

平成 24 年度
環境研究総合推進費補助金 研究事業

総合研究報告書

変異・融合酵母による稲藁の高度エタノール発酵技術の開発

(K2411、) K2339、K22027

平成 25 年 3 月

明星大学 田中 修三

補助事業名	環境研究総合推進費補助金研究事業（平成 22 年度～平成 24 年度）
所管	環境省
国庫補助金	44,257,000 円（3 年度の総計）
研究課題名	変異・融合酵母による稲藁の高度エタノール発酵技術の開発
研究期間	平成 22 年 4 月 1 日～平成 25 年 3 月 31 日
研究代表者名	田中修三（明星大学）
研究分担者	なし

目 次

	頁
総合研究報告書概要	1
本文	
1. 研究背景と目的	8
1.1 研究背景	8
1.2 研究目的	8
2. 研究方法	9
2.1 亜塩素酸・重曹法による前処理	9
2.2 低温性セルラーゼによる糖化	9
2.3 変異・融合酵母による発酵	12
3. 結果と考察	14
3.1 亜塩素酸・重曹法による前処理	14
3.2 低温性セルラーゼの産生と糖化活性	20
3.3 細胞融合による変異・融合酵母の獲得	31
3.4 融合酵母 FSC1 株の改良と改良酵母による稲藁の並行複発酵	36
4. 結論	38
5. 参考文献	40
6. 研究発表	41
論文発表	
学会等発表	
7. 知的財産権の取得状況	42
研究概要図	43
英文概要	44

環境研究総合推進費補助金 研究事業 総合研究報告書概要

研究課題名：変異・融合酵母による稲藁の高度エタノール発酵技術の開発

研究番号：(K2411,) K2339、K22027

国庫補助金清算所要額：44,257,000 円（3 年度の総計）

研究期間：平成 22 年 4 月 1 日～平成 25 年 3 月 31 日

研究代表者名：田中修三（明星大学）

研究分担者：なし

研究目的

稲藁を原料として、前処理によるセルロース結晶構造（以下結晶構造という）の改変、低温性セルラーゼによる糖化及び変異・融合酵母による発酵を行う高度エタノール発酵技術を開発する。具体的には、エタノール発酵の障害となる稲藁のリグニンや結晶構造、酵素糖化（55℃）と発酵（30℃）の最適温度の違い及び *Saccharomyces* 酵母がキシロースを利用しないこと等の問題に対して、本研究では亜塩素酸塩による脱リグニンと重曹による結晶構造の改変、*Trichoderma* 変異株による低温性セルラーゼの産生・糖化及び *Saccharomyces* 変異株と *Candida* 変異株によるキシロース利用変異・融合酵母の獲得・発酵を行い、技術的な解決を図る。全体目標として、前処理済み稲藁の糖化率 90%、30℃活性の高いセルラーゼの産生及びエタノール収率 0.4（kg/kg 前処理済み稲藁）をめざし、これらの要素技術を統合した並行複発酵方式の高度エタノール発酵技術を開発する。

研究方法

前処理：ブレンダー粉砕した稲藁に対して、亜塩素酸 Na と酢酸の反応で生成する塩素種により弱酸性域でリグニンの可溶化・除去を行い、その後重曹水溶液に浸けた熱処理で繊維束の膨潤と結晶構造の改変を行う。この亜塩素酸・重曹法の処理条件と効果（脱リグニン、弛緩処理、結晶構造改変、副産物生成、糖化率など）に関する実験を行い、前処理済み稲藁の糖化率 90%を目指した前処理プロセスを確立する。また、SEM 観察、X 線回折及び FT-IR 解析等により前処理による脱リグニンと結晶構造の改変を解析する。

低温性セルラーゼによる糖化：セルラーゼ産生 *T. reesei* を野生株（以下 WT 株という）として紫外線により変異処理し、並行複発酵方式のためのセルラーゼを産生する変異株を獲得・育種する。具体的には、*T. reesei* の亜硝酸添加・紫外線処理により得た変異株が産生する酵素タンパクをドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下 SDS-PAGE という）等による分離・解析を行ない、30℃で十分な活性を保持する低温性セルラーゼの生産技術を開発する。目標は前処理済み稲藁の糖化率 90%を可能にするセルラーゼの産生と糖化条件を確立することであり、また稲藁を炭素源としたセルラーゼ産生も検討する。酵素タンパクとしては β グルコシダーゼ（BGL）、セロビオヒドロラーゼ I（CBH I）、セロビオヒドロラーゼ II（CBH II）、エンドグルカナーゼ（EG）及びキシラナーゼ（XYN）について解析した。

変異・融合酵母による発酵：酵母 *S. cerevisiae* と *C. intermedia* をメタンスルホン酸エチル（EMS）で変異処理し、キシロース取込み能を向上させた *S. c.* 変異株とキシロース代謝遺伝子を持つ *C. i.* 変異株とのプロトプラスト融合を行い、キシロース利用変異・融合酵母を獲得する。メタボローム解析により変異・融合酵母のキシロース代謝機構を解析し、さらにタンパク・遺伝子

解析により遺伝学的特徴も調べる。その上で、前処理、低温性セルラーゼ及び変異・融合酵母をもって、稲藁を原料とする並行複発酵方式でエタノール転換率 0.4 (kg/kg 前処理済み稲藁) を達成することを目指す。流入負荷 50 (g 稲藁/L) で、プロセスの効率や運転条件等を検討し、稲藁に対する前処理、低温性セルラーゼ及び変異・融合酵母による並行複発酵方式の高度エタノール発酵技術を開発する。

結果と考察

本研究により、稲藁を原料とするエタノール発酵において、前処理、低温性セルラーゼ及び融合酵母に関して得られた知見と技術は以下の通りである。

・亜塩素酸・重曹法による前処理

稲藁の前処理は、酢酸酸性域での亜塩素酸 Na (ASC) 処理による脱リグニンと重曹 (SB) 処理による膨潤化とセルロース結晶構造の改変を行った。稲藁は ASC 処理により脱リグニンされ、SB 処理により膨潤した微細繊維 (マイクロフィブリル) に変化し、特に (3 回 ASC+SB) 処理が最大の効果を発揮した (図 1)。稲藁のリグニン量は約 14% (乾重%、クラークソン法)、 κ 値は約 16 であり、(3 回 ASC+SB) 処理によりリグニン除去率 88% (処理後リグニン量 1.7%) を達成した (図 2)。FTIR 解析から、ASC 処理は主にリグニン構造ユニットを除去し、SB 処理は内部リグニンの除去に関与することが分かった。稲藁の前処理は ASC 処理の後に SB 処理を行う必要があり、その逆順では効果が低い。

生成される塩素種の分析から、リグニンは亜塩素酸イオンにより酸化・除去、すなわち脱リグニンされ、亜塩素酸イオンは塩化物イオンに還元されることが分かった。ASC 処理のみでは亜塩素酸があっても内部リグニンが除去されず、SB 処理による膨潤化が脱リグニンを完遂するのに重要な役割を果たすことが確認された。

稲藁の結晶構造の変化について X 線回折と FTIR 解析を行った結果、3 回 ASC 処理による表面リグニンの除去により結晶性が見かけ上増加し、その後 SB 処理を施すと再び減少するが、これは膨潤・微細繊維化と共にマイクロフィブリルの非晶質化が起きているためと推測された。セルロースの結晶型は、(3 回 ASC+SB) 処理を施すことによって、無処理稲藁のタイプ I から、結晶密度が低くかつ分解性の高いタイプ II に変化した。

結晶セルロース末端からセロビオースを分離する CBH I (Cel17A と同じ) を用いて糖化に対する前処理効果を調べたところ、3 回 ASC 処理と SB 処理の単純加算の糖化率は 40% であり、(3 回 ASC+SB) 処理は 85% という 2.1 倍の相乗効果を示した。糖化に対する前処理の効果を工業用セルラーゼによる糖化で調べたところ、無処理稲藁は 48 時間でも糖化率 20% に留まったが、(3 回 ASC+SB) 処理を行うと 6 時間で 86% に達した (図 3)。糖化速度では、(3 回 ASC+SB) 処理が 0.22 (wt./wt./h) であり、無処理の 11 倍の糖化速度であった。

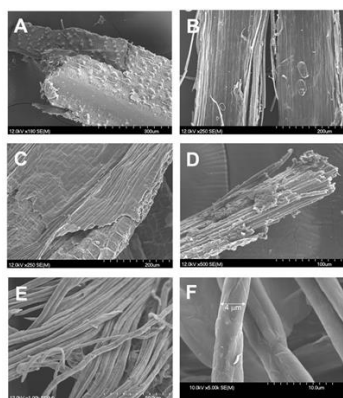


図 1 前処理済み稲藁の SEM 写真

A: 無処理、B: 3 回 ASC 処理、C: SB 処理
D: (SB+3 回 ASC) 処理、E: (3 回 ASC+SB) 処理、F: E の拡大 (マイクロフィブリル)

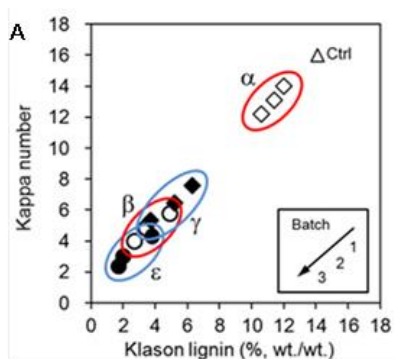


図 2 稲藁の前処理によるリグニン量の変化

Ctrl は無処理、 α (白菱形) は SB 処理、 β (白円) は ASC 処理、 γ (黒菱形) は (SB+ASC) 処理、 ϵ (黒円) は (ASC+SB) 処理、1~3 は処理回数

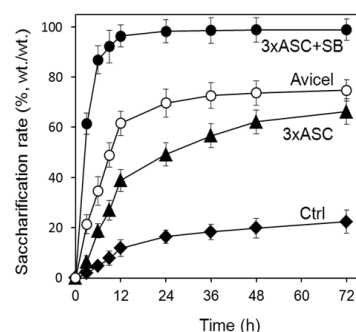


図 3 稲藁の酵素糖化に対する前処理の効果

Ctrl: 無処理、3xASC: 3 回 ASC 処理、3xASC+SB: (3 回 ASC+SB) 処理、Avicel: アビセルセルロース、糖化: (Celluclast 1.5L + Novozym 188) による 50°C での糖化

・低温性セルラーゼによる糖化

低温（30℃）で十分な活性を有するセルラーゼを産生する株を獲得するために、*T. reesei* を WT 株として亜硝酸添加・UV 照射による変異処理と選択培地による選別で改良し、その変異株 MT957 のセルラーゼ産生能と糖化活性を調べた。セロビオースに対する BGL 活性（以下 CBU 活性という）では、MT957 株は 30℃で約 110 (CBU/mg)であり、WT 株の 3 倍及び工業用セルラーゼ C1.5L の 6 倍高い値を示した。フィルターペーパーユニット活性（以下 FPU 活性という）では、30℃活性が対 50℃活性で C1.5L が 20%に低下したが、MT957 株セルラーゼは 40%を保持し、C1.5L の約 2.5 倍の活性を示した。MT957 株セルラーゼは単糖への転換量が 2.5 g/L（単糖・二糖量の 77%）であり、WT 株と C1.5L に比べて 2 倍以上であった。MT957 株が産生するセルラーゼを SDS-PAGE で分離した結果、BGL、CBH1、CBH2、EG 及び XYN に相当するバンドが確認された（図 4）。二次元電気泳動解析によると、MT957 株はセルラーゼ成分の BGL、CBH 及び EG の発現量が WT 株よりかなり増加していた。

MT957 株セルラーゼの各種セルロースに対する糖化活性を調べたところ、温度 30℃で WT 株に比べて α セルロース活性が 3.6 倍、アビセル（微結晶セルロース）活性が 5.4 倍及びカルボキシメチル化セルロース（CMC）活性が 2 倍高く、C1.5L に比べるとそれぞれ 3.3 倍、3.5 倍及び 4 倍高い活性を示した（図 5）。温度が 50℃から 30℃に低下すると、WT 株と C1.5L の活性が 40%程度に低下するのに対して、MT957 株セルラーゼは約 70%を保持しており、低温（30℃）域で十分な活性を持つ低温性セルラーゼを生産できることを確認した。

精製・分離したセルラーゼ成分の α セルロース糖化への寄与を解析したところ、EG を添加すると CBH1 と CBH2 の活性は高くなり、特に CBH1 の活性が約 7 倍に向上した。（EG+CBH1+CBH2）系では糖化速度が EG 無添加系に比べて 3.5 倍に向上し、糖化の初期段階で関与する EG の存在が重要であることが分かった。一定量の酵素（E）CBH1 と CBH2 に対して基質（S）との重量比（E/S 比）を変えた結果、30℃で E_{EG}/S 比が 0.02~0.05 の範囲で EG 添加の相乗効果が見られた。

亜塩素酸・重曹法で前処理した稲藁を用いて MT957 株セルラーゼによる糖化を調べたところ、MT957 株セルラーゼは乾燥稲藁に対して約 86%の糖化率であり、本研究の目標値 90%に近い糖化率を達成できた（図 6）。

稲藁をセルラーゼ産生の炭素源として利用するため、各種粉碎稲藁に対して MT957 株が産生する酵素タンパク量を調べたところ、ボールミル粉碎で標準セルロースの 1.2 倍のセルラーゼが得られた。酵素成分を SDS-PAGE で分離した結果、粉碎稲藁の産生酵素は標準セルロース産生酵素より EG と BGL と XYN のバンドがより濃く現れ、キシランをキシロースに糖化する XYN が多いことは、単糖への糖化が促進され、後段のエタノール発酵に有利に働く可能性が示された。稲藁炭素源の MT957 株セルラーゼによる糖化活性において、高い比活性を示したのは 30mm ボールミル粉碎稲藁であり、酵素産生の炭素源として利用できることが分かった。

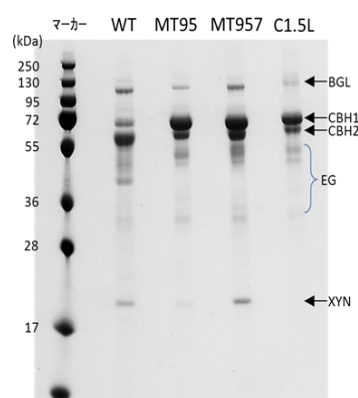


図 4 SDS-PAGE によるセルラーゼ成分の分離

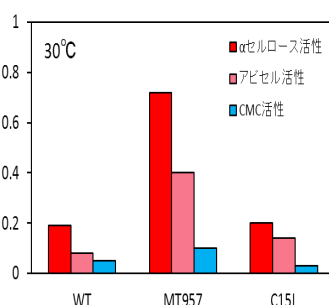


図 5 セルラーゼの各種セルロースに対する活性

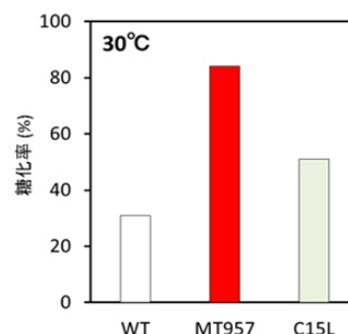


図 6 亜塩素酸・重曹法で前処理した稲藁のセルラーゼによる糖化
条件：温度 30℃、pH4.8、DNS 還元糖測定、
酵素添加量は基質の 1/100 (mg/mg)

・変異・融合酵母によるエタノール発酵

細胞融合の前に、*S. cerevisiae* のキシロース取込み能を高め、逆に *C. intermedia* のキシロース取込み能を抑えるために、各野生株を EMS 変異処理により改変した。*S. cerevisiae* 変異株は、デオキシグルコース (DOG) を用いた DOG 耐性選別により、カタボライト抑制を抑え、グルコース存在下でもキシロース取込み能が野生株の 4.5 倍高い M2 株を獲得した[文献 1]。*C. intermedia* 変異株はキシリトール代謝に係る *xdh* 遺伝子を保持しながらも、キシロース取込み能を抑えた m11 株を得た。野生株に比べて、M2 株はより多くのキシロースを細胞内に取込み、グリセロールの生成は少なく、エタノール生成量が増加した。一方、m11 株はキシロースを全く取込まず、グリセロールを少なからず生成することを確認した。また、細胞融合は両変異株の一俵子細胞 (a 細胞・ α 細胞又は相当細胞) のプロトプラスト融合を行うが、事前に m11 株を酢酸カリウム (KAc) 胞子形成培地で培養し、ブリリリアントグリーン染色と SEM による観察で胞子形成を確認した。

M2 株と m11 株の各胞子の一俵子細胞のプロトプラスト融合により、変異・融合酵母を製造し、活性の高い融合細胞を FSC1 株と命名した。DAPI 染色により、FSC1 株は核融合した単一核であることを確認し、細胞形状は楕円状であるが、親株の M2 株と m11 株より大きく、長円軸が $10\mu\text{m}$ 程度であった。FSC1 株は M2 株と m11 株の融合酵母であり、M2 株と m11 株の接合ではないことを確認するため、それぞれの株の DOG 耐性とキシロース代謝試験及び接合試験を行った。YMG 培地でいずれの株もコロニーを形成することを確認した上で、YMXDOG 培地で FSC1 株のみが DOG 耐性のキシロース代謝酵母であることを確認した。接合試験では、YMG 培地で (M2 株+m11 株) の混合培養を行い、その後 YMXDOG 培地で培養した。もし M2 株と m11 株の接合が起きていれば、FSC1 株と同様、接合株もコロニーを形成するはずだが、全く形成されなかった。ここに、FSC1 株が M2 株と m11 株の融合株であり、親株同士の接合は起こらないことを確認した。さらに、FSC1 株胞子形成について、前出の m11 株と同様に、KAc 培地にて培養した結果、ブリリリアントグリーン染色と SEM による観察で FSC1 株が胞子を形成することを確認した。

キシロース含有 MMGX 培地でのエタノール発酵試験を行った結果、FSC1 株はグルコースとキシロースの両基質を着実に発酵し、その結果エタノール生成量は M2 株の約 2.7 倍に達し、FSC1 株がキシロース代謝とエタノール生成に優れた酵母であることが確認された。代謝の安定性を調べるため FSC1 株の継代培養を行い、各世代のエタノール発酵能を調べた結果、FSC1 株は 14 世代に亘り安定してキシロース利用とエタノール生成を行うことが確認された。エタノール収率を比較すると、FSC1 株が 0.38 (g/g-基質) であり、M2 株の 0.14、野生株 *S. c.* の 0.1 より約 3 倍高かった。主要アミノ酸 7 種に対して、FSC1 株は要求性はなく、MMG 培地でも十分増殖した。

キシロース代謝遺伝子とアルコール脱水素酵素遺伝子の発現レベルを RT-PCR 法で調べ、さらに抽出タンパクの二次元電気泳動と MALDI-TOF/TOF による一部の同定を行った (図 7)。FSC1 株において、キシロースのキシリトールへの転換に関与する遺伝子は m11 株の *xr* と M2 株の *gre3*、キシリトールのキシロースへの転換遺伝子は m11 株の *xdh*、キシロースのキシロース-5-リン酸への転換遺伝子は M2 株の *xks1* が発現しており、また発酵の最終段階で働くアセトアルデヒドのエタノールへの転換に関与するアルコール脱水素酵素遺伝子は M2 株の *adh1* が強く発現していた。タンパクの発現については、FSC1 株には M2 株と m11 株の全てのタンパクスポットが見られ、そのほとんどが親株より濃く出ていた。このうち 2 種のタンパクが同定され、FSC1 株に m11 株の XR と M2 株の TDH (グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素) が確認された。

FSC1 株のエタノール発酵能を改良するため、再度 EMS により変異処理し、改良型の FSC3 株を製造した。FSC3 株によるグルコース・キシロース基質からのエタノール発酵試験を行った結果、FSC3 株のキシロース消費速度 (g/g-cell.h) が FSC1 株の 0.18 から約 6 倍の 1.07 にまで向上した。FSC3 株のエタノール生成速度は容積当り 0.65 (g/L.h) 又は菌体当り 0.17 (g/g-cell.h) であり、FSC1 株の約 2 倍の速度であった。FSC3 株のエタノール収率 (g/g-基質) は FSC1 株の 0.38 から 0.42 に向上し、親株である *S. cerevisiae* M2 株の 0.14 (g/g-基質) の 3 倍であった。FSC3 株のエタノール収率 0.42 は、グルコース・キシロース基質ではあるが、本研究の目標値 0.4 (g/g-前処理済み稲藁) を上回る値であった。

本研究で開発した亜塩素酸・重曹法による前処理、*T. reesei* MT957 株が産生する低温性セルラーゼによる糖化及び融合酵母 FSC3 株による発酵を組み合わせ、稲藁の前処理と並行複発酵の一連の実験を行った。エタノール生成は発酵 48 時間で頭打ちになり、発酵開始時にあった繊維状の稲藁固形分は 48 時間後には完全に糖化（可溶化）されていた（図 8）。エタノール生成量は最大で 16.2g/L であり、この生成量から計算したエタノール収率は 0.324（g/g-前処理済み稲藁）又は液量で 0.41（L/kg-前処理済み稲藁）であった。この実験では菌体収率が 0.25（g-cell/g-前処理済み稲藁）であり、前出のグルコース・キシロース基質系に比べて約 4 倍高い。稲藁においては、基質が菌体増殖に使われたためにエタノール収率がやや低くなったと考えられる。エタノール収率 0.324（g/g-前処理済み稲藁）は本研究の目標値 0.4（g/g-前処理済み稲藁）の 81% に相当し、概ね目標値に近いエタノール収率を達成することができたと考える。

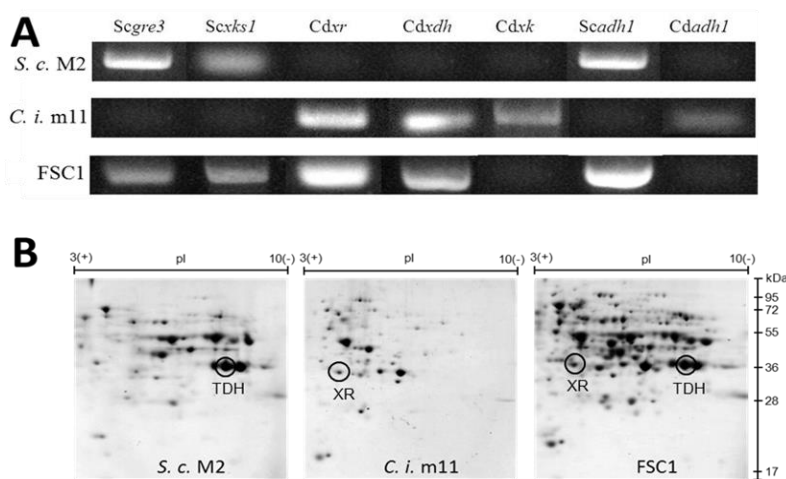


図 7 変異株 *S. cerevisiae* M2 と *C. intermedia* m11 及び融合酵母 FSC1 のキシロース代謝遺伝子の発現 (A) と抽出タンパクの二次元電気泳動 (B)

A: RT-PCR による遺伝子解析

B: 2D-PAGE 解析、横軸は等電点、縦軸は分子量 (kDa)

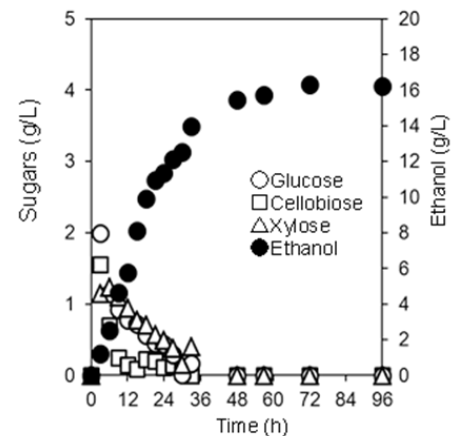


図 8 前処理済み稲藁の低温性セルラーゼと改良型 FSC3 株による並行複発酵

前処理: 亜塩素酸・重曹法

並行複発酵: *T. reesei* MT957 株産生の低温性セルラーゼによる糖化と融合酵母 FSC3 株による同時発酵、酵素/基質 (E/S) 比=1/100、酵母素ベース 1.7g/L 添加、前処理済み稲藁 50g/L、初期菌体量 1.6gDW/L、pH5.0、30℃、微好気

環境政策への貢献

本研究の成果は、次の応用・実用化レベルの研究・試験につなぎ、将来的に実用化されれば、地球温暖化対策のための再生可能エネルギーとして草木質系バイオマスを原料とするバイオエタノール生産の環境政策に貢献すると考える。その場合、エタノール発酵の障害となるリグニンやセルロース結晶構造、酵素糖化（55℃）と発酵（30℃）の最適温度の違い及び発酵酵母が五炭糖キシロースを利用しないこと等が問題となる。本研究で開発した亜塩素酸・重曹法による前処理、低温性セルラーゼによる糖化及びキシロース利用変異・融合酵母による発酵はこれらの諸問題を解決する新技術であり、賦存量の多い草木質系バイオマスを原料とするバイオエタノール生産による温室効果ガス削減政策の推進に役立つと期待される。

