

木質系糖鎖のバイオマス変換*

渡 辺 隆 司**

Biomass Conversion of Glycans from Wood

Takashi WATANABE

(平成4年8月1日受理)

1. 緒 言

植物は大気中の炭酸ガス、根などから吸収した水やミネラル等を原料にし、太陽の光エネルギーを使って多糖類やリグニン、さらにはタンパク質や脂肪、ビタミンなど多種類の物質を作ることができる。こうしてできる植物体やこれを食糧とする動物・微生物などの生物資源はバイオマスと呼ばれ、再生産が可能であることから有限性のある石油などの化石資源に代わるものとして注目されている。Whittaker と Likens によればバイオマスのうち木材などの植物資源は地球上で最も大量に存在する生物資源であり、これにより生産されるバイオマスは年間1,700億トンに達する¹⁾。植物バイオマスのうち、陸地で生産されるものは年間1,150億トンと推定され、そのうち約70%が森林で生産される。これに対し、植物の現存量は陸地1兆8,370億トン、海洋39億トン、合計1兆8,410億トンであり、森林が全体の9割を占める¹⁾。森林面積の減少は、地球上の「生物現存量」、即ちバイオマスの減少と直結している深刻な問題である。

森林で生産されるバイオマスを構成する主要成分はセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンである。これらの成分のうちセルロースはグルコースが直鎖状に β -1,4結合した多糖類であり、その生産量は地球上で生産される全合成ポリマーの総量よりも多い。一方、ヘミセルロースはグルコース、マンノース、キシロース、ガラクトース、アラビノース、グルクロン酸などの異なる種類の単糖が一定の規則をもって配列したセルロース以外の細胞壁多糖であり、針葉樹はアラビノグルクロノキシラン、アセチルグルコマンナン(図1)を主成分とし^{2,3)}、広葉樹はアセチルグルクロノキシラン(図2)を主成分とする⁴⁾。セルロースおよびヘミセルロースは低分子化によってオリゴ糖に変換したり、単糖まで分解した後アルコールに転換することができる。報告によれば、石油から製造される全ポリマーの95%はセルロースおよびヘミセルロースから誘導されるという⁵⁾。また、リグニンは基本骨格であるフェニルプロパン単位が不規則に重合した難分解性の疎水性高分子物質であり、分解物は抗ウイルス作用、抗菌作用などの生理活性を持つ他⁶⁾、スルホン酸塩誘導体がセメントや染料の分散剤として利用されている。現在、このスルホン酸塩誘導体はサルファイトパルプの廃液として工業生産されている。また、上に述べた3成分のうち、疎水性のリグニンと親水性のヘミセルロースは樹木の細胞壁中でバラバラに存在しているわけではなく、両者が化学的に結合してひとつの化合物となっていることが明かとなった^{7~12)}。この両親媒性の物質はリグニン・糖結合体(Lignin-carbohy-

* 第47回木研公開講演会(平成4年5月22日、大阪)において講演した。

** バイオマス変換研究分野(Laboratory of Biomass Conversion)

Key words: Biomass conversion, Lignocellulose, Glycans, Oligosaccharides, Transglycosylation

drate complex; LCC) と呼ばれ (図3), セルロース, ヘミセルロース, リグニンにつづく第四の木材構成成分として注目されている。LCC はリグニンとヘミセルロースがなかなか分離できないことや, アルカリや酸で分解すると両者が分離することから, その存在が100年以上の長きにわたって推定されてきた。英

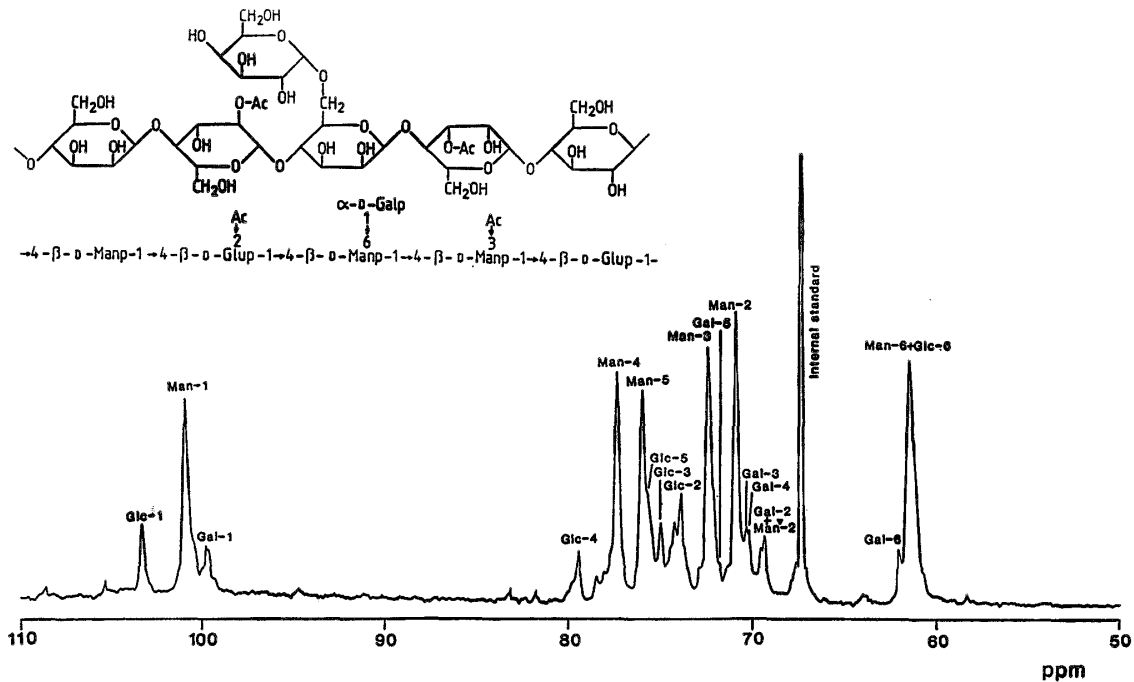


図1 アカマツアセチルグルコマンナンの ^{13}C -NMR スペクトル^{7,11)}

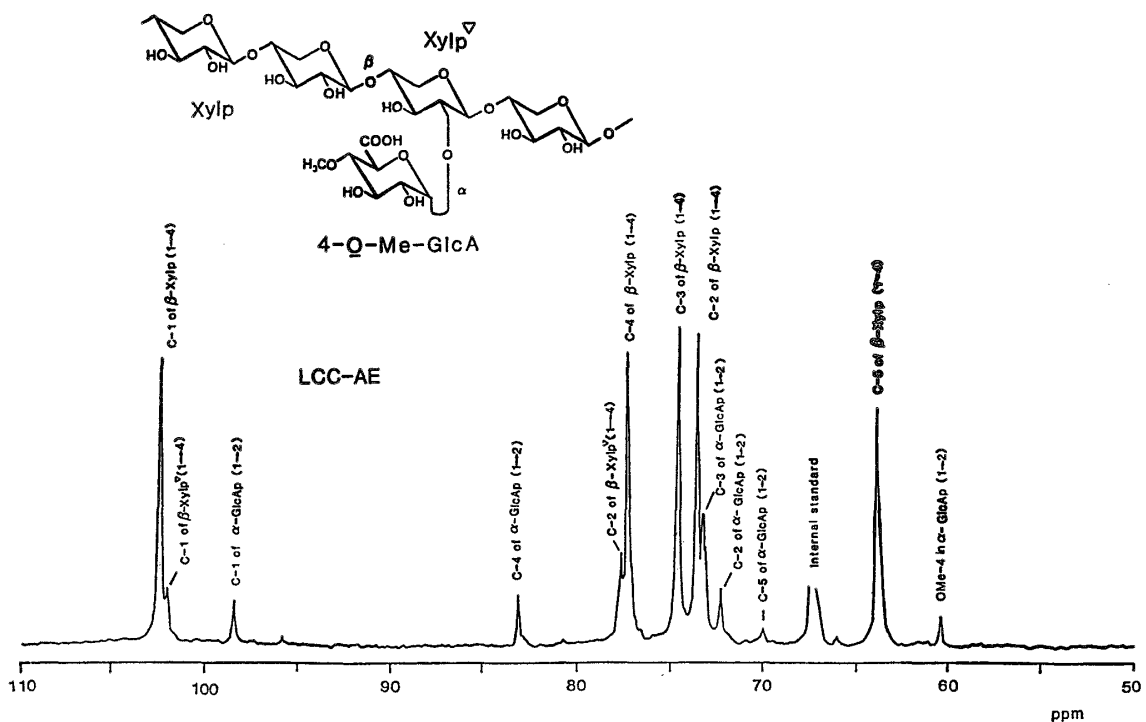


図2 *Albizia falcata* グルクロノキシランの ^{13}C -NMR スペクトル⁴⁾
(アセチル基はアルカリ抽出の際脱離)

語名が“Compound（化合物）”ではなく，“Complex（複合体）”となっているのは，化学結合の明確な証拠が得られなかった歴史的遺産とも言える。LCC は水溶液中で界面活性剤として作用し^{13,14}，樹木中では細胞壁の強度を増強させる働きを持つ¹⁵。このように樹木のからだはセルロース，ヘミセルロース，リグニン，および LCC からなり，全体の 7 割から 8 割を糖鎖が占める。それでは，これらの木材成分を有用物質に変換するにはどうすればよいのであろうか。そのひとつの答えは自然のなかに秘められていると言えよう。

