

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850232

研究課題名(和文)バイオマスの酵素糖化抵抗性に対するリグニンの寄与の包括的理解

研究課題名(英文)Comprehensive understanding of the effect of lignin on biomass recalcitrance

研究代表者

野中 寛 (Nonaka, Hiroshi)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：90422881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：セルロース系バイオマスの酵素糖化におけるリグニンの影響を、単離リグニンではなく、実バイオマスを用いて包括的に理解することを目的とした。実験には主として蒸気爆砕ユーカリを用いた。まず糖化残渣の窒素量の測定により、セルラーゼ吸着挙動を追跡する手法開発に成功した。基質へのセルラーゼ吸着量は初期で最大となり、セルロースに吸着したセルラーゼが時間とともに遊離すると推測された。低酵素量の際でも、全セルラーゼがリグニンに吸着するわけではなく、基質中のリグニン含有率の増大につれ、飽和吸着量が増大することを明らかにした。一方アルカリ蒸解前処理を行うと基質中リグニンのセルラーゼ吸着量が大きくなることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed at understanding the effect of lignin on enzymatic saccharification of cellulosic biomass comprehensively using not isolated lignins but some real biomass samples. Steam-exploded eucalyptus was mainly used for our experiments. First, we successfully developed a method to study cellulase adsorption behavior by calculating the amount of protein adsorbed on the substrate based on elemental analysis data. The amount of cellulase adsorbed reached maximum at the beginning stage, and was gradually decreased probably due to detachment from cellulose as the cellulose was hydrolyzed. Cellulase remained in the solution even at lower enzyme loadings, and the amount of adsorbed cellulase was increased with the increase of lignin content of the substrate as saccharification proceeds. It was suggested that the lignin suffered from alkaline pretreatment adsorbs more cellulase than that with other pretreatments.

研究分野：バイオマス科学

キーワード：酵素糖化 リグノセルロース リグニン セルラーゼ 吸着 蒸気爆砕 元素分析

1. 研究開始当初の背景

近年、アメリカ、カナダ、EU、ブラジルなどで、さとうきび(糖系)、とうもろこし(デンプン系)等からのバイオエタノール生産が盛んである。食糧生産との競合は深刻であり、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の利用が急務とされる。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し、エタノール発酵のための糖をえる必要がある。

糖化酵素・セルラーゼの低価格化は近年目覚ましいが、依然としてコスト高である。酵素糖化法における究極の目標は、出来る限り少ない酵素量で、最大限の糖化率を達成することである。しかしながら、セルロース表面積を増加させる前処理のあとでも、特に少量のセルラーゼを供試した際に、糖化効率が優れない現象が広く認められ、“Biomass Recalcitrance (バイオマスの抵抗性)”として大きな議論の対象となっている。抵抗性の由来として、セルロース自身、ヘミセルロースおよびリグニンの影響が挙げられ、各前処理過程におけるセルロースの結晶性の変化、セルロース表面積の変化、ヘミセルロースの除去率との相関について明らかになりつつある。これに対してリグニンの影響については未解明の点が多い。

リグニンは、物理的にセルロースを被覆しているだけでなく、セルラーゼを不可逆的に吸着し、またリグニン分子およびその官能基の存在が、水およびセルラーゼを反発していることも指摘されている。対象リグノセルロース試料より、磨砕リグニン(Chernoglazov *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 503-507, 1988 など)、アルカリリグニン(Palonen *et al.*, *J. Biotechnol.*, 107, 65-72, 2004 など)、酵素糖化リグニン(Tu *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 57, 7771-7778, 2009 など)、硫酸リグニン等を単離し、セルラーゼとの吸着現象について解析されているが、磨砕リグニンは低収率、アルカリリグニンは縮合変性があるなど、問題があった。相分離系変換システム(Funaoka and Abe, *Tappi J.*, 1989)を用いれば、リグニン分子鎖間の縮合が抑制されたりニア型のリグニンが高収率で得られる。申請者は、科研費若手B「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」(2008~2010年度)において、ヒノキ、ユーカリから本手法によりリグニンを取得し、セルラーゼ吸着材としての利用を目的にセルラーゼの吸着試験を行ってきた。吸着量は、明確に針葉樹>広葉樹リグニンであり、また広葉樹リグニンからのほうが脱離しやすい結果をえた。一方で脱離セルラーゼの活性は、針葉樹>広葉樹という興味深い結果を得ている(高

