

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860318

氏 名 高田 昌阿

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地 (派遣先国名) ブリティッシュコロンビア大学 (カナダ国)

2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

リグノセルロースからの高効率バイオエタノール生産に向けたリグニンのトポ化学の解明3. 派遣期間: 平成 30 年 4 月 1 日 ~ 令和 2 年 1 月 28 日

4. 受入機関名及び部局名

ブリティッシュコロンビア大学 木質科学専攻5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入也可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

1. 研究背景

石油代替燃料として、バイオエタノールが世界中で積極的に導入されている。バイオエタノールの主な原料は糖蜜やデンプン資源であるが、食糧との価格競合が問題となっており、非可食性資源であるリグノセルロースを用いたバイオエタノール生産が注目されている。一般的なバイオエタノール生産には、デンプンなどの多糖類を酵素糖化によって単糖に低分子化し、さらに酵母を用いて単糖をエタノールへと発酵する生物学的変換プロセスが用いられる。一方、リグノセルロースの細胞壁は多糖類であるセルロースとヘミセルロース、及び芳香族高分子であるリグニンが三次元的に複合した緻密な構造を有しており、高効率変換には何らかの前処理が必要となる。

近年、酵素糖化におけるリグニンの阻害効果が明らかとなっている。例えば、物理的阻害による酵素のセルロースへのアクセシビリティの低減や、リグニンと酵素間の結合生成による阻害が報告されている^{1,2)}。リグニンを除去した基質では、理論収率近いグルコース収量が認められるが、一般的に脱リグニンに用いられる化学薬品は高価である。そこで、細胞壁中リグニンの分布を転移、もしくは構造改変させることで、リグニンを完全に除去することなく、酵素のセルロースに対するアクセシビリティを向上させることが期待される。

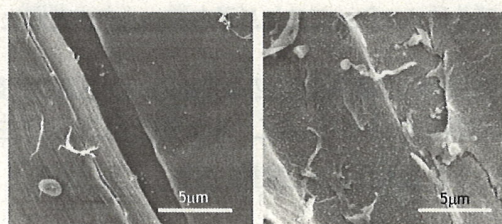
2. 研究実施状況

(1) 針葉樹及びトウモロコシ茎葉の蒸気処理によるリグニン転移メカニズムの解明

酵素のセルロースに対するアクセシビリティを向上させるため、様々な前処理が検討されている。中でも蒸気処理は、触媒を添加せず水のみを使用する比較的低環境負荷な前処理法である。蒸気処理では、加水分解反応により、ヘミセルロースと一部のリグニンが分解され、酵素のアクセシビリティの高い基質が生成できる。蒸気処理に用いられる温度条件 (160~220℃) はリグニンのガラス転移点 (130℃) を超えており、細胞壁中のリグニンが可塑化し、細胞壁外へ溶出する³⁾。細胞壁から溶出したリグニンは疎水性であるため、水 (蒸気) との接触面積を小さくするために球状を形成

し、細胞表面に滴状に付着する。このリグニンの細胞壁からの“転移”が、細胞壁中のセルロースに対する酵素のアクセシビリティを高めているものと考えられている。しかし、リグニン転移のメカニズムについて、不明な点は多い。例えば、トウモロコシなどの草本植物では比較的温和な条件で転移が報告されているのに対し⁴⁾、針葉樹では厳しい条件下でのみ報告されているが⁵⁾、相違が生じる理由は明らかになっていない。

そこで、実際に針葉樹及びトウモロコシ茎葉に対し同じ条件（160°C/10 分）で蒸気処理を施し、リグニンの転移に注目した。蒸気処理した残渣の走査型電子顕微鏡（SEM）画像を図1に示す。その結果、いずれの樹種でも細胞壁表面に球状の小滴が認められ、リグニンの転移が生じていることがわかる。小滴の数に大きな違いがあり、針葉樹に比べてトウモロコシ茎葉より多くの小滴が生じており、容易にリグニン転移が生じていることがわかる。本研究では、この違いが生じる原因について検討した。