以下に草木質系バイオマスのポテンシャルと本研究で開発した技術との関係を説明する。

・草木質系バイオマスの賦存量と環境ポテンシャル

わが国のバイオマス賦存量は約 32,200 万 t であり、このうち未利用分は約 7,650 万 t であるが、その 44% に相当する約 3,400 万 t が草木質系バイオマスである。未利用バイオマスのエネルギーとしての利用は、二酸化炭素の排出抑制と再生可能エネルギーの確保の両面で注目されており、また残材や間伐材を利用すれば資源の有効利用と森林保全の推進にもつながる。

エタノールは、ガソリンの代替エネルギーとして利用されると、自動車等からの二酸化炭素排出量の削減に大きく貢献する。エタノールの二酸化炭素の排出量原単位は $1.54\text{kg-CO}_2/\text{L}$ (ガソリンの排出量原単位 $2.554\text{kg-CO}_2/\text{L} \times 0.602$) であり、わが国の年間ガソリン消費量 6,000 万 kL の 10% にエタノール (E10 ガソリン) を使えば、単純計算で年間 924 万 t の二酸化炭素が排出されずに済む (エタノールやガソリンの製造・輸送過程での二酸化炭素排出は考慮していない)。

本研究で達成した稲藁からのエタノール収率 $0.41\text{ (kL/t-前処理済み稲藁)}$ を仮に草木質系バイオマスに適用すると、バイオマスのリグニン含量 20% の場合、エタノール生成量は 1,115 万 kL ($=3,400\text{ 万 t} \times 0.8 \times 0.41\text{ kL/t}$) であり、E10 ガソリンに必要なエタノール量 600 万 kL を十分供給できると試算される。

バイオエタノールは経済効果の面でも大きなポテンシャルを有している。わが国のエタノール等バイオ燃料の生産可能量は 2030 年で原油換算 360 万 kL/年 (エタノール換算 600 万 kL) と試算されており (バイオマス・ニッポン総合戦略推進会議、2007)、仮にエタノール価格として 100 円/L (農林水産研究基本計画における技術開発目標) で販売すると 6,000 億円市場となる。さらに、アセアン諸国におけるバイオエタノールの生産ポテンシャルは 2030 年で 1 億 kL 以上と試算されている (NEDO、2008)。アセアン諸国とのバイオエタノール関連輸出入を含めると、バイオエタノール製造がわが国の経済に及ぼす効果は極めて大きいと推定される。

・亜塩素酸・重曹法による前処理

バイオエタノール製造において、草木質系バイオマスは賦存量が多くかつ食料・飼料の供給と競合しない原料であるが、一方で草木質成分であるリグノセルロースが糖化されにくい構造であるという欠点を持つ。セルロース・ヘミセルロース・リグニンから構成されるリグノセルロースは、まずエタノールに転換されないリグニンを除去する必要がある。これを前処理といい、前処理したバイオマスに対して糖化・発酵という流れでバイオエタノールが製造される。

リグノセルロースを構成する成分の組成は、木質系がリグニン 20~30%、セルロース 40~50%、ヘミセルロース 20~40% であり、草本系がそれぞれ 5~20%、35~40%、20~40% である。前処理の第一の役割はリグニンを除去し、リグノセルロースの剛構造を破壊することである。しかし、セルロース繊維は結晶性が高く、リグニン除去だけでは不十分であり、結晶化度の低減や結晶型 (天然セルロースは結晶密度の高いタイプ I) の改変も重要である。

本研究で開発した亜塩素酸・重曹法は、稲藁に対してリグニンを 88% 除去し、また結晶化度の低減と結晶型のタイプ II への改変を可能にする技術である。さらに、セルロース繊維を膨潤化することにより、糖化工程で酵素が効率よく繊維に吸着できる構造に改変する。その結果、工業用セルラーゼによる 50℃ 糖化の場合、無処理稲藁の糖化率 20% に対して、亜塩素酸・重曹法により前処理を行うと、反応 12 時間で 96% の糖化が可能となる。

・低温性セルラーゼによる糖化

前処理を施したバイオマスは発酵の前に糖化されるが、代表的な糖化法として酵素法がある。酵素法は特殊な反応器は不要で、発酵に対する阻害物質も生成されないが、使用される工業用セルラーゼの糖化活性や価格が問題となる。また、発酵方式として酵素による糖化と酵母による発酵を同時に行う並行複発酵が効率的であるが、問題は最適な反応温度が工業用セルラーゼの 55℃ に対して酵母は 30℃ と異なる点であり、並行複発酵を行うにはこの点も解決する必要がある。

本研究で開発した *T. reesei* 変異株の MT957 株が産生する低温性セルラーゼは、亜塩素酸・重曹法による前処理済み稲藁に対して、温度 30℃ で工業用セルラーゼの約 1.6 倍の糖化活性を示し、酵素/基質比 = 1/100 という少ない酵素添加量で糖化率 86% を達成した。また、温度が活性に及ぼす影響として、純セルロースろ紙に対する FPU 活性において、工業用セルラーゼの 30℃ 活性が対 50℃ 活性の 20% に低下したのに対して、低温性セルラーゼは 30℃ 活性が 40% を保持し、工業用セルラーゼの約 2.5 倍高い活性を示した。

セルラーゼを生産するにはセルラーゼ産生菌 (代表的菌が *T. reesei*) のための炭素源が必要であるが、炭素源として微結晶セルロースを用いる代わりに、MT957 株はミル粉碎稲藁を炭素源として利用できる。

・変異・融合酵母 FSC3 株による並行複発酵

リグノセルロースを原料とするエタノール生成において、前処理と糖化を経て発酵工程に移るが、発酵で一般的に用いられる酵母はリグノセルロースに含まれる五単糖キシロースを利用できない。キシロースは量的にセルロースに次ぐ成分であるヘミセルロースから生成される五炭糖であり、その利用の可否はエタノール収率に大きく影響する。また、前述の通り、並行複発酵における工業用セルラーゼと酵母の反応温度の違いの問題もある。

本研究では、細胞融合によりキシロース代謝能を付与した変異・融合酵母と変異処理によりセルラーゼの低温適応性を高めた低温性セルラーゼを製造する技術を開発した。

エタノール生成能の高い *S. cerevisiae* とキシロースを利用する *Candida intermedia* の変異処理と細胞融合による変異・融合酵母の製造技術を開発し、キシロースを利用しかつエタノール生成能の高い変異・融合酵母 FSC1 株と FSC3 株を製造した。FSC1 株はグルコースとキシロースを着実に発酵し、エタノール収率は 0.38 (kg/kg-基質) に達した。このエタノール生成量は親株の約 2.7 倍に達しており、しかも 14 世代に亘り安定した発酵を行った。

FSC1 株のエタノール発酵能をさらに改良するため、再度変異処理し、改良型の FSC3 株を製造した。FSC3 株によるグルコース・キシロース基質からのエタノール発酵試験を行った結果、FSC3 株のエタノール収率 (g/g-基質) は FSC1 株の 0.38 から 0.42 に向上し、グルコース・キシロース基質ではあるが、本研究の目標値 0.4 (g/g-前処理済み稲藁) を上回る値を得た。

本研究で開発した亜塩素酸・重曹法による前処理、*T. reesei* MT957 株が産生する低温性セルラーゼによる糖化及び融合酵母 FSC3 株による発酵を組み合わせ、稲藁の前処理と並行複発酵の一連の実験を行った。エタノール生成は発酵 48 時間で頭打ちになり、発酵開始時にあった繊維状の稲藁固形分は 48 時間後には完全に糖化 (可溶化) されていた。エタノール生成量は最大で 16.2g/L であり、この生成量から計算したエタノール収率は 0.324 (g/g-前処理済み稲藁) であった。これは液量に換算すると 0.41 (L/kg-前処理済み稲藁) であり、これまでに報告されている各種バイオマスの 0.30~0.35 (L/kg) に比べて高い収率である。

研究成果の実現可能性

本研究は基礎研究であり、パイロットスケールの技術・コスト評価を行った上で、当該技術が実用化され、エタノールが E10 ガソリンに利用されると年間 924 万 t の二酸化炭素が排出されずに済み、仮にエタノールを 100 円/L で販売すると 6,000 億円市場を生むと試算される。本研究で得たエタノール収率 0.41 (kL/t) を草本質系バイオマスに適用すると 1,115 万 kL のエタノールが生成可能であり、E10 ガソリンに必要な 600 万 kL を十分供給できる。実用化に当たっては、原料の収集・輸送や排水処理等に対する計画・体制作りが必要であり、また将来の原料価格の高騰が考えられるので、食品廃棄物等幅広いバイオマスを対象とし、アジア諸国からの原料輸入も視野に入れた体制が求められる。

結論

亜塩素酸・重曹法において稲藁は ASC 処理により脱リグニン、SB 処理により膨潤化と結晶構造の改変が施され、特に (3 回 ASC+SB) 処理はリグニン除去率 88%、結晶型タイプ II への改変などを可能にした。*T. reesei* を変異させた MT957 株は 30℃でも高い活性のセルラーゼを産生し、この低温性セルラーゼは前処理済み稲藁の 86%を糖化し、目標値 90%に近い糖化率を達成した。*S. cerevisiae* M2 株と *C. intermedia* m11 株との細胞融合によりキシロース利用 FSC1 株を獲得し、さらに発酵能を改良した FSC3 株を製造した。FSC3 株は、グルコース・キシロース基質に対してエタノール収率 0.42 (g/g-基質) という目標値 0.4 (g/g-前処理済み稲藁) を上回る発酵能を示した。亜塩素酸・重曹法による前処理済み稲藁に対しては、低温性セルラーゼと FSC3 株による並行複発酵によりエタノール収率 0.324 (g/g-前処理済み稲藁) 又は液量で 0.41 (L/kg-前処理済み稲藁) を達成し、目標値の 81%相当のエタノール収率を得た。

1. 研究背景と目的

1.1 研究背景

地球温暖化やエネルギー問題を背景に、カーボンニュートラルで再生可能なエネルギーの需要が拡大している。その一つとして賦存量が多く食料と競合しない草本質系（リグノセルロース系）バイオマスを原料とするエタノール生産が期待されている。しかし、リグノセルロース系バイオマスをエタノール原料として利用するには、まだ解決すべき技術的課題が残されている。

リグノセルロースはそれを構成するリグニンやセルロース結晶構造のために難分解性（糖化されにくい構造）であり、また発酵に用いられる酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）が五炭糖キシロースを利用できないという問題がある。キシロースは量的にセルロースに次いで多いヘミセルロースから生成される糖であり、その利用の可否は発酵収率に大きく影響する[文献2]。さらに、発酵方式として酵素による糖化と酵母による発酵を同時に行う並行複発酵が効率的であるが、問題は最適な反応温度が工業用セルラーゼの 55℃に対して酵母は 30℃と異なる点であり、並行複発酵を行うにはこの点も解決する必要がある。

リグノセルロースの難分解構造を改良するためには前処理が必要であり、既存の方法に酸処理法、アルカリ処理法、蒸解法、水熱法、超臨界法などがある[文献3]。これらの方法はそれぞれ利点があるが、一方で酸・アルカリや高温・高圧に耐える反応器の必要性、糖の一部分解、発酵を阻害するフラン化合物の生成など、いずれかの問題を抱えている。また、バイオマスは発酵の前に糖化されるが、糖化方法としては前処理で糖化を兼ねる方法のほか、代表的なものに濃硫酸法と酵素法がある。濃硫酸法は前出の諸問題のほか、黒液と呼ばれる高濃度有機性廃液の問題がある。酵素法は特殊な反応器は不要で、フラン化合物も生成されないが、一般に使われる工業用セルラーゼの糖化活性やコストが問題となる。

発酵酵母が利用できない五炭糖キシロースに関しては、近年遺伝子組換えや細胞表層（アーミング）技術により酵母にキシロース代謝能を付与する研究がなされ、将来の実用化が期待されているが、特定の遺伝子のみを導入するために起こる代謝の不安定性や発酵収率の低下などの問題が残っている[文献4、5]。発酵方式に関する酵素と酵母の反応温度の違いに対して、酵素の添加量を増やして 30℃で同時に発酵する方法、あるいは糖化と発酵を別々に各温度で行う方法があるが、これらは発酵効率やコストの面から必ずしも好ましくない。

このようにリグノセルロースを原料とするエタノール製造においては、リグノセルロースの難分解構造、セルラーゼの糖化活性、五炭糖キシロースの生成及び酵素と酵母の反応温度の違いなどの諸問題を解決する必要がある。

1.2 研究目的

本研究の目的は、草本質系バイオマスのうち賦存量が多くかつ未利用分の多い稲藁を原料として、前述の諸問題を解決するための新しい前処理法、30℃で活性の高い低温性セルラーゼの生産と糖化及びキシロース利用酵母による発酵を目指して、各要素技術を研究・開発し、それらを統合した並行複発酵による高度エタノール発酵技術を開発することである。具体的には、①稲藁に対して亜塩素酸塩と重曹を用いた化学処理により脱リグニン、セルロース繊維の膨潤化と結晶構造の改変を行うための技術の開発（亜塩素酸・重曹法による前処理）、②真菌 *Trichoderma reesei* の変異処理により 30℃で活性の高い低温性セルラーゼを産生する変異株の獲得とそのセルラーゼによる糖化を行うための技術の開発（低温性セルラーゼによる糖化）及び③酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と *Candida intermedia* との細胞融合によりキシロースを利用する変異・融合酵母の獲得とその変異・融合酵母による発酵を行うための技術の開発（変異・融合酵母による発酵）である。以下に、これらの目的の詳細と達成目標を記す。

前処理においては、亜塩素酸塩と重曹による処理条件と効果（脱リグニン、膨潤化、結晶構造の改変、阻害物質の生成など）に関する実験を行い、前処理済み稲藁（稲藁有機分）に対して工業用セルラーゼによる糖化率 90%程度を達成する前処理技術を確立する。

糖化においては、低温性セルラーゼの産生とそのセルラーゼによる糖化を目指して、セルラーゼ産生 *T. reesei* の変異処理を行い、酵素タンパクの分離・解析を行ないながら、30℃で増殖し、

セルラーゼを産生する変異株を獲得する。達成目標としては、前処理済み稲藁の糖化率 90%程度を可能にする低温性セルラーゼの産生と糖化条件を確立する。この際、前処理済み稲藁をセルラーゼ産生用基質として利用する実験も行う。タンパク解析は主要成分である endoglucanase (EG)、cellobiohydrolase (CBH) 及び β -glucosidase (BGL) の産生と活性について調べる。

発酵においては、*S. cerevisiae* とキシロース代謝能を持つ *C. intermedia* の変異処理とその変異株同士の細胞融合によりキシロース利用変異・融合酵母を獲得し、その変異・融合酵母によるエタノール発酵に関する実験を行う。変異・融合酵母について、キシロース代謝機構をメタボローム解析により明らかにし、またタンパク解析と遺伝子解析により細胞学的特徴を調べる。その上で、前処理、低温性セルラーゼ及び変異・融合酵母をもって、稲藁を原料とする並行複発酵方式でエタノール収率 0.4 (kg/kgDW-前処理済み稲藁) 程度を達成する高度エタノール発酵技術を開発する。

全体としての最終目標は、亜塩素酸・重曹法により前処理した稲藁に対して、低温性セルラーゼにより糖化率 90%程度及び変異・融合酵母によりエタノール収率 0.4 (kg/kgDW-前処理済み稲藁) 程度を達成する要素技術を開発し、それらを統合した並行複発酵による高度エタノール発酵技術を開発することである。ここに、セルラーゼと酵母の温度差を解消する方法として、近年酵母の耐熱性を改良した高熱酵母の研究もなされているが [文献 6]、本研究は逆にセルラーゼの低温適応性を高める技術を開発するものである。また、発酵に用いる変異・融合酵母は細胞融合により独自に開発する菌株であり、多くの研究で扱われている遺伝子組換えによる組換え酵母とは全く異なる [文献 4、5]。したがって、本研究で開発を目指す低温性セルラーゼと変異・融合酵母による並行複発酵技術は他に類を見ない独創的かつ革新的な技術になるものと考えている。

2. 研究方法

2.1 亜塩素酸・重曹法による前処理

実験に用いる稲藁は (有) 宮原商店 (長野県長野市上高田 1371) から購入した新潟コシヒカリの稲藁であり、使用する前に稲藁を水洗し、一週間以上室内で天日乾燥した。天日乾燥後の稲藁の組成は水分 5%、無機分 10% 及び有機分 85% であり、リグニン含量は約 13% (本研究におけるクラークソン法による定量) である。

稲藁は、酵素による糖化率を高めるために、まず数 cm に裁断した後ブレンダーで 5mm 程度に粉碎し、次に粉碎稲藁に対して脱リグニン処理、セルロース繊維束の膨潤化と結晶構造の改変を行った。脱リグニン処理は酢酸酸性域 (pH4.6 程度) で亜塩素酸ナトリウムを用いて行った。処理操作は、まず三角フラスコに乾燥稲藁 2.5g を量り、これに対してイオン交換水 150mL、亜塩素酸ナトリウム 1g、酢酸 200 μ L の順に入れ、温水浴中で 80°C の約 1 時間の熱処理 (開放状態) を行い、曝気により塩素ガスを除いた後、残渣を水洗した。実験目的によって本操作を 1 回~4 回と繰り返し行い、脱リグニン後の稲藁は 3 日間程度の天日乾燥を行った。

セルロース繊維の膨潤化と結晶構造の改変は、脱リグニン後の稲藁を 0.5% 重曹 (炭酸水素ナトリウム) 水溶液 200mL に 24 時間浸し、オートクレーブによる 122°C・20 分間の熱処理にて行った。熱処理後の反応液の pH は 11 付近になるため、イオン交換水で水洗・中和し、その後 3 日間程度の天日乾燥を行ってから前処理済み稲藁をデシケータに保存した。

稲藁に対する前処理の効果を評価するため、リグニンをクラークソン法とカップー価 (κ 価: 1g 試料が消費する 0.1N-KMnO₄ の mL 数) による分析、セルロース表面の変化を SEM 観察 (Hitachi S-4700 Type II、Hitachi、Tokyo、Japan)、結晶構造の変化を粉末 X 線回折 (RIGAKU-D/MAX instrument、Ultima III、Rigaku International Corporation、Tokyo、Japan) と FT-IR 解析 (JASCO FT/IR4200 Spectrometer、JASCO、Tokyo、Japan) で調べたが、いずれも一般的方法であるので説明は割愛する。また、前処理済み稲藁に対して、工業用セルラーゼ (Celluclast 1.5L、Novozym 188) による糖化実験を行い、HPLC で分析した糖成分から前処理が糖化に及ぼす影響を評価した。

2.2 低温性セルラーゼによる糖化

2.2.1 変異処理とセルラーゼ産生

セルラーゼ産生真菌である *T. reesei* NBRC31327 (製品評価技術基盤機構 (NITE)・微生物資源センター (NBRC) より取得) を野生株として、変異処理を施す前に、野生株を PDA スラント寒天培地にて 10 日間 30℃ で孢子形成させ、生理食塩水で孢子を回収した後、0.1% TritonX-100 と 0.1% L-sorbose を含んだ PDA 寒天培地 (PDATS 寒天培地) にてコロニー形成を行った。単コロニーの形成は希釈倍率 $10^3 \sim 10^8$ の孢子懸濁液のうち 10^6 系で最もよく確認できたので、以後は希釈倍率 10^6 の孢子懸濁液を用いて変異処理を行うことにした。

セルラーゼ産生能を改良するための *T. reesei* の変異処理は、紫外線 (UV) による変異処理と亜硝酸で処理してから UV 処理する方法で行った。UV 処理は低温 (30℃) 適応性及び亜硝酸処理は β グルコシダーゼ産生能を改良することを期待して行った。UV 処理は 254nm の UV 灯で 5 分～90 分の範囲で照射時間を変えて行い、亜硝酸 UV 処理法では UV 処理の前に野生株を 0.1% 亜硝酸溶液に浸してから行った。その後、変異株の自己回復を回避するために 10 分間暗室 (30℃) で放置した。UV 照射した孢子懸濁液を 10^6 まで生理食塩水で希釈し、1% カルボキシメチル化セルロース (CMC) を含んだ PDATS 寒天培地上にまき、30℃ で 8 日間変異株の孢子形成を行った。形成コロニーから別の PDATS 寒天培地上 (CMC 無し) にレプリカを作製し、さらに 3～7 日間孢子形成を行い、孢子を生理食塩水で回収後 4℃ 冷蔵保存した。

変異株によるセルラーゼの産生は 3 L 容三角フラスコで行い、培地組成 (pH は約 5.0) は硫酸アンモニウム 7.5g/L、酵母エキス 0.25g/L、ペプトン 0.75 g/L、リン酸二水素カリウム 2g/L、硫酸マグネシウム七水和物 0.3g/L、塩化カルシウム二水和物 0.3g/L、Tween-80 0.2ml/L、硫酸鉄七水和物 0.005g/L、硫酸マンガン一水和物 0.0016g/L、硫酸亜鉛七水和物 0.0014g/L、塩化コバルト六水和物 0.002g/L である。なお、炭素源は前培養 (シード用) には乳糖 30g/L、本培養 (セルラーゼ産生用) にはセルロース微結晶粉 30g/L、キシラン (ビーチウッド由来) 10g/L、L-Sorbose 1g/L の混合物を用いた。本培養における炭素源を稲藁とする場合、シードの前培養後、稲藁 30g/L を基質として与えた。培養条件は、前培養が 100ml、150rpm、37℃、3 日間で行い、本培養が 1L、150rpm、30℃、10 日間とした。

2.2.2 セルラーゼの定量と組成分析

セルラーゼ粗酵素の回収・濃縮は次の手順に従った。まず、変異株の培養終了後、培養液を 8,000 ×g で遠心分離し、上澄液をガラスフィルターで吸引ろ過した。ろ液にアジ化ナトリウムを 0.02% になるように添加し、3 日間 4℃ で冷蔵保存すると未分解の残存セルロース微結晶が沈殿した。次に、ろ液の上澄み (残存セルロースを除く) に対して、GE ヘルスケア社の QuixStand System と Xampler カートリッジ (10 kD 限界) を用いて限外濾過法による濃縮を行った。この酵素タンパク濃縮液に対して酵素精製用硫酸アンモニウム (硫安) を 60% になるように添加し、4℃ で一晩静置した後、22,000 ×g で冷却高速遠心分離し、全酵素を硫安沈殿させた。最後に、脱塩カラム PD-10 (GE ヘルスケア社) で硫安を除去し、バッファーを MilliQ 水に交換し、4℃ (分析用) あるいは -80℃ (ストック用) にて保存した。

酵素タンパクの定量は標準 Bradford 法によって行った。標準サンプルとして牛血清アルブミン (BSA) を 0.02～0.1 (g/L) でエッペンチューブに 100 μ L 入れ、Bradford 試薬 (色素は Coomassie Brilliant Blue : CBB) を 1mL 添加し、ボルテックスミキサーで攪拌後 15 分間反応させ、吸光度 (OD_{595}) を測定して検量線を作成した。実試料も同様に測定した。

セルラーゼの組成は SDS-PAGE により分析した。SDS-PAGE ゲルのウェルに入れる酵素タンパク量を約 10 μ g に調製し、SDS サンプルバッファーと混合した。なお、SDS-PAGE 分析の前に、阻害物質 (アルブミンなど) を除去する目的で、各サンプルに対してマイクロバイオスピナラム (BioGel 6-DG、バイオラッド社) による脱塩を行った。SDS-PAGE の展開においては 1 ゲル当たり約 200mV の電圧にて各酵素タンパクの分離を行った。その後、ゲルを MilliQ 水で洗浄し、CBB 溶液で染色した。染色したゲルを脱色液 (リン酸とエタノール混合液) で脱色し、ゲルに残ったタンパクのバンドをスキャナで読み取り、画像処理ソフトで解析した。粗酵素に含まれる酵素タンパクの種類を確認するため、脱塩した粗酵素液に対して 2 次元電気泳動を行なった。2 次元電気泳動はまず等電点 (pI) による酵素タンパク成分の分離を行い、その後分子量による分離を行

った。pI による分離は IPGStrip 3-10NL (BioRad 社) を用いて等電点電気泳動 (IEF) システムによって行った。分子量による分離は pI 展開した IPG ストリップを脱塩処理、還元処理及びアルキル化処理した後、SDS-PAGE により行った。

2.2.3 セルラーゼの分離・生成

セルラーゼの分離は、イオン交換とセラミックヒドロキシアパタイトにより行なった。イオン交換では、まず強陰イオン交換 HighQ カラムにより分離し、その後非吸着分あるいは特定吸着分に対して弱陽イオン交換カラム CM による分離を行なった。強陰イオン交換 HighQ カラムによる分離を向上させるため、移動相の検討を行なったところ、20 mM NaPi バッファーで pH7.0 より pH7.2 の方が目的画分を多く分離できることが分かった。強陰イオン交換でタンパクを分離する場合、移動相の pH を目的タンパクの等電点より 0.5 以上高く設定する必要があるが、産生セルラーゼ等電点はアルカリ側に多く存在していたので、HighQ での分離は pH7.2 で行うことにした。次に移動相の種類を確認するために、20mM KPi、20mM NaPi、20mM Tris/HCl を用いてセルラーゼ分離 (pH7.2) を検討した。その結果、20mM Tris/HCl (pH7.2) で最も良好なピーク分離ができ、非吸着画分よりは高い回収率で目的画分を得ることが可能となった。

イオン交換カラムに吸着したタンパクは塩濃度勾配法で溶出されるので、まず勾配濃度を決定するために疎水性カラム HIC - Phenyl-5PW (Tosoh 社) により溶出実験を行った。硫酸アンモニウム (イオン極性が強い) による塩濃度を 1M (高塩濃度) から徐々に下げていくと、0.6M H_2SO_4 から少しずつ目的タンパクが溶出し、最も溶出するのは低塩濃度域の 0.2M 以下であることがわかった。したがって、低塩濃度域で溶出させるため、イオン交換カラムではイオン極性の弱い塩化ナトリウムを用いて、濃度を硫酸アンモニウムの半分程度 (0~0.3M) に設定した。

2.2.4 セルラーゼ活性

植物由来セルロースは結晶性のセルロースと非結晶性のヘミセルロースからなるホロセルロース構造になっている。これらを糖に分解するためには、それぞれに分解能をもつセルロース分解酵素 (セルラーゼ) が必要である。*T. reesei* が産生するセルラーゼは複数の酵素タンパクから構成されており、主要成分はエンドグルカナナーゼ (EG、エンド型)、セロビオヒドロラーゼ (CBH、エキソ型)、 β グルコシダーゼ (BGL) の 3 種類であり、その他にヘミセルロースのキシランを分解しキシロースを遊離するキシラナーゼ (XYN) も含まれている。さらに、各酵素には幾つかの異なる種類が存在する。本研究では分子量を参考にして EG、CBH I、CBH II、BGL 及び XYN の 5 種類を扱うことにした。

酵素活性は基質として Whatman ろ紙、アビセル (微結晶セルロース) 粉末、カルボキシメチル化セルロース (CMC)、pNPG (p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside) などから 1 分間で 1 μ mole のグルコース (もしくは還元糖) を生成するのに要する酵素量を 1 ユニット (U) として測定した。酵素の全体的なセルラーゼ活性は Whatman ろ紙 (No. 1) を用いて測定した。まず、エッペンチューブにろ紙 10mg 入れて、酵素タンパク量 0.1mg、酢酸 buffer 50mM、MilliQ 水を加え、全量 1mL として混合後、50℃又は 30℃で、1000rpm、1 時間の糖化を行った。糖化後、温水浴で 5 分間煮沸により酵素を失活させた後、遠心分離で残存ろ紙を沈殿させ、上澄液中の糖を HPLC あるいは DNS 法 (還元糖) で分析した。低濃度セルラーゼの場合は、フィルタペーパーアッセイ (FPA) 法 (米国 Technical Report NREL/TP-510-42628) に基づき、粗酵素液の希釈系列を作製し、それぞれに対して前出と同様な操作を行い、上澄液中の糖を DNS 法で測定して FPU 活性とした。

CBH 活性は、アビセル粉末を基質として、アビセル粉末 30mg を 990 μ L の 0.1M 酢酸バッファーに浸し、10 μ L の酵素液を添加し (全体量 1mL)、50℃又は 30℃で 1 時間反応し、5 分間煮沸した後、DNS 法により還元糖量を測定した。EG 活性は、CMCase 測定法に基づき、基質を 0.5% CMC 溶液とした全体量 1mL に対して CBH 活性と同様な操作で測定した。BGL 活性は、pNPG 測定法に基づき、25 μ L の酵素液、25 μ L の pNPG (10mM)、50 μ L の 0.1M 酢酸バッファーを用意し、50℃又は 30℃で 30 分間反応させた後、100 μ L の 0.4M NaOH-glycine 緩衝液 (pH10.8) で反応を停止し、波長 405nm で吸光度を測定した。サンプルから遊離した pNP 量は絶対検量線により読み取った。

前処理済み稲藁に対する糖化活性を評価するために、亜塩素酸・重曹法で前処理した稲藁に対して 30℃で産生セルラーゼによる糖化を行なった。前処理済み稲藁を 0.1M 酢酸バッファー (pH4.8) に一晚浸し、その稲藁 20mgDW (乾重) に対して酵素/基質 (E/S) 比が 1/100 になるよう産生セルラーゼを添加し、18~24 時間の糖化を行ない、酵素を 5 分間煮沸による失活後、液中の糖を HPLC 法及び DNS 法により測定し、糖化率を算出した。

2.3 変異・融合酵母による発酵

2.3.1 菌株と培地

キシロース利用変異・融合酵母を製造するに当たって、エタノール発酵能の高い *Saccharomyces cerevisiae* NBRC2114 とキシロース代謝能を持つ *Candida intermedia* NBRC10601 (Synonym: *Kluyveromyces cellobiovorous*) (両酵母とも NITE-NBRC より取得) を野生株として用いた。現時点では *S. cerevisiae* と *C. intermedia* は異なる分類学上の科に属する酵母であることが想定されたので、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づき、細胞融合実験に当たっては事前に拡散防止措置 (P1 相当) に関して本学及び文部科学大臣の確認を得た。

細胞融合では両酵母の一倍体子嚢胞子のプロトプラストによる融合を行うため、*C. intermedia* の胞子形成能を事前に確認した。酢酸カリウム寒天培地にて *C. intermedia* を 30℃で 7 日間培養し、形成された胞子を 0.05% Tween80 を含む生理食塩水で洗い出し、遠心分離 (3,000×g、10 分) した。採取した胞子をスライドグラスに乗せ、5% ブリリアントグリーン溶液を垂らしてゆめく火炎で焼いた後、水洗して、胞子を緑色に染色した。また、栄養細胞を赤く対比染色するために 0.5% サフラニン液に 10 秒程度浸漬し、再度水洗した。染色した胞子は顕微鏡にて確認し、加えて胞子の形状を SEM により観察した。

培養に使用した培地は、その目的によって YM 培地 (ペプトン 5g/L、酵母エキス 3g/L、麦芽エキス 3g/L)、YMG 液体培地 (YM+グルコース 10g/L)、YMG 培地 (YM+グルコース 10g/L+寒天 20g/L)、YMGX 培地 (YM+グルコース 10g/L+キシロース 10g/L)、YMXDOG 培地 (YM+キシロース 10g/L+2-デオキシグルコース (DOG) 5g/L+寒天 20g/L)、YMFDOG 培地 (YM+フルクトース 10g/L+DOG 適量+寒天 20g/L)、さらに MM 培地 (酵母窒素ベース 1.7g/L (アミノ酸無し) +硫酸アンモニウム 5g/L+寒天 20g/L)、MMGX 培地 (MM+グルコース 20g/L+キシロース 20g/L)、MMXDOG 培地 (MM+キシロース 10g/L+DOG 5g/L) を用意した。また、細胞融合における変異株の胞子形成は SPO 培地 (酢酸カリウム 10g/L+グルコース 0.5g/L+酵母エキス 1g/L+寒天 20g/L) を使用した。

2.3.2 変異処理とプロトプラスト融合

細胞融合の前に、異なる表現型 (phenotype) の様々な株を確保するために、*S. cerevisiae* と *C. intermedia* に対してメタンスルホン酸エチル (EMS) を変異原とする変異処理を施した。変異処理後、それぞれの変異細胞を 0.1M リン酸バッファーで 3 回洗浄し、細胞懸濁液 100 μ L を 3g/L の DOG を含む YMFDOG 培地とレプリカとしての YMG 培地 (DOG 無し) に分散させ、それぞれを 30℃で培養した。その後、YMFDOG 培地上の *S. cerevisiae* 変異細胞のコロニーを採取し、5g/L の DOG を含む YMFDOG 培地にて 30℃で再生培養後、DOG 耐性変異株を選択し、M2 株と命名した [文献 1]。一方、*C. intermedia* 変異細胞は YMFDOG 培地では全く増殖せず、YMG 培地のレプリカから DOG 感受性変異株を選択し、m11 株と命名した。

M2 株と m11 株をそれぞれ SPO 培地に植種し、胞子形成のため 24 時間培養を行った。各株の一倍体の子嚢胞子を含む子嚢を採取し、一倍体の二倍体化を抑制することを期待して添加した α ファクター (Sigma-Aldrich) 2mg/L を含む YMG 液体培地にてそれぞれ 30℃で 2 世代培養した。それぞれの対数増殖期の細胞を遠心分離 (5,000×g、10 分) し、細胞ペレットを 20mM Tris/HCl バッファー (1% β -メルカプトエタノールと 10mM EDTA を含む) で 10 分間処理した。再び遠心分離後、細胞ペレットを 20mM リン酸バッファー (0.6M ソルビトール、0.6M KCl、10mM β -メルカプトエタノールを含む) (pH6.5) に分散させ、各細胞のプロトプラストを得るためにザイモリアーゼ 20-T を濃度 20mU/mg-cell にまで添加して 30℃・1h で反応させた。その後、同量のプロ

トプラストをそれぞれ 20mM リン酸・クエン酸バッファー (30% MgSO_4 、20mM Tris/HCl バッファー (pH7.5) (1 M ソルビトールと 0.1M EDTA を含む) を含む) (pH6.5) に分散させ、精製した。

両変異株のプロトプラスト融合を行うため、各精製プロトプラストを 1:1 の割合で 1mL 融合バッファー (1.2M ソルビトール、30%PEG4000、0.1M リン酸カルシウム、10mM Tris/HCl バッファー (pH7.2)、1g/L BSA、15%DMSO を含む) にて混合し、1 時間反応させ、その後核融合を確実にするため電気泳動装置にて 50V の直流電流に 2 秒間さらした。

次に、融合プロトプラスト細胞の細胞壁等の再生のために、再生培地 (1.2M ソルビトール、5 倍濃縮の YM 培地、2%グリセロール、0.6M 塩化カリウム、1mg/mL コルヒチン、5g/L DOG を含む) にて 30°C で 6~8 時間培養した。ここに、DOG は DOG 耐性細胞を選択するために添加した。コルヒチンは多倍数性 (polyploidy) の指示薬として用いられるが、体細胞分裂 (mitosis) の抑制剤としても知られており、ここでは後者の効果を期待して融合していない変異細胞 (α 細胞、a 細胞) の接合を避けるために添加した。部分再生した融合細胞を遠心分離 (3,000 $\times$ g、10 分) し、その細胞を 0.4M のリン酸カルシウムを含む 1.5%寒天に分散させ、直ちに 0.6M のリン酸カルシウムを含む MMXDOG 培地に塗布し、融合細胞を完全に再生させて変異・融合酵母を製造した。

2.3.3 シード培養と発酵実験

変異・融合酵母のシード培養は二段階で行い、まず当該酵母を YMGX 培地にて 30°C で 3 日間のコロニー形成を行い、そのうち最大の単コロニーを 100mL の YMG 液体培地に植種し、150rpm で攪拌しながら 30°C で 12~18 時間の培養 (前々培養) を行い、次にその 10mL をそれぞれ 4 系列の 100mL の YMGX 液体培地に植種し、同様に 18~24 時間の培養 (前培養) を行った。集菌後、リン酸バッファー食塩水 (PBS) で 2 回洗浄し、再び 50mL の PBS 液に分散させた (シード液)。

発酵実験は、ジャーファーマンタを用いて 1.3~1.6gDW の融合細胞を含む 50mL シード液を 950mL の MMGX 培地に植種し、温度 30°C で行い、5N-NaOH により反応液を pH5 付近に設定することにより雑菌の繁殖を抑えた。反応液を微好気に保つため、液中の溶存酸素 (DO) を飽和濃度の 5% 程度に維持するよう空気量を調節した。また、稲藁の並行複発酵実験では、イオン交換水 800mL に基質として前処理済み稲藁 50gDW と硫酸アンモニウム 5g を添加し、オートクレーブにかけた後、酵母窒素ベース 1.7g を添加し、pH を調整した上で、低温性セルラーゼ 0.5g (S/E=1/100) を含む液 60mL を添加し (全液量は概ね 1L となる)、MMGX 培地発酵と同様な条件 (30°C、pH5、微好気) で発酵を行った。なお、発酵液の糖成分は HPLC で分析した。

2.3.4 遺伝子・タンパク解析

ジャーファーマンタの培養 (反応) 液中の炭素源が無くなった直後に細胞を採取し、滅菌水で 2 回洗浄した後、細胞を凍結乾燥した。凍結乾燥細胞 100mg をプロテアーゼ阻害剤 5 μ L を含む酵母タンパク抽出剤 (Y-PER、和光純薬) 250 μ L に懸濁させ、60 分間反応後、遠心分離 (14,000 $\times$ g、10 分) した。上澄液の余分な塩類を除去するため、10mM Tris/HCl (pH7.4) で緩衝された脱塩カラム (Bio-Gel P-6、BioRad) を用いて脱塩し、溶出液をタンパク解析の試料とした。

キシロース代謝に関与する遺伝子 (*xr*、*xdh*、*xk*) とアセトアルデヒドのエタノール転換に関与する遺伝子 (*adh1*) の発現レベルを調べるため、M2 株、m11 株及び変異・融合酵母に対して各株の全 mRNA に基づく RT-PCR 解析を行った。各細胞を微好気条件で 18 時間培養した後、遠心分離 (5,000 $\times$ g、4°C、10 分) し、細胞を滅菌水で 2 回洗浄して直ちに凍結乾燥した。全 RNA は、細胞 30mgDW を粉砕キット (GE Healthcare) で粉砕後、NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel GmbH) を用いて抽出した。mRNA は Oligotex-dT30<super>mRNA 精製キット (TakaraBio) を用いて全 RNA から精製分離した。設計された PCR プライマーは以下の通りであり、精製 mRNA の増幅を One Step PrimeScript RT-PCR Kit (TakaraBio) を用いて行った。RT-PCR 遺伝子産物は TAE バッファーの 1%アガロースゲル電気泳動で分離した。

Sc-*gre3*: (forward) 5' -CCATCCAGGCAGTACCACTT-3'、(reverse) 5' -TACCATCCAACCAGGTCCAT-3'

Sc-*xks1*: (forward) 5' -GGCTCAATTAACAGGGTCCA-3'、(reverse) 5' -ACAGGCATCTGCCTCCTCTA-3'

Sc-*adh1*: (forward) 5' -AGGCCAACGAATTGTTGATCA-3'、(reverse) 5' -GTGTCAACAACGTATCTACCA-3'

Ci-*xr*: (forward) 5' -CCTGCTGTTTGCAAGTTGA-3'、(reverse) 5' -CTCTTTGAGCGGACCATCTC-3'

Ci-*xdh*: (forward) 5' -AATGGTCTTGGGTCACGAATCC-3'、(reverse) 5' -GCTCTGACCAAGTCGTAGGCTTC-3'

Ci-*xk* : (forward) 5' -GGATTCGACTTATCCACCCAACAA-3'、(reverse) 5' -CCAGTACACGGATCCATGTTG-3'
 Ci-*adh1* : (forward) 5' -CACTCACGATGGTTCATTTCG-3'、(reverse) 5' -AAGATGGTGCACATTGG-3'

全タンパクの発現については各株のタンパクを CBB 染色二次元電気泳動 (2D-PAGE) で解析した。まず、IPG ReadyStrip pH3-10 NL (BioRad) を用いて脱塩タンパク試料の等電点電気泳動を行った。次に、IPG ストリップをアルキル化溶液 (0.375mM Tris/HCl (pH8.8) 中に 100mM 酢酸ヨード、6M 尿素、2%SDS、20%グリセロールを含む) で処理した後、15%非グラジエント SDS-PAGE 電気泳動にかけ、最後にゲルを CBB 溶液で染色して全タンパクの発現の変化を調べた。

タンパクスポットを MALDI-TOF/TOF 解析により同定するため、スポットを 50%アセトニトリルで洗浄して SDS や塩分等を除去した後、洗浄済み試料を Genomine 社に委託して分析した。その概要を記すと、溶媒を完全に除去するためスポットを真空乾燥し、50mM 重炭酸アンモニウム中の trypsin (8~10ng/ μ L) (pH8.7) で再び水和させ、37°C で 8~10 時間反応後、スポット試料を Applied Biosystem 4700 proteomics analyzer を用いて分析 (Genomine 社) する、という手順である。シーケンスタグ検索は MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) プログラムで行った。

3. 結果と考察

3.1 亜塩素酸・重曹法による前処理

3.1.1 亜塩素酸・重曹処理による稲藁の脱リグニンと膨潤化 (形状と化学的な変化)

稲藁の前処理は、酢酸酸性域での亜塩素酸ナトリウム (ASC) 処理による脱リグニン、及び重曹 (SB) 処理による膨潤化と結晶構造の改変を行った。図 3.1.1 に示したように、無処理の稲藁 (J) に対して、ASC 処理を 1 回~3 回と繰り返すにつれて漂白され (A、B、C)、この後に SB 処理を加えることによりパルプ状になり (D、E、F)、拡大すると膨潤した微細繊維に変化していることがわかる (K、L)。特に (3 回 ASC+SB) 処理において稲藁の漂白と膨潤・微細繊維化の効果が大きかった (F、L)。

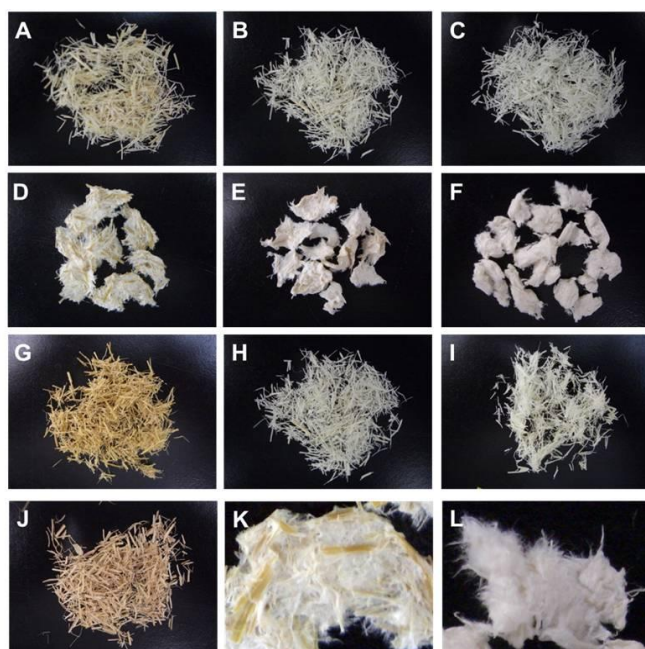


図 3.1.1 稲藁の亜塩素酸(ASC)・重曹(SB)法による前処理における形状変化

A、B、C：順に ASC1 回、2 回、3 回
 D、E、F：順に ASC+SB、2 回 ASC+SB、3 回 ASC+SB
 G、H、I：順に SB、SB+ASC、SB+3 回 ASC
 J、K、L：順に無処理、E の拡大、F の拡大

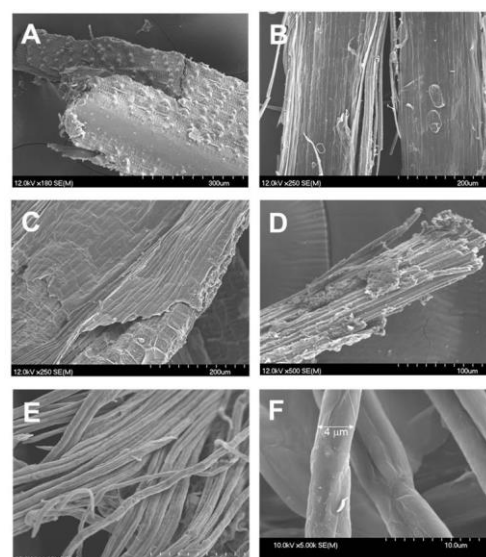


図 3.1.2 前処理済み稲藁の SEM 写真

A：無処理、B：3 回 ASC 処理、C：SB 処理
 D：(SB+3 回 ASC) 処理、E：(3 回 ASC+SB) 処理
 F：E の拡大 (マイクロフィブリル)

これに対して、前段で SB 処理を行ってから ASC 処理を施しても、漂白はある程度進むが、形状はほとんど変化しなかった (G、H、I)。SB 処理による膨潤・微細繊維化は ASC 処理した稲藁に対して効果があり、逆の処理順 (SB→ASC) ではほとんど効果がなかった。

前処理済み稲藁の形状変化を SEM で観察すると、図 3.1.2 に示したように、表面をリグニン層で覆われた無処理稲藁に対して (A)、3 回 ASC 処理は表面リグニンの除去は見られるが繊維束のままであり (B)、SB 処理は繊維束がある程度破碎されたが表面リグニンが残っており (C)、(SB + 3 回 ASC) 処理は表面リグニンの除去と繊維束の破碎は見られたが十分とは言えない (D)。これに対して、(3 回 ASC+SB) 処理を施すと、表面リグニンが除去され、繊維束は膨潤・微細繊維化が進み、マイクロフィブリルがバラバラになっていることが確認された (E、F)。また、繊維束の破碎は内部リグニンの除去にも寄与していることが推測される。これらの結果は図 3.1.1 の形状変化をよりマイクロ単位で裏付けており、また ASC 処理による漂白は脱リグニン (特に表面リグニンの除去) の結果であることも分かった。

前処理による稲藁のリグニン含有量の変化を調べるため、図 3.1.3 にクラークソン法と κ 値により定量した結果 (A) と前処理済み稲藁の熱処理後の色の変化 (B) を示した。図 3.1.3(A) に示したようにクラークソンリグニンと κ 値の間には強い相関がみられ、無処理の稲藁のリグニン含有率 14.1% (乾重%) に対して κ 値は約 16.0 であった。稲藁の ASC 処理 (β) はリグニン含有率を 4.9~2.7% にまで低下させるが、SB 処理 (α) は 12.0~10.6% 程度に留まった。ASC と SB を組み合わせた処理の場合、ASC 処理後に SB 処理を施す (ϵ) とリグニン含有率は 3.8~1.7% にまで低下するが、SB 処理後に ASC 処理を行う (γ) と 6.3~3.7% であり、リグニン除去率が低下した。リグニン除去率の最も高いのは (3 回 ASC+SB) 処理であり、リグニンを 88% 除去できることが分かった。

図 3.1.3(B) は無処理 (a)、3 回 ASC 処理 (b)、(SB+3 回 ASC) 処理 (c) 及び (3 回 ASC+SB) 処理 (d) を施した稲藁をオートクレーブで熱処理し、稲藁の色の変化を調べたものである。リグニン除去率の最も高い (3 回 ASC+SB) 処理により稲藁はきれいに漂白されていたが、3 回 ASC 処理や (SB+3 回 ASC) 処理では漂白が不十分であり、先のリグニン量の変化を視覚的にも確認できた。稲藁のリグニンはその表面を覆うリグニン層に多く存在するが、繊維束の内部にも存在している。(SB+3 回 ASC) 処理は図 3.1 の (I) では一見完全漂白されているように見えたが、表面リグニンは除去されても内部リグニンが残っているため、図 3.1.3(B) の (c) の通り熱処理すると漂白 (脱リグニン) が十分ではないことがわかる。SB 処理は ASC 処理済み稲藁の膨潤・微細繊維化を促進することにより、内部リグニンを除去する効果があると言える。

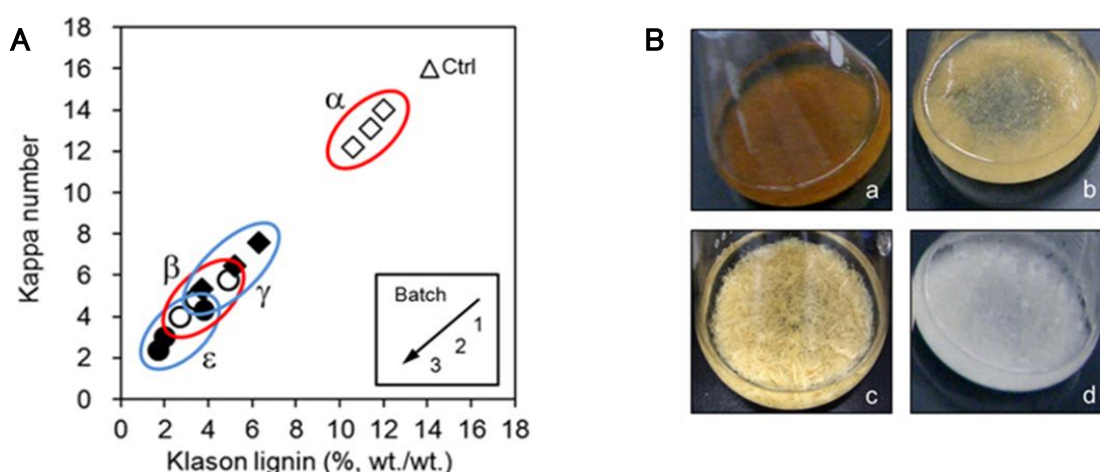


図 3.1.3 稲藁の前処理によるリグニン量の変化 (A) と熱処理後の色の変化 (B)

