様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２７　年　　６　月　１２　日現在

機関番号：　１３６０１
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2013～2014
課題番号：　２５８５０１２２

研究課題名（和文）モノコンポーネントセルラーゼによるイオン液体処理セルロースの酵素分解性評価

研究課題名（英文）Degradation of regenerated cellulose treated with ionic liquids by monocomponent cellulases

研究代表者

水野　正浩（MIZUNO, Masahiro）

信州大学・学術研究院工学系・助教

研究者番号：６０４３２１６８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,900,000円

研究成果の概要（和文）：イオン液体と呼ばれる常温で液体の塩を用いて、強固な結晶構造を有するセルロースを溶解し、そこに水を加えて得られる再生セルロースの構造と、酵素による分解性の評価を行った。イオン液体の種類は、セルロースIIと呼ばれる結晶構造を得やすいものが酵素分解には適しており、また、酵素にはセルロースに対してランダムに作用するエンド型酵素が含まれるとイオン液体処理セルロースの分解に適していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Ionic liquid (IL) is a salt composed of an organic cation and a variety of organic and inorganic anions, and some of them can dissolve cellulose under mild condition without any other compound. After dissolution of cellulose in IL, cellulose is easily regenerated by the addition of an anti-solvent such as water. For the effective hydrolysis of cellulose treated with IL, it is necessary to prepare the cellulase mixture containing an adequate ration of cellulase component according to crystal allomorph and the crystallinity of regenerated cellulose. Here, the reactivity of each monocomponent cellulase for the regenerated cellulose is investigated. As a result, ILs that provide cellulose II type regenerated cellulose were better suited for enzymatic degradation. Furthermore, endoglucanase was more effective for the degradation of regenerated cellulose rather than exo-type cellulase.

研究分野：　酵素化学

キーワード：　セルラーゼ　イオン液体　再生セルロース

１．研究開始当初の背景

結晶性の天然セルロースを繊維等に加工するためには、一度化学的な処理により溶解した後、形成を行い、再度セルロースに再生させる必要がある。このため、セルロース溶剤の開発は 19 世紀中期から後期にかけ、主に繊維業界を中心に研究が進められてきた。一方、イオン液体 (IL) は、蒸発しない電解質溶液としての観点から、主に安全なシステム設計を目指す化学工業分野の中で発展してきた。IL のバイオ分野への展開は、2002 年に Roggers (米国・コロラド大) らによって、IL へのセルロースの溶解現象が報告されて以降、セルロース溶解性を示す IL の開発や応用技術に関する研究が国内外で急速に進んでいる。

IL の最大の利点は、既存のセルロース溶剤と比較して、比較的柔和な環境下 (100˚C 以下のものも多い) で、かつ短時間 (数時間) に処理可能である点である。こうした利点は、純粋セルロースの溶解という点に留まらず、セルロース系バイオマスの酵素分解の前処理方法として非常に有効である。

２．研究の目的

イオン液体処理によって得られる再生セルロースの構造は、IL 中におけるセルロース鎖の分散挙動に大きな影響を受けると考えられる。本研究では、セルロース溶解性を示すことが知られている 6 種類の IL を用いて、それぞれの処理から得られる再生セルロースの構造を明らかにし、次いで、それらの再生セルロースに対して、作用機序の異なる様々な単一なセルラーゼを作用させ、IL 処理セルロースに適した酵素処理法を検討することを目的とした。

３．研究の方法

(1) 使用した IL 及びセルロース

イオン液体には 6 種類の親水性イオン液体、1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim][OAc]) 、 1-ethyl-3-methylimidazolium diethyl phosphate ([Emim][DEP]) 、 1-ethyl-3-methylimidazolium chloride ([Emim][Cl]) 、 1-allyl-3-methylimidazolium chloride ([Amim][Cl]) 、 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([Bmim][Cl]) (Sigma Aldorich) 及び *N*,*N*-diethyl-*N*-methyl-*N*-(2-methoxyethyl)ammonium alanine ($[N_{221ME}]$[Ala]) を用いた。また、標準セルロースには、微結晶性セルロース (Merck) を用いた。

