

ブナ・ホロセルロース (*Fagus crenata*) の 酵素加水分解に及ぼすガンマ線照射の影響

古 屋 信 子⁽¹⁾

Nobuko FURUYA: Effect of γ -Ray Irradiation
of Beech Wood Holocellulose (*Fagus crenata*)
on its Enzymatic Hydrolysis

要 旨: γ 線照射処理を受けたホロセルロースのセルラーゼによる酵素分解性を明らかにするため、 γ 線を照射したブナ・ホロセルロースの結晶化度、重合度、平衡含水率および表面積を測定し、これらの特性と酵素加水分解による還元糖収率との関係を検討した。

結晶化度は 10 Mrad の照射によりやや増加するが、50 Mrad 以上の照射では低下した。重合度は照射線量の増加により低下するが、平衡含水率ならびに表面積は増大する傾向がみられた。

10 Mrad の照射では還元糖収率は減少するが、50 Mrad 以上の照射では加水分解速度と還元糖収率はともに増加し、また結晶領域も急激に加水分解され、24 時間でほぼ完全に加水分解されることが明らかになった。しかし 200 Mrad 照射したホロセルロースの還元糖収率は 6 時間の加水分解で約 80% に達するが、分解時間を延長してもそれ以上の値は得られなかった。結晶化度の低下にともなって、還元糖収率はほぼ直線的に増大することが明らかになった。50 Mrad 以上の照射線量において、還元糖収率は重合度の低下とともに増大することがわかった。

I 緒 言

再生産可能な資源として、木材資源が注目され、これを有効利用するために、木材多糖類（セルロース、ヘミセルロース）の酵素加水分解についての研究が盛んに行われている。たとえば酵素分解率の向上を目的とした前処理法の検討あるいはセルロースの構造と反応性に関する研究など種々の立場から検討がなされている。本報では γ 線を照射したブナ・ホロセルロースを取り上げ、酵素加水分解に影響する主な構造特性として、結晶化度、重合度、平衡含水率および表面積を測定し、これらの特性と酵素による還元糖収率との関係を検討した。

本実験を行うにあたり、適切な助言をいただいた村山敏博林産化学部第 1 科長、ならびに報告のまとめにあたり、助言をいただいた平林靖彦林産化学部第 1 科複合化工研究室長にお礼申し上げます。

II 実 験

1. 供 試 材 料

亜塩素酸塩法⁽¹⁾で調製したブナ・ホロセルロース（リグニン含有量：13.2%）を試料として用いた、 γ 線照射は試料をポリエチレン袋で包み、⁶⁰Co 線源を用い、線量率： 1.351×10^5 rad/hr. で空气中、室温において行った。照射総線量は 10, 50, 100, 200 Mrad である。

2. 重 合 度

ホロセルロースの重合度は、カドキセン溶液を用い、25°C でウベローデ型粘度計を使用して粘度を測

定し, JAYME ら²⁾の方法にしたがい極限粘度 $[\eta]$ を求めた。重量平均重合度 (DP_w) は次式により算出した。

$$DP_w = K[\eta] \quad K = 230$$

3. 結 晶 化 度

赤外分光光度計用 KBr 錠剤成型器を用い, 試料を薄円盤に成型し(圧縮圧 100 kg/cm²), この錠剤状試料を用いて, X線回折法でその回折曲線を測定した。装置は理学電機 Ru-200 型, 測定条件は Cu-K α 線を用い, 電圧: 30 kV, 電流: 15 mA, 走査速度: 1°/min である。回折曲線からの結晶化度の算出は SEGAL ら³⁾の方法にしたがった。

4. 平 衡 含 水 率

試料 (0.5 g) を秤量びんに取り, 五酸化リン上で真空乾燥により絶乾としたのち, 硫酸カリウム飽和溶液(相対湿度: 97%)を入れたデシケーター中, 25°C で吸湿させ, 経時的に重量増加を測定し, 平衡時の含水率を求めた。

