

グルコアミラーゼを包括固定した 生体ポリマー複合膜の調製と加水分解特性の解析

加島 敬太*¹, 石川 拓真*², 神尾 優太郎*³

Efficient hydrolysis of starch by glucoamylase immobilized on hybrid biopolymer membranes

Keita KASHIMA, Takuma ISHIKAWA, Yutaro KAMIO

Efficient hydrolysis of starch is one of the important reactions in various applications such as bio-ethanol production. Biopolymer membrane immobilizing glucoamylase which hydrolyze polysaccharide such as starch was successfully prepared. Hydrolyzing characteristics of commercial glucoamylase were first evaluated in batch process. Next, the two types of membrane immobilizing glucoamylase were investigated. One is the membrane prepared from calcium alginate and gelatin immobilizing glucoamylase with chemical cross-link using glutaraldehyde. Another is the membrane composed of calcium alginate and chitosan immobilizing glucoamylase with ionic interaction and with physical fixing in the polyelectrolyte-cross-linked hybrid polymer network.

KEYWORDS : glucoamylase, calcium alginate, gelatin, chitosan

1. 緒言

膜型バイオリアクターは、生体触媒の長期利用と連続反応を可能とするだけでなく、基質と生産物の透過速度差によって分離精製の同時達成が期待できる¹⁾。また、固定化担体として膜型を選択することで、基質を強制透過によって固定化酵素に供給するとともに、生産物を系外に排出することが可能となるため、生成物の濃度上昇に伴う逆反応や副反応を抑制した連

続生産が望める。

一般に酵素の固定化には、架橋剤の添加による化学固定法と、多孔質構造を有するゲル担体に酵素を包括する物理固定法が用いられる。化学固定法は、酵素を担体に共有結合によって固定化するため、酵素の脱離が僅少であり、固定化率の高度化に有利である。一方で、反応活性の低下とともに、架橋形成にアルデヒド化合物を用いるため、最終生産物の残留毒性に懸念がある。物理的固定法は固定化酵素の化学修飾が為されないため、活性の低下が抑制されるが、

*1 物質工学科 (Dept. of Materials Chemistry and Bioengineering) 助教, E-mail: keitakashima@oyama-ct.ac.jp

*2 物質工学科 平成 26 年度卒業 (Dept. of Materials Chemistry and Bioengineering)

*3 物質工学科 平成 27 年度卒業 (Dept. of Materials Chemistry and Bioengineering)

化学固定法と比較して酵素の脱離が大きい傾向にある。

本研究では、膜型バイオリアクターによる連続的グルコース生産を目指し、多糖の加水分解酵素であるグルコアミラーゼの固定化と、酵素反応が可能な生体ポリマー膜の調製法を開発した。具体的には、アルギン酸カルシウムとゼラチンの複合ゲルに、グルタルアルデヒドによる脱水縮合によって、アルギン酸-ゼラチン-グルコアミラーゼを相互に架橋する化学固定法に基づく製膜法を検討した。また、アニオン性の生体ポリマーであるアルギン酸と、カチオン性の生体ポリマーであるキトサンによるポリエレクトロライト架橋²⁾を導入し、電荷による化学固定と、ポリマーネットワークによる物理固定との協働効果による新規な製膜法を検討した。アルギン酸、ゼラチン、並びにキトサンは、可食性の生体ポリマーでありながら、平滑な自立膜を形成するゲル形成能を有している^{3,4)}。調製した膜を用いて、フラスコ内での回分試験によるデンプン糖化機能の解析を行った。

2. 実験方法

2. 1 自由酵素反応系によるデンプンの加水分解における反応速度パラメータの評価

自由酵素反応試験から、グルコアミラーゼによるデンプンの加水分解反応における、反応速度パラメータを評価した。デンプンを所定濃度(1, 2, 5, or 10 g L⁻¹)となるよう pH 4.5 の酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液に溶解した。調製したデンプン水溶液 100 mL を三角フラスコ内に注ぎ、恒温振とう器中で所定の温度(40 °C, 50 °C)に保温し、温度が一定となったところでグルコアミラーゼ 5mg を加え、加水分解反応を開始した。反応液 20 μ L を経時的に採取し、直ちに煮沸湯煎して酵素を失活させ、ムタロターゼ GOD 法(グルコース CII テストワコー, Wako)を用いて発色させた。紫外可視分光光度計(UV-mini 1240, SHIMADZU)により 505nm の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線を用いてグルコース生成量を求めた。

