

木質飼料の製造に関する研究 (第1報)

- 酵素糖化率測定法に関する検討 -

斎藤 直人 大宮 康則
安久津 久* 葛西 章

Studies on The Production Wood Roughage
by Steaming ()

- A method to estimate enzymatic saccharification
and some properties of steamed wood -

Naoto SAITO Yasunori OMIYA
Hisashi AKUTSU Akira KASAI

It is well-known fact that wood of some species of woods can be converted by steaming into roughage for ruminants. The popularization of the wood roughage, however, would require an easier and quicker way to estimate the digestion of the food by the ruminants. This studies were made on the method to estimate the enzymatic saccharification with the commercial cellulose derived from *Trichoderma viride* and on evaluating the saccharification by some simpler methods. The results are summarized as follows:

- (1) On estimating susceptibility, the grain size of wood roughage is needed to be 32 to 60 mesh when it was in a green or air-dry condition.
- (2) Susceptibility to enzymatic saccharification of hard woods Shirakanba (*Betula platyphlla*), Shinanoki (*Tilia japonia*), Mizunara (*Quercus crispula*), and Buna (*Fagus crenata*) for 48 hours was approximately 1.8 times as large as that for 5 hours, when it ranged 40 to 60%.
- (3) The amount of extraction with hot-water was also available to evaluate the saccharification of the wood roughage. However, in the case of over-steaming, the values of hot-water extraction and saccharification had to be corrected with the steaming extraction.

木材の蒸煮による反すう動物の粗飼料化が知られている。この木質飼料が普及するためには、その評価方法がより手軽で敏速であることが好ましい。

そこで、本研究ではセルロース分解酵素による酵素糖化率について検討し、さらに、その規則性を利用した簡易な評価方法についても検討し、以下の結果を得た。

- 1) 試料調製条件として、生または風乾状態で32~60メッシュの粒度にすることが必要である。
- 2) 広葉樹材(シラカンバ、シナノキ、ミズナラ及びブナ)の48時間後の糖化率は40~60%の範囲にあるとき、糖化時間5時間の約1.8倍に一致する。

- 3) 酵素を使わない評価指標として、熱水抽出率が利用可能と思われる。さらに、これを過蒸煮条件にも適合させるためには蒸煮収率を加味するとよい。

1. はじめに

現在、農林水産省の大型プロジェクト研究「バイオマス変換計画」の中で、林産資源の新規素材化技術開発の一環として蒸煮による木材の飼料化が検討されている。

そこで、飼料価値の簡易評価法である酵素糖化率に着目し、糖化率の測定¹⁾に影響に及ぼす因子として、試料の水分と粒度について検討した。また、糖化時間と糖化率の関係から適正糖化時間についても検討した。さらに、糖化時間短縮の可能性及び酵素を用いない簡便な評価方法についても検討した。

また、これまでの報告²⁾では、蒸煮条件が高圧または蒸煮時間が長い場合高リグニン含量状態になった過蒸煮試料については、木質飼料の対象外として考えて来たが、ここでは、それにも適合する簡易評価法について検討した。

2. 実験方法

2.1 木質飼料の製造

はく皮したシラカンパチップを原料に用いた。このチップを100lのオートクレーブで、温度187 (11 kg/cm²) で20分間蒸煮した。これを、間隙7mmに調整したD.D.R.で解繊し木質飼料として供試した。

2.2 酵素糖化率の測定

酵素(メイセラゼ、明治製菓kk製)50mg、試料0.2g、PH4.8の0.1モル酢酸緩衝液10mlとトルエン数滴をL字型ガラス管に入れ、40の温水中で48時間、30rpmで振とうし糖化した。その後、糖化残さを1G4ガラスフィルターでろ過し、105で乾燥後秤量し、残存乾物量を求め糖化率を次式より算出した。

$$\text{糖化率(\%)} = \left(1 - \frac{\text{残存乾物量 (g)}}{\text{試料乾物量 (g)}} \right) \times 100$$

