

平成22年5月18日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19380183

研究課題名（和文） セルロースを含むゲル状バイオマスの資源化

研究課題名（英文） Utilization of Gellous Biomass Containing Cellulose

研究代表者

東 順一 (AZUMA JUN-ICHI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：80115782

研究成果の概要（和文）：植物の種子からセルロースを含むゲル状バイオマスを調製し、構成多糖の化学構造、熱安定性、レオロジー特性等を解析した結果、酸性のキシランがセルロースとの会合に重要であること、ウロン酸の静電反発がゲルの形成に中心的な役割を果たしていること、二価の金属や水素結合もゲルの形成に関与していることを示した。また、キシラン鎖のウロン酸による置換の頻度がキシロース約2残基あたり1置換と異常に高いことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Gellous biomass containing cellulose is produced from plant seeds and chemical structure of its constituent polysaccharides, thermal stability, rheological property were analyzed. The results indicate the importance of acidic xylan to attach on the surface of cellulose. Electrostatic repulsions between carboxyl groups due to uronic acids took major role in formation of gels. Importance of divalent metals and hydrogen bonds for formation of gellous structure was also shown. In addition, degree of substitution by uronic acid in the main chain of xylan was abnormally as high as one uronic acid per about two xylopyranosyl residues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：セルロース、ゲル、バイオマス、資源化、ゲル状バイオマス

1. 研究開始当初の背景

植物の種子の表皮の色や性状は、メンデルが豆を用いて遺伝学に画期的な進歩をもたらしたことで有名であり、農作物の品質を規定する重要な因子の一つとなっている。そればかりではなく、種子の表皮は表皮細胞が長く伸長成長して繊維状となるワタやカボック・ガガイモ等では繊維製品として人類は太古より用い続けている。これまで、申請者は

ヤドリギ (Azuma et al., Cellulose, 7, 3-19, 2000) に端を発し、バジルやサルビアの種子の表皮に同様のゲル状物質（水溶性高分子）の形状を呈するセルロースを含む種皮多糖コンポジットが存在していることを見出し (Indrarti et al., 2005; Yudianti et al., 2005, 共に 6th International Wood Science Symposium, Bali, Indonesia; 東等, 日本セルロース学会2006年度大会; 東, 第9回応用糖質

ワークショップ)、セルロースを含むゲル状多糖コンポジットの構造・機能と生合成・生分解機構を解明することをテーマに研究に取り組んできた。さらに、アマの種子表層からゲル状多糖コンポジットを調製する方法を開発し、高い粘弾性を有することについても世界に先駆けて研究してきた(本間等, 日本セルロース学会2006年度大会)。

このような研究を経て、セルロースを含むゲル状バイオマスの形態、物性、安定性とそれを形成する仕組み、セルロースに対して高い親和性を持ち、結晶化を阻害しゲル状を付与するために不可欠なセルロース以外の多糖の構造と物性・機能、セルロースを含むゲル状多糖バイオマスの生合成に関与する遺伝子の特定と生分解性を基礎として将来長さ・太さ・風合い・保水性等の人為的コントロールを可能とした未来型セルロース研究分野の創生を企画することが必要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では研究代表者によって発見されたセルロースを含むゲル状多糖バイオマスに関して、(1) 種皮由来のセルロースを含むゲル状多糖バイオマスの形態的・全体的特徴の解析、(2) セルロースと共存している多糖の分離と構造解析、(3) セルロースを含むゲル状バイオマスの粘弾性の解析を行うと共に、(4) セルロースを含むゲル状多糖バイオマスの構成多糖間の相互作用を解析する。同時に、(5) セルロースを含むゲル状バイオマスのフィルム化等による用途開発と(6) 微生物による生分解性の解析を行うとともに、(7) セルロースを含むバイオマスの生合成解析を平行して行い、セルロースを中心としたゲル状セルロースバイオマス研究の飛躍的な発展により新規なバイオマスの将来への用途開発の基礎の構築をめざす。

