靱皮繊維の生化学パルプ化機構について

工業技術院四国工業技術試験所 小林 良生, 田辺 寛之

Mechanistic Investigations on Biochemical Pulping of Bast Fibers

Yoshinari Kobayashi and Hiroyuki Tanabe

Government Industrial Research Institute, Shikoku

Mechanistic investigations on biochemical pulping of bast fibers were overviewed from viewpoints of biochemical properties of enzymes causing maceration and solubilized components.

The pulping using pectinolytic enzymes secreted by *Erwinia carotovora* was found to proceed by maceration as the result of concerted reaction of *endo*-pectate lyase (*endo*-PATE) and *endo*-pectin lyase (*endo*-PNTE). The *endo*-PATE was composed of 4 kinds, or sometime 2 kinds, of pI-isozyme, depending on the strains used. The optimal constitution ratio of *endo*-PATE to *endo*-PNTE was approximately 30 : 1.

Both in alkaline presoaking and enzymatic pulping, lignin-carbohydrate complexes with molecular weight of 20,000-25,000 were found to be eluted.

As to aggregation between pectic substance and LCC, *endo*-PATE yielded the elution of LCC rich in L-arabinose and D-galactose, while *endo*-PNTE produced that mainly composed of D-xylose in the pulping of mitsumata (*Edgeworthia papyrifera* Sieb. et Zucc.). This result was commented in relation with biosynthesis process of hemicellulose.

Keywords : Bast fibers, Biochemical pulping, Mechanism, Maceration, Pectinolytic enzymes, *Erwinia carotovora*

1. はじめに

植物原料から生化学的反応で繊維を解繊・抽出するプロセスをバイオケミカルパルプ化, 又は生化学パルプ化 (biochemical pulping) と呼び, これには微生物の増殖に伴って起るバイオリジカルパルプ化 (biological pulping) と酵素によるパルプ化 (enzymatic pulping) とが含まれる¹⁾²⁾。

バイオリジカルパルプ化は植物組織の腐朽, 腐敗と極めて密接な関連性を持っている。パルプ原料が木材, すなわちグリノセルロース系資源の場合には, 担子菌, 特に白色腐朽菌が中心であり, そのなかでも *Phanerochaete chrysosporium* (*Sporotorichum purpureolum*), *Coriolus hirsutus*, *Corpinus cinereus* が広く取

上げられている³⁾。非木材, 特に靱皮繊維を中心とするペクトセルロース資源の場合のバイオリジカルパルプ化は, 発酵精練又は腐化精練 (retting) との呼称で, 種々の糸状菌, 細菌が提案されている⁴⁾⁵⁾⁶⁾。ここで注意しなければならないことは, バイオリジカルパルプ化に関与している腐朽菌は, いずれも死物寄生菌であるということである。

筆者らは, 靱皮繊維の生化学パルプ化の研究過程で繊維植物の植物病の病徴がバイオリジカルパルプ化現象に極めて類似性があることに着目し, 桑枝, コウゾなどの軟腐病の病原細菌である *Erwinia carotovora* を取上げて研究してきた⁷⁾。つまり, 活物寄生菌を生化学パルプ化に応用してきた点に特徴がある。

一般的にいて, 植物の柔組織病を起す細菌にはべ

クチン分解能を持つものが多い。しかし、植物に対する病原性とペクチン分解性とは必ずしも一致していず、まして、パルプ化能との関係は明かでなかった。

本稿では、*E. carotovora* の生産するペクチン分解酵素系による生化学パルプ化における機構的考察を植物病原性と関連づけて考察してみたい。

2. マセレーションと生化学パルプ化の差異

植物病理学をはじめ農芸化学の分野で広く使用されている術語の一つにマセレーション (maceration) がある。「解離」、「離解」、「単離」あるいは「分散」と訳されている。筆者らは、本稿のような場合には「軟化」との訳が適していると思う。ペクチンを多量に含んだ植物柔組織を構成している細胞間結合を弱めて単一細胞に分離する処理のことであり、細胞壁あるいは中間層のペクチン質のゲルをゾル化する現象である。この処理には機械的、超音波、酸、アルカリ、キレート化剤、あるいはペクチン分解酵素などが使用されている。

