バイオ技術による木材のパルプ化と漂白

松 本 雄 二

1. はじめに

紙パルプ産業は巨大なバイオマス産業でありその原料を植物資源に大きく依存している以上、バイオテクノロジーがこの産業の未来において決定的に重要な役割を果たすことはまちがいない。例えば、優良林木の育種のために、古くから行われてきた従来型の育種技術に加えて、細胞融合、細胞の大量培養技術などが応用されるようになってきた。最近では遺伝子組換え技術の応用も試みられており、リグニンの生合成系に手を加えてリグニン構造を変える、あるいはリグニン量を抑制することによって、パルプ化が容易で高品質の繊維を与える樹木を創り出そうという試みが世界的に行われている。得られた形質転換体がうまく樹木として再生し、それがパルプ化材として適正かどうかを判断できるようになるまでには長い期間が必要となる。その判断の方法自体がまた研究対象になるほどであり、地道な努力が今後も続けられるだろう。

ところで最近、原料問題以外でもパルプの製造工程に直接かわる分野で生物学的方法を応用することが盛んに試みられている。その方法の多くは、パルプの生産工程に酵素処理あるいは微生物処理を組み込むというものであり現代的な意味でのバイオテクノロジーとは言えないかも知れない。しかし100%を化学薬品に頼っていた工程に酵素あるいは菌処理など微生物学的過程を組み込む可能性をまじめに研究するようになったこと自体が、この分野における研究の歴史では画期をなすことであり、世の中のバイオテクノロジーの隆盛と無関係ではない。その背景には、有機塩素化合物の排出に象徴される環境問題をクリアするために、パルプ製造工程（特に漂白工程）の抜本的変革が必要とされているというこ

とがある。本年の6月に京都で紙パルプ産業におけるバイオテクノロジーに関する第5回国際会議が開催された。この会議は1980年に第1回が行われて以来3年毎に開催地を変えて行われているものである。京大の木質科学研究所がリグニンの微生物分解の研究で世界的な中心地の一つであることから、この会議が京都で開催されるのは2度目である。この一連の会議では当初はリグニンの微生物分解機構など基礎的研究の発表が中心となっていたが、次第に微生物を用いたパルプ化（バイオパルピング）・漂白（バイオブリーチング）・排水処理など、応用的分野での発表も充実してきた。それにとまって、わが国でもこの分野での微生物学的方法に対する紙パルプ産業以外からの関心も最近とみに高まっているように感じられる。

微生物学的方法を蒸解あるいは漂白工程と組み合わせるためには、微生物あるいは酵素によって引き起こされる反応と、化学的 engineering での反応が合理的に組み合わせる必要がある。例えば、酸素アルカリによる反応と、フェノール性芳香核を環解裂するジオキシゲナーゼ酵素の反応を組み合わせようと努力することは、合理的とはいえないだろう。なぜならば、後者の反応は前者の反応のうちに含まれているからである。本稿では、このような観点から微生物学的方法と蒸解、漂白工程の関わりについて考えてみたい。なお昨年、紙パルプ技術協会誌にこの分野の研究文献を紹介する総説を書いており¹⁾、一年間でそれほど劇的な変化はないので、この分野の研究の現状について文献的知識を得たい場合にはそちらも参照して戴きたい。また、紙パルプ産業が抱える問題点とそれを克服する上でのバイオ技術の可能性について、山陽国策パルプの小林晃夫氏が幅広く論じられているのでそちらもぜひ参照されたい²⁾。最初に述べた林木育種に関

Production of Bleach Pulp from Wood by Biological Treatment

筆者紹介 YUI MATSUMOTO

Wood Chemistry Laboratory, Department of Forest Products, Faculty of Agriculture, the University of Tokyo

