

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：12605

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22591

研究課題名(和文) バイオマス細胞壁中に局所的に分布する無機物及びタンパク質が熱化学変換に及ぼす影響

研究課題名(英文) Influence of inorganics and protein, locally distributed within biomass cell wall, on the thermochemical conversion

研究代表者

高田 昌嗣 (Takada, Masatsugu)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00872988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：バイオマスの主要細胞壁構成成分であるリグニンから、有用物質の創製に向けて、熱化学処理による脱リグニンが検討されている。バイオマス細胞壁に微量だが局所的に分布する無機物及びタンパク質が熱化学処理(超臨界メタノール処理(270 /30分))での脱リグニンに及ぼす影響は不明な点が多く、本研究はその解明を目的とした。その結果、無機物による二次生成物の生成への寄与や、タンパク質の脱リグニン率向上への寄与が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

死細胞の集合体である木部細胞壁中における、生命活動の痕跡である無機物とタンパク質が熱化学処理での分解機構に影響を及ぼす、という知見は学術的意義が高い。また両成分は生育環境条件が及ぼす影響が大きいと予想され、熱化学処理に適した両成分の分布や構造の制御に関する新たな研究分野の探索も期待される。さらに、昨今エネルギー作物と期待される被子植物単子葉類の植物は両成分の含有量が多く、本研究成果は社会的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：Decomposition of lignin, a major cell wall component of woody biomass, by thermochemical treatment has been investigated for the conversion to valuable chemicals. The influence of inorganics and proteins, which are locally distributed within biomass cell walls, on delignification by thermochemical treatment are not elucidated yet. In this study, we investigated the influence of these substances on the delignification behavior by supercritical methanol treatment (270 /30 min). As a result, it was apparent that the inorganics affected the formation of secondary products, and the proteins enhanced the delignification rate.

研究分野：バイオマス科学

キーワード：バイオマス 脱リグニン 熱化学変換 トポ化学 微量成分 無機物 タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

リグニンから有用物質の創製に向けて、水熱処理等の熱化学処理による脱リグニンが検討されている。近年、高温での熱分解処理にて、無機物やタンパク質が炭化物生成に影響することが指摘されているが、脱リグニンに用いる低温の熱化学処理での影響は検討されていない。また、無機物及びタンパク質は樹体全体としては微量だが、物質流動の要所に局在する。そのため、生成した炭化物が反応溶媒や分解生成物の流動性を低下させ、結果的に脱リグニンに悪影響を及ぼすと予想されるが、詳細は不明である。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究の目的は、細胞壁中に局在する微量成分が熱化学変換による脱リグニン挙動に及ぼす影響の解明である。なお、熱化学処理には超臨界メタノール処理を用いる。バイオマスのケミカルス変換に関する研究において、化学と組織形態学を融合した「トポ化学」的視点から議論した例はほとんど見られず、独自性が高い。また、樹木は死細胞の集合体であり、生命活動に必要な無機物やタンパク質含量は微量であることから、生きている植物に比べて詳細な情報が少なく、得られる知見は組織形態学において学術的にも新たな知見がもたらされ、新たな視点・分野の創造に繋がる。

### 3. 研究の方法

バイオマスからの熱化学処理による高効率な脱リグニンの達成に向けて、バイオマス細胞壁中に局在する無機物及びタンパク質が熱化学処理における脱リグニン挙動にどのような影響を及ぼすか、(1) 無機物が脱リグニンに及ぼす影響、(2) タンパク質が熱化学処理による脱リグニンに及ぼす影響、の2ステップに分けて検討した。

#### (1) 無機物が熱化学変換による脱リグニンに及ぼす影響：

ブナ (*Fagus crenata*) 辺材から調製した木粉をアセトン抽出し、得られた脱脂木粉 150 mg をメタノール 4.9 mL と共に 5 mL 容バッチ式反応管に封入し、270°Cの塩浴中に所定時間浸漬することで超臨界メタノール処理 (270°C/27MPa ; Tc 239°C、Pc 8.09MPa) を行った。その後、水浴で冷却することで反応を停止し、得られた反応物をメタノール可溶部と不溶残渣とに分画した。不溶残渣に対し、Klason 法及びその処理液の糖分析を行うことで、リグニン、ヘミセルロース及びセルロース含有量を評価した。不溶残渣中の残存リグニン量から脱リグニン率を算出した。また、不溶残渣をエポキシ樹脂で包埋し、ウルトラマイクロームで作製した 0.5µm 厚の薄切片を作成し、紫外線 (UV) 顕微鏡 MSP 800 (Carl Zeiss) を用いて UV 波長 280±5 nm にて観察した。さらに、無機物の影響を理解するための実験として、希酸処理により、細胞壁構造及び他の化学組成成分に極力影響を与えることなく、無機成分を除去 (脱ミネラル) した。得られた脱ミネラル木粉を熱化学処理に供し、未処理木粉と脱リグニン挙動を比較した。

#### (2) タンパク質が熱化学変換による脱リグニンに及ぼす影響：

スギ (*Cryptomeria japonica*) 辺材から調製した木粉をアセトン抽出し、得られた脱脂木粉 150 mg にタンパク質 (牛血清アルブミン (BSA) 及び大豆タンパク質 (SP)) を 10%または 20%添加し、メタノール 4.9 mL と共に 5 mL 容バッチ式反応管に封入し、270°Cの塩浴中に 30 分間浸漬することで超臨界メタノール処理 (270°C/27MPa) を行った。その後、水浴で冷却することで反応を停止し、得られた反応物をメタノール可溶部と不溶残渣とに分画した。不溶残渣に対し、Klason 法及びその処理液の糖分析を行うことで、リグニン、ヘミセルロース及びセルロース含有量を評価した。不溶残渣中の残存リグニン量から脱リグニン率を算出した。メタノール可溶部に対し、ゲル濾過クロマトグラフィ (GPC)、ガスクロマトグラフィ質量分析 (GC-MS) 及び液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いて構造解析を行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) 無機物が熱化学変換による脱リグニンに及ぼす影響

ブナを超臨界メタノール処理した際の不溶残渣の化学組成を図1に示す。処理の進行に伴い、リグニンが初期の段階で急激に溶出しているが、5分以降はわずかな溶出に留まっており、30分の処理で脱リグニン率は71.6%に達している。一方、ヘミセルロース及びセルロースはそれほど分解・溶出していない。

ブナ不溶残渣のUV顕微鏡画像を図2に示す。樹木細胞壁構成成分のうち芳香族高分子であるリグニンのみがUVを吸収するため、黒色部がリグニンの存在を示している。処理の進行に伴い、木部繊維二次壁、道管二次壁、細胞間層のいずれの組織部位でもUV吸光度が減少し、脱リグニンの進行が認められる。脱リグニ

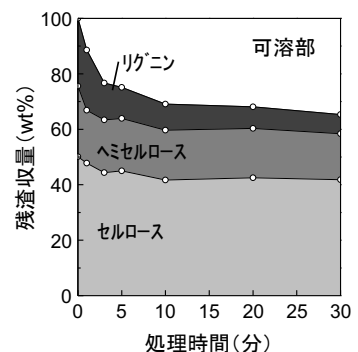


図1 ブナの超臨界メタノール処理による不溶残渣の化学組成

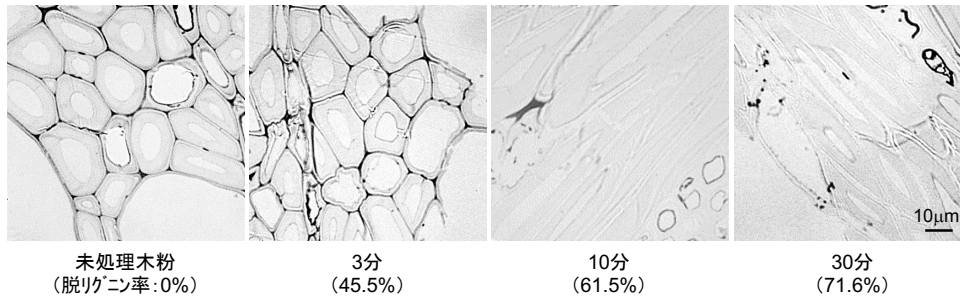


図2 プナの超臨界メタノール処理不溶残渣の紫外線顕微鏡画像( $\lambda = 280 \pm 5\text{nm}$ )

ンが70%以上進行した30分処理残渣では二次壁のみならず、セルコーナ一部での細胞間層でもほとんどUV吸収が認められず、リグニンが除去されていることがわかる。このようにいずれの組織部位でも脱リグニンが大きく進行していたにも関わらず、最終的な脱リグニン率は71.6%に留まっていた。

一方で、30分処理残渣の柔細胞及び木部繊維のUV顕微鏡画像を図3に示す。特に、柔細胞の内腔に強いUV吸収を示す部位が見られる。柔細胞の内腔にはフェノール性物質が存在することが知られているが[1]、本実験では予めアセトン抽出しており、処理前の柔細胞ではこのような物質は観察されていない。したがって、UV吸収を示す物質は超臨界メタノール処理の過程で生成したものであると思われる。しかし、UV吸収スペクトルは二次壁や細胞間層リグニンのものと異なっており、リグニンもしくは糖由来の生成物であると考えられる。この生成物はおそらくKlason法でのリグニンの定量に影響し、脱リグニン率71.6%と低い値になっていると推察した。

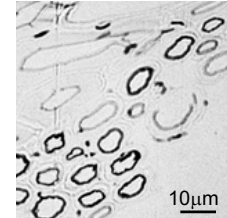


図3 プナの超臨界メタノール処理(30分)不溶残渣のUV顕微鏡画像( $\lambda = 280\text{nm}$ )

柔細胞の内腔にはアモルファスレイヤーと呼ばれる無機物に富む層が存在する[2]。そこで、無機物の存在がこのUV吸収を示す物質の形成に及ぼす影響を明らかにするため、希酸処理により脱ミネラル木粉を調製し、同様に超臨界メタノール処理(270°C/27MPa)に供した。得られた不溶残渣のUV顕微鏡画像を図4に示す。脱ミネラル処理した木粉の不溶残渣では、柔細胞内腔の生成物が明確に抑制されている。したがって、柔細胞内腔に多く分布する無機物がUV吸収を示す物質の生成に寄与している可能性が示唆された。なお、依然柔細胞内腔にUV吸収を示す物質の生成が認められており、無機物と同様に柔細胞内腔に多く分布するタンパク質の影響も予想され、その詳細の解明は今後の課題である。

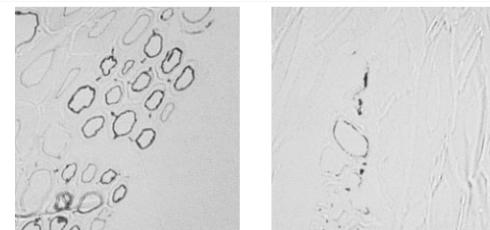


図4 プナ木粉及び脱ミネラル木粉を超臨界メタノール処理した際の不溶残渣のUV顕微鏡画像

## (2) タンパク質が熱化学変換による脱リグニンに及ぼす影響

スギ木粉にBSA(図5-(a))もしくはSP(図5-(b))を添加した試料を超臨界メタノール処理した際の不溶残渣の化学組成を図1に示す。その結果、いずれのタンパク質においても、タンパク質の添加により不溶残渣のKlasonリグニン量が減少し、脱リグニン率が向上していた(図5-(c))。一方でメタノール可溶部について、HPLC分析の結果、主要なリグニン由来単量体であるコニフェニルアルコール(CA)及びその $\gamma$ -メチルエーテル(CA- $\gamma$ )の生成量が大幅に低下していた(表1)。また、糖類由来の過分解物に着目すると、フルフラール、5-HMFといったフラン類の収量

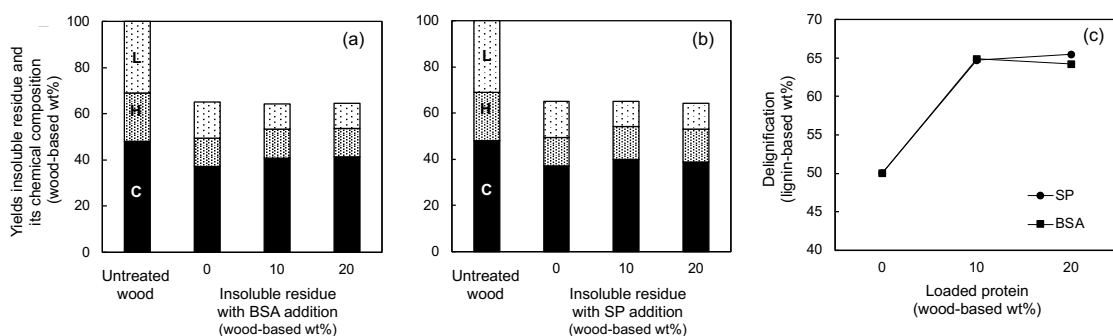


図1 タンパク質添加スギ木粉の超臨界メタノール処理(270°C/27MPa/30分)で得られた不溶残渣の収量及び化学組成 (a) BSA添加系、(b) SP添加系、(c) タンパク質添加量と脱リグニン率の相関 L、リグニン；H、ヘミセルロース；C、セルロース

が大幅に減少していた。さらに、GC-MS 分析から、タンパク質由来の窒素含有環式化合物の生成が認められた。これら不溶残渣の分析で明らかとなった脱リグニン率の向上、及び可溶部の分析で明らかとなったリグニン由来単量体 (CA 及び CA- $\gamma$ ) の収率低下の原因について、以下の通り各々考察した。

まずタンパク質添加による脱リグニン率の向上に関して、1) タンパク質-多糖類の反応に起因するチャー形成の抑制、2) タンパク質-リグニンの反応による可溶化の促進、の二つの仮説が考えられる。1つ目について、水熱処理においてフラン類がチャー形成の中間体として知られているが、Fan らはタンパク質存在条件下で、タンパク質中の

アミノ基と還元糖のカルボニル基間でのメイラード反応によりフラン類の形成が抑制され、結果的にチャーの形成が抑制されることを報告している[3]。今回の超臨界メタノール処理においても、タンパク質添加系のメタノール可溶部中のフラン類の生成は大幅に抑制されており、水熱処理と同様のチャー形成の抑制が生じていたものと考えられる。なお、モデル化合物 (ホロセルロース) を用いた検討でも、タンパク質の添加によるフラン類生成の大幅な抑制が確認された。さらに、メタノール可溶部に回収された窒素含有環式化合物は、ラジカル捕捉剤として知られており[4]、重合・高分子化の抑制に寄与し、チャー形成を抑制していたと考えられる。つまり、チャーは Klason 法でリグニンとして回収されていたため、チャー形成の抑制が Klason 法による見目の脱リグニン率の向上に寄与したと考えられる。一方、2つ目について、水熱処理でアミノ酸がリグニンカルボカチオン捕捉剤として反応する例が報告されているが[5]、今回のメタノール可溶部中に窒素含有リグニン単量体は認められなかった。

タンパク質を添加したスギを超臨界メタノール処理 (270°C/27MPa) した際のリグニン分解挙動を議論した。BSA、SP ともに添加により不溶残渣の Klason リグニン量が低下し、脱リグニン率の向上が認められた。これは糖類-タンパク質間のメイラード反応によるフラン類の抑制、及びラジカル捕捉剤である窒素含有環式化合物の生成に伴う、チャー形成の抑制が主な原因と考えられた。一方で、メタノール可溶部については、リグニン由来の主要単量体生成物である CA 及び CA- $\gamma$  の選択性が低下していた。本研究で得られた知見が、タンパク質を有する多様なバイオマス資源の有効活用に繋がることを期待される。

表 1 タンパク質添加スギ木粉の超臨界メタノール処理で得られたメタノール可溶部における主要なリグニン由来単量体及び糖由来フラン類の収率

Compounds	Yields (wt%)	
	Wood	Wood + SP
Coniferyl alcohol (CA)	0.08	0.05
CA- $\gamma$ methylated	0.20	0.03
5-Hydroxymethylfurfural	0.03	0.02
Furfural	0.16	0.05

- [1] B. J. Fergus, D. A. I. Goring: *Holzforschung*, 24, 113-117 (1970).
- [2] T. Fujii H. Harada, H. Saiki, *Mokuzai gakkaiishi*, 27, 149-156 (1981).
- [3] Y. Fan et al.: *Biomass Convers.*, 8, 909-923 (2018).
- [4] A. Kruse et al.: *Ind. Eng. Chem. Res.* 46, 87-96 (2007).
- [5] T. Pielhop et al.; *Green Chem.*, 18, 5239-5247 (2015).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takada Masatsugu, Minami Eiji, Kawamoto Haruo	4. 巻 6
2. 論文標題 Topochemistry of the Delignification of Japanese Beech (<i>Fagus crenata</i>) Wood by Supercritical Methanol Treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 20924 ~ 20930
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.1c02345	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takada Masatsugu, Okazaki Yutaka, Kawamoto Haruo, Sagawa Takashi	4. 巻 7
2. 論文標題 Tunable Light Emission from Lignin: Various Photoluminescence Properties Controlled by the Lignocellulosic Species, Extraction Method, Solvent, and Polymer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 5096 ~ 5103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.1c06104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高田昌嗣、南英治、河本晴雄
2. 発表標題 ブナの超臨界メタノール処理による脱リグニン挙動のトポ化学
3. 学会等名 第71回 日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田昌嗣、岡崎豊、河本晴雄、佐川尚
2. 発表標題 リグニンの発光特性：樹種、抽出法、溶媒及びポリマーによる発光特性の制御
3. 学会等名 第30回日本エネルギー学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田 昌嗣, 岡崎 豊, 河本 晴雄, 佐川 尚
2. 発表標題 リグニンからの発光材料の創製: 樹種、抽出法、溶媒及びポリマーによる発光特性の制御
3. 学会等名 第66回リグニン討論会(リグニン学会第3回年次大会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masatsugu Takada, Yutaka Okazaki, Haruo Kawamoto, Takashi Sagawa
2. 発表標題 Photoluminescence and chiroptical properties of various lignins in solvents
3. 学会等名 MRM2021 Materials Research Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masatsugu Takada
2. 発表標題 Topochemistry of delignification behavior of woody biomass using thermochemical treatments
3. 学会等名 Sakura Science Exchange Program (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田昌嗣, Yilin Yao, 南英治, 河本晴雄
2. 発表標題 タンパク質が超臨界メタノール処理中でのスギリグニン分解挙動に及ぼす影響
3. 学会等名 第72回 日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 リグニン含有蛍光液およびリグニン含有蛍光材料	発明者 高田昌嗣、岡崎豊	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-122045	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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