

目的別テーマ：天然繊維の高機能化と応用

研究テーマ

17-2-20：酵素反応によるセルロース-鉄複合体形成に関する研究

ABSTRACT

During cellulose degradation by the combination of cellulase and cellobiose dehydrogenase, cellulose-iron complexes have been formed and they were colored at blue called Prussian Blue. The cyanic groups were detected in cellulose treated with those enzymes by FT-IR and iron ion was also detected by ICP, which is showed the formation of blue colored complex. This detection method might be useful tool for determination of the precise action of each cellulase component.

研究目的

白色腐朽菌は、各種セルラーゼと共にセロビオース脱水素酵素（CDH）を生産して効率的にセルロースを分解することが知られている。CDHはセルロース分解で生じたセロオリゴ糖のC-1位のヘミアセタール性の水酸基を、電子受容体の存在下で酸化してセロオリゴノラクトンを生成する酵素であるが、セルラーゼの生成物阻害を解除する効果があることが報告されている。その際、セルロース、鉄、セロビオースの存在下でCDHが反応すると、セルロースと鉄の複合体ができ、青い発色が見られた。本研究では、セルラーゼとCDHを作用させた時のセルロースの表面構造を観察し、複合体の形成メカニズムを明らかにする事を目的としている。

2年間の研究内容と成果

粗酵素製剤は Driselase (*Irpex lacteus* 起源のセルラーゼ製剤、協和発酵、CDHを含む) および Sumizyme C (*Trichoderma reesei* 起源のセルラーゼ製剤、新日本化学工業、CDHを含まない) を、また精製酵素としては、CBH I, CBH II, CDH を精製して用いた。酵素反応はパルプ、酵素、フェリシアン化カリウム、セロビオース、過酸化水素を組み合わせ混合し、30℃で24h インキュベーションして行った。その後、セルロースの着色の有無から複合体形成を確かめた。また、FT-IR でサンプル表面の構造解析、ICP で鉄の含有量の測定を行った。

酵素 (Driselase, CDH を含む) で処理したサンプルには、青色の着色が見られた (図1、図2)。FT-IR (ATR 法) による構造解析の結果、着色物質にはシアノ基が検出された (図3)。この着色物質は、プルシアンブルーと呼ばれる鉄とシアンの複合体であると考えられた。また、CDHを持たない粗酵素 Sumizyme C では着色が見られなかったことから、CDHの有無がセルロースの着色を左右すると考えられた。そこで、CDHの反応条件を解析した結果、この複合体がセルロース表面に形成されるためには、CDHの他に、 Fe^{3+} 、セロビオースが不可欠である事が判明した (表1)。また、ICPによる分析では、サンプルに鉄が含有している事が確かめられ、予想通り3価の鉄イオンがCDHの酸化反応で生じる電子の受容体となつて、2価鉄イオンを生じ、プルシアンブルー複合体を形成し、これがセルロースの酸化された末端に結合することが予想された。

最終的に酸化されたセルロース末端と2価および3価の鉄イオンとシアノ基が複合体を形成し、着色するのがプルシアンブルーの形成機構であるが、この反応に酵素反応を組み入れて考えると、図4に示したような着色のメカニズムになると考えられる。まず、セルロースはセルラーゼにより分解さ

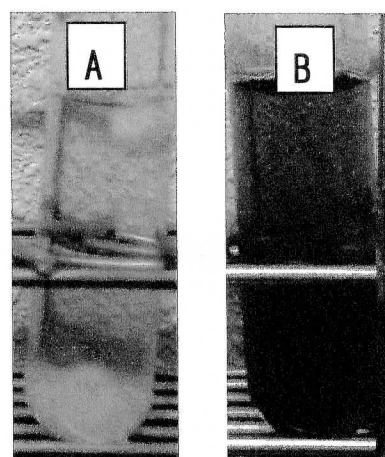


図1. Driselase処理時のセルロースの着色

- (A) 酵素未処理
(B) Driselase処理

れ、還元末端を生じる。この時、すぐ近くに CDH が存在すれば、この還元末端はすぐに酸化される。このように生じたセロビオノラクトンは、自発的な化学変化によりセロビオン酸へと変化し、これがプルシアンブルー複合体を形成すると考えられた。この反応は、あくまでセルラーゼとCDHが共存した系でのみ観察されるので、それぞれを順番に別々に反応させても効果がないことが判明した。本反応はセルラーゼの、酵素反応において基質の末端変化を観察する良い手段となることが予想された。

