

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月10日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20688007

研究課題名（和文）酸素漂白条件下における多糖類およびリグニン分解機構の基礎的解析

研究課題名（英文）Fundamental analysis for the degradation mechanisms of carbohydrate and lignin under oxygen bleaching conditions

研究代表者

横山 朝哉（YOKOYAMA, Tomoya）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10359573

研究成果の概要（和文）：糖類のモデル化合物メチルβ-D-グルコピラノシド(MGP)、MGPの各炭素の立体配置が異なるMGPの異性体、そして、MGPの各炭素に結合する水素を重水素ラベルした重水素化MGPを、活性酸素種生成源となるフェノール性化合物と共に酸素漂白条件下で処理することによって、糖モデル化合物の各炭素の立体配置の相違が、それらと活性酸素種との反応に影響を及ぼすこと、そして、実際に活性酸素種がMGPの各炭素に結合する水素を引き抜くことを、明らかにした。

研究成果の概要（英文）：A carbohydrate model compound, methyl β-D-glucopyranoside (MGP), isomers of MGP with the stereo configuration of a hydroxyl carbon different from MGP, and deuterated MGP's with a deuterium substituting the hydrogen of MGP bonding to a hydroxyl carbon were treated together with a phenolic compound as the generator of active oxygen species (AOS) under oxygen bleaching conditions. It was indicated that the stereo configuration influences the reaction of model compounds with AOS and AOS certainly abstract the hydrogens of MGP bonding to hydroxyl carbons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	14,600,000	4,380,000	18,980,000
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
総計	20,400,000	6,120,000	26,520,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：漂白、リグニン、糖、フェノール、酸素、アルカリ、活性酸素種

## 1. 研究開始当初の背景

製紙用化学パルプ製造工程の一部である漂白過程では、環境負荷を低減でき経済的にも安価な酸素漂白がより重要になってきているが、この漂白には多糖類の分解が激しく、パルプ強度が低下するという大きな問題がある。しかし、研究開始当時までの酸素漂白における化学反応に関する既知の知見では、

反応を自在に制御することが困難であった。そこで、パルプ構成成分である多糖類とリグニンの酸素漂白条件下における分解機構を単量体レベルで詳細に検討し、多くの基礎的知見を蓄積する研究、および、これらの基礎的知見を、酸素漂白における化学反応の高度な制御へ昇華する研究、が必要であった。

## 2. 研究の目的

本研究申請時の目的は、パルプ構成成分である多糖類とリグニンの酸素漂白条件下における分解機構を、単量体レベルで詳細に解析することであった。具体的には第一に、どの化学種が多糖類とリグニンを分解するかを、モデル的に詳しく解析し明らかにすること、第二に、それらの化学種と多糖類およびリグニンとの反応を、モデル的に詳しく解析し明らかにすること、そして、第三に、これらの反応機構に基づき、より脱リグニン効率が高く、なおかつ、糖の分解が抑制できる最適酸素漂白条件を確立すること、を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、酸素漂白における多糖類およびリグニンの分解機構を、単量体レベルで詳細に検討して基礎的知見を蓄積するため、これらのモデル化合物を用いた。また、これらの分解を引き起こす活性酸素種は、主としてリグニンのフェノール性部位と酸素との反応で生成するため、実際の酸素漂白を忠実に再現する目的で、フェノール性化合物の共存下で反応を行い、これと酸素分子との反応によって、反応系中で活性酸素種を生成させた。

糖モデル化合物であるメチルβ-D-グルコピラノシド(MGP)、MGPの各炭素の立体配置が異なるMGPの異性体、そして、MGPの各炭素に結合する水素を重水素ラベルした重水素化MGPを(これらの構造は図1)、活性酸素種生成源となるフェノール性化合物と共に酸素漂白条件下で処理した。MGPとMGPの異性体の分解の比較から、活性酸素種と糖モデル化合物との反応における、糖モデル化合物の各炭素の立体配置の相違の影響について検討した。また、重水素化MGPとMGPの分解の比較によって速度論的同位体効果の有無を確認し、その結果から、重水素化された部位の水素が、実際に活性酸素種によって引き抜かれるかどうかを検討した。

