

1-2 低酵素量使用時の糖化率頭打ち現象の解析

堀川 祥生¹・杉山 淳司²

はじめに

近年、セルロース系バイオマスからエタノールを生産するさまざまな方策が提案されているが、経済的に採算が成り立つプロセスの開発は容易ではない。特に、酵素コストはバイオエタノールの全製造コストの中で非常に大きなウェイトを占めており、酵素使用量の低減は重要な課題となっている。我々は経産省・農水省が発表している「バイオ燃料技術革新計画」のベンチマーク「1 mg-タンパク質/g-生成糖」を目標に研究開発を推進している¹⁾。酵素使用量低減化における最大の障壁は、糖化反応における「頭打ち現象」である。これは十分な酵素量が存在すれば大部分の基質は糖化されるのに対し、酵素量が少量の場合では親和性の高い基質から順に糖化されていくが、ある程度糖化が進むと酵素が基質から遊離できずに不動化してしまう。これを酵素の非生産的吸着と呼ぶ。その結果、未分解の基質が多く残り、反応系全体で見ただけでは糖化率が頭打ちになってしまう。この現象は、ヘミセルロース・リグニンが存在する前処理バイオマスだけでなく、市販セルロース標品でも確認されている。本稿では、植物バイオマスの組織・細胞構造、細胞壁構成成分、セルロースの結晶構造といった基質の立場から頭打ち現象の実態とその解析結果について紹介する。

バイオマスの組織・細胞構造と頭打ち現象

細胞とは生物を構成する構造的・機能的な基本単位であり、組織とは同一の形態ならびに機能を有する細胞集団を示している。植物バイオマスもこの組織・細胞が集まった3次元構造体であり、機能の異なる細胞間では構造も化学構成成分も異なる。したがって、セルラーゼによる分解性も多様であり、どのような組織・細胞が分解残渣として残るか理解することは、バイオマスならびに前処理条件を選択するうえで有益な情報となる。たとえば、一般的な広葉樹に見られる道管要素は高い水分通道機能を保持するためにリグニンの沈着量が他の細胞に比

べて多い。そのため、相対的に酵素分解を受けにくいとされている。頭打ち現象が生じたユーカリの細胞内表面を走査型電子顕微鏡（SEM）で観察すると非生産的に吸着した酵素が多く見られる（図1）。この不動化した酵素吸着を抑制し、いかにして次の分解へと促すかが頭打ち現象を克服する要点である。

リグニンと頭打ち現象

芳香族化合物が構築した疎水性の3次元ネットワークから成るリグニンは、細胞壁を構成する多糖類の接着ならびに細胞同士を接着させることによって、細胞壁および植物体に対して力学的強度を与えている。しかしながら、酵素糖化の観点からは基質を被覆してセルラーゼのアクセシビリティを低下させる阻害物質に他ならない。したがって、前処理によるリグニンの除去は有効な手段として古くから検討されている。さらに、糖化残渣に対して電気泳動を行うと、リグニンには β -グルコシダーゼなど特定の酵素が吸着するため、低酵素濃度で糖化を行った場合には、頭打ち現象が引き起こされる。リグニンはセルラーゼの基質ではないため、リグニンへの酵素吸着は非特異的吸着と呼ぶ。そのため、前処理にはリグニンを除くだけでなく、非特異的吸着を抑えるリグニンの改質も望まれる。

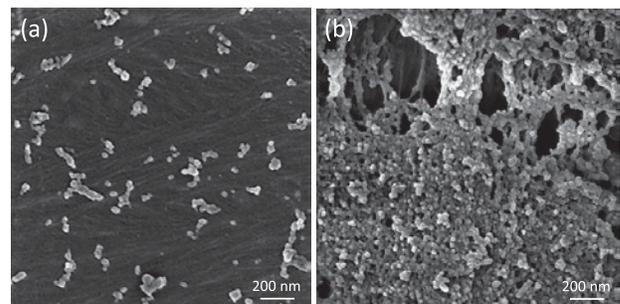


図1. ユーカリ木部線維細胞の内表面のSEM画像。(a)糖化前、(b)頭打ち現象後。(写真提供：高部圭司 教授)