表 1. セルロース着色条件の概要

酵 素		Fe	G2	H ₂ O ₂	着色
1	Driselase	Ⅲ	○	○	○
2	Driselase	Ⅲ	×	×	○
3	Sumizyme	Ⅲ	○	○	×
4	CDH	Ⅲ	○	○	○
5	CDH	Ⅲ	×	×	×
6	CDH	Ⅲ	○	×	△
7	Driselase	Ⅱ	○	○	×

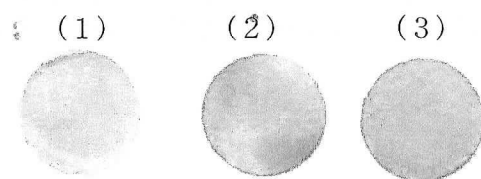


図 2. 残渣セルロースの着色

- (1) : 0 時間
(2) : 30 分反応
(3) : 6 時間反応

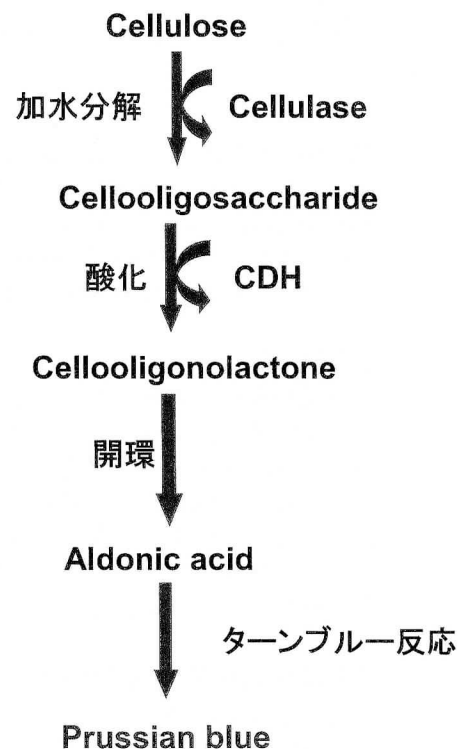


図 4. 着色反応のメカニズム

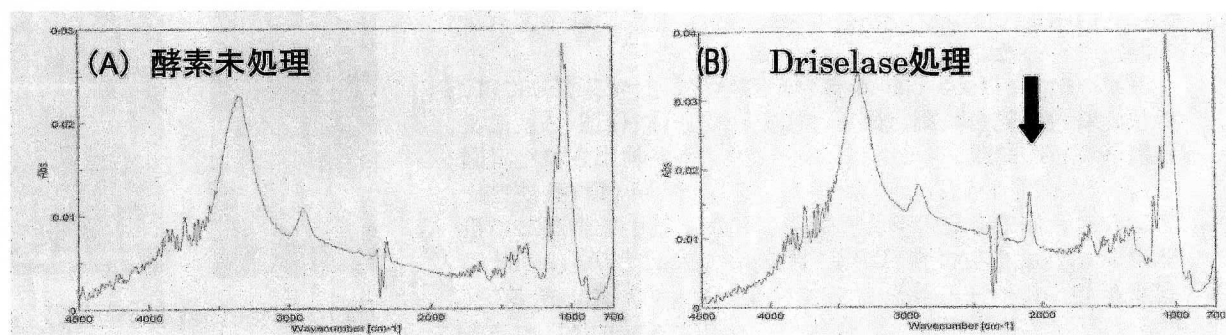


図 3. 酵素処理 (Driselase) の有無によるFT-IRスペクトルの変化
矢印は、シアノ基の吸収に相当する