

1-3 バイオマス糖化におけるグルコース添加の影響

小林 良則

はじめに

先の項でも述べたように我々は、バイオマスの高効率糖化法の開発を行ってきた。セルロース系バイオマスからのエタノールの製造においては、当然ながら糖液の濃度はできるだけ高い方が好ましく、最低でも15%以上が望まれる。この濃度を実現するための障害として、糖化生成物であるグルコースやセロビオースによる糖化酵素阻害が報告されてきた。この糖化阻害については、これまではセルロース糖化の最終工程で生成されるグルコースによりこの工程を担う β -Glucosidase活性(BGL)が阻害されることに関する研究が多い¹⁾。この阻害を解除することが糖化率向上につながると考えられることから、我々のプロジェクトにおいても産総研のグループはグルコースで阻害されない性能のBGLの探索を行い、きわめてグルコース耐性の高い酵素を得ている²⁾。一方、最近、CBHやEGに対するグルコース、セロビオースの阻害についての研究成果が報告され、CBH I、CBH IIに対するグルコースおよびセロビオースの影響を解析した結果、程度の差はあるものの、これら成分酵素に対する両生成物の阻害が確認されている³⁾。この報告では、基質として可溶化されたセルロースが用いられており、これらの阻害現象が実際のバイオマスの場合と同じかどうかは定かでないものの、50%阻害を示すグルコース

濃度はCBH Iの場合は400 mM、CBH IIの場合は140 mM程度であった。

我々は糖化機構解析において見いだした「頭打ち現象」の原因究明において、糖化生成物の影響を検証した。このなかで、BGL活性の高いAccellerase 1500や、我々が開発したJN系高機能糖化酵素の場合には、バイオマス前処理物やセルロース微結晶の糖化反応系中にセロビオースの顕著な蓄積が見られず、BGLが阻害されていることは確認できなかった。しかるに、糖化反応系にあらかじめグルコースを添加した系についての同様な糖化反応の解析から、セロビオースの蓄積が見られないのに、全体として糖化が阻害される現象が見いだされた。このことはセルロース糖化においてセロビオースが生成される前の段階での阻害が存在する可能性を示唆している。

我々は、この阻害の程度を検証する目的で併行複発酵により生成糖をエタノールに導いた場合の糖化についても解析し、この方式が高効率糖化にとって有効な方法であることを確認した。本稿においては、グルコースの糖化阻害に関する検討結果について紹介する。

結晶セルロースの糖化

セルロース微結晶5% (w/v) を基質に、市販酵素Accellerase 1500を3 mg/g-バイオマスおよびJN13を1 mg/g-バイオマスを用いた標準的な糖化反応系に、あら

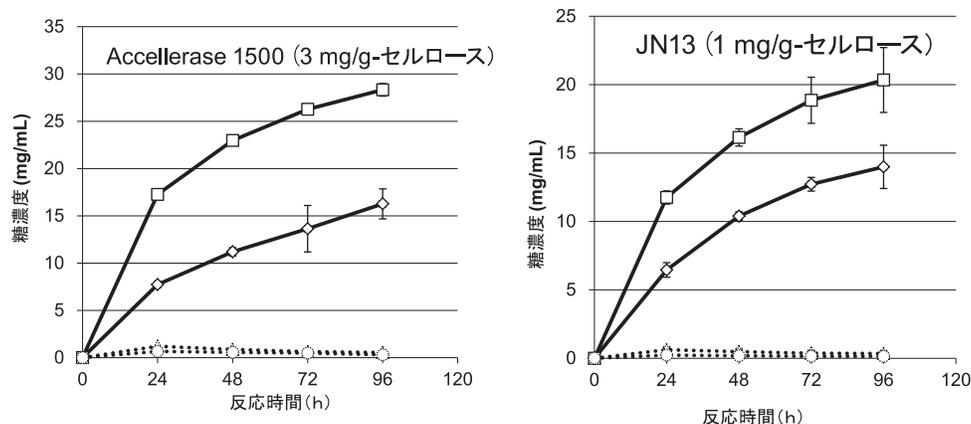


図1. グルコース添加の影響 (セルロースパウダー). 反応系: 5% (w/v) スラリー, 2 mL. ◇: グルコース30 mg/ml添加時のグルコース生成量, □: グルコース無添加時のグルコース生成量, △: グルコース30 mg/ml添加時のセロビオース生成量, ○: グルコース無添加時のセロビオース生成量.

著者紹介 (一財) バイオインダストリー協会つくば研究所 (室長) E-mail: yn-kobayashi@aist.go.jp

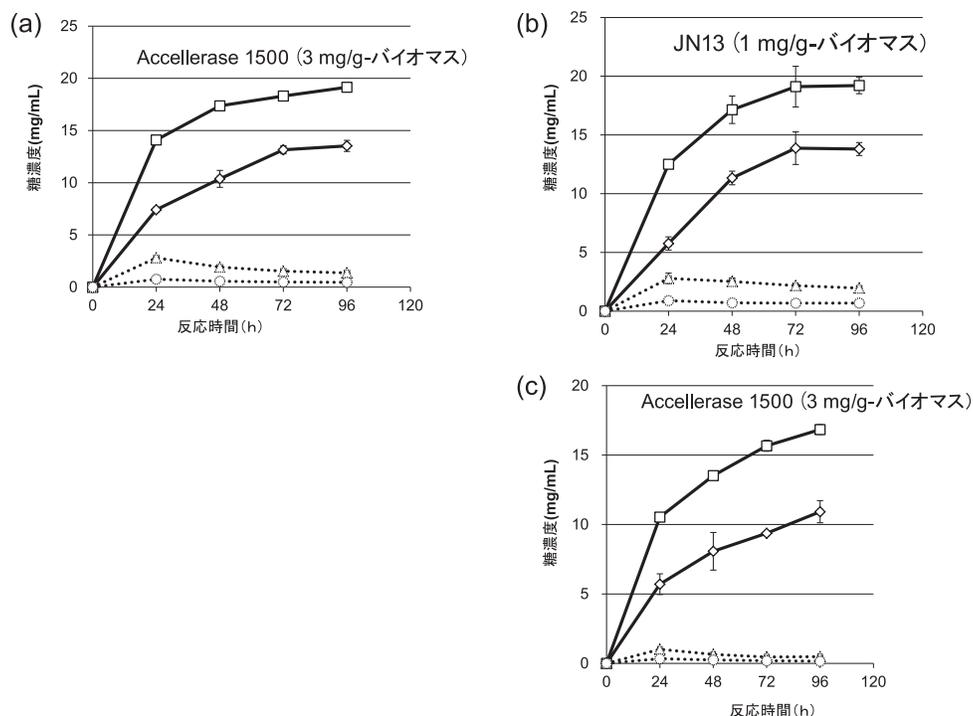


図2. グルコース添加の影響 (バイオマス). (a), (b): 稲わらNaOH処理, (c): エリアンサス水熱処理. 反応系: 5% (w/v) スラリー, 2 ml. ◇: グルコース 30 mg/ml 添加時のグルコース生成量, □: グルコース無添加時のグルコース生成量, △: グルコース 30 mg/ml 添加時のセロビオース生成量, ○: グルコース無添加時のセロビオース生成量.

はじめグルコースを 30 mg/ml 添加した場合の糖化反応を解析した. 図1に見られるように, 最終糖化率において Accellerase 1500 の場合で約 40%, JN13 の場合で約 35% の差が見られた. しかしながら, この両者の反応液中にはセロビオースの蓄積は見られない. ここで用いた 2 種の糖化酵素は BGL が強化されたものであることから BGL は十分機能しているものと考えられる. これらのことからこの糖化阻害現象は, BGL の阻害ではないと推定される.

バイオマスの糖化

稲ワラ苛性ソーダ処理物を用いた場合とエリアンサス水熱処理物を用いた場合について同様に Accellerase 1500 を 3 mg/g-バイオマスと JN13 を 1 mg/g-バイオマスの条件におけるグルコースの影響を検討した結果を図2に示す. これらの場合もセルロース微結晶の場合と同様にグルコース存在下で阻害が認められた. エリアンサス水熱処理物ではセルロース微結晶と同様であったが, 稲ワラNaOH処理物については反応初期 24 時間までにセロビオースの蓄積が少し認められたが時間経過とともに減少している. この結果, 稲ワラ苛性ソーダ処理物においては若干の BGL 阻害が認められるものの, 全体としてこれだけの大きな阻害を引き起こす原因

とは考え難いと判断された.

