

針葉樹バーク分解微生物の検索

山本 忠*、小野寺和江**

針葉樹バークを堆肥化するため、リグニン分解微生物を検索した。リグニン分解微生物検索試験は、市販の針葉樹バーク堆肥や漆チップの堆積されている土壌を分離源として行った。ダイオキシシン分解菌の選択に利用されている色素を用いた方法で、色素を変色させる微生物がいくつか見出された。これらはリグニン分解微生物である可能性が高い。また、針葉樹バークの高速堆肥化について現場規模への準備試験として、10m³程度の針葉樹バークで添加栄養条件の相違による比較試験を進めている。

キーワード：リグニン、分解、微生物、堆肥、針葉樹、バーク

Screening of Conifer Bark - Degrading Microorganism

YAMAMOTO Tadashi, ONODERA Kazue

The degrading microorganism was examined in order to decompose lignin. The lignin-degrading microorganism retrieval test did the soil that conifer bark compost and Japanese lacquer chip of the marketing were piled up with the separation source. Some microorganisms were found in the selection which made the decomposition of the pigment to be an index. And, the comparative test by the difference of addition nutritional factor of the conifer bark of about 10m³ is advanced on the high-speed composting of the conifer bark as preparation test to the field scale.

key words : lignin, degrading, microorganism, compost, conifer, bark

1 緒言

リグニンは木材に多く含まれ、その構造・強度を支える天然高分子成分として知られている。その分解されにくいという性質から、難分解性物質の代表とみなされている。生物学的リグニン分解については、製紙工程への利用などの観点から広く研究されている。特に、ダイオキシシン分解と共通する反応があることから環境の視点での検討が進んでいる。1980年代に白色腐朽菌がダイオキシシンを分解することが報告¹⁾されてから急激に研究が進み多くの分解微生物が報告されている。

今まで担子菌でリグニン分解について知られていることを割石は以下のようにまとめている²⁾。リグニン分解の初期段階に働く主要な酵素は、リグニンパーオキシダーゼ、マンガンオキシダーゼ、ラッカーゼであることが知られている。また、リグニン分解にはセルロース、グルコースのようなエネルギー源が必要で、酸化的に進行し、二次代謝として発現、過酸化水素により促進され、細胞外活性であることが知られている。さらに、複雑な構造を有する芳香族高分子であるリグニンを分解する担子菌は、優れた芳香族化合物分解酵素群を有すると考えられている。それに比べて、細菌によるダイオキシシン分解は Klecka ら³⁾によって報告されているもののまだ少

ない。

岩手県は、多くの杉を生産しており、その際に皮の部分であるバークと呼ばれる部位の利用価値が低いため、多くの製材所で処理に困っている。この杉バークを堆肥に利用するための工夫が有限会社グリーン総業によりなされてきた。しかし、杉バークの堆肥製造への利用は、有機性の窒素を多量に添加しないと堆肥化するまでに広葉樹バークの数倍の時間がかかることから、肥料化として扱おうとする場合でも課題が多い。また、針葉樹は燃料用にペレット化した場合でも灰分が多く出するため、灰の処理が課題であることから有効な利用方法の開発が期待されている。今回、針葉樹バークの堆肥化で、有機性廃棄物添加の効果をリグニン分解菌の分離源の視点で検討したので報告する。

2 実験方法

2-1 堆肥化試験に用いたバークおよび微生物

岩手県産の杉由来のバークを原料として使用した。対照としてブナを中心とする広葉樹由来のバークを使用した。また、これらに添加する種菌と呼んでいる微生物は、有限会社グリーン総業（岩手県藤沢町）で従来菌の市販菌を自社でトウモロコシとふすまベースの培地で拡大培

* 食品技術部、現在 企画情報部

** 有限会社グリーン総業

養して堆肥製造に使用しているものである。種菌試験区の菌株は、メタン発酵残さ微生物群である。

2-2 バーク分解速度に与える栄養条件比較試験

現場での実施につながる規模で、バーク分解速度に与える栄養条件比較試験を行った。窒素源として用いた鶏糞は、養鶏場から分けていただいたものを使用した。窒素を総窒素で 0.5% として、投入鶏糞量を計算した。

