

1-1 バイオマス糖化反応の網羅的解析

小林 良則

はじめに

バイオ燃料技術革新計画で提示されたベンチマーク、「2015–2020年に、エタノール40円/L、酵素コスト4円/L、酵素タンパク質1 mg/g-生成糖の実現」は非常にハードルの高い数値目標である。我々はこの数値目標達成に向けて確実な道筋をつけるべく、NEDOのプロジェクトにおいて高効率糖化法の開発と、高機能糖化酵素の創成に取り組んできた。高効率糖化法開発のためには、バイオマスと酵素タンパク質（成分酵素）間のインターアクションの解析が非常に重要である。このため、基質の特性、特にセルロースやリグニンの各種物理化学的性質と糖化されやすさ、酵素タンパク質の吸脱着、糖化酵素の活性変動などの関係について解析した報告も多い¹⁻³⁾。また、このような糖化時に各種界面活性剤を添加すると糖化が促進されるという報告もあり、酵素回収・再利用の可能性を探る目的からも注目されている^{4,5)}。このように、バイオマス糖化の機構解析については多くの研究があるが、この糖化反応には基質の多様性、前処理方法の影響、反応条件、糖化酵素の特性など多くの要因が関与することからその反応機構の詳細についてはまだ不明な点も多い。

我々は、高効率糖化法開発と高機能糖化酵素創成に向けて、有用な知見を得るべく、プロジェクトで制定したバイオマス前処理物と市販酵素、および我々が開発したJN系糖化酵素を用い、独自に開発した実験手法も活用して、バイオマス糖化反応の中身を成分酵素のタンパク質レベル、活性レベルの両面についての挙動を網羅的に解析した。本稿では、このような観点から取り組んだ研究の成果について紹介する。

実験材料、手法の開発

標準前処理標品の調製 セルロース系バイオマスに対する種々のセルラーゼの糖化性能を比較評価するためには、基準となる品質のバイオマスが必要である。我々は、このプロジェクト研究において草本系、木本系、それぞれの代表的なバイオマスとして、稲ワラ、エリアンサス、ユーカリ、スギを選択し、前処理方法として、苛性ソーダ、希硫酸、水熱処理を取り上げた。原料・前処

理方法・条件をさまざまに組み合わせて前処理サンプルを作製し、生成物の成分を分析評価することにした。得られた前処理物を固液分離し、固形分、可溶画分、それぞれについて、セルロース、ヘミセルロース、リグニンなどの物質収支データを採取した。固形分については代表的市販糖化酵素Accellerase 1500を40 FPU/g-バイオマス（過剰量）用いて糖化处理を行い、糖化率を評価した。このような一連の作業により、これら前処理方法の特性を理解するとともに、得られた標品の品質の再現性についても検討し、それぞれの原料についての標準前処理標品を制定した⁶⁾。

実験手法の整備 我々は、糖化機構を解析する上で、糖化酵素およびその成分酵素について、酵素活性ならびにタンパク質の両面からの定量的解析技術の開発が重要と考え、これらの手法開発に取り組んだ。

まず、糖化酵素の性能を正確に評価するためには、その活性測定法が標準化されていなければならない。この考え方の基に、セルラーゼ活性測定法の基礎となる還元糖定量法、タンパク質定量法の検討を行い、これらを用いて、Filter paper分解活性 (FPU)、Carboxymethylcellulose分解活性 (CMCase)、 β -Glucosidase活性 (BGL)、Xylanase活性、 β -Xylosidase活性など一連の酵素活性測定法を標準化した。また、糖化酵素のバイオマス糖化性能を評価するため、標準的な基質濃度5%(w/v)、2 ml系で測定する方法と、ハイスルーブット対応の基質濃度3%(w/v)、500 μ lスケールで96穴プレートを用いて測定する方法も制定した⁶⁾。

糖化反応における反応上清中の残存酵素活性を正確に測定するためには、上清中のタンパク質をロスさせることなく除糖する方法が必要である。種々検討の結果、特定の膜を用いることで目的を達成した。さらに、成分酵素のタンパク質レベルでの挙動を解析する手法として、簡易的には1次元電気泳動法を、詳細な解析の場合には、2次元電気泳動法を用いた。成分酵素が多く分子種を持つことや、染色再現性などにより、これらの電気泳動法により定量的解析を行うにはまだ問題もあるが成分酵素の大きな挙動の解析法としては十分利用可能と判断した。

