ード蒸解において黒液に抽出した灰分は、濃縮工程においてスケール生成を起こして回収工程を困難にする。

以上の問題に関連して、本報では稲、小麦および大麦ワラの灰分組成およびアルカリ蒸解中のシリカの挙動を検討した。以下に、結果を要約する。

(1) ワラ類の水抽出物が多い。シリカ残存量は水抽出後の稲および大麦で元のシリカの約 70%であり、小麦のそれは約 40%である。稲ワラを水抽出した後の灰分を構成する元素は Si と Ca で、その大部分は Si である。

(2) 市販シリカの苛性ソーダに対する溶解度は、稲ワラのそれに比較して著しく少ない。これは両者のシリカの形態構造の相違に基づく。すなわち、市販シリカは Quartz 型であるが、稲ワラ・シリカは Opal-CT 型またはクリストバーライト型と推定される。

(3) ソーダ・サルファイトおよびソーダ・メタノール蒸解したパルプのシリカ分は、ソーダ蒸解のそれよりも多い。これは興味ある結果であり、今後の検討事項はシリカの多いパルプのシート物性の解明である。

(本文 54 ページ)

リグニン分解酵素系によるクラフトパルプの漂白

(第 1 報) マンガンペルオキシダーゼによる漂白

九州大学農学部 原園幸一, 近藤隆一郎, 坂井克己

高活性リグニン分解菌である白色腐朽担子菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株の産生するマンガンペルオキシダーゼ (MnP) を用いた広葉樹未晒クラフトパルプの漂白のための処理条件を検討した。MnP はリグニン生分解に関与するヘム酵素であり、 H_2O_2 による Mn^{2+} の Mn^{3+} への酸化を触媒し、 Mn^{3+} がリグニンを攻撃する。MnP によるパルプ漂白には Mn^{2+} 、 Mn^{3+} 錯体形成試薬の有機酸、 H_2O_2 、界面活性剤の添加を必要とする。最適 pH は 4.4 であり、45°C で処理したとき白色度の上昇が最大であった。 Mn^{3+} 錯体形成試薬としてはマロン酸やグルコン酸が効果的であり、キレート能のないコハク酸存在下では漂白効果は観察されなかった。また、有機酸の濃度も重要であり、シュウ酸は低濃度で漂白効果がみられた。Tween 20 や Tween 80 などの界面活性剤は重要な因子であり、Tween 80 に含まれる不飽和脂肪酸の過酸化による非フェノール性リグニン部分の酸化も起こっていることが考えられ、この反応により漂白効果がさらに促進されていることが推察された。*in vivo* で H_2O_2 の供給を行っているとされるグルコースオキシダーゼを用いても、また MnP 活性を含む精製を行っていない培養液を用いても部分精製 MnP と同様の漂白効果を示した。さらに広葉樹酸素漂白クラフトパルプも MnP により漂白可能であった。

(本文 59 ページ)

段ボールシートにおける板紙と中芯との引離し接合強度の応力解析

(第 1 報) 両面段ボールの応力および変位状況

愛媛大学工学部 松島 理, 松島 成夫

段ボールの両表面クラフト・ライナ (KL) の引離し強度は、段ボールの接合強度を明らかにするために必要なものであり、段ボールの力学的強度を保つための一基本となるものである。そこで、本報告では、段ボール中芯の形状を正弦波形であるとして、両面段ボールの両表面 KL に引離し力が働く際の

研 究 報 文

リグニン分解酵素系によるクラフトパルプの漂白 (第1報)

マンガンペルオキシダーゼによる漂白¹⁾

九州大学農学部 原園幸一, 近藤隆一郎, 坂井克己

Application of Ligninolytic Enzymes to Bleaching of kraft pulp (I)

—Bleaching of pulp with manganese peroxidase—

Koichi Harazono, Ryuichiro Kondo and
Kokki Sakai
Faculty of Agriculture, Kyushu University

