

木材セルロース（溶解）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 on Enzymatic
Hydrolysis of Wood Cellulose (Dissolving)

要 旨: γ 線照射処理を受けた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 線照射したセルロースのセルラーゼによる還元糖収率、および結晶化度、重合度、平衡含水率、および内部表面積を測定し、これらの特性と酵素分解性との関係を検討した。

セルロースの結晶化度、重合度は照射線量の増加によって低下するが、平衡含水率ならびに表面積は照射線量の増加によって増大した。165 Mrad 照射したセルロースは、非照射ならびに 10, 60 Mrad 照射したセルロースと比べて短時間で急速に酵素分解が進むことがわかった。結晶化度の低下にともなって、還元糖収率は増大するが、両者は直線関係にあることがわかった。還元糖収率は重合度の低下にともなって増大するが、重合度が 60 から 25 に低下した場合、還元糖収率の増大の程度は、重合度が 180 から 60 まで低下した場合のそれに比べて大であった。165 Mrad 照射したセルロースの酵素分解率は 93% の値を示した。

I 緒 言

将来予測されるエネルギー危機と食料、飼料不足に対応して、再生産可能なバイオマス、その中でもセルロース資源として最大の蓄積量を有する木材資源が注目されるようになった。これを有効利用するために、木材中に含まれるセルロースやヘミセルロース等の多糖類を酵素分解し、糖を得る研究が盛んに行われるようになった。セルロースを酵素で分解する際、セルロースの結晶領域は酵素の作用に対し抵抗性があるため、非晶領域に比べて分解効率が低い。したがってセルロースの結晶領域の酵素反応性を上げるためには、何らかの前処理が必要になる。前処理法には化学的方法、物理的方法がある。そのうち物理的方法についてみると、セルロース繊維の切断、微粉化により非晶化することで反応を容易にすることが研究されている。

たとえば γ 線処理、あるいは振動ボールミル、ロールミルを用いて微粉碎すると、セルロース質の酵素分解率が増大することが知られている¹⁾⁻³⁾。

WALSETH⁹⁾はセルロースの微細構造におけるセルラーゼの作用として、まず非晶領域が選択的に速く分解され、それに引き続いて結晶領域が分解されることを指摘した。BETRABET ら¹⁰⁾は各種のセルロース物質の酵素反応特性の差異を、 α -セルロース含量、表面積、結晶化度、結晶ディメンジョンによって説明した。すなわち彼らは綿の還元糖収率が低い値を示すのは、綿がパガスパルプ、麦わらパルプなどに比べて結晶化度が高く、結晶ディメンジョンが大きく、表面積が小さいことによると述べている。一方 FAN ら¹¹⁾はセルロースの酵素分解率は結晶化度の減少ならびに比表面積の増加によって増大する傾向があり、

また両者の間では比表面積より結晶化度への依存性が大きいことを報告している。

本報告では γ 線照射したセルロースの重合度、結晶化度、平衡含水率、表面積などを測定し、これら微細構造にかかわる特性の変化と酵素反応性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心得に厚くお礼申し上げます。

II 実 験

1. 供 試 材 料

セルロース試料として、山陽国策パルプ製溶解パルプ（パルプ組成：アカマツ 80%，モミとツガ 20%）を用いた。試料をポリエチレン袋に入れ、 $^{60}\text{Cobalt}$ 線源、照射線量率： $1.351 \times 10^6 \text{ rad/hr}$ 、室温、大気中の条件で γ 線照射を行った。総線量は 10, 60, 165 Mrad とした。

2. 重 合 度

試料 (30~40 mg) をカドキセン溶液 50 ml に溶解し、ウベローデ型粘度計を使用し、25°C で粘度を測定し、JAYME ら¹²⁾ の方法に従い極限粘度 $[\eta]$ を求めた。重量平均重合度 (DP_w) は次式により $[\eta]$ から算出した。

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

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）、X 線回折法で回折曲線を求めた。装置は理学電機 Ru-200 形、測定条件は、X 線源：Cu-K α 、電圧：30 kV、電流：15 mA、走査速度：1°/min である。得られた回折曲線から結晶化度 (CrI) を SEGAL ら¹³⁾ の方法で算出した。

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、真空で絶乾としたのち、硫酸カリウム飽和溶液を入れたデシケーター中、その溶液上で、25°C で吸湿させ（相対湿度 97%）、重量増加を経時的に測定した。絶乾重量の差をもって含水量として絶乾試料に対する % で表し、平衡時の含水率を求めた。

5. 表 面 積

セルロースの表面積は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¹⁴⁾を入れたデシケーター中に放置、25°C で平衡になるまで吸湿させ、その水分吸着量を測定した。調湿液に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。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・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%。

