酵素と微生物の工業的利用

Industrial Utilization of Enzymes and Microorganisms

吉 村 由利香

1. はじめに

酵素や微生物の工業的利用技術は、近年のバイオテクノロジーの研究成果によって劇的に進歩している。これらは生体反応を利用するため、エネルギー効率や環境負荷の面においてメリットが大きい。そのため、環境問題が頻繁に議論される今日、非常に関心の持たれる技術といえる。

本稿では、繊維産業における酵素、微生物の工業的利用を進めることを目的として、これら酵素反応や微生物培養技術を応用して何ができるかを焦点に解説する。また、天然繊維の酵素による改質加工についても述べる。酵素反応や微生物培養の基礎知識に関しては、生物学の成書を参照されたい¹⁾。

2. 酵素と微生物の性質

酵素は、生体内に存在する機能性タンパク質である。動物や微生物はその体内で生命維持に必要な有機物を合成・分解しなければならない。その際、これらの反応を生体に適合した条件下で効率よく進行させるための反応ツールが酵素である。酵素は触媒物質であるため自身が反応によって変化することはない。酵素は表1に示すように大きく6種類に分類される。

工業的に利用されている酵素の多くは微生物によって生産されたものである。微生物の増殖速度は速く、代謝活性が高いため酵素生産の宿主として適している。これら微生物由来酵素は、微生物を破碎後、超音波処理・圧力の急激な変化・自己分解などの方法で微生物体内から抽出される。微生物が酵素を体外に放出する場合もある。この酵素粗抽出液はさらに塩析・沈殿・吸着操作による分画、イオン交換クロマトグラフィー、電気泳動、超遠心分離、ゲル濾過などによって、精製、結晶化される²⁾。

酵素反応の第一の特徴は基質を極めて厳密に選ぶ基質特

表1 酵素の分類

酵素の種類	作 用
酸化還元酵素	水素原子、電子の移動、酸素原子の付加によって酸化剤、還元剤として働く。反応性が高い。
転 移 酵 素	$A-B + C-D \rightleftharpoons A-C + B-D$ のように特定の基が入れ替わる転移反応を触媒する。
加水分解酵素	$A-B + H_2O \rightleftharpoons AOH + BH$ の加水分解反応を触媒する。タンパク質、糖類などの有機物の加水分解に有用である。
脱 離 酵 素	一つの分子から基を脱離し、二つの化合物を作る。一つの分子の二重結合に他の分子を付加結合して新しい分子を作る反応も触媒する。
異性化酵素	異性化を生じる反応を触媒する。
合 成 酵 素	ATP など高エネルギー化合物を用いて、新しい化学結合を形成、あるいは分解する反応を触媒する。有機化学的な合成反応に使用される酵素は脱離酵素や転移酵素に分類される。

異性である。この基質選択性は酵素の活性部位に基質分子が結合する際の構造適合性が極めて厳密であるために生じる。また、酵素反応は通常の有機合成のような副生成物を伴わないため、生成物の純度が高い。酵素反応の第二の特徴は常温、常圧、中性域の穏やかな条件下で効率良く反応が進行し、省エネルギーで、廃液などの環境問題が少ない点である。また、過激な化学薬品を使用しないことは製品の安全性にもつながる。

一方、酵素の欠点は、タンパク質であるため、高温、強酸、強アルカリ、タンパク変性剤、高濃度の塩類などで変性し触媒活性を失うことである。また、pH、温度、基質濃度など反応条件がわずかに変化しても反応速度や平衡状態が変化するため、反応の制御が難しい。また、酵素の価格は化学触媒よりも高価である。酵素の高価格を解決するために、酒、醤油、味噌では酵素を抽出せず、酵母菌や麹菌がそのまま利用されることもある。このような微生物利用の場合、酵素の抽出・精製工程が省かれるため製造価格は下がる。しかし、製品に含まれる不純物が多くなり、酵素単体の反応のような高純度で精密な反応系は期待しにくくなる。そのため医薬品のように精密さが要求される用途には不向きである。その他の価格問題の解決策として、培養技術の改良や、遺伝子操作法を利用した酵素生産性の向上の研究、酵素を固定化して長期間連続使用するバイオリアクターの開発もなされている。一方、高温、低温、強酸、

YURIKA YOSHIMURA
 大阪市立工業研究所 有機化学課
 繊維研究室 研究主任 工学博士
 〒536-8553 大阪市城東区森之宮 1-6-50
 Tel: 06-6963-8047 Fax: 06-6963-8049
 E-mail: yosimura@omtri.city.osaka.jp
 <専門> 繊維加工
 <趣味> 旅行、スキー、読書