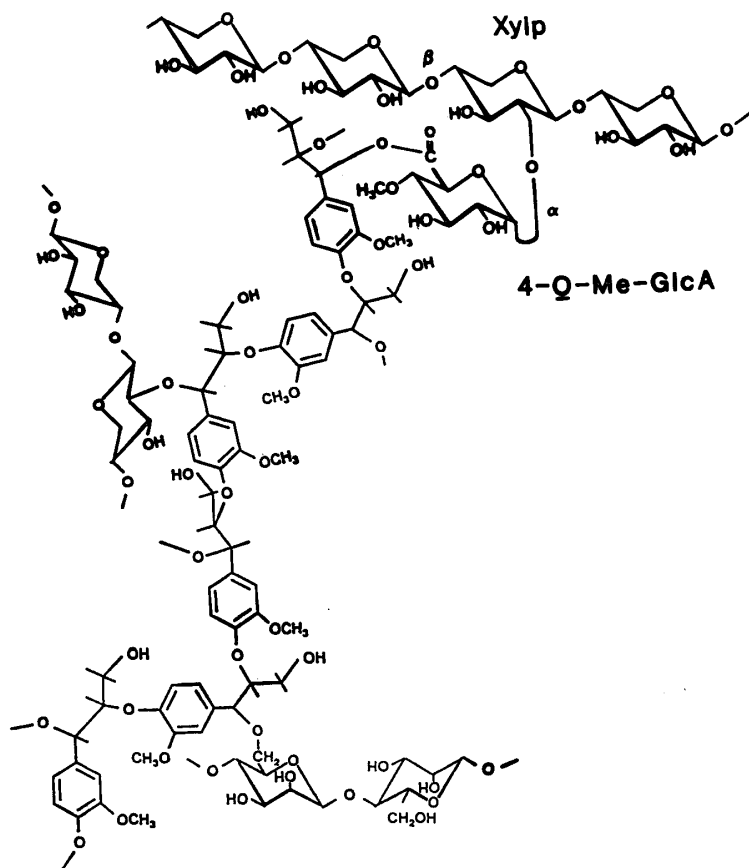


図 3 リグニン—糖結合体（LCC）の構造

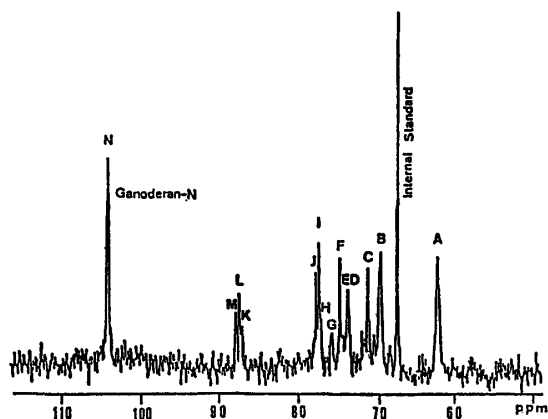


図 4 マンネンタケ β -1,3 グルカンの ^{13}C -NMR スペクトル¹⁶⁾
帰属は表 1，図 5 に記載

森林で育った樹木はやがて寿命をむかえ死にいたる。しかし、樹木がその生涯を終えても、枯木や枯枝が貯まって山のようにつもることはない。これは、かび、バクテリア、放線菌などの微生物が木材を分解しているからである。こうした微生物のもつ分解力は主に酵素の働きによって営まれており、人類がこうした酵素の働きを上手に利用することができれば林産バイオマスを効率的に有用物質に変換できるものと期待できる。とりわけ、木材腐朽菌と呼ばれる担子菌のなかまは木材の分解力が強く、担子菌の生産する酵素の利用法が活発に研究されている。また、担子菌のなかには食用として美味であったり、抗腫瘍活性をもった多糖を生産するものがあり、そうした担子菌を木材を栄養源として効率よく育てることができれば、大変付加価値の高い木材の利用法となることが期待される。さらに、生理活性をもったオリゴ糖や食物繊維も木材から生産することが可能である。

ここでは、木材にはえる“きのこ”も木質系バイオマスと捉え、“きのこ”や樹木の糖鎖から誘導される付加価値の高い化合物とその変換法を紹介してみたい。

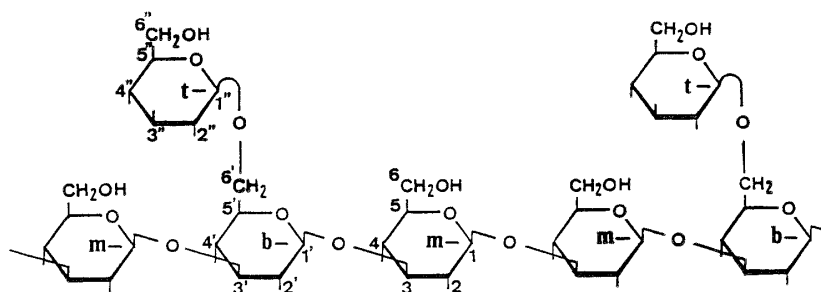


図5 マンネンタケ β-1,3 グルカンの構造¹⁶⁾

表1 β-グルカンの ¹³C-NMR のケミカルシフト¹⁶⁾

Peak	Peak assignment			Chemical shift (ppm) for each carbon atom			
	Residue			Ganoderan-N	HAβ- ¹⁹⁾ glucan	Curdlan ²⁰⁾ (→3Glc→)	GE-3 ²¹⁾ (→6Glc→)
	m-	b-	t-				
A	C-6		C-6''	62.1	61.8	62.4	
B	C-4		C-4'	69.6	69.3	69.9	70.0
C			C-4''	71.2	70.9		71.4
D	C-2	C-2'		73.7	73.6		
E	C-2			73.7	73.8	74.3	
F			C-2''	74.8	74.5		75.0
G		C-5'		75.8	75.4		77.1
H	C-5		C-5''	77.3	76.7		
I	C-5			77.4	77.0	77.7	
J			C-3''	77.8	77.4		78.1
K		C-3'		87.1	86.4		
L	C-3			87.5	87.0	87.5	
M	C-3			87.9	87.7		
N	C-1	C-1'	C-1''	104.1	103.7	104.5	104.9

ピーク番号，糖残基の記号は，それぞれ図4，5に対応

2. 担子菌類の糖鎖の利用

樹木にはえる担子菌には、生理活性を持つポリアセチレン化合物、テルペノイド、芳香族化合物、多糖類を生産するものがあり、こうした有用担子菌の薬理成分を医薬品等として利用するバイオマス変換法がある。医学上重要なものとしてはシイタケ (*Lentinus edodes*) から得られた血清コレステロールを低下させるエリタデニン、血小板凝結抑制作用を持つ 5'-GMP、抗腫瘍活性を持つレンチナン、カワラタケ (*Coriolus versicolor*) の抗腫瘍性糖タンパクであるクレスチンなどが挙げられる。

マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) は中国名で霊芝と呼ばれ、分類学上担子菌類ヒダナンタケ目サルノコシカケ科に属し、梅雨から夏の高温期にかけて立木の根元や切株に発生する。中国ではマンネンタケの効能効果に対する近代的な研究が進み、肝炎、高血圧症、慢性気管支炎、高脂血症など数多くの症状に対して、臨床的効果が解明され、現在薬として使用されている。われわれは霊芝リキュールの性質解明のためマンネンタケの多糖をアルコール水で抽出してその構造を調べた (図4-5, 表1)¹⁶⁾。その結果、抽出された多糖は β -1,3 結合したグルコースの主鎖に3つの1つの割合で β -1,6 結合したグルコースの側鎖をもつ中性グルカンであることを明らかにした。こうした β -1,6 結合したモノグルコシル側鎖をもつ β -1,3 グルカンは宿主仲介性の抗腫瘍活性を持つことが報告されている¹⁷⁾。 β -1,6 結合したモノグルコシル側鎖の結合

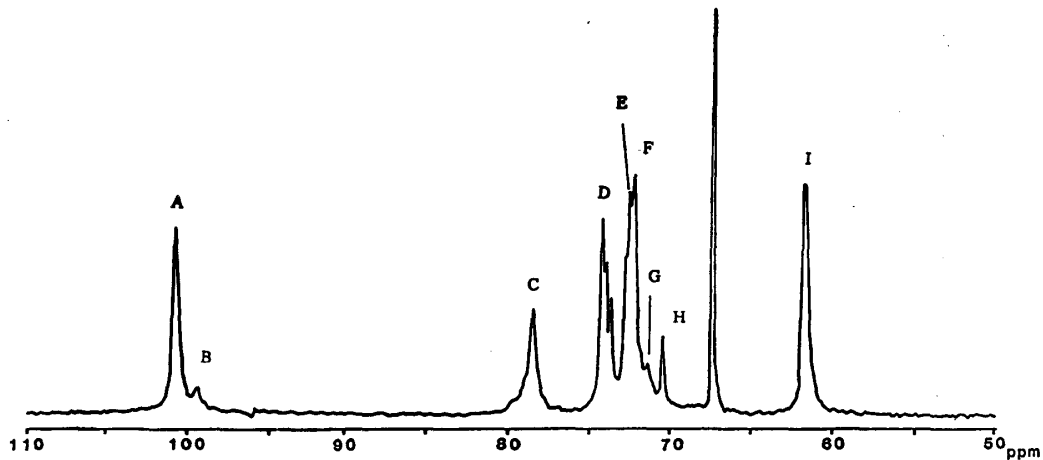


図6 ヒラタケ菌糸より精製した α -1, 4 グルカンの ^{13}C -NMR スペクトル¹⁸⁾
シグナルの帰属は表2に記載

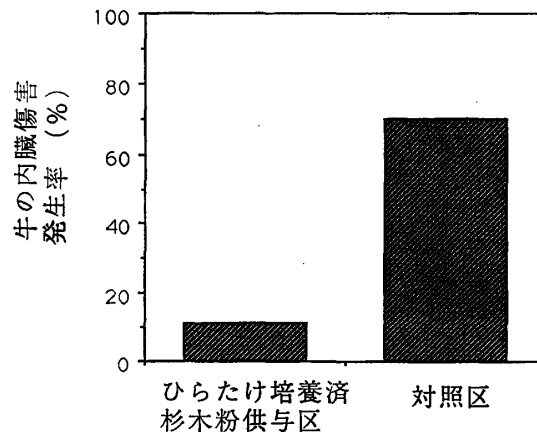


図7 ヒラタケ培養済杉木粉供与による牛の内臓疾患の減少²⁵⁾

表2 ヒラタケ菌糸より精製した α -1, 4-グルカンの ^{13}C -NMR のケミカルシフト¹⁸⁾

Chemical shift (ppm) for each carbon atom				
MHW-N-II	Standard Polysaccharides			Peak assigments
	(α -1→4: 1→6)			
	Amylose	-Glucan ²²⁾	Amylopectin ²³⁾	
A 100.9	100.9			C-1 of α -Glc (1→4) in Amylose and Amylopectin
B 99.5		99.6		C-1 of α -Glc (1→6) in Amylose and Amylopectin
C 78.5	78.4			C-4 of α -Glc (1→4) in Amylose and Amylopectin
D 74.2	74.5			C-3 of α -Glc (1→4) in Amylose and Amylopectin
E 72.5	72.7			C-2 of α -Glc (1→4) in Amylose and Amylopectin
F 72.3	72.4			C-5 of α -Glc (1→4) in Amylose and Amylopectin
G 71.4		71.2		C-5 of α -Glc (1→6) in Amylopectin
H 70.4			70.1	C-4 of α -Glc (1→4) in Amylose and Amylopectin (Non-reducing end)
I 61.6	61.6			C-6 of α -Glc (1→4) in Amylose and Amylopectin

