whatman セルロースと略す) を, また, 九州大学農学部近藤民雄, 張豊吉両氏提供のアカマツ・ホロセルロースは WISE 法により, 同 α -セルロースは, ホロセルロースを 17.5% NaOH で処理したものを用いた。

2) ミセル幅の測定

各試料の 200~300 メッシュの粉末を赤外分光光度計 KBr 錠剤成形器を用いて, 約 120 kg/cm² 加圧し, 直径 13 mm, 重さ 0.20 g の錠剤を作り, 反射法で X 線回折強度曲線を自記記録した。この曲線から, 便宜的に $2\theta=10^\circ$ と $2\theta=30^\circ$ の回折強度を直線で結び, それを基線として SCHERRER 式を用いてミセル幅を算出した。

X 線回折装置は島津製作所 K K 製 GX-3B 型を用いた。

3) 解体試料の観察

上記粉末試料をホモジナイザーで解体し, 懸濁液をつくり, この懸濁液と同量の 4% 酢酸ウラニル水溶液とを混合し, 白金ループを使ってホルムバル支持膜を張った電顕用グリッド上に混合液をのせ, 風乾後電顕観察した。また, 懸濁液中で加水分解, セルラーゼ処理したものについても同様の観察を行なった。

3. 結果と考察

1) X 線回折法によるミセル幅

X 線回折法による粉末試料の回折強度曲線は Fig. 1 のようになった。Whatman セルロースでは (101), (10 $\bar{1}$) 面が区別され, (002) 面の強度が他の試料に比べていちじるしく大きく, 結晶化度の高いことが推定できる。ただ, アカマツのうち α -セルロースのみはセルロース II で, 他のものはセルロース I の図形を示した。SCHERRER 式より, アカマツの α -セルロースは (101) 面より, 他のものは (002) 面よりミセル幅を計算した。その結果を Table 1 に示す。

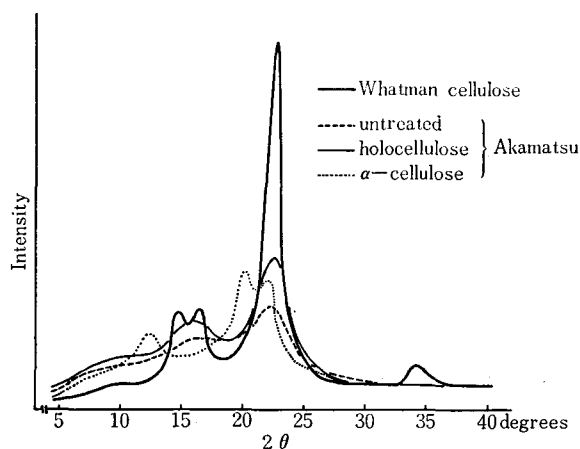


Fig. 1. X-ray diffraction curves of Whatman cellulose and Akamatsu.
Cu-K α radiation

Table 1. Micelle width and microfibril width.

Samples	Micelle width	Microfibril width
Whatman cellulose	63.5 Å (002)*	ca. 50 Å
Akamatsu		
untreated	20.2 (002)	—
holocellulose	27.6 (002)	ca. 25
α -cellulose	30.7 (101)	ca. 30

* () denotes the spacing examined.

2) 解体試料の観察

各粉末試料を解体し、酢酸ウラニルで負染色してえられた電顕写真は以下のものであった。

負染色法で観察しているため写真上ではマイクロフィブリルは白い線にみえ、Whatman セルロースではマイクロフィブリルは短く、真直ぐで比較的太そうであった (Fig. 2)。アカマツ・ホロセルロースの場合、試料の分散がよく、マイクロフィブリルは細く長いものがあり、折れ曲がったところもかなりあった (Fig. 3)。また、大きな幅のものが何本かの小さな幅のものに分れている部分も存在した (Fig. 3 中○印)。アカマツの α -セルロースではマイクロフィブリル自身は細いが束状のままであった (Fig. 4)。

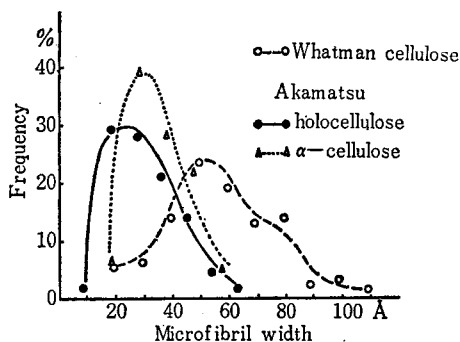


Fig. 5. Width distribution of microfibrils of Whatman cellulose, Akamatsu holocellulose and α -cellulose.

