

平成21年3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19560779
 研究課題名（和文） 微生物由来エチレン生成酵素の耐熱化と都市下水余剰汚泥からのエチレン生産への応用
 研究課題名（英文） Improvement of the stability of the microbial ethylene-forming enzyme and application to ethylene production from municipal sewage excess sludge.
 研究代表者
 長濱 一弘 (NAGAHAMA KAZUHIRO)
 崇城大学・生物生命学部 准教授
 研究者番号：50248605

研究成果の概要：2-オキシグルタル酸（2-OG）からエチレンとコハク酸を2：1に作る新規な酵素、エチレン生成酵素（EFE）をコードする遺伝子を *Pseudomonas putida* AC10 中で発現させ、合成培地を用いた連続培養を行い、希釈率が 0.25hr^{-1} 以降では約 $60\text{ml}/1/\text{d}$ のエチレン比生成速度を得た。都市下水余剰汚泥を培地として用いるための前処理方法の検討を行い、 60°C 、1hr 加熱処理が有効であった。EFE の反応最適温度が 30°C と低いため、前処理汚泥から直接エチレン生産を行うために、EFE の耐熱化実験を試みた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：エチレン、都市下水余剰汚泥、耐熱化

1. 研究開始当初の背景

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* PK2 由来のエチレン生成酵素遺伝子 (*efe*) を異種微生物に組み込み発現させることで各種バイオマスよりエチレン生産システムを構築することを目的として実験を行っている。炭酸ガスをバイオマスとした場合、宿主にラン藻を用い、そのほかの有機系廃棄物用の宿主としては *P. syringae* pv. *phaseolicola* PK2 が植物病原菌であり雑食性に乏しいと思われたため、大腸菌、光合成細

菌、*Pseudomonas putida* AC10 株に *efe* を導入し (*P. putida* AC10 (pMEFE))、各種組み換え菌株を作成した。今回利用するバイオマスとして選択した下水処理場から大量に発生する都市下水余剰汚泥（以下、余剰汚泥とする）は近年増加の一途を辿っており、その効果的な処理技術の開発が切望されている。一般的な有機性廃水の処理方法である活性汚泥法の処理結果として生じる余剰汚泥は、主として廃水処理時に増殖した微生物からなる。濃縮余剰汚泥は年間約 8 千 500 万トン

(乾物換算で約 170 万トン) 発生しているバイオマスである。そのリサイクル率は 33% であり脱水汚泥後、堆肥化されたりセメント原料に、またレンガやブロック、タイルなどの製造に用いられたりしている。また 4 割弱は焼却を経て埋め立て処分されているが、焼却に伴う有害物質の発生、埋め立てスペース確保の困難さと同時に浸出水による新たな汚濁発生など、避けて通れない解決すべき問題点が非常に多く、各種の再利用技術や汚泥の発生量そのものを削除する技術開発が行われている。

2. 研究の目的

上記背景に基づき、研究の目的に以下の 3 点を定めた。(1) 合成培地を用いて *P. putida* AC10 (pMEFE) 株のエチレン生成能を検討する、(2) 活性汚泥を 70°C で 1 時間処理することで汚泥が 20~30% 分解され、汚泥中にその際生じるポリリン酸を回収し、肥料などにリサイクルする方法が開発されている。そこで余剰汚泥に熱処理と酵素反応を組み合わせ可溶化法の検討を行い、組み換え菌株を用いてエチレン生成を検討する、(3) 最適反応温度が 30°C である EFE の耐熱性を高めるため *Thermus thermophilus* を宿主として in vivo での耐熱進化を試みる。なお、図 1 に *P. putida* AC10 (pMEFE) のエチレン生成の概略を示した。