2.3 水分の影響

蒸煮したシラカンパチップをD.D.R.で解繊した

ままの生試料(水分43.6%)、生試料を大口乾燥した風乾試料(水分13.3%)及び105で生試料を乾燥した絶乾試料(水分3.0%)について、糖化率及びクラソン・リグニン量(K.L.量)を測定した。

2.4 粒度の影響

2.1の条件で蒸煮したシラカンパチップを風乾後、粉碎機(wiley mill)によって粉碎し、5~9、9~16、16~32、32~60、60~115及び115メッシュパスにふるい分けした。そして、比較のため同一蒸煮チップをD.D.R.で解繊したのもを加え、これら7条件の試料について糖化率及びK.L.量を求めた。

2.5 糖化時間の影響

蒸煮圧力8kg/cm²(175)で10分(糖化率31.2%)及び20分(糖化率53.3%)、同12kg/cm²(191)で15分(糖化率71.4%)の落葉件で蒸煮したシラカンパ試料をD.D.R.で解繊した。この3つの試料について、30分から48時間までの糖化時間における糖化率を求めた。

2.6 簡易な評価方法

酵素を用いない簡便な評価方法の検討には、はく皮したシラカンバ、ブナ、ミズナラ、シナノキ及びカラマツ Karamatsu (Larix Leptolepis) の5樹種のチップ(絶乾重量換算250g)をアスブルド法で蒸煮し試料とした。蒸煮圧力は、8kg/cm²(175)、10kg/cm²(183)及び12kg/cm²(191)とし、蒸煮時間を5、10、15及び20分とし、これらの組み合わせにより合計12条件で蒸煮した。蒸煮後、室内に2~3週間放置して風乾した後、Wiley millで粉碎し32~60メッシュの木粉を供試した。

1) 糖化時間の短縮

48時間後の糖化率が31.2、47.0、53.3及び71.4%となるシラカンバの4試料と、同じく糖化率が9.4、20.5、36.3、44.9、58.4及び63.3%となるミズナラの6試料について、糖化時間0.5、1、2、3、4及び5

時間の糖化率を求め、その値から回帰直線を得た。

2) 抽出

5 樹種の試料について、JISの木材分析法により熱水抽出 (JIS P 8005 - 1959)、冷水抽出 (JIS P 8004 - 1959) 及びアルカリ抽出 (JIS P 8006 - 1959) を行い、各々の抽出率を求めた。また、熱水抽出液はろ過後、全量を200mlとしpHを測定した。

3) 逐次抽出

前記の5 樹種の試料を熱水抽出し、その残さを2時間30分40 で乾燥後、一夜放置し五酸化リンを入れたデシケーター内で6時間真空乾燥し重量減少率を求め熱水抽出率とした。引き続きこの残さをアルカリ抽出し、ろ過後これを同様な方法で乾燥して重量減少率を求めアルカリ抽出率とした。

4) 補正抽出率

シラカンパチップを前記のアスブルンド法で、蒸煮圧力を8, 10, 12, 14, 16及び18kg/cm²、蒸煮時間を5, 10, 15及び20分の合計24条件の組み合わせで蒸煮し、各々の蒸煮収率を求めた。そして、風乾し粉碎した後、それぞれ、糖化率と熱水抽出率を求めた。これらから、蒸煮収率を考慮した補正糖化率と補正熱水抽出率を次式より算出した。

$$E' = E \times \frac{Y}{100} + (100 - Y) \dots\dots\dots(1)$$

- E : 糖化率または熱水抽出率 (%)
- E' : 補正糖化率または補正熱水抽出率 (%)
- Y : 蒸煮収率 (%)

5) 糖量測定

シラカンパの糖化率 7.2, 31.2, 53.3, 65.9 及び 70.5%の5条件の試料について、熱水抽出後の抽出液及びさらにそれを硫酸濃度3%で2時間煮沸して加水分解したものを調製し、これらについて、ソモジ・ネルソン法により糖量を求めた。また、ガスクロマトグラフィー (GC) を用いて糖組成を求めた。

