

# セルラーゼによる結晶セルロースの加水分解 過程での相乗効果有無の判別式の確立

田中三男、嶋原泰二\*、尾嶋洋彰\*

岡山理科大学理学部生物化学科

\* 岡山理科大学大学院理学研究科修士課程生物化学専攻

(1999年11月4日 受理)

## 1. 緒言

セルロースを加水分解するセルラーゼは多成分系であり、作用機作の異なる酵素成分から構成されている。各セルラーゼ成分によるセルロースの加水分解速度は分解率の増大と共に急激に低下する<sup>1)</sup>。しかしながら、それらの成分の混合系では分解速度の低下がかなり抑制されるので、結晶セルロースはより効果的に加水分解される。このような効果を相乗効果と呼ぶが、その発現機構については不明な点が多い。加水分解速度の急激な低下を引き起こす因子については酵素活性の失活や生成物阻害など種々考えられるが、それらの影響を抑制するのみでは相乗効果の発現機構についての十分な説明ができない。一方、不溶性セルロースの加水分解ではセルラーゼの基質への吸着が前提条件となることから、我々は従来より加水分解過程でのセルラーゼの基質への吸脱着挙動について検討してきた。その結果、セルラーゼの基質への吸脱着過程を考慮した動力学モデルにより結晶セルロースの加水分解過程を比較的良好にシミュレートできるものの<sup>2)</sup>、特に、反応の初期段階は必ずしも満足にはシミュレートできなかった<sup>3)</sup>。この結果はセルラーゼ反応に特有の相乗効果(作用)という現象が考慮されていないことに起因している。

本研究では相乗効果を考慮した加水分解モデルを構築するために、まず初めに各セルラーゼ成分の動力学定数と相乗効果との関係より相乗効果の有無の判別式を確立したので報告する。

## 2. 実験法

### 2-1 セルラーゼの精製

*Trichoderma viride* の生産するセルラーゼ (Meicelase CEP-6000, 明治製菓株式会社製) がカラム分画法により部分精製 (FI~FV および PV-I) された<sup>4)</sup>。得られた 5 画分のそれぞれについてスラブ電気泳動を行った。各画分の泳動後、主成分部分のみを切り取り、ホモジナイズした後、0.05 M-酢酸緩衝液 (pH 5.0) にて抽出した。各抽出液を濃縮後、SDS-ディスク電気泳動にて単一バンドとなることを確認し、精製セルラーゼ成分 (FIE~FIVE および PV-IE と仮称) として凍

結保存した<sup>5)</sup>。

### 2-2 各種セルラーゼ活性

活性測定は基本的には Tanaka 等の方法<sup>6)</sup> に従った。各成分の微結晶セルロース (MCC, Merck 社製) の加水分解活性は 30 °C で 2 時間振とうしながら反応後、上澄み中の全糖量をフェノール-硫酸法により測定して求めた。基質濃度は 10 g/l とした (Hofstee plot による動力学定数を求める場合には MCC 濃度を適当な範囲で変化させた)。基質懸濁液は酵素添加前に 24 時間振とうを行った。各成分のカルボキシメチルセルロース (CMC, 和光純薬 (株) 製) の加水分解活性は 30 °C で 30 分反応後、反応液中の還元糖量を Somogyi-Nelson 法により測定して求めた。基質濃度は 4 g/l とした。反応液および基質調製液には 0.05 M-酢酸緩衝液 (pH 5.0) を用いた。酵素活性の 1 Unit は MCC から 1 分間に 1  $\mu$ mole の全糖量、または CMC から 1 分間に 1  $\mu$ mole の還元糖量 (いずれもグルコース相当量として) を生産する酵素量と定義した。一方、各成分の  $\beta$ -グルコシダーゼ活性は 0.3 g/l p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (p-NPG) を基質溶液として、30 °C で 20 分反応後、反応溶液中の p-NP 量を測定 (1 M 炭酸ソーダ溶液にて酵素反応を停止させるとともに、発色させる) して求めた。酵素液および基質溶液の調製には上記の緩衝液を用いた。酵素活性の 1 Unit は 1 分間に 1  $\mu$ mole の p-NP を生産する酵素量と定義した。

各セルラーゼ成分の CMC 分解に対するランダム性については Tanaka 等の方法<sup>6)</sup> に従って測定した。

### 2-3 セルラーゼ成分間の相乗効果

精製されたセルラーゼ成分中の 2 成分を組合わせた混合系と各成分単独系との加水分解量の比より相乗効果の大きさを検討した。MCC 濃度を 10 mg/l とし、2 成分の混合比を変化させた。ただし、反応液中の全タンパク濃度は合計 0.1 g/l とした。反応は振とうしながら 30 °C で 2 時間行い、生成した全糖量を測定した。相乗効果の値は次のように計算して求めた。即ち、相乗効果の値 = 混合系での生成全糖量 / それぞ

