

ソフトセルロースの酵素糖化とエタノールへの変換

甲斐 孝憲¹・谷村 健¹・野崎 直樹¹・水光 正仁²・小川喜八郎^{3*}

¹ 雲海酒造株式会社, ² 宮崎大学農学部応用生物科学科, ³ 宮崎大学工学部物質環境化学科

(2009年9月14日受付 2009年12月16日受理)

Bioconversion of soft cellulosic resources into sugar and ethanol

Takanori Kai¹, Takeshi Tanimura¹, Naoki Nozaki¹, Masahito Suiko², and Kihachiro Ogawa^{3*}
(Unkai Shuzo Co., Ltd., 1800-5 Minamimata, Aya, Miyazaki 880-1303¹; Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Faculty of Agriculture²; Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering³, University of Miyazaki, Miyazaki 889-2192) *Seibutsu-kogaku* **88**: 66-72, 2010.

Bioconversion of soft cellulosic resources such as rice straw, and napiergrass into sugar and ethanol was examined using the genetically modified cellulase, Accellerase 1000 preparation and compared with the use of other cellulase preparations. Treatment of soft cellulosic resources with 0.25 M sodium hydroxide solution at 100°C for 1 h was considered to be a practical method for delignification. A sugar solution containing 15-20% reducing sugar at 15-20% substrates (w/v) was produced by saccharification of delignified rice straw and napiergrass using Accellerase 1000 preparation at 45°C for 72 h. The reducing sugars after saccharification were glucose and xylose at a ratio of about 7 : 3. A concentrated reducing sugar solution (24.3%) derived from delignified rice straw which included Henneberg's inorganic salts was incubated at pH 5.0 and 28°C for 3 d after inoculation with *Saccharomyces cerevisiae* TV2. The ethanol concentration in the fermented solution was 6.3%, but xylose was not utilized by the yeast. In conclusion, sugar and ethanol production from soft cellulosic resources may be realized in the near future.

[**Key words:** soft cellulosic resources, delignification, genetically improved cellulase, saccharification, sugar composition, bioethanol]

糖質系（サトウキビ）やデンプン系（トウモロコシ）由来の食料系エタノール生産拡大は食料とエネルギーの競合を生じ、トウモロコシの国際価格を引き上げ、大豆などのいろいろな食料や飼料の高騰を招いている。特に、米国を中心とする各国のバイオエタノール推進政策が世界の農産物の需要供給関係を混乱させ、食料とエネルギーの競合を招いてきた。

バイオエタノール資源の食料との競合を解決するために、非食料系セルロース資源由来のエタノール生産に関する研究開発が米国をはじめ世界各国で急速に進展している。米国では、スイッチグラス、ネピアグラス、バミューダグラスなどのC₄植物が研究されている¹⁾。日本の各省府はセルロース系バイオ燃料の効率的糖化と発酵技術の確立、システム実証・実用化を目指し中長期構想を示している²⁾。

わが国では、21世紀初頭から木質系セルロースの糖化に関する研究は硫酸（濃硫酸や希硫酸法）による酸糖化法が主流であった³⁾。著者らは1973年の第一次オイルショックの頃から、稲わらやネピアグラスなどの草本系ソフトセルロース資源の酵素糖化とエタノールへの変換に関する研究を行ってきた⁴⁻⁶⁾。

セルロース性資源を用いるバイオエタノール生産に関する基本的な問題点は1) リグノセルロース性資源の前処理（脱リグニン処理）、2) セルロース分解酵素製剤（セルラーゼ製剤）のコスト低減および3) キシロースのエタノール発酵の解決などである。

これらの問題に対して、著者らは稲わらやネピアグラスなどの草本系ソフトセルロース資源を1% (0.25M) 苛性ソーダ溶液を用いて、100°Cで1時間煮沸することにより脱リグニンする方法を開発している⁷⁾（溶出リグニ

