

日産科学振興財団助成研究

特別研究課題

イオン液体を用いたバイオマスからのエネルギー抽出

成果報告書 要約

2008~2010

研究代表者

大野弘幸

国立大学法人 東京農工大学 大学院工学府

1. 研究背景

二酸化炭素の排出削減や再生可能エネルギーへの転換などの社会的背景をうけ、植物を原料とするエネルギー生産が注目を集めている。しかし、可食性デンプンからバイオエタノールなどを生産する安易な政策が様々な問題を引き起こしている。世界的な穀物価格の高騰などの懸念から、食糧資源との競合の無い非可食性バイオマス、特に、天然に存在する最大量のバイオマスであるセルロースが注目されている。セルロースは、グルコースが β -1,4 結合でつながった多糖類である。そのため、セルロースからグルコースやセロビオースなどの有用な物質を生産し、各種エネルギー源として利用することが可能となる。しかし、天然状態でのセルロースはリグニンやヘミセルロースと高分子複合体を形成しているため、溶解、抽出、更に単位糖への変換は容易ではない。これまで報告されている方法論の多くは、高温、高圧での処理や、強酸、塩基などを使用するなど、処理に費やされるエネルギーコストや環境負荷等の問題が指摘されている。これを大幅に改善できれば、資源の有効活用が可能となる。

本研究は、イオン液体と生体高分子の相互作用に関する知見を基礎とし、イオン液体をマトリックスとするバイオ燃料電池作成のための物理化学的な知見を集積することを最終目標としている。これまでセルロースを溶解するいくつかの溶媒系が提案されている。多くは極性溶媒に塩を溶解させ、極性を高めた溶媒系である。これらセルロースを溶解させるために溶媒に要求される項目を満たす溶媒として、我々はイオン液体に注目した。イオン液体とは、100 °C 以下でも液体として扱うことのできる有機塩であり、構成イオンの設計によって、室温以下でも溶融しているイオン液体も数多く報告されるようになった。また、構成イオンの多様性やデザインの可能性を巧みに使うことによって、イオン液体への機能賦与や、物性制御を行うことが可能となる。バイオマス処理に用いることのできるイオン液体の分野は、R. D. Rogers などが先駆的な研究を報告し、その後研究例が増えてきている。しかしながら、これまでの検討では特定のイオン液体を用いた検討にとどまっており、目的に合致する様にイオン液体をデザインする検討はほとんどなされていなかった。我々は、様々なイオンを合成し、イオン構造とイオン液体の諸物性との相関関係を整理し、セルロースの溶解のみならずその後の処理に適したイオン液体の創製を行っている。

本特別研究では、①バイオマスからの有用多糖類の省エネルギー抽出、②セルロースのイオン液体中での分解、③グルコースなどの単位糖から電気エネルギーの抽出の 3 項目に焦点をあて、各項目に最適なイオン液体や方法論の確立を目的とした検討を行った。

研究成果の概要

2. 天然バイオマス为非加熱で処理できる新規イオン液体の創製

我々はイオン液体の極性に着目し、極性やその他の物理化学的性質とイオン構造との関連性について検討を行った。これまで我々は、アルキルイミダゾリウムカチオンとギ酸などのカルボン酸アニオン、またはリン酸誘導体アニオンを組み合わせたイオン液体が、低熱エネルギーでセルロースを溶解することを明らかとした。特に、我々が提案した種々のリン酸誘導体塩は、1段階の反応で高純度品が得られ、優れた安定性を有し、低粘性の液体となることが特徴である。そこで、これらのイオン液体を基礎として、物理化学的な特性を改善することによって、バイオマスからセルロースなどの有用多糖類を高効率に抽出できる系が構築できるものと期待した。

我々は、カルボン酸アニオンの側鎖構造によって粘性や極性が大きく異なり、セルロースの溶解性も異なることを見いだしている。そこでメチル亜リン酸アニオンのエステル部位を改変した種々のイオン液体 (図 1) を作製し、バイオマス処理用の溶媒として検討した。

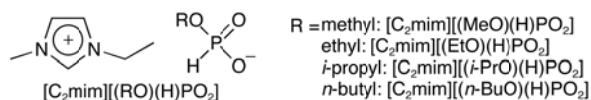


Figure 1. Chemical structure of alkyl phosphonate salts

作製したイオン液体は、全て室温で液体であった。それらの熱物性を表 1 に示す。示差走査熱量測定の結果、得られたイオン液体はガラス転移温度(T_g)のみを示し、常温で安定な過冷却状態となっていることが明らかとなった。また、いずれのイオン液体も、250 °C 程度までは加熱しても重量損失が見られず、熱安定性に優れた液体であることも認められた。

Table 1. Thermal properties of 1-ethyl-3-methylimidazolium salts

Anions	T_g / °C	T_{dec} / °C
[(MeO)(H)PO ₂]	-86	278
[(EtO)(H)PO ₂]	-79	266
[(i-PrO)(H)PO ₂]	-71	256
[(n-BuO)(H)PO ₂]	-77	259

次に、作製したイオン液体の極性、特に水素結合能を Kamlet-Taft パラメータにより評価した(表 2)。得られたイオン液体はいずれも高い水素結合受容性 (β) を示した。また、水素結合供与性 (α)はいずれのイオン液体もほぼ同等の値であった。また双極性(π^*)はアニオン

