



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	両親媒性リグニン誘導体を用いたオイルパーム空果房およびスギパルプの酵素糖化の改善
Author(s)	バルダント, テウク・ベウナ; 及川, 千皓; 野尻, 昌信 他
Citation	木材学会誌, 56(6), 420-426 https://doi.org/10.2488/jwrs.56.420
Issue Date	2010
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/45031
Type	journal article
File Information	MG56-6_420-426.pdf



表題：

両親媒性リグニン誘導体を用いたオイルパーム空果房およびスギパルプの酵素糖化の改善

著者名：

テウク・ベウナ・バルダント^{*1}、及川千皓^{*1}、野尻昌信^{*2}、幸田圭一^{*3}、
ヤニ・スディヤニ^{*4}、山田竜彦^{*5}、浦木康光^{*3}

英文表題：

Improvement of saccharification of empty fruit bunch and Japanese cedar
pulps with an amphiphilic lignin derivative

英文著者名：

Teuku Beuna BARDANT¹⁾, Chihiro OIKAWA¹⁾, Masanobu NOJIRI²⁾, Keiichi
KODA³⁾, Yanni SUDIYANI⁴⁾, Tatsuhiko YAMADA⁵⁾, Yasumitsu URAKI³⁾

欄外表題：両親媒性リグニン誘導体によるパルプの酵素糖化の改善

脚注

^{*1} 北海道大学大学院農学院 Graduate School of Agriculture, Hokkaido
University, Sapporo 060-8589, Japan

^{*2} 森林総合研究所きのこ・微生物研究領域 Department of Applied
Microbiology, Forest and Forest Products Research Institute, Tsukuba,
305-8687, Japan

- *³ 北海道大学大学院農学研究院 Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan
- *⁴ Research Center for Chemistry, Indonesian Institute of Science (LIPI), Serpong, Tangerang 14513, Indonesia
- *⁵ 森林総合研究所バイオマス化学研究領域 Department of Biomass Chemistry, Forest and Forest Products Research Institute, Tsukuba, 305-8687, Japan

ABSTRACT

A huge amount of lignocellulosic wastes are disposed on an industrial scale as unused biomass both in Japan and in Southeast Asia; including forest thinnings of Japanese cedar wood and empty fruit bunches (EFB) of the oil palm tree. Supposing the production of platform compounds from such unused biomass through enzymatic saccharification, we have developed a cellulase-aid agent by the conversion of acetic acid lignin into an amphiphilic derivative (PE-AL). EFB pulps with 10% and 12% residual lignin and cedar pulp with 11% residual lignin were prepared by kraft and soda pulping processes, respectively, as a pretreatment of enzymatic saccharification. An addition of PE-AL significantly improved the saccharification yield of the cedar pulp, while it improved those of EFB pulps dramatically. After the enzymatic saccharification, the cellulase activity remained in the presence of PE-AL, although no activity was detected in the absence of PE-AL.

Keywords: amphiphilic lignin derivative, cellulase-aid agent, enzymatic saccharification, empty fruit bunch, unbleached cedar pulp

和文概要

日本および東南アジアで多量排出されるスギ間伐材やオイルパームの空果房 (EFB) から酵素糖化を経てバイオエタノールなどのプラットフォーム化合物を製造することを想定して、本研究では、酵素糖化助剤となる両親媒性リグニン誘導体を開発し、スギおよび EFB の糖化に対する効果を検討した。酵素糖化のための前処理として、スギにはアルカリパルプ化、EFB にはクラフトパルプ化を

行い、残存リグニン量約 11%のスギパルプ、および残存リグニン量 10%と 12%の EFB パルプに対し糖化を行った。これらのパルプのセルラーゼ処理時に、リグニン誘導体を添加すると糖化率、特に E F B パルプに対し向上し、処理後も有意なセルラーゼ活性が検出された。

