

光架橋性樹脂による酵素の固定とその特性

河 邊 誠 一 郎

岡山理科大学理学部基礎理学科

(昭和54年9月21日受理)

緒 言

酵素は古くから各種の産業分野に広く利用されてきたが、特に最近の酵素化学、あるいは応用微生物学の進歩によって、さらには資源の有効利用の重要性が強く認識されはじめた今日、酵素の新しい利用法が盛んに研究されるようになった。

普通、酵素は水に溶解した状態で基質と反応させる。そのために反応は回分方式をとり、反応終了後は酵素を変性、失活させるために一反応ごとに損失となる。また無機触媒と比較した場合にも、一般に不安定で必ずしも満足すべき性質を備えてはいない。そこで、酵素の持つ特異的な触媒活性を保持したまま、しかも安定に連続使用の出来る水に不溶な酵素を造り得たならば、酵素の持つ様々な欠点が解消され、無機触媒と同様にカラムに充填して連続反応も可能となり、酵素の工業的利用法として非常に有利である。すでに固定化酵素（水不溶性酵素）に関しては多くの研究報告¹⁻³⁾がみられ一部実用化されている。

著者は、先に植物プロテアーゼとして、現在でも重要な酵素の1つであるパパインを用い、その反応機構⁴⁾、およびマーキュリー化⁵⁾について報告した。今回はそれらの結果をもとに、パパインの光硬化性樹脂を用いた包括による固定化について検討した。

実 験 方 法

酵素の固定化には数多くの方法が報告¹⁾されているが、大別すると図1に示す3方法が挙げられる。

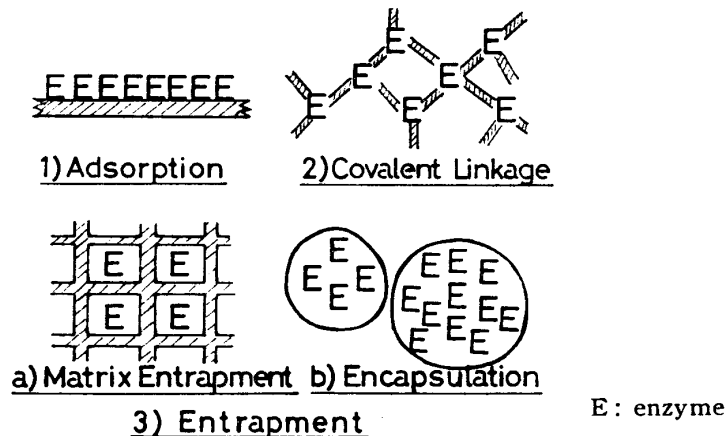
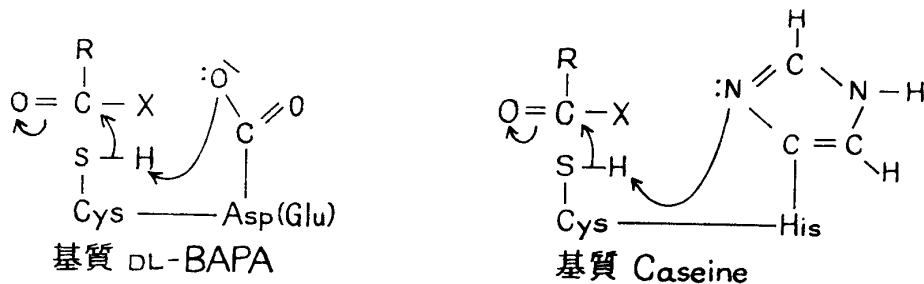


Fig. 1. Classification of immobilized enzymes.

