

木材ヘミセルロースの吸湿に関する研究 (第1報)

ヘミセルロースの定義と構造

佐 道 健

TAKESI SADOH: Studies on the sorption of water vapour by wood hemicellulose. I. Definition and structure of hemicellulose.

要 約 本報においては、木材ヘミセルロースの吸湿に関する諸現象を解明するあたり、その動機、重要性について記述し、ついで既往の研究に基づいてヘミセルロースの定義および構造についての概略を記し、さらに吸湿性と関係のあるネットワーク構造について論じた。

本研究の一連の実験、測定に用いられた試料については、これが結晶性を示すネットワーク構造を有し、

乾燥状態と水溶液の間を可逆的に移行し、この際角質化現象の起らないことを確認した。

さらに、吸湿性研究に関連するヘミセルロースの構造、組成に関する問題点を挙げ、a) 木材中に存在する状態と単離した状態のヘミセルロースの関係、b) ヘミセルロースを単一の材料として取扱うるか、否か、c) 供試試片の作成法、のそれぞれについて考察を加えた。

緒 言

木材の吸湿に関する研究は、従来、主として吸着等温線、膨潤、吸着熱、および吸着および拡散速度に関して数多く行われている。しかし、木材の吸湿特性は最近まで、主として木材中に含まれるセルロースの吸湿特性によって支配されていると考えられており、また木材の吸湿に関する研究がセルロースの吸湿で得られた結果からの類推によつて発展したといつて過言ではない。このことは木材の吸湿に関する諸現象がセルロースのそれと非常に類似していること、量的にセルロースが木材を構成する物質の大半を占めること、およびセルロースは純粋な試料が得やすく、しかも構造も最近では詳細に亙つて知られており、工業的な立場からもセルロースの吸湿についての知識が非常に豊富であることに由来している。

このようにセルロースを重視する反面、木材のほぼ1/2を占める他の成分、すなわち、ヘミセルロース、リグニン、樹脂などがそれぞれ独自の吸湿特性を持っており、木材の種々の吸湿特性に影響を与えると考えられるにも拘らず、ほとんど注意がはらわれていなかった。

これらセルロース以外の木材成分のうち、化学構造がセルロースのそれに類似しており、しかもセルロースとことなつて非結晶構造をとると言われているヘミ

セルロースの吸湿および膨潤能力が、セルロースの吸湿および膨潤能力より大であり、木材の膨潤に関してヘミセルロースの存在が大きな役割を示すであろうとの推定が L. VORREITER (1954)¹⁾、R. O. H. RUNKEL (1954)²⁾、佐道・梶田 (1956)³⁾、W. KLAUDITZ (1957)⁴⁾らによつてなされた。一方パルプ、製紙の分野においては、近年ヘミセルロースが特に注目され、多くの研究者によつてヘミセルロースの存在がパルプの保水性、パルプ、紙のコロイド的性質に重要な役割を演ずることが報告されている^{5,6,7,8,9)}。

以上のような見地から、1956年頃より木材ヘミセルロースを含めて木材構成成分の吸湿性が系統的に研究され始めた。すなわち R. O. H. RUNKEL ら (1956)¹⁰⁾ は各成分の吸湿等温線の比較について、G. N. CHRISTENSEN, K. E. KELSEY (1958~)^{11,12,13)} は吸湿等温線、吸着熱の比較について研究を行つている。

筆者らもまたヘミセルロースの種々の吸湿特性、すなわち吸湿等温線、吸着熱、膨潤、吸湿速度、吸湿における履歴効果などについての一連の研究を行い、その一部は別の機会に報告した^{14~21)}。

本研究は、これらヘミセルロースの吸湿についての一連の研究のうち、主として吸湿平衡状態についての種々の現象について記述したものである。

本研究を行うにあたり、終始懇切なる御指導を賜つた京都大学農学部梶田教授に対して衷心より謝意を表

する。また多くの助言を頂いた京都大学農学部館教授、杉原教授、本学農学部中戸教授、また常に御援助を与えていただいた京都大学農学部梶田研究室、京都大学木材研究所の各位、農林省林業試験場原田技官、本学農学部重松助手に感謝の意を表す。