(2) 単一成分セルラーゼの調製

白色腐朽菌 *Irpex lacteus* が生産するエンドグルカナーゼ (En1) 及び、セロビオヒドロラーゼ I 及び II (CBH I 及び CBH II) は、麹菌 *Aspergillus oryzae* を発現宿主として培養を行い、培養液をセルロースアフィニティーカラムに供することで電気泳動的に単一になるまで精製を行った。海洋性子嚢菌 *Pestalotiopsis* sp. AN-7 のエンドグルカナーゼ (Cel5A) についても、同様に発現させた後、2 種類の陰イオン交換カラム (Toyopearl DEAE-650M、Q Sepharose High performance) 及びゲル濾過カラム (HiPrep 16/10 Sephacryl S-200) による精製を行った。

(3) セルロースの溶解及び再生

35 mm 口径のネジ口ガラス管に IL を加え、アルミバスにて予め 120℃で予備加熱をしておき、そこに微結晶性セルロースを所定の濃度になるように添加した。スパチュラで時折攪拌しながら、セルロースを完全に溶解させた。セルロースの再生は、IL の 5 倍量の貧溶媒を添加することで行い、得られた再生セルロースを乳鉢中ですりつぶした後、遠心分離により回収した。その後、IL を取り除くために、乳鉢ですりつぶしながら洗浄する作業を 3 回繰り返し、最終的に脱イオン水を加えて 2wt% 再生セルロース懸濁液を調製した。

(4) 再生セルロースの機器分析

得られた再生セルロースは、凍結乾燥させた後に、KBr 法によるフーリエ変換型赤外分光法 (FT-IR)、CP/MAS 法による ^{13}C-NMR、粉末 X 線回折法 (XRD)、ゲル浸透クロマグラフィー (GPC) に供した。

(5) 再生セルロースの酵素分解

再生セルロースと酵素の反応は、質量比で再生セルロース：酵素 = 100：1 となるように混合し、pH5.0、40℃にて酵素反応を行った。酵素反応の停止は、20 分間の煮沸によって行い、生成還元糖量を Somogyi-Nelson 法により測定した。酵素のタンパク質量は、牛血清アルブミンを標準物質として、Lowry 法により測定した。

(6) バイオマスの IL 処理及び酵素分解

長野県安曇野市付近の用水路にて、定期的に除去されている水生植物ナガエミクリを採取し、汚れなどを十分に洗浄した後、乾燥させた。乾燥物を粉砕処理した後、500 μm、300 mesh のふるいを通したものを試料として用いた。ナガエミクリ乾燥試料を、5wt%になるように[Emim][OAc]に加え 140℃で 2 時間処理し、溶解させた後、脱イオン水にて析出させた。この再析出物を市販酵素剤にて分解し、生成グルコース量をグルコース C-II テストワコーにて測定した。

４．研究成果

(1) 単一成分セルラーゼの調製

I. lacteus 及び *Pestalotiopsis* sp. AN-7 より、セルロースへの作用機序が異なる 4 種類の酵素を調製した (図１)。いずれの酵素も電気泳動的に単一になるまで精製された。

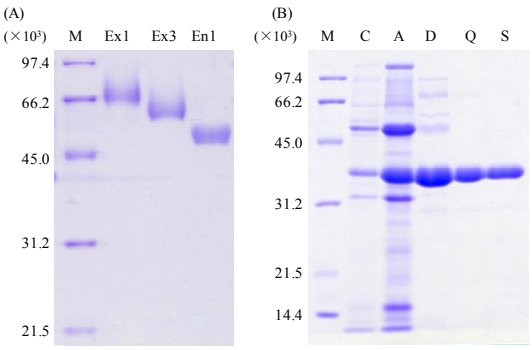


図１　単一成分酵素の精製
(A) *I. lacteus* 由来のセルラーゼ、(B) *Pestalotiopsis* sp. AN-7 由来のエンドグルカナーゼの精製 C, 粗酵素液; A, 硫安沈殿後; D, Toyopearl DEAE; Q, Q Sepharose; S, Sephacryl S-200

