

各種シロアリによるリグニンモデル化合物の分解

| | |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: jpn 出版者: 公開日: 2016-08-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 平井, 浩文, 新里, 尚也, 中川, 明子, 渡辺, 吉雄, 倉根, 隆一郎 メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/10297/9779 |

各種シロアリによるリグニンモデル化合物の分解*¹平井浩文*², 新里尚也*³, 中川明子*⁴,
渡辺吉雄*³, 倉根隆一郎*⁴Degradation of Lignin Model Compounds
by Various Termites*¹Hirofumi HIRAI*², Naoya SHINZATO*³, Akiko NAKAGAWA*⁴,
Yoshio WATANABE*³ and Ryuichiro KURANE*⁴

We determined ligninolytic activity of 7 termites with a β -O-4 type-lignin model compound in order to bleach kraft pulp by intestinal bacteria of ligninolytic termite. High degradation activity of a β -O-4 type-lignin model compound (non-phenolic) was observed in *Reticulitermes flaviceps amamianus*, *Nasutitermes takasagoensis*, and *Coptotermes formosanus*. *C. formosanus*, which showed higher degradation activity of the model compound than other termites, hardly modified an oligomer prepared from coniferyl alcohol, although *Hodotermopsis japonica* oxidized an oligomer prepared from coniferyl alcohol.

Keywords: termite, lignin model compound, oligomer of coniferyl alcohol, gel permeation chromatography.

シロアリ腸内細菌群(複合生物系)によるクラフトパルプの漂白を目指して、まず最初に各種シロアリのリグニン分解力を測定した。検討に用いた7種のシロアリのうち、アマミキアシロアリ、タカサゴシロアリ、イエシロアリにおいて高い β -O-4型リグニンモデル化合物分解活性が観察された。コニフェリルアルコールより調製されたオリゴマーの分解実験を行ったところ、オオシロアリではオリゴマーの酸化のみが観察され、イエシロアリでは顕著な変化は観察されなかった。

1. 緒 言

現在のクラフトパルプの漂白には、塩素、次亜塩素酸塩、二酸化塩素などの塩素系薬剤が用いられている。このため、その廃液は腐食性や塩化物の蓄積をきたすため、濃縮・燃焼に適さず、活性汚泥や凝集沈殿などの処理を経て排出されている。また塩素系漂白工程に生じる毒性、変異原性及び発ガン性物質が注目され¹⁾、特に最近では塩素化ダイオキシン²⁾やクロロホルム³⁾の生成が問題視されており、塩素系漂白に代わる漂白法の開発が急がれている。そのひ

*¹ Received March 23, 1999; accepted August 13, 1999. 本研究の一部は第48回日本木材学会大会(1998年4月, 静岡)において発表した。

*² 静岡大学農学部 Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka 422-8529

*³ メルシャン(株) Mercian Corp., Fujisawa 251-0057

*⁴ 工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Tsukuba 305-8566

とつとして白色腐朽菌が持つリグニン分解能を利用して、微生物⁴⁻¹⁰⁾もしくはその酵素¹¹⁻¹³⁾によるクラフトパルプの漂白法の研究がなされている。しかしながら、白色腐朽菌による漂白法において十分な白色度を得るには菌処理期間が数日に及び、また白色腐朽菌は糖加水分解酵素を分泌するため、多かれ少なかれセルロース繊維がダメージを受けるなど問題点も多い。また白色腐朽菌の分泌する酵素による漂白では、24時間で白色化が観察されるものの、酵素が高価なため、実用性に乏しい。そこで、白色腐朽菌に代わる微生物漂白法の開発が望まれる。

自然界の多くの生物は生物と生物が深く相互に関与し、多様な相互関係を維持しながら共存した複合生物系を形成しているにも関わらず、単一生物を対象とした従来のバイオ技術では、取り扱い可能な生物種が微生物の場合0.1%未満と言われている。それは、複合生物系を取り扱う技術がないためであり、数多くの生物資源が未利用のまま残されているからである。複合生物系のユニークなモデルの一つがシロアリ・カミキリムシ等の食材性昆虫である。

