

# 博士論文

樹木の葉の化学的手法によるリグニン定量と  
そのための前抽出に関する研究

戸 田 守 一

# 目次

第1章 緒言	1
1.1. 本研究の背景	2
1.2. 本研究で用いた試料についての考察	
1.2.1 二次木部と葉の組織の違いについての考察	6
1.2.3 本研究で用いた樹種(イチョウ、ケヤキ)の特徴	7
1.3. 抽出についての考察	9
1.4. リグニン分析法についての考察	
1.4.1. クラーソン法	10
1.4.2. Acid detergent法	11
1.4.3. アセチルブロミド法	13
1.4.4. ニトロベンゼン酸化法	13
1.4.5. オゾン分解法	14
1.4.6. 赤外吸収スペクトルによる芳香核量の試算	14
1.4.7. 過マンガン酸カリウムの消費量測定	15
1.5. 本研究の目的	16
1.6. 参考文献	17
第2章 様々な樹種の様々な部位のリグニン分析の比較	19
2.1. 緒言	20
2.2. 実験	
2.2.1. 試料	23
2.2.2. ニトロベンゼン酸化	25
2.2.3. クラーソン法	27
2.2.4. 赤外スペクトル測定による芳香核量指標値の試算	28
2.3. 結果と考察	
2.3.1. ニトロベンゼン酸化による分析	30
2.3.2. クラーソン法による分析	32
2.3.3. 赤外吸収スペクトル分析による芳香核量の試算	33
2.3.4. 化学分析による非木質組織のリグニン量の評価	35
2.3.5. ニトロベンゼン酸化生成物収率と芳香核量指標値の比較	36
2.3.6. クラーソン法による定量値と芳香核量指標値の比較	38

2.4. 第2章のまとめ	40
2.5. 参考文献	40
第3章 イチョウとケヤキの葉試料への抽出による影響	41
3.1. 緒言	42
3.2. 実験	
3.2.1. 試料調製	43
3.2.2. クラーソン法による分析	44
3.2.3. アセチルブロミド法	44
3.2.4. ニトロベンゼン酸化	44
3.2.5. 中性糖分析	45
3.2.6. 元素分析	45
3.2.7. 抽出後の溶媒の赤外吸収スペクトル分析	46
3.3. 結果と考察	
3.3.1. 抽出の試料重量への影響	47
3.3.2. クラーソン法による分析	48
3.3.3. アセチルブロミド法による分析	50
3.3.4. ニトロベンゼン酸化による分析	52
3.3.5. 中性糖分析	55
3.3.6. 元素分析	57
3.3.7. 抽出後の溶媒の赤外吸収スペクトル分析	58
3.4. 第3章のまとめ	59
3.5. 参考文献	59
第4章 葉試料のクラーソン残渣の分析	60
4.1. 緒言	61
4.2. 実験	
4.2.1. 試料	62
4.2.2. 赤外吸収スペクトル分析による芳香核量指標値の算出	62
4.2.3. 元素分析	62
4.2.4. 過マンガン酸消費量	63
4.2.5. メトキシル基定量	63
4.3. 結果と考察	

4.3.1. クラーソン残渣の芳香核量指標値.....	64
4.3.2. クラーソン残渣の元素分析.....	66
4.3.3. クラーソン残渣の過マンガン酸消費量.....	68
4.3.4. クラーソン残渣のメトキシル基量.....	70
4.4. 第4章のまとめ.....	72
4.5. 参考文献.....	72
第5章 総括.....	73
謝辞.....	75

# 第 1 章

## 緒言

### 1.1. 本研究の背景

植物バイオマスの利用に関する研究は古くから進められてきた。その一つが植物バイオマスという再生可能な資源から化石資源の代替品を作り出すための研究であり、CO<sub>2</sub>排出や資源枯渇問題の対策の一つとして期待されている。近年、バイオマス由来の石油代替燃料としてバイオエタノールの燃料利用が進み、アメリカやブラジルなどで大規模な導入が行われたが、原料に使われたトウモロコシなどの穀物価格の高騰を招くきっかけの一つとなった。高騰した理由は投機によるところが大きいと言われているが、穀物由来のバイオマス燃料は原料の価格が安定しない恐れが示された。これらのことから、食物以外のバイオマスの利用が重要視されるようになり、成長の早い植物や農林業の過程で廃棄されている廃棄物がバイオマス資源として注目されるようになった。

地球上のバイオマスの 90%は森林由来であり、その中で大きな割合を占める樹木の有効利用はバイオマス利用において非常に重要であり、そのための研究が古くから進められてきた。

木材として一般的に使われる部分はほとんどが二次木部と呼ばれる形成層より内側の部分である。二次木部の細胞壁の化学成分は主にセルロース、ヘミセルロース、リグニンから構成されている。その割合は一般的にセルロースがおおよそ 50%、ヘミセルロースとリグニンが針葉樹ではそれぞれ 20%と 30%、広葉樹ではそれぞれ 30%と 20%ほどである。阿久津は日本の木材から広葉樹 8 種類、針葉樹 2 種類、そしてイネ科のチシマザサを分析し、ホロセルロースは 74.5 (トドマツ) ~86.1 (シラカバ) %、リグニン量は 18.9 (シラカバ) ~29.2 (トドマツ) %であった。また、チシマザサは、ホロセルロースが 75.3%、リグニン量が 24.4%であった。[1][2] Fengel らは温帯と熱帯由来の針葉樹材と広葉樹材の計 96 試料のリグニンの木材試料を分析し、リグニン量は、17.6%(Trembling aspen: temperate hardwood)~39.8% (Red iron wood: tropical hard wood) であり、平均は 26.8%であった。また、幹、枝、根、樹皮等ではこれらの成分量は大きく異なった値を示したと述べている。

木材の化学原料としての利用はセルロースとそこから得られる糖が中心であり、木材からこれらを効率よく

取り出す方法についての研究は最重要項目の一つである。この目的においてリグニンは不要物として除去されるべき成分であり、リグニンの効果的な分解除去のため、定量分析、化学的な反応挙動、構造の解析などの研究が進められてきた。また、近年ではリグニンを利用した高付加価値製品の開発も試みられており、リグニンに関する研究は重要性を増している。[3]

リグニンの研究においてその単離は非常に重要な要素であるが、未変化体のリグニンの単離とその正確な量はいまだ不可能であり、このため、全ての単離方法は、基本的にリグニンの本来の構造を変更する、または変化の少ない一部分のみを解放するなどなんらかの欠点を有する。[1][3]

一方で、樹木の樹皮や枝葉などの部位の利用に関する研究は二次木部ほど進んでおらず、基本的な成分分析法についても確立したものが無い。その理由の一つとしてこれらの組織の構成成分が二次木部よりも多様であるため、構成成分の把握および単離が困難なことが挙げられる。それゆえに有効利用されている樹木の部位は大部分が二次木部であり、樹皮や枝をバイオマスとして有効利用する試みは進んでいないのが現状である。一方で樹木の葉や樹皮などに含まれる微量成分を有用物として利用する研究は様々な分野で進められており、特に薬効を持つと考えられる成分については非常に多くの報告が挙げられている。例えば Beek や Sign らは、イチョウについて、葉に含まれる薬効成分の化学分析を行ったが、リグニンとの関連には言及していない。

[4][5]

樹木の二次木部以外のリグニン定量法に関しては様々な研究が進められてきたが、その進歩は木材ほどではなく、樹木の葉についても構成成分の定量法は確立したものはない。特にリグニンについては、既往の研究により木材のリグニン定量に用いられるクラークソン法を樹木の葉に用いた場合、樹木と比較して同等かそれ以上の値を示すことがわかっている。一方で、葉試料のニトロベンゼン酸化生成物収率や赤外スペクトル分析による芳香核量の推定値は木材よりも低い値を示すことから、葉試料においてはリグニン以外の成分がリグニンとして定量されるためクラークソン法では過大な値を示すことが強く示唆され、葉試料に含まれる実際のリグニン量は少ないと考えられる。 [6] [7] [8]

樹木の葉の分析の参考になるものとして、飼料科学の分野における草本植物の研究がある。例えば、リグニン分析に関しては、クラークソン法は飼料に含まれるタンパク質が正確なリグニンの定量を妨げるために限界があるため、飼料のためのリグニン定量法として酸性デタージェント法が開発された。この方法は、一般的にタンパク質を含む草本類の飼料中のリグニン濃度から消化性を見積もるために用いられている。その他、樹木の葉のリグニン定量にも応用されている場合もある。[9] [10]

Grabberらはリグニンの遺伝学、生化学の研究は木材を対象にしたものが多く、これはパルプ化の効率上昇と環境負荷の低減を目的とした研究が多く進められてきたためであり、一方でリグニンの生合成や細胞壁の生分解性に関する研究は飼料を対象にしたものが多いと述べている。[11]

リグニンの正確な定量に影響を与えるリグニン以外の成分の一つとしてタンパク質がしばしば俎上に挙げられ、葉や草本においてはその影響が大きいと考えられてきた。タンパク質によるクラークソン法への影響はNormanとJenkinsが藁などの草本試料について詳細に検討している。彼らの研究では藁に牛由来のタンパク質を加えた飼料をクラークソン法による分析にかけた結果、残渣の重量および窒素含有量が増えなかったものよりも増加したことため、タンパク質がクラークソン残渣の形成に参加していることが示された。また、タンパク質がリグニンとともに残渣を形成するのは72%硫酸処理の過程であることが示唆された。ただし、加えるタンパク質の量が一定量を超えると窒素含有量の増加に対する残渣重量は増加しにくくなり、リグニンと共に残渣を形成するタンパク質の割合には上限があることが示された。また、タンパク質の添加による残渣重量の増加は窒素のおよそ6倍であり、この値はアミノ酸の窒素重量に対する全体の重量の比の平均としてよく用いられる6.25に近いものであるため、タンパク質はほとんど分解されない状態で残渣を形成している可能性がある。多糖類とタンパク質のみ、またはタンパク質単独では残渣を形成しないことから、クラークソン残渣に含まれるタンパク質が酸不溶の残渣を形成するためにはリグニンが必要であると考えられる。Ronaldらの研究においても、セルロースとキシランは単体ではクラークソン処理の過程で遊離タンパク質やアミノ酸と共に残渣を形成しないことが確認されている。[12] [13]



タンパク質以外にリグニン定量に影響を与える成分の一つとして、イネ科植物に大量に含まれるシリカが挙げられる。Van Soest は稲わらのシリカに影響を受けにくいリグニン定量法として、Acid detergent fiber(酸性条件でたんぱく質を除去した繊維)を過マンガン酸により分解し、その前後の重量差をリグニンとして測定する方法を提案している。[12]

## 1.2 本研究で用いた試料についての考察

本研究では樹木の葉を試料として用いたが、葉と木材は組織構造が大きく異なり、構成成分もより多岐にわたる。葉の構成成分は生態によっても変化する可能性がある。本項では二次木部と葉の違いと用いた樹種の特徴について考察する。

### 1.2.1. 二次木部と葉の組織の違いについての考察

樹木の木材として扱われる部位は形成層より内側の二次木部が中心であり、形成層より外側の樹皮などが材として扱われることは少ない。二次木部はほぼ細胞壁のみで構成され、細胞壁は一次壁と二次壁に区別される。二次壁の主成分はセルロース、ヘミセルロース、リグニンであり、一次壁は加えてタンパク質やペクチンなどを含む。

草本類におけるリグニンの機能は細胞壁の柔軟性と浸透性を低下させ、疎水性を与えるものと考えられている。草本類のリグニン構造は木材と同様にフェニルプロパン単位がエーテルあるいは炭素 - 炭素結合により高分子化したものであるが、その比率は木材と同等であるとは限らない。 [14]

葉の組織は一般的に表皮組織、柵状組織、海綿状組織、維管束で構成されており、維管束以外の組織には細胞壁の内側に生きた組織が存在する。そのため、葉試料を前処理なしで扱う際は生きた組織に由来する成分の影響を受けることを考慮に入れる必要がある。細胞の多くは二次壁を持たず、表皮組織の細胞などは一次壁が発達することで構造体を維持する機能を得ており、細胞間の接着はペクチン質が主体である。

葉肉部分である柵状組織、海綿状組織を構成する細胞は細胞間の接触が密ではない。また、非木質試料の表皮系は木材の樹皮に相当するものであり、樹皮と同様にリグニン分析に影響を与える成分を少なからず含む。特に葉の表面のクチクラ層は正確なリグニン定量における障害の一つとなっている。この組織は葉や茎の物理的防御や構造の維持に貢献しており、外側にワックス層、内側にペクチン層を挟んで表皮細胞が存在する。クチクラ層の構成成分はクチンと呼ばれる長鎖脂肪酸を含む物質が主であり、その他にスベリン、ワックス、タ

ンニン等の成分から構成され、クチクラ層の表皮細胞に近い部分はセルロースを含む。これらの成分の構成比は部位ごとに異なる。スベリン、ワックス、タンニンは樹皮やコルク層などの樹木の表皮系にも含まれる成分である。クチクラ層は酸に強く、クチクラ層の単離法の一つとして酸により細胞組織を分解する方法がある。従って、クラークソン法などの酸による分解を伴う成分分析法において、クチクラ層は分解されずに残渣を形成し、正確な測定を困難なものにしている原因の一つとなっている。[15] [16]

このように葉試料は構成成分が多様であるため成分分析が木材に比べて非常に困難なものとなっている。また、細胞壁そのものについても二次木部と葉試料が同じような構成をしている保証はなく、葉試料の細胞壁は二次木部に比べてリグニンの量や構造が大幅に異なる可能性もある。

### 1.2.2. 本研究で用いた樹種(イチョウ、ケヤキ)の特徴

#### ・イチョウ

雌雄異株の落葉樹であり、赤道地帯、極地方を除く世界各地に植えられている。古代から生息している樹種であり、1億年以上前から遺伝子に大きな変化はなく、生きた化石とも呼ばれる。ゲノム解析によると遺伝子的には針葉樹とは遠く、むしろソテツ(九州、南西諸島、台湾、中国南部などに分布する裸子植物)に近い種である。植樹目的は街路樹や実の食用、材のほか、欧米では成分採集のための大規模プランテーションも行われている。[17] [18]

古来よりイチョウの葉には様々な効能があると言われ、薬として重用されてきたほか、書物に挟んでおくと紙魚(紙などを食害する昆虫の一種)から守られる等伝えられてきた。現在の主な需要の一つに樹皮や葉から得られる二次代謝物であるテルペントリラクトンやフラボノイド等に認知症への薬効があり、それらを効率よく抽出、精製するために様々な研究が進められている。ただしこれらの成分の抽出率は非常に低く、重量にして1%にも満たない。[19]

材は家具などに使われ、特に将棋や彫刻の材として用いられる。種子は食用に供される。

- ・ケヤキ

雌雄同株の落葉樹であり、日本、台湾、朝鮮、中国の温帯～暖帯気候帯に生息している。植樹目的は街路樹と材が主であり、材は狂いが非常に少なく水湿にもよく耐えるため、社寺建材、船の竜骨材のほか、漆器によく用いられる。成分利用などは特に行われていない。[20]

### 1.3. 抽出についての考察

前述したように樹木細胞壁の主成分はセルロース、ヘミセルロース、リグニンの3種であるが、それ以外にも抽出成分などを含む。中性溶媒や水により化学反応を伴わずに抽出される成分を抽出成分と呼び、テルペン、アルカロイド、ポリフェノール、脂肪酸、炭化水素、配糖体等の二次代謝産物が中心である。抽出成分の含有量は、例えば南洋材など樹種によっては大きな値を示すことがあるが、国産材では3～5%の範囲である。[21]

抽出成分以外にも縮合型タンニンなど、上記の方法では抽出できない細胞壁主成分以外の成分が存在する。

木材の分析では抽出成分を除去するための前処理としてエタノール-ベンゼン(1:2)による抽出が行われることが一般的であり、この操作では遊離脂肪酸やリン脂質などの脂質、また脂質と類似する溶解性を示す樹脂などを除去できるとされている。しかし、樹皮や師部などのように抽出成分を明らかに多量に含む組織や熱帯産樹の中にはエタノール-ベンゼン処理によって抽出し切れない抽出成分を含む樹種もあり、このような試料では水酸化ナトリウム水溶液やエタノールによる処理を加えて施す場合がある。脂質の抽出はエタノール-ベンゼンのほかにクロロホルム-メタノール、エーテル、メタノール-ベンゼンなどによっても行われる。また、脱脂操作において、アセトン、80%エタノール、85%メタノールなどの親水性有機溶媒を用いる場合もあり、これらは脂質のほかに水溶性物質の除去も目的としている。[22]

水溶性物質の除去には冷水、温水のまたは前述した80%エタノールなどの親水性有機溶媒を用いる。植物中には様々な水溶性物質が存在するため、その内訳の特定は困難であるが、遊離多糖、一部のタンニン、低分子成分などが除去できるとされている。

タンパク質は塩化ナトリウム溶液や希アルカリ溶液、界面活性剤などで除去するのが一般的である。ただし、アルカリ溶液はリグニンやヘミセルロースの一部も分解除去してしまう恐れがある。

葉試料における抽出は木材で行われるような不要物の除去を目的とするものよりも有効成分を得るために行われるものが多い。例えばイチョウにおいてはギンコライド(薬効成分があるとされるテルペン類)を効果的に抽出するために水-メタノールあるいは水-アセトンによる様々な抽出条件が検討されている。[19]

#### 1.4. リグニン分析法についての考察

リグニンの定量法は直接方法として酸などにより細胞壁中のセルロースとヘミセルロースを分解し、生じた不溶性の残渣をリグニンとして重量を計量する方法と、間接方法として、リグニン含有量を多糖類の定量の後で計算する方法、分光測定方法により定量する方法、もしくは酸化試薬とリグニンの反応結果から導く方法に分類できる。しかし、全てのリグニン定量方法は、不純物（抽出成分や多糖類由来成分）の存在や計量の不確かさなどの問題が生じる恐れがある。

リグニンの構造を調べるための分析法がニトロベンゼン酸化とオゾン酸化である。前者はリグニンの芳香核構造について、後者はリグニンの側鎖構造についての知見を得るために用いられる。

##### 1.4.1. クラーソン法

木材における代表的なリグニン分析法の一つであるクラーソン法は試料を 72%と 3%の硫酸による逐次処理により糖を分解除去し、その残渣をリグニンとして定量する方法である。

植物の細胞壁試料を72%硫酸によって膨潤させ、3%硫酸によって熱処理することにより、セルロースとヘミセルロースは加水分解し、リグニンは縮合して不溶性の残渣となり一部は酸に可溶化する。この残渣の重量と酸性溶液中のリグニンを測定することにより、試料中のリグニン量を定量する方法がクラーソン法である。

