Thermobacillus composti によるキシランの糖化と 菌体の親水性ゲル状多孔担体への固定化^{*1}

中根優子^{*2}, 渡邊啓子^{*3}, 中川香奈子^{*2}, 阪口利文^{*4}

Saccharification of Xylan by *Thermobacillus composti* and Its Immobilization on a Hydrophilic Porous Gel Carrier^{*1}

Yuko NAKANE^{*2}, Keiko WATANABE^{*3}, Kanako NAKAGAWA^{*2}
and Toshifumi SAKAGUCHI^{*4}

We investigated saccharification of xylan by *Thermobacillus composti* and its immobilization on a hydrophilic porous gel carrier. *T. composti* saccharified xylan at 50°C in aerobic condition and the product was used as carbon source for growth of *T. composti*. Xylose was detected in the culture of *T. composti*. Then *T. composti* was immobilized on the carrier. Scanning electron microscopy (SEM) showed that *T. composti* entered into the holes of the carrier and proliferated there well. Xylose was also detected in the culture of *T. composti* immobilized on the carrier. The immobilization did not inhibit the saccharification ability of *T. composti*.

Keywords : *Thermobacillus composti*, saccharification, xylan, xylose, immobilization on carrier.

本研究では, *Thermobacillus composti* によるキシランの糖化と菌体の親水性ゲル状多孔担体への固定化について検討した。*T. composti* は50°Cの好気条件下においてキシランを糖化し, これを炭素源として増殖した。この *T. composti* 培養液より, キシロースが検出された。次に *T. composti* を担体へ固定化した。走査型電子顕微鏡によって *T. composti* が担体の孔内に入り込み, そこでよく増殖したことが観察された。この担体固定化 *T. composti* の培養液においても, キシロースが検出された。*T. composti* の糖化能は固定化によって阻害を受けなかった。

1. 緒 言

石油等の化石燃料の枯渇が世界的な課題となって

いる現代において, バイオエタノールは化石エネルギーの代替となり, かつカーボンニュートラルであるため注目されている。第一世代バイオエタノールはトウモロコシや小麦を原料としたため食糧問題とのジレンマとなった。そこで, 農産廃棄物・建築廃材など, 食料と競合しない木質系バイオマスを原料とした第二世代バイオエタノールの開発が求められている^{1, 2)}。これら植物体を形成する繊維様高分子体リグノセルロースは, セルロース, ヘミセルロース, リグニンなどから構成されている。このうちヘミセルロースはリグノセルロースの20~40%を占めており, セルロースに次いで多く含まれる多糖である。広葉樹ヘミセルロースの主成分はキシランであり, キシランの主鎖は5炭糖であるキシロースによって構成されている。通常のエタノール発酵は6炭糖を原料とするため, これまでの第二世代バイオエ

^{*1} Received June 2, 2010; accepted November 8, 2010.
本報の一部は第60回日本木材学会大会(2010年3月, 宮崎)において発表した。

^{*2} 創価大学工学部生命情報工学科 Department of Bioinformatics, Soka University, Tokyo 192-8577, Japan

^{*3} 創価大学工学部環境共生工学科 Department of Environmental Engineering of Symbiosis, Soka University, Tokyo 192-8577, Japan

^{*4} 県立広島大学生命環境学部環境科学科 Department of Environmental Science, Prefectural University of Hiroshima, Hiroshima 727-0023, Japan

タノールの開発はグルコースを構成成分とするセルロースに限られていた³⁾が、近年において、遺伝子組換え大腸菌 KO11^{4, 5)} やアーミング酵母^{6, 7)} などの開発によって、5炭糖からのエタノール発酵も可能となってきた。そのため、第二世代バイオエタノールの開発では、キシランの糖化が重要な課題となっている。