の側鎖構造によって異なり、アニオンの側鎖長の伸長に伴って低下した。これはイオン密度の低下に起因するものと考えられる。

Table 2. Kamlet-Taft parameters of 1-ethyl-3-methylimidazolium salts

Anions	α	β	π^*
[(MeO)(H)PO ₂]	0.52	1.00	1.06
[(EtO)(H)PO ₂]	0.55	1.02	1.02
[(<i>i</i> -PrO)(H)PO ₂]	0.55	1.03	1.00
[(<i>n</i> -BuO)(H)PO ₂]	0.56	1.06	0.97

低温、短時間で、効率よくセルロースを溶解する際には、イオン液体の粘度も重要な因子になる。今回新規に作製したイオン液体の粘度は、アニオン側鎖のアルキル鎖長の伸長に伴い増大した。(図 2)。

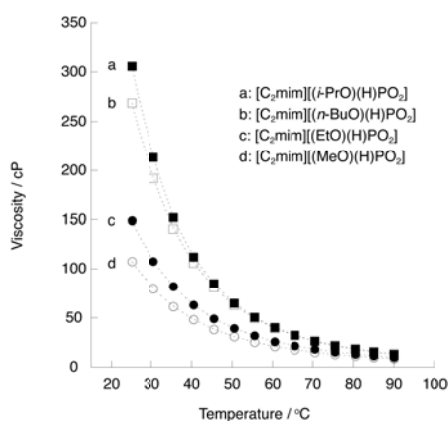


Figure 2. Viscosity of a series of ionic liquids

次いで作製したこれらのイオン液体を用いたバイオマスからの多糖類抽出を試みた。バイオマスとしては主に小麦外皮(ブラン)を用いて検討を行った。イオン液体(1.9g)とブラン粉末(0.1g)を窒素雰囲気下で混合し、所定温度で所定時間の攪拌を行った。まず [C₂mim][(MeO)(H)PO₂] にブランを 5 wt% となるように混合し、50 °C で攪拌を行った。ブラン粉末を完全に溶解することはできなかった(図 3-2)。ブラン粉末はセルロース、ヘミセルロース、及びリグニンの高分子複合体である。これらの成分中、リグニンは難溶性であるため、均一透明な溶液を得ることができなかったものと考えられる。そこで、ガラスフィルターを用いて不溶部分を濾別し、回収したイオン液体溶液(Xg)(図 3-3)に過剰量の温エタノールを添加し、攪拌した。その結果、白色沈殿の析出が見られた(図 3-4)。析出した成分

を濾過により回収し、繰り返し温エタノールで洗浄した。回収した粉末を減圧下、80 °C で12 時間加熱真空乾燥した後、重量(Yg)を測定した。抽出率(Degree of extraction)は以下の式より求めた。

$$\text{Degree of extraction (\%)} = [Y/(X-Y) \times 1.9] / 0.1 \times 100$$

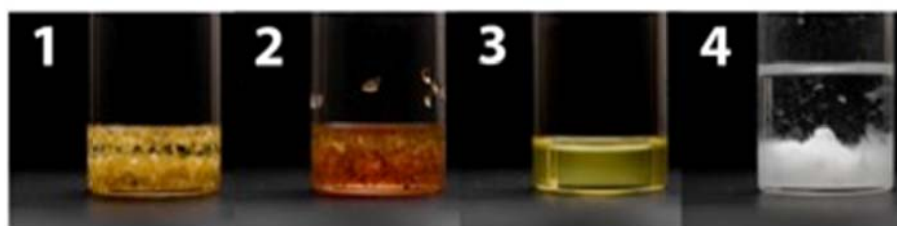


Figure 3. Extraction of polysaccharides from bran with ionic liquids

1) IL/bran mixture 2) After heating 3) Filtrate 4) Precipitate

回収した沈殿物を乾燥後、重量を測定し、多糖類の抽出率を算出した。結果を図4に示す。ブランからの多糖類抽出率は用いたアニオン種によって異なり、低粘性のイオン液体ほど高い抽出率を示す傾向が見られ、今回用いた中で最も低粘性の[C₂mim][[(MeO)(H)PO₂]]では50 °C、30分で29 %の多糖類を抽出できた。

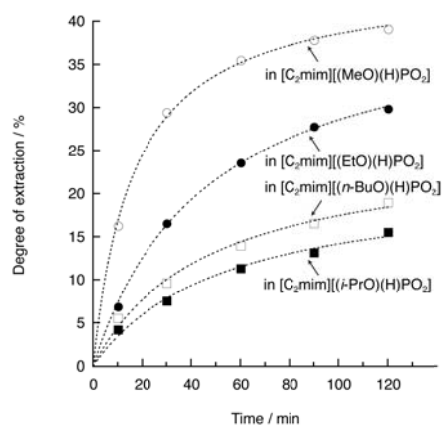


Figure 4. Degree of extraction of polysaccharides from bran with a series of ILs

一連の検討で得られた傾向から、より低粘性のイオン液体を作製すれば、多糖類を更に効率よく抽出できるものと期待された。そこで、プロトン側鎖に有する次亜リン酸アニオンを用いてイオン液体(図5)を新規に作製した。

