

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20710059

研究課題名（和文）機能性バイオ素材を用いたセルラーゼの分離回収およびリサイクル利用

研究課題名（英文）Recovery and Recycling of cellulase using a functional biopolymer

研究代表者

野中 寛 (NONAKA HIROSHI)

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：90422881

研究成果の概要（和文）：リグニン由来の機能性バイオ素材「リグノフェノール」を吸着素材として用いるセルラーゼ分離回収、再利用システムを提案し、吸着・脱離性能について検討した。セルラーゼの吸着は、混合攪拌のみで10分以内に飽和吸着量に達し、吸着量は100 mg/g（粗酵素ベース）以上に達した。針葉樹を原料とした方が吸着量は大きく、グルコースによる吸着阻害は認められなかった。pH、塩濃度制御による脱離は困難で、有機溶媒添加による沈殿回収では酵素の溶解性に問題が生じた。吸着回収後、固定化セルラーゼとして利用したとき、ネイティブ酵素の約20～60%の活性を維持し、至適pHの拡大が認められた。

研究成果の概要（英文）：Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass by cellulase has been receiving attention. In this study, recovery and recycling of cellulase were proposed using a functional lignin-based phenolic polymer “lignophenol” as an adsorption carrier. Cellulase was easily immobilized on lignophenol simply by mixing to give water-insoluble cellulase-lignophenol complex. Adsorption capacity of lignophenol from softwood was higher than that from hardwood. The presence of glucose did not change the adsorption capacity. Control of pH and salt concentration did not work effectively for desorption of the cellulase. Precipitation separation of cellulase with organic solvents was possible, but the reuse seemed difficult because of limited solubility to water. Cellulase-lignophenol complex was available as an immobilized cellulase with 20-60% of enzymatic activity of native cellulase with wider optimum pH range.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：バイオマス利用

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：セルラーゼ，セルロース，酵素糖化，吸着回収，バイオエタノール，  
リグノフェノール，リグニン，固定化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

さとうきび（糖系），とうもろこし（デン

ブシ系）等からのバイオエタノール生産が世界的に活発になる一方，これら穀物の値上がりが始まり，食糧生産との競合が早くも顕在

化している。そこで、コーンストーバー（とうもろこしの実以外の茎や葉など）や稲わらなどの農産系廃棄物、さらには資源量の観点から木質系バイオマスが原料として注目されている。これらはリグニンの含有量の差こそあれセルロース系バイオマスであり、原料中のセルロースを加水分解することにより、エタノール発酵のための糖をえる必要がある。

セルラーゼによる酵素加水分解は、酸加水分解と比較して、高選択性、高収率、中和の必要がない、というメリットを有するが、セルラーゼコストが大きな問題であった。近年アメリカの大手2社(Novozyme, Genencore)の企業努力によりセルラーゼの急速な低価格化が進み、酵素法によるセルロース系バイオエタノールに関する基礎研究、実用化研究とも盛んになっており、セルロース系バイオエタノールの大量生産が現実味を帯びてきた。急速なエタノール生産量増加によりセルラーゼ需要の大幅な増大が予想されるなか、セルラーゼコストをさらに低減していくには、セルラーゼの効率的生産以外に、回収・リサイクル技術の開発が必須である。

## 2. 研究の目的

水中に溶存したセルラーゼの吸着回収のための吸着材として、これまでセルロース系素材や無機系材料を使用した研究がある。これに対して、本研究では、リグノセルロースの酵素糖化において、セルラーゼがリグニンに吸着する現象が見出されていることに着目し、リグニン由来の機能性バイオ素材「リグノフェノール」を利用するプロセスを構築する。リグノフェノールは、応募者とともに研究室を運営している船岡正光教授が開発した「相分離系変換システム」(Funaoka and Abe, *Tappi J.*, 1989)により、植物中のリグニンから合成されるバイオ素材の総称で、汎用有機溶媒に可溶、水に不溶、既存のリグニン素材と比較して、たんぱく質に対する高い吸着能が確認されている。合成の際の試料、反応溶媒、反応条件の選択、または、リグノフェノール自身の反応制御により、構造や官能基等の制御(デザイン)が可能なのが最大の利点で、セルラーゼの吸脱着に最適な吸着材を設計により“目指す”ことができる素材である。そこで、本研究では、以下を具体的目的として設定し、新規セルラーゼ分離回収およびリサイクル利用を目指した。

