

【 論 文 】

硫酸塩還元条件におけるセルロースを共存基質とした 高分子リグニンの分解特性

高 在 中*・清水 芳 久**・池 田 和 弘**
金 錫 九*・松 井 三 郎***

【要 旨】 本研究は嫌気性硫酸塩還元条件における高分子リグニンの分解について調べたものである。硫酸塩還元条件で、セルロースを共存基質として与え連続運転を行い、高分子リグニンの変化を定性的、定量的に追跡した。特に、高分子リグニンの分解に伴う分解産物として水溶性低分子リグニンである APPL (Acid Precipitable Polymeric Lignin) や芳香族化合物に着目した。

その結果、高分子リグニンは硫酸塩還元条件下で最大 12% の減少 (分解速度としては 3.49 mg/L/day) がみられ、低分子リグニンの構造を持つ APPL は増加する傾向を示した。この時 hydrocinnamic acid などの芳香族リグニンモノマーも同時に検出された。本研究の結果から高分子リグニンは硫酸塩還元条件下で、共存基質としてセルロースを利用して分解が促進されること、また、その分解が低分子化によって起こることが明らかになった。

キーワード：硫酸塩還元条件, 高分子リグニン分解, 分解産物, APPL (Acid Precipitable Polymeric Lignin)

1. はじめに

リグニンは地球上に存在する炭素源として、セルロースに次いで多い天然高分子である。またこのリグニンは芳香族有機化合物を多く含み、分解性が極めて低い物質として知られている。構造的には3つのモノリグノール (*p*-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol, sinapyl alcohol) の重合体からなる不規則な3次元網目状構造を持ち、微生物分解を受けにくく、木材に耐腐朽性を与えている。リグニンの生物分解に関する研究は植物など自然界における物質循環の解明、パルプ製造における選択的リグニン分離の立場から重要な研究課題となっている。環境の分野

では、リグニンを生物分解する際に生成されるリグニン分解酵素が dioxin 類など有害難分解物質を分解できることで注目されている¹⁾。これまでリグニンを分解する微生物としては好気性白色腐朽菌が知られており、嫌気性条件におけるリグニン分解に関する研究はほとんど行われてない。

嫌気性条件におけるリグニン分解は、木質材料由来のごみが多い家庭ごみ埋立地の安定化や、パルプ廃水の嫌気性処理等に重要である。木材成分の嫌気性分解に関する研究では、セルロース、ヘミセルロースは分解されるものの、高分子リグニンの分解は否定されてきた。なお、リグニン含量が多いほどセルロースの分解率は低くなることも知られている²⁾。それはリグニンの生物分解において、リグニンの低分子化に深く関与する extracellular 酵素が酸素を必要とするので、嫌気性でのリグニン生物分解は起こらないからであると報告されている³⁾。しかしながら、Pareek ら⁴⁾は硫酸塩還元条件で β -O-4 結合リグニンモデル化合物が分解されることを定量的、定性的変化で示した。さらに同じ硫酸塩還元条件で、リグニンを 24% 含有する新聞紙を唯一の炭素源とした分解実験

原稿受付 2007. 7. 17 原稿受理 2008. 11. 28

* 韓国建設技術研究院 国土環境研究部

** 京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター

*** 京都大学

連絡先：〒 520-0811 滋賀県大津市由美浜 1-2

京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター

清水 芳久

を行い、リグニンの分解産物である vanillic acid など低分子芳香族を検出した。これは、材成分が主に入っている埋立地の安定化の指標として低分子芳香族の測定が有効であることを示した結果でもある。しかし、この研究では芳香族濃度の経時変化に一定の傾向は見られず、また極めて微量で検出されたため、高分子リグニンの分解を定量的に表すことはできなかった。

埋立地のような嫌気性条件で、硫酸塩還元菌はメタン生成菌より強い電子親和力を持つため、難分解物質の分解において注目されている。本研究の目的は嫌気性、特に硫酸塩還元条件で不溶性高分子リグニンの分解を定量的、定性的に調べることである。特に分解において律速段階と考えられる反応を考慮し、低分子化され可溶化したリグニンを最初の分解産物として同定し、定性的、定量的分析を行った。人為的に酸処理した試料を可溶化した分解産物として採取し、構造分析の結果からリグニンの構造を持ちながら低分子化したことに着目し、高分子リグニンの低分子化に関する議論を行った。なお、最後にリグニン分解産物として芳香族濃度の経時変化を求めた。微生物によるリグニンの分解は、リグニンの構造的な特性から直接炭素源にはならないため、糖類などの別の基質を必要とする⁵⁾。さらにリグニン分解は加水分解反応ではなくラジカル反応によるもので、そのラジカルの生成に必要な過酸化水素は糖類の代謝を通じて生成される場合がある⁶⁾。そのため、本研究ではセルロースを共存基質として与えることによって、微生物の活性度を高めながらリグニンの分解を調査した。なお、研究に用いた微生物は模擬埋立地浸出水を起源としたセルロース・リグニン分解集積培養系から得た。

2. 実験方法

2.1 実験装置および実験条件

本研究には図1に示したような有効容積 10 L の嫌気性消化実験装置を用いた。これを $37 \pm 1^\circ\text{C}$ に保ちながら攪拌を行った。種菌には 10 年前から硫酸塩還元条件で稼働している、木材成分が主に入っている模擬埋立地の浸出水⁷⁾を、さらにセルロースとリグニンを基質にして 1 年以上馴養したものを利用した。与えた栄養塩は表1に示した。実験に使用した試薬は、organosolv リグニンと、avicell セルロースは Aldrich-Sigma から、他は Wako の特級を購入した。嫌気性条件であるため、セルロースが分解するに従って電子受容体としての硫酸塩の濃度が低くなるとメタン菌の活性度が高くなり、硫酸塩還元菌の活性度が低くなる。そのため、運転期間中 20 日目、40 日目、97 日目と 181 日目に硫酸塩として

