

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560959

研究課題名(和文) イオン液体とラジカルを利用したリグノセルロースのトータルリファイナリー

研究課題名(英文) Lignocellulose refinery using ionic liquids

研究代表者

仁宮 一章 (Ninomiya, Kazuaki)

金沢大学・新学術創成研究機構・准教授

研究者番号：10379125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：カーボンニュートラルな資源であるバイオマスのうち、地球上で最も量の多く、食糧と競合しないリグノセルロース(籾殻、木屑など)を原料として、エタノール(輸送用燃料・エチレン系化合物の原料)や芳香属化合物等の混合物(フェノール系樹脂の原料・原油代替資源)を効率的に生産する技術を創出した。特に、イオン液体を用いたリグノセルロースの酵素糖化前処理技術、および本プロセスで生成してくるリグニンの有効利用技術の創出をおこなった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we had developed the ionic liquid-assisted bio-refinery process which converts lignocellulosic biomass to biofuel and bioplastics. Especially, the ionic liquid was utilized as a solvent for biomass pretreatment before the enzymatic hydrolysis of polysaccharides, and also utilized as solvent and catalyst for chemical reaction of lignin macromolecules.

研究分野：生物化学工学

キーワード：バイオマス リグノセルロース イオン液体 リファイナリー 超音波 ラジカル セルロール リグニン

1. 研究開始当初の背景

リグノセルロースを原料としてエタノールを製造する際に今後克服すべき課題として、その製造コストの低減があげられる。リグノセルロースからのエタノール製造は大きく分けて、①糖化前処理、②糖化、③発酵の3つの単位プロセスに分けられる。この一連のプロセスにおいて、製造コスト低減のために優先的に改善すべき工程は、②糖化、③発酵よりもむしろ、プロセスの最も上流に位置し、従来からエネルギー効率および環境負荷の観点で課題が多く、下流のプロセス設計を大きく左右するといわれる①の糖化前処理プロセスである。このリグノセルロースの糖化前処理を効率的に行うためには、a)セルロースの結晶構造や b)セルロースを取り囲むリグニン構造をいかに緩和するかが特に重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では、応募者の研究成果である「I イオン液体と超音波を用いた新規なリグノセルロース前処理法」と「II 安価・低細胞毒性の新規なコリン系イオン液体」を核としたリグノセルロースのトータルリファイナリープロセスの構築(図1)を行う。これにより、リグノセルロースの酵素糖化の障壁である a)セルロースの結晶構造や b)リグニン構造の効率的な緩和という課題を解決できる。そして、リグノセルロース中のホロセルロース(セルロース+ヘミセルロースの総称)の資源化だけでなく、リグニンも事前に分離し資源化を行う。図1のプロセスは、下記3つの単位プロセスから構成される。

(1)プロセス1: リグノセルロースの前処理・分画: リグノセルロースをイオン液体と超音波で前処理した後、前処理ホロセルロースと前処理リグニンに分画する。

(2)プロセス2: 前処理・分離されたホロセルロースの糖化・発酵: 前処理・分離されたホロセルロースを酵素と酵母を用いた同時糖化発酵によりエタノールへと高速・高収率で変換する。

(3)プロセス3: 前処理・分離されたリグニンの低分子化: 前処理・分離されたリグニンを光化学的 OH ラジカル反応により低分子化して再資源化する。

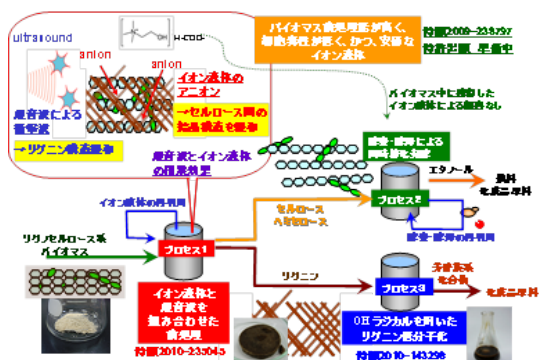


図1. 本申請で提案するリグノセルロース

のトータルリファイナリープロセス

3. 研究の方法

(1) プロセス 1: リグノセルロースの前処理・分画

リグノセルロースをイオン液体と超音波で前処理した後、前処理ホロセルロースと前処理リグニンに分画する。使用するコリン系イオン液体の種類、バイオマスに対するイオン液体の重量比、超音波照射強度・時間などがリグニン/ホロセルロース分離効率や前処理効率(酵素糖化率)に及ぼす影響を検討し、前処理条件を最適化する。ここで、低細胞毒性・高前処理能を持つコリン系イオン液体の探索には、既に合成したコリン系イオン液体のアニオンの種類を種々の飽和脂肪酸やリン酸系化合物へと変えた新規なイオン液体を合成し、その細胞毒性試験と前処理試験を行う。現状より優れたイオン液体が探索できない場合には、コリン酢酸(2頁の図3)を用いる。イオン液体前処理の効果を評価するため、分画したホロセルロースの酵素糖化反応を行なう。オリゴ糖、単糖、糖過分解物などを液体クロマトグラフィーおよびゲル浸透クロマトグラフィーで測定する。

(2) プロセス 2: 前処理・分離されたホロセルロースの糖化・発酵

(1)にて前処理・分離されたホロセルロースからエタノールへの同時糖化発酵条件を最適化する。(比較として、リン酸膨潤セルロース(モデルセルロース)も基質として用いる。)同時糖化発酵にはキシロース資化経路を導入した組み換え酵母を用いる。またホロセルロース糖化酵素にはメイセラゼ等のセルラーゼ酵素製剤を用いる。前処理・分画されたホロセルロースを逐次添加する間欠流加発酵を行う。仕込み菌体濃度、糖化酵素濃度、基質流加速度が生産エタノール濃度、残糖濃度に及ぼす影響を調べ、最適発酵条件(菌体・酵素の仕込み量の最小化等)を検討する。プロセス1での低毒性イオン液体探索とは別に、イオンビーム照射変異導入によるイオン液体耐性酵母の育種・そのDNAアレイ解析も行う。

(3) プロセス 3: 前処理・分離されたリグニンの低分子化

本項では、(1)にて前処理・分離されたリグニンを低分子化(オリゴマー化)して化学原料として有効利用できるか検討する。(比較として、アルカリ処理で得られるモデルリグニンも基質として用いる。)リグニンの低分子化の方法として、光触媒存在下において光照射で生じるOHラジカルを利用する方法、H2O2のフェントン反応で生じるOHラジカルを用いる方法を用いる。光触媒濃度、H2O2濃度、照射光の波長、強度がリグニン低分子化に及ぼす影響を調べる。低分子化したリグニンはエーテルで抽出し、残渣の乾燥重量から

低分子化量を評価する。生成した低分子化合物を特定するために、液体クロマトグラフィー質量計やガスクロマトグラフィー質量計を用いた測定を行なう。低分子化して得られたリグニンが、樹脂として利用可能であるかどうか判断するために、熱物性を測定して熱溶解性について測定を行なう。また、低分子化した

リグニンの分子量をゲル浸透クロマトグラフィーにより評価し、熱溶解するために必要な分子量などについて明らかにする。

4. 研究成果

(1) プロセス 1: リグノセルロースの前処理・分画

バイオマス（バガス：1 mm以下）に対して、0-20 倍重量のイオン液体(EmimOAc および ChOAc)を用いて 110°C 180 min 前処理を行った結果、1-3 倍量のイオン液体さえあれば、80-90%の糖化率を示すまで前処理できることを見出した。このとき、セルロースの結晶構造は緩和されているのが XRD 分析によっても確認できた。

バイオマス（バガス：1 mm以下）に対して、倍重量のイオン液体(EmimOAc および ChOAc)を用いて超音波照射による前処理（図 7）を室温にて行った結果、60 min の前処理時間で 90%の糖化率を示すまで前処理できることを見出した。