分子学会[2011.5]、ネットワークポリマー講演会[2011.10]にて発表)。これらの実験結果より、セルラーゼのリグニンへの吸着現象は酵素糖化に影響していることを確信するに至り、単離リグニンではなく、酵素糖化中の糖化残渣を用いることにより、実バイオマスベースで、その複雑な寄与を解明しようという着想に至った。

2. 研究の目的

セルロース系バイオマスの酵素糖化において、糖化酵素セルラーゼのコスト低減が大きな課題である。糖化残渣に含まれるリグニンはセルラーゼを非生産的に吸着することが知られ、低酵素使用量の際に糖化効率が頭打ちとなる理由と考えられている。この現象の解明のため、著者も含め多くの研究者が試料より何らかの方法でリグニンを単離し、セルラーゼとの吸着実験を行ってきた。これに対し本研究では、単離リグニンの水中での状態と、実バイオマスの酵素糖化進行中におけるリグニンとは状態が異なることに着目し、実バイオマスを用いて包括的に「バイオマスの酵素糖化抵抗性に対するリグニンの寄与」を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 蒸気爆砕ユーカリを用いた酵素糖化 酵素濃度を変えた糖化反応

蒸気爆砕ユーカリ(*Eucalyptus globulus*)は日揮株式会社より提供を受けた(爆砕条件: 230℃, 5分)。蒸気爆砕ユーカリ 0.1 g に 0.1 M クエン酸緩衝液(pH 4.8)で希釈したセルラーゼ(Novozymes, Cellic CTec 2, 原液: 138 FPU/mL)を 3 mL 加えた。このときの希釈度は、それぞれ 300, 600, 1200, 2400 倍である。攪拌しながら 50℃ でインキュベートし、所定時間(0 - 16 時間)糖化した。糖化後、上澄みをろ過し、糖化液、糖化残渣を試料として得た。

糖化液、糖化残渣中のセルラーゼ定量

糖化液内のタンパク質量測定は Bradford 法を用いた。糖化液 0.1 mL にクマーシプル溶液 1.0 mL を加えて発色させ、595 nm の吸光度を測定し、ウシ血清アルブミン(BSA)を用いて作成した検量線(25, 50, 100, 150, 200, 250 µg/mL)より、相対的なセルラーゼ量を算出した。算出した値を添加したセルラーゼ量から差し引きし、糖化残渣のセルラーゼ吸着量を求めた。

糖化残渣は CHN 元素分析を用い、セルラーゼ量を定量した。糖化残渣を鈴ボードに少量加え、キャリアガスとしてヘリウムを用い元素分析(EL-VARIO CUBE, ドイツエレメンタル社)を行った。アセトアニリド検量線より窒素含有量を求め、窒素-タンパク質換算係数を 16.5%としてセルラーゼ吸着量を算出

した。

(2) 樹種、前処理の違いの影響 前処理基質の調製

ユーカリおよびヒノキのアルカリ蒸解処理は、2 N NaOH, 170 °C, 1 h の条件で処理を行った。水洗浄で中性化後、10 %酢酸で洗浄後に再び水で中性化し、40 °C で一晩乾燥した。蒸気爆砕ユーカリも同様に乾燥した。

酵素糖化およびセルラーゼ定量

蒸気爆砕ユーカリおよびアルカリ蒸解ユーカリを、炭水化物量がおおよそ 15.3 mg となるようにそれぞれ試料を秤量した。またアルカリ蒸解ヒノキはアルカリ蒸解ユーカリと同量の基質となるように 16.3 mg で秤量した。0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.8) で希釈したセルラーゼ (Novozymes, Cellic CTec 2, 原液: 138 FPU/mL) を 3 mL 加えた。攪拌しながら 50 °C でインキュベートし、所定時間 (0 - 8 時間) 糖化した。糖化後、上澄みをろ過し、糖化液、糖化残渣を試料として得た。糖化残渣は上記同様に元素分析より窒素含有量およびセルラーゼ量を算出した。また糖化液は TN 分析により、窒素含有量を測定した。