ここに報告する方法は近年福井ら⁶⁻¹²⁾によって報告された光硬化性樹脂を用い、紫外線を照射して、酵素をその格子中に包括する方法を参考にし、パパインの固定化を試みたものである。ところで、パパインはその分子中に1個のSH基を持ち、この基がパパインの活性中心の1つである事が知られている。前報⁴⁾に示した様にpk値からもカルボキシル基、イミダゾリウム基と共に、スルフヒドリル基が



の様に作用していることが推定されている。

またパパインはそのままの状態では、周囲の環境に左右され、酸化や高温、高圧、酸、アルカリおよび腐敗等の種々な影響を受け、容易に失活してしまう。ところが、このスルフヒドリル基を Hg^{2+} でマスクングしたマーキュリーパパイン (MP) は、native な性質を失うことなく、またそれよりも優れた性質を持ち、長期の保存に耐え、失活を或程度防ぐことができる事も前報⁵⁾で示した。本実験ではこのマーキュリーパパインを利用して高活性の固定化酵素を作成しその性質を調べた。

マーキュリーパパイン (MP) の調製

前報⁵⁾に示した方法に従って作成した。調製物は密封して 4°C にて保存した。

酵素活性測定法 アミダーゼ活性を測定した。すなわち、 35°C にて活性化した。一定濃度の native papain (NP), mercury papain (MP) 緩衝溶液 (pH 6.8, $\frac{\text{M}}{10}$ phosphate buffer) 2ml, 或は一定濃度の酵素 (MP) を含んだ固定化酵素樹脂 (200 mg) 緩衝液 2ml に同じく 35°C に保温した N- α -ベンゾイル-DL-アルギニン-p-ニトロアニリド塩酸塩 (BAPA, BDH Chemicals. Ltd, England) $1.2 \times 10^{-3}\text{M}$ 緩衝溶液 (5%ジメチルスルホオキシド : DMSO を含む) 5 ml を加え、同温度で一定時間攪拌しながら酵素反応を行なったのち30%酢酸水溶液 1 ml を加え、反応を終結させる。遊離した p-ニトロアニリンを 410 nm における比色分析により定量する。

固定化酵素の調製

福井ら⁶⁻⁹⁾の報告を参考にししてマーキュリーパパインを固定化した。光硬化性樹脂 (新中村化学工業 K.K. の NK エステル14G) : ポリエチレンジメタアクリレート (PEGM と略す) に増感剤 : ベンゾインエチルエーテル (BE と略す) を混合し均一に溶解する。これに一定濃度の酵素溶液 (MP) を加え、攪拌後シャーレに移し 360 nm 近辺に最大出力を

持つ東芝ケミカルランプ (FL-20 BLS 20W) で 10 cm の距離から一定時間照射する。この際 N_2 を還流する。硬化した PEGM-酵素樹脂は、乳鉢で砕いて 20~40 mesh に揃え、水でよく洗浄した後、デシケーター中にて減圧乾燥し、 N_2 置換乾燥状態で $4^\circ C$ 保存した。

結果および考察

1) PEGM オリゴマーのポリマー化

a) 増感剤の影響 光硬化性樹脂 (オリゴマー) PEGM には重合禁止剤として 100 ppm 程度のハイドロキノンモノメチルエーテルが含まれている。この程度の量では、紫外線照射量を増加すると PEGM は硬化する。しかし酵素を扱う場合、出来るかぎり処理時間を短かくし、紫外光線、オリゴマー、温度、空気等々酵素に影響を与えると思われる因子の量、および接触時間を小さくする事が要求される。そこで重合促進のためにベンゾインメチルエーテル (BE) を添加し、その影響を検討した。

表 1 に PEGM 4 ml に BE を 0.5~100 mg 添加し、5 分間近紫外線を照射し、洗浄乾燥後の非ポリマー量を示した。表 1 より BE 添加量がオリゴマー PEGM 4 ml に対し 10 mg 程度では、ポリマー形成が完了していないと考えられ、20 mg 以上の添加でポリマー

Table 1. Effect of Concentration of BE on Polymerization

BE (mg)	0	0.5	1.0	2.0	3.0	5.0	10	20	30	60	100
Nonpolymer (mg)	4240	1000	710	600	510	400	250	220	200	140	140

BE: benzoin ethyl ether.