本報においては既往の研究に基いてヘミセルロースの定義および構造についての概略を記し、さらに吸湿性と関係のあるネットワーク構造について記した。

1. 木材を構成する成分^{22,23)}

木材を構成する主な成分はセルロース、リグニン、ヘミセルロースで、このほかに樹脂、灰分などを含んでいる。これらの量は樹種、個体、さらに同一個体にあつてもその個所によつて異なるが、ほぼ第1表に示すような値である。また、これらの成分の割合は細胞膜の中では次のような値を示す。セルロースは1次膜および2次膜の6~7割を占め、かつ内腔に向つてその割合を増加する。ヘミセルロースもまた1次膜、2次膜に存在するが、1次膜、2次膜外層に最も密に存在する。リグニンは主として細胞間層とその附近に集中し、この部分では殆んどリグニンのみからなつていると考えられている^{24,25)}。

もちろん、これらの成分はそれぞれ独立して存在しているのではなく、多かれ少なかれ相互に化学的に、または物理的に結合しているらしく、全体として、一種のコロイド系を形成している。

これら木材成分のうちヘミセルロースについてみれば、その定義は可成り漠然としていて、現在のところすべての見地からみて満足な定義を与えることは不可

能である。現在広く用いられている概念からすれば、ヘミセルロースとは次のような物質である。

木材はセルロース以外になお多数の多糖類を含んでいて、これらは水には不溶性であるが、大部分酸によつて分解され易く、また稀アルカリに溶解する。ヘミセルロースはこのような物質に与えられた名称である (E. SCHULZE, 1891)。しかし木材中にはこの他に稀酸で分解されず、稀アルカリにも溶解しない。セルロース以外の多糖類が見出されているので、木材中の非セルロース多糖類を総称して Holzpolyose (HUSEMANN, 1940) と呼ぶことがある。また、これらの物質は随伴炭水化物 (begleitende Kohlenhydrate; HESS, 1928) とも呼ばれる。これらはマンノース、キシロース、アラビノース、ガラクトースなどを構成単糖類とし、それらが鎖状に結合して多糖類を形成しており、それぞれの構成単糖類に応じて、マンナン、キシラン、アラボガラクトタンなどと呼ばれている。

このように木材ヘミセルロースは単一な物質ではなく、種々の多種類の混合物であるが、木材中に含まれる割合はほぼ一定しており、第1表に示すように、針葉樹ヘミセルロースは主としてマンナンおよびキシランよりなり、広葉樹ヘミセルロースは主としてキシランよりなる。また、ガラクトタンは *Larix* 属の材には特に著しく多量含まれるが、他の樹種においては極めて少量しか含まれない。*Larix* 属の材のガラクトタンはアラボガラクトタンであつて水溶性であり、他のヘミセルロースと特に異つた挙動を示す²⁶⁾。

また木材より単離したヘミセルロースを構成する多糖類の種類と量は抽出する条件によつて第2表に示すようにやや異なるが、これを構成する単糖類はほとん

Table 1 Chemical constituents of some Japanese woods²⁷⁾.

Species	Cellulose (%)	Hemicelluloses			Lignin (%)	Resin (%)	Ash (%)
		Pentosans (%)	Mannan (%)	Galactan (%)			
Coniferous tree							
Sugi	50~56	10~12	3~8	0.4~0.8	30~33	1.3~2.0	0.3~0.6
Momi	49~54	8~11	8	1	30~32	2	0.1~0.6
Hinoki	51~57	8~10	5~8	0.4~0.5	28~31	1.4~2.5	0.2~0.5
Karamtsu	47~54	6~11	5~7	1~8	21~30	2~5	0.2~0.5
Akamatsu	49~58	10~12	2~8	0.3~0.8	26~31	2~4	0.2~0.4
Broad-leaved tree							
Buna	51~58	21~26	—	0.2~1.5	18~24	1~4	0.3~1.0
Shina	48~55	19~21	—	0.1	20~27	3~5	0.4~0.5
Makanba	51~61	18~27	—	0.3~0.7	19~24	1~6	0.2~0.5
Mizunara	50~62	18~22	—	0.5~1.7	20~22	0.6~1	0.2~0.7
Keyaki	53	15	—	0.6	22	1.0	0.5
Katsura	58~60	25~27	—	0.6~0.9	23~24	1.0	0.5

Table 2 Chemical constituents of isolated hemicelluloses.

Species	Method of extraction*	Xylan (%)	Mannan (%)	Uronic anhyd. (%)	Ref.
Oak	4% NaOH, N	82.5~85.5	—	8.8~10.7	28
"	" A	52.2~82.0	—	12.0~17.2	"
Yamazakura	4% NaOH, N	86.5	—	6.8	27
"	" A	81.4	—	8.2	"
Buna	5% KOH, NA	81.0~84.4	—	8.9~10.9	16
Akamatsu	5% NaOH, NA	36.5	27.4	11.9	14
Karamatsu	" "	31.3	10.7	10.8	"

* N ; Precipitant by neutralization of alkaline extract with acid.