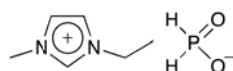


Figure 5. Chemical structure of $[\text{C}_2\text{mim}][\text{H}_2\text{PO}_2]$

作製した $[\text{C}_2\text{mim}][\text{H}_2\text{PO}_2]$ は融点が $17\text{ }^\circ\text{C}$ の室温で液体の塩として得られた。また、 $260\text{ }^\circ\text{C}$ 程度まで熱安定性を有することも明らかとなった。また、作製した次亜リン酸塩の水素結合能等を算出した結果、新規に作成した $[\text{C}_2\text{mim}][\text{H}_2\text{PO}_2]$ は、他の亜リン酸誘導体塩と比較し、水素結合受容性が若干低下していた。これは、側鎖構造の電子供与性の違いに起因するものと考えられる。しかしながら、 β 値が 0.97 と一般的なイオン液体と比較して高く、セルロースを溶解する際には十分な水素結合受容性有していることが明らかとなった。

Table 3. Physico-chemical properties of 1-ethyl-3-methylimidazolium phosphinate

Ionic liquid	T_m	T_{dec}	α	β	π^*
$[\text{C}_2\text{mim}][\text{H}_2\text{PO}_2]$	17	260	0.52	0.97	1.09

Unit for T_m and T_{dec} is $^\circ\text{C}$.

$[\text{C}_2\text{mim}][\text{H}_2\text{PO}_2]$ の粘性は今回評価したイオン液体の中で最も低く、室温においても約 65 cP であった(図 6)。極性の発現は相互作用の発現を伴うため、一般的にイオン液体の粘性は増大する。そのため、このイオン液体は極性が高い割には低粘度のイオン液体に分類される。

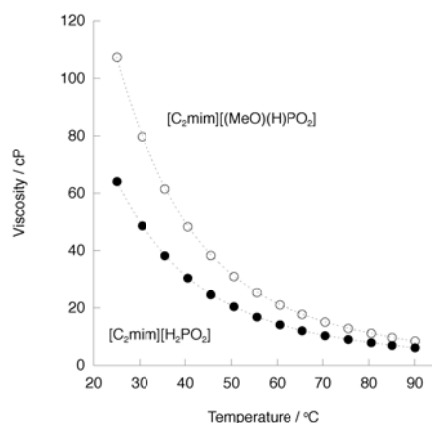


Figure 6. Viscosity of $[\text{C}_2\text{mim}][\text{H}_2\text{PO}_2]$ and $[\text{C}_2\text{mim}][(\text{MeO})(\text{H})\text{PO}_2]$

以上の結果から、新規に作製した $[\text{C}_2\text{mim}][\text{H}_2\text{PO}_2]$ は、従来系よりも低熱エネルギーで多糖類を抽出できると期待された。そこで次に、次亜リン酸塩を用いて 50°C でブランからの多糖類抽出を検討した。その結果、 $[\text{C}_2\text{mim}][\text{H}_2\text{PO}_2]$ の抽出能はこれまで最も高い多糖類抽出能を示した $[\text{C}_2\text{mim}][(\text{MeO})(\text{H})\text{PO}_2]$ よりも高く、30分の攪拌で32%、2時間の攪拌では41%もの多糖類が抽出できた(図7)。次に、これら2種類のイオン液体を用い、非加熱下での多糖類抽出を試みた。検討の結果、これらのイオン液体も常温常圧でブランから10%以上の多糖類を抽出する能力を有していることが確認できた。特に $[\text{C}_2\text{mim}][\text{H}_2\text{PO}_2]$ は14%もの抽出率を示した。前述したように、 $[\text{C}_2\text{mim}][\text{H}_2\text{PO}_2]$ が他のイオン液体よりも低い粘性を示すため、ブラン粉末が効率よく分散し、短時間内により多くの多糖類が溶解できたものと考えられる。

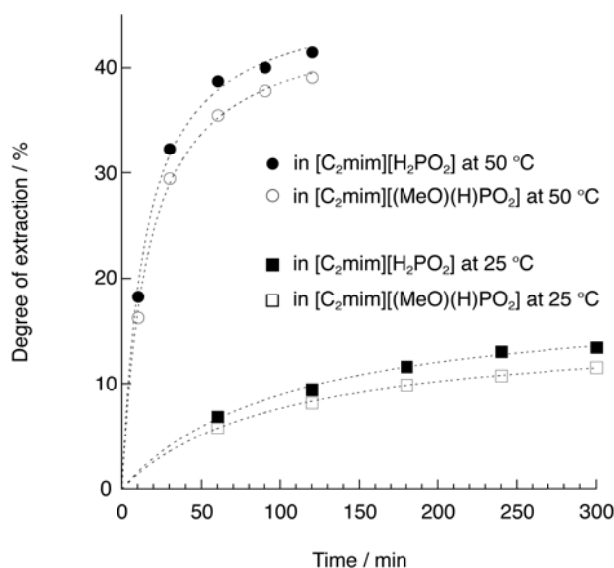


Figure 7. Extraction of polysaccharides from bran with $[\text{C}_2\text{mim}][\text{H}_2\text{PO}_2]$ and $[\text{C}_2\text{mim}][(\text{MeO})(\text{H})\text{PO}_2]$

3. セルロースの酵素加水分解

セルロースは、グルコースが β -1,4結合でつながった多糖類である。このセルロースを加水分解できれば、デンプンから得ると同様にグルコースが得られる。しかしながら、セルロースは、分子内、分子鎖間で形成している多重の水素結合により、強固な結晶構造、集合構造を形成しているため、セルロースの抽出と加水分解は容易ではない。