化はほぼ完了するものと考えられる。なお出来たポリマーは、いずれも無色透明であるが、BE 30 mg 添加のものまでは、その樹脂表面は爪で傷付く程度の硬度であり、60 mg 以上では傷が付かなかった。BE の量は PEGM の約 1% 程度が適量と考えられた。

b) 照射時間の影響 PEGM の重合エネルギーとして東芝ケミカルランプ FL-20BL-S 20W (最大波長 360 nm) を用いたが、この近紫外線照射時間がポリマー形成におよぼす影響を検討した。方法は、PEGM 4 ml に 40 mg の BE を加えた後、10 cm の距離から一定時間紫外線照射した後、a) で述べた様に水洗乾燥したポリマーの重量を添加量と比較し、非ポリマー量を求めた結果を表 2 に示す。表 2 より照射時間 5 分以上でポリマー量はほぼ一定となりポリマー化が完了していると考えられ、a) の傾向と一致した。

Table 2. Effect of illumination time on polymerization

Illumination time (min)	0	0.25	0.5	0.75	1	2	3	5	8	10
Nonpolymer (mg)	4240	2215	1610	252	226	190	170	113	103	105

c) 重合熱 ポリマー形成を行なうに際し重合熱が或程度発生する。酵素にとって高

温に晒される事は好ましくない。この点に関して検討した。PEGM 12 ml, BE 120 mg を加え、一定時間照射し温度の変化を調べた結果を図2に示す。この図より3分までは直線

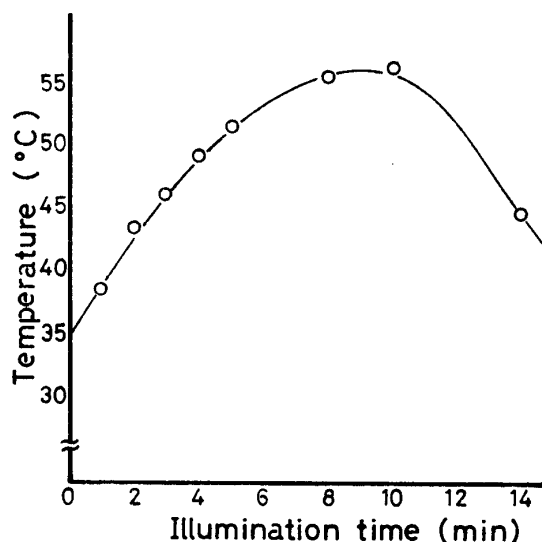


Fig. 2. Heat of polymerization. The illumination is carried out using Toshiba-Chemical Lamp FL-20BL-S (maximum intensity at 360 nm).

的な発熱が見られ、その後10分程度まで徐々に温度が上昇し、56.5°C（室温 35°C，光源 20Wケミカルランプ，距離 10 cm）まで達しその後急速に低下している。この温度変化からも5分～8分頃までに重合の大部分が完了していると考えられる。またこの程度の温度上昇は酵素活性にそれ程大きな影響を与えるものではないが、重合量が更に多量になった場合には冷却も考慮する必要が生じるものと考えられる。

d) 脱離におよぼす照射時間の影響 福井ら⁷⁻⁹⁾の報告によると、本固定化による脱離はほとんどないとしている（酵素：インベルターゼ）が、本実験で使用した PEGM にパパインを固定化した際の固定化物からの酵素脱離の有無を検討した。所定の時間照射し作成した固定化酵素樹脂 200 mg に活性化剤を 2 ml 添加し、35°C 30分間活性化した後、20分間酵素反応を行なう。反応液をすばやく口過し 410 nm で吸光測定する。その口液の一部を更に20分間放置した後、同様吸光測定を行ない反応後20分目と口過後20分目の O. D. 差より脱離の有無を求めた。表3にその結果を示すが、これより固定化物からのパパインの脱離はほとんどないものと考えられる。

Table 3. Effect of illumination time on leakage of papain

Illumination time (min)	Leakage of papain (%)
3	2
5	1
10	1
20	2
30	2
60	4

e) 活性に及ぼす照射時間の影響 所定の時間照射し作成した固定化酵素を 200 mg とり定法通り活性化, 反応を行ない比色測定し活性を調べた. 5 分間照射したものの活性を 100%とした時の比活性は図 3 の通りである. これより照射による酵素活性への影響はほとんどない事がわかった.