硫酸処理の条件はJIS法(JIS P 8008)では72%硫酸処理を4時間、3%での還流煮沸を4時間としている。クラーソン法は数々の修正方法が開発されており、硫酸処理の条件は研究者によって異なることが少なくない。本研究では吉原一年らの開発した改良法に基づき、72%硫酸処理が室温で3時間、3%での煮沸還流がオートクレーブによる121℃で30分の条件を用いた。[23]

72%硫酸処理の段階では試料の膨潤、炭水化物の加水分解、リグニンの縮合が起こり、3%硫酸処理の段階では可溶化したリグニンの残渣形成、72%硫酸処理で形成した残渣の一部可溶化が起こるとの報告がある。酸可溶性リグニンは一般的に広葉樹が針葉樹よりも高い値を示し、シリングル核構造の量が酸可溶性リグニンの

量に影響を与えていると考えられる。[24]

硫酸では分解されないリグニン以外の成分を多く含む木材試料、例えば南洋材などは、そのままではクラークソン法による定量値が過大な値を与えられる可能性がある。そのため、木材試料の分析では前処理としてエタノール-ベンゼン(1:2)を用いたソックスレー抽出による脱脂が一般的に行われている。また、タンニンが多く含まれる樹種は95%エタノール抽出による前処理を施すことがある。

二次木部を構成する糖類の大部分はクラークソン法の処理過程で可溶化するが、ごく僅かにクラークソン残渣を形成するものがある。これは糖類のごく一部がリグニンに埋包されているため硫酸処理の影響を受けにくいと考えられている。硫酸処理の過程で残渣を形成する成分に埋包されているため本来は残渣を形成しない成分が残渣中に含まれる現象は、葉試料の分析において大きく影響すると考えられる。例えばクチクラ層は酸で分解されにくい組織であり、セルロースが含まれている部分もある。

このように、非木質試料ではクラークソン法による値が過大に与えられる可能性が非常に高く、非木質試料の正確なリグニン定量法として用いるためには厳密な検証が必要である。

#### 1.4.2. Acid detergent法

Acid detergent法は畜産や動物学の分野において飼料となる草本植物のリグニン分析に広く用いられている方法であり、この方法によって得られた値は飼料の消化性の重要な指標として用いられている。[25]

Acid detergent 法はクラークソン法におけるタンパク質の残渣への残留の問題に対して、クラークソン法に代わるリグニン定量法として P.J Van Soest により開発された。酵素やアルカリ溶液を用いたタンパク質の除去は試料中のリグニンをも除去してしまう恐れがあるが、Acid detergent 法はセチルトリメチルアンモニウムブロマイド(CTAB)のタンパク質を酸性溶媒に溶かす能力を利用しリグニンを除去せずにたんぱく質の除去をめざしたものである。Acid detergent 法の具体的な手順は、Acid detergent solution (0.5mol/l 硫酸に CTAB を溶解させたもの)を用いた熱処理で試料を Acid detergent fiber へと調製し、さらにそれを 72%硫酸により処理

して残った残渣をリグニンとして定量する。[26]

Jung (1992) は、飼料作物 (SwitchgrassとBig Bluestem) の成熟に伴うリグニン増加量の分析をクラークソン法とAcid detergent法で行い、どちらの分析法も作物の成熟度とリグニン量に相関を示したと述べている。

[27] また、牧草を含む16種類の飼料作物のリグニン分析にクラークソン法とAcid detergent法の両方を用いた結果、全ての飼料で、クラークソン法による定量値がAcid detergent法によるそれより高いこと、とくに草本飼料ではその差が最大になることを発見した。リグニン量の幅はクラークソン法では4.8~14.3%、Acid detergent法では1.6~9.4%であった。[28] Hatfieldらの報告においても同様に、クラークソン法による定量値はAcid detergent法によるそれよりも高い値を示した。アルファルファは他の草類の2倍のタンパク質を有しているが、クラークソン法による定量値はAcid detergent法による定量値よりも30~40%高い値を示した一方で、他の草本類では、クラークソン法による定量値は、Acid detergent法による定量値よりも200から300%高かった。[13]

クラークソン法とAcid detergent法から得られた残渣を熱分解GC-MS分析した結果、元の試料と得られた残渣のリグニン構成がほぼ同じことを確認した。草本試料のクラークソン法とAcid detergent法による定量値の差は、タンパク質または炭水化物の加水分解が不完全なためではなく、Acid detergent処理の過程でクラークソン法においてリグニンとして定量される成分が酸可溶化するためであると考えられる。したがって、クラークソン法による定量はリグニン量を過大評価し、Acid detergent法はリグニン量を過小評価している可能性が高い。[29]

[30] [31] [32] [33]

本研究ではリグニンが可溶化することで正確な定量値を得られなくなることを避けるために酸性デタージェント法による分析法は行わなかった。ただし、中性デタージェントによる前処理はAcid detergent法によるリグニン分析の前処理としてよく用いられるものであり、この処理はペクチン、タンパク質、糖、脂質、水溶性成分などの除去を目的としている。[25]



#### 1.4.3. アセチルブロミド法

アセチルブロミド法によるリグニンの定量は紫外吸収スペクトルを利用したリグニン分析法の一つである。この分析法は試料をアセチルブロミド酢酸溶液に完全に溶解させ、リグニンの特徴的な吸収波長である280 nmの紫外吸収強度を測定することによりリグニン量を算出する方法である。加熱溶解の際に過塩素酸を加えることで木粉を溶解しやすくした改良法が飯山らによって示されており、本研究ではこれを採用している。

[34] アセチルブロミド法をクラークソン法と比較すると少量の試料で迅速に分析を行える利点がある一方で、正確な定量のためには正確な吸光係数を必要とするため、何らかの方法で正確なリグニン量を予め測定しておくことが必要となる。また、リグニン以外の280nmに吸光を与える成分が試料中に存在する場合は過大な評価を与えてしまうなどの欠点がある。

樹木の葉は様々な成分を含むため、この方法で分析する際は前述の欠点による影響が大きくなる恐れがある。また、前述したように紫外吸収強度からリグニン量を算出する際に用いる吸光係数は正確なリグニン量を求める上で非常に重要であるが、吸光係数を求めるにあたってリグニンを単離あるいは正確に定量することが必要であり、非木質組織はそれが非常に困難であるため、正確な吸光係数を求めることは難しい。

非木質組織の分析の際はクチクラ層由来の成分などアセチルブロミド酢酸溶液での処理後も可溶化しない成分が残りやすいため、紫外吸収スペクトル測定を行う前にこれらを取り除く必要がある。

#### 1.4.4. ニトロベンゼン酸化法

ニトロベンゼン酸化法はアルカリ性下でリグニン側鎖の $\alpha$ 位と $\beta$ 位の炭素-炭素結合を酸化的に開裂させることにより得られた生成物を分析する方法である。ニトロベンゼン酸化生成物は元の芳香核構造を保持しているため、リグニンの芳香核構造についての知見を得ることができる。シリンギル核からはシリンガアルデヒドおよびシリンガ酸、グアイアシル核からはバニリンおよびバニリン酸、 $p$ -ヒドロキシフェニル核からは $p$ -ヒドロキシベンズアルデヒドおよび $p$ -ヒドロキシ安息香酸がそれぞれ生成する。ただし、芳香核およ

び側鎖の $\alpha$ 位に炭素－炭素結合が存在する、いわゆる縮合型リグニンからはベンズアルデヒド誘導体ごく低い収率でしか得られないため、ニトロベンゼン酸化によって得られる芳香核構造の知見は非縮合型構造にほぼ限定される。

葉試料などの非木質試料の分析に際してはリグナンなどのリグニン様成分からもニトロベンゼン酸化生成物を得られる可能性について留意しておく必要がある。

#### 1.4.5. オゾン分解法

オゾン分解法はリグニンの側鎖構造を保持したまま芳香核のみを選択的に分解することによりリグニンの $\beta$ -O-4結合の二つの立体異性体であるエリスロ型とスレオ型から、それぞれエリスロン酸とスレオン酸の二種類のテトロン酸を生成する。この二つの有機酸の生成量から試料中に存在するエリスロ型とスレオ型 $\beta$ -O-4構造の量を算出することができる。オゾン分解法は $\beta$ -O-4構造以外の側鎖構造は、 $\beta$ -5、 $\beta$ -1、glycerladehyde-2-aryl etherの各構造に適用されている。

#### 1.4.6. 赤外吸収スペクトルによる芳香核量の試算

赤外吸収スペクトル分析は容易かつ迅速に微量の試料で行うことができ、また、試料をほぼ変質させずに分析することが可能である。これを用いたリグニンの定性、定量分析は古くから数多くの研究がなされており、定性分析の例として、 $1580\sim 1760\text{cm}^{-1}$  付近のピーク面積と $1503\text{ cm}^{-1}$  付近のピーク面積の比によって、針葉樹、広葉樹の判別を行うことができる。定量分析は芳香核二重結合の伸縮振動に由来する $1600\text{cm}^{-1}$  付近および $1500\text{cm}^{-1}$  付近のピークをリグニン由来のピークとして用いられることが多く、本研究ではこれらのリグニン由来のピークとほかのピークとの面積比あるいは高さ比をリグニン量の指標として扱えるかを検討した。しかし、文献によって算出方法や結果が異なっており、赤外吸収スペクトル分析を用いたリグニンの定量法が確立されているとは言えない。また、芳香核を持つ物質ならリグニン以外の物質でも $1600\text{cm}^{-1}$  および $1500\text{cm}^{-1}$

付近にピークを示すため、リグニン以外の芳香核を持つ成分が試料に含まれている場合、過大な値を示すおそれがある。[8] [35]

ニトロベンゼン酸化あるいはオゾン酸化によって得られる生成物の量はリグニンの化学構造によって変化するため、これらの値から正確なリグニン量を導くことはできないが、リグニン量の最低値の指標とはなり得る。一方で、赤外吸収スペクトル分析により直接リグニン量を測定することには疑問が残るが、芳香核量を算出することによりリグニン量の最大値を見積もることができる。したがって、リグニン分解生成物収量と芳香核指標値を比較することにより、リグニン量の範囲を見積もることが可能だと思われる。

#### 1.4.7. 過マンガン酸カリウムの消費量測定

パルプのリグニンの分析法の一つに、パルプに酸化処理を施した際に消費される酸化剤の量からリグニン量を算出する方法がある。その代表的なものが過マンガン酸カリウムを用いたカップー価測定であり、パルプなどのリグニン量を示す指標として、ひいては漂白における薬品等の必要量の指標として広く用いられている。ただし、この方法は結束繊維やリグニンを多く含む試料には適用困難であり、パルプ化などの脱リグニンを経ていない植物組織の分析に用いられることはほとんどない。一方、リグニン定量の目的でこの方法を使う場合、試料が何かしらの酸化剤の影響を受けてなおリグニンが失われていないならばリグニンの値が少なく見積もられる。その一方で過マンガン酸カリウムは不飽和結合と反応し、その二重結合を分解することによりリグニンを分解するため、リグニン以外の不飽和結合をもつ成分が存在した場合、過マンガン酸カリウム消費量を過大に与える事がある。本研究ではクラークソン残渣の過マンガン酸カリウム消費量を測定したが、非木質試料を扱う場合、タンパク質由来のフェニルアラニンやクチクラ由来のオレイン酸など、不飽和結合をもつ物質が影響することが考えられる。

### 1.5 本研究の目的

樹木の葉のリグニン分析法はいまだ確立しているとはいいがたい。樹木の葉の利用可能性を検討するためにも、リグニンのみならずその正確な構成成分を明らかにすることは非常に重要である。本研究では樹木の葉に様々な前抽出を施し、クラークソン法を中心とした化学的分析法にどのような影響を与えるのかを検討した。

## 1.6. 参考文献

- [1] Dietrich Fengel, Gerd Wenger "Wood, Chemistry, Ultrastructure, Reactions". Berlin/New York: Walter de Gruyter. p 49-51, 1984
- [2] 安久津 久、"木質飼料にふさわしい樹種をさぐる" 林産試験だより 12 月号、北海道立総合研究機構森林研究本部 林産試験場、1985
- [3] Y. Matsumoto, A. Ishizu and J. Nakano "Studies on Chemical Structure of Lignin by Ozonation", *Holzforschung*, 40 p81-85, 1986
- [4] Teris A. van Beek. "Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts". *Journal of Chromatography A*, 967 p21-55, 2002
- [5] Bikram Singh, Pushpinder Kaur, Gopichand, R.D. Singh, P.S. Ahuja, "Biology and chemistry of *Ginkgo biloba*", *Fitoterapia*, 79 p401-418, 2008
- [6] Jin, Z., Akiyama, T., Chung, B. Y., Matsumoto, Y., Iiyama, K., and Watanabe, S., "Changes in lignin content of leaf litters during mulching," *Phytochemistry*, 64(5) p1023-1031, 2003
- [7] 中村裕貴 修士論文 (2008)
- [8] 戸田守一 修士論文 (2010)
- [9] Rebecca Van Acker, Ruben Vanholme, Véronique Storme, Jennifer C Mortimer, Paul Dupree, and Wout Boerjan "Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana*", *Biotechnology for Biofuels*, p.6-46, 2013
- [10] 厚生省 食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会報告書 (2015) "遺伝子組換え食品等評価書 低リグニンアルファルファKK179 系統"、2015年3月
- [11] John H. Grabber, John Ralph, Catherine Lapierre, Yves Barrière "Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions". *C. R. Biologies*, 327 p455-465, 2004
- [12] P.J. Van Soest, "Rice straw, the role of silica and treatments to improve quality". *Animal Feed Science and Technology*. 130 p137-171, 2006
- [13] Ronald D Hatfield, Hans-Joachim G Jung, John Ralph, Dwayne R Buxton and Paul J Weimer, "A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures." *J. Food and Agriculture*, 65, p51-58, 1994
- [14] John Ralph, Stephane Quideau, John H. Grabber and Ronald D. Hatfield, "Identification and Synthesis of New Ferulic Acid Dehydrodimers Present in Grass Cell Walls", *Journal of the Chemical Society*, 1994, 3485-3498
- [15] 原襄、植物形態学、朝倉書店、1994
- [16] J. T. Martin and B. E. Juniper, *The Cuticles of Plants*, Edward Arnold Ltd, London. (1970)
- [17] Teris A. van Beek, "Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts", *Journal of Chromatography A*, 967 p21-55, 2002
- [18] T. Hori, "Ginkgo biloba: a global treasure: from biology to medicine", *Journal of Plant Research*, Special Issue, 1997
- [19] Koji Nakanishi "Terpene trilactones from *Ginkgo biloba*: From ancient times to the 21<sup>st</sup> century", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13 p4987-5000, 2002

- [20] 朝日出版社(編)、世界の植物 7、朝日出版社、1975
- [21] 谷田貝光克、植物成分の特性とその利用、八十一出版、2006
- [22] 松田和雄(編著)、多糖の分離・精製法、学会出版センター、1999
- [23] 吉原一年, 小林 武, 藤井利郎, 赤松 勲, "Klason lignin 定量法の改良法", 紙パ技協誌 第38巻第4号 466-475、
- [24] Eiichi Yasuda, Kazuhiko Fukushima, Akihiro Kakehi, "Formation and chemical structures of acid-soluble lignin 1: sulfuric acid treatment time and acid-soluble lignin content of hardwood", *Journal of Wood Science*, 47 p69-72, 2001
- [25] Van Soest, P. J., and Robertson, J. B., "Systems of analysis for evaluating fibrous feeds", *Standardization of Analytical Methodology for Feeds*, W. J. Pigden, C. C. Balch, and M. Graham (eds.), International Development Research Centre, Ottawa, p49-60, 1980
- [26] P. J. VAN SOEST (1963) 'Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. II. A Rapid Method for the Determination of Fiber and Lignin'. *the Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, Vol. 46, p 829-835, 1963
- [27] H. G. Jung, D. R. Mertens, And A. J. Payne, "Nutrition, Feeding, And Calves, Correlation of Acid Detergent Lignin and Klason Lignin with Digestibility of Forage Dry Matter and Neutral Detergent Fiber", *J Dairy Sci*, 80 p1622-1628, 1997
- [28] Hans-Joachim G Jung, "Lignification of Switchgrass (*Panicum virgatum*) and Big Bluestem (*Andropogon gerardii*) Plant Parts during Maturation and its Effect on Fibre Degradability" *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 59 p169-176, 1992
- [29] Kondo T., Mizuno K., Kato T., "Some characteristics of forage plant lignin". *Japan Agriculture Res Quart* 21 p47-52, 1987
- [30] Kondo, T., Mizuno, K., and Kato, T. "Variation in Solubilities of Lignin in Acid Detergent and Alkali", *Journal of Japanese Glassland Science*, 33 (3) p296-299, 1987
- [31] Norman A. G., Jenkins S. H., The determination of lignin. II. Errors introduced by the presence of proteins, *Biochem J*, 28 2160-2168, 1934
- [32] Jung, H.G., Mertens, D.R., and Payne, A.Y., "Correlation of Acid Detergent Lignin and Klason Lignin with Digestibility of Forage Dry Matter and Neutral Detergent Fiber", *Journal of Dairy Science*, Vol. 80 No. 8 p1622-1628, 1997
- [33] Christopher R. Orton, Dilworth Y. Parkinson, Philip D. Evans, Noel L. Owen, *Applied Spectroscopy*, 58 (11) p1265-1271, (2004)
- [34] K. Iiyama and A. F. A. Wallis, "An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps", *Wood Sci. Technol*, 22 p271-280, 1988
- [35] 北浦和弥：修士論文 (2005)

## 第 2 章

様々な樹種の様々な部位のリグニン分析の比較

## 2.1. 緒言

金らの研究および中村の研究により、葉や茎などの非木質試料のクラークソン法によって得られる定量値は、ニトロベンゼン酸化やオゾン分解、メトキシル基定量によるリグニン構造分析の生成物収量から見積られるリグニン量よりも過大に与えられることが分かっている。[1][2] この原因として、二つの理由が考えられる。一つは、非木質試料のリグニンは、ニトロベンゼン酸化・オゾン分解・メトキシル基定量における分解生成物を与えにくいような構造をしている、つまり樹木のリグニン構造とは異なっており、フェニルプロパン単位間の結合様式は縮合型に富むためニトロベンゼン酸化とオゾン分解では分解生成物が得られず、*p*-ヒドロキシフェニル核を主要な芳香核構造として持つため芳香核メトキシル基が少ないというものである(理由 1)。もう一つの理由は、リグニン以外の成分、例えば抽出成分やたんぱく質、クチクラ由来の成分などがクラークソン法における硫酸処理によって分解されずに残渣を形成し、リグニンとして定量される成分が多いというものである(理由 2)。理由 2 の場合は、それらを選択的に試料から取り除いてからリグニンを定量すればよいことになるが、実際には、そのような選択的な抽出法は未だ開発されていない。そのため、中村の研究では未抽出の試料を用い、金らは 80%エタノール水溶液による抽出処理を行っている。