- (1) リグノフェノールに対する、セルラーゼの吸着速度や吸着等温線を明らかにする。
- (2) 酵素加水分解により生成する糖とセルラーゼとの競争吸着(糖による吸着阻害)

を検討する

- (3) 以上試験で優れた性能のリグノフェノールに関して、セルラーゼ脱離条件を見出す。
- (4) リグノフェノールを用いて、セルラーゼを回収し、回収したセルラーゼでセルロースの加水分解が可能かを検証し、問題点を検討する。
- (5) セルラーゼ吸着材に適したリグノフェノールを提示する。

## 3. 研究の方法

### [1] 吸着担体としての機能性バイオ素材・リグノクレゾールの合成と特性解析

ヒノキ及びユーカリ木粉を原料として、サンプルに含まれる抽出成分をアルコール・ベンゼン溶媒抽出にて除去後、相分離系変換システム(濃硫酸、*p*-クレゾール系)を適用し、リグノクレゾールを合成した。GPC, FT-IR, TG, TMA になどより特性解析を行った。

### [2] 機能性バイオ素材によるセルラーゼの吸着試験

バイアル瓶もしくはマイクロチューブ中の酢酸緩衝溶液に、吸着材のリグノクレゾールを超音波分散させた。この状態に所定量のセルラーゼを加え、攪拌を続けることにより、セルラーゼの吸着実験を行った。所定時間混合後遠心分離し、上澄み中に残存するセルラーゼ量をBradford法により定量し、差し引きにより吸着セルラーゼ量を算出した。吸着量の経時変化を測定することにより吸着速度を、セルラーゼ濃度を変化させることにより吸着等温線を得た。

### [3] 糖類によるセルラーゼ吸着阻害試験

グルコースを溶解した緩衝溶液中においてリグノクレゾールを分散させ、同様のセルラーゼ吸着試験を行った。グルコース非存在下との比較により、糖の競争吸着による吸着阻害を明らかにする。

### [4] 機能性バイオ素材上に吸着されたセルラーゼの脱離試験

飽和吸着量のセルラーゼを吸着したリグノクレゾール(セルラーゼ-リグノクレゾール複合体)を、繰り返し酢酸緩衝溶液中に供して、セルラーゼの脱離を確認した。また、セルラーゼの代わりにモデルタンパク質としてBSAを用い、BSA-リグノクレゾール複合体をpH2-12の溶液や異なる塩濃度のNaCl溶液に浸漬した。脱離操作後、遠心分離を行い、溶液中に脱離したタンパク量Bradford法により定量した。リグノクレゾールは有機溶媒に可溶で、セルラーゼは沈殿することを利用して、セルラーゼ-リグノクレゾール複合体に

有機溶媒（アセトン，エタノール，メチルセロソルブ）を加えるセルラーゼの分離回収も行った。

#### [5] 回収セルラーゼの再利用試験

有機溶媒を用いてリグノクレゾールより分離沈殿回収したセルラーゼについて，水への溶解性を確認した。

セルラーゼ-リグノクレゾール複合体に，繊維状 $\alpha$ -セルロース 0.01 g を加え，pH3~11 の溶液中，30-70°C と変化させ，4 時間酵素加水分解反応を行った。遠心分離後上澄み液をろ過し，グルコースキット（WAKO）を用いて生成グルコース量を定量し酵素活性の指標とした。また各条件における Native セルラーゼとの活性を比較した。

