

特集

多様なエネルギー資源の利用における新展開

マイクロ波によるリグノセルロースの酵素糖化促進

Promotion of Enzymatic Saccharification of
Lignocellulosic Materials by Microwave Irradiation

越 島 哲 夫*

Tetsuo Koshijima

はじめに

農林産資源はセルロースを主成分とするが、セルロースのみから成るのではなく、必ずヘミセルロースとよばれる一群の多糖とリグニンがこれに附随する。この三者の複合体をリグノセルロースと総称している。農林産資源からアルコールを生産するとき、まずセルロース質に加水分解酵素が作用することが必要である。リグノセルロースを酵素を用いて糖化する場合、他の二者、特にリグニンが関与してくる。このものは細胞間を接着すると同時に細胞壁内にまで入り込み、菌の侵入を阻んだり、水の蒸散を防いで長距離の導通を可能にする。しかし、他方、セルラーゼのセルロース分子への接触を妨げるので酵素糖化プロセスには逆にマイナス因子となることが多い。

このリグニンを酵素作用に対し無害化するために、一般に前処理が必要となる。前処理法は、従ってリグニンを除去するまでに至らなくともこれを低分子化、あるいは部分的除去だけで十分な場合が多い。この前処理は実際には後述するようにリグニンの低分子化に止まらず、セルロース層に細孔生成をもたらすことが糖化促進の最大要因になっていることが最近明らかになった。これが本稿の結論とも云えるがその結論を得るまでのプロセスをマイクロ波を用いる酵素糖化について説明する。同時にマイクロ波加熱の特徴的な効果をも述べていく。

1. マイクロ波照射木粉の酵素糖化と発酵

マイクロ波は波長1メートル以下の電波の一種でありわが国では2450MHzのものと915MHzのものが使用可能である。木材チップまたは木粉を密閉系中水共存下で数分間マイクロ波加熱(200~220℃)することによりセルラーゼの攻撃を受け易い状態に変化させる

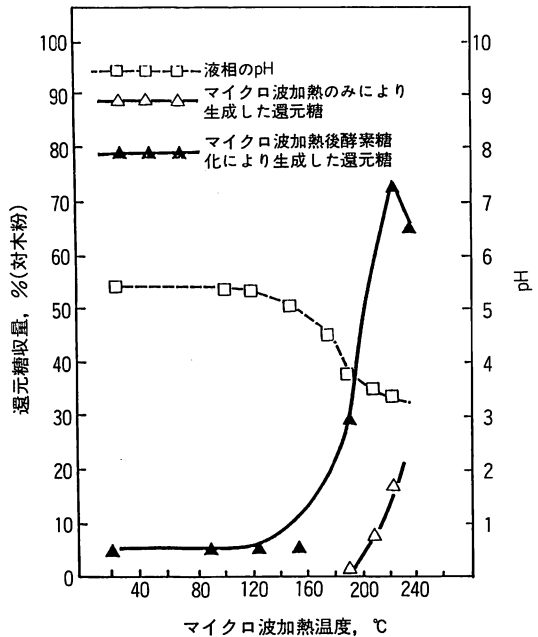


図-1 マイクロ波照射ブナ木粉の酵素糖化と前処理温度の関係

ことができる。

図-1はブナ木粉を、図-2はアカマツ木粉をマイクロ波加熱し、その後セルラーゼ製品(メイセラーゼCE PSB5115)により糖化したときの還元糖生成量を示したものである¹⁾。温度190℃付近から糖生成量は急激に増大し、220℃で最高となる。その値はブナで木材当り77%、アカマツで50%となるが含有多糖量をベースにとるとそれぞれ93%および66%である。一般に広葉樹の糖化率が針葉樹よりかなり高い(表1)。液のpHは、加熱中に木材へミセルロースに由来するアセチル基が遊離するため200℃で3.0まで下る。この弱酸性高温条件下ではリグニンの50%以上を占めるアルキルアリルエーテル結合(β -0-4結合)の切断とヘミセルロースの加水分解、並びにセルロースの若干の低

