

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22760603

研究課題名（和文）低細胞毒性のセルロース溶媒を用いた

リグノセルロースリファイナリー基盤技術の構築

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

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・助教

研究者番号：10379125

研究成果の概要（和文）：

リグノセルロースの糖化前処理能力が高く、かつ細胞毒性が低いイオン液体を探索した結果、コリン系イオン液体の中でも、酢酸イオンを陰イオンに持つコリン酢酸（Ch10Ac）が、バイオマス前処理能力（2時間の前処理で約90%の糖化効率）と低細胞毒性（EC50約10%）を兼ね備えるイオン液体であることを発見した。また、イオン液体にリグノセルロースを溶解させた上で、加熱ではなく超音波を照射し続ける新規な糖化前処理法を検討した。その結果、約2時間の前処理を行うことで、その後の24時間の酵素反応により、リグノセルロース中のセルロースをほぼ100%糖化し、リグニンを残渣として分離回収できる優れた方法であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

This study demonstrates that the enzymatic hydrolysis of cellulose is drastically enhanced following ultrasonic pretreatment of lignocellulosic material in ionic liquids when compared to conventional thermal pretreatment. Moreover, chorine acetate was most effective among the ionic liquid tested.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物化学工学

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：リグノセルロース、イオン液体、超音波、糖化前処理

## 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。

2002年、セルロースを非結晶化させ溶解可能にでき、またリサイクルも可能である画期的な溶媒として“イオン液体”が報告された。(イオン液体とは、イオンのみからなり、100℃以下の温度で液体の物質であり、常温融解塩とも称される)。2007年以降、イオン液体でリグノセルロースを溶解させた後にセルラーゼによる酵素糖化を行なう研究が報告され始めた。しかしながら、以下のような問題を依然抱えている。

**問題①:** リグノセルロース前処理に用いられてきた従来のイオン液体は、イミダゾリウム系化合物(殺虫剤等に用いられる細胞膜合成阻害剤)をカチオンとしており、生体触媒(酵素・微生物)への毒性が高く、反応系に1-2%でも残存すると微生物発酵への顕著な阻害が生じるため、処理したバイオマスからイオン液体を洗い流す際の廃液が大量に発生することが問題である。

**問題②:** イオン液体を用いたリグノセルロースの糖化前処理では、従来、リグノセルロースをイオン液体に溶解し約110℃で加熱・混合を行ってきた。粘性の低いイオン液体が近年開発されてはいるが、リグノセルロースを溶解させた際の液の粘性は、やはり極めて高く、反応が拡散律速となり、前処理反応に12時間から24時間を要していた。またイオン液体自体にはリグニン構造を緩和させる効果がないことも、イオン液体によるリグノセルロース前処理の問題点であった。

## 2. 研究の目的

**目的①:** 我々は、細胞膜成分であるコリンに着目し、コリン系イオン液体を合成した。すなわち、合成したコリン系イオン液体の中から、リグノセルロースの糖化前処理能力が高く、かつ細胞毒性が低いイオン液体を探索することを目的とし実験を行った。

**目的②:** 我々は、リグノセルロース系バイオマスの糖化前処理の際に用いる外部エネルギーとして、加熱ではなく、超音波に着目し、前処理を行った。すなわち、イオン液体にリグノセルロースを溶解させた上で超音波を照射し続ける新規な方法についてその効果を定量的に検討することを目的とし実験を行った。

## 3. 研究の方法

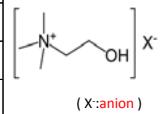

**実験方法①:** 実験に使用したイオン液体は、①イミダゾリウム系イオン液体(表1)と②コリン系イオン液体(表2)である。イミダ

ゾリウム系イオン液体としては、リグノセルロースを溶解し、16時間の110℃加熱によりセルロースの非結晶化ができることが既に報告されている表1の5種類を購入し、実験のcontrolとして用いた。細胞毒性の低いセルロース溶媒の新たな候補として、表2の8種類のコリン系イオン液体を調整した。

表1. 実験に用いたイミダゾリウム系イオン液体

実験方法: 使用したイオン液体

コリン系イオン液体 (低毒性イオン液体の候補として、新規に調整した)