我々は前項で述べたようにセルロースを均一溶解できる極性イオン液体を開発し、それらを用いて天然バイオマスから多糖類を穏和な条件で抽出できることを明らかにしてきた。これらのイオン液体を溶媒として用いると、セルロースを誘導体化せずに溶解でき、セルロースの結晶構造も乱すことができる。そのため、イオン液体中でのセルロースの加水分解反応が行えれば、エネルギー抽出に大いに寄与する。本研究では、i) 再生セルロースを作製し、酵素反応させる方法及び、ii) 直接セルロース溶液に酵素を添加する方法でセルロースの酵素分解を試みた。

3-1. 再生セルロースの加水分解

我々が新規に開発した 1-ethyl-3-methylimidazolium methylphosphite ($[\text{C}_2\text{mim}][(\text{MeO})\text{HPO}_2]$) は誘導体化、分子量低下を伴わずにセルロースを溶解できる。前述したように、イオン液体に溶解したセルロースはアルコール類などの貧溶媒を添加することによって容易に析出させることができる。イオン液体溶液から再生させたセルロースの X 線結晶解析を行った結果、溶解前に見られたセルロース I 型の結晶構造が再生後には見られず、アモルファスな状態になっていることを認めた。そこで、この再生セルロース(10 mg)をリン酸バッファー(0.5 ml)に分散させ、セルラーゼ(3 mg)を添加して加水分解を試みた。反応は 50 °C にて 90 分間行った。生成グルコース濃度は GOD-ムタロターゼ法によって求めた。

イオン液体で再生したセルロース粉末の分解効率は、再生前のセルロースと比較して大幅に向上し、1.5 倍以上のグルコース生成が見られた(表 4)。

Table 4. Glucose concentration obtained by the hydrolysis of regenerated cellulose

Solvents used for pretreatment	Glucose concentration [mg/dL]
$[\text{C}_2\text{mim}][(\text{MeO})(\text{H})\text{PO}_2]$	36.1
Buffer	19.1

同様に、 $[\text{C}_2\text{mim}][(\text{MeO})(\text{H})\text{PO}_2]$ を用いて植物バイオマスを前処理し、抽出したセルロース成分の分解を行い、生成グルコース濃度の測定を行った。

Table 5. Generated glucose concentration; Effect of pretreatment with ionic liquids

Sample	Glucose concentration [mg/dL]
Regenerated cellulose	26.1
Untreated bran	2.31

検討の結果、未処理のブラン粉末と比較し、イオン液体で前処理(溶解・再生)を行うことで、10倍以上のグルコースを生成させることができた(表 5)。本研究により作製したイオン液体は、低温、場合によっては非加熱でバイオマス中のセルロースを抽出できるため、従来の酸処理や爆砕処理などの前処理方法と比較し、低コスト、高効率なバイオマス処理系の構築につながるものと期待できる。

3-2. イオン液体/水混合溶媒中でのセルロースの酵素糖化

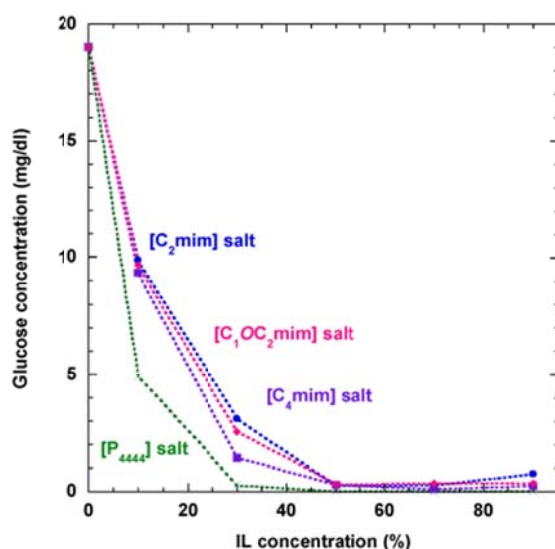
前述したようにセルロースはイオン液体中で分子分散した状態で溶解することが明らかとなっている。そこで、セルロースをイオン液体に溶解した後、イオン液体溶液中で酵素反応させることができれば、より効率的なセルロースの処理系が構築できる。加水分解には水が必要なため、イオン液体に水を添加した系において、セルラーゼを用いた酵素糖化を試みた。

各種イオン液体に所定量のクエン酸バッファーを添加し、イオン液体濃度を 10~90wt% となるように調整した。反応溶液(0.5ml)にセルロースパウダー(10mg)及びセルラーゼ(3mg)を添加し、50 °C にて 90 分間反応を行った。生成グルコース量は GOD-ムタローゼ法により決定した。

[C₂mim][(MeO)(H)PO₂]を用い、水添加系でのセルロースの糖化を試みた。残念なことに、イオン液体濃度の上昇に伴って生成グルコース量が低下した。[C₂mim][(MeO)(H)PO₂]と同様にセルロース溶解能を有する[C₂mim]Clを用いて検討したところ、[C₂mim][(MeO)(H)PO₂]を用いた場合と同様に、イオン濃度の増加に伴って酵素活性が低下する傾向が見られた。一方、水素結合受容性(β 値)が低く、セルロースを溶解しない *N*-エチル-*N'*-メチルイミダゾリウム メチル硫酸塩([C₂mim][MeOSO₃])を用いて検討したところ、[(MeO)(H)PO₂]塩及び Cl 塩と比較して高い酵素活性を示した。セルロースの溶解には、セルロース分子内および分子間で形成される水素結合を切断する必要があるため、イオン液体に高い β 値が必要となる。そのためセルラーゼに対しても強く水素結合し、酵素活性発現に不可欠な高次構造が乱れ活性が低下したものと考えられる。