* 近畿大学農学部教授・京都大学名誉教授
〒631 奈良市中町3327-204

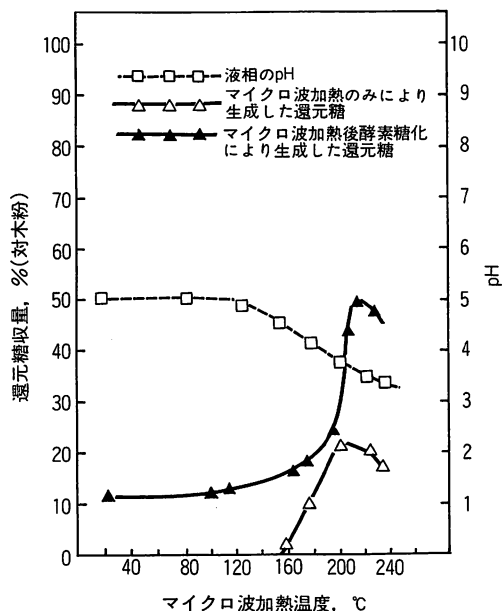


図-2 マイクロ波照射アカマツ木粉の酵素糖化と前処理温度の関係

分子化が起る。このときリグニンの大部分は分子量 (\bar{M}_n) 3000~4000まで低下し、90%ジオキサン、メタノール、希アルカリに溶けるようになる。従ってこれら溶媒への溶解量はリグニンの低分子化の度合いを表わす。マイクロ波加熱と爆砕を比べると同じリグニン分解率ではマイクロ波加熱の方が高い酵素糖化を与える。特に初期段階でその差が著しい²⁾。図-3はマイクロ波または爆砕により200°Cまで木粉を加熱したとき、

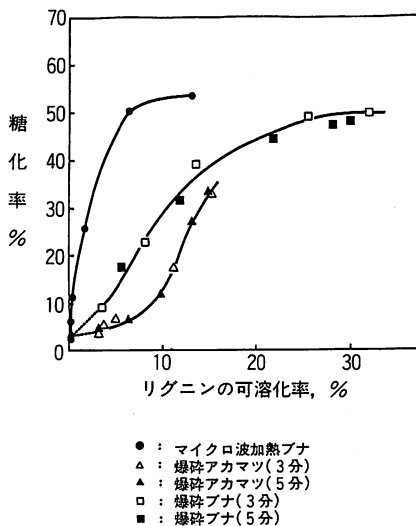


図-3 含水ジオキサン可溶リグニン量と酵素糖化率の関係

90%ジオキサン可溶リグニン量を処理したリグノセルロースの酵素糖化率に対しプロットしたものである。この結果は同温度でも爆砕による方が中に含まれるリグニンの溶解度が低いことを示す。これは溶融したリグニンが爆砕によって飛び散り、木材繊維表面に再吸着したことによるとも云われている。しかし、スチーム蒸煮をしてみると同じ温度でマイクロ波加熱よりもクラークソンリグニン量が遥かに多い³⁾ことからマイクロ波の高い周波数に起因するリグニン・セルロース間水素結合の切断がリグニンの低分子化にプラスに寄与しているものと思われる。

表1 マイクロ波照射したリグノセルロース100gから生成する還元糖収量*3

リグノセルロース源	最高還元糖収量, g	リグノセルロース源	最高還元糖収量, g
針葉樹 アカマツ	66 95*1 90*2	広葉樹 ブナ	93 100*2
エゾマツ	60	ポプラ	88
ヒノキ	61	ユーカリ	93
カラマツ	61	シラカバ	90
スギ	36	レッドラワン	69*1
トドマツ	54	イエロウラワン	92*1
テーダマツ	59	イネ科植物	
メタセコイア	46	バガス	84
スラッシュパイン	62	イネワラ	80
針葉樹樹皮		モミガラ	77
アカマツ	74		
エゾマツ	74		
ヒノキ	56		
カラマツ	60		
スギ	42		

