

ミミズ由来酵素によるバイオマス糖化

静岡市立高等学校
2年 宮田竜 他3名

1 動機

バイオエタノールは近年、環境にやさしい液体燃料として注目されている。原料であるセルロース系バイオマスは紙やダンボールなどの資源が多いという特徴がある。しかし、それらはトウモロコシやサトウキビなどに比べ、糖化处理が困難である。糖化处理には高温の酸あるいは耐熱性の酵素を用いて高温条件で糖化する必要がある。この工程の問題点は化石燃料を用いて高温にするため、温室効果ガスが発生してしまい環境に良くないことである。

ミミズは変温動物であり、人間の体温より低い温度の条件下で消化酵素が働いているのではないかと考えた。ミミズの消化酵素を取り出し、常温でセルロース系バイオマスからグルコースが生成できるのなら、このことをバイオエタノールの生成する際の糖化处理に応用することができるのではないかと、という点に注目して研究を行った。

2 仮説

ミミズの消化酵素を使用し、常温でバイオマスを糖化することができるのではないかと。

3 目的

ミミズの消化酵素を使用すれば環境に配慮でき、かつ低コストでバイオエタノールを生成する。

4 実験

(1) 使用材料

シマミミズ（釣具屋で購入したもの）、リン酸ナトリウム緩衝液（25mM, 50mM）、1 mM DTT（ジオトトレイトール）硫酸アンモニウム、BSA スタンダード（牛血清アルブミン）、カルボキシメチルセルロース（CMC）、ダンボール、コピー用紙、セルロース粉末、トイレットペーパー、グルコース、Somogyi 銅試薬、Nelson 試薬、液体窒素、独立遠沈管、1.5ml マイクロチューブ、Bradford 染色液、脱イオン水

(2) 方法

ア 実験 1

- (ア) シマミミズを断食させず凍結固定し、50℃で約4時間乾熱滅菌庫にて乾燥させ、乳鉢と乳棒ですりつぶし粉末にした。
- (イ) ミミズ粉末1gあたり10mlの50mMリン酸ナトリウム緩衝液に浸し、4℃で20時間程度放置してその後、4℃、12,000×gにて15分間遠心分離させた。
- (ウ) 得られた上清に最終濃度60%の硫酸アンモニウムを添加した。その溶液を4℃、12,000×gにて60分間遠心分離させた。
- (エ) 沈殿物を回収し1mM DTTを含む25mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH8.0）100mlに溶解させた。
- (オ) 遠沈管1本あたり40mlのリン酸ナトリウム緩衝液を入れた（n=2）。できた溶液をミミズの粗酵素液とした。
- (カ) Bradford法によりミミズの粗酵素液に含まれているタンパク質を測定した。検量線からミ

ミズ 1 g に含まれるタンパク質量を算出した。

- (キ) Bradford 染色液を各チューブに 1 ml 加え、よく混合する。(25°C前後の室温で 5 分間反応させる) その後分光光度計の波長 595nm で吸光度を測定した。(反応後 1 時間以内)
- (ク) Blank 値を差し引いた後、平均値を算出する。希釈系列から作成した検量線を用いてサンプルの濃度を求める。ミミズの粗酵素液と CMC を 40°C で 15 分間反応させた。

イ 実験 2

- (ア) Somogyi-Nelson 法より糖の量を測定する際の基準の検量線を作成した。
- (イ) 分光光度計の波長 520nm で吸光度を測定した。測定した吸光度から検量線を作成した。
- (ウ) ミミズの粗酵素液とバイオマス (ダンボール, コピー用紙, セルロース粉末, トイレットペーパー) を混ぜ生成された糖の量を測定した。50cc のバイアルに、バイオマス各 0.1g を入れた。
- (エ) 50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0) 10.7ml を添加し、バイアルを煮沸させ放冷させた。
- (オ) フィルター滅菌した 3.3ml の粗酵素液を添加したのち 40°C で 24 時間反応させ、Somogyi-Nelson 法により還元糖を分光光度計の波長 520nm を当て吸光度を測定した。
- (カ) バイオマスだけを入れたものと酵素だけを入れたものの吸光度を測定し、対照実験を行った。

ウ 実験 3

- (ア) シマミミズを 1 日断食させ、凍結固定したのち、凍結乾燥器を用いて 24 時間かけ、圧力・温度を下げた。(圧力: 10.4~5.4Pa, 温度: -54.9~-60.3°C) 乾燥させた後、すりつぶした。ミミズ粉末 (0.5g) に 5.0ml の 50mM リン酸ナトリウム緩衝液に浸した。4°C で 20 時間程度放置し、その後実験 1 と同様の手順でミミズの粗酵素液を作成した。そして実験 2 と同様の方法で粗酵素液と CMC, 各バイオマスを混ぜ、生成された糖量を測定した。

5 結果

(1) 実験 1

傾き 1.1697, 相関係数 0.9856 の関数のグラフが作成できた。このグラフと粗酵素液を測定した吸光度から、ミミズ粉末 1 g 当たりのタンパク質量が 143.2mg だとわかった (図 1)。