れ単独系での生成全糖量の和である。ただし、分母の生成全糖量は混合系でのそれぞれの成分の濃度の場合に生成される全糖量に換算後の和である<sup>7)</sup>。

3. 結果と考察

3-1 各種セルラーゼ成分の反応動力学定数

Table 1 は電気泳動的に単一バンドにまで精製した各種セルラーゼ成分の各種基質に対する比活性、および MCC に対する Km 値 (即ち、Michaelis 定数) および Vmax/e<sub>0</sub> (即ち、反応速度定数) を示している。ここで、Km 値の大きさからセルラーゼ成分を 2 大別できる。即ち、FIE と FIIIe は Km 値が大きく、FIIe と FIVE は Km 値が小さい成分である。また、前 2 成分は CMC 分解活性が高く、CMCase 的成分であり、後 2 成分は CMC 分解活性が低く (MCC 分解活性は前 2 成分と同程度である)、MCCase 的成分であると思われる。PV-IE の Km 値は中間的な値であるが、p-NPG に対する活性が極めて高く、β-glucosidase であると思われる。

3-2 2 成分組み合わせ系での相乗効果

精製セルラーゼの 2 成分組み合わせ系での MCC 加水分解における相乗効果の結果を Fig. 1 に示している。CMCase 的成分と MCCase 的成分の組み合わせ系ではいずれの場合も

Table 1. Specific activities and kinetic constants of reaction for crude cellulase and purified cellulase components.

	Specific activity (unit/mg) toward			Km ((w/v)%)	Vmax/e <sub>0</sub> (total sugar/g protein/h)
	MCC	CMC	p-NPG		
Meicelase	0.260	3.0	0.45	0.48	4.36
F IE	31.1	31.1	0.0029	4.95	12.8
F IIE	0.092	0.092	0.0037	0.82	2.37
F IIIe	10.3	10.3	0.0071	2.07	9.45
FIVE	0.079	0.079	0.0025	0.34	0.87
PV-IE	0.270	0.270	31.0	1.67	0.83

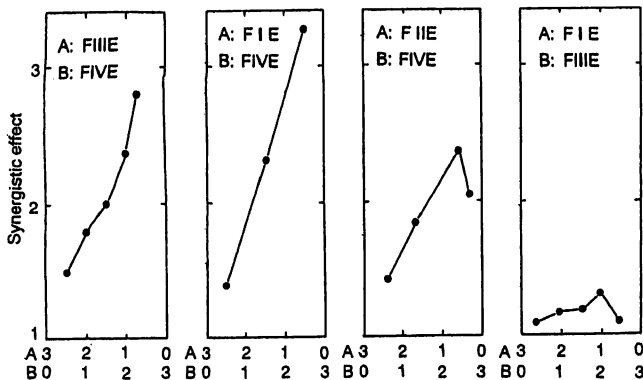
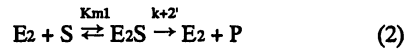
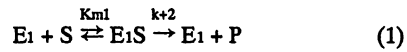


Fig. 1. Synergistic effects during MCC hydrolysis with mixture of purified two cellulase components.

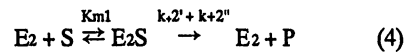
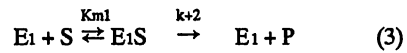
相乗効果が現われている。相乗効果の大きさは MCCase 的成分と CMCase 的成分の添加量比に依存することが明らかであり、MCCase 的成分の添加量比が大きいほど大きくなるが、最適値が存在するようである。

3-3 相乗効果と反応動力学定数の関係 (理論的考察)

相乗効果と反応動力学定数との関係を求めるため、次の仮定をした。即ち、各セルラーゼ成分は、単独系においても、組み合わせ系 (混合系) においても、MCC 加水分解では Michaelis-Menten 型の反応に従うものとする。一般的に、酵素反応は Michaelis-Menten 型の反応に従うとして解析的に扱われる。単独系 (E1 (Km 値が大きい方の成分) ) または E2 (Km 値が小さい方の成分) ) における素反応式は(1)および(2)式で与えられる。



ここで、S は MCC((w/v)%), Km1 と k+2 はそれぞれ E1 (g protein/l) による MCC 加水分解における Michaelis 定数 ((w/v)%) と反応速度定数 (g total sugar/g protein/h) を表わし、Km2 と k+2' はそれぞれ E2 (g protein/l) による MCC 加水分解における Michaelis 定数 ((w/v)%) と反応速度定数 (g total sugar/g protein/h) を表わしている。また、E1S および E2S は酵素基質複合体濃度 (g protein/l) を表わし、P は反応生成物濃度 (g total sugar/l) を表わす。一方、混合系の場合には E1 の存在により E2 の反応速度定数が高められると仮定すると、素反応式として(3)および(4)式がえられる。