#### [6] 機能性バイオ素材の設計

コルベ・シュミット反応によるリグノクレゾールのカルボキシル化，リグノクレゾールの水熱処理による親水的凝集構造への変換を試みた。

### 4. 研究成果

#### [1] セルラーゼの吸着特性

セルラーゼは単純な溶液の攪拌により，機能性バイオ素材・リグノクレゾールに迅速に吸着し，吸着時間 10 分以降は吸着量にほぼ変化が認められなかった。供試セルラーゼ量を増加させると，吸着量は飽和傾向にあり，飽和吸着容量が存在することが明らかになった (Fig. 1)。飽和量に達するまでは，液中セルラーゼ濃度はほぼゼロで，吸着サイトが存在する限りは吸着が進行する，不可逆吸着様の振る舞いを示すことが明らかとなった。

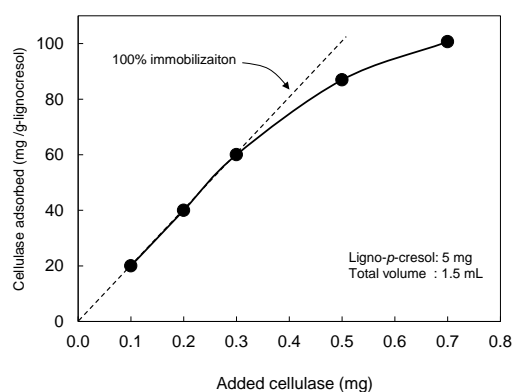


Figure 1. Effect of the added cellulase amount on the immobilization of cellulase on lignocresol.

#### [2] 糖類の吸着への影響

ヒノキ，ユーカリを原料としたリグノクレゾールに対して，二種類のセルラーゼの吸着

試験をグルコース存在下のもと行ったが，吸着量に大きな変化は認められなかった。(Fig. 2, ユーカリリグノクレゾール, *Trichoderma viride* 由来のセルラーゼの組み合わせを除く)

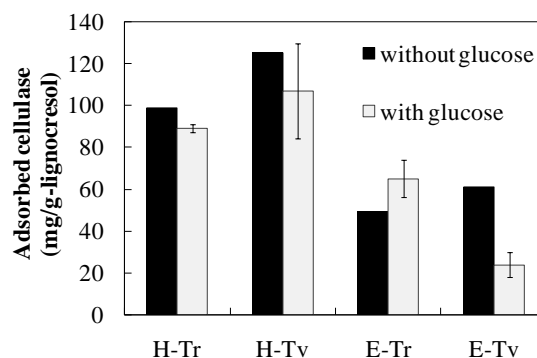


Fig. 2 Adsorption capacities of lignocresols for two cellulases. Lignocresol = H: Hinoki, E: Eucalyptus lignocresol, Cellulase = Tr: *Trichoderma reesei*, Tv: *Trichoderma viride*

#### [3] セルラーゼの脱離特性

セルラーゼを飽和吸着したのちに，酢酸緩衝液に繰り返し浸漬し，その際溶液中に脱離したセルラーゼ量を定量した結果，少しずつ遊離することが確認された (Fig. 3)。

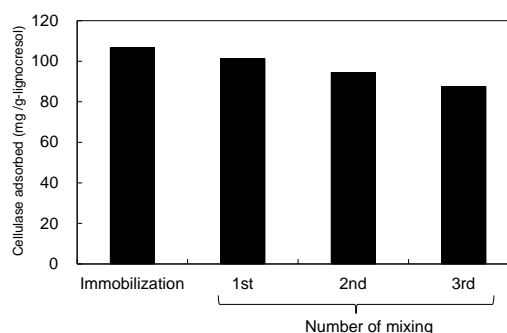


Fig. 3 Detachment of cellulase from lignocresol. Cellulase-lignocresol complex was mixed with acetate buffer three times.

