



Title	亜塩素酸脱リグニン処理材の組織化学的研究
Author(s)	山下, 泰範; YAMASHITA, Yasunori; 深沢, 和三 他
Citation	北海道大學農學部 演習林研究報告, 36(2), 469-478
Issue Date	1979-07
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/21011
Type	departmental bulletin paper
File Information	36(2)_P469-478.pdf



亜塩素酸脱リグニン処理材の 組織化学的研究*

山下泰範** 深沢和三** 石田茂雄**

Histochemical Study on the Chlorite Delignified Wood of Spruce

By

Yasunori YAMASHITA**, Kazumi FUKAZAWA**
and Shigeo ISHIDA**

目 次

1. 緒 論	469
2. 実験方法	471
3. 結果と考察	471
1) 紫外線顕微鏡	473
2) 蛍光顕微鏡	473
4. 結 論	475
文 献	476
Summary	477
Explanation of photographs (plate 1-2)	

1. 緒 論

細胞壁の化学処理による脱リグニン過程に関する組織化学的な研究は多く発表されている^{1),4),5)}。特に亜塩素酸塩法による脱リグニン処理材に関する研究は、紫外線 (UV) 顕微鏡を用いた WOOD ら¹⁸⁾ の、また電子顕微鏡を用いた STOLL¹¹⁾ 及び HOFFMANN ら⁷⁾ の論文がある。しかしながら、UV 顕微鏡では、その観察の対象が、芳香族に由来する吸収の変化にのみ限られるために、脱リグニンの経過を捕えることしかできない。また電子顕微鏡では、細胞壁の微細構造まで観察しうるが、試料調製に多くの時間が必要である。これに対して、薄切片を、アクリジンオレンジ (AO) で染色して蛍光 (FL) 顕微鏡で観察した場合には、脱リグニン処理による壁成分の変化を、赤から緑への色調の変化として鋭敏に、かつ比較的簡単な操作で観察しう

* 1978年7月31日受理

内容の1部を第28回日本木材学会大会 (名古屋1978) で発表した。

** 北海道大学農学部林産学科木材理学教室

Laboratory of Wood Physics, Dept. of Forest Products, Faculty of Agriculture, Hokkaido University.

ることが、当研究室の研究で明らかとなった^{6),19)}。

本研究は、UV 顕微鏡と FL 顕微鏡を併用することにより、亜塩素酸塩法による脱リグニンの進行と、それに伴う AO 染色による色調の変化について観察し、その染色性に関与する壁成分を明らかにすることを主な目的とする。

また著者らは、先の研究で白色腐朽材において、AO 染色により細胞壁の一部に赤色帯が形成されるのを観察した。他の方法による実験と合わせて、その部位を *degrading zone* として菌の酵素の作用域と定義した¹⁹⁾。化学処理による脱リグニンと、菌の酵素によるそれとは、リグニンの除去のしかたが大変異なると考えられる。しかしながら顕微鏡観察では非常に似た染色性を示した。したがって本研究の結果から、木材細胞壁の有機的分解という観点においても、その染色性に関与する壁成分について、より明確になし得たと考えられる。

また参考のため、市販の酵素（セルラーゼ“オノヅカ”R-10+マセロザイム R-10）を用いて、細胞壁を分解し、それに伴う色調の変化も観察した。

本研究のガスクロマトグラフィーによる分析その他の実験に関しては、木材化学教室の佐野嘉拓氏の御指導により、同教室の装置を用いて行なった。ここに心からの謝意を表します。

2. 実験方法

苫小牧演習林にて採取したエゾマツ (*Picea jezoensis*) の辺材を実験材料として用いた。試料はマッチの軸木状のチップ (1×1×4 mm) として、アルコール・ベンゼン (1:2) で抽出した後に、亜塩素酸塩法 (NaClO₂ 10 g, 酢酸 5 cc, 水 100 cc) により、50°C で 15 分, 30 分, 2 時間, 5 時間, 8 時間, 12 時間それぞれ脱リグニン処理した²⁾。12 時間処理材の一部は、17.5% の NaOH で 30 分処理して α -セルロースとした。

