

氏名	張 文娟		
授与学位	博士 (工学)		
学位授与年月日	平成27年3月20日		
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項		
研究科専攻	秋田県立大学大学院システム科学技術研究科 博士後期課程総合システム科学専攻		
学位論文題目	Study on Preparation of Functionalized Magnetic Supports for the Cellulase Immobilization (機能性磁性担体の創製およびセルラーゼの固定化に関する研究)		
指導教員	教授 <u>邱 建輝</u>		
論文審査委員	主査 教授 <u>邱 建輝</u>		
	副査 教授 <u>尾藤輝夫</u>	教授 <u>倪 慶清</u>	(信州大学)
	准教授 <u>金澤伸浩</u>		

論文内容要旨

本論文は、バイオエタノールの製造工程において回収および再利用可能となる固定化酵素の開発を目的として、異なる方法で作製した機能性磁性担体を用いて酵素を固定化し、その固定化酵素のセルラーゼ固定量、安定性および再利用特性などを評価し、その成果をまとめたものであり、全6章からなる。

第1章では緒論として、磁性担体の作製方法および固定化方法について、既存の研究報告から問題点を挙げ、本研究の目的と意義を述べた。近年、化石資源の枯渇化や地球温暖化などの環境問題から、バイオマスのエネルギー利用が大いに注目されている。バイオマスとは、例えば植物のような再生可能な天然資源のことを指し、その利用により排出された二酸化炭素は植物の生長過程において光合成により利用されるため、二酸化炭素の収支をゼロとして考えることのできるカーボンニュートラルの特徴をもつ。この特徴から、ガソリン代替燃料としてバイオエタノールの利用が期待されており、その製造技術について世界中で研究開発が進められている。中でも、食料と競合しない草本系および木質系バイオマスからのエタノール製造は、それらのバイオマスが地球上で最も大量に存在している未利用資源であるために、大きな関心が寄せられている。草本系および木質系バイオマスからエタノールを製造するためには、セルラーゼと呼ばれる複合酵素を用いてセルロース成分をグルコースのような単糖にまで加水分解(糖化)させるエタノール発酵前処理が必要となる。しかし、このセルラーゼは複雑な構造をもつタンパク質であるため、有機溶媒、酸、アルカリや熱などの外的因子によって不可逆的な構造変化を受けると不活性な状態となってしまう(失活する)という問題があり、また、そのコストが高い上に使用後の分離・回収が困難であるため、使い捨てとなってしまうことが実用化の障害になっている。このため、生成物との分離および再利用、失活の抑制を狙いとしたセルラーゼの固定化が注目されている。固定化

とは、水に不溶性の担体に適当な手法で酵素を固定することを指しており、セルラーゼのような酵素に新たな特性を与えることでその欠点を補うことができるため、生成物との分離だけでなく失活の抑制にも有効である。特に近年、ナノサイズの磁性粒子に固定化することで磁石により回収する方法が提案されており、セルロース資源の糖化コスト削減への期待は大きくなっている。

一般に、酵素の固定化法には、包括法、架橋法、吸着法、共有結合法がある。各々にはさらに細かい分類があり、これまで多様な固定化方法が研究されてきた。数ある固定化方法の中でも、化学修飾せずに固定化できるため活性が高くなるなどの利点をもつ吸着法と、酵素結合量が大きく、酵素の漏出を抑制できるなどの利点をもつ共有結合法は、磁性粒子に固定化した酵素のセルロース糖化およびその後の回収工程において優位性があるため、バイオエタノール製造の実用化に貢献できる可能性がある。しかし、磁性粒子は酸化しやすく、分散性がよくないという問題がある。磁性ナノ粒子表面を何らかの材料でコーティングすれば、それらの酸化を防止するとともに、分散性上昇や生成物の交換性を上昇させることができると考えられるが、コーティング材料の種類によって、その後の化学修飾や酵素の固定化に強い影響を及ぼしてしまう。

そこで、本研究では磁性粒子をシリカもしくはポリマーでコーティングすることとし、その後の化学修飾などにより作製した機能性磁性担体を用いてセルラーゼを固定化した。シリカやポリマーは、構造の制御や表面の化学修飾が容易であるため、セルラーゼの固定化にも有効であると考えられる。これより、各々の手法で作製した固定化酵素のセルラーゼ固定量、活性、安定性および再利用性を調査し、磁石により回収および再利用できる固定化酵素の開発とバイオエタノール製造実用化への寄与を目指すことを目的とする。