## 4. 研究成果

(1) 3. に記載の実験方法により、MGPおよびMGPとC-1~C-4位各炭素の立体配置が異なる化合物それぞれメチルα-D-グルコピラノシド(MGPα)、メチルβ-D-マンノピラノシド(MMP)、メチルβ-D-アロピラノシド(MAP)、メチルβ-D-ガラクトピラノシド(MGaP)を、酸素と反応して活性酸素種の生成源となるフェノール性化合物2,4,6-トリメチルフェノール(TMPH)と共に、単独あるいは複数で酸素漂白条件下での処理に供した。なお、これらの化合物の構造を、図1に示す。単独での処理の結果、MAP、MGaP、MMP、MGP、そして、MGPαの順に分解が少なくなった。MAPの分解は非常に激しかった。また、MGPおよび

MGP以外の化合物1種類の計2種類を共にTMPH共存下で処理した結果、MMPの存在のみが共存するMGPの分解を促進させ、その他の化合物の存在は、MGPの分解に大きな影響を及ぼさなかった。以上の結果から、糖モデル化合物の各炭素の立体配置の相違が、活性酸素種との反応に影響を及ぼすこと、そして、存在するモデル化合物の種類によって、生成する活性酸素種の種類や量が異なる可能性が、示唆された。

(2) 3. に記載の実験方法により、MGPおよびMGPのアノマー位水素を重水素ラベルした化合物MGP-1D(図1)をTMPHと共に、酸素漂白条件下での処理に供した。その結果、MGPの方がMGP-1Dよりも速く分解され、明瞭な速度論的同位体効果が観測されたため、MGPのアノマー位水素が、活性酸素種によって実際に引き抜かれることが明らかにされた。既往の研究により、ヒドロキシルラジカル(HO·)およびその共役塩基であるオキシルアニオンラジカル(O·)による多糖類への攻撃が、酸素漂白における多糖類の分解の主要原因であることが、提案されている。TMPHと酸素との反応で生成する活性酸素種には、様々な種類のものが存在するが、これらを上記のHO·あるいはO·に限定する目的で、MGPとMGP-1Dをアルカリ性過酸化水素処理に供した。その結果、明瞭な速度論的同位体効果が観測されず、これらのラジカルが、MGPのアノマー位水素を引き抜かない可能性が示唆された。

(3) 3. に記載の実験方法により、MGPおよびMGPのC-2位水素を重水素ラベルした化合物MGP-2D(図1)をTMPHと共に、酸素漂白条件下での処理に供した。その結果、MGPの方がMGP-2Dよりも速く分解され、明瞭な速度論的同位体効果が観測されたため、MGPのC-2位水素が、活性酸素種によって実際に引き抜かれることが明らかにされた。また、これらの化合物をアルカリ性過酸化水素処理に供したところ、明瞭な速度論的同位体効果が観測されず、HO·とO·がMGPのC-2位水素を引き抜かない可能性が示唆された。

(4) 3. に記載の実験方法により、MGPとMGP-1Dを、あるいは、MGPとMGP-2Dを、活性酸素種生成源となる別のフェノール性化合物4-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアルコール(バニリルアルコール、Valc、図1)と共に、酸素漂白条件下での処理に供したところ、どちらの反応系でも、明瞭な速度論的同位体効果が観測されなかった。したがって、Valcから生成する全ての活性酸素種が、MGPのアノマー位およびC-2位水素を引き抜かない可能性が示唆された。また、上記(2)、(3)で示されたMGPのアノマー位およびC-2位水素を引き抜く活性酸素種が、TMPHからのみ生成する化学種であることが明らかになった。

