

学位論文の要旨

氏名

村岡 仁

学位論文題目

糖質資源再生のための効率的糖化技術に関する研究

本論文は、セルロース系糖質資源としての非可食性の紙から、再生エネルギーとしてのバイオエタノールを製造する技術の確立をめざして、結晶セルロースからの化学的、生物化学的アプローチ両面による糖化处理技術の研究を行ったものである。特に、新規の磁性を持つイオン液体を開発してその糖化試験を行うとともに、カビのセルラーゼ由来のセルロース結合ドメインタンパク質を用いた非結晶化反応の効率化を試みた。本論文は、カーボンナノチューブによるセルラーゼ酵素触媒の効率化と合わせ、セルロース系糖質資源の糖化技術に対する新しい展開の可能性を示した。

第1章は、従来のセルロース系糖資源を基にしたバイオエタノール作製技術の方法と特徴、現時点での技術課題についてまとめた。これらの課題において、経済的な視点も踏まえ、セルロースの非結晶化技術の重要性を明らかにした。

第2章は、非結晶化ステップでの新しい技術の確立を目標に、セルロースの非結晶化を可能とする磁性イオン液体の開発とその有用性について検討、評価した。新規の磁性化イオン液体である1-carboxymethyl-3-methylimidazolium FeCl₄の合成を行い、そのセルロースに対する非結晶化活性を明らかにするとともに、実用化における問題点を考察した。

第3章は、酵素による糖化活性において、最も重要なコンポーネントであるセロビオヒドラーゼの一部であるセルロース結合ドメイン (CBM) の高機能化をフェージライブラリの手法を用いて試みた。即ち、CBMのセルロース結合部位にランダム変異を加えたCBMライブラリーの作製を行い、パンニングによる特異的クローンのスクリーニング手法の確立とクローンの単離を行った。

第4章は、さらに、CBMのセルロースの糖化における機能、有用性を検証するため、遺伝子組み換え技術により作製した種々のCBMの誘導体の添加の効果について、特に糖化効率の変化を指標に、検討を行った。CBM誘導体の添加のみでは、明確な効果がなかったものの、セルラーゼによる糖化過程において、添加による糖化速度の加速効果が見られたことから、CBM誘導体そのもののが、非結晶化過程に寄与していることが示された。

第5章は、酵素による糖化過程の改良を行うため、固定化セルラーゼによる糖化効率の上昇について検討した。具体的には、カーボンナノチューブ(CNT)基材に、セルロースの分解に必須の3種類のセルラーゼを疎水吸着した場合と、溶液中での反応の糖化効率を比較検討し、固定化しないセルラーゼに比べ、カーボンナノチューブ状で複合体化したセルラーゼの糖化活性の上昇を明らかにした。

第6章は、本論文のまとめを記載するとともに、非食系の紙を中心とするセルロース資源のエタノールへの再生エネルギー変換における、本研究の意義について総括した。

Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Study on Effective Cellulose Saccharification Technology for Glucose Resource Recycling

Name: Muraoka Jin

This thesis mainly comprises studies of saccharification methods by both chemical and biochemical approaches from microcrystalline cellulose in order to establish the technologies for producing bioethanol as renewal energy from paper as non-edible sugar resource. Especially, this paper developed methods for amorphous-ized reaction by a ionic liquid developed here and by addition of cellulose binding domain originated from a cellulase of fungi. From these results, this thesis proposed a possibility for new deployment of saccharification from cellulose resources, together with enhancement effect of cellulase enzyme catalyst by a carbon nanotube.

Chapter 1 summarized the methods of the conventional bioethanol production technology based on cellulose sugar resources and their features including the technical problems at present. In these subjects, the importance of amorphous-ized technology of cellulose for saccharification is clarified from economical viewpoint.

Chapter 2 evaluated the usefulness of a newly developed ionic liquid in amorphous-ized step of microcrystalline cellulose. While synthesizing a new compound of magnetic ionic liquid, 1-carboxymethyl-3-methylimidazolium FeCl_4 and estimating its effect on saccharification of cellulose, the advantages and problems in utilization were discussed.

Chapter 3 described the approach for the improvement of cellulose binding domain (CBM) which is an important component of cellulase by using the technique of a phage library. The CBM library in which random mutations were introduced on the cellulose binding surface of CBM was constructed, and the screening from the library was performed to isolate specific clones which showed the binding to cellulose.

In Chapter 4, to evaluate the functions and usefulness of CBM domain in saccharification of cellulose, the effect of addition of CBM derivatives which was generated by gene recombination technologies was examined by monitoring the saccharification activity. No clear effect only at addition of CBM derivatives was observed but the acceleration effect by its addition was seen in saccharification during cellulase-hydrolyzing process, indicating CBM derivative itself contribute to the amorphous-ized process of cellulose.

In Chapter 5, to improve saccharification process by cellulase enzyme, the immobilized celluloses was used for analysis. Three kinds of cellulase enzymes which are essential for saccharification of cellulose were fixed on a carbon nanotube (CNT) and the saccharification efficiency was compared with that of non-fixed (free) cellulase enzymes. The results demonstrated the enhancement of saccharification activity in the fixed enzymes on CNT and its mechanism was discussed.

Finally, Chapter 6 summarized the results of this research and mentioned about the significances in the renewal energy conversion to the ethanol of cellulose resources, indicating the conclusion of this thesis.