

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34416  
 研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21360403  
 研究課題名（和文）  
 リグニン分解能を有するバクテリアによるセルロース系バイオマスの生物的前処理  
 研究課題名（英文）  
 Delignification of cellulosic biomass by a bacterium  
 研究代表者  
 片倉 啓雄（KATAKURA YOSHIO）  
 関西大学・化学生命工学部・教授  
 研究者番号：50263207

## 研究成果の概要（和文）：

*Ureibacillus thermosphaericus* による生物的脱リグニンを行うために、まず、*Thermobifida fsuca* の Cel9B の cellulose binding domain を用いて、糖化率と高く相関する脱リグニン効果を迅速に評価する方法を確立した。本菌はリグニン分解に関与する酵素として、Mn-peroxidase、Cu-amine oxidase などをもっていた。本菌は7種のアミノ酸、2種のビタミンおよび無機塩からなる培地で培養することができ、グルタミン酸を添加しながら培養することによってリグニン分解酵素を継続的に生産させることができた。

## 研究成果の概要（英文）：

To establish biological delignification of biomass by *Ureibacillus thermosphaericus*, a rapid method evaluating the degree of delignification using cellulose binding domain from *Thermobifida fsuca* Cel9B was developed. This bacterium was found to produce Mn-peroxidase and Cu-amine oxidase. It was possible to produce these enzymes by cultivating this bacterium in a synthetic medium containing seven amino acids and two vitamins.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

## 研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオ生産プロセス、リグノセルロース

## 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化を遅らせ、化石資源を温存するため、バイオマスの積極的な利用は急務であ

るが、食糧と競合しないリグノセルロース性バイオマスを糖化してエタノールや乳酸などの有用物質に変換するには、その表面を覆

うリグニン層を除去しなければならない。これまでに、爆砕、ダイノミルなどの物理的方法、酸・アルカリあるいは亜臨界水などを用いた化学的方法が開発され、満足のいくレベルの糖化率を達成することができているが、高価な設備が必要で投入エネルギーが大きく、発酵阻害物が生成するという課題が解決できていない<sup>1)</sup>。腐朽菌を用いた生物的方法は、環境負荷も小さく低コストであるが、月単位の時間を要し、糖の歩留まりが低いという問題を残している<sup>1)</sup>。

申請者らは、富栄養化した湖沼の栄養塩を吸収させた水生植物をコンポスト化して農地に還元する研究において、コンポストから単離した好熱性桿菌 *Ureibacillus thermosphaericus*<sup>2)</sup> と好熱性放線菌 *Thermobifida fusca* によってプロセスを再構成し、水生植物のセルロースとヘミセルロースをほぼ完全に分解することに成功した。*T. fusca* は強いセルロース分解能を持つものの単独では水性植物をほとんど分解できないのに対して、*U. thermosphaericus* はセルラーゼを持たず、糖を全く資化しないが、リグニン分解活性を持ち、リグニンを分解することによって *T. fusca* によるセルロース分解を助けていると考えられる。実際に、水生植物およびコーンコブを *U. thermosphaericus* で処理するとリグニン層が除去され、セルロースのマイクロフィブリル構造が露出することを走査型電子顕微鏡観察で確認している。

上述のように、*U. thermosphaericus* はリグニン分解能をもち、コーンコブのリグニンを分解し、セルラーゼによる糖化率を向上させることができるが、その活性は弱く、コーンコブに対して乾燥重量として 1/10 もの菌体が必要であった。また、脱リグニンの効果はこれまで、試料を 2~3 日かけてセルラーゼで消化して糖化率を測定することによって評価しており、多数の検体について迅速に糖化率を評価する方法が望まれている。

## 2. 研究の目的

脱リグニンの効果は、単位バイオマス重量あたりのセルロースの露出度と相関すると考えられる。

そこでまず、*T. fusca* の Cel9B の cellulose binding domain (CBD) を蛍光標識し、その単位バイオマスあたりの結合量を測定することにより、脱リグニンによる糖化率の上昇を迅速に評価する方法を検討する。