各相対湿度と含水率とから吸着等温曲線を求めた。吸着曲線は Fig. 1 に示すように典型的な Sigmoid 型を示したので次式に示す BET¹⁵⁾ 式を適用し、単分子吸着層が表面に形成された時の吸着量 N_0 を求めた。

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

x ：相対湿度、 N ：1 g あたり吸着された水の量、 C ：吸着熱に関する定数、

N_0 ：単分子の吸着量

この時の吸着分子の占めている面積がわかれば、セルロースの表面積を求めることができる。そこで STAMM¹⁶⁾ の式を用いて表面積を算出した。

$$\Sigma = \frac{a A N_0 \times 10^{-4}}{M}$$

Σ : 表面積 m^2/g ,

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

A : アボガドロ数 = 6.02×10^{23} ,

N_0 : 表面積における単分子吸着量,

M : 水分子量 = 18

6. 酵素加水分解

Tricoderma viride に由来する市販酵素メイセラゼ P（明治製菓株）を使用した。L 字型試験管に試料（0.2 g）を採取，50 mg の酵素を含む 0.1 M 酢酸緩衝液（pH 5, 10 ml）を加え，40°C で 3, 12, 24 時間振とうして反応させた。反応終了後，試料を 1G4 のガラスフィルターで濾過し，濾液中の還元糖量を SOMOGYI-NELSON 法¹⁷⁾ でグルコースとして定量した。

III 結果と考察

Table 1 に試料の重合度，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：24 時間）などの測定結果を示した。

1. 照射による重合度の変化

Table 1 に示すように非照射セルロースの重合度は 1363 であり，照射線量の増加するとともに重合度は低下した。165 Mrad は照射線量では重合度は 25 まで低下し，非照射セルロースの重合度の約 1/55 で

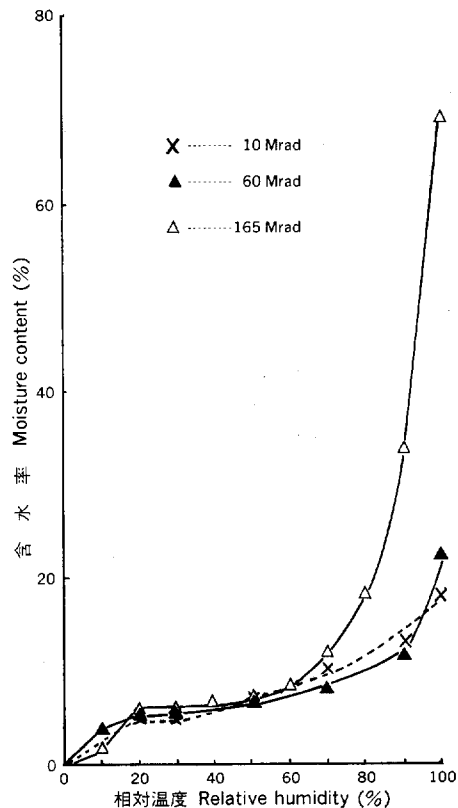


Fig. 1. セルロースの吸着等温曲線
Adsorption isotherms of cellulose.

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

試料 Sample	照射線量 Irradiation dose (Mrad)	重合度 Degree of polymerization	結晶化度 Crystallinity index (%)	平衡含水率*1 E. M. C. (%)	表面積 Surface area (m^2/g)	還元糖収率*2 Reducing sugar yield (%)
セルロース Cellulose	0	1363	84.4	21.7	179.1	44.0
	10	180	82.2	18.2	166.3	27.3
	60	62	80.1	22.2	209.4	39.0
	165	25	64.9	69.0	215.3	93.0

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

*2 酵素分解時間：24 時間 Enzymatic hydrolysis time : 24 hrs.