A: クラークソンリグニン量 (乾重%) の変化と κ 値の変化; Ctrl は無処理、 α (白菱形) は SB 処理、 β (白円) は ASC 処理、 γ (黒菱形) は (SB+ASC) 処理、 ϵ (黒円) は (ASC+SB) 処理、1~3 は処理回数
B: 前処理済み稲藁の熱処理 (122°C、20 分) 後の色の変化; a は無処理、b は 3 回 ASC 処理、c は (SB+3 回 ASC) 処理、d は (3 回 ASC+SB) 処理

前処理による稲藁の化学的な変化を調べるため、リグニンを含まないアビセルを対照として FTIR 解析を行い、稲藁に見られる FTIR スペクトルの主なバンド（波数）と解析結果を表 3.1.1 と図 3.1.4 に示した。まず、リグニン構造の芳香環の振動に起因するカルボニル (C=O) 伸縮による 1745 と 1732 cm^{-1} バンドの変化が観察された。カルボニルはリグニン構造側鎖の重要な官能基であり、特に 1732 cm^{-1} バンドはリグニン側鎖とヘミセルロースとの連結に関連する。これらのバンドは 3 回 ASC 処理では変化しなかったが、SB 処理又は (3 回 ASC+SB) 処理によりほぼ完全に消滅した。このことは SB 処理による膨潤（繊維束の破碎）によってヘミセルロースに連結した内部リグニンが除去されていることを意味する。次に、リグニン構造の芳香環 1606 cm^{-1} バンドは 3 回 ASC 処理によって消滅したが、SB 処理では残っており、芳香環は ASC 処理によって破壊されることが分かった。プロパノイド 1638 cm^{-1} バンドはしばしばセルロース吸着水バンドと重なるため、明確な変化は観察されていない。芳香環 C-O 伸縮に起因する 1512 cm^{-1} バンドは 3 回 ASC 処理でかなりの程度消え、(3 回 ASC+SB) 処理で完全に消滅したが、SB 処理では除去されなかった。FTIR 解析から、(3 回 ASC+SB) 処理は主に 1606 と 1512 cm^{-1} バンドのリグニン構造ユニットを除去し、SB 処理は 1745 と 1732 cm^{-1} バンドの内部リグニンの除去に関わっていることが分かった。

表 3.1.1 稲藁に対する FTIR スペクトルの主なバンド

Wave number (cm^{-1})	Assignment
3450-3350	O-H stretching
2901-2892	C-H stretching
1745	Carbonyl bonds (associated with lignin side chain removal)
1732	Alkyl ester from cell wall hemicellulose C=O; strong carbonyl groups in branched hemicellulose
1638, 1606	Doublet phenolics of remained lignin
1512	Aromatic C-O stretching mode for lignin; guayacil ring of lignin; lignocellulose
1430	CO ₂ stretching; carboxylic acids
1373	C-H stretch of cellulose
1247	C-O-H deformation and C-O stretching of phenolics
1165	Antsymetric stretching C-O-C glycoside; C-O-C β -1,4 glycosil linkage of cellulose
1060, 1035	C-O vibration of cellulose
898	Amorphous cellulose vibration; glucose ring stretch

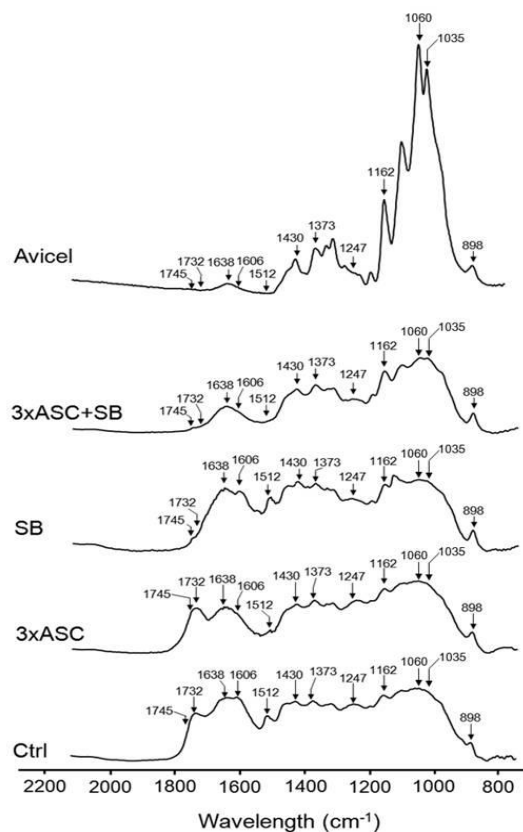


図 3.1.4 FTIR 解析における稲藁の前処理による化学的变化（波数 2200～760 cm^{-1} ）

以上の結果を総合すると、稲藁の前処理は ASC 処理の後段に SB 処理を行う必要があり、その逆の処理順では効果が低くなることが明らかになった。亜塩素酸・重曹法による稲藁の前処理は、3 回 ASC 処理により表面リグニン層が破壊・除去（脱リグニン）され、これに続く SB 処理により繊維束の膨潤・微細繊維化と内部リグニンの除去が進むことが確認された。

3.1.2 脱リグニン過程で生成される塩素種

亜塩素酸ナトリウムを用いた稲藁の脱リグニン過程 (ASC 処理) で生成される塩素種は、図 3.1.5 に示したように亜塩素酸イオン (ClO_2^-)、塩化物イオン (Cl^-)、塩素酸イオン (ClO_3^-) 及び二

酸化塩素 (ClO_2) であった。二酸化塩素による脱リグニンもいくつか報告されているが、ここでは二酸化塩素の生成量はわずかであり、その脱リグニンへの寄与は低いと推定される。なお、生成される塩素種は脱リグニン反応器が開放系でも密閉系でもほぼ同じ結果であった。

亜塩素酸ナトリウムは水中で pH に応じて解離し、亜塩素酸イオンに転換される。また、pH2 以下の酸性条件では亜塩素酸ナトリウムは二酸化塩素や塩化物イオン等を生成する。また、系内に被酸化性物質がある場合、亜塩素酸ナトリウムは被酸化性物質を酸化し、自身は塩化物イオンに還元される。本実験においては、酢酸緩衝系 (pH=4.5~4.8) であるために二酸化塩素の生成はわずかに留まり、亜塩素酸イオンによりリグニンが被酸化性物質として酸化されたと考えられる。実際に、コントロール (基質無し) と標準リグニンにおいて生成された塩素種から、リグニンは亜塩素酸イオンにより酸化・除去、すなわち脱リグニンされ、一方、亜塩素酸イオンは塩化物イオンに還元されたと解釈できる。また、このとき塩素酸イオンも生成されていた。

同様に、稲藁においても亜塩素酸イオンによりリグニンが酸化・除去され、塩化物イオンが生成される。但し、ASC 処理 1 回では亜塩素酸イオンが残存していても約 36% (図 3.1.3(A) の稲藁乾重の 5%) のリグニンが残り、ASC 処理 3 回目でも約 20% (図 3.1.3(A) の稲藁乾重の 2.8%) のリグニンが残留した。前述の通り、この残留リグニンは繊維束の内部リグニンであり、ASC 処理のみでは亜塩素酸があっても内部リグニンが除去されず、SB 処理による膨潤化が脱リグニンを完遂するのに重要な役割を果たすことが確認された。

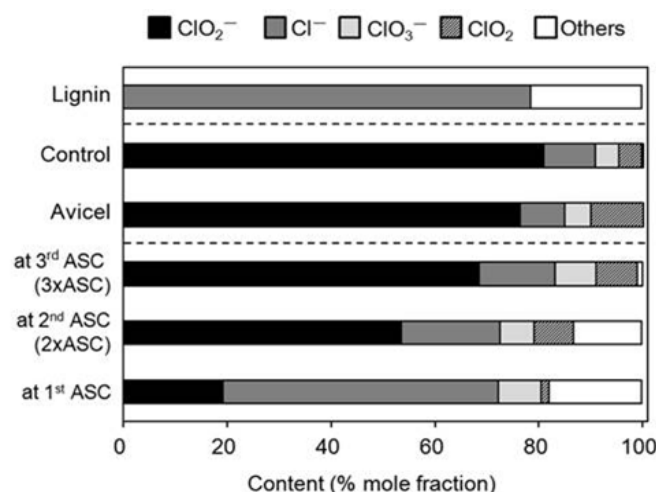


図 3.1.5 亜塩素酸による脱リグニン過程で生成される塩素種

Control : 基質無し、標準リグニンとアビセルセルロースは比較対象

ASC : 1st は 1 回目、2nd は 2 回目、3rd は 3 回目の ASC 処理

3.1.3 ミクロフィブリルの結晶性と結晶構造の変化

稲藁のような植物バイオマスは幅 3~4nm の微細繊維 (ミクロフィブリル) が基本単位となって構成されているが、この微細繊維は高い結晶性を示しており、その結晶型をタイプ I と呼ぶ。稲藁の難分解性はそのタイプ I の結晶構造とも深い関係がある。稲藁の分解性を向上させるためには、セルロース繊維束からリグニンやヘミセルロースを分離することに加えて、この微細繊維の結晶構造を改変する必要がある。そこで、前処理による稲藁の結晶性の変化を調べるため、セルロース繊維の結晶性に関して X 線回折及び結晶構造に関して FT-IR 解析を行った。

稲藁の前処理によるセルロース結晶性の変化について、結晶性セルロースのアビセルを比較対象として、X 線回折によるスペクトル変化を図 3.1.6 に示した。結晶性の高いアビセルが示した 5 つの結晶格子面のピーク (干渉強度) に対して、無処理稲藁は (002) 格子面以外の干渉強度はかなり低かったが、これは非晶質のリグニンやヘミセルロースの妨害によるものと考えられる。3 回 ASC 処理によって (002) や (101) 格子面の強度が増大したが、これは図 3.1.2 の SEM 観察でも分かるように表面リグニンの除去によりセルロースがある程度出現してきたためであるが、

その他の格子面はあまり変化しなかった。3回ASC処理の後SB処理を施すと、(002)や(101)格子面の強度は増加せず、再び減少した。これは膨潤・微細繊維化によりマイクロフィブリルが出現するが、同時にセルロースの非晶質化がある程度起きているためと推測する。これは、図3.4の波数1035と898 cm^{-1} バンドの変化において、必ずしも十分な変化ではないが、(3回ASC+SB)処理によりセルロースのC-O振動(1035 cm^{-1})が増大し、一方で非晶質セルロース振動(898 cm^{-1})も増大していることからある程度裏付けられる。

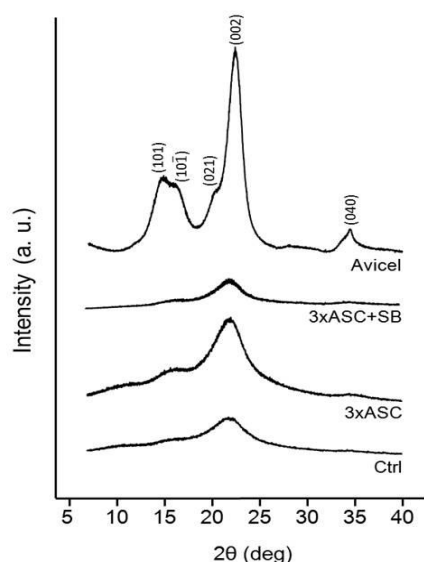


図3.1.6 X線回折における稲藁の前処理による結晶性の変化
Ctrl: 無処理稲藁、Avicel: 比較対象のアビセル

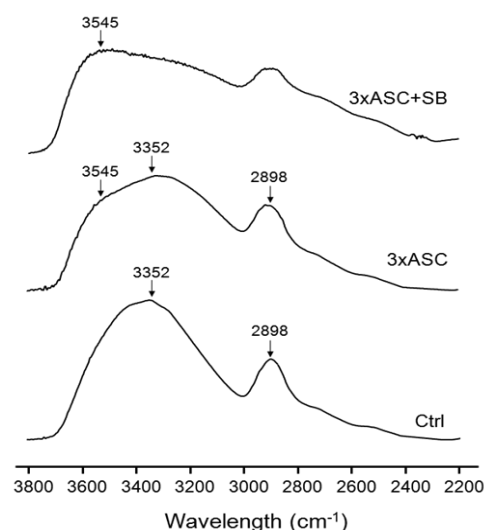


図3.1.7 FTIR解析における稲藁の前処理による結晶構造の変化(波数3800~2200 cm^{-1})

FT-IR解析によるセルロース繊維の結晶構造(結晶型)の変化を図3.1.7に示した。FT-IR解析の結果はIRスペクトルの変化を2200~760 cm^{-1} (低エネルギー領域)と3800~2200 cm^{-1} (高エネルギー領域)二つの領域に分けて示しており、前出の図3.1.4の低エネルギー領域には伸縮振動と変角振動による吸収が現れるため複雑なスペクトルとなり、図3.1.7の高エネルギー領域では伸縮振動による吸収のみのため比較的簡単なスペクトルとなる。

セルロースの結晶型はOH伸縮領域(3600~3100 cm^{-1} 付近)のスペクトル変化から推定できるが、自然界のセルロースはタイプIに分類される。稲藁の場合、図3.1.7の無処理稲藁(Ctrl)の波数3352 cm^{-1} バンドにタイプIの特徴的ピークが現れている。これが3回ASC処理と(3回ASC+SB)処理を施すことによって、ピークが3352 cm^{-1} から3545 cm^{-1} に転移しており、結晶型が無処理稲藁のタイプIから、混在型を経て、タイプIIに変化していることが分かる。タイプIに比べて、タイプIIは結晶密度が低く、分解性の高い結晶構造であり、この転移は上述の(3回ASC+SB)処理によるセルロースの非晶質化と矛盾しない。

3.1.4 CBH I 酵素による稲藁の糖化に対するASC処理とSB処理の相乗効果

稲藁の前処理としてその形状、リグニン含量及び化学構造等の変化から(3回ASC+SB)処理が効果的であることを明らかにした。ここでは、稲藁の糖化に対するASC処理とSB処理の相乗効果を評価するため、セルラーゼのうち結晶セルロース末端からセロビオースを分離するセロビオヒドロラーゼCBH I (Cel17A)を用いて、各処理の稲藁の糖化(分解)に対する効果を調べた。セルラーゼには役割の異なる様々な酵素が含まれているので、いわゆるカクテル効果を除き、セルロースの結晶性に対する前処理効果を評価するために、カラムクロマトグラフィにて工業用セルラーゼ(Celluclast 1.5L)からセルロースの結晶部位を攻撃する酵素であるCBH Iを分離した。

工業用セルラーゼの粗酵素と分離酵素を SDS-PAGE により分離した結果を図 3.1.8(A)に示す。分子量 62kDa のバンドが CBH I であり、CBH I をほぼ分離することができた (Lane3)。結晶性セルロースであるアビセルに対する糖化活性を調べたところ、分離した CBH I は 1.49U/mg であり、粗酵素 (Lane1) の 1.5 倍高い活性を示した。一方、非晶質の CMC 活性に対しては、粗酵素の 1/4 程度の活性ではあるが、この CBH I は 0.16U/mg の活性を示した。CBH I は概ね分離・精製されたが、非晶質セルロースを攻撃する EG I (Cel17B) も少し混ざっているものと思われる。

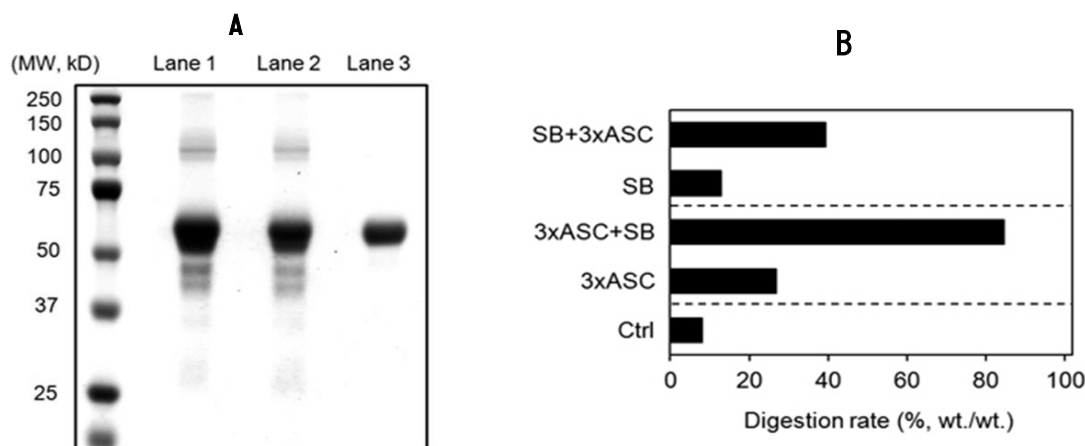


図 3.1.8 CBH I 酵素による稲藁の糖化に対する亜塩素酸 (ASC)・重曹 (SB) 処理の相乗効果

A: 工業用セルラーゼからのセロビオヒドロラーゼ CBH I の分離・精製; Lane1 は非脱塩の粗酵素、Lane2 は脱塩試料、Lane3 は分離 CBH I

B: CBH I による稲藁の糖化 (50°C、24h、pH4.8); Ctrl は無処理

工業用セルラーゼから分離された CBH I を用いて前処理済み稲藁の糖化を温度 50°C 行い、DNS 還元糖としての糖化率を示したのが図 3.1.8(B)である。無処理稲藁の糖化率 8% に対して、糖化率が 3 回 ASC 処理により 27% に、(3 回 ASC+SB) 処理により 85% に向上した。一方、SB 処理では 13%、(SB+3 回 ASC) 処理では 39% の糖化率に留まった。3 回 ASC 処理と SB 処理の単純加算の糖化率は 40% であり、(SB+3 回 ASC) 処理の 39% とほぼ同じ率であるのに対して、(3 回 ASC+SB) 処理は 85% という 2.1 倍の相乗効果を示した。ここに、(SB+3 回 ASC) 処理ではその相乗効果は全く出ず、ASC 処理の後に SB 処理を施すという順番が重要であることを再確認した。

3.1.5 前処理済み稲藁の工業用セルラーゼによる糖化

糖化に対する前処理の効果を総合的に評価するため、工業用セルラーゼ (Celluclast 1.5L+Novozym 188) を酵素/基質比=1/100 で添加して温度 50°C で稲藁の糖化を行い、その結果を糖化率として図 3.1.9 及び糖組成を表 3.1.2 に示した。無処理稲藁は 48 時間の糖化でも糖化率 20% に留まっていたが、3 回 ASC 処理により 62% に向上し、さらに (3 回 ASC+SB) 処理を行うと 6 時間で 86%、12 時間で 96% に達した。一方、比較対象としたアビセルは 48 時間で糖化率 72% であり、(3 回 ASC+SB) 処理済み稲藁よりかなり低い糖化率であった。これはアビセルの結晶化度が高く、結晶型がタイプ I であるためと思われる、逆に言うと、稲藁は (3 回 ASC+SB) 処理によりある程度非晶質化が起き、結晶型もタイプ II に転換されていたためと考える。

前処理の効果を定量的に評価するため、糖組成と糖化速度を調べた結果、表 3.1.2 に示したように、3 回 ASC 処理はグルコース 46% とキシロース 10% であるのに対して、(3 回 ASC+SB) 処理はそれぞれ 74% と 12% であり、より低分子への糖化が進んでいることが分かった。ここに、キシロースはヘミセルロース由来の糖であり、キシロース生成は前処理段階でヘミセルロースが分解・除去されていないことを意味し、エタノール発酵の基質の損失がないことも分かった。また、前処理の効果を最大糖化速度で見ると、(3 回 ASC+SB) 処理が 0.22 (wt./wt./h) であり、無処理の 11 倍、3 回 ASC 処理の約 5 倍及びアビセルの約 3 倍の糖化速度であった。

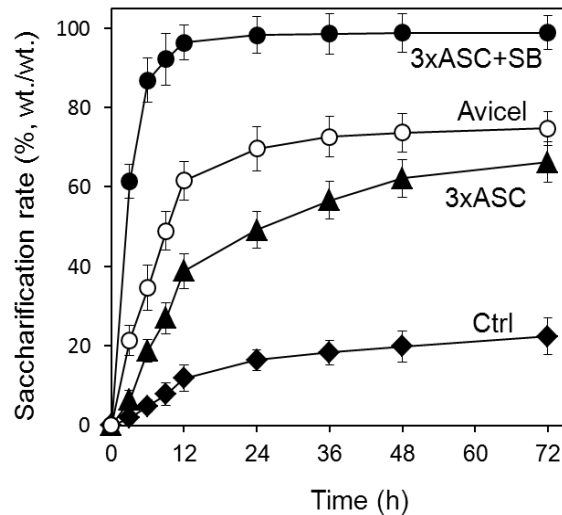


図 3.1.9 稲藁の酵素糖化に対する前処理の効果

Ctrl: 無処理、3xASC: 3 回 ASC 処理、3xASC+SB: (3 回 ASC+SB) 処理、Avicel: アビセルセルロース、糖化: (Celluclast 1.5L +Novozym 188) による 50℃での糖化

表 3.1.2 前処理済み稲藁の酵素糖化による生成糖の組成 (図 3.1.9 の糖組成)

前処理	糖組成 (% wt./wt.)			糖化速度 v_{max} (wt./wt./h)
	グルコース	キシロース	その他	
無処理(Ctrl)	14.1 ± 2.1	4.2 ± 1.5	3.9 ± 0.6	0.02
3 回 ASC	45.5 ± 3.6	10.4 ± 2.0	10.4 ± 0.7	0.04
3 回 ASC+SB	73.6 ± 1.9	11.9 ± 1.8	13.3 ± 1.5	0.22
Avicel	71.3 ± 4.2	n. d.	3.4 ± 0.2	0.08

3.2 低温性セルラーゼの産生と糖化活性

3.2.1 糸状菌 *T. reesei* NBRC31327 の変異処理とセルラーゼ活性

低温 (30℃) で高活性のセルラーゼを産生する株を獲得するために、NBRC から入手した *T. reesei* NBRC31327 を野生 (WT) 株として紫外線 (UV) 照射による変異処理と選択培地による選別で繰り返し改良し、その変異株のセルラーゼ産生能と活性を調べた。

変異処理の手順は図 3.2.1 に示した通りであり、まず野生株から増殖の早いコロニーを選別し、スラント培地でその孢子形成を行い、その培地に生理食塩水 1 ml を注ぎ孢子懸濁液として孢子を回収した。孢子懸濁液をエッペンチューブに移し、生理食塩水で 10^6 倍まで希釈した後、UV 照射を行い、その孢子懸濁液を 0.5% カルボキシメチルセルロース (CMC) を含む PDA 寒天培地に蒔いて 30℃ で培養・コロニー形成を行った。培地上のコロニーを採取し、それぞれの孢子をエッペンチューブ内の生理食塩水に懸濁・保存し、培地は Congo-Red 液に 30 分間浸してから 1M NaCl 液で数回洗浄し、培地上のハロー形成を確認した。そのうち最大のハローを形成した MT9 株を CMC 分解能の高い株として選別した。この MT9 株は PDA 寒天培地でも最大のコロニーを形成した。次に、MT9 株の孢子懸濁液を CMC-PDA 培地に蒔きコロニーを形成させ、その最大の (増殖能の高い) コロニーから MT95 株を選別し、さらに MT95 株に対して亜硝酸添加系で UV 変異処理を行い、増殖能と酵素タンパク産生能の高い MT957 株を選別した。こうして得られた MT95 株と MT957 株を低温 (30℃) で高活性セルラーゼを産生する *T. reesei* 変異株として、以下の実験に供した。なお、酵素活性を示すユニット (U) は 1 分間で基質から $1 \mu\text{mole}$ のグルコース (または還元糖) を生成するのに要する酵素量を 1 (U) として定義した。

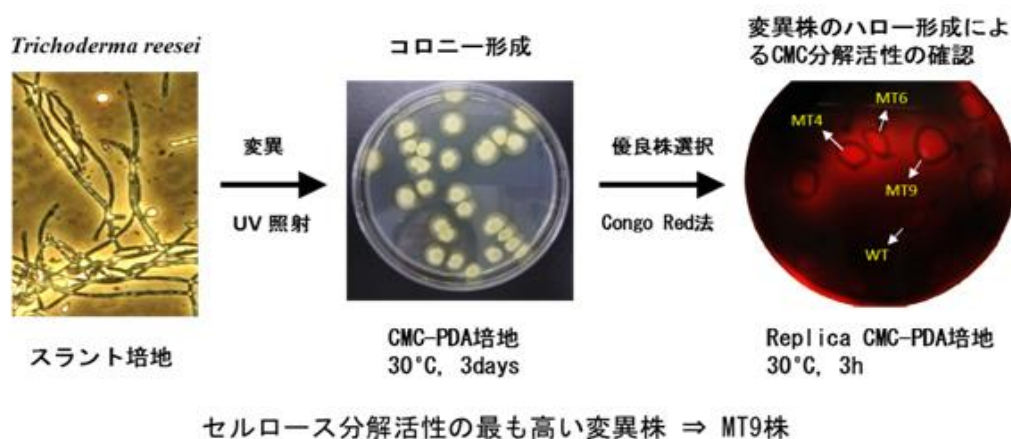


図 3.2.1 *T. reesei* の変異処理による低温高活性セルラーゼ産生株の獲得

変異株のセルラーゼ活性は、セルロースろ紙（Whatman No. 1）を基質としてセルラーゼと反応（糖化）させ、生成されたグルコース又は還元糖の量を HPLC 法又は DNS 法で測定して確認した。糖化は 50 mM クエン酸バッファー（pH5.0）で 50°C 又は 30°C で 1 時間行い、糖測定の前に 100°C で 5 分間煮沸して酵素を失活させた。

まず、セルロースろ紙を基質として MT95 株が産生したセルラーゼの活性は、WT 株と同程度であるが、市販セルラーゼ C1.5L に比べると 50°C では低かった（図 3.2.2 の左側）。セルラーゼは一般に複数の成分から構成され、セルロースをグルコースにまで転換するには β グルコシダーゼ（BGL）が必要であり、グルコースへの糖化活性が全体的に低かったのは BGL 量の不足であると思われる。そこで、それぞれの糖化液に Novozym188（BGL）を添加して 50°C で 1 時間反応させると、いずれもグルコース生成量が増加し、特に MT95 株は、前段のセルロースろ紙糖化が 30°C の場合、WT 株の 10 倍及び C1.5L の 3 倍量のグルコースを生成した（図 3.2.2 の右側）。

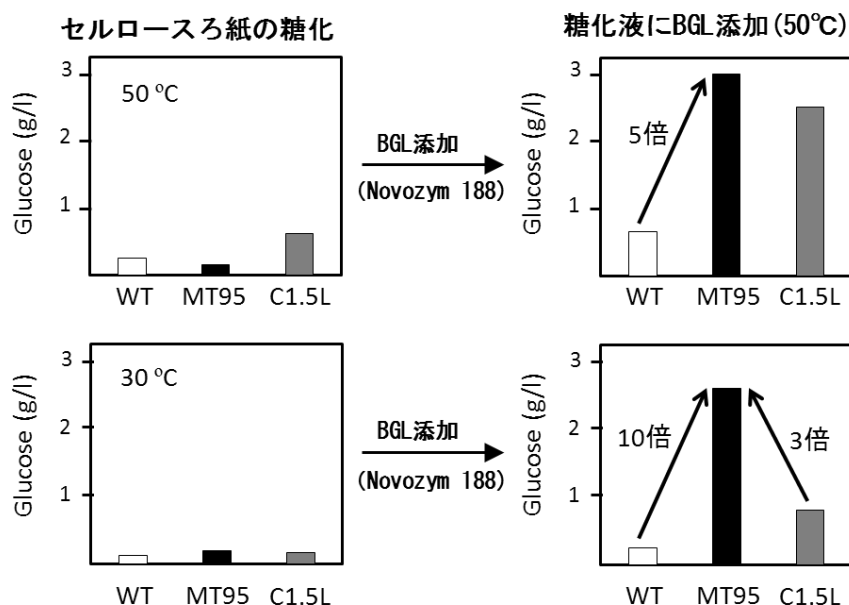


図 3.2.2 MT95株産生セルラーゼと市販セルラーゼの活性比較

酵素反応条件

セルラーゼ : WTとMT95は各酵母産生のセルラーゼ、C1.5LはNovozym celluclast 1.5L

BGL無添加系 : 酵素/セルロースろ紙=1/100、50mMクエン酸バッファー（pH5）、反応時間1h

BGL添加系 : BGL無添加系の反応終了後100°Cで失活させた後、反応液にNovozym 188を1mg-BGL/mlで添加し、50°Cで1時間反応

この結果を踏まえて、MT95 株のセルラーゼ産生能（BGL 産生能を含む）のさらなる改良を期待して、前述のとおり亜硝酸添加・UV 照射による変異処理を行い、亜硝酸存在下でも増殖し（増殖力が強く）かつ酵素タンパク産生能の高い MT957 株を選別した。図 3. 2. 3 は MT95 株に 15 分、45 分、60 分、90 分の照射時間で UV 照射し、CMC 含有寒天培地にてコロニー形成を行った結果である。UV は殺菌や DNA を破壊する作用があるので、UV 照射時間が長くなるにつれてコロニー数が減少した。UV 照射により弱いコロニーは死滅し、強いコロニーが変異株として選別できた。

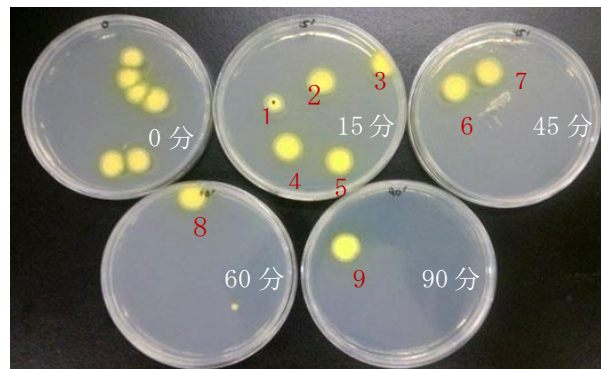


図 3. 2. 3 MT95 株の CMC 寒天培地でのコロニー形成
UV 照射 0～90 分

UV 照射後に出現した 9 個のコロニーを用いてセルラーゼ産生を行い、各セルラーゼのタンパク濃度を調べ図 3. 2. 4 に示した。MT95 株の変異株である m1～m9 株のセルラーゼのタンパク濃度を比較すると、m7 株のタンパク濃度が高いことが確認された。親株である MT95 株と比べてタンパク濃度は約 3 倍の増加が見られ、この m7 株を最優良株として MT957 株とした。

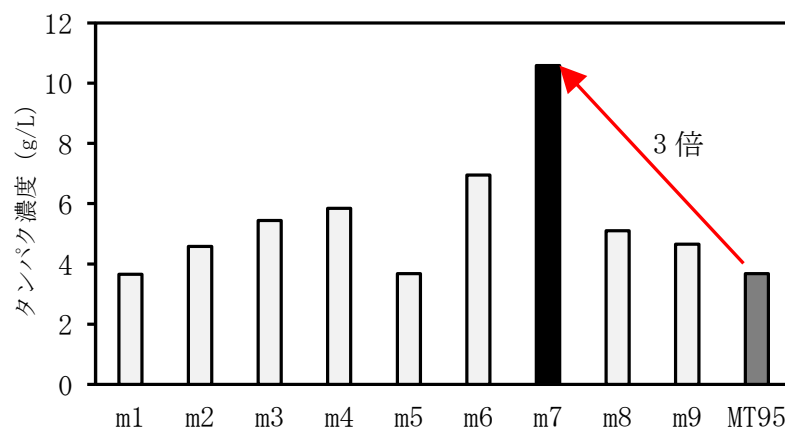


図 3. 2. 4 MT95 株の 9 変異株による産生セルラーゼのタンパク

変異株 m1～m9 のセルラーゼに含まれるタンパクの種類と発現量を確認するため、SDS-PAGE による組成の解析を行い、図 3. 2. 5 に示した。セルラーゼ中のセルロース分解酵素は触媒機能によって大きくエンドグルカナーゼ (EG)、セロビオハイドロラーゼ (CBH)、 β グルコシダーゼ (BGL) に分類され、これらの酵素の働きにより多糖類が単糖であるグルコースへ分解される。したがって、多くのグルコース量を得るためには EG、CBH、BGL の働きが平均的に高くなければならない。本研究ではキシロース代謝能を有する酵母を分子育種するために、キシランをキシロースへ分解するキシラナーゼ (XYN) の産生量が高いことが望ましい。m1～m9 株のセルラーゼを比較すると、m7 株すなわち MT957 株が BGL、CBH I、CBH II、EG、XYN の発現量が多いことが確認された。

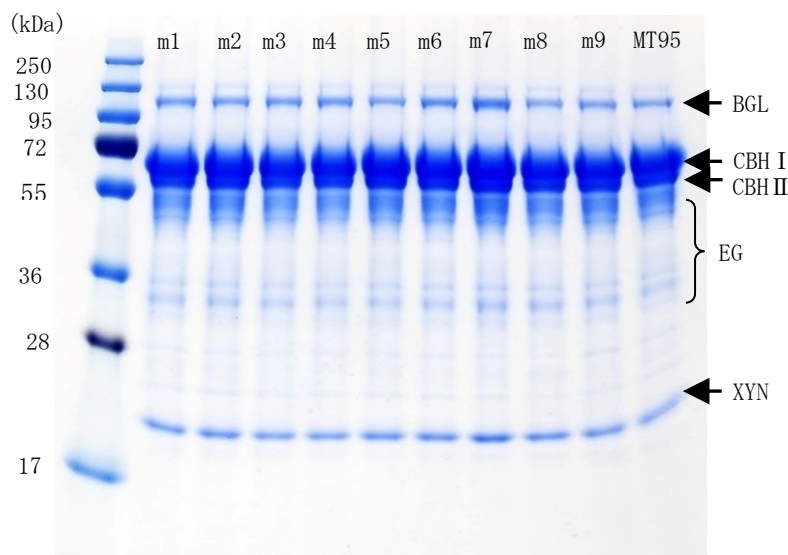


図 3.2.5 MT95 株の変異 m1～m9 株による産生粗タンパクの組成

この MT957 株に対してセロビオースを基質とした BGL 活性 (CBU) を調べたところ、MT957 株の BGL 活性は 30℃ で約 110 (CBU/mg) であり、WT 株の 3 倍及び C1.5L の 6 倍高い値を示した (図 3.2.6)。得られた MT957 株のセルラーゼ活性を評価するため、各株が産生するセルラーゼと市販セルラーゼの酵素タンパク量を一定にして、米国 Technical Report NREL/TP-510-42628 の方法に従ってフィルターペーパー活性 (FPU) を調べ、比活性 (FPU/mg 酵素) を求めた (図 3.2.7)。

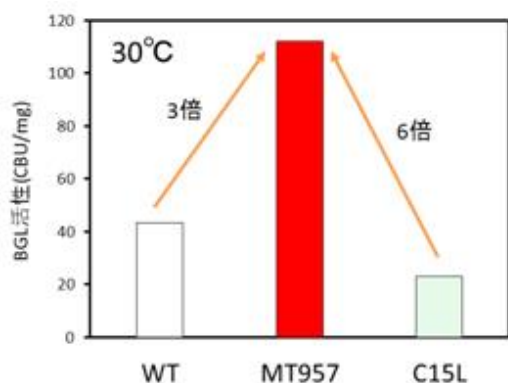


図 3.2.6 セルラーゼのセロビオースに対する β グルコシダーゼ (BGL) 活性 (CBU)

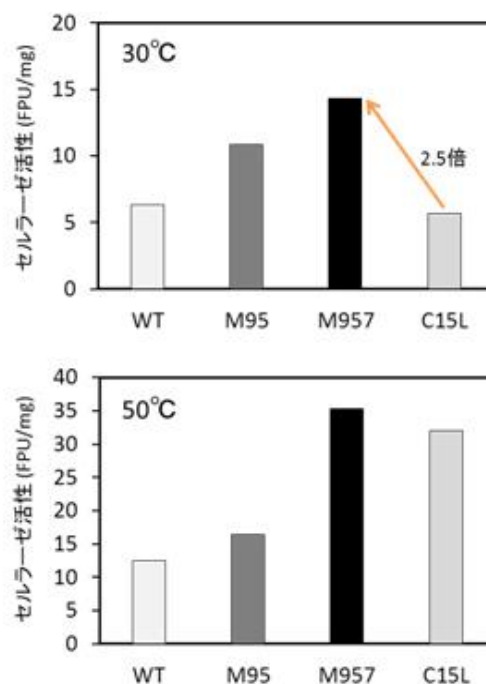


図 3.2.7 セルラーゼの Filter Paper 活性 (FPU)

条件：酵素/セルロースろ紙=1/20

その結果、MT957 株セルラーゼが最も高い FPU 活性を示し、50℃ で 36 (FPU/mg)、すなわち WT 株の約 3 倍、MT95 株の約 2 倍及び C1.5L の約 1.1 倍であった。一方、30℃ では全体的に低下したが、対 50℃ 活性で C1.5L が 20% 程度にまで低下したのに対して、MT957 株セルラーゼは 40% 程度に留まっており、結果的に C1.5L の約 2.5 倍の活性を保持していた。

別実験 (30℃) で酵素 (E) と基質 (S) との重量比 (E/S) は異なるが、セルロースろ紙の糖化による還元糖のうち単糖 (グルコース、キシロース) と二糖 (セロビオース) への転換を評価すると、MT957 株はキシロース生成量が多く (単糖・二糖量の 36%)、またセロビオースのグルコースへの転換能が MT95 株より高いことが特徴的である (図 3.2.8)。単糖への転換量は MT957 株が 2.5 g/L (単糖・二糖量の 77%)、MT95 株は 0.5 g/L (同 25%)、WT 株は 0.9 g/L (同 60%) 及び C1.5L は 1.2 g/L (同 76%) であった。

ここに、*T. reesei* 株の変異処理により、野生株や市販セルラーゼに比べて、低温 (30℃) で高活性のセルラーゼを産生する能力をもつ MT957 株を獲得することができた。

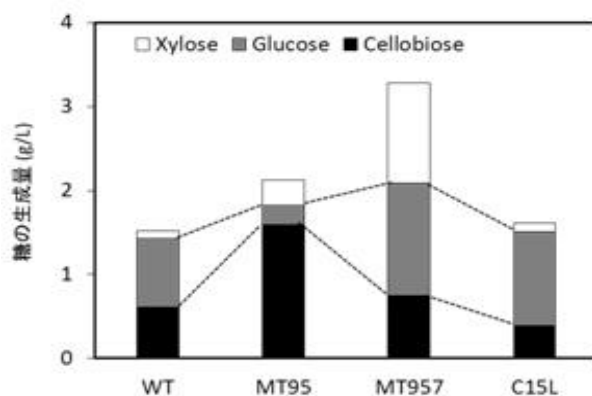


図 3.2.8 セルラーゼによる単糖・二糖への転換 (30℃)

条件：酵素/セルロースろ紙=1/20

3.2.2 MT957 株産生セルラーゼの分離と精製

セルラーゼには一般に複数の成分が含まれているので、MT957 株が産生するセルラーゼを分離し、その組成を詳細に調べた。まず、MT957 株を 1L 容・30℃で 10 日間培養して十分量のセルラーゼを産生させた (比較のために WT 株と MT95 株も行った)。基質はセルロース微結晶 (30 g/l) とビーチウッド由来キシラン (5 g/l) を用いた。培養液をガラス繊維濾紙でろ過し、液分を 10kDa 分子サイズ排除膜の QuixStand による限外濾過濃縮を行い、その後 60% 硫酸沈殿法で全タンパクを沈殿させた。PD-10 脱塩カラムを用いて硫酸を除去し、得られた粗タンパク液を 10kDa 限外濾過ユニットで濃縮し、0.02% になるようにアジ化ナトリウムを加え、-80℃で保存した。この保存した粗タンパク液の一部を融解させ、Bradford 法によるタンパク定量を行い、SDS-PAGE 分析を行った。その結果を図 3.2.9 に示す。

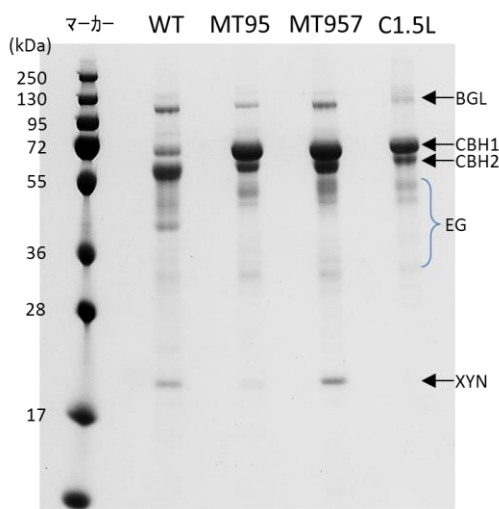


図 3.2.9 SDS-PAGEによる各セルラーゼ成分の分離

SDS-PAGE 分析の結果、130～95 kDa の間に β -glucosidase (BGL) に相当するバンドが確認され、さらに 72～55 kDa の間に cellobiohydrolase (CBH1 と CBH2)、55～36 kDa の間に endoglucanase (EG)、28～17 kDa の間に xylanase (XYN) に相当するバンドが確認された (図 3.2.9)。WT 株に比べて、MT957 株は明らかに酵素タンパク量が増加しており、MT95 株や C1.5L に対しても同様な傾向が見られた。このうち EG はセルロースの非結晶部位を分解してオリゴ糖に転換、CBH1 と CBH2 はその結晶部位を攻撃してセロビオースに転換、BGL はさらにグルコースに転換する成分であり、先の FPU 試験 (図 3.2.7) や BGL 活性試験 (図 3.2.6) において MT957 株セルラーゼが最も高い活性を示したことを裏付けている。同様に、キシランのキシロースへの転換に関与する酵素 XYN についても、MT957 株が比較的高い産生能を示しており、単糖・二糖への転換のキシロース生成 (図 3.2.8) に見られたように、当該セルラーゼにより稲藁に含まれるキシランの分解が促進されることが期待される。

MT957 株が産生するセルラーゼ成分を精製し、その活性を個々に測定するため、FPLC による粗酵素の分離と精製を行った。まず、BioRad 社 High-Q 強陰イオン交換カラムを用いて、吸着・洗浄を 20 mM Tris/HCl バッファー (pH7.2) 及び溶出を 0～500mM NaCl を含んだ 20mM Tris/HCl バッファー (pH7.2) にて分離・精製を試みた。その結果、MT957 株セルラーゼの粗酵素液からクロマトグラム上に 4 つのピークが確認され、最初にカラムに吸着しない成分 (非吸着分) が溶出し、次に画分 A、B 及び C が分離された (図 3.2.10)。この段階では各画分はまだ十分に精製されていないが、それぞれの酵素タンパクを用いて各種セルロースの分解を予備的に調べた結果、画分 A は CBH2、画分 B は EG と BGL の混在及び画分 C は CBH1 が主成分であることが判明した。

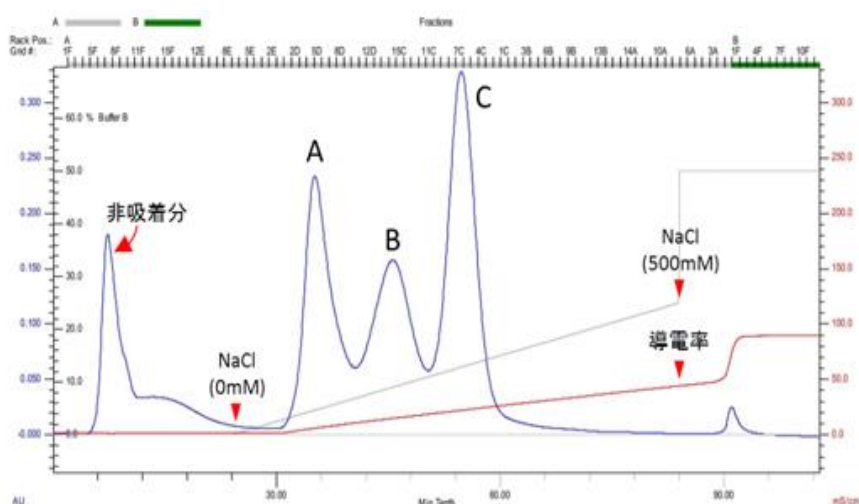


図 3.2.10 陰イオン交換 (High-Q) カラムによる MT957 産生セルラーゼ成分の分離

次に、陰イオン交換カラムで分離した画分 A と画分 C の精製をセラミックヒドロキシアパタイト TypeI (CHT-I) を用いて行った。吸着・洗浄は 10 mM KPi バッファー (pH 6.5) であり、溶出は KPi 濃度を 10～500 mM まで徐々に上げながら精製を行った。CHT-I カラムにより各画分から余計な成分が除去され、クロマトグラム上のきれいなピークに見られるように、画分 A から CBH2 及び画分 C から CBH1 が精製された (図 3.2.11)。

最後に、陰イオン交換カラムで分離した画分 B からの EG と BGL の精製を BioRad 社 Macro-Prep CM カラム (陽イオン交換カラム) を用いて行った。吸着・洗浄は 20 mM 酢酸バッファー (pH4.8) であり、溶出は 0～500mM NaCl を含んだ酢酸バッファー (pH4.8) を用いた。EG は CM カラムに吸着せず、最初に非吸着分として溶出し、溶出バッファーの塩濃度を上げるにつれてブロードなピークではあるが BGL が溶出された (図 3.2.12)。クロマトグラムには BGL に 3 つのピークが現れ、MT957 株が産生する BGL には数種類の BGL が含まれていることが伺える。

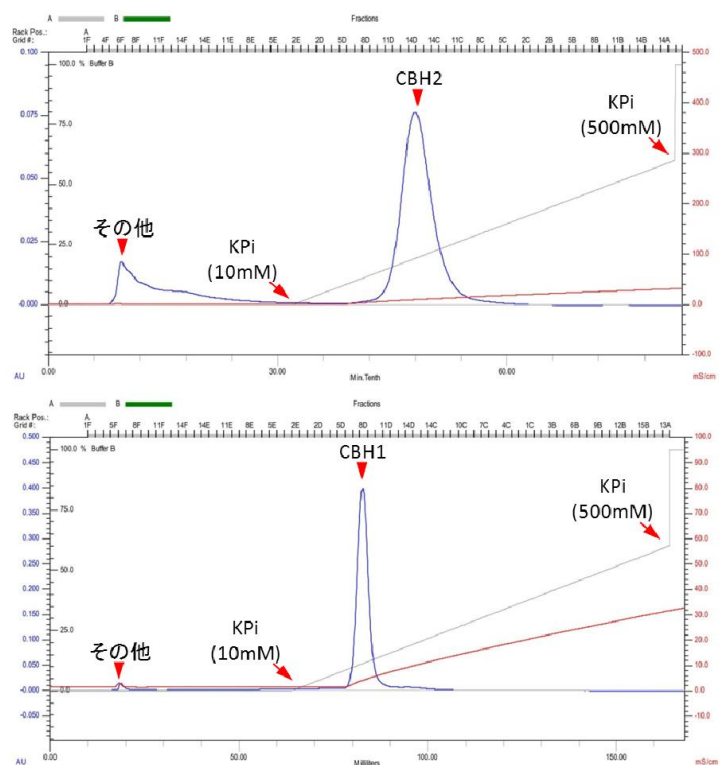


図 3.2.11 セラミックヒドロキシアパタイト Type I (CHT-I) カラムによる CBH1 と CBH2 の分離精製

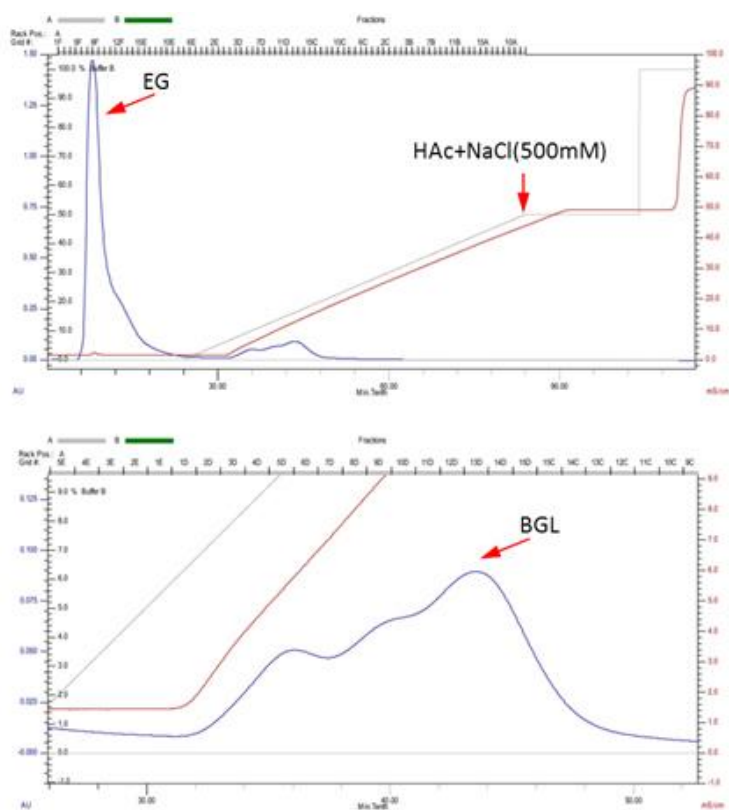


図 3.2.12 陽イオン交換 (CM) カラムによる EG と BGL の分離精製

これらの精製過程で得られたセルラーゼの各成分を再び SDS-PAGE 分析にかけ、さらに分離の確認を行った。SDS-PAGE ゲル上のレーン 1 は分子量マーカー、2 は粗酵素液、3～5 はそれぞれ陰イオン交換カラムで得られた画分 A (CBH2)、画分 B (EG と BGL の混在) 及び画分 C (CBH1)、6 は CHT-I で得られた CBH2、7 と 8 はそれぞれ陽イオン交換カラムで得られた EG と BGL、9 は CHT-I で得られた CBH1 である (図 3.2.13)。ゲル上のレーン 6～9 により、先の 3 種類のカラムを用いた方法で CBH2、CBH1、EG 及び BGL が分離・精製されたことを再確認し、さらにレーン 7 の EG には数種類の EG が含まれていることが判明した。

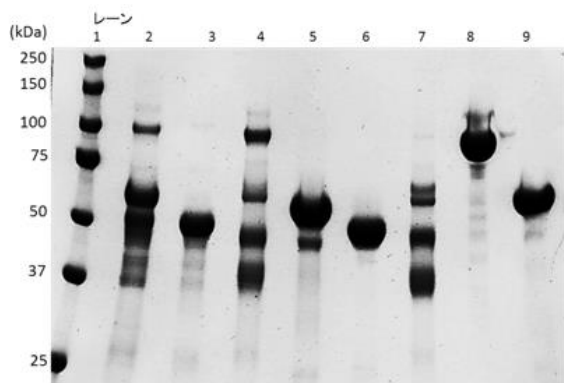


図 3.2.13 SDS-PAGE による MT957 産生セルラーゼ成分の確認

レーン 1: 分子量マーカー; 2: 粗酵素液; 3: 陰イオン交換の A 画分; 4: 陰イオン交換の B 画分; 5: 陰イオン交換の C 画分; 6: CHT の CBH2 画分; 7: 陽イオン交換の EG 画分; 8: 陽イオン交換の BGL 画分; 9: CHT の CBH1 画分

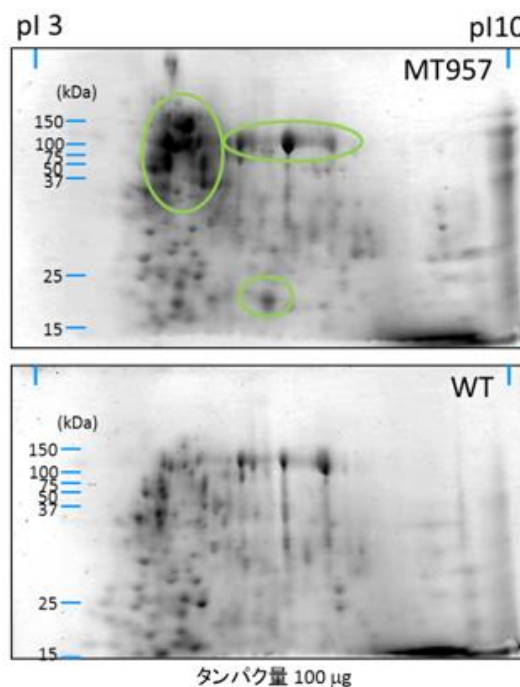


図 3.2.14 二次元電気泳動による MT957 株産生セルラーゼ成分の分離

さらに、二次元電気泳動による MT957 株セルラーゼの分離を行ったところ、WT 株に比べて、MT957 株は特に高分子量域 (37～130kDa) の酵素タンパクが増加しており、また 20kDa 付近の XYN と思われる酵素タンパクの増加もはっきりと見て取れた (図 3.2.14 の楕円部分)。ゲル上のスポットを MALDI-TOF 質量分析計により同定・確認する必要があるが、二次元電気泳動の結果からも MT957 株はセルラーゼ成分の BGL、CBH 及び EG の発現量が WT 株よりかなり増加していた。

3.2.3 MT957 株セルラーゼの各成分の糖化活性

MT957 株が産生するセルラーゼ (粗酵素) に対して各種セルロースを使った α セルロース活性、アビセル活性及び CMC 活性を温度 50℃ と 30℃ にて測定した。ここに、 α セルロースは不要性セルロースであり、その活性は前処理済み稲藁に対する全体的な糖化活性を見ることになり、一方アビセルは結晶性セルロースであり、その活性は CBH の糖化活性を、また CMC は可溶性の非結晶性セルロースであり、その活性は EG の糖化活性を示すものとみなせる。 α セルロース活性とアビセル活性は、30 mg の α セルロース又はアビセル粉末を 990 μ L の 0.1M 酢酸バッファーに浸し、CMC 活性は 0.5% CMC 溶液 (0.1M 酢酸バッファー) を用意し、それぞれ 10 μ L の酵素液を添加して 50℃ と 30℃ で 1 時間反応させ、残存酵素を不活化してから、生成された還元糖を DNS 法により定量することにより測定した。

温度 50℃ では、MT957 株セルラーゼは WT 株に比べて α セルロース活性が 3 倍、アビセル活性が 2.5 倍及び CMC 活性が 2 倍程度高くなっており、さらに C1.5L に比べるとそれぞれ 4 倍、2.5 倍及び 3 倍高い活性を示すことがわかった (図 3.2.15)。同様に、温度 30℃ では、MT957 株セル

ラーゼは WT 株に比べて α セルロース活性が 3.6 倍、アビセル活性が 5.4 倍及び CMC 活性が 2 倍高くなっており、C1. 5L に比べるとそれぞれ 3.3 倍、3.5 倍及び 4 倍高い活性を示した。このように、MT957 株セルラーゼは CBH と EG の活性が高く、結果的に全体的な糖化活性は WT 株や C1. 5L より 3~4 倍高くなった。さらに、糖化温度が 50℃ から 30℃ に低下すると、WT 株と C1. 5L のセルラーゼ活性は 40% 程度にまで低下するのに対して、MT957 株セルラーゼの活性は約 70% を保持しており、低温 (30℃) 域でも高活性を持つセルラーゼを生産するという本研究の目標を達成していることを再確認した。

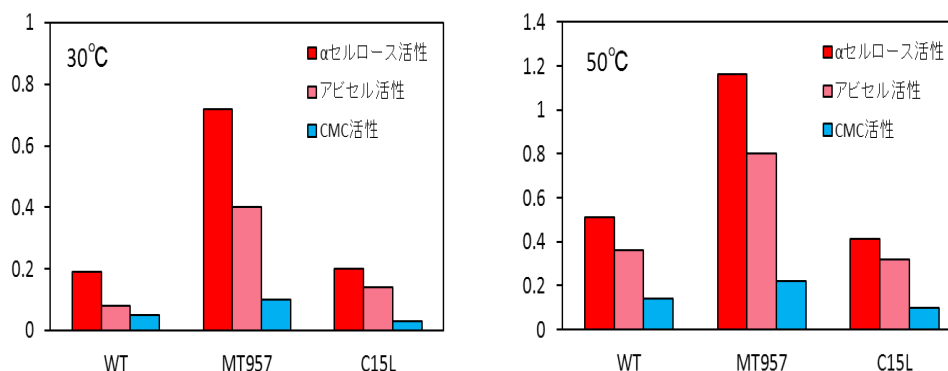


図 3.2.15 セルラーゼの各種セルロースに対する活性 (IU)

次に、先に分離・精製した各セルラーゼ成分のセルロース糖化に対する関与 (寄与) の程度を解析するため、全体的な糖化活性を示す α セルロースの分解に対して、各成分のうち EG 無添加系の CBH1、CBH2 及び CBH1+CBH2、EG 添加系の EG+CBH1、EG+CBH2 及び EG+CBH1+CBH2 の組み合わせで糖化速度を調べた (図 3.2.16)。実験は 30mg の α セルロース粉末を 1mL の 0.1M 酢酸バッファー (pH4.8) に浸し、これに 0.3mg の各セルラーゼ成分を添加して 50℃ と 30℃ で 1 時間反応させ、1 時間で生成されるセロビオースの量 (μ M) で評価した。

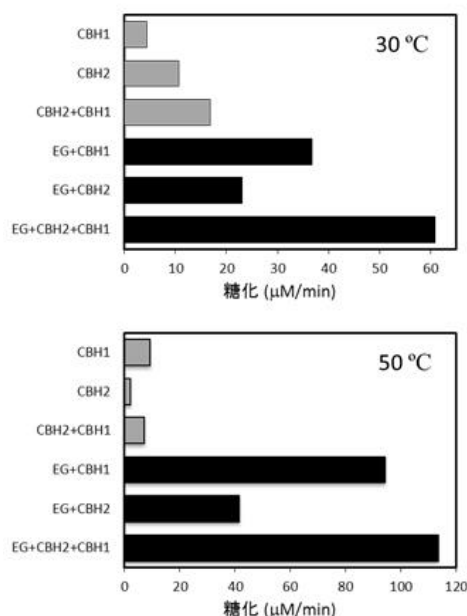


図 3.2.16 MT957 株セルラーゼの各成分による α セルロースの糖化速度

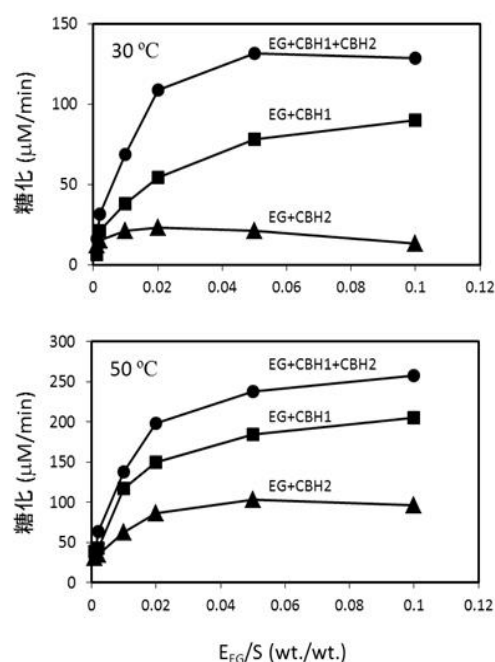


図 3.2.17 糖化速度に及ぼす EG 添加の影響

まず、EG 無添加系でも α セルロースの糖化が少し起こっており、CBH1 と CBH2 はセルロースの非結晶部位を分解する EG の機能もわずかながら有していることを確認し、また CBH2 の EG 機能は 50℃ より 30℃ の方が高かった。CBH1 と CBH2 を同時に加えると、30℃ で相加的な糖化活性が見られたが、50℃ では変化がなかった。CBH1 と CBH2 に EG を添加すると、活性はそれぞれ高くなり、特に CBH1 の活性が 50℃ で約 10 倍、30℃ で約 7 倍にまで向上した。EG+CBH1+CBH2 の系では、糖化速度が 50℃ で 112 (μ M/min)、30℃ で 62 (μ M/min) であり、EG 無添加系に比べてそれぞれ 14 倍と 3.5 倍にまで活性が向上した。 α セルロースの糖化に対して、CBH1 と CBH2 のみでは活性が低く、糖化の初期段階で関与する EG の存在が重要であることが分かった。

次に、EG 添加の効果を調べるため、一定量の CBH1 と CBH2 に対して (E/S) 比を変えた糖化実験を行った (図 3.2.17)。温度 50℃ と 30℃ のいずれの系でも、EG 添加によって糖化速度が向上し、30℃ 系では E_{EG}/S 比が 0.02~0.05 の範囲で EG 添加の相乗効果が期待できることが分かった。しかし、EG 添加の効果は E_{EG}/S 比 0.05 以上になると頭打ちになり、特に CBH2 は 30℃ 系で 0.02 以上になると逆に活性が低下する傾向を示した。

T957 株が産生するセルラーゼは各成分 (CBH、EG、BGL) とともに低温 (30℃) で高い糖化活性を持ち、野生株に比べて各成分の発現量も増加していることが明らかになった。また、各成分の組み合わせ (セルラーゼカクテル) によって糖化活性の更なる向上が期待できることが分かった。さらに、低温 (30℃) での糖化の場合、セルラーゼ活性が 50℃ の場合より長く保持されること (酵素添加量の節減) が期待される。

3.2.4 MT957 株セルラーゼによる稲藁の糖化

MT957 株セルラーゼによる稲藁の糖化を調べるため、本研究で昨年度開発した亜塩素酸・重曹法で前処理した稲藁を用いた糖化実験を行った。実験は天日乾燥した前処理済み稲藁を 20mg/ml の濃度でエッペンチューブに入れ、E/S 比を 1/100 に設定して、pH4.8 (0.1M NaAc で調整)、温度 30℃ で 18 時間の糖化を行った。その結果、18 時間という比較的短い糖化時間でも、MT957 株セルラーゼは稲藁に対して約 82% の糖化率 (還元糖ベース) を達成しており、これは WT 株セルラーゼの 2.5 倍及び C1.5L の 1.6 倍高い糖化率であった (図 3.2.18)。糖化率を前処理済み稲藁の水分量 5% を差し引いた乾燥重量当りで求めると、MT957 株セルラーゼの稲藁に対する糖化率は 86% となる。ここに、本研究の目標値 90% が概ね達成できていると言える。

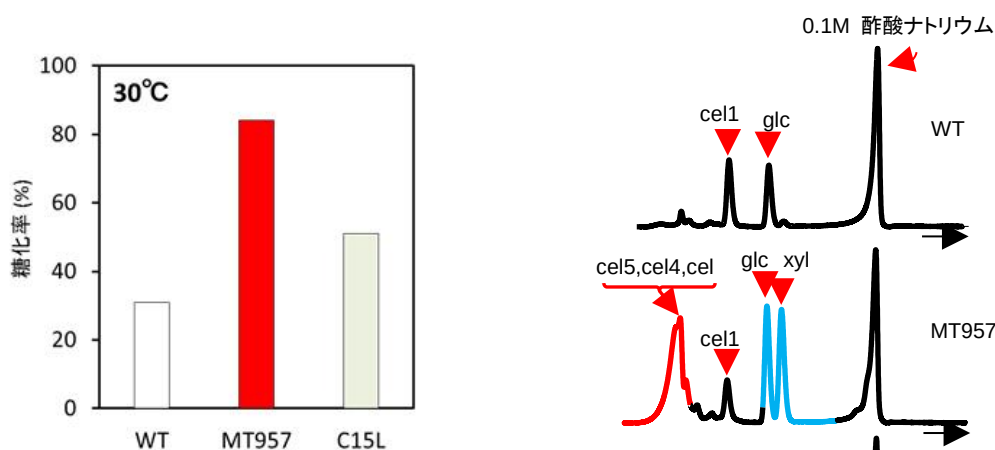


図 3.2.18 亜塩素酸・重曹法で前処理した稲藁のセルラーゼによる糖化
条件：温度 30℃、0.1M 酢酸 Na バッファー (pH4.8) DNS 還元糖測定、酵素添加量は基質の 1/100 (mg/mg)

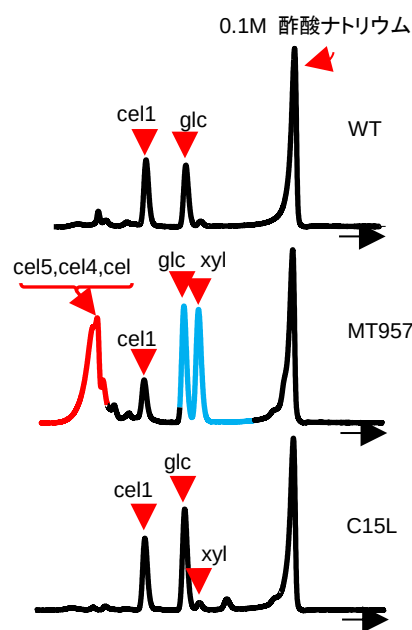


図 3.2.19 前処理済み稲藁の糖化液中の糖組成 (HPLC 分析)

glc: グルコース、xyl: キシロース、cel1: セロビオース、cel3, cel4, cel5: セロオリゴ糖

生成された還元糖の組成を調べると、WT 株と C1. 5L はグルコースとセロビオースが生成されていたが、MT957 株の糖化液にはそのほか 20%程度（還元糖から HPLC 定量糖を差し引いた分）のセロオリゴ糖が含まれていた（図 3. 2. 19）。発酵段階でのエタノール転換率を上げるためには、このセロオリゴ糖を単糖にまで糖化する必要がある。そのためには、セルラーゼ成分のうち CBH 及び BGL の働きが重要であり、MT957 株の更なる改良等を行う必要がある。

3. 2. 5 稲藁を炭素源とするセルラーゼ産生

MT957 株を使ったセルラーゼ生産において、稲藁を炭素源として利用するための諸条件を検討した。まず、稲藁を洗浄・天日乾燥させた後、ブレンダー粉砕、ブレンダーミル粉砕、30mm ボールミル粉砕、5mm ボールミル粉砕した稲藁を用意し、加えて標準セルロース（microcrystalline cellulose）を比較として用意した。稲藁はホロセルロース含有量が 76%であるため、その含有量を合わせて稲藁 6g に対して標準セルロース 4. 56g をセルラーゼ産生に供与した。培養条件は全量 200mL、30℃、130rpm である。回収した産生セルラーゼに対して、Bradford 法によるタンパク定量を行い、酵素量 10 μ g で合わせて SDS-PAGE で組成分離を行った。また、産生酵素の糖化活性を調べるため、基質として α -cellulose を用いて酵素／基質（E/S）比＝1/100 に設定し、50℃と 30℃で 1 時間の酵素糖化（pH4. 8）を行い、DNS 法で還元糖の定量を行い、結果は酵素（mg）当たりの活性値（Unit）で表される比活性（Unit/mg）で示した。

粉砕稲藁 4 種と標準セルロースの SEM 写真を図 3. 2. 20 に示した。稲藁は長さ 3000～20 μ m に粉砕され、5mm ボールミル粉砕では標準セルロースよりやや小さいサイズに粉砕されていた。ブレンダー粉砕は繊維表面を覆っているリグニン層を残しているが、ボールミル粉砕では微粒子状に粉砕され、その表面のリグニン層も破砕されているように見える。

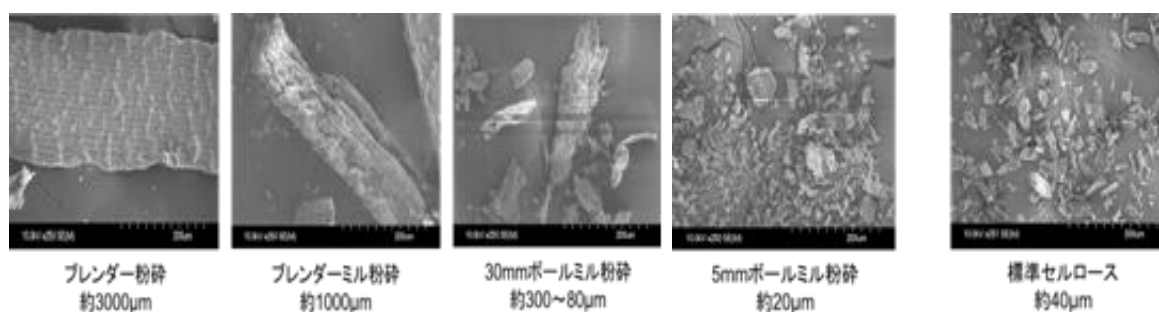


図 3. 2. 20 SEM 観察による各粉砕法での稲藁の粉砕状態（スケール 200 μ m）

粉砕稲藁と標準セルロースを炭素源として、MT957 株によるセルラーゼ産生量を酵素タンパク量で示したのが図 2. 2. 21 である。培養 11 日間でのタンパク生成において、5mm と 30mm のボールミル粉砕で約 1. 10 g/L のタンパクが生成され、標準セルロースの 0. 92 g/L と比較すると 1. 2 倍のセルラーゼが得られた。一方、ブレンダーとブレンダーミル粉砕は標準セルロースよりタンパク生成量が大幅に少なかった。これは稲藁が繊維状のままで、表面のリグニン層も残っていることにより、MT957 株 が炭素源として利用しにくいと考えられる。セルラーゼ産生用炭素源としての稲藁の粉砕は 30mm ボールミル粉砕が適していることが明らかになった。

稲藁の粉砕法による産生酵素の成分の違いを明確にするため、各粉砕稲藁と標準セルロースを基質として産生させた酵素を SDS-PAGE で分離した結果を図 3. 2. 22 に示した。粉砕稲藁の産生酵素は、CBH を除き、標準セルロース産生酵素より EG と BGL と XYN のバンドがより濃く現れていた。酵素の糖化活性は各成分の混合比によって異なるが、粉砕稲藁の産生酵素の EG と BGL が多く、さらにキシランをキシロースに糖化するキシラナーゼ（XYN）が多いことは、単糖への糖化が促進され、後段のエタノール発酵に有利に働く可能性が示された。

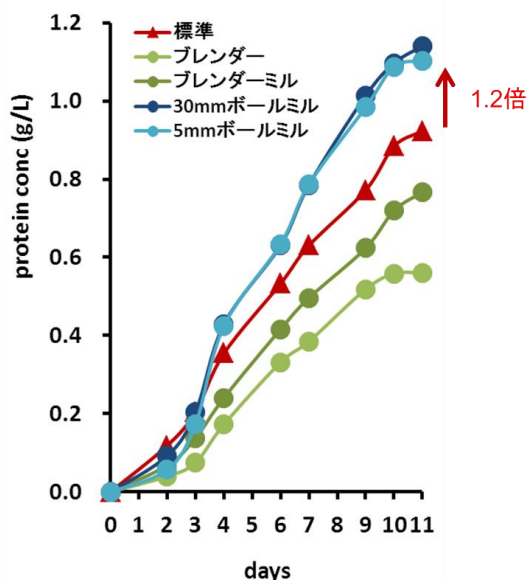


図 3.2.21 各種粉碎法による稲藁を基質とした MT9-7 株による酵素タンパクの生成

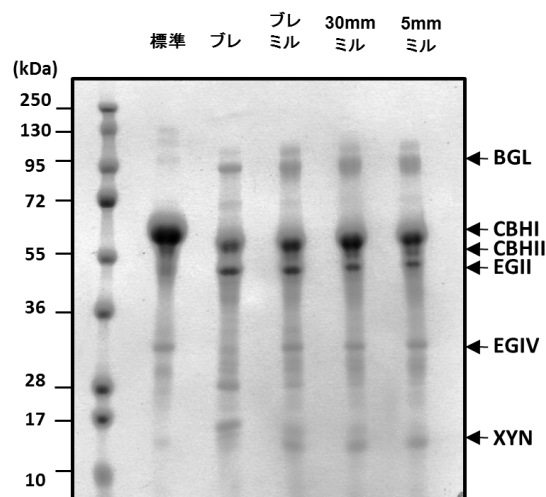


図 3.2.22 各粉碎基質に対する MT9-7 株 産生酵素の SDS-PAGE による組成分離
酵素量：10 μ g

各粉碎稲藁と標準セルロースを炭素源として MT957 株が産生した酵素による α -cellulose の糖化活性を 50℃ と 30℃ で調べ、単位酵素量当たりの比活性を比較したのが図 3.2.23 である。高い比活性を示したのはいずれの温度でも 30mm ボールミル粉碎稲藁を炭素源とした産生セルラーゼであり、50℃ で 1.37 Unit/mg、30℃ で 0.82 Unit/mg という標準セルロースに対して 10～20% 高い活性であった。炭素源として 30mm ボールミル粉碎稲藁を用いた産生酵素は 30℃ でも 50℃ の約 60% の比活性を保持しており、低温性セルラーゼとして 30℃ での並行複発酵に利用できる可能性が示された。これらの結果から、稲藁を 30mm ボールミルで粉碎することにより、酵素産生の炭素源として使用可能であることが分かった。

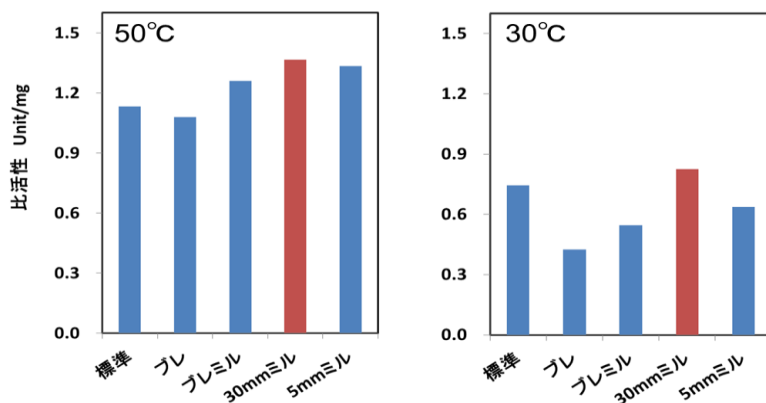


図 3.2.23 各種粉碎稲藁を炭素源とした MT957 株産生酵素による α セルロースの糖化活性
標準：対照としての標準セルロース

3.3 細胞融合による変異・融合酵母の獲得

3.3.1 野生株の変異処理による代謝改変

細胞融合の前に、*S. cerevisiae* のキシロース取込み能を高め、逆に *C. intermedia* のキシロース取込み能を抑えるために、各野生株を EMS 変異処理により改変した。*S. cerevisiae* 変異株はヘキソーストランスポーター (HXT) でのカタボライト抑制を抑えるために DOG 耐性で選別し、グル

コース存在下でもキシロース取込み能が野生株の 4.5 倍高い変異株 M2 を獲得した（詳細は後出の論文に記載）。*C. intermedia* はキシリトール代謝に係る *xdh* 遺伝子を保持しながらも、キシロース取込み能を抑えた変異株 m11 を得た。それぞれの野生株と変異株による発酵能を MMGX 培地で調べた結果を図 3.3.1 に示した。

S. cerevisiae 野生株に対して、M2 株はより多くのキシロースを細胞内に取込み、グリセロールの生成量が少なく、エタノール生成量が増加した。発酵液中にキシリトールは存在しなかったが、キシロースの細胞内蓄積を確認した。グルコースの消費は HXT を通したキシロースの同時取込みのためやや遅れた。一方、*C. intermedia* においては、野生株がグルコースとキシロースを取込み、キシリトールを生成しているが、m11 株はキシロースを全く取込まないことを確認した。いずれの株もエタノール生成は少なく、グリセロールを少なからず生成した。

細胞融合では両変異酵母の一倍体子嚢胞子（ α 細胞・ α 細胞又は相当細胞）のプロトプラストによる融合を行うが、カンジダ属は分類学上ヘテロジニアスであり、様々な性状の菌が存在するので、事前に *C. intermedia* m11 株の胞子形成能を酢酸カリウム（KAc）胞子形成培地で確認することにした。その結果、図 3.3.2 に示したように、ブリリリアントグリーン染色（A、B）と SEM（C）による観察で m11 株が胞子を形成することを確認した。別途行ったサフラン染色では栄養細胞（赤く染まる）は全く見られず、ブリリリアントグリーンにより青緑色に染まった胞子が確認された（A）。この胞子を生理食塩水で膨潤させて染色したところ、*S. cerevisiae* がそうであるように、m11 株は子嚢中に複数の子嚢胞子を形成しているものと思われる（B）。これらの子嚢は SEM 観察により 2 μ m 程度の球状であることを確認した。

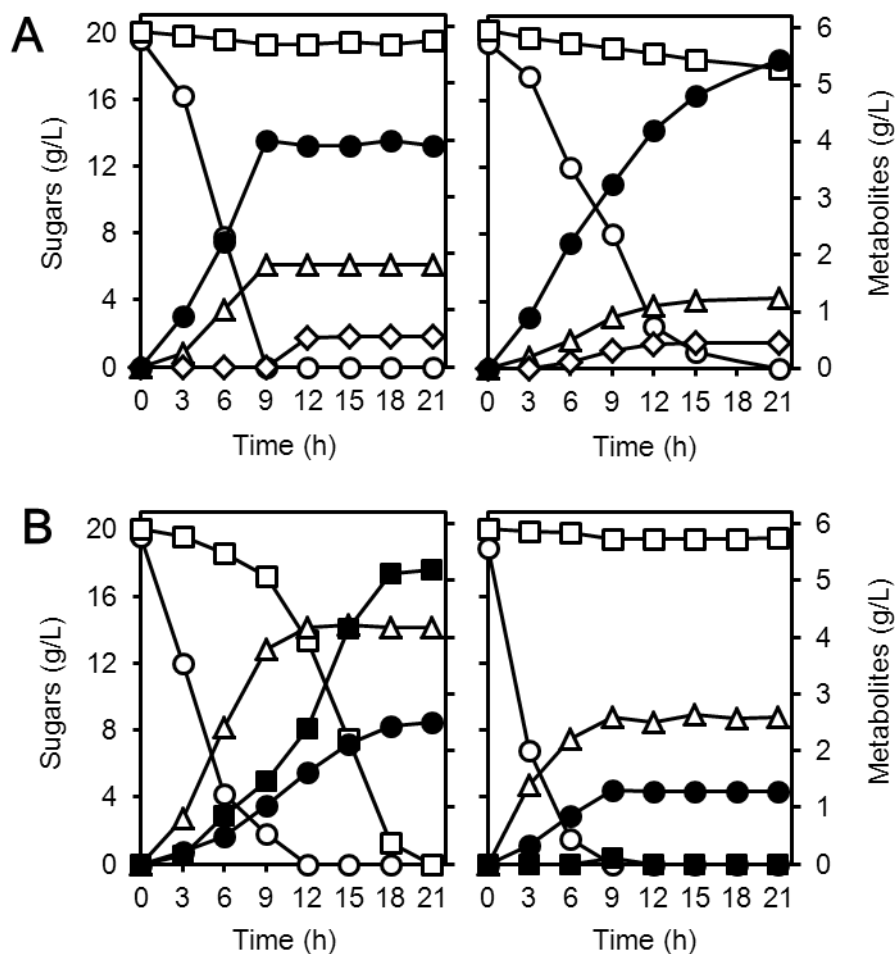


図 3.3.1 *S. cerevisiae* と *C. intermedia* の野生株と変異株によるグルコースとキシロースの発酵

A : *S. cerevisiae* (左は野生株、右は変異株 M2)、B : *C. intermedia* (左は野生株、右は変異株 m11)

シンボル : ○グルコース、□キシロース、●エタノール、■キシリトール、△グリセロール、◇乳酸

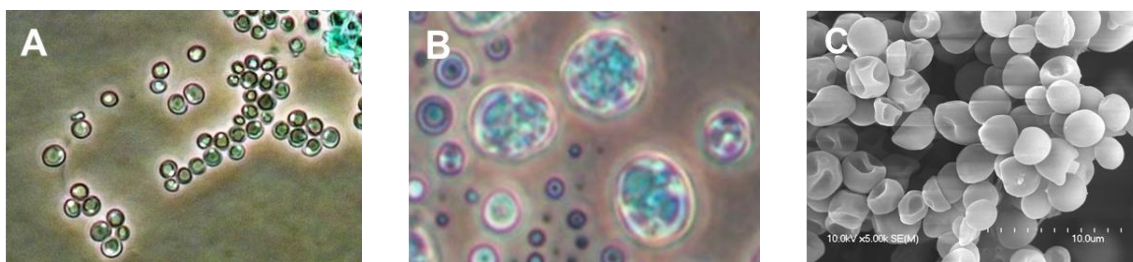


図 3.3.2 変異株 *C. intermedia* m11 の KAc 培地での孢子形成

A : 孢子のブリリアントグリーン染色、B : 生理食塩水中で膨潤させた孢子の染色、C : 孢子の SEM 写真

3.3.2 変異株 (M2 株と m11 株) のプロトプラスト融合によるハイブリダイゼーション

DOC 耐性 M2 株とキシロース代謝 m11 株の孢子から得られた一倍体細胞のプロトプラストをソルビトール・PEG バッファーにて混合・プロトプラスト融合し、さらに核融合を確実にするため電流を 2 秒間流した。その後、融合プロトプラストをコルヒチン添加の MMXDOG 再生培地で培養し、融合細胞の再生を行った。得られた融合細胞を FSC1 と命名した。図 3.3.3 に変異株 M2 (A) と m11 (B) 及び融合株 FSC1 (C、D) の顕微鏡写真を示す。DAPI 染色により、FSC1 株は核融合した単一核であることを確認した (D)。細胞形状はいずれの株も楕円状であるが、FSC1 株は親株である M2 株と m11 株より大きく、長円軸が $10\mu\text{m}$ 程度であった。細胞融合においては融合細胞が親細胞より大きくなるのが一般的であり、FSC1 株も明らかにその特徴を示した。

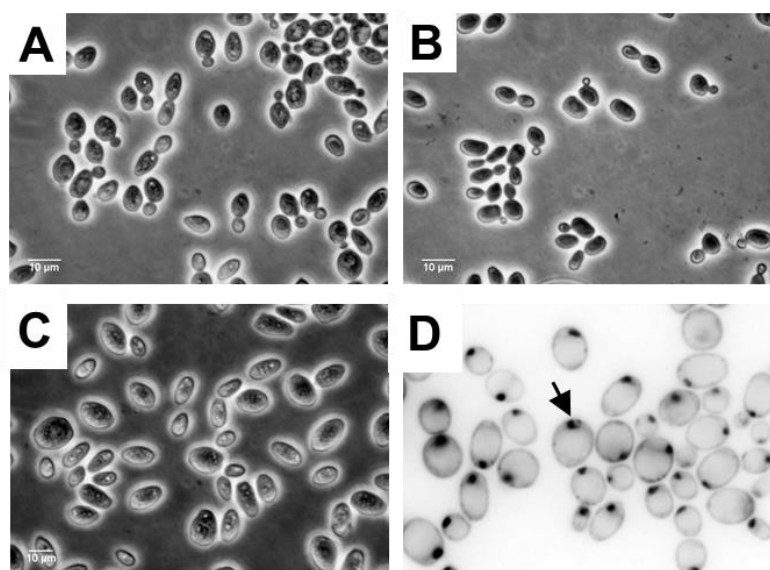


図 3.3.3 変異株 *S. cerevisiae* M2 (A) と *C. intermedia* m11 (B) 及び融合酵母 FSC1 (C、D) の顕微鏡写真 (スケールバー $10\mu\text{m}$)

D : FSC1 株の核融合を示す DAPI 染色

FSC1 株は M2 株と m11 株の融合酵母であり、また M2 株と m11 株の接合は起きないことを確認するため、それぞれの株の DOG 耐性とキシロース代謝試験及び接合試験を行った。図 3.3.4 に示したように、まず YMG 培地 (A) でいずれの株もコロニーを形成することを確認した上で、YMFDOG 培地 (B) では m11 株が DOG 非耐性であり、YMXDOG 培地 (C) では M2 株がキシロースを利用できず、最終的に FSC1 株のみが DOG 耐性のキシロース代謝酵母であることを確認した。接合試験では、YMG 培地で (M2 株+m11 株) の混合培養を行い、その後 MMXDOG 培地で培養した。もし接合が起きていれば、FSC1 株と同様、DOC 耐性 M2 株とキシロース代謝 m11 株の接合株もコロニーを形

成するはずであるが、コロニーは全く形成されなかった (D)。ここに、FSC1 株が M2 株と m11 株の融合株であり、親株同士の接合は起こらないことが確認された。

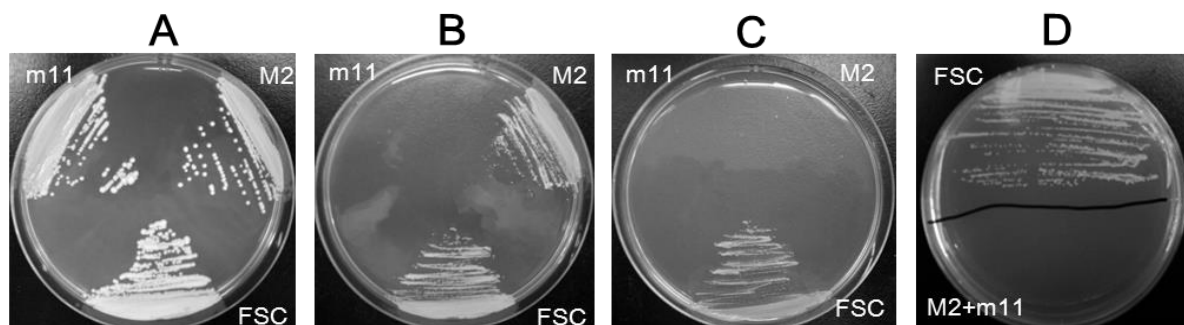


図 3.3.4 変異株 m11、M2 と融合株 FSC1 のコロニー形成及び (M2+m11) 混合培養による接合試験
コロニー形成：A=YMG 培地、B=YMFDOG 培地、C=YMXDOG 培地、接合試験：D=MMXDOG 培地での M2 と m11 の接合試験

融合株 FSC1 について、前出の *C. intermedia* m11 株と同様に、KAc 培地にて孢子形成能を調べた。その結果、図 3.3.5 に示したように、ブリリリアントグリーン染色 (A、B) と SEM (C) による観察で FSC1 株が孢子を形成することを確認した。別途行ったサフラニン染色では栄養細胞 (赤く染まる) は全く見られず、ブリリリアントグリーンにより青緑色に染まった孢子が確認された (A)。この孢子を生理食塩水で膨潤させて染色したところ、*S. cerevisiae* がそうであるように、FSC1 株は子嚢中に複数の子嚢孢子を形成しているものと思われる (B)。これらの子嚢は SEM 観察により 2~3 μm 程度の球状であることを確認した。

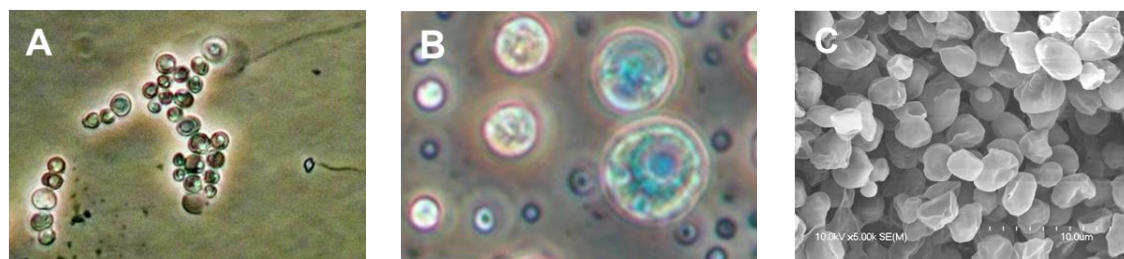


図 3.3.5 融合酵母 FSC1 株の KAc 培地での孢子形成

A：孢子のブリリリアントグリーン染色、B：生理食塩水中で膨潤させた孢子の染色、C：孢子の SEM 写真

3.3.3 キシロース利用融合酵母 FSC1 による代謝

融合酵母 FSC1 株によるキシロース含有 MMGX 培地でのエタノール発酵試験を行い、その結果を図 3.3.6 (A) に示した。FSC1 株はグルコースとキシロースの両基質を着実に発酵し、その結果エタノール生成量は M2 株の約 2.7 倍に達した (図 3.3.1 (A) 右の M2 株との比較)。キシリトールも野生株 *C. intermedia* (図 3.3.1 (B) 左) の半分程度の生成が見られたが、グリセロールは微量であった。FSC1 株がキシロース代謝とエタノール生成に優れた酵母であることが確認された。変異や融合を施した細胞においては代謝の安定性が重要な評価因子となるので、FSC1 株の継代培養を行い、各世代のエタノール発酵能を調べた。図 3.3.6 (B) に示したように、FSC1 株は 14 世代に亘って安定したキシロース利用とエタノール生成を行い、代謝の安定性が確認された。

FSC1 株とその親株のエタノール収率 (g/g-基質) を比較すると、図 3.3.7 の通り、FSC1 株が 0.38 であり、変異親株 M2 の 0.14 や野生親株 *S. c.* の 0.1 より約 3 倍高い収率を示した。これは理論収率の約 75% であり、まだ FSC1 株の改良の余地があることが示唆された。

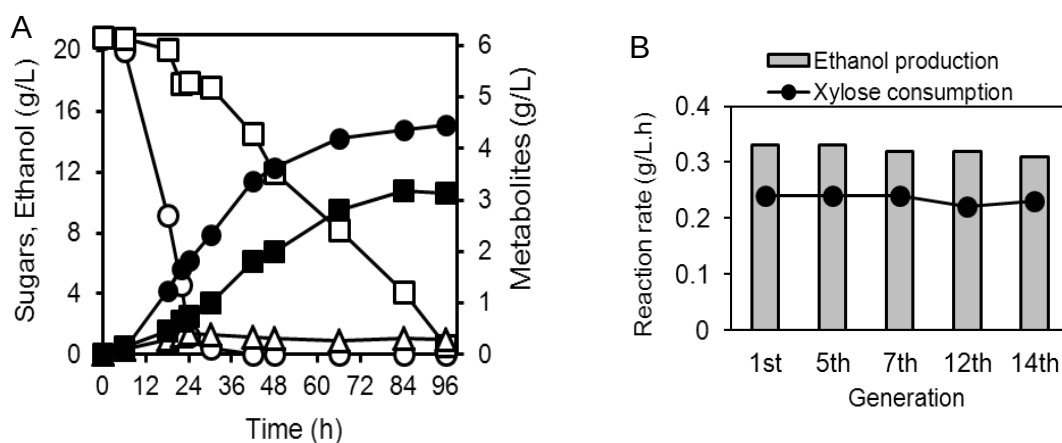


図 3.3.6 融合株 FSC1 によるグルコース・キシロースの発酵とエタノール生成の安定性

A: グルコース・キシロースの発酵、B: エタノール生成の安定性

シンボル: ○グルコース、□キシロース、●エタノール、■キシリトール、△グリセロール

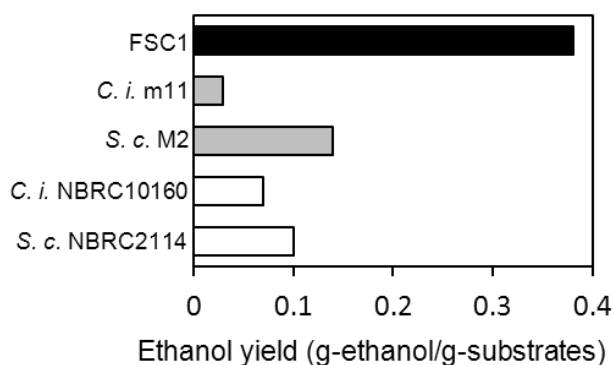


図 3.3.7 *S. cerevisiae* と *C. intermedia* の野生株と変異株 (M2、m11) 及び融合株 FSC1 によるグルコース・キシロースからのエタノール収率

主要アミノ酸 7 種に対する要求性を調べたところ、表 3.3.1 に示したように、M2 株は全アミノ酸を合成することができたが、m11 株はウラシル要求性が高く、ヒスチジンに対しても弱い要求性が見られた。FSC1 株は、M2 株と同様に、これら 7 種のアミノ酸に対して要求性はなく、MMG 培地でも十分増殖することができた。

表 3.3.1 変異株 *S. cerevisiae* M2 と *C. intermedia* m11 及び融合株 FSC1 のアミノ酸要求性 (MMG 培地、30℃)

Media	Growth (+, grow; -, not grow)		
	<i>S. c.</i> M2	<i>C. i.</i> m11	FSC1
Minimal (MMG)	+++	-	+++
Enriched with amino acids	+++	+++	+++
Deficient in	Adenine	++	+++
	Uracil	-	+++
	L-Tryptophan	+++	+++
	L-Histidine	+	+++
	L-Methionine	+++	+++
	L-Lysine	+++	+++
	L-Leucine	+++	+++

3.3.4 遺伝子とタンパクの発現

キシロース代謝遺伝子とアルコール脱水素酵素遺伝子の発現レベルを RT-PCR 法で調べ、さらに抽出タンパクの二次元電気泳動と MALDI-TOF/TOF による一部の同定を行い、その結果を図 3.3.8 に示した。同図 (A) の FSC1 株において、キシロースのキシリトールへの転換に関与する遺伝子は m11 株の *xr* と M2 株の *gre3*、キシリトールのキシルロースへの転換遺伝子は m11 株の *xdh*、キシルロースのキシルロース-5-リン酸への転換遺伝子は M2 株の *xks1* が発現しており、また発酵の最終段階で働くアセトアルデヒドのエタノールへの転換に関与するアルコール脱水素酵素遺伝子は M2 株の *adh1* が強く発現していた。このように細胞融合によるキシロース代謝に係る遺伝情報の FSC1 株への伝達が遺伝子レベルで確認された。

タンパクの発現については、図 3.3.8 (B) の通り、FSC1 株には M2 株と m11 株の全てのタンパクスポットが見られ、そのほとんどが親株より濃く出ている。このうち 2 種のタンパクが同定され、FSC1 株に m11 株の XR と M2 株の TDH (グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素) が確認された。この TDH は等電点が 6.3 であり、MASCOT 検索より TDH2 又は TDH3 であると思われる。

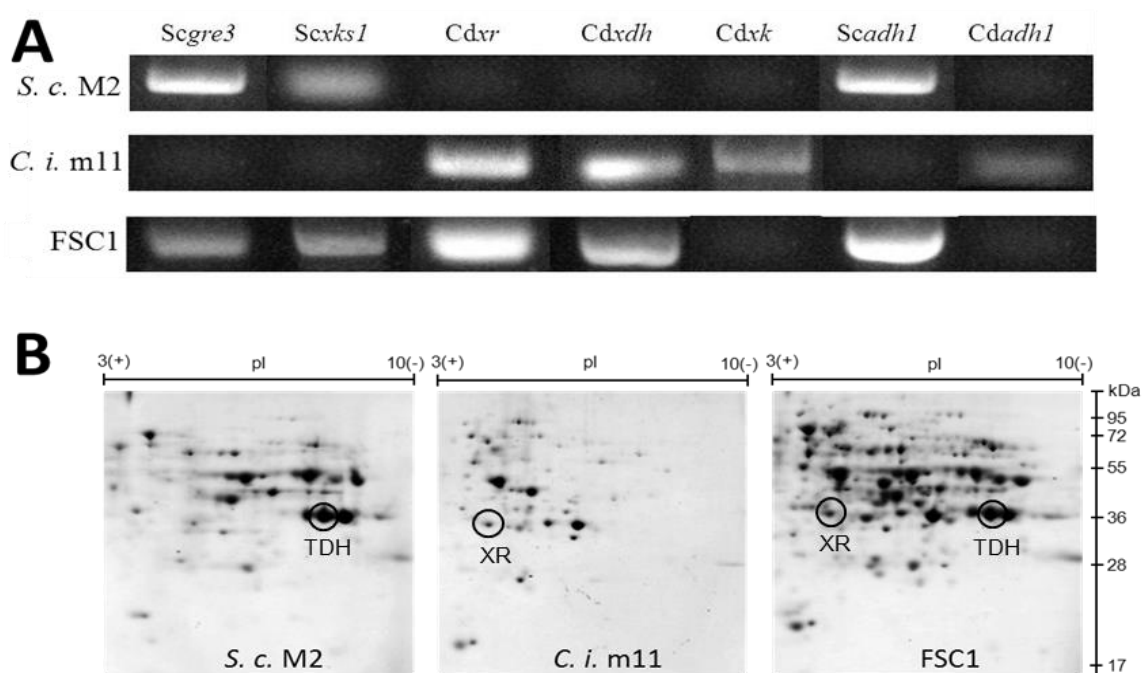


図 3.3.8 変異株 *S. cerevisiae* M2 と *C. intermedia* m11 及び融合酵母 FSC1 のキシロース代謝遺伝子の発現 (A) と抽出タンパクの二次元電気泳動 (B)

A : RT-PCR による遺伝子解析、B : 2D-PAGE 解析、横軸は等電点、縦軸は分子量 (kDa)

3.4 融合酵母 FSC1 株の改良と改良酵母による稲藁の並行複発酵

3.4.1 融合酵母 FSC1 株の改良と発酵特性

融合酵母 FSC1 株のエタノール発酵能を改良するため、再度 EMS により変異処理し、改良型の FSC3 株を製造した。FSC3 株によるグルコース・キシロース基質からのエタノール発酵試験を行い、その結果を発酵特性として表 3.3.2 に FSC1 株とその親株を含めて整理した。FSC3 株は 30 時間で基質をすべて消費し、キシロースの比消費速度 (g/g-cell.h) が FSC1 株の 0.18 から約 6 倍の 1.07 にまで向上した。FSC3 株のエタノール生成速度は容積当り 0.65 (g/L.h) 又は菌体当り 0.17 (g/g-cell.h) であり、FSC1 株の約 2 倍の速度であった。FSC3 株のエタノール収率 (g/g-基質) は FSC1 株の 0.38 から 0.42 に向上し、親株である *S. cerevisiae* M2 株の 0.14 (g/g-基質) の 3 倍であった。FSC3 株のエタノール収率 0.42 は、グルコース・キシロース基質ではあるが、本研究の目標値 0.4 (g/g-前処理済み稲藁) を上回る値であった。なお、これはグルコース・キシロースからの理論エタノール収率の 82% に相当する。

表 3.3.2 変異株 M2 と m11 及び融合株 FSC のグルコース・キシロースの発酵特性 (30℃)

Strain	Cells ^a (g-DW/L)	R_{xylose} (g/g-cell, h)	v_{EtOH} (g/L, h)	r_{EtOH} (g/g-cell, h)	I_p (g/g-substrate)		
					Ethanol	Xylitol	Cells
M2	0.4	ND	0.46	0.61	0.14 (0.28)*	ND	0.005 (0.01)*
m11	0.4	ND	0.25	0.34	0.03	ND	0.06
FSC1	1.3	0.18	0.33	0.09	0.38	0.08	0.06
FSC3	1.4	1.07	0.65	0.17	0.42	0.03	0.06

^a, 初期濃度; R_{xylose} , 比キシロース消費速度; v_{EtOH} , エタノール生成速度; r_{EtOH} , 比エタノール生成速度 (最終菌体濃度当り); I_p , 生成物収率; ND, not detected; *, グルコース当りの収率.

3.4.2 低温性セルラーゼと融合酵母 FSC3 株による稲藁の並行複発酵

本研究で開発した亜塩素酸・重曹法による前処理、*T. reesei* MT957 株が産生する低温性セルラーゼによる糖化及び融合酵母 FSC3 株による発酵を組み合わせ、稲藁の前処理と並行複発酵の一連の実験を行った。具体的には、稲藁を亜塩素酸・重曹法により前処理し、その前処理済み稲藁 50g/L (乾燥重量) に対して酵素/基質 (E/S) 比=1/100 として低温性セルラーゼ 0.5g/L を添加し、微好気・30℃の条件で並行複発酵を行った。その結果を図 3.3.9 に示す。

エタノール生成は発酵 48 時間で頭打ちになり、エタノール生成量は最大で 16.2g/L であった。反応器の写真に見られるように、発酵開始時にあった繊維状の稲藁固形分は 48 時間後には完全に糖化 (可溶化) されていた。発酵糖としてはグルコース、セロビオース及びキシロースが反応初期に蓄積したが、36 時間後にはすべて消失した。最終菌体量は 14.1gDW/L であり、12.5gDW/L の増殖量であった。最大エタノール生成量からエタノール収率を計算すると、

エタノール収率=0.324 (g/g-前処理済み稲藁) 又は 0.41 (L/kg-前処理済み稲藁)

となる。これは本研究の目標値 0.4 (g/g-前処理済み稲藁) の 81% に相当する。この実験では菌体増殖量から計算した菌体収率が 0.25 (g-cell/g-前処理済み稲藁) であり、前出のグルコース・キシロース基質の菌体収率 0.06 (表 3.3.2 参照) に比べて約 4 倍高い。稲藁においては、基質が菌体増殖に使われたためにエタノール収率が低くなったと考えられ、エタノール収率を高めるためには溶存酸素や pH 等を制御して菌体への転換量を減らす必要があると思われる。

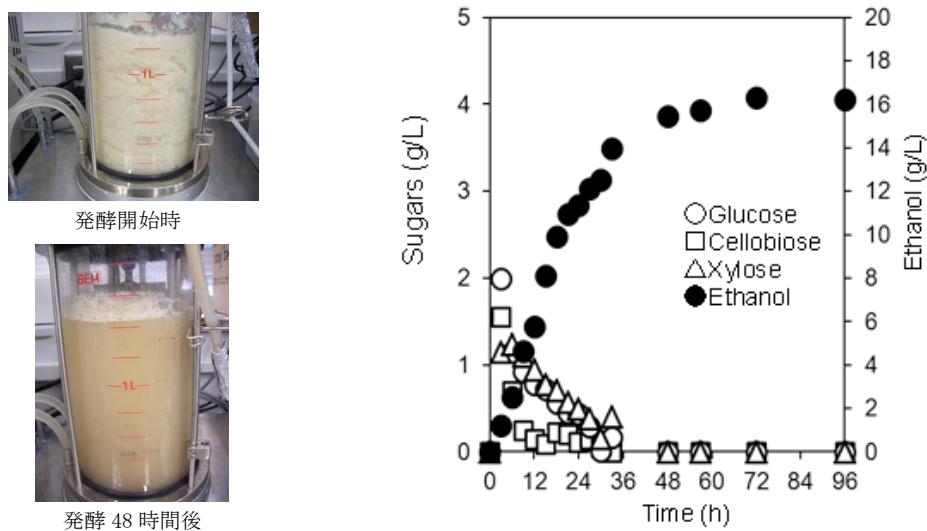


図 3.3.9 前処理済み稲藁の低温性セルラーゼと改良型 FSC3 株による並行複発酵

前処理: 亜塩素酸・重曹法

並行複発酵: *T. reesei* MT957 株産生の低温性セルラーゼによる糖化と融合酵母 FSC3 株による同時発酵、酵素/基質 (E/S) 比=1/100、酵母窒素ベース 1.7g/L 添加、前処理済み稲藁 50g/L、初期菌体量 1.6gDW/L、pH5.0、30℃、微好気

4. 結論

本研究は、稲藁を原料としたエタノール発酵において、亜塩素酸・重曹法による前処理、低温性セルラーゼによる糖化及び変異・融合酵母による発酵の3課題について検討した。本研究により得た知見と開発した技術は以下の通りである。

・亜塩素酸・重曹法による前処理

稲藁の前処理は、酢酸酸性域での亜塩素酸 Na (ASC) 処理による脱リグニンと重曹 (SB) 処理による膨潤化とセルロース結晶構造の改変を行った。稲藁は ASC 処理により脱リグニンされ、SB 処理により膨潤した微細繊維 (マイクロフィブリル) に変化し、特に (3 回 ASC+SB) 処理が最大の効果を発揮した。稲藁のリグニン量は約 14% (乾重%、クラソン法)、 κ 値は約 16 であり、(3 回 ASC+SB) 処理はリグニン除去率 88% を達成した。FTIR 解析から、ASC 処理は主にリグニン構造ユニットを除去し、SB 処理は内部リグニンの除去に関与することが分かった。稲藁の前処理は ASC 処理の後段に SB 処理を行う必要があり、その逆順では効果が低かった。生成される塩素種の分析から、リグニンは亜塩素酸イオンにより酸化・除去、すなわち脱リグニンされ、亜塩素酸イオンは塩化物イオンに還元されることが分かった。

稲藁のセルロース結晶構造の変化について、X 線回折と FTIR 解析により、3 回 ASC 処理による表面リグニンの除去により結晶性が見かけ上増加し、その後 SB 処理を施すと再び減少するが、これは膨潤・微細繊維化と共にマイクロフィブリルの非晶質化が起きているためと推測された。セルロースの結晶型は、(3 回 ASC+SB) 処理を施すことによって、無処理稲藁のタイプ I から、結晶密度が低くかつ分解性の高いタイプ II に変化した。

CBH I を用いて糖化に対する前処理効果を調べたところ、3 回 ASC 処理と SB 処理の単純加算の糖化率は 40% であり、(3 回 ASC+SB) 処理は 85% という 2.1 倍の相乗効果を示した。糖化に対する前処理の効果を工業用セルラーゼによる糖化で調べたところ、無処理稲藁は 48 時間でも糖化率 20% に留まったが、(3 回 ASC+SB) 処理を行うと 6 時間で 86% に達した。

・低温性セルラーゼによる糖化

低温 (30℃) で十分な活性を有するセルラーゼを生産するために、*T. reesei* を野生株として亜硝酸添加・UV 照射による変異処理と選択培地による選別で改良し、変異株 MT957 のを得た。BGL 活性 (CBU) では、MT957 株は 30℃ で野生株 (WT) の 3 倍及び工業用セルラーゼ C1.5L の 6 倍高い値を示した。FPU 活性では、30℃ 活性が対 50℃ 活性で C1.5L が 20% に低下したが、MT957 株セルラーゼは 40% を保持し、C1.5L の約 2.5 倍の活性を示した。MT957 株セルラーゼは単糖への転換量 (単糖・二糖量の 77%) が WT 株と C1.5L に比べて 2 倍以上であった。MT957 株セルラーゼには SDS-PAGE において BGL、CBH、EG、XYN に相当するバンドが確認され、二次元電気泳動解析によれば MT957 株は BGL、CBH 及び EG の発現量が WT 株よりかなり増加していた。

各種セルロースに対する糖化活性を調べたところ、MT957 株セルラーゼは WT 株に比べて 30℃ で α セルロース活性が 3.6 倍、アビセル活性が 5.4 倍及び CMC 活性が 2 倍高く、C1.5L に比べると各々 3.3 倍、3.5 倍及び 4 倍高い活性を示した。温度が 50℃ から 30℃ に低下すると、WT 株と C1.5L の活性が 40% 程度に低下するのに対して、MT957 株セルラーゼは約 70% を保持しており、低温 (30℃) 域で十分な活性を持つ低温性セルラーゼを生産できることを確認した。

亜塩素酸・重曹法で前処理した稲藁に対して、MT957 株セルラーゼは酵素/基質比 = 1/100 で糖化率約 86% (乾重%) であり、本研究の目標値 90% に近い糖化率を達成できた。

稲藁をセルラーゼ産生の炭素源として利用するため、各種粉碎稲藁に対して MT957 株が産生する酵素タンパク量を調べたところ、ボールミル粉碎で対照系標準セルロースの 1.2 倍のセルラーゼが得られた。酵素成分としては、粉碎稲藁の産生酵素は標準セルロース産生酵素より EG と BGL と XYN がより多かった。炭素源として産生セルラーゼが高い比活性を示したのは 30mm ボールミル粉碎稲藁であり、稲藁を酵素産生の炭素源として利用できることが分かった。

・変異・融合酵母によるエタノール発酵

細胞融合の前に、*S. cerevisiae* のキシロース取込み能を高め、逆に *C. intermedia* のキシロース取込み能を抑えるために、各野生株を EMS 変異処理により改変した。*S. cerevisiae* 変異株は、DOG 耐性選別により、カタボライト抑制を抑えてグルコース存在下でもキシロース取込み能が野生株の 4.5 倍高い M2 株を獲得した。*C. intermedia* 変異株はキシリトール代謝に係る *xdh* 遺伝子を保

持しながらも、キシロース取込み能を抑えた m11 株を得た。また、細胞融合においては両変異株の一倍体子嚢胞子（a 細胞・ α 細胞又は相当細胞）のプロトプラスト融合を行うが、事前に m11 株を酢酸カリウム（KAc）胞子形成培地で培養し、ブリリリアントグリーン染色と SEM による観察で胞子形成を確認した。

M2 株と m11 株の各胞子の一倍体細胞のプロトプラスト融合により、変異・融合酵母を製造し、活性の高い融合細胞を FSC1 株と命名した。DAPI 染色により、FSC1 株は核融合した単一核であることを確認した。M2 株と m11 株及びその融合株 FSC1 株について、FSC1 株のみが DOG 耐性のキシロース代謝酵母であり、接合試験により M2 株と m11 株の親株同士の接合は起こらず、FSC1 株が融合株であることを再確認した。キシロース含有 MMGX 培地での発酵試験において、FSC1 株はグルコースとキシロースを着実に代謝し、その結果エタノール生成量は M2 株の約 2.7 倍に達し、さらに 14 世代に亘り安定した発酵を示した。FSC1 株のエタノール収率は 0.38 (g/g-基質) であり、M2 株より 2.7 倍高かった。また、FSC1 株は主要アミノ酸 7 種に対する要求性はなかった。

RT-PCR と二次元電気泳動による遺伝子やタンパクの発現解析の結果、FSC1 株において、キシロースのキシリトールへの転換遺伝子は m11 株の *xr* と M2 株の *gre3*、キシリトールのキシルロースへの転換遺伝子は m11 株の *xdh*、キシルロースのキシルロース-5-リン酸への転換遺伝子は M2 株の *xks1* が発現しており、また発酵のアルコール脱水素酵素遺伝子は M2 株の *adh1* が強く発現していた。FSC1 株には M2 株と m11 株の全てのタンパクスポットが見られ、そのほとんどが親株より濃く出ていた。このうち 2 種のタンパクが MALDI-TOF/TOF により同定され、FSC1 株に m11 株の XR と M2 株の TDH（グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素）が確認された。

FSC1 株の発酵能をさらに改良するため、再度 EMS により変異処理し、改良型の FSC3 株を製造した。FSC3 株によるグルコース・キシロース基質の発酵試験を行った結果、FSC3 株のキシロース消費速度 (g/g-cell/h) が FSC1 株の 0.18 から約 6 倍の 1.07 にまで向上し、エタノール生成速度は FSC1 株の約 2 倍であった。FSC3 株のエタノール収率 (g/g-基質) は FSC1 株の 0.38 から 0.42 に向上し、グルコース・キシロース基質ではあるが、FSC3 株の収率 0.42 は本研究の目標値 0.4 (g/g-前処理済み稲藁) を上回る値であった。

亜塩素酸・重曹法による前処理、*T. reesei* MT957 株が産生する低温性セルラーゼによる糖化及び融合酵母 FSC3 株による発酵を組み合わせ、稲藁の前処理と並行複発酵の一連の実験を行った。エタノール生成は発酵 48 時間で概ね最大に達し、最大エタノール生成量から計算したエタノール収率は 0.324 (g/g-前処理済み稲藁) であった。菌体収率は 0.25 (g-cell/g-前処理済み稲藁) であり、前出のグルコース・キシロース基質の菌体収率に比べて約 4 倍高い。稲藁においては基質が菌体増殖に使われたため、エタノール収率がやや低くなったと考えられる。エタノール収率 0.324 (g/g-前処理済み稲藁) は本研究の目標値 0.4 の 81% に相当し、概ね目標値に近いエタノール収率を達成することができたと考える。

本研究は、稲藁を原料としたエタノール発酵において、亜塩素酸・重曹法による前処理、低温性セルラーゼによる糖化及び変異・融合酵母による発酵について検討した。稲藁は ASC 処理により脱リグニン、SB 処理により膨潤・微細繊維化と結晶構造の改変が施され、特に (3 回 ASC+SB) 処理はリグニン除去率 88%、結晶型タイプ II への改変などを可能にした。*T. reesei* を変異させた MT957 株は 30°C でも高い活性のセルラーゼを産生し、この低温性セルラーゼは亜塩素酸・重曹法による前処理済み稲藁の 86% を糖化し、目標値 90% に近い糖化率を達成できた。*S. cerevisiae* M2 株と *C. intermedia* m11 株との細胞融合によりキシロース利用 FSC1 株を獲得し、さらに変異をかけて発酵能を改良した FSC3 株を製造した。FSC3 株は、グルコース・キシロース基質に対してエタノール収率 0.42 (g/g-基質) という目標値 0.4 (g/g-前処理済み稲藁) を上回る発酵能を示した。亜塩素酸・重曹法による前処理済み稲藁に対しては、低温性セルラーゼと FSC3 株による並行複発酵によりエタノール収率 0.324 (g/g-前処理済み稲藁) を達成し、目標値の 81% 相当のエタノール収率を得ることができた。このエタノール収率は液量に換算すると 0.41 (L/kg-前処理済み稲藁) であり、これまでに報告されている各種バイオマスの 0.30~0.35 (L/kg) に比べて高いエタノール収率となっている。

5. 参考文献

- 1) Kahar P, Taku K, Tanaka S, Enhancement of xylose uptake in 2-deoxyglucose tolerant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, J Biosci Bioengi, 111/5, 557-563 (2011)
- 2) Lin Y, Tanaka S, Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol, 69, 627-642 (2006)
- 3) Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, Stroeve P, Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production, Ind Eng Chem Res, 48, 3731-3729 (2009)
- 4) Matsushika A, Inoue H, Kodaki T, Sawayama S, Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol, 84, 37-53 (2009)
- 5) Runquist D, Hahn-Hägerdal B, Bettiga M, Increased expression of the oxidative pentose phosphate pathway and gluconeogenesis in anaerobically growing xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. Microbial Cell Fact, 8, 49 (2009)
- 6) Hari KS, Janardhan RT, Chowdary GV, Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast, Bioresource Technol, 77, 193-196 (2003)

6. 研究発表

・論文発表

- 1) Enzymatic digestion of corncobs pretreated with low strength of sulfuric acid for bioethanol production, J. Bioscience and Bioengineering, 110/4, 453-458 (2010)
- 2) Enhancement of xylose uptake in 2-deoxyglucose tolerant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, J. Bioscience and Bioengineering, 111/5, 557-563 (2011)
- 3) Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742, Biomass and Bioenergy, 47(12), 395-401 (2012)
- 4) Multiple effects of swelling by sodium bicarbonate after delignification on enzymatic saccharification of rice straw, J. Bioscience and Bioengineering, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.05.036> (2013) (印刷中)
- 5) Xylose-fermenting yeast hybridized by intergeneric fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida intermedia* mutants for ethanol production, Applied Microbiology and Biotechnology (投稿中)

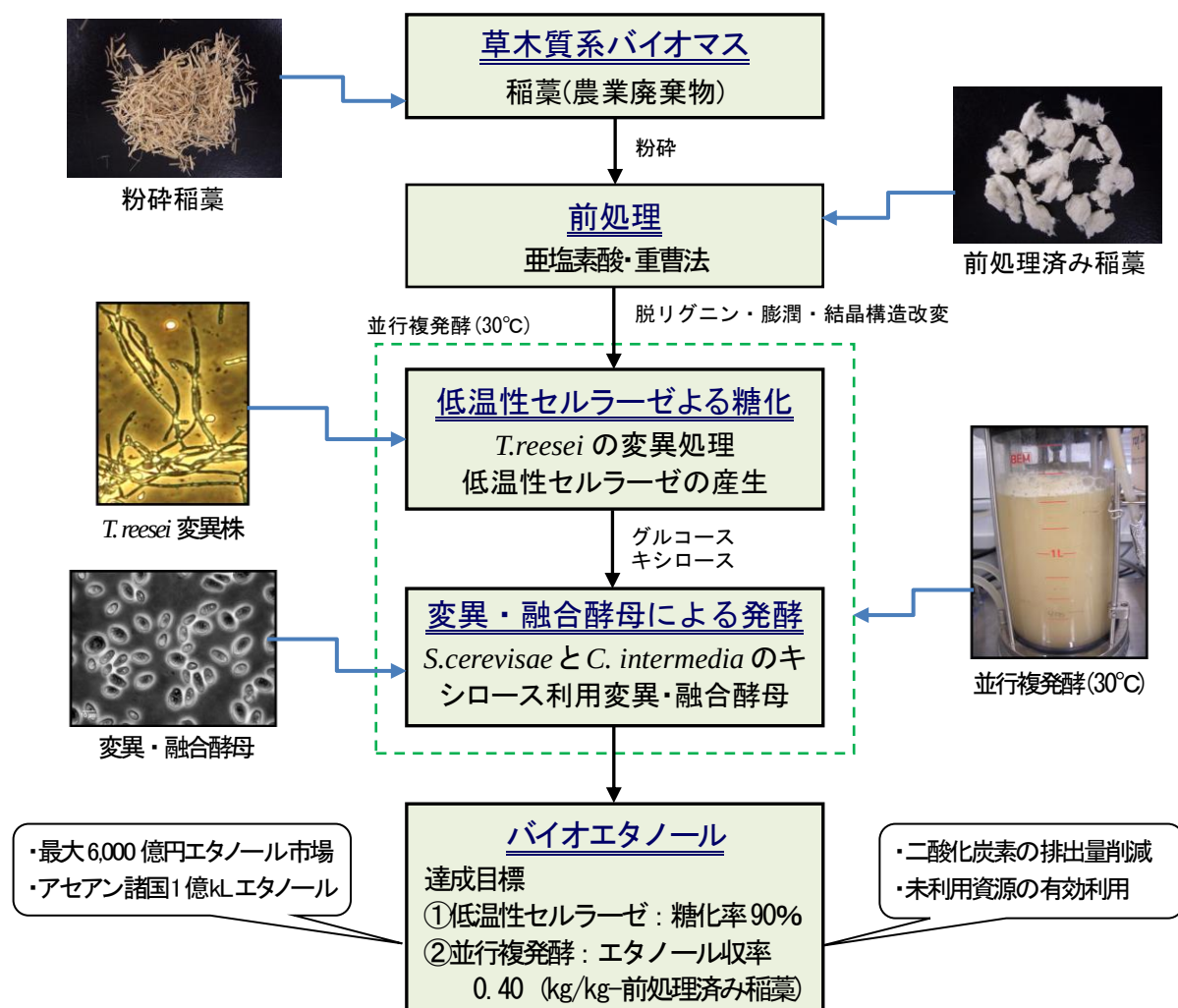
・学会等発表

- 1) Improved Utilization of Xylose by Mutated-fused Yeast for Bioethanol Production, 14th International Biotechnology Symposium, Rimini/Italy (2010)
- 2) Enhancement of Xylose Uptake in *Saccharomyces cerevisiae* by EMS mutagenesis、第 62 回日本生物工学会大会、宮崎 (2010)
- 3) 変異融合酵母による稲わらの高効率エタノール発酵技術の開発、明星大学連携研究センター研究成果報告会、東京 (2010)
- 4) 高効率エタノール変換に向けた稲藁の脱リグニン及び弛緩処理技術の開発、日本農芸化学会大会、京都 (2011) 〈東北地震のため直前に開催中止〉
- 5) Advanced Pretreatment Process for Enzymatic Saccharification of Rice Straw in Bioethanol Production, International Conference on Sustainable Energy Technologies, Istanbul/Turkey (2011 年 9 月)
- 6) バイオエタノール生産のための細胞変異融合法によるキシロース代謝利用の分子育種、第 63 回日本生物工学会大会、東京 (2011 年 9 月)
- 7) 稲わらの並行複発酵のための高活性セルラーゼ生産、日本農芸化学会 2012 年度大会、京都 (2012 年 3 月)
- 8) 稲わらの酵素糖化における脱リグニン処理と弛緩処理の効果、第 64 回日本生物工学会大会、神戸 (2012 年 10 月)
- 9) バイオエタノール生産のためのセルラーゼ産生菌の変異処理、第 4 回大学コンソーシアム八王子学生発表会、八王子 (2012 年 12 月)
- 10) キシロース発酵における細胞融合酵母 FSC 株の in vitro 代謝解析、日本農芸化学会 2013 年度大会、仙台 (2013 年 3 月)
- 11) *Trichoderma reesei* 変異菌による低温性セルラーゼの産生、第 65 回日本生物工学会大会、広島 (2013 年 9 月) (発表決定済み)

7. 知的財産権の取得状況

既に出願又は取得した特許権はない。但し、エタノール発酵能の高い *S. cerevisiae* 変異株 M2 とキシロース代謝能を持つ *C. intermedia* 変異株 m11 とのプロトプラスト融合で獲得した変異・融合酵母 FSC（ハイブリッド酵母 FSC）とその製造方法を特許出願すべく準備中である。

変異・融合酵母による稲藁の高度エタノール発酵技術の開発



研究の背景と目的

草木質系バイオマスを原料とするエタノールは二酸化炭素の排出量削減に貢献するが、糖化されにくいリグノセルロース構造とキシロースが発酵されないという難点があり、また糖化酵素の高い反応温度 (55°C) が並行複発酵を難しくしている。本研究の目的は、稲藁を原料として、脱リグニンと膨潤・結晶構造改変に効果的な前処理、低温性セルラーゼの生産、キシロース利用変異・融合酵母を用いた並行複発酵の各要素技術を研究し、それらを組み合わせた高度エタノール発酵技術を開発することである。

研究の年次計画

研究項目	2010 年度	2011 年度	2012 年度
前処理 (亜硫酸酸・重曹法)	←→		
低温性セルラーゼ産生・糖化		←→	
変異・融合酵母製造・発酵		←→	

研究の実施体制

明星大学理工学部
水環境・バイオエネルギー研究室
研究総括者 (田中修三)
研究員 2 名
大学院生 RA 2 名

研究員等勤務報告
研究報告書等提出

大型機器分析支援
各種事務の支援

明星大学 連携研究センター

総合分析・研究部門 (機器オペレータ)
産学公連携業務部門 (経理担当者)

E-mail: tanakash@es.mesiei-u.ac.jp
TEL/FAX: 042-591-5517
URL: <http://www.meisei-u.ac.jp/>

英語概要

Research theme

Development of Advanced Ethanol Fermentation Technology Using Mutated-fused Yeast

Representative researcher

Shuzo Tanaka (Meisei University)

Abstract

In order to develop the advanced technology for bioethanol production from rice straw, acidified sodium chlorite (ASC) and sodium bicarbonate (SB) method for pretreatment, low-temperature cellulase for enzymatic saccharification and mutated-fused yeast for fermentation. In ASC-SB method, rice straw was delignified by ASC and swelled and altered in crystal structure of cellulose by SB, particularly the three time (3x) ASC + SB treatment achieved the 98% delignification and the change of crystal type from type I to type II. MT957 strain obtained by mutation of *T. reesei* produced cellulase active at 30°C, and this low-temperature cellulase saccharified rice straw by 86% and achieved the rate close to the target 90%. Xylose fermenting FSC1 strain was newly developed by intergeneric hybridization between *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida intermedia* mutants by protoplast fusion and FSC3 strain improved the ability of FSC1 strain was obtained by further mutation. In the mixed substrate of glucose and xylose, FSC3 strain achieved 0.42 g/g-substrate in ethanol yield exceeding the target 0.4. In rice straw pretreated by the 3xASC-SB method, the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) using the low-temperature cellulase and FSC3 strain achieved 0.324 g/g-pretreated rice straw in ethanol yield, which is close to the target yield (81% equivalent).

Keywords:

bioethanol, sodium bicarbonate, low-temperature cellulase, mutation and fusion, xylose fermentation