第2章では、用いた材料である磁性ナノ粒子 (Fe_3O_4 、マグネタイト)、セルラーゼ、シリカ前駆体、グルタルアルデヒド (GA)、シランおよびモノマーについて説明し、シリカ被覆磁性ナノ粒子およびポリマー被覆磁性粒子の作製方法について説明し、それらによるセルラーゼの固定化原理について提案した。磁性ナノ粒子は共沈法により作製したものをを用いた。その構造を広角X線回折測定 (XRD) により分析した結果、スピネル構造であることがわかり、透過型電子顕微鏡 (TEM) によりモルフォロジーを観察した結果、直径 10~13nm であることが明らかとなった。セルラーゼおよび GA は市販のものを用いた。このセルラーゼは、原子間力顕微鏡 (AFM) での分析から、直径 4~20nm (凝集体を含む) であることがわかった。GA は共有結合法により酵素を固定化する場合に用いた。シリカ前駆体にはオルトケイ酸テトラエチル (TEOS) を、シランはアミノシランとして主に 3-アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES) を、モノマーは主に GMA を用いることとし、各々市販のものとした。これらの材料を用いて、本研究では下記3種類の機能性磁性担体および固定化酵素の作製法を提案した。

- (1) 磁性ナノ粒子表面にシリカを被覆して APTES により化学修飾した後に、GA を用いることで主に共有結合法によりセルラーゼを固定化する方法 (シリカ被覆磁性ナノ粒子の応用①)。
- (2) シリカ被覆磁性ナノ粒子を APTES などで化学修飾した後に、GA を用いないことで主に吸着法によりセルラーゼを固定化する方法 (シリカ被覆磁性ナノ粒子の応用②)。
- (3) 磁性ナノ粒子に GMA などのモノマーを共重合することでポリマーを被覆し、吸着法と共有結合法によりセルラーゼを固定化する方法 (ポリマー被覆磁性粒子の応用)。

作製した機能性磁性担体は、モルフォロジー評価、分子構造分析、化学成分分析、ゼータ電位測定および飽和磁化測定 (VSM) に供し、磁性ナノ粒子からの変化を調べた。固定化酵素については、種々の

条件で作製した各機能性磁性担体に固定化したセルラーゼの固定量、(β -グルコシダーゼ) 活性、安定性および再利用性の測定に供した。活性、再利用性の測定には、基質として 1%カルボキシメチルセルロース (CMC) 溶液 (0.1M 酢酸緩衝液中、pH5.0) を用いた。安定性はこの CMC との糖化反応における pH と温度、高温での長時間使用による影響の分析から、再利用性は活性測定後に磁石で回収して繰り返し反応させたときの活性の変化を 10 回まで調べることで評価した。

第 3 章では、提案方法(1)に基づき、シリカ被覆磁性ナノ粒子およびそれより作製した機能性磁性担体と固定化酵素の特性に及ぼす TEOS 添加量の影響を検討した。シリカ被覆磁性ナノ粒子のモルフォロジーを TEM により観察した結果、磁性ナノ粒子単体では大きく凝集してしまうのに対して、シリカを被覆させると分散性が向上することが明らかとなった。また、TEOS 添加量を増加させると、シリカ層が厚くなり、Core-shell 構造が認められた。そのシリカ層の形成と増大は、分散性を向上させる一方で飽和磁化の低下につながった。しかし、TEOS 添加量 5mL (シリカ被覆量 37%) での飽和磁化は、単体では 57.6emu/g であるのに対し、32emu/g と低下したが、磁性を示した。このシリカ被覆磁性ナノ粒子に化学修飾を行った後、GA を用いた共有結合法によりセルラーゼを固定化したときの固定量と相対活性を調べた結果、TEOS 添加量 5mL (2.5mL/g) でセルラーゼの固定量がほぼ飽和値 (92mg/g) に達し、酵素単体の 80%の活性を示した。また、TEOS 添加量 5mL での固定化酵素の相対活性は、糖化反応における pH および温度の変化に耐性が高く、高温での長時間使用でも酵素単体ほど失活しないことが明らかとなった。この固定化酵素の再利用性は 10 回使用後で初期の 85.5%となった。