表1 バーク分解速度に与える栄養条件比較試験の配合

試験区 名称	記 号	バーク(kg)		種菌(kg)			窒素	合計 (kg)
		針葉樹	広葉樹	なし	従来 の 種菌	メタン 発酵 残渣	鶏糞 (kg)	
対照区	C1	1,000		0				1,000
従来区	C2	1,000			10			1,010
種菌 試験区	C3	1,000				10		1,010
窒素 添加区	C4	1,000		0			10	1,010
窒素添加 従来菌区	C5	1,000			10		10	1,020
窒素添加 新菌区	C6	1,000				10	10	1,020
広葉樹 対照区	B1		1,000	0				1,000
広葉樹 従来区	B2		1,000		10			1,010

平成 14 年 9 月に、有限会社グリーン総業の敷地内の屋外に積み上げ自然条件下で堆肥化を行った。温度は、おんどとり Jr.TR52 (株式会社ティアンドディ製) のセンサーを堆肥の山に 50cm 突き刺し検知・記録した。

2-3 ダイオキシシン分解標準微生物

標準微生物は、ダイオキシシン分解菌として知られている 3 株を使用した。白色腐朽菌として NBRC 9791 *Coriulus versicolor*、NBRC 30340 *Coriulus versicolor*、細菌としては ATCC 13368 *Bacillus megaterium* de Bary を用いた。

2-4 微生物培養液の吸光度測定

吸光度の測定は、吸光度計 UV200 (島津製作所株式会社製) を用い、色素レマゾール ブリリアント ブルー-R (RBBR) の吸収が大きい波長 595nm で測定した。10ml 容の L 字試験管に培地を 10ml 分注して、高通気性のシリコン栓をしてオートクレーブで 121°C、15 分の滅菌後、別途培養した微生物を植菌した。培養条件は、25°C で静置培養とした。

2-5 微生物試験法

衛生試験法・注解⁴⁾に基づいて試験を行った。一般細菌は、標準寒天培地 (日水製薬株式会社製) を用いて 37°C、48 時間で測定した。生酸菌は、BCP 加プレートカウンタガール (日水製薬製) を用いて、37°C、48 時間で測定した。大腸菌群は、デソキシコレート培地を用い (日水製薬株式会社製) を用い、37°C、48 時間で測定した。嫌気性菌

は、変法 GAM 培地 (日水製薬株式会社製) で脱酸素剤を用い、37°C、48 時間で測定した。

2-6 リグニン分解菌検出用培地

一次分離用の培地としては、橘らの方法⁵⁾ に準じてポテトデキストロース寒天培地に 0.03% の RBBR を添加して、オートクレーブ後平板培地にして使用した。培地の色素の変化は、植菌後 25°C で培養したプレートで、2 日後、7 日後、14 日後に観察した。また、トリプトソーヤ寒天菌培地でも 0.03% の RBBR を添加して、同様に行った。

2-7 セルロース分解菌検出用培地

一次分離用の培地としては、ポテトデキストロース寒天培地に 1% のセルロースパウダーを添加して、オートクレーブ後平板培地にして使用した。分解菌の存在は、培地のクリアーゾーンの形成を、植菌後 25°C で培養したプレートで、2 日後、7 日後、14 日後に観察した。針葉樹バークの堆肥化現場での管理を考えて、栄養源の少ない状況で生育できる微生物を選択するため、ポテトデキストロース寒天培地の量を通常の 1/10、また 1/100 量とし、寒天濃度を 1.5% になるように調整したセルロース培地も作成した。また、トリプトソーヤ寒天菌培地でも、同様に行った。

2-8 キシラン分解菌検出用培地

セルロース分解菌と同様に行った。一次分離用の培地としては、ポテトデキストロース寒天培地に 1% のキシランパウダーを添加して、オートクレーブ後平板培地にして使用した。分解菌の存在は、培地のクリアーゾーンの形成を、植菌後 25°C で培養したプレートで、2 日後、7 日後、14 日後に観察した。針葉樹バークの堆肥化現場での管理を考えて、栄養源の少ない状況で生育できる微生物を選択するため、ポテトデキストロース寒天培地の量を通常の 1/10、また 1/100 量とし、寒天濃度を 1.5% になるように調整したキシラン培地も作成した。また、トリプトソーヤ寒天菌培地でも、同様に行った。

