

セルラーゼ生産菌の培養における木酢液の効果

誌名	静岡大学農学部演習林報告 = Bulletin of the Shizuoka University Forests
ISSN	03899489
著者	寺谷, 文之 山下, 武司 久保山, 晶子
巻/号	13号
掲載ページ	p. 27-32
発行年月	1989年3月

セルラーゼ生産菌の培養における木酢液の効果

寺谷文之*・山下武司*・久保山晶子*・大野浩司*

Effect of Wood Vinegar on Incubation of the Cellulase-Producing Fungi

Fumiyuki TERATANI,* Takeji YAMASHITA,* Akiko KUBOYAMA,* Koji OHNO*

SUMMARY

Two wood-rotting fungi isolated from the decayed woods in a forest of Sudajii (*Castanopsis cuspidata* var. *Sieboldii* Nakai) around the campus of Shizuoka University were used for the investigation of the effect of wood vinegars on the activities of cellulose-degrading enzymes. The enzyme activity of the strain 822 C was studied in detail because it was higher than that of the strain 80 C at low concentration of the wood vinegar.

The cell-free crude enzyme solution obtained from the incubation of 822 C with the wood vinegar showed that the power of degrading filter paper was similar to that of commercial cellulase Onozuka R-10. Since Avicelase and CMCase activities were varied in the range of 12.8~7.0 and 5.3~3.5 units respectively owing to the physiological variation of the cultured microorganisms in success, the effect of addition of the wood vinegar was evaluated by the relative activity to the value obtained without the wood vinegar.

The wood vinegar distilled under 300°C from Buna (*Fagus crenata* Blume) destroyed completely the enzyme activities at 0.2% concentration, but that from Urajiromomi (*Abies homlepis* Sieb. et Zucc.) inhibited only 30% of the activities. The Urajiromomi wood vinegar caused the increase of about 40% in both Avicelase and CMCase activities although the Buna wood vinegar was effective at the same degree only in CMCase activity. The wood vinegar produced at a charcoal kiln was settled for about one month and the separated low layer exhibited the increases in Avicelase and CMCase activities of 40% and 67% respectively.

The most effective carbonyl component among 5 fractions isolated by the fractionation of the wood vinegar brought about the increase in CMCase activity of 76% but did not improve Avicelase activity over 30%. The fast moving compound A on TLC of the carbonyl component demonstrated the greatest elevation of both enzyme activities, 60% in Avicelase and 105% in CMCase.

It became obvious from these results that the addition of the wood vinegar to culture medium was quite effective on production of the extracellular cellulase during culture of the isolated fungi and the material contributed to this effect was the compound A involved in the carbonyl component of the wood vinegar.

1 緒 言

近年、木炭のもつ諸性質が再認識され、水質浄化及び土壌改良にかなり利用されるようになった。これに伴って、炭窯による製炭法が日本古来の伝統的技術の一つとして見直され、各地で復活保存の機運が高まっている。また、木材炭化により副生する木酢液の利用についても、製炭コストの低減及び資源

の有効利用の観点から研究が進められている。

従来から木酢液は微生物や植物に対し生物活性を有すると言われてきたが^{1,2)}木酢液の性質及び成分に関する最近の研究³⁻⁷⁾のうち、谷田貝ら⁶⁾の植物種子に対する発芽・生長促進作用、及び著者ら⁸⁾の木材腐朽菌に対するセルロース分解酵素の生産能力の向上などの報告は、木酢液を生物活性の面から検討したものである。特に、セルラーゼはバイオマスの燃

* 静岡大学農学部木材化学研究室 Laboratory of Wood Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University.

料及び飼料への変換技術において木材糖化に不可欠な酵素であり、各方面で実用化に向けて盛んに研究されつつある。

乾留法によって工場生産される木酢液を除いて、炭窯で生産される木酢液の利用上の最大の欠点は、集荷ルートが確立されていないために貯蔵中に著しい化学変化を生じ、品質が全く一定しないことである。したがって、木酢液中の有効な化学物質を特定することなしに生物活性のような高度利用をはかることは不可能に近い。

本研究は木酢液のセルラーゼ生産菌に対する効果を明らかにし、さらにそのような生物活性を示す物質を探索するために実施された。有効物質を特定するまでには至らなかったが、かなりそれに近づくことができたので報告する。

2 実 験

2.1 供試菌の単離

静岡市大谷に存在するスダジイ極相林中の表層土壌、同林中の腐朽木片及びパーク堆肥製造工場の堆肥を試料として、セルラーゼ生産菌の単離を行った。炭素源として1%アビセルまたはモルトエキスを含む寒天平板培養(Reese-Mandels無機培養基, 0.1%ペプトン, 2%寒天を使用)によって16種の菌株を分離した後、振とう培養したろ液についてアビセル活性及びCMCアーゼ活性を測定した。その結果、腐朽木片から分離した2種の菌株(80C及822C)が比較的高い活性を示したので、これらを供試菌として選んだ。これらの菌の同定は行っていないが、菌糸の観察により糸状菌に属し、隔壁を有することを認めた。

2.2 菌の継代培養

2か月ごとに単離した菌の植え替えを行った。菌を採集した同じ場所(スダジイ極相林)の腐朽材片を含む表層土壌を試験管に約3cmの高さに詰め、1時間滅菌した。無菌箱内で種菌に滅菌水約3mlを加えてかくはんした後、その上澄み液約1mlを試験管内の土壌に加えた。25°Cで4日間静置培養した後、冷蔵した。

2.3 菌液の調製

Mandels無機塩溶液にペプトン0.1%及びグルコース1%を加え、試験管に同液5mlを入れ、20分間滅菌した。無菌箱内で継代培養した種菌を接種し、25°Cで4日間静置培養した。

2.4 菌の培養

単離した菌の最適培養条件を見出すために、各種の窒素源、炭素源、培養温度、pH、培養期間について検討した。生成酵素量をLowry-Folin法⁹⁾により

定量し、またろ液の酵素活性を測定した。その結果、標準的な培養法として、次のような条件を用いることとした。

セルロース粉末(東洋科学, 100~200メッシュ)300mgに0.1%ペプトンを含む無機塩溶液30mlを加え、pH5に調節し、蒸気滅菌した後、調製した菌液0.1mlを添加し、所定の木酢液を添加または添加しないで25°Cで6日間振とう培養した。

(a) アビセラゼ活性

アビセル(微結晶セルロース市販品)100mgに酢酸一酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.4)9ml及び菌培養ろ液1mlを加え、40°Cで24時間振とうした。固形物をろ別し、ろ液0.1ml中の糖量をフェノール・硫酸法¹⁰⁾により測定した。ブランク試験との差を求め、予め作成したグルコースの検量線を用いて定量した。酵素活性は培養ろ液1mlにより24時間に生成するグルコースのmg数として表わした。

(b) CMCアーゼ活性

1%カーボキシメチルセルロース(CMC)溶液0.5mlに酢酸塩緩衝液0.5ml及び菌培養ろ液0.1mlを加え、40°Cで0.5時間振とうした。反応終了後、直ちに0.25N NaOH 0.9mlを加えて酵素を失活させた。この溶液中の還元糖量をNelson-Somogyi法¹¹⁾により測定した。ブランク試験との差を求め、予め作成したグルコースの検量線を用いて定量した。酵素活性は培養ろ液1mlにより0.5時間に生成するグルコースのmgとして表わした。

2.5 木酢液の調製

本研究に使用した木酢液は次の3種である。

- A. プナ材及びウラジロモミ材の乾留により実験室で調製した木酢液
 - B. 農林水産省林業試験場から提供された木酢液
 - C. 伊豆松崎町の炭窯でシイ材から製造した木酢液
- Aの調製

100ml枝つきフラスコに木材チップ20gを入れて加熱し、留出物を氷冷した受器に捕集した。まず20分間で180°Cに上昇させ、その後は1.5°C/分の速度で昇温し、最高温度440°Cで20分間保持した。留出物を3つの温度範囲(~240, ~300, ~440°C)に区切って分取した。

2.6 木酢液の分別

Fig. 1に示す方法¹²⁾に従って5成分に分別した。また、分取したカルボニル成分を薄層クロマトグラフィにより展開し、さらに3画分に分離した。試料をスポットしたシリカゲルプレートクロロホルム：ベンゼン：アセトン(5：5：1)混液で展開し、プナ及びウラジロモミのそれぞれについて分離した3画分(Rf 0.48, 0.68, 0.80及び0.57, 0.67,

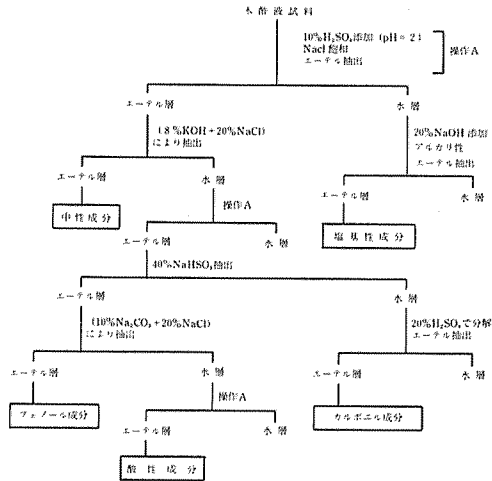


Fig. 1. Fractionation scheme of wood vinegar.¹²⁾

0.9%) をアセトンで溶出し、濃縮した。

3 結果と考察

3.1 菌株による木酢液の効果の違い

供試した2菌株の培地に対する木酢液Bの添加の影響を Fig. 2 に示す。少量の木酢液の添加により80 C 菌アビセラゼ及び CMC アーゼの両活性が無添加の場合に比較して著しく低下したが、822 C 菌では逆に約25%上昇した。また、80 C 菌は添加濃度0.8%において両活性とも最大値に達し、それ以上の添加量では活性が減少した。これらの結果から、少量の木酢液添加により大きい効果が得られる822 C 菌を以後の実験に用いることとした。

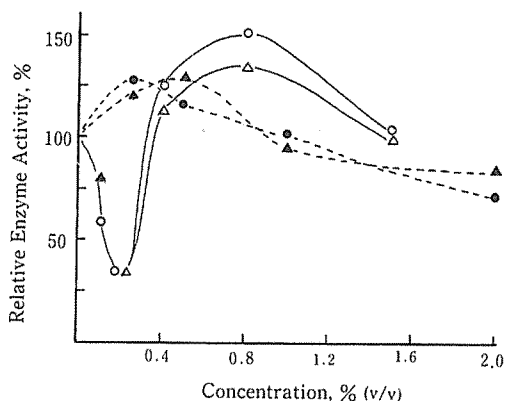


Fig. 2. Effect of concentration of the wood vinegar added to culture medium on the enzyme activities of the strain 80 C and 822 C.

Note: Avicelase activity (—○—, ---●---) and CMCCase activity (—△—, ---▲---) of 80 C and 822 C respectively.

822 C 菌のセルロース分解力を市販の酵素と比較した結果を Table 1 に示す。分解率は、ワットマンろ紙 100 mg を加えて 40°C で 24 時間振とうした後のろ別残さの重量から求めた。木酢液 0.25% 濃度で培養した 822 C 菌の生産する酵素は、セルラーゼオノヅカ R-10 の最高分解率に近い値を示し、実用的には十分な分解力をもっていると判断される。

Table 1. Filter paper-degrading activity of the cell-free crude enzyme solution from the strain 822C and of commercial cellulase.

Enzyme source	Concentration of enzyme (%)	Volume added (ml)	Degradation ratio (%)
Strain 822C	Crude enzyme solution	10	21.3
		5 *	57.4
Cellulase Onozuka R-10	0.1	10	36.1
	0.25	//	58.3
	0.5	//	64.8
	1.0	//	66.6

* Another 5ml of acetate buffer solution was added.

3.2 各種の木酢液の比較

ブナ木酢液を添加した場合の結果を Fig. 3 に示す。

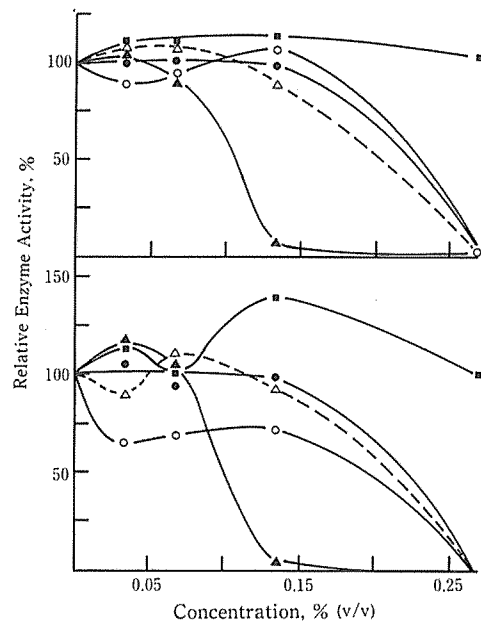


Fig. 3. Comparison of the effect of Buna wood vinegars distilled under different conditions.

Note: —○—~400°C in air, ---△---~400°C in N₂, —●—~240°C in air, —▲— 240°C in N₂, —■— 300~440°C in air; Avicelase (upper) and CMCCase (lower).

アビセラゼ活性に対する効果は小さく、添加濃度 0.27% で完全に活性が阻害された。しかし、木酢液の留出温度の異なる画分による例外も認められ、高温留出画分は実験濃度内では活性の阻害作用を示さなかった。CMCアーゼ活性についてもアビセラゼ活性とほぼ同様な傾向を示したが、高温留出画分

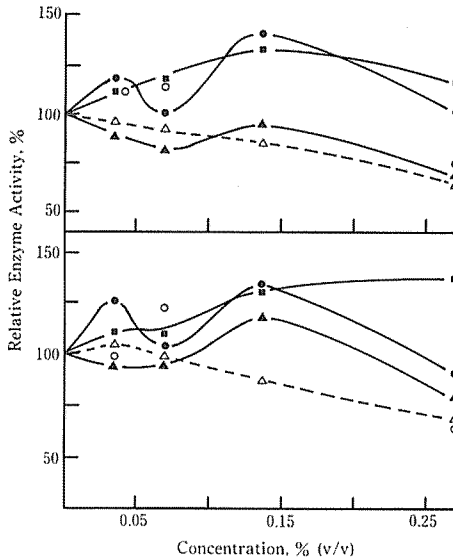


Fig. 4. Comparison of the effect of Urajiromomi wood vinegars distilled under different conditions.

Note: the same as Fig. 3.

については濃度 0.13% で著しい活性向上の効果が認められた。

ウラジロモミ木酢液を添加した場合、Fig. 4 に示すようにアビセラゼ及び CMCアーゼの両活性に対し良好な結果が得られた。低温及び高温留出画分の濃度 0.13% において約 35~40% の活性上昇が認められたが、中間温度留出画分の添加は有効でなかった。また、ブナ木酢液と異なり、高濃度でも活性を完全に阻害することはなかった。

伊豆松崎町の大型炭窯でシイ材の製炭を行った際に採取された木酢液⁹⁾を約 1 か月間静置し、透明な上層部とタールを含む下層部とに分離した。この両者について酵素活性誘導試験を行った。Fig. 5 に示すように、上層部を添加した場合の効果はほとんど認められないが、下層部を添加すると、濃度 0.07%

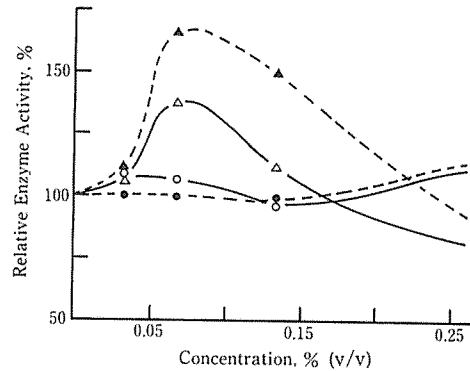


Fig. 5. Effect of the wood vinegar produced at a charcoal kiln and settled for one month.

Note: Avicelase activity (—○—, —△—) and CMCase activity (---○---, ---△---) of upper and lower layer respectively.

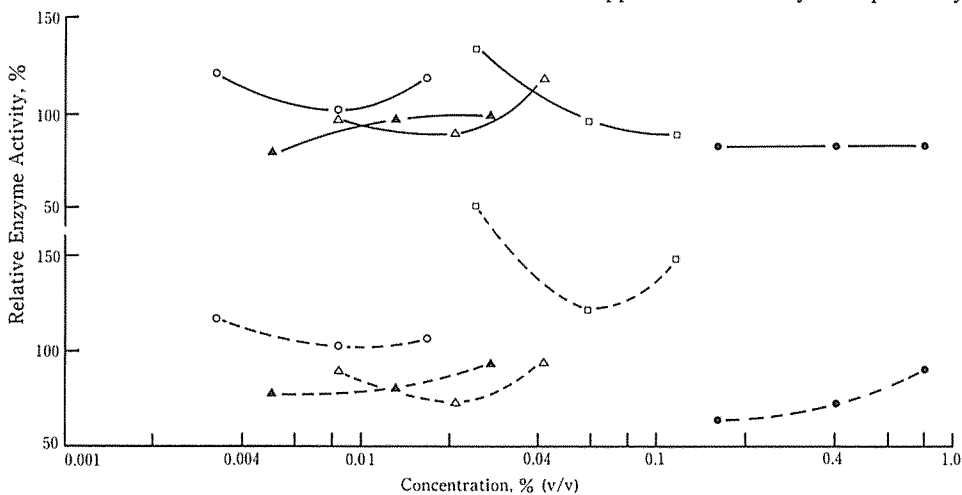


Fig. 6. Comparison of the effects of the five fractions of the wood vinegar.

Note: acidic ○, phenolic △, carbonyl □, neutral ● and basic ▲ fractions; Avicelase — and CMCase ---.

においてアビセラゼ活性が67%、CMCアーゼ活性が40%上昇する好結果が得られた。

3.3 木酢液の成分の比較

林業試験場から提供された木酢液を Fig. 1 に示す方法によって5成分に分離し、それぞれの添加効果を調べた。Fig. 6 に示す結果から、アビセラゼ活性に対して有効な成分は、酸性、フェノール及びカルボニルの3成分であると判定される。特に低い添加濃度におけるカルボニル成分の効果が大きかった。CMCアーゼ活性に対する影響をみると、やはりカルボニル成分の効果が低濃度において顕著であり、76%の最高上昇率が得られた。

伊豆松崎町の炭窯で生産された木酢液の下層部から分離したカルボニル成分についても同様な実験を行い、0.03%濃度において両方の酵素活性が約30%上昇することを確認した。以上の結果は、木酢液中のカルボニル成分が菌のセルロース分解性酵素の生産力または酵素活性を高める作用を有することを明瞭に示している。

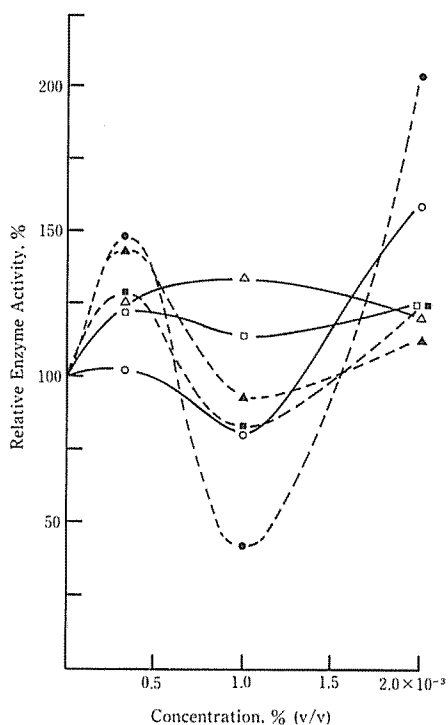


Fig. 7. Effect of the isolated compounds by TLC of the carbonyl component in the wood vinegar.

Note: Avicelase and CMCase activities of the compound A (—○—, ---●---), B (—△—, ---▲---) and C (—□—, ---■---).

3.4 カルボニル成分中の単離物質の比較

カルボニル成分の収量は、乾留に用いたモミ材に対し0.03%、ブナ材に対し3%であったが、このモミ木酢液のカルボニル成分から薄層クロマトグラフィーにより単離した3物質について添加効果を調べた。Fig. 7 に示すように、添加濃度によりかなりの変動を生じたが、0.0003%の低濃度でも有効性が認められ、A及びB物質のCMCアーゼ活性が45%上昇した。これより高濃度の0.002%の添加においては、物質Aのアビセラゼ活性が60%、CMCアーゼ活性は100%を超える驚異的な上昇率を示した。したがって、このRf値の高い物質Aについては、さらに詳細な検討を続けることが必要と考えられる。

3 総括

静岡大学近辺のスダジイ極相林中の腐朽木材から単離した2種の菌株(80C及び822C)について、セルロース分解に関係する2種の酵素活性に対する各種の木酢液及びその成分の影響を検討した。80C菌の場合よりも低濃度において木酢液添加の効果が現れた822C菌を用いて、詳細な実験を行った。同菌の培養粗酵素液は、市販酵素セルラーゼオノゾカR-10に近い紙分解力を示した。また、継代培養中の同菌の供試時期の差異によってアビセラゼ活性は 12.8 ± 7.0 ユニット、CMCアーゼは 5.3 ± 3.5 の範囲内で変動したが、木酢液無添加の場合の酵素活性との比によって効果を判定した。

ブナ木酢液は、高温留出部を除いて、濃度0.25%において酵素活性を全く消失させたが、モミの木酢液は約30%の活性低下を引き起こしたに過ぎない。モミ木酢液は最適濃度においてアビセラゼ及びCMCアーゼの両活性を約40%上昇させたのに対し、ブナ木酢液は後者の活性についてのみ、同等の効果を示した。炭窯で生産したシイ木酢液の静置後の下層部は、アビセラゼ活性を40%、CMCアーゼを67%増大させた。

分別木酢液の5成分のうち最も効果的なカルボニル成分は、最高76%のCMCアーゼ活性の上昇率を示したが、アビセラゼ活性の増加は30%に止まった。カルボニル成分からTLCによって単離した3物質のうち最も高いRf値を示す物質は、本研究において最大の酵素活性上昇率(アビセラゼ60%、CMCアーゼ105%)を与えた。

以上の結果から、木酢液の培養基質に対する添加は、単離菌822Cの菌体外酵素の生産性向上に効果的であり、その有効物質はカルボニル成分に含まれる物質Aであることが明らかとなった。

謝 辞

本研究にあたり、木酢液をご提供下さった農林水産省林業試験場林産化学部木材炭化研究室及び松崎町森林組合に対し謝意を表します。

文 献

- 1) 栗山 旭：林業技術史 5, 281—288, 日本林業協会 (1975)
- 2) 林業試験場：木材工業ハンドブック 904—908, 丸善 (1982)
- 3) 野沢彰夫, 里中聖一：北大演林報 39, 163—189 (1982)
- 4) 谷田貝光克, 雲林院源治, 杉浦銀治：木材誌, 32, 467—471 (1986)
- 5) 谷田貝光克, 高橋利夫, マサコ N.サキタ：木材誌, 32, 626—631 (1986)
- 6) 谷田貝光克, 雲林院源治：木材誌, 33, 521—529 (1987)
- 7) 谷田貝光克, 雲林院源治, 大平辰朗：木材誌, 34, 184—188 (1988)
- 8) 寺谷文之：新製炭技術確立事業調査報告書 I, 19—27, 静岡県林業会議所 (1983)
- 9) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: J. Biol. Chem., 193, 265—269 (1951)
- 10) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: Anal. Chem., 28, 350-353 (1956)
- 11) Somogyi, M.: J. Biol. Chem., 195, 19-22 (1952)
- 12) 栗山 旭：第16回日本木材学会大会研究発表要旨集 190 (1966)