

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03844

研究課題名(和文) 酵素分解反応を模倣するリグニンの電解システム反応の開発と応用

研究課題名(英文) Electrolytic mediator system for lignin degradation

研究代表者

高野 俊幸 (Takano, Toshiyuki)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：50335303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：リグニンの微生物分解反応を模倣したElectrolytic mediator system (EMS) 反応について検討した。具体的には、EMS反応における各種メディエーター(LMS用メディエーター、遷移金属メディエーター、天然系メディエーターなど)の効果を調べた。その結果、EMS反応の効率や選択性は、メディエーターの影響を大きく受けた。LMS反応では使用できない酸化電位の高いメディエーターでも、EMS反応では使用可能であった。また、リグニン分解物もEMS反応において酸化能を示した。いくつかのメディエーターは、リグニンのEMS反応のメディエーターとして有望であることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、リグニンの電解反応(EMS反応)について検討し、種々のメディエーターの反応効率や反応選択性を明らかにした。このことは、これまで知見の乏しかったEMS反応の基礎的知見が収集できた点で学術的意義も高い。また、本研究の成果により、EMS反応の“環境に優しいリグニンの分解反応”としての実用化の可能性が示唆され、実用的な面からの価値も大きい。

研究成果の概要(英文)：The effect of various mediators such as mediators for laccase mediator system (LMS), transition metal mediator, natural mediators (lignin degradation products, fatty acid) in electrolytic mediator system (EMS) reaction of lignin model compounds such as lignin dimer and synthetic lignin were investigated as fundamental study of EMS reaction of lignin. As the results, the reaction efficiency and selectivity were much influenced by the mediators. The mediators with high oxidation potential which could not be applied to LMS reaction could be used in EMS reaction. And lignin degradation products exhibited good lignin oxidation ability in EMS reaction. Several mediators were promising to eco-friendly lignin degradation process.

研究分野：木質化学

キーワード：リグニン 電解反応 生体模倣反応

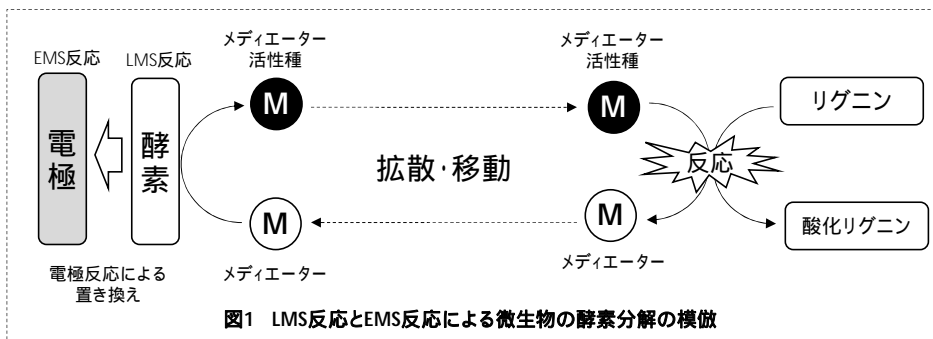
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

環境に優しいリグニンの工業的な変性・分解プロセスの開発は、バイオリファインリーやグリーンケミストリーの観点から、重要な課題の一つである。例えば、現在、主流のクラフトパルプ化における脱リグニン反応は、厳しい反応条件を必要としており、パルプ収率の低下を招いているばかりでなく、環境負荷も小さくないのが現状である。一方、リグニンは、自然界では、微生物の酵素分解反応により、常温常圧の温和な反応条件で分解されている。そこで、この酵素分解反応をリグニンの工業的な脱リグニン工程に応用することが考えられ、リグニン分解酵素を直接用いる反応、特に、Laccase mediator system (LMS) 反応が長年検討されてきた。しかしながら、LMS 反応は、酵素の失活しない反応条件に限定される、経済性が低いなどの点から、工業的な応用には大きな問題を抱えていた。

一方、微生物の酵素分解反応の模倣のもう一つの手段が、Electrolytic mediator system (EMS) 反応である(図1)。EMS 反応とは、LMS 反応がメディエーターとよばれる低分子化合物を介する間接的なラジカル分解反応であることから、LMS 反応の酵素部分を電極で置き換えて、LMS 反応の酵素由来の弱点を改善した反応のことである。研究開始当初、EMS 反応に関する報告は数例にと

