

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04371

研究課題名(和文)木質バイオマスから創生する次世代化学品の生産基盤の確立と環境負荷低減技術への応用

研究課題名(英文) Transformation of lignin-derived aromatics in wood biomass into nonaromatic polymeric substances with fluorescent activities

研究代表者

岩淵 範之 (IWABUCHI, Noriyuki)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：90328708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、バイオ・非バイオプロセスで低分子リグニン類を開環し、アミン・アミノ酸類と重合させることで、世界初の非ベンゼン性有機蛍光物質(NAPSFA)を生産できることを見出している。本研究では、NAPSFAの生産基盤を検討し、また原料としての木質バイオマスや食品バイオマス等の廃棄物の有用性を検討した。さらに研究終盤では、NAPSFAの安全性も検討した。その結果、NAPSFAの最も効果的な生産条件を確立すると共に、本物質は、変異原性が無く、また無刺激物であり、従来品に比べ極めて生体毒性が低いことから、発光や可視化の従来用途に加え、新規用途が期待される有用な次世代化成品であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有機蛍光物質は、バイオ医薬、バイオイメージング、有機ELなど応用可能な高機能物質であり、従来型のものは基本的にその分子内にベンゼン環構造を含んでいる。これに対しわれわれは、自身の分子構造にベンゼン環を含まないNAPSFAを見出した。当初、NAPSFAは特殊な微生物が生産するレアな物質と考えられていたが、本研究により、ベンゼン環構造を含まない蛍光物質群が化学合成できることが示され、有機蛍光物質には、ベンゼン系および非ベンゼン系の物質群が存在することが明らかとなった。また、NAPSFAは極めて安全性が高いと考えられることから、今後の応用が期待される有用な次世代化成品であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We recently reported that *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 can transform the lignin-derived aromatic compound syringaldehyde (SYAL) into non-aromatic polymeric substances with fluorescent activity (NAPSFA). We subsequently showed that the NAPSFA are produced by a non-biological process. The NAPSFA are particularly rare organic substances that fluoresce despite the absence of aromatic rings. In this study, we examined most effective productions of NAPSFA using various biomass.

When *Pseudomonas* sp. ITH-B52 was cultured in LB broth supplemented with syringic acid, the NAPSFA with the highest fluorescence intensity were produced. The NAPSFA used for further downstream analyses. On the other hand, safety examinations revealed that the NAPSFA has extremely low biological toxicity compared to conventional products. These results suggested that the NAPSFA is a useful next-generation chemical product that is expected to have new uses.

研究分野：環境バイオテクノロジー

キーワード：リグニン 未利用バイオマス 有機蛍光物質 非ベンゼン性

1. 研究開始当初の背景

環境省によると、近年の世界全体での森林の純消失面積は全体の約 1.3%と見積もられていることから(FAO 世界森林資源評価 2010)、今後は、植物バイオマス利用のカーボンニュートラルの概念が崩れると予想される。ゆえに今後の植物バイオマスの利用には、カーボンマイナスの概念を取り入れた、「植物バイオマスのエネルギー利用を少なくし、炭素をなるべく CO₂ の形で大気圏に排出しないで、直接、有用な次世代化学品に変換することができる新技術の開発」が必要である。

われわれは、有用な次世代化学品として、有機蛍光物質ながらその分子構造にベンゼン環構造を含まない新規有機蛍光物質、Non-Aromatic Polymeric Substances with Fluorescent activity; NAPSFA を有しており、これは、エネルギー利用よりも付加価値の高い利用法に相当する。ゆえに本 NAPSFA を効果的に生産し、有効利用するための研究が必要となる。

有機蛍光物質は、バイオ医薬、バイオイメージング、有機 EL など応用可能な高機能物質であり、従来型のもは基本的にその分子内にベンゼン環構造を含んでいる。これに対しわれわれは、自身の分子構造にベンゼン環を含まない NAPSFA を、リグニン由来の芳香族炭化水素を原料として作り出せる微生物 *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株を単離した(Iwabuchi et al. 2015, 特許第 6090838 号)。当初、本化合物は特殊な微生物が生産するレアな物質と考えられていたが、その後のわれわれ、および Ye et al.の研究により、ベンゼン環構造を含まない蛍光物質群が化学合成できることが示された(Iwabuchi et al. 2016, 特許第 6344647 号, 特許第 6813885 号, Ye et al. 2017 DOI: 10.1039/c7py00154a)。これらのことから有機蛍光物質には、ベンゼン系および非ベンゼン系の物質群が存在することが明らかとなった。