現在の糖化法としては、主に酸加水分解が行われている⁸⁾。硫酸を用いるこの分解法は、酸による糖の過分解や装置の腐食といった問題に加え、糖化処理後の硫酸が環境負荷となっている。これに対し加水分解酵素による糖化は、環境負荷は低いものの、高価な酵素を大量に必要とするためコストが問題となっている。また、キシランの糖化に関しては、多糖であるキシランから単糖であるキシロースを得るためには、キシランからキシロオリゴ糖への分解とキシロオリゴ糖からキシロースへの分解といった多段階の反応であり、生物種によって異なるものの、複数の酵素が必要とされている^{9, 10)}。効率良くキシロースを得るためには、使用する酵素の選択や組合せ、酵素の活性に及ぼす温度や pH といった要因の複雑な反応制御が必要となる。

我々は、微生物がこの酵素による複合的な多段階反応を自律的に行っていることに着目した。キシランの糖化によってエネルギーを獲得する微生物は、体内に自律的な酵素制御機構を有しており、基質濃度や環境変化に柔軟に対応することが可能なセルフコントロールマシンと考えることができる。また、微生物を利用する糖化法は、処理時間の長さが大きな障害となっているものの、強酸や高熱といった環境での反応を要しないため環境負荷が少なく、さらに、菌体が自己増殖するといった利点を有している。

Thermobacillus composti は、家庭用生ごみ処理機より単離された好気性中等度好熱微生物で、その至適生育 pH は9.0、温度は50℃である¹¹⁾。キシラン糖化能を有する微生物 *Thermobacillus xylanilyticus*^{12, 13)} と16S rRNA 遺伝子の相同性が98.3%の近縁種である上、*T. composti* もキシランのみを炭素源とする培地で生育可能であるため、キシランの糖化が可能であると予想された。

そこで、本研究ではこの *T. composti* を用い、キシランの糖化によるキシロースの生成について調べ、次にこの微生物の担体への固定化を検討した。

微生物を担体へ固定化すると、反応系内の菌体濃度を常に高い状態に保てるようになる上、連続処理が可能となるといった点で利便性が向上する。同様な観点から水処理設備では汚染物質を分解する微生物

物を担体へ固定化し、処理に要する時間とコストを減少させている¹⁴⁾。しかし、これを微生物による糖化法へ応用するには、基質の不溶性が問題であった。そこで空隙率の高いウォール構造を有する親水性ゲル状多孔体を担体として用いた。空隙率が高いことで、内部空間と外液との液交換に立体障害がほとんどなく、水に不溶なキシランであっても分散によってその内部空間へ入り込み、微生物との接触が容易になるように設定した。

2. 実験方法

2.1 試薬と装置

キシランはブナ原料のものをシグマアルドリッチジャパン株式会社より、キシロースと培地成分の無機塩類はナカライテスク株式会社より、酵母抽出物は日本ベクトン・ディッキンソン株式会社より、キシロース測定キットは Megazyme D-xylose including xylan and arabinoxylan assay kit を日本バイオコン株式会社より購入した。微生物固定化担体は日清紡ケミカル株式会社の高機能性樹脂素剤 APG® を使用した。水はすべて Milli-Q SP (日本ミリポア株式会社) で処理した超純水を用いた。

波長600 nm の吸光度 (OD₆₀₀) の測定には SPEC-TRONIC 20D (Milton roy 社)、分光測定には UV-2450 (株式会社島津製作所)、遠心分離には M150-IV (株式会社佐久間製作所)、担体の観察用デジタルカメラには SH-905i (シャープ株式会社)、走査型電子顕微鏡 (SEM) には JSM-5600LV (日本電子株式会社)、過冷却凍結乾燥装置には Aqua FD-6500 (株式会社サン・テクノロジーズ) を使用した。

