ソルボリシスパルプの酵素加水分解*

笹谷宜志** 佐野嘉拓** 榊原　彰**

Enzymatic Hydrolysis of Solvolysis Pulp*

By

Takashi SASAYA**, Yoshihiro SANO**
and Akira SAKAKIBARA**

要　旨

ソルボリシスパルプに対するセルラーゼ"Meicelase P"の加水分解性能を検討した。広葉樹(ブナ, シラカンバ, ミズナラ)および針葉樹(トドマツ, アカエゾマツ)の各材からのソルボリシスパルプの酵素加水分解はいずれもパルプ残存リグニン(クラーソンリグニンKL)量に強く依存した。また, 残存KL量はソルボリシスの諸条件—溶媒混合比, 反応温度, 反応時間, 触媒—により変化した。広葉樹材の脱リグニンは180°Cで充分行えるが, 酢酸の添加で温度を低下させ得た。一方, 針葉樹材のそれは高温(190°C)または酢酸の添加が必要であった。残存KL量10%前後の広葉樹材ソルボリシスパルプは糖化率が80%以上に達するのに反し, 針葉樹材のそれは40%以下に過ぎない。針葉樹材ソルボリシスパルプの酵素糖化率を80%以上にするには残存KL量を5%以下にしなければならない。セルラーゼによる加水分解の観点からすれば, 広葉樹材は針葉樹に比べ, 省エネルギー的と言える。

キーワード：　ソルボリシスパルプ, 脱リグニン, セルラーゼ"Meicelase P", 酵素加水分解, 糖化率。

目　次

* 昭和60年8月30日受理。本報は"ソルボリシスパルプ化"の研究の第5報であり, 第4報は文献7である。
Received August 30, 1985. This paper is Part 5 in the series "Solvolysis Pulping" and Part 4 see Ref. 7.

** 北海道大学農学部林産学科木材化学講座
Laboratory of Wood Chemistry. Dept. of Forest Products, Fac. of Agric., Hokkaido University.

1.　緒　言

森林バイオマスから分離された各成分のウッドケミカルスへの化学変換は今日的な高い関心事の1つである。木材はセルロース，ヘミセルロース，リグニンの主要成分と少量の抽出成分および微量の無機成分からなり，これら成分の有効利用は重要課題の一つであるが，この目的のためにまず第一に各成分の分離が必須である。従前より小規模ながら抽出，発酵，熱分解などの処理法で成分の利用が行われているが充分な木材成分の分離法ではない。一方，パルプ化のような木材化学工業においてすら，セルロースのみを利用の主な対象としており，他の成分についてはほとんど関心が払われていないのが実情である。セルロースは紙，レーヨンおよび他の各種誘導体の製造原料として利用され，また加水分解で生ずる糖の発酵でエタノールを生成し，それの脱水で容易にエチレンに変換可能である。エチレンは現在石油化学工業の主役である事は周知の事実である。リグニンはハイドロクラッキング，脱アルキル化を経てフェノールやベンゼンなどの芳香族化合物に変換し得る。一方，広葉樹ヘミセルロースの主体であるキシランからのキシリットはアルキッド樹脂，ノンカロリー甘味料の原料，あるいは脱水生成物のフルフラールよりフラン樹脂等高分子の原料としての可能性を有する。

木材の主要成分の分離にはいくつかの処理法が考えられるが，その内の1つの鉱酸による加水分解法は，セルロースをグルコースまで分解すると同時に，リグニンもかなりの変質が免れない。各成分の変質をできるだけ避け，分離する手段としてソルボリシス法がある[1]。これはアルコール類，フェノール類，有機酸類を用いた木材のソルボリシスによる主要成分の分離である。後述するようにアカエゾマツを用い，クレゾール：水：酢酸＝3.5：3：3.5の溶媒混合比，液比7，180°C，90 minのソルボリシスでセルロースはパルプとして49.3％得られ（パルプ残存クラーソンリグニンKL：2.7％）[2]，パルプ中のグルコース残基は92.9％である。一方，リグニンは有機層へ，またヘミセルロースは水層へ略々完全に溶出する。クレゾール—水系の混合溶媒またはこの系へ酢酸を添加した系等を用いたシラカンバ材のソルボリシスパルプ化では同材

のクラフトパルプに近いシート強度のものを得ている[3]。

近年，高活性のセルラーゼが *Trichoderma viride* から生産されるようになり，木材加水分解への応用が考えられ，セルロースの高い加水分解率（糖化率）と省エネルギー的性質からウッドケミカルス変換における有望な1つの方法であろう。しかし，木材は直接酵素加水分解を受け難く，前処理として微粉砕化または脱リグニンを必要とする。

本研究は，脱リグニン処理のため，ソルボリシス法を適用し，各種条件で製造されたソルボリシスパルプに対するセルラーゼ Meicelase P による酵素加水分解の関係を検討し，加水分解に関する基礎的知見を得るために行われたものである。

2. 実　　験

2.1 ソルボリシスパルプの調製

試料は広葉樹ブナ *Fagus crenata* Blume (KL : 22.9%)，ミズナラ *Quercus mongolica* var. *grosseserrata* Rehd. et Wils. (KL : 22.8%)，シラカンバ *Betula platyphylla* var. *japonica* Hara (KL : 20.6%) および針葉樹トドマツ *Abies sachalinensis* Masters (KL : 30.1%)，アカエゾマツ *Picea glehnii* Masters (KL : 26.8%) の各材から手造りチップ (3×3×10 mm) を調製し用いた。各チップ 2 g（絶乾）は 20 mℓ 容ミクロオートクレーブ中で，各種クレゾール：水混合溶媒を用い，液比 7 で油浴中で反応させた。混合溶媒はクレゾール (C)：水 (W) を 8：2 から 2：8 まで変え，反応温度は 150°～190°C，反応時間 0～240 min とした。反応温度までの到達時間は約 90 min であり，一部の実験については所定量の酢酸を加え，その添加の効果をも検討した。さらに用いたクレゾールは市販の混合物（m-クレゾール：p-クレゾール≒3：2）であるが，一部には各異性体単独で用いた。放冷後，得られたパルプを 1G3 グラスフィルターでろ別し，アセトン—水 (9：1) で 2 回洗浄した。ついでパルプを乳鉢に移し，潰して解繊し，先のグラスフィルターに戻し，アセトン—水 (9：1)，アセトン，エチルエーテル，石油エーテルで順次洗浄した。ソルボリシス反応液と洗浄液を合し，減圧下溶媒を留去し，溶出した全分解物の量を測定した。溶出リグニンおよびポリオースの化学的性質についてはここでは取り扱わない。パルプ中の残存リグニンはパルプ 0.5 g を乳鉢中で 10 mℓ の 72% H_2SO_4 で 2 hr 加水分解後，ついで 500 mℓ 容エルレンマイヤーフラスコに移し 3% H_2SO_4 に稀釈後 4 hr 煮沸処理し，酸不溶部として定量した。

