担体結合法による固定化セルラーゼの調製とその安定性について

柏木 豊*・馬替由美*・佐々木 堯*

Preparation and Some Properties of Immobilized Cellulase on Cyanogen Bromide Activated Sepharose

Yutaka KASHIWAGI*, Yumi MAGAE* and Takashi SASAKI*

* National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,
2-1-2, Kannondai, Yatabe-machi, Tsukubagun, Ibaraki, 305

Cellulase (1, 4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.4) from *Aspergillus niger* was immobilized on cyanogen bromide activated agarose beads (Sephacrose CL-6B). Over 90% of protein was immobilized and 24% of cellulase activity was retained. Some properties of immobilized cellulase were investigated and compared with those of native cellulase. (1) pH profile of immobilized cellulase activity was not altered, as compared with native cellulase, but the immobilized cellulase was stable at pH 2-8. (2) The immobilized cellulase showed good thermal-stability, 90% of carboxymethyl cellulase (CMC-ase) activity remained at pH 4, 60°C, and 60% was maintained at pH 2, 50°C when it was incubated for 1 hr. (3) The residual activity was about 50% after 8 days storage at pH 2, 25°C. (4) Enzyme did not leak from immobilized cellulase, and 80% of the initial activity was maintained after 15 times repetition of the reaction. (5) Paper chromatography of the hydrolysate of CMC with immobilized cellulase showed that the reaction product was glucose as is the case with native cellulase preparation.

(Received May 30, 1983)

セルロースの酵素分解性は、セルラーゼ複合系に含まれる結晶性セルロース分解酵素 (C_1 -酵素), 非晶性セルロース分解酵素 (Cx-グルカナーゼ) 及び β -グルコシダーゼのバランスによって影響をうける。特に結晶性セルロース部分に作用する C_1 -酵素活性がセルロース酵素分解の鍵となっている。しかしながら前報において、セルロースを効率的に酵素糖化する前処理過程でセルロース結晶構造の崩壊がおこり非晶性となったセルロースは、 C_1 -酵素を必要とせず *Aspergillus niger* のセルラーゼ系すなわち Cx-グルカナーゼと β -グルコシダーゼの2段階の反応系で容易に分解されることが明らかにされた^{1),2)}。したがって、固定化により Cx-グルカナーゼ及び β -グルコシダーゼの安定化が可能になれば非晶性セルロースを連続的に糖化できることが期待される。

本研究では、非晶性セルロースを固定化セルラーゼ系によってグルコースまで変換することを目的に、その第

一段階として cyanogen bromide 法^{3),4)}によるセルラーゼ固定化を試みた。この方法は、酵素を担体表面に結合させることが可能であり、酵素-基質の接触を行うことができる点で有利な固定化法である。また結合が強固であり固定化反応を比較的温和な条件で行うことができる方法である。

本報文では、調製された固定化セルラーゼの安定性等の性質について検討したので報告する。

実験方法

1. 担体及び試薬

固定化の担体には、Pharmacia Fine Chemicals 社製の Sepharose CL-6B を用い、担体活性化剤に cyanogen bromide (pure grade, 和光純薬製) を使用した。

酵素反応基質には、当研究室で調製した硫酸膨潤セル

* 農林水産省食品総合研究所 (〒305 茨城県筑波郡谷田部町観音台 2-1-2)

ロース又は、第一工業製薬から供与されたカルボキシメチルセルロース (D. S.=0.5) を使用した。

2. 酵素標品

酵素セルラーゼは、西独 SERVA 社製の *Aspergillus niger* crude cellulase 凍結乾燥標品を用いた。

3. 固定化法

酵素の固定化は、Axén³⁾ 及び Porath ら⁴⁾ の方法をもとにして行った。すなわち、Sephacrose CL-6B 10 g (wet weight) を 0.1 M Na₂HPO₄-NaOH buffer (pH 12.0) 15 ml に懸濁し、これに 10% cyanogen bromide 水溶液 6 ml を加えて 6°C 恒温水槽中において 20 分間攪拌して活性化を行った。その後、蒸留水で十分に水洗を行い活性化型 Sepharose CL-6B を得た。

