

植物細胞壁構成成分の水熱処理技術の開発と抽出成分の酵素分解

誌名	応用糖質科学：日本応用糖質科学会誌 = Bulletin of applied glycoscience
ISSN	21856427
著者名	天野, 良彦
発行元	日本応用糖質科学会
巻/号	7巻1号
巻号補足	
掲載ページ	p. 2-9
発行年月	2017年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat





—受賞論文—

Extraction of Plant Cell Wall by Hydrothermal Reaction and Its Enzymatic Degradation*

植物細胞壁構成成分の水熱処理技術の開発と抽出成分の酵素分解*

天野良彦 (あまの よしひこ)^{1,**}Yoshihiko Amano^{1,**}

¹ 信州大学学術研究院工学系
380-8553 長野市若里 4-17-1

¹ Institute of Engineering, Academic Assembly, Shinshu University
4-17-1 Wakasato, Nagano-shi, Nagano 380-8553, Japan

要旨：本研究で開発した連続式の水熱反応装置は、常温・常圧でスラリー状の試料を投入し、高温・高圧の水処理を経て、再び常温・常圧の状態に戻して排出するものである。この水熱反応装置は水を完全な密閉容器内でガス層のない液密状態で反応させるところに特徴がある。このような条件では、水自体が触媒活性を有し、なおかつ誘電率が低いことから通常の水では溶解しない成分の抽出が可能となる。この性質を活かして、植物細胞壁の成分のうち主にヘミセルロースを可溶化させ、リグノセルロースとの分離を可能とした。通常ヘミセルロースの抽出にはアルカリが用いられることが多いが、天然のヘミセルロースは多くのエステル基により修飾されているため、これらの多くは加水分解されてしまっていた。本研究では、エステル基をできるだけ天然に近い形で保持できる水熱反応条件を特定し、これまでにない構造の糖質を抽出することに成功した。これらの抽出成分を NMR で構造解析すると共に、酵素処理後に MALDI TOF-MS 分析を行い、水熱反応ではアセチル基やフェルラ酸などが保持された、重合度分布の広い画分が得られることを見出した。

キーワード：キシロオリゴ糖、フェルラ酸、アセチル化、コーンコブ、水熱反応、分子量解析***

1. はじめに

植物の細胞壁は、その種類によって含まれる成分や構造が異なっており、それ故にこれを分解する微生物も異なっている。植物が海から陸へと上がる過程で、乾燥耐性や陸上でしっかりと直立するために、セルロースやリグニンを獲得してきたと考えられている。このセルロースやリグニンを分解する微生物が存在しない時代には、多くの植物性残渣が堆積し、これが長い年月を経て石炭などに变化したものが化石資源として地下に埋もれている(石炭紀)。しかし、現在の地球環境では、これらの成分は微生物により分解を受け、炭素が循環する社会が形成されている。担子菌類の大規模な遺伝子群の調査から、この植物の進化とこれを分解する微生物の関係について興味深い報告がなされている^{1,2)}。リグニンを分解できるクラス II のパーオキシダーゼの出現が石炭紀の終焉に関係しているらしい。この微生物の主役は、酸化還元酵素を豊富に作ることができる担子菌であると考えられている。それゆえ、担子菌(キノコ菌)は植物の細胞壁を効率よく分解できる能力を有する、地球環境にとって大切な菌であると考えられる。この

キノコ菌のバイオマス分解について、筆者らは長年研究を続けてきている。

筆者らの研究室で長年研究を続けてきている *Irpex lacteus* (和名：ウスバタケ) は、昭和 14 年頃に西澤らにより、木材腐朽力が高い菌としてスクリーニングされたものである³⁾。この菌株は、軍事進出をしていた中国(現在の中国)において、軍馬に食べさせる飼料に困窮し、木を腐朽してから食わせるための有効な菌を選抜してほしいという日本陸軍の要請によりスクリーニングされた菌株である。その後、神田らにより本菌のエンド型およびエキソ型のセルラーゼについて研究され⁴⁾、家畜の飼料効果を増進する添加剤としての有効性が示された。これにより、現在でも飼料添加物として認可されているドリセラーゼ(協和発酵製)が誕生したのである。筆者も、修士および博士課程で本酵素剤中のキシラナーゼの研究を行ったことを光栄に感じている⁵⁻⁸⁾。同時代に、アメリカ陸軍のナティック研究所において、現在では世界最強のセルラーゼ生産菌として有名な *Trichoderma reesei* の研究がスタートしたのも、何か因縁めいたものを感じる次第である。最近になって、本菌がバイオレメディエーションに有効な菌株として、酸

* 本原稿は、日本応用糖質科学会平成 28 年度大会の学会賞受賞講演で一部発表された。

** 連絡先 (Tel./Fax. 026-269-5394, E-mail: yoamano@shinshu-u.ac.jp)

*** Key words: xylo-oligosaccharide, corncob, hydrothermal reaction, MALDI-TOF MS, acetylation

化還元酵素に関する論文が多く報告されるようになった。これらを含めて、*I. lacteus* に関する総説が書かれているので参照されたい⁹⁾。

上記で紹介したセルロース分解菌によって生産される酵素群をもってしても、天然のバイオマスを直に分解することは不可能である。これは、セルロースをヘミセルロースやリグニンが覆う形でコンポジットを形成しているためであり、セルロース分解のためにはこれらの成分を除く必要がある。その方法として、これまで物理的な方法、化学的な方法および生物的な方法など、さまざまな方法が検討されてきている。筆者らの研究室でも、イオン液体を用いてセルロースを溶解してから分解するなどの研究を行っているが¹⁰⁾、本稿では水熱反応を用いた方法について紹介する。高温高压の水は常温の水とは異なる溶媒特性を示す。特に、超臨界状態の水は酸化力が強く、有機物はたちどころに分解してしまうという特性がある。廃棄物処理の観点ではものがなくなることは良いことであるが、有効な成分を抽出して利用する場合や、細胞壁構成成分の構造の分析などのためには、マイルドな条件での処理が望まれる。植物のヘミセルロースやリグニンは、種によってその構造や存在形態が異なるため、バイオマスの前処理としての効果の最適化条件を検討する必要がある。ちなみに、200℃での液体状態の水におけるイオン積は常温の水の約千倍に、また誘電率は80から20程度に低下するといわれている。