(2) 再生セルロースの機器分析

各種 IL 処理によって得られる再生セルロースの構造特性を調べるために、機器分析による評価を行った。

先ず、微結晶セルロースを各 IL に混ぜて 120℃で加熱すると、1 時間以降にいずれの IL においても IL の褐変が認められた。特に $[N_{221ME}]$[Ala]では、褐変具体が著しかった。これは、アニオンを形成するアラニン部分が、セルロースとメイラード反応をしたためだと考えられた。

各 IL で処理して得られた再生セルロースの FT-IR スペクトルを未処理セルロースと比較すると、両者において大きな差は認められなかった。

XRD による結晶構造の分析では、未処理セルロースがセルロース I 型の結晶ピークを示したのに対して、再生セルロースでは使用した IL の種類により、スペクトルが変化していた。[Bmim][Cl]や[Emim][DEP]では全体がブロードなスペクトルが得られた。一方、[Emim][Cl]や[Emim][OAc]及び$[N_{221ME}]$[Ala]では、ピーク位置が低角側に移動し、セルロース II に近いスペクトルが得られた (図２)。

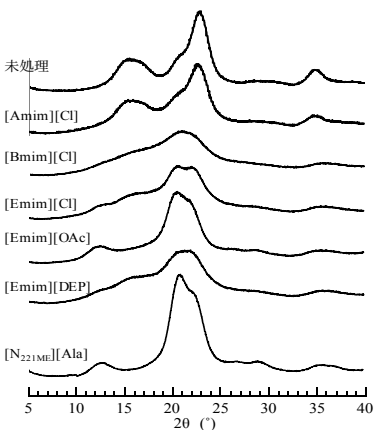


図２　IL 処理セルロースの XRD スペクトル

GPC による重合度測定の結果から、未処理の微結晶性セルロースの重量平均重合度が約 300 であったのに対して、アニオンに塩化物イオンをもつ IL では、約 30 ~ 60%の低下が認められた。それ以外の IL では大きな変化は認められなかった。

(3) 再生セルロースの酵素分解

I. lacteus から調製した作用機序の異なる 3 種類のセルラーゼを、[Emim][OAc]及び、[Emim][DEP]、$[N_{221ME}]$[Ala]で処理して得られた再生セルロースに作用させて、酵素分解性を評価した。

先ず、単独酵素での分解性を調べるために、セルロース量：酵素量が 100：1 となるように酵素間のタンパク質量を揃え、反応を行った。いずれの酵素も、未処理セルロースに比べ各 IL 処理セルロースに対する反応性は高くなった。特にセルロースの非晶質部分に作用するエンドグルカナーゼ (En1) の反応初期における分解性が向上した。一方、使用した IL の種類と酵素反応性の点からは、[Emim][OAc]及び[Emim][DEP]と比較して、$[N_{221ME}]$[Ala]で処理して得られた再生セルロースの反応性が、他のものより 20%程度低い分解性となった。特にセルロースの結晶性部位に作用しセルロース鎖の還元性末端側から連続的にセロビオース生産を行う Ex1 の分解性が、未処理セルロースとほぼ同じであった。Ex1 については反応生成物であるセロビオースによって生成物阻害を受け、酵素分解性が上がらなくなっている可能性が考えられたため、反応系内に β-グルコシダーゼ (BGL) を添加し、グルコースにまで分解させることでセルラーゼの生成物阻害を解除させた条件で条件検討を行った。Ex3 及び En1 では BGL の添加による大幅な酵素分解率への寄与は得られなかったが、Ex1 においては分解率において 10%程度の改善が認められた。また、IL 処理再生セルロースの分解では、特にエンドグルカナーゼの効果が認められたため、*I. lacteus* の En1 と同じ Glycoside hydrolase family 5 に属する、*Pestalotiopsis* sp. AN-7 由来のエンドグルカナーゼ (Cel5A) との比較を行った結果、IL の種類の違いによる分解特性に大きな差は認められなかったが、タンパク質濃度を揃えた場合、En1 の方が Cel5A よりも約 2 倍高い分解性を示した。これは、En1 が N 末端側にセルロース結合モジュール (CBM1) を有するのに対して、Cel5A は CBM1 を有しておらず、セルロース表面への吸着のし易さの違いによるものだと考えられた。