3. 研究の方法

(1) ゲル状バイオマスの調製と分画

種子に蒸留水を加え膨潤させ小型高速粉砕機処理後吸引ろ過器でろ過を行い、ろ過されたゲル状物質を回収し、必要に応じて凍結乾燥した。17.5%NaOH - 4%ホウ酸を用いてセルロース以外の多糖を可溶化し、陰イオン交換クロマトグラフィーにより中性多糖と酸性多糖に分離した。

(2) 酸性多糖の還元と部分加水分解

酸性多糖はTaylor and Conrad法で還元した。還元酸性多糖を0.1N H₂SO₄ で100°C、2時間部分加水分解した。反応後、炭酸バリウムで中和した後イオン交換樹脂で処理し中

性オリゴ糖の混合物を得た。

(3) 形態観察

ゲル状バイオマスの形態観察は光学顕微鏡(OLYMPUS BX51)、低電圧走査型電子顕微鏡(日本電子JSM-5600低電圧走査型顕微鏡, 加速電圧10~20kV)及び原子間力顕微鏡(OLYMPUS生物用走査型プローブ顕微鏡 NV2600)により行った。

(4) 化学組成分析

中性糖組成はSaeman法で加水分解しHPAEC(Dionex DX-500)により求めた。中性糖含量はフェノール硫酸法、ウロン酸含量は*m*-フェニルフェノール法により測定した。

(5) メチル化分析

中性多糖と還元酸性多糖を箱守法によりメチル化後、90%ギ酸で100°C、12時間処理した後0.5N硫酸でさらに100°Cで12時間加水分解し、部分メチル化アルジトールアセテートとしてGC-MS分析(島津製作所 PARVUM2 ガスクロマトグラフ質量分析計, カラム:CBP1-M25-025, 25 m×0.22 mm i. d.)に供した。

(6) 粘弾性分析

ゲル状物質の粘弾性測定はRheosol-G3000 NT動的粘弾性測定装置(UBM, Co., Ltd.)を用いて行った。3.0%、2.0%、1.0%、0.5%の濃度のゲルについて、貯蔵弾性率(*G'*)と損失弾性率(*G''*)の周波数依存性を調べた。温度は30-60°Cで行った。

(7) 機器分析

X線回折はRINT2200(株式会社リガク, CuのK α 線, 40kV/30mA)により測定した。アルカリ不溶成分のFT-IRスペクトル分析はPerkin Elmer社製 System 2000型フーリエ変換赤外分光光度計を用いてKBr錠剤法で測定し、セルロースのセルロースI α の指数を次式によって求めた。

$$F_{\alpha}^{IR} = A_{750} / (A_{750} + kA_{710}) \quad (k=0.16)$$

溶液¹³C-NMRスペクトル分析はInova-300(Varian, 75.4MHz)を用い、重水中、60°Cで測定した。化学シフトはTSP換算とした。また、固体CP/MAS¹³C-NMRスペクトル分析は直径7mmのジルコニア弾丸タイプのローターを用いてCMX-300(Chemagnetics, 75.3MHz)により測定した。また、多糖類の分子量はサイズ排除クロマトグラフィー(YMC-Pack Diol-300, YMC, 8.0×500mm)により測定した。

4. 研究成果

(1) 種皮由来のセルロースを含むゲル状多糖バイオマスの形態的・全体的特徴の解析
種子を水に浸漬した時に膨潤してゲル状物質を周囲に突出するのは種子表層の外皮のみであることがわかった。メボウキの場合の例を図1に示す。また、原子間力顕微鏡観察の結果、いずれの種子由来のゲル状バイオ