2. 水熱反応条件最適化のための指標

当初、本プロジェクトでは地域のバイオマス利用の前処理として水熱反応を研究することとし、その対象を長野県で大量に廃棄されているキノコ栽培後の使用済み培地とした。キノコ栽培用の培地には栄養剤として、ふすまやコメ糠が使用されており、比較的窒素含量が多い。水熱反応より可溶化した糖質とのメイラード反応より独特の茶褐色の

液体が得られ、それゆえ、糖質の回収率の低下を招いているようであった。これらの成果については2報の論文としてまとめられているので、そちらを参照されたい^{11,12)}。そこで、研究としてはコーンコブのみを用いて、水熱反応を解析することとした。コーンコブの成分分析の結果を表1に示す。セルロースとヘミセルロースを合わせたホロセルロースの画分が約6割を占めた。これらの成分の回収について、最適化条件の検討を行った。まず、反応条件を検討する際に、温度履歴の指標となるものが必要となった。一般に水熱反応といっても、液体と蒸気が混ざった状態の反応であるか否か、また昇温から冷却に至るまでの温度履歴がバッチ型では著しく異なることから、実験の再現性が取れないことが考えられた。そこで、水が沸騰する温度以上の履歴を表すような以下の式を導入した。

$$R_0 = \int_0^t \exp\left(\frac{T(t) - T_r}{\omega}\right) dt$$

ここで、 R_0 は反応過酷度を表す。また、 $T(t)$ は温度の時間変化(℃)、 T_r は基準となる温度(100℃)を表す。また、 t は100℃以上の処理時間(分)を、 ω は反応速度定数であり文献値より14.75の値を採用した。この指標で計算した値とコーンコブ中の全キシラン量の減少とこれに由来する可溶性糖質生成の関係を求めたところ、図1に示すような結果となった。水熱反応により、一次壁中のヘミセルロースであるキシランが減少し、反応液中にキシロ多糖(XPS)として抽出されていることがわかる。その収率は、反応過酷度では3,000から7,000程度の範囲で制御す

表1. コーンコブの成分組成

成 分	組 成 (%)
セルロース	29.7
ヘミセルロース	29.9
リグニン	15.3
アラビナン	3.4
灰分	3.5
エタノールベンゼン抽出物	2.7
その他	15.5

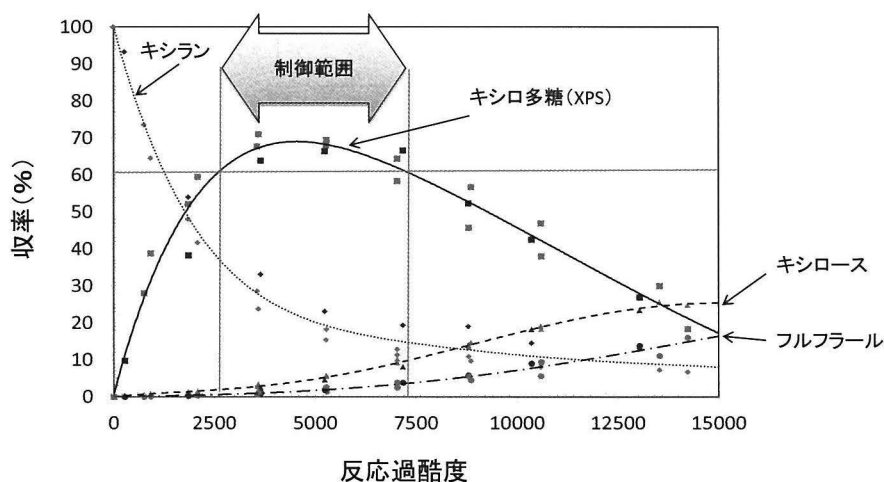


図1. コーンコブ熱水処理におけるキシラン由来可溶性糖質の生成と反応過酷度の関係

反応過酷度は本文中の計算式による。*山川ら：化学工学会第48回秋季大会発表(F209)。コーンコブ中に存在するキシランの量を100%とし、可溶化したXPS、オリゴ糖および単糖などを示した。

ることにより、60%以上を確保できることが判明した。これ以上の反応過酷度では、XPSが分解され、単糖であるキシロースからフルフラールへと変化し、糖の回収率が低下させることがわかった。このフルフラールの生成については、Garroteらにより、反応速度論的考察がされており、我々の結果もこの考察結果とよく一致している¹³⁻¹⁵⁾。反応過酷度を3,000~7,000の間で制御する場合の反応温度と時間の関係を図2に示す。例えば、170°Cでの処理では、約30分から60分の温度範囲での処理が適切であることがわかるが、温度が上昇すると反応時間の制御範囲が短くなり、200°Cでは4分から8分の間となることわかる。

3. コーンコブ中のヘミセルロース成分の水熱反応による動態

水熱反応においてヒドロニウムイオンの触媒効果により

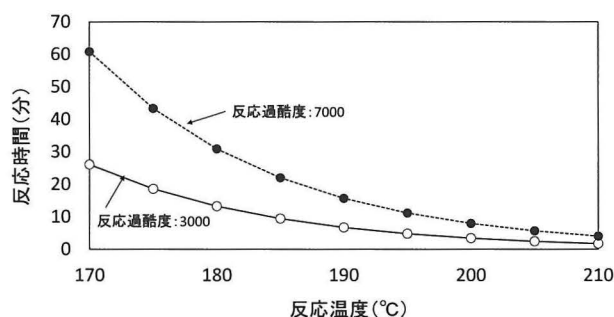


図2. 反応過酷度の制御範囲

各反応温度における反応過酷度3,000から7,000に入る処理時間を示す。*山川ら：化学工学会第48回秋季大会発表(F209)。

各種結合が加水分解を受け、主にヘミセルロース画分が可溶化することがわかっている。コーンコブでは幅広い重合度のキシロオリゴ糖が得られることが報告されている^{15,16)}。天然のヘミセルロースではキシロース残基の2位または3位がアセチル基で修飾されていることが報告されている¹⁷⁻¹⁹⁾。また側鎖のアラビノース残基には、フェルラ酸やクマル酸により修飾されていることも報告されている²⁰⁻²²⁾。我々のデータにおいても、表2に、フェルラ酸およびクマル酸が結合していることが示された。しかしながら、ヘミセルロースはアルカリ処理により抽出されることが多いので、エステル結合はほとんど除去されてしまっている。そこで、天然のキシラン中の各種エステルの動態について調べることにした。図3に、反応過酷度と各種成分の可溶化の度合いを示す。可溶化した成分のうち、遊離型(完全に加水分解したもの)を白抜きのマークで、結合型(他成分