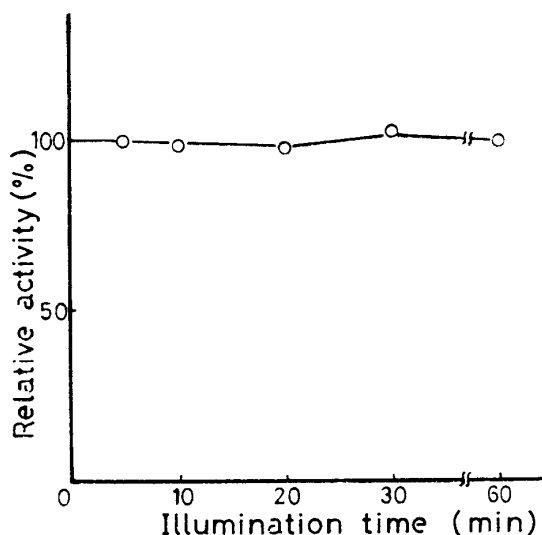


Fig. 3. Effect of illumination time on relative papain activity after immobilization. The activity of native papain was taken as 100%.

f) 反応生成物の樹脂への吸着 固定化パパインの反応口過後の樹脂に生成物 p-ニトロアニリンと思われる黄色の着色が見られる. この問題について検討した. 酵素を包括していない樹脂を所定の量とりマーキュリーパパイン (7.8 mg/ml) 1 ml を添加し, 定法通り活性化, 反応を行ない, その口液を比色測定した結果を図 4 に示す.

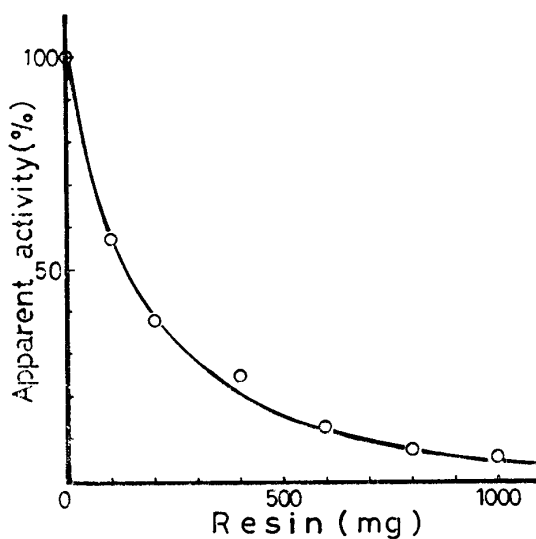


Fig. 4. Relationship between resin weight and apparent activity.

樹脂量が増加するに従い急激に p-ニトロアニリンの出現率が低下している. これは疎水性基を持つ樹脂に p-ニトロアニリンが吸着されるためと考えられる.

g) 酵素量と吸着の関係 前述の吸着についてさらに追究した。樹脂 100mg, 200mg 中に包括される酵素の量を変え, その活性出現率を検討した。所定の酵素量を包括した樹脂 100 mg, 200 mg を用い定法通り活性測定を行なった。その結果を図 5 に示す。さらに図 4 の p-ニトロアニリン吸着率より 100% 換算した場合の酵素濃度と OD の関係を図 6 に

