

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292106

研究課題名(和文) イオン液体混合溶媒系を用いた木質バイオマスの有用物質への変換と細胞壁成分の解析

研究課題名(英文) Conversion of woody biomass into useful materials and analysis of cell wall components by using ionic liquid/cosolvent

研究代表者

岸本 崇生 (Kishimoto, Takao)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号：60312394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：イオン液体混合溶媒系は、微粉碎化した木質バイオマスを温和な条件で完全に溶解できる。本研究では、最適なイオン液体と共溶媒の組み合わせを探索するとともに、DMSOなどの共溶媒はセルロースの溶解性を高めるだけでなく、セルロースの保護効果があることを明らかにした。さらに、新しいセルロース前処理溶媒として、セルラーゼとの親和性の高いアミノ酸イオン液体共溶媒系を提案し、効率的なセルロースの酵素加水分解ができることを示した。またメタノールの存在下、セルラーゼの活性を損なわずに、セルロースをメチル  $\beta$ -D-グルコシドに約40%の収率で変換できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Ionic liquid (IL) cosolvent systems can dissolve woody biomass under the mild conditions. Cosolvents increase solubilization efficiency and have superior cellulose-protective effects during enhanced dissolution of cellulose in IL. Novel cellulose pretreatment solvent: phosphonium-based amino acid ionic liquid/cosolvent enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. Methyl  $\beta$ -D-glucoside was successfully synthesized at 40% yield from cellulose pretreated with tetrabutylphosphonium glycine/dimethyl sulfoxide, whereas the yield was only 1.4% from untreated cellulose.

研究分野：木質バイオマス

キーワード：木質バイオマス イオン液体 セルロース セルラーゼ NMR

## 1. 研究開始当初の背景

イオン液体は、室温で液体状の塩であり、繰り返し利用が出来るグリーンな溶媒として知られており、陽イオンと陰イオンの組み合わせにより様々な分子設計ができる。木材チップをイオン液体に溶解可能という Rogers らの報告(2007)以来、国内外の研究グループが関連した研究に取り組んでいる。そこでは、比較的高温(80~130℃)での長時間処理が行われており、木材成分の液化・分解が進むことが報告されている。

一方、申請者らは、ピリジン、ジメチルアセトアミド(DMAc)等の共溶媒とイオン液体との混合溶媒系を用いると、ボールミル処理により微粉碎化した木粉を、木材成分の顕著な分解を伴わずに温和な条件(30℃)で完全に溶解できることを見出した。その溶液中に誘導体化試薬を加えるだけで、エステル化やエーテル化等の均一な誘導体化が可能である。

この混合溶媒系は、HSQC 法などの 2 次元核磁気共鳴(NMR)スペクトルによる木質バイオマス(トドマツ、シラカンバ、タケ)の細胞壁成分の解析に応用できること、また、共溶媒を用いることにより溶解した木質バイオマスの分子量の制御ができることも見出している。

## 2. 研究の目的

イオン液体にある種の有機溶媒(共溶媒)を混ぜることにより、微粉碎化した木質バイオマスを室温という温和な条件で完全に溶解できること、さらにエステル化等の均一誘導体化ができることを報告した。この混合溶媒系は NMR(核磁気共鳴)法を用いた細胞壁全成分(リグニン、セルロース、ヘミセルロース)の解析に利用できる。

本研究では、この混合溶媒系をさらに発展させ、細胞壁成分の網羅的解析および未利用バイオマスの有用物質への変換のためのプラットフォームとするため、以下のことを計画した。

### 2.1. セルロースを溶解する温和な混合溶媒(イオン液体/有機溶媒)系の探索

イオン液体として 1-allyl-3-methylimidazolium chloride ([Amim]Cl)を用い、有機溶媒として DMSO, DMAc, ピリジン等と組み合わせることにより、30℃という温和な条件で木質バイオマスを溶解できることを見出している。フィルム化やプラスチック化等の高分子的な利用では、分子量の低下による強度の低下を抑制するため、一層温和な条件での溶解条件が求められる。イオン液体と有機溶媒の種類や組み合わせを再検討し、より温和な溶解条件を検討する。

### 2.2. 混合溶媒(イオン液体/有機溶媒)系を用いた NMR による細胞壁全成分の網羅的解析法の未成熟細胞系への応用

混合溶媒系に溶けた木質バイオマスは、無水酢酸/ピリジンを加えることにより容易にアセチル化できる。アセチル化木質バイオマス(針葉樹、広葉樹、タケ)を NMR 溶媒である DMSO- $d_6$ に溶かし、2次元 NMR 測定することにより、細胞壁(二次壁)の全成分(リグニン、セルロース、ヘミセルロース)を、成分分離することなく一度に解析することができることをすでに報告している。

これらの研究をさらに発展させ、NMR による細胞壁成分分析法を未成熟タケなどの未成熟細胞系に応用し、木化の進行などに伴う細胞壁成分の違いや構造変化を解明する。以上のことを通して、混合溶媒系を用いた NMR による本分析法の有効性を明らかにする。

### 2.3. 木質バイオマスの低分子化による有用ケミカル(化学品)への変換

分解などの副反応の伴わない温和な条件でセルロースを溶解できるイオン液体・混合溶媒系を用いて、セルロース(Avicel)の酵素加水分解によるグルコースへの変換を行い、イオン液体前処理の効果を明らかにする。さらに、メタノールなどのアルコール存在下でのセルラーゼ処理によるアルキルグルコシドへの効率的変換について検討する。

## 3. 研究の方法

### 3.1. セルロースを溶解する温和な混合溶媒(イオン液体/有機溶媒)系の探索

これまでの条件よりもさらに温和な条件でセルロースを溶かすことができるイオン液体混合溶媒系を探索した。用いたイオン液体と共溶媒を図 1 に示す。

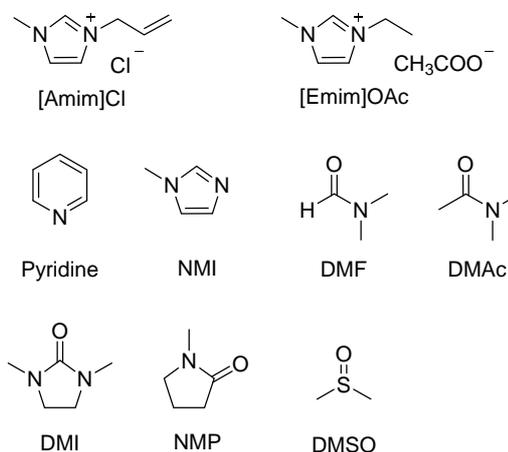


図 1. 用いたイオン液体と共溶媒

### 3.2. 混合溶媒（イオン液体/有機溶媒）系を用いた NMR による細胞壁全成分の網羅的解析法の未成熟細胞系への応用

約 6 m の高さの当年生タケ（ハチク、*Phyllostachys nigra* Munro var. *Henonis*）を未成熟な先端部から、比較的成熟している根本部まで 7 等分し、それぞれ微粉碎してタケ粉を作成し、そこからリグニンを抽出した。さらにタケ粉をイオン液体に溶解後、アセチル化し、アセチル化タケ粉の HSQC NMR スペクトル解析し、抽出したリグニンと比較した。

Frac. No.	1	2	3	4	5	6	7
長さ (cm)	88.5	88.1	85.9	84.2	87.3	84.8	104
質量 (g)	80.5	62.3	49.6	36.1	21.3	9.5	2.7

表1 未成熟ハチクの長さど質量

### 3.3. 木質バイオマスの低分子化による有用ケミカルへの変換

[Amim]Cl などのイミダゾリウム型のイオン液体は、環境への影響が少ないことが報告されている。本研究では、まず、より環境への負荷の少ないアミノ酸イオン液体 (AAIL) (図 2) のセルロース溶媒としての可能性を検討した。

次に、アミノ酸イオン液体を用いてセルロースの酵素糖化を行い、緩衝溶液中での酵素糖化と比較した。用いる共溶媒の種類を変え、より高い酵素活性が得られるイオン液体と有機溶媒の組み合わせを検討した。さらに、メタノールの存在下セルラーゼ処理を行い、生成する methyl  $\beta$ -D-glucoside を、HPLC を用いて定量した。

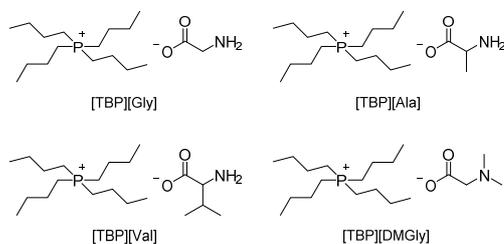


図 2. アミノ酸イオン液体

## 4. 研究成果

### 4.1. セルロースを溶解する温和な混合溶媒（イオン液体/有機溶媒）系の探索

セルロースのイオン液体への溶解性を上げるため、pyridine, N-methylimidazole (NMI),

DMF, DMAc, DMI, N-methyl-2-pyrrolidone (NMP), dimethyl sulfoxide (DMSO) など様々な非プロトン性極性溶媒の効果を検討した。その結果、検討した共溶媒はいずれも微結晶セルロース (Avicel) の溶解温度を効果的に低下させることができた。中でも、NMI, NMP, DMSO は極めて効果的であり、30°C で 12–15% のセルロースをイオン液体 1-allyl-3-methylimidazolium chloride [Amim]Cl に溶解することができた。

次に、セルロースの重合度の高い紙パルプを用いて検討した (図 3)。NMI, NMP, DMAc, DMSO を共溶媒として用いるとセルロースの溶解温度を効果的に下げることができた。1-ethyl-3-methylimidazolium acetate [Emim]OAc 単独では、30°C で 5–8% 程度の溶解性であったのに対し、DMAc を共溶媒として用いた場合は、12% の紙パルプを溶解することができた。また、NMI, NMP を用いた場合は、セルロースの重合度の顕著な低下が観測されたのに対し、DMSO では重合度の低下が見られなかった。

また、イオン液体混合溶媒系から再生させたセルロースの熱重量測定 (TGA) では、[Amim]Cl/DMSO から再生させたセルロースは DMSO の非存在下と比べて、熱安定性が高いことがわかった (図 4)。これらのことから、DMSO などの共溶媒はセルロースの溶解性を高めるだけでなく、セルロースの保護効果があることがわかった。



図 3. 紙パルプ (12%) を (EMIM)OA に溶解した様子

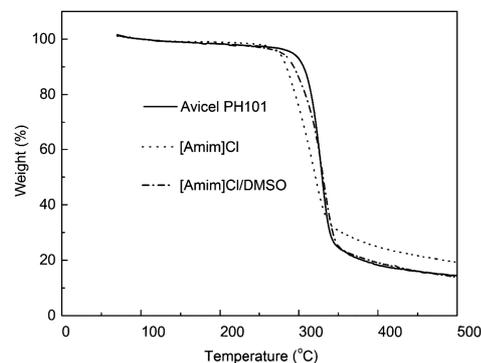


図 4. イオン液体から再生したセルロースの TGA 分析

### 4.2. 混合溶媒（イオン液体/有機溶媒）系を用いた NMR による細胞壁全成分の網羅的解析法の未成熟細胞系への応用

HSQC NMR 解析の結果、グアイアシルリグニン、シリングリグニンに加え p-coumaric acid (pCA) や ferulic acid (FA) のシグナルが、成熟、未成熟リグニンのいずれからも観測された。さらに、未成熟タケリグニンでは、pCA と FA のシグナルが成熟タケリグニンより強いという結果が得られた。 $\beta$ -O-4 構造は、成熟、未成熟リグニンのいずれにも観測されたが、 $\beta$ -5 および  $\beta$ - $\beta$  構造のシグナルは、未成熟リグニンでは比較的弱かった (図 5)。成熟部と未成熟部におけるこれらのリグニンの化学構造の違いは、木化の進行と密接に関連していると考えられ、さらに検討を進めている。

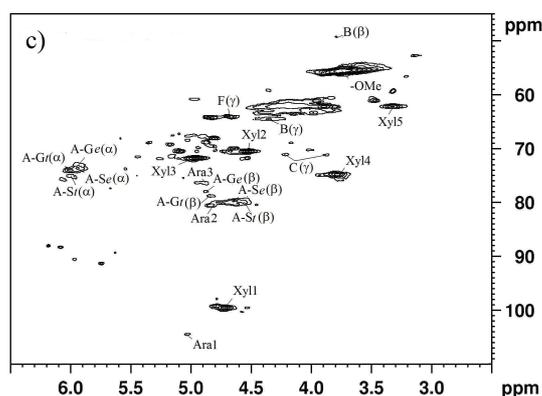


図 5. 未成熟タケリグニンの HSQC NMR スペクトル

#### 4.3 木質バイオマスの低分子化による有用ケミカルへの変換

##### 4.3.1 アミノ酸イオン液体へのセルロースの溶解と酵素加水分解

陽イオンとしてフォスフォニウムイオン tetrabutylphosphonium ion を、陰イオンとしてアミノ酸を有するイオン液体を用いた (図 2)。検討したイオン液体はすべて、120°C でも単独では全くセルロース (Avicel) を溶解できなかった。しかし、DMSO などの極性有機溶媒を共溶媒として用いた場合は、30°C において 5-15% のセルロースを溶解することができた。用いたアミノ酸の中では、最も単純な構造をもつ glycine (Gly) の場合、セルロースの溶解性が高く、15% のセルロース (Avicel) を溶解できたが、alanine (Ala) や valine (Val) はあまり効果的ではなかった。またより安定性が高いと考えられる *N,N*-dimethylglycine (DMGly) を陰イオンとしたイオン液体の場合も、10% のセルロースを溶解できた。

