

食用きのこを利用した脱リグニン処理による木材の飼料化

京都大学・木質科学研究所

桑原正章・渡辺隆司

1. はじめに一植物細胞壁に含まれる成分

木材など植物バイオマスは再生および持続可能であり、化石資源に代わる資源としてその重要性は益々増加するものと考えられる。木質資源は建築や家具の用材の原料として、また、紙やパルプ製造の原料として全世界で大量に用いられてきている。

植物バイオマスの細胞壁を構成する主要な成分はセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンである。前2者は糖のポリマーであり、後者はフェノール性のポリマーである。セルロースはグルコースが β -1,4-グルコシド結合を介して直鎖状に連なった構造を有し、さらにセルロース鎖は水素結合によりフィブリル構造を形成する。ヘミセルロースはアルカリで溶解される多糖成分の総称である。糖の直鎖状の主鎖に他の糖あるいは酸が結合した基本構造を持つ。代表的な広葉樹のヘミセルロースはキシロースが β -1,4-結合したキシランを主鎖とし、これに側鎖に α -4-O-メチルグルクロン酸残基を持つグルクロノキシランである。針葉樹のキシランは側鎖にメチルグルクロン酸のほかアラビノースを含む。一方、グルコマンナンは針葉樹の主要なヘミセルロースである。グルコマンナンは β -1,4-結合したマンノースとグルコースが主鎖を形成し、その末端にガラクトースが α -1,6-結合した構造を持つ。このほか、針葉樹にはガラクトースを主鎖とし、アラビノースを側鎖とするアラビノガラクトンが含まれる。さらに、植物によっては内樹皮成分としてペクチンが高濃度に含まれる。ペクチンはガラクツロン酸が α -1,4-結合で結合し、カルボキシル基の一部はメチル化されている。このほか、木材あるいは植物にはアラビナンやガラクトンあるいはそれらの誘導体が多糖成分として含まれる。

リグニンはメトキシル基と水酸基を有する芳香環（炭素数6）に炭素数3の側鎖を有するフェニルプロパン（C6-C3）がラジカル重合反応により結合したポリマーである（図-1）。また、ヘミセルロースはリグニンと化学結合し、リグニン-炭水化物複合体(Lignin-carbohydrate complex, LCC)の形で存在する（図-2）。以上の成分は、植物の細胞壁中で複雑なマトリクスを形成している（図-3）また、樹皮にはタンニンが大量に含まれる。タンニンは温水により抽出されるポリフェノールと定義され、その化学構造から縮合型タンニンと加水分解型タンニンに分けられる。縮合型タンニンはフラバノール誘導体のポリマーであり、後者は1個以上の没食子酸あるいはそのダイマーのラクトンであるエラグ酸と糖（主としてグルコース）がエステル結合した構造を持つ。