著者紹介 ¹京大大学生存圏研究所（研究員） Email: yhorikawa@rishi.kyoto-u.ac.jp
²京大大学生存圏研究所（教授） E-mail: sugiyama@rishi.kyoto-u.ac.jp

ヘミセルロースと頭打ち現象

細胞壁中のヘミセルロースは不均一に局在しており、セルロースとは水素結合によって相互作用し、リグニンとはエーテルならびにエステル結合などを形成することで両成分を化学的に架橋する重要な役割を担っている。NaOH前処理によってほぼセルロースとヘミセルロースからなる前処理バイオマスをキシラナーゼ活性が低い市販セルラーゼ Accellerase 1500で糖化したところ、頭打ち現象が認められた。さらに、この糖化が停止したバイオマス残渣にヘミセルラーゼを添加すると反応が再開し、頭打ち現象の緩和が確認された。以上の結果から、市販酵素中のヘミセルラーゼが失活もしくは非生産的吸着することによりヘミセルロースがセルロースを被覆したまま残るため、反応系全体の糖化が阻害されてしまう。前処理によってセルロースからヘミセルロースを完全に溶脱させることは非常に困難であるため、添加するヘミセルラーゼの選択は高効率糖化を達成するための重要な課題である。

セルロースと頭打ち現象

グルコースが直鎖状に結合した高分子であるセルロー

スは細胞壁の骨格成分として強靱かつしなやかな物性を発現する結晶性多糖であり、バイオマスの酵素糖化においては主たる基質でもある。糖化実験において市販の微結晶セルロースがしばしば用いられるが、この基質は調製段階において過酷な化学処理後に乾燥された標品である。そのため、セルロースマイクロフィブリル同士は強固に凝集しており、これが酵素のアクセシビリティを妨げている。そこで、我々は木質バイオマスから温和な化学処理によって非セルロース成分を除去し、さらに組織構造による糖化阻害の影響を排除するためディスクミル処理を施してセルロースを調製した。得られた基質は非常