強アルカリ下で酵素を利用したいという要求もあり、これに応えるため極限環境で生存できる微生物からの酵素利用や遺伝子操作を用いた既存酵素の性能改良も進められている。

以上のように、酵素と微生物の工業的利用における使い分けは、高純度、精密さが要求される医薬品合成、高付加価値製品、分析用センサーなどには酵素を利用し、高い純度が要求されない低価格製品で、培養によって増殖する利点を活かせる場合には微生物の利用が適している。

3. 酵素、微生物の工業的利用例

3.1 微生物によるバイオサーファクタントの生産

微生物が比較的大量に生産する新規な界面活性剤はバイオサーファクタントと呼ばれ、付加価値の高いファインケミカルズとして研究が進められている。これらの界面活性剤は一般に毒性が低く、かつ生体に対して親和性を持つものが多い。多官能性で、セッケンと同等の生分解性があり、廃水問題も少ない。また、かさ高い分子構造を持ち、光学活性など様々な性質を有している³⁾。例えば、ラムノリピッドは二鎖アルキル型の親油基を持ち、親水基としては糖類を含んでいる。この複雑な構造のため、pHが変化すると、その会合体構造はミセル、脂質粒子、ラメラ液晶、小包構造(ベシクル)と順に変化する⁴⁾。そのため、ラムノリピッドは生体膜の代替としての機能も持ち、その誘導体と共に種々の利用が期待されている。また、微生物サーファクタントは臨界ミセル濃度が低く(有効濃度が高い)、界面活性が大きく、環境負荷が小さいことから、工場敷地など汚染土壤に散布して土中の微生物による汚染物質の吸収、分解を促進させ、土壤浄化に利用する研究が進められている⁵⁾。

3.2 光学異性体の分離

通常の有機合成では、生成物の中にD体とL体が必ず混在する。これら光学異性体は構造的な特徴が同じであるため、分子構造の異差から生じる物理的性質の違いを利用した精製はできない。このような化学的手法による分離が困難な光学異性体の識別に酵素を利用することができる。

福村らは、ナイロンの原料であるカプロラクタムを石油から有機合成する際、副生成物として生じるシクロヘキセン(D体とL体が半量ずつ混在するラセミ体)を、酵素による精製技術を利用して有用アミノ酸(L-リシン)に変換した(図1)^{6,7)}。彼らは、まずシクロヘキセンを原料に有機合成法によって合成されたDL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタムラセミ体から、微生物を利用して、有用なL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタムを選択的に取り出すことを試みた。そして、土壤中よりラセミ体の半量を分解するカプロラクタム分解菌、すなわちL体のみを栄養源にする菌と、ラセミ体全量すなわちD、L体両方を分解消化する菌の2種類を得た。この2種類の菌の違いを調べると、後者の菌はその体内にD体→L体変換酵素 α -アミノ- ϵ -カプロラクタムラセマーゼを有しており、微生物が消化できないD体を変

図1 酵素法によるリシンの製造

換率99.8%でL体に変換後、全量のアミノカプロラクタムを消化していた。そこで、この酵素反応を用いて、アミノカプロラクタムラセミ体を100%L体に変換し、次に前者のL体分解菌で加水分解すると、アミノカプロラクタムの開環を伴う加水分解反応によって、必須アミノ酸L-リシンを光学純度99.5%で得ることに成功した。

3.3 不安定物質の濃縮・精製

温和な条件下で反応を触媒し、かつ高い基質特異性をする酵素の性質を利用すると、不安定な化合物を効率よく濃縮したり、精製することができる。ここでは、リパーゼによる選択的加水分解反応を利用したドコサヘキサエン酸(DHA)高含有油の製造と、選択的エステル化反応を利用したDHAの精製を紹介する。

マグロ油やかつお油には20数%の有用物質DHAが含まれている。このDHAは化学的に不安定であるため、これを濃縮するには酵素法が有効である。DHAを基質として認識しにくいリパーゼ(*Candida rugosa*)でマグロ油を加

図2 マグロ油の選択的加水分解における加水分解率と未分解の油中のDHA含量

水分解すると、DHA 以外の脂肪酸のエステル結合が優先的に加水分解され、未分解の油中に DHA を濃縮することができる(図 2)。加水分解率を 70% まで高めると DHA を 50% 含む油を製造することができ(DHA の収率、65%)⁹⁾、現在この方法で製造された DHA 高含有油が健康補助食品として販売されている。さらに DHA を高純度化するには *Rhizopus delemar* リパーゼを触媒とした選択的エステル化反応の利用が効果的である。この酵素を触媒とし、マグロ油由来の脂肪酸を高級アルコールでエステル化すると 70% 以上の収率で DHA の純度を 23% から 90% 以上に高めることができる⁹⁾。

上記の二例のように、酵素反応では反応(加水分解とエステル化)が変わると酵素の基質特異性も変化する。酵素の活用において、詳細な反応条件の検討が重要である。

4. 環境問題における酵素・微生物の利用

近年、環境問題の解決に酵素・微生物を利用する例が増えている。特に微生物は汚染物質を栄養源として体内に取り込み消化してしまうため、廃棄物のゼロエミッション対応技術として注目されている。例えば、微生物を用いた活性汚泥による廃液処理は、すでに染色廃水の処理に多く使用されているし、ポリ乳酸なども微生物によって生分解される。また、ビス-フェノール A など環境ホルモンの微生物分解の挙動についても多くの研究が進められている¹⁰⁾。また、前項で示したように、微生物処理は化学薬品処理では手間・価格が見合わない環境中の広範囲な低濃度汚染の浄化に有効である。

5. 繊維関連分野での酵素・微生物の利用の現状

5.1 合成繊維における酵素・微生物の利用

繊維分野における酵素・微生物の利用は、従来は天然繊維の準備工程、仕上げ加工に関するものが中心であったが、近年は、合成繊維の分解菌などに関する研究も多く報告されている。ポリエステル繊維の減量加工時のアルカリ廃液問題を解決するため、ポリエステルの加水分解に適した菌を探索し、得られたリパーゼでポリエステル繊維の表面を加水分解し、改質と吸水性付与を行った報告がある¹¹⁾。また、ポリエステルの高温染色時に繊維内部から溶出するオリゴマーは、繊維表面の平滑性や染色機械を汚染しトラブルを生じる。このポリエステルオリゴマーの分解除去を目的として、遺伝子改良によって耐熱性、基質特異性を向上させたクチナーゼの報告もある¹²⁾。

ポリ乳酸繊維は生分解性を有する合成繊維として注目されているが、原料となる乳酸はアメリカで大量栽培されているトウモロコシから作られている。この乳酸原料の価格を下げるため、廃棄物の活用も検討されている。例えば、製紙汚泥中に大量に含まれるセルロースをセルラーゼで加水分解し、得られたグルコースを原料として乳酸菌によって乳酸を製造する試み¹³⁾や、ある種のカビを用いた固体培養法によって乳酸を安価に製造できる可能性についても示

されている¹⁴⁾。

5.2 天然繊維における酵素・微生物の利用

天然繊維における酵素・微生物の利用は、 α -アミラーゼによる糊抜き、ペクチナーゼによる綿の精練など環境への負荷軽減を目的とした利用が多く研究されている。本項では繊維製品に付加価値を付けるための酵素処理について、著者がこれまでに関わった研究から、綿、羊毛の酵素処理について述べる。

綿、麻、レーヨンなどのセルロース系繊維はセルラーゼ処理によって、柔軟性や風合いを改良することができる。しかし、繊維の製造順序として、染色後酵素処理を行う場合、セルラーゼの酵素活性は染料の種類、染着濃度によって影響を受ける¹⁵⁻¹⁷⁾。特に直接染料や反応染料はセルラーゼを阻害する傾向が強い(図 3)。これは、セルラーゼがセ

図 3 反応染料(C. I. Reactive Red 22)で染色された綿のセルラーゼによる加水分解

ルロースの β -1, 4-グルコシド結合を切断する際、吸着した染料が立体障害となること、また、イオン結合によって染料と酵素が複合体を形成し、酵素活性を低下させるためである。しかし、バット染料には酵素阻害は認められない(図 4)。これは、低分子量のバット染料は立体障害になりにくいこと、染料分子がイオン性を持たないことによる。そのため、インジゴなどバット染料で染色されたデニムはセルラーゼによる仕上げ加工が可能となる。一方、繊維の製造工程として、酵素処理を先に行い、その後染色した場

図 4 バット染料(C. I. Vat Blue 1)で染色された綿のセルラーゼによる加水分解

合は、酵素活性に問題は生じないが、繊維の染色性は若干低下する。これは染料の染色領域である非結晶領域が酵素の加水分解によって減少するためである。(逆に、非結晶領域が増大するマーセル化処理では、酵素の加水分解作用は促進される。)

また、綿などの短繊維では、繊維表面に浮き出た毛羽によって生地が白っぽく見える白化現象が問題になるが、セルラーゼ処理はこれらの毛羽を分解・脱落させるので、白化を抑制することができる。これらの毛羽は酵素による加水分解と機械作用によって、酵素処理の極初期に脱落する。上田らは、この脱落量を考慮した酵素による綿の減量曲線が以下の式(1)で表わされることを示した¹⁸⁾。

$$A = (A_0 - F_0)e^{-at} + F_0e^{-bt} \quad (1)$$

A: 時間 t における綿繊維重量、 A_0 : t=0 における綿繊維重量、 F_0 : t=0 における毛羽重量、a: セルラーゼ触媒反応の速度定数、b: 毛羽脱落反応の速度定数

一方、羊毛の酵素処理においては、タンパク質加水分解酵素が利用されることが多い。羊毛表面には架橋構造を形成するシスチンを多く含む硬いスケールがあり、このスケールは羊毛の収縮の原因となる。そこで羊毛の防縮性を高める目的で、スケールに優先的に作用する基質特異性を持つケラチン分解酵素を生産する微生物のスクリーニングが行われている¹⁹⁾。また、洗剤などに添加される安価な工業用タンパク質分解酵素 subtilisin を用いた羊毛の酵素処理では、羊毛をあらかじめラウリル硫酸ナトリウム(SDS)などで処理すると酵素反応が著しく促進され、防縮性も向上する(図5)²⁰⁻²²⁾。この場合、酵素阻害性の重金属(クロム

図5 SDS前処理を行なった羊毛のプロテアーゼによる加水分解

○: SDS前処理、---: SDS前処理なし

など)を含む染料で染色した場合も酵素処理が可能である。また、この酵素はシスチン結合を持たないため、還元剤の影響を受けないことから、羊毛繊維を還元処理しながら酵素処理することも可能である。

6. おわりに

酵素や微生物を用いた技術は、環境への負荷が少ないことが最大の特徴であり、今後も環境保全の追い風をうけて、

ますます利用が進むものと考えられる。しかしながら、これらの技術を他分野の技術者が自分の研究領域に応用しようとするとき、知識の不足と異分野との境界をまたぐことの困難さが足かせになる。本稿がそのような場合の何らかの参考になれば幸いである。

参考文献

- 1) 西沢一俊、志村憲助、入門酵素化学、南江堂(1969)。
- 2) 山田常雄、前川文夫、江上不二夫、八杉竜一、小関治男、古谷雅樹、日高敏隆、生物学辞典、岩波書店(1986)。
- 3) 石上 裕、日本油化学会関西支部第36回夏季セミナーテキスト、p.47(1996)。
- 4) Y. Ishigami, Y. Gama, H. Nagahora, M. Yamaguchi, H. Nakahara, T. Kamata, *Chem. Lett.*, 763(1987)。
- 5) S. Thangamani, G. S. Shreve, *Environ. Sci. Technol.*, 28(1993)。
- 6) 一島英治、酵素、p159 東海大学出版会(1994)。
- 7) 福村 隆、加藤嵩一、日本農芸化学会誌、54、647(1980)。
- 8) Y. Shimada, A. Sugihara, Y. Tominaga, *Enzymes in Lipid Modification*, U.T. Bornscheuer(ed.), p128, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim(2000)。
- 9) Y. Shimada, A. Sugihara, Y. Tominaga, *Lipid Biotechnology*, T. M. Kuo, H. W. Gardner(ed.), p493 Marcel Dekker, New York(2002)。
- 10) T. Fukuda, H. Uchida, Y. Takashima, T. Uwajima, T. Kawabata, M. Suzuki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 284, 704(2001)。
- 11) 日本農芸化学会誌(臨時増刊講演予稿集)、75、153(2001)。
- 12) 日本農芸化学会誌(臨時増刊講演予稿集)、75、296(2001)。
- 13) R. Kurane, K. Hatamochi, T. Kakuno, M. Kiyohara, M. Hirano, Y. Taniguchi, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 428(1994)。
- 14) 今中忠行監修、松風まさみ編集、微生物利用の大展開、p932 エヌ・ティー・エス(2002)。
- 15) H.Koo, M.Ueda, T.Wakida, Y.Yoshimura, T. Igarashi, *Textile Research Journal*, 64, 70(1994)。
- 16) M.Ueda, H.Koo, T.Wakida, Y.Yoshimura, *Textile Research Journal*, 64, 615(1994)。
- 17) M.Ueda, I.Ohgoh, Y.Yoshimura, T.Wakida, *Sen-i Gakkaishi*, 50, 554(1994)。
- 18) 上田充夫、具 泓林、坪倉孝徳、脇山尚久、吉村由利香、王 憲迎、繊維学会誌、53、27(1997)。
- 19) 吉村由利香、大江 猛、安部郁夫、澤田和也、繊維学会誌、59、35(2003)。
- 20) 日本農芸化学会誌(臨時増刊講演予稿集)、75、153(2001)。
- 21) 吉村由利香、科学と工業、76、286(2002)。
- 22) 吉村由利香、加工技術、36、671(2001)。