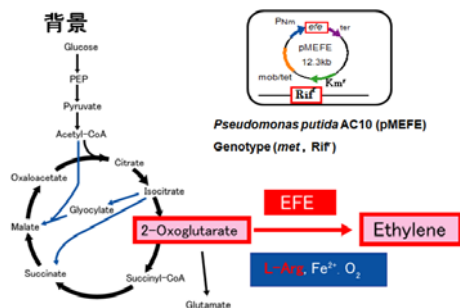


図 1. 組み換え *Pseudomonas putida* AC10 株を利用したエチレン生成

3. 研究の方法

熱処理汚泥培地作成：100ml 容三角フラスコに濃縮余剰汚泥 6.67g、脱イオン水 5.47ml、合成培地 (A)、(B) をそれぞれ 3.33ml、鉄溶液 0.2ml、2g/l L-メチオニン溶液を 1.0ml 添加し、3 倍希釈余剰汚泥 20ml とした。そして種々の温度のインキュベーターで処理し、加熱処理汚泥培地とした。酵素処理汚泥培地は 100ml 容三角フラスコに濃縮余剰汚泥 6.67g、鉄溶液 0.2ml、セルラーゼ SS (ナガセケムテック (株)) を 1% になるように添加し、12.14ml 容の 3 倍希釈余剰汚泥を調整した。この 3 倍希釈余剰汚泥を種々の温度で 3hr インキュベ

ート後、(A)、(B) 液を各々 3.33ml 添加、全量を 20ml に調整し、これを 1% 酵素処理汚泥培地とした。

エッペンドルフチューブに種々の前処理汚泥培地 1ml、終濃度 50 μ g/ml Km と終濃度 25 μ g/ml Rif になるように添加した。よく混合した後、その混合溶液を 18 ϕ (13ml 容) または 24 ϕ (34ml 容) 試験管に 100 μ l ずつ分注した。*P. putida* (pMEFE) のシングルコロニーをかきとり、菌体懸濁液の終濃度が OD₆₁₀ で 1 \pm 0.1 になるように滅菌水で調整した溶液を菌体溶液として用いた。先ほどの試験管に OD 調整済み菌体懸濁液 10 μ l を植菌し 24 時間、30°C でシール培養を行い、24 時間後、試験管の気相部をガスクロで測定した。エチレン生成速度は Table 3 に従って求めた。またジャーファメンターの場合は排気口からガスを直接サンプリングし、Table 4 の式でエチレン生成速度を求めた。エチレンへの炭素収率 ($Y_{E/S}$) は $Y_{E/S} (\%) = \{ (\text{エチレン生成速度 (ml/l 培養液/hr)} \times 1/22.4 \times 24 \times 10^{-3}) / (1 - \text{残存グルコース濃度 (g/l)} \times (1/180) \times 72 \times \text{希釈率 (D)}) \} \times 100$ で求めた。

CODMn MLSS の求め方は常法に従い、グルコース濃度はグルコーステストワコーを使用した。

Table 1 無機塩合成培地組成

NH ₄ Cl	1.0 g/l	(A)
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g/l	
NaHCO ₃	0.5 g/l	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.02 g/l	
A5 solution+Co (Table 2)	1.0 ml/l	
Na ₂ HPO ₄	7.4 g/l	(B)
KH ₂ PO ₄ (pH 7.8~8.2)	0.5 g/l	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.02 g/l	

Table 2 A5 solution+Co の組成 (g/l)

H ₃ BO ₃	32.86
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.22
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.08
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.39
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.049

Table 3 In vivo エチレン生成活性の計算式

$$v = A/94299 \times (Z-X) \times 1/Y \times 1/W \times 1/T$$

v : ethylene-forming activity (nl ethylene/ml culture/min)

A : AREA
Z : Total volume of the test tube (ml)
X : Volume of culture broth (ml)
Y : Sampling volume of gas (ml)
W : Volume of culture broth (ml)
T : Incubation time (min)

Table4 ジャーファーメンター使用時のエチレン生成活性の計算式

$$v = (A/94299) \times X \times 1/Y \times 1/W$$

v : ethylene-forming rate (nl ethylene/ml culture/hr)
 A : AREA
 X : Aeration rate (ml/hr)
 Y : Sampling volume of gas (ml)
 W : Volume of culture broth (ml)

4. 研究成果

(1) 合成培地を用いた *P. putida* AC10 (pMEFE) 株のエチレン生成能の検討

終濃度 L-メチオニン 100mg/l、グルコース 10 g/l 含有完全合成培地を用いて、エチレンの生成を検討した結果を Fig2 に示した。培養の条件として実容量 (1ℓ)、通气速度 (1vvm)、攪拌速度 (300rpm)、培養温度 (28℃) で行った。前培養は完全合成培地で行い、2%植菌で行った。