A ; Precipitant by addition of alcohol into supernatant liquid of N treatment.

NA ; Precipitant including both N and A.

ど、マンノース、キシロース、グルクロン酸に限られる。

2. ヘミセルロースの化学構造

ヘミセルロースを構成する各々の多糖類はおおむね単糖類が鎖状に結合した鎖状高分子である。アラボガラクトランは比較的分岐しているが、マンナン、キシランはあまり分岐していないことが、それぞれの稀薄溶液の挙動から明らかになっている¹⁴⁾。またキシランにはつねにグルクロン酸基を伴っていることが知られており^{14,22,23,27,28)}、その割合はモル比でキシロース基4~10個に対してグルクロン酸基1個を伴っている。

これらの化学構造はグルコースの鎖状結合よりなるセルロースと非常に似た構造をもち、それぞれ親水性のOH基をもっている。セルロースとヘミセルロースとが構造の点でとくに異っている点は、重合度および結晶性で、重合度はセルロースのそれが1000~5000またはそれ以上であるに対して、ヘミセルロースのそれがいずれの場合も100~200程度である^{14,29)}。またセルロース分子が結晶-非結晶両領域を貫らぬく、いわゆる房状ミセル構造を形成し、木材中では明らかにフィブリルを形成しているに対して、ヘミセルロースは木材中では非結晶でセルロース・フィブリル間隙を充填しているものと考えられている。さらに木材中であつてはリグニンと化学的に結合しており、セルロースとも可成り強固な結合をしていることが知られている^{30,31)}。

これに対して木材より単離した場合には、可成り単純な組成を示し、広葉樹の場合には主としてウロン酸基を含むキシラン、針葉樹ではこれにマンナンが加わっている。これは一般に結晶性を示さず、ただ試料の調整の方法によつては結晶構造をとりうるということが認められている。

3. ヘミセルロースのネットワーク構造

セルロースについては吸湿性と関係ある構造が単にその化学構造だけでなく、分子相互の結合によつて形成される結晶-非結晶構造のようなネットワーク構造にもあることは、既往の研究によつて明らかとなつている³²⁾。ヘミセルロースの構造に関しても、同様に単に化学構造だけでなく、ネットワーク構造が吸湿性の密接な関係にあることが推察される。

木材中におけるヘミセルロース分子相互間にごどのような結合が存在するか、すなわちヘミセルロース分子によつて形成されているネットワーク構造については明らかでない。しかし、単離したヘミセルロースについてはその構造についての2, 3の研究がみられる。K. HESS, M. LÜDTKE³³⁾はFichte 亜硫酸パルプから得たマンナンについてX線的に結晶構造をもつことを明らかにした。A. P. YUNDT³⁴⁾、今村³⁵⁾は広葉樹ヘミセルロース(キシラン)が試料の作成方法によつてはX線的に結晶構造をもちうることを報告している。

以下、本研究において主として用いられたブナ・ヘミセルロースのネットワーク構造について述べる。

1. 試 料

今村によつて報告された方法³⁵⁾にしたがつて試料を調製した。すなわち、40~60メッシュのブナ(*Fagus crenata* BLUME)の木粉をWISE法³⁶⁾で脱リグニンし、得られたホロセルロースを20倍量の5%苛性カリ水溶液を用いて室温、水素気流中で3時間抽出した。ついで抽出液を酢酸で中和し、3倍量のメタノールを加えてヘミセルロースを沈澱させた。これを遠心分離し、沈澱を80%メタノールで数回洗滌した。さらに純メタノールで脱水し、ついでメタノールをエーテルで置換した。このエーテル湿潤ヘミセルロースを熱水中

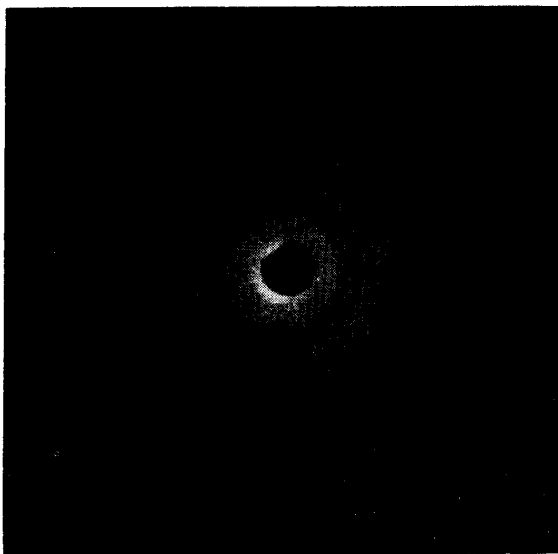


Fig. 1 X-ray diffraction diagram of hemicellulose isolated from Buna wood (*Fagus crenata* BLUME).