それぞれの試料は、流水中で洗浄した後にメタクリレートで包埋した。

薄切片 (1 μ) 作成の後に脱包埋して、次の方法で観察を行なった。(1) 各処理時間における UV 吸収量の減少率を見るために UV 顕微鏡光度計 (カール・ツァイス, MPM 01 型) により観察と吸光度測定を行なった。(2) (1) に対応する試料について、染色性の変化を観察するために AO 染色 (0.02%, 3 hr) して落射型 FL 顕微鏡で観察した。(3) ペクチン質を検出するためにルテニウムレッド (0.001%, 12 hr) で染色して光学顕微鏡で観察した。

残留リグニンの量は、クラソンリグニン量を規準とした¹⁵⁾。またその加水分解液を用いてガスクロマトグラフィー法により構成糖比の変化を調べた。これは、AO の染色性の変化と多糖類との関係を明らかにするために行なった。

酸化処理: 5 時間, 8 時間, 12 時間処理材及び α -セルロースとしたものの一部は、多糖類の還元性末端基を酸化するために、さらに亜塩素酸 0.05 n pH 3.5 で 16 時間室温で処理した後に前述の方法で観察した¹²⁾。これは主にヘミセルロースの量と AO の染色性との関係について調べるために行なった。

酵素処理：薄切片を脱包埋の後にセルラーゼ“オノヅカ”R-10とマセロザイムR-10(ヤクルト生化学KK製)の混液(2%:0.5%, pH 4, 40°C, 4日間)で処理した。セルラーゼ“オノヅカ”R-10は、説明書によると、*Trichoderma viride*から精製したものであり、セルロースの他にも、キシラン・マンナンなどにも活性を有する粗酵素である。またマセロザイムR-10は、*Rhizopus* sp.からつくられたペクチナーゼである。処理の後に、前記と同様に、AOとルテニウムレッドで染色して、酵素による細胞壁の分解を染色性の変化として捕えようとした。

実験の手順については、Fig. 1にまとめて示す。

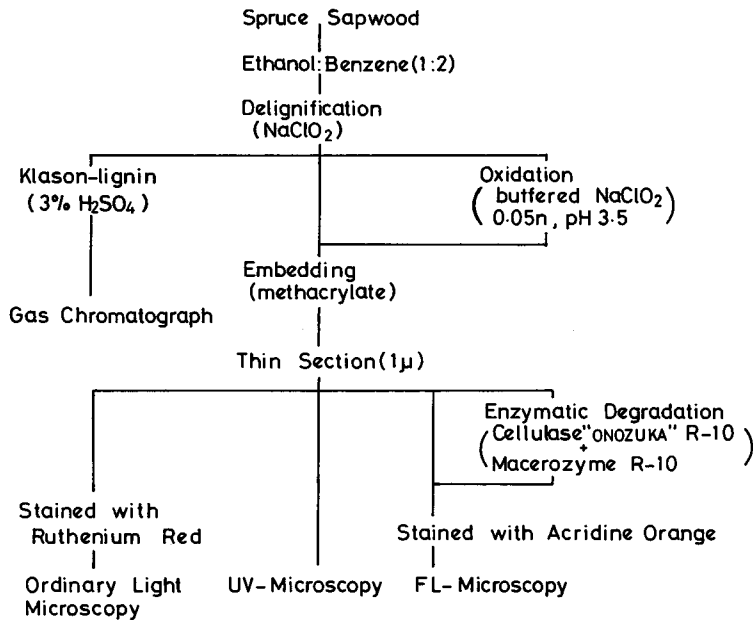


Fig. 1. Procedure of this experiment.