針葉樹

トウモロコシ茎葉

図1 針葉樹及びトウモロコシ茎葉の蒸気処理で得られた残渣の SEM 画像

まず、高分子の物理的特性が大きく変化するガラス転移点に注目した。含水率が高いとリグニンのガラス転移点が低下することが報告されている⁹⁾。つまり、細胞壁中リグニンに対する水蒸気のアクセシビリティの違いが、リグニンの可塑化に影響すると考えた。そこで、両種からリグニンを単離し、分子量及び疎水性に注目して、構造解析を試みた。その結果、トウモロコシに比べて針葉樹リグニンは、分子量が大きく、疎水性であることが示唆された。従って、トウモロコシリグニンの方が、水蒸気のリグニンに対するアクセシビリティが高い可能性が示唆された。

次に、十分に水蒸気のリグニンに対するアクセシビリティがある条件での両種のリグニン転移の違いを比較するため、単離したリグニンをろ紙（セルロース）表面に塗布し、蒸気処理を行った。その結果、いずれも容易にリグニンが可塑化し、転移が生じていた。つまり、水蒸気がリグニンにアクセスできる条件であれば、針葉樹でも容易に転移することが明らかとなった。また、蒸気処理前後のろ紙に対して酵素糖化効率を分析したところ、いずれも蒸気処理後に糖収率が増加しており、リグニン転移が酵素のセルロースへのアクセシビリティに寄与することが明らかとなった。

さらに、蒸気処理において、リグニンは分解・低分子化と同時に、縮合反応も進行する。縮合反応は分子量の増加及び疎水性の増大を促進し、リグニン転移への影響も考えられる。そこで、2-ナフトール及び希酸を添加することで、縮合反応の抑制及び促進を試み、リグニン転移への影響を検討した。その結果、疎水性の増加がリグニン転移を抑制することが明らかとなった。

以上の結果を踏まえ、蒸気処理におけるリグニン転移に関するモデル図を図2に示す。針葉樹リグニンに比べて、分子量が小さく、親水性であるトウモロコシ茎葉リグニンは、水蒸気がアクセスしやすく、ガラス転移点の低下を引き起こしていたものと考えられ、リグニンの転移が容易に生じていたものと考えられる。

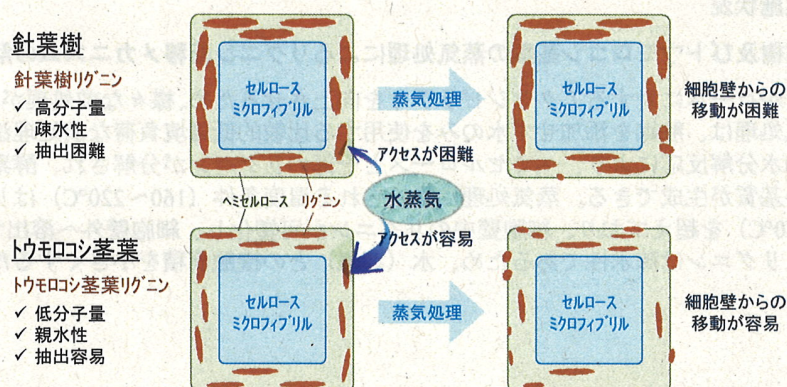


図2 針葉樹及びトウモロコシ茎葉を蒸気処理した際のリグニン転移機構のモデル図

(2) アルカリ添加スルホン化処理によるリグニン構造改変

蒸気の細胞壁中リグニンへのアクセシビリティを向上させる手法の一つとして、リグニン構造の親水性化が挙げられる。親水性基であるスルホン基を導入することで、リグニンの親水性を向上でき、さらにアルカリ添加がスルホン基の導入を促進することが報告されている。そこで本研究では、針葉樹に対しアルカリ添加スルホン化処理し、条件の最適化、及び構造改変がリグニン分布に及ぼす影響を検討した。

その結果、亜硫酸ナトリウム：炭酸ナトリウム＝8%：4%を含浸し、190℃で5分処理した残渣で最も高い変換効率が得られた。この条件で得られた残渣を透過型電子顕微鏡（TEM）観察した結果を図3に示す。リグニンを選択的に染色しているため、黒い部分がリグニン分布を示す。細胞壁中に多くの空隙が認められ、リグニンが溶出していることが示唆された。リグニンの構造改変が上記のアクセシビリティを高め、細胞壁リグニンが容易に転移し、結果的にセルロースに対する酵素のアクセシビリティが向上していた。