原園幸一

近藤隆一郎

坂井克己

Bleaching of unbleached hardwood kraft pulp was performed under various conditions with manganese peroxidase (MnP) secreted from *Phanerochaete sordida* YK-624. MnP, which is a heme-containing enzyme associated with the degradation of lignin, requires H_2O_2 as co-substrate and catalyzes the oxidation of Mn^{2+} to Mn^{3+} . The Mn^{3+} complexed with an organic acid oxidizes phenolic lignin model compounds. Bleaching of kraft pulp with MnP also required Mn^{2+} , Mn^{3+} -chelator, H_2O_2 and a surfactant. An optimum pH for enzyme treatment was 4.5. A maximum increase in pulp brightness was observed at a temperature $45^\circ C$. Malonate and gluconate functioned effectively as an Mn^{3+} chelator during bleaching of pulp with MnP. A surfactant, such as Tween 20 and Tween 80, was an important factor on enzyme bleaching. Enzyme treatments with H_2O_2 -generating enzyme, glucose oxidase, had a similar effect on pulp brightness and bleachability as those H_2O_2 added directly. It was also possible to brighten an oxygen-bleached hardwood kraft pulp with MnP.

Keyword : Enzyme bleaching, *Phanerochaete sordida* YK-624, manganese peroxidase, hardwood kraft pulp, white-rot fungi

1. 緒 言

クラフトパルプの漂白に用いられている塩素系漂白

プロセスは発がん性物質であるダイオキシンなどの有機塩素化合物の生成を引き起こすと言われており、それに代わる漂白法の一つとして、白色腐朽菌を利用し

¹⁾本報の結果の一部は「Ryuichiro Kondo, Koichi Harazono and Kokki Sakai; Bleaching of hardwood kraft pulp with manganese peroxidase secreted from *Phanerochaete sordida* YK-624. Appl. Environ. Microbiol., 60, 4359-4363 (1994).」から引用した。

たバイオブリーチングが研究されてきた¹⁻⁷⁾。しかしながら、高白色度のパルプを得るためには長期間を要すること、さらにはセルラーゼなどの糖加水分解酵素によるパルプ繊維へのダメージが懸念されることなど問題点が多い。一方、リグニン分解酵素系を導入したプロセスが可能となれば、多糖類に何ら影響を及ぼさずリグニンを選択的に分解すると期待され、理想的な漂白法と言えよう。リグニン分解酵素系としてはリグニンペルオキシダーゼ (LiP)、マンガンペルオキシダーゼ (MnP)、ラッカーゼが知られており、これらの酵素による漂白が試みられている。Arbeloa ら⁸⁾は LiP 主体でのパルプ漂白を試み、引き続き化学漂白後の最終的な白色度を LiP 処理していないコントロールに比べ約 1 ポイント増加させ得ると報告している。MnP を利用したクラフトパルプ漂白については Paice ら⁹⁾が報告しているが、脱リグニンは認められたものの顕著な漂白効果は観察されなかった。ラッカーゼについては ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) の共存下、クラフトパルプの脱リグニンが確認されたことが報告されている¹⁰⁾が、漂白性については言及されていない。このようにリグニン分解酵素系を漂白に用いた研究はいくつか例があるが、*in vivo* でのリグニン生分解機構について不明な点が多く残っているためか、効果的な酵素漂白法の開発には至っていないのが現状である。

我々はこれまで、自然界から分離したリグニン分解能の優れた白色腐朽菌によるパルプ漂白を試み、漂白性とリグニン分解酵素系との関係を検討した。パルプ漂白能を有するほとんどの菌株においてバイオブリーチング時に MnP 主体の酵素活性が観察され、さらに漂白能の高い菌株ほど高い MnP 活性を示したことから、MnP がバイオブリーチングにおいて重要な役割を演じていることを示唆した¹¹⁾。また、高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株の菌体とパルプをメンブランフィルターで隔てた培養系において 7 日間で 20 ポイント以上の白色度の上昇がみられ、そのときの菌体外のリグニン分解酵素系は MnP 主体であったことから、やはりパルプ漂白において MnP が寄与していることを明らかにした¹²⁾。

これらの知見から、MnP を用いた広葉樹未さらしクラフトパルプ (UKP) の漂白について基礎的検討を試みた¹³⁾。まず、MnP 反応系において直接リグニンを攻撃するのは MnP により酸化された Mn^{3+} であることから、 Mn^{3+} -マロン酸錯体による化学的なパルプ処理を試みたところ、若干の漂白性が認められた。そこで、さらに MnP を使用した処理を検討した。