次に、*U. thermosphaericus* が生産するリグニン分解酵素を特定し、その誘導および抑制条件を明らかにする。

さらに、リグニン分解活性を高める培養条件を明らかにすることにより、本菌による脱リグニン効率を向上させ、リグノセルロースを生物的に低コストで迅速に前処理するプ

ロセスを開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) 菌株、培地、材料

*U. thermosphaericus* NCIMB 13819 を triptic soy 培地 (Becton and Dickinson Company, TS 培地) またはカザミノ酸培地 (Casamino acid 18 g, biotin 0.1 mg, thiamine HCl 0.4 mg, NaCl 5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 50 mg, MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.38 mg, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 7.5 mg, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.5 mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.7 mg, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 0.17 mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.75 mg, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.1 mg in 1 L, pH 8.0) を用い、50°C で培養した。市販の飼料用コーンコブ (トウモロコシの穂軸) を、乾燥状態のまま家庭用ミキサーで粉碎し、ふるいにかけて粒径を 2 mm 以下とした。

### (2) コーンコブの生物的脱リグニン

50 mL 容のプラスチックチューブにコーンコブ 2 g を入れ、水道水で含水率が約 60% になるように調整し、シリコ栓をしてオートクレーブ滅菌した。50 mM NaOH を用いて pH を約 7 に調整した後、*U. thermosphaericus* を播種し、50°C で処理した。24 時間毎に、含水率が 60% を下回らないよう滅菌水を添加し、同時に、葉さじで攪拌して反応器内を均一するとともに好氣的に保った。

### (3) リグニン分解酵素活性の測定

90 mM guaiacol, 2 mM pyrogallol または 5 mM caffeic acid を基質として、50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1 mM MnSO<sub>4</sub> を含む 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 中で 50°C で反応させ、それぞれ、470 nm, 430 nm, または 420 nm で反応生成物による吸光度の増加で測定した。

### (4) 活性染色

Native PAGE を行ったゲルを(2)の酵素活性と同一組成の反応液中に入れ、室温で適当な時間インキュベートして発色させた。

### (5) 蛍光標識 CBD の調製

*T. fusca* の染色体 DNA を鋳型として、5'-tctctg aattcctcctgcgcggtgacgtaccagacca と 5'-tagccgaagct tgccgatggagcagaccgcgcgcttgac をもちいて PCR 反応を行い、endoglucanase E1 (Cel9B)<sup>3)</sup> 遺伝子を増幅した。HindIII と EcoRI で消化した後、同酵素で消化した pET21a (Novagen) に連結し、大腸菌 TG1 株に導入した。抽出したプラスミドの挿入配列の塩基配列を確認した後、大腸菌 BL21 株に導入し、100 µg/mL のカルベニシリンを含む 100 mL の LB 培地 (0.5% 酵母エキス、1% トリプトン、0.5% NaCl) を用いて OD<sub>660</sub>=2 まで 37°C で培養した後、終濃度として 0.5 mM の isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside を加え、その後、1 時間おきに 20% 酵母エキスを 2 mL 添加して 5 時間培養した。遠心分離によって菌体を集め、超音波破碎し、Ni-NTA supper flow BioRobot (Qiagen) を用いて His-tag が付加された CBD を精製した。PBS

(20 mM Na-phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4) に対して透析した CBD に、2 当量の N-hydroxy succinimidyl fluorescein (Pierce) を加えて 37°C で 2 時間反応させ、1/100 容の 1 M Tris-HCl (pH 7.4) を加えてクエンチした後、PBS に対して透析した。

(6) 蛍光標識 CBD 結合量の測定

乾燥重量として 20 mg の試料に対して 0.8 mg/mL の蛍光標識 CBD (F-CBD) 溶液を 0.1 mL 加えて 27°C で 90 分反応させた。遠心分離によって PBS で 5 回洗浄した後、0.2% SDS を含む PBS を加えて、結合している F-CBD を回収し、NHS-fluorescein を標準として結合 CBD 量を求めた。

