

# 耐熱性酵素を用いたバイオエタノール生産 Production of Bioethanol Using Thermophilic Enzymes



○岩田 英之、鹿島 康浩、四方 孔、種子田 艶、田中 寿枝 (株)耐熱性酵素研究所  
○Hideyuki IWATA, Yasuhiro KASHIMA, Koh SHIKATA, Tsuya TANEDA, Hisae TANAKA  
Thermostable Enzyme Laboratory Co.,Ltd.

## Introduction

近年、環境問題、原油依存脱却の観点からバイオエタノールが注目されており、中でも、木質バイオマスを原料としたセルロース系バイオエタノールの重要性が高まっている。セルロース系バイオエタノールの製造は、セルロース系原料を硫酸法あるいは酵素法によりグルコースへと糖化する工程と、糖化したグルコースをエタノールへと変換する工程の大きく二つに分けられる。後者の反応には12種類の酵素が関与しており、酵母ではこれらの酵素反応によりエタノールを産生している (Fig. 1)。

現在、バイオエタノールの製造は酵母等を用いた発酵法が主流であるが、酵素を用いた *in vitro* のエタノール製造が実現すれば、エタノール生産の高効率化および反応産物精製の簡易化が可能となる。また、耐熱性酵素を用いて酵素反応を高温度化することで、酵素反応と反応産物蒸留の同時進行が可能となる他、反応速度の向上、雑菌の混入抑制など更なる利点も期待される。

そこで本研究では、グルコースからエタノールへの反応を司る耐熱性酵素12種類を単離し、これら酵素を用いた *in vitro* のエタノール生産技術の確立を試みた。

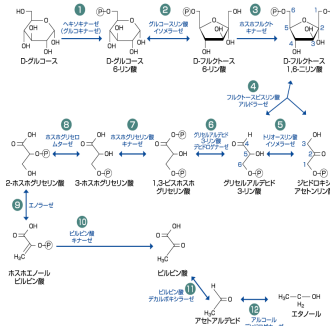


Fig. 1. グルコースからエタノールへの変換図

## Materials and methods

### (1) Preparation of thermophilic enzymes

耐熱性アーキア/耐熱性バクテリアゲノム  
↓  
各酵素遺伝子をPCRにより増幅  
pET21aに組み込み  
↓  
BL21(DE3) または Rosetta(DE3) に形質導入  
↓  
組換え大腸菌  
↓  
20 μM IPTGにて発現誘導  
超音波破碎  
75°C, 30min (PDCのみ55°C, 30min)  
12,000rpm, 4°C, 30minにて遠心  
↓  
上清を回収し、硫酸分画  
↓  
粗精製酵素標品

### (2) Production of ethanol

Glucose	5 mM
Glucokinase	2 unit
Glucosephosphate isomerase	20 unit
Phosphofructokinase	15 unit
Aldolase	8 unit
Triosephosphate isomerase	30 unit
GAPDH	8 unit
Phosphoglycerate kinase	10 unit
Phosphoglycerate mutase	10 unit
Enolase	8 unit
Pyruvate kinase	25 unit
Pyruvate decarboxylase	8 unit
Alcohol dehydrogenase	8 unit
NAD <sup>+</sup>	5 mM
ATP	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Thiamine pyrophosphate	0.1 mM
Potassium phosphate buffer (pH7.0)	20 mM
H <sub>2</sub> O	Up to 1 ml

↓ 50°C インキュベート

### (3) Assay of ethanol

反応溶液 (10倍希釈) 100 μl  
発色試薬<sup>※1</sup> 900 μl  
Total 1 ml  
↓ 30°C, 20min  
0.8 M HCl 150 μl 混合  
↓ A450測定

※1 発色試薬  
0.065 mM 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine  
2 unit Alcohol oxidase  
2.5 unit Horseradish peroxidase  
50 mM Potassium phosphate buffer (pH7.0)

## Results

組換え大腸菌より調製した各酵素は全て可溶性画分に回収され、酵素活性も確認された (Table 1)。また、Pyruvate decarboxylase 以外の11種類の酵素は熱処理により約90%の純度に精製された。

各酵素および基質、補助因子を Materials and methods の条件に従い混合し、50°Cにて反応させた。その結果、80min までは反応時間の増加とともにエタノールの産生量が増加した (Fig. 2)。5 mM のグルコースから 8.4 mM のエタノールが産生されたので、反応収率は約85%であった。

また、12種類の酵素を混合し、液体窒素による凍結を繰り返した結果、凍結融解を5回繰り返してもエタノール生産速度は維持されていた (Fig. 3)。

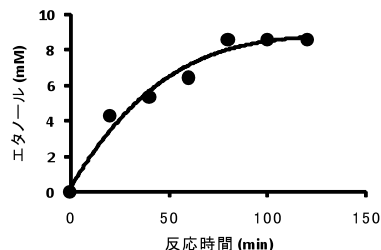


Fig. 2. エタノール産生の反応時間依存性

Table 1. 各酵素の活性およびタンパク質濃度

Enzyme	EC No.	酵素活性 (U/ml)	タンパク質濃度 (mg/ml)	比活性 (U/mg)
Glucokinase	2.7.1.2	274	5.6	48.9
Glucosephosphate isomerase	5.3.1.9	1506	17.0	88.6
Phosphofructokinase	2.7.1.11	769	7.0	109.9
Aldolase	4.1.2.13	105	43.0	2.4
Triosephosphate isomerase	5.3.1.1	13880	10.0	1388.0
GAPDH	1.2.1.12	184	16.0	11.5
Phosphoglycerate kinase	2.7.2.3	1537	5.9	260.5
Phosphoglycerate mutase	5.4.2.1	2247	7.0	321.0
Enolase	4.2.1.11	940	10.0	94.0
Pyruvate kinase	2.7.1.40	208	26.0	8.0
Pyruvate decarboxylase	4.1.1.1	4257	31.5	135.1
Alcohol dehydrogenase	1.1.1.1	205	22.0	9.3

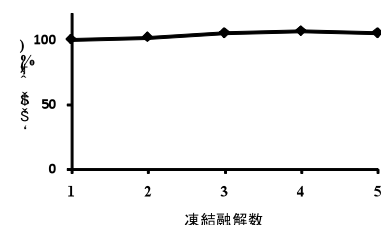


Fig. 3. 凍結融解による失活検討

## Conclusion and visions

- ・耐熱性酵素を用いた、*in vitro* のエタノール生産系が確立された。
- ・グルコースもしくはセルロースを出発物質とした、エタノール以外の中間物質生産にも本生産系は利用できる。
- ・今後、エタノールおよび中間物質生産の高効率化(収率増加・反応速度促進)を検討していく。



今回の酵素12種類をパッケージングしたエタノール産生Kitを発売予定 (170,000/Kit)。学生実験等にお使い下さい。