表2. 連続式水熱反応装置により製造したキシロ多糖(XPS)の組成

	組 成		モル比* (x/y)
	(mg/g)	($\mu\text{mol/g}$)	
糖質			
キシロース	535	3561 (x)	
グルコース	121	672	
アラビノース	23	153 (y)	23
マンノース	19	104	
ガラクトース	18	98	
ウロン酸	36	176 (y)	20
修飾基			
アセチル基	39	645 (y)	5.5
フェルロイル基	14	73 (y)	49
p-クマル酸基	4	26 (y)	137

*キシロースをベースとするモル比 (mol/mol)。

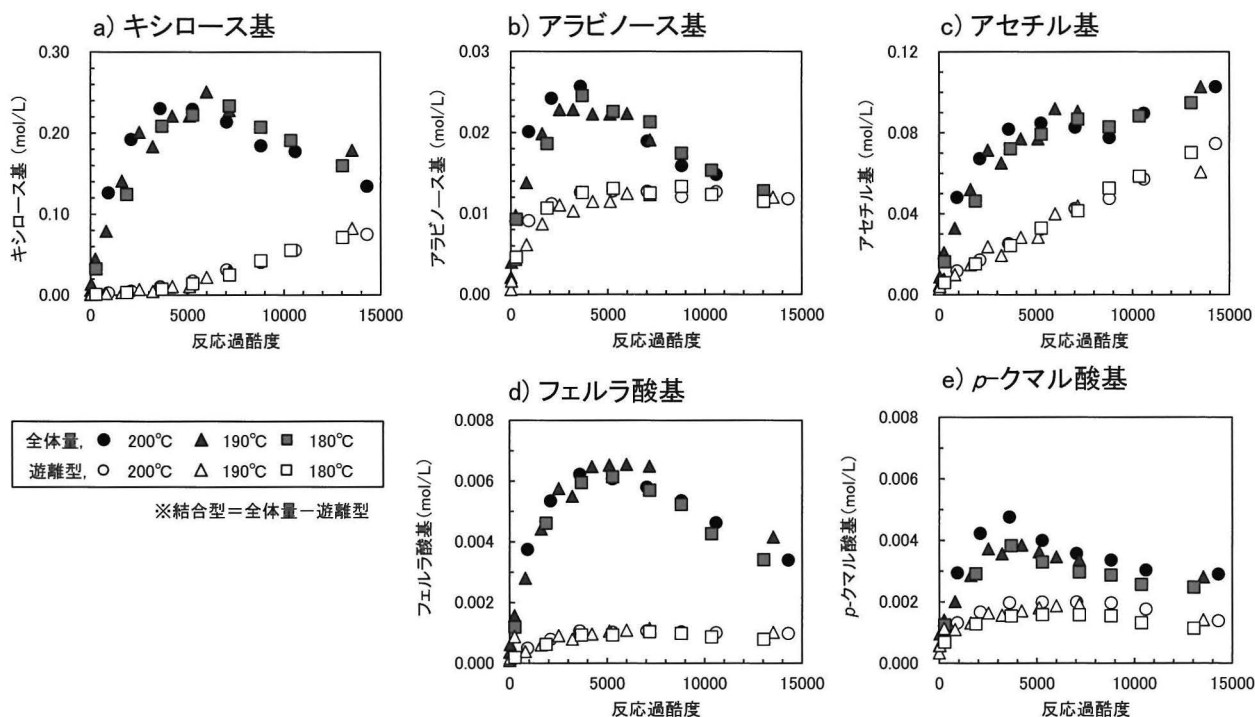


図3. 反応過酷度と可溶化物に含まれる結合型および遊離型の生成物量の相関

結合型の官能基量 = 全体の官能基量 - 遊離した官能基。全体の官能基量は、塗り潰しのマークで表し、遊離型は白抜きのマークで示した。○は200°C、△は190°C、□は180°C処理を示す。

と結合したもの)も含めた全量を塗りつぶしのマークで示している。この2つの値の差分が結合型成分の量であると見積られる。反応過酷度が4,000から6,000の範囲では、キシロース残基はほぼ結合型、すなわちオリゴ糖または多糖として抽出されていることがわかる。一方、キシラン側鎖に結合しているアラビノースは、約半分量は遊離型であるが、上述の範囲では残りの半分は結合型であると見積られる。天然のキシランには、2位または3位にアセチル基が導入され、キシランナーゼの分解を阻害していることが考えられる。このアセチル基の遊離は反応過酷度と比例的に増加することがグラフより読み取れる。上述の範囲では約2/3のアセチル基はキシロース残基に残存していると考えられた。さらに、アラビノース残基にはフェルラ酸やクマル酸のような官能基がエステル結合していることが報告されているが、水熱反応後でも遊離型のこれらの残基は少ないことがわかる。この残存する残基の量は、結合型のアラビノースの量とほぼ等しい値となることから、エステル基が導入されているアラビノース側鎖は、水熱反応に抵抗性であると予想された。図4に水熱反応の効果をまとめた。高温高压の水においては、水のイオン積が増加しプ

ロトンが遊離した状態になり、水分子とプロトンが一緒になったヒドロニウムイオンが形成される。これが触媒となってグリコシド結合の開裂が起こるが、キシラン主鎖に対してはランダムに作用していると考えられた。一方、キシロース残基に結合しているアセチル基は、水熱反応の進行とともに遊離し、これがさらなるプロトンを供給することにより、反応が促進されるものと考えられた。また、側鎖のアラビノース残基に関しては、エステル結合のないアラビノースは容易に分解され遊離型になるが、フェノール性の修飾基があるアラビノースのグリコシド結合は、水熱反応に対して抵抗性であると考えられた。これらのことを検証するため、抽出されたヘミセルロース画分の構造を分析することとした。

