

論文の内容の要旨

氏名：松本 和

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：*Humicola insolens* の分散培養と生産酵素群のイナワラ分解への応用

序論

近年、物質変換及び生産システムとして、バイオリファイナリーという概念が注目されている。これは、バイオマスの分解によって得られた糖を、微生物発酵による物質変換によって、医薬品、食糧品、肥料、化学製品、バイオエタノール、などを体系的に生産するシステムのことを指し、オイルリファイナリーに替わる次世代の化学産業として期待されている。

再生可能なバイオマス資源としては、食糧と競合をしないことから、リグノセルロース系のバイオマスが主流となってきており、特に農業残渣の利用は、化石資源依存からの脱却のみならず、農村地域の活性化につながることを期待されている。日本国内では、各種存在している農業残渣のうち毎年 1,300 万 t 生産されるイナワラからのプロセスを構築することが検討されており、その効率的な酵素糖化技術の開発が喫緊の課題となっている。

イナワラの様な草本系バイオマスの分解には、*Trichoderma* が最もよく用いられるが、イナワラに含まれるシロカによる糖化酵素の阻害や、セルラーゼでの分解が困難なヘミセルロースやリグニンが多く含まれていることから、イナワラに最適な前処理方法の開発及び糖化酵素の生産技術の確立が必要不可欠とされている。

Humicola 属は無害、無毒性の糸状菌であり、食品加工、醸造、繊維業などの一部で利用可能な酵素生産菌として知られているが、近年バイオマス分解においても有用性が指摘され期待を集めている。本研究に着手するにあたり、予備的実験で *Humicola* 由来酵素剤(Novozymes 社製 NS22002)と、*Trichoderma* 由来酵素剤(同 NS50013)を用いてイナワラの分解率を測定したところ、12 時間の反応で *Humicola* 由来酵素剤は *Trichoderma* 由来酵素剤の約二倍の分解率を示すなど、イナワラの分解に有効であることが示唆された。しかし、本菌は一般的な液体培地で培養を行うと菌体同士が凝集を起して培養を続けることが困難となり、酵素の生産性が著しく低下する難点がある。このことが本菌由来糖化酵素の性状解明や、その利用の妨げとなっている。よって本研究では、イナワラ分解酵素の高生産と酵素機能の解明・利用を目指し、*H. insolens* (ATCC26908)の効果的な液体分散培養方法の開発、分散機構及び生産酵素のイナワラ分解への応用について検討を行った。

1 分散培養方法の開発

イナワラの分解には有効なことが示唆される本菌であるが、液体培養時に菌体が凝集し、直径 1 cm ほどの凝集体（ペレット）を形成する。この状態では生育がそれ以上進まず、酵素の生産性も極めて低いため、凝集体の生成を抑制して菌体を均一に分散させる培養方法につき検討した。

1.1 培養方法と菌の分散

液体培養時の菌の分散性を評価する一般的な方法は存在しない。そこで、本実験では培養産物を、40 メッシュの篩で篩別して凝集菌体を除去し、得られた濾液を希釈し、YpSs 平板培地に植菌した。3 日間 30°C で培養を行った後、生育してきたコロニー数を測定することで、菌の分散性を評価した。生育してきたコロニー数が対照と比較し多いものほど、分散効果が高いものとした。

Glucose を炭素源とした 500 ml 容三角フラスコを用いて、窒素源、回転半径、pH、分散媒、粘度、植菌量、界面活性剤の添加効果等について検討を行った。その結果、ほとんどの条件において、菌の凝集を改善する効果は見られなかったが、唯一窒素源において分散効果を確認することができた。

5 % Glucose と 0.3 % 窒素源を含む液体培地を用い、各種窒素源を添加して 30 °C、200 rpm、3 日間培養を行った。コーンステープリカー、ゼラチンペプトン、ナタネ粕などでは、菌体の凝集性には改善はみられなかったが、大豆由来の窒素源及び魚粉を用いた場合に大きく改善された。中でも、不溶性成分を含む、高温高压処理脱

脂大豆粕(ExSBM: Extruded Soybean Meal)を窒素源として用いると、*H. insolens* の菌体が劇的に分散することが明らかとなった。このことから、ExSBM を窒素源とする培地を本菌の分散培地として、以後の実験の基本培地として用いた。

2 分散メカニズムの推定

本章では、前章で提案した難培養性菌 *H. insolens* の分散培養につき、菌の分散メカニズムの検討を行った。特に菌糸形成に関わるとされる含硫アミノ酸の組成比、細胞表層の菌体凝集性タンパク質の関与、ExSBM の三次元構造に着目し、菌の凝集を抑え分散を促進するメカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

2.1 含硫アミノ酸の菌糸形成への影響

糸状菌では、含硫アミノ酸や Proline によって菌糸形成が促進するという報告がある。そこで ExSBM に含まれる可溶性アミノ酸の分析を行ったところ、含硫アミノ酸である Methionine と Cysteine は、他の成分と比較して ExSBM には極めて少ないことが分かった。このことが、菌糸の伸長阻害を起こし菌体同士の凝集を抑制する一要因ではないかと予想された。しかし、Methionine 及び Cysteine を添加した分散培地で培養を行っても、分散性に大きな変化は観察出来なかったことから、含硫アミノ酸量と菌糸の伸張及び菌体の凝集についての関係性は必ずしも明確ではなかった。