1. 緒 言

東南アジアの主要な商品作物となったアブラヤシは、当初マレーシアでのプランテーションが有名であったが、現在ではインドネシアにも拡大しつつある。インドネシアでの植栽面積は 2008 年で 7.36×10^6 ha であり、アブラヤシの果実から採取されるヤシ油は 18.6×10^6 ton となっている（インドネシア農務省の公表値）。2009 年の植栽面積は 7.82×10^6 ha と推定され、ヤシ油の生産量も 19.8×10^6 ton へと増加している。同省では、2025 年まで、年間 20,000 ha の割合で植栽面積の拡大を計画している。アブラヤシの果実は果実房に重量ベースで 77 % 含まれるが、ヤシ油製造時には、果実を取り除いた空果房（Empty fruit bunch; EFB）が産業廃棄物として排出され、その量はヤシ油の生産量にほぼ匹敵すると見積もられ、1 つの工場からの排出量も日産約 200 ton に達することから、集約型木質系廃棄物と位置付けられる。さらに、伐採期が約 25 年のアブラヤシでは、年間 2.6×10^6 本にも及ぶ膨大な数の樹幹部が伐倒されて廃棄物となり、これらの有効活用が望まれている。その活用法の一つとして、酵素糖化を用いたバイオエタノールの生産が期待されており、種々の研究が進行している¹⁻³⁾。一方、日本でも、代表的造林樹種であるスギの間伐材の利用が望まれ、「バイオマス・ニッポン総合戦略」でもその糖化研究の推進を重要事項と捉えている。

木質バイオマスの酵素糖化における問題は、酵素であるセルラーゼが使用中に失活することであり、その主要因はセルラーゼの基質であるセルロースへの特異的吸着、加えて、残存するリグニンへの非特異的な疎水性相互作用による吸着である^{4,5)}。これらの吸着を抑制するために界面活性剤の添加が検討された^{6,7)}。浦木らは、界面活性能を有するリグニン誘導体が開発できれば、基質中のリグニンへ吸着の抑制、さらには、セルラーゼの基質からの脱離が容易になると考えて、常圧酢酸パルプ化法で得たリグニンと⁸⁾、ジグリシジル基をポリエチレングリコ

ールの両端に持つ化合物との反応によって両親媒性リグニン誘導体 (PE-AL) をセルラーゼ活性増強剤として開発した⁹⁾。この PE-AL は、セルラーゼの保存を緩衝液の状態でも長期間可能にし、さらに、セルラーゼの繰り返し利用も可能にした。この機能は弱い界面活性能に起因すると前報で報告したが、その後の研究で、この誘導体は純水の表面張力を 72.8 mN/m から 36 mN/m まで低下させ、臨界ミセル濃度も検出できるほどの有意な界面活性能を有することが明らかとなった¹⁰⁾。この報告後、非イオン系界面活性剤や長鎖エチレンオキシド鎖を含むポリエチレングリコール (PEG) が、リグノセルロースのセルラーゼ糖化に効果的であることも報告された¹¹⁾。したがって、PE-AL のセルラーゼ活性増強効果は、PE-AL 中の PEG ドメインとリグニンドメインの相乗効果と想定されるが、詳細な作用機構は不明である。

本研究では、クラフトパルプ化によって得られた EFB パルプ³⁾およびアルカリパルプ化で調製されたスギパルプのセルラーゼによる酵素糖化において、PE-AL が前報⁹⁾のセルロース系基質の糖化と同様な効果を発現するかを解明することを目的に、これらパルプの糖化に及ぼす影響について検討すると共に、PE-AL の作用機構を解明する最初の試みとして、ろ紙分解活性¹²⁾に及ぼす影響についても検討した。

2. 実 験

2.1. PE-AL の調製¹⁰⁾

シラカンバの常圧酢酸パルプ化法⁸⁾によって得られた酢酸リグニン (AL) 10 g を 100 mL の 1 M NaOH 水溶液に溶解させた。この溶液にエチレンオキシドの繰り返し単位を約 13 個有するポリエチレングリコールジグリシジルエーテル (PEGDE; ナガセケムテックス社より提供) を 1 g 加え、70 °C で 2 時間攪拌し

た。その後、酢酸を加えて pH 4 まで低下後、反応液を限外ろ過に供した。ろ過には排除限界 1000 Da のメンブレンを用い、供試液が 30 mL まで濃縮されたら蒸留水を 200 mL 加えるという操作を 2 回行った。最後に、この限外ろ過による濃縮液を凍結乾燥して PE-AL を得て、使用するまで減圧下で保存した。