の Whatman セルロース (おそらく綿であると思われる) と、アカマツとでは、電顕的にもマイクロフィブリルの幅が違った。電顕観察では酢酸ウラニルによる負染色法を用いているが、この染色剤は水の入りのところへはどこでも入る、すなわち結晶以外の部分に浸入するといわれている。したがってこの考え方にたつと電顕写真上の白い線に見えている部分が、マイクロフィブリルの結晶の部分を示すということができる。それゆえ、得られたマイクロフィブリルの幅の相違というのは、マイクロフィブリルの結晶芯の大きさに差があることを示すと見なしてよいであろう。

また、アカマツの α -セルロースでは他の試料と異なり (101) 面で測定しているにもかかわらず、全般的に X 線回折法による値と負染色法による値とがかなり近い値であるのは興味がある。さらに、各測定値から、セルロース・マイクロフィブリルは、FREY-WYSSLING^{5,6)} のいう 35 Å が構造単位でなく、それぞれ異なった大きさの結晶芯を持っていると思われる。

アカマツ・ホロセルロースにはマイクロフィブリルの折れ曲がった部位が見い出された (Fig. 3)。この折れ曲がった点と点の間の距離は約 450 Å に極大をもつ分布であったが、周期性は認

この方法で観察したマイクロフィブリルはその横断面の形がどのようなものであっても、一番安定な面が支持膜に接していると考えられ、ここでいうマイクロフィブリルの幅はそのような状態で測定したものを意味する。

このような考えで電顕写真からマイクロフィブリルの単離が良好な部分より、60~130 個の幅を測定した (Fig. 5)。Fig. 5 より最も頻度の高いマイクロフィブリル幅を Table 1 に示してある。

以上の X 線回折法と電顕写真よりえられた結果から、X 線回折法により明らかに異なるミセル幅をもつセルロースの標準試料として

められなかった。この折れ曲がり方がマイクロフィブリルの内部の結晶欠陥部を示すのか、あるいは結晶領域間の非晶性部分であるのかについてはさらに検討を要する。

3) 加水分解, セルラーゼ処理による 2, 3 の観察例

Whatman セルロースをセルラーゼ (*Aspergillus niger* より精製したもの) で 30°C 9 日間処理して、解体法により電顕観察したものを Figs. 6, 7 に示す。かなり鋭い針状を呈しているものや、また WARDROP がバロニアで行なった実験のようにある角度でとがった先端をもつものも得られた。また、この処理により多少マイクロフィブリルの幅が狭くなった。

アカマツ・ホロセルロースについてもセルラーゼ処理 (*Trichoderma viride* より調製した Cellulase Onozuka P1500) を行なった (Fig. 8) が、Whatman セルロースと同様に先端のとがったものも見え、また処理によりマイクロフィブリル自体短くなっているようである。

次に、アカマツのホロセルロースを 2.5N-HCl と 5.8N-HCl で処理したものを Figs. 9, 10 に示す。処理前のもの (Fig. 3) に比べ、2.5N-HCl では多少マイクロフィブリルの幅が大きくなり (最頻値は約 30 Å), ある長さに切れており、また折れ曲がっている部位は存在しなかった。5.8N-HCl で処理を行うと、さらに長さが短く、細くなり、幅が均一化してきている (最頻値は約 25 Å)。アカマツ・ホロセルロースの処理による幅の変化を Fig. 11 に示す。

ここで、2.5N-HCl 処理でマイクロフィブリル幅が多少増加した原因として、マイクロフィブリルのまわりのパラクリスタリン中に存在する非グルコース成分が取り除かれて、グルコース成分が結晶化し、マイクロフィブリルの幅を増加させたのであろう。さらに 5.8N-HCl の場合には、その結晶化をおこすグルコース成分も取り除かれたのではないかと推察される。