東京大学農学部林産学科 木材化学研究室 助手、農学博士

筆者はリグニン化学を専門とされる。著書に「オゾン利用の新技術」（分担執筆，三秀書房，近刊予定）。趣味は音楽，ドライブ。

本稿では、木材のパルプ化と漂白に微生物学的方法を応用する試みについて解説いただいた。

わるバイオテクノロジーの最近の進歩については東京農工大の川合氏らによる解説を参照されたい³⁾。

2. 漂白と微生物学的方法の組合せ

化学パルプ製造の場合、蒸解（パルプ化の反応）の後に漂白が必要とされるのは、蒸解の段階では脱リグニンがある程度で止めざるを得ないからである。蒸解の理想は、リグニンのみを分解、溶出させることである。ところが、蒸解がある限度以上にまで進めると脱リグニン速度が遅くなりそれに比べて相対的にセルロースの崩壊の程度が大きくなる、すなわち脱リグニンの選択性が失われる。脱リグニン速度が遅くなる理由は、(1)リグニンと多糖類の間にパルプ化反応に対して安定な結合が存在する、(2)解裂して脱リグニンに寄与する β -aryl ether 結合の量が蒸解の進行とともに少なくなる、とりわけ解裂の容易な erythro 型の割合が減少する、(3)アルカリによっては解裂しない縮合型構造が蒸解の進行とともに増える、(4)蒸解反応に曝されにくいリグニンが部分的に存在する、等が挙げられる。(1)から(3)は化学的な理由、(4)は物理的な理由と言える。

2.1 多糖分解酵素の利用

さて漂白過程での生物学的方法として現在盛んに研究されているのが、多糖類分解酵素による処理を行うことによって漂白工程での脱リグニンを促進させるというものである。これによって、酵素処理の前後でリグニン含有量が大きく低下するといほど明白な脱リグニンがおこるわけではなく、したがってパルプ収率も大きく低下することはないが、漂白に用いられる塩素系薬品量を削減することができる。漂白過程での塩素の使用に世界的に厳しい目が向けられつつあったので、この研究がフィンランドの Viikari⁴⁾らによって発表されると多くの注目を集めた。当初は多糖類分解酵素としては種々の活性も持つヘミセルラーゼが用いられていたが、次第に、広葉樹でも針葉樹でもキシラナーゼが効果を有することが明らかになってきた。現在では世界の多くの酵素生産会社、より高温、より広い pH 範囲で活性を持つキシラナーゼの供給にしのぎを削っている。pH が 10 ほどのアルカリ領域、温度 80℃ で活性なキシラナーゼがすでに発表されている。塩素を用いない漂白工程にキシラナーゼ処理を組み入れる方法は日本でも、国外でもすでに実用化の段階にある⁵⁾。それでは、キシラナーゼ処理の効果は、どのようにして生じるのだろうか。

化学的に考えた場合キシラナーゼ処理は、上に記した漂白が必要とされる理由のうち(1)に着目した処理だといえる。すなわち、多糖類を分解することによってそれに結合しているリグニンを除き易くするというものであ

る。ヘミセルロースにもいろいろな種類があるにもかかわらず、なぜ特にキシランが脱リグニンの阻害に関与しているのか、という疑問に対しては現在の所積極的な回答はない。リグニン・多糖結合体 (LCC) の生成について現在多くの研究者によって支持されている機構によると、リグニンとキシランの間に化学結合が生じる可能性は、他のヘミセルロースに比べて高いわけではない。しかし実験事実として、種々の単離過程を経て調製されたリグニン試料中に除ききれないキシランが存在するというデータは多数提出されている。例えば、昨年のリグニンシンポジウムだけでも 3 件の発表があった⁶⁾。キシランとリグニンの間の結合が樹木中にもともと存在するのか、あるいは蒸解過程も含めた、リグニンの単離過程で二次的に生じるのかは今のところ不明である。蒸解過程で糖とリグニンの間に二次的な結合が生じ得ることを示したモデル実験もいくつかある。

キシラナーゼ処理の効果は、物理的なもの（上記の理由の(4)）であるという考えもある。例えば、蒸解末期にパルプ中に再吸着されるというキシランの関与を示す次のようなおもしろい実験もある。Kantelinen らは、パッチ式と蒸解液をフローさせる形式の 2 種類の蒸解釜でパルプを製造し、それぞれキシラナーゼ処理の効果を調べたところ、キシランの再吸着が可能なパッチ式の釜で得たパルプには漂白効果が認められたが、キシランの再吸着が防止される蒸解液フロー式の釜で得たパルプには明白な効果が認められなかった⁷⁾。キシランが再吸着されるためには分岐側鎖、置換基が失われるなど形が整っていることが必要になるので、リグニンとの結合（が仮に存在したとしても）を残したまま、再吸着することは考えにくい。そこで、再吸着したキシランにリグニンが結合しているためではなく、再吸着する際に繊維表面を覆うために繊維中に残存するリグニングが脱リグニンし難くなり、そこにキシラナーゼの働き場所が生じる、と考えられる。材中のキシランは通常多くの置換基を持つものにも関わらず、未置換の直鎖状キシランを分解する Endo- β -xylanase のみで十分な漂白効果があることを示した最近の Viikari の結果は、再吸着キシランの関与を一層強く示唆している⁸⁾。

2.2 リグニン分解系の利用

脱リグニンにキシラナーゼを用いると言うのはいわば間接的方法と言えるが、直接的方法であるリグニン分解系の利用は残念ながら今のところ基礎的研究の段階にある。木材を腐朽させる微生物の中にはリグニンの分解をよく行う白色腐朽菌と総称される菌があり、そのリグニン分解系を用いる研究が主である。生菌、酵素、人工酵素という各レベルで研究が行われている。生菌を用いた

場合実際にパルプが漂白され得ることは既にカワラタケを用いた実験で確認されている⁹⁾。わが国でも、脱リグニンに優れた菌 IZU-154株を用いて示されている¹⁰⁾。またリグニンを分解する酵素ではないかとして発見以来10年近くも全世界で精力的に研究されてきているリグニンペルオキシダーゼの活性中心に似た構造を持つ人工酵素を用いた実験でも、多くの研究者によってリグニンの分解¹¹⁾、あるいは脱リグニン反応が起きることは確認されている¹²⁾。しかし、生菌あるいは人工酵素系での成功は基礎的研究として重要であるが、実際の漂白過程には馴染まないと考えられる。生菌の場合、パルプへの菌糸の混入という厄介な問題がある上処理時間が長期にわたる。人工酵素の場合、酵素の使用に期待される最も大きな利点であるところの基質特異性が失われる。先に記したように、漂白過程ではできる限り多糖類を分解せずにリグニンのみを分解する反応選択性が求められるだけに、この点は無視できない。したがって、酵素自体の利用が望まれるのだが、今のところ、リグニンの分解に関与すると考えられているリグニンペルオキシダーゼ、マンガン依存性ペルオキシターゼ、ラッカーゼなどを漂白に用いる実験はうまくいっていない。成功したという報告、特許などもあるのだが追試してみると、その通りにはいかない。

生菌でうまくいく過程であるから単離酵素によってもうまくいくとは限らないのは当然である。例えば、炭水化物からエタノールを得る過程は、その一つ一つの過程がほぼ完ぺきに酵素的に明らかにされているが、エタノールを得るにはやはり、発酵という生菌を用いる方法がベストである。しかし漂白に必要とされるリグニン分解反応はそれほど複雑ではない。個々の漂白段階に即して反応を組み立てれば、酵素を用いるという道も開けると考えられる。パルプが漂白されるためにはリグニンにどのような変化が起きなければならないか、また、酵素によってリグニンにどのような変化を起こすことを期待するのか、という点を一つ一つ詰めながら合理的に化学試薬との組み合わせを考えれば、可能性は多いにある。例えば、ラッカーゼの反応と酸素脱リグニンの反応を比べた場合、両者とも遊離のフェノール性水酸基を持つ芳香核ユニットに限定された反応であり（酸素脱リグニンの場合カルボニル基隣接の活性メチレンからの反応もあるが）、フェノキシラジカルを生成するのが最初の反応である。それではなぜ酸素では脱リグニンし、ラッカーゼではうまくリグニンが分解しないのか。酸素脱リグニンの過程では、酸素分圧が高いため生じたラジカルが酸素と結びつく確率が高くなる、つまりリグニンラジカル同志が縮合して脱リグニンを阻害する確率が減る。こう考

えると、酸素圧を高めた条件でのラッカーゼ処理に可能性があるように思えてくる。また、酸素脱リグニンに限界が生じるのは酸素と反応し得るリグニン中のフェノール性水酸基が反応し尽くすためだと考えられる。そうだとすると、メトキシル基を脱メチルして新たにフェノール性水酸基を生じるモノオキシゲナーゼ類の酵素を利用すれば酸素に対してリグニンを再び活性化し得ると考えられるのではないか。リグニン側鎖 α 位のカルボニル基を水酸基に、あるいは水酸基をメチレン基に変えれば芳香核と酸素との反応性が大きく高まるが、その目的で、バクテリアのリグニン分解系の中に存在する側鎖 α 位のデヒドロゲナーゼ類の酵素を利用できないか。側鎖二重結合部分の解裂を行うことを目的として、バクテリアのリグニン分解系に存在することが知られているリグノスチルベンジオキシゲナーゼ¹³⁾で、漂白の第一段階を行えないか。これらは、実はうまくいかない、いわゆる“単なるアイディア”かも知れない。しかし漂白過程は、反応の選択性が求められる過程なので、必ず酵素が有効に働き得るものと、筆者は確信している。漂白とは多少異なるが、高収率パルプの色戻りの抑制に微生物処理を応用しようという橋らの試みは、ここに記したような意味の合理性を感じられる¹⁴⁾。

3 パルプ化と微生物学的方法の組み合わせ

リグニンを分解する白色腐朽菌でチップを処理すると従来よりも容易にパルプ化が行えるのではないかと、いうのがバイオパルピングである。究極的には、微生物処理だけでパルプを得るというのが理想だが、そこまではなかなか望めない。微生物処理したチップから化学パルプを作るバイオ化学パルプ化と機械パルプを作るバイオメカニカルパルプ化の二つに大別することができ、両者ともすでに全世界で20年近い研究の歴史がある。すぐにも実用化への道が開かれるような状況には残念ながら至っていないが、学問的には興味深いいくつかの結果が得られている。

バイオ化学パルプ化の場合、菌処理に期待されたものはリグニンの分解であるから、多糖類の分解をできる限り押さえることが重要なポイントであった。実際には菌処理の過程で多糖類の分解も相当に進む。リグニン分解活性が高いといわれる菌で処理した場合でも脱リグニンが殆ど進行せずに多糖類ばかり分解されることがあるほどである。したがって菌処理チップから得た化学パルプは一般に、収率が低く強度的にも弱い。リグニンの変化に基づくものと思われるが、白色度も低くなる傾向にある。セルラーゼ活性を欠く変異株を用いた実験でも、得られた化学パルプの収率は菌処理をしていないブランク

試料に比べて低い。それはセルロースの分解を押さえてもヘミセルロースの分解を押さえることができないからである。菌処理中に培地にグルコースを添加すると多糖類の分解をある程度押さえて脱リグニンを進めることができる。このようにして得たチップのパルプ化でさえ、パルプ収率は同一脱リグニン度で比較して最高数%増えたに過ぎない。しかも菌処理によるチップ重量の減少も少なくないと推察されるのでそれを換算すると、実際の収率増はごく僅かであろう。