シロアリは熱帯地方で非常に繁栄している生物の一つであり、植物遺体(リター)のバイオリサイクルに関係する重要な昆虫である。シロアリは後腸に多様な原生物、バクテリアを共生させ、リターの分解、窒素源の確保など他の生物に見られない機能を有している¹⁴⁾。シロアリによる木材分解の研究は、主としてセルロース分解について検討が数多く行われており、シロアリ由来のセルラーゼ¹⁵⁾、また後腸に存在する原生物によりセルロースは分解されると考えられている¹⁶⁾。一方、シロアリによるリグニン分解についていくつか報告がなされている。一般的に下等シロアリはあまりリグニンを分解できないが、高等シロアリはリグニンをある程度まで分解できると言われている¹⁶⁾。Cooksonらは、高等シロアリである *Nasutitermes exitiosus* (Hill), 下等シロアリである *Coptotermes acinaciformis* (Froggatt), *Mastotermes darwiniensis* Froggatt を用いて、¹⁴C-DHP の分解を検討したところ、*C. acinaciformis*, *M. darwiniensis* より *N. exitiosus* において多くの無機化が観察されたことを報告している¹⁷⁾。また Butler らも *N. exitiosus* を用いて、¹⁴C-DHP の分解を観察している¹⁸⁾。一方、Kyou らは、下等シロアリである *Coptotermes formosanus* Shiraki を用いて Milled-wood-lignin を処理し、その時の腸内微生物層を観察している¹⁹⁾。また各種シロアリによるリグニン類似化合物であるフェニルプロパノイドや安息香酸の無機化も報告されている^{20,21)}。つまり、シロア

リは若干ではあるがリグニン分解能を有しており、その分解には腸内微生物が大きく関与していることが推定される。これらのリグニン分解性腸内微生物群を単離・培養・安定供給が可能となれば、紙・パルプ産業において塩素に代わる漂白法の一つとなる可能性がある。そこで今回は、シロアリ腸内細菌群(複合生物系)によるクラフトパルプの漂白を行う第一歩として、国内産7種のシロアリのリグニンモデル分解力を調査した。

2. 実 験

2.1 シロアリ

供試シロアリとして、オオシロアリ (*Hodotermopsis japonica* Holmgren), コウシュンシロアリ (*Neotermes kosshunensis* (Shiraki)), ヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus* (Kolbe)), ヤエヤマヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus yaeyamanus* Morimoto), アマミキアシシロアリ (*Reticulitermes flaviceps amamianus* Morimoto), イエシロアリ (*Coptotermes formosanus* Shiraki), タカサゴシロアリ (*Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki)) の職蟻を使用した。オオシロアリは鹿児島県屋久島より、コウシュンシロアリ、ヤエヤマヤマトシロアリ、イエシロアリ、タカサゴシロアリは沖縄県西表島より、アマミキアシシロアリは鹿児島県徳之島より、またヤマトシロアリは茨城県つくば市内においてコロニーを採取し、それぞれ工業技術院生命工学工業技術研究所内(茨城県つくば市)にて飼育しているものを使用した。実験に使用するシロアリは、シロアリの重量をそろえて飼育系に入れた。オオシロアリ1頭、コウシュンシロアリ4頭、ヤマトシロアリ20頭、ヤエヤマヤマトシロアリ20頭、アマミキアシシロアリ20頭、イエシロアリ13頭、タカサゴシロアリ10頭をそれぞれ飼育系に添加した。

2.2 試料

Hortling らは、クラフトパルプ残留リグニンはカルボニル基が増大していることを報告している²²⁾。そこで緒言でも述べたように、シロアリ腸内細菌群によるクラフトパルプの漂白(残留リグニンの分解)を目的に、 α 位にカルボニル基を有し、また、飼育系にクラフトパルプを用いるため、パルプ残留リグニンより生じる分解生成物と区別するため、B環に4-メチルウンベリフェロンを有する β -O-4型リグニンモデル化合物 substrate I (1-(4-O-ベンジルグアイアシル)-3-ヒドロキシ-2-(4-メチルウンベリフェリル)-プロパノン)²³⁾ 及びコニフェリルアルコールより調製したオリゴマー²⁴⁾を使用した。

2.3 飼育系

各種リグニンモデル化合物の投与は、各種リグニンモデル化合物を溶解させた有機溶媒300 μ l (β -O-4型リグニンモデル化合物ではクロロホルム、コニフェリルアルコールオリゴマーではメタノール) を含浸させ、風乾した未晒クラフトパルプシート (直径2.6 cm; 10 mg) を使用した。substrate I については5 μ mol, コニフェリルアルコールオリゴマーについては2 mg をパルプシートに含浸させた。シャーレ (直径3.7 cm) に、50 μ l の蒸留水及び各種リグニンモデル化合物を含む未晒クラフトパルプシートを添加し、これに上記のシロアリを入れ、所定期間25°Cで飼育した。また、パルプシートが乾燥した場合は、さらに50 μ l の蒸留水を添加した。substrate I の場合1週間、コニフェリルアルコールオリゴマーの場合は20日間、それぞれのシロアリを飼育した (n=2)。コニフェリルアルコールオリゴマーの分解実験には、オオシロアリとイエシロアリを使用し、コントロールとして、コニフェリルアルコールオリゴマーをパルプシートに含浸させ、25°Cで20日間インキュベートしたものを使用した。