に投入し、溶解させた*。得られたヘミセルロース水溶液を濃縮し、ゼリー状となつたものをガラス板上に塗布し、90~100°Cで乾燥した。このようにし得られた試料は透明な膜状を呈する。試料の重合度は10%苛性カリを溶媒とした粘度法²⁹⁾で測定した結果110であつた。

2. X線廻折図

上述の試料を気乾状態で DEBYE 法によつてX線廻折に附した。得られた廻折図を第1図に示す。本廻折図は明らかな Debye-Scherrer 環を示し、X線的に結晶構造を有することが明らかである。

3. ヘミセルロースのネットワーク構造

以上の結果が示すように、本試料は明らかに配列のよいネットワーク構造をもつ。しかし同様に広葉樹ヘミセルロースであつても、常法で得られた粉末試料ではX線的に結晶構造が認められないことが知られている。このようにヘミセルロースの構造に関してはなお多くの問題を含んでいるが、ここでは触れず、結晶構造を持つ場合について述べる。

ヘミセルロースが枝分れの少ない鎖状分子であることは、その希薄溶液の挙動から知られている¹⁴⁾。したがつてネットワークを形成する場合は1次結合による3次元ネットワークを形成することなく、分子鎖間は2次結合によつていられるものと思われる。勿論この2次結合の強さは結合個所によつて異なるだろうが、結晶構造を持つ以上その強さは比較的均一であるに違いない。また、これらの2次結合はヘミセルロースがセル

ロースと同様の化学構造であることから、水酸基が主役を演じているものと思われる。

4. 吸湿性研究に関連するヘミセルロースの構造の問題点

以上のべたようにヘミセルロースは原木の樹種により、また単離方法によつて量比の異なる2, 3の多糖類の混合物である。ヘミセルロースの吸湿について研究を行うに際しては、この問題に関連して次の諸点についてあらかじめ考慮する必要がある。すなわち、a) 木材中に存在する状態と単離した状態のヘミセルロースの関係、b) ヘミセルロースを単一の材料として取扱うるか否か、c) 供試試片の作成法である。つきにこれらの諸点について考察を加える。

1. 木材中に存在する状態と単離した状態のヘミセルロースの関係

ヘミセルロースの吸湿性が単離した状態と木材中にある状態とで差異が認められるか否かの問題は、いまだ充分明らかにされていない。この関係を明らかにするためにはヘミセルロース含量を異にする多数の木材試料について種々の吸湿性を明らかにし、これらの結果をヘミセルロース含量との関係を検討し、これと単離したヘミセルロースを用いて検討した吸湿挙動とを比較考察すればよい。しかし前者においては、木材中にはヘミセルロース以外に吸湿性に影響をおよぼす因子が多数存在するので、これらを棄却して純粋にヘミセルロースの特性を抽出することが困難である。また前述のようにヘミセルロースが木材中において他の成分と相互に何らかの結合をしていることが推定されているので、吸湿性に関してもこれらの知見がさらに明らかになつてはじめて充分な解析が可能となる。したがつて本研究ではヘミセルロースの吸湿に関する研究の一段階として、主として、その構造の比較的明らかな、単離ヘミセルロースについて検討した。

2. 単一物質としてのヘミセルロース

ヘミセルロースを構成する個々の多糖類がそれぞれ著しくことなつた吸湿挙動を示すならば、ヘミセルロースを単一の物質として取扱うるかについては問題がある。この点に関してヘミセルロースを構成する各多糖類の構造より推定を試みた。

吸湿挙動を支配する因子を主として水分子を吸着する吸着点の数および水分子との結合エネルギーであり、膨潤を伴う場合には吸着媒を構成する分子相互のネットワーク構造であることが既往の多くの物質の吸湿研究によつて知られるところである。

