

# 天野良彦、神田鷹久、野崎功一

目的別テーマ：天然繊維の高機能化と応用

17年度研究テーマ

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 those complexes by FT-IR and iron ion was also detected by ICP.*

### 研究目的

白色腐朽菌は、各種セルラーゼと共にセロピオース脱水素酵素 (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ラク톤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、セロピオースの存在下で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。

### 一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、セロピオース、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)。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2)。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 (図3)。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、 $Fe^{3+}$ 、セロピ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って、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。

### 展望

プルシアンブルーは、もともと繊維の酸化劣化を示す指標としてターンブルブルー試験で用いられているものである。今回の実験で、この反応が酵素反応の際に生じていることが示唆された。本反応は、セルロースの末端を認識するものであり、これまでセルラーゼの反応で検出されてこなかった反応後の基質中 (セルロース) の末端の数の評価に応用できるものと考えられた。さらに、今後は本反応を用いて、これまで観察されてこなかったセルラーゼによるグリコシド結合の分解反応を感度良く検出する方法を開発する予定である。これにより、最終的にはセルロースの効率的な酵素分解技術にフィードバックさせることが望まれる。

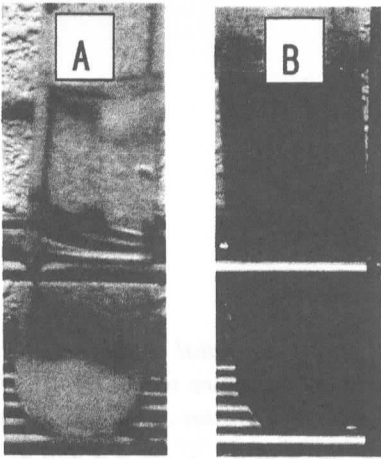


図1. Driselase処理時のセルロースの着色

- (A) 酵素未処理
- (B) Driselase処理

表1. セルロース着色条件の概要

酵素	Fe	G2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	着色
1 Driselase	Ⅲ	○	○	○
2 Driselase	Ⅲ	×	×	○
3 Sumizyme	Ⅲ	○	○	×
4 CDH	Ⅲ	○	○	○
5 CDH	Ⅲ	×	×	×
6 CDH	Ⅲ	○	×	△
7 Driselase	Ⅱ	○	○	×

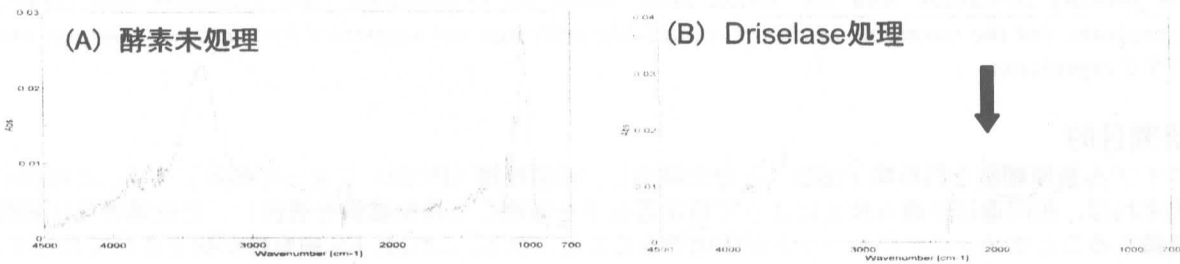


図2. 酵素処理(Driselase)の有無によるFT-IRスペクトルの変化

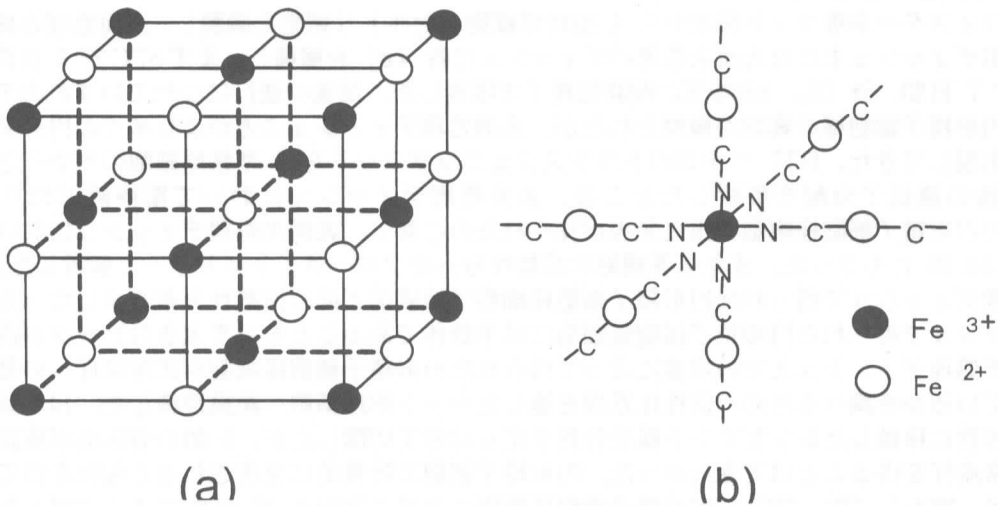


図3. プルシアンブルーの構造 (鉄イオン複合体)