これに 50 mM Na₂B₄O₇-HCl buffer (pH 8.0) 10 ml に溶解したセルラーゼ標品 50 mg を加え 4~6°C の恒温水槽中で 16 時間攪拌してセルラーゼの固定化反応を行った。固定化反応後、0.2 M glycine 水溶液に浸漬し室温において 2 時間放置して残留する活性基をマスクした。つづいて 0.3 M NaCO₃ buffer (pH 8.0), 0.3 M Na acetate-acetic acid buffer (pH 4.1) 及び蒸留水で洗浄して固定化セルラーゼ標品とした。

4. 測定法

酵素活性は次のようにして測定した。すなわち、1.25% 酸膨潤セルロース又はカルボキシメチルセルロース溶液 200 μ l に固定化セルラーゼ懸濁液 50 μ l を最終濃度で 2~5 mg/ml となるように加え、100 mM Na acetate-acetic acid buffer (pH 4.0) 中で 40°C において振盪しながら反応を行わせた。反応終了後、生成する還元糖量を SOMOGYI-NELSON 法⁵⁾ によりグルコースを標準として定量した。活性の 1U は 1 分間に 1 μ mole のグルコースに相当する還元力を生成する酵素量とした。遊離の酵素に対しても同様に反応を行い活性を測定した。

蛋白量は Lowry らの方法⁶⁾ によって牛血清アルブミンを標準として定量した。

5. ペーパークロマトグラフィー

ペーパークロマトグラフィーは次のようにして行った。反応終了後、反応混合液にアンバーライト MB-3 を加え脱塩を行った後東洋濾紙 No. 50 に一定量をスポットした。乾燥後 1-butanol: pyridine: 蒸留水 (6:4:4) を溶媒に 60°C, 4 時間展開して十分乾燥後、硝酸銀-アルカリ発色によって生成糖を検出した。

結果と考察

1. 固定化率と保持活性

実験方法に示した条件で固定化を行った結果、最初に加えた蛋白量から固定化セルラーゼの洗液及び濾液に流出した蛋白量を差引いて計算すると蛋白質の約 90% が結合した。またセルラーゼ活性は、酸膨潤セルロースを基質として測定した場合、約 24% が保持されていた (Table 1)。

Table 1 Immobilization of cellulase on Sepharose CL-6B

cellulase	protein		activity	
	mg	%	units	%
used	7.3	100	4.5	100
in wash solution	0.7	9.6	0.3	7
immobilized	6.6	90.4	1.1	24

蛋白質は、ほとんど完全に担体に結合し非常に高い固定化率を示した。酸膨潤セルロースに対する活性の保持率は初発に比べて約 1/4 となっているが、カルボキシメチルセルロースを基質とした場合 60% 以上の活性保持率を示したことから、担体に酵素が結合することにより担体表面の酵素と不溶性基質の接触に対する立体障害による活性の低下、ないしは酵素が担体内部に固定化している場合もあることが考えられる。

Tanaka⁷⁾ らは、イオン交換樹脂にセルラーゼを結合させた後にグルタルアルデヒド架橋による固定化を行い、水溶性低分子基質であるセロビオースに対する活性で調べているが約 90% 程度の活性を保持したと述べている。

2. 至適 pH

固定化セルラーゼ及び native セルラーゼのカルボキシメチルセルロース分解活性に対する pH の影響を pH 1~12 の範囲で調べた。反応は 1% カルボキシメチルセルロースを基質として、緩衝液に 100 mM Na acetate-HCl buffer (pH 1~3), 100 mM Na₂HPO₄-citric acid buffer (pH 4~8), 100 mM Na₂B₄O₇-HCl buffer (pH 9), 100 mM Na₂B₄O₇-NaOH buffer (pH 10~12) を使用して 40°C において行った。その結果 pH 4 付近に至適 pH を示す曲線が得られた。固定化によって至適 pH の変化はみられなかった (Fig. 1)。

固定酵素の至適反応 pH がシフトするのは固定化によって酵素周囲の荷電状態が変化することによるとされて

Fig. 1 Effect of pH on CMC-ase activity
Immobilized (●) and native (○) cellulase were reacted with CMC at 40°C for 30 min.

Fig. 2 pH stability of CMC-ase activity
Immobilized (●) and native (○) cellulase were preincubated in each pH buffer at 25°C for 120 hr. Reaction was carried out at pH 4.0, 40°C.

Fig. 3 Thermal stability of CMC-ase activity
Immobilized (●) and native (○) cellulase were preincubated in sodium acetate buffer (pH 2.0) for 1 hr. and immobilized cellulase (□) was also incubated at pH 4.0.

いるが、担体として荷電をもたない Sepharose を用いた場合には酵素反応に影響するような荷電状態の変化もないため至適反応 pH のシフトもみられない。

3. pH 安定性

酵素を固定化することによって安定性が増大する場合があることが知られているが、セルラーゼを固定化することによっても安定性がよくなることが考えられ pH に対する安定性を検討した。

固定化セルラーゼ懸濁液 (200 mg/ml) 0.1 ml に各 pH の緩衝液 0.9 ml を加えた後、25°C において 120 時間保存した。その後カルボキシメチルセルロースを基質として残存活性を測定した。native セルラーゼの場合も同様に緩衝液で希釈後同様に保存して残存活性を測定した。

Aspergillus niger セルラーゼは、もともと相当広範囲の pH で安定であることが知られている⁸⁾。本実験の場合は native セルラーゼは pH 3~8 でほぼ安定であった。これに対し固定化セルラーゼは酸性側での安定度がよりよくなって pH 2~8 で安定であるという結果が得られた (Fig. 2)。

4. 熱安定性

温度に対する安定性について調べた。固定化セルラーゼを pH 2 及び 4 の緩衝液中に 100 mg/ml となるように懸濁液とし 30, 40, 50, 60°C において 1 時間保存した後のカルボキシメチルセルロース分解活性について残存活性を測定した。native セルラーゼの場合も 5 mg/ml となるように緩衝液に溶かし各温度に保存後残存活性を測定した。

その結果、pH 2 においては native セルラーゼは 40°C、1 時間で 50% に活性低下し、50°C ではほとんど完全に失活するのに対し、固定化セルラーゼでは 40°C ではほぼ安定であり 60°C、1 時間でも 30% 以上の活性を保持していた。また pH 4 において各温度に保存した場合安定性はさらによくなり 60°C においても 90% の活性を保持していた (Fig. 3)。

5. 保存安定性

酸性側で安定性の向上が認められた固定化セルラーゼの酸性側における保存安定性を native セルラーゼと比較して調べた。固定化セルラーゼは、100 mg/ml となるように 100 mM Na acetate-HCl buffer (pH 2) 5 ml に懸濁し、少量のトルエンを滴下して 25°C において保存した。各時間ごとに一定量をサンプリングして、残存するカルボキシメチルセルロース分解活性を測定した。Native セルラーゼは 0.5 mg/ml となるように緩

Fig. 4 Stability of immobilized cellulase

Immobilized (●) and native (○) cellulase were stored in sodium acetate buffer (pH 2.0) at 25°C.

Fig. 5 Test for leakage of cellulase activity from immobilized cellulase

Immobilized cellulase was incubated with 1% CMC solution in sodium acetate buffer (pH 4.0) at 40°C.

Arrow: Immobilized cellulase removed by filtration

—△—: Amount of reducing sugar in filtrate

—●—: Amount of reducing sugar in reaction mixture

—○—: control

Fig. 6 Recycling of immobilized cellulase

Immobilized cellulase was subjected to the reaction at 40°C for 1 hr repeatedly 15 times.

Fig. 7 Paperchromatogram of the hydrolysate of CMC with immobilized cellulase

ST: celloligosaccharide standard

G₁, G₂, G₃, G₄: glucose, cellobiose, cellotriose, cellotetraose

衝液に溶解保存し同様に残存活性を測定した。

その結果を Fig. 4 に示した。native セルラーゼは 50 時間程度で急速に失活し 25% 程度まで残存活性が低下し、さらに失活をつづけて 186 時間後ではわずか 6% 程度の活性が残っているにすぎない。これに対して固定化セルラーゼでは、保存初期における活性低下が極めて緩慢であり 186 時間後 (約 8 日後) においても約 50% の活性を保持していた。このように酸性 pH における長期保存に対しても、固定化セルラーゼはかなり高い安定性を示した。

6. 酵素のリーク

固定化セルラーゼ標品からの酵素の脱落について調べた。すなわち、100 mM Na acetate-HCl buffer (pH 4) に溶解した 1% カルボキシメチルセルロース 50ml に固定化セルラーゼ標品 1g (wet weight) を加え 40°C において反応を行わせた。反応開始後 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 分に反応液をサンプリングした後に凍結して保存し後に還元力を測定した。反応後 30 分において反応混合液の 20 ml をとり No. 3 グラスフィルターによる吸引濾過で固定化セルラーゼを除去し、濾液は再び 40°C でインキュベートを継続して、60, 120 分後の還元力を測定した。Fig. 5 に示すように反応混合液中では反応の進行にしたがって還元力が増加しつづけるが (●), 固定化セルラーゼを濾別除去した場合の還元力の増加はほとんどみられなかった (△)。このことからセルラーゼ酵素が固定化された担体から脱落し濾液に移行することはないと考えられる。

前項までに示したようにセルラーゼを固定化することによって安定性の向上がたしかめられたが、バイオリアクターとして用いる場合カラムタイプにしても攪拌槽タ

イブにしても酵素のリークがあつては使用中に酵素が流失してしまうため実際の使用は困難である。本固定化セルラーゼ標品では酵素のリークがほとんどないことが確認された。

7. くり返し利用試験

固定化酵素を考える場合、反応後酵素を回収再利用することができる点で native 酵素に比べて有利である。本実験で調製した固定化セルラーゼについても酵素反応後回収再利用を行う試験を行った。

固定化セルラーゼ標品 2g (wet weight) を、100 mM Na acetate-HCl buffer (pH 4.0) に溶解したカルボキシメチルセルロース 0.5% 溶液に加え振盪しながら 40°C において反応を行わせた。60 分反応後、No. 3 グラスフィルターによって吸引濾過しついで蒸留水によって洗浄回収した。濾液と洗液は 1 回分の反応液として合わせ還元力を測定した。回収した固定化セルラーゼにただちに基質を加え再び反応を行った。このような反応回収操作を 15 回くり返した結果、15 回目においても最初の 80 % 以上の活性を示しておりかなり安定して再利用することが可能である (Fig. 6)。

1 回の反応について平均 1.5 % 程度の活性低下がみられるが、これは濾過回収時においてグラスフィルターに残留し回収しきれなかったことによる損失であると思われる。

8. 反応生成物

固定化セルラーゼ反応による生成物をペーパークロマトグラフィーによって調べた。1 % カルボキシメチルセルロース 7ml に固定化セルラーゼ懸濁液 (200 mg/ml) 7ml を加え反応を行わせ、経時的にサンプリングして脱塩後、一定量を濾紙にスポットしてペーパークロマトグラフィーを行った。反応の初期からグルコースのみがあらわれて、カルボキシメチルセルロースから速やかにグルコースが生成していることがわかる (Fig. 7)。

Native セルラーゼも同様にして反応生成物を調べると全く同じクロマトパターンが得られ固定化によって酵素反応生成物に何ら変化のないことがわかった。

以上のようにセルラーゼを cyanogen bromide 法によって担体に結合させた場合、期待されたように pH 及び熱に対する安定性が向上した。また酵素のリークもなく、多数回くり返し反応を行っても安定である固定化セルラーゼを調製することができた。

一般にセルロースは水に不溶性であり、固定化セルラーゼによって酵素分解を行うことは酵素-基質の接触が少く反応が困難である。しかし、非晶性セルロースは液

中において膨潤状態にあるため固定化セルラーゼとの接触の困難も比較的解消されているとみることができる。事実、本実験における固定化セルラーゼでは、硫酸膨潤セルロースを基質にした場合の活性で native セルラーゼの 24% が保持されていた。また、本固定化セルラーゼは、酸性 pH に対する安定性が向上し pH 2 付近までは非常に安定な酵素となっているため、非晶性セルロースを酸性 pH で分解するためには非常に都合がよい。さらに高温においても安定性がよくなっていることから、より高温の条件で反応させ活性をたかめることが期待できる。

本固定化セルラーゼは *Aspergillus niger* セルラーゼ系全体を固定化した形となっているため β -グルコシダーゼも同時に固定化され、最終反応生成物としてグルコースのみが生じる結果となっている。したがって、非晶性セルロースを一つのリアクターでグルコースにまで変換することが可能である。

しかしながら、非晶性セルロースは水溶性ではないため、より効率的な糖化には酵素-担体間にスパーサーを入れるなどして基質酵素の接触が多くとれるような形体の固定化を試みる必要があると考えられる。

要 約

Aspergillus niger のセルラーゼをブロムシアンによって活性化した Sepharose CL-6B に固定化した。蛋白の 90% 以上が固定化され、セルラーゼ活性の 24% が保持された。この固定化セルラーゼの性質を調べて、native セルラーゼと比較した。

(1) 固定化セルラーゼの活性の pH 曲線は、native セルラーゼに比べて変化しなかった。しかし固定化セルラーゼは pH 2~8 の範囲で安定となった。

(2) 固定化セルラーゼは熱安定性が向上し、pH 4, 60°C, 1 時間のインキュベートではカルボキシメチルセルロース (CMC) 分解活性の 90% を、pH 2, 50°C では 60% の活性を維持した。

(3) pH 2, 25°C で 8 日間保存した後の残存活性は 50% であった。

(4) 固定化セルラーゼからの酵素の流出はなく、くり返し 15 回の反応を行っても 1 回目の 80% の活性を維持した。

(5) 固定化セルラーゼによる CMC の加水分解物のペーパークロマトグラフィーから、反応生成物は native セルラーゼ同様グルコースであることが認められた。

本研究にあたり、基質 CMC サンプルを供与された第一工業製菓株式会社に感謝いたします。なお、本研究は、農林水産省技術会議事務局バイオマスプロジェクト(82-V-1-6)の予算によって実施されたものである。

文 献

- 1) SASAKI, T., TANAKA, T., NANBU, N., SATO, Y. and KAINUMA, K., *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1031 (1979).
- 2) 佐々木堯, 佐藤陽子, 中川貞人, 白石真人, 貝沼圭二, 日食工誌, **26**, 523 (1979).
- 3) AXÉN, R. and ERUBACK, S., *Eur. J. Biochem.*,

18, 351 (1971).

- 4) PORATH, J., ASPBERG, K., DREVIN, H. and AXÉN, R., *J. Chromatogr.*, **86**, 53 (1973).
- 5) SOMOGYI, M., *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952).
- 6) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., LEWIS FARR, A. and RANDALL, R. J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 7) TANAKA, M., MORITA, T., TANIGUCHI, M., MATSUNO, R., and KAMIKUBO, T., *J. Ferment. Technol.*, **58**, 517 (1980).
- 8) IKEDA, R., YAMAMOTO, T. and FUNATSU, M., *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 1201 (1967).

(昭和 58 年 5 月 30 日受理)

新 刊 紹 介

食品学

林 寛 編著

本書は生活科学の立場から、日常の食生活に関連の深い食品を選び系統的に整理して書かれている。食品の成分や性状などのほか、食品の選択、保蔵、調理・加工などについて消費者に必要と思われる知識をもり込むように配慮されている。

内容は以下に示すとおりである。こめと小麦粉、とうもろこしとそば、いもとデンプン、砂糖と他の甘味料、食用油脂、種実、だいずと他の豆類、魚介類と海藻、肉と肉製品、鶏卵、牛乳と乳製品、野菜と果実、きのこ類、嗜好品飲料、調味料と香辛料、インスタント食品。

本書は図表も多く、比較的平易に記述されているので、食品学、調理学、栄養学などを学ぼうとする学生にとって、また食品の生活科学に関心を持つ人達にとって好著である。

A 5 版, 330 頁, 定価 2 600 円

弘学出版 (〒214 川崎市多摩区南生田 6-16-2)

新 刊 紹 介

食品工業と酵素

一島英治 編

本書は食品工業の発展の一つの基盤であるバイオテクノロジーに視点を置いて、食品工業に対する酵素の役割を解説している。多くの工業化された例を示しながら、酵素反応の解析を折りこんで書き進めている。著者は 14 名の各部門毎の専門家から成っている。内容は以下に示すとおりである。すなわち、1. 食品工業と酵素、2. 糖質関連酵素と食品加工、3. 植物組織崩壊酵素と食品加工、4. タンパク分解酵素と調味料製造、5. 食肉の熟成、6. 乳製品と酵素、7. 核酸分解酵素と調味料製造、8. 脂質分解酵素と食品加工、9. 醸造と酵素、10. フレーバー酵素、11. プラスティン反応の利用、12. 酵素利用による食品の解毒である。本書は食品工業に従事する研究者、技術者および経営者には好著であり、また自然科学系の学部学生、大学院生にとって、酵素学の応用的教科書として最適であると思われる。

15.7 cm × 21.8 cm, 1983 年 10 月刊行, 314 ページ,
5 200 円, 朝倉書店 (〒162 東京都新宿区新小川町
2-10)