$MnSO_4$ 、マロン酸及び Tween 80 存在下、連続的に H_2O_2 を添加しながら 24 時間処理したところ、MnP あるいは H_2O_2 を添加しないコントロールに対して、白色度が約 10 ポイント上昇し、Kappa 値が約 6 ポイント減少した。また、この酵素処理をアルカリ抽出を併用して繰り返すことにより、酵素処理 5 段目で白色度が 31.8% から 73.1% へ約 40 ポイント上昇可能であることを示した。本報では MnP のパルプ漂白において重要と思われる処理条件、有機酸の種類及び濃度、界面活性剤の効果、pH、処理温度等について検討した。また *in vivo* において H_2O_2 の供給を行っていると思われるグルコースオキシダーゼの利用、MnP を含む培養ろ液の使用及び酸素漂白パルプの漂白についても検討した。

2. 実 験

2.1 供試パルプ

工場製広葉樹未さらしクラフトパルプ (UKP) 及び酸素漂白パルプ (OKP) を使用した。

2.2 酵素の調製

供試菌として、当研究室で腐朽材より分離された高活性リグニン分解菌である *P. sordida* YK-624 株^{11,12)}を用いた。菌体はポテトデキストロース寒天培地 (Difco Laboratories 製) で 30°C 3 日間前培養した。菌体プレート (直径 9 cm) の約 4 分の 1 をホモジナイズした後、Kirk 基本液体培地¹⁴⁾ (1% グルコース、1.2 mM 酒石酸アンモニウム、0.1% Tween 80 を含む、pH 4.5) 200 ml に添加し、30°C、150 rpm で振とう培養した。培養 3 日目にベラトリルアルコール (7.5 mM) を添加した後、毎日酸素ページを行い 1 週間培養した。その培養ろ液を透析後、DEAE-セファロース CL-6B (ファルマシア社製) により分画した。20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) で平衡化したカラムに 5% ポリエチレングリコール (平均分子量 3,000) を添加し pH 7.2 に調整した培養ろ液をチャージした後、段階的に 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0)、20 mM コハク酸緩衝液 (pH 5.5)、50 mM コハク酸緩衝液 (pH 4.5) で溶出させた。MnP 活性を含むフラクションは 50 mM コハク酸緩衝液 (pH 4.5) で溶出させたときに得られ、そのフラクションを酵素処理に用いた。MnP の酵素活性は 1.0 mM 2,6-ジメトキシフェノール、1.0 mM $MnSO_4$ 及び 0.2 mM H_2O_2 を含む反応液中の 2,6-ジメトキシフェノールの酸化による 470 nm の吸光度変化を測定し、U (ユニット) は 1 分間当たりの吸光度変化として表示した。

2.3 酵素処理法

十分離解した UKP 1 g を MnP (100 U), MnSO_4 (0.1 mM) 及び Tween 80 (0.05%) を含む 50 mM マロン酸緩衝液 (pH 4.5) 100 ml に懸濁させ (パルプ濃度 1%), そのパルプ懸濁液にペリスタポンプを用いて 10 mM H_2O_2 水溶液を流速 3 ml/h で添加しながら 30°C で攪拌した。この条件を標準条件とし、一部条件を変化させて酵素処理を行った。 H_2O_2 生成酵素であるグルコースオキシダーゼを使用する場合は前述のパルプ懸濁液に 25 mM のグルコースを添加し、酸素バージを行った後密栓し 30°C, 150 rpm で振とうした。グルコースオキシダーゼの酵素活性は Swoboda ら¹⁵⁾の方法に従って測定した。この方法は生成した H_2O_2 量を西洋ワサビのペルオキシダーゼによる *o*-ジアニシジンの酸化速度から求めるものである。

2.4 パルプの分析

処理パルプは水洗しブフナーロートでパルプシートを作製した後、白色度を測定した。白色度は色彩色差計 MINOLTA CR-200 (ミノルタカメラ(株)製)で測定し、ISO ブライトネスに換算した。Kappa 価は TAPPI スタンダード (T 236) に従い測定した。

3. 結 果

3.1 MnP による UKP の漂白

(1) 酵素量の影響

MnP 添加量のパルプ漂白への影響を検討した結果を図 1 に示す。酵素量を増やすにつれ漂白性は向上し、100~1,000 U で最大であった。また、MnP を添加しない場合、白色度は上昇せず、この実験系において H_2O_2 による漂白効果は認められなかった。