2. 2 グルコアミラーゼを固定したアルギン酸カルシウム-ゼラチン複合膜の調製

30 g/L (3wt%) アルギン酸ナトリウム-1 g/L (0.1 wt%)グルコアミラーゼの混合水溶液 7 g, 5 wt%ゼラチン水溶液 3 g, 20 % グルタルアルデヒド 1 g を加えて混合した。この混合溶液 7.86 g をシャーレに分注し、冷蔵庫にて 5°C で 24h 冷却した。冷却後、1 M 塩化カルシウム溶液 20mL をシャーレ内に加えてアルギン酸分子鎖をカルシウムイオンにてキレート架橋することで、水中で安定なアルギン酸カルシウム膜を調製した。グルコアミラーゼはグルクザイム AF6(天野エンザイム)を用いた。調製した膜内に存在する酵素量は 5 mg/枚とした。

2. 3 グルコアミラーゼを固定したアルギン酸カルシウム-キトサン膜の調製

5wt%アルギン酸ナトリウム水溶液 10g, グルコアミラーゼ 0.0075g を混合し、攪拌しながら 2wt%キトサン-酢酸溶液 5g を加えた。その後 20 min 攪拌した後、混合溶液 10 g をシャーレに分注して、酢酸雰囲気ガラス製デシケータ内で 24 h 静置した。1 M 塩化カルシウム水溶液 20ml を加えて、未架橋のアルギン酸を架橋させ、実用的な機械的強度を有した膜を調製した。膜内酵素量は前項と同じく 5 mg/枚とした。

2. 4 グルコアミラーゼ固定膜の回分式加水分解試験

調製した膜を用いて、デンプンの加水分解試験を行った。10g/L デンプン-酢酸緩衝液(pH4.5) 100ml を三角フラスコにいれ、恒温槽内で所定の温度とし、酵素固定膜を投入して酵素反応を開始した。反応液 20 μ L を経時的に採取し、直ちに煮沸湯煎して酵素を失活させ、ムタロターゼ GOD 法を用いて発色させ、505nm の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線を用いてグルコース生成量を求めた。

3. 結果・考察

3. 1 自由酵素反応系におけるデンプンの加水分解の反応速度パラメータ

Fig. 1 に、自由酵素反応系におけるグルコアミラーゼによるデンプンの加水分解試験から得られた、反応液中のグルコース濃度の経時変化を示す。

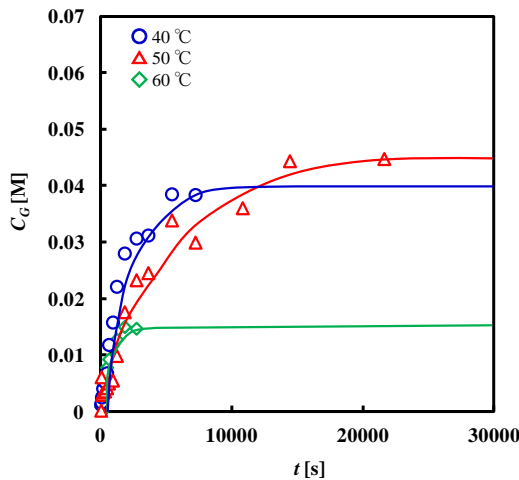


Fig. 1 Concentration of produced glucose in mixture during glucoamylase-catalyzed hydrolysis of starch at pH 4.5. $\circ T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\triangle T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\diamond T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Initial concentration of starch was 10 g L^{-1} .