植物細胞中に含まれる物質を表-1に示す。

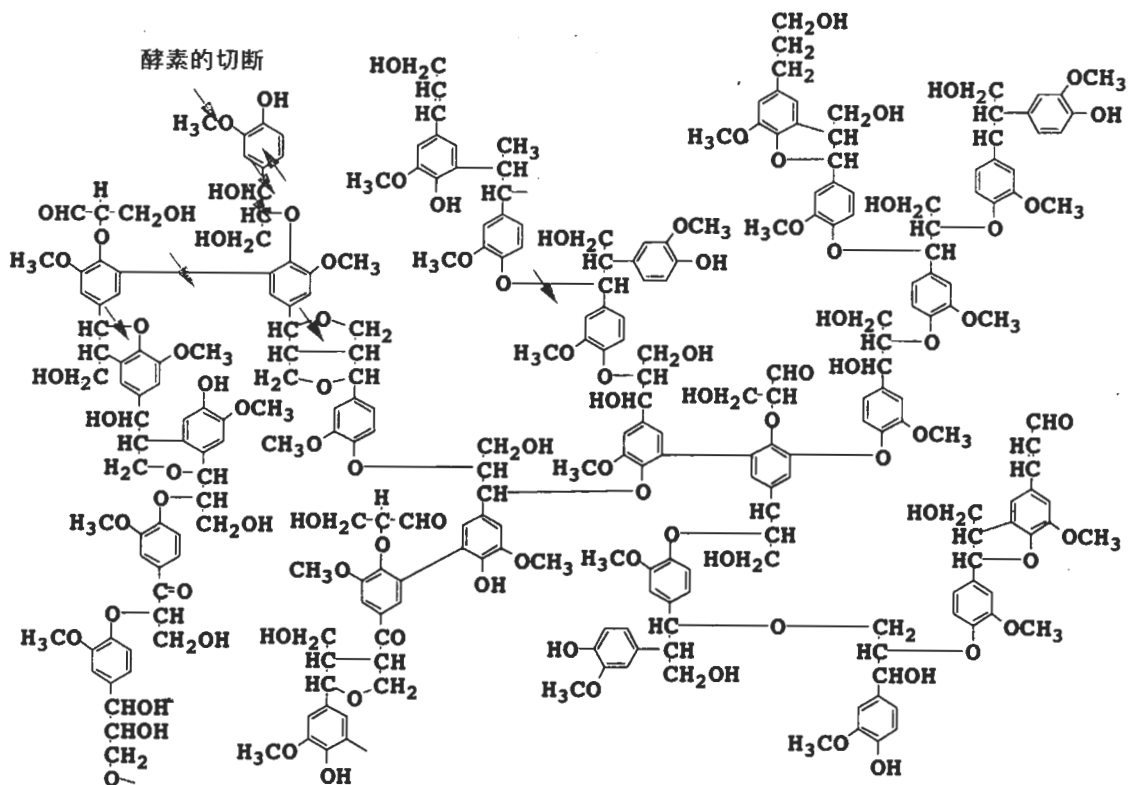


図-1 針葉樹リグニンの模式的構造

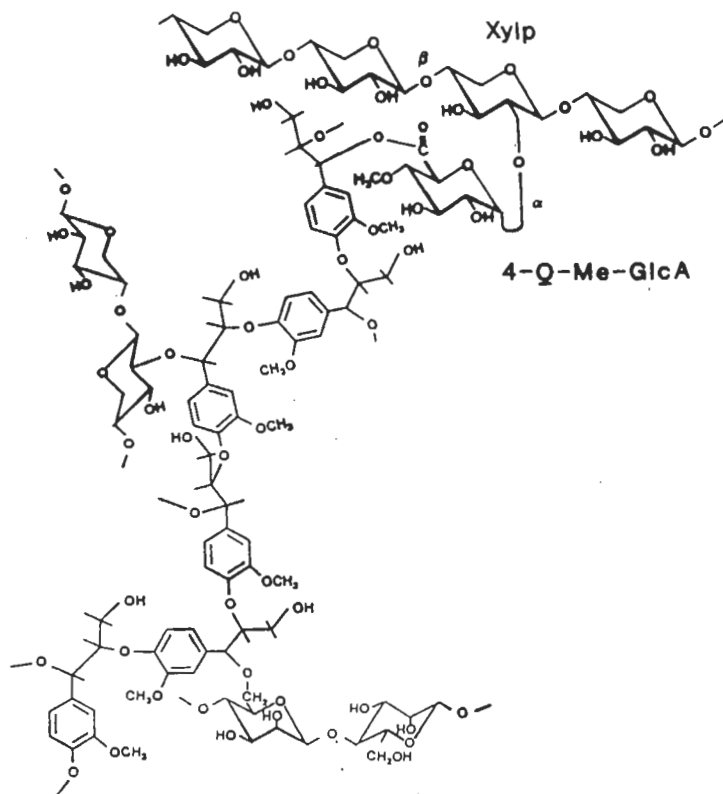


図-2 リグニン-炭水化物複合体の構造 (渡辺隆司による)