次に、イオン液体/DMSO 混合溶媒に溶解したセルロースを再生させ、水で洗浄後、セルラーゼ処理した。その結果、未処理のセルロースよりもイオン液体処理した方が、いずれの場合もグルコースへの変換効率が高かった。とくに [TBP][DMGly]/DMSO を用いた場合は、ほぼ

100% の変換効率を得られた (図 6 a)。また、イオン液体混合溶媒系 6% 存在下においても、特に [TBP][DMGly]/DMSO を用いた場合には反応速度がやや遅くなるものの約 100% の変換効率を得られた (図 6 b)。イオン液体混合溶媒系 13% 存在下においても変換効率は約 75% と高かった (図 6 c)。以上のことから、アミノ酸イオン液体はセルラーゼとの適合性が高く、アミノ酸イオン液体を用いた前処理は、セルロースのグルコースへの酵素変換に対して大きな効果があることがわかった。

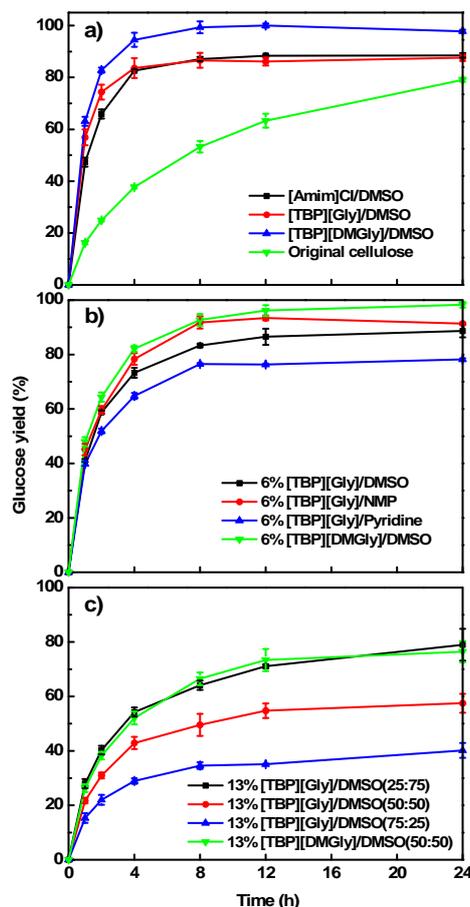


図 6. セルロースの酵素加水分解

- a) イオン液体/DMSOにより前処理した場合
- b) 6%イオン液体/共溶媒存在下
- c) 13%イオン液体/DMSO存在下

##### 4.3.2 アミノ酸イオン液体へのセルロースの溶解とアルキルグルコシドへの変換

フォスフォニウム型アミノ酸イオン液体を用いて、セルロースからのアルキルグルコシドの酵素による直接合成を試みた。メタノールの存在下、イオン液体・混合溶媒で前処理したセルロース (Avicel) をセルラーゼ処理した (図 7)。その結果、[TBP][Gly]/DMSO を用いた場合は、40% の収率で目的の methyl  $\beta$ -D-glucoside が得られたのに対し、未処理のセルロースを用いた場合には、収率はわずか

1.6%であった。以上のことから、セルロースの methyl  $\beta$ -D-glucoside への変換には、イオン液体処理が必須であるといえる。さらに、methyl  $\beta$ -D-glucoside の生成機構について考察した。セルロースは、セルラー処理によりまずセロビオースに加水分解され、生成したセロビオースがさらにメタノールと反応して methyl  $\beta$ -D-glucoside とグルコースに変換されると推定した。

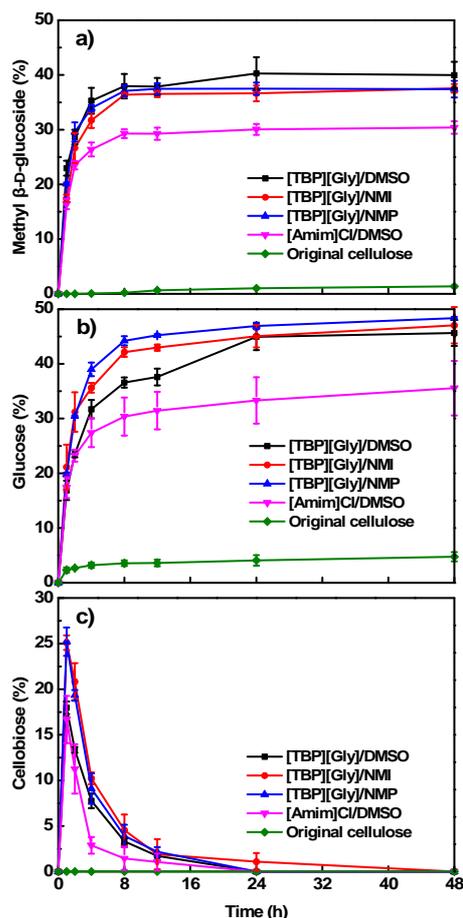


図7. セルロースからの methyl  $\beta$ -D-glucoside の酵素合成

- a) methyl  $\beta$ -D-glucoside
- b) glucose の収率
- c) cellobiose の収率

## 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 2 件)

Juan Tao, Takao Kishimoto, Satoshi Suzuki, Masahiro Hamada, Noriyuki Nakajima. Superior cellulose-protective effects of cosolvent during enhanced dissolution in imidazolium ionic liquid, *Holzforschung*, in press, DOI. 10.1515./hf-2015-0116

Juan Tao, Takao Kishimoto, Masahiro Hamada, Noriyuki Nakajima. Novel cellulose pretreatment solvent: phosphonium-based amino acid ionic liquid/cosolvent for enhanced enzymatic hydrolysis, *Holzforschung*, in press, DOI. 10.1515./hf-2016-0017

〔学会発表〕(計 8 件)

Juan Tao, Takao Kishimoto, Masahiro Hamada, Noriyuki Nakajima. Direct enzymatic synthesis of methyl  $\beta$ -D-glucoside from cellulose dissolved in amino acid ionic liquid with cosolvent, セルロース学会第 22 回年次大会, 2015.7 (札幌)

Juan Tao, Takao Kishimoto, Masahiro Hamada, Noriyuki Nakajima. Enhanced enzymatic synthesis of methyl  $\beta$ -D-glucoside and glucose from cellulose pretreated by amino acid ionic liquid/cosolvent, 平成 27 年度有機合成化学北陸セミナー, 2015.10 (富山)

Juan Tao, Takao Kishimoto, Masahiro Hamada, Noriyuki Nakajima. Novel cellulose pretreatment by amino acid ionic liquid/cosolvent for enhancing direct enzymatic synthesis of methyl  $\beta$ -D-glucoside, 第 66 回日本木材学会大会, 2016.3 (名古屋)

Noriyuki Nakajima, Juan Tao, Takao Kishimoto, Masahiro Hamada. Novel cellulose pretreatment solvent: amino acid ionic liquid/cosolvent for enhancing enzymatic synthesis of methyl  $\beta$ -D-glucoside from cellulose, 日本農芸化学会 2016 年度札幌大会, 2016.3 (札幌)

Juan Tao, Takao Kishimoto, Masahiro Hamada, Noriyuki Nakajima. Enzymatic hydrolysis of cellulose in amino acid ionic liquid with co-solvent, IAWPS International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS 2015), 2015.3.15-17 (Tokyo).

Juan Tao, Takao Kishimoto, Masahiro Hamada, Noriyuki Nakajima. Dissolution of cellulose in amino acid ionic liquid with co-solvent, セルロース学会第 21 回年次大会, 2014.7 (鹿児島)

Juan Tao, Takao Kishimoto, Masahiro Hamada, Noriyuki Nakajima. Enzymatic hydrolysis of cellulose in amino acid ionic liquid with co-solvent, 平成 26 年度有機合成化学北陸セミナー, 2014.10 (福井)

Juan Tao, 岸本崇生、濱田昌弘、中島範行: Dissolution of cellulose in ionic liquid with co solvents, 第 6 回北陸合同バイオシンポジウム,

2013.11 (石川)

〔図書〕(計 0 件)  
なし

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)  
なし

取得状況(計 0 件)  
なし

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

岸本 崇生 (KISHIMOTO, Takao)  
富山県立大学・工学部・准教授  
研究者番号：60312394

### (2)研究分担者

萩田 信二郎 (OGITA Shinjiro)  
県立広島大学・生命環境学部・教授  
研究者番号：50363875

鈴木 聡 (Suzuki Satoshi)  
富山県農林水産総合技術センター・木材研  
究所・副主幹研究員  
研究者番号：50446639

### (3)連携研究者

なし