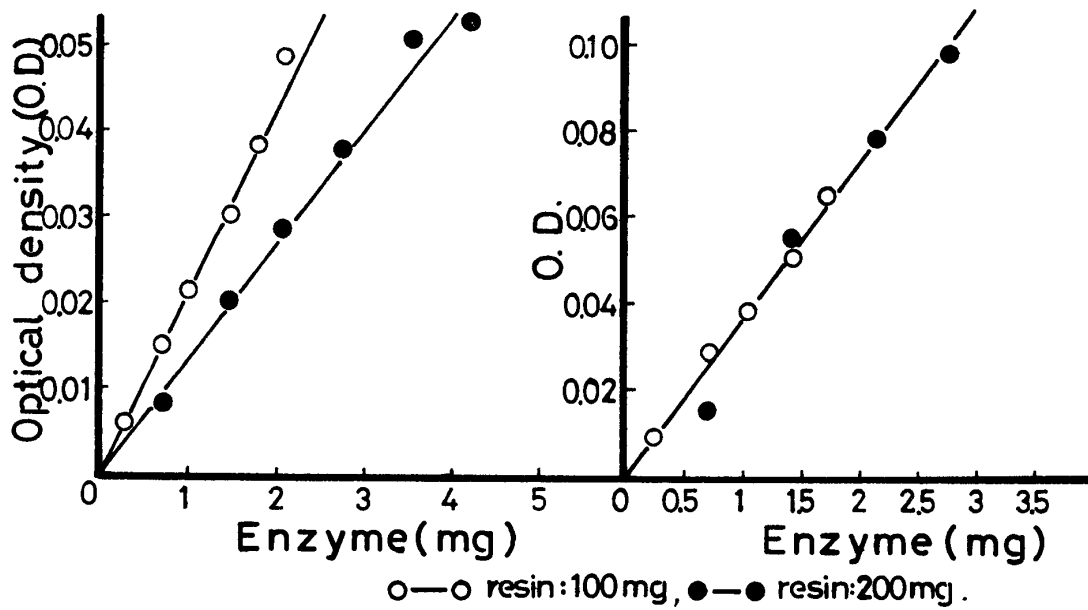


Fig. 5. (left), Fig. 6. (right) Effect of concentration of immobilized papain and weight of resin on activity.

(Fig. 5.: apparent activity, Fig. 6.: calculated in terms of 100% activity)

示す (樹脂 100 mg の吸着率; 42.9%, 200 mg の吸着率; 62.8%)。これよりこの固定化酵素による p-ニトロアニリン生成量はこの程度の包括酵素量内では比例している。活性は樹脂吸着率の換算により樹脂量に関係なく同一直線上にある。

2) 固定化酵素の性質

a) 固定化酵素の活性について 所定の酵素量を包括させた固定化酵素 200 mg を用

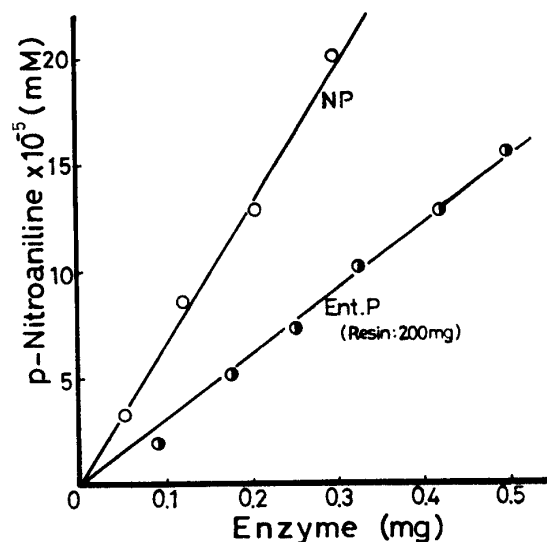


Fig. 7. Effect of concentration of immobilized and native papain.

い、活性化後 $1.2 \times 10^{-3} \text{M}$ BAPA にて定法によりその活性を測定した。図 7 は 100% 出現時の値で示している。福井らのインベルターゼによる活性出現率は 40~50% であり、この活性の低下の因は高分子ゲル内での基質および生成物の拡散に起因する事を挙げている。パパインの場合 native パパインと比べた活性は約 48% であり同様の結果を示した。

b) pH 依存性 pH と活性の関係を図 8 に示す。pH 調製に用いた緩衝液は pH 4~5.5 : $\frac{\text{M}}{10}$ クエン酸-クエン酸第二ナトリウム緩衝液, pH 5.5~7.5 : $\frac{\text{M}}{10}$ リン酸緩衝液, pH 7.5~8.5 : $\frac{\text{M}}{10}$ トリス-塩酸緩衝液である。図より固定化パパインは native パパイン

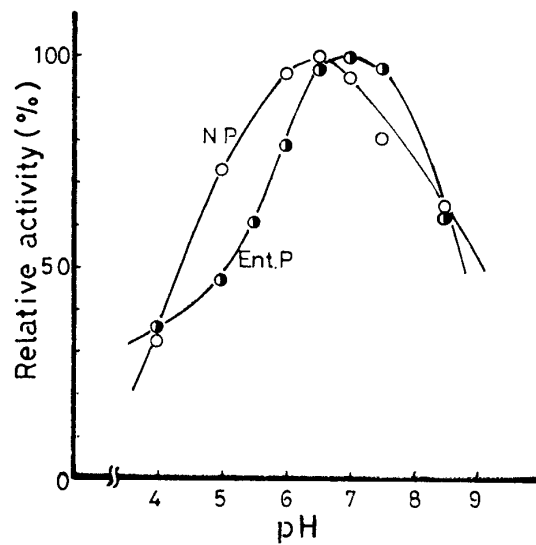


Fig. 8. pH-activity curve.

に比べ酸性側で活性が低く、アルカリ側で幾分か安定が増大する傾向にある。最適 pH は、いずれも pH 6.5~7 付近にある。

c) 温度依存性 反応温度と活性の関係を図 9 に示す。最適反応温度は共に 70°C 付

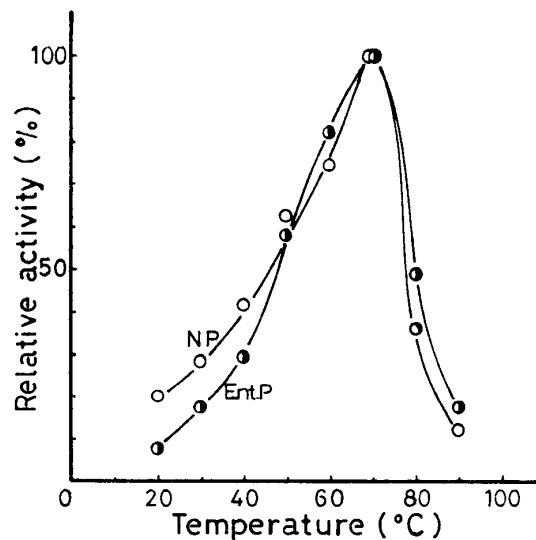


Fig. 9. Temperature-activity curve.

近で一致している。低温部での固定化パパインの活性の低下は、 native パパインと比較して大きい。この因として、高分子ゲル内の温度による拡散の影響が考えられる。なお通常の反応は連続反応への利用、酵素の活性低下、取り扱い等を考慮し 40°C 付近で行なうのが好ましいと考えられる。

d) 熱安定性 酵素活性におよぼす熱安定性について検討した結果を図10に示す。

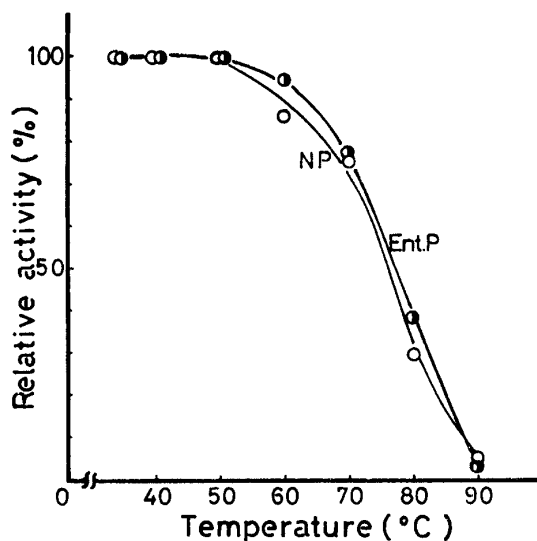


Fig. 10. Thermal stability.