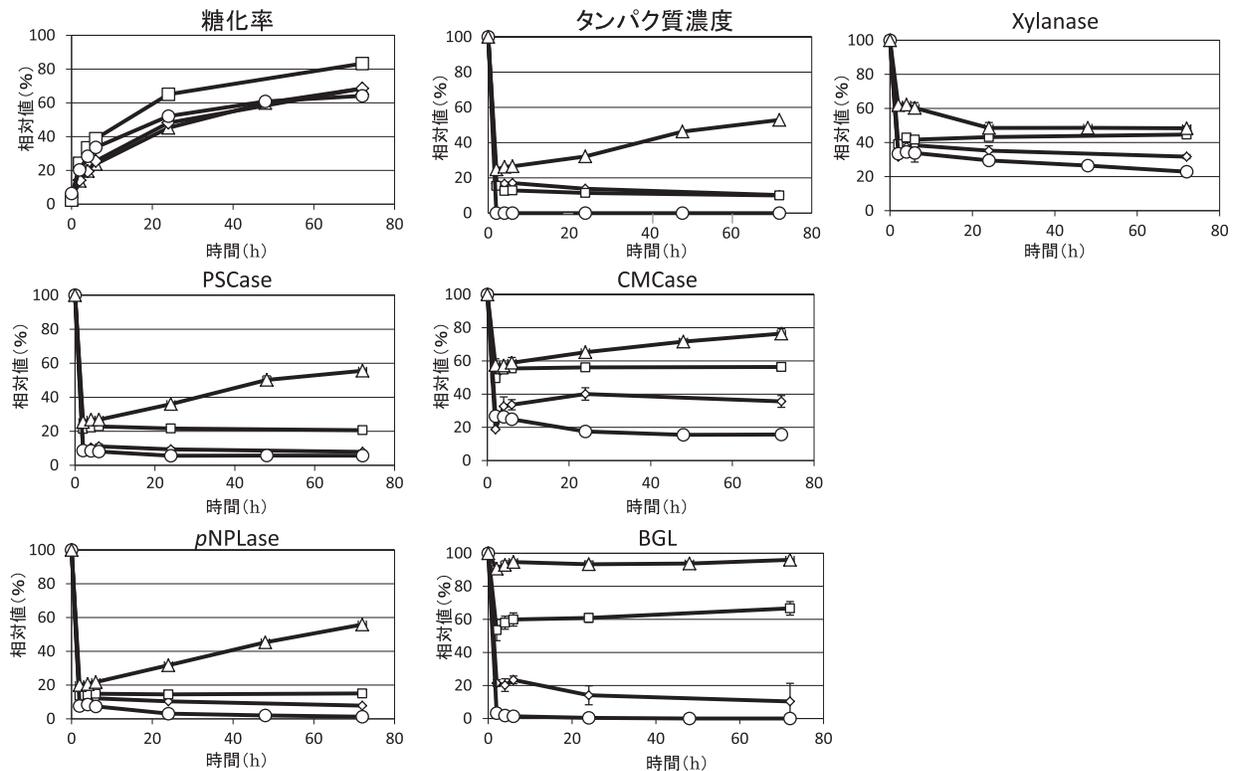


図1. 前処理エリアンサスの糖化率および上清のタンパク質濃度と酵素活性. バイオマス濃度: 5% (w/v). Accellerase 1500: 5 mg/g-バイオマス. △: アビセル, □: NaOH処理エリアンサス, ◇: 水熱処理エリアンサス, ○: 希硫酸処理エリアンサス.