Ionic liquid (略称)	cation	anion
Choline Formate (Chl For)	 (X: anion)	H-COO <sup>-</sup>
Choline Acetate (Chl OAc)		カルボン酸 (飽和脂肪酸) CH <sub>3</sub> -COO <sup>-</sup>
Choline Propionate (Chl Pro)		CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -COO <sup>-</sup>
Choline Oxalate (Chl Oxa)		ジカルボン酸 HOOC-COO <sup>-</sup>
Choline Malonate (Chl Mal)		HOOC-CH <sub>2</sub> -COO <sup>-</sup>
Choline Succinate (Chl Suc)		HOOC-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COO <sup>-</sup>
Choline Phosphate (Chl Pho)		P(OH) <sub>2</sub> -COO <sup>-</sup>
Choline Benzoate (Chl Benz)		芳香族カルボン酸 

コリン: 細胞膜脂質の構成成分

表2. 実験に用いたコリン系イオン液体

実験方法: 使用したイオン液体

イミダゾリウム系イオン液体 (比較対象として、購入した)

Ionic liquid (略称)	cation	anion
1-Ethyl-3-methylimidazolium Acetate (Emim OAc)		CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>
1-Ethyl-3-methylimidazolium Diethylphosphate (Emim DEP)		(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O) <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
1-Ethyl-3-methylimidazolium Chloride (Emim Cl)		Cl <sup>-</sup>
1-Allyl-3-methylimidazolium Chloride (Amim Cl)		
1-Butyl-3-methylimidazolium Chloride (Brim Cl)		

イミダゾリウム: 抗菌剤

リグノセルロースを溶解することが報告されているイオン液体  
Ning Sun et al Green Chem., 2009, 11, 646-655

**実験方法②:** イオン液体としては、リグノセルロースを溶解し16時間の110℃加熱によりセルロースの非結晶化ができることが既に報告されているイミダゾリウム系イオン液体5種類(表1)を用いた。原料バイオマス(ケナフ芯部)をイオン液体に懸濁させ、これに対して、従来法として加熱(IL-heat法)、そして、新規な方法として超音波照射(IL-US法)を行った(図1)。また、比較実験として、リン酸緩衝液に懸濁させ、加熱もしくは超音波照射(水US法)を行う実験も行なった。イオン液体中で超音波を併用した糖化前処理(2時間以内)の後に、水を加え析出させた前処理リグノセルロースについて、酵素糖化反応を行なった(図2)。

## 実験方法: 前処理条件

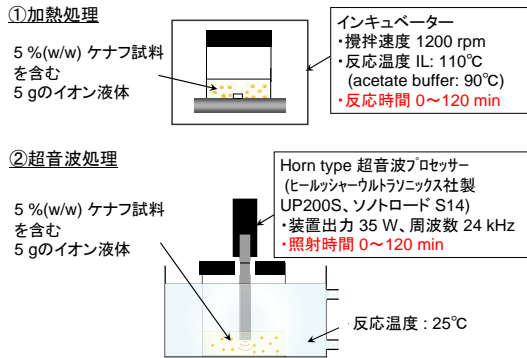


図1. イオン液体と超音波を組み合わせたリグノセルロースの糖化前処理方法

提案: 「イオン液体」と「超音波」を組合わせたリグノセルロースの酵素糖化前処理

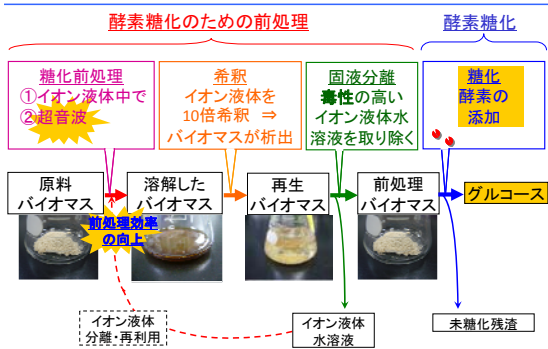


図2. イオン液体と超音波を組み合わせたリグノセルロースの糖化前処理

## 4. 研究成果

**結果①:** 細胞毒性の指標である半数影響濃度 ( $EC_{50}$ )、そしてバイオマス前処理能力の指標である溶解率と酵素糖化率を、各イオン液体について測定した。その結果、表3に示すように、イミダゾリウム系イオン液体では、総じて酵母に対する細胞毒性が高いことが確認できた。またイミダゾリウム系イオン液体の中では、酢酸イオンを陰イオンに持つ 1-Ethyl-3-methylimidazolium acetate (EmimOAc) が最もバイオマス前処理能力が高いことが分かった。一方、コリン系イオン液体の中では、細胞毒性の低いものが多く見られた。また、コリン系イオン液体の中でも、酢酸イオンを陰イオンに持つコリン酢酸 (ChlOAc) が、バイオマス前処理能力と低細胞毒性を兼ね備えるイオン液体であることが分かった (表3)。