このように見てくると、既存のパルプ化法を前提とする限り、その前処理としての菌によるチップの脱リグニンには、意味があまりないように思われてくる。というのは、既存のパルプ化法では脱リグニンは困難な過程ではない、すなわち、菌処理による助けを必要としていないのである。困難なのは、多糖類の損失をいかに少なくするかということである。もし完全に選択的な脱リグニンが可能になれば、計算上ではパルプ収率は70~80%になるが、実際には50%以下である。このような収率低下が起きるのは、ヘミセルロースの大規模な溶出とピーリング反応による。既存のパルプ化法、すなわちアルカリ系での蒸解反応を前提としながらこれらを押さえるにはどうしたら良いか。ヘミセルロースの溶出を押さえるには、より低温、低アルカリ度で脱リグニンを行う必要がありピーリング反応を押さえるには、多糖類の還元末端を酸化あるいは還元してアルドースでなくする必要がある。これらを微生物による処理に期待できないだろうか。これはすでに飯塚らによって試みられているが、今のところうまくいっていない。しかし可能性が組み尽くされているわけではない。あるいは、菌による前処理を前提として、より温和な条件での蒸解法の確立を試みられないだろうか。何も菌処理の後に既存のクラフト法でパルプを作り評価する必要はない。菌処理によって組織を軟化することは可能なことから、菌処理に求めるものを脱リグニンに限定せずに、種々の効果を各種の蒸解法について検定してみるべきであろう。

機械パルプ化の場合、リグニン分解菌による前処理によって製造エネルギーを削減することが目的になる。最近の集中的な研究の結果¹⁵⁾ 菌による前処理の効果は、脱リグニンそのものよりも組織の軟化によることが明らかにされた。脱リグニンの効果を期待して多くの白色腐朽菌が調べられたわけだが、効果の源が、他のファクターにあったという点がおもしろい。これによって得られた繊維の特徴は、よくフィブリル化し羊毛状でしなやかで、かさ高く比較的長さが揃っているなど、化学パルプに似た特徴を有しているという。

4. おわりに

漂白、蒸解反応に微生物学的方法を応用する試みについて簡単にみてきた。これらの試みは現段階ではハイテクノロジーと言えるようなものではないかも知れない。単に木材を腐朽させるという形での微生物学的脱リグニンはそのままでは、パルプ化にも漂白にも使えそうもないことは明らかになったといえる。しかし、今まで化学的工程の一本槍で来たところに生物学的方法を取り入れる機運が高まりつつあることは高く評価されるべきことである。より一層腐朽のメカニズムを明らかにするとともに化学的工程との合理的な組み合わせを追求すれば、必ず生物学的方法はパルプ生産の場で、将来のハイテクノロジーたる可能性を持っていると私は考えている。

文 献

- 1) 桃原郁夫、松本雄二：『パルプ化工程における生物学的プロセスの適用』紙パ技協誌，45 (12)，1297~1315 (1991)
- 2) 小林晃夫：紙パルプ技術タイムス連載『バイオテクノロジー入門 紙パルプ産業における可能性(1)~(10)』1987年3月号~1988年3月号
- 3) 川合伸也 他：紙パ技協誌，46 (3)，403~418 (1992)
- 4) L. Viikari et al: Proceedings of Third International Symposium on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Stockholm, (1986), 67-69
- 5) Pulp and Paper International : 1992 (3)，50~52
- 6) 松本雄二：『第36回リグニン討論会の概要』紙パ技協誌，46 (8)，981~985 (1992)
- 7) A. Kantelinen et al: Proceedings of 6th ISWPC, vol. 1, 493-500 (1991)
- 8) L. Viikari et al: Proceedings of 5th International Symposium on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Kyoto, (1992), 4
- 9) M. Paice et al: *Tappi J.*, 72 (5), 217-221 (1989)
- 10) K. Fujita et al: Proceedings of 6th ISWPC, vol. 1, 475-480 (1991)
- 11) T. Habe et al: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1323, (1985)
- 12) B. Pettersson et al: *Nordic Pulp Paper Res. J.*, 198-202 (1988)
- 13) N. Habu et al: *Mokuzaigakkaishi*, 35, 26-29 (1989)
- 14) 橘ら：第42回日本木材学会大会要旨集 (名古屋)，310, (1992)
- 15) G. Leatham et al: *Tappi J.*, 73 (5), 197-200, (1990)
(平成4年9月25日受理)