(7) 全糖量

乾燥重量として 0.5 g 試料に 72% (w/w) 硫酸 8 mL を加えてガラス棒で細かく砕き、室温で 2 時間反応させた後、200 mL の蒸留水を加えて 121°C で 60 分オートクレーブした。放冷後遠心分離した上清を適当に希釈し、グルコースを標準としてフェノール硫酸法で全糖量を測定した。

(8) 糖化率

試料 0.2 g (乾燥重量) を 8 units のメイセラゼ (明治) とトルエン 100  $\mu$ L を含む 10 mL の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) 中で 50°C, 48 時間処理し、遠心分離した上清の還元糖をフェノール硫酸法で測定した。

(9) 亜塩素酸による脱リグニン

乾燥させた試料 0.5 g を水 30 mL に懸濁し、亜塩素酸ナトリウム 0.2 g、酢酸 40  $\mu$ L を加え、80°C で 20 分~180 分反応させた。秤量済のガラス繊維ろ紙で吸引ろ過し、脱イオン水とアセトンで洗浄して乾燥させ、秤量してリグニン減少量を求めた。

(10) その他の分析

アミノ酸は、内部標準としてノルロイシンを加えて phenylisothiocyanate で標識し、逆相 HPLC で分離して定量した。タンパク質は BCA 法で、グルタミン酸はオキシダーゼを用いた酵素法で定量した。

4. 研究成果

(1) CBD を用いた脱リグニンの評価

1) 組換え CBD の性質

*T. fusca* の endoglucanase E1 (Cel9B) の CBD を PCR で大腸菌にクローニングし、His-tag を付加して発現させ、ニッケルキレートクロマトグラフィーで精製した。Fluorescein で蛍光標識した CBD は、リグニンに対する有意な吸着はなく、pH 7.4, 27°C における濾紙に対する吸着定数を求めたところ  $1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  であり、*Trichoderma reesei* などの CBD とほぼ同等の同じ値であった。また、解離速度定数は  $9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  であり、セルロース露出度を評価するためには十分に低い値をもっていた。

2) リグニン除去量と CBD 結合量の関係

亜塩素酸の処理時間を変えて、様々な脱リグニン度合いのコーンコブを調製した。単位重量のコーンコブから除去されたリグニン量と F-CBD の結合量の関係を示したのが図 1 であり、ある程度脱リグニンが進まないと F-CBD 量は増加しないことがわかる。また、酵素糖化率は単位バイオマスあたりの F-CBD 結合量と高く相関し (図 2)、脱リグニンの程度を迅速に評価する指標となることがわかった。

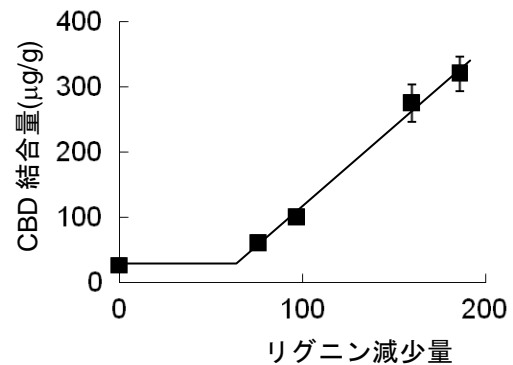


図 1. 脱リグニン度合いと CBD 結合量の関係 (エラーバーは標準偏差(n=3))

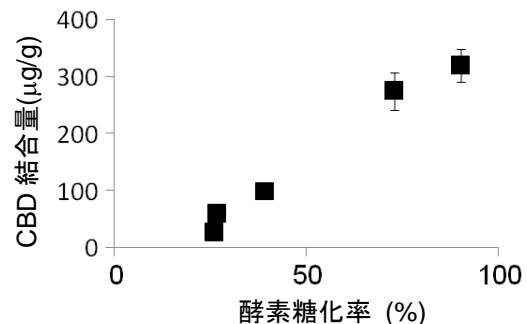


図 2. 酵素糖化率と CBD 結合量の関係 (エラーバーは標準偏差(n=3))