2.2. EFB パルプの調製³⁾

アブラヤシの EFB は、PT Perkebunan NusantaraVIII (Pandeglan, Indonesia) が所有するプランテーションで採取し、乾燥後、3–5 cm の長さに切断した。この EFB に、活性アルカリ 22%、硫化度 30% となるように、NaOH と Na₂S からなる蒸解液を加えた。液比は、4 または 5 で行った。蒸解は、90 分間で 165 °C まで昇温させ、その後、同温度を 90 分間保持した。蒸解後のパルプは、洗浄液が中性になるまで水洗し、ディスクリファイナーに 2 回かけ、液比 5 のパルプ化よりクラークソンリグニン (KL) として 9.96 %、液比 4 より 12.4 % の残存リグニンを有する解繊 EFB パルプをそれぞれ得た。以下では、KL9.96% および KL12.4% の EFB パルプと略記する。

2.3. スギパルプの調製

風乾したスギチップ 1 kg に、水酸化ナトリウム 260 g を含む水溶液 6 L を加え、蒸解助剤として 1,4-dihydro-9,10-dihydroxyanthracene disodium salt (アントラキノン) を 10 g 添加した。この蒸解液を 20 °C から 90 分間かけて 170 °C まで加温し、さらに 170 °C に 150 分間保持した。反応終了後、スギパルプを取り出して十分に水洗し、含水率 70 % になるまで圧縮脱水し、冷蔵庫で保管した。パルプのクラークソンリグニン量は 10.5 % であった。

2.4. ろ紙分解活性 (Filter paper unit; FPU) の測定⁸⁾

セルラーゼはメイセラーゼ（明治製菓社製）を用いて、Adney と Baker が定義した方法¹²⁾に従い、FPU を測定した。この測定法を簡潔に記す。1 cm x 6 cm のろ紙（Whatman No.1; 約 0.05 g）を 1 mL のクエン酸緩衝液（50 mM, pH 5.0）に浸漬して 50 °C まで加熱した。その後、所定量の粉末メイセラーゼをクエン酸緩衝液に溶解した酵素液を加え、60 分間加水分解を行い、3 mL の DNS 試薬（3,5-ジニトロサルチル酸、ロッシェル塩、フェーノールおよびメタ重亜硫酸ナトリウムからなる混合試薬）を加えた。この混合液を 100 °C で 5 分間加熱し冷却後、540 nm の吸光度を測定した。予めグルコースを用いて検量線を作成し、吸光度から糖濃度（Glc 生成量）を求めた。この測定を異なる希釈率の酵素溶液について行い、最終的には、Glc 生成量 2 mg を挟む酵素液の希釈率と Glc 生成量をプロットして 2 mg を与える酵素希釈率を内挿により見積もり、希釈前の酵素液の FPU を算出した。

以下に記す糖化実験において、糖化後の残存活性を FPU 値で表すとき、酵素原液を用いても Glc 生成量が 2 mg が達成できないときは、酵素原液とその希釈液から Glc 生成量を求め、そのプロットを外挿して 2 mg を与える希釈率（実際は 1 を超える）から FPU を求めた。

PE-AL、PEGDE 及びポリエチレングリコール 4000（PEG 4000）が FPU 測定に与える影響を調べる実験では、1 mg 当たり 0.523FPU の活性を持つメイセラーゼを用い、上記添加物を基質に対し 10 %重量で加え、同様な手順で FPU を測定した。

2.5. EFB パルプの酵素糖化

EFB パルプのセルラーゼによる酵素糖化は、まず、1 mg 当たり 0.04 FPU の活性を持つメイセラーゼ 4 g を 1 L のクエン酸緩衝液（1 M, pH 4.5）に溶解した。1.5 g の EFB 前処理繊維を 200 mL のクエン酸緩衝液に懸濁させて、基質

1 g 当たり 20 FPU に相当するメイセラーゼ緩衝液を加えた。振とう機を用い 100 rpm で攪拌しながら、28 °C で 48 時間糖化を行った。反応後は、G3 ガラスフィルターを用いて不溶部をろ取し、十分水洗後、乾燥して重量を測定した。この不溶部重量から次式により糖化収率 (SA) を求めた。

$$SA (\%) = \frac{[EFB \text{ 前処理繊維重量 (g) } - \text{不溶部重量 (g) }]}{EFB \text{ 前処理繊維重量 (g) }} \times 100$$