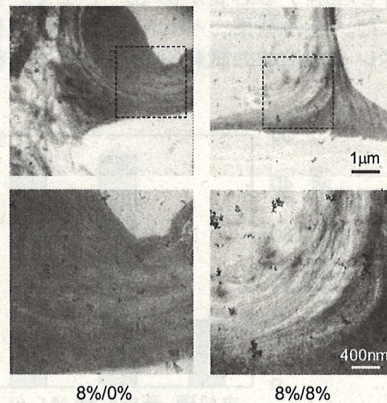


図3 アルカリ添加スルホン化処理した針葉樹のTEM画像

以上、蒸気処理によるリグニン転移のメカニズム、及びその糖化効率への影響の解明に加え、リグニン転移の更なる促進に向け、アルカリ添加スルホン化処理によるリグニン構造改変について明らかにした。

リグノセルロース資源からのバイオエタノール生産について、既往の研究の多くは木材チップや木粉を原料として研究されてきた。しかし、実用化を検討する上で、効率的な輸送に向けた高密度化が重要となる。特に、木質ペレットは世界中で年々生産量及び貿易量が急増している。木質ペレットは主に燃焼用や、コージェネレーションに用いられているが、酵素糖化を用いた生物変換によるバイオエタノール生産の原料に向けた研究例は非常に少ない。そこで、ペレットの生物変換の原料としての可能性について検討した。

(3) リグニン分布がペレット耐久性に及ぼす影響

木質ペレットの取扱いにおいて、重要なパラメータの一つが、ペレットの機械的耐久性である。運搬や取扱いの際に一部がほぐれてしまい、重量損失のみならず、健康被害や、粉塵爆発の危険性がある。木質ペレットの耐久性はリグニン含量や抽出成分含量、細胞長など様々な要素に起因するが、中でもリグニンは重要な要素として考えられている。

ペレット製造の前処理として、蒸気処理が検討されており、ペレットの耐久性を向上させることが知られている。特に、蒸気処理で細胞表面に転移したリグニンがペレット化の際に細胞同士を固める糊としての役割を担っていると考えられる。一方で、その詳細なメカニズムについて十分に検討されていない。そこで、蒸気爆砕処理した試料から転移リグニンを除去し、転移リグニンがペレット耐久性に及ぼす影響を検討した。

その結果、転移リグニンのうち低分子のものは、細胞壁表面で Chemical weak bond layer (CWBL) を形成し、耐久性の向上に必要な水素結合を覆ってしまうため、耐久性を低下させていた。一方、比較的高分子のリグニンは、ペレット化で熱軟化し、細胞同士を繋ぐ糊として働き、耐久性の向上に寄与していた。さらに、構造の異なる4種類のリグニンを添加し、ペレット化することでリグニン構造がペレットの耐久性に及ぼす影響について検討した。その結果、低分子リグニンは、上述の

CWBLを形成し、耐久性の低下が認められた。一方で、中程度の分子量を有するリグニンは、耐久性の向上が認められた。しかし、高度に縮合した高分子リグニンを添加した場合、ペレット化の条件がリグニンのガラス転移点を下回っていたため、耐久性に影響はなかった。このように、リグニン構造によって、ペレットの機械的耐久性への影響が大きく異なることが明らかとなった。

(4) ペレットの酵素糖化性とリグニン分布の影響

酵素糖化を用いた生物変換の原料としての木質ペレットの可能性を検討する上で、ペレット化処理が酵素糖化性に及ぼす影響を理解する必要がある。そこで、上述の蒸気処理した針葉樹をペレット化し、酵素糖化実験に供した。その結果、ペレットで酵素糖化効率が減少した。しかし、機械解繊することで、糖化効率がペレット化前の試料と同程度まで回復した(図4)。

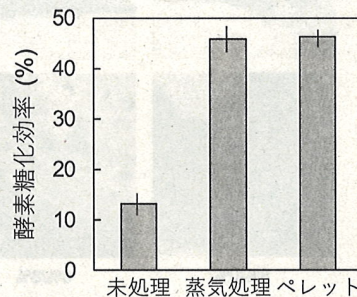


図4 蒸気処理残渣及びペレットの酵素糖化効率

さらに、ペレット化前後の細胞壁中リグニン分布をTEM観察した結果を図5に示す。未処理の針葉樹では、リグニンが細胞壁中で均一に分布しているが、蒸気処理残渣では、二次壁に多くの空隙が認められる。これは、脱リグニンに伴い生じたものと考えられ、セルロースのアクセシビリティの向上に寄与することがわかる。一方で、ペレット化した試料について、興味深いことに、細胞壁中リグニン分布に変化はなく、二次壁中の空隙が充填されず、セルロースのアクセシビリティが維持されていることが明らかとなった。そのため、酵素糖化効率の低下が認められなかったものと考えられる。従って、蒸気処理した針葉樹由来ペレットの生物変換の原料としてのポテンシャルが示された。

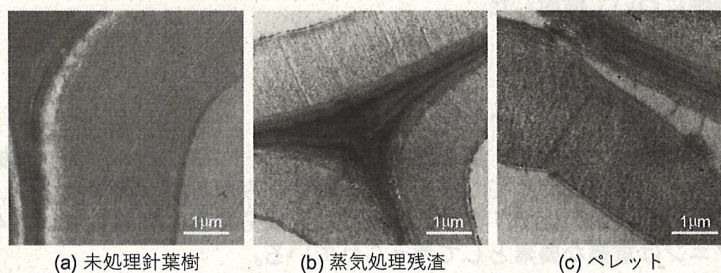


図5 蒸気処理残渣及びペレットのTEM画像

(5) リグノスルホン酸添加の耐久性及び酵素糖化性への影響

蒸気処理した針葉樹から得られたペレットは高い耐久性を有しつつ、酵素糖化性も低下しないことが明らかとなった。しかし、機械的耐久性及び酵素糖化性ともに更なる改良が必要である。耐久性を向上するためには、2%までの添加物が一般的に用いられ、リグニンも検討されている。上述の通り、リグニンは酵素糖化を阻害することが知られているが、スルファイトパルプの副産物である、リグノスルホン酸は、その両親媒性から、酵素と複合体を形成し、この複合体は負に帯電してリグニンを反発するため、酵素とリグニン間の吸着を軽減できる。そこで、リグノスルホン酸を添加剤として用いることで、耐久性と酵素糖化効率の両者が向上する、という仮説を立てた。その結果、耐久性は93%から98%に向上しつつ、酵素糖化効率はほぼ横ばいであった。これは、ペレット化によりリグノスルホン酸の一部が細胞表面を被覆し、酵素のアクセシビリティが低下したのに加え、一部水溶性状態で存在するリグノスルホン酸の阻害軽減効果が打ち消しあったものと考えられる。

以上、派遣者のバックグラウンドである農学・組織形態学的知見を活かした視点から、木質バイオマスの有用物質への高効率変換に向け、様々な研究に取り組んできた。上記の研究に加え、研究室内外の多くの研究者との共同研究（深共晶溶媒による脱リグニン挙動の解明、種々アルカリ溶液を用いて調製したディゾルビングパルプの構造解析、セルロースバインディングモジュールの酵素糖化性評価への応用、メカニカルパルプ設備のバイオリファイナリーへの応用など）にも取り組み、一定の成果を残すことができた。

3. 成果発表

研究内容（１）については、*Biotechnology and Bioengineering* 誌にて原著論文を投稿した。研究内容（２）、（３）、（４）、（５）についても原著論文を執筆中である。さらに、関連分野の最新動向、研究をまとめたレビューを *Bioresource Technology* 誌にて投稿した。これらの研究内容は、複数の国内・国際学会にて発表した。加えて、他の研究者との共同研究でも、深共晶溶媒による脱リグニン挙動に関する研究で、*Frontiers Plant Science* 誌にて原著論文の投稿し、他の研究内容でも国際学会での発表予定である。