

森林バイオマス評価分析システムにおける リグニン分析プロトコール*

梅澤 俊明** ***, 和田 将平**, 山村 正臣**, 榊原 紀和**, 中坪 朋文**, 鈴木 史朗***,

服部 武文**, 幸田 みどり**

Protocols for lignin analysis for Forest Biomass Analytical System of RISH, Kyoto University*

Toshiaki Umezawa****, Shohei Wada **, Masaomi Yamamura **, Norikazu Sakakibara **,
Tomoyuki Nakatubo **, Shiro Suzuki****, Takefumi Hattori **, and Midori Koda **

概要

京都大学生存圏研究所森林バイオマス評価分析システムにおいて、技術員向けにリグニン分析プロトコールを改変した。

1. はじめに

今後人類が持続的生存を維持するためには、再生可能バイオマス資源に依拠する社会の構築が必須である。ここで、優良土地は食料生産に譲らざるを得ず、資源・エネルギー生産用森林バイオマスの生産適地の拡大は今後望めない。従って、先端樹木バイオテクノロジーを用いた、劣悪環境林地における効率的な森林バイオマス系原材料・エネルギーの安定供給と利用システム構築が世界的に緊急の課題となっている。これらは、当研究所のミッションのうち、環境計測・地球再生、太陽エネルギー変換・利用、循環型資源・材料開発、およびアカシアプロジェクトに密接にかかわっている。そして、環境修復、持続的森林バイオマス生産、バイオエネルギー生産、高強度・高耐久性木質生産などを最終目標として、現在さまざまな形質転換樹木の作出が試みられつつある。加えて、関連する基礎科学分野においても、種々の遺伝子機能を検証するために様々な形質転換植物が活発に作成されている。

これらの研究開発においては、木質バイオマスの本体である細胞壁の性質が、形質転換体と野生型とでどう違うかを正確に解析することが必須である。木質バイオマスは細胞レベルから分子レベルにいたるまできわめて複雑であり、その正確な評価には専門的技術を要する。これらの評価方法はいわゆる木材分析であるが、確立されて久しい技術であり、それ自体は先端研究対象となるものではない。しかし、熟練を要し、昨今流行の試薬キットなどとは異なり、未習熟の誰でもが簡単に結果を出せるような手法ではない。よって、昨今、木材分析に不慣れな研究者から、形質転換植物の評価分析に関する依頼が多く寄せられていた。さらに、バイオマスから燃料、有用化学品などを生産するバイオリ

* 2007年8月20日受理

** 〒611-0011 宇治市五ヶ庄 京都大学生存圏研究所森林代謝機能化学分野
E-mail: tumezawa@rish.kyoto-u.ac.jp

*** 〒611-0011 宇治市五ヶ庄 京都大学生存基盤科学研究ユニット

ファイナリーが近年急展開しており、木質バイオマスの変換効率を左右するリグニンの構造分析に関する要望が増加している。

そこで、これらの要望に応えるため、本研究所では、平成 18 年 4 月 1 日付で森林バイオマス評価分析システム (Forest Biomass Analytical System, FBAS) を立ち上げ、全国共同利用施設としての運用を開始した。

ここで、リグニンの構造解析手法であるチオアシドリシスおよびニトロベンゼン酸化分解、リグニン定量法であるクラウソンリグニン法およびアセチルブロマイド法の標準プロトコールは、研究者や学生が時間無制限に行うことが暗黙の前提となっていることから、まず、技術員の勤務形態に即したものに改良した。

2. リグニンの化学分析プロトコール

リグニン分析のうちアセチルブロマイド法、チオアシドリシス法、ニトロベンゼン酸化分解法について、プロトコールの改変を行なった。それぞれにつき、参照した文献は、以下の通りである。アセチルブロマイド法¹⁻²⁾、チオアシドリシス法³⁾、ニトロベンゼン酸化分解⁴⁾。これらの文献の実験条件を、技術員の勤務時間 (9:00 ~ 17:00) 内で消化できるものに改変したものが以下のプロトコールである。

2.1 アセチルブロマイド法

1. 前日によく乾燥させたサンプルを、実験直前に再度 1 時間ほど真空ポンプで乾燥させる。
2. キャップ付試験管に試料 10 mg とスターラーバーを入れる (湿気を取りこむのですばやく)。
3. *アセチルブロマイド試薬を 5 mL 入れ、キャップを閉じ、さらにパラフィルムを巻いて密封する。
(作業はドラフトで行い、試験管内のガスを吸わないようにする)
4. 50°C のオイルバス中で 6 時間反応させる。
5. 100 mL メスフラスコに酢酸 20 mL、2M NaOH 10 mL を入れ、そのメスフラスコに 6 時間後の反応液を全て移す (酢酸で何度か洗う)。0.5 M 塩酸ヒドロキシルアミン 3.5 mL を加え、100 mL まで酢酸でメスアップする。(作業はドラフトで行い、試験管内のガスを吸わないようにする)
6. 石英セルを用いて、分光光度計で 200 ~ 400 nm のスペクトルを測定する。
7. 280 nm における吸光度の値を**計算式に代入することで、リグニン含量を算出する。

*アセチルブロマイド(99%)-酢酸 ; 1:3 (v/v)

**リグニン含量 (%) = {(100 x 吸光度 x V) / (A x W)} - B

V: 溶液の量 (L) (本プロトコールではこの値は 0.1)

A: 標準リグニンの吸光度係数 = 20.09

W: 試料の重量 (g)

B: パルプのときのみ使用する補正係数

2.2 チオアシドリシス法

1. 前日によく乾燥させたサンプルを、実験直前に再度 1 時間ほど真空ポンプで乾燥させる。
2. キャップ付試験管に試料 10 mg とスターラーバーを入れる (湿気を取りこむのですばやく)。
(以下の作業はドラフトで行い、試験管内のガスをなるべく吸わないようにする)
3. サンプルが入っている試験管に*チオアシドリシス試薬を 3 mL、内標としてドコサン (1 mg/mL) 50 μL を加え、キャップし、パラフィルムを巻いて密封する。
4. 100°C のオイルバスで 4 時間反応させる。
5. 4 時間後、試験管を氷水で冷却し、0.4M NaHCO₃ を 5 mL 加える。
6. 希塩酸を用いて反応液を pH 3~4 にあわせる。
7. ジエチルエーテルで抽出し、エーテル層を回収する。(3 回)

- 回収したエーテル層をエバポレーターで濃縮する。
- 濃縮したエーテル層に適量の無水硫酸ナトリウムを加え、マイクロチューブに数滴（1, 3, 10 滴など）移し、減圧溜去する。
- BSA 8 μ L 加え、TMS 化する（60 $^{\circ}$ C, 45 min）。
- GC-MS 分析に供する。

*チオアシドリシス試薬：エタンチオール（97%） 2.5 mL
 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ （47%） 0.625 mL
 1,4-ジオキサンで 25 mL までメスアップ

2.3 ニトロベンゼン酸化法

- 前日によく乾燥させたサンプルを、実験直前に再度 1 時間ほど真空ポンプで乾燥させる。
- テフロンチューブに試料 100 mg 入れる（湿気を取りこむのですばやく）。
- 2M NaOH を 2 mL、ニトロベンゼンを 0.24 mL 加え、ソニケーターを用いて液内のサンプルの塊をつぶす。このときサンプルがまだつぶれないようであればスパーテルを用いてつぶす。
- さらに 2M NaOH 2 mL で壁を洗う。
- テフロンチューブを専用のオートクレーブに入れ、反応させる（170 $^{\circ}$ C, 1 h）。
- オートクレーブ温度が 100 $^{\circ}$ C 以下になったところで、テフロンチューブを取り出し氷水で冷ます。
- 内標としてアセトバニロン（10 mg/mL）100 μ L を添加する。
- 綿を詰めたカラムで反応液をろ過する。
- 0.1M NaOH 2 mL でテフロンチューブ内壁を洗い、カラムに通しろ過する。（5 回）
- ろ液に酢酸エチルを加え、抽出する。（3 回）
- 水層のみを回収し、4M HCl を用いて pH 2~3 にする。
- この水層に酢酸エチルを加え、抽出する。（3 回）
- 酢酸エチル層のみ回収し、これに飽和食塩水を加え脱水する。
- 酢酸エチル層のみ回収し、これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、さらに脱水する。
- 酢酸エチル層を減圧溜去する。
- 減圧溜去したサンプルを 25 mL の酢酸エチルに溶解させ、そのうち適量をマイクロチューブに移し、再度減圧溜去する。
- BSA 8 μ L を加え、TMS 化する（60 $^{\circ}$ C, 45 min）。
- GC-MS 分析に供する。

2.4 GC-MS 分析条件

ガスクロマトグラフィーカラムは SHIMADZU Hicap CBP-10-M25-025（20 m x 0.2 mm）を用い、インジェクションポートの温度は 240 $^{\circ}$ C、インターフェースの温度は 250 $^{\circ}$ C に設定する。分析時のカラムの昇温条件は 0~2 min の間は 40 $^{\circ}$ C で、その後 230 $^{\circ}$ C まで 40 $^{\circ}$ C/min で昇温する。キャリアーガスとして He を用い、スプリットレスインジェクションで行う。キャリアーガスの全流量は 0.5 mL/min に設定している。

参考文献

- Dence, C. W., The Determination of Lignins, in *Methods in Lignin Chemistry*, Lin, S. Y. and Dence, C. W., eds., Springer-Verlag, Berlin, pp. 33-61, 1992.
- Hatfield, R. D., Grabber, J., Ralph, J., Brei, K., *J. Agric. Chem.*, 47, 628-632, 1999.
- Saito, K., Fukusima, K., *J. Wood. Sci.*, 51, 246-251, 2005.
- Katahira, R., Nakatsubo, F., *J. Wood. Sci.*, 47, 378-382, 2001.