反応初期において、デンプンの加水分解によって生成したグルコースの濃度は、反応時間が $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ において最も高い反応速度を示した。一方で、平衡状態におけるグルコースの濃度は $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ での反応で最大となった。 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ではグルコアミラーゼの失活が優位となり、反応基質として存在するデンプンの総量を十分に加水分解することが困難であると考えられる。

次いで、デンプン濃度を変化させた加水分解試験から、各反応における初期反応速度を求めた。酵素反応における酵素-基質複合体の形成と目的物質の生成を、速度論的にモデル化した Michaelis-Menten 式(Eq. 1)では、初期反応速度を $r\text{ [M s}^{-1}\text{]}$ 、基質濃度を $C_s\text{ [g L}^{-1}\text{]}$ 、最大反応速度を $V_{max}\text{ [M s}^{-1}\text{]}$ 、酵素-基質複合体の形成と脱離における速度定数の比として示される Michaelis 定数を $K_m\text{ [g L}^{-1}\text{]}$ として、Eq. 1 のように表される。特に、 V_{max} と K_m を動力学定数あるいは反応速度パラメータという。

$$r = \frac{V_{max} C_s}{K_m + C_s} \quad (1)$$

反応速度パラメータは、種々の条件下で個別に求めた初期反応速度の基質濃度に対する依存性から求めることができる。本研究で得られた実験値を、Michaelis-Menten 式を変形した Lineweaver-Burk 式(Eq. 2)、並びに Eadie-Hofstee 式(Eq. 3)に適用し、 V_{max} と K_m を求めた。

Table 1 Experimental values of V_{max} and K_m obtained from free enzyme system (without immobilization)

T [$^{\circ}\text{C}$]	Lineweaver-Burk plot		Eadie-Hofstee plot	
	V_{max} [M s^{-1}]	K_m [g/L]	V_{max} [M s^{-1}]	K_m [g/L]
60	1.15×10^{-5}	0.41	1.18×10^{-5}	0.45
50	1.14×10^{-5}	0.91	1.17×10^{-5}	0.94
40	8.70×10^{-6}	0.91	9.10×10^{-6}	0.93

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{C_s} \quad (2)$$

$$r = V_{max} - K_m \frac{r}{C_s} \quad (3)$$

Table 1 に、自由酵素反応系におけるグルコアミラーゼによるデンプンの加水分解の V_{max} と K_m を示す。Lineweaver-Burk 式は、多くの酵素反応系についてよく相関が得られるが、横軸が基質濃度の逆数で示されるため、基質濃度が低い領域における僅少な実験誤差がプロットの近似関数に大きく影響する。一方、Eadie-Hofstee 式は双方の変数に実測値である初期反応速度を含むため、直線性の高い一次関数を得るためには正確な実験操作が不可欠である。

本研究で得られた実験値は、Lineweaver-Burk 式、Eadie-Hofstee 式ともに相関を示すとともに、両式から得られた反応速度パラメータはよく一致した。また、 V_{max} は $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ と $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ の反応で最大かつ同等の値を示すとともに、 K_m は $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ の反応で最小となり、酵素と基質の親和性が最も高い反応条件であることを明らかにした。

3. 2 グルコアミラーゼ固定アルギン酸カルシウム-ゼラチン複合膜の製膜とデンプンの加水分解における速度論的解析

グルタルアルデヒドによる脱水縮合によってグルコアミラーゼを固定化したアルギン酸カルシウム-ゼラチン複合膜を調製した。調製した膜の観察像を Fig. 2 に示す。膜は平滑な表面を有しており、水中に置いても実用に供し得る機械的強度を有していた。

調製したグルコアミラーゼ固定アルギン酸カルシウム-ゼラチン複合膜を用いて、回分式デンプン加水分解試験を実施した。

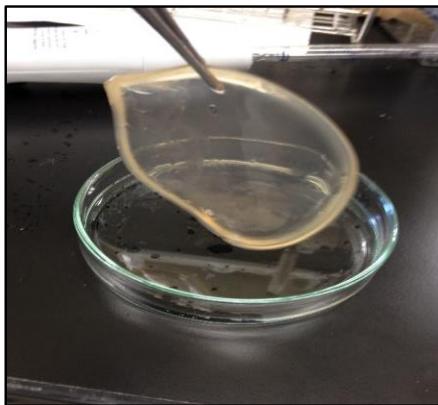


Fig. 2 Calcium alginate-gelatin hybrid membrane immobilizing glucoamylase cross-linked with glutaraldehyde.