金らはイチョウやケヤキの落葉を土壌表面に散布するマルチング処理の過程において、葉の構成成分がどのように変化するかを詳しく分析し、マルチングの全過程を通じて、落葉のクラークソン法によって得られる値は落葉のメトキシル基定量値やニトロベンゼン酸化・オゾン分解生成物の収量から推定されるリグニン量に比べて過大であると結論した。そしてクラークソン定量値の代わりにメトキシル基定量値やニトロベンゼン酸化・オゾン分解生成物の収量からリグニン量を逆に推定する” Assumed lignin content” という概念を提唱した。それによると、イチョウの葉の Assumed lignin content は、クラークソン法によるリグニン量の 10 分の 1 にしかならないことが分かった。しかしこの手法は樹木タイプのリグニン構造を前提として分解生成物収量からリグニン量を逆算するものであるため、樹木タイプのリグニンとは全く異なる構造のリグニン(上記の理由 1)が多く存在する場合には、この概念は通用しない。



そこで、中村はリグニンの構造に寄らずに芳香核量を推定する方法として、赤外スペクトルを用いることを試みた。芳香核の置換基の数と構造によらずに芳香核の量を推定することができれば、リグニン量を考察する有力な情報の一つとなる。赤外スペクトルによる芳香核量の推定値にはリグニンのみでなく芳香核を有する他の成分(抽出成分やたんぱく質など)も含まれるが、芳香核量推定値以上のリグニン量にはならないため、その値が小さければリグニン量も小さいと言うことはできる。実際、Fig.2-1 に示すように、木質、葉、茎試料からのニトロベンゼン酸化生成物の収率と、赤外スペクトルによる芳香核量の指標値(Indication value of aromatic structure)の間には、良好な相関が見られた。つまり、リグニン構造の指標の一つとなるニトロベンゼン酸化生成物の収率が低ければ、リグニン量も低いと見なせることが示唆された。これは、金らが採用した” Assumed lignin content” という概念が妥当であることを示唆するものである。つまり、葉や茎のクラークソン法によるリグニン定量値がニトロベンゼン酸化生成物・オゾン酸化生成物の収量に比べて過大な原因は、リグニン以外の物質がクラークソン残渣として挙動すること、しかもそれが芳香核を有さないことが主な理由であると強く示唆されたのである。

以上により非木質試料のクラークソン法によるリグニン定量値が、過大な値を示すことが確定されたと考えられる。しかし、「適切な前処理法があれば正しいリグニン量の測定がクラークソン法によっても可能なのではないか」という可能性は常に残っている。そこで本研究ではまずいくつかの葉・茎試料について、金らが用いたのと同じ 80%エタノール水溶液による抽出を行った試料と行っていない試料の比較を行った。すなわち、ニトロベンゼン酸化、クラークソン法、赤外スペクトル測定による分析結果への抽出処理の影響を調べることを目的とした。

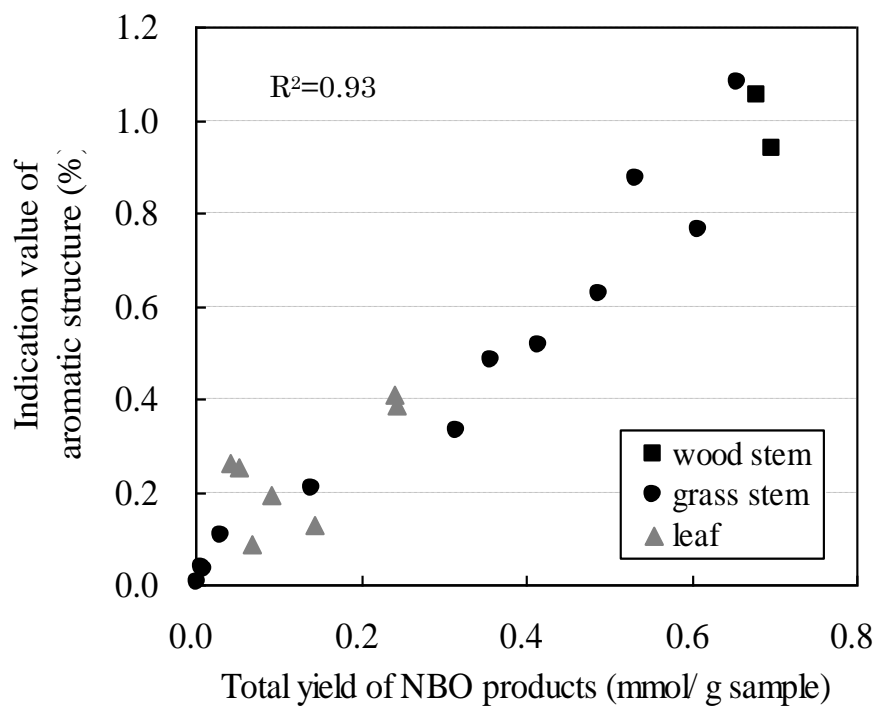


Fig.2-1 Correlation between Indication value of aromatic structures and total yield of nitrobenzene oxidation (NBO) products. Yield of NBO products was based on the sample weight.

## 2.2. 実験

### 2.2.1. 試料

木質試料として 2 種類（キョウチクトウ・キリ）、茎試料として 4 種類（ササ・ツタ・ミズヒキ・ヒガンバナ）、葉試料として 7 種類（スダジイ・ササ・ツバキ・キョウチクトウ・キリ・イチョウ・ツタ）の計 13 試料を 9 月上旬に採取した。それぞれを凍結乾燥させ、Wiley Mill で粉碎し（40-80mesh の区分を得て）、40℃で一晩真空乾燥した。非木質試料は凍結乾燥する前に水洗し、適当な断片の大きさに切断した。なお、葉の試料については切断時に葉柄の部分を取り除いた。

木質試料はエタノール：ベンゼン＝1：2 (v/v)の溶液を用いて 8 時間、ソックスレー抽出を行った。

茎より 2 種類（ツタ・ミズヒキ）、葉より 3 種類（キョウチクトウ・キリ・ツタ）を選び、これらを 80%エタノール水溶液 (v/v)を用いて 1 時間の煮沸抽出を 3 回行った後、イオン交換水に室温で一晩浸漬した。水を除いた後、凍結乾燥を行った。

80%エタノールによる抽出は、一般的に植物試料のポリフェノールなどの成分の抽出に用いられる手法であり、細胞壁が木化しておらず、細胞質成分が多く残っている茎・葉の試料についてはこの抽出が有効であると考えられる。

用いた試料名を Table.2-1 に示す。今後、抽出した試料は No. に ' をつけて示す。

Table. 2-1 List of the samples examined

No.	和名	species	sample type
0	ブナ	<i>Fagus crenata</i>	wood
1	キョウチクトウ	<i>Nerium Indicum</i>	wood
2	キリ*	<i>Paulownia tomentosa</i>	wood
3	クマザサ	<i>Sasa veitchii</i>	stem
4	ツタ	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	stem
5	ミズヒキ	<i>Polygonum filiforme</i>	stem
6	スダジイ	<i>Castanopsis sieboldii</i>	leaf
7	クマザサ	<i>Sasa veitchii</i>	leaf
8	ツバキ	<i>Camellia japonica</i>	leaf
9	イチョウ	<i>Ginkgo biloba</i>	leaf
10	キリ	<i>Paulownia tomentosa</i>	leaf
11	キョウチクトウ	<i>Nerium Indicum</i>	leaf
12	ツタ	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	leaf
13	ヒガンバナ	<i>Lycoris radiata</i>	stem

### 2.2.2. ニトロベンゼン酸化

試料を約 20mg 精秤し 10ml 容のオートクレーブに入れ、4ml の 2mol/L 水酸化ナトリウム水溶液をホールピペットを用いて加え、さらに 0.25ml のニトロベンゼンをマイクロピペットを用いて加えた。170℃の振とう式オイルバス中で 2 時間反応後、オートクレーブを氷水で冷やした。

内部標準として、3-エトキシ-4-ヒドロキシベンズアルデヒドの 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液を木質試料は 2ml、茎と葉は 1ml マイクロピペットを用いて加え、50ml 容のビーカーに移した。オートクレーブを 1 回 5ml の 0.1mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を用いて 3 回洗浄し、洗浄液をビーカーに加えた。

100ml 容の分液ロートを用い、1 回 15ml のジクロロメタンで 3 回抽出した。下層のジクロロメタンは廃棄し、上層の水層を前に用いたビーカーに移し、4mol/L の HCl を用いて pH1 に調整した。調整した水層を前に用いた分液ロートを用いて 1 回 20ml のジクロロメタンで 2 回抽出し、下層のジクロロメタンを前に用いたビーカーに保存した。上層の水層は 15ml のジエチルエーテルにより 1 回抽出し、下層の水層は破棄し、上層のジエチルエーテルはビーカーに保存したジクロロメタンと合わせた。ジクロロメタンとエーテルの混液を前に用いた分液ロートに移し 20ml のイオン交換水により 1 回抽出し、下層の有機溶媒層を 200ml 容の三角フラスコに移し、上層の水層は廃棄した。三角フラスコ中の有機溶媒層に粉末状の無水硫酸ナトリウムを加え、一晩室温に放置して脱水した。

脱水した試料を桐山ロートを用いて硫酸ナトリウムを濾別しナシ型フラスコに移し、約 40℃でエバポレーターにより有機溶媒を完全に除去した。残渣をジエチルエーテルに溶かしてバイアルシリンジに移し、窒素ガスを吹き付けることによってエーテルを完全に除去した。

0.1ml のビス (トリメチルシリル) アセトアミド (BSA) のピリジン溶液をマイクロピペットを用いて加え、100℃のオーブンで 10 分間トリメチルシリル化を行い、木質は 1  $\mu$ l を、茎と葉は 0.5  $\mu$ l を、島津製ガスクロマトグラフィーGC-17A を用いて分析を行った。ガスクロマトグラフィーの条件は次の通り。

カラム : GL Sciences 製 InertCap-1

キャリアーガス : He

インジェクター温度 : 250°C

ディテクター温度 : 280°C

カラム温度 :

150°Cで 15 分間保持

3°C/分で 210°Cまで昇温

10°C/分で 280°Cまで昇温し、6 分間保持

### 2.2.3. クラーソン法

試料を約 500mg (抽出した茎・葉は約 200mg)秤量し、50ml 容のビーカーに移し、5ml (抽出した茎・葉は 2ml)の 72%(w/w)硫酸をホールピペットにより加え、時々かき混ぜながら室温で 3 時間処理した。酸の濃度が約 3%に希釈されるように、酸処理物を 187.5ml(抽出した茎・葉は 75ml)のイオン交換水を用いて 500ml 容の(抽出した茎・葉は 100ml 容の)三角フラスコに移し、121℃のオートクレーブにより 30 分処理した。

オートクレーブ処理した試料を空气中で放冷し 1G4、または 1GP16 のガラスフィルターを用いて吸引濾過し、濾液が 500ml 以下(抽出した茎・葉は 200ml 以下)になるようにイオン交換水で洗浄した。ガラスフィルター中の残渣は 105℃のオーブンで重量が減少しなくなるまで乾燥させ、これをクラーソン残渣 (KR; Klason Residue) として重量を測定した。ろ液はメスフラスコを用いて 500ml (抽出した茎・葉は 200ml) に希釈し、島津製可視・紫外分光光度計 UV-240 により 200nm 付近の極大吸光度を測定し、以下の関係式により計算し、酸可溶性リグニン量を算出した。なお、非木質試料の 200nm 付近において紫外吸光を与える物質が、リグニンのみである確証はないが、本実験ではこれにより算出された値を酸可溶性リグニン (ASL ; Acid Soluble Lignin) とみなす。

$$A = a \cdot c \cdot l$$

A : 吸光度、c : 酸可溶性リグニン濃度 (g/L)、l : 光路長 (本実験では 1cm)

a : リグニンのグラム吸光係数 本実験では広葉樹の  $113(\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ を用いる

クラーソン残渣(KR)と酸可溶性リグニン(ASL)の合計を試料中の全リグニン量と仮定し、Apparent lignin content として以下の式より算出した。

$$\text{Apparent lignin content (\%)} = (\text{KR} + \text{ASL}) / S \times 100$$

S : 試料重量

#### 2.2.4. 赤外スペクトル測定による芳香核量指標値の試算

赤外試料調製用の Ball Mill (Retsch 社製) を用いて試料を 60/sec、20 分の振とうにより粉末状にし、これから約 2mg をとり約 200mg の臭化カリウムの粉末と合わせ、メノウ乳鉢を用いて粉碎混合した。粉末を錠剤成形器に移し、真空ポンプにより排気をしつつ約 300Kgf/cm<sup>2</sup> で加圧し、ペレットを作成した。

作成したペレットを JASCO 製赤外分光光度計 FT/IR-615 を用い、積算回数 128 回、スペクトル分解能 2cm<sup>-1</sup> の条件で赤外吸収を測定した。

得られたスペクトルデータの 3965cm<sup>-1</sup> の点、3000 cm<sup>-1</sup> 付近の谷、2800 cm<sup>-1</sup> の点、1800 cm<sup>-1</sup> の点、850 cm<sup>-1</sup> 付近の谷の各点を結んだ直線をベースラインとして補正した。(Fig.2-2 (A))

補正されたスペクトルの木と茎は 1613 cm<sup>-1</sup> から 1566 cm<sup>-1</sup> および 1530 cm<sup>-1</sup> から 1488 cm<sup>-1</sup> の区間を、葉は 1616 cm<sup>-1</sup> から 1572 cm<sup>-1</sup> および 1530 cm<sup>-1</sup> から 1492 cm<sup>-1</sup> の区間を芳香環二重結合由来のピークエリアとみなし、二点法によりピーク面積を算出した。木質、茎、葉のそれぞれの部位における谷の位置がほぼ一致したため、スペクトルの区間を一律に設定した(Fig.2-3)。なお、ピーク面積が符の値となったものは 0 とみなした。

また、クラーソン残渣の赤外測定においても上記と同様の区間を用いて測定した。

3965 cm<sup>-1</sup> から 1000 cm<sup>-1</sup> のベースラインより上のエリアをスペクトル全体の面積とし(Fig.2-2 (B))、以下の式により芳香環量の指標値を算出した。

$$\text{Indication value of aromatic structure (\%)} = A/B \times 100$$

A : 芳香環二重結合由来の二つのピーク面積の合計値 (1600 cm<sup>-1</sup>, 1500 cm<sup>-1</sup>)

B : スペクトル全体の面積 (3965 cm<sup>-1</sup> - 1000 cm<sup>-1</sup>)



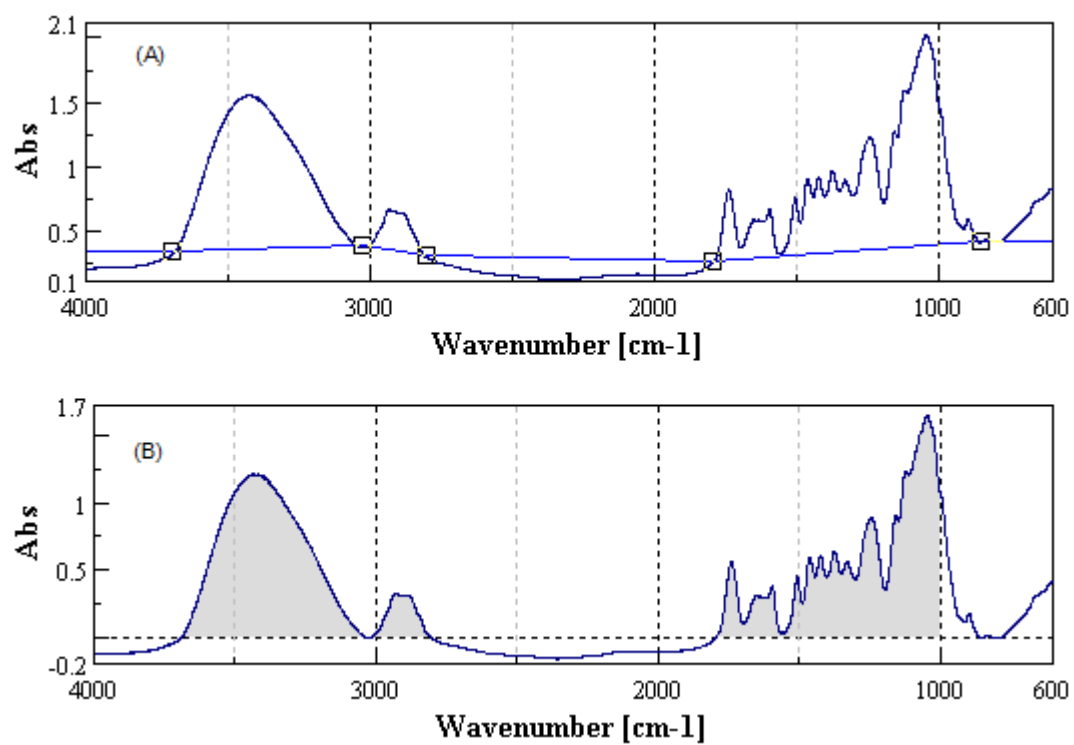


Fig.2-2 An example of revising base line (A) and applied whole area (B).

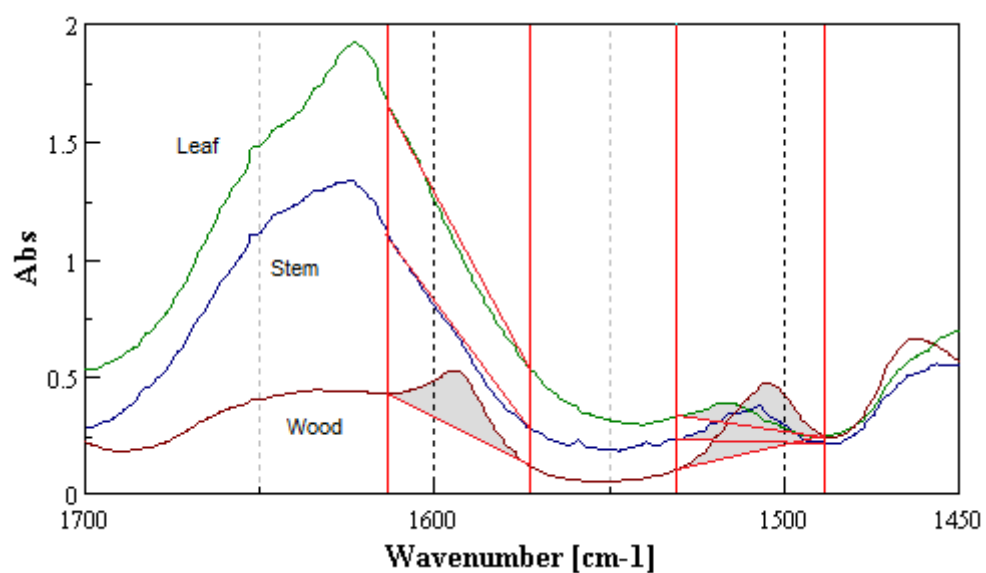


Fig.2-3 Example of two aromatic C=C peak areas.

## 2.3. 結果と考察

### 2.3.1. ニトロベンゼン酸化による分析

Fig.2-4 にニトロベンゼン酸化生成物の収率を示した。木材においてはニトロベンゼン酸化生成物の収率はクラークソン法により測定されたリグニン量あたりの収量で示されることが一般的であるが、非木質組織はクラークソン法では正確なリグニン量を得られないため、本研究では試料重量あたりの収率で示す。

木材の収率は約 0.6mmol/g sample 以上の値をとり、秋山らが用いた樹種の範囲(0.55–0.80mmol/g sample)に収まった。葉は約 0.2mmol/g sample 以下の値をとり、中村が用いた試料と同様の傾向を示した。[3]

芳香核構造の存在比において、イチョウ葉(No.9)を除き、総収率が高いほど S 核の存在比が大きく、H 核の存在比が小さくなる傾向にあるが、V 核の存在比は樹種や部位に関係なく約 20%~55%の範囲内に収まった。

キョウチクトウ木(No.1)、キリ木(No.2)、ミズヒキ茎(No.5)、キリ葉(No.10)、ツタ葉(No.12)は抽出後に生成物の収率が多少増加しているが、これは抽出によりニトロベンゼン酸化生成物を与える成分が比較的除去されずに、それ以外の成分が比較的多く除去されたためだと考えられる。

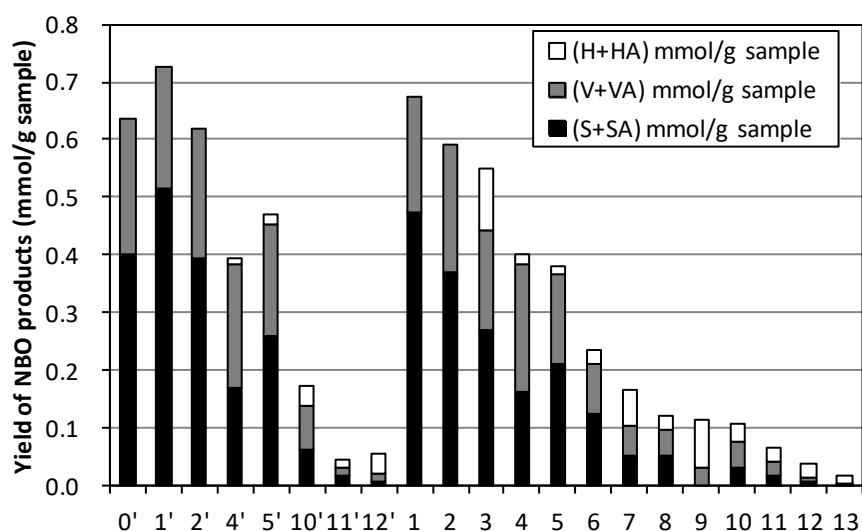


Fig.2-4 Yield of nitrobenzene oxidation (NBO) products based on the sample weight.  
試料名は Table 2-1 参照。0', 1', 12'等の '付の番号は抽出処理を行った試料

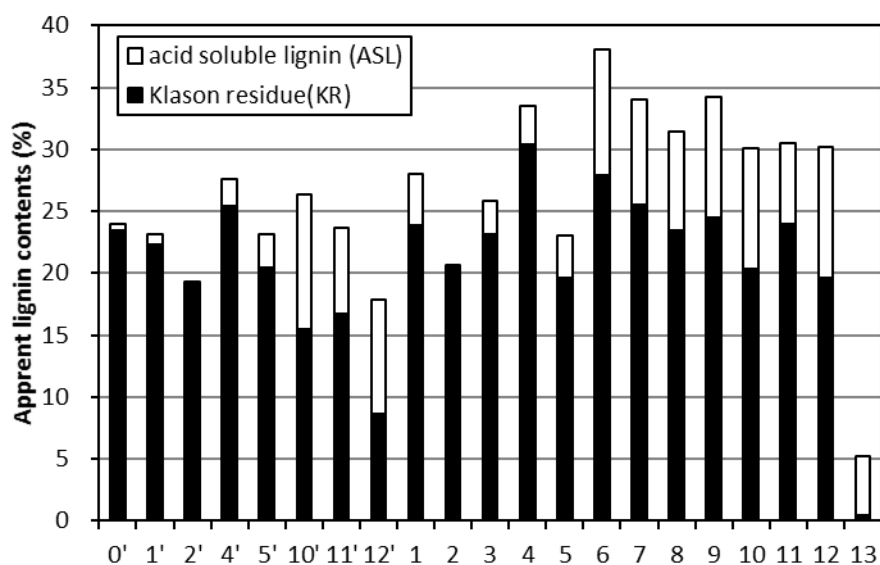


Fig.2-5 Apparent lignin content of 22 samples measured by Klason method

### 2.3.2. クラーソン法による分析

Fig.2-5 にクラーソン法により測定した 22 試料の定量値を Apparent lignin content として示した。

未抽出試料においてはヒガンバナ(No.13)を除き、全ての試料が 20%~40%の値をとっており、ヒガンバナはそれ以上の値を示した。クラーソン残渣(KR)の収率はいずれの試料でも抽出後の試料は抽出前の試料よりも低い値を示し、抽出後の葉試料の収率は木質試料の収率を下回るようになった。したがって、抽出により除去された成分がクラーソン法において過大な値を与える原因の一つであることが示された。しかし、Fig.2-4 に示したニトロベンゼン酸化生成物収率と比較すると、クラーソン法による定量値は抽出後も依然として過大である状況に変わりはない。

木質は 1%未満、茎はヒガンバナ(No.13)を除き約 3%、葉は約 10%の酸可溶性リグニン量を示した。酸可溶性リグニンの算出において、200nm 付近の極大吸収の値を用いたが、この吸収は共役構造に由来し、共役構造の長さによって変化する。木質が 205nm 付近に極大値を示したのに対し、茎や葉は 195nm 付近に極大値を示したことから、木質組織と非木質組織では硫酸処理により可溶化する物質が異なり、非木質試料ではリグニン以外の共役構造をもつ物質も酸可溶性リグニンとして測定された可能性がある。

酸可溶性リグニンとして算出された値は抽出後もほとんど変化しなかったため、抽出による酸可溶性リグニンとして測定される成分の重量減少は全体の重量減少と同等であったと考えられる。

なお、本研究ではグラム吸光係数に一般的な広葉樹に使われる値( $113(\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ )を用いて酸可溶性リグニンを算出したが、非木質試料においてはこの数値が妥当な数値であるという保証はない。

### 2.3.3. 赤外吸収スペクトル分析による芳香核量の試算

Fig.2-6 に各植物試料の芳香核量指標値を、Fig.2-7 にそれら植物試料から得られたクラークソン残渣の芳香核量指標値を示した。

植物試料とクラークソン残渣の両方において、クラークソン残渣のクマザサ茎 (No.3)を除き、非木質試料は木質試料よりも低い芳香核量指標値を示した。植物試料におけるこの結果は非木質試料中の芳香核量が木質試料と比べて少ないことを示している。

クラークソン残渣におけるこの結果は、非木質試料から得られたクラークソン残渣には芳香核以外の物質が多く含まれていることを示唆しており、リグニン以外の物質がクラークソン残渣の形成に参加するという考え方を支持する結果となった。

植物試料の芳香核量指標値において、いくつかの試料は抽出の前後で芳香核の指標値が大きく変化しており、増加はキリ葉(No.10)に、減少はキョウチクトウ葉(No.11)顕著に見られる。前者は抽出により芳香核を持たない成分が比較的多く除去され、後者は芳香核を持つ成分が比較的多く除去されたことを示している。

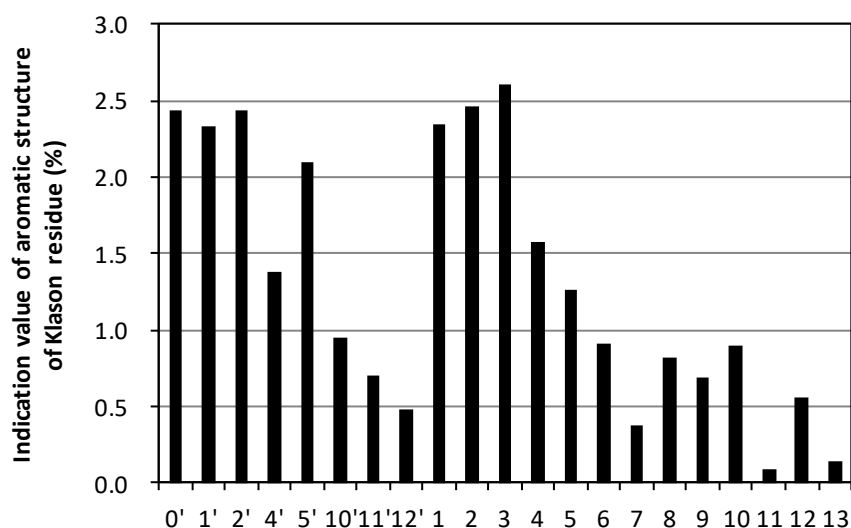


Fig. 2-7 Indication value of aromatic structures obtained from 22samples by infrared analysis.

クラークソン残渣の芳香核指標値においても抽出の前後で大きく変化しているものがあり、ミズヒキ 茎(No.5)とキョウチクトウ葉 (No.11)に顕著な増加がみられる。これは抽出によりクラークソン残渣を形成する芳香核を持たない成分が比較的多く除去されたことを示している。特にミズヒキ茎(No.5)を抽出処理した No.5' のクラークソン残渣の芳香核量指標値は木質なみに高くなっている。つまり、抽出によりミズヒキ茎(No.5)のクラークソン残渣に含まれる芳香核を持つ成分の割合が木質試料並みになったことを示している。事実、次節の Fig.2-8 に見られるように、ニトロベンゼン酸化生成物の収率とクラークソン法による定量値 (Apparent lignin content) の関係は No.5' においては木質試料に近くなっている。従って、ミズヒキ茎(No.5)においては 80%エタノール水の抽出がクラークソン法を用いてより正確なリグニン定量値を得る上で効果があったといえる。しかし、葉試料 (No.10' ~No.12') ではこの抽出を行ってもクラークソン法による定量値は依然として高い値を示した。

#### 2.3.4. 化学分析による非木質組織のリグニン量の評価

Fig.2-8 にニトロベンゼン酸化生成物収率に対するクラークソン法によるリグニン定量値をプロットした図を示す。

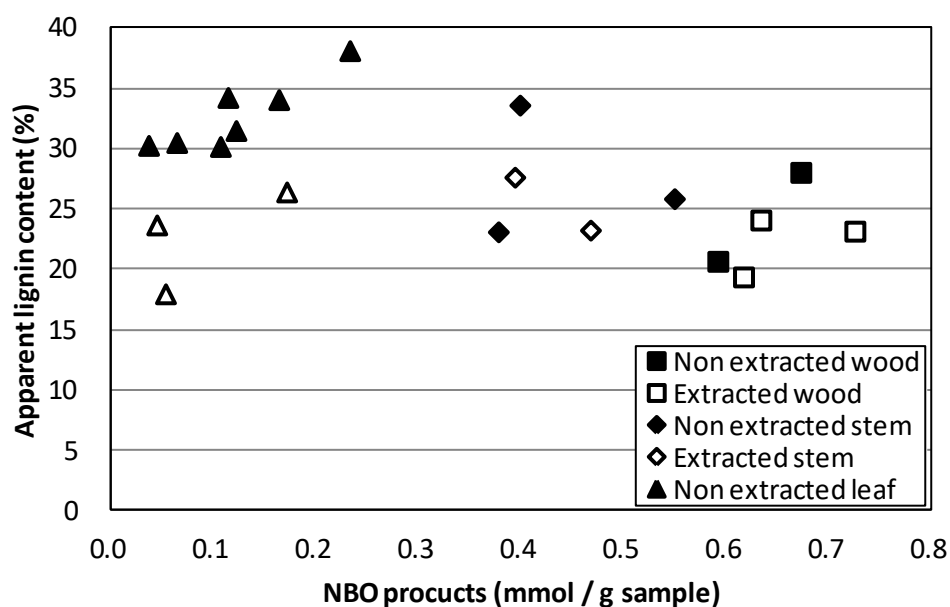


Fig.2-8 Correlation between yield of nitrobenzene oxidation products and Apparent lignin content.

クラークソン法によるリグニン定量値はニトロベンゼン酸化生成物の収率によらず高い値を示し、既往の研究と同様の傾向を示した。この原因の一つとして抽出成分の存在が示唆されていたが、葉試料 (No.10' ~No.12') では 80%エタノール水溶液および水による逐次抽出した試料の値は多少低くなっているものの依然として高い値を示しており、この抽出処理がクラークソン処理においてリグニンとともに残渣を生成する成分を除去するうえでは十分な効果がないことを示している。ただし、茎試料のうちミズヒキ (No.5') では抽出の効果がみられたことはすでに述べた。

### 2.3.5. ニトロベンゼン酸化生成物収率と芳香核量指標値の比較

Fig.2-9 にニトロベンゼン酸化生成物収率と芳香核量指標値を比較した図を示す。この二つの間には相関がみられ、既往の研究と一致する結果となった。

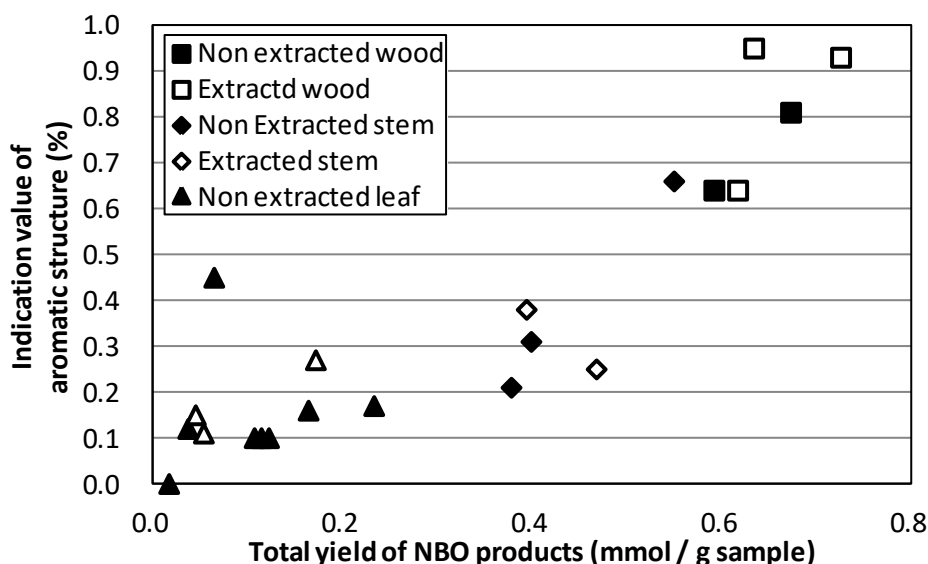


Fig. 2-9 Correlation between Indication value of aromatic structures and total yield of nitrobenzene oxidation (NBO) products.

キョウチクトウ (No.11)は低いニトロベンゼン酸化生成物収率を示す一方で高い芳香核量指標値を示すが、前抽出を施すことにより(No.11') 低い芳香核量指標値を示すことから、前の節で述べたように抽出成分が高い芳香核量を示す原因となっていたと考えられる。

Fig.2-10 はクラークソン残渣の芳香核指標値にクラークソン残渣の試料あたりの収率をかけたものを縦軸に、ニトロベンゼン酸化生成物収率を横軸にとってプロットしたものである。縦軸の値は植物試料中に含まれるクラークソン残渣として挙動する芳香核量の指標値を示している。この二つの間には強い相関がみられた。ニトロベンゼン酸化が縮合型リグニンに関する知見を得られない一方で、クラークソン残渣は酸によりリグニンを縮合させて沈殿を得る。二つの値が強い直線の相関をもつことから非木質組織における縮合型リグニンの割合は木質組織に近いことがしめされた。この結果は諸元において述べた非木質試料のクラークソン法によって得られたリ



グニン定量値が過大な値を示す原因の理由 1 を否定するものである。

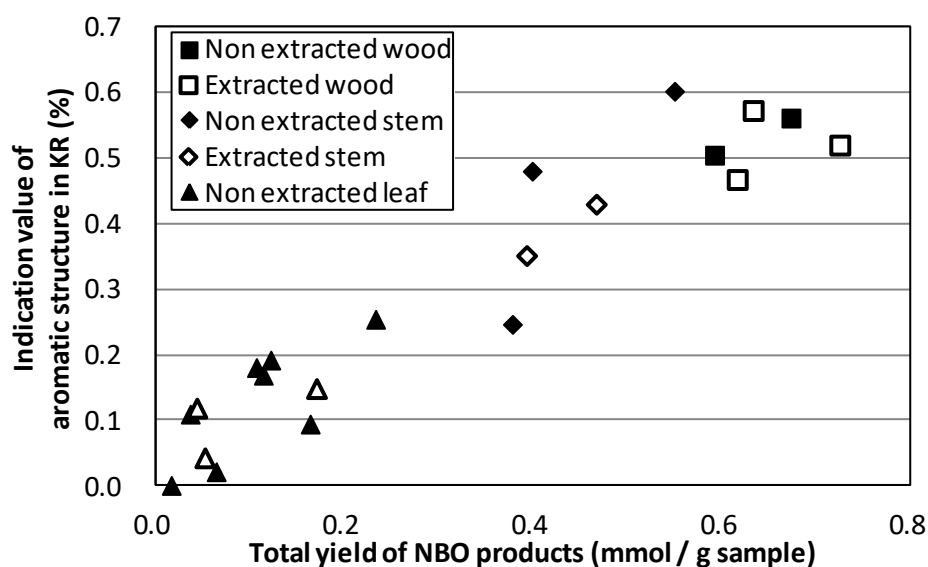


Fig. 2-10 Correlation between Indication value of aromatic structures in Klason residue corrected by Klason residue content and total yield of nitrobenzene oxidation (NBO) products.

抽出の有無にかかわらず全てのプロットが近い相関上にあることから、クラフソン残渣には抽出成分由来の芳香核が多くは存在しない可能性と、80%エタノール-水の逐次抽出による影響が赤外スペクトルに現れていない可能性が考えられる。前者の場合はクラフソン残渣を過大に与える原因となる成分の多くは非芳香核成分であることになる。

### 2.3.6. クラーソン法による定量値と芳香核量指標値の比較

Fig.2-11 に横軸にクラーソン法によるリグニン定量値を、縦軸に試料中の芳香核量指標値をプロットした図を、Fig.2-12 に横軸にクラーソン残渣収率を、縦軸に試料あたりのクラーソン残渣中の芳香核量指標値をプロットした図を示す。

どちらの図でも葉試料は抽出・未抽出試料ともクラーソン法によるリグニン定量値は大きい芳香核量指標値は小さく、芳香核を持たない成分、即ちリグニン以外の成分が葉試料のクラーソン残渣に多く含まれることを示している。

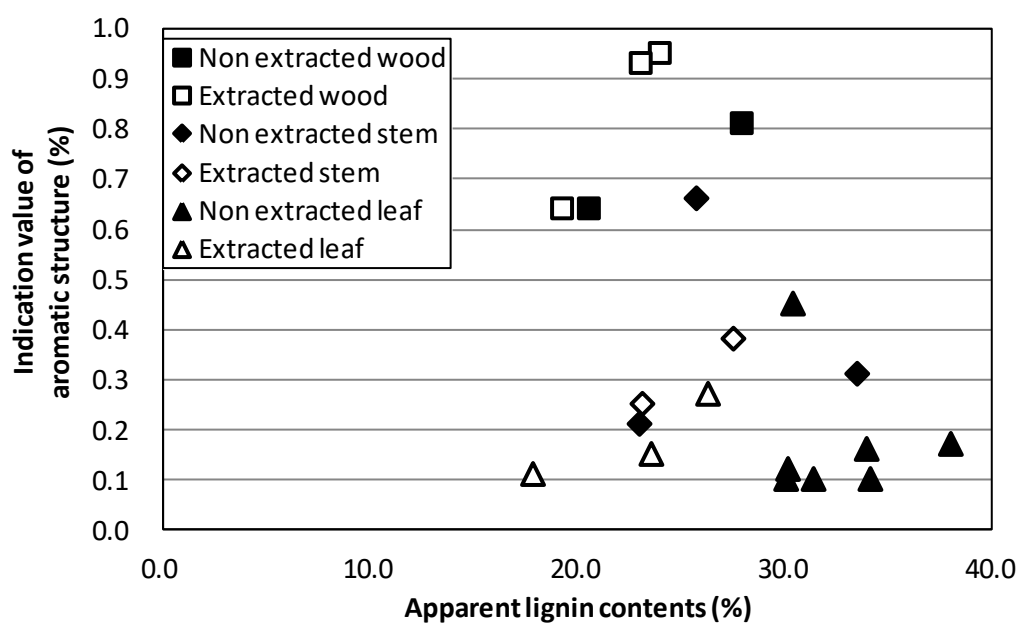


Fig.2-11 Correlation between Indication value of aromatic structures and Apparent lignin content

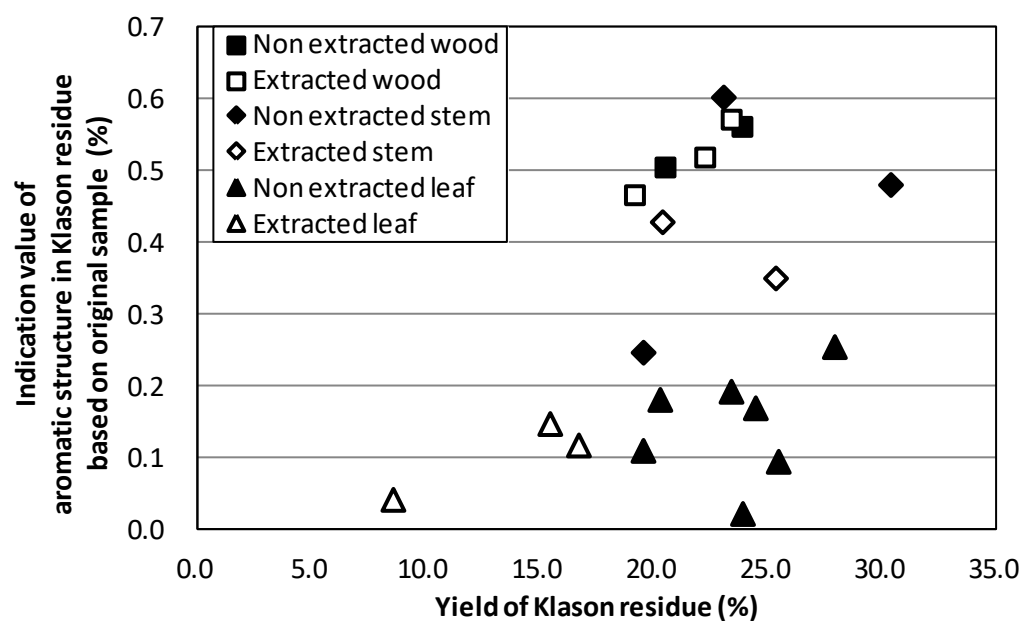


Fig.2-12 Correlation between Indication value of aromatic structures in Klason residue and yield of Klason residue

Fig.2-12 において、葉試料のクラソン残渣収率の抽出による減少量は芳香核量指標値の減少量よりも大きい。この結果は、80%エタノール抽出が葉試料に含まれるクラソン残渣を形成するリグニンではない成分をやや選択的に除去する効果があることを示している。ただし、葉試料の芳香核量指標値に対するクラソン残渣収率は木質試料のそれよりも依然として高いため、葉試料に含まれるクラソン法においてリグニンとして定量されるリグニンではない成分を完全に除去することはできなかった。

#### 2.4. 第2章のまとめ

80%エタノール抽出により非木質試料のクラークソン法によるリグニン定量値が減少したことから、この抽出によりクラークソン法においてリグニンとして定量される成分が除去されることが示された。しかし、この抽出により除去された成分の詳細は不明であり、この抽出によりクラークソン法による定量値が真のリグニン量に近くなったと判断することはできない。また、葉試料においては抽出後もクラークソン法による定量値がニトロベンゼン酸化生成物収率から推測されるリグニン量よりも大きな値を示すため、この抽出法はクラークソン処理においてリグニンとして定量されるリグニンではない成分を完全には除去できないことが示された。

非木質試料が高いクラークソン残渣収率を示す一方で、クラークソン残渣の芳香核量指標値が低い値を示したことから、クラークソン残渣として挙動するリグニン以外の成分は芳香核を持たない成分に富むことが示唆された。また、クラークソン残渣の芳香核量指標値がニトロベンゼン酸化生成物収率との間に良い相関をもつことから、クラークソン残渣に含まれるリグニン以外の芳香核を持つ成分は多くは含まれていない可能性がある。

#### 2.5.参考文献

- [1] Jin, Z., Akiyama, T., Chung, B. Y., Matsumoto, Y., Iiyama, K., and Watanabe, S. (2003). "Changes in lignin content of leaf litters during mulching," *Phytochemistry* 64(5) 1023-1031.
- [2] 中村裕貴：修士論文(2008)
- [3] Akiyama, T., Goto, H., Nawawi, D. S., Syafii, W., Matsumoto, Y., and Meshitsuka, G. (2005). "Erythro/threo ratio of  $\beta$ -O-4 structures as an important structural characteristic of lignin. Part 4: Variation in the erythro/threo ratio in softwood and hardwood lignins and its relation to syringyl/guaiacyl ratio," *Holzforschung* 59(3), 276-281.

## 第 3 章

イチョウとケヤキの葉試料への抽出による影響

### 3.1 緒言

2章において、クラークソン法によって測定された非木質試料のリグニン定量値はリグニン以外の成分がリグニンと同様に挙動するため過大な値を与えられることを示した。また、80%エタノール水溶液を用いた抽出によりクラークソン法においてリグニンとして定量されるリグニンではない成分を完全ではないが除去することができた。この結果から、葉試料に前抽出処理を施すことにより、クラークソン法などの化学的手法を用いて正確なリグニン量を測定できる可能性が考えられる。

本章ではイチョウとケヤキの葉に対してそれぞれに様々な溶媒を用いた抽出を施し、各試料にどのような影響を与えるかを検討した。抽出の理想的な効果はクラークソン法においてリグニンとして定量されるリグニンではない成分を選択的に除去し、多糖類やリグニンなどの細胞壁構成成分を残すことである。

葉試料に含まれるリグニンとして定量されるリグニン以外の成分として考えられるものとして、一次壁や細胞小器官などに由来するタンパク質、表皮のクチクラ層に由来する脂質などが挙げられる。後者のクチクラ層由来の成分は酸に対して耐性を持つことが知られており、クチクラの単離法の一つに酸による細胞壁の分解がある。[1] 葉試料を粉砕せずに72%硫酸への長時間の浸漬後、硫酸濃度を3%に希釈し、121℃、30分のオートクレーブの条件で処理するとクチクラ層と思われる透明な膜状の組織が残った。この硫酸処理は本研究で用いたクラークソン法に基づいたものであり、この方法ではクチクラ由来の成分を分解できないことが示された。

本研究で用いた抽出は前述したタンパク質と脂質を除去することに重点を置いたものを中心に扱った。タンパク質の除去を主な目的とした抽出は80%エタノール、熱水、KOH 水溶液による抽出であり、これらの抽出は水溶性成分の抽出も同時に行われる。エタノール-ベンゼン、クロロホルム-メタノール、KOH メタノール、50%アセトン、ジクロロメタンによる抽出は脂質の除去を主な目的として行った。[2] また、粘液の除去を水による抽出で試みた報告もある。[3] 中性デタージェントによる抽出は飼料のリグニン分析に用いられる酸性デタージェント法において前処理として用いられるものである。この処理はペクチン、タンパク質、糖、脂質、水溶性成分などの除去を目的としている。[4]

### 3.2. 実験

#### 3.2.1. 試料調製

イチョウ、ケヤキの葉を採取し、水洗後、葉柄の部分を取り除き1cm 角程度の断片に切断した。これらを凍結乾燥させ、Wiley Mill で粉碎し、40℃で一晩真空乾燥した。

それぞれの試料について、以下に記す抽出法により前抽出を行った。

- ・エタノール - ベンゼン(1 : 2)、クロロホルム - メタノール(1 : 1):

ソックスレー抽出器を用い、それぞれの溶媒により8時間抽出後、吸引濾過し、40℃で真空乾燥を行った。

- ・80%エタノール、熱水、KOH メタノール (10g/l):

試料約3g につき溶媒200ml を用いて1時間の煮沸抽出を3回行った後、自然濾過し、80%エタノール、KOH メタノールはメタノールによる洗浄後に40℃で真空乾燥、熱水は105℃のオーブンにより一晩乾燥を行った。

- ・50%アセトン、ジクロロメタン:

試料約3g につき溶媒200ml を用いて三日間室温にて浸漬した後、吸引濾過し、真空乾燥を行った。

- ・KOH 水溶液(10g/l)、中性デタージェント溶液:

試料約3g につき溶媒200ml を用いて1時間の煮沸抽出を1回行い、熱水による洗浄後、自然濾過し、100℃のオーブンで一晩乾燥を行った。

中性デタージェント溶液の組成

0.0g/l ラウリル硫酸ナトリウム、18.61g/l エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物、6.81g/l 四ほう酸ナトリウム十水和物、4.56g/l 無水りん酸二ナトリウム、10.0ml/l トリエチレングリコールの水溶液

また、木質試料として、ブナの木片を Wiley Mill により粉碎し、エタノール-ベンゼン(1:2)による8時間のソックスレー抽出後、40℃の真空乾燥により一晩乾燥させ、40-80メッシュにふるい分けた試料を用意した。

### 3.2.2. クラーソン法

2章と同様の実験を行った。

### 3.2.3. アセチルブロミド法

絶乾の試料5mg をネジ蓋付ガラス試験管に精秤し、25%(w/w)アセチルブロミド酢酸溶液2.5ml、70%過塩素酸溶液(市販)0.1ml を正確に加えた。これを75℃±0.5℃に調整したブロックヒーターで10分おきによく混ぜながら、30分反応させ、反応後、氷水で冷却した。50ml のメスフラスコに2mol/l の水酸化ナトリウムを10ml、酢酸を12ml 加えた。これに反応物を加え、酢酸を用いて試験管を洗浄し、洗液をメスフラスコに加えた。酢酸で50ml に調整した。遠心分離を行い、上澄みの UV を測定した。リグニンの濃度を以下の式により算出した。

$$A = a \times c \times l$$

A : 280nm の吸光度      a : グラム吸光係数( $l \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) (本実験では20とした)

c : アセチルブロミドリグニンの濃度(g/l)      l : 光路長(cm) (本実験では1cm)

### 3.2.4. ニトロベンゼン酸化

2章と同様の実験を行った。



### 3.2.5. 中性糖分析

試料を約500mg 秤量し、50ml 容のビーカーに移し、5ml の72%硫酸をホールピペットにより加え、時々かき混ぜながら室温で3時間処理した。酸の濃度が約4%に希釈されるように、酸処理物を140ml のイオン交換水を用いて500ml 容の三角フラスコに移し、120℃のオートクレーブにより60分処理した。

オートクレーブ処理した試料を空气中で放冷し1G4、または1GP16のガラスフィルターを用いて吸引濾過し、濾液をイオン交換水で500ml に希釈した。10ml のろ液に、内部標準としてイノシトール水溶液(約1mg/100ml)を2ml 加え、水酸化バリウム  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  水溶液を用いて pH5.5～6.5となるよう中和し、生成した沈殿を遠心分離によって取り除いた。清澄液に水素化ホウ素ナトリウム  $\text{NaBH}_4$  約20mg を加えて一晩還元し、酢酸を用いて過剰の  $\text{NaBH}_4$  を、水素が発生しなくなるまで分解した。エバポレーターを用いて濃縮し、シロップ状にした後、数 ml のメタノールを加え、再び濃縮乾固させる操作を3回繰り返した。105℃の乾燥器で15分間乾燥させた後、無水酢酸3ml を加え、120℃で3時間処理し、アセチル化した。アセチル化した試料を島津製ガスクロマトグラフィーGC-14B を用いて分析を行った。ガスクロマトグラフィーの条件は次の通り。

カラム：GL Sciences 製 InertCap-1

キャリアーガス：He

インジェクター温度：220℃

ディテクター温度：230℃

カラム温度：220℃

### 3.2.6. 元素分析

イチョウ葉、ケヤキ葉の未抽出試料および、各種抽出試料について、東京大学農学生命科学研究科先端機器分析室に元素分析を依頼し、炭素、水素、窒素の含有量を測定した。使用された機器は2400 Series II (PerkinElmer, USA)である。

### 3.2.7. 抽出後の溶媒の赤外吸収スペクトル分析

各種抽出に用いられた溶液を **FTIR** 分析用の結晶板の上に垂らし、溶媒をドライヤーにより乾燥させ、3.2.5.にて用いた機械により赤外吸収スペクトルを測定した。

### 3.3. 結果と考察

#### 3.3.1. 抽出の試料重量への影響

Fig.3-1にイチョウ(Ginkgo)の葉、Fig.3-2にケヤキ(Zelkova)の葉の、各種抽出処理後の重量保持率を示す。イチョウ、ケヤキとも水を含む抽出溶媒は水を含まない抽出溶媒よりも抽出後の重量保持率が小さい傾向を示した。また、全体的にイチョウ葉はケヤキ葉よりも抽出後の重量保持率が小さかった。抽出後の重量保持率が最も低かったのはイチョウ葉とケヤキ葉の両方とも中性デタージェントによる抽出であり、それぞれ25%と57%だった。

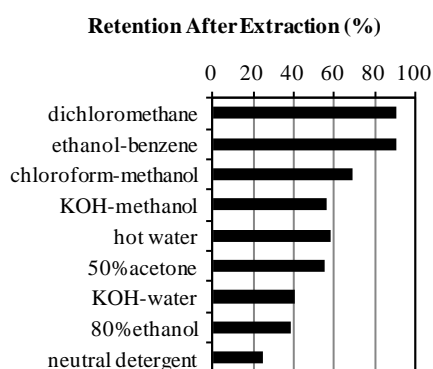


Fig.3-1 Retention after extraction of ginkgo leaf

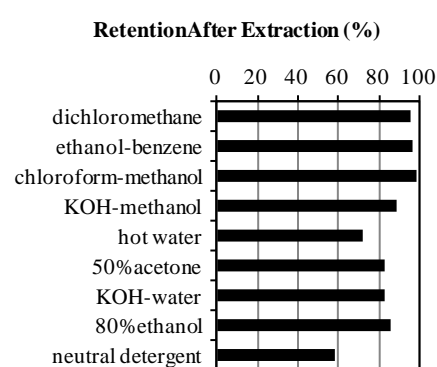


Fig.3-2 Retention after extraction of zelkova leaf

### 3.3.2. クラーソン法による分析

Fig3-3にイチョウ(Ginkgo)の葉、Fig3-4にケヤキ(Zelkova)の葉の、未抽出試料と各種抽出試料のクラーソン残渣収率と酸可溶性成分収率(合計を apparent lignin content とする)を示す。また、抽出前の試料重量当たりの各種収率をイチョウは Fig.3-6、ケヤキは Fig.3-7に示した。

イチョウ葉の水を含む溶媒(熱水、50%アセトン、水酸化カリウム水溶液、中性デタージェント)により抽出された試料は、抽出後の試料あたりのクラーソン定量値では未抽出試料よりも高い値を示し、これらの抽出ではクラーソン法においてリグニンとして定量されない成分が比較的多く抽出により除去されたと考えられる。一方で、水を含まない溶媒により抽出された試料は未抽出試料と同等かそれ以下の値を示した。ケヤキ葉では中性デタージェントにより抽出された試料は未抽出試料よりも低い値を示したが、それ以外の抽出試料では未抽出試料と大きな差が見られなかった。