また、アカマツ・ホロセルロースをセルラーゼ処理したものが、5.8N-HCl 処理と同様な結果となったのは、このセルラーゼが粗セルラーゼで、他の分解酵素たとえばペクチナーゼ、ヘミセルラーゼなどを含んでいることによると考えられる。

このように加水分解処理やセルラーゼ処理は、セルロース・マイクロフィブリルの内部構造を知る上で有効な手段であり、二、三の知見を得ることができたが、さらに詳細な検討が必要である。

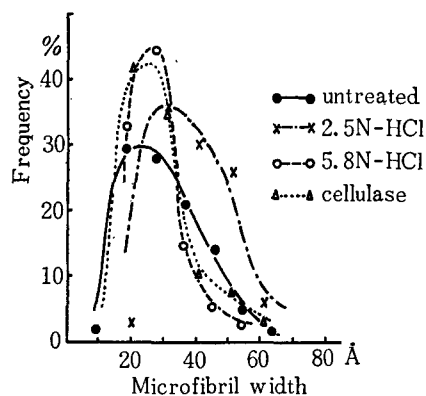


Fig. 11. Width distribution of microfibrils of Akamatsu holocellulose before and after the treatments.

引用文献

- 1) HENGSTENBERG, J and H. MARK: XVIII Über Form und Größe der Mizelle von Zellulose und Kautschuk, Z. Krist. **69**, 271-284, (1928)
- 2) 長沢武雄: 木材繊維「ミセル」の大きさ, 日林誌, **19**, 260-262, (1928)
- 3) WARDROP, A. B.: The Fine Structure of the Conifer Tracheid, *Holzforschung* **8**, 12-29, (1954)
- 4) BALASHOV, V. and R. D. PRESTON: Fine Structure of Cellulose and Other Microfibrillar Substances, *Nature* **176**, 64-65, (1955)
- 5) FREY-WYSSLING, A.: The Fine Structure of Cellulose Microfibrils, *Science* **119**, 80-82, (1954)

- 6) FREY-WYSSLING, A. and K. MÜHLETHALER: Die Elementarfibrillen der Cellulose, Makromol. Chem. **62**, 25-30, (1963)
- 7) HEYN, A. N. J.: The Microcrystalline Structure of Cellulose in Cell Walls of Cotton, Ramie, and Jute Fibers as revealed by Negative Staining of Sections, J. Cell Biol. **29**, 181-197, (1966)
- 8) WARDROP, A. B. and S. M. JUTTE: The Enzymatic Degradation of Cellulose from *Valonia ventricosa*, Wood Sci. Tech. **2**, 105-114, (1968)

Résumé

Cellulose microfibrils of Standard Cellulose Powder (Whatman cellulose) and wood (Akamatsu, *Pinus densiflora* SIEB. et ZUCC.) were studied by X-ray diffraction and electron microscopy.

The powder of each material was pressed into a tablet for the measurement of micelle width which was calculated from X-ray line broadening by the Scherrer equation (Fig. 1). The materials were also mechanically disintegrated in a homogenizer and they were mixed with negative staining solution (4% uranyl acetate) (Figs. 2, 3, 4). The widths of microfibrils were measured directly from the electron micrographs. Both the widths measured by X-ray diffraction and electron microscope from Whatman cellulose were greater than those from Akamatsu (Table 1), and it has been shown that the difference of the widths originated in the crystalline core of the microfibrils.

The kinkings of microfibrils in Akamatsu holocellulose were observed (Fig. 3) to indicate that the microfibrils may be highly crystalline. The shift of microfibril width by treatment with hydrochloric acid and cellulase (*Trichoderma viride*) suggests that some portion of the paracrystalline regions surrounding microfibril cores is either crystallized or dissolved away, depending on the condition of the treatment (Figs. 8, 9, 10, 11).

