

博士論文

広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化に関する研究

櫻木 潔



- 目次 -

|        |                               |    |
|--------|-------------------------------|----|
| 1.     | 序論.....                       | 1  |
| 1.1.   | リグノセルロース系バイオマス.....           | 2  |
| 1.2.   | リグノセルロース系バイオマスの生化学変換プロセス..... | 7  |
| 1.2.1. | 生化学的変換プロセス.....               | 7  |
| 1.2.2. | 酵素糖化前処理.....                  | 9  |
| 1.2.3. | 酵素糖化プロセス.....                 | 15 |
| 1.3.   | 本研究の目的.....                   | 21 |
| 2.     | アンモニア前処理バイオマスの酵素糖化特性.....     | 22 |
| 2.1    | 目的.....                       | 23 |
| 2.2    | 実験.....                       | 23 |
| 2.3    | 結果.....                       | 27 |
| 2.4    | 考察.....                       | 42 |
| 2.5    | 結論.....                       | 43 |
| 3.     | ホロセルロースの酵素糖化特性.....           | 44 |
| 3.1.   | 目的.....                       | 45 |
| 3.2.   | 実験.....                       | 45 |
| 3.2.1. | 試料調製.....                     | 45 |
| 3.3.   | 結果.....                       | 47 |
| 3.4.   | 考察.....                       | 66 |
| 3.5.   | 総括.....                       | 68 |
| 4.     | 広葉樹由来木質バイオマス糖化酵素の探索.....      | 69 |
| 4.1    | 目的.....                       | 70 |
| 4.2    | 実験.....                       | 70 |
| 4.3    | 結果.....                       | 74 |
| 4.4    | 考察.....                       | 86 |

|      |                            |     |
|------|----------------------------|-----|
| 4.5  | 総括.....                    | 88  |
| 5.   | 広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化の効率化..... | 89  |
| 5.1. | 目的.....                    | 90  |
| 5.2. | 実験.....                    | 90  |
| 5.3. | 結果.....                    | 91  |
| 5.4. | 考察.....                    | 95  |
| 5.5. | 総括.....                    | 96  |
| 6.   | 総括.....                    | 97  |
| 6.1. | 総括.....                    | 98  |
| 6.2. | 今後の展望.....                 | 100 |
| 7.   | 参考文献.....                  | 103 |
| 8.   | 謝辞.....                    | 115 |

## 1. 序論

## 1.1. リグノセルロース系バイオマス

### 1.1.1. リグノセルロース系バイオマスの利用

バイオマスは生物資源の量をあらわす概念で、「再生可能な生物由来の有機性資源で化石資源を除いたもの」とされている。バイオマスは再生可能であり、かつカーボンニュートラルであることから、その利用は循環型社会の構築に有効であると考えられている。現在もサトウキビやトウモロコシなどのバイオマス原料から、バイオエタノールなどの有用物質が生産されているが、その利用拡大に伴って食料生産との競合や資源量の限界が問題となってきた。一方で、リグノセルロース系バイオマスには、主なものとして木質バイオマス（広葉樹、針葉樹）と草本バイオマス（エリアンサス、稲わら、コーンストバーなど）が含まれる。木質バイオマスは草本バイオマスに比べて単位面積当たりの年間生産量は少ないが、通年伐採が可能であり、貯蔵安定性が高い利点がある。なかでも広葉樹由来木質バイオマスは、短周期で収穫でき、食料との直接的な競合が避けられ、かつ一定の資源量が望めることから、地球温暖化抑制や化石資源代替のために、一層の活用拡大が期待されている。

### 1.1.2. リグノセルロース系バイオマスの主要構成成分と細胞壁構造

リグノセルロース系バイオマスは、セルロースおよびヘミセルロースのような多糖類と、リグニンのようなフェノール性化合物を主成分とする (Table 1.1) (Eriksson *et al.*, 1990)。これらのリグノセルロース系バイオマス構成成分は、複雑な混合体として細胞壁に存在することで、物理的および生化学的に強固な構造を示すと考えられている (Himmel *et al.*, 2007)。

一般にリグノセルロース系バイオマス細胞壁は、一次壁(P)と二次壁(S)に分けられ、さらに二次壁が三つの層に分けられるという大まかな概念が広く受け入れられている (Brändström, 2002)

(Figure 1.1)。二次壁は多層構造をとることが知られているが、セルロース、ヘミセルロースおよびリグニンの配置は様々なモデルが提案されている (Atalla & Agarwal, 1985, Åkerholm & Salmén, 2003, Salmén, 2004) (Figure 1.2)。本節では、リグノセルロース系バイオマスの主要な構成成分であるセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンについて示す。

Table 1.1 Major chemical composition of lignocellulosic biomasses(Pettersen, 1984, Eriksson *et al.*, 1990)

| Lignocellulosic biomass | Cellulose [wt%] | Hemicellulose [wt%] | Lignin [wt%] |
|-------------------------|-----------------|---------------------|--------------|
| Hardwoods               | 40-55           | 20-40               | 15-25        |
| Softwoods               | 45-50           | 25-35               | 25-30        |
| Grasses                 | 25-40           | 35-50               | 10-30        |

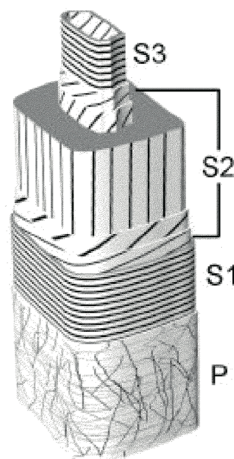


Figure 1.1 Model of cell wall layers in a latewood fibre. Wood fibre showing the different cell wall layers; primary wall (P), S1, S2 and S3 secondary cell wall layers (Brändström, 2002).

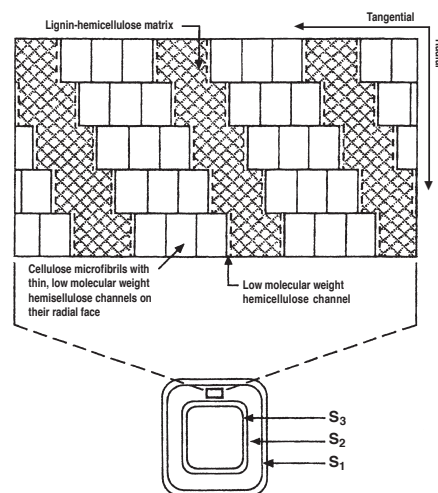


Figure 1.2 Proposed ultrastructural model for the arrangement of wood polymers (Larsen *et al.*, 1995).

### 1.1.2.1. セルロース

リグノセルロース系バイオマスの最も主要な構成成分であるセルロースは、植物、藻類、真菌、細菌などによって毎年約 $4 \times 10^{10}$ トンが生産されていることから(Coughlan, 1985)、地球上に最も豊富に存在する再生可能な生物由来有機資源である。セルロースはD-グルコピラノースが $\beta$ -1,4グリコシド結合した高分子化合物であり、グルコース1残基ごとに $\beta$ -1,4グリコシド結合を軸として $180^\circ$ 回転していることから、構造上の反復単位はセロビオースである(Figure 1.3)。特にアノマー炭素を有するセルロース分子鎖の末端は還元末端と呼ばれ、他端は非還元末端と呼ばれる。

セルロース分子鎖同士は多数収束することで結晶化し、植物細胞壁においては幅数nm程度(Gardner & Blackwell, 1974, Brown & Montezinos, 1976, Hon, 1994, Persson *et al.*, 2004)、重合度2,000以上(Hon, 1994)のマイクロフィブリルを形成している。セルロースには結晶領域と非晶領域が存在し(Verlhac *et al.*, 1990, Hon, 1994, O'sullivan, 1997)、天然に存在する結晶形としてセルロースI( $I_\alpha$ および $I_\beta$ )が知られている(Atalla & VanderHart, 1984, Bayer *et al.*, 1998)。セルロースIでは、C3位水酸基(OH-3)とO-5、OH-2とOH-6の間で分子内水素結合が形成されており(Nishiyama *et al.*, 2002)、セルロースマイクロフィブリルは寄り集まってさらなる高次構造を形成し、これが植物細胞壁の一次壁や二次壁に存在するために、植物は高い物理強度および難生分解性を示すと考えられている。

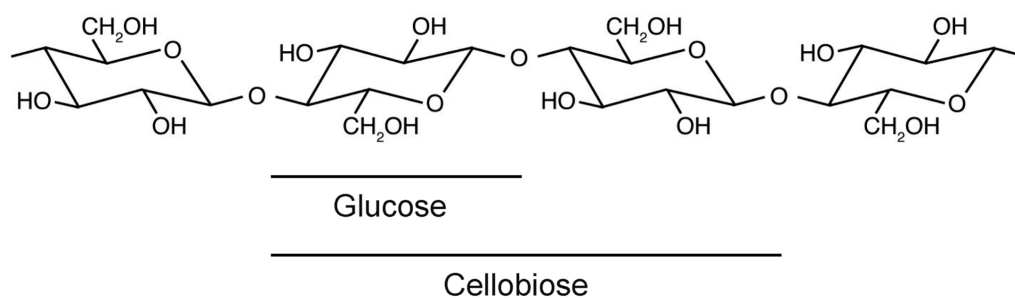


Figure 1.3 Structure of cellulose with cellobiose unit linked through  $\beta$ -1,4-glycosidic bond.

### 1.1.2.2. ヘミセルロース

植物細胞壁の主要構成成分の一つであるヘミセルロースは、D-グルコース、D-ガラクトース、D-マンノース、D-キシロース、L-アラビノース、D-グルクロン酸および4-O-メチル-D-グルクロン酸(Adler, 1977)などの構成成分からなるヘテロなポリマーである。特に広葉樹のヘミセルロース



は、D-キシロピラノースが $\beta$ -1,4結合したポリマーを主鎖とし、これに4-O-メチルグルクロン酸が $\alpha$ -1,2結合し、さらにキシラン主鎖の2位および/あるいは3位にアセチル基が結合した4-O-メチルグルクロノキシランがヘミセルロースの約9割を占め(Figure 1.4a)、他に数%のグルコマンナンを含んでいる(Timell, 1967, Ebringerová & Heinze, 2000)。針葉樹では、4-O-メチルグルクロン酸側鎖の他に $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)結合したアラビノース側鎖を持つアラビノグルクロノキシランが全ヘミセルロースの約1/3を占め(Figure 1.4b)、他にヘミセルロースの約1/3分をグルコマンナンが占めている(Ebringerová, 2005)。また、草本バイオマスのキシランは、キシロース単位の2位および/または3位にL-アラビノースの側鎖を有するアラビノキシランと主とする。このアラビノース側鎖の5位には、フェノール類(主にフェルラ酸および*p*-クマル酸)が結合していることも報告されている。このように、ヘミセルロースはさまざまな単糖を構成成分として含むヘテロな多糖であり、さらにグルクロン酸などの側鎖やメチル基などの修飾基を有して、細胞壁中に不均一に存在している。またヘミセルロースは、セルロースと水素結合によって会合し、リグニンとはエーテルやエステル結合していると考えられている(Eriksson *et al.*, 1980)。ヘミセルロースはバイオマスの種類によって含有量やその組成に差があることから(Heredia *et al.*, 1995, Ebringerová, 2005)、植物細胞壁の三次元構造を決定する重要な要因であると考えられている。

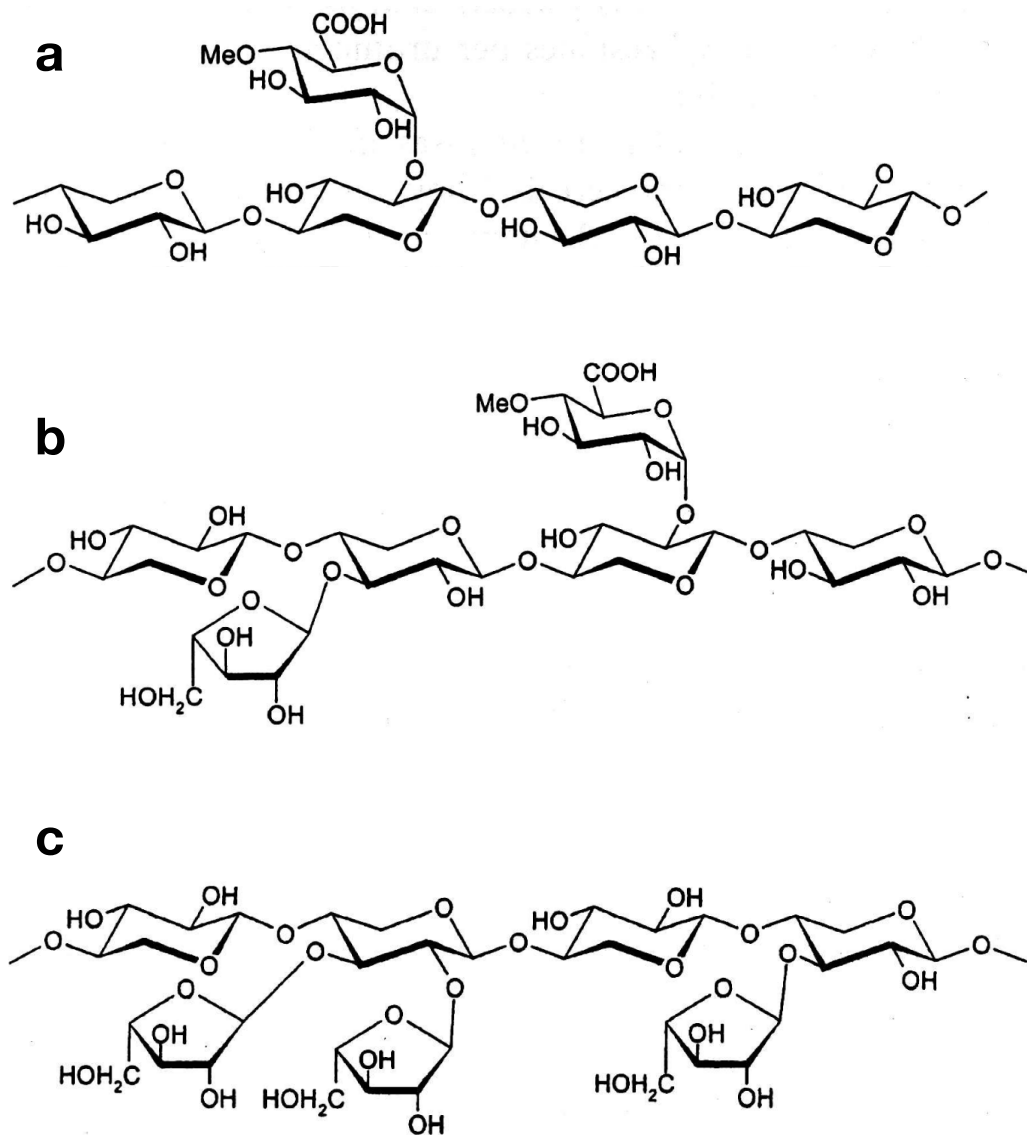


Figure 1.4 Structures of hemicellulose from lignocellulosic biomass. a: Glucuronoxylan, b: Arabinoglucomannan, c: Arabinoxylan (Ebringerová, 2005)

### 1.1.2.3. リグニン

リグニンは植物細胞壁を構成する主成分の一つであり、広葉樹においては構成成分の20~30%を占め、針葉樹においては構成成分の25~35%を占めている(Pettersen, 1984, Eriksson *et al.*, 1990)。リグニンは無定形のポリフェノールであり、3種類のフェニルプロパンユニット、すなわちコニフェニルアルコール、シナピルアルコールおよび

-クマリルアルコールの脱水縮合物からなる(Figure 1.5)(Lin & Dence, 2012)。リグニンはセルロースなどの天然ポリマーに見られる規則正しい結晶性のポリマーではなく、物理的、化学的に不均一な物質である。スプルーースやブナ

由来リグニンの構造モデルが提案されているが(Nimz, 1974, Adler, 1977)、これらはリグニンの構造式と見なされるものではなく、構成要素の結合様式や全体のバランス表現していると理解する必要がある。また、リグニンはどこどころアラビノース、キシロースおよびガラクトース基と化学結合していると考えられている(Eriksson *et al.*, 1980)。

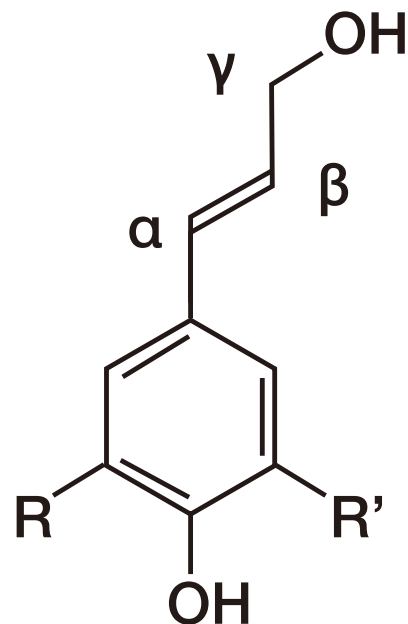


Figure 1.5 (A) Structure model of phenyl propane unit of lignin. (*p*-coumaryl alcohol: R = R'=H; coniferyl alcohol: R = H, R'= OCH<sub>3</sub>; and sinapyl alcohol: R = R' = OCH<sub>3</sub>).

## 1.2. リグノセルロース系バイオマスの生化学変換プロセス

### 1.2.1. 生化学的変換プロセス

リグノセルロース系バイオマスからエタノールおよび化成品等の付加価値物質を生産するためには、リグノセルロース系バイオマスの構成多糖を効率的かつ選択的にグルコースおよびキシロースなどの単糖類に変換することが有効な方法である。バイオマス構成成分を単糖類に変換するうえで、酵素糖化は酸糖化プロセスで必要とされる高温または圧力を必要とせず、穏やかな反応条件下で選択的にグルコースなどの単糖を得ることができる利点がある。

リグノセルロース系バイオマスからの生化学的変換方法によるエタノール生産の代表的なプロセスを Figure 1.6 に示す。リグノセルロース系バイオマスはセルロース、ヘミセルロースおよび

リグニンなどの構成成分から成る難酵素分解性の構造を有する。そのため、リグノセルロース系バイオマスから酵素糖化によって効率的に単糖を得るためには、酵素糖化に先立って、リグノセルロース系バイオマスに前処理を施すことで酵素分解性を高めることが不可欠である。通常、酵素糖化前処理に先立って、リグノセルロース系バイオマスの粒径を小さくするために粉碎処理が施される。リグノセルロース系バイオマスに対する粉碎処理は、酵素の基質へのアクセスを改善するとともに、セルロースの重合度および結晶化度を低下させることによって、酵素分解性が向上すると考えられている(Yoshida *et al.*, 2008)。粉碎方法には、乾式、湿式、振動型ボールミル粉碎(Millett *et al.*, 1979, Rivers & Emert, 1987, Sidiras & Koukios, 1989, Alvo & Belkacemi, 1997)および圧縮粉碎(Tassinari *et al.*, 1980)等があるが、粉碎処理にともなうエネルギー消費量が非常に大きいため(Tassinari *et al.*, 1980)、一定の粒径までの粉碎が現実的と考えられている。その後、粉碎されたリグノセルロース系バイオマスに対して、酸およびアルカリによる様々な前処理を施すことで、酵素分解性が高められる(Mosier *et al.*, 2005, Hendriks & Zeeman, 2009)。前処理バイオマスは酵素によって糖化され、グルコース等の単糖に変換される。糖化によって得られた単糖はつづく発酵プロセスにおいてエタノールに変換される。またエタノール生産プロセスで生じた固体残渣は発電用燃料等として用いることができる。

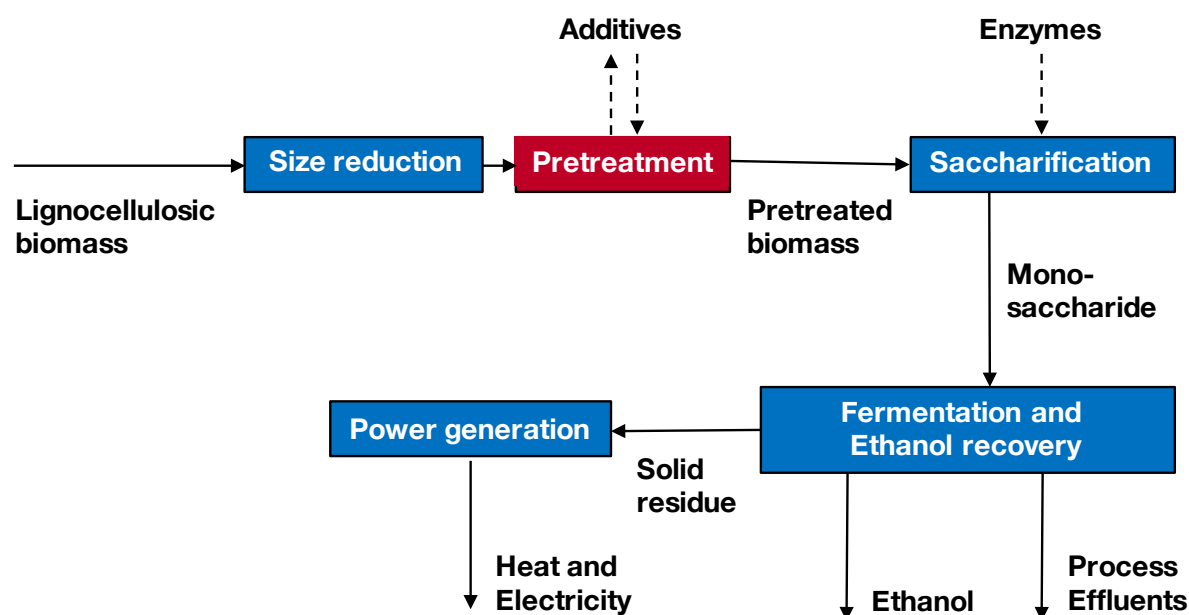


Figure 1.6 Schematic model of bio-refinery process based on enzymatic saccharification.

### 1.2.2. 酵素糖化前処理

これまでの研究によって、リグノセルロース系バイオマスに有効なさまざまな酵素糖化前処理方法が提案されているが、現在、酵素糖化前処理として有望と考えられている方法の大部分は、酸あるいはアルカリを用いた化学的前処理な前処理方法である。一般に化学的前処理方法においては、リグノセルロース系バイオマスと酸あるいはアルカリ等の添加剤を混合し、加熱および加圧処理することで、酵素分解性に優れた前処理バイオマスを得る (Figure 1.7)。

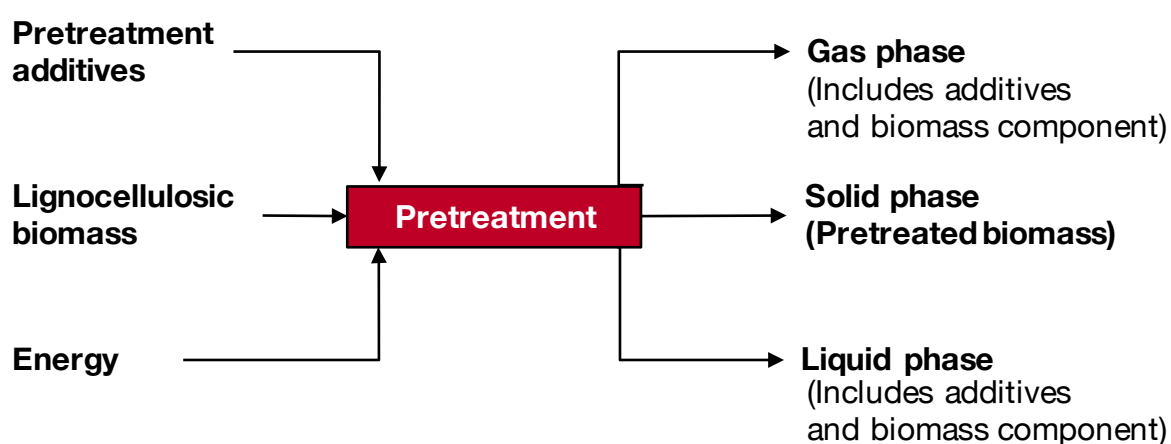


Figure 1.7 Schematic image of pretreatment process.

特に積極的な研究が行われているコーンストーバーにおいて、有効であることが示されている前処理方法と、その処理条件を Table 1.2 に示す。これらの前処理方法なかで、希酸前処理および熱水前処理は、酸性の前処理である。また Lime、ARP および液化アンモニア前処理は、アルカリ性の前処理である。化学的前処理においては、処理にともなって細胞壁構造および化学修飾が改変されることによって、酵素による基質へのアクセシビリティおよび酵素分解性が向上すると考えられている。

各前処理がバイオマス構成成分に与える影響を Table 1.3 に示す。酵素糖化前処理には、グルコースなどの単糖を過分解することなく、リグノセルロース系バイオマスの酵素分解性を高め、かつ、つづく発酵プロセスで問題となる発酵阻害物質の生成は少ないものが望ましい。またコー

ンストーバーからのバイオエタノール生産研究において、前処理は原料および酵素とともにコストのかかるステップの1つであることが指摘されており(Lynd, 1996)、前処理に必要なエネルギーおよびコストは最小限に留められることが必要である。そのため、前処理に用いられる酸、アルカリおよび有機溶媒等の添加剤は、安価もしくは再利用できるものが好ましく、副生成物の利用も含めて、プロセス全体のコストバランスを考える必要があることが指摘されている(Lynd, 1996)。

Table 1.2 Suggested operating conditions of pretreatment methods for corn stover (Partially modified (Chundawat *et al.*, 2011) and references therein)

| Pretreatment                | Chemical          | Temp [°C] | Reaction time [min] | Chemical loading [g/g dry biomass] | Note                                                                |
|-----------------------------|-------------------|-----------|---------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Dilute acid                 | Sulfuric acid     | 160       | 20                  | 0.015                              | Batch process                                                       |
| Steam explosion             | None              | 190       | 5                   | -                                  | Batch process                                                       |
| Hot water                   | None              | 190       | 15                  |                                    | Flow-through mode                                                   |
| Lime                        | Calcium hydroxide | 55        | Hours to weeks      | 0.5                                | Purged with air                                                     |
| Ammonia recycle percolation | Ammonia           | 170       | 10                  | 0.5                                | Flow-through mode using 5 mL/min of ammoniacal solution., 15% [w/w] |
| Ammonia                     | Ammonia           | 90        | 5                   | 1                                  | Liquid ammonia added to biomass before heating reaction             |

Table 1.3 Effects of thermochemical pretreatments for chemical compositions of corn stover.

(Partially modified (Mosier *et al.*, 2005) (Chundawat *et al.*, 2011) and references therein)

| Pretreatment    | Cellulose removed [wt.%] | Hemicellulose removed [wt.%] | Lignin removed [wt.%] | Acetyl group removed [wt.%] | Glucose yield [wt.%] | Xylose yield [wt.%] |
|-----------------|--------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------|
| Dilute acid     | 5-15                     | 70-95                        | 10-20                 | 50-95                       | 92 <sup>a</sup>      | 93 <sup>a</sup>     |
| Steam explosion | 1-5                      | 40-95                        | 40-50                 | 50-85                       | 87 <sup>b</sup>      | 78 <sup>b</sup>     |
| Hot water       | 1-10                     | 40-55                        | N.D.                  | 55-75                       | 91 <sup>a</sup>      | 81 <sup>a</sup>     |
| Lime            | 1-3                      | 3-35                         | 50-60                 | 90-95                       | 94 <sup>a</sup>      | 76 <sup>a</sup>     |
| ARP             | 1-10                     | 30-60                        | 40-85                 | 85-90                       | 90 <sup>a</sup>      | 88 <sup>a</sup>     |
| Ammonia         | 0                        | 0                            | 0                     | 80-95                       | 96 <sup>a</sup>      | 91 <sup>a</sup>     |

<sup>a</sup>Enzymatic saccharification was performed with Spezyme CP (Genencor) at 15FPU/g.

<sup>b</sup>Enzymatic saccharification was performed using Celluclast 1.5 L at 65 FPU/g (Novozyme) mixture and 17 beta-glucosidase IU/g mixture.

Glucose and xylose yield were calculated to the initial content of corn stover (based on acid saccharification). N.D.: not determined.

#### 1.2.2.1. アンモニア前処理

これまで様々な前処理方法が研究されてきたが、それらなかでアンモニア処理(Holtzaple *et al.*, 1992)は、最も有望な前処理方法の1つである。アンモニア前処理を用いた酵素糖化プロセスでは、リグノセルロース系バイオマスを液化アンモニアに浸すことで前処理を行い、得られた前処理バイオマスに対して酵素糖化を行うことで、グルコースなどの単糖を得る (Figure 1.8) 。前処理に液化アンモニアを用いることから、処理後のアンモニアは気体として除去でき、前処理バイオマスは乾燥状態で得ることができる。そのため、アンモニア前処理においては、液体画分へのバイオマス成分の溶出がない利点がある。また、アンモニア前処理を用いた酵素糖化プロセスでは、ほとんどのアンモニアを回収して、次の前処理のために使用することができる。

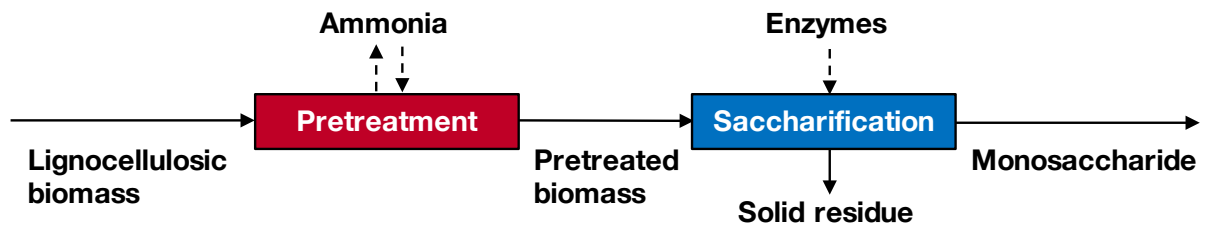


Figure 1.8 Schematic image of ammonia pretreatment process.

アンモニア前処理がリグノセルロース系バイオマスの主要構成成分に与える特徴的な変化として、セルロース結晶型の変態が挙げられる。リグノセルロース系バイオマスの主要な構成成分であるセルロース  $I_{\beta}$  は、アンモニア、第一級アミン、エチレンジアミンおよびポリアミンなどを包接することでセルロース  $III_1$  を形成することが知られており (Barry *et al.*, 1936) (Creely & Wade, 1978, Creely & Wade, 1978) (Wada *et al.*, 2004)、このセルロース  $III_1$  への変態は熱水処理によって I 型に戻るため、 $III$  型の形成プロセスは可逆的である (Wada *et al.*, 2009) (Figure 1.9) (Wada *et al.*, 2009)。また特に超臨界アンモニアを用いた処理では、セルロースの結晶性を低下することなく  $III$  型に変態することが知られている (Ishikawat *et al.*, 1998)。これらのセルロース I からセルロース  $III_1$  への変態は、酵素分解性を劇的に向上することが報告されている (Igarashi *et al.*, 2007)。これはセルロース I に比較して、セルロース  $III_1$  が CBH の吸着可能な表面積が大きく、かつセルロース分子間の間隔が大きいバルキーな結晶 (Wada *et al.*, 2004) であるために酵素分解性が高いことが原因と考えられる。そのため、セルロース結晶型を変化させることができるアンモニア前処理は、リグノセルロース系バイオマスの有望な前処理であると考えられている (Igarashi *et al.*, 2009)。



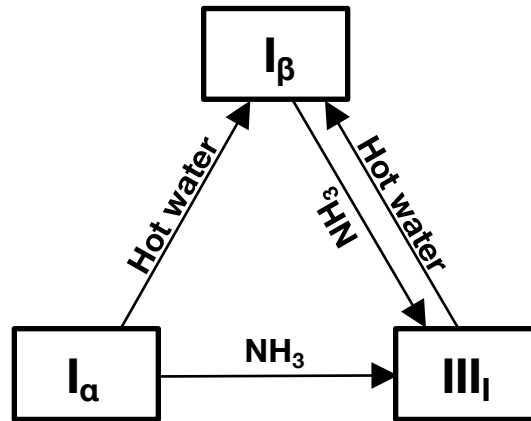


Figure 1.9 Inter-conversion scheme among cellulose polymorphs.

