

セロオリゴ糖生産を目的とする酵素糖化反応において 反応系のスケールアップが酵素反応に与える影響調査

長岡技術科学大学大学院 (学) ○武笠 巨典
長岡技術科学大学 志田洋介, 小笠原渉, (正) 幡本将史, (正) 山口隆司

1. はじめに

セルロース系バイオマス資源の有効利用技術として、酵素糖化法による糖類の生産が近年注目されている。酵素糖化法はセルラーゼと呼ばれる酵素を用いてセルロースを分解し、糖を生成する手法である。代表的な生成物は単糖であるグルコースと二糖のセロビオース、三糖のセロトリオース等のセロオリゴ糖である。セロオリゴ糖は生体内に糖として吸収されないという特性¹⁾から、健康食品や医薬品としての産業利用が期待されている。しかし、生産技術が確立されていないことから、市場では実験用試薬として販売されるのに留まっており、市販価格も高価なのが現状である。

そこで我々は、セルロース系バイオマスの酵素糖化法による安価なセロオリゴ糖生産技術に着目した。酵素糖化法で用いるセルラーゼは様々な微生物により生産されている²⁾。その中でも、糸状菌 *Trichoderma reesei* は多種のセルラーゼ成分を多量に分泌するため、安価にセルラーゼを生産する菌として注目されている。*T. reesei* が分泌する酵素として、セルロース鎖の末端から 2 糖を遊離するセロビオハイドロラーゼ (CBH)、セルロース鎖の内部をランダムに分解するエンドグルカナーゼ (EG)、遊離したセロオリゴ糖を単糖に分解する β -グルコシダーゼ (BGL) が知られている。我々のグループでは EG 以外の酵素分泌を抑制することで、セルロースから 3 糖以上のセロオリゴ糖を優先的に生成できる酵素表品を生産できるセルラーゼ遺伝子多重破壊株の開発に成功した³⁾。

本研究では、上述の遺伝子破壊株から作成した酵素を用いて酵素糖化試験を行ってきた。1 mL の反応系ではセロオリゴ糖の生成が確認されていることから、今回は反応系スケールを 100 mL に拡大し酵素糖化特性の把握および最適条件の探索を行ったので報告する。

2. 実験手法

2.1 基質 PSC の作成

本実験では基質としてリン酸膨潤セルロース

(Phosphoric acid Swollen Cellulose; PSC)を用いた。PSC の作成には微結晶セルロース試薬である Avicel (フナコシ薬品製)を使用した。Avicelの膨潤処理は試薬10 g に対し、250 mL の氷冷した H_3PO_4 (ナカライテスク株式会社、純度85%) で一晩行った。処理後、PSC懸濁液を2,000 mLの氷冷水に攪拌しながら流し込み、1 h以上攪拌した。膨潤後のPSCはブフナーロート (Whatmann 社製, No. 3) を用いてろ過し、回収した。その後、取得したPSCを50 mL の純水で4 回、50 mL の1 % (w/w)- $NaHCO_3$ で2回、50 mL の純水で3回洗浄した。最終的にPSCを適量の純水に懸濁し、ホモジナイザーで処理したものを本実験に用いた。また作成したPSCに含まれる水分量を確認するためPSCを0.5 g分取し、含水率測定装置 (OHAUS MB45) を用いて基質含水率を測定した。

2.2 セルラーゼ遺伝子多重破壊株からの酵素取得

セルラーゼ遺伝子破壊株の培養は、Avicel (微結晶セルロース:フナコシ株式会社) を基質としたマゼンダ培地で行った。基質濃度は1.0% (w/v)、培養時間は120 h とし、28°Cの恒温槽において220 rpm で回転振とうした。培養終了後、0.22 μ mのMF膜を用いて培養液を回収し、糖化試験に使用する酵素液とした。酵素液は、糖化反応前にタンパク質濃度とCMCase活性を測定し、これらのデータを基に反応系を構築した。タンパク質濃度の分析にはブラッドフォード法を使用し、CMCase 活性の測定にはSomogyi-Nelson法を用いた。

2.3 酵素糖化反応

酵素糖化試験には基質としてPSCを使用し、基質濃度は1.0 %-cellulose (w/v) とした。酵素は2.2で取得した遺伝子破壊株由来の酵素と遺伝子非破壊株由来の酵素を用いた。酵素濃度は1, 2 mg-protein/g-PSCとした。反応系は1 mLおよび100 mLで構築し、50°Cの恒温槽において約1200 rpm でバイアル瓶を振とうした。糖化開始から24, 48, 72 h後にサンプリングを行った。採取したサンプルは 100 °Cの恒温槽内で10 min 加熱し酵素を失活

させた後、遠心し、上清を0.45 μ mのMF膜でろ過した。この膜透過液中に含まれる糖類をHPLCで分析し、各糖の生成量を定量した。

3. 実験結果および考察

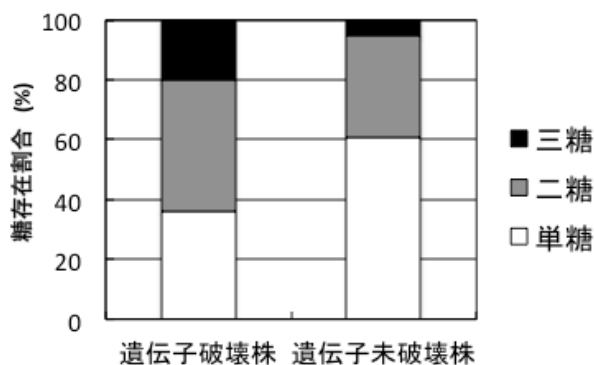
3.1 セルラーゼ遺伝子破壊株由来酵素の分析

培養により取得した遺伝子破壊株由来の酵素タンパク質濃度は0.17 mg-protein/mLであり、比較として用いた遺伝子非破壊株由来の酵素タンパク質濃度は0.51 mg-protein/mLであった。

3.2. 酵素糖化試験

遺伝子多重破壊株および非破壊株から取得した酵素を用いたPSCの糖化結果を図1に示す。両者とも単糖から三糖までのセロオリゴ糖が生成されたが、遺伝子破壊株由来の酵素を用いた反応系では、それぞれの収率が単糖36.0%、二糖43.7%、三糖20.3%であるのに対し、非破壊株では単糖60.6%、二糖34.1%、三糖5.3%であった。そのため、遺伝子破壊株由来の酵素は三糖の生成に適していると示唆された。

図1 分泌遺伝子破壊の有無による



酵素糖化特性の違い

(糖化時間 72 h, 酵素量 5 mg-protein/mL)

遺伝子多重破壊株由来酵素による100 mLスケール糖化結果を図2に示す。二糖の生成量は、添加酵素量2 mg-protein/mL、糖化時間48 hの条件において、最大0.30 g/g-substrateであった。一方で三糖の生成量は、添加酵素量1 mg-protein/mL、糖化時間24 hで最大0.20 g/g-substrateであった。また、三糖は糖化時間および酵素添加量の増加によって生成量が減少する傾向が見られた。またスケールアップの影響を比較するため1 mLおよび100 mLスケールの反応系で行った糖化結果を図3に示した。今回の実験では両スケールの反応系においてほぼ同等の糖化性能を示し、明確な差はみられなかった。

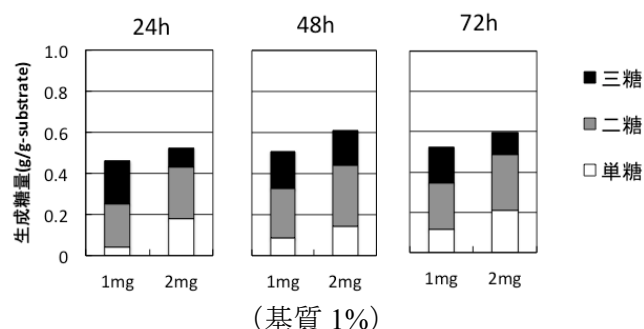
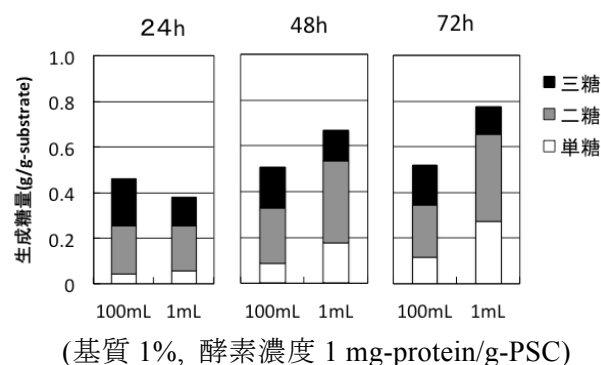


図2 100 mLスケールにおける酵素糖化試験結果 (上段は糖化時間、下段は添加酵素mg-protein/mLを示す。)



(基質 1%, 酵素濃度 1 mg-protein/g-PSC)

図3 1 mL および 100 mL スケールにおける酵素糖化試験結果

(上段は糖化時間、下段は反応系のスケールを示す。)

4. まとめ

本研究では、遺伝子破壊株由来の酵素を用いることで、非破壊株由来の酵素と比較して三糖が高収率で生成可能であった。また、遺伝子破壊株由来酵素を用いて100 mLに反応系をスケールアップした場合の酵素糖化反応において最適な三糖の生成条件は、酵素濃度1 mg-protein/mL、糖化時間24 hであると判明した。また、スケールアップにおける糖化特性への影響は見られないことが判明した。

参考文献

- 1) 里内美津子ら, ラットおよびヒトにおけるセロオリゴ糖の消化吸収生および生体へ及ぼす影響, 日本栄養・食糧学会誌 vol.49, No.3, pp.143-148, (1996)
- 2) 森川康『キノコとカビの基礎科学とバイオ技術』, キノコ編 (i 基礎科学) 第7章 7.1.3 pp.111~112 アイピーシー刊 (2002)
- 3) 吉田里奈ら, セルロース系バイオマスからのセロオリゴ糖生産を目指した *Trichoderma reesei* の改良, 第65回 日本生物工学会 発表資料 1P-210.(2013)