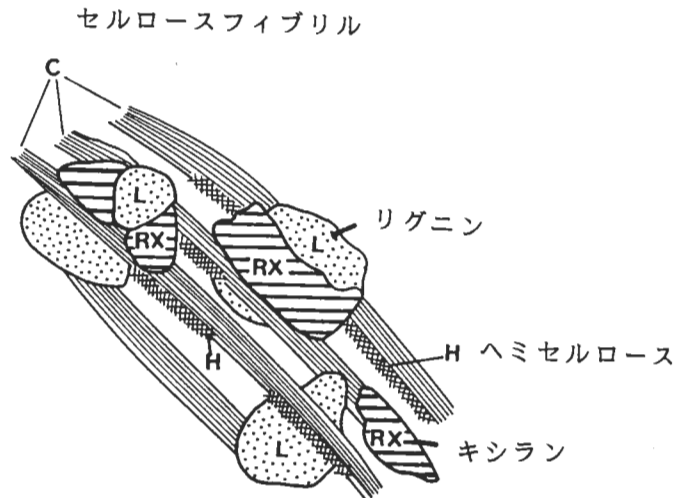


図-3 細胞壁のマトリックス構造

表-1 植物細胞中に含まれる成分¹⁾

Phase	Components	
microfibrillar	cellulose (β -1,4-glucan)	
matrix	pectins	rhamnogalacturonan araninan galactan araninogalactan I homogalacturonan
	hemicellulose	xylan glucomannan mannan glucuronomannan xyloglucan callose (β -1,3-glucan) β -1,3-, β -1,4-glucan arabinogalactan
	proteins	extensin arabinogalactan-protein others, including enzymes
	phenolics	lignin ferulic acid others, e.g. coumaric acid, truxillic acid

2. 成分の微生物分解とその機構

2.1 木材腐朽菌による細胞壁の分解

自然界には木質に生育する多くの糸状菌が存在し、これらは木材腐朽菌と総称される。菌種により3主要成分の分解能に相違がある。木材腐朽菌はその能力の違いにより、白色腐朽菌、褐色腐朽菌および軟腐朽菌に分別される。それぞれの腐朽菌による細胞壁の破壊の状態を図-4

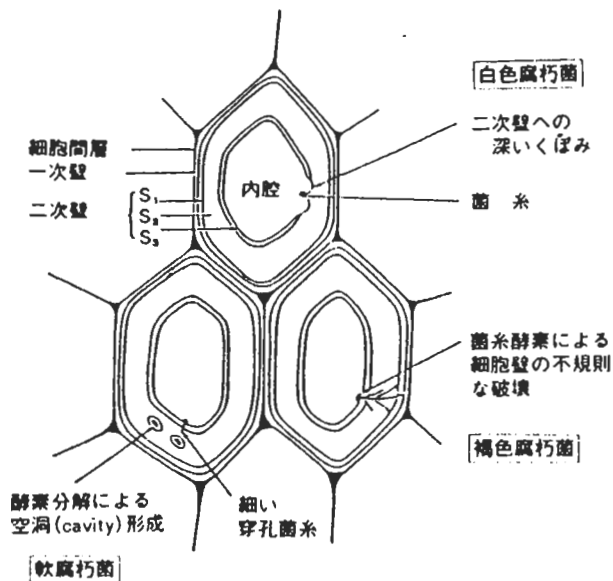


図-4 腐朽菌による細胞壁の分解²⁾

に示す。このうち、特に白色腐朽菌に高いリグニン分解能が認められる。リグニンは担子菌に対する栄養源・エネルギー源になるとは考え難く、セルロースやヘミセルロースなどあるいはほかの低分子炭素化合物を分解して生育すると考えられている。一方、褐色腐朽菌はリグニンに対しては部分的な分解や化学的な修飾にとどまるとされている。しかし、褐色腐朽菌のセルロース低分子化能は極めて高い。これはセルラーゼによる加水分解によると考えるより、菌体外に分泌されるシュウ酸による加水分解や、ラジカル種による分解反応に起因すると考えるべきとされている。また、軟腐朽菌はリグニンに対してはほとんど作用せず、もっぱら多糖成分やその他の炭素源を分解する。この中には高いセルロース分解能を持つ、*Trichoderma* や *Aspergillus* 属などの糸状菌が含まれる。

2.2 成分の分解

セルロースはセルラーゼ群を構成する酵素により加水分解される。反応の基本は、セルロースの β -1,4-グルコシル結合の加水分解である。一般的に言えば、セルラーゼは、セルロース鎖をランダムに切断するエンド型セルラーゼ (CMC アーゼ、EG)、セルロース鎖の非還元末端 (あるいは還元末端) から二糖 (セロビオース) 単位で切断するエキソ型セルラーゼ (アビセラゼ、CBH) および前二者により生成したオリゴマーを分解する β -グルコシダーゼの混合物として生産される。それぞれの酵素は、構造の異なる複数のアイソザイムから構成される。また、これら酵素の組合せは菌種により異なる。ヘミセルロースはヘミセルラーゼと総称される酵素により分解されるが、その基質に対する反応性により、キシラナーゼ、アラビナンナーゼ、マンナンナーゼなどがある。菌種によっては、セルラーゼにはキシラナーゼ活性を併せ持つアイソザイムが含まれる。