次に、異なる 2 つの酵素の組合せによる分解性を調べるためにセルロース量：酵素合計量が、100：2 となるように酵素間のタンパク質を調製し、反応を行った。Ex1 と Ex3 は共にセルロース鎖の末端に作用して連続的に分解する酵素であり、En1 はランダムに作用して非連続的に分解を行う酵素である。各 IL

処理セルロースへの 2 種類の酵素の組合せで効果的だったのは、連続的に作用する酵素と(Ex1 及び Ex3)、非連続的に作用する酵素(En1) とを組み合わせるものであった。Ex1 と En1、Ex3 と En1 の組合せ間では、あまり大きな変化は認められなかったが、いずれの場合も、連続的に作用する酵素の割合が 8 割、非連続的に作用する酵素の割合を 2 割にすると、最も高い分解率 ([Emim][OAc] 及び [Emim][DEP]で約 70%、$[N_{221ME}][Ala]$で約 40%、反応 24 時間) となった。

また、上記で使用した 3 種類の酵素を全て均等に混合し、セルロース量：酵素量合計が 100：3 になるようにして分解性を測定した。[Emim][OAc]及び[Emim][DEP]処理再生セルロースでは、酵素を単独で作用させた場合よりも相乗効果が認められ、反応開始 24 時間までに分解率がほぼ 100%になったのに対し、$[N_{221ME}][Ala]$処理再生セルロースでは、Ex3 で作用させた場合と変化がなかった。

(4) バイオマスの IL 処理及び酵素分解

実バイオマスの IL による処理効果と、酵素分解性を評価するために、水生植物ナガエミクリを試料として試験を行った。先ず、IL 処理の効果を調べるために、水酸化ナトリウムを用いたアルカリ処理を対照区として、偏光顕微鏡下における観察を行った。アルカリ処理では処理開始後 1 時間までに、セルロースを覆うヘミセルロースやリグニンの溶出が起こり、結晶性のセルロースに起因する結晶面が綺麗に露出した。一方、IL 処理では緩やかにセルロースの結晶面が露出し始め、その後、アリカリ処理では観察されなかったセルロースの束がばらけ出す様子が観察された（図３）。

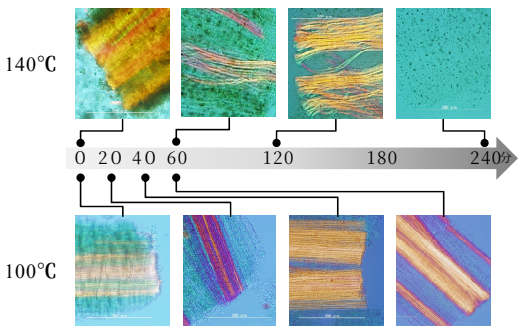


図３　IL 処理 (上段) とアルカリ処理 (下段) 過程のナガエミクリ粉末の偏光顕微鏡観察

IL 処理及びアルカリ処理のいずれにおいても、処理後 2 時間では溶け残りがあったため、それらを残渣として回収し、可溶性画分と分離した。また、IL 処理については可溶性画分に脱イオン水を添加することで再析出物が回収できることから、それらを沈殿物として回収し、それぞれ、成分分析を行った。