2.4 分析

飼育後、シロアリ・パルプシート・シロアリ排泄物共々水を用いて超音波により破碎し (600 W, 1 min), substrate I 分解実験では、これに酢酸エチルを添加して、代謝物を抽出した。酢酸エチル層は濃縮・乾固後、ガスクロマトグラフィーによりB環由来の4-メチルウンペリフェロン (MUF; 保持時間45.3分) を定量した。ガスクロマトグラム測定には、GC-14A (島津製作所) を、カラムはTC-17 (Length: 30 m, I.D.: 0.25 mm, Film thickness: 0.25 μ m, 島津製作所) を使用した。キャリアーガスには窒素を使用し、スプリット比は1/40, インジェクション温度, ディテクター温度はともに280°Cで行った。カラム温度は120°Cで3分間保持した後、280°Cまで3°C/min の速度で昇温し、280°Cで10分間保持した。コニフェリルアルコールオリゴマー分解実験では、シロアリ・パルプシート・シロアリ排泄物共々N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) を用いて超音波により破碎し (600 W, 1 min), 遠心分離 (3000 rpm, 10 min) により固形物を除き、上澄み液をゲル濾過クロマトグラフィーにより分析した。高速液体クロマトグラム測定には、Alliance 2690 (Waters), 検出部にはWaters 996 Photodiode Array Detector (Waters) を、カラムにはTSKgel G3000PW_{XL} (東ソー株式会社) を使用した。溶離液は50% DMF 水溶液を使用し、流速は1 ml/min で分析 (室温) した。

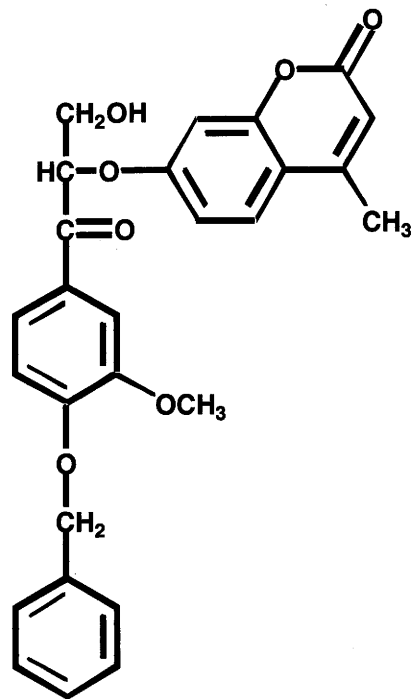
またパルプシート摂取率は、飼育前のパルプシート of 絶乾重量と、飼育後のパルプシートの絶乾重量より求めた。

3. 結果及び考察

3.1 各種シロアリによる β -O-4型リグニンモデル化合物の分解

シロアリ腸内微生物群 (複合生物系) によるクラフトパルプの漂白を行う予備段階として、リグニン分解力に優れたシロアリの選抜を試みた。

今回リグニン分解力の指標として、Fig. 1 に示した substrate I を用いて、分解に伴い生成すると思わ



substrate I

Fig. 1. A lignin model compound used in this study.

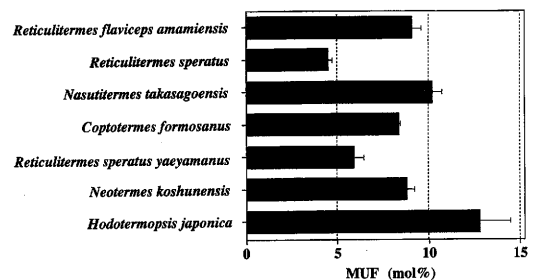


Fig. 2. Degradation of substrate I by various termites.