2.2 ソルボリシスパルプの構成糖分析

0.5 g のパルプを 0.5 mℓ の 72% H_2SO_4 で 2 hr 処理した後，14 mℓ の水で稀釈し 4 hr 沸とう湯浴中で加水分解した。不溶物をろ別後，分解液は飽和 $Ba(OH)_2$ 水溶液で pH 5.5 に調整し，生じた沈澱を遠心分離した。上澄液を 5 mℓ に濃縮し，$NaBH_4$ で糖アルコーに変え，常法により糖アルコールアセテートに誘導した。アセテートは 3% ECNSS-M (2 m×3 mm ガラスカラム，カラム温度 180°C，キャリアーガス N_2 10 mℓ/min) のガスクロマトグラフ (GLC) で分析

し，定量分析のため，イノシトールを内部標準とした。

2.3 ソルボリシスパルプの酵素加水分解

ソルボリシスパルプの酵素による加水分解は志水らの方法[4]に準拠して行った。用いた酵素は *Trichoderma viride* から調製されたセルラーゼ "Meicelase P" の市販品である。2gのパルプおよび Meicelase P 50 mg をキャップ付L型試験管にとり，0.1N酢酸緩衝液 (pH 5.0) 10～15 mℓを加え，さらに防腐剤として2～3滴のトルエンを加え，40°C，48 hr 振とう式インキュベーターで処理した。反応後，残留物は1G4グラスフィルターでろ別し，105°Cで乾燥後秤量した。残留物の量からパルプ当りの加水分解率 susceptibility を算出した。

3. 結果および考察

ソルボリシスによる木材のパルプ化に関する研究[5]，溶出ソルボリシスリグニン[6]および溶出ポリオース[7]の化学的性質に関する一連の研究で用いられた諸条件に準拠して調製したソルボリシスパルプに対するセルラーゼ Meicelase P による酵素加水分解率 susceptibility を検討した。得られた結果はブナ材パルプについて Table 1 に，トドマツ材についてのそれは Table 2 に，シラカンバ材，ミズナラ材およびアカエゾマツ材の各パルプのそれらについては Table 3 に各々示した。

3.1 ソルボリシス条件と酵素加水分解

酵素による加水分解では，酵素は木材に直接作用し難いのであらかじめ脱リグニン等の前処理を必要とする。脱リグニンの諸条件―溶媒組成比，反応温度，反応時間，触媒―と酵素加水分解率との関係をパルプ残存 KL 量に視点を置き考察を行った。

3.1.1 溶媒組成

ブナ材を用いた Be-1 系において，C:W (4:6) 混合溶媒のソルボリシスで得たパルプの残存 KL は 6.6%，C:W (2:8) では 7.3% を示し，これら5種の溶媒系での残存 KL 量はこの範囲にある結果を得た (Table 1)。この際の加水分解率 (糖化率：susceptibility) は C:W (6:4) では 85.9% から C:W (2:8) での 90.9% とかなり高い値を示す。この系内でクレゾール―水が等量のとき糖化率が 90% を超えた (Fig. 1)。一方，Be-3 系，C:W (5:2)，180°C，90 min のようにクレゾールを増加させた場合，残存 KL 量は 10.2% と Be-1 系より脱リグニンが進行せず，結果として酵素加水分解は 76.5% と低下する。同様の結果はシラカンバ材 Bi-1 系においても認められる。C:W (8:2) 混合溶媒でのパルプ (残存 KL 8.2%) の糖化率は 97.7% とかなり高いが，C:W (5:5) のそれは 99.3% と向上し，略々完全に加水分解される (Table 3)。

これに反しトドマツ材では溶媒組成による変動が大きい (Table 2)。A-1 系において C:W (5:5) のパルプ残存 KL は 7.6%，C:W (2:8) のそれは 17.8% を示し，ブナ材に比べ脱リグニンし難い。結果として C:W (4:6) の際の糖化率 67.4% を最高に C:W (6:4) の 38.6% の間に変動する (Fig. 1)。

Table 1. Solvolysis of beech wood with cresol : water system and susceptibility for Meicelase P

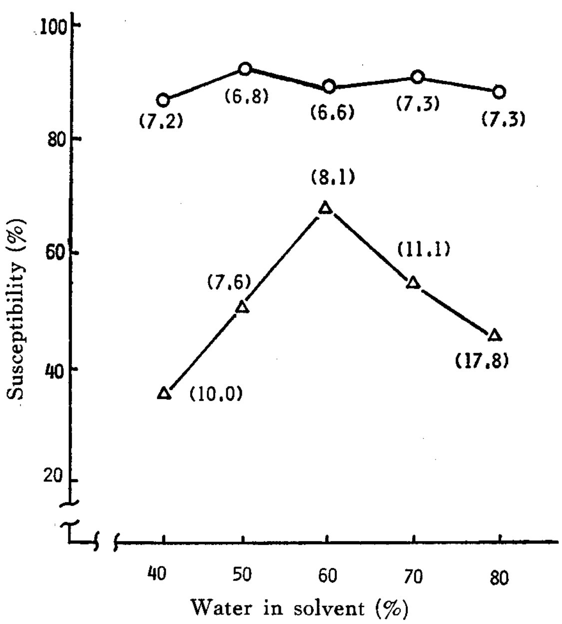
Experimental system	Conditions: Reaction temperature (°C)	Conditions: Reaction time (min.)	Conditions: Solvent C:W:A*1	Pulp (%)*2	Klason lignin (%)*3	Delignification (%)*4	Susceptibility (%)*3
Beech Be-1	180	90	6:4:0	59.6	7.2	81.3	85.9
			5:5:0	55.4	6.8	83.5	90.9
			4:6:0	52.7	6.6	84.7	88.9
			3:7:0	52.6	7.3	83.8	90.1
			2:8:0	51.1	7.3	83.0	87.9
Be-2	180	5	6:4:0	87.9	20.2	22.5	19.3
		10		83.4	19.0	30.8	28.2
		30		72.7	16.0	49.2	52.5
		60		61.8	10.8	70.9	82.3
		70		60.3	8.9	76.6	85.3
		90		56.1	7.9	80.6	87.4
		120		53.4	4.9	88.6	93.4
		150		51.5	4.0	91.0	94.0
Be-3	180	5	5:2:0	94.8	20.6	14.7	8.9
		20		87.8	18.9	27.5	19.5
		30		81.6	17.2	38.7	38.8
		60		69.3	12.8	61.3	67.5
		90		64.1	10.2	71.4	76.5
Be-4	170	30	7:3:0.1	86.4	17.4	34.0	24.6
		60		71.7	15.7	50.8	45.7
		90		67.8	12.8	62.6	64.0
		120		59.6	7.6	80.2	80.5
		180		57.3	5.3	86.7	90.8
		240		55.6	3.6	91.3	93.2
Be-5	170	30	5:5:0.2	77.5	19.4	34.3	28.2
		60		62.7	12.8	65.0	61.2
		90		58.6	10.4	73.4	77.0
		120		53.6	6.5	84.8	90.4
		180		48.7	4.2	91.1	90.7
		240		48.1	3.1	93.5	95.7
Be-6	160	60	5:5:0.2	82.0	17.8	36.3	22.3
		90		71.8	15.9	50.1	38.1
		120		65.3	12.8	63.5	56.8
		180		58.3	10.1	74.3	81.3
		240		55.1	6.8	83.6	89.5
Be-7	160	30	5:5:0.4	81.8	19.3	31.1	27.3
		60		72.5	16.5	47.8	45.1
		90		63.7	13.8	61.6	66.4
		120		59.4	10.2	73.5	76.1
		180		53.7	6.6	84.5	92.3
		240		52.1	5.3	87.9	95.3
Be-8	150	60	5:5:0.8	82.6	18.4	33.6	20.3
		90		74.0	16.1	48.0	38.2
		120		68.8	14.2	57.3	46.3
		180		59.1	8.9	77.0	82.2
		240		54.8	5.6	86.6	89.0

