

原著論文 (通常論文)

バイオマスからの次世代型エタノール製造技術に有用な
新規ヘミセルラーゼ生産菌 *Aspergillus aculeatus* KIF 78 株

A Newly Isolated Hemicellulase-producing Fungus for Second-generation Ethanol Production,
Aspergillus aculeatus KIF 78

矢野 伸一^{1,2*}, 喜多尾千秋¹, 井上 宏之¹, 澤山 茂樹¹, 芋生 憲司², 横山 伸也²

SHINICHI YANO, CHIAKI KITAO, HIROYUKI INOUE, SHIGEKI SAWAYAMA, KENJI IMOU and SHINYA YOKOYAMA

¹ 独立行政法人産業技術総合研究所バイオマス研究センター 〒737-0197 広島県呉市広末広 2-2-2

² 東京大学大学院農学生命科学研究科 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

* TEL: 0823-72-1935 FAX: 0823-73-3284

* E-mail: s-yano@aist.go.jp

¹ Biomass Technology Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 2-2-2

Hiro-suehiro, Kure, Hiroshima 737-0197, Japan

² Graduate School of Agricultural and Life Sciences, the University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi,

Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

(原稿受付 2009年10月19日 / 原稿受理 2009年11月20日)

Enzymatic saccharification of cellulose and hemicellulose is the most important process in the second-generation ethanol production which utilizes lignocellulosic biomass as feedstock. We have developed fungal strain with enhanced cellulase productivity, *Acremonium cellulolyticus* CF-2612. However, the hemicellulase productivity of this strain was not sufficient. To supplement hemicellulase activity, we screened new hemicellulase-producing fungal strains from soils in Japan, and have isolated a promising strain, *Aspergillus aculeatus* KIF 78. The enzyme solution from this strain can hydrolyze hemicellulose efficiently from both hardwood and softwood. The addition of this enzyme solution to commercial cellulase from *A. cellulolyticus* enhanced total sugar yield from lignocellulose significantly. An ethanol production system which can efficiently utilize hemicellulose fraction of biomass can be expected with this new fungal strain.

Key words: lignocellulosic biomass, enzymatic saccharification, cellulase, hemicellulase, *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*

キーワード: リグノセルロース系バイオマス, 酵素糖化, セルラーゼ, ヘミセルラーゼ, *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*

1. 緒 言

バイオマス由来のエタノールでガソリンを代替することは、石油代替および地球温暖化対策の目的で既に多くの国で実施されており、特に米国とブラジルが世界の2大生産国になっている。しかし現状では、トウモロコシなどのデンプンやサトウキビなどのシヨ糖という、本来は食用である農産物をエタノールの原料としているため、資源の食用との競合、穀物価格の上昇、などの問題が懸念されている。そこで、非食用のバイオマス資源である木質、農業残渣等からのエタノール生産技術の開発が期待されている。

シヨ糖やデンプンからのエタノール生産は基本的に酒造と同じで、技術的には成熟した段階にあるが、木質、農業残渣等からのエタノール生産には、まだ克服すべき技術課題が存在する¹⁾。シヨ糖はエタノール発酵用酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) がそのまま利用でき、デンプンは高分子で酵母は利用できないがデンプン糖化酵素

(アマラーゼ)により容易に分解されて発酵可能なグルコースを生成する。これに対し、木質、農業残渣等はセルロース、ヘミセルロース、リグニンの3成分を主要構成要素としており、このためにリグノセルロース系バイオマスと呼ばれるが、3成分中、通常最も量が多いセルロースは、結晶性の分子が整然と配列した構造を持っており、同じグルコースのポリマーであるデンプンに比べて分解が難しい。さらにリグニンとヘミセルロースがセルロースを保護しているため、セルロース糖化酵素(セルラーゼ)を直接作用させても、セルロースの分解はほとんど起こらない。このため、リグニン等の保護を緩め、またセルロース自体の酵素との反応性を増加させるために、酵素糖化の前に適切な処理を行うことが必須である。

この前処理については、様々な原理による多様な方法が世界中で研究されているが²⁾、産業技術総合研究所バイオマス研究センターでは、硫酸などの劇物を使用しないことを基本に、微粉碎(メカノケミカル法)を中心とした前処理技術の研究開発を行っている^{3,4)}。これにより

糖化に必要な酵素の量を減らすことができるが、それでも製品のエタノールがガソリン代替用であることを考えると、セルラーゼコストの更なる大幅な削減が求められる。そのため、市販のセルラーゼを購入しては経済的に成立する可能性が低いと考えられるので、エタノール生産者が、エタノール生産の場所で自ら酵素も生産するという、オンサイト酵素生産が必要であるという考え方が一般的になってきている⁹⁾。しかしこの場合、エタノール生産者が自ら優良な酵素生産菌を保有する必要がある。