2.2 菌体凝集性レクチン様タンパク質の影響

一般的な糸状菌培養用液体培地である N 培地(3% glucose, 2% yeast extract, 0.1% polypepton, 0.03% MgSO₄, 0.03% CaCl₂)に Xylose, Fucose, Galactose, Mannose などの糖のなかには、添加することによって分散化が促進されるものがあることが明らかとなった。特に、Galactose 及び Mannose を添加した場合に分散効果が高く、糖無添加の場合と比較して、生育コロニー数は 1.9×10^6 から 3.6×10^6 と、約 100 倍の分散効果を示した。このことから、菌体の凝集には、菌体表層のレクチン様タンパク質による菌体同士の架橋作用が関わっていることが示唆された。培地中に存在するこれらの糖が、菌体とレクチン様タンパク質に作用することで、菌体同士の架橋凝集が抑えられ、分散状態が維持されると推定した。

2.3 大豆不溶性成分の微細構造と分散

大豆不溶性成分の三次元構造と菌糸の伸張の状況を、走査型電子顕微鏡で解析した。その結果、高温高压処理をした ExSBM は不溶性成分に細孔や溝のような特徴的な構造をもち、菌糸がその細孔から内側に潜り込むように生育している様子が観察された。一方、高温高压処理をしていない SBM (Soybean Meal) では、構造に凹凸はあるものの細孔や溝がなく、不溶物の表面に菌糸が這うように生育していることが観察できたことから、*H. insolens* の菌体は ExSBM の不溶性成分の空隙部に密着し、溶液中に存在する栄養素とともに不溶性成分を少しずつ分解しながら生育することで、菌糸同士の絡まりを物理的に抑制しているものと考えられた。

3 分散培養による酵素生産と生産酵素群のイナワラ分解への応用

分散培養方の開発によって本菌の培養とそれに伴う酵素生産が可能となったことから、*H. insolens* の培養と生産酵素の性状解明、及び *Trichoderma* 酵素との併用による、イナワラ分解への応用につき検討を行った。

3.1 分散培養法を用いた *H. insolens* の酵素生産性

500 ml 容三角フラスコを用いて、N 培地及び分散培地(5% glucose, 0.3% ExSBM)を調製し、200 rpm, 30°C で 3 日間培養を行った。その培養上清について、DNS 法を用いて CMC (Carboxymethyl cellulose)分解活性及び Xylan(from beech wood)分解活性を比較したところ、CMC 分解活性では約 5.5 倍、キシラン分解活性は約 2.6 倍に上昇し、培養菌体の分散状態と、酵素の生産性には密接な関係があることが判明した。

3.2 反応領域の測定

アビセルを炭素源として酵素生産を行い、その培養濾液を粗酵素液として CMC 分解活性、Xylan 分解を測定した。見掛けの至適 pH および温度は

CMC 分解活性の pH 反応領域は 4 から 7 で、至適 pH は 5、Xylan 分解活性では pH5 から 8 で、至適 pH は 6 であった。また、見掛けの至適温度は両活性とも 60°C であった。このように、*H. insolens* の酵素は *T. reesei* の酵素と比べて広範囲な至適反応領域を持つことが明らかとなった。

3.3 イナワラ分解酵素群の生産培養

アビセルに比べてはるかに安価なイナワラを炭素源として培養を行い、各種基質に対する分解活性を測定した。その結果、アビセルや Xylan など単独の基質に対する分解活性よりも、イナワラ(アンモニア処理)に対する分解活性の方が高く、Xylan 分解活性と比較して約 3 倍の値を示した。このことから、本菌の酵素はイナワラを炭素源として生産したとき、そのイナワラ自身の分解に特に有効であることが明らかとなった。また *H. insolens* の生産酵素の pH、温度反応領域は、*T. reesei* のそれと同じ領域にあることから、*T. reesei* との共使用によってイナワラ分解をさらに向上させ得る可能性が唆された。そこで、*T. reesei* 由来酵素との混合酵素系によるイナワラ分解試験を試みたところ、*T. reesei* : *H. insolens* = 75 : 25 のとき、*T. reesei* 由来酵素の単独使用と比べて、約 10% の糖化率の上昇がみられた。

4 総括

糸状菌 *H. insolens* は窒素源に高温高压処理をした脱脂大豆粕(ExSBM)を用いることで、これまで困難とされた効率的な分散培養が可能になった。その分散は、Galactose、Mannose のなどの糖の添加によって促進されたことから、凝集には菌体表層に存在する凝集レクチン様タンパク質が関与しており、培地中に存在する糖がレクチン様タンパク質と結合することによって凝集を抑制していることが示唆された。また、ExSBM がもつ微細な溝や孔が菌糸にとって好適な環境条件を作り出し、その中に菌糸が潜り込むように伸長することによる物理的な効果の関与も推定された。一方、菌糸成長に関わりがあるとされる Methionine や Cysteine 等の含硫アミノ酸には分散状態に特段の分散効果をみられなかったことから、これらのアミノ酸量と菌糸の伸張及び菌体の凝集について直接関連性はないものと考えられた。

本研究で開発した分散培養方法により、*H. insolens* 由来酵素の高生産化が可能となり、特にイナワラを炭素源として培養した酵素群はイナワラ自身の分解に有効であった。また、*T. reesei* 由来酵素との共使用により、イナワラ分解率がさらに促進された。今後は、菌体の分散メカニズムのさらなる解明とともに、酵素の生産性の向上を図り、イナワラ分解の効率化を目指して検討を行う予定である。