

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580463

研究課題名(和文) 偏光による複屈折を用いた維管束組織の検出及び定量法の開発

研究課題名(英文) Detection and quantity of vascular bundles in oil palm trunk using cell wall birefringence on exposure to polarized light

研究代表者

村田 善則 (Murata, Yoshinori)

独立行政法人国際農林水産業研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：40322664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：オイルパームトランク(幹)の維管束は、細胞壁成分の偏光方向の違いから、複屈折を示す。一方、トランクのもう一つの成分である柔組織にはこの性質はない。偏光による複屈折の強度は、維管束の成分に依存する。それゆえ、画像解析装置を有する偏光顕微鏡を用いて容易に維管束を検出することができる。ここで述べるオイルパーム維管束の偏光による検出法は、X線回折や近赤外を用いた方法よりも、もっと単純に定量できる。オイルパームトランクの維管束と柔組織は、セルロース、ヘミセルロース、リグニン、そしてデンプンを含むが、柔組織のセルロース含量は、維管束のその約半分の量であった。

研究成果の概要(英文)：Vascular bundles (VBs) of oil palm trunks exhibited birefringence due to polarized orientation of their cell wall components, although another component of the trunks, parenchyma tissue (PT), did not. The intensity of the birefringence depended on the VB composition; therefore, it was possible to estimate the VB content readily using a polarizing microscope connected to an image analyzer. The method proposed in this manuscript should allow easier quantification of VBs in oil palm trunks than methods using X-ray diffraction. Both VBs and PT contained cellulose, hemicelluloses, lignin, and starch; however, the cellulose content of PT was less than half that of VBs. This difference in cellulose content between VB and PT may explain why VBs were detected under polarizing light.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学

キーワード：オイルパーム 維管束組織 柔組織 偏光 複屈折 セルロース

1. 研究開始当初の背景

パーム油はマレーシア、インドネシアを中心に年間約3,300万トン生産され、大豆油の生産量を抜いて世界最大の植物油脂資源である。オイルパームプランテーションは2007年にインドネシアで520万ha、マレーシアで420万haであり、今後も増える傾向にある(文献1)。オイル生産に伴ったプランテーションの拡大は、熱帯雨林の伐採を招くことから環境破壊として非難されている。オイルパームには経済的な寿命があり油脂生産の維持のため25-30年ごとに伐採され、このとき大量のトランクが廃棄される。パームトランクには70%以上の水分が含まれるため、強度も脆弱で乾燥後の縮み具合が大きいことから建築用材としては不向きである(文献1)。年間700万トンの廃棄トランクのうち90%以上が焼却処分され、大気汚染を引き起こしていることからパーム産業は、環境に悪い産業として非難されている。しかし、マレーシアにとってパームオイル産業は、輸入収入として80億ドル(2004年)を稼ぎだし、57万人の雇用を生み出している基幹産業であることから、環境との共存を模索することが最重要課題である。そのため廃棄パームトランクの焼却ではない有効な利用法が強く求められている。

2. 研究の目的

廃棄されるオイルパームトランク(幹)の柔組織は、高い吸水性を有することから新たな機能性素材としての開発が見込まれている。このため高品質の柔組織が必要とされるが、柔組織の純度について迅速に評価できる方法はない。我々はパーム維管束組織に偏光を複屈折する性質があることを見出した。偏光の屈折と画像解析との組み合わせにより柔組織中に混在する維管束を正確かつ迅速に検出・定量することができる。本研究ではこの知見に基づいた簡便な維管束の検出法を開発し、維管束が混在する柔組織の純度とその物性について明らかにする。

3. 研究の方法

オイルパームトランクより分離した維管束および柔組織より調整した標準サンプルについて偏光顕微鏡を用いた維管束の検出を行い柔組織の純度について検量線を作成する。標準サンプルの化学分析結果と偏光の結果を比較することで検量線の検定を行う。トランクより調整した純度未知の柔組織について標準曲線を用いた柔組織の評価を行う。柔組織の物性(多孔性)について明らかにし、柔組織サンプルの糖化を行い、糖化率と柔組織純度との関連性について明らかにする。

維管束結晶の複屈折により方向が変えられた光が偏光フィルタを通過できるので維管束は明るい画像としてとらえることがで

きる。一方、柔組織では複屈折がないため暗い画像となる。画像処理による維管束の面積から維管束の定量化を行う(図1)。

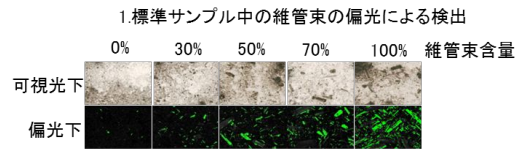


図1. 標準サンプル中の維管束の偏光による検出

4. 研究成果

簡易な維管束の検出法を開発するため、オイルパームトランクより柔組織と維管束をお互いに混合しないように注意深く分別し、高純度の柔組織および維管束組織サンプルを調整した。これらを一定の重量比で混合し、柔組織と維管束を一定の割合で含んだ標準サンプルを作成し、偏光による複屈折の強度から維管束組織を定量できるように標準曲線を作成した(図2)。

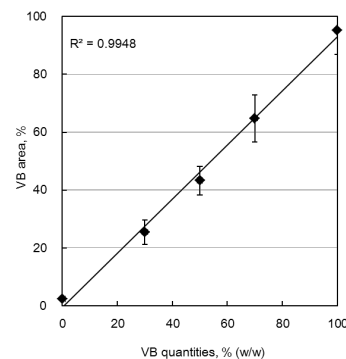


図2. 維管束量(VB content)とVBによる偏光の強度の割合(VB area, %)による標準曲線

維管束組織は、導管、師管、そして繊維からなる構造を有することから、偏光による複屈折が強くなる傾向がみられた。そこで、各標準サンプルのセルロース、ヘミセルロース、デンプンの成分分析を行った。維管束と柔組織(0%維管束)においては、各成分に違いがみられたが、その中でセルロースの量は、維管束で柔組織の2倍の差があった(表1)。

Table 1. Chemical composition¹ of the standards.

% VB ²	Extractive, ³ %	Lignin, %	a-Cellulose, ⁴ %	Hemicellulose, %	Starch, %	Total, %
100	4.9	15.0	45.9	31.4	6.0	103.1
70	5.8	15.8	35.5	36.9	8.8	102.7
50	6.2	16.3	35.2	34.4	8.8	100.8
30	6.0	19.2	30.1	36.1	12.8	104.2
0	6.7	19.9	22.4	38.4	16.5	103.9

表1. 標準サンプル中の化学成分含量

維管束でのセルロース含量が多いことから、その構造の違いによる偏光強度への影響

が考えられた。

そこで、偏光と各成分の相関係数を比較した。その結果、偏光が維管束のセルロース含量にきわめて高い相関を示した(表 2)。

	Polarization	Extract	Lignin	a-Cellulose*	Hemicellulose	Starch
Polarization	1.00	-0.94	-0.94	0.98	-0.81	-0.96
Extract	-0.94	1.00	0.77	-0.94	0.85	0.85
Lignin	-0.94	0.77	1.00	-0.92	0.74	0.97
a-Cellulose*	0.98	-0.94	-0.92	1.00	-0.92	-0.97
Hemicellulose	-0.81	0.85	0.74	-0.92	1.00	0.84
Starch	-0.96	0.85	0.97	-0.97	0.84	1.00

表 2 . 各成分と偏光の相関係数

維管束の細胞壁の構造が柔組織よりも成熟して分厚くなっていることから、偏光は細胞壁の二次構造に由来することを示すことができた。

また最近非破壊分析に使用されている近赤外 (NIR) によるサンプル中の維管束の定量と、X 線回析による定量を行い、それぞれの結果について検討した。サンプルとしては、維管束と柔組織を一定の割合で混合した標準サンプルを用いた。NIR による測定では、相関係数 0.97 を示す標準曲線が得られ、これより NIR によりサンプル中の維管束量を見積もることが可能であった。NIR の吸収スペクトルからは、4 つのピーク (1929nm, 2104nm, 2276nm, 2335nm) が同定されたが、各サンプルのデンプン含量がピークの高さに影響することから、NIR では維管束を見積もる際にデンプン量も考慮する必要があることが明らかになった。

X 線回析では、標準サンプルを Rigaku RINT-2550HF Xray generator のピンホールコリメータで測定した(40kV, 200mV)。X 線回析のパターンでは、シンチレーションカウンタを用いて求めた。5 つのピーク(15°、17°、22°、30°、35°)のうち、22.5°のピークが維管束量を明白に示していたことから、このピークの高さより維管束の量を求めた。その結果、相関係数 0.93 を示す標準曲線が得られ、ホロセルロースとの共分散が 0.99 という高い相関を示した(図 3)。

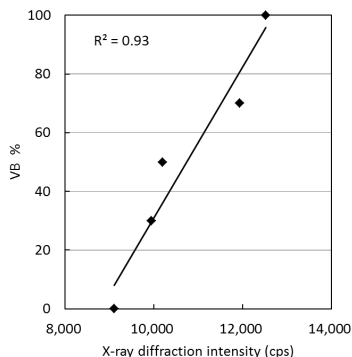


図 3 . X 線回析による標準曲線。

しかし、X 線回析による標準曲線では、相関係数 0.93 であったが、前述の近赤外を用いた維管束の検出法では、相関係数が 0.97 であ

り、偏光による維管束の検出では、相関係数が 0.99 であった。相関係数と分析に X 線回析装置を必要とすることから、X 線回析よりも、デンプンの影響を受けにくい点からも偏光法による維管束の定量法が、オイルパームサンプル中の維管束量を見積もるのに適していると判断した。

柔組織の多孔性について比表面積計 (SA-1100 型、柴田科学器械工業株式会社) を用いて、BET 法を用いて調べた。試料セルの一方(吸着容器)に試料(柔組織あるいは維管束)を入れて、他方(比較容器)は空のままとし、これを圧力センサーで読み取ることで、吸着した窒素量から表面積を見積もることができる。柔組織を用いて表面積を測定したところ、同じ重さの維管束に比べて柔組織の圧力が低くなった。これより柔組織は維管束よりも窒素の吸着が起きやすいことから、呪詛式の表面積が維管束のそれよりも大きいことが明らかになった。電子顕微鏡を用いて柔組織の構造を維管束と比較したところ、柔組織には無数の穴が空いており、そこにはデンプン粒が存在することも確認することができた。

柔組織および維管束の糖化および発酵を試みた。柔組織にはデンプン顆粒を含んでいることから、糖化の際には、先にデンプンだけを アミラーゼで糖化して分別後、繊維だけの柔組織を糖化するほうが、効率的に糖化できることが明らかになった。柔組織の表面積と糖化効率との関連については明らかにすることができなかった。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Abe H, Murata Y, (1 番目、2 番目他 5 名) (2013) Estimation of the Ratio of Vascular Bundles to Parenchyma Tissue in Oil Palm Trunks using NIR Spectroscopy. *Bioresources* 8(2): 1573-1581 (査読有)

Murata Y, Tanaka R, (1 番目、他 10 名) (2013) Development of sap squeezing systems from oil palm trunk. *Biomass and Bioenergy* 51 8-16 (査読有)

Waeonukul R, Kosugi A (Corresponding author、他 7 名) (2012) Efficient saccharification of ammonia soaked rice straw by combination of *Clostridium thermocellum* cellulosome and *Thermoanaerobacter brockii* β -glucosidase. *Bioresour Technol.*;107:352-7. (査読有)

〔学会発表〕(計 1件)

Yoshinori Murata, et al. Detection of vascular bundle in oil palm trunk by polarization microscopy.

日本農芸化学会 2012 年度大会(3月25日発表、京都、京都女子大)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田善則 (Murata Yoshinori)

(独)国際農林水産業研究センター、生物資源・利用領域)主任研究員

研究者番号：40322664

(2) 研究分担者

小杉昭彦 (Kosugi Akihiko)

(独)国際農林水産業研究センター、生物資源・利用領域)プロジェクトリーダー

研究者番号：70425544

(3) 連携研究者

安倍久 (Abe Hisashi)

(独)森林総合研究所、木材特性領域)主任研究員

研究者番号：80343812