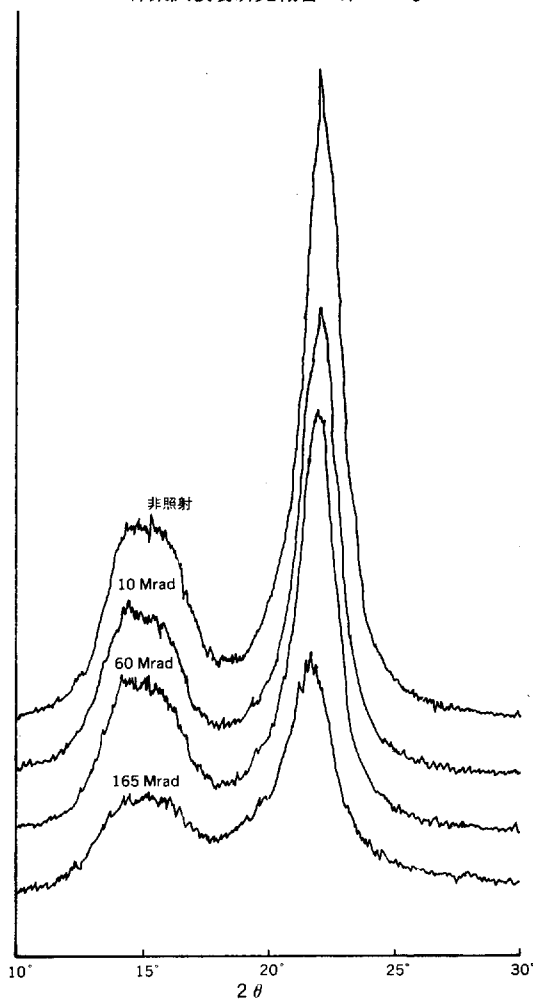


Fig. 2. セルロースのX線回折曲線
X-ray diffraction curve of cellulose.

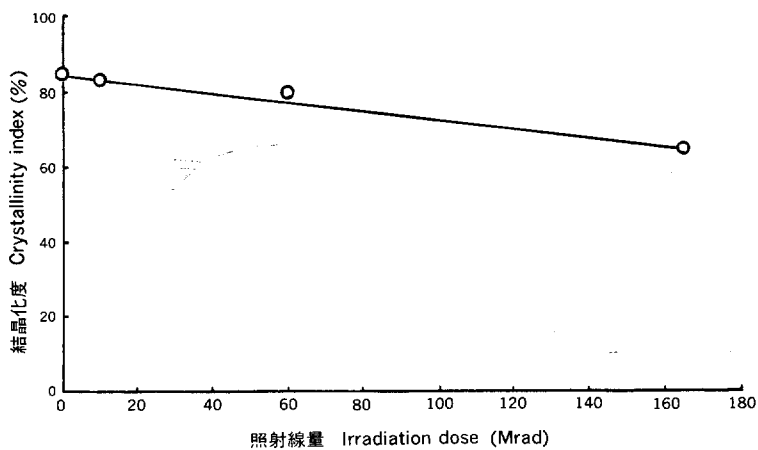


Fig. 3. 結晶化度と照射線量の関係
Relationship between crystallinity index and irradiation dose.

ある。

2. 照射による結晶化度の変化

Fig. 2 の X 線回折図に示されるように、セルロースの結晶構造による特有のピーク ($2\theta = 22^\circ$) は非照射セルロースが最も大きく、照射線量の増加するとともに小さくなる。この回折図より算出した結晶化度の変化を Fig. 3 に示す。ARTHER¹⁸⁾や高棕ら¹⁹⁾は X 線回折法で求めた照射セルロースの結晶化度はほとんど変化が認められないとしている。しかし本報の測定法では、Fig. 3 からわかるように結晶化度は照射線量が増加するに従って減少する。

3. 還元糖収率と酵素分解時間

照射線量の異なるセルロースの還元糖収率と酵素分解時間との関係を Fig. 4 に示した。この図から明らかなように、165 Mrad 照射したセルロースは 3 時間の分解で 93% の還元糖収率を得、急速に酵素分解が進むことがわかる。10, 60 Mrad 照射セルロースの還元糖収率が非照射セルロースのそれより小さい値を示すことは、木粉、もみがら、古紙などの照射処理の酵素分解⁶⁾⁸⁾とは異なる結果を示した。

4. 還元糖収率に及ぼす重合度の影響

Fig. 5 にセルロースの還元糖収率と重合度の関係を示した。なお還元糖収率は 24 時間、酵素分解をおこなったときの収率で示した。照射セルロースの還元糖収率は重合度の低下にともなって増大した。重合度が約 60 から 25 に低下した場

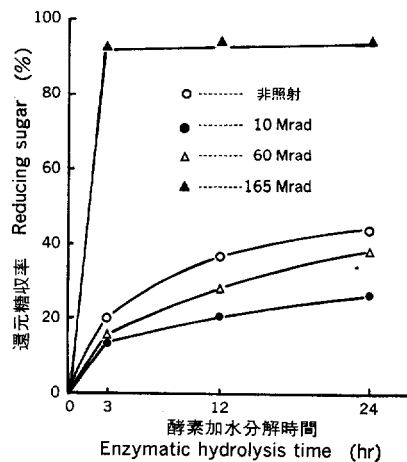


Fig. 4. 還元糖収率と酵素加水分解時間の関係
Relationship between reducing sugar yield and enzymatic hydrolysis time.