*1: 微粉砕前処理

*2: マイクロ波加熱後10分間印解したもの。無印はマイクロ波加熱処理のみ

*3: 含有多糖100gよりの生成量

表2 マイクロ波照射したリグノセルロース1kgから得られたエタノール収量

糖化法	原料	生成アルコール量 (ml)	アルコール収量 (%)
酸素糖化	アカマツ 加熱媒体: 水 加熱媒体: 0.5%酢酸	154 (244* ²) 129 (51)	36.6 (57.9* ²) 31.6 (12.5)
	ブナ 加熱媒体: 水 加熱媒体: 0.5%酢酸	275 (285) 294 (333)	57.1 (59.2) 62.0 (70.1)
	バガス 加熱媒体: 水	285 (284)	56.5 (56.1)
	イネワラ 加熱媒体: 水	378 (307)	80.8 (65.1)
	モミガラ 加熱媒体: 水	103 (135)	28.2 (37.1)
マイクロ波加熱 酸糖化	アカマツ	124	44.1
	ブナ	190	48.9

* 1 : 95%アルコール量, ml

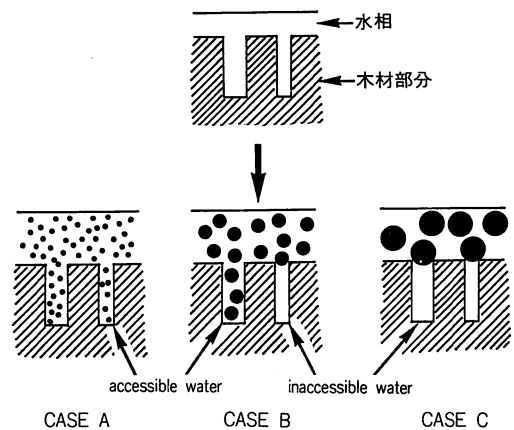
* 2 : 平行複発酵を行った場合の値

表1は各種リグノセルロースに含まれる多糖100g当り生成する還元糖量(グリコース換算)を示したもので、この場合は爆砕や蒸煮と同様広葉樹からの収量が針葉樹より高い。これに反し針葉樹の前処理法としては微粉碎の方が高い(表中*1を参照)。しかしマイクロ波加熱でも針葉樹に照射後、ビーター中で約10分間叩解することによって広葉樹並みの高い糖化率を得ることができる(*2参照)。

表2はSaccharomyces cerevisiaeによるアルコール発酵の結果を示したものである。括弧内は糖化と発酵を同時に行う平行複発酵の結果である。マイクロ波による加熱媒体が水と希酢酸で差はあるが、95%エタノール容量として1kgのリグノセルロースから最高378mlのアルコールが得られた⁴⁾。これに比べ酸糖化では副反応のため糖収率が低く従ってアルコール収量も大幅に低下する。

2. マイクロ波前処理木粉の形態的变化

このようなマイクロ波前処理が有効である理由をリグノセルロースの形態的变化と関連づけて調べた。図-4にStoneによる細孔分析の原理⁵⁾を示した。溶質として分子直径既知の配糖体およびオリゴ糖を用い、それが溶質として細孔に入り得る限度から細孔幅を、入り得ない場合の細孔内の水(inaccessible water)の量からその容積の積算量を、上澄の糖濃度の変化から測定できる。マイクロ波加熱各温度について細孔分布を測定したのが図-5と図-6である。広葉樹の代表として用いたブナ木粉の結果(図-5)から幅3.5~11.0

図-4 Stoneによる細孔分析の原理⁵⁾

nmの細孔が190℃より急激に増加し、210℃からは3.5nm以下の細孔が減り、11.0nm以上がさらに増える⁴⁾ことがわかる。210℃からの減少は元々存在していた3.5nm以下の細孔からヘミセルロースが溶出して細孔幅が大きく開いたため11.0nm以上の細孔が増えたと考えられる。一方糖化率も190℃から急激に上昇するので、両者の相関をみると3.5~11.0nm幅をもつ細孔の表面積と酵素糖化率間には高い相関関係(相関係数0.957~0.964)があることが見いだされた。この結果はリグノセルロースの酵素糖化に関して極めて重要な指標を与える。すなわち、①酵素糖化には一定の孔幅(3.5nm以上)をもつ細孔の存在が必要である。②この大きさの細孔は元々木材に存在するものではなく、水共存下における190℃以上のマイクロ波加熱によ