Fig2 よりエチレンの生産が 2 段階から成り立っていることが示された。最初のピークでは、菌の増殖と連動してエチレンを生産し、後者のピークでは、グルコースが完全に消費されていることから、増殖の過程で生じた酢酸等の消費でエチレンが生成したと考えられた。30 時間培養してエチレンの蓄積量は 23.2ml/l 培養液であり、炭素収率は 0.62% であった。

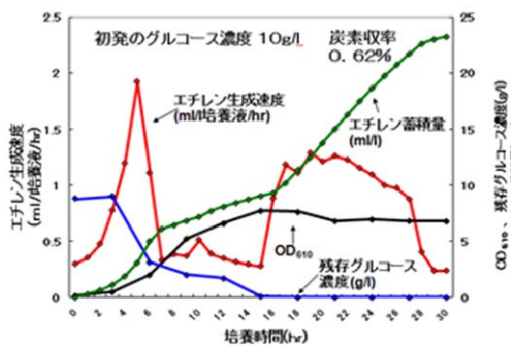


図2 *P.putida* AC10(pMEFE)の合成培地を用いた回分培養

次に L-メチオニンを 100mg/l 添加したグルコース 1 g/l 含有完全合成培地を用いての連続培養の結果を Fig3 に示した。培養の条件として実容量 (1ℓ)、通气速度 (1vvm)、攪拌速度 (300rpm)、培養温度 (28℃) で行った。前培養は 2%植菌で行った。

この連続培養は、完全にグルコースが増殖に使われており、グルコース制限ケモスタット連続培養となっていた。菌体の OD₆₁₀ はどの希釈率 D でも OD₆₁₀=1 前後とほぼ一定の値を示した。

エチレンの生成速度は、D=0.25hr⁻¹ までは、D に正相関した形を示しており、それ以降の D ではある一定の値を示し、その値は約

2.5ml/l 培養液/hr(60ml/l/day)であった。

エチレン生成速度を OD₆₁₀ で割った値を ρ とすると、 ρ はエチレンの生成速度と同じ形を示した。炭素収率は D が低いほど高く、D が高くなるにつれて次第に減少していった。D=0.037hr⁻¹ の時、炭素収率は最高で 4.3% であった。

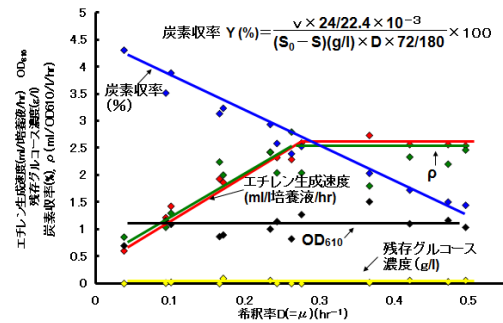


図3 連続培養における希釈率(D)のエチレン生産への影響

(2) エチレン生産のための汚泥濃度の最適化と余剰汚泥可溶化のための前処理法の検討

培地中の汚泥濃度(MLSS)を 0、5.25、10.5、14、21 g/l としてエチレン生成の比較を行った結果を図 4 に示した。反応時間は 60℃、3hr で酵素処理と熱処理を同時に行い、培養条件は、1%酵素処理+熱処理、2%酵素処理+熱処理、熱処理そして未処理の 4 種類で行った。

酵素処理した汚泥培地のエチレン生産量は、SS=14 g/l 付近からグラフの傾きが、少し緩やかになった。この結果からエチレン生成に用いる汚泥濃度は 14g/l を選択した。