*連絡先 E-mail: ogawa@cc.miyazaki-u.ac.jp

ンも酸処理に比べて変化していない)。

一方、セルラーゼ製剤については、最近活性部位の遺伝子改変などにより、酵素活性が格段に増強されている。これらの観点から米国では、トウモロコシ原料から非食料系のソフトセルロース資源の酵素糖化・アルコール生産の実用化研究に移行している。

しかし、わが国では、これらの研究成果を踏まえた稲わらやネピアグラス（牧草）などのリグニン含量の少ないソフトセルロースを用い、遺伝子改変した新規の酵素製剤によるソフトセルロースの酵素糖化とエタノールへの変換に関する基礎的な発表は行われていない。そこで本研究では、本酵素を用いてソフトセルロースの酵素糖化とエタノール生産の可能性について2, 3の知見を報告する。

実験方法

実験材料 ソフトセルロース資源として稲わら（収穫稲わら）、ネピアグラス（牧草、宮崎大学農学部農場）およびベージグラス（牧草、野生）を使用した。

酵素製剤 Genencor製（米国製）のCellulase GC220製剤（食品用、*Trichoderma reesei*由来）および遺伝子改変したAccellerase 1000製剤（*T. reesei*由来）ならびに明治製菓製剤のAcremozyme（*Acremonium cellulolyticum*）などを使用した。

酵素活性測定法⁸⁻¹⁰⁾ 1) Avicel [結晶性セルロース, PH 101, 旭化成(株)製] 糖化活性 (Avicelase), CMC (カルボキシメチルセルロース, 和光純薬製, 特級) 糖化活性 (CMCase), Xylan (和光純薬製, 特級) 糖化活性 (xylanase) 測定は、既報の方法によって測定した。2) β -glucosidase 活性は1.0%サリシン溶液（和光純薬製, 特級）を用いてCMC糖化活性 (CMCase) に準じて測定した。反応液中の生成還元糖はSomogyi-Nelson法¹¹⁻¹²⁾で定量した。酵素単位はいずれの酵素活性測定法においても、各々の反応条件下で1分間に1 μ molのグルコースまたはキシロース（キシラナーゼ活性測定）を生成する酵素量を1単位として算出した。3) グルコースの定量はグルコースキット-グルコースCII-テストワコー（Mutarotase-GOD法）[和光純薬製]を用いて定量した。4) キシロースの定量¹³⁾はBialのオルシン反応によるペントースの定量法を用いた。

タンパク質の定量 フェノール試薬を用いるLowryらの方法¹⁴⁾に従って定量した。

リグノセルロースの脱リグニン法 1~2 cmに切断した原料に5~7倍の1% (0.25M) 苛性ソーダ溶液を加えて100°Cで1時間煮沸後ろ過し、残さを水洗・乾燥して基質とした。得られたろ液に0.25 Mの塩酸を加えて中

和するとリグニンが沈殿した。

セルロースのセルラーゼによる糖化およびエタノール発酵法 500 ml 容三角フラスコに脱リグニンセルロース基質（ミキサー粉碎物）を入れ、これに市販のセルラーゼ製剤溶液を基質濃度10~25% (w/v) になるように加えて、pH 5.0, 45°Cで一定時間糖化した。糖化後ろ液中の生成還元糖（グルコース換算）を定量した。大型試験管を用いた糖化実験法は各々の表中に記した。糖化率 (%) は脱リグニンセルロース基質（乾物）に対する生成還元糖量の割合で表示した。300 mlの三角フラスコに200 mlの糖化液 [糖質を含まないHenneberg無機塩培地 ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, KH_2PO_4 0.2%, CaCO_3 0.5%含有)] を加え、100°Cで15分間殺菌後グルコースを含むHenneberg無機塩培地で前培養した10 mlの*Saccharomyces cerevisiae* TV2を加えて28°Cで72時間発酵を行った。発酵後、発酵液中のエタノール濃度は蒸留法により酒精計を用いて測定した¹⁵⁾。糖化液にはグルコースおよびキシロースなどの複合糖を含み、単純に発酵歩合の算出は不可能であるため、今回は糖化液（グルコース）からのエタノール生成収率を理論値と比較した。

