

2023年 3月 23日

金沢大学産学連携協力会 御中

## 第7回 若手研究者奨励賞 研究経過報告書

所 属 金沢大学理工研究域生命理工学系  
職 名 准教授

ふりがな くろだ こうすけ  
氏 名 黒田 浩介

## 1. 研究計画

### (1) 応募研究テーマ名

高効率バイオエタノール生産プロセスの開発

#### 緒言

セルロース系バイオエタノールは石油の代替燃料として知られている。しかし、セルロース系バイオマスは強固な結晶構造を持つため、エタノールへ変換する前に前処理を行う必要がある。前処理溶媒は多く報告されているが、常温・常圧での溶解は難しく、エネルギーコストが多くかかってしまう。その中で、イオン液体が常温・常圧でセルロースを溶解できることが報告された。しかし、イオン液体は基本的に微生物に対する毒性が高く、発酵の前の洗浄によってイオン液体を取り除く必要がある。そのため、一つの容器内で連続的にバイオエタノールを生産（ワンポットエタノール生産）できず、エネルギーコストの削減が不十分である。

2017年に低毒性な前処理溶媒として、双性型のイオン液体（ $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}$ ; Fig. 1）が開発された<sup>1)</sup>。ほとんどの双性イオンは固体である一方、 $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}$ では柔軟なオリゴエーテル鎖によって融点が大きく低下し前処理溶媒として機能することが分かっている。この $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}$ を用いることで一つの容器内でのバイオエタノール生産が可能となっている。

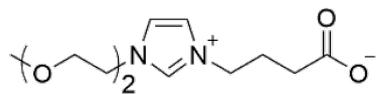


Fig. 1 Structure of  $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}$ .

しかし $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}$ は、そのオリゴエーテル鎖の導入により、双性イオンの中でも合成が煩雑であること、それにもなるとアトムエコノミーも低下してしまうこと、さらに価格が高くなってしまふことがデメリットとして挙げられる。特に複雑な合成はエネルギーコストを上げてしまい、バイオエタノール生産という目的に合致しない。オリゴエーテル鎖よりも容易に導入可能な長鎖アルキル基を導入することでも双性イオンを液体にできるが、毒性が高くなるためワンポットエタノール生産への利用は困難であった。そこでさらに我々は、固体の双性イオンも含めて検討を開始した。アトムエコノミー、原料価格の観点から最もシンプルなイミダゾリウム/カルボン酸系双性イオンである $\text{C}_1\text{imC}_3\text{C}$  (Fig. 2) が最も有用であると期待される。 $\text{C}_1\text{imC}_3\text{C}$ は、常温・常圧では固体であるためにそのままでは前処理できない。イオン液体や双性イオンでは、水やDMSOなどの共溶媒を利用することも可能であるが、 $\text{C}_1\text{imC}_3\text{C}$ は共溶媒存在下でも均一な液体にならない、あるいはセルロースを溶解しなかった。しかし、その一方で、Kamlet-Taftパラメータの水素結合受容能である $\beta$ 値を実験的に推定したところ1.15であった<sup>2)</sup>。そこで我々は、セルロースを溶解できない固体の $\text{C}_1\text{imC}_3\text{C}$ を用いたとしても、セルロースの結晶性を低下させる

ことができ、バイオマスの前処理に利用できるのではないかと考え、検討した。

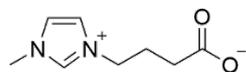


Fig. 2 Structure of  $C_1imC_3C$ .

## (1) セルロース結晶構造の緩和

### 実験操作

$C_1imC_3C$  10 wt%溶液 (10 g) に微結晶セルロース (0.2 g) 添加し、100 °C の攪拌条件下で溶媒を揮発させながら 3 時間前処理した。前処理後、少量の水を加え、偏光顕微鏡観察を行い結晶性について観察した。その後、洗浄によって  $C_1imC_3C$  を除去し、真空乾燥を行った。得られた乾燥済みセルロースの結晶性を粉末 X 線回折 (XRD) によって評価し、さらに、セルラーゼにより酵素加水分解を行い (酵素量: 10 FPU/g-cellulose)、加水分解効率からも結晶性の変化を評価した。

### 結果及び考察

偏光顕微鏡観察では、水のみで前処理した場合と比較して、 $C_1imC_3C$  で前処理したセルロースで明度の低い結晶が確認された (Fig. 3)。セルロース溶解能を持つ液体の  $OE_2imC_3C$  で前処理した場合でも同様に結晶の明度が低下していることが確認され、 $C_1imC_3C$  はセルロースの結晶性を低下させることが示唆された。その一方で、 $C_1imC_3C$  で前処理した場合は明度の高い結晶も観察された。このことは  $C_1imC_3C$  での前処理にはムラがあることを示唆している。 $C_1imC_3C$  はセルロースを溶解できないため、水を蒸発させながら前処理したときにムラができてしまったと考えられる。

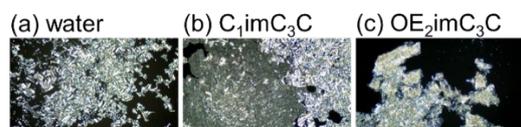


Fig. 3 Polarized light observation of cellulose pretreated by (a) water (b)  $C_1imC_3C$  (c)  $OE_2imC_3C$ .

