

木材中に添加した窒素濃度が白色腐朽菌によるリグニン分解に及ぼす影響 第1報

菌種による相違について

山本 幸一⁽¹⁾・松岡 昭四郎⁽²⁾・広居 忠量⁽³⁾

Koichi YAMAMOTO, Shoshiro MATSUOKA, and Tadakazu HIROI: Effects of Nutrient Nitrogen Impregnated in Wood on Lignin Degradation by White-rot Fungi I. Comparison among fungus species.

要 旨: 木質系資源から生物的処理によりリグニンを効率的に除去し、その残渣の有効利用を図ることは重要である。微生物による木材中のリグニン分解を促進させる試みの一つとして、木材自体に窒素源を添加し、白色腐朽菌による分解を行い、添加窒素濃度が木材中のリグニンの選択的分解に及ぼす影響を調べた。

無機態窒素としてリン酸 2 アンモニウム、アミノ態窒素としてアスパラギンを用いたが、前者の添加はリグニンの選択的分解を阻害する傾向にあった。そのため窒素源には主としてアスパラギンを用い、濃度の異なる水溶液 (0.0~1.6%) を減圧注入したシラカンバ試験片 (20×20×10mm) を窒素無添加の培地上で7種類の白色腐朽菌により分解させた。

その結果、木材の分解は一定のアスパラギン添加濃度までは促進された。すなわち、ヒラタケ、タモギタケ、*Sporotrichum pulverulentum* は1.6%濃度の添加で、*Phanerochaete chrysosporium*、マンネンタケは0.8%で分解は最も促進された。一方、ナメコ、シイタケは低濃度の添加では分解は促進されたものの、高濃度では阻害された。

リグニンの選択的分解はアスパラギンの添加により向上するもの、低下するもの、あまり左右されないものの3つの型に分けられた。リグニンの選択的分解の程度をアスパラギン無添加と1.6%までの水溶液添加とで比べると、ヒラタケ、タモギタケではリグニンの選択的分解は増加傾向を示した。逆に *Sporotrichum pulverulentum*、*Phanerochaete chrysosporium*、シイタケ、ナメコでは減少傾向を示した。マンネンタケでは添加濃度にあまり左右されなかった。

1. はじめに

リグノセルロースから効率良くリグニンを除けば、その残渣は有用な炭水化物資源となる。この見地から生物的脱リグニンは広く研究されている^{1)~8)}。

木材の窒素含量はきわめて低く、微生物にとって十分な基質であるとは言いがたい¹⁾。培地中あるいは木材中に窒素源を添加すると、一般に木材腐朽菌による木材の分解は促進されることが明らかにされている⁶⁾。ところが、窒素濃度を高くすると、二、三の菌種を除きリグニンの分解は阻害されることが知られている^{6)~7)}。これらの結果は窒素源を添加した液体培地中において¹⁴Cラベルリグニンやリグノセルロースを白色腐朽菌により分解して得られたものであり、木材そのものに窒素源を添加しての報告はほとんど見られない。リグニンの分解は炭水化物の共存により促進されるという研究や⁸⁾、木材が分解されるには木材組織中に菌糸が侵入しなければならない等の理由から、実際の木材を用いてさらに実験を行う必要が

あると考えた。

本研究では、木材自体に窒素源を注入し、それを白色腐朽菌で分解させ、添加窒素濃度がリグニンの選択的分解に及ぼす影響を調べた。以下、結果のみをまとめて報告する。

2. 実験方法

2-1 リグニン分解の選択指数

腐朽による木材成分の分解の選択性を示すための数値化については多くの報告がある。KAWASE(1962)⁹⁾は天然腐朽材について、(腐朽材のホロセルロース含量)/(腐朽材のリグニン含量)によって得られる数値(0 から∞の値)を用いて腐朽型を分類した。これに対し実験的に腐朽させた木材について、原口(1958)¹⁰⁾らは、((腐朽によるリグニンの減少量)/(腐朽によるリグニンと全セルロースの減少量))×10を材質分解型指数(1 から10の値)とし木材腐朽菌の類別を行った。これらの数値化は腐朽型の分類には適当であるが、リグニン分解の選択性を求めるには数値の開きが大き過ぎる。

一方、石原(1982)¹¹⁾はリグニンの選択的分解という観点から、腐朽後の(炭水化物の含量)/(リグニンの含量)を指数として、この指数を未処理材の指数と比べて評価すべきとした。