5. 表 面 積

規定の相対湿度を示す塩類飽和溶液⁴⁾を用い, 水分吸着法で測定した。試料 (0.5 g) を秤量びんに取り, 五酸化リン上で真空乾燥後, 所定の相対湿度を示す塩類飽和溶液を入れたデシケーター中に入れ, 25°C で恒量になるまで吸湿させ, その水分吸着量を測定した。なお調湿液として用いた塩類とその飽和溶液の示す相対湿度は 25°C でそれぞれ次に示す通りである。すなわち塩化リチウム: 11%, 酢酸カリウム: 22%, 塩化マグネシウム: 32%, 炭酸カリウム: 43%, 亜硝酸カリウム: 63%, 亜硝酸ナトリウム: 66%, 塩化ナトリウム: 75%, クロム酸カリウム: 88%, リン酸二水素ナトリウム: 93%, 硫酸カリウム: 97% である。

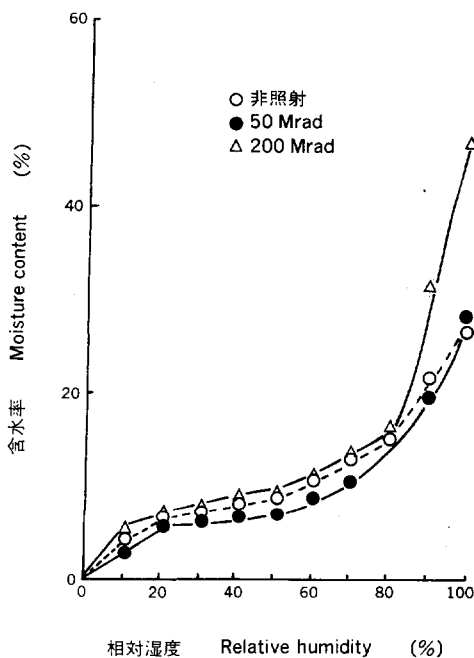


Fig. 1. ホロセルロースの吸着等温曲線
Adsorption isotherm of holocellulose.

各相対湿度と含水率とから吸着等温曲線を求めると Fig. 1 に示すように Sigmoid 型であった。Fig. 1 には非照射, 50, 200 Mrad 照射したホロセルロースを示した。次式に示す BET⁵⁾式により単分子層吸着量 N_0 を計算から求めた。

$$\frac{x}{(1-x)N} = \frac{1}{N_0 C} + \frac{C-1}{N_0 C} \cdot x$$

x : 相対湿度

N : 1 g 当たり吸着された水の量

C : 吸着熱に関する定数

N_0 : 単分子層吸着量

この時の吸着分子の 1 分子当たりの面積を用いて, N_0 に相当する分子数を乗ずれば表面積が算出できる。そこで次に示す STAMM⁶⁾の式を用いて表面積を求めた。

$$\Sigma = \frac{aAN_0 \times 10^{-4}}{M}$$

Σ : 表面積

a : 吸着分子 (水) の占める面積 $14.8 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$

A : アボガドロ数 = 6.02×10^{23}

N_0 : 単分子層吸着量, BET 式より計算

M : 水分子量 = 18

6. 酵素加水分解

用いた酵素は *Trichoderma viride* に由来する市販セルラーゼのメイセラーゼ p (明治製菓株) である。酵素濃度 0.5%, 基質濃度 2%, 0.1 M 酢酸溶液 (pH 5.0, 10 ml), 40°C で 3, 6, 12, 24 時間振とうとして反応させた。反応終了後, 試料を 1 G 4 のガラスフィルターで濾過し, 濾液中の還元糖量を SOMOGYI-NELSON⁷⁾ により測定し, グルコースとして定量した。