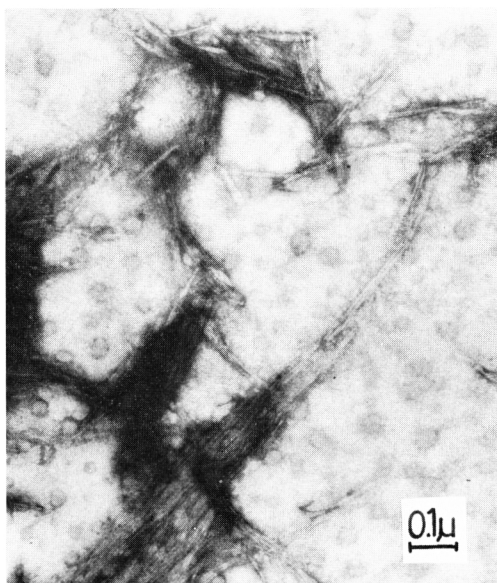


Fig. 2. Microfibrils of Whatman cellulose, negatively stained with uranyl acetate.

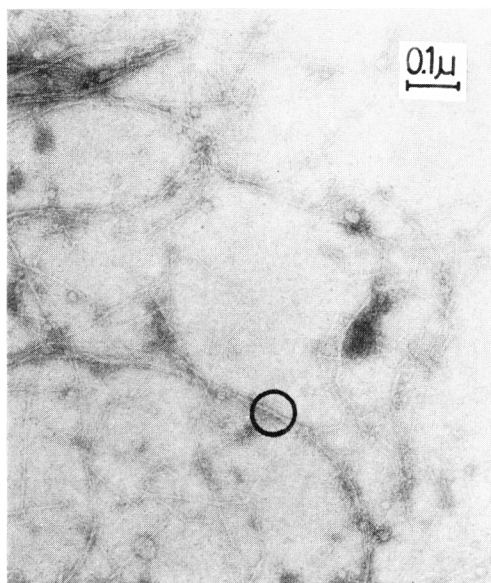


Fig. 3. Microfibrils of Akamatsu holocellulose, negatively stained with uranyl acetate. The circled area shows the aggregation of microfibrils.

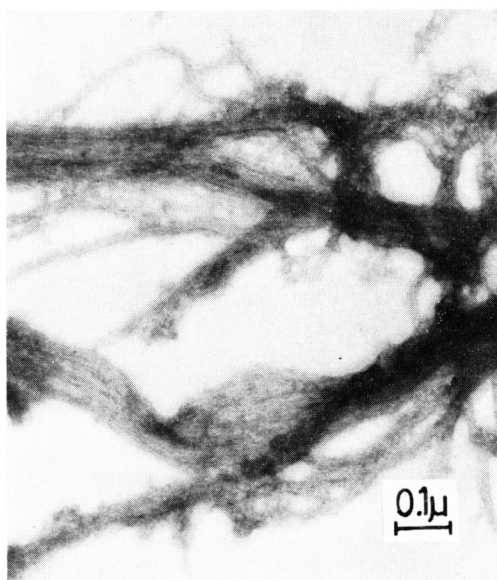


Fig. 4. Microfibrils of Akamatsu α-cellulose, negatively stained with uranyl acetate.

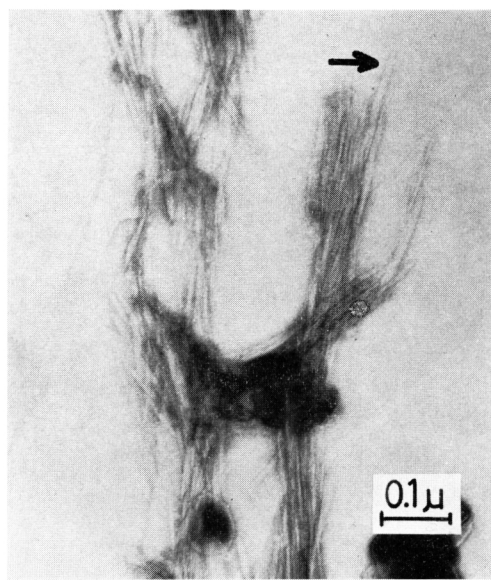


Fig. 6. Microfibrils of Whatman cellulose after cellulase (*Asperigillus niger*) treatment, showing pointed end (arrow). Negatively stained with uranyl acetate.