リグニンの分解機構は複雑である。古くはラッカーゼ (Lac) がリグニンの分解に関与するとされていたが、1983 年ころから、リグニンペルオキシダーゼ (LiP) とマンガンペルオキシダーゼ

(MnP)が相次いで見出された。特に、MnPは広く白色腐朽菌に分布していることが認められている。これら3種の酵素の反応機構については詳細に検討され、反応の基本は基質の1電子酸化であることが明らかにされている。LiPとMnPの補酵素はヘム鉄であり、Lacは銅である。LiPは非フェノール性の基質の芳香環から1電子を引き抜き、カチオンラジカルを生成する。このラジカルは、分子内の電子移動により、結合が切断される。一方、MnPとLacはフェノール性の基質の水酸基から1電子を引き抜き、フェノキシラジカルを生成する。このラジカルは分子内の電子移動によりその種々の結合が切断される。ただし、MnPは直接フェノールを酸化する反応を示すが、基本的にはMn(II)の酸化によるMn(III)の生成を触媒する。生成したMn(III)がフェノールを1電子酸化する。しかし、触媒サイクル中MnPにはフェノール性基質を直接酸化する反応も存在する。さらに、*Pleurotus eryngii* や *P. ostreatus* のMnP遺伝子はLiPに類似の塩基配列を持つ。このようなMnPをVersatile MnPと呼ぶこともある。これらの触媒サイクルを図-5に示す。リグニン分解酵素のタンパク構造、反応機構、遺伝子構造などについては多くの総説があるので参照されたい。³⁻⁵⁾

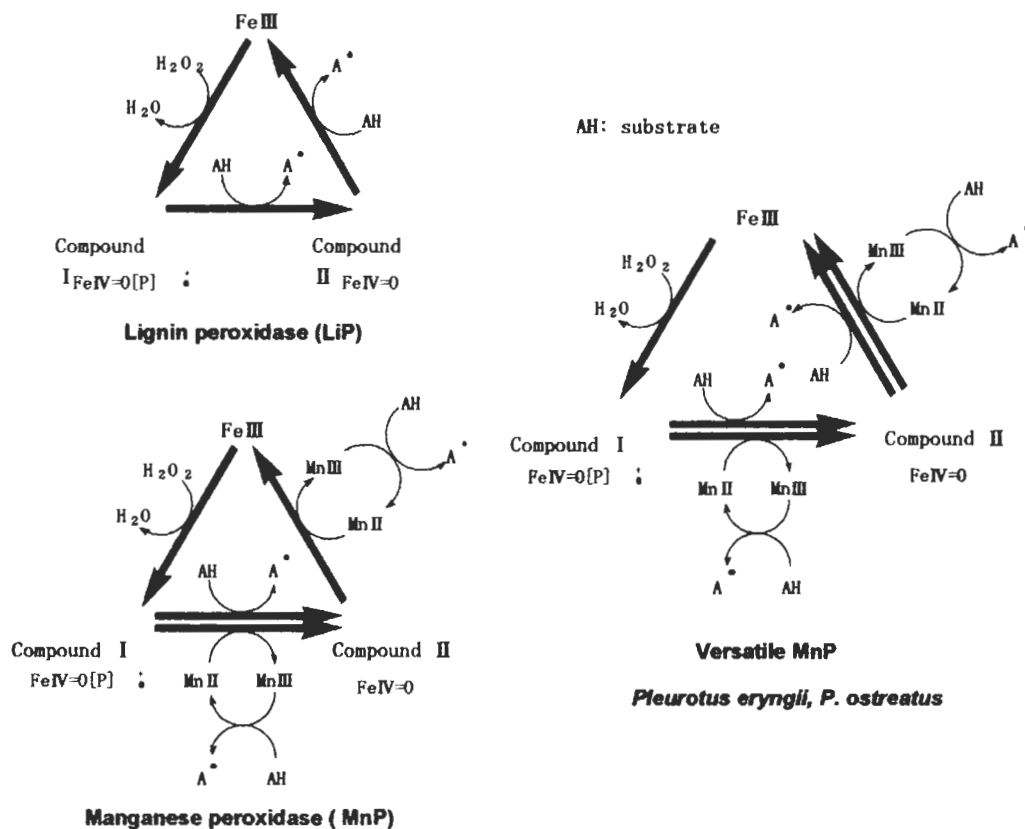


図-5 マンガンペルオキシダーゼおよびリグニンペルオキシダーゼの触媒サイクル³⁾

しかし、最近、細胞間層に濃度高く分布するリグニンだけでなく、二次壁に深く存在するリグニンの分解が行われることから、リグニンの分解には細胞壁中に浸透する低分子化合物が関与することが推測されるようになった。これらの低分子が酵素反応のメディエーターとして働

く可能性が高いことが認識されている。メディエーターが機能することにより、MnP においても非フェノール性の基質も酸化される。^{4,6)}

ところで、細胞壁中に存在するリグニンはセルロースなど糖ポリマーを有効に利用するための物理的な障害となる。リグニンを除去するための前処理法として、化学的にリグニンを可溶化して分離するいろいろな方法が開発されている。例えば、オゾンや過酸化水素その他の強力な酸化剤、過酢酸などの酸、フェノール、クレゾール、ポリアルコールなどの有機溶媒⁷⁾が用いられる。有機溶媒を用いる方法はオルガノソルブ法と称される。また、後述する高温の水蒸気を用いる蒸煮・爆砕も物理化学的な前処理法として有効である。

しかし、飼料などの目的のためにバイオマスを利用する場合には化学的な前処理は不適當であろう。リグニン分解菌を脱リグニン処理に用いる場合には、セルロースなど糖ポリマーの分解を抑え、リグニンのみを選択的に除去することが重要になる。また、組織がなるべくセルロースの構造を損なうことなく崩壊させることも重要である。このためには、選択的リグニン分解菌の利用が不可欠となる。選択的なリグニン分解担子菌として、*Ceriporiopsis subvermispora* や *Dichomitus squalens* などが知られている。われわれは、木質材料からの糖やアルコールの生産のための前処理にこれらの菌を利用することを検討している。*C. subvermispora* と非選択的リグニン分解菌である *Coriolus versicolor* (カワラタケ) をブナ木粉に2ヶ月間生育させた状態を図-6に示す。この写真に示すように、*C. versicolor* では細胞間層のリグニンが完全に除去され、かつ細胞壁全体の分解が進行している。一方、*C. subvermispora* では、細胞間層が分解され、各細胞が相互に分離しているが、細胞壁はインタクトの状態に保たれていることが観察される。