結晶性の低下について詳細に検討するために、XRD の結果から、Segal 法によってセルロースの結晶化度 (CrI) を算出し、定量的に結晶性の変化を評価した。水で前処理した場合の CrI は 86%であったのに対して、 $C_1imC_3C$  で前処理した場合の CrI は 73%であった (Table 1)。したがって、 $C_1imC_3C$  はセルロースの結晶性を低下させられることが明らかとなった。さらに、セルロース溶解能を持つ  $OE_2imC_3C$  で前処理した場合の CrI は 68%であったことから、 $C_1imC_3C$  の前処理能は  $OE_2imC_3C$  と同等であることが判明した。続いて、 $C_1imC_3C$  によって前処理したセルロー

スを3時間加水分解した結果、グルコース収率は47%であり、水で前処理した場合(34%)よりも13%高く、OE<sub>2</sub>imC<sub>3</sub>Cで前処理した場合(49%)とほぼ同等であった(Table 1)。したがって、酵素加水分解の結果からも、C<sub>1</sub>imC<sub>3</sub>Cはセルロースの結晶性を低下できることが明らかとなった。

**Table 1** CrI and glucose yield after 3h hydrolysis of cellulose pretreated by water, C<sub>1</sub>imC<sub>3</sub>C and OE<sub>2</sub>imC<sub>3</sub>C

|                                    | CrI<br>(%) | Glucose yield<br>(%) |
|------------------------------------|------------|----------------------|
| water                              | 86         | 34 ± 5               |
| C <sub>1</sub> imC <sub>3</sub> C  | 73         | 47 ± 5               |
| OE <sub>2</sub> imC <sub>3</sub> C | 68         | 49 ± 6               |

## (2) C<sub>1</sub>imC<sub>3</sub>Cによるバイオマス(バガス)の前処理

### 実験操作

C<sub>1</sub>imC<sub>3</sub>C 10 wt%溶液(10 g)にバガス(サトウキビの搾りかす、0.2 g)添加し、100 °Cの攪拌条件下で溶媒を揮発させながら3時間前処理した。前処理後、洗浄によってC<sub>1</sub>imC<sub>3</sub>Cを除去し、真空乾燥を行った。得られた乾燥済みバガスの酵素加水分解を行い(酵素量:50 FPU/g-bagasse)、バイオマスの前処理が可能か評価した。さらに、上記と同様の前処理後、少量の水(10 mL)を加え攪拌し、溶液の280 nmにおける吸光度を測定することで、脱離したリグニン量を概算し定量的に評価した。また、前処理済みの乾燥済みバガスに対してXRDを測定し、結晶性の変化を確認した。

### 結果及び考察

C<sub>1</sub>imC<sub>3</sub>Cで前処理したバガスを72時間加水分解した後のグルコース収率は43%であった(Table 2)。この値は、水で前処理した場合(31%)よりも高く、OE<sub>2</sub>imC<sub>3</sub>Cで前処理した場合(44%)とは差がなかった。この結果から、C<sub>1</sub>imC<sub>3</sub>Cであってもバイオマスを前処理できることが示された。

前処理のメカニズムを検討するために、XRDを測定したところ、前処理後のバガスのCrIはわずかに増加していた(Table 2)。このCrIの増加は、非晶成分(ヘミセルロース及びリグニン)が脱離した結果である。C<sub>1</sub>imC<sub>3</sub>Cによる前処理によって脱離したリグニンはバイオマス中に含まれる全リグニンのうち9%であり、水の場合(3%)より多く、OE<sub>2</sub>imC<sub>3</sub>Cで前処理した場合(9%)とは差がなかった(Table 2)。このことからC<sub>1</sub>imC<sub>3</sub>CはOE<sub>2</sub>imC<sub>3</sub>Cと同程度の脱リグニン能力も有しており、その結果、加水分解反応が促進したことが確認された。

**Table 2** Delignification ratio, CrI and glucose yield after 72h hydrolysis from bagasse pretreated by water, C<sub>1</sub>imC<sub>3</sub>C and OE<sub>2</sub>imC<sub>3</sub>C

|                                    | Glucose<br>yield (%) | CrI<br>(%) | Delignification<br>ratio (%) |
|------------------------------------|----------------------|------------|------------------------------|
| water                              | 31 ± 0.7             | 51         | 3                            |
| C <sub>1</sub> imC <sub>3</sub> C  | 43 ± 1.8             | 53         | 9                            |
| OE <sub>2</sub> imC <sub>3</sub> C | 44 ± 3.1             | 55         | 9                            |

### 結言

双性イオンの中でも合成が簡便な C<sub>1</sub>imC<sub>3</sub>C が、OE<sub>2</sub>imC<sub>3</sub>C と同程度にバイオマスを前処理できることを明らかにした。これにより、アトムエコノミーの向上、低価格化、エネルギーコストの低下を達成した。

### 地域との連携

現在、北陸の会社から声を掛けていただき、セルロース系バイオマスの有効活用について検討を始めた。北陸には多くの残渣バイオマスや森林資源があるため、様々な地域連携が可能であると考えている。

### 発表論文

A. Hachisu, H. Tobe, K. Ninomiya, K. Takahashi, K. Kuroda, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 10, 6919-6924 (2022)

### 参考文献

- 1) K. Kuroda *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 16052-16055 (2017)
- 2) G. Sharma, K. Kuroda *et al.*, *Carbohydr. Polym.*, **267**, 118171 (2021)