

令和元年6月15日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14955

研究課題名(和文) リグニンの分子形状を相溶ブレンド薄膜中で浮かび上がらせ可視化する

研究課題名(英文) Visualizing the molecular shape of isolated lignin in miscible blend thin films

研究代表者

寺本 好邦 (TERAMOTO, Yoshikuni)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：40415716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：リグニンは木材中においてランダムな三次元網目構造をとるとされており、その構造には未だ不明瞭な点が多い。化学分析やNMRにより、主にモノリグノール二量体間の構造データが蓄積されてきた。GPCや光散乱法も適用されてきたが、溶液中での分子の凝集が懸念される。一方、近年、合成高分子の1分子鎖が相溶ブレンドの走査型プローブ顕微鏡(SPM)により観察されている。そこで本研究では、単離リグニンの分子形状の新しい情報を得るため、酵素処理リグニン(CEL)と異種ポリマーの相溶ブレンドを構築し、SPM観察した。その結果、CELをポリマーで希釈することにより、単分子に近いCELの分子形状を観察することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題は、研究代表者らが見出してきた単離リグニンの相溶ブレンド化の手法と、SPMによる高分子の1分子イメージングを使い、単離リグニンの分子形状の理解のための新しい情報を提供するものである。本研究で手法を確立することができたため、今後のデータの蓄積によって、樹種、部位、組織等によるリグニン分子の形状の違いが明確になる可能性がある。一方、リグニンの近傍には常に多糖が共存している。多糖混在量を変化させて分子形状を可視化することによって、多糖とリグニンの共存様式にも知見を与え得る。ひいては、紙パルプ産業やバイオ燃料製造で必要とされるリグニンの化学処理の最適化につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Lignin is usually supposed to have a random three-dimensional network structure in wood, and its exact structure is still unclear. Chemical analysis and fine NMR have mainly accumulated structural data between monolignol dimers. GPC and light scattering have also been applied to isolated lignin, but there is a concern about the aggregation of the molecules in solution. On the other hand, in recent years, single molecule chain imaging of synthetic polymers has been achieved by scanning probe microscopy (SPM) for miscible blends. In this study, in order to obtain new information on the molecular shape of isolated lignin, we thus constructed miscible blends of enzyme-treated lignin (CEL) and different polymers and observed their thin films by SPM. Eventually, by diluting CEL with the miscible polymers, we succeeded in observing the molecular shape of CEL virtually regarded as a single molecule.

研究分野：バイオマス材料化学

キーワード：リグニン 相溶ブレンド 薄膜 走査型プローブ顕微鏡(SPM) 分子形状 可視化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

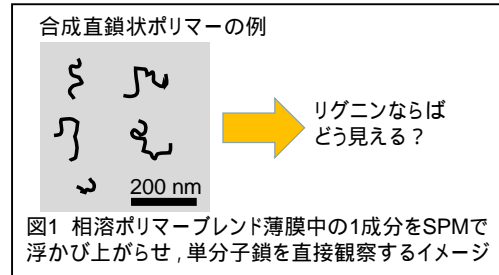
### 1. 研究開始当初の背景

高分子としてのリグニンは、モノリグニルが酵素酸化されフェノキシラジカルとなり、これがランダムなラジカルカップリングで高度に重合することにより生成する。植物の生体中では、三次元網目構造を形成していると解釈されることが多い。その分子構造を調べるためには、化学的・生物学的に分解・低分子化されたものを分析するのが定法であり、非常に多くの有用な知見が蓄積されてきた。主として結合の種類 ( $\beta$ -O-4,  $\beta$ -5,  $\beta$ - $\beta$  結合) で分類され、事実上モノリグニル単位 2 個分を描写できていることになる。これに対して、もし 3 個以上のモノリグニル単位を含む overall なリグニンの分子形状を可視化できれば、リグニン構造の理解のための新たな観点を提供できる。

研究代表者の専門は、高分子科学をベースとしたバイオマス構成分子の複合体の構築と、材料としての機能化である。研究開始までに、単離リグニンの種々の相溶ブレンド化に成功していた<sup>1-4</sup>。例えば、オルガノソルブリグニンをエステル化すれば、代表的な生分解性プラスチック(脂肪族ポリエステル)のポリカプロラクトンと相溶化できる<sup>2,3</sup>。両分子が混在しているスケールは 5 nm 以下である。相溶化によって、単離リグニンに不足している賦形化能をブレンド相手成分で補いつつ、力学物性を幅広く制御できる。

一方、近年の高分子科学における大きなトピックとして、単一高分子鎖の実像観測がある<sup>5</sup>。ブレンド薄膜や Langmuir-Blodgett (LB) 膜の走査型プローブ顕微鏡 (SPM) 観察テクニックが進展しており、ポリ(*n*-ノニルアクリレート)に少量埋め込んだポリメタクリル酸メチルの一分子イメージが報告されている(図1左のイメージ)。

研究開始当初まで、研究代表者はリグニン研究を主に材料利用の観点から行ってきたが、上述の成果と先端の高分子科学のテクニックを活用すれば、リグニンの構造研究にも貢献できるのでは? との着想に至った。すなわち、「リグニンの相溶ブレンド薄膜を作製し、そこに埋め込んだリグニン分子の形態を、試料表面の物性(粘弾性)の違いを基にして画像化できるのでは?」と考え、本課題を立案した。



### 2. 研究の目的

単離リグニンの分子構造は、これまで有機化学的合理性や平均像から表現されてきた。本研究では、リグニンの構造を、可視化された実像から明快に解明することに挑戦した。そのために、リグニンの相溶ブレンド薄膜を作り、リグニン孤立鎖の分子形状をマトリックスから浮かび上がらせ、走査型プローブ顕微鏡 (SPM) で可視化することを目指した。単離リグニン試料として、高収率で比較的化学変性が少ないと言われているセルロース酵素分解リグニン (CEL) を主な研究対象とした。具体的には、

- ・ 単離リグニンと分子レベルで相溶する非晶性且つガラス転移点 ( $T_g$ ) の低いポリマーを見出す。
- ・ スピンキャスト法でブレンドの薄膜を調製し、SPM で単離リグニンの分子形状を可視化することを目的とした。

### 3. 研究の方法

**試料調製** ヒノキ木粉 (*Chamaecyparis obtusa*, 0.2 mm 径以下, Cy と略記) あるいはユーカリ木粉 (*Eucalyptus globulus*, 0.2 mm 以下, Eu と略記) をトルエン/エタノール (2:1 in v/v) で脱脂した後、ボールミル (Fritsch 製遊星型ボールミル P6) で粉碎した; 室温下 350 rpm で 10 min 回転させた後に 10 min 休止するサイクルを繰り返し、総粉碎時間が X h となる木粉 (WXh) を調製した。WXh からのセルラーゼ処理と溶媒抽出によるリグニンの単離は、松本らの手法<sup>6</sup>を参考に行った。Cy および Eu から得られた単離リグニンを、それぞれ CyXh および EuXh とよび、CEL と総称する。CEL と相溶化させるポリマーは、ポリ (*N*-ビニルピロリドン) (PVP) とグリセリンをジメチルスルホキシド (DMSO) 溶媒中で所定の比で混合させたポリマーマトリックス (PM) とした。CEL6h と PM を DMSO 溶媒中で種々の重量比で混合し、ポリマーブレンドを調製した。

**キャラクタリゼーション** 様々な組成比のポリマーブレンド溶液をホットプレート上でキャストし、キャストフィルムとしてそれを DSC 測定に供した。試料を  $-150^{\circ}\text{C}$  から  $220^{\circ}\text{C}$  まで  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で昇温 (1st heating) して 1 min 保持、 $-150^{\circ}\text{C}$  まで約  $60^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で急冷し、 $250^{\circ}\text{C}$  まで  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で昇温 (2nd heating) した。CEL は 0.02 wt% DMSO 溶液として動的光散乱測定 (DLS) に供し、10 mM LiBr/DMSO に溶解して GPC 測定も行った。SPM 観察には、ポリマーブレンドの DMSO 溶液をマイカ上に滴下し、スピンコートした試料を用いた。こうして得られた薄膜について、タッピングモードの SPM によって位相像と高さ像を取得した。それらを ImageJ による画像解析に供した。

### 4. 研究成果

一連の CEL と PM のブレンドの DSC 分析により PM の組成を適切に選択することによって、特に CEL 低含有率のブレンドの  $T_g$  は単一かつブレンド組成に応じて系統的にシフトした。これより、相溶性を確認した。

図 2 に DLS で評価した Cy12h および Eu12h の粒子径分布を示す。これより、DMSO 溶液中で CEL はそれぞれの樹種において数 nm から数百 nm までの広い分布をとることがわかる。数百 nm 付近の大きな粒子は DMSO 溶液中で各種 CEL が凝集していることを示しており、これは溶液中で溶質・溶質間の引力的相互作用が非常に大きいためであると考えられる。

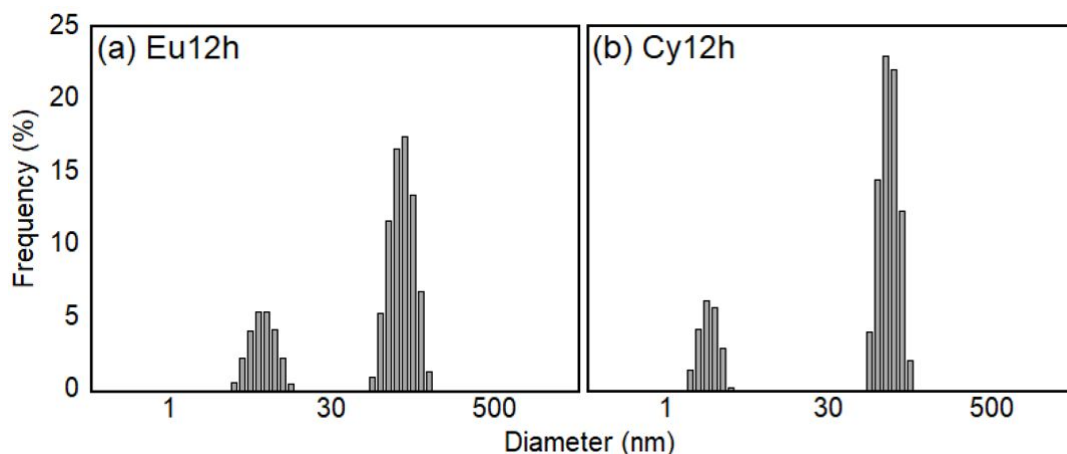


図 2 DLS で求めた(a) Cy12h および(b) Eu12h の粒度分布

GPC により、Eu12h および Cy12h の数平均分子量  $M_n$ 、重量平均分子量  $M_w$ 、多分散度  $M_w/M_n$  を求めた。データを表 1 に示す。いずれの樹種においても多分散度が大きい値をとることから、CEL の分子量自体の分布が広いが、DLS 測定の結果と同様に、溶液中 (in 10 mM LiBr/DMSO) で CEL 分子が凝集している可能性がある。

表 1 Eu12h および Cy12h について GPC (10 mM LiBr/DMSO 溶液) で見積もった分子量データ

Sample	Number average molecular weight $M_n$	Weight average molecular weight $M_w$	Polydispersity $M_w/M_n$
	$\times 10^{-4}$		
Eu12h	0.49	3.7	7.6
Cy12h	0.26	1.1	4.1