また、カチオン構造がセルラーゼ活性に及ぼす影響について検討した(図 8)。検討の結果、カチオン構造によってもセルラーゼ活性に差異が見られた。イオン液体濃度の増加に伴っ

て酵素活性が減少したものの、 $[\text{C}_2\text{mim}][(\text{MeO})(\text{H})\text{PO}_2]$ を用いた場合のみイオン液体の含有率が 90wt%の場合に生成グルコース濃度の増大が見られた。 $[\text{C}_2\text{mim}][(\text{MeO})(\text{H})\text{PO}_2]$ を用いた場合には、水を 10%程度添加した系においてもセルロースが溶解する。そのため、セルロースの結晶性が低下し、セルラーゼの残存活性による分解が起こった可能性がある。作製したイオン液体のうち、セルロース溶解能を持たない $[\text{P}_{4444}][(\text{MeO})(\text{H})\text{PO}_2]$ を用いた場合、他のイオン液体と比較してセルラーゼ活性が低下した。そのため、イオン液体溶液中でのセルロースの加水分解には、適切なカチオン構造の設計も重要であることが示唆された。



S

以上のように、ネイティブのセルラーゼを用いてイオン液体中で加水分解を行った際に、イオン液体濃度の上昇によってセルラーゼ活性の低下が見られた。そこでセルラーゼを担体に固定化し、イオン液体中での安定化を試みた。セルラーゼの固定化担体としてアクリル系ポリマービーズ及びセラミックビーズの3種を用いた。セルラーゼの固定化は、いずれも固定化担体及びセルラーゼのアミノ基と架橋剤であるグルタルアルデヒドのアルデヒド基とのSchiff塩基生成反応を利用して行った。

含水率 10 wt%の $[\text{C}_2\text{mim}][(\text{MeO})(\text{H})\text{PO}_2]$ を用い、50 °Cにて3時間、セルロースの加水分解反応を行った。表 6 に各担体に固定化されたセルラーゼ 1 mg あたりが生成するグルコース濃度及び固定化していない未修飾セルラーゼ 1 mg の酵素活性を 1.0 とした場合の相対活性を示した。一方、セラミックビーズ、アクリルビーズに固定化したセルラーゼを用いた場合、イオン液体に 10wt%の水を添加した混合溶液中において、固定したセルラーゼは未修飾セルラーゼと比較して 9 倍の酵素活性を示した。このことから、担体に固定化すること

でイオン液体中におけるセルラーゼの安定性を向上させ、イオン液体へ溶解した結晶構造が乱れたセルロースの加水分解反応を進めることが期待できる。

Table 6. Relative activity of immobilized cellulase in IL/Water (90/10 [w/w])

Carriers	Glucose concentration (mg/dl)	Relative activity
Acryl beads	2.3	9.2
Ceramic beads	1.4	5.6
Free (unmodified)	0.25	1.0

次に、作製した固定化セルラーゼの安定性に関して検討を行った。バッファー及び含水率10wt%のイオン液体0.5mLにアクリルビーズ固定化セルラーゼ10mgを添加し、25 °Cにて1.5、6、12及び24時間攪拌した。その後、純水及びクエン酸バッファーで洗浄し、吸引濾過により固定化セルラーゼを取り出した。得られた固定化セルラーゼを各溶液に再び添加し、セルロース10mgを加えて50 °Cで1.5時間反応させた。反応後、グルコースC IIテストにより生成グルコース濃度を測定し、セルラーゼ活性を評価した。図9に、セルロース添加前に攪拌を行っていない場合の活性を100とした時のセルラーゼの残存活性を示した。

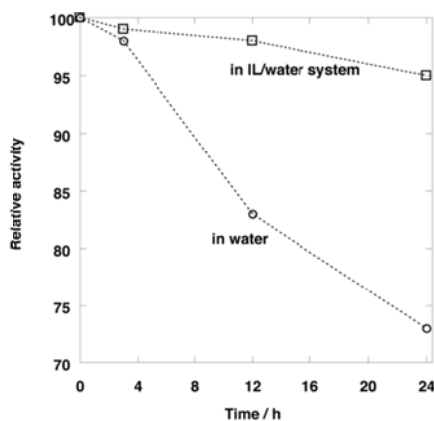


Figure 9. Stability of immobilized cellulase at 25 °C in buffer (○) and IL/water mixture (□).

検討の結果、アクリルビーズ固定化セルラーゼは、バッファー中では時間と共にセルラーゼ活性が低下するのに対し、イオン液体/水混合溶液中では24時間後も90%以上の活性を保持していることが明らかとなった。両者の比較から、水系におけるセルラーゼ活性の低