2-9 成分分析

分析は次のとおり行った。窒素分析は、TECATOR 社製ケルテックオートサンプラーシステム 1035 を用いて測定した。試料約 1g を耐熱ビーカーに精秤して、105°C の送風乾燥機で 2 時間乾燥した。減少した重量を水分として計算した。直接還元糖はソモギー変法で、pH は遠心チューブに取った試料 10g に精製水 10ml 加え振とう後ろ過し、pH メーターの電極を直接差し込み読みとった。

有機態炭素及び硫黄は LECO SC144DR を用い燃焼法、脂質はクロホルム・メタノール抽出法によって測定した。

木材の高分子成分であるリグニン、セルロースは、木質科学実験マニュアル⁶⁾ に準じて測定した。リグニンのうち酸不溶リグニン成分については、硫酸分解、ガラスフィルターろ過により重量分析した。酸可溶性リグニン成分は、吸光度法 (205nm) により測定した。

セルロースは、 α -セルロースについては、硫酸分解、ガラスフィルターろ過により重量分析した。 β -セルロースは、 α -セルロースのろ液に酢酸を加え加熱して結晶を形成させ、ろ紙で集めて重量測定した。

2-10 微生物分離源

リグニン分解菌などの分離源は、漆廃木材など特殊な土壌を含めて岩手県内で収集したものを用いた。

3 結果

3-1 微生物源の違いによるリグニン分解菌出現度合い

試験に用いた針葉樹・広葉樹別、接種微生物群、養分添加別の微生物源の違いによる分析結果を図1に示した。

白色腐朽菌標準株のような強い色素変化を示すものは指標とする変色は赤色化するものと、緑色化するものがあった。ダイオキシシン分解で知られた白色腐朽菌の2株は、ポテトデキストロース培地の色素 RBBR を赤色化させた。一方、細菌 ATCC 13368 *Bacillus megaterium* de Bary は、周辺を緑色化した。多くは得られなかったが、色素を変化させる微生物が色を変化させない普通の微生物の数%程度出現し、かなりの割合で見いだされた。ただし、鶏糞で窒素添加し、メタン発酵残渣を微生物源とした区では、色素を変化させるような微生物を見いだすことはできなかった。

この試験のほかに、漆廃木材置き場土壌など県内の幾つかの土壌から色素変化を指標として微生物の分離を行った。そこで得られた色の变化の強い株を経時的な RBBR 色素分解試験に用いた。

3-2 堆肥成分の比較

試験5ヶ月後の堆肥の基本成分及び今回検討の主な対象

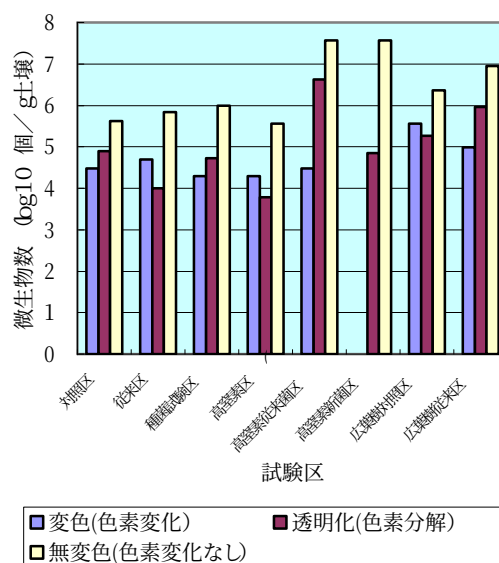


図1 針葉樹バーク堆肥製造における分解酵素生産菌の動向

とした堆肥のリグニン及びセルロース成分を試験5ヶ月後の試料で分析したものを表2に示した。

3-3 微生物による色素分解の変化

カビの培養でよく利用される培地で、窒素があまり高くないポテトデキストロース培地で培養した微生物の RBBR 3-3 色素分解の変化を図2に示した。ここでは対照とした NBRC 30340 の変化が大きかった。細菌が生育しやすい窒素の多い培地であるトリプトソーヤブイヨン培地での RBBR 色素の吸光度の経時変化を図3に示した。ここでは、選択した Kenkyou b1、Kenkyou b2、Japan a、Conifer c の変化が大きかった。

表2 発酵6ヶ月後の肥成分表

(乾物あたりの%、イタリックは各成分の内訳)