図 3 に Cy6h/PM=100/0, 30/70 および 5/95 ならびに Eu12h/PM = 1/99, 0.5/99.5 および 0.1/99.9 の SPM 像を示す。PM 非存在系である Cy6h/PM = 100/0 では、数十 nm から数  $\mu\text{m}$  のドメインが観察され、スピんキャストフィルム中で Cy6h が凝集する様子が観られた。PM 存在系の Cy6h/PM=30/70 においても、数十 nm から数  $\mu\text{m}$  のドメインが観られた。一方、PM 存在系かつ CEL 低含有率である Cy6h/PM = 5/95, Eu12h/PM = 1/99, 0.5/99.5 および 0.1/99.9 においては  $\mu\text{m}$  オーダーのドメインは観察されず、数 nm から数十 nm 程度のドメインのみが観察された。さらに、CEL 含有率の低下に伴い、 $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  あたりに観察されるドメイン数が減少する傾向も観られた。したがって、CEL の含有率の低下に伴って粒子径が縮小し、その数が減少していることから、PM 存在系で観察されたドメインも CEL であると考えられる。また CEL は、PM 非存在および CEL 含有率 30 % 程度では、DMSO 溶液中と同様にスピんキャストフィルム中でも粒子径について広い分布をとることが分かる。しかし、Cy6h/PM = 5/95, Eu12h/PM = 1/99, 0.5/99.5 および 0.1/99.9 の CEL 低含有率系においては、粒子径の縮小化に伴い、粒子径が均一化する傾向が観られた。これは PM の存在により CEL の凝集が抑制されていることを示している。

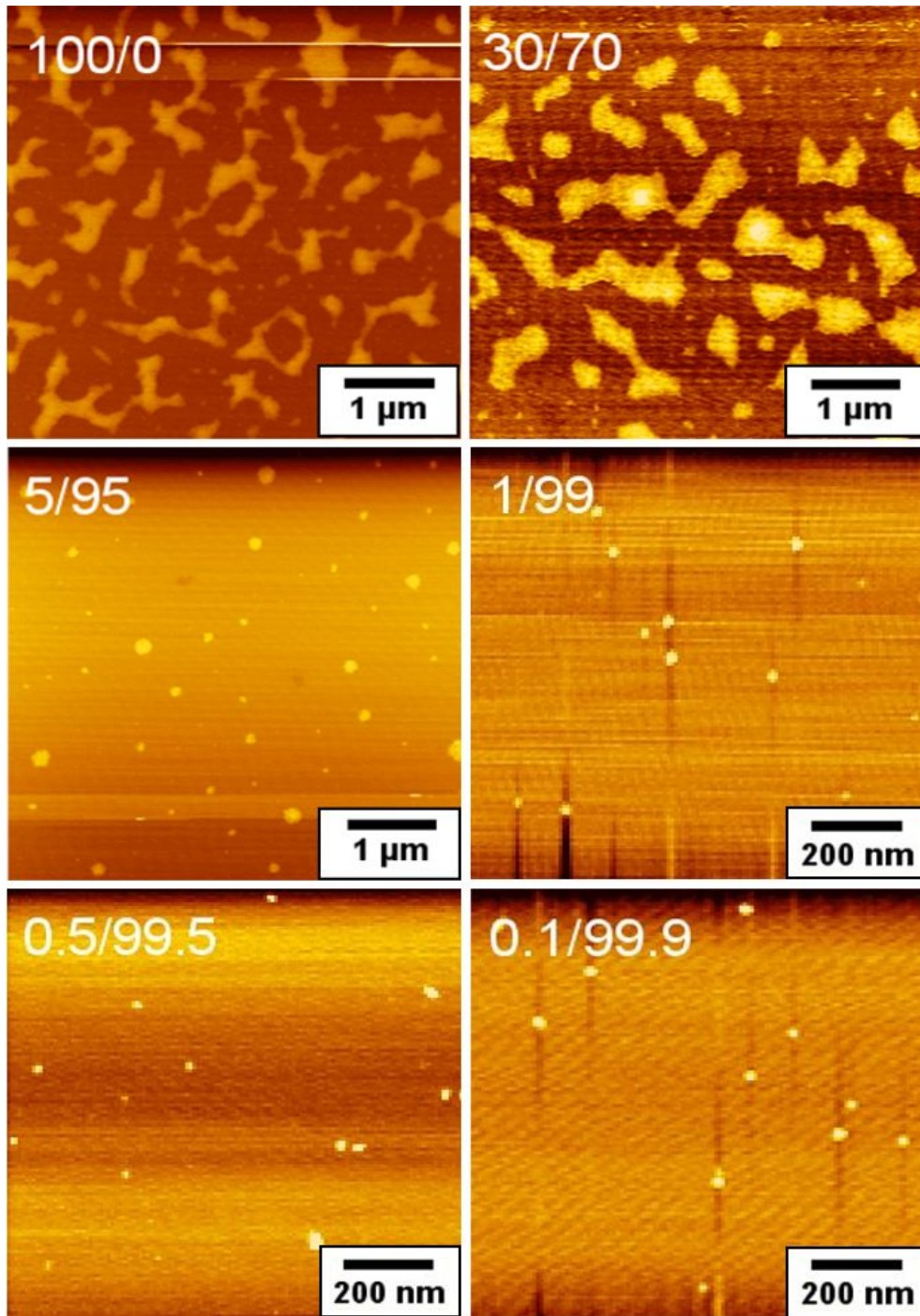


図3 ブレンドの0.1 %DMSO 溶液をスピんキャストして得た薄膜のSPM 像: Cy6h/PM = 100/0 , 30/70 , 5/95 , Eu12h/PM = 1/99 , 0.5/99.5 and 0.1/99.9 in weight

図4に CEL/PM = 1/99 , 0.5/99.5 および 0.1/99.9 の AFM 像からそれぞれ観察された約 500 個のドメインの直径と、その分布を示した。この直径は、得られたドメインの面積を画像処理ソフト Image J により取得し、ドメインと同じ面積の円の直径として算出したものである。算出した直径  $D_i$  nm の粒子が  $N_i$  個存在するとき、数平均直径  $D_n$  および重量平均直径  $D_w$  を以下のように定義し、各濃度における  $D_n$  ,  $D_w$  および多分散度  $D_w/D_n$  を表 2 に示した。また、DLS 測定で算出した粒子径についても同様の操作を行い、その  $D_n$  ,  $D_w$  および多分散度  $D_w/D_n$  を表 3 に示した。

$$D_n = \Sigma D_i N_i / \Sigma N_i$$

$$D_w = \Sigma D_i^2 N_i / \Sigma D_i N_i$$

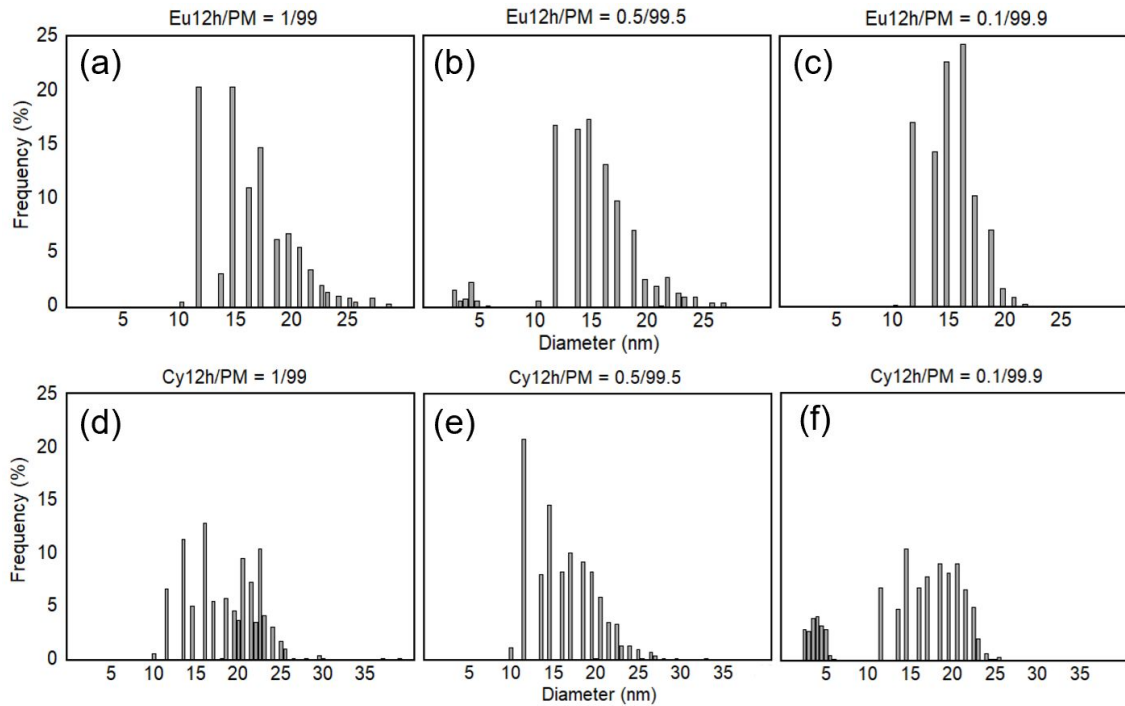


図4 CEL/PM ブレンド薄膜の SPM 像を画像解析して得た CEL と考えられる粒子径の分布

表2 SPM 像の画像解析からの数値計算の結果

Cy12h	Number average diameter $D_n$ (nm)	Weight average diameter $D_w$ (nm)	Polydispersity $D_w/D_n$
1/99	18.8	19.8	1.05
0.5/99.5	16.7	17.6	1.05
0.1/99.9	15.1	17.8	1.18

Eu12h	Number average diameter $D_n$ (nm)	Weight average diameter $D_w$ (nm)	Polydispersity $D_w/D_n$
1/99	16.6	17.3	1.05
0.5/99.5	15.0	16.2	1.08
0.1/99.9	15.3	15.6	1.02

表3 DLS データからの数値計算の結果

Sample	Number average diameter $D_n$ (nm)	Weight average diameter $D_w$ (nm)	Polydispersity $D_w/D_n$
Eu12h	78.42	104.7	1.34
Cy12h	67.49	86.49	1.28

図4と表2より、いずれの樹種においても、そのCEL含有率が低くなるにつれて $D_n$ および $D_w$ の値が減少傾向にあることが分かる。また表2および3より、DMSO溶液中では $D_n$ および $D_w$ が数十nmから数百nmであるのに対し、PM中に存在しているCELの $D_n$ および $D_w$ は数nmから数十nmとなっている。これらのことから、スピんキャストフィルムにおけるCELはPMによってその凝集が抑制されていると考えられる。

スピんキャストフィルム中でのCEL粒子のSPM像から、ImageJでアスペクト比を算出した結果を表4に示す。これより、いずれの樹種においてもCEL含有率の低下に伴ってアスペクト比の値も減少する傾向にあることが分かる。一方、リグニンを適当な溶媒で溶解させたとき、その溶液はセルロースなどと比較して非常に低粘度であり、Mark-Houwink-Sakuradaの式における指数 $a$ は0.1から0.5の値をとることが知られている。したがってリグニンは剛体球のような構造をとると推測されてきた<sup>7</sup>。これらより、木材中に存在するリグニンの構造に近いと考えられるCELも球に近い形状をとる可能性があり、PM中でCEL含有率を低下・分散させることで、CELがより単分子に近い状態で存在しやすくなったため、観察された粒子のアスペクト比が減少したと推測される。