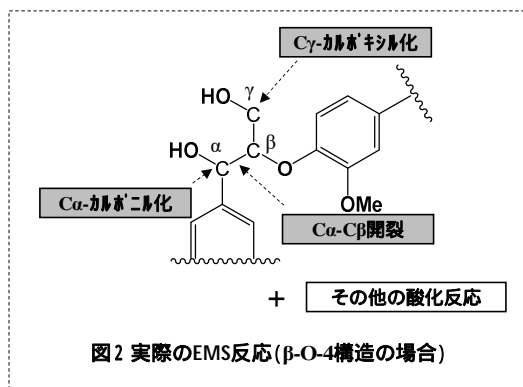
どまり、EMS 反応に関する基礎的知見がほとんど無い状況であった。



2. 研究の目的

本研究では、「環境に優しいリグニンの工業的な変性・分解プロセス」への応用を最終目標として、微生物の酵素分解反応を模倣する EMS 反応の開発を研究の目的とした。

リグニンの EMS 反応は、実際には、複数の化学反応が競争的に進行する反応である。例えば、リグニンの主要構造である β -O-4 構造の EMS 反応では、 α -カルボニル化反応、 α -C β 開裂反応、 γ -カルボキシル化反応などが挙げられる(図2)。一方、リグニン自体も、多種多様な結合様式を有する複雑な化合物である。そのため、本研究では、リグニンの EMS 反応の反応因子と反応の効率性・選択性に関する基礎的知見の収集を具体的な課題とした。

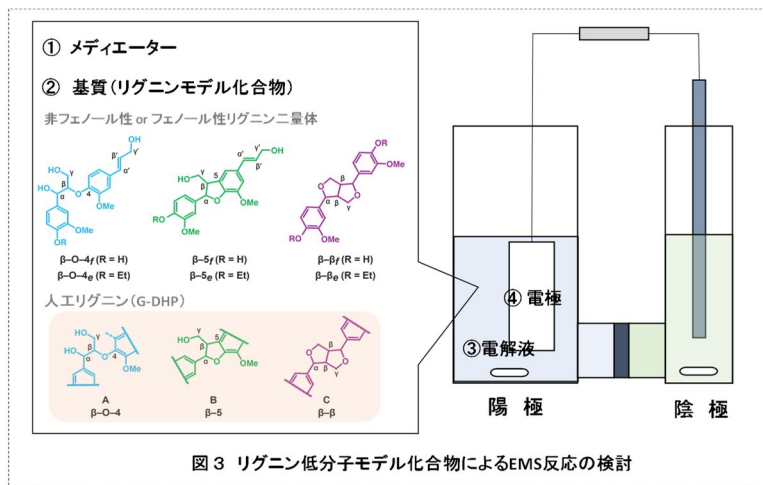


3. 研究の方法

研究開始当初、リグニンの EMS 反応は、メディエーター、基質、電解液、電極の影響を大きく受けることが漠然と理解されていたものの、それに関する知見は、皆無に近いのが現状であった。そこで、本研究では、基質として、リグニンモデル化合物(非フェノール性、もしくはリグニン二量体モデル化合物と人工リグニン(DHP))を用いて、図3のようなH型セルを用いる反応系で、メディエーターの影響の検討(言い換えれば、メディエーターのスクリーニング)を中

心に検討した(図3)。

具体的には、Cyclic Voltammetry (CV)により、EMS 反応の適用電位を決定した後、次いで、リグニンモデル化合物の EMS 反応(定電位電解)を行い、HSQC NMR スペクトル、GPC 測定などによる EMS 反応生成物の解析を行った。

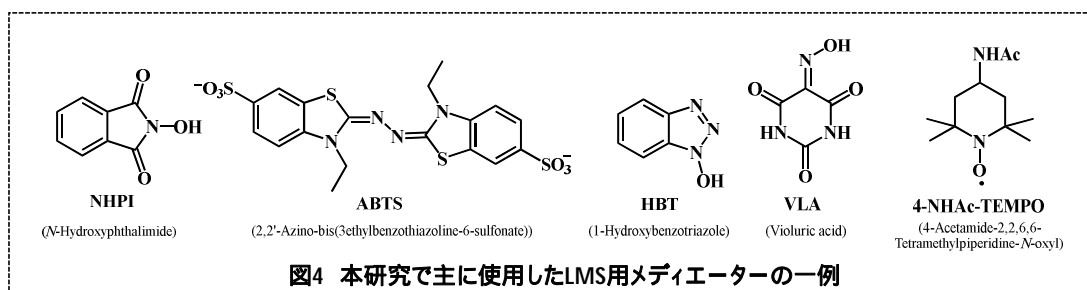


4. 研究成果

本研究の研究成果をメディエーター別に、以下に簡単に述べる。

(1) LMS 反应用メディエーターによる EMS 反応の検討

EMS 反応は、LMS 反応の酵素部分を電極で置き換えた反応であるため、LMS 反応で用いられているメディエーターは、EMS 反応のメディエーターとして有望であると考えられる。例えば、LMS 反应用メディエーターとして、NHPI、ABTS、HBT、VLA、4-NHAc-TEMPO など知られている(図4)。そこで、最初に、LMS 反应用メディエーターによる β-O-4 型二量体モデル化合物の EMS 反応を検討し、研究開始前に、NHPI による EMS 反応において、C α -カルボニル化反応が高選択的、かつ高収率に進行することが判明していた。¹⁾



この結果を受けて、次に、グアイアシル型リグニン (G-DHP) の NHPI による EMS 反応を検討した。G-DHP の NHPI による EMS 反応(室温)では、約 15%程度が可溶化した。また、不溶部を HSQC-NMR スペクトルにより分析したところ、G 核芳香核の酸化、C α ケト型 β-O-4 型構造由来のシグナルなどが認められ、この反応では、C α -カルボニル化反応、C α -C β 開裂反応、末端酸化反応が進行していることが判明した。この結果は、EMS 反応が高分子リグニンに適用可能であることを示唆するとともに、および、実際の高分子リグニンの反応では、複数の化学反応が競争的に進行することを改めて確認された。また、反応温度 60 °C でも、EMS 反応は進行し、EMS 反応では幅広い反応条件の設定が可能であった。

表1 EMS反応不溶物のHSQC NMR および GPC解析結果の一例

	メディエーター	収率 (%)	C α 酸化 (%)	C α -C β 開裂 (%)	末端酸化 (%)	合計 (%)	Mn (kDa)	Mw/Mn
基質 (G-DHP)	-	-	0	0	1.1	1.1	3.3	1.8
EMS反応不溶物	NHPI	84.8	0.6	4.3	5.3	10.2	3.6	1.6
EMS反応不溶物	4-NHAc-TEMPO	89.5	<0.5	<0.5	2.8	<3.8	3.1	1.6

一方、G-DHP の 4-NHAc-TEMPO による EMS 反応では、約 10%程度が可溶化した。不溶

部を HSQC-NMR スペクトルにより分析したところ、特定の溶媒系では、C α -カルボニル化反応と C α -C β 開裂反応はほとんど進行せず、末端酸化反応が優先的に進行していることが判明した。この結果は、EMS 反応の反応選択性は、メディエーターの種類に大きく影響されることを示唆した。

(2) 遷移金属錯体メディエーターによる EMS 反応の検討

EMS 反応の LMS 反応に対する優位性の一つとして、酸化還元電位の高いメディエーターも使用可能である点が挙げられる。そこで、遷移金属錯体メディエーター、例えば、鉄ビピリジル錯体 Fe(bpy)₃、マンガンビピリジル錯体 Mn(bpy)₃ など(図5)による β -O-4 型二量体モデル化合物の EMS 反応を検討した。その結果、これらの反応では、C α -カルボニル化反応と C α -C β 開裂反応が競争的に進行すること(言い換えれば、反応選択性は低かった) および Fe(bpy)₃ による EMS 反応は Mn(bpy)₃ による EMS 反応より効率的に進行することが判明した。

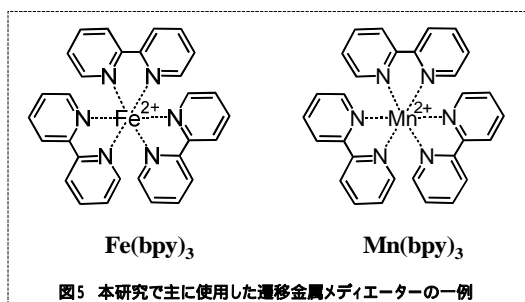


図5 本研究で主に使用した遷移金属メディエーターの一例

次に、Fe(bpy)₃ による G-DHP の EMS 反応を検討したところ、約 20%程度が可溶化し、4-NHAc-TEMPO による EMS 反応の結果と同様な反応挙動を示した。このことは、 β -O-4 型二量体モデル化合物の EMS 反応結果が、必ずしも G-DHP の EMS 反応結果に直接的に反映されないこと、言い換えれば、リグニンの EMS 反応では、基質(リグニン)の影響も大きいこと示唆した。また、EMS 反応では、LMS 反応で使用できない酸化還元電位の高いメディエーターも使用可能であることを確認できた。