pHや塩濃度の異なる各種溶液中でのBSAを用いたモデル脱離試験では，アルカリ条件で一定量のタンパク質が脱離することが示された。アルカリ環境下でリグノクレゾールのフェノール性水酸基，タンパク質の酸性官能基がイオン化することで両者が反発・遊離した，または吸着複合体自体が水和して遠心分離により回収されなくなったことによると考えられる。しかしながら，以上のいずれもが脱離が不十分であり，脱離法としては不十分であることが明らかとなった。一方，有機溶媒の利用により，リグノクレゾールは溶解し，セルラーゼはほぼ完全に沈殿し，選択的

分離回収が実現された。

#### [4] 回収セルラーゼの再利用

有機溶媒によって沈殿回収したセルラーゼは、酢酸緩衝液にほとんど溶解しなくなっていた。リグノクレゾール非存在下において同様に沈殿回収した Native セルラーゼは溶解したので、リグノクレゾールとの吸着、脱離の間に何らかの変性が生じた可能性について引き続き検討中である。

セルラーゼ-リグノクレゾール複合体を固定化セルラーゼとして再利用したとき、溶存ネイティブセルラーゼに比べて、活性は条件により 20~60%を維持した。固体を基質とする酵素反応において、活性の低下は酵素固定化に伴う接触頻度の低下により通常もたらされる。活性の温度依存性は、ネイティブセルラーゼとほぼ同様であった (Fig. 4) のに対し、至適 pH 領域はやや広がる傾向が確認された (Fig. 5)。今後、本固定化セルラーゼの寿命について検討し、活性低下と併せて総合的に利点欠点を議論することが必要である。

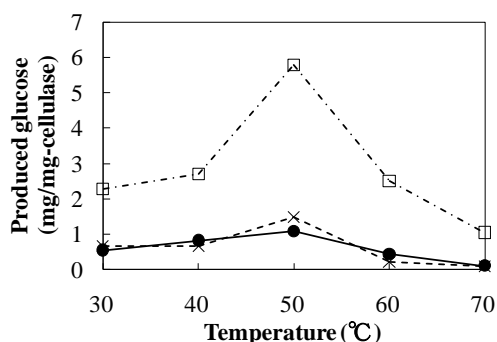


Fig. 4 Difference of the activities of immobilized and native cellulases at different temperatures. ●: Immobilized on Hinoki lignocresol, ×: Immobilized on Eucalyptus lignocresol, □: Native-0.4 mg/mL

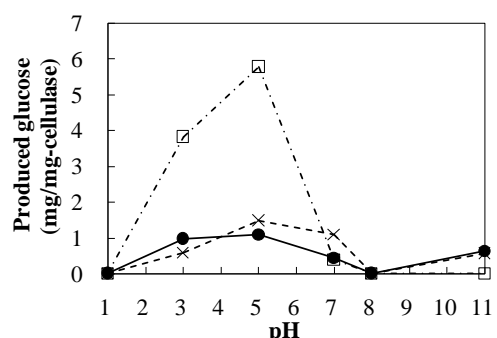


Fig. 5 Difference of the activities of immobilized and native cellulases under different pHs. Each shape demonstrates the same cellulase as shown in Fig. 4.

#### [5] セルラーゼ吸着に適したリグノフェノールの探索

ヒノキよりユーカリを原料としたリグノクレゾールの方がセルラーゼ吸着量が多い (Fig. 2)。一因として、広葉樹リグニンにはフェノール性水酸基の両オルト位にメトキシル基をもつシリングル核が存在し、タンパク質とのアクセシビリティを低下させていることが考えられる。メトキシル基の存在は、むしろリグノクレゾール分子の疎水性を向上させ、水中においてより強く凝集し、分散性の低下、表面積が低下している可能性もある。

