

## Ⅱ 多様なエタノール変換プロセスに対応可能な 糖化酵素生産基盤技術の開発

### 1. はじめに

地球上で最も豊富に存在する有機資源であるセルロース系バイオマスから製造されるバイオエタノールは、従来の化石燃料に代わるクリーンな燃料として注目されている。セルロース系バイオマス中には、多糖成分としてセルロースやヘミセルロースなどが含まれており、それぞれの含有量は植物種により異なるものの、一般的に25～45%及び20～50%程度であるとされる<sup>1)</sup>。セルロースはグルコースが $\beta$ -1,4-グリコシド結合した直鎖状のホモポリマーであり、セルロース鎖が分子内及び分子間で水素結合することで、強固な結晶構造を形成している。ヘミセルロースは、セルロースとペクチンを除いた植物細胞壁多糖成分の総称である。ヘミセルロースは分岐構造を有するヘテロ多糖であり、その構造や糖組成は植物種によって大きく異なる(図1)。植物細胞壁中のセルロース基本骨格は、ヘミセルロースや高分子フェノール性化合物であるリグニンなどと互いに絡み合った状態で存在している。

セルロース系バイオマスの糖化、すなわちセルロースやヘミセルロースなどの

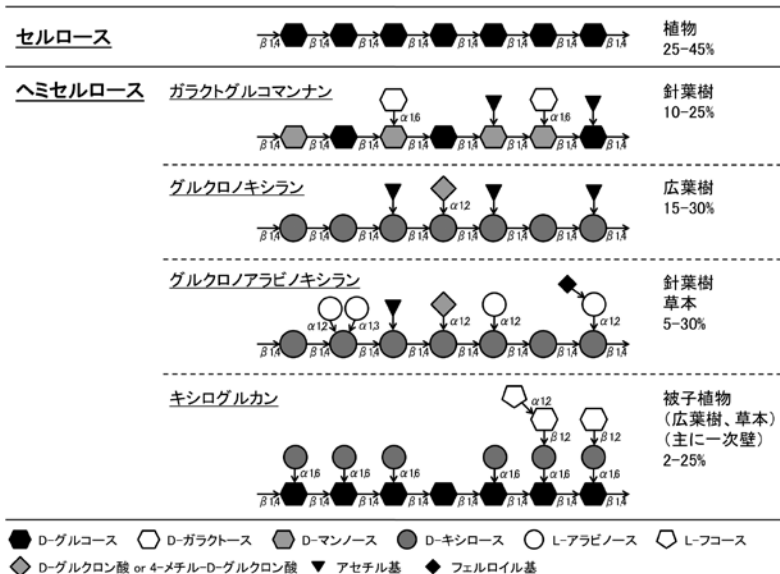


図1 セルロース・ヘミセルロースの構造、起源及び乾物あたりの含有量

植物細胞壁多糖成分から発酵性単糖を生産する工程は、バイオエタノール製造において非常に重要である。一般的にセルロース系バイオマスの糖化法として、硫酸などを用いる酸糖化法と、糖化酵素群を用いる酵素糖化法に大分される。このうち酵素糖化法は、比較的温和な条件（反応条件は糖化酵素に依存するが、一般的に30～50℃、pH 4～7程度）での糖化反応を行うことができ、過分解（生成した単糖がさらに分解され非発酵性の物質に変化すること）が起こらないため収率が高いなどのメリットがある。しかしながら、上述のように、植物細胞壁中のセルロース繊維は高度に結晶化しており、さらにヘミセルロースやリグニンなどの高分子化合物と絡み合った複雑な構造をとっているため、酵素による分解には、大量の酵素を長時間作用させる必要がある。このことが、酵素糖化に係るコストを引き上げており、セルロース系バイオマスからのバイオエタノール製造の実用化の際の大きな障壁となっている。我々の研究グループでは、酵素糖化工程に係るコストを低減するために、①「よく働く酵素を（糖化酵素群の高機能化）」、②「安く製造し（効率的生産技術開発）」、そして③「うまく利用する（効果的利用法の開発）」という3つの観点から総合的に技術開発を行っている。本稿では、セルロース系バイオマスの糖化酵素について解説すると共に、糖化酵素の効率的生産技術開発について紹介する。

## 2. セルロース系バイオマス分解酵素（表1）

セルラーゼはセルロース鎖の $\beta$ -1,4-グリコシド結合を加水分解する酵素の総称であり、以下の3つに大分される。

- (1) セロビオヒドロラーゼ（CBH；EC 3.2.1.91, EC 3.2.1.176）：結晶領域、非晶領域に関わらず、セルロース鎖の末端からセロビオース単位で切断していく酵素であり、非還元末端に作用するCBH（EC 3.2.1.91）と還元末端に作用するCBH（EC 3.2.1.176）とがある。
- (2) エンドグルカナナーゼ（EG；EC 3.2.1.4）：非晶領域セルロース鎖内部をランダムに切断する酵素であり、セロオリゴ糖、セロビオース、グルコースなどを生成する。結晶領域にはほとんど作用しない。
- (3)  $\beta$ -グルコシダーゼ（BGL；EC 3.2.1.21）：非還元末端の $\beta$ -グリコシド結合を切断する酵素であり、上記2種の酵素により生成したセロオリゴ糖やセロビオースを加水分解し、グルコースを生成する。

結晶性セルロース分解の際、これらの3者が相乗的に作用して分解が進行していくと推察されている。すなわち結晶性セルロース中に部分的に存在する非晶領域をEGが切断し、新たな末端を生じる。この末端にCBHが作用し、結晶性セルロース繊維表面を削っていき、セルロース繊維内部の非晶領域が表面に露出し、EGが作用する。このようにCBHとEGが互いの作用可能領域を作り出すことで、相乗効果が生じると考えられている（エンド-エキソ相乗効果モデル、

