総説

セルロースのグルコースへの酵素的変換に関する研究

佐々木 堯*

Enzymatic Conversion of Cellulose to Glucose

Takashi SASAKI*

* National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,
2-1-2, Kannondai, Yatabe, Ibaraki-ken, 305

地球上の植物の光合成器官は、太陽エネルギーを固定して莫大な量のバイオマスを生産している。その貯蔵エネルギーの形で生産される年間バイオマスの量は、世界の年間エネルギー消費量の約 10 倍もあり、また地球上の人類に必要な食糧資源の約 200 倍にも達すると推算されている。しかも、それらは毎年再生産されるので、事実上、地球上に最も豊富にある無限な資源といえよう。

炭水化物についてみても、陸上植物により少くとも年間約 50 億トンも生成され、その中約 25% が耕地で生成され、残りは森林草原で生成される。

Fig. 1 に耕地系バイオマスを主体とした変換利用フローを示してある。ここで、バイオマス-I は光合成器官により生成された植物総体をさし、デンプン、タンパク、油脂、セルロース、ヘミセルロース、リグニン等から構成される有機体である。具体的には、従来農業で栽培される稲、麦、とうもろこし、さとうきび等の作物体であり、最近のバイオマス研究の流れからすればホテイアオイ、ユーカリ、ミドリサング、ジャイアントケルプ等のエネルギー植物とみなされる生産性の高い新規バイオマスもバイオマス-I に入れられる。新規バイオマスは、主として植物油、バイオガス等の燃料に変換利用される。

バイオマス-II は、バイオマス-I の中の子実、いも等の可食部であり、デンプン、糖類、タンパク、油脂等からなる、いわゆる食糧バイオマスである。この区分は、バイオマス-I の 1/4~1/3 程度であり、現状では食料の他に飼料に使用されている。

最近、バイオマスをアルコールに変換し、石油代替エ

ネルギーとして利用する研究開発が、各国で推進されている。その中に、この食糧バイオマス (バイオマス-II) をアルコールに変換利用する技術開発が、アメリカ、ブラジルをはじめ余剰農産物を有する国々で行われている。しかし、この方向は農業に食糧かエネルギーかの世界の耕地への新たな競合問題を提起しつつある。

一方、バイオマス-I から、可食部のバイオマス-II をとった残り約 60% のバイオマス-III は、セルロース性バイオマスといえるもので、現在でも未利用のバイオマスである。しかし、これらの未利用炭水化物資源を加水分解してグルコース、キシロース等に転換すれば、既食糧、工業原材料あるいはアルコール等エネルギー源として利用できるものであり、食糧生産と競合することはない。バイオマス-III は、換言すれば、長期貯蔵性のある莫大な炭水化物性バイオマスといえよう。

Fig. 1 Conversion of cellulosic biomass

* 農林水産省食品総合研究所 (〒305 茨城県筑波郡谷田部町観音台 2-1-2)

世界的な食糧危機、エネルギー危機が叫ばれている今日我々は太陽エネルギーにより合成されたこの地球上に豊富に存在する未利用炭水化物の変換利用の研究開発を、積極的におし進める必要がある。

これまでのセルロースのグルコースへの酵素分解に関する研究は、理論的可能性にとどまっていたが、最近のセルラーゼ生産菌の改良およびセルロースの前処理技術等の研究の著しい発展により、実用化の可能性を提示しつつある。

セルロースの酵素分解の特徴と酵素生産菌の改良

天然セルロースのセルラーゼによる分解反応は、一般に極めて遅く、分解率も低く、なみのセルラーゼ生産菌ではとうてい実用化の見込みはない。天然セルロースが酵素分解されにくいのは、基質がリグニン、ヘミセルロースと不溶性の強固な構造を形式にしていること、ならびに作用の異なる数種の酵素が分解反応に関与することによる。

天然セルロースがグルコースにまで酵素分解される機作についてみると、まだ未解明の部分もあるが、現在のところ Fig. 2 に示したように、 β -1,4-glucan cellobiohydrolase (C1, Avicelase, cellobiohydrolase), β -1,4-glucano glucanohydrolase (Cx, CMCase, endocellulase), および β -1,4-glucosidase (cellobiase) の3種類の反応を必要とするのが特徴である。すなわち、天然セルロースの非晶区分に作用する Cx-酵素、結晶区分の β -1,4 グルコースポリマー間の水素結合をはずして、セリビオースに分解する C1-酵素、ついで非晶性グルコースポリマーを低分子化し、グルコースにまで分解する Cx-酵素およびセロビアーゼの3種類の反応である。この中で特にセルロースの結晶構造に作用する C1-酵素が重要であり、この酵素の活性の強さが、次の酵素反応を左右する。現在地球上で見出された最大の C1-活性を有する菌は *Trichoderma* であり強力な C1-酵素を擁しているが、実用レベルには到っていない。しかし、最近この菌の改良により、従来より数倍活性の強い酵素生産菌が開発されてきている。

Fig. 3 は、アメリカで最も強い活性を有する *Trichoderma reesei* の遺伝的改良系図であり、その改良菌のセルラーゼ活性は表に示してある。

野生株の *T. reesei* QM6a は、アメリカの Natick 研究所と Rutgers 大学で改良され、液体培養技術の開発とあわせて、2~3 倍高活性のセルラーゼを生産するに到っている。ここで、CMCase は Cx-酵素、Avicelase

Fig. 2 Schematic representation of sequential stages in cellulolysis²⁾ stalling cellulose by 3-step enzyme reaction

Fig. 3 Genetic lineage of current cellulase mutant strains of *T. reesei*²⁾

Table 1 Cellulase Production by Mutant Strains of *Trichoderma reesei*²⁾

Strain	CMC u/ml	Filter paper u/ml	β -glucosidase u/ml	Productivity EPU/Liter/h	Soluble protein mg/ml
BM 6a (Parent)	88	5	0.3	15	7
QM 9414 (Natick)	109	10	0.6	30	14
MCG 77 (Natick)	104	11	0.9	33	16
C 30 (Rutgers)	150	14	0.3	42	19
NG 14 (Rutgers)	133	15	0.6	45	21

Table 2 The Comparison of different cellulase preparations³⁾

Activity (pH 4.8, 50°C)	Natick 3G 78	Natick PP 174	Novo SP 122	Meicelase CEPB-5011
Reducing sugar (mg/mg)	0	0	0.06	0
Protein (Lowry) (mg/mg)	0.84	0.85	0.50	0.71
Salicinase (30 min) (u/mg)	0.05	—	0.03	1.08
Cellobiase (30 min) (u/mg)	—	0.31	0.05	0.46
CMCase 7 L 2 (30 min) (u/mg)	31.5	—	—	33.9
CMCase 50 T (30 min) (u/mg)	—	—	6.5	12.3
FPase (60 min) (u/mg)	0.56	0.53	0.26	0.33
Avicelase (60 min) (u/mg)	0.78	—	—	0.79

は C1-酵素, FPase は (C1+Cx) 活性をみている。

Rutgers 大学の NG 14 株は, FPase 活性で 3 倍, CMC 分解活性で 1.5 倍, β -グルコシダーゼ活性が 2 倍に改良されている。また Natick 研究所の MCG 77 株は, FPase および CMCase では NG 14 株よりも劣るとはいえ, β -グルコシダーゼは 3 倍に増強されている。

一方, 最近の国産のセルラーゼの改良技術の進歩もめざましく, アメリカの *Trichoderma* のセルラーゼ以上の活性を有す菌が作出されている。Table 2 は, アメリカの Natick 研究所の最近の改良株と考えられる *Trichoderma* 3G 78 および PP 174 株のセルラーゼ, 明治製菓(株)の CEPB-5011 株の酵素(メイセラゼ)ならびにデンマークの Novo 社の SP 122 株のセルラーゼの活性を比較したものである。

Table 2 から, 国産のセルラーゼの FPase 活性は, Natick 3G 78 株に比べてわずかに劣るが, Avicelase, CMCase, Cellobiase 活性に関しては, アメリカやデンマークのセルラーゼよりも強力であることがわかる。しかし, このような優秀なセルラーゼ生産菌でもセルロースの糖化の実用化には到っていないようである。

しかもここまで活性を上げるのに, 約 10 年かかっており今後セルラーゼ生産菌の変異法による高活性菌の開発研究の 1 つのめやすになろう。今後とも, より強力なセルロース分解菌のスクリーニング, 遺伝子工学的手法導入による改良・作出が必要である。

天然セルロースの結晶性とセルロースの作用^{4)~8)}

結晶セルロースの基本構造は, Fig. 4 に示したように, β -1,4-結合のセロビオース単位からなる直鎖状ポリマーで, 隣接するポリマーは 1/4 分子ずれて格子空間に配位し, グルコース残基の -OH 基は全て分子間・分子内水素結合を形成し, 強固な結晶構造をとっている。このような結晶格子になると酵素分子はもちろん, 水分子さえもセルロース内に侵入することはできない。その上, このセルロース分子にリグニンやヘミセルロースが, からみついて立体的にも酵素分子がセルロース分子に接触するのを妨害している。

このような天然セルロースの結晶性と酵素分解性との関係を我々の実験結果からまとめてみると Table 3 の

Table 3 Crystallinity of native cellulose and action of cellulase complex

Crystallinity	X-ray diffractogram	Cellulase complex	Estimated hydrolysis
C1+Cx (<i>T.viride</i>)	Low
C1+Cx (<i>T.viride</i>)	Low
Cx (<i>A.niger</i>)	High

ようになる。ここでは、天然セルロースの存在形態を便宜上3つに分類してみたが、最初のは純粋なセルロースからなるもので、結晶度合が高く X 線図形からも $2\theta=22.5^\circ$ に特有のピークが認められる。このような結晶度合の高いセルロースの分解には、結晶構造を破壊する C1-酵素を必要とし、予想される分解率も非常に低いものになる。

第2のタイプは、主成分の結晶化したセルロースの他にリグニン、ヘミセルロースなど含量を異にする夾雑物(X)を含むもので、結晶度合に応じた X 線図形を示すにせよ結晶性があるので C1-酵素を必要とし、分解率も低いものになる。

第3のタイプは、夾雑物を含むとはいえセルロースには結晶性がなく、X線図形にピークは認められない。このようなタイプのセルロースが植物組織にあるかは不明であるが、この場合は C1-酵素を必要とせず、Cx-酵素系で容易に分解される。

これらの関係からわかるように、天然セルロースの結晶性の有無が、その酵素分解率に大きく影響してくる。実際に我々がセルロース糖化に資源として扱おうとし

ているセルロースは、主に第2のタイプ(バイオマス-III, Fig. 1)と考えられるので、何らかの方法で結晶性を破壊して第3のタイプにした方が効率よい酵素分解率が得られる。

強固なセルロースの結晶構造破壊方法として、(1)生物学的方法、(2)化学的方法ならびに(3)物理的方法が試みられている (Fig. 5)。

生物学的方法は、前述の微生物の生産する C1-酵素によって結晶構造を破壊する方法であり、現在かなり強力な改良菌が作出されていることはいえ、実用レベルの活性のある酵素にはもう一歩というところであろう。したがって、この方法は補助手段として使用することはできるが、この方法だけで結晶構造を破壊するには問題があり、物理的あるいは化学的方法との組合せが必要となる。

化学的方法によるセルロース結晶構造破壊は、セルロース溶剤を用いて溶解し再沈殿させるという方法で、容易に非晶質タイプに転換することができる (Fig. 6)。この化学的に非晶質タイプに転換したセルロースは、C1-酵素の助けを必要とせずに、Cx-酵素系ですみやか

Fig. 4 Structure of ligno-cellulose

Fig. 5 Degradation of cellulose crystalline structure and action of cellulase complex. C₁-enzyme and C_x-enzyme mean 1,4-β-glucan cellobiohydrolase and 1,4-β-glucan glucanohydrolase respectively⁵⁾

Fig. 6 X-ray diffractograms of various treated celluloses: (a) Untreated: (b) cryo-milled: (c) 30 min acid treated: (d) 60 min acid treated: (e) Cadoxen treated: (f) DMSO-*p*-formaldehyde (DMSO-FA) treated⁵⁾

に糖化されるようになる (Fig. 7 (a) および (b))。

我々は溶剤として、酸性、アルカリ性あるいは有機溶媒系のものを使用し、短時間に90%以上の糖化率を得ている (Table 4)。残念ながら、これらのセルロース溶剤は実用的なものではない。しかし、この方法は将来単一の有機溶媒系で回収可能なセルロース溶剤が開発されれば、実用化可能な方法である。

つぎの物理的方法は、高温高压、粉碎、放射線、凍結等により結晶構造を破壊する方法である。この分野で世界をリードしているアメリカの Natick 研究所のグループは、常温で行うポット・ミル法でセルロースを粉碎し、*T. reesei* mutant セルラーゼで実用化可能な糖化率を報告している。

そしてそれらの結果に基いてパイロットプラントレベルでの研究を行っている。しかしこの方法では、セルロースからグルコースへのプロセスの中で、ポットミルに使用されるエネルギーは50~60%もあり、また混在するリグニンの影響で60%程度の糖化率といわれ問題が残る。

これに対し、我々は凍結粉碎法で微粉化したセルロースは、X線図形の分析から結晶性が低下しており (Fig. 8)、C₁-酵素の助けを必要とせず C_x-酵素系 (*A. niger* セルラーゼなど) で糖化されるようになることを明らかにしている。しかしながら、一般にもみながら、稲ワラ、廃木材等の農林産廃物および新聞紙のセルロースは、リグニン、ヘミセルロース等の夾雑物と組織構造体

Table 4 Correlation between crystallinity and biological susceptibility of various treated celluloses⁴⁾

Cellulose	Yield of insoluble fraction (%)	Crystallinity index (1) ^a	Saccharification (%) ^b
Untreated		8.8	26
+Cryo-Milled	100	4.9	36
+Acid treated (30 min)	96	0.8	93
+Acid treated (60 min)	93	0.7	94
+Cadoxen	98	1.0	93
+DMSO- <i>p</i> -formaldehyde	98	0.8	94

^a 1=relative intensity of 2θ=22.5°/relative intensity of 2θ=18°

^b Data after 48 h

Fig. 7 (a) Hydrolysis of DMSO-FA-treated cellulose by *T. viride* cellulase. (—○—) Saccharification of untreated cellulose: (—●—) saccharification of DMSO-FA-treated cellulose: (----) relative turbidity of DMSO-FA-treated cellulose⁶⁾

(b) Hydrolysis of acid-treated cellulose by cellulase preparation from *T. viride* and *A. niger*. (—○—) Untreated cellulose + *T. viride* cellulase: (---○---) untreated cellulose + *A. niger* cellulase: (—●—) acid-treated cellulose + *T. viride* cellulase: (---●---) acid-treated cellulose + *A. niger* cellulase⁶⁾

形成のための強固な結合様式をとっており、酵素のセルロース分解を立体的に邪魔しているため糖化率に限界が生じてくる。特にリグニンは、リグノセルロースの形で

Fig. 8 X-ray diffractogram of rice hull cellulose⁶⁾

(A) Cryomilled cotton cellulose powder
(B) Cryomilled rice hull cellulose powder

セルロースに強く結合しており、凍結粉碎だけでリグニンとセルロースを離すことは不可能である。したがって、リグニンを除く操作が、次の酵素分解性を高めるうえに必要となる。

セルロース試料中に含まれるリグニン除去法としては Sodium hydroxide, Ammonia, Ammonium bisulfite, Sulfite, Sodium chlorite, Butylalcohol 等が用いられているが、実験室的には希アルカリ液中で加熱することにより簡単に除去できる。このような脱リグニンしたセルロースは、Cx-酵素系ですみやかに 80% 以上分解される。一方、パルプ製造工程で高度に脱リグニンされたセルロース等を酵素糖化する場合には、凍結粉碎後脱リグニン処理する必要はなく、そのまま酵素反応に供することができよう。

凍結粉碎のもう 1 つの効果は、かさの減少である。もみがら、稲ワラ等農産副生物は一般にかさがあり、処理操作の上で大容量の容器を必要とし繁雑になる。しかしながら、かさのある試料を凍結粉碎により単時間内で連続的に微粉化し、かさを減少させることができることは、酵素糖化の前に簡単に X 線分析により結晶性の有無がチェックでき、無駄のない酵素糖化処理をすることができる。

このような凍結粉碎は、物質が低温下で機械的衝撃に非常に脆くなる性質を利用したもので、セルロースの構造破壊に非常に効果があり、短時間で微粉末化される。例えば試料にもよるが、アメリカのポット・ミル法はセルロースを 250 メッシュにするのに 15~16 時間を要す

るが、本法では10分位の短時間で微粉化可能である。したがって、運転エネルギーも少なくて済むことになる。この凍結粉碎の冷媒は実験室的には液体窒素が使用されるが、実用的には最近問題となっているLNGの未利用の冷熱を活用することにより安く供給できよう。

セルロース試料を90%以上糖化するには

つぎに、これまでの我々の研究成果をもとに、ある未知のセルロース試料を90%以上糖化する方法をまとめる。一般に天然セルロースは、Table 3の第2のタイプが大部分を占めていると考えられるので、この第2のタイプを中心に話を進める。

Fig. 9 Saccharification of cellulosic biomass to over 90%

Fig. 9に示したように、最初にセルロース試料を凍結粉碎により微粉化する。そのX線図形を分析し、結晶性の有無をチェックする。結晶性がある場合には、リグニン除去後C1-Cx-酵素系（例えば *T. viride* セルラーゼ）により90%以上の糖化が望まれるところであるが、現時点では限界がある。それに代る有効な方法として、セルロースの溶解-再沈澱法により結晶構造を非晶質に転換する。これはCx-酵素系（例えば *A. niger* セルラーゼ）ですみやかに90%以上糖化される。

一方、結晶性がない場合は、勿論セルロースを溶解-再沈澱法により回収すれば、すみやかに90%以上分解されるが、もう1つの方法は酵素がセルロースに接触し

やすいように、リグニンを除くことである。リグニンを除去したセルロース試料は、すみやかにCx-酵素系により糖化される。

この中でセルロースの溶解-再沈澱法は、非常に有効な方法であるが、現在のところ実用的なセルロース溶剤は見出されていないことから、実験室的な方法といえる。しかしながら、もう1つの方法、凍結粉碎セルロースを脱リグニンし、Cx-酵素系で糖化する方法は操作も簡易であり、技術的にも実用化可能な方法と考えられる。

セルロース性バイオマス利用研究の今後の方向

以上、セルロースの酵素糖化を中心にみてきたが、セルロース性バイオマスという観点からみても、セルロースという単一成分からなつるバイオマスは非常に少い。やはり対象となるものは、セルロース、ヘミセルロース、リグニン等から成るバイオマス-III (Fig. 1) であろう。したがって、今後の研究方向としては、Table 5に示したように、(1) セルロース性バイオマスを分解する強

Table 5 Research needs on cellulosic biomass conversion

1. Increasing enzyme yields
1) Selection of an organism
2) Mutation of a highly productive form
2. Pretreatment of cellulose etc.
1) Physical treatment.....Cryomilling etc.
2) Chemical Treatment.....Cellulose solvent etc.
3. Bioreactor
1) Immobilizing
2) Multisystem

力な酵素生産菌の検策ならびに遺伝子工学的手法をも駆使する有用菌の改良・作出、(2) セルロース性バイオマスの効果的な前処理技術ならびに(3) 多成のバイオリア分系バイオマスの連続的複合的変換利用システムのためクターの技術の開発が重要である。Fig. 10にセルロース性バイオマスの複合利用システムを示したが、今後はセルロースだけの糖化・利用というのではなく、キシロース等のC5-化合物、グルコース等のC6-化合物、リグニンの環状C6-化合物を複合的に変換利用するバイオマス・システムの開発が必要であり、セルロースの糖化技術もそのトータルシステムの中で評価していくべきであろう。

Fig. 10 System flow of total cellulosic biomass utilization

文 献

- 1) MONTENECOURT, B. S., SCHOMBRANT, D. H.J., CUSKEY, S.M. and ERELEIGH D.E.: in Proceedings

of the 3rd Annual Biollass Energy System Conference (Solar Energy Research Institute, Department of Energy, Golden, Co.) p. 85, (1979).

- 2) GALLS, B.J., ANDREOTT, R., ROCHE, C., RYU, D. and MANDELS, M.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No. 8, 89 (1978).
- 3) RYU, D. and MANDELS, M.: *Enzyme Microb. Technol.* 2, 91 (1980).
- 4) 外山信夫: '81 バイオマスと新エネルギー開発会議・資料 1-6-1 (1981).
- 5) SASAKI, T., TANAKA, T., NANBU, N., SATO, Y. and KAINUMA, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 1031 (1979).
- 6) 佐々木堯・佐藤陽子・中川真人・白石真人・貝沼圭二: 日食工誌, 26, 523 (1979).
- 7) 佐々木堯・佐藤陽子・貝沼圭二: 日食工誌, 26, 493 (1979).
- 8) 佐々木堯・田中 崇・貝沼圭二: 日食工誌, 26, 538 (1979).
- 9) 佐々木堯・佐藤陽子・小林登史夫・貝沼圭二: 日食工誌, 27, 270 (1980).

(昭和 56 年 7 月 8 日受理)