特別賞

リグニンの有効利用に向けた効率的分解反応の開発

米子工業高等専門学校 物質工学科5年

小島 翼

1. 緒言

1.1 研究背景

科学技術の発展とともに我々の生活は豊かになった。しかし生活が豊かになったことでより多くの資源を必要とするようになった。現在では、燃料や工業製品の原料の大部分を石油や石炭などの化石資源で賄っており、環境汚染や資源の枯渇が危惧されている。そのため、化石資源に代わりバイオマス資源などの再生可能資源を中心とした持続可能な社会の構築が現代社会の抱える課題となっている。1)(図1)

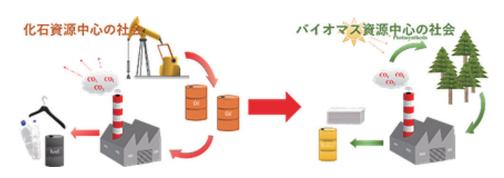


図1 バイオマス資源を中心とした持続可能な社会

木質バイオマスは自然界に豊富に存在する資源であり、化石資源に代わる新たなバイオマス資源として注目されている。木質バイオマスは主にセルロース、ヘミセルロース、リグニンから構成されている。細胞壁中でセルロース、ヘミセルロース繊維の隙間をリグニンが埋めるように共存し木材の強度を強くするとともに含有成分の分離、分解を困難にしている。(図2)

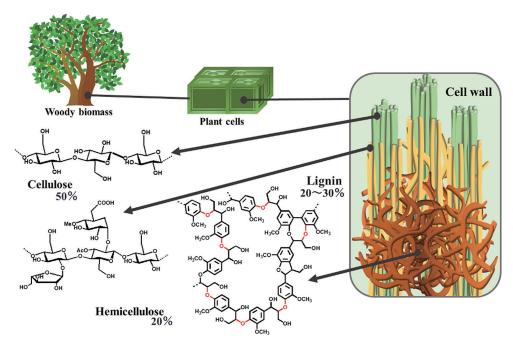


図2 木質バイオマスの構造

リグニンは主にグアイアシル、シリンギル、ヒドロキシフェニルといったフェニルプロパノイドユニットから構成されている芳香族高分子化合物である。各ユニットはβ-[O]-4結合を中心として結合し立体網目状の複雑な構造を形成している。(図3)従来リグニンはセルロース、ヘミセルロースの利用を難しくする成分として除去対象とされてきた。しかしリグニンはセルロースやヘミセルロースに並び自然界に豊富に存在している化合物であることから、近年資源としての利用に期待が高まっている。

図3 リグニンの化学構造と ß-[O]-4結合

現在用いられているリグニン分解法は大きく分けて物理化学的なアプローチと生物学的な アプローチの二つがある。パルプ製造プロセスである酸性の亜硫酸溶液中で加圧蒸煮しリグ ニンや糖分等の非繊維成分を溶出させ分離する亜硫酸法²⁾、水酸化ナトリウムと硫化ナトリ ウムなどのアルカリで加圧蒸煮し非繊維成分を溶出させ分離するクラフト法は物理化学的な 分解法である。²⁾ これらの方法はリグニンを効率的に分解除去することができる方法である が問題点もいくつかある。亜硫酸法では廃液が環境汚染を引き起こすため適切な中和処理が 必要であるという点、クラフト法は分解溶出後のリグニンの利用性が乏しいといった問題点 がある。3) このように物理化学的な分解は一般的に効率的なリグニンの分解、除去ができる 一方で分解は非選択的でありハードな反応条件を必要とする。一方で生物学的な分解は白色 腐朽菌などの生物が生産する酵素を利用した分解法である。リグニン分解酵素にはリグニン ペルオキシターゼやマンガンペルオキシターゼ、ラッカーゼなどがありそれぞれの酵素がリ グニンの特定部位を選択的に酸化分解することことができる。さらに酵素を用いた分解は物 理化学的な分解に比べ温和な反応条件で分解できることから、新しいリグニン分解法として 期待されているが、反応速度が遅いことや酵素の大量生産が難しいことなどが課題である。⁴⁾ そのため木質バイオマスの有効利用のために温和で効率的なリグニン分解法の開発が期待さ れている。当研究室の本田らは金属含有イオン液体にマイクロ波による内部加熱を組み合わ せてユーカリに含まれるリグニンを効率的に分解することに成功し、分解物からバニリンな どの有用な化合物が得られることを明らかにした。5) これにより木質バイオマスに含まれる リグニンの効率的な分解に金属含有イオン液体が利用できることを明らかにした。しかしイ オン液体はコストが高く実用化には課題が残る。そこで低コストで効率的なリグニン分解法 として有機電解反応によるリグニンの分解が考案された。有機電解反応は電子による直接的

な酸化還元によって分解させる方法である。そのため有害な試薬を用いることなく高効率で分解を行うことが可能な方法である。Lina Ma らはプラチナ電極を用いて β -[O] -4結合を含むリグニンモデルの電解を報告しており、電解反応がリグニン分解へ応用できる可能性を報告している 6 。(図4)

$$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \text{OH} \\ \text{OH} \\ \end{array} \begin{array}{c} \text{O)Me } t\text{-BuOOH}(5.0 \text{ eq.}) \\ \underline{Pt(+)/Pt(-). \ I=20 \text{ mA}} \\ \text{nBu4NOH, MeCN} \\ \text{r.t., 3 h} \\ \end{array} \\ \text{MeO} \begin{array}{c} \text{O} \\ \text{H} \\ \end{array} + \begin{array}{c} \text{OOMMe} \\ \text{NOMMe} \\ \text{NOMMe}$$

図4 Pt 電極を用いたリグニンモデルの電解4)

1.2 研究目的

本研究はハードな反応条件を必要とし、分解後のリグニンの用途が乏しいという物理化学的な分解手法の欠点を克服し、より低コストで効率的なリグニン分解法の開発を目指したものである。本研究ではプラチナ電極よりも低コストな電極である炭素電極を用いて有機電解反応によるリグニン分解を検討した。さらに得られた電解生成物の利用性を模索するために得られた電解生成物を植物生育試験と抗菌活性試験を行った。

2. リグニンモデルの有機電解

リグニンは木質バイオマス中でセルロース、ヘミセルロースなどの他の高分子と共存しているため、単離が難しい。そのためリグニン分解法の評価にはリグニンと類似した構造を持つ低分子のリグニンモデルが使われることが多い。本研究ではリグニンのユニット同士をつなぐ主な結合である β -[O]-4の分解を目的としている。そこで β -[O]-4結合を有する単純な構造を持つリグニンモデルとして2-(2-methoxyphenoxy)-1-phenylethanol(1a)、パラ位にメトキシキを置換させよりリグニンに近い構造を持つ2-(2-methoxyphenoxy)-1-(4-methoxyphenyl) ethanol(1b) をリグニンモデルとして用いた。(図5) リグニンモデルを基質として2時間半の電解を行った結果茶褐色のオイル状電解生成物が得られ分解物の構造解析の結果それぞれの基質由来の骨格を持つ化合物の検出に成功しリグニン分解への有機電解反応の有効性を明らかにした。

 β -[O] -4結合を有するリグニンモデル 2-(2-methoxyphenoxy) -1-phenylethanol(1a) と 2-(2-methoxyphenoxy) -1-(4-methoxyphenyl) ethanol(1b) は Nichols らによる報告に基づき合成を行った。 $^{7)}$ (スキーム 1)

$$\begin{array}{c|c} \text{OH} & \text{OMe} \\ \hline \\ 1a & \text{MeO} & 1b \\ \end{array}$$

図5 リグニンモデルの構造

$$\begin{array}{c} O \\ R \end{array} \begin{array}{c} O \\ B \end{array} \begin{array}{c} O \\ A \end{array} \begin{array}{c$$

1b:R=OMe, 97%

スキーム1 リグニンモデルの合成

合成したリグニンモデルを有機電解装置を用いて電解を行った。(図6)

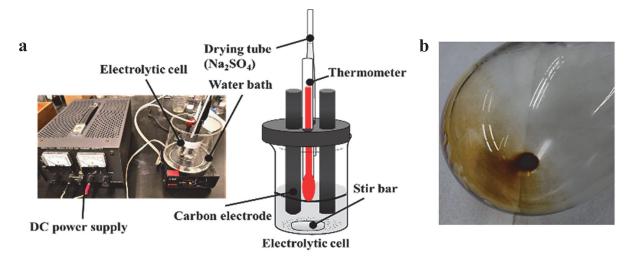


図6 リグニンモデルの電解 (a) 有機電解装置 (b) 電解生成物

電解はリグニンモデル0.2g を基質として行った。電解質としてテトラエチルアンモニウムp-トルエンスルホナートを加え、5% メタノール-アセトニトリル溶液中で炭素電極を用いて0.2A 定電流条件で2.5時間行った。反応後は水を加えて、酢酸エチルで抽出し洗浄、脱水後に溶媒を減圧留去し褐色オイル状の電解生成物が得られた。(図6)

1a 電解生成物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製し、このとき展開溶媒は酢酸を1%添加した酢酸エチル:ヘキサン=1:2を用いた。得られたフラクションを濃縮し、6つのフラクション A1-A6を得た。(表1) それぞれのフラクションは NMR および GC-MS で構造解析を行った。1b 電解生成物は GC-MS を用いて市販の標準物質と比較し分解物の検出を行った。

1a 電解物を精製し得られたフラクション A1-A6 を NMR および GC-MS で構造解析を行った結果フラクション A1から 2a-4a、A6から 5a の分解物が得られ 1b 電解物の GC-MS を用いた分解物の検出の結果 2b-5b の電解生成物を検出することに成功した。(図7)

それぞれ1a、1b の骨格由来の分解物を得ることに成功し炭素電極を用いた有機電解反応によって β -[O] -4結合の切断が可能でありリグニン分解へ応用可能であることを確認することができた。

表1 電解物のフラクション(シリカゲルカラムクロマトグラフィー、酢酸エチル: ヘキサン =1:2酢酸1%)

FR	A1	A2	А3	A4	A5	A6
hoRf	0.69	0.53	0.38	0.31	0.23	0.12
収量(mg)	2.1	6.2	26.0	4.3	6.2	17.3
電解生成物	2a+3a+4a					5a

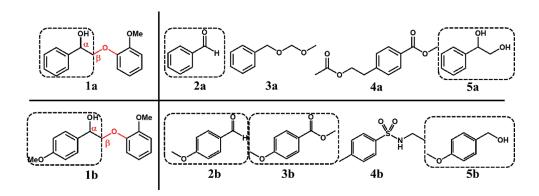


図7 リグニンモデル電解生成物の構造

3. ボールミルユーカリを用いた木粉の電解

有機電解反応を木材に適応させる実験を行うため、本研究ではリグニンを 30%含むユーカリを木材として用いた。ボールミルで細かく破砕したユーカリ木粉(ボールミルユーカリ) 0.2g をリグニンモデルと同様に 2 時間電解を行った。電解後はリグニンモデルと同様に褐色オイル状の電解生成物を得た。(図8)木粉の電解生成物は酢酸を 2% 添加した酢酸エチル:ヘキサン =1:2 を展開溶媒としてシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製した。得られたフラクションを濃縮し、8つのフラクション C1-C8 を得た。(表2) それぞれのフラクションは NMR および GC-MS で構造解析を行った。構造解析の結果フラクション C1 に、フラクション C2 に C2 に、フラクション C3 に C3 に C3 に C4 に C4 に が含まれていることが判明した。(図8) C4 に C4 のように支持塩由来と推測される生成物も混ざっていたものの、木材を電解した結果リグニンモデルと同様に電解生成物を得ることに成功した。したがって有機電解反応を用いることで低コストでリグニンを分解することが可能なことを明らかにした。