また、KL12.4% の EFB パルプについて、糖化後のろ液をポリスルホン製のメンブレン (排除限界 10 kDa) を用いた限外ろ過に供して、酵素のみを単離、濃縮した。その後、FPU 測定を行った。

2.6. スギパルプの酵素糖化

スギパルプの酵素糖化には、セルラーゼとして Genencor 社製の GC220 を用いた。パルプを 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 懸濁させた。さらに、PE-AL を基質に対し 0–10 % の重量比なるように加え、その後、基質 1 g に対し 20 FPU になる酵素を加えた。最終的には 溶液量 10 mL、基質濃度が 2 % (w/v) となった。50 °C で 120 時間、酵素加水分解を行い、反応液を遠心分離した。上清液の一部を取り出し、グルコース (Glc) 濃度をバイオセンサ BF-5 (王子計測社製) を用いて測定した。また、0.5 mL の上清液を取り出し、ミリポア Ultrafree-0.5 (Biomax-5K) に 2 回掛けて限外ろ過を行い、酵素濃縮液を得た。この液に緩衝液を加えて 0.40 mL に調整後、0.20 mL を Whatman No.1 ろ紙の分解に供した。この時の Glc 生成量と酵素糖化に供する前の酵素緩衝液から生成した Glc 量との比から残存活性を求め百分率で表した。

さらに、PE-AL の添加量を 10 % に固定して反応液の液量を 150 mL に増やし、基質 1 g に対し 10 FPU 及び 20 FPU 加え、50 °C、48 時間の酵素加水分解も行った。反応後は、ろ液を前項の限外ろ過に供し、30 mL まで濃縮した。その後、

0.1 M 酢酸緩衝液を 200 mL 加え再度限外ろ過で 30 mL まで濃縮した。この操作を 2 度行い、最終的には、10 FPU を用いたときは、15 mL、20 FPU 用いたときは 30 mL まで濃縮して、FPU 測定に供した。

以上の FPU 測定およびパルプ糖化実験は、各々の実験に対し 3 回の繰り返し実験を行い、その平均値を測定値とした。

3. 結果および考察

3.1. スギパルプの酵素糖化

以前の研究⁴⁾では、PE-AL とセルラーゼが、PE-AL 中のリグニンが関与する疎水的相互作用、さらには、PE-AL 分子中に残存しているエポキシ基がセルラーゼのアミノ基や水酸基などと反応して、共有結合を含む化学的相互作用により複合体を形成し、酵素活性が長時間維持されたと推定した。この仮定を実証する予備実験として、*Trichoderma reesei* 由来の Novozyme NS50013 を既報¹³⁾に準じて陰イオン交換カラムを用いて SDS-PAGE で 1 バンドになるまで精製した CBH I および CBH II と、分子量分画した PE-AL の複合体形成について SDS を加えないポリアクリルアミド電気泳動 (native PAGE) を用いて検討した。その結果、複合体形成による明確な分子量の増加が観測されなかった。したがって、PE-AL の添加には、以前の研究⁹⁾で行ったセルラーゼと PE-AL を混合後、1 週間複合化を図ってから酵素糖化実験に用いるという操作は無意味と判断して、単に基質、PE-AL および酵素 (GC220) を混合するという方法でスギパルプの酵素糖化を行った。

Fig. 1 に、PE-AL の添加量と 120 時間の酵素加水分解により生じた Glc 濃度との関係を示す。PE-AL を基質に対し 2 % 添加するだけで、Glc 濃度は約 40 % 増加し、その後、添加量の増加と共に Glc 濃度は徐々に増加し、PE-AL がスギ

の未漂白パルプの酵素糖化にも有用な酵素助剤であることが示された。しかし、漂白パルプの糖化では、有意な効果が確認されなかった。

酵素糖化後の残存セルラーゼ活性を Fig. 2 に示す。PE-AL を添加しない時は、残存活性は検出できず、2 % 添加でも実験誤差範囲の活性しか検出できなかった。しかし、5 % 添加で初期活性の 20 % が残存しており、10 % 添加条件では 50 % と、高い活性の残存が確認できた。糖化による活性の消失は、セルラーゼが基質および基質中のリグニンへの吸着が主要因と考えられている^{4,5)}。したがって、PE-AL による酵素糖化率の向上および高い残存活性は、基質などへのセルラーゼ吸着の抑制に起因すると考えられ、漂白パルプの糖化に対しては PE-AL が有意な効果を示さなかった事実を考慮すると、PE-AL は主にリグニンへの吸着を抑制していると推定される。