* 常法によるヘミセルロース試料の作成では、このエーテル湿潤ヘミセルロースを風乾して粉末状試料をうる。

すでに述べたように木材中においてヘミセルロースに属するものはマンナン、キシラン、アラボガラクトンであり、木材より単離したものについてはマンナンおよびキシランである。それゆえここではマンナンとキシランの差およびキシラン中に含まれるウロン酸の量比のばらつきが問題となる。

吸着点に関してキシランとマンナンの差は主として吸着点となる $-OH$ 基の数である。セルロースの吸湿でしられているように $-OH$ 基が吸着点として作用する場合、その数（セルロースの場合は非結晶領域量）の多少は各関係湿度における吸湿量の相対的増大または減少として現れることがしられている。この点は重量当り吸着点数を異にするマンナン、キシランについても同様のことが推定できる。キシラン中のウロン酸の量比は、ウロン酸が $-COOH$ 基を持つ点で考慮されるべきである。 $-OH$ 基と $-COOH$ 基のそれぞれが水分子を吸着する際の結合エネルギーの差は明らかでない。しかしいずれも水素結合であるから特にかけるなれた差異を示すものとは思われない。またヘミセルロース中のウロン酸基の含量は第2表に示すように著しく変化するものではない。

つぎにネットワーク構造に関しては、すでに述べたように針葉樹マンナンおよび広葉樹キシランはいずれも結晶構造をとりうることから、可成り配列のよいネットワーク構造をとりうることを示す。しかしヘミセルロースは角質化しないかぎり、水に可溶である³⁶⁾から分子鎖間の結合が弱く、この点セルロースの場合と本質的に異なり、ヘミセルロースの特徴を示す点であると思われる。

以上述べたように、ヘミセルロースの吸湿性を取扱う場合には当然個々の多糖類について考慮を払うべきであるが、これは本質的な問題ではなく、個々の多糖類の量による吸湿性の差異は結晶性の異なる各種のセルロース間、または構成成分の異なる木材間のそれに相当するものであると推定される。

3. 供試試料の調製

ヘミセルロースのような膠質状物質においては、試料作成時、乾燥時における2次的な物理的変化がその吸湿性に著しい影響をおよぼすに違いない。G. N. CHRISTENSEN らはユーカリ・ヘミセルロースの吸湿に関して、常法によつて得られたヘミセルロース粉末状試料では乾燥時に角質化を生じ、再現性が得られないことを報告している¹¹⁾。

したがって吸湿性の研究においては、このような欠点のない再現性のある試料が望まれる。この点3.で示した方法で作成した試料は乾燥状態、吸湿状態、水溶液の相互の間を可逆的に移行でき、その構造およ

び吸湿挙動に再現性が認められる。また膜状であるため、ヘミセルロース中の水分子の移動の研究に適している。ただし、本試料においても試料の履歴効果は存在するから¹⁸⁾、試料をあらかじめ充分コンディショニングする必要がある。

本研究において上述の諸点に関して充分考慮を払い論を進めた。

引用文献

- 1) VORREITER, L. (1954): Holz als Roh- u. Werkst. **12**, 223.
- 2) RUNKEL, R. O. H. (1954): Holz als Roh- u. Werkst. **12**, 226.
- 3) 佐道 健・梶田 茂 (1956): 木材学会誌, **2**, 73.
- 4) KLAUDITZ, W. (1957): Holzforsch. **11**, 110.
- 5) ALGAR, W. H., GIERTZ, H. W. & GUSTAFSSON, A. M. (1951): Svensk Papp-tidn. **54**, 335.
- 6) JAYME, G. (1947): Svensk Papp-tidn. **50**, 117.
- 7) 今村力造 (1952): 繊維学会誌, **8**, 539.
- 8) WASTON, A. J., STEWART, C. M. & DADSWELL, H. E. (1956): Tappi, **39**, 318.
- 9) COTTRALL, L. E. (1950): Tappi, **33**, 471.
- 10) RUNKEL, R. O. H. u. LÜTHGENS, M. (1956): Holz als Roh- u. Werkst. **14**, 424.
- 11) CHRISTENSEN, G. N. & KELSEY, K. E. (1958): Aust. J. Appl. Sci. **9**, 265.
- 12) CHRISTENSEN, G. N. u. KELSEY, K. E. (1959): Holz als Roh- u. Werkst. **17**, 189.
- 13) KELSEY, K. E. & CHRISTENSEN, G. N. (1959): Aust. J. Appl. Sci. **10**, 269.
- 14) 佐道 健 (1955): 京都大学修士論文.
- 15) 佐道 健・梶田 茂 (1956): 木材学会誌, **2**, 237.
- 16) 佐道 健・梶田 茂 (1957): 木材学会誌, **3**, 100.
- 17) 佐道 健・山中 寛・梶田 茂 (1958): 木材学会誌, **4**, 146.
- 18) 佐道 健 (1959): 木材学会誌, **5**, 218.
- 19) 佐道 健 (1959): 京府大学報・農, **11**, 114.
- 20) 佐道 健 (1960): 木材学会誌, **6**, 45.
- 21) 佐道 健: 木材学会誌 (投稿中).
- 22) NIKITIN, N. I. (1955): Die Chemie des Holzes.
- 23) WISE, L. E. & JAHN, E. C. (1952): Wood Chemistry, 2nd ed.
- 24) ASUNMAA, S. & LANGE, P. W. (1954): Svensk Papp-tidn, **57**, 501.
- 25) LANGE, P. W. (1954): Svensk Papp-tidn. **57**,