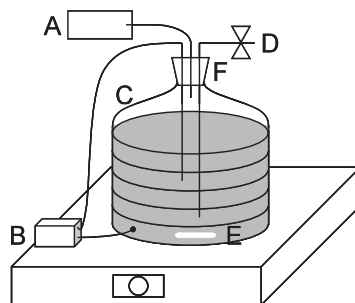


図1 実験装置 (A: ガスバッグ, B: 温度コントローラー, C: 10 L 反応器, D: 採取口, E: 攪拌子, F: ゴム栓)

表1 栄養塩成分 (1L 中)

成 分		微量成分 (g/L)	
KH ₂ PO ₄	0.4 g	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.6
K ₂ HPO ₄	0.4 g	CuCl ₂	0.03
NaCl	0.5 g	FeCl ₂ · 4H ₂ O	1
NH ₄ Cl	0.5 g	H ₃ BO ₃	1.14
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1 g	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.4
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.1 g	NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.3
酵母エキス	2.0 g	ZnCl ₂	0.42
微量成分	1.5 mL		

Na₂SO₄、基質として avicell セルロースとリグニンを計 4 回添加し、連続運転を行った。それぞれ電子受容体と供与体を与えた後の分解実験初期条件を表2に示した。なお、以下の議論では *n* 回目の添加から次の添加までの期間を第 *n* 期と呼ぶ。また、分解が微生物学的反応によるものであることを確認するため、blank として硫酸塩還元菌の活性を抑制することが知られている molybdate 20 mM を添加したリアクターを同じ条件で運転し比較を行った。

2.2 分析項目および方法

本研究では硫酸塩還元条件での生物の活性度を確認するため、セルロース濃度、溶存有機物濃度 (DOC)、硫酸塩濃度および固形有機物濃度の分析を行った。セルロース濃度は、試料をホモジナイズした後、フェノール-硫酸法を利用し、吸光波長 490 nm で総炭水化物として定量した⁸⁾。溶存有機炭素は、孔径 0.45 μm のろ紙によるろ液を TOC-5000A (Shimadzu) で分析した。また、同じろ液で、イオンクロマトグラフを利用して硫酸塩濃度を測定した。固形有機物の濃度は凍結乾燥した試料から灰分を引いた総重量で求めた。

2.2.1 高分子リグニンの定量的減少と分解産物の生成

高分子リグニンの定量的変化に関しては、不溶性高分子

表2 硫酸塩還元条件における高分子リグニン分解実験初期条件

	運転期間 (日数)	pH	硫酸塩 (mM)	基質	セルロース (g/L) クラースンリグニン (g/L)	TS* (g/L)	VS** (g/L)
第1期	0-19 (19)	6.8	22.1	セルロース リグニン	6.64 1.59	10.3	2.07
第2期	20-39 (20)	6.6	32.9	セルロース リグニン	6.27 1.32	9.4	1.81
第3期	40-96 (56)	6.5	21.7	セルロース リグニン	10.60 1.69	12.7	0.41
第4期	97-156 (59)	6.7	21.2	セルロース リグニン	9.80 1.77	12.5	0.93
第5期	181-280 (99)	7.4	22.4	セルロース リグニン	9.50 2.49	16.6	4.61

*TS: 凍結乾燥した試料の質量から灰分の質量を引いた値 (試料 1L 中)

**VS: TS からセルロースとクラースンリグニンの質量を引いた値 (試料 1L 中)

子リグニンとしてクラースンリグニンを、水溶性低分子リグニンとして APPL (Acid Precipitable Polymeric Lignin) を、リグニンモノマーとして芳香族成分の分析を行った。

(1) クラースンリグニン

サンプリングし、凍結乾燥した固体試料 100 mg に 72% 硫酸 (比重 1.634) 2 mL を加え、10 分間超音波処理した後、しばしば攪拌しながら 1 時間放置した。その後、水を 56 mL 加え、120℃ で 1 時間オートクレーブした。重さを量ったワットマン No. 1 ろ紙でろ過し、ろ紙の酸性がなくなるまで熱水で十分に洗浄した。ろ紙を 100℃ で 1 時間乾燥し、クラースンリグニンをろ過前後のろ紙の重さの差で定量した。各サンプリングでは複数の試料を採取し平均値を求めた。なお、セルロースのみの試料に同様の操作を行い、強酸によりセルロースは完全溶解することを確認した。また、ろ液の吸光分析により、酸水溶性リグニンの構造の変化をみた^{9,10)}。

(2) APPL (Acid Precipitable Polymeric Lignin)

リグニン分解に関する研究において、リグニンの構造を持つ分解産物として APPL (Acid Precipitable Polymeric Lignin) が提案されている⁹⁾。その採集方法はまず、50 mL 試料を超純水で 100 mL に合わせて 120℃ で 1 時間オートクレーブし、ワットマン No. 54 によるろ液に 3 mL の 30% 塩酸を注ぎ込んだ。一晩静置しておいた後、遠心分離し沈殿物を採取し、凍結乾燥した乾燥残量を APPL として定量した。APPL の定量においても試料を複数とした。

(3) 低分子芳香族化合物

リグニンが化学的、生物学的に分解する際、分解生成物としてフェノール性化合物が生成される。したがって、低分子芳香族化合物を分離、同定するのはリグニンの変化を調べる最も有効な方法の一つである。0.22 μm ろ紙

でろ過した試料 5 mL を pH1~2 とし、20 mL のジエチルエーテルを加えて 2 時間攪拌する抽出を 2 回繰り返して、ジエチルエーテル溶液層を回収した。50℃ で溶媒を揮発させた後、内標として veratraldehyde 5 mg/L が入っている 1 mL のジエチルエーテルを入れ溶解させた。その後 50 μL の *O*-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) を加え、70℃ で 20 分間誘導体化処理した。この試料 1 μL を GC-MS (Shimadzu QP5000) 分析に利用した。SCAN mode で検出された物質の中で、標準物質と保持時間とスペクトルが一致するものを同定して、SIM mode で定量した。