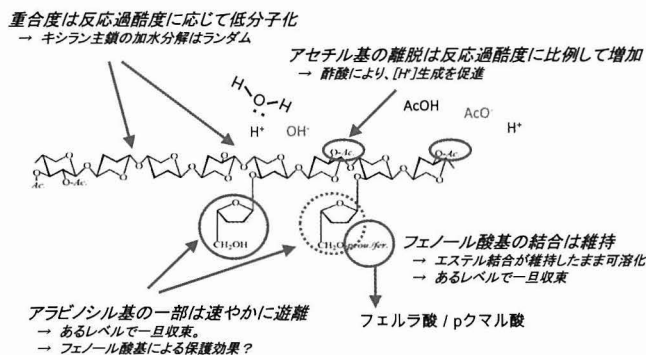


図4. 反応模式図：水熱反応によるコーンコブ由来キシロオリゴ糖の修飾成分の変化

図3のデータから類推して作成。

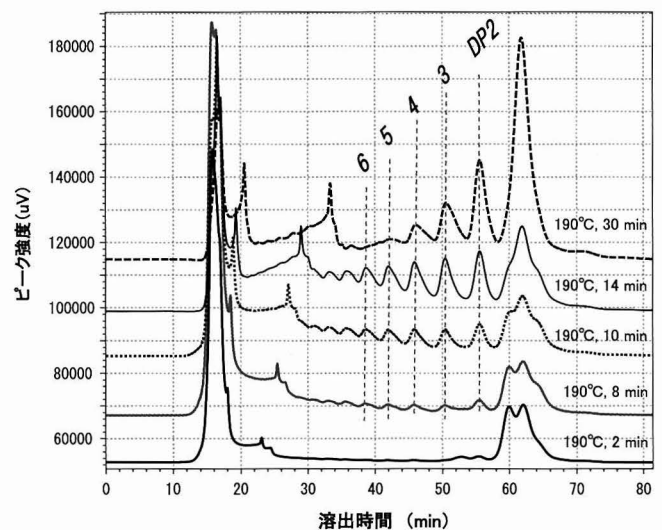


図5. コーンコブの水熱抽出成分の分子量分布 (ゲルろ過クロマトグラフィー)

HPLC 分析条件は以下のとおり。カラム, 三菱化学 MCI-CK02A; 移動相, 超純水; 流量, 1.0 mL/min; カラム温度, 85°C; 検出器, RI 検出器。

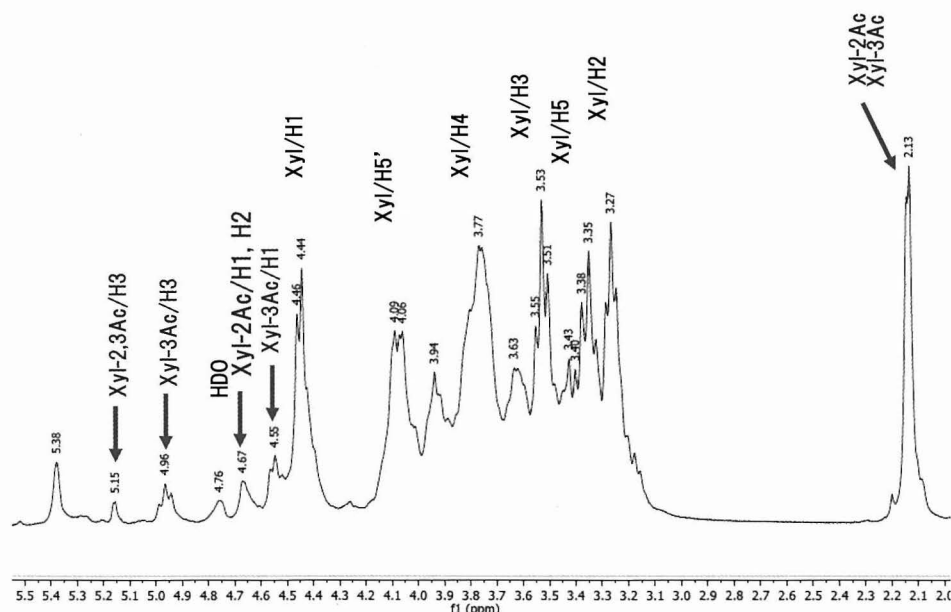


図6. キシロ多糖 (XPS) の 1H -NMR 分析

4. コーンコブからの XPS の構造分析

水熱反応により可溶化した成分のサイズ排除クロマトグラフィー (HPLC, SEC) の結果を図5に示す。反応時間の経過と共にオリゴ糖画分の増加が観察された。また未処理では確認されない高分子の画分も短時間で抽出されており、それらが徐々に低分子化している様子も伺える。そこで、オリゴ糖画分 (XOS) を除いた成分の分析を行うため、3倍量のエタノールを加えて沈殿する画分を採取し、これを XPS として構造の分析を行い、もともと植物細胞の一次壁の構成成分として存在している際の構造を推定することとした。図6に¹H-NMR 分析の結果を示す (Dr. Peter Biely との共同研究による未発表データ)。XPS 中のアセチル基については、脱アセチル処理によりアセチル基が遊離することから、存在が知られていたが、NMR の結果よりキシロシル基の2位または3位がアセチル基修飾されていることが明らかとなった。また、2位および3位の両方が置換されたものの存在も認められたが、これらは既に報告されている結果と同様であった¹⁷⁻¹⁹⁾。この手法のみでは、フェルラ酸のようなフェノール性の残基の存在については、はっきりと認めることはできなかった。2次元の NMR のデータ (省略) からは、その存在自体は示唆されたので、これを MALDI TOF-MS により分析した (図7)。DHBA (2,5-ジヒドロキシ安息香酸) をマトリックスとして分析を行ったところ、重合度が20 (分子質量2,682 Da) くらいまではイオン化が可能であったが、それ以上の高分子では分析は困難であることがわかった。また、チャートからわかるようにこの範囲の重合度のものには、未修飾のキシロース重合物の分子質量に相当するシグナルは認められたが、修飾基が入っているものはほとんど認められなかった。この原因としては、修飾基の入ったもののイオン化が難しいためにシグナルが検出されなかったか、もしくはこのような重合度範囲の画分には修飾基を持つ成分がないことが考えられる。そこで、各種酵素を用いて分解した断片を分析することとした。最初に、*Orpinomyces* 由来の CE6 アセチルキシランエステラーゼを用いて処理したところ、図6に示すアセチル基のピークの減少がみられた (データ省略)。また、酵素処理によって2位にメチルグルクロン酸、3位にアセチル基の両方が結合したキシロース