- 525.
- 26) WHITE, E. V. (1941) : J. Am. Chem. Soc. **63**, 2871.
- 27) 館 勇・山森 昇 (1950) : 木材研究, No. 4, 1, 11.
- 28) O'DWYER, M. H. (1939, 1940) : Biochem. J. **33**, 713; **34**, 149.
- 29) TOMPSON, J. O. & WISE, L. E. (1952) : Tappi, **35**, 331.
- 30) 川村一次・樋口隆昌 (1951, 1952, 1953) : 繊維学会誌, **7**, 269 ; **8**, 335, 442 ; **9**, 9, 157.
- 31) MEREWETHER, J. W. T. (1957) : Holzforsch. **11**, 65.
- 32) OTT, E., SPURLIN, H. M. & GRAFFLIN, M. W. (1954) : Cellulose and Cellulose Derivatives I, 231, 393.
- 33) HESS, K. u. LÜDTHE, M. (1928) : Ann. **466**, 18.
- 34) YUNDT, A. P. (1951) : Tappi, **34**, 94.
- 35) 今村力造 (1952) : 繊維学会誌, **8**, 445.
- 36) WISE, L. E., MURPHY, M. & D'ADDIECO, A. A. (1946) : Paper Trade J. **122**, 35.
- 37) 農林省林業試験場 (1958) : 木材工業ハンドブック, 166.
- 38) 今村力造 (1956) : 紙パ技協誌, **10**, 518.

Summary

Preface

The sorption of water by wood has been studied for many years on sorption isotherm, swelling, heat of sorption, and rate of sorption and diffusion. Most of these investigations have been discussed on wood itself or in connection with cellulose contained in wood. Little attention has been paid to the sorptive natures of wood hemicellulose, although the high sorptive capacity is inferred by reason of the chemical and morphological structures, namely having the hygrophilic -OH groups, probably amorphous structure in wood and so on. In this study the some sorptive behaviours of water vapour by wood hemicellulose are investigated.

Part 1

In this report the definitions and structures of wood hemicellulose are described in accordance with previous investigations, and the network structures of it are discussed in relation of sorptive and swelling characters. To obtain a knowledge of network structures of hemicellulose the X-ray diffraction diagram of it is given. Hemicellulose films, which are prepared from Buna wood (*Fagus crenata* BLUME) by delignification with WISE'S method, extraction with 5% KOH aq. solution, precipitation with acidic alcohol, replacements of the liquids with alcohol and successively ether, dissolution into hot water, and drying on a glass

plate, are used in the experiment. The X-ray diffraction diagram is shown in Fig. 1, and the diagram shows that the hemicellulose can take a well-orientated network structure. And the specimens are water soluble and change between filmy solid and aqueous solution reversibly without hordification (see part IV of this study).

Hemicellulose is a mixture of several polysaccharides whose ratios differ with different species of original wood and with different methods of isolation, and has some colloidal natures. Thus it is concluded that to investigate on sorption of water vapour by wood hemicellulose man must pay attention to following subjects :

a) Natural and isolated hemicelluloses. The sorptive behaviours will be effected by chemical and physical changes in hemicellulose during isolation.

b) Hemicellulose as a simple material. The characters of individual polysaccharides must be considered in this case, but it is assumed that the different sorptive natures of hemicellulose with different ratios of compositions will be similar to them of wood with different ratios of components.

c) Preparation of specimens. The specimens are required to give reproducible results. The physical changes during experiments *i.e.* hordification, must be kept off, and the conditioned specimens must be used.