2.2.2 分解に伴うリグニンの構造の変化

リグニンの構造変化は上記(1)と(2)のリグニンに対して、時間の経過に伴う変化をみると同時に、同じ経過時間におけるクラースンリグニンとして定量される高分子リグニンの画分と、APPL として定量される低分子リグニンの画分の構造の違いに注目した。リグニンの構造の変化を求めると行う分析項目は色々紹介されているが、本研究ではフーリエ変換赤外スペクトル、サイズ排除クロマトグラフィーによる分子量分布の測定を行った。

(1) フーリエ変換赤外吸収スペクトル

クラースンリグニンと APPL を KBr に混ぜたペレットを FTIR-8400S (Shimadzu) で分析した。試料にセルロースが混ざるとリグニンと吸収帯が重なることで解析が困難となるが、高分子リグニンとしてクラースンリグニンを利用したため、この影響は除去できた。

(2) 分子量分布

測定対象として、高分子リグニンとセルロースを含む凍結乾燥した試料および低分子リグニンである APPL を選択した。Asahi pak GF-310HQ Column を備えた HPLC (Waters 616 LC) を使い、0.5 mL/min の流速で DMF (dimethylformamide) を移動相とし、UV 260

nm で検出を行った。校正曲線は polystyrene を利用して作製した。試料は 0.1% w/v の濃度で DMF に溶かし、遠心分離した上澄みを分析した。

3. 実験結果および考察

3.1 セルロースの分解特性

図2は硫酸塩濃度の変化を示す。矢印は硫酸塩と基質を再投入した時期を表す。運転開始から遅滞期なしに硫酸塩の減少が現れ、硫酸塩還元が起きたと考えられる。硫酸塩還元菌の活性を抑制する molybdate 20 mM を入れたものは硫酸塩の変化がほとんどなかった。嫌気性硫酸塩還元は有機物の酸化による微生物呼吸反応である。図3に炭素源として投入したセルロースの変化をグル

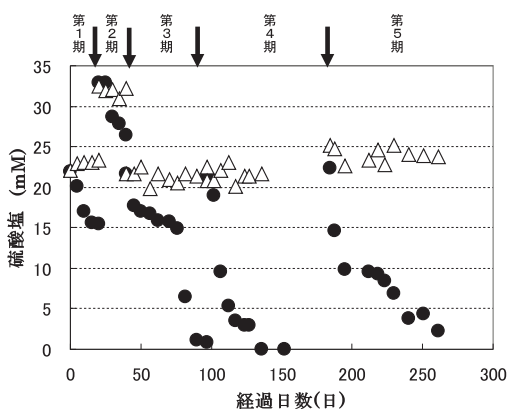


図2 硫酸塩濃度の変化
(●：硫酸塩還元条件 △：molybdate 添加条件)
矢印は硫酸塩と基質を再投入した時期を示す

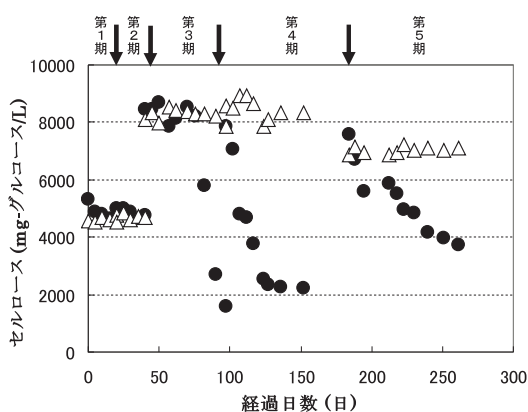


図3 セルロースの濃度変化
(●：硫酸塩還元条件 △：molybdate 添加条件)
矢印は硫酸塩と基質を再投入した時期を示す

コース等量で表現した。40日まではセルロースの分解が現れなかったが、40日以後、すなわち第3期からは硫酸塩の減少現象と同じ傾向を表した。図4は溶存有機炭素濃度の変化を示す。溶存有機炭素濃度が上昇しているのは、投入した唯一の炭素源であるリグノセルロースは不溶性物質であるため、基質が分解されるに従って可溶化した炭素が増加することを示している。最初はあまり増えなかったが、90日以後、すなわち第4期から高くなった。3,000 mg/L を超えると上昇は止まったが、無機炭素だけが增加する測定結果が得られた。90日以前(第3期まで)と181日以後(第5期)は溶存有機炭素濃度の変化がみられなかった。これはセルロースの加水分解より低級脂肪酸、単糖などの溶存炭素を主な基質として利用した結果であると考えられる。181日以後(第5期)に硫酸塩の減少にも関わらず、セルロースの分解率が第4期よりは低くなったのも易分解性物質が多すぎるからであると考えられる。

セルロースは、 β -1,4 結合したグルコースが水素結合により結晶化した不溶性高分子で、リグニンに比べ分解され易いことが知られている¹¹⁾。また嫌気性条件におけるセルロースの分解はリグニンの含量によって異なると報告されている^{2,12)}。本研究に使用した avicell セルロースは化学構造的にはリグニンと結合していないため、あまり妨害を受けなかったと考えられる¹³⁾。

本研究に使われた基質はリグニン、セルロースともに水に溶けにくい物質であるため固形有機物濃度の変化は主に生物分解を示すと考えられる。図5は総固形有機物濃度の変化を示す。総固形有機物の最大の減少は40日から96日の間、すなわち第3期でみられ、12.7 g/L から

