

[成果情報名]連続フィード培養によるリグノセルロース糖化酵素の効率的生産システム

[要約]誘発した突然変異株を用いて、可溶性糖質を連続的に添加しながらリグノセルロース糖化酵素の生産を行う技術（連続フィード培養）は、安価な原料からの酵素生産を安定的に行うことができ、酵素生産コストの低減が期待される。

[キーワード]リグノセルロース、糖化酵素（セルラーゼ）生産、バイオエタノール

[担当]食総研・食品素材科学研究領域・糖質素材ユニット

[代表連絡先]電話 029-838-7189

[区分]バイオマス

[分類]技術・参考

[背景・ねらい]

稲わらなどの原料を用いて 100 円/L 以下の低コストでバイオエタノールを製造するためには、リグノセルロース糖化酵素の生産コストを大幅に低減し、また、多様な原料や前処理法に適した糖化酵素カクテルを生産・供給していくことが必要である。そこで、エタノール変換プロセスに応じて生産酵素組成を調節可能な、効率的糖化酵素システムを開発する。

[成果の内容・特徴]

1. セルラーゼ高生産株 *Trichoderma reesei* ATCC66589 を親株とし、紫外線照射により誘発した変異株 M2-1 および変異株 M3-1 は、グルコースを唯一の炭素源とする培地でもセルラーゼを生産する（表 1）。
2. M2-1 および M3-1 を用い、セルロースを原料としてセルラーゼの大量生産を行った場合、原料あたりのセルラーゼ生産効率はそれぞれ 257 および 281 濾紙分解ユニット (FPU)/g-炭素源であり、親株(237 FPU/g-炭素源)と比較して、約 1~2 割高い。
3. 可溶性糖質であるグルコースとセロビオースの混合液を連続的に添加（混合比 6:1、添加速度約 45g/日）しながら、M2-1 を培養した場合、主要酵素活性は直線的に増加し、原料あたりのセルラーゼ生産効率およびセルラーゼ生産速度はそれぞれ 210 FPU/g-炭素源および 130 FPU/L/hr となる（図 1）。
4. グルコース、セロビオースの 2 種混合液（混合比 6:1）およびグルコース、キシロース、セロビオースの 3 種混合液（混合比 3:3:1）を用い、添加速度約 45g/日で M3-1 を培養した場合の生産酵素活性を比較すると、セルロース分解酵素活性はほぼ同等であるのに対し、ヘミセルロース分解活性は 3 種混合液を用いた場合が 2 倍以上高い（図 2）。

[成果の活用面・留意点]

1. 突然変異株 M2-1 および M3-1 を用いることで、通常株ではセルラーゼ生産を抑制するグルコース培地において糖化酵素の誘導が可能となる。また、これらの突然変異株を、可溶性炭素源を連続的に添加しながら培養することで、安定的かつ効率的な糖化酵素生産が可能となる。
2. 添加する可溶性炭素源の種類や混合比を変化させることで、生産される酵素群の組成を調節できる。ただし、生産される各酵素タンパク質の比率などをより厳密に調節するためには、添加液組成の他に、添加のタイミングや添加速度などの条件を検討し、厳密にコントロールする必要がある。

[具体的データ]

表1 異なるグルコース濃度のフラスコ培養における突然変異株のセルラーゼ生産性

菌株	親株			M2-1			M3-1		
グルコース (mg/ml)	20	50	100	20	50	100	20	50	100
タンパク質 (mg/ml)	0.20	0.21	0.27	0.59	0.67	0.74	0.97	0.64	0.44
活性* (mU/ml)	N.D.*	N.D.	N.D.	53	49	48	110	54	26

グルコースを炭素源とする培地 (100ml in 500ml フラスコ) に 10^7 個の胞子を植菌し、28℃、180rpm、5日間培養を行った。

* pNP-ラクトシド加水分解活性(CBHI 活性)、N.D.:検出限界以下

菌株: *Trichoderma reesei* M2-1

添加糖質(炭素源): グルコース+セロビオース(6:1)

炭素源添加速度: 約 45 g/day

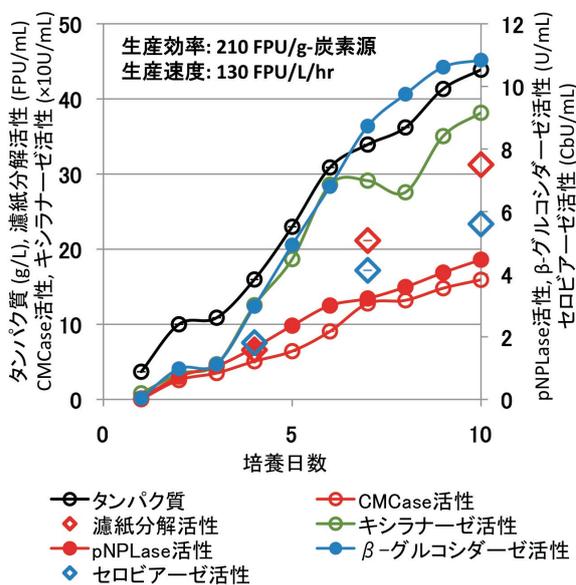


図1 可溶性基質 (グルコース+セロビオース) の連続添加によるセルラーゼ生産

菌株: *Trichoderma reesei* M3-1

添加糖質(炭素源): グルコース+セロビオース(6:1)

グルコース+キシロース+セロビオース(3:3:1)

炭素源添加速度: 約 45 g/day

培養日数: 7 days

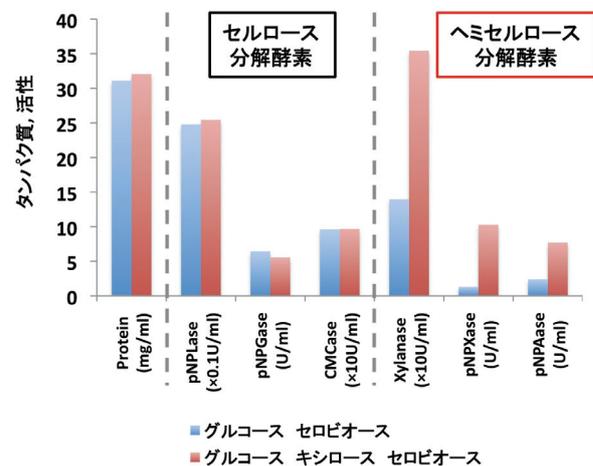


図2 連続添加基質の組成の違いが生産酵素組成へ与える影響

(池正和)

[その他]

研究課題名: 未利用バイオマス及び資源作物を原料とした低コスト・高効率バイオエタノール変換技術の開発

課題 ID: 224-b

予算区分: 委託プロ (バイオマス)

研究期間: 2007年度~2010年度

研究担当者: 池正和、徳安健

発表論文等: 池正和ら: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*(2010) 87, 2059-2066.