Beech: *Fagus crenata*.
*1 C:W:A = Cresol : Water : Acetic acid.
*2 % on a wood basis.
*3 % on a pulp basis.
*4 % on an original lignin.

Table 2. Solvolysis of fir wood with cresol-water system and susceptibility for Meicelase P

Experi-mental system	Cooking Conditions			Pulp	Klason lignin	Delignfi-cation	Suscepti-bility
	Reaction temperature (°C)	Reaction time (min.)	Solvent C : W : A*1	(%)*2	(%)*3	(%)*4	(%)*3
Fir A-1	190	90	6:4:0	57.0	10.0	81.1	38.6
			5:5:0	52.3	7.6	86.8	54.0
			4:6:0	50.6	8.1	86.4	67.4
			3:7:0	51.3	11.1	81.1	57.4
			2:8:0	53.5	17.8	68.4	49.4
A-2	190	10	6:4:0	82.2	23.0	37.2	12.8
		30		74.0	19.4	52.3	17.1
		60		64.9	14.1	65.6	18.9
		90		57.0	10.0	81.1	38.6
		120		53.9	7.6	86.4	48.4
		150		52.3	5.0	91.3	81.8
		180		51.5	4.5	92.3	84.4
		210		50.0	3.2	94.7	91.6
		240		48.6	2.7	95.6	94.3
A-3	190	90	4:6:0.1	48.8	7.8	87.1	74.3
			4:6:0.2	46.8	4.3	93.3	78.8
			4:6:0.3	46.5	3.5	94.6	90.6
			4:6:0.5	45.9	3.0	95.4	93.7
			4:6:0.0	45.5	2.6	96.1	92.7
A-4	190	90	3:7:0.2	47.6	6.8	89.2	65.0
			3:7:0.3	47.6	6.2	90.2	83.1
			3:7:0.4	46.4	5.9	90.9	82.8
			3:7:0.5	46.0	4.9	92.5	88.2

Fir: *Abies sachalinensis.*
*1 C : W : A = Cresol : Water : Acetic acid. *2 % on a wood basis.
*3 % on a pulp basis. *4 % on an original lignin basis.



—○—: 180°C, 90 min., on beech.
—△—: 190°C, 90 min, on fir.
( ): % residual KL on a pulp basis

Figure 1. Effects of solvent system (cresol-water) on enzymatic susceptibility of beech and fir pulps.

ミズナラ O–1 系 (C : W 6 : 4, 180°C, 90 min, 糖化率 91.2%, Table 3) の結果をも考慮し，クレゾール—水混合比が等量もしくは若干水の量が多い混合系が脱リグニンに適当と考えられるが，針葉樹についての脱リグニンには別の反応要因，たとえば触媒の存在等を考慮する必要がある。

3.1.2 反応温度

反応温度による影響について，ブナ材 Be–5 および Be–6 系にみられるように，溶媒混合比および反応時間が同一でも，脱リグニンに差異を生ずる結果を得た。前者 170°C, 90 min で得られたパルプの残存 KL は 10.4%，後者 160°C, 90 min では 15.9% と残存率が高く，Be–1 系 C : W (5 : 5) での残存 KL 6.8% に比べ脱リグニンし難い。その結果，Be–5 系の酵素加水分解率は 77.0%，Be–6 系のそれはわずか 39.1% に過ぎない (Fig. 2)。さらに低温でのソルボリシス条件では，Be–1 系 (C : W 5 : 5) と同じ分解率を得るためには触媒としての酢酸の増加および反応時間の延長が必要である (Table 1, Be–8 系)。

アカエゾマツのソルボリシスパルプ化において，脱リグニンに及ぼす反応温度の影響はすでに知られている。溶媒混合比 C : W (6 : 4), 180°C, 120 min でのパルプ残存 KL は 9.2% であるが，190°C, 90 min では 2.2% まで脱リグニンし得る[2)]。アカエゾマツ P–1 系 C : W : A (6 : 4 : 0.14) に見られるように酢酸添加により反応温度 180°C, 90 min の反応においても残存 KL 7.4% まで脱リグニンし得る (Table 3)。このとき得られたパルプの糖化率は 50.2% である。

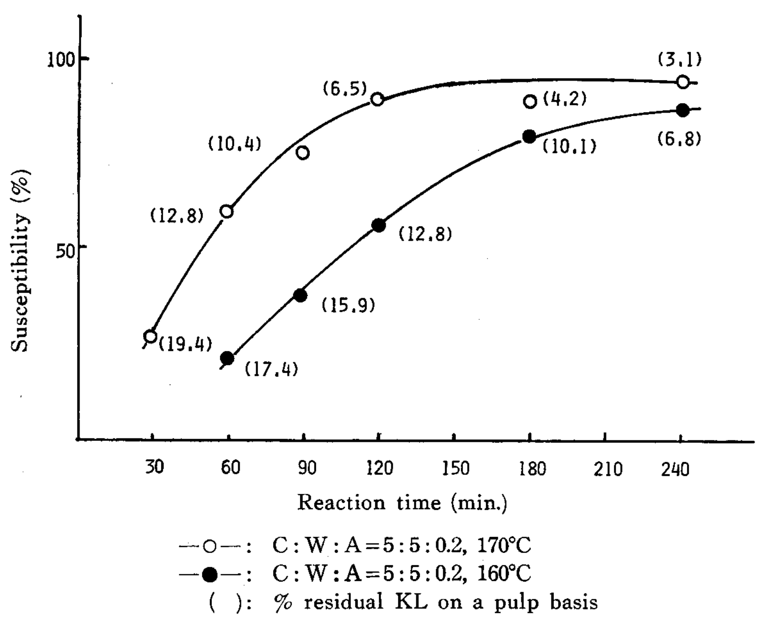


Figure 2. Effects of reaction time on enzymatic susceptibility of beech pulp.

