

(道総研林産試) ○折橋 健、安久津 久
(森林総研林育セ北海道) 福田陽子、矢野慶介

1 はじめに

地球温暖化対策、地域産業創出などの観点からバイオマス利用への関心は年々高まっている。バイオマスの利用拡大に合わせて、量のみならず質的にも安定したバイオマス供給体制を確立していく必要がある。ヤナギ類は、道内で栽培可能なバイオマス資源として注目されており、試験栽培も始まっている^{1,2)}。今後、ヤナギ類の導入に向けた動きの拡大が予想される中、ヤナギ類の優良品種選抜や栽培技術に求められる期待は大きい³⁾。

ヤナギ類の育種では、これまで生産性(量)に着目した育種が行われてきた^{2,4)}が、含有成分(質)に着目した例⁴⁾はほとんどない。短伐期収穫ヤナギを原料とするバイオエタノールの製造実験⁵⁾では、エタノールの生産効率がセルロース、ヘミセルロース、リグニン等の含有量の影響を受けることが明らかにされており、含有成分に着目した優良品種選抜の可能性について検討が必要となっている。以上のことから本研究では、ヤナギの成分育種の可能性について検討することを念頭に、ヤナギ優良バイオマス品種候補木の含有成分量について検討を行った。

2 実験方法

2.1 材料

釧路川流域(弟子屈町、標茶町)に自生するオノエヤナギ(*Salix sachalinensis*)の中から選定した優良バイオマス品種候補木、計14個体(No.1~14)を分析対象とした。2010年8月に各個体の枝を1~4本ずつ採取し、その3~5年生部位を材料とした。

2.2 分析試料の調製

採取した材料は、剥皮して木部のみとし、風乾した。風乾した木部は、サイクロンサンプルミル粉碎機(静岡精機製、CSM-F1)により粉碎し、各個体につき1~4点の分析試料を得た。

2.3 分析

含有成分の分析は、**図1**に示す流れにより分析し、最終的に絶乾ベースの木部に対する含有割合を算出した。

2.3.1 アルコール・ベンゼン混液抽出物

抽出溶媒としてアルコール・ベンゼン混液(99%エタノール/ベンゼン=1/2、v/v)を使用した。ソックスレー抽出装置を用いて、試料3g(風乾)、アルコール・ベンゼン混液150ml、抽出時間6時間の条件で抽出を行い、抽出残渣(以下、脱脂試料とする)を回収し、風乾した。抽出前の試料と脱脂試料の重量差(絶乾)をアルコール・ベンゼン混液抽出物(以下、アルベン抽出物とする)の量とした。

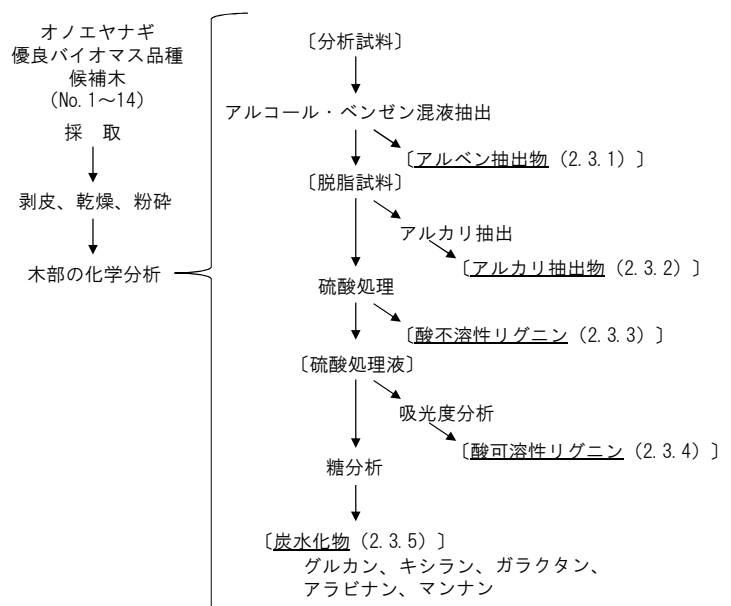


図1 分析の流れ

2.3.2 アルカリ抽出物

抽出溶媒として 1%水酸化ナトリウム水溶液を使用した。脱脂試料 1g (風乾) と 1%水酸化ナトリウム水溶液 100ml を 200ml 容丸底フラスコに入れ、フラスコ上部に還流冷却器を取り付けた。これを電気加熱器にセットし、1 時間煮沸した。煮沸後、ガラスろ過器 (1GP16) を用いて固液分離を行い、得られた残渣 (以下、アルカリ処理試料とする) を水、10%酢酸水溶液、水、アセトンにより順次洗浄してから風乾した。脱脂試料とアルカリ処理試料の重量差 (絶乾) を求め、さらにアルベン抽出物量の補正を行って、木部に含まれる 1%水酸化ナトリウム水溶液抽出物 (以下、アルカリ抽出物とする) の量とした。