表2 EMS反応不溶物のHSQC NMR および GPC解析結果の一例

	メディエーター	収率 (%)	C α 酸化 (%)	C α -C β 開裂 (%)	末端酸化 (%)	合計 (%)	Mn (kDa)	Mw/Mn
基質(G-DHP)	-	-	0	0	1.1	1.1	3.3	1.8
EMS反応不溶物	Fe(bpy) ₃	78.7	<0.5	<0.5	3.7	4.7	3.6	1.8

(3) リグニン低分子分解物(天然系メディエーター)による EMS 反応の検討

自然界の微生物によるリグニン分解では、分解中に生成するリグニン低分子分解物(特に、低分子フェノール化合物)がメディエーターとして働き、効率的なリグニン分解が行われていると考えられている。そこで、MV や SV などのリグニン低分子分解物(図6)の EMS 反応のメディエーターとしての適用を検討した。なお、この EMS 反応では、メディエーターが天然に存在する化合物であり、安全性が高い(=生分解性を有する)ことも大きな特徴の一つである。なお、ここでは、(2)の EMS 反応における基質の影響結果を受け、高分子リグニンの反応性の検討を重視し、G-DHP の EMS 反応を検討した。

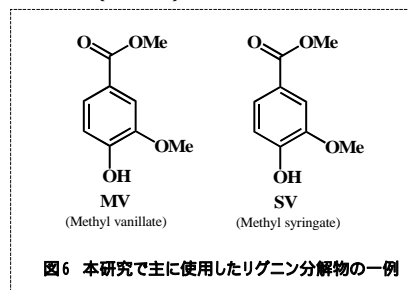


図6 本研究で主に使用したリグニン分解物の一例

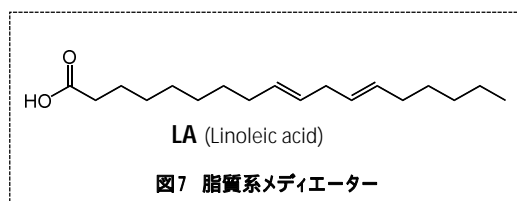
G-DHP の MV による EMS 反応では、約 35%程度が可溶化し、リグニン酸化能を示した。また、不溶部を HSQC-NMR スペクトルにより分析したところ、C α -カルボニル化構造はほとんど見当たらず、G 核芳香核の酸化、レジノール構造(β - β 型構造)の著しい減少、および末端酸化が進行していることが判明した。

一方、SV による G-DHP の EMS 反応では、約 26%程度が可溶化し、不溶物の G 核酸化率、

末端酸化率も高く、リグニン酸化能を示した。SV による EMS 反応でも、C α -カルボニル化構造は見当たらず、レジノール構造 (β - β 型構造) の著しい減少が特徴的であった。このことは、リグニン低分子分解物が、自然界における微生物分解でもメディエーターとして機能していることを示唆した。

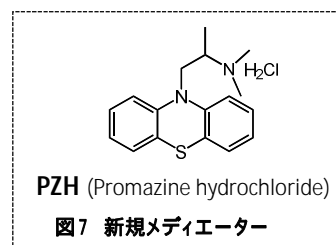
(4) 脂質化合物 (天然系メディエーター) による EMS 反応

一部の白色腐朽菌のリグニン分解では、脂質化合物がメディエーターと作用することが示唆されている。そこで、長鎖不飽和脂肪酸である LA (図7) の EMS 反応のメディエーターとしての適性を調べた。LA の CV 測定では、検討した反応系では、明確な酸化ピークは認められなかった。そのため、暫定的な電位で、G-DHP の LA による EMS 反応を行ったが、G 核酸化の進行が若干認められるものの、反応はほとんど進行しなかった。一方、予備実験では、二量体モデル化合物の LA による EMS 反応では、酸化反応の進行を確認できたことから、今後、LA による EMS 反応の場合、基質の影響が非常に大きく、G-DHP の反応の場合、新しい反応系の構築が必要であることが示唆された。