3.1.3 反応時間

Be–8 系のような低温においても触媒の存在および長時間の反応が脱リグニンに影響を及

Table 3. Enzymatic susceptibility of solvolysis pulps and their sugar composition

Experimental system	Cooking conditions			Pulp	KL	Susceptibility	Sugar Composition (%)*4				
	Reaction temperature (°C)	Reaction time (min.)	Solvent C:W:A*1	(%)*2	(%)*3	(%)*3	Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose
Birch Bi-1	180	90	8:2:0*5	58.3	7.2	93.4	0.3	31.8	3.2	0.5	63.0
			8:2:0*6	61.2	5.9	93.8		30.3	2.7	0.6	66.3
			8:2:0*7	59.0	5.1	96.3	0.6	28.9	2.7	0.8	67.0
			8:2:0	57.2	8.2	97.7	0.3	28.5	2.5	0.5	68.3
			5:5:0	48.0	2.7	99.3		12.2	2.5	0.6	84.8
Bi-2	180	5	6:4:0*7	85.8	16.5	65.5		51.3	2.8	2.3	43.7
		10		80.1	15.5	70.3		47.3	2.3	2.9	47.4
		20		71.8	14.1	79.9	0.6	45.0	2.8	1.8	49.8
		30		70.2	13.5	88.8		42.6	2.8	1.3	53.3
		40		67.6	11.2	81.1		42.3	2.8	1.7	53.2
		60		59.0	7.6	97.7	0.6	38.1	3.1	1.3	56.8
		90		55.0	5.1	98.8		36.6	3.1	0.8	59.5
		120		52.0	3.6	98.8		33.4	3.1	1.4	62.1
Oak O-1	180	5	6:4:0*7	74.0	18.0	57.0	0.8	47.7	1.9	3.6	45.9
		10		71.0	16.5	65.8	1.8	43.8	2.3	4.7	47.9
		20		66.4	14.9	73.4		41.2	2.3	2.7	53.8
		30		63.7	13.1	84.6		35.3	2.4	1.6	60.7
		45		61.2	10.0	39.4	0.7	35.5	2.4	2.2	59.9
		60		57.7	7.6	90.4		34.7	2.2	2.2	60.9
		90		54.7	5.2	91.2		32.6	2.1	1.7	63.7
		120		51.4	3.4	92.3		29.1	2.1	2.4	66.5
Spruce P-1	180	90	6:4:0.14	54.7	7.4	50.2		5.7	5.2	0.4	88.0
			7:3:0.14	61.8	10.7	27.5		7.3	12.2	0.6	79.8
			8:2:0.14	73.1	15.7	7.6		7.9	20.8	2.1	69.8
			8:2:0.28	59.7	8.2	40.6		6.3	8.7	0.6	84.4
			3.5:3:3.5	49.3	2.7	99.3		3.3	3.4	0.4	92.9

Birch: *Betula platyphylla*. Oak: *Quercus mongolica* var. *grosseserrata*. Spruce: *Picea glehnii*.
*1: C:W:A=Cresol:Water:Acetic acid. *2: % on a wood basis. *3: on a pulp basis. *4: % on a lignin-free pulp basis. *5: o-Cresol.
*6: m-Cresol. *7: p-Cresol.

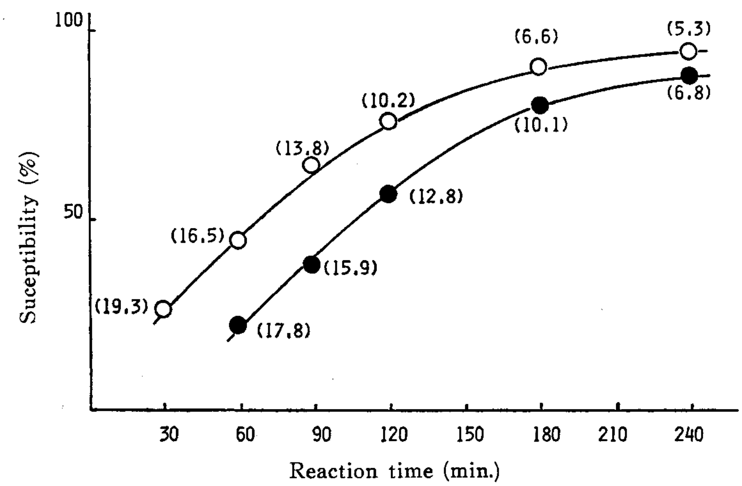
ぼす事に触れたが，時間の経過にともなう脱リグニンの挙動を知るための実験を試みた。

ブナ材 Be-2〜Be-8 系は混合溶媒比，反応温度を変えて蒸解を行ったものであるが，いずれの場合も時間の経過とともに脱リグニンは進行し，糖化率は向上する。Be-5 系で 30 min 後の糖化率は 28.2%，60 min 後では 61.2% と 2 倍以上に向上する。90 min 後では 77.0%，120 min で 90.4%，240 min 後では 95.7% に達する。同様に，Be-6 系においても 60 min 経過で 22.3% の糖化率が 120 min 後で 56.8%，240 min では 89.5% に至る (Fig. 3)。同様の結果はシラカンバ (Bi-2 系) およびミズナラ (O-1 系) の各材のパルプについても認められる (Table 3)。C : W (6 : 4)，180°C，120 min の条件で得られたブナ，シラカンバおよびミズナラの各パルプ (残存 KL 4.9%，3.6%，3.4%) の酵素加水分解率は各々 93.4%，95.8% および 92.3% に達する。

トドマツ材 A-2 系にみられるように，広葉樹材の場合と同様，時間の経過とともに脱リグニンは進行する (Table 2) が C : W (6 : 4)，190°C の条件下，10 min 後，脱リグニン率は 37.2% しか進行せず，得られたパルプ (残存 KL 23%) の糖化率はわずか 12.8% である。60 min 経過後，残存 KL は 14.1% であるがその糖化率はほとんど向上せず 18.9% に過ぎない。90 min 後，残存 KL は 10.0% に達するが加水分解率はようやく 38.6% に達し，広葉樹材と比べ著しく異なる様相を呈する。糖化率 80% 以上になるためには残存 KL 5% 以下にする必要があり，このため反応時間は 150 min をも要する。