2.3.3 酸不溶性リグニン^{6,7)}

脱脂試料 0.3g (風乾) と 72%硫酸 3ml を ϕ 18mm 試験管に入れた。ガラス棒で混練してから 30°C のウォーターバスに入れ、1 時間加温処理した。加温中、10 分おきにサンプルを混練した。処理後のサンプルは、水 84ml により試験管から 100ml 容ねじ口瓶に移した (これにより硫酸濃度は 4%となる)。さらに、ふたをしてからオートクレーブに入れ、121°C で 1 時間の加圧加熱処理を行った。処理後のサンプルは、ガラスろ過器 (1GP16) を用いて固液分離を行った。残渣は水で洗浄してから 105°C のオーブンで 24 時間乾燥して絶乾重量を求め、さらにアルベン抽出物量の補正を行って、木部に含まれる酸不溶性リグニン量とした。また、液体 (以下、硫酸処理液とする) は液量を計測してから酸可溶性リグニンおよび糖類の定量分析に用いた。

2.3.4 酸可溶性リグニン^{6,7)}

硫酸処理液を水で 20 倍希釈し、希釈液の 190~210nm における最大吸光度を測定した。吸光度の測定にはダブルビーム分光光度計 (日立製作所製、228A 形) を使用し、ブランクには 4%硫酸を水で 20 倍希釈したものを使用した。測定した最大吸光度から下式により、木部に含まれる酸可溶性リグニンの割合を算出した。

酸可溶性リグニン (%) = [20 倍希釈した硫酸処理液の最大吸光度 (ブランク補正值)] \times 20 (希釈率) \times 2.3.3 で得られた硫酸処理液量 (L) \times [100 - 2.3.1 で求めたアルベン抽出物量 (%)] \times 100 / 2.3.3 で用いた脱脂試料量 (g) / 110 (リグニン吸光係数) / 100

2.3.5 炭水化物⁸⁾

硫酸処理液 10ml、内部標準 (0.1g/ml エリスリトール水溶液) 0.1ml、水酸化バリウム八水和物 1.3g を 50ml 容遠沈管に入れた。スターラー上で液を攪拌しながら液中の硫酸を硫酸バリウムとして沈殿させた。さらに、3%水酸化バリウム水溶液を加えながら pH を 6~7 に調整した後、遠沈管を遠心分離機 (3,000rpm、20 分) にかけて固液分離し、上澄み液を得た。この液を表 1 に示す条件で高速液体クロマトグラフにかけ、グルコース、キシロース、ガラクトース、アラビノースおよびマンノースを定量し、下式により木部から得られる各単糖の割合を算出した。

単糖 (%) = 単糖定量値 (g/ml) \times 1.01 (内部標準添加による希釈率) \times 2.3.3 で得られた硫酸処理液量 (ml) \times [100 - 2.3.1 で求めたアルベン抽出物量 (%)] \times 100 / 2.3.3 で用いた脱脂試料量 (g) / 100

最後に、上式で得た単糖の値から炭水化物含有量への変換を行った。すなわち、グルコース、ガラクトース、マンノースについては 0.9 をかけてグルカン、ガラクトタン、マンナンとし、キシロース、アラビノースについては 0.88 をかけてキシラン、アラビナンとした。

表 1 高速液体クロマトグラフの稼動条件

機器	日立ハイテクノロジーズ製 La Chrom Elite L2000 series
検出器	示差屈折率検出器
カラム	Bio-Rad製 Aminex HPX-87P (ϕ 7.8 \times 300mm \times 2)
カラム温度 (°C)	80
溶離液	水
流速 (ml/min)	1.0
試料注入量 (μ l)	10

2.3.6 その他未同定成分

木部における全成分の含有割合を 100%とし、逐次分析により定量した成分、すなわちアルベン抽出物、酸不溶性リグニン、酸可溶性リグニン、グルカン、キシラン、ガラクトタン、マンナンの含有割合を差し引いた残りを未同定成分とした。なお、後述するが、アラビノースの全分析データが定量下限未満であったため、アラビナンはこの計算には含めなかった。

2.4 統計解析

各成分の含有割合の個体間での比較には、クラスカル・ウォリス検定⁹⁾（有意水準は上側 5%）を使用した。

3 結果と考察

表 2 に木部に含まれる各成分の割合（絶乾ベース）を示す。

表 2 オノエヤナギ木部の成分含有割合（%）

個体No.	試料数	アルコール・ベンゼン 混液抽出物		1%NaOH水溶液 抽出物		酸不溶性 リグニン		酸可溶性 リグニン		グルカン	
		平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
1	2	2.8	0.4	27.5	2.6	21.8	0.6	2.4	0.1	35.8	4.6
2	3	3.4	0.7	27.5	1.7	23.7	1.2	2.3	0.2	36.5	2.2
3	1	3.0		26.4		22.5		2.5		39.3	
4	3	3.3	0.3	27.6	0.8	25.2	1.4	2.4	0.2	37.4	3.2
5	3	2.8	0.5	26.2	0.3	21.1	0.9	2.4	0.3	42.6	2.7
6	4	3.4	0.4	28.1	0.9	24.1	0.5	2.5	0.0	37.6	0.4
7	4	3.2	0.2	27.5	1.4	21.5	0.7	2.4	0.1	43.0	3.1
8	3	3.4	0.6	28.2	0.8	21.2	1.8	2.3	0.1	41.6	2.6
9	3	3.3	0.4	27.7	0.4	22.2	0.6	2.1	0.1	41.3	0.1
10	3	3.1	0.1	28.2	0.6	21.3	1.1	2.2	0.2	40.5	1.6
11	1	2.8		26.3		21.3		2.4		40.6	
12	3	4.9	0.6	30.9	0.8	23.3	0.7	2.0	0.2	35.8	2.1
13	4	3.2	0.4	27.3	0.3	22.1	1.1	2.2	0.1	40.6	1.1
14	3	3.4	0.3	26.8	2.2	22.7	1.3	2.7	0.1	35.9	3.5
		P>0.05		P>0.05		P<0.05		P<0.05		P<0.05	

個体No.	試料数	キシラン		ガラクトタン		アラビナン	マンナン		未同定成分			
		平均値	標準偏差	平均値	標準偏差		備考	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	備考
1	2	9.3	1.5	1.2	0.1	*	trace	5.6	1.3	21.2	5.1	*
2	3	11.7	1.2	1.5	0.3	*	trace	2.4	0.4	18.4	1.6	*
3	1	13.4		1.7			trace	3.1		14.4		
4	3	12.1	0.5	1.6	0.7	*	trace	1.7	0.2	16.3	2.7	*
5	3	12.1	0.5	1.4	0.0		trace	2.0	0.3	15.6	2.2	
6	4	13.1	0.3	1.4	0.2	*	trace	1.5	0.3	16.4	0.6	*
7	4	13.4	0.8	1.4	0.3	*	trace	1.8	0.4	13.5	3.3	*
8	3	13.7	0.4	1.7	0.2		trace	1.7	0.2	14.6	1.2	
9	3	13.2	0.5	1.8	0.4		trace	1.9	0.3	14.2	1.0	
10	3	13.7	1.2	1.7	0.1		trace	2.2	0.2	15.4	0.8	
11	1	14.8		1.9			trace	1.7		14.5		
12	3	12.8	0.8	1.9	0.2		trace	2.0	0.4	17.2	1.8	
13	4	14.7	0.6	2.0	0.4		trace	2.0	0.2	13.1	2.8	
14	3	13.6	0.6	1.5	0.3	*	trace	2.2	0.3	18.0	2.8	*
		P<0.01						P<0.05				

数値の下に細線：最小値、太線：最大値。*：ガラクトースの分析で一部に定量下限（脱脂試料に対して 1.2%相当量）未満のデータがあり、それをういた値のため参考値とした。trace：アラビノースの分析では、全試料においてピークは検出されたが、全て定量下限（脱脂試料に対して 1.2%相当量）未満であったため trace とした。

アルベン抽出物の含有割合は No.12（4.9%）を除き 3%前後（2.8~3.4%）であった（有意差なし）。アルカリ抽出物の含有割合は 26.2~30.9%であった（有意差なし）。アルカリ抽出においてはポリフェ

ノール類や低分子のリグニンなどが溶出するとされ、新生木部では多量となるとされる¹⁰⁾。酸不溶性リグニンの含有割合は21.1~25.2%、酸可溶性リグニンの含有割合は2.0~2.7%であった(いずれも $P < 0.05$)。グルカンの含有割合は35.8~43.0%であり、個体間で最大7%強の開きがあった($P < 0.05$)。キシランの含有割合は9.3~14.8%と個体間で最大5%強の開きがあった($P < 0.01$)。ガラクトサンの含有割合は多い個体でも2.0%であった。マンナンの含有割合は1.5~5.6%であった($P < 0.05$)。アラビナンは各個体に含まれるが、その量は他の多糖よりも少なかった。広葉樹に含まれるヘミセルロースについては、一般にグルクロノキシランが主体であり、その他グルコマンナンが含まれるとされる¹¹⁾。それを裏付けるかのように、各個体ともキシランの含有割合が高かった。未同定成分は13.1~21.2%含まれていた。ここに属する成分として、ポリフェノール類、配糖体、ヘミセルロース由来の酸性糖(グルクロン酸)やアセチル基、タンパク質、灰分などが想定される。

宮城県内で、挿し木1年後に台切りし、そこからの萌芽を1シーズン育てた後に収穫して化学組成を調査した事例がある⁴⁾。この事例では全木試料(樹皮を含む試料)が使用されているが、道内でも栽培が検討されているエゾノキヌヤナギ、オノエヤナギの成分含有割合に関しては、アルベン抽出物が2.7~4.0%、酸不溶性リグニンが26.2~31.4%、酸可溶性リグニンが0.88~1.01%、 α -セルロース(グルカンに相当)が36.9~40.2%と報告されている。この事例の試料が全木であるため、木部を使用した今回の結果と単純には比較できないが、おおまかに見ると両結果は類似していると言える。

今回の分析において、含有割合に関する個体間差が比較的大きかったのは、グルカンとキシランであった。個体間差が大きくなるほど成分育種(品種選抜)の可能性が高まることから、さらに分析数を増やし、個体間差がさらに広がるのか否かを見極める必要があると思われる。また、分析数が増えると化学的な分解操作を伴う手法では対応が追いつかなくなる可能性がある。そこで、例えば近赤外分光法のような分解操作を伴わない迅速な手法の導入についても検討が必要と考える。

4 参考文献

- 1) 北海道開発局開発調査課：北海道開発計画調査 北海道に適した新たなバイオマス資源の導入促進事業(平成20~22年度)の概要、2011。
- 2) 丸山 温：ヤナギ超短伐期栽培による新たなバイオマス資源の作出(研究プロジェクトの紹介)。北海道の林木育種 51(1), 26-27, 2008。
- 3) 矢野慶介, 福田陽子, 田村 明, 折橋 健, 安久津 久：バイオマス生産用ヤナギ類優良品種選抜の取り組み。北の国・森林づくり技術交流発表集 2011, 174-177, 2012。
- 4) 佐藤 茂：早生樹の栽培による高収量木質バイオマス生産—短伐期ヤナギ林適性種の選抜—。第39回木材の化学加工研究会シンポジウム講演集, 7-12, 2009。
- 5) 岸野正典, 折橋 健, 檜山 亮：短伐期収穫ヤナギを原料とするエタノールの製造実験(1)—グルコースへの変換率におよぼす構成成分の影響—。第60回日本木材学会大会講演要旨集, 2010, PP015。
- 6) Effland, M. J. : Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. *Tappi J.*, 60(10), 143-144, 1977。
- 7) 日本木材学会：木質科学実験マニュアル。文永堂出版, 東京, 2000。
- 8) Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. : Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. National Renewable Energy Laboratory, USA, 2008。
- 9) 柳井久江：4 Steps エクセル統計 第2版。オーエムエス出版, 埼玉, 2004。
- 10) 日本木材学会 化学編編集委員会：木材科学実験書 II。化学編, 中外産業調査会, 東京, 1985。
- 11) 城代 進, 鮫島一彦：木材科学講座 4 化学。海青社, 東京, 1993。

【付 記】本研究は、(独)森林総合研究所林木育種センターの育種交付金プロジェクト「バイオマスイエネルギー・化成品生産に向けたヤナギ類の優良品種の開発」の一環として実施した。

【謝 辞】本研究の分析では、中村正憲氏、吉田隆司氏にご尽力いただいた。記してお礼申し上げる。