糖化反応の網羅的解析

比較対象としてアビセルを、実バイオマスとしてエリアンサスの苛性ソーダ、水熱、希硫酸処理の標準前処理標品を、基質濃度5% (w/v)、糖化酵素としてAccellerase 1500、5 mg/g-バイオマスを用いる標準条件で糖化反応を行った。糖化反応開始後、経時的にサンプリングし、糖化率、上清液中のタンパク質濃度、各種酵素活性を測定した。得られた結果を図1に示す。糖化率は苛性ソーダが一番高く80%となった。他の3種の基質について最終的にはほぼ同程度で約70%となった。上清中のタンパク質濃度の変動を見ると程度の差はあれ、すべてにおいて、反応開始直後から急激に低下し、酵素タンパク質が直ちに基質に吸着していることが分かる。その後アビセルの場合は、24時間経過後から徐々に上清に戻り、72時間では約50%に達したがバイオマス3種については10%程度以下のレベルとなりほとんど戻らない。セルロースの分解に関与する酵素活性であるが、リン酸膨潤セルロース分解活性 (PSCase)、パラニトロフェニルラクトース分解活性 (pNPLase) についてはいずれの基質の場合もほとんど同じパターンを示し、反応開始直後から活性が急激に低下している。これ

らの活性の担い手はセロビオヒドロラーゼ (CBH) やエンドグルカナーゼ (EG) であるが、これらはセルロース結合モジュール (CBM) を持ちこれが基質であるセルロースに吸着すると言われている。CBHがセルロースに吸着した後に動けなくなる状態、所謂非生産的吸着現象についての研究も多いが、基質がリグニンを持つ場合はリグニンへの非特異的吸着も考えられ、どちらへどの程度吸着しているのかは区別できない。アビセルについてはPSCaseとpNPLaseは、反応24時間から上清中への戻りが認められるが、各種エリアンサス前処理物についてはそれがない。CMCaseについては傾向が異なり、反応開始直後の吸着は同様であるが、その後の上清中の活性は全般的にPSCase、pNPLaseに比べ高く、アビセルで約80%、苛性ソーダで約60%もある。ただし、バイオマスについてはPSCase、pNPLaseと同様に反応経過とともに上清に戻る傾向はない。BGLにおいて非常に特徴的な傾向が見られ、アビセルでは上清中に殆どの活性が保持されているが、苛性ソーダで60-70%、水熱で10-20%の活性が保持されている。一方、希硫酸では上清中の残存はほとんど認められず、すべて残渣に吸着していることが分かる。この傾向は、基質中のリグニンの存在と関係すると推測される。しかし、水熱と希硫酸

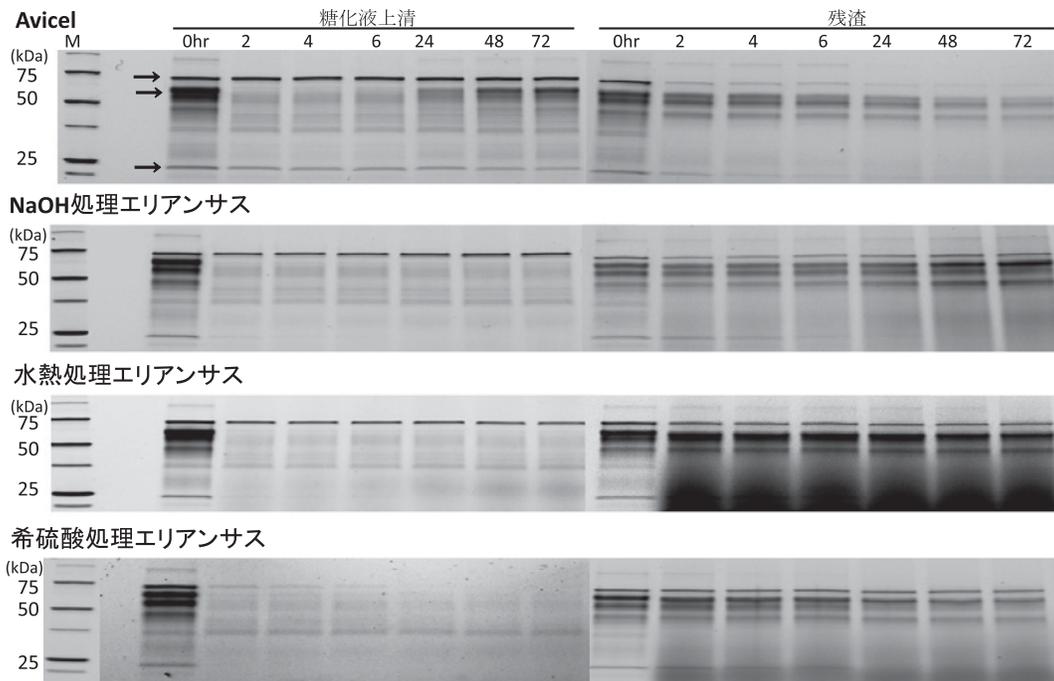


図2. 前処理エリアンサスの糖化液上清および残渣のタンパク質SDS-PAGE. バイオマス濃度：5%(w/v). Accellerase 1500：5 mg/g-バイオマス. 矢印：上から BGL, CBH I, Xylanase.