Fig. 3 に 40°C 並びに 60°C におけるデンプンの加水分解における生成グルコース濃度の経時変化を示す。初期反応速度は 60°C 自由系が最も高く、60°C 膜固定系が最も低い結果となった。一方、グルコースの最終生成量は 40°C 自由系、膜固定系が共に高かった。40°C では、グルコアミラーゼの活性が維持され、十分に基質と反応して平衡に達したが、60°C では、すべての基質と反応を終える前に酵素が失活したと考えられる。生成グルコースの総量では、40°C での反応が有利であることが明らかとなった。

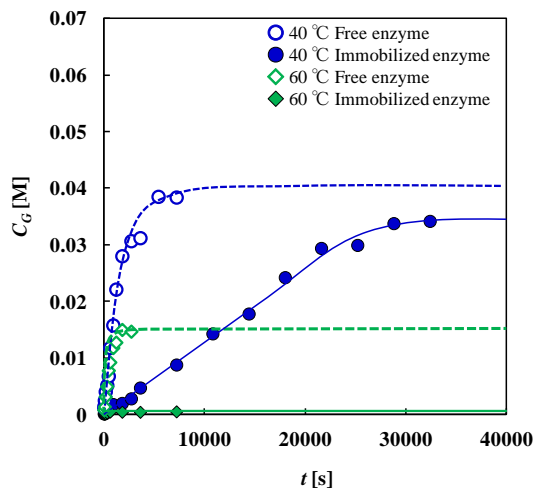


Fig. 3 Concentration of produced glucose in mixture during hydrolysis of starch using calcium alginate-gelatin membrane immobilizing glucoamylase at pH 4.5. ○ Free enzyme system at $T = 40^\circ\text{C}$, ● Immobilized enzyme system at $T = 40^\circ\text{C}$, ◇ Free enzyme system at $T = 60^\circ\text{C}$, and ◆ immobilized enzyme system at $T = 60^\circ\text{C}$. Initial concentration of starch was 10 g L^{-1} .

Table 2 Experimental values of V_{max} and K_m obtained from immobilized enzyme system using calcium alginate-gelatin hybrid membrane immobilizing glucoamylase

T [°C]	Lineweaver -Burk plot		Eadie-Hofstee plot	
	V_{max} [M s^{-1}]	K_m [g/L]	V_{max} [M s^{-1}]	K_m [g/L]
60	4.90×10^{-7}	1.15	5.85×10^{-7}	1.48
40	1.31×10^{-6}	2.00	1.43×10^{-6}	2.33

Table 2 にグルコアミラーゼ固定化カルシウムアルギン酸-ゼラチン膜によるデンプンの加水分解の V_{max} と K_m を示す。得られた実験値は Lineweaver-Burk 式, Eadie-Hofstee 式ともに相関を示すとともに、両式から得られた反応速度パラメータは概ね一致した。Table 1 で示した自由系での値と比較して V_{max} は低く、高分子膜内における基質の拡散が抑制されたことが示唆された。また、 K_m は高い値を示したことから、グルタルアルデヒド架橋による酵素活性の低下が生じたと考えられる。

3. 3 グルコアミラーゼ固定アルギン酸カルシウム-キトサン複合ポリエレクトロライト架橋膜の製膜とデンプンの加水分解

アルギン酸カルシウム-キトサンの複合ポリエレクトロライト架橋によるグルコアミラーゼ固定膜を調製した。調製した膜の観察像を Fig. 4 に示す。膜は水中で不溶であり、安定な強度を維持した。また、膜表面は微小な起伏が確認されるとともに、ゲル構造中に局所的なドメインが形成されている様子が観察された。

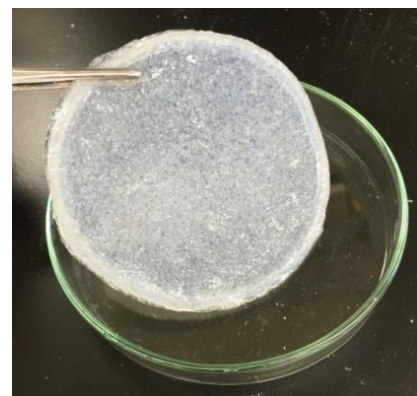


Fig. 4 Calcium alginate-chitosan hybrid membrane immobilizing glucoamylase cross-linked with polyelectrolyte interaction between anionic alginate and cationic chitosan.