実験結果

市販酵素製剤のセルラーゼおよび関連酵素活性 現在日本では、明治製菓、新日本化学工業、長瀬産業、天野製菓、エイチビアイなどの多くの企業でセルラーゼ製剤が工業的に生産され、食品や繊維工業などへ利用されている。一方、海外では最近、遺伝子組換えセルラーゼ製品（Genencor社など）がセルロース糖化用に開発されている。そこで、日本で製造されているセルラーゼ製剤の一部とGenencor社の遺伝子組換え製剤などのセルラーゼ活性および関連酵素活性を調べた。Table 1に示すように、酵素製剤①から⑤の日本製の酵素製剤は粉末製であり、精製度の高い製剤であるが、Genencor製は培養ろ液である。したがって、日本製については1%酵素液の酵素活性およびGenencor製では培養ろ液の酵素原液あたりの酵素活性で表示した。また、酵素液中のタンパク質を定量したが、日本製剤は精製度の高い酵素であり、Genencor製は精製度の低い粗酵素であることが認められた。米国製培養ろ液は日本製の1%酵素製剤のセルラーゼ活性と比較すると、10~20倍の活性を示すので、実用性の高い酵素製剤である。このように、日本製と米国との酵素製剤の形態が異なり、精製度も異なるので、試料溶液1 mlあたりの酵素濃度 ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$) を基準に酵素活性を比較するのが妥当である。また、遺伝子改変されたAccellerase 1000は β -glucosidaseも増強されている

Table 1. Cellulase and related enzyme activities of commercial cellulase preparations.

Enzyme preparation	Enzyme activity (Units/ml)				Protein (mg/ml)	Saccharification ^a (%)
	Avicelase	CMCase	Xylanase	β -Glucosidase		
① Cellulase MC	24.50	68.45	82.59	19.29	4.37	76.1
② Cellulase P5	8.53	17.17	831.88	11.27	4.76	73.2
③ Cellulase MENM	7.17	39.50	76.01	3.65	7.10	83.9
④ Cellulase M60	16.70	25.86	71.63	19.74	3.12	81.2
⑤ Acremozyme	20.53	37.04	86.84	35.36	5.07	90.2
⑥ Cellulase GC220	664.45	897.72	824.24	183.00	83.02	96.1
⑦ Accellerase 1000	331.56	587.11	208.53	320.16	54.23	91.0

Enzyme activities were assayed as explained in the text, and enzyme activity was shown as units/ml of 1% enzyme solution in case of Cellulase MC to Acremozyme, and crude enzyme solution in the case of Cellulase GC220 and Accellerase 1000.

^aIn a large test tube, 2 g of delignified rice straw powder was incubated with 18 ml of cellulase solution, pH 5.0, at 45°C for 48 h. Zero point five percent enzyme solution in the case of Cellulase MC to Acremozyme, and 10 times diluted enzyme solution in the case of Cellulase GC220 and Accellerase 1000 were used for saccharification.

Table 2. Sugar production from delignified soft cellulosic resources by the saccharification with Cellulase GC220 preparation (*Trichoderma reesei*).

Substrate (%)		Incubation (h)					
		24		48		72	
		R. sugar (%)	Decom. (%)	R. sugar (%)	Decom. (%)	R. sugar (%)	Decom. (%)
Vesey grass	10	8.1	73.0	10.4	93.6	10.6	95.6
	20	17.4	69.7	19.1	76.2	19.6	78.2
Rice straw	10	9.1	81.6	10.5	94.2	10.7	95.8
	20	19.1	76.4	20.6	82.4	21.4	85.6

In a large test tube, 2 g or 4 g of delignified vesey grass powder or delignified rice straw powder was incubated with 18 ml or 16 ml of a 10 times diluted Cellulase GC220 solution, pH 5.0, at 45°C for 24 to 72 h.

