

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07885

研究課題名（和文）鉄イオンと複合沈殿するリグノスルホン酸の糖化触媒としての機能解明

研究課題名（英文）Function of lignosulfonic acid as acid catalyst for biomass saccharification and the phenomenon of forming a precipitate with heavy metal ions.

研究代表者

菱山 正二郎 (Hishiyama, Shojiro)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：00353821

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：木材の化学パルプ化（サルファイトパルプ化）工程でパルプ化廃液中に副生するリグノスルホン酸を基材とした天然高分子由来酸触媒の開発を目的とした。木質系バイオマスに由来するリグノスルホン酸は、木粉の酸加水分解の際、基質に対する高い親和性を有すると考えられるため、効率的な酸糖化触媒として機能することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

安価で入手容易なリグノスルホン酸が木質系バイオマスの酸糖化触媒として使用できる可能性を示したことで、バイオエタノール製造に必要なセルロース系バイオマスの糖化工程のコスト、エネルギー削減に大きな貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：The aims of this study was to develop a natural polymer-derived acid catalyst based on lignosulfonic acid, which is by-produced in the pulping waste liquid during chemical pulping process of woody biomass (sulfite pulping). It was revealed that lignosulfonic acid play a role as an efficient acid saccharification catalyst in the acid hydrolysis of woody biomass.

研究分野：木質科学

キーワード：リグノスルホン酸 木粉 多糖類 酸加水分解

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

二酸化炭素排出量削減が喫緊の問題となる中、再生可能資源であるバイオマスを原料としたエネルギーおよび工業材料の開発研究が世界的に進められている。バイオマスである森林資源は、薪、炭等の固体燃料として太古から使用されているが、化石資源、特に石油資源を代替するためには、液体および気体燃料に変換する技術が必要となる。森林資源を原料とする液体燃料の製造法に関しては、植物系油脂、糖類から製造されるバイオディーゼルおよびバイオエタノールに関して、これまで多くの報告がある。

我が国においては、歴史的に、木材からのバイオエタノールの製造研究が盛んに進められてきた。森林資源の主体となるセルロース系バイオマスからのバイオエタノール製造法の重要な工程であるバイオマス多糖の加水分解工程には、大きく分けて酵素加水分解法と酸加水分解法がある。酵素加水分解法によるエタノール生産では、酵素処理効率に影響を与える原料中のリグニンの除去が必要であり、また実用的生産に向けては、酵素となるセルラーゼの低価格化および酵素による糖化速度の改善が必要である。酸加水分解法には、装置の腐食および酸加水分解液からの硫酸触媒の除去に関わる問題があり、また、酸加水分解反応中の糖の過分解に起因する発酵阻害物質の生成に関する問題があり、現状では、両技術ともに実用生産には至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、バイオエタノールの製造のうち、酸加水分解法で指摘されている問題を解決できる触媒の開発を目的としている。酸加水分解にともなう装置の腐食、酸触媒の除去等問題を解決する手法として、固体酸触媒等の新規触媒の開発が報告されている。固体酸触媒を使用することで、加水分解後の酸触媒の除去に関わる問題は解決できる。しかしながら、固体酸触媒は高価であることに加え、原料となるセルロース系バイオマスが加水分解媒体に不溶であることから、加水分解反応系が固体-固体反応になり、古くから使用されている硫酸等による固体-液体反応に比べて糖化速度に関わる問題を改善する必要がある。

これら固体酸触媒の欠点を改善する触媒として、本研究ではリグノスルホン酸の酸触媒としての可能性に着目した。リグノスルホン酸は、現行の亜硫酸パルプ製造工場において工業的に製造可能であり、材料として汎用性を有する。水溶性であることから、木材多糖の加水分解で固体-液体反応系の触媒として使用可能であり、木材由来リグニンの部分化学構造を維持していることから、木材由来リグニンとの親和性が期待され、酸加水分解工程では基質吸着型の触媒として働く可能性がある。さらに、リグノスルホン酸の調製原料となるサルファイトリグニンは、鉄(II)を加えることで沈殿することを本事業申請時に見いだしている。この特性を利用できれば比較的安全とされる二価の鉄塩を使用することで、加水分解後の糖液と触媒を簡便に分離することが可能であると考えられる。本研究では、上記特性を持つリグノスルホン酸の木材の酸化素分解触媒としての機能解明に取り組む。

### 3. 研究の方法

ナトリウム型の市販サルファイトリグニン(サンエキス P252、日本製紙株式会社)を分画分子量 1,000 あるいは 3,000 の限外ろ過膜で分画した高分子画分を強酸性イオン交換樹脂カラムに通過させることで酸型にし、リグノスルホン酸を得た。リグノスルホン酸はエバポレーターで乾固後、減圧乾燥しデシケーター内で保存した。

加水分解試験で使用した基質は、木材構成多糖のモデル化合物となるセロビオースおよびキシロピオース、アルコール/ベンゼンで脱脂したスギ木粉およびシラカバ木粉、同木粉より常法(wise法)で調製したホロセルロースである。加水分解物の分析は、各種クロマトグラフィーを使用した糖分析、および核磁気共鳴測定装置(NMR)で行った。また木粉試料の加水分解残渣は、赤外分光装置(FT-IR)およびX線回折で分析を行うと共に、電子顕微鏡(SEM)により加水分解中の形態変化を観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) リグノスルホン酸の調製と酸触媒としての機能の確認

市販未精製のサルファイトリグニンの NMR 分析では非常に複雑なスペクトルが得られ、HSQC 二次元 NMR 分析では、キシロース、グルコースの混入が明確に確認された。単糖類の混入は、後段に行う糖化試験での定量結果にも影響を与えることから、本研究では使用に先立ち限外ろ過によるサルファイトリグニンの低分子化合物の除去を試みた。限外ろ過を行った試料の NMR 分析では、グルコース、キシロースに帰属されるシグナルが消失していた。また限外ろ過を行ったリグノスルホン酸の糖分析結果でも、グルコース、キシロースが取り除かれていることが確認できた。

サルファイトリグニンから調製したリグノスルホン酸は、種々有機合成における酸触媒としての使用できることが報告されている。本研究で調製したリグノスルホン酸の酸触媒能をフィッシャー合成によるエステル化触媒能として、市販の酸触媒と比較した。図 1 に示すとおり、硫酸を酸触媒、フェルラ酸を基質としたメチル化反応では、15 時間の反応でほぼすべての基質がメチル化された。p-トルエンサルホン酸(TsOH)および 10-カンファースルホン酸(CSA)を触媒とした同メチル化では、痕跡量の未反応基質が確認された。それに対して、リグノスルホン酸触媒のメチル化では、基質の約半量が未反応であった。また 40 時間の反応においても、約 20%

の基質が未反応物として残存していた。今回調製したリグノスルホン酸の酸触媒としての能力は、比較に用いた市販酸触媒に比べて重量ベースでは劣っていたが、温和な酸触媒としての機能が確認された。

### (2) リグノスルホン酸による木粉の加水分解

木粉の加水分解実験では、リグノスルホン酸の濃度を 10% (w/v) とした。120 °C での加水分解では、スギおよびシラカバ両木粉からの単糖類の生成が確認され、リグノスルホン酸による木粉の加水分解が可能であることが確認された。しかし、処理時間を 15 時間まで延長しても、木粉の分解率はスギで約 19%、シラカバで約 25% と低い値にとどまった。それに対して、150 °C、6 時間の加水分解では、スギ、シラカバ木粉の加水分解率はそれぞれ 24.8% および約 34.9% であった。試料木粉のクラソンリグニン量はスギ、シラカバでそれぞれ、35.4% および 21.0% である。このことから、リグノスルホン酸による加水分解中に木粉中のリグニンが可溶化されることが無いと仮定すると、スギおよびシラカバ木粉中の多糖成分に対する分解率は、それぞれ 38.4% および 55.6% に相当することになる。

加水分解残渣の光学顕微鏡観察の結果を図 2 に示した。150 °C の加水分解においては加水分解時間 3 時間までは、加水分解前の木粉の構造を維持しており、またスギ木粉とシラカバ木粉間で大きな違いは見られなかった。それに対して、6 時間以上の加水分解では、スギ木粉に比べてシラカバ木粉がより大きな損傷を受けている様子が観察された。また図 3 に示した電子顕微鏡による観察結果からは、6 時間の加水分解後の試料では、もとの木材組織に由来する形態が残存している様子が観察されたが、18 時間の加水分解では、各組織が等方的に碎片化されており、木材の組織に由来する構造を明確に判別することが困難であった。これら各顕微鏡による観察でも、リグノスルホン酸の処理により、木材が分解を受けている様子が確認され、またスギ木粉に比べてシラカバ木粉でより大きな分解が起こっていることが確認できた。しかし、顕微鏡による形態観察の結果からは、組織異方的な分解は観察できず、部位特異的な分解をとまなう吸着型の加水分解触媒としての様子は確認できなかった。

図 4 に加水分解液の <sup>13</sup>C-NMR スペクトルを示した。スギ木粉ではマンノースに帰属されるシグナル強度が強く、その他の単糖としては、キシロース、グルコースが同程度のシグナル強度を持って観察された。また、シラカバの加水分解液の分析では、キシロースに帰属されるシグナル強度が強く、それに次ぐものとして、グルコースに帰属されるシグナルが観察された。しかし、マンナンに帰属されるシグナルは検出限界以下であった。この結果から、リグノスルホン酸による木粉の加水分解では、セルロース成分に比べて、ヘミセルロースの分解速度が大きいことが示唆された。図 5 に示した、スギおよびシラカバ木粉の加水分解残渣の FT-IR 分析の結果では、カルボニル基 (1,700/cm 近傍) に帰属されるバンド強度が、加水分解をリグノスルホン酸で処理することで減少しており、その減少は特にシラカバ木粉で顕著であった。木粉中のカルボキシル基は、ヘミセルロース含量と関係があると考えられる。このことから、FT-IR による分析結果からも、ヘミセルロースの優先的な加水分解が示唆された。また、図 6 に示した X 線回折の結果からは、セルロース I に帰属されるピーク強度が、加水分解前の木粉に比べて増加していることが分かった。この回折ピークの強度の増加は、非晶質であるヘミセルロースあるいはセルロースのアモルファス部位の加水分解が、セルロース結晶の加水分解に比べて優先的に起こっていることを表すものと考えられる。以上の結果から、リグノスルホン酸による木粉の加水分解速度は、セルロース結晶に比べてヘミセルロースあるいはセルロースの非晶部位で速いことが分かった。また加水分解液の分析では、シラカバ木粉の加水分解液中にはフルフラールの生成が確認できたが、スギ、シラカバ木粉両加水分解液中には 5-ヒドロキシメチルフルフラールの生成は検出されなかった。リグノスルホン酸を用いた木粉の直接酸糖化では、6 単糖の過分解は抑制されると考えられる。

### (3) リグノスルホン酸によるホロセルロースの加水分解

上記顕微鏡観察では、リグノスルホン酸の吸着型酸触媒としての特性が確認できなかった。そこで、上記加水分解で使用した木粉を wise 法で脱リグニンしたホロセルロースを調製し、リグノスルホン酸による加水分解率を脱リグニン前の木粉と比較した。スギ、シラカバ木粉から調製したホロセルロースの木粉同条件下での加水分解率は、それぞれ 37.7% および 45.7% であった。スギおよびシラカバ木粉中の多糖成分に対する分解率が、それぞれ 38.4% および 55.6% であったことから、脱リグニンを行うことで分解率が同等あるいは若干であるが低下することが分かった。リグニンの存在による糖成分の加水分解率が増加するという結果は、リグノスルホン酸が木材由来リグニンに対する吸着型の酸触媒として働いていることを示すものである。また、リグノスルホン酸は他の酸触媒に比べて弱い酸であるにも関わらず、木粉、特にシラカバの非晶性成分に対しては、(木材中のセルロースの結晶化度が 40~50% であると仮定すると) 比較的高い分解率が得られていると考えられる。しかしながら、ホロセルロース調製時には、脱リグニン率が大きくなるに従い多糖成分の溶出が促進され、多糖の組成に変化が生じることが知られていること、また木材からリグニンが溶出することで生じる木材の物理的な変化が酸加水分解に及ぼす影響も考慮すべき点であるため、リグノスルホン酸の吸着型酸触媒としての機能を明らかにする為には、今後、市販酸触媒との比較等による検討が必要である。

(4) リグノスルホン酸によるモデル化合物の加水分解

上記木粉を用いた結果からは、ヘミセルロースの分解速度が、セルロースに比べて速いことが示唆された。このヘミセルロースとセルロースの分解速度の差は、結晶構造等の物理的な要因によるものであると考えられるが、化学的特性面として、両多糖成分のグリコシド結合加水分解特性にも差がある可能性がある。この点を明らかにするために、セロビオース、キシロビオースをモデル基質とした、リグノスルホン酸による均一系での加水分解を行った。

図7にモデル化合物の加水分解試験の結果を示した。リグノスルホン酸によるキシロビオースの加水分解速度はセロビオースに比べて速く、リグノスルホン酸濃度 5%、120 の温度条件下では、120 分の加水分解でキシロビオースの全量は分解されたが、投入キシロビオースに対するキシロースの収率は約 70%であった。それに対して、セロビオースの加水分解速度はキシロースに比べて遅く、同条件下での 120 分の加水分解でのグルコースの収率は約 25%に留まった。このことから、木粉の加水分解実験で見られたヘミセルロースの優先的な加水分解には、結晶構造等の物理的要因ばかりではなく、構成単位間結合であるグリコシド結合の加水分解速度にも関係すると考えられる。また、セロビオースからの 5-ヒドロキシメチルフルフラールの生成は検出されなかったが、キシロビオースからはフルフラールの生成が確認された。この点に関して、リグノスルホン酸による木材の酸加水分解では、6 単糖の過分解が抑制されるという木粉の加水分解実験の結果と同じ結果が得られた。

(5) 鉄(II)イオン添加によるリグノスルホン酸の沈殿

本事業申請時に得た、リグノスルホン酸塩水溶液への鉄(II)イオン添加による沈殿現象には再現性があったが、加水分解反応後反応液への塩化鉄(II)の添加では、過剰添加を行った場合にも明確な沈殿の生成は確認できなかった。この原因については現在不明であるが、リグノスルホン酸を加水分解液から分離する方法として、リグニンと強固な不溶塩を形成することが知られている鉛(II)イオン、あるいはアルミ(III)イオンを添加することで、リグノスルホン酸触媒を沈殿分離することは可能であった。鉛やアルミを用いた法的規制による使用制限をとまなう方法以外の代替法として、加水分解液を高温に加熱し、溶解しているリグノスルホン酸を熱硬化させることで系外に取り出す方法を試みたが、均一系で使用できる酸触媒として再生利用できる手法の開発には至らなかった。今後は、リグノスルホン酸と鉄(II)イオンの錯体形成などの沈殿形成に関わる機構の解明が必要であると考えている。

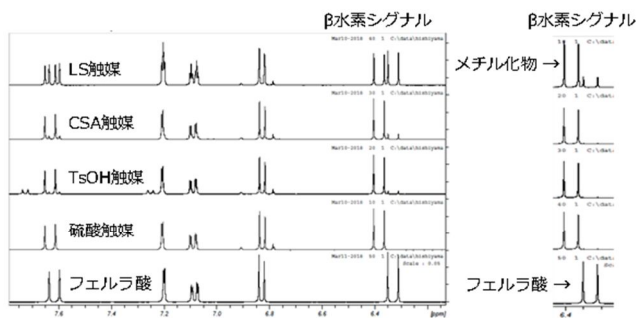


図1 リグノスルホン酸を用いたエステル化反応(15時間)

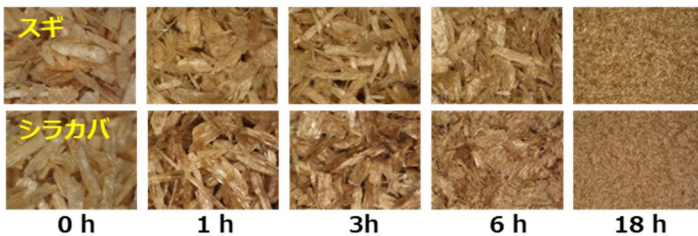


図2 加水分解残渣の光学顕微鏡観察

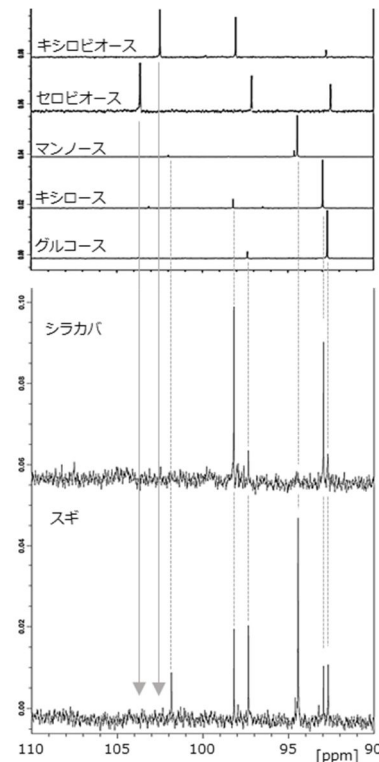


図4 加水分解液の13C-NMRスペクトル



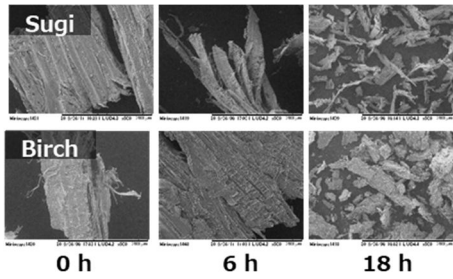


図3 加水分解残差の電子顕微鏡観察

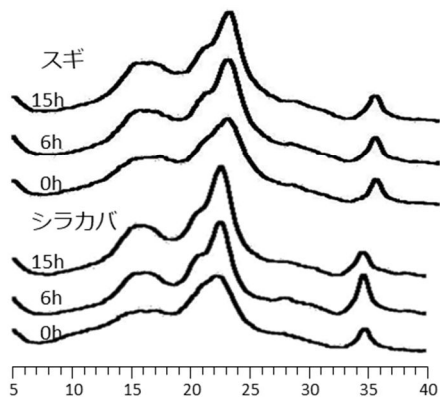


図6 加水分解残差のX線回折分析

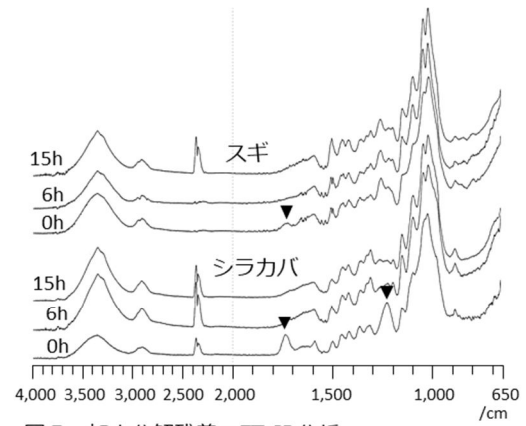


図5 加水分解残差のFT-IR分析

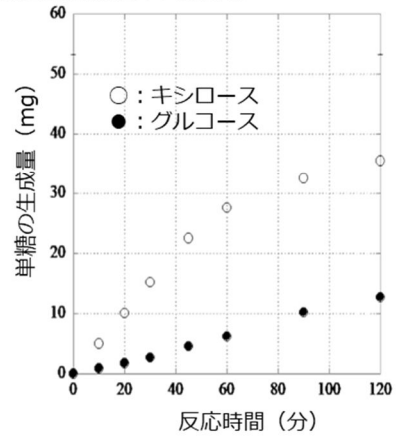


図7 モデル化合物の加水分解試験

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菱山正二郎、久保智史、橋田光、池田努、眞柄謙吾
2. 発表標題 酸触媒としてのリグノスルホン酸の特性
3. 学会等名 紙パルプ研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菱山正二郎、久保智史、橋田光、池田努、眞柄謙吾
2. 発表標題 リグノスルホン酸の酸糖化触媒としての特性
3. 学会等名 リグニン討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菱山正二郎、久保智史、戸川英二、橋田光、池田努、眞柄謙吾
2. 発表標題 リグノスルホン酸による木粉の酸加水分解
3. 学会等名 日本木材学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菱山正二郎、久保智史、橋田光、眞柄謙吾
2. 発表標題 酸糖化触媒としてのリグノスルホン酸に関する研究
3. 学会等名 第68回日本木材学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菱山正二郎、久保智史、戸川英二、眞柄謙吾
2. 発表標題 リグノスルホン酸の木材加水酸分解触媒としての特性；加水分解液の分析
3. 学会等名 日本木材学会
4. 発表年 2020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	久保 智史  (Kubo Satoshi)  (50399375)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等    (82105)	