抽出後の試料あたりのクラーソン定量値はいずれの試料においても葉試料としては依然として高い値を示し、今回行った抽出ではリグニンとして定量されるリグニンではない成分を完全に除去することはできなかったと考えられる。したがって、クラーソン法を用いて葉試料の正確なリグニン量を定量するための前抽出としては、本研究にて行った抽出法は適さないと判断される。

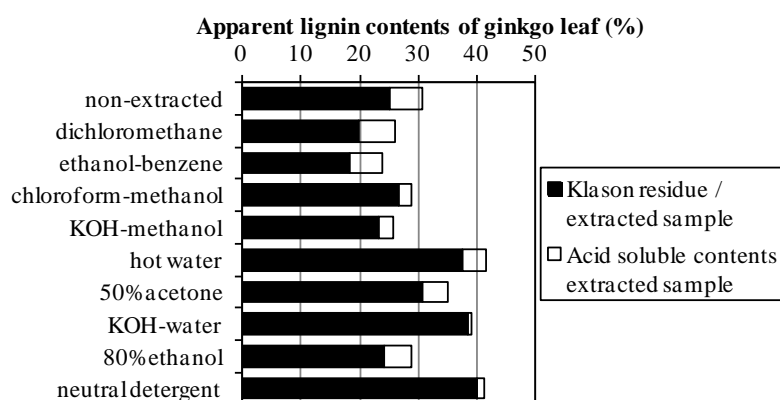


Fig.3-3 Apparent lignin contents of ginkgo leaf based on extracted sample

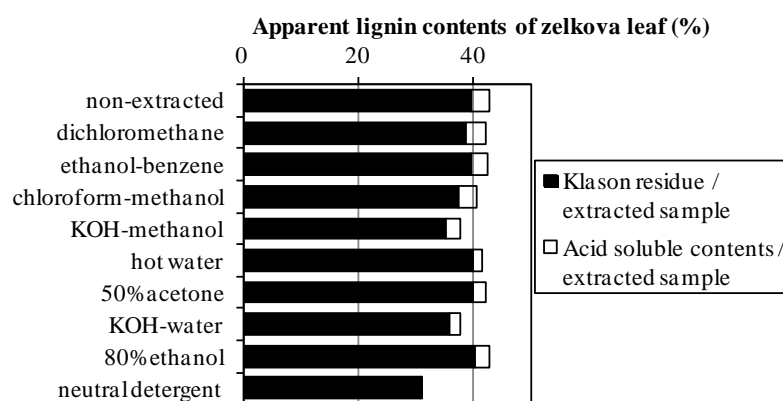


Fig.3-4 Apparent lignin contents of zelkova leaf based on extracted sample

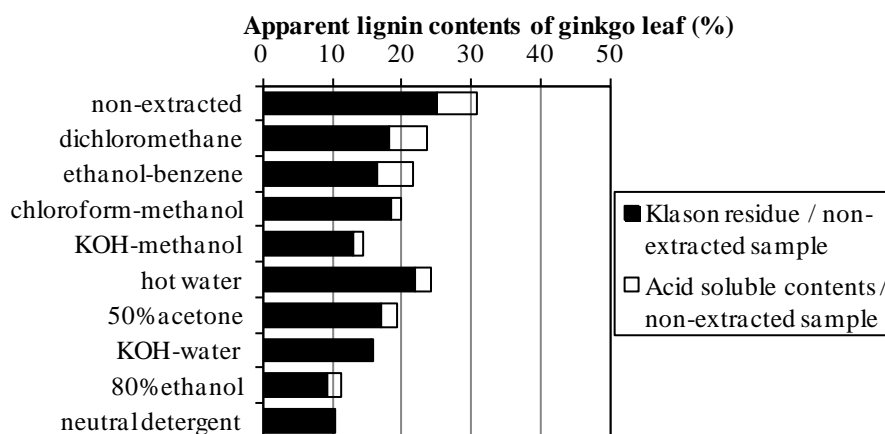


Fig.3-5 Apparent lignin contents of ginkgo leaf based on non-extracted sample

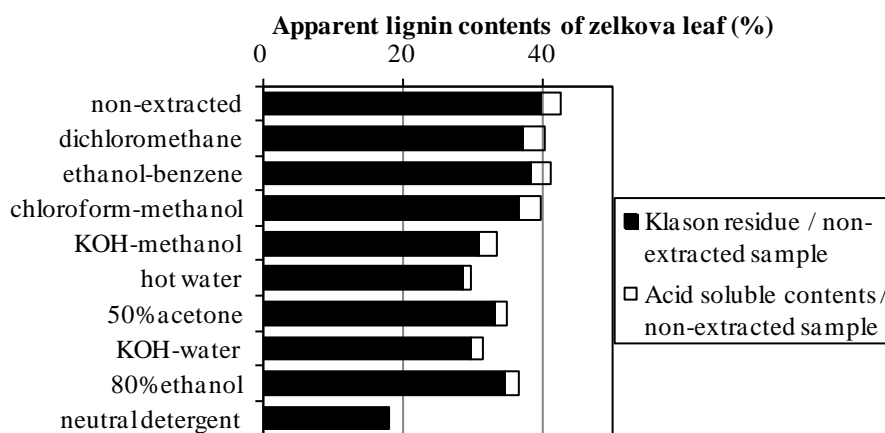


Fig.3-6 Apparent lignin contents of zelkova leaf based on non-extracted sample

### 3.3.3. アセチルブロミド法による分析

Fig.3-7にイチョウ葉の、Fig3-8にケヤキ葉の抽出試料あたりのアセチルブロミド法により測定したリグニン量(Apparent lignin contents)を、未抽出試料あたりの値に計算し直したものと共に示した。

全体的にケヤキはイチョウよりも高い値を示し、イチョウ、ケヤキとも抽出の種類による分析値への影響に明確な傾向は見られなかった。

リグニン分析のための前抽出として、抽出の影響はクラークソン法と同様に抽出後の値が減少することが望ましい。この観点から、イチョウでは50%アセトン、水酸化カリウム水溶液が、ケヤキでは熱水と中性デタージェントが比較的有効だと考えられる。

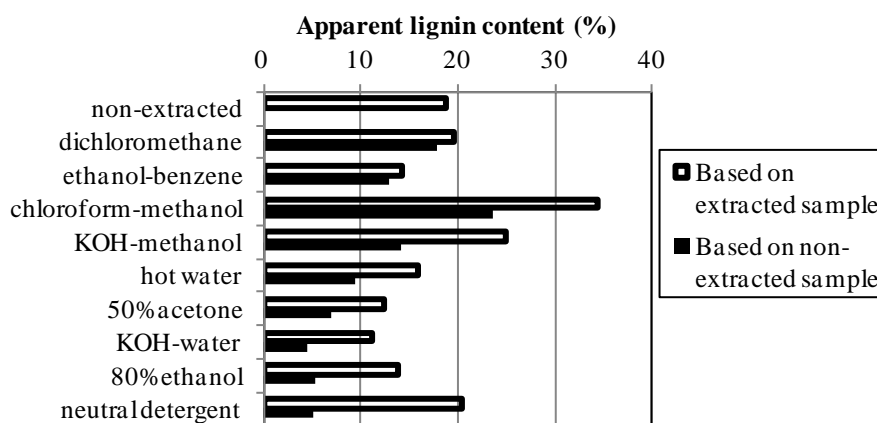


Fig.3-7 Apparent lignin contents of ginkgo leaf based on extracted sample measured by acetyl bromide method

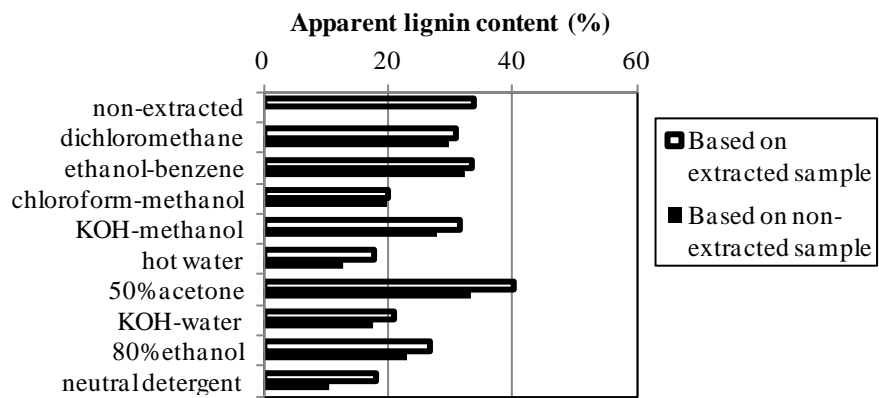


Fig.3-8 Apparent lignin contents of zelkova leaf based on extracted sample measured by acetyl bromide method

### 3.3.4 ニトロベンゼン酸化による分析

Fig.3-9にイチョウ(Ginkgo)の葉、Fig.3-10にケヤキ(Zelkova)の葉の、未抽出試料と各種抽出試料のニトロベンゼン酸化生成物収率を示す。また、抽出前の試料重量当たりの各種収率をイチョウ葉は Fig.3-11、ケヤキ葉は Fig.3-12に示した。ブナ木粉に比べ、葉試料はかなり低い値を示しており、これらは既往の研究と一致する。抽出後のニトロベンゼン酸化生成物収率はイチョウ葉ではジクロロメタンを除いた試料で低い値を示し、ケヤキ葉の値も高くない。また、ケヤキ葉はイチョウ葉よりも抽出後の保持率が高かった。ニトロベンゼン酸化生成物収率が抽出によりリグニンが除去された可能性を示している。

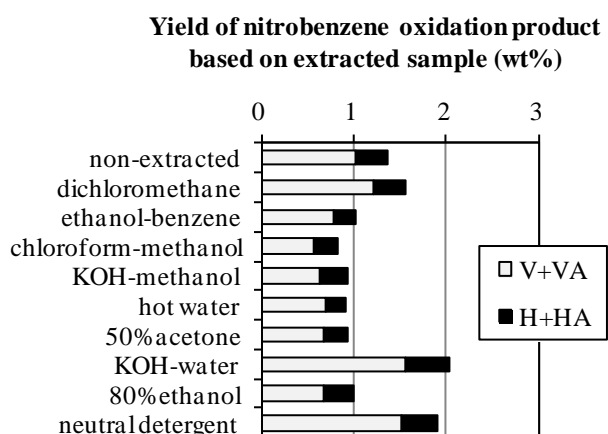


Fig. 3-9 Yield of nitrobenzene oxidation products of ginkgo leaf based on extracted sample

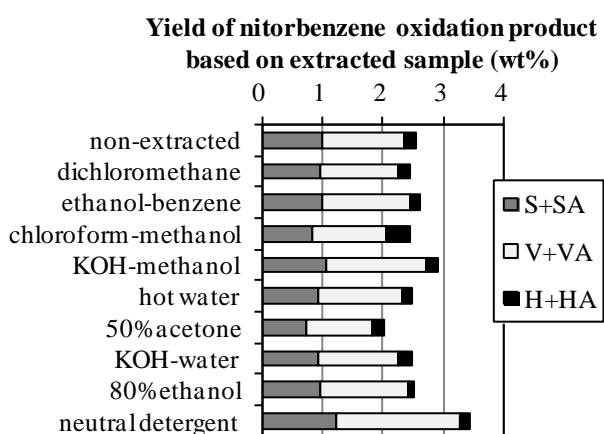


Fig. 3-10 Yield of nitrobenzene oxidation products of zelkova leaf based on extracted sample



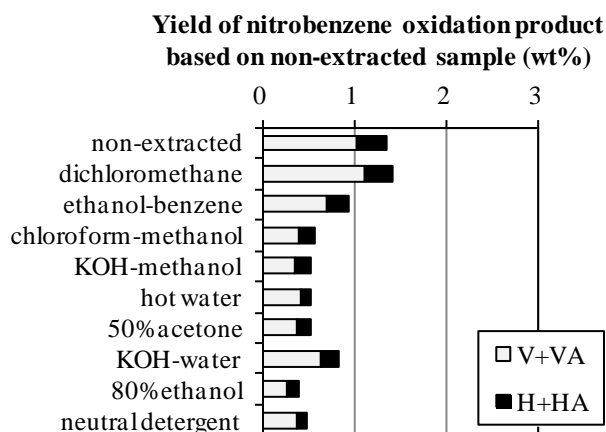


Fig. 3-11 Yield of nitrobenzene oxidation products of ginkgo leaf based on non-extracted sample

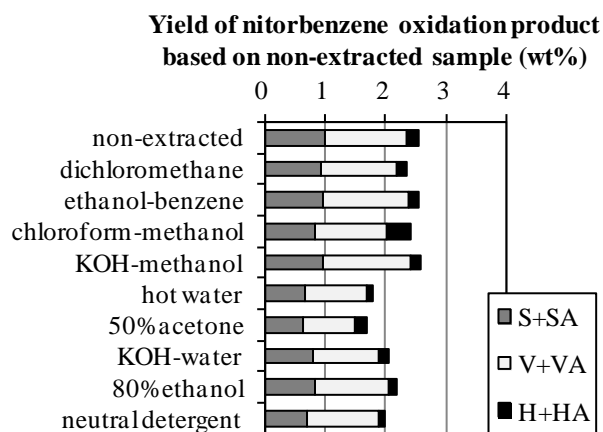


Fig. 3-12 Yield of nitrobenzene oxidation products of zelkova leaf based on non-extracted sample

Fig.3-13は横軸に葉の未抽出試料と各種抽出試料のクラークソン法定量値を、縦軸にニトロベンゼン酸化生成物収率をプロットした図を秋山らのデータとともに示したものである。[5] もし前抽出によりクラークソン法においてリグニンとして挙動するリグニン以外の成分が選択的に除去されたならば、クラークソン法の定量値に対するニトロベンゼン酸化生成物収率の比は未抽出試料のそれよりも高くなり、木質試料のそれに近い値を示すはずであるが、葉試料は抽出後も依然として木質試料より低い比率を示した。

酸可溶性リグニンは205nmに吸収を与える成分が存在した場合に過大な値を与えることが考えられる。そこで Fig.3-14にクラークソン残渣収率を横軸に、ニトロベンゼン酸化生成物収率を縦軸にプロットした図を示したが、それでも葉試料におけるクラークソン残渣収率とニトロベンゼン酸化生成物収率の比は0.02-0.11と木質試料の0.26-0.68よりも依然として低かった。これらの結果から、葉試料に含まれるニトロベンゼン酸化生成物を与えずにクラークソン法においてリグニンとして定量される成分が抽出試料に含まれていることが示された。また、水を含む溶媒によって抽出されたイチョウ葉試料はクラークソン残渣の保持率よりも全体の抽出後の保持率が低く、これらの抽出はリグニンではない成分を選択的に除去しなかったと考えられる。

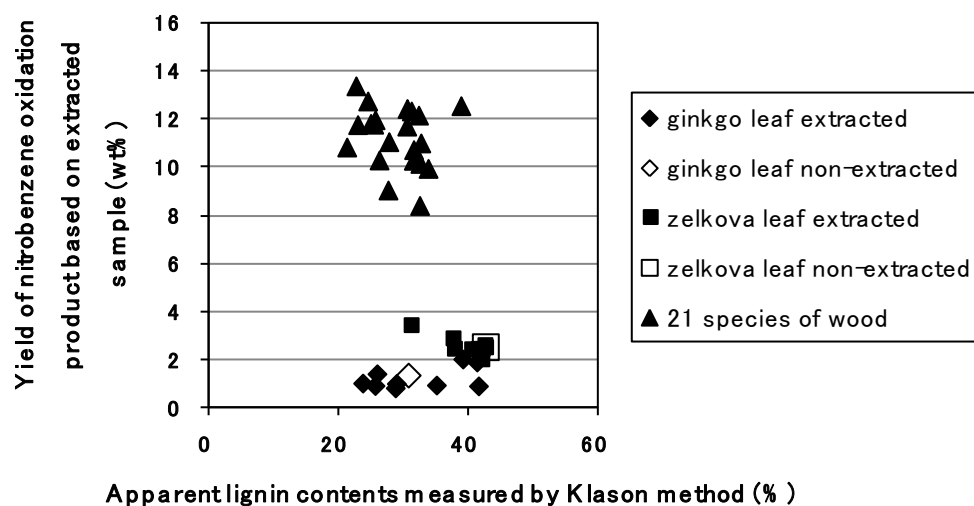


Fig. 3-13 Correlation between yield of nitrobenzene oxidation products and apparent lignin content measured by the Klason method (total of Klason residue and acid-soluble material)

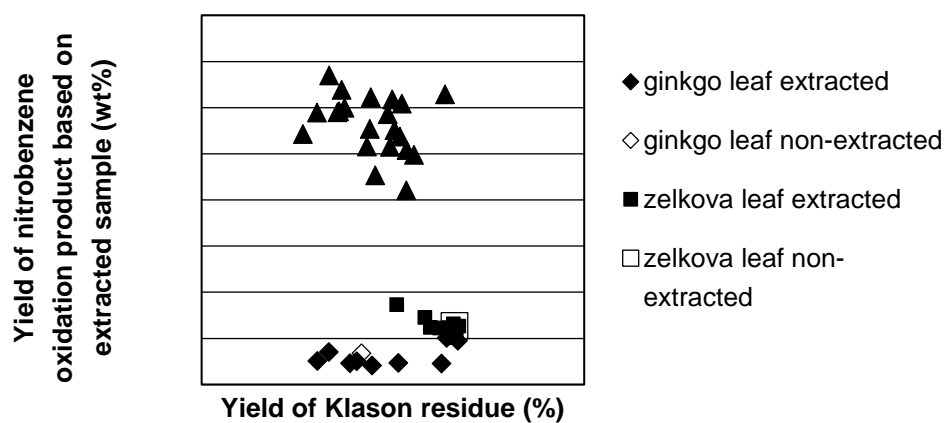


Fig. 3-14 Correlation between yield of nitrobenzene oxidation products and Klason residue

### 3.3.5 中性糖分析

Fig.3-15にイチョウ葉の Fig.3-16にケヤキ葉の抽出試料あたりの中性糖の収率を、そして Fig.3-17にイチョウ葉の Fig.3-18にケヤキ葉の未抽出試料あたりの値に計算し直したものを示す。抽出後の中性糖の保持率はケヤキ葉では低くないものもあったが、イチョウ葉は全体的に高くなかった。

葉試料に含まれる中性糖は細胞壁由来ではないものも含まれると考えられ、グルコースなどは貯蔵多糖からも得られる。イチョウ葉では抽出後のグルコースの保持率が他の糖よりも低く、セルロースがヘミセルロースよりも除去されやすいとは考えにくいいため、この結果は抽出により細胞壁に由来しないグルコースが除去された可能性を示している。一方で、ケヤキ葉では抽出後のグルコースの保持率が全体的に高く、細胞壁由来ではないグルコースも完全には除去されていない可能性がある。水を含む溶媒によって抽出された試料はラムノースとアラビノースの保持率が低く、これらの糖はペクチンの主要単糖であり、この抽出法はペクチン由来の多糖を除去する効果があると考えられる。