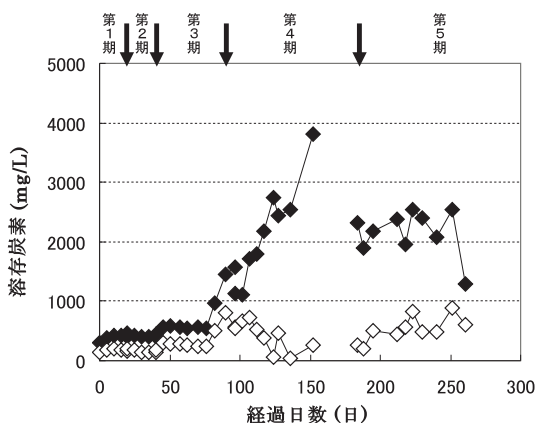


図4 硫酸塩還元条件における溶存有機炭素の変化
(◆：溶存有機炭素 ◇：溶存無機炭素)
矢印は硫酸塩と基質を再投入した時期を示す

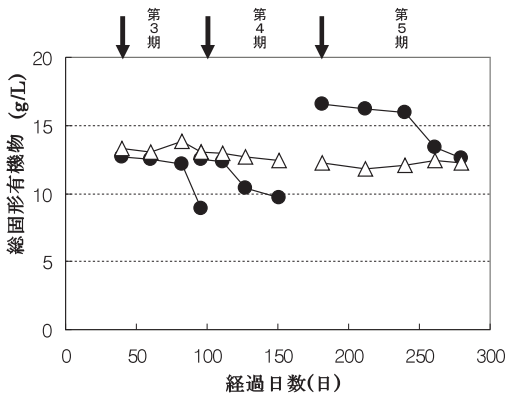


図5 総固形有機物濃度の変化
 (●：硫酸塩還元条件 △：molybdate 添加条件)
 矢印は硫酸塩と基質を再投入した時期を示す

8.9 g/L へと 30% 減少した。

3.2 高分子リグニンの分解特性

クラートンリグニンとして定量される高分子リグニンの濃度変化を図6に示した。硫酸塩還元条件で、97日から156日まで(第4期)では、1.77 g/L から 1.56 g/L に 11.9% 減少し、分解速度で計算すると 3.49 mg/L/day であった。なお、181日から280日まで(第5期)は 2.49 g/L から 2.19 g/L に 12.0% (分解速度は 3.03 mg/L/day) の減少がみられた。この結果からリグニンの分解は、まずセルロースを分解し、ある程度微生物が成長してから初めてリグニンへの攻撃に取り組むと考えられる。リグニンの分解率は低いものの、嫌気性硫酸塩還元条件

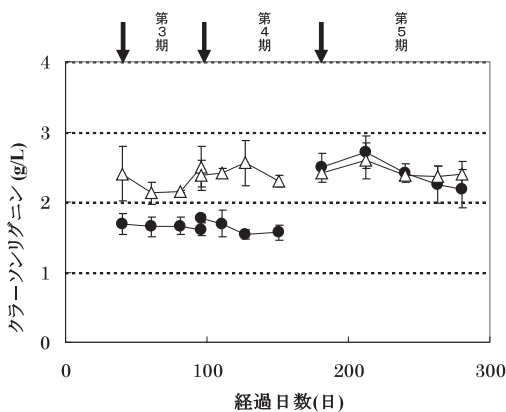


図6 クラートンリグニンとして定量された高分子リグニン画分の濃度変化 (●：硫酸塩還元条件 △：molybdate 添加条件) 縦線は標準偏差を、矢印は硫酸塩と基質を再投入した時期を示す

で高分子リグニンが分解されることを示した結果といえる。Zeikusら¹⁴⁾は嫌気性条件におけるリグニンの分解実験を行い、高分子リグニンは分解しないものの、部分的溶解する kraft リグニンだけは、30日の培養の結果 11%の分解率を得たと報告した。また、高分子リグニンが分解されるためには化学的変化による分子量の低下が必要であるとの主張がある¹⁵⁾。

図7は酸可溶性リグニンの変化を吸光度スペクトル変化でみた結果である。リグニンは置換ベンゼン誘導体であるが、複数の誘導基を有するため吸収帯の幅が広く、280 nm で吸収極大を現す。本研究では硫酸塩還元条件で、培養時間に伴ってスペクトル山と谷の差が小さくなる傾向がみられた。それを E280 nm/E260 nm の値で見ると 40日から96日まで(第3期)は 1.07 から 0.93 まで、97日から156日まで(第4期)では 1.10 から 0.95 まで低下した。このリグニンの吸光スペクトルでみられる 280 nm 付近の吸光度の減少は、微生物活動により高分子内の芳香環構造が開裂したことによると考えられる。

Crawfordら^{9,16,17)}はリグニンが分解する際の間中代謝物質として APPL を提案し、APPL はリグニンの構造を持ちながら水に溶ける低分子リグニンで、不溶性リグニンからフェニルエーテル結合とメトキシル基が破壊される構造的変化により生成すると主張した。図8は培養時間の経過に伴う APPL の増減を示した結果である。40日から96日まで(第3期)と 181日から280日まで(第5期)は、APPL として定量される低分子リグニンが増加する傾向をみせた。これは、不溶性高分子リグニンの水溶性低分子化が進んで、分解産物である APPL が蓄積した結果であると考えられる。一方、97日から156日の間(第4期)は増加した後、減少する傾向をみせた。これは蓄積した APPL がさらに分解され、リグ

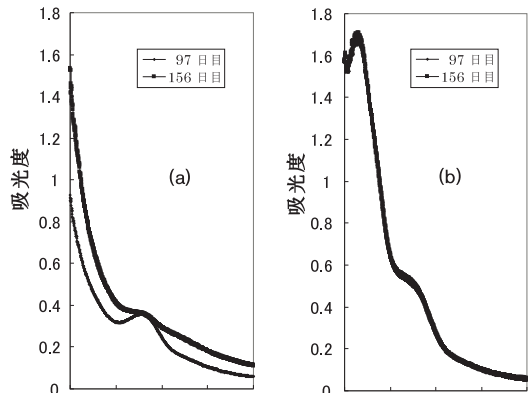


図7 酸可溶性リグニンの変化
 (a) 硫酸塩還元条件 (b) molybdate 添加条件

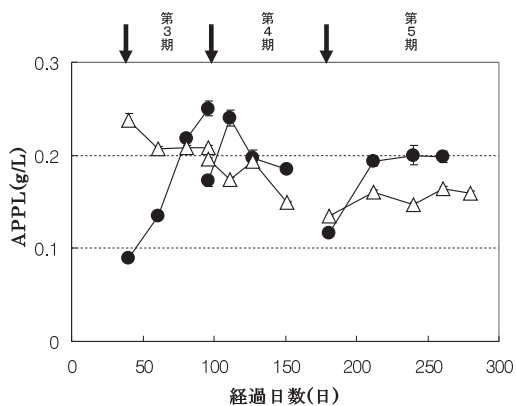


図8 APPLの濃度変化(●:硫酸塩還元条件 △: molybdate 添加条件) 縦線は標準偏差を, 矢印は硫酸塩と基質を再投入した時期を示す

ニンモノマーなどの芳香族化合物に変換され, 最終的に無機化されるからであると考えられる。クラソンリグニンとして定量された高分子リグニン画分が減少しながら, APPLとして定量される低分子リグニンも減少するのは, 高分子リグニンからAPPLへ低分子化する速度より, APPLからリグニンモノマーに分解される速度が速いからであると判断される。なお, 第3期と第5期において, クラソンリグニンとして定量された高分子リグニン画分が減少していないようにみられるにも関わらず, APPLとして定量される低分子リグニンが上昇している傾向をよくみせるのは, APPLの定量の方が変化をより感度よくみることができると考えられる(図6と図8の縦軸のスケールに注目)。

図9にフーリエ変換赤外線吸光分析の結果を, 表3にその吸収帯に対応するリグニンの構造を示す。クラソンリグニンとして定量された高分子リグニン画分, APPLとして定量される低分子リグニンともに $1,210\text{ cm}^{-1}$, $1,460\text{ cm}^{-1}$, $1,511\text{ cm}^{-1}$, $1,650\text{ cm}^{-1}$ および $3,400\text{ cm}^{-1}$ 付近に吸収帯が現れ, APPLはリグニンの構造を

表3 FTIRの吸収帯と対応するリグニン構造

波数 (cm^{-1})	対応する構造
3,396	O-H stretching
1,650	C=O conjugated keton stretching
1,511	aromatic skeletal vibration
1,458	C-H deformation in CH_3 , CH_2
1,425	C-H deformation with aromatic ring stretching
1,288	C-O of guaiacyl ring
1,213	C-O of syringyl ring
1,113	syringyl C-H
1,068	C-O of secondary alcohol
1,030	C-O of primary alcohol
848	C-H out of plane

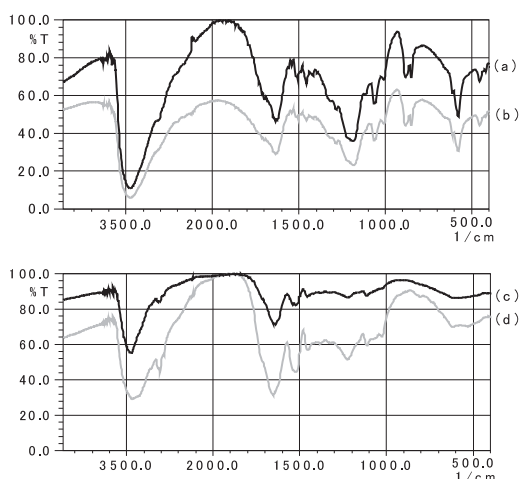


図9 硫酸塩還元条件におけるリグニンの赤外スペクトル変化 (a) クラソンリグニン 97日目 (b) クラソンリグニン 156日目 (c) APPL97日目 (d) APPL156日目

保つものであることがわかった。しかし, APPLではクラソンリグニンにはなかった $1,113\text{ cm}^{-1}$ 付近の吸収帯が現れた。一方, クラソンリグニンに現れた 850 cm^{-1} , $1,068\text{ cm}^{-1}$ 吸収帯はAPPLには現れず, 両者の化学構造が異なることを示唆している。また, グアイアシル核と思われる $1,213\text{ cm}^{-1}$ 付近の吸収帯は, クラソンリグニンに比べAPPLの方が強く, グアイアシル核の割合が多い構造になっていると考えられる。経時変化に関してみると, クラソンリグニンの場合は培養時間の経過に伴う変化は現れなかったが, APPLの場合 $1,213\text{ cm}^{-1}$ 付近の吸収帯が時間の経過とともに大きくなった。

図10は分子量分布を測定した結果である。クラソンリグニンとして定量された高分子リグニン画分およびセルロースを含む凍結乾燥した試料と, APPLとして定量される低分子リグニンの両者ともに分子量 (Mw)

20,000以上の非常に高分子量の物質を含有していた。また, 2つのピークがみられ, Mw5,000を基準に低分子量領域と高分子量領域に分かれる分布をしていた。凍結乾燥試料に比べてAPPLの方はMw>5,000におけるピークが低分子側にシフトしており, また, Mw<5,000のピークの高さも減少した。すなわち, APPLは基質として与えた高分子リグニンより低分子された物質であることを確認した。しかし, 高分子リグニン試料,

APPL とともに時間の経過に伴う分布の変化はみられなかった。

図 11 は APPL がさらに分解され検出されると考えられる, hydrocinnamic acid の定性で使ったマススペクトルとその量的変化を示す。高分子リグニンの代謝速度が非常に遅いのにに対し, 低分子分解生成物である芳香族化合物の代謝は比較的に早いので, その蓄積は起こりにくいと考えられ, 確実に同定された分解物は少なかった。本研究で主に検出された物質は, hydrocinnamic acid を含め benzoic acid, *m*-hydroxybenzoic acid, *m*-hydroxy phenylacetic acid, phenoxy acetic acid, phthalate, *p*-hydroxy benzaldehyde, *p*-hydroxy benzoic acid, *m*-hydroxy phenylacetic acid, *p*-hydroxy hydrocinnamic acid, protocatechuic acid, syringic acid, vanillic acid などであった。図 12 はリグニン分解産物であるリグニンモノマーの培養時間に伴う量的変化を示す。量的には 97 日から 156 日の間 (第 4 期) に増加する傾向をみせ

た。第 4 期では APPL として定量される低分子リグニンが増加後減少しており (図 8), 低分子リグニンである APPL がさらに低分子化し, その代謝産物が増加したものと考えられる。すべての芳香族化合物が 96 日まで (第 3 期まで) は低い濃度であったが, 97 日以後増えたのは高分子リグニンの分解に伴う APPL の生成と分解のどちらかが卓越した反応であったことを反映した結果であると考えられる。

検出したすべての物質が一様な経時変化をみせてないのは, リグニンは様々な種類の芳香族が不規則的に結合している立体的な高分子であるからである。なお, リグニン分解産物は高分子リグニンに比べ分解されやすく, より早く無機化される。Phelps ら¹⁸⁾は硫酸塩還元条件で ferulic acid, syringic acid を基質にした分解実験を行い, 遅滞期なしに分解されることを報告した。化学的構造の面から分類してみると, 高い濃度で検出されたのは水酸基を持つフェノール酸だった。また, リグニンの基本単位におけるフェニルプロパン部位に $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$ を有する物質の濃度が, カルボキシル基を有する物質より高く検出された。メトキシルを持つ物質としては vanillic acid, syringic acid などが検出されたが, 他の物質に比べ低い濃度であった。

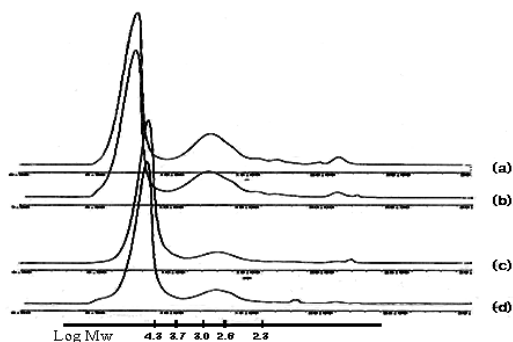


図 10 硫酸塩還元条件における試料の分子量分布の変化 (a) 高分子リグニンとセルロースを含む試料 97 日目 (b) 高分子リグニンとセルロースを含む試料 156 日目 (c) APPL97 日目 (d) APPL156 日目

3.3 硫酸塩還元条件における高分子リグニン分解経路に関する考察

生物分解に関する研究で, 対象物質としてリグニンは複雑な構造を持つ高分子であるため, ダイマーであるモデル化合物がよく使われている。代表的ダイマーの β -O-4 結合モデルリグニンなどの水溶性低分子リグニンは, 酸素が存在しない条件で分解されるという結果が報告されている^{3,19)}。しかし, この場合は均一反応として

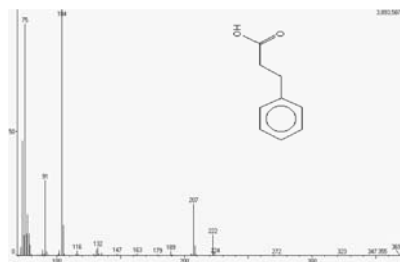
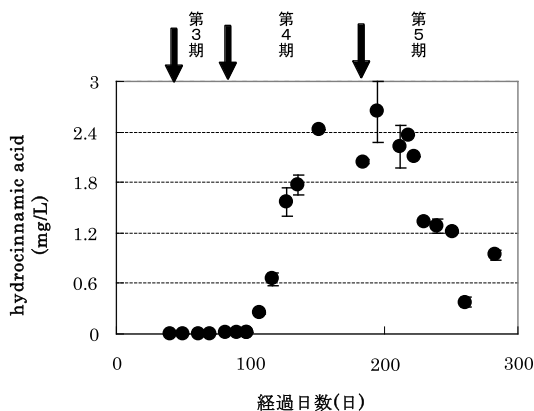


図 11 hydrocinnamic acid のマススペクトルと量的変化



縦線は標準偏差を, 矢印は硫酸塩と基質を再投入した時期を示す

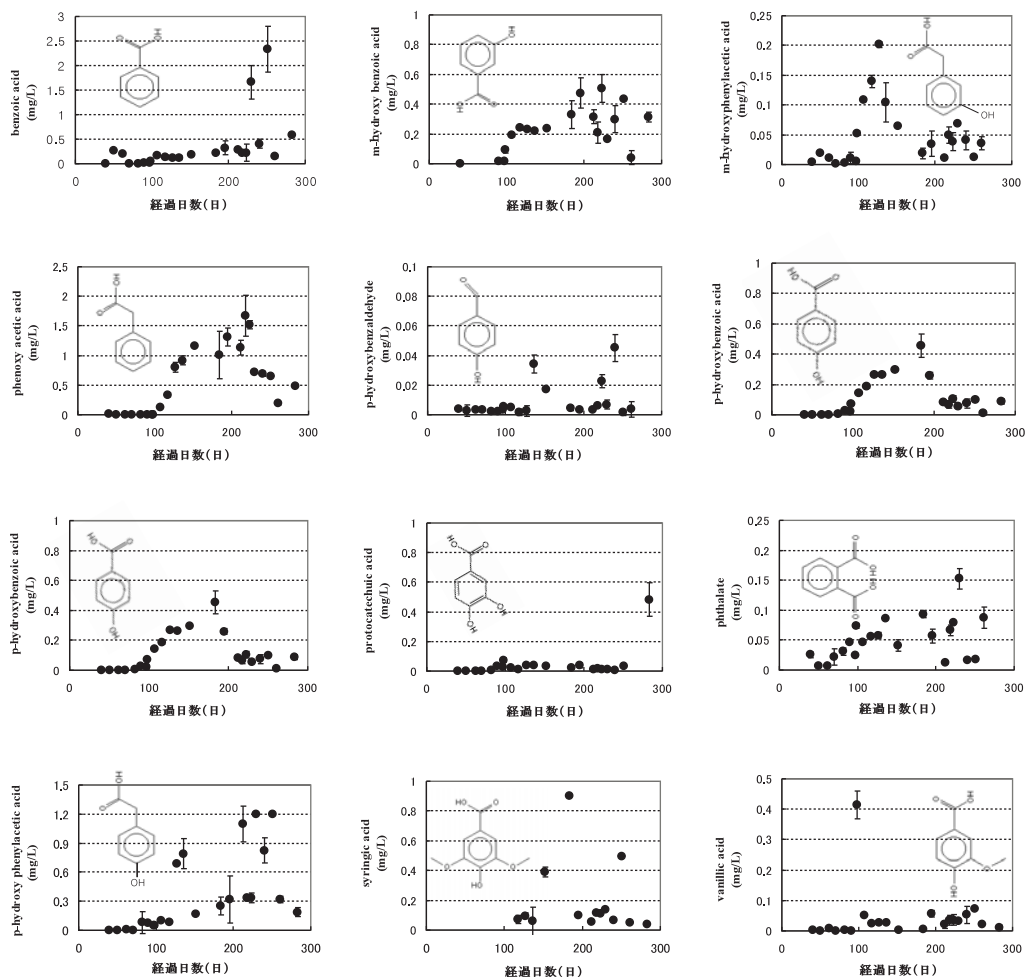


図 12 硫酸塩還元条件における芳香族リグニンモノマーの濃度変化 縦線は標準偏差を示す

進められるものである。 $[^{14}\text{C}]$ -DHPs (Dehydrogenative Polymerizate) を分子量 1,000 以下と以上に分けて分解実験を行った結果、低分子リグニンは 30 日で 5% 以上の炭素無機化回復率が得られたが、高分子の方は分解されないと報告されている²⁰⁾。なお、嫌気性条件における不溶性高分子リグニンの分解経路など、メカニズムに関しては明らかになっていないが、高分子リグニン分解の律速段階は低分子化による可溶化であるとの主張がある²⁰⁾。Kuhnigk ら²¹⁾は木材成分を分解すると知られているシロアリ (termites) により、side chain oxidation, demethylation によるモノマーの化学的変化は起きるものの、高分子リグニンの depolymerization は検証されないと報告した。リグニンの分解は、大きい分子量、構造の複雑性および化学的安定性などの性質から、加水分解ではなくラジカル反応で進むと考えられる。好気

性白色腐朽菌による研究では、リグニン分解は lignin peroxidase, manganese peroxidase laccase 等によりアリルラジカルやフェノキシラジカルが生成され、リグニンを酸化することから低分子化される、といわれている²²⁾。白色腐朽菌は、主として酸素を利用して H_2O_2 を生成しリグニンを酸化するので、嫌気性条件でのリグニン分解は不可能であると知られている²²⁾。そこで、リグノセルロースの生物分解における H_2O_2 の挙動に関する研究が行われ、嫌気性条件ではないが白色腐朽菌によるセルロース分解の過程で H_2O_2 が測定された⁶⁾。リグニン分解におけるセルロースの共代謝効果は、セルロースの分解過程で生成される H_2O_2 によるものであると考えられる。本研究でも共基質としてセルロースを与え、硫酸塩還元によるセルロース分解が行われたことが、リグニンの分解に効果をもたらしたと考えられる。なお、硫

酸塩還元反応を抑制した本研究の blank 試験では、リグニンの分解はほとんど起きていないことが示されており、リグニンの分解が微生物によるものであることが確認されている。

高分子リグニンは初期の低分子化によって水に溶け始める。これは β -エーテル結合の破壊などの酸化反応の結果であり、なんらかの微生物が産生した extracellular enzyme が関与していることはいうまでもない。本研究で定量した APPL は、定性的に不溶性高分子クラウンリグニンとは異なる構造を持つものの、リグニンであることが赤外分光分析により確認された。APPL は初め、クラウンリグニンが分解されるに従い蓄積し、APPL 濃度がある程度高くなるとさらに分解され、リグニンモノマーの濃度が急激に増すと考えられる。これは、図 8 で示された APPL の濃度が下がる期間中に、図 11 と図 12 で示されたように芳香族化合物の増加率が一番高くなる結果が得られたことから推察される。リグニンの構造から考えると低分子化された APPL はその後、side chain oxidation, あるいは demethylation が行われ、さらに低分子化されリグニンモノマーになったと考えられる。検出された芳香族化合物濃度の経時変化から判断し、リグニンの複雑な立体構造を考えると、その反応は不規則的に行われると考えられる。

4. おわりに

本研究の実験結果から、硫酸塩還元条件下でセルロースの分解とともにクラウンリグニンとして分析された不溶性高分子リグニンも分解されることが確認された。その分解率は、嫌気性条件で基質が高分子リグニンであり、運転期間が短いことなどから約 60 日間で 12% 程度にとどまり、分解速度は最大 3.49 mg/L/day と高くはなかった。しかし、分解産物である APPL の定量、定性的変化とリグニンモノマーである芳香族が検出されたことで、硫酸塩還元条件下で高分子リグニンは分解される物質であると確認された。なお、定量的な変化を観察できたことから、高分子リグニンの分解に関する指標として低分子 APPL と芳香族の定量が有効であることが示唆された。

今後、硫酸塩還元条件における高分子リグニン分解において最適な物理、化学的条件の検討を通して、分解率を高める必要があると考えられる。そのためには、高分子リグニン分解の律速段階である可溶化、低分子化に関与する酵素に着目し、分解メカニズムの研究を行うことが不可欠である。

参考文献

- 1) M.L. Ravinovich, A.V. Bolobova and L.G. Vasil'chenko: Fungal Decomposition of Natural Aromatic Structures and Xenobiotics: A Review, Applied Biochemistry and Microbiology, Vol. 40, No. 1, pp. 5-23 (2004)
- 2) P.K. Dimitris and K.H. Robert: The Effect of Lignin and Sugars to the Anaerobic Decomposition of Solid Wastes, Waste Management, Vol. 23, pp. 419-423 (2003)
- 3) T.K. Kirk and R.L. Farrel: Enzymatic "Combustion": The Microbial Degradation of Lignin, Annual Review Microbiology, Vol. 41, pp. 465-505 (1987)
- 4) S. Pareek, J.I. Azuma, S. Matsui and Y. Shimizu: Degradation of Lignin and Lignin Model Compound in Sulfate Reducing Condition, Water Science Technology, Vol. 44, pp. 351-358 (2001)
- 5) S.R. Couto and M. Rättö: Effects of Vetratryl Alcohol and Manganese (IV) Oxide on Lignolytic Activity in Semi Solid Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, Biodegradation, Vol. 9, pp. 143-150 (1988)
- 6) C.S. Evans, M.V. Dutton, F. Guillen and R.G. Veness: Enzymes and Small Molecular Mass Agents Involved with Lignocellulose Degradation, FEMS Microbiology Reviews, Vol. 13, pp. 235-240 (1994)
- 7) 金 錫九, 松井 三郎, Sandeep Pareek, 清水 芳久: 廃棄物埋立地における硫酸塩還元およびメタン生成経路による難分解性有機物の分解特性: 連続実験, 廃棄物学会論文誌, 第 9 巻, 第 2・3 号, pp. 79-86 (1998)
- 8) M. Dubois, K. Gilles, J. Hamilton, P. Robert and F. Smith: Colorimetric Methods for Determination of Sugar and Related Substance, Analytical Chemistry, Vol. 28, pp. 350-356 (1956)
- 9) D.L. Crawford and A.L. Pometto III: Acid-precipitable Polymeric Lignin: Production and Analysis, In W.A. Wood and S.T. Kellogg (Ed.) Methods in Enzymology, Vol. 161, pp. 35-47 (1988)
- 10) S.Y. Lin and C.W. Dence: Methods in Lignin Chemistry, Springer-Verlag, Berlin (1992)
- 11) J. Pérez, J. Muñoz-Dorado, T. de la Rubia and J. Martínez: Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin: and Overview, International Microbiology, Vol. 5, pp. 53-63 (2002)
- 12) S.B. Leschine: Cellulose Degradation in Anaerobic Environments, Annual Review Microbiology, Vol. 49, pp. 399-426 (1995)
- 13) P. Béguin and J.P. Aubert: The Biological Degradation of Cellulose, FEMS Microbiology Reviews, Vol. 13, pp. 25-58 (1994)
- 14) J.G. Zeikus, A.L. Welstein and T.K. Kirk: Molecular Basis for the Biodegradative Recalcitrance of Lignin in Anaerobic Environments, FEMS Microbiology Letters, Vol. 15, pp. 193-197 (1982)
- 15) J.R. Borgmeyer and D.L. Crawford: Production and Characterization of Polymeric Lignin Degradation Intermediates from Two Different *Streptomyces* spp.

- Applied Environmental Microbiology, Vol. 49, No. 2, pp. 273-278 (1985)
- 16) D. L. Crawford, A. L. Pometto III and R. L. Crawford: Lignin Degradation by *Streptomyces viridosporus*: Isolation and Characterization of a New Polymeric Lignin Degradation Intermediates, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 45, No. 3, pp. 898-904 (1983)
- 17) A. L. Pometto III and D. L. Crawford: Catabolic Fate of *Streptomyces viridosporus* T7-produced, Acid Precipitable Polymeric Lignin upon Incubation with Lignolytic *Streptomyces* species and *Phanerochaete chrysosporium*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 51, No. 1, pp. 171-179 (1986)
- 18) C. D. Phelps and L. Y. Young: Microbial Metabolism of the Plant Phenolic Compounds Ferulic and Syringic Acids under Three Anaerobic Conditions, Microbial Ecology, Vol. 33, pp. 206-215 (1997)
- 19) H. Kajikawa, K. Kudo, T. Kondo, K. Jodai, Y. Honda, M. Kuwahara and T. Watanabe: Degradation of Benzyl ether Bonds of Lignin by Ruminant Microbes, FEMS Microbiology Letters, Vol. 187, pp. 15-20 (2000)
- 20) J. G. Zeikus: Lignin Metabolism and the Carbon Cycle, Advances in Microbial Ecology, Vol. 5, pp. 211-243 (1981)
- 21) T. Kuhnigk, E. M. Borst, A. Ritter, P. Kämpfer, A. Graf, H. Hertel and H. König: Degradation of Lignin Monomers by Hindgut of Xylophagous Termites, Systematic and Applied Microbiology, Vol. 17, pp. 76-85 (1994)
- 22) J. A. Breznak and A. Brune: Role of Microorganism in the Digestion of Lignocellulose by Termites, Annual Review Entomology, Vol. 39, pp. 453-489 (1994)

Biodegradation of High-Molecular-Weight Lignin in Sulfate Reducing Conditions with a Cellulose Cosubstrate

Jae-Jung Ko*, Yoshihisa Shimizu**, Kazuhiro Ikeda**
Seog-Ku Kim* and Saburo Matsui***

* Korea Institute of Construction Technology

** Research Center for Environmental Quality Management, Kyoto University

*** Kyoto University

† Correspondence should be addressed to Yoshihisa Shimizu:

Research Center for Environmental Quality Management, Kyoto University
(2-1 Yumihama, Otsu, Shiga 520-0811 Japan)

Abstract

To investigate the biodegradation of lignin with high molecular weight (HMW) in sulfate reducing conditions, changes in the HMW lignin concentration and chemical structure were analyzed in the presence of a cellulose cosubstrate with a continuously-operated mesophilic reactor. Acid-precipitable polymeric lignin (APPL) and lignin monomers, which are known as degradation byproducts, were isolated and detected. The results showed that HMW lignin was degraded with a maximum degradation capacity of 3.49 mg/L/day. APPL was confirmed to be a polymeric degradation byproduct and accumulated along with HMW lignin reduction. We also identified the nonlinear accumulation of aromatic lignin monomers such as hydrocinnamic acid. Through our experimental results, we observed that HMW lignin biodegrades into APPL and aromatic monomers in anaerobic sulfate reducing conditions with a cosubstrate of cellulose.

Key words: sulfate reducing condition, high molecular weight lignin biodegradation, degradation byproducts, acid precipitable polymeric lignin (APPL)