またリグノセルロース系バイオマスのアンモニア前処理においては、アンモニアがヒドロキシルイオンの生成に関与するだけでなく、アンモニア自身がバイオマス構成成分と反応する。そのため、アンモニア前処理において生じる代表的な反応としては、1) 加水分解反応だけではなく、2) アンモノリシス反応、および3) メイラード反応も生じることが知られている (Figure 1.10) (Chundawat et al., 2010)。アンモノリシス反応は主としてリグノセルロース系バイオマスに存在するエステル結合と反応すると考えられており、特に草本バイオマスにおいては、アラビノキシランのアセチル基、リグニンおよびヘミセルロースのフェルラ酸、ジフェルラ酸、およびp-クマル酸残基等と反応してアミド化合物を生じることが報告されている(Chundawat et al., 2010, Vismeh et al., 2013)。同様に広葉樹由来木質バイオマスであるポプラにおいても、アンモニア前処理によって、キシラン側鎖のアセチル基が取り除かれることが報告されている(Kumar et al., 2009)。また、メイラード反応としては、アンモニアが多糖類と反応することが知られており、コーンストーバーにおいて複数のメイラード反応生成物が同定されている(Chundawat et al., 2010)。

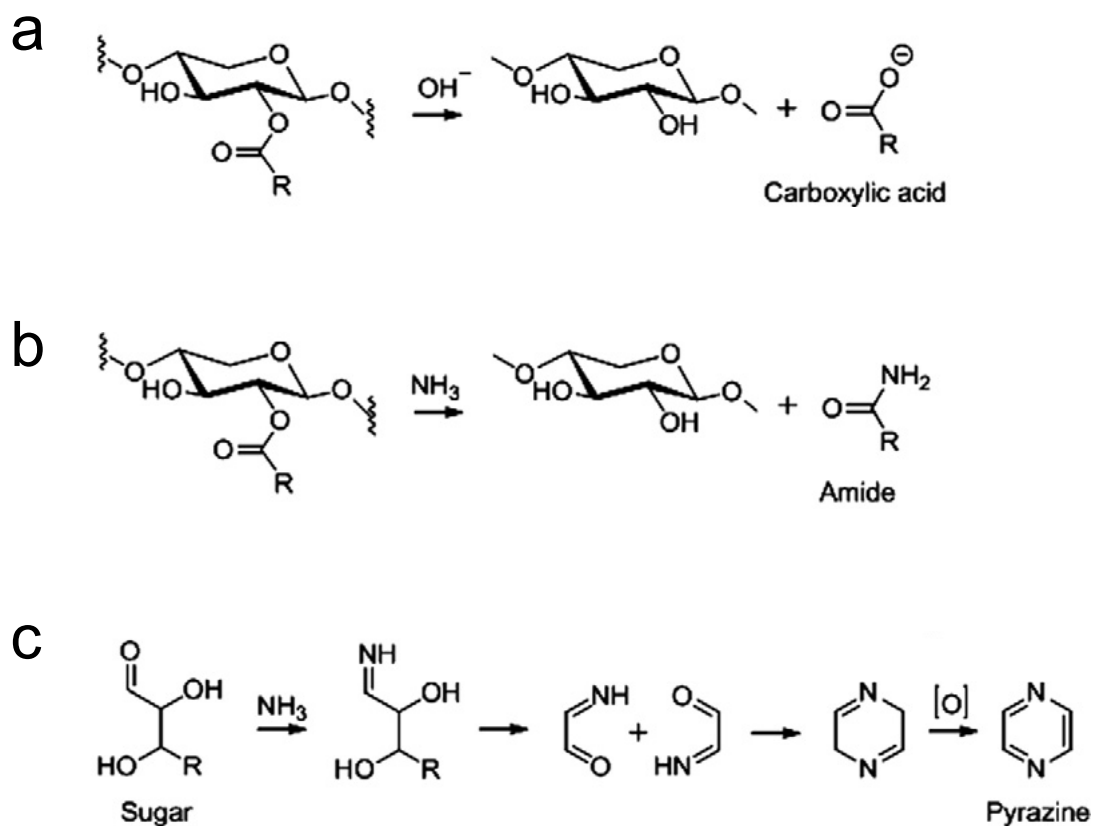


Figure 1.10 Schematic representation of nitrogenous reactions that occur during ammonia treatment. a; ammonolysis reaction of lignin-carbohydrate ester linkages, b; hydrolysis reaction of lignin-carbohydrate ester linkages, c; Maillard type reactions. (Chundawat *et al.*, 2010)

酸糖化プロセスに比較して、アンモニア前処理によって生じるバイオマス分解成分は少ないことが報告されている(Lau *et al.*, 2009, Chundawat *et al.*, 2010, Garlock *et al.*, 2012)。前処理によって生じる分解物が少ないことは、糖の過分解による収率低下を最小限に抑えることが期待できる。またバイオマスの酵素変換プロセスにおいては、前処理によって生成するバイオマス分解物が、つづく酵素糖化や発酵プロセスの阻害要因となる場合がある。しかしながら、アンモニア前処理を施したコーンストーバーおよびアカシアにおける研究では、(Teymouri *et al.*, 2005, Lau *et al.*, 2009, Chundawat *et al.*, 2010)水洗浄および栄養添加をすることなく、アンモニア前処理バイオマスを窒素源を含む基質として、つづく発酵プロセスを行うことができることが報告

されている(Garlock *et al.*, 2012, Uppugundla *et al.*, 2014, Tang *et al.*, 2015)。これらの利点から、これまでに日本においてもアンモニア処理を草本バイオマスであるエリアンサスの酵素糖化前処理として用いたエタノール生産が検討された(Kurosawa *et al.*, 2014)。また、アンモニア前処理を用いたコーンストーバーからの商業規模のエタノール生産プロジェクトも検討されている(Sarks *et al.*, 2016)。

アンモニアによる前処理は、エリアンサス(Kurosawa *et al.*, 2014)、アルファルファ(Ferrer *et al.*, 2002)、スイッチグラス(Reshamwala *et al.*, 1995)、バミューダグラス(Reshamwala *et al.*, 1995)、コーンストーバー(Teymouri *et al.*, 2004, Teymouri *et al.*, 2005)、リードカナリーグラス(Bradshaw *et al.*, 2007)、ミスカンサス(Murnen *et al.*, 2007)、イナワラ(Vlasenko *et al.*, 1997)などの草本バイオマスの酵素糖化前処理として、特に有効であることが報告されている。これらの研究より、アンモニア前処理においては、アンモニア浸漬時の温度、アンモニア/バイオマス比、処理時間、粒径および水分等(Chundawat *et al.*, 2007)のパラメーターが前処理としての効果に影響を及ぼすことが報告されている。また草本バイオマスに比較して、アンモニア前処理は広葉樹においては効果が限定的であり(Balan *et al.*, 2009, Garlock *et al.*, 2012)、針葉樹においてはほとんど効果がないことが報告されている(McMillan, 1994)。

### 1.2.3. 酵素糖化プロセス

#### 1.2.3.1. バイオマス分解関連酵素

リグノセルロース系バイオマスには様々な多糖が含まれるため、これらを効率的に糖化するためには、対応した酵素を混合して用いることが不可欠である。バイオマス分解関連酵素として、糖質加水分解関連酵素 (CAZy) データベース内において、セルラーゼやヘミセルラーゼなどの糖質加水分解酵素 (Glycoside hydrolase, GH)、アセチルキシランエステラーゼなどの糖質エステラーゼ (Carbohydrate Esterases, CE)、補助活性酵素 (Auxiliary activities, AAs) などに分類される酵素が知られている

なかでもセルラーゼは、リグノセルロース系バイオマスの主要な構成成分であるセルロース分解において中心的な役割を果たす酵素であることが知られている。セルラーゼは、セルロース分

子鎖の $\beta$ -1,4-グリコシド結合を加水分解する酵素の総称として用いられている。セルラーゼはセルロース分解特性の差によって、エンド型グルカナーゼ (Endo-glucanase, EG) とセロビオヒドロラーゼ (Cellobiohydrolase, CBH) に慣習的に分類されてきた。EG は非晶性セルロースや可溶性セロオリゴ糖などに対する反応性が高く、それらの分子鎖を内側からランダムに切断して重合度を大きく低下させるが、結晶性セルロースへの反応性が低い。これに対して、CBH に分類される酵素は、セルロースに結合できるドメイン (Cellulose-binding domain, CBD) と加水分解ドメイン (Catalytic domain, CD) およびそれらをつなぐリンカーによって構成される。CBH は結晶性セルロースを分解することができ、主要な生成物としてセロビオースを与える。

CBH によるセルロース分解においては、まず CBD がセルロース結晶の疎水面に吸着したあと、CD がセルロース分子鎖を捉え、 $\beta$ -1,4-グリコシド結合が加水分解される。CBH 濃度が高くなると、セルロース結晶表面における酵素の表面密度も高くなるために、CD によるセルロースへの吸着反応が阻害される。その結果、CD がセルロース分子鎖を捉えることができず、加水分解も阻害される。これらの現象から、効率的なセルロース分解においては、セルロース表面におけるセルラーゼの密度が重要であり、セルロース表面の状態がセルラーゼによる加水分解に大きく関与する。特にアンモニア処理を施すことで得られるセルロース III<sub>1</sub> は、セルロース I に比べてセルラーゼの最大吸着量が大きく、また酵素分解性も非常に高いことがシオグサ由来セルロースにおける研究において報告されている。セルロース III<sub>1</sub> は、セルロース I に比べて、バルキーな結晶であることから、リグノセルロース系バイオマスの最も主要な構成成分であるセルロースの分解においては、セルロース結晶型の変態が酵素分解性を向上させるうえで重要であると考えられている。

ヘミセルラーゼは、リグノセルロース系バイオマスの主要な構成成分であるヘミセルロースを加水分解する酵素の総称である。ヘミセルロースは様々な構成糖を含むヘテロな多糖であり、多くの分岐構造を有するために、その分解は側鎖の種類や頻度によって大きく制約をうける。そのため、ヘミセルロースの分解には様々な酵素を組み合わせる必要がある。

広葉樹由来木質バイオマスの代表的なヘミセルラーゼとして、キシランの $\beta$ -1,4-グリコシド結合を加水分解する $\beta$ -D-キシラナーゼが知られている。キシラナーゼはキシラン主鎖をランダムに加水分解するエンド型の酵素であり、そのほとんどが GH ファミリーの 10 および 11 に分類され

ている。GH10 と 11 のファミリーに属するキシラナーゼを比較したとき、両者では異なる分解生成物が得られることが知られている。これは両キシラナーゼの側鎖認識特性が異なるためであると考えられており、この側鎖認識特性の差はキシランの側鎖がキシラナーゼの活性中心に入ることができるかという立体障害によって説明される。特に木材腐朽のモデル担子菌である *Phanerochaete chrysosporium* 由来 GH10 と GH11 のキシラナーゼによって XX 由来キシランを分解したとき、Figure 1.12 に例示した分解生成物が得られる。特にグルクロン酸を側鎖として持つ 4-O-メチルグルクロノキシランを基質とした場合において、両キシラナーゼが作用するためには GH10 では 2 残基、GH11 では 3 残基以上の側鎖を持たないキシロース残基が必要である。

例えば、広葉樹由来キシラン等の多糖が単糖まで完全に加水分解されるためには、キシラン側鎖のアセチル基を遊離するエステラーゼなどの側鎖分解酵素や、オリゴ糖を単糖まで分解する  $\alpha$ -、 $\beta$ -グリコシダーゼも必要である。これらの酵素のいくつかの特性を Table 1.4 に要約する。

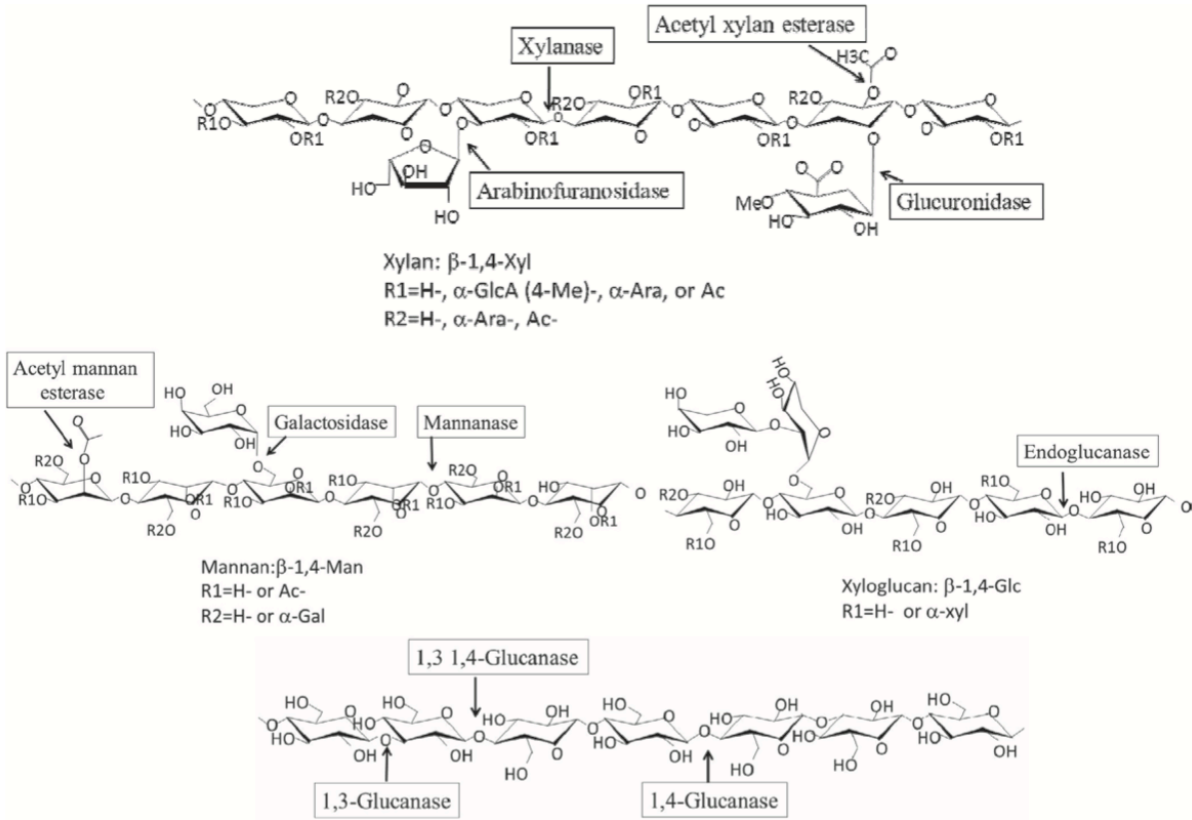


Figure 1.11 Major xylan degradation enzymes.(Yoshida *et al.*)

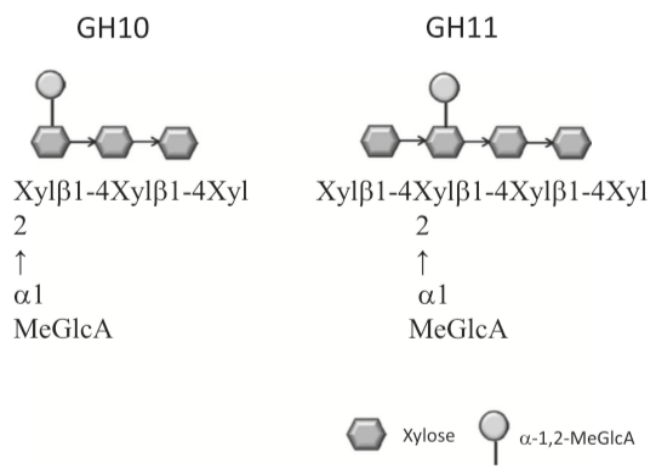


Figure 1.12 Example of xylan degradation products from GH10 and GH11 xylanases.

(Yoshida *et al.*)

Table 1.4 Major biomass degradation enzymes.

| Name                              | Function                                                                                                 |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cellobiohydrolyase I (CBH I)      | Hydrolysis of cellulose chain from the reducing end and release cellobiose.                              |
| Cellobiohydrolyase II (CBH II)    | Hydrolysis of cellulose chain from the non-reducing end and release cellobiose.                          |
| Endo-glucanase (EG)               | Hydrolysis of glycosidic bonds randomly inside cellulose chains.                                         |
| $\beta$ -Glucosidase              | Hydrolysis of cello-oligosaccharides into glucose                                                        |
| Endo-xylanase                     | Hydrolysis of glycosidic bonds inside xylan chain                                                        |
| $\beta$ -Xylosidase               | Hydrolysis of xylo-oligosaccharides into xylose                                                          |
| $\beta$ -Mannanases               | Hydrolysis of glycosidic bonds inside mannan chain                                                       |
| $\beta$ -Mannosidases             | Hydrolysis of manno-oligosaccharides into mannose                                                        |
| $\alpha$ -Arabinofuranosidases    | Remove arabinose from the xylan main chain                                                               |
| $\alpha$ -D-Glucuronidases        | Remove the 4-o-methyl-D-glucuronic acid side chain from the xylan                                        |
| Acetyl xylan esterases            | Hydrolysis of acetyl groups from xylan main chain                                                        |
| Ferulic acid esterases            | Hydrolysis of the ester bond between the arabinose and ferulic acid                                      |
| Lytic polysaccharide monoxygenase | Help the original GH, PL and CE enzymes gain access to the carbohydrates comprising the plant cell wall. |

### 1.2.3.2. 市販酵素製剤を用いた糖化プロセス

リグノセルロース系バイオマスには様々な多糖や高分子化合物が含まれるため、これらを効率的に酵素糖化するためには、対応した酵素を混合して用いることが不可欠である。そのため、様々な酵素を混合した酵素剤が各社から販売されている(Malgas *et al.*, 2017)。一般にこれらの酵素剤には、セルラーゼやヘミセルラーゼなどの糖質加水分解酵素、アセチルキシランエステラーゼなどの糖質エステラーゼ、補助活性酵素などに分類される酵素が含まれている。

Table 1.5 Enzyme activities reported in commercially available enzyme mixtures. (Partially modified (Malgas *et al.*, 2017) and references therein)

| Name            | Cellulase           | Endoglucanase       | Glucosidase        | Xylanase           | Xylosidase        |
|-----------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| Cellulast       | 95.2 <sup>c</sup>   | 385.1 <sup>a</sup>  | 0.3 <sup>b</sup>   | 813.9 <sup>a</sup> | 0.4 <sup>b</sup>  |
|                 | 60.7 <sup>c</sup>   | -                   | 65 <sup>e</sup>    | -                  | -                 |
|                 | 63.8 <sup>c</sup>   | -                   | 30 <sup>d</sup>    | -                  | -                 |
|                 | 65 <sup>c</sup>     | -                   | 10 <sup>d</sup>    | -                  | -                 |
| Spezyme         | 58.2 <sup>c</sup>   | -                   | 128 <sup>b</sup>   | 2622 <sup>b</sup>  | 7.3 <sup>b</sup>  |
|                 | 55.2 <sup>c</sup>   | -                   | 15.4 <sup>d</sup>  | -                  | -                 |
|                 | 59 <sup>c</sup>     | -                   | -                  | 2622 <sup>b</sup>  | -                 |
| Novozyme 188    | 8.5 <sup>c</sup>    | -                   | 665 <sup>b</sup>   | 123 <sup>b</sup>   | 16.6 <sup>b</sup> |
|                 | -                   | -                   | 856 <sup>d</sup>   | -                  | -                 |
|                 | 0.1 <sup>c</sup>    | -                   | 662 <sup>d</sup>   | -                  | -                 |
|                 | -                   | -                   | 665 <sup>e</sup>   | -                  | -                 |
|                 | -                   | -                   | 626.4 <sup>d</sup> | -                  | -                 |
| Accelerase 1000 | 299.33 <sup>c</sup> | -                   | -                  | -                  | -                 |
|                 | 67.3 <sup>c</sup>   | -                   | 84.2 <sup>d</sup>  | -                  | -                 |
| Accelease 1500  | 10.95 <sup>c</sup>  | 178.37 <sup>b</sup> | 33.42 <sup>b</sup> | 97.03 <sup>b</sup> | 0.2 <sup>b</sup>  |
|                 | 262.48 <sup>c</sup> | -                   | -                  | -                  | -                 |
| Cellic CTec     | 534.24 <sup>c</sup> | -                   | -                  | -                  | -                 |
|                 | 86.5 <sup>c</sup>   | -                   | 564 <sup>d</sup>   | -                  | -                 |
|                 | 126 <sup>c</sup>    | -                   | 269 <sup>d</sup>   | -                  | -                 |
|                 | 115.6 <sup>c</sup>  | -                   | 281 <sup>d</sup>   | -                  | -                 |
| Cellic HTec     | -                   | -                   | -                  | 1090 <sup>e</sup>  | -                 |
|                 | -                   | -                   | -                  | 1090 <sup>e</sup>  | -                 |
|                 | -                   | -                   | -                  | 1654 <sup>b</sup>  | -                 |

<sup>a</sup>  $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}$ , <sup>b</sup>  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ , <sup>c</sup> FPU/mL, <sup>d</sup> FXU/mL, <sup>e</sup> CMC/mL,



### 1.3. 本研究の目的

草本バイオマスでは、脱リグニンを伴わないアンモニア処理のような簡便な前処理によっても酵素糖化を非常に効率的に行うことができることが示されている。しかし、特に木質バイオマスではリグニンの除去を伴う前処理が、酵素糖化の効率化のためには不可欠とされている。アンモニア前処理のような簡便な前処理を広葉樹由来木質バイオマスに適用できることが望ましいが、アンモニア前処理の適用例はアカシアおよびポプラだけで、この場合、草本バイオマスにおける酵素糖化に比べて、前処理としての効果は小さく、適用は困難であることが指摘されている。そこで本研究では、脱リグニン処理を伴わないアンモニア前処理の広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化への適用拡大を目指して研究に取り組むとともに、広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化における制約要因を精査することで、酵素糖化のさらなる効率化を検討した。

上述した目的を達成するために、まず第二章においてアンモニア前処理の適用事例の報告のあるアカシアおよびポプラを含めた、資源量の豊富な合計6樹種の広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化に与えるアンモニア前処理の影響を調べ、その適用可能性を調べた。次に第三章にて、広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化において、リグニンを除去すれば酵素糖化の制約要因が解除されるのかを明らかにするためにホロセルロースの酵素分解性を詳細に調べた。また第四章にて、アンモニア前処理広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化に有効な酵素を探索するために、木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* がアンモニア前処理シラカバを炭素源とした培養時に生産する酵素を網羅的に探索した。さらに、第五章にて、広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化の効率化を目指して、酵素剤の強化およびオゾン処理による脱リグニン処理が酵素糖化の効率化に与える効果を調べた。以上の取り組みにより、広葉樹由来木質バイオマスの効率的な酵素糖化における指針を得ることとした。

## 2. アンモニア前処理バイオマスの酵素糖化特性

## 2.1目的

キシランとリグニン含有率の異なる6種類の広葉樹由来木質バイオマスおよび対照とした草本バイオマス（エリアンサス）について、アンモニア前処理が化学的特徴および酵素糖化特性に与える影響を構成成分含有率、結晶構造の変化、化学結合状態に基づき比較検討することで、アンモニア前処理が広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化に与える影響を明らかにすることを目的とした。

## 2.2実験

### 2.2.1 試料調製

広葉樹由来木質バイオマスであるアカシア (*Acacia mangium*、王子製紙株式会社提供)、ブナ (*Fagus crenata*、市販板材を購入)、シラカバ (*Betula platyphylla*、森林総合研究所東北支所提供)、ユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis*、王子製紙株式会社提供)、ポプラ (*Populus sieboldii*、森林総合研究所東北育種場提供)、ヤナギ (*Salix pet-susu*、森林総合研究所北海道支所提供) および草本バイオマスであるエリアンサス (*Erianthus ravennae*、生体調和農学機構提供) をウィリー式ミル (W140、池田サイエンティフィック社、東京、日本) を用いて粉碎したあと、ふるい分けすることで40メッシュパスの木粉を得た。得られた木粉をベンゼン-エタノール (2:1 v/v) 溶液を用いてソックスレー抽出することで、未処理バイオマスを得た。未処理バイオマスを-13°Cに設定した浴中で冷却したステンレス製圧力容器に装填し、圧力容器にアンモニアガスを導入することで、試料を液体アンモニア中に完全に浸漬した。圧力容器を密閉したあと、140°Cで1時間加熱処理することでアンモニア処理を行った。未処理バイオマスおよびアンモニア処理バイオマスの含水率は、乾熱乾燥式水分計 (MS-70; 研精工業、神奈川、日本) を用いて測定した。

### 2.2.2 バイオマス試料の構成成分分析

未処理およびアンモニア処理バイオマスの中性糖、有機酸、リグニンおよび窒素含有率を明らかにするため構成化学成分の分析を行った。中性糖含有率の測定は、硫酸法(A. Sluiter, 2008)を一部変更して行った。中性糖分析では、約 0.1 g のバイオマス試料に 72%硫酸水溶液 1 mL を加

え、ガラス棒を用いて押しつぶしながら 30°Cで 1 時間処理した。処理後の試料に 28 mL の蒸留水を加え（最終硫酸濃度、4%）、121°Cで 1 時間処理し、上澄み液をガラスフィルター(Whatman)でろ過した。得られたろ液は高速液体クロマトグラフ（Prominence シリーズ、島津製作所、京都、日本）によって分析した。高速液体クロマトグラフの検出器には荷電エアロゾル検出器（Corona Veo RS; Thermo Fisher Scientific、MA、USA）を用い、分析用カラムには SP0810 カラム（昭和電工、神奈川、日本）を用いた。また高速液体クロマトグラフィーによる分析時の溶出液として、アセトニトリル/ 水 13.0/ 87.0 (v/v) を流速 0.5 mL/min で用いた。標準試薬には分析用グレードの L-アラビノース、D-ガラクトース、D-グルコース、D-マンノース（いずれも和光純薬工業株式会社、大阪、日本）、D-キシロース（東京化成工業株式会社、東京、日本）を用いた。

酸性不溶性リグニン（Klason lignin）は Klason 法(Dence, 1992)に従って測定したが、硫酸濃度などは中性糖分析と同一条件で実施した。

グルクロン酸および酢酸の定量においては、約 0.1 g のバイオマス試料に 72%硫酸水溶液 1 mL を加え、ガラス棒を用いて押しつぶしながら 30°Cで 1 時間処理した。処理後の試料に 10 mL の蒸留水を加え（最終硫酸濃度、10%）、121°Cで 1 時間処理し、上澄み液をガラスフィルター(Whatman)でろ過した。得られたろ液は高速液体クロマトグラフ（Prominence シリーズ、島津製作所、京都、日本）によって分析した。高速液体クロマトグラフの検出器には UV-2075 検出器（島津）を用い、分析用カラムには KC-811 および SH-1821 カラム（昭和電工）を用いた。また高速液体クロマトグラフィーによる分析時の溶出液として、3mM の硫酸水溶液を流速 1.0 mL/min で用いた。分離後の有機酸は 10 倍希釈 ST-3R(昭和電工)と反応させ、430 nm における吸光度を測定した。定量分析のための標準物質として、分析用グレードの酢酸およびグルクロン酸（和光純薬工業株式会社、大阪、日本）を用いた。

未処理バイオマスおよびアンモニア処理バイオマスの窒素含有率は窒素・硫黄分析装置 T-2100H(三菱化学アナリテック、三重、日本)、窒素検出器ND-210(三菱化学アナリテック)およびオートボードコントローラーABC-210(三菱化学アナリテック)を用いて測定した。各バイオマス試料約 3 mg を磁性ボードにセットし、電気炉入口温度 800°、出口温度 900°の条件で、155 mm で 20 秒間、170 mm で 50 秒間、190 mm で 10 秒間燃焼させた。燃焼によって得られた NO ガスと

オゾンとが反応することで発生した光強度を測定することで窒素を定量した。定量のための標準試薬として、分析グレードのピリジンおよびトルエン（和光）を使用した。

### 2.2.3 バイオマス試料の分光分析

真空乾燥機 DP-33(Yamato)を用いて乾燥した未処理およびアンモニア処理バイオマス約 150 mg を 200 kgf/cm<sup>2</sup> で 30 秒間加圧成型し、得られた錠剤をフーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) 測定および X 線回折 (XRD) 測定に用いた。FT-IR にあたっては分光計 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Pittsburgh, PA, USA) を用いた。X 線回折は管球型 X 線発生装置 RINT2200(リガク)を用い、ディフラクトメトリー法によって行った。電圧 38 kV、電流 50 mA で発生し、モノクロメーターで単色化した CuK $\alpha$  線(波長 0.15418 nm)を用い、走査範囲  $2\theta$  を 5°から 30°、ステップ幅 0.1°、集積時間 20 秒の条件にてステップスキャン法で測定した。

### 2.2.4 バイオマス試料の酵素糖化実験

未処理およびアンモニア処理バイオマスを酵素糖化のための基質として使用した。等量の Cellic® CTec (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) および Cellic® HTec (Novozymes) を混合し、酵素カクテルとして使用した (Table 2.1)。未処理およびアンモニア処理バイオマス (1.0% w/v) について、50mM 酢酸ナトリウム (pH4.5) 中、37°C、15rpmにて、酵素/バイオマス (E/B) 比 1/ 25にて酵素糖化を行った。酵素糖化 1、2、4、8、24 および 48 時間反応後、得られた反応溶液に含まれる D-グルコースおよび D-キシロースの量を、グルコース CII-テストワコー試薬 (Wako) および D-キシロースアッセイキット試薬 (Megazyme International Ireland, Ltd., Wicklow, Ireland) によって測定した。各測定データは、3回の測定の平均値として示した。

Table 2.1 Activities of enzymes examined in this study

| Activities                        | Cellic CTec [U/ $\mu$ L] | Cellic HTec [U/ $\mu$ L] |
|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Cellulase <sup>1)</sup>           | 4.0 $\pm$ 0.1            | 0.3 $\pm$ 0.1            |
| Xylanase <sup>1)</sup>            | 4.7 $\pm$ 0.6            | 1.3 $\pm$ 0.1            |
| Glucosidase <sup>2)</sup>         | 2,165 $\pm$ 233          | 1.0 $\pm$ 0.1            |
| Xylosidase <sup>2)</sup>          | 86 $\pm$ 2               | 42 $\pm$ 1               |
| Arabinofuranosidase <sup>2)</sup> | 23 $\pm$ 0.4             | 6.7 $\pm$ 0.2            |
| Glucuronidase <sup>2)</sup>       | 2.1 $\pm$ 0.7            | 0.7 $\pm$ 0.3            |
| Acetylerase <sup>2)</sup>         | 0.4 $\pm$ 0.8            | 0.4 $\pm$ 0.1            |

<sup>1)</sup>To measure activities of cellulase and xylanase, Cellic® CTec or HTec was incubated with 1.0% (w/v) avicel or xylan in 1 mL of 50 mM sodium acetate pH 4.5 at 37°C and 15 rpm at an initial E/B ratio of 1/50 for 24 h. The yields of monosaccharide with CTec (33.7% and 27.1% for glucose and xylose, respectively), and HTec (1.8% and 8.0% for glucose and xylose, respectively). Here, one unit of cellulase and xylanase were defined as the amount of enzyme required to release 1 nmol reducing sugar per min<sup>-1</sup> under the assay conditions.

<sup>2)</sup>We have used following substrates to measure the activities of enzymes; Glucosidase activity, 4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-Glucuronide; Xylosidase, 4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-xylopyranoside; Arabinofuranosidase, 4-Nitrophenyl  $\alpha$ -L-arabinofuranoside; Glucuronidase, 4-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-Glucopyranosiduronic Acid; Acetylerase, 4-nitrophenyl acetate. The activities were estimated from the release of *p*-nitrophenol.

We also measured the activity of glucuronidase by  $\alpha$ -glucuronidase assay kit (Megazyme). In that case, both the activity of glucuronidase of Ctec and Htec was under 0.1 U/ $\mu$ L.

## 2.3結果

### 2.3.1. アンモニア前処理がバイオマスの構成化学成分に与える影響

6種の広葉樹由来木質バイオマスおよび対照とした草本バイオマス（エリアンサス）について、構成化学成分、結晶構造、結合状態および酵素糖化に与えるアンモニア前処理の影響を調べた。未処理およびアンモニア前処理した試料のセルロース（グルコース収率から無水換算して算出）、キシラン（キシロース収率から無水換算して算出）、リグニンおよび窒素含有率の分析結果をTable 2.2に示す。アンモニア前処理によるバイオマス重量の減少は5 wt.%以下であり、処理後も主要なバイオマス構成成分は固体画分に残存することが確認された。アンモニア前処理によって、草本バイオマスでは顕著なリグニン含有率の減少が確認されたが、広葉樹由来木質バイオマスではリグニン含有率に大きな変化は確認されなかった。広葉樹由来木質バイオマスに含まれるセルロース含有率は33-41 wt.%であり、草本バイオマスのセルロース含有率33 wt.%よりも高かった。広葉樹由来木質バイオマスにおいては、キシラン含有率とリグニン含有率に樹種間で大きな差異が確認された。未処理バイオマスにおいて比較したとき、シラカバおよびヤナギは他の広葉樹よりも高いキシラン含有率（それぞれ16.4%および14.4%）および低いリグニン含有率（それぞれ21.3%および23.0）を有することが分かった。これに対して、アカシア、ユーカリおよびポプラでは、他の広葉樹よりも高いリグニン含量（それぞれ30.5%および27.0%）およびより低いキシラン含量（それぞれ8.3%および10.2%）であった。またブナは、上記の2つのグループと比較して中程度のリグニンおよびキシラン含量（それぞれ23.7%および13.6%）を示した。同様の傾向はアンモニア前処理試料でも確認され、広葉樹由来木質バイオマスにおいては、樹種によってキシランおよびリグニン含有率に大きな差異があることが確認された。また、アンモニア処理にもなってグルクロノイル基の含有率のわずかな減少も観察された。Figure 2.1に有機酸含有率とキシラン含有率との関係を示す。広葉樹由来木質バイオマスにおいて、アセチル基含有率とキシラン含有率には良好な相関が確認されたが（Figure 2.1a）、グルクロン酸含有率とキシラン含有率の間（Figure 2.1b）には明確な相関は確認されなかった。

Table 2.2. Analytical data of untreated and ammonia-treated biomasses.

| Name             | Treatment       | Ara<br>[%] | Gal<br>[%] | Glc<br>[%] | Man<br>[%] | Xyl<br>[%] |
|------------------|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Acacia           | Untreated       | 0.2 ± 0.2  | 1.0 ± 0.1  | 40.8 ± 3.1 | 1.1 ± 0.4  | 8.3 ± 0.8  |
|                  | Ammonia-treated | 0.2 ± 0.0  | 0.8 ± 0.0  | 39.7 ± 0.5 | 1.2 ± 0.1  | 10.2 ± 0.2 |
| Beech            | Untreated       | 0.4 ± 0.1  | 1.1 ± 0.3  | 36.7 ± 4.5 | 1.1 ± 0.2  | 13.6 ± 0.4 |
|                  | Ammonia-treated | 0.4 ± 0.0  | 0.8 ± 0.0  | 33.3 ± 1.3 | 1.1 ± 0.0  | 16.1 ± 0.2 |
| Birch            | Untreated       | 0.4 ± 0.1  | 1.6 ± 0.6  | 33.1 ± 1.2 | 1.4 ± 0.4  | 16.4 ± 1.0 |
|                  | Ammonia-treated | 0.5 ± 0.0  | 1.4 ± 0.1  | 35.0 ± 0.9 | 1.5 ± 0.0  | 19.3 ± 0.3 |
| Eucalyptus       | Untreated       | 0.3 ± 0.2  | 1.6 ± 0.4  | 37.6 ± 2.8 | 0.7 ± 0.2  | 10.2 ± 0.5 |
|                  | Ammonia-treated | 0.4 ± 0.0  | 1.6 ± 0.1  | 38.7 ± 0.2 | 0.7 ± 0.1  | 11.1 ± 0.1 |
| Poplar           | Untreated       | 0.5 ± 0.1  | 1.0 ± 0.2  | 39.3 ± 1.3 | 1.0 ± 0.4  | 14.1 ± 1.1 |
|                  | Ammonia-treated | 0.5 ± 0.0  | 0.7 ± 0.0  | 40.1 ± 0.8 | 1.1 ± 0.1  | 14.7 ± 0.1 |
| Willow           | Untreated       | 0.3 ± 0.2  | 0.8 ± 0.2  | 38.0 ± 4.3 | 1.8 ± 0.3  | 14.4 ± 0.3 |
|                  | Ammonia-treated | 0.3 ± 0.0  | 0.8 ± 0.0  | 38.8 ± 0.6 | 1.8 ± 0.0  | 15.0 ± 0.1 |
| <i>Erianthus</i> | Untreated       | 3.2 ± 0.3  | 0.9 ± 0.4  | 33.4 ± 2.4 | 0.0 ± 0.0  | 16.0 ± 1.4 |
|                  | Ammonia-treated | 3.3 ± 0.0  | 1.1 ± 0.0  | 33.3 ± 0.3 | 0.0 ± 0.0  | 18.0 ± 0.1 |

HPLC was used to measure the contents of arabinose (Ara), galactose (Gal), glucose (Glc), mannose (Man), and xylose (Xyl) in untreated and ammonia-treated biomass. Neutral sugars are presented as the weight percentages contained in the biomass sample (%). Each value is the mean of three measurements with the standard deviation.



