

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23760746

研究課題名(和文)電気化学測定と熱測定の複合システムによる糖質バイオマス分解過程の解析

研究課題名(英文) Kinetic analysis of cellulosic biomass degradation based on an electrochemical measurement combined with calorimetry

研究代表者

巽 広輔 (TATSUMI, Hirotsuke)

信州大学・学術研究院理学系・准教授

研究者番号：60336609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖質バイオマス、とくにセルロースの酵素的加水分解過程を、電流計測型バイオセンサーとカロリメトリーを用いるリアルタイム計測法により追跡し、詳細な速度解析を行なった。セロビオヒドロラーゼによるセルロースの加水分解では、反応初期に急激な反応速度の変化が生じることが特徴であるが、それを追跡するために応答時間の速いセンサーを開発した。速度解析の結果、反応初期の急激な反応速度の低下は、セロビオヒドロラーゼのセルロースからの脱離過程が遅いためであることが示された。

研究成果の概要(英文)：The kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass was studied by real-time monitoring with amperometric biosensor and calorimetry. The response time of the biosensor was improved to follow a rapid change in reaction rates at a pre-steady state of cellobiohydrolase reaction. By the kinetic analysis, it was concluded that the rapid decrease in the rate of cellobiohydrolase reaction at a pre-steady state was derived from the slow dissociation of the enzyme from a cellulose chain.

研究分野：電気分析化学

キーワード：バイオマス バイオセンサー カロリメトリー

1. 研究開始当初の背景

酵素反応の速度測定は、通常均一溶液を用いて行われるが、セルロースのような不溶性基質を用いる場合、従来法においては分離等の処理が必要となり直接測定が困難であった。筆者は本研究開始までの研究で、電流計測型バイオセンサーを用いることにより、デンプン、セルロースといった糖質バイオマスの分解過程を直接、リアルタイムで計測する方法を提案してきた。一方ロスキレ大学(デンマーク)の P. Westh 教授の研究グループは、同じ発想から熱測定(カロリーメトリー)による糖質バイオマス分解過程の直接計測を提案してきた。バイオセンサーとカロリーメトリーは、どちらも試料溶液の濁度に影響されず、不溶性基質の懸濁液を直接測定できる、という共通の長所を持つが、バイオセンサーは最終生成物を選択的に測定するのに対し、カロリーメトリーは加水分解の総和を測定する、といった違いがある。そこで糖質バイオマス(とくにセルロース)の酵素的加水分解過程を、バイオセンサーとカロリーメトリーの両面から追跡することにより、より詳細な速度解析が可能になる、という着想を得た。

2. 研究の目的

電流計測型バイオセンサーとカロリーメトリーの測定セルに導入することにより、電気化学測定と熱測定との複合システムを構築し、バイオマス加水分解過程の詳細な酵素反応速度論的解析、とくにエンド型とエキソ型酵素による協同効果についての定量的解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、海外共同研究者であるロスキレ大学(デンマーク)P. Westh 教授、大学院生、博士研究員および酵素製造会社研究員の協力のもとに、異が実施した。種々の電流計測型バイオセンサーを作成し、それを用いて糖質バイオマス加水分解過程の反応速度を追跡した。糖質バイオマスは、主として結晶性セルロースを用い、セロビオヒドロラーゼ等による加水分解速度を対象とした。計測に用いるバイオセンサーは、セロビオースデヒドロゲナーゼ等の酸化還元酵素と、ベンゾキノン等の電子伝達メディエーターを、カーボンペースト電極に固定化することにより作製した。バイオマス加水分解反応初期の急激な速度の変化を正確に追跡するためには、応答時間の短いバイオセンサーが必要であったが、酵素の固定化法を検討することにより応答時間の短縮を行なった。またバイオセンサーとカロリーメトリーによる測定結果の比較を行なった。

4. 研究成果

(1) 不溶性セルロースのセロビオヒドロラーゼによる加水分解反応速度を、主としてカロリーメトリーを用いて解析した。反応初期に見

られる極端に速い反応速度と、それに引き続いて起こる急激な反応速度の低下が観察された。この急激な速度低下は、セロビオヒドロラーゼがセルロース構造の中でトラップされ、セルロース鎖に沿って進むことができなくなったためと示唆された。(論文)

(2) 不溶性セルロースのセロビオヒドロラーゼによる加水分解反応速度を、主として電流計測型バイオセンサーを用いて解析した。得られた電流時間曲線をもとに反応の諸過程(セロビオヒドロラーゼのセルロースへの吸着、セルロースの加水分解、セルロースからの脱離)の速度定数を見積もった。その結果、反応初期における急激な反応速度の低下は、セロビオヒドロラーゼのセルロースからの遅い脱離によることが示された。(論文)