2.2 *T. composti* のキシラン糖化によるキシロース生成

2.2.1 培地の調製と培養条件

無機塩類混合物として Modified Brock's Basal Salts : MBS¹⁵⁾ を使用した。MBS (1 L) の組成は Table 1 に示す。これに10 M NaOH を添加することで pH を9.0に調整し、120℃で20分間、オートクレーブにて滅菌したものを使用した。これに炭素源として、酵母抽出物やキシラン等を加えた場合は、再度上記と同様に滅菌して用いた。酵母抽出物を添加した場合は、最終濃度が0.5%となるように調整した。用いた培地組成を Table 2 に示す。培地名には培地に含まれる MBS、酵母抽出物、キシランをそれぞれ M, Y, X で表記した。また、X 培地はキシランを生理的食塩水に懸濁したものである。5 mL の培地に対数増殖期の培養液20 µL を加えた後、至適生育温度である50℃で、好気条件となるよう

Table 1. Composition of modified Brock's basal salts for 1 L.

(NH ₄) ₂ SO ₄	1.3 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.07 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	2.0 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.8 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	4.5 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.05 mg
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.03 mg
VOSO ₄ ·2H ₂ O	0.03 mg
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 mg

Table 2. Composition of media.

Medium	MBS	Yeast extract (0.5%)	Xylan (5 g/L)
X	—	—	+
MY	+	+	—
MX	+	—	+
MXV	+	+	+

150 rpm で振とう培養した。

2.2.2 菌体の増殖の測定

菌体の増殖は波長600 nm での吸光度測定 (OD₆₀₀) によって測定した。試料と同組成で植菌しない培地をコントロールとし、試料と同条件の温度、好気条件下の操作を行った。測定値はコントロールとの差分値とした。キシランは水に不溶であるため、これを炭素源とする培地では分散による濁度も OD₆₀₀ に反映される。濃度 5 g/L 以下ではキシランと OD₆₀₀ との間に濃度依存性が見られた。キシラン濃度 5 g/L での OD₆₀₀ 値は装置の測定限界に近かったことから、培地の炭素源をキシランとする検討は 5 g/L 以下で行うこととした。

2.2.3 キシロース生成の確認

培養液中のキシロース量は以下のようにして測定した。1 週間培養後の培養液を 15000 rpm、4℃ で 20 分間遠心分離し、菌体と糖化されなかったキシランを沈殿させ、上清に含まれるキシロースをキシロース測定キットによって比色定量分析した。この分析法では、以下の 2 式のような反応により、D-キシロースと同量の NADH が生成される。

この NADH 変化量を波長 340 nm の吸光度変化として測定し、検量線からキシロース濃度を算出した。

2.3 T. *composti* の担体への固定化とキシロース生成の検討

2.3.1 T. *composti* の担体への固定化

微生物固定化用の担体は 120℃ で 20 分間オートクレーブ滅菌後使用した。100 mL 三角フラスコへ 20 mL の培地と担体 20 個を投入した後再度滅菌処理し、T. *composti* を植菌して 50℃ で 1 晩振とう培養した。この培地には、固定化後のすすぎを容易にするため、MBS にグルコースと酵母抽出物を加えたものを用いた。グルコース培地での良好な菌体の増殖は確認されている¹¹⁾。培養後、担体を MBS で 2 回すすぎ、余分な培地と担体へ固定化されなかった菌体を洗い流し、これを担体固定化 T. *composti* とした。

2.3.2 担体への固定化の確認

担体への固定化の確認には、走査型電子顕微鏡 (SEM) を使用した。観察用に担体を厚さ 1 mm 程度にスライスし、試料の損傷を防ぐため過冷却凍結乾燥処理した。これを白金コーティングし、SEM で観察した。観察は高真空モード、加速電圧 5 kV、スポットサイズ 10 μm の条件で行った。

2.3.3 担体固定化 T. *composti* によるキシランの糖化と生成キシロースの定量

担体固定化 T. *composti* のキシラン糖化によるキシロース生成について検討した。MBS に 5 g/L キシランを分散させた培地 20 mL に T. *composti* を固定化した担体を 20 個投入し、50℃、150 rpm で 1 週間振とう培養した。1 日毎に培養液を 1 mL ずつ採取し、遠心分離後、上清画分中に含まれるキシロース量をキシロース測定キットで定量した。また対象試料として、同じ培地 20 mL に遊離の T. *composti* を植菌したものを同条件で培養し、1 日毎の経時試料を同様に定量分析した。