未処理およびイオン液体(ChOAc)による前処理を行ったリグノセルロース（バガス粉末；1 mm以下）について、SEM 観察、XRD 分析、FTIR 分析により結晶構造および化学結合の状態を分析した。その結果、イオン液体によるセルロースの結晶構造の緩和に加えて超音波照射により発生する衝撃波等によるリグニン構造の緩和が見られた。

イオン液体とバイオマスを混合し超音波を照射することで前処理し、そこへアセトン水溶液（セルロースに対する貧溶媒かつリグニンに対する溶媒）を加えることにより、ホロセルロースとリグニンを分画した（図 2）。FTIR スペクトルからも分画されていること、セルロースが非結晶化していることが確認できた。分画セルロースは、モデルセルロースと同様に、約 95%の糖化率を示した。（ただし、すべてのリグニンを分画することはできなかった。）

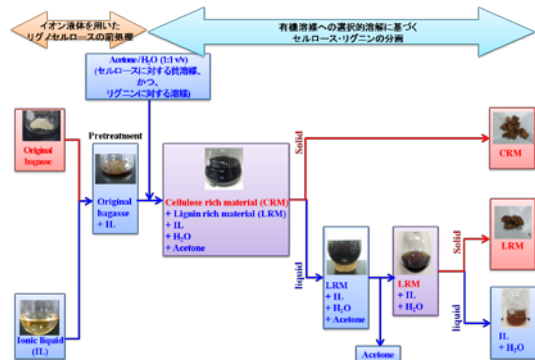


図 2 イオン液体前処理時のセルロースとリグニンとの分画作業

(2) プロセス 2: 前処理・分離されたホロセルロースの糖化・発酵

イオン液体・超音波を用いて前処理後、分画したセルロース rich 画分を半固体状で酵素糖化し、高濃度の糖液を調整した（図 3）。セルロース rich 画分中のセルロースおよびヘミセルロースの糖化率は、それぞれ 96%および 73%と高い値であり、膨潤処理モデルセルロースの酵素糖化の場合と比較しても同等の値と言える。また、その糖化速度も極めて早く、膨潤処理モデルセルロースと比較しても、遜色ないものであった。

イオン液体・超音波を用いて前処理後、分画したホロセルロースを酵素糖化することにより得られた糖液に、キシロース資化経路（キシロースリダクターゼならびにキシルトールデヒドロゲナーゼ）を付与した酵母株を添加し発酵を行った（図 3）。この発酵過程においては、キシロース資化経路を付与した酵母株を用いることにより、培養 48 時間目までに、6 単糖（グルコース）はすべて資化され、また 5 単糖（キシロース）も 83%が資化されていることが確認できた。また得られたグルコース・キシロース混合糖液から理論収率の約 90%でエタノールへの変換を達成した。

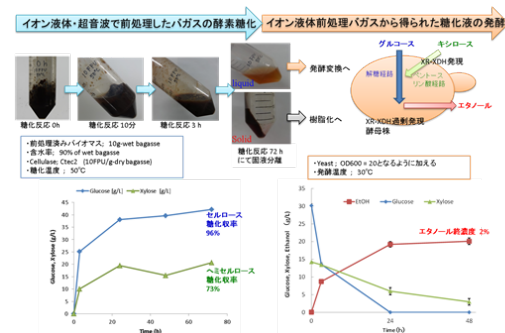


図 3 イオン液体により前処理されたバイオマスの糖化と発酵

(3) プロセス 3: 前処理・分離されたリグニンの低分子化

本研究で提案するプロセスでは、イオン液体・超音波を用いて前処理後、バイオマスをセルロース rich 画分とリグニン rich 画分とに分画した。このうち分画リグニンについては、一般的なクラフトリグニンは希硫酸リグニンと比べ分子量が一桁低く、分子量は約 10³ 弱であり、熱溶解性を示した。このことから、熱溶解・紡糸によりピッチ系炭素繊維へと変換可能である。

さらに非結晶化されたセルロース rich 画分からは糖化残渣リグニンが得られた。この糖化残渣リグニンについては、酸触媒機能をもつイオン液体中において、解重合すると同時にクレゾールと重合反応を起こすことにより、リグニン含有フェノール樹脂が合成され

ることを見出した (図 4)。

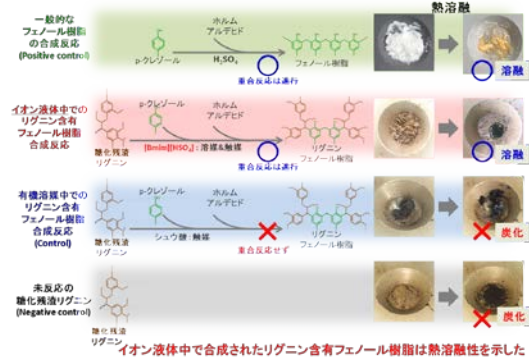


図 4 イオン液体前処理後の糖化残渣リグニンのイオン液体中での高分子反応

最後に、本研究で提案するイオン液体を用いたバイオマスリファイナリにおける物質収支を示す(図 5)。



図 5 イオン液体を用いたバイオマス前処理・糖化・発酵・リグニン利用での物質収支の結果

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 19 件)

- ① K. Ninomiya, A. Kohori, M. Tatsumi, K. Osawa, T. Endo, R. Kakuchi, C. Ogino, N. Shimizu, K. Takahashi, Ionic liquid/ultrasound pretreatment and in situ enzymatic saccharification of bagasse using biocompatible cholinium ionic liquid, *Bioresour. Technol.*, 176, 169-174 (2015) Jan. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.11.038 (査読有)
- ② K. Ninomiya, K. Inoue, Y. Aomori, A. Ohnishi, C. Ogino, N. Shimizu, K. Takahashi, Characterization of fractionated biomass component and recovered ionic liquid during cholinium ionic liquid-assisted pretreatment process with its recycle, *Chem Eng. J.*, 259(1) 323-329 (2015)

Jan. DOI: 10.1016/j.cej.2014.07.122 (査読有)

- ③ K. Ninomiya, T. Yamauchi, C. Ogino, N. Shimizu, K. Takahashi, Microwave pretreatment of lignocellulosic material in cholinium ionic liquid for efficient enzymatic saccharification, *Biochem Eng. J.*, 90(15) 90-95 (2014) Sep. DOI: 10.1016/j.bej.2014.05.013 (査読有)
- ④ K. Ninomiya, A. Fukuda, C. Ogino, and N. Shimizu, Targeted and sonocatalytic cancer cell injury using avidin-conjugated TiO₂ nanoparticles, *Ultrason. Sonochem.*, 21(5), 1624-1628 (2014) Sep. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2013.12.023 (査読有)
- ⑤ K. Ogura, K. Ninomiya, K. Takahashi, C. Ogino, A. Kondo. Pretreatment of Japanese cedar by ionic liquid solutions in combination with acid and metal ion, and its application to high solid loading. *Biotechnology for Biofuels*, 7, 120 (2014) Aug. DOI: 10.1186/s13068-014-0120-z (査読有)
- ⑥ K. Ninomiya, T. Yamashita, S. Kawabata, and N. Shimizu, Targeted and ultrasound-triggered drug delivery using liposomes co-modified with cancer cell-targeting aptamers and a thermosensitive polymer, *Ultrason. Sonochem.*, 21(4), 1482-1488 (2014) July. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2014.03.010 (査読有)
- ⑦ K. Ninomiya, R. Yamada, H. Meisaku, N. Shimizu, Effect of ultrasound irradiation on bacterial internalization and bacteria-mediated gene transfer to cancer cells, *Ultrason. Sonochem.*, 21(3), 1187-1193 (2014) May. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2013.12.005 (査読有)
- ⑧ K. Ninomiya, S. Kawabata, H. Tashita, and N. Shimizu Ultrasound-mediated drug delivery using liposomes modified with a thermosensitive polymer. *Ultrason. Sonochem.*, 21(1), 310-316 (2014) Jan. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2013.07.014 (査読有)
- ⑨ K. Ninomiya, K. Noda, C. Ogino, S. Kuroda, and N. Shimizu. Enhanced OH radical generation by dual-frequency

- ultrasound with TiO₂ nanoparticles: its application to targeted sonodynamic therapy. *Ultrason. Sonochem.*, 21(1), 289–294 (2014) Jan. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2013.05.005 (査読有)
- ⑩ K. Ninomiya, T. Ishijima, M. Imamura, T. Yamahara, H. Enomoto, K. Takahashi, Y. Tanaka, Y. Uesugi, N. Shimizu, Evaluation of extra- and intracellular OH radical generation, cancer cell injury, and apoptosis induced by a non-thermal atmospheric pressure plasma jet, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 46(42), 425401 (2013) Oct. DOI: 10.1088/0022-3727/46/42/425401 (査読有)
- ⑪ K. Ninomiya, C. Ogino, S. Kawabata, K. Kitamura, T. Maki, H. Hasegawa, N. Shimizu, Ultrasonic inactivation of *Microcystis aeruginosa* in the presence of TiO₂ particles, *J. Biosci. Bioeng.*, 116(2) 214–218 (2013) Aug. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.02.006 (査読有)
- ⑫ K. Ninomiya, H. Takamatsu, A. Ohnishi, K. Takahashi, N. Shimizu, Sonocatalytic-Fenton reaction for enhanced OH radical generation and its application to lignin degradation, *Ultrason. Sonochem.*, 20(4) 1092–1097 (2013). July. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2013.01.007 (査読有)
- ⑬ K. Ninomiya, K. Kaneda, S. Kawashima, Y. Miyachi, C. Ogino, N. Shimizu, Cell-SELEX based selection and characterization of DNA aptamer recognizing human hepatocarcinoma, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 23(6) 1797–1802 (2013). March. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.01.040 (査読有)
- ⑭ K. Ninomiya, M. Arakawa, C. Ogino, and N. Shimizu, Inactivation of *Escherichia coli* by sonoelectrocatalytic disinfection using TiO₂ as electrode. *Ultrason. Sonochem.* 20(2), 762–767 (2013). March. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2012.10.007 (査読有)
- ⑮ K. Ninomiya, T. Yamauchi, M. Kobayashi, C. Ogino, N. Shimizu, K. Takahashi, Cholinium carboxylate ionic liquids for pretreatment of lignocellulosic materials to enhance subsequent enzymatic saccharification, *Biochem Eng. J.*, 71, 25–29 (2013). Feb. DOI: 10.1016/j.bej.2012.11.012 (査読有)
- ⑯ K. Ninomiya, R. Yamada, M. Matsumoto, S. Fukiya, T. Katayama, C. Ogino, and N. Shimizu, Image analyzing method to evaluate in situ bioluminescence from an obligate anaerobe cultivated under various dissolved oxygen concentrations. *J. Biosci. Bioeng.*; 115(2), 196–199. (2013) Feb. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.09.006 (査読有)
- ⑰ K. Ninomiya, A. Ohta, S. Omote, C. Ogino, K. Takahashi, N. Shimizu, Combined use of completely bio-derived cholinium ionic liquids and ultrasound irradiation for the pretreatment of lignocellulosic material to enhance enzymatic saccharification, *Chem Eng. J.*, 215–216, 811–818 (2013). Jan. DOI: 10.1016/j.cej.2012.11.020 (査読有)
- ⑱ K. Ninomiya, H. Soda, C. Ogino, K. Takahashi, N. Shimizu, Effect of ionic liquid weight ratio on pretreatment of bamboo powder prior to enzymatic saccharification, *Bioresour. Technol.*, 128, 188–192 (2013). Jan. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.10.097 (査読有)
- ⑲ K. Ninomiya, C. Ogino, S. Oshima, S. Sonoke, S. Kuroda and N. Shimizu, Targeted sonodynamic therapy using protein-modified TiO₂ nanoparticles, *Ultrason. Sonochem.* 19(3) 607–614 (2012) May. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2011.09.009 (査読有)
- [学会発表] (計 7件)
- ① K. Takahashi, M. Tatsumi, K. Osawa, K. Ninomiya; Separation of ionic liquid from glucose solution, Gordon Research Conferences Ionic Liquids, Sunday River Resort Newry, ME, Boston (2014) Aug. 17–22 (Poster)
- ② K. Ninomiya, and K. Takahashi; Biomass refinery using ionic liquids, Proceedings of the 33th International Conference on Solution Chemistry, Post Symposium on Ionic Liquids from Science to Green Chemical Application, p. 10, Tokyo (2013) July 13 (Oral) (invited)
- ③ Y. Nishizawa, Y. Takamizawa, Y. Aomori, K. Inoue, K. Ninomiya, K. Takahashi:

Reaction of lignin dissolved in ionic liquid, Proceedings of the 33th International Conference on Solution Chemistry, Post Symposium on Ionic Liquids from Science to Green Chemical Application, p. 29, Tokyo (2013) July 13 (Poster)

- ④ Y. Aomori, Y. Ueda, K. Inoue, K. Ninomiya, K. Takahashi: Application of lignin fractionated by ionic liquid to resin, Proceedings of the 33th International Conference on Solution Chemistry, Post Symposium on Ionic Liquids from Science to Green Chemical Application, p. 30, Tokyo (2013) July 13 (Poster)
- ⑤ K. Ninomiya and K. Takahashi: Pretreatment of lignocellulosic biomass using ionic liquid, Proceedings of the 2013 Korean Society for Microbiology and Biotechnology KMB's 40th Anniversary International Symposium, IS4-2, Pyeongchang, Gangwondo (2013) July 4 (Oral) (invited Korean Society for Microbiology and Biotechnology)
- ⑥ K. Ninomiya, C. Ogino, K. Takahashi, and N. Shimizu: Bio-derived ionic liquids for pretreatment of lignocellulosic biomass, Proceedings of the 5th Congress on ionic liquids (COIL5), P108, Algarve (2013) April 22 (Poster)
- ⑦ K. Ninomiya, C. Ogino, K. Takahashi, and N. Shimizu: Bio-derived ionic liquids for pretreatment of lignocellulosic biomass, Proceedings of the 18th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC) 2012, p.132, Tokushima (2012) Oct 27 (Poster)

[図書] (計 2件)

- ① 仁宮一章, 滝口昇: “第4章培養状態の計測・制御”. 実践 有用微生物培養のイロハ, NTS, 東京, (2014), pp.111-129. July.
- ② 大政健史, 仁宮一章, 萩野千秋, 滝口昇, 中島田豊: “基礎から学ぶ生物化学工学演習” (日本生物工学会編) コロナ社, 東京 (2013) Sep.

[産業財産権]

○出願状況 (計 3件)

名称: 多糖類誘導体の製造方法
発明者: 覚知 亮平, 仁宮一章, 柴田 佳樹, 鶴澤 潔, 高橋 憲司
権利者: 金沢大学、金沢工業大学
種類: 特許

番号: 特願 2014-218237
出願年月日: 2014年10月27日
国内外の別: 国内

名称: イオン液体の分離方法
発明者: 高橋憲司, 仁宮一章
権利者: 金沢大学
種類: 特許
番号: 特願 2013-0023
出願年月日: 特願 2013/8/28
国内外の別: 国内

名称: 微細藻類バイオマスを原料とするバイオ燃料の製造方法
発明者: 仁宮一章, 東浩, 守屋繁春, 増田光平
権利者: 金沢大学
種類: 特許
番号: 特願 2013-142868
出願年月日: 2013/7/8
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1件)

名称: バイオマスの前処理法
発明者: 仁宮一章, 高橋憲司, 清水宣明
権利者: 金沢大学
種類: 特許
番号: 特開 2012-86154
取得年月日: 2012/5/10
国内外の別: 国内

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仁宮一章 (NINOMIYA, Kazuaki)
金沢大学・環日本海域環境研究センター・
准教授
研究者番号: 10379125

(2) 研究分担者

清水 宣明 (SHIMIZU, Nobuaki)
長崎国立大学・薬学部・名誉教授
研究者番号: 50019634

(3) 連携研究者

高橋 憲司 (TAKAHASHI, Kenji)
金沢大学・理工研究域・教授
研究者番号: 00216714