ここでは、この考えをもとに両者の指数の比、すなわち、{(腐朽後の炭水化物の含量)/(腐朽後のリグニンの含量)} / {(腐朽前の炭水化物の含量)/(腐朽前のリグニンの含量)}をリグニン分解選択指数とした。このように表現すると、腐朽材のリグニン含有率が減少し、相対的に炭水化物含有率が増加するとリグニン分解選択指数の値は1 より大きくなる。逆に、腐朽材のリグニン含有率が増加し、相対的に炭水化物含有率が減少すると選択指数は1 より小さくなる。

2-2 無機態窒素とアミノ態窒素の比較

無機態窒素としてリン酸2アンモニウム、アミノ態窒素としてアスパラギンを選び、0.0, 0.1, 1.0, 3.0%濃度のそれぞれの水溶液を20(R)×20(T)×10(L)mmの試験片に減圧注入した。窒素源注入後の各試験片のケルダール法によって定量された窒素含有率をTable 1に示す。使用した樹種はシラカンバとヤマナラシである。培地は、500 mlのブロービンに石英砂200gと0.2%グルコース水溶液60 mlを加え、

Table 1. アスパラギンおよびリン酸2アンモニウムを注入したシラカンバ材とヤマナラシ材の窒素含有率

Nitrogen contents of *Betula platyphylla* and *Populus sieboldii* impregnated with asparagine and ammonium phosphate dibasic solution.

窒素源 Source of N	材名 Wood species	窒素源水溶液濃度 (%) Concentration of N solution (%)			
		0	0.1	1.0	3.0
アスパラギン Asparagine	シラカンバ <i>B. platyphylla</i>	0.11	0.13	0.49	1.07
	ヤマナラシ <i>P. sieboldii</i>	0.16	0.15	0.36	0.77
リン酸2アンモニウム Ammonium phosphate, dibasic	シラカンバ <i>B. platyphylla</i>	0.11	0.13	0.39	0.81
	ヤマナラシ <i>P. sieboldii</i>	0.16	0.15	0.31	0.62

Table 2. アスパラギンを注入したシラカンバ材の C/N 比
C/N ratio of *Betula platyphylla* wood impregnated with
asparagine solution.

	アスパラギン水溶液濃度 (%) Concentration of impregnated asparagine solution (%)				
	0	0.2	0.4	0.8	1.6
窒素含有率 N (%)	0.06	0.12	0.16	0.27	0.52
炭素含有率 C (%)	47.78	47.63	47.40	47.70	48.05
C/N 比 C/N ratio	769	397	296	177	92

ブナ木粉 0.5 g で培地表面を覆った窒素無添加培地である。試験片は1条件につき9個とし、1ビンにつき3個ずつを木口面が培地面と接するように置き、各試験片の上面に菌体を20—30 mg ずつ載せた。接種用の菌体は、麦芽抽出物2%、ペプトン1%の培養液中で菌体を3—7日間振盪培養を行った後、菌体を培養液と無菌的に遠心分離し、殺菌蒸留水で3回繰り返して洗浄して得た。使用した白色腐朽菌は、カワラタケ (*Coriolus versicolor*) である。腐朽期間は8週間とした。腐朽後に重量減少率を測定し、各条件につき3個の試験片のクラソンリグニン量を定量し、2-1によりリグニン分解選択指数を求めた。

2-3 菌種ごとの比較

2-2の実験結果に基づき、窒素源としてリン酸2アンモニウムに比べ効果のあるアスパラギンを用い、シラカンバについて以下の白色腐朽菌により2-2と同様の実験を行った。注入するアスパラギン水溶液濃度は0.0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6%の5段階とした。アスパラギン注入後の各試験片について元素分析を行い、窒素含有率と炭素含有率およびC/N比を求めTable 2に示す。使用した白色腐朽菌は、比較的反リグニン分解力が強いヒラタケ16 (*Pleurotus ostreatus*)、タモギタケ FMC 453 (*Pleurotus cornucopiae*)、シイタケ F 403 (*Lentinus edodes*)、ナメコ F 27 (*Pholiota nameko*)、マンネンタケ G1-1 (*Ganoderma lucidum*)、*Phanerochaete chrysosporium* ME 44 b、*Sporotrichum pulverulentum* K-3 の7種である。腐朽期間は8週間とした。