れるB環由来のMUFを定量した。Fig. 2に各種シロアリにより1週間処理されたsubstrate Iより生成したMUF量を示す。1週間で5~13%のMUFが観察された。

今回の検討において、シロアリ間でリグニンモデル化合物含有パルプシート摂取速度に違いが認められ (Table 1), 実際の分解率 (シロアリ体内に取り込まれて分解された量) は, このシート摂取率で補正することにより算出可能になると思われたので, 各種シロアリのパルプシート摂取率を求め, この値でsubstrate I分解率を補正した値をFig. 3に示す。このように, シロアリ体内に取り込まれたモデルの量を分母に分解率を算出すると, アマミキアシシロアリ, タカサゴシロアリ, イエシロアリにおいて高い分解活性が観察された。これまでの報告¹⁶⁻¹⁸⁾では, 高等シロアリは下等シロアリよりリグニン分解能に優れているという知見があるが, 今回のモデル実験では下等シロアリであるアマミキアシシロアリ及びイエシロアリでも高い分解率が観察された。Kyouらは, イエシロアリにmilled-wood-ligninを投与し, その時の腸内の様子を観察しており, 小型及び大型の原生動物では観察されなかったmilled-wood-ligninの取り込みが, 中型の原生動物*Holomastigoides harmani* Koidzumiにおいて取り込みを観察している¹⁹⁾。このように, 腸内に原生動物

物を共生させている下等シロアリでも, *H. harmani*のような原生動物がリグニンの分解に関与していることが予想される。

3.2 シロアリのよるコニフェリルアルコールオリゴマーの分解

Fig. 3の結果において, substrate Iの分解に優れていたイエシロアリ, 及びさほど分解率が高くなかったオオシロアリを用いて, コニフェリルアルコールオリゴマー (3~5量体)の分解実験を行った。今回, リグニン構造の変化を調査するため, 検出部にPhotodiode Array Detectorを使用し, 各溶出部のスペクトル変化を主として観察した。Fig. 4にオオシロアリの結果を示すが, シロアリ未処理のコニフェリルアルコールオリゴマーと比較して, 処理後のコニフェリルアルコールオリゴマーは12分台に溶出する画分の280 nmの吸収が増大していた。しかしながら, コニフェリルアルコールオリゴマーの低分子化は観察されなかった。つまり, オオシロアリではリグニンの変質 (酸化) のみが起こったものと思われる。どのような酸化が起こったか不明ではあるが, 処理後のコニフェリルアルコールオリゴマーは濃色化していたことから, 共役系が延長するような

Table 1. Degradation rate of pulp sheet by various termites.

| Species | Degradation rate (%) |
|--|----------------------|
| <i>Reticulitermes flaviceps amamiensis</i> | 19±1 |
| <i>Reticulitermes speratus</i> | 34±4 |
| <i>Nasutitermes takasagoensis</i> | 22±1 |
| <i>Coptotermes formosanus</i> | 19±3 |
| <i>Reticulitermes speratus yaeyamanus</i> | 31±2 |
| <i>Neotermes koshunensis</i> | 99±1 |
| <i>Hodotermopsis japonica</i> | 52±4 |

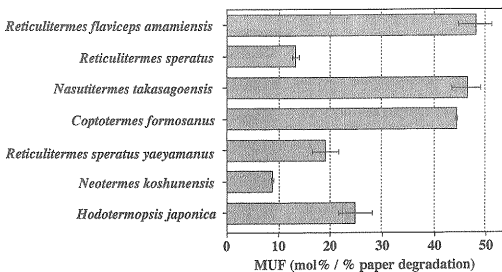


Fig. 3. Degradation rate of substrate I calculated by amount of the ingested substrate and the produced MUF.

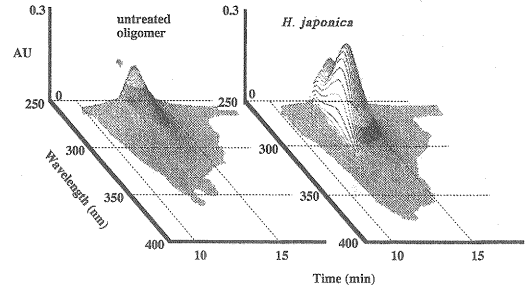


Fig. 4. A gel permeation chromatogram of an oligomer prepared from coniferyl alcohol treated by *H. japonica*.

