

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19089

研究課題名(和文)生物由来燃料生産のための機能性酵素カクテル合成と対応フォーミュラの創成

研究課題名(英文)Synthesis of functional enzyme cocktail for biofuel production

研究代表者

浅田 元子(ASADA, Chikako)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・准教授

研究者番号：10580954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：セルロースからのバイオ燃料(バイオエタノールやバイオメタン等)生産においては、セルロースの加水分解(グルコースへの糖化)の効率を上げることが最も重要な鍵である。本研究では、現在法で製造不可能な理想的特性を持つ加水分解酵素(セルラーゼ)群の製造・利用プロセス(最適な新規酵素種の選定、カクテル比の決定、算式化)創成について検討した。Archaea系超耐熱性菌由来のセルラーゼ発現遺伝子を必要種類人工合成し、増殖速度の速い大腸菌に導入して簡易に酵素を取得した。次に、耐熱性酵素を用いた場合の加水分解速度式の最大酵素反応速度とMichaelis-Menten定数を推算した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、石油などの枯渇性エネルギーに代替しうる再生可能エネルギーとしてバイオ燃料が注目されている。リグノセルロース系バイオマスからのバイオ燃料生産においては、セルロースの酵素糖化の効率を上げることが最も重要な鍵である。従来の酵素糖化では糸状菌由来の酵素が使われてきたが、糸状菌の生育速度が遅いこと、非常に低いこと、酵素の精製に時間と費用がかかることなどが問題となっている。これらの問題を改善して酵素糖化を迅速かつ効率よく行うために、超好熱性古細菌由来の耐熱性酵素を世代時間の短い大腸菌により大量発現させることに着目した。その利用により酵素糖化時間の短縮やコスト削減が可能となる。

研究成果の概要(英文)：In the production of biofuel (bioethanol, biomethane, etc.) from cellulose, the most important key is to increase the efficiency of cellulose hydrolysis, i.e. saccharification of cellulose into glucose. In this study, we investigated the production and utilization process (selection of optimum new enzyme species, determination of cocktail ratio, formulation) of hydrolase (cellulase) group having ideal characteristics that cannot be produced by the present method. A cellulase-expressing gene derived from a superthermostable Archaea bacterium was synthesized and incorporated into E.coli, which has a fast growth rate, to easily obtain the enzyme. Next, the maximum enzyme reaction rate and the Michaelis-Menten constant of the equation were estimated.

研究分野：生物化学工学

キーワード：耐熱性セルラーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、石油などの枯渇性エネルギーに代替しうる再生可能エネルギーとしてバイオ燃料が注目されている。食糧と競合しないリグノセルロース系バイオマスを原料として用いるためには、前処理・糖化・発酵の過程が必要である。特に、リグノセルロース系バイオマスからのバイオ燃料生産においては、セルロースの加水分解(酵素によるグルコースへの糖化)の効率を上げることが最も重要な鍵である。セルロース分解酵素(セルラーゼ)を用いたセルロースの加水分解(図1)は、単糖の過分解が進行することなく、少ない環境負荷で収率よく単糖を生成することが可能な方法である。しかしながら、従来の酵素糖化では *Trichoderma reesei* などの糸状菌由来の酵素が使われているが、糸状菌の生育速度が遅いこと、アミラーゼと比べ活性が非常に低いこと、酵素の精製に時間と費用がかかることなどが問題となっている。これらの問題を改善して酵素糖化を迅速かつ効率よく行うために、超好熱性古細菌由来の耐熱性酵素を世代時間の短い大腸菌により大量発現させることに着目した。熱に強い酵素を用いて高温で糖化反応を行うことによって、反応速度の上昇や安定、雑菌の増殖抑制が可能になる。また、耐熱性酵素は熱耐性をもつため熱処理のみによる精製が可能となる。従来の酵素精製が必要であった何段階ものクロマトグラフィーなどの操作を省くことができ、酵素生産にかかる時間短縮、コスト削減が可能となる。

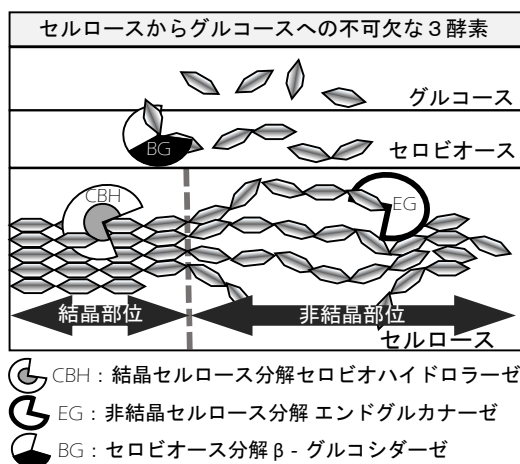


図1 セルロースの加水分解機構

2. 研究の目的

本研究では、大腸菌コンピテントセルを用いて、超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* DSM3638 由来 β -グルコシダーゼ BG-mut, 超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来エンドグルカナーゼ EG および *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 由来セロビオハイドロラーゼ CBH の3種類の耐熱性酵素の発現を行った。次に、得られたセルラーゼを用いた糖化実験をすると共に、工業化のために必要となる反応速度式を作成した。

3. 研究の方法

(1) プラスミド調製

制限酵素 Bam HIおよび Nde Iで処理した耐熱性酵素 EG, BG-mut, CBH の発現部位をベクター pET11a に導入し、組換えプラスミドを作製した。氷上で融解した大腸菌 *E.coli* DH5 α Competent Cells 50 μ L に組換えプラスミド(pET11a \times EG, pET11a \times BG-mut, pET11a \times CBH)をそれぞれ 2 μ L 加え、氷上で静置した。30分後、42°Cで 45 s 間ヒートショックを行い、すぐに氷上に戻した。2 min 後、SOC 培地を 400 μ L 加え、37°Cで 1 h 培養した。培養後、LB+Amp 寒天培地に 100 μ L 程度まき、37°Cで一晩培養した。200 μ L チューブに dH₂O, PCR 酵素(KAPA Taq Extra HotStart ReadyMix), プライマー(T7ter, T7pro)を混合した。EG, BG-mut, CBH の大腸菌コロニーを滅菌済み爪楊枝でつつき、混合溶液に懸濁後、LB+Amp 寒天培地に植菌(マスタープレートを作製)し、37°Cで静置培養した。混合溶液はサーマルサイクラーで PCR にかけて後、アガロース電気泳動を行った。電気泳動の結果からプラスミドが導入された菌を確認し、その菌をマ

スタープレート内で広げて培養した。滅菌済み 15 mL ファルコンチューブ : LB 1mL+Amp 1 μ L に、白金耳を用いてプラスミドが導入された菌を懸濁し、140 rpm, 37°Cで 3h 培養を行った(前培養)。滅菌済み 50 mL ファルコンチューブ (LB 15 mL, Amp 15 μ L) に前培養した菌を全量入れ、140 rpm, 37°Cで一晩培養した。培養後、プラスミド精製キット(QIAGEN 社製)を用いてプラスミドを精製し、得られたプラスミドは-4°Cで保存した。制限酵素 Bam HI および Nde I を用いてアガロース電気泳動を行い、耐熱性酵素を発現する目的の遺伝子部位が導入されているか再度確認した。

(2) アガロース電気泳動

1 \times TBE バッファー200 mL とアガロース 1.4 g をスターラーでよく混合し、121°C, 20 min 間オートクレーブで滅菌し、室温で保存した。ゲルを作成する際は、電子レンジで温め、50°C程度まで冷まし、固まらないうちにゲル板に流し込んだ。気泡を除いた後、コームを差し込んで静置した。静置後、ゲルが固まっていることを確認し、1 \times TBE バッファーで満たした電気泳動装置((株)ADVANCE)にゲルを入れた。サンプル 20 μ L に 10 \times Loading Buffer 2.2 μ L を加えて、ボルテックス、フラッシュしました。サンプル 20 μ L と分子量マーカー6 μ L をウェルにアプライし、100V で泳動を開始した。ゲルの 7 割程度までサンプルが流れたら泳動を止め、エチジウムブロマイド溶液に 5 min 間浸した。染色後、UV トランスイルミネーター(Bio Tool 社製)でバンドを確認した。

(3) 酵素作成

BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL Competent Cells 30 μ L に組換えプラスミド(pET11a \times EG, pET11a \times BG-mut, pET11a \times CBH)をそれぞれ 1 μ L 加え、氷上で静置した。30 min 後、42°Cで 45 s 間ヒートショックを行い、すぐに氷上に戻した。2 min 後、SOC 培地を 200 μ L 加え、37°Cで 1 h 培養した。培養後、LB+Amp 寒天培地に 100 μ L 程度まき、37°Cで一晩培養した。滅菌済み 500 mL フラスコ : SB 150 mL+Amp 150 μ L に白金耳を用いてプレート内の菌を全量懸濁し、37°C, 120 rpm で 4 h 程度振盪培養した。OD₆₆₀>0.6 であることを確認し、0.1 M IPTG 150 μ L(最終濃度 0.1 mM)を加えて、37°C, 120 rpm で 3 h 程度振盪培養した。OD の測定には、DS-11 Nano Pad 微量分光光度計(DeNovix 社製)を用いた。滅菌し、あらかじめ計量しておいた 50 mL ファルコンチューブ(①)に菌液を 40 mL 程度(ファルコンチューブの 8 割程度)入れ、7,000rpm で 3 min 間遠心分離し、上清を除いた。このとき重量が釣り合わない場合は、0.85% NaCl で調整した。洗菌のため、0.85% NaCl を 15 mL 入れ、ボルテックスで完全に懸濁後、7,000 rpm で 5 min 間遠心分離し上清を除いた。遠心分離し、上清を除く作業を数回繰り返す、菌体の計量(②)を行った。10 mM Tris-HCl (pH7.5) を菌体重量(②-①) \times 5 mL 加えて、ボルテックスミキサーで完全に懸濁した。懸濁後、超音波ホモジナイザー(Branson 社製 sonifier 250)を用いて超音波破碎(1 min \times 1 min インターバル \times 3 回)を行った。このとき、破碎機の先を 70%ヒストールと蒸留水で洗浄し、破碎を行うときは先がファルコンチューブの底につかないよう注意して行った。超音波破碎後、10,000 rpm, 10 min 間遠心分離し、上清を滅菌済み 15 mL ファルコンチューブに回収した。このとき重量が釣り合わない場合は 10 mM Tris-HCl で調整した。ミニクーラー(major science 社製)を用いて熱処理(EG, BG-mut : 90°C, 15min, CBH : 80°C, 15 min)を行った後、10,000 rpm で 10 min 間遠心分離し、上清を滅菌済み 15 mL ファルコンチューブに回収した。上清は SDS-PAGE による目的酵素の生成確認と、Bradford 法によるタンパク質濃度の測定を行い、酵素糖化に用いた。

4. 研究成果

図2は得られた耐熱性酵素 BG-mut と EG の SDS-PAGE 結果を示す。SDS-PAGE 結果より、BG-mut は 54.1 kDa, EG は 43.2 kDa の箇所に目的酵素のバンドが得られた。未処理で確認できる目的酵素以外のバンドは 90°C, 15 min 間の熱処理により、明らかに薄くなっており、目的酵素以外のタンパク質がほとんど除去されたことがわかった。

図3は得られた耐熱性酵素 CBH を種々の温度で熱処理精製した場合の SDS-PAGE 結果を示す。SDS-PAGE 結果より、CBH は 77 kDa の箇所に目的酵素のバンドが得られた。目的酵素以外のバンドは、処理温度を上げるにつれ薄くなった。また、90°Cでは目的酵素のバンドはほとんど確認できなくなったことから、CBH は 80°Cでの処理が適しており、90°C, 15 min の熱処理により失活してしまうことがわかった。

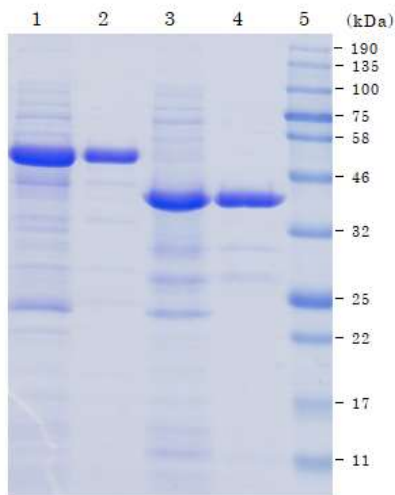


図2 耐熱性酵素 BG-mut と EG の SDS-PAGE 結果 (1: BG-mut 未処理, 2: BG-mut 90°C, 15 min 間熱処理, 3: EG 未処理, 4: EG 90°C, 15 min 間熱処理, 5: マーカー)

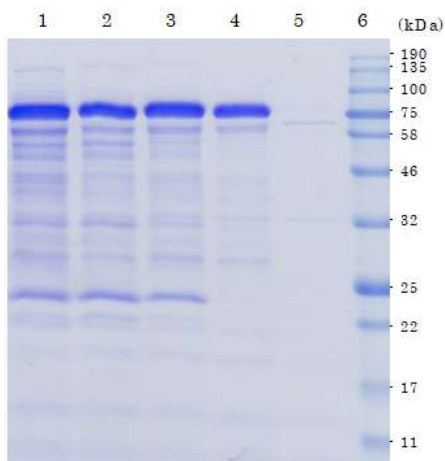


図3 耐熱性酵素 CBH の SDS-PAGE 結果 (1: 未熱処理, 2: 60°C, 15 min 間熱処理, 3: 70°C, 15 min 間熱処理, 4: 80°C, 15 min 間熱処理, 5: 90°C, 15 min 間熱処理, 6: マーカー)

図4は培養温度 90°Cの時の BG-mut を用いたセロビオースの酵素加水分解結果を示す。培養時間の増加とともにグルコース濃度が増加し、セロビオース濃度が高いほど酵素加水分解初速度が大きいことがわかった。また、図5は培養温度 90°Cの時の BG-mut を用いたセロビオースの酵素加水分解データに基づいて作成した Lineweaver-Burk プロットを示す。プロットの結果より、Michaelis-Menten の式の最大酵素反応速度 V_{max} と Michaelis-Menten 定数 K_m はそれぞれ 0.95 g/L/h と 4.46 g/L となった。

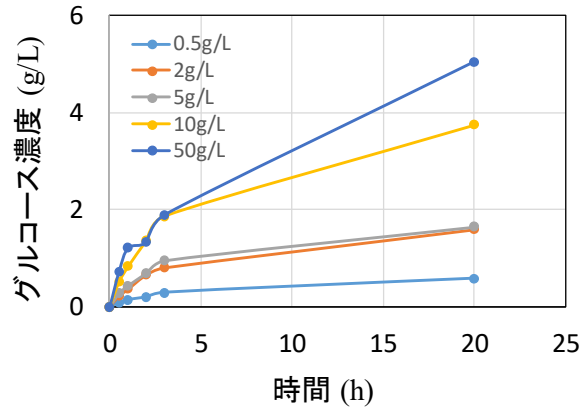


図4 BG-mut を用いたセロビオースの酵素加水分解に及ぼすセロビオース濃度の影響 (培養温度 90°C)

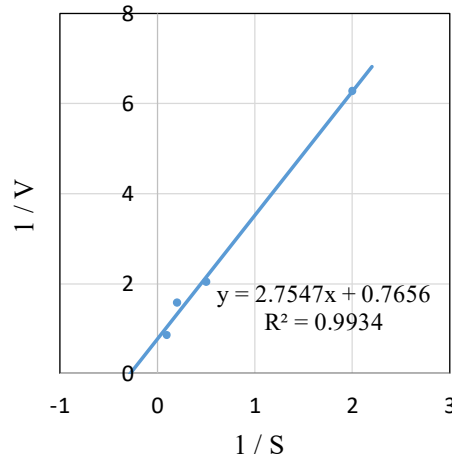


図5 Lineweaver-Burk プロット

図6はBG-mutとメイセラージェ(市販酵素: *Trichoderma viride* 由来, 224 FPU/g, β -glucosidase activity: 264 IU/g)によってセロビオースを酵素加水分解した時の V_{max} と K_m の比較を示す。BG-mutによる糖化では温度の増加にともない V_{max} と K_m も増加した。また、培養 50°Cにおける、BG-mutの V_{max} はメイセラージェの V_{max} より約10倍高い値であった。さらに、 K_m についてはメイセラージェよりBG-mutが低い値となった。それゆえ、培養温度 50°Cにおいては、メイセラージェよりBG-mutの方が基質と結合しやすく酵素加水分解が迅速に行われることがわかった。今後はEGやCBHについても反応速度論的解析をし、3種の耐熱性酵素を用いる最適な酵素加水分解条件を決定するとともに酵素糖化液を用いて効率的なバイオ燃料(バイオエタノールやバイオメタン)生産について研究する予定である。

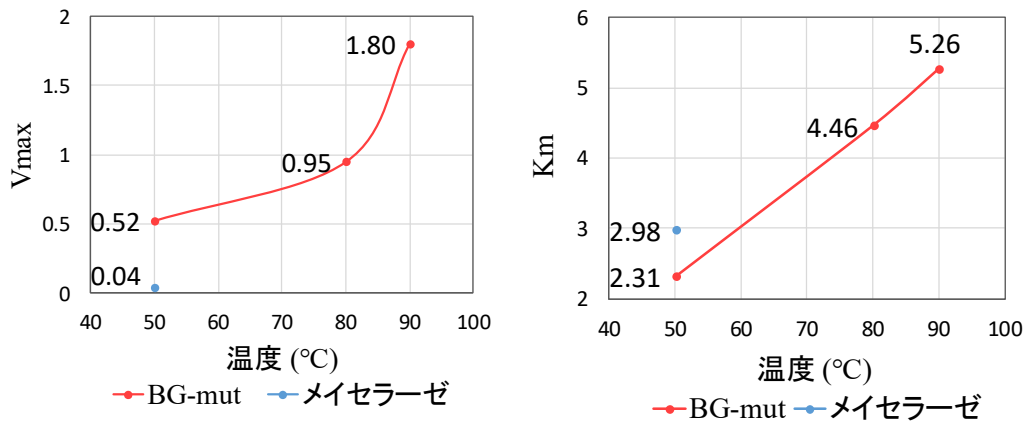


図6 BG-mutとメイセラージェ(市販酵素)の V_{max} と K_m の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki Akihiro, Sasaki Chizuru, Asada Chikako, Nakamura Yoshitoshi	4. 巻 194
2. 論文標題 Production of cellulose nanofibers from Aspen and Bode chopsticks using a high temperature and high pressure steam treatment combined with milling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Carbohydrate Polymers	6. 最初と最後の頁 303 ~ 310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carbpol.2018.04.047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuji Akihiko, Yuasa Keizo, Asada Chikako	4. 巻 13
2. 論文標題 Cellulose-binding activity of a 21-kDa endo-B-1,4-glucanase lacking cellulose-binding domain and its synergy with other cellulases in the digestive fluid of <i>Aplysia kurodai</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0205915	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asada C., Sasaki C., Suzuki A., Nakamura Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Total Biorefinery Process of Lignocellulosic Waste Using Steam Explosion Followed by Water and Acetone Extractions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Waste and Biomass Valorization	6. 最初と最後の頁 2423 ~ 2432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12649-017-0157-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asada Chikako, Sasaki Chizuru, Nakamura Yoshitoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 High Concentration Ethanol Production from Mixed Softwood Sawdust Waste	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Waste and Biomass Valorization	6. 最初と最後の頁 433 ~ 439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.1007/s12649-017-0073-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 C. Asada, C. Sasaki, Y. Nakamura
2. 発表標題 Renewable Resource-Based Material Synthesized from Lignocellulosic Biomass
3. 学会等名 12th World Congress on Biofuels and Bioenergy & 13th Global Summit and Expo on Biomass and Bioenergy, Zurich (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅田元子
2. 発表標題 環境低負荷プロセスによる木質バイオマスからのバイオフューエルとバイオマテリアルの製造
3. 学会等名 日本薬剤学会第1回超分子薬剤学FGシンポジウム（熊本大学）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高田弥生、浅田元子、佐々木千鶴、中村嘉利
2. 発表標題 バイオマスへの応用を考慮した耐熱性セルラーゼ利用のための酵素カクテルの相乗効果検討
3. 学会等名 第9回日本醸造学会 若手シンポジウム，東京
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 妹尾政都、浅田元子、佐々木千鶴、中村嘉利
2. 発表標題 ファルカタを原料としたバイオエタノール製造のための水蒸気爆砕前処理の最適条件の検討
3. 学会等名 第9回日本醸造学会 若手シンポジウム，東京
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤井萌、浅田元子、佐々木千鶴、中村嘉利
2. 発表標題 バイオエタノール残渣となるモデルリグニンをを用いたエポキシ樹脂合成の抽出溶媒検討
3. 学会等名 第9回日本醸造学会 若手シンポジウム, 東京
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浅田元子
2. 発表標題 木材構成成分の分離回収と有効利用
3. 学会等名 化学工学会第82年会(芝浦工業大学豊洲キャンパス)(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浅田元子
2. 発表標題 徳島県産間伐材を有効利用するための総合プロセス開発
3. 学会等名 日本生物工学会生物資源を活用した地域創生研究部会シンポジウム(大阪大学吹田キャンパス)(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuta Danura, Chikako Asada, Chizuru Sasaki, Yoshitoshi Nakamura
2. 発表標題 Comparison of steam explosion and steaming followed by milling treatment for bioethanol production from woody biomass
3. 学会等名 13th International Conference on Ecomaterials(国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----