3. 結 果

3-1 無機態窒素とアミノ態窒素の比較

無機態窒素としてのリン酸2アンモニウムの木材への添加により、カワラタケによる木材の分解はシラカンバでは完全に阻害され、ヤマナラシでは0.1%濃度の添加ではわずかに促進されたが、1.0%濃度以上では阻害された (Table 3)。一方、アミノ態窒素としてのアスパラギンの木材への添加によっては、シラカンバ、ヤマナラシとも、木材の分解は1.0%濃度までは促進されたが、3.0%濃度では、ヤマナラシは完全に阻害され、シラカンバも阻害される傾向にあった (Table 3)。無機態窒素とアミノ態窒素の比較については、過去の多くの研究においても、アミノ態窒素の添加は培地中にせよ木材中にせよ木材の分解を促進し、無機態窒素はむしろ阻害することが示されており¹¹⁾¹²⁾、本実験でも同様の傾向であった。同濃度の窒素源を注入しても、シラカンバとヤマナラシとは窒素含有率はかなり異なっており (Table 1)、今後樹種間の比較を行う場合には注入した木材のC/N比も考慮する必要がある。

カワラタケによるリグニン分解選択指数はシラカンバ、ヤマナラシともアスパラギンを添加したもの

は、リン酸 2 アンモニウムに比べて高い。そして無添加に比較すると両者とも添加濃度が高くなるに従い選択指数は低下する傾向にある (Table 3)。本実験からは、無機態窒素はアミノ態窒素に比較して、リグニンの選択的分解には効果がないばかりか、阻害要因になっている。REID(1983)⁶⁾は¹⁴C リグニンを加えた

Table 3. シラカンバとヤマナラシにおいて窒素源添加がカワラタケによる腐朽重量減少率とリグニン分解選択指数に及ぼす影響
Effect of nitrogen supplements on weight loss and specificity of lignin degradation in *Betula platyphylla* and *Populus sieboldii* by *Coriolus versicolor* after decay for 8 weeks.

窒 素 源 Source of N	材 名 Wood species	窒素源水溶液濃度 (%) Concentration of N solution (%)			
		0	0.1	1.0	3.0
アスパラギン Asparagine	シラカンバ <i>B. platyphylla</i>	33.7 (1.20)	35.5 (1.29)	36.1 (1.29)	34.1 (1.29)
	ヤマナラシ <i>P. sieboldii</i>	36.4 (1.22)	45.3 (1.28)	48.7 (0.92)	9.6 (1.05)
リン酸 2 アンモニウム Ammonium phosphate, dibasic	シラカンバ <i>B. platyphylla</i>	33.7 (1.20)	30.5 (1.17)	20.0 (1.08)	20.8 (1.04)
	ヤマナラシ <i>P. sieboldii</i>	36.4 (1.22)	40.7 (1.12)	27.5 (0.98)	24.1 (1.02)

括弧の中の数字はリグニン分解選択指数を示す。The number in the parenthesis indicates the specificity of lignin degradation = (carbohydrate content in decay wood / lignin content in decay wood) ÷ (carbohydrate content in sound wood / lignin content in sound wood).

Table 4. アスパラギン添加が白色腐朽菌によるシラカンバ材の重量減少率に及ぼす影響

Effect of nitrogen supplements on weight loss in *Betula platyphylla* by white rot fungi after decay for 8 weeks.

菌 種 Fungus species	アスパラギン水溶液濃度 (%) Concentration of asparagine solution (%)				
	0	0.2	0.4	0.8	1.6
ヒラタケ <i>Pleurotus ostreatus</i>	2.2 (1.04)	5.0 (1.04)	9.8 (1.07)	12.7 (1.16)	18.8 (1.19)
タモギタケ <i>Pleurotus cornucopiae</i>	1.5 (1.00)	6.0 (1.01)	15.5 (1.03)	14.2 (1.06)	21.8 (1.17)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	13.1 (1.05)	18.2 (0.97)	25.3 (0.96)	31.0 (0.89)	29.8 (0.93)
<i>Sporotrichum pulverulentum</i>	8.5 (1.19)	10.2 (1.19)	12.3 (1.09)	17.3 (1.14)	23.3 (1.05)
マンネンタケ <i>Ganoderma lucidum</i>	4.7 (1.03)	23.1 (1.06)	25.9 (0.99)	29.5 (1.04)	13.6 (1.05)
シイタケ <i>Lentinus edodes</i>	12.3 (1.42)	14.4 (1.41)	14.1 (1.47)	3.9 (0.95)	4.0 (0.95)
ナメコ <i>Pholiota nameko</i>	7.2 (1.09)	8.7 (0.97)	10.7 (0.99)	14.7 (1.01)	4.7 (0.97)

脚注は Table 3 を参照。See footnote in Table 3.