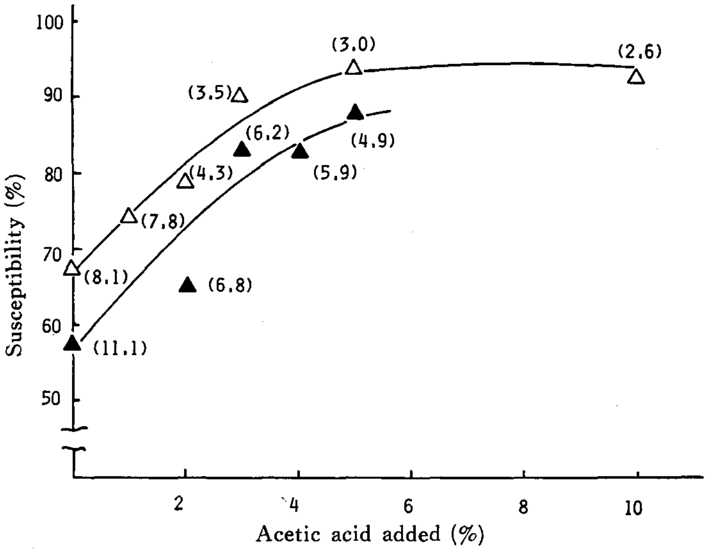
3.1.4 酢酸添加の効果

触媒として酢酸の添加はソルボリシスパルプ化において効果的である事は明らかであり，特に針葉樹材の選択的脱リグニンには有効である[2]。本研究においても，酵素加水分解がパルプ残存 KL と高い相関がある事が上述の結果より明らかであり，各条件に酢酸を添加した際の



—○—: C : W : A = 5 : 5 : 0.4, 160°C
—●—: C : W : A = 5 : 5 : 0.2, 160°C
( ): % residual KL on a pulp basis

Figure 3. Effects of acetic acid on enzymatic susceptibility of beech pulp.



—△—:　C:W=4:6, 190°C, 90 min.
—▲—:　C:W=3:7, 190°C, 90 min.
( ):　% residual KL on a pulp basis

Figure 4.　Effects of acetic acid addition on enzymatic susceptibility of fir pulp.

影響を検討した。

これらの結果はブナ材については Fig. 3 に，トドマツ材については Fig. 4 に各々示した。溶媒混合比および反応温度が同条件で酢酸添加量の異なる Be-6 および Be-7 系では添加量が 2 倍の後者では前者に比べ 1.5%～3.5% の範囲で脱リグニンが進行する。90 min 反応経過後の糖化率は Be-6 系でわずか 38.1% に過ぎないが，Be-7 系は 66.4% と約 1.7 倍程酵素に対するアクセシビリティが向上する。180 min 後では Be-6 系はようやく 81.3% に到達するが，Be-7 系では 92.3% と向上する。ブナ材の全系列における試験を通して，酢酸添加の効果が明らかであり，加水分解率 80% 以上を一規準とするなら，反応温度を 150°C まで低下させる事も可能である。しかし，反応温度の設定は目的とする最終生成物等他の要因をも含めて決定されるべきものである。

トドマツ材については，異なる溶媒比の系 A-3 および A-4 について添加酢酸量にともなう加水分解率の変化を Fig. 4 に示した。ブナ材に見られたと同様，脱リグニンの進行にともない糖化率は増加した。しかし，広葉樹材に比べ選択的脱リグニンは低く，酢酸添加により初めて達せられる (A-1 系と A-3, A-4 系の比較，Table 2)。アカエゾマツを用いたソルボリシスパルプ化 (C:W:A=5:5:0.1) で得られたパルプの残存 KL は 7.3% である[2]が，略々クレゾール—水の量比が類似の C:W:A=3.5:3.0:3.5 (P-1 系) のように酢酸の増加は残存 KL を 2.7% まで低下させ，糖化率 (99.3%) を飛躍的に向上させる。

ソルボリシス条件の要因としては針・広葉樹材ともに，クレゾール—水混合比が等量もし

くは若干水が多い系で脱リグニンが容易に進行する。針葉樹材は広葉樹材に比べ脱リグニン進行し難く，反応温度を高めるか，または反応時間を延長する必要がある。酢酸添加は脱リグニンに対し効果があり，特に針葉樹材では著しい。結果として針葉樹材の加水分解率は飛躍的に向上する。さらに広葉樹材における酢酸添加の効果は反応温度を低下させる事ができ，省エネルギー的観点から重要視されるべきである。

3.2 ソルボリシスパルプ残存リグニンと酵素加水分解

上述の如く Meicelase P によるパルプの加水分解はパルプ残存 KL と強く関連している結果を示した。この点に関し，反応時間の経過にともなう脱リグニンの進行および加水分解効果に検討を加えた。

ブナ材 Be-2 系 (C : W=6 : 4, 180°C) で反応時間 5 min～150 min まで変化させた際，脱リグニン率は 22.5%～91.0% と向上しパルプ残存 KL は 20.2% より 4.0% に減少する。加水分解率は反応時間 5 min の場合 19.3%，50 min では 52% と緩慢に上昇する。さらに，60 min，90 min，120 min，150 min 後で各々 82.3%，87.4%，93.4%，94.0% と向上する。80% 以上の糖化率は 60 min で達せられ，この際のパルプ残存 KL は 10.8% (脱リグニン率 70.9%) と比較的高い。シラカンバ材 Bi-2 系 (C : W=6 : 4, 180°C) 120 min で得られたパルプ (残存 KL 3.6%) の糖化率は 95.8% に達する (Table 3)。残存 KL 14.1% のパルプにおいての糖化率は略々80% で，これは反応時間 20 min 後におけるものである。また，ミズナラ材 O-1 系 (C : W=6 : 4, 180°C) においても，脱リグニンの進行にともない糖化率の向上が顕著である。30 min 後に得