表1 セルロース, ヘミセルロース分解酵素の種類

酵素	セルロース、ヘミセルロース分解における作用様式	CAZy Families <sup>a</sup>	EC number		
セルラーゼ	Cellobiohydrolase	セルロース鎖の各末端に作用 主にセロビオースを生成	GH 5, 6, 7, 9, 48 EC 3.2.1.91 EC 3.2.1.176		
	$\beta$ -1,4-endoglucanase	非晶部セルロース鎖内部をランダムに切断 グルコース、セロビオース、セロオリゴ糖を生成	GH 5, 6, 7, 8, 9, 12, 44, 45, 48, 51, 74, 124	EC 3.2.1.4	
	$\beta$ -1,4-glucohydrolase	セロビオース、セロオリゴ糖の非還元末端に作用 グルコースを生成	GH 1, 3, 30, 116	EC 3.2.1.21	
	endo- $\beta$ -1,4-xylanase	キシラン主鎖内部をランダムに切断 主にキシロビオース、キシロオリゴ糖を生成	GH 5, 8, 10, 11, 43	EC 3.2.1.8	
	$\beta$ -1,4-endomannanase	ガラクトグルコマンナン等に作用 主鎖内部のマノース間の結合を切断	GH 5, 26, 113	EC 3.2.1.78	
	xyloglucan $\beta$ -1,4-endoglucanase	キシログルカン主鎖に作用 主鎖内部のグリコシド結合を切断	GH 5, 12, 16, 44, 74	EC 3.2.1.151	
	$\beta$ -1,4-xylosidase	キシロビオース、キシロオリゴ糖等に作用 非還元末端のキシロースを遊離	GH 3, 30, 39, 43, 52, 54, 120	EC 3.2.1.37	
	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase	グルクロン/アラビノキシラン等の側鎖に作用 非還元末端から $\alpha$ -Lアラビノフラーノースを遊離	GH 3, 43, 51, 54, 62	EC 3.2.1.55	
	ヘミセルラーゼ	$\beta$ -mannosidase	ガラクトグルコマンナン等の分解物オリゴ糖等に作用 非還元末端から $\beta$ -マンノースを遊離	GH 1, 2, 5	EC 3.2.1.25
		xylan $\alpha$ -1,2-glucuronidase	グルクロン/キシラン等の側鎖に作用 非還元末端からグルクロン酸を遊離	GH 67, 115	EC 3.2.1.131
$\alpha$ -galactosidase		ガラクトグルコマンナン等の側鎖に作用 非還元末端からガラクトースを遊離	GH 4, 27, 36, 57, 97, 110	EC 3.2.1.22	
$\beta$ -galactosidase		キシログルカン等の側鎖に作用 非還元末端からガラクトースを遊離	GH 1, 2, 35, 42	EC 3.2.1.23	
$\alpha$ -fucosidase		キシログルカン側鎖に作用 末端のL-フコースを遊離	GH 29, 95	EC 3.2.1.51	
$\alpha$ -xylosidase		キシログルカン側鎖、イノプリメベロースに作用 非還元末端から $\alpha$ -Dキシロースを遊離	GH 31	EC 3.2.1.177	
acetylsterase		種々の糖質中のアセチル基を切断	CE 16	EC 3.1.1.6	
acetylxylan esterase		キシラン側鎖中のアセチル基を切断	CE 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12	EC 3.1.1.72	
feruloyl esterase	フェルロイル基と糖質間のエステル結合を切断	CE 1	EC 3.1.1.73		

<sup>a</sup> CAZy - Carbohydrate-Active enZymes (<http://www.cazy.org/>).

GH: Glycoside Hydrolases, CE: Carbohydrate Esterases (19, Oct. 2012)

図2)。また、糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー 61 に属する酵素や Swollenin など、単独では活性を示さないものの、CBH や EG と相乗効果を示す成分の存在が明らかとなってきている<sup>2), 3)</sup>。尚、GH ファミリー 61 酵素は、以前は EG とされていたが、近年の研究で酸化還元酵素 (Cu-dependent polysaccharide monooxygenase) であることが明らかとなっている<sup>4), 5)</sup>。セルラーゼには、触媒活性を担う触媒ドメインに加えて、糖質吸着モジュールを持つものもある。糖質吸着モジュールが基質であるセルロースと相互作用することで、触媒ドメインがセルロース表面に接近するため、セルロース分解の効率化に寄与していると考えられている。ヘミセルラーゼはヘミセルロースを分解する酵素の総称である。図1に示したように、ヘミセルロースはヘテロ多糖であり、その構造は植物種によつ

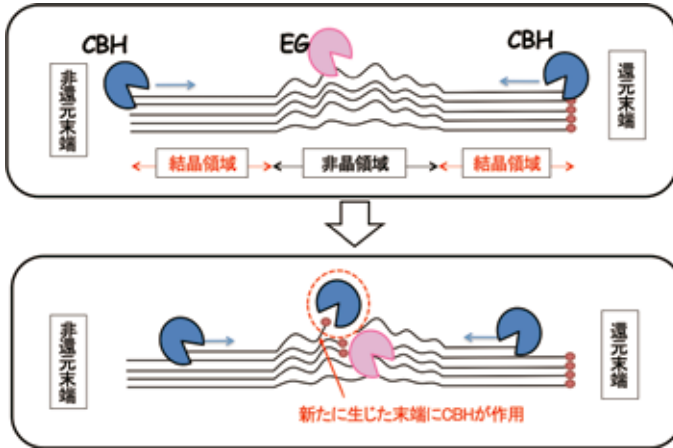


図2 CBHとEGの相乗作用によるセルロース分解モデル

大きく異なるため、多くの種類の酵素がヘミセルロース分解に関わる（表1）。ヘミセルラーゼには、図1に示したようなヘテロ多糖の主鎖を切断するエンド型酵素（エンドマンナーゼ（EC 3.2.1.78）、キシラーゼ（EC 3.2.1.8）、キシログルカンエンドグルカナーゼ（EC 3.2.1.151））と、それぞれの多糖の側鎖に作用するエキソ型酵素とがある。ヘミセルロースの完全分解には、種々のエンド型、エキソ型の酵素が必要となるが、その分解過程は非常に複雑である。これはヘミセルロースが分岐構造をとることや、分解に関わる酵素の基質認識の違いなどに起因する。例えば、グルクロノアラビノキシランの分解には、キシラーゼ、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ、 $\alpha$ -グルクロニダーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼ及び2種のエステラーゼが関わる。キシラーゼはキシラン主鎖をランダムに加水分解する酵素であるが、個々のキシラーゼの持つ基質特異性と基質側鎖の結合箇所との関係により、切断部位が制限される<sup>6)</sup>。また、キシラン側鎖のアラビノースを遊離する酵素である $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼには、2つのアラビノースが結合しているキシロース残基の $\alpha$ -1,3結合を特異的に切断するものや、1つのアラビノースが結合しているキシロース残基のみからアラビノースを遊離するものなどがある<sup>7)</sup>。 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼによりアラビノース側鎖が除去されることにより、キシラーゼが作用可能な部位を生み出し、分解が進行していく。このようにヘミセルロース分解には各々性質の異なる多数のエンド型、エキソ型の酵素が協奏的に作用し、複雑な過程を経て完全分解に至る。