R. sugar, reducing sugar; Decom., decomposition.

のが特徴である。

酵素製剤 Cellulase GC220 によるによるページグラスおよび稲わらの糖化 ページグラス（タチスズメノヒエ）は野生の草本類で南九州ではよく繁茂している。そこで、脱リグニンページグラスおよび脱リグニン稲わらの酵素糖化性を調べた。Cellulase GC220（非遺伝子組換え製剤）を用いて糖化した結果を Table 2 に示した。本酵素製剤は食品用の粗酵素であるが、Avicelase（天然セルロース分解活性）の比活性（ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ）および酵素濃度（ $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ ）は後述の組換え酵素製剤 Accellerase 1000 よりも高いので、各セルロース基質の糖化性を比較するために行った。10%基質濃度におけるページグラスおよび稲わらの糖化率は、いずれの基質でも48時間糖化で90%以上の高い分解性を示した。さらに、基質濃度20%、72時間糖化で、ページグラスでは19.6%の還元糖液が得られた。稲わらでは同様に72時間糖化で21.4%の還元糖液

が得られた。ページグラスも稲わらの糖化性には及ばないが、ソフトセルロースのエタノール生産に可能なバイオマスであることが認められた。これらの結果から、稲わらやページグラスは有用なソフトソフトセルロース資源であることが示唆された。

ソフトセルロースのセルラーゼ酵素製剤による糖化液の糖組成 各ソフトセルロースの酵素糖化液のグルコースおよびキシロースの糖組成を調べることはエタノール収量に大きな影響を及ぼす。現在、キシロース資化性エタノール発酵性微生物の研究開発が行われているのでキシロース含量も重要である。そこで、各種脱リグニンソフトセルロースを Cellulase GC220 製剤および Acremozyme 製剤による糖化液（基質濃度10%）の糖組成（グルコースおよびキシロース）を調べた（Table 3）。日本でよく使用されている Acremozyme 製剤と Cellulase GC220 製剤のセルロース糖化性を比較することは、バイ

Table 3. Sugar composition in sugar solution produced by the saccharification of soft cellulosic resources with cellulase preparations.

Substrate	Cellulase GC220 ^a			Acremozyme ^b		
	R. sugar (%)	Glucose (%)	Xylose (%)	R. sugar (%)	Glucose (%)	Xylose (%)
Rice straw	9.1	6.1 (67.0)	2.9 (31.9)	7.7	5.1 (66.6)	2.6 (33.8)
Vesey grass	8.0	5.5 (68.8)	2.2 (27.5)	6.0	2.9 (48.3)	2.8 (46.7)
Napiergrass (L)	10.2	7.3 (75.8)	2.9 (28.4)	9.1	4.4 (44.4)	4.0 (43.9)
Napiergrass (S)	9.3	6.2 (66.7)	3.0 (32.3)	7.8	3.6 (46.2)	4.0 (51.3)

In a large test tube, 2 g of delignified vesey grass powder or delignified rice straw powder was incubated with 18 ml of a cellulase solution, pH5.0, at 45°C for 48 h.

Glucose was measured by the glucose oxidase method (Mutarotase-GOD method).

Figure in parenthesis shows ratio of sugar composition in the reducing sugar (%). Xylose content was assayed by the Bial reaction method.

^aTen times diluted enzyme solution (against crude enzyme solution)

^bZero point five percent enzyme solution.

R. sugar, reducing sugar; L, leaf of napiergrass; S, stalk of napiergrass.

Table 4. Saccharification of soft cellulosic resources with Cellulase GC220 preparation.

Substrate	Substrate conc.	R. sugar (%)	Saccharification (%)
Napiergrass (L)	10	10.2	91.8
	20	20.6	82.4
Napiergrass (S)	10	9.3	83.7
	20	20.7	82.8

In a large test tube, 2 g or 4 g of delignified napiergrass powder was incubated with 18 ml or 16 ml of a cellulase solution, pH 5.0, at 45°C for 48 h.