(3) 分泌タンパク質の同定

リグニン分解に関与する酵素は分泌タンパク質であると考えられるので、まず、本菌が分泌する主要なタンパク質を二次元電気泳動で分離して同定した。TS 培地で前培養した本菌をアミノ酸培地で 22 時間培養し、遠心分離した上清を 10000 カットの限外濾過膜で濃縮した後、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で透析した。pH 4-7 の Immobiline DryStrip (GE Healthcare 社) を用いて二次元電気泳動を行い、Coomassie brilliant blue で染色した (図 3)。

主要なスポットを切り出してトリプシン消化し、ペプチドフィンガープリントによって同定したところ、スポット 1~3 はどれも copper amine oxidase N-terminal domain を有し、*Lysinibacillus sphaericus* の copper amine

oxidase like protein と 97% の相同性があった。スポット 7 も *Clostridium thermocellum* および *Bacillus* sp. の copper amine oxidase like protein とそれぞれ 83% および 97% の相同性を有していた。スポット 4 および 6 は、それぞれ serine protease 前駆体および *N*-acetylglucosaminidase と、スポット 5, 8, 9, 10 はいずれも S-layer protein と推定された。

次に、リグニン基本骨格と類似の構造を持つ各種低分子化合物について、本菌の培養上清が反応性を示すかどうかを検討したところ、guaiacol、caffeic acid および pyrogallol について呈色が認められた。そこで、これらを

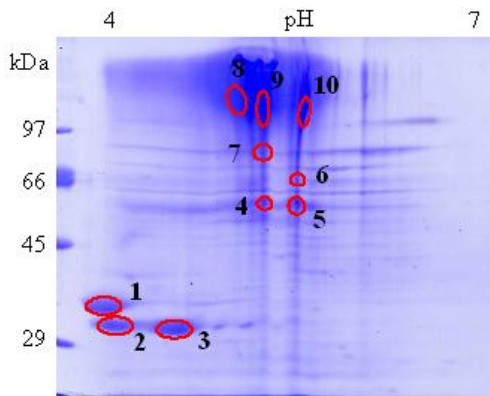


図3 培養上清の二次元電気泳動

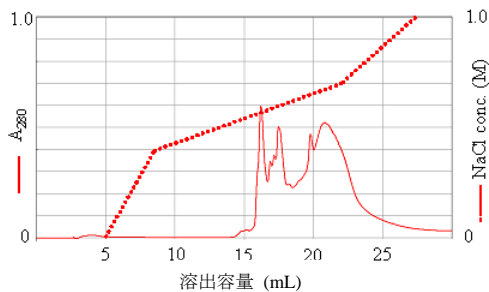


図4 陰イオン交換クロマトグラフィー DEAE 5PW (7.5 mm×7.5 cm, Tosho), 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mL/min

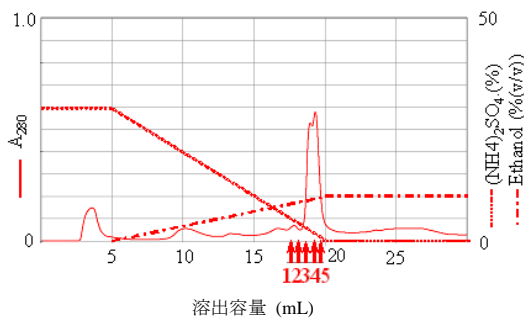


図5 疎水クロマトグラフィー Phenyl 5PW (7.5 mm×7.5 cm, Tosho), 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mL/min