記号	内容	N	C	CN比	脂質	S	リグニン	酸可溶性 リグニン	ホロセル ロース	α -セル ロース	β -セル ロース	?-セル ロース
a-1	対照区	2.41	36.65	15.20	1.11	0.18	41.32	0.81	45.92	28.43	4.93	12.55
a-2	従来区	3.53	38.69	10.96	2.47	0.21	43.68	0.79	44.88	27.49	5.00	12.39
a-3	種菌試験区	8.74	34.96	4.00	1.18	0.30	37.18	1.05	47.34	27.95	5.07	14.32
a-4	窒素添加区	2.36	37.56	15.95	0.98	0.16	41.27	0.60	47.66	28.77	5.32	13.56
a-5	窒素添加従来菌区	10.56	39.36	3.73	1.00	0.25	38.44	1.46	45.40	27.39	5.35	12.66
a-6	窒素添加新菌区	7.61	36.81	4.84	1.27	0.23	39.71	0.90	45.63	30.05	6.00	9.57
b-1	広葉樹対照区	3.08	37.89	12.30	1.62	0.15	39.29	1.54	53.15	28.56	9.26	15.32
b-2	広葉樹従来区	4.93	39.03	7.92	2.51	0.15	40.84	1.64	53.58	26.39	6.28	20.90
t-1	屋外新菌区	7.91	37.13	4.69	0.81	0.20	41.23	1.14	40.68	28.37	5.08	7.23
a-0	針葉樹原料	2.09	41.03	19.62	0.73	0.21	37.08	0.58	47.39	30.35	4.22	12.82
b-0	広葉樹原料	2.65	42.73	16.15	2.76	0.13	32.04	1.33	49.19	30.12	5.17	13.9

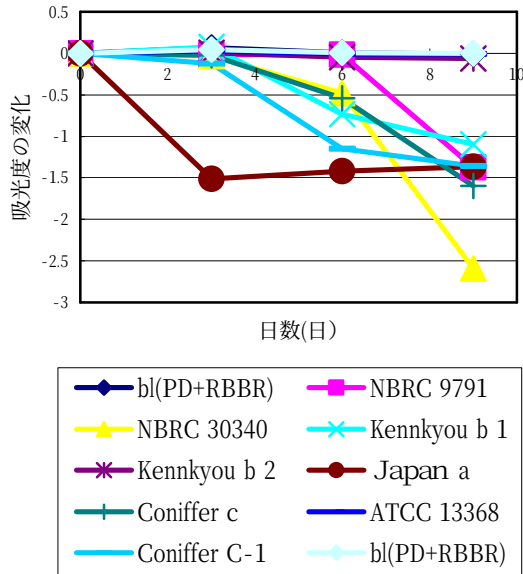


図2 ポテトデキストロース培地でのRBBR色素の変化

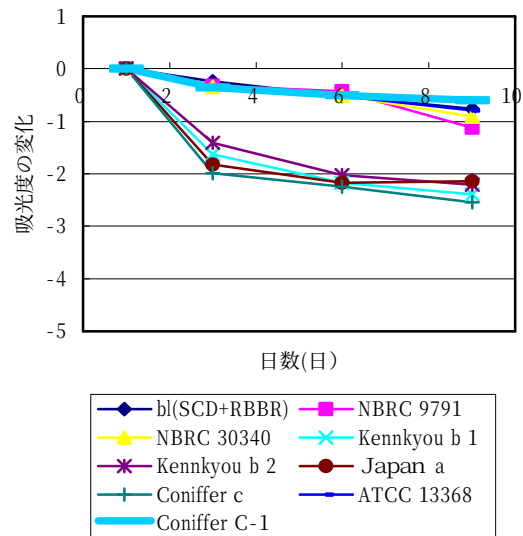


図3 トリプトソーヤブイヨン培地でのRBBR色素の変化

3-4 セルロース分解菌の選択

ポテトデキストロースをベースとした栄養成分の濃度の違いによるセルロース分解菌の検索の結果を表3に示した。用いた微生物源の中では、新鮮な抜根材を砕いたものから多く検出できた。なお、栄養成分は、標準で用いられる濃度での発現が多く見られた。