3. 結果と考察

1) 紫外線顕微鏡

細胞壁の脱リグニン過程を Plate 1 の Photo 1~12 に示す。細胞壁の UV 吸収は、処理時間の増加と共に全体的に低下して、コントラストを失ってゆく。放射柔細胞は、処理の後期でも依然として高い UV 吸収を示した。また仮道管でも、 S_1 と S_2 層の境界に相当すると考えられる領域に若干の UV 吸収が観察された。

各処理時間におけるクラソンリグニン量を Table 1 に示す。5 時間処理以後の試料でも、全ホロセルロースに対して、6.5% 程度のリグニンが残留していた。他の研究でも同程度のリグニンが残留することが報告されている³⁾。これよりさらにリグニンを除去するためには、炭水化物(主にヘミセルロース)の溶出を伴うと考えられている。これらの除去しにくい残留リグニンが細胞壁のどの部位に多く存在するのかについては明確に述べた論文はほとんど無い。

Fig. 2 は、クラソンリグニンの減少率と UV 顕微鏡による吸光度との関係を示した。吸光度は、リグニンの減少にもなつて、2 次壁、細胞間層ともに徐々に減少しているが、Wood ら¹⁸⁾の報告のように、両者の間で直線関係は認められなかった。特に処理早期の試料では、そのばらつきは大きかった。その理由として次の事が考えられる、リグニン分解溶液は試料の表面 (特に木口面) から細胞壁中へ浸透していき、逐次リグニンを分解除去していく。そのために試料の外側と内側で、顕著なリグニンの濃度こう配が生じて、そのために切片の作成位置により吸光度に大きな相違が表われたものと思われる。

5 時間以上の処理材では、UV 吸光度はほぼ一定となった。しかし放射柔細胞は、仮道管に比べて高い UV 吸収を示している。

本実験では、この脱リグニン法により、2 次壁ないしは細胞間層が優先的に脱リグニンされるという topochemical effect は観察されなかった^{11), 18)}。

2) 蛍光顕微鏡

処理時間による色調の変化を Plate 2 の Photo 13~19 に示す。5 時間処理材を境として色は大きく変化した。これはクラソンリグニン量の変化とも対応する。前期では 15 分・30 分処理材ともに、細胞壁は全体的に強い赤色に発光する。また 2 時間処理材では複合細胞間層 (CML), S₁ 層及び S₁ と S₂ 層との境界領域及び放射柔細胞は依然として赤色であるが、S₂ 層は緑色側の発光を示し始める (Photo 13)。5 時間処理以後の細胞壁の色調の変化は、各壁層において差が表われた。CML は、処理時間が長くなるにつれて発光を失い、しばしばその部分において切片作成時に割れが生じた。S₂ 層と S₃ 層は、徐々に発光を失い暗い緑色となった。S₁ 層と S₁ と S₂ 層の境界と思われる領域では、長時間処理後においても、依然として赤色の発光を示した (Photo 14)。

アクリジンオレンジ (AO) は蛍光メタクロマジー性の塩基性色素である。それは、染色性が高まるにつれて長波長 (赤色) 側の発光を示す。AO の分子は、基質の好塩基性の作用基に静電的に結合することが報告されている⁸⁾。このことから、前記の各処理時間及び各細胞壁層の間での色調の相違は、細胞壁成分中の酸基の量と細胞壁の AO 分子に対するアクセシビリティの 2 つの観点から解釈し得る。

5 時間処理以前の試料では、クラソンリグニン量に示されるように、まだ相当量のリグニンが残留している。それらは、多かれ少なかれ、この処理に

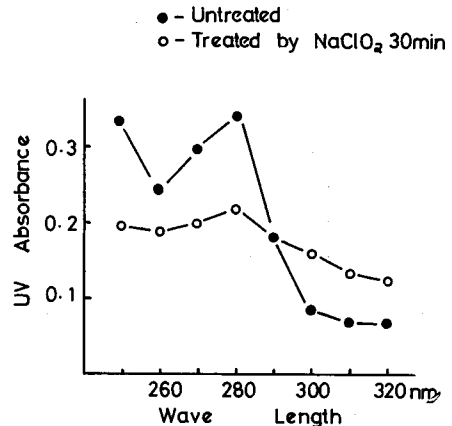


Fig. 3. UV spectral curves for the S₂ layers of control wood tracheid and treated wood tracheid. It can be noticed that increase of UV absorption of treated wood above 300 nm wave length shows creation of functional groups such as conjugated carbonyl groups in the lignin fraction.

によって酸化されていると考えられる。また環開裂などによって多くのカルボン酸などの酸基も形成されることが述べられている¹⁶⁾。本実験でも、30分処理材のUVスペクトルで $\epsilon_{280}/\epsilon_{300}$ が約1.5と未処理材の約3.5に比べて、長波長側で吸収が増加しているのが認められた(Fig. 3)。これはリグニンの側鎖にカルボキシル基を含む共役系のカルボニルが形成されていることを示唆していると考えられる。

以上のことから、処理前期において、細胞壁が全体的に赤色の発光を呈する理由としては、薬液の処理により細胞壁が膨潤されたこと、及びリグニンが離脱されたことなどにより、細胞壁のAO分子に対するアクセシビリティが増加したことと、それに加えて、残留しているリグニンも、この処理により、酸化作用を受けて多くの酸基が形成され、AO分子が多数この細胞壁成分(酸化リグニン)に結合し、そのために強い赤色の発光を示すと考えられる。

5時間処理以後では、クラソンリグニン量は、6.5%前後とほぼ一定と成っている。このことから、長時間処理材の赤色から暗緑色への染色性の変化は、主にヘミセルロースの崩壊と溶出によるものと予想した。そのためにガスクロマトグラフィー法で構成糖比の変化を調べたが、各処理材の間で顕著な差は認められなかった(Table 2)。またルテニウムレッドを用いて、多糖類の中で一番多くの酸基を有しているペクチン質を染色したが、その結果、仮道管と放射柔細胞のCML部分が強く染色された(Photo 20)。しかしながら、FL顕微鏡観察で認められる赤色に発光したS₁層とS₁とS₂層の境界の部位とは一致しなかった。

Table 2. Sugar composition at each degree of delignification

Treated hour	Glu.	Composition of extr. saccharides (%)			
		Man.	Xyl.	Ara.	Gal.
control	64	23	9	3	2
15 min.	64	24	7	3	2
30 min.	64	24	7	3	2
2 hr.	63	25	6	5	1
5 hr.	65	22	4	7	2
8 hr.	67	20	8	3	2
12 hr.	61	23	8	4	4

以上のことから、ヘミセルロースなどの多糖類は、AOの染色性にあまり多くの影響を及ぼさないことが予想された。

その事をさらに明らかにするために、亜塩素酸で酸化処理を行ないAO染色を試みた。これは、ヘミセルロースに多い還元性末端基(セルロースの約20倍)を酸化してカルボン酸として、AOの染色性を高めるために行なったものである^{12),13)}。その結果、S₂層は全体的に黄橙色となった(Photo 17)。 α -セルロースは、この処理後でも暗い緑色の発光しか示さず色調に相違が認められないことから(Photo 16)、この黄橙の発光はヘミセルロースの存在に由来する酸基の増加が原因であると考えられる。このように、酸化処理を行なうと壁は全体的に赤色側の

発光を示して、ヘミセルロースも検出する。しかしこのような酸化処理をしない場合には、多糖類は、AOの染色性にあまり関与しないことが明らかとなった。

これらのことから、AO染色によって赤色の発光を示すのは、すべて酸化された残留リグニンに由来しており、特に長時間処理材で細胞壁中において赤色の発光を示す部位は、UV顕微鏡観察でも吸収の差として明確に捕え得ない程の微量な残留リグニンの存在位置を鋭敏に示しているものと考えられる。またこれらの残留リグニンは、ヘミセルロースが多く存在すると報告されている部位、例えばS₁とS₂層の境界領域などに多く存在していることはHOFFMANN⁷⁾らの過マンガン酸カリウム染色による報告と対比して興味深い事実である。

次に各処理材について、酵素処理を行ない細胞壁の酵素的分解を染色性の変化として捕え得るかどうかを試みた。処理前と処理後の色調の変化をPhoto 18に示した。S₁層付近の赤色の発光は黄色に変化した。またルテニウムレッドの染色性も顕著に低下しており、ペクチンが分解されたことが分かる(Photo 20)。

このように、酵素処理によって色調が変化したのは、多糖類の分解に伴い酸基を多く有する残留リグニンが除去されたためであることが考えられる。

分解は、晩材よりも早材が早い、これは前者より後者の方が木化度が高いと考えられており¹⁷⁾、脱リグニン処理後では、早材がよりporousとなり、酵素が作用しやすくなったためであろう。