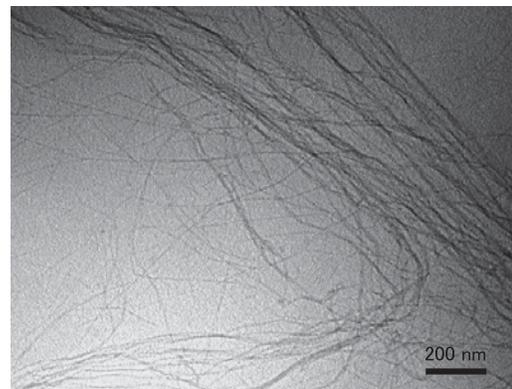


図2. ユーカリから調製した高分散性セルロースのCryo-TEM画像。

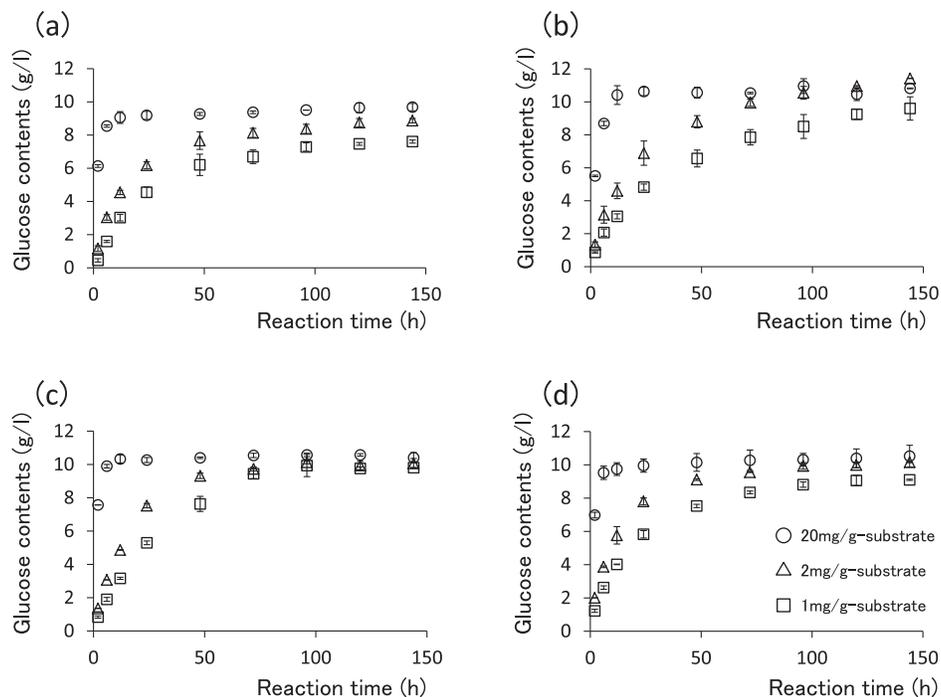


図3. ユーカリから調製したセルロースの酵素糖化。(a)セルロースI, (b)セルロースII, (c)セルロースIII, (d)リン酸膨潤セルロース。

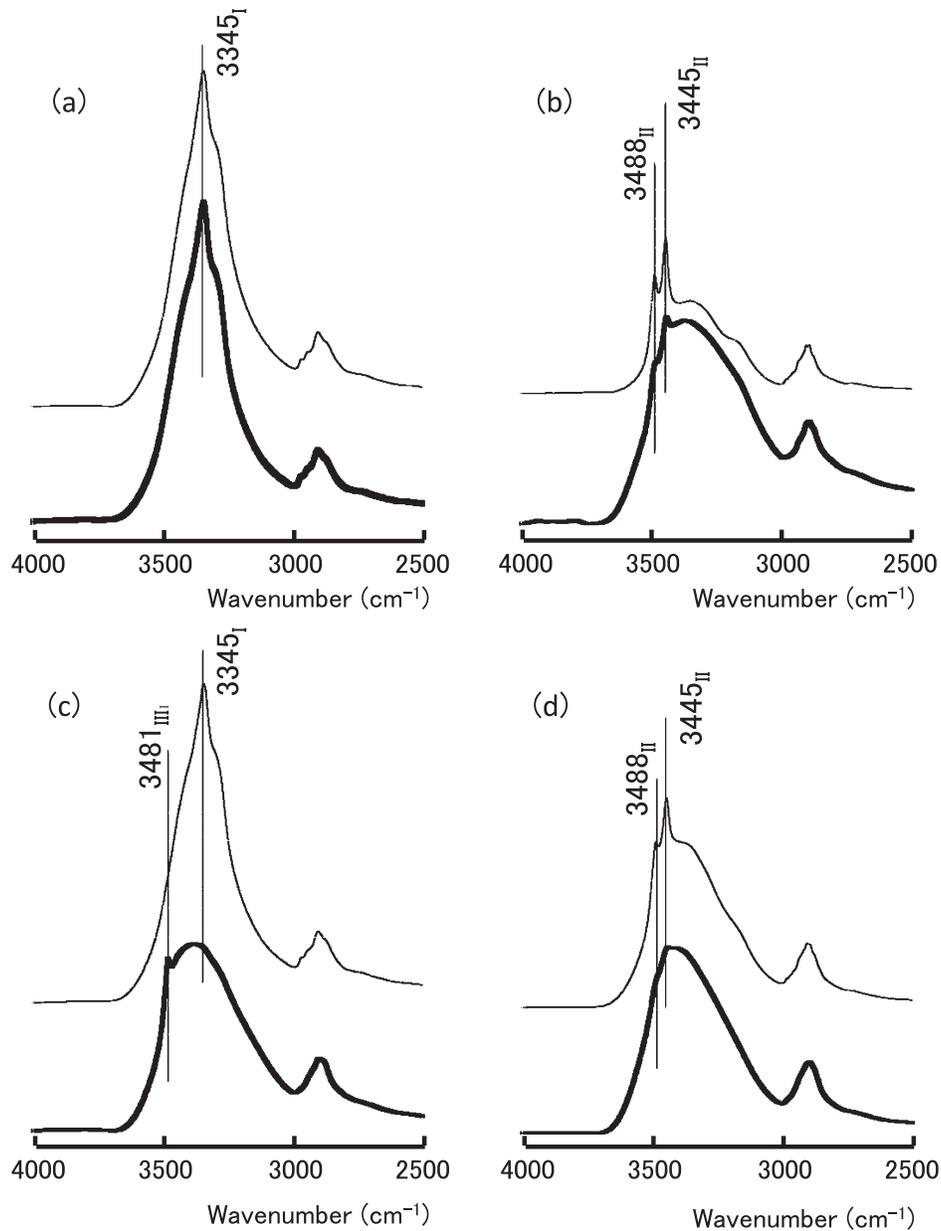


図4. セルロースの糖化前（太線）と糖化後（細線）の赤外吸収スペクトル. (a) セルロースI, (b) セルロースII, (c) セルロースIII_I, (d) リン酸膨潤セルロース.