3. 結果および考察

3.1 T. *composti* を用いたキシランの糖化とキシロースの生成

3.1.1 菌体の増殖の検討

各培地で T. *composti* を培養したときの OD₆₀₀ の経時変化を Fig. 1 に示した。MXV、MY 培地では培養開始から約 24 時間は OD₆₀₀ が上昇した。これは培養開始後、酵母抽出物を栄養源として菌体が急速に増殖したためであると考えられた。24 時間以降は OD₆₀₀ が急激に減少しているが、これは増殖した菌体が凝集したためであると考えられた。凝集の様子は目視によっても観察された。MXV 培地と MY 培地における OD₆₀₀ の最大変化値は各々 0.593 と 0.418

Fig. 1. Changes of OD₆₀₀ in culture solutions of *T. composti* incubated in MX, MY and MXY media at 50°C.

で、キシランの存在する MXY 培地の方が有意に大きい。また、MXY 培地では 75 時間以降においてコントロールよりも OD₆₀₀ が減少していることから、この減少には菌体の凝集に加え、キシラン糖化による濁度の減少も反映されていると推測された。MX 培地では OD₆₀₀ が増加することなく、培養 24 時間以降有意に減少した。これは MXY 培地と同様、キシランの糖化によると考えられた。MXY, MY, MX 培地ともに定性的な菌体の増殖やキシランの糖化は確認されたものの、OD₆₀₀ ではこれら二成分が相殺しており、定量的な判断には至らなかった。一方、X 培地では OD₆₀₀ の有意な変化は見られなかったため、*T. composti* のキシラン糖化には NaCl 以外の無機塩類も必要とすることが示唆された。無機物イオンは代謝や生育機構のシグナルとして関与していることや、酵素の活性部位に必要であるため、必須であることは十分に考えられた。キシラン分解能を有する微生物の多くは、キシランを直接体内へ取り込むことはできないため、キシラン分解酵素であるキシラナーゼを体外分泌型として発現する。本研究では糖化に関与する酵素についての検討はまだ行っていないが、近縁種である *T. xylanilyticus* においても分泌型キシラナーゼを有することが報告されている¹⁶⁾ ため、*T. composti* も同様の酵素を有する可能性が高いと考えられた。

3.1.2 *T. composti* によるキシロース生成の確認

キシラン濃度を 0.5, 5 g/L とした MX, MXY 培

地での、培養 1 週間後における培養液中のキシロース濃度を Fig. 2 に示した。生成されたキシロース量は培地のキシラン濃度と相関性を有していた。コントロールではキシロースが全く検出されなかったため、キシロースの生成は *T. composti* のキシラン糖化によることが示された。通常、キシラナーゼによって糖化されたキシロオリゴ糖はキシロシダーゼによりキシロースへ変換される。培養液からキシロースが検出されたことから、キシロシダーゼが菌体外に分泌されている可能性が示唆された。また、いずれのキシラン濃度においても MX 培地の方が MXY 培地よりも産生されたキシロース濃度が高かった。OD₆₀₀ の結果では酵母抽出物によって *T. composti* の増殖自体は促進されているため、酵母抽出物に含まれる栄養源をキシランよりも優先的に代謝に用いていると考えられた。このことから、*T. composti* も他の微生物と同様、菌体周囲の基質によって菌体の代謝経路を変更または調節することが示唆された。また、この結果により、担体への固定化の実験には MX 培地の方が適していることが示された。

3.2 担体固定化 *T. composti* によるキシランの糖化

3.2.1 固定化の確認

T. composti の担体への固定化の観察画像を Fig. 3 に示す。Fig. 3a は担体の全体像であり、一辺が約 10 mm の立方体で、ウォール状構造であることが分かる。このウォール部分の SEM による拡大像を Fig. 3b に示す。ウォール壁面に無数の孔が存在している様子が観察された。さらに拡大すると、その

Fig. 2. Xylose concentration of culture solutions of *T. composti* incubated in MXY and MX media at 50°C for 1 week.