マスも繊維状で、直径が約2 nmと極めて細くナノファイバーの一種であることがわかった。メボウキの場合の例を図2に示す。

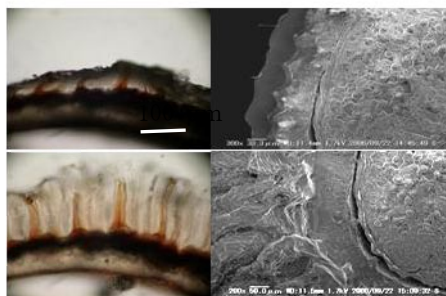


図1 表層細胞の膨潤の様子（メボウキの種子の場合：左は光学顕微鏡像、右は低電圧走査型電子顕微鏡像で、各上は膨潤前、下は膨潤後を示す。）

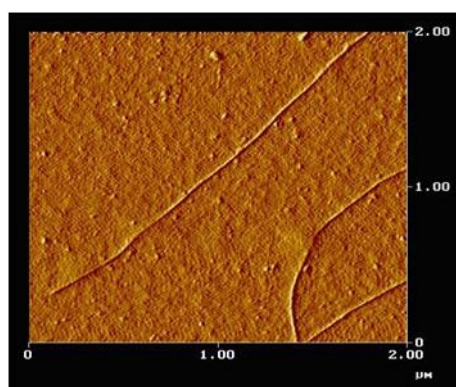


図2 ゲル状バイオマスの原子間力顕微鏡像（メボウキの種子の場合）

ゲル状バイオマス中にセルロースが含まれていることは、X線回折で結晶化度（39.2%）の低い天然型のセルロースの回折図を与えること（図3）及び固体CP/MAS ^{13}C -NMRスペクトルからも裏付けられた（図4）。また、後者からカルボキシル基を含む化合物、例えばウロン酸の存在が示唆された。

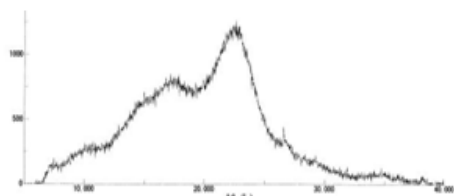


図3 ゲル状バイオマスのX線回折図（メボウキの種子の場合）

(2) セルロースと共存している多糖の分離と構造解析

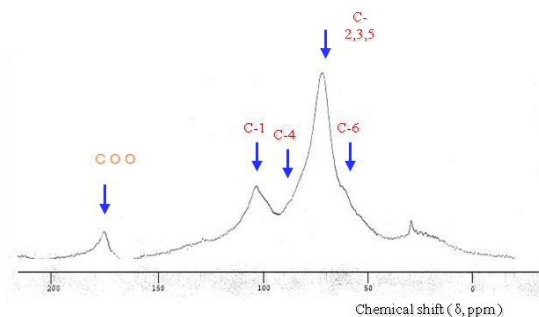


図4 ゲル状バイオマスの固体 CP/MAS ^{13}C -NMRスペクトル（メボウキの種子の場合）

乾燥したメボウキ種子から種子重量に対し20.0%の割合でゲル状バイオマスが得られた。ゲル状バイオマスの中性糖組成はグルコース47.3%、ガラクトース21.9%、キシロース13.9%、アラビノース7.9%、マンノース6.5%、ラムノース2.5%であった。このゲル状バイオマスからアルカリ不溶成分が26.0%、アルカリ可溶成分が74.0%得られた。アルカリ不溶成分は98.3%がグルコースから成り、セルロースであることがわかった。FT-IR分析の結果から、セルロースの $\text{I}\alpha$ 指数は0.67と、植物の一次壁セルロースに似た値であった。アルカリ可溶成分は分子量 7.8×10^5 で、中性糖組成はガラクトース28.3%、グルコース27.6%、キシロース19.8%、マンノース9.7%、アラビノース10.9%、ラムノース3.7%であった。陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて、アルカリ可溶成分を酸性多糖59.5%と中性多糖40.5%に分離した。