以上, 述べたように, グルコース存在下での糖化反応が確実に阻害を受けていることは確認できたが, その原因は BGL にあるようには見えない. 今回用いた糖化酵素はいずれも BGL が強化された改良型の糖化酵素であるため, 用いたバイオマス濃度や酵素使用量の場合は十分な活性が存在したためと思われる. そうなると, BGL 反応の前の段階, すなわち, CBH 段階での解析が必要となる. そこで, JN11 から CBH I と CBH II をカラムクロマトにより精製し, これら精製酵素を用いて, 同様にグルコース存在下での微結晶セルロースの糖化反応を行った. 図3に見られるようにいずれの CBH I, CBH II とも阻害を受けることが確認され, その程度は CBH I の方が大きいことが判明した.

単一成分欠損酵素による解析

上記のように, 糖化反応において CBH の段階でグルコース阻害を受けている可能性を示す結果が得られたが, 単一成分欠損酵素を用いる方法でこの点を確認することにした.

T. reesei PC-3-7 株の生産する糖化酵素 (WT) を対照として, 長岡技術科学大学で創成された WT から CBH I, CBH II, EG I をそれぞれ欠損した Δ CBH I, Δ CBH II,

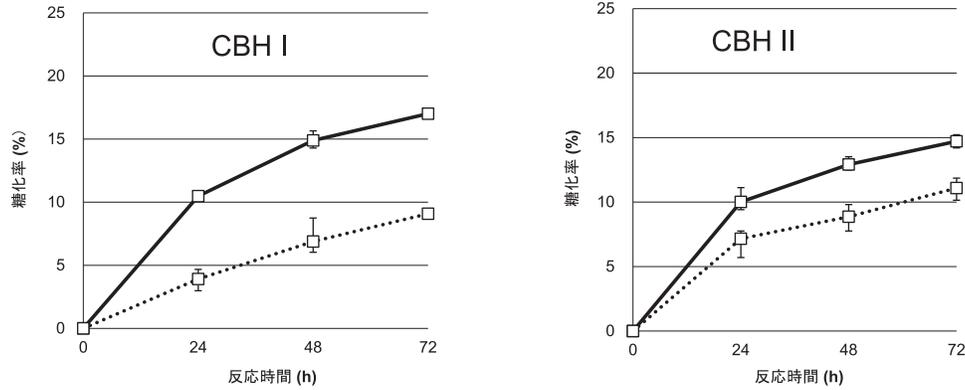


図3. CBH IおよびCBH IIのセルロース分解反応に対するグルコース添加の影響. 反応系:2 ml. 基質:セルロースパウダー5%(w/v), 酵素: JN11より精製したCBH IあるいはCBH II(3 mg/g-セルロース)にA. aculeatus BGL(0.5 mg/g-セルロース)添加. 実線: グルコース添加無. 点線: グルコース30 mg/ml添加.

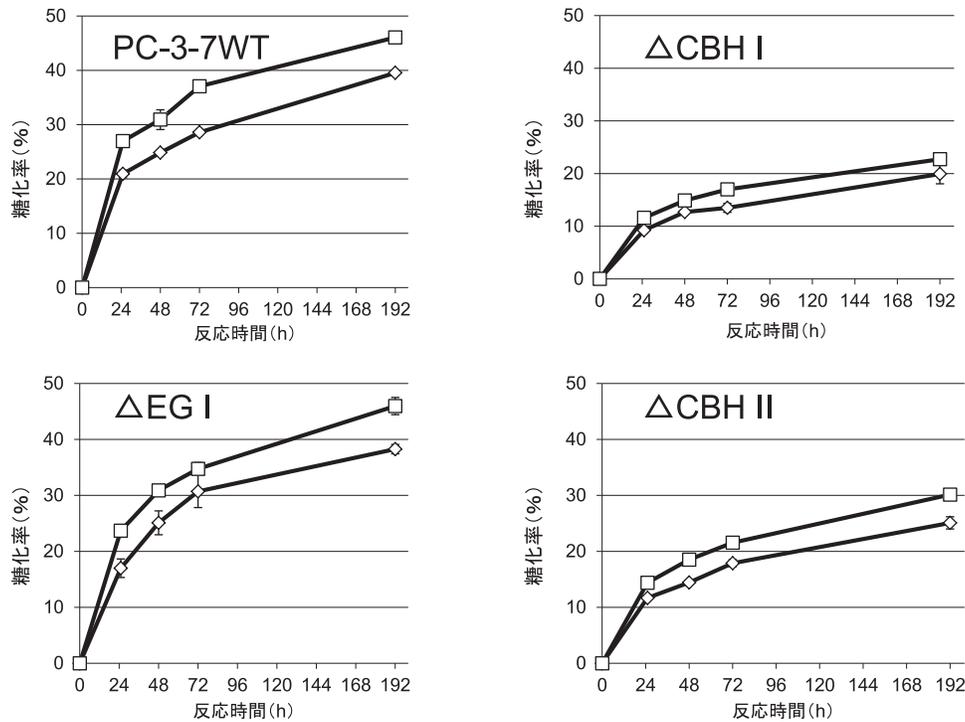


図4. 単一成分欠損糖化酵素のセルロース分解に対するグルコース添加の影響. 反応系: 2 ml. 基質:セルロースパウダー5%(w/v), 2 ml. 酵素: 3 mg/g-セルロースにA. aculeatus BGL(0.5 mg/g-セルロース)添加. □: グルコース添加無, ◇: グルコース30 mg/ml添加.

ΔEG Iを用い, これらについてのグルコース阻害を検証した. 図4に見られるようにグルコースの添加有無による糖化率の差は $\Delta EG I > \Delta CBH II > \Delta CBH I$ という順になった. すなわち, グルコースの阻害を受ける順番はCBH I $>$ CBH II $>$ EG Iであると推定された. これらの結果からも, 少なくとも2種のCBHは程度の差はあれ, グルコースによる阻害を受けていることが確認された.

併行複発酵による阻害解除

セルロース系バイオマスからのエタノール製造においては, 糖化反応における生成グルコースの阻害を排除する目的で, 併行複発酵法が検討されている. 我々も, 実バイオマスを用い, 糖化酵素としてJN13を用い, 酵母は産総研が開発したキシロース代謝能を付与したDPP株を用いて併行複発酵を行い, この糖化・発酵方式の性能を検証した. 結果を図5に示す. この結果から明らか

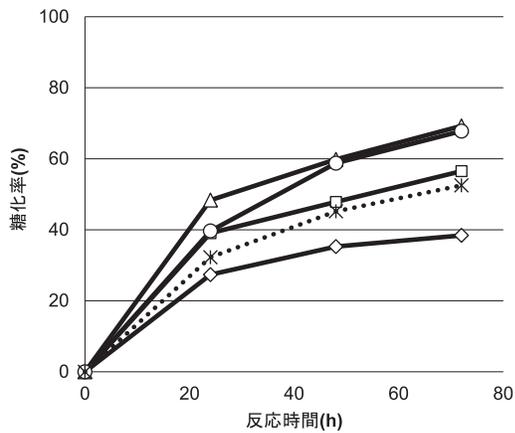


図5. 酵素糖化における併行複発酵の効果. 反応系: 50 ml. 基質: 水熱処理エリアンサス, 15% (w/v). 酵素: JN11 (5, 10, 15 mg/g-バイオマス). 酵母: DPP株 (1% (w/v)). 温度: 36 °C or 50 °C. ◇: 5 mg/g-バイオマス, 36 °C, ×: 5 mg/g-バイオマス, 50 °C, □: 10 mg/g-バイオマス, 36 °C, ○: 5 mg/g-バイオマス + DPP 株, 36 °C, △: 15 mg/g-バイオマス, 36 °C. 糖化率: グルコースとキシロースより算出. 併行複発酵: エタノール, グルコース, キシリトール, グリセロールより算出.

なように併行複発酵という方式は糖化におけるグルコースの阻害を解除する目的において, 非常に効果的な方法である. この検討において, 糖化に用いる酵素量を変化させ併行複発酵の効果を検証したところ, 酵素の使用量

を1/3程度に低減できるほどの効果であることが確認された.

終わりに

これまで, バイオマス糖化における阻害の問題は, 糖化の最終工程であるBGLの段階について論じられてきた. しかしながら, 最近のように糖化酵素の改良によりBGLが大幅に強化された結果, この工程における阻害はさほど問題にならないように思える. それに対し, 今回, 我々が明確にしたように, その前の段階, 少なくともCBHの段階での阻害が明らかになった. この問題を回避する策としての併行複発酵の方式の効果は非常に大きいものであることが確認された. 以上の結果から, 今後の更なる高機能酵素の創成, 高効率糖化方法の開発においてはCBH段階でのグルコース阻害を回避する方策が必要と思われる.

文 献

- 1) Pavle, A. *et al.*: *Biotechnol. Adv.*, **28**, 308 (2010).
- 2) Uchiyama, T. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **288**, 18325 (2013).
- 3) Murphy, L. *et al.*: *Enzyme Microb. Technol.*, **52**, 163 (2013).