4. 研究成果

(1) 蒸気爆砕ユーカリを用いた酵素糖化

今回用いた蒸気爆砕ユーカリの組成は、Glucan:55.1%, Lignin:43%, Xylan:0.5% である。蒸気爆砕ユーカリは前処理段階でヘミセルロースが除去され、リグニンとセルロースが大部分を占める基質である。この基質の酵素糖化における重量変化を Fig. 1 に示した。全てのサンプルにおいて重量減少が見られる。これは基質中の炭水化物が酵素で分解されたことを示す。一方、本実験手法中で一番高い酵素濃度条件 (300 倍希釈) では、糖化時間が 6 時間を過ぎると重量減少が見られなくなる。これは基質中のセルロースを含む多糖がほとんど分解され、リグニンのみの基質となることに関係している。実際に多糖類のみが分解されると仮定し組成を算出した結果、残渣内の 95%以上がリグニンであることが推定された。

一番高い酵素濃度条件 (300 倍希釈) で添加するセルラーゼ溶液のタンパク質量を 100 % とし、それぞれの糖化液中に遊離するタンパク質量 (%) を Fig. 2 に示した。300 倍希釈セルラーゼ添加の場合、セルラーゼの基質への吸着は 20 分以内に速やかに進行し、1 時間後に基質へのセルラーゼ吸着量が最大となった。また加えたセルラーゼ量の半分近くが吸着せずに糖化液中に残存している状態である。1 - 6 時間糖化を行った時、セルラーゼ吸着量の減少が見られた。これは Fig. 1 の重量減少結果より、残渣内の多糖に原因があると考えられる。多糖に吸着したセルラーゼが分解と共に遊離することが要因であ

ると言える。その他の酵素濃度においては、基質に対するセルラーゼ吸着と遊離について確認できない。

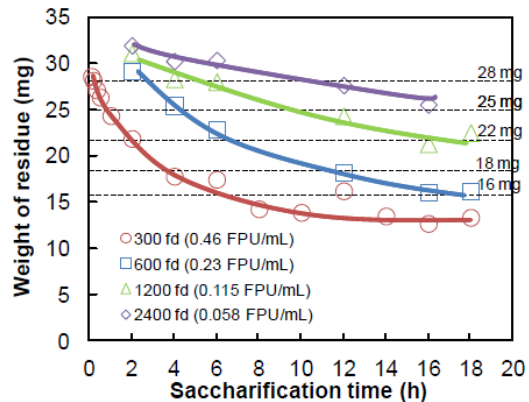


Fig. 1 Change of the weight of saccharification residue.

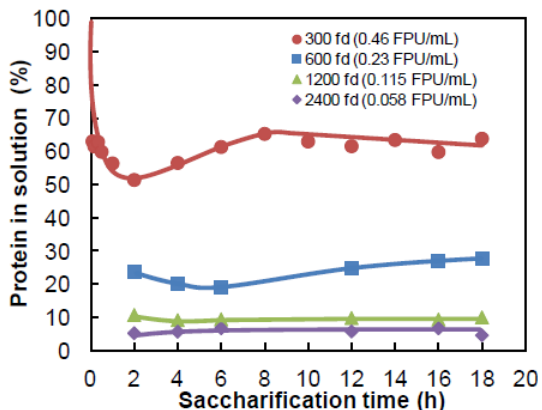


Fig. 2 Change of the protein ratio left in liquor during enzymatic saccharification.

特定の残渣重量時における糖化液中のセルラーゼ割合 (Fig. 1) と、単位残渣重量当たりのセルラーゼ割合をプロットして得られる、各残渣重量時のセルラーゼ吸着等温線を Fig. 3 に示した。残渣重量が低いほど残渣単位当たりのセルラーゼ吸着量が増加することを示す。つまりリグニン濃度の増加に起因してセルラーゼ吸着量が増加することを示した。この結果より、セルロースに対する吸着量よりもリグニンに対するセルラーゼの吸着量が高い可能性を示している。本結果は糖化過程における基質-セルラーゼ間の吸着等温線の逐次変化を示したものであり、極めて新規性に富むものである。