木材化学、製紙科学の分野でマーセリゼーション (マーセル化, marcerization) というよく発音の似た術語があるが、これは全く別概念である。因みに、マーセル化とは、セルロース繊維を 17-18% の苛性ソーダ液に浸漬し、アルカリセルロースを生成する操作であり、シルケット加工の方法である。

ところで、パルプ化というのは、単に細胞間を埋める中間層のみならず、一次壁、二次壁のセルロース繊維膠着物も化学的又は機械的に解離させてセルロース繊維を単一の繊維として抽出することである。マセレーションと対比してみると分るように、パルプ化の場合には細胞壁の崩壊を伴う。従って、パルプ化はマセレーションよりも植物組織の崩壊が一步進んだ状態であるということが出来る⁴⁾。ただ、便宜的にはほぼ同一の意味で使用している傾向があり、本稿でもそれに準じている。

3. 生化学パルプ化機構研究の端緒

古くは、マセレーションを起す酵素として、プロトペクチナーゼ (protopectinase) という酵素が存在すると考えられていた。この酵素は不溶性のプロトペクチンを可溶性のペクチンに転換する酵素である。また、これとは別にマセレーション酵素 (maceration enzyme 又は macerating enzyme) という特殊な酵素系があるという仮説も存在した⁸⁾⁹⁾。しかし、現在ではかかる特殊な酵素の存在を考える必要はないとされている。マセレーションの主要な役割をしている酵素はペ

クチン分解酵素系のうちで、ペクチンの主鎖、 α -1, 4-グリコシド結合をランダムに切断する酵素、すなわち *endo*-ポリガラクトクロナーゼ (*endo*-polygalacturonase, 略して *endo*-PG と記す) 又は *endo*-ペクチン酸リアーゼ (*endo*-pectate lyase 又は *endo*-pectate *trans*-eliminase, ここでは *endo*-PATE と略記) ないし *endo*-ペクチンリアーゼ (*endo*-pectin lyase 又は *endo*-pectin *trans*-eliminase, *endo*-PNTE と略記) であるとされた。

Erwinia 属細菌の場合、主要なペクチン分解酵素は *endo*-PATE であり、まず生化学パルプ化に適した同属細菌のクリーニングの目的で、国内外の軟腐病研究者から集めた 72 株の *Erwinia* 属細菌 (*E. carotovora* 62 株; *E. chrysanthemi* 9 株; *E. herbicola* 1 株) について、標準培養法を定めて培養し、*endo*-PATE の分泌量と不飽和ガラクトクロン酸量又は結束繊維率との相関性を求めた¹⁰⁾。その 1 例を図 1 に示す。*endo*-PATE の生成量と結束繊維率との相関性は認められるものの大きなバラツキがあり、かつ、*E. carotovora* と比較すると *E. chrysanthemi* が同一 *endo*-PATE 量でも極端に解離率が低いことが分かる。

これらの結果を説明する機構として、筆者は植物病理学のマセレーション機構の諸説を整理して 3 つの仮説を立てた。第 1 は、*E. chrysanthemi* が生成する

Fig.1 Relationship between PAL productivity of *E. carotovora* and *E. chrysanthemi* strains and defibration rate in enzymatic pulping of kozo bast.

----- *E. carotovora*

----- *E. chrysanthemi*

× □ Pulping by a constant volume

○ □ Pulping by a constant PAL unit

endo-PATE は靱皮繊維のパルプ化には活性の低いイソ酵素であるという考え方である。Garibaldi ら¹¹⁾によると同じ PATE でもニンジン、ジャガイモ、キウリの組織を容易にマセレーションするもの、ニンジンにはマセレーションの作用が弱いジャガイモとキウリには強いもの、3つの植物組織に対して全くマセレーション作用のないものがあると報告がある。類例は *Coniothyrium diplodiella*, *Botrytis cinerea*, *Clostridium felsineum* などにもみられる。主鎖を分解するペクチン分解酵素にイソ酵素が存在し、そのなかにはマセレーション活性を持たないものも存在するという考え方である⁹⁾。

第2の説は石井¹²⁾が *Aspergillus japonicus* で提唱しているマセレーション因子という説である。それ自身はマセレーション作用を持たない蛋白質で、*endo*-PG や *endo*-PATE と共存するとジャガイモなどをマセレーションする作用がある。このマセレーションを相補する因子をマセレーション因子と名付けている。この因子はペクチン、ペクチン酸、アラビナン、ガラクトン、キシラン、蛋白質などの分解能はなく、あるのはセルロース分解性のみであるが、それも微弱である。このように、主鎖を切断する *endo*-PG, *endo*-PATE の働きとそれ等を強化する非酵素的な因子との合奏作用という考え方である。

第3の説は *endo*-PG, *endo*-PATE を補強するものは中性糖やウロン酸を放出するある種のヘミセルラーゼであるとするものである。これらの考え方は Bateman ら¹³⁾、あるいは Wood¹⁴⁾によって提唱されているが、特に具体的な例示があるわけではない。植物柔組織の成分組成からの推測である。

このような諸説に関連し、*E. carotovora* の生産する酵素による靱皮繊維の酵素パルプ化においてはどのよ

うな機構で進行しているのであろうか。

4. イソ酵素とマセレーション因子の探索

4.1 ペクチン酸リアーゼの pI-イソ酵素

E. carotovora FERM P-7579 の生産する *endo*-PATE をイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、等電点電気泳動で精製を試みたところ、同じペクチン酸リアーゼ活性を有する4種類の酵素に単離された¹⁵⁾。その基本的性質は表1のようであるが、それを正確にはイソ酵素であるとは出来ない。イソ酵素と同定されるためには、①本質的に同一の触媒反応を行う酵素が2種以上あり、②蛋白質の一次構造が異なり、かつ、③異なる遺伝子によって決定されていなければならないからである。ここでは、②及び③の研究が十分になされていなかったため、等電点の相違なる同一触媒反応活性のある酵素として、pI-イソ酵素と命名している。注目される特性は、等電点が10.0-10.9と極めて高く、かつ、至適pHも9.3~9.7とアルカリ側にあることである。*endo*-PATE は糸状菌、例えば *A. japonicus* では至適pHは酸性側にある¹²⁾ことと対比すると興味がある。

endo-PATE は細菌から生産されるものは好アルカリ性酵素なのである。これらのpI-イソ酵素はマセレーション活性では差異はなく、第1の説は否定的となった。

また、同じ *E. carotovora* でも菌株が異なれば、pI-イソ酵素の分布が異なることが明らかにされた¹⁶⁾。同属同種の FERM P-7576 株は、図2のようにpI-イソ酵素は2種であり、一遺伝子・一酵素説に従えば、この菌株は前述の FERM P-7579 株のpI-イソ酵素を生産する遺伝子が部分的に欠如していたり、あるいは欠陥を持っていると考えられる。

Table 1 Fundamental Properties of *endo*-PATE pI-Isozymes

PATE pI-isozyme	I	II	III	IV
Molecular weight	28,000	31,000	28,000	33,000
Isoelectric point	10.0	10.6	10.3	10.9
Optimum pH	9.7	9.3	9.7	9.5
Optimum Ca ²⁺ (mM)	0.6	0.5	0.6	0.6
k _m (wt%)	0.054	0.050	0.052	0.055
V _{max} (mmol mg ⁻¹ min ⁻¹)	0.70	0.69	0.78	0.80
Comparison ratio ^a	3.77	3.95	3.60	3.90

^a Comparison ratio = $\frac{\Delta \text{fluidity (1}/\eta_{sp})/\text{time}}{\Delta \mu \text{ mol reducing groups/time}}$

Fig.2 Chromatography of Crude Enzyme from FERM P-7576 on CM-Sephacryl CL-6B. The crude enzyme (480.5 mg as protein) was applied on a column of CM-Sephacryl CL-6B (column size : 1.6×30 cm), previously equilibrated with 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0). The charged column was developed with a gradient of 0.5 M NaCl in the same buffer at a flow rate of 20 ml/hr. —, O. D.₂₈₀ ----, PATE activity.