セルラーゼを用いる木質バイオマスの糖化では、一般的に FPU が酵素活性の表示に用いられるが、上記の小スケールでの糖化実験では、残存活性を FPU で求めることができなかった。そこで、残存 FPU 活性を求めるために、反応液量を 150 mL に増やし、再度糖化実験を行った。得られた結果を Table 1 に示す。本研究では、酵素活性が低く 2 mg が達成できない条件では、外挿して値を求めているために、FPU が高く見積もられている。本実験において、定義に従った内挿法により FPU を求めるには、残存活性が 37 % 以上であった。よって、Table 1 で、この閾値より低い値には、* を付した。また、本実験では、日本製紙より提供された漂白パルプを酵素糖化の指標となる参照試料として使用した。基質 1 g 当たり 10 FPU の酵素を用いた漂白パルプの糖化では、90.5 % の糖化収率を与え、残存活性は 32% 検出された。20 FPU を添加したときは、95.9 % の糖化収率で、残存活性は 51% であった。一方、未漂白スギパルプでは、糖化収率は予想される通り漂白パルプより顕著に低く、残存活性も漂白パルプより低かった。PE-AL の添加により、糖化収率は若干向上したに過ぎなかったが、著量の残存

活性が確認できた。酵素の失活は、基質等への吸着と、酵素使用中、特に、高温での構造変化による変性が原因と考えられるが、セルラーゼの場合、 β -glucosidase は 50 °C の条件で失活するが、*Trichoderma* の主要酵素である CBH は 50 °C でも活性が長時間維持される¹⁴⁾。これらのことを考慮すると、本研究で用いたセルラーゼは、リグニンとの相互作用により未漂白パルプへ多量吸着したと考えられる。そこで、PE-AL はリグニン含有基質へのセルラーゼ活性を直接増強するのではなく、その吸着を抑制して、前報⁹⁾で報告したセルラーゼの繰り返し使用を可能にしたと推定される。

3.2. EFB パルプの酵素糖化

前項のスギパルプの結果を基に、EFB パルプに対し 10 %の PE-AL を加えて、酵素糖化を行った。本実験では、インドネシアでも入手が可能であったメイセラ一ゼを用いた。至適反応温度を調べた予備実験より、EFB パルプは室温 (28 °C) でも、かなりの糖化率が達成された。そこで、作業時のコスト及び PE-AL 添加の優位性を確認する観点から、室温での酵素糖化を検討した。その結果を Table 2 に示す。

PE-AL の添加により、いずれの条件でも糖化収率はスギパルプの糖化より顕著に向上した。特に、KL9.96%の EFB パルプの基質濃度 7.5 g/L における糖化では、30 %以上の収率の向上が観測され、リグニンを除したホロセルロースに対する収率は 94.4 %と、室温における糖化でもほぼ全多糖が水溶化したことが示され、PE-AL のセルラーゼ活性向上効果が EFB パルプで顕著に発現した。

KL12.4%の EFB パルプを用い基質濃度 7.5 g/L における糖化後の残存 FPU 活性の測定を試みた。残念ながら残存活性が少なく、正確な FPU は測定できなかった。スギパルプの糖化実験で用いた外挿法による FPU の算出では、残存活性が、糖化前の初期活性とほぼ等しくなった。これは、低濃度の酵素が高濃度の酵

素より、酵素量当たりの Glc 生成量が多いことに起因しており、過度な外挿は大きな誤差を生じさせることになる。そこで、過度な外挿を行わない Glc 生成量 1.5 mg を与える FPU を求めると残存活性は初期の 33.9 % となり、外挿による誤差を考慮するとその活性はより少ないと判断でき、高い糖化収率を与える EFB には、漂白パルプのようにその残存活性は少ないと言える。スギパルプと EFB パルプに及ぼす PE-AL の効果は異なり、その原因はパルプの性状および残存リグニンの構造に起因とすると推測されるが、詳細は、まだ、検討中である。