上記は Bradford 法という比色法による吸光度データを基に、初期タンパク量との相対割合で結果を示したものである。この手法の欠点はタンパク質の種類により大きく発色度が異なり、夾雑物の影響を受けることである。そのため本実験系において、セルラーゼ吸着の傾向確認には十分に使えるが、セルラーゼ量の定量は確実ではないと考えられる。そこで別途、元素分析による残渣中セルラーゼの直接的な定量法も取り入れた。BSA を検量線とした Bradford 法と元素分析法で求めた残渣吸着セルラーゼを比較し、Fig. 4 に

示した。糖化時間進行に伴う吸着量の変化は似た傾向を示したが、明らかに Bradford 法による定量値が大きくなる。これは BSA がセルラーゼより発色度が大きいことに起因する。ただし糖化時間 8~18 時間では Bradford 法で約 2 倍の定量値になったのに対し、糖化時間 1~2 時間では約 3 倍の定量値であり、発色度の補正のみでは対応が困難であることを示している。

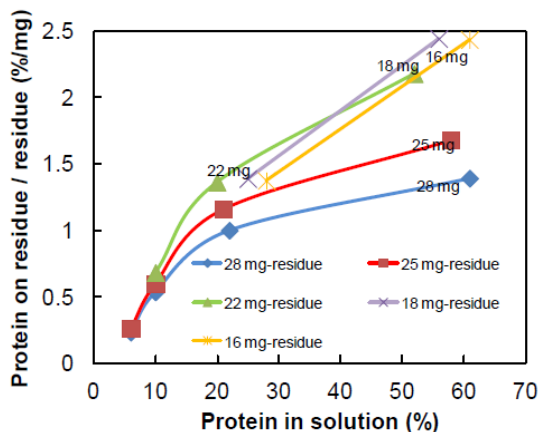


Fig. 3 Cellulase adsorption isotherm for each weight of saccharification residue.

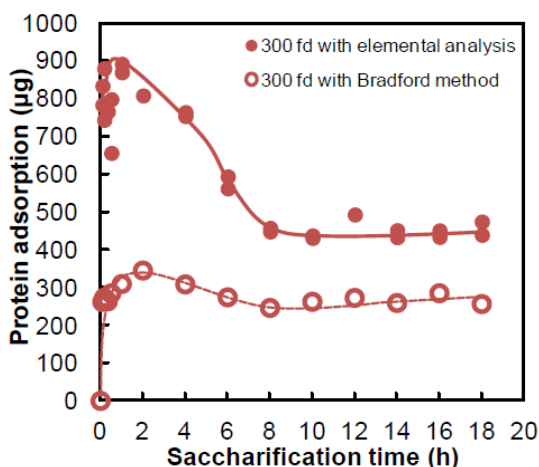


Fig. 4 Quantification of proteins adsorbed on residues based on elemental analysis and Bradford method.

(2) 樹種, 前処理の違いの影響

蒸気爆砕 (SE-Eu, 研究成果 (1) と異なるロット) およびアルカリ蒸解したユーカリ (Al-Eu), アルカリ蒸解したヒノキ (Al-Hi) の酵素糖化率について Fig. 5 に示した。Al-Eu では 8 時間までに糖化が大きく進み、基質中炭水化物の 90 % が糖化された。一方 Al-Hi は糖化が緩やかに進み、8 時間後においても 24 % しか糖化されなかった。これはリグニン量の違いによる物理的要因やリグニン構造の違いに原因があると考えられる。また、SE-Eu よりも Al-Eu の方が高い糖化率である結果も上記と同様のことが言える。しかし、異なる樹種および前処理である SE-Eu と

Al-Hi を比較した場合、SE-Eu の高いリグニン率にも関わらず、Al-Hi よりも糖化率が高い結果を示した。これはリグニン構造の違いだけでなく、前処理の違いによるセルロース繊維の開き方に起因する。蒸気爆砕処理では細胞壁の内部から構造を破壊するため、内腔に多く存在するセルロース表面が外に露出する。そのため、セルロースに対するセルラーゼのアクセシビリティが増加し、Al-Hi より大きく糖化が進んだと言える。

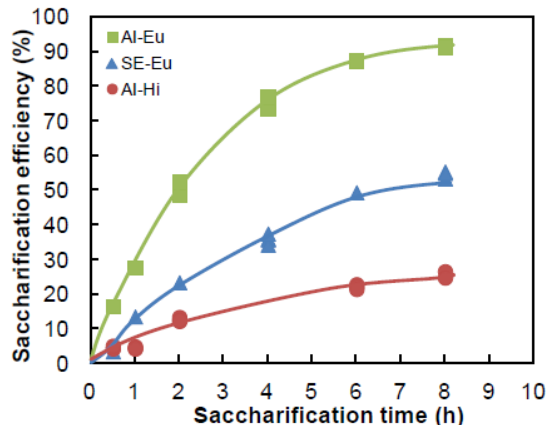


Fig. 5 Change of saccharification efficiency for each substrate.

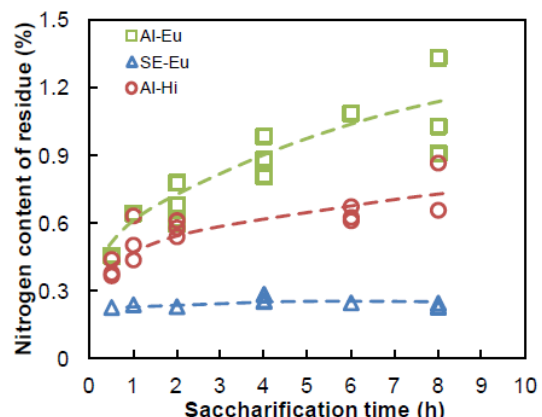


Fig. 6 Change of the nitrogen content of the residue during enzymatic saccharification.

Fig. 6 に糖化残渣の窒素含有率の推移を示す。Al-Eu および Al-Hi の両方において、糖化の初期段階 (30 min) では同様の窒素含有量を示した。さらに糖化が進むと窒素含有量が徐々に増加するが、その増加量には違いがあり、Al-Hi では 8 時間で 0.8 %、Al-Eu では 1.1 % の値まで増加した。これは糖化が進むと共に徐々に基質内部が開き、酵素の吸着サイトが現れる可能性を示している。すなわち酵素糖化初期では基質表面に存在する吸着サイトに差がないことからおよそ同じ窒素含有量を示す一方、糖化が進むことで徐々に基質が開き、特に糖化の進んだユーカリ由来のアルカリ蒸解物では吸着サイトが増加し、セルラーゼ吸着量も増加したと言える。一方、SE-Eu の酵素糖化において窒素含有量

が初期段階から糖化 8 時間まで一定量を保持している。これは上記同様に、前処理によるセルロース繊維の開きが影響し、初期段階で基質全体にセルラーゼが素早く吸着した結果であると考えられる。しかし、その吸着量は AI-Eu, AI-Hi の結果と異なり、非常に低い値となった (0.3%)。この基質に含まれるリグニン構造の違いに起因すると考えられる。すなわち、SE-Eu 基質は少ないセルラーゼ吸着量で効率よく糖化することが出来るため、有用な基質と言える。

本研究により、元素分析手法による新しいセルラーゼ吸着量の測定法を確立した。蒸気爆砕ユーカリを用いたセルラーゼ吸着量の結果より、酵素糖化過程における基質中リグニンに対し、セルラーゼが吸着することを示した。また樹種および前処理の違いを比較した結果、基質単位当たりのセルラーゼ吸着量はリグニン量だけでなく、セルロース繊維自体の構造の変化にも影響していることを示した。酵素糖化における前処理法や樹種の選択は、この結果を考慮する必要がある。

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 9 件)

野中 寛, バガスの多段階アルカリ前処理の効果, *Kagaku Kogaku Ronbunshu* (2016), 42(3), 131-135. 査読有

野中 寛, 河野 宏紀, 蒸気爆砕ユーカリ酵素糖化過程におけるセルラーゼ吸着挙動の解釈, *Journal of the Japan Institute of Energy* (2014), 93(12), 1251-1256. 査読有

Nonaka, Hiroshi; Hideno, Akihiro, Quantification of cellulase adsorbed on saccharification residue without the use of colorimetric protein assays, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (2014), 110, 54-58. 査読有

Nonaka, Hiroshi; Kobayashi, Ai; Funaoka, Masamitsu, Enzymatic activity of cellulases adsorbed on lignophenols, *Journal of Wood Chemistry and Technology* (2014), 34(3), 169-177. 査読有

野中 寛, 花本 和奏, 船岡 正光, リグノフェノールのタンパク質吸着能に対する凝集構造の影響, *Kobunshi Ronbunshu* (2013), 70(12), 697-703. 査読有

小林 亜衣, 野中 寛, 船岡 正光, 針葉樹リグノクレゾール固定化セルラーゼの担体回収方法の開発, *Journal of the Japan Institute of Energy* (2013), 92(10),

930-935. 査読有

Nonaka, Hiroshi; Kobayashi, Ai; Funaoka, Masamitsu, Separation of lignocresol from eucalyptus lignocresol-cellulase complex using organic solvents, *Bioresource Technology* (2013), 143, 657-659. 査読有

Nonaka, Hiroshi; Kobayashi, Ai; Funaoka, Masamitsu, Lignin isolated from steam-exploded eucalyptus wood chips by phase separation and its affinity to *Trichoderma reesei* cellulase, *Bioresource Technology* (2013), 140, 431-434. 査読有

Nonaka, Hiroshi; Kobayashi, Ai; Funaoka, Masamitsu, Behavior of lignin-binding cellulase in the presence of fresh cellulosic substrate, *Bioresource Technology* (2013), 135, 53-57. 査読有

[学会発表](計 11 件)

河野 宏紀, 野中 寛(三重大大学), P-31 酵素糖化過程におけるセルラーゼ吸着挙動の植物種間比較, 第 11 回バイオマス科学会議 (朱鷺メッセ, 新潟県新潟市) 2016/1/20-21

Hiroki Kawano and Hiroshi Nonaka (Mie University), P-37 Difference of cellulase adsorption during enzymatic saccharification of various pretreated lignocelluloses, 3rd Asian Conference on Biomass Science (朱鷺メッセ, 新潟県新潟市) 2016/1/19

Hiroshi Nonaka and Hiroki Kawano (Mie Univ.), 3DV.2.34 Monitoring of Cellulase Adsorption Behavior during Enzymatic Saccharification of Steam-Exploded Eucalyptus, 23rd European Biomass Conference and Exhibition (オーストリア・ウィーン) 2015/6/1-4

河野宏紀, 野中 寛(三重大大学), P-25 蒸気爆砕ユーカリの酵素糖化過程におけるセルラーゼ吸着挙動の解析, 第 10 回バイオマス科学会議 (産業技術総合研究所, 茨城県つくば市) 2015/1/14-15

Hiroshi Nonaka, Hiroki Kawano (Mie Univ.), Akihiro Hideno (Ehime Univ.), Tracking of cellulase using elemental analysis, MIE Bioforum 2014 (合歓の郷, 三重県志摩市) 2014/11/18-21

Hiroshi Nonaka and Hiroki Kawano (Mie

Univ.), Cellulase adsorption onto steam-exploded eucalyptus during enzymatic saccharification, MIE Bioforum 2014 (合歓の郷, 三重県志摩市) 2014/11/18-21

野中 寛, 河野 宏紀(三重大学), 3P-165 セルラーゼ定量における元素分析の適用性, 第 66 回日本生物工学会大会(札幌コンベンションセンター, 北海道札幌市)2014/9/9-11

河野宏紀, 野中 寛(三重大学), P-46 蒸気爆砕ユーカリの酵素糖化におけるセルラーゼ-リグニンの相互作用解析, 第 9 回バイオマス科学会議(高知県立県民文化ホール, 高知県高知市) 2014/1/15-16

秀野晃大(愛媛大学), 野中 寛(三重大学), 0-503 元素分析によるリグノセルロース吸着セルラーゼの直接定量, 第 9 回バイオマス科学会議(高知県立県民文化ホール, 高知県高知市) 2014/1/15-16

Akihiro Hideno(Ehime Univ.), Hiroshi Nonaka(Mie Univ.), P-16 Direct determination of lignocellulose-adsorbed cellulases based on elemental analysis, 1st Asian Conference on Biomass Science (高知県立県民文化ホール, 高知県高知市) 2014/1/14

Hiroshi Nonaka, Ai Kobayashi and Masamitsu Funaoka, 6-19: Evaluation of the inhibitive effect of lignin on cellulase using a novel lignin isolation method based on phase separation, 35th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals (アメリカ・ポートランド) 2013/4/29-5/2

〔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
<http://www.bio.mie-u.ac.jp/kankyo/shinrin/lab5/index.html>

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所
・准教授
研究者番号: 90422881

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号: