

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23656486

研究課題名(和文) 界面活性剤によるセルロースのナノ・ミクロ構造の改変と糖化酵素の拡散・吸着の促進

研究課題名(英文) Change of nano and microstructure of cellulose by surfactant treatment and its effect on promotion of diffusion and adsorption of cellulase

研究代表者

迫田 章義 (Sakoda, Akiyoshi)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：30170658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、一部のリグニンを除去したリグノセルロースを、界面活性剤で処理することによって、セルロースフィブリルのナノ・ミクロ構造を変化させることが可能であり、その結果、糖化を高効率化できることを示した。これを実用化するためには、既往の脱リグニン処理との組み合わせが鍵になることに着目し、白色腐朽菌、またはアルカリ処理との組み合わせの可能性を検討したところ、アルカリ処理との組み合わせにおいて、運転条件を緩和することができた。さらには、セミバッチ運転方式との組み合わせを検討したところ、糖化効率を著しく改善可能であることが確認できた。この方法は非常に簡便であり、実用化し易い技術であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was shown that treatment of partially delignified lignocellulose with surfactant significantly enhanced cellulase's accessibility to cellulose fibrils through the changes of cellulose microfibril structure. Since a feasible delignification method is a key for the practical application of this method, the combination of surfactant treatment with biological delignification using a white-rot fungi or alkaline treatment was examined. As a result, the combination of the surfactant treatment with the alkaline treatment allowed the experimental condition to be milder. Hence, a semi-batch saccharification and fermentation system with the surfactant treatment was proposed. It was found that the saccharification efficiency was increased during the semi-batch reaction. Moreover, it was expected that the proposed concept can be practical due to its simplicity.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：酵素糖化 界面活性剤 前処理

1. 研究開始当初の背景

近年、リグノセルロース系バイオマスのバイオ燃料やバイオマテリアルへの活用が期待されている。なかでもセルロースの糖への転化は重要な役割を担っており、その転化率や転化速度を既往の方法に比べて著しく向上することが期待されている。リグノセルロースはリグニン、ヘミセルロース、セルロースが強固に絡みあった構造をしているうえ、セルロース繊維自体もエレメンタリーフィブリル、ミクロフィブリル、マクロフィブリルの三元構造をとることが知られており、このような構造がセルロースの糖化を困難にしている。このためリグノセルロースの強固な構造を物理・化学的に破壊するための前処理が長年の研究課題となってきた。前処理に求められる一般的な役割は、脱リグニン、脱ヘミセルロースによるアクセス可能なセルロース表面の増大、セルロース結晶構造の非結晶化である。しかし、既往の前処理法は大量な薬剤や高温高圧等の過酷な操作を必要とし、実用化技術が確立されている状況には至っていない。

2. 研究の目的

我々はリグノセルロース由来のセルロースに、ある種の界面活性剤を少量長時間作用させることによりセルロースのナノ・ミクロ構造に著しい変化が生じ、セルロース内部への糖化酵素の浸透・拡散が容易になることを発見した。界面活性剤をセルロースミクロフィブリル等に吸着させることにより、そのナノ・ミクロ構造を変化させ、糖化酵素のセルロースへの拡散・吸着を促進させ、従来法に比べて著しく速度も転化率も高い糖化反応を行い、効率的に発酵収率を向上できる一連のプロセスを提案することを最終的な目的としている。

3. 研究の方法

(1) 界面活性剤の添加によるセルロースナノ・ミクロ構造変化の分析

リグニンの含有量が多い松を用いて既往のリグニン除去法に従ってリグニン含有量が異なるリグノセルロース試料を準備した。さらに比較のため、微結晶セルロース(avicel)を用いた。前処理後の酵素や生物反応を考慮して生物毒性の低いかつ取り扱いが容易で安価な非イオン性界面活性剤を用いた。界面活性剤によるセルロース構造への影響を調べるために、SEM、XRD、DSC等の分析法を用いた。