Table 2.2. Analytical data of untreated and ammonia-treated biomasses. (Continued)

| Name             | Treatment       | KL<br>[wt.%] | GlcA<br>[%] | AcOH<br>[%] | Nitrogen<br>[wt.%] | Recovery of<br>weight [%] |
|------------------|-----------------|--------------|-------------|-------------|--------------------|---------------------------|
| Acacia           | Untreated       | 30.5 ± 0.3   | 1.5 ± 0.2   | 3.6 ± 0.0   | 0.1 ± 0.0          | -                         |
|                  | Ammonia-treated | 29.7 ± 0.3   | 1.3 ± 0.1   | 2.4 ± 0.1   | 0.7 ± 0.1          | 95                        |
| Beech            | Untreated       | 23.7 ± 1.2   | 1.9 ± 0.1   | 8.2 ± 0.0   | 0.1 ± 0.0          | -                         |
|                  | Ammonia-treated | 21.6 ± 0.4   | 1.7 ± 0.1   | 5.9 ± 0.0   | 0.6 ± 0.0          | 98                        |
| Birch            | Untreated       | 21.3 ± 1.3   | 2.0 ± 0.0   | 7.0 ± 0.1   | 0.1 ± 0.0          | -                         |
|                  | Ammonia-treated | 20.8 ± 0.2   | 1.9 ± 0.1   | 5.1 ± 0.1   | 0.6 ± 0.0          | 99                        |
| Eucalyptus       | Untreated       | 27.0 ± 2.7   | 2.5 ± 0.0   | 4.9 ± 0.2   | 0.2 ± 0.0          | -                         |
|                  | Ammonia-treated | 28.1 ± 0.9   | 2.0 ± 0.0   | 3.4 ± 0.0   | 0.7 ± 0.0          | 96                        |
| Poplar           | Untreated       | 24.4 ± 1.9   | 1.8 ± 0.1   | 5.9 ± 0.0   | 0.1 ± 0.0          | -                         |
|                  | Ammonia-treated | 25.3 ± 0.6   | 1.9 ± 0.1   | 2.8 ± 0.1   | 0.5 ± 0.0          | 99                        |
| Willow           | Untreated       | 23.0 ± 1.2   | 2.5 ± 0.0   | 6.6 ± 0.1   | 0.2 ± 0.0          | -                         |
|                  | Ammonia-treated | 21.6 ± 0.2   | 2.0 ± 0.1   | 5.3 ± 0.0   | 0.7 ± 0.0          | 97                        |
| <i>Erianthus</i> | Untreated       | 20.1 ± 1.6   | 1.5 ± 0.2   | 3.7 ± 0.1   | 0.4 ± 0.0          | -                         |
|                  | Ammonia-treated | 13.1 ± 0.3   | 1.3 ± 0.1   | 2.2 ± 0.0   | 0.9 ± 0.1          | 98                        |

HPLC was used to measure the contents of glucuronic acid (GlcA) and acetic acid (AcOH) contents in untreated and ammonia-treated biomasses. Nitrogen content was determined using a total nitrogen analyser. Klason lignin (KL) was estimated according to the Klason method. Glucuronic acid, and acetic acid contents are presented as the weight percentages contained in the biomass sample (%). Each value is the mean of three measurements with the standard deviation

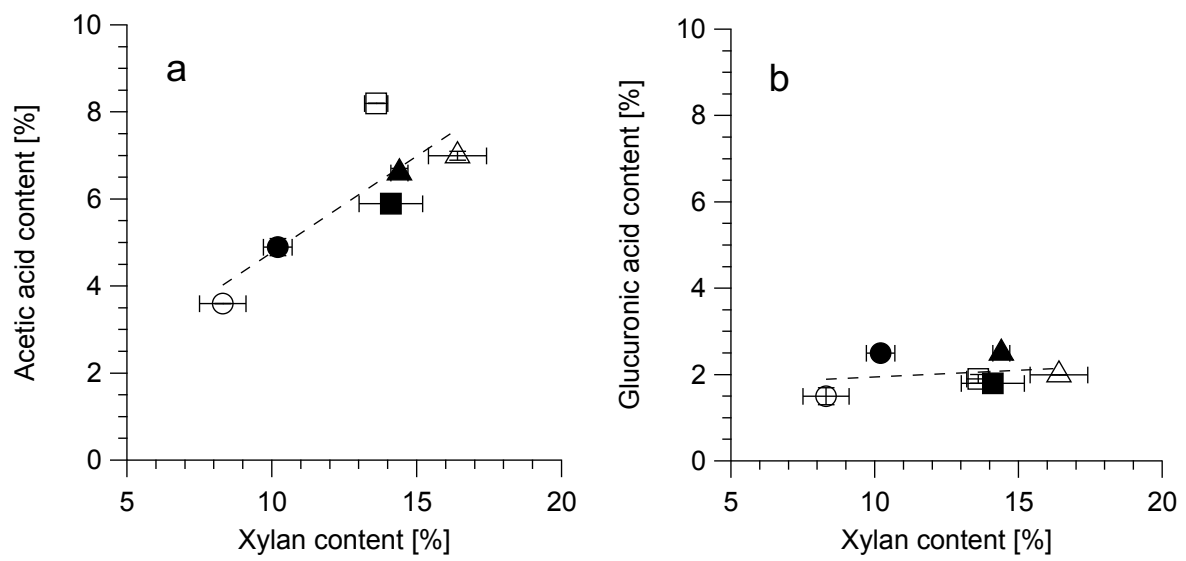


Figure 2.1. The relationship between organic acid content and xylan content. Open circles, ammonia-treated acacia; open squares, ammonia-treated beech; open triangles, ammonia-treated birch; closed circles, ammonia-treated eucalyptus; closed squares, ammonia-treated poplar; closed triangles, ammonia-treated willow.

### 2.3.2. アンモニア前処理がバイオマスの化学結合および結晶構造に与える影響

未処理およびアンモニア処理バイオマスのFTIRスペクトルを

Figure 2.2に示す。全ての試料において、 $1745\text{cm}^{-1}$ 付近の吸収ピークは消失し、 $1245\text{cm}^{-1}$ 付近はアンモニア処理後に減少した。これらのピークはアセチル基に由来する(Sun *et al.*, 2005, Windeisen *et al.*, 2007, He *et al.*, 2008)ことから、得られた結果は化学分析の結果と一致した。すべてのアンモニア前処理試料において、 $1650\text{cm}^{-1}$ 付近に新しいピークが観察された。このピークはアミド結合の形成に対応することから、アンモニア前処理試料の化学分析において、窒素含有率が増大した結果と一致した。

未処理およびアンモニア前処理試料のXRDスペクトルをFigure 2.3に示す。未処理バイオマスではセルロース I に特徴的な $14.9^\circ$ 、 $16.7^\circ$ 、 $22.8^\circ$ 付近の回折ピークが確認されたが、アンモニア前処理バイオマスではセルロース III<sub>1</sub> に特徴的な $11.7^\circ$ および $20.8^\circ$ 付近の回折ピークが確認された。これらことから、アンモニア前処理は、植物種にかかわらず、バイオマス中のほぼすべてのセルロースの結晶型をセルロース I からセルロース III<sub>1</sub> に結晶型を変態したことが確認された。

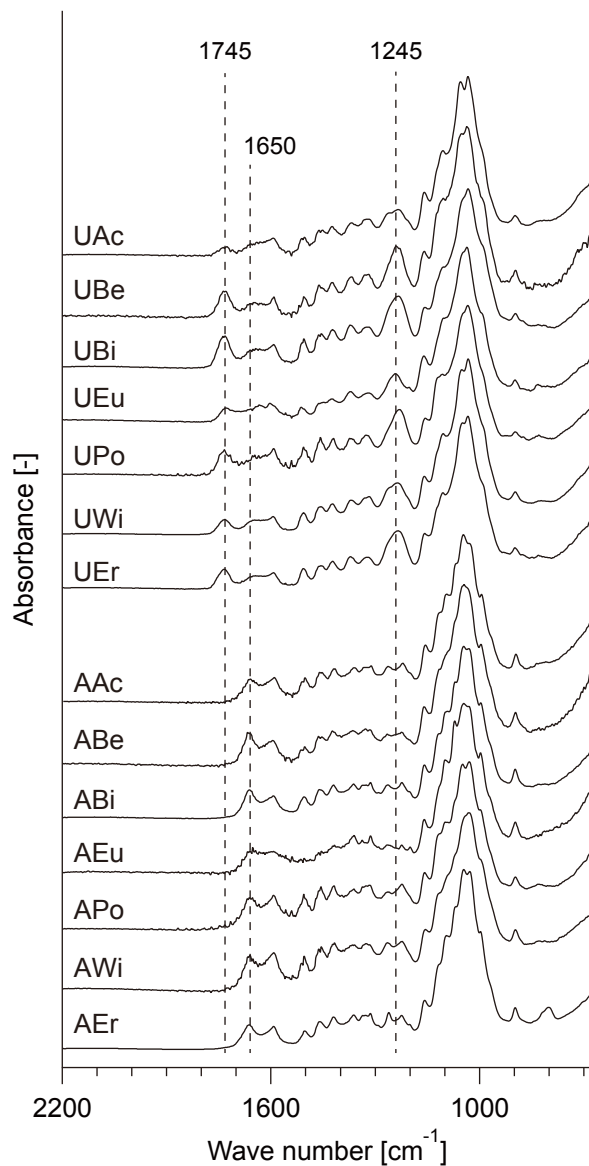


Figure 2.2. FTIR analysis of untreated and ammonia-treated biomasses. UAc, untreated acacia; UBe, untreated beech; UBi, untreated birch; UEu, untreated eucalyptus; UPo, untreated poplar; UW, untreated willow; UEr, untreated Erianthus meal; AAc, ammonia-treated acacia; ABe, ammonia-treated beech; ABi, ammonia-treated birch; AEu, ammonia-treated eucalyptus; APo, ammonia-treated poplar; AWi, ammonia-treated willow; AEr, ammonia-treated Erianthus meal.

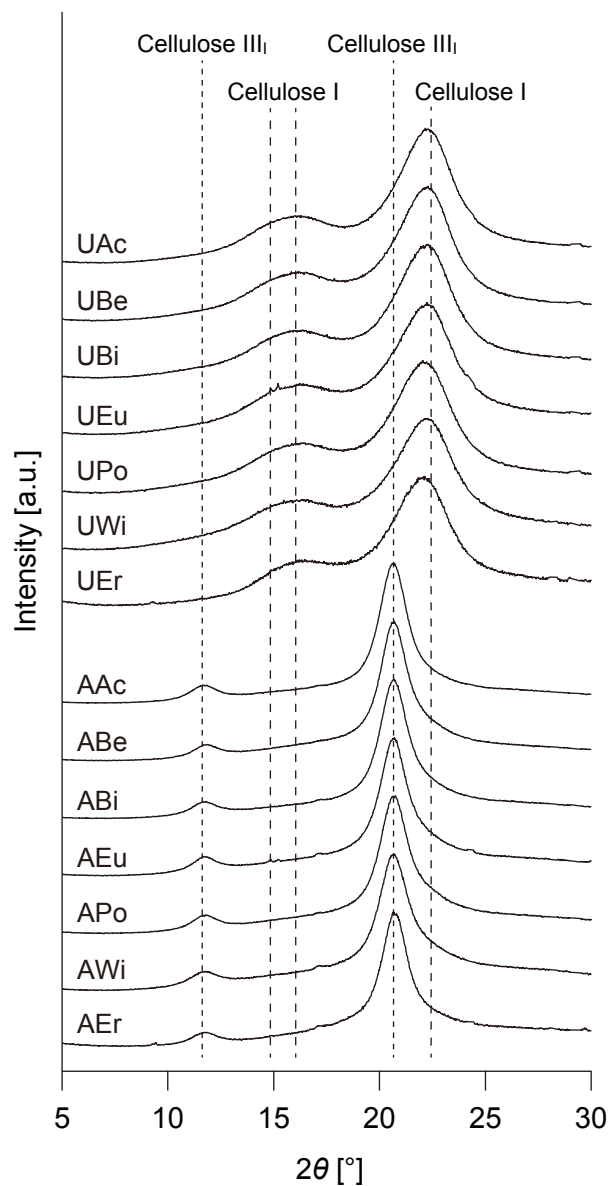


Figure 2.3. X-ray diffraction profiles of untreated and ammonia-treated biomasses. UAc, untreated acacia; UBe, untreated beech; UBi, untreated birch; UEu, untreated eucalyptus; UPo, untreated poplar; UW, untreated willow; UEr, untreated Erianthus meal; AAc, ammonia-treated acacia; ABe, ammonia-treated beech; ABi, ammonia-treated birch; AEu, ammonia-treated eucalyptus; APo, ammonia-treated poplar; AWi, ammonia-treated willow; AEr, ammonia-treated Erianthus meal.

### 2.3.3. アンモニア前処理バイオマスの酵素糖化における経時変化

未処理バイオマスの酵素糖化におけるグルコースおよびキシロース収率の経時変化を Figure 2.4 に示す。またアンモニア処理バイオマスの酵素糖化におけるグルコースおよびキシロース収率の経時変化を Figure 2.5 に示す。未処理バイオマスと比較してグルコースおよびキシロース生成速度はアンモニア処理バイオマスの方が高かった。エリアンサスの酵素糖化においてはグルコースとキシロースが同時に生成したが (Figure 2.5g)、広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化においては (Figure 2.5a-f)、キシロース生成に比べてグルコース生成が遅れた。したがって広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化においては、セルロース分解に比較してキシラン分解が先行すると考えられる。

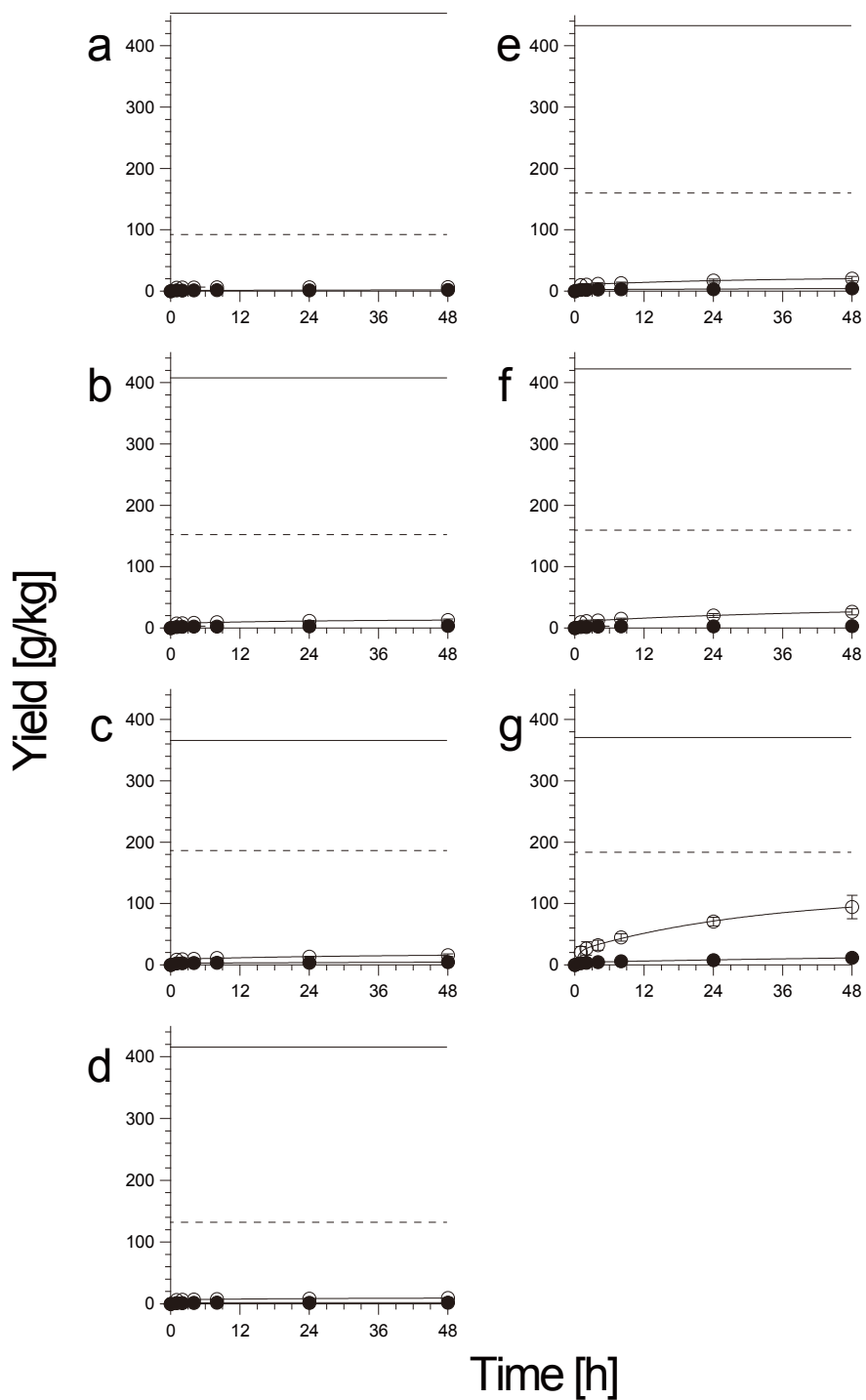


Figure 2.4. Enzymatic hydrolysis of untreated lignocellulosic biomasses, acacia, beech, birch, eucalyptus, poplar, willow, and *Erianthus*. a: acacia; b: beech; c: birch; d: eucalyptus; e: poplar; f: willow; g: *Erianthus*; Open circles, glucose yield; closed circles, xylose yield. Equal amounts of Cellic® CTec and HTec were mixed and used for enzymatic hydrolysis. This enzyme cocktail was incubated with 1.0% (w/v) untreated or ammonia-treated biomass in 1 mL of 50 mM sodium acetate pH 4.5 at 37°C and 15 rpm at an initial E/B ratio of 1/25. Glucose and xylose concentrations were determined with glucose and xylose assay kits.

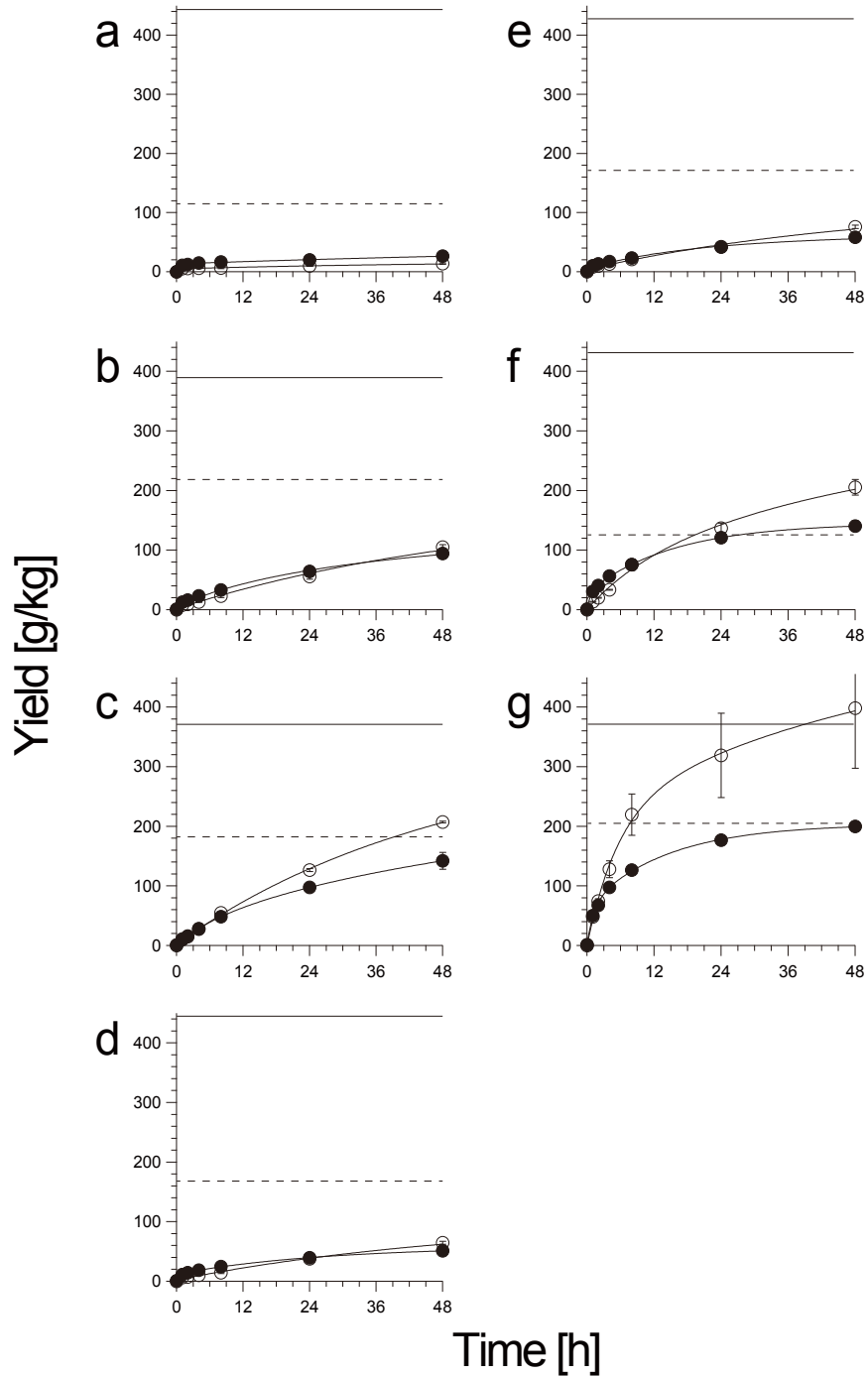


Figure 2.5. Enzymatic hydrolysis of ammonia-treated lignocellulosic biomasses, acacia, beech, birch, eucalyptus, poplar, willow, and *Erianthus*. a: acacia; b: beech; c: birch; d: eucalyptus; e: poplar; f: willow; g: *Erianthus*; Open circles, glucose yield; closed circles, xylose yield. Equal amounts of Cellic® CTec and HTec were mixed and used for enzymatic hydrolysis. This enzyme cocktail was incubated with 1.0% (w/v) untreated or ammonia-treated biomass in 1 mL of 50 mM sodium acetate pH 4.5 at 37°C and 15 rpm at an initial E/B ratio of 1/25. Glucose and xylose concentrations were determined with glucose and xylose assay kits.



#### 2.3.4. アンモニア前処理がバイオマスの酵素糖化収率に与える影響

未処理およびアンモニア処理バイオマスの酵素糖化 48 時間におけるグルコース収率およびキシロース収率を Table 2.3 に示す。アンモニア前処理は広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化を促進したが、酵素糖化前処理としての効果には樹種によって大きな差異が確認された。アンモニア前処理を施した広葉樹由来木質バイオマスにおける糖化収率を比較したとき、グルコース収率は大きい順にシラカバ、ヤナギ、ブナ、ポプラ、ユーカリおよびアカシアであった。同様にキシロース収率は大きい順にヤナギ、シラカバ、ブナ、ユーカリ、ポプラおよびアカシアであった。エリアンサス（グルコースおよびキシロース収率はそれぞれ 108%と 97.9%）と比較すると低いが、アンモニアの前処理はシラカバに対して特に効果的であり、グルコース収率 53.3%およびキシロースの収率 64.8%が得られた。またヤナギにおいても高いグルコース収率 47.6%とキシロース収率 82.4%が得られた。これに対して、アカシア（グルコース収率 3.1%およびキシロース収率 22.9%）、ユーカリ（グルコース収率 15.1%およびキシロース収率 40.6%）およびポプラ（グルコース収率 17.0%およびキシロース収率 34.9%）では、アンモニア前処理の効果が小さく、これは以前の報告の結果と一致していた(Balan et al., 2009, Garlock et al., 2012)。

アンモニア前処理を施した広葉樹由来木質バイオマスにおける酵素糖化 48 時間後のグルコースとキシロース収率との間の関係を Figure 2.6 に示した。広葉樹由来木質バイオマスにおけるグルコースとキシロース収率には、正の相関があることが確認された。この正の相関に基づく回帰直線は x 軸切片（キシロース収率）がゼロではないことから、広葉樹由来木質バイオマスにおいては、セルロースが分解されなくても分解されるキシランが一定量存在することが示唆された。注目すべきことに、アンモニア前処理を施したコーンストーバーおよびポプラの酵素糖化においても同様の傾向があることが報告されている(Wyman et al., 2009)。

アンモニア処理広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化 48 時間後（E/B = 1/25 および pH4.5）のグルコースおよびキシロース収率と、主要構成成分含有率の関係を Figure 2.7 に示す。グルコースおよびキシロース収率とキシラン含有率の間には正の相関が確認されたが、グルコースおよびキシロース収率とリグニン含有率の間には負の相関が観察された。言い換えれば、相対的に高キシラン含有率および低リグニン含有率であるシラカバおよびヤナギでは、高い糖化収率が得られた。これに対して、アカシア、ユーカリおよびポプラなどの広葉樹由来木質バイオマスは、

相対的に低キシラン含有率および高リグニン含有率であり、酵素糖化収率は低かった。異なる広葉樹由来木質バイオマスを用いたため直接的な比較は慎重に行う必要があるが、アンモニア前処理は広葉樹由来木質バイオマスのキシラン含有率が高く、リグニン含有率の低い広葉樹種の酵素糖化を大幅に改善したことが確認された。

Table 2.3. Enzymatic hydrolysis of untreated and ammonia-treated biomasses.

| Name             | Glucose yield |                      |      | Xylose yield  |                      |      |
|------------------|---------------|----------------------|------|---------------|----------------------|------|
|                  | Untreated [%] | Ammonia -treated [%] | Fold | Untreated [%] | Ammonia -treated [%] | Fold |
| Acacia           | 1.5 ± 0.0     | 3.1 ± 0.2            | 2.1  | 2.5 ± 0.6     | 22.9 ± 1.0           | 9.3  |
| Beech            | 3.5 ± 0.2     | 28.4 ± 0.6           | 8.1  | 1.7 ± 0.3     | 51.6 ± 1.9           | 30   |
| Birch            | 4.3 ± 0.3     | 53.3 ± 0.7           | 12   | 2.1 ± 0.2     | 64.8 ± 1.9           | 31   |
| Eucalyptus       | 2.4 ± 0.1     | 15.1 ± 0.8           | 6.3  | 1.6 ± 0.1     | 40.6 ± 1.3           | 25   |
| Poplar           | 4.8 ± 0.5     | 17.0 ± 0.7           | 3.5  | 2.4 ± 0.3     | 34.9 ± 0.7           | 15   |
| Willow           | 6.4 ± 0.7     | 47.6 ± 2.1           | 7.4  | 2.0 ± 0.1     | 82.4 ± 4.0           | 41   |
| <i>Erianthus</i> | 24.8 ± 3.0    | 108 ± 13             | 4.3  | 6.8 ± 1.0     | 97.9 ± 1.6           | 14   |

Equal amounts of Cellic® CTec and HTec were mixed and used for enzymatic hydrolysis. This enzyme cocktail was incubated with 1.0% (w/v) untreated or ammonia-treated biomass in 1 mL of 50 mM sodium acetate pH 4.5 at 37 °C and 15 rpm at an initial E/B of 1/25. The reaction mixtures were sampled at 48 h. Glucose and xylose concentrations were determined with glucose and xylose assay kits.

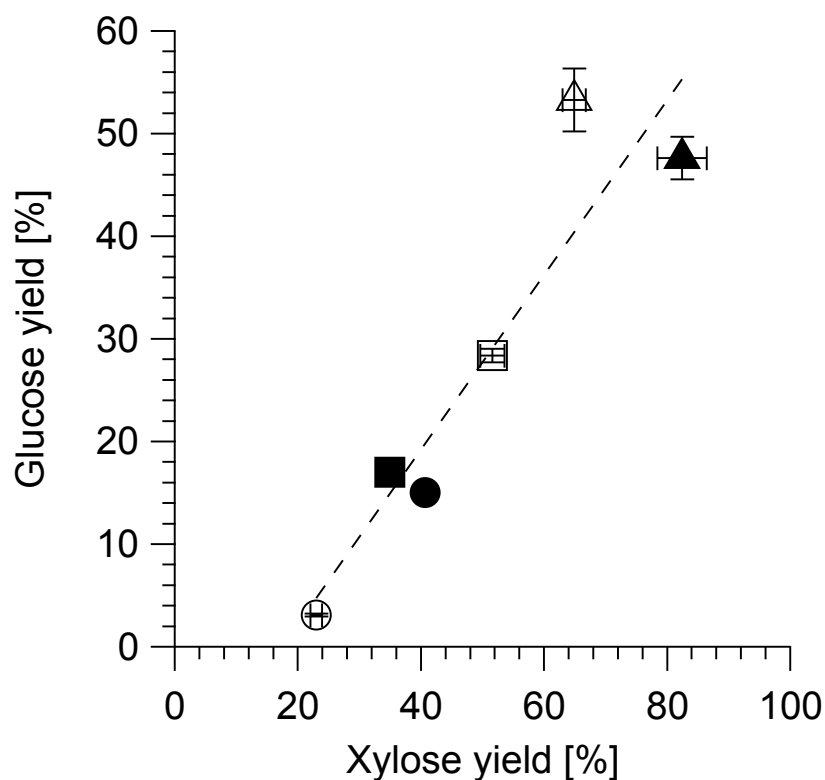


Figure 2.6. Relationship between glucose and xylose yields of ammonia-treated biomasses. Open circles, ammonia-treated acacia; open squares, ammonia-treated beech; open triangles, ammonia-treated birch; closed circles, ammonia-treated eucalyptus; closed squares, ammonia-treated poplar; closed triangles, ammonia-treated willow. Equal amounts of Cellic® CTec and HTec were mixed and subjected to enzymatic hydrolysis. The enzyme cocktail was incubated with 1.0% (w/v) untreated or ammonia-treated biomass in 1 mL 50 mM sodium acetate (pH 4.5) at 37°C agitated at 15 rpm with initial enzyme/biomass (E/B) ratio of 1/25. The reaction mixture were sampled at 48 h. Glucose and xylose concentrations were determined using specific assay kits.