(2) MnSO_4 添加量の影響

100 U の MnP を用い、 MnSO_4 添加量の影響を検討した結果を図 2 に示す。0.1~0.5 mM の濃度範囲で白色度の上昇と Kappa 価の減少が顕著であった。

(3) H_2O_2 添加量の影響

酵素量が 100 U と 1,000 U の場合で、 H_2O_2 の添加量のパルプ漂白への影響を検討した結果を図 3 に示す。100 U の MnP を使用した処理では、5~10 mM の H_2O_2 水溶液を添加した際に漂白効果が大きかった。 H_2O_2 添加量が多すぎると MnP が失活するため漂白性は低下した。1,000 U の MnP を使用した場合、5~100 mM の広い範囲で同程度の漂白効果が観察された。

(4) 有機酸の影響

酢酸、乳酸、シュウ酸、マロン酸、酒石酸、コハク酸の有機酸緩衝液 (50 mM, pH 4.5) を用い、30°C

Fig.1 Effect of MnP activity on bleaching of UKP at 37°C for 24 h.

Legend: —●—Brightness

—○—Kappa number

(Appl. Environ. Microbiol., 60, 4359-4363, 1994 より引用)

Fig.2 Effect of MnSO_4 concentration on bleaching of UKP with MnP at 37°C for 24 h.

Legend: —●—Brightness

—○—Kappa number

(Appl. Environ. Microbiol., 60, 4359-4363, 1994 より引用)

でパルプ漂白を試みた結果を図 4 に示す。酢酸、乳酸及びマロン酸緩衝液を用いたとき漂白性が優れ、一方、酒石酸ではかなり漂白性が劣り、コハク酸緩衝液中では 24 時間処理で 3 ポイントの白色度の上昇に過ぎなかった。

Fig.3 Effect of the concentration of added H₂O₂ on bleaching of UKP with MnP at 37°C for 24 h.

Legend : —●—Brightness —○—Kappa number

(Appl. Environ. Microbiol., 60, 4359-4363, 1994 より引用)

Fig.4 Bleaching of UKP with MnP in different buffers (50 mM, pH 4.5).

Legend : —□—Acetate —△—Lactate —○—Succinate

—■—Malonate —▲—Tartrate —●—Oxalate

次に各 50 mM の有機酸緩衝液に 2.5 mM のマロン酸を添加してバルブ処理を行った (図 5)。漂白効果があまり観察されなかったコハク酸緩衝液に少量のマロン酸を添加して処理すると漂白性が向上した。また酒石酸においてもわずかながら漂白性が向上した。これらのことから Mn³⁺ と錯体を形成することができる有機酸の添加が MnP によるバルブ漂白において重要であることが確認された。

有機酸濃度のバルブ漂白への影響をマロン酸とシュ

ウ酸について検討した。5 mM 濃度以下の場合には 50 mM コハク酸緩衝液 (pH 4.5) 中で、10 mM 濃度以上はそれぞれの有機酸緩衝液 (pH 4.5) 中で 24 時間処理した。その結果を図 6 に示す。マロン酸は 10 及び 50 mM の濃度で白色度の上昇が大きかった。50 mM 濃度では漂白効果が見られなかったシュウ酸は 0.5~10 mM の濃度のとき白色度の上昇が顕著に見られた。

また、5 mM 酢酸緩衝液中、2 mM グルコン酸存在

Fig.5 Bleaching of UKP in different buffers (50 mM, pH 4.5) containing 2.5 mM malonate at 30°C.

Legend: —□—Acetate —△—Lactate —○—Succinate
 —■—Malonate —▲—Tartrate —●—Oxalate

Fig.6 Effect of chelator concentration on bleaching of UKP with MnP at 30°C for 24 h.

Legend: —□—Oxalate
 —●—Malonate

Fig.7 Effect of gluconate on bleaching of UKP with MnP.

Legend: —□—50 mM malonate buffer
 —●—2 mM sodium gluconate in 5 mM acetate buffer

下でパルプ処理を行った結果を図7に示す。50 mMのマロン酸の場合より漂白性が向上し、より有能な Mn^{3+} 錯体形成試薬の選択がMnPによる漂白において有効であると思われる。

(5) pHの影響

50 mM マロン酸緩衝液のpHを3.5, 4.5, 5.5と変化させ、30°Cで処理した結果を図8に示す。MnP活性発現の至適pH⁽⁶⁾とされている4.5において最大

の漂白性が認められた。

(6) 処理温度の影響

処理温度を30°Cから50°Cまで変化させて処理した際の結果を図9に示す。45, 50°Cでの6時間処理で白色度は10ポイント上昇し、24時間後には45°Cで17ポイントの白色度の上昇が認められた。

(7) 界面活性剤の影響

Fig. 8 Effect of pH on bleaching of UKP with MnP at 30°C.