残基の存在も明らかになり、アセチル基が多いオリゴマーなどは本酵素に抵抗であると考えられた (データ省略)。ついで、β-キシロシダーゼ、GH10 および GH11 のキシラナーゼで酵素処理を行った。データはここでは割愛するが、アセチルが多く結合したオリゴマーが酵素分解に対して抵抗であるため、多く残存した。さらに、表3に示したようにフェルラ酸などのフェノール性残基の結合したオリゴ糖も多く検出された。この表では、キシロースとアラビノースが区別できないために合わせて Pen と表記したが、フェノール性の残基は、アラビノースに結合していることが報告されている²⁰⁻²²⁾。未処理では、キシロトリオースがアラビノース側鎖を有し、さらにアラビノースにフェルラ酸が結合した分子に相当する分子質量のオリゴ糖のみが検出された。キシロシダーゼ処理では、このほかにキシロトリオースとキシロテトラオースにフェルラ酸に加えてアセチル基も結合したものも検出された。キシラナーゼ処理で

表3. 各種酵素処理により検出されたエステル化オリゴ糖の種類

未処理	β-キシロシ ダーゼ処理	GH10 キシラ ナーゼ処理	GH11 キシラ ナーゼ処理	分子量 m/z (M + Na ⁺)
	FAPen3	FAPen3		614
		FAPen3Ac1		656
		FAPen3Ac2		698
FAPen4	FAPen4	FAPen4	FAPen4	746
	FAPen4Ac1	FAPen4Ac1	FAPen4Ac1	788
		FAPen4Ac2	FAPen4Ac2	830
	FAPen5	FAPen5	FAPen5	878
		FAPen5Ac1	FAPen5Ac1	920
		FAPen5Ac2	FAPen5Ac2	962
		FAPen5Ac3		1004
	FAPen5	FAPen6	FAPen6	1010
	FAPen5Ac1	FAPen6Ac1	FAPen6Ac1	1052
		FAPen6Ac2		1094
		FAPen7	FAPen7	1142
		FAPen7Ac1		1184
		FAPen7Ac2		1226
		FAPen8Ac1		1316
		CAPen3		583
		CAPen3Ac1		626
		CAPen4	CAPen4	716
		CAPen4Ac1	CAPen4Ac1	758
		CAPen5	CAPen5	848
		CAPen5Ac1		890

FA, フェルラ酸残基; CA, クマル酸残基; Pen, ペントース残基 (キシロースまたはアラビノース); Ac, アセチル基。数字は残基の数を表す。

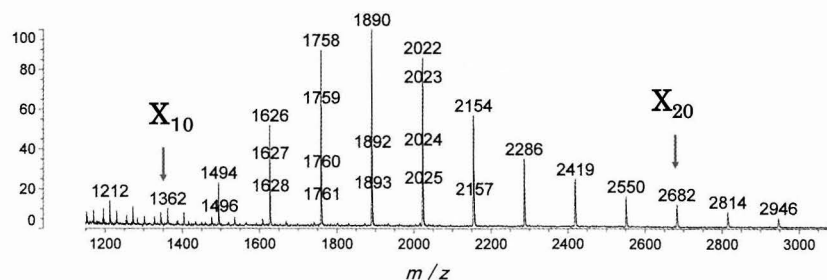


図7. 水熱抽出成分の MALDI TOF-MS 分析

MALDI TOF-MS 分析条件は以下のとおり。測定装置、島津 AXIMA-CFR Plus; Matrix 溶液, DHBA; 測定モード, リフレクトロン, ポジティブ; レーザー強度, 90. Makishima *et al.* (2006)¹¹⁾。

は、GH10の方がGH11に比較して側鎖残基に対して、近接のグリコシド結合を切りやすいことから短いオリゴ糖が検出されたが、これらはこれまでの報告とよく一致している²³⁻²⁵⁾。またオリゴ糖中にはアセチル基修飾されているものも多くみられた。このように、酵素処理前ではエステルで修飾された低分子のオリゴ糖が検出されないのに対して、酵素処理では多くのエステル結合が確認された。このことは、もとのキシランの構造には、エステル基が均一に分布しているのではなく、ブロック状にアセチル基やフェルラ酸基が集中している部分があることが予想される。またこの部分は水熱反応に対して抵抗性であり、高分子のまま水溶性化して、抽出されているものと考えられた。このような不均一な構造は、ヘミセルロース繊維間を繋ぎ止めている構造を示唆するものと考えられる。すなわち、セルロースに吸着しやすい未置換の直鎖状の部分と、その間のマトリックスとして機能する部分(エステル基が多く修飾)に分かれた構造を持つことが示唆された。これらのことは Busse-Wicher らによっても推測されているが^{26,27)}、今回の水熱反応と酵素処理の組み合わせにより、これらの結果が支持されることを結論した。

5. ビートファイバーからのアラビノオリゴ糖の製造

コーンコブからの水熱反応による細胞壁構成成分、特にヘミセルロース画分の抽出結果を、他の植物に応用することを考えた。多くの農業系残渣に着目し行った研究のうち、ここではビートファイバー (BF) の結果について紹介する。ゲルろ過クロマトグラフィーによる分析結果を図8に示す。170°C 処理では、処理直後から高分子成分の低分子化が始まり、時間経過とともにオリゴ糖の生成が確認さ