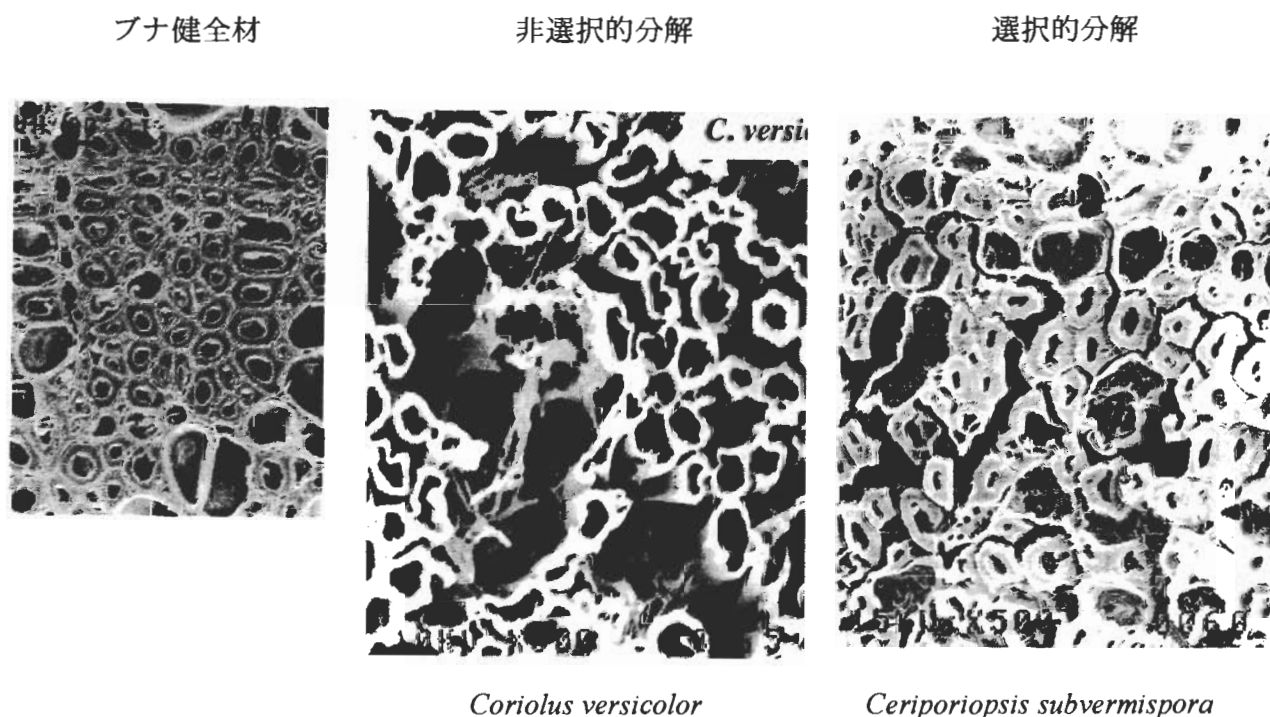


図-6 選択的および非選択的なリグニン分解菌による構造の変化 (28°C、2ヶ月)⁸⁾

このような培養を行っている状態での成分の分解の経時変化を図-7に示す。*C.subvermispora* や *D. squalens* では、ホロセルロース（セルロースとヘミセルロース）の減少が低く抑えられるのに対し、リグニンの分解が顕著であることを示している。なお、*C. subvermispora* についてはその選択的リグニン分解性を利用して、バイオロジカルパルピングの開発が進んでいる。⁹⁾

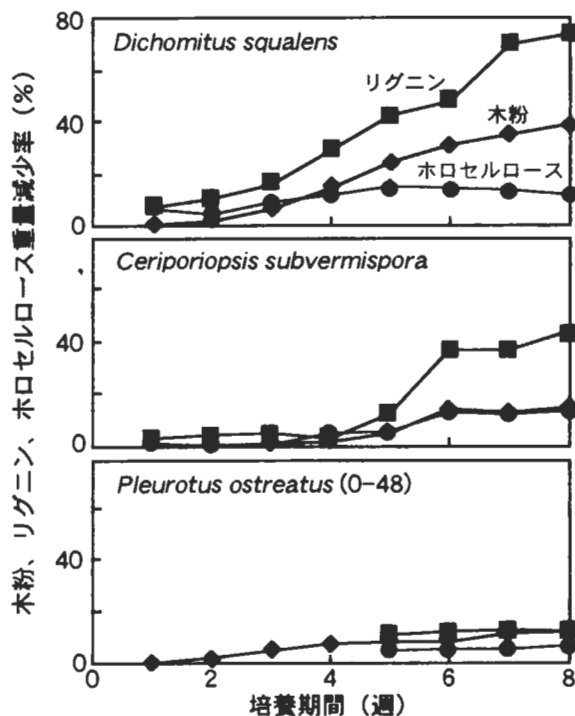


図-7 選択的リグニン分解菌による木質成分の分解⁸⁾

3. 木質およびリグノセルロースバイオマスの飼料化

農産廃棄物あるいは木質系物質を飼料化する場合、原料自身の処理と、それを食する動物消化管の環境の両者を考えることが必要であろう。

3.1 蒸煮処理による飼料化

林野庁森林総合研究所のバイオマス変換プロジェクトにおいて水蒸気蒸煮により木材チップを処理し、牛の飼料とする検討が行われ、パイロットプラントを用いてカンバの飼料化が行われた。

通常、蒸煮・爆砕法では 50MPa 程度までの高圧水蒸気を用いて、短時間で試料を処理する方法であり、反応槽の圧力を急激に下げることにより処理試料の組織を破壊する。この処理により、木材チップの組織は破壊され、ヘミセルロースはほぼ完全に加水分解される。また、リグニンの一部は低分子化され、メタノール可溶性となる。しかし、セルロースは比較的安定に保たれる。しかし、処理時間が長くなると、リグニンの一部はセルロース表面に再結合することになり、見かけ上のリグニン量は増加する。また、可溶化されたヘミセルロースの一部もセル

ローズ表面に再結晶することになる。ユーカリの爆砕の例を図-8 に示す¹¹⁾。水蒸気の温度と処理時間を適切に設定することにより、組織の破壊と、リグニンの分解により、セルローズを有効に利用することが可能になる。蒸煮・爆砕法は基本的にはエネルギー消費量が高いが、廃熱の再利用や、安価なエネルギー源が確保できれば極めて有効な飼料製造手段となる。