3. 結果と考察

3.1 水分の影響

シラカンパを温和な条件下で蒸煮し解繊して得られ

た生試料、この風乾試料及び絶乾試料について、これらの糖化率の測定結果を第1表に示した。生と風乾の試料は68.4%と69.3%の近似する糖化率であったが、絶乾試料の場合はこれより若干低い値を示した。この低下は、蒸煮により低分子化したリグニンの一部が105 の乾燥により再重合すると同時に、炭水化物の一部を再び包み込むことによって炭水化物に対する酵素の親和性が損なわれたことに起因すると思われる。また、リグニンの再重合は、絶乾試料のK.L.量の相違からも推定された。したがって絶乾法は不適である。

第1表 試料の調製条件と糖化率との関係
Table 1 Relationship between E.S. or K.L. and drying method

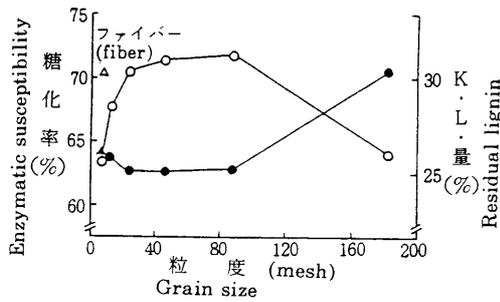
試料条件 Drying method	水分量 M.C.(%)	糖化率 E.S.(%)	K.L.量 R.L.量(%)
生試料 green	43.6	68.4	26.7
風乾試料 air-dry	13.3	69.3	26.9
絶乾試料 oven-dry	3.0	64.8	28.1

Notes : M.C. : moisture content
E.S. : enzymatic susceptibility
R.L. : residual lignin
K.L.量 : クラースン・リグニン量

3.2 粒度の影響

シラカンパの7条件の試料について各々糖化率を測定し、その結果とK.L.量を合わせて第1図に示した。図から明らかなように、試料の粒度が細くなるに従って、糖化率は直線的に増加し、32メッシュでほぼ極大に達し、以後115メッシュの粒度まで緩慢な増加を示した。そして、解繊した木質飼料(ファイバー)の糖化率と一致する粒度は32メッシュであった。つまり、製品と同一の糖化率を得るためには、粒度を32メッシュに調製することが望ましいことがわかった。

また、115メッシュパスの微粉末試料の糖化率はかなり低く、5~9メッシュとほぼ同じ値を示した。このことは、K.L.量が示すように115メッシュパスの試料が高リグニン含量要素からなっているために、低い糖化率になったものと推定された。



第1図 シラカンバの各粒度における糖化率とK.L.量
Fig. 1 Enzymatic susceptibility and residual lignin in each grain size of Shirakanba meals

- : 糖化率
Enzymatic susceptibility
- : クラーソン・リグニン量(K.L.量)
Residual lignin
- △: ファイバーの糖化率
Enzymatic susceptibility in fiber
- ▲: ファイバーのK.L.量
Residual lignin in fiber

3.3 木質飼料の簡易評価方法

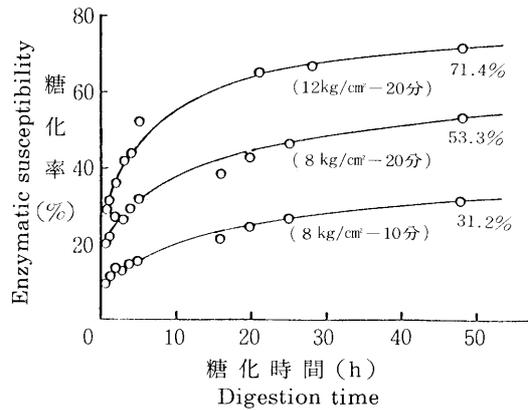
シラカンバの3試料について糖化率の経時変化を求め、糖化時間と糖化率の関係を第2図に示した。3試料とも同じような曲線で示され、糖化時間5時間までは糖化率は急激に増加し、それ以降は緩やかに上昇した。

