



バイオセンサを用いる糖質バイオマス分解過程の解析

巽 広輔

信州大学 理学部化学科
〒390-8621 長野県松本市旭 3-1-1

Kinetic Studies on Enzymatic Hydrolysis of Polysaccharides by Amperometric Biosensors

Hirosuke TATSUMI

Department of Chemistry, Faculty of Science, Shinshu University
3-1-1 Matsumoto, Nagano 390-8621, Japan

Kinetics of the enzymatic hydrolysis of insoluble polysaccharides has been studied by using amperometric biosensors. The hydrolysis of starch, cellulose, chitin, and chitosan, catalyzed by glucoamylase, cellobiohydrolase, chitinase, and chitosanase, respectively, has been successfully monitored by direct and continuous measurements of saccharides in thick suspensions without the influence of turbidity. The dependence of the hydrolytic rates on the enzyme concentration and on the amount and specific surface area of substrate can be explained by the rate equation based on the Langmuir adsorption of the free enzyme onto the surface of the substrate.

1. はじめに

近年、環境・エネルギー問題への関心の高まりの中で、年間 1,000 億トン以上も生産されるバイオマス、とりわけデンプン、セルロース等の多糖が再生産可能なエネルギー資源として注目されている。これらの糖質バイオマスから燃料用アルコールを生産するためには、多糖のグリコシド結合を加水分解し、発酵可能な低分子量の糖を生成する必要がある。多くの場合、この加水分解反応の遅さが糖質バイオマスの利用における最も大きな障害となっている。したがって、この反応を触媒するアミラーゼ、セルラーゼ等の加水分解酵素をいかに効率よく働かせることができるかが、糖質バイオマス高度利用のための鍵である。

アミラーゼ、セルラーゼ等の酵素反応速度の研究は、従来は測定および解析のしやすさなどの理由から、基質と酵素がともに水に溶けている均一反応のみを扱っていることが多い。しかしながら、これらの加水分解酵素は、糖質バイオマス分解過程においてデンプン、セルロース等の不溶性多糖の表面で作用するため、従来の均一系での結果だけに基づく触媒機能評価は必ずしも十分とはいえない。不溶性多糖を用いる場合は、これまで反応速度の測定法として多糖懸濁液に加水分解酵素を添加し一定時間反応させた後遠心し、上清を分光測定等に供する方法が用いられてきたが、分離の操作が必要であり直接測定は不可能である。また他に比濁法も用いられてきたが、定量的解析は困難である。

(平成 25 年 2 月 18 日受理)

電気化学センサの利点の一つとして、試料溶液の濁りや着色の影響を受けないことが挙げられる¹⁾。最近筆者らはこの利点を活かし、デンプン粒、微結晶セルロース等の濃厚懸濁液中で、これら糖質バイオマスの分解過程を電流計測型バイオセンサにより直接、連続的に追跡する方法を確立した²⁾。また、この方法を用いて詳細な酵素反応速度解析を行なった。本稿では、それらの結果を要約して述べる。本稿で取り上げる糖質バイオマスを表1に、加水分解酵素を表2に、バイオセンサに用いる酸化還元酵素を表3にまとめた。

2. デンプンの加水分解

グルコアミラーゼ (GA, EC 3.2.1.3) は、デンプンの非還元末端からグルコースを切り出す加水分解酵素である。近年、デンプン粒に直接作用できる GA が、デンプン系バイオマスからのエタノール³⁾や乳酸⁴⁾の生産に応用できる可能性があるとして注目されてきた。従来の研究では、デンプン粒を異なる反応時間で遠心分離等により取り除いたのち、生成した還元糖を吸光度測定し加水分解速度を見積もるといった方法が用いられてきた⁵⁾。しかしながら電気化学測定法を用いれば、試料溶液の濁度の影響を受けずに直接かつ連続的に反応を追跡できる。そこで筆者らは、デンプン粒の濃厚懸濁液中での反応速度の測定に電流計測型グルコースバイオセンサを導入し、GAによるデンプン粒加水分解の速度解析を行なった⁶⁻⁸⁾。