基質とする酵素の分画、単離を試みた。まず、陰イオンクロマトグラフィーで分画したところ (図4)、溶出容量 14~16 mL の画分に guaiacol をわずかに呈色させる活性が、16~18 mL に caffeic acid および pyrogallol を呈色させる活性が認められた。後者の画分を回収し、さらに疎水クロマトグラフィーで分画したところ (図5)、caffeic acid および pyrogallol を呈色させる活性は図中の 1~5 の画分に認められた。これらの画分について native PAGE で展開して caffeic acid および pyrogallol を基質として活性染色したところ、同じ染色パターンを示した (図6)。そこで、移動度が異なる図6の1および2のバンドを切り出してペプチドフィンガープリントをデータベースで検索したところ、1は機能未知のタンパク質であったが、2は catalase と同定された。

陰イオンクロマトグラフィーの溶出容量 14~16 mL の画分に含まれる guaiacol を呈色させる活性についても、native PAGE で分離し、同定したところ、図6の1のバンドと同一のタンパク質であった。

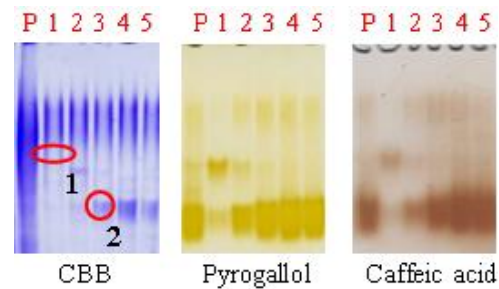


図6 活性染色

1~5は図5の番号に対応する。Pは分画前の試料。

以上のことから、*U. thermosphaericus* はリグニン分解に関与するタンパク質として、少なくとも、copper amine oxidase、catalase、および、caffeic acid および pyrogallol を呈色させる機能未知のタンパク質の計3種を生産していると考えられる。

#### (4) リグニン分解酵素の誘導・抑制条件

*U. thermosphaericus* は糖を全く資化しないので、カザミノを炭素源として培養するが、対数増殖期にはリグニン分解酵素は生産しない。即ち、カザミノ酸に含まれる何れかのアミノ酸がその生産を抑制していると考えられる。そこでまず、カザミノ酸と同じ組成のアミノ酸混合液を作製し、増殖およびリグニン分解酵素 (ここでは caffeic acid を基質として測定) の生産に必要なアミノ酸を特定した。オミSSIONテストの結果、本菌は、Glu (2.86)、Pro (1.44)、Asp (0.43)、Met (0.25)、Ile (0.72)、Leu (0.90)、Val (1.01) の7種類のアミノ酸を添加すれば (括弧内は終濃度 (g/L))、

カザミノ酸を用いた場合とほぼ同じ増殖とリグニン分解酵素生産を行うことがわかった。

カザミノ酸をこれらの7種のアミノ酸に置き換えた培地に本菌を植菌して 50°C で好氣的に培養すると、約 12 時間後にリグニン分解酵素の生産が始まった。そこで、7 種類のアミノ酸それぞれについて、培養開始 12 時間後に、初発と同じ量を添加し、24 時間後のリグニン分解酵素活性を調べた (図 7)。その結果、Asp, Met, Ile, Leu の添加は MnP 活性を低下させたが、Glu および Pro の添加は活性を高めた。そこで、Glu および Pro について、12 時間目に添加する濃度が 24 時間目の MnP 活性に及ぼす影響を検討した (図 8)。その結果、Pro は 20 mM 以上を添加すると 24 時間後の MnP 活性が低下したが、Glu については 80 mM 以下の添加で活性が増加した。

(5) Glu の添加が MnP 活性に及ぼす影響

アミノ酸培地での培養において、Glu の添加が MnP 活性に及ぼす影響を検討した。無添加の場合、MnP 活性は 33 時間後に約 4 units/mL のピークに達するのに対して、12 時間後に Glu を 80 mM 添加すると、MnP 活性は 42 時間まで増加を続け、約 7 units/mL に達した。12 時間以降、3 時間ごとに Glu 濃度を測定して 80 mM を保った場合、MnP 活性は 48 時間後も増加を続け、約 12 units/mL に達した。