この酵素処理で、30分処理材でも顕著な色調の変化が観察された(Photo 19)。これも多糖類主にヘミセルロースの分解に伴って酸化されたリグニンも除去されたためと考えられるが、同試料中には、まだ相当量(21.2%)のリグニンが残留している。このことは、細胞壁がある程度porousとなり、酵素が細胞壁中に浸透して行けるようになった場合には、リグニンの存在いかんにかかわらず、ラッカーゼなどのリグニン分解酵素の助力なしでも多糖類を分解でき、また同時にある程度脱リグニンを行ない得ることを示唆している。

これは、脱リグニン酵素を持たない褐色腐朽菌の細胞壁の分解過程と関連して興味深い事実であるが、詳細は今後の研究に待たなければならないであろう。

4. 結 論

UV顕微鏡観察では、topochemical effectは観察されなかった。また放射柔細胞と仮道管のS₁層及びS₁とS₂層の境界では処理の後期まで吸収が認められた。

FL顕微鏡観察では、リグニンの酸化に伴い細胞壁は赤色の色調となり、それらが逐次細胞壁中から離脱するのに伴って緑色の暗い発光へと変化した。放射柔細胞と仮道管のS₁層及びS₁とS₂層の境界部分は処理の後期においても赤色の発光を示した。これは少量残っているリグニンの位置を示していると考えられる。これらは、多糖類分解酵素で処理することにより同様に除去される。酵素は脱リグニン処理時間の長短にかかわらず細胞壁に作用した。

以上から、アクセシビリティが最も高い状態にあると仮定して、壁成分と色調との関係を、簡単にまとめてみると； α -セルロースは暗い緑色の発光を示す。これにヘミセルロースが加わって、ホロセルロースとなると黄緑色のやや明るい発光と成り、さらに酸化されたリグニンが加わると赤色の発光を示すものと考えられる。

AO染色による赤色の発光は主に酸化されたリグニンが原因であり、多糖類は、壁のAO分子に対するアクセシビリティに関与するのみであることが明らかとなった。したがって、緒論で述べた腐朽材細胞壁に認められる赤色帯は、菌の酵素作用によってリグニンが酸化された部位を示していることが明らかとなった。

文 献

- 1) BUCHER, H. H.: Der mikroskopische Nachweis von Lignin in verholzten Fasern durch Jodmalachitgrün. *Das Papier*, **22**, 390-396 (1968).
- 2) CÔTÉ, Jr. W. A., A. C. DAY & T. E. TIMELL: Studies on Compression Wood Part VII, Distribution of Lignin in Normal and Compression Wood of Tamarack. *Wood Sci. Technol.* **2**, 13-37 (1968).
- 3) DIETRICH, H. H. & K. I. ZSCHIRNT: Untersuchungen über den enzymatischen Abbau von Holocellulosen in vitro. *Holz Roh- und Werkstoff*, **30**, 66-74 (1972).
- 4) FENGEL, D.: The Ultrastructure of Cellulose from Wood. Part 1, Wood as the Basic Material for the Isolation of Cellulose. *Wood Sci. Technol.* **3**, 203-217 (1969).
- 5) FENGEL, D.: The Ultrastructure of Cellulose from Wood. Part 2, Problems of the Isolation of Cellulose. *Wood Sci. Technol.* **4**, 15-35 (1970).
- 6) 深沢和三・今川一志・土居修一: 紫外及び蛍光顕微鏡による腐朽材細胞壁劣化過程の観察. *北大農演研報*, **33**(1), 101-114 (1975).
- 7) HOFFMANN, P. & N. PARAMESWARAN: On the Ultrastructural Localization of Hemicelluloses within Delignified Tracheids of Spruce. *Holzforsch.* **30**, 62-70 (1976).
- 8) 伊藤 隆・藤田 斉・市村幸子・座間光雄: Photodynamic 作用—核酸と色素との相互作用を中心として—。蛋白質, 核酸, 酵素, **12**(7), 555-578 (1967).
- 9) JAYME, G. & H. F. TORGERSEN: Topochemie der Delignifizierung beim Aufschluß von Fichtenholz nach dem Sulfit- und Sulfatverfahren. *Holzforsch.* **21**, 110-116 (1967).
- 10) 小竹無二雄: 大有機化学, **19**, 天然高分子化合物 I. 朝倉書店, 43 (1972).
- 11) STOLL, M. & D. FENGEL: Studies on Holocellulose and Alpha-Cellulose from Spruce Wood Using Cryo-Ultramicrotomy. Part I, Structural Changes of the Fiber Walls during Delignification and Alkali Extraction. *Wood Sci. Technol.* **11**, 265-274 (1977).
- 12) STRÖLE, U.: Bestimmung der Aldehydgruppen in oxydierter Cellulose. *Das Papier*, **11**, 453-459 (1957).
- 13) TIMELL, T. E.: Recent Progress in the Chemistry of Wood Hemicelluloses. *Wood Sci. Technol.* **1**, 45-70 (1967).
- 14) TIMELL, T. E.: Wood and Bark Polysaccharides. in "Cellular ultrastructure of woody plants" (W. A. CÔTÉ, Jr. Ed.), Syracuse Univ. Press, 127-156 (1965).
- 15) 東京大学農学部林産化学教室: 林産化学実験書, 103 (1965).
- 16) 右田伸彦・米沢保正・近藤民雄: 木材化学, 下, 285 (1968).
- 17) WILSON, J. W. & R. W. WELLWOOD: Intra-Increment Chemical Properties of Certain Western Canadian Coniferous Species. in "Cellular ultrastructure of woody plants" (W. A. CÔTÉ, Jr. Ed.), Syracuse Univ. Press, 551-571 (1965).