膜被膜 - 酵素固定 - メディエータ練り込みカーボンペースト電極は、池田らの方法にしたがって作製した^{9,10)}。グラファイト粉末、電子伝達メディエータとしてベンゾキノン、流動パラフィンを用いたものをカーボンペースト

表1 本研究で取り上げた糖質バイオマス

	グリコシド結合	-Q
デンプン	α -(1→4) (α -(1→6))	
セルロース	β -(1→4)	-OH
キチン	β -(1→4)	-NHCOCH ₃
キトサン	β -(1→4)	-NH ₂

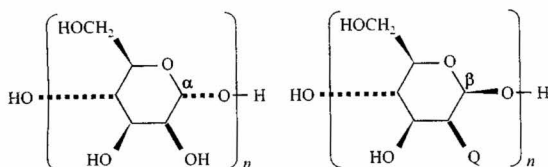


表2 本研究で取り上げた加水分解酵素

	基質	作用する結合	生成物
グルコアミラーゼ (GA)	デンプン	α -(1→4) (exo)	β -D-グルコース
セロビオヒドロラーゼ (CBH)	セルロース	β -(1→4) (exo)	β -セロビオース
キチナーゼ	キチン	β -(1→4) (endo)	キチンオリゴ糖
キトサナーゼ	キトサン	β -(1→4) (endo)	キトサンオリゴ糖

表3 バイオセンサ作製のために用いた酸化還元酵素

	基質	電子受容体
グルコースオキシダーゼ (GOx)	β -D-グルコース	O ₂ 、キノン類等
PQQ依存型グルコースデヒドロゲナーゼ (PQQ-GDH)	さまざまな単糖、オリゴ糖	キノン類等
セロビオースデヒドロゲナーゼ (CDH)	β -(1→4)で結合したオリゴ糖	キノン類等
N-アシルヘキソサミンオキシダーゼ	N-アシルヘキソサミン	O ₂

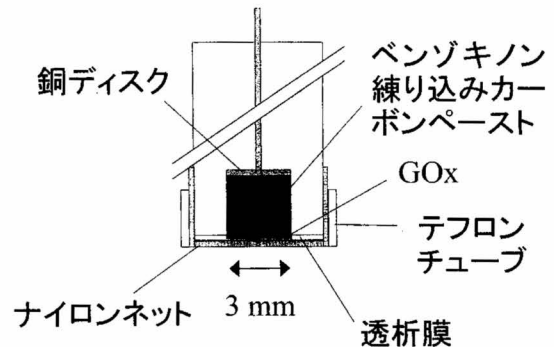


図1 透析膜被覆-GOx固定-ベンゾキノン練り込み電極の模式図

ト電極用ホルダの先端に埋め込み、ベンゾキノン練り込みカーボンペースト電極とした。この電極表面上に、グルコースオキシダーゼ (GOx, EC 1.1.3.4) の溶液を数 μ L のせ、水分を蒸発させ濃縮した。それを透析膜とナイロンネットで覆い、テフロンチューブで固定した (図1)。この電極にヒドロキノンが酸化される +0.60 V vs. Ag|AgCl|0.1 M KCl の電位を印加し、GOx が触媒するグルコース酸化に伴う電流 (I) を時間 (t) の関数として記録した (図2)。図3の A、B は、それぞれ 0.25 mg mL⁻¹ の可溶性デンプン溶液、0.020 g mL⁻¹ のトウモロコシデンプン粒 (粒径 5 ~ 25 μ m) 懸濁液中でのグルコース生