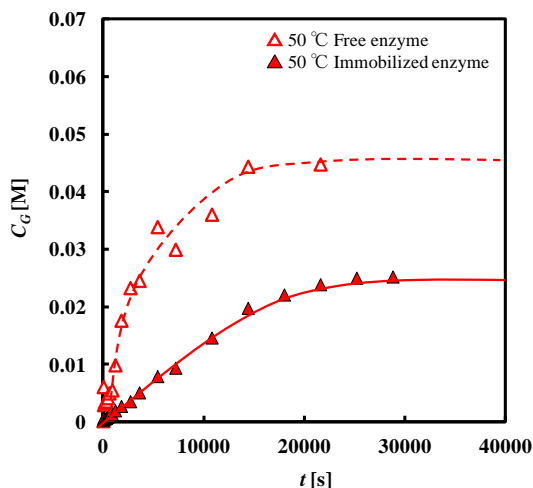


Fig. 5 Concentration of produced glucose in mixture during hydrolysis of starch using calcium alginate-chitosan membrane immobilizing glucoamylase at pH 4.5. \triangle Free enzyme system at $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, \blacktriangle Immobilized enzyme system at $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Initial concentration of starch was 10 g L^{-1} .

Fig. 5 に、グルコアミラーゼ固定アルギン酸カルシウム-キトサン膜によるデンプンの加水分解における生成グルコース濃度の経時変化を示す。グルコアミラーゼ固定膜による加水分解の初期反応速度は、自由酵素系での初期反応速度と比較して抑制された。また、グルコアミラーゼを固定化することで、平衡グルコース濃度は低下した。

Table 3 に、グルコアミラーゼ固定化カルシウムアルギン酸-キトサン膜によるデンプンの加水分解の V_{max} と K_m を示す。得られた実験値は Lineweaver-Burk 式, Eadie-Hofstee 式ともに相関を示し、両式から得られた反応速度パラメータはよく一致した。Table 1 で示した自由系での値と比較して V_{max} は低下し、基質と酵素の接触回数が減少したことが示唆された。膜構造により基質の拡散が抑制されたと考えられる。

一方、 K_m は自由系と膜固定系で明らかな差が現れなかったことから、固定化による酵素の変性は僅少であることが示唆された。脱水縮合による酵素固定と比較して、より穏やかな電気的相互作用による酵素固定であるポリエレクトロライト架橋を適用することで、酵素活性を維持した固定化を実現した。

Table 3 Experimental values of V_{max} and K_m obtained from immobilized enzyme system using calcium alginate-chitosan hybrid membrane immobilizing glucoamylase

$T\text{ [}^{\circ}\text{C]}$	Lineweaver -Burk plot		Eadie-Hofstee plot	
	$V_{max}\text{ [M s}^{-1}\text{]}$	$K_m\text{ [g/L]}$	$V_{max}\text{ [M s}^{-1}\text{]}$	$K_m\text{ [g/L]}$
50	1.35×10^{-6}	1.01	1.29×10^{-6}	0.84

4. 結言

本研究では、多糖の加水分解酵素であるグルコアミラーゼを、グルタルアルデヒドによる脱水縮合によってアルギン酸カルシウム-ゼラチン複合膜に固定化するとともに、ポリエレクトロライト架橋によってアルギン酸カルシウム-キトサン複合膜に固定化した、新規な生体ポリマー膜の開発を行った。ポリエレクトロライト架橋によって酵素を固定化した膜では、膜に非固定の自由酵素反応系と比較して、最大初期反応速度が低下し、高分子ゲルによる基質の拡散抑制が生じたことが示唆された。一方、酵素-基質複合体の形成と脱離における速度定数の比で表される Michaelis 定数は一定であったことから、共有結合の形成による酵素の活性低下を回避できることを明らかにした。今後、基質の拡散抑制が低減できる高分子ゲル構造の設計によって、より効果的な酵素固定膜の開発が期待できる。

5. 謝辞

グルクザイム AF6 をご提供頂いた天野エンザイム株式会社に篤く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) 佐藤ら, 化学工学論文集, 第20巻 (1994) 47-53.
- 2) Sibaja, B., et al., Carbohydrate Polymers, 134 (2015) 598-608.
- 3) Kashima, K., Imai M., Food and Bioproducts Processing 102 (2017) 213-221.
- 4) Fujisaki, T., et al., Chemical Engineering & Technology 42 (2019) 910-917.

【受理年月日 2019年9月13日】