産業技術総合研究所の前身の1つである旧微生物工業技術研究所では、1980年代に国内の土壌からセルラーゼ生産糸状菌 *Acronium cellulolyticus* を単離した⁶⁾。その後の研究開発により、この菌が生産するセルラーゼ(アクレモニウムセルラーゼ: AC)は明治製菓(株)による商業生産に至り、特にサイレージ用酵素として高い評価を得ている⁷⁻⁹⁾。セルラーゼは単一の酵素ではなく、セルロースの非品質部分に切れ目を入れるエンドグルカナーゼ、この切れ目からセロビオース単位で結晶質の鎖を切っていくセロビオハイドラーゼ、セロビオースをグルコースに分解するβ-グルコシダーゼの3種の酵素から成っているが、ACは現在一般的に使用されている *Trichoderma* 属の糸状菌が生産するセルラーゼに比べて、β-グルコシダーゼの活性が高いという特長を持っている。*S. cerevisiae* はセロビオースを利用できないため、これを分解してグルコースを生成するβ-グルコシダーゼの活性が高いことはエタノール生産用の酵素として望ましい性質である。そこで我々はこの菌種に再注目し、突然変異処理を行うことによって、酵素の生産性がさらに大きく向上した菌株(CF-2612)を取得することができた¹⁰⁾。

一方、ヘミセルロースも糖を中心とした構造の高分子であるので、これを分解して得られる糖も発酵基質に用いることで、エタノール生産性の更なる向上を図ることができる。ヘミセルロースは一般にセルロースよりは糖化が容易であるが、やはり糖化酵素(ヘミセルラーゼ)を必要とする。我々が取得したセルラーゼ高生産菌 *A. cellulolyticus* CF-2612 株は、親株の変異処理後、セルラーゼの活性を指標として選抜されたためか、ヘミセルラーゼの生産性は親株とほとんど差がなく、ヘミセルロースを効率良く糖化するには活性が不足する傾向が認められた。そこで、新たに菌株のスクリーニングを行い、ACを補完できるヘミセルラーゼを高生産できる菌を取得したので、これについて報告する。

2. 材料及び方法

2.1 培地炭素源および酵素活性測定用物質

糸状菌分離培地の炭素源、および酵素活性測定用の基質として、アビセル(アビセル HP101, Fluka)、キシラン(birchwood 由来, Sigma)、リグニン(クラフトリグニン, Sigma Aldrich)、グルコマンナン(Megazyme)を使用した。

また前処理済み木質試料として、カッターミルで粒径2 mm 以下に粗粉碎後、遊星型ボールミル(Fritsche 社製 pulverisette 7)で4時間粉碎して粒径40 μm 以下にし

た、ボールミル粉碎ユーカリ(BE)、ボールミル粉碎ダグラスファー(通称バイマツ, BD)も使用した。

2.2 微生物スクリーニング方法

① 土壌からの糸状菌の分離

リグノセルロース分解酵素生産糸状菌を分離する培地は、Eggins-Pugh 培地¹¹⁾(硫酸アンモニウム 0.5 g, リン酸一カリウム 1.0 g, 硫酸マグネシウム・7水和物 0.2 g, 塩化カリウム 0.5 g, 塩化カルシウム 0.1 g, 酵母エキス 0.5 g, L-アスパラギン 0.5 g, 寒天末 20 g, 精製水 1 L)を基本組成とし、これにアビセル, BE, キシラン, リグニンを各1%炭素源として加えた4種類の培地を調製した。

土壌サンプル約100 mg を滅菌水10 ml に懸濁し、さらにその100 μl を滅菌水10 ml に希釈した懸濁液1 ml を滅菌シャーレに分注しておき、それらに約60°C に保温した上記炭素源基質の寒天培地を分注、混釈固化し、30°C で7日間培養した。出現するコロニーをポテト・デキストロース寒天培地(PDA 培地)に分離・移植して保存した。

② 1次スクリーニング

保存菌をシード用液体培地(グルコース 1.0 g, ペプトン 5.0 g, 硝酸ナトリウム 0.5 g, リン酸二カリウム 1.0 g, 塩化カリウム 0.5 g, 硫酸マグネシウム・7水和物 0.5 g, 硫酸第一鉄・7水和物 0.1 g, 精製水 1 L, pH 6.0) 5 ml を分注した試験管に接種し、30°C で7日間シード培養した。このシードをさらに酵素生産用 AXP 液体培地(ペプトン 15 g, 酵母エキス 1.0 g, 硝酸ナトリウム 5.0 g, リン酸一カリウム 10.0 g, 硫酸マグネシウム・7水和物 1.0 g, 硫酸第一鉄・7水和物 0.01 g, 硫酸マンガン・5水和物 0.01 g, 硫酸亜鉛・7水和物 0.01 g, アビセル 25 g, キシラン 25 g, 精製水 1 L, pH 5.0) 5 ml を分注した試験管に接種し、30°C で7日間振とう培養した。得られた培養液について、アビセル, キシラン, BE, BD のいずれか1つを基質として50 mg を含む50 mM 酢酸緩衝液(pH 5.0) 1 ml に培養液1 ml を混合し、45°C, 7日間酵素反応を行った。反応液を遠心分離した上清液について、アミネックス HPX-87P (BioRad) カラムを装着した日本分光社製 HPLC システム(検出器: 示差屈折計 2031 Plus) で生成した糖の定量を行った。