3.3.1 酵素を用いた簡易評価方法

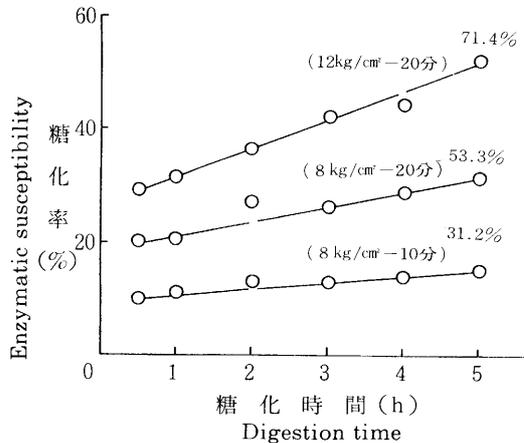
糖化時間短縮のため、48時間の糖化率既知のシラカンバ3試料とナラ6試料のそれぞれについて、糖化時間30分から5時間までの糖化率の経時変化を求め、第3図に示した。シラカンバは、各々直線として示され、ミズナラは、糖化時間2時間以降において直線で示された。

しかし、ナラの糖化率63.3%の試料だけは、その傾向と異なる結果であった。この理由は、他の試料よりもこの試料の蒸煮収率が特に低く、過蒸煮状態になっているためと考えられた。

次に、経時変化の傾向から各々糖化時間と糖化率の回帰直線を求め、その回帰係数及び切片と48時間糖化率との関係を第5図に示した。両樹種とも直接関係が認められ、糖化率が急激に上昇するシラカンバは回帰



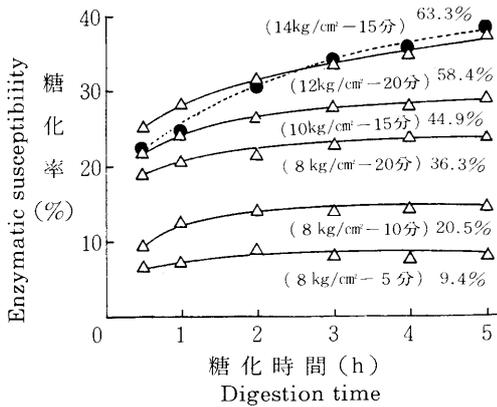
第2図 シラカンバの糖化率の経時変化
Fig. 2 Time course of saccharification of the steamed Shirakanba
図中の数字は供試試料の48時間後の糖化率を示す
The numerals in the figure show the enzymatic susceptibility of the tested samples treated for 48hrs.



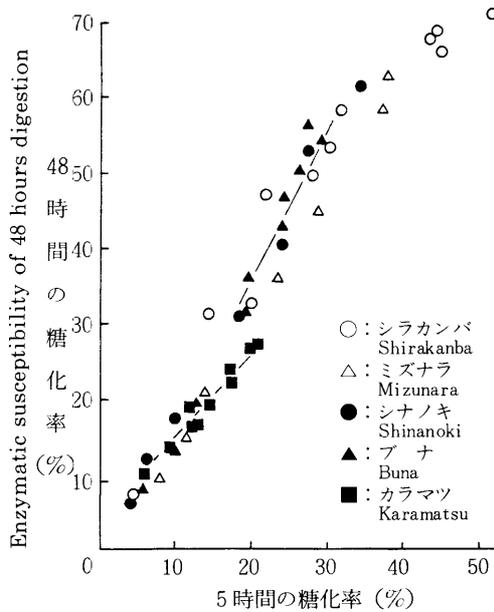
第3図 シラカンバの糖化率の経時変化
Fig. 3 Early time course of saccharification of Shirakanba
図中の数字の意味は第2図に同じ
The meaning of the numerals in the figure is shown in Fig. 2

係数も大きく変化した。また、両樹種の回帰直線の切片は平行直線として示された。この結果から、これらの規則性を利用すれば、簡易な評価方法として糖化時間短縮は可能と思われた。