下は、主にセルラーゼと担体とを結合する架橋剤のグルタルアルデヒドが加水分解を受け、セルラーゼが脱離することが主な原因であろう。

4. イオン液体を展開溶媒とした液体クロマトグラフィーの開発

セルロースの加水分解反応を評価する際には、加水分解によって生成したグルコースやセロビオースなど溶媒に可溶性成分を HPLC によって解析する方法や、生成したグルコースをムタロターゼ・GOD 法を用いて解析する方法が用いられている。しかしながら、グルコース等の低分子化合物の生成のみを追跡する方法では、セルロースの分子量変化についての詳細な情報を得ることができない。高分子量のセルロースを分析する方法論として、分子性液体に可溶性セルロース誘導体を作製し、HPLC で用いられる溶媒に溶解させて測定する方法や、セルロースを溶解することが報告されているジメチルアセトアミド/LiCl を展開溶媒とした HPLC を用いて解析する方法が提案されている。しかしながら、これらの既知の方法では、イオン液体中での反応後、生成物を分離して誘導体化する操作や、各種塩溶液に再溶解するという煩雑な操作を必要とする。そのため、イオン液体中でのセルロースの分子量変化をダイナミックに測定する方法論として適切ではない。イオン液体を HPLC の移動相として用いることができれば、イオン液体中でセルロースを分解し、分子量変化をダイレクトにモニタリング可能である。しかしながら、イオン液体を HPLC の移動相として用いる検討はこれまで行われておらず、イオン液体を移動相とした場合のサイズ排除効果や装置のセットアップ、測定条件などの詳細な情報は全くないのが現状である。そこで本研究では、セルロース溶解能を有するイオン液体を HPLC の移動相とした HPLC システム(以下 HPILC と省略)をセットアップし、セルロースの分子量を解析する新たな方法論の確立に向けた基礎知見の集積を行った。

イオン液体を展開溶媒とする際には、①セルロースを温和な条件で溶解できるイオン液体、②低粘性のイオン液体、③高純度のイオン液体を簡便に作成できること、④セルロースを化学的に変性させないことが求められる。このような要求を満たすことのできる溶媒として、今回は、1-ethyl-3-methylimidazolium methylphosphonate ($[C_2mim][[(MeO)(H)PO_2]$)を選択した。このイオン液体の粘度は室温で約 100 cP であり、一般的な HPLC の測定で用いられている分子性液体と比較すると高粘度である。そこで、市販されている各種 HPLC システムの中で高耐圧システムを選択した。それでも室温での送液は現状のシステムの耐圧と送液速度の限界から不可能であった。そこで、ポンプからカラムまでを 55 °C に保ち、RI 検出器を 40 °C で保温したところ、送液速度を 0.01 ml/min に設定することで、イオン液体でも送液可能であることを実証した。この系では適切な操作で試料を除けばイオン液体を再利用できる(図 10)

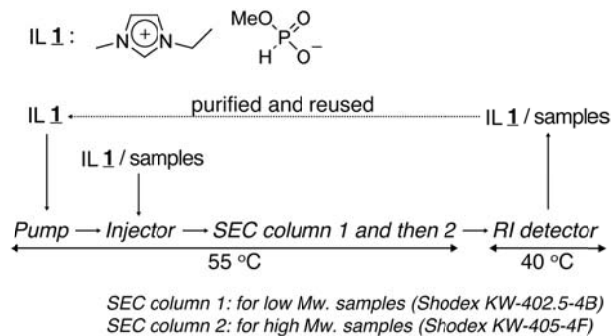


Figure 10. Flowchart of HPILC used in this study

次に、汎用されている標準物質を用いて、イオン液体を展開溶媒とした時もカラムのサイズ排除効果が出現するのか確認を行った。本検討で用いたイオン液体(IL1)はセルロースのみならず様々な種類の多糖類を溶解することができる。そこで、一般的な HPLC の測定で用いられている標準物質の中から、今回はプルランを選択した。まず、分子量の異なる種々のプルランスタンダードを 0.5 wt% となるように混合し、室温付近で攪拌した。その結果、いずれの分子量のプルランも溶解できることを確認した。

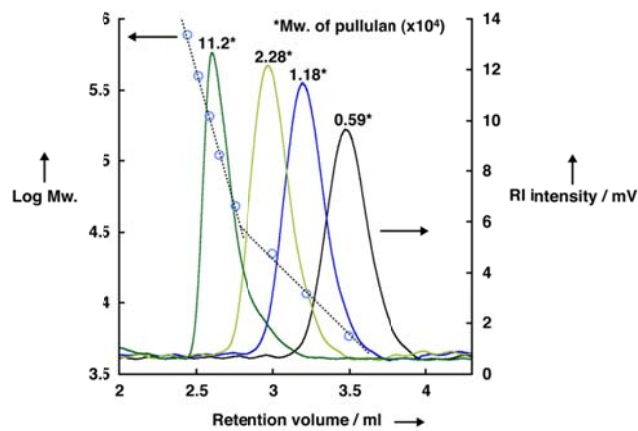


Figure 11. SEC elution patterns and calibration curve of pullulan standards in IL 1.

イオン液体へ溶解させている間に分解などが起こる可能性もある。そこでプルランの分子量に及ぼす影響に関して検討した。プルランが溶解しているイオン液体溶液を室温で 50 日間保存し、その後、エタノールを過剰量添加することで溶解しているプルランを析出させた。得られたプルラン試料を水に溶解させ、水を移動相とした HPLC を用いて分子量分布の測定を行った。イオン液体溶液から再生したプルラン試料は、溶解前のピークと比較し変化が無く、イオン液体へ溶解させ、2 ヶ月程度保存してもプルランの分子量に影響は与えず、プルランを標準試料として用いることができることを確認した。

次にイオン液体を移動相とした HPLC で、プルランのイオン液体溶液を解析した。その結果、プルランの分子量に応じてピークがよく分離し、分子量の大きいものほど短時間で溶出した(図 11)。これは、水などの分子性溶媒を用いた HPLC で解析した場合と同様であり、イオン液体を移動相とした場合であってもサイズ排除効果によるサンプルの分離が可能であることが示された。