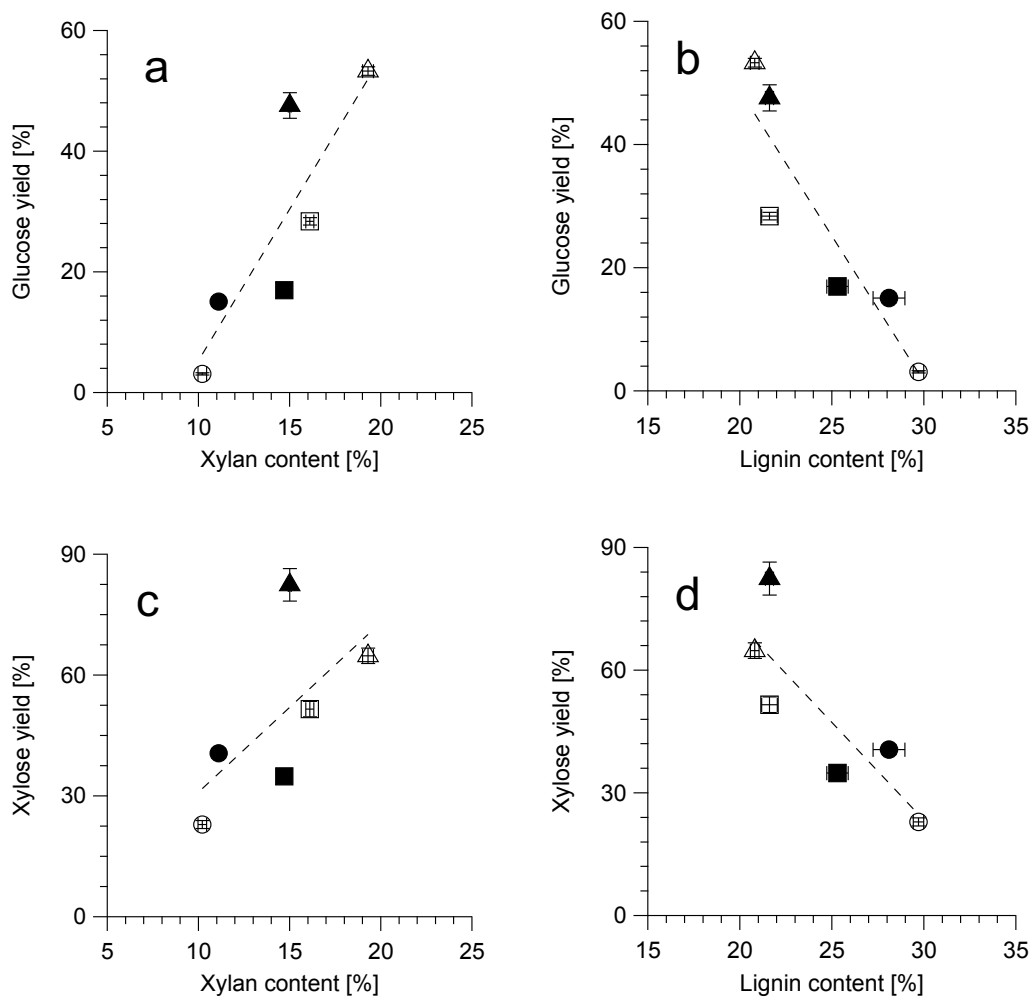


Figure 2.7. Relationship between composition and sugar yield for ammonia-treated biomasses. Open circles, ammonia-treated acacia; open squares, ammonia-treated beech; open triangles, ammonia-treated birch; closed circles, ammonia-treated eucalyptus; closed squares, ammonia-treated poplar; closed triangles, ammonia-treated willow. Equal amounts of Cellic® CTec and HTec were mixed and applied for enzymatic hydrolysis. This enzyme cocktail was incubated with 1.0% (w/v) untreated or ammonia-treated biomass in 1 mL of 50 mM sodium acetate pH 4.5 at 37 °C and 15 rpm at an initial E/B ratio of 1/25. Glucose and xylose concentrations were determined with glucose and xylose assay kits.

## 2.4 考察

6種の広葉樹由来木質バイオマスおよび対照とした草本バイオマス（エリアンサス）について、構成化学成分を調べたところ、処理後も主要なバイオマス構成成分は固体画分に残存することが確認されたが、アンモニア処理による窒素含率の増大とアセチル基含有率の減少が確認された。また未処理およびアンモニア処理バイオマスのFTIRスペクトルにおいても同様に、アンモニア処理によるアセチル基関連ピークの減少とアミド結合関連ピークの増大が確認された。コーンストーバーおよびポプラを対象とした研究において、アンモニア前処理がバイオマス中のエステル結合を切断することが報告されており(Kumar *et al.*, 2009, Chundawat *et al.*, 2010)、本研究においても同様にアセチル基の除去とアミド化合物が生成したと考えられる。

市販酵素剤 (CTec+HTec) を用いたアンモニア処理広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化において (Figure 2.7)、アンモニア前処理はシラカバ等のキシラン/リグニン含有率 (X/L) 比の大きい樹種の酵素糖化に有効である一方、アカシアやユーカリ等のX/L比の小さい樹種に対する効果は小さいことが明らかになった。このことから、広葉樹由来木質バイオマスのキシラン/リグニン比は、アンモニア前処理に適した樹種を選択において有用な指標であると考えられる。また、アンモニア前処理はキシランを修飾するアセチル基を除去することから、キシランの酵素分解性およびアクセシビリティの増大が糖収率増大の要因として考えられる。したがって、X/L比の大きな広葉樹由来木質バイオマスでは、草本バイオマスの場合と同様にアンモニア処理は酵素糖化の前処理として有効であり、リグニンの存在による酵素糖化の制約は限定的であることを示した。その一方で、アンモニア前処理は広葉樹由来木質バイオマスの酵素分解性を大きく改善するが、リグニン含有率の大きい樹種では前処理としての効果が小さく、リグニンによる酵素糖化の制約が大きいと考えられる。

アンモニア前処理は、広葉樹由来木質バイオマスのセルロース結晶をI型から酵素分解されやすいIII型に完全に变化させた (Igarashi *et al.*, 2007)。しかし、セルロース分解はキシラン分解に比較して依然として遅れており (Figure 2.4)、シラカバおよびヤナギを含むすべての広葉樹由来木質バイオマスにおいて、セルロース分解とキシラン分解は強く相関していた。電子顕微鏡を用いた研究において(Awano *et al.*, 2000)、ブナの細胞壁にセルロース-キシラン複合体が観察され、キシランがセルロースの酵素分解を妨げる可能性があることが示唆されている。また

Busse-Wicher および共同研究者は、セルロースマイクロフィブリルの親水性表面へのキシランの結合およびマイクロフィブリルの安定化におけるキシラン側鎖修飾の重要性を指摘している (Busse-Wicher *et al.*, 2016)。これらのことから、セルロースおよびキシランの同時分解は、酵素糖化において高い糖化収率を達成するために重要であり、酵素剤のキシラン分解を強化することが酵素糖化において高いグルコース収率を達成するために重要と考えられる。

## 2.5 結論

アンモニア前処理が6種の広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化に与える影響を明らかにすることで、その適用性を調べた。市販酵素剤 (CTec+HTec) を用いた酵素糖化実験の結果、アンモニア前処理はシラカバ等のキシラン/リグニン含有率 (X/L) 比の高い樹種の酵素糖化に有効である一方、アカシアやユーカリ等のX/L比の低い樹種に対する効果は小さいことを明らかにした。したがって、X/L比の高い広葉樹由来木質バイオマスでは、草本バイオマスの場合と同様にアンモニア処理は酵素糖化の前処理として有効であり、リグニンの存在による酵素糖化の制約は限定的であることを示した。

### 3. ホロセルロースの酵素糖化特性

。



### 3.1. 目的

第二章において、リグニンの除去をとまなわないアンモニア前処理によっても、シラカバなどのX/L比の高い一部の広葉樹種バイオマスからは、高い酵素糖化収率が得られることを明らかにした。しかし、アカシアおよびポプラ等のX/L比の低い広葉樹由来木質バイオマスでは、リグニンの存在が酵素糖化の制約となり、脱リグニンを伴わない前処理では十分に糖化が進行しなかった。そこで、脱リグニンされた広葉樹由来木質バイオマスでは、酵素糖化の制約が解除されたかどうかを確認するために、Wise法による脱リグニン処理によって得られたホロセルロースの酵素糖化特性を調べた。

### 3.2. 実験

#### 3.2.1. 試料調製

第二章にて調製したアカシア (*Acacia mangium*)、ブナ (*Fagus crenata*)、シラカバ (*Betula platyphylla*)、ユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis*)、ポプラ (*Populus sieboldii*)、ヤナギ (*Salix pet-susu*) およびエريانサス (*Erianthus ravennae*) 由来の未処理バイオマスについて、Wise法(Wise *et al.*, 1946)を一部修正した方法によって処理することで、ホロセルロースを調製した。Wise法による脱リグニン処理では、未処理バイオマスに対して、1.0g-亜塩素酸ナトリウム/g-未処理バイオマスおよび0.2ml-酢酸/g-乾燥を毎時添加しながら、80°Cにて最大5時間処理することでホロセルロースを得た。得られたホロセルロースの含水率は、乾熱乾燥式水分計 (MS-70; 研精工業、神奈川、日本) を用いて測定した。

#### 3.2.2. セルロース結晶化度と結晶サイズ

ホロセルロースのX線回折は、第二章と同様に測定した。ホロセルロース試料の結晶サイズはSegal法(Segal *et al.*, 1959)によって、以下の式より算出した。

$$L = 0.9 \lambda / (H \cos \theta) \quad (1)$$

ここで、 $L$ は平面に垂直な結晶サイズであり、 $\lambda$ はX線の波長、 $H$ は半値幅、 $\theta$ はブラッグ角度を示す。また、セルロースの結晶化度は、以下のScherrer式[29]を用いて算出した。

$$CI = (I_t - I_a) / I_t \times 100 \quad (2)$$

ここで、 $I_t$ はセルロース $I_\beta$ の(200)面に由来する $22.6^\circ$ におけるピーク強度を示し、 $I_a$ はセルロース $I_\beta$ の非晶質領域に由来する $18.7^\circ$ におけるピーク強度を示す。

### 3.2.3. ホロセルロースの構成成分分析

ホロセルロースに含まれる中性糖、有機酸およびリグニンは、第二章と同様の方法で定量した。簡潔に記載すると、中性糖含有率は硫酸法(A. Sluiter, 2008)、酸性不溶性リグニン(Klason lignin)はKlason法(Dence, 1992)、有機酸は酸処理によって得られるグルクロン酸および酢酸を高速液体クロマトグラフによって定量することで行った。

### 3.2.4. ホロセルロースの酵素糖化実験

ホロセルロースの酵素糖化は、第二章と同様にCellic® CTec (Novozymes、Bagsvaerd、Denmark) およびCellic® HTec (Novozymes) を酵素剤として用いて行った。ホロセルロース(1.0 w/v%)を基質として、50mM酢酸ナトリウム(pH4.5)中、 $37^\circ\text{C}$ 、15rpmにて、酵素/バイオマス(E/B)比1/100、1/50、1/25、1/16.7および1/12.5にて酵素糖化を行った。酵素糖化1、2、4、8、24および48時間反応後、得られた反応溶液に含まれるD-グルコースおよびD-キシロースの量を、グルコースCII-テストワコー試薬(Wako)およびD-キシロースアッセイキット試薬(Megazyme International Ireland、Ltd.、Wicklow、Ireland)によって測定した。

セルロース分解を伴うことなく酵素糖化できるキシラン(易分解性キシラン)を定量するために、HTecのみを酵素剤として用いて糖化した。第二章に示したようにHTecは、主にキシラン分解関連酵素を含む酵素剤であり、セルロース分解活性はほとんどない。ホロセルロース(1.0 w/v%)を基質として、酵素/バイオマス(E/B)比1/50、50mM酢酸ナトリウム(pH4.5)中、 $37^\circ\text{C}$ 、15rpmにて48時間糖化を行った。得られた反応溶液を15,000rpmで5分間遠心し、得られた上澄のみを回収、さらに酵素/バイオマス(E/B)比1/50となるようにCTecを添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、15rpmでさらに48時間反応させ、得られた反応溶液に含まれるD-グルコースおよびD-キシロースを上記の方法で測定した。

### 3.2.5. ホロセルロースからの単糖生成速度の分析

酵素糖化の近似式は複数提案されているが(Väljamäe *et al.*, 1998)、ホロセルロースの酵素糖化においては、グルコース生成は指数関数および線形関数の和 (3)、キシロース生成は2つの指数関数の和によって、最も正確に近似することができた。したがって、ホロセルロースの酵素糖化におけるグルコース収量の経時変化は、以下の近似式にフィッティングさせた。

$$G(t) = a(1 - e^{-bt}) + ct \quad (3)$$

ここで、 $G(t)$ はグルコース収量 (g/kg-ホロセルロース)、 $t$ は時間 (h)、 $a$ 、 $b$ 、 $c$ は定数である。(3)式より、グルコース生成速度 ( $dG(t) / dt$ ) は、以下の(1)式の微分によって求めた。

$$dG(t)/dt = abe^{-bt} + c \quad (4)$$

同様に、ホロセルロースの酵素糖化におけるキシロース収量の経時変化は、以下の近似式にフィッティングさせた。

$$X(t) = a(1 - e^{-bt}) + c(1 - e^{-dt}) \quad (5)$$

ここで、 $X(t)$ はキシロース収量 (g/kg-ホロセルロース)、 $t$ は時間 (h)、 $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、 $d$ は定数である。(5)式より、キシロース生成速度 ( $dX(t) / dt$ ) は、以下の(3)式の微分によって求めた。

$$dX(t)/dt = abe^{-bt} + cde^{-dt} \quad (6)$$

## 3.3. 結果

### 3.3.1. ホロセルロースの構成成分分析

広葉樹由来木質バイオマスのセルロース分解に与えるキシラン分解特性の影響について調べるため、Wise 法による脱リグニン処理を6広葉樹由来木質バイオマスおよび対照とした草本バイオマス (エリアンサス) に施し、得られたホロセルロースの構成成分および酵素分解特性を調べた。

未処理試料およびホロセルロースの構成成分分析結果を示す (Table 3.1)。Wise 法による5時間の脱リグニン処理によって、広葉樹由来木質バイオマスの重量収率は21.9-28.0% (未処理試料基準) 減少した。Wise 法による脱リグニン処理では、広葉樹由来木質バイオマス主要構成成分

のうちリグニンが優先的に除去されるために、5回の脱リグニン処理によって全ての広葉樹由来木質バイオマスでリグニン含有率は4%以下にまで減少した。。リグニン含有率が選択的に低下するために、植物バイオマス由来ホロセルロースの構成成分は、大部分がセルロースおよびキシランであった。広葉樹由来木質バイオマス由来ホロセルロースに含まれるセルロース含有率（酸糖化によって生成したグルコース量より算出）は、アカシアが特に高く（56.3%）、ユーカリ、ポプラおよびブナも高い含有率（46.7~49.6%）を示したが、シラカバおよびヤナギでは低かった（それぞれ39.6、41.0%）。これに対して、広葉樹由来木質バイオマス由来ホロセルロースに含まれるキシラン含有率（酸糖化によって生成したキシロース量より算出）は、シラカバ、ブナおよびポプラにおいて高く（20.1~22.2%）、アカシアおよびユーカリでは低く（それぞれ15.3%および15.6%）、ヤナギはこれらの樹種の間（18.9%）であった。全ての広葉樹由来木質バイオマスにおいて、脱リグニン処理による未処理試料基準のセルロース含有率の減少、キシラン含有率の増大が確認されたが、変化の動態には樹種によって差がみられた。広葉樹由来木質バイオマス由来ホロセルロースの酢酸含有率（酸糖化によって生成した酢酸量より算出）は1.3~2.6%（from 3.6~8.2%）、グルクロン酸含有率（酸糖化によって生成したグルクロン酸量より算出）は0.4~0.7%（from 1.5~2.5%）まで最大5時間の脱リグニン処理によって大きく低下した。これらの現象については、広葉樹由来木質バイオマスだけではなく、対照とした草本バイオマスのエリアンサスについても同様に確認されたが、脱リグニン処理によるアラビノース含有率の低下はみられなかった。また、Wise法による脱リグニン処理は、植物バイオマスのセルロース結晶化度および結晶サイズを増加する傾向が確認された。広葉樹バイオマスにおいては、セルロース結晶化度は56~66%および結晶サイズは4.3~5.4nmと差があり、それらの値は5時間の脱リグニン処理によって64~73%および5.1~6.3nmへとわずかに増加した（Table 3.2）。対照とした草本バイオマスのエリアンサスでは、セルロース結晶化度は56%および結晶サイズは4.2nmであり、広葉樹バイオマスよりも値は小さく、同様に脱リグニン処理によってこれらの値は61%および4.8nmへとわずかに増加した。広葉樹由来木質バイオマス由来ホロセルロースに含まれるセルロースの結晶化度および結晶サイズには樹種間で差が認められ、それらの値は脱リグニン処理によってわずかに増加した。

Table 3.1. Analytical data of holocellulose samples.

| Name       | Treatment<br>time [-] | Ara [%] | Gal [%] | Glc [%]  | Man [%] | Xyl [%]  |
|------------|-----------------------|---------|---------|----------|---------|----------|
| Acacia     | 0                     | 0.2±0.2 | 1.0±0.1 | 40.8±3.1 | 1.1±0.4 | 8.3±0.8  |
|            | 1                     | 0.1±0.0 | 0.2±0.2 | 47.5±3.9 | 0.9±0.2 | 13.3±1.1 |
|            | 2                     | 0.0±0.0 | 0.5±0.1 | 51.2±4.5 | 1.3±0.4 | 14.2±0.9 |
|            | 3                     | 0.1±0.0 | 0.5±0.1 | 58.6±5.4 | 1.8±0.2 | 15.6±1.5 |
|            | 4                     | 0.0±0.0 | 0.4±0.1 | 56.8±5.1 | 1.9±0.2 | 15.6±1.0 |
|            | 5                     | 0.0±0.0 | 0.2±0.1 | 56.3±3.8 | 1.8±0.2 | 15.3±1.1 |
| Beech      | 0                     | 0.4±0.1 | 1.1±0.3 | 36.7±4.5 | 1.1±0.2 | 13.6±0.4 |
|            | 1                     | 0.7±0.5 | 0.8±0.0 | 39.6±2.8 | 1.1±0.4 | 17.1±1.3 |
|            | 2                     | 0.5±0.2 | 0.8±0.0 | 42.9±3.7 | 1.6±0.1 | 18.6±0.9 |
|            | 3                     | 0.2±0.1 | 0.7±0.1 | 44.2±3.7 | 1.5±0.2 | 19.5±0.9 |
|            | 4                     | 0.3±0.2 | 0.9±0.1 | 47.3±4.3 | 1.8±0.2 | 20.6±0.9 |
|            | 5                     | 0.7±0.6 | 0.7±0.1 | 46.7±4.4 | 1.7±0.1 | 20.2±1.1 |
| Birch      | 0                     | 0.4±0.1 | 1.6±0.6 | 33.1±1.2 | 1.4±0.4 | 16.4±1.0 |
|            | 1                     | 0.3±0.2 | 1.9±0.2 | 36.8±3.2 | 1.1±0.2 | 20.6±1.9 |
|            | 2                     | 0.4±0.2 | 2.1±0.2 | 36.5±2.0 | 1.1±0.2 | 20.1±2.2 |
|            | 3                     | 0.4±0.3 | 2.3±0.3 | 40.8±4.5 | 1.2±0.2 | 22.5±1.8 |
|            | 4                     | 0.2±0.1 | 1.7±0.2 | 36.5±3.6 | 1.0±0.2 | 20.6±2.6 |
|            | 5                     | 0.2±0.1 | 1.8±0.3 | 39.6±3.8 | 1.1±0.2 | 22.2±2.4 |
| Eucalyptus | 0                     | 0.3±0.2 | 1.6±0.4 | 37.6±2.8 | 0.7±0.2 | 10.2±0.5 |
|            | 1                     | 0.3±0.2 | 1.7±0.1 | 39.5±3.2 | 0.3±0.0 | 13.0±1.0 |
|            | 2                     | 0.3±0.1 | 1.8±0.2 | 41.6±3.3 | 0.4±0.1 | 13.8±1.1 |
|            | 3                     | 0.2±0.1 | 1.7±0.2 | 43.6±3.4 | 0.4±0.1 | 14.6±1.2 |
|            | 4                     | 0.3±0.2 | 1.9±0.3 | 45.4±3.1 | 0.7±0.1 | 15.2±1.5 |
|            | 5                     | 0.2±0.1 | 1.9±0.2 | 47.3±3.4 | 0.6±0.0 | 15.6±1.2 |

|           |   |         |         |          |         |          |
|-----------|---|---------|---------|----------|---------|----------|
| Poplar    | 0 | 0.5±0.1 | 1.0±0.2 | 39.3±1.3 | 1.0±0.4 | 14.0±1.1 |
|           | 1 | 0.4±0.2 | 0.3±0.1 | 40.1±2.5 | 1.2±0.2 | 16.6±1.5 |
|           | 2 | 0.4±0.2 | 0.4±0.1 | 41.2±3.6 | 1.2±0.1 | 17.0±0.7 |
|           | 3 | 0.4±0.2 | 0.4±0.1 | 45.0±4.5 | 1.4±0.1 | 18.4±0.7 |
|           | 4 | 0.3±0.2 | 0.4±0.1 | 47.6±3.9 | 1.7±0.1 | 19.6±1.1 |
|           | 5 | 0.3±0.1 | 0.3±0.1 | 49.6±3.6 | 1.5±0.1 | 20.1±1.3 |
| Willow    | 0 | 0.3±0.2 | 0.8±0.2 | 38.0±4.3 | 1.8±0.3 | 14.4±0.3 |
|           | 1 | 0.2±0.1 | 0.4±0.1 | 39.9±3.5 | 2.0±0.1 | 18.3±0.7 |
|           | 2 | 0.1±0.1 | 0.4±0.0 | 41.2±1.4 | 1.5±0.0 | 17.4±0.6 |
|           | 3 | 0.3±0.2 | 0.4±0.2 | 44.3±2.0 | 2.2±0.1 | 21.0±1.4 |
|           | 4 | 0.2±0.2 | 0.3±0.1 | 43.1±4.4 | 2.0±0.0 | 20.0±0.5 |
|           | 5 | 0.1±0.1 | 0.1±0.2 | 41.0±5.1 | 1.9±0.1 | 18.9±0.5 |
| Erianthus | 0 | 3.2±0.3 | 0.9±0.4 | 33.4±2.4 | 0.0±0.0 | 16.0±1.4 |
|           | 1 | 4.7±0.4 | 0.8±0.2 | 37.9±2.3 | 0.0±0.0 | 22.6±1.1 |
|           | 2 | 5.1±0.4 | 0.9±0.1 | 39.1±2.0 | 0.0±0.0 | 23.3±1.2 |
|           | 3 | 4.6±1.3 | 0.8±0.1 | 43.1±3.0 | 0.0±0.0 | 26.1±0.7 |
|           | 4 | 4.8±0.2 | 0.9±0.1 | 43.6±0.5 | 0.0±0.0 | 22.7±0.5 |
|           | 5 | 5.3±0.5 | 0.8±0.1 | 42.4±3.0 | 0.1±0.1 | 23.6±0.8 |

HPLC was used to measure the contents of arabinose (Ara), galactose (Gal), glucose (Glc), mannose (Man), and xylose (Xyl) in untreated and ammonia-treated biomass. Neutral sugars are presented as the weight percentages contained in the biomass sample (%). Each value is the mean of three measurements with the standard deviation.

Table 3.1 Analytical data of holocellulose samples. (Continued)

| Name       | Treatment<br>time [-] | Lignin [wt.%] | GlcA [%] | AcOH [%] | Recovery [wt.%] |
|------------|-----------------------|---------------|----------|----------|-----------------|
| Acacia     | 0                     | 30.5±0.7      | 1.5±0.2  | 3.6±0.0  | -               |
|            | 1                     | 20.9±0.5      | 0.3±0.0  | 1.0±0.0  | 89.1±3.3        |
|            | 2                     | 12.2±0.5      | 0.4±0.0  | 1.1±0.0  | 82.1±3.1        |
|            | 3                     | 6.7±0.1       | 0.4±0.0  | 1.1±0.0  | 76.9±2.1        |
|            | 4                     | 4.1±0.4       | 0.4±0.0  | 1.1±0.0  | 73.5±1.9        |
|            | 5                     | 1.8±0.2       | 0.5±0.0  | 1.3±0.1  | 72.0±2.6        |
| Beech      | 0                     | 23.7±0.4      | 1.9±0.1  | 8.2±0.0  | -               |
|            | 1                     | 16.9±0.6      | 0.4±0.1  | 2.7±0.7  | 90.3±2.0        |
|            | 2                     | 11.6±0.4      | 0.4±0.1  | 2.5±0.5  | 87.6±3.3        |
|            | 3                     | 6.6±0.4       | 0.5±0.1  | 2.7±0.7  | 81.3±1.0        |
|            | 4                     | 5.2±0.7       | 0.5±0.0  | 2.7±0.1  | 76.7±2.4        |
|            | 5                     | 3.6±0.2       | 0.5±0.0  | 2.6±0.1  | 77.6±1.1        |
| Birch      | 0                     | 21.3±0.7      | 2.0±0.0  | 7.0±0.1  | -               |
|            | 1                     | 14.2±0.7      | 0.4±0.0  | 2.2±0.1  | 91.6±3.2        |
|            | 2                     | 8.5±0.8       | 0.4±0.0  | 1.8±0.1  | 87.6±2.4        |
|            | 3                     | 5.4±0.5       | 0.4±0.0  | 1.9±0.1  | 82.8±1.8        |
|            | 4                     | 3.2±0.1       | 0.4±0.0  | 2.0±0.1  | 77.5±6.8        |
|            | 5                     | 1.9±0.1       | 0.5±0.0  | 2.2±0.1  | 78.2±3.6        |
| Eucalyptus | 0                     | 27.0±3.2      | 2.5±0.0  | 4.9±0.2  | -               |
|            | 1                     | 20.3±2.2      | 0.5±0.0  | 1.3±0.1  | 92.4±3.1        |
|            | 2                     | 14.0±1.8      | 0.5±0.0  | 1.2±0.1  | 87.8±1.9        |
|            | 3                     | 7.7±2.0       | 0.6±0.0  | 1.4±0.1  | 81.3±1.3        |
|            | 4                     | 5.0±1.4       | 0.6±0.0  | 1.5±0.1  | 79.3±2.0        |
|            | 5                     | 3.0±0.5       | 0.7±0.1  | 1.8±0.1  | 75.5±2.1        |

|           |   |          |         |         |          |
|-----------|---|----------|---------|---------|----------|
| Poplar    | 0 | 24.4±0.5 | 1.8±0.1 | 5.9±0.0 | -        |
|           | 1 | 17.5±0.6 | 0.4±0.0 | 1.9±0.1 | 91.4±0.7 |
|           | 2 | 10.7±0.6 | 0.4±0.0 | 1.9±0.2 | 85.3±1.8 |
|           | 3 | 6.4±0.6  | 0.4±0.1 | 1.8±0.2 | 81.4±0.4 |
|           | 4 | 3.3±0.2  | 0.4±0.0 | 1.8±0.4 | 76.5±1.0 |
|           | 5 | 1.3±0.3  | 0.4±0.0 | 1.9±0.3 | 75.1±0.2 |
| Willow    | 0 | 23.0±0.3 | 2.5±0.0 | 6.6±0.1 | -        |
|           | 1 | 14.9±0.4 | 0.5±0.1 | 2.0±0.5 | 89.5±2.6 |
|           | 2 | 9.7±0.3  | 0.5±0.4 | 1.5±1.4 | 85.2±3.8 |
|           | 3 | 5.8±0.1  | 0.6±0.1 | 2.1±0.4 | 81.4±2.0 |
|           | 4 | 3.3±0.7  | 0.6±0.1 | 2.2±0.3 | 79.5±1.0 |
|           | 5 | 1.5±0.1  | 0.6±0.1 | 2.2±0.4 | 78.1±4.3 |
| Erianthus | 0 | 20.1±1.5 | 1.5±0.2 | 3.7±0.1 | -        |
|           | 1 | 9.3±0.5  | 0.1±0.0 | 1.4±0.4 | 76.2±3.6 |
|           | 2 | 7.3±0.7  | 0.1±0.1 | 0.9±0.9 | 72.7±2.6 |
|           | 3 | 5.6±0.2  | 0.1±0.0 | 1.4±0.6 | 70.4±0.9 |
|           | 4 | 5.0±0.8  | 0.2±0.0 | 1.4±0.3 | 67.2±0.5 |
|           | 5 | 4.5±0.1  | 0.2±0.1 | 1.5±0.3 | 63.1±2.1 |

HPLC was used to measure the contents of glucuronic acid (GlcA) and acetic acid (AcOH) contents in untreated and ammonia-treated biomasses. Nitrogen content was determined using a total nitrogen analyser. Klason lignin (KL) was estimated according to the Klason method. Glucuronic acid, and acetic acid contents are presented as the weight percentages contained in the biomass sample (%). Each value is the mean of three measurements with the standard deviation.



Table 3.2 Crystallinity index and crystal size analysis of holocellulose samples.

| Name       | Treatment time [-] | Crystallinity index [%] | Crystal size [nm] |
|------------|--------------------|-------------------------|-------------------|
| Acacia     | 0                  | 66                      | 5.4               |
|            | 1                  | 69                      | 5.4               |
|            | 2                  | 70                      | 5.9               |
|            | 3                  | 71                      | 6.0               |
|            | 4                  | 72                      | 6.4               |
|            | 5                  | 73                      | 6.3               |
| Beech      | 0                  | 63                      | 4.6               |
|            | 1                  | 65                      | 5.1               |
|            | 2                  | 66                      | 5.1               |
|            | 3                  | 67                      | 5.1               |
|            | 4                  | 67                      | 5.1               |
|            | 5                  | 69                      | 5.1               |
| Birch      | 0                  | 63                      | 5.1               |
|            | 1                  | 66                      | 5.7               |
|            | 2                  | 68                      | 5.6               |
|            | 3                  | 68                      | 6.0               |
|            | 4                  | 69                      | 5.8               |
|            | 5                  | 72                      | 6.0               |
| Eucalyptus | 0                  | 56                      | 4.3               |
|            | 1                  | 59                      | 4.6               |
|            | 2                  | 60                      | 4.8               |
|            | 3                  | 61                      | 5.5               |
|            | 4                  | 64                      | 5.3               |
|            | 5                  | 64                      | 5.4               |
| Poplar     | 0                  | 58                      | 4.5               |

|           |   |    |     |
|-----------|---|----|-----|
|           | 1 | 61 | 5.0 |
|           | 2 | 61 | 5.2 |
|           | 3 | 63 | 5.1 |
|           | 4 | 65 | 5.5 |
|           | 5 | 67 | 5.8 |
| <hr/>     |   |    |     |
| Willow    | 0 | 58 | 4.4 |
|           | 1 | 61 | 4.9 |
|           | 2 | 62 | 4.9 |
|           | 3 | 63 | 4.9 |
|           | 4 | 64 | 4.9 |
|           | 5 | 65 | 5.1 |
| <hr/>     |   |    |     |
| Erianthus | 0 | 56 | 4.2 |
|           | 1 | 57 | 4.5 |
|           | 2 | 58 | 4.2 |
|           | 3 | 59 | 4.5 |
|           | 4 | 61 | 4.8 |
|           | 5 | 61 | 4.8 |

---

### 3.3.2. ホロセルロースの酵素糖化

市販酵素剤 (CTec+HTec, E/B = 4%) を用いて、ホロセルロースを酵素糖化したときのグルコースおよびキシロース収率の経時変化を示す (Figure 3.2)。ポプラの酵素糖化においては、反応 48 時間において、酸糖化と同程度までキシロースおよびグルコース収率が効率化された。また、アカシアおよびシラカバにも脱リグニン処理が有効であったが、ユーカリに対する脱リグニン処理の効果は小さく、その効果に樹種間で差がみられた。また、ヘミセルラーゼ製剤 (HTec) のみを用いて酵素糖化を行ったところ、CTec と組み合わせて用いた場合と比較して、得られるキシロース収率が低下し、このときグルコースはほとんど得られないことを確認した。一方、対照としたエリアンサスでは、特にセルロースの酵素糖化の効率化が顕著であり、CTec+HTec を用いた 48 時間の反応で、酸糖化以上の糖収率が得られた。また、広葉樹由来木質バイオマスに比較して、HTec のみで酵素糖化できるキシロース収率が多いことが明らかになった。

Figure 3.2 のシミュレーションから、セルロース分解を伴うことなく糖化できるキシラン (易分解性キシラン) 量を求めた (Table 3.3)。広葉樹由来木質バイオマスでは、ポプラのように易分解性キシランが約 46% を占める樹種がある一方、多くの樹種では 20~40%、ユーカリに至っては約 15% にとどまり、6 広葉樹種間で含有率に大きな差が認められた。また、CTec および HTec を用いた酵素糖化から求められたキシロース収率から、HTec のみを用いたときのキシロース収率を差し引くことで、セルロース分解を伴って糖化されるキシラン (難分解性キシラン) を求めたところ、広葉樹由来木質バイオマスの難分解性キシランは、ユーカリのように約 69% と多くを占める樹種がある一方で、多くの樹種では 39.8~48.4% を占めていた。一方、対照としたエリアンサスでは、広葉樹由来木質バイオマスに比較して、易分解性キシランが多く (約 55%)、難分解性キシランが少なかった (20.9%)。

市販酵素剤 (CTec+HTec, E/B = 1, 2, 4, 6, 8%) を用いて、ホロセルロースを酵素糖化 (反応 1, 2, 4, 8, 24, 48 時間) したときのキシロースおよびグルコース収率の関係を示す (Figure 3.3)。いずれの樹種においても、キシロース収率とグルコース収率に強い正の相関がみられた。酵素濃度を増大することで、得られる糖収率は向上し、E/B=8%、反応 48 時間において、ポプラでは酸糖化を上回る糖収率、アカシア、シラカバおよびヤナギでは酸糖化と同程度、ブナおよびユーカリでは酸糖化の約 70~85% の糖収率が得られた。

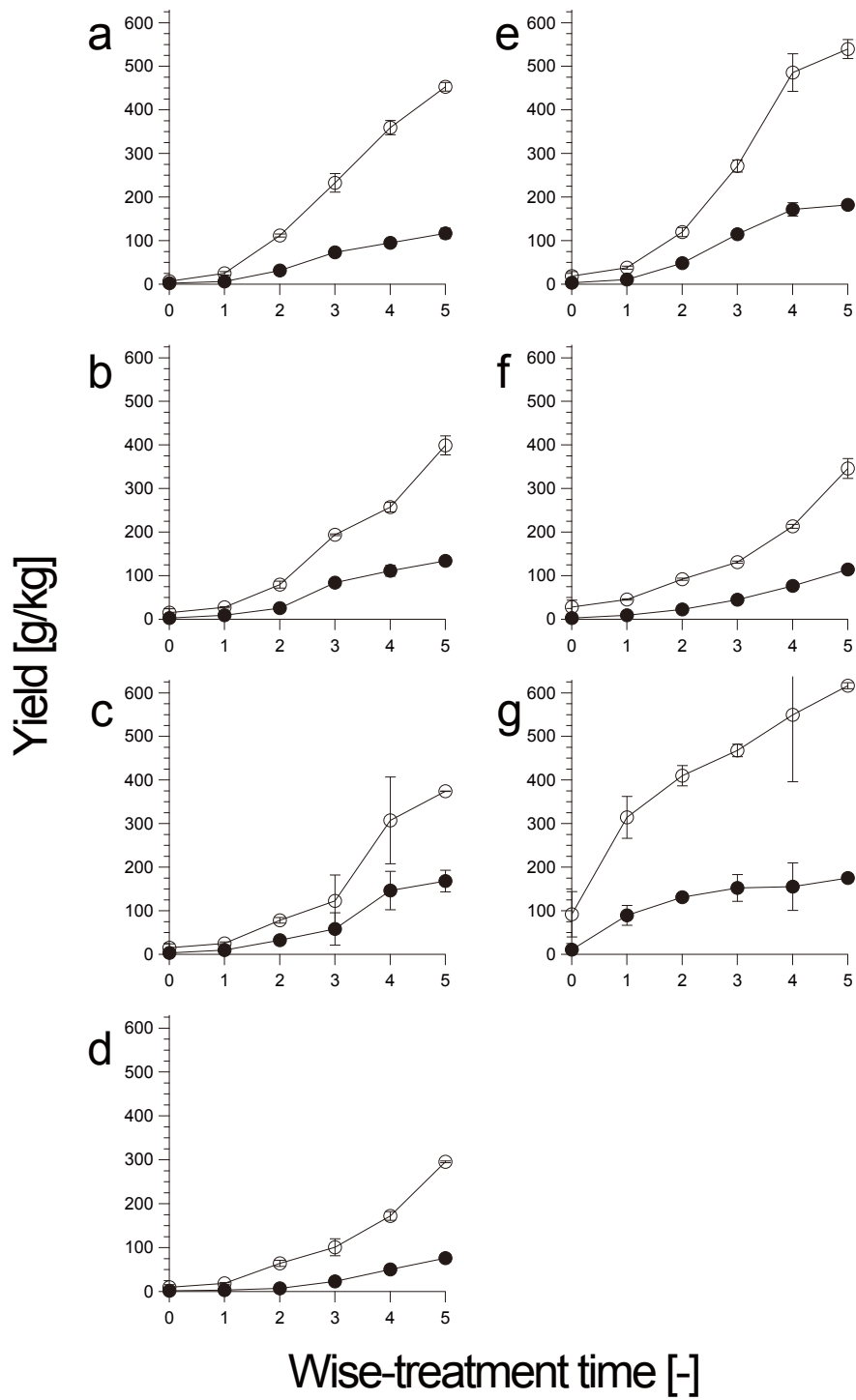


Figure 3.1 Effect of reaction time for enzymatic saccharification from holocelluloses.

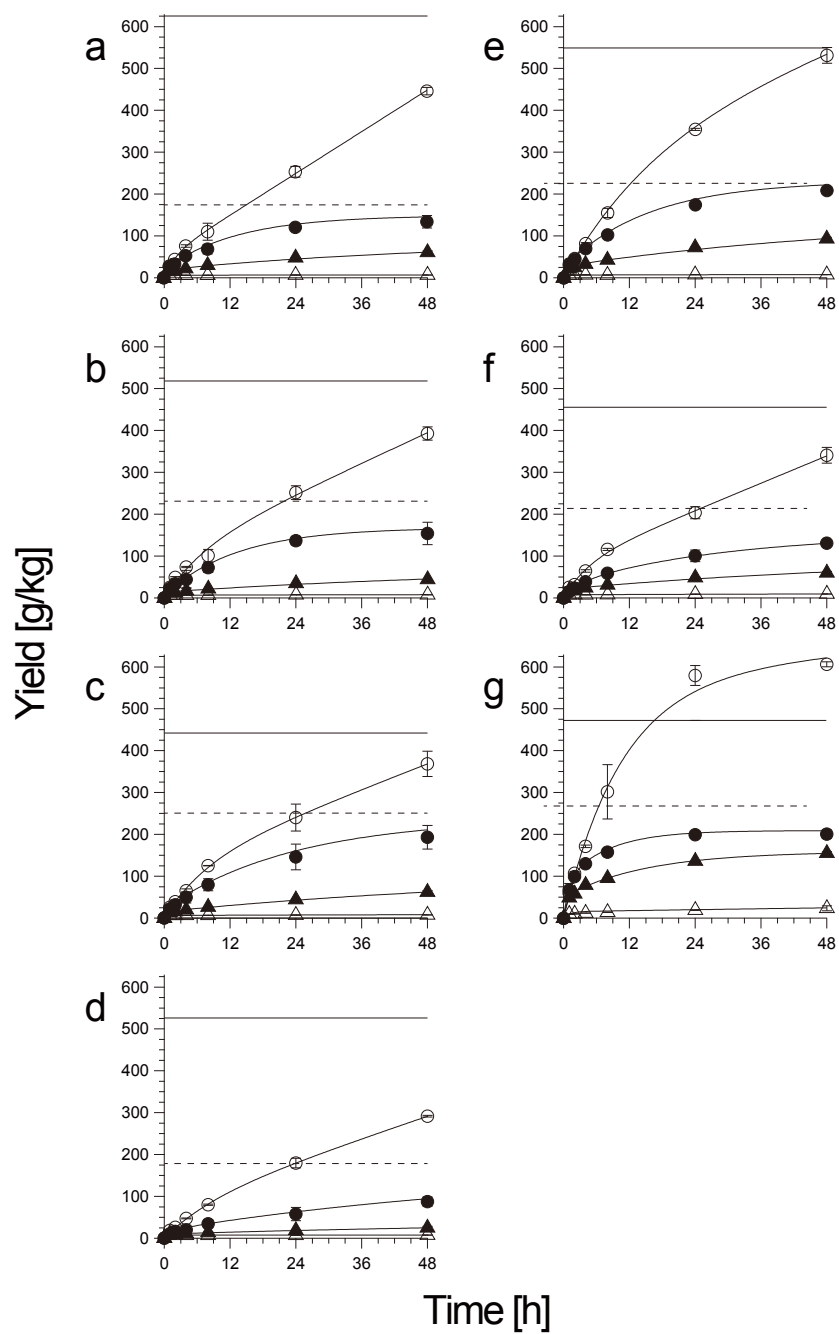


Figure 3.2 Time course of monosaccharide production from holocellulose samples. a: acacia; b: beech; c: birch; d: eucalyptus; e: poplar; f: willow; g: Erianthus. Open circles, glucose yield (CTec+HTec); closed circles, xylose yield (CTec+HTec), Open triangle, glucose yield (HTec); closed triangle, xylose yield (HTec), solid line: maximum glucose yield calculated from chemical analysis; dashed line: maximum xylose yield calculated from chemical analysis.

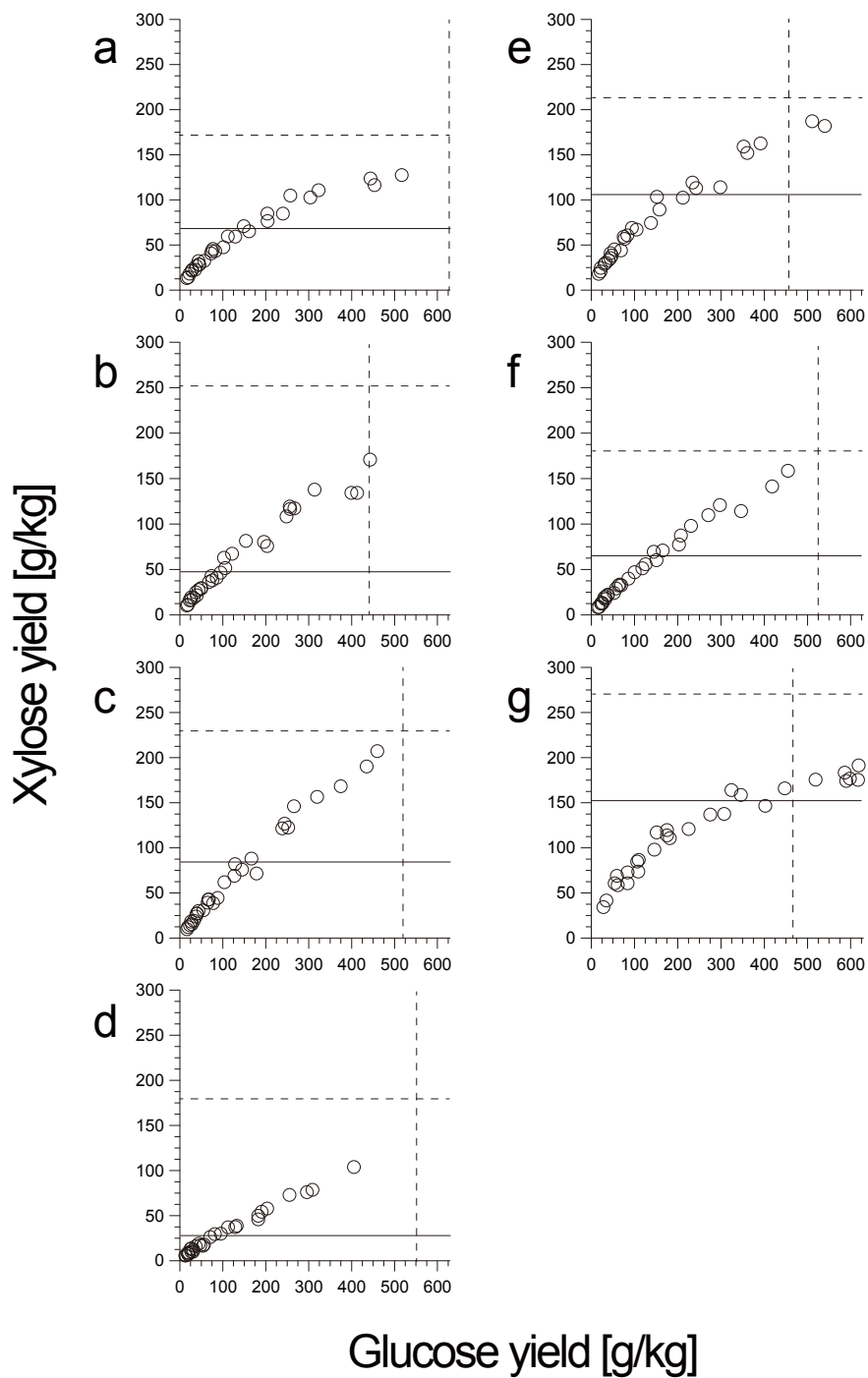


Figure 3.3 Relationship between glucose and xylose yields from holocellulose samples. a: acacia; b: beech; c: birch; d: eucalyptus; e: poplar; f: willow; g: Erianthus. Horizontal dashed line: the maximum yield of xylose calculated from acid saccharification; vertical dashed line: the maximum yield of glucose calculated from acid saccharification; Horizontal line: the content of degradable xylose.

Table 3.3 Calculated xylose yield from holocellulose samples by enzymatic saccharification.

| Name       | CTec+HTec<br>[g/kg] | HTec<br>[g/kg] | Subtraction<br>[g/kg] <sup>1)</sup> |
|------------|---------------------|----------------|-------------------------------------|
| Acacia     | 147.6 (78.6)        | 67.5 (38.8)    | 80.1 (38.9)                         |
| Beech      | 174.5 (69.9)        | 49.3 (21.5)    | 125.2 (48.4)                        |
| Birch      | 216.6 (78.8)        | 81.1 (32.1)    | 135.5 (46.7)                        |
| Eucalyptus | 153.0 (84.4)        | 28.2 (15.9)    | 124.8 (68.6)                        |
| Poplar     | 214.8 (94.0)        | 106.1 (46.4)   | 108.7 (47.6)                        |
| Willow     | 151.5 (70.6)        | 65.6 (30.6)    | 85.9 (40.0)                         |
| Erianthus  | 201.3 (77.5)        | 151.6 (56.6)   | 49.8 (20.9)                         |

1) Xylose yield (CTec+HTec) – Xylose yield (HTec)

### 3.3.3. ホロセルロースの酵素糖化における速度論的解析

樹種によって異なるキシランとセルロースの存在状態が、広葉樹由来木質バイオマス由来ホロセルロースの酵素糖化収率の差異の一因であるとする、このことはキシランとセルロースの酵素糖化速度の経時変化として現れると考えられる。そこで、キシロース生産速度およびグルコース生産速度の経時変化を Figure 3.2 のシミュレーション式より求めた微分式にパラメーター (Table 3.4) を挿入することで求め (Figure 3.4)、さらに反応 0, 24.48 時間における速度を示した (Table 3.5)。キシロース生産の初速は、ユーカリおよびヤナギのように遅い樹種 (11.2, 15.1 g/h) がある一方で、アカシアおよびポプラでは速く (77.6, 61.5g/h)、広葉樹種間で差がみられた。またグルコース生産の初速は、ユーカリでは 12.9 g/h と遅いが、多くの樹種で初速 20.1 ~ 29.6g/h であった。いずれの広葉樹種由来ホロセルロースにおいても、グルコース生産速度はキシロース生産速度に比較して常に大きい、キシロース生産速度が反応時間の進行にともなって急激に低下するのに比較して、グルコース生産速度は反応 48 時間以上をかけてゆっくりと低下する傾向が見られた。

キシラン分解とセルロース分解の関係に植物種間で差が見られたことから、両者の関係をより詳細に調べるために、ホロセルロースのキシロース生産速度とグルコース生産速度の相対速度解析を行った (Figure 3.5, Figure 3.6)。反応 48 時間後もキシラン分解が継続しているシラカバ、ユーカリおよびヤナギでは、キシロース生産の相対速度が速いが、アカシアではキシロース生産の相対速度が反応 48 時間にかけて非常に遅くなり、これにポプラやブナが続いていた。また注目すべきことに、広葉樹由来木質バイオマス由来ホロセルロースでは、反応初期の短時間で分解されて急速に分解速度が低下するキシランと、その後、セルロース分解に伴って、一時的に分解速度が上がるキシラン (山となって現れる部分) が存在することが明らかになった。一方、対照としたエリアンサスにおいては、キシロース生産速度とグルコース生産速度の相対速度解析から見出されるキシラン分解の二相性は確認されなかった。



Table 3.4 The parameters from fitting curves

|                  | Glucose yield |      |      |   | Xylose yield |      |        |      |
|------------------|---------------|------|------|---|--------------|------|--------|------|
|                  | a             | b    | c    | d | a            | b    | c      | d    |
| Acacia           | 48.69         | 0.44 | 8.24 | - | 18.48        | 3.67 | 129.10 | 0.08 |
| Beech            | 102.19        | 0.14 | 6.03 | - | 25.48        | 0.51 | 149.02 | 0.06 |
| Birch            | 121.90        | 0.13 | 5.07 | - | 19.38        | 0.90 | 197.17 | 0.04 |
| Eucalyptus       | 77.35         | 0.11 | 4.41 | - | 16.10        | 0.56 | 136.94 | 0.02 |
| Poplar           | 318.42        | 0.06 | 4.78 | - | 23.34        | 2.10 | 191.47 | 0.06 |
| Willow           | 77.36         | 0.22 | 5.40 | - | 28.62        | 0.37 | 122.84 | 0.04 |
| <i>Erianthus</i> | 570.70        | 0.09 | 1.10 | - | 82.73        | 1.02 | 118.61 | 0.12 |

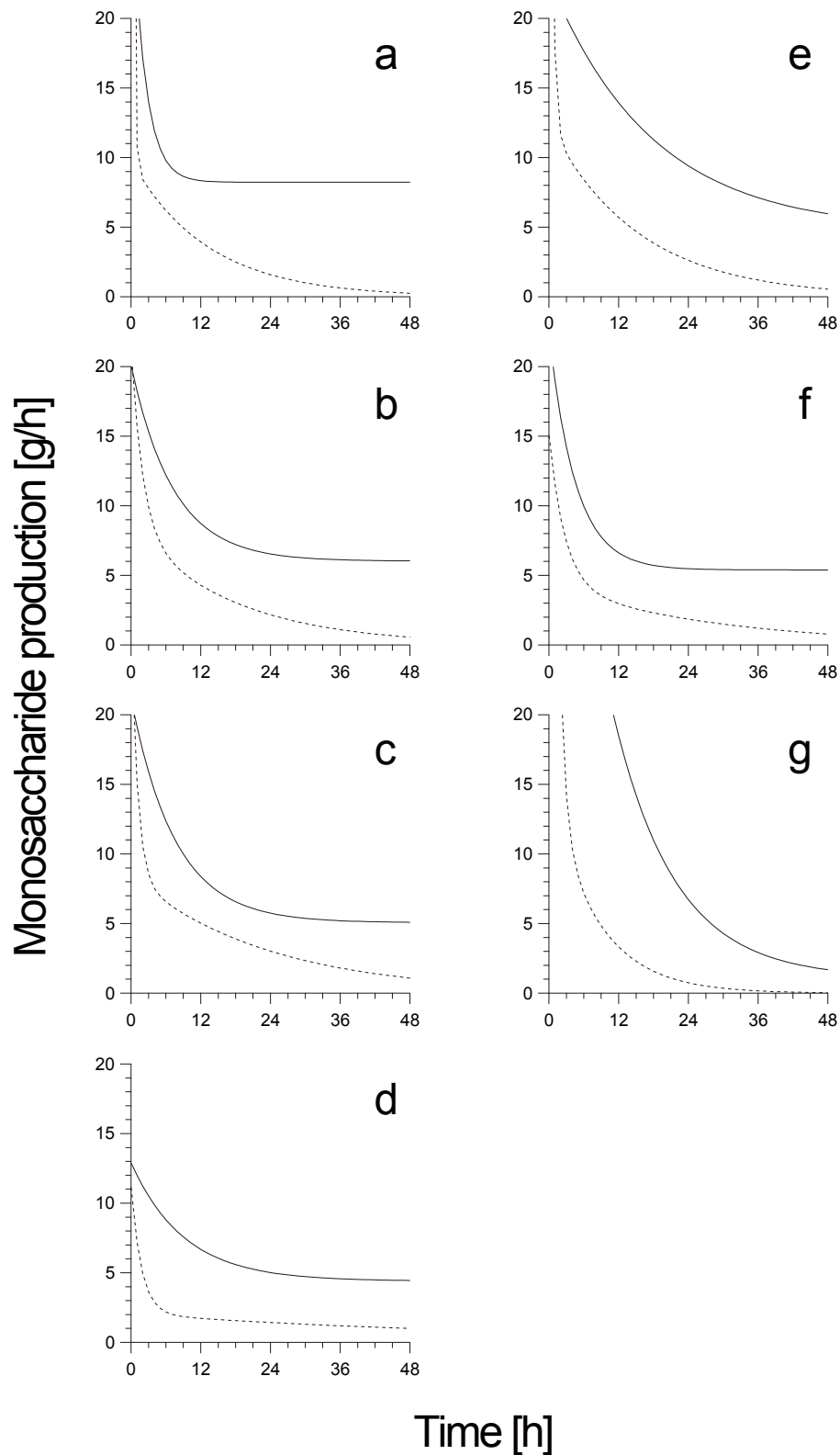


Figure 3.4 Time course of the rate of xylose and glucose production from holocellulose. a: acacia; b: beech; c: birch; d: eucalyptus; e: poplar; f: willow; g: Erianthus. Solid line: the rate of glucose production; dashed line: the rate of xylose production.

Table 3.5 Glucose and xylose production rate obtained from an approximate expression.

| Name             | Glucose production [g/h] |      |      | Xylose production [g/h] |      |      |
|------------------|--------------------------|------|------|-------------------------|------|------|
|                  | 0 h                      | 24 h | 48 h | 0 h                     | 24 h | 48 h |
| Acacia           | 29.6                     | 8.2  | 8.2  | 77.6                    | 1.6  | 0.3  |
| Beech            | 20.1                     | 6.6  | 6.1  | 21.3                    | 2.2  | 0.6  |
| Birch            | 21.1                     | 5.8  | 5.1  | 25.9                    | 3.0  | 1.1  |
| Eucalyptus       | 12.9                     | 5.0  | 4.5  | 11.2                    | 1.4  | 1.0  |
| Poplar           | 22.9                     | 9.4  | 6.0  | 61.5                    | 2.6  | 0.6  |
| Willow           | 22.4                     | 5.5  | 5.4  | 15.1                    | 1.9  | 0.8  |
| <i>Erianthus</i> | 54.8                     | 6.7  | 1.7  | 99.1                    | 0.8  | 0.04 |

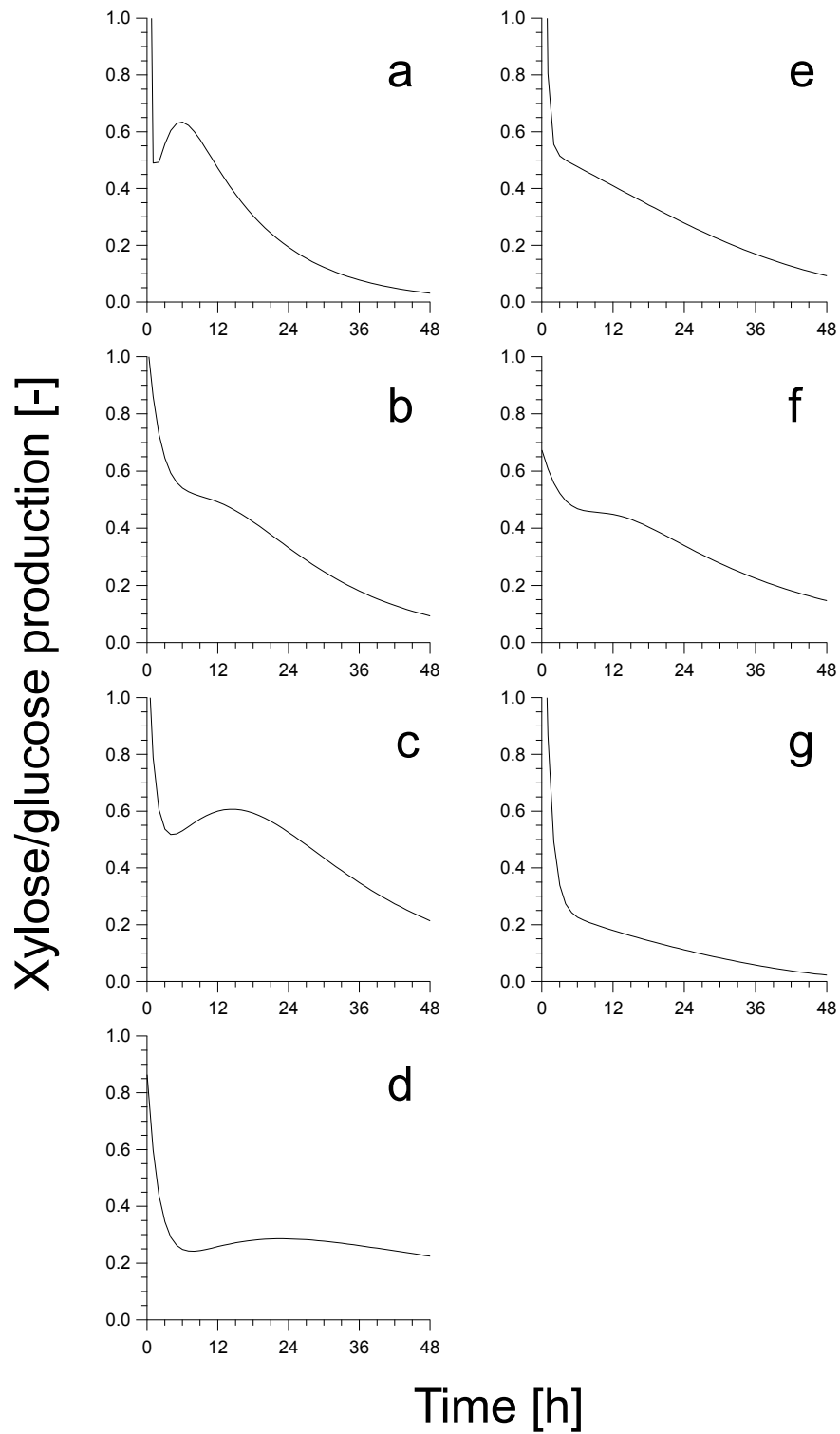


Figure 3.5 Time course of the ratio of the production rate between xylose and glucose production from holocellulose. a: acacia; b: beech; c: birch; d: eucalyptus; e: poplar; f: willow; g: *Erianthus*.

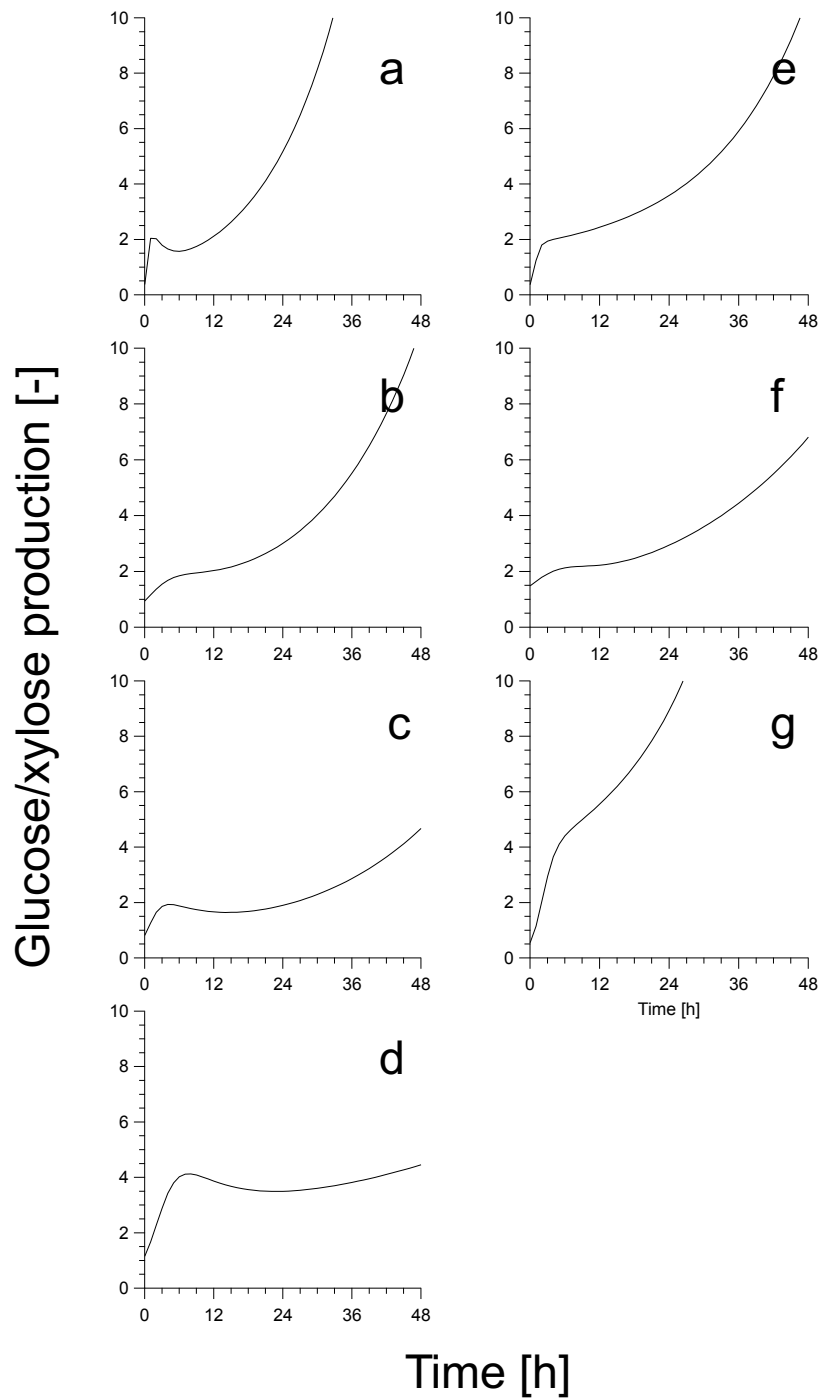


Figure 3.6 Time course of the ratio of the production rate between glucose and xylose production from holocellulose. a: acacia; b: beech; c: birch; d: eucalyptus; e: poplar; f: willow; g: *Erianthus*.