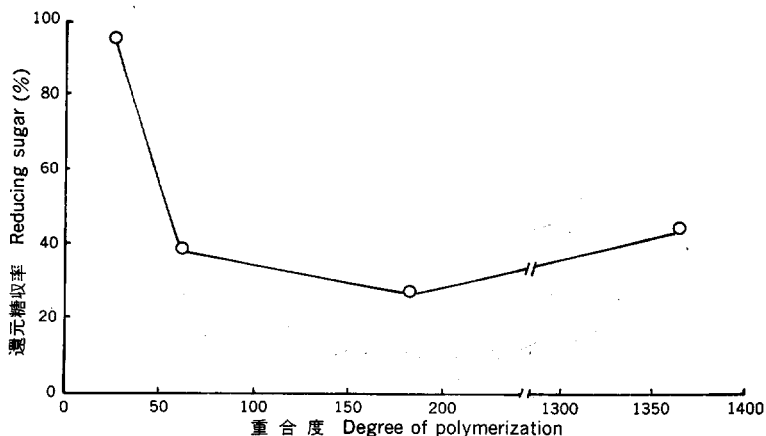


Fig. 5. 還元糖収率と重合度の関係
Relationship between reducing sugar yield and degree of polymerization.

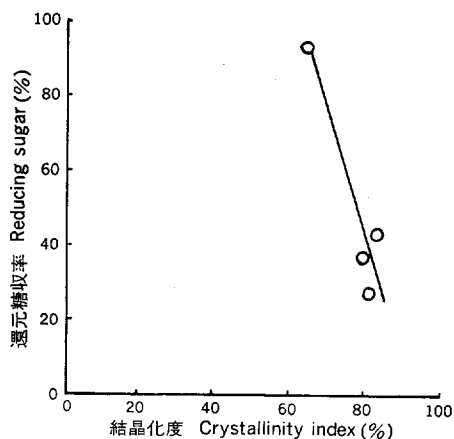


Fig. 6. 還元糖収率と結晶化度の関係
Relationship between reducing sugar yield and crystallinity index.

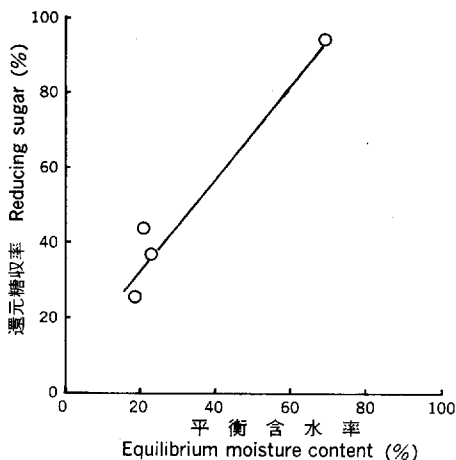


Fig. 7. 還元糖収率と平衡含水率の関係
Relationship between reducing sugar yield and equilibrium moisture content.

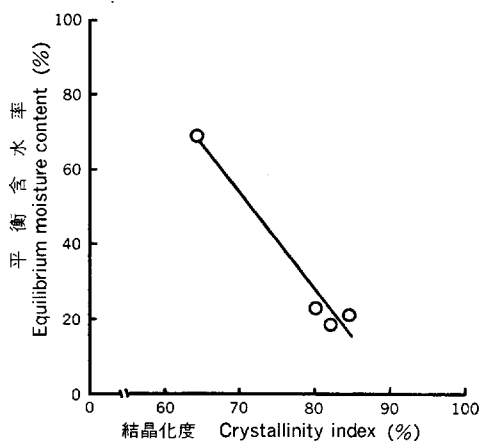


Fig. 8. 平衡含水率と結晶化度の関係
Relationship between equilibrium moisture content and crystallinity index.

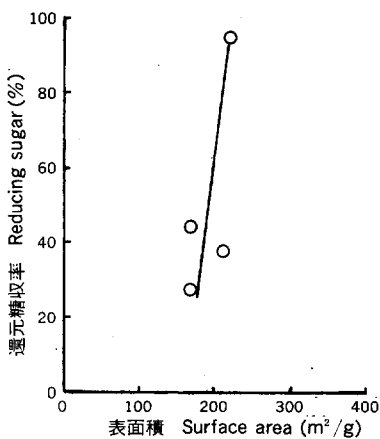


Fig. 9. 還元糖収率と表面積の関係
Relationship between reducing sugar yield and surface area.