スペクトルは図6に記載，ピーク記号(A～I)は，図6に対応，MHW-N II：ヒラタケ菌糸 α -1, 4-グルカン

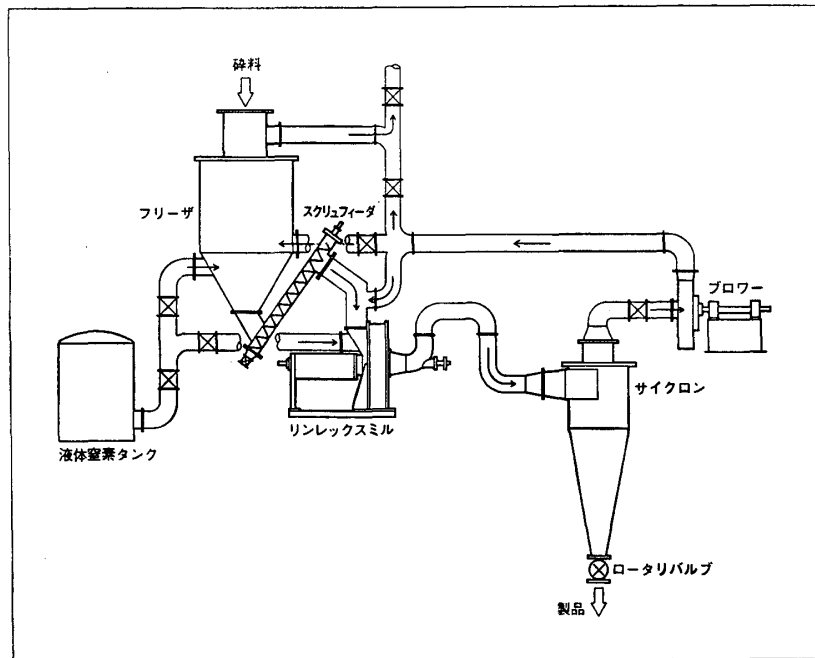


図8 凍結粉碎機の構造

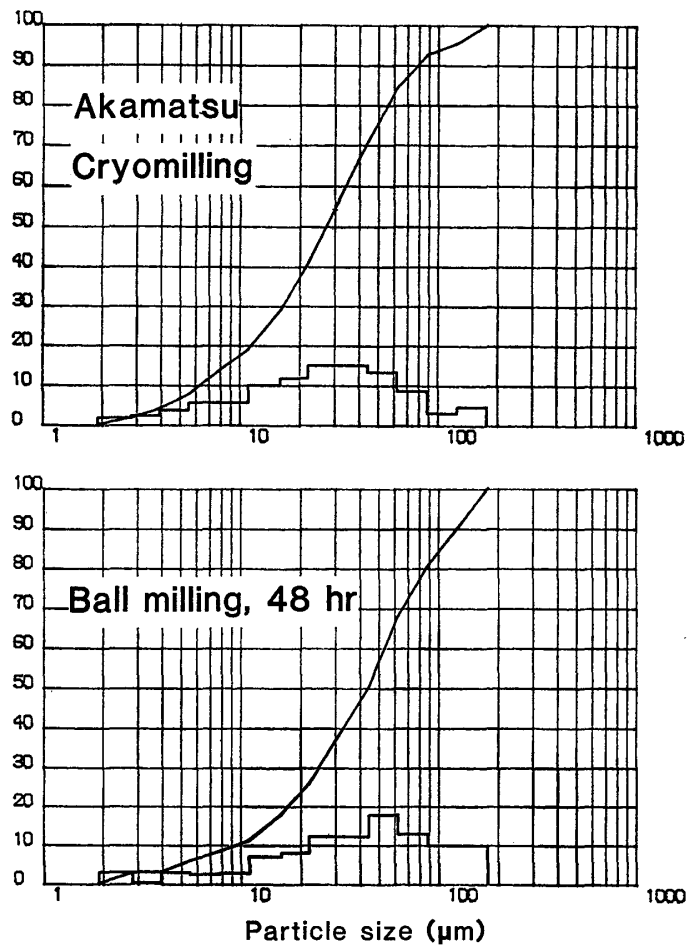
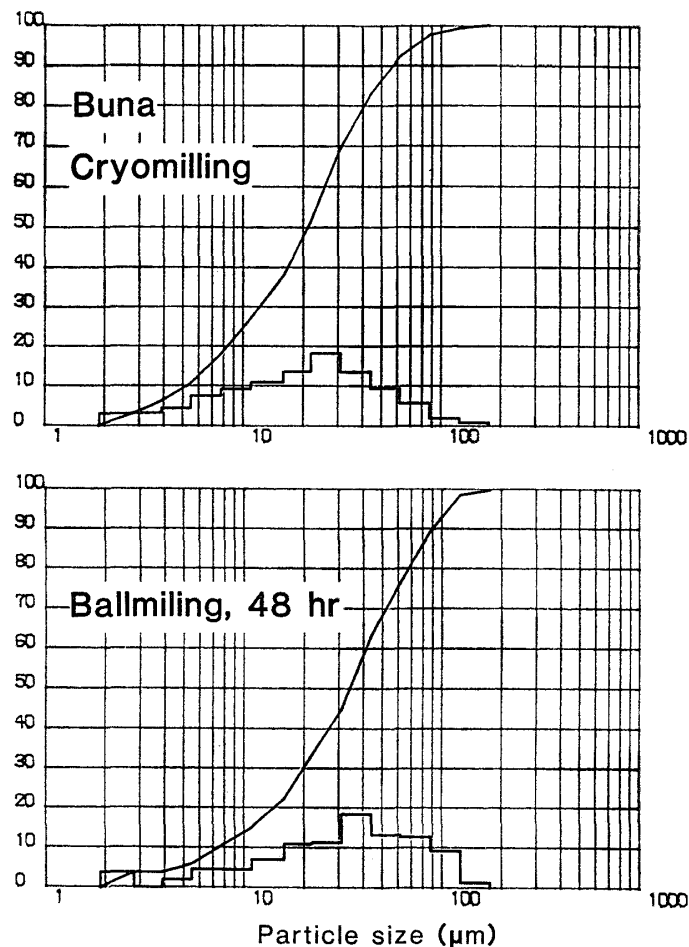


図9 凍結粉碎木粉 (上) とボールミル木粉 (下) の粒子径 (アカマツ)²⁶⁾

図10 凍結粉碎木粉(上)とボールミル木粉(下)の粒子径(ブナ)²⁶⁾

頻度は種によって異なりヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) では4つに1つの割合で結合し、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) では3つに1つの割合で側鎖を持つ。樹木細胞壁の糖鎖はその大部分が β -1,4 結合でできているが、きのこはそれから β -1,3 グルカンやアラビノキシログルカン、フコキシロマンナン、マンノフコガラクトタン、フコガラクトタン、キチン、ガラクトマンナン、キシログルカン、キシロマンノグルカン、あるいは貯蔵性多糖としてのデンプン (図6, 表2)¹⁸⁾ など多種多様な糖鎖をつくる能力を持つ。

また、木材を水蒸気で高温高圧にした後、一気に常圧に戻すと木材組織が破壊される。こうして得られた爆砕処理木粉は牛の飼料として利用できることが知られており、その利用法が各地で研究されている²⁴⁾。ところが、ヒラタケを杉木粉培地で育て、きのこを収穫して残った木粉を牛の飼料に混ぜると牛の内臓疾患が減少することが明かにされた (図7)²⁵⁾。これはさしずめ、“きのこ”と牛の流れ作業による木材の“しめじ”ご飯とステーキへのバイオマス変換であり、木材が食物繊維として牛の消化器系に好影響を及ぼした例である。

3. 樹木の糖鎖から有用物質をつくる

従来、木質バイオマス変換というと木材中にある多糖を単糖まで分解した後、酵母で発酵してアルコールを生産する研究がほとんどであった。しかし、美しい糖鎖の並びをもつ木質系糖鎖を単糖まで分解せず、その配列の特質を活かして高度に利用できれば、木質バイオマスの付加価値が高まると思われる。ここでは、

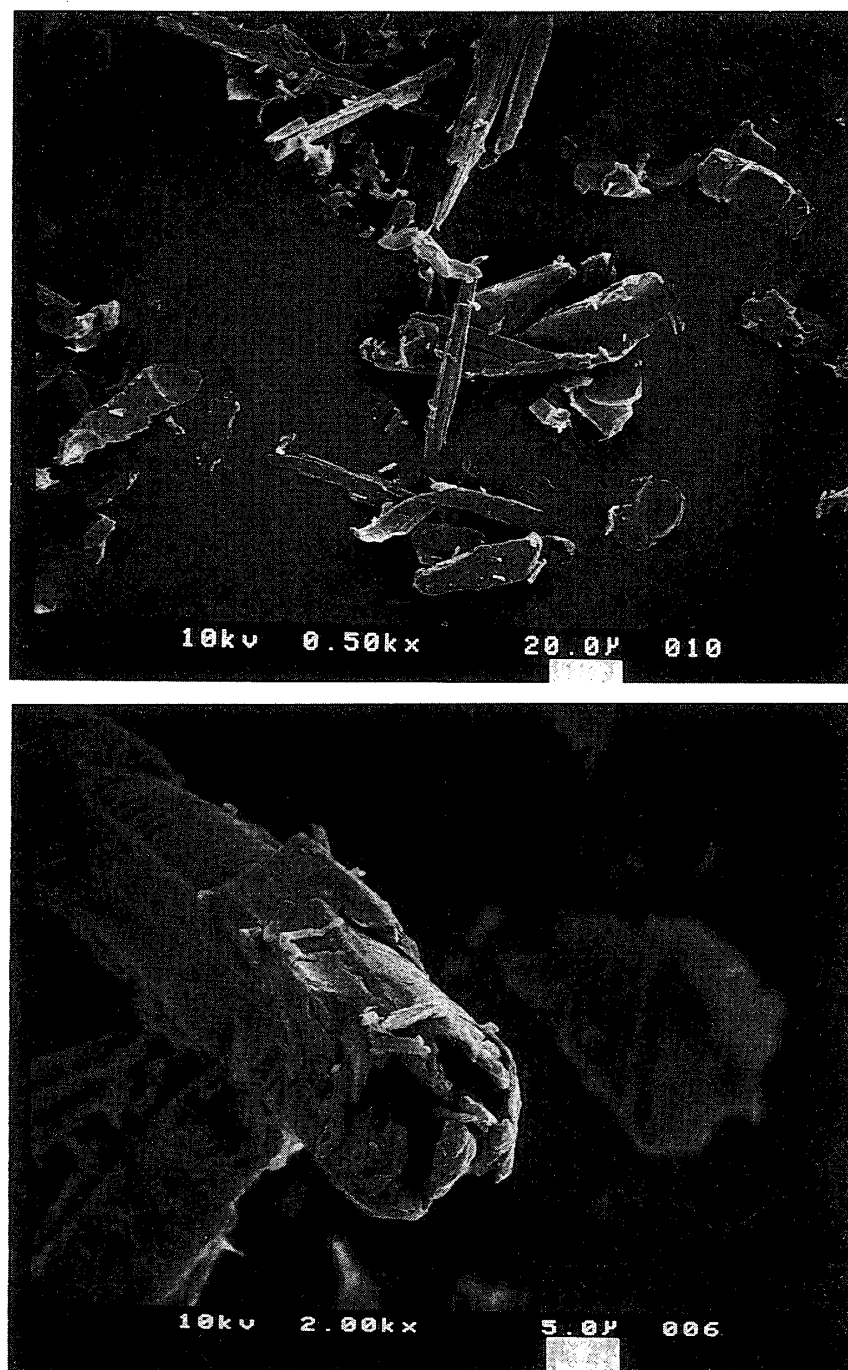


図11 凍結粉碎木粉の走査電子顕微鏡写真²⁶⁾
(上) アカマツ, (下) プナ

高付加価値型の木質系糖鎖のバイオマス変換について主にふれる。

3-1. 木材酵素糖化のための前処理

木材中でセルロースの一部は結晶性の束となって存在しており、またセルロースの束はリグニンや LCC に覆われている。このため、木材をそのままセルラーゼと反応させても、木材中の糖はほとんど分解しない。このことが、木材を有用物質に変換する際の最大の障壁となっている場合が多い。我々は、セルラーゼ