カルボキシル基などの親水基はリグノフェノール粒子の分散性向上に寄与することが期待される。コルベ・シュミット反応は、フェノールのカルボキシル化反応として、サリチル酸製造などの工業的なプロセスであり、フェノール系高分子であるリグノフェノールへの適用を狙った。しかし、フェノールのカルボキシル化と同条件ではカルボキシル化できないことが確認され、今後反応に無関与な溶媒の利用、またその媒体への分散性向上を検討する必要がある。

リグノクレゾールの 200°C程度までの緩和な水熱処理では、ベンジル位を介する高分子化が進行した。これらのサンプルは、必ずしも水への分散性が優れず、セルラーゼ吸着量が減少するデータを得た。ベンジル位結合は、リグノクレゾール分子の三次元化に寄与し、分子全体の剛直性をます。結果として水との親和性の低下、分散性の低下を引き起こした可能性がある。

#### 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 4 件)

- ① 野中 寛, 船岡 正光, Hidayah Ariffin, リグノフェノールを担体とする固定化セルラーゼの基礎的特性, *高分子論文集*, 査読有, 68, 掲載決定, 2011
- ② H. Nonaka, M. Funaoka, Decomposition characteristics of softwood lignophenol under hydrothermal conditions, *Biomass and Bioenergy*, 査読有, 35, 1607-11, 2011
- ③ 野中 寛, 船岡 正光, 低温水熱環境下におけるリグノクレゾールの分子応答, *バイオマス科学会議論文集*, 査読無, 6, 116-7, 2011

- ④ H. Nonaka, H. Tanaka, M. Funaoka, Immobilized cellulase using lignophenol: a lignin-based functional phenolic polymer”, *Proceedings of RENEWABLE ENERGY 2010*, 査読無, P-Bm-40, 2010

[学会発表] (計 8 件)

- ① 小林 亜衣・野中 寛・船岡 正光, 「リグノフェノールによるセルラーゼの吸着回収と再利用」, 第 60 回高分子学会年次大会 (大阪) 2011 年 5 月 25 日 (発表確定)
- ② 野中 寛・船岡 正光, 「水熱処理リグノフェノールのタンパク質吸着能」, 第 60 回高分子学会年次大会 (大阪) 2011 年 5 月 25 日 (発表確定)
- ③ 野中 寛・船岡 正光, 「低温水熱環境下におけるリグノクレゾールの分子応答」, 第 6 回バイオマス科学会議 (大阪) 2011 年 1 月 12 日
- ④ 野中 寛・船岡 正光・Hidayah Ariffin, 「リグノフェノールを担体とする固定化セルラーゼの諸特性」, 第 19 回日本エネルギー学会 (東京) 2010/8 月 2 日
- ⑤ H. Nonaka, H. Tanaka, M. Funaoka, 「 Immobilized cellulase using lignophenol: A lignin-based functional phenolic polymer」, 再生可能エネルギー 2010 国際会議(RE2010) (横浜) 2010/6 月 27 日
- ⑥ 野中 寛・倉本 昌也・船岡 正光, 「リグノフェノールのカルボキシル化の検討」, 59 回高分子学会年次大会 (横浜) 2010/5 月 26 日
- ⑦ 野中 寛・花本 和奏・船岡 正光, 「水分散性リグノフェノールによるタンパク質吸着」, 化学工学会第 75 年会 (鹿児島) 2010/3 月 18 日
- ⑧ 野中 寛・田中 宏章・船岡 正光, 「リグノフェノールによるセルラーゼの吸着回収」, 第 18 回日本エネルギー学会大会 (札幌) 2009/ 7 月 30 日

[図書] (計 1 件)

野中 寛, 船岡正光,  
第 4 章-8 セルラーゼの固定化,  
「木質系有機資源の新展開 II」, 船岡正光監

修, シーエムシー出版(2009), pp148-156

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

木質分子素材制御学研究室ホームページ  
<http://www.bio.mie-u.ac.jp/kanky/shinrin/lab5/Japanese/top.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野中 寛 (NONAKA HIROSHI)  
三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授  
研究者番号: 90422881

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者: なし