- 18) WOOD, J. R., P. A. AHLGREN & D. A. I. GORING: Topochemistry in the chlorite delignification of spruce wood. The role of the hemicelluloses. Sv. Papperstidn. **75**, 15-19 (1972).
- 19) YAMASHITA, Y., K. FUKAZAWA & S. ISHIDA: Histochemical observation of wood attacked by white rot fungi, *Coriolus versicolor* and *Cryptoderma yamanoi*. Res. Bull. College Exp. For., Hokkaido Univ., **35**(1), 109-122 (1978).

Summary

Histochemical observation was made on the chlorite delignified wood of spruce, using ultraviolet (UV) microscope and fluorescence (FL) microscope. The progressive removal of lignin from cell wall was investigated with UV microscope. In this experiment, it was unclear that the topochemical effect was present or not, because the absorbance of the secondary wall and middle lamella was not in proportion to the degree of delignification. The cell walls were lost their UV absorbance gradually with the lapse of the treatment time. It was interesting to note that ray cells and S_1 and S_1/S_2 border region in tracheids remained relatively high absorbance even in the late stage of treatment.

The samples at each degree of delignification were observed with FL microscope, stained with acridine orange which is a sort of fluorochrome and metachromatic basic dye. In the early stage of the treatment whole cell walls showed red discolouration but in the late stage the colour of the cell walls differed among individual cell wall layers. S_2 layer of tracheid became green, and S_1 and S_1/S_2 border region in tracheids and ray cells still coloured red. It was clear in this experiment that the cause of the red discolouration appeared in cell wall was mainly oxidized residual lignin because no significant difference of colours appeared after oxidation of aldehyde groups of polysaccharide. After enzymatic degradation of hemicelluloses using cellulase "Onozuka" R-10 and Macerozyme R-10 these red coloured regions in the cell walls disappeared even in the early stage sample. It could be considered from this result that the residual lignin was also dissolved from the cell walls.

Explanation of photographs

Note: The cell axis is vertical in all photographs. All photographs show radial views.

Plate 1 (photo 1-12). All photographs are UV microphotographs taken at a wave length of 280 nm. These are arranged as follows: in the left column, **photos 1-4** show early wood tracheids, in the central, **photos 5-8** show late wood tracheid and in the right, **photos 9-12** show ray cells. Figures in the photographs express the duration time of the treatment.