れた。コーンコブ処理に比較して、処理温度が20°Cほど低く容易に可溶化することがわかった。抽出される成分は主にBF中のアラビナンに由来するアラビノオリゴ糖であることがわかったが、このほかにもガラクトン由来のガラクトオリゴ糖も含まれていた。これらの糖の非還元末端には、フェルラ酸が多く付加されていることが報告されているので²⁸⁾、水熱反応におけるこれら成分の動態を調査した(図9)。エステル結合を分解処理した前後での遊離のフェルラ酸量を測定し、結合型と遊離のフェルラ酸量を見積もったところ、水熱反応では160~190°Cの温度範囲ではエステル結合はほとんど加水分解を受けないことが明らかとなった。図10には抽出した成分の分子質量の測定結果を示した。各シグナルの質量の差は132 Daであり、これ

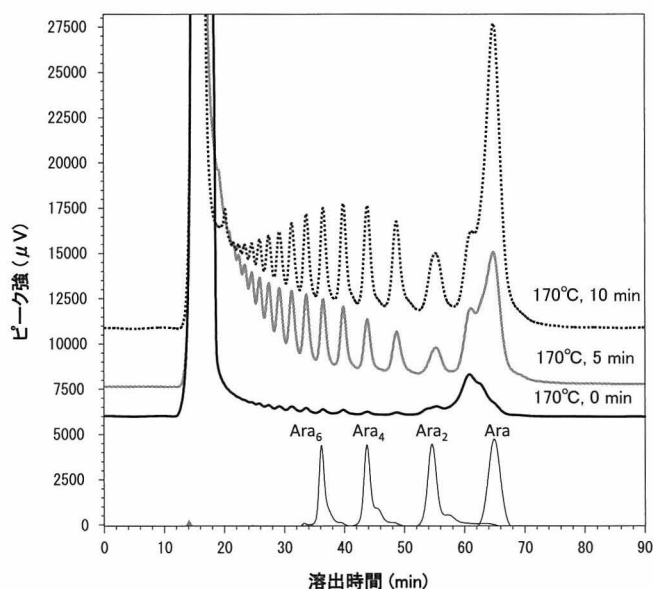


図8. ビートファイバー可溶化成分の分子量分布(ゲルろ過クロマトグラフィー)

HPLC 条件は、図5に同じ。Sato *et al.* (2013)²⁹⁾を修正して掲載。

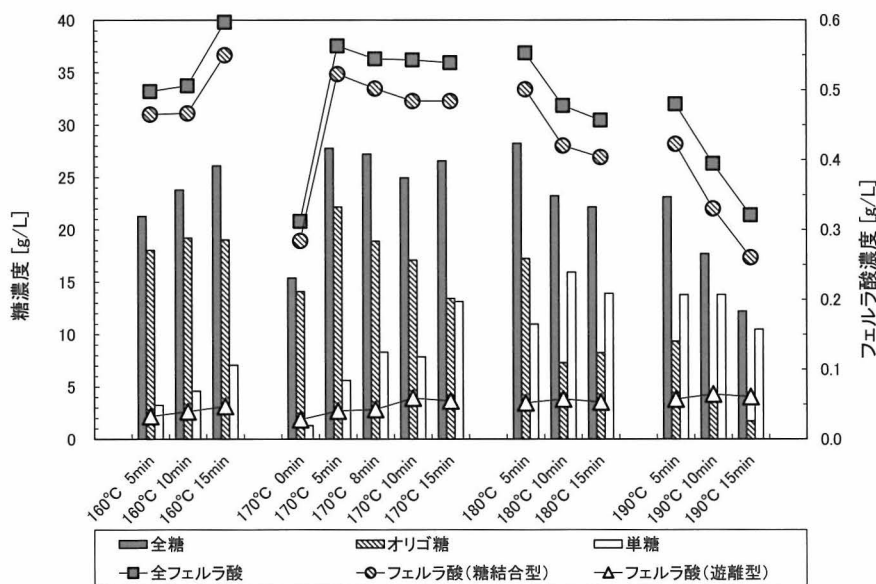


図9. ビートファイバー可溶化液に含まれる遊離型および結合型フェルラ酸量

各3本の棒グラフは、左から全糖量、オリゴ糖量および単糖量を示す。□は全フェルラ酸量、○は糖結合型のフェルラ酸量および△は遊離型のフェルラ酸量を示す。Sato, *et al.*, (2013)²⁹⁾を修正して掲載。

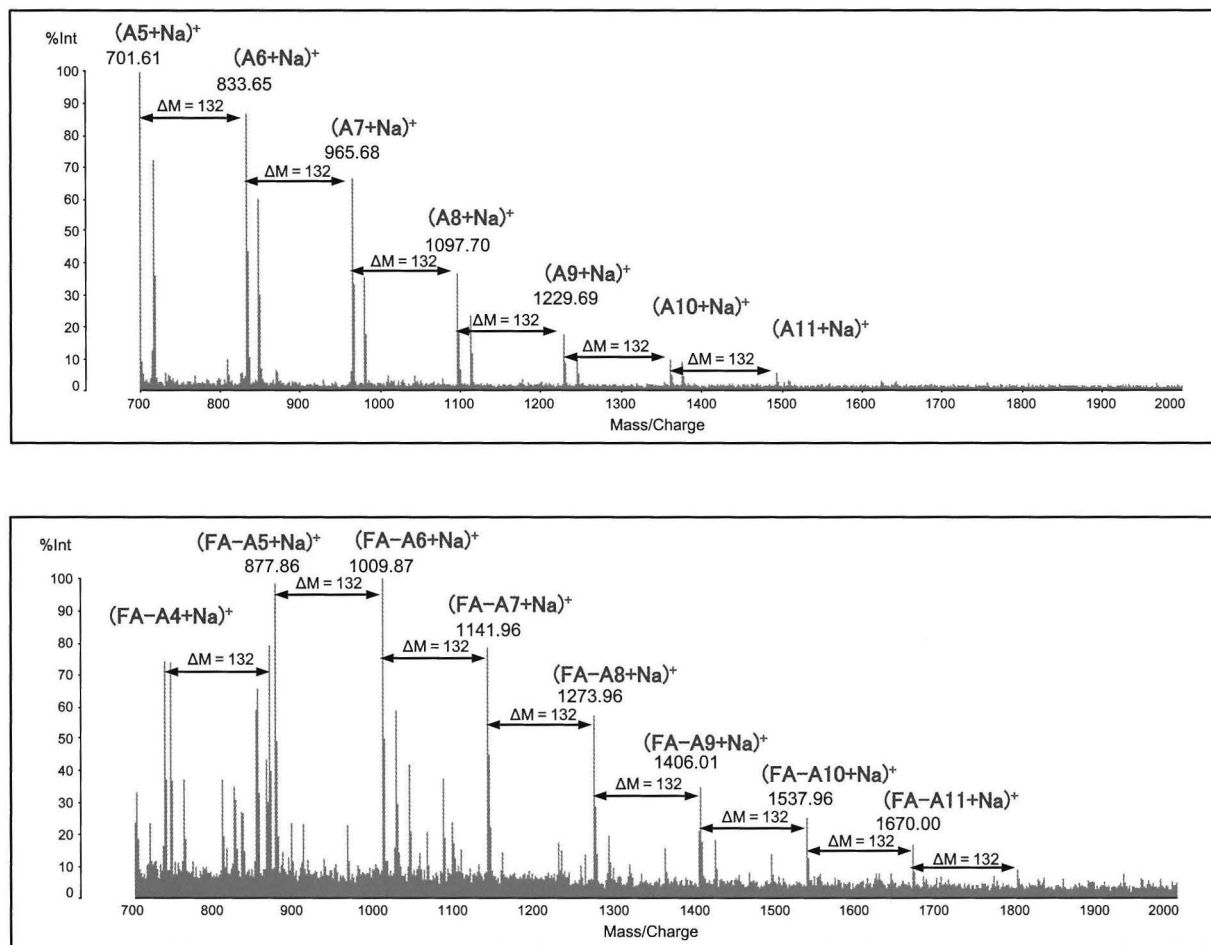


図 10. ビートファイバー可溶化液の MALDI TOF-MS 分析

MALDI TOF-MS 分析条件は、図 7 に同じ。Sato *et al.* (2013)²⁹⁾。

はアラビノースの脱水した質量と一致する。また、疎水性カラムクロマトグラフィーにより成分を分離したところ、水抽出による画分との質量差として 176 Da 異なるオリゴ糖画分が得られた。これは、フェルラ酸の脱水物の質量と一致することから、エステル結合が保持されていることが証明された。ビートから砂糖を抽出する際には熱水で処理が行われるが、この処理では可溶化しない不溶性のペクチン成分から、水熱処理により効率的にアラビナンなどの糖質が回収できることが判明した²⁹⁾。また処理温度別の成分の比較をみると、多糖またはオリゴ糖として回収するには 160℃ というマイルドな水熱処理で良いことがわかり、実用化面ではかなりメリットがあると考えられた。

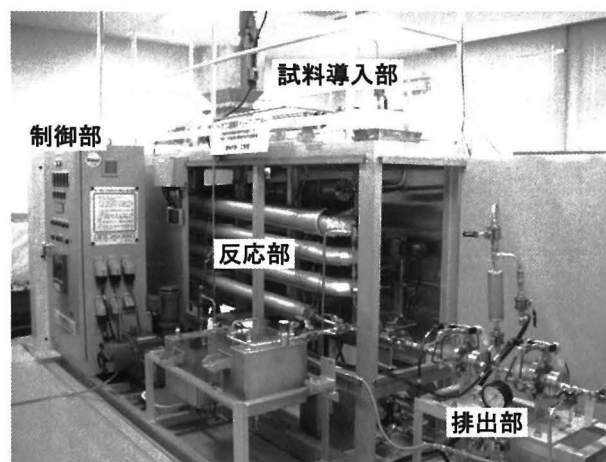


図 11. 開発した連続式水熱反応装置

6. 結びに

以上のように、水熱反応は植物細胞壁から各種の糖質を抽出する方法として優れた方法であることがわかった。特に、一次壁由来のヘミセルロースやペクチンの可溶化には有効な手段であり、アルカリ抽出法に比較してエステル結合が保持されるという特徴がある。これまで上市されているオリゴ糖はほとんどが中性糖であるが、酸性糖やエステル結合を持ったオリゴ糖は今後その機能面からの研究の進展が期待される。そこで、簡便に大量の材料が調製できる

方法が望まれるので、我々は装置の開発も並行して行っている¹⁶⁾。最初に述べたように、水熱反応では厳密に温度処理条件を制御することが大事であるため、バッチ処理ではなく、連続式の処理装置を設計した (図 11)。本装置では、チューブ式の反応管内を試料が通過する際に水熱反応を行う。試料の導入部ではスラリー状の植物残渣をモノポンプで圧力を維持しながら送液する。排出部では 2 つのシリンダーバルブが同期して開閉するため、反応管内の圧力は維持される。これにより、水は沸騰することなく液

密状態で水熱反応が進行することとなる。また、処理時間では5分間で所望の処理温度に加熱し、反応後は速やかに冷水で冷却される。この装置では、1分間に300 mLのスラリーが処理できるため、試験材料は十分に確保できる。さらに実用化に向けて、実用機も設計を終えており、水熱反応の応用の今後の展開が期待される。

謝辞

本研究は、農水省生研センターの異分野融合研究助成事業のサポートのもとに行われたものである。本事業に参画いただいた農研機構食品部門、東芝、物産フードサイエンスの関係者には心より感謝申し上げたい。また本研究を支えて頂いた信州大学工学部生物化学研究室の関係各位には、学会賞の受賞の栄誉を共に分かち合いたいと考えている。