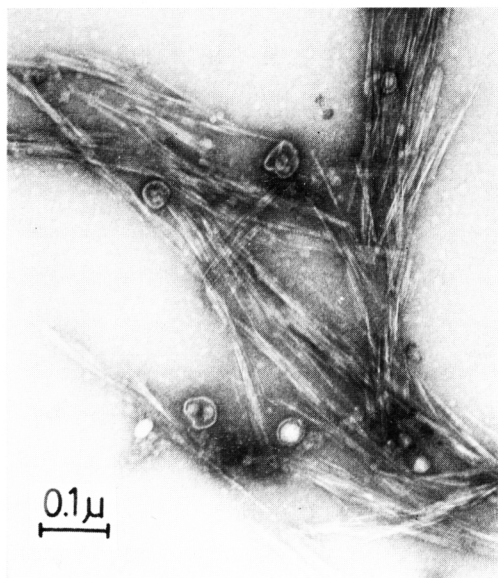


Fig. 7. Microfibrils of Whatman cellulose after cellulase (*Asperigillus niger*) treatment, showing needle-like shape. Negatively stained.

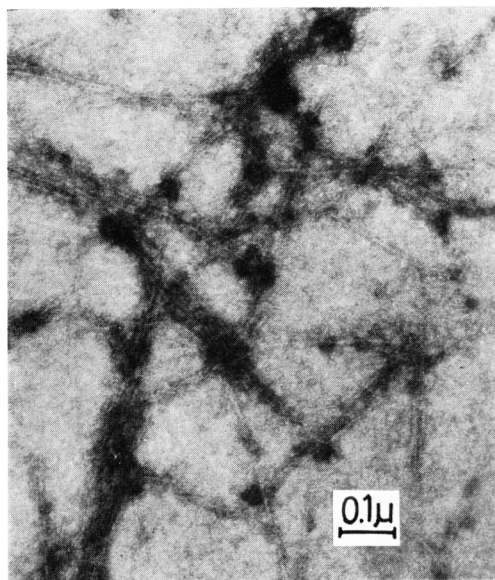


Fig. 8. Microfibrils of Akamatsu holocellulose after cellulase (*Trichoderma viride*) treatment, negatively stained with uranyl acetate.

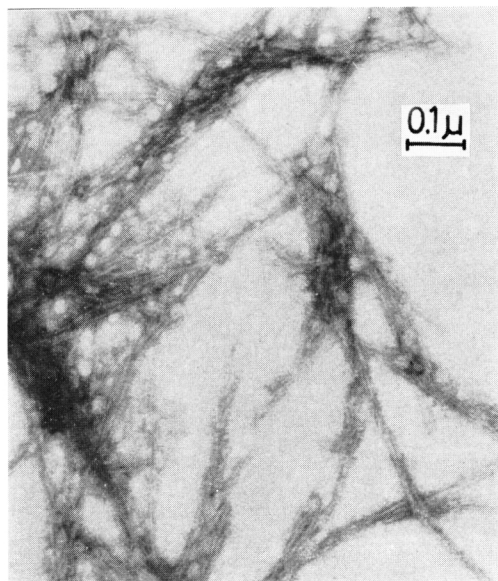


Fig. 9. Microfibrils of Akamatsu holocellulose hydrolyzed with 2.5N-HCl (5 hrs. 90°C) Negatively stained with uranyl acetate.

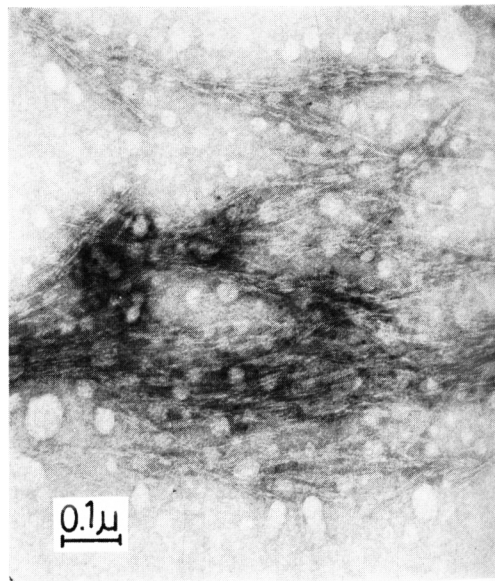


Fig. 10. Microfibrils of Akamatsu holocellulose hydrolyzed with 5.8N-HCl (1 hr. 90°C) Negatively stained with uranyl acetate.