(6) コーンコブの脱リグニン処理

以上のことから、Glu の添加が MnP 活性を

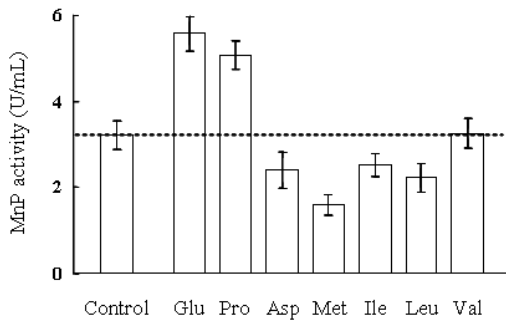


図 7 アミノ酸添加による MnP 活性の変化

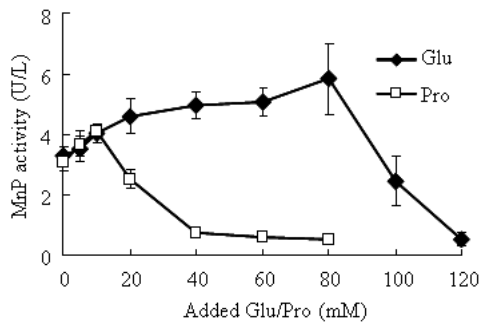


図 8 Glu および Pro の添加濃度の影響

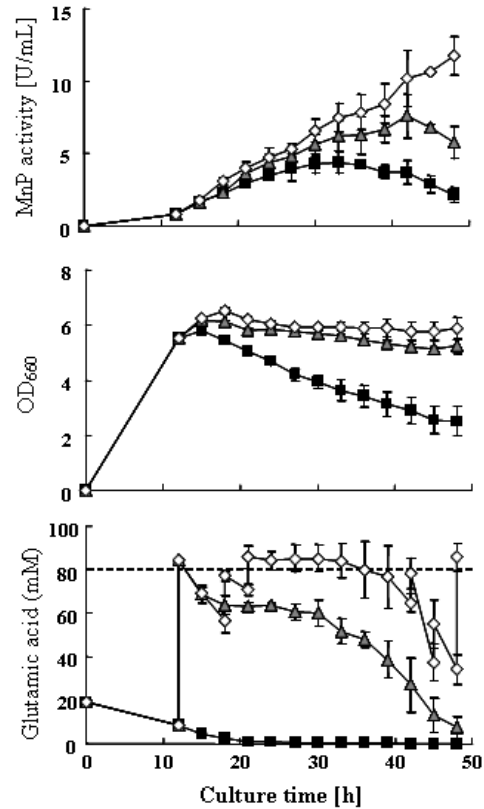


図 9 MnP 活性の経時変化

■, 無添加; ▲, 12 時間後に Glu を 80 mM 添加; ◇, 12 時間目以降 3 時間毎に Glu を 80 mM とするよう添加

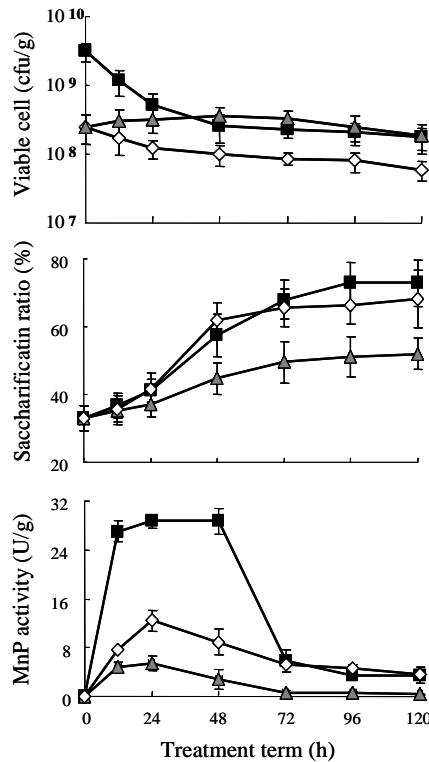


図 10 コーンコブの脱リグニン経過

■, ▲, ◇はそれぞれ乾燥重量比 1/10, 1/100, 1/100 の菌体を添加; ◇は 12 時間毎に Glu を 80 mM 添加

高めることがわかったので、本菌によるコーンコブの脱リグニン反応において、Glu の添加を検討した。その結果、コーンコブに対して乾燥重量比で 1/10 の菌体を播種した場合、120 時間後の糖化率は 72%まで上昇したものの、生菌数が初期の約 1/20 まで減少した。播種量を 1/100 とすると、120 時間後の糖化率は 53%にとどまり、生菌数も低下した。これに対して、12 時間毎にグルタミン酸を添加した場合、生菌数が維持されただけでなく、従来の 1/10 の播種量、つまりコーンコブの 1/100 量の播種にも関わらず、従来の播種量と同等の糖化率まで上昇した。

以上、まとめると、

1. *Thermobifida fusca* の Cel9B の cellulose binding domain を蛍光標識し、単位バイオマスあたりの結合量を測定すれば、酵素糖化率と高く相関し、脱リグニンの効果を迅速に評価する指標となることを明らかにした。
2. *Ureibacillus thermosphaericus* が生産するリグニン分解に関与する酵素として、copper amine oxidase、catalase、及び、機能未知であるが、caffeic acid を呈色させるタンパク質を同定した。
3. *U. thermosphaericus* の迅速な培養に必要なアミノ酸は Glu、Pro、Asp、Met、Ile、Leu、Val の 7 種であり、Glu を補いながら培養すれば、リグニン分解活性を高めることができ、コーンコブの脱リグニンに必要な菌体播種量を 1/10 に削減することができた。

本研究は、バクテリアによる迅速な生物的脱リグニンに関する初めての報告である。今後、さらにリグニン分解酵素の生産性を高めるとともに、最終的な糖化率をさらに高めるため、ペクチナーゼなどの補助酵素の使用や、本研究で同定した oxidase 類によって生成する酸化力をリグニンにより効率的に伝えるメディエーターを探索して増強あるいは添加することにより、省エネ低コストの生物的脱リグニンプロセスを確立させたい。