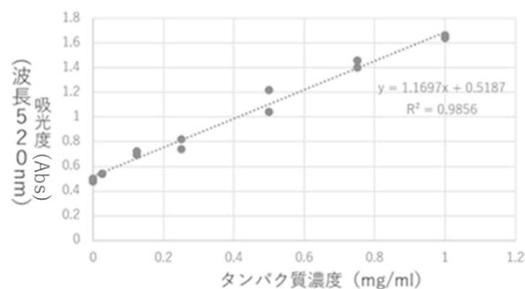


図 1 タンパク量の検量線

表 1 CMC 0.1g と粗酵素液を 40°C, 15 分間反応させて生成された糖量

	生成された糖量 ($\mu\text{mol}/0.1\text{g}$)
CMC (15min)	1.808

(2) 実験 2

傾き 33.476, 相関係数 0.7516 の関数のグラフが作成できた (図 2) .

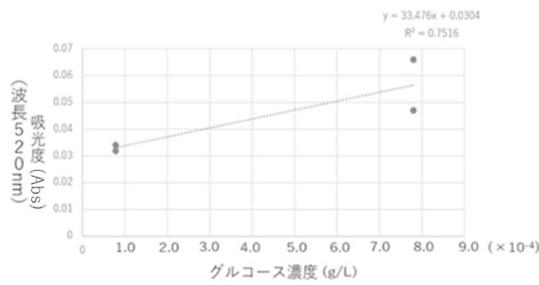


図 2 実験 2 での還元糖の検量線

図 2 の検量線をもとに, 各バイオマスのグルコース量を検出した. ミミズ由来酵素に分解された順に並べると, セルロース粉末, トイレットペーパー, ダンボール, コピー用紙となる (図 3) (表 2) .

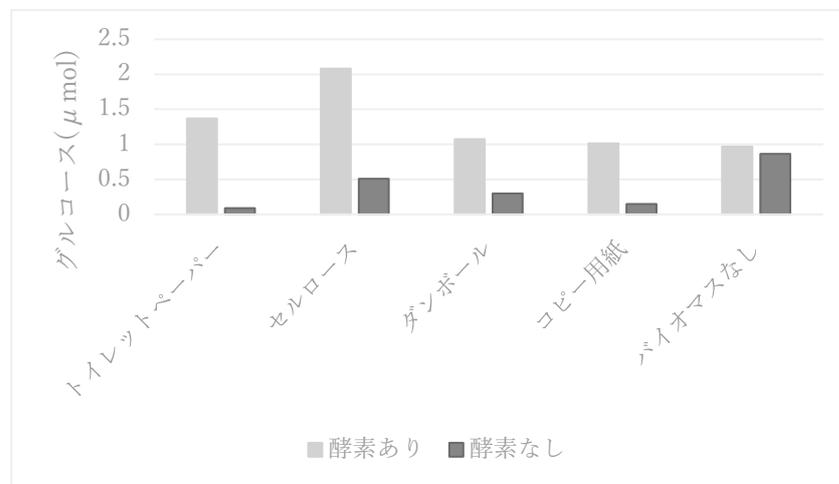


図 3 ミミズ由来酵素に分解され生成された各バイオマスの糖の濃度

表 2 実験 2 でのミミズ由来酵素から分解され, 生成された各バイオマスに含まれる糖の濃度

バイオマス	TP		セルロース粉末		コピー用紙		ダンボール		バイオマスなし	
	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし
グルコース濃度 (mg/mL)	1.37	0.0873	2.08	0.507	1.01	0.149	1.07	0.279	0.97	0.865

(3) 実験 3

傾き 39.48, 相関係数 0.9932 の関数のグラフが作成できた (図 4) .

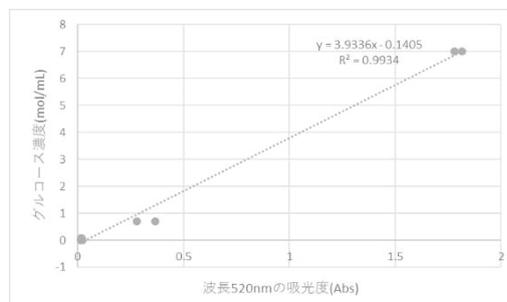


図 4 実験 3 での還元糖の検量線

実験3での還元糖の検量線をもとに、各バイオマスのグルコース量を検出した。(図5)

