

論文の内容の要旨

生物材料科学専攻
平成 12 年度博士課程進学
氏名 相見 光
指導教官 飯塚 堯介

論文題目 **Structural characteristics of small lignin fragments retained in water soluble polysaccharides extracted from MWL isolation residue**

(和訳 MWL 抽出残渣から得た水溶性多糖類に含まれる小断片リグニンの構造)

緒言

これまでに Lignin-Carbohydrate Linkages (以下 L-C 結合)の存在、性質等に関する多くの検討がなされている。L-C 結合は木材からのリグニンの分離を妨げている大きな要因の 1 つであると考えられており、このことが木材から高収率かつ未変質でのリグニンの単離を難しくし、また木材のパルプ化において、パルプ残存リグニンが存在する原因にもなっていると考えられている。これらのことより、L-C 結合の性状を理解することは非常に重要である。リグニン-多糖類間の結合様式については未だ確定的な情報は得られていないものの数多くの研究がある。また Lignin-Carbohydrate Complexes (LCC)としてリグニンの近傍に存在する多糖類の構造についても知見が多数得られている。しかし逆に、LCC として多糖類の近傍に存在するリグニンが、どのような構造的特性を有したリグニンなのか、という点については、ほとんど知見が得られていない。多糖類サイドの知見が多く得られているのは、多糖類分解酵素の存在、または糖を特異的な位置で切断できる試薬の存在 (過ヨウ素酸等)が考えられる。特に多糖類分解酵素を用いることにより、L-C 結合近傍に存在する糖残基を試料中に濃縮することが可能であり、それらの性状を調べることにより、L-C 結合近傍に存在する糖に関する知見を得ることが可能である。一方リグニンについては、そのような特異的な分解を可能にする酵素は知られていない。また選択的に分解(脱リグニン)できる試薬等も知られてはいるが、リグニン化学構造の不安定さから、元の構造の情報を十分に保持しているものはほとんど無いと考えられる。

このようにリグニンに関しては、分解反応等により L-C 結合近傍に存在するリグニン部分の濃縮、分析といった最も有用と考えられる手法が使用できない。このことが L-C 結合近傍に存在するリグニン部分に関する情報が不足している大きな原因の 1 つであると考えられる。

本論文では L-C 結合近傍に存在するリグニン部分の性状を明らかにする目的で、‘多糖に伴って抽出される小断片リグニン’ に焦点を当てて研究を行った。このようなリグニン部分は、多糖との何らかの相互作用(L-C 結合を含む)を有している可能性が高いと考えられるうえ、もし L-C 結合が存在しているとするならば、‘小断片リグニン’ は L-C 結合近傍に存在するリグニン部分であると考えられるからである。またこの‘小断片リグニン’ が単離過程での何らかの切断等で生成したものでなく、元から存在していたものであるならば、‘リグニン生合成時の高分子化初期段階のリグニン’ を代表する試料である可能性も期待できる。本研究の目的は、この‘多糖に伴って抽出される小断片リグニン’ の性状を、他のリグニン区分との比較において解明することにある。

抽出溶媒の選定

木材試料から抽出される多糖類は常にリグニンを含んでいる。そのうち、‘小断片リグニン’ を伴う多糖類を、できる限りリグニンの構造変化が少ない方法で抽出することを目的とした溶媒系の選定を、Björkman LCC 抽出法と同様に MWL 抽出後の磨砕木粉を対象として行った。Björkman LCC は、MWL を抽出した残渣をさらに DMF、DMSO などの溶媒で抽出することにより得られる画分であり、MWL の良溶媒を用いた精製を行ってもそこからリグニンを分離出来ないことから、この画分中の糖とリグニンは何らかの結合を介して存在していると考えられる。また DMF、DMSO 以外の溶媒系を用いてもこの画分の抽出が可能であることから、抽出に用いる溶媒系を選択することにより、その溶媒系固有の性質を持った画分が得られる可能性が高いと考えられる。

種々の溶媒系を用い、24 時間、室温または 60°C にてスギ MWL 抽出残渣の抽出を行い、ろ過後に抽出液中のリグニン量、および各中性糖の定量を行った。その結果、用いた溶媒系の多くでは、抽出された糖のリグニンに対する量比がほとんど 1 であったにもかかわらず、水抽出の場合のみ極めて糖の量比が高かった。またその量比は 60°C の時に比較して室温で抽出した場合の方が高かった。MWL を抽出した後であるにもかかわらず水抽出されるリグニン部分は、糖と何らかの相互作用を有しているために水可溶となっている可能性が高いと考えられた。