ではリグニン含量の差は5%程度であることからこの結果は単にリグニン含量にのみ依存するのではなく、リグニンの化学的特性に依存していると見ることができる。BGLはCBMを持っていないことからリグニンへの吸着は非特異的吸着と言え、最後にXylanaseの場合は、いずれの基質の場合においても活性は大きく低下し、戻らない。アビセルの場合においても50%程度に減少していることから、反応系中で失活している可能性が高い。

次に、これら成分酵素の挙動を電気泳動パターンから解析した(図2)。一見してわかるようにアビセルとバイオマスの場合で上清、残渣に存在するタンパク質量の違いと反応経過に伴う挙動の違いが明瞭に把握できる。セルロースのみから構成されるアビセルの場合は、BGLが吸着しないこと、糖化につれてCBHが上清に戻る現象が認められるが、バイオマス3種の場合、少なくとも今回の基質濃度5%(w/v)、酵素量5 mg/g-バイオマスというような条件での糖化反応においては残渣に吸着した成分酵素はなかなか遊離し難く、上清中に戻ってこない。この現象は次項で解説される「頭打ち現象」と関連して面白い。前処理方法の違いの影響については希硫酸処理の場合の吸着性の強さが特異的である。以上の結果を見る限りにおいて、このような反応条件の場合は、上清中にわずかに残存する酵素も当初の成分酵素のバランスが大きく崩れ、全体としても糖化性能がかなり低下

していることが予想されることから、反応終了後の上清から残存酵素を回収・再利用することはかなり困難と思われる。

界面活性剤の効果

バイオマスの酵素糖化においては、TweenやPEGのような界面活性剤やBSAが糖化反応を促進することが知られている^{4,5)}。一般的に界面活性剤は基質と酵素タンパク質間の親和性を弱めることで、BSAはリグニンに吸着することで酵素タンパク質の吸着を阻害し、糖化を促進していると言われている。経済性の観点からは、よほど安価で効果の高い化合物でなければ実用的利用の可能性は低いと思われる。これら添加物の糖化促進効果の本質が明らかにできれば高効率糖化のためのヒントが得られるのではないかと考え、界面活性剤の添加効果を検討した。

我々は、改めて、各種セルラーゼを対象に一般的な界面活性剤、ポリグリセリン脂肪酸エステル、シヨ糖脂肪酸エステル、アミノ酸系界面活性剤などについて糖化反応の促進効果を検証した。その結果、これまででも言われているように、非イオン系界面活性剤に比較的高い糖化促進効果を認めた。中でもADEKA社のアデカトールLA-50がTweenやPEG、BSAを凌ぐ効果を示した。ここでLA-50をバイオマス基質量に対し十分量添加した

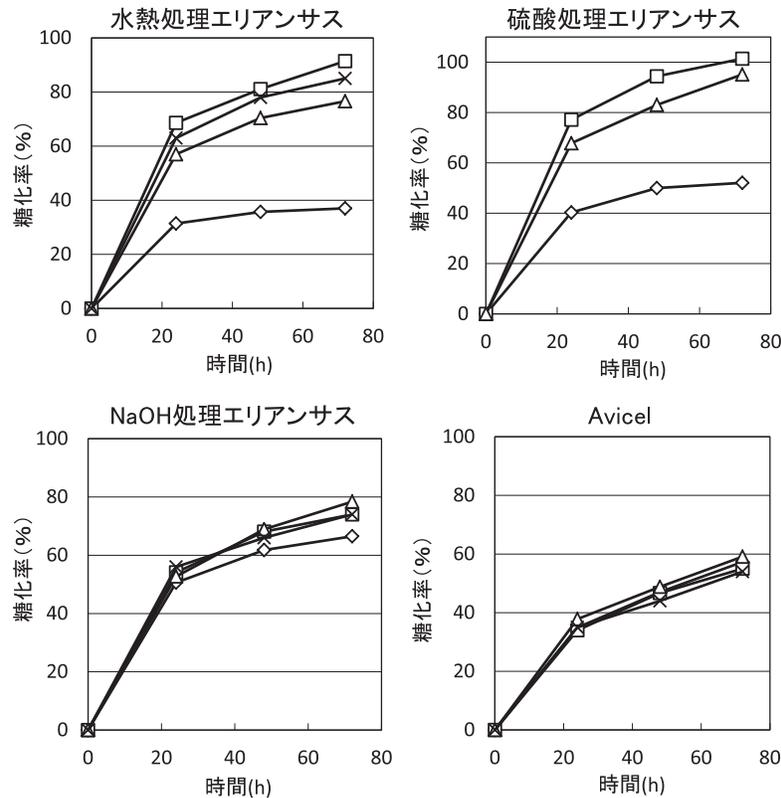


図3. 糖化における添加物の効果. Accellerase 1500, 3mg/g-バイオマス. □: LA-50, ×: PEG6000, △: BSA, ◇: 無添加.

場合、これまで知られている効果に比べ、予想外の高い糖化促進効果を示した。

添加効果を最大限に発揮させた場合の性能を比較する目的で Accellerase 1500 を対象に LA-50, PEG6000, BSA を 100 mg/g-バイオマス添加した条件で、各種基質の糖化に及ぼす添加効果を検証した結果を図3に示す。LA-50の糖化促進効果はアビセルと苛性ソーダ処理の場合認められず、水熱、希硫酸の場合のみに認められた。基質成分の比較からして、この結果は、基質に含まれるリグニンが関与しているものと考えられた。各種前処理エリアンサスについて80%糖化に必要な酵素タンパク質量という観点からこの化合物の添加効果を評価した。この結果、水熱、希硫酸の場合は無添加の場合の約1/4の値になると言う劇的な効果が認められたが、苛性ソーダの場合は、15%程度の低下に留まった。さらに同様な検証を稲ワラについて行ったところ、これらの効果はエリアンサスの場合に比べ、いずれも半分程度の値に留まり、この化合物の効果はバイオマス種により大きく異なるというこれまた興味深い結果となった。

そこで、上記で説明したものと同様の方法で苛性ソーダの場合と水熱の場合について Accellerase 1500, 5 mg/g-バイオマスの条件における糖化反応の網羅的解析を行

い、タンパク質と各種酵素活性の挙動を解析した(図4)。LA-50添加で糖化が促進される水熱の場合は、反応初期段階での吸着量も少なく、反応経過とともに、上清中へのタンパク質と PSCase, pNPLase, CMCcaseの戻りが見られた。BGLについては添加効果が極端に大きく、ほとんどの活性が最初から上清に残存した。Xylanaseについてはそれ程戻らないものの、約60%程度の活性が上清に保持されていた。一方、効果が認められなかった苛性ソーダの場合は、反応初期においても吸着にそれ程大きな差が見られず、また反応経過に伴う戻りの程度も小さい。

これらの結果を総合的に判断すると LA-50 は基質と酵素タンパク質の親和性を弱め、成分酵素を上清中に遊離させることで糖化活性を向上させているものと思われる。アビセル、苛性ソーダの場合と水熱、希硫酸の場合とを比較すると、この化合物はこれまでも言われているように各種酵素タンパク質とリグニンとの関係に関与していることが考えられる。しかしながら今回は紹介しないが、それ以外の要因が関与している可能性を示唆する結果も得られており、現象の本質は単純ではないと考える。いずれにせよ、経済性も満足させながらリグニンと酵素タンパク質の親和性を弱める手段があれば糖化効率