第 4 章では、前章の知見から TEOS 添加量を 5mL として作製したシリカ被覆磁性ナノ粒子を用いて、提案方法(2)に基づき、機能性磁性担体および固定化酵素の特性に及ぼすアミノシランの種類の影響を検討した。アミノシランには、前章で用いた APTES に加えて、3-(2-アミノエチルアミノプロピル)-トリエトキシシラン (AEAPTES) と、3-(2-アミノエチルアミノプロピル)-トリメトキシシラン (AEAPTMS) を用いた。TEM で観察した機能性磁性担体のモルフォロジーには、アミノシランの種類による変化が認められなかったが、表面ゼータ電位には違いが現れた。シリカ被覆磁性ナノ粒子の表面ゼータ電位は、どのシラン改質でも電荷がマイナスからプラスへと変化し、明らかな化学修飾効果を示した。また、その値は、AEAPTMS で最も高く (pH5.0 のとき 29mV)、順に APTES、AEAPTES となった。したがって、AEAPTMS で化学修飾した機能性磁性担体は、吸着能が最も高いといえる。一方、飽和磁化は AEAPTES で最も高い値を示したが (39emu/g)、吸着能が最も高い AEAPTMS でも 37emu/g と大きな差は認められなかった。これらの機能性磁性担体を用いて吸着法によりセルラーゼを固定化したときの固定量と相対活性を調べた結果、AEAPTMS で固定量 89mg/g と最も高い値を示し、活性も酵素単体の 87%と最大の値を示した。また、その固定化酵素の相対活性に及ぼす糖化反応における pH および温度の影響を調べた結果、AEAPTMS で最も耐性が高いことが明らかとなった。しかし、その再利用性を評価したところ、この固定化酵素の活性は 5 回使用後には作製時の 64%となり、共有結合法よりも大幅に低い値を示した。これは、吸着法により固定化されたセルラーゼは自由度が高いゆえに活性が高くなる一方で、CMC に吸着してしまい、担体から脱落してしまうことが原因と考えられる。

第 5 章では、提案方法(3)に基づき、モノマーである GMA、EDGMA、もしくは MATAc を磁性粒子に共重合することでポリマー被覆磁性粒子を作製し、これによりセルラーゼを吸着と共有結合の両方を主として固定した固定化酵素の特性を評価した。作製したポリマー被覆磁性粒子は、走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した結果、直径 2 μ m 程度と比較的大きなサイズであることがわかった。これは、複数の

磁性ナノ粒子をまとめてポリマーで取り囲む構造となるためと考えられる。また、そのポリマー量は39%を示し、飽和磁化は26emu/gと本研究において最も低い値となった。しかし、固定化酵素のセルラーゼ固定量は153mg/gと本研究で最大の値を示し、相対活性も酵素単体の73%と比較的高い値を維持した。その固定化酵素の相対活性は、セルラーゼ単体を含み、前章までで作製した固定化酵素の最適なpH値が5.0であったのに対し、4.0で最大の値を示した。これは、この固定化酵素の耐酸および耐アルカリ性が被覆したポリマーの耐性に強い影響を受けるためと考えられる。また、その再利用性は10回使用後も作製時の72%であった。

第6章では結論として、本研究で得られた知見について主に次のようにまとめた。

- (1) シリカ被覆は、磁性ナノ粒子の分散性を向上させる効果を示し、さらに化学修飾を容易にさせるため高いセルラーゼ固定量の固定化酵素を作製可能にすることがわかった。
- (2) 吸着法のみで作製した固定化酵素は、セルラーゼの制限が小さいために高い活性を示すが、脱落しやすいために共有結合法で固定化したものよりも再利用性が大幅に低くなることが明らかとなった。
- (3) ポリマー被覆磁性粒子は、機能性磁性担体として用いることが可能であったため、作製が最も容易なものであった。
- (4) ポリマー被覆磁性粒子は、主として共有結合法と吸着法の両方の原理を利用した固定化方法であったため、本研究で最も高いセルラーゼ固定量である153mg/gを示した。

以上の成果において、高い性能を有する回収および再利用可能な固定化酵素の開発を可能としたことから、実用化の障害となっている酵素糖化工程におけるコストの削減およびそれによるバイオエタノール製造の実用化に寄与できるものと思われる。今後、固定化酵素によるバイオマスの糖化に関する実用的な研究は更に詳細に検討する必要がある。