### 3.4. 考察

広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化においては、リグニンだけではなく、キシランも制約要因となることが指摘されている。報告者らは、近年、リグニン除去を伴わないアンモニア前処理によっても、X/L比の高いシラカバなどの一部の広葉樹由来木質バイオマスから高い糖収率が得られることを報告したが、同時にX/Lの低いアカシアやポプラにはアンモニア前処理の適用が難しいことも合わせて報告した。そこで、広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化制約要因をさらに詳細に調べるため、Wise法による脱リグニン処理を6広葉樹由来木質バイオマスおよび対照とした草本バイオマス（エリアンサス）に最大5時間施して、ホロセルロースを得た。

いずれの広葉樹由来木質バイオマス由来ホロセルロースにおいても、未処理試料に比較して、既報(Kumar *et al.*, 2013)と同様に酢酸含有率が低下するとともに、グルクロン酸含有率が低下するという新たな知見を得た。このことから、Wise法による脱リグニン処理によって、キシランを修飾するアセチル基およびグルクロノイル基が除去されたと考えられる。また、広葉樹由来木質バイオマス由来ホロセルロースでは、未処理試料基準のキシラン含有率が増加する傾向がみられたが、この原因として、グルクロノイル基脱離にともなうキシランの酸加水分解抵抗性の低下(Sands & Gary, 1933, Toda, 1960)およびリグニンに補足されたキシランの酸溶出性向上(Matsumoto *et al.*, 1984) (Imai, 1992)が考えられる。これらの結果より、Wise法による脱リグニン処理では、広葉樹由来木質バイオマス主要構成成分のうち、リグニンが優先的に除去されるものの、セルロースに対する限定的な変化が生じており、特にキシランの一次構造には大きな変化が生じていると考えられる。

第二章より、未処理6広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化におけるキシロース収率は1.6~2.5%、グルコース収率は1.5~6.4%であったことから、70~80%以上のリグニンを除去することで高い糖収率が得られるとする既報(Sudo *et al.*, 1976)と一致する結果が得られた。しかしながら、広葉樹由来木質バイオマス由来ホロセルロースにおける糖化収率および糖化速度には樹種によって大きな差異があり、ほぼ全てのリグニンを除いたにも関わらず、酵素糖化効率化の制約要因が残されていることが明らかになった。広葉樹由来木質バイオマス由来ホロセルロースに含まれるキシランを、セルロース分解を伴うことなく酵素糖化できる易分解性キシランと、セルロース分解を伴って糖化される難分解性キシランに分類したところ、広葉樹由来木質バイオマスに

は易分解性キシランが少なく、難分解性キシランが多く含まれていることが明らかになった。難分解性キシランはセルロース分解を伴って分解されるキシランであることから、広葉樹由来木質バイオマスに多く含まれる難分解性キシランがセルロース分解の制約要因となっていると考えられる。

広葉樹由来木質バイオマス由来ホロセルロースにおけるキシラン分解とセルロース分解の強い相互関係は、キシロース生産速度とグルコース生産速度の相対速度解析からも見出された。興味深いことに、キシラン分解の二相性は広葉樹由来木質バイオマス由来ホロセルロースにのみ確認され、キシランとセルロースの存在形態に広葉樹と草本バイオマスで差異があることが示唆された。特に反応初期段階におけるグルコース生産の立ち上がりにキシロース生産に比較した遅れが見られたことは (Figure 3.6) 、セルロース表面に存在する易分解性キシランが、初期のセルロース分解の制約要因であることを示すと考えられる。また、易分解性キシランの大部分が分解されたと考えられる反応約 12 時間以降のグルコース生産相対速度の立ち上がりについても、広葉樹種間で差がみられた。特に難分解性キシランを多く含むユーカリでは、反応約 12 時間以降のグルコース生産相対速度の立ち上がりが非常に低く、これは難分解性キシランがセルロース分解の制約要因となるためであると考えられた。

### 3.5. 総括

前章より、X/L比の低い樹種ではリグニンが酵素糖化の大きな制約要因となることが示された。そこで、脱リグニンされた広葉樹由来木質バイオマスでは酵素糖化の制約が解除されたかどうかを確認するために、Wise法による脱リグニン処理によって得られたホロセルロースの酵素糖化特性を調べた。その結果、すべての樹種において、脱リグニン処理は酵素分解性を大幅に改善したが、その効果には樹種間で大きな差がみられ、未だに酵素糖化の制約要因が存在することが明らかとなった。そこで、酵素糖化について速度論的解析を行ったところ、広葉樹由来木質バイオマスのキシランにはセルロース分解を伴うことなく分解できるキシラン（易分解性キシラン）とセルロース分解を伴わないと分解できないキシラン（難分解性キシラン）の二相状態が存在することが明らかとなった。さらに、二相状態の比率については樹種間で大きな差があることが明らかとなり、これが酵素糖化特性にも大きな差を与える要因となると考えられた。



#### 4. 広葉樹由来木質バイオマス糖化酵素の探索

## 4.1目的

前章までの結果により、広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化においては、リグニンによる制約のみならず、セルロースに対するキシランの存在状態による制約が大きな影響を与えていることが示された。そこで、キシラン分解の促進に有効な酵素を探索することを目的に、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* がアンモニア処理シラカバ由来木質バイオマスの分解過程に分泌する酵素を網羅的に分析した。

## 4.2実験

### 4.2.1 胞子液の調製

3.9%ポテト・デキストロース寒天(PDA)培地(日本製薬)をオートクレーブで 121°C、20 分間滅菌処理した。滅菌した培地を良く攪拌し、プラスチック製滅菌シャーレ(90x15 mm)に約 20 mL ずつ分注した。室温で冷却し固化した培地に *P. chrysosporium* K-3 株(Johnsrud & Eriksson, 1985)の種胞子を約 20  $\mu$ L ずつ摂取し、26.5°Cで 7 日間静置培養した。培養後のシャーレに滅菌した 0.9%生理食塩水を約 10 mL 加え、滅菌したスパーテルで菌糸層を穏やかにこすり、胞子と生理食塩水を良く懸濁させ滅菌した 10 mL 用カルスピペットで胞子液を回収した。得られた胞子液の一部を 100 倍に希釈し、血球計数板を用いて胞子数を数え、胞子液中の胞子濃度を算出した。胞子液は 4°Cで保存した。

### 4.2.2 培養

*P. chrysosporium* K-3 株(Johnsrud & Eriksson, 1985)は Wood 培地(Kremer & Wood, 1992)で培養した。Wood 培地は 1 L あたり:2.2 g ジメチルコハク酸、2.6 g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、1.1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、74 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、10 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5 mg  $\text{MgSO} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.6 g Urea、0.1 mg Thiamine  $\cdot$  HCl を含み、炭素源として 20 g の未処理木粉あるいはアンモニア処理木粉を用いた。Wood 培地成分の Urea および Thiamin  $\cdot$  HCl を除く各成分を秤量し、イオン交換水に溶解した。この水溶液を、リン酸水溶液を用いて pH5.0 に調製し、200mL 容の三角フラスコに 80mL ずつ分注した後、オートクレーブで 121°C、20 分間滅菌処理し、室温にて冷却した。各フラスコに別滅菌した Urea および

Thiamin・HCl を添加した。培地を良く攪拌し、*P. chrysosporium* の孢子液をフラスコあたりの孢子数が  $1.0 \times 10^9$  個となるように接種した。これを 37°C、回転数 150rpm で 3 日間振とう培養した。

#### 4.2.3 菌体量測定および酵素活性測定

フラスコを良く振った後、滅菌ピペットを用いて約 1 mL の培養液を採取した。採取した培養液は 30 分間静置し、培養液あたりの沈殿の体積を菌体量とした。サンプリングは培養開始時から 24 時間ごとに行った。

0.1%(w/v)アビセル(フナコシ)および 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)の条件下、4%(v/v)菌体外溶液を加え、30°C、回転数 15rpm で 240 分間反応させた。反応後、遠心機 Centrifuge5415R(eppendorf)を用いて回転数 15,000rpm で 10 分間遠心し、得られた上澄を等量の 1M NaOH 水溶液と混合した。上澄に含まれる還元糖量は *p*-hydroxybenzoic acid hydrazide を用いた比色法によって測定した(Lever, 1972, Hartmann *et al.*, 1994)。反応後の上澄 100  $\mu$ L に PHBAH 溶液 100  $\mu$ L を加え、沸騰した湯浴中で 10 分間加熱した。PHBAH 溶液は 0.1 M PHBAH、0.2 M 酒石酸ナトリウムカリウムおよび 0.5 M 水酸化ナトリウムを含む溶液とした。加熱後、すみやかに氷水に入れ 10 分間冷却した。反応後液の 405 nm における吸光度を分光光度計(Thermo Scientific、Multiskan FC)を用いて測定した。D-グルコースについて検量線を測定した値(243  $\mu$ M/Abs)を用いて、遊離した糖の量を算出し、1 分間に 1  $\mu$ mol の糖を遊離させる酵素量を 1 ユニット(U)と定義した。

0.1%(w/v)カバ由来キシラン(SIGMA)および 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)の条件下、4%(v/v)菌体外溶液を加え、30°C、回転数 15rpm で 300 分間反応させた。反応後、遠心機 Centrifuge5415R(eppendorf)を用いて回転数 15,000rpm で 10 分間遠心し、得られた上澄 500  $\mu$ L を 1M NaOH 水溶液 500  $\mu$ L と混合した。上澄に含まれる還元糖量は *p*-hydroxybenzoic acid hydrazide を用いた比色法によって測定した(Lever, 1972, Hartmann *et al.*, 1994)。反応後の上澄 500  $\mu$ L に PHBAH 溶液 500  $\mu$ L を加え、沸騰した湯浴中で 10 分間加熱した。PHBAH 溶液は 0.1 M PHBAH、0.2 M 酒石酸ナトリウムカリウムおよび 0.5 M 水酸化ナトリウムを含む溶液とした。加熱後、すみやかに氷水に入れ 10 分間冷却した。反応後液の 405 nm における吸光度

を分光光度計 Multiskan FC(Thermo Scientific)を用いて測定した。D-キシロースについて検量線を測定した値(643  $\mu$ M/Abs)を用いて、遊離した糖の量を算出し、1分間に1  $\mu$ molの糖を遊離させる酵素量を1ユニット(U)と定義した。

0.0267%(w/v)アゾアルブミン(SIGMA)、66.7 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)および20%(v/v)菌体外溶液の条件で、30°C、回転数 15rpm で240分間反応させた。反応後、遠心機 Centrifuge5415R(eppendorf)を用いて回転数 15,000rpm で10分間遠心し、得られた上澄の335 nmにおける吸光度を分光光度計 V-660(日本分光)およびソフトウェア V-600 for windows(日本分光)を用いて測定した。1ユニット(U)は1分間に0.001の吸光度生じる酵素量と定義した。

#### 4.2.4 菌体外タンパク質の二次元電気泳動による分離と画像解析によるタンパク質量測定

*P. chrysosporium* K-3株(Johnsrud & Eriksson, 1985)を未処理シラカバあるいはアンモニア処理シラカバを炭素源として培養したときに得られた菌体外溶液を VIVASPIN 20(300 kDa、Sartorius)を用いて遠心ろ過した。得られたろ液を VIVASPIN 20(5 kDa、Sartorius)を用いて濃縮した。100  $\mu$ g相当の菌体外タンパク質溶液をスピнкаラム(Sartorius)で限外ろ過し、イオン交換水を用いて3回洗浄した。菌体外タンパク質溶液に300  $\mu$ Lの膨潤バッファー(7.5 M urea、2.0 M thiourea、4.0%(w/v)CHAPS、2.0%(w/v)dithiothreitol、0.5% IPG buffer (GE Healthcare)および0.001% bromophenol blue)を加えて溶解し、これをサンプル溶液とした。サンプル溶液を Immobiline Drystrips (18 cm、pH4-7、GE Healthcare)に供して、1晩膨潤処理した。等電点電気泳動は以下のプログラムによって行った。まず、500Vで1分間処理した後、3500Vまで90分間かけて電圧を上げた。その後、3,500Vを定圧として6時間の泳動を行った。電気泳動終了後、平衡化バッファーI(50 mM Tris-HCl pH 6.8、6 M urea、2% w/v sodium dodecyl sulfate (SDS)、30% w/v glycerol、1% w/v dithiothreitol)中で20分間緩やかに振とうした。その後、平衡化バッファーIを捨てて平衡化バッファーII(50 mM Tris-HCl pH 6.8、6 M urea、2% w/v SDS、30% w/v glycerolおよび2.5% w/v iodoacetamide)を加え、さらに20分間緩やかに振とうした。泳動槽に SDS ポリアクリルアミドゲル(ExcelGel™ SDS XL 12-14; GE Healthcare)をセットし、そこにバッファーストリップ(ExcelGel™ SDS Buffer Strip; GE Healthcare)および平衡化の終了

したストリップをセットし、1,000V、12 mA で 60 分間、ついで 1,000V、40 mA で 5 分間電気泳動を行い、ストリップからゲルへタンパク質を移した。その後、1,000V、40 mA で 160 分間電気泳動を行った。電気泳動終了後、ゲルを 12%(v/v)トリクロロ酢酸水溶液で 60 分間緩やかに振とうした。ゲルを洗浄液(30%(v/v)エタノールおよび 10%(v/v)酢酸)に移して 30 分間緩やかに振とうした後、洗浄液を交換して一晩静置した。翌日、再度洗浄液を交換して 30 分間緩やかに振とうした。ゲルは Coomassie Brilliant Blue (CBB)溶液(0.02% CBB、30%エタノール、10%酢酸、0.01%硫酸銅)を用いて 3 時間染色した。染色後、洗浄液で 20 分間に 1 回水溶液を交換しながら 1 時間脱色をした。染色後のゲルをスキャナーES-10000G(EPSON)を用いてスキャンし、得られた画像を画像解析ソフトウェア Prodigy 2D ver. 1.0(Nonlinear Dynamics Limited)を用いて解析することで、スポットの一致とタンパク質の定量を行った。

#### 4.2.5 LC-MS/MS およびアミノ酸配列解析によるタンパク質スポットの同定

ゲルからタンパク質量の多いあるいは単一として観察できた主要な 55 スポットを切り出し、500  $\mu$ L のアセトニトリルが入ったエッペンチューブに入れた。シェーカーで 10 分間振とうした後、アセトニトリルを除き、遠心濃縮機 5305(eppendorf)で 30 分間減圧乾燥した。乾燥させたゲル片のチューブに 100 mM DTT/0.1M 重炭酸アンモニウムを 50  $\mu$ L 加え、56°Cで 30 分間静置した。溶液を取り除いた後、100 mM ヨードアセトアミド/0.1 M 重炭酸アンモニウムを 100  $\mu$ L 加え 37°Cで 30 分間暗所に静置した。チューブ中の溶液を捨てた後、0.1 M 重炭酸アンモニウムを 200  $\mu$ L 加えて、10 分間振とうし、残存する DTT およびヨードアセトアミドを取り除いた。チューブ内の溶液を捨て、アセトニトリルを加えて 10 分間振とうした後、溶液を取り除き、遠心濃縮機 5305(eppendorf)で 30 分間減圧乾燥した。乾燥させたゲル片に 12.5 ng/ $\mu$ L トリプシン/10 mM Tris-HCl(pH8.8)を 50  $\mu$ L 加えて、氷上で 1 時間トリプシンを吸収させ、余分な溶液を取り除いた。そこに 10mM Tris-HCl(pH8.8)を 50  $\mu$ L を添加し、37°Cで一晩ゲル内消化させた。反応液を新しいチューブに回収し、ゲル片に 5%ギ酸および 70%アセトニトリルを含む溶液を 50  $\mu$ L 加え、5 分間超音波処理し、ゲル内に残存する消化物を回収した。この操作をさらに 1 回繰り返した。回収した消化物を遠心濃縮機 5305(eppendorf)で 3 時間減圧乾燥し、固化させた。これに 0.1%トリフルオロ酢酸を加えて 10 分間攪拌し、完全に溶かした後、MS 測定用バイアル

瓶に移して-20°Cで保存した。この溶液をペプチドサンプルとして質量分析に供した。ペプチドサンプルはシリカカラム ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 600 Bar (2.1x100 mm、1.8 μm) (Agilent Technologies) を用いて超高速液体クロマトグラフ X-LC(日本分光)で分離した。移動相には溶液 A(5%(v/v)アセトニトリルおよび 0.1%(v/v)ギ酸)と溶液 B(100%(v/v)アセトニトリル)を用い、以下の条件で分離した。まず、溶液 B を 4.2%で 1 分間流した後、溶液 B を 20 分間で 58%にし、さらに溶液 B を 4 分間で 89.5%にした。分離したペプチドをイオントラップ型質量分析装置 LTQ Velos (Thermo Fisher Scientific)に供し、ペプチドの質量スペクトルデータを得た。ペプチドの質量スペクトルデータを *P. chrysosporium* v. 2.0 のゲノムデータベース (<http://genome.jgi-psf.org/Phchr1.home.html>)に対して MASCOT 検索し、対応する遺伝子座を特定した。また、得られた遺伝子座を NCBI サーバ上にて BLASTP 検索にかけ、アミノ酸配列の類似性からタンパク質機能の推定を行った。

## 4.3結果

### 4.3.1 *P. chrysosporium* の生長、タンパク生産および酵素活性

*P. chrysosporium* を未処理シラカバあるいはアンモニア処理シラカバを炭素源とする Wood 培地で培養した。Figure 4.1a に示すように、アンモニア処理によって本菌の生育は顕著に増大した。未処理シラカバを炭素源として用いたとき、菌体量は培養 1 日目に 0.1 mL/mL-培養液となったあと、3 日目まで変化しなかった。これに対してアンモニア処理シラカバを炭素源として用いたとき、菌体量は培養時間の経過に伴って増大し、培養 3 日目の菌体量は 0.7 mL/mL-培養液となった。シラカバに対するアンモニア処理は、本菌の生育を顕著に促進することが明らかとなったが ( $P < 0.01$ )、菌体外タンパク質濃度はアンモニア処理によって低下した (Figure 4.1b)。未処理シラカバを炭素源としたときの菌体外タンパク質濃度は  $1.2 \times 10^2 \text{ gL}^{-1}$  だったのに対して、アンモニア処理シラカバを炭素源としたときは  $0.6 \times 10^2 \text{ gL}^{-1}$  であり、アンモニア処理によって菌体外タンパク質濃度は 0.5 倍になった。培養 3 日後の培養液中のタンパク質濃度の変化は有意ではなかったが ( $P = \text{n.s.}$ )、アンモニア前処理は *P. chrysosporium* の増殖を大きく促進した。

培養 3 日目の菌体外用液のセルラーゼ、キシラナーゼおよびプロテアーゼ活性を測定したところ (Figure 4.2)、キシラナーゼおよびプロテアーゼ活性は、アンモニア処理によってそれぞれ 7.8 倍および 2.2 倍に増大した ( $P < 0.01$ )。これに対して、未処理シラカバとアンモニア処理シ

ラカバの間で、セルラーゼ活性には有意差がなかった ( $P = n.s.$ )。これは *P. chrysosporium* によって分泌される主要なタンパク質がセルラーゼであるためと考えられる。

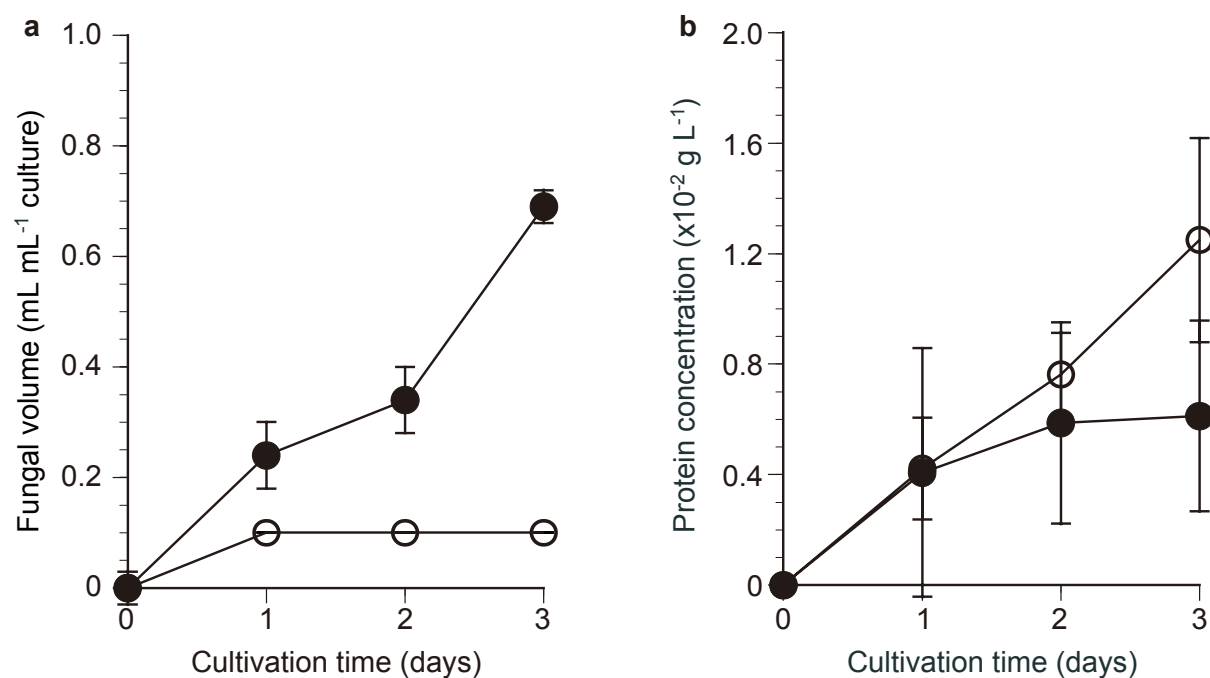


Figure 4.1. Fungal growth and extracellular protein production of *P. chrysosporium*.

a) Fungal growth and b) extracellular protein production of *P. chrysosporium* cultivated for 3 days in synthetic medium containing 2.0% (w/v) UB (white) and 2.0% (w/v) AB (black) as carbon sources. The mycelium volume per 1 mL of culture filtrate was measured as described in Materials and Methods. Protein concentration of the culture filtrate was estimated by the Bradford method. UB, untreated birch wood meal; AB, ammonia-treated birch wood meal. Each data point represents the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three replicates. Where the error bars are not visible, they fit within the symbols.

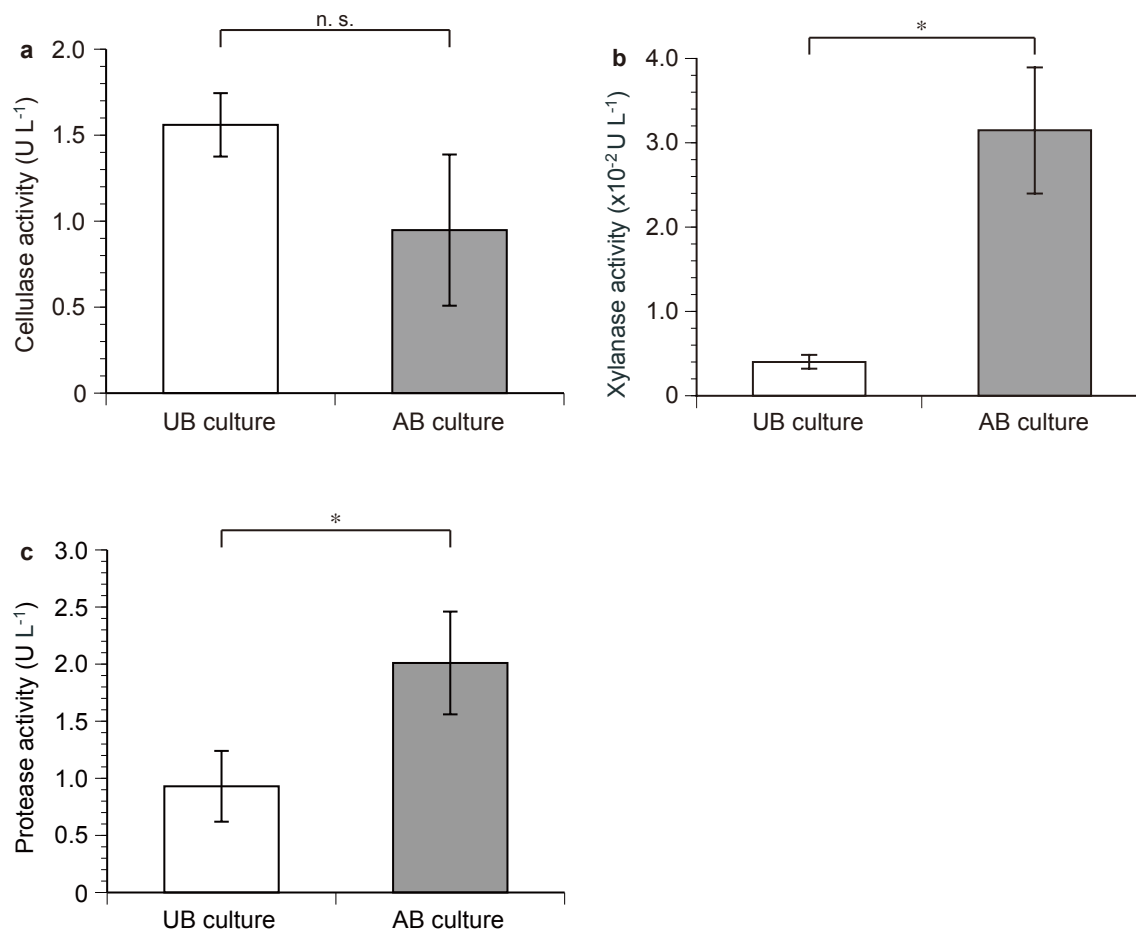


Figure 4.2. Comparison of cellulase, xylanase, and protease activities in UB and AB cultures after 3 days. Enzyme activity was measured in sodium acetate (pH 5.0) at 30°C. a) Avicel (0.1% (w/v)) and b) xylan from birch wood were used as substrates to measure enzyme activity in the UB and AB cultures. The newly formed reducing ends were estimated using the PHBAH method (Lever, 1972, Hartmann *et al.*, 1994) with some modifications. c) Azoalbumin (0.3% (w/v)) was used as a substrate.  $A_{335nm}$  of the reaction was measured. Each data point represents the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three replicates.



### 4.3.2 菌体外タンパク質のセクレトーム解析

未処理シラカバおよびアンモニア処理シラカバを炭素源とする培地で *P. chrysosporium* を 3 日間培養し、得られた培養液に含まれる菌体外タンパク質を二次元電気泳動によって分離した (Figure 4.3)。未処理シラカバおよびアンモニア処理シラカバにいずれを炭素源とした場合においても、CBB 染色によって検出されたタンパク質スポットの多くは等電点 4.5 から 5.5、分子量 37 から 100kDa の範囲に存在した。これらのスポットから、タンパク質量およびスポットの鮮明さを基準に計 55 スポットを切り出し、トリプシン消化後、LC-MS/MS に供した。同定されたタンパク質の多くは糖質加水分解酵素 (34 スポット)、糖質エステラーゼ (10 スポット)、AAs (3 スポット) などの CAZymes として分類された (Table 4.1)。また 4 スポットが thaumatin like protein、1 スポットが aldose 1-epimerase として分類された。タンパク質の機能解析によって、菌体外タンパク質の多くが、セルロース分解に関与するセロビオヒドロラーゼおよびエンドグルカナーゼ、ならびにキシラナーゼおよびキシラン側鎖の分解に関連する酵素であり、本菌がセルロースやヘミセルロース分解に関わる多様な酵素を菌体外に分泌していることが明らかになった (Abbas *et al.*, 2005, Wymelenberg *et al.*, 2005, Vanden Wymelenberg *et al.*, 2006, Sato *et al.*, 2007, Ravalason *et al.*, 2008, Vanden Wymelenberg *et al.*, 2009, Hori *et al.*, 2011)。スポット No. 5, 7, 9, 10, 11, 12, 19, 22, 24, 30, 35, 48 および 52 は、未処理シラカバおよびアンモニア処理シラカバを炭素源とするいずれの培養においても同定された。これらの主要スポットはセロビオヒドロラーゼ (Cel6A: スポット 5; Cel7C: スポット 11, 12, 13; および Cel7D: スポット 7 および 9)、エンドグルカナーゼ (Cel5A: スポット 4; および Cel5B: スポット 2) およびキシログルカナーゼ (Xgh74B: スポット 31) であった。本研究において同定された酵素が全タンパク質に占める割合は、未処理シラカバを炭素源とする培養において 49%、アンモニア処理シラカバを炭素源とする培養において 51% であった。各タンパク質の生産量に与えるアンモニア前処理の影響を比較したとき、10 個のタンパク質スポットは 2 倍以上に生産量が増大したのに対して (Table 4.2)、6 つのタンパク質スポットは 0.5 倍未満に減少した (Table 4.3)。GH ファミリー 7 のセロビオヒドロラーゼは、いずれの培養系においても最も一般的な菌体外タンパク質であり、いずれの培養系においても総タンパク質の約 40% を占めていた。またスポット No.

19 および 20 は同じタンパク質 Xyn10C に割り当てられた。これらの酵素は同じ等電点を有することから、プロテアーゼによる分解の影響を受けたためにタンパク質量を大きく変化したと考えられる。GH ファミリー11 キシラナーゼ (スポット 22) についても同様に、プロテアーゼによって分解により分解され、低分子量のスポット 23 として示された。

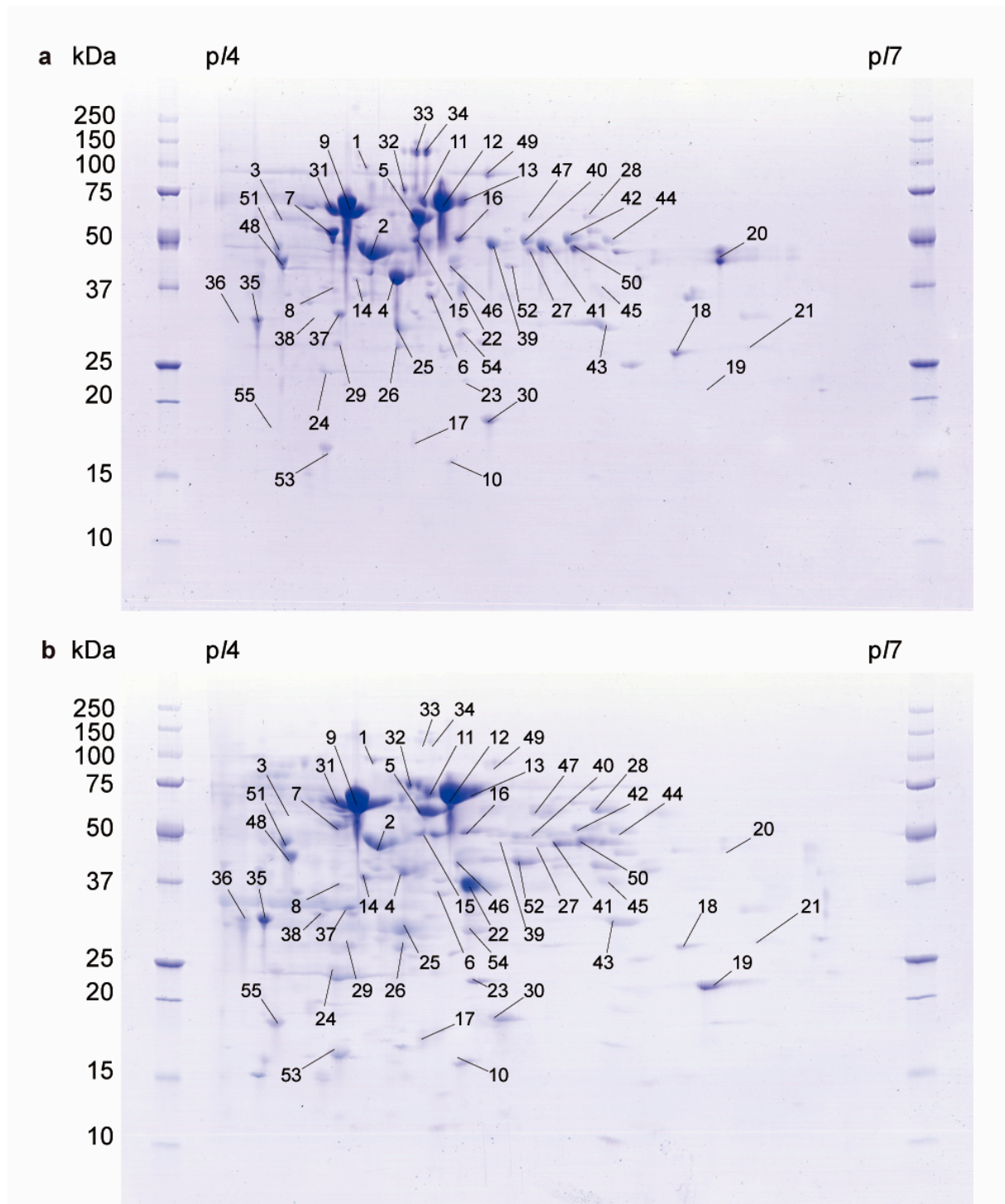


Figure 4.3. Two-dimensional gel electrophoresis (2DE) of the UB and AB cultures stained with Coomassie brilliant blue. *P. chrysosporium* was cultivated in synthetic medium containing 2.0% (w/v) UB or 2.0% (w/v) AB for 3 days. An aliquot (100  $\mu$ g) of extracellular protein from each sample was separated as described in Materials and Methods. Spot numbers correspond to the proteins in Table 1.

### 4.3.3 菌体外タンパク質のセクレトーム解析

担子菌 *P. chrysosporium* はアンモニア処理シラカバ由来木質バイオマスの分解時に GH ファミリー11 に属するキシラナーゼの分泌を顕著に増大させていることが示された。そこで、糖化実験に用いてきた市販酵素剤 (CTec+HTec) に対して *N. patriciarum* 由来組換えキシラナーゼあるいは *B. pumilus* xylanase 由来キシロシダーゼを添加することで、酵素剤のキシラン分解活性を強化したときに、酵素糖化収率に与える影響を調べた (Figure 5.1)。特に *N. patriciarum* 由来組換えキシラナーゼを用いて酵素剤のキシラン分解活性を強化したときに糖収率は増大した。

アンモニア処理シラカバについて、*N. patriciarum* 由来組換えキシラナーゼを用いてキシラン分解活性を強化した酵素剤を用いて 48 時間酵素糖化したとき、キシロース収率 91.3%、グルコース収率 76.5% が得られ、十分な糖収率が得られた。したがって、高いキシラン含有率および低いリグニン含有率を有するシラカバにおいては、酵素カクテルの適正化によってアンモニア前処理が十分に適用できることが示された。

Table 4.1. Proteins secreted by *P. chrysosporium* after cultivation with untreated or ammonia-treated birch wood meal

| SpotNo. | Score <sup>a</sup> | Protein ID <sup>b</sup> | Function (Gene or domain)                     | Protein family | CBM <sup>c</sup> | Th Mw <sup>d</sup> | Th pI <sup>d</sup> | Sequence coverage (%) |
|---------|--------------------|-------------------------|-----------------------------------------------|----------------|------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|
| 1       | 830                | 129849                  | Glucan $\beta$ -glycosidase ( <i>gly3B</i> )  | GH 3           | -                | 87.1               | 4.72               | 36                    |
| 2       | 336                | 4361                    | Endo- $\beta$ -1,4-glucanase ( <i>cel5B</i> ) | GH 5           | N                | 49.7               | 6.21               | 17                    |
| 3       | 308                | 5115                    | $\beta$ -Mannanase ( <i>man5C</i> )           | GH 5           | N                | 41.1               | 4.27               | 10                    |
| 4       | 845                | 6458                    | Endo- $\beta$ -1,4-glucanase ( <i>cel5A</i> ) | GH 5           | N                | 39.9               | 5.04               | 49                    |
| 5       | 989                | 133052                  | Cellobiohydrolase II ( <i>cel6A</i> )         | GH 6           | N                | 49.0               | 5.04               | 41                    |
| 6       | 343                | 133052                  | Cellobiohydrolase II ( <i>cel6A</i> )         | GH 6           | N                | 49.0               | 5.04               | 30                    |
| 7       | 299                | 137372                  | Cellobiohydrolase 58 ( <i>cel7D</i> )         | GH 7           | C                | 59.5               | 4.96               | 25                    |
| 8       | 416                | 137372                  | Cellobiohydrolase 58 ( <i>cel7D</i> )         | GH 7           | C                | 59.5               | 4.96               | 34                    |
| 9       | 2046               | 137372                  | Cellobiohydrolase 58 ( <i>cel7D</i> )         | GH 7           | C                | 59.5               | 4.96               | 52                    |
| 10      | 224                | 137372                  | Cellobiohydrolase 58 ( <i>cel7D</i> )         | GH 7           | C                | 59.5               | 4.96               | 19                    |
| 11      | 1326               | 127029                  | Cellobiohydrolase 62 ( <i>cel7C</i> )         | GH 7           | C                | 56.1               | 5.03               | 54                    |
| 12      | 2010               | 127029                  | Cellobiohydrolase 62 ( <i>cel7C</i> )         | GH 7           | C                | 56.1               | 5.03               | 55                    |
| 13      | 1448               | 127029                  | Cellobiohydrolase 62 ( <i>cel7C</i> )         | GH 7           | C                | 56.1               | 5.03               | 50                    |
| 14      | 683                | 127029                  | Cellobiohydrolase 62 ( <i>cel7C</i> )         | GH 7           | C                | 56.1               | 5.03               | 45                    |
| 15      | 1173               | 138345                  | Endo- $\beta$ -1,4-xylanase ( <i>xyn10A</i> ) | GH 10          | N                | 44.1               | 5.21               | 55                    |
| 16      | 409                | 138345                  | Endo- $\beta$ -1,4-xylanase ( <i>xyn10A</i> ) | GH 10          | N                | 44.1               | 5.21               | 55                    |
| 17      | 498                | 7045                    | Endo- $\beta$ -1,4-xylanase ( <i>xyn10C</i> ) | GH 10          | N <sup>e</sup>   | 31.2               | 6.89               | 42                    |
| 18      | 962                | 7045                    | Endo- $\beta$ -1,4-xylanase ( <i>xyn10C</i> ) | GH 10          | N <sup>e</sup>   | 31.2               | 6.89               | 76                    |
| 19      | 572                | 7045                    | Endo- $\beta$ -1,4-xylanase ( <i>xyn10C</i> ) | GH 10          | N <sup>e</sup>   | 31.2               | 6.89               | 62                    |
| 20      | 1033               | 7045                    | Endo- $\beta$ -1,4-xylanase ( <i>xyn10C</i> ) | GH 10          | N <sup>e</sup>   | 31.2               | 6.89               | 76                    |
| 21      | 537                | 7045                    | Endo- $\beta$ -1,4-xylanase ( <i>xyn10C</i> ) | GH 10          | N <sup>e</sup>   | 31.2               | 6.89               | 75                    |
| 22      | 428                | 133788                  | Endo- $\beta$ -1,4-xylanase ( <i>xyn11B</i> ) | GH 11          | C                | 30.8               | 5.72               | 21                    |
| 23      | 114                | 133788                  | Endo- $\beta$ -1,4-xylanase ( <i>xyn11B</i> ) | GH 11          | C                | 30.8               | 5.72               | 17                    |
| 24      | 184                | 7048                    | Putative endo-xyloglucanase ( <i>cel12B</i> ) | GH 12          | -                | 27.1               | 4.74               | 10                    |

|                 |      |        |                                                           |           |                |      |      |    |
|-----------------|------|--------|-----------------------------------------------------------|-----------|----------------|------|------|----|
| 25              | 179  | 8466   | Endo- $\beta$ -1,4-glucanase<br>( <i>cel12A</i> )         | GH 12     | -              | 26.5 | 4.79 | 19 |
| 26              | 176  | 8466   | Endo- $\beta$ -1,4-glucanase<br>( <i>cel12A</i> )         | GH 12     | -              | 26.5 | 4.79 | 8  |
|                 |      |        | Putative                                                  |           |                |      |      |    |
| 27              | 277  | 29397  | rhamnogalacturonase<br>( <i>rgh28C</i> )                  | GH 28     | -              | 44.8 | 5.22 | 51 |
|                 |      |        | Putative                                                  |           |                |      |      |    |
| 28              | 674  | 29397  | rhamnogalacturonase<br>( <i>rgh28C</i> )                  | GH 28     | -              | 44.8 | 5.22 | 50 |
| 29              | 91   | 4822   | Endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinanase                         | GH 43     | -              | 33.1 | 4.82 | 9  |
| 30 <sup>f</sup> |      |        | Endo- $\beta$ -1,4-glucanase ( <i>cel45</i> )             | GH 45     | -              | 18.2 | 5.04 |    |
| 31              | 595  | 28013  | Glycoside hydrolase family 74<br>( <i>xgh74B</i> )        | GH 74     | -              | 66.6 | 4.56 | 44 |
| 32              | 604  | 138226 | Putative xyloglucanase<br>( <i>gly74A</i> )               | GH 74     | -              | 77.8 | 4.72 | 36 |
| 33              | 973  | 134556 | Xyloglucanase ( <i>xgh74B</i> )                           | GH 74     | C              | 89.9 | 5.05 | 43 |
| 34              | 1014 | 134556 | Xyloglucanase ( <i>xgh74B</i> )                           | GH 74     | C              | 89.9 | 5.05 | 41 |
| 35              | 123  | 3280   | Thaumatococcus-like protein ( <i>thn2</i> )               |           | -              | 27.8 | 4.74 | 14 |
| 36              | 97   | 3280   | Thaumatococcus-like protein ( <i>thn2</i> )               |           | -              | 27.8 | 4.74 | 14 |
| 37              | 240  | 5297   | Thaumatococcus-like protein ( <i>thn1</i> )               |           | -              | 29.3 | 4.99 | 14 |
| 38              | 143  | 5297   | Thaumatococcus-like protein ( <i>thn1</i> )               |           | -              | 29.3 | 4.99 | 14 |
| 39              | 697  | 126075 | Putative acetyl xylan esterase<br>( <i>axe1</i> )         | CE 1      | -              | 36.0 | 5.91 | 29 |
| 40              | 511  | 126075 | Putative acetyl xylan esterase<br>( <i>axe1</i> )         | CE 1      | -              | 36.0 | 5.91 | 29 |
| 41              | 772  | 126075 | Putative acetyl xylan esterase<br>( <i>axe1</i> )         | CE 1      | -              | 36.0 | 5.91 | 29 |
| 42              | 391  | 126075 | Putative acetyl xylan esterase<br>( <i>axe1</i> )         | CE 1      | -              | 36.0 | 5.91 | 29 |
| 43              | 776  | 126075 | Putative acetyl xylan esterase<br>( <i>axe1</i> )         | CE 1      | -              | 36.0 | 5.91 | 29 |
| 44              | 275  | 129015 | Carbohydrate esterase family<br>1 protein ( <i>axe1</i> ) | CE 1      | N <sup>e</sup> | 30.8 | 6.20 | 21 |
| 45              | 289  | 129015 | Carbohydrate esterase family<br>1 protein ( <i>axe1</i> ) | CE 1      | N <sup>e</sup> | 30.8 | 6.20 | 13 |
| 46              | 439  | 132137 | Pectin methylesterase                                     | CE 8      | -              | 36.3 | 5.84 | 36 |
| 47              | 554  | 130517 | Putative glucuronoyl esterase                             | CE 15     | N              | 49.7 | 5.55 | 28 |
| 48              | 245  | 3097   | Fungal cellulose binding<br>domain-containing protein     | CE 16     | N              | 43.2 | 5.08 | 15 |
| 49              | 821  | 11098  | Iron reductase                                            | AA8-AA3_1 | -              | 82.2 | 5.19 | 31 |

|    |     |        |                                                     |     |   |      |      |    |  |
|----|-----|--------|-----------------------------------------------------|-----|---|------|------|----|--|
|    |     |        | domain/Cellobiose<br>dehydrogenase ( <i>cdh</i> )   |     |   |      |      |    |  |
| 50 | 313 | 41563  | Lytic polysaccharide<br>monooxygenase               | AA9 | C | 33.2 | 5.39 | 29 |  |
| 51 | 301 | 121193 | Lytic polysaccharide<br>monooxygenase               | AA9 | C | 32.6 | 4.31 | 25 |  |
| 52 | 207 | 138479 | Aldose 1-epimerase ( <i>ald1</i> )                  |     | - | 38.5 | 4.98 | 27 |  |
| 53 | 316 | 8221   | Hypothetical protein<br>(IPR010829 Cerato-platanin) |     | - | 15.0 | 4.69 | 33 |  |
| 54 | 453 | 3085   | Hypothetical protein                                |     | - | 40.2 | 5.02 | 35 |  |
| 55 | 117 | 2416   | Hypothetical protein                                |     | - | 17.5 | 8.44 | 27 |  |

Protein production was determined after 3 days of cultivation in synthetic media containing 2.0% (w/v) untreated birch wood meal (UB) or ammonia-treated birch wood meal (AB).

<sup>a</sup>In-house-licensed MASCOT score.

<sup>b</sup>Protein model number from the *P. chrysosporium* genome database.

<sup>c</sup>Deduced amino acid sequence with and without a carbohydrate binding module (CBM); N, N-terminal; C, C-terminal.

<sup>d</sup>Theoretical molecular mass (Th Mw, kDa) and pI.

<sup>e</sup>Manual examination revealed a conserved CBM sequence at the N-terminus of this gene model.

<sup>f</sup>MS/MS dataset of spot number 30 searched against genome dataset version 2.0 in Scaffold 6:1798039-1798139 (Igarashi *et al.*, 2008).

Table 4.2. Increased 2DE spot volumes between ammonia-treated and untreated birch wood meal cultures

| Spot No. | Protein family | Function (Gene or domain)                              | Normalized average volume |                     | Relative degree |
|----------|----------------|--------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------|-----------------|
|          |                |                                                        | UB<br>$\times 10^7$       | AB<br>$\times 10^7$ |                 |
| 36       |                | thaumatin-like protein                                 | 0.13                      | 0.64                | 5.0             |
| 22       | GH 11          | Endo- $\beta$ -1,4-xylanase ( <i>xyn11B</i> )          | 0.60                      | 2.9                 | 4.9             |
| 19       | GH 10          | Putative Endo- $\beta$ -1,4-xylanase ( <i>xyn10C</i> ) | 0.25                      | 1.2                 | 4.7             |
| 55       |                | Hypothetical protein                                   | 0.07                      | 0.28                | 4.2             |
| 23       | GH 11          | Endo- $\beta$ -1,4-xylanase ( <i>xyn11B</i> )          | 0.12                      | 0.52                | 4.2             |
| 52       | A1e1           | Aldose 1-epimerase ( <i>a1e1</i> )                     | 0.24                      | 0.83                | 3.4             |
| 38       |                | thaumatin-like protein                                 | 0.09                      | 0.27                | 3.0             |
| 14       | GH 7           | Cellobiohydrolase 62 ( <i>cel7C</i> ) (Fragment)       | 0.30                      | 0.70                | 2.4             |
| 24       | GH 12          | Putative endoxyloglucanase ( <i>cel12B</i> )           | 0.43                      | 1.0                 | 2.4             |
| 13       | GH 7           | Cellobiohydrolase 62 ( <i>cel7C</i> ) (Fragment)       | 1.6                       | 3.6                 | 2.2             |

Spots showing a normalized average volume increase by 2-fold or more on 2DE gels in ammonia-treated birch wood meal (AB) vs. untreated birch wood meal (UB) cultures. Spot numbers correspond to those in Figure 4.3 and Table 4.1, and the intensity was analysed by Prodigy 2D ver. 1.0. The relative degree calculation equals the normalized average volume of AB divided by the normalized average volume of UB. 2DE, two-dimensional electrophoresis.



Table 4.3. Decreased 2DE gel spot volumes in ammonia-treated versus untreated birch wood meal cultures

| Spot No. | Protein family | Function (Gene or domain)                                     | Normalized average volume |                     | Relative degree |
|----------|----------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------|-----------------|
|          |                |                                                               | UB<br>$\times 10^7$       | AB<br>$\times 10^7$ |                 |
| 33       | GH 74          | Xyloglucanase ( <i>xgh74B</i> )                               | 0.45                      | 0.04                | 0.087           |
| 20       | GH 10          | Putative Endo- $\beta$ -1,4-xylanase ( <i>xyn10C</i> )        | 0.92                      | 0.12                | 0.14            |
| 34       | GH 74          | Xyloglucanase ( <i>xgh74B</i> )                               | 0.81                      | 0.17                | 0.21            |
| 27       | GH 28          | Putative rhamnogalacturonase ( <i>rgh28C</i> )                | 0.14                      | 0.04                | 0.30            |
| 49       | AA8-AA3_1      | Iron reductase domain/Cellobiose dehydrogenase ( <i>cdh</i> ) | 0.56                      | 0.20                | 0.36            |
| 39       | CE 1           | Putative acetyl xylan esterase ( <i>axe1</i> )                | 0.71                      | 0.32                | 0.45            |

Spots showing a normalized average volume decrease by 0.5-fold or greater on 2DE gels in ammonia-treated birch wood meal (AB) vs. untreated birch wood meal (UB) cultures. Spot numbers correspond to those in Figure 4.3 and Table 4.1, and the intensity was analysed by Prodigy 2D version 1.0. The relative degree was calculated as the normalized average volume of AB divided by the normalized average volume of UB. 2DE, 2-dimensional electrophoresis.

#### 4.4 考察

第二章において、草本バイオマスの前処理方法として知られるアンモニア処理が、キシラン/リグニン比の高い広葉樹由来木質バイオマスにも適用できることを示した。またアンモニア前処理は、リグノセルロース系バイオマスの中性糖含有率はほとんど変化しないが、エステル結合の開裂、アミド化合物の生成およびセルロース結晶型の I 型から III 型への変態をともなって、酵素糖化を顕著に促進する。*P. chrysosporium* はアンモニア処理シラカバを炭素源としたとき、生産する菌体外酵素量は低下したが、本菌の生長は著しく促進された。この原因として、アンモニア処理によってシラカバが分解されやすい状態になり、容易に分解可能な糖の遊離によってカタボライト抑制が生じ、菌体外酵素の生産量が減少したことが考えられた。したがって、アンモニア前処理は、広葉樹由来木質バイオマスの生分解を効果的に促進することが示された。

リグノセルロース系バイオマスの酵素糖化プロセス効率化において特に重要であることから、最適な糖化酵素カクテルの探索に大きな関心が寄せられている(Gao et al., 2011, Karnaouri et al., 2016)。本研究では、*P. chrysosporium* の生産する菌体外酵素に与えるアンモニアの前処理の効果を明らかにするために、セクレトーム解析による比較を行った。*P. chrysosporium* によるリグニン分解酵素の生産には、窒素濃度が重要なパラメータであることが知られているが(Dass et al., 1995)、十分な窒素を含む Kremer and Wood 培地(Kremer & Wood, 1992)を用いたためにリグニン分解酵素は検出されなかった。アンモニア処理シラカバを炭素源としたときの二次元電気泳動画像では、プロテアーゼの影響と考えられる低分子量タンパク質が多く見られた。培養液のプロテアーゼ活性は、未処理シラカバを炭素源とした場合と比較して、アンモニア処理シラカバを炭素源としたとき 2.2 倍高かった。GH ファミリー10 に属するキシラナーゼに対応するスポット No. 19 および No. 20 は、アンモニア処理によるタンパク量の変化が大きかったが (Table 4.2、Table 4.3)、これは GH ファミリー10 に属するキシラナーゼがプロテアーゼによって分解されたために各スポットのタンパク質量が変化したためであることから、AB および UB 培養物において GH ファミリー10 キシラナーゼの総量が本質的に同じであると考えた。

一方で、アンモニア処理シラカバを炭素源として用いた場合、GH ファミリー11 に属するキシラナーゼの生産が顕著に増大した。注目すべきことに、GH ファミリー11 に属するキシラナーゼは *P. chrysosporium* を含む様々な白色木材腐朽菌が生産する。

本菌は複数のエンド-1,4- $\beta$ -キシラナーゼを分泌することが知られており(Hori *et al.*, 2011)、2つの *xyn* 遺伝子 (*xynA* および *xynC*) は GH ファミリー10 に属する糖質加水分解酵素をコードし、1つの *xyn* 遺伝子 (*xynB*) は GH ファミリー11 のタンパク質をコードする(Decelle *et al.*, 2004, Huy *et al.*, 2011)。XynA および XynC は、*p*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-セロビオシドおよび *p*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-キシロピラノシドに対して活性を示したが、XynB はキシランのみを加水分解した(Decelle *et al.*, 2004)。XynA および XynC は、分解物としてキシロビオースおよびキシロテトラオースを生成したのに対し、XynB はキシロビオースおよびキシロペントースを生成した(Decelle *et al.*, 2004)。大麦由来可溶性キシランを含む *P. chrysosporium* の培養において、GH ファミリー10 に属するキシラナーゼの強力な誘導が観察されているが、このとき GH ファミリー11 に属するキシラナーゼの生産量は変化しなかった(Hori *et al.*, 2011)、。オオムギ由来キシランは  $\alpha$ -1-アラビノース側鎖を有するが、カバ由来キシランは 4-O-メチル- $\beta$ -D-グルクロン酸側鎖を有し、その側鎖構造には差があることが知られている。本研究の結果は、大麦由来キシランを用いた研究の結果に矛盾するように見えるが、これは *P. chrysosporium* がアンモニア処理シラカバのキシラン側鎖の変化を認識し、対応して GH10 から 11 に属するキシラナーゼの生産を誘導したと考えられる。

さらにアンモニア処理バイオマスを炭素源としたとき、*P. chrysosporium* は GH ファミリー74 に属するキシログルカナーゼ、GH ファミリー28 に属するポリガラクトナーゼ、および AA8-AA3 に属するセロビオースデヒドロゲナーゼの生産量を減少させた。注目すべきことに、大麦由来可溶性キシランをセルロースに加えて本菌を培養した以前の研究では、これらの酵素の産生が減少するのではなく、増強された(Hori *et al.*, 2011)、。これらの結果は、*P. chrysosporium* が生育環境に応じて、生産する酵素を変化していることを示すと考えられ、本菌が非常に複雑で未確認のメカニズムを採用していると考えられる。

本章では、*P. chrysosporium* を未処理あるいはアンモニア処理シラカバを炭素源として培養し、得られた培養液に含まれる菌体外酵素の比較解析を行った。得られた結果をまとめて**エラー! 参照元が見つかりません**。に示す。アンモニア処理シラカバを炭素源とする培養では、糖化に有効な酵素である GH ファミリー11 に属するキシラナーゼの生産量が顕著に増大した。また GH ファミリー74 に属するキシログルカナーゼおよび GH28 に属するポリガラクトナーゼ、CE ファミ

リー1に属するアセチルキシランエステラーゼおよびセロビオースデヒドロゲナーゼの生産は減少した。これらの結果は *P. chrysosporium* が、アンモニア処理シラカバを炭素源としたときに脱アセチル化されたキシランおよび窒素含有バイオマスの分解に関連した酵素群を生産することを示した。加えてこれらの結果は、*P. chrysosporium* がアンモニア処理バイオマスをキシランおよび窒素含有バイオマスとして認識し、関連する酵素の生産を制御している可能性を示すと考えられる。しかしながら、*P. chrysosporium* がバイオマスの微細な変化を認識し、対応した酵素を制御する複雑な機構は未だに不明である。*P. chrysosporium* 由来単一酵素を用いて、前処理されたリグノセルロース系バイオマスを酵素糖化する研究は、バイオマス分解の複雑なメカニズムのより良い理解を導く手がかりを与え、効率的な生産のための酵素カクテルの最適化に役立つバイオ燃料と化学品の生産に役立つと考えられる。

#### 4.5 総括

第三章までの結果により、広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化においては、リグニンによる制約のみならず、セルロースに対するキシランの存在状態による制約も大きな影響を与えていることが示された。アンモニア処理広葉樹由来木質バイオマスを効率的に酵素糖化するうえでは、糖化に用いる酵素剤のキシラン分解強化が有効であると考えられたことから、キシラン分解の促進に有効な酵素を探索することを目的に、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* がアンモニア処理シラカバ由来木質バイオマスの分解過程に分泌する酵素を網羅的に解析した。その結果、同菌はアンモニア処理シラカバ由来木質バイオマスを炭素源として生長するとき、培養液のキシランナーゼ活性を顕著に向上し、その際、特にGHファミリー11に属するキシランナーゼの分泌を顕著に増大させていることが明らかになった。

## 5. 広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化の効率化

## 5.1. 目的

第四章までの結果により、広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化においては、リグニンによる制約のみならず、セルロースに対するキシランの存在状態による制約が大きな影響を与えていることが示された。また第四章より、担子菌*P. chrysosporium*はアンモニア処理シラカバ由来木質バイオマスの分解時に、GH11に属するキシラナーゼの生産を顕著に増大していることが確認された。これらの結果をふまえ本章では、アンモニア処理広葉樹由来木質バイオマスの糖化収率の向上を目指して、糖化実験に用いてきた市販酵素剤 (CTec+HTec) に対してキシラン分解酵素を添加することで、酵素剤のキシラン分解活性の強化したときに酵素糖化に与える影響を調べた。さらに、X/L比の低いポプラ由来木質バイオマスについては、リグニンの存在が酵素糖化のボトルネックとなっていると考えられたことから、オゾン処理による簡便な脱リグニン処理が、アンモニア処理ポプラ由来木質バイオマスの酵素糖化に与える影響を調べた。

## 5.2. 実験

### 5.2.1. アンモニア処理シラカバ由来木質バイオマスの酵素糖化に与えるキシラナーゼの添加効果

アンモニア処理シラカバ由来木質バイオマスを酵素糖化のための基質として使用した。等量の Cellic® CTec (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) および Cellic® HTec (Novozymes) を混合し、ベース酵素カクテルとして使用した。このベース酵素カクテルに市販単一酵素 (GH11 に属する *Neocallimastix patriciarum* あるいは *A.niger* 由来の組換えエンド-1,4- $\beta$ -キシラナーゼ (Megazyme) 、GH10 に属する *T.maritima* および *C. japonicus* 由来の組換えエンド-1,4- $\beta$ -キシラナーゼ (Megazyme) 、*Orpinomyces. sp.*由来アセチルキシランエステラーゼ、*G. stearothermophilus* 由来の  $\alpha$ -グルクロニダーゼ、および GH43 に属する *Bacillus pumilus* 由来  $\beta$ -キシロシダーゼ) を E/B 比 1/250 添加することで、キシラン分解関連酵素の添加効果を調べた。未処理およびアンモニア処理シラカバ由来木質バイオマス (1.0%w / v) について、50mM 酢酸ナトリウム (pH4.5) 中、37°C、15rpm にて、酵素/バイオマス (E/B) 比 1/ 25 にて酵素糖化を行った。酵素糖化 48 時間反応後、得られた反応溶液に含まれる D-グルコースおよび D-キシロースの量を、グルコース CII-テストワコー試薬 (Wako) および D-キシロースアッセイキット

試薬 (Megazyme International Ireland, Ltd., Wicklow, Ireland) によって測定した。各測定データは、3回の測定の平均値として示した。

### 5.2.2. オゾン処理ポプラ由来木質バイオマスの調製と酵素糖化

未処理およびアンモニア処理ポプラ由来木質バイオマスに対して、オゾン処理を行った。オゾン処理は、1 gの湿潤試料 (水分37.5%) を振り混ぜながら、3% O<sub>3</sub>を含むO<sub>2</sub>流 (500ml min<sup>-1</sup>) に攪拌しながら5分間接触させることで行った。また得られたオゾン処理ポプラ由来木質バイオマスに対して、第二章と同様の条件にてアンモニア処理を行った。オゾン処理後の試料に含まれるグルコース、キシロースおよびクラソンリグニン は第二章と同様の方法で求めた。酵素糖化は、2.2.4節と同様に、等量のCellic® CTec (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) およびCellic® HTec (Novozymes) を混合し、酵素カクテルとして使用した。また、上記の酵素カクテルに糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 11に属する*N. patriciarum*由来の組換えエンド-1,4-β-キシラナーゼ (Megazyme) をE/B比1/250添加したときの酵素糖化実験も行った。

## 5.3. 結果

### 5.3.1. アンモニア処理シラカバ由来木質バイオマスの酵素糖化に与えるキシラナーゼの添加効果

酵素カクテル (Cellic® CTec および HTec) に各種キシラン分解関連単一酵素を添加することで、酵素剤のキシラン分解活性を強化したときに、アンモニア処理シラカバ由来木質バイオマスの酵素糖化収率に与える影響を調べた (Figure 5.1)。特に *N. patriciarum* 由来組換えキシラナーゼを添加した酵素剤を用いてアンモニア処理シラカバを 48 時間酵素糖化したとき、キシロース収率 91.3%、グルコース収率 76.5% が得られ、十分な糖収率が得られた。したがって、高いキシラン含有率および低いリグニン含有率を有するシラカバにおいては、酵素カクテルの適正化によってアンモニア前処理が十分に適用できることが示された。

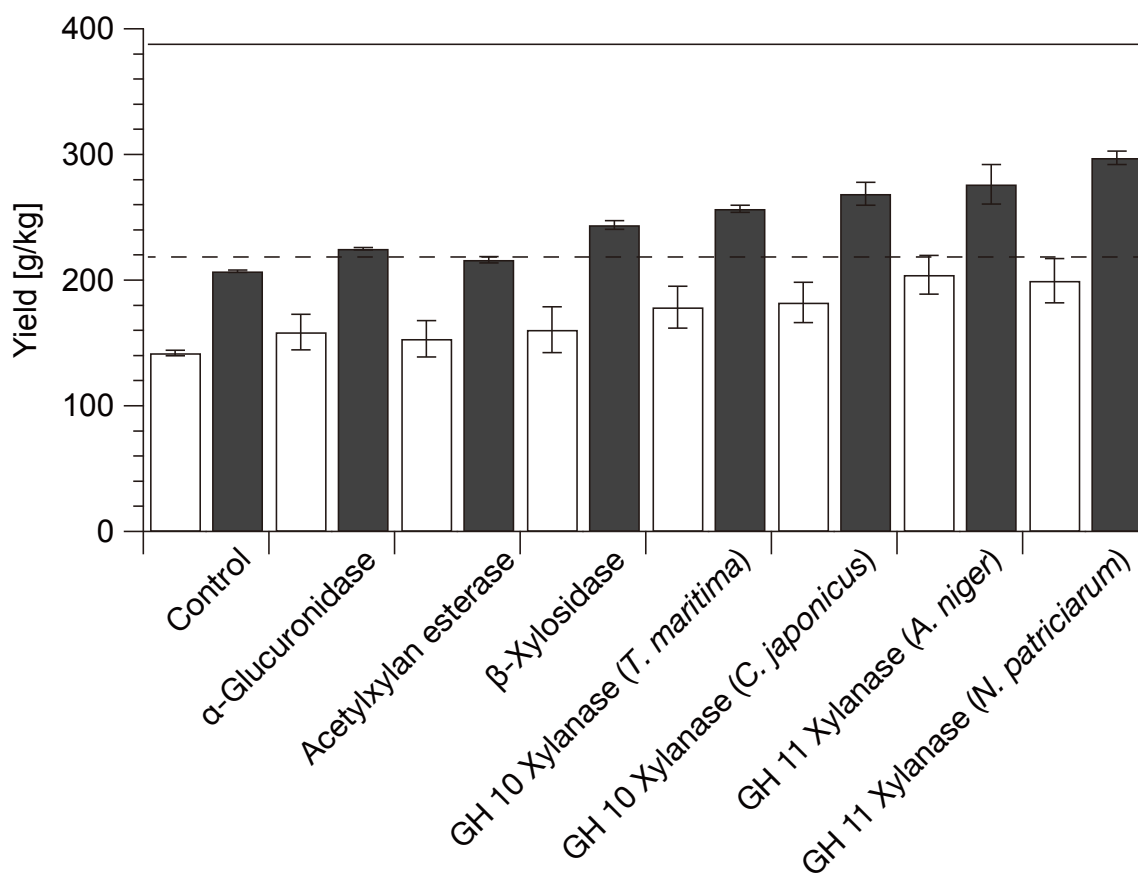


Figure 5.1. Enzymatic hydrolysis of ammonia-treated birchwood biomass with recombinant enzymes. a: glucose yield; b: xylose yield. Ammonia-treated biomass from birch wood was used as substrate for assaying the enzymatic hydrolysis to measure the effects of single enzyme addition. Commercially available recombinant enzymes (GH family 11 endo-1,4- $\beta$ -Xylanase from *Neocallimastix patriciarum* or  $\beta$ -xylosidase from *Bacillus pumilus*, Megazyme International Ireland) and a 1:1 mixture of Cellic CTec (Novo) and Cellic HTec (Novo) were used as enzyme cocktails. The reaction cocktail was prepared with enzyme/biomass (E/B) ratio of 1:25 for Cellic® CTec and HTec enzymes plus recombinant enzyme at an initial E/B ratio of 1/250. The other conditions were the same as described in material and methods.



### 5.3.2. ポプラ由来木質バイオマスの酵素糖化に与えるオゾン処理およびキシラナーゼの添加効果

5分間のオゾン処理によって、ポプラ由来木質バイオマスおよびアンモニア処理ポプラ由来木質バイオマスのリグニン含有率は、6.4 wt.% (from 24.4wt.%) および 7.5 wt.% (from 25.3wt.%) まで低下した。ポプラ由来木質バイオマスおよびアンモニア処理ポプラ由来木質バイオマスの酵素糖化に与えるオゾン脱リグニン処理および *N. patriciarum* 由来組換えキシラナーゼの添加効果を調べたところ (Figure 5.2)、オゾン処理はグルコース収量を顕著に増大したが、キシロース収量の増大に与える効果は小さかった。また、オゾン処理とアンモニア処理を組み合わせることで、オゾンあるいはアンモニア処理のみの場合と比較して、高いグルコースおよびキシロース収量が得られた。さらに、オゾン処理とアンモニア処理を組み合わせることで処理したポプラの酵素糖化において、*N. patriciarum* 由来組換えキシラナーゼ添加による酵素剤のキシラナーゼ強化を行うことで、グルコース収率およびキシロース収率の増大が確認された。興味深いことに、アンモニア処理試料に対してオゾン処理を行った試料と比較して、オゾン処理後にアンモニア処理を施したポプラ由来木質バイオマスの方が、同一酵素糖化条件において、より高いグルコースおよびキシロース収率が得られた。

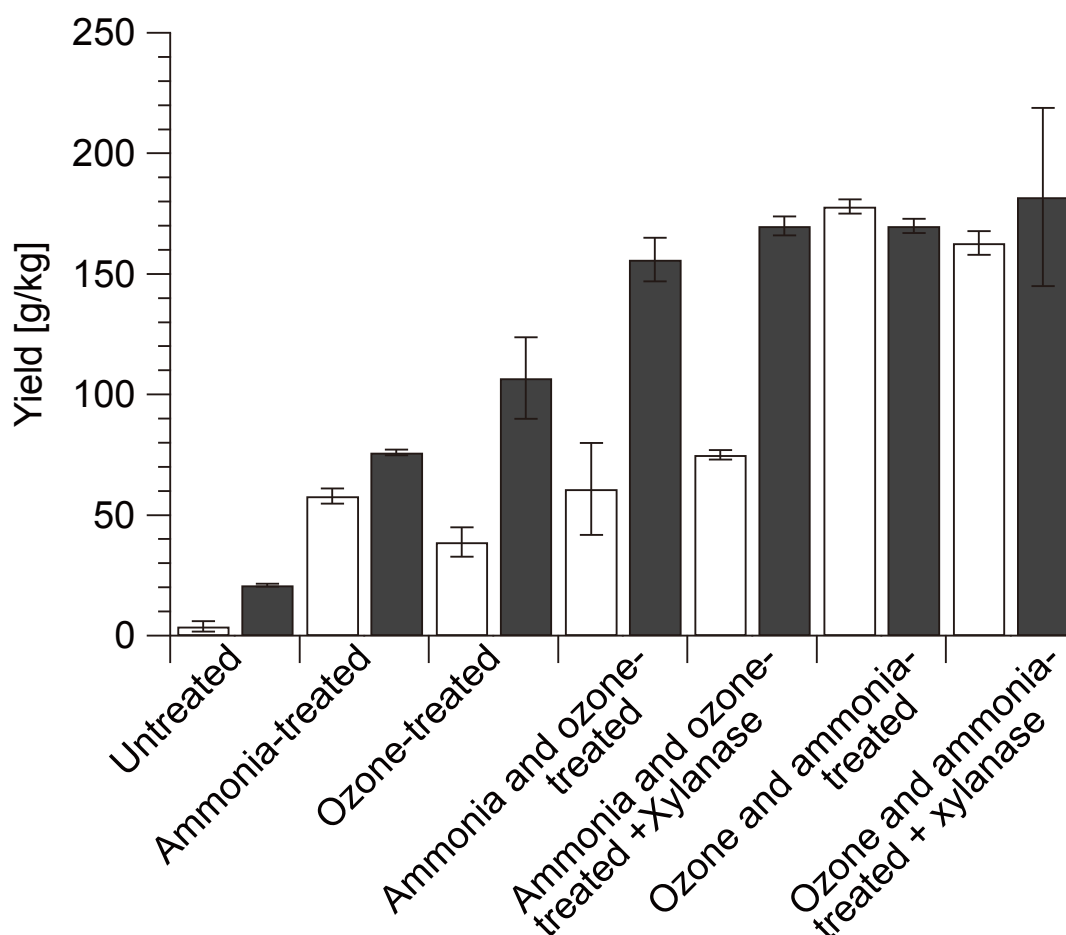


Figure 5.2 Enzymatic saccharification of ozone-treated poplar sample.

Untreated: untreated poplar, APo: ammonia-treated poplar, OzPo: ozone-treated poplar, AOzPo: ozone-treated poplar following ammonia treatment, OzAPo: ammonia-treated poplar following ozone treatment. Xyn: Commercially available recombinant enzyme (GH family 11 endo-1,4- $\beta$ -Xylanase from *Neocallimastix patriciarum*, Megazyme International Ireland) was added. Equal amounts of Cellic® CTec and HTec were mixed and used for enzymatic hydrolysis. This enzyme cocktail was incubated with 1.0% (w/v) untreated or ammonia-treated biomass in 1 mL of 50 mM sodium acetate pH 4.5 at 37 °C and 15 rpm at an initial E/B of 1/25. The reaction mixtures were sampled at 48 h. Glucose and xylose concentrations were determined with glucose and xylose assay kits.