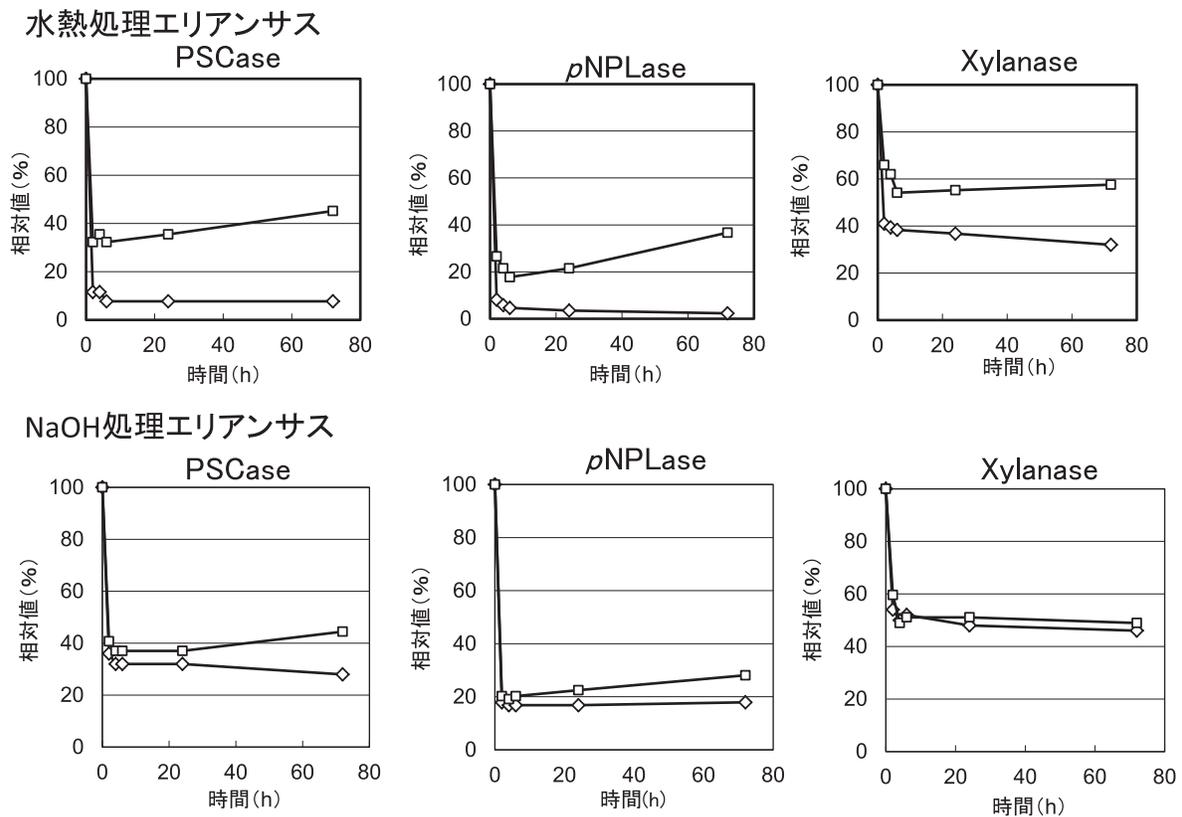


図4. 糖化時の上清中の残存活性に及ぼす LA-50 の効果. □ : LA-50 添加, ◇ : 無添加.

の向上につなげることができることが確認された。

終わりに

バイオマスの高効率糖化法の開発を目指して、種々のバイオマス前処理物の糖化反応そのものをタンパク質と酵素活性の挙動の両面から網羅的に解析した。結果として、苛性ソーダ、水熱、希硫酸処理という前処理方法により規定されるリグニンの量と質のような特性により各成分酵素の吸着挙動が異なることが明確になった。界面活性剤 LA-50 の添加効果の解析からはリグニンと糖化酵素の親和性を弱めてやることで糖化効率向上につなが

ることが確認された。成分酵素の安定性増強、および基質、特にリグニンとの親和性改変が更なる高機能化に向けた改良点であることが確認できた。

文献

- 1) Boussaid, A. *et al.*: *Enzyme Microb. Technol.*, **24**, 138 (1999).
- 2) Kim, D.W. *et al.*: *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 461 (1992).
- 3) Kumar, R. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **103**, 252 (2009).
- 4) Sun, Y. C. *et al.*: *Bioresour. Technol.*, **83**, 1 (2002).
- 5) Eriksson, T. *et al.*: *Appl. Microbiol. Ind.*, 373 (2009).
- 6) バイオマス分解酵素研究の最前線—セルラーゼ・ヘミセルラーゼと中心として—, P.114, シーエムシー出版.