4.2 マセレーション因子

endo-PATE 以外にパルプ化に関与する要因が存在することは、*endo*-PATE とパルプ中の結束繊維率とが十分な相関が得られないことから明らかである。そのうち、マセレーション活性に差異のある *endo*-PATE のイソ酵素ではないことが解明された。そこで *endo*-PATE 以外のマセレーション活性を持つ蛋白質の分離を試みた。

精製手段としては、カチオン交換クロマトグラフィー、DEAE-セファローズ CL-6B 及びセファクリル S-200 のカラム、更に焦点電気泳動を 2 回行って、マセレーション活性を持つ単一の蛋白質を分離した¹⁷⁾。このものは Link ペクチンをトランス脱離する以外は特別の触媒反応を示さないことから、*endo*-PNTE と同定された。単離された *endo*-PNTE の特性は表 2 に示す通りである。これによって、*E. carotovora* はマセレーション活性を持つ 2 種のペクチン分解酵素、*endo*-PATE 及び *endo*-PNTE を同時に分泌することが明らかにされた。その酵素活性の比率は 34 : 1 であった。

高橋らの研究^{18),19)}によると、マイトマイシン C などの抗生物質のように DNA 合成を阻害するようなもの

Table 2 Fundamental Properties of *endo*-PNTE Spontaneously Secreted by *E. carotovora* FERM P-7576

Molecular weight	39,000
pI	8.2
Optimal pH	9.3
K _m (wt%)	0.045
V _{max} (mmol mg ⁻¹ min ⁻¹)	1.08
Comparison ratio	4.15

を共存させて培養すると、*E. carotovora* は *endo*-PATE の生産から *endo*-PNTE の生産に切替える。この研究に基づいて、露無ら²⁰⁾ は同菌が *endo*-PATE と *endo*-PNTE の両ペクチン分解酵素を生産するのは、培養に用いる植物組織のなかに DNA 合成阻害物質が存在しているからではないかという仮説を提示した。同菌株から *endo*-PNTE の生産が DNA 合成阻害物質に起因するとすれば、筆者らの研究時に *endo*-PNTE が単離されたのは培地に用いた炭素源がシトラスペクチンであり、そのなかにかかる阻害物質が存在していたと考えられるのである。しかし、炭素源として合成品であるグリセロールを用いても *endo*-PNTE は、その混合比率は低下しているものの、明らかに生成を見る。従って、*endo*-PNTE の生産をすべて DNA 合成阻害要因に帰するという考え方²⁰⁾ とは矛盾があり今後更に研究を行う必要があると思われる。

ところで、生化学パルプ化が *endo*-PATE と *endo*-PNTE の合奏反応として起るとすると、この両者の混合割合に最適混合割合があるに違いない。これら 2 種の pI-イソ酵素は一まとめにして、両者の最適の混合比率を生化学パルプ化のパラメータを基準に測定した²¹⁾。その結果は図 3 に示すように、*endo*-PATE : *endo*-PNTE は 30 : 1 のところに極大値があることが明らかにされた。この研究結果から 2 つの結論を導くことができる。第 1 には、生化学パルプ化、あるいはマセレーションは主として *endo*-PATE が主役を演じているということである。第 2 にはペクチンを炭素源とした培養のときに得られた混合比は最適混合比率に近い値となっているということができることである。つまり、通常の混合比は、最も大きいマセレーション効果を持つという摂理に注目しなければならないのである。

この 2 種類のペクチン分解酵素系でマセレーションが遂行されると説明した場合、図 1 に示したように、*E. chrysanthemi* では *endo*-PATE を基準とした時に

Fig.3 Optimal Constitution of PATE and PNTE for Maceration of Caustic Soda-pres soaked Mitsumata Bast.

Caustic soda (1% NaOH)-pres soaked mitsumata bast (20 g, dry weight) was pulped with the crude enzyme produced by *E. carotovora* FERM P-7576 with (□, △, ● and ▲) or without (■, ▲, ● and ▼) the addition of mitomycin C. Simultaneously the same procedure was performed with the purified enzyme composite of *endo*-PATE and *endo*-PNTE at an appropriate mixing ratio (□, △, ○ and ▽). The total enzyme activity of *endo*-PATE and *endo*-PNTE in each enzyme preparation was adjusted to 800 units. The enzyme reaction was performed in 200 ml of 0.1 M NH_4OH - NH_4Cl buffer (pH 9.5) with rotary shaking at 30°C for 6 hr.

マセレーション作用が低下している¹⁰⁾のは何故かという疑問が生まれる。そこで、同種の *endo*-PNTE を検討してみると、*E. carotovora* のそれと異なり、pI は酸性側にあることが分った²²⁾。しかもこの *endo*-PNTE は *E. carotovora* のそれと比較するとマセレーション活性も劣る。*E. carotovora* では *endo*-PATE は通常 Ca^{2+} などの金属イオンの添加でペクチン分解性は向上する¹⁵⁾ のであるが、プロトペクチンを対象としたときは殆んど添加効果はなく、逆に負の効果を持つ²³⁾。そのことは *E. chrysanthemi* の精製 *endo*-PATE の場合も同様である²²⁾。しかしながら、この系の *endo*-PNTE は Ca^{2+} の添加効果はマセレーションで著しく正の効果を示した。これらの実験効果から、*E. chrysanthemi* の *endo*-PNTE はカルボキシル基等の負イオンの多い蛋白質であり、ペクチン質と

静電反撥などで相互作用が起り難いのではないかと考えられる。 Ca^{2+} などの正電荷を持つイオンの添加は、それらを中和し相互接近、相互作用が起りやすい環境を整える役割を果しているのではないかと推定される。つまり、*E. chrysanthemi* のマセレーション活性が低い理由は、補助作用をしている *endo*-PNTE の機能が低いことによるものであり、それを *E. carotovora* の *endo*-PATE と置換すれば活性は *E. carotovora* 並みになるのである²²⁾。これらの結果は、*endo*-PNTE はマセレーションの補助機能ではあるが、良好な活性を示すには極めて重要な役割を持っているといえる。

以上の結果から、ペクトセルロース系から成る靱皮繊維のマセレーションにおいては、*endo*-PATE と *endo*-PNTE が合奏的に作用していることを明らかにした。

そこで、もう一度、本研究の出発点になったペクチン分解酵素の活性と解繊率との相関性を調べてみた。マセレーションに関与しているペクチン分解酵素は、*endo*-PATE と *endo*-PNTE であるから、この両者の和をパラメータとして、解繊率をプロットすると図4の

Fig.4 Relationship between defibration activity and total lyase activity of crude enzyme from *Erwinia* strains. Defibration activities of crude enzymes produced by 10-arbitrary strains of *Erwinia* spp. toward mitsumata bast were given as a function of the sum activity of *endo*-PATE and *endo*-PNTE of each crude enzyme. The data were displayed in a group.

ようになり、ほぼ直線的に近い関係に修正されることが分った²⁴⁾。

4.3 菌体外へのペクチン分解酵素の分泌性

同じ *E. carotovora* に属しながら、マセレーション因子となる *endo*-PATE 及び *endo*-PNTE を生産する能力にかなり差があることが明らかにされている。この差異を生じている原因は2つ考えられる。第1は生産性そのものが不活発、つまり菌株の活動性が低いこと、第2には生産性そのものは高いのであるが菌体外への放出性が低いこと、換言すれば細胞壁を構成する層を透過できないことである。後者においては、菌体内酵素の蓄積は高いと考えられるのである。

ペクチン分解酵素の細菌細胞内での生成機構は Slack らの説²⁵⁾ に従えば、図5のようである。更に細分すれば細胞壁のどの部分が通過のボトルネックになっているかである。*E. carotovora* はグラム陰性菌に属するが、この菌群の細胞壁は3層から成立っている。内膜、その外側にあるペプチドグリカン層（すなわち、ペリプラズム）及び最外部の外膜である。筆者らの研究結果では、分泌性の低い菌株は、*endo*-PATE がペリプラズムの部分を通過できず、内部に蓄積されていることが分った²⁶⁾。この層に存在する酵素をペリプラズム酵素と呼ぶが、一般に加水分解型の酵素が多い。この種の酵素は浸透圧ショックなどで菌体外に取出せることが知られているが、*endo*-PATE については未検討である。

5. 繊維マトリックスの分解機序

5.1 アルカリ前浸漬に伴う効果

靱皮中のペクチンは、①靱皮繊維束とそれを取り巻く柔軟組織との間、②柔軟組織中で細胞の間に中間層として、③靱皮維管束中で繊維の間に中間層として、それぞれ存在している²⁷⁾ といわれている。このうち、①及び②のペクチンは弱アルカリで除去できるが、③はペクチン質がリグニン化して抵抗性が強く、溶解するのは難しいといわれている。

筆者らは、酵素パル化に先立って、アルカリ前浸漬が効果的であることを明らかにした²⁸⁾。その効果としては、上記の①及び②のような弱アルカリ溶出成分の除去及び繊維マトリックスの膨潤効果であると推定されるが、詳細な理由は明らかにされていなかった。

そこで、アルカリ前浸漬により何が除去され、繊維原料側にはどんな成分が存在しているのかを分析してみた²⁹⁾。その結果を図6に示す。水、0.1% NaOH、1.0% NaOH 及びこれら希薄アルカリ水溶液に浸漬後、*endo*-PATE と *endo*-PNTE の混合系で処理した結果をまとめたものである。注目されることは、アルカリ前浸漬やそれと併用して酵素処理することでリグニン成分が溶出して³⁰⁾、繊維中のリグニン、特に可溶性リグニンが低減しているという現象である²⁹⁾。そこで、ここで溶出されているリグニン成分をゲル濾過及び疎水クロマトグラフィーで分析を試みた。ゲル濾過では

Fig.5 Schematic interaction of plant cell wall and pectinolytic enzymes from *E. carotovora*

PD : pectate depolymerase

(後藤正夫著「新植物細菌病学」から引用)

Fig.6 Solubility behaviors of fiber components in presoaking and in enzymatic pulping.

A, B 及び C の 3 成分に分離し, 分子量はそれぞれ 25,000, 20,000-25,000 及び 20,000-25,000 ダルトンと推定され, 更に疎水クロマトグラフィーでは B, C はそれぞれ 2 成分に分離した。これらのリグニン成分は表 3 のように中性糖が結合されている。従って, このリグニン成分はリグニン・多糖結合体 (lignin-carbohydrate complex, 以下 LCC と略称) で溶出されてくることが明らかにされた。靱皮部は木化があまり進んでいず, 比較的低分子の LCC が溶出されることは大変興味あることである。また, ペクチン質のマトリックスを分解すれば, リグニンも除去されるという定性的な結果が明確に裏付けられた。

Table 3 Carbohydrate composition of LCC fractions

LCC	Neutral sugars ^{a)} (%)						Molecular weight
	Ara	Gal	Rha	Xyl	Glu	Man	
A-1	64.1	33.2	1.1	0.9	0.4	0.3	25,000
B-1	65.8	31.5	0.9	1.0	0.5	0.3	25,000
B-2	24.0	14.0	0.4	60.4	0.6	0.6	20,000
C-1	68.8	28.4	0.8	1.1	0.5	0.4	25,000
C-2	19.7	8.4	0.2	71.5	0.1	0.1	20,000

a) Ara : L-arabinose Gal : D-galactose
Rha : L-rhamnose Xyl : D-xylose
Glu : D-glucose Man : D-mannose

同時に, 繊維マトリックスがアルカリ液によって膨潤するという定性的な性質も, 図 7 のように Scallan らの方法で定量性を持たせることができた。アルカリ環境下で, 膨潤した繊維マトリックスに *endo*-PATE 及び *endo*-PNTE が入り込み, マセレーションを行うわけであるが, そのアクセシビリティは高く, パルプ化の速度が大きいという結果が裏打ちされたわけである。

5.2. ペクチン質は LCC との会合性

靱皮繊維中でリグニン質は LCC の形で存在してい

Fig.7 Effect of presoaking on inaccessible water amount of bast fibers.

● : water presoaking
▲ : 0.1%-NaOH presoaking
■ : 1.0%-NaOH presoaking

ることが明らかになったが、ペクチン質とはどのような関係にあるかは明らかでない。そこで、生化学パルプ化過程でペクチン質、リグニン質(すなわち、LCC)の溶質がどのように変化するかをミツマタ白皮で追跡した³¹⁾。ゲル濾過で経時的に追跡すると、12時間の反応でペクチン成分と LCC 成分がほぼゲル濾過で分離できることが分った。そこで、酵素パルプ化を精製した *endo*-PATE のみで行い、そこで生成してきたペクチン質と LCC をゲル濾過、アニオン交換樹脂、フェニルセファロースの疎水クロマトグラフィーで分離した。その時の成分を LCC では A-2-1、ペクチン質では A-1-1 及び A-3-1 と名づけた。同様に *endo*-PNTE のみで酵素パルプ化した溶出成分中、LCC は N-2-2、ペクチン質は N-1-1、N-3-1 と記号をつけた。これらの成分中の中性糖を分析して見ると、表 4 のようになった。結果をみると *endo*-PATE で溶出してくる LCC の中性糖は L-アラビノースと D-ガラクトースが主体でその構成は 2:1 であり、それ以外の糖は殆んど含まれていない。他方 *endo*-PNTE で溶出してくる LCC の中性糖は D-キシロースが 70% を占め、残りを L-アラビノースと D-ガラクトースが分けあっている。この傾向はペクチン質のなかの中性糖の構成でも類似の傾向を持っている。

この実験結果はヘミセルロースの生合成過程³²⁾と重畳させると極めて重要な推測がなされる。細胞壁のヘミセルロースの分布については完全に一致してはいないが、細胞壁形成の初期では中間層 (M) と一次壁 (P) で L-アラビノースと D-ガラクトースを多く含む多糖が堆積される。この中間層及び一次壁の形成過程ではウリジン-5'-二リン酸 (UDP) -グルクロン酸から

エピメラーゼにより UDP-ガラクトン酸が生じ、シンターゼによりペクチンが生成するとされている。*endo*-PATE で分解されて溶出してくるのは、構成糖の組成からみるとこの画分に由来するのではないかと推定させる。二次壁 ($S_1 + S_2 + S_3$) のヘミセルロースの堆積は一次壁が形成がなされてから行われるのであるが、これは UDP-グルクロン酸の脱炭酸によって生成する UDP-キシロースからキシランを生成するシンターゼによって行われる。このシンターゼは二次壁の肥厚が始まると活性化し、逆にペクチン合成酵素の活性は急速に低下するのである。つまり、二次壁にはキシランが多く堆積しているのである。*endo*-PNTE で分解されて溶出してくるものは、この画分に由来しているように思える。この推測が正しいものとすれば、M+P 層に堆積するペクチン質はエステル化度が低く、S 層に堆積されるそれは高度にエステル化されていることを予測させる。これらの推測の正否は今後の研究に待たねばならない。

5.3 キシランマトリックスの分解処理

キシラン成分は二次壁に堆積し、この画分の分解はペクチン分解酵素のみでは必ずしも十分でないかもしれない。逆にキシラナーゼで予じめこのキシラン成分を分解させれば、生化学パルプ化は高度に進行すると推定される。そこで、予じめキシラナーゼでミツマタ白皮を処理した後、ペクチン分解酵素でパルプ化すると、パルプ化は顕著に促進されることが明らかにされた³³⁾。キシラナーゼは *E. carotovora* も生産しており、従って、pH を微酸性～中性に保持すれば起源の異なるキシラナーゼを添加しなくても作用させることができる。留意すべきことは、キシラナーゼのみでは全く

Table 4 Carbohydrate composition of enzymatically eluted LCCs and pectic fragments

Fraction	Neutral sugars ^{a)} (%)						Molecular weight (×10 ³)
	Ara	Gal	Rha	Xyl	Glu	Man	
(LCC)							
A-2-1	63.4	33.8	1.0	1.1	0.3	0.4	25
N-2-1	67.8	30.7	0.6	0.8	0.5	0.6	25
N-2-2	18.6	17.9	0.5	72.3	0.4	0.3	20
(Pectic fragment)							
A-1-1	63.4	25.5	9.4	1.7	0	0	≥100
A-3-1	62.4	26.2	9.9	1.5	0	0	8
N-1-1	14.0	18.4	8.7	68.9	0	0	≥100
N-3-1	13.7	8.9	6.1	74.3	0	0	10

a) Ara: L-arabinose Gal: D-galactose Rha: L-rhamnose
 Xyl: D-xylose Glu: D-glucose Man: D-mannose

マセレーション効果は認められない点である。

6. おわりに

靱皮繊維の生化学パルプ化について、主として機構的な面について筆者らの研究成果を中心に概説した。この機構解明の端緒は、*endo*-PATEの活性と解繊率との関係が分散して、一次の関係が得られなかったことにある。小さな疑問をもって、解明を加えていくうちに、マセレーションの機構の本質に触れるような成果となり、それは植物病、特に軟腐病の発生機序にも示唆的な成果となったと思われる。今後のバイオテクノロジーの進展は、この分野の研究にも大きく寄与するものと考えられる。