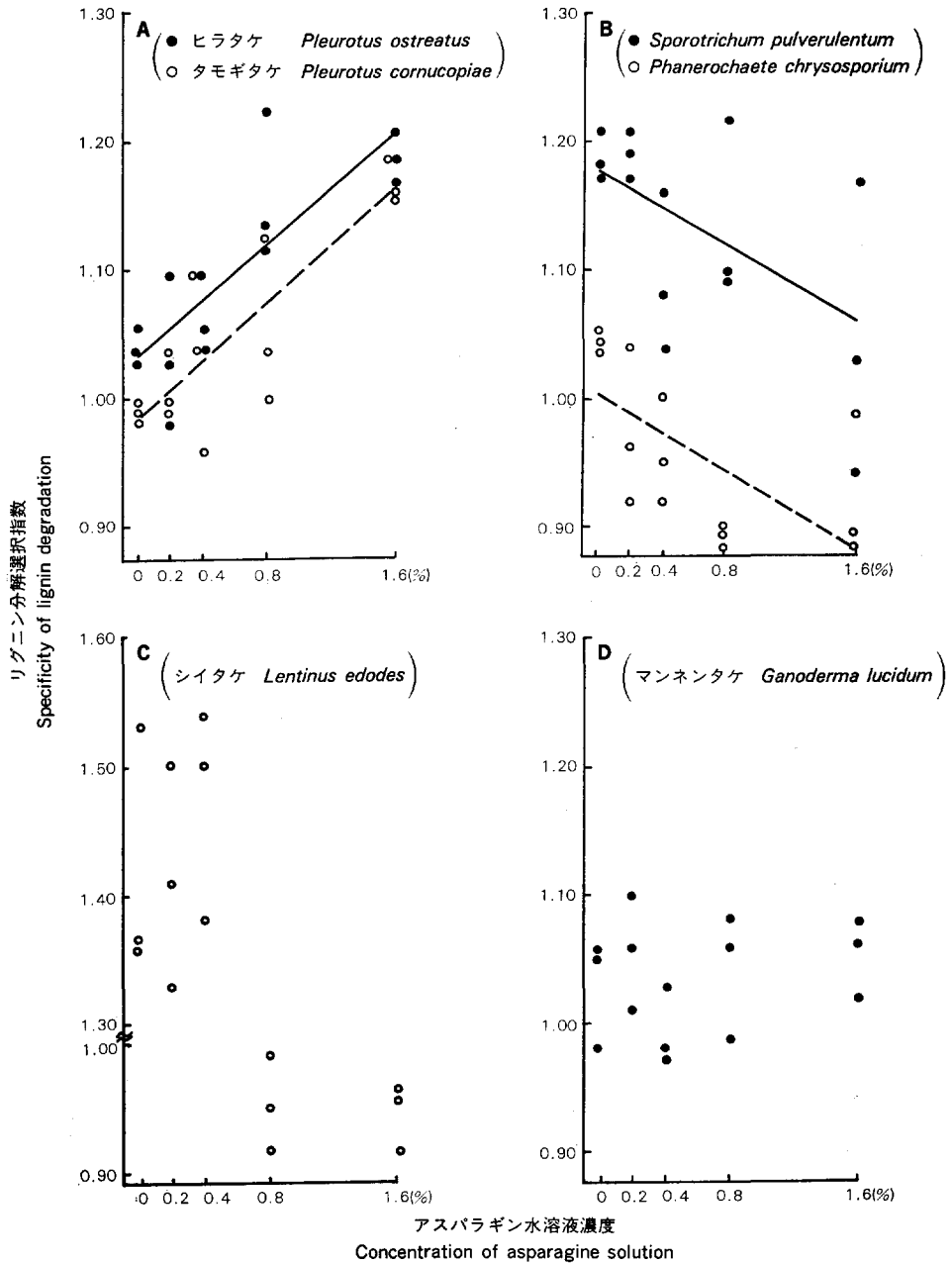


Fig. 1. 添加したアスパラギン水溶液濃度がリグニン分解選択指数に及ぼす影響
 Effect of asparagine supplement on the specificity of lignin degradation of *Betula platyphylla* wood by white-rot fungi.