セルロース系バイオマス原料において、セルロース繊維は、前述の通り強固な結晶構造を有しており、さらにヘミセルロースやリグニンに取り囲まれること

で、繊維構造が強化されているため、セルラーゼやヘミセルラーゼによる分解速度は極端に遅い。このため、通常、酵素糖化の際には、セルロース繊維の結晶性の低下、ヘミセルロースやリグニンの分解・解離などの効果をもたらす物理的・化学的処理（粉碎・前処理）を施した原料を用いる。粉碎・前処理を行うことで糖化酵素が作用し易くなるものの、糖化工程は（少なくとも初期段階では）不均一な固液界面での非効率な酵素糖化を行うこととなるため、それでも尚、その分解速度は遅い。また、疎水性が高く酵素と非特異的に結合しうるリグニンが混在するなど、酵素糖化の阻害要因も少なくない。このような中で、セルロース繊維の糖化を最大限に効率化するために、上述のようなセルロース系バイオマス分解に関わる多種類の糖化酵素について、個々の酵素の組み合わせや比率などを最適化する試みが世界中で行われている。この際、セルロース系バイオマス原料の植物種や粉碎・前処理の工程によって繊維中多糖の組成や構造が大きく異なるため、各々の変換プロセスに応じた糖化酵素の最適化を図ることが重要である。

### 3. セルロース系バイオマス分解酵素生産微生物

セルラーゼを中心とする植物細胞壁分解酵素を生産する微生物は、自然界に幅広く分布している。代表的なセルラーゼ生産微生物を表2に示す。これらの微生物が生産する酵素をセルロース系バイオマスの糖化反応に利用するために、強力な植物細胞壁分解能力をもつ微生物の選抜や個々の生産酵素の機能解析が

表2 代表的なセルラーゼ生産微生物

好気性細菌	好気性真菌
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	<i>Acremonium cellulolyticus</i>
<i>Cellulomonas fimi</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Aspergillus aculeatus</i>
<i>Streptomyces cellulolyticus</i>	<i>Humicola grisea</i>
<i>Thermobifida fusca</i>	<i>Irpex lacteus</i>
<i>Thielavia terrestris</i>	<i>Penicillium decumbens</i>
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
	<i>Trichoderma reesei</i>
嫌気性細菌	嫌気性真菌
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	<i>Anaeromyces mucronatus</i> 543
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	<i>Neocallimastix frontalis</i>
<i>Clostridium cellulovorans</i>	<i>Orpinomyces</i> sp.
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>Piromyces</i> sp.
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	
<i>Ruminococcus albus</i>	
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	

古くから行われてきた。生産酵素群の植物細胞壁分解能力やそれらの生産性などの点から、*Trichoderma* 属、*Acremonium* 属、*Aspergillus* 属等の糸状菌類や *Clostridium* 属等の嫌気性細菌が研究対象として注目を集めてきた。いずれも、前項で述べたような植物細胞壁多糖成分の完全分解に必要な一連の酵素群を生産する。糸状菌類は一連の酵素群を大量に分泌生産することで知られており、すなわち酵素生産の面で大きなメリットを持つ一方、近年、分解速度の遅さや非生産的吸着（触媒作用を示さない部位に吸着すること）による作用効率の低さなどの問題点が明らかとなってきた。一方、嫌気性細菌である *Clostridium* 属は、セルロソームと呼ばれる巨大酵素複合体を細胞表層に生産し、極めて効率的にバイオマス分解を行う。セルロソームは、細胞表層に発現したセルロソーム骨格タンパク質に、数十もの酵素（多くの酵素の分子量は2万～10万程度）が配置・結合された酵素複合体であり、その総分子量は200～400万程度となる。多数の分解酵素が近傍に位置し、それぞれが協調的に作用することで効率的に分解を行うと推察されている。セルロソームの持つセルロース繊維分解能力は糸状菌由来酵素と比較して高く、高温での糖化も可能であるなどメリットも多い一方で、酵素生産量が低いという問題点がある。両者のセルロース繊維分解機構は大きく異なっており、それぞれの利点を活かした酵素糖化系の研究開発が世界各国で進められている。

#### 4. 微生物セルラーゼ生産技術の開発と効率化

##### 4.1. *Trichoderma reesei* を用いた糖化酵素生産技術開発戦略

セルロース系バイオマスの酵素糖化に係るコストを軽減するために、安価で効率的な酵素生産系の構築が重要な課題の一つである。前項で述べたように、セルラーゼを中心とする植物細胞壁分解酵素を生産する微生物は自然界に幅広く分布している。その中で、*Trichoderma* 属や *Acremonium* 属などの糸状菌類は大量の糖化酵素を菌体外に生産することが知られており、工業的にも酵素生産効率の面で大きなメリットを持つ。特に糸状菌 *T. reesei* はセルラーゼ生産菌として古くから研究されており、世界中の多くの研究室でセルラーゼ生産向上株が取得されてきている。本菌のセルラーゼ生産能力は非常に高く、セルロースを炭素源として培養を行うと、数十 g/L のタンパク質を菌体外に分泌し、そのほとんどがセルロース分解に関わる酵素である。また、野生株 *T. reesei* QM6a 株のゲノム配列解析が既に終了しており<sup>8),9)</sup>、表3に示すようなセルロース系バイオマス分解に必要な一連の酵素遺伝子群を有していることが明らかとなっている<sup>10)</sup>。

*T. reesei* セルラーゼの大量生産のための炭素源として、微結晶性セルロースやセルロース系バイオマス前処理物等の固形分が用いられることが多い。この際、セルロース系バイオマス糖化酵素の多くは、不溶性セルロースに吸着する性質を有するため、生産酵素の一部が培地中に残存する固形分に吸着し、酵素回収



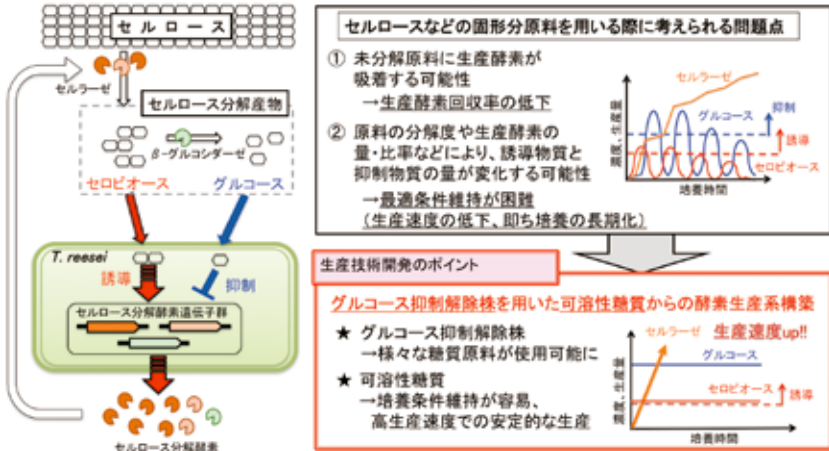


図3 *Trichoderma reesei* セルラーゼ酵素生産技術高度化戦略

化酵素の安定生産技術も併せて開発していく必要がある。以上のことから、*T. reesei* 糖化酵素生産技術開発を行うに当たり、可溶性糖質を原料とし、多様な変換プロセスに対応可能な糖化酵素の高効率生産系の構築を目指すこととした。