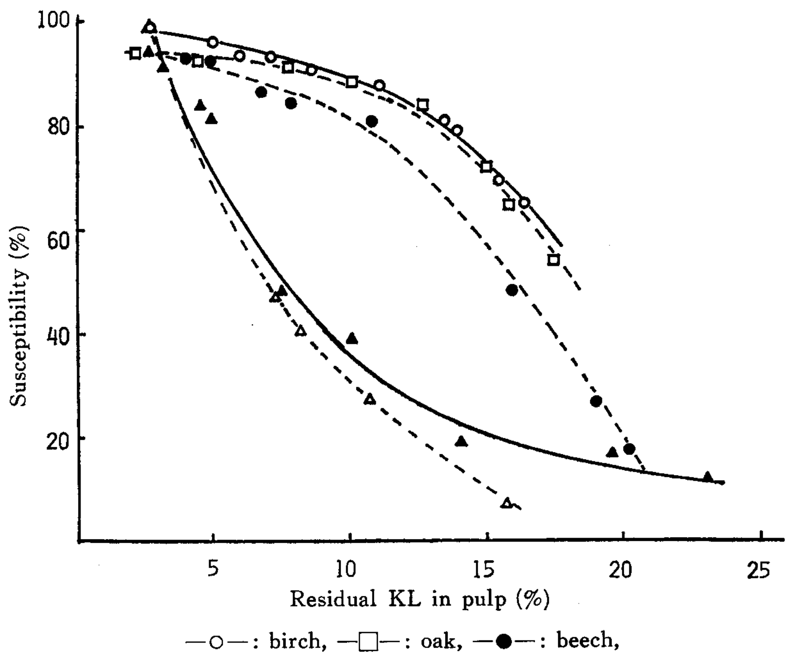


Figure 5. Effects of residual KL on enzymatic susceptibility.

られたパルプ(残存 KL 13.1%)の糖化率は 84.6% を示す。これら3樹種間ではセルラーゼによる加水分解効果はシラカンバ，ミズナラ，ブナの順になる傾向を与え，結果を Fig. 5 に示す。本研究で対象とされなかった他の広葉樹についても，これら3樹種と同様な傾向を示すと推察される。さらに3樹種より得られたパルプの残存 KL が 10～13% と比較的高い量にもかかわらず糖化率は 80% 以上を示す。しかしブナ材とシラカンバ材に見られる分解率の差異は樹種固有のものであるか否かはさらに精査しなければならない。

一方，トドマツ材 A-2 系 (C : W=6 : 4, 190°C) で，残存 KL と加水分解率の間に広葉樹材で得られた結果に類似した関係があるが，残存 KL 10% のパルプを得るため 90 min を要し広葉樹材に比べ脱リグニンし難い。また，この際得られたパルプの糖化率は 38.6% と著しく低く，広葉樹材からの残存 KL 10% 程度のパルプの糖化率の 50% 以下である。80% 以上の糖化率を示すパルプを得るために反応時間 150 min を要し，残存 KL を 5% 以下としなければならない。残存 KL 3% 以下では広葉樹材と同様 90% 以上の加水分解率を示す。Fig. 5 にこの結果を示す。また，同図にアカエゾマツ材のパルプについて残存 KL と加水分解率 (Table 3) の関係を載せた。トドマツおよびアカエゾマツ材の Meicelase P に対する挙動は略々同じと見做す事ができる。

Fig. 5 に見られるように広葉樹，針葉樹の各パルプの酵素に対する挙動は非常に特徴的である。Goring らはスプルース材，バーチ材の KP および SP 蒸解における脱リグニン過程を UV 顕微鏡で観察し後者の脱リグニンが前者より容易である事を指摘した[8,9]。また広葉樹材の各組織要素により，リグニンの構成が異なる事を見出し[10]，蒸解中の細胞の変形にまで言及している。しかし，酵素に対する糖化率の変移は単に残存 KL 量によってのみ論ずる訳には行かない。残存 KL 約 10% のパルプに対する糖化率は広葉樹材においては略々 80% 以上であるのに反し，針葉樹材においては 40% 以下であり，後者が 80% 以上の糖化率に達するのは残存 KL 5% 以下の場合である。これらの原因の究明についてはさらに精査の必要があるが，残存 KL のパルプ中での存在形態も要因の1つと推察され，今後，ソルボリシスパルプの組織化学的研究が必要である。

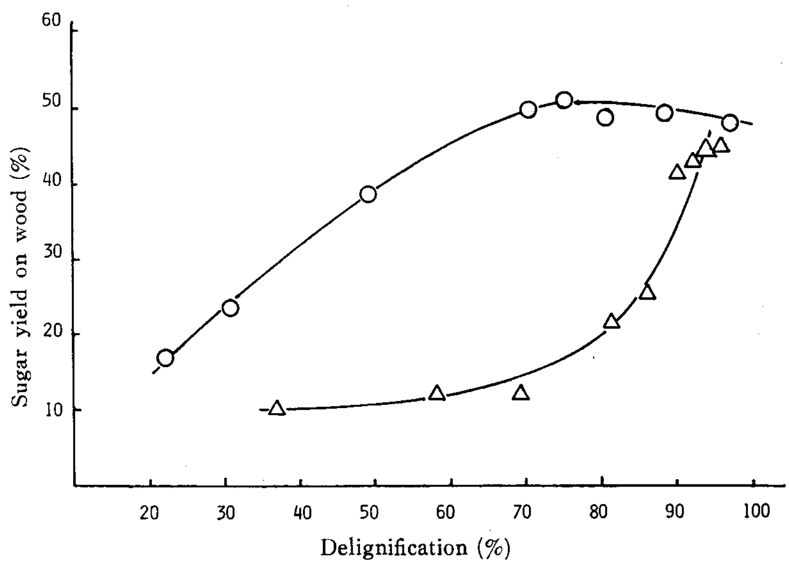
3.3　ソルボリシスによる脱リグニンと糖収率

木材に対するソルボリシス反応の最も強調される事は木材の主要成分を完全に分離するという点にある。ブナ材を C : W : A=7 : 3 : 0.1, 170°C, 120 min のソルボリシスでの物質収支はソルボシスパルプ 57% (残存 KL 7.3%, 脱リグニン率 81.8%), ソルボルシスリグニン 28.3%, 溶出多糖類 12.5%, 計 97.8% である[11]。また，アカエゾマツ P-1 系 (C : W : A=3.5 : 3 : 35, 180°C, 90 min) でのパルプ (残存 KL 2.7%) 収率 49.3% であり，このパルプの構成糖分析でグルコースが 92.9% を占めている。これはヘミセルロースおよびリグニンが略々完全に溶出した事を示す。このパルプの Meicelase P に対する糖化率は 99.3% でほとんど完全に分解された結果である。加水分解された糖がすべて回収または利用されると仮定するなら，糖収率は約 48.9% (対

Table 4. Sugar composition of pulp from beech and fir wood by Solvolysis pulping*1

Experimental system	Reaction temperature (°C)	Reaction time (min.)	Pulp (%)	Sugar composition (%)*2				
				Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose
Beech Be-2	180	5	87.9	2.0	28.6	2.9	2.7	63.8
		10	83.4	0.4	24.4	2.9	9.5	62.3
		30	72.7	0.6	19.5	5.1	6.0	68.8
		60	61.8	0.5	15.5	6.4	4.7	72.9
		70	60.3	0.3	15.0	2.7	4.2	77.7
		90	56.1	0.2	13.0	6.3	3.4	77.1
		150	51.5	2.1	10.2	7.9	4.0	75.8
Fir A-2	190	10	82.2	1.3	6.5	18.5	4.2	69.5
		30	74.2	0.2	4.9	19.5		75.4
		60	64.9	0.1	4.4	14.5	0.7	79.8
		90	57.0	0.3	4.2	10.0	0.8	84.7
		120	53.9		3.1	8.9	0.6	87.4
		150	52.3	0.4	2.8	5.2	2.3	89.3
		180	51.5		3.3	4.9	1.3	90.5
		210	50.0		2.8	5.5		91.7

Beech: *Fagus crenata*. Fir: *Abies sachalinensis*.
*1: Solvent system: Cresol : Water : Acetic acid = 6 : 4 : 0
*2: % on a lignin-free pulp basis.