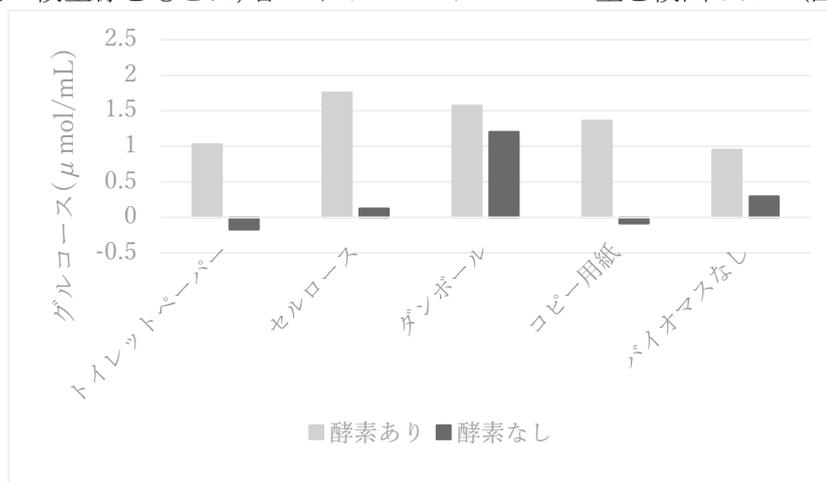


図5 ミミズ由来酵素に分解され生成された各バイオマスの糖の濃度

表3 実験3でのミミズ由来酵素から分解され、生成された各バイオマスに含まれる糖の濃度

バイオマス	TP		セルローズ粉末		コピー用紙		ダンボール		バイオマスなし	
	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし
グルコース濃度 (mg/mL)	0.663	-0.011	0.113	0.012	0.101	0.0774	0.0876	-0.00546	0.0612	0.0191

6 考察

(1) 実験1

実験1の結果より 40℃の状態では、一定時間で一定量のセルラーゼから生成される糖量を計算することができる。

実験2の結果より、ダンボールの酵素なしはコピー用紙の酵素なしより糖量が多いため生成された糖量から酵素なしを差し引くと、ダンボールよりコピー用紙のほうが糖が多く生成されていることが分かった。また、バイオマスなしの酵素なしの結果が酵素ありの結果とほぼ同じなのは、ミミズ粉末を作成する際に断食させなかったためであり、ミミズ体内の内容物に糖が含まれていたものと考えられる。よって、ミミズ由来酵素によって生成された糖量は検出した糖量より少ないと考えられる(図3)(表2)。

実験3の結果から凍結乾燥によるミミズ粉末の粗酵素液の場合、ミミズ由来の酵素に分解された順に並べると、セルローズ粉末、コピー用紙、トイレットペーパー、ダンボールとなる(図5)(表3)。ダンボールの酵素なしの結果が高温乾燥のバイオマスなし以外の酵素なしの結果に比べて高い値が出ている。これはNelson試薬500μLを添加し、1,000×gにて15分間遠心分離し、上清を回収するときに、完全にバイオマスであるダンボールが沈殿しておらず、回収した上清にダンボールが含まれてしまい、吸光度測定の際に実際よりも高い吸光度を分光光度計が検出してしまったからではないかと考える。また、トイレットペーパーとコピー用紙の酵素なしの結果でグルコース量が負の値が出ているのは測定ミスであり、実際は0に近い数値であると考えられる。

実験2・3の結果からミミズの粗酵素液に含まれていたセルラーゼがバイオマスを糖化したと考えられる。各バイオマスの中で一番糖に分解されているものはセルローズ粉末だった。他のバイオマスはパルプの繊維が残っており、紙にするための接着剤やインクなどの色素などが含まれているため、バイオマスに含まれているセルローズに酵素が触れる面積が少なくなってしまったためだと考えられる。

表4 ミミズ由来酵素から CMC が分解され、生成された糖量

CMC	乾熱滅菌による高温乾燥	凍結乾燥
グルコース $\mu\text{mol}/\text{CMC}0.1\text{g}(15\text{min})$	1.808	8.978

高温乾燥と凍結乾燥によるミミズ粉末の粗酵素液の比較は CMC の結果を用いた。それは、CMC は水溶性のセルロースであり、糖化効率が最も高く、高温乾燥と凍結乾燥の差が、明瞭になると考えたからである。実験1と実験3の結果から、凍結乾燥は高温乾燥の結果よりも4倍以上の糖が生成されていることがわかる(表4)。このことから、高温乾燥で作成したミミズ粉末よりも凍結乾燥で作成したミミズ粉末の方が、多くのセルロース分解酵素が含まれることがわかる。これは、高温乾燥の際に 50℃で4時間乾燥させたため、セルロース分解酵素が高温によって変性し失活した酵素があったからではないかと考えた。

5 今後の展望

本実験では、凍結乾燥の粗酵素液のタンパク質量を測定せずに実験したため、生成された糖量を高温乾燥の粗酵素液と比較しても信憑性が低い。そのため今後の実験では高温乾燥と凍結乾燥の粗酵素液の実験を同じ日に行い、どちらもタンパク質量を測定し、実験結果を比較したい。さらにバイオマスと粗酵素液の濃度の割合を変えて生成された糖量にどのような差が出るのか調べたい。

また、ミミズの体表に存在する菌が CMC や各バイオマスの分解に関わっている可能性が考えられる。それを考慮すると、実験1～3の方法ではミミズの消化酵素によるセルロース分解酵素活性が正確に測定できていないと予想する。そのため、断食させる際にガーゼに抗生物質を含ませておき、ミミズの体表に存在する菌を取り除く方法を考えている。

最終的には効率的に多くのバイオエタノールを作ることのできる方法を見つけたい。