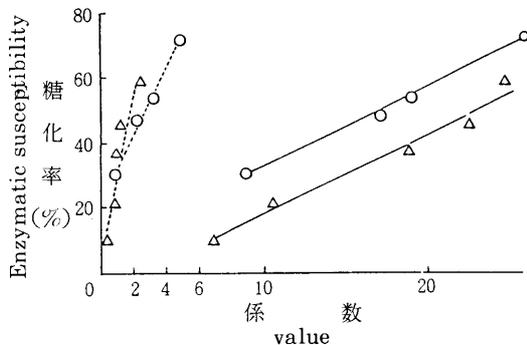
そこで、糖化時間を5時間に固定し、48時間糖化率との関係を5樹種の試料について求め第6図に示した。



第4図 ナラの糖化率の経時変化
 Fig. 4 Early time course of saccharification of Nara
 図中の数字の意味は第2図に同じ
 The meaning of the numerals in the Figure is shown in Fig. 2
 : 過蒸着試料 over-steaming sample.



第6図 糖化時間5時間と48時間の糖化率の関係
 Fig. 6 Relationship between enzymatic susceptibility of 5 hours digestion and 48 hours



第5図 回帰直線と糖化率の関係
 Fig. 5 Relationship between regression equation and enzymatic susceptibility
 : シラカンバ Shirakanba
 : ミズナラ Mizunara
 —: 切片 intersection
 ...: 回帰係数 regression coefficient

48時間糖化率40~60%の範囲では、直線性のある関係が示された。シラカンバとカラマツは、他と異なる傾向を示した。しかし、広葉樹材試料は、ほぼ同程度の傾きをもち糖化5時間の値の約1.8倍が48時間の値によく一致し、広葉樹材について、±5%程度の誤差で糖化48時間の値を推定し得ると思われた。

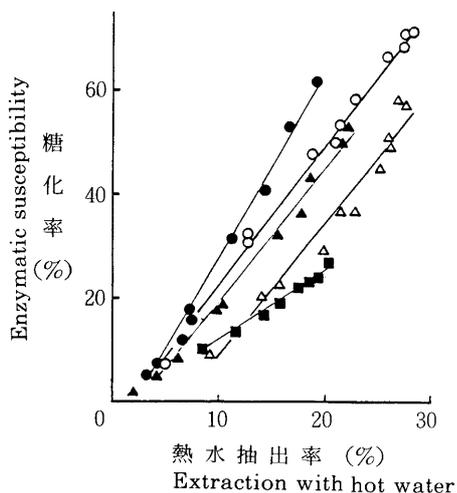
3.3.2 酵素を使わない評価方法

糖化の回帰直線における規則性を利用し、評価方法の簡略化について検討した。

1) 熱水抽出とpH

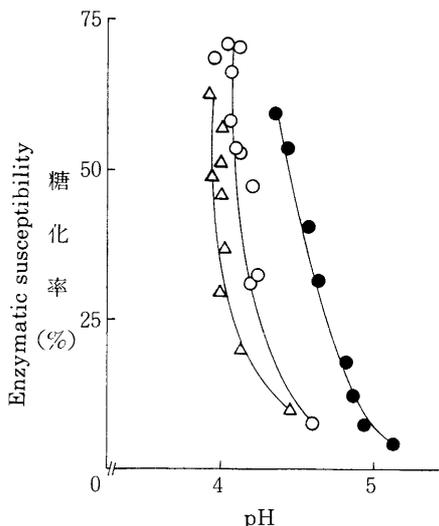
J I S P 8005に従って、5樹種のそれぞれ糖化率既知の試料について熱水抽出率を求め、糖化率との関係を調べた。また、その抽出液を放冷後200mlに調整してpHも合わせて求めた。シラカンバ、シナンキ、ミズナラ、ブナ及びカラマツの5樹種の試料の熱水抽出率と糖化率の関係を第7図に示した。5樹種とも明らかに直線性のある結果となり、その回帰直線を第2表に示した。個々の樹種間で直線の傾きは異なったが、これは、木材組織内でのリグニン分布³⁾⁴⁾⁵⁾、木材成分及び構造の違いによると思われた。この結果、樹種を特定すれば、今後さらに詳細な検討を必要とするが熱水抽出率は糖化率測定の簡易評価指標法になり得る可能性があった。