—○—: beech, C : W = 6 : 4, 180°C
—△—: fir, C : W = 6 : 4, 190°C

Figure 6. Effects of delignification on sugar yield.

チップ）と算出される。

各種脱リグニンの異なるパルプと酵素加水分解との間における糖収率の関係を知るためブナ材 Be-2 系およびトドマツ材 A-2 系の結果を考察した。

これらの系で得られた各パルプの構成糖分析の結果は Table 4 に，また脱リグニンと糖収率との関係を Fig. 6 に示す。

ブナ材は脱リグニンが進行するにともない糖収率が増加する。脱リグニン率 70～80% で略々 50% の糖収率に達するが，さらに脱リグニン率が増加しても糖収率は増加しない。この系で 70 min 後のパルプ収率 60.3%（残存 KL 8.9%），加水分解率 85.3% の場合，糖収率は 51.4% と算出される。このパルプ中のグルコースは 77.7%（対木材 46.8% に相当）ですべて加水分解された事になる。パルプ中のヘミセルロース由来の約 22.2% の多糖類もかなり加水分解を受ける結果になり，Meicelase P はセルロース以外の多糖類の加水分解にも寄与している事を示す。

一方，トドマツ A-2 系において，脱リグニン率 80% 程度は糖収率は 22% と低く以後 90% 近くまで脱リグニンが進行して徐々に糖収率が増加する。さらに脱リグニン率が 90% 以上に達する（残存 KL 3% 以下）と急激に糖収率は増加する。これはパルプ残存 KL と糖化率との関係を良く反映している。脱リグニン率 80% 以上のトドマツパルプの構成糖はグルコースが 87.4% 以上を占め，ほとんどセルラーゼにより加水分解を受ける事を示す。

両樹種のパルプはグルコース以外の構成糖の存在が明らかであり，Meicelase P がどのように加水分解に寄与しているかは，今後加水分解生成物の分析をまたねばならない。以上の結果より，ブナ材の糖収率は 51% 前後が1つの目安となるであろう。しかしトドマツ材についてはパルプ構成糖中 90% 以上のグルコースからなるパルプを生成するための諸条件は広葉樹材のそれよりかなり苛酷であり，単に糖収率の多寡のみでいずれを最適と断定する訳にはいかない。どのようなソルボリシス条件を選定すべきかは，木材成分をいかなる最終目的生成物へ変換するかにより決められるべきである。

4. 結　　言

木材は酵素の直接的加水分解を受け難く，木材加水分解のため，前処理を必要とする。一つの前処理法としてソルボリシス反応を用い，得られたパルプに対するセルラーゼ Meicelase P の挙動を検討した。

本研究に供した3種の広葉樹（ブナ，シラカンバ，ミズナラ）および2種の針葉樹（トドマツ，アカエゾマツ）の各材よりのソルボリシスパルプの酵素加水分解はいずれもパルプ中の残存 KL 量に強く依存する結果を得た。またソルボリシスの諸条件――溶媒混合比，反応温度，反応時間，触媒の有無――は脱リグニンに影響する結果を示す。全般的に，同じ加水分解率もしくは糖収率を得るためのソルボリシス条件に関して，広葉樹材は針葉樹材に比べ省エネルギー的条件で充分に達成する事ができる。

10% 前後の残存 KL の広葉樹パルプの糖化率は 80% 以上に達するが，同程度の残存 KL の針葉樹材パルプのそれは 40% 以下に過ぎない。一般的に酵素加水分解がパルプ残存リグニンに強く影響されるとはいえ，単にリグニン除去のみが分解率を向上させると強調する事ができず，むしろソルボリシスパルプ中のリグニン存在形態に要因がある事を示唆する。今後，パルプ残存リグニンに関する組織化学的研究が主要な課題の1つと考えられる。糖収率およびパルプ構成糖の知見をも含め，ウッドケミカルス生成の観点から，いかなるソルボリシスプロセスが必要かは加水分解により生ずる糖の最終目的生成物への化学変換の方法とともに選択されるべきである。さらに，酵素加水分解の工業的アプローチとしては高価な酵素を回収する方法や，酵素の固定化などが今後解決されねばならない重要課題である。

謝　　辞

本研究に供したセルラーゼ Meicelase P は明治製菓株式会社食糧研究所農学博士日高秀昌氏の御厚意により供与されたものであり深甚なる謝意を表する次第である。また，本研究を遂行するに当り，一部のパルプの構成糖分析は農林水産省林業試験場農学博士志水一允氏に御依頼したものであり，さらに終始本研究に尽力された吉井信秋氏，横田信三氏の各氏に心より謝意を表する次第である。

本研究に供した試料の採取にあたっては北海道大学農学部附属演習林，北海道営林局および北海道林務部の各位の御厚意によるものであり深甚なる謝意を表するとともに，本研究の経費の一部は農林水産省“バイマス変換計画”に依ったものである事を併記し謝意を表する次第である。

文　　献

1) 佐野嘉拓・榊原　彰： 木材誌, **30**, 569–579 (1984).
2) 榊原　彰・枝重有祐： 紙パ技協誌, **38**, 337–344 (1984).
3) 榊原　彰・枝重有祐・武山浩武： *ibid.*, 37, 423–429 (1983).
4) SUDO, K., Y. MATSUMURA and K. SHIMIZU: *Mokuzai Gakkaishi*, **22**, 670–676 (1976).
5) SAKAKIBARA, A., Y. EDASHIGE, Y. SANO and H. TAKEYAMA: *Holzforschung*, **38**, 159–165 (1984).
6) 佐野嘉拓・榊原　彰・笹谷宜志： 木材誌, **30**, 857–863 (1984).
7) 小沢修二・武山浩武・榊原　彰・笹谷宜志： 北大演報, **43**, 127–142 (1986).
8) Proctor, A. R., W. Q. YEAN and D. A. I. GORING: *Pulp and Paper Mag. Can.*: **68**, 445–455 (1967).
9) FERGUS, B. J. and D. A. I. GORING: *ibid.*, **70**, T-314–322 (1969).
10) FERGUS, B. J. and D. A. I. GORING: *Holzforschung*, **24**, 113-117 (1970).
11) 佐野嘉拓・笹谷宜志・榊原　彰： 未発表.