非ベンゼン系有機蛍光物質は、主に高分子ポリマーであり、外側の分子表面の官能基により水溶性にすることや毒性の低減化・生体適合性を調節することが可能であり、また内部に分子を取り込む分子カプセル化ができるため、薬剤や遺伝子の輸送媒体としての利用なども含め、幅広い応用が期待できる新規の次世代化学品である。

一方で、われわれは、非ベンゼン系有機蛍光物質群を植物バイオマス由来のリグニン画分類から生産する技術をいくつか有している。これは、リグニン画分を低分子化し、さらに特殊な微生物で処理することで、芳香環を開環させ、重合させるものであり、当グループのオリジナルの技術である。本技術は、リグニンの高機能化、有効利用という点において、他に対し先導性、優位性の高い独創的なものである。そこで本研究では、この技術的背景を十分に生かし、原料の植物バイオマスを森林廃棄物に求め、非ベンゼン系有機蛍光物質群の生産基盤の確立を試みた。

2. 研究の目的

非ベンゼン系有機蛍光物質を、植物バイオマスから生産する場合、骨格となる主たる化合物と重合を手助けする化合物が必要となる。前者は森林廃棄物由来のリグニン画分類となるが、その他に重合の相手となるアミノ酸系の物質が必要であり、本研究ではその供給源を食品廃棄物由来のアミノ酸にする予定である。

これらのことを踏まえ、本研究では、森林廃棄物と食品廃棄物を利用して、非ベンゼン系有機蛍光物質群の生産基盤を確立することを目標とし、具体的には、まず、蛍光物質として高機能かつ安全な物質を生産するための低分子リグニンとアミン・アミノ酸の組み合わせを検討した。次に、再利用する廃棄物原料の組み合わせを検討し、続いて、本物質安全性を検討した。

3. 研究の方法

(1)低分子リグニンとアミン・アミノ酸の組み合わせの検討

本有機蛍光物質群は、微生物を使ったバイオプロセス、および微生物を使わない非バイオプロセスの工程で生産できる。現在のところ、バイオプロセスでは、特許第 6813885 号の製造方法、すなわち、出発物質を低分子リグニン的一种であるシリング酸とし、

Pseudomonas sp. ITH-B52 をつかったバイオプロセスで生産される有機蛍光物質が最も機能的であると評価されている。今回、本結果を再評価するため、シリングアルデヒド、シリング酸など種々の低分子リグニンを基質として、LB 培地、TSB 培地などでの ITH-B52 株の蛍光物質の生産について検討した。

一方、非バイオプロセス条件では、組み合わせ検討が容易であることから、21 種類の低分子リグニンを含めた芳香族化合物および牛乳より調製したカゼイン酵素分解物を基質として同様の検討を行った。

(2)安全性試験

Pseudomonas sp. ITH-B52 をシリング酸を添加した LB 培地で培養し、上述した方法で部分精製したサンプルの 5%水溶液を母液として、ウサギ目刺激性試験を行った。本試験は、GLP 相当試験として行われ、試験は日本白色種ウサギ (Tla:JW) を用いて検討した。被験物質 0.1 mL をウサギ (雌 3 匹) の左眼に点眼 (投与) し、投与 1、24、48 及び 72 時間後の眼刺激性を Draize 法に従って観察した。

4. 研究成果

(1)低分子リグニンとアミン・アミノ酸の組み合わせ及び廃棄物の検討

研究の方法に記載した要領で実験を行った結果、これまで同様、LB 培地にシリング酸を添加条件が最も強度の高い蛍光物質が生産されたことから、本サンプルを用いて以降の実験を行った。

本有機蛍光物質は pH2 ~ 12 の範囲で極めて安定で、また水、メタノール、DMSO に溶解することが判明した。中でも水への溶解性は高く、10%(100 g/L)まで溶解可能であった。バイオプロセスおよび非バイオプロセスで生産された調製液中の未反応のシリング酸は、ポリフェノールの吸着能を有し、食品添加物のろ過助剤として使用が認められているポリビニルピロリドン (PVPP) の添加、遠心ろ過により除去可能であり、さらにろ液を DMSO に転溶させることで、未反応のトリプトンや培地中の成分を除去した蛍光物質精製品を簡便な操作で精製することができた。蛍光物質精製品 (純度約 90 ~ 95%) は調製液 1 L から約 6g 入手可能であった。これにより、後続の安全性試験が可能となった。

現在のところ、上述した特許第 6813885 号の製造方法が最も高機能であることが再確認されたことで、本項目では、主骨格側の低分子リグニンの原材料を森林廃棄物に、およびインターカレーターとして重合を手助けするアミノ酸、ペプチド供給源の物質の原材料を食品廃棄物に求める生産方法の検討を行う計画を立てた。

一方で、実際の実験に着手する前に、キノコ廃菌床の熱水抽出物に数 ~ 数十 nmol/L 程度のシリング酸やバニリン酸が含まれることが、日本食品科学工学会第 68 回(2021)大会で報告された。廃菌床は、有効な活用法が求められている森林由来の産業廃棄物であり、熱水抽出でシリング酸等が水相中に遊離してくることは、当初想定していた木粉廃棄物や廃茶葉などより低分子リグニン抽出の工程が簡便であることから、廃菌床を第一選択肢して検討することとした。

千葉県佐倉市、神奈川県愛甲郡愛川町のキノコ業者、キノコ農家よりシイタケ栽培後の廃菌床を入手し、粉体化した後、10%(w/v)で LB 培地に直接添加し、オートクレーブにより熱水抽出を試みた。得られた LB 培地を使って、バイオプロセス、非バイオプロセスにより蛍光物質が生産されるか否かを検討した。その結果、現在までに供試した限り、用いたサンプルにより差はあるものの、総じて蛍光物質が生産されることが示唆された。

牛乳廃棄物の原料としての有用性の検討では、市販の牛乳を用い、水で 3 倍に希釈後、酢酸を

添加して pH4.6 に調整した。静置後、沈殿物を、メタノール、ジエチルエーテル-メタノール混液(4:1=v/v)、アセトンで順次洗浄し、風乾して粗カゼインを入手した(牛乳 1L から 37.8g)。次いで、市販パンクレアチン酵素を用いて、40°C、6 時間反応させ、粗カゼイン-パンクレアチン分解液を調製した。これを各種芳香族化合物と反応 pH を変化させながら、蛍光発光試験を試みたところ、シリング酸との混合(pH10)が最も強い蛍光を示し、これまでとほぼ同等の蛍光物質の生産が可能であることが判明した。

(2)安全性試験

被験物質投与眼において、投与 1、24、48 及び 72 時間後の観察でいずれの動物にも角膜、虹彩及び結膜に刺激反応は認められず、Maximum mean total score (MMTS) は 0 であった。これらの結果から、本被験物質はウサギの眼に対して刺激性を示さず、Kay and Calandra の方法に従った刺激性区分は、暫定評価及び最終評価ともに「刺激性なし」と判断された。なお、いずれの動物においても一般状態及び体重に異常は認められなかった。ここから、本試験条件下において、本サンプルはウサギの眼に対して「刺激性なし」と判断された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 岩淵範之	4. 巻 -
2. 論文標題 低分子リグニンからの非ベンゼン性有機蛍光物質の微生物による生産とその応用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 バイオマス利用研究	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩淵範之
2. 発表標題 低分子リグニンからの非ベンゼン性有機蛍光物質の微生物による生産とその応用
3. 学会等名 第115回バイオマス利用研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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	松藤 寛 (Matsufuji Hiroshi) (70287605)	日本大学・生物資源科学部・教授 (32665)	

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
---------	---------