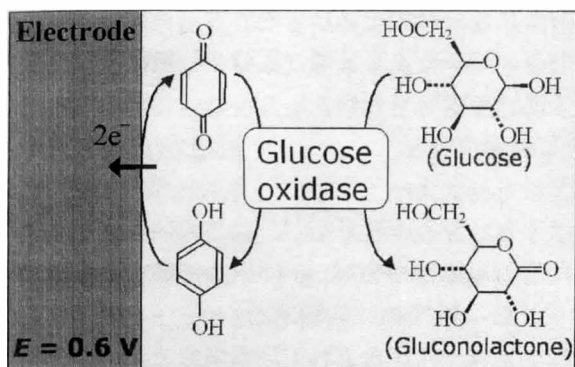


図2 グルコースの触媒的酸化の反応式

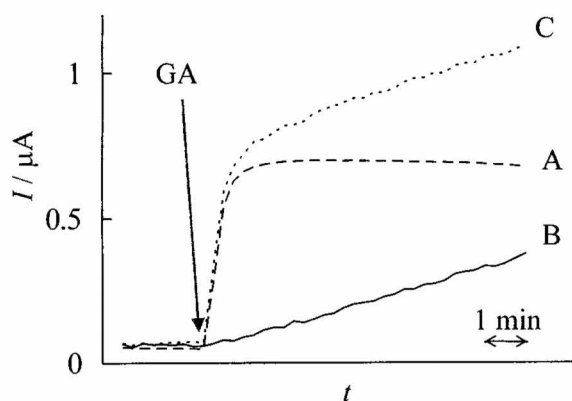


図3 (A)0.25 mg mL⁻¹の可溶性デンプン溶液、(B)0.020 g mL⁻¹のトウモロコシデンプン粒懸濁液、(C)両者の混合液(いずれも25°C、pH 5.0)中でのグルコース生成。矢印で示すところで2 U mL⁻¹のGAを添加。センサの感度は0.47 μA mM⁻¹

成を表す $I-t$ 曲線である。可溶性デンプン溶液 (A) に 2 U mL⁻¹ の GA を添加すると、1 分程度で電流値は一定になったのに対し、デンプン粒懸濁液 (B) に同濃度の GA を添加すると、電流値は直線的に上昇し続けた。懸濁液の上清を同様に測定した場合は GA を添加しても電流上昇は見られなかったため、この条件でのデンプン粒の溶解は無視できる。すなわち B の電流上昇は、GA が触媒するデンプン粒の表面加水分解によるものである。可溶性デンプン溶液とデンプン粒懸濁液を両者同時に用いた場合は、C に示すように A と同様の電流上昇ののち B と同じ傾きで直線的に電流値が上昇した。したがって、測定試料が可溶性デンプンを含んでいる場合でも、反応速度の違いによってデンプン粒の表面加水分解の速度 (v) を決定することが可能である。

図4は基質量 (S) 一定の条件下で得られた v を遊

離酵素濃度 ($[E_f]$) に対してプロットしたものである。興味深いことに、 v は $[E_f]$ が比較的小さいときにはその増加に伴って大きくなるが、 $[E_f]$ が比較的大きいときには明らかに飽和する。これは反応速度が酵素濃度に単純に比例する、とする通常のカラウーシ型速度式では説明できない。この v の $[E_f]$ 依存性は、(i) 遊離酵素の基質表面へのラングミュア吸着、(ii) 吸着した酵素の基質との反応、(iii) 生成物の溶液中への拡散、の三段階機構を仮定して得られる以下の速度式で説明できた。

$$v = \frac{v_{\max} \beta [E_f]}{1 + \beta [E_f]} \quad (1)$$

$$v_{\max} = k_0 \Gamma_{\max} a S \quad (2)$$

ここで、 β は吸着係数、 k_0 は吸着した酵素のターンオーバー数、 Γ_{\max} は単位面積あたりの最大吸着量、 a は基質の比表面積である。図4の実線は式1をあてはめたものであり、これより $\beta = (1.4 \pm 0.4) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 、 $v_{\max} = 0.051 \pm 0.005 \text{ mM min}^{-1}$ の値が得られた。図5は $[E_f] \gg \beta^{-1}$ の条件下で得られた v_{\max} を S に対してプロットしたものである。式2からの予測にしたがい、 v_{\max} は測定した範囲内で S に比例した。図5の回帰直線より、 k_0 は $6.3 \pm 1.7 \text{ s}^{-1}$ と求められた。また、分級して得た異なる粒径のデンプン粒を用いた場合にも、 v_{\max} は式2からの予測にしたがい S 一定の条件下で a に比例した。このとき k_0 は $6.1 \pm 3.1 \text{ s}^{-1}$ と求められた。ここで得られた k_0 は、可溶性デンプン (平均重合度 15.5) に対して得られた GA のターンオーバー数¹¹⁾ $24 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ よりいくぶん小さく、不溶性デンプンの非還元末端が可溶性デ