所定の温度で10分間処理した後、冷却して、それぞれの酵素活性を測定した。その結果熱処理による安定性の差はほとんど認められない。

e) 反応動力学 低濃度基質 (0.075~0.75 mM) における酵素活性から, Lineweaver-

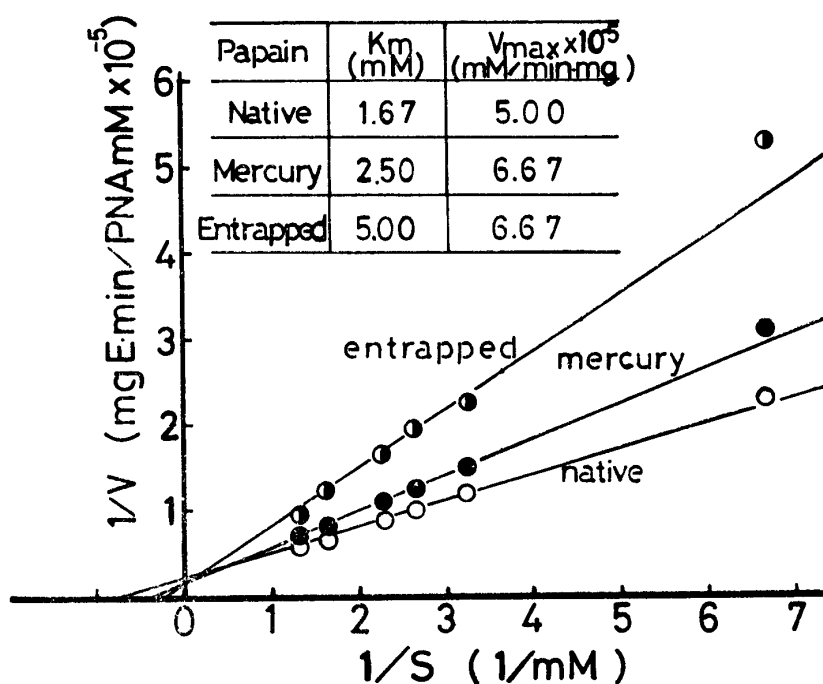


Fig. 11. Lineweaver-Burk plots of native, mercury and entrapped papain.

Burk プロットを求めた結果を図11に示す。固定化パパインの見掛けの Michaelis 定数 K_m は NP, MP に比べ約 $\frac{1}{2}$ の値を示し、基質 DL-BAPA との親和性が低下している。

最大速度 (V_{max}) に関しては、ほとんど変化は認められず固定化しても触媒能力はもとのまま保たれていると考えられる。

f) 固定化パパインによる連続反応 固定化パパインをカラムに詰め基質 (DL-BAPA) を連続的に反応させる事によるカラム内の酵素の挙動について検討した。

ガラスろ過器 (15 A-G 3, 20×100 mm) 内にて定法通り酵素反応を行ない吸引口液を 30% 酢酸で反応停止後活性を測定した。ろ過後次反応を行なうに当たり、カラム容器内には、p-ニトロアニリンや基質が吸着され、残っている事が考えられたため 1% DMSO を含むイオン交換水 200 ml で洗浄した。6回～9回目の反応は反応のみさせ測定しなかった。結果を表 4 に示す。樹脂に p-ニトロアニリン等の吸着が相当量あると考えられるた

Table 4. Repeated use of entrapped papain

Number of assays	Relative activity (%)
1	100
2	103
3	169
4	171
5	183
⋮	⋮
10	195

The activity of number 1 of assay was taken as 100 %.

め正確な値が求められていない。反応ごとに行なった洗浄もその吸着物を十分溶出しきれなかった。また反応容器の都合で十分攪拌できず基質と酵素の接触が十分ではなかった。しかし表より回を追うごとに相対活性が増加しており10回以上相当回数の連続使用に耐え得るものと考えられる。福井らの報告^{6,12)}では、反応時間5時間、30回の繰返し使用が可能であるとし、30回目の相対活性は1回目の120%を示したと述べている。この様に回を追うごとに相対活性が増加するのは基質と生成物の樹脂への吸着率の減少、および高分子ゲルの網目状組織の弛緩による影響が大きいためと考えられる。

g) 保存安定性 20～40 mesh に揃えた固定化酵素を水洗、減圧乾燥後 N_2 置換して 4°C にて密封保存した。一定日数ごとにその活性を測定した。NP, MP と共にその残存活性を図12に示す。固定化パパインと MP の保存安定性は非常に高い。但し7日目に急に活性の低下が見られるが、試料が室温中に放置されていたためとも考えられる。以後の低下はほとんどない。

