

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月23日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656531

研究課題名（和文） 疎水性イオン液体を用いるセルロース糖化プロセスの革新

研究課題名（英文） Process innovation of enzymatic saccharification using hydrophobic ionic liquids

研究代表者

神谷 典穂 (KAMIYA NORIHO)

九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：50302766

研究成果の概要（和文）：

本研究では、セルロース系バイオマスから、簡便かつ効率よくグルコースを取り出すための革新的糖化プロセスの構築に向け、結晶性セルロースを非結晶化する新規溶剤の開発を通して、1つの反応器を使い、1ステップでセルロース系バイオマスからグルコースを生産するための水-疎水性イオン液体二相系プロセスの構築を目的とした研究を行った。その結果、セルロースとの親和性の高い官能基をイオン液体のカチオン部位に導入した新規疎水性イオン液体に塩化リチウムを添加した溶剤を用いることで、セルロースの再生と酵素糖化を二相系界面で促進可能な反応プロセスを実現した。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we explored a new potential strategy for converting cellulosic biomass to sugars by using hydrophobic ionic liquids (ILs). To realize an aqueous-hydrophobic IL two-phase system for enzymatic saccharification, we synthesized new ILs comprising functional groups that have ability to dissolve crystalline cellulose. Finally, we developed one potential two-phase system for a simultaneous pretreatment and enzymatic saccharification process of cellulosic biomass.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：セルロース、セルラーゼ、イオン液体、バイオマス、酵素糖化

1. 研究開始当初の背景

食糧と競合しない再生可能なセルロース系バイオマスからの物質・エネルギー生産は、近年、持続可能な社会を構築する上での選択肢の1つとして各国で精力的な研究開発が進んでいる。セルロース系バイオマス変換法として、生体触媒として酵素セルラーゼを利用する「酵素糖化（enzymatic saccharification）」は、常温・常圧で選択的にグルコースが得られることから期待が大きい。しかし、化学的に安定で不均一な高次化学構造

を有する植物系バイオマスをもそのままセルラーゼの基質とすることは極めて難しい。そのため、セルロース系バイオマスを酵素が作用しやすい基質へと変換する「前処理」と呼ばれるプロセスが必須であり、これにかかるエネルギーの低減、さらには酵素糖化の高効率化の難しさが、酵素糖化プロセスの実用化に向けたボトルネックとなっている。

研究代表者は、これまでイオン液体と呼ばれる新規な溶剤に着目し、これを活用するセルロースの酵素糖化について検討を進めて

きた。その結果、親水性イオン液体が体積分率で 30%程度共存する水—イオン液体混合溶媒系においてもセルラーゼが十分に機能することを見出した。しかし、セルロースの強固な水素結合を分断・溶解する親水性イオン液体中での酵素機能発現には至らなかった。そこで発想を転換し、セルロース溶解と酵素糖化の場を分離する二相系界面酵素糖化プロセス（水—疎水性イオン液体二相系）を着想した（図 1）。もし疎水性イオン液体相によりセルロースの結晶構造を緩和しつつ溶解することができれば、水との接触界面で結晶性の崩壊したセルロース（再生セルロース）が生じることが期待される。この水相にセルラーゼを添加しておけば、イオン液体相に溶解したセルロースをその界面において高効率に変換し、水相に分配した水溶性の単糖を容易に回収し、さらには疎水性イオン液体相のリサイクルが可能な新規プロセスが実現できるのではないかと発想した。

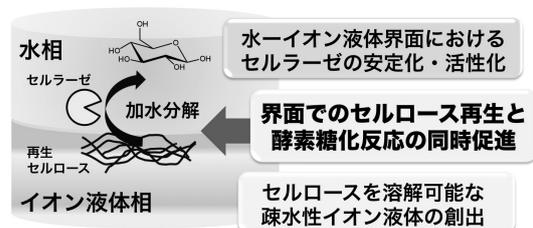


図 1 本研究で提案する水—疎水性イオン液体二相系界面酵素糖化反応の概念図

2. 研究の目的

上記の発想に基づき、本研究では、セルロース系バイオマスから、簡便かつ効率よく単糖類（グルコース等）を取り出すための革新的糖化プロセスの構築を目指した。即ち、結晶性セルロースを非結晶化する新規疎水性溶剤の開発を通して、1つの反応器（1バッチ）・1ステップでセルロース系バイオマスからグルコースを生産・回収するための新規水—疎水性イオン液体二相系プロセスの構築により、既往のセルロース系バイオマス変換バイオプロセスのボトルネックとなっている「前処理」と「酵素糖化」を統合したバイオマス変換プロセスの構築を目的として検討を行った。

具体的には、(1) 疎水性イオン液体の分子設計に基づく溶媒工学的アプローチによる界面酵素糖化反応場の構築と、(2) 界面配向型セルラーゼの分子設計に基づく酵素工学的アプローチの2つの方向から、シンプル且つ効果的なセルロース系バイオマス変換プロセスの実現を目指した。研究の前半は結晶性セルロースを基質とした検討を中心に、後半は実バイオマスへの適用を視野

に入れた基礎検討を実施した。

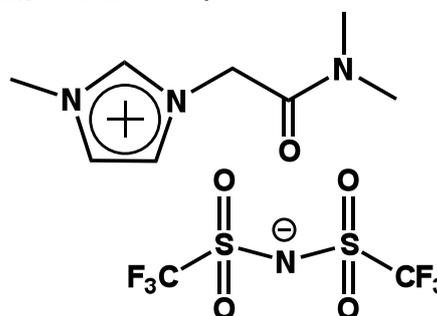
3. 研究の方法

(1) セルロース結晶構造緩和と酵素糖化に適した疎水性イオン液体の探索

カチオン/アニオン部位の官能基を変えた市販および新規合成疎水性イオン液体を2種類選抜し、これらに結晶性セルロースを添加し、80℃～150℃で適当な時間加熱前処理した後、室温まで冷却した。その後、前処理セルロースを含む疎水性イオン液体溶液の上からセルラーゼ水溶液を添加することで水—疎水性イオン液体二相系を形成させ、イオン液体相（下層）をマグネティックスターラーで攪拌しながら、酵素糖化反応を試みた。

新規疎水性イオン液体としては、カチオン部位に従来のセルロース溶剤の1つであるジメチルアセトアミド (DMAc) 基を導入した疎水性イオン液体 [DMAcC₁mim][Tf₂N] を合成した（図 2）。このイオン液体と LiCl の混合溶媒を用い、セルロースの前処理条件の最適化を試みた。対照サンプルとして、1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([Emim][Tf₂N]) を用いた。また、それぞれの IL に LiCl を適当量添加して 80℃、3時間加熱攪拌した後、結晶性セルロースを 1 wt% となるように添加し、加熱攪拌することで前処理を施した。

酵素水溶液としては、100 mM クエン酸緩衝溶液 (pH 5.0) と Novo Celluclast (Sigma)、Novo188 (Sigma) を混合して調製したセルラーゼ水溶液を用いた。これらを用いて水—疎水性イオン液体二相系を構築し、40℃で酵素糖化反応を行った。反応後、水相を適宜サンプリングし、4-Aminobenzoic acid ethyl ester (Sigma) を用いて生じた還元糖を誘導体化し、高速液体クロマトグラフィーにより還元糖量を定量した。



[DMAcC₁mim][Tf₂N]

図 2 新規疎水性イオン液体の分子構造例

(2) 水—疎水性イオン液体二相系におけるセルラーゼの安定性評価

水—疎水性イオン液体二相系の界面形成がセルラーゼに与える影響を調べるため、各

疎水性イオン液体を用いて調製した二相系の水相にセルラーゼを添加し、経時的に水相を微量サンプリングし、endoglucanase および cellobiohydrolase それぞれに特異的な基質を用いて酵素活性の経時変化を追跡した。

(3) 実バイオマスを対象とするための基礎検討

将来的な実バイオマスを用いた系の構築を目指すための予備検討として、種々のイオン液体による実バイオマス（バガス、松）の前処理が、後段の酵素糖化効率に与える影響についての基礎データを収集した。