Summary

It is well known that woods are more subject to hydrolysis when they are pre-treated with fine-pulveriation or solvolysis. This paper deals with the enzymatic hydrolysis on solvolysis pulps of Japanese hard- and softwoods. Wood chips were cooked by solvolysis process with cresol (C) and water (W) mixture, in some case an addition of acetic acid (A), at 150～190°C for 5～240 min. The enzymatic susceptibilities of various solvolysis pulps from hard- and softwoods were estimated by using a commerical cellulase "Meicelase P" derived from *Trichoderma viride.* The behavior on the enzymatic hydrolysis of various pulps from beech (*Fagus crenata* Blume), birch (*Betula platyphylla* var. *japonica* Hara), oak (*Quercus mongolica* var. *grosserrata* Rhed. et Wils.), fir (*Abies sachalinensis* Masters.) and spruce (*Picea glehnii* Masters.) were highly affected by the residual lignin (Klason lignin KL) content in each pulp. Morever, these residual KL contents in pulps were markedly dependent on the reaction conditions— solvent system, temperature, time and catalyst.

The results obtained are shown in Tables 1, 2 and 3, and the analytical data on sugar composition of beech and fir pulp are indicated in Table 4.

1. Aspects of solvolysis conditions on enzymatic hydrolysis are summarized as follows:

i). Solvent systems: Beech pulp (the residual KL 7.6%) obtained by solvent system of C:W (5:5) (Be-1 system) gave the maximum value of 90.9% on enzymatic susceptibility (Table 1 and Fig. 1). Similarly, that of birch pulp with the same solvent system went up to 99.3% (Table 3). Fir wood also was delignified by cooking with various solvent systems. The solvolysis pulps obtained had the higher residual KL contents (7.6～17.8%, A-1 system) than those of hardwood pulp. The enzymatic susceptibilities of fir pulp were significantly lower than those of hardwood and were in the range from 38.6% to 67.4% (Table 2 and Fig. 1).

From the standpoint of the enzymatic susceptibility, the mixture consisting of each equal portin of cresol and water and/or somewhat more portion of water appear to be favourable solvent system.

ii). Reaction temperature: The residual KL in beech pulp prepared with solvent system of C:W (5:5) at 170°C for 90 min (Be-5 syste,) was 10.4%, and the residual KL in pulp obtained with the same solvent system at 160°C for 90 min (Be-6 system) was 15.9%. Their susceptibilities for Meicelase P were 77.8% and 38.1%, respectively (Fig. 2). The delignification in solvolysis process is facilitated by the use of the elevated temperature and the enzymatic susceptibilities of pulps are therefore improved.

iii). Reaction time: Various solvolysis pulps of hardwoods under the conditions at Be-2–Be-8 (beech), Bi-2 (birch) and O-1 (oak) were subject to delignification with increasing reaction times. The enzymatic susceptibilities of pulps from beech, birch and oak resulted in 28.2%, 70.3% and 65.8% by cooking for ten min, and those were improved to 94.0%, 95.8% and 92.3% by extending of the reaction time up to 240 min, respectively (Table 1 and 3). However, that of fir pulp barely reached to 48.6% at 120 min of the reaction time (A-2 system). To obtain the pulp of over 90% on emzymatic hydrolysis, the time had to be extended up to 210 min.

iv). Effect of acetic acid as catalyst: It is known that delignification of softwood by solvolysis pulping is more difficult than that of hardwood and an addition of acetic acid as catalyst in the solvent system can facilitate its delignification. In the case of beech wood, an

addition of acetic acid was effective to delignification and morever made possible to depress the reaction temperature (Be-5 system). Furthermore, the increment of the amount of acetic acid improved a delignification and consequently enhanced the susceptibility for Meicelase P (Be-7 to Be-6 system and Fig. 3). On the other hand, the effect of addition of acetic acid on delignification in solvolysis of fir wood was more significant than in the case of non-acetic acid system. The susceptilbility of fir solvolysis pulp for cellulase was markedly improved by the use of acetic acid (A-3 and A-4 to A-1 system and Fig. 4).

2. The influences of the residual KL in various solvolysis pulps on the enzymatic susceptibility are indicated in Fig. 5. Hard- and softwoods became gradually susceptible to hydrolysis with reduction of the residual KL contents. The rates of hydrolysis on hardwood pulps containing about 10～11% of the residual KL ranged from 82.3% to 89.4% and those of firwood pulps with the same amount of the residual KL was only 38.6%. When the residual KL of fir pulp was delignified less than 5%, its susceptibility for cellulase could be improved in over 80% (Fig. 5). These findings suggest that the peculiar behavior for Meicelase P between hard- and softwoods is apparently influenced not only by the amount of the residual KL but by the existence situation of the residual lignin in pulps. A further histochemical survey may be required for the elucidation of those differences for cellulase.

3. Solvolysis of spruce wood under the condition of C : W : A (3.5 : 3.0 : 3.5) at 180°C for 90 min gave 49.3% of pulp which contained 2.7% of the residual KL and consisted of 92.3% of glucose residue (Table 3). Its susceptibility for cellulase was 99.3%. Assuming all hydrolysates were recoverd, the sugar yield could be estimated about 49% on a wood basis. With progress of delignification, the sugar yield on beech wood increased gradually and reached about 50% at the stage of 70～80% of delignification. A further delignification resulted in no further increment of the sugar yield. Solvolysis of beech wood with solvent system of C : W (6 : 4) at 180°C for 90 min gave 60.3% pulp which indicated 94.2% of the susceptibility by enzymatic hydrolysis. The sugar yield was estimated from these results about 51% on a wood basis. On the other hand, the sugar yield of fir wood was improved by increaseing of delignification, but was less than 26% even when was delignified up to 90% by solvolysis. The sugar yield over 43% could be expected at the stage of above 90% of delignification. Under the condition of C : W (6 : 4) at 190°C for 90 min, fir wood yielded 53.9% of pulp containing about 7.6% of the residual KL. Its susceptibility for Meicelase P was 48.4% and therefore the sugar yield caluculated about 26%. Also, fir wood by the same condition for 150 min gave 52.3% of pulp with 5.0% of the residual KL. Above pulp was hydrolyzed up to 81.1% by cellulase and its sugar yield was estimated about 42.8%.

Form these findings, the optimum condition of solvolysis process to obtain the pulp of high susceptibility for cellulase and high sugar yield should be determined by the end use of the solvolysis products.