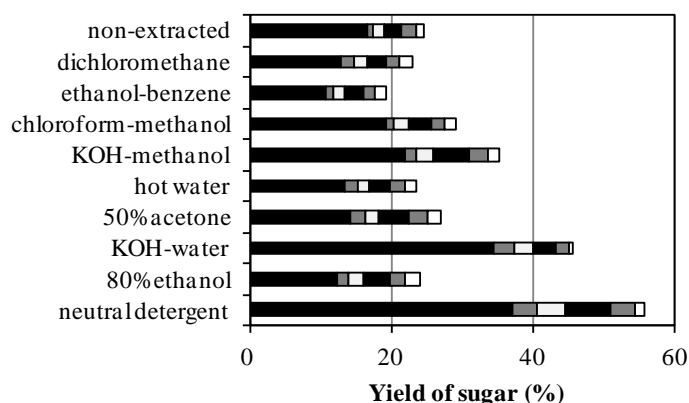


Fig.3-15 Yields of neutral sugar of ginkgo leaf based on extracted sample  
(From left, glucose, xylose, mannose, arabinose, galactose, rhamnose)

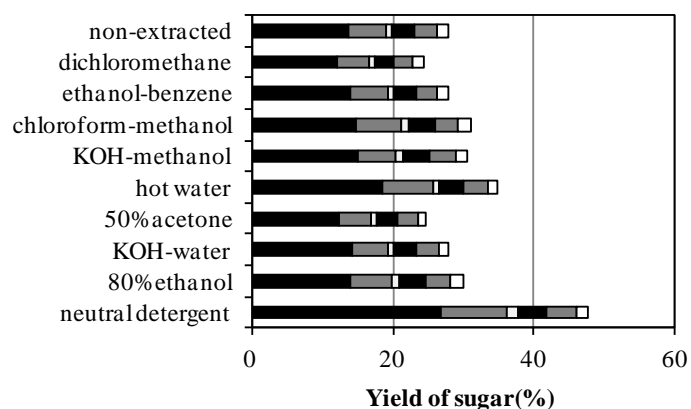


Fig.3-16 Yields of neutral sugar of zelkova leaf based on extracted sample  
(From left, glucose, xylose, mannose, arabinose, galactose, rhamnose)

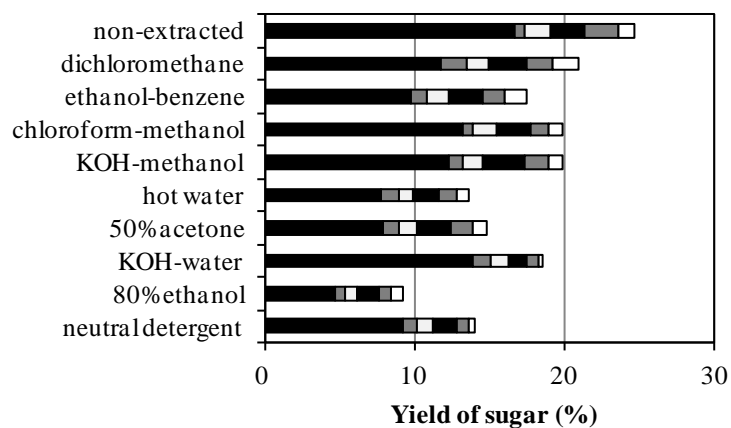


Fig.3-17 Yields of neutral sugar of ginkgo leaf based on non-extracted sample  
(From left, glucose, xylose, mannose, arabinose, galactose, rhamnose)

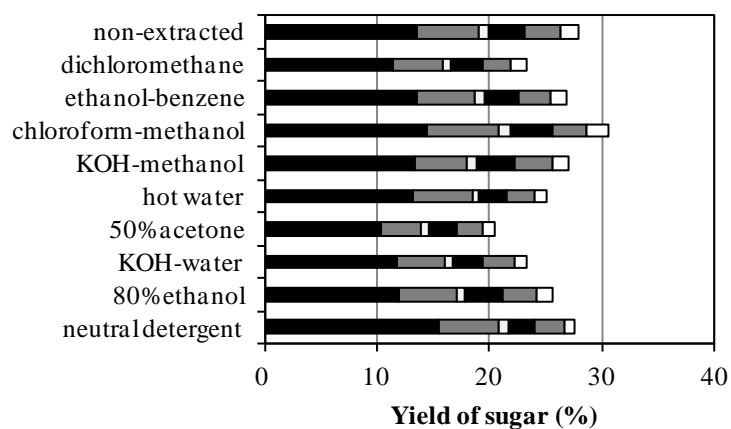


Fig.3-18 Yields of neutral sugar of zelkova leaf based on non-extracted sample  
(From left, glucose, xylose, mannose, arabinose, galactose, rhamnose)

### 3.3.6 元素分析

Fig.3-19に抽出試料あたりの窒素含有量を、Fig.3-20にそれらの値を未抽出試料あたりの値に計算し直したものを示す。

抽出後も葉試料の窒素含有量はイチヨウの KOH 水溶液抽出試料を除いて高い値を示し、本研究にて用いた抽出法では窒素を含む成分を完全には除去できなかったことが示された。

イチヨウ葉の KOH 水溶液以外の水を含む溶媒により抽出された試料は窒素含有量の保持率が試料全体の保持率よりも低く、水を含まない溶媒ではその逆の傾向がみられた。また、ケヤキ葉では窒素含有量の保持率はどの溶媒でも高かった。

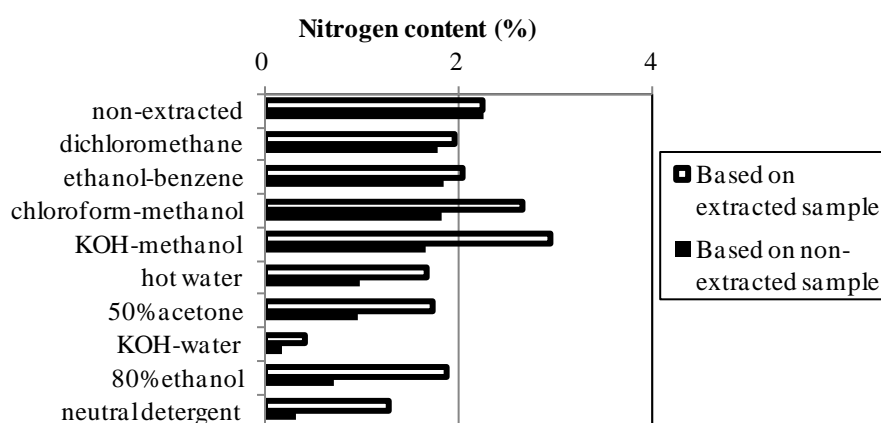


Fig.3-19 Nitrogen content of ginkgo leaf

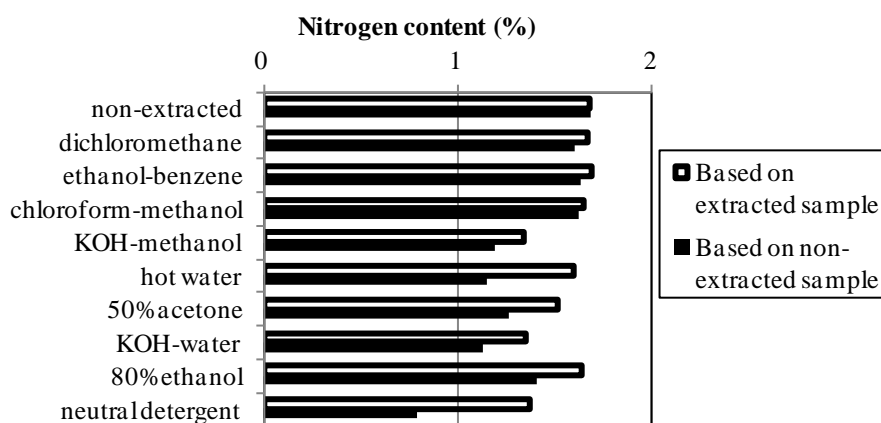


Fig.3-20 Nitrogen content of ginkgo leaf

### 3.3.7. 抽出後の溶媒の赤外吸収スペクトル分析

クラーソン残渣として挙動するリグニン以外の物質の一つとして、クチクラ層由来と考えられる脂肪族の物質（クチン）が考えられた。したがって、前抽出に用いる溶媒は、クチン等の脂肪族化合物を効果的に除去できることが求められる。Fig.3-21にイチョウの、Fig.3-22にケヤキの抽出溶媒の赤外吸収スペクトルを示す。

イチョウはジクロロメタン、エタノール-ベンゼン、クロロホルム-メタノール、80%エタノール、中性デタージェントに、ケヤキはジクロロメタン、エタノール-ベンゼン、クロロホルム-メタノール、50%アセトン、80%エタノールにクチクラ層と同様の二本の特徴的なピークが見られ、これらによる抽出はクチクラ層由来の成分をある程度取り除くことができたと考えられる。

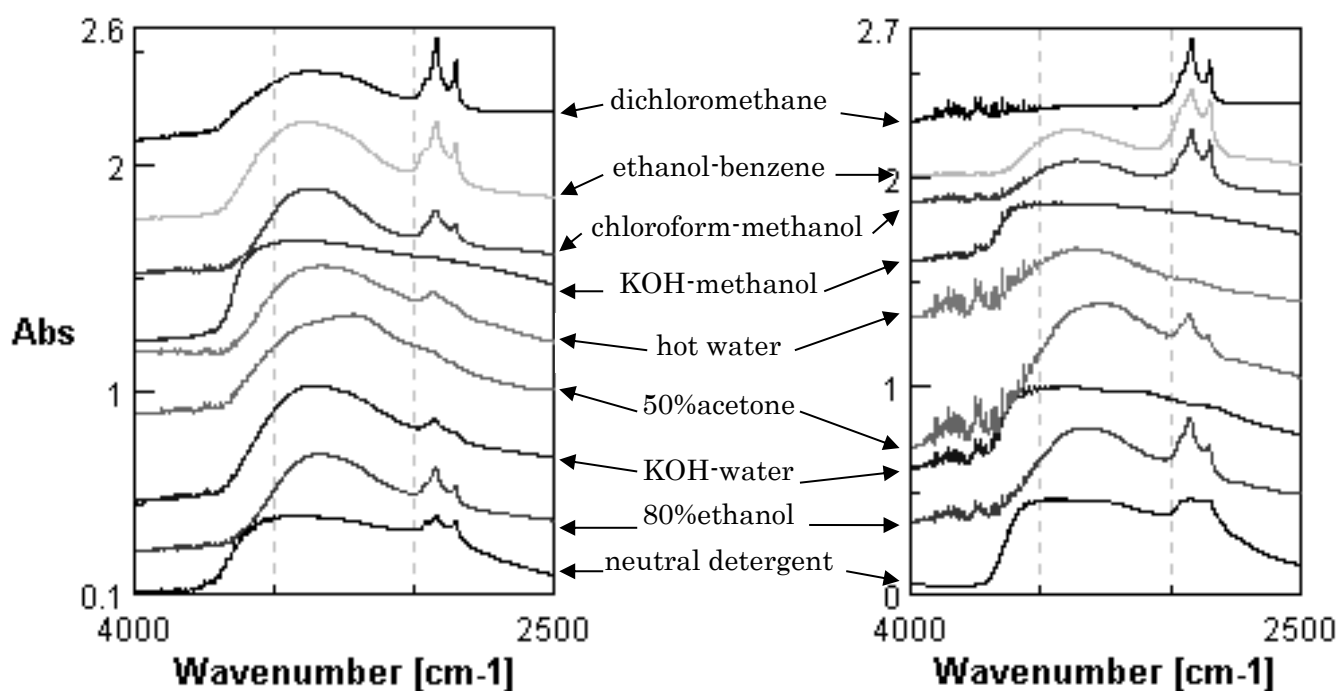


Fig.3-21 Infrared spectrum of extracted components of ginkgo

Fig.3-22 Infrared spectrum of extracted components of zelkova

### 3.4. 第3章のまとめ

本研究にて行った抽出法では細胞壁成分以外の成分を選択的かつ効果的に除去することはできず、細胞壁成分までもが除去されてしまった可能性もあった。また、イチヨウとケヤキで抽出による影響が異なる場合が多々見られ、樹種が異なると抽出の影響が異なることが示された。

以上のことから本研究で用いた抽出法はクラークソン法を用いた葉試料の正確なリグニン量を定量するための前処理としては不適切であると考えられる。本研究で行った抽出は基本的に1段階のみであり、成分分析のための前抽出を多段階に分けて行うことも少なくない。したがって、前抽出処理を伴う化学的手法によって葉試料の正確なリグニン量を測定できる可能性が否定された訳ではない。

### 3.5. 参考文献

- [1] J. T. Martin and B. E. Juniper, *The Cuticles of Plants*, Edward Arnold Ltd, London. (1970)
- [2] 松田和雄(編著)、多糖の分離・精製法、学会出版センター、1999
- [3] Chung BY., Cho JY., Lee SS., Nishiyama Y., Matsumoto Y., and Iiyama K. (2008) “The relationship between lignin and morphological characteristics of the tracheary elements from cacao (*Theobroma cacao* L.) Hulls,” *Journal of Plant Biology*, 51(2) 139-144. DOI: 10.1007/BF03030723
- [4] Van Soest, P. J., and Robertson, J. B., “Systems of analysis for evaluating fibrous feeds,” in: *Standardization of Analytical Methodology for Feeds*, W. J. Pigden, C. C. Balch, and M. Graham (eds.), International Development Research Centre, p49-60, 1980
- [5] Akiyama, T., Goto, H., Nawawi, D. S., Syafii, W., Matsumoto, Y., and Meshitsuka, G., “Erythro/threo ratio of  $\beta$ -O-4-5 structures as an important structural characteristic of lignin. Part 4: Variation in the erythro/threo ratio in softwood and hardwood lignins and its relation to syringyl/guaiacyl ratio”, *Holzforschung* 59(3), 276-281, 2005

## 第 4 章

### 葉試料のクラーソン残渣の分析



#### 4.1 緒言

3章にて前処理として葉試料に抽出を施すことにより細胞壁成分およびリグニン定量値にどのような影響を及ぼすのかを検討した。クラークソン法においてリグニンとして定量されるリグニン以外の成分を完全に除去できた抽出法は本研究で試みた抽出法の中にはなく、抽出の種類によってはセルロースやリグニンが除去されたものがあつた。クラークソン残渣に含まれるリグニン以外の成分として考えられるものにたんぱく質と脂質があげられる。

本研究ではクラークソン残渣を構成する成分がどのような構造を持つかを検討するため、クラークソン残渣について元素分析、赤外スペクトル分析、過マンガン酸消費量の測定、メトキシル基量の測定を行った。また、前抽出処理を施した試料のクラークソン残渣についても同様の分析を行い、前抽出が残渣を形成する成分にどのような影響を及ぼすのか検討した。

## 4.2. 実験

### 4.2.1. 試料

3章のクラークソン処理の際に得られたイチヨウの葉とケヤキの葉の未抽出試料と各種抽出試料のクラークソン残渣を用いた。

### 4.2.2. 赤外吸収スペクトル分析による芳香核量指標値の算出

未抽出試料および各種抽出試料のクラークソン残渣をメノウ乳鉢を用いて粉末状にし、クラークソン残渣粉末 2mg に 200mg の KBr を加えてペレットを作成し、2章と同様に赤外吸収スペクトルをから芳香核量指標値を算出した。

### 4.2.3. 元素分析

各種抽出、未抽出試料のクラークソン残渣について東京大学農学生命科学研究科先端機器分析室に元素分析を依頼し、2400 Series II (PerkinElmer, USA)により窒素の含有量を測定した。

### 4.2.4. 過マンガン酸消費量

各種抽出、未抽出試料のクラークソン残渣をカップパー価法に基づいて分析した。

クラークソン残渣を 8mg 精秤し、 $25.0 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  に保った 50ml のイオン交換水を加え、気泡を巻き込まないように攪拌した。0.02mol/L 過マンガン酸カリウム溶液 10ml および 1mol/L 硫酸 20ml を  $25^{\circ}\text{C}$  にして加え、10 分間反応させた。1.0mol/L ヨウ化カリウム溶液を 2ml 加えて反応を止め、1%デンプン指示薬を添加し、0.05mol/L チオ硫酸ナトリウムで滴定した。[2]

#### 4.2.5. メトキシル基の定量[1]

バイアル瓶中に各種抽出、未抽出試料のクラークソン残渣30mg と57% HI 10ml を加えしっかりと封をし、130℃で20分反応させた。氷水で冷却し、内部標準(ヨウ化エチル四塩化炭素溶液20mmol/L)を加えた。さらに四塩化炭素を10ml 加えて良く攪拌し、上層から数 ml を採取し、硫酸ナトリウムで脱水した。脱水した試料を GC(島津製作所 GC-17)で分析した。

### 4.3. 結果と考察

#### 4.3.1. クラーソン残渣の芳香核量指標値

クラーソン残渣の赤外吸光スペクトルを測定し、全体のピークに対する芳香核由来のピークの比を芳香核指標値として算出した(Table 4-1)。この芳香核指標値より、クラーソン残渣に含まれるリグニンの最大値を見積もることができる。葉試料のクラーソン残渣の芳香核指標値は木質試料のそれに比べて低い値を示した結果から葉試料のクラーソン残渣に含まれる芳香核の量は少なく、リグニン以外の成分がクラーソン残渣に含まれることが強く示唆された。イチョウ葉のエタノール-ベンゼン、KOH 水溶液、中性デタージェント抽出試料のクラーソン残渣は未抽出試料のクラーソン残渣より芳香核指標値が高く、これらの抽出ではクラーソン残渣を形成する芳香核を持たない成分が比較的多く除去されたと考えられるが、それ以外の抽出試料のクラーソン残渣では芳香核指標値が未抽出試料のクラーソン残渣よりも低く、クラーソン残渣を形成する芳香核を持たない成分の除去量は比較的少なかったと考えられる。同様に、ケヤキの葉では KOH メタノール溶液と熱水抽出試料のクラーソン残渣は未抽出試料のクラーソン残渣よりも高い値を示し、クラーソン残渣を形成するリグニンではない成分が除去されやすく、それ以外の抽出法ではクラーソン残渣を形成するリグニン以外の成分が除去されにくかったと考えられる。イチョウ葉の KOH 水溶液抽出試料のクラーソン残渣は特に高い値を示した。この試料は $1600\text{cm}^{-1}$ 付近のピーク面積が他のイチョウ葉の抽出試料のクラーソン残渣よりも高い値を示したが、これは抽出による波形の変化が本研究での算出法では大きな値を示すようになったためである。