表4 SPM 像の画像解析で見積もった CEL と考えられる粒子のアスペクト比

Sample	Aspect ratio		
	1/99	0.5/99.5	0.1/99.9
Eu12h	1.73	1.45	1.38
Cy12h	2.10	1.41	1.52

## 5. まとめ

CEL と相溶する PM を見出し、PM とのブレンドにより、CEL の凝集が抑制された。ブレンド中の CEL 含有率の低下に伴い、SPM 像における CEL のドメインサイズは縮小、且つ形状が円に近づき均一化された。すなわち、観察された粒子は CEL 単分子に近いものと考えられる。樹種による違いの評価も可能であることが示唆された。

以上の結果から、単離リグニンである CEL の分子形態を視覚的に直接評価することに成功したと判断する。

### < 引用文献 >

- (1) Hasegawa, D.; Teramoto, Y.; Nishio, Y. *J. Wood Sci.* **2008**, *54* (2), 143–152.
- (2) Teramoto, Y.; Lee, S.-H.; Endo, T. *Polym. J.* **2009**, *41* (3), 219–227.
- (3) Teramoto, Y.; Lee, S.-H.; Endo, T.; Nishio, Y. *J. Wood Chem. Technol.* **2010**, *30* (4), 330–347.
- (4) Teramoto, Y.; Lee, S.-H.; Endo, T. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *125* (3), 2063–2070.
- (5) Sugihara, K.; Kumaki, J. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (22), 6561–6568.
- (6) Wu, W.; Wang, Z.; Jin, Y.; Matsumoto, Y.; Zhai, H. *BioResources* **2014**, *9* (3), 4382–4391.
- (7) Wang, L.; Uraki, Y.; Koda, K.; Gele, A.; Zhou, X.; Chen, F. *Holzforschung* **2019**, *73* (4), 363–369.

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

寺本好邦, ライフサイエンスへの応用を指向したナノセルロース・ナノキチンの複合化とプロセッシング, *Cellulose Communications*, 査読無し, 24 巻, 2017 年, 13-17 頁

### 〔学会発表〕(計8件)

朝岡美帆, 宮森雄大, 勝永毅, 寺本好邦, 相溶するポリマーで希釈した単離リグニン分子の原子間力顕微鏡観察, 第 69 回日本木材学会大会 (函館大会), 2019 年

Asaoka, M., Miyamori, Y., Katsu, N. & Teramoto, Y., Direct Observation of Lignin Molecules Isolated in Miscible Polymer Blends by Atomic Force Microscopy. 2018 Joint Convention Society of Wood Science and Technology (SWST) and The Japan Wood Research Society (JWRS), 2018 年

宮森雄大, 朝岡美帆, 葭谷耕三, 勝永毅, 寺本好邦, 原子間力顕微鏡による単離リグニン孤立分子の直接観察, 第 68 回日本木材学会大会 (京都大会), 2018 年

勝永毅, 葭谷耕三, 寺本好邦, 分子運動性解析による多糖/リグニンのナノスコピックな共存形態の評価 (学生口頭発表賞受賞), 第 62 回リグニン討論会, 2017 年

宮森雄大, 勝永毅, 葭谷耕三, 寺本好邦, 原子間力顕微鏡による単離リグニン孤立分子の直接観察, 第 62 回リグニン討論会, 2017 年

Katsu N., Teramoto Y., Nanoscale evaluation of polysaccharide/lignin mixing states in lignocellulosic biomass, The 4th International Cellulose Conference ICC 2017, 2017 年

勝永毅, 葭谷耕三, 寺本好邦, 木材中の多糖/リグニンのナノスコピックな平均的緊密度の評価, 第 67 回日本木材学会 (福岡大会), 2017 年

勝永毅, 葭谷耕三, 寺本好邦, 木材中の多糖/リグニンの混在スケールの評価, 第 61 回リグニン討論会, 2016 年

### 〔図書〕(計0件)

### 〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

### 〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/view/1812-yoshikuniteramoto>