

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310061

研究課題名(和文) バイオリファイナリーのための植物細胞壁全可溶化・バイオミメティック分解系の構築

研究課題名(英文) Development of dissolution and biomimetic degradation systems of whole plant cell walls for biorefinerywalls

研究代表者

渡邊 隆司 (Watanabe, Takashi)

京都大学・生存圏研究所・教授

研究者番号：80201200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、木材を安価な電解質溶媒に可溶化して利用する方法を開発した。研究の結果、室温で微粉碎木粉が全可溶化する有機酸による溶解法を見出した。調製した木材溶液は、可溶化直後に高分子溶液としての性質を示した。可溶化液の異種溶媒混合により、セルロース性の多孔体が分離し、溶液画分からは溶媒留去により透明なフィルムが生成することを見出した。この可溶化機構をモデル化合物を用いた反応で提案した。溶解温度を110にすると、おが屑がセルロースの加水分解を伴い全可溶化することも見出した。さらに、ヘテロポリ酸による微粉碎木粉の可溶化条件や酵素糖化性も明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We developed a method to utilize whole wood components by dissolution of wood in simple organic acids at room temperature. We analyzed changes in physical properties of the wood solution. After dissolution, all solutions demonstrated non-Newtonian fluid behavior, demonstrating that wood was dissolved as polymeric substances. Porous cellulosic solid was separated from the solution by addition of the other solvents. Evaporation of the separated soluble fraction gave a smooth transparent film. We proposed a mechanism for the dissolution by using model compounds. We also found that heating at 110 deg. in one of the solvent solubilized Wiley-milled wood. We elucidated the conditions for dissolution of wood with heteropoly acids. The wood processed with heteropoly acids was suitable for enzymatic saccharification.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：バイオマス バイオリファイナリー リグニン

### 1. 研究開始当初の背景

化石原料の枯渇や大気中の CO<sub>2</sub> 濃度の急激な上昇を背景として、石油リファイナリーから、セルロース系バイオリファイナリーへの変革が世界的に希求されている。ポスト石油リファイナリーでは、糖の変換と同時に、化学産業にとって重要な芳香族基幹物質をつくる技術開発が必須である。不溶性の木材を温和な条件で溶液に溶かすことができれば、均一反応により木材の変換が可能となる。また、木材の構成成分を溶液から分離することが可能となり、低いエネルギーで成分分離が可能となる。これまで、木材をイオン液体や DMSO で可溶化する方法は研究されているが、これらの溶媒の高いコストは、産業化には不利である。このため、安価な溶媒に木材を全可溶化して成分分離や変換を行う方法の開発が待たれていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、木材をまるごと安価な電解質溶媒に可溶化する技術を開発し、木質バイオマスの全成分を有効利用する成分分離・変換法を開発し、多糖と芳香族資源であるリグニンの有用化学品への変換を同時に達成することを目的とした。強固な構造をもつ木材の固液反応には限界があるため、木材そのものを常温で安価な溶媒への溶解させる技術が開発されると、木材からの芳香族や脂肪族化学品、バイオエタノール生産を含む高効率バイオマス成分分離・変換系の構築が大きく進展する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 有機酸による木材可溶化・成分分離法の開発

ユーカリおよびスギ木粉をボールミルで窒素雰囲気下で微粉碎し、粉碎木粉の溶媒への可溶化実験を行った。

ボールミル木粉を各種溶媒に添加し、一定時間攪拌後、あらかじめ乾燥した(105 1時間) ADVANTEC グラスフィルター GA-100 (5.5cm) を用いて吸引濾過した。濾紙を真空凍結乾燥機にて1晩乾燥し、重量を測定し不溶分とした。また濾液からロータリーエバポレーターによって溶媒を留去し、同様に凍結乾燥機にて乾燥し、重量測定して可溶分とした。

溶解した溶媒系に関しては、吸光度測定、SEC による分子量測定、粘度計を用いた溶液物性の測定、可溶液の透過度や吸光度の測定、熱分解 GCMS による成分分析、分離した固形分の SEM による解析に供した。

溶液物性の測定は、東機産業製 Viscometer TVE-25H と標準ロータを用い、一定のロータ回転速度で、温度 30 で一分間測定した。温度は Micro Chiller MC-1 を用いて 30 にした水を循環させることで一定とした。3 サンプルの測定を行い、平均と標準偏差を示した。

透過度は、内径 16mm の試験管に約 4 g の液を入れ、OD モニター Miniphoto 518R (TAITEC)

を用いて 660nm の光の透過率を測定した。T(%) の値をよみとり、3 サンプルの平均をとった。

SEC は島津製作所の HPLC システム、プロミネンスで、ガードカラム付きの 2 本の Shodex KD-803 を用いて分析した。溶離液としては DMF を使用し、流速は 0.8mL/min とした。カラム温度は 40 とした。

溶液の吸光度は、分光光度計 HITACHI Spectrophotometer U-3310 を用い、波長スキャンモードで 190nm-800nm の光の吸収をスキャンスピード 300 nm/min で測定した。セルは光路長 10.0mm の石英セルを用いた。

ボールミル木粉溶解液に対し、水と 2-Me-THF を添加して成分分離を行った。分離して得た画分は Py-GC-MS で構成成分を解析した。パイロリシスは Pyrolyser PY-2020D (フロンティア・ラボ) を島津製作所の GCMS-QP5050A システムに繋ぎ、DB-5MS カラム (J&W) を用いて分析した。

走査型電子顕微鏡 (SEM) は 3D リアルサーフェスビュー顕微鏡 VE-9800 (キーエンス) を用いて行った。サンプルはサンプルタブに両面カーボンテープで取り付け、マグネトロンスパッタ装置 MSP-1S (真空デバイス、茨城) で金コーティングした。

微粉碎木粉の可溶化・成分分離実験の他、ウイレーミル木粉をボールミルで微粉碎することなく、直接マイクロ波で加熱することにより、全可溶化する実験を行った。加熱には、2.45GHz のマイクロ波合成装置 InitiatorEXP あるいは Initiator+60 システム (Biotage) を使用した。

### 4. 研究成果

化石原料の枯渇や大気中の二酸化炭素濃度の急激な上昇を背景として、石油リファイナリーから、セルロース系バイオリファイナリーへの変革が世界的に希求されている。本研究では、木材をまるごと安価な電解質溶媒に可溶化し、木質バイオマスの全成分を有効利用する成分分離・変換法を開発した (論文審査中)。本研究の結果、これまで報告されてきた高価なイオン液体や DMSO などの溶媒に代わり、構造がシンプルな 3 種の有機酸により室温で木粉が全可溶化することを見出した。3 種の有機酸のうち、一種は木材の溶解には全く報告例がない生物の代謝系においても重要な鍵物質である。他の 2 種についても、添加剤を加えず可溶化した例は報告されておらず、新規な可溶化法を見出した。可溶化にともなう分子量や溶液物性を詳細に検討し、全ての木材溶液は、溶解後には非ニュートン性流動を示すことを明らかにし、高分子体として木材を可溶化することを示した。3 種のうちの 1 種の有機酸については、長期間インキュベートすることにより分子量が低下し、非ニュートン性流動からニュートン性流動に変化することを明らかにした。また、調製した可溶化液に、バイオマスから製造可能な 2-メチル-THF を加えることにより、セ

ルロースを主成分とする多孔体をリグニンやヘミセルロースを主成分とする可溶画分と分離できることを見出した。この可溶液を減圧留去することにより、透明なフィルムが生成した(図2)。また、可溶化には、アセタール化やエステル化が関与することをメタノールを用いたモデル実験により示した(論文投稿中)。

また、ウイレーミル木粉をボールミルで微粉碎することなく、直接マイクロ波で加熱することにより、全可溶化する溶媒系を見出した。この溶液の物性を粘度計で分析したところ、ニュートン流動を示し、可溶化に伴いバイオマス成分の加水分解が進んだことが明らかとなった。この溶液も 2-MeTHF と水を用いて成分分離したが、セルロースは加水分解が進んでいたため沈殿は生成しなかった。全可溶化と同時にセルロースの糖化が達成されたことを示し、リグニンと糖の利用法として期待される。