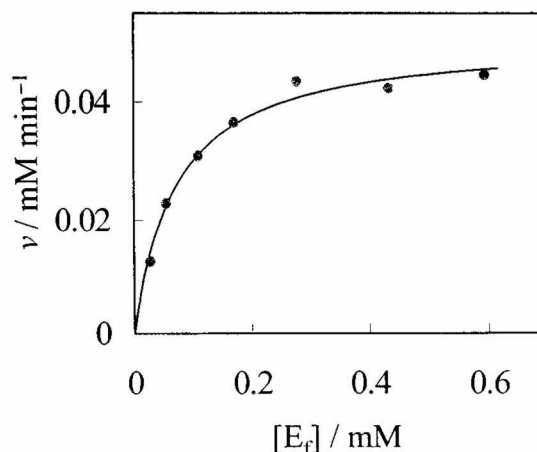


図4 v の $[E_f]$ に対するプロット ($S = 0.010 \text{ g mL}^{-1}$)。実線は式1に基づく回帰曲線

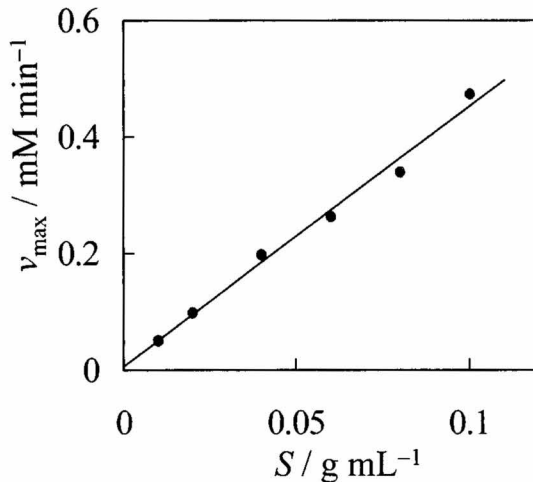


図5 v_{\max} の S に対するプロット。実線は式2に基づく回帰直線

ンプンのそれより GA の活性中心に近づきにくいことを示している。筆者らは、異なる植物由来のデンプン粒（米、小麦、キャッサバ、サツマイモ、馬鈴薯）についても同様の速度解析を行ない、得られた k_0 とデンプン粒の結晶構造との関係を論じた⁸⁾。

3. セルロースの加水分解

セロビオヒドロラーゼ (CBH, EC 3.2.1.91) は、セルラーゼの一種であり、セルロースの糖鎖末端からセロビオースを切り出す加水分解酵素である。とくに *Trichoderma* 属の真菌が分泌する CBH は¹²⁾、結晶性セルロースに対して高い活性を示すため、古くから注目され、また工業的にも広く利用されてきた。近年、CBH の構造と活性の関係については、かなり多くの部分が解明されたが、その詳細な反応速度論的研究については、依然として不溶性基質（セルロース）と可溶性酵素（CBH）の二相系における適当な反応速度の測定法が知られてこなかったため、それほど大きな進展は見られない^{12,13)}。

電流計測型バイオセンサは、CBH によるセルロース加水分解の速度を測定するのに有用である。セルロース懸濁液中のセロビオース濃度を高感度で測定するために、筆者らはピロロキノリンキノン依存型グルコースデヒドロゲナーゼ (PQQ-GDH, EC 1.1.5.2) を用いたバイオセンサを作製した¹⁴⁾。PQQ-GDH は比較的低い基質特異性を有しており、グルコースだけでなくセロビオースのような二糖にも同程度の活性で作用することが知られている。PQQ-GDH を固定化したバイオセンサを用いることにより、セルロースの濃厚懸濁液中でも直接かつ連