孔の中に菌体が存在し、孔の中で増殖している様子が観察された (Fig. 3c 白色矢印)。このような増殖の様子は多数の孔で確認された。また、棒状の形状や大きさの特徴から、この菌体は *T. composti* であ

Fig. 3. Images of a porous gel carrier after immobilization treatment. a; overview of the carrier (not SEM image), b; SEM image of walls of the carrier, c; SEM image of *T. composti* (white arrow) in a hole of the wall.

り、担体への固定化が確認された。

3.2.2 担体固定化 *T. composti* のキシラン糖化によるキシロース産生

担体固定化 *T. composti* と浮遊菌体を用いた場合の培養液中のキシロース量の変化を Fig. 4 に示した。どちらも有意なキシロースの増加が認められた。担体固定化 *T. composti* では、培養開始直後からキシロースが増加した。これは、多数の菌体が担体へ固定化されているため、培養開始直後から有意なキシラン糖化が進行するためであると考えられた。また、キシロースの増加は約3日ではほぼ定常状態に達し、7日間の培養での最大キシロース濃度は1.58 g/Lであった。キシロース生成曲線の近似式は $y = 0.343 \ln(x) + 0.854$ 、相関係数 $R^2 = 0.96$ で、この式により最大濃度の半分に達する時間 ($T_{1/2}$) は0.8日と算出された。

浮遊菌体の場合では、培養開始1日後まではキシロースは検出されず、2日以降キシロースが増加した。Fig. 1 の OD_{600} の結果でも、培養開始24時間後までは変化がなく、その後 OD_{600} の減少が見られたため、キシランの糖化とキシロース生成とは時間的に一致していた。また、キシロースの増加は約5日で定常状態に達し、7日間での最大値は1.61 g/Lであった。キシロース生成のみについて考えるために、培養1日後を開始 (時間=0) とした近似式は $y = 0.413 \ln(x) + 0.834$ 、 $R^2 = 0.92$ で、最大濃度の半分量を生成するのに要する時間は0.9日と算出された。

Fig. 4. Xylose concentration of culture solutions of *T. composti* immobilized on the carrier and free *T. composti* incubated in MX media at 50 °C.

$T_{1/2}$ はこれに1日を加えた1.9日となった。

担体固定化 *T. composti* と浮遊菌体を用いた場合のキシロース生成の結果を Table 3 にまとめた。キシロースの最大濃度と近似式はほぼ同じであり、菌体自体のキシロース生成効率が大きく異なることが示された。前述のように *T. composti* がキシラナーゼおよびキシロシダーゼを分泌する機構が、菌体周囲の基質によって調節を受けるとするならば、菌体周囲のキシランの分散が不充分である場合、菌体によるキシロース生成効率が抑制されるはずである。すなわち担体のウォール状構造は、担体の内部空間におけるキシランの分散を妨げず、固定化された *T. composti* との接触が充分であるため、*T. composti* のキシラン糖化によるキシロースの生成が、担体への固定化によっても阻害されていないと考えられた。

また、要する時間について比較をすると、担体固定化 *T. composti* では定常状態へ至るまでの時間を約2日間、 $T_{1/2}$ では2.3倍、浮遊菌よりも短縮できることが示された。これは反応系内における菌体数の違いによるものであるが、微生物を担体へ固定化することによって菌体数を常に高濃度に保て、処理時間が短縮できたことを示している。実際の糖化処理原料となる木質バイオマスでは、キシランはキシラン単体として存在せず、複合多糖であるグルクロノキシランや、リグニンやセルロースとの複合体として存在している。このことを考慮に入れた検討は今後必要であるが、多孔質担体へ菌体を固定化することによって、微生物糖化処理の課題である処理時間の長さを解決するひとつの手段となる可能性が示された。