#### 5.4. 考察

第四章より、担子菌 *P. chrysosporium* はアンモニア処理シラカバ由来木質バイオマスの分解時に GH ファミリー11 に属するキシラナーゼの分泌を顕著に増大させていたことから、糖化実験に用いてきた市販酵素剤 (CTec+HTec) に対して、各種単一酵素を添加することで酵素剤のキシラン分解活性を強化した。その結果、GH ファミリー11 に属する *N. patriciarum* 由来組換えキシラナーゼを添加することで、酵素剤のキシラン分解活性を強化したところ、アンモニア処理シラカバの酵素糖化において十分な糖収率が得られることが明らかになった。

アンモニア前処理の効果が小さい樹種においては、リグニンが酵素糖化の阻害要因となることが考えられたため、オゾンによる脱リグニン処理が酵素糖化収率に与える影響を調べた。オゾン処理による脱リグニン処理は、ポプラ由来木質バイオマスの酵素糖化収量を顕著に向上した。しかしながら、興味深いことに、アンモニア処理ポプラ由来木質バイオマスに比較して、オゾン処理ポプラ由来木質バイオマスのキシロース収量は低く、オゾン処理試料ではキシラン分解がボトルネックとなることが示唆された。また、オゾン処理ポプラ由来木質バイオマスの酵素糖化においても、アンモニア処理シラカバ由来木質バイオマスの酵素糖化の場合と同様に、キシラナーゼの強化による酵素糖化収量の増大が確認された。これらのことから、オゾン処理ポプラ由来木質バイオマスの酵素糖化においても、酵素剤のキシラナーゼ強化によるキシラン分解の促進が有効であることが示された。また、アンモニア処理試料に対してオゾン処理を行った試料に比較して、オゾン処理後にアンモニア処理を施したポプラ由来木質バイオマスの方が、同一酵素糖化条件において、より高いグルコースおよびキシロース収率が得られた。これは、オゾン処理とつづくアンモニア処理によって、酵素糖化の制約要因であるリグニンの分解が促進されるためであると考えられる。

これまでに脱リグニン処理を施したパルプを原料とする酵素糖化プロセスの開発が多くなされてきたが、草本バイオマスの場合よりも糖化効率が低いため、広葉樹由来木質バイオマスのアンモニア前処理にはほとんど注意が払われていない(Balan *et al.*, 2009)。しかしながら、これらの結果は、少なくともキシラン/リグニン比が比較的高い広葉樹由来木質バイオマスにおいては、アンモニア前処理とともにキシラン分解活性を強化した酵素カクテルを用いることによって、脱リグニンを行わずに高い糖収率が達成できることを示すと考えられる。また、キシラン/リグニン比が

比較的低い広葉樹由来木質バイオマスにおいても、アンモニア前処理はキシラン分解性の向上に有効であり、オゾン処理などの簡便な脱リグニン処理と酵素剤のキシラナーゼの強化を組み合わせることによって、広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化を効率的に進めることができる可能性を示していると考えられる。

## 5.5. 総括

前章までの結果により、アンモニア処理広葉樹由来木質バイオマスにおいては、用いる酵素剤のキシラン分解を強化することが酵素糖化の効率化に重要であると考えられた。そこで、アンモニア処理シラカバ由来木質バイオマスの酵素糖化において、市販酵素剤 (CTec+HTec) に各種キシラン分解関連酵素を添加し、酵素剤のキシラン分解活性を強化したところ、*N. patriciarum* 由来の GH ファミリー11 に属するキシラナーゼによって、酵素糖化収率が大きく改善されることが明らかとなった。このことから、アンモニア処理シラカバ由来木質バイオマスの酵素糖化の効率化のためには、キシラナーゼの選択とその強化が有効であることが示された。さらに、X/L 比が低くアンモニア前処理が必ずしも有効でなかったポプラ由来木質バイオマスについては、アンモニア処理後にオゾン処理を施し、リグニンを部分酸化すると酵素糖化が効率化された。また、この場合も、キシラナーゼの強化によって、さらに酵素糖化の効率化が可能であることが示された。

## 6. 総括

## 6.1. 総括

地球温暖化防止や化石資源代替のために、リグノセルロース系バイオマスから、エタノールや化成品等の有用物質を生産することが期待されている。リグノセルロース系バイオマスをグルコース等の単糖に変換するうえで、酵素糖化は高温・高圧を必要とせず、分解生成物の高い選択性が望めるという利点がある。しかし、木質バイオマスの酵素糖化においてはリグニンの存在が大きな制約要因となっていると考えられている。そのため、リグニンの除去を伴う前処理が、酵素糖化の効率化のためには不可欠とされている。アンモニア処理は脱リグニンを伴わない簡便な前処理であり、草本バイオマスには非常に有効であることが示されている。しかし、広葉樹由来木質バイオマスへのアンモニア前処理の適用例はアカシアおよびポプラだけで、この場合、草本バイオマスにおける酵素糖化に比べて、前処理としての効果は小さく、適用は困難であることが指摘されている。そこで本研究では、広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化における制約要因を精査するとともに、脱リグニン処理を伴わないアンモニア前処理の広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化への適用性について検討を行い、新たな知見を得ることができた。これらについて以下に総括する。

アンモニア処理が6種の広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化に与える影響を明らかにし、前処理としての適用性を調べた。市販酵素剤 (CTec+HTec) を用いた酵素糖化実験の結果、アンモニア前処理はシラカバ等のキシラン/リグニン含有率 (X/L) 比の大きい樹種の酵素糖化に有効である一方、アカシアやユーカリ等のX/L比の小さい樹種に対する効果は小さいことを明らかにした。したがって、X/L比の大きな広葉樹由来木質バイオマスでは、草本バイオマスの場合と同様にアンモニア処理は酵素糖化の前処理として有効であり、リグニンの存在による酵素糖化の制約は限定的であることを示した。また、広葉樹由来木質バイオマスのセルロース分解量は、キシランの分解量に依存していることが想定されたため、酵素剤のキシラン分解を強化することが酵素糖化において高いグルコース収率を達成するために重要と考えられた。

第二章において、X/L比の低い樹種では、リグニンが酵素糖化の大きな制約要因となることが示された。そこで、脱リグニンされた広葉樹由来木質バイオマスでは、酵素糖化の制約が解除されたかどうかを確認するために、Wise法による脱リグニン処理によって得られたホロセルロースの酵素糖化特性を調べた。その結果、すべての樹種において、脱リグニン処理は酵素分解性を大

幅に改善したが、その効果には樹種間で大きな差がみられた。そこで、酵素糖化の速度論的解析を行ったところ、広葉樹由来木質バイオマスには、セルロース分解を伴うことなく分解できるキシラン（易分解性キシラン）とセルロース分解を伴わないと分解できないキシラン（難分解性キシラン）の二相状態が存在することが明らかとなった。さらに、二相状態の比率には樹種間で大きな差があることが示され、これが酵素糖化特性にも大きな差を与える要因であると考えられた。

前章までの結果により、広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化においては、リグニンによる制約のみならず、セルロースに対するキシランの存在状態による制約が大きな影響を与えていることが示された。そこで、キシラン分解の促進に有効な酵素を探索することを目的に、担子菌 *P. chrysosporium* がアンモニア処理シラカバ由来木質バイオマスの分解過程に分泌する酵素を網羅的に分析したところ、同菌は GH ファミリー 11 に属するキシラナーゼの分泌を顕著に増大させていることが示された。

そこで、糖化実験に用いてきた市販酵素剤 (CTec+HTec) に対して各種市販キシラン分解酵素を添加することで、酵素剤のキシラン分解活性の強化を行った。その結果、*Neocallimastix patriciarum* 由来の GH ファミリー 11 キシラナーゼを添加すると酵素糖化収率が大きく改善されることが明らかとなり、アンモニア処理シラカバ由来木質バイオマスから糖化収率約 80% を達成した。このことから、アンモニア処理広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化において、キシラナーゼの選択とその強化が酵素糖化の効率化に重要であることが示された。さらに、X/L 比が低くアンモニア前処理が必ずしも有効でなかったポプラ由来木質バイオマスについては、アンモニア処理後にオゾン処理を施すことで酵素糖化が効率化され、この場合も、キシラナーゼの強化によって、さらに酵素糖化の効率化が可能であることが示された (Figure 5.2)。

以上のように本研究では、アンモニア処理が X/L 比の大きいシラカバなどの広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化前処理として、有効に用いることができることを明らかにした。また、広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化においては、リグニンによる制約に加えて、キシランの存在状態も制約要因になることを明らかにした。これらの制約は草本バイオマスではアンモニアによる簡便な前処理によって解除することができるが、広葉樹由来木質バイオマスでは、制約解除の度合いには樹種差で大きな差があることが示された。広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化において、リグニンによる制約はアンモニア前処理やオゾン処理によって軽減できるが、一方、本研究

で新たに明らかとなったキシランによる制約については、キシラナーゼの選択と強化がその解除のために重要であることが示された。本研究で得られた知見に基づき、木質バイオマスからのバイオリファイナリープロセスが開発されることを期待し、総括とする。

## 6.2. 今後の展望

アンモニア前処理を用いたリグノセルロース系バイオマスからのエタノール生産に関する取り組みは、日本においても「バイオエタノール一貫生産システムに関する研究開発」において実証に向けた広範な検討が実施された。本プロジェクトの最終報告書(バイオエタノール革新技術研究組合 & 国立大学法人東京大学大学院農学生命科学研究科, 2015)では、草本バイオマス(エリアンサス)にアンモニア前処理を適用したシステムにおいて、エタノール生産コスト 80 円/L を達成したことが報告されているが、アンモニア消費量(回収率)が原料バイオマスおよび酵素に次ぐ変動費であり、かつシステム全体においてアンモニア消費が最も大きな温室効果ガス排出要因であることが合わせて指摘された。アンモニア前処理を用いたバイオマス変換プロセスにおいて、アンモニア消費量(回収率)が大きなコスト要因であることは、コーンストーバーからのエタノール生産プロセスにおいても同様の指摘がされている(Stoklosa *et al.*, 2017)。したがって、アンモニア前処理をバイオマス変換プロセスに適用するためには、酵素糖化プロセスの効率化だけでなく、低コストかつ環境に優しい技術によってアンモニアを生産することも重要な技術課題であると考えられる。

一方で近年、水素キャリアとしてのアンモニアに注目が集まっており、2017年12月に決定された水素基本戦略においては(再生可能エネルギー・水素等関係閣僚会議, 2017)、2030年頃に商用規模の水素サプライチェーンを構築し、年間約30万トンの水素を調達するとともに、将来的には20円/Nm<sup>3</sup>程度の水素コストの実現を目指すことが明記されている。水素社会の構築にあたっては、アンモニアは体積水素密度が大きい(液化水素の1.5倍)ため、インフラ整備をより小規模で安価に形成でき、天然ガスから比較的安価に製造できること、既存の商業サプライチェーンを活用であることから、実用化が期待されている。また、アンモニアは燃焼させることで発電用燃料として直接利用することが可能であり、燃焼時にCO<sub>2</sub>を排出しない特徴がある。そのため水素キャリアとしてのアンモニア利用が期待されており、実用化において課題となる直接燃焼利用



時の窒素酸化物（NO<sub>x</sub>）の低減、可燃性劇物に係る安全性確保に関する技術開発が盛んに行われている。水素基本戦略では、アンモニアの積極的な活用が明記されており、発電量燃料として2020年頃までに石炭火力発電所でのアンモニア混焼の開始、2030年頃までにガスタービン等への利用拡大を目指すことが示されている。現状では、アンモニアは天然ガスから生産されているが、二酸化炭素回収・貯留（CCS）を組み合わせることで生産された水素、あるいは太陽光発電等の再生可能エネルギーの余剰電力から得られた水素を用いることによって、カーボンニュートラルなアンモニアを生産することが期待されている。前述のように、アンモニア前処理を用いた酵素糖化プロセスの課題は、アンモニアを低コストかつ環境に優しい技術によって生産することにあるので、発電用燃料と同程度の価格で、カーボンニュートラルなアンモニアが得られるようになれば、実用化のボトルネックとなっていたコストおよび温室効果ガス排出量の課題は解消されると考えられる。

本研究の成果をもとに考えられるアンモニア前処理を用いたバイオマス変換プロセスのフロー案を示す（Figure 6.1）。バイオエタノール一貫生産システムに関する研究開発では、原料作物として草本バイオマスが選定されたが、アンモニア前処理はX/L比が高いシラカバ等の一部の広葉樹由来木質バイオマスにも適用できることから、既存ケースよりも適応原料の拡大が期待できる。広葉樹由来木質バイオマスでは、リグニンが酵素糖化の重要な制約要因であるため、X/L比の低いアカシア、ユーカリおよびポプラ等の樹種ではアンモニア前処理の適用が困難であるが、オゾン処理等の簡便な脱リグニン処理によって、リグニンの一部を除去することで酵素糖化収率が增大することから、アンモニア前処理にオゾンなどによる脱リグニン処理を組み合わせることも適応樹種拡大に有効と考えられる。

またコーンストーバーにおける研究では、キシランの一部が液化アンモニアに溶解することが指摘されている（da Costa Sousa *et al.*, 2016）。オゾン等によってリグニンの一部を分解した場合、分解物の一部はアンモニアへの溶解性が向上することが想定されることから、バイオマス構成成分の液化アンモニアへの溶解性を生かした分画は、バイオリファイナリープロセスの構築において有効と考えられる。加えて酵素糖化によるバイオマス変換は、酵素の基質特異性を生かした多段階プロセスを構築できることから、前処理バイオマスを段階的に酵素糖化することで、キシロース、III型セルロース+キシラン、グルコース+キシロース、リグニン+灰分などとして有用物質を分

離回収することができる。これらの物質は、例えばキシロースはフルフラール原料として、Ⅲ型セルロース+キシランは素材原料として、リグニン分解物は化成品原料として利用できる可能性がある。以上より、アンモニア前処理を用いた広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化プロセスは、グルコースおよびキシロースなどの単糖を高い収率で得られる可能性が示されるとともに、糖化処理後の固体残渣としてリグニンを回収できることから、段階的に歩留まり高く各成分を分離回収することで、バイオマス構成成分を余すところなく活用したバイオリファイナリープロセスの構築に有望な技術と考えられる。

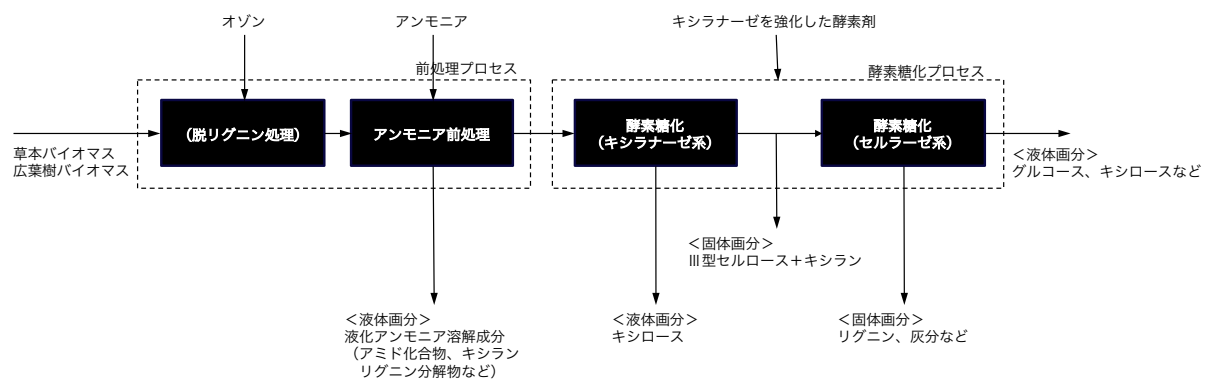


Figure 6.1 Suggested biorefinery process based on ammonia pretreatment.

## 7. 参考文献

A. Sluiter BH, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, D. Crocker, (2008) Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory TP-510-42618.

Abbas A, Koc H, Liu F & Tien M (2005) Fungal degradation of wood: initial proteomic analysis of extracellular proteins of *Phanerochaete chrysosporium* grown on oak substrate. *Curr Genet* 47: 49-56.

Adler E (1977) Lignin chemistry—past, present and future. *Wood science and technology* 11: 169-218.

Åkerholm M & Salmén L (2003) The oriented structure of lignin and its viscoelastic properties studied by static and dynamic FT-IR spectroscopy. *Holzforschung* 57: 459-465.

Alvo P & Belkacemi K (1997) Enzymatic saccharification of milled timothy (*Phleum pratense* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bioresource technology* 61: 185-198.

Atalla RH & VanderHart DL (1984) Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science* 223: 283-286.

Atalla RH & Agarwal UP (1985) Raman microprobe evidence for lignin orientation in the cell walls of native woody tissue. *Science* 227: 636-639.

Awano T, Takabe K, Fujita M & Daniel G (2000) Deposition of glucuronoxylans on the secondary cell wall of Japanese beech as observed by immuno-scanning electron microscopy. *Protoplasma* 212: 72-79.

Balan V, Sousa LdC, Chundawat SPS, Marshall D, Sharma LN, Chambliss CK & Dale BE (2009) Enzymatic digestibility and pretreatment degradation products of AFEX-treated hardwoods (*Populus nigra*). *Biotechnol Prog* 25: 365-375.

Barry A, Peterson F & King A (1936) X-ray studies of reactions of cellulose in non-aqueous systems. I. Interaction of cellulose and liquid ammonia. *Journal of the American Chemical Society* 58: 333-337.

Bayer EA, Shimon LJ, Shoham Y & Lamed R (1998) Cellulosomes—structure and ultrastructure. *Journal of structural biology* 124: 221-234.

Bradshaw TC, Alizadeh H, Teymouri F, Balan V & Dale BE (2007) Ammonia fiber expansion pretreatment and enzymatic hydrolysis on two different growth stages of reed canarygrass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, pp. 395-405. Springer.

Brändström J (2002) Morphology of Norway spruce tracheids with emphasis on cell wall organisation.

Brown RM & Montezinos D (1976) Cellulose microfibrils: visualization of biosynthetic and orienting complexes in association with the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73: 143-147.

Busse-Wicher M, Grantham NJ, Lyczakowski JJ, Nikolovski N & Dupree P (2016) Xylan decoration patterns and the plant secondary cell wall molecular architecture. *Biochemical Society Transactions* 44: 74-78.

Chundawat SP, Venkatesh B & Dale BE (2007) Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility. *Biotechnology and bioengineering* 96: 219-231.

Chundawat SP, Beckham GT, Himmel ME & Dale BE (2011) Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annual review of chemical and biomolecular engineering* 2: 121-145.

Chundawat SP, Vismeh R, Sharma LN, Humpala JF, da Costa Sousa L, Chambliss CK, Jones AD, Balan V & Dale BE (2010) Multifaceted characterization of cell wall decomposition products formed during ammonia fiber expansion (AFEX) and dilute acid based pretreatments. *Bioresource Technology* 101: 8429-8438.

Chundawat SPS (2010) Ultrastructural and physicochemical modifications within ammonia treated lignocellulosic cell walls and their influence on enzymatic digestibility. Michigan State University.

Coughlan MP (1985) The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnology and genetic engineering reviews* 3: 39-110.

Creely J & Wade R (1978) Complexes of cellulose with sterically hindered amines. *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters* 16: 477-480.

Creely JJ & Wade RH (1978) Complexes of cellulose with polyamines. *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters* 16: 291-295.

da Costa Sousa L, Jin M, Chundawat SP, Bokade V, Tang X, Azarpira A, Lu F, Avci U, Humpala J & Uppugundla N (2016) Next-generation ammonia pretreatment enhances cellulosic biofuel production. *Energy & Environmental Science* 9: 1215-1223.

Dass SB, Dosoretz CG, Reddy CA & Grethlein HE (1995) Extracellular proteases produced by the wood-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* under ligninolytic and non-ligninolytic conditions. *Arch Microbiol* 163: 254-258.

Decelle B, Tsang A & Storms RK (2004) Cloning, functional expression and characterization of three *Phanerochaete chrysosporium* endo-1,4-beta-xylanases. *Curr Genet* 46: 166-175.

Dence CW (1992) The Determination of Lignin. *Methods in Lignin Chemistry*, (Lin S & Dence C, eds.), pp. 33-61. Springer Berlin Heidelberg.

Ebringerová A (2005) Structural diversity and application potential of hemicelluloses. Vol. 232 p. pp. 1-12. Wiley Online Library.

Ebringerová A & Heinze T (2000) Xylan and xylan derivatives– biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular rapid communications* 21: 542-556.

Eriksson K-EL, Blanchette R & Ander P (1990) Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, Berlin.

Eriksson Ö, Goring D & Lindgren B (1980) Structural studies on the chemical bonds between lignins and carbohydrates in spruce wood. *Wood science and technology* 14: 267-279.

Ferrer A, Byers F, Sulbarán-de-Ferrer B, Dale B & Aiello C (2002) Optimizing ammonia processing conditions to enhance susceptibility of legumes to fiber hydrolysis. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*, pp. 123-134. Springer.

Gao D, Uppugundla N, Chundawat SP, Yu X, Hermanson S, Gowda K, Brumm P, Mead D, Balan V & Dale BE (2011) Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. *Biotechnology for Biofuels* 4: 5.

Gardner K & Blackwell J (1974) The structure of native cellulose. *Biopolymers* 13: 1975-2001.

Garlock RJ, Wong YS, Balan V & Dale BE (2012) AFEX pretreatment and enzymatic conversion of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) to soluble sugars. *BioEnergy Research* 5: 306-318.

Hartmann P, Haswell SJ & Grasserbauer M (1994) Monitoring of reducing sugars by flow-injection analysis using p-hydroxybenzoic acid hydrazide. *Analytica Chimica Acta* 285: 1-8.

He Y, Pang Y, Liu Y, Li X & Wang K (2008) Physicochemical characterization of rice straw pretreated with sodium hydroxide in the solid state for enhancing biogas production. *Energy & Fuels* 22: 2775-2781.

Hendriks AT & Zeeman G (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 100: 10-18.

Heredia A, Jiménez A & Guillén R (1995) Composition of plant cell walls. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 200: 24-31.

Himmel ME, Ding S-Y, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW & Foust TD (2007) Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *science* 315: 804-807.

Holtzapple MT, Lundeen JE, Sturgis R, Lewis JE & Dale BE (1992) Pretreatment of lignocellulosic municipal solid waste by ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 34: 5-21.

Hon DN-S (1994) Cellulose: a random walk along its historical path. *Cellulose* 1: 1-25.

Hori C, Igarashi K, Katayama A & Samejima M (2011) Effects of xylan and starch on secretome of the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* grown on cellulose. *FEMS Microbiol Lett* 321: 14-23.

Huy ND, Kim S-W & Park S-M (2011) Heterologous expression of endo-1,4-beta-xylanaseC from *Phanerochaete chrysosporium* in *Pichia pastoris*. *JBIOSC* 111: 654-657.

Igarashi K, Wada M & Samejima M (2007) Activation of crystalline cellulose to cellulose III(I) results in efficient hydrolysis by cellobiohydrolase. *FEBS J* 274: 1785-1792.

Igarashi K, Wada M & Samejima M (2009) セロビオヒドロラーゼの反応速度論的解析: 固液界面における酵素反応を表面密度という概念を用いて定量化する. *Trends in glycoscience and glycotecchnology* 21: 13-22.

Igarashi K, Ishida T, Hori C & Samejima M (2008) Characterization of an endoglucanase belonging to a new subfamily of glycoside hydrolase family 45 of the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 74: 5628-5634.

Imai T (1992) Studies on the selective radio-labeling of polysaccharides in wood cell walls. Thesis, Nagoya University.

Ishikawat A, Kuga S & Okano T (1998) Determination of parameters in mechanical model for cellulose III fibre. *Polymer* 39: 1875-1878.

Johnsrud SC & Eriksson KE (1985) Cross-breeding of selected and mutated homokaryotic strains of *Phanerochaete chrysosporium* K-3: new cellulase deficient strains with increased ability to degrade lignin. *Applied microbiology and biotechnology* 21: 320-327.

Karnaouri A, Matsakas L, Topakas E, Rova U & Christakopoulos P (2016) Development of thermophilic tailor-made enzyme mixtures for the bioconversion of agricultural and forest residues. *Frontiers in microbiology* 7: 177.

Kremer SM & Wood PM (1992) Evidence that cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is primarily an Fe (III) reductas. *European Journal of Biochemistry* 205: 133-138.



Kumar R, Mago G, Balan V & Wyman CE (2009) Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresour Technol* 100: 3948-3962.

Kumar R, Hu F, Hubbell CA, Ragauskas AJ & Wyman CE (2013) Comparison of laboratory delignification methods, their selectivity, and impacts on physiochemical characteristics of cellulosic biomass. *Bioresource technology* 130: 372-381.

Larsen MJ, Winandy JE & Green F (1995) A proposed model of the tracheid cell wall of southern yellow pine having an inherent radial structure in the S2 layer. *Material und Organismen* 29: 197-210.

Lau MW, Gunawan C & Dale BE (2009) The impacts of pretreatment on the fermentability of pretreated lignocellulosic biomass: a comparative evaluation between ammonia fiber expansion and dilute acid pretreatment. *Biotechnology for Biofuels* 2: 30.

Lever M (1972) A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Anal Biochem* 47: 273-279.

Lin SY & Dence CW (2012) *Methods in lignin chemistry*. Springer Science & Business Media.

Lynd LR (1996) Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. *Annual review of energy and the environment* 21: 403-465.

Malgas S, Thoresen M, van Dyk JS & Pletschke BI (2017) Time dependence of enzyme synergism during the degradation of model and natural lignocellulosic substrates. *Enzyme and microbial technology* 103: 1-11.

Matsumoto Y, Ishizu A, Nakano J & Terasawa K (1984) Residual sugars in Klason lignin. *Journal of wood chemistry and technology* 4: 321-330.

McMillan JD (1994) *Pretreatment of lignocellulosic biomass*. p.^pp. ACS Publications.

Millett MA, Effland MJ & Caulfield DF (1979) Influence of Fine Grinding on the Hydrolysis of Cellulosic Materialsâ€” Acid Vs. Enzymatic. p.^pp. ACS Publications.

Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M & Ladisch M (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 96: 673-686.

Murnen HK, Balan V, Chundawat SP, Bals B, Sousa LdC & Dale BE (2007) Optimization of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Miscanthus x giganteus* to fermentable sugars. *Biotechnology progress* 23: 846-850.

Nimz H (1974) Beech lignin—proposal of a constitutional scheme. *Angewandte Chemie International Edition* 13: 313-321.

Nishiyama Y, Langan P & Chanzy H (2002) Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I $\beta$  from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society* 124: 9074-9082.

O'sullivan AC (1997) Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4: 173-207.

Persson PV, Hafren J, Fogden A, Daniel G & Iversen T (2004) Silica nanocasts of wood fibers: A study of cell-wall accessibility and structure. *Biomacromolecules* 5: 1097-1101.

Pettersen RC (1984) The chemical composition of wood. p.^pp. ACS Publications.

Ravalason H, Jan G, Mollé D, et al. (2008) Secretome analysis of *Phanerochaete chrysosporium* strain CIRM-BRFM41 grown on softwood. *Applied microbiology and biotechnology* 80: 719-733.

Reshamwala S, Shawky BT & Dale BE (1995) Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal bermudagrass and switchgrass. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 51: 43-55.

Rivers DB & Emert GH (1987) Lignocellulose pretreatment: a comparison of wet and dry ball attrition. *Biotechnology letters* 9: 365-368.

Salmén L (2004) Micromechanical understanding of the cell-wall structure. *Comptes rendus biologies* 327: 873-880.

Sands L & Gary WY (1933) The hemicelluloses of mesquite wood. *Journal of Biological Chemistry* 101: 573-581.

Sarks C, Bals BD, Wynn J, Teymouri F, Schwegmann S, Sanders K, Jin M, Balan V & Dale BE (2016) Scaling up and benchmarking of ethanol production from pelletized pilot scale AFEX treated corn stover using *Zymomonas mobilis* 8b. *Biofuels* 7: 253-262.

Sato S, Liu F, Koc H & Tien M (2007) Expression analysis of extracellular proteins from *Phanerochaete chrysosporium* grown on different liquid and solid substrates. *Microbiology* 153: 3023-3033.

Segal L, Creely J, Martin Jr A & Conrad C (1959) An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal* 29: 786-794.

Sidiras D & Koukios E (1989) Acid saccharification of ball-milled straw. *Biomass* 19: 289-306.

Stoklosa RJ, del Pilar Orjuela A, da Costa Sousa L, Uppugundla N, Williams DL, Dale BE, Hodge DB & Balan V (2017) Techno-economic comparison of centralized versus decentralized biorefineries for two alkaline pretreatment processes. *Bioresource technology* 226: 9-17.

Sudo K, Matsumura Y & Shimizu K (1976) Enzymatic hydrolysis of woods. I. Effect of delignification on hydrolysis of woods by *Trichoderma viride* cellulase. *J Jap Wood Res Soc.*

Sun X, Xu F, Sun R, Fowler P & Baird M (2005) Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw. *Carbohydrate research* 340: 97-106.

Tang X, da Costa Sousa L, Jin M, Chundawat SP, Chambliss CK, Lau MW, Xiao Z, Dale BE & Balan V (2015) Designer synthetic media for studying microbial-catalyzed biofuel production. *Biotechnology for biofuels* 8: 1.

Tassinari T, Macy C, Spano L & Ryu DD (1980) Energy requirements and process design considerations in compression-milling pretreatment of cellulosic wastes for enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 22: 1689-1705.

Teymouri F, Laureano-Pérez L, Alizadeh H & Dale BE (2004) Ammonia fiber explosion treatment of corn stover. p.^pp. 951-963. Springer.

Teymouri F, Laureano-Perez L, Alizadeh H & Dale BE (2005) Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresour Technol* 96: 2014-2018.

Teymouri F, Laureano-Perez L, Alizadeh H & Dale BE (2005) Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource technology* 96: 2014-2018.

Timell TE (1967) Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Science and Technology* 1: 45-70.

Toda H (1960) Paperchromatographic determination of methylglucuronoxylan in woods and pulps. *Journal of The Society of Fiber Science and Technology* 16: 725-729.

Uppugundla N, da Costa Sousa L, Chundawat SP, Yu X, Simmons B, Singh S, Gao X, Kumar R, Wyman CE & Dale BE (2014) A comparative study of ethanol production using dilute acid, ionic liquid and AFEX™ pretreated corn stover. *Biotechnology for biofuels* 7: 72.

Väljamäe P, Sild V, Pettersson G & Johansson G (1998) The initial kinetics of hydrolysis by cellobiohydrolases I and II is consistent with a cellulose surface- erosion model. *The FEBS Journal* 253: 469-475.

Vanden Wymelenberg A, Gaskell J, Mozuch M, Kersten P, Sabat G, Martinez D & Cullen D (2009) Transcriptome and secretome analyses of *Phanerochaete chrysosporium* reveal complex patterns of gene expression. *Appl Environ Microbiol* 75: 4058-4068.

Vanden Wymelenberg A, Mingos P, Sabat G, et al. (2006) Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins. *Fungal Genet Biol* 43: 343-356.

Verlhac C, Dedier J & Chanzy H (1990) Availability of surface hydroxyl groups in Valonia and bacterial cellulose. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 28: 1171-1177.

Vismeh R, Lu F, Chundawat SP, Humpala JF, Azarpira A, Balan V, Dale BE, Ralph J & Jones AD (2013) Profiling of diferulates (plant cell wall cross-linkers) using ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analyst* 138: 6683-6692.

Vlasenko EY, Ding H, Labavitch J & Shoemaker S (1997) Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. *Bioresource technology* 59: 109-119.

Wada M, Chanzy H, Nishiyama Y & Langan P (2004) Cellulose IIII crystal structure and hydrogen bonding by synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Macromolecules* 37: 8548-8555.

Wada M, Heux L, Nishiyama Y & Langan P (2009) The structure of the complex of cellulose I with ethylenediamine by X-ray crystallography and cross-polarization/magic angle spinning <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance. *Cellulose* 16: 943.

Windeisen E, Strobel C & Wegener G (2007) Chemical changes during the production of thermo-treated beech wood. *Wood Science and Technology* 41: 523-536.

Wise L, Murphy M & D'Addieco A (1946) *Paper Trade* 22: 35.

Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee Y, Mitchinson C & Saddler JN (2009) Comparative sugar recovery and fermentation data following pretreatment of poplar wood by leading technologies. *Biotechnology Progress* 25: 333-339.

Wymelenberg AV, Sabat G, Martinez D, Rajangam AS, Teeri TT, Gaskell J, Kersten PJ & Cullen D (2005) The Phanerochaete chrysosporium secretome: database predictions and initial mass spectrometry peptide identifications in cellulose-grown medium. *J Biotechnol* 118: 17-34.

Yoshida M, Liu Y, Uchida S, Kawarada K, Ukagami Y, Ichinose H, Kaneko S & Fukuda K (2008) Effects of cellulose crystallinity, hemicellulose, and lignin on the enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* to monosaccharides. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 72: 805-810.

バイオエタノール革新技術研究組合 & 国立大学法人東京大学大学院農学生命科学研究科  
(2015) 平成 21 年度－平成 25 年度成果報告書 セルロース系エタノール革新的生産システム開

発事業 バイオエタノール一貫生産システムに関する研究開発 セルロース系目的生産バイオマスの栽培から低環境負荷前処理技術に基づくエタノール製造プロセスまでの低コスト一貫生産システムの開発. (国立開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 & 新エネルギー部, eds.), 再生可能エネルギー・水素等関係閣僚会議 (2017) 水素基本戦略. (経済産業省, ed.).

## 8. 謝辭

本研究を進めるにあたり、実験や論文作成の御指導に加え、私に本研究室で勉強する機会を与えて下さいました指導教員である鮫島正浩教授に深く感謝申し上げます。本学学部、修士、さらには社会人経験を経て、博士課程での指導を受け入れてくださったこと、また、様々な機会に学外での発表や実験の機会を頂いたことも重ねてお礼申し上げます。同研究室の五十嵐圭日子准教授には、研究のあらゆる面においてご指導を頂いただけでなく、研究者としての心がけや考え方など幅広くご指導頂きました。心より感謝いたします。また、研究室において温かくお声をかけて頂きました寺田珠美助教に感謝致します。さまざまな面でお世話になりました、古久保美樹様に御礼申し上げます。また、石田卓也様、堀千明様、砂川直輝様をはじめとする森林化学研究室内の皆様にも大変お世話になりました。深く感謝致します。

木材化学研究室の秋山拓也助教にはバイオマス分析において大変お世話になるとともに、様々なアドバイスを頂きました。深く感謝致します。

高分子材料学研究室の木村聡特任准教には、顕微鏡観察方法を初めとした実験方法についてご指導頂きました、お礼申し上げます。

またバイオエタノール革新技術研究組合の三橋秀一様をはじめとする皆様には、先進的な実験環境で学ぶ機会を頂きました、深く感謝致します。

電力中央研究所の伊藤茂男エネルギー技術研究所所長、市川和芳領域リーダー、河瀬誠上席研究員、大高円上席研究員、山口哲正上席研究員には、博士課程入学の機会を頂くとともに、博士研究に集中できるよう業務面でも大変お世話になりました。心から感謝いたします。

最後に、これまで私を支えて下さった全ての方々、ならびにいつも温かく見守って下さった家族に感謝を表して、謝辞とさせていただきます。