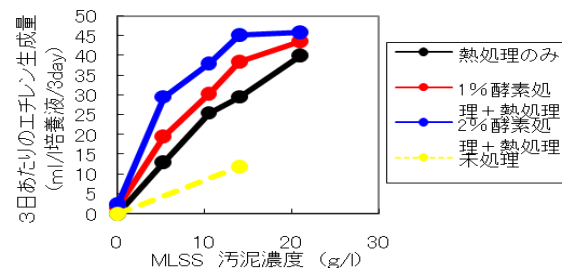


図4 培地中の汚泥濃度とエチレン生産

セルラーゼ SS を用いての酵素処理によるエチレンの生成量の比較を行った結果を図 5 に示した。酵素の処理は 1%処理、2%処理、未処理とし、60℃、3hr で熱処理と同時に行った。今回用いた酵素(セルラーゼ SS)からは、エチレンの生成はほとんどみられなかった。酵素未処理のエチレンの生成量を 100%とすると、1%酵素処理では 130%、2%酵素処理では 153%となった。よって酵素処理によって約 30%~50%のエチレン生産の伸びを確

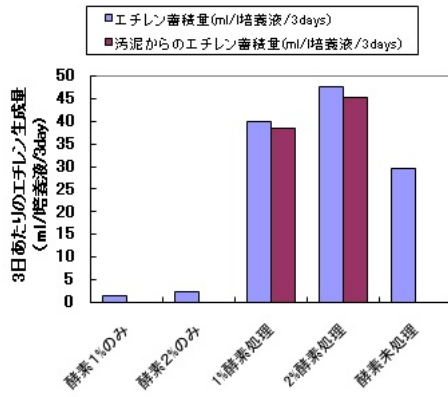


図5 エチレン生産に及ぼす酵素処理

認できた。汚泥からエチレンへの炭素収率は、酵素未処理で0.56%、1%酵素処理で0.74%、2%酵素処理では0.86%となった。

(3) EFE の in vivo 耐熱化

60°Cで組換え微生物を培養して汚泥から直接エチレン生産を行うために、EFEの耐熱化実験を行った。好熱菌 *Thermus thermophilus* の2-オキシグルタル酸-NAD酸化還元酵素の遺伝子 (*sucA*) を破壊した *sucA* 株を作成するために、*sucA* 破壊プラスミド pMOSBlue/*sucA*/*Pleu-PyrE-efe-kan* を作成した。

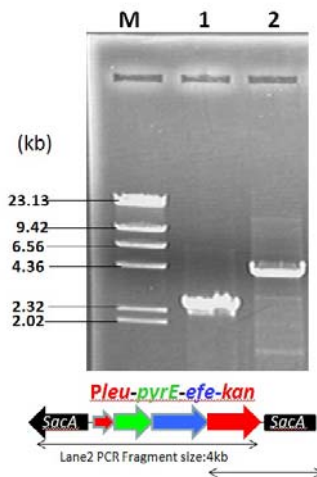
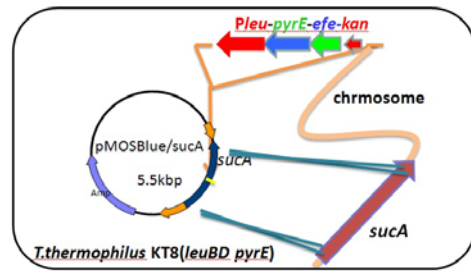


図6 *sucA*破壊プラスミドの挿入断片の方向の確認

得られたプラスミドに挿入断片がどの向きで入ったかを確認するためにPCR解析を行い、得られた結果を図6に示した。この結果より、得られたプラスミドでは *Pleu-PyrE-efe-kan*断片が *sucA*の転写方向に対して逆方向に挿入されていることが確認された。

現在得られたプラスミドを用いて *Thermus thermophilus* KT8 (*leuBD, pyrE*) の形質転換を試みている。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

① 発表者: 長濱一弘

発表表題: in vivo 進化法を利用した細菌由来エチレン生成酵素の耐熱化

学会等名: 第22回熊本県産学官技術交流会

発表年月日: 平成20年1月22日

発表場所: 熊本テルサ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平成19年度: 小川 隆平 (OGAWA TAKAHIRA)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号: 40029244

平成20年度: 長濱 一弘 (NAGAHAMA

KAZUHIRO)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号: 50248605

(2) 研究分担者

平成19年度:

松岡 正佳 (MATUOKA MASAYOSHI)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号: 10121667

長濱 一弘 (NAGAHAMA KAZUHIRO)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号: 50248605

平成20年度: なし

(3) 連携研究者

平成19年度: なし

平成20年度: 松岡 正佳 (MATUOKA

MASAYOSHI)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号: 10121667