Legend : —□—pH 3.5 —●—pH 4.5
—▲—pH 5.5

Fig. 9 Effect of temperature on bleaching of UKP with MnP.

Legend : —●—30°C —◆—37°C
—□—45°C —△—50°C

標準条件として、非イオン性界面活性剤の Tween 80 (Polyethylene sorbitan monooleate) を使用しているが、界面活性剤の影響を検討するために他の界面活性剤を使用して処理を試みた。結果を図 10 に示す。界面活性剤を添加しないと白色度の上昇は約 5 ポイントに過ぎなかった。Tween 20 (Polyethylene sorbitan monolaurate) やコール酸を母核とする両性界面活性剤である CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate) を用いた

場合、Tween 80 を使用した場合より 2 ポイントほど白色度の上昇が低かった。最近、Tween 80 に若干含まれている不飽和脂肪酸の存在下 MnP の反応系で非フェノール性化合物であるフェナントレンの酸化が可能であることが報告されており¹⁷⁾、MnP によるパルプ漂白においても不飽和脂肪酸の過酸化の影響が考えられる。そこで、Tween 20 系にリノレン酸 (0.1 mM) を添加したところ、Tween 80 と同等の漂白効果が確認された。またリノレン酸のみを添加した場合

Fig. 10 Effect of surfactant on bleaching of UKP with MnP.

Legend : —□—Tween 20 —△—Tween 20+Linolenic acid —○—Tween 80
—◆—Linolenic acid —▲—CHAPS —●—Without surfactant

でも漂白性が見られた。

(8) グルコースオキシダーゼの利用

グルコースオキシダーゼとグルコースの反応により生成する H_2O_2 を利用をした MnP によるパルプ漂白を試みた。25 mM のグルコースを添加した場合の結果を図 11 に示す。グルコースオキシダーゼを 0.5~5 U 添加したとき直接 H_2O_2 を添加する処理法と同様の漂白効果が見られた。

3.2 *P. sordida* YK-624 株の培養ろ液による

UKP の漂白

液体振とう培養後ろ過及び透析を行った培養ろ液を用いてパルプ漂白を行った結果を図 12 に示す。MnP 以外の夾雑タンパク質が含まれていると思われる培養ろ液を使用しても、DEAE-セファロースカラムに通した場合と同様の漂白効果が確認された。

3.3 MnP による OKP の漂白

現在、酸素漂白を漂白シーケンスの第1段に導入することが多くなり、非塩素系の多段階プロセスを構築する際 OKP の漂白は有効である。MnP による OKP の漂白を検討した結果を表 1 に示す。UKP を処理した場合と同様な方法で、OKP においても漂白性が確認された。

4. 考 察

P. sordida YK-624 株は広葉樹未さらしクラフトパルプの漂白能が優れ¹¹⁾、菌体とパルプを隔てたメンブランフィルター系においてもパルプの白色度を7日間で約22ポイント上昇させることができた¹²⁾。そのメンブランフィルター法での菌処理による白色度の上

Fig. 11 Effect of glucose oxidase on bleaching of UKP with MnP 30°C for 24 h.

Fig. 12 Comparison of bleaching with dialyzed culture liquid and partially purified MnP with anion-exchange column.

Legend : —□—Dialyzed culture liquid
—●—Isolated MnP

Table 1 Bleaching of OKP with MnP

Pulp	Brightness (%)
Treated with MnP	61.1
Without MnP	54.3
Without H_2O_2	53.0
Unbleached	47.1

昇は Kappa 価やアセチルプロマイド法で定量したリグニン量の減少と相関した。この菌株はパルプの生菌処理時に MnP 活性とわずかなフェノールオキシダーゼ活性を示したが、LiP 活性は全く認められず^{11,12)}、酵素液の調製に使用した液体培養時にも同様のリグニン分解酵素活性を示した。最近では LiP を分泌せず、MnP やラッカーゼを分泌する菌として、*Dichomitus squalens*¹⁸⁾、*Lentinus edodes*¹⁹⁾、*Stereum hirsutum*²⁰⁾ などが報告されており、さらに *P. sordida* の培養液中に MnP 活性しか検出されなかったという報告²¹⁾ もみられ、以上のことから MnP がリグニン分解に鍵酵素として働いている可能性が高いことが推測される。

MnP は白色腐朽菌 *P. chrysosporium* のリグニン分解時の菌体外培養液から初めて単離されたヘムタンパク質である^{22,23)}。MnP は活性の発現に H_2O_2 を必要とし、 Mn^{2+} の Mn^{3+} への酸化を触媒する。マロン酸などの有機酸と錯体を形成した Mn^{3+} は容易にフェノール性リグニンモデル化合物を酸化する^{24,25,26)}。MnP

が MnSO_4 や H_2O_2 存在下, *in vitro* で $\text{DHP}^{27)}$ や高分子量 ($\text{Mr} > 30,000$) のクロロリグニン^{28,29)}の解重合を触媒するという報告はみられるが, クラフトパルプの効果的な漂白が単離 MnP で達せられた報告はみられない。むしろ, *Trametes versicolor* から単離された MnP やその MnP を含む培養ろ液を用いてクラフトパルプを処理しても, 生菌処理時に観察されるような著しい脱リグニンや漂白性は認められなかった¹⁰⁾。一方, 我々は *P. sordida* YK-624 株からの MnP を含む培養ろ液や部分精製した MnP を用いることにより, MnSO_4 や H_2O_2 存在下白色度を約 10 ポイント上昇させ, Kappa 価を約 6 ポイント減少させ得ることに成功し, また, アルカリ抽出を併用して 6 回酵素処理を繰り返すことにより, 生菌処理に匹敵する約 43 ポイントの白色度を上昇させ得ることを報告した¹³⁾。

生菌処理において MnP はクラフトパルプ中に元々存在する Mn^{2+} を利用すると考えられる。しかしながら, *in vitro* の MnP による漂白系では Mn^{2+} を新たに添加しないと顕著な漂白効果は見られなかった。生菌処理時にはパルプ中への菌体の侵入といった菌体自身の作用がパルプ中の Mn^{2+} と MnP との接触機会を増加させ, Mn^{2+} の触媒サイクルへの供給を行っていることも予想される。

パルプ懸濁液に添加した H_2O_2 は MnP の触媒作用に大きく影響した。 MnP 活性や LiP 活性は過剰な H_2O_2 により減少する。このことは, MnP によるパルプ漂白系において 100 U の MnP を用いた際に漂白効果が H_2O_2 添加量に大きく左右され, 1,000 U の MnP で漂白した場合にはそれほど影響を受けなかったことから推測された。

MnP 活性の発現, 即ち MnP によるフェノール性化合物の酸化は, MnP の直接の基質である H_2O_2 や MnSO_4 の濃度の他に, マンガンイオンのキレーターの種類やその濃度の影響を受ける。例えばマロン酸やシュウ酸, 乳酸などの C_2 や C_3 のジカルボン酸あるいは α -ヒドロキシ酸によって MnP 活性は向上する^{16,30)}。その理由としては MnP によって酸化されて生成した Mn^{3+} と錯体を形成し, 水溶液中で安定化させるためと考えられている。パルプの漂白におけるマンガンイオンのキレーターの影響は ABTS や 2,6-ジメトキシフェノールを用いて測定された酵素活性についてのこれまでの報告^{16,30)}とほぼ同様の傾向が見られ, Mn^{3+} と安定な錯体を形成できないコハク酸の緩衝液中では顕著な漂白効果は見られず, 50 mM 濃度ではマロン酸が最適のキレーターであると予想される。マロン酸とシュウ酸については濃度の影響を検討し, マ

ロン酸は 10 及び 50 mM で, シュウ酸は 0.5~10 mM の濃度で漂白性が高かった。この結果も以前報告されている 2,6-ジメトキシフェノールやフェノールレッドを用いた MnP 活性測定時の結果^{31,32)}と良く一致している。様々な白色腐朽菌がシュウ酸を分泌し^{33,34)}, *P. chrysosporium* の培養時にシュウ酸の生成と MnP 活性に相関が見られる³²⁾ことから, *in vivo* においては低濃度で存在するシュウ酸がマンガンイオンのキレーターとして働いている可能性が示唆される。一方, グルコースオキシダーゼの反応生成物であるグルコン酸やセロビオース: キノンオキシドレダクターゼ³⁵⁾の反応生成物であるセロビオン酸などが 50 mM のマロン酸より優れた Mn^{3+} 錯体形成試薬であるという報告³⁶⁾があり, 本報でもグルコン酸ナトリウムの添加により良好な漂白性が認められた。

pH や温度もパルプ漂白に影響した。 MnP の至適 pH である 4.5¹⁶⁾で漂白効果は最大であり, 処理温度は生菌処理の培養時の温度 (30℃) より高い 45~50℃で漂白性が向上した。

界面活性剤の添加は漂白性を向上させた。おそらく分解されたリグニンフラグメントをパルプ付近から除去し水溶液中に分散させることにより, リグニンの再重合を防ぎ漂白性を高めていると思われる。また, Tween 20 添加系にリノレン酸を添加してパルプ処理を行ったところ, Tween 80 を添加したときと同様な漂白効果が見られたことから, MnP によるパルプ漂白においても Tween 80 に含まれる不飽和脂肪酸の過酸化に起因するリグニン中の非フェノール性部分の酸化が起こっている可能性³⁷⁾が考えられ, この反応がフェノール性部分を攻撃する MnP の反応以外にもリグニンに作用し, 漂白効果が高まっていることが推察される。

H_2O_2 の供給方法は MnP によるパルプ漂白において重要である。*P. chrysosporium* のリグニン分解時の培養系中に H_2O_2 生成酵素であるグルコースオキシダーゼ^{38,39)}やグルオキシサルオキシダーゼ⁴⁰⁾などが確認されており, バイオブリーチング時にもこれらの H_2O_2 生成酵素によって H_2O_2 の供給がなされていると考えられる。そこでグルコースオキシダーゼとグルコースの反応により生成する H_2O_2 を利用して漂白を試みたところ, 直接 H_2O_2 を添加した場合と同様に漂白効果が見られた。

透析後の培養ろ液を用いても一部精製した酵素液を用いたときと漂白性は変わらず, 精製の程度による漂白性の違いは見られなかった。即ち, 漂白処理に用いる酵素は精製する必要はなく, 培養ろ液を直接使用で

きることから、酵素液の調製は容易であろう。また、OKPの漂白も可能であり、MnPを用いた漂白法を導入した非塩素系漂白プロセスの構築の可能性が示唆された。この点については次報で詳細に報告したい。

5. ま と め

リグニン分解酵素系の1つであるMnPを利用して、広葉樹の未さらしクラフトパルプあるいは酸素漂白パルプの漂白を試みたところ、MnSO₄、マロン酸やグルコン酸等のMn³⁺錯体形成試薬及びTween 80といった界面活性剤の存在下、pH 4.5、30~50℃で少量のH₂O₂を連続的に添加しながら処理を行うことにより10数ポイントの白色度の上昇が可能であった。