に分散性の高いセルロースであることが氷包埋法による透過型電子顕微鏡観察 (Cryo-TEM) から示唆された (図2). スラリー濃度1%の本セルロースを市販セルラーゼ Accellerase 1500で糖化したところ, 酵素濃度2 mg/g-biomassでは20 mg/g-biomassの最終糖化率に到達できず, 頭打ち現象が確認された (図3a)²⁾. したがって, 天然セルロースが持つ結晶構造と酵素の非生産的吸着が頭打ち現象の本質的な原因であると考えられる.

結晶変態による頭打ち現象の打破

天然に存在するセルロースマイクロフィブリルはセルロース分子鎖が平行にパッキングされた結晶構造を有しており, この結晶をセルロースIと呼ぶ. セルロースには結晶多形が存在し, それぞれの多形間では熱安定性などの物理化学特性が異なる. 近年, セルロースI型結晶構造を変態させることで糖化を大幅に促進させることが報告されている³⁻⁵⁾. そこで, 5 MのNaOHに浸漬させてセルロースIIを調製し, 市販セルラーゼで糖化したとこ

ろ頭打ち現象の緩和が認められた。しかしながら、酵素濃度を1 mg/g-biomassまで低下させると完全分解には至らなかった(図3b)。次に、結晶構造が解消されたリン酸膨潤セルロースを糖化したところ、やはり酵素濃度を1 mg/g-biomassまで下げると頭打ち現象が認められた(図3d)。その原因を明らかにするため、分解残渣を赤外分光法によって解析するとセルロースIIに特徴的で非常にシャープな2本のバンドが観察された(図4b, d)。したがって、双方とも頭打ちした分解残渣は非常に結晶性の高いセルロースIIであることを確認した。結晶構造を持たない基質でさえ頭打ちした原因は、糖化が進むにつれて残った高結晶性の基質に対し酵素の非生産的吸着が起きたため糖化が停止したと考えられる。その一方、エチレンジアミンを用いて調製したセルロースIII₁を検証したところ、酵素濃度1 mg/g-biomassでも糖化阻害が起きず高濃度酵素の最終糖化率にほぼ到達できることが明らかとなった(図3c)²⁾。この成果はベンチマーク「1 mg-タンパク質/g-生成糖」の達成を意味している。興味深いことに、僅かに残った分解残渣の赤外吸収スペクトルはセルロースIII₁に特徴的な3481 cm⁻¹のバンドが消え、典型的なセルロースIのパターンであった(図4c)。

本結果からも、頭打ち現象の要因は天然セルロースの結晶構造と酵素の相互作用にあることが重ねて示唆された。

おわりに

本稿では、高効率糖化システムの構築を阻む糖化率の頭打ち現象に関して、植物バイオマスの構造的・化学的立場から概説するとともに、ベンチマーク「1 mg-タンパク質/g-生成糖」の達成が非常に困難であることを述べた。従来の前処理と市販セルラーゼの組合せでは目標を達成できないことから、引き続き前処理法ならびに高機能糖化酵素の開発が進むと思われる。そのためにも、糖化されやすいバイオマス構造を正確に理解するとともに、酵素反応場である基質表面の解析が求められるであろう。

文 献

- 1) バイオ燃料技術革新計画。
- 2) Horikawa, Y. *et al.*: *Polym. Degrad. Stab.*, DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2013.08.004
- 3) Igarashi, K. *et al.*: *FEBS J.*, **274**, 1785 (2007).
- 4) Wada, M. *et al.*: *Polym. Degrad. Stab.*, **95**, 543 (2010).
- 5) Mittal, A. *et al.*: *Biotechnol. Biofuels*, **4**, 41 (2011).