酸性多糖は分子量 1.6×10^5 で、ウロン酸34.0%、中性糖66.0%を含有していた。構成単糖はキシロースが78.7%を占め、キシランあるいはヘテロキシランを骨格とする多糖であることが示唆された。

中性多糖は分子量 1.0×10^5 で主要な構成単糖はガラクトース（44.5%）、グルコース（23.2%）、アラビノース（14.6%）、マンノース（16.8%）であった。メチル化分析及び ^{13}C -NMRスペクトル分析を行った結果、これらはアラビノ-（1,3:1,6）-ガラクトン及びグルコマンナン、デンプンから構成されていると考えられた。また、アラビノースは多糖中で主にフラノシド型として存在していることが示唆された。

酸性多糖を還元し、部分加水分解したものをESIマスペクトル及びMALDI-TOF/MS/MS分析することにより構造解析を進めた結果、1~2残基のXylに1残基の4-O-MeGlcが結合した中性のキシロオリゴ糖 Xyl₁₋₂MeGlc の他、2残基の4-O-MeGlcで置換されたオリゴ糖Xyl₂MeGlc₂、Xyl₃₋₆MeGlc₂、4-O-MeGlc 1残基で置換されたキシロオリゴ糖Xyl₃₋₅MeGlc等多数の置換型が存在していることが明らかとなった。全体的にみると、主鎖キシロースに対

する4-*O*-メチルグルクロン酸の割合は組成分析の結果から Xyl: 4-*O*-MeGlcA=1.3:1、メチル化分析の結果からはXyl: 4-*O*-MeGlcA=1.9:1であった。これは主鎖キシロース1~2残基に1つの割合で4-*O*-メチルグルクロン酸が分岐していることを示している。植物細胞壁中におけるXyl: 4-*O*-MeGlcA比は、広葉樹では10~15:1、針葉樹では5~6:1、最も4-*O*-MeGlcA含量の高いマルメロでも2:1であることから、セルロースを含むゲル状バイオマスはこれまでのキシランにない高度な分岐を持つ多糖を有していることが示唆された。

このような酸性キシランはその他の種子由来のゲル状バイオマスにおいても見出された。(3) セルロースを含むゲル状バイオマスの粘弾性の解析

セルロースを含むゲル状バイオマスの0.1~2.0%における貯蔵弾性率 (G')、損失弾性率 (G'') の周波数依存性を分析した結果、図5にマスターカーブが得られた。0.5~2.0%の濃度について貯蔵弾性率 (G') > 損失弾性率 (G'') となり、0.5~2.0%の濃度においてはゲル化点 ($G' = G''$ となる点) の存在が確認できた。このことから、0.5%以上の濃度でゲル状を示すことがわかった。また、ゲル化点も濃度の増大に伴い低周波数側、つまり高温側に移動しているところから、ゲルの濃度が上がるほど高温下でもゲル状態を保つことが示唆された。

次に、pHと粘度の関係を分析した。図6に示したように、pHが増加するに従って粘度も増加し、pH10周辺で粘度が最大になるが、それ以上pHを上げると粘度は低下した。低いpH下ではカルボキシル基が解離せず多糖鎖の分子間の凝集が起こったことが原因と考えられ、pH12付近での粘度の低下はアルカリ塩の形成と水素結合の切断が起こった結果と考えられた。一方、中間pHの領域での粘度の上昇はウロン酸のカルボキシル基間の静電反発が関与していることが示唆された。

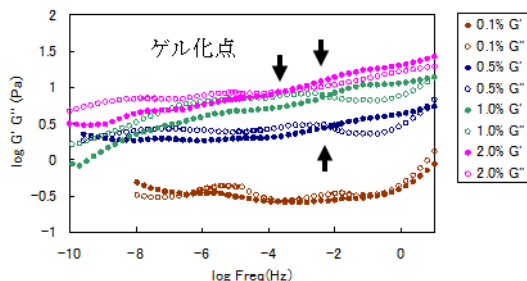


図5 ゲル状バイオマスの動的粘弾性 (メボウキの種子の場合: G' , 貯蔵弾性率; G'' , 損失弾性率)