合、還元糖収率の増大の程度は、重合度が約 180 から 60 まで低下した場合のそれに比べて非常に大きいことが明らかになった。

5. 還元糖収率に及ぼす結晶化度の影響

Fig. 6 にセルロースの還元糖収率と結晶化度の関係を示した。結晶化度が減少するに従って還元糖収率は増大し、両者は直線関係にあることがわかった。このことは松村ら²⁾が摩砕木粉を用いて酵素分解を行った結果、FAN ら¹¹⁾が微結晶セルロースや Solka Floc SW 40 および微粉砕した Solka Floc SW 40 で酵素分解を行った結果、さらに熊倉ら⁷⁾が放射線処理した木粉、もみがらなどについて行った酵素分解の結果とも一致している。

6. 還元糖収率に及ぼす平衡含水率の影響

Fig. 7 にセルロースの還元糖収率と平衡含水率の関係を示した。セルロースの還元糖収率は平衡含水率が増加するとともに増大している。Fig. 8 に示すように平衡含水率と結晶化度の関係は、結晶化度が減少するとともに平衡含水率は増加する傾向を示した。このことは BETRBET ら²⁰⁾²¹⁾ が表すバルブ、パガスバルブで得た平衡含水率と結晶化度の関係と同様な結果を与えている。

7. 還元糖収率に及ぼす表面積の影響

セルロース系物質がセルラーゼによって加水分解されるためには、セルラーゼと基質との間で物理的な直接の接触が必要である。そこでセルラーゼが到達するセルロース表面を接触反応の場として考え、還元糖収率と表面積の関係を検討した。その結果は Fig. 9 に示すとおりで、セルロースの還元糖収率は表面積の増加するにつれ、増大する傾向が認められた。この結果は FAN ら¹¹⁾ の報告と一致している。

引用文献

- 1) J. C. PEW and P. WEYNA : *Tappi*, **45**, 247~256, (1962)
- 2) 松村義人・須藤賢一・志水一允 : *木材誌*, **23**, 562~570, (1977)
- 3) Y. TANAKA, F. YAKU, E. MURAI and T. KOSHIIJIMA : *Cellulose, Chem. Technol.*, **14**, 859~868, (1980)
- 4) 越島哲夫 : *木材研究, 資料*, 第 16 号, 16~25, (1981)
- 5) M. KUMAKURA and I. KAETSU : *International Journal of Applid Radiation and Isotopes*, **30**, 139~141, (1978)
- 6) R. G. KELSEY and F. SHAFIZADEH : *Biotechnol Bioeng.*, **22**, 1025~1036, (1980)
- 7) M. KUMAKURA, T. KOJIMA and I. KAETSU : *Biomass*, **2**, 279~308, (1982)
- 8) 熊倉 稔・嘉悦 勲 : *高分子論文集*, **39**, 687~691, (1982)
- 9) C. S. WALSETH : *Tappi*, **35**, 233~238, (1952)
- 10) S. M. BETRBET, K. M. PARALIKAR and N. B. PATIL : *Cellulose Chem., Technol.*, **14**, 811~820, (1980)
- 11) L. T. FAN, Y-H. LEE, and D. H. BEARDMORE : *Biotechnol Bioeng.*, **23**, 419~424, (1981)
- 12) G. JAYME und R. KLEPPE : *Das papier*, **15**, 6~10, (1961)
- 13) L. SEGAL, J. J. CREELY, A. E. MARTIN, Jr. and C. M. CONRAD : *Textile Res. J.*, **29**, 786~794, (1959)
- 14) 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)
- 15) 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., (1957)
- 16) A. J. STAMM : *Tappi*, **40**, 761~765, (1957)
- 17) 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)
- 18) J. C. ARTHUR, F. A. BLOUTV and R. J. DERNINT : *Am. Dyestuff Repr.*, **49**, 383~388, (1960)
- 19) 高棕節夫・宮本 靖・八浜義和 : *工化誌*, **64**, 2027~2029, (1961)
- 20) S. M. BETRBET and K. M. PARALIKAR : *Cellulose Chem. Technol.*, **11**, 615~625, (1977)
- 21) S. M. BETRBET and K. M. PARALIKAR : *Cellulose Chem. Technol.*, **12**, 241~252, (1978)

**Effect of γ -Ray Irradiation on Enzymatic Hydrolysis of
Wood Cellulose (Dissolving)**

Nobuko FURUYA⁽¹⁾

Summary

The susceptibility of cellulose to a cellulase is discussed in terms of its degree of polymerization (DP), crystallinity and accessibility to moisture which are varied by γ -irradiation. Reducing sugar yield increases with decreases in crystallinity and degree of polymerization of cellulose associated with an increase in its accessibility to water.