4. 研究成果

(1) 疎水性イオン液体の分子設計による溶媒工学的アプローチに基づく界面酵素糖化反応場の構築

本研究では、疎水性をアニオン部位で担保していることから、イオン液体のカチオン部位の分子構造を様々に変えて検討を行った。市販の疎水性イオン液体の中から、カチオン部位に種々の官能基を有するイオン液体を選択した。また、既往のセルロース溶剤の溶解機構を参照し、セルロースに高い親和性を有する官能基（エーテル基、水酸基等）が導入された疎水性のイオン液体を分子設計した。その結果、用いる疎水性イオン液体の種類により、前処理結晶性セルラーゼの酵素糖化効率において数%~70%程度の開きが観察され、カチオン部位への官能基導入が結晶性セルロースの界面酵素糖化反応効率に影響を与えることが明らかとなった。また、疎水性イオン液体の種類を変えても、二相系を構築した際のセルラーゼ活性にはさほど大きな影響を与えなかったことから、糖化効率への効果はイオン液体種に依存したものであることが示唆された。結果として、カチオン部位はイミダゾール系が好ましく、カチオン部位側鎖への水素結合受容性の官能基の付与が糖化効率を向上する因子となり得ることが明らかとなった。

次に、さらなる糖化効率の向上を目指し、既往のセルロース溶剤であるジメチルアセトアミド (DMAc) 部位をイオン液体のカチオン部位に導入した Task-specific 型の疎水性イオン液体 [DMAcC1mim][Tf2N] を合成した。これに塩化リチウムを添加した疎水性イオン液体溶剤を調製し、ここに結晶性セルロースを添加した後、適当な時間加熱し、常温まで冷却した後、セルラーゼ水溶液を添加することで、セルロースの再生と酵素糖化を同一反応場で実現することを試みた。

①LiCl の添加量の最適化

まず、DMAc を分子構造に含有する [DMAcC1mim][Tf2N] においてのみ、LiCl の添加による糖化率の上昇が確認された。LiCl を 1 wt% 添加したサンプルにおいては、24

時間後、二相系に添加した 1 wt%セルロースから 80 %を上回るグルコースを水相側に回収できた。一方、LiCl 添加量が 1 wt%の前後で糖化効率は低下した。LiCl の添加量がより少ない場合、セルロースを構造緩和するのに十分な塩化物イオンが得られず、添加量がより多い場合には、二相系の構築の際、水相に分配する LiCl によってセルラーゼ活性が低下することが示唆された。以降は、LiCl の添加量を 1 wt%に固定して検討を行った。

②前処理温度の最適化

前処理温度 80°C以上では、前処理温度によらず、[DMAcC1mim][Tf2N]が対照イオン液体よりも高い糖化率を与えた。

③前処理時間の最適化

前処理時間の延長とともに糖化率が増加した。また、カチオン側鎖に DMAc を有していない [Emim][Tf2N] においては、前処理時間の延長が糖化率の向上には寄与しないことが明らかとなった (図3)。このことから、DMAc 基をイオン液体分子構造に組み込み、LiCl 添加と組み合わせることで、セルロース結晶構造緩和と酵素糖化の促進が可能なが示唆された。

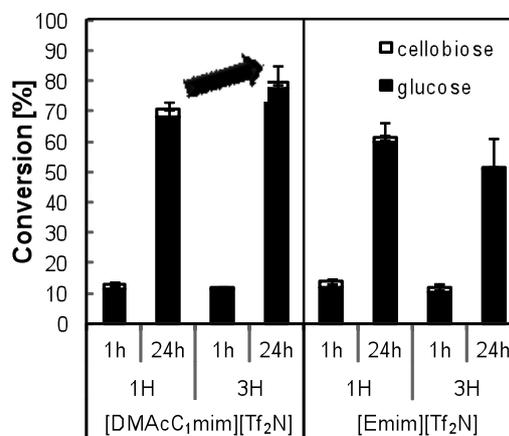


図3 二相系酵素糖化反応の結果

(H: 前処理時間; h: 糖化反応時間)

最後に、疎水性イオン液体の再利用性について検討した。[DMAcC1mim][Tf2N]と LiCl の混合溶媒を用いて、セルロース (1 wt%) を前処理した後、上記の実験と同様の手順で酵素糖化反応、還元糖量の定量を行った。疎水性イオン液体相を回収した後、Milli-Q 水による洗浄を3回行って LiCl を除去を試み、凍結乾燥を経て得られたイオン液体を再度前処理及び酵素糖化反応に用いた。