III 結果と考察

Table 1 にホロセルロースの重合度, 結晶化度, 平衡含水率, 表面積, 還元糖収率 (酵素加水分解時間: 6 時間) の測定結果をまとめて示した。

1. 照射による重合度の変化

Table 1 に示すように, ホロセルロースの重合度は γ 線照射により, 照射線量の増加とともに低下した。非照射ホロセルロースの重合度は 524 であるが, 10 Mrad では非照射の約 1/2 となり, 200 Mrad ではその重合度は 12 となり, 非照射の約 1/44 に低下した。セルロースに関する筆者の実験⁸⁾ においても, γ 線照射により重合度は低下する。即ちセルロースの場合, 非照射セルロースの重合度は 1363 であるが, 10 Mrad では非照射の約 1/8 に低下し, 165 Mrad では約 1/55 の重合度になる。このことはセルロースの γ 線照射による重合度の低下がホロセルロースのそれより若干大きいことを示している。セルロースやヘミセルロースのような崩壊型の高分子での放射線による主鎖切断効果はその分子量 (または重合度) の大きい程高い⁹⁾。したがって γ 線照射によるホロセルロースとセルロースの重合度低下について上述のような結果を示したものと思われる。

2. 照射による結晶化度の変化

Fig. 2 はホロセルロースに γ 線を照射した時のホロセルロースの X 線回折曲線を示したものである。この X 線回折曲線から算出したホロセルロースの結晶化度と照射線量の関係を Fig. 3 に示した。結晶化

Table 1. ホロセルロースの微細構造の変化
Changes in fine structure of holocellulose.

試料 Sample	照射線量 Irradiation dose (Mrad)	重合度 Degree of polymeri- zation	結晶化度 Crystallinity index (%)	平衡含水率 E. M. C. *1 (%)	表面積 Surface area (m ² /g)	還元糖収率 Reducing sugar yield *2 (%)
ホロセルロース Holocellulose	0	524	64.5	26.3	448.0	55.0
	10	199	70.2	27.2	517.3	45.2
	50	98	63.2	27.1	460.3	68.3
	100	27	52.8	36.0	487.1	76.5
	200	12	51.6	47.2	492.5	78.7

*1 E. M. C. ; Equilibrium moisture content.

*2 酵素加水分解時間: 6 時間. Enzymatic hydrolysis time ; 6 hrs.

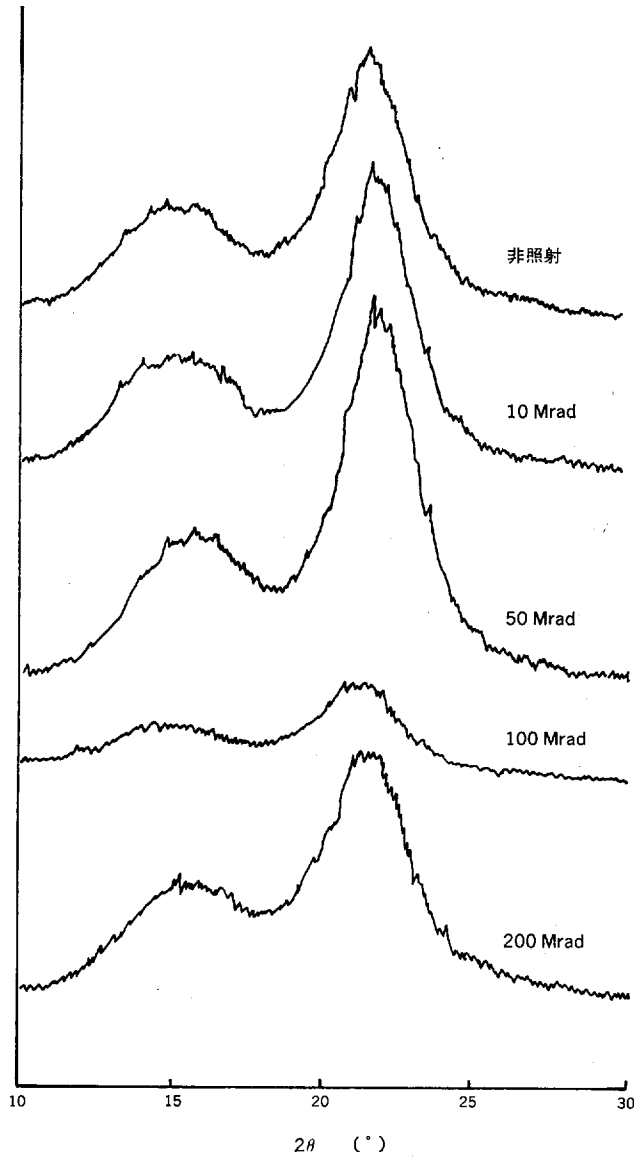


Fig. 2. ホロセルロースのX線回折図
X-ray diffraction curve of hollocellulose.

度は10 Mradの照射によりやや増加し、50 Mrad以上の照射では照射線量の増加するとともに低下しているが、大差は認められなかった。γ線照射による結晶化度の変化は、結晶領域の分子の移動がそれ程大きくないことが予想されるため、X線で測定する場合には結晶化度の変化は少ないであろう。セルロース⁸⁾についても同様な傾向が示されている。ホロセルロース、セルロースの結晶化度の変化の割合を比較すれば、ホロセルロースの場合、50, 100, 200 Mradでそれぞれ2.0, 18.1, 20%であり、セルロースの場合10, 60, 165 Mradでそれぞれ2.6, 5.0, 23.2%である。ホロセルロースの結晶化度の低下の割合がセルロースのそれより少ないのは、ホロセルロース中のヘミセルロースの量などのためと考えられるが明らか

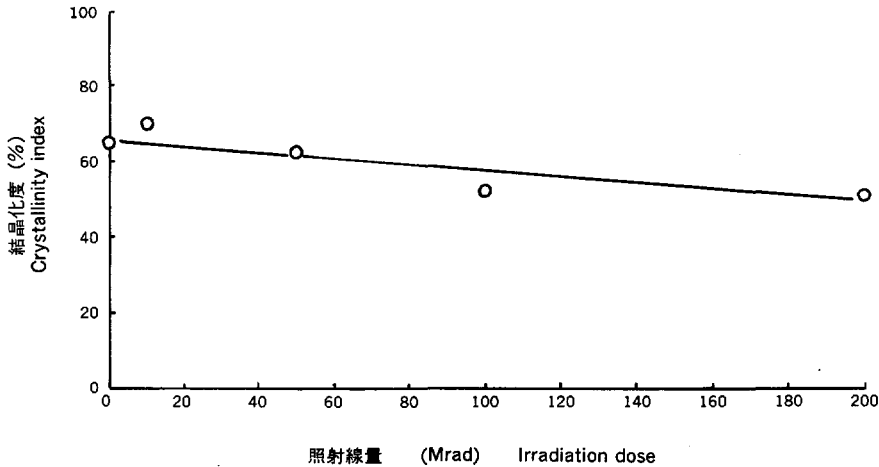


Fig. 3. 結晶化度と照射線量の関係
Relationship between crystallinity index and irradiation dose.

ではない。

3. 照射による平衡含水率の変化

ホロセルロースの平衡含水率は主として繊維組織の崩壊度に大きく依存する。すなわち繊維の制限膨潤の変化が平衡含水率を左右することが考えられる。10 Mrad までは繊維組織の崩壊がそれ程大きくなく、10 Mrad 以上から約 50 Mrad 附近までは、崩壊がゆるやかに進行するので¹⁰⁾平衡含水率の変化は小さい。Table 1 に示すように 50 Mrad 以上では、平衡含水率は線量の増加するにつれ増大する傾向がうかがわれた。

4. 還元糖収率と酵素加水分解時間

照射線量の異なるホロセルロースの還元糖収率と酵素加水分解時間との関係を Fig. 4 に示した。10 Mrad までは還元糖収率は減少するが、50 Mrad 以上では加水分解速度とともに還元糖収率は増大し、また結晶領域も急激に加水分解され、24 時間でほぼ完全に加水分解されることが明らかになった。すなわち 3 時間の酵素加水分解で約 40~60% の還元糖収率を得ているが、これはセルラーゼ分解ではまず優先的に非晶部から分解されるため¹¹⁾、ヘミセルロースならびにセルロースの非晶部から生成した還元糖によるものと思われる。200 Mrad 照射したホロセルロースの還元糖収率は 6 時間で約 80% に達するが、その後加水分解時間を延長しても増大しなかった。