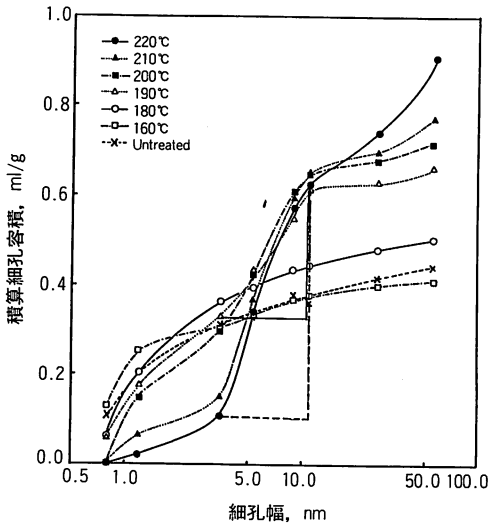


図-5 マイクロ波加熱ブナ木粉の細孔分布

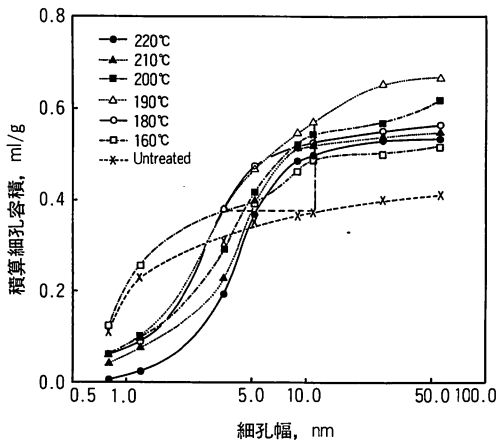


図-6 マイクロ波加熱アカマツ木粉の細孔分布

て生成したものである、という2点である。セルロースの細孔と酵素糖化の関係は松野ら⁹⁾によっても認められているがその有孔細孔の大きさについては人によって異なり、本研究結果では5.5nm以上より3.5nm以上と考えた方が後述のように相関性が高い。いずれにしてもセルラーゼの大きさと関連性があるセルラーゼを球形とすると直径約60Å、楕円体とすると33-200Å⁷⁾と考えられている。従ってマイクロ波加熱によって生成する細孔は、そこへセルラーゼがはまり込み、セルロースと複合体を形成して加水分解を進めるのに十分な時間セルロース層に吸着できる物理的環境をつくるのに幅3.5~11.0nmの細孔が役立っているものと考え

られる。さらに、このような細孔を生成させるのに必要な温度は190°Cであって、それ以下の温度では3.5~11.0nm幅の細孔生成が極めて少なく、既述のように酵素化率も低くなることがわかっている(図-1, 2参照)。セルロースやグルコースの分解は230°C付近から起るらしく、糖収率はこの温度を境に漸減する。

200°Cにマイクロ波加熱した後乾燥した木粉と乾燥しない木粉を酵素糖化し、糖化率を比べると前者で20.9%、後者で34.8%となり乾燥によって収率は40%減少した。両者の細孔分布を比較すると図-7のように3.5~11.0nm幅の細孔は乾燥によって大部分消失したことがわかる。この結果は上述の推論に実験的根拠を与えたと云えよう。

3. マイクロ波加熱による木材成分の変化とその酵素糖化に与える効果

一般に針葉樹(例えばアカマツ)は広葉樹(例えばブナ)に比べるとマイクロ波加熱による前処理効果が低い。すなわちセルラーゼによる糖化率が表1のように低く出る。これはマイクロ波照射したアカマツ木粉とブナ木粉の細孔分析結果を比較すると3.5~11.0nm幅の細孔量(図の点線で囲まれた面積)がアカマツではかなり少いことによって裏付けられる。その理由を知るため、木材の三大化学成分であるセルロース、リグニン、ヘミセルロースのマイクロ波加熱による変化をしらべた。その結果、セルロース崩壊度の指標となるβ-セルロース生成量はブナでは220°Cで最高値14.9%を示したのに対しアカマツでは9.4%であった。また、リグニンの分解程度を表わす90%ジオキサン可溶性リグニン量はブナでは最高12.4%に対しアカマツでは