(3) セロビオヒドロラーゼ活性を測定するための電流計測型バイオセンサーを開発した。酸化還元酵素としてセロビオースデヒドロゲナーゼ、電子伝達メディエーターとしてベンゾキノン、カーボンペースト電極に固定化した。セロビオヒドロラーゼ反応は、その反応初期において急激な反応速度の変化が生じることが特徴であるが、それを追跡するためには応答時間の速いセンサーが必要となる。そこで酵素の固定化法を検討し、応答時間の短い(約3秒)センサーを得ることに成功した。(論文)

(4) セルロースのセロビオヒドロラーゼによる加水分解反応速度を、主として電流計測型バイオセンサーを用いて解析した。先に開発した応答時間の速い電流計測型バイオセンサーを用い、構造の異なるセルロースについて詳細な速度解析を行なった。その結果、セロビオヒドロラーゼのセルロースからの脱離の速度定数がきわめて小さく(約0.01毎秒)、それが律速段階になっていることが示された。(論文)

(5) セルロース鎖に結合していない(フリーの)セロビオヒドロラーゼの活性部位を定量するための新たな方法として、グラフェン印刷電極を用いる方法を提案した。p-ニトロフェニルラクトシドをフリーの活性部位により加水分解させ、生成したp-ニトロフェノールをグラフェン印刷電極により電気化学測定した。一般にp-ニトロフェノールの電気化学測定は、電極表面が汚され感度が低下することが知られているが、本電極ではその影響がほとんど見られなかった。(論文)

(6) ここまでの研究で用いてきた電流計測型バイオセンサーでは、加水分解酵素としてセロビオースデヒドロゲナーゼを固定化していたが、本酵素は糖の1位の炭素に付く水酸基の位置により異なる応答を示すという問題があった。そこで、活性が1位の炭素に付

く水酸基の位置に依存しないピラノースデヒドロゲナーゼを固定化し、この問題を解消した。これにより、加水分解酵素が維持型か反転型かによらず、加水分解反応速度を正確に追跡できるようになった。(論文)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

Sensitive electrochemical measurement of hydroxyl radical generation induced by the xanthine-xanthine oxidase system, H. Tatsumi, Y. Tsuchiya, K. Sakamoto, *Anal. Biochem.*, **467**, 22-27 (2014). (査読有)

Development of dropping carbon fluid electrodes for polarography, H. Tatsumi, S. Tanaka, *Electrochim. Acta*, **135**, 255-259 (2014). (査読有)

A pyranose dehydrogenase-based biosensor for kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulases, N. Cruys-Bagger, S. F. Badino, R. Tokin, M. Gontsarik, S. Fathalinejad, K. Jensen, M. D. Toscano, T. H. Sørensen, K. Borch, H. Tatsumi, P. Våljamäe, P. Westh, *Enz. Micorb. Technol.*, **58-59**, 68-74 (2014). (査読有)

A graphene screen-printed carbon electrode for real-time measurements of unoccupied active sites in a cellulase, N. Cruys-Bagger, H. Tatsumi, K. Borch, P. Westh, *Anal. Biochem.*, **447**, 162-168 (2014). (査読有)

Transient Kinetics and Rate-Limiting Steps for the Processive Cellobiohydrolase Cel7A: Effects of Substrate Structure and Carbohydrate Binding Domain, N. Cruys-Bagger, H. Tatsumi, G. R. Ren, K. Borch, P. Westh, *Biochemistry*, **52**, 8938-8948 (2013). (査読有)

バイオセンサを用いる糖質バイオマス分解過程の解析, 巽 広輔, 化学センサ, **29(1)**, 9-14 (2013). (査読無)

Kinetic Studies on Enzymatic Hydrolysis of Polysaccharides by Amperometric Biosensors, H. Tatsumi, *Rev. Polarogr.*, **58**, 75-82 (2012). (査読有)

An Amperometric Enzyme Biosensor for Real-Time Measurements of Cellobiohydrolase Activity on Insoluble Cellulose, N. Cruys-Bagger, G. Ren, H. Tatsumi, M. J. Baumann, N. Spodsberg, H.

D. Andersen, L. Gorton, K. Borch, P. Westh, *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 3199-3204 (2012). (査読有)

Polarography with a dropping carbon electrode, H. Tatsumi, M. Shiba, *Electrochem. Commun.*, **20**, 160-162 (2012). (査読有)

Pre-steady-state Kinetics for Hydrolysis of Insoluble Cellulose by Cellobiohydrolase Cel7A, N. Cruys-Bagger, J. Elmerdahl, E. Praestgaard, H. Tatsumi, N. Spodsberg, K. Borch, P. Westh, *J. Biol. Chem.*, **287**, 18451-18458 (2012). (査読有)

Origin of Initial Burst in Activity for *Trichoderma reesei* endo-Glucanases Hydrolyzing Insoluble Cellulose, L. Murphy, N. Cruys-Bagger, H. D. Damgaard, M. J. Baumann, S. N. Olsen, K. Borch, S. F. Lassen, M. Sweeney, H. Tatsumi, P. Westh, *J. Biol. Chem.*, **287**, 1252-1260 (2012). (査読有)

Sensitive Electrochemical Detection of the Hydroxyl Radical Using Enzyme-catalyzed Redox Cycling, H. Tatsumi, N. Osaku, *Anal. Sci.*, **27**, 1065-1067 (2011). (査読有)

[学会発表](計12件)

液状炭素電極を用いるポーラログラフイー.電極攪拌装置の検討, 清家成彬, 巽広輔, 第60回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会, 2014年11月15日~2014年11月16日, 京都工芸繊維大学

液状炭素電極を用いるポーラログラフイー, 巽広輔, 2014年度第2回関西電気化学研究会, 2014年10月18日, 京都大学桂キャンパス(招待講演)

Sensitive electrochemical measurement of hydroxyl radical generation induced by the xanthine-xanthine oxidase system, H. Tatsumi, Y. Tsuchiya, K. Sakamoto, 1st Asian Symposium of Analytical Sciences, 2014年9月17日~2014年9月19日, 広島大学東広島キャンパス(招待講演)

Sensitive electrochemical measurement of hydroxyl radical generation induced by the xanthine-xanthine oxidase system, H. Tatsumi, Y. Tsuchiya, K. Sakamoto, 65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, August 31 - September 5, 2014, EPFL, Lausanne (Switzerland)

滴下炭素電極を用いるポーラログラフィー、田中翔悟、巽広輔、第 59 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会、2013 年 11 月 28 日～2013 年 12 月 1 日、石垣市民会館

酵素触媒レドックスサイクリングを用いる OH ラジカルの高感度検出、巽広輔、第 44 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2013 年 11 月 2 日～2012 年 11 月 3 日、静岡大学浜松キャンパス（招待講演）

滴下炭素電極を用いるポーラログラフィー、田中翔悟、巽広輔、第 58 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会、2012 年 11 月 26 日～2012 年 11 月 28 日、高尾の森わくわくビレッジ

酸化還元応答性イオノフォアによる液液界面イオン移動の制御、市村遼太郎、巽広輔、日本分析化学会第 61 年会、2012 年 9 月 19 日～2012 年 9 月 21 日、金沢大学

滴下炭素電極を用いるポーラログラフィー、巽広輔、田中翔悟、日本分析化学会第 61 年会、2012 年 9 月 19 日～2012 年 9 月 21 日、金沢大学

Carbon paste electrode modified with ferric hydroxide for the sensitive detection of paracetamol, Irdhawati, H. Tatsumi, Regional Electrochemistry Meeting of South-East Asia 2012 (REMSEA 2012), 2012 年 4 月 11 日～2012 年 4 月 13 日, EDSA Shangri-La Hotel, Manila (Philippines)

Application of enzyme-modified electrodes based on cellobiose dehydrogenase in cellulose research, N. Cruys-Bagger, H. Tatsumi, K. Borch, P. Westh, Annual Meeting of Danish Electrochemical Society, September 30, 2011, University of Southern Denmark, Odense (Denmark)

Pre-steady-state kinetics cellobiohydrolase I on insoluble cellulose Cel7A, P. Westh, N. Cruys-Bagger, E. Praestgaard, H. Tatsumi, N. Spodsberg, K. Borch, *Gordon Research Conferences (Cellulosomes, Cellulases & Other Carbohydrate Modifying Enzymes)*, July 24-29, 2011, Stonehill College, Easton, MA (USA)

〔その他〕
ホームページ等
http://science.shinshu-u.ac.jp/~chem/?page_id=400

6. 研究組織

(1) 研究代表者

巽 広輔 (TATSUMI, Hirotsuke)
信州大学・学術研究院理学系・准教授
研究者番号：60336609

(4) 研究協力者

Nicolaj Cruys-Bagger
ロスキレ大学・博士研究員

Kim Borch
ノボザイム・研究員

Peter Westh
ロスキレ大学・教授