There was no significant gradient in absorbance across the secondary wall of tracheids at any stage in delignification. In the later stage of the treatment, after 5 hour duration, some absorbance were left in the tracheids at the region probably corresponding to S_1 and S_1/S_2 border and ray cells.

Plate 2 (photos 13-20). All photographs are FL microphotographs, stained with acridine orange, except photo 20.

Photo 13. The tracheids and ray cells in the early stage of the treatment. Each duration time is 15, 30 minutes and 2 hours from left side of this photograph.

The red discolouration being similar to the colour tone in degrading zone of white rotted wood appears in whole cell walls.

- Photo 14.** The tracheids and ray cells in the late stage of the treatment. Each duration time is 5, 8 and 12 hours from left side of this photograph. S_2 layer of tracheids become green again but S_1 and compound middle lamella of tracheids and ray cells still red.
- Photo 15.** The tracheids and ray cells of control wood. The secondary wall coloured yellowish green and the compound middle lamella coloured yellow. The red colour materials visible in the ray cells correspond to the extractive constituents.
- Photo 16.** The tracheids and ray cells after alkali extraction (alpha-cellulose). They are illuminated only gloomy green even after oxidation of reducing end groups of cellulose.
- Photo 17.** The effect of the oxidative treatment of aldehyde groups of polysaccharide. Showing the right two tracheids before this treatment and left two after this. The colour of S_2 layer change slightly yellowish by this treatment but striking difference of colour between before and after is not noticeable.
- Photo 18.** The effect of the enzymatic degradation of hemicellulases, cellulase "ONozuka" R-10 and Macerozyme R-10. On the left of this photograph degraded tracheids are illustrated, and right before it. The red discolouration remained in the cell walls corresponding to S_1 and S_1/S_2 border region disappeared.
- Photo 19.** The effect of enzymatic degradation. The red discolouration visible in whole cell walls showing on the right of this photograph disappeared after this treatment on the left. The enzyme can penetrate into and act within the cell walls even of the early stage, 30 minutes, delignification rate only 25% on whole lignin. It can be considered from this that the oxidized residual lignin causing red discolouration also dissolve from the cell walls.
- Photo 20.** The pectic material rich layers in the cell walls, stained with ruthenium red, showing compound middle lamella of tracheids and ray cells distinctly stained in lower part of this photograph. After enzymatic degradation these regions are weakly stained as shown in the upper part. From this, the pectic materials are found to be decomposed by this treatment.