その結果、LiCl の添加の有無に関わらず IL の繰り返し使用に伴う糖化率の大幅な減少は確認されなかったことから、本系では疎水性イオン液体の繰り返し利用が不可能ではないことが裏付けられた。しかしながら、IL

の回収率は約 75 %であった。これは、再生処理の過程 (特に Milli-Q 水による洗浄過程) において、水相に若干分配するイオン液体成分が存在するためと推察した。

(2) 界面配向型セルラーゼの分子設計に基づく酵素工学的アプローチ

タンパク質工学と有機化学を組み合わせたアプローチにより、水—疎水性イオン液体の液液界面に対して親和性を示す組換えセルラーゼを得ることで、本研究で提案するセルロース変換プロセスの高効率化を目指した。セルラーゼを界面に能動的に濃縮するため、ペプチドと親和性を有する部位を導入した疎水性イオン液体を新たに合成した。これを二相系界面酵素糖化系に添加し、当該ペプチドを挿入した組換えセルラーゼを添加したところ、添加系において酵素糖化効率の向上が確認され、当初期待した効果の概念検証に成功した。

(3) 実バイオマス利用に向けた基礎検討

実バイオマスを利用するための予備検討として、種々のイオン液体による前処理が酵素糖化効率に与える影響について検討した。その結果、ピリジニウム系イオン液体の利用や、過酢酸前処理との併用により、実バイオマスの酵素糖化効率が向上することが明らかとなった。実バイオマスを用いた二相系酵素糖化の実施には至らなかったが、本検討で得られた基礎知見は、新たなセルロース系バイオマス分解プロセスの構築に資するものと期待している。

以上を纏めると、疎水性イオン液体は結晶性セルロースの構造緩和を大幅に促進することはできないながらも、セルロースとの親和性を高める官能基を導入することで、最終的な糖化効率を向上可能な疎水性イオン液体の合成が可能となった。また、得られた疎水性イオン液体を利用した二相系界面酵素糖化プロセスの実証に成功した。さらに、界面に酵素を積極的に濃縮することで、本システムの酵素糖化効率の向上が可能となったことが示唆された。疎水性イオン液体は、親水性イオン液体よりも容易に回収・再利用が可能ことから、さらなる機能化により、目的に合うイオン液体が得られる可能性が示唆された。

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 2 件)

(1) Uju, Nakamoto, A., Shoda, Y., Goto, M., Tokuhara, W., Noritake, Y., Katahira, S., Ishida, N., Ogino, C. and Kamiya, N.
'Low melting point pyridinium ionic liquid

pretreatment for enhancing enzymatic saccharification of cellulosic biomass.'
Bioresource Technology, Vol. 135, p 103-108 (2013)

(2) Uju, Abe, K., Uemura, N., Oshima, T., Goto, M. and Kamiya, N.

'Peracetic acid-ionic liquid pretreatment to enhance enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass'

Bioresource Technology, Vol. 138, p 87-94 (2013)

[学会発表] (計 5 件)

① Noriho Kamiya, Masahiro Goto, Kazunori Nakashima, Nobuhiro Ishida;

'Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass in Aqueous-Ionic Liquid Media'

第 6 回 日中化学工学シンポジウム, 2011 年 6 月 21 日、中国

② 庄田靖宏、後藤雅宏、石田亘広、神谷典穂
「新規疎水性イオン液体による酵素糖化促進効果の解析」

第 63 回 日本生物工学会大会, 2011 年 9 月 26 日、東京

③ Noriho Kamiya, Uju, Wataru Tokuhara, Yoshiyuki, Noritake, Nobuhiro Ishida, Masahiro Goto

'Potential of Ionic Liquids Pretreatment on Lignocellulosic Biomass for Efficient Enzymatic Saccharification'

The 17th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community, 2011 年 10 月 7 日、韓国

④ 神谷典穂
「セルロース系バイオマス高効率分解に向けた酵素工学的アプローチ」

トークショー・イン・九州 2012, 2012 年 9 月 6 日、福岡

⑤ Noriho Kamiya

'Enzyme engineering with the aid of ionic liquid'

The 90th Anniversary Annual Meeting of Society for Biotechnology, Japan, 2012 年 10 月 24 日、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 典穂 (Kamiya Noriho)

九州大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：50302766