ここで、(3)式は(1)式と同じ式である。k+2'+k+2'' は混合系での E2 による MCC 加水分解における反応速度定数である。従って、単独系および混合系の反応速度 V1 および V2 (g total sugar/h) は(5)および(6)式で表わせる。

$$V_1 = k+2E_1S + k+2'E_2S \quad (5)$$

$$V_2 = k+2E_1S + (k+2'+k+2'')E_2S \quad (6)$$

また、E10 および E20 (初期酵素添加量) は(7)および(8)式で、E1S および E2S は(9)および(10)式で表わすことができる。

$$E_{10} = E_1 + E_1S \quad (7)$$

$$E_{20} = E_2 + E_2S \quad (8)$$

$$E_1S = E_1 \times S / K_{m1} \quad (9)$$

$$E_2S = E_2 \times S / K_{m2} \quad (10)$$

相乗効果の定義より、相乗効果( $Seff(-)$ )は(5)~(10)式より(11)式で与えられる。

$$Seff = V_2/V_1 = 1 + \frac{k_{+2}' \frac{E_{20} \times S}{K_{m2} + S}}{k_{+2} \frac{E_{10} \times S}{K_{m1} + S} + k_{+2}'' \frac{E_{20} \times S}{K_{m2} + S}} \quad (11)$$

ところで、(6)式より  $k_{+2}''E_2S$  の反応速度で生成される糖量が相乗効果分であると考えられ、これは(11)式の右辺第2項に反映されている。この効果分は  $E_2$  の相手方である  $E_1$  による何らかの作用で加水分解速度が促進されて生じると考えるのが妥当である。そこで、 $k_{+2}''$  (g total sugar/g protein/h) を(12)式のように  $E_1S/E_0$  なる因子で表わした。ここで  $E_0 = E_{10} + E_{20}$  で初期添加酵素濃度 (g protein/l) である。

$$k_{+2}'' = k_{+2}''' (E_1S/E_0)^\beta \quad (12)$$

指数、 $\beta$  の値を求めるために、実測値より  $k_{+2}''$  (g total sugar/g protein/h) と  $E_1S/E_0$  (-) との相関関係を求めた。Fig. 2 が得られた結果である。

FIE ( $E_1$ ) と FIVE ( $E_2$ ) の混合系では  $k_{+2}''' = 6.4$  (g total sugar/g protein/h)、FIIIE ( $E_1$ ) と FIVE ( $E_2$ ) の混合系では  $k_{+2}''' = 3.0$  (g total sugar/g protein/h)、および FIIIIE ( $E_1$ ) と FIVE ( $E_2$ ) の混合系では  $k_{+2}''' = 4.6$  (g total sugar/g protein/h) が得られる。即ち、 $k_{+2}''$  の値は成分の組合わせ方に依存しているが、一方、 $\beta$  の値 (直線の傾き) は成分の組合わせ方に依存せず、 $\beta = 1/3$  の一定値が得られた。このようにして、(12)式と  $\beta = 1/3$  の関係から、(11)式を変形すると(13)式が得られる。

$$Seff = 1 + \frac{k_{+2}''' \left( \frac{E_{10} \times S}{K_{m1} + S} \right)^{1/3} \left( \frac{E_{20} \times S}{K_{m2} + S} \right)}{k_{+2} \frac{E_{10} \times S}{K_{m1} + S} + k_{+2}''' \left( \frac{E_{10} \times S}{K_{m1} + S} \right)^{1/3} \left( \frac{E_{20} \times S}{K_{m2} + S} \right)} \quad (13)$$

組合わせた両成分の反応動力学定数 ( $K_m$  値および反応速度定数) が与えられても、 $k_{+2}'''$  が成分の組合わせ方によって変化するので、相乗効果の大きさは(13)式により求めることができない。しかしながら、相乗効果の有無の判別は(13)式を変形した(14)式で行うことができる。

$$Y = (Seff - 1)/k_{+2}''' = \frac{\left( \frac{E_{10}}{E_0} \times \frac{S}{K_{m1} + S} \right)^{1/3}}{k_{+2} \frac{E_{10}}{E_{20}} \times \frac{S}{K_{m1} + S} + k_{+2}'''} \quad (14)$$

ここで、 $Y$  (-) を相乗効果有無判別式とよぶ。

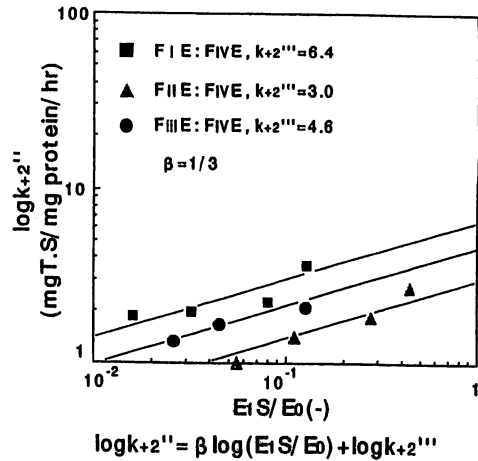


Fig. 2. Relationship between  $k_{+2}''$  and  $E_1S/E_0$ .