図1 3種の溶媒による木材の可溶化

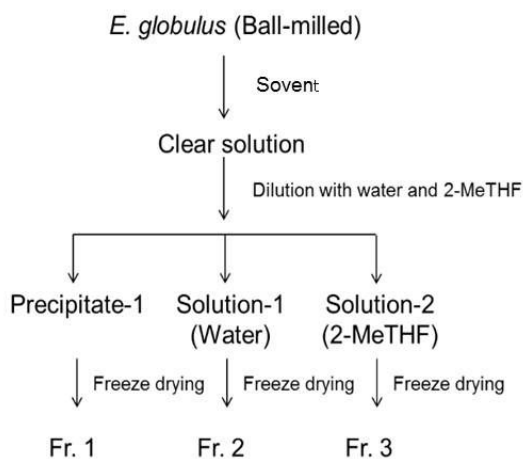


図2 全可溶化木粉溶液の 2-Me-THF と水による成分分離。

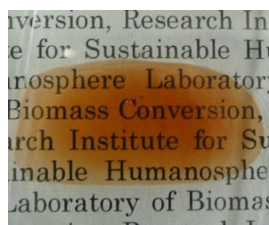


図3 2-Me-THF と水添加により分離した可溶液の溶媒留去により作成したフィルム

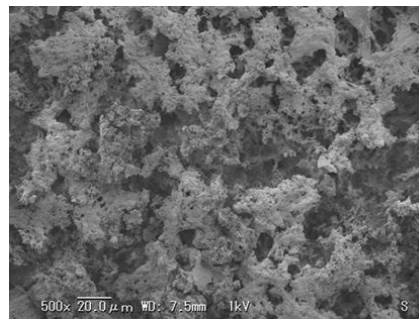


図4 2-Me-THF と水により分離したセルロースを主成分とする多孔体

## (2) ヘテロポリ酸による木材可溶化・成分分離法の開発

これまでに、ヘテロポリ酸が微粉碎木粉の可溶化能をもつことを見出しているが、本研究において、タングステン酸系触媒による木材の可溶化条件を詳細に検討し、ユーカリボールミル木粉を室温で可溶化する触媒や溶媒の濃度条件を明らかにした。ヘテロポリ酸処理をした木材は、セルロースやヘミセルロースが糖化発酵可能な状態変換されており、リグニンと糖鎖の総合利用法として期待される。タングステン酸やモリブデン酸系触媒をマイクロ波加熱することにより、木材重量当たり 50%以上の収率で多糖が加水分解されて還元糖が生成することを見出した。

以上のように、酵素反応や過酸化物の生成反応を用いることなく、木材の全可溶化が達成された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計5件)

Yuri Nishiwaki-Akine and Takashi Watanabe: Dissolution of wood in  $\alpha$ -keto acid and aldehydic carboxylic acids and fractionation at room temperature, *Green Chem.*, in press (2014), DOI: 10.1039/C4GC00504J. (査読有り)

渡辺隆司: 化学資源としてのバイオマス, *化学工学*, 76, 444-448 (2012). (査読有り)  
[http://www.scej.org/kagakukogaku\\_shi/mokujiji/76/7608.pdf](http://www.scej.org/kagakukogaku_shi/mokujiji/76/7608.pdf)

渡辺隆司: バイオマスが拓く持続的社會、*生存圏研究*, 7, 23-28 (2012). (査読有り)  
[http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/bitstream/2433/184841/1/rish%2000700\\_023.pdf](http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/bitstream/2433/184841/1/rish%2000700_023.pdf)

渡辺隆司: 熱帯早生樹のバイオリファイナ

リー、生存圏研究、7、73-77 (2012). (査読有り)  
[http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/bitstream/2433/184833/1/rish%2000700\\_073.pdf](http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/bitstream/2433/184833/1/rish%2000700_073.pdf)

渡辺隆司：ウッドバイオリファイナリー、材料、61、668-674 (2012). (査読有り)  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jams/61/7/61\\_668/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jams/61/7/61_668/_pdf)

〔学会発表〕(計11件)

渡辺隆司、リグノセルロース系バイオマスからのバイオ燃料・機能化学品生産のための成分分離のデザイン、第65回日本生物工学会大会、生物工学シンポジウム、デザインバイオマス学とスマート発酵工学：植物育種研究と発酵工学研究のコラボレーション、広島市、広島国際会議場、平成25年9月19日

渡辺隆司、持続的社会的構築を目指したバイオマスのバイオ燃料・機能性物質への変換、東京電機大学総合研究所—新分野開拓研究—第1回シンポジウム「地域に密着したスマートエネルギーへの取組」、東京、東京電機大学、平成25年6月29日

T. Watanabe, Biorefinery study to utilize whole cell wall components for 2nd generation biofuels, chemicals and functional materials, SABH2012, “International symposium on sustainable development and human security in Southeast Asia through biorefinery and low cost house”, 宇治、平成24年12月11-12日

渡辺隆司、リグノセルロース包括利用を目指した植物細胞壁の精密構造解析とバイオ燃料・機能性物質への変換、日本バイオプラスチック協会講演会、宇治、平成24年11月16日

渡辺隆司、リグノバイオリファイナリーに向けたバイオマスの包括構造解析と変換戦略、エコマテリアル研究会 バイオマス資源からの高度物質生産技術の開発動向、東京、平成24年10月19日

T. Watanabe, Disintegration of lignocellulosic biomass for 2nd generation, biofuels & biorefineries. The International Symposium on Human Development and Sustainable Utilization of Natural Resources in Asia Countries/ The 6th Thailand-Korea-Indonesia Joint Symposium on Biomass Utilization and Renewable energy, バリクパパン、平成24年7月9日

渡辺隆司、リグノセルロース包括利用を目指した植物細胞壁の精密構造解析と担子菌、電磁波反応による変換、環境バイオテクノロジー

—学会シンポジウム、宇治、平成24年6月26日

T. Watanabe, Analysis and conversion of woody biomass for lignocellulosic biorefinery, WWSC 国際会議、ストックホルム、平成24年6月18-19日

渡辺隆司、リグノバイオリファイナリー構築に向けての取り組み、第62回日本木材学会、北海道大学、平成24年3月16日

渡辺隆司、リグノセルロース包括構造解析とマイクロ波を利用したバイオ燃料・機能性物質への変換、分析化学会近畿支部セミナー：分析化学とマイクロ波化学 No.9、京都府相楽郡精華町、平成24年2月14日

渡辺隆司、マイクロ波を利用した木質バイオマスの燃料・機能性物質への変換、京都産学公連携機構 バイオリソースを活用した京都発リファイナリー構築 フォーラム、京都、平成24年1月24日

〔図書〕(計4件)

Takashi Watanabe, “Introduction: Potential of Cellulosic Ethanol”, In Lignocellulose Conversion, Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production, Chapter 1; Vincenza Faraco Ed.; Springer: New York, 2013, pp.1-20 (DOI: 10.1007/978-3-642-37861-4\_1)

三谷友彦、渡辺隆司：バイオマス分解・燃料化、マイクロ波プロセス技術、シーエムシー出版、262-272 (2013).

吉岡康一、渡辺隆司：超高分解能質量分析法 FT-ICR MS によるリグニンの構造解析、リグニン利用の最新動向、シーエムシー出版、84-93 (2013).

Watanabe, T. and T. Mitani, Microwave technology for lignocellulosic biorefinery, The Role of Green Chemistry in Biomass Processing and Conversion, eds. by H. Xie, N. Gathergood, John Wiley & Sons, 281-291 (2012).

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

セルロース系バイオマスからバイオエタノール・化学品を生産する基礎および応用研究  
<http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/W/LBC/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 隆司 (WATANABE Takashi)  
京都大学生存圏研究所・教授  
研究者番号：80201200

### (2) 研究分担者

片平 正人 (KATAHIRA Masato)  
京都大学エネルギー理工学研究所・教授  
研究者番号：70211844  
(平成24年度より連携研究者)

### (3) 連携研究者

渡邊 崇人 (WATANABE Takahito)  
京都大学生存圏研究所・助教  
研究者番号：30362403