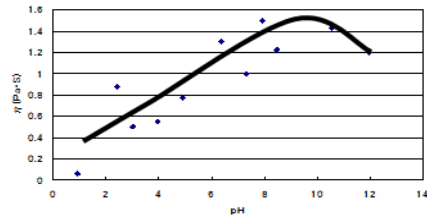


図6 ゲル状バイオマスの粘度のpH依存性 (メボウキの種子の場合)

次に、アルカリ金属塩を加えた際の粘度とイオン半径との関係を分析した。その結果を図7に示す。加えたカチオンのイオン半径が大きくなるに従って、粘度が低下する傾向にあることがわかった。ゲルに含まれるウロン酸のカルボキシル基間の静電反発はカルボキシル基間の距離が短いほど強くなる。イオン半径の大きいカチオンを添加することでカルボキシル基間の距離が大きくなって静電反発が弱まり、粘度が弱くなる。また、加えたカチオンのイオン半径が大きくなればなるほど、カルボキシル基間の距離も大きくなり、さらに粘度が低下する。粘度の低下が著しいことから、ゲルの粘性には静電反発の寄与が大きいと考えられた。

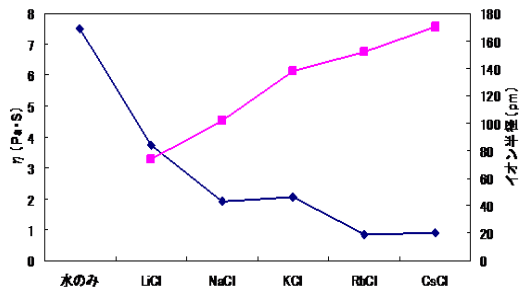


図7 アルカリ金属塩の粘度に及ぼす効果 (メボウキの種子の場合)

ゲルの粘度は上記したようにアルカリ金属塩の添加により影響を受けるので、次に種々の性質の異なる塩を加えた際の粘度の変化を分析した。その結果を図8に示す。いずれの添加物も超純水を加えたゲルより粘度が低くなった。これらの塩は各々特有の作用があり、 SO_4^{2-} は水分子の秩序を安定化させる作用があり、 SCN^- 及び K^+ は水分子の秩序を乱す作用があり、尿素は分子間の水素結合を阻害する作用があり、そしてグアニジン塩酸塩は疎水結合に作用する効果がある。このことから、ゲルの粘性には静電反発だけでなく、水素結合や疎水結合も関与していると考えられた。しかしながら、図7と比較すると粘度の低下が緩やかであることから、静電反発の寄与が水素結合や疎水結合の寄与よりも大きいことが示唆された。

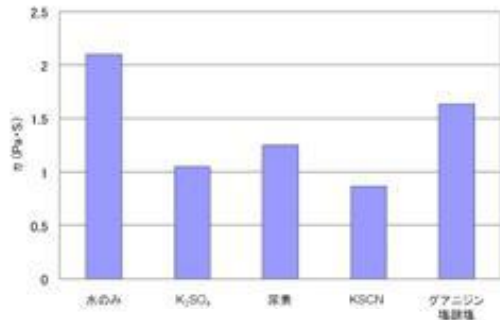


図8 各種の塩が粘度に及ぼす影響

(4) セルロースを含むゲル状多糖バイオマスの構成多糖間の相互作用

水和ゲルをマイクロ波加熱し、その性状を分析した結果、水和ゲルの熱安定性は低く、150°C、5分の加熱で水和ゲル中のセルロースと酸性キシラン間の結合が開裂し、完全に二層に分離することがわかった。不溶化物には主にセルロースが含まれ、その純度は加熱温度の上昇とともに高くなった。以上の結果から、いずれのゲル状バイオマスもゲル状を呈するためには酸性キシランとセルロース間の相互作用が不可欠であることがわかった。