また、シラカンバ、シナンキ及びミズナラ試料の熱水抽出液のpHを測定し第8図に示した。シナンキには低い相関性が認められたが、これは、蒸着によって生じた遊離酸の増加に起因されると思われた。しかし、この遊離酸が弱酸性であるため、抽出液のpHも強酸



第7図 熱水抽出率と糖化率の関係

Fig. 7 Relationship between extraction with hot water and enzymatic susceptibility
 図中の記号は第6図と同じ
 symbols used are same as Fig. 6



第8図 熱水抽出液のpHと糖化率

Fig. 8 pH of extraction and saccharification
 図中の記号は第6図と同じ
 symbols used are same as Fig. 6

第2表 5時間糖化率及び熱水抽出率の回帰直線
 Table 2. Regression equation of saccharification of 5 hours digestion and extraction

樹種 Species	5時間糖化率の回帰直線 R.E.S.	熱水抽出率回帰直線 R.E.E.
シラカンバ Shirakanba	$y = 1.47x + 7.01$	$y = 2.66x - 4.11$
ミズナラ Nara	$y = 1.72x - 4.16$	$y = 2.64x - 19.03$
シナノキ Shinanoki	$y = 1.88x - 2.55$	$y = 3.66x - 10.34$
ブナ Buna	$y = 1.99x - 4.23$	$y = 2.69x - 8.72$
カラマツ Karamatsu	$y = 1.17x + 2.91$	$y = 1.44x - 3.40$

Notes: R. E. S. : Regression equation of saccharification of 5 hour digestion

R. E. E. : Regression equation of extraction with hot water

: 熱水抽出率または5時間糖化率 extraction with hot water or saccharification of 5 hours digestion

y : 48時間糖化率 saccharification of 48 hours

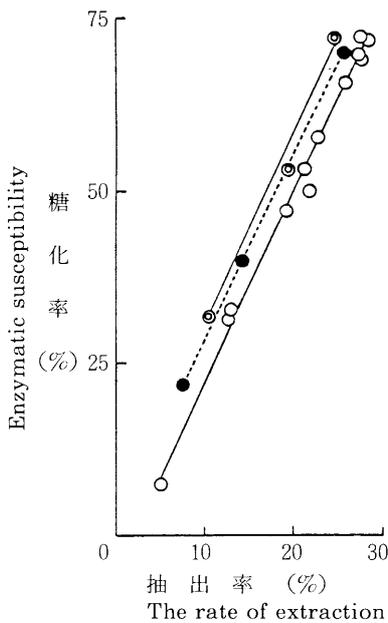
に至らない。そのため、ミズナラとシラカンバ試料では、糖化率30~70%試料がほぼ同じpH4を示した。したがって、pHを糖化率の指標とすることは難しいと思われた。

次に、抽出温度による影響と抽出時間の影響について検討した。J I S P 8004に基づく冷水抽出と、抽出時間を30分間に短縮した熱水抽出を行い、その結果を第9図に示した。図からも明らかのように、冷水抽出率及び抽出時間30分の熱水抽出率はともにJ I S P 8005の熱水抽出率に近似した。

この結果、熱水抽出する場合の抽出時間と温度が多少変化しても、ほぼ等しい抽出率が得られ信頼性のある評価方法になり得ると思われた。

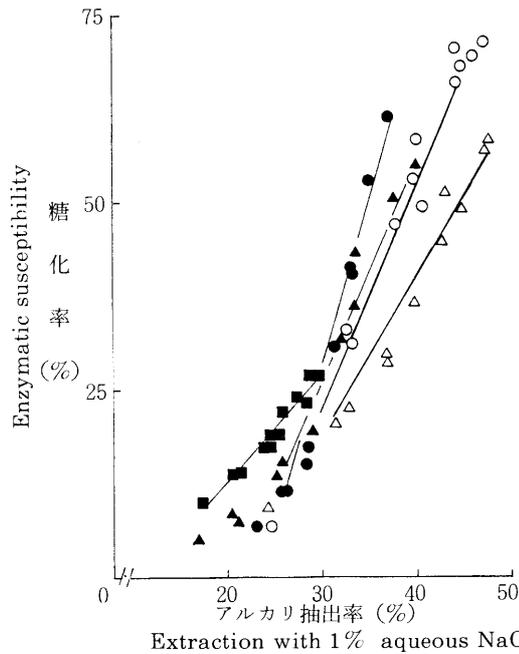
2) アルカリ抽出と逐次抽出

次に、抽出方法としてさらにアルカリ抽出をJ I S P 8006に基づいて行った。この抽出は、熱水抽出処理よりもヘミセルロース及びリグニンが溶出するため、さらに酵素糖化率と近似すると思われた。5樹種の試料について糖化率とアルカリ抽出との関係を第10図に示した。アルカリ抽出率は、糖化率に近い値を示したが、この場合においても樹種ごとの差異が認められた。そして、カラマツとブナの抽出率は他樹種よりも低いことがわかった。そこで、第11図にアルカリ抽出率と熱水抽出率の関係を示した。ミズナラ、シナノキ及びシラカンバは、ほぼ同一の回帰直線 $Y = X + 17$ で示されたが、ブナは傾きが大きく、また、カラマツは切

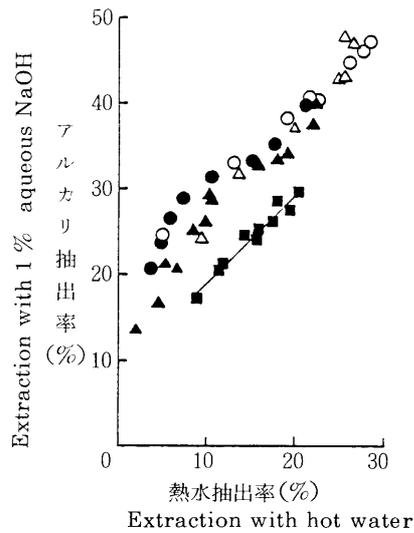


第9図 抽出法と糖化率の関係
Fig. 9 Relationship between the rate of different extraction method and saccharification

○: 3時間熱水抽出 extraction with hot water for 3 hours.
○・: 0.5時間熱水抽出 extraction with hot water for 0.5 hours.
○—: 冷水抽出 extraction with water.



第10図 アルカリ抽出率と糖化率の関係
Fig. 10 Relationship between extraction with alkali and saccharification
図中の記号は第6図と同じ
Symbols used are same as Fig. 6



第11図 熱水抽出率とアルカリ抽出率の関係
Fig. 11 Relationship between extraction without water and alkali
図中の記号は第6図と同じ
Symbols used are same as Fig. 6

片の値の小さい直線となった。

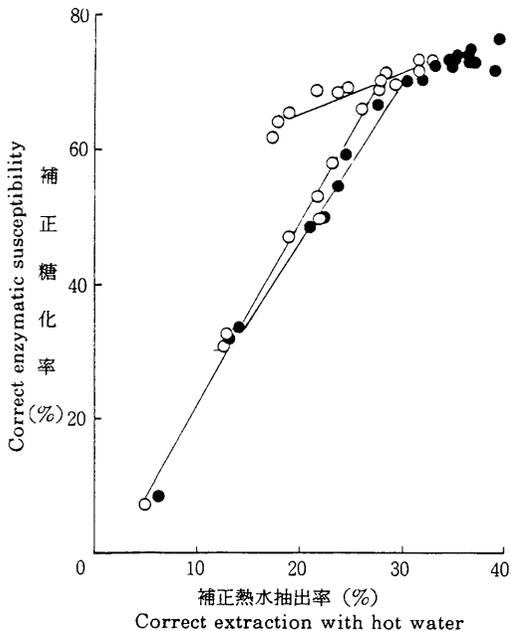
抽出率や糖化率が樹種ごとに異なる理由として、組成的な要因と組織的な要因が考えられた。前者の例として、シナノキとミズナラは同量のK.L.量23.1%を持つが、ミズナラはシラカンバと同量のペントザンを持つため、比較的温和な蒸煮で糖化率が高まると考えられた。つまり、ヘミセルロース及びリグニンの含有率の相違も直線に影響をあたえる因子であると思われる。

また、ブナとシナノキの糖化率の向上が難しいのは、細胞要素比率において道管要素が多いためと思われる。すなわち、道管は放射組織と共に試料内部への酵素侵入経路⁶⁾とされてはいるが、糖化の阻害効果を示すグアヤシルプロパン構造のリグニンが多いため⁴⁾⁵⁾糖化されにくいと思われる。

次に逐次抽出について検討したが、あらたな傾向は見いだせなかった。

なお、温和な蒸煮(蒸煮圧力8kg/cm², 10分)のシ

ラカンバ試料(糖化率31.2%)をアルカリ抽出し、そ



第12図 シラカンバの補正熱水抽出率と補正糖化率の関係
Fig.12 Extraction and saccharification added the steaming yield of Shirakanba

○ : 従来値 direct rate
● : 補正值 correct rate

の残さの糖化率を調べると62%にも達し、興味深い結果となった。

3) 補正抽出率

木質飼料の商業的生産条件では過蒸煮は、収率を低下させるため適当な方法とは言えないが、木材の完全利用を目的とした場合には、副産物の利用⁷⁾を可能にする条件として蒸煮が高温高压になる可能性がある。そこで、評価方法がこれらの条件にも適合する簡易な方法であることが望まれる。

そこで、蒸煮の際に蒸煮廃液として流出する可溶性物質も、熱水抽出物及び糖化物として、その抽出率及び糖化率に加え、(1)式により算出し、これらと従来の抽出率と糖化率の関係を第12図に示した。図から明らかのように、従来の方法²⁾による折れ曲がった直線と異なって、補正值による両者の関係は一次直線として示された。このことで、今まで同じ熱水抽出率として示された温和な蒸煮試料と過蒸煮のため収率の低下から熱水抽出が減少した試料とは、異なった抽出率を持つことになった。つまり、収率さえ測定可能であれば、

いかなる蒸煮条件でも熱水抽出率から糖化率を推定し得ると思われた。

なお、木質飼料製造における副産物の利用として熱水抽出物が考えられる。そのため、この抽出物の分析⁸⁾⁹⁾と分離技術の確立も、今後のバイオマス利用の大きな課題である。

4. まとめ

以上の結果をまとめると、酵素糖化率を測定する場合の試料としては、生または風乾状態が望ましく、粒度は32~60メッシュに調製したものがよい。

さらに、5時間の糖化率、熱水抽出率及び収率を考慮した補正抽出率の各数値から、48時間の糖化率を推定し得ることがわかった。

文献

- 1) 志水一允: 木材学会誌, 26, 7, 488 (1980)
- 2) 斎藤直人: 日本木材学会北海道支部講演集 第16号, 49 (1984)
- 3) Y. Musha & D.A.I. Goring: Wood Sci. Technol. Vol.9 (1975)
- 4) 藤井智之, 志水一允, 須藤賢一, 山本幸一: 木材学会誌, 31, 5, 366 (1985)
- 5) 趙南夾, 李鍾潤, 飯塚堯介, 中野準三: 木材学会誌, 26, 8, 527 (1980)
- 6) K. Rvel, F. Barnoud and K. E. Erikson; Holzforschung 35 (1981)
- 7) 志水一允, 須藤賢一, 長沢定男, 石原光朗: 木材学会誌, 29, 6, 428 (1983)
- 8) G. N. Milfond, T. A. Watts and C. B. Pvrves: Pulp&Paper mag. T-535 (Nov. 1960)
- 9) 新納守, 上杉隆久, 斉藤光雄: 林産試研報 No.43 (1965)

— 試験部 繊維板試験科 —
— 林産化学部 繊維化学科 —
(原稿受理 昭60. 11. 19)