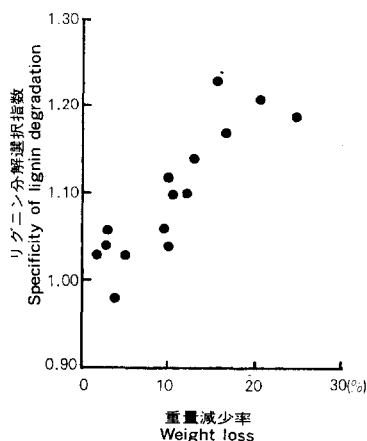


Fig. 2. ヒラタケによるシラカンバの重量減少率とリグニン分解選択指数の関係

Relation between specificity of lignin degradation and weight loss of *Betula platyphylla* wood caused by *Pleurotus ostreatus*.

シイタケ、ナメコは低濃度のアスパラギン水溶液の添加では促進されたものの、高濃度では阻害された。

リグニンの選択的分解は、アスパラギンの添加とともに向上するもの、低下するもの、あまり左右されないものの3つの型が見られた。第1の型にはヒラタケ、タモギタケがあり、1.6%アスパラギン水溶液を添加したものは無添加のものに比べリグニン分解選択指数はそれぞれ1.04から1.20へ、0.99から1.16へ向上した (Fig. 1 A)。第2の型には *Sporotrichum pulverulentum*, *Phanerochaete chrysosporium* があり、選択指数はそれぞれ1.18から1.06へ、1.00から0.88へと低下した (Fig. 1 B)。シイタケ、ナメコも低下する傾向にあった (Fig. 1 C)。第3の型にはマンネンタケがあった (Fig. 1 D)。

REID(1983)⁶⁾は、*Phanerochaete chrysosporium* によるアスペンの¹⁴Cリグニンの分解は、1%のアスパラギンや塩化アンモニウム添加により阻害されることを示した。ところが、LEATHAMら(1983)⁷⁾は、グルタミン酸を3段階に加えた培地中での¹⁴Cリグニンの分解は、*Phanerochaete chrysosporium* やカワラタケ等では阻害されるが、ヒラタケとシイタケでは促進されることを示した。そして、高い窒素濃度下でリグニン分解が阻害されるのは全ての菌種に共通する現象ではなく、シイタケ、ヒラタケではむしろ促進されることを強調している。木材そのものを用いた本実験においても、ヒラタケについてはLEATHAMら(1983)⁷⁾の報告とほぼ同様の傾向が認められるが、シイタケについては選択指数は高いものの促進されるとは言えない。この違いは、窒素源の添加を培地中にするか木材中にするかにより、添加した窒素源が前者ではほぼ均一に、後者では木材組織中に不均一に分布し¹⁴⁾、その影響が両者で異なることにも起因しよう。さらに、リグニンの選択的分解に与える影響がヒラタケ、タモギタケと *Phanerochaete chrysosporium*, *Sporotrichum pulverulentum* では相反するという結果は、ANDERら(1977)¹⁵⁾による両者のフェノールオキシダーゼ生成の様式の違いと一致する。

このように、リグニン分解選択指数は窒素源の添加により変化するが、菌種によっては重量減少の程度

アスペン木粉に種々の窒素源を添加し、*Phanerochaete chrysosporium* で分解させた結果、¹⁴Cリグニンの分解は無添加で最も高く、ペプトン、塩化アンモニウム、アスパラギンの順に低下することを示した。リグニン分解の選択性に対する、無機態窒素とアミノ態窒素の、あるいは無機態窒素間の効果の違い¹⁶⁾についてはさらに検討を必要とする。

3-2 菌種ごとの比較

アスパラギンの木材への添加によって、一定の添加濃度までは、用いた全ての菌種で程度の差はあるが、例外なく木材の分解は促進された (Table 4)。ヒラタケ、タモギタケ、*Sporotrichum pulverulentum* は1.6%濃度のアスパラギン水溶液の添加まで促進される傾向であった。とくに、ヒラタケは無添加に比べて約9倍の重量減少率となった。*Phanerochaete chrysosporium*, マンネンタケは0.8%濃度の添加まで促進される傾向を示した。

によっても変化した。この傾向はヒラタケで比較的是っきり見られ、20%程度の重量減少率で高い選択指数となった (Fig. 2)。木材の腐朽程度が進行すると腐朽後の木材成分の比も変動することが多くの木材腐朽菌について調べられている。HIGHLEY(1982)¹⁶⁾はスイートガムとホワイトオークをカワラタケで分解させた場合、20%前後の重量減少率でリグニンの分解率が最大になることを示した。今後は、リグニン分解の選択性に影響を与える要因として窒素源添加量に加え、C/N比や重量減少率も含めて検討する必要がある。