続的に加水分解の追跡が可能になった。実験結果は、先のデンプン粒加水分解と同様の三段階機構に基づく速度式で説明できた。

最近、筆者らは PQQ-GDH の代わりにセロビオースデヒドロゲナーゼ (CDH, EC 1.1.99.18) を用いたバイオセンサも作製した¹⁵⁻¹⁷⁾。この酵素はグルコースにほとんど作用せず、 β -(1 \rightarrow 4) で結合した二糖やオリゴ糖に特異的に作用するため、CBH の反応溶液にグルコースが含まれている場合でも、その妨害を受けずセロビオースを容易に定量することができる。さらに、CDH の固定化法を工夫することにより、より応答を速くすることにも成功した¹⁶⁾。これまで用いてきた図1の形の電極では、透析膜での物質透過が遅いため応答時間が 20 s 程度であったが、透析膜を用いず CDH をグルタルアルデヒド架橋法で固定することにより、“dynamic delay” と呼ばれる遅延時間が約 1 s のものが作製でき、10 s 程度の反応時間であれば速度測定が正確に行なえるようになった。これを用いてセルロース加水分解の初期段階（反応時間 1 分まで）におけるセロビオースの濃度変化を追跡し、定常状態に達する前の反応速度を解析した結果、反応初期の加水分解速度は不活性 CBH—セルロース複合体の遅い解離によって律せられていることが示された¹⁷⁾。

4. キチン・キトサンの加水分解

キチンとキトサンは、それぞれ *N*-アセチルグルコサミンとグルコサミンが β -(1 \rightarrow 4) 結合で重合した多糖であり、通常は真菌の細胞壁や無脊椎動物の外骨格等と一緒に見出される。その加水分解生成物、すなわち *N*-アセチルグルコサミン、グルコサミンおよびそれらのオリゴ糖は、抗菌、抗腫瘍、エリシター活性があるなどとして注目を集めている¹⁸⁾。これまで、キチン、キトサンの加水分解酵素であるキチナーゼ (EC 3.2.1.14) とキトサナーゼ (EC 3.2.1.132) の活性測定は、反応溶液中のアミノ糖を定量することにより行なわれてきたが、その測定法におけるアルカリ溶液中での煮沸や酸溶液処理が煩雑であるため、より簡便な測定法が望まれてきた。筆者らは、キトサナーゼの活性測定のためにグルコサミンおよびキトサンオリゴ糖を検出できる電流計測型バイオセンサを導入した¹⁹⁾。ここで用いたバイオセンサは、先に述べたセロビオース測定用の PQQ-GDH 固定化センサと同じものである。PQQ-GDH は比較的基質特異性が低いため、グルコサミンやキトサンオリゴ糖にも作用することができる。

本センサを用いることにより、キトサン溶液または懸濁液中でのグルコサミンおよびキトサンオリゴ糖の測定が容易に行なえるようになり、簡便なキトサナーゼ活性測定法が構築できた。また、筆者らは、*N*-アシルヘキソサミンオキシダーゼ (EC 1.1.3.29) を用いた *N*-アセチルグルコサミンおよびキチンオリゴ糖の電流計測型バイオセンサも作製し²⁰⁾、それをキチナーゼ活性測定に応用した²¹⁾。

5. おわりに

一般に、糖質加水分解酵素はその反応様式にしたがって2種類に分類される。一方は、糖鎖の末端に作用し単糖または二糖を生成するエキソ型、他方は、糖鎖の内部にランダムに作用するエンド型である。エキソ型加水分解酵素の生成物は一種類の単糖または二糖であるから、それに選択的な電流計測型バイオセンサを用いれば反応速度を容易に測定できる。それに対しエンド型加水分解酵素の生成物は重合度の異なるオリゴ糖の混合物であるから、電流計測型バイオセンサだけで反応速度を測定するのは困難である。

通常、デンプンやセルロースの工業的糖化においては、加水分解を促進するためエキソ型とエンド型を同時に用いる。この両者を用いることにより、それぞれを単独で用いたときよりも加水分解が促進される効果は「協同効果 (synergetic effect)」と呼ばれているが、従来の協同効果についての研究は、主として測定の困難さから、定量的な解析にまで至っていないものが多い。このような二酵素反応系の詳細な速度解析を実現するためには、電流計測型バイオセンサと、エンド型加水分解酵素の反応速度を追跡できる別の方法を組み合わせればよいと考えられる。近年、等温滴定カロリーメトリーが、不溶性多糖の酵素的加水分解を追跡する手段として有用であることが示された^{22,23)}。同法はグリコシド結合の加水分解反応熱の測定に基づいているので、二酵素反応系に用いた場合には、エキソ型とエンド型の反応速度の和を与えることになる。さらに、試料溶液の濁りの影響を受けない、という電気化学センサと同じ利点を有している。もし電流計測型バイオセンサと等温滴定カロリーメトリーとを組み合わせることができれば、糖質バイオマスの濃厚懸濁液中でエキソ型とエンド型それぞれの反応速度を同時に追跡できると期待される。筆者らは現在、小型のバイオセンサをカロリーメトリーセルに挿入し、二酵素反応系の速度解析を試みている²⁴⁾。

参考文献

- 1) “バイオ電気化学の実際 — バイオセンサ・バイオ電池の実用展開 —”, 池田篤治監修, CMC 出版, 2007.
- 2) H. Tatsumi, *Rev. Polarogr.*, 58, 75 (2012).
- 3) H.-R. Kim, Y.-K. Im, H.-M. Ko, J.-E. Chin, I.-C. Kim, H. B. Lee, S. Bai, *Biotechnol. Lett.*, 33, 1643 (2011).
- 4) R. P. John, G. S. Anisha, K. Madhavan Nampoothiri, A. Pandey, *Biotechnol. Adv.*, 27, 145, (2009).
- 5) A. C. Dona, G. Pages, R. G. Gilbert, P. W. Kuchel, *Carbohydrate Polymers*, 80, 599 (2010).
- 6) H. Tatsumi, H. Katano, *Chem. Lett.*, 33, 692 (2004).
- 7) H. Tatsumi, H. Katano, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 8123 (2005).
- 8) H. Tatsumi, H. Katano, T. Ikeda, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 946 (2007).
- 9) T. Ikeda, H. Hamada, K. Miki, M. Senda, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 541 (1985).
- 10) T. Ikeda, H. Hamada, M. Senda, *Agric. Biol. Chem.*, 50, 883 (1986).
- 11) K. Hiromi, Y. Nitta, C. Numata, S. Ono, *Biochim. Biophys. Acta*, 302, 362 (1973).
- 12) Y.-H. P. Zhang, L. R. Lynd, *Biotechnol. Bioeng.*, 88, 797 (2004).
- 13) Y.-H. P. Zhang, M. E. Himmel, J. R. Mielenz, *Biotechnol. Adv.*, 24, 452 (2006).
- 14) H. Tatsumi, H. Katano, T. Ikeda, *Anal. Biochem.*, 357, 257 (2006).
- 15) N. Cruys-Bagger, H. Tatsumi, K. Borch, P. Westh, *Dansk Kemi (in Danish)*, 91(3), 10 (2010).
- 16) N. Cruys-Bagger, G. Ren, H. Tatsumi, M. J. Baumann, N. Spodsberg, H. D. Andersen, L. Gorton, K. Borch, P. Westh, *Biotechnol. Bioeng.*, 109, 3199 (2012).
- 17) N. Cruys-Bagger, J. Elmerdahl, E. Praestgaard, H. Tatsumi, N. Spodsberg, K. Borch, P. Westh, *J. Biol. Chem.*, 287, 18451 (2012).
- 18) H. Kimoto, M. Akamatsu, Y. Fujii, H. Tatsumi, H. Kusaoke, A. Taketo, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 14 (2010).
- 19) H. Tatsumi, H. Katano, T. Ikeda, H. Kimoto,

- Anal. Sci., 25, 825 (2009).
- 20) 稲垣英典, 福井県立大学卒業論文 (2008).
- 21) 野田太以良, 福井県立大学卒業論文 (2008).
- 22) L. Murphy, K. Borch, K. C. McFarland, C. Bohlina, P. Westh, *Enz. Microb. Technol.*, 46, 141 (2010).
- 23) L. Murphy, N. Cruys-Bagger, H. D. Damgaard, M. J. Baumann, S. N. Olsen, K. Borch, S. F. Lassen, M. Sweeney, H. Tatsumi, P. Westh, *J. Biol. Chem.*, 287, 1252 (2012).
- 24) N. Cruys-Bagger, H. Tatsumi, K. Borch, P. Westh, The 61st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Nice, France, Abstract file 'ise101046' (2010).