文献

- 1) D. Floudas, M. Binder, R. Riley, *et al.*: The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*, **336**, 1715–1719 (2012).
- 2) 堀 千明, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩: 木材腐朽担子菌のゲノム・ポストゲノム解析から植物細胞壁と分解酵素の共進化を考える。化学と生物, **53**, 381–388 (2015).
- 3) 西澤一俊: *Irpex lacteus* (ウスバタケ) セルラーゼの初期基礎研究の歩み。富士経済付属阿部研究所研究報告, **97**, 1–14 (2004).
- 4) 神田篤久: セルロースの構造と酵素分解に関する研究。 *J. Appl. Glycosci.*, **50**, 77–81 (2003).
- 5) T. Kanda, Y. Amano and K. Nishizawa: Purification and Properties of two endo-1,4- β -xylanases from *Irpex lacteus*. *J. Biochem.*, **98**, 1545–1554 (1985).
- 6) Y. Amano, K. Nishizawa, R. Tokoo and T. Kanda: Mode of action of two endo-1,4- β -xylanases from *Irpex lacteus* towards rice-straw xylan. *Mokuzai Gakkaishi*, **40**, 57–63 (1994).
- 7) Y. Amano, K. Nishizawa, R. Tokoo and T. Kanda: Transglycosyl reaction of endo-1,4- β -xylanases from *Irpex lacteus* on aryl β -xylosides. *Mokuzai Gakkaishi*, **40**, 308–314 (1994).
- 8) Y. Amano, K. Nishizawa, R. Tokoo and T. Kanda: Effects of substituted groups of aryl β -D-xyloside on transglycosyl reactions of two different xylanases from *Irpex lacteus*. *Mokuzai Gakkaishi*, **40**, 315–320 (1994).
- 9) Ć. Novotný, T. Cajthaml, K. Svobodová, M. Šušla and V. Šásek: *Irpex lacteus*, a white-rot fungus with biotechnological potential — review. *Folia Microbiol.*, **54**, 375–390 (2009).
- 10) 水野正浩: セルロースの高次構造改変とその酵素分解性の評価。応用糖質科学, **7**, 10–15 (2017).
- 11) S. Makishima, K. Nozaki, M. Mizuno, E. Netsu, K. Shinji, T. Shibayama, T. Kanda and Y. Amano: Recovery of soluble sugars from waste medium for Enokitake (*Flammulina velutipes*) mushroom cultivation with hydrothermal reaction and enzyme digestion. *J. Appl. Glycosci.*, **53**, 261–266 (2006).
- 12) N. Sato, K. Shinji, M. Mizuno, K. Nozaki, M. Suzuki, S. Makishima, M. Shiroishi, T. Onoda, F. Takahashi, T. Kanda and Y. Amano: Improvement in the productivity of xylooligosaccharides from waste medium after mushroom cultivation by hydrothermal treatment with suitable pretreatment. *Bioresour. Technol.*, **101**, 6006–6011 (2010).
- 13) G. Garrote, H. Domínguez and J.C. Parajó: Kinetic modeling of corncob autohydrolysis. *Process Biochem.*, **36**, 571–578 (2001).
- 14) G. Garrote, H. Domínguez and J.C. Parajó: Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharides production. *J. Food Eng.*, **52**, 211–218 (2002).
- 15) J.C. Parajó, G. Garrote, J.M. Cruz and H. Domínguez: Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. *Trends Food Sci. Technol.*, **15**, 115–120 (2004).
- 16) S. Makishima, M. Mizuno, N. Sato, K. Shinji, M. Suzuki, K. Nozaki, F. Takahashi, T. Kanda and Y. Amano: Development of continuous flow type hydrothermal reactor for hemicellulose fraction recovery from corncob. *Bioresour. Technol.*, **100**, 2842–2848 (2009).
- 17) R. Naran, S. Black, S.R. Decker and P. Azadi: Extraction and characterization of native heteroxylans from delignified corn stover and aspen. *Cellulose*, **16**, 661–675 (2009).
- 18) A. Teleman, J. Lundqvist, F. Tjerneld, H. Stålbrand and O. Dahlman: Characterization of acetylated 4-*O*-methylglucuronoxylan isolated from aspen employing ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, **329**, 807–815 (2000).
- 19) A. Teleman, M. Tenkanen, A. Jacobs and O. Dahlman: Characterization of *O*-acetyl-(4-*O*-methylglucurono) xylan isolated from birch and beech. *Carbohydr. Res.*, **337**, 373–377 (2002).
- 20) G. Williamson, P.A. Kroon and C.B. Faulds: Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases. *Microbiol.*, **144**, 2011–2023 (1998).
- 21) F. Peng, P. Peng, F. Xu and R.-C. Sun: Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnol. Adv.*, **30**, 879–903 (2012).
- 22) R. Deutschmann and R.F.H. Dekker: From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. *Biotechnol. Adv.*, **30**, 1627–1640 (2012).
- 23) P. Biely, M. Vršanská, M. Tenkanen and D. Kluepfel: Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.*, **57**, 151–166 (1997).
- 24) Y. Fujimoto, S. Kaneko, A. Kuno, H. Kobayashi, I. Kusakabe and H. Mizuni: Crystal structures of decorated xylooligosaccharides bound to family 10 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 9606–9614 (2004).
- 25) K. Kolenová, M. Vršanská and P. Biely: Mode of action of endo- β -1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. *J. Biotechnol.*, **121**, 338–345 (2006).
- 26) J.R. Bromley, M. Busse-Wicher, T. Tryfona, J.C. Mortimer, Z. Zhang, D.M. Brown and P. Dupree: GUX1 and GUX2 glucuronyltransferases decorate distinct domains of glucuronoxylan with different substitution patterns. *Plant J.*, **74**, 423–434 (2013).
- 27) M. Busse-Wicher, T.C.F. Gomes, T. Tryfona, N. Nikolovski, K. Stott, N.J. Grantham, D.N. Bolam, M.S. Skaf and P. Dupree: The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **79**, 492–506 (2014).
- 28) L. Saulnier and J.-F. Thibault: Ferulic acid and diferulic acid as components of sugar beet pectins and maize bran heteroxylan. *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 396–402 (1999).
- 29) N. Sato, Y. Takano, M. Mizuno, K. Nozaki, S. Umemura, T. Matsuzawa, Y. Amano and S. Makishima: Production of feruloylated arabinooligosaccharides (FA-AOs) from beet fiber by hydrothermal treatment. *J. Supercrit. Fluids*, **79**, 84–91 (2013).