3-5 キシラン分解菌の選択

ポテトデキストロースをベースとした栄養成分の濃度の違いによるキシラン分解菌の検索の結果は表4に示したように、セルロース分解菌の場合と同様な結果となった。

表3 微生物分離源のポテトデキストロースをベースとしたセルロース分解菌の出現頻度の比較

(土壌1gあたりの106培地でのコロニー数)			
微生物源	培地中のセルロース濃度 1%		
	PDA 標準量 (1/1)	PDA 薄め (1/10)	PDA 極薄 (1/100)
針葉樹バーク堆肥 (開始時)	2	0	0
針葉樹バーク堆肥 (1年後)	1	0	0
針葉樹バーク堆肥 (完熟製品)	1	0	0
抜根材チップ (開始時)	15	2	1
抜根材チップ (1年後)	2	0	0

PDA:ポテトデキストロースアガー

用いた微生物源の中では、新鮮な抜根材を砕いたものから多く検出できた。なお、栄養成分濃度の影響は、標準で用いられる濃度で分解菌の発現が多く見られた。

4 考 察

今までに見出されているダイオキシン分解菌は、白色腐朽菌がほとんどであり、生育速度に問題があり、類似の分解機構をもっているリグニン分解への微生物による実用化研究の幅を狭めていた。今回、リグニン分解の可能性のある細菌と考えられる微生物が簡単に見出された意義は大きい。ただし、それらの微生物は指標色素の分解力が弱く、実用化のためには、さらに選択方法の検討を進める必要がある。

表4 微生物分離源のポテトデキストロースをベースとしたキシラン分解菌の出現頻度の比較

(土壌1gあたりの106培地でのコロニー数)			
微生物源	培地中のキシラン濃度 1%		
	PDA 標準量 (1/1)	PDA 薄め (1/10)	PDA 極薄 (1/100)
針葉樹バーク堆肥 (開始時)	8	1	0
針葉樹バーク堆肥 (1年後)	2	0	0
針葉樹バーク堆肥 (完熟製品)	3	0	0
抜根材チップ (開始時)	25	5	2
抜根材チップ (1年後)	7	2	0

PDA:ポテトデキストロースアガー

白色腐朽菌は、培地に窒素が多いとダイオキシン分解酵素を生産しなくなるとされており、今回の RBBR 色素を指標とする L チューブによる培養試験でも、白色腐朽菌はテトデキストロース培地では、色素分をよく分解するが、窒素の高いトリプトソーヤブイヨンではほとんど分解しなかった。このことは、針葉樹バークを畜舎の敷き藁とした場合、堆肥化過程でリグニンの分解が期待出来ないことになるため、実用化を目指してリグニン分解酵素生産の条件をさらに検討したい。ただし、堆肥の高速製造視点では、リグニン分解にこだわる必要はなく、高窒素で針葉樹バーク堆肥を製造できることを考慮しなければならない。針葉樹バークの堆肥化の際、熟成不十分な針葉樹バークが水をはじくことやテルペン成分が微生物の生育の阻害因子となる⁷⁾などの問題点が解決されれば土壌改良材としては十分利用できる可能性が高いので、その面での検討も進めたい。

なお、リグニンに比べてはるかに分解速度が速く、またセルロースに比べても微生物に利用されやすく、成分としても含有率の高いヘミセルロースの代表であるキシランの分解菌の選択を試みた。窒素成分の少ない培地で生育するキシランの高速分解菌を選択することで、針葉樹バークの高速堆肥化が可能となると考えている。

本研究は、平成 14 年度の基盤的先導的研究事業でおこない、一部をテクノブリッジ推進事業の研究として、平成 14～15 年度に実施した。最後になりましたが、本研究を進めるにあたり、多くの御配慮をいただいた有限会社グリーン総業代表取締役熊谷勝氏の御支援に感謝いたします。

文 献

- 1) J. A. Bumpus, M. Tien, D. Wright and S. D. Aust : Science, 228, 1434-1436 (1985)
- 2) 片山義弘、桑原正章、林隆久編：木材科学講座 11 バイオテクノロジー：p105、海青社 (2002)
- 3) Klecka, G. M. and Gibson, D. T. : Biochem. J., 180, 639-645 (1979)
- 4) 日本薬学会編：衛生試験法・注解、金原出版 (1990)
- 5) 橘 燦朗、大川浩樹、伊藤和貴、沖 妙、平林達也：紙パルプ技術協会誌：50、1806-1815 (1996)
- 6) 日本木材学会編：木質科学実験マニュアル：p97、文永堂出版 (2000)
- 7) 今村博之、岡本 一、後藤輝男、安江保民、横田徳郎、善本智知孝編：木材利用の科学：p97、文永堂出版 (2000)