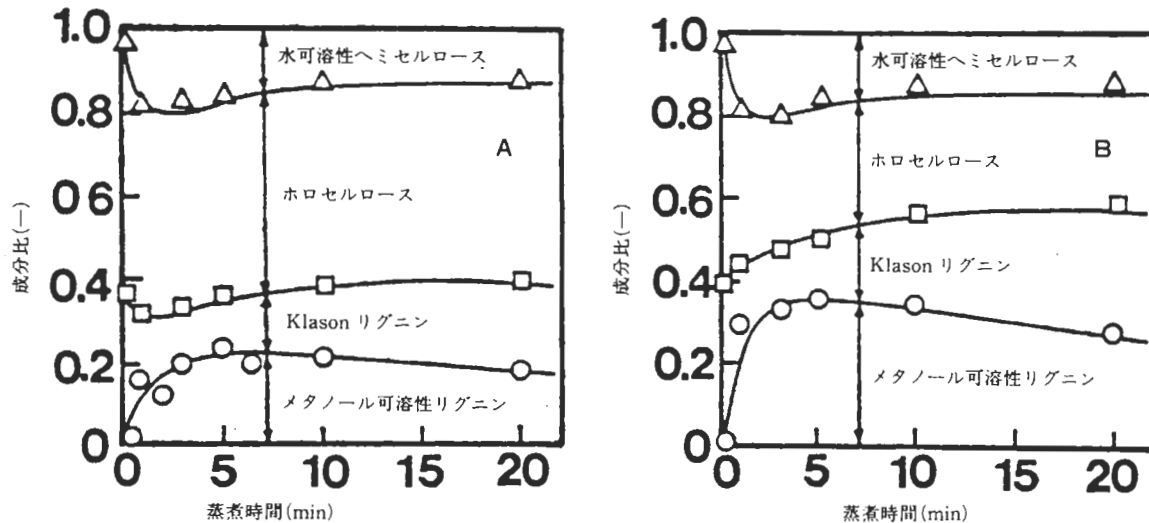


図-8 爆砕によるユーカリ成分の分解¹¹⁾

3.2 担子菌処理による飼料化

南米チリでは、古くから担子菌で腐朽された切り株を牛が好んで食べることが知られている。特に、先述した *C. subvermispora* で腐朽されたものである。この例にもみられるように、リグノセルローズ系原料をリグニン分解性の担子菌で処理して飼料化される可能性があり、これまでも多くの研究例が報告されている。担子菌で処理する効果は言うまでもなく脱リグニンによるセルローズなどの消化性の向上であるが、担子菌の菌体が良好な蛋白源となり得る。

これまで、稲ワラなどの穀物の廃棄物、バガスなど、多くの農産廃棄物の処理が検討され、*Coprinus fimetarius*、*Pleurotus salmoneostramineus*、*P. cystidiosus*、*Auricularia polytricha*、*Pleurotus sajor-caj*、*Trichoderma viride*、*Rhizopus stolonifer*、*Pycnoporus sanguineus*、*Ceriporiopsis subvermispora*、*Irpex lacteus* など、食用担子菌を含む多くの糸状菌が供試されている。

3.3 ルーメン中におけるリグニンの分解

反芻動物のルーメン内でのリグノセルローズの分解は興味深い。一般には、牧草など飼料中に含まれるリグニンや LCC は反芻動物ルーメン内でのセルローズの分解を阻害するといわれている。したがって、これらの物質のルーメン内でリグニンが分解されれば飼料効率が上昇することになる。ルーメン内でリグニンが分離されるか否かについては論議の対象となっている。一般的には、ルーメン内ではリグニンは主要な構造が分解するとはされていないが、少なくとも部分的な分解や修飾は受けていると考えられる。

これまで、ティモシー等の牧草を与えたヒツジの糞便中から、ジオキサンの抽出されるリグニン（ジオキサン可溶性リグニン）の分子量は、飼料中に存在する可溶性リグニンよりも低分子側に分布することが観察されている。このことは、少なくとも消化管の何処かの部位でリグニンが部分分解を受けていることを示している。また、シリンジルプロパン単位が増加し、結合フェノール性酸の量が減少していることも観察されている¹²⁾。

