

令和元年6月17日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04193

研究課題名(和文) イオン液体を用いたリグニンのカスケード利用による完全型バイオマスリファイナリー

研究課題名(英文) Ionic liquid-assisted complete biomass refinery by utilizing lignin

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) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イオン液体を用いて、木質系バイオマス中のリグニンを「リグニンモノマー」、「リグニンオリゴマー」、「リグニン残渣」の3種類にプロセッシングし、それぞれから、「新奇エポキシ樹脂」、「超高分子量・構造化樹脂」、「無機材料との複合化材料」を合成する。本技術は、木質系バイオマスの多糖成分に加えて、リグニンをも高度利用する「完全型バイオマスリファイナリー」の基盤となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発されるリグニンの化学資源としてのカスケード的高付加価値化技術は、バイオマスリファイナリープロセス全体の経済的収支に極めてプラスに働く。また、本研究で開発するリグニン由来の高分子は、従来の石油由来の高分子では達成できない新奇な構造・性質を持つと予想される。本研究は、従来の多糖成分に加えて、リグニンをも高度利用する「完全型バイオマスリファイナリー」のための基盤技術である。現在のオイルリファイナリーに代わる次世代産業の鍵技術であることから、資源に乏しい日本での意義は大きい。また、地球温暖化ガスの削減の観点からも意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this research, lignin in woody biomass is processed into 3 types of "lignin monomer", "lignin oligomer" and "lignin residue" using ionic liquid. From respective lignin-derived materials, we synthesize "new epoxy resin", "ultra-high molecular weight structured resin", and "composite material with inorganic material". This technology is the basis of the "complete biomass refinery" which makes high use of lignin in addition to the polysaccharide component of woody biomass.

研究分野：生物化学工学

キーワード：バイオマスリファイナリー イオン液体 セルロース リグニン 樹脂

1. 研究開始当初の背景

背景：木質系バイオマスの細胞壁の多糖成分（セルロースとヘミセルロース）は、糖化・発酵・化学変換によるバイオ燃料・化成品への変換技術が確立している。しかし、酵素糖化残渣であるリグニンについては、熱源としての利用を超えるような高付加価値物質への変換技術がまだ未確立である。リグニンの高付加価値物質への変換技術の確立は、植物細胞壁成分を全て高度利用する「完全型バイオマスリファイナー」の鍵であり、またリファイナープロセス全体の経済的収支を成立させるためにも重要な課題である。

国内外の動向：現在、バイオマスの糖化前処理は、希硫酸やアルカリを用いて高温・高圧条件下で行われている。この前処理法は、高エネルギーコストや、反応容器劣化の原因になるだけでなく、糖化残渣リグニンの構造の変性（反応部位の低下）を招き、リグニンの高度利用の妨げとなる。また、糖化残渣リグニンは、高分子量のため通常の有機溶媒に不溶であり、強酸・強塩基で溶解させる必要がある。しかし、この強酸・強塩基条件は、多くの高分子修飾反応を阻害する。これもリグニンの高度利用の妨げとなる。

2. 研究の目的

本研究では、イオン液体を用いることにより木質系バイオマス中のリグニンを3種類の分子量の異なる「リグニンモノマー」、「リグニンオリゴマー」、「リグニン残渣」へプロセッシングし、それぞれから、「新奇エポキシ樹脂」、「超高分子量・構造化樹脂」、「無機材料との複合化材料」を創成する。本申請は、「1）バイオマスに含まれるリグニンのイオン液体を用いたプロセッシング（主にH27-28年度）」と「2）種々の分子量のリグニンからの高付加価値材料の製造（主にH29-30年度）」から構成されている。

本研究の特徴は以下のとおりである。

- 溶解性・反応性が極めて低い糖化残渣リグニン（分子量 10^5 ）をイオン液体に溶解させ、リグニンモノマーへ高効率分解する点。さらに、独自のリグニンモノマー代謝酵素群による変換を経て、樹脂合成する点。
- イオン液体を用いて「常温・常圧」でバイオマスを前処理し、その過程で分画される分子量や構造がある程度均一なリグニンオリゴマー（分子量 10^3 程度）から、新奇な超高分子量化・構造化樹脂を合成する点。
- イオン液体を「溶媒」かつ「触媒」として用いることで、溶解性・反応性が著しく低いリグニン残渣（分子量 10^5 程度）への高分子修飾反応が初めて可能となり、無機材料との複合化により新奇機能を付与する点。

3. 研究の方法

1) バイオマスに含まれるリグニンについてのイオン液体を用いたプロセッシング

1-a) イオン液体によるバイオマスの糖化前処理&リグニンオリゴマー分画

バイオマスとイオン液体とを混合し加熱溶解することによってセルロースの結晶構造を緩和させる（前処理）。得られるバイオマス・イオン液体混合物に対して、リグニン良溶媒（50%アセトン水溶液）を用いて多糖リッチ画分を選択的に再沈殿させる。これにより、原料バイオマスを、多糖リッチな前処理バイオマス（分子量 10^5 の高分子量リグニンを含む）と、分子量 10^3 程度のリグニンオリゴマーへと分画する。イオン液体としては、安価で、バイオマス前処理が高いことを明らかにしてきたコリン酢酸を用いる。ここで、バイオマスの種類（杉、ユーカリ、バガス）やサイズ（200 μ m 粉末～数cmペレット）、イオン液体の最少使用量（原料バイオマスに対して等量～1/10量）、イオン液体と共に用いる co-solvent の種類（DMSO 等）、加熱方法（加温、マイクロ波、超音波）や処理時間（数min～数10min）が、上記の前処理・分画操作の効率に及ぼす影響を調べる。前処理バイオマスは、収量、組成分析、XRD によるセルロース結晶度評価を行う。リグニンオリゴマーの評価には、収量、GPC による分子量分布、NMR による OH 基の量を測定する。

1-b) イオン液体中での糖化残渣リグニンのモノマー化

上記 1-a) の前処理・分画操作の結果得られた多糖リッチな前処理バイオマスに対して、糖化酵素を用いてセルロースとヘミセルロースの糖化反応を行い、糖化残渣リグニンを調整する。糖化酵素としては市販の Ctec2, Htec2 を用いる。ここで、多糖成分を含まない純度の高い糖化残渣リグニンを得るために必要となるセルラーゼ/ヘミセルラーゼの比、酵素の最少量について検討を行う。単糖については HPLC 分析から糖化率を評価する。糖化残渣リグニンについては、収量、組成分析、GPC による分子量分布、NMR 分析による OH 基の量を評価する。

上記により得られた糖化残渣リグニンに対して、種々の酸化分解法を行い、酢酸エチル等の溶媒抽出によりリグニンモノマーを得る。ここで、酸化分解法の反応溶媒（水、NaOH 水溶液、リグニン良溶解性イオン液体（EmimOAc, MmimMeSO₄ 等）、触媒（ニトロベンゼン、硫酸銅）、酸化剤（Air, H₂O₂, O₂）、加熱方法（加温、マイクロ波）、反応温度・時間等が、糖化残渣リグニ

ンのモノマー化に及ぼす影響を調べる。リグニンモノマー（主にバニリン、シリングアルデヒド、*p*-ヒドロキシベンズアルデヒド等）は、GC/MSによる定性・定量分析を行う。酸化分解残渣リグニンについては、収量、GPCによる分子量分布、NMRによるOH基の量を測定する。

1-c) イオン液体のリサイクル

上記1-a)の前処理・分画操作の結果生じるイオン液体水溶液（バイオマス由来の低分子夾雑物を多量含む）に対して、イオン交換膜を用いた電気透析を行った後、水分をエバポレーターで除去することにより、純粋なイオン液体を回収する。ここで電気透析の電圧、流量等の条件を最適化する。回収イオン液体については、収量、含水率、NMR分析を行う。

2) 種々の分子量のリグニンからの高付加価値材料の製造

2-a) リグニンモノマーからの熱硬化性樹脂の開発

前頁1-b)の糖化残渣リグニンのモノマー化により得られたリグニンモノマー（バニリン、シリングアルデヒド、*p*-ヒドロキシベンズアルデヒド等の混合物）を原料物質として、エポキシ樹脂合成のためのモノマーへと変換する。具体的には、*Sphingobium* sp. SYK-6株由来のvanillin dehydrogenase 遺伝子 (*ligV*) 発現 *Pseudomonas putida* PpY1100株 (*P. putida* PpY1100/*ligV*株) を作成し、バニリン酸、シリング酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸の混合物へと変換する。または、*ligV*に加えて *p*-hydroxy benzoatehydroxylase 遺伝子 (*PobA*) syringate *O*-demethylase 遺伝子 (*DesA*)、vanillate/3MGA *O*-demethylase (*ligM*)を発現させた *P. putida* PpY1100株 (*P. putida* PpY1100/*ligV/PobA/DesA/LigM*株) を作成し、プロトカテク酸とガリック酸の混合物へと変換する。ここで、リグニンモノマーの存在により宿主 *P. putida* PpY1100株内で強力に発現が誘導されるプロモータをトランスクリプトーム解析により探索し、上述の系へ適用する。培養液中のリグニンモノマー原料、中間・最終物質について、GC/MS分析により変換率を評価する。得られた最終物質のOH基をターゲットとしてエピクロロヒドリンを用いてエポキシ樹脂モノマーを合成し、プレポリマー化・硬化反応を行う。得られたエポキシモノマーや樹脂については、NMRやIRによる分光分析、DSCやTGによる熱分析を行う。

2-b) リグニンオリゴマーからの超高分子量・構造化材料の開発

前頁1-a)の糖化前処理・分画操作により得られたリグニンオリゴマー（分子量 10^3 程度）を原料として、超高分子量樹脂ならびに構造化樹脂の合成を行う。フェノールオリゴマーを原料とした場合を参考に行う。リグニンオリゴマー単独で高分子合成が進まない場合は、構造の明確なフェノールオリゴマーとの共重合を行う。超高分子量樹脂合成は、強酸性条件にて行う。IPN構造・ラダー構造を有する樹脂合成は、リグニンオリゴマーとビニル系モノマーの同時ネットワークポリマー化を行う。得られた超高分子量樹脂ならびに構造化樹脂の評価には、DSCやTGによる熱分析ならびに引っ張り試験を行う。

2-c) リグニン残渣と無機材料からの複合化材料の開発

前頁1-b)の糖化残渣リグニンの酸化分解反応の後に得られる“リグニン残渣（分子量 10^5 ）”を原料として、まず、イオン液体中での修飾反応によってリグニン主骨格であるベンゼン環への官能基の導入を行い、その後、無機材料（ガラス材料、金属材料、炭素材料、粘土）との複合化を行う。高分子量フェノール樹脂や市販リグニンを原料としたこれまでの成果を参考に行う。ガラス材料との複合化には、シリカゲル表面のシラノール基と相互作用するようなアミド基、ウレタン基をリグニン残渣に導入する。金属材料との複合化には、金属に配位できるチオール基の導入、もしくはリグニンが従来有しているメチロール基を利用する。炭素材料との複合化には、炭素材料とリグニン残渣との芳香環相互作用を増大させるために、多核芳香族分子をリグニン残渣に導入する。粘土との複合化には、アニオン性の粘土層と相互作用することが可能な、アンモニウム塩のようなカチオン性部位をリグニン残渣に導入する。得られたリグニン残渣ベースの複合化材料の機能性評価には、DSCやTGによる熱分析ならびに引っ張り試験を行う。

4. 研究成果

研究成果1) バイオマス中のリグニンについてのイオン液体を用いたプロセッシング

研究成果1-a) イオン液体によるバイオマスの糖化前処理&リグニンオリゴマー分画

研究代表者の仁宮らは、バイオマスの糖化前処理として、イオン液体と超音波/マイクロ波を組み合わせた独自の手法により、常温・常圧（100℃以下・解放系）という温和な条件下でバイオマスを溶解・前処理することに成功した。その結果、セルロースの非結晶化と酵素糖化促進（**図1**、**2**）が起こり、一方、リグニンの一部は分子量 10^3 程度のリグニンオリゴマーに断片化され（**図2**）分画できることも明らかにした。

研究成果1-b) イオン液体中での糖化残渣リグニンのモノマー化

従来のリグニン酸化分解法（アルカリニトロベンゼン酸化法）では反応溶媒としてアルカリが用いられる。研究代表者の仁宮らは、アルカリよりもリグニン溶解性の高いイオン液体を選抜して、糖化残渣リグニン（分子量 10^5 ）の酸化分解を試験し、バニリン、シリングアルデヒド等のリグニンモノマーが著量得られるという知見を得た。

研究成果1-c) イオン液体のリサイクル

従来、バイオマスの前処理で生じるイオン液体希薄水溶液は、イオン液体の非揮発性を利用して、水をエバポレーションで除去し、再利用していた。しかし、この従来法では、バイオマス由来の夾雑物がイオン液体に残留・蓄積してしまい、バイオマス前処理能力が低下する原因となっていた。一方、研究代表者の仁宮らは、イオン交換膜・電気透析法によりバイオマス由来の夾雑物を全く含まないイオン液体の回収に成功した（図1）。これによりイオン液体の持続的な再利用が可能となった。

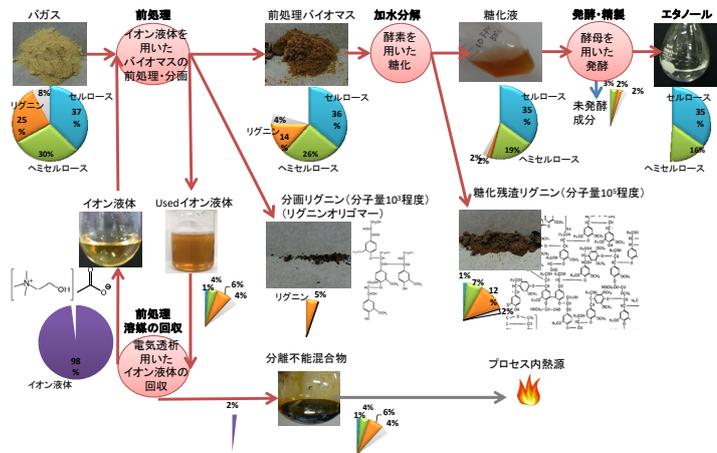


図1. イオン液体によるバイオマスの前処理・糖化・発酵・リグニン分画における細胞壁成分の物質収支データ

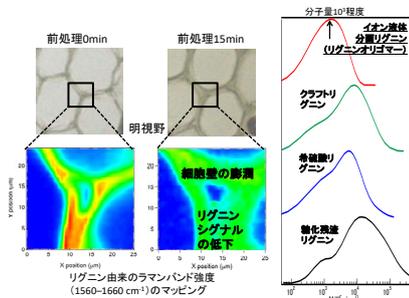


図2. イオン液体前処理バイオマスのラマンイメージング画像（右）、および、分画リグニンの分子量分布（左）

研究成果2) 種々の分子量のリグニンからの高付加価値材料の製造

研究成果2-a) リグニンモノマーからの熱硬化性樹脂の開発

リグニン由来の芳香族モノマー・ダイマーの資化能を有する *Sphingobium* sp. SYK-6 株に関して、主要な代謝反応経路群を初めて明らかにした。これをもとに、バニリン、シンリガアルデヒド、*p* ヒドロキシベンズアルデヒド（高分子リグニンの酸化分解により生成するリグニンモノマー群）を PDC に変換するための遺伝子群を発現させた組換え *Pseudomonas putida* 株を開発し、さらに得られた PDC をモノマーとしたポリアミド、ポリウレタン、ポリエステルを合成してきた（図3）。

研究成果2-b) リグニンオリゴマーからの超高分子量・構造化材料の開発

フェノールが数分子連結したフェノールオリゴマー（リグニンオリゴマーのモデル）の合成に初めて成功し、これをもとに、種々の耐熱性・強度に優れる高分子合成に成功した（図4）。具体的には、 10^6 を超える超高分子量フェノール樹脂や、高分子相互侵入網目（Interpenetrating Polymer Network: IPN）構造やラダー構造を有するフェノール樹脂である。

研究成果2-c) リグニン残渣と無機材料からの複合化材料の開発

有機溶媒に不溶である高分子量のリグニンについて、温和な条件下でのイオン液体への溶解性や、イオン液体中での反応性について実証した（図5）。また、高分子量フェノール樹脂（高分子量のリグニン残渣のモデル）について、イオン液体中での高分子修飾反応を行い、さらに、様々な異種材料との複合材料の合成を達成した。

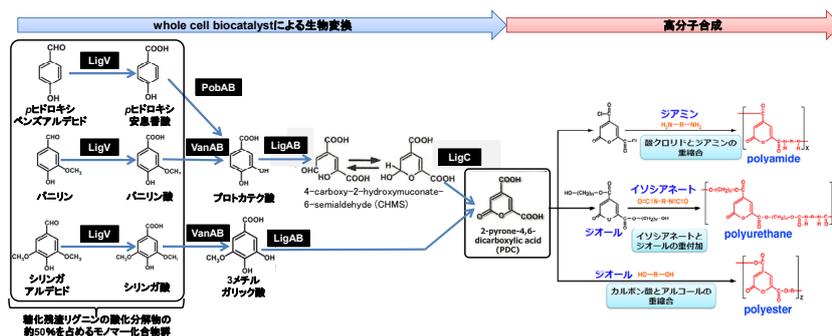


図3. リグニンモノマー群からの PDC ベースポリマーの合成

発明者：仁宮一章、高橋憲司、柘植陽太
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2016-175354
出願年：2016 年 9 月 8 日
国内外の別： 国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：高橋 憲司
ローマ字氏名：Kenji TAKAHASHI
所属研究機関名：金沢大学
部局名：生命理工学系
職名：教授
研究者番号（8 桁）：00216714

研究分担者氏名：生越 友樹
ローマ字氏名：Tomoki OGOSHI
所属研究機関名：金沢大学
部局名：ナノ生命科学研究所
職名：教授
研究者番号（8 桁）：00447682

研究分担者氏名：黒田 浩介
ローマ字氏名：Kosuke KURODA
所属研究機関名：金沢大学
部局名：生命理工学系
職名：助教
研究者番号（8 桁）：10748891

研究分担者氏名：政井 英司
ローマ字氏名：Eiji MASAI
所属研究機関名：長岡技術科学大学
部局名：工学研究科
職名：教授
研究者番号（8 桁）：20272867

研究分担者氏名：山岸 忠明
ローマ字氏名：Tadaaki YAMAGISHI
所属研究機関名：金沢大学
部局名：物質化学系
職名：教授
研究者番号（8 桁）：90220251