(2) 界面活性剤を用いた前処理の酵素吸着や糖化速度への影響

糖化酵素は市販のセルラーゼ(Celluclast 1.5L)を用いた。糖化酵素による糖化反応を無視できる温度(0~4℃)で、リグノセルロース試料や微結晶セルロースへの糖化酵素の平衡吸着量と吸着速度を計測した。また、吸

着挙動の経時変化を化学工学的に解析し、セルロース内部への糖化酵素の浸透・拡散速度のオーダーを求めた。リグノセルロースの糖化実験では酵素糖化反応を実際に行い、還元糖の生成量を分析した。

(3) 実用化を考慮した他の前処理方との組み合わせについての検討

本研究では界面活性剤処理によるセルロース構造変化に着目しているが、界面活性剤処理だけではリグノセルロース内のセルロースへの糖化酵素のアクセシビリティを大きく改善することは事実上不可能であろうと考えている。そこでリグノセルロース内のセルロースへのアクセシビリティを改善可能な従来の前処理法と界面活性剤処理の組み合わせについて、その有効性を検討した。具体的には、稲わらを対象バイオマスに設定し、白色腐朽菌を用いた固体発酵法による脱リグニン処理と組み合わせた界面活性剤処理の有効性を評価した。さらに、アルカリ前処理の添加剤としての効果についても評価した。

(4) 前処理から糖化・発酵までの一連のプロセスの設計と有効性の検討

(1)、(2)、(3)の研究から得られた知見をに基づき前処理から糖化までの一連のプロセスを提案し、その有効性を評価した。

4. 研究成果

(1) 界面活性剤の添加によるセルロースナノ・ミクロ構造変化

界面活性剤は溶液中の濃度変化や共存質への吸着等の相互作用により液-固、液-気界面においての物質移動性を大きく変化させる性質を持っている。そのためまず、非イオン性界面活性剤である Tween 20 のリグニン含有量が異なるリグノセルロース試料(R: 31.2%、P1:25.9%、P2:15.9%、P3:9%、P4: 4.8%)と微結晶セルロース(avicel)、リグニンへの吸着特性を調べた。

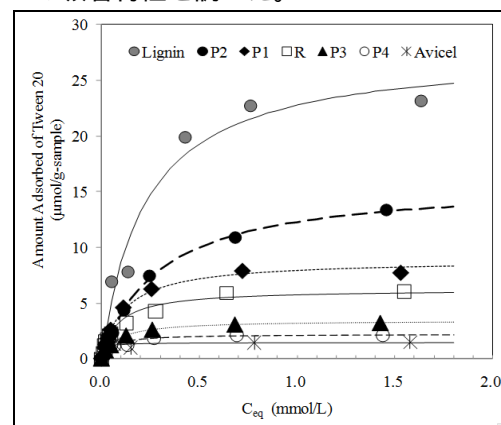


図 1 Tween 20 吸着等温線

その結果を図 1 に示す。Tween 20 はリグニンへの吸着容量はセルロースより高いが、リグニンの存在に関係なく単分子吸着すること

が分かった。P1-4, avicel を 0-8mM の Tween 20 溶液に液固比 50 として投入し常温で 24-48 時間攪拌しながら構造変化をモニタリングした。リグニン含量の高い P1 と 結晶性の高い avicel を除くリグノセルロースにおいて 0.3-3.2 mM の濃度範囲での界面活性剤処理による細胞壁構造変化が見られた。図 2 は前処理前後の P4 の SEM 写真である。

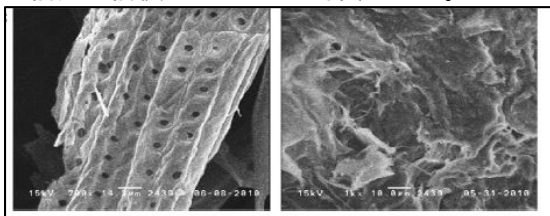


図 2 界面活性剤処理前(左)後(右)の様子

ナノ・マイクロ構造変化を調べるため XRD 分析を行った。XRD 結果を Scherrer 式を用いて解析したところ、界面活性剤による細胞壁の変化はセルロース結晶子サイズに相当するエレメンタリーフィブリル(~10nm 程度)より大きな範囲で起こることが分かった。細孔の中に存在する水の融点を DSC で測定した(図 3)。これを Gibbs-Thomson 式により解析し、界面活性剤処理前後の細孔分布を求めた(図 4)。ここで、各 P1-4 のサンプルについて、界面活性剤処理後のサンプルを P1T-P4T とした。