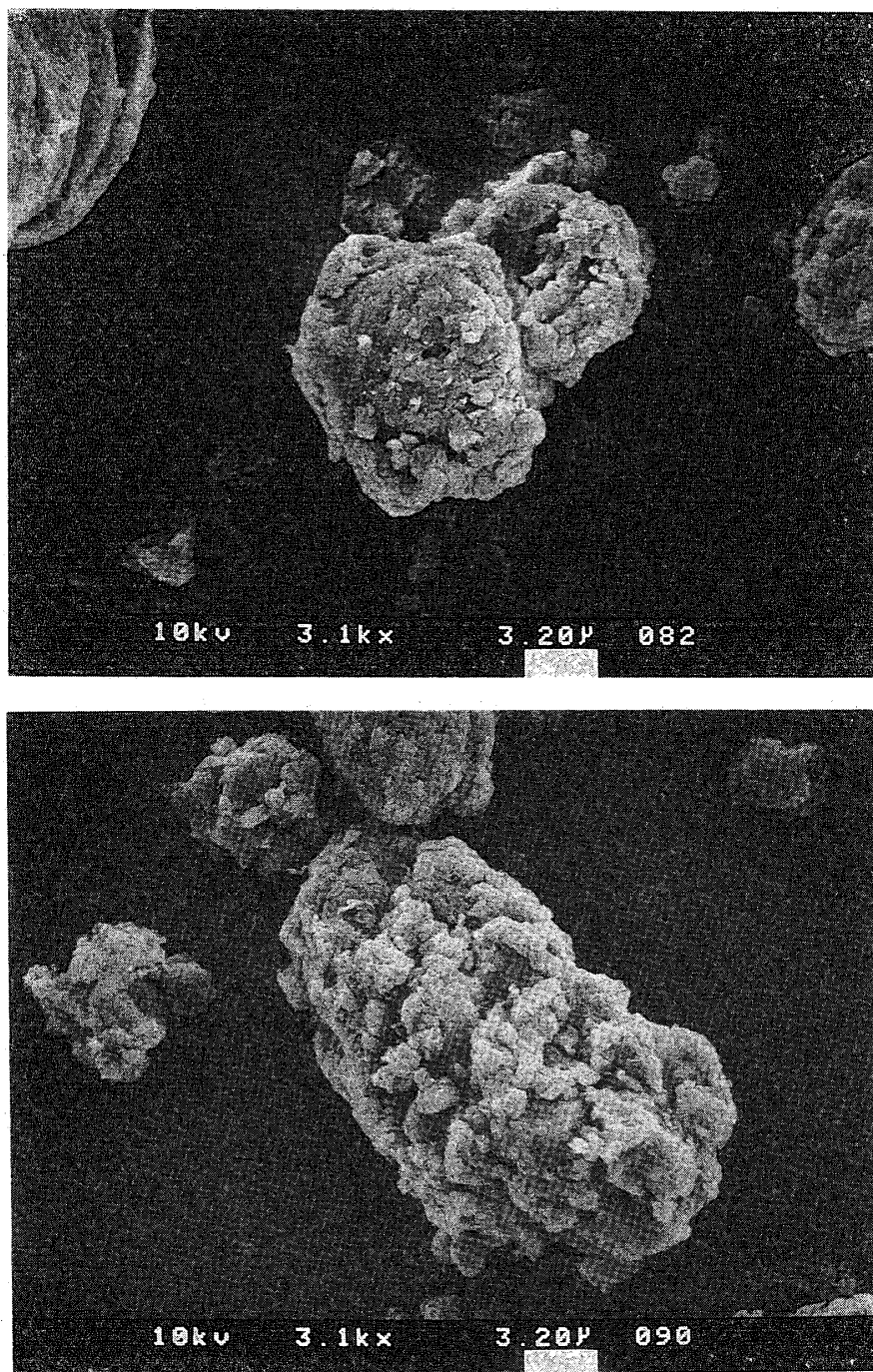


図12 ボールミル木粉の走査電子顕微鏡写真²⁶⁾
(上) アカマツ, (下) ブナ

の反応性と木材組織の破壊状態との関係を考察するため、木材を凍結した状態で微粉碎する凍結粉碎法（図8）と、木材をステンレスボールで摩砕するボールミル粉碎法でアカマツとブナを粉碎し、粉碎木粉をセルラーゼで処理して、その糖化率を比較した。その結果、粉碎した木粉の粒子径はブナ、アカマツとも凍結粉碎法（平均 $30\mu\text{m}$ ）の方がボールミル法（平均 $40\mu\text{m}$ ）より小さいことが明かとなった（図9—10）。しかしながら、粉碎された木粉の形状を走査型電子顕微鏡で調べると、凍結粉碎法は木材組織がほとんど破壊せれ

ずに、主に細胞の剝離や切断によって微粒子化しているのに対し、ボールミル粉碎法では細胞壁そのものが激しく破壊されていることが明かとなった(図11~12)。そこで、この2種類の微粉碎化木粉のセルラーゼとの反応性を調べるため、*Trichoderma viride* 由来のセルラーゼ(メイラーゼ, 明治製菓(株)製)を50°Cで48時間粉碎木粉と反応させた。その結果、セルラーゼ糖化率は凍結粉碎法がブナで0.5%, アカマツで3.5%という小さい値であったのに対し(図13), 細胞壁を摩砕するボールミル処理ではそれぞれ94.6%と84.0%という高い値が得られた(図14)²⁶⁾。従来、酵素糖化前処理のための粉碎は、微粒子化によって酵素との反応性を高めると考えられがちであったが、この結果から微粒子化とセルラーゼ反応率には相関がなく、酵素糖化には、木材組織を破壊し糖鎖分子を露出する前処理が必要なことが明かとなった²⁶⁾。こうした木材の前処理は、摩砕などの機械的処理、マイクロ波加熱、蒸煮・爆砕などの物理化学的処理の他、酸、アルカリ、オゾン、有機溶媒などで脱リグニンを行う化学的処理やリグニン分解菌を用いる生物的前処理がある。この中で生物的前処理は無公害でエネルギー消費量が少ないため、木材酵素糖化^{27,28)}の他、パルプの製造や漂白などとも関連して有用菌株の探索が盛んに行われている。切っても切れない関係(?)にあるリグニンと糖の仲を引き裂くのが木質バイオマス変換の基本である。

3-2. 生理活性高分子としての木質系糖鎖

血液型の識別やガンの転移など生体の細胞認識に糖鎖が関与していることが最近次第に明かとなってきた。アカマツなどに含まれるアラビノガラクトタンは骨髄細胞腫瘍の転移に関与するレクチンのリガンドと類似した構造をもつため、静脈中に投与すると癌細胞の転移を抑制する²⁹⁾。また、セルロースやカードラン、デキストランなどの多糖の硫酸誘導体もエイズウイルスと反応してエイズウイルスによる免疫不全を防ぐ作

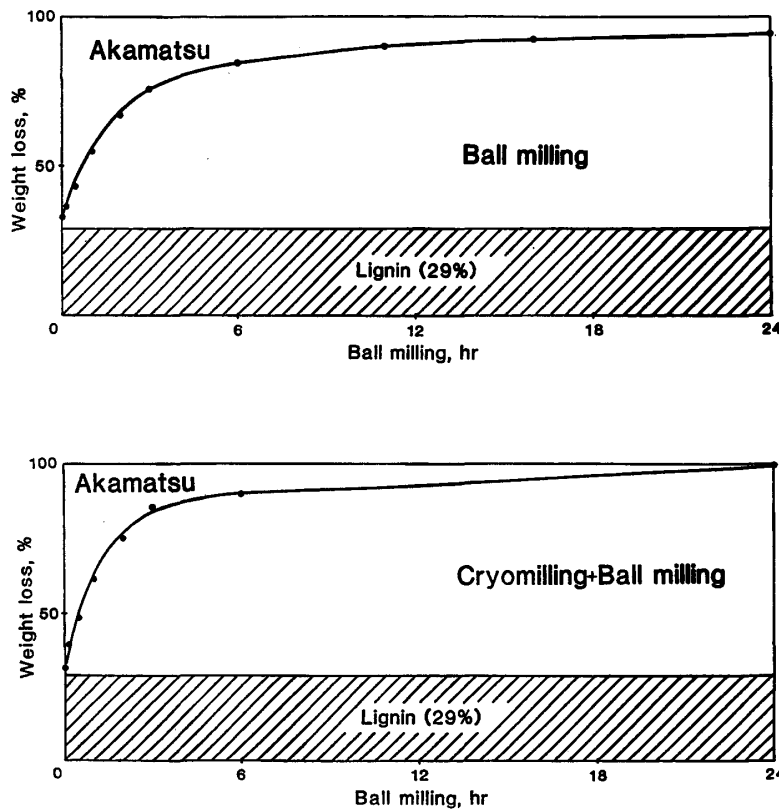


図13 ボールミル粉碎時間と酵素糖化率の関係(アカマツ)²⁶⁾

(上) ウィレーミル処理木粉(60~80メッシュ)のボールミル処理

(下) 凍結粉碎木粉のボールミル処理

粉碎後、セルラーゼで酵素糖化したものの重量減少率

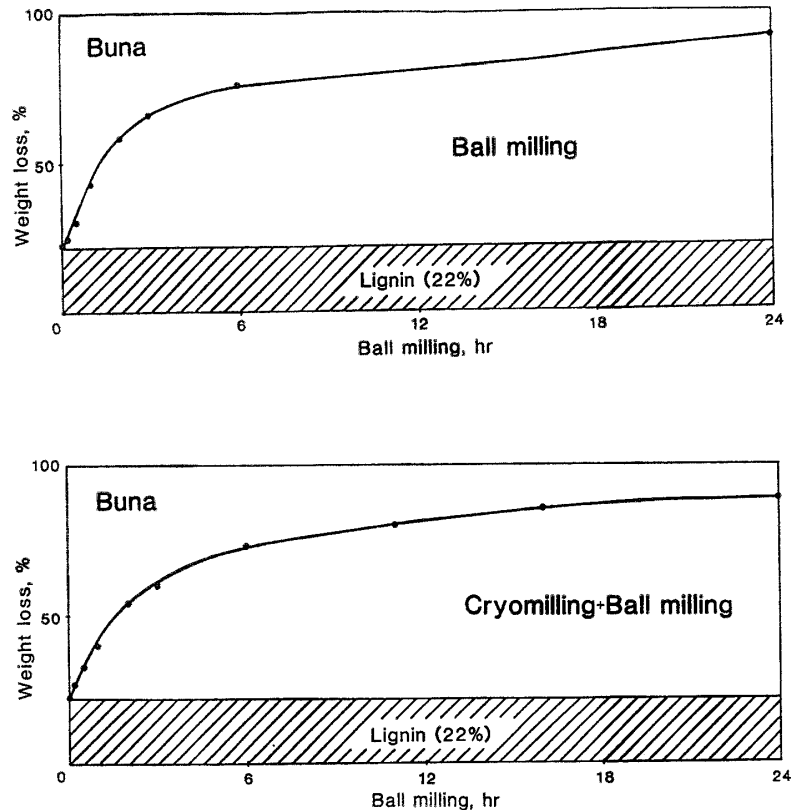


図14 ボールミル粉碎時間と酵素糖化率の関係 (ブナ)²⁶⁾
 (上) ウィレーミル処理木粉 (60~80メッシュ) のボールミル処理
 (下) 凍結粉碎木粉のボールミル処理
 粉碎後, セルラーゼで酵素糖化したものの重量減少率

表3 人の糖質消化酵素³³⁾

消化液/消化器官	酵 素	基 質
唾 液	α -アミラーゼ	デンプン
膵 液	α -アミラーゼ	デンプン
小腸の膜消化酵素	マルターゼ	マルトース
	イソマルターゼ	イソマルトース
	スクラーゼ	ショ糖
	ラクターゼ	乳糖
	トレハラーゼ	トレハロース
	グルコアミラーゼ	マルトオリゴ糖

表4 セロオリゴ糖の調製法

- 1) アセトリシス
- 2) 塩酸加水分解
- 3) 85% 燐酸加水分解
- 4) トリフルオロ酢酸加水分解
- 5) 70% 硫酸加水分解
- 6) 濃硫酸-塩酸加水分解
- 7) 爆砕法
- 8) マイクロ波法
- 9) 酵素分解
 - 9-1) バッチ法
 - 9-2) バイオリクター法

を持つ³⁰⁾。また, リグニン-糖結合体 (LCC) のスルホン酸塩誘導体はきのこの成長促進作用を持つが, リグニンのスルホン酸塩誘導体はきのこ成長抑制作用を持つ^{31,32)}。LCC のスルホン酸塩誘導体はサルフェイトパルプの副産物として工業生産されており, 市販されている。スルホン酸塩としてはカルシウム塩の成長促進効果が高い。LCC のスルホン酸カルシウムを添加してシイタケ, ヒラタケおよびエノキタケを栽培すると, 成長が促進させると同時に, カルシウムがきのこの中に取り込まれ, カルシウムに富むきのこが得

られる³²⁾。

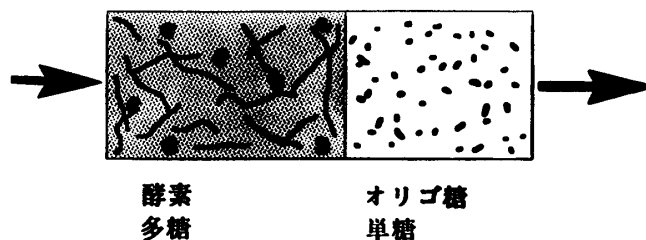
デンプンは、人のもつアミラーゼという糖分解酵素によってグルコースまで分解され、最終的に栄養源として利用される。ところが、キシランやセルロースなどの木質系糖鎖は糖と糖が β 結合で結合しているため、人間のもつ消化酵素（表3）³³⁾では分解されず食物繊維となる。食物繊維にはコレステロールやトリグリセリドの上昇抑制作用、脂質の吸着作用、大腸癌の発生率の低下などの生理作用がある³⁴⁾。また、セルロースには水分や食品の形を一定に保つ効果もあり、木材由来のセルロースがパンやビスケットに加えられ、ファイバー食品として市販されている。

3-3. オリゴ糖生産バイオリアクター

キシランを部分的に分解してできるキシロオリゴ糖は、人の持つ消化酵素（表3）による分解を受けないため血中の糖濃度をほとんど上昇させず、大腸中でビフィズス菌により分解・資化される。この結果、腸内細菌の働きが活発となり便中の水分含量が適度に調整される³⁵⁻³⁷⁾。キシロオリゴ糖は良質の甘味をもち、*Streptococcus mutans*, *S. sanguis* などの虫歯菌を増殖させない。また植物の成長促進作用を持つ³⁸⁾。現在、キシロオリゴ糖は、草本植物由来のキシランのキシラナーゼによる部分加水分解により工業生産されている。

一方、セルロースを部分加水分解して得られるセロオリゴ糖も人の消化酵素によって分解されないため、血中の糖濃度をほとんど上昇させない³⁹⁾。セロオリゴ糖は光学活性高分子の原料となる他、ビフィズス菌増殖作用などキシロオリゴ糖と同様な生理機能が期待されている。しかし、原料となるセルロースは高度に結晶化して水不溶性である上、グルコース間の β -1,4結合は酸加水分解速度が遅いため、セルロースの分解は容易ではない（表4）。セルロースを強酸で加水分解すると結晶性の部分を残したまま、生成したグルコースの一部が5-ヒドロキシメチルフルフラール、レブリン酸などの化合物に変化する。また、デンプンの分解酵素であるアミラーゼに匹敵するほど強力なセルラーゼは発見されていない。こうした「難分解性」のセルロースを身にまとっているおかげで植物は自分の体を重力、雨風、外敵から守っているのであるが、適当に分解して利用しようと企む人間にとってはセルロースの“強さ”は障害となる。我々はセルロースの難分解性を克服してセロビオースを選択的に生産するため、*Trichoderma viride* 由来のセルラーゼと膜分離装置を組み合わせた連続式バイオリアクターを開発した（図15）。

バイオリアクターを用いてセルロースからセロオリゴ糖を生産する試みは、*Celloibrio gilvus* のセルラーゼを用いて佐々木らにより行われた^{40,41)}。*C. gilvus* のセルラーゼは β -グルコシダーゼ活性が弱いため、セロオリゴ糖の生産に適している。しかし、結晶性のセルロースに対する分解力が弱い欠点を持つ。一方、結晶性セルロースに対する分解力の強い *T. viride* 由来のセルラーゼを使用した場合は、共存する β -グル



バイオリアクターのメリット

1. 生成物阻害がない
2. グリコシダーゼによる分解を抑えられる
3. 酵素の回収が容易である
4. 基質濃度を高められる

図15 オリゴ糖製造バイオリアクターの原理

コンダーゼ活性のため、生成したセロオリゴ糖のほとんどはグルコースまで分解する^{42, 43)}。このため、セロオリゴ糖の生産を目的とした場合には、セルラーゼから β -グルコシダーゼを除く処理が試みられている。谷口らは、セルロースカラムクロマトグラフィーを用いて *T. viride* セルラーゼ中の β -グルコシダーゼの大部分を吸着除去し、得られたセルラーゼ標品を用いて、結晶性セルロースであるアビセルをバッチ法で分解した。その結果、セルロースの全糖量 $2.13 \mu\text{mol/ml}$ に対し、生成したグルコース量は $0.83 \mu\text{mol/ml}$ 、還元糖量は $1.67 \mu\text{mol/ml}$ という値を得た。この実験条件では、セロビオースは生成するものの酵素分解物のおよそ50% (モル比) がグルコースまで分解した⁴⁴⁾。グルコース含量が比較的高い原因としては、エキソ-1,4- β -グルコシダーゼ (EC. 3.2.1. 74) の作用によりセルロースから直接グルコースが生成する点と、水に溶けないセルロースに比べ水可溶性のセロビオースの方が酵素加水分解速度が大きいことによる。また、セロビオースはセルラーゼの阻害剤となるため、セロビオースが反応系の中に貯るとセルラーゼが阻害を受けてセルロースの酵素反応速度がさらに遅くなる。バイオリアクター法ではセロビオースを反応系外に除くことで、生成物阻害と残存する β -グルコシダーゼによるセロオリゴ糖の分解を抑えることができる (図15)。他方、セルラーゼによるセロオリゴ糖の生産は、活性炭の存在下で *T. viride* のセルラーゼとセルロースを反応させることによっても行われている。この方法では、セロオリゴ糖と β -グルコシダーゼの接触時間を少なくするため、生成したセロオリゴ糖を活性炭に吸着させながらセルロースを分解する。この方法でのセロオリゴ糖の収率は30%であった⁴⁵⁾。

我々は、グルコースの生成比を抑えながら、セルロースを *T. viride* 由来のセルラーゼと反応させてセロ

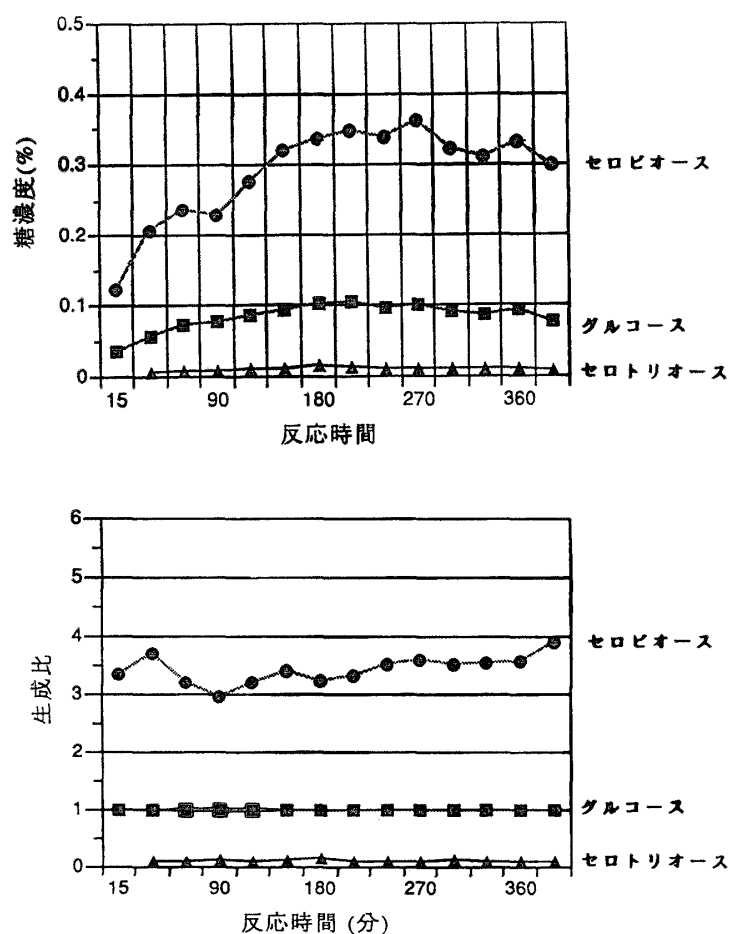


図16 バイオリアクターによるセロビオースの連続生産^{46, 47)}

表5 遠心液液分配クロマトグラフィーによるセロオリゴ糖分離の操作条件

操 作 条 件	分配液組成	Vol. 比	正 溶 出 (上昇法)		反 転 溶 出	
	n-BuOH	4	固定相	下層液		
	iso-ProOH	1	移動相	上層液		
	H ₂ O	5	流 速	4.0 ml/min	流 速	4.0 ml/min
	カートリッジ 種 類 250W×12個 (容量 250 ml)		送液圧	40 kg/cm ²	送液圧	35 kg/cm ²
			排除体積	112 ml		
	試料量	500 mg	回転数	600 rpm	回転数	600 rpm
	上 層	2 ml	分画条件 (1 Fraction) —		分画条件 (1 Fraction) 1.25 min 5 ml	
	下 層	3 ml				
	温 度	25°C				
	検 出 フェノール・硫酸法		溶出量	— fract.	溶出量	50 fract.
			総 量	1,400 ml	総 量	250 ml

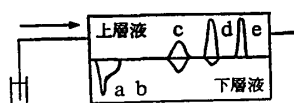
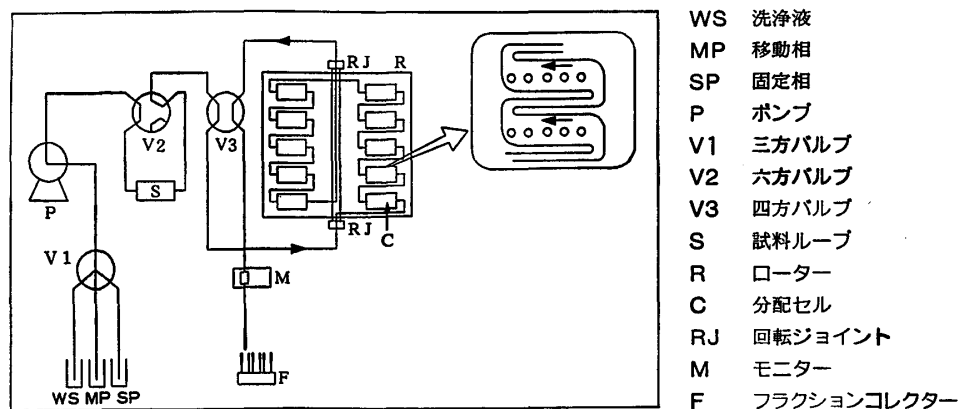


図17 遠心液液分配クロマトグラフィー (CPC) の原理

ビオースを生産するため、セパレーターを備えた高流速膜分離型バイオリクターを開発した。この装置を用い、*T. viride* 由来のセルラーゼを前処理をしない広葉樹サルファイトパルプと 50°C で反応させ、セロビオースを連続的に生産した。この場合のセルロースの分解率は90%以上に達し、セルラーゼから β -グルコシダーゼを除去しないにもかかわらず、セロビオースがグルコースの3.5倍の重量比で連続的に生産された (図16)^{46,47)}。

また、オリゴ糖の分離は通常ゲル濾過などのカラムクロマトグラフィーで行うが、カラムクロマトグラフィーは分離効率が低い上、カラムの経年劣下を起こす欠点を持つ。遠心液液分配クロマトグラフィー (CPC法) は、カラムクロマトグラフィーに比べて分離能は必しも高くないが、短時間で大量の試料を処理でき、また充填剤を使用せず有機溶媒のみで分離を行うため工業化に適した方法と思われる (表5, 図17)。この方法は、比重の異なる互いに混じり合わない2層の溶媒系に対する試料の分配率の差を利用して分離を行う

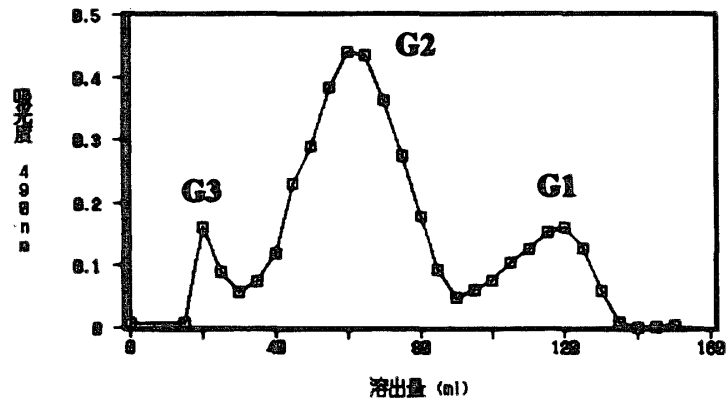


図18 遠心液液分配クロマトグラフィー (CPC) によるセロオリゴ糖の分離

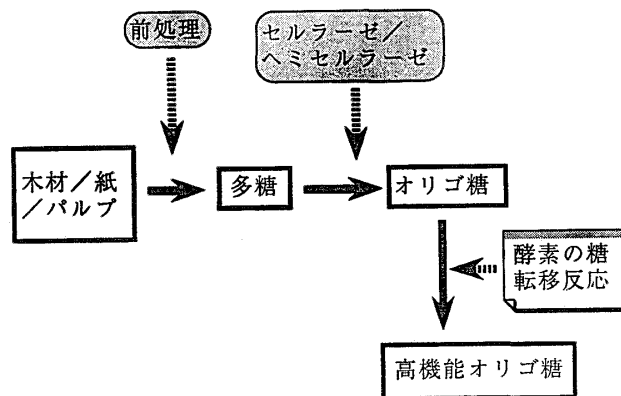


図19 木質系糖鎖のオリゴ糖への変換

方法で、遠心力を加えることによって一方の溶媒をセル内に固定し、比重の異なる移動層を送液ポンプで分散させながら固定層中を通過させて分離を行う。セロオリゴ糖を CPC 法で分離したところ図18に示したようにオリゴ糖が有機溶媒のみによって分離された。

3-4. 酵素によるオリゴ糖の合成

木質系糖鎖を部分的に分解してできるオリゴ糖はグルコースやキシロースなどの単糖よりもはるかに付加価値の高い魅力ある化合物である。しかし、分解によって手にすることができる糖の種類はごくわずかである。そこで、もっと発展的に付加価値の高い糖を作るため、加水分解酵素の糖転移反応によるオリゴ糖の合成法が研究されている (図19)。

糖の特徴とは何であろうか？ それは水酸基 (OH 基) という一つのタイプの官能基が隣あって幾つも並んでいることである。この特徴のため、糖と糖を特定の結合様式で結合させることは大変難しい。たとえば、グルコースとグルコースを結合させる組合せは、糖のリング型をピラノース型に限定しても11通りある。これが、3個つながると、176通りとなる。さらに、3種類の異なるヘキノースからなる3種類の組合せは1,056通りとなる。この特徴のため、化学試薬を用いて糖と糖を結合させる場合には水酸基を区別するための反応を幾度も繰り返さなければならない。それでも、アノマー効果や立体障害のため合成の困難なオリゴ糖がある。また、糖の有機合成は有害なハロゲン化物を使用するため、有機合成品は日本では食品添加物として認められていない。酵素はこれに対して特定の化合物と特定の反応を起すことが可能で、しかも安全であるという優れた特徴を持っている。われわれは、加水分解酵素を用いてオリゴ糖を合成するため次のような作戦を立てた。

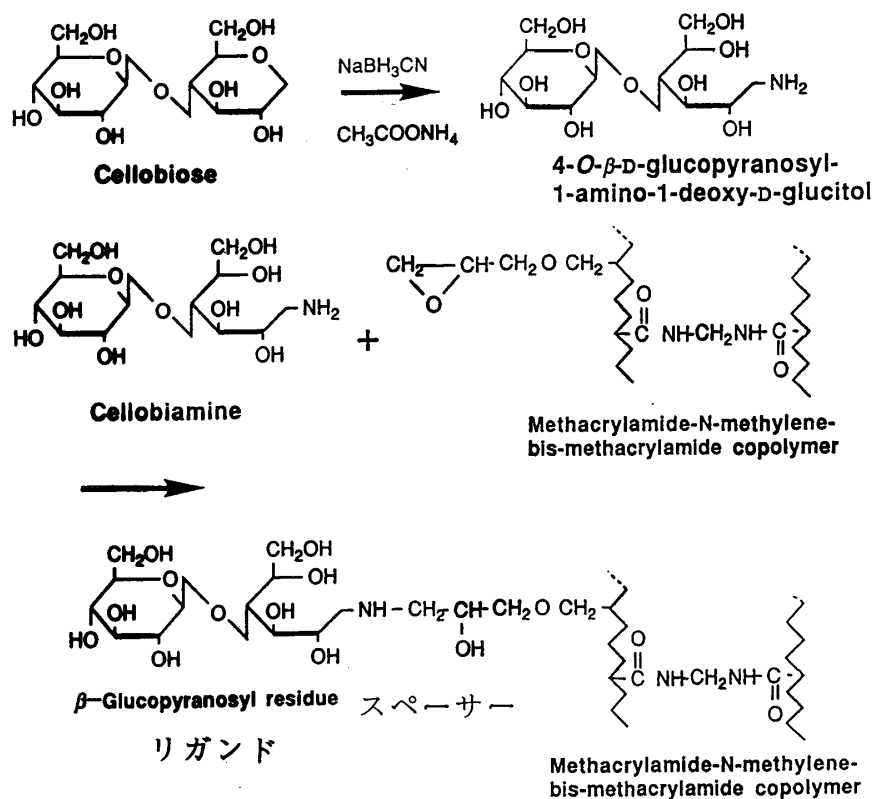


図20 グリコシダーゼの特異的吸着体の合成^{48,49)}

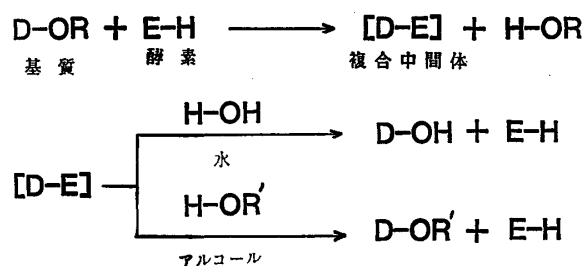


図21 酵素による糖加水分解反応と糖転移反応のメカニズム

3-4-1 グリコシダーゼのアフィニティークロマトグラフィー

有用な反応を起こす酵素を利用するためには、その酵素を単離し性質を明らかにしなければならない。酵素を化学修飾したり、遺伝子工学的に利用していくためにもこれは必須の作業である。そこで、簡単に目的となる酵素が精製できるように糖加水分解酵素の基質結合部位と親和性をもつ化合物をリガンドとする特異的吸着体を開発した。その構造を図20に示す。この方法では、リガンドの種類を変えることにより、異なる種類のグリコシダーゼを精製することができる。我々は、このアフィニティークロマトグラフィーを用いて、*Aspergillus niger* から β -グルコシダーゼを精製した^{48,49)}。

3-4-2 糖転移反応によってオリゴ糖を合成する

糖加水分解酵素は糖のグリコシド結合を切断するが、加水分解と同時に縮合反応や糖転移反応を起こすものがある。糖転移反応は図21に示すように、酵素基質複合中間体に、水ではなく糖などのアルコールが付加することによる。一般に、反応の pH を加水分解の至適 pH からはずしたり、反応系に有機溶媒を加えて生

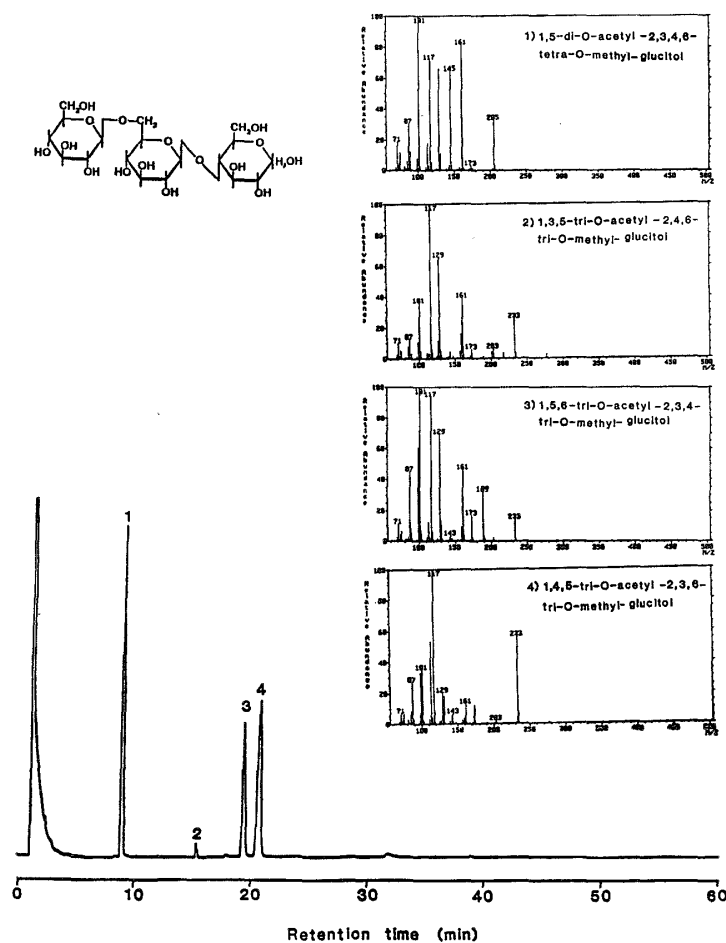


図22 *Aspergillus niger* β -グルコシダーゼの糖転移反応によって合成した3糖類のメチル化分析⁴⁸⁾

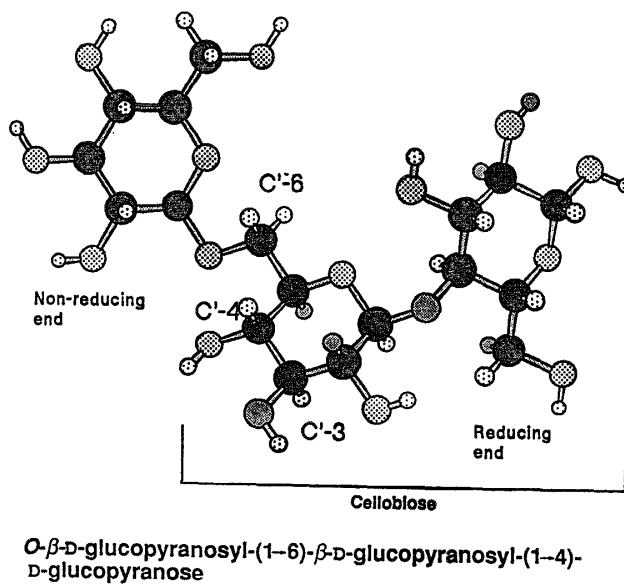
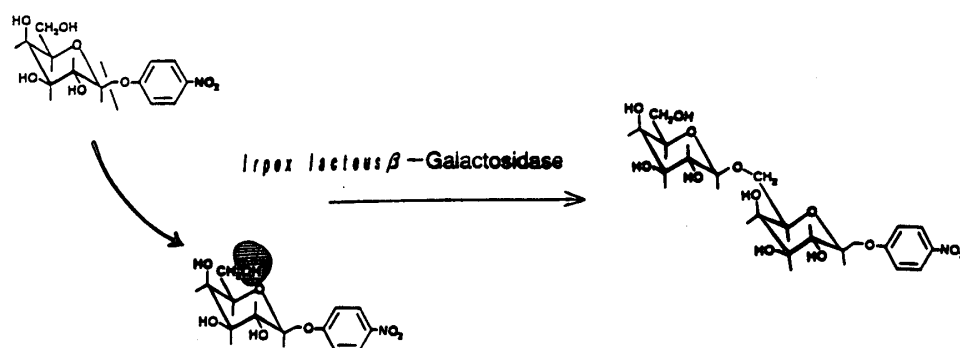


図23 *Aspergillus niger* β -グルコシダーゼの糖転移反応によって合成した3糖類一分子力学計算法によって求めたエネルギー極小の構造

図24 *Irpex lacteus* β -ガラクトシダーゼによる糖転移反応⁵⁰⁾

成物の溶解度や水分含量を減少させると、合成反応が促進される。上に述べた *A. niger* の β -グルコシダーゼも中性条件や有機溶媒を反応系に加えることによってセロビオースと反応して3糖類に合成することを見出した。この際、糖転移反応はセロビオースの非還元末端6位に対して優先的に起こり、3種類 *O*- β -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)-D-グルコースが生成した(図22, 23)。反応系に加える有機溶媒としてはアセトニトリルが最も効果的であった。

また、木材腐朽菌である *Irpex lacteus* を培養して、分泌される β -グルコシダーゼと β -ガラクトシダーゼの生産性と性質を調べた。その結果、*Irpex lacteus* の生産する β -グルコシダーゼと β -ガラクトシダーゼはそれぞれセロビオースとラクトースによる誘導を受け、このうち β -ガラクトシダーゼは配糖体 *p*-ニトロフェニル β -ガラクトシドと反応して位置選択的にガラクトースを2つもつ配糖体を合成することを見出した。この場合、糖転移はガラクトース C-6 位に対し選択的に起こった(図24)⁵⁰⁾。このように、部分的に保護基を入れた糖を酵素と反応させたり、ハロゲンを導入したオリゴ糖を酵素と反応させる新しい糖の合成化学が注目されている。有機合成法で合成困難な糖鎖は酵素反応を利用していくべきであると考えられる。また、糖鎖の合成や機能発現に分子設計を導入することも活発化している。その応用例を以下に示す。

3-4-3 味覚の発現と糖質の構造相関

糖と言えば「甘い」という言葉が連想される。これは、図25に示したように甘味剤である糖が舌にある味細胞の AH, B, X という反応部位で互いに結合することによって感覚器が刺激を受け電気信号に変えられるためである。これらの反応部位のうち、AH, B という2つの部位は水素結合で甘味剤と結合し、Xは疎水結合で結合する。そこでシロ糖の構造と分子密度分布が分子軌道法で計算され、糖のどの部位が舌の味細胞と反応するかが計算された。その結果、AH と Bはシロ糖のグルコースの2位と3位で結合し、Xはフルコース残基と結合することが予測された(図25)^{51~53)}。実際、Hough らは、疎水結合反応サイトのフルコース側の水酸基を疎水性の塩素に置換してやることによりX位の結合力を高め、その結果シロ糖の甘さを3,500倍に増加させた^{53~55)}。木材のセルロースやグルコマンナンの分解物から得られるグルコースもメチル化や塩素化によって自由に甘さが変わることが示されている。また、木材由来の中性糖のうち、 β -マンノースは唯一苦みを呈するが、それ以外は甘味を呈する(図26)^{56,57)}。 β -マンノースが苦みを呈するのは一番目と二番目の酸素原子がリングの酸素原子と 2.5Å 隔たった同一平面上に位置するためであると言われている⁵⁷⁾。味覚の発現を原子オーダーで予測制御することが可能となりつつある。

3-5. 単糖から得られる有用物質

ヘミセルロース分解酵素(ヘミセルラーゼ)やセルラーゼによって木材の多糖類を単離まで分解すると、分解された糖質を微生物の栄養源とすることが可能である。このようにして微生物の代謝系に組み込まれた糖からは、エチルアルコール、アセトン、ブタノール、アミノ酸、タンパク質など多種多様な化合物が生産

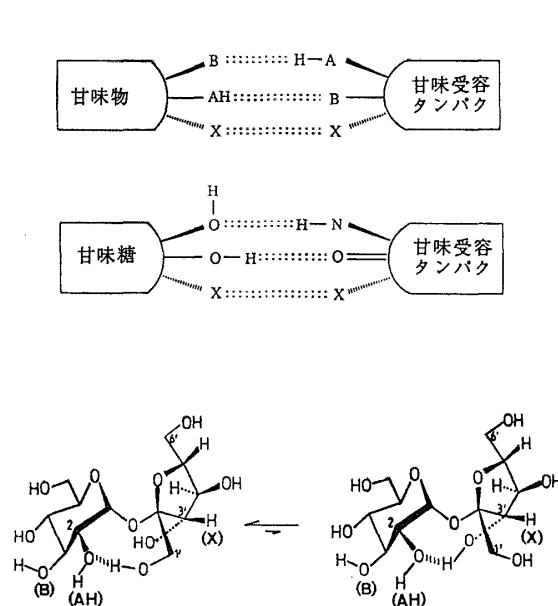


図25 甘さの発現メカニズムとショ糖の甘味反応サイト⁵¹⁻⁵³⁾

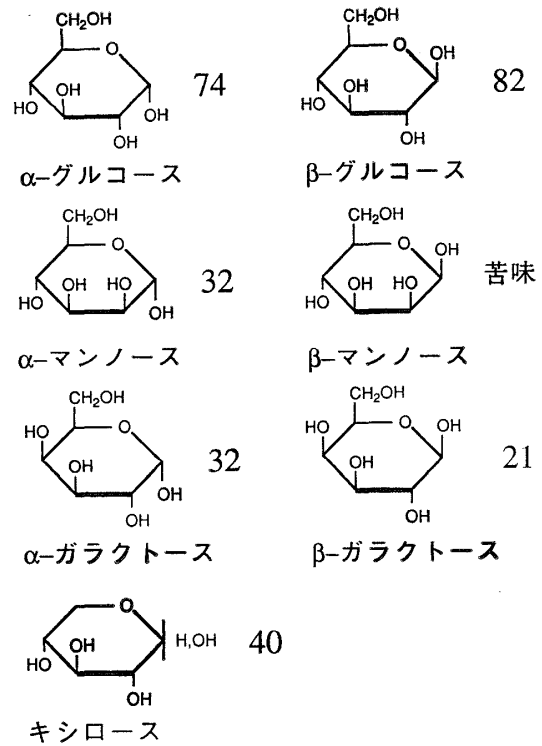


図26 木質系糖質の甘味度
(ショ糖の甘味度=100)⁵⁸⁾

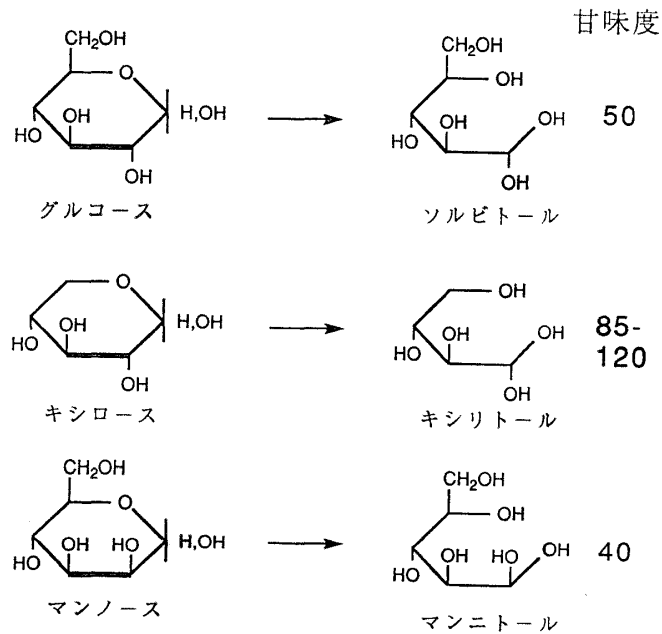


図27 糖アルコールの甘味度 (ショ糖の甘味度=100)⁵⁸⁾

される。また、単糖は還元することによって糖アルコールとなり、元の糖にはない生理機能が生まれる。たとえば、キシロースとグルコースを還元することによってできるキシリトールとソルビトールは、血糖値をほとんど上昇させず、補酵素の NADP や NADPH を生産するので、輸液剤の糖質ベースとして利用される。

これらの糖アルコールにはビタミン B₁, B₂ の合成促進作用, 鉄の吸収促進作用, 抗ケトン作用, 抗う歯作用などがあり, キシリトールはショ糖に匹敵する甘さがある (図27)⁵⁸⁾。また, マンノースの還元物であるマンニトールは浸透圧利尿剤として用いられ, 吸湿性が低いためキャンデーやチューインガムの防湿剤・甘味剤としても利用されている。また, コリネバクテリウムの遺伝子を *Erwinia* という土壌細菌に導入することにより, グルコースから1ステップでビタミンCを合成する試みもなされている⁵⁹⁾。このように, 遺伝子工学的に糖の発酵プロセスを改良する研究も盛んである。

4. お わ り に

糖質は甘味をもつが, リグニンの主要骨格であるグアイアシル核をもつ誘導体には辛味をもつ化合物が多数知られている。親水性の糖と疎水性のリグニンという異なるタイプの高分子化合物を合わせもつ木材から, 性質を異にする様々な有用物質が生まれることが期待される。

本総説に記載した研究のうち, セロオリゴ糖製造用バイオリアクターに関する研究は日本化学機械製造(株)との共同研究であり, 都宮孝彦氏および笹谷昌見氏と共に行ってきたものである。また, セロオリゴ糖の分離に関する研究は三鬼エンヂニアリング(株)小菅康孝氏との共同研究の形で行なわれた。ヒラタケ培養済木粉による牛の内臓疾患減少のデータは四国健康食品(株)近藤泰史氏より提供されたものである。さらに, 凍結粉碎に関する研究は, 大阪ガス(株)総合研究所宮田知幸氏の御協力を得た。

記して皆様に感謝申し上げます。

引 用 文 献

- 1) R.H. WHITTAKER and G.E. LINKENS: *Ecol. Stud.*, **14**: 305 Springer, Berlin (1975)
- 2) T. WATANABE, J. AZUMA and T. KOSHJIMA: *Mokuzai Gakkaishi*, **33**: 798 (1987)
- 3) T. WATANABE, K. INABA, A. NAKAI, T. MITSUNAGA, J. OHNISHI and T. KOSHJIMA: *Phytochem.*, **30**: 1425 (1991)
- 4) T. WATANABE, T. KOSHJIMA, T. IMAMURA and M. KARINA: *Proceedings of 6th International Symp. on Wood and Pulping Chem.*, **1**: 275 (1991)
- 5) I.S. GOLDSTEIN: *Science*, **189**: 847 (1975)
- 6) G.M. LAEKEMAN, L. VAN HOOF, A. HAEMERS, D.A. VANDEN BERGHE, A.G. HERMAN and A.J. VLIETINICK: *Phytotherapy Res.*, **4**: 90 (1990)
- 7) T. WATANABE, J. OHNISHI, Y. YAMASAKI, S. KAIZU and T. KOSHJIMA: *Agric. Biol. Chem.*, **53**: 2233 (1989)
- 8) T. WATANABE and T. KOSHJIMA: *Agric. Biol. Chem.*, **52**: 2953 (1988)
- 9) T. WATANABE, S. KAIZU and T. KOSHJIMA: *Chem. Lett.*, **1986**: 1871
- 10) J. OHNISHI, T. WATANABE and T. KOSHJIMA: *Phytochem.*, **31**: 1185 (1992)
- 11) T. WATANABE: *Wood Res.*, **76**: 59 (1989)
- 12) 渡辺隆司(分担執筆): リグニンの化学—基礎と応用(増補改訂版)—中野準三編, ユニ出版, 東京, 425 (1990)
- 13) F. YAKU, S. TSUJI and T. KOSHJIMA: *Holzforschung*, **33**: 54 (1979)
- 14) T. KOSHJIMA, T. WATANABE and F. YAKU: *ACS Symp. Ser.*, **397**: 11 (1989)
- 15) 高瀬節子, 白石信夫: 第38回日本木材学会研究会発表要旨集, 269 (1988)
- 16) 稲葉和功, 渡辺隆司, 高野真奈美, 光永俊郎, 越島哲夫: 日本栄養・食糧学会誌, **45**: 163 (1992)
- 17) 水野 卓, 加藤尚美, 戸塚 夫, 新海健吉, 清水雅子: 農化, **58**: 871 (1984)
- 18) 稲葉和功, 渡辺隆司, 北村 馨, 光永俊郎, 越島哲夫: 日本栄養・食糧学会誌, in press (1992)
- 19) Y. YOSHIOKA, R. TABETA, H. SAITO, N. UEHARA and F. FUKUOKA: *Carbohydr. Res.*, **140**: 93 (1985)
- 20) H. SAITO, T. OHMI, N. TAKATSUKA and Y. SASAKI: *Carbohydr. Res.*, **58**: 293 (1977)
- 21) H. SAITO: *ACS Symp. Ser.*, **150**: 125 (1981)
- 22) R. PARTHASARATHY, J.M. OHRT and G.B. CHHEDA: *J. Am. Chem. Soc.*, **96**: 8081 (1974)

- 23) P. DAIS and A.S. PERLIN: *Carbohydr. Res.*, **100**: 117 (1982)
- 24) 「蒸煮広葉術による乳牛および肉用牛の飼養マニュアル」, 農林水産技術会議事務局編, 東京 (1988)
- 25) 近藤泰史, 未発表データ.
- 26) 渡辺隆司, 吉村直子, 越島哲夫: 第33回リグニン討論会講演要旨集, 25 (1988)
- 27) 桑原正章, 渡辺隆司, 麻田恭彦: 文部省エネルギー重点領域研究平成3年度研究成果報告書, 131 (1991)
- 28) T. SAWADA, Y. NAKAMURA, M. MOHAMED, T. WATANABE and M. KUWAHARA: *Proceedings of 6th International Symp. on Wood and Pulping Chem.*, **2**: 463 (1991)
- 29) I. CORNIL, R.S. KERBEL and J.W. DENNIS: *J. Cell Biol.*, **111**: 773 (1990)
- 30) 山本直樹: 医学のあゆみ, **152**: 753 (1990)
- 31) 稲葉和功, 飯塚義富, 越島哲夫: 木材誌, **28**: 319 (1982)
- 32) 稲葉和功, 飯塚義富, 越島哲夫: 日本防菌防黴学会誌, **12**: 57 (1984)
- 33) 武藤泰敏: 新版 消化・吸収・消化管機能の調節と適応, 第一出版, 東京, 164 (1988)
- 34) 印南 敏: 食物繊維—印南 敏, 桐山修八編, 第一出版, 東京, 3 (1982)
- 35) 岡崎昌子, 藤川茂昭, 松元信也: 日本栄養・食糧学会誌, **43**: 395 (1990)
- 36) 藤川茂昭, 岡崎昌子, 松元信也: 日本栄養・食糧学会誌 **44**: 37 (1991)
- 37) 岡崎昌子, 好田祐史, 泉 玲子, 藤川茂昭, 松元信也: 日本栄養・食糧学会誌, **44**: 41 (1991)
- 38) 石原光朗, 長尾精文, 志水一允: 第41回日本木材学会大会研究発表要旨集, 315 (1991)
- 39) A.M. UGOLEV: *Physiology and Pathology of Membrane Digestion*, 107, Plenum Press, New York (1968)
- 40) 佐々木堯, 谷口 肇, 貝沼圭二: 特開平1-256394.
- 41) 谷口 肇: 農化, **63**: 1135 (1989)
- 42) バイオマス変換計画—豊かな生物資源を活かす, 農林水産省農林水産技術会議事務局編, 東京, 515 (1991)
- 43) 野崎信幸, 中川秀幸, 柏木 豊, 馬替由美, 佐々木堯: 日本食品工業学会誌, **33**: 496 (1986)
- 44) M. FUJII, T. HOMMA, E.D. BAKAR and M. TANIGUCHI: 第24回化学工学会研究発表講演要旨集, **2**: 350 (1991)
- 45) Y. KUBA, Y. KASHIWAGI, G. OKADA and T. SASAKI: *Enzyme Microb. Technol.*, **12**: 72 (1990)
- 46) 渡辺隆司, 桑原正章, 越島哲夫, 都宮孝彦, 笹谷昌見: 特願平4-128899.
- 47) 渡辺隆司, 桑原正章, 越島哲夫, 都宮孝彦, 笹谷昌見: 特願平4-129000.
- 48) T. WATANABE, T. SATO, S. YOSHIOKA, T. KOSHIJIMA and M. KUWAHARA: *Eur. J. Biochem.*, **209**: 651 (1992)
- 49) 渡辺隆司: セルロース資源—越島哲夫編, 学会出版センター, 東京, 49 (1991)
- 50) 渡辺隆司, 菅谷明美, 桑原正章: 第42回日本木材学会大会講演要旨集, 369 (1992)
- 51) C. CHRISTOFIDES and D.B. DAVIS: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1985**: 1533
- 52) D.B. DAVIES and J.C. CHRISTOFIDES: *Carbohydr. Res.*, **163**: 269 (1987)
- 53) F.W. LICHTENTHALER, S. IMMEL and U. KREIS: *Carbohydrate as raw organic materials*-Ed. by F.W. Lichtenthaler, VCH, Weinheim, 1 (1990)
- 54) L. HOUGH and R. KHAN: *Trends Biol. Sci.*, **3**: 61 (1978)
- 55) L. HOUGH and R. KHM: *Progress in Sweeteners*-Ed. by T.H. Gren, Elsevier Appl. Sci., London, 102 (1989)
- 56) 有吉安男: 化学と生物, **12**: 189, 274 (1974)
- 57) 有吉安男: 味とにおいの化学—日本化学会編, 学会出版センター, 東京, 85 (1976)
- 58) 浅岡久俊: 糖質, 丸善, 東京, 127 (1986)
- 59) J.F. GRINDLEY, M.A. PAYTON, H. VAN de POL and K.G. HARDY: *Appl. Environm. Microbiol.*, **54**: 1770 (1988)