#### 4.2. *Trichoderma reesei* グルコース抑制解除株の取得

これまでに取得されている *T. reesei* セルラーゼ高生産変異株の多くは、グルコースなどの抑制物質がなく、かつセルラーゼ誘導物質が存在する条件下でのセルラーゼ生産力が強化されたものである。そこで、現在公に入手可能で、最もセルラーゼ生産能力の高い変異株の一つである *T. reesei* ATCC66589 株を親株とした変異導入により、酵素生産の抑制物質であるグルコース存在下でもセルラーゼを生産する変異株の取得を試みた。*T. reesei* ATCC66589 の UV 照射株 (生存率約 2~3%) のおよそ 25,000 株について、10%グルコースおよびリン酸膨潤セルロース (PSC) を含むプレート上でのスクリーニングを行い、培養中に PSC を分解することで生じるハローを形成する計 78 株の変異株を取得した。図 4 に示すようにこれらの変異株のいくつかは誘導物質の有無にかかわらず、10%グルコース存在下でも明らかなハローを示した一方で、親株ではハローは見られなかった。このことは、取得した変異株のいくつかは、グルコース存在下でも充分量のセルラーゼを生産することを示している。

グルコース及びセルラーゼの誘導物質である L-ソルボースを用い、取得した変異株のセルラーゼ活性を評価した結果を表 4 に示す。L-ソルボースのみで培養した際には、親株を含めたすべてでセルラーゼ活性が認められた。一方で、グ



ルコースを唯一の炭素源とした場合には、M2-1, M3-1, M4-2 及び M8-1 株の4種において有意なセルラーゼ活性が検出され、特に、M2-1 及び M3-1 では誘導物質 L-ソルボースの共存下で特に高いセルラーゼ活性を示した。グルコース存在下でのセルラーゼ生産量が多いこと、及び誘導物質存在下におけるセルラーゼ生産能の点から、M2-1, M3-1 の2つの変異株が糖化酵素生産株として、より適していると考えられる。

#### 4.3. 変異株 M2-1 及び M3-1 の酵素生産特性

前項で取得した変異株 (M2-1 株及び M3-1 株) を用いた酵素生産系を構築するに当たり、まず変異株の酵素生産特性について評価した。M2-1 株及び M3-1 株は、唯一の炭素源としてグルコースを用いた場合でもセルラーゼを生産する一方で、グルコース濃度とセルラーゼ生産性との関係において、両者で異なる特性を有することが明らかとなった。図5に示すように、M2-1 株では初期グルコース濃度が 100 mg/mL まで増加しても、セルラーゼ生産量はほぼ一定であったのに対し、M3-1 株ではグルコース濃度が高くなるにつれて、セルラーゼ生産量が低下した。また、グルコース消費量に関しては、M2-1 株は親株とほぼ同等



図4 取得した変異株 (一部) のハロー形成及び顕微鏡写真

表4 変異体 (一部) のグルコース、誘導物質存在下におけるセルラーゼ生産性

	ATCC 66589	M2-1	M3-1	M4-2	M5-1	M7-3	M8-1
Glc	-	+	++	++	-	-	+
Glc+Sor	-	+++++	++++	++	+	+	+++
Sor	++++	+++++	++++	++++	++++	+++	+++

0.4 mLの培地に各変異株胞子を約 $10^4$ 個接種し、28°Cで7日間培養  
CBH I及びEG IIに対する基質である

-nitrophenyl  $\beta$ -D-lactopyranoside)に対する分解活性で評価

Glc: 50 mg/mL グルコース, Sor: 2 mg/mL L-ソルボース (誘導物質)

-: 未検出, +: <7 mU/mL, ++: 7-26 mU/mL, +++: 26-84 mU/mL, ++++: 84-142 mU/mL, +++++: >142 mU/mL

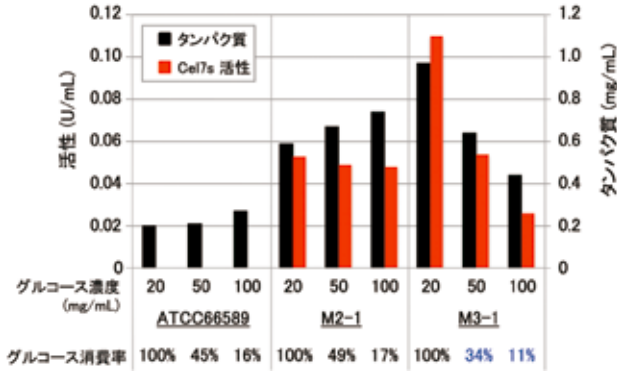


図5 初期グルコース濃度がセルラーゼ生産へ与える影響

各濃度のグルコースを炭素源とする培地 100mL (500mL フラスコ) に孢子 107 個を植菌し、28℃、180rpm で 5 日間培養を行った。セルラーゼ活性は、*Trichoderma reesei* が生産する主要なセルラーゼであるセロビオヒドロラーゼ I (CBH I) 及びエンドグルカナーゼ I (EG I) に対する活性 (Cel7s 活性) で評価。

であった一方で、M3-1 株では低下していた。両変異株共に「グルコースの存在下でもセルラーゼを生産する」という表現型を持つが、グルコース濃度に対する感受性が異なるという点は非常に興味深く、現在解析を進めている。誘導物質であるセルロースやセロビオース存在下におけるセルラーゼ生産性に関して、親株である *T. reesei* ATCC66589 株は、誘導物質が存在していても、一定濃度以上のグルコース存在下では少量のセルラーゼしか生産しない。これに対し、変異株 M2-1 株及び M3-1 株はグルコースの有無に関わらず、誘導物質存在下では高いセルラーゼ生産性を示した<sup>11)</sup>。また、安価原料からの酵素生産を想定し、グルコースに加え、①セロビオース、キシロース、アラビノース、②澱粉、③ショ糖を炭素源とした際の酵素生産特性の評価結果を図6に示す<sup>12)</sup>。①はバイオマス原料の前処理工程や糖化工程より回収可能であり、②や③は比較的安価に入手できる糖源である。全てのケースにおいて、変異株は、親株と比べて高いセルラーゼ生産性を示した。糖源としてのキシロースやアラビノースの存在は、セルラーゼ生産性に大きな影響を与えることなく、キシラン分解酵素活性を増大させた。また、澱粉やショ糖を原料とした際、予め分解酵素で処理することで、高いセルラーゼ生産性を得ることができた。特に、ショ糖と原料とする場合には、*T. reesei* がインバルターゼ (ショ糖を分解し、グルコース及びフルクトースを生成する酵素) 遺伝子を持たないため、予備分解が必須であると考えられる。尚、変異株 M3-1 に関しても、生産活性量に関して多少の違いがあるものの、M2-1 と同様な傾向を示した。

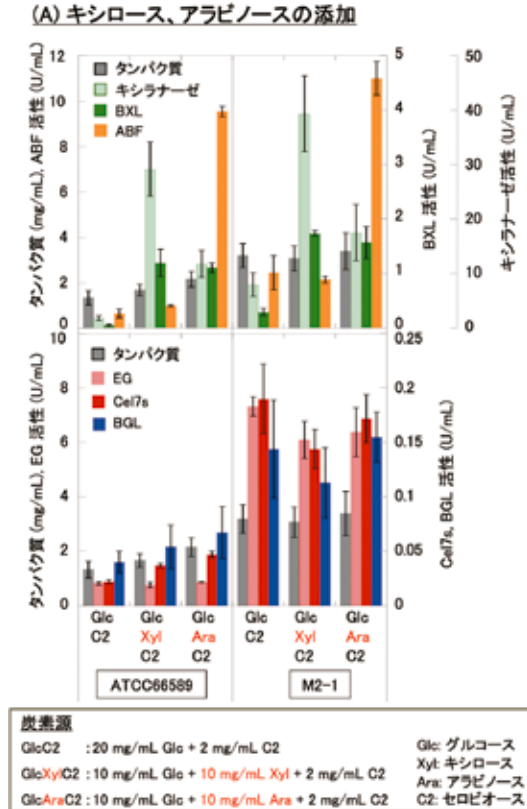


図6 種々の炭素源でのバッチ培養における生産酵素活性

グルコース培地での前培養液 100ml を、各炭素源を含む培地 1.1L (2L-fermenter) に添加し、28℃、300rpm、pH 4.0-4.2、通気量 1vvm で 4 日間培養

(A) グルコース、セロビオースへのキシロース、アラビノース添加

(B) 澱粉系原料の使用、(C) ショ糖の使用、

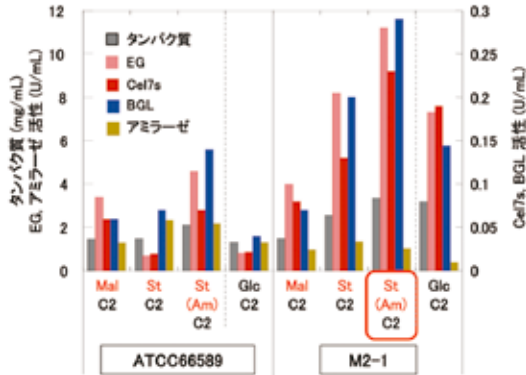
菌株： *Trichoderma reesei* ATCC66589 及び M2-1

Cel7s：セロビオヒドロラーゼ I + エンドグルカナーゼ I、EG：エンドグルカナーゼ、BGL：β-グルコシダーゼ、BXL：β-キシロシダーゼ、ABF：α-L-アラビノフラノシダーゼ

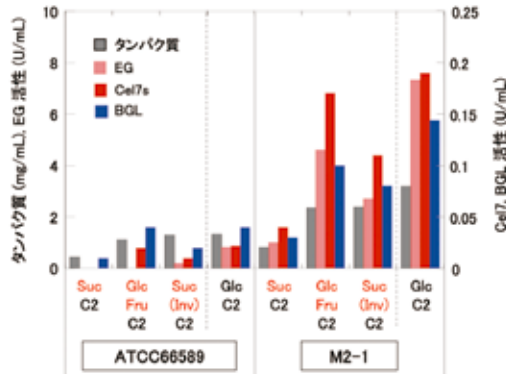
#### 4.4. 可溶性糖源連続フィード培養による効率的セルラーゼ生産

先に述べたように、不溶性セルロース等を酵素生産原料とした場合、残存原料への吸着による生産酵素回収率の低下や最適生産条件の維持が困難などの問題が生じる可能性がある。そこで、グルコース存在下においてもセルラーゼを生産す

(B) 澱粉系原料



(C) ショ糖系原料



炭素源	
GlcC2	: 20 mg/mL Glc + 2 mg/mL C2
MalC2	: 20 mg/mL Mal + 2 mg/mL C2
StC2	: 20 mg/mL St + 2 mg/mL C2
St(Am)C2	: 20 mg/mL St(Am)* + 2 mg/mL C2 *アミラーゼで部分分解した可溶性澱粉
SucC2	: 20 mg/mL Suc + 2 mg/mL C2
GlcFruC2	: 10 mg/mL Glc + 10 mg/mL Fru + 2 mg/mL C2
Suc(Inv)C2	: 20 mg/mL Suc(Inv)* + 2 mg/mL C2 *インベルターゼで分解したショ糖

Glc: グルコース	Mal: マルトース
St: 可溶性澱粉	Fru: フルクトース
Suc: スクロース	C2: セロピオース

図6 種々の炭素源でのバッチ培養における生産酵素活性 (つづき)

る *T. reesei* 変異株を用いて、可溶性炭素源を用いた酵素生産系の構築を試みた。主要炭素源としてグルコース、誘導物質としてセロピオースを用い、原料供給様式を検討したところ、上記2種糖質を連続的に添加しつつ培養(連続フィード培

養)を行うことで、安定的かつ効率的な酵素生産が可能となった<sup>1)</sup>。本培養に使用した装置等の写真を図7に示す。原料糖質の混合液を重量管理用天秤にセットし、ポンプを用いて一定速度で培養槽内に添加していく。図8に、*T. reesei* M2-1株を生産菌株としたセルロースバッチ培養及びグルコースを主要炭素源と



図7 連続フィード培養装置

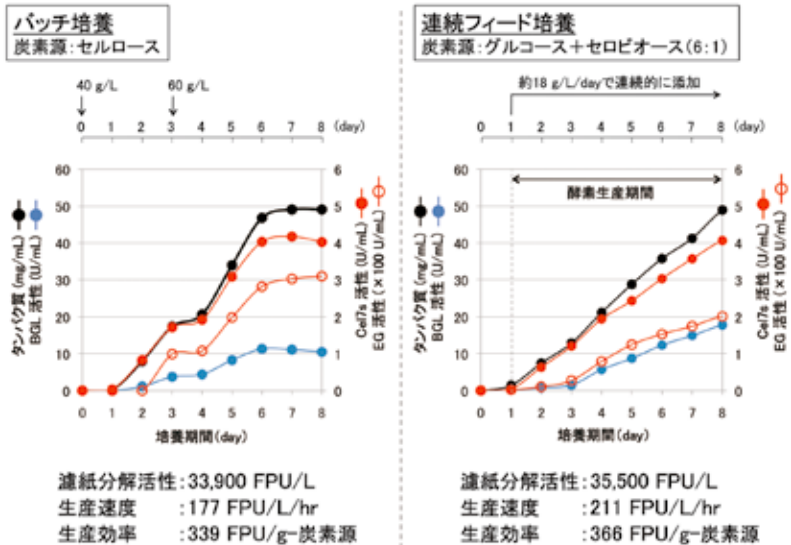


図8 バッチ培養及び連続フィード培養によるセルロース分解酵素生産

(左) セルロースでのバッチ培養。セルロースは2回に分けて添加

(右) グルコース、セロビオース混合液を用いた連続フィード培養

菌株: *Trichoderma reesei* M2-1株

Cel7s: セロビオヒドロラーゼI + エンドグルカナーゼI, EG: エンドグルカナーゼ, BGL:  $\beta$ -グルコシダーゼ

した連続フィード培養による酵素生産試験の結果について示す。連続フィード培養では、原料の連続供給開始（1日目）以降、培養液中のタンパク質濃度及びセルロース分解酵素活性が直線的に増加し、1週間の酵素生産期間で約50 g/Lのタンパク質及び35,500 FPU（濾紙分解活性単位）/Lのセルラーゼが生産された。この間のセルラーゼ生産速度及び投入炭素源あたりの生産効率は、それぞれ211 FPU/L/hr, 366 FPU/g 炭素源であり、セルロースバッチ培養での結果と比較して高い値であった。一方で、セルロースバッチ培養では、セルロース投入直後（3日目と4日目の間）や6日目以降のセルラーゼ活性増加が鈍いなど、生産速度が不安定であった。この原因としては、基質投入ストレスによる生産速度の一時的な低下、基質への酵素吸着、基質分解速度低下による炭素源や誘導物質濃度の低下などが挙げられる。可溶性炭素源を用いた連続フィード培養では、これらのような酵素生産速度の低下要因が軽減されるため、直線的な活性増加、即ち安定した酵素生産速度が得られたものと考えられる。また、可溶性物質を供給原料とすることで、培養の連続化、原料の滅菌工程簡略化、培養条件の維持制御が容易になる等のメリットが考えられる。

図8に例示したように、*T. reesei* 変異株 (M2-1) の連続フィード培養において、グルコースを酵素生産の主要原料としながらも、セルロースバッチ培養以上の効率で、かつ安定したセルラーゼ生産が達成された。供給量や培養条件などに多少左右されるものの、連続フィード培養系で、タンパク質濃度90 g/L程度（所要期間2週間程度）までは安定した生産性を示すことを確認している。炭素源供給量などの諸条件の最適化による生産効率や生産速度の更なる向上が今後の課題である。

#### 4.5. 可溶性糖源連続フィード培養による糖化酵素組成改変技術

バイオマス原料の種類や前処理法により、効率的な糖化反応に必要な酵素群は異なってくる。例えば、CaCCO法（本書「国産草本系原料を用いた4種類のバイオエタノール製造プロセス開発」, p. 21 参照）のような希アルカリ処理バイオマスなどでは、ヘミセルロースも前処理物に多く残存する一方で、希硫酸処理バイオマスなどでは、固形分中の糖質の大部分がセルロースとなる。酵素糖化効率向上のためには、バイオマス基質の構造や変換プロセスの特徴に応じて酵素のラインアップを調整し、不要な酵素の生産を抑制するとともに、酵素カクテルとして組成を最適化する必要がある。従って、バイオマス糖化酵素の培養生産において、効率的生産（即ち「量」）と同時に、原料特性に応じた酵素組成（即ち「質」）の制御も重要となる。そこで、異なる原料・前処理法に応じた糖化酵素を効率的に生産するため、生産酵素組成の改変・調節システムを構築した。このシステムは、グルコース等の可溶性糖質混合液を酵素生産原料とした連続フィード培養法による酵素生産系であり、糖質混合液の組成と供給量等の添加様式を調節するこ

とで生産酵素群(酵素カクテル)の組成を制御することが可能となる<sup>13)</sup>。例えば、グルコース+セロビオース(A)、グルコース+キシロース+セロビオース(B)、グルコース+キシロース+アラビノース+セロビオース(C)の3種類の糖質混合液を用い、各々を連続供給しつつ、変異株 M2-1 を培養した場合、セルロース分解酵素活性はほぼ同等となる一方で、キシロースやアラビノースを含む混合液(B)や(C)で生産された酵素カクテルのヘミセルロース分解活性は、混合液(A)と比較して2倍以上高く、特に混合液(C)ではABF活性が5倍以上高かった(図9)。また、図10に示すように、混合液(A)及び(B)を用いて、キシロースの添加期間を変えて連続フィード培養を行うことで、最終生産酵素液中のキシラナーゼ及びBXL活性の量を調節することができた。高いヘミセルロース分解酵素活性を含むセルラーゼ製剤は、水酸化カルシウム前処理稲わらの糖化反応において、高い単糖遊離活性を有したことから(図11)、ヘミセルロースを多く含むバイオマス基質の糖化に有用であると考えられる。以上のように、グルコース、セロビオースを基本とし、キシロースやアラビノースの供給量を適切にコン

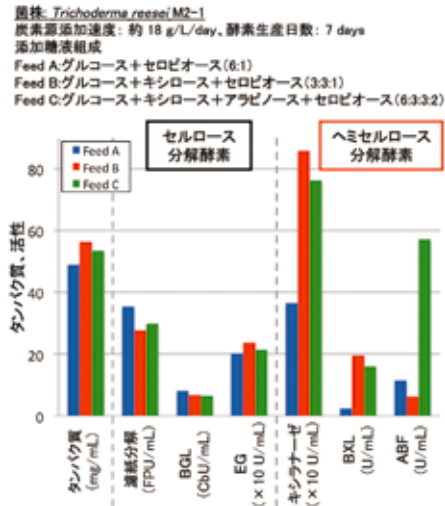


図9 3種の糖質混合液を用いた連続フィード培養により生産された酵素活性

EG: エンドグルカナーゼ, BGL:  $\beta$ -グルコシダーゼ, BXL:  $\beta$ -キシロシダーゼ, ABF:  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ

Feed BやFeed Cの条件で生産された酵素液中のセルロース分解酵素活性はFeed Aとほぼ同等であるのに対し、ヘミセルロース分解酵素活性はFeed Aのものよりも高い。

菌株: *Trichoderma reesei* M2-1

炭素源添加速度: 約 15 g/L/day、酵素生産日数: 7 days

添加様式 (A): グルコース+セロビオース (6:1)

(B): 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)

(C): グルコース+キシロース+セロビオース (3:3:1)

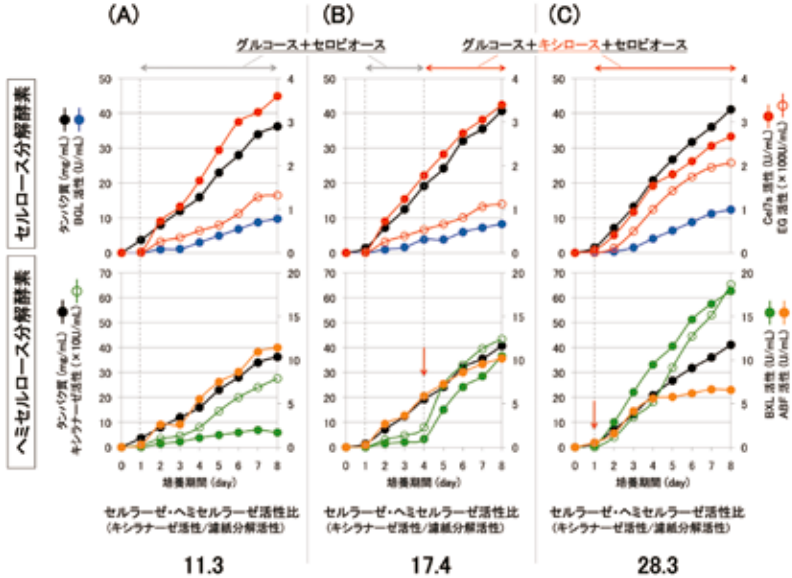


図 10 ヘミセルラーゼ活性量を調節したセルラーゼ生産

Cel7s: セロビオヒドロラーゼ I + エンドグルカナーゼ I, EG: エンドグルカナーゼ, BGL:  $\beta$ -グルコシダーゼ, BXL:  $\beta$ -キシロシダーゼ, ABF:  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ

供給糖液にキシロースが加わると (↓) キシラナーゼ及び BXL 活性の生産速度が増大。キシロース供給期間を調節することで、最終産物中のキシラン分解酵素活性量の調節が可能。

水酸化カルシウム処理稲わら

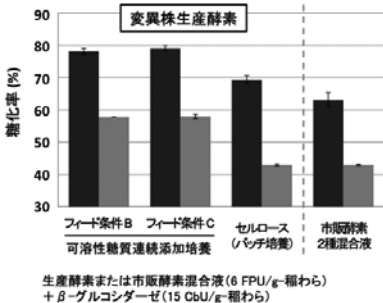


図 11 各生産酵素のアルカリ前処理原料に対する糖化試験

オンサイト酵素 (図9の Feed B 及び Feed C, 図8のセルロースバッチ培養) または市販酵素混合液 (セルラーゼ製剤+グルカナーゼ・ヘミセルラーゼ製剤) を用いて,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  処理稲わらを糖化 (50°C, 24 時間)。

■: グルカン糖化率, ■: キシラン糖化率。

生産酵素または市販酵素混合液 (6 FPU/g-稲わら) +  $\beta$ -グルコシダーゼ (15 CbU/g-稲わら)



トロールしながら *T. reesei* 変異株を培養することで、高いセルラーゼ生産性を維持しつつ、ヘミセルラーゼ活性量の異なる種々の酵素カクテルを生産することが可能となった (表5)。

これまでに構築した酵素生産プロセスである「可溶性炭素源連続フィード培養法」の概略を図12に示す。本プロセスは、*T. reesei* グルコース抑制解除株を用いて、グルコース等の可溶性糖質混合液を連続的に添加しつつ酵素生産培養を行

表5 可溶性炭素源連続フィード培養により生産した酵素の活性組成比較  
(*Trichoderma reesei* M2-1 株；濾紙分解活性10単位あたり)

炭素源 <sup>*1</sup> 、添加量 (g/L/day)	生産 日数	濾紙分解 (FPU)	BGL <sup>*3</sup> (CbU)	EG <sup>*3</sup> (U)	キシラナーゼ (U)	BXL <sup>*3</sup> (U)	ABF <sup>*3</sup> (U)	
Cellulose	-	8	10	2.4	56	120	0.74	2.4
GC2	15	7	10	2.0	54	110	0.69	4.7
GC2	18	7	10	2.3	57	100	0.66	3.2
GC2→GXC2	15	7	10	1.7	45	170	4.2	4.1
GXC2	15	7	10	2.8	90	280	7.8	2.9
GXC2	18	7	10	2.4	86	310	7.0	2.3
GXAC2	18	7	10	2.2	72	260	5.4	19
糖化液 <sup>*2</sup>	7.3	5.5	10	1.4	95	190	7.5	18

<sup>\*1</sup> G: グルコース, X: キシロース, A: アラビノース, C2: セロビオース

(GC2) G:C2 = 6:1; (GXC2) G:X:C2 = 3:3:1; (GXAC2) G:X:A:C2 = 6:3:3:2

<sup>\*2</sup> 水酸化カルシウム処理稲わらをGXC2酵素で処理した糖化液上清(G:X:C2=10:5:1)