③ 2次スクリーニング

1次スクリーニングにおいて何らかの酵素活性を示した菌株について、1次スクリーニング同様にシード培養を行い、これをさらに酵素生産用 AXP 基礎培地に各5%のアビセル, キシラン, BE, BD, およびカッターミル粉碎ユーカリを個別に炭素源として加えた5種類の培地15 ml を分注した100 ml フラスコに接種して30°C で7日間振とう培養し、再度酵素活性によるスクリーニングを行った。

2.3 培養液中の各酵素活性測定方法

Filter-paperase (FPase) 活性, Carboxymethyl-cellulase (CMCase) 活性, アビセラナーゼ, キシラナーゼ, マンナン分解酵素: それぞれ, ろ紙, カルボキシメチルセルロース(CMC), アビセル, キシラン, グルコマンナンを基質として酵素反応を行い, ジニトロサリチル酸

(DNS) 法による比色定量法 (540 nm) により還元糖量を測定した。各酵素の活性は、1 分間に 1 μmol の還元糖を生成する酵素量を 1 U として定義した。

β -グルコシダーゼ: *p*-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド (Sigma) を基質として酵素反応を行い、生成した *p*-ニトロフェノール (PNP) を比色定量 (420 nm) して測定した。酵素活性は、1 分間に 1 μmol の PNP を生成する酵素量を 1 U として定義した。

2.4 選抜株の酵素反応の至適 pH, pH 安定性, 至適温度, 熱安定性の測定方法

① 反応至適 pH の検討

1.5 ml マイクロチューブにろ紙粉末 (Whatman CF11) 50 mg, またはキシラン 50 mg を秤量し, pH 2 ~ 9 までの 0.1 M 酢酸またはホウ酸緩衝液各 0.5 ml および培養液 0.5 ml を混合して 45°C で 48 時間反応させた。生成したグルコースまたはキシロースの量を HPLC を用いて定量し, 至適 pH を決定した。

② pH 安定性の検討

pH 2 ~ 9 までの 0.1 M 酢酸またはホウ酸緩衝液 1 ml に培養液 0.5 ml を加えて 45°C で 30 分間保温後, ろ紙粉末およびキシランを基質として酵素反応を行い, DNS 法により残存活性を測定した。

③ 反応至適温度の検討

5 ml L 字試験管に上記ろ紙粉末またはキシラン各 50 mg を秤量し, 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1 ml および培養液 1 ml を混合して小型 L 型振とう培養装置 (アドバンテック TVS062CA) を用い, 30 ~ 70°C の各温度で 24 時間酵素反応させ, 生成するグルコースまたはキシロースを HPLC で分析して至適反応温度を決定した。

④ 熱安定性の検討

5 ml L 字管に 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1 ml および培養液 1 ml を分注し, 小型 L 字管振とう培養装置を用いて, 30 ~ 70°C の各温度で 30 分間保温した後に, ろ紙粉末およびキシランを基質として酵素反応を行い, DNS 法により残存活性を測定した。

2.5 選抜株培養液と AC の基質糖化性の比較

培養液を限外ろ過濃縮し, AC を用いた我々の実験において通常使用している酵素量 (FPase として 2.0 U) とほぼ同等の活性を示すように濃度調整した。酵素による各種基質 (アビセル, キシラン, BE, BD) の糖化反応は, 基質 50 mg に酵素液 1 ml (混合する場合は各 0.5 ml ずつ) を混合し, 45°C にて 3 日間反応し, 生成した糖を HPLC によって定量した。

3. 結 果

3.1 スクリーニング

① 1 次スクリーニング

日本各地の山地, 畑地, 腐植などから採集した 111 種の土壌サンプルから 130 株の糸状菌を分離し, KIF 株として番号を付けて保存した。それらを 1 次スクリーニング培養した結果, 79 株において糖 (グルコース, キシロース) の生成が認められた。あらかじめ各種基質を混合した寒天平板培地にて選択培養されていたこともあって,

分離した 130 株の 60% 以上が選択されるという高効率の結果であった。

② 2 次スクリーニング

1 次スクリーニング選択株 79 株について 2 次スクリーニング培養を行い, 13 株の高活性菌が選抜された。選択された菌株の分離培地はアビセルが 5 株, ME が 1 株, キシランが 5 株, リグニンが 2 株, であった。

③ 有望株の特定

これらの 13 株のうち, グルコース生成能およびキシロース生成能が特に優れていた KIF 78 株 (東京都あきる野市の土壌から分離) がさらに検討すべき株として選択された。KIF 78 株の 2 次スクリーニングでの培養液の各基質に対する糖生成能を Table. 1 に示す。

本菌株をキシラン培地で酵素誘導して培養し, 50 mg/ml のキシランを基質として反応 (40°C, 6 日間) させると, 35.4 mg/ml のキシロースが生成した。また, BE 培地で酵素誘導培養し, キシランを基質として反応させると, 25.8 mg/ml のキシロースが生成した。アビセル培地, カッターミル粉碎ユーカリ培地, BD 培地の場合は, キシランからのキシロース生成は 7 ~ 8 mg/ml 程度に留まった。一方, アビセル基質からのグルコース生成に関しては, キシラン培地から誘導培養された培養液が 4.03 mg/ml と最も高く, 他の培地ではいずれもそれ以下であった。このように, キシランからのキシロース生成の方が, アビセルからのグルコース生成よりも優れており, KIF 78 株はヘミセルラーゼ生産菌として有望であることが確認された。そこで, この菌株およびその酵素についてさらに詳しく解析を行った。

3.2 KIF 78 株の菌学的性状

KIF 78 株の菌種の同定を財団法人日本食品分析センターに依頼したところ, 各種形態学および生理学的性状により, *Aspergillus aculeatus* と同定された。その顕微鏡写真と分生胞子の拡大顕微鏡写真を Fig. 1 に示す。

3.3 KIF 78 株酵素の至適酵素反応条件および安定性

KIF 78 株の生産するセルラーゼおよびヘミセルラーゼの pH 安定性, 至適 pH, 熱安定性, および至適温度について調べた結果を Fig. 2 に示す。セルラーゼ活性については, pH 3 ~ 6 の間で安定で至適 pH は 4.5 であり, 熱安定性に関しては 30 ~ 60°C の間で安定であり, 至適温度は 50°C であった。

一方, ヘミセルラーゼ活性については, pH 3 ~ 6 の間で安定であり, 至適 pH は 4.5, 熱安定性に関しては 30 ~ 50°C において安定であり, 至適温度は 50°C であった。

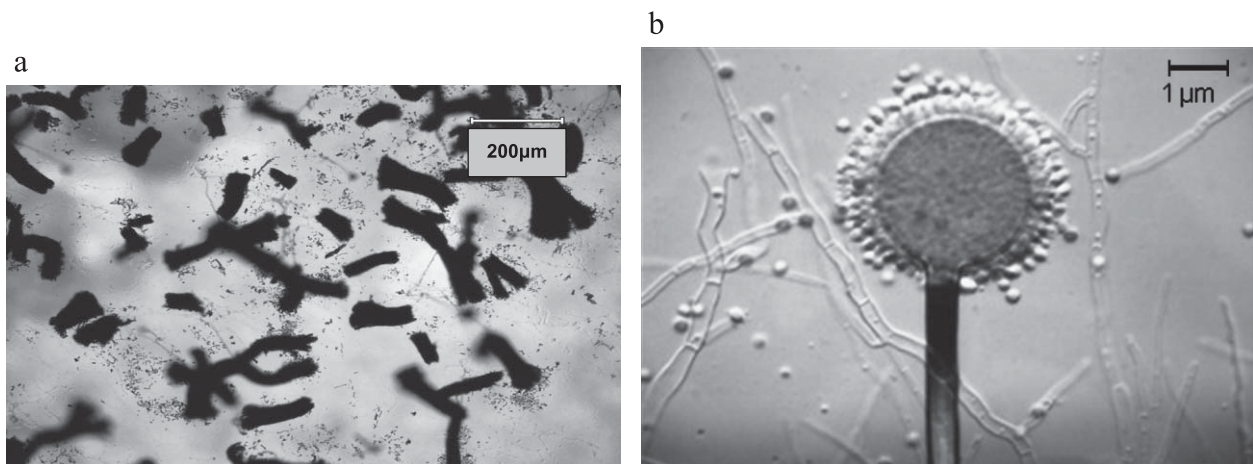
3.4 KIF 78 株酵素と AC の活性比較

KIF 78 株の培養液を限外ろ過濃縮し, これとほぼ同じ FPase 活性を示す量の AC と, CMCCase, アビセラゼ, β -グルコシダーゼ, キシラナーゼ, およびマンナン分解酵素の活性を比較した。またそれらを等量ずつ混合した場合の活性も測定した。結果を Table. 2 に示す。

AC の FPase=2.1 U/ml に対して KIF 78 のそれを 1.9 U/ml で実験を行った場合, CMCCase 活性は両者に大差なく, アビセラゼは AC の方が若干高い結果であっ

Table 1. Saccharolytic enzyme activities of *Aspergillus aculeatus* KIF 78.

Carbon source for culture	Substrates for enzyme assay	Released sugar (mg/ml)	
		Glucose	Xylose
Avicel	Avicel	2.90	
	Xylan		7.55
	Ball-milled eucalyptus	2.46	0.77
	Cutter-milled eucalyptus	1.30	
	Ball-milled Douglas-fir	1.17	
Xylan	Avicel	4.03	
	Xylan		35.36
	Ball-milled eucalyptus	5.03	2.68
	Cutter-milled eucalyptus	1.80	1.39
	Ball-milled Douglas-fir		
Ball-milled eucalyptus	Avicel	1.37	
	Xylan		25.80
	Ball-milled eucalyptus	3.06	2.46
	Cutter-milled eucalyptus	1.03	
Cutter-milled eucalyptus	Avicel	2.44	
	Xylan		8.96
	Ball-milled eucalyptus	2.41	0.65
	Cutter-milled eucalyptus	0.80	
Ball-milled Douglas-fir	Avicel	3.78	
	Xylan		8.09
	Ball-milled eucalyptus	3.38	0.95
	Cutter-milled eucalyptus	0.90	
	Ball-milled Douglas-fir	1.29	

Fig. 1. Microscopic picture of *A. aculeatus* KIF 78 (a) and its conidia (b).

たが、 β -グルコシダーゼ活性においては KIF 78 の方が 5 倍以上高かった。AC と KIF 78 を等量混合した場合、FPase、アピセララーゼ、およびキシランナーゼにおいて元の KIF 78 よりも活性が強化された。

3.5 KIF 78 株酵素、AC 酵素液および混合液の各種基質に対する糖化反応

基質として、アピセル、キシラン、BE、BD を用い、

KIF 78 培養液単独、AC 酵素液単独での糖化反応およびそれらを等量ずつ混合した混合液の糖化反応を行い、相乗効果を調べた。

AC の活性を 100% とした、KIF 78 酵素と混合酵素の相対活性比を Fig. 3 に示す。

アピセルからの KIF78 でのグルコース生成は、AC と比較して 67% と低かったが、この 2 つを混合した場合は、AC のみと同等であった。一方、キシランに対する KIF

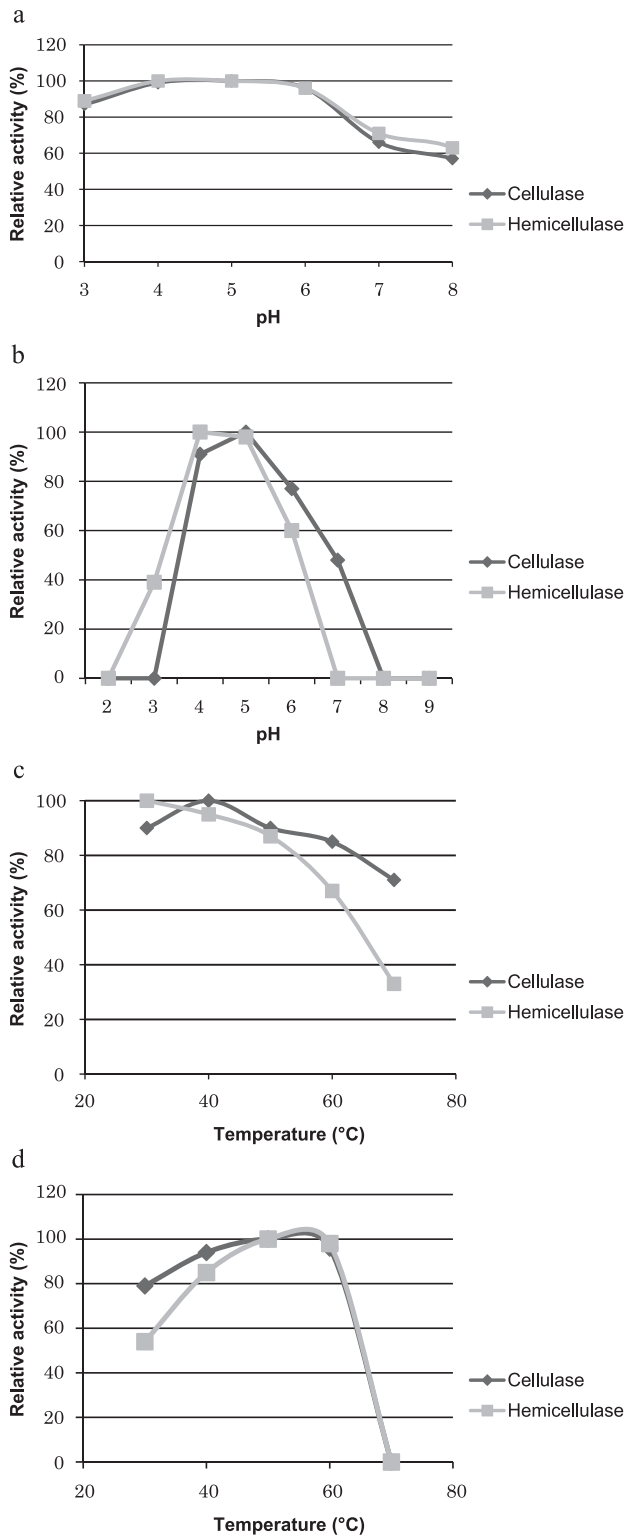


Fig. 2. Stability and optima for KIF 78 cellulase and hemicellulase. (a) stability for pH, (b) optimum pH, (c) stability for temperature, (d) optimum temperature

Table 2. Comparison of enzyme activities between commercial *Acremonium* cellulase (AC), enzyme solution from *A. aculeatus* KIF 78, and their mixture.

Activity (U/ml)	AC	KIF78	Mixture
FPase	2.1	1.9	2.5
CMCase	4.5	4.9	4.7
Avicelase	3.1	2.5	3.2
β -Glucosidase	0.5	2.7	1.2
Xylanase	30.1	22.4	27.7
Mannosidase	ND	0.03	0.02

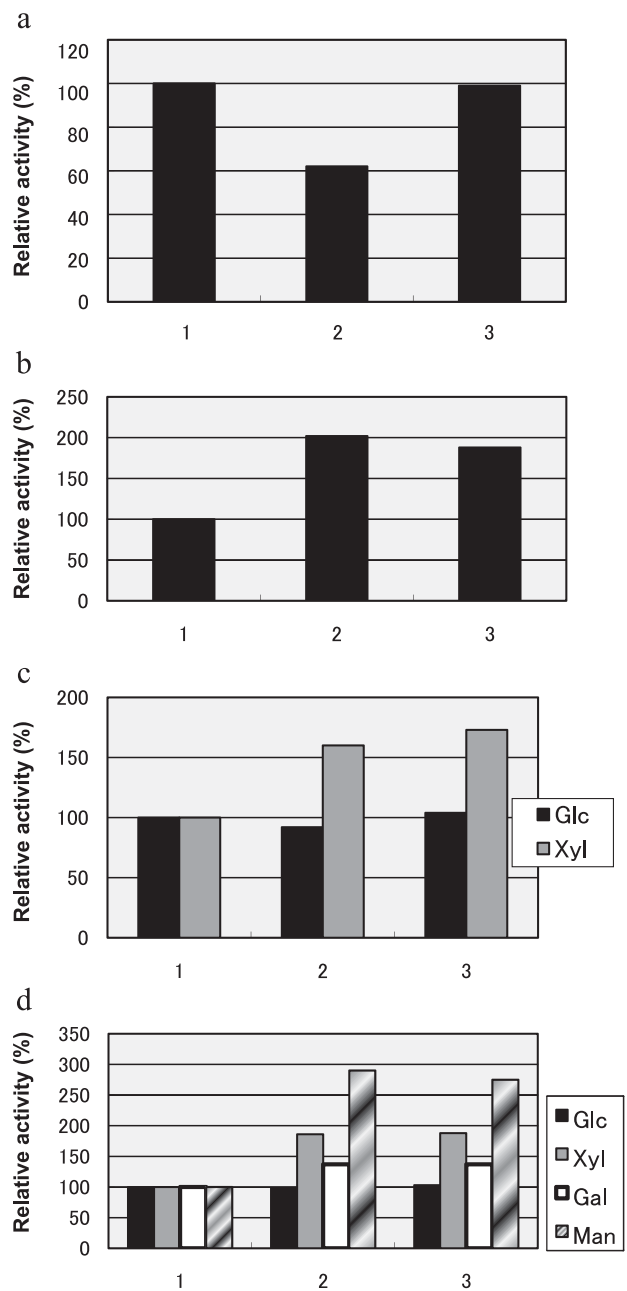


Fig. 3. Relative enzyme activities for commercial *Acremonium* cellulase (1), enzyme solution from *A. aculeatus* KIF 78 (2), and mixture of both enzymes (3) on different substrates. Substrates: (a) Avicel, (b) xylan, (c) ball-milled eucalyptus, (d) ball-milled Douglas-fir.

78の糖化力はACの2倍以上であった。広葉樹であるBEの場合、混合酵素ではACに比較してグルコース104%、キシロース173%という効率で生成した。またキシラン基質の場合、ACのみでは約40%のキシロビオースが未反応のまま残存しているが、混合酵素ではキシロースのみに変換された (Fig. 4-a)。

針葉樹であるBDを基質とした場合、KIF 78においてはACより1.8倍のキシロース、1.4倍のガラクトース、2.9倍のマンノースが生成し、混合酵素でも同様の糖が生成した。またBD基質においてはACではマンノースがほとんど検出されずマンノビオースとして残存しているが、混合酵素ではマンノースに変換されていた (Fig. 4-b)。

BEおよびBD基質の混合酵素による糖化によって生成された糖量、および硫酸による完全分解により得られた全糖量から求めた回収率を比較した結果をTable. 3に示した。

BEについては、グルコースはAC単独では回収率82.9%、KIF 78では76.2%とやや落ちるが、2つの混合により86.5%に増加した。キシロースについてはAC単独では33.8%であったが、KIF 78では54.2%、混合酵素では58.5%と向上した。全体の糖回収率もAC単独と比較して混合酵素の方が約8%良好であった。

BDについては、グルコースではAC単独で88.8%、KIF 78で81.9%、混合酵素で85.8%と差がみられなかったが、マンノースに対してはAC単独では24.2%であったのに対し、KIF 78では70.2%と回収率が3倍近く増加した。キシロースにおいてはKIF 78および混合酵素ではACの1.8倍以上の糖が得られたものの、糖収率は43.8%と低く、ガラクトースはさらに低く35.3%であった。しかしキシロース、ガラクトースの含量が少ないため、4種のトータルでは76.9%の糖収率が得られた。

4. 考 察

我々が開発したセルラーゼ高生産性糸状菌 *A. cellulolyticus* CF-2612株の酵素系ではヘミセルラーゼ活性が十分ではないために、ヘミセルラーゼ生産性が高い菌株を新規に探索し、ヘミセルラーゼ高生産性糸状菌 *Aspergillus aculeatus* KIF 78株を得た。この菌株が生産する糖化酵素は、アビセル等の結晶性セルロースに対する活性はACに及ばないが、ヘミセルラーゼ活性およびβ-グルコシダーゼ活性はACより優れていることが明らかになった。ACとKIF 78酵素とを混合して前処理された木質に使用した場合、グルコース生成量はAC単独の場合と大きな差はないが、ユーカリ基質の場合、

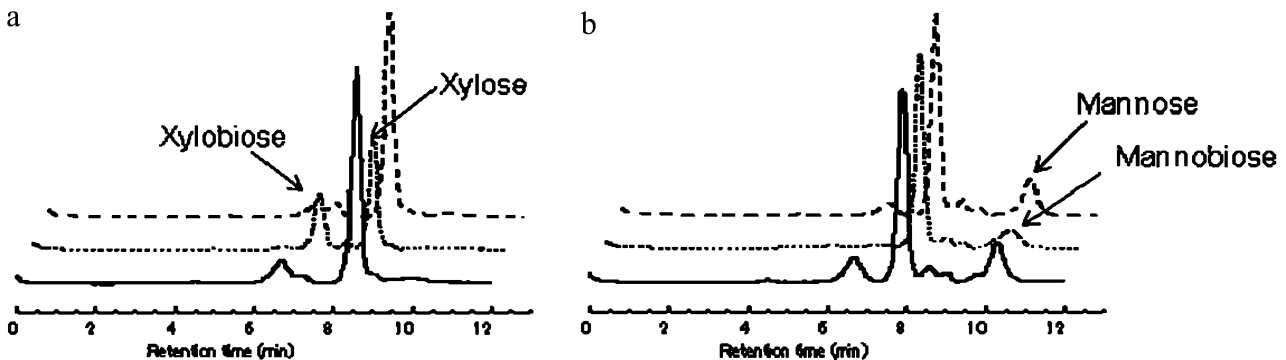


Fig. 4. HPLC chromatogram of sugar analyses after enzymatic saccharification with commercial *Acremonium cellulase* (.....), enzyme solution from *A. aculeatus* KIF 78 (——), and mixture of both enzymes (- - -). Substrates: (a) xylan, (b) ball-milled Douglas-fir.

Table 3. Sugar yields from ball-milled wood with commercial *Acremonium cellulase* (AC), enzyme solution from *A. aculeatus* KIF78, and their mixture (Mix)

		Sugar contents (mg/g substrate)	sugar yields (mg/g substrate) and recoveries (%)					
			AC		KIF78		Mix	
			Yield	Recovery	Yield	Recovery	Yield	Recovery
Ball-milled eucalyptus	Glucose	441	365.8	82.9	336.2	76.2	381.4	86.5
	Xylose	117	39.6	33.8	63.4	54.2	68.4	58.5
	Total	558	405.4	72.7	399.6	71.6	449.8	80.6
Ball-milled Douglas-fir	Glucose	509	452.2	88.8	417	81.9	436.6	85.8
	Xylose	42	9.8	23.3	18.2	43.3	18.4	43.8
	Galactose	38	9.8	25.8	13.2	34.7	13.4	35.3
	Mannose	151	36.6	24.2	106	70.2	100.6	66.6
	Total	740	508.4	68.7	554.4	74.9	569	76.9

キシロース生成量が AC 単独の場合の 1.73 倍、ダグラスファー基質の場合、キシロース、ガラクトース、マンノースの生成量が、それぞれ 1.88 倍、1.37 倍、2.75 倍に増加した。これにより、セルロース由来のグルコースだけでなく、ヘミセルロース由来の各種の糖も効率良く回収することが可能になり、トータルの糖収率が増加することで、原料当たりのエタノール生産性が向上する。この菌のヘミセルラーゼの生産性 (unit/ml) は、培養条件等の違いがあるため単純には比較できないが、報告されている *Aspergillus* 属の菌によるキシラナーゼ¹²⁻¹⁴ およびマンノシダーゼ¹⁵ の数値と同程度と考えられる。今後我々が *A. cellulolyticus* のセルラーゼに対して行った変異処理等でさらに生産性を高めることも期待できる。

ヘミセルロースは、植物種によって構造が違い、針葉樹ではグルコマンナン、ガラクトグルコマンナンが中心であるが、広葉樹、草本ではグルクロノキシランがほとんどである。これに対応して、ヘミセルラーゼも、マンナン分解系酵素を中心とする針葉樹に適したものと、キシラン分解系酵素を中心とする広葉樹、草本に適したものがあがるが、今回得られた *A. aculeatus* KIF 78 株の酵素系は、特に針葉樹からのマンノース回収に対する効果が大きく、一般にキシラン分解系に比べてマンナン分解系酵素を生産する菌の種類は少ないため¹⁶、針葉樹のヘミセルロース分解用酵素生産菌として有用性が高いと考えられ、かつ広葉樹からのキシロース回収も良好であるので、原料の種類を選ばない汎用的なヘミセルラーゼ生産菌としての利用も期待される。

セルラーゼ生産菌とは別にヘミセルラーゼ生産菌を培養して酵素生産することは、システムの要素が 1 つ増え、その分コスト増加の要因にはなるが、2 種の酵素の相乗効果によってそれを打ち消すだけの糖収率の向上が期待できる可能性もある。1 種の菌がセルラーゼ、ヘミセルラーゼとも十分に生産できることが理想ではあるが、微生物のタンパク質生産能には限界があり、その中で各酵素の生産比率を最適に制御することは難度が高い技術になると考えられる。我々は既にセルラーゼ高生産性菌株を保有しており、この菌の特質を最大限に生かすためには、ヘミセルラーゼを別途生産するシステムが有効と考えるが、コストに関しては更に精密な解析が必要である。

効率の良いエタノール生産のためには、セルロースの糖化だけでなく、ヘミセルロースからの糖回収も重要であることは従来から指摘されているが^{17,18}、糖が得られても広葉樹、草本では主成分であるキシロースを通常の酵母では発酵できないことが重大な問題になっている。この点我々は、京都大学との共同研究により、キシロースを効率良くエタノールに変換できる遺伝子組み換え *S. cerevisiae* の開発に成功しており¹⁹、この技術と今回得られたヘミセルラーゼ高生産菌による酵素生産を組み合わせることにより、ヘミセルロース由来の糖もフルに活用できる、リグノセルロース系バイオマスからの効率的なエタノール生産技術が確立されることが期待される。

文 献

- 1) 矢野伸一. 2008. セルロース系バイオエタノールの製造技術動向. ペトロテック. 31: 429-434.
- 2) Wyman, C.E., B.E. Dale, R.T. Elander, M. Holtzapple, M.R. Ladisch, and Y.Y. Lee. 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 96: 1959-1966.
- 3) Inoue, H., S. Yano, T. Endo, T. Sakaki, and S. Sawayama. 2008. Combining hot-compressed water and ball milling pretreatments to improve the efficiency of the enzymatic hydrolysis of eucalyptus. *Biotechnol. Biofuels.* 1: 2.
- 4) 遠藤貴士, 矢野伸一, 井上宏之, 澤山茂樹. 2008. 木質系バイオマスからのエタノール製造技術の現状. 日本エネルギー学会誌. 87: 430-437.
- 5) Fujimoto, S., H. Inoue, S. Yano, T. Sakaki, T. Minowa, T. Endo, S. Sawayama, and K. Sakanishi. 2008. Bioethanol production from lignocellulosic biomass requiring no sulfuric acid: mechanochemical pretreatment and enzymatic saccharification. *J. Jpn. Petrol. Inst.* 51: 264-273.
- 6) Yamanobe, T., Y. Mitsuishi, and Y. Takasaki. 1987. Isolation of a cellulolytic enzyme producing microorganism, culture conditions and some properties of the enzymes. *Agric. Biol. Chem.* 51: 65-74.
- 7) 友田裕代, 大桃定洋, 田中 治, 北本宏子, 浜谷 徹, 河野敏明, 丹野 裕. 1996. *Acremonium cellulolyticus* Y-94 由来のセルラーゼの添加がアルファルファサイレージの発酵品質に及ぼす影響. *Grassland Science.* 42: 155-158.
- 8) 田川伸一, 岡島 毅, 伊東睦泰. 2001. リードカナリーグラスサイレージの発酵品質に及ぼす酵素製剤の影響. *Grassland Science.* 47: 157-162.
- 9) 徐 春城, 蔡 義民, 藤田泰仁, 河本英憲, 佐藤崇紀, 増田信義. 2003. 乳酸菌およびアクレモニウムセルラーゼ添加緑茶飲料残渣サイレージの化学組成と栄養価. 日畜会報. 74: 355-361.
- 10) Fang, X, S. Yano, H. Inoue, and S. Sawayama. 2009. Strain improvement of *Acremonium cellulolyticus* for cellulase production by mutation. *J. Biosci. Bioeng.* 107: 256-261.
- 11) Eggins, H., and P.J.F. Pugh. 1962. Isolation of cellulose decomposing fungi from soil. *Nature* 193: 94-95.
- 12) Purushottam, V.G., and M.Y. Kamat. 1998. Immobilization of *Aspergillus* sp. on nylon bolting cloth for production of xylanase. *J. Ferment. Bioeng.* 86: 243-246.
- 13) Ghanem, N.B., H. Hoda, and H.K. Mahrouse. 2000. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Bioresour. Technol.* 73: 113-121.
- 14) Shah, A.R., and D. Madamwar. 2005. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochem.* 40: 1763-1771.
- 15) Kanamasa, S., G. Takada, T. Kawaguchi, J. Sumitani, and M. Arai. 2001. Overexpression and purification of *Aspergillus aculeatus* beta-mannosidase and analysis of the integrated gene in *Aspergillus oryzae*. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 131-137.
- 16) Shallom, D., and Y. Shoham. 2003. Microbial hemicellulases. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 219-228.
- 17) Saha, B.C. 2003. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 279-291.
- 18) Hamelinck, C.N., G. van Hooijdonk, and A.P.C. Faaij. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass Bioenergy.* 25: 384-410.
- 19) Matsushika, A., H. Inoue, S. Watanabe, T. Kodaki, K. Makino, and S. Sawayama. 2009. Efficient bioethanol production by a recombinant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain with a genome-integrated NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3818-3822.