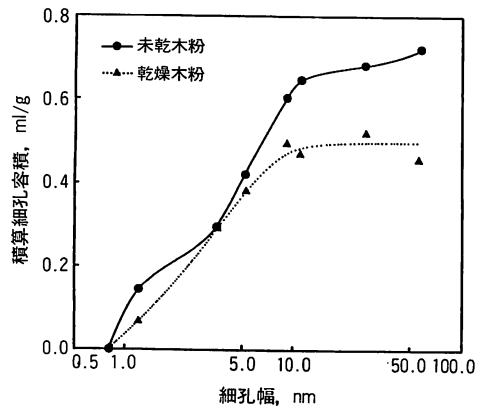


図-7 マイクロ波加熱後乾燥した木粉と乾燥しない木粉の細孔分布比較

8.6%であって両者間にかなりの差が認められた⁸⁾。これらに対しヘミセルロース分解量については両者間に全く差がなく、多糖種に違いがあるにも拘わらず、210℃から一様に急速に分解した。セルロース並びにリグニンの分解量と細孔生成との間の相関係数を単回帰分析によって求めるとそれぞれ0.983および0.966と何れも高い値を示した。この単回帰分析におけるβ-セルロース量(X)と3.5~11.0nm幅の細孔量F(x)の関係はブナ(式1)およびアカマツ(式2)について次式で表わせる。

$$F(x) = 0.032X + 0.078 \quad (1)$$

$$F(x) = 0.020X + 0.123 \quad (2)$$

上式は生成するβ-セルロース量が同一でも3.5~11.0nm幅の細孔生成量はブナがアカマツの1.6倍に達することを示している。この相違を生む原因はリグニンの構造上の相違であることが表3よりわかる。この表はマイクロ波加熱された木粉中のリグニンからニトロベンゼン酸化により生成するアルデヒド量を各温度につき比較したものである。表中全アルデヒド量はリ

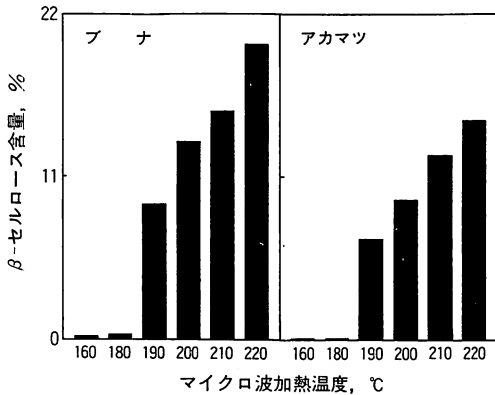


図-8 マイクロ波加熱木粉のβ-セルロース含量の変化

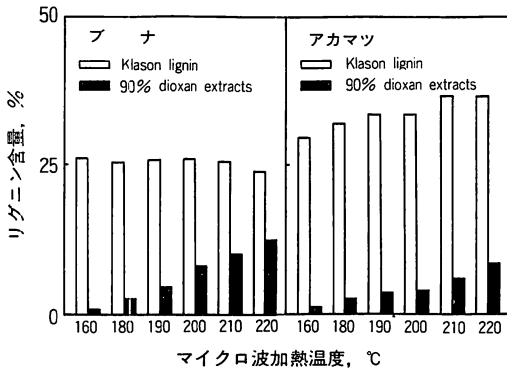


図-9 マイクロ波加熱木粉のリグニン量の変化

グニンの非縮合型構造(図-10)に対応する。すなわち、このような構造から表中の全アルデヒド類は生成する。しかし他方、この非縮合型構造は加熱によって芳香核5位で縮合が起り易く、縮合は他の2種のアルデヒド種と共にバニリンの生成を妨げる。つまりバニリン生成量の変化は縮合の多寡を判定する目安となるわけである。一般的に云うならば5位が空いている芳香核が多いほど縮合の起る確立も高いことになる。

針葉樹リグニンでは殆んど全ての芳香核はグアイヤシル核(3位にメトキシル基をもつ)から成るが広葉樹リグニンではシリングル核(5位と3位にメトキシル基をもつ)が多く、これとグアイヤシル核の比は樹種によって異なる。表3からブナではマイクロ波加熱により縮合は見掛け上殆んど進んでいないが、アカマツでは温度上昇と共に減少し、従って全アルデヒド量は減少する。これは前処理温度の上昇によりデヒドロジバニリンが増加することから確認された。

この現象がグアイヤシル核を多く含む樹種ほどマイクロ波加熱によるリグニンの低分子化を抑制し、惹いてはセルロースの膨潤とそれに伴う細孔の生成を阻むため、結果として細孔量の増大を減衰させ酵素糖化の進行を遅らせる原因となることが明らかとなった。ブナなどの広葉樹では5位がふさがれているシリングル核が多く、その含量によって縮合のおこり難さが異ってくる。表4は各種木材から得られるバニリン量を示したものでその量が多いほど非縮合型グアイヤシル核が多いことになるので、加熱による縮合が起り易く、結果として有効細孔(細隙)の生成が妨げられる。そ

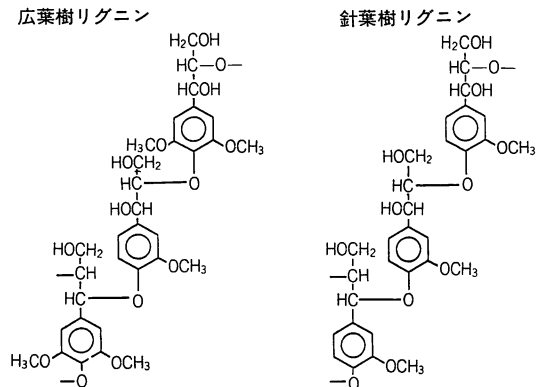


図-10 シリングル核を含む広葉樹リグニンおよびグアイヤシル核から成る針葉樹リグニンの非縮合型構造模式図

表3 マイクロ波加熱木粉のニトロベンゼン酸化

マイクロ波加熱温度			酸化生成物収率, %		
試 科	℃	バニリン	シリング	P-ヒドロキシ ベンツアルデヒド	全アルデヒド量
ブ ナ	未処理	4.1	9.3	—	13.4
	160	3.8	10.6	—	14.4
	180	4.3	9.4	—	13.7
	190	4.6	9.5	—	14.1
	200	4.1	9.1	—	13.2
	210	4.2	10.5	—	14.7
	220	4.4	9.9	—	14.3
アカマツ	未処理	16.0	0.2	1.9	18.1
	160	17.8	0.1	0.3	18.2
	180	15.3	0.1	0.3	15.7
	190	12.9	0.1	0.3	13.3
	200	11.5	0.1	0.2	12.8
	210	12.2	0.1	0.1	12.4
	220	8.4	0.1	—	8.5

表4 マイクロ波加熱*した各種木粉に生成した有効細孔の表面積とバニリン収量

樹 種	細孔幅3.5nm以上の 細孔表面積, m ² /g	バニリン収量, %	
		未処理材	照射材
エゾマツ	103.9	15.4	12.1
アカマツ	121.7	16.0	8.4
ブナ	210.4	4.1	4.4
トチノキ	130.7	11.8	7.9
ヤチダモ	123.9	12.5	7.5
アカラワン	107.4	11.8	5.0
バルサ	114.5	12.1	7.5
ニセアカシア	171.9	8.3	7.1

* 220℃

のため酵素糖化も進まなくなるわけである。この関係は図-11に如実に表わされている。ここでいうバニリン比とは、マイクロ波照射材のバニリン収量/未処理材のバニリン収量である。

4. その他の前処理法について

前処理法としてはそのほか単に水と加熱する①蒸煮法、特殊な装置を用いる②爆砕法、振動式ボールミルによる③微粉砕法およびリグニンペルオキシダーゼまたは改質した或種の担子菌による④微生物分解法がある。マイクロ波加熱についてここに述べた細孔生成による糖化促進は①と②にも当てはまるのが最近明らかになった。①については主として家畜飼料製造を目的として志水らによりかなり詳細な研究が進められている。②はカナダで開発された方法であるが最近沢田らによって省エネルギー型の二段爆砕法が考案された。③は針葉樹に特に有効な方法であるが広葉樹にも使用

できる条件が夜久らによって明らかにされている⁹⁾。この方法では単に木粉をより細く剪断するだけでは効果はなく、木粉に対する衝撃力の大きさが必要であっ

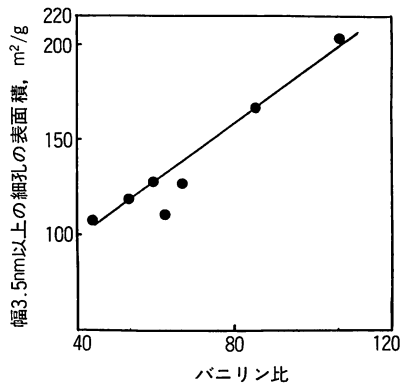


図-11 有効細孔の表面積とバニリン比の関係

て、その結果破壊された細胞壁が再び aggregate を形成し、多孔質粒子になることが電顕観察によって確認されている。その形態の特徴が結果として本稿で述べた細孔生成と、プロセスは異っても極めて類似する点は興味深い。④法は環境面と省エネルギー面から将来最も期待される方法である。天然に存在する菌では白色腐朽菌とよばれる一群の微生物、中でも *Phanerochaete chrysosporium* やカワラタケが最もリグニン分解力が大きいことが知られているが、これらにしてもリグニン分解に数ヶ月以上かかる。従って前処理法あるいは脱リグニン法として用いるには菌のリグニン分解能を数百倍以上に高める必要がある。そのため変異株をつくったりエンザイムを遺伝子工学的に改質することが求められている。現在、桑原ら¹⁰⁾によってリグニペルオキシダーゼ活性として在来種の約100倍に高められた *P. chrysosporium* 変異株がつくられているが、さらに強力な分解能を賦与すべく努力が続けられている。

参考文献

- 1) J. Azuma, F. Tanaka, T. Koshijima; Mokuzaï Gakkai-shi, 30 (1984) 509-511
- 2) 越島哲夫, 真柄謙吾; 木材研究・資料, 24 (1988) 1-12
- 3) 越島哲夫, 真柄謙吾; “多様なエネルギー資源の利用” 平成元年度研究成果報告書 (1990) 165-170
- 4) K. Magara, S. Ueki, J. Azuma, T. Koshijima; Mokuzaï Gakkai-shi, 34 (1988) 462-468
- 5) J. E. Stone, A. M. Scallen; Cellulose Chem. Technol., 2 (1968) 343-358
- 6) M. Tanaka, M. Fukui, R. Matsuno; Biotechnol. Bioeng., 32 (1988) 897-902
- 7) Y. E. Lee, L. T. Fan; Adv. Biochem. Eng., 17 (1980) 101
- 8) 越島哲夫, 真柄謙吾; “多様なエネルギー資源の利用” 昭和63年度研究成果報告書 (1989) 157-162
- 9) 村木永之介, 夜久富美子, 田中龍太郎; 大阪工業技術試験所報告, 35 (1984) 149-154
- 10) 桑原正章, 麻田泰彦; “多様なエネルギー資源の利用” 昭和63年度研究成果報告書 (1989) 147-152

協賛行事ごあんない

第11回触媒燃焼に関するシンポジウム

<主催> 触媒学会触媒燃焼研究会

<協賛> 日本化学会, 日本セラミックス協会, 電気化学協会, 石油学会, エネルギー・資源学会, 燃料協会, 日本燃焼研究会

<日時> 平成3年6月7日(金) 13時30分~17時

<会場> 東京大学工学部11号館

<プログラム>

1. 小繊維状ペーメイドゲルからのアルミナ調製
豊橋技術科学大学 上野 晃史氏
2. 多段触媒燃焼を利用した工場用遠赤外暖房器
日本ケミカルプラントコンサルタント
丸子 三郎氏
3. 高温触媒燃焼の検討
三菱重工業 萬代 重実氏
4. 触媒燃焼における非線形現象の理解と応用
京都大学 乾 智行氏

<参加費(資料代を含む)> 当日会場にて申し受けます。

会員 5000円, 学生 1000円, 非会員 8000円

<世話人>

御園生 誠(東大), 乾 智行(京大),
荒井 弘通(九大), 福沢 久(電力中研),
山下 寿生(日立日立研)

<連絡先>

〒816 春日市春日公園6-1
九州大学総合理工学研究科材料開発専攻
荒井 弘通 TEL(092)573-9611(内310)
FAX(092)575-2318