4. 結 論

本研究では、好気性中等度好熱微生物である *T. composti* が、広葉樹ヘミセルロースの主成分であるキシランを糖化し、キシロースを生成することを明らかにした。また、この菌を高空隙率のウォール構造親水性ゲル状多孔体へ固定化し、固定化によって菌体のキシラン糖化によるキシロースの生成が抑

制されないことを示した。

謝 辞

SEM 観察に協力戴いた株式会社サン・テクノロジー鈴木武雄氏に感謝する。水処理用微生物固定化担体 APG[®] は日清紡ケミカル株式会社より御提供頂いた。本研究は2009-2010年度創価大学「次世代共同研究プロジェクト」の助成を受けたものである。

文 献

- 1) 近藤昭彦, 福田秀樹, 萩野千秋, 田中 勉: “第二世代バイオ燃料の開発と応用展開”, 吉田和哉, 植田充美, 福崎英一郎監修, シーエムシー出版, 東京, 2009, pp. 3-7.
- 2) 児玉 徹: “バイオマスエネルギー利用技術”, 湯川英明監修, シーエムシー出版, 東京, 2001, pp. 3-10.
- 3) 鮫島正浩: “第二世代バイオ燃料の開発と応用展開”, 吉田和哉, 植田充美, 福崎英一郎監修, シーエムシー出版, 東京, 2009, pp. 12-21.
- 4) Underwood, S. A., Buszko, A. L., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O.: *Appl. Environ. Microb.* **70**(5), 2734-2740 (2004).
- 5) Yomano, L., York, S., Zhou, S., Shanmugam, K., Ingram, L.: *Biotechnol. Lett.* **30**(12), 2097-2103 (2008).
- 6) Katahira, S., Mizuike, A., Fukuda, H., Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**(6), 1136-1143 (2006).
- 7) Madhavan, A., Tamalampudi, S., Srivastava, A., Fukuda, H., Bisaria, V., Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**(6), 1037-1047 (2009).
- 8) 社団法人日本エネルギー学会: “バイオマス技術ハンドブック”, 財団法人新エネルギー財団編, オーム社, 東京, 2008, pp. 449-554.
- 9) Polizeli, M., Rizzatti, A., Monti, R., Terenzi, H., Jorge, J., Amorim, D.: *Appl. Microbiol. Biot.*

Table 3. Comparisons of xylose production by *T. composti* immobilized on the carriers and free *T. composti*.

	Immobilized <i>T. composti</i>	Free <i>T. composti</i>
Time to steady state (d)	3	5
Maximum (g/l xylose)	1.58	1.61
Xylose production curve	$y = 0.343 \ln(x) + 0.854$	$y = 0.413 \ln(x) + 0.834$
Correlation coefficient (R^2)	0.96	0.92
$T_{1/2}$ (d)	0.8	1.9

- 67(5), 577-591 (2005).
- 10) Knob, A., Terrasan, C. R. F., Carmona, E. C.: *World J. Microb. Biot.* **26**(3), 389-407 (2010).
- 11) Watanabe, K., Nagao, N., Yamamoto, S., Toda, T., Kurosawa, N.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 1473-1477 (2007).
- 12) Touzel, J., O'Donohue, M., Debeire, P., Samain, E., Breton, C.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**(1), 315-20 (2000).
- 13) Paes, G., Skov, L., O'Donohue, M., Remond, C., Kastrup, J., Gajhede, M., Mirza, O.: *Biochemistry* **47**(28), 7441-7451 (2008).
- 14) 滝沢 智: “微生物固定化法による水処理”, エヌ・ティー・エス, 東京, 2000, pp. 87-105.
- 15) Kurosawa, N., Itoh, Y. H., Iwai, T., Sugai, A., Uda, I., Kimura, N., Horiuchi, T., Itoh, T.: *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 451-456 (1998).
- 16) Paes, G., O'Donohue, M. J.: *J. Biotechnol.* **125**, 228-350 (2006).