



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                                                                                        |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | Enzymatic Saccharification of Cedar and Sago Waste Pulps with Amphipathic Lignin Derivatives as Cellulase-Aid agent [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s)           | Ina, Winarni                                                                                                                                                                           |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                                                                                  |
| Degree Name         | 博士(農学)                                                                                                                                                                                 |
| Dissertation Number | 甲第11107号                                                                                                                                                                               |
| Issue Date          | 2013-09-25                                                                                                                                                                             |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/53770">https://hdl.handle.net/2115/53770</a>                                                                                                      |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a>                                                              |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                                        |
| File Information    | Ina_Winarni_review.pdf, 審査の要旨                                                                                                                                                          |



## 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博 士（農学） 氏名 Ina Winarni （イナ ウィナルニ）

|       |     |     |         |
|-------|-----|-----|---------|
| 審査担当者 | 主 査 | 教 授 | 浦 木 康 光 |
|       | 副 査 | 教 授 | 佐 野 雄 三 |
|       | 副 査 | 教 授 | 森 春 英   |
|       | 副 査 | 講 師 | 幸 田 圭 一 |

## 学 位 論 文 題 名

### Enzymatic Saccharification of Cedar and Sago Waste Pulps with Amphipathic Lignin Derivatives as Cellulase-Aid Agent

（両親媒性リグニン誘導体を助剤としたスギ及びサゴ廃棄物パルプの酵素糖化）

本論文は、全4章からなる総頁数83頁の英文論文である。論文には、図21、表4、引用文献112が含まれ、別に参考論文1編が添えられている。化石資源の枯渇及び高騰が懸念される今日、バイオマスを原料とするバイオエタノールなどの液体燃料の生産が世界的な課題となっている。この生産工程は、バイオマスを糖化してグルコースなどの単糖類を作り、その後、発酵によりエタノールを製造する。単糖類を原料とする発酵では、その他にも多種のケミカルスの調製が可能であり、単糖類の製造がケミカルス製造の重要な鍵となっている。第1世代のバイオエタノールはトウモロコシなどのデンプンから作られ、飼料等の高騰を招いた。そこで、食糧生産と競合しない原料として、第2世代のバイオエタノールはリグノセルロースである木質バイオマスからの製造に力点が置かれた。木質バイオマスの糖化には、酸糖化と酵素糖化があるが、環境負荷を考慮して酵素糖化が望ましいと考えられている。しかし、セルロース分解酵素であるセルラーゼの価格が高く、バイオエタノール生産コストの約50%を占めるとの試算もあり、酵素製造コストの低減と共に、酵素の長期使用がセルラーゼを利用する上での課題となっている。

本研究では、セルラーゼの加水分解活性を上昇させ、且つ、酵素の長期使用を可能とするセルラーゼ助剤の開発を目的とし、日本で林地残材として未利用なスギ間伐材及び、インドネシアでデンプンを採取後のサゴヤシ廃棄物の糖化について検討した。

セルラーゼの長時間利用を妨げる要因は、糖化反応中に酵素活性が低下することである。その原因は、セルラーゼが基質のセルロースに非生産的で不可逆的な吸着を起こすことに加えて、基質中の残存リグニンとの疎水的相互作用による非特異的な吸着によって引き起こされると考えられている。これらの吸着現象を抑制する目的で、1970年代よりセルラー

ぜに対する水溶性固定化酵素という概念が提案されていた。Winarni 氏は、この固定化酵素担体に界面活性能を有する両親媒性リグニン誘導体を用いることを考え、まず、スギチップをソーダ蒸解したパルプの酵素糖化に使用した。この実験では、シラカンバのオルガノソルブパルプ化で得られたリグニンから 3 種の両親媒性リグニン誘導体（PEGDE-、EPEG-と DAEO-リグニン）を調製して用いている。その中で、EPEG-リグニンが酵素糖化率を向上させた上に、使用後も 100%の酵素活性を保持させる機能を有することを明らかにした。

また、この作用機作を解明する目的で、酵素とリグニン誘導体との相互作用について検討した。全てのリグニン誘導体が、セルラーゼ構成酵素の CBH II に直接強固に吸着することを見出した。この誘導体の部分構造である PEG のみでも、糖化率を向上させるとの報告もあり、その相互作用の比較も行った。PEG のみでは、CBH II に殆ど吸着せず、PEG と両親媒性リグニン誘導体は異なる機構で酵素糖化の向上に寄与していることが明示された。

この結果を基に、酵素糖化用基質もリグニン誘導体も同一資源から調製した自己完結型の酵素糖化を検討した。原料は、インドネシアのサゴヤシ由来のデンプン抽出滓であり、現在、農産廃棄物として取り扱われているものである、この廃棄物中に残存するデンプンを温和な加水分解で除去後、ソーダ蒸解に供して、基質となるパルプを調製した。また、蒸解廃液からリグニンを単離し、さらに、両親媒性誘導体へと変換した。これらの材料を用い、酵素の繰り返し使用における酵素糖化率の変化を追跡した。この実験では、一度使用した酵素は、限外濾過で糖類を除去して、再使用に供した。多量の残存リグニン（10.2%）を含有するパルプを基質とし、添加剤を加えないコントロール実験では、1 回目の糖化率 77%が 4 回目には 3%まで減少した。しかし、リグニン誘導体を添加した系では、いずれの誘導体も初期糖化率が 80%以上で、4 回目でも約 70%の糖化率を示し、酵素の繰り返し利用が可能であることを明らかにした。

以上のように、この研究では、リグノセルロースの酵素糖化後のセルラーゼ活性を高いレベルで維持する両親媒性リグニン誘導体の開発に成功し、その作用機作を明らかにした。この成果は、酵素の繰り返し利用を可能にすることや、酵素を追加することなく基質の連続投入を可能にすることなど、糖化における酵素のコスト低減に寄与する。このことは、さらに、未利用資源となっているスギ間伐材や、サゴヤシ廃棄物の有効利用にもつながり、資源循環型社会の構築に向けた木質バイオマスの利活用にも資する研究であることを示唆している。

よって、審査員一同は、Ina Winarni 氏が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。