(5) セルロースを含むゲル状バイオマスのナノフィルム化等による用途開発

タラヨウの葉のクチクラ膜に0.5~2.0%のセルロースを含むゲル状バイオマスを貼り付けてフィルムを作成し引張試験を行った。その結果、0.5%の濃度では破断強度、ひずみが無添加の場合よりも低下したが、1.0%を越えると濃度が上昇するに伴い破断強度、ひずみはいずれも改善する方向に向かうことが明らかとなった。このことから、セルロースを含むゲル状バイオマスは強度改善添加物として有用である可能性が芽生えた。

(6) 微生物による生分解性の解析

セルロースを含むゲル状バイオマスを餌としてイエシロアリを飼育し、利用度を分析した。その結果、イエシロアリはセルロースを含むゲル状バイオマスを食するが後腸内原生動物は速やかに死滅し、利用率は低く飢餓状態と似ていることが明らかとなった。

(7) セルロースを含むバイオマスの生合成解析

ヤドリギのゲル状多糖中のセルロースの生合成に関与する遺伝子を調査した結果、*VaCesA1*と*VaCesA2*の二種の遺伝子の関与が強く示唆され、ゲル状バイオマスの生合成の基礎的知見が得られた。

(8) 総合考察

セルロースを含むゲル状バイオマスは、シソ科、バラ科、ヤドリギ科、アブラナ科等広範囲な植物の種子を水に浸漬すると表皮から突出するように生成する。ゲル状の保持には酸性のキシランの存在が不可欠であり、このキシランはウロン酸による置換度がキシロ

ース約2個に1個と非常に高い特徴がある。ゲル状を呈する原因として、ウロン酸のカルボキシル基間の静電反発の寄与が高いが、水素結合や疎水結合の関与も考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計10件)

① Gisk, B., Yasui, Y., Kochi, T., and Frankenberg-Dinkel, N., Characterization of the heme oxygenase protein family in *Arabidopsis thaliana* reveals a diversity of functions, *Biochemical Journal*, 査読有, Vol. 425, 2010, pp. 425-434

② Tsubaki, S., Nakauchi, M., Ozaki, Y., and Azuma, J., Microwave heating for solubilization of polysacchride and polyphenol from soybean residue (Okara), *Food Science Technological Research*, 査読有, Vol. 15, 2009, pp. 307-157

③ Ookushi, Y., Sakamoto, M., and Azuma, J., Effects of microwave irradiation on water-soluble polysaccharides of the fruiting body of *Hericium erinaceum*, *Journal of Glycoscience*, 査読有, Vol. 56, 2009, pp. 153-157

④ Yudianti, R., Karina, M., Sakamoto, M., and Azuma, J., DSC Analysis on water state of *Salvia* hydrogels, *Macromolecular Research*, 査読有, Vol. 17, 2009, pp. 1015-1020

⑤ Yudianti, R., Karina, M., Sakamoto, M. and Azuma, J., Effects of Salts on rheological behavior of *Salvia* hydrogels, *Macromolecular Research*, 査読有, Vol. 17 (5), 2009, pp. 332-338

⑥ Hyodo, F., Tsugeki, N., Azuma, J., Urabe, J., Nakanishi, M. and Wada E., Changes in stable isotopes, lignin-derived phenols, and fossil pigments in sediments of Lake Biwa, Japan: Implications for anthropogenic effects over the last 100 years, *Science of the Total Environment*, 査読有, Vol. 403, 2009, pp. 139-147

⑦ Tsubaki, S., Iida, H., Sakamoto, M. and Azuma, J., Microwave heating of tea residue yields polysaccharides, polyphenols, and plant biopolyester, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 査読有, Vol. 56, 2008, pp. 11293-11299