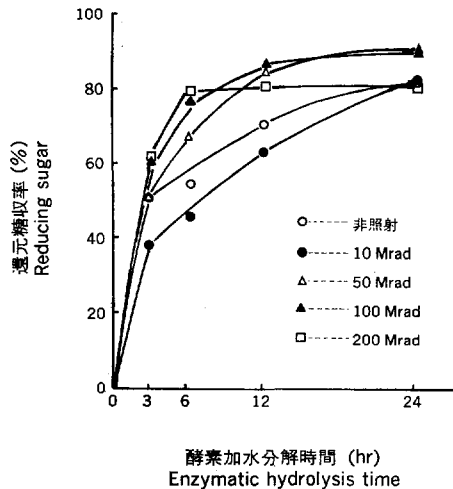


Fig. 4. 還元糖収率と酵素加水分解時間の関係
Relationship between reducing sugar yield and enzymatic hydrolysis time.

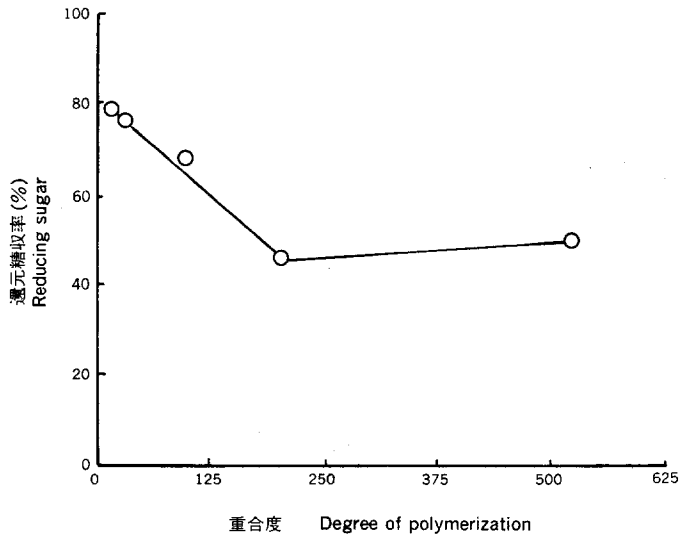


Fig. 5. 還元糖収率と重合度の関係
Relationship between reducing sugar yield and degree of polymerization.

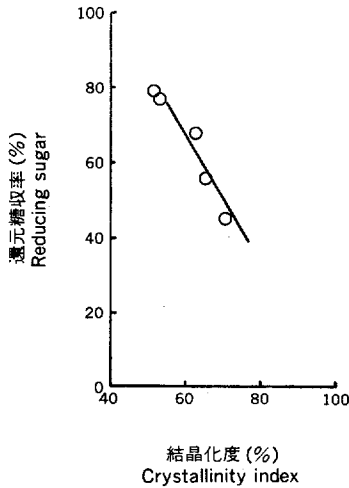


Fig. 6. 還元糖収率と結晶化度の関係
Relationship between reducing sugar yield and crystallinity index.

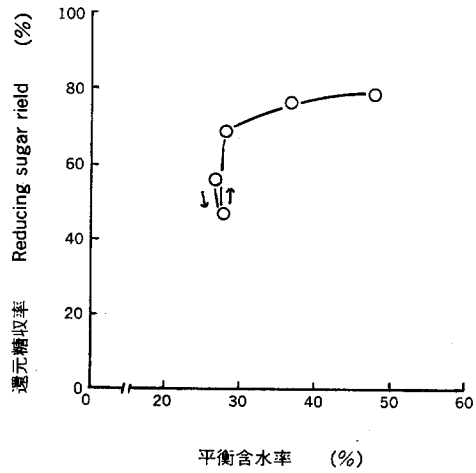


Fig. 7. 還元糖収率と平衡含水率の関係
Relationship between reducing sugar yield and E. M. C.