**結果②:** 比較対象である従来法 IL-heat 法 (イオン液体中での加熱処理) の場合、120 分の前処理では糖化率は、前処理反応時間によらず約 15% で一定であった。一方、今回提案する IL-US 法では試験したいずれのイオン液体の場合でも、120 分の前処理で糖化率は

50-100% に達しており、比較対象のそれを大きく上回っていた (図3)。また、セルロースの結晶度やリグニン構造の変化も観察された (図4)。従来の IL-heat 法でも後の糖化反応が促進することが報告されていたが、それには約 12-24 時間加熱する必要があった。今回提案する IL-US 法では、1-2 時間程度でも糖化率は、約 80% に達しており、超音波を組み合わせた効果は極めて大きいといえる。

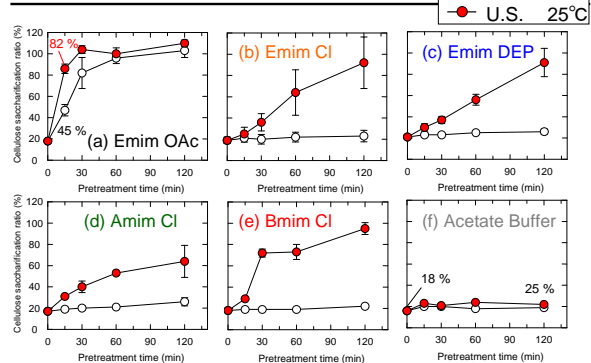
結果: イオン液体の細胞毒性とバイオマス前処理性能

Ionic liquid	細胞毒性	バイオマス前処理性能 (110°C/120 min)			
	$EC_{50}$ [(w/v)%]	溶解率 [%]	酵素糖化率 [%]		
イミダゾリウム系	Emim OAc	2.0	85.7	96.0	
	Emim DEP	6.0	未試験	24.0	
	Emim Cl	1.0	未試験	26.0	
	Amim Cl	1.0	未試験	28.0	
	Bmim Cl	2.0	未試験	29.0	
コリン系	Chl For	7.1	41.6	94.4	
	Chl OAc	8.2	60.4	92.0	
	Chl Pro	2.7	64.5	108.6	
	Chl Oxa	0.9	21.2	43.3	
	Chl Mal	0.3	23.0	87.8	
	Chl Suc	> 10	11.5	37.2	
	Chl Pho	> 10	5.5	16.4	
	酢酸カルコリン系	Chl Benz	0.2	22.4	94.3

青字: 細胞毒性が低い・バイオマス前処理性能が高い 一目的のイオン液体  
赤字: 細胞毒性が高い・バイオマス前処理性能が低い

コリン酢酸が、リグノセルロース処理能と低細胞毒性を兼ね備えている

結果: IL/U.S. 糖化前処理が糖化反応促進に及ぼす影響

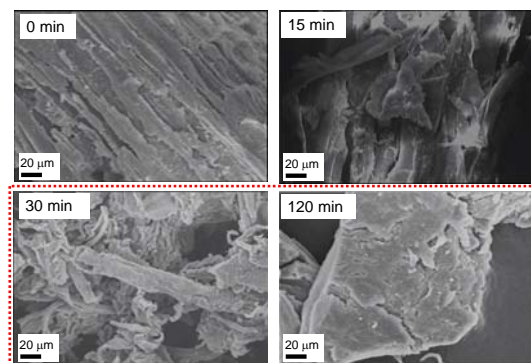


IL/U.S. 糖化前処理によって糖化反応が促進した

図3. イオン液体と超音波を組み合わせたリグノセルロースの糖化前処理の効果

結果: ① SEM によるバイオマス表面構造の観察

● [Emim OAc]/U.S. 糖化前処理後の前処理バイオマス



IL/U.S. 糖化前処理により糖化酵素がアクセスしやすい構造に変化

図4. イオン液体と超音波を組み合わせたリグノセルロースの糖化前処理後の SEM 画像

## 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 6 件)

1. Kazuaki Ninomiya, Kazuki Kamide, Kenji Takahashi and Nobuaki Shimizu. Enhanced enzymatic saccharification of kenaf powder after ultrasonic pretreatment in ionic liquids at room temperature, *Bioresour. Technol.*, 103 259-265 (2011) 査読あり
  2. Kazuaki Ninomiya, Chiaki Ogino, Shuhei Oshima, Shiro Sonoke, Shun'ichi Kuroda and Nobuaki Shimizu. Targeted sonodynamic therapy using protein-modified TiO<sub>2</sub> nanoparticles, *Ultrason. Sonochem*, 19, 607-614 (2011) 査読あり
  3. Kazuaki Ninomiya, Shuhei Oshima, Shiro Sonoke, Chiaki Ogino, Shun'ichi Kuroda and Nobuaki Shimizu: Targeted sonodynamic therapy using protein-modified TiO<sub>2</sub> nanoparticles, Proceedings of the 20th Annual Meeting of the Japan Society of Sonochemistry & The International Workshop on Advanced Sonochemistry, p.80-83, Nagoya (2011) Nov. (Invited) 査読なし
  4. Kazuaki Ninomiya, Kazuki Kamide, Kenji Takahashi, and Nobuaki Shimizu: Ultrasonic pretreatment in ionic liquids enhanced subsequent enzymatic saccharification of lignocellulosic materials, Proceedings of the 20th Annual Meeting of the Japan Society of Sonochemistry & The International Workshop on Advanced Sonochemistry, p.121-124, Nagoya (2011) Nov. 査読なし
  5. Kyohei Noda, Kazuaki Ninomiya, and Nobuaki Shimizu: Enhanced hydroxyl radical generation and cell injury by the combined use of TiO<sub>2</sub> particles and ultrasounds with dual frequencies, Proceedings of the 20th Annual Meeting of the Japan Society of Sonochemistry & The International Workshop on Advanced Sonochemistry, p.145-148, Nagoya (2011) Nov. 査読なし
  6. 仁宮一章, 高橋憲司, 清水 宣明: イオン液体と超音波を組み合わせたリグノセルロースの糖化前処理, ケミカルエンジニアリング, 56(2), 19-23 (2011) Feb. 査読なし
1. 仁宮一章, 曾田裕司, 清水宣明, 佐藤勝也, 鳴海一成: 重イオンビーム照射とFACSを繰り返すことによるセルラーゼ酵素高発現酵母の選抜育種, 第6回高崎量子応用研究シンポジウム, 高崎シテイギャラリー, 2011年10月13-14日(群馬県)
  2. 曾田裕司, 上出一輝, 仁宮一章, 高橋憲司, 清水宣明: イオン液体と超音波照射を組み合わせたリグノセルロースの糖化前処理, 日本生物工学会 第63回大会, 東京農工大学 小金井キャンパス, 2011年9月26-28日(東京都)
  3. 仁宮一章, 曾田裕司, 山内崇史, 小林雅史, 高橋憲司, 清水宣明: コリン系イオン液体を用いたリグノセルロースの糖化前処理, 日本生物工学会 第63回大会, 東京農工大学 小金井キャンパス, 2011年9月26-28日(東京都)
  4. 松本真実, 山田龍治, 仁宮一章, 片山高嶺, 清水宣明: 発光性ビフィズス菌の構築とその特性評価, 日本生物工学会 第63回大会, 東京農工大学 小金井キャンパス, 2011年9月26-28日(東京都)
  5. 岩倉和希, 川嶋聡, 仁宮一章, 荻野千秋, 清水宣明: Cell SELEX法により選抜したヒト肝臓由来がん細胞に対するDNAアプタマーの評価, 日本生物工学会 第63回大会, 東京農工大学 小金井キャンパス, 2011年9月26-28日(東京都)
  6. 仁宮一章: 超音波、固体触媒、イオン液体を組み合わせたリグノセルロースの糖化前処理, NPO 法人近畿バイオインダストリー振興会議 バイオマス研究会 第14回 研究会, 神戸大学, 2011年7月9日(兵庫県)

## 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・助教

研究者番号: 10379125

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし

[学会発表] (計 6 件)