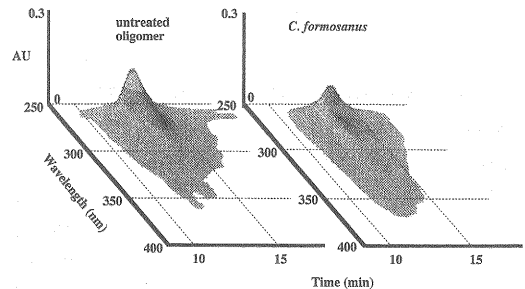


Fig. 5. A gel permeation chromatogram of an oligomer prepared from coniferyl alcohol treated by *C. formosanus*.

反応(キノン, α -カルボニルの形成等)が起こったと予想される。一方, イエシロアリでは (Fig. 5), 12分台に溶出する画分の吸収が全体的に小さくなっていったにも関わらず, 低分子化は観察されず, 一部若干の高分子化が観察された。Kyouらは, イエシロアリによるリグニン骨格の大きな変化は生じないと報告しており¹⁰⁾, 今回も同様にイエシロアリでは高分子リグニンの分解はさほど起こらないものと考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり, substrate I を提供していただきました東京農工大学 片山義博先生に深く感謝します。

文 献

- 1) Kringstad, K. P., Lindstron, K.: *Environ. Sci. Technol.* **18**, 236 (1984).
- 2) Rappe, C., anson, S., Glas, B., Kringstad, K. P., DeSousa, F., Johanson, L., Abe, Z.: *Pulp Pap. Can.* **90**, T273 (1991).
- 3) Crawford, R. J., Dallons, V. J., Jain, A. K., Jett, S. W.: *Tappi J.* **75**, 129 (1991).
- 4) Fujita, K., Kondo, R., Sakai, K., Kashino, Y., Nishida, T., Takahara, Y.: *Tappi J.* **74**, 123-127 (1991).
- 5) Fujita, K., Kondo, R., Sakai, K., Kashino, Y., Nishida, T., Takahara, Y.: *Tappi J.* **76**, 81-84 (1993).
- 6) Murata, S., Kondo, R., Sakai, K., Kashino, Y., Nishida, T., Takahara, Y.: *Tappi J.* **75**, 91-94 (1992).
- 7) Hirai, H., Kondo, R., Sakai, K.: *Mokuzai Gakkaishi* **40**, 980-986 (1994).
- 8) Tsuchikawa, K., Kondo, R., Sakai, K.: *Jpn. Tappi J.* **49**, 1332-338 (1995).
- 9) Paice, M. G., Jurasek, L., Ho, C., Bourbonnais, R., Archibald, F. S.: *Tappi J.* **72**, 217-221 (1989).
- 10) Reid, I. D., Paice, M. G., Ho, C., Jurasek, L.: *Tappi J.* **73**, 149-153 (1990).
- 11) Kondo, R., Harazono, K., Sakai, K.: *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4359-4363 (1994).
- 12) Harazono, K., Kondo, R., Sakai, K.: *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4359-4363 (1996).
- 13) Ehara, K., Tsutsumi, Y., Nishida, T.: *Mokuzai Gakkaishi* **43**, 861-68 (1997).
- 14) 大熊盛也, 守屋繁春, 工藤俊章: 蛋白質核酸酵素 **43**, 1237-1245 (1998).
- 15) Watanabe, H., Nakamura, M., Tokuda, G., Yamaoka, I., Scrivener, A. M., Noda, H.: *Insect biochem. Molec. Biol.* **4**, 305-313 (1997).
- 16) 阿部琢哉: “シロアリの生態”, 東京大学出版, 東京, 1989, pp. 9-11.
- 17) Cookson, L. J.: *Wood Sci. Technol.* **21**, 11-25 (1987).
- 18) Butler, J. H. A., Buckerfield, J. C.: *Soil Biol. Biochem.* **11**, 507-513 (1979).
- 19) Kyou, K., Watanabe, T., Yoshimura, T., Takahashi, M.: *Wood Research* **83**, 50-54 (1996).
- 20) Brune, A., Miambi, E., Breznak, J. A.: *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2688-2695 (1995).
- 21) Kuhnigk, T., Borst, E. M., Ritter, A., Kampfer, P., Graf, A., Hertel, H., Konig, H.: *System. Appl. Microbiol.* **17**, 76-85 (1994).
- 22) Hortling, B., Tamminen, T., Kentta, E.: *Holzforchung* **51**, 405-410 (1997).
- 23) 中野準三編: “リグニンの化学”, ユニ出版株式会社, 東京, 1978, pp. 524-528.
- 24) 中野準三編: “リグニンの化学”, ユニ出版株式会社, 東京, 1978, p. 522.