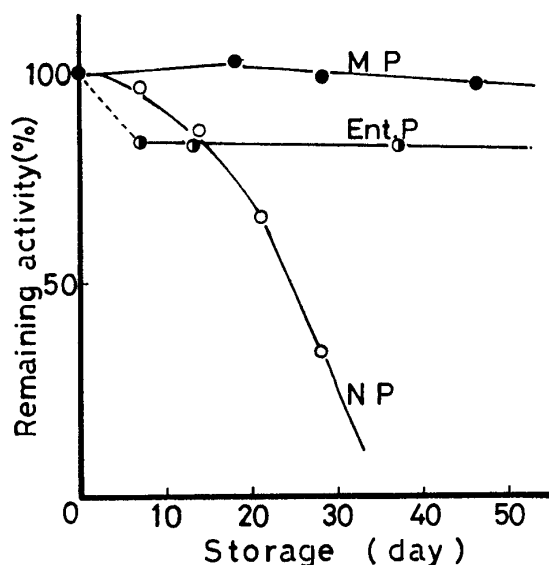


Fig. 12. Relationship between storage period and remaining activity.

ま と め

光硬化性樹脂：ポリエチレングリコールジメタアクリレートに少量の増感剤：ベンゾインエチルエーテルと、酵素：マーキュリーパパイン水溶液を添加し、近紫外光を数分間照射するだけで不溶性パパインを得ることが出来た。この操作は極めて簡単、かつ穏和な条件下で行なうことが出来る。得られた不溶性パパインは約50%の高い酵素活性を保持していた。その不溶性パパインは native パパインと比較し優れた性質を示した。特に連続反応10回以上相当回数使用可能であり、また長期間の保存がきくこと等が挙げられる。従って光硬化性樹脂を用いた酵素の固定化は、従来の様々な方法に比べ有利な方法であることが結論された。しかし問題点もいくつか指摘される。①樹脂に生成物や基質等も吸着されてしまう、②高分子基質の取り扱い、③オリゴマーの毒性、等々、今後さらに検討する必要がある。

本研究を行なうに当たり御助言、御指導をいただいた早稲田大学工学部宇佐美昭次教授に深謝いたします。また実験に協力してもらった伊藤章則君ならびに本実験に使用した光硬化性樹脂をご提供いただいた新中村化学工業株式会社に感謝いたします。

文 献

- 1) 千畑一郎(編)：固定化酵素，講談社，東京 (1975)。
- 2) Chang, T. M. S.: *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins*, Vol. 1~2, Plenum Press, New York
- 3) Goldstein, L.: *Applied Biochemistry and Bioengineering, Immobilized Enzyme Principles*, Vol. 1, Academic Press, New York (1976)。
- 4) 河邊誠一郎：岡山理科大学紀要，**13**, 119 (1977)。
- 5) 河邊誠一郎：岡山理科大学紀要，**14**, 97 (1978)。

- 6) Fukui, S., et al.: *FEBS Lett.*, **66**, 179 (1976).
- 7) Fukui, S., et al.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 71 (1977).
- 8) Fukui, S., et al.: *J. Ferment. Technol.*, **56**, 511 (1978).
- 9) 福井三郎, 田中渥夫: 醸酵工学, **56**, 448 (1978).
- 10) Oster, G.: *J. Polymer Sci.*, **22**, 185 (1956).
- 11) Oster, G.: *J. Polymer Sci.*, **2**, pp. 1181 (1964).
- 12) Bernfeld, P., et al.: *J. Science.*, **142**, 678 (1963).

Immobilization of Papain by the Use of Photocrosslinkable Resin Oligomer and Properties of the Immobilized Enzyme

Seiichiro KAWABE

Department of Fundamental Natural Science,
Okayama University of Science
Ridai-cho, Okayama 700, Japan

(Received September 21, 1979)

To a water-soluble and photocrosslinkable oligomer (polyethylene glycol dimethacrylate) was added an initiator (benzoin ethyl ether) and an enzyme (papain).

Papain, used as test enzyme, was entrapped successfully and easily in the resin formed by a few minutes' illumination with a chemical lamp (λ_{\max} , 360 nm) at room temperature.

The enzyme-entrapping resin thus formed was used as test sample of an immobilized papain. The activity of the immobilized papain was about 50% of that of the native papain. Compared with the native papain, the immobilized papain showed the excellent natures, especially in stability for at least 10 batch reactions and stability for long storage life. As the photocrosslinking reaction occurs very easily and under very mild conditions, formation of gel matrices under such conditions permits the immobilization of unstable enzymes.

The results presented in this paper indicate the usefulness of photocrosslinkable oligomers for immobilization of papain.