高基質濃度 (45 g/L) においても PE-AL の明確な効果は確認できるが、その糖化収率は低い。これは酵素の運動性が高基質濃度条件のために制限され、酵素活性の低下を招いたことを意味する。糖化後のエタノール発酵およびその濃縮工程を考慮する時、高基質濃度での糖化収率の向上が重要な課題であり、現在、この課題に対処する新たなリグニン誘導体の開発を進めている。

3.3. PE-AL が FPU 活性に及ぼす影響

これまで、セルラーゼ活性を表すのに、一般的に用いられている FPU を基に残存活性等を論じてきたが、以前の研究⁹⁾を含めて FPU に及ぼす PE-AL の効果は検討していなかった。そこで、メイセラーゼに PE-AL を添加して、FPU に与える影響について調べた。メイセラーゼには、乳糖などの安定化剤が入っているために、これらが FPU 測定にもたらす影響を排除するために、限外ろ過により低分子の安定化剤を除去したメイセラーゼも調製して、併せて測定を行った。限外ろ過前後のタンパク質含有量を、クマーシーブリリアントブルー(CBB)を用いた Bradford 法¹⁵⁾により測定した結果、メイセラーゼのタンパク質含有量は 52.2 % であり、残りが安定化剤などの添加物であることが示された。

Table 3 に、PE-AL、PEGDE およびポリエチレングリコール (PEG) 4000 をろ紙に対し 10 % 添加して活性を測定した結果を掲載した。この表では、酵素

1 mg 当たりの FPU を表している。PE-AL を添加すると、FPU 活性は、限外ろ過を行わない時で 0.384 FPU/mg から 0.364 FPU/mg、また、行った時で 0.523 FPU/mg から 0.497 FPU/mg と、限外ろ過の有無に関わらず減少した。このことより、PE-AL はリグニンを含まないろ紙の分解活性には負の効果をもたらすことが示唆された。しかし、興味深いことは、PE-AL の原料である PEGDE が PE-AL の場合とは対照的に、限外ろ過の有無に関わらず、明確な FPU 活性向上効果をもたらしたことである。

Borjesson らにより、高分子量の PEG は針葉樹の酵素糖化を改善し、その効果は PEG 4000 以上で発現するとの報告がなされている¹⁶⁾。そこで、PEG 4000 を用いて FPU 活性に与える影響を調べた。この添加物は、限外ろ過の有無に関わらず、顕著な活性の増加を示した。文献では、リグニンが存在する基質を対象とした場合、PEG がパルプ中の残存リグニンに吸着し、*Trichoderma reesei* の主要酵素である Cel7A (CBHI) の基質への吸着を抑制することで糖化向上に至ったと論じている。しかしながら、リグニンを含まない基質であるろ紙を対象とした本研究からは、PEG の添加が、酵素のセルロースからの遊離に対しても正の効果をもたらす方向で関与するために、FPU 活性が向上したと推測される。PE-AL は PEG 4000 よりエチレンオキシド繰り返し単位の短い PEG 鎖を含有するが、これらの FPU の結果から、PE-AL は PEG 4000 とは異なる機構でセルラーゼの加水分解作用に寄与していると示唆される。より詳細な機構解明は今後の課題であり、セルラーゼ成分の単離・精製を進めると共に、吸着機構および活性への寄与について検討している。

4. 結 論

本研究では、セルラーゼとして Genencor GC220 とメイセラーゼを用いて、

アルカリパルプ化で得たスギパルプおよびクラフトパルプ化で得た EFB パルプの酵素糖化を行い、PE-AL がこれらの基質の糖化にも有効であるかを検討したところ、スギパルプには若干の糖化収率の向上、EFB パルプには顕著な向上を観測した。これらのセルラーゼは *Trichoderma* 属由来であるので、PE-AL は *Trichoderma* 属のセルラーゼ活性向上に寄与したと言える。また、PE-AL を始め数種の添加剤を用いて FPU 活性に与える影響を検討した結果、PE-AL は PEG 4000 とは異なる機構でセルラーゼの活性挙動に対して関与していることが見出され、単に PE-AL 中の PEG 部分が未漂白パルプの糖化率向上に寄与しているわけではないことも示唆された。このセルラーゼ活性向上機構の解明と共に、高基質濃度条件においても効果がある新規セルラーゼ助剤の開発、さらには、糖化後の残存活性を高く維持し連続糖化が可能となるセルラーゼ助剤の開発も今後の課題であり、現在、より界面活性能が高い両親媒性リグニン誘導体を用いて¹⁷⁾、その効果を検討している。