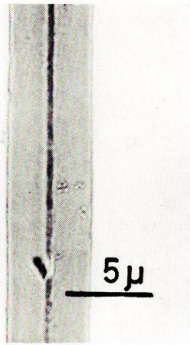


Photo 1

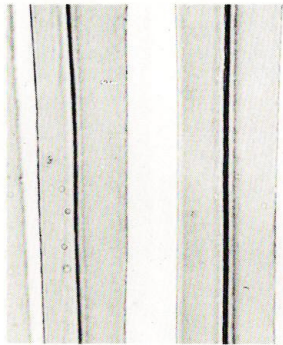


Photo 5



Photo 9



Photo 2

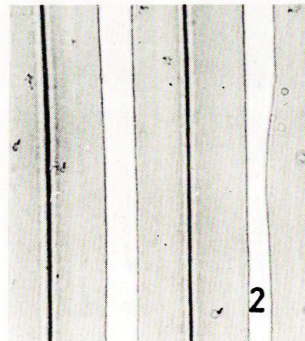


Photo 6

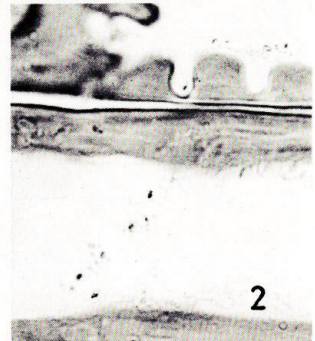


Photo 10

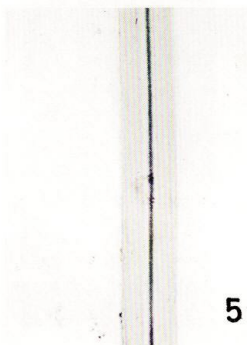


Photo 3



Photo 7



Photo 11



Photo 4

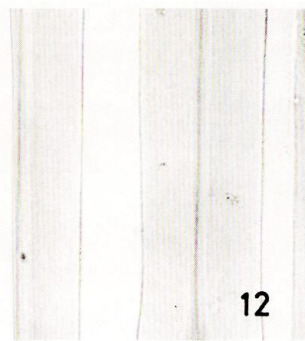


Photo 8

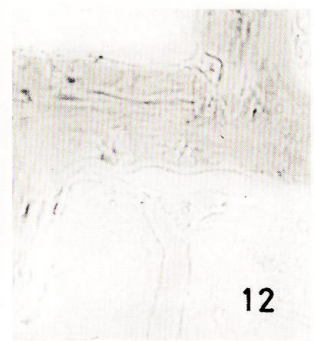


Photo 12

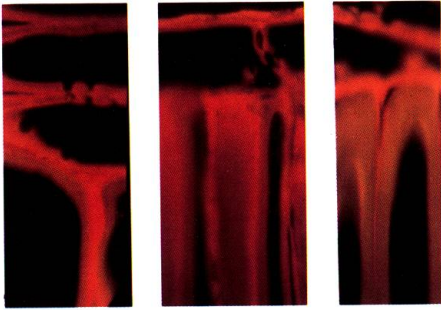


Photo 13

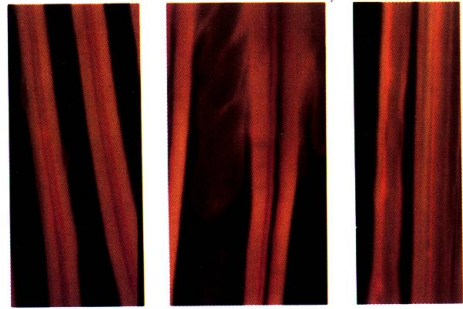


Photo 14



Photo 15



Photo 16

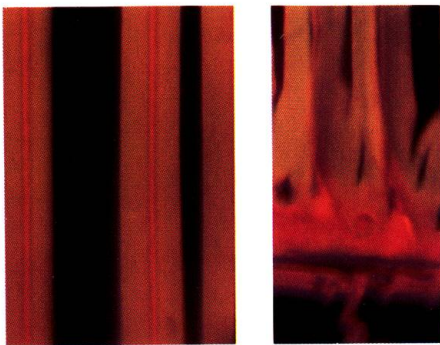


Photo 17

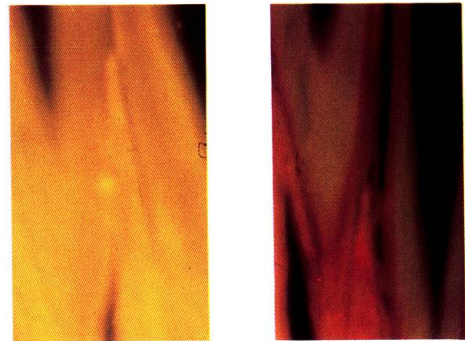


Photo 18

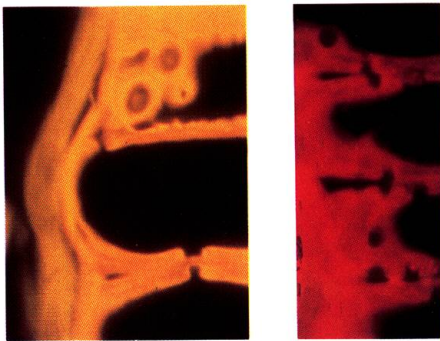


Photo 19

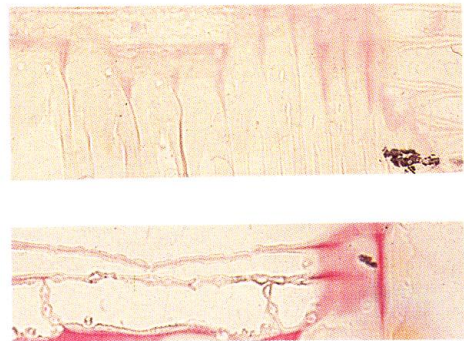


Photo 20