(5) 3. に記載の実験方法により、MGP と MGP の炭素に結合する全ての水素を重水素に置換した化合物 MGP-a11D (図 1) を、活性酸素種生成源となる TMPH あるいは Valc と共に、酸素漂白条件下での処理に供した。その結果、TMPH 共存系においては、これまでに得られた結果と同様に、明瞭な速度論的同位体効果が観測された。一方、Valc 共存系においても、明瞭な速度論的同位体効果が観測された。また、アルカリ性過酸化水素処理においても、明瞭な速度論的同位体効果が観測された。これらの結果とこれまでに得られた知見から、HO・および O<sup>•</sup> を含む Valc から生成する活性酸素種は、MGP のアノマー位および C-2 位以外の水素を引き抜く可能性が示唆された。しかしこの可能性は、ラジカル種である活性酸素種の化学反応としては、合理的ではないと考えられた。これまでの MGP と重水素化 MGP を用いた実験では、重水素化 MGP から重水素ラベルした部位の水素が引き抜かれることによって重水素化 MGP が分解されれば、MGP の分解との比較により、明瞭な速度論的同位体効果が観測されると仮定していた。しかし、この仮定が常に成立しない場合には、以下の可能性も考慮する必要があると考えられた。すなわち、HO・および O<sup>•</sup> を含む Valc から生成する全ての活性酸素種は、MGP の炭素に結合する全ての水素を引き抜くが、その際の各水素の引き抜き反応に起因して出現する速度論的同位体効果は明瞭ではない。しかし、MGP-a11D のように多くの重水素を保持する化合物の分解の場合には、速度論的同位体効果が総計として観測されるため、明瞭となる。なお、水素引き抜き反応における速度論的同位体効果の出現の明瞭さは、この反応の遷移状態が反応進行度の中間に位置する場合に最大となり、進行度が早期あるいは後期に位置する場合には小さくなることが、知られている。水素引き抜き反応における遷移状態の位置は、攻撃種の強度によって決定されるため、観測される速度論的同位体効果の明瞭さは、反応に関与する活性酸素種の種類に依存する。以上の考察から、Valc 共存系で生成する全ての活性酸素種は、MGP の水素引き抜き反応において明瞭な速度論的同位体効果を示さない化学種であり、TMPH 共存系で特異的に生成する何らかの活性酸素種のみが、明瞭な速度論的同位体効果を示す、と考えることが合理的であろう。しかし、これらをさらに詳しく検討するためには、MGP の C-3、C-4、C-5、C-6、および、アグリコン部位の水素のみをそれぞれ重水素ラベルした化合物を用いた実験を行う必要がある。

(6) 酸素漂白におけるリグニン  $\beta$ -O-4 結合の開裂機構を検討する目的で、図 1 に示す非フェノール性の  $\beta$ -O-4 型 2 量体リグニンモデル化合物 VDF を、活性酸素種生成源となる

Valc 共存下で、酸素漂白処理に供した。この反応の特徴として、以下を挙げるができる。すなわち、VDF は非フェノール性であるため、酸素漂白条件下で酸素分子によっては直接分解されない。また、VDF の  $\beta$ -O-4 結合が開裂すると、3,5-ジフルオロフェノール (DFPh、図 1) が遊離するが、DFPh は活性酸素種が働く酸素漂白条件下において非常に安定であるため、これを定量すること、すなわち、VDF の  $\beta$ -O-4 結合開裂を定量することが可能である。一般的な  $\beta$ -O-4 型モデル化合物を用いると、遊離するフェノール性化合物が酸素によって分解されるため、定量が不可能である。上記処理により、VDF の消失と共に DFPh が相当量検出されたため、酸素漂白過程において、非フェノール性のリグニンユニットがフェノール性のユニットに変換され、これによって、元来非フェノール性であったユニットの酸素酸化が進行する可能性が示唆された。また、この  $\beta$ -O-4 結合開裂は、活性酸素種による VDF の側鎖への攻撃によって引き起こされると考えられた。酸素分子はフェノール性のリグニン部位のみを酸化分解できるため、従来から、非フェノール性のリグニン部位は、酸素漂白において分解され難いと考えられてきた。したがって、上記の示唆は非常に重要な知見であろう。

(7) VDF に替えて VDF の側鎖  $\alpha$  位の水酸基をメトキシル基に置換したモデル化合物  $\alpha$ -OMe-VDF を用いて (6) と同様の実験を行ったところ、 $\alpha$ -OMe-VDF はほとんど分解されなかった。この結果から、活性酸素種と  $\beta$ -O-4 型リグニン側鎖部位との反応においては、 $\alpha$  位水酸基の存在が非常に重要であることが示唆された。