4. ま と め

木材に添加した窒素源が白色腐朽菌による木材の分解およびリグニンの選択的分解に与える影響を調べた。その結果

- (1) アミノ態窒素であるアスパラギンの添加は、白色腐朽菌による木材の分解を促進し、かつ菌種によってはリグニンの選択的分解も向上させる。しかし、無機態窒素であるリン酸2アンモニウムの添加はこれらを阻害する傾向にある。
- (2) リグニンの選択的分解は菌種により、アスパラギンの添加とともに向上するもの、低下するもの、あまり左右されないものの3つの型に分けられる。
- (3) 今後はさらに多くの菌種および樹種について、添加窒素源の濃度および種類を変えて、C/N比や重量減少率も要因に含めて検討する必要がある。

文 献

- 1) KIRK, T. K. : Recent advances in lignin biodegradation, Proceedings of an international seminar, organized under the auspices of the U. S.-Japan cooperative science program, Kyoto, Japan, 1-11 (1983)
- 2) 石原達夫 : 紙パルプ技術タイムズ, 25(5), 12-19 (1982)
- 3) Abstracts lignin biodegradation a BIOFOR workshop, Univ. of British Columbia. (1985)
- 4) MERRILL, W. and E. B. COWLING : Can. J. Bot., 44, 1555-1580 (1966)
- 5) 松岡昭四郎 : 林試研報, 294, 183-194 (1977)
- 6) REID, I. D. : Appl. Environ. Microbiol., 45, 830-837 (1983)
- 7) LEATHAM, G. F. and T. K. KIRK : FEMS Microbiol. Letters, 16, 65-67 (1983)
- 8) HIROI, T. and K.-E. ERIKSSON : Svensk Papperstidn., 79, 157-161 (1976)
- 9) KAWASE, K. : J. Facul. Agr., Hokkaido Univ., 52(2), 186-245 (1962)
- 10) 原口隆英, 山口 鴻 : 日林誌, 40, 512-514 (1958)
- 11) FINDLAY, W. P. K. : Ann. Bot., 48, 109-117 (1934)
- 12) SCHMITZ, H. and F. KAUFERT : Am. J. Bot., 23, 635-638 (1936)
- 13) 水本 晋 : 静岡県林業試験場特別報告, (1963)
- 14) 矢田茂樹ほか : 京都府大学術報告 (農学), 33, 73-85 (1981)
- 15) ANDER, P. and K.-E. ERIKSSON : Physiol. Plant., 41, 239-248 (1977)
- 16) HIGHLEY, T. L. : Can. J. For. Res., 12, 435-438 (1982)

**Effects of Nutrient Nitrogen Impregnated in Wood on Lignin
Degradation by White-rot Fungi I.
Comparison among fungus species.**

Koichi YAMAMOTO⁽¹⁾, Shoshiro MATSUOKA⁽²⁾ and Tadakazu HIROI⁽³⁾

Summary

The effects of supplement nutrient nitrogen into the wood itself on the lignin degradation of wood by the white-rot fungi were examined,

Wood blocks (2×2×1 cm) of *Betula platyphylla* were impregnated with asparagine solution (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6%) by vacuum method. The blocks were placed on a quartz sand medium containing 0.2% glucose solution, covered with a thin beech sawdust layer and then exposed to the following fungi: *Pleurotus ostreatus*, *P. cornucopiae*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Pholiota nameko* for 8 weeks.

The degradation of wood was accelerated by the additional asparagin inside certain concentrations in all the fungi examined. The weight loss increased up to 1.6% asparagine concentration in *Pleurotus ostreatus*, *P. cornucopiae*, *Sporotrichum pulverulentum*, up to 0.8% in *Phanerochaete chrysosporium*, *Ganoderma lucidum*, *Pholiota nameko*, up to 0.4% in *Lentinus edodes*.

The ligninolytic activity as more nitrogen was added could be divided into three types. In type I fungi, *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopiae*, 1.6% asparagine supplement indicated an increased specificity of lignin degradation, from 1.04 to 1.20, from 0.99 to 1.16 compared with the control respectively.

On the contrary, in type II fungi, *Sporotrichum pulverulentum* and *Phanerochaete chrysosporium*, the specificity decreased from 1.18 to 1.06, from 1.00 to 0.88. In type III fungus, *Ganoderma lucidum*, there were no effects due to the increase of nitrogen concentrations.

Received July 2, 1986

(1) (2) Wood Utilization Division

(3) Forest Products Chemistry Division