そこで次に、各種セルロースをイオン液体に溶解させ、イオン液体を移動相とする HPLC システムを用いて解析した。検討の結果、用いたセルロース試料の分子量に応じて溶出体積が異なり、プルランの場合と同様にサイズ排除効果によるセルロース分子量の解析が可能であることが示された(図 12)。

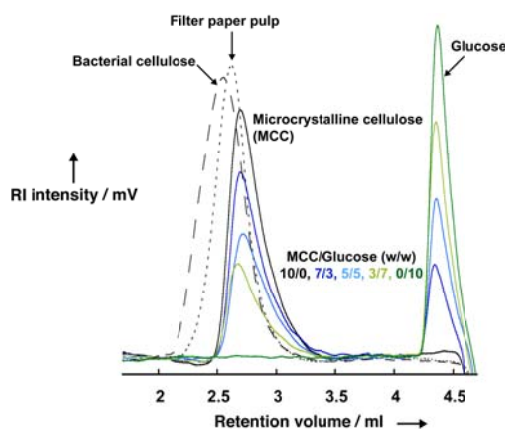


Figure 12. SEC elution patterns of a series of cellulose and cellulose/glucose mixtures.

さらに、セルロースの加水分解のモデルである高分子セルロースとグルコースの混合組成を変えた試料を作製し、HPLC で解析を行った。検討した結果、図 12 と図 13 に示すよう

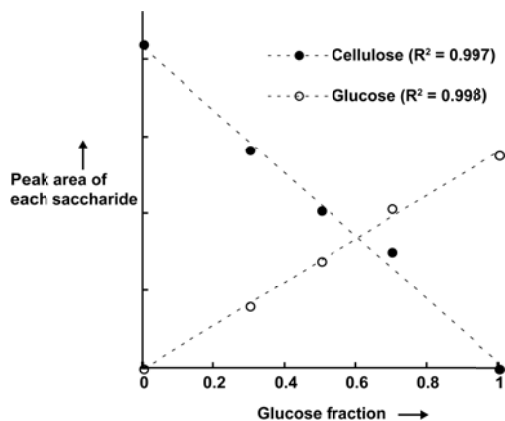


Figure 13. Relationship between peak areas and the composition of cellulose/glucose.

に、ピーク面積と組成比の間に良い相関関係が見られ、混合試料の解析が行えることも併せて明らかとした。

以上の結果から、セルロースなどの多糖類溶解能を有する極性イオン液体を移動相として用いた本 HPILC システムは、セルロース類の分析のみならず、加水分解などのダイナミックな解析にも利用できることが期待される。

5. イオン液体中でのグルコースの酵素酸化

我々はこれまでに、極性イオン液体を設計し、植物バイオマスからセルロースなどの多糖類を抽出し、セルラーゼを用いた酵素加水分解を試みてきた。加水分解により得られたグルコースをそのままイオン液体中で酸化することができれば、植物バイオマスを投入するだけで電気エネルギーを生成するバイオ燃料電池の構築につながる。本研究では、第 3 番目の課題を達成させるために重要なグルコース酸化電極の設計を行った。グルコース酸化触媒としては、酵素や、金ナノ粒子が考えられる。今回はグルコースオキシダーゼ(GOD)に着目し高濃度 IL 中でのグルコース酸化を行った。一般的に、極性 IL のセルロース溶解能は水を添加すると低下するが水が少ない条件では、GOD が触媒活性を失ってしまう。そこで、低含水率でも GOD が活性を維持できる極性イオン液体の設計を行った。まず、1-ethyl-3-methylimidazolium methylphosphonate ($[\text{C}_2\text{mim}][(\text{MeO})(\text{H})\text{PO}_2]$)が、室温でセルロースの溶解性を示すことに着目し、アニオンをメチル亜リン酸に固定し、種々のカチオンを有するイオン液体を作製した(図 14)。これらのイオン液体を用いて含水量をできるだけ少なくできる条件下で GOD の活性を維持するカチオン構造の探索を行った。

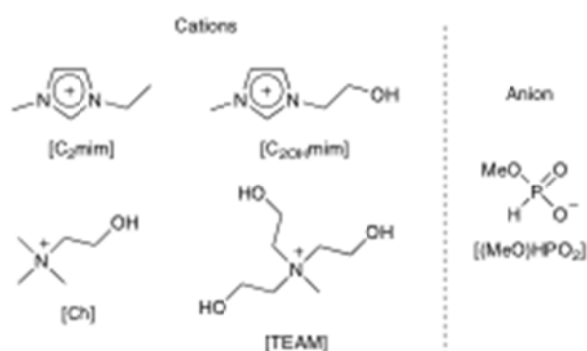


Figure 14. Chemical structure of ILs evaluated here

種々のイオン液体と pH7.0 の 0.05 M リン酸緩衝液を所定の比率で混合し、メディエーターとして *p*-toluquinone、基質の D-glucose、酵素である GOD をそれぞれ 1 mM、100 mM、5 mg/ml となるように溶解させた。作製した溶液をセルに入れ、作用極に PFC 電極、対極に