参 考 文 献

- 1) K. Addleman and F. S. Archibald : Appl. Environ. Microbiol., **59**, 266-273 (1993)
- 2) M. G. Paice, L. Jurasek, C. Ho, R. Bourbonnais, F. S. Archibald : Tappi J., **72** (5), 217-221 (1989)
- 3) I. D. Reid, M. G. Paice, C. Ho and L. Jurasek : Tappi J., **73**(8), 149-153 (1990)
- 4) K. Fujita, R. Kondo, K. Sakai, Y. Kashino, T. Nishida and Y. Takahara : Tappi J., **74**(11), 123-127 (1991)
- 5) K. Fujita, R. Kondo, K. Sakai, Y. Kashino, T. Nishida and Y. Takahara : Tappi J., **76**(1), 81-84 (1993)
- 6) S. Murata, R. Kondo, K. Sakai, Y. Kashino, T. Nishida and Y. Takahara : Tappi J., **75**(12), 91-94 (1992)
- 7) 坂井克己, 近藤隆一郎 : 紙パ技協誌, **47**(8), 933-943 (1993)
- 8) M. Arbeloa, J. Leclerc, G. Goma and J. C. Pommier : Tappi J., **73**(3), 215-221 (1992)
- 9) R. Bourbonnais, and M. G. Paice : Appl. Microbiol. Biotechnol., **36**, 823-827 (1992)
- 10) M. G. Paice, I. D. Reid, R. Bourbonnais, F. S. Archibald and L. Jurasek : Appl. Environ. Microbiol., **59**, 260-265 (1993)
- 11) H. Hirai, R. Kondo and K. Sakai : Mokuzai Gakkaishi, **40**, 980-986 (1994)
- 12) R. Kondo, K. Kurashiki and K. Sakai : Appl. Environ. Microbiol., **60**, 921-926 (1994)
- 13) R. Kondo, K. Harazono and K. Sakai : Appl. Environ. Microbiol., **60**, 4359-4363 (1994)
- 14) M. Tien and T. Kirk : Methods Enzymol., **161**, 238-249 (1988)
- 15) B. E. P. Swoboda and V. Massay : J. Biol. Chem., **240**, 2209 (1965)
- 16) J. K. Glenn and M. H. Gold : Arch. Biochem. Biophys., **242**, 329-341 (1985)
- 17) M. A. Moen and K. E. Hammel : Appl. Environ. Microbiol., **60**, 1956-1961 (1994)
- 18) F. H. Périé and M. H. Gold : Appl. Environ. Microbiol., **57**, 2240-2245 (1991)
- 19) G. F. Leatham : FEMS Microbiol. Lett., **24**, 51-58 (1986)
- 20) F. Nerud, Z. Zouchova and Z. Misurcovaz : Biotechnol. Lett., **13**, 657-660 (1991)
- 21) C. Rüttimann-Johnson, D. Cullen and R. T. Lamar : Appl. Environ. Microbiol., **60**, 599-605 (1994)
- 22) M. Kuwahara, J. K. Glenn, M. A. Morgan and M. H. Gold : FEBS Lett., **169**, 247-250 (1984)
- 23) A. Paszczynski, V. B. Huynh and R. Crawford : FEMS Microbiol. Lett., **29**, 37-41 (1985)
- 24) U. Tuor, H. Wariishi, H. E. Schoemaker and M. H. Gold : Biochemistry, **31**, 4986-4995 (1992)
- 25) H. Wariishi, L. Akileswaran and M. H. Gold : Biochemistry, **27**, 5365-5370 (1988)
- 26) H. Wariishi, K. Valli and M. H. Gold : Biochemistry, **28**, 6017-6023 (1989)
- 27) H. Wariishi, K. Valli, V. Reganathan and M. H. Gold : Biochem. Biophys. Res. Commun., **176**, 269-276 (1991)
- 28) R. Lackner, E. Srebotnik and K. Messner : Biochem. Biophys. Res. Commun., **178**, 1092-1098 (1991)
- 29) F. C. Michael, S. B. Dass, E. A. Grulke and C. A. Reddy : Appl. Environ. Microbiol., **57**, 2368-2375 (1991)
- 30) H. Wariishi, K. Valli and M. H. Gold : J. Biol. Chem., **267**, 23688-23695 (1992)
- 31) B. P. Roy and F. S. Archibald : Appl. Environ. Microbiol., **59**, 1855-1863 (1993)
- 32) K. Kishi, H. Wariishi, L. Marquez, H. B. Dunford and M. H. Gold : Biochemistry, **33**, 8694-8701 (1994)

- 33) D. P. Barr, M. M. Shah, T. A. Gover and S. D. Aust : Arch. Biochem. Biophys., **298**, 480-485 (1992)
- 34) M. V. Dutton, C. S. Evans, P. T. Atkey and D. A. Wood : Appl. Microbiol. Biotechnol., **39**, 5-10 (1992)
- 35) P. Ander : FEMS Microbiol. Rev., **13**, 297-312 (1994)
- 36) B. P. Roy, M. G. Paice, F. S. Archibald, S. K. Misra and L. E. Misiak : J. Biol. Chem., **269**, 19745-19750 (1994)
- 37) W. Bao, Y. Fukushima, K. A. Jensen Jr., M. A. Moen and K. E. Hammel : FEBS Lett., **354**, 297-300 (1994)
- 38) R. L. Kelley and C. A. Reddy : J. Bacteriol., **166**, 269-274 (1986)
- 39) R. L. Kelley and C. A. Reddy : Arch. Microbiol., **144**, 248-253 (1986)
- 40) P. J. Kersten and T. K. Kirk : J. Bacteriol., **169**, 2195-2201 (1987)

(受理 : '95.6.29)