5. 還元糖収率に及ぼす重合度の影響

Fig. 5 に還元糖収率と重合度の関係を示した。γ線照射により、10 Mrad で重合度は初期重合度の約 1/2 に低下し、還元糖収率は若干減少した。50 Mrad 以上の照射線量において、還元糖収率は重合度の低下ともなって増大することがわかった。

6. 還元糖収率に及ぼす結晶化度の影響

還元糖収率と結晶化度の関係を Fig. 6 に示した。結晶化度の測定はX線法であり、結晶化度の変化の

割合はあまり大きくはないが、還元糖収率は結晶化度の低下とともに増大し、両者はほぼ直線的な関係が認められた。還元糖収率と結晶化度の関係は、アピセル¹²⁾、硫酸パルプ¹²⁾、ハンマーミルで粉碎した硫酸パルプ¹²⁾、 γ 線照射した溶解セルロース⁸⁾、あるいはボールミルで粉碎した木粉¹³⁾などについても同様な傾向が示されている。

7. 還元糖収率に及ぼす平衡含水率の影響

Fig. 7 に還元糖収率と平衡含水率の関係を示した。50 Mrad 以下では平衡含水率の変化は小さく、10 Mrad では還元糖収率は減少するが、50 Mrad 以上では平衡含水率が増加するにつれ還元糖収率は増大する傾向がうかがわれた。

8. 還元糖収率に及ぼす表面積の影響

酵素反応はまず酵素が基質の表面に吸着して、はじめて起こる反応である。したがって酵素の吸着点となる基質の表面積はその反応性に影響を持つことが考えられる。大島ら¹⁴⁾は酵素の吸着が単分子吸着式であるラングミュアの式で整理できることを報告している。そこで水分子の単分子吸着から BET 法により、単分子層吸着量を計算し、ホロセルロースの表面積を求めた。

γ 線照射による表面積の変化は、照射線量がかなり多くなってもわずかであるが、線量の増加により、増大する傾向がうかがわれた。

還元糖収率と表面積の関係は Fig. 8 に示すように還元糖収率は表面積の増加にもなって増加する傾向がうかがわれた。

還元糖収率に及ぼす表面積の影響について $F_{AN}^{15)}$ はアピセル、Solka Floc SW 40 など 19 種類のセルロース物質について検討し、還元糖収率は表面積の増加により増大する傾向があるがその依存性は大きくないことを報告している。

IV ま と め

γ 線を照射したホロセルロースの酵素加水分解に及ぼす照射の影響を明らかにするため、ブナ・セルロースに γ 線を照射して、結晶化度、重合度、平衡含水率、表面積および酵素加水分解による還元糖収率を測定し、これら構造特性と還元糖収率との関係を検討した。

結晶化度は 10 Mrad の照射によりやや増加し、50 Mrad 以上の照射では照射線量の増加とともに低下したが、大差は認められなかった。200 Mrad では約 1/44 に低下した。

平衡含水率の照射による変化は、50 Mrad まではその変化は小さく、50 Mrad 以上では線量の増加につれ、平衡含水率は増大する傾向がうかがわれた。

照射による表面積の変化についてみると、線量の増加とともに表面積は増大する傾向がみられるが、ごくわずかである。

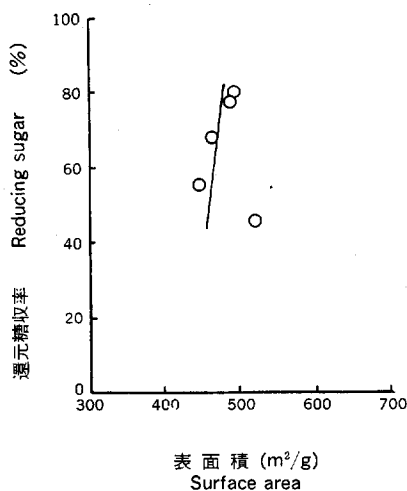


Fig. 8. 還元糖収率と表面積の関係
Relationship between reducing sugar yield and surface area.