	Ginkgo leaf	Zelkova leaf	Beech wood
non-extracted	0.0097	0.0045	0.0244
dichloromethane	0.0106	0.0046	-
ethanol-benzene	0.0086	0.0041	-
chloroform-methanol	0.0068	0.0045	-
KOH-methanol	0.0063	0.0041	-
hot water	0.0074	0.0056	-
50%acetone	0.0100	0.0038	-
KOH-water	0.0154	0.0049	-
80%ethanol	0.0072	0.0036	-
neutral detergent	0.0109	0.0049	-

Yield of nitrobenzene oxidation products (%)

Indication value of aromatic structure of Klason residue

- ◆ ginkgo leaf extracted
- zelkova leaf extracted
- ◇ ginkgo leaf non-extracted
- zelkova leaf non-extracted
- beech wood

Sample	Indication value of aromatic structure of Klason residue	Yield of nitrobenzene oxidation products (%)
ginkgo leaf extracted	0.005	1.0
ginkgo leaf extracted	0.008	1.5
ginkgo leaf extracted	0.010	1.8
ginkgo leaf extracted	0.015	2.0
ginkgo leaf non-extracted	0.005	0.8
ginkgo leaf non-extracted	0.008	0.5
ginkgo leaf non-extracted	0.010	0.8
ginkgo leaf non-extracted	0.015	2.0
zelkova leaf extracted	0.002	2.5
zelkova leaf extracted	0.003	3.0
zelkova leaf extracted	0.004	3.5
zelkova leaf extracted	0.005	2.5
zelkova leaf non-extracted	0.002	2.5
zelkova leaf non-extracted	0.003	2.5
zelkova leaf non-extracted	0.004	2.5
zelkova leaf non-extracted	0.005	2.5
beech wood	0.025	11.5

65

#### 4.3.2 クラーソン残渣の元素分析

元素分析により炭素、水素、窒素の含有量を測定することで、葉試料のクラーソン残渣に含まれるリグニンではない成分について検討した(Table 4-2)。葉試料のクラーソン残渣に含まれる窒素含有量は高く、窒素化合物、即ちリグニン以外の成分が葉試料のクラーソン残渣の形成に参加することが示された。アミノ酸の平均分子量の窒素に対する比率は6.25であり、窒素含有量からタンパク質量を推定する際に窒素含有量を6.25倍した値が用いられる。この方法により算出したクラーソン残渣中のタンパク質はイチョウ葉で8%、ケヤキで10%ほどであり、葉試料の高いクラーソン残渣収率はタンパク質の存在のみでは十分に説明できず、タンパク質以外の成分も著量に含まれることが示唆される。各種抽出試料のクラーソン残渣の窒素含有量はイチョウ葉の KOH 水溶液抽出試料を除いた全てで未抽出試料のクラーソン残渣よりも高い値を示し、今回行った抽出ではクラーソン残渣を形成する窒素化合物は他の成分よりも除去されにくいことが示された。Hatfiledらはアルファルファとカモガヤ(Cocksfoot)の葉のクラーソン残渣について窒素含有量を分析しており、それぞれ1.8%と2.5%(wt)であった。イチョウと樺の葉に含まれる窒素化合物はこの2種と比べるとやや少ない。[3]

葉試料のクラーソン残渣の H/C モル比はイチョウ葉で1.48、ケヤキ葉で1.39とブナ木粉のクラーソン残渣の1.12よりも高い値を示した。H/C モル比が1に近いほど芳香環あるいは長鎖共役アルケンの含有率が高いことを示唆するため、葉試料のクラーソン残渣の高い値は芳香環あるいは長鎖共役アルケンの含有率が低く、即ちリグニン含有率が少ないことが示唆された。イチョウ葉のクラーソン残渣の酸素含有率は23.5%とブナ木粉のクラーソン残渣の33.6%より高く、イチョウ葉のクラーソン残渣は炭素と水素のみで構成される成分に富む可能性を示した。ケヤキ葉のクラーソン残渣は酸素含有率が45%とブナ木粉のクラーソン残渣の34%より高く、クラーソン残渣を形成するリグニン以外の成分が酸素を多く含む成分である可能性を示した。有機溶媒(ジクロロメタン、アルベン、クロロホルム-メタノール、KOH メタノール溶液、80%エタノール)により抽出された試料のクラーソン残渣は未抽出試料のクラーソン残渣よりも高い酸素含有率を示し、炭素と水素のみで構成される成分が抽出により比較的多く除去されたことを示した。

Table 4-2 Elemental analysis of Klason residue

		C	H	N	Total	O	H/C (mol ratio)
ginkgo leaf	non-extracted	67.0	8.2	1.3	76.5	23.5	1.48
	dichloromethane	61.6	7.3	1.7	70.6	29.4	1.43
	ethanol-benzene	62.3	7.2	2.0	71.5	28.5	1.39
	chloroform-methanol	60.1	7.0	3.0	70.0	30.0	1.39
	KOH-methanol	57.1	5.7	3.7	66.6	33.4	1.20
	hot water	68.3	8.5	1.9	78.7	21.4	1.49
	50%acetone	67.2	8.7	1.7	77.6	22.4	1.56
	KOH-water	67.4	8.9	0.6	76.9	23.1	1.57
	80%ethanol	63.7	7.7	2.3	73.7	26.3	1.46
	neutral detergent	65.6	8.4	1.8	75.8	24.2	1.53
zelkova leaf	non-extracted	48.1	5.6	1.6	55.2	44.8	1.39
	dichloromethane	47.6	4.9	1.7	54.2	45.8	1.23
	ethanol-benzene	45.3	4.8	1.8	51.9	48.1	1.27
	chloroform-methanol	46.0	4.7	1.9	52.6	47.4	1.23
	KOH-methanol	45.0	4.3	2.2	51.5	48.5	1.14
	hot water	57.5	6.1	2.5	66.0	34.0	1.27
	50%acetone	46.7	5.4	1.9	54.0	46.1	1.38
	KOH-water	50.6	5.4	2.2	58.3	41.7	1.29
	80%ethanol	44.5	4.8	2.0	51.3	48.7	1.30
	neutral detergent	49.8	5.3	2.4	57.5	42.5	1.28
	beech wood	60.5	5.6	0.3	66.4	33.6	1.12

### 4.3.3 クラーソン残渣の過マンガン酸消費量

過マンガン酸消費量は芳香核や二重結合の不飽和結合の量を示す指標となる。ブナ木粉のクラーソン残渣に比べ、葉試料のクラーソン残渣は消費量が少なく、仮に葉試料のクラーソン残渣の過マンガン酸の消費が仮に全てリグニンによるものだとしてもブナ木粉のクラーソン残渣よりも低いことから、葉試料のクラーソン残渣に含まれるリグニンは少ないことが示唆された (Table 4-3)。イチョウの葉のクラーソン残渣では KOH・メタノール抽出試料のクラーソン残渣以外で未抽出試料のクラーソン残渣よりも低い値を示し、これらの抽出ではイチョウの葉のクラーソン残渣を形成する不飽和結合をもつ成分が比較的除去されやすかったことが考えられる。ケヤキの葉のクラーソン残渣では50%アセトン抽出試料と KOH 水溶液抽出試料以外のクラーソン残渣が未抽出試料よりも高い値を示し、これらの抽出ではケヤキの葉のクラーソン残渣を形成する不飽和結合をもつ成分が除去されにくかったと考えられる。

Table 4-3 Permanganate consumption of  
Klason residue (mmol/g)

	Ginkgo leaf	Zelkova leaf	Beech wood
non-extracted	7.96	8.13	11.27
dichloromethane	6.44	9.10	-
ethanol-benzene	7.35	9.79	-
chloroform-methanol	7.10	8.95	-
KOH-methanol	10.38	8.78	-
hot water	4.36	8.94	-
50%acetone	3.13	7.68	-
KOH-water	2.45	8.06	-
80%ethanol	5.74	8.64	-
neutral detergent	4.43	8.49	-

未抽出の葉試料のクラーソン残渣の芳香核指標値に対する過マンガン消費量の割合はブナ木粉のクラーソン残渣のそれに比べて高い値を示し (Fig.4-3)、未抽出の葉試料のクラーソン残渣には芳香核以外の不飽和結合が多く含まれると考えられる。イチョウの葉のクラーソン残渣は抽出の種類によっては芳香核指標値に対する過マンガン酸消費量の比がブナ木粉のクラーソン残渣のそれよりも減少し、これらの試料は抽出により不飽和結



合をもつ成分が除去されただけではなく何らかの変質が起きた可能性が考えられる。

ブナ木粉に対する葉試料の比はクラソン残渣の芳香核指標値における比よりかなり大きく、仮にブナ木粉のクラソン残渣がすべてリグニンであり芳香核成分がすべてリグニンだとすると、イチョウのリグニンによる過マンガン酸消費量はおよそ5.2mmol/g であり、芳香核を持たない成分により約2.8mmol/ の過マンガン酸が消費されている。葉試料の芳香核以外の不飽和結合をもつ物質の一つとしてクチクラ層由来のオレイン酸などが考えられるが、オレイン酸の過マンガン酸消費量はおよそ1mmol/ であり、これだけでは葉試料がクラソン残渣の芳香核指標値に比べ大きな過マンガン酸カリウム消費量を与えることを説明できないため、葉試料の過マンガン酸消費量が高い値を示す原因についてはさらなる検討が必要である。

Van Soest は、一章でも述べたが、飼料のリグニン分析法として Acid detergent fiber (酸性条件でたんぱく質を除去した繊維)を過マンガン酸により分解し、その前後の重量差をリグニンとして測定する方法を提案している。[4]しかし、葉試料は過大な過マンガン酸消費量を示ため、葉試料のリグニン定量法としては不適切であると考えられる。

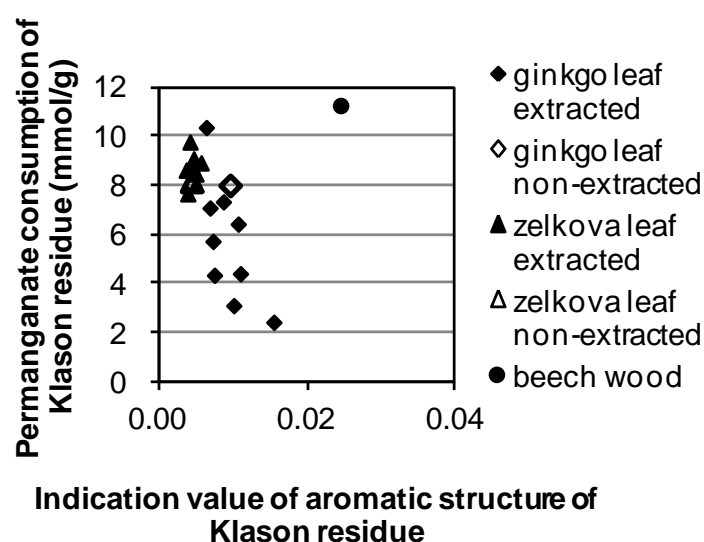


Fig.4-3 Correlation between permanganate consumption and indication value of aromatic structure of Klason residue

#### 4.3.3 クラーソン残渣のメトキシル基量

葉試料のクラーソン残渣のメトキシル基量はブナ木粉のそれに比べ低い値を示した(Table 4-4)。この結果より、葉試料のクラーソン残渣に含まれるS核とG核構造を持つリグニンは少ないことが強く示唆された。葉試料のリグニンが多く、H核構造を持つ可能性もあるが、葉試料のニトロベンゼン酸化による芳香核構造の分析においてH核の量がS核とG核よりも特別に高い値を示さないことから、葉試料のクラーソン残渣にH核構造を持つリグニンが特別に多く含まれることは考えにくい。従って葉試料のクラーソン残渣に含まれるリグニンは少ないことが示唆された。

秋山らは21種類の樹種のクラーソン残渣についてメトキシル基を定量しており、その範囲は0.97～1.49と、本研究で分析した葉試料よりも高い値を示した。[5] 金らはイチョウ、クスノキ、ケヤキ、アオギリのメトキシル基量について分析しており、それぞれ0.10、0.24、0.16、0.23 (mol/200g lignin)であった。[6] イチョウとケヤキの葉の値については本研究よりも低く、クスノキとアオギリは本研究でのケヤキと同等の値を示し、いずれにしても木質試料よりも低い値である。

イチョウ葉ではジクロロメタンと50%アセトン以外の抽出試料のクラーソン残渣が未抽出試料のクラーソン残渣よりも低い値を示し、これらの抽出ではクラーソン残渣を形成するリグニンを含めたメトキシル基を与える成分が比較的除去されやすかったことが考えられる。ケヤキ葉では50%アセトン以外の抽出試料のクラーソン残渣が未抽出試料のクラーソン残渣よりも高い値を示し、クラーソン残渣を形成しメトキシル基を与える成分が比較的保持されやすかったと考えられる。

Table 4 Yield of iodo methane of Klason residue  
(mol / 200g Klason residue)

	ginkgo leaf	zelkova leaf	beech wood
non-extracted	0.19	0.24	1.23
dichloromethane	0.26	0.27	-
ethanol-benzene	0.17	0.27	-
chloroform-methanol	0.08	0.26	-
KOH-methanol	0.15	0.28	-
hot water	0.08	0.26	-
50%acetone	0.31 <sup>a</sup>	0.24	-
KOH-water	0.18	0.27	-
80%ethanol	0.10	0.26	-
neutral detergent	0.19	0.35	-

a: Experimental was carried by half scale

#### 4.4. 第4章のまとめ

葉試料のクラークソン残渣に含まれるリグニンがブナ木粉の残渣に比べて少ないことを示す結果が芳香核指標値、過マンガン酸消費量、メトキシル基定量によって示唆された。葉試料においてクラークソン残渣を形成するリグニン以外の成分の一つに窒素を含む成分が存在することが示されたが、仮に全てタンパク質由来だとしてもクラークソン残渣に占めるタンパク質の割合は決して大きくないことが示唆された。

抽出によりクラークソン残渣の全ての分析結果がリグニン純度の上昇を示した抽出法はなく、抽出によりリグニンが除去された可能性が示唆された抽出法もあった。また、イチョウとケヤキで効果が異なる場合も多かったため、今回行った前抽出法はクラークソン法によるリグニン分析のための前処理としては適さないと考えられる。

#### 4.5. 参考文献

- [1] Goto, H., Koda, K., Tong, G.L., Matsumoto, Y., Meshitsuka, G.: Interference of carbohydrates in the determination of the methoxyl content of lignin in woody samples. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 26(1), 81-93 (2006)
- [2] Stephen Y.Lin, Carlton W.Dence (Eds), 中野順三、飯塚堯介(訳)、「リグニン科学研究法」、ユニ出版、1992
- [3] Ronald D Hatfield, Hans-Joachim G Jung, John Ralph, Dwayne R Buxton and Paul J Weimer, “A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures.” *J. Food and Agriculture*, 65, p51-58, 1994
- [4] P.J. Van Soest, “Rice straw, the role of silica and treatments to improve quality”. *Animal Feed Science and Technology*. 130 p137–171, 2006
- [5] Akiyama, T., Goto, H., Nawawi, D. S., Syafii, W., Matsumoto, Y., and Meshitsuka, G., “Erythro/threo ratio of  $\beta$ -O-4-5 structures as an important structural characteristic of lignin. Part 4: Variation in the erythro/threo ratio in softwood and hardwood lignins and its relation to syringyl/guaiacyl ratio,” *Holzforschung* 59(3), 276-281. (2005).
- [6] Jin, Z., Akiyama, T., Chung, B. Y., Matsumoto, Y., Iiyama, K., and Watanabe, S., “Changes in lignin content of leaf litters during mulching,” *Phytochemistry*, 64(5) p1023-1031, 2003

## 第 5 章

### 総括

本研究の目的の一つは、葉試料に前抽出を施すことでリグニン分析にどのような影響を与えるのかを検討するものであり、抽出の主な目的はリグニンとして定量されるリグニンではない成分を除去し、なおかつセルロース、ヘミセルロース、リグニンの細胞壁成分を残すことであった。本研究にて行った抽出法ではクラークソン残渣に含まれるリグニンではない成分を完全に除去できたものではなく、抽出によっては細胞壁成分が除去されてしまったものもあった。また、抽出の効果がイチョウとケヤキで異なることも少なくなく、非木質組織のリグニン分析の前処理としてこれらの抽出の適切さには疑問が残る。また、植物バイオマスの構成成分の分析にあたって前抽出を施す際には、試料の樹種ごとに抽出の影響が異なる可能性を検討する必要があると考えられる。

クラークソン残渣に含まれるリグニン以外の成分として、窒素分析の結果からタンパク質の存在が強く示唆されたが、クラークソン残渣収量約25%のうちタンパク質による寄与は大きくて2%ほどであり、クラークソン残渣中のリグニン以外の成分が全てタンパク質で構成されるものではないことが示された。また、葉試料のクラークソン残渣には芳香核以外の不飽和結合をもつ成分が多量に含まれる可能性が示唆された。

葉試料の正確なリグニン分析のアプローチには前抽出による不要成分の除去、リグニンの選択的な分解、リグニン特有の構造の検知の3通りが考えられる。本研究では1番目を中心に実験を行ったが不要成分の除去を完全に除去することはできず、2番目に関しても過マンガン酸による分解はリグニン以外にも作用することが強く示唆された。3番目はニトロベンゼン酸化生成物、メトキシル基、芳香核量、本研究では行わなかったがオゾン酸化生成物の収率はそれぞれ良好な相関を示すことから、およそその量を見積もるまでなら優秀な手法である。しかし、正確な量の測定となるとリグニン以外の成分の影響について詳細に検討する必要があると思われる。葉試料の成分分析は葉の全体を扱うものがほとんどであるが、今後詳細な成分分析を試みるならば組織の構成比や組織ごとの成分組成を個別に明らかにしていくことが必要になると考えられる。

# 謝辞

本研究を進めるにあたって、多大なるご指導、助言をいただきました東京大学農学生命科学研究科生物材料科学専攻木材化学研究室の松本雄二教授に心より御礼申し上げます。

研究およびその他でご助言いただきました木材化学研究室の横山朝哉準教授と秋山拓也特任助教に深く感謝いたします。

また、日頃から様々な面でお世話になりました木材化学研究室の皆様に感謝いたします。

2017 年 7 月