引用文献

- 1) 小林良生；紙パ技協誌，37 (1)，40 (1983)
- 2) 小林良生；“バイオ新素材”，pp.267-273 (1987) シー・エム・シー社（東京）
- 3) 西田篤実；繊維学会誌，43 (8)，P-313 (1987)
- 4) 小林良生；繊維学会誌，33 (1)，P-317 (1977)
- 5) 中浜敏雄；“繊維原料の醗酵精練に関する基礎的研究とその工業化”(京都府立大農学部応用菌学研究室) (1965)
- 6) 朝井勇宣，斉藤日向；醗酵協会誌，10，22 (1951)
- 7) 工業技術院四国工業技術試験所編，“重要地域技術研究開発，非木材資源の生化学パルプ化技術”，pp.4-53 (1987)，工業技術院総務部計画課・四国工業技術試験所
- 8) J. J. Doesburg；“*Pectic Substances in Fresh and Preserved Fruits and Vegetables*”，pp.74-75，(1965) Institute for Research on Storage and Processing of Horticultural Produce, Wageningen, The Netherlands.
- 9) 梶 明；化学と生物，40，409 (1966)
- 10) 小林良生，小前幸三，田辺寛之，松尾隆吉；
 - a) “A Comment on Maceration Mechanism in Enzymatic Pulping of Bast Fiber by Alkalophilic Pectinolytic Enzymes Produced by Genus *Erwinia*”，Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, London, September 12-14, (1983) pp.79-88.
 - b) Biotechnology Advances, 投稿中.
- 11) A. Garibaldi and D. F. Bateman；*Physiol. Plant Pathol.*, 1, 25 (1971)
- 12) S. Ishii and K. Kiho；*Phytopathol.*, 66, 1077. (1976)
- 13) a) D. F. Bateman, R. L. Millar；*Ann. Rev. Phytopathol.*, 4, 119 (1966)
- b) D. F. Bateman；*Neth. J. Plant Pathol.*, 14 (Suppl. 1)，67 (1968)
- 14) R. K. S. Wood；*Ann. Rev. Phytopathol.* 11. 299 (1960)
- 15) 田辺寛之，小林良生，松尾雄志，西 望，和田文雄；*Agric. Biol. Chem.*, 48 (8)，2113 (1984)
- 16) 田辺寛之，松尾隆吉，小林良生；*Agric. Biol. Chem.*, 49 (12)，3595 (1985)
- 17) 田辺寛之，小林良生；*Agric. Biol. Chem.*, 50(11)，2779 (1986)
- 18) S. Kamimiya, K. Izaki and H. Takahashi；*Agric. Biol. Chem.*, 36, 2367 (1972)
- 19) S. Kamimiya, T. Nishiya, K. Izaki, H. Takahashi；*Agric. Biol. Chem.*, 44, 1071 (1972)
- 20) S. Tsuyumu, T. Funakubo, K. Hori, Y. Takikawa and M. Goto；*Ann. Phytopath. Soc., Jpn.*, 51, 294 (1985)
- 21) 田辺寛之，小林良生，伏見 豊，金崎寛次，多田秀；*Agric. Biol. Chem.*, 51 (2)，589 (1987)
- 22) 田辺寛之，小林良生；*Agric. Biol. Chem.*, 51 (3)，779 (1987)
- 23) 小林良生，松尾隆吉，福岡 聡，浜田 康，大川昭典，江渕栄貫；第52回紙パルプ研究発表会要旨集，pp.14-17 (1985)
- 24) 田辺寛之，小林良生；*Agric. Biol. Chem.*, 51(10)，2845 (1987)
- 25) J. P. Slack, M. S. Mount, P. M. Berman and J. P. Hubbard, *Phytopathol.*, 70, 267 (1980)
- 26) 田辺寛之，小林良生；昭和62年度農芸化学大会要旨集 p.790 (1987)
- 27) 大蔵省印刷局研究所編，“みつまた紙”，pp.77-77 (1959)
- 28) 小林良生，松尾隆吉，浜田 康，大川昭典，江渕栄貫；木材学会誌，30 (10)，848 (1984)
- 29) 田辺寛之，小林良生，*Holzforschung*, 41 (6)，395 (1987)
- 30) 小林良生，松尾隆吉，*Cellulose Chem. Technol.*, 11, 487 (1977)
- 31) 田辺寛之，小林良生，*Holzforschung*, 42 (1)，47 (1988)
- 32) 寺島典二，木材学会誌，33 (8)，615 (1987)
- 33) 田辺寛之，松尾隆吉，小林良生，*Holzforschung*, 印刷中