⑧ 東 順一, 木材からバイオエタノールをつくる技術開発, *農業と経済*, 査読無, Vol. 73 (12), 2007, pp. 93-98

⑨ Yudianti, R., Indrarti, L., Karina, M., Sakamoto, M. and Azuma, J., Chemical compositions of hydrocolloids produced

from nutlets of *Salvias*, Journal of Tropical Wood Science and Technology, 査読有, Vol. 5, 2007, pp. 12-16

⑩ Yudianti, R., Indrarti, L. and Azuma, J., Structure and physical properties of natural gellous materials, Journal of Applied Sciences, 査読有, Vol. 7, 2007, pp. 580-584

〔学会発表〕(計8件)

① Yudianti, R., Indrarti, L., Azuma, J., Sakamoto, M., Tsunoda, K. and Yoshimura, T., Digestibility of cellulosic hydrocolloid by termite *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae), The Fifth Conference of the Pacific-Rim Termite Research Seminar, 2008年3月3-4日, Bali, Indonesia

② 東 順一、坂本 正弘、R. Yudianti, カリン種子のゲル状多糖の化学構造とレオロジー特性, 日本木材学会, 平成21年3月, 長野県, 松本

③ Azuma, J., Honma, Y., Sakamoto, M., and Yudianti, R., Rheological properties of gellous polysaccharides present in *Linum grandiflorum*, International Seminar on Chemistry and Polymer 2009, 2009年5月19日, Tiara Convention Centre, Medan, Indonesia

④ Yudianti, R., Karina, M., Sakamoto, M., and Azuma, J., DSC analysis on water state of *Salvia* hydrogels, International Seminar on Chemistry and Polymer 2009, 2009年5月19日, Tiara Convention Centre, Medan, Indonesia

⑤ Azuma, J., Maitani, Y., Sakamoto, M., Yudianti, R., Indrarti, L. and Karina, M., Precise structure of the hemicellulosic polysaccharides present in basil seed mucilage, MAPEKI XII (National seminar of the Indonesian Wood Research Society XII), 2009年7月23日, Cileunyi Convention Centre, Bandung, Indonesia

⑥ Yudianti, R., Karina, M., Sakamoto, M., and Azuma, J., Precise structure of acidic polysaccharide present in salvia hydrogels, The First International Symposium of Indonesian Wood Research Society "Contribution of Scientific Profession Society on the Development of Wood Science and Technology in Indonesia", 2009年11月2日, Bogor Agricultural University, Bogor, Indonesia

⑦ 井川太一, 坂本正弘, 東 順一, バジル種子由来ゲル状多糖の性質, 第60回日本木

材学会大会, 2010年3月18日, 宮崎観光ホテル、宮崎市、宮崎県

⑧ 東 順一, リケ ユディアンティ, バジル種子多糖水和ゲルにおけるセルロースと酸性多糖との相互作用, 日本農芸化学会2010年度(平成22年度)大会, 2010年3月30日, 東京大学駒場キャンパス, 東京都

〔図書〕(計1件)

① Tsubaki, S., Sakamoto, M., and Azuma, J., Application of microwave heating for the utilization of agricultural biomass in "Recent Advances in Agricultural and Food Chemistry" Vol. 1, Global Research Network, Trivandrum, Kerala, India, 2009, pp. 1-12

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 可溶性リグニン、糖類原料および単糖類原料の製造

発明者: 東 順一、大西清高他

権利者: 新日本製鐵(株)

種類:

番号: 2008-266887

出願年月日: 2009.10.15

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biomass.kais.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 順一 (AZUMA JUN-ICHI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 80115782

(2) 研究分担者

河内 孝之 (KOUCHI TAKAYUKI)

京都大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号: 40202056

武田 博清 (TAKEDA HIROSHI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 60109048

二井 一禎 (FUTAI KAZUYOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 50165445

山内 龍男 (YAMAUCHI TATSUO)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 40093330

坂本 正弘 (SAKAMOTO MASAHIRO)

京都大学・大学院農学研究科・講師

研究者番号: 40303870