<sup>\*3</sup> EG: エンドグルカナーゼ, BGL:  $\beta$ -グルコシダーゼ, BXL:  $\beta$ -キシロシダーゼ,

ABF:  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ

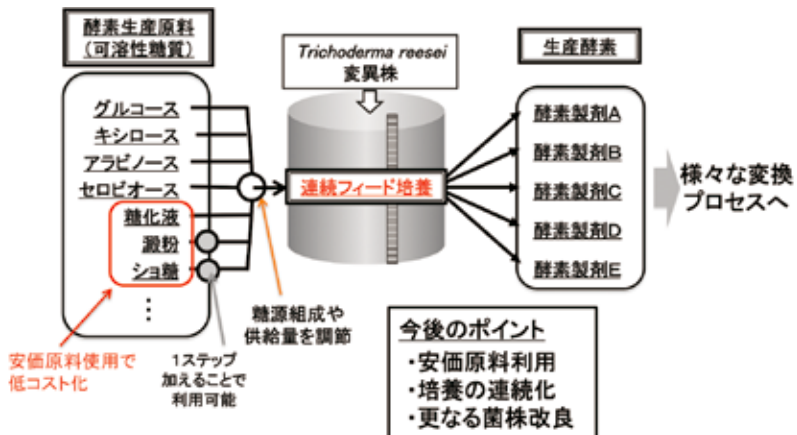


図12 可溶性炭素源連続フィード培養法による酵素生産概略

うものである。この際、供給糖源の組成や供給量を制御することで、生産酵素の組成を改変・調節することができるため、多様な原料や前処理法に応じた糖化酵素カクテルの生産が可能となる。酵素生産原料としては、セルロース系バイオマス糖化物の利用も可能と考えられる。夾雑成分が生産酵素の品質や生産量に及ぼす効果をより詳細に検証する必要があるものの、実際にアルカリ前処理稲わらの糖化液（図9Feed Bの条件で生産した酵素液を使用）の上清部を供給糖源とした場合でも、高効率での酵素生産が可能であることを確認している（未投稿、生産酵素組成は表5）。この時の投入炭素源あたりのセルラーゼ生産効率は、320 FPU/g 炭素源であり、セルロースバッチ培養での効率(335 FPU/g 炭素源)に匹敵した。さらに、変異株 M2-1 や M3-1 は、予め酵素分解を行うことで澱粉やショ糖なども使用可能であることが明らかとなっている(4.3参照)。セルロース系バイオマス糖化物や澱粉水解物等の低コスト・低純度の糖液を連続フィード培養の供給糖源として使用可能となれば、酵素生産原料コストの大幅な低減が期待できる。これと併せ、培養の連続化による生産コスト低減や、更なる菌株改良などによる高性能糖化酵素カクテルの高効率生産などが今後のポイントとなり、現在、研究開発を進めている。

## 5. おわりに

本稿では、糸状菌 *Trichoderma reesei* を用いたセルロース系バイオマス糖化酵素の生産技術開発について紹介してきた。セルロース系バイオマスからのエタノール製造に必要となる糖化酵素のコストを低減するため、糸状菌由来のセルラーゼを中心とした高機能型の酵素製剤が、世界中の企業により次々と製品化されてきている。これに対し、バイオエタノール製造プラント近くで酵素生産を行う、オンサイト酵素生産技術については、対応する原料に応じた酵素組成や、酵素の輸送・貯蔵などの点で、市販酵素と比較してメリットがあると考えられる。このような中で、我々は、*Trichoderma reesei* 変異株を用いた可溶性炭素源連続フィード培養による効率的酵素生産基盤技術を開発した。本技術は、可溶性原料の組成・添加量等の添加様式をコントロールすることで、高い酵素生産速度を維持しつつ、酵素組成の制御を行うものであり、多様な基質特性または変換プロセス特性に対応した酵素カクテルの組成制御が可能となる。また、本法による糖化酵素の長期連続生産が可能となれば、酵素生産設備費や運転に係るコスト等が低減し、酵素製造費用の大幅低減に繋がるものと期待される。さらに、可溶性原料として糖化液や澱粉水解物なども使用可能であることも確認しており、各地域で入手しやすい原料を用いるなど、地域特性に合わせた酵素生産様式にフレキシブルに対応が可能であるものと考えられる（図13）。現在、更なる生産性向上に向け変異株や培養技術の高度化を図ると共に、遺伝子発現やタンパク質発現の面から、効率的な酵素生産に繋がる情報の収集・整理を進めている。また、バイオ

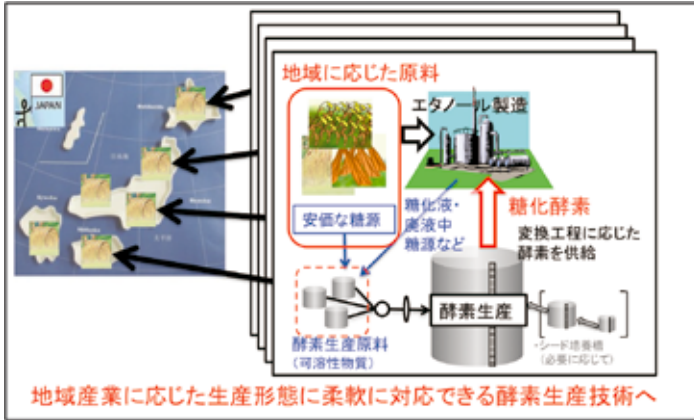


図 13 オンサイト酵素生産実用化のイメージ

エタノール製造の実用化に向け、酵素糖化に係るコストの低減が極めて重要な課題となっており、本稿で述べた酵素生産技術の効率化と併せて、糖化酵素の高機能化や使用酵素量の低減技術についても研究開発を進めていきたい。

尚、本研究は農林水産省委託研究プロジェクト「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発」により実施されたものである。

(食品素材科学研究領域 糖質素材ユニット 池 正和)

#### 参考文献等

- 1) Saha BC, Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 279-291 (2003)
- 2) Vaaje-Kolstad G et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science* **330**, 219-222 (2010)
- 3) Merino ST and Cherry J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* **108**, 95-120 (2007)
- 4) Saloheimo M et al. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur. J. Biochem.* **269**, 4202-4211 (2002)
- 5) Quinlan RJ et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 15079-15084 (2011)
- 6) 前原智子, 金子哲, ヘミセルロースの構造と分解酵素 - キシラン分解酵素

を例としたヘミセルロースの分解機構について - 応用糖質科学 **2**, 165-168 (2012)

- 7) Sørensen HR et al., A novel GH43 *a*-L-arabinofuranosidase from *Humicola insolens*: mode of action and synergy with GH51 *a*-L-arabinofuranosidases on wheat arabinoxylan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 850-861 (2006)
- 8) Martinez D et al., Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*), *Nature Biotechnol.* **26**, 553-560 (2008)
- 9) <http://genome.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html>
- 10) Kubicek CP et al., Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol.* **12**, R40 (2011)
- 11) Ike M. et al. Cellulase production on glucose-based media by the UV-irradiated mutants of *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 2059-2066 (2010)
- 12) 池正和ら, 様々な可溶性糖質を主要炭素源とした *Trichoderma reesei* セルラーゼ生産システムの構築, 日本応用糖質学会 応用糖質科学 **1**, 54 (2011)
- 13) Ike M. et al. Controlled preparation of cellulases with xylanolytic enzymes from *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) by continuous-feed cultivation using soluble sugars. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 161-166 (2013)