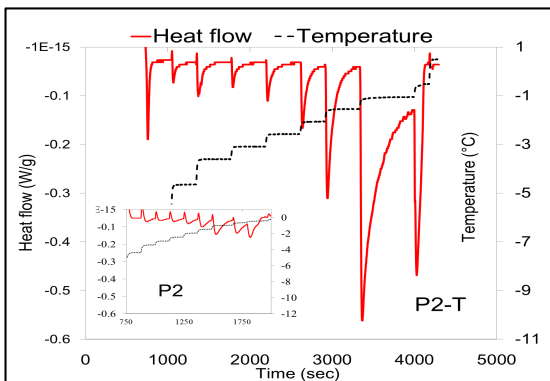


図 3 DSC 分析データ

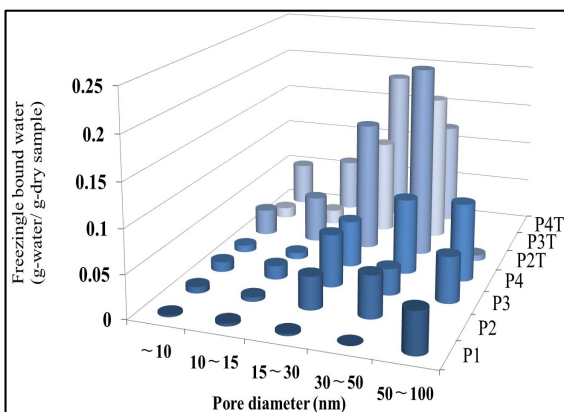


図 4 界面活性剤処理前後の細孔サイズ変化

この結果から、細胞壁の崩壊によってマイクロフィブリル間に 10-50nm の細孔が新たに形成されたことがわかった。さらに細胞壁の崩壊はセルロース還元末端の増加に寄与してい