10 Mrad の照射では還元糖収率は減少するが、50 Mrad 以上では加水分解速度とともに、還元糖収率は増大し、結晶領域も急激に加水分解され、24 時間でほぼ完全に加水分解されることが明らかになった。しかし 200 Mrad 照射したホロセルロースの還元糖収率は、6 時間の加水分解で約 80% に達するが、分解時間を延長してもそれ以上の値は得られなかった。

還元糖収率は結晶化度の低下にともなってほぼ直線的に増大することが明らかになった。50 Mrad 以上の照射線量では還元糖収率は重合度の低下にともなって増大することがわかった。

引用文献

- 1) 右田伸彦・米沢保正・近藤民雄編：木材化学（下），共立出版，7 pp., (1968)
- 2) JAYME G. und R. KLEPPE : Das papier, 15, 6~10, (1961)
- 3) SEGAL L., J. J. CREELY, A. E. MARTIN, JR. and C. M. CONRAD : Textile Res. J., 29, 786~794, (1959)
- 4) 矢野 泰：“材料と水分ハンドブック，塩類飽和溶液による調湿法”，高分子学会・高分子と吸湿委員会編，共立出版，246 pp., (1968)
- 5) 矢野 泰：“高分子実験学講座 5，高分子の物性 III”，共立出版，109 pp., (1958)
- 6) J. STAMM A. : Tappi, 40, 761~765, (1957)
- 7) 福井作蔵：“生物化学実験法，還元糖の定量”，東京大学出版会，10 pp., (1973)
- 8) 古屋信子：林試研報，326, 1~8, (1984)
- 9) 雨宮綾夫編：放射線化学入門（下），丸善，472 pp., (1962)
- 10) 八浜義和・高椋節夫：工化誌，63, 1043~1050 (1960)
- 11) WALSETH C. S. : Tappi 35, 233~238, (1952)
- 12) FAN L. T., Y-H. LEE and D. H. BEARDMORE : Biotechnol Bioeng., 22, 177~199, (1980)
- 13) 松村義人・須藤賢一・志水一允：木材誌，23, 562~570, (1977)
- 14) H. OOSHIMA, M. SAKATA and Y. HARANO : Biotechnol Bioeng., 25, (1983)
- 15) FAN L. T., Y-H. LEE and D. H. BEARDMORE : Biotechnol Bioeng., 23, 419~424, (1981)

**Effect of γ -Ray Irradiation of Beech Wood Holocellulose
(*Fagus crenata*) on its Enzymatic Hydrolysis**

Nobuko FURUYU⁽¹⁾

Summary

The holocellulose prepared from powdered beech wood (*Fagus crenata*) was irradiated with γ -ray and the effect of the γ -ray irradiation on the enzymatic hydrolysis of the holocellulose was discussed in terms of the crystallinity index, the degree of polymerization, the equilibrium moisture content, the surface area of the holocellulose samples and the yield of sugar.

The crystallinity showed a slight increase at 10 Mrad irradiation dose, but decreased with an increase in the irradiation dose of above 50 Mrad.

The increase of irradiation dose showed a tendency to decrease the degree of polymerization but increase the equilibrium moisture content and the surface area of holocellulose.

The rate of enzymatic hydrolysis increased with an increase in the γ -ray dose. The yield of sugar showed a minimum at 10 Mrad irradiation dose, then increased with an increase in the irradiation dose of above 50 Mrad. The irradiation dose of above 50 Mrad enabled to hydrolyze the crystalline region of the samples within 24 hours. The plot of the yield of sugar from the samples irradiated to the amount of 200 Mrad versus hydrolysis time, however, showed a level-off point of about 80% at 6 hours.

The yield of sugar increased linearly with a decrease in the crystallinity index.

The yield of sugar increased with a decrease in the degree of polymerization at above 50 Mrad irradiation dose.

Received June 25, 1983

(1) Forest Products Chemistry Division