水抽出画分に含まれるリグニンの定性

水抽出画分に含まれるリグニンの更なる定性を行う目的で、スギとマカンバの両 MWL 抽出残渣より水抽出画分を調製した。これらの画分のリグニン含有率はそれぞれ 5.3% と 8.5% であり、極めてリグニン含有率が低い画分であった。これらの画分中のリグニンが糖に伴って抽出されるのはなぜか、またその分子量は小さいのか大きいのかという点を明らかにする目的で、これらの画分の多糖類分解酵素処理を行い、ゲルろ過法を用いて処理前後の糖とリグニンの分子量分布変化を調べた。その結果、多糖類分解酵素処理前では、大部分のリグニンは糖と同じ位置にピークを示した。しかし処理後には、多糖の分解・低分子化に伴い、リグニンも大幅に低分子領域に移行していく様子が確認された。またスギ水抽出画分の温和なアルカリ処理では、処理後に糖の分子量分布はほとんど変化しなかったにもかかわらず、リグニンは大幅に低分子領域に移行していく様子が確認された。これらの結果より、両樹種から得られた水抽出画分に含まれるリグニンは、糖と何らかの相互作用を有しているといえる。また、酵素処理後にリグニンが大幅に低分子領域に移行していくことが確認されたことは、リグニン自体の分子量は比較的小さいことを示している。これらの結果より、両樹種より得られた水抽出画分に含まれるリグニンは、多糖長鎖に化学結合などを介して結合したリグニン小断片であることが強く示唆された。

水抽出画分に含まれるリグニンの構造解析を目的として、アルカリ性ニトロベンゼン酸化とオゾン酸化分解を行った。アルカリ性ニトロベンゼン酸化の結果には、スギの場合、水抽出画分、MWL、LCC 抽出溶媒で同様に抽出された画分、およびその残渣との間で特に大きな違いは見られなかった。しかし、マカンバの場合、水抽出画分の S/V 比は他の画分に比べ極めて高い値が得られた。このことは、マカンバ水抽出画分中の非縮合型リグニンは、シリリングル核に富むことを示している。またオゾン酸化分解の結果、両樹種とも水抽出画分では、 β 位に C-アリアル結合を有するリグニン構造(β -5、 β -1構造)由来の生成物が他の画分よりも多く得られ、同時にこの生成物の立体構造比 (*threo/erythro* 比) は極めて高いことがわかった。これは C-アリアル結合としては、*threo* 型のものが多いことを示している。C-アリアル結合のうち β -5構造は *trans(erythro)* 型のみ存在することが知られているので、これらの結果は両樹種より得られた水抽出画分に含まれる小断片リグニンは、他の画分に含まれるリグニンとは異なって、 β -1構造に富むことを示している。

多糖と相互作用を有する小断片リグニンと **endwise type lignin**

先の結果より、本研究で得られた両樹種の水抽出画分は、多糖と相互作用を有する小断片リグニンを含んでおり、またそのリグニンは MWL 等と比較して β -1構造に富むことが示唆された。このことをさらに確認するために、 β -1構造とともに生成すると考えられているグリセルアルデヒド-2-アリアルエーテル型構造についてオゾン分解法を用いて定量を行った。この構造は、リグニン前駆体の β 位と1位のラジカルカップリングにより、 β -1構造と共に生成する **detached side-chain** 構造の代表的なものであり、両構造ともに **endwise type lignin** の特徴であると考えられているので、リグニン構造の全体的な特徴づけを行うための重要な指標となると考えた。定量の結果、他の画分に比べて多量のグリセルアルデヒド-2-アリアルエーテル型構造が、両樹種の水抽出画分リグニンに含まれている事が確認された。水抽出画分中のリグニンが β -1構造に富むと推定されたこととあわせると、L-C 結合近傍のリグニンが **endwise type lignin** の特徴を有していることが示された。なお、これらの結果は β -1構造とグリセルアルデヒド-2-アリアルエーテル型構造が同時に生成するという考え方を裏づけるものであり、また、生成後は両構造が互いに近傍に存在していることを示している。

L-C 結合の生成機構としては、低分子モデル化合物を用いた実験より、 β -O-4 型キノンメチドへの糖水酸基の付加反応が提案されている。**endwise type lignin** は β -O-4 構造に富むと考えられているので、このような機構による L-C 結合を生成する機会が多いことになる。本研究において L-C 結合近傍のリグニンが、**endwise type lignin** の特徴を有していることが示されたことは、このような考え方に合致するものである。