ることが分かった(図 5)。

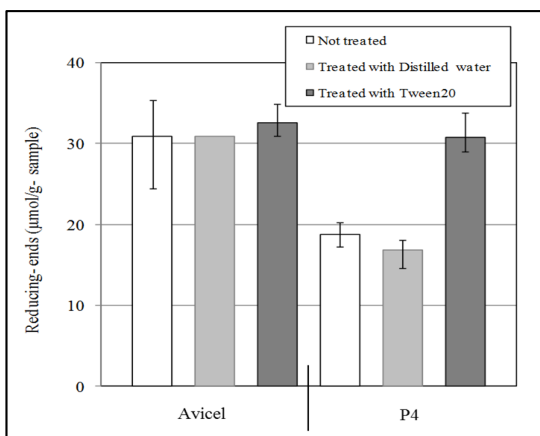


図 5 還元末端濃度の変化

(2) ナノ・マイクロ構造変化が酵素吸着や糖化速度への影響

図 6 には構造変化によるセルラーゼの吸着速度と平衡吸着量の変化を示した。

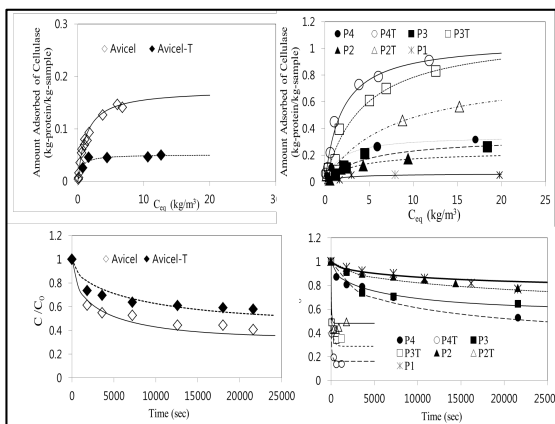


図 6 酵素吸着速度及び吸着等温線

界面活性剤処理で構造が変化したサンプルにおいては最大吸着量が処理前のサンプルのおよそ 3 倍に増加している。しかし、avicel においては界面活性剤の効果はほとんど見られないことがわかった。さらに、半径 r の円筒形セルロースフィブリルを仮定した吸着に伴う酵素のセルロースフィブリル内部拡散モデルを構築し吸着速度を解析したところ、界面活性剤処理で構造が変化したサンプルにおいては吸着速度が最大 880 倍速くなっていた。細胞壁崩壊で形成された 10-50nm の細孔によってセルラーゼのセルロースフィブリル内部への浸透性が著しく改善されたと考えられる。しかし、avicel においては界面活性剤による吸着速度の変化は見られなかったことから界面活性剤による平衡吸着量の低下は外表面のセルラーゼの吸着サイトの一部が界面活性剤によって占められているためだと思われる。糖化反応でも同じく avicel の場合、界面活性剤処理によって糖化率が低下された。しかし、界面活性剤処理で構造が変化したサンプルにおいては糖化率及び糖化速度が著しく改善されたこと

が分かった。(図7)

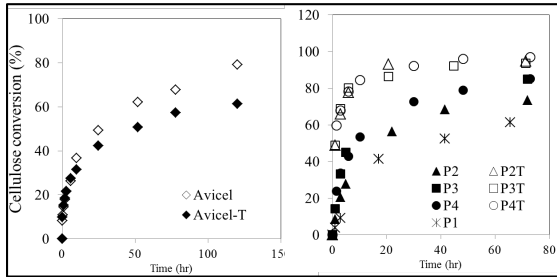


図7 酵素糖化の結果

これらの結果から界面活性剤処理によって酵素のセルロースフィブリルへのアクセシビリティが著しく改善され、効果的な糖化反応が出来ることが確かめられた。しかし、界面活性剤によるリグノセルロースの構造変化のためには先にある程度の脱リグニン処理を行う必要があることも明らかになった。

(3) 白色腐朽菌及びアルカリ前処理と界面活性剤の組み合わせによる運転の検討

そこで選択的な脱リグニン能力を持つと言われている白色腐朽菌(*P. ostreatus*)の一つであるヒラタケを用いた固体発酵法による脱リグニン処理と連係した界面活性剤処理の有効性を評価した。対象バイオマスとして稲わらを用いた。白色腐朽菌はMEA斜面培地(麦芽エキス寒天培地)上で25℃7日培養を行った後、麦芽エキス液体培地で同じ条件で振盪培養を行った。この液体培地をホモジナイザーで均一したものを滅菌済みの稲わら固体培地に接種し、30日間培養しながら稲わらの組成をモニタリングした。その結果を図8に示す。

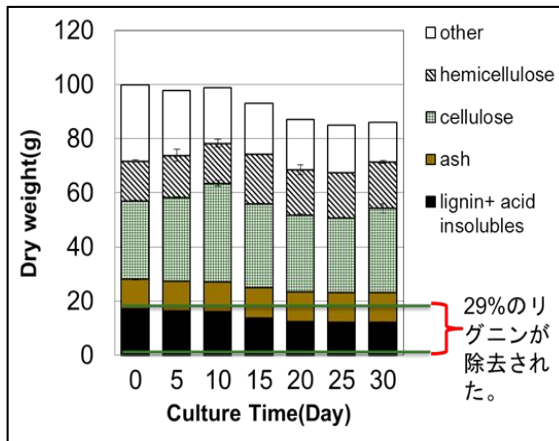


図8 白色腐朽菌処理による稲わら組成の変化

白色腐朽菌によって30日間で凡そ29%のリグニンが除去されたのが分かった。30日培養した稲わらを陰イオン性界面活性剤であるSDS(sodium dodecyl sulfate)と非イオン性界面活性剤 Tween20 で処理した後酵素糖化を行ったが図9に示されているように糖化促進までは至らなかった。