文献

- 1) Sun Y. and Cheng J, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Biores. Technol.* 83, 1-11 (2002)
- 2) Gagné, M. *et al.*, Phenotypic and genotypic characterization of esterase-producing *Ureibacillus thermosphaericus* isolated from an aerobic digester of swine waste. *Can. J. Microbiol.*, 47, 908-915 (2001)
- 3) Elyse D *et al.* "DNA sequences and expression in *Streptomyces lividans* of an

exoglucanase gene and endoglucanase gene from *Thermomonospora fusca*." *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3032-3043 (1993)

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

- ① 片倉啓雄、橋爪祥輝、紀ノ岡正博 "基質認識部位の除去が cellobiohydrolase I の比活性に及ぼす影響", セルラーゼ研究会, 花王土浦研修所, 2011 年 10 月 15 日
- ② 片倉啓雄、橋爪祥輝、紀ノ岡正博 "基質認識部位の除去が cellobiohydrolase I の比活性に及ぼす影響" 日本生物工学会平成 23 年度大会, 東京農工大学, 2011 年 9 月 26 日

[図書] (計 1 件)

- ① 片倉啓雄, "前処理および糖化の評価とプロセスの最適化", セルロース系バイオエタノール製造技術, p97-107, NTS, 2010

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: エタノールの製造方法

発明者: 片倉啓雄、野田秀夫

権利者: 関西化学機械製作(株)、大阪大学

種類: 特許

番号: 2010-194832

出願年月日: 2010 年 8 月 31 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://microbial.life-bio.kansai-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

片倉 啓雄 (KATAKURA YOSHIO)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号: 50263207

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし