

もみ殻からのセロオリゴ糖生産

長岡技術科学大学大学院 (学) ○吉田理奈, 志田洋介, 中村明靖
(学) 岡部陽平, (学) 菅生亜美, (正) 幡本将史, 小笠原渉, (正) 山口隆司
国際石油開発帝石株式会社 若山樹, 今田美郎

1. はじめに

酵素糖化は、回収した糖類をバイオエタノールの原料やその他化成品へ利用可能であるため、セルロース系バイオマスの資源化におけるキーテクノロジーとして関心が高まっている。しかし、酵素糖化においては酵素 (セルラーゼ) の高いコストが課題となっている。そこで我々は、酵素糖化によって得られる糖類の付加価値向上によるコスト収支の改善を目指し、高付加価値を有する糖である三糖以上のセロオリゴ糖生産を検討している。

セルラーゼは多成分からなる酵素の総称であり、セルロース鎖の末端から二糖を遊離するセロビオヒドロラーゼ (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) に分類される。セルラーゼは様々な微生物により生産され¹⁾, 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。そこで我々は、*T. reesei* の有するセルラーゼ遺伝子のうち単糖および二糖の生産に関与する様々な遺伝子を破壊することで、分泌されるセルラーゼ成分を制御したセルラーゼ遺伝子破壊酵素標品を取得した。本研究では、酵素糖化による三糖以上のセロオリゴ糖の生産を目的とし、セルラーゼ遺伝子破壊酵素標品をリン酸膨潤セルロース (PSC) およびもみ殻の酵素糖化試験に適用し、各酵素のセロオリゴ糖生産能を評価した。

2. 実験方法

2-1. セルラーゼ遺伝子破壊酵素の取得

標的遺伝子は、BGL の中で菌体外分泌量が最も多い BGL I をコードする *bgl1*¹⁾, CBH I および CBH II をコードする *cbh1* および *cbh2*, EG の中でも単糖および二糖を優先的に生産する EG I をコードする *egl1*²⁾ とした (表 1)。標的遺伝子の破壊は、ピリミジン塩基生合成に関わる *pyr4* を選択マーカーとして行った。セルラーゼ遺伝子破壊株の培養は、微結晶セルロースを基質としたマンデル培地で行った。基質濃度は 1.0% (w/v), 培養時間は 120 hr 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 μm の MF 膜を用いて培養液を回収し、セルラーゼ遺伝子破壊酵素標品とした。

2-2. 酵素糖化試験

もみ殻は、外部委託により微粉化 (中位径 30 μm) したものをを用い、乾燥重量 1.0 g 中の糖類はセルロース 0.36 g, ヘミセルロース 0.19 g である。糖化時間は、PSC を基質とした場合 12, 24, 48, 72 hr, もみ殻を基質とした場合 72 hr とした。基質濃度は 1.0% (w/v), 酵素濃度は 1 mg-タンパク質/g-substrate とした。酵素のタンパク質濃度はブラッドフォード法を用いて測定した。反応系は 1 mL とし、50°C の恒温槽において約 1200 rpm で振とうさせた。反応終了後、糖化液は 100°C の恒温槽において酵素を失活させ、遠心した上清を 0.45 μm の MF 膜でろ過した。全糖濃度はフェノール・硫酸法、主な単糖およびセロオリゴ糖は HPLC を用いて測定した。

表 1 本研究で取得したセルラーゼ遺伝子破壊酵素標品

標的セルラーゼ遺伝子	酵素標品
<i>bgl1</i>	$\Delta B1$
<i>cbh2, cbh1, bgl1</i>	$\Delta C2\Delta C1\Delta B1$
<i>cbh2, cbh1, bgl1, egl1</i>	$\Delta C2\Delta C1\Delta B1\Delta EG1$

キーワード セルロース系バイオマス, 酵素糖化, セロオリゴ糖, *Trichoderma reesei*

連絡先 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学 環境・建設系 水圏土壌環境制御工学研究室

TEL. 0258-47-1611(内線 6646) E-mail: ecoya@vos.nagaokaut.ac.jp

3. 実験結果および考察

3-1. リン酸膨潤セルロースの酵素糖化試験

PSC の酵素糖化試験では、単糖および四糖までのセロオリゴ糖が生産可能であった (図 1) . $\Delta B1$ を用いたとき、親酵素を用いたときと比較して、糖化時間の経過に伴う単糖であるグルコースの生産が抑制され、二糖のセロビオースが蓄積した。二糖の生産量は、糖化時間 48 hr のとき最大 0.71 g/g-substrate であった。以上より、*bgII* の破壊は酵素糖化における二糖の生産に効果があることが確認された。 $\Delta C2\Delta C1\Delta B1\Delta EG1$ は三糖であるセロトリオースを優先的に生産し、生産量は糖化時間 72 hr のとき最大 0.19 g/g-substrate であった。一方、 $\Delta C2\Delta C1\Delta B1$ を用いたとき三糖は優先的に生産されなかったため、*eglI* の破壊は三糖の生産に効果があると確認された。糖化時間 72 hr におけるセルロースの変換率 (基質の含有するセルロース成分を 100%とした場合の、同定されたセルロース由来の糖成分の割合) は、親酵素を用いたとき 94.4%、 $\Delta C2\Delta C1\Delta B1\Delta EG1$ を用いたとき 40.0%であった。

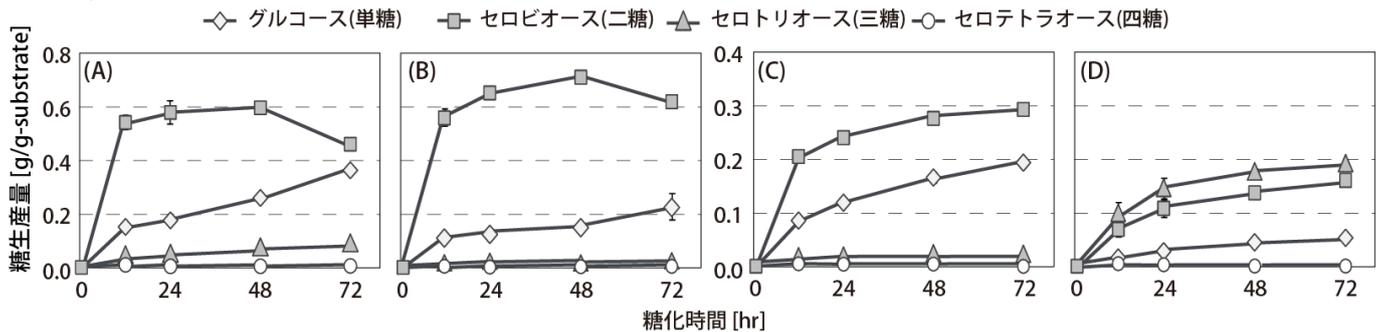


図 1 リン酸膨潤セルロースの酵素糖化試験 (A:親酵素, B: $\Delta B1$, C: $\Delta C2\Delta C1\Delta B1$, D: $\Delta C2\Delta C1\Delta B1\Delta EG1$)

3-2. もみ殻の酵素糖化試験

糖の成分比は、もみ殻 1.0 g から生産された全糖を 100%として算出し、同定された糖類の生産量の積算が 100%に満たない場合は不明分とした (図 2)。親酵素を用いたときのセルロースの変換率は 31.9%であり、PSC を基質とした場合と比較して 1/3 程度に減少した。一方、 $\Delta C2\Delta C1\Delta B1\Delta EG1$ を用いたときのセルロースの変換率は 37.3%であり、PSC を基質とした場合とほぼ同等であった。使用した酵素の種類によって優先的に生産された糖は異なり、親酵素を用いたときはグルコース、 $\Delta C2\Delta C1\Delta B1\Delta EG1$ を用いたときは三糖のセロトリオースであった。 $\Delta C2\Delta C1\Delta B1\Delta EG1$ を用いたとき、三糖の生産量は最大 0.06 g/g-substrate であり、全糖中の 28.1%を占めた。一方、親酵素を用いたとき三糖は生産されなかった。以上より、本研究で取得したセルラーゼ遺伝子破壊酵素 $\Delta C2\Delta C1\Delta B1\Delta EG1$ は、実際のバイオマスであるもみ殻から三糖の生産が可能であり、PSC を基質とした場合と比較してセルロース変換率の減少が少なかったことから、実バイオマスの酵素糖化に適した酵素であると示唆された。

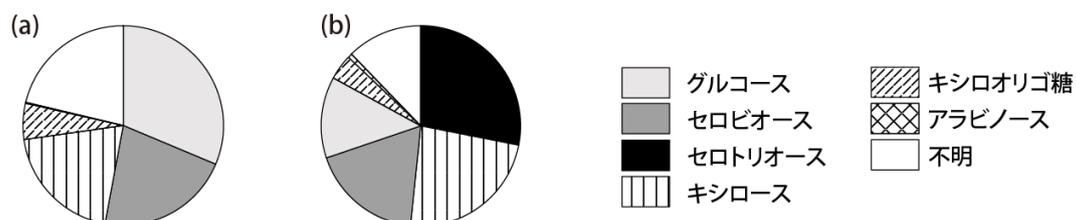


図 2 もみ殻の酵素糖化試験における糖の成分比 (a:親酵素, b: $\Delta C2\Delta C1\Delta B1\Delta EG1$)

4. 結論

本研究で取得した *T. reesei* 由来のセルラーゼ遺伝子破壊酵素標品を PSC およびもみ殻の酵素糖化試験に適用した結果、高付加価値を有する三糖以上のセロオリゴ糖が生産可能であった。*bgII* の破壊は二糖の生産、*eglI* の破壊は三糖の生産に効果があった。 $\Delta C2\Delta C1\Delta B1\Delta EG1$ は、三糖を優先的に生産可能であり、1.0 g のもみ殻から最大 0.06 g の三糖を生産した。

参考文献 1) 森川康 (2002) 『キノコとカビの基礎科学とバイオ技術』, アイピーシー刊抜刷, 2) Johan Karlsson *et al.* (2002) Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cell2A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*, pp.63-78, *Journal of Biotechnol.*