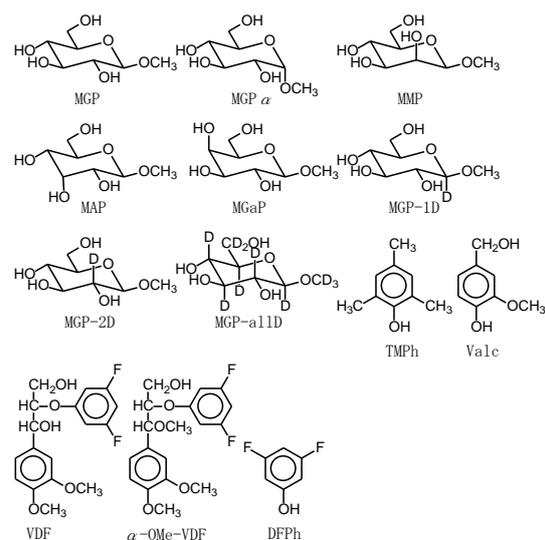


図 1 本研究で用いたモデル化合物の構造

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1. Satoshi Ohmura, Tomoya Yokoyama, Yuji Matsumoto, Significance of benzylic hydroxymethylene group in the reaction of lignin side-chain with active oxygen species under oxygen bleaching conditions, *J. Wood Sci.*, DOI: 10.1007/s10086-013-1339-1 査読有
2. Akihiko Nakagawa, Tomoya Yokoyama, and Yuji Matsumoto, Investigation on the hydrogen abstraction from methyl glucoside by active oxygen species under oxygen delignification conditions IV: Appearance of kinetic isotope effect in the reaction between methyl glucoside and deuterated methyl glucoside, *J. Wood Sci.*, **58** (6), 563-569 (2012) 査読有
3. Satoshi Ohmura, Tomoya Yokoyama, and Yuji Matsumoto, Progress of oxidation of non-phenolic lignin moiety in an oxygen bleaching process *via* the conversion of non-phenolic into phenolic lignin moiety, *J. Wood Sci.*, **58** (3), 243-250 (2012) 査読有
4. Akihiko Nakagawa, Tomoya Yokoyama, and Yuji Matsumoto, Investigation on the hydrogen abstraction from methyl glucoside by active oxygen species under oxygen delignification conditions. Part 2: Study on the C-2 position, *J. Wood Chem. Technol.*, **32** (1), 10-22 (2012) 査読有
5. Tomoya Yokoyama, Akihiko Nakagawa, Fumiko Konishi, and Yuji Matsumoto, Investigation on the hydrogen abstraction from methyl glucoside by active oxygen species under oxygen delignification conditions III: Effect of the origin of active oxygen species, *J. Wood Sci.*, **57** (6), 512-519 (2011) 査読有
6. Fumiko Konishi, Tomoya Yokoyama, and Yuji Matsumoto, Investigation on the hydrogen abstraction from methyl glucoside by active oxygen species under oxygen delignification conditions. Part 1: Study on the anomeric position, *Holzforschung*, **63** (1), 52-60 (2009) 査読有

[学会発表] (計21件)

1. 中川明彦ら、酸素漂白条件下における炭水

化物と活性酸素首都の反応に対する炭水化物の立体配置の影響、第63回日本木材学会大会、岩手大学教育学部(岩手県岩手市)、2013/03/29

2. Tomoya Yokoyama *et al.*, Analysis of kinetic isotope effect in hydrogen abstraction from carbohydrate by active oxygen species, The 4th International Conference on Pulping, Papermaking, and Biotechnology, Nanjing, China, 2012/11/19
3. 中川明彦ら、活性酸素種による糖の水素引き抜き反応における速度論的同位体効果の解析、第56回リグニン討論会、山形大学農学部(山形県鶴岡市)、2011/09/15
4. Akihiko Nakagawa *et al.*, Reactivity of active oxygen species toward C-2 position of carbohydrate and its dependence on the origin of active oxygen species under oxygen bleaching conditions, The 16th International Symposium on Wood, Fiber and Pulping Chemistry, Tianjin, China, 2011/06/10
5. Tomoya Yokoyama *et al.*, Investigation of hydrogen abstraction from methyl glucoside by active oxygen species under oxygen bleaching conditions, The 4th International Symposium on Emerging Technologies of Pulping and Papermaking, Guangzhou, China, 2010/11/10
6. Tomoya Yokoyama *et al.*, Evaluation of anomeric position of carbohydrate as a reaction site of active oxygen species under oxygen delignification conditions, 2008 International Pulp Bleaching Conference, Quebec City, QC, Canada, 2008/06/03

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横山 朝哉 (YOKOYAMA, Tomoya)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10359573