しかし、ルーメン内でのリグニンの分解や変換を勘弁に判定する有効な分析手段が確立されてはいない。そこでわれわれはベンジルエーテル結合を持つリグニンモデル化合物を合成し、ルーメン生物群によるリグニン分解反応を検出する分析系を確立することを試みた。まず、4種類の化合物、3,4-Dimethoxybenzyl 4-methylumbellifery ether (VAU)、1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-O-(4-methylumbelliferyl)-2-methoxyphenoxy)-3-propanol (GGC)、1-(4-Ethoxy-3-methoxyphenyl)-1-O-(4-methylumbelliferyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-3-propanol (GGU-ET) および Coniferyl alcohol-bearing GGU(F-DHP)を合成した(図-9)。ルーメンジュースによるこれらモデル化合物の分解を行ったところ、VAUとGGCについては48時間でほぼ完全な分解が認められた。また、高分子モデルのF-DHPでは約20%の分解が認められた。このように、反芻動物のルーメン内では少なくともリグニンの低分子化が行われていることが *in vivo* の反応で明らかになった¹³⁾。

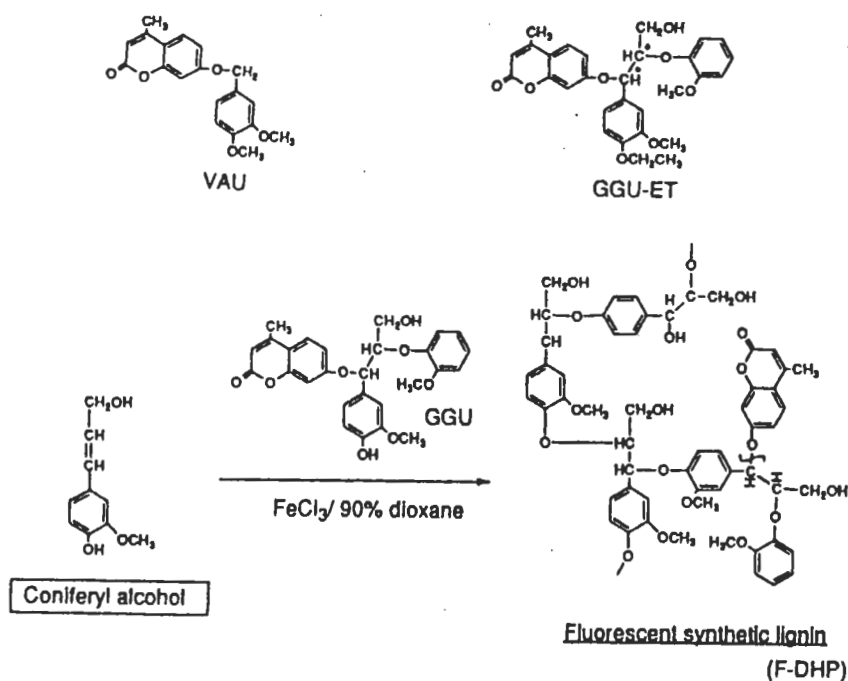


図-9 ルーメンジュースのリグニン分解活性を測定するための基質¹³⁾

参考文献

- 1) C. Brett and K. Waldron: *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*, Unwin Hyman, 1990
- 2) 高橋旨象: 木材研究・試料, No.22, 19-36 (1986)
- 3) 渡辺隆司, 桑原正章: 化学と生物, 38, 161-166 (2000)

- 4) A. Hatakka: Biopolymers. Lignin, Humic Substrates and Coal, (ed. M. Hofrichter and A. Steinbuchel), Wiley-VCH, 129-180 (2001)
- 5) D. Cullen: J. Biotechnol., 53, 273-289 (1997)
- 6) 渡辺隆司: 木材研究・資料, No.36, 34-50 (2000)
- 7) A. Ferraz et al.: J. Chem. Technol. Biotechnol., 75, 1190-1196 (2000)
- 8) 桑原正章: NEDO/RITEJ国際共同研究報告書(2001)
- 9) G. M. Scott and M. Akhtar: Biopolymers. Lignin, Humic Substrates and Coal, (ed. M. Hofrichter and A. Steinbuchel), Wiley-VCH, 181-208 (2001)
- 10) 農林水産技術会議事務局編: バイオマス変換計画, 光琳, p.363-384 (1991)
- 11) 桑原正章, 澤田達郎: 木材工学, 47, 157-163 (1992)
- 12) T. Kondo, T. Watanabe, T. Ohshita and T. Kyuma, JARQ, 32, 187-195 (1998)
- 13) H. Kajikawa, H. Kudo, T. Kondo, K. Jodai, Y. Honda, M. Kuwahara and T. Watanabe: FEMS Microbiol. Lett., 187, 15-20 (2000)