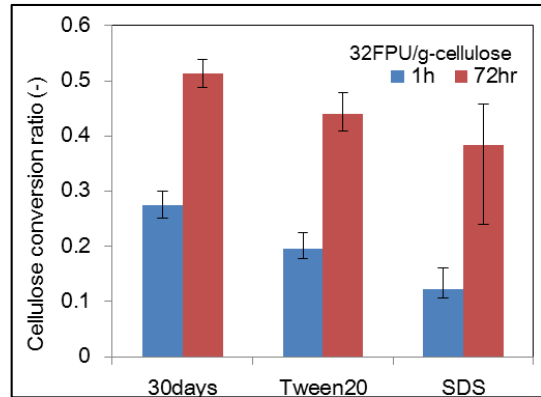


図9 30日培養した稲わらの界面活性剤前後の糖化反応

その原因は化学的脱リグニン法に比べ、表面近傍のリグニンしか除去できないと考えられること、またリグニン除去率が十分ではなかったことに加え、稲わら表皮に多く存在しているシリカが糖化酵素の侵入を阻害しているためと推察された。(図10)

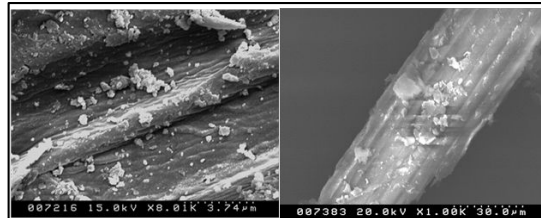


図10 化学的脱リグニン処理した稲わら(左)と白色腐朽菌で30日処理した稲わら(右)の表面

次にアルカリ処理との組み合わせについても検討した。アルカリ処理は稲わらに含まれているリグニンやシリカを双方同時に除去可能であるため、草本植物処理に適していると考えられる。界面活性剤をアルカリ処理時に添加することによってアルカリの使用量の低減や処理条件の緩和が可能であると考へ、その効果を検討した。稲わらを様々な濃度の水酸化ナトリウム水溶液(0-1M)に液固比を10で一日間浸した(30℃~80℃)。添加剤として用いた界面活性剤は陽イオン性界面活性剤であるCTAB(Cetrimonium bromide)、陰イオン性界面活性剤であるSDS、非イオン性界面活性剤であるTween20を用いた。図11にその結果の一部を示す。アルカリ濃度が0.25M以下では界面活性剤添加による効果は見られなかった。アルカリ濃度が0.5M以上の範囲では界面活性剤添加によってリグニン等の非セルロース成分の除去率が5-10%程度増加した。また、80℃、0.5M-NaOH、CTAB0mMにおける除去率と30℃、5M-NaOH、CTAB1mMにおける除去率はほぼ同等であることがわかる。これはCTABを臨界ミセル濃度程度添加することによって、反応温度を著しく緩和(具体的には80℃から30℃まで)できることにほかならない。このよう

に温度条件の緩和に、界面活性剤は著しく効果があることがわかった。しかしながら、シリカやリグニンの除去のためには、界面活性剤を添加した場合においても、かなり高濃度のアルカリ処理を必要とした。このことから、アルカリ添加量(NaOH 添加量)の低減については、界面活性剤の添加はほとんど効果を持たないことがわかった。

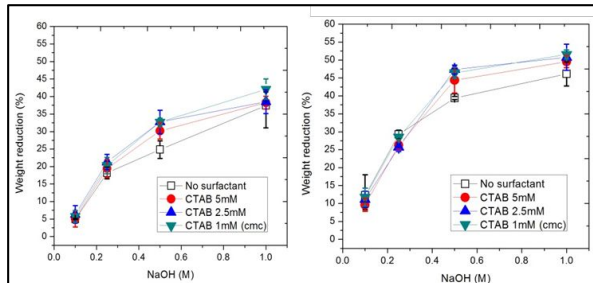


図 11 界面活性剤添加によるアルカリ処理効果の変化(左:30、右:80)

(4)界面活性剤を用いる Semi-batch 糖化
 酵素糖化と発酵はそれぞれ最適反応条件(pHや温度)が異なるため、糖化反応の後に発酵を行う逐次糖化発酵プロセスも存在する。しかしながら、この方法においては、還元糖生成による糖化反応の劣化(生成物阻害)や糖生成による微生物増殖速度の制御が困難であるため、これらの問題を克服可能な同時糖化発酵法(SSF)が広く利用されている。SSFは温度に敏感な酵母を使用し、反応温度は通常35度付近に設定される。しかし、50度付近において最大活性を有するセルラーゼを35度で用いるため、特に反応初期における糖化反応効率が低下する。図12に示されるように35度の反応では酵素投入量が少ない場合は前処理を行っても初期糖化速度はあまり向上しないことがわかる

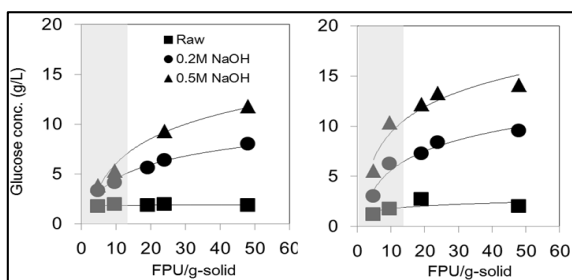


図 12 30度(左)と50度(右)での初期糖化反応の比較

ここでSSFにおいて、反応初期における糖化効率は酵母の成長にとって重要なファクターであるため、これを補償するために過剰なセルラーゼの投入は避けられない。また、基質の濃度が増加するにつれ、セルラーゼがリグニンなどの非セルロース成分に吸着されるため、糖化に寄与するセルラーゼの割合も低下する。そこで、SSFの運転操作を工夫することで、低濃度のアルカリ処理でも効果的な糖化・発酵が可能な界面活性剤処理を提案

する。そのアイデアの元となった結果を図13に示す。これはバッチ実験における糖化反応の界面活性剤添加の依存性を示している。この結果からグルコース生産量については、界面活性剤(Tween20)添加の効果はほとんど見られない。

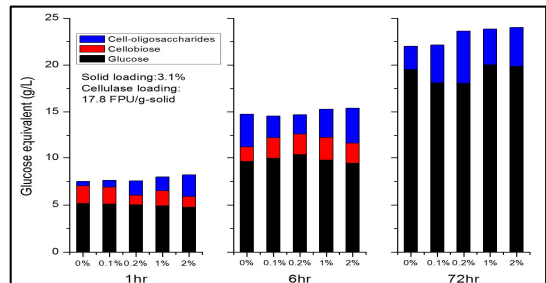


図 13 バッチ法による糖化結果

しかしながら、初期反応(1h)においては、界面活性剤の添加によって、セロオリゴ糖類の生成が増大していることが見て取れる。これは、界面活性剤添加によって、セルラーゼの成分のうちの Endo-glucanase が有効にセルロースに作用しているためと推察された。このことを確認するため、バッチ実験後の溶液のセルラーゼの各種活性を測定した。その結果を図14に示す。

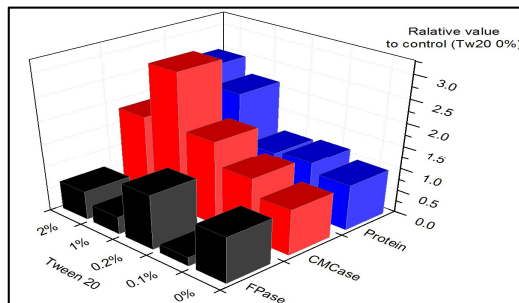


図 14 界面活性剤による溶液側の酵素活性やタンパク濃度の変化

界面活性剤を添加していないコントロール実験に比べ、明らかに Endo-glucanase の活性(CMCase)が高くなったことが見て取れる。このことから、界面活性剤がリグニンの表面を覆うことで、Endo-glucanase の非生産的吸着を防ぎ、より有効に基質に作用すると推察された。このことから、当初より過剰なセルラーゼと界面活性剤を添加した上で、継続的に基質を反応液に添加するセミバッチ反応形式の採用により、糖化・発酵反応をより効率化できる可能性がある。そこで、実際にセミバッチ実験を行い、その有効性を検討した。実験条件は固形物 3.1%、酵素投入比 35.4FPU/g 条件で運転を開始し、最終的に固形物 9.6%、酵素投入比 8.8FPU/g になるように基質を4回に分けて投入させた。運転結果を図15に示す。

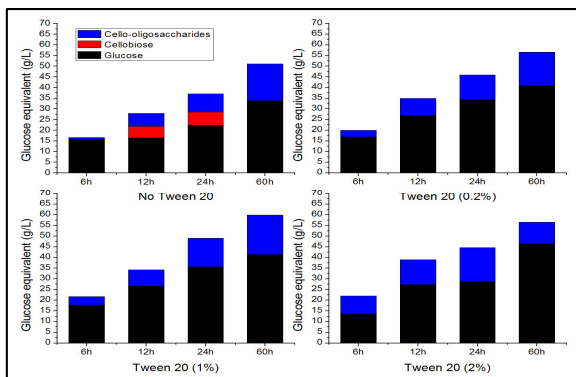


図 15 界面活性剤と連係したセミバッチ運
転結果

セミバッチ方式の採用により、グルコースの生成が最大 37.5%、セロオリゴ糖類を含めた糖生成は最大 17%向上した。この結果からバッチ法より界面活性剤処理と連係したセミバッチ法の有効性が確かめられた。

本研究では一部リグニンを除いたリグノセルロースを界面活性剤で処理することでセルロースフィブリルのナノ・マイクロ構造を変化させることにより、糖化効率を改善することを見出した。これを実現するためには脱リグニン処理との連係が鍵となるが、本研究では白色腐朽菌やアルカリ処理との組み合わせについての可能性と限界について検討した。この結果、界面活性剤とセミバッチ法の組み合わせを検討したところ、糖化効率の改善が可能であることが確認できた。この方法は非常に簡便であるため、実用化に近い方法であると思われる。

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 1 件)

Dong-June Seo, Hirotaka Fujita, Akiyoshi Sakoda, Structural changes of lignocelluloses by a nonionic surfactant, Tween 20, and their effects on cellulase adsorption and saccharification, *Bioresource Technology* 102. 9605-9612 (2011), 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

陳 佳敏, 徐 東準, 藤田洋崇, 藤 隆夫, 迫田章義, 白色腐朽菌を用いた稲わらの前処理とそのバイオエタノール生産収率への影響, 化学工学会第78年会, 大阪大学, 2013.3.17-19

陳 佳敏, 徐 東準, 藤井 隆夫, 迫田章義, 稲わらからのバイオエタノール生産における白色腐朽菌を用いた前処理, 化学工学会 関東支部 横浜大会, 横浜国立大学, 2012.8.30-31

藤田洋崇, 秋本佳希, 徐東準, 迫田章義, 細孔構造が異なるセルロースへの糖化酵

素セルラーゼの吸着特性とその初期糖化速度への影響, 第 25 回日本吸着学会研究発表会, 那覇 2011.11.10-12

Dong-June Seo, Hirotaka Fujita and Akiyoshi Sakoda, Significant Enhancement of Enzymatic Saccharification of Cellulose with Nanostructural Change of Cellulose Fibrils by Adsorption of a Non-ionic Surfactant, Tween 20, 第 25 回日本吸着学会研究発表会, 那覇 2011.11.10-12

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

迫田 章義 (Sakoda, Akiyoshi)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号: 30170658