謝 辞

本研究は、農林水産省「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発 (BM-D1320)」プロジェクトの一環として行った。茲に、謝意を表す。また、予備実験として行ったセルラーゼに単離・精製に協力して頂いた東京大学の五十嵐圭日子准教授に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Yano, S., Murakami, K., Sawayama, S., Imou, K., Yokoyama, S.: *Journal of the Japan Institute of Energy* **88**, 923-926 (2009).
- 2) Kaida, R., Kaku, T., Baba, K., Oyadomari, M., Watanabe, T., Hartati, S., Sudarmonowati, E., Hayashi, T.: *J. Wood Sci.* **55**, 381-386 (2009).
- 3) Sudiyani, Y., Fitria, I., Idiyanti, T., Haroen, W. K., Hermiati, E.: *Journal of Tropical Wood Science*, **8**(1), 24-31 (2010).
- 4) Ooshima, H., Burns, D. S., Converse, A. O: *Biotechnol. Bioeng.* **36**: 446-452 (1990).
- 5) Sutcliffe, R., Saddler, J.N., *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **17**, 749. (1986)
- 6) Ooshima H, Sakata M, Harano Y. *Biotechnol Bioeng* **28**: 1727-34. (1986)
- 7) Castanon M, Wilke CR. *Biotechnol Bioeng* ;XXIII:1365-72. (1981)
- 8) 浦木康光, 佐野嘉拓, 笹谷宜志: *紙パ技協誌*, **45**(9), 1018-1024 (1991).
- 9) Uraki, Y., Ishikawa, N., Nishida, M., Sano, Y. (2001) *J. Wood Sci.* **47**(4): 301-307
- 10) Homma, H., Kubo, S., Yamada, T., Matsushita, Y., Uraki, Y. *J. Wood Chem. Technol.* **28**(4), 270-282 (2008).
- 11) Eriksson, T., Börjesson, J., Tjerneld, F., *Enzyme Microb. Technol.* **31**, 353-364. (2002)
- 12) Adney, B., Baker, J. LAP-006 NREL Analytical Procedure. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. (1996).
(<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42628.pdf>)
- 13) Samejima M, Sugiyama J, Igarashi K, Eriksson K-E L. *Carbohydr Res* **305**:281-288. (1998)
- 14) B. J, Hagerdal, D. Ferchak and E. K. Pye, *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1515 (1980).

- 15) Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
- 16) Borjesson, J., Peterson, R., Tjerneld, F.: *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 754-762 (2007).
- 17) Homma H; Kubo S; Yamada T; Koda K; Matsushita Y; Uraki Y. *J. Wood Chem. Technol.* **30**:164-174. (2010)

Table 1. Saccharification of Japanese cedar pulp with Genencor GC220

Substrate	Cellulase charge (FPU/g of substrate)	Saccharification yield (%)	Residual cellulase FPU activity (%)
Bleached pulp ^{a)}	10	90.5	32.0*
	20	95.9	51.0
Unbleached pulp	10	53.1 (59.3)	20.5*
	20	64.0 (71.4)	33.7*
Unbleached pulp with PE-AL	10	55.2 (61.6)	74.0
	20	64.2 (71.6)	100

Note; Parentheses indicate saccharification yields based on holocellulose. ^{a)}This bleached pulp was supplied from Nippon paper Compony. *This FPU activity was obtained by the extrapolation of measurement activity to the activity for 2 mg of Glc generation that was a definition value in FPU measurement in the reference literature 12.

Table 2. Sacchrification of EFB pulp with Meicelase.

Substrate	Substrate consistency (g/L)	PE-AL	Saccharification yield (%)
EFB pulp with KL 9.96%	7.5	X	51.5 (57.2)
	7.5	O	84.4 (94.7)
EFB pulp with KL 9.96%	45	X	23.5 (26.1)
	45	O	50.0 (55.5)
EFB pulp with KL 12.4%	7.5	X	49.5 (56.5)
	7.5	O	71.4 (81.5)

Note: 20 FPU / g of substrate was used in this saccharification. X, no addition of PE-AL.O, 10% of PE-AL based on substrate weight was added to the reactor. Parentheses indicate saccharification yields based on holocellulose.

Table 3. FPU activity of Meicelase in the presence of additives.

Additives	Ultrafiltration	Cellulase activity (FPU/mg of enzyme)
None	O	0.523
	X	0.384
PE-AL	O	0.497
	X	0.364
PEGDE	O	0.565
	X	0.421
PEG 4000	O	0.760
	X	0.459

Note; O, cellulase was used after ultrafiltration to remove stabilizer.
X, cellulase was directly used without ultrafiltration. The weight in FPU/mg was dry weight of cellulase preparation.

Figure captions

Fig. 1. Glucose generation from Japanese cedar pulp with Genencor GC220 in the presence of PE-AL.

Note; Pulp consistency is 2%(w/v).

Fig. 2. Residual cellulase activity after saccharification of Japanese cedar pulp with Genencor GC220 in the presence of PE-AL.

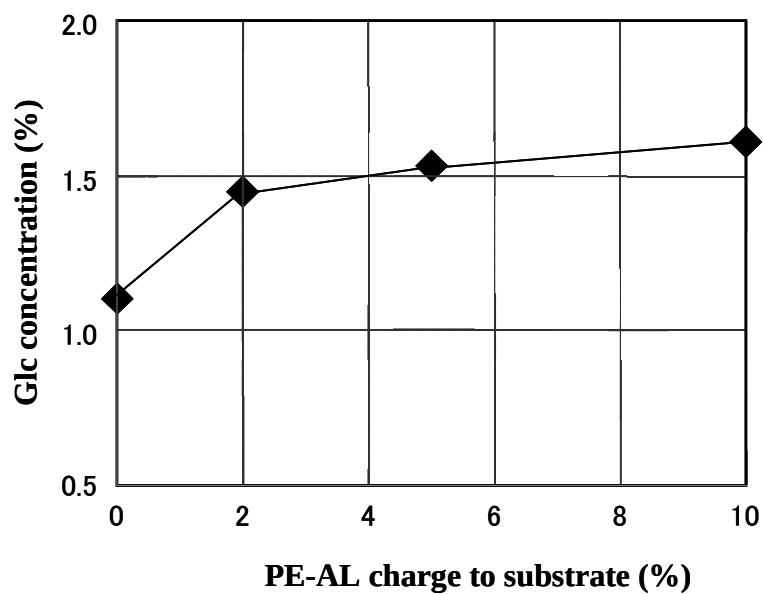


Fig. 1. Glucose generation from Japanese cedar pulp with Genencor GC220 in the presence of PE-AL.

Note; Pulp consistency is 2%(w/v).

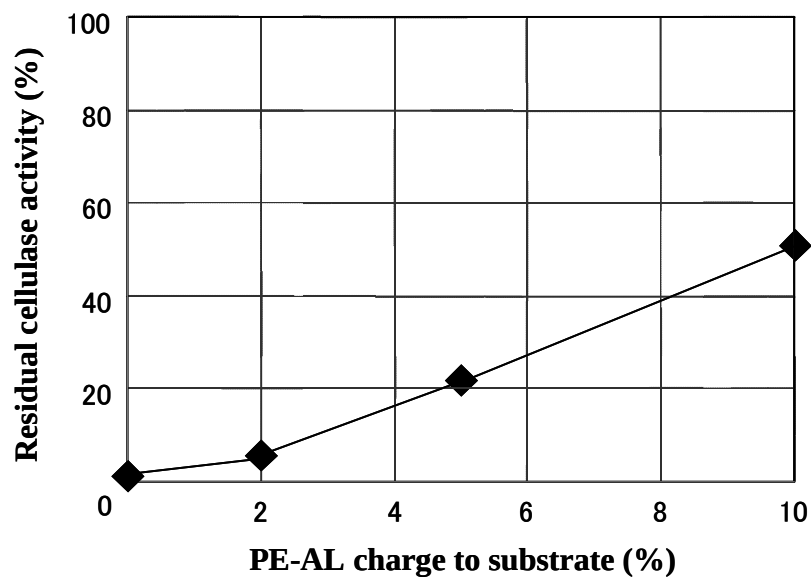


Fig. 2. Residual cellulase activity after saccharification of Japanese cedar pulp with Genencor GC220 in the presence of PE-AL.