IL 処理では、処理に供したナガエミクリの 55%が IL 中に溶け出ており、アルカリ処理では 77%が溶出していた。いずれもリグニンや灰分などの溶出が認められるが、糖画分の溶出も多い。しかし、IL 処理では脱イオン水の添加により IL 中に溶け出た糖画分が再析出されて固形物として回収できるため、最終的に約 90%の糖画分を維持することが可能であった。

IL 処理で得られた残渣及び、脱イオン水を添加することで生じた沈殿物、アルカリ処理残渣を XRD に供し、それぞれの結晶性を評価した（図４）。IL 処理残渣は、全体的なピーク強度が未処理のものよりも高くなったが、セルロース I と II が混在するような状態であった。沈殿物についてはピーク位置が低角側にシフトしており、セルロース II に近くなっていた。一方、アルカリ処理ではセルロース I に近いスペクトルが明確に現れており、リグニンやヘミセルロースの除去効果が高いことが示唆された。

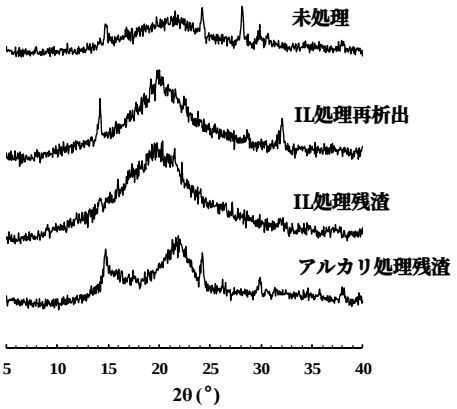


図４　IL 処理とアルカリ処理 で得られた画分の XRD スペクトル

次に、IL 処理及びアルカリ処理から得られる残渣について市販のセルラーゼ製剤を用いて酵素処理を行った結果、反応開始 12 時間後において、アルカリ処理残渣では約 90%の分解率を示したのに対して、IL 処理残渣は 40%に留まった。これは、IL 処理残渣はアルカリ処理と同様に、セルロースの表面を露出させる効果があるものの、図４で示したように、セルロース I と II が混在する様な状態であり、酵素反応には適していないことが示唆された。IL 処理については、脱イオン水を添加して得られるセルロース II を多く含む画分とを合せた際の分解性を今後は評価する必要がある。

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）

〔学会発表〕（計４件）

① 水野　正浩、吉崎　涼、野﨑　功一、天

野　良彦、イオン液体処理セルロースのモノコンポーネント酵素を用いた糖化性の評価、セルロース学会第 21 回年次大会、2014 年 7 月 17 日～18 日、鹿児島大学郡元キャンパス（鹿児島県、鹿児島市）

② 早川　源矢、水野　正浩、佐藤　伸明、野﨑　功一、天野　良彦、酵素反応のためのイオン液体によるエリアンサス前処理に関する研究、第 44 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2013 年 11 月 2 日～3 日、静岡大学浜松キャンパス（静岡県、浜松市）

③ 水野　正浩、古邸　洋紀、佐藤　伸明、野﨑　功一、天野　良彦、水生植物に対するイオン液体処理の効果及び酵素糖化性の評価、セルロース学会第 20 回年次大会、2013 年 7 月 18 日～19 日、京都大学宇治キャンパス（京都府、宇治市）

④ Masahiro Mizuno, Kouichi Nozaki, Toshiyuki Itoh, Yoshihiko Amano. Enzymatic hydrolysis of cellulose regenerated from ionic liquid pretreatment using monocomponent cellulase. The 17th International Symposium on Wood, Fiber and Pulping Chemistry. 2013 年 6 月 12 日～14 日、Sheraton Vancouver Wall Center (Vancouver, Canada).

６．研究組織

(1)研究代表者

水野　正浩（MIZUNO, Masahiro）

信州大学・学術研究院工学系・助教

研究者番号：６０４３２１６８