Enzyme solution: Ten times diluted Cellulase GC220 solution was used as enzyme solution.

Substrate conc., substrate concentration; R. sugar, reducing sugar; L, leaf of napiergrass; S, stalk of napiergrass.

オマスエネルギー研究にとって大きな意義がある。その結果、括弧に示すように Cellulase GC220 ではソフトセルロースの種類により多少異なるが、グルコースの比率が高く、グルコースおよびキシロースの糖組成の比率は概して7:3を示した。一方、Acremozyme糖化液の糖組成はキシロースの割合が高く、グルコースおよびキシロースの糖組成の比率は概して5:5に近いものであった。このように糖化液の糖組成はソフトセルロースの種類や酵素活性および酵素製剤の形態（培養ろ液や酵素沈殿処理製剤）によって多少の変動が見られることが判明した。Acremozyme については培養粗酵素ろ液を用いるセルロース分解の成果が期待される。

遺伝子組換え酵素製剤 Accellerase 1000 による脱リグニンソフトセルロースの糖化 酵素製剤 Accellerase 1000 は遺伝子改変された最初の市販セルロース分解酵素である。まず、Cellulase GC220酵素製剤によるネピアグラスの実用的な基質濃度と生成糖濃度の関係を検討した。その結果、ネピアグラスでは基質濃度20%で48時間糖化すると20%濃度の糖化液が得られ、80%以上の分解率を示

した（Table 4）。したがって、Cellulase GC220も実用性の高い酵素製剤であることが示唆された。そこで、実用的観点から90%以上の糖化率が望ましいので、遺伝子組換え酵素製剤 Accellerase 1000を用いて、基質濃度10～15%における生成糖濃度と分解率の関係を調べた。基質濃度10%の脱リグニン稲わらの糖化率は99.0%で、糖組成は括弧に示すように、グルコース：キシロースが74.7：25.3の割合を示した。基質濃度15%では16.1%の糖濃度、91.2%の糖化率を示し、糖組成はグルコース：キシロースが67.7：32.3の割合を示した。一方、ネピアグラス（葉部）の場合、15%基質濃度では16.3%の糖濃度、92.4%の分解率を示し、糖組成はグルコース：キシロースが73.6：26.4の割合を示した（Table 5）。脱リグニン稲わらおよびネピアグラスの酵素糖化液のグルコース：キシロースの割合は基質濃度や酵素製剤に影響するが、およそ7:3の糖組成を示すことが認められた。これらの結果からソフトセルロースの酵素糖化により高濃度の糖化液を得る可能性が示唆された。

Table 5. Saccharification of delignified soft cellulosic resources with Accellerase 1000 derived from *Trichoderma reesei*.

Substrate	Saccharification		Sugar composition	
	R. sugar (%)	Decom. (%)	Glucose (%)	Xylose (%)
Rice straw				
10%	11.1	99.0	8.3 (74.7)	2.8 (25.3)
15%	16.1	91.2	10.9 (67.7)	5.2 (32.3)
Napiergrass (L)				
15%	16.3	92.4	12.0 (73.6)	4.3 (26.4)

In a 500 ml Erlenmeyer flask, 30 g of delignified rice straw powder or delignified napiergrass powder was incubated with 270 ml (substrate concentration, 10%) or 170 ml (substrate concentration, 15%) of a 7.5 times diluted enzyme solution (against crude enzyme solution), pH 5.0, at 45°C for 72 h.

Figure in parenthesis shows ratio of sugar composition in the reducing sugar (%).

R. sugar, reducing sugar; Decom., decomposition; L, leaf of napiergrass.

Table 6. Ethanol production using saccharified sugar from delignified rice straw with Accellerase 1000 preparation derived from *T. reesei*.

Before fermentation			After fermentation			Ethanol (%)
R sugar (%)	Glucose (%)	Xylose (%)	R. sugar (%)	Glucose (%)	Xylose (%)	
24.3 (100)	15.5 (63.8)	8.5 (35.0)	8.2 (33.7)	0.5 (0.2)	8.5 (35.0)	6.3

In a 500 ml Erlenmeyer flask, 30 g of delignified rice straw powder was incubated with 170 ml (substrate concentrate, 15%) of a 7.5 times diluted enzyme solution (against crude enzyme solution), pH 5.0, at 45°C for 48 h. After saccharification, the sugar was concentrated by vacuum evaporator.

In a 300 ml Erlenmeyer flask, the concentrated sugar solution (reducing sugar, 24.3%) supplemented with Henneberg's inorganic salts was incubated after inoculation with a seed (10 ml) of *Saccharomyces cerevisiae* TV2, at pH 5.0 and 28°C for 3 d.

Figure in parenthesis shows ratio of sugar composition in the reducing sugar (%). R. sugar, reducing sugar.

**遺伝子組換え Accellerase 1000 製剤による脱リグニン
いならわの糖化とエタノール発酵¹⁶⁾** 稲わらおよびネ
ピアグラスなどのソフトセルロースは新規酵素, Cellu-
lase GC220 および Accellerase 1000 を用いる酵素糖化に
より 90%以上の糖化率で 15 ~ 20%の糖化液が得られる
ことが実験的に証明された (Table 4, 5). それゆえ, 経
済的なエタノール生産条件は還元糖濃度 15%以上およ
び糖化率 90%以上が望ましいので, 16.1%の糖化液 (糖
化率 91.2%) を減圧濃縮して 24.3%の糖化液を調製した.
糖組成は括弧に示す通りであり, 本糖化液を用いてエタ
ノール発酵を試みた結果, 6.3%濃度のエタノールが得ら
れた (Table 6). 本実験で得られたエタノールの生成収
率はグルコースに対して 76.9%を示した.

考 察

非食糧系のセルロース性資源のバイオエタノール変換
技術開発は 21 世紀の世界的重要な課題となっており, 地
球規模のエネルギー・リスク低減や地球温暖化防止など
を解決することがその背景となっている. セルロース性

バイオマス由来のエタノール生産はすでに国内外で研究
開発が行われているが, 特に, 21 世紀初頭からわが国で
はセルロースの糖化に濃硫酸や高温・高圧希硫酸法が研
究されてきた. 著者らの研究も従来の基礎・応用研究を
もとに実用化に向けての可能性実証研究 (FS) として重
要な段階を迎えている. 現在, 酵素糖化法が世界的に見
直されているが 1) リグノセルロースの前処理 (脱リグ
ニン法), 2) セルロース分解酵素系の増強や酵素製剤の
低廉化および 3) キシロースのエタノール変換などの問題
も残されている. セルラーゼ酵素製剤の活性については,
すでに述べたように遺伝子改変された Accellerase 1000
製剤は, セルラーゼ (Avicelase および CMCase) の比活
性 ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) および酵素濃度 ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$) において日
本製の酵素製剤を凌駕している. セルロース性バイオマ
スの酵素糖化では酵素濃度 ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$) の高い酵素製剤
が実用的に有望な酵素製剤であることが認められた. し
たがって, 粗酵素でも酵素濃度の高い酵素製剤がセル
ロース性バイオマスの酵素糖化に重要で生産コストの低
廉化にも貢献することが示唆された.

ソフトセルロース由来の酵素糖化液（セルラーゼ製剤による糖化）の糖組成はグルコースとペントース（主としてキシロース）の混合糖液で、グルコース：キシロースがおおよそ7：3の割合となっているが、酵素製剤のセルラーゼやキシラナーゼ活性が影響していることが示唆された。セルラーゼ酵素製剤によるソフトセルロースの経済的糖化条件は、著者らの実験結果から少なくとも糖化率は90%以上が理想的であり、それを満たす基質濃度は15～20%、糖濃度15～20%であった。しかし、アルコール生産においては25%程度の糖化液の方が蒸留コストなどの観点から経済的効果が大きいので、すでに述べた経済的糖化条件で得た糖化液を25%程度まで減圧濃縮してエタノール発酵を行うのが得策であると考えられる。著者らの実験から、濃縮液の還元糖濃度24.3%におけるグルコースとキシロース比率は、15.5：8.4を示した（Table 6）。エタノール発酵により6.3%のエタノールが得られたが、なお、エタノール発酵後の還元糖は8.2%で、グルコースおよびキシロースの比率は0.5：8.5であった。エタノール収率は76.9%を示し、酵母によるグルコースの利用率も良好で98%であった。セルロース性糖化液全体の発酵歩合は算出できないが、エタノール収率はデンプン質系および糖質系（サトウキビ）の発酵歩合に近い。エタノール収率は糖化液に含まれるペントースなどの影響もあり、今後糖化液のエタノール発酵に関する研究が残された課題といえる。さらに、グルコースに対するセルロース酵素糖化液のキシロース発酵ではDiauxy現象（グルコースの存在でシロース発酵が阻害される現象）が起こるので一層の研究が望まれる。

現在、セルロース糖化液のエタノール発酵はFig.1に示すように、糖組成の70%を占めるグルコースは*S. cerevisiae*によりエタノールに変換されるが、残りのキシロースは*S. cerevisiae*により利用されないため、実用的なキシロース資化性微生物によるエタノール生産が望まれる。セルロースの酵素糖化とキシロースのエタノール発酵についてはかなり研究も進んでいるので大いに期待されている¹⁷⁾。ソフトセルロースの糖化液の濃縮液24.3%（還元糖量）中のキシロース濃度は8.5%であるので、将来、2～3%のエタノール収量が期待される。キシロースのエタノール発酵については、他の研究者により研究が進められているが、著者らは世界的な食飼料資源の不足や高騰に鑑み、キシロースの微生物タンパク質¹⁸⁾への変換もまた重要な研究課題でもありと考えている。著者らは、*Candida utilis*の微生物タンパク質（SCP）への変換についても研究を行ってきた⁸⁾。

地球環境の悪化、地球資源の枯渇および人口増加は、食料やエネルギー危機の誘因となっており、人類の夢の

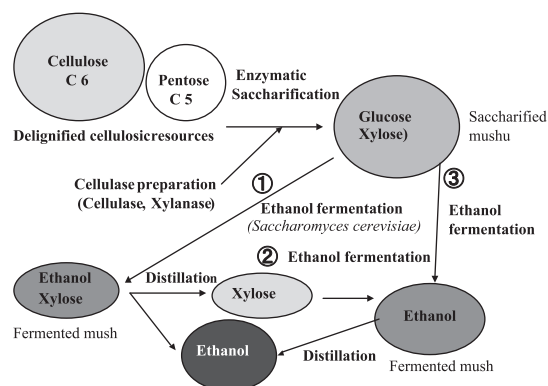


Fig. 1. Bioconversion of soft cellulosic resources into sugar and ethanol using microorganisms. Enzymatic saccharified sugar solution (saccharified mash) including glucose and xylose is firstly fermented with *Saccharomyces cerevisiae*, after which the fermented mash is subjected to distillation ①, and xylose in the residual mash will be subjected to xylose fermentation (in future) ②. The sugar solution including glucose and xylose will be subjected simultaneously to glucose and xylose fermentation (in future) ③.

一つとしてセルロースの酵素糖化とエタノールへの変換の研究は21世紀の環境・エネルギー問題解決の重要な課題の一つである¹⁹⁾。

要 約

著者らはリグニン含量の少ない草本系（C₄およびC₃植物）のソフトセルロースがエタノール生産に最適であると考え、本研究を行った。1%前後の苛性ソーダによる脱リグニン処理は経済性の高い脱リグニン法と考え、さらに酵素濃度（U/ml⁻¹）の高い遺伝子改変されたセルラーゼ酵素製剤などを用いて、ソフトセルロースの実用的な酵素糖化とエタノール生産の可能性を検討した。セルロース酵素糖化のネックとなっているセルラーゼ活性の強化については、強力な遺伝子改変されたセルラーゼ製剤が開発されているので、本酵素を用いて稲わら、ネピアグラスなどのソフトセルロースの酵素糖化とエタノール生産の可能性を検討した。1) セルロース糖化用の遺伝子改変された Accellerase 1000 はわが国の市販の酵素製剤に比べて強力なセルラーゼおよび関連酵素活性（U/ml⁻¹）を示し、特に β -glucosidase 活性が増強されている。2) 脱リグニンネピアグラスおよび脱リグニン稲わらは Cellulase GC220 および Accellerase 1000 により基質濃度20%、72時間糖化で20%の糖化液を得ることが可能である。3) 脱リグニン稲わらやネピアグラスの Accellerase 1000 による糖化液中のグルコースおよびキシロースの割合は概して7：3を示すことが認められた。4) 脱リグニン稲わらの Accellerase 1000 による糖化濃縮液（24.3%）のエタノール発酵を行い6.3%のエタノール

を得ることができた。5) 以上の結果からネピアグラスや稲わらなどの地域ソフトセルロース資源は遺伝子改変した酵素製剤などを用いれば85～90%以上の糖化率で15～20%の糖化液が得られ、その濃縮還元糖液(24.3%)から6.3%濃度のエタノールを生成することが認められた。したがって、ソフトセルロースの酵素糖化および*Saccharomyces cerevisiae*により経路①(Fig. 1)によるエタノール生成の可能性が示唆されるので、今後一層の研究が必要である。

文 献

- 服部太一郎, 森田茂紀: 食料白書編集委員会編集, 食料白書, p. 101, 農山村魚村文化協会 (2008).
- 農林水産省: 平成19年度版食料・農業・農村白書のポイント, p. 4, 農林統計協会 (2007).
- 大聖泰弘・三井物産編: 図解バイオエタノール最前線, p. 133-144, 工業調査会 (2004).
- Toyama, N. and Ogawa, K.: *Symp. on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*, p. 375-387, Aulanko, Finland (1977).
- Toyama, N. and Ogawa, K.: *Biotechnol. & Bioeng. Symp.*, No 5, p. 225-224 (1975).
- Toyama, N. and Ogawa, K.: *Proc. Bioconversion Symp. IIT*, p. 372-386, New Delhi (1977).
- Toyama, N., Ogawa, K., and Toyama, H.: *The Royal Society of Canada International Symp. on Ethanol from Biomass*, p. 570-621 (1982).
- Ogawa, K.: *Proc. of the International Seminar on Underutilized Bioresources in the Tropics (JSPS)*, p. 131-141, Philippines (1988).
- Toyama, N. and Ogawa, K.: *Proc. IFS, Ferment. Technol. Today*, p. 743-757 (1977).
- Ogawa, K., Toyama, D., and Fujii, N.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **37**, 249-259 (1991).
- Somogyi, M.: *J. Chem. Biol.*, **193**, 265-275 (1952).
- Nelson, N.: *J. Biochem.*, **153**, 376-380 (1952).
- 阿武喜美子, 瀬野 信: 糖質定量法, p. 17, 共立出版 (1968).
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. I., and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 注解編集委員会: 第四回改正 国税庁所定分析法注解, p. 14-16, 日本醸造協会 (1993).
- 小川喜八郎, 水光正仁: 第15回日本生物工学会九州支部熊本大会講演要旨集, p. 22 (2008).
- Ohota, K., Beall, D. S., Mejla, J. P., Shanmugam, K. T., and Ingram, L. O.: *Appl. Env. Microbiol.*, **57**, 893-900 (1991).
- 村尾沢夫, 荒井基夫: 応用微生物学, p. 139-140, 倍風館 (1998).
- 斉木 隆: 生物工学, **87**, 328-332 (2009).