(5) 新規メディエーターによる EMS 反応の検討

リグニンの EMS 反応において、反応の高選択性と高効率を両立できるメディエーターの探索は重要な課題である。そこで、新規メディエーターとして PZH (図8) を検討した。G-DHP の PZH による EMS 反応を、PZH の第1酸化電位付近の電位と第2酸化電位付近の電位の2種類の適用電位で検討した。その結果、第1酸化電位付近の EMS 反応と第2酸化電位付近の EMS 反応で異なる生成物を与えることが判明した。このことは、適用電位も EMS 反応の重要な反応因子であることを示唆した。



以上、本研究の結果、リグニンのモデル化合物の EMS 反応におけるメディエーターを中心として反応因子の影響を種々明らかにすることができた。また、リグニンの EMS 反応に有用なメディエーターとして、NHPI、PZH などが有望であることが示唆された。最近、リグニンの EMS 反応については、研究開始時と異なり、報告例が見られるようになってきた。今後、本研究の研究成果が、「環境に優しいリグニンの工業的な変性・分解プロセス」の実用化の一助となることを望みたい。

<引用文献>

1. Shiraiishi, T., Sannami, Y., Kamitakahara, H., Takano, T. (2013) Comparison of a series of laccase mediators in the electro-oxidation reactions of non-phenolic lignin model compounds. *Electrochim. Acta* 106: 440-446.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 謝冰、飛松裕基、寺本好邦、高野俊幸
2. 発表標題 リグニンモデル化合物の電解酸化における新規メディエーターの評価
3. 学会等名 第87回紙パルプ研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 謝冰、飛松裕基、寺本好邦、高野俊幸
2. 発表標題 新規メディエーター (promazine hydrochloride) によるリグニンの電解酸化
3. 学会等名 第65回リグニン討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中健一郎、飛松裕基、上高原浩、高野俊幸
2. 発表標題 天然系メディエーターによるリグニン電解酸化の検討 - G核およびS核メディエーターの比較 -
3. 学会等名 第86回紙パルプ研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenichiro Naka, Yuki Tobinatsu, Hiroshi Kamitakahara, Yoshikuni Teramoto, Toshiyuki Takano
2. 発表標題 Electro-oxidation of artificial lignin with natural mediators (phenolic compounds)
3. 学会等名 1st International Lignin Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Bing Xie, Yuki Tobimatsu, Hiroshi Kamitakahara, Yoshikuni Teramoto, Toshiyuki Takano
2. 発表標題 Electro-oxidation of artificial lignin with mediators (promazine hydrochloride, linoleic acid)
3. 学会等名 1st International Lignin Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sayaka Sakurai, Yuki Tobimatsu, Hiroshi Kamitakahara, Yoshikuni Teramoto, Toshiyuki Takano
2. 発表標題 Synthesis of new phenyl glycoside type LCC model compounds for NMR analysis of native LCC
3. 学会等名 1st International Lignin Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 謝冰、飛松裕基、寺本好邦、高野俊幸
2. 発表標題 リグニンモデル化合物の電解酸化における新規メディエーターの評価
3. 学会等名 第70回日本木材学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中健一郎、飛松裕基、上高原浩、高野俊幸
2. 発表標題 天然系メディエーターによるリグニン電解酸化の検討
3. 学会等名 第85回紙パルプ研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中健一郎、飛松裕基、上高原浩、高野俊幸
2. 発表標題 天然系メディエーターによるリグニン電解酸化の検討
3. 学会等名 第63回リグニン討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻井沙也佳、水上貴仁、飛松裕基、上高原浩、高野俊幸
2. 発表標題 フェニルグリコシド型LCC（リグニン-多糖複合体）解析用モデル化合物の合成
3. 学会等名 第63回リグニン討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平野義貴、上高原浩、高野俊幸
2. 発表標題 量子化学計算によるリグニンの間接電解反応機構/反応性の解析
3. 学会等名 第68回日本木材学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高野俊幸	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 228 (担当分: 8)
3. 書名 リグニンの利活用のための最新技術動向 第3章リグニンの分解・抽出 5. リグニンの電解酸化	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	上高原 浩 (Kamitakahara Hiroshi) (10293911)	京都大学・農学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	飛松 裕基 (Tobimasyu Yuki) (20734221)	京都大学・生存圏研究所・准教授 (14301)	
研究分担者	榊原 圭太 (Sakakibara Keita) (20618649)	京都大学・化学研究所・助教 (14301)	榊原先生は、ご転職に伴い、2020年度、研究分担者からはずれた。

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関