表2 電解生成物のフラクション

							C7	
R _f	0.92	0.68	0.6	0.41	0.20	0.10	EtOAc	MeOH
収量(mg)	3.3	2.1	1.6	3.7	3.1	1	2.1	18.7
電解生成物	1c	2c	3c	4c				

a
$$\begin{array}{c} b \\ 1c \\ 2c \\ \hline \\ 3c \\ \end{array}$$

図8 (a)ボールミルユーカリ (b)ユーカリ電解生成物 (c)電解生成物の化学構造

4. 木粉電解物の利用性の検討

4.1 植物生育試験

本研究ではリグニンを分解するだけでなく分解後のリグニンの利用を目指している。その利用法の一つとして期待されているのが植物成長調節物質としての農業分野での利用である。そこで得られた分解粗生成物を植物に与え発育の状態を観察し分解物が与える影響を調べた。電解によって得られた電解粗生成物を水20mLに1.0mg、2.0mg、3.0mg、4.0mg、5.0mg、10.0mgで各量混合させ、カイワレ大根に与えて5日間27℃の暗室で生育した。生育後のカイワレ大根の胚軸と主根の長さをノギスで測定し分解物がカイワレ大根の生育に与える影響を調べた。カイワレ大根を5日間生育した後、生長したカイワレの胚軸と主根の長さを測定した。図9より水のみを与えたコントロールに比べ、分解物を与えたカイワレは胚軸と主根共に長さが短くなっており少量から生長抑制を示した。また与える量を増やすと量の増加とともに成長抑制作用が強くなっていることがわかった。このことから分解物には植物の成長を抑制する成分が含まれていると推測される。したがって木粉の電解によって得られる電解生成物の利用法の一つとして植物成長調節剤としての利用が可能であることを明らかにした。

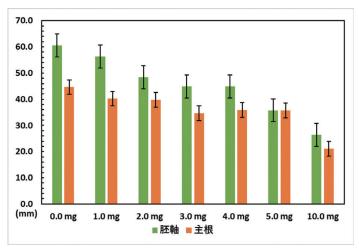


図9 生育後のカイワレの胚軸と主根の平均長

4.2 抗菌活性試験

リグニンの分解によって生成が期待される化合物の中にはバニリンがある。バニリンはバニラの香料として食品添加物やとして利用されている化合物である。また、バニリンには抗菌活性作用があり近年抗菌製品の需要が高まっていることもあり安全な抗菌材料としての利用が期待されている。⁸⁾ そこで本研究では生成が期待されるバニリンやその他の電解生成物が抗菌活性を持つのか調べた。

ボールミルユーカリの電解によって得られた電解生成物の抗菌活性を調べるために Bacillus cereus を用いてペーパーディスク法による抗菌活性試験を行った。電解粗生成物を DMSO に溶解させペーパーディスクにしみ込ませ Bacillus cereus 培養液を塗布した平面寒天培地上に置き 24時間静置培養させた。その後ペーパーディスク周りの阻止円の大きさを測定し抗菌活性を調べた。ペーパーディスクにしみ込ませる試料溶液は電解粗生成物を各量 (100 μ g、200 μ g、300 μ g、400 μ g、500 μ g、1000 μ g)をマイクロピペットで量り取った DMSO20 μ L に溶解させて調製し、コントロールはストレプトマイシン500 μ g と DMSO を 用いた。(表3)

溶解量(µg)	100	200	300	400	500	1000
阻止円(mm)	無し	無し	6.1	6.4	6.8	6.1
ストレプトマイシン阻止円(mm)	17.9	16.0	18.7	16.7	17.5	14.8
DMSO 阻止円 (mm)	無し	無し	無し	無し	無し	無し

表3 ユーカリ電解生成物の抗菌活性

300-1000 μg にかけてはディスクの周りにわずかに阻止円が見られ、ユーカリ電解物の抗菌活性が示唆されたがコントロールのストレプトマイシンに比べると活性は弱いことが分かった。今回用いた分解物は粗生成物であることから分解物の一部の成分に抗菌活性があると推測される。したがって得られた電解物を精製することで抗菌材料としての電解物の利用が期待できる。

5. 総括と展望

本研究では低コストで効率的なリグニン分解法として炭素電極を用いた有機電解反応によるリグニンの分解を検討した。 β -[O]-4型リグニンモデルを用いた電解実験においては β -[O]-4結合が切れそれぞれのリグニンモデルの骨格由来の電解生成物の生成を確認しリグニン分解に有機電解反応が有効であることを確認することに成功した。さらに実際の木材へ実用可能か検討するために、ボールミルユーカリを用いた電解実験を行った。電解の結果リグニンモデルと同様の褐色オイル状の電解生成物を得ることができ、分解物の内4種類の化合物の構造を明らかにすることができた。これらの結果は亜硫酸法やクラフト法に劣らない結果を導くことに成功したと言える。資源に乏しい国においても安定した電力供給ができれば、木材からリグニンを分解することができ、分解産物を製品化できる夢のプロセスと言えよう。

分解産物の有効利用を検証するために行った植物生育試験では少量から植物生長抑制作用

があることを明らかにし、植物の成長調節剤として利用できることを明らかにすることができた。抗菌活性試験ではわずかながら分解物に抗菌活性があることを明らかにし、抗菌材料として利用できる可能性も示した。

本研究によって炭素電極を用いた有機電解反応で複雑な高分子であるリグニンを低コストで温和に分解可能なことと分解物の利用も十分期待できることを明らかにした。木粉が電極に付着し長時間の電解を妨げることや電解生成物の精製が難しいなどいくつかの課題があるが木質バイオマスの有効利用を実現する可能性を示すことができた。本実験結果は、環境調和型未利用資源の展開としての重要な位置付けと言える。さらに研究を発展させ未利用資源である木材の有効利用を木質バイオマスの有効利用の実現と持続可能な社会の構築を目指していく。

謝辞

本研究は長岡技術科学大学物質材料工学専攻前川博史教授、山田知宏修士らと共同で行われました。また本研究を行うにあたり、ボールミルユーカリをご提供いただいた京都大学生存圏研究所渡辺隆司教授、構造解析のための各種測定に協力してくださった大阪市立大学土江松美先生にこの場を借りて深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 飛松裕基、生存圈研究、13,10-18,2017.
- 2) 小泉信義、紙パ技協誌、vol. 25, No. 2, 94-101, 1971.
- 3) 三輪萬治、化学と生物、Vol. 7, No. 6, 337-342, 1969.
- 4) Singhania, R.; Patel, A.; Tirath, R.; Chen, C.; Ponnusamy, V.; Tahir, N.; Kim, S.; Dong, C., Fuel, **2021**, 311, 122608
- 5) 粳間由幸、本田望実、近藤直弥、日本高専学会誌 (Journal of JACT), vol. 18, No. 4, 51-54, 2013
- 6) Ma, L.; Zhou, H.; Kong, X.; Li, Z.; Duan, H. ACS Sustainable *Chem. Eng.*, **2021**, 9, 1932-1940.
- 7) Nichols, J. M.; Bishop, L. M.; Bergman, R. G.; Ellman, J. A. J. Am. Chem. Soc., **2010**, 132, 12554-12555.
- 8) Mell, A.; Kragl, U. Green Chem., 2011, 13, 3007-3047.