Pt 線、参照極に Ag 線を用いて CV 測定を行った。

[C₂mim][(MeO)HPO₂]を用いた際にはイオン液体の 1 イオンペアに対して水を 8 分子水和させた系において明瞭な酸化還元電位が観測されたものの、水を 7 分子水和した状態(含水率 42%)では GOD 活性が観測されなかった。一方で、イミダゾリウムカチオンの側鎖に水酸基を導入した[C_{2OH}mim]塩を用いた際には 1 イオンペアに対して 4 分子の水を添加した時(含水率 25%)においても GOD によるグルコースの酸化が観測された。以上の結果から、イオン構造に水酸基を導入することによって、より低含水率時においても GOD の酵素活性が維持されることが強く示唆された。セルロースの溶解性を考慮すると、より低含水率の条件において GOD の活性が保持される系が望ましい。そこで、水酸基を導入した他のカチオンを用いてイオン液体を作製し、カチオン構造が GOD 活性に及ぼす影響について検討を行った。

水酸基を 1 つ有するコリン塩([Ch][(MeO)HPO₂])、及び 3 つの水酸基を有するトリエタノールメチルアンモニウム塩([TEAM][(MeO)HPO₂])を作製し、これらのイオン液体中での GOD によるグルコースの酸化を行ったところ、[Ch][(MeO)HPO₂]では 1 イオンペアに対して 7 分子の水を添加した系(含水率 39%)で活性を示したのに対し、[TEAM][(MeO)HPO₂]を用いた場合は 3 分子の水を加えた状態(含水率 17%)においても GOD の活性を維持できることが明らかとなった。

メチル亜リン酸アニオンを有する種々のイオン液体を作製し、カチオン構造と GOD が活性を維持できる最少含水率を評価した結果、複数の水酸基を導入した[TEAM]カチオンを用いた系で低含水率時においても GOD が活性を示すことが明らかとなった。そこで次に、[TEAM]カチオンと種々のアニオンを組み合わせさせたイオン液体(図 15)を作製し、アニオン種が GOD 活性にあたる影響について検討を行った。

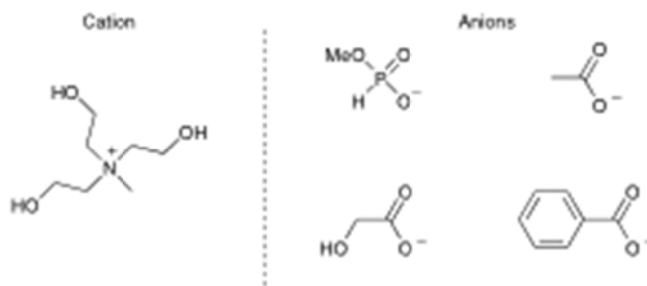


Figure 15. Chemical structure of ILs evaluated here

[TEAM]はカチオン内に 3 個の水酸基を有し、水素結合の寄与により粘性が高い。そのため通常の CV 測定では明確な応答を追跡することは難しい。そこで今回は

2,6-dichloroindophenol sodium (DCIP)を用いて GOD の活性を評価した。DCIP は酸化体では青色で最大吸収波長を 600nm 付近に示すが、電子を受け取って還元体になると無色になる(図 16)。従って GOD によりグルコースが酸化されれば、600nm 付近の吸光度が低下する。DCIP、GOD、D-glucose をそれぞれ 10mM、1mM、100mM となるよう溶解させ、UV 測定から GOD の活性評価を行った。

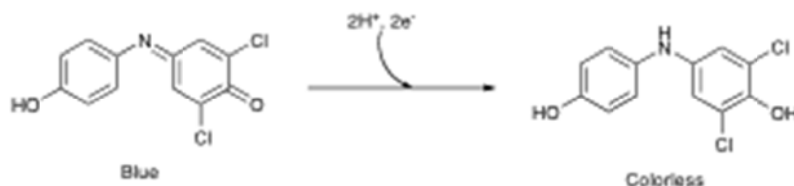


Figure 16. Reaction scheme of DCIP

新規に作製した 3 種のカルボン酸塩及びメチル亜リン酸塩を溶媒として用い、GOD によるグルコースの酸化を行った結果、いずれのカルボン酸塩も 1 イオンペアに対して水を 1 分子水和した系(含水率: 酢酸塩(8wt%)、グリコール酸塩(7 wt%)、安息香酸塩(6 wt%))においても GOD による酸化が見られた。この結果から、カルボン酸塩を用いることで、より低含水率の条件(10wt%以下)でも、GOD の活性が確認できた。含水量 10 wt %以下のイオン液体中でのグルコース酸化反応を酵素によって行うことができた例は今までになく、ワンポット発電システムを支える新規イオン液体の開発のための当初の計画を達成することができた。

6. まとめ

再生可能な植物バイオマスの有効利用、特に化石燃料に代わる新たなエネルギー資源としての利用は、21 世紀で最も注目されるべきテクノロジーである。本特別研究では、イオン液体の設計を通じ、植物バイオマスを低熱エネルギーで処理できる極性イオン液体の新規開発に成功した。更に、溶解したセルロースをイオン液体中で穏和な条件で処理し、グルコースなどの有用物質への変換を実証した。セルロース類の分析のみならずセルロースの加水分解を解析する新たな方法論として、イオン液体を展開溶媒とした HPLC システムも併せて提案した。また、イオン液体中でグルコースの酵素酸化反応により電子を抽出できる系の構築を示唆する新規イオン液体群の開発に至った。イオン液体の特徴は構造の多様性である。本特別研究の推進により得られた様々な基礎知見をもとに、溶解のみならずその後の反応に供するための構造要件の解明を進めることにより、イオン液体を用いたバイオマス変換システムの構築も可能であろう。