

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660138

研究課題名(和文) 国産針葉樹の直接酵素糖化処理に向けたイオン液体前処理法の開発

研究課題名(英文) Development of the ionic-liquid pretreatment for direct enzyme saccharification process of Japanese softwood

研究代表者

中川 明子 (NAKAGAWA-IZUMI, Akiko)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：30323249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：国産針葉樹材からのバイオエタノール生産の実現に向け、国産針葉樹材からセルロースを単離することなく酵素糖化時の効率を向上させるためにイオン液体(1-エチル-3-メチルイミダゾリウムアセテート)を用いた前処理技術を検討した。最大100、8時間のイオン液体処理を施した針葉樹材の酵素糖化率は向上し、X線回折法による分析結果からセルロースの結晶構造に変化が見られた。活性炭処理および凍結乾燥法により水分除去した回収イオン液体は微量の溶解物よりも残存した水分が酵素糖化率に多大な影響を及ぼしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Ionic liquid treatment with 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim]Ac) was studied as pre-treatment method of glucose production from cellulose in Japanese softwood. In spite of high lignin content in the mixtures, the yields of glucose liberated from the mixtures by enzymatic saccharification were higher than that of untreated wood. Mixtures were analyzed by X-ray diffraction for cellulose crystal structure. It was suggested that cellulose crystal structures were changed by [Emim]Ac treatment. Recycling process of [Emim]Ac was conducted by the active carbon treatment and freeze-drying. The small amount of dissolved materials hardly had an influence on the enzyme saccharification, but the residual water in ionic liquid had a great influence on that.

研究分野：木材化学

キーワード：国産針葉樹 イオン液体 酵素糖化

1. 研究開始当初の背景

日本における人工針葉樹の蓄積量は 2010 年時点で約 26 億 m<sup>3</sup> である。しかし木材自給率は 3 割近くに留まっており、豊富な木質バイオマス資源を保有しつつも十分に活用できていない。国内の木質バイオマス資源の利用促進を図る手段の一つとして、針葉樹材からのバイオエタノール生産が挙げられるが、効率的なセルロース回収もしくは糖化技術の確立が必要である。

これまで、木材からのセルロース分離・回収方法の一つとして Fig.1 に示すイオン液体を用いてセルロースおよびリグニンの溶解について検討してきた[1,2]。その中で、スギ木粉を、1-ethyl-3-methylimidazolium acetate([Emim]Ac)によって処理したところ、用いた試料の 25%程度しか溶解せず、溶け残った木粉(イオン液体処理残渣)を酵素糖化に供したところ、イオン液体処理残渣中のセルロースの 90% (未処理木粉は 6%程度)がグルコースに変換されることを見いだした[2]。

これは、既往の報告[3,4]から、Fig. 2 に示すようにイオン液体処理残渣中のセルロースがセルロース I からセルロース II へと結晶構造が変化した結果と推察される。しかし、セルロースの結晶構造におよぼす詳細な処理条件の影響は報告されていない。

そこで、これを明らかにすることにより、セルロースを単離することなく、成分の溶解を最小限に抑え、酵素糖化時の効率を向上させることが可能なのではないかと、そしてその結果として、回収したイオン液体中に含まれる木材由来の不純物により従来困難であったイオン液体の再使用も可能となるのではないかと、と着想した。

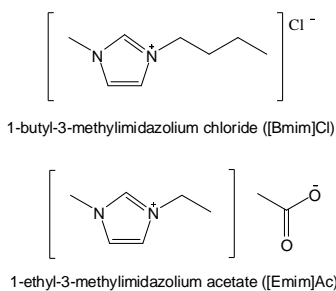


Fig.1 これまで用いたイオン液体[1,2]

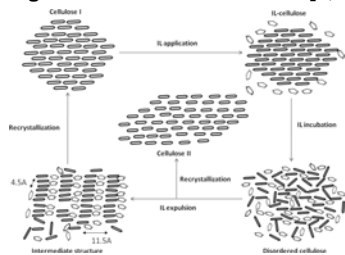


Fig. 2 イオン液体処理に伴うセルロース結晶構造の想定される変化[4]

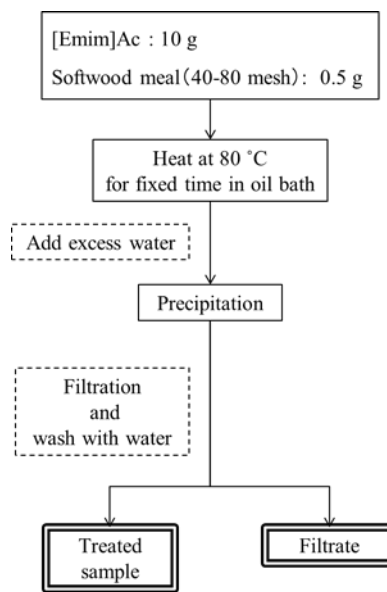
2. 研究の目的

国内の木質バイオマス資源、とくに針葉樹材からのバイオエタノール生産の実現に向け、国産針葉樹材からセルロースを単離することなく酵素糖化時の効率を向上させる、イオン液体を用いた前処理技術を開発する。

3. 研究の方法

(1) イオン液体処理条件の影響

セルロースの結晶構造に影響をおよぼすであろう、処理温度および処理時間について、イオン液体[Emim]Acを用い Scheme 1 の手順によりスギ木粉の前処理を行い、処理木粉の酵素糖化率を検討した。



Scheme 1 Treatment Procedure

(2)イオン液体処理における水分の影響

乾燥したトドマツ木粉に水を添加して Scheme 1 の手順に従い前処理を行い、処理木粉の酵素糖化率を検討した。

(3)イオン液体の回収方法と酵素糖化率におよぼす回収したイオン液体の再使用の影響

回収したイオン液体を活性炭処理および凍結乾燥法により水分除去し回収イオン液体を得た。回収イオン液体によりスギ木粉の前処理を行い、酵素糖化率を検討した。

4. 研究成果

(1) イオン液体処理条件の影響

スギ木粉を 60,80,100°C で 2,4,6,8 時間前処理を行ったところ、残渣率は 93-99%とほとんど溶解は見られなかった。Fig.3 に 60,80,100°C および 2,4,6,8 時間前処理を行ったスギ木粉の、未処理木粉の酵素糖化率を 1 とした酵素糖化の結果を示す。60°C の場合は未処理木粉の 5 倍前後であったが、80°C およ

び 100°Cでは処理時間と共に相対比は高くなりそれぞれ 11.9 倍、21.4 倍となった。

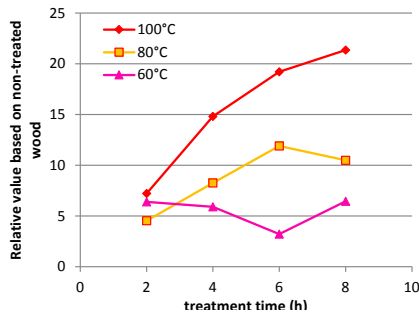


Fig.3 イオン液体前処理木粉の相対酵素糖化比 (未処理木粉を 1 とする)

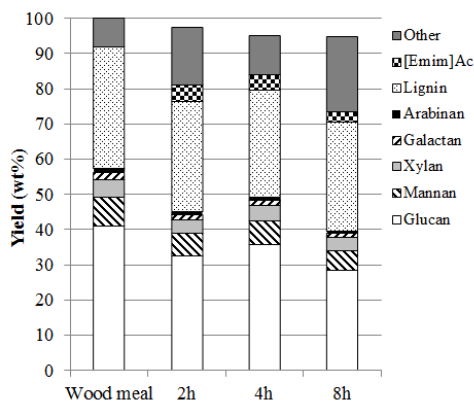


Fig. 4 Chemical component of Japanese cedar treated with [Emim]Ac for fixed time at 80 °C.

Table 1 Enzymatic saccharification for mixtures treated with [Emim]Ac for fixed time

	Glucose content in initial sample (mg)	Lignin content (%)	[Emim]Ac content (%)	Liberated glucose (mg)	Yield (% based on glucose from starting material)
Filter paper	22.3	-	-	7.0	31.4
Wood meal	9.2	34.5	-	0.4	4.8
2h treatment	7.5	31.4	4.6	1.9	25.8
4h treatment	8.4	30.5	4.4	2.3	27.5
8h treatment	6.7	30.9	3.0	2.3	34.1

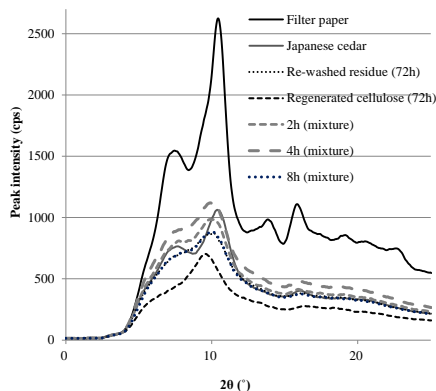


Fig. 5 X-ray diffraction patterns of [Emim]Ac treated Japanese cedar samples. ( X-ray source : Mo )

80°C、2-8 時間の前処理を行い、残渣の化学分析、X 線回折、酵素糖化処理をそれぞれ行った。Fig.4 の結果から主に減少した成分は

セルロースであった。Table 1 に酵素糖化の結果を示す。リグニン量は 30.5–34.5%と非常に高いにも関わらず、特に 80°C8 時間処理の残渣木粉の酵素糖化率はろ紙 (セルロース 100%) とほぼ同等であった。Fig.5 に示す X 線回折の結果から、ろ紙と未処理木粉は類似のピーク形状であったが、処理残渣木粉のピーク形状は異なることから、セルロース結晶構造が変化していることが明らかとなった。

### (2)イオン液体処理における水分の影響

乾燥トドマツ木粉に対して水分率が 10,20,30,50%となるように水を添加後、80°C、2-8 時間処理を行った。Fig.6 に示す通り残渣率は 96%以上であるが、スギと同様にセルロースの減少が見られた。また酵素糖化率は水分の増加に対して 62.7%から 37.5%に減少した。Fig.7 の X 線回折の結果から、特に水分率 50%ではピーク形状の変化が見られたことから、水分が処理に影響を及ぼすことが明らかとなった。

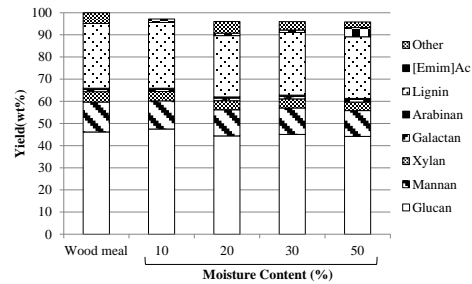


Fig. 6 Chemical components of Sakhalin fir after the [Emim]Ac treatment (80°C, 2h) at the fixed initial moisture contents.

Table 2 Enzymatic saccharification for Sakhalin fir after the [Emim]Ac treatment (80°C, 2h) at the fixed initial moisture contents.

	Glucose content in initial sample (mg)	Lignin Content (%)	[Emim]Ac content (%)	Liberated glucose (mg)	Yield (% based on glucose from starting material)
Filter paper	18.8	-	-	9.2	49.2
Wood meal	9.5	29.2	-	0.3	3.6
Mixture Content 10%	9.9	29.7	1.6	6.2	62.7
Mixture Content 20%	9.9	27.7	1.1	5.9	59.6
Mixture Content 30%	10.9	28.2	1.1	5.7	52.7
Mixture Content 50%	10.1	27.8	4.1	3.8	37.5

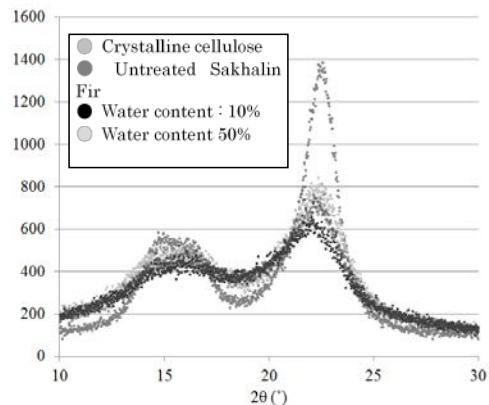


Fig. 7 X-ray diffraction patterns of [Emim]Ac treated Sakhalin fir samples. ( X-ray source : Cu )

### (3)イオン液体の回収方法と酵素糖化率にお

よぼす影響

Scheme1 のろ液からイオン液体は活性炭処理により不純物の除去後、凍結乾燥法により更に水を除去した。回収したイオン液体処理では酵素糖化率が市販品の3分の1程度であった (Table 3)。Table 4 に示す元素分析の結果から、活性炭処理により不純物は除去出来たが、微量の水が除去できていないことが示唆された。凍結乾燥法で水を除去したイオン液体を加熱減圧乾燥法により水の除去を徹底的に行ったところ、イオン液体後の残渣の酵素糖化率は向上し、ろ紙とほぼ同等の結果が得られた。イオン液体処理の回収では徹底的な水の除去が必要であることが明らかとなった。

**Table 3 Enzymatic saccharification of [Emim]Ac treated wood meals**

	Glucose content in initial sample (mg)	Liberated glucose (mg)	Yield (%)
Filter paper	20.4	14.2	69.6
Untreated wood meal	10.3	0.7	6.8
Fresh	10.6	3.8	35.8
Recycled without activated carbon	11.1	1.0	9.0
Recycled with activated carbon	10.7	1.2	11.2

**Table 4 Elemental analysis of [Emim]Ac**

	C (%)	H (%)	N (%)	O (%)
Theoretical	56.5	8.2	16.5	18.8
99%, commercial	44.3	10.2	13.3	32.0
Recycled without activated carbon	37.9	10.2	11.2	40.7
Recycled with activated carbon	43.9	10.5	12.9	32.7

<引用文献>

- [1]岸野正典, 谷口僚, 中川明子, 大井洋, 木材学会誌, 55号4巻, (2009)
- [2]荒川拓哉, 岸野正典, 中川明子, 大井洋, 第58回リグニン討論会講演要旨集, 2013年11月, 高松
- [3]Tong-Qi Yuan, Wei Wang, Li-Ming Zhang, Feng Xu and Run-Cang Sun, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 110, No. 3, (2013)
- [4]Indira P. Samayam, B. Leif Hanson, Paul Langan, and Constance A Schal, Biomacromolecules, Vol. 12, No. 8, (2011)

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0件)

[学会発表] (計4件)

1. 中川明子, 荒川拓也, 岸野正典, 大井洋, セルロースからのグルコース生産を目的としたイオン液体処理におけるセルロース結晶構造の変化, 第81回紙パルプ研究発表会, 2014年6月2,3日(東京大学農学部弥生講堂, 東京都文京区)

2. 岸野正典, 中川明子, 国産針葉樹の酵素糖化におよぼすイオン液体処理の影響ー水分の影響ー, 第65回日本木材学会大会, 2015年3月16-18日(タワーホール船堀, 東京都江戸川区)

3. Nakagawa-izumi Akiko, H'ng Yinying, Arakawa Takuya, Kishino Masanori, Influence of water on enzymatic saccharification of Japanese softwood treated with an ionic liquid, 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate, 18th International Symposium on Wood, Fibre and Pulping Chemistry, 2015年9月9-11日(ウィーン, オーストリア)

4. Hamidah Umi, YinYing H'ng, Akiko Nakagawa-izumi, Masanori Kishino, Effect of Activated Carbon on Impurities Removal of Recycled [Emim]Ac (1-Ethyl-3-Methylimidazolium Acetate) for Enzymatic Saccharification, 第60回リグニン討論会, 2015年11月5,6日(筑波大学大会館, 茨城県つくば市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 明子 (NAKAGAWA-IZUMI, Akiko)

筑波大学生命環境系・准教授

研究者番号：30323249

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

岸野 正典 (KISHINO Masanori)

地方独立行政法人北海道立総合研究機構

森林研究本部林産試験場・研究主査

研究者番号：20446298