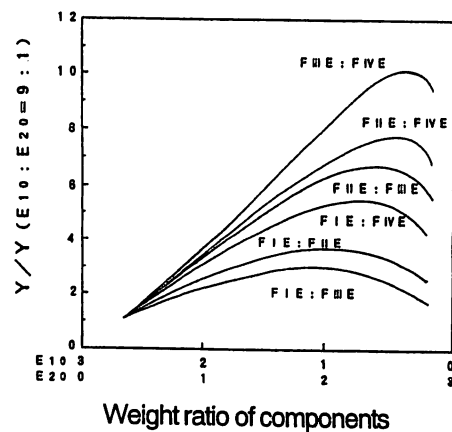


Fig. 3. The values of  $Y$  calculated with the discriminant of Eq.(14). The component having higher  $K_m$  value in two cellulase components was used as  $E_{10}$ .

### 3-4 相乗効果有無判別式の有効性

(14)式を用いて、2成分組合わせ系での各種混合比における  $Y$  値を求めた結果を Fig. 3 に示している。ここでは、仮に  $E_{10} : E_{20} = 9 : 1$  の場合に得られる  $Y$  値を 1 としたときの値を示している。相乗効果のある組合わせ系では最適組合わせ比での値 ( $Y/Y_9 : 1$ ) が大きく、相乗効果のない組合わせ系ではその値が小さくなるのが分かった。この結果は Fig. 1 (実験値) の相乗効果の結果と非常によく一致している。従って、各セルラーゼ成分の反応動力学定数を求めるだけで、2成分を組合わせた場合の相乗効果の有無が容易に判定できるので非常に有効な式と考えられる。

#### 4. 結論

- 1) *Trichoderma viride* の生産するセルラーゼを精製して得られた各セルラーゼ成分の反応動力学定数を求めた。
- 2) 精製セルラーゼの 2 成分混合系での MCC 加水分解における相乗効果を実測した。相乗効果の起こる組合せと、起こらない組合せがあり少なくとも各成分の Km 値が相乗効果発現に影響を及ぼしていると思われる。
- 3) 理論的考察により、各セルラーゼ成分の反応動力学定数を用いた相乗効果有無判別式を誘導し、実測値とよく一致した判定ができることが分かった (但し、より大きい Km 値を持つ成分の方を E10 とし、より小さい Km 値を持つ成分の方を E20 とする)。

#### 5. 参考文献

- 1) M. Tanaka, S. Takenawa, R. Matsuno and T. Kamikubo : *J. Ferment Technol.*, **56**, 108 - 113 (1978)
- 2) M. Tanaka, H. Nakamura, M. Taniguchi, T. Morita, R. Matsuno and T. Kamikubo, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 263 - 268 (1986)
- 3) A. O. Converse, R. Matsuno, M. Tanaka and M. Taniguchi : *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 38 - 45 (1988)
- 4) M. Tanaka, M. Ikesaka, R. Matsuno and A. O. Converse : *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 698 - 706 (1988)
- 5) Tanaka, M, and R. Matsuno : *Ann. The New York Acad. Sci.*, **613**, 571-574 (1990)
- 6) Tanaka, M, M. Taniguchi, R. Matsuno and T. Kamikubo : *J. Ferment Technol.*, **59**, 177 - 183 (1981)
- 7) 田中三男 : 松嶺科学技術振興財団、研究報告集, **5**, 48 - 54 (1994)

## Confirmation of a discriminant of synergistic effect during MCC hydrolysis with cellulases

Mitsuo Tanaka, Taiji Shigihara\* and Hiroaki Ojima\*

*Department of Biochemistry, Faculty of Science,*

*\*Graduate School of Science,*

*Okayama University of Science*

*Ridai-cho, Okayama 700-0005, Japan*

(Received November 4, 1999)

Some kinetic constants of reaction of each cellulase component purified from crude cellulase produced by *Trichoderma viride* were obtained. Synergistic effects during MCC hydrolysis with mixture of purified two cellulase components were measured. There were two cases of combinations expressing synergistic effect and those not expressing one. At least, Km value of each cellulase components seemed to influence expression of synergistic effect. On the basis of theoretical consideration, a discriminant of synergistic effect was derived by using some kinetic constants of reaction of each cellulase component. The values of calculated synergistic